

11-154300
0-002040-
01

발간등록번호

11-1543000-002040-01

통통마디 가수분해물의 발효를 통한 고부가가치 기능성 조미소재 개발 최종보고서 2017 농림축산식품부

고부가가치식품기술개발사업 R&D Report

통통마디 가수분해물의 발효를 통한 고부가가치 기능성 조미소재 개발

최종보고서

2017. 12. 29.

주관연구기관 / (주)파이토코퍼레이션
협동연구기관 / 인천대학교
위탁연구기관 / 차의과대학교

농림축산식품부

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “통통마디 가수분해물의 발효를 통한 고부가가치 기능성 조미소재 개발”(개발기간 : 2015. 10. 23 ~ 2017. 10. 22)과제의 최종보고서로 제출합니다.

2017. 12. 29.

주관연구기관명 : (주)파이토코퍼레이션 (대표자) 김득희 (인)
협동연구기관명 : 인천대학교산학협력단 (대표자) 서명지 (인)
위탁연구기관명 : 차의과학대학산학협력단 (대표자) 이종훈 (인)

주관연구책임자 : 김득희
책임연구원 : 조은아
책임연구원 : 권미향
연구원 : 윤현주
협동연구책임자 : 서명지
위탁연구책임자 : 이종훈

국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정 제18조에 따라 보고서 열람에 동의합니다.

〈국문 요약문〉

	코드번호	D-01
연구의 목적 및 내용	<p>최종 목표: 통통마디(함초) 가수분해물의 발효를 통한 고부가가치 기능성 조미소재 개발</p> <ul style="list-style-type: none"> ○ 통통마디 가수분해물의 발효를 통한 고부가가치 기능성이 있는 유럽형 식물성 소금대체 소재 개발 ○ 통통마디 가수분해물의 발효를 통한 간장대체 소금무첨가(No Salt-Added) 기능성 조미소스 개발 ○ 통통마디 가수분해물의 발효를 통한 고부가가치 기능성 유럽형 조미소스 개발 ○ 통통마디 가수분해물의 발효를 통한 기능성 조미소재의 생산 공정 최적화 ○ 전임상시험을 통한 소금무첨가(No Salt-Added) 조미소스의 안전성 및 기능성 검증 ○ 서구인의 입맛에 맞는 유럽형 조미 소스(European Sauce)의 제품화 ○ 통통마디 및 이의 생물전환 산물을 이용한 기능성소재의 개발 및 작용기전 연구 	
연구개발성과	<ul style="list-style-type: none"> ○ 통통마디 마쇄물의 발효로 증가된 glutamate, aspartate를 정량 및 정성 분석할 수 있는 kit 분석법 및 HPLC 분석법 확립 ○ 통통마디 발효산물에 대한 항산화, 항당뇨, 미백활성, 총폴리페놀 및 플라보노이드 효과 검증 ○ 갈리나블랑카스타와 유니레버의 R&D 연구소와 공동으로 유럽형 소금무첨가(No Salt-added) 기능성 조미소스 개발을 진행하여 3개 제품을 제품화 함 ○ 통통마디를 효소처리 후 유산균 및 <i>Corynebacterium glutamicum</i> 균주를 이용한 발효법을 개발하여 기타 첨가물이 들어가지 않는 형태의 소스 개발 및 발효후 이미취 제거를 위한 정제공정 확립 ○ 산·알칼리로 분해한 통통마디 가수분해물의 영양성분 변화 확인 및 기능성 성분의 활성 지표성분(카페인산, 클로로젠산, 쿠마린산, 프로토포카테추산, 페롤산)을 HPLC 및 UV스펙트럼 분석을 통해 정성, 정량 분석 ○ 통통마디 및 염전 유래 호염세균 91종 확보 후 고염 생육도를 기준으로 23균주를 선정, 2차로 통통마디의 유용성분 용출 및 유용활성이 높은 기준으로 선별하여, 3종의 통통마디 발효에 우수한 균주를 선정(<i>Bacillus subtilis subsp. subtilis</i>, <i>Bacillus stratosphericus</i>, <i>Halobacillus salinus</i>) ○ 통통마디 발효산물을 추출하여 항산화, 항혈전, 적혈구 용혈활성, 항균 등 생리활성을 평가하여 국내 학술지에 3편의 논문을 게재, 학술발표 3건, 특허출원 3건을 달성함 ○ 통통마디 마쇄물을 이용한 조미소스의 최적 생산 공정을 확립하였으며 대량생산에 적합한 시설 및 처리 시간 등을 확립 ○ 통통마디 발효액을 분무건조하여 분말과 과립 형태의 제형으로 개발함. 1인 가구를 위한 미니 사이즈 포장 및 휴대성을 높인 1회용 파우치 포장 등으로 포장을 다각화 하여 편의성을 증대 ○ 통통마디 발효산물의 총 에너지, 탄수화물, 단백질, 지질, 식이섬유, 나트륨 등의 영양분석을 통해 맛 뿐 아니라 영양적으로도 우수한 조미 소스임을 확인 ○ 유럽형 소금무첨가(No salt added) 천연조미소스의 공정개발을 통해 농축 단계를 축소함. 또한 후발효를 통하여 감칠맛과 향미를 증대시킴 ○ 통통마디 마쇄물 및 발효액의 실험 동물 적용 결과 급격한 몸무게 변화 없음 및 식이 거부 반응 없음을 통해 통통마디 마쇄물과 발효액의 안전성 확인 ○ AOM/DSS 모델에서 통통마디 마쇄물은 carcinoma 로 의심할 수 있는 큰 크기의 용종 (4mm이상)을 억제하는 효능을 보이며, 발효액도 상당한 억제능을 보임. 따라서 통통마디 마쇄물의 대장암 억제 효능을 확인함 	

	<ul style="list-style-type: none"> ○ 통통마디 마쇄물 또는 발효액의 대장암 억제능과 미생물 군총변화와의 상관관계를 관찰함. 분변을 채취하여 차세대 염기서열 분석을 실시한 결과, 통통마디 마쇄물 실험군에서 항암 효과와 관련된 특이적인 미생물은 발견되지 않았으나, 전체적인 미생물 군총의 다양성이 높아졌음을 확인함 ○ 발효식품으로부터 <i>Bacillus velezensis</i> K26 균주를 분리하고 이를 이용한 통통마디 발효를 통해 항당뇨 및 항염증 활성을 <i>in vitro</i>상에서 확인함. 배지 최적화를 통해 기존 AGI 활성(항당뇨)을 75.5%에서 83%까지 높임. 통통마디 발효물의 메탄올 추출 분획을 UPLC-ESI-Q-TOF-MS 분석하여 AGI 활성물질이 1-deoxynojirimycin (DNJ)임을 확인 ○ <i>B. velezensis</i> K26 균주로 통통마디를 발효한 결과 발효액 내의 식이섬유 분해 및 조단백 생성율이 증가함을 확인할 수 있었으며 이를 바탕으로 상기 통통마디 발효산물의 식품소재 활용 가능성을 확인함 ○ 통통마디 발효산물의 항당뇨 및 항비만(3T3-L1 지방세포), 항염증(RAW 264.7 대식세포주) 생리활성을 평가하기 위하여 세포실험을 진행하여 지방세포 분화를 억제하는 항당뇨(항비만) 효과를 확인하였고 염증성 cytokine인 IL-6의 분비량이 감소하는 항염증 기작을 확인하여 2편의 SCI 국제학술지에 논문을 게재 				
<p>연구개발성과의 활용계획 (기대효과)</p>	<ul style="list-style-type: none"> ○ 통통마디 발효를 통한 새로운 개념의 소금 무첨가 (No Salt-Added) 기능성 조미소스 개발 및 상품화 ○ 통통마디를 이용한 항산화, 항혈전, 항당뇨, 항염증, 대장암 억제, 장내균총 변화 활성 기반 식품 소재 개발 ○ 서구인의 입맛에 맞는 유럽형 조미소스 제품 개발 및 GB Foods사와의 협력으로 유럽 소스 시장 진출을 위한 수출 상품화 ○ 아시아의 대표 소스인 간장의 단점을 보완한 저염식 소스 개발로 일본을 비롯한 해외 시장 진출 ○ 국내외 식품 전시회 참가 및 홈페이지 운영에 의한 홍보 ○ 발효 소스의 다양한 생리활성 연구결과 및 SCI 논문을 활용한 제품 홍보 ○ 특허출원 및 등록에 의한 고유 기술 확보 및 독점적 사업화 가능 				
<p>중심어 (5개 이내)</p>	<p>소금 무첨가 소스</p>	<p>유럽형 소스</p>	<p>가수분해물</p>	<p>발효</p>	<p>기능성 소스</p>

〈 SUMMARY 〉

		코드번호	D-02
Purpose& Contents	<ul style="list-style-type: none"> ○ Development of high value-added functional european phyto salt substitute of <i>salicornia</i> hydrolysates fermentation ○ Development of soy sauce substitute, ‘no salt added’ , <i>salicornia</i> fermented products ○ Development of high value-added functional European sauce of <i>salicornia</i> fermented products ○ Optimization of the process of functional sauce production of <i>salicornia</i> fermented products ○ Preclinical study to verification of safety and functionality of the salicornia fermented products ○ Production of sauce for Westerners taste of European sauce ○ Elucidation of bio-active components and physiological functions of <i>salicornia</i> and its microbial fermented products 		
Results	<ul style="list-style-type: none"> ○ Quantitative and qualitative analysis of salicornia fermentation product increasing the amount of glutamate and aspartate by HPLC and kit methods ○ Verification of anti-oxidation, anti-diabetes, whitening activity, total polyphenol and flavonoides effects through <i>salicornia</i> hydrolysates fermented products ○ Three products of <i>salicornia</i> fermented functional sauce are developed jointly with the GB Foods and Unilever R&D institute ○ Development sauce of fermentation process that does not use of food additives using the lactic acid bacteria and <i>Corynebacterium glutamicum</i> ○ Quantitative and qualitative analysis of bio-active component of <i>salicornia</i> hydrolysates with treated acid and alkali degradation products by HPLC and UV spectrum ○ Selection of 3 strain(<i>Bacillus subtilis subsp. subtilis</i>, <i>Bacillus stratosphericus</i>, <i>Halobacillus salinus</i>) are based on the high bio-active and effective component contents. It comes from 91 strain, <i>Salicornia</i> and salt pond isolates, can grow well halophilic condition ○ Domestic scientific journal(non-SCI, 3), academic conference(3), patent application(3) ○ In the observation of inhibition of colon cancer using the AOM / DSS model, crushed <i>Salicornia europaea</i> showed the inhibitory effects on large size polyps (more than 4mm) suspected to be carcinoma, and the fermented <i>Salicornia</i> also showed significant inhibition. Therefore, we confirmed the inhibitory effect on the colorectal cancer of the <i>Salicornia europaea</i>. Followed by anti-cancer experiment, analysis of intestinal microbiome was performed. <i>Salicornia europaea</i> was found to increase intestinal flora diversity. ○ In order to investigate the functional compounds via microbial fermentation of <i>salicornia</i> extract extracted from <i>Salicornia europaea</i>(PSE), <i>Bacillus velezensis</i> K26 		

	<p>was isolated from the domestic traditional fermented food as functional microbial strain for targeted functions (anti-diabetic and anti-inflammatory activities). The α-glucosidase inhibitory (AGI) activity of <i>B. velezensis</i> K26 was in vitro determined to be 75.5%. The optimization of culture media for the increase of AGI activity by <i>B. velezensis</i> K26 resulted to be 83%. The UPLC-ESI-Q-TOF-MS analysis of the extract showed the peak to be identified as 1-deoxynojirimycin(DNJ).</p> <ul style="list-style-type: none"> ○ As the results of analysis of useful and nutritional components of the PSE-fermented products, the <i>salicornia</i> extract fermented by <i>B. velezensis</i> K26 (P-K26) increased the decomposition of dietary fibers and production ratio of crude proteins compared to other samples (PSY-K26). ○ In order to evaluate the biological activities of PSE-fermented products by <i>B. velezensis</i> K26, the anti-diabetic and anti-inflammatory activities were investigated. Cytotoxicity analysis of PSE-fermented products for 3T3-L1 pre-adipocytes exhibited that the 1/20-fold diluted samples showed the relatively low cytotoxicity, whereas the cell viability was less than 50% in the cases of over 1/10-fold diluted samples. The adipogenesis assay resulted in that the salicornia extract fermented by <i>B. velezensis</i> K26 (P+K26 sample) relatively inhibited lipid accumulation compared to other samples including SY+K26, PSY+K26, thus considering the PSE-fermented products to be effective against diabetes (or obesity). After evaluating the effects of the PSE-fermented products by <i>B. velezensis</i> K26 on RAW 264.7 murine macrophages, the LPS-induced IL-6 and TNF-α were down-regulated in the PSE-fermented products by <i>B. velezensis</i> K26, thus suggesting that the PSE-fermented products could be considered to have anti-inflammatory effects. Based on the above results, two research articles have been published in the international SCI journal 				
Expected Contribution	<ul style="list-style-type: none"> ○ Technology development and commercialization of 'no salt added', salicornia fermented products ○ Based on the anti-oxidation, anti-thrombosis, anti-inflammation, colon cancer suppression, intergenerational change basis food source development ○ Development of European sauce and export commercialization into the European market ○ Development of low-sodium salt sauce supplement shortcoming of soy sauce and export Japan and global market ○ Participation of domestic and foreign food exhibition and promotion by the website operation ○ Promotion of products using a variety of bio-active study and SCI journal ○ Commercialization by unique patent and technology 				
Keywords	No Salt-Added Sauce	European Sauce	Hydrolysate	Fermentation	Functional sauce

< Contents >

Chapter 1	Project Overview	9
Chapter 2	Current Status in Technology Development of Related Project in Domestic and Overseas	14
Chapter 3	Contents and Results of the Project	16
Chapter 4	Project Achievements and Contributions to Related Fields	99
Chapter 5	Application Planning of Research Results	106
Chapter 6	Collected New Science and Technology Information of Project in Overseas	109
Chapter 7	Security Grade of Project Achievements	110
Chapter 8	Research Facilities and Equipment Status Registered in National Science and Technology Information System	111
Chapter 9	Lab Safeguards Implementation in the Process of the Project Performance ..	112
Chapter 10	Major Research Performance of the Project	114
Chapter 11	References	117

<Attached> Self-Evaluation Report

< 목 차 >

1. 연구개발과제의개요	9
2. 국내외 기술개발 현황	14
3. 연구수행 내용 및 결과	16
4. 목표달성도 및 관련분야에의 기여도	99
5. 연구결과의 활용계획 등	106
6. 연구과정에서 수집한 해외과학기술정보	109
7. 연구개발성과의 보안등급	110
8. 국가과학기술종합정보시스템에 등록된 연구시설·장비현황	111
9. 연구개발과제 수행에 따른 연구실 등의 안전조치 이행실적	112
10. 연구개발과제의 대표적 연구실적	114
11. 기타사항	116
12. 참고문헌	117

<별첨> 자체평가의견서

1. 연구개발과제의개요

코드번호	D-03
------	------

1-1. 연구개발 목적

가. 식물성 소금대체 조미소재 개발

○ 통통마디(합초: *Salicornia Europaea*)는 명아주과에 속하는 1년생 식물로, 바닷가, 간척지 등 고염지역에서 바닷물을 먹고 자라 다량의 소금성분 (NaCl) 및 칼슘(Ca), 마그네슘(Mg), 칼륨(K) 등 다량의 미네랄을 적절히 함유하여 ‘미네랄의 보고’ 라고 불림. 또한 인체에 필수적인 아미노산을 다량 함유하고 있음

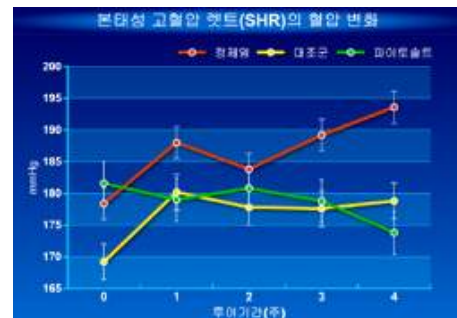


○ 최근 통통마디의 생리활성으로는 항심혈관계 질환, 항고혈압, 항당뇨, 항산화, 항암, 항고지혈, 그리고 면역 조절 기능 등이 수 십여 편의 학술논문으로 발표되고 있음. 외국 정부와 해외 우수 식품 기업들도 나트륨 섭취량을 줄이기 위한 다양한 노력을 경주하고 있으며 특히 글로벌 식품회사인 Nestle, Unilever, Kraft Foods, General Mills, Tate and Lyle, McCormick 등이 많은 연구비를 투자하여 ‘저나트륨 소금’ 을 개발하기 위한 연구를 진행 중이지만 아직 소름을 대체할만한 소재는 미개발임

○ ㈜파이토코퍼레이션의 ‘식물성 소금대체제’ 개발

㈜파이토코퍼레이션은 염생식물인 통통마디를 이용한 ‘식물성 소금대체제’ 제조기술의 독창성 및 제품의 시장성을 인정받아 2013년 12월 23일 미국 Oxford Bioscience Partners와 한화 인베스트먼트로부터 20억 원을 투자 유치한 바 있음(서울시 바이오 메디칼 신성장동력 펀드)

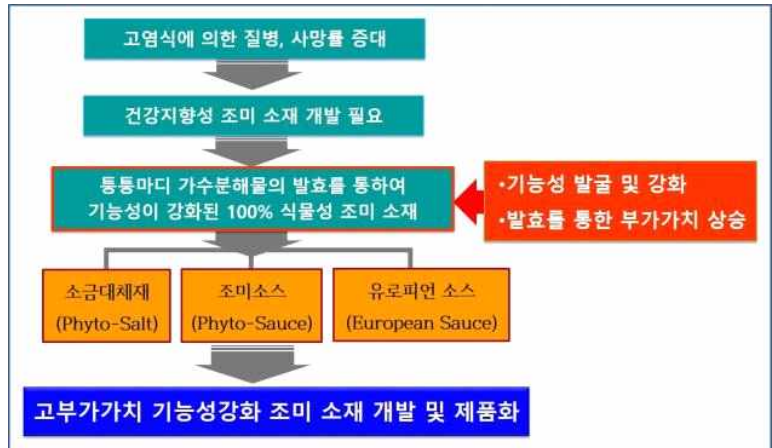
○ 당사가 연구 개발한 100% 식물성 소금 대체제(파이토솔트)는 전북대병원 기능성식품 임상시험센터에서 식물성 소금 대체제의 고혈압 효능에 대한 전임상 시험결과, “식물성 소금 대체제가 고혈압에 효과가 우수” 한 결과를 획득함(파이토솔트의 혈압영향 전임상시험, 한국동물의과학연구소). 또한 비알콜성 지방간 질환 예방에 효과적인 것으로 나타남 (특허 10-2016-0078354).



- 상기의 배경과 연구 결과를 바탕으로 기존의 식물성 소금 대체제와 차별화된 고부가가치 기능성을 가지는 식물성 소금대체 조미소스의 개발이 가능해짐
- 고혈압, 지방간 등과 같은 성인 질환을 예방하면서 맛과 풍미를 더한 고부가가치의 식물성 소금 대체소재의 개발에 착안함
- 맛과 풍미를 더하기 위해 발효기술을 이용하여 감칠맛(Umami)이 증대된 고부가가치 식물성 소금 대체 조미소스의 개발이 필요해짐

1-2. 연구개발의 필요성

- 발효 및 효소처리 가수분해물의 발효에 의한 서구인의 입맛에 맞는 유럽형 조미소스(European Sauce) 개발 및 제품화를 위해 2015년 5월, 유럽 글로벌식품회사 GB Foods(Gallina Blanca Star)에서 당사를 방문하여 유럽형 조미소스의 공동연구 개발을 요청함. 전형적 유럽의 소스 형태인 밀, 고기, 생선, 향료, 소금, 조미료 등을 배제하고 콩을 기본 원료로 하는 동양의 전통적 발효기술을 접목하여 식물성 원료만을 이용하고, 발효 또는 효소반응 등에 의해 제조된 Salt and MSG replacer에 대한 공동 프로젝트 연구개발을 요청함



또한, 유니레버, 네슬레, 강스푸, 가루비 등 글로벌 식품기업들도 광물성 소금이 아닌 식물 유래의 organuc salt 개발에 관심을 갖고, 소금대체제 및 소재로서 조미 소스의 샘플 테스트를 요청함

- 글로벌 식품기업 ‘GB Foods(Gallina Blanca Star)’ 는 천연 원료만으로 제작된 식물성 조미소스를 기존의 동물성 및 밀, 조미료 등의 원료로 제작된 제품들의 문제점들을 해결할 수 있는 유일한 솔루션으로 선정하고 대량구매 의향을 밝힌 LOI 당사와 체결함
- 함초의 식품으로의 이용성은 극히 제한적으로 함초 자체 성분만을 주성분으로 하는 제품은 극히 드물며 오미자, 구기자 등의 한방 약재를 혼합하여 추출 및 발효된 제품이 주를 이루고 있음
- 함초 추출물을 분말화한 제품으로 복합 성분에 의한 정제염 대체 소재로 개발되고 있음
- 함초로부터 추출된 함초 소금은 염 농도의 저하로 인해 자염등과의 혼합에 의해 제품 적용되고 있으나 함초 추출물만을 원료로 개발된 식품 및 소재는 없음. 함초의 나트륨을 비롯한 미네랄 성분과 식이섬유의 기능성을 활용한 고부가가치 식품 개발이 요구되고 있음

1-3. 연구개발 범위

○ 유럽 소스 시장의 최신 트렌드 키워드는 ‘자연친화적인’, ‘기능적인’, ‘저나트륨의’



▷ 유럽에서는 품질을 신뢰할 수 있는 유기농 식품의 판매가 증가하고 있으며 윤리적인 식품 소비에 대한 관심이 높아지고 있음

- 유럽에서는 유기농 식품을 신뢰할 수 있는 식품이라고 여기며, 소비자뿐 아니라 유통업계에서도 유기농 식품에 관심을 보이고 있고, 2014년 2013년 대비 18.9%의 판매 증가율을 보이고 있음

- 또한, 지속가능한 개발과 관련된 제품에 대한 인식이 높아지고 있음. 지속가능한 개발과 가장 잘 부합하는 요리는 자국을 대표하는 요리 및 고향을 떠올리게 하는 식품이라고 평가하면서 제조업체들의 마케팅 방안의 주요 관심사가 되고 있음

▷ 사회구조의 변화 및 식품위생 문제가 발생하면서 더 건강한 원료를 사용하여 소스를 제조하려는 제조업체들이 증가함

- 서유럽 사회구조(도시화, 성별의 사회적 역할에 대한 재정의, 여가활동 지출에 대한 증가)가 변화함에 따라 간편식을 찾는 소비자들이 늘게 되었고 쉽게 맛에 변화를 줄 수 있는 소스와 양념에 대한 소비자의 관심이 증가하는 추세

- 지난 십여 년 동안 유럽은 식품위생 파동, 비만 인구의 증가 등을 겪으면서 소비자들은 식품의 품질과 영양 성분에 주의를 기울이게 되었음

- 균형 잡힌 식생활에 소비자들이 관심을 가짐에 따라 소스 제조과정에서 염분과 지방의 함량을 제한하여 소스를 생산하는 국가들이 늘어나는 추세임

- 소스제조에 식품첨가물을 줄이고, 무방부제, 무색소, 글루텐프리 등 인공향료를 첨가하지 않는 추세이며, 유전자 변형작물(GMO) 사용을 제한하는 추세임

▷ 2014년 유럽의 소스 시장규모를 보면 러시아, 영국, 독일, 폴란드, 프랑스, 스페인, 루마니아 순으로 큰 시장규모를 가지고 있으며 이 중 프랑스, 스페인 등의 나라에서는 소스 수입 비용이 지속적으로 증가하고 있음

2014년 유럽 4개국 소스 시장규모

(단위 : 백만 달러)

	국가	규모
1	러시아	704.37
2	영국	560.96
3	독일	433.45
4	폴란드	398.08
5	프랑스	372.74
6	스페인	266.67
7	루마니아	148.15

출처 : Data Monitor

시장트렌드 출처

- 프랑스 농업부 연구 및 조망센터(CEP)
- 프랑스 식품품질검사기관
- 유럽연합 European Union
- 한국농수산식품유통공사 aT자료
- 세계 식품 언론 Eater.com
- 세계 식품 언론 Food Businessnews

○ 간장, 연두 등 국내 시판되는 소스류의 대부분은 무기염을 비롯한 화학첨가제등을 첨가하여 제조되고 있고 16~24% 정도의 NaCl을 첨가하고 있어 다량 섭취시에는 고혈압을 비롯한 동맥경화 등 성인병의 발병율이 높아질 것으로 사료됨

○ 국내 대표 소스인 간장은 ‘콩(bean)을 원료로 한 소스(soybean-based sauce)’의 한계 즉, 대두 등의 분해 및 발효에 의한 특유의 콧냄새가 있어 유럽을 비롯한 서구 소비자들의 입맛에 맞추기 어려움

○ 소스 제품의 기능 강화 필요성

- 소스에 대한 수요와 사용 빈도수가 증가하면서 제품의 맛뿐만 아니라 추가적인 기능(건강기능적

요소)에 대한 요구도 늘고 있음

- 소비자들은 긍정적인 요소에 반응하며 먹지 말아야 될 것보다는 먹으면 건강해지는 것에 더 관심을 기울이는 경향을 가짐. 세계 소비자 중 59%가 영양성분을 첨가한 제품에 관심을 느끼는 한편 87%의 소비자가 본래 높은 영양소를 가지고 있는 제품에 관심을 갖는 것으로 나타남. 이를 근거로 보면, 소비자들의 관심을 유도하기 위해 제품의 자연적인 영양성분을 부각시킬 필요가 있음



(출처: 식품음료신문, 해외정보 해외동향 「2015 소스 드레싱 해외 시장 동향」)

○ 글로벌 식품 대형 유통 마트의 아시안 소스 수요에 대한 시장 조사

- “2015 aT 한국농수산물유통공사”의 ‘2015 농식품 해외시장 맞춤조사’ 중 전세계 지점을 보유하고 있는 대형유통 마트의 매장정보 및 소스 유통현황에 대한 조사를 살펴보면 ‘아시안 소스에 대한 수요가 늘고 있으며, 인지도가 높고, 매장 내에서 매우 판매율이 높은 곳도 있음’을 확인할 수 있음. 따라서 동양의 전통 발효 조미소스에 대한 마켓이 글로벌화 되고 있으며 시장진입에 유리한 시점임을 확인할 수 있음

SHOP #1. Auchan		SHOP #3. Carrefour	
이미지			
Contact Point	Tel : +33 03 20 67 62 22 Add : Quartier de l'Hôtel, Villeneuve-d'Ascq, 59650, France	Contact Point	Tel : +33 03 28 52 99 79 Add : 3 Centre commercial Europe, 59777 Lille, France
기업 정보	규모 - 프랑스 Croix에 본사를 두고 있음 - 전세계 639개의 하이퍼마켓과 2,419개의 슈퍼마켓을 운영중임 매장 정보 - 전세계 중국, 헝가리, 이탈리아, 인도 등 나라에서 지점을 보유하고 있음 - 다국적 식품 및 생활용품 유통업체로 다양한 형태 및 종류의 식품을 취급하고 있음	기업 정보	규모 - 1958년 설립되었고 파리에 본사를 두고 있음 - 전세계적으로 1,452개의 하이퍼마켓 체인을 보유하고 있음 매장 정보 - 다국적 기업으로, 중국, 도미니카 공화국, 아르헨티나 등 모든 대륙에 진출해 있음 - Carrefour Express, Carrefour City 등 슈퍼 스토어를 운영하고, 디스카운트 스토어도 운영하고 있음
인터뷰 내역	“아시안 소스에 대한 수요가 늘고 있으며, 꽤 인지도는 유명한 편이다. 아시안 소스를 사는 데 브랜드가 가장 중요한 것 같다.” -Auchan Commercial Employee Ms Marjolaine Morel	인터뷰 내역	“아시안 소스만 한 위치를 차지하고 있음 정도로 제품들에 대한 수요가 늘고 있는 것 같다.” -Carrefour Product Manager Linae Anq

< 출처 : aT 한국농수산물유통공사 “2015 농식품 해외시장 맞춤조사“ >

- 국제 대형유통 마켓인 Intermarche의 2015년 10월 기준 동양소스의 가격 현황은 다음 표와 같다. 보통 유리 용기 형태로 판매되고 있으며 150~300 ml 용량으로 생산되어 판매되고 있으며, mL당 가격은 0.01~ 0.02 유로의 비슷한 가격대를 형성하고 있음

○ 함초를 추출물을 이용하여 발효한 소스의 경우 짭짤한 맛을 가지면서도 이취가 없으며 감칠맛을 배가한 고부가가치 소스의 개발이 가능함을 확인하였으며, 이러한 소스는 GB foods와 함께 유럽시장에서 신규 소스로 판매 가능할 것으로 전망함. 당사에서 개발하고자 하는 통통마디를 이용한 발효 조미소스의 장점은 다음과 같음

- 함초 식물 자체의 짭맛으로부터 기인한 NaCl 성분과 식물이 지니고 있는 기능성 성분(phytochemicals)를 기본 원료로, 발효 및 효소분해를 통하여 맛과 기능성을 겸비한 식물성 조미소스로 개발이 가능
- 나트륨 고함량 소금 섭취로 인한 고혈압, 지방간 등의 성인병 질환 예방 효과
- 국내의 천연 자원의 활용성을 극대화함으로써 재배 농가의 수익 창출
- 함초의 발효 산물은 최근의 연구에서 항혈전효과, 항산화효과 등의 기능성이 우수하여 고기능성의 소스로 개발
- 통통마디 추출물의 분석 결과 NaCl의 짭맛을 강화시키는 glutamate의 양이 상당히 많음을 확인함

Technical Sheet of Phytosalt & Phytosauce (2015.05.12)

Specifications	Phytosalt		Phytosauce		
	#100	#120	#1010	#1020	
Form	Powder	Powder	Liquid	Liquid	
Color	Green	Green	Light Brown	Dark Brown	
Use	Salt Substitute	Salt Substitute	Taste Enhancer	Taste Enhancer	
Sodium Chloride(NaCl)	53.66%	56.83%	23.31%	17.75%	
Total Salt	61.98%	61.51%	27.53%	23.23%	
Sodium(Ia) Reduction Effect	18.62%	13.34%	15.33%	23.59%	
Raw Material	100% Salicornia Extract	100% Salicornia Extract	100% Salicornia Extract	100% Salicornia Extract	
Additives	None	None	None	None	
Labeling (Nutritional Components)	Calorie (Kcal/100g)	108.48	98.86		61.91
	Carbohydrate (%)	17.91	16.84		11.09
	Crude protein (%)	9.87	9.47		5.76
	Crude fat (%)	0.42	0.34		0.18
	Moisture (%)	4.16	4.61		61.22
	Ash (%)	67.64	68.74		21.74
	Sodium (mg/100g)	21,575.16	20,864.16		5,523.43
	Saccharide (%)	Not Detective	Not Detective		Not Detective
	Saturated fatty acid (%)	Not Detective	Not Detective		Not Detective
	Trans fatty acid (%)	Not Detective	Not Detective		Not Detective
Cholesterol(mg/100g)	Not Detective	Not Detective		Not Detective	
Dietary fiber (%)	3.23	4.72		3.60	
Proximate Analysis (g/100g)	Moisture	4.19	3.46	83.11	64.53
	Ash	66.77	66.22	24.15	20.88
	Protein	8.52	8.25	3.13	4.12
	Fat	0.30	1.53	3.83	7.42
Carbon Analysis (mg/100g)	Carbohydrate	30.22	38.52	338	7.05
	N	21,197.21	22,403.80	9,148.08	6,881.89
	NH ₄	1,567.01	424.19	377.97	312.43
	K	3,076.28	3,163.21	1,567.50	2,969.28
	Mg	876.35	802.21	372.14	103.46
	Ca	433.35	499.90	146.17	213.37
Anion Analysis (mg/100g)	Cl	39,834.11	39,064.88	17,487.50	14,834.83
	Br	104.48	156.55	88.40	106.69
	NO ₃	59.20	130.08	34.08	46.38
	SO ₄	1,362.12	1,467.57	833.38	1,116.93
Amino Acids (g/100g)	PO ₄	485.34	713.60	290.40	261.75
	Cysteine	0.053	0.053	0.019	0.021
	Methionine	0.028	0.014	0.006	0.011
	Aspartic acid	0.294	0.254	0.096	0.129
	Threonine	0.097	0.088	0.024	0.035
	Serine	0.173	0.153	0.048	0.063
	Glutamic acid	0.793	0.738	0.311	0.407
	Glycine	0.077	0.067	0.018	0.027
	Alanine	0.117	0.106	0.034	0.046
	Valine	0.167	0.148	0.054	0.068
	Isoleucine	0.066	0.061	0.023	0.032
	Leucine	0.069	0.061	0.020	0.019
	Tyrosine	0.067	0.106	0.024	0.028
	Phenylalanine	0.068	0.060	0.029	0.038
	Lysine	0.108	0.076	0.024	0.032
	Histidine	0.032	0.028	0.010	0.013

<통통마디 열수추출액의 성분 분석표>

2. 국내외 기술개발 현황

코드번호	D-04
------	------

- 우리나라 시판 간장의 경우 2016년(10.7백만 달러) 대비 2017년(11.5백만 달러)로 7.1백만 달러 증가하고 있는 추세이며 주력 시장인 미국, 러시아의 안정적 수출확대를 보이고 있음. 특히 러시아는 11.9% 가파른 수출 증가세를 보이며 2.5백만 달러를 보이며, 1위 수출 대상국인 미국의 2.5백만 달러 수출액에 달하고 있음

(단위 : 천톤, 백만불, %)

구분	2016	2016.1.1.~10.31(A)		2017.1.1.~10.31(B)		증감률(B/A)	
		물량	금액	물량	금액	물량	금액
가공식품	5,355	2,821	4,399	2,876	4,692	1.9	6.7
- 소스류	187	58	153	65	165	11	8.2





<출처 : 2017년 10월 농림수산물 수출동향 및 통계>

- 유럽, 영국, 중국 시장의 무첨가 제품 선호도 증가

(1) 무첨가식품이란, 소비자들이 기피하는 성분(설탕, 색소, 방부제 등의 인공 또는 화학첨가물)을 제거한 식품으로, 알레르기나 질병을 유발할 수 있는 성분을 제거한 식품을 포괄하는 개념임. 소비자들의 건강에 대한 관심이 높아지면서 화학조미료 무첨가제품 외에도 건강에 해가 될 수 있는 성분을 뺀 식품수요 증가하고 있으며 라벨을 통해 함유성분을 꼼꼼하게 확인하는 소비자들이 많아지면서 무첨가식품 시장은 더욱 성장할 전망이다

(2) 천연 조미료 제품 선호 추세

치킨스톡을 대체하는 각종 천연조미료가 소비자들 사이에서 인기이며 주로 버섯과 양파 등의 채소를 건조하여 분쇄한 가루 형태의 조미료가 다수임. 중국의 식생활이 서구화되기 시작하면서, 인공첨가물을 사용하지 않은 수입산 소스의 수요도 증가

	브랜드 푸오이젠(朵伊人) 원산지 중국 제품 표고버섯 분말(味粉) 가격 50.0위안 (6,306원) 특징 · 고단백, 저지방 식품으로 대표되는 표고버섯을 건조하여 만든 조미료 · 중국에서 건강한 천연조미료로 주목 소비자들 사이에서 인기		브랜드 아지노모토(味の源) 원산지 중국 제품 양파 분말(洋葱粉) 가격 23.0위안 (3,621원) 특징 · 다른 재료의 첨가없이 순수 양파를 건조한 분말 · 일본계 조미료기업인 아지노모토의 중국 내 OEM 생산 제품 · 육류 등을 요리할 때 사용		브랜드 픽스(PIC'S) 원산지 뉴질랜드 제품 땅콩버터(花生醬) 가격 168.0위안 (27,913원) 특징 · 호주산 땅콩을 통째로 넣어 만든 제품으로 생 땅콩이 씹히는 식감이 특징 · 인공색소와 향료를 넣지 않고, 천연염을 첨가한 땅콩버터 · 어린이용 간식이나 중국 음식을 만들 때 사용		브랜드 몬티(Monti) 원산지 이탈리아 제품 크림소스(奶油醬) 가격 59.0위안 (9,003원) 특징 · 양송이버섯, 마늘, 엑스트라 버진 올리브 오일이 들어간 크림소스 · 제품의 재료가 모두 천연재료로만 구성되어 유통기한이 짧음 · 전 공정이 이탈리아에서 제조되어 위생적으로 우수함을 강조
---	--	---	--	---	--	---	--

<출처 : aT한국농수산물유통공사, 2017년 7월 무첨가식품 시장분석 최종본>

(3) 인공색소 무첨가 제품

영국 내 천연색소 첨가제품은 제과, 음료, 소스 등 다양한 분야의 가공식품에서 증가하는 추세이며, 인공색소 첨가에 민감한 어린이용 간식 제품에서 많이 찾아볼 수 있음

	브랜드	나폴리나(Napolina)		브랜드	하틀리(Hartley)			브랜드	리베나(Ribena)		
	원산지	영국		원산지	영국			원산지	영국	원산지	영국
	제품	파스타 소스 (Pasta Sauce)		제품	라즈베리 젤리 (Raspberry Jelly)			제품	딸기 밀크셰이크 (Strawberry Milkshake)	제품	블랙커런트 스쿼시 (Blackcurrant Squash)
	가격	£1.85 (2,685원)		가격	£0.50 (726원)			가격	£1.00 (1,452원)	가격	£2.46 (3,571원)
특징	<ul style="list-style-type: none"> · 인공색소, 인공향료, 방부제가 무첨가된 소스 제품 · 인공 첨가물 대신 양파와 허브, 마늘을 사용 		특징	<ul style="list-style-type: none"> · 인공색소, 인공향료, 설탕 무첨가 젤리 · 동물성 젤라틴 성분을 사용하지 않아 비건인증을 취득 		특징	<ul style="list-style-type: none"> · 설탕, 인공색소, 인공향료 및 과당을 천연성분으로 대체한 밀크셰이크 · 천연재료의 사용 및 설탕 무첨가를 강조하여 어린이 건강간식으로 포지셔닝한 제품 		특징	<ul style="list-style-type: none"> · 인공색소, 인공향료 대신 천연색소와 향료를 첨가한 드링크 제품 · 유리병에 포장되어 있고, 블랙커런트 추출물 및 비타민C를 첨가하여 프리미엄 음료를 강조 	

<출처 : aT한국농수산물유통공사, 2017년 7월 무첨가식품 시장분석 최종본>

○ 2022년까지 중국 조미료 시장 규모 4천억 위안(65조 원) 예상

생활 수준 향상에 따라 조미료 제품이 지속적으로 고급화 되고 있으며 중국 조미료 산업 규모가 확장되고 있음. 2016년 중국의 요식업 수입은 35,779억 위안에 달해 동기대비 10.8% 상승하였으며 요식업 소비증가로 2016년 중국의 조미료 생산량은 2,533만 톤을 기록. 그중 간장과 식초 생산량이 가장 큰 비중을 차지하였으며 간장 생산량은 991.43만 톤에 달해 4% 증가, 총42% 비중을 차지하였음. 2016년 말까지 중국의 조미료 시장규모는 2,885.98억 위안에 달해 2017-2022년 기간 안정된 증가세를 보일 것으로 전망되며 2022년까지 시장규모는 4,419억 위안으로 예상됨



<중국 조미료 시장 규모, 출처 : aT베이징 지사>

3. 연구수행 내용 및 결과

제 1절 연구개발 수행 내용

코드번호	D-05
<p>1. 주요 연구개발 수행 내용</p> <p>가. 통통마디 가수분해물의 미생물 발효 기술 개발</p> <ol style="list-style-type: none"> (1) 통통마디 가수분해물의 발효에 적합한 균주 개발 (2) 통통마디 발효를 통한 조미소스 생산 공정 개발 <p>나. 통통마디 가수분해물의 발효를 통한 소금무첨가(No Salt-added) 기능성 조미소스 개발</p> <ol style="list-style-type: none"> (1) 항산화, 항당뇨, 미백활성, 혈전 분해능, 면역력 강화, 간 손상예방, 알도스테론 수치 강화 효능 등 기능성 소재 확인 및 검증 (2) 발효산물로부터 유용 기능성 성분 분리 및 생리 기능성 소스 소재 검증 <p>다. 서구인의 입맛에 맞는 유럽형 조미 소스(European Sauce)의 제품화</p> <ol style="list-style-type: none"> (1) 유럽의 글로벌 식품회사와 샘플테스트 및 업무협력 (2) 샘플테스트를 통해 개선된 맛의 조미소스 시제품 제작 <p>라. 통통마디 마쇄물 및 발효 산물의 기능성 유효성분 규명</p> <ol style="list-style-type: none"> (1) 발효식품 유래 고 AGI 활성을 나타내는 <i>B. velezensis</i> K26 균주 분리 (2) <i>B. velezensis</i> K26의 AGI 활성 증진을 위한 배지 최적화 (3) 통통마디 마쇄물(salicornia extract)의 <i>B. velezensis</i> K26 발효 (4) UPLC-ESI-Q-TOF-MS 기반 상기 통통마디 발효산물의 추출물 분석 <p>마. 통통마디로부터 유용 기능성식품 소재 확보</p> <ol style="list-style-type: none"> (1) <i>B. velezensis</i> K26에 의한 통통마디 발효산물의 기능성식품 소재 확보 (2) <i>B. velezensis</i> K26에 의한 통통마디 발효산물의 영양성분(조단백질, 조지방, 트랜스지방, 포화지방산, 탄수화물, 회분, 수분, 식이섬유, 열량, 콜레스테롤, 당류, 나트륨) 분석 <p>바. 확보소재 및 정제물질의 생리활성(항당뇨, 항비만 및 항염증) 평가</p> <ol style="list-style-type: none"> (1) <i>B. velezensis</i> K26에 의한 통통마디 발효산물의 세포독성 실험 (2) 3T3-L1 지방세포의 adipogenesis assay를 통한 통통마디 발효산물의 지방세포 분화 억제 분석 및 이를 통한 항비만 효과 확인 (3) RAW 264.7 대식세포주의 염증성 cytokine (IL-6 및 TNF-α)의 분비량 결정을 통한 통통마디 발효산물의 항염증능 확인 <p>사. 전임상시험을 통한 소금무첨가(No Salt-added) 조미소스의 안전성 및 기능성 검증</p>	

2. 연구방법

가. 실험재료

(1) 통통마디

통통마디(*Salicornia europaea*)는 전라남도 신안에서 재배하여 8~9월에 수확한 것을 구입하여 -24℃ 이하의 냉동고에 보관하며 원료로 사용함. 냉동 보관된 통통마디는 흐르는 물에 세척하며 이물 등을 제거하여 선별함.

(2) 활성탄

통통마디 추출물 또는 통통마디 발효산물의 탈색 및 이미취 제거를 위하여 CGSP (Norit, USA) 를 이용함.

(3) 균주 및 배지

통통마디 발효에 사용한 균주로는 *Corynebacterium glutamicum* KCTC1738, *Aspergillus oryzae*, *Bacillus* 속, *Lactobacillus* 속, *saccharomyces* 속, *Zygosaccharomyces* 속 및 *Leuconostoc* 속의 균주를 한국생명공학연구원 생물자원센터 및 발효미생물 산업진흥원에서 분양받아 사용함. *C. glutamicum* seed용 배지로는 BHI(Difco, USA)를 사용하였고, L-glutamate 생산을 위한 최소배지는 CGX2배지 ((NH₄)₂SO₄ 2%, glucose 4%, KH₂PO₄ 0.1, K₂HPO₄ 0.1%, MgSO₄ · 7H₂O 0.025%, 0.1% CaCl₂ 50μl, trace elements solution(FeSO₄ · 7H₂O, MnSO₄ · H₂O, ZnSO₄ · 7H₂O, CuSO₄, NiCl₂ · 6H₂O, pH 7.0) 50μl + Biotin 최종 농도로 5μg/L를 사용함. 유산균 seed용 배지는 MRS를, *A. oryzae* seed 배지로는 PDA를 이용함.

나. 실험방법

(1) 통통마디 열수추출

선별하여 세척한 통통마디는 세절 후 초고속진공추출기 (COSMOS-660, 경서 E&P)를 이용하여 추출함. 통통마디 10 kg에 물 25 L를 넣고, 105℃에서 5시간 동안 추출함. 최종 염도가 약 20%에서 농축을 종료함. 염도 측정은 염도계(Salt meter ES-421, ATAGO, Japan)를 사용함. 최종 농축된 통통마디 열수추출물은 10,000 rpm에서 20분간 원심분리하여 불용성분을 제거 후 통통마디 추출액으로 사용함.

(2) 활성탄 처리

활성탄은 처리하고자 하는 추출액 또는 발효액의 brix 값을 측정(PAL-1, ATAGO, Japan) 후 그 값의 5~10%에 해당하는 양을 첨가하였고 80℃로 가온하여 30분간 교반함. 활성탄 제거는 원심분리 후 상등액을 filter paper와 micro filter(0.45~0.1 μm)를 이용하여 제거함.

(3) 농축

통통마디 추출액 또는 발효액은 감압농축기 (Rotary Vacuum Evaporator N-1100, EYELA, Japan)를 이용하여 water bath(SB-1100, EYELA, Japan) 50°C 조건에서 농축하여 사용함.

(4) 분무건조

통통마디 발효액의 과립화를 위해 분무건조기 (SD-1000, ETELA, Japan)를 이용하여 분무 건조함. 분무건조 조건은 outlet temp 92-95°C, blower 0.4 m³/min, pump speed 2에서 3까지 서서히 높이며 분무건조함. 분무건조 후 cyclone을 통해 회수통으로 모인 건조물은 70°C 오븐에서 약 30분~1시간 동안 최종 건조하여 냉장 또는 냉동보관함.

(5) 일반성분 분석

일반성분 분석은 식품 공전에 기재되어 있는 방법을 통해 측정함. 수분 함량은 105°C에서 오븐건조법, 조회분 함량은 550°C에서 회화법, 조단백 함량은 켈달법, 조지방 함량은 에테르추출법으로 측정함.

(6) 미네랄 측정

미네랄 함량은 이온 크로마토그래피를 통해 측정함.

(7) 아미노산 측정

아미노산 분석은 HPLC(Agilent, USA)를 이용함. Column은 Zorbax eclipse plus C18 4.6 x 150 mm, 3.5 μm으로 40°C로 incubation하며 분리하였으며 UVD를 이용하여 검출함. 아미노산의 경우 single-bond로 이루어져 UV/VIS에서 흡광을 갖지 않으므로 OPA(*o*-phthalialdehyde)로 1차 아미노산을 유도체화 하여 DAD 338 nm(10 nm bandwidth)의 파장을 이용해 검출함. 이때 Reference wavelength는 390 nm(20 nm bandwodth)로 설정함. 이동상 A는 40 mM Sodium phosphate (Di-basic) with 0.1% Phosphoric acid(pH 7.2), 이동상 B는 Acetonitrile: Methanol: H₂O=45:45:10이며 flow rate은 1.5 ml/min, injection program(표 1)을 이용하여 유도체화 시약과 샘플을 주입하였으며, 표준품은 Sigma 사의 제품을 이용함. Injection시 mixture를 제작하는데 필요한 borate solution은 Agilent Technologies의 Borate buffer 0.4N in wzter(pH 10.2)를 사용하였고 모든 용매는 HPLC임.

표 1.. Time sequnce 및 Injection program

Time(min)	B %	seq.	operation process
0.0	0	1	Draw 2.5μl from borate (vial 1)
		2	Draw 0.5μl from sample (vial 2)
1.9	0	3	Mix 3.0μl in washport 5 times
		4	Wate 0.5 min
18.1	57	5	Draw 0.5μl from OPA (vial 3)
		6	Mix 3.5μl in air max speed 6x
18.6	80	7	Draw 32μl from injection diluent vial
		8	Mix 18μl in air max speed, 2x
22.3	80	9	Injettion
		10	Wait 0.10 min
23.2	0	11	Valve bypass
26.0	0		

(8) Glutamic acid 정량법

Glutamic acid는 Megazyme사의 L-Glutamic acid assay kit을 이용하여 492 nm에서 흡광도를 spectrophotometer로 측정함. 표준용액 L-glutamic acid로 standard curve를 얻고 시료들을 발색하여 아래의 식에 대입하여 L-glutamate의 농도를 계산함.

$$C = \frac{V \times MW}{\epsilon \times d \times v} \times \Delta A_{L\text{-glutamic acid}}$$

V = final volume [mL]

MW = molecular weight of L-glutamic acid [g/mol]

ϵ = extinction coefficient of INT-formazan at 492 nm = 19900 [l x mol⁻¹ x cm⁻¹]

d = light path [cm]

v = sample volume [mL]

(9) 총당(Total Sugar) 함량 측정

총당함량은 phenol-sulfuric acid 방법을 이용함 (Rasouli, et al., 2014). 시험관에 1mg/mL의 시료를 10배 희석하여 조제한 시료용액과 표준당 용액 각 200 μ l를 분주하고 5% phenol 용액을 vortexing 한 후 1mL의 c-H₂SO₄ (Junsei, Japan)을 가하여 ice bath에 정치함. 10분간 발생열을 식힌 후 발색되는 반응용액의 황색을 490nm 파장의 흡광도를 UV-VIS 분광광도계를 이용하여 비색정량하였으며, 표준당용액은 glucose(Sigma, G-0750, USA) 100 μ g/ml을 증류수에 희석하여, 0, 20, 40, 60, 80, 100 μ g/ml 표준용액으로 하여 검량선을 작성하고, 시료의 농도를 계산하여 정량함.

(10) 산성당(Uronic acid) 함량 측정

Uronic acid 함량은 m-dihydroxybidiphenyl 법을 이용함 (Kweon et. al, 2003). 시험관에 1mg/mL의 시료를 10배 희석하여 조제한 시료용액과 표준당 용액 각 200 μ l를 분주하고 0.0125M sodium borate가 함유된 c-H₂SO₄ (Junsei, Japan)을 1.2ml 가하여 ice bath에 10분간 정치한 후 100°C water bath에서 5분간 반응시킴. 반응후 ice bath에 10분간 cooling 하고 20 μ l의 m-HBP(m-dihydroxybidiphenyl, Sigma H-6527, USA)를 가하여 즉시 vortexing 하여 나타나는 pink color를 540nm 파장의 흡광도를 UV-VIS 분광광도계를 이용하여 비색정량함. 표준당용액은 galacturonic acid (Sigma, G-2125, USA) 100 μ g/ml을 증류수에 희석하여, 0, 20, 40, 60, 80, 100 μ g/ml 표준용액으로 하여 검량선을 작성하고, 시료의 농도를 계산하여 정량함.

(11) 총단백질(Total Protein) 함량 분석

통상의 Brad-ford 시약을 이용하여 Bovine Serum Albumin(BSA) 용액을 표준용액으로 하여 측정하였으며, 반응시 나타나는 남색을 595nm에서 비색정량함.

(12) 총폴리페놀(Total Polyphenol) 함량 분석

총 폴리페놀 함량은 Folin-Davis 방법을 수정하여 96-well microplate에서 실시함 Lee et. al., 1997). 추출 또는 정제시료 1mg을 증류수 1ml에 용해하여 10배로 희석한 100ug/ml의

시험액을 조제하였으며, 표준물질로 tannic acid(Sigma Co.,USA)를 농도별로 사용함. 96-Well-microplate를 이용하여 시료액 또는 표준액 20ul에 2% sodium carbonate 250ul를 가한 후 16ul의 50% Folin-Ciocalteau's phenol reagent(Folin-C, Sigma, USA) 용액을 첨가하고 30분간 실온에서 반응시킴. 반응 후 나타나는 청색의 반응물의 725 nm 흡광도를 UV-VIS microwell plate reader(Bio-RAD, x-Mark, USA) 측정하였으며, 표준물질의 표준곡선으로부터 시료내 총 폴리페놀 함량을 계산함.

(13) 총플라보노이드(Total Flavonoid) 함량 분석

총 플라보노이드 함량은 Chung(2014)의 방법을 수정하여 96-well microplate에서 실시함. 다양한 농도로 증류수에 녹인 시료액 30 μ l에 90% diethylene glycol 200 μ l를 첨가하고 다시 1 N NaOH 5 μ l를 넣고 37 $^{\circ}$ C에서 1시간 반응 후 420nm에서 흡광도를 Microreader 기(Bio-RAD, x-Mark, USA)를 이용하여 측정함. 표준시약 rutin(Sigma Co., USA)을 사용하여 얻은 검량곡선으로부터 추출시료에 함유되어 있는 총 플라보노이드함량을 계산함.

(14) 총아이소플라본(Total Isoflavone) 함량 분석

Isoflavone 함량은 Choung 등(2006)의 방법을 수정하여 측정함. 시험시료 분말 1g을 메탄올 15 mL를 첨가하고 3시간동안 교반 후 10,000 rpm 에서 5분간 원심분리를 실시하였다. 원심분리 된 상정액은 다시 메탄올로 희석하였고, filter로 여과한 뒤 HPLC 분석을 실시함. HPLC는 Agilent 1100 series (HP, USA), column 은 Merck사의 ODS 계열인 Lichrosper 100RP-18ecartridge column(125 \times 4 mm, 5 μ m)을 사용하였다. 이동상은 1 mM ammonium acetate를 함유한 증 류수와 메탄올을 60 : 40의 비율로 혼합한 단용매 조건으로 35분간 용출하였으며, 유속은 1.0 mL/min로 조절하였고, 시료 주입 량은 20 μ L, 검출파장은 260 nm, 컬럼 온도를 25 $^{\circ}$ C로 제한하여 분석하였다. 분석시료별 isoflavone함량은 외부표준물질의 농도별 peak 면적을 기초로 한 검량 식에 의해 계산함.

(15) 항산화활성 측정

블로이스의 방법(Abe *et al.*, 2000)을 수정하여 1,1-diphenyl-2-picryl hydrazyl (DPPH, Sigma Co., USA)을 이용함. DPPH 5 mg을 에탄올 50 ml에 녹여 DPPH 용액을 만든 후 96-well microplate에 180 μ l를 가하고 시료를 0~100 μ g/ml의 농도로 첨가하고, 5초 동안 혼합한 후 30분 동안 실온에서 반응시키고, 517nm에서 시료를 가하지 않은 대조군에 대한 흡광도 감소를 유리라디칼소거 활성(%)으로 나타내었음. 50%의 유리라디칼을 소거하는데 필요한 물질의 농도를 IC₅₀ 값으로 나타낼 수 있으며, 이 값이 낮을수록 항산화능이 강함을 의미함.

(16) 항응고활성(anti-coagulant activity) 측정

통통마디 추출물 또는 발효물의 추출물 또는 유기용매 분획시료의 항혈전 활성 평가의 일환으로 혈액응고 저해활성을 평가하되, 내인성 경로 및 외인성 경로의 응고과정을 이용하여 기존에 보고된 방법에 준해 평가하였으며(Kim *et al.*, 2012 등), 프로트롬빈 타임과 에이피티티 타임을 측정함. 혈장은 시판 control plasma (MD Pacific Technology Co.,

Ltd, Huayuan Industrial Area, China)을 시험의 검정을 위하여 사용하되, 대부분의 측정에서는 건강한 성인의 혈장을 구하여, -80°C에 분주시료로 보관하면서 실험에 이용함.

(17) 프로트롬빈타임(Prothrombin Time, PT)

건강한 성인의 혈장 30 μ l와 다양한 농도의 시료액 5 μ l를 Coagulation analyzer(Genus CA 51-52 semiauto coagulometer, Shenzhen China)의 튜브에 첨가하여 37°C에서 3분간 가온 후, 40의 PT reagent(Diagon PT, Hungary)를 첨가하고 혈장이 응고될 때까지의 시간을 3회 반복한 실험의 평균치로 나타냄. 대조로는 아스피린(Sigma Co., USA)을 사용하였으며, 용매 대조구로는 시료 대신 DMSO를 사용함. 프로트롬빈 저해활성은 시료 첨가시의 응고시간을 용매 대조구의 응고시간으로 나눈 값으로 나타냄.

(18) 에이피타임(activated Partial Prothromin Time, aPTT)

건강한 성인 혈장 30 μ l와 다양한 농도의 시료 추출액 5 μ l를 Coagulation analyzer(Genus CA 51-52 semiauto coagulometer, Shenzhen China)의 튜브에 첨가하여 37°C에서 3분간 가온한 후, 20 μ l의 aPTT reagent(Diagon APTT, Hungary)를 첨가하고 다시 37°C에서 3분간 배양함. 이후 50 μ l CaCl₂ (35 mM)을 첨가한 후 혈장이 응고될 때까지의 시간을 측정함. 용매 대조구로는 시료 대신 DMSO를 사용하였으며, 이 경우 50-55초의 응고시간을 나타냄. aPTT의 결과는 3회 반복한 실험의 평균치로 나타내었으며, 혈액응고인자 저해활성은 시료 첨가시의 aPTT시간을 용매 대조구의 aPTT시간으로 나눈 값으로 나타냄.

(19) 항당뇨활성 측정

포유류 소장 점막의 brush border에 분포하고 있는 탄수화물 소화효소들인 maltase, sucrase 및 glucoamylase들이 α -Glucosidase이며, 이 효소의 과도한 활성을 저해함으로써 이당류, 다당류가 단당류로 분해되는 과정을 억제하여 식후 과도한 혈당상승을 지연시키는 효과를 나타냄. 이 효소의 활성 저해는 항당뇨 효능을 측정하는 도구로 사용되므로, α -Glucosidase 억제제는 소장 내에서 탄수화물의 소화를 지연시켜, 식후의 혈당 수치의 증가를 약화시키고, 고혈당으로 인한 인슐린 분비를 지연시키는데 효과적임. 효소반응은 96 wall microplate에 다양한 농도로 조제된 20 μ l 시료액, 20 μ l의 α -Glucosidase (Sigma Co., USA) 2 U/ml 및 180 μ l의 100 mM phosphate buffer (pH 7)을 37°C에서 10분간 preincubation 후 30 μ l의 20 mM p-니트로페닐- α -D-글루코피라노스 용액을 가하여 37°C에서 30분간 반응시킴. α -Glucosidase 억제 활성은 96 wall 반응액 (180 μ l)에 glucose oxidase reagent를 가하여 생성되는 과산화수소를 o-dianisidine과 반응시켜 생성되는 색소물질을 540 nm에서 비색정량하고 시료를 첨가하지 않은 대조군과 비교하여 계산하였으며, 양성대조군으로서 arcabose (Sigma Co., USA) 0-100 μ g/ml을 사용함.

- α -글루코시다제 활성의 억제(%) = $(1 - As/Ac) \times 100$ (%)
- Ac: 540 nm에서의 대조군 흡광도
- As: 540 nm에서의 샘플 흡광도

(20) 미백활성 측정

통통마디 추출물 또는 통통마디 발효-추출물 또는 유기용매 분획시료의 미백 화장품 용도로서의 가능성을 확인하여 보고자 피부 멜라닌색소의 생성을 유발시키는 갈변화 효소인 tyrosinase에 대한 저해활성을 측정함. 순수분리한 irilin B의 멜라닌 생합성 저해에 관여하는지 알아보기 위해 인간 피부 유래의 효소(Sigma Co, USA)인 tyrosinase를 이용하였으며 Peralta 등의 방법(Peralta, et. al. 2011)을 변형하여 실험함. 100 mM 포타슘 포스페이트 완충액(pH 6.8) 180 μ l, 5 mM L-DOPA 수용액 30 μ l 및 1,250 U/ml 농도의 휴면 tyrosinase 40 μ l를 혼합한 후 다양한 농도의 시료용액을 각각 20 μ l 가하여 37°C에서 30 분간 효소반응을 진행시켰고, 반응용액의 흡광도를 490 nm에서 측정하여 tyrosinase의 활성 억제율을 구함. 양성대조군으로는 알부틴(Sigma, USA)을 사용함.

$$\text{Tyrosinase 저해활성 (\%)} = [(A-B)/A] \times 100$$

A : 시료를 첨가하지 않은 반응용액의 490 nm에서 흡광도

B : 시료를 첨가한 반응용액의 490 nm에서 흡광도

(21) 관능평가법

관능평가의 시료는 총 6가지(통통마디 열수추출액, 통통마디 열수추출액을 이용한 발효액, 활성탄 정제액, 활성탄 처리 후 시판 조미소스 수준으로 농축한 농축액, 비교시료로서 시판 조미소스인 S사의 YD 제품)로 5점 척도법을 사용하여 평가함. 척도법에서 흔히 발생하는 중간 부분 선호평가의 문제점을 해결하기 위해 패널들은 테스트 할 시료의 염도와 같은 염도의 소금용액으로 수 차례 맛의 강도에 대해 테스트하여 훈련 후 관능평가에 임하였음. 또한 테스트의 시료가 짠맛을 갖고 있어 이에 대한 감가의 순응현상을 피하고자 각 시료의 테스트 사이에 충분히 맑은 물로 입을 헹구고 테스트에 임하도록 함. 관능성 평가는 20명을 대상으로 5점 척도로 평가하였으며, 매우 나쁘다 1점, 조금 나쁘다 2점, 보통이다 3점, 조금 좋다 4점, 매우 좋다 5점으로 표기함.

(22) 색차계 분석

관능적 특성으로 제품의 색도 중요한 factor이므로 색차 분석을 실행함. 색차 분석은 Hunter Color Difference meter (Super color sp-80 color meter, Tokyo Denshoku Co., Japan)를 이용하여 측정하였으며, 명도(백색 100~0 검정색), 적색도 (적색 100~-80 녹색), 황색도(황색 70~-80 검정색)를 측정함. 이때 표준백관의 색도는 L값이 94.70, a값이 -0.61, b값이 4.04로 기준을 정하였으며, 시료당 3회 반복 측정하여 표에 그 평균값을 나타냄.

(23) 유럽형 조미소스 제조

유럽형 조미소스는 우리나라 콩 발효 제조 공정을 변형하여 사용함. 전통 방식으로 제조된 간장은 *Bacillus* 균이 다량 성장하여 쿼퀴한 취가 발생하므로 *Aspergillus oryze*의 접종 비율을 높여 접종하는 방식으로マイル드한 향과 맛의 메주를 제조함. 적당히 발효한 메주

에 염도 20% 내외의 통통마디 추출물을 1:3~1:6 (w/w) 비율로 배합하여 28±0.5℃의 배양기에서 30~100일간 배양함. 배양의 종료 시점은 콩 발효의 숙성 중 감칠맛 성분인 glutamic acid의 생성량이 최대치에 이르는 시점으로 정함. 배양된 통통마디 열수추출 콩 발효액은 발효 후 약간의 발효취 및 조미소스의 색도 조절을 위해 활성탄으로 처리하고 제거함.

(24) 유산균의 내산성 및 내담즙성 측정

유산균의 내산성을 측정하기 위해 각 유산균 1 colony를 5 ml MRS 액체배지에 접종하여 37℃에서 24시간 동안 배양한 후 0.1%를 새로운 액체배지에 접종하여 본배양함. 본배양된 유산균 5 ml를 1,300×g에서 10분간 원심분리하여 균체를 회수함. 여기에 5 ml의 0.1N HCl로 조정된 MRS(pH 2.5) 배지를 넣어 현탁하였으며 균수는 1.0×10⁸ cfu/ml 수준으로 하여 37℃에서 24시간 배양후 생균수를 측정함. 내담즙성은 내산성과 동일한 방법으로 실행하되, 0.5% oxgall이 들어있는 MRS 액체배지에 24시간 동안 배양한 후 생존균수를 측정함.

(25) 발효산물의 분석

유기산 분석은 NICEM(National Instrumentation Center for Environmental Management, 서울대학교 농생명과학대학)에 분석 의뢰하였으며, Dionex Ultimate3000(USA))를 이용하여 분석함. Aminex 87H column을 사용하여 RI 검출기(ERC, RefractoMAX520, Japan)로 UV파장 210 nm에서 검출함. 이동상으로 0.01N H₂SO₄를 사용하였고 Flow rate 0.5ml/min, Injection volume는 10µl이다. 표준시료는 Acetic acid (JTB 99%), Formic acid, Lactic acid sodium salt (Fluka 98%), Citric acid, Oxalic acid, Fumaric acid (Showa chem 99.5%), Malic acid (Kanto chem 99%), Succinic acid (Aldrich 99%), VOAs mixture (AccuStandard FAMQ-004 10mM)를 사용함. 암모늄 이온분석은 Dionex ICS3000(Dionex, USA)를 이용하였으며, Ionpac CS12A column (4x250 mm Dionex, USA)을 사용함. Column oven Temperature 30℃, flow rate는 1ml/min이며 injection volume는 25µl, 20mM MSA(Methanesulfonic acid)로 elution함. 검출기는 suppressed conductivity(CSRS URTRA, 4mm) recycle mode에서 검출함. 표준시료는 sigma의 HPLC 등급 시료로 Li, Na, Mg, K, Ca, NH₄를 사용함. 중금속 분석은 시료를 dry oven 105 ℃에서 방치하여 수분을 모두 증발시킴. 건조된 시료는 균질화를 위해 ball mill을 사용하여 분쇄하여 0.5 g을 분해용기에 담아 질산 10 mL를 넣고 밀봉하여 1~2 시간 정치하고 microwave를 사용하여 sample을 분해함. 분해되는 동안 밀봉이 되어있는 분해용기의 안은 온도가 올라가며 이를 control해주는 sensor를 이용해 170℃에서 약 10분간 분해가 진행되도록 함. 분해용기의 온도를 식혀준 뒤 밀봉된 분해용기를 해체 하고 50 mL 플라스크에 중금속 전용 여과지를 사용하여 여과 후, 분해용기의 잔여물질을 정제수를 이용하여 2, 3회 씻어줌. 여과가 끝난 후, 정제수를 이용하여 최종 부피를 50 mL 표선까지 채운 후 검액으로 사용함. 검액에 대한 정량은 유도결합플라즈마발광광도계(ICP)를 이용하여 측정하여 아래의 식에 대입하여 계산하였음.

$$\text{시료 중 금속의 농도(mg/kg)} = \frac{(C_1 - C_0)}{W_d} \times f \times V$$

C_1 : 검정곡선에서 얻어진 분석시료의 금속 농도(mg/L)

C_0 : 검정곡선에서 얻어진 바탕시험용액의 금속 농도(mg/L)

f : 희석배수(검정곡선의 범위를 벗어날 경우)

V : 시료용기의 부피(여기서는 0.1 L)

W_d : 시료의 건조중량(kg)

중금속 분석은 시료 50 g을 polyethylene bottle에 칭량하고 acetonitrile 100 mL를 가하여 5,000 rpm으로 3분간 균질화하여 추출함. NaCl 20 g을 추가하고 shaker에서 30분간 진탕 후 원심분리기를 이용하여 3,000 rpm으로 원심분리함. 상등액 10 mL를 취하여 감압 농축 후 methylenechloride 2 mL로 재용해함. SPE cartridge(NH₂, 1 g)에 methylenechloride 5 mL로 conditioning 시료액 loading 후, 5% methanol 함유 methylenechloride 6 mL로 용출하고 5배로 미세농축 후 acetonitrile 1 mL에 재용해하여 UVD로 분석함.

(26) 통통마디의 건조방법 비교를 위한 처리방법

통통마디 생초는 2015년 9월 및 2016년 10월에 수확한 것을 사용함. 동결건조의 경우, 이물질을 제거한 함초를 3 cm로 세절하고 이를 -40°C 초저온 냉장고에서 예비동결한 후, 동결건조기(일신바이오베이스 PVTFD-100R, Dongducheon, Korea)에 넣어 건조하였으며, -40°C에서 시작하여 15°C/200분씩 온도를 증가시켜 운전하고 최종적으로는 25°C에서 80시간 건조함. 열풍건조의 경우, 이물질을 제거한 상기 세절 함초를 60°C의 열풍건조기에 넣고 2일간 향량 건조하였으며, 음건의 경우 세절 함초를 25°C의 실온에서 7일간 향량 건조함.

(27) 항혈전 및 항균 활성의 통계분석

실험 결과는 SPSS 23.0 버전을 사용하여 mean±SD로 나타내었으며, 각 군간의 차이는 ANOVA로 분석하고, Duncan 다중비교 검증법으로 통계적 유의성 검정을 조사함. 유의수준은 $p < 0.05$ 로 함.

(28) K26 균주 분리

통통마디 마쇄물의 미생물 발효를 위해 우선 식품소재에 적용이 가능한 기능성 미생물을 다양한 발효식품으로부터 분리함. 대표적인 발효식품 중 하나인 된장 1 g (w/v)을 0.85% NaCl 9 ml에 넣고 잘 섞어준 뒤, TSB (Tryptic Soy Broth, BD)와 LB (Nutrient Broth, BD) agar plate에 연속희석법에 따라 200 uL씩 spreading하여 37°C에서 24-48시간 배양하였음. 이 후 분리된 colony는 3차례 streaking 하여 단일 colony로 분리함.

(29) *B. velezensis* K26 균주의 동정

상기 분리된 균주의 동정을 위해 각 균주들의 genomic DNA를 16S rRNA 유전자 염기서열 결정에 사용하는 universal primer인 27F (5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3')와 1492R (5'-GGTTACCTTGTTACGACTTC-3')을 사용하여 polymerase chain reaction (PCR)을 수행하고 정제하여 ABI PRISM 3700 DNA analyzer로 염기서열을 분석함. 분석 결과는

BLASTN 프로그램(<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)을 이용하여 GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank>)의 ribosomal DNA 염기서열과 비교하였으며, 염기서열의 상동성은 ClustalX 2.1 프로그램(version 2.1)으로 분석하였고 Mega 6 프로그램 (version 6)을 이용하여 phylogenetic tree를 작성함.

(30) AGI 활성 측정

α -Glucosidase는 소장에서 이당류를 단당류로 분해하는데, 항당뇨 활성물질인 AGI는 이러한 α -glucosidase의 역할을 저해하여 혈당의 급속한 상승을 막아주는 역할을 함. 본 연구에서는 통통마디 마쇄물의 미생물 발효를 위해 활용하고자 하는 미생물의 목적 기능성으로 항당뇨 활성을 선정하였으며 이를 위해 1차적으로 발효식품으로부터 분리된 균주의 AGI 활성을 측정함. 분리 균주는 YG (1% glucose, 1% yeast extract, 0.05% (NH₄)₂SO₄, 0.05% KH₂PO₄) 액체배지에 접종하여 37°C, 220 rpm에서 5일간 진탕배양 하였고, 배양액은 100°C에서 10분간 열처리 후 10,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 얻은 상층액을 AGI 활성 측정에 사용함. 96 well plate에 0.1 M potassium phosphate buffer와 기질 10 mM PNPG (p -nitrophenyl- α -glucopyranoside)를 각각 30 μ l씩 넣은 후, 배양 상층액 147 μ l를 넣고 섞어준 뒤 3 μ l의 α -glucosidase (100 unit/ml, Sigma)를 첨가함. 이후 37°C에서 10분간 효소 반응을 유도한 후 UV/VIS spectrophotometer (Multiskan FC, Thermo scientific)를 활용하여 405 nm에서의 흡광도를 측정하였음. 이후 AGI의 활성 정도는 아래와 같은 식을 통해 결정함.

$$\text{AGI (\%)} = [1 - (\text{시험구 } A_{405} - \text{공시험구 } A_{405}) / \text{대조구 } A_{405}] \times 100$$

시험구: Buffer + PNPG + 배양상층액 + α -glucosidase

공시험구: 시험구에서 효소 대신 D.W. 첨가

대조구: 시험구에서 배양상층액 대신 D.W. 첨가

(31) 배지 최적화

최종 선정된 *B. velezensis* K26 균주의 AGI 활성 증가를 목적으로 탄소원 및 질소원의 배지 최적화를 진행함. *B. velezensis* K26의 기본배지(GY; 1% glucose, 1% yeast extract, 0.05% KH₂PO₄, 0.05% (NH₄)₂SO₄, w/v) 성분 중 glucose를 제외한 1% yeast extract, 0.05% (NH₄)₂SO₄, 0.05% KH₂PO₄에 다양한 탄소원(glucose, galactose, lactose, fructose, sucrose, xylose, sorbitol, soluble starch, corn starch, potato starch, maltose 등)을 각각 1% (w/v)씩 첨가하여 200 ml Erlenmeyer flask에 80 ml broth를 넣고 TSB broth에서 24시간 전배양한 *B. velezensis* K26을 1% (v/v) 접종한 후 37°C, 220 rpm에서 5일간 진탕배양함. 최적 질소원을 결정하기 위한 실험의 경우 다양한 질소원(yeast extract, soybean meal, soytone, malt extract, trypton, beef extract, corn steep liquor, casamino acid, polypeptone 등)을 각각 1% (w/v)씩 첨가하여 탄소원 최적화와 동일한 조건에서 배양함. 최종적으로 결정된 탄소원과 질소원을 통통마디 마쇄물의 미생물 발효 시 발효의 촉진을 위한 factor로 사용함.

(32) *B. velezensis* K26에 의한 통통마디 마쇄물의 발효

상기 분리된 *B. velezensis* K26을 이용하여 통통마디 마쇄물의 발효를 진행하기 위하여 우선 통통마디를 마쇄함. *B. velezensis* K26의 통통마디 마쇄물 발효는 다음과 같이 3개의 실험군으로 나누어 배양을 진행함.

P: 4% (w/v) salicornia extract

PSY: 4% salicornia extract + 2% sucrose + 2% yeast extract

SY: 2% sucrose + 2% yeast extract

상기 실험군의 본배양을 위하여 TSB 배지에서 37°C, 24시간 전배양된 *B. velezensis* K26 배양액의 0.5% (v/v)를 각각의 본 배양액에 접종하고 37°C에서 5일간 배양을 진행함.

(33) 통통마디 발효산물의 분석시료 준비

상기 *B. velezensis* K26에 의한 통통마디 발효산물의 유효 성분을 분석하고 동정하기 위하여 UPLC-ESI-Q-TOF-MS 분석을 진행함. 이를 위해 각 실험군의 배양액을 100°C에서 열처리한 후 10,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 획득한 상층액에 메탄올을 5:5 (v/v) 비율로 섞어 추출을 진행하여 분석 시료를 준비함.

(34) UPLC-ESI-Q-TOF-MS 분석

초고성능 액체 크로마토그래피 질량분석(UPLC-ESI-Q-TOF-MS)은 Agilent 1290 Infinity UPLC 시스템 및 친수성 크로마토그래피(HILIC) 컬럼(ZORBAX HILIC Plus, 2.1×100 mm, 3.5 μm, Agilent Technologies, USA)을 이용하여 수행함. 준비된 시료 1 μl를 주입한 후, 용매 A (5 mM 암모늄 아세테이트가 함유된 물) 및 용매 B (0.1% 포름산이 포함된 아세트나이트릴)를 0.3 ml/min의 유속으로, 0분 (90% B), 0.1분 (90% B), 9.9분 (60% B), 1분 (100% B), 2분 (100% B), 1분 (90% B), 및 6분 (90% B)의 농도 기울기로 흘러줌. 용출액은 기체 (N₂) 유속 (8 l/min) 및 기체 온도 (325°C)의 조건에서 Agilent 6520 Q-TOF 질량분석기(Agilent Technologies, USA)를 통하여 검출하였고, Agilent MassHunter data acquisition 프로그램을 이용하여 분석함.

(35) Authentic DNJ 분석

UPLC-ESI-Q-TOF-MS 분석을 통해 나타난 활성 peak의 동정을 위하여 authentic DNJ 화합물을 Sigma-Aldrich (1-deoxynojirimycin hydrochloride, D9305)에서 구입함.

(36) 3T3-L1 지방전구세포 배양

B. velezensis K26에 의한 통통마디 발효산물의 항당뇨(및 항비만) 효과를 세포실험을 통해 평가하기 위하여 3T3-L1 지방전구세포를 활용함. 우선 마우스 pre-adipocyte 세포주인 3T3-L1 세포는 10% Bovine Calf Serum (BCS)와 1%의 Penicillin (100 U/ml)/Streptomycin (100 ug/ml) (P/S)을 포함하는 DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium; Cambrex Bio Science, Walkersville MD, USA) 배지를 사용하여 37°C, 5% CO₂ 조건하에서 배양하여 사용함.

(37) 3T3-L1 세포독성

3T3-L1 세포주에서 통통마디 발효산물의 세포독성을 평가하기 위하여 3T3-L1 세포를 96 well plate에 200 cells/well로 분주하여 37°C, 5% CO₂ 조건하에서 24시간 동안 배양함. 배양 후, 배지를 모두 제거한 후 각 배양 상층액을 일정한 농도가 되도록 DMEM 배지를 이용하여 희석하여 100 μ l/well에 처리한 후 48시간 동안 배양함. 이후 CellVia (Enhanced Cell Viability Assay Kit, LF-EZ1001, Abfrontier) kit를 이용하여 DMEM에 CellVia를 섞어 준 후 각 well에 100 μ l씩 분주하여 30분간 37°C 에서 반응시켜주고 microplate reader를 이용하여 450 nm에서 흡광도를 측정함. 각 실험은 triplicate로 수행하였으며 이에 대한 평균값과 표준오차를 분석하여 세포독성 여부를 확인하였음. D.W.를 첨가한 처리군 (control)의 흡광도와 비교하여 통통마디 발효산물 처리에 따른 세포 독성을 다음과 같은 계산식을 통해 상대값(%)으로 나타냄.

Cell viability(% of control)=sample 처리 실험군의 O.D. value/D.W. 처리 실험군의 O.D. value)×100

3T3-L1 세포독성 실험의 통계적 유의차는 SPSS (Statistical Package for the Social Sciences) 프로그램을 이용하여 각 통통마디 발효산물 시료군을 D.W.와 비교하는 t-test 방법으로 분석함.

(38) 3T3-L1 세포분화 유도

3T3-L1 세포를 48 well plate에 10% BCS와 1% P/S가 포함된 DMEM 배지를 이용하여 100% confluent 상태로 만든 후, 배지를 분화유도 배지 (DMEM-MDI; DMEM, 10% FBS (Fetal Bovine Serum; GibcoBRL, USA), 1% P/S, 0.25 μ M dexametasone (Sigma Co. USA), 0.5 mM IBMX (methyisobutylxanthine, Sigma Co. USA), 10 μ g/ml insulin (Sigma Co. USA))로 바꿔준 뒤, 준비된 시료를 처리하고 37°C, 5% CO₂ 조건하에서 2일간 배양함. 그 후, 분화유지 배지 (DMEM, 10% FBS, 5 μ g/ml insulin)로 교체하고 시료를 처리하였음. 이후 2일 간격으로 분화 유지배지와 시료를 교체하면서 6일 동안 추가적으로 배양함.

(39) Oil-red-O 염색

통통마디 발효산물의 3T3-L1 세포분화 유도 억제를 측정하기 위해 adipogenesis assay kit (ENZ-KIT 103-0005, Enzo Life Sciences)를 이용함. Cell fixative 100 μ l를 모든 well에 추가한 뒤 실온에서 30분간 반응시키고 cell fixative를 제거한 후 adipogenesis dye 100 μ l를 각 well에 추가하여 30분간 염색함. 이후 adipogenesis dye를 제거하고 증류수로 3회 세척 후 완전히 말려줌. 마른 well에 extraction solution 100 μ l을 넣고 30분간 반응시킨 후 96 well plate에 옮긴 후 490 nm에서 흡광도를 측정함.

(40) LPS를 이용한 RAW264.7 세포주의 염증반응 유도

B. velezensis K26에 의한 통통마디 발효산물의 항염증능을 측정하기 위하여 RAW264.7 대식세포주를 이용함. RAW264.7 대식세포주(Korea Cell Line Bank, Seoul, Korea)는 1% antibiotic/antimycotic solution (Hyclone, Logan, UT, USA)과 10% fetal bovine serum (FBS, Hyclone)가 첨가된 DMEM (Hyclone)에서 배양함. 세포를 회수하고 계수한 후, 24-well

plate에 1×10^5 cells/ml의 세포 농도로 분주하고, 각 통통마디 발효산물 실험군의 100배 희석된 시료균을 24시간 처리함. 이후, 시료균이 처리된 세포배양액에 500 ng/ml 농도의 LPS (Sigma-Aldrich Co., St. Louise, MO, USA)를 처리하여 12시간 동안 염증반응을 유도 하였음. 이때, 양성대조군은 LPS만 500 ng/mL의 농도로 처리하였고, 음성대조군은 아무 것도 처리하지 않음.

(41) 염증성 cytokine의 정량

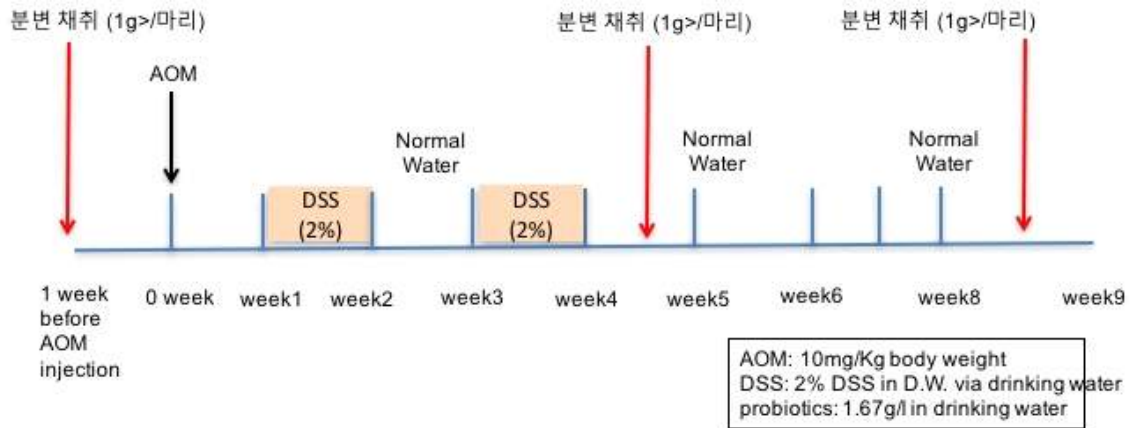
세포 배양액을 $300 \times g$ 에서 5분간 원심분리하여 상층액을 회수한 후, 염증성 cytokine인 IL-6 및 TNF- α 에 특이적인 상용 ELISA kit (eBioscience, San Diego, CA, USA)를 이용하여 분석하였음. 96-Well plate를 capture antibody로 4°C에서 12시간 코팅한 후, assay diluent를 이용하여 비특이적 항원-항체반응을 정지함. Kit에 포함된 sample diluent 용액을 100배 희석한 세포배양액 100 μ l를 분주하여 상온에서 1시간 방치하였음. Washing buffer를 이용하여 수차례 세척한 후, capture antibody 100 μ l를 분주하여 상온에서 1시간 방치한 후, biotinconjugated detection antibody와 streptoavidin-conjugated horse radish peroxidase를 첨가하여 상온에서 1시간 반응하였음. 제공된 기질용액을 첨가하여 30분간 발색반응을 유도한 후, stop solution (1 M H₃PO₄)를 첨가하여 반응을 종료하고 마이크로 플레이트 리더(iMark, Bio-Rad, Hercules, CA, USA)를 이용하여 450 nm에서의 흡광도를 측정 한 후, kit에 제공된 cytokine 표준품의 표준곡선을 이용하여 정량함.

(42) 항당뇨 및 항염증의 통계분석

각 실험은 triplicate로 수행하였고 이에 대한 실험결과는 PRISM 5.0 (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA)을 이용하여 평균값 \pm 표준오차로 표시하였으며, 통계적 유의차는 SPSS (Statistical Package for the Social Sciences) 프로그램을 이용함. 3T3-L1 지방전구세포를 활용한 지방 축적정도의 분석은 각 통통마디 발효산물 시료균을 각각의 독립변수로 one-way analysis of variance (ANOVA) 및 Duncan's new Multiple Range Test 방법으로 분석하였음. 반면 RAW264.7 세포 기반의 염증성 cytokine의 분비량 분석은 통통마디 발효산물 시료균을 각각 독립변수로하여 ANOVA 및 Tukey's post hoc test 방법으로 분석 함).

(43) AOM/DSS로 유발된 대장암 모델 구축

8주령의 C57BL/6을 이용하여 1주일간의 안정기를 거친 후 복강 주사로 azoxymethane(AOM)을 주사함. 이 때 농도는 쥐의 몸무게를 측정하여 10mg/KG의 농도로 주사함. AOM주사 후 1 주일 후에 음용수에 2%의 농도로 DSS를 용해시켜 1주일간 DSS를 섭취시킴. DSS투여는 1주간 지속하며, 1차 DSS투여가 종료된 후 2차 DSS투여를 실시함. 2차 DSS투여도 마찬가지로 1주간 지속함. AOM 주사 후 9주차에 실험 동물을 안락사 시켜 대장암의 발생 및 억제 여부를 관찰함.



(44) 장내 미생물 균총 분석을 위한 분변 채취

장내 미생물 균총 분석을 위하여 분변을 3회 채취함. 차세대 염기서열 분석기(next generation sequencing; NGS)에 적용하기 위한 충분한 DNA양을 확보하기 위하여 1회 채취 시 2-3g의 분변을 채취하도록 함. 채취한 분변은 각 실험동물 별로 labeling하여 -20° C에 보관함.

(45) 실험군

본 과제에서 실험군은 다음과 같음.

1. Con: 대조군으로서 AOM/DSS로 대장암 유발 시키지 않은 그룹
2. No AOM/DSS로 대장암을 유발시키고 아무런 처치를 하지 않은 그룹
3. phyto: AOM/DSS로 대장암을 유발시키고 통통마디 감쇄물 1.0855mg/day 처치
4. PNU: AOM/DSS로 대장암을 유발시키고 통통마디 감쇄물을 김치로부터 추출한 *Lactobacillus. plantarum*으로 발효시켜 2.0×10^9 /day의 농도로 처치
5. 3099: AOM/DSS로 대장암을 유발시키고 통통마디 감쇄물을 KTCC 3099 균주 (*Lactobacillus. plantarum*)으로 발효시켜 2.0×10^9 /day의 농도로 처치

(46) 실험동물 체중 측정

실험 동물의 체중은 매주 1회 측정하였으며 AOM 처치 1주일 전부터 측정을 시작하였음. AOM와 DSS가 투입되면 장내 염증반응에 의해 체중 감소가 관찰됨.

(47) 조직 획득

안락사 후에 실험 동물의 대장 조직을 ileocecal junction에서부터 anal verge까지 절제하여 획득함. 대장의 길이와 대장암 및 용종 (polyp)의 수를 기록함. 용종의 크기는 2mm 미만을 small, 2-4mm 사이를 medium, 4mm이상을 large로 기록함. 획득한 조직은 histopathological 분석과 생화학적 분석을 수행하기 위해 일부는 10%포르말린 용액에 일부는 -20° C에서 냉동 보관하도록 함.

(48) Histopathological 분석

안락사 후 10% 포르말린 용액에서 고정시키고, 1일 경과 후 70% 에탄올 용액에서 보관 하였던 대장 조직을 알맞은 크기로 잘라 병리조직용 cassette에 넣고 탈수화를 시킴. 최종 xylene용액에서 파라핀블록을 제작함. 파라핀 블록으로부터 조직 분석용 슬라이드를 잘라 내어 hematoxylin과 eosin 으로 염색하여 용종의 암 진행 정도를 관찰하도록 함. 대장 조직은 위상차 현미경 (Olympus CKX53)으로 관찰하고 함께 장비되어 있는 DP-27 CCD 카메라로 촬영함.

(49) 분변 분석

3회에 걸쳐 수집한 분변으로부터 DNA를 추출하여 장내 미생물 군총의 변화를 관찰함. 분변 내의 DNA는 QIAamp PowerFecal DNA Kit을 이용하여 획득하며, 제조사의 procedure를 따름.

(50) 차세대 염기서열 분석

추출한 분변 샘플은 차세대 염기서열 분석을 위해 천랩에 의뢰하여 Illumina miSeq으로 분석하였으며, 천랩의 데이터 분석 서비스를 이용하여 분석함. PCR 증폭은 추출된 DNA로 16S rRNA 유전자의 V3 또는 V4 영역을 표적으로하는 프라이머를 사용하여 수행하였음. 박테리아 증폭을 위해, 341F의 프라이머 (5' -TCGTCGGCAGCGTC-AGATGTGTATAAGAGACAG-CCTACGGGNGGCWGCAG-3')와 805R(5' -GTCTCGTGGGCTCGG-AGATGTGTATAAGAGACAG-GACTACHVGGGTATCTAATCC-3'). 증폭은 다음 조건 하에서 수행함: 95 °C에서 3 분간의 초기 변성, 95 °C에서 30 초 동안 변성, 55 °C에서 30 초 동안 프라이머 어닐링, 및 72 °C에서 연장 30 초, 마지막 신장은 72 °C에서 5 분. 그런 다음 Illumina NexTera 바코드를 부착하기 위한 2 차 증폭을 i5 forward primer로 수행함. (5' -AATGATACGGCGACCACCGAGATCTACAC-XXXXXXXXX-TCGTCGGCAGCGTC-3' ;X는 바코드 영역을 의미함) 그리고 i7 reverse 프라이머 (5' -CAAGCAGAAGACGGCATACGAGAT-XXXXXXXXX-AGTCTCGTGGGCTCGG-3'). 2 차 증폭의 조건은 증폭 사이클을 8로 설정하는 것을 제외하고는 이전의 조건과 동일함. PCR 생성물은 2 % 아가로스겔 전기 영동을 사용하여 확인하고 Gel Doc 시스템 (BioRad, Hercules, CA, USA) 하에서 시각화함. 증폭된 생성물을 QIAquick PCR 정제 키트 (Qiagen, Valencia, CA, USA)로 정제하였음. 동등한 농도의 정제된 제품을 함께 모으고 Ampure beads kit (Agencourt Bioscience, MA, USA)로 짧은 단편 (비 표적 제품)을 제거하였음. DNA 7500 칩을 사용하여 Bioanalyzer 2100 (Agilent, Palo Alto, CA, USA)에서 품질 및 제품 크기를 평가하였음. 혼합된 앰플리콘을 풀링하고 시퀀싱을 Chunlab, Inc. (Seoul, Korea)에서 Illumina MiSeq Sequencing system (Illumina, USA)을 사용하여 제조자의 지시에 따라 수행함.

(51) 차세대 염기서열 분석법 (MiSeq)

Raw reads 처리는 품질 확인 및 trimmomatic 0.321을 통한 저품질 (<Q25) 읽기 필터링으로 시작하여. QC 패스 후, 쌍방향 시퀀스 데이터는 PandaSeq2를 사용하여 병합시킴. 그런 다음 ChunLab의 사내 프로그램을 이용하여 유사성을 0.8으로 줄여 프라이머를 잘라냄. Mothur's3 사전 클러스터링 프로그램을 사용하여 시퀀스의 noise를 제거하는데, 이 때

시퀀스 간 최대 2 개의 차이를 허용하는 고유 시퀀스가 추출 및 병합됨. EzTaxon 데이터 베이스는 BLAST 2.2.224를 사용하여 Taxonomic Assignment에 사용되며 pairwise alignment⁵는 유사성을 계산하는 데 사용됨. Uchime⁶과 EzTaxon의 비 키메라 16S rRNA 데이터베이스는 유사성이 97 % 미만인 유사성이있는 읽기에서 chimera를 탐지하는 데 사용됩니다. 그런 다음 CD-Hit⁷ 및 UCLUST⁸을 사용하여 시퀀스 데이터를 클러스터링하고 α -diversity 분석을 수행함.

3. 추진전략 및 방법

가. 기술정보 수집

- 국회도서관, 서울대 도서관, KISTI 등 국내 도서관 망을 통하여 국내외 논문 및 학술 발표 자료 수집
- 국내외 특허 정보는 KIPRIS 특허정보넷을 통한 검색으로 수집하고 필요 시 특허 정보 전문 기관에 의뢰하여 수집

나. 전문가 확보

- 연구 책임자가 제안 기술 관련 개발 경력 7년의 연구 경력과 우리나라, 미국, 유럽, 일본 등지에 통통마디에서 소금 대체제를 생성하는 물질특허를 등록한 전문가이며 파이토포레이션 부설 연구소 소속 식품전문 연구원이 참여하여 연구를 수행
- 염생식물의 가공 기술 및 공정 개선 분야는 aT 한국농수산물유통공사에서 제공하는 현장코칭 전문가 활용
- 기술 및 경영 자문을 위한 국내 최고 수준의 식품공학, 식품가공, 안전성분석, 기술경영, 함초 재배, 식품 수출, 유통 전문가로 구성된 자문위원회 구성 운영

다. 통통마디 원료 확보

- 원활한 연구 개발을 위한 통통마디 원료를 안정적으로 확보하기 위하여 통통마디 재배 전문 기업과 공급 계약 수립 및 원료 확보

라. 국가 연구시설장비 진흥센터 및 서울대 유전공학연구소 장비 공동 이용

- 연구비의 절감과 효율적인 실험 수행을 위해 국가 연구시설장비 진흥센터 및 서울대 유전공학연구소가 보유하고 있는 고가의 실험 장비 공동 활용 적극 추진

마. 과제의 관리, 기술 및 경영자문은 한국산업진흥기술협회, 한국식품기술사협회, 벤처기업협회 전문가를 활용

바. 해외 수출 제품 개발을 위한 샘플테스트 및 기호 조사는 업무 협력 의향서를 체결한 유럽의 글로벌 업체와 협력을 통하여 추진하고, 점진적으로 식물성 천연 조미소스에 관심이 많은 대형 식품업체들로 확대함. 주관기관은 샘플을 생산하여 제공하고 글로벌 식품업체의 연구소와 함께 샘플테스트 수행 및 선호하는 맛의 식물성 천연 조미소스 개발에 협력

사. 추진 방법 및 계획

연도	세부연구목표	월 단위 추진계획											
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1 차 년 도	통통마디 가수분해물의 발효에 의한 기능성을 가진 유럽형 식품성 소금대체 소재 및 고부가가치 조미소재의 개발	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
	통통마디 마쇄물의 미생물 발효산물의 발효를 통한 기능성 소스 개발	■	■	■	■								
	유럽형 소금무첨가(No Salt added) 기능성 조미소스 개발			■	■	■	■	■	■	■			
	통통마디 마쇄물의 효소처리 가수분해물의 발효에 의한 조미/기능성 소재 개발						■	■	■	■	■	■	■
	통통마디 마쇄물의 산알칼리 가수분해물의 발효에 의한 조미/기능성 조미소재 생산						■	■	■	■	■	■	■
	발효에 필요한 포도당, 설탕 등 인위적 첨가물을 사용하지 않는 발효기술 개발	■	■	■	■	■	■	■	■	■			
	통통마디 및 염생식물의 이용성 및 식품학적 특성 평가			■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
	통통마디 및 염전 유래 유용 미생물의 발굴 및 발효 적용							■	■	■	■	■	■
	통통마디 마쇄물의 발효에 의한 기능성분의 항산화, 항혈전, 항당뇨 등 생리 활성 평가							■	■	■	■	■	■
2 차 년 도	전임상 시험을 통한 발효 조미소스의 안전성 및 기능성 검증			■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
	통통마디 마쇄물을 주원료로 한 조미 소재의 최적 생산 공정 확립	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
	소스 소재의 관능 및 기능성 평가에 의한 천연 소스 제형 개발				■	■	■	■	■	■	■	■	■
	통통마디 마쇄 가수분해물을 주성분으로 하는 천연 소스의 제품화				■	■	■	■	■	■	■	■	■
	유럽형 소금무첨가(No Salt-Added) 기능성 조미소재의 최적 공정 개발 및 제품화	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
	통통마디 마쇄물 및 발효 산물의 기능성 유효성분 및 작용기전 규명	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
	통통마디로부터 유용 기능성식품 소재 확보	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■
	확보소재 및 정제물질의 분자생물학적, 생화학적 활성 평가	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■

제 2절 연구개발 수행 결과

코드번호

D-05

1. 통통마디 가수분해물의 발효를 통한 다양한 고부가가치 기능성 조미소재 개발

가. 통통마디 가수분해물의 발효에 의한 기능성을 가진 유럽형 식물성 소금대체 소재 및 고부가가치 조미소재의 개발

(1) 통통마디와 다양한 식물성소재 혼합물 유래의 ‘감칠맛’이 강화된 유럽형 식물성 소금대체 소재 개발

- 통통마디 열수추출물을 소금물 대신 사용하였고, *A. oryze*를 배양한 콩 코지(koji)를 1:3 비율로 배합하여 28℃에서 100일간 배양하여 제조된 통통마디 콩 발효액은 통통마디 열수추출액에 부족한 단백질이 콩으로부터 가수분해 되어 나와 감칠맛이 상당히 증가한 발효 조미소스의 기본 원료가 됨. 발효 후 원심분리, 필터링, 활성탄 등의 정제처리를 거쳐 통통마디 열수추출물 만으로 제작된 콩 발효액을 얻었으며 이는 열수추출물보다 10배 이상 감칠맛의 척도인 glutamate양이 증가한 조미소스의 베이스임을 확인함. 이를 분무건조기를 이용하여 분무건조한 결과 분말 또는 과립형태로 제조 가능하였으며 통통마디 100%와 식물성 소재인 콩 발효액이 더해진 유럽형 식물성 소금대체 소재로 개발이 가능하였음.

(2) Glutamic acid 함량 측정법 도입

- 감칠맛을 갖는 아미노산은 glutamic acid, aspartic acid 등이 있으나 통통마디 열수추출물을 분석한 결과 자체 아미노산 중 glutamic acid가 차지하는 양이 많아 그 자체로서도 약간의 감칠맛을 가지는 것을 확인함. 염생식물로서는 많은 양의 glutamate를 보유하고 있으나 소스로서 이용하기 위해서는 감칠맛 성분의 보강이 필요하므로 감칠맛의 지표성분으로 glutamic acid를 선정함. 또한 유럽형 조미소스의 컨셉으로 콩발효를 두고 있어, 콩 발효시 다량 생성되는 주된 감칠맛 성분이 glutamate이므로 감칠맛의 지표로 glutamic acid함량을 도입하였음.

나. 통통마디 마쇄물의 미생물 발효산물의 발효를 통한 기능성 소스 개발

(1) 항산화 활성, 항당뇨 활성, 혈전 분해능, 면역력 강화, 항암활성, 간 손상예방, 알도스테론 수치 강화 효능 등의 기능성 소재 확인

- 통통마디 발효물의 열수추출 및 에탄올 환류 추출을 통한 기능성 비교 평가
통통마디 마쇄물의 미생물 발효 실험을 통하여 발효 후 통통마디 조직의 분해력과 발효 후 관능성이 우수한 *Bacillus* spp.을 선별하고, 본 균주로 대량 발효한 산물을 농

축하고 동결건조 후 수득된 분말(5g)에 열수 및 에탄올 환류 추출을 실시함. 각 추출물을 감압농축 후 동결건조하여 수득된 시료(열수추출물: SEW, 에탄올추출물: SEE)에 대하여 항산화, 항균, 항당뇨 및 혈류개선과 관련된 항혈전활성 예비실험을 통하여 검토하여 본 결과 항균활성의 경우 열수추출물 및 에탄올추출물 모두에서 세균과 진균 생육억제 활성이 낮아 통통마디에서 알려진 대표적인 기능성인 미백효과(Sung et. al., 2009, Chung et. al., 2005, Lee et. al., 2005)를 추가하여 항산화, 항당뇨, 항응고활성(Jang et. al., 2007)을 비교평가함. 시료농도별로 통통마디에서 알려진 대표적인 기능성들 즉 항산화, 항당뇨, 미백효과(Sung, 2009, Chung, 2005, Lee, 2005)와 함께 항응고활성(Jang, 2007)을 비교하여 그림 1에 나타냄. 항산화, 항당뇨, 미백 및 항응고활성 모두에서 통통마디 발효산물의 열수추출물보다 에탄올 추출물이 우수한 기능성을 나타냄. 이는 기능성 지표성분들이 소수성 저분자 물질들 중 특히 폴리페놀과 플라보노이드화합물들이 열수추출물보다 에탄올추출물에 집적되어 있음을 알 수 있음.

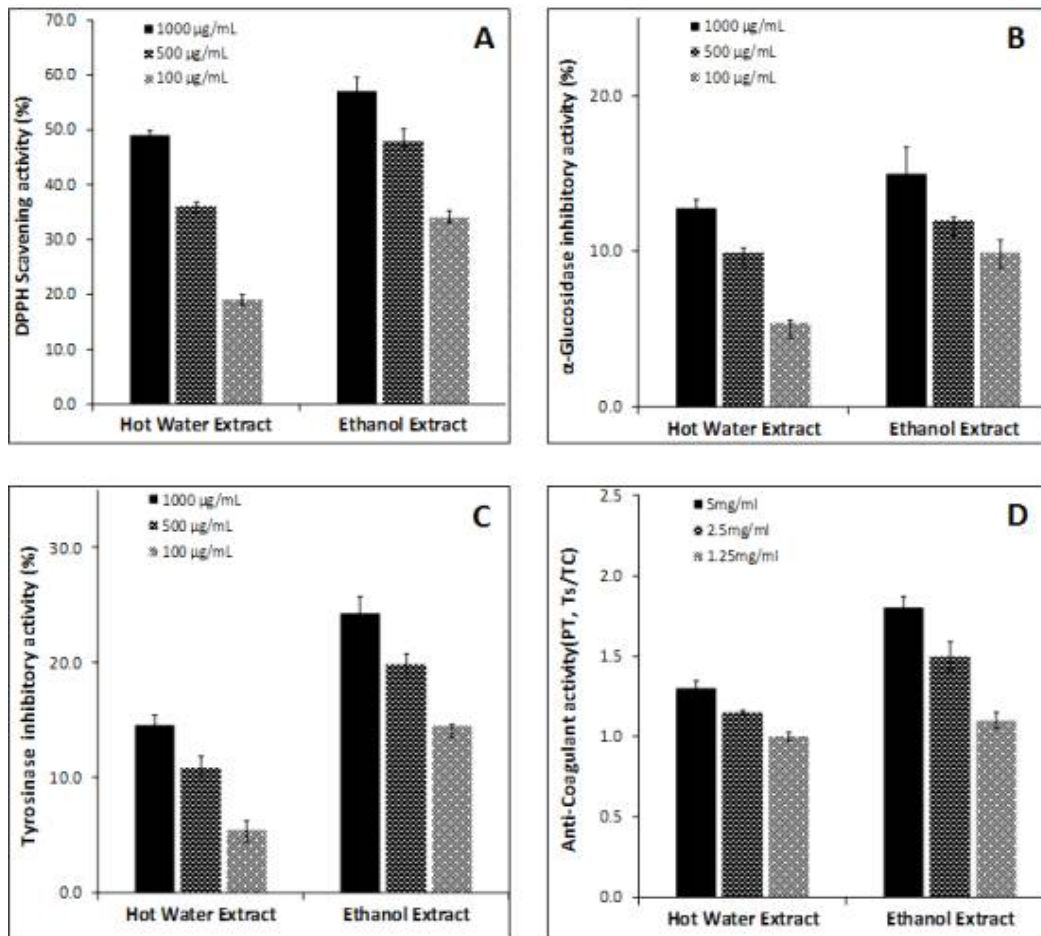


그림 1. 통통마디 발효물의 열수추출 및 에탄올 환류 추출을 통한 기능성 비교 평가
A: 항산화활성, B: 항당뇨활성, C: 미백활성, D: 항응고활성

○ 통통마디 발효 에탄올 추출물의 유기용매 분획 및 수율

통통마디 발효물 분말(SEE, 500g)을 에탄올 환류추출한 분말 (SEE-1, 500g)을 물에 용해시킨 후 에탄올 침전 및 원심분리를 통하여 고분자획분이 제거된 시료(SEE-1)에 대하여 헥산, 클로로포름, 에틸아세테이트, 부탄올을 이용하여 유기용매 분획을 그림 2

의 방법으로 각 분획물(SEE-2H, SEE-2C, SEE-2EA, SEE-2B, SEE-2Q)을 수득하였음. 그림 2에서 수득된 각각의 분획물에 대한 수율은 표 2에 나타냄.

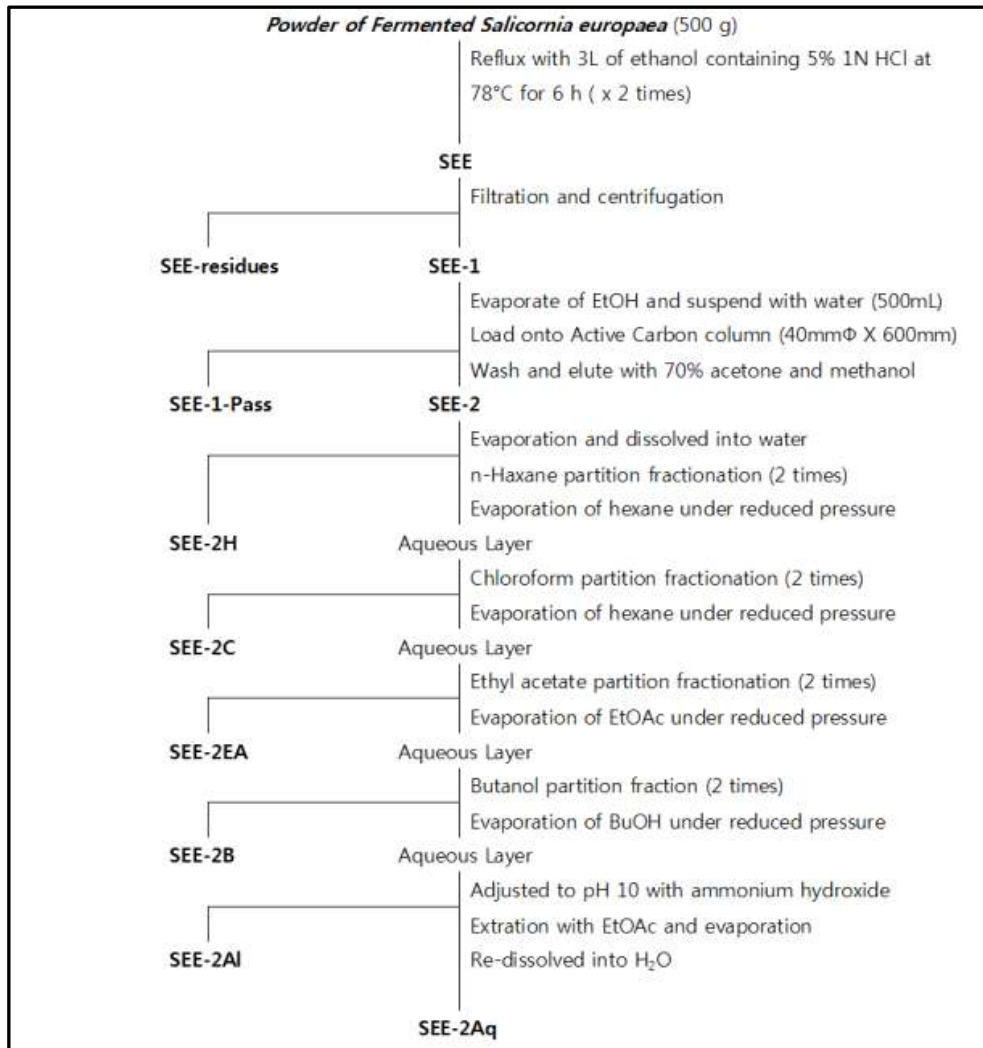


그림 2. 통통마디 발효 에탄올 추출물의 유기용매 분획 도식도

표 2의 결과에서 통통마디 발효물로부터 고분자 다당류 및 단백질이 제거된 에탄올 환류 추출물(SEE-1, 51.05g)로부터 수득된 유기용매 분획물 들 중 가장 수율이 높았던 부분은 부탄올 분획물(SEE-2B)로 약 16.2%, 에틸아세테이트 획분(SEE-3EA)은 9.5%, 헥산 분획물(SEE-2H)은 6.3%, 클로로포름 획분(SEE-2C)은 4.1%, 알칼로이드 분획물(SEE-2AI)은 2.4%, 나머지 물잔류층(SEE-2Aq)는 2.77g으로 5.4%의 수율임.

표 2. 통통마디 발효 에탄올 추출 분말의 유기용매 분획을 통하여 수득된 획분의 수율 비교

통통마디 발효 에탄올 추출물의 유기용매 분획										
Sample Name	SEE-1	SEE-Pass	SEE-W	SEE-2	SEE-2H	SEE-2C	SEE-2EA	SEE-2B	SEE-2AI	SEE-2Aq
Yield (g)	51.05	22.21	5.25	22.54	3.26	2.11	4.83	8.25	1.23	2.77
% yield	100	43.5	10.3	44.2	6.3	4.1	9.5	16.2	2.4	5.4

○ 통통마디 발효 에탄올 추출 유기용매 분획물의 항산화활성

통통마디 발효 에탄올 추출물의 유기용매 분획물에 대하여 항산화 활성을 비교하여 그림 3에 나타냄. 각 시료의 농도별로 동일조건에서 DPPH 라디칼 소거능을 비교하여 항산화활성을 측정함. 그림 3의 결과에서 에탄올 추출물(SEE-1)보다 에탄올 추출물의 고분자획분(SEE-Ps)에서는 항산화 활성이 미미하여 실험한 모든 농도에서 20%이하를 나타내었으며, 알칼로이드 획분(SEE-AI)과 물잔류층(SEE-Aq)에서도 비교적 낮은 활성을 확인하였으나, 나머지 유기용매 분획물들에서는 분획전 에탄올 추출물 보다 항산화 활성이 증가됨. 특히 에틸아세테이트획분(SEE-2EA)과 부탄올획분(SEE-2B)에서 강력한 항산화 활성을 확인할 수 있었으며, 에틸아세테이트 획분의 경우 0.1mg/ml의 낮은 농도에서도 65% 정도의 우수한 항산화활성을 나타냄. 통통마디의 알려진 항산화물질인 CDCQ (Caffeoyl- dihydrocaffeoyl-quinnic acid) 화합물과 플라보노이드 화합물들이 에틸아세테이트 획분에 존재할 가능성이 높음을 확인함.

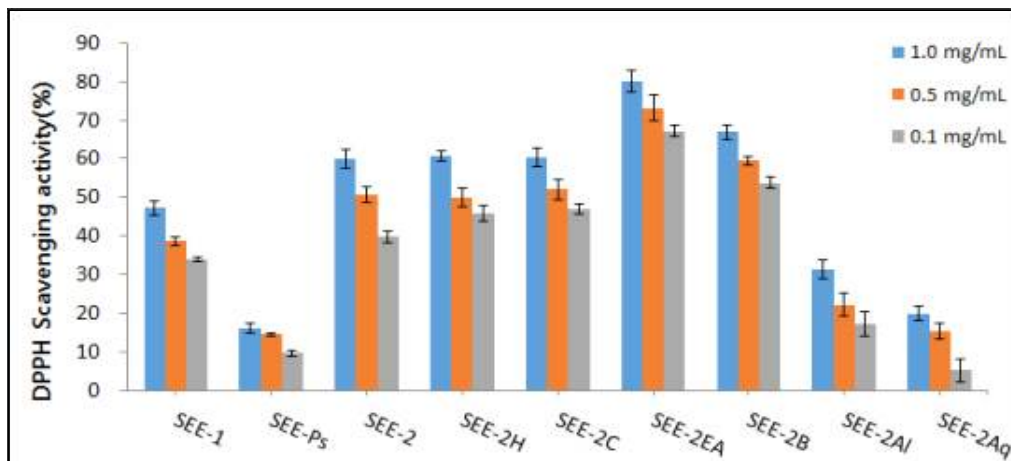


그림 3. 통통마디 발효 에탄올 추출 유기용매 분획물의 DPPH 소거능 비교

○ 통통마디 발효 에탄올 추출 유기용매 분획물의 알파글루코시다제 저해활성

통통마디 발효 에탄올 추출물의 유기용매 분획물의 알파글루코시다제 저해활성을 측정함(그림 4). 알파글루코시다제는 동물 소장 내의 이당류들을 마지막으로 가수분해하고 포도당을 유리시켜 소장점막으로 흡수시키는 역할을 하므로 이 효소의 활성 저해는 식사 후 탄수화물의 흡수를 억제하여 과도한 혈당증가를 방지할 수 있으므로 당뇨병 환자 특히 인슐린 저항성이 과다하게 나타나는 인슐린 비의존형 당뇨병 (Non-insulin-dependent diabetes mellitus, NIDDM) 환자들의 식후 급격한 혈당상승을 억제하여 당뇨병을 예방하기 위해 중요함. 따라서 각각의 시료를 농도별로 동일조건에서 효소와 반응시켜 생성되는 기질의 양을 분광광도계를 이용하여 비색정량하고 활성의 크기를 비교평가한 결과 에탄올 추출물(SEE-1)보다 에탄올 추출물의 고분자획분(SEE-Ps)에서는 항당뇨활성이 미미하여 실험한 모든 농도에서 20%이하를 나타내었으며, 알칼로이드 획분(SEE-AI)과 물잔류층(SEE-Aq)에서도 비교적 낮은 활성을 확인하였으나, 나머지 유기용매 분획물들에서는 분획전의 에탄올 추출물 보다 알파글루코시다제 저해활성이 증가되었음. 특히 에틸아세테이트획분(SEE-2EA)과 부탄올획분(SEE-2B)에서 강력한 알파글루코시다제 저해활성을 확인하였으며, 에틸아세테이트 획

분은 0.1mg/ml의 낮은 농도에서도 65%의 우수한 알파글루코시다제 저해활성을 나타내었음. 통통마디의 선행연구에서 isorhamnetin-3- β -glucoside가 항당뇨성 물질로 보고된 바 있으므로(Lee, 2005) 이들 획분에 화합물이 존재할 가능성이 높음을 확인함.

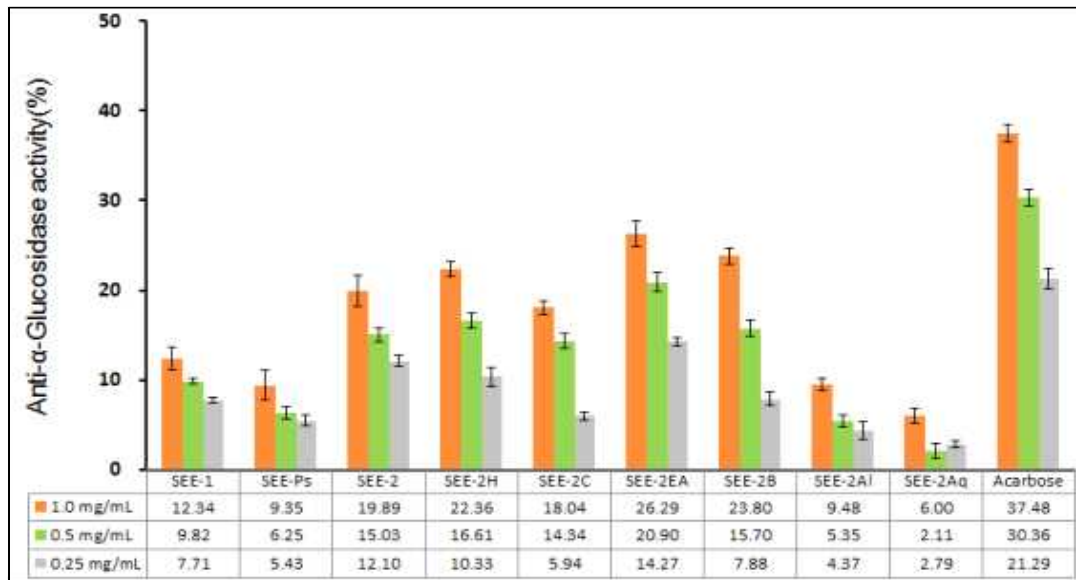


그림 4. 통통마디 발효 에탄올 추출 유기용매 분획물의 알파글루코시다제 저해활성 평가

○ 통통마디 발효 에탄올 추출 유기용매 분획물의 타이로시나제 저해활성

통통마디의 아임계 추출물의 미백효과에 관한 선행연구(Sung, 2009)에 따라서 통통마디 순수발효 에탄올 추출물의 유기용매 분획물에 대하여 미백활성을 평가하고자 타이로시나제 저해활성을 측정함(그림 5). 사람의 피부색은 멜라닌 색소를 만드는 멜라노사이트(melanocyte)의 활동성, 혈관의 분포, 피부의 두께, 및 카로티노이드, 빌리루빈 등 인체 내외의 색소 함유 유무와 같은 여러 요인들에 의해 결정되며 특히 멜라노사이트에서 타이로시나제(tyrosinase) 등의 여러 효소가 작용하여 생성되는 멜라닌이라는 흑색 색소가 가장 중요한 요인으로 작용하므로 타이로시나제 저해활성이 있는 성분들인 알부틴(arbutin), 코지산(kojic acid), 하이드로퀴논(hydroquinone)이 미백 화장품으로 사용되어어 음. 그러나, 불충분한 미백 효과, 피부에 대한 안전성 문제, 및 화장품에 배합시 제형 안정성 등의 문제로 인해 사용이 제한되고 있어 식품소재나 천연물로부터 안전성과 안정성이 입증된 미백 소재의 개발이 필요함.

그림 5의 결과에서 에탄올 추출물(SEE-1)보다 에탄올 추출물의 고분자획분(SEE-Ps)에서 타이로시나제 저해활성이 미미하여 실험한 모든 농도에서 20%이하를 나타내었으며, 알칼로이드 획분(SEE-A1)과 물잔류층(SEE-Aq)에서도 비교적 낮은 활성을 확인하였으나, 나머지 유기용매 분획물에서 분획전 에탄올 추출물 보다 타이로시나제 저해활성이 증가됨. 특히 에틸아세테이트획분(SEE-2EA)과 부탄올획분(SEE-2B)에서 강력한 타이로시나제 저해활성을 확인할 수 있었으며, 에틸아세테이트 획분은 0.1mg/ml의 낮은 농도에서도 65%의 우수한 타이로시나제 저해활성을 나타냄.

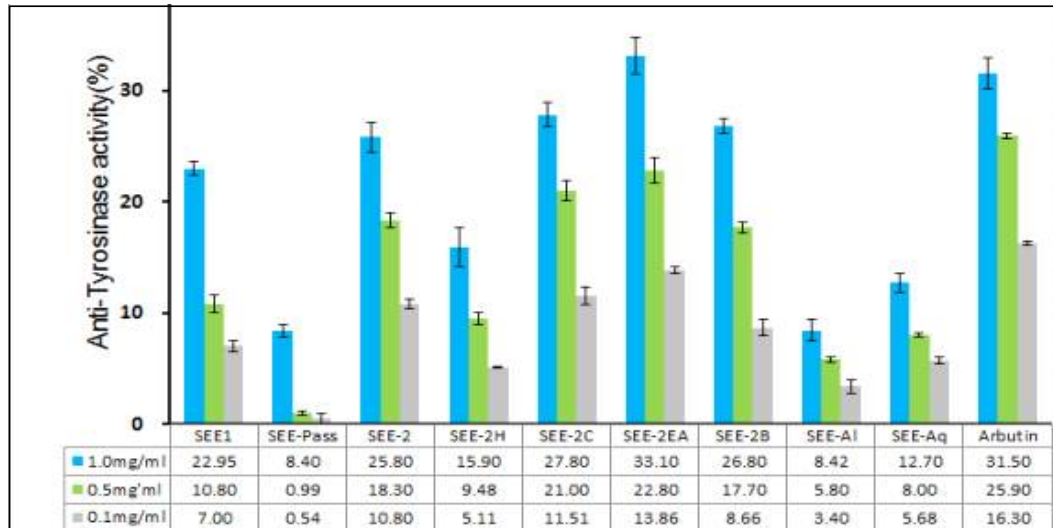


그림 5. 통통마디 발효 에탄올 추출 유기용매 분획물의 타이로시나제 저해활성 평가

○ 통통마디 발효 에탄올 추출 유기용매 분획물의 항응고활성

혈액응고반응에는 외인성(extrinsic pathway)과 내인성(intrinsic pathway)경로 두 가지가 있으며 최종적으로 피브린의 생산으로 종결됨. 혈관이 파괴되면 내피하 조직이 노출되는데 이 내피하 조직에 제 XII인자가 접촉함으로써 내인성 경로의 응고반응이 일어난다. 반면에 외인성 경로에서는 혈관이 파괴되면 혈액이 흘러나올 뿐 아니라, 혈관 밖에서 혈관 안으로 응고를 촉진시키는 물질인 tissue factor가 유입되고, 이 조직인자는 제 VII인자와 복합체를 형성하여 제 X인자를 활성화시켜 피브린이 형성됨. 즉 응고반응이 시작되는 계기가 혈관 외에 있는 것인지, 혈관 내에 있는 것인지에 따라 외인성, 내인성 경로로 분류됨. 혈액응고 검사법에서는 에이피타임(aPTT, activated partial thromboplastin time)이 불리는 내인성 경로의 혈액응고 시간과 prothrombin time(PT)으로 명명되는 외인성 경로의 혈액응고 시간을 측정함. 심혈관계 질환의 예방 및 치료를 위하여 혈액순환 개선 효과를 가진 새로운 항혈전 제제의 개발을 위한 연구의 일환으로, 특히 부작용이 없는 식품소재로부터 항응고 활성 혹은 혈소판 응집 저해 활성을 나타내는 새로운 물질의 탐색 및 개발의 필요성이 대두되고 있음.

표3의 결과에서 시료를 가하지 않은 혈장 단독의 프로트롬빈타임은 11.7 초로 측정되었으며, DMSO를 용매로 사용한 대조군의 프로트롬빈타임은 17.13초 임. 양성대조군으로 사용한 아스피린은 1.25 mg/ml, 2.5 mg/ml 및 5 mg/ml 농도에서 대조군의 프로트롬빈타임을 각각 1.24 및 11.5 배 연장시켜 우수한 항응고 활성을 나타냄. 통통마디 발효물의 에탄올 추출물을 유기용매 분획하여 얻어진 분획물 중 프로트롬빈타임을 가장 많이 연장시킨 것은 에틸아세테이트 획분(SEE-EA)으로서 5 mg/ml 및 6 mg/ml 농도에서 각각 2.07배 및 11.5 배 연장시킴. 시료를 가하지 않은 혈장 단독의 에이피타임은 26.0 초로 측정되었으며, DMSO를 용매로 사용한 대조군의 프로트롬빈타임은 60.28초 임. 양성대조군으로 사용한 아스피린은 1.25 mg/ml, 2.5 mg/ml 및 5 mg/ml 농도에서 대조군의 프로트롬빈타임을 각각 1.28, 1.98 및 3.3배 연장시켜 우수한 항

물 중 에틸아세테이트(SEE-2EA) 및 부탄올 분획물(SEE-2B)에서 항산화, 항당뇨, 항미백 및 항혈전활성이 우수하였으므로, 활성이 비교적 낮은 헥산(SEE-2H) 및 클로로포름(SEE-2C) 분획물과 함께 화학적 조성으로 총당, 중성당, 산성당 및 총단백질 함량을 측정함(표 5). 특히 식물의 생리활성물질의 대부분이 항산화성을 나타내는 폴리페놀, 페놀릭산 및 플라보노이드 물질들이므로 각 분획물의 총폴리페놀 및 총플라보노이드 함량을 비교측정하고 그 결과를 그림 7에 나타냄.

표 5. 통통마디 발효 에탄올 추출-유기용매 분획물의 화학적 조성 분석

mg (%)	SEE-2H	SEE-2C	SEE-2EA	SEE-2B	SEE-2Aq
Total Polyphenol	18.7	5.9	44.1	28.9	8.2
Total Flavonoids	5.3	2.9	21.8	15.6	7.8
Total Sugar	0.8	3.7	11.5	19.6	55.2
Uronic acid	0.5	2.8	8.8	12.3	23.6
Total Protein	1.5	2.4	5.5	7.5	6.9

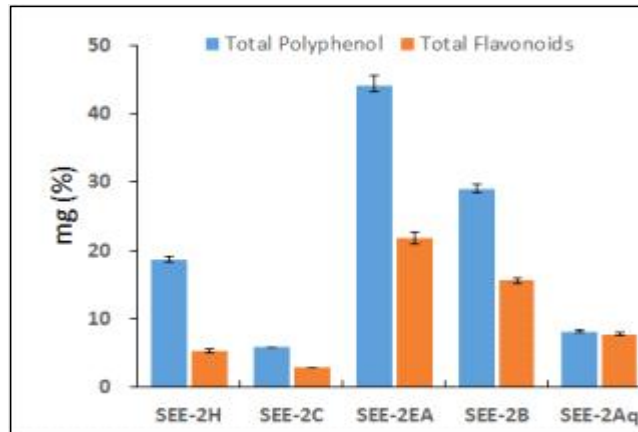


그림 7. 에탄올 추출-유기용매 획분의 총폴리페놀 및 플라보노이드 함량 비교

표 5의 결과에서 총당, 산성당 및 단백질 함량을 유기용매 분획물 간 비교하여 보면, 비극성 용매인 헥산과 클로로포름 획분에서는 주로 지방계 물질들인 지방산, 식물검류, 파이토스테롤, 및 지용성 색소물질들이 주성분이며 총당, 산성당 및 단백질 함량은 적게 나타남. 반면 물잔류층은 다량의 총당과 산성당이 50% 이상 함유되어 있음. 생리활성 기능성이 강하게 나타나는 에틸아세테이트 획분에(SEE-2EA) 총폴리페놀 44.1mg%, 총플라보노이드 21.8mg%로 가장 많이 함유되어 있어서 기능성 지표성분은 분리할 수 있을 것으로 판단함.

(2) 통통마디 마쇄물로부터 조미/기능성 성분의 분석

- 통통마디 생초즙을 HPLC로 아미노산 유도체화 하여 분석한 결과 일반적인 녹색 식물과는 달리 glutamic acid 함량이 매우 높음. 이는 Ahmed(2016)에서 보논바와 같이 염생식물들이 salt stress에 견디기 위해 스스로 aspartic acid나 glutamic acid 등의

acidic한 아미노산을 만들어내는 것임. 이로 인해 염생식물 자체가 가지고 있는 짠맛과 glutamic acid가 공존하면서 감칠맛 있는 짠맛을 만들어내는 것임. HPLC로 유도체화하여 통통마디의 아미노산을 분석한 결과 aspartic acid, glycine 및 alanine 등 단맛을 내는 아미노산이 다량 존재하는 것을 확인함. 통통마디는 그 자체만으로도 감칠맛, 단맛, 짠맛을 가지는 조미 성분을 함유하고 있는 조미소재임을 확인함.

(3) 유용 식품 미생물에 의한 통통마디 마쇄물의 발효 조건 설정

○ 식품 발효에 사용하는 미생물을 통통마디 열수추출물에 적용하기 위해 salt tolerance 테스트를 시행함. *Leuconostoc mesenteroides* SRCM195 및 *Weissella cibaria* STCM177의 경우 염도 1%에서 생육이 활발하였으며 염도 5에서는 *Leuconostoc mesenteroides* SRCM195가 조금 더 잘 생육하는 것을 확인함(Fujihara, 1993). 효모의 경우 시판되는 양조효모인 *Saccharomyces cerevisiae* DY의 경우 염도 1%에서만 생육하여 고염에서는 생육하기 어려움을 확인함. 반면 된장에서 분리한 *Zygosaccharomyces rouxi* 1063의 경우 염도 10%에서도 생육하는 것으로 보아 일반적인 효모류가 갖는 내염성 보다 상당히 내염성을 가진 균주임을 확인함. *Bacillus*의 경우 염도 5%까지의 환경에서 유산균 및 효모류 보다 생육속도가 빨랐고, 염도 10%의 환경에서는 생육이 약간 느려지는 것을 확인함. 그러나 대체로 *Bacillus*는 염도 10% 이하의 환경에서 생육에 크게 지장이 없는 것을 확인함(그림 8).

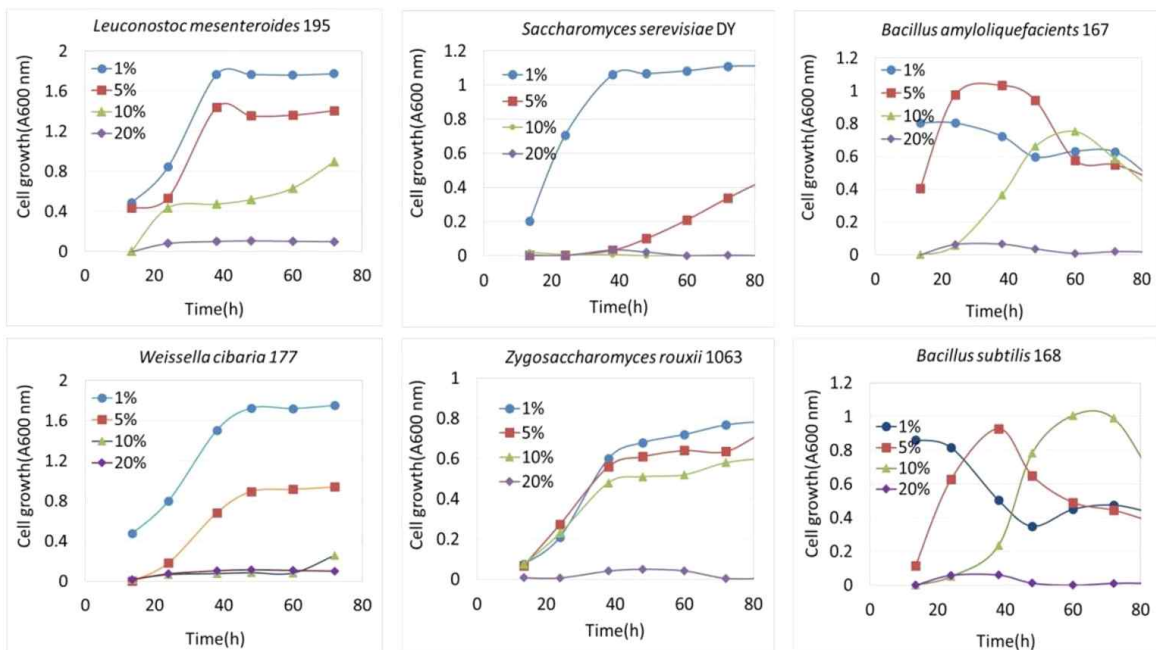


그림 8. 식품 발효 미생물의 salt tolerance 테스트

○ 제1협동 연구기관에서 스크리닝한 *Bacillus subtilis* #7과 *Halobacillus salinus* #18를 통통마디 마쇄액 30%에 배양하여 5일간 배양하며 통통마디 분해력을 확인함(그림 9). 또한 발효미생물 산업진흥원에서 구입한 *Bacillus amyloqufaciance* SRCM167 및

Bacillus lichemiformis SRCM164, *Zygosaccharomyces rouxii* SRCM293 및 *Saccharomyces cerevisiae* SRCM410도 함께 배양하면서 통통마디 분해력을 비교 확인함. *Bacillus subtilis* #7과 *Halobacillus salinus* #18 두 균주 모두 통통마디에 대한 분해력을 가지고 있었으며 그림의 배양액에서도 볼 수 있듯이 *Bacillus subtilis* #7 보다는 *Halobacillus salinus* #18 균주가 조금 더 통통마디 조직 분해력이 있는 것을 알 수 있음(그림 10). 특징적으로 *Halobacillus salinus* #18의 경우 염도 7에서 잘 생육하는 호염균으로 통통마디 마쇄액을 희석하지 않고 고농도로 사용할 수 있어서 유용할 것임. 그러나 두 균주는 염전에서 분리한 균으로 통통마디에 대한 분해력은 우수하나 맛과 향 면에서는 된장 또는 간장에서 분리한 균주보다는 덜 우수한 편임. 그림 9에서와 같이 *B. subtilis* #7과 *Halobacillus* #18의 경우 발효 후 다양한 단백질을 만들어 내는 것을 확인하였으며 이로부터 다양한 생리활성 물질이 기인될 가능성이 높을 것으로 보임.

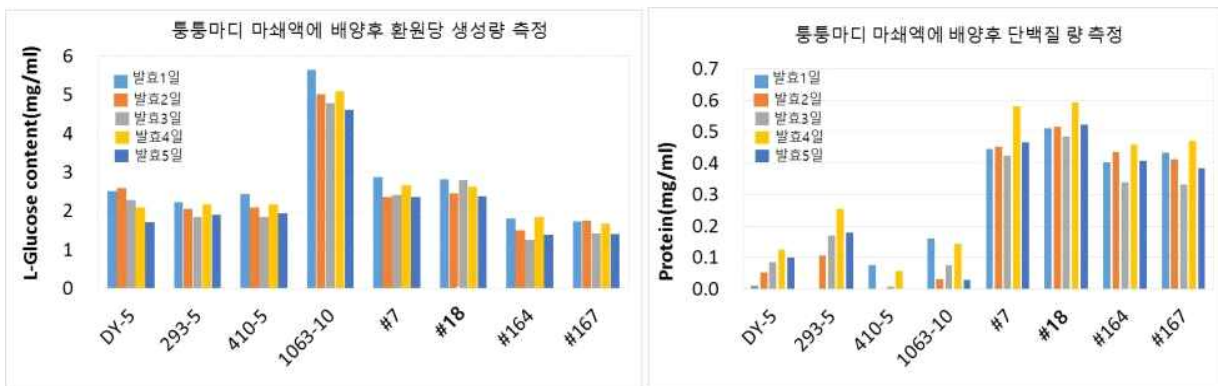


그림 9. *Bacillus*, 효모류, 및 제1협동에서 스크리닝한 균주로 통통마디 마쇄액의 분해력 테스트



그림 10. 협동연구기관에서 분리한 *Bacillus subtilis* #7과 *Halobacillus salinus* #18의 통통마디 마쇄 배양액

- 30% 통통마디 마쇄액(염도 5%)와 열수추출물(염도 5%)에 glucose 1%를 첨가하여 발효를 진행하여 *Saccharomyces cerevisiae*를 배양하여 Glucose 첨가가 발효에 미치는 영향 확인함. 1%의 glucose 첨가만으로도 24시간 만에 열수추출물(염도5) 및 생함초 마쇄액 30%(염도5)에서 생육하는 것을 확인하였으며 특징적으로 생육하며 CO₂를 생산하므로 거품이 생성된 것도 확인함(그림 11). 특히 통통마디 열수추출물에서보다 생함초의 마쇄액에서 활발히 증식한 것으로 보아 장시간 열수추출한 액보다는 생함초에 효모의 증식에 필요한 growth factor가 더 함유되어 있음을 유추할 수 있음.

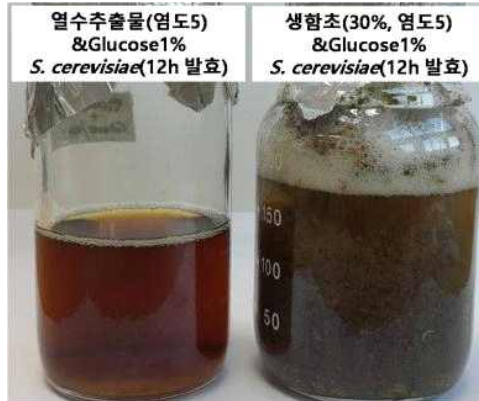


그림 11. 통통마디 열수추출물 및 통통마디 마쇄액에 1% glucose를 첨가하여 *Saccharomyces cerevisiae*를 배양한 결과

- 효모를 통통마디에 접종하여 발효시 통통마디에 존재하는 L-glutamic acid를 이용하여 GABA를 생성하는 것을 확인함(그림 12). *Zygosaccharomyces* 속이 *Saccharomyces* 속 보다 GABA 생성량이 우수한 것을 확인하였으며 이는 혈행개선 및 면역력 증진에 우수한 생리활성 물질인 GABA를 발효를 통해 천연으로 얻을 수 있는 것으로 효모류를 통통마디에 발효시 생리활성 측면에서도 우수한 발효물이 될 수 있음을 확인함.

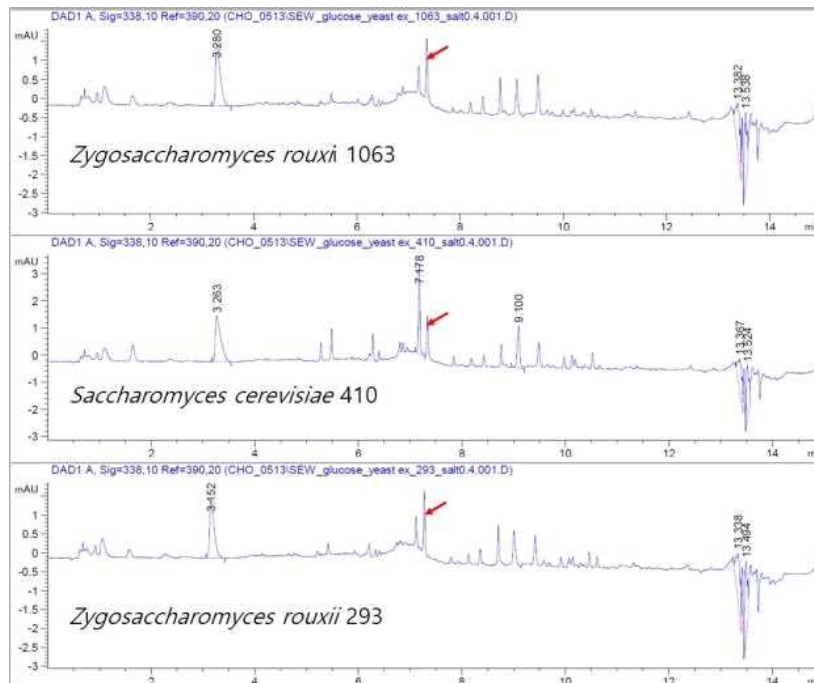


그림 12. HPLC 분석을 통한 *Saccharomyces* 및 *Zygosaccharomyces*의 GABA 생성 비교 (화살표: GABA)

(4) 발효 산물로부터 유용 기능성분 분리 및 생리 기능성 소스 소재 분리 및 특성

○ 개발 조미소스(ES#2020, ES#2020)의 항산화활성, 총폴리페놀, 플라보노이드 함량 분석
 발효 개발품 조미소스인 아시안 스타일 소스(ES#2030)와 유티피안 스타일 소스(ES#2020)를 경쟁사 시판 조미소스(Yondu)와 항산화 활성을 DPPH 라디칼 소거능을 이용하여 측정
 한 결과 당사 개발품의 항산화활성이 경쟁모델보다 매우 우수한 것을 확인함(그림 13A).
 이는 기존 시판 제품들과는 달리 본 과제에서 개발된 통통마디 조미소스는 콩발효시 첨
 가되는 소금대신 통통마디 열수추출물을 이용하여 즉 소금 무첨가 방식으로 발효한 제
 품으로 다양한 파이토케미컬들이 함유되어 있음을 시사함. 따라서, 본 개발품(ES#2030,
 ES#2020)과 경쟁사 시판 조미소스(Y, S)를 대상으로 총 폴리페놀 및 플라보노이드 함
 량을 분석한 결과 당사 개발품에서 총 플라보노이드 및 폴리페놀 함량이 경쟁모델보다
 2배이상 높게 함유되어 있음을 확인함(그림 13B, 13C). 이로서 본 개발품이 기존 시판소
 스와 비교시 생리 기능성이 우수한 소스로서 차별화 제품 및 프리미엄 급의 제품화가
 가능할 것으로 판단됨.

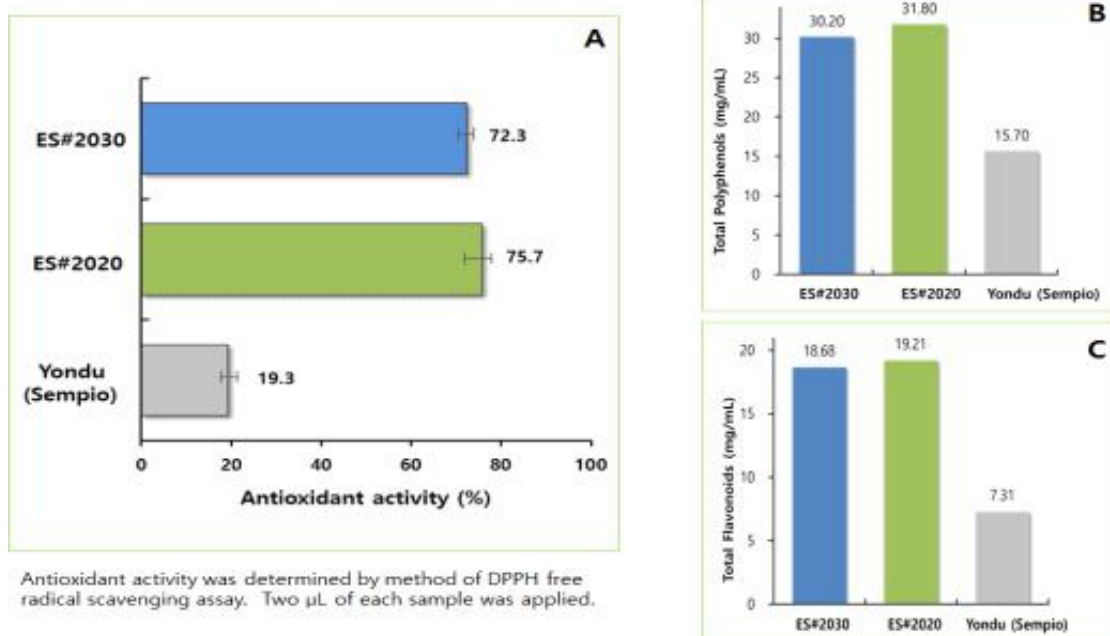


그림 13. 개발 조미소스(ES#2020, ES#2020)의 항산화활성 및 총폴리페놀, 플라보노이드 함량 분석
 A: DPPH 라디칼 소거능 분석, B: 총폴리페놀 함량 분석, C: 총플라보노이드 함량 분석

○ 개발 조미소스(ES#2020, ES#2020)의 이소플라본 함량 분석 및 에스트로제닉 활성 평가
 개발 조미소스(ES#2020, ES#2020)는 소금무첨가 통통마디 추출물을 이용한 콩발효 소스
 이므로 에스트로제닉 활성을 MCF-ERE P3 cell을 이용한 Steady-Glo Luciferase assay
 system 측정된 결과 당사 개발품의 estrogenic activity가 경쟁모델보다 매우 우수한 것으
 로 확인되었으며, 소스에 첨가되는 콩발효물로부터 유래되는 isoflavone 함량을 비교 측
 정한 결과 에스트로제닉 활성과 비례하여 당사 개발품(ES#2020, ES#2020)내 isoflavone
 함량이 YD보다 2배이상 높은 수준으로 함유되어 있음을 확인함(그림 14).

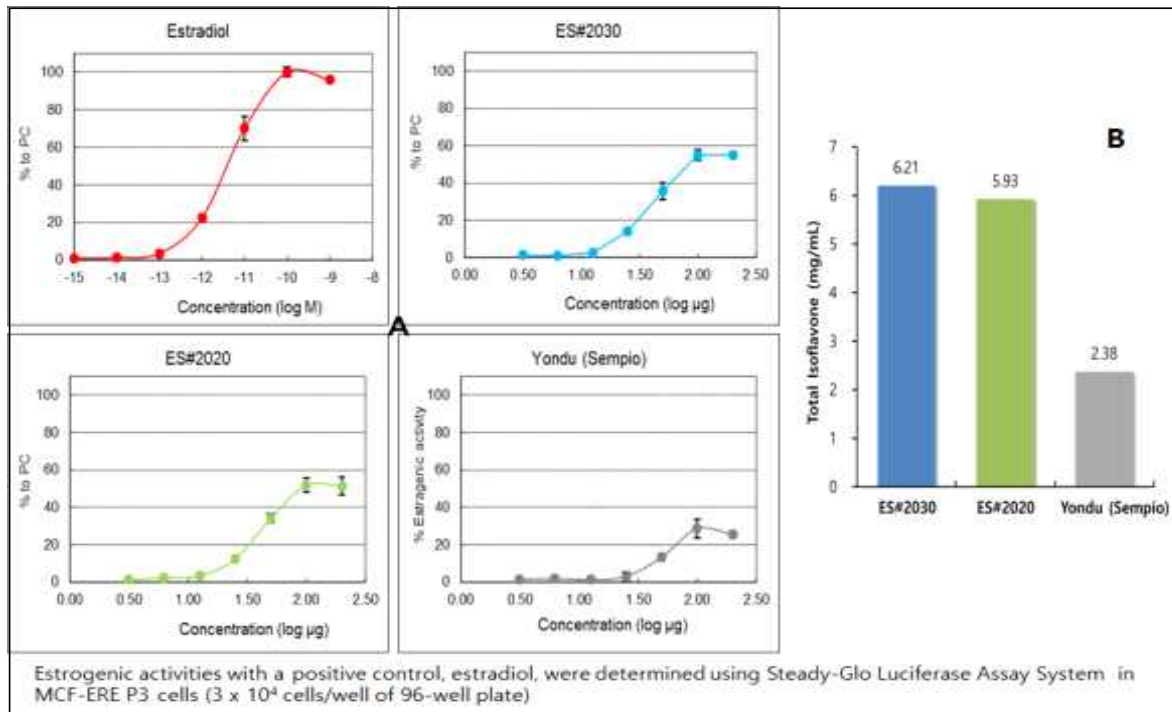


그림 14. 개발 조미소스(ES#2020, ES#2030)의 이소플라본 함량 분석 및 에스트로제닉 활성 평가

(5) 유산균 발효를 통한 소스 소재 개발

- 유산균 발효 중 생합초 마쇄물(30%w/w)을 cellulase 복합효소(Plantase TL, Rohament CL) 처리 후 *Leuconostoc mesenteroides* 195, *Weissella cibaria* 177 및 *Leuconostoc citrium* PC1을 배양하였음. 발효기간에 따라 L-glutamate의 생성량이 늘어나는 것을 확인함(그림 15). 또한 hetero-fermented lactic acid bacteria의 특징처럼 젖산 뿐 아니라 CO₂, H₂, 알코올, 유기산 등을 다양하게 생성하기 때문에 관능적으로도 새콤하면서 향기로운 조미소스로의 소재 개발이 가능함을 확인함. 그러나 젖산에 의한 pH 저하 때문에 유산균 단독으로는 발효에 적용하기 어려울 것으로 보임. 따라서 유산균 발효액을 따로 제작하여 소량 첨가하는 방식이라면 조미소스에 적용할 수 있을 것으로 사료됨.

다. 유럽형 소금무첨가(No Salt-Added) 기능성 조미 소스 개발

(1) 산미, 향미, 염도, 감칠맛, 알코올 성분 등을 고려한 유럽형 천연소스 개발

- 유럽의 대형 식품회사인 GB Foods사(파이토코퍼레이션과 공동 R&D 중인 기업) 및 최근 유럽의 조미소스 동향을 조사한 결과 동양의 발효기술을 이용하는 콩베이스의 조미소스에 대한 기업 및 소비자의 니즈(needs)가 급증하는 추세임. 그러나 염미를 가지는 대부분의 발효 조미소스들은 그 염미의 유래가 정제염 또는 천일염 등 광물

성 소금에서 기인하며 이는 나트륨(Na)의 과도한 섭취로 이어지는 단점을 가짐. 이에 본 연구에서 유로소스를 개발하는 가장 큰 목적은 통통마디 식물 자체가 함유하고 있는 나트륨, 칼륨 등의 풍부한 미네랄 등을 이용해 ‘저나트륨’, ‘천연 식물을 그대로 이용하는 자연 친화적인’, ‘기능성’의 염미소스를 개발하고자 함. 통통마디는 식물 자체의 고염 함유로 인해 식물이 생육하고자 칼륨함량을 스스로 높이는 식물이며 glutamate와 같은 salt-stress를 견디기 위한 방안을 보유한 식물이기 때문에 통통마디 추출물에는 염미를 가지는 염화나트륨 뿐 아니라 염화칼륨 및 소량으로도 염미강화의 역할을 하는 glutamic acid를 보유하는 천연의 조미소스 재료가 됨. 또한 특유의 풀향을 제거한다면 열수추출과정 및 발효과정에서 식물체 특유의 향긋한 향을 보유하게 되어 콩발효물과 혼합시 쿼퀴한 냄새를 마스킹하는 역할을 하는 소재임. 본 연구에서는 이러한 통통마디 마쇄물 및 추출물을 조미소스의 베이스로 개발하기 위해 현재 국내 기업에서 생산중인 조미소스와 본 연구에서 개발한 유로소스를 비교 분석함. 시판중인 소스류는 모두 광물성 소금을 첨가하여 염미를 부여하였으나 본 연구에서 개발한 유로소스는 통통마디 자체에서만 유래하는 100% 식물 유래의 염미소스인 것이 특징임. 따라서 동일한 염도 (16.0)에서 나트륨의 함량을 비교하였을 때 본 개발품인 유로소스는 가장 낮은 나트륨 함량을 나타내어, 나트륨 저감 또는 저나트륨 소스로서 건강에 유익한 소스임을 확인함. 관능평가를 통한 색도 비교는 5점 척도법 (5점:매우 좋다, 4점:조금 좋다, 3점:보통이다, 2점:조금 나쁘다, 1점:매우 나쁘다)로 구별하여 다음의 표 7에 나타냄. C사의 제품은 천연원료에서 유래하는 조미소스는 아니며 조미료가 첨가된 제품으로 glutamate의 양이 가장 높은 이유임. 천연 원료만으로 glutamate의 양을 높인 경우의 제품을 비교했을 때 EuroSauce의 감칠맛이 우수함을 알 수 있음.

표 7. 국내 시판 조미소스와 유로소스의 나트륨 및 글루탐산 함량 비교

	D사	S사	S사	C사	EuroSauce
제품명	H	YD	L	D	#2030
염도	16.0	16.0	16.2	21.6	16.0
Brix	28	34	34	56	45
pH	5.2	5.1	5.0	4.9	5.0
Na (mg/100g)	6,546	6,334	6,281	8,945	5,523
단백질(mg/ml)	0.03	0.09	0.06	0.89	1.02
환원당(mg/ml)	5.42	-	1.46	-	3.61
글루탐산(mg/ml)	9.66	15.84	13.30	27.32 이상	16.02
색(5점 척도)	3	2	5	5	2

(2) 소금무첨가(No Salt-Added), ‘감칠맛 풍부’, 및 천연의 발효 조미소스 개발(GB Foods 요청)

- 유럽형(Natural extracts, soy sauce, salt and MSG replacer)에 적합한 콩 발효액을 소금을 전혀 첨가하지 않고 100% 통통마디의 열수추출만을 이용하여 약 100일간 발효

함. 발효 45일까지 콩 발효의 숙성 정도를 가늠할 수 있는 glutamate의 양이 비례적으로 증가하였고 45일 이후로는 약간씩 더 증가함. 발효기간별 샘플링을 통해 glutamate의 생성량 및 관능성을 테스트한 결과 100일정도 발효한 액이 가장 우수하였음(그림 16). 따라서 통통마디 열수추출물을 이용한 콩 발효액의 숙성 기간은 100일로 설정함. 이 발효액을 베이스로 유럽인이 선호하는 식재료 중 식물성 유래의 재료를 선정하여(Teng, 2012) EuroSauce #2020(Western type), EuroSauce#2030(Asian type), EuroSauce#2025(Mild type)의 세 종류 시제품을 개발함. 사전 글로벌 조미소스 시장조사에서 살펴본 바와 같이 유로소스는 투명 유리병에 병입하여 소스의 색이 드러나도록 계획하였으며, 통통마디 조미소스의 예상하는 가격대는 5,500원/480g으로 역시 유럽시장 조사결과 아시안 소스들의 가격대인 ml당 0.01~0.02유로(한화 12.4원)과 유사한 가격대로 생산 및 판매 가능할 것임. 유로소스의 용량은 기본적으로 1회당 10 ml 내외로, 30~50일 정도의 사용기간을 예상하여 480g을 기본 용량으로 결정하였으며 수출 국가의 특성에 따라 250~ 500 ml 등으로 다양하게 개발도 계획중임. 유로소스 #2020, 2030 및 2025를 GB Foods R&D 연구팀에서 관능평가 및 조리 시연하여 평가한 결과(그림 17)를 본 연구진과 의논하며 개발함. 첫 시제품인 #2020과 #2030의 경우는 색이 짙음, soy 향이 강함, baked flavor 등이 지적되어 이것을 줄이는 연구를 시행하였고 #2025의 경우 콩발효액을 정제하는 과정을 수정하여 개선된 색도 및 마일드한 맛과 향의 통통마디 콩발효액을 얻을 수 있었음.

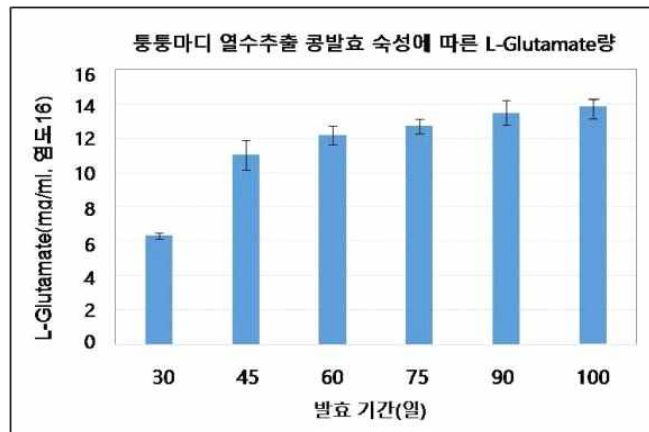


그림 16. 통통마디 열수추출물 콩발효액의 숙성기간에 따른 glutamate의 생성량



그림 17. GB Foods의 연구팀이 본 연구진의 시제품으로 관능평가

라. 통통마디 마쇄물의 효소처리 가수분해물의 발효에 의한 조미/기능성 소재 개발

(1) Cellulase, lignanase, beta-glucanase, aminopeptidase, protenase 등의 효소 이용 통통마디 마쇄물 가수분해물의 발효

- Cellulase 복합효소인 plantaseTL을 생함초(30%, 염도5)에 첨가 후 10일간 분해정도를 관찰하며 상등액의 분해되어진 환원당량을 DNS method로 확인함. 이때 효소의 첨가량은 생함초 무게에 대한 1%를 사용함. 생함초 30% 내에는 약 5~6 mg/ml의 환원당이 존재함. 이에 효소처리로 가수분해하면 함초내의 다당류 및 cellulose가 분해되어 환원당량이 최대 28 mg/ml로 증가하는 것을 알 수 있음(그림 18). 이로써 함초에 섬유질 분해 효소를 이용하여 다당류 및 섬유질 등을 분해하면 환원당량이 약 2.8~3% 생성되는 것을 의미하며 식품 유용미생물을 이용해 발효하기에 유용한 당원이 됨을 알 수 있음. 생함초 90.006 g(수분 포함)을 효소처리로 가수분해하면 17.813 g(수분 포함)으로 그 무게가 줄어들음을 알 수 있음(그림 19).



그림 18. Cellulase 복합효소를 이용하여 통통마디 마쇄물을 분해한 결과



A: 생함초 B: 효소분해(10일)후 거즈로 걸러낸 침전물

그림 19. 생함초의 효소분해 결과 무게의 변화

(2) 최적 활성 효소의 선정 및 최적 반응 조건 설정

- 식품용으로 많이 사용되는 섬유질 분해효소인 Plantase, Optivin, PyrFlo 세 종류의 효소로 통통마디 마쇄액을 분해한 결과 50℃, pH 4.5~5 범위에서 활성이 가장 높은 것을 확인함(그림 20).

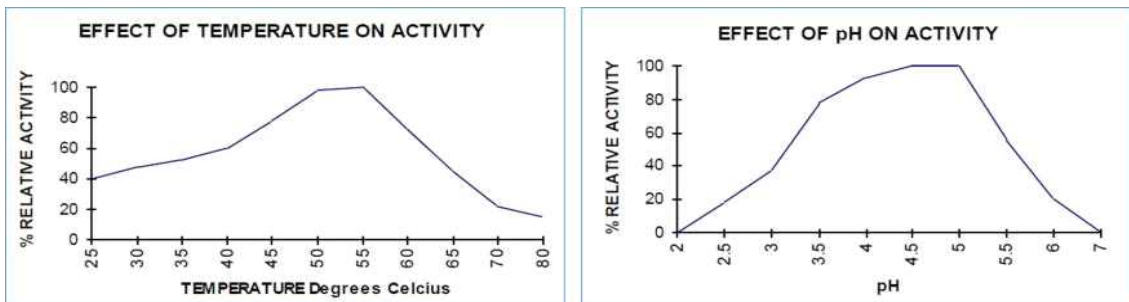


그림 20. 통통마디 마쇄액의 최적 효소 분해 조건

(3) 효소 분해산물의 조미/기능성 소재의 특성 분석

- Cellulase 복합효소인 Plantase, Otivin, PyrFlo의 경우 Plantase가 가장 우수한 가수분해력을 나타냄. Plantase는 pectinase, beta-glucanase, cellulase, hemicellulase가 주를 이루는 효소로 이 중 어떠한 효소에 가장 잘 반응하는지 알아보기 위해 각각의 효소로 분해해 본 결과 pectinase, beta-glucanase의 가수분해 정도가 가장 큰 것을 알 수 있음. 따라서 본 연구에서는 pectinase 및 betagluase 복합효소인 Plantase 복합효소를 사용하여 통통마디 마쇄액을 가수분해에 가장 적합한 효소로 선정함.

(4) 단일 또는 복합 효소 처리된 통통마디 마쇄물의 발효에 의한 기능성 소재의 특성분석

- 탄수화물 가수분해물의 활성탄 처리를 통한 염도 및 가용성고형분(Brix) 변화

통통마디 마쇄물에 탄수화물가수분해 셀룰로스, 베타글루카네이즈, 헤미셀룰로스, 펙티네이즈를 첨가하여 가수분해 후 유산균을 배양하여 발효한 발효물에 대하여 다양한 농도의 활성탄을 처리시 소재의 특성을 염도, Brix, 및 항산화활성을 비교 평가함(표 8, 그림 21). 활성탄 처리에 따라 염도변화는 없었으나, 총고형분 중 특히 폴리페놀 함량의 감소와 항산화활성 감소를 보였음. 따라서 기능성 성분의 손실을 최소화하면서 쓴맛을 제거하는 활성탄 처리 농도는 2% 내외로 사용함이 적절함.

표 8. 탄수화물 가수분해물의 활성탄 처리를 통한 염도 및 가용성 고형분(Brix) 변화

10 mg/mL	SEF	0% AC	1% AC	2% AC	3% AC	4% AC
Salt Conc.(%)	0.54	0.61	0.61	0.63	0.66	0.68
Brix (%)	1.1	1.1	1.1	1.1	1.1	1.1

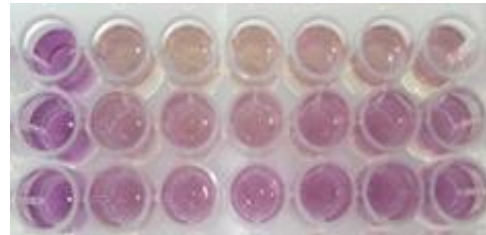
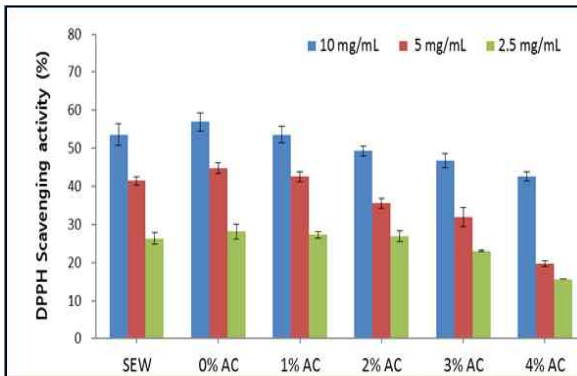


그림 21. 탄수화물 가수분해물의 활성탄 처리를 통한 염도, 가용성고형분(Brix) 및 항산화활성 변화

마. 통통마디 마쇄물의 산알칼리 가수분해물의 발효에 의한 조미/기능성 조미 소재 생산

(1) 통통마디 마쇄물의 산가수분해물을 원료로 한 미생물 발효 및 조미/기능성 조미 소재 생산

- 산가수분해하여 중화한 통통마디 마쇄물에 *Zygosaccharomyces rouxii* SRCM101063을 접종하여 발효한 결과 통통마디 자체의 풀 향이 많이 감소하는 것을 관능검사로 확인함. *Zygosaccharomyces*는 청주 등의 후발효에서도 향미 성분을 부여하는 효모로서 간장 등의 장류에서도 풍미를 부여하는 역할을 함. 통통마디 마쇄물에서 좋지 않은 향으로 분류되었던 풀비린내는 *Zygosaccharomyces rouxii* SRCM101063로 후발효하면 상쇄될 수 있음을 이점비교검사법을 이용하여 발효전과 발효후의 시료 중 풀비린향이 감소하는 응답이 20인 중 20인 모두가 감소한다고 응답하여 효모 발효후에 풀비린향이 감소하는 것을 확인함.

(2) 탈염법(이온교환, 전기투석막 등)에 의한 염제거 공정 개발

○ 유용 기능성 유기화합물의 손실을 최소화할 위한 저온냉수 탈염법 개발
 이온교환수지 및 투석막을 이용하여 통통마디의 탈염을 시도하였으나, 통통마디 내 유용 생리성분과 클로로필 등의 유기화합물의 손실 없이 염분만을 제거하기가 어려웠음. 이온 교환수지의 경우, 통과한 통통마디액 내의 pH를 중성화하기 위하여 산이나 염기를 첨가 하는 과정에서 다시 염화나트륨이 생성되는 됨을 확인하였으며, 투석막을 통하여 염분을 제거시 시판되는 투석막으로는 분자량 컷 사이즈의 한계로 대부분의 저분자성 생리활성 물질(플라보노이드, 폴리페놀, 알칼로이드, 사포닌 등)들도 동시에 제거되어 탈염물의 가치가 저하되는 단점이 있음. 따라서, 유용성 생리활성물질의 손실을 최소화하는 탈염법을 찾던 중 온도에 따른 염류의 물에 대한 용해도 차이를 이용하여 염화나트륨만 효과적으로 제거할 수 있는 “저온냉수 추출법”을 확립하게 됨(표 9).

표 9. 물의 추출온도 변화에 따른 통통마디 분말 탈염과 저온냉수 추출법 확립

시료량 (g)	추출(°C)	가수량(L)	추출시간 (min)	총고형분	브릭스 (고형분량)/염도	고형분 중 염 비율(%)	총염량 (g)	염제외 고형분 (g)
100	4	2	1	33.0	1.26	79.4	26.2	6.8
100	4	2	5	35.0	1.25	80.0	28.0	7.0
100	4	2	10	35.6	1.27	78.9	28.1	7.5
100	4	2	15	36.3	1.29	77.7	28.2	8.1
100	4	2	20	36.8	1.30	76.9	28.3	8.5
100	4	2	25	37.2	1.31	76.3	28.4	8.8
100	4	2	30	37.5	1.32	76.0	28.5	9.0
100	9	2	1	34.3	1.30	76.6	26.3	8.0
100	9	2	5	36.4	1.30	76.9	28.0	8.4
100	9	2	10	37.0	1.31	76.2	28.2	8.8
100	9	2	15	37.8	1.33	75.0	28.3	9.5
100	9	2	20	38.3	1.35	74.2	28.4	9.9
100	9	2	25	38.7	1.36	73.7	28.5	10.2
100	9	2	30	39.0	1.36	73.3	28.6	10.4
100	20	2	1	40.3	1.52	65.8	26.5	13.8
100	20	2	5	42.3	1.51	66.2	28.0	14.3
100	20	2	10	45.8	1.63	61.5	28.2	17.6
100	20	2	15	47.3	1.67	59.8	28.3	19.0
100	20	2	20	48.8	1.71	58.4	28.5	20.3
100	20	2	25	50.3	1.76	56.9	28.6	21.7
100	20	2	30	51.0	1.78	56.3	28.7	22.3
100	100	2	1	44.1	1.53	65.3	27.1	14.9
100	100	2	5	43.6	1.56	64.0	27.9	15.7
100	100	2	10	48.0	1.71	58.5	28.1	19.9
100	100	2	15	52.8	1.87	53.6	28.3	24.5
100	100	2	20	55.3	1.94	51.5	28.5	26.8
100	100	2	25	56.7	1.98	50.6	28.7	28.0
100	100	2	30	58.5	2.02	49.4	28.9	29.6

표 9의 결과에서, 온도변화에 따른 시간별 염의 용출정도는 거의 차이가 없는 것을 확인하였으며, 이는 온도의 영향에 따른 염류의 물에 대한 용해도(Solubility)에 관한 것으로서, NaCl의 용해도는 물의 온도변화와 무관한 결과와 일치함. 100g의 통통마디 건조분말을 4, 9, 20, 100℃의 물(2L)로 추출하였을 때 추출 30분의 경우, 모든 온도에서 용출되는 염의 양은 거의 동일한 것으로 보아 30분 이내에 통통마디에 함유된 염은 모두 용출된 것으로 볼 수 있음. 그러나 염을 제외한 가용성 유기 고형분은 온도차에 따른 용출의 효과가 매우 커서 추출 30분 기준에서 실온(20℃ 추출은 냉수 추출(4℃)의 2.47배, 열수 추출(100℃)은 냉수 추출(4℃)보다 3.28배 높게 나타남. 이는 브릭스/염도 비가 낮을수록 탈염에 따른 유기고형분의 손실이 적은 것으로 판단 할 수 있는데 모든 온도구간에서 시간이 지날수록 상기 지수가 점점 증가함을 알 수 있음. 즉, 4℃ 이하의 냉수로 4분 이내 추출할 경우 유기물의 추출을 최소화하면서 염을 효과적으로 제거할 수 있음을 확인하고 “저온 냉수 탈염법”을 확립함.

○ 영양성분 및 기능성 성분의 비교(총당, 산성당, 총폴리페놀, 총플라보노이드 함량)

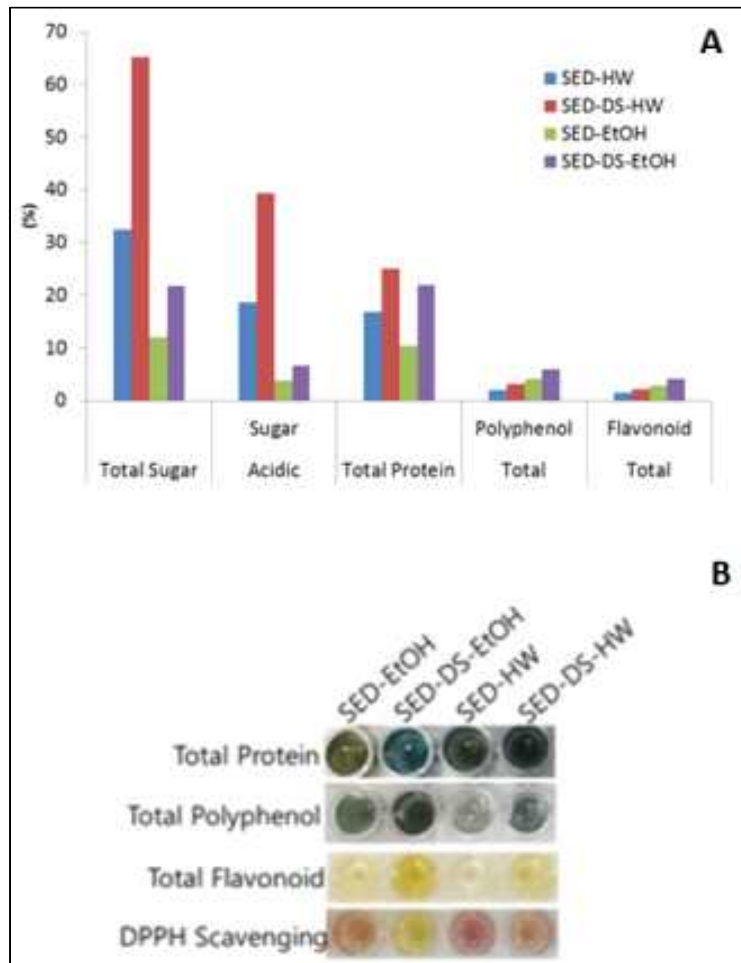


그림 22. 저온 냉수탈염 전후 통통마디 열수 및 에탄올 추출물의 이화학적 특성

냉수 탈염된 건조분말의 열수 추출물(SED-DS-HW)은 탈염 전 건조분말의 열수 추출

물(SED-HW)과 비교시 총당 함량(63.0%)과 특히 총산성당 함량(32.8%)이 현저히 증가되었음을 확인할 수 있음. 다당류 중 특히 산성다당류들이 면역강화, 항응고 및 항혈전, 항암 활성이 우수한 것으로 많이 보고되고 있으므로 냉수탈염을 통하여 수득되는 염생식물 분말은 고농도로 존재하는 산성다당류로 인하여 기능성이 강화된 우수한 영양 조성물로 활용될 수 있음. 냉수 탈염된 건조분말의 열수 추출물(SED-DS-HW)은 탈염 전 건조분말의 열수 추출물(SED-HW)과 비교시 50~100% 이상 증가된 총폴리페놀 (~40.8 mg/g), 총플라보노이드(~31.0 mg/g) 및 총단백질(~15.9 중량%)을 함유하고 있음(그림 22). 따라서, 냉수탈염을 통해 염분(NaCl)은 효과적으로 제거하면서 유용식물기능성 화합물은 용출되지 않고 상대적으로 그 함량이 현저히 증가하여 기능성이 강화된 우수한 영양 소재로 활용될 수 있음을 알 수 있음.

(3) 산/알칼리 가수분해 통통마디 마쇄물의 미생물 발효(장기 숙성 발효 및 단기 숙성 발효)에 의한 조미/기능성 성분 도출

- 산가수분해하여 중화한 통통마디 마쇄물에 *Zygosac. rouxii* SRCM101063을 접종하여 단기간 배양과 장기간 발효에 의한 관능적 차이를 확인함. *Zygosaccharomyces*를 1일간, 30일간 발효한 발효액의 맛, 향, 전체적 선호도를 바탕으로 5점 척도법으로 관능평가한 결과 30일간 장기간 발효한 배양에서 매우 좋은 과일향이 나서 전체적인 선호도가 증가한 것을 확인함(표 10). 따라서 통통마디 가수분해물을 제조시 좋지 못한 풀비린향 등을 제거하기 위해서 효모로 후 배양을 실행하는 방법을 사용하기로 함.

표 10. *Zygosaccharomyces rouxii* SRCM101063로 1일간, 30일간 발효한 통통마디 가수분해물의 관능검사 결과

Variety	Procedure	Sensory Evaluation		
		Overall Acceptability	Flavor	taste
통통마디 산가수분해물의 효모 발효액	1일 발효	1.6±0.4	1.0±0.4	2.2±0.5
	30일 발효	4.3±0.4	4.8±0.2	3.6±0.3

(4) 조미/기능성 성분 분석에 의한 이화학적 특성 분석

○ 발효 전후 통통마디 에탄올 추출물의 HPLC 분석 프로파일 비교

통통마디 발효를 통하여 주요 기능성 화합물들의 함량 변화를 HPLC 분석을 통하여 비교하고자 *Bacillus* spp 균주를 이용하여 발효한 발효 건조분말과 발효전 통통마디 건조분말에 대하여 각각 에탄올 환류추출한 시료를 동일 농도와 동일조건에서 HPLC 분석을 실시함.

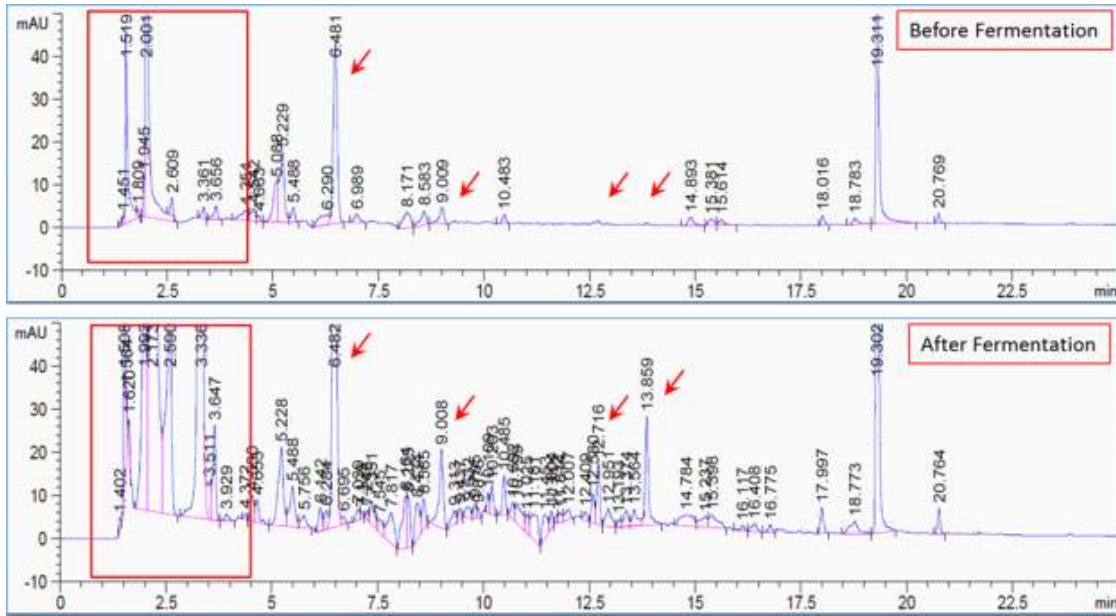


그림 23. 발효 전후 통통마디 에탄올 추출물의 HPLC 분석 프로파일

그림 23의 HPLC 크로마토그램에서 0~5분 이내에 검출되는 피크물질은 대부분 페놀릭산 계통의 물질임을 UV spectrum, λ_{max} 값 및 표준물질의 retention time을 비교하여 확인하였음. 동일한 방법으로 6.4분대의 피크 성분은 isorhamnetin-3-glucoside, 9.0분의 검출피크 성분은 quercetin-3-glucoside, 12.7분대는 quercetin, 13.85 분대는 isorhamnetin으로 확인함. 선행 연구에 의하면 수종의 페놀릭산(주로 caffeic acid, ferulic acid), isorhamnetin-3-glucoside, quercetin-3-glucoside은 통통마디의 에탄올 또는 메탄올 추출물에서 항산화성분으로 분리 보고된 바 있으며(Chung, 2005), isorhamnetin-3-glucoside는 항당뇨성 기능성 성분으로 보고된 바 있음(Lee, 2005). 최근 미나리에서 분리된 isorhamnetin과 isorhamnetin-3-glucoside는 항혈전성 활성성분으로 보고되어 있음(Ku, 2013). HPLC 프로파일의 결과를 분석하여 보면, 통통마디를 본과재에서 선발한 *Bacillus* spp 균주로 발효하였을 때 다양한 종류의 페놀릭산들과 선행연구에서 밝혀진 항산화성과 항혈전 활성을 나타내는 플라보놀 및 그 배당체 화합물이 현저히 증가함을 확인할 수 있음.

- 통통마디 발효-에탄올 추출물의 에틸아세테이트 분획물로부터 항응고활성 물질의 정제 발효시 현저히 증가하는 항응고성 페놀릭산 화합물을 정제하기 위하여 내인성 및 외인성 경로의 항응고활성이 우수한 통통마디 발효-에탄올 추출물의 에틸아세테이트 획분(SEE-2EA, 5g)을 소수성 흡착성이 강한 합성수지인 Diaion HP-20을 컬럼(4x33cm)에 충전하고 알카리수(pH 10)에 용해한 SEE-2EA를 컬럼 상단에 로딩하고 증류수 500 ml과 50-100% 메탄올 및 아세톤으로 용출시켜 세 개의 획분(SEE-2EA-UB, ~B1, ~B2)을 수득하였고 이들 세 획분을 분획전 에틸아세테이트 획분과 함께 박층크로마토그래피 분석을 통하여 전체 조성 성분의 프로파일과 각 스팟성분들의 항산화활성을 DPPH-Spray법을 통하여 관찰함(그림 24). 표 11에는 에틸아세테이트 획분으로부터 분리된 세가지 획분(SEE-2EA-UB, ~B1, ~B2)의 화학적 조성을 총당, 산성당, 중성당, 및 총폴리페놀과 총플라보노이드 함량을 비교분석하였으며, 항응고활성을 함께 비교

하여 나타냄. 그림 24의 TLC분석 프로파일에서 에틸아세테이트 획분의 조성물질들이 Diaion HP-20 을 컬럼 크로마토그래피로 분리한 세 개의 획분에 서로 다른 양상으로 분리되었음을 보여주며, 특히 UB 획분에는 다른 두 획분(B1, B2)보다 상대적으로 자외선 흡수 영역을 가지면서 극성이 강한 성분들, 즉 페놀산들이 즉 집적되어 있음을 알 수 있음. SEE-2EA-UB, ~B1, ~B2 획분에서 UV과장을 254nm와 354nm로 달리하였을 때 물질의 흡광영역이 달라짐을 볼 때 다양한 폴리페놀들과 플라보노이드 성분들이 혼재되어 있음을 알 수 있었으며, 특히 354nm에서 254nm보다 강하게 발광하는 SEE-2EA-UB획분에는 페놀릭산들이 주로 집적되어 있음을 알 수 있음(그림 24).

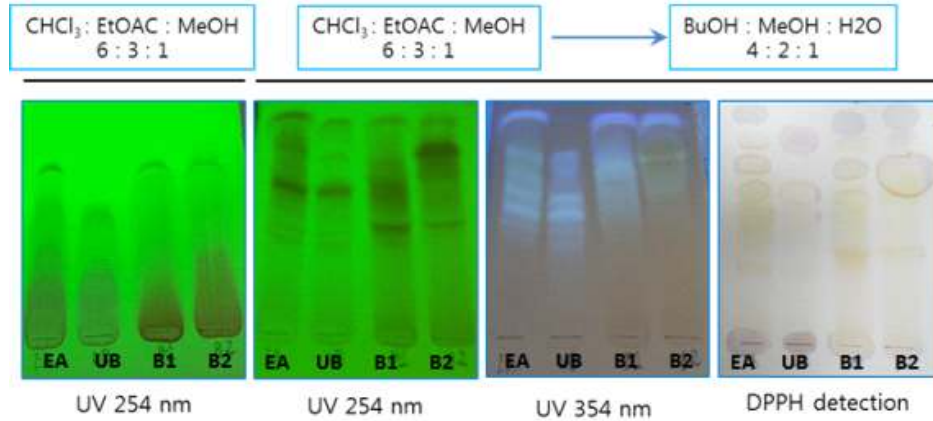


그림 24. 에틸아세테이트 획분으로부터 분리된 세가지 획분의 TLC 분석
 EA: 통통마비 발효-에탄올 추출물의 에틸아세테이트 분획 (SEE-2EA)
 UB: SEE-2EA로부터 Diaion HP-20 컬럼크로마토그래피로 분리한 페놀릭산 획분
 B1: SEE-2EA로부터 Diaion HP-20 컬럼에 흡착된 메탄올 용출획분
 B2: SEE-2EA로부터 Diaion HP-20 컬럼에 흡착된 아세톤 용출획분

표 11. 에틸아세테이트 획분으로부터 분리된 세 가지 획분의 화학적 조성 및 항응고활성

Sample	SEE-2EA	SEE-2EA-UB	SEE-2EA-B1	SEE-2EA-B2
Yield (g)	5.0	1.28	1.38	1.45
Total Polyphenol (mg%)	26.13	40.66	38.6	31.46
Total Flavonoids (mg%)	18.94	5.3	12.82	23.35
Total Sugars (mg%)	16.06	11.33	17.38	19.83
Uronic acids (mg%)	0.00	0.00	0.00	0.00
Antioxidant Activity (%) (100ug/mL)	50.69	66.85	84.35	79.35
PT (Ts/Tc)	2.5 mg/mL	1.17	1.45	1.03
	5.0 mg/mL	1.69	2.73	1.55
aPTT (Ts/Tc)	2.5 mg/mL	1.23	1.87	1.22
	5.0 mg/mL	2.35	3.14	2.06

EA: 통통마비 발효-에탄올 추출물의 에틸아세테이트 분획 (SEE-2EA)
 UB: SEE-2EA로부터 Diaion HP-20 컬럼크로마토그래피로 분리한 페놀릭산 획분
 B1: SEE-2EA로부터 Diaion HP-20 컬럼에 흡착된 메탄올 용출획분

B2: SEE-2EA로부터 Diaion HP-20 컬럼에 흡착된 아세톤 용출획분

표 11에서 SEE-2EA-UB획분에는 SEE-2EA-B1과 B2 획분과는 달리 플라보노이드 함량이 적은 것으로 보아 대부분의 폴리페놀성 페놀릭화합물들이 집적되어 있음을 알 수 있으며, SEE-2EA-B1과 B2 획분에 존재하는 총당함량은 주로 플라보노이드화합물과 배당체를 이루는 당의 존재일 가능성이 큼. 통통마비 발효-에탄올 추출물의 에틸아세테이트 분획(SEE-2EA)에서 분리된 세 획분은 에틸아세테이트 획분보다 모두 항산화활성이 증가하였으며, 프로트롬빈타임과 에이피타임으로 측정한 항응고활성의 경우 페놀릭 획분인 SEE-2EA-UB획분에서 가장 우수하였음. 따라서, 항응고활성이 강한 SEE-2EA-UB획분에 존재하는 페놀릭산들의 정제와 프로파일 분석이 필요하였음.

○ 페놀릭획분, SEE-2EA-UB로부터 페놀릭산의 정제 및 HPLC 분석

항응고 활성이 우수한 SEE-UB 획분 (1.28g)을 Silicagel 60G 컬럼(2.5x30cm)의 상단에 로딩 후 클로로포름과 메탄올 그래디언트 혼합용매(10:1 → 2:8)를 이용하여 용출시키고 항응고활성 및 항산화활성이 우수한 기능성 페놀릭 활성획분(SEE-2EA-UB-7)을 수득함. SEE-2EA-UB-7 획분을 HPLC-UV 분석을 통하여 7종의 페놀릭산성분(카페인산, 클로로젠산, 쿠마린산, 프로토카테추산, 페룰산, 바릴린산, 시넵픽산)을 동정함. 정량 분석은 표준품과 함께 HPLC 분석을 통하여 실시함. 발효전 통통마디 페놀릭산 획분과 발효 후 페놀릭산 획분을 비교 분석한 HPLC크로마토그램 프로파일과 각 페놀릭산들의 UV-스펙트럼을 나타냄(그림 25).

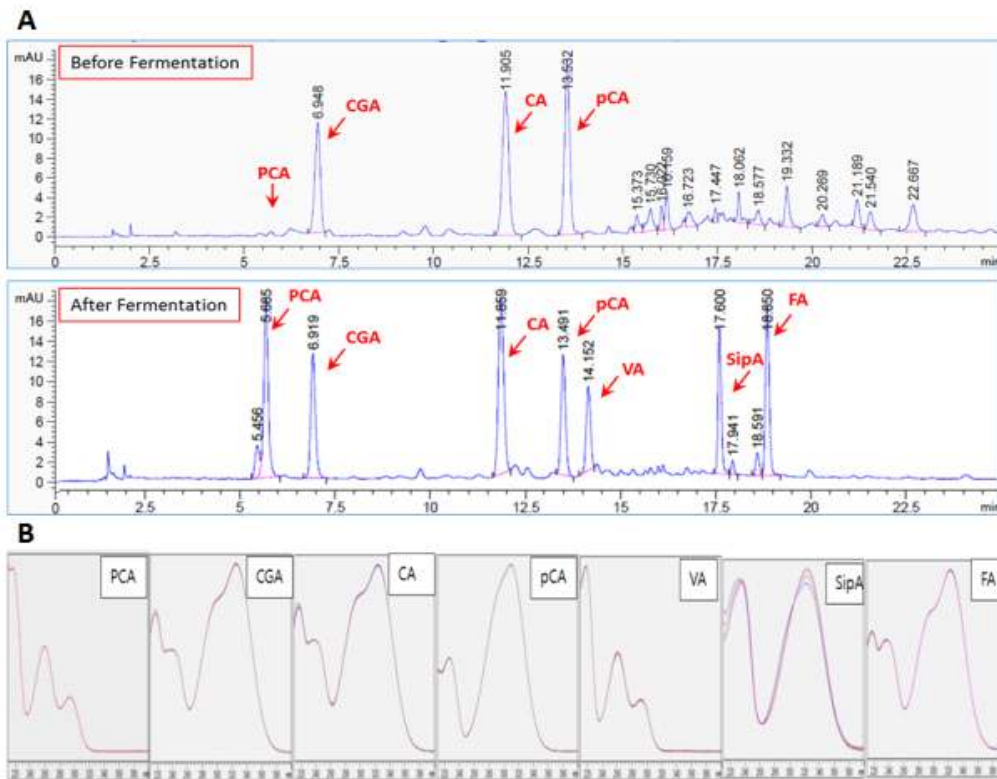


그림 25. 발효 전후 통통마디 항응고성 페놀릭산 획분의 HPLC크로마토그램 및 UV 스펙트럼 특성

A: HPLC 크로마토그램, B: UV 스펙트럼 ;PCA: protocatechuic acid, CGA: chlorogenic acid, CA: Caffeic acid, pCA: para-coumaric acid,VA: vanillic acid, SipA: sinapic acid, FA: Ferulic acid

그림 25과 같이 *Bacillus* spp. 발효를 통하여 수득되는 통통마디 페놀릭산의 함량과 페놀릭산의 다양성이 현저히 증가함을 확인할 수 있음. 분석된 모든 페놀릭산의 함량이 발효 전 보다 증가되었으며, 특히 vanillic acid와 sinapic acid는 발효전의 통통마디 시료에는 거의 미미하였으나, *Bacillus* spp. 발효를 통하여 그 함량이 급격히 증가되었음을 볼 수 있음. 이는 *Bacillus* spp 발효를 통하여 거대분자들 특히 통통마디의 가용성 다당류외에 불용성 식이섬유질이 분해됨으로써, 이들 거대구조와 결합되어 있던 저분자성 기능성성분들의 추출용매에 의한 용출이 증가되었으며, 일부는 *Bacillus* spp.에 의한 생합성을 통하여 생성된 결과로 해석됨. 따라서 통통마디를 발효함으로써 다양한 기능성 화합물들의 증가와 이를 통한 기능성 향상, 항혈전활성과 항산화활성의 증가는 향후 프리미엄급의 건강기능성 조미소스로의 개발 가능성을 확인함.

(5) 관능평가에 의한 최적 소스 성분 도출 조건 설정

- 통통마디 추출물을 이용하는 발효를 통해 조미소스를 제작하는 공정을 확립하고자 각 단계별 샘플을 척도검사를 통한 관능검사를 실시함. 통통마디 열수추출액의 경우 입에서 느껴지는 염미가 낮고 쓴맛이 강하며 어두운 색상(색차계 결과 참고)으로 인해 소스로서의 기능으로는 부족함. 이를 보완하고자 통통마디 열수추출물을 배양배지로 감칠맛 성분인 L-glutamic acid를 생산하는 *C. glutamicum*을 배양하여 발효액 내에 glutamate의 양을 증가하도록 하였으며, 이를 통해 발효액 내의 짠맛인 Na성분과 glutamate의 맛을 함께 느낄 수 있으므로 어떠한 조미성분도 첨가하지 않은 상태로도 전체적인 관능성이 좋아진 것을 확인함. 발효 후에도 남아 있는 통통마디 고유의 쓴맛은 활성탄 처리를 통해 쓴맛 펩타이드 및 소수성 분자들의 제거함. 색차계 결과를 토대로 육안으로 관찰시 호감가는 색 정도를 확인함으로써 활성탄 처리량과 시간을 확인하였고, 제품 공정 척도로서 사용함. 활성탄 처리로 정제된 통통마디 발효액은 시판 조미소스와 동일한 염도로 저온 진공농축을 실행하였고 짠맛, 신맛, 통통마디 고유의 향미, 감칠맛 등이 농축되면서 일으키는 작용으로 인해 본 연구에서 비교대상으로 본 S사의 YD 제품보다 맛과 향이 우수하여 전체적인 기호도가 높은 것을 확인함(표 12, 그림 26). 이로써 통통마디 추출물을 이용하는 조미소스의 제작은 열수추출, 열수추출액의 발효, 발효물의 활성탄 정제 및 농축의 과정을 통해 충분히 시장성 있는 조미소스로서의 개발 가능성을 확인함과 동시에 제작 과정을 확립함.

표 12. 통통마디 추출물을 이용한 조미소스 제작 단계별 관능평가

Variety	Procedure	Sensory Evaluation				
		Overall Acceptability	Flavor	Sour	Bitter	Salty
통통마디 추출물	통통마디 열수추출액	1.9±0.4	1.8±0.7	2.0±0.4	1±0.1	1.5±0.1
	통통마디 열수추출액의 발효물	2.8±0.2	2.7±0.4	3.5±0.4	1.5±0.6	1.8±0.5
	활성탄 정제액	4.1±0.1	4.2±0.5	3.6±0.4	4.3±0.5	2.3±0.1
	농축액	4.8±0.2	4.8±0.3	4.3±0.3	4.5±0.1	4.3±0.1
시판 조미 소스		3.3±0.1	3.0±0.2	3.8±0.1	3.4±0.6	4.2±0.1

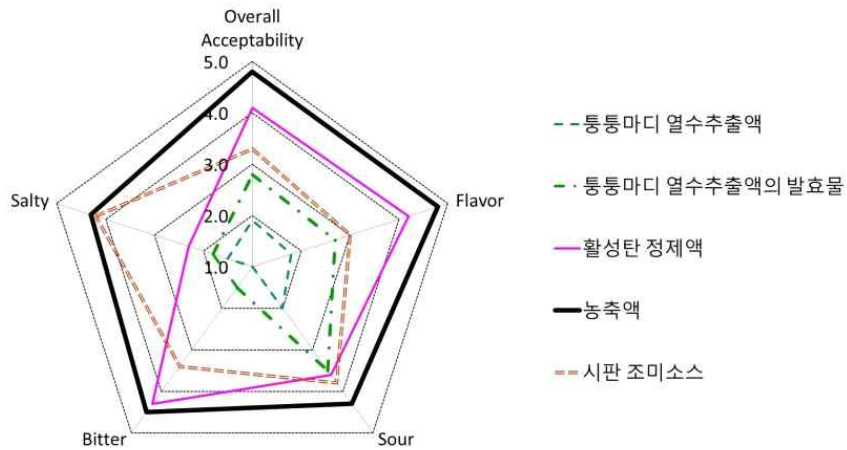


그림 26. 통통마디 추출물을 이용한 조미소스 제작 단계별 관능평가

- 통통마디 추출물을 이용한 조미소스 제작단계별 색도를 색차계를 이용하여 분석함. 이는 각 단계별 색도를 표준화함으로써 활성탄의 처리량을 결정하는 단계임.

표 13. 통통마디 추출물을 이용한 조미소스 제작 단계별 색도 비교

Variety	L	a	b
통통마디 열수추출액	32.20±0.09	10.45±0.12	14.19±0.16
통통마디 열수추출 발효액	31.98±0.02	10.55±0.02	12.41±0.01
활성탄 정제액	41.94±0.41	5.30±0.04	18.15±0.32
농축액	36.34±0.55	4.08±0.17	21.15±0.17
시판 조미 소스	34.06±0.30	4.48±0.21	18.85±0.16

(6) 소스 및 기능성 소재의 최적 생산 공정 설정

- 조미소스로서의 요건으로 맛난 짠맛, 신맛, 감칠맛, 단맛, 색, 향 등의 관능성 및 감칠맛의 척도로서 glutamate의 발효에 의한 생성량을 HPLC 및 Glutamate assay kit을 이용하여 가장 바람직한 발효기간, 활성탄 처리량 등을 결정하였으며 다음과 같이 통

통통마디 추출물을 이용한 발효 조미소스의 제조공정도를 확립함(그림 27).



그림 27. 통통마디 추출물을 이용한 발효 조미소스의 제조 공정도

바. 발효에 필요한 포도당, 설탕 등 인위적 첨가물을 사용하지 않는 발효기술 개발

(1) 기타 식물 추출물 등의 원료를 사용하지 않고 통통마디만을 이용하는 발효기술 개발

- *Corynebacterium glutamicum*을 이용한 발효를 실행함. 통통마디 열수추출물을 배양 배지로 사용하였으며 이때 *C. glutamicum*의 성장에 요구되는 microbial foods로서 L-glutamate를 생산하기 위한 최소 배지 CGX II를 열수추출물에 첨가하는 방식으로 변형하여 사용함. 열수추출물에 여러 종의 미네랄이 포함되어 있기 때문에 CGX II 배지에 필수 생육인자로서 첨가되는 trace elements($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, CuSO_4 , $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, pH 1)는 첨가하지 않는 것이 cell growth 및 glutamate 생성에 도움이 됨. 이때 배양 배지의 pH는 NaOH로 조정하는 대신에 식품 첨가물로 사용 가능하며 *C. glutamicum*의 세포벽 구성에 필수 영양인자인 제2인산염(K_2HPO_4)를 사용함. 본래 CGX II 배지에는 제1인산염(KH_2PO_4)과 제2인산염이 동량으로 사용되나 본 연구에서는 알칼리성을 가지므로 산성 식품의 pH를 중성 부근으로 조정하기 위해 사용 가능한 제2인산염만을 사용하여 pH를 조정함(그림 28). 최소 배지에 사용되는 질소원으로 soyton, casamic acid, yeast extract, malt extract, ammonium sulfate 등을 사용하여 발효를 실행한 결과 이미취 없이 L-glutamate를 가장 많이 생성하는 것이 황산암모임. 황산암모임은 식품공전에도 등록된 식품첨가물이지만 배양액 내에 황산염이 잔류하는 것은 바람직하지 못하므로 식품에 사용해도 안전한 질소원으로 교체하고자 함(그림 29).

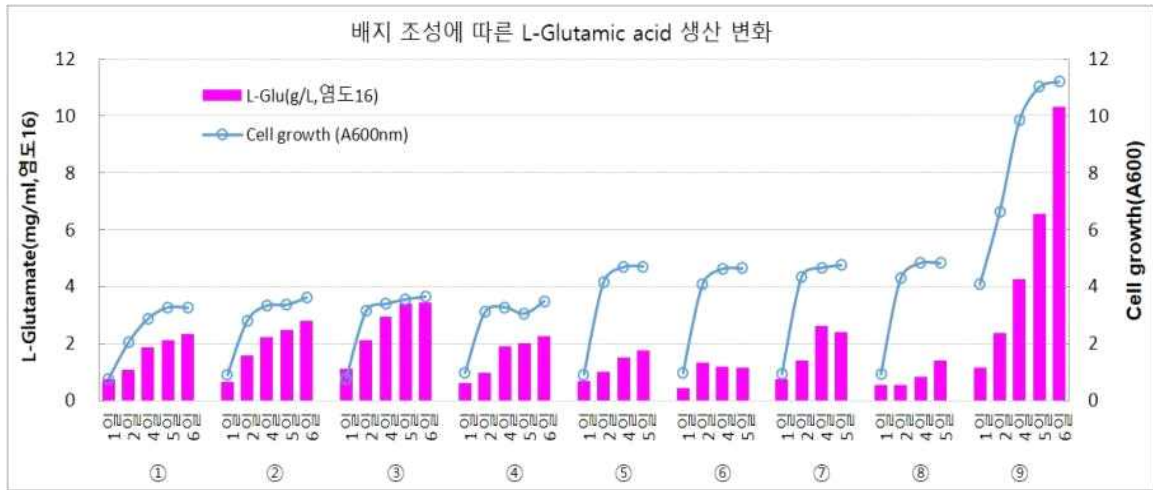


그림 28. *C. glutamicum*의 L-glutamate 생산을 위한 최적 배지 조성 연구

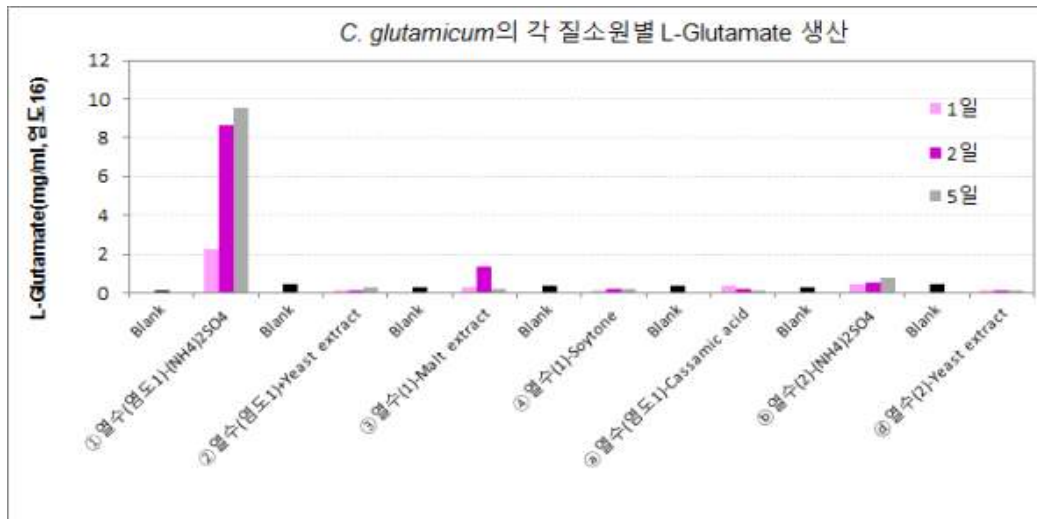
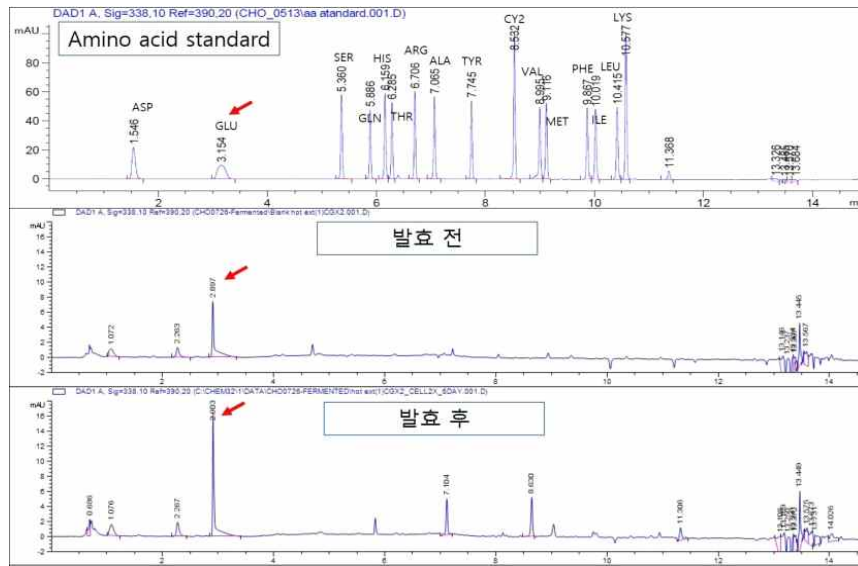


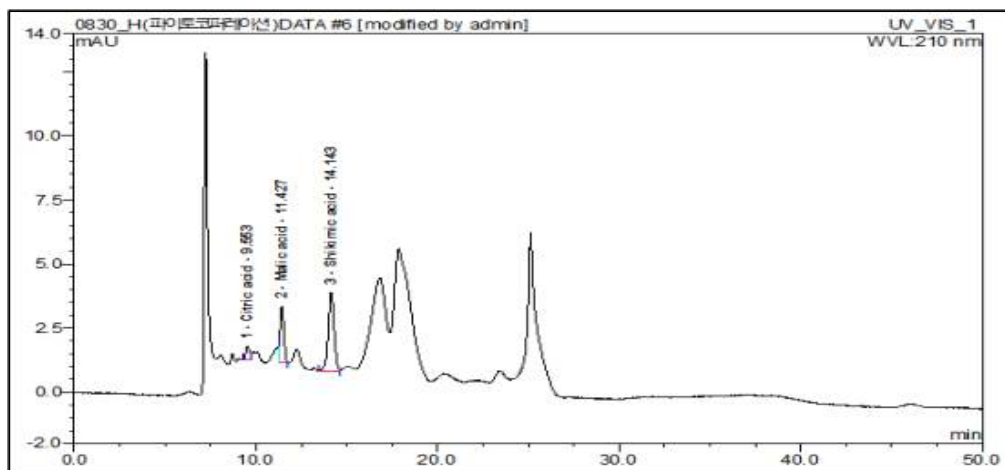
그림 29. 최소배지에 사용할 질소원 설정을 위한 다양한 질소원별 L-glutamate 생성량

- 발효산물의 아미노산 함량을 HPLC으로 분석한 결과 발효전 glutamate의 양보다 발효 후의 양이 약 8~10배 증가한 것을 확인할 수 있음(그림 30).

그림 30. *Corynebacterium glutamicum* KCTC 1738 발효 전, 후 HPLC에 의한 아미노산 분석



- *Corynebacterium glutamicum* KCTC 1738로 열수추출물을 발효 후 발효산물의 유기산을 분석한 결과 세 종류의 유기산이 생성된 것을 확인함(그림 31). 그 중 약 39%가 가장 많이 생성된 유기산은 L-malic acid임. Malate의 나트륨염인 Sodium malate는 유기산계 조미료, 산도조절제, 방향제로 사용되며 L-형에 나트륨의 짠맛이 존재(D-형에는 없음)하여 소금 대용으로 간장, 수산가공품(젓갈), 축육가공식품(햄)의 Na 절감 효과시 사용하기도 하는 유기산계 조미료임. 짠맛의 정도는 소금의 1/3, 유기산 염류 중 짠맛이 가장 강한 것으로 알려져 있음. 합성 제조시에는 DL-형의 malate가 생성되나 발효를 한 경우는 L-형의 malate만 생성되므로 실제 나트륨이 아니면서 짠맛을 증강시킬 수 있는 효과가 있는 것임. 특성차이검사법으로 관능테스트를 한 결과 발효하지 않은 열수추출물과 발효 후 유기산이 생성된 발효물과의 짠 맛에 대한 비교 평가에서, 10명의 패널 중 9명이 발효물에서 더 짠 맛을 느낀다고 답해 5% 유의수준에서 유의성 있게 발효물의 유기산 생성이 짠맛을 증강하는 데에 도움이 된 것을 확인함.



No.	Ret.Time min	Peak Name	Height mAU	Area mAU*min	Rel.Area %	Amount mg/L
1	9.55	Citric acid	0.516	0.118	6.47	7.033
2	11.43	Malic acid	2.195	0.556	30.38	38.657
3	14.14	Shikimic acid	3.091	1.156	63.15	1.376
Total			5.802	1.831	100.00	47.066

그림 31. *Corynebacterium glutamicum* KCTC 1738으로 발효한 통통마디 열수추출 발효액 내의 유기산 함량

- 위의 결과를 바탕으로 통통마디 열수추출물로 *C. glutamicum*을 이용하여 감칠맛의 대표 성분인 L-glutamate를 생산하도록 하여 맛난맛의 통통마디 열수추출물 발효액을 얻고자 함. 발효액 자체를 조미소스로 이용하고자 하므로 열수추출물에 최소배지인 CGX II 배지의 화학성분을 가능한 줄이고자 함. 당원으로서 glucose 4%를 첨가하는 대신 통통마디 열수추출물을 cellulase 복합효소로 처리하여 glucose 2.8% 내외의 당을 얻어 사용함. CGX II 배지의 trace elements는 열수추출물 내에 천연으로 존재하는 복합 미네랄을 그대로 사용하기로 해도 되는 것을 확인하였기 때문에 TE는 배양액에 사용할 필요가 없으며, Ca염, Mg염 등도 열수추출물내에 존재하는 것을 그대로 사용하기로 함. 질소원은 외부로부터의 공급이 불가피하므로 첨가하였으나 CGX II 최소배지에서 사용하던 황산암모늄 대신 탄산수소암모늄을 사용하여 최종 발효액에서 암모늄염이 검출되지 않도록 함. 탄산수소암모늄은 빵, 과자 등에 사용량의 제한 없이 사용할 수 있는 식품첨가물임. 액상에서는 이온화되면 약 60℃ 이상에서 탄산가스, 암모늄가스로 모두 용출된다. 이것은 이온크로마토그래피법을 통해 발효액 내의 잔류 암모늄이온의 양을 분석하여 발효액 내에 암모늄이온이 잔류하지 않는 것을 확인함(그림 32). 기타 당원의 첨가 없이 통통마디 열수추출물만을 이용하여 *C. glutamicum*을 이용한 발효를 통해 L-glutamic acid를 생산하여 감칠맛을 강화하였고, 발효를 통해 생성된 malic acid로 인해 열수추출물 내에 천연으로 존재하는 나트륨과 함께 섭취하면 짠맛이 강화되는 효과가 있어 ‘저나트륨 감칠맛의 ‘통통마디만으로 제조된’ 발효 조미소스를 얻을 수 있었음. 발효를 통해 얻어진 감칠맛 나는 저나트륨 소스액은 유기산 생성으로 액의 pH가 4.3~4.5로 낮아져 산미가 강하므로 발효기간의 조절 또는 발효액과 열수추출액을 혼합하는 방식으로 제조가 가능함.

No.	Time min	Peak Name	Type	Area • S ² min	Height • S	Amount mg/L
1	4.82	NH4	M ⁺	5.635	22.452	n.a.
TOTAL:				5.64	22.45	0.00

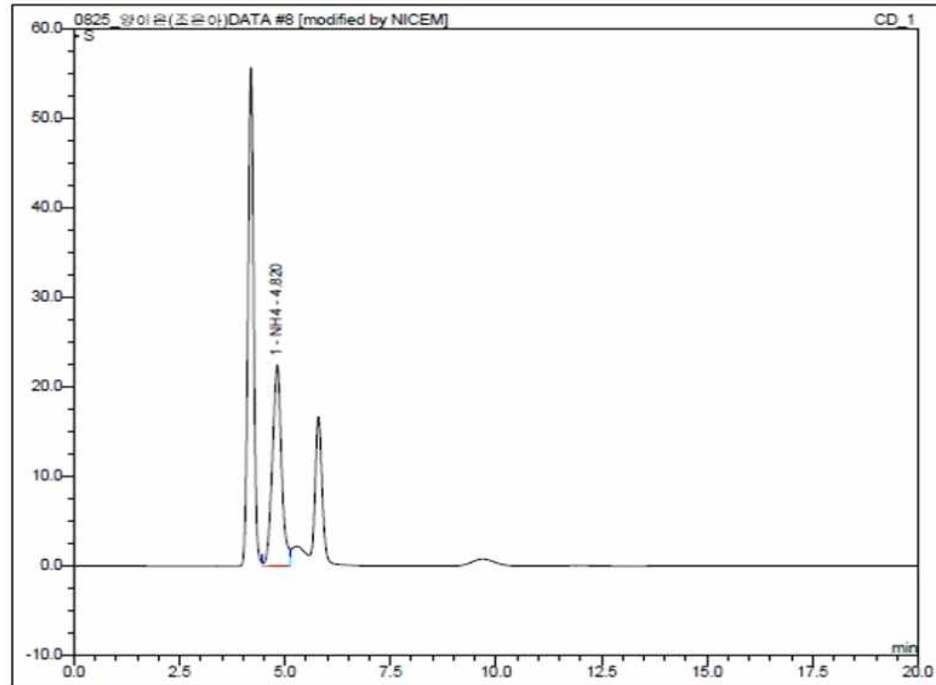


그림 32. 탄산수소암모늄을 질소원으로 사용한 발효액의 정제공정을 거친 후 잔류 암모늄염의 이온크로마토그래피 분석

2. 통통마디 및 이의 생물전환 산물을 이용한 기능성 소재의 개발 및 작용기전 연구

가. 통통마디의 유용기능성 검토 및 식품학적 특성 평가

(1) 통통마디의 추출물의 유용성분 함량 분석 및 통통마디 탈염박을 이용한 제빵 등의 가공 식품 제조 우수성 확인

- 통통마디는 9월말 재배한 것을 구입직후 잎, 줄기, 씨로 구분하고 추출물 제조를 위해 이물질을 제거하여 수세한 잎, 줄기, 씨에 각각 10배의 95% ethanol을 가한 후 상온에서 24시간, 3회 반복 추출하였으며, 추출액은 filter paper(Whatman No. 2)로 거른 후 감압 농축(Eyela Rotary evaporator N-1000, Tokyo Rikakikai Co., Ltd., Japan)하여 분말로 조제함. 이때 함초 잎, 줄기 및 씨의 각각의 추출수율은 6.1, 6.5 및 8.1%임(표 14). 실험 결과는 SPSS 23.0 버전을 사용하여 mean ± SD로 나타내었고, 각 군간의 차이는 ANOVA로 분석함. 이후 Duncan 다중비교 검증법으로 통계적 유의성 검정을 조사하였으며, 유의수준은 $p < 0.05$ 로 함. 측정 결과, 총 폴리페놀 함량은 잎 > 줄기 > 씨의 순, 총 플라보노이드 함량은 잎 > 줄기 = 씨의 순으로 나타났으며,

총당 및 환원당 함량은 잎과 줄기가 씨보다 월등히 높았음. 따라서 통통마디의 잎과 줄기를 이용한 식품제조시 항산화 성분이 풍부한 원료로서 이용성이 높음을 확인함.

표 14. 통통마디 에탄올 추출물의 수율 및 유용성분 분석

Parts	Extraction yield (%)	Contents (mg/g)			
		Total polyphenol	Total flavonoid	Total sugar	Reducing sugar
Leaf	6.1 ± 0.3 ^{a1)}	16.7 ± 0.0 ^c	16.1 ± 0.1 ^b	56.0 ± 1.9 ^b	50.2 ± 1.4 ^c
Stem	6.5 ± 0.2 ^a	12.1 ± 0.2 ^b	9.8 ± 0.3 ^a	59.9 ± 0.8 ^c	46.1 ± 2.2 ^b
Seed	8.1 ± 0.4 ^b	10.6 ± 0.1 ^a	10.1 ± 0.3 ^a	8.7 ± 0.6 ^a	4.4 ± 0.6 ^a

- 통통마디 추출 후 탈염된 박(de-salted cake)은 건조하여 분쇄함. 통통마디 동결건조 분말도 분쇄하였으며, 생초의 마쇄액도 믹서로 갈아서 사용함. 이를 밀가루 함량 대비 5%의 비율로 대체하여 기존의 식빵과 비교함. 반죽 정도 및 발효 후 부풀어 오르는 성질, 오븐적성 및 색감과 맛의 관능평가를 통해 제빵 적성이 우수함을 확인함(그림 33)..



그림 33. 통통마디 분말, 마쇄액, 탈염박을 이용한 식빵 제조 비교

(2) 통통마디의 수확시기별 성분 및 효능 비교

- 통통마디 생초를 4월, 6월, 8월, 9월, 10월에 수확하여 이의 다양한 성분분석 및 유용 생리활성(항균, 항산화, 항혈전, 항당뇨)을 평가함. 수확시기별 함초 열수 추출물의 총 폴리페놀 함량은 4월 8.8 mg/g에서 지속적으로 증가하였으며, 10월에는 22.4 mg/g에 도달함. 반면 총 플라보노이드 함량은 4월 6.3 mg/g에서 6월 11.1 mg/g으로 증가하여 9월까지 유지되다가 10월에 다시 17.6 mg/g으로 유의적으로 증가함. 이러한 변화는 에탄올 추출물과는 차이가 나타났으며, 에탄올 추출물의 총 폴리페놀 함량은 4월 11.4 mg/g에서 6~8월 14.8~14.9 mg/g으로 미약하게 증가되다가 9월에는 20.1 mg/g까지 증가 후, 10월 12.4 mg/g으로 급감함. 반면 총 플라보노이드 함량은 4~8월에 9.8~10.8 mg/g에서 9월 19.3 mg/g으로 급증하였다가 10월에는 12.8 mg/g으로 유의적

으로 감소하는 것을 확인함. 따라서 관능성과 부드러운 식감을 고려할 때, 식용으로는 8월 함초가 적합하며, 유용 생리활성소재로 이용하고자 하는 경우 9~10월 함초가 적합함을 알 수 있음(그림 34).

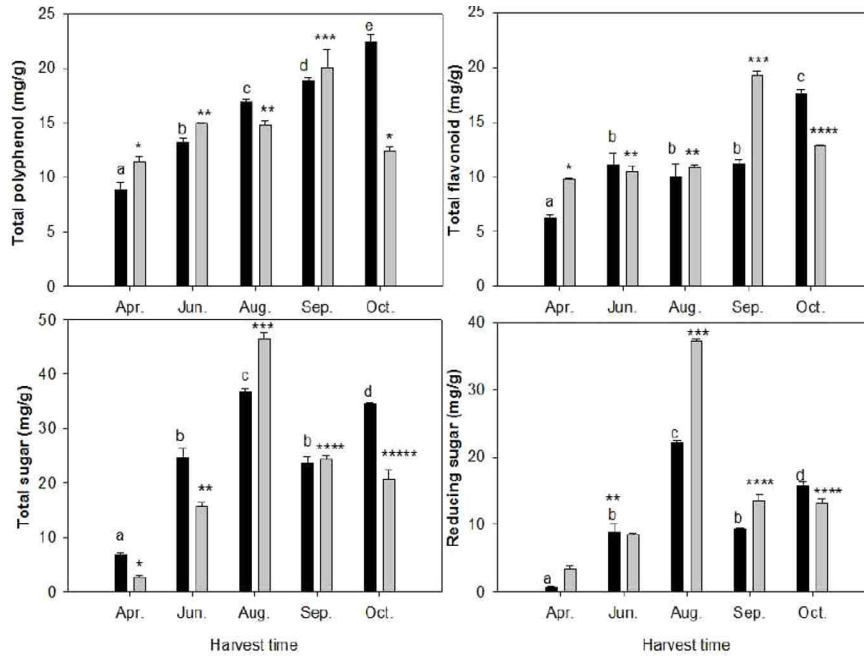


그림 34. 함초의 수확시기별 열수 및 에탄올 추출물의 총 폴리페놀, 총 플라보노이드, 총당 및 환원당 분석

○ 통통마디의 수확시기별 열수 및 에탄올 추출물의 항산화 활성

그림 34의 결과와 같이 통통마디 추출물의 항산화 활성을 평가함. DPPH 음이온 소거능을 0.5 mg/ml 농도에서 평가한 결과 9월 함초에서 가장 높게 나타났으며, 열수 추출물은 9월 함초의 강력한 DPPH 소거능이 10월까지 유지된 반면 에탄올 추출물은 9월 함초의 72.7% 소거능이 10월 통통마디에서는 52%로 유의적으로 감소함. ABTS 양이온 소거능을 0.5 mg/ml 농도에서 평가한 결과, 열수 추출물에서는 10월 함초가 81.1% 소거능, 에탄올 추출물에서는 9월 함초가 79.2%로 가장 높게 나타났으며, 4월 함초의 경우 추출용매와 무관하게 가장 낮은 소거능을 나타냄. Nitrite 소거능을 0.2 mg/ml 농도에서 평가한 경우, 열수 추출물은 6, 9, 10월 함초가 57~59%의 유사한 소거능을 나타낸 반면, 에탄올 추출물의 경우 4월에서 9월로 재배시기가 증가할수록 nitrite 소거능도 유의적으로 증가하여 최대 69.4% 소거능을 나타내었으며, 이후 10월에는 8월 소거능 수준으로 감소함(그림 35). 이러한 결과는 항산화 활성이 우수하다고 알려진 함초를 대상으로 활성 radical을 제거하고자 하는 경우, 열수 추출의 경우 9~10월 함초, 에탄올 추출의 경우 9월 함초를 사용하는 것이 적합함.

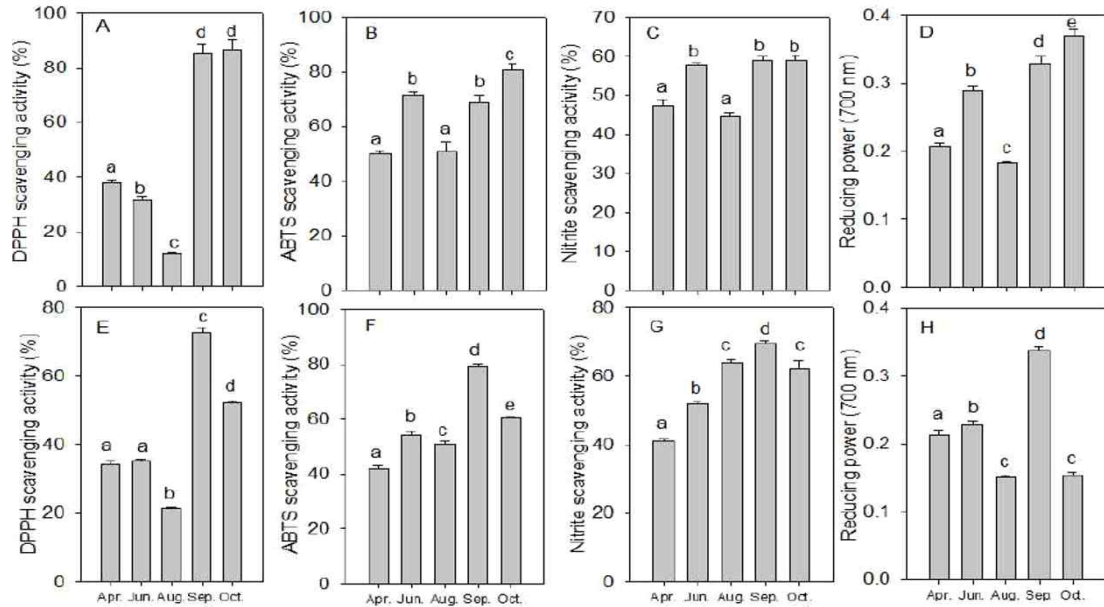


그림 35. 함초의 수확시기별 열수 및 에탄올 추출물의 항산화 활성

(3) 통통마디의 건조방법에 따른 성분 변화 및 항응고 및 적혈구 용혈활성 평가

○ 통통마디의 동결건조, 열풍건조 및 음건 시료의 항산화 활성

통통마디의 동결건조, 열풍건조 및 음건하에서 건조한 시료의 항산화 활성 평가를 위해 DPPH, ABTS 및 nitrite 소거능 및 환원력을 평가함. 동결건조 시료의 경우 0.5 mg/mL 농도에서 2.8%, 21.7%, 0.041의 DSA, ASA 및 환원력을 나타내었으며, 0.2 mg/mL 농도에서 41.1%의 NSA를 나타내어, 양이온 소거능과 nitrite 소거능이 우수하였음. 열풍건조 시료는 상기 농도에서 DSA는 인정되지 않았으며, 21.3%의 ASA, 42.9%의 NSA 및 0.079의 환원력을 나타내어 동결건조와 유사한 라디칼 소거능을 나타냄(표 15). 반면 음건한 경우 ASA는 28.1%로 다소 증가하였으나, NSA 활성은 오히려 17.2%로 감소하였으며, 환원력도 나타나지 않음을 확인함. 이에 따라서 건조방법은 동결건조 및 열풍건조가 바람직하며 실온에서 7일간 자연건조하는 음건법의 경우는 유용성분을 보존하는 것이 어려움을 확인함.

표 15. 통통마디의 동결건조, 열풍건조 및 음건 시료의 항산화 활성

Samples	Radical scavenging activity ¹⁾ (%)			Reducing power (0.5 mg/mL)
	DPPH	ABTS	Nitrite	
Freeze drying	2.8±0.7 ^{a2)}	21.7±2.7 ^a	41.1±1.9 ^a	0.041±0.001 ^a
Hot-air drying	-2.5±3.8 ^a	21.3±0.6 ^a	42.9±1.6 ^a	0.079±0.001 ^b
Shade drying	-0.7±4.0 ^a	28.1±1.4 ^b	17.2±2.3 ^b	-0.009±0.001 ^c

○ 통통마디 동결건조, 열풍건조 및 음건 시료의 혈액응고저해 활성

9~10월 재배한 통통마디의 동결건조, 열풍건조 및 음건 함초 시료의 항응고 활성을 TT, PT, aPTT를 각각 측정하여 평가하였음(그림 36). 먼저 대조구로 사용된 1.5

mg/mL aspirin은 무처리구에 비해 TT는 2.09배, PT는 1.23배, aPTT는 1.38배 연장시켜 우수한 혈액응고저해 활성을 나타냄. 동결건조 함초 시료는 5 mg/mL 농도에서 TT는 1.92배, PT는 1.06배, aPTT는 1.12배 연장시켜 양호한 트롬빈 저해 활성을 나타냄. 이러한 항응고 활성은 농도 의존적으로 증가되었으며, 건조과정을 거치지 않은 함초 에탄올 추출물의 항응고 활성과 유사함. 열풍건조 시료의 경우, 5 mg/mL 농도에서 TT는 1.89배, PT는 1.09배, aPTT는 1.48배 연장시켜 aPTT에서만 활성 증가가 나타났으며, 농도 의존적인 항응고 활성이 나타남. 한편 음건 시료의 경우 5 mg/mL 농도에서 TT는 1.50배, PT는 1.12배, aPTT는 1.27배 연장시켜, 동결건조시료에 TT의 감소가 확인됨. 특이한 점은 열풍건조 시료의 7 mg/mL 처리시, TT 및 aPTT를 각각 2.87및 1.95배 연장시켜, 동일농도의 동결건조 시료에 비해서도 유의적으로 항응고 활성의 증가가 나타남. 이러한 결과는, 함초의 항응고 활성 물질은 열풍건조시에 손실되지 않으며, 열풍건조시 동결건조와 유사한 항응고 활성을 나타냄을 의미함.

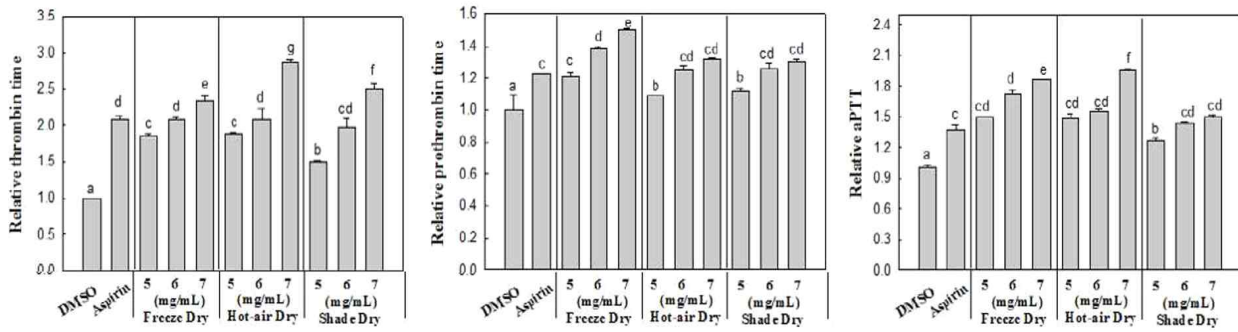


그림 36. 함초 동결건조, 열풍건조 및 음건 시료의 혈액응고저해 활성

○ 통통마디 동결건조, 열풍건조 및 음건 시료의 적혈구 용혈활성

통통마디 건조 시료들의 적혈구 용혈활성을 평가하여 표 16에 나타냄. 대조구로 사용된 DMSO는 용혈활성이 없었으며, triton X-100은 1 mg/mL 농도에서, amphotericin B는 0.02 mg/mL에서 적혈구를 100% 용혈시킨 반면, 동결건조, 열풍건조 및 음건 함초 시료의 ethanol 추출물은 1 mg/mL 농도까지 용혈활성이 전혀 나타나지 않음. 따라서 통통마디는 다양한 건조과정에서 추가적인 적혈구 용혈 문제는 나타내지 않으리라 판단됨.

표 16. 통통마디 동결건조, 열풍건조 및 음건 시료의 적혈구 용혈활성

Chemicals/Samples (mg/mL)	Hemolysis against hRBC (%)
DMSO	-0.6±1.6 ^(1)a2)
Triton-X 100 (1.0).	100.4±1.4 ^b
Amphotericin B (0.02)	100.8±2.5 ^b
Freeze drying (1.0)	-2.1±0.1 ^a
Hot-air drying (1.0)	-0.8±0.8 ^a
Shade drying (1.0)	2.3±2.0 ^a

이상의 결과는, 통통마디 재배 농가에서 일반적으로 사용하는 천일건조 및 음건보다는 열풍건조 또는 동결건조가 통통마디의 유용성분, 항산화 및 항혈전 활성 유지측면에서 유리하며, 특히 동결건조 및 열풍건조시 성분 및 활성의 변화가 거의 없으며, 열풍건조가 동결건조보다 훨씬 경제적인을 감안한다면, 오히려 통통마디의 경우 열풍건조가 유리함을 제시하고 있음. 특히 통통마디의 항혈전 활성을 이용하는 기능성 음료를 제조하고자 하는 경우 열풍건조를 이용하는 것이 경제적이면서 효과적임을 제시하고 있음.

나. 통통마디 및 고염지 유래 유용 미생물의 발굴 및 발효 적용

(1) 1차 선정된 23종 균주의 통통마디 발효 및 발효액의 특성 평가

- 통통마디가 자랄 수 있는 염전 및 젓갈에서 91종의 균주를 분리 후 확보된 호염성 균주 중, 고염조건에서의 생육성 및 통통마디 배지(비마쇄, 무처리 생함초 25% 및 0.1% 효모 추출물을 포함하는 배지)에서의 생육성을 기준으로 우수한 23종의 균주를 1차로 선별하여 분리함(표 17).

표 17. 고염조건 및 통통마디 배지에서 생육이 우수한 1차 분리균주 리스트

No.	균주명	분리원	1차선정 균주번호
92	bacteria (미동정)	젓갈	1
93	bacteria (미동정)	젓갈	2
94	bacteria (미동정)	젓갈	3
95	bacteria (미동정)	젓갈	4
96	bacteria (미동정)	젓갈	5
4	bacteria (미동정)	염전	6
66	<i>Bacillus subtilis subsp. subtilis</i>	염전	7
80	<i>Marinobacter flavimaris</i>	간수	8
40	<i>Oceanobacillus picturae</i>	염전	9
26	<i>Halobacillus trueperi</i>	간수	10
33	<i>Bacillus endophyticus</i>	염전	11
30	<i>Humihabitans oryzae</i>	염전	12
45	<i>Jeotgalibacillus salarius</i>	염전	13
52	<i>Halomonas saccharevitans</i>	간수	14
58	<i>Bacillus stratosphericus</i>	염전	15

59	<i>Halobacillus dabanensis</i>	염전	16
39	<i>Bacillus subterraneus</i>	염전	17
40	<i>Halobacillus salinus</i>	간수	18
41	<i>Salinicoccus roseus</i>	염전	19
42	<i>Halobacillus yeomjeoni</i>	염전	20
20	<i>Virgibacillus halodenitrificans</i>	간수	21
82	<i>Marinobacter adhaerens</i>	간수	22
19	<i>Halobacillus mangrovi</i>	간수	23

○ 1차 선정 23종 호염성 세균의 통통마디 발효액 분석

고염환경 및 통통마디 배지 환경에서 생육이 우수한 1차 선정 호염성 균주를 발효한 통통마디 발효액을 대상으로 이화학적 분석, 성분 및 유용 기능성을 평가하였음. 그 결과 통통마디 분해력이 우수하며 발효취가 향기로운 균주를 2차로 선별하였으며 총 3종의 세균을 선별함(표 18). 2차 선정된 균은 각각 *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* #7, *Bacillus stratosphericus*, *Halobacillus salinus* #18을 각각 확인함(이때 대조구는 121°C 에서 15분간 열처리한 열수 가수분해물임). 이 중 *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis* #7와 *Halobacillus salinus* #18는 통통마디를 분해하는 활성 뿐 아니라 *Bacillus* 특유의 강한 발효취가 적어 이를 선별하여 주관기관의 통통마디 분해에 사용할 수 있도록 분양함.

표 18. 1차 선정한 23종 호염 세균 리스트

균주	pH	Brix	salinity (%)	환원당(mg/ml)	Cell OD (600 nm)
1	7.98	3.0	2.1	0.52	0.307
2	8.01	3.0	2.0	0.52	0.314
3	4.84	2.8	2.0	0.19	0.087
4	8.44	3.0	2.2	0.36	0.312
5	8.20	3.2	2.2	0.61	0.314
6	7.99	3.2	1.8	2.18	0.369
7	8.55	3.0	2.2	0.48	0.508
8	7.68	2.6	2.1	0.64	0.229
9	5.62	3.0	2.2	1.77	0.092
10	5.83	3.0	2.1	2.04	0.116
11	7.85	2.9	2.2	0.29	0.211
12	6.10	3.0	1.9	1.80	0.089
13	5.95	2.9	1.9	1.61	0.102
14	6.05	3.0	2.2	2.07	0.112
15	8.47	2.9	1.8	0.20	0.64
16	5.92	3.0	2.2	1.73	0.085
17	6.00	2.9	2.0	1.67	0.123
18	8.41	3.0	2.0	0.53	0.584
19	5.99	3.0	2.2	1.82	0.091
20	7.98	3.0	2.2	0.29	0.219
21	8.12	3.0	2.3	0.33	0.302
22	5.81	3.0	2.3	1.52	0.105
23	8.24	2.9	2.3	0.24	0.214
Control1	5.86	2.7	1.8	1.44	0.074
Control2	5.89	2.7	2.0	1.66	0.074

- 통통마디 발효 세균의 배양 상등액에 대한 이화학적 특성 및 성분 분석
23종의 선별된 균주를 통통마디 배지에서 발효 후 배양상등액의 DPPH 음이온, ABTS 양이온, 환원력 reducing power 등 항산화 활성을 평가함(그림 37). 함초 발효력이 우수하면서, 항산화력이 우수한 No.3, 7, 18번을 2차 선정함.

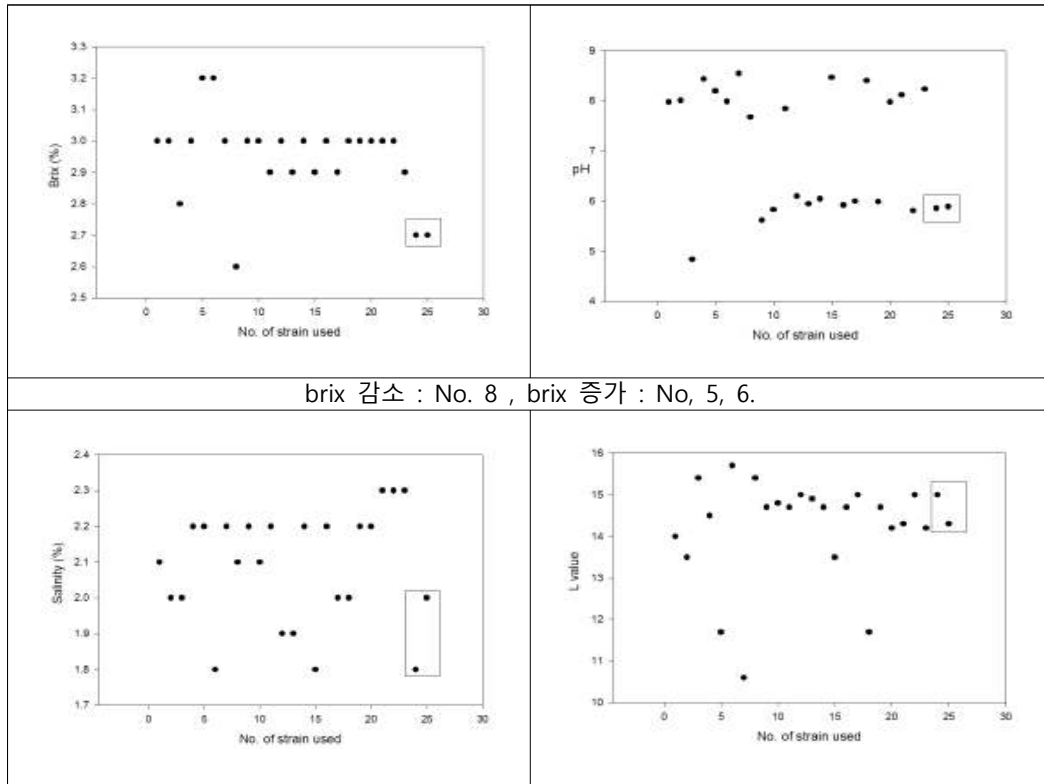


그림 37. 통통마디 발효 세균의 배양 상등액에 대한 이화학적 특성 및 성분 분석

- 통통마디의 발효 전, 후 구조도 변화 관찰
호염세균에 의한 발효 전과 발효 후의 구조도 비교를 통해 발효에 의해 일어나는 통통마디 구조의 변화를 관찰함(그림 38, 그림 39). 염생균 발효에 의해 분해된 통통마디 유래 물질 결정 (소금포함)이 열수 가수분해물의 결정성과 차이가 없어 통통마디 발효 균주에 의한 발효물의 실제적 적용에 문제가 없을 것으로 판단함.

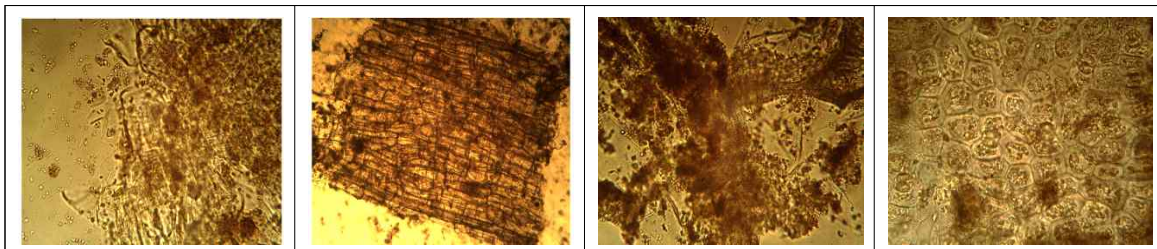


그림 38. 통통마디 발효 전 구조도

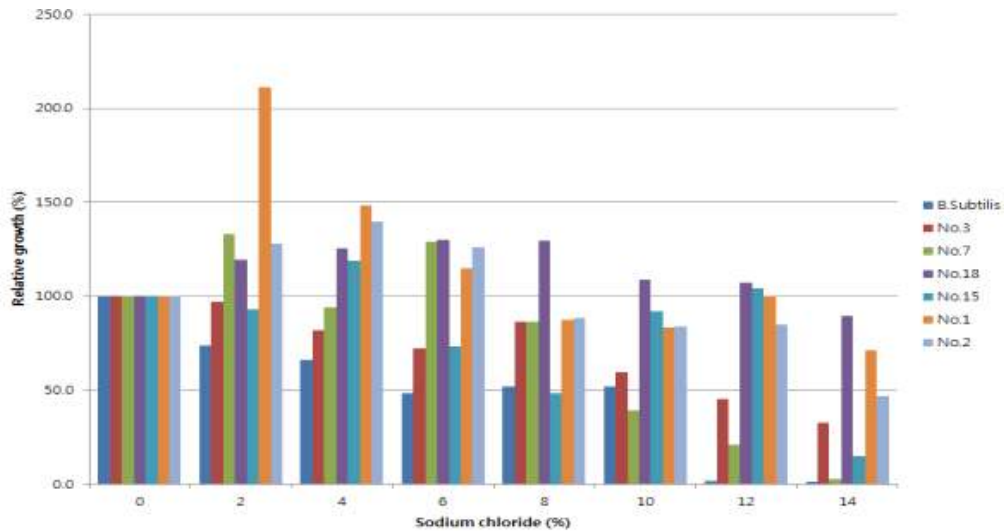


그림 41. 선택균주들의 내염성 평가

○ 선정균주를 이용한 통통마디 4일 발효시의 분해율

선정된 균주를 4일간 발효하여 미분해 고형물의 건조중량을 측정함으로 분해율을 계산함(그림 42). 균주 3, 7, 18의 경우 4일의 발효에서 열수가수분해물의 경우 분해율이 60%로 가장 낮았으며 18번 균주가 83%의 분해율을 가져 가장 많은 분해를 할 수 있는 균주임을 확인함.

구분	열수가수 분해	No. 3 발효	No. 7 발효	No. 18 발효
분해율 (%)	60	63	76	83
Filter 용이성	용이	용이	양호	어려움
여과 후 고형분 성상				

그림 42. 선정균주를 이용한 통통마디 4일 발효시의 분해율

○ 상기 균주 중 통통마디 분해도가 열수 가수분해보다 우수한 7, 18번에 대해 효소 활성 분석함(그림 43). 분석 결과, β -glucosidase, Esterase(C4), Leucine arylamidase, Naphtol- AS-BI- phospho hydrolase의 강력한 활성이 확인되었으며, 특히 β -glucosidase, Esterase(C4) 효소활성이 통통마디 분해에 중요하게 관련되는 것으로 판단됨. 최종적으로 통통마디의 열수 가수분해 및 발효에 의한 통통마디 분해시 생성되는 소금 결정의 구조를 비교한 결과 거의 유사함을 확인(그림 44). 결과적으로 염생균 발효에 의해 분해된 통통마디 유래 물질 결정 (소금포함)이 열수 가수분해와 차이가 없어 균주를 이용한 발효의 실제적 적용에 문제가 없을 것으로 판단됨.

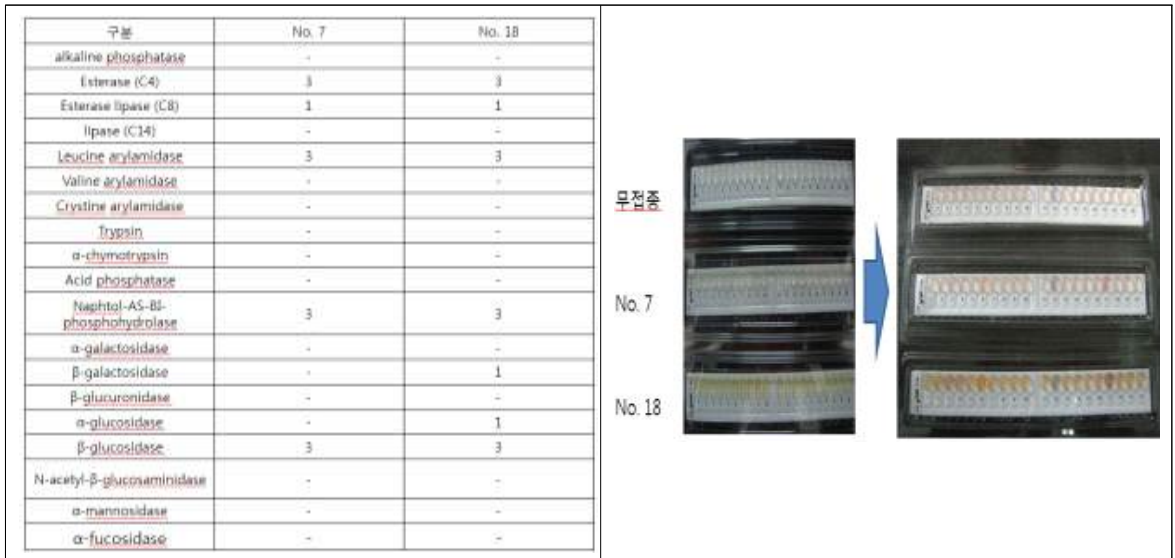


그림 43. 분리 균주 7, 8번에 대한 효소 활성 분석

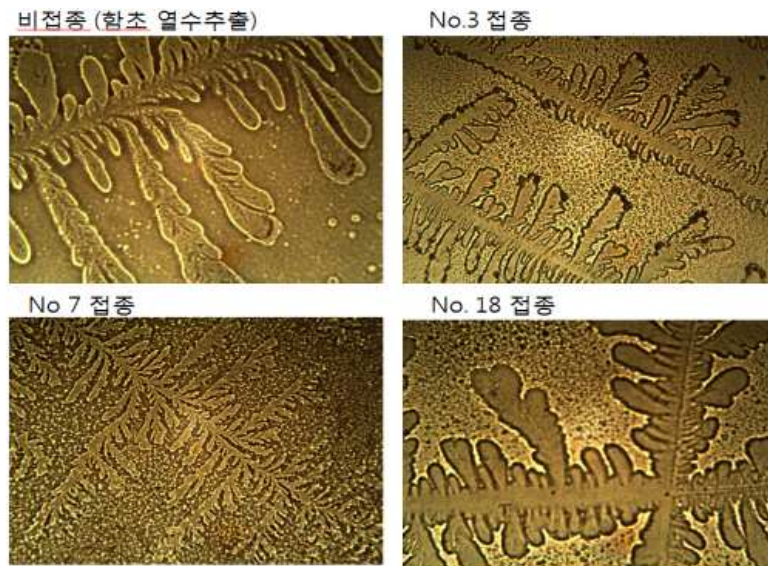


그림 44. 통통마디의 열수 가수분해와 선정 균주를 이용한 통통마디 발효에 의한 분해시 생성되는 소금결정의 구조

다. 통통마디의 발효, 효소처리 및 화학적 처리물의 유용성분 평가 및 기능성 평가

(1) 호염성 선정균주에 의한 생함초 발효액의 항산화 활성 평가

- 배양시기별 항산화 활성을 평가하여 발효에 의해 항산화 활성이 증가되는 균주를 선정하여 표19과 그림 45에 나타냄.

표 19. 배양시기별 항산화 활성 평가

균주 번호	8일째							18일째						
	DPPH	ABTS					Nitrite	DPPH	ABTS					Nitrite
	원액	원액	1/2 희석액	1/4 희석액	1/8 희석액	IC50 (%)	원액	원액	원액	1/2 희석액	1/4 희석액	1/8 희석액	IC50 (%)	원액
1	30.0	85.3	82.8	60.0	34.5	20.2	26.4	27.3	86.3	74.0	45.1	25.9	31.4	-30.6
2	29.1	85.7	83.1	39.9	24.2	30.9	-42.2	28.3	86.5	75.6	43.0	24.8	31.4	-80.7
3	33.7	78.0	39.5	22.9	14.7	63.7	36.3	52.0	68.4	42.1	21.3	16.1	68.4	27.6
4	27.4	85.9	71.2	69.0	38.4	17.6	42.2	27.6	86.3	67.8	36.8	27.6	35.0	33.3
5	32.7	85.6	84.0	35.0	20.3	32.6	-10.0	24.2	85.6	86.5	52.9	38.9	22.4	-64.5
6	29.5	85.7	72.1	38.8	23.2	33.4	49.2	35.7	85.6	59.7	28.9	17.8	41.9	11.3
7	28.4	83.4	87.4	34.8	21.7	32.2	9.6	37.2	83.8	85.4	52.6	34.1	22.5	-33.2
8	23.0	87.1	52.3	21.4	14.7	49.1	40.1	30.2	74.6	44.6	24.6	18.1	62.2	25.5
9	38.4	88.1	62.3	25.4	18.3	41.7	42.9	58.2	85.9	62.2	32.2	24.3	39.0	10.3
10	40.8	88.0	61.3	25.1	18.4	42.2	39.8	62.6	86.7	60.5	32.4	24.7	39.8	36.3
11	19.4	86.9	60.2	27.9	19.9	42.1	31.0	31.7	82.5	59.2	30.5	21.7	41.3	16.1
12	31.0	86.5	48.5	24.4	17.2	54.9	35.2	53.4	83.2	59.0	28.7	22.6	41.8	1.2
13	34.6	85.7	50.7	23.5	15.7	49.7	31.3	48.5	78.9	51.0	26.0	20.8	48.3	23.5
14	30.6	87.8	56.1	26.8	18.1	44.5	46.8	60.1	84.3	68.4	31.6	27.6	35.9	33.8
15	11.6	81.0	80.9	49.4	31.2	24.2	48.5	18.1	86.2	79.8	55.5	33.7	21.6	32.9
16	37.8	88.0	54.2	23.7	13.5	47.1	46.4	56.8	83.3	58.9	27.3	21.8	42.3	4.3
17	36.9	87.4	55.5	18.0	12.9	46.4	30.6	37.0	85.4	60.8	25.8	23.1	42.4	20.8
18	22.2	82.0	86.3	36.4	22.3	29.9	12.4	43.7	83.5	84.9	53.3	43.1	20.9	3.1
19	19.4	87.5	55.3	22.1	15.5	46.6	29.9	55.3	84.8	66.5	31.0	29.8	38.2	26.3
20	18.7	86.6	57.1	12.8	8.2	46.0	-106.0	21.3	79.0	61.9	27.3	19.5	40.9	-138.8
21	10.6	85.7	53.1	16.8	9.1	47.8	-122.4	24.2	83.0	66.0	28.6	20.4	38.4	-109.9
22	29.6	87.8	57.9	26.7	16.9	43.7	42.2	65.4	83.8	69.8	31.5	25.4	35.6	26.3
23	13.4	86.9	56.7	25.8	12.1	44.9	-142.7	27.6	85.2	69.0	30.0	23.7	36.4	-212.2
Control1	37.4	87.7	52.3	19.2	11.8	49.9	34.9	52.9	77.9	57.6	26.3	28.7	44.1	20.4
Control2	-	87.7	51.9	21.4	13.9	49.5	40.5	48.8	80.6	60.2	29.3	22.3	41.0	23.0



그림 45. 호염성 선정균주에 의한 생합초 발효액의 항산화 활성 평가 비교

(2) 선정된 호염성 균주에 의한 생함초 발효액의 항혈전 활성 평가

○ 배양시기별 항혈전 활성 평가

발효에 의해 항혈전 활성이 증가되는 균주를 선정하였으며, 혈전 생성 활성이 강화된 것을 확인함. 이 경우에는 지혈제 용도로 개발 가능하며, 내인성, 외인성 지혈과정의 연구에 사용 가능함(표 20).

표 20. 23종 호염성 균주의 통통마디 발효액과 열수분해, 알카리 가수분해액의 항혈전 활성 평가 결과

Anti-coagulation			pro-coagulation		
Sample	농도 (ul)	TT	Sample	농도(ul)	aPTT
Water	-	1.00±0.02	Water	-	1.00±0.01
5	5	1.11±0.00	3	2.5	0.70±0.02
	20	2.26±0.13		5	0.56±0.02
7	5	1.26±0.04		10	0.54±0.02
	20	2.02±0.01		20	0.60±0.00
15	5	1.12±0.03	19	2.5	0.51±0.00
	20	1.71±0.04		5	0.57±0.03
18	5	1.41±0.06		10	0.71±0.04
	20	2.21±0.04		20	0.76±0.01
24 (열수분해)	5	0.49±0.69	22	2.5	0.61±0.01
	20	0.62±0.88		5	0.42±0.04
marin broth 배지	10	1.22±0.08		10	0.58±0.00
marin broth 18	10	1.09±0.01		20	0.66±0.05
			24	2.5	0.57±0.04
				5	0.60±0.03
				10	0.65±0.03
				20	0.76±0.05
			marin broth 배지	10	1.01±0.10
			marin broth3	10	1.04±0.06
			marin broth22	10	1.01±0.06

3. 통통마디로부터 고부가가치 기능성 조미소재의 최적 공정 개발 및 제품화

가. 전임상 시험을 통한 발효 조미소스의 안전성 및 기능성 검증

(1) 조미소스의 성분 및 기능성 검증

○ 구강 섭취되는 유산균은 위와 십이지장을 통과하여 장에 도달하게 되므로 pH 3 이하의 조건에서 생존이 가능한 유산균만이 장에 도달하여 기능성을 나타낼 수 있음. 각 균주의 인공 위액에 대한 내성을 측정하기 위해 pH 2.5의 산성 조건에 각 균주를 접종하여 2시간 후의 생존수를 측정함. 각 균주의 내산성을 비교한 결과 *L. plantarum*-PNU가 64.5%로 가장 높은 생존율을 나타냄(표 21). *L. plantarum* 균은 김치발효에서도 후반기에 우점하는 균으로 내산성이 높은 것으로 알려져 있음(Lee 등, 2016).

표 21. 유산균주의 내산성 및 내담즙성 비교

Strain	Survival (%)	
	pH 2.5 at 2h	at 48h with 0.3% Oxgall
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> SRCM195	44.5	54.3
<i>Lactobacillus plantarum</i> KCTC3108	46.6	76.6
<i>Lactobacillus plantarum</i> -PNU	64.5	79.8
<i>Lactobacillus casei</i> KCTC3109	41.7	29.7
<i>Lactobacillus fermentum</i> KCTC3112	43.6	59.8
<i>Lactobacillus reuteri</i> KCTC3594	58.5	41.1
<i>Lactobacillus rhamnosus(LGG)</i> KCTC5033	55.7	40.9
<i>Lactobacillus plantarum</i> KCTC3099	23.5	69.4

- 통통마디 유산균 발효액의 섭취 안전성 평가를 위해 중금속 및 잔류농약검사를 실시함. 잔류농약은 NICEM에서 다성분 동시분석법(식품의약품안전처 고시 제 2015-23호)를 따랐으며 320종에 대하여 모두 검출한계 미만의 결과를 얻음. Hg, Pb, As, Ni, Cd, Se, Sn의 중금속 분석에 대하여도 모두 검출한계 미만의 결과를 얻음

(2) 대장암 세포주를 이용한 통통마디 발효액의 대장암 활성 평가

- AOM/DSS로 유발되는 대장암 모델의 체중 변화 및 통통마디 안전성 검증
AOM을 복강 내 주사하고 DSS를 음용수에 용해시켜 대장암을 유발시키는 동물 모델은 대장암 연구에서 보편적으로 적용되고 있는 모델임 (Robertis 등, 2011). 일반적으로 DSS를 투여하는 기간에 체중 감소가 관찰되는데, 이는 DSS로 유발되는 대장 염증 반응에 의한 것으로서 본 연구진이 수행한 실험 중에도 마찬가지로 관찰됨. 그림 46에서, 대장암을 유발시키지 않은 con그룹은 전 실험 기간 중 고르게 체중이 증가하였으나, 대장암을 유발시킨 그룹에서는 DSS투여 후 현격한 체중감소가 관찰됨. 발암 억제제를 위해 처치한 통통마디 마쇄물 또는 통통마디 발효액을 처치한 그룹에서도 특이적인 체중감소가 관찰되지 않는 것으로 보아 통통마디 마쇄물이나 통통마디 발효액의 독성을 없는 것으로 판단됨
- AOM/DSS로 유발되는 대장암 모델에서의 통통마디 마쇄물의 항암 활성
실험 방법에서 기술하였듯이 안락사 후, 대장 조직을 절제하여 사진에서와 같이 대장의 길이를 측정하고 용종의 개수를 파악함(그림 47). 용종의 크기가 2mm 이하인 경우 일반적으로 adenoma정도의 암 진행 정도를 보이며, 용종의 크기가 4mm 이상인 경우 adenocarcinoma나 carcinoma로 분류할 수 있게됨 (Lee 등, 2012). 병리학적인 소견없이 용종을 암이라고 언급할 수는 없으므로 본 보고서에서는 AOM/DSS로 유발된 대장 조직에서 관찰되는 신생물에 대해 용종이라는 용어를 사용함. 대장 조직의 길이는 DSS 투여 후 현저히 줄어들게 되는데, 이는 DSS가 유발하는 극심한 대장 염증에 의한 것으로 알려짐 (Suzuki 등, 2006)

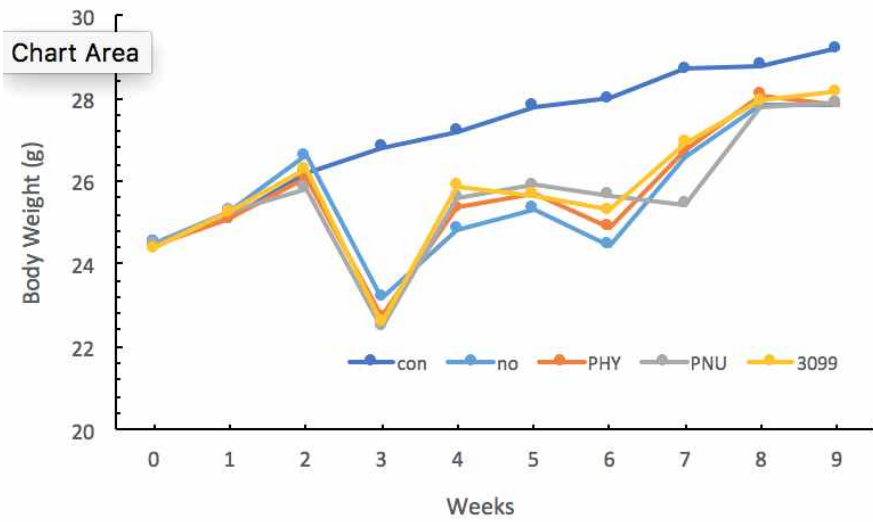


그림 46. AOM/DSS로 유발된 대장암 모델 실험 동물 체중 변화

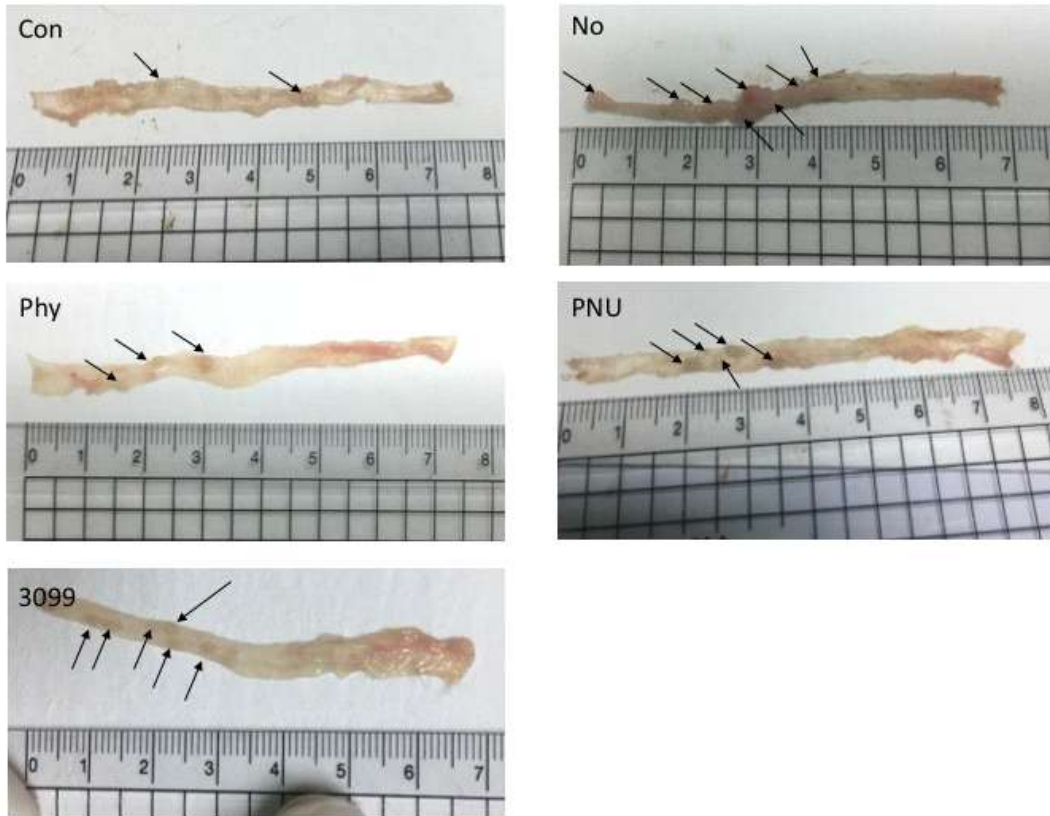


그림 47. 각 실험군의 대장 조직 및 용종

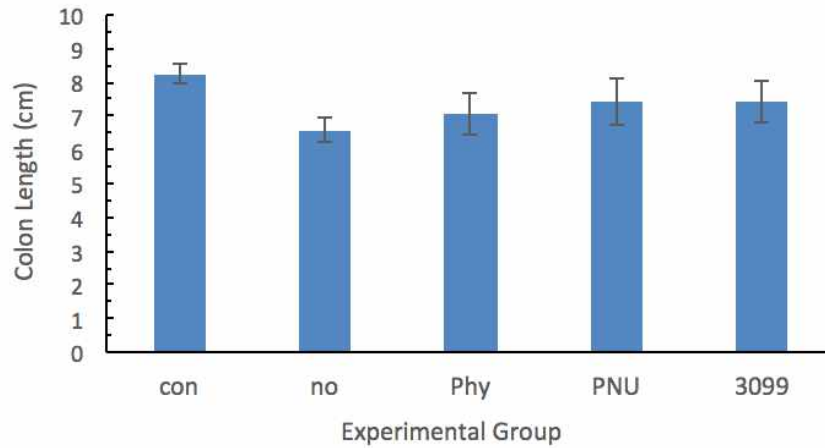


그림 48. 통통마디 마쇄물 및 통통마디 발효액에 의한 대장 길이 변화

대장암을 유발시킨 con 그룹에 비해 대장암을 유발시키고 발암 억제 물질을 투여하지 않은 no 그룹에서 대장 길이의 현저한 감소가 관찰됨. 이에 비해, 통통마디 마쇄물을 투여한 phy 그룹, 통통마디를 각각 다른 균주로 발효한 PNU와 3099 그룹에서 no 그룹 대비 대장 조직의 길이가 상대적으로 덜 줄어든 것을 확인함(그림 48) 병리학적 분석을 하여도 carcinoma로 분류될 수 있는 4mm이상의 큰 용종은 통통마디 마쇄물 또는 발효액을 투여한 실험군에서 현저히 감소하는 것을 확인할 수 있었음 (그림 49)

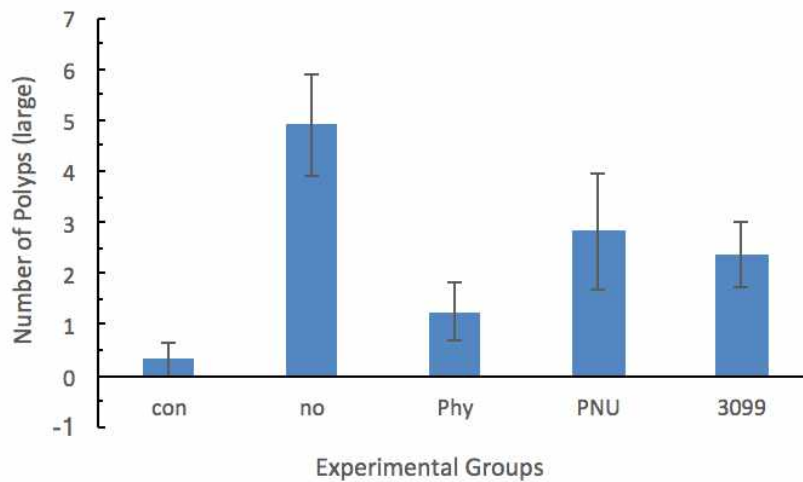


그림 49. 통통마디 마쇄물 및 발효액의 4mm 이상의 용종 억제능

특히, 통통마디 마쇄물은 큰 용종의 생성을 억제하는 능력이 다른 발효액에 비해 매우 큼을 확인할 수 있었음.

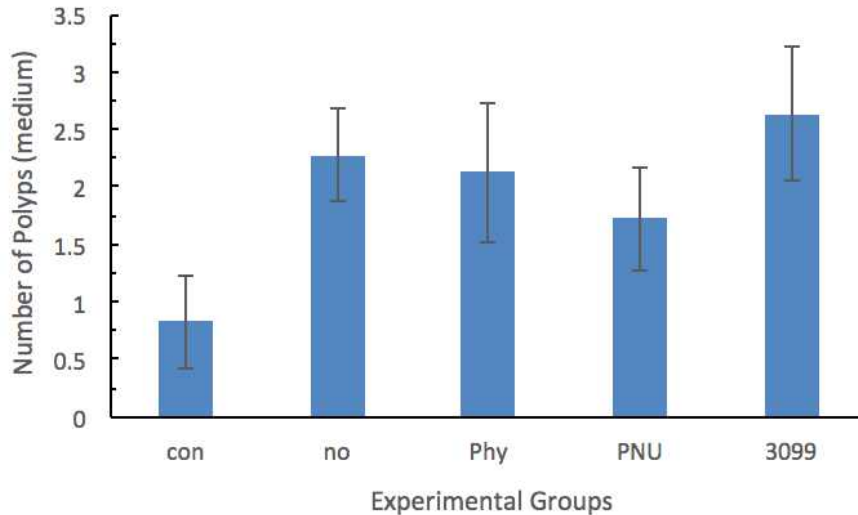


그림 50. 통통마디 마쇄물 및 발효액의 2-4mm 용종 억제능

통통마디 마쇄물과 발효액의 중간 크기 용종의 억제능은 큰 용종에 비해 상대적으로 약한 것으로 관찰됨. 하지만, 이미 크기가 커져 있어야 하는 용종의 크기를 상대적으로 감소시켰다는 점에서 통통마디 마쇄물 및 발효액의 항암 효과는 유효하다고 봄. 즉, 이러한 항암 소재를 복용하지 않은 경우, no 그룹과 같이 매우 큰 용종으로 진행되는데 비해 상대적으로 크기가 작은 용종으로 암화(carcinogenesis)를 늦추는 효과가 있다고 볼 수 있음(그림 50)

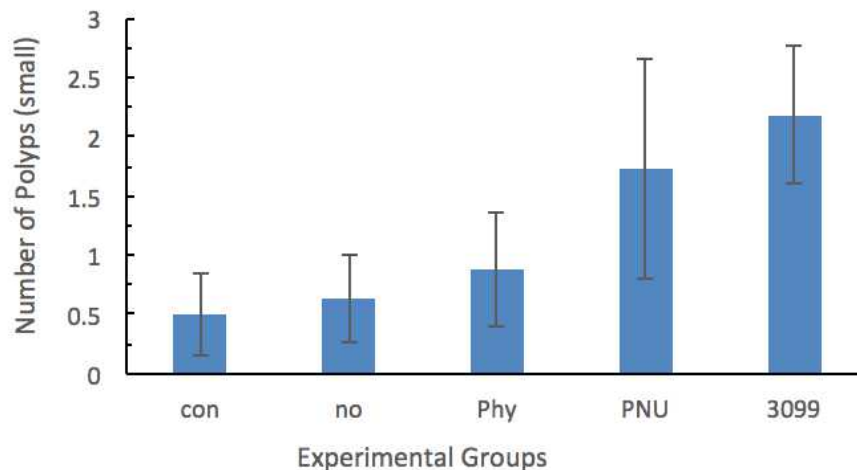


그림 51. 통통마디 마쇄물 및 발효액의 2mm이하 용종 억제능

2mm 크기의 용종은 그림 51에서 보듯이, 대장암을 유발시키지 않은 실험군과 대장암을 유발시킨 실험군과의 큰 차이를 볼 수 없음. 이는 작은 용종은 장기간 사육함으로써 노화의 과정으로 발생하는 신생물이라고 볼 수 있음. 이 때, 통통마디 마쇄물은 타 실험군 대비 큰 차이가 없었으나, 발효액을 투여한 실험군에서는 상대적으로 증가된 수의 용종이 관찰됨. 이는 AOM/DSS와의 상관관계일 것으로 유추되나 보다 정확한 결과를 얻기 위해서는 대장암을 유발 시키지 않은 동물을 대상으로 아무런 처치를 하지

않은 대조군 대비 통통마디 발효액의 용종 유발 여부에 대한 확인을 할 수도 있음. 결론적으로, 통통마디 마쇄물과 발효액 모두 항암 활성이 관찰되나 특히 마쇄물은 현저히 매우 뛰어난 활성을 갖고 있음을 확인할 수 있었으며, 이는 carcinoma로 의심되는 큰 크기의 용종 발생 억제능으로 설명할 수 있음. 또한, 중간 크기의 용종이 상대적으로 많이 발생하는 것은 이들 통통마디 마쇄물과 발효액이 암의 생성 자체를 완벽히 억제는 못 하지만 상대적으로 진행 속도를 늦추고 있는 것으로 해석됨. 마지막으로 작은 크기의 용종은 대장암을 유발시키지 않은 실험군에서도 관찰되는 것으로서 장기간 사육에 의한 노화 과정의 일부로 볼 수 있음.

(3) 통통마디 발효액의 동물 모델에 대한 장내 미생물 군총 변화 관찰

최근 대장암 등 다양한 장내 질병과 장내 균총과의 상관관계에 대한 관심이 증대되고 있음. 이에 본 과제에서는 대장암 억제 활성을 보인 통통마디 마쇄물 및 발효액으로 유발되는 장내 미생물 군총 변화에 대한 연구를 수행하였음. 실험 기간 중 분변을 채취하여 천랩에 NGS 분석을 의뢰하여 데이터를 얻음(그림 52)

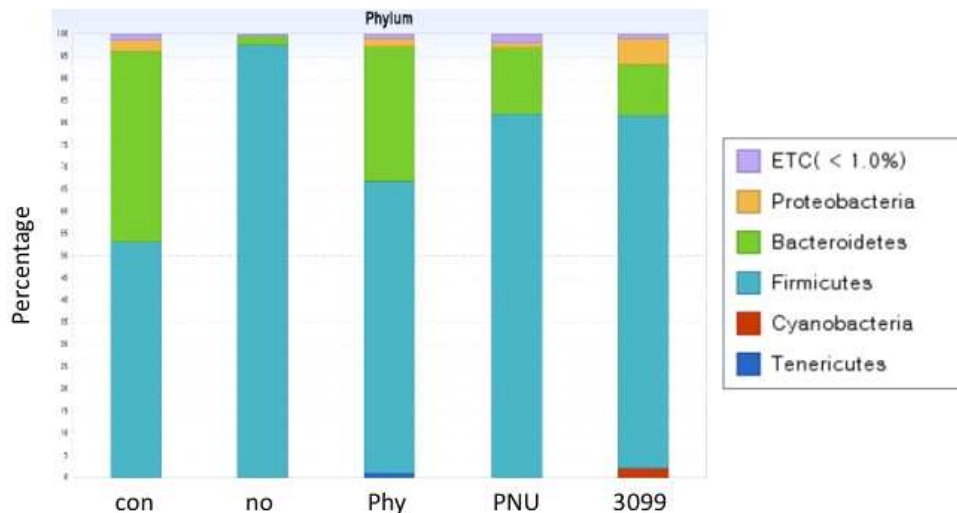


그림 52. 문(phylum) 수준에서의 분류학적 조성

문(phylum) 수준에서의 분류학적 조성을 살펴보면, Firmicute 속의 비율이 대부분을 차지하고 있음. 이 firmicute 속에는 Bacillus, Listeria, Staphylococcus, Streptococcus, Enterococcus와 Clostridium이 속해 있음. AOM/DSS로 대장암을 유발시킨 no 실험군은 대부분 firmicutes로 이루어져 있어 미생물 군총의 조성이 상대적으로 제한되어 있음을 알 수 있음(그림52). 속(genus) 수준의 분류학적 조성에서는 gram-negative anaerobic bacteria인 bacteroide가 기타 다른 속 들을 제외하고 가장 많은 비율을 차지함. bacteroide 속은 포유동물의 장내 미생물군총의 대부분을 차지하고 있는 속으로 포유동물이 섭취한 음식물로부터 유래된 당류를 이용하여 에너지원으로 사용하는 것으로 알려져 있음. 그런데, 대부분을 차지하는 bacteroide류가 AOM/DSS로 대장암을 유발시킨 no 실험군에서는 상대적으로 다른 실험군에 비해 그 비율이 매우 줄어들었음을 확인할 수 있음(그림 53)

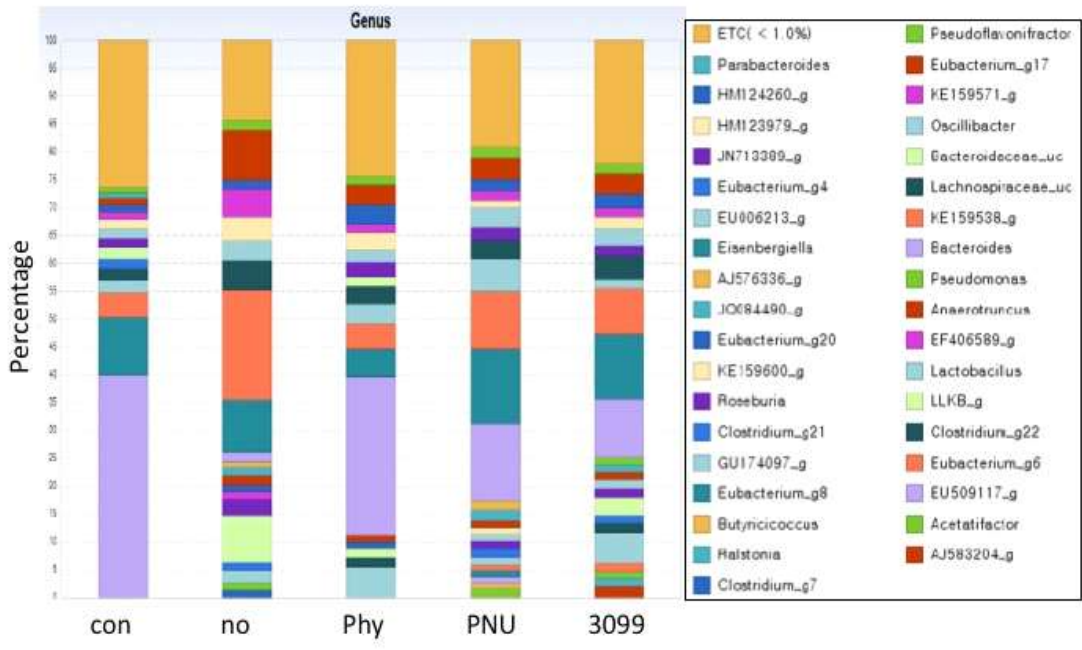


그림 53. 속(genus) 수준에서의 분류학적 조성

이는 발암 물질로 인하여 미생물 균총의 변화가 유발되었고 이러한 비 정상적인 균총의 조성이 장내 환경을 교란시켜 대장암의 발생 및 진행을 더욱 촉진 시켰을 것이라는 추론을 가능케 함. 이와 관련하여 실험 기간에 따른 용종의 생성 정도와 그에 따른 장내 미생물 균총의 변화를 다양한 시간 별로 관찰하는 실험을 수행하여 보다 과학적인 결과를 유추할 수 있을 것으로 사료됨

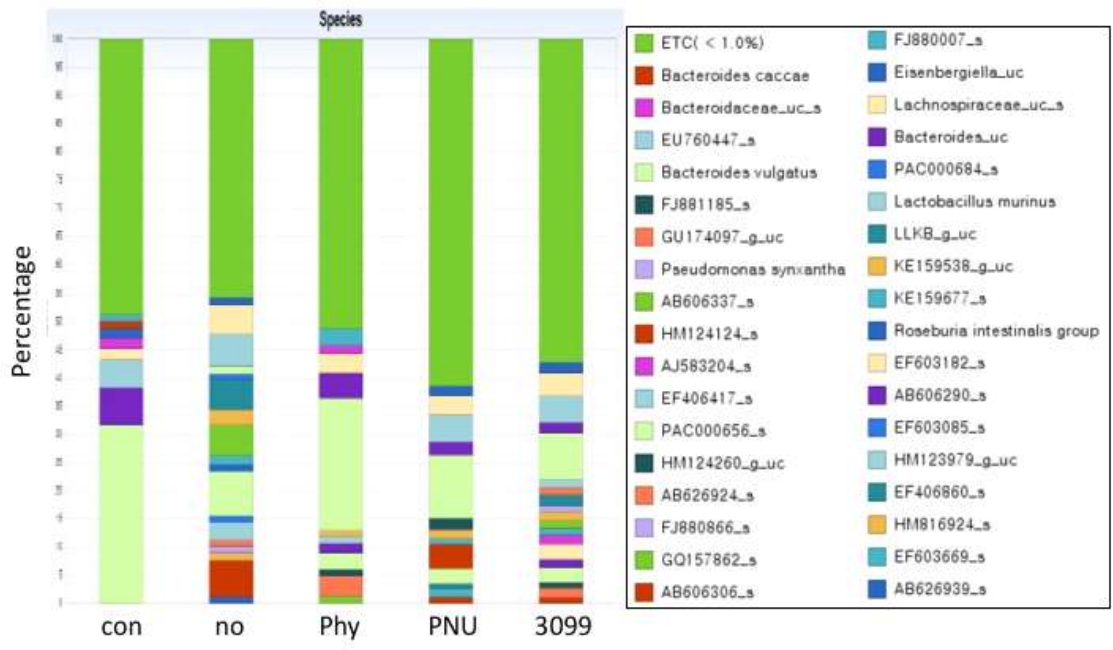


그림 54. 종(species) 수준에서의 분류학적 조성

종 수준에서의 미생물 군총 분석은 보다 다양한 균주 조성의 정보를 주고 있음. 하지만, 각 종의 역할 등에 대한 연구는 보다 오랜 시간을 두고 인과 관계를 찾아야 할 것임(그림54). Rarefaction curve는 샘플의 양이 증가함에 따라 그 안에 속해있는 종의 수가 늘어남을 보여주는 곡선임. 본 연구진의 샘플은 모두 시퀀스 reads 수가 증가함에 따라 OTU(operational taxonomic units)의 수가 증가함을 보여주고 있음(그림 55). 초기 read 수가 증가 시에는 OTU의 수가 기하급수적으로 증가하다가 read수가 늘어나면서 steady-phase로 OTU의 수가 안정화됨. 이 경우에서도 no 실험군이 read 수의 증가 대비 종의 수가 상대적으로 적게 증가함을 확인할 수 있음.

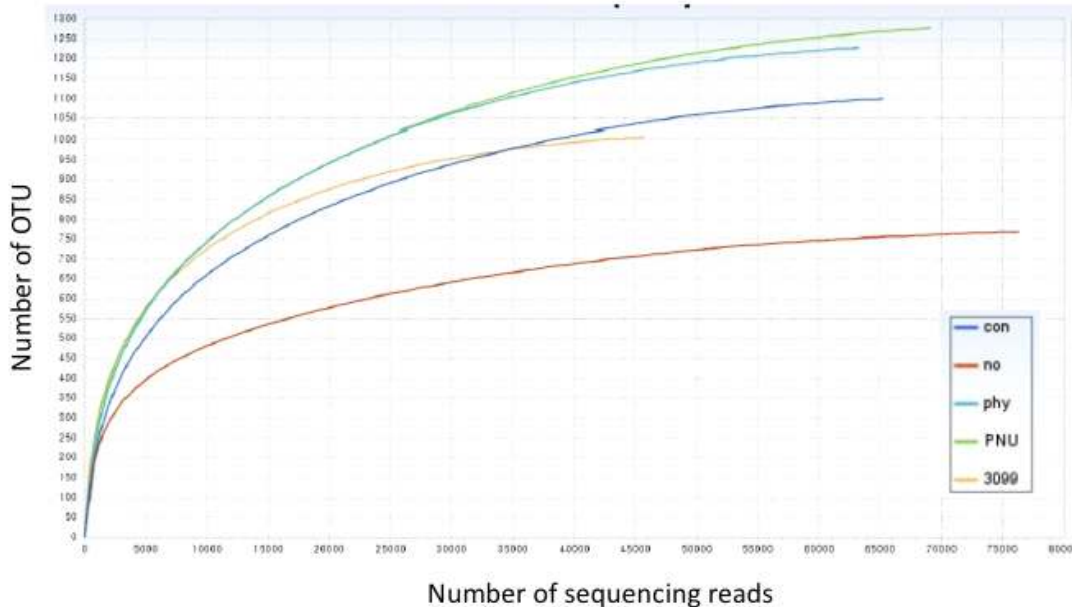


그림 55. Rarefaction curve

나. 통통마디 마쇄물을 주원료로 한 조미소재의 최적 생산 공정 확립

(1) 통통마디로부터 조미소스의 생산을 위한 최적 생산 공정

- 12월에 파종하여 9월까지 자란 통통마디는 잎과 줄기만을 선별하여 채취함. 채취한 통통마디 잎과 줄기는 고압살수 장비를 이용해 수세하는 전처리 과정을 통과함. 이후 자동절단기를 통과하여 10 cm 길이로 파쇄하여 추출시 표면적을 넓혀 열처리를 용이하도록 하고 진공 추출기에서 105℃로 5시간 추출함. 추출액은 바로 농축으로 이어져, 농축조에서 염도 약 20으로 농축되며 발효조로 옮겨 배양실에서 따로 배양한 seed 균주를 접종하고 각 균주별 배양시간과 온도에 따라 발효를 진행함. 유산균, 효모, *C. glutamicum* 등의 균주로 발효 후 원심분리하여 균주를 분리하고 80℃에서 30분간 살균을 실행함. 농축조로 옮겨 염도 16까지 농축하고 고온순간 살균을 거쳐 병입 하는 대량생산 공정을 확립함(그림 56).



그림 56. 통통마디 조미소스의 대량 생산 공정

다. 소스 소재의 관능 및 기능성 평가에 의한 천연소스 제형 개발

(1) 통통마디 추출물을 이용한 유산균 발효

- 통통마디 추출물을 Atago 염도계 염도 5의 농도로 희석하고 glucose 2%, yeast extract 0.5%, beef extract 0.5%로 유산균 배지를 제작함. Lactic acid bacteria seed를 1%씩 배양 배지에 접종 후 37°C에서 48시간 배양하였음. 배양액을 원심분리하여 크로마토그래피 방법으로 유기산을 분석한 결과 표 22와 같이 유산균 8종 모두 oxalic acid의 양은 비슷한 수준이었으며 이는 탄수화물 대사의 중간대사체로서 생성되었음을 알 수 있음. 균주마다 특이하게 다른 것은 lactic acid와 acetic acid의 양인데 관능적으로 특 쏘는 불쾌한 냄새를 내는 acetic acid의 양이 적게 생성되고 상쾌한 향미를 내는 lactic acid가 많이 생성된 발효산물을 관능평가를 통하여 선별하였음. 관능성 평가는 20명을 대상으로 5점 척도로 평가하였으며, 매우 나쁘다 1점, 조금 나쁘다 2점, 보통이다 3점, 조금 좋다 4점, 매우 좋다 5점으로 표기하도록 하여 4.5점 이상의 전체적 관능성이 우수한 세 균주를 선별하였음. 선별된 유산균은 *Lactobacillus plantarum* KCTC3108, *Lactobacillus plantarum*-PNU, *Lactobacillus plantarum* KCTC3099 이며, 이들 세 균주는 위탁연구기관에서 대장암 저해 효과를 확인하는 데에 사용된 균주와 동일함.

표 22. 통통마디 추출물에 유산균 발효 후 생성된 유기산 분석

Strain	Lactic acid	Acetic acid	Oxalic acid
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> SRCM195	2801.8	120.9	342.3
<i>Lactobacillus plantarum</i> KCTC3108	6886.8	194.9	342.7
<i>Lactobacillus plantarum</i> -PNU	7108.9	160.1	343.1

<i>Lactobacillus casei</i> KCTC3109	5969.9	113.1	351.7
<i>Lactobacillus fermentum</i> KCTC3112	4788.0	306.3	344.7
<i>Lactobacillus reuteri</i> KCTC3594	6481.2	284.0	349.6
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> (LGG) KCTC5033	7130.3	130.5	345.3
<i>Lactobacillus plantarum</i> KCTC3099	7022.5	172.3	354.1

(2) 분말상 제형 개발 및 포장 방법의 다각화에 따른 편의성 증대

- 통통마디 추출물에 증자한 콩을 넣어 *A. oryzae* 로 100일간 발효한 유로소스를 원심 분리하여 상등액을 모음. 상등액의 가용성고형분 함량 대비 5% 양의 활성탄을 넣고 80℃에서 30분간 100 rpm으로 교반하여 반응 후 원심분리 및 membrane filter로 활성탄을 제거하였음. 활성탄을 이용하여 쓴 맛을 내는 펩타이드 및 아미노산, 기타 이 미취를 생성하는 유기물을 제거한 뒤 분무건조기를 이용하여 분말화 함. 분말은 보존 성을 위해 60℃ 건조기에서 수분함량 4% 이하로 건조한 뒤 무균적으로 병입 하였음. 과립형태는 분말을 이용하여 유동층 건조 방식으로 제작하였음. 1인 가구 증가 등으 로 인해 대용량 식자재보다는 용량을 줄인 소비형태가 증가함에 따라, 분말 및 과립 형태의 소스를 150g 용량의 유리병에 포장하여 대용량 식자재 구매에 대한 부담을 줄이고 소비자로 하여금 빠른 소비를 유도하여 공기중 노출시 산화되어 변색 또는 멍치는 현상을 줄이고자 함. 캠핑 등의 이동시 가볍고 파손의 우려가 적도록 편리성 을 부여하여 1회용 파우치 포장용으로 포장의 변화를 줌(그림 57).



그림 57. 파우더 타입과 그레놀 타입 제형 및 병 포장과 1회용 파우치 포장제품 개발

라. 통통마디 마쇄 가수분해산물을 주성분으로 하는 천연 소스의 제품화

- (1) 아미노산, 당질, 탄수화물, 단백질, 지질 및 식이섬유 등의 구성물에 의한 풍미 및 기능성이 우수한 조미료 개발
 - 통통마디 추출물에 증자한 콩을 넣어 *A. oryzae* 로 100일간 발효한 유로소스를 원심 분리하여 맑은 상등액의 영양분석을 실시함. 영양분석의 기본 항목을 분석한 결과 조

단백질 8.33% 및 식이섬유 1.38%, NaCl 함량 약 14% 임을 확인하였음. 단백질 중 일부는 감칠맛 등의 맛이 풍부한 아미노산류로서 소스의 풍미와 맛에 중요한 역할을 함. 통통마디 콩발효 소스는 당질, 탄수화물, 단백질, 지질 및 식이섬유 등이 풍부한 조미료임을 확인함(표 23)

표 23. 조미소스의 영양분석표

Analysis Category	Nutritional Value
Calorie (Kcal/100g)	58.98 Kcal/100g
Carbohydrate (%)	6.79 %
Crude Protein (%)	8.33 %
Crude Fat (%)	0.14 %
Moisture (%)	70.12 %
Ash (%)	14.62%
Sodium (mg/100g)	5,523.43 mg/100g
Dietary Fiber (%)	1.38 %

마. 유럽형 소금무첨가(No Salt-Added) 기능성 조미소재의 최적 공정 개발 및 제품화

(1) 산미, 향미, 염도, 감칠맛, 알코올 성분 등을 고려한 유럽형 천연 소스 공정 개발 및 제품화

○ 통통마디 추출물에 콩원료를 첨가하고 *A. oryzae* 로 발효한 유로소스의 미네랄 분석을 실시함. 그림 58에서 보는 바와 같이 Na과 K의 비율이 약 5:1로서, 천일염의 약 100:1 비율과 비교한다면 나트륨과 칼륨의 적절함 섭취가 동시에 이루어 질 수 있는 이상적인 미네랄 밸런스를 가진다고 볼 수 있음. 뿐만 아니라 마그네슘과 칼슘의 함량도 우수함. 이는 나트륨만 과다 섭취할 경우 발생하는 다양한 질환들로부터 보다 안전하게 나트륨을 섭취할 수 있는 소스임을 알 수 있음.

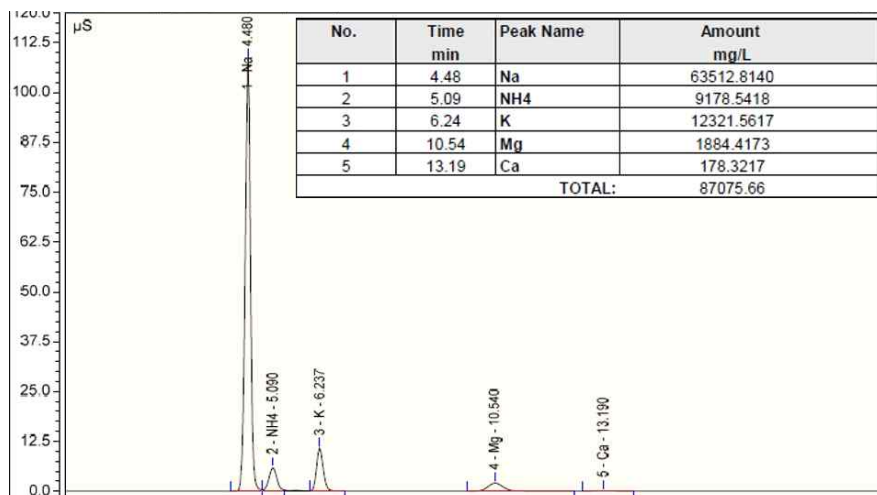


그림 58. 유럽형 조미소스의 미네랄 분석 결과

(2) 유럽형 ‘감칠맛’ 이 증대된 천연 조미소스 공정 개발 및 제품화

○ *Aspergillus oryzae* 발효 후 *Zygosaccharomyces ruxii* 를 이용하는 후발효로 glutamate 뿐 아니라 GMP, AMP 등 핵산계열 발효산물을 얻어 감칠맛을 증대시킨 천연 발효 조미소스로 개발하고자 함. *C. glutamicum*으로 4일간 발효 후 발효액 내에 남은 균 발효 향 등의 이미지를 *Zygosaccha. ruxii* 1063 및 293으로 발효 후 사과향이 감도는 향긋한 향으로 바뀌는 것을 확인함(그림 59). 또한 감칠맛을 높여주는 glutamic acid의 양이 약간 증가하였으며 glutamate와 상승작용 하여 맛난 맛을 끌어내는 IMP 및 GMP의 양이 증가함을 HPLC 분석으로 확인함(그림 60). 통통마디 발효액 자체의 염도 때문에 효모의 증식 이후 따라서 *C. glutamicum*을 발효시에는 단독 발효하기보다는 발효취 등의 이미지 등을 상쇄할 수 있으며 감칠맛 성분인 핵산 계열 물질을 생성하는 *Zygosaccha. ruxii* 1063 또는 293을 발효 후기에 첨가하여 감칠맛 뿐 아니라 천연의 감미로운 향을 부여하는 2단 발효가 우수함을 확인함. *Zygosaccha. ruxii* 1063 과 293을 각각 단독으로 사용시, 1063보다는 203의 발효에서 균 발효취가 거의 없고 상쾌하며 감미로운 향미를 내는 것을 확인하여 이후의 향미 증진을 위한 후 발효의 균주로는 *Zygosaccha. ruxii* 293을 사용하기로 함.

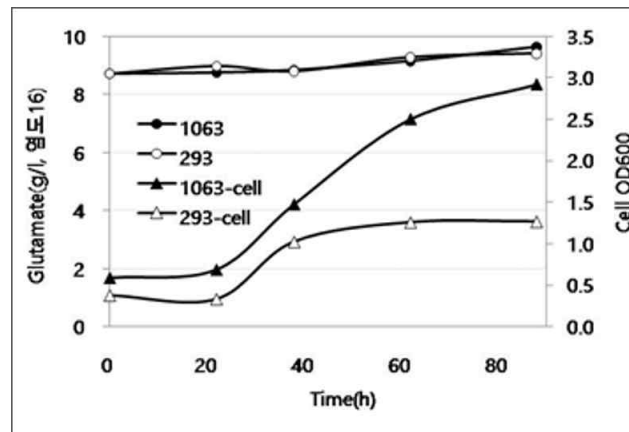


그림 59. *Corynebacterium glutamicum* 발효에 의한 glutamic acid 생성

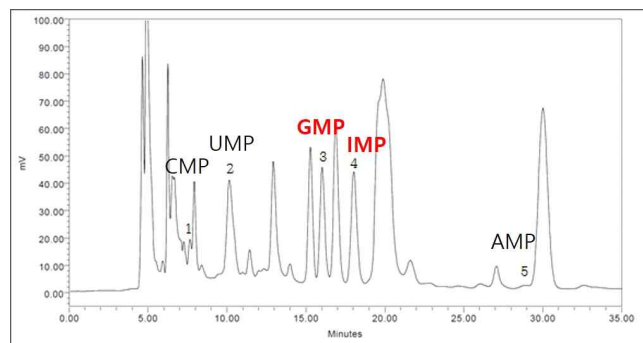


그림 60. *Zygosaccharomyces ruxii* 발효에 의한 핵산 생성

바. 통통마디 마쇄물 및 발효 산물의 기능성 유효성분 및 작용기전 규명

(1) 발효식품 유래 고 AGI 활성을 나타내는 *B. velezensis* K26 균주 분리

- 통통마디 마쇄물의 미생물 발효를 유도하고 이를 통해 기능성 발효식품 및 식품소재로의 개발 가능성을 높이고자 전통발효식품 유래 기능성 미생물의 분리를 시도하였음. 발효식품 유래 미생물 중 종균으로의 활용 가능성을 열어두고자 젖산균 및 *Bacillus* 유래 미생물에 초점을 맞추었으며 본 연구과제에서는 특히 발효식품 유래 *Bacillus* 균주에 목적을 두고 미생물 분리를 시도하였음
- 국내 대표적인 전통발효식품 중의 하나인 된장으로부터 100여종의 미생물을 분리하였으며 본 연구과제에서 목적하는 기능성인 AGI 활성을 갖는 미생물을 재분리하고자 상기 1차로 분리된 100여종의 미생물을 바탕으로 AGI 활성 스크리닝을 진행하였음. 약 10여종의 미생물이 60% 이상의 고 AGI 활성을 나타냈으며 이중 K26 균주의 AGI 활성(73%)이 가장 높게 나타나 K26 균주를 향후 통통마디 마쇄물의 발효를 유도하기 위한 미생물로 선정함
- 최종 선정한 K26 균주의 정밀한 genotypic 특성을 이용한 동정을 위하여 16S rRNA gene sequence 분석을 진행함. 그 결과 K26 균주는 *B. velezensis* CR-502^T와 99.93%의 상동성을 보이는 균주로 동정되었으며(그림 61), 상기 *B. velezensis* K26 균주를 최종적으로 향후 통통마디 마쇄물의 미생물 발효를 위한 발효균주 활용하여 AGI 생리활성을 갖는 기능성 발효식품 소재로의 적용 가능성을 유도하고자 함
- 상기 *B. velezensis* K26 균주의 whole genome sequencing을 수행하여 그 결과를 NCBI (National Center for Biotechnology Information; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)에 등록하여 전체 genome의 accession number를 CP023075로 부여받음

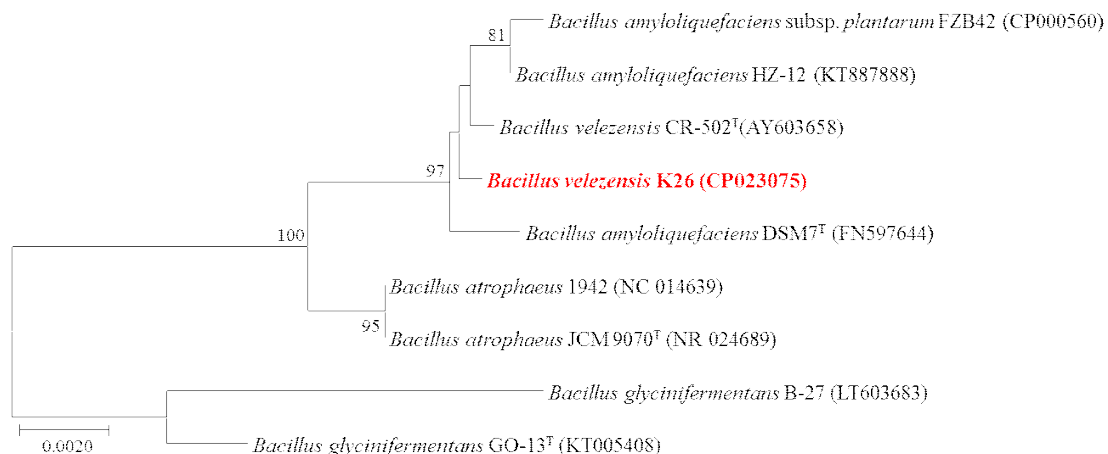


그림 61. *B. velezensis* K26 및 reference 균주의 16S rRNA gene 염기서열 기반 phylogenetic 분석

(2) *B. velezensis* K26의 AGI 활성 증진을 위한 배지 최적화

- 최종 선정된 *B. velezensis* K26 균주의 AGI 활성을 높이고 향후 통통마디 마쇄물의 발효를 더욱 유도하기 위한 추가 배지 성분을 선정하고자 다양한 탄소원과 질소원들의 추가가 AGI 활성에 미치는 영향을 조사함.
- 우선 각 탄소원을 기본배지(GY; 1% glucose, 1% yeast extract, 0.05% KH_2PO_4 , 0.05% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, w/v)에 1% 농도로 glucose 대신 추가한 뒤 37°C, 220rpm 조건에서 5일 동안 배양함. 그 결과 sucrose가 78.25%로 기본배지의 탄소원인 glucose보다 약 7%이상 높은 AGI 활성을 나타냄(그림 62).

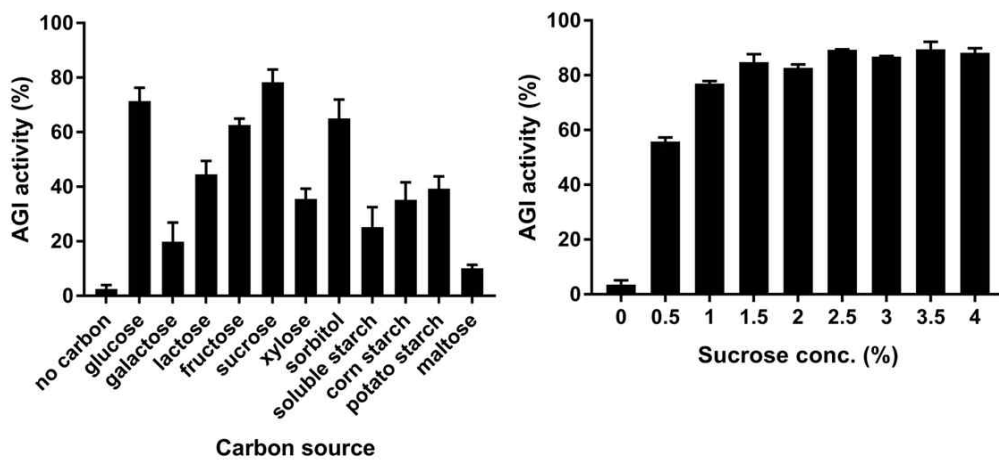


그림 62. *B. velezensis* K26의 탄소원별 및 sucrose 농도별 AGI 활성

- 상기 최적화된 2.5%의 sucrose가 탄소원으로 첨가된 기본배지에 1%의 농도로 각 질소원을 yeast extract 대신 추가한 뒤 37°C, 220rpm 조건에서 5일 동안 배양하여 최적 질소원을 선정하였고 그 결과 yeast extract가 가장 높은 활성을 나타냄(그림 63).

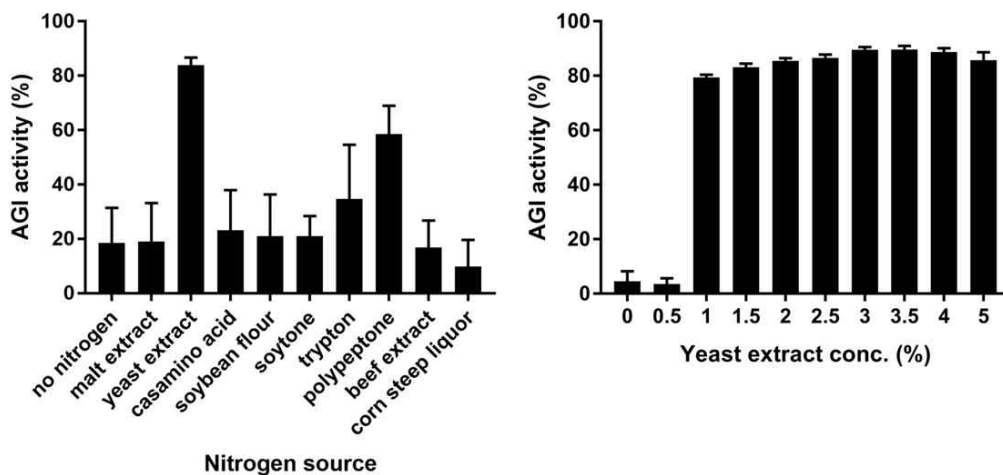


그림 63. *B. velezensis* K26의 질소원별 및 yeast extract 농도별 AGI 활성

- *B. velezensis* K26 균주의 고 AGI 활성을 위한 최적 탄소원과 질소원으로 성분으로 2.5% sucrose와 3.5%의 yeast extract가 선정되었으나 이후 상기 미생물을 활용하여 통통마디 마쇄물의 발효를 유도하고 이들 발효산물의 영양성분 및 세포실험 기반의 생리활성 평가 시 추가된 영양성분의 영향을 최소화하기 위하여 각 탄소원 및 질소원의 농도를 2%로 하향 조정해서 향후 실험을 진행함. 또한 2.5% sucrose 및 3.5% yeast extract가 끼치는 AGI 영향과 비교할 때 2%의 농도에서 큰 차이가 없는 것으로 나타났기 때문에 향후 통통마디 마쇄물의 미생물 발효 시 추가영양성분이 들어간 시료군(PSY)의 경우 sucrose와 yeast extract를 각 2%씩 추가하여 진행함.

(3) 통통마디 마쇄물(phyto source)의 *B. velezensis* K26 발효

- 최적화가 완료된 AGI 활성을 나타내는 *B. velezensis* K26 균주를 이용하여 통통마디 마쇄물의 발효를 진행하여 통통마디 발효산물을 제조하였음. 3개의 실험군 (P, PSY 및 SY)에 대해 발효를 진행하였고, 각 발효산물의 AGI 활성을 측정함(그림 64).

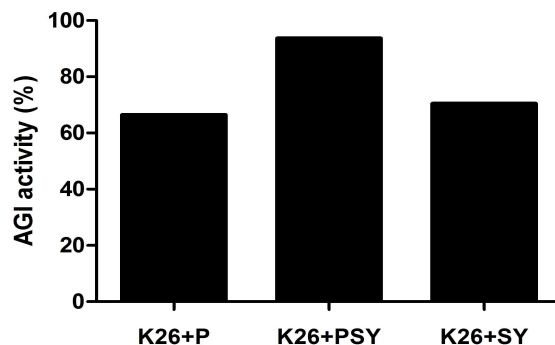


그림 64. *B. velezensis* K26에 의한 통통마디 마쇄물 발효산물의 AGI 활성

- 통통마디 마쇄액만을 배지로 사용하여 *B. velezensis* K26 균주를 발효한 경우 66.4%의 AGI 활성을 보인 반면, SY 배지의 경우에는 70.4% 그리고 PSY 배지의 경우에는 93.6%의 AGI 활성을 나타냄. 따라서 통통마디 마쇄액만을 단독으로 활용하여 발효를 한 경우 및 일반 영양성분을 단독으로 활용한 경우보다 통통마디 마쇄액에 영양성분을 첨가한 경우 AGI 활성이 높게 나타났음을 확인하였으며 이를 통해 *B. velezensis* K26에 의한 통통마디 발효산물이 AGI 활성 증가에 더욱 효과적임을 확인함.

(4) UPLC-ESI-Q-TOF-MS 기반 상기 통통마디 발효산물의 추출물 분석

- *B. velezensis* K26에 의한 통통마디 발효산물의 AGI 활성에 따른 유효 성분을 분리 및 분석하기 위하여 UPLC-ESI-Q-TOF-MS 분석을 진행함. 다양한 AGI 활성의 기존 성분들 중에서 glucose와 구조적으로 유사한 1-deoxynojirimycin (DNJ)을 목적 성분으로 선정하여 분석을 진행함.
- UPLC-ESI-Q-TOF-MS의 chromatogram에서 authentic DNJ standard compound는 5.6 분대에서의 단일 피크를 보임. 4% (w/v)의 통통마디 마쇄물만을 사용하여 *B.*

velezensis K26을 발효한 P+K26 실험군과 상기 통통마디 마쇄물에 2% (w/v)의 sucrose와 2% (w/v)의 yeast extract가 추가로 첨가된 배지에서 배양된 PSY+K26 실험군 모두 동일한 시간대에서 peak를 확인할 수 있음(그림 65).

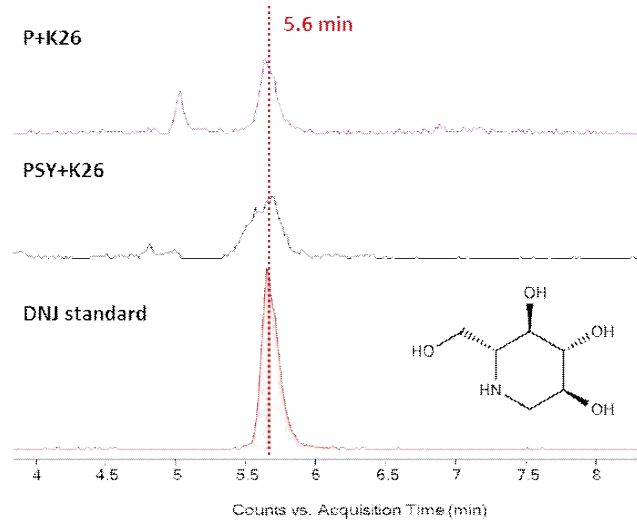


그림 65. *B. velezensis* K26에 의한 통통마디 마쇄물 발효산물의 UPLC-ESI-Q-TOF-MS ion chromatogram

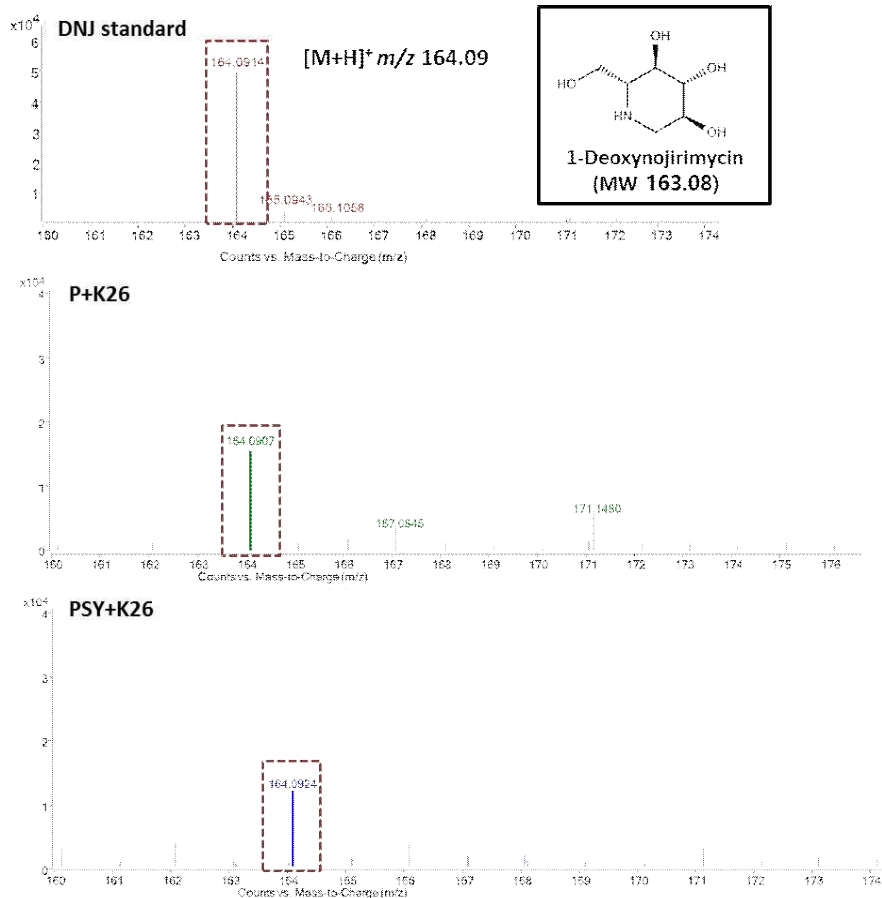


그림 66. *B. velezensis* K26에 의한 통통마디 마쇄물 발효산물의 UPLC-ESI-Q-TOF-MS의 MS spectrum

- 상기 peak에서의 mass spectrum을 양이온 모드 ($[M+H]^+$)로 분석한 결과 m/z 164.09의 고유한 mass peak를 확인하였으며 이 peak는 authentic DNJ standard compound ($C_6H_{13}NO_4$, *calcd.* 163.08)의 peak와 동일한 것으로 나타남(그림 66). 이러한 결과를 바탕으로 *B. velezensis* K26 균주에 의한 통통마디 마쇄물의 발효산물의 AGI 활성은 DNJ에 의한 활성임을 확인하였으며 이를 통해 통통마디 마쇄물의 미생물 발효산물을 기능성 발효식품 및 식품소재로 활용할 수 있다고 판단함.

사. 통통마디로부터 유용 기능성식품 소재 확보

(1) *B. velezensis* K26에 의한 통통마디 발효산물의 기능성식품 소재 확보

- 본 과제를 통해 확보한 통통마디 발효산물의 기능성 식품 소재로 AGI 활성이 있는 항당뇨 후보물질인 DNJ를 확보하고 분리함. 지금까지 항당뇨병 치료제 및 기능성 소재를 개발하기 위해 AGI활성을 갖는 다양한 화합물들이 화학적으로 합성되거나 천연물로부터 분리되어 왔으나, 간 장애와 같은 부작용 유발 및 낮은 수득율 등의 문제가 있어 왔음. 때문에 미생물 발효산물 유래 α -glucosidase 저해제 개발이 많은 관심을 받아왔고, 그 결과 validamycin 및 acarbose와 같은 방선균 유래의 α -glucosidase 저해제들이 최근까지 개발되어 왔으나 이러한 방선균류는 α -glucosidase 저해활성을 갖는 유용한 소재를 생합성함에도 불구하고 식품 산업에 직접적으로 적용하기에 적합하지 않다는 한계가 있어 왔음.
- Polyhydroxylated alkaloid 계열 화합물인 DNJ는 pyranose 고리의 산소 원자가 NH 그룹으로 치환된 glucose 유사체로서 항당뇨, 항암 및 항바이러스와 같은 중요한 생물학적 활성을 나타내며 α -glucosidase를 저해하는 것으로 알려져 있음. 지금까지 생물학적인 방법으로 DNJ를 생산하기 위해서는 뽕나무 뿌리로부터 직접 DNJ를 분리하는 방법이 개발되어 왔으나 추출되는 DNJ의 양이 매우 소량이고, 환경적인 요인 (재배 지역 및 계절) 및 긴 생육시간 그리고 복잡한 정제과정 등의 이유로 DNJ의 생산 비용이 증가하는 한계가 나타났으며 이러한 한계를 극복하고자 미생물의 발효를 통한 DNJ 생산 연구가 시급함.
- 통통마디의 다양한 생리활성 중 AGI 활성은 널리 알려져 있으나, 이러한 AGI 활성의 유효 성분이 잘 알려져 있지 않으며 미생물의 통통마디 발효를 통한 AGI 활성을 증진이 시급함. 따라서 본 과제를 통해 확보한 *B. velezensis* K26에 의한 통통마디 마쇄물의 발효산물로부터 AGI 활성이 측정되었으며 이러한 AGI 활성의 주요 유효 성분으로 DNJ를 분석하고 확보하였다는 점에서 통통마디의 미생물 발효산물이 기능성 발효식품 및 식품소재로 적용될 수 있음을 보여줌.

(2) *B. velezensis* K26에 의한 통통마디 발효산물의 영양성분

- 발효식품으로부터 분리한 *B. velezensis* K26을 활용하여 통통마디 마쇄물의 발효를

진행하고 상기 발효산물의 영양성분을 분석함. 실험군으로 P (4% 통통마디 마쇄물) 및 PSY (4% 통통마디 마쇄물, 2.5% sucrose, 3.5% yeast extract)를 기본 배지로 활용하여 *B. velezensis* K26의 배양을 진행한 시료(P+K26, PSY+K26)와 미생물 발효를 하지 않은 시료(P, PSY)를 사용함.

- 영양성분 분석은 한국건강기능식품 연구원에 의뢰하여 분석을 진행하였으며 각 시료의 조단백질, 조지방, 트랜스지방, 포화지방산, 탄수화물, 회분, 수분, 식이섬유, 열량, 콜레스테롤, 당류 및 나트륨을 분석하였음. P 및 PSY 시료의 경우 *B. velezensis* K26에 의한 통통마디 발효산물 시료(P+K26, PSY+K26)와의 비교를 위해 수분함량을 기준으로 보정(PM, PSYM)을 함(표 24).

표 24. *B. velezensis* K26에 의한 통통마디 마쇄물 발효산물의 영양성분 분석

	P	PM	P+K26	발효 후 변화율(%)	PSY	PSYM	PSY+K26	발효 후 변화율(%)
Calorie	9.78	9.80	9.25	-5.63	22.55	22.88	17.14	-25.07
Carbohydrate (dietary fiber 포함)	3.01	3.02	2.82	-6.52	4.92	4.99	3.33	-33.28
Crude protein	0.42	0.42	0.46	9.29	1.74	1.77	1.79	1.41
Crude fat	0.22	0.22	0.13	-41.04	0.17	0.17	0.24	39.17
Moisture	96.13	96.34	96.34	0.00	92.84	94.18	94.18	0.00
Ash	0.22	0.22	0.25	13.39	0.33	0.33	0.46	37.41
Sodium	16.33	16.37	11.28	-31.08	34.64	35.14	33.39	-4.98
Saccharide	0	0.00	0	0.00	18.01	18.27	0	-100.00
SFA	0.02	0.02	0.01	-50.11	0.01	0.01	0.02	97.15
TFA	0	0.00	0	0.00	0	0.00	0	0.00
Cholesterol	0	0.00	0	0.00	0	0.00	0	0.00
Dietary fiber	2.96	2.97	2.52	-15.05	2.81	2.85	2.75	-3.53

- 통통마디 마쇄물(P 실험 군 시료)의 경우 *B. velezensis* K26에 의한 미생물 발효를 통해 식이섬유가 포함된 총 탄수화물을 분해하였음을 확인하였으며, 추가 영양성분이 있는 경우 (PSY 실험 군 시료)에 비해 단순 통통마디 마쇄물만의 미생물 발효 시료의 경우가 식이섬유 분해율이 5배 정도 큰 것으로 확인됨(식이섬유 변화율: -15.05% for P 발효, -3.53% for PSY 발효).
- 통통마디 마쇄물만 있는 경우 조단백 생성율이 *B. velezensis* K26에 의해 9.29% 증가한 반면, 추가 영양성분이 있을 경우에는 미생물의 발효가 진행되었음에도 불구하고 1.41%의 증가율을 보였음. 또한 통통마디 마쇄물만 있는 경우에 미생물 발효를 통해 crude fat이 분해 (-41.04%)된 반면, PSY 시료 군의 경우에는 미생물 발효가 진행되었음에도 불구하고 분해가 되지 않았으며 오히려 증가 (39.17%)되었음을 확인함.
- 배지 내 sodium 변화율은 P 시료 군의 경우 -31.08%인 반면 PSY 시료 군의 경우에는 -4.98%인 것으로 나타나 통통마디 마쇄물만을 배지로 활용하여 발효한 경우에 sodium 소모율이 높음을 확인함.

아. 확보소재 및 정제물질의 생리활성(항당뇨, 항비만 및 항염증) 평가

(1) *B. velezensis* K26에 의한 통통마디 발효산물의 세포독성 실험

- 통통마디 발효산물의 항당뇨(항비만) 생리활성을 세포수준에서 확인하기 위하여, 먼저 세포에 대한 독성을 CellVia cell viability assay kit를 사용하여 측정하였음. 상기 Cellvia kit는 기존 MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) 시약을 대체하여 살아있는 세포의 양을 측정하는 kit로 수용성 tetrazodinium salt 중에서 가장 민감도가 높고 편의성이 뛰어난 High Sensitive Water Soluble Tetrazolium Salt (WST)를 이용함.
- 상기 세포독성실험에 사용된 실험군은 기존 실험군인 P, PSY 및 SY 배양배지에 *B. velezensis* K26 균주가 없는 경우(P, PSY, SY)와 있는 경우(K26-P, K26-PSY, K26-SY), 그리고 AGI 활성이 없는 *B. subtilis* 142 균주로 배양된 경우(N-P, N-PSY, N-SY)로 각각 나누어 실험을 진행함.
- 미생물 발효의 경우 기존 배양조건인 37°C에서 5일간 배양을 진행하였으며, 배양 후 원심분리하여 취한 상층액을 일정 농도로 DMEM 배지에 희석(1/10, 1/5, 1/4 희석)하여 세포독성 실험을 진행함. 그 결과 1/10배 희석한 시료군들 중에서 phyto source가 첨가되지 않은 시료군(SY, K26-SY 및 N-SY)들에서 각각 72.51%, 64.81%, 60.46%의 세포 사멸률을 보여 미생물 발효 증진을 유도하기 위한 추가 영양성분의 공급이 세포 독성에 sensitive함을 확인함(그림 67).

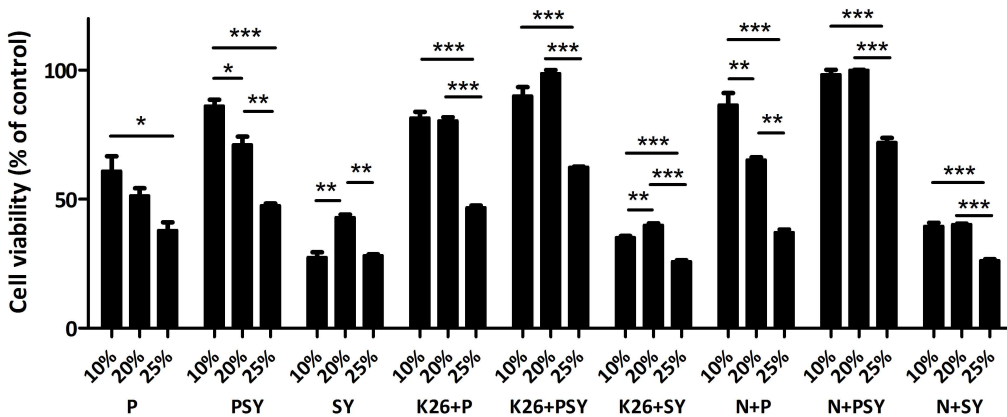


그림 67. 통통마디의 미생물 발효산물에 노출된 3T3-L1 지방세포주의 세포생존률 (*, P<0.05 ; **, P<0.01 ; ***, P<0.001)

- 반면 P 시료군들과 PSY 시료군들을 비교한 결과 전반적으로 시료의 희석배수와 상관없이 PSY 시료군들의 세포독성이 P 시료군들에 비해 낮음을 확인함. 앞서 SY 시료군들의 세포독성 영향이 상당히 높음에도 불구하고 PSY의 세포독성이 낮게 나타나는 것은 흥미로운 결과로서 아마도 phyto source와 추가 영양성분들과의 상호작용에 기인한 것으로 사료되나 정확한 원인 규명은 추후 밝힐 필요가 있다고 보임.
- 1/10배 희석된 시료보다 더 높은 희석배수의 시료가 세포독성에 미치는 영향을 알아보기 위하여 1/100, 1/20, 1/10, 1/4배 희석된 시료들을 가지고 추가 세포독성 실험을

진행함. 단, 이때 *B. velezensis* K26 및 *B. subtilis* 142 균주와 같은 미생물 자체로 인한 세포독성 영향을 제거하기 위하여 우선 상기 균주들에 의한 발효가 아닌 P, PSY, SY 시료군만을 대상으로 실험을 진행함.

- 그 결과 시료군에 상관없이 대부분의 시료군에서 1/20배 희석까지는 D.W. 처리군 대비 70.15% 이상의 세포생존률을 나타냄(그림 68). 단, SY 시료군의 경우 1/10배 희석 시료에서 16.96%의 세포생존률을 보여 기존 SY 시료군의 높은 세포독성 영향을 재확인 할 수 있음. 이러한 결과를 바탕으로 1/100 및 1/20배 희석 시료들의 경우 이후 세포실험에서 안전영역에 해당한다고 판단되었으나, 1/100배 희석을 시료로 사용할 경우 미생물의 발효가 포함된 시료의 경우에는 너무 낮은 농도의 미생물 배양 상층액이 실험에 사용될 수 있고 이로 인해 통통마디 마쇄물의 미생물 발효에 의한 정확한 항당뇨(및 항비만) 생리활성의 평가를 할 수 없다고 판단되어 최종적으로 1/20 및 1/10배 희석 시료군들을 추후 실험에 사용함.

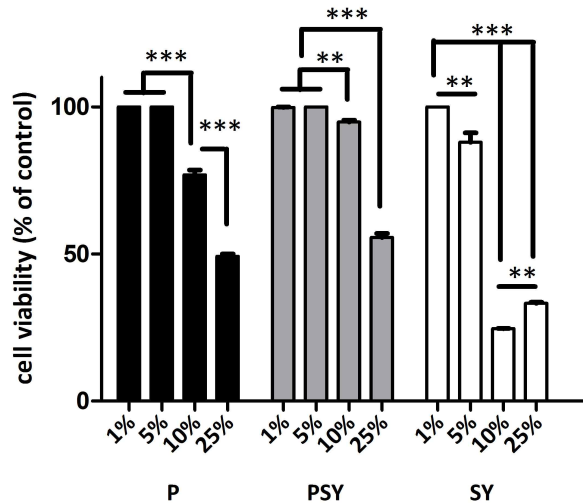


그림 68. 통통마디 마쇄물 및 추가 영양성분에 노출된 3T3-L1 지방세포주의 세포생존률 (**, P<0.01; ***, P<0.001)

(2) 통통마디 발효산물의 항비만 활성 평가

- 통통마디 발효산물의 지방세포 분화에 대한 효과를 확인하기 위하여 3T3-L1 지방세포의 분화 억제 효과를 보고자 하였으며 이를 위해 Oil-red-O 염색 기반의 adipogenesis assay를 진행함. 이때 대조군으로 분화하지 않은 NDF (non-differentiation)와 시료를 처리하지 않은 non-treated를 사용함.
- 대조군으로 사용된 non-treated를 기준으로 지방축적률(%)을 계산하였고, 그 결과 1/20배 희석 시료 (5%)에서 시료를 처리하지 않은 non-treated 실험군은 K26+SY를 제외하고 유의적 차이를 보이는 것으로 나타났으며, K26균주에 의해 phyto source만 발효한 실험군이 발효를 진행하지 않은 통통마디 마쇄물과 negative 균주에 의해 발효시킨 실험군과 유의적 차이를 보이는 것을 확인하여 K26균주에 의해 발효시킨 phyto source가 발효하지 않은 실험군과 negative 균주를 이용하여 발효한 실험군 보다 지

방 축적을 억제시키는 것으로 확인됨(그림 69).

- 1/10배로 희석한 (10%) 시료의 경우 시료를 처리하지 않은 non-treated 실험군이 PSY를 제외하고 유의적 차이를 보이는 것으로 나타났고, N+P와 K26+P가 유의적 차이를 보이는 것을 확인할 수 있었지만 이외의 시료군 사이에서는 유의차가 없어 10% 희석 시료는 지방 축적 억제에 큰 영향이 없는 것으로 확인됨.

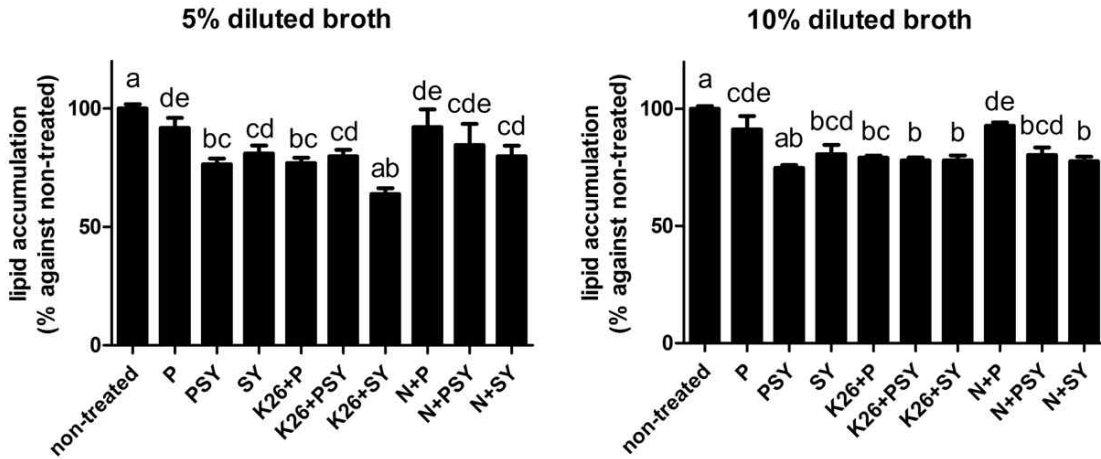


그림 69. 통통마디 발효산물의 3T3-L1 지방세포에 대한 adipogenesis assay 결과

- 전반적으로, 특히 1/20배 희석 시료의 경우를 보면 *B. velezensis* K26 균주로 통통마디 마쇄물을 발효시킨 시료군들(K26-P, K26-PSY, K26-SY)이 미생물에 의한 발효가 아닌 시료군들과 negative 균주 (*B. subtilis* 142)에 의해 발효가 진행된 시료군들에 비해 상대적으로 지방세포의 축적이 억제되는 것을 확인할 수 있음(그림 70).

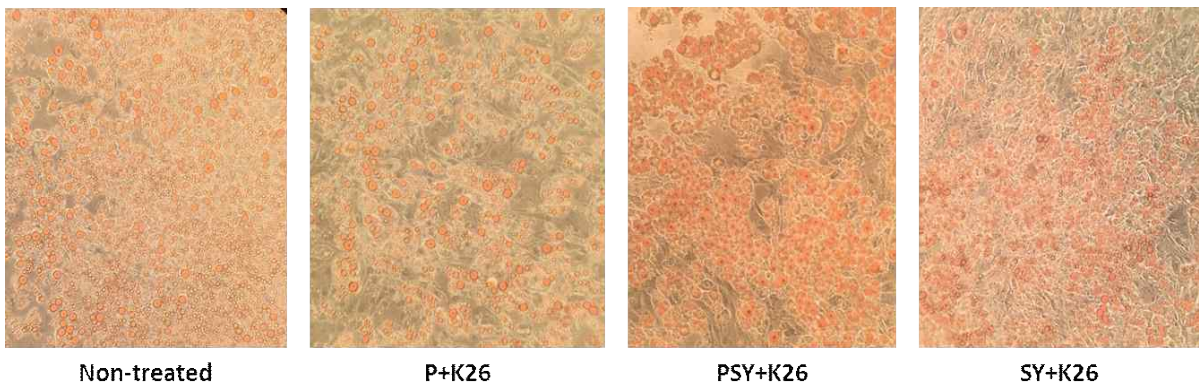


그림 70. *B. velezensis* K26에 의한 통통마디 마쇄물의 발효산물 (1/20배)을 처리한 분화 3T3-L1 지방세포의 Oil-red-O 염색 결과

- 상기 연구결과를 토대로 본 연구과제에서 분리한 기능성 식품미생물인 *B. velezensis* K26 균주에 의한 통통마디 발효산물이 세포 수준에서 비교적 낮은 농도로도 효과적으로 지방을 억제할 수 있으며, 이를 통해 통통마디 마쇄물의 기능성(항비만) 식품 소재로의 적용 가능성을 확인할 수 있음.

(3) 통통마디 발효산물의 항염증 활성 평가

- 통통마디 발효산물이 염증성 cytokine의 분비에 영향을 미치는지 확인하기 위하여, LPS로 자극된 RAW264.7 세포주의 배양액을 ELISA kit를 이용하여 IL-6와 TNF- α 를 정량함(그림 71). 그 결과 염증성 cytokine인 IL-6의 분비량이 SY 시료 처리 시 무처리군(non-treated)과 비교하여 유의차가 없었으나, P 및 PSY 시료 처리 시 유의적으로 감소함을 보임으로써($p < 0.05$), 통통마디 자체 내에 있는 유효 성분이 항염증 기작을 가지는 것으로 보임.

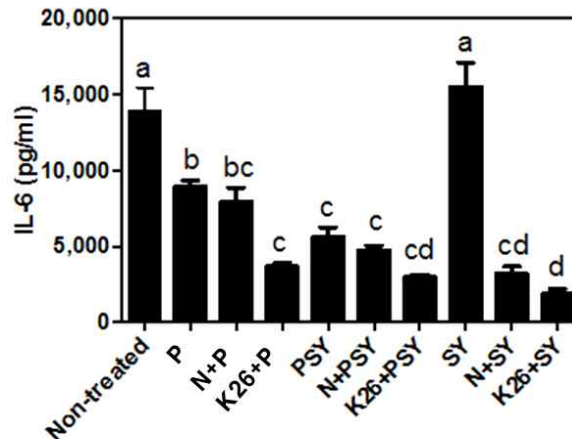


그림 71. 통통마디 발효산물이 LPS-유도 RAW264.7 대식세포 내에서 염증성 cytokine IL-6의 분비량에 미치는 영향

- 또한 negative 균주(*B. subtilis* 142)로 통통마디 마쇄물을 발효한 N-P 시료의 경우 미생물 발효가 진행되지 않는 통통마디 마쇄액만 있는 시료(P)와 유의적 차이가 없었지만, *B. velezensis* K26 균주로 발효한 통통마디 마쇄액의 시료(K26-P)는 P 시료와 유의적 차이를 보임으로써($p < 0.05$), *B. velezensis* K26 균주 통통마디 발효산물이 항염증 활성을 증가시킨다는 것을 확인할 수 있었음. 이러한 경향은 추가 영양성분이 함유된 시료군들(PSY, K26-PSY, N-PSY)의 경우에도 비슷한 경향을 보였음.
- 그러나 통통마디 마쇄물이 포함되지 않은 영양성분 배지에서 *B. velezensis* K26이 발효된 시료(K26-SY)에서도 강한 항염증 기작을 보이는 것으로 미루어, 항염증 기작은 통통마디 마쇄물의 영향도 있지만 *B. velezensis* K26 자체의 영향이 더 클 수 있다는 것을 알 수 있음.
- 하지만 앞서 언급된 것처럼 통통마디 마쇄물(P 시료)의 항염증 효과가 유의적으로 나타났으며 또한 *B. velezensis* K26에 의한 통통마디 발효산물(K26-P 시료)에서 그 항염증 정도가 유의적으로 더 증가했음을 보였기 때문에 전체적으로 *B. velezensis* K26에 의한 통통마디 발효산물의 항염증 효능이 분명 있다고 판단됨. 역시 미생물 배양액 내 통통마디의 첨가여부가 중요한 결정요소가 아니고, K26 균주에 의한 효과임을 알 수 있음.
- IL-6와 더불어 또 다른 염증성 cytokine인 TNF- α 의 분비량을 조사한 결과 미생물에 의한 발효가 진행되지 않은 시료군들(P, PSY, SY)에 비해 미생물에 의한 발효가 동반

된 시료군들의 분비량이 유의적으로 작게 나타남을($p < 0.05$) 확인함(그림 72). 그러나 IL-6와는 달리 전체적으로 *B. subtilis* 142 균주와 *B. velezensis* K26 균주간의 차이는 유의적 차이가 없음을 확인함.

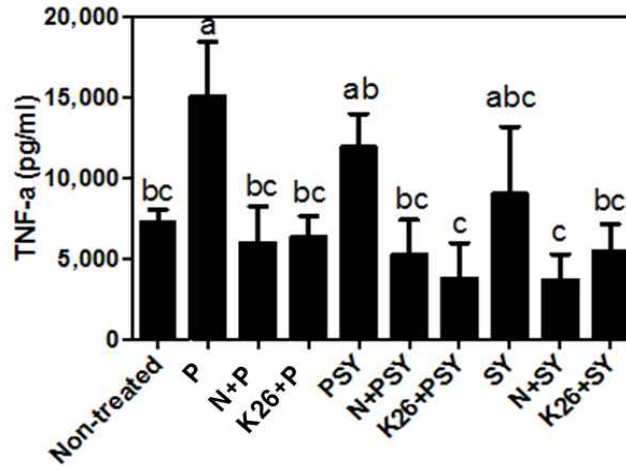


그림 72. 통통마디 발효산물이 LPS-유도 RAW264.7 대식세포 내에서 염증성 cytokine TNF- α 의 분비량에 미치는 영향

- 이러한 결과들을 바탕으로 염증성 cytokine 간의 차이는 존재하지만 통통마디 마쇄물 자체의 항염증 효과, 그리고 미생물, 특히 *B. velezensis* K26에 의한 통통마디 발효산물의 항염증 효과를 세포실험을 통해 최종 확인함.

제 3절 연구개발 성과

코드번호	D-05
------	------

○ 특허성과

1. 나문재 속 식물의 추출물을 유효성분으로 함유하는 혈전증의 예방 또는 치료용 약학적 조성물 및 건강 기능 식품 (출원번호: 10-2015-0178211)
2. 나문재 속 식물의 추출물을 유효성분으로 함유하는 항균성 조성물 (출원번호: 10-2015-0178189)
3. 통통마디 유래의 이소람네티를 유효성분으로 함유하는 비알코올성 지방간 질환 예방 또는 치료용 약학 조성물 (출원번호: 10-2016-0078354)
4. 함초씨 추출물을 유효성분으로 함유하는 혈전증의 예방 또는 치료용 약학적 조성물 및 건강 기능 식품 (출원번호 : 10-2016-0102065)
5. 5-deoxy-irilin B Having Angiotensin-I converting enzyme Inhibition Activity Derived from *Salicornia* SPP. and Composition Containing the Same (PCT 출원 : PCT/KR2016/012624)
6. 나문재 속 식물의 추출물을 유효성분으로 함유하는 항균성 조성물 (등록번호 : 10-1715622)
7. 나문재 속 식물의 추출물을 유효성분으로 함유하는 혈전증의 예방 또는 치료 (등록번호 : 10-1719612)
8. 통통마디 유래 비알코올성 지방간 질환 예방 또는 치료용 이소람네티의 분리방법 (등록번호 : 10-1794294)

○ 논문게재 성과

1. *Flavimarina flava* sp. nov., isolated from *Salicornia herbacea*. 2017. *Int J Syst Evol Microbiol* 67(10): 4240~4245 (SCI : IF 2.488)
2. *Paenibacillus arcticus* sp. nov., isolated from Arctic soil. 2017. *Int J Syst Evol Microbiol* 67(11): 4385~4389 (SCI : IF 2.488)
3. Changes of *in-vitro* Anti-oxidant and Anti-thrombosis Activities of *Salicornia herbacea* L according to Harvest Time. 2016. *J Life Science* 26(9): 101~108 (비SCI)
4. Anti-oxidation and Anti-thrombosis Activities of Different parts of *Salicornia herbacea* L. 2016. *Microbio Biotechno Lett* 44(3): 311~316 (비SCI)
5. Antimicrobial, Antioxidant, and Anticoagulation Activities of *Salicornia europaea* seeds. 2016. *Microbiol Biotechno Lett* 44(4): 452-460 (비SCI)
6. Effect of different drying methods on anti-oxidation and anti-thrombosis activities of *Salicornia europaea*. 2017. *Korean J Food Preserv* 24(5): 658-665 (비SCI)

○ 시제품개발 성과

1. EuroSauce 2020 : Western taste에 맞춰 토마토 및 양파 등 추출물을 가미한 액상 소스
2. EuroSauce 2030 : Asian taste에 맞춰 표고버섯 및 배추 등 추출물을 가미한 액상 소스

- 3. EuroSauce 2025 : 유럽소비자의 입맛에 맞는 neutral taste 액상 소스 개발
- 4. PhytoSauce Granule & Powder : 액상 타입의 조미소스인 PhytoSauce를 분무건조 및 유동층 건조방식으로 건조, 휴대성 및 운송 편리성의 분말과 과립 형태의 제품 개발

○ 사업화성과 및 매출 실적

- 사업화 성과

- 사업화 계획 및 매출 실적

항 목	세부 항목	성 과			
사업화 계획	사업화 소요기간(년)	3년			
	소요예산(백만원)	5,000			
	예상 매출규모 (억원)	현재까지	3년후	5년후	
		-	3	10	
	시장 점유율	단위(%)	현재까지	3년후	5년후
		국내	-	0.5	2.0
국외		-	0.5	2.0	
	향후 관련기술, 제품을 응용한 타 모델, 제품 개발계획	Phytosalt(미세분말 타입)의 B to B제품을 시작으로 식품회사의 소재로 판매 시작, 이후 소 포장(30~60g) 단위의 개별 소비자 판매용으로 개발. 추가 기능성 연구에 대한 R&D를 지속하여 후속 모델 진행중.			
무역 수지 개선 효과	(단위: 억원)	현재	3년후	5년후	
	수입대체(내수)	-	1	2	
	수 출	-	2	8	

항목	세부항목			성 과
사업화 성과	매출액	개발제품	개발후 현재까지	1.2백만원
			향후 3년간 매출	2 억원
		관련제품	개발후 현재까지	-
			향후 3년간 매출	1 억원
	시장 점유율	개발제품	개발후 현재까지	국내 : - 국외 : -
			향후 3년간 매출	국내 : 0.5 % 국외 : 0.5 %
		관련제품	개발후 현재까지	국내 : - 국외 : -
			향후 3년간 매출	국내 : 0.5 % 국외 : 0.5 %
	세계시장 경쟁력 순위	현재 제품 세계시장 경쟁력 순위		-
		3년 후 제품 세계 시장경쟁력 순위		3 위

4. 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

		코드번호	D-06
4-1. 목표달성도			
○ 1차년도			
세부과제명	세부연구목표	연구개발 수행내용	달성도 (%)
통통마디 가수분해물의 발효를 통한 다양한 고부가가치 기능성 조미소재 개발	통통마디 가수분해물의 발효에 의한 기능성을 가진 유럽형 식물성 소금대체 소재 개발	통통마디와 다양한 식물성 소재 혼합물 유래의 ‘감칠맛’ 이 강화된 유럽형 식물성 소금대체 소재 개발	100
	통통마디 가수분해물 및 고부가가치 조미소재 개발	HPLC 및 Megazyme사의 정량 kit를 이용한 glutamic acid 함량 측정법의 도입으로 감칠맛의 데이터화가 가능해 짐	100
	통통마디 마쇄물의 미생물 발효산물의 발효를 통한 기능성 소스 개발	항산화, 항당뇨활성 및 혈전 분해능, 면역력 강화, 항암활성, 간손상 예방활성, 알도스테론 수치 강화 효능 등의 기능성 소재를 통통마디 발효산물로부터 추출한 획분에서 확인 함	100
		통통마디 마쇄물로부터 조미/기능성 성분의 분석을 통해 통통마디의 짠맛, 단맛, 신맛,	100

	쓴맛, 감칠맛 등을 이용해 조미 소재로서의 우수성을 확인함	
	유용 식품 발효균인 <i>Aspergillus oryzae</i> , <i>A. niger</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Saccharomyces cerevisiae</i> 를 통통마디 마쇄물 및 마쇄물에 콩성분을 더한 추출액에서 발효하여 다량의 감칠맛, 단맛 등이 증가된 발효물 확보	100
	발효 산물로부터 유용기능성 성분을 분리하여 항산화 활성, 총폴리페놀 및 플라보노이드 함량비교, 이소플라본 함량 등을 분석하여 시판되는 조미소스 보다 우수한 기능성 소재임을 확인	100
	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> , <i>Leuconostoc citrium</i> , <i>Lactobacillus plantarum</i> , <i>Weissella cibaria</i> , <i>Weissella confusa</i> 등 유용 식품발효 유산균을 이용한 통통마디 마쇄액 발효를 통해 L-glutamate 생성량 및 관능테스트를 통해 조미소스에 적용할 적정량 확인	100
유럽형 소금무첨가(No Salt-Added) 기능성 조미소스 개발	산미, 향미, 염도, 감칠맛 등이 풍부한 유럽형 천연 염미소스의 개발을 통해 스페인의 GB Foods R&D 센터 연구원들과 시제품 샘플테스팅을 하고 결과를 주고 받음	100
	소금무첨가(No Salt-Added)의 감칠맛이 풍부한 천연 발효 조미소스를 개발	100
통통마디 마쇄물의 효소처리 가수분해물의 발효에 의한 조미/기능성 소재 개발	cellulase, pectinase, hemi-cellulase의 복합효소 분해시 통통마디 마쇄물의 가수분해가 활발함을 확인하였으며 reducing sugar 함량을 측정 한 결과 열수추출물에 많은 다당류가 효소분해되어 많은 양의 reducing sugar로 생산되었음을 확인함	100
	생함초(30%, 살균전)에 섬유질 분해효소(PlantaseTL, Optvin, PyrFlo) 세 종류로 분해 테스트결과 50℃에서 12시간 이상 처리하는 경우에서 reducing sugar의 생성량이 가장 많은 것을 효소활성이 가장 우수한 조건으로 정하여 optimum condition을 결정함	100
	열수추출물의 다당류에 대한 효소의 분해력 테스트를 통해 통통마디의 다당류를 분해하는데에 가장 적합한 효소(Optivin) 확인	100

		<p>통통마디 마쇄물에 탄수화물가수분해 효소(셀룰로스, 베타글루카네이즈, 헤미셀룰로스, 펙티네이즈)를 첨가하여 가수분해 후 유산균을 배양하여 발효한 발효물에 대하여 다양한 농도의 활성탄을 처리시 소재의 특성을 염도, Brix, 및 향산화활성을 비교 평가한 결과 활성탄 처리에 따라 염도변화는 없었으나, 총고형분 중 특히 폴리페놀 함량의 감소와 향산화활성 감소를 보였음. 따라서 기능성 성분의 손실을 최소화하면서 쓴맛을 제거되는 활성탄 처리 농도는 2% 내외로 사용함이 적절함</p>	100
		<p>산가수분해하여 증화한 통통마디 마쇄물에 <i>Zygosacch. rouxii</i> 1063을 접종하여 발효한 결과 통통마디 자체의 풀 향이 많이 감소하는 것을 관능검사를 통해 확인함. 통통마디 마쇄물에서 좋지 않은 향으로 분류되었던 풀비린내는 <i>Zygosacchar. rouxii</i> 1063으로 후발효하여 관능검사(이점비교 검사법)로 발효전과 발효후의 시료 중 풀비린향이 감소하는 정도를 20인을 대상으로 조사한 결과 20인 모두가 감소한다고 응답하여 효모 발효후에 풀비린향이 감소함을 확인함</p>	100
<p>통통마디 마쇄물의 산·알칼리 가수분해물의 발효에 의한 조미/기능성 조미 소재 생산</p>		<p>온교환수지 및 투석막을 이용하여 통통마디의 탈염을 시도하였으나, 통통마디 내 유용생리성분과 클로로필 등의 유기화합물의 손실없이 염분만을 제거하기가 어려웠음. 이온교환수지의 경우, 통과한 통통마디액내의 pH를 중성화하기 위하여 산이나 염기를 첨가하는 과정에서 다시 염화나트륨이 생성되는 됨을 확인하였으며, 투석막을 통하여 염분을 제거시 시판되는 투석막으로는 분자량 컷 사이즈의 한계로 대부분의 저분자성 생리활성물질(플라보노이드, 폴리페놀, 알칼로이드, 사포닌 등)들도 동시에 제거되어 탈염물의 가치가 저하되는 단점이 있음. 따라서, 유용성 생리활성물질의 손실을 최소화하는 탈염법을 찾던 중 온도에 따른 염류의 물에 대한 용해도 차이를 이용하여 염화나트륨만 효</p>	100

		과적으로 제거시킬 수 있는 “저온냉수 추출법”을 확립함	
		통통마디 발효물의 유기용매 분획 및 컬럼크로마토그래피 (Diaion HP-20, Silicagel-60G, Sephadex L-20 정제를 통하여 항응고활성 및 항산화활성이 우수한 기능성 성분으로 5종의 페놀릭산성분(카페인산, 클로로젠산, 쿠마린산, 프로토키테추산, 페룰산)을 동정하고 정량분석함. 동정은 HPLC와 UV스펙트럼을 통하여 실시하였고, 정량분석은 표준품과 함께 HPLC 분석하여 확인함	100
		통통마디를 이용한 조미소스의 최적 생산공정을 다음과 같이 설정함. 통통마디 세척→ 열수추출→ 질소원 및 탄소원 보충후 살균→ 미생물 배양→ glutamic acid생산 곡선을 관찰하여 발효 종료→ 활성탄 처리로 발효액 내의 이미, 이취, 쓴맛 펩타이드, 유해물질 등 제거 → 활성탄 제거 → 마이크로 필터링을 통한 살균처리 → 병입	100
	발효에 필요한 포도당, 설탕 등 인위적 첨가물을 사용하지 않는 발효기술 개발	통통마디 열수추출물을 배양액으로 <i>C. glutamicum</i> mutant를 이용하여 배양액 내에 glutamic acid를 높이는 발효기술을 개발함	100
통통마디 및 이의 생물전환 산물을 이용한 기능성소재의 개발 및 작용기전 연구		식품공전에 따른 통통마디 영양성분 평가 완료함. 통통마디 탈염 박 (de-salted cake)을 이용한 제빵 등의 가공식품 제조 우수성을 확인함	100
	통통마디 및 엽생식물의 이용성 및 식품학적 특성 평가	통통마디의 수확시기별 성분 분석 및 항균, 항산화, 항혈전, 항당뇨 활성 평가 완료	100
		통통마디 건조방법에 따른 성분 변화 및 항응고, 항당뇨 및 실제적 적용을 위한 인간 적혈구 용혈활성 등 평가. 동결건조가 가장 적합하나, 항혈전 활성의 경우 열풍건조도 효율적임	100
	통통마디 및 엽전 유래 유용 미생물의 발굴 및 발효 적용	갯벌 엽전 및 짓갈 유래 호염세균 분리 및 배양학적 특성을 검토하여 고염조건에서 빠른 생육을 보이는 23종의 호염균 분리.	100
		고염 생육도 및 통통마디 배지에서 잘 생육하는 23종 균주 선별 후 항산화, 항혈전, 항	100

		당뇨 활성을 평가하여 최종 3종 선정함	100
		최종 선정된 <i>Bacillus</i> 속 들은 β -glucosidase, esterase(C4) 활성과 관련된 것으로 판단함	
	통통마디 마쇄물의 발효에 의한 기능성분의 항산화, 항혈전, 항당뇨 등 생리활성 평가	통통마디를 유기용매 또는 열수로 추출후 분획하여 성분을 분석함	100
		항혈전(항응고, 인간 혈소판 응집저해활성), 항산화, 항당뇨, 항균(항세균, 항진균), 적혈구 용혈활성 등을 확인함	100

○ 2차년도

세부과제명	세부연구목표	연구개발 수행내용	달성도 (%)
통통마디 가수분해물의 발효를 통한 고부가가치 기능성 조미소재 개발	전임상 시험을 통한 발효 조미소스의 안전성 및 기능성 검증	통통마디 마쇄물과 발효액의 동물실험 적용 안전성 확인	100
		AOM/DSS모델을 이용한 대장암 억제능 관찰에서 통통마디 마쇄물은 carcinoma 로 의심할 수 있는 큰 크기의 용종 (4mm이상)을 억제하는 효능을 보여 주었으며, 발효액도 상당한 억제능을 보임. 따라서, 통통마디 마쇄물의 대장암 억제 효능 확인	100
		통통마디 마쇄물 또는 발효액의 대장암 억제능과 미생물 균총변화와의 상관관계를 관찰함. 분변을 채취하여 차세대 염기서열 분석을 실시한 결과, 통통마디 마쇄물 실험군에서 항암 효과와 관련된 특이적인 미생물은 발견되지 않았으나, 전체적인 미생물 균총의 다양성이 높아졌음을 확인	100
	통통마디 마쇄물을 주원료로 한 조미 소재의 최적 생산 공정 확립	통통마디 채집은 줄기와 잎을 기계로 자르는 공정을 거치며 고압살수 세척하는 전처리공정을 거침→절단기를 이용해 약 10 cm로 파쇄하며 열처리를 통해 추출함→ 발효를 개시할 미생물의 종류에 따라 농축정도를 달리하여 미생물 발효 및 효소분해 후 활성탄 정제공정을 통해 이미취 및 미생물 잔해를 제거→ 경우에 따라 농축하며 살균공정을 통해 포장하는 대량생산공정을 확립함	100
	소스 소재의 관능 및 기능성 평가에 의한 천연소스 제형 개발	발효 또는 효소분해로 증가된 glutamic acid 측정법으로, 효소반응을 이용하여 흡광도 측정에 의한 정량분석 및 HPLC 아미노산 분석	100

		법에 의한 정량, 정성분석을 통해 감칠맛의 변화를 확인함으로써 발효의 종료시점 및 숙성 여부를 객관적으로 가늠할 수 있는 지표로 삼음	
		<i>C. glutamicum</i> , Lactic acid bacteria, <i>Zygosacchar. rouxii</i> , <i>A. oryzae</i> 를 이용하여 발효 후 각각의 관능평가를 통해 조미소스류, 드레싱류, 감칠맛 증강 인헨서(enhancer) 등의 목적에 맞도록 공정을 개발함	100
		액상타입의 제품을 분무건조하여 분말 및 과립화함으로써 운송 및 휴대의 편의성을 증대한 제품을 개발함. 또한 1인가구 증가의 추세에 맞추어 미니 사이즈의 제품으로 개발하여 소비자 편의성을 증대한 제품을 개발함	100
	통통마디 마쇄 가수분해산물을 주성분으로 하는 천연 소스의 제품화	통통마디 마쇄물을 발효하여 가수분해된 산물의 주성분인 아미노산, 탄수화물, 단백질, 지질 및 식이섬유 및 미네랄 분석을 통해 다양한 영양성분을 함유하고 있으면서 감칠맛이 우수한 조미 소스임을 확인함	100
	유럽형 소금무첨가(No Salt added) 기능성 조미소재의 최적 공정 개발 및 제품화	효소분해 및 발효를 통해 산미와 감칠맛 뿐 아니라 향미 성분이 더해진 소금무첨가 조미소스의 최적 발효 공정 확립 및 제품화 완료	100
		유럽의 GB Foods가 요청한 ‘감칠맛’ 과 ‘천연재료’ 의 이용 및 ‘온화한 맛’ 을 반영한 조미소스의 공정 확립 및 제품화 완료	100
		네슬레, 강스푸 등에서 요구한 사항에 맞춰 저나트륨 염미소스로의 공정을 개발함	100
통통마디 및 이의 생물전환 산물의 유용성분 규명 및 유용 생리활성 기전 연구	통통마디 마쇄물 및 발효 산물의 기능성 유효성분 및 작용기전 규명	발효식품(된장)으로부터 고 AGI 활성(73%)을 나타내는 <i>B. velezensis</i> K26 균주를 분리	100
		<i>B. velezensis</i> K26의 AGI 활성 증진을 위한 영양성분을 최적화하였으며 그 결과 sucrose 와 yeast extract (각 2%, v/v)를 선정	100
		통통마디 마쇄물(phyto source)의 <i>B. velezensis</i> K26 발효 (PSY+K26)를 통해 phyto source에서 추가 영양성분을 첨가한 경우 AGI 활성(93.6%)이 높게 나타났음을 확인	100
		UPLC-ESI-Q-TOF-MS 기반 상기 통통마디 발효산물의 추출물을 분석한 결과 <i>B. velezensis</i> K26 균주에 의한 통통마디 마쇄물의 발효산물의 AGI 활성은 DNJ에 의한 활성	100

		임을 확인	
통통마디로부터 유용 기능성식품 소재 확보		<i>B. velezensis</i> K26에 의한 통통마디 발효산물의 기능성식품 소재로 DNJ를 확보	100
		<i>B. velezensis</i> K26에 의한 통통마디 발효산물의 영양성분을 분석한 결과 미생물 발효를 통해 식이섬유가 포함된 총 탄수화물이 분해되고 조단백 생성률이 증가함을 확인	100
확보소재 및 정제물질 의 분자생물학적, 생화 학적 활성 평가		<i>B. velezensis</i> K26에 의한 통통마디 발효산물의 3T3-L1 세포독성 실험 결과 1/20 및 1/10 배 희석 시료군의 안정성을 확인	100
		3T3-L1 지방세포의 adipogenesis assay를 통한 통통마디 발효산물의 지방세포 분화억제를 분석한 결과 <i>B. velezensis</i> K26 균주로 통통마디 마쇄물을 발효시킨 경우 상대적으로 지방세포 축적이 억제되는 것을 확인	100
		<i>B. velezensis</i> K26 균주로 통통마디 마쇄물을 발효시킨 경우 RAW 264.7 대식세포주의 염증성 cytokine (IL-6 및 TNF- α)의 분비량이 유의적으로 감소됨을 확인하여 미생물 발효를 통한 통통마디 발효산물의 항염증능 확인	100

4-2. 관련분야 기여도

- 통통마디 추출물 100%를 이용한 염미소스 및 소금 대체제는 지금까지 없었으며 본 연구기관이 최초로 특허 받은 제조 아이디어이자 기술임. 따라서 본 과제를 통해 개발된 모든 기술과 제품이 최초로 저나트륨 소스 시장에 기여하는 바가 될 것임.
- 본 과제를 통해 통통마디 추출물을 이용한 저나트륨 염미소스를 개발함 (기여도 100%)
- 액상 형태가 대부분인 소스의 제형 다양화를 통해 제품 사용 용도의 다양화를 꾀함 (기여도 100%)
- 콩을 이용하는 우리나라 전통 발효 방식과 접목하여 통통마디를 이용한 조미소스를 개발하였으며 이는, 일체의 광물성 소금을 가하지 않은 100% 식물성 소스임 (기여도 100%)
- 통통마디를 이용한 발효 기술을 보유하여 다양한 맛과 향 등의 천연적 첨가가 가능함 (기여도 100%)
- 고염환경에서 통통마디를 잘 분해할 수 있는 균주를 이용하여 항산화능, 항혈전능 등의 기능성이 발효를 통해 증대되는 염미소스를 개발함 (기여도 100%)
- 통통마디 발효를 통해 항당뇨 기능이 높아진 발효 소스를 확보함 (기여도 100%)
- 통통마디 발효물의 동물실험을 통해 대장암의 억제에 효과적인 발효 소스를 개발함 (기여도 100%)

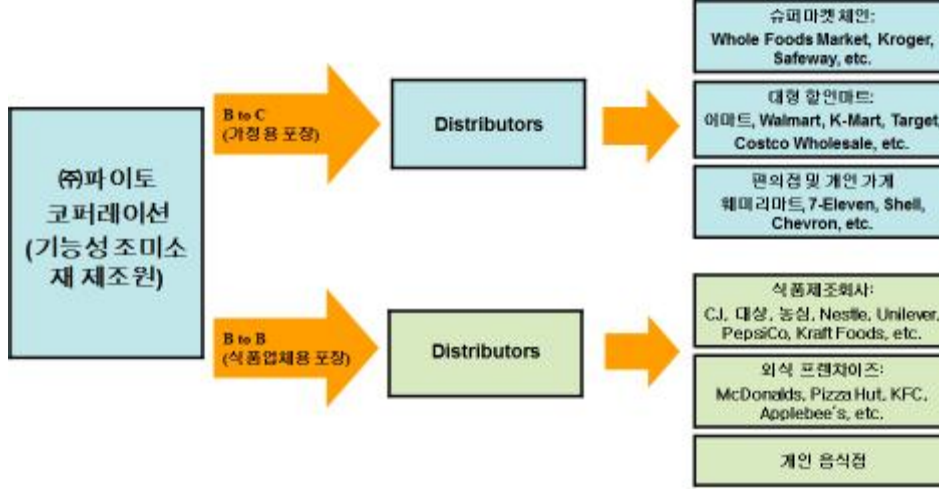
5. 연구결과의 활용계획 등

코드번호	D-07
------	------

- 사업화 전략
 - 제품홍보, 판로확보, 판매전략 등의 사업화 추진전략

구분	구체적인 내용
형태/규모	<ul style="list-style-type: none"> ○ 상용화 형태 : 480g의 병(액체) 포장 형태 및 분말 또는 과립의 병(고체) 포장형태 (아래쪽 사진: 당사가 개발한 시제품) ○ 수요처 : 일반 소비자 ○ 예상 단가 : 5,500원 (단위: 480g/ 1병), 3,000원 (단위: 50g/ 1병) ○ 개발 투입인력 및 기간 : 10명/ 2015.10.23.~2017.10.22. 

상용화 능력 및 자원보유	<ul style="list-style-type: none"> ○ 당사의 기술력이 뛰어나고, 관련 특허 다수 보유하고, 최근 벤처투자사로부터 20억원의 투자를 유치하여 상용화를 위한 자금이 충분함 ○ 통통마디 재배 농업회사 법인 '다사랑'과 원료 공급 계약 체결로 안정적인 원료 자원 보유가 가능함
---------------	--

상용화 계획 및 사업화 추진전략	<ul style="list-style-type: none"> ○ 2018년부터 할인마트, 백화점, 편의점 등을 통하여 'B to C' 전략으로 일반 소비자에게 판매, 'B to B' 전략으로 식품제조회사에 납품 계획 
-------------------	---

○ BM 목표 및 핵심경쟁요인

(1) BM 목표

- 세계최초로 통통마디 가수분해물의 발효를 통한 **항당뇨, 항비만 및 항암의 효능을 가미한** 고부가가치 기능성 조미소재를 개발 및 생산하여 소금을 첨가하지 않은 (No Salt-Added) 100% 식물성 염미소스로 국내 판매 및 해외 수출을 목표로 함

(2) 핵심경쟁요인

- 기존의 소금첨가 (Salt-Added) 조미소스 시장에서, 본 제품은 세계최초의 ‘소금 무첨가 (No Salt Added) 조미 소스’로 차별화 가능
- 본 과제의 조미 소스는 세계최초의 통통마디를 베이스로 하는 새로운 개념의 조미 소스임
- 본 제품은 100% 식물성 조미소스로 100% 식물성 조미소스가 아닌 기존 제품들과 차별화
- 항고혈압, 항혈전, 항염증 등의 효능이 있는 통통마디를 발효를 통해 고부가가치 기능성을 부가한 조미소재로 차별화
- 글로벌 식품회사와의 협력 및 수출 상품화
 - 현재 글로벌 식품회사인 GB Foods에서 본 제품에 대하여 구매 목적의 샘플 테스트를 진행 중임
 - **2015 aT 한국농수산물유통공사의 ‘2015 농식품 해외시장 맞춤형조사’ 중 전세계 지점을 보유하고 있는 대형유통 마트의 매장정보 및 소스 유통현황에 대한 조사에서도 ‘아시안 소스에 대한 수요가 늘고 있으며, 인지도가 높고, 경우에 따라서는 매장 내에서 매우 판매율이 높은 곳도 있음**

○ 목표 시장 구조

(1) 경쟁기업 현황

- 경쟁기업 현황

현재 대표적인 액상 조미소스 제품으로 샘표식품의 ‘연두’와 CJ의 ‘요리수’ 등이 있으나, 기존의 제품들은 콩을 베이스로 하고, 정제염 또는 천일염 등 광물성 소금이 첨가된 반면에, 당사의 본 제품은 세계최초로 통통마디를 베이스로 하고 소금을 첨가하지 않는 ‘소금 무첨가 (No-Salt Added) 100% 식물성 기능성 조미소재’로 차별화가 가능하고 경쟁력이 높음

- 경쟁구조

현재 액상 조미소재의 시장규모 연간 250 억원 중 ‘연두’가 70%를 차지하고 있으며 당사는 본 과제 기간 완료 이후 시장에 진입하여 5년 이내에 시장점유율을 10%까지 올릴 계획임

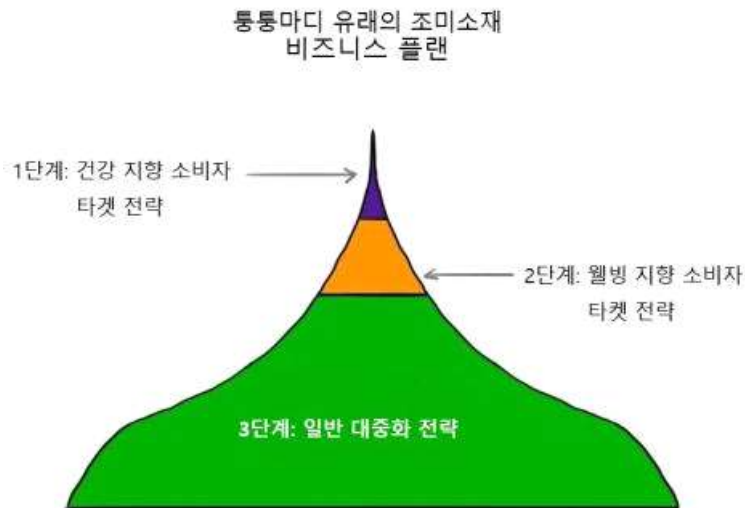
(2) 시장진입 장벽

- 본 통통마디 유래의 조미 소재의 원료인 통통마디(Salicornia SPP.)는 한국식품공전에 식용 가능한 원료로 등재되어 있는 등 매우 '안전한 식품 소재'로 관련 법규 등의 제약 요인이 없음

○ 수익 확보 전략

(1) 주요 고객군

본 제품 판매의 1단계 타겟 고객군은 '건강지향 소비자'를 대상으로 하고, 2단계 타겟 고객군은 '웰빙 지향 소비자'로 확대하고 3단계 타겟 고객군은 타겟의 범위를 '일반 대중'으로 확대 계획임



(2) BM의 수익창출 방안

- 본 과제의 통통마디 유래의 조미소재는 'B to C' 형태로 할인마트, 백화점, 편의점 등에 일반 소비자용으로 판매함
- 또한 'B to B' 형태로 글로벌 식품회사인 GB Foods 등의 식품회사에 납품할 계획임.
- 현재 GB Foods와는 본 제품의 구매의향서를 체결한 상태 임


6. 연구과정에서 수집한 해외과학기술정보

코드번호

D-08

○ 유럽 소스시장의 최신 트렌드에 대한 시장조사의 키워드는 ‘자연친화적인’, ‘기능적인’, ‘저나트륨의’

KEY INFO



유기농 인증

- 품질의 우수성, 고유하고 지속적인 제품의 특징, 친환경적인 생산방식을 검증받아 유기농식품으로 인증을 받을 수 있음

2014년 유럽 4개국 소스 시장규모

(단위 : 백만 달러)

국가	규모
1 러시아	704.37
2 영국	560.96
3 독일	433.45
4 폴란드	398.08
5 프랑스	372.74
6 스페인	266.67
7 루마니아	148.15

출처 : Data Monitor

시장트렌드 출처

- 프랑스 농업부 연구 및 조망센터(CEP)
- 프랑스 식품품질검사기관
- 유럽연합 European Union
- 한국농수산식품유통공사 aT자료
- 세계 식품 언론 Eater.com
- 세계 식품 언론 Food Businessnews

- ▷ 유럽에서는 품질을 신뢰할 수 있는 유기농 식품의 판매가 증가하고 있으며 윤리적인 식품 소비에 대한 관심이 높아지고 있음.
 - 유럽에서는 유기농 식품을 신뢰할 수 있는 식품이라고 여기며, 소비자뿐 아니라 유통업계에서도 유기농 식품에 관심을 보이고 있고, 2014년 2013년 대비 18.9%의 판매 증가율을 보이고 있음.
 - 또한, 지속가능한 개발과 관련된 제품에 대한 인식이 높아지고 있다. 지속가능한 개발과 가장 잘 부합하는 요리는 자국을 대표하는 요리 및 고향을 떠올리게 하는 식품이라고 평가하면서 제조업체들의 마케팅 방안의 주요 관심사가 되고 있다.

- ▷ 사회구조의 변화 및 식품위생 문제가 발생하면서 더 건강한 원료를 사용하여 소스를 제조하려는 제조업체들이 증가하고 있음.
 - 서유럽 사회구조(도시화, 성별의 사회적 역할에 대한 재정의, 여가활동 지출에 대한 증가)가 변화함에 따라 간편식을 찾는 소비자들이 늘게 되었고 쉽게 맛에 변화를 줄 수 있는 소스와 양념에 대한 소비자들의 관심이 증가하는 추세임.
 - 지난 십여 년 동안 유럽은 식품위생 파동, 비만 인구의 증가 등을 겪으면서 소비자들은 식품의 품질과 영양 성분에 주의를 기울이게 되었음.
 - 균형 잡힌 식생활에 소비자들이 관심을 가지게 따라 소스 제조과정에서 염분과 지방의 함량을 제한하여 소스를 생산하는 국가들이 늘어나는 추세임.
 - 소스에 들어가는 식품첨가물을 줄이고, 무방부제, 무색소, 글루텐프리 등 인공 향료를 첨가하지 않는 추세이며, 유전자 변형작물(GMO) 사용을 제한하는 추세임.

- ▷ 2014년 유럽의 소스 시장규모를 보면 러시아, 영국, 독일, 폴란드, 프랑스, 스페인, 루마니아 순으로 큰 시장규모를 가지고 있으며 이 중 프랑스, 스페인 등의 나라에서는 소스 수입 비용이 지속적으로 증가하고 있음.

- 소비자들은 긍정적인 요소에 반응하며 먹지 말아야 될 것보다는 먹으면 건강해지는 것에 더 관심을 기울이는 경향을 가짐. 세계 소비자 중 59%가 영양성분을 첨가한 제품에 관심을 느끼는 한편 87%의 소비자가 본래 높은 영양소를 가지고 있는 제품에 관심을 갖는 것으로 나타남. 이를 근거로 보면, 소비자들의 관심을 유도하기 위해 제품의 자연적인 영양성분을 부각시킬 필요가 있음.



(출처: 식품음료신문, 해외정보 해외동향 「2015 소스 드레싱 해외 시장 동향」)

7. 연구개발성과의 보안등급

		코드번호	D-09
보안등급 분류	보안	일반	
		√	
결정 사유	「국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정」 제24조의4에 해당하지 않음		

8. 국가과학기술종합정보시스템에 등록된 연구시설.장비현황

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

9. 연구개발과제 수행에 따른 연구실 등의 안전조치 이행실적

코드번호	D-11
------	------

1. 기술적 위험요소 분석

가. 연구실 안전 점검 체계 및 실시

(1) 실험실 안전 점검 체계

구분	세부내용
일일안전점검	<ul style="list-style-type: none"> · 점검횟수 : 매일 1회 · 점검내용 : 시약 및 실험폐기물 관리상태 및 정리정돈 상태 등 · 점검대상 : 이공분야 전체 실험실습실 · 점검자 : 연구활동종사자 및 연구실 책임자 / 주관 : 연구실책임자
정기점검	<ul style="list-style-type: none"> · 점검기간 : 연 1회 이상 · 점검대상 : A, B, C영 실험실 · 점검내용 : 시약보관 상태, 가스용기 관리상태, 보호구 착용 및 관리 상태 외 · 점검자 : 정기점검 기관 및 연구실안전환경관리자 / 주관 : 시설관리팀
정밀안전진단	<ul style="list-style-type: none"> · 점검기간 : 2년 1회 · 점검대상 : A, B, C영 실험실 중 정기점검 결과에 따른 정밀한 진단이 필요한 시범실 · 점검내용 : 가스누출여부, 전기과부하, 접지 상태 점검, 화학약품 반응위험도 점검 등 · 점검자 : 정밀안전진단 전문기관 위탁 / 주관 : 시설관리팀
안전순찰	<ul style="list-style-type: none"> · 점검기간 : 2년 1회 · 점검대상 : 송도, 제물포 이공분야 실험·실습실 · 점검내용 : 연구실 관리 상태 및 일일점검일지 작성 여부를 확인을 통한 관리·감독강화 · 점검자 : 연구실안전환경관리자(시설관리팀)

나. 실험실 안전점검

(1) 실험실 일상 점검

- 연구활동 시작 전 각 실험실 책임자가 육안으로 장비 및 시설을 매일 점검.

(2) 실험실 정기 점검

- 내용 : 과학기술분야 실험실의 일반안전, 산업위생, 전기안전, 소방안전, 화공안전, 가스안전, 기계안전, 생물안전 등의 전문분야 점검
- 실시 : 매월 각 실험실을 주기적으로 점검

(3) 실험실 정밀안전진단

- 대상 : 연구개발활동에 유해화학물질 관리법 제2조 7호에 따른 유해화학물질을 취급하는 연구실, 산업안전보건법 제39조에 따른 유해인자를 취급하는 연구실, 과학기술부령이 정하는 독성가스를 취급하는 연구실.(우리대학은 실험실관리등급 A, B급에 해당하는 실험실)
- 실시 : 매년 1회 이상 외부 전문기관에 의뢰하여 실시 후 중대결함이 발견될 경우, 보고 및 조치

※ 관리위험등급의 지정

- A등급 : 가연성가스, 인화성 시약, 유해화학물질, 다량의 폐액배출, 독극물, 생물 및 동물, 방사성 동위원소, 위험성이 높은 기계장비가 설치된 실험실
- B 등급 : 일반시약, 소규모 인화성 시약, 불연성가스, 소량의 폐수발생실험실
- C 등급 : 이화학실험을 수행하지 않는 전기, 설계, 컴퓨터 관련 실험실

다. 교육 훈련

- (1) 개요 : 『연구실 안전환경 조성에 관한 법률』에 의거하여 연구실안전교육을 통하여 연구활동종사자의 안전의식을 높이고, 실험실내 위험인지능력을 강화함으로써 안전사고 및 화재로부터 안전한 연구실 환경을 구축하고자 함.
- (2) 교육대상 : 교수, 대학원생, 실험조교, 소속연구원, 실험참여 학부생 및 업체직원 등
- (3) 교육실시
 - 1학기 : 공통이수과목(연구실 안전 일반, 전기, 소방설비 사용요령)을 온라인 교육 이수
 - 2학기 : 선택과목(화학, 기계, 생물, 소방안전 분야)을 온라인 교육으로 이수

라. 건강 검진

- (1) 개요 : 인체에 치명적인 위험물질 및 바이러스 등에 노출될 위험성이 있는 연구활동 종사의건강을 보호함.
- (2) 대상 : 산업안전보건법 시행령 제29조에 따른 유해물질 및 같은 법 시행규칙 별표 12의2에 따른 유해인자를 취급하는 연구활동 종사자에 대하여 일반건강검진 과 특수건강검진을 실시
- (3) 건강검진 실시 : 매년 1회 건강검진 대상자를 선정하여 건강증진센터에 의뢰하여 일반 건강검진 및 특수건강검진 실시

마. 추가 이행 계획

연번	이행계획	세부내용	비고
1	연구활동종사자 건강검진	상시연구활동종사자 건강검진(일반, 특수) 시행	
2	실험실 공기질 관리, 환기	유해물질농도 측정관리, 환기대책수립	
3	실험실 환경개선공사	노후 실험실 개선공사 시행	
4	연구실안전정보시스템 관리·운영	온라인 안전교육 및 안전정보 DB구축	
5	위험물 관리 감독 강화	위험물 저장소 관리·운영 다량의 위험물 별도 관리	
6	연구실 안전용품 구매	개인용 보호구 구매·비치	
7	연구실 상시 안전순찰 점검 시행	불시 안전순찰을 통한 연구실 안전환경 점검 및 개선	

2. 안전관리대책

가. 연구실의 안전관리 추가 이행 계획

- 연구실 작업환경 개선을 위한 폐기물함 커버 구입
- 인화성 물질 보관함 구입 및 비치
- 화재 대비용 소화기 지속적 점검 및 관리
- 눈에 이물질이 들어가는 것을 대비한 연구용 고글구입 및 사용교육
- 눈에 이물질이 들어갔을 경우에 대비해 아이 워셔 구입 및 비치
- 유해화학물질 사용에 필요한 마스크 비치 및 지속적인 후드의 상태 점검

10. 연구개발과제의 대표적 연구실적

번호	구분 (논문/ 특허/ 기타)	논문명/특허명/기타	소속 기관명	역할	논문게재지/ 특허등록국 가	코드번호		D-12	
						Impact Factor	논문게재일 /특허등록일	사사여부 (단독사사 또는 중복사사)	특기사항 (SCI여부/인용횟 수 등)
1	특허	나문재 속 식물의 추출물을 유효성분으로 함유하는 혈전증의 예방 또는 치료 용 약학적 조성물 및 건강 기능 식품	(주)파이 토코퍼레 이션	협동 50% 주관 50%	대한민국	-	2015.12.14	단독 (100%)	출원번호: 10-2015-01782 11
2	특허	나문재 속 식물의 추출물을 유효성분으로 함유하는 항균성 조성물	(주)파이 토코퍼레 이션	협동 50% 주관 50%	대한민국	-	2015.12.14	단독 (100%)	출원번호: 10-2015-01781 89
3	특허	통통마디 유래의 이소람네티를 유효성분으로 함유하는 비알코올성 지방 간 질환 예방 또는 치료용 약학 조성물	(주)파이 토코퍼레 이션	주관 100%	대한민국	-	2016.06.23	중복 (50%)	출원번호: 10-2016-00783 54
4	특허	함초씨 추출물을 유효성분으로 함유하는 혈전증의 예방 또는 치료용 약학적 조성물 및 건강 기능 식품	안동대학 교산학협 력단	협동 100%	대한민국	-	2016.08.10	단독 (100%)	출원번호: 10-2016-01020 65
5	논문	수확시기에 따른 함초의 항산화 및 항혈전 활성의 변화	안동대학 교산학협 력단	협동 100%	J Life Science	-	2016.09.30	단독 (100%)	비SCI
6	논문	함초의 부위별 항산화 및 항혈전 활성	안동대학 교산학협 력단	협동 100%	Microbiol Biotechnol Lett	-	2016.09.30	단독 (100%)	비SCI
7	논문	함초 씨의 항균, 항산화 및 항혈전 활성	안동대학 교산학협 력단	협동 100%	Microbiol Biotechnol Lett	-	2016.10.25	단독 (100%)	비SCI
8	특허	안지오텐신 전환효소 저해활성을 갖는 통통마디 유래의 5-deoxy-irilin B 및 이를 함유하는 조성물	(주)파이 토코퍼레 이션	주관 100%	대한민국	-	2016.11.03	중복 (50%)	출원번호 10-2016-01458 62
9	특허	5-Deoxy-irilin B having angiotensin-I converting enzyme inhibition activity derived from Salicornia spp and compound containing the same	(주)파이 토코퍼레 이션	주관 100%	해외	-	2016.11.04	중복 (50%)	PCT/KR2016/0 12624

10	특허	나문재 속 식물의 추출물을 유효성분으로 함유하는 항균성 조성물	(주)파이토키퍼레이션	주관50% 협동50%	대한민국	-	2017.03.07	단독 (100%)	특허등록: 10-1715622-00 00
11	특허	나문재 속 식물의 추출물을 유효성분으로 함유하는 혈전증의 예방 또는 치료용 약학적 조성물 및 건강기능 식품	(주)파이토키퍼레이션	주관50% 협동50%	대한민국	-	2017.03.20	단독 (100%)	특허등록: 10-1719612-00 00
12	논문	함초의 건조방법에 따른 항산화 및 항혈전 활성	안동대학교산학협력단	협동 100%	한국식품저장유통학회	-	2017.08.10	단독 (100%)	비SCI
13	논문	<i>Flavimarina flava</i> sp. nov., isolated from <i>Salicornia herbacea</i>	인천대학교산학협력단	협동 100%	Int. J. Syst. Evol. Microbiol.	2.134	2017.10.01	중복 (60%)	SCI
14	논문	<i>Paenibacillus arcticus</i> sp. nov., isolated from Arctic soil	인천대학교산학협력단	협동 100%	Int. J. Syst. Evol. Microbiol.	2.134	2017.11.01	중복 (40%)	SCI
15	특허	통통마디 유래 비알코올성 지방간 질환 예방 또는 치료용 이소람네틴의 분리방법	(주)파이토키퍼레이션	주관 100%	대한민국	-	2017.11.01	(50%)	특허등록: 10-1794294-00 00

11. 기타사항

코드번호	D-13
○	

12. 참고문헌

	코드번호	D-14
○ Abe, N, Nemoto, A, Tsuchiya, Y, Hojo, H, Hirota, A (2000). Studies of the 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical scavenging mechanism for a 2-pyrone compound. <i>Biosci Biotech Biochem</i> 64:306-333		
○ Ahmed MZ, Kikuchi A, Watanabe KN, Khan MA (2016). Bio-informatic analysis of a vacular Na ⁺ /H ⁺ antoportor(ALaNHX) from the salt resistant grass <i>Aeluropus lagopoides</i> . <i>Pak J Bot</i> 48(1):57-65		
○ Chung HJ (2014). Comparison of Total Polyphenols, Total Flavonoids, and Biological Activities of Black Chokeberry and Blueberry Cultivated in Korea. <i>J Korean Soc Food Sci</i> 43(9):1349 ~ 1356		
○ Choung MG, Kang ST, Han WY, Baek IY, Kim HK, Shin DC, Kang NS, Hwang YS, An YN, Lim JD, Kim KS, Park SH, Kim SL (2006). Variation of isoflavone contents in Korean soybean germplasm. <i>Korean J Crop Sci</i> 51(S):146-151		
○ Chung YC, Chun HK, Yang JY, Kim JY, Han EH, Kho YH, Jeong HG (2005). Tungtungmadic acid, a novel antioxidant, from <i>Salicornia herbacea</i> . <i>Arch Pharm Res</i> 28(10):1122-1126		
○ Iskshmi PV and mangaka DS (2011). Fermentative production of L-glutamic acid. <i>Int J Adv Biotech Res</i> 2:376-381		
○ Jang HS, Kim KR, Choi SW, Woo MH, Choi JH (2007). Antioxidant and antithrombus activities of enzyme-treated <i>Salicornia herbacea</i> extracts. <i>Ann Nutr Metab</i> 51(2):119-125		
○ Kim TH, Ku SK, Bae JS (2012). Antithrombotic and profibrinolytic activities of eckol and dieckol. <i>J Cell Biochem</i> 113:2877-2883		
○ Ku SK, Kim TH, Lee S., Kim SM, Bae JS (2013). Antithrombotic and profibrinolytic activities of isorhamnetin-3-O-galactoside and hyperoside. <i>Food Chem Toxicol</i> 53:197-204		
○ Kweon MH, Hwang HJ, Sung HC (2003). Isolation and characterization of anticomplementary uronic acids from the shoots of bamboo. <i>Phyllostachys edulis Planta Med</i> 69(1):56-62		
○ Lee XM, Lee HA, Kweon M, Park ES, Park KY. 2016. Probiotic Effects of <i>Lactobacillus plantarum</i> Strains Isolated from Kimchi. <i>J Korean Soc Food Sci Nutr</i> 45:1717-1724		
○ Lee YC, Hwang KH, Han DH, Kim SD (1997). Compositions of <i>Opuntia ficus-indica</i> . <i>Korean J Food Sci Technol</i> 29:847-853		
○ Lee YS, Lee S, Lee HS, Kim BK, Ohuchi K, Shin KH (2005). Inhibitory effects of isorhamnetin-3-O-beta-D-glucoside from <i>Salicornia herbacea</i> on rat lens aldose reductase and sorbitol accumulation in streptozotocin-induced diabetic rat tissues. <i>Biol Pharm Bull</i> 28(5):916-918		
○ Lothar E and Michael B (2005). <i>Corynebacterium glutamicum</i> . <i>Taylor&Francis</i> pp. 439-556		
○ Park MK, Kweon MH, Cho HY, Yang HC (1999) Anti-coagulant activity of sulfated		

- polysaccharides isolated from *Codium fragile*. *J Korean Soc Agric Chem Biotechnol* 42(2):140-146
- Peralta MA, Ortega MG, Agnese AM, Cabrera JL (2011). Prenylated flavanones with anti-tyrosinase activity from *Dalea boliviana*. *J Nat Prod* 74(2):158-162
 - Rasouli M, Ostovar-Ravari A, Shokri-Afra H (2014). Characterization and improvement of phenol-sulfuric acid microassay for glucose-based glycogen. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 18(14):2020-2024
 - Sung JH, Park SH, Seo DH, Lee JH, Hong SW, Hong SS (2009). Antioxidative and skin-whitening effect of an aqueous extract of *Salicornia herbacea*. *Biosci Biotechnol Biochem* 73(3):552-556
 - Su ZR, Fan SY, Shi WG, Zhong BH (2015). Discovery of xanthine oxidase inhibitors and/or α -glucosidase inhibitors by carboxyalkyl derivatization based on the flavonoid of apigenin. *Bioorg Med Chem.Lett* 25(14):2778-2781
 - Taylor ES (1949). The assimilation of glutamic acid by yeast. *Microbiology* 3(2):211-228
 - Wu YV and Abbott PT (2003). Protein Enrichment of Defatted *Salicornia* Meal by Air Classification. *JAACS* 80(2):167-169
 - Stadermann KB, Blom J, Borgmeier C, Sciberras N, Herbold S, Kipker M, Meurer G, Molck S, Petri D, Pelzer S, Schneider J. 2017. First complete genome sequence of *Bacillus glycinifermentans* B-27. *J Biotechnol* 257:187-191
 - Cai D, Liu M, Wei X, Li X, Wang Q, Nomura CT, Chen S. 2017. Use of *Bacillus amyloliquefaciens* HZ-12 for High-Level Production of the Blood Glucose Lowering Compound, 1-Deoxyojirimycin (DNJ), and Nutraceutical Enriched Soybeans via Fermentation. *Appl Biochem Biotechnol* 181:1108-1122
 - Kim MS, Seo JY, Oh J, Jang YK, Lee CH, Kim JS. 2017. Neuroprotective Effect of Halophyte *Salicornia herbacea* L. Is Mediated by Activation of Heme Oxygenase-1 in Mouse Hippocampal HT22 Cells. *J Med Food* 20:140-151
 - Gao K, Zheng C, Wang T, Zhao H, Wang J, Wang Z, Zhai X, Jia Z, Chen J, Zhou Y, Wang W. 2016. 1-Deoxyojirimycin: Occurrence, Extraction, Chemistry, Oral Pharmacokinetics, Biological Activities and In Silico Target Fishing. *Molecules* 21: pii: E1600
 - Cheung KL, Lee JH, Khor TO, Wu TY, Li GX, Chan J, Yang CS, and Kong AN, Nrf2 knockout enhances intestinal tumorigenesis in *Apc(min/+)* mice due to attenuation of anti-oxidative stress pathway while potentiates inflammation. *Mol Carcinog.* 53: 77-84 (2014)
 - Robertis MD, Massi E, Poeta ML, Carotti S, Morini S, Cecchetelli L, Signori E, and Fazio VM, The AOM/DSS murine model for the study of colon carcinogenesis: From pathways to diagnosis and therapy studies. *Journal of Carcinogenesis.* 10: 9 (2011)
 - Suzuki R, Kohno H, Sugie S, Nakagama H, and Tanaka T, Strain differences in the susceptibility to azoxymethane and dextran sodium sulfate-induced colon carcinogenesis in mice. *Carcinogenesis.* 27: 162-9 (2006)

주 의

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