

119027
-3

생물 전환공정 기반 천연비타민 K2 생산 및 소재화
2021

농림축산식품부
농림식품기술기획평가원

보안 과제(), 일반 과제(O) / 공개(O), 비공개() 발간등록번호(O)
맞춤형혁신식품및천연안심소재기술개발사업 2021년도 최종보고서

발간등록번호

11-1543000-004055-01

생물전환공정 기반 천연비타민K2 생산 및 소재화 기술 개발

2022. 05. 02

주관연구기관 / (주)동의보궁
공동연구기관 / 환동해산업연구원
공동연구기관 / 한국식품연구원

농림축산식품부
(전문기관)농림식품기술기획평가원

제출문

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “생물전환공정 기반 천연비타민K2 생산 및 소재화 기술개발”(개발기간 :
2019. 05. 20. ~ 2021. 12. 31)과제의 최종보고서로 제출합니다.

2022. 05. 02

주관연구기관명 : 농업회사법인(주)동의보감 (대표자) 박 정 철 (인)
공동연구기관명 : 환동해산업연구원 (대표자) 전 강 원 (인)
공동연구기관명 : 한국식품연구원 (대표자) 백 형 희 (인)



주관연구책임자 : 박 정 철
공동연구책임자 : 홍 선 미
참여기관책임자 : 이 상 희

국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정 제18조에 따라 보고서 열람에 동의 합니다.

< 요약 문 >

※ 요약문은 5쪽 이내로 작성합니다.

사업명		미래형혁신식품기술개발사업				총괄연구개발 식별번호 (해당 시 작성)	
내역사업명		천연안심소재 산업화				연구개발과제번호	119027-3
기술 분류	국가과학기술 표준분류	LB1801	35%	LB1703	35%	LA1704	30%
	농림식품 과학기술분류	PA0102	35%	PA0103	35%	PA0105	30%
총괄연구개발명							
연구개발과제명		생물전환공정 기반 천연비타민K2 생산 및 소재화 기술 개발					
전체 연구개발기간		2019. 05. 20. - 2021. 12. 31 (32개월)					
총 연구개발비		총 798,300 천원 (정부지원연구개발비: 637,000 천원, 기관부담연구개발비 : 161,300 천원)					
연구개발단계		기초[] 응용[] 개발[<input checked="" type="checkbox"/>] 기타(위 3가지에 해당되지 않는 경우)[]			기술성숙도 (해당 시 기재)		착수시점 기준(2) 종료시점 목표(7)
연구개발과제 유형 (해당 시 작성)							
연구개발과제 특성 (해당 시 작성)							
연구개발 목표 및 내용	최종 목표	원료(야채류) 고유의 성분과 부가적으로 기능성분을 향상시켜 비 타민 K2 강화 식품소재를 개발하기 위해 생물전환공정 기반의 (1)유산균발효를 통한 천연 비타민 K2 생산기술을 개발하고, (2)개발된 생산기술을 적용하여 pilot-scale의 식품소재 제조공정 을 확립하고자 함					
	전체 내용	<p>가. 1차년도(2019년)</p> <ul style="list-style-type: none"> ◦ 소규모발효공정 구축 및 발효물 제조조건 확립 ◦ 표준 발효 공정 확립 및 지표물질 설정 ◦ 세포수준의 평가방법 및 조건확립 <p>나. 2차년도(2020년)</p> <ul style="list-style-type: none"> ◦ 대량발효공정 구축 파일럿 시제품 생산 ◦ 효소발현 기반 표준발효공정 확립 및 유효성분 표준화 ◦ in vitro 효능평가 및 in vitro 기반 전임상실험 동물모델 구축 <p>다. 3차년도(2021년)</p> <ul style="list-style-type: none"> ◦ 대량생산공정 확립 제품생산 및 식품적용 기술 개발 ◦ 비타민K1, K2 소재의 안정적 생산 및 안정성 특성 분석 ◦ in vitro 기반 전임상 시험 효능평가 및 기전연구 수행 					

연구개발성과 활용계획 및 기대 효과	(식품분야)
	(농산분야)
	(융복합분야)
	(기대효과)

연구개발성과의
비공개여부 및 사유

연구개발성과의 등록·기탁 건수	논문	특허	보고서 원문	연구 시설 ·장비	기술 요약 정보	소프트 웨어	표준	생명자원		화합물	신품종	
								생명 정보	생물 자원		정보	실물
	6	4	4		4				4			
연구시설·장비 종합정보시스템 등록 현황	구입 기관	연구시설· 장비명	규격 (모델명)	수량	구입 연월일	구입가격 (천원)	구입처 (전화)	비고 (설치장소)	ZEUS 등록번호			
국문핵심어 (5개 이내)	비타민 K2		유산균		생물전환공정		야채류		골건강			
영문핵심어 (5개 이내)	vitamin K2		lactic acid bacteria		bioconversion		vegetables		bone health			

〈 목 차 〉

제 1 장 연구개발과제의 개요	01
제 1 절 연구개발의 목적	01
제 2 절 연구개발의 필요성	03
제 3 절 연구개발의 범위	15
제 2 장 연구개발과제의 수행과정 및 수행내용	20
제 1 절. 연구개발의 추진계획	20
1. 연구개발 추진전략	20
2. 연구개발 추진 세부 흐름도	21
3. 연구개발 추진 체계	22
제 2 절. 연구개발의 수행내용	24
1. 생물전환공정 기반 천연비타민K2 제품 개발(주관)	24
2. 비타민K2생산을 위한 생물전환공정 및 이용기술개발(공동1)	25
3. 비타민K2 강화 소재의 효능평가 및 전임상(공동2)	31
제 3 장 연구개발의 수행결과 및 목표 달성 정도	35
제 1 절. 연구수행 결과	35
1. 정성적 연구 개발 성과	35
2. 연구 개발 결과	39
3. 정량적 연구 개발 성과	131
제 2 절. 연구 목표 달성 정도	137
제 4 장 목표 미달 시 원인분석	138
제 5 장 연구개발성과 및 관련 분야에 대한 기여 정도	139
제 6 장 연구개발성과의 관리 및 활용 계획	140

제 1 장 연구개발과제의 개요

제 1 절 연구개발의 목적

1-1. 연구개발 최종 목적

1) 연구개발 목표

생물전환공정 기반의 천연 비타민 K2 강화 식품소재 개발을 위해, (1)유산균발효를 통한 천연 비타민 K2 생산기술을 개발하고, (2)개발된 생산기술을 적용하여 pilot-scale의 식품소재 제조 공정을 확립하고자 함

[기술개발 개념도]



2) 연구개발 정성적 목표

(1) 생산공정기술개발:

- ① 야채류(비타민K1) ② 비타민K2생산 유산균선별, ③ 72시간 이내 배양 (MK2 specific yield: 500 ug 이상/100mL 음료파우치)

(2) 천연비타민K 성분표준화

프로비타민K1(500ug/100mL), 비타민K2(50ug/100mL), DHNA

(3) 천연비타민K 소재의 전임상 결과(마우스 실험)

(4) 비타민K1, K2 함유 제품 개발



1-2. 연구개발 세부 목표

1) 주요 기능

- 유산균발효에 의한 야채류의 비타민 K1과 유산균의 K2 성분 강화
- 야채류에 함유된 각종 영양성분(비타민 K1, 필라퀴논, 미네랄 등) 뿐만 아니라, 유산균이 생산하는 비타민 K2(메나퀴논; menaquinone)가 강화되어 기능성 소재로의 승화
- 전임상까지 실시하여 혈행, 혈당 및 골분화 기능개선에도 우수한 고차가공 기술의 확립

2) 주요 성능

- 유산균발효 및 효소반응 촉진에 따른 전략소재의 함량 증가

	일반착즙액 (야채류)	유산균발효 (A)	효소반응촉진 (B)	A+B
비타민 K1	+++	+++	+++	+++
비타민 K2	-	+++	++	+++
DHNA	-	+++	+	+++

- 최종 개발소재의 혈당개선, 혈행개선 및 골건강 효과 증명
- 지방세포 또는 근육세포 배양계 기반의 지방세포분화억제 효능, glucose uptake 자극 증명
- AMPK, PPAR감마 등 혈당지표와 관련있는 마커의 발현 및 활성화 증명
- 혈당지표와 관련된 마커의 발현 및 활성화 증명
- 고지방식이 동물모델 또는 당뇨유발 마우스에서 비타민 K2 강화 소재의 공복혈당 개선 효능 검증 및 염증성 사이토카인 억제효능 증명
- RANKL로 RAW264.7세포를 파골세포로 유도한 후 TRAP 염색을 시행, 파골세포 분화기전으로 잘 알려져 있는 c-Fos와 NFATc1의 발현량을 real time PCR로 확인, p65의 활성화 정도를 단백질 발현량을 측정

3) 핵심 기술

(1) 유산균발효를 통한 천연 비타민 K2 생산기술

- 연구진이 보유한 유산균(Lactobacillus sp, Weissella sp)의 최적배양조건(온도, pH, 질소원 등) 확립으로 비타민 K2 및 그의 전구체(1,4-dihydroxy-2-naphthoate, DHNA)를 생산함

(2) 비타민 K2 전환효소의 반응 촉진 기술

- 비타민 K2 전구체에 작용하는 전환효소(Men A~H)의 반응 기반 비타민 K2를 생산효율 높임
- 전환효소 활용 비타민 K2 생산능 향상 및 적용기술 개발

4) 적용 범위

- 비타민 K2의 기능성을 결합한 야채류 발효액의 혈행개선, 혈당개선 및 뼈건강 기능의 갱년기 여성 또는 고령친화식품으로의 개발
- 고령화 시대를 사는 현재 고령친화식품의 소재로써 개발하여 다양한 식품에 활용 가능

제 2 절 연구개발의 필요성

2-2. 연구개발 대상의 국내·외 현황

가. 국내 기술 수준 및 시장 현황

1) 기술 현황 및 수준

- 고령인구 증가 등에 따라 면역력, 고지혈증, 골다공증 등의 질환이 증가되고 있는 추세이며 이로 인한 사회 경제적 비용이 증가되고 있어 이를 예방하기 위하여 호르몬 보충요법과 비타민 D와 K2(특히, menaquinone(MK)-7)를 섭취를 권장하고 있지만, 고기, 계란, 발효식품 등에서 섭취할 수 있는 비타민 K2의 양은 미미한 수준임
- 일본 전통음식인 나토(natto)에는 100g당 800~900 μg 의 menaquinone(MK)-7이 포함되어 있어, 메나퀴논-7을 가장 풍부하게 가지고 있는 식품으로 알려져 있지만(Collins et al., 2018), 많은 사람들이 나토 섭취에 익숙하지 않아 최근에 미국에서 권장하는 일일권장섭취량 1 μg /kg(body weight)/day 섭취량보다 적은 양의 비타민 K2를 섭취하고 있음(Sarah, 2011)
- 이러한 이유로 인해 많은 건강 소식지에서는 미생물이 생산하는 발효제품 섭취를 권장하고 있으며, 해외 많은 회사들 또한 비타민 K2 함유 제품을 시판하고 있는 실정임
- 비타민 K2의 구조 및 생성
 - 비타민 K는 천연에서는 비타민 K1(phyloquinone)과 K2(menaquinone-n, MK-n)가 있는데, 비타민 K1은 식물에서는 녹황색 야채와 해조류에 많이 함유되어 있고, 비타민 K2는 주로 미생물에 의해 만들어짐(Shearer, 1990)
 - 특히, 비타민 K2(메나퀴논, menaquinone)는 isophenyl기 측쇄의 길이에 따라 동족체가 존재하여 menaquinone(MK) 1~14로 분류되며, isophenyl기(아래 붉은색 괄호) 개수에 따라 MK-n+1로 명명됨(Shearer, 1990) * 예) isophenyl기가 3개 일 경우, 3+1=4, MK-4로 명명됨
 - 현재까지 비타민 K2의 동족체가 생성되는 메카니즘은 밝혀지지 않았으나, 동족체의 구조적인 차이를 볼 때, 비타민 K 생성능 보유 균주들은 menaquinone(MK)의 기본구조에 작용하여 지방산 사슬을 재배열 등으로 MK 1~14를 생산하는 것으로 추정됨
- 비타민 K2 생산균주에 관한 연구현황 및 기술수준
 - 비타민 K2 생산 균주로는 *Flavobacterium* sp, *Lactobacillus* sp, *Propionibacteria* sp, *Lactococcus* sp, *Leuconostoc* sp, *Bacillus* sp 등이 알려져 있으며, 각각의 미생물들이 주로 생산하는 비타민 K2의 종류는 다양함
 - 상기의 미생물이 생성하는 비타민 K2의 90~96%는 menaquinone(MK)-7 형태로(한국등록 특허 10-1196338). 이에 따라, 현재까지 비타민 K2의 MK-7 생산에 관한 연구는 주로 *Bacillus* sp을 이용하여 진행되었으며, *Bacillus subtilis natto* 균주가 비타민 K2(특히, MK-7)를 많이 생산하는 것으로 알려져 있음
 - 다만, 배지 내 방향족 아미노산인 L-phenylalanine, L-tryptophan, L-tyrosine의 농도가 높으

면 퀴논 골격의 생성을 저해하기 때문에(Tsukamoto et al., 2001), MK-7의 대량생산을 위해 *Bacillus subtilis* sp 균주에 UV 또는 nitrosoguanidine(NTG)를 처리하여 방향족 아미노산에 대한 저해를 받지 않고 menadione에 대한 내성을 지니는 돌연변이 균주(KCTC13028BP; 한국특허 10-1888072)를 이용하고 있음

- 비타민 K2 생산균주에 관한 국내연구는 “비타민 K 생산 젖산균 분리 및 이를 이용한 발효유 개발(임 등, 2011)”, “유전체 정보를 활용한 비타민 K 양산체제 구축 및 활용 기반기술 개발(권 등, 2006)” 등 극히 소수의 연구진에 의해 주도된 것 외에는 대부분이 비타민 K의 효능 또는 식품에 함유된 함량분석 조사 연구에 관한 것임

• 비타민 K2(메나퀴논) 생성 대사경로 및 관여효소에 관한 연구현황 및 기술수준

- 메나퀴논의 대사회로는 head group(1,4-dihydroxy-2-naphthoate, DHNA)을 만드는 전구체 대사회로와 polyprenyl side chain(octaprenyl-diphosphate, OPP)을 만드는 전구체 대사회로로 구성되어 있음

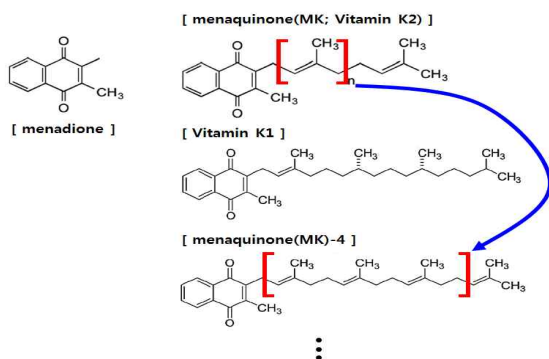
- 1,4-dihydroxy-2-naphthoate(DHNA)는 MenA(1,4-dihydroxy-2-naphthoate prenyl transferase), MenG(demethyl menaquinone methyl transferase)의 유전자 발현에 의해 menaquinone(MK)를 생산함(Hirota et al., 2013; 아래그림 참고)

- 인체 장내 균총에 의해 비타민 K1는 비타민 K2(menaquinone-4, MK-4)로 전환되는데, 이에 관여하는 효소의 활성을 촉진시키는 연구보다는 비타민 K2를 생산하는 균주의 발굴에 관한 연구가 대부분을 이루고 있음(Hirota et al., 2013)

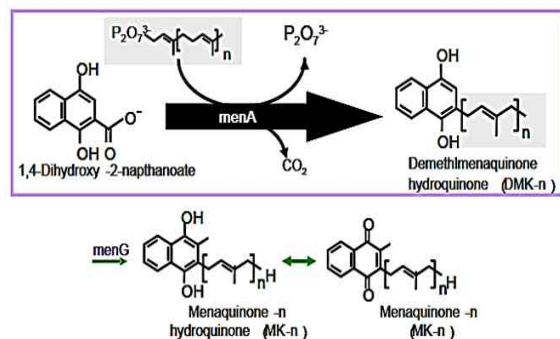
- 즉, 인체 장내 균총에 의해 음식으로 섭취된 비타민 K1은 여러 단계의 산화인산화 과정을 거치면서 비타민 K2(메나퀴논, menaquinone)로 변환되고, 미생물 대사과정에서 생성된 1,4-dihydroxy-2-naphthoate(DHNA)로부터 전환효소인 men A / G에 의해 비타민 K2가 생성되며, 체내에 흡수됨

- 현재까지 국내에서는 비타민 K2 생산능을 가지는 미생물 발굴에 관한 연구는 소수의 연구자에 의해 몇몇 진행하였으나, 상업적으로 활용하기까지는 여러 단계의 연구가 필요한 실정이며, 비타민 K2 생성에 관여하는 전환효소의 활성을 촉진시키거나 효소의 특성에 관한 연구는 국내에는 전무한 실정임

[VitaminK 구조]



[menaquinone(MK) 생성 대사과정]



• 비타민 K2의 효능에 관한 연구현황

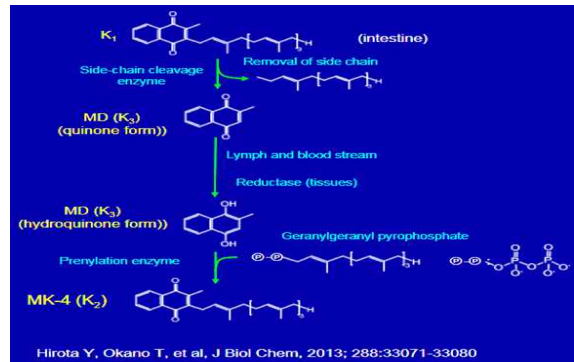
- 비타민 K는 혈액응고 인자 내에 glutamicacid를 카복실화(carboxylation)시키고, 골 대사에 있어 osteocalcin이라는 단백질의 카복실화에 중요한 역할을 하는데(Kohlmeier 등, 1996), 특히 비타민 K2(MK-7)은 골아세포 형성을 촉진시키고 파골세포를 감소시켜, 골형성을 돕고 골흡수는 막아줌(Hidaka et al., 2002)
- 비타민 K에 관한 국내연구로는 박 등(2007)의 ‘비타민 K와 심혈관계 질환과의 연관성’, 조 등(2015)의 ‘한국 성인의 비타민 K섭취와 골밀도 간의 연관성 연구’, 장 등(2011)의 ‘비타민 K의 골 건강 증진 효과’, 최 등(2000)의 ‘비타민 K 유도체의 혈소판 응집억제 활성 및 작용기전’ 등 골밀도, 심혈관질환 등에 관한 연구가 대부분으로, 비타민 K2가 염증, 골건강, 심혈관질환 등의 예방에 도움을 주는 성분임을 시사하고 있음
- 그 외 비타민 K에 관해서는 시판 상품 / 식품, 농산물 또는 야채소류에 함유된 비타민 K의 함량, 그의 분석법 등에 관한 연구가 주를 이루고 있음

[VitaminK 특성]

Table 4. Property of vitamin K

분류	Vitamin K ₁	Vitamin K ₂	Vitamin K ₃
Source	식물에 의해 합성	장내 미생물총에 의해 합성	합성 유도체
효능	섭취 후 1일이면 소실	5일 이상 효능 발휘	vitamin K ₂ 에 비해 2배 이상 활성
분포	상추, 시금치, 브로콜리, 녹차, 순무잎, 양배추	육류, 발효식품, Natto	-
안전성	30mg/day(허용상한 섭취량, 미국, 일본)		
권장량	성인 남성 120µg/day, 여성 90µg/day		
결핍증	신생아 출혈 - 뇌출혈, 출혈 성향 증가		

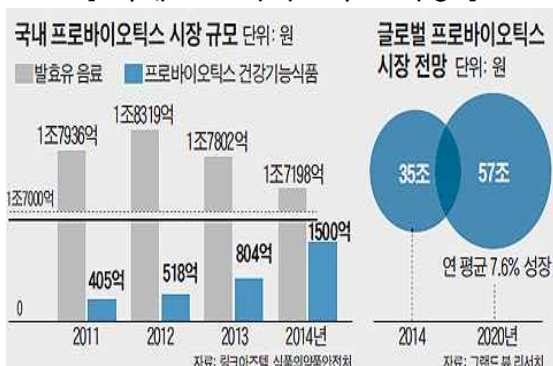
[장내 비타민K1에서의 MK 생성]



2) 시장현황

- 국내 프로바이오틱스 건강기능식품 시장규모는 200억원대에 이르고, 특히 발효 식품을 대상으로 한 한국형 유산균 제품이 대세를 이루고 있으며, 최근 스트레스, 미세먼지 등의 환경영향에 따른 알레르기 증상 억제를 위한 프로바이오틱스 시장이 확대되고 있음
- 청정 유래 및 바이오테크놀로지 활용 유산균 개발이 활발하며, 국내의 경우 김치, 청국장 유산균 또는 발효 식품 또는 부산물을 활용한 기술 개발 연구가 활발함

[국내 프로바이오틱스 시장]

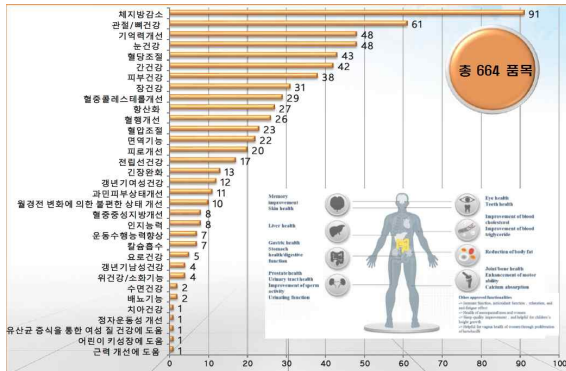


[건강식품으로의 프로바이오틱스]

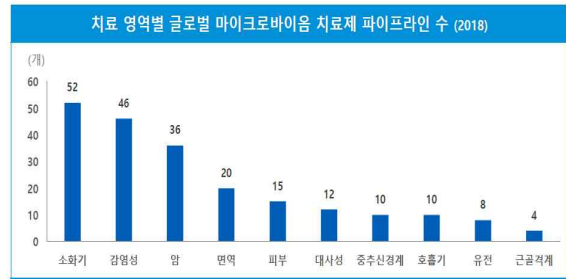


- 2018년 기준 개별인정형 건수는 체지방감소가 1위, 뼈건강이 2위, 혈당, 혈중콜레스테롤개선 등의 순으로 차지하고 있는데, 이는 소비패턴 및 인식도에 기인되기 때문에 본 연구사업으로 개발된 ‘천연 비타민 K2 소재’는 synbiotics의 의미를 구현하는 제품으로의 시장진입이 가능할 것으로 판단됨

[개별인정형 기능성별 인정건수]



[의약품으로의 프로바이오틱스]



- 품목별로 살펴보면 홍삼 기능성 원료를 사용한 제품의 출하액이 6,685억원으로 가장 큰 비중 (38.6%)을 차지하고 있으며, 그 다음으로 개별인정제품 및 비타민/무기질 제품 순이었음
- ‘12년도 생산실적의 경우 상위 10개 품목이 전체실적의 91.2%를 차지하고 이중 홍삼제품이 전체 실적의 46%를 차지하여 8년 연속 1위를 차지하였지만, ‘11년도에 비하면 크게 감소하였음
- 반면, 개별인정형 제품은 ‘11년에 비해 25.9% 가량 증가하여 빠른 성장세를 이어가고 있으며, 급격한 성장세를 보인 제품은 가르시니아카모보지아추출물 112.56%(207→440억원), 식이섬유제품 44.83%(116→168억원), 프로바이오틱스제품 27.9% (405→518억원)이 있음
- 이 중 프로바이오틱스는 시장 내 3위를 차지하고 있어 개발제품의 시장진입은 어렵지 않을 것으로 판단됨

[연도별 품목별 출하 현황(국내 출하액 기준, 단위 : 억원)]

품목명	2011년	2012년	2013년	2014년	2015년
홍삼	6,980	6,294	5,627	6,093	6,685
개별인정제품	1,419	1,790	2,296	3,128	3,123
비타민 및 무기질	1,555	1,622	1,726	1,397	2,041
프로바이오틱스	278	373	618	1,214	1,320
밀크씨슬 추출물	-	-	308	676	698
알로에	691	687	628	565	530
EPA 및 DHA 함유 유지	-	-	-	-	474
가르시니아카모보지아추출물	206	440	95	217	259
인삼	231	318	272	333	239
식이섬유	116	168	167	171	235
상위 10개 품목 소계	11,476	11,692	11,736	13,793	15,605
기타	1,650	1,815	2,329	1,847	1,721
합 계	13,126	13,507	14,066	15,640	17,326

※ 연도별 식품의약품통계연보, 식품의약품안전처

- 현재 섭취중인 건강기능식품은 비타민(27.4%), 홍삼(19.4%), 유산균·프로바이오틱스 제품(13.8%) 순이었고, 선물용으로 구입할 때에는 홍삼(35.9%), 비타민(22.0%) 제품을 가장 선호하였음

[현재 섭취중인 제품과 선물용 구입 경험이 있는 제품의 비교(단위 : %)]

현재 섭취 중인 제품			선물용 구입 경험 제품		
1	비타민	27.4	1	홍삼 제품	35.9
2	홍삼 제품	19.4	2	비타민	22.0
3	유산균/프로바이오틱스 제품	13.8	3	오메가3/EPA/DHA 함유 제품	14.0
4	오메가3/EPA/DHA 함유 제품	13.8	4	인삼 제품	9.1
5	칼슘 제품	6.9	5	유산균/프로바이오틱스 제품	4.9
6	인삼 제품	4.8	6	칼슘 제품	3.9
7	루테인	4.2	7	선물용 구입경험 없음	3.7
8	밀크씨슬	3.3	8	글루코사민 제품	2.7
9	기타	2.2	9	루테인	1.0
10	글루코사민 제품	2.2	10	클로렐라/감마리놀렌산 제품	1.0
합 계		100.0	합 계		100.0

- 건강기능식품 품목별 판매액 순위는 홍삼이 46.3%, 개별인정현 11.0%, 비타민 및 무기질 10.1%, 프로바이오틱스 9.7%, 밀크씨슬 추출물 4.7% 순으로 발표 됨(2017년)
- 건강기능식품의 판매규모는 2012년 1조 4,091억원에서 2017년 2조 2,379억원으로 연평균 9.69% 성장 됨.

[건강기능식품 시장규모(단위 : 억원)]

구분	2012	2013	2014	2015	2016	2017	CAGR
판매규모	14,091	14,820	16,310	18,230	21,260	22,374	9.69%

자료 : 식품의약품안전처, 2018 식품의약품 통계연보, 2018.

- 국내 건강기능식품 상위 10개 업체의 매출액은 한국인삼공사 부여와 원주공장이 1, 2위이며 그 뒤를 한국야쿠르트, 서흥, 콜마비엔에이치가 차지함
- 국내 비타민 및 무기질 시장은 고려운단, 서흥, 콜마비엔에이치, 푸디팜, 노바렉스, 마임 순

3) 경쟁기관현황

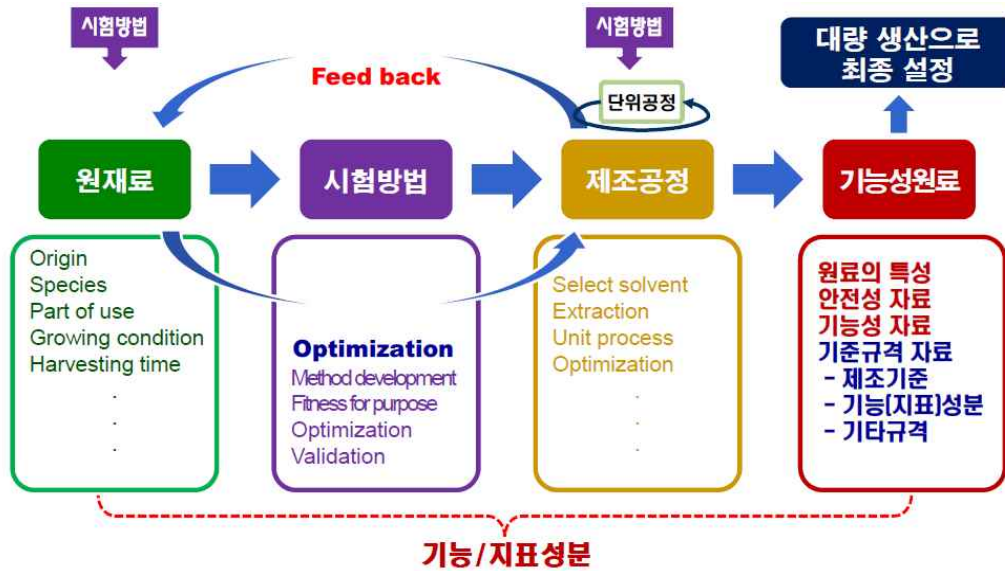
- (주)한국야쿠르트는 2008년 메디컬 그룹 나무(Namuh)라는 법인을 설립하고 본격적인 헬스케어 사업에 진출한 이후 현재 국내 유산균 분야 1위(점유율 40% 이상)를 차지함(출처, 장성재 (2018). 프로바이오틱스 분야의 현주소. BRIC View 2018-T09)
 - 2014년에 다목적 프로바이오틱스 플랜트공장 완공을 통해 생산량을 확대하였고, 2016년 갱년기 여성을 위한 건강기능식품을 출시하며 제품 라인을 확장하고 있으며, 주요 제품에는 헛개나무프로젝트쿠퍼스, 브이푸드, 바이오리브, LOOK(룩) 등이 있음
- (주)셀바이오텍은 프로바이오틱스 생산업체로, 중간재 및 완제품을 국내･외에 OEM 또는 ODM 형태로 공급하는 국내 프로바이오틱스 시장을 개척한 업체로 평가를 받고 있음
 - 2013년 공중파 광고 확대로 브랜드 인지도를 확립하였고, 프로바이오틱스 균주의 듀얼코팅 기술을 개발해 2016년 한국, 미국, 유럽, 일본, 중국에서 특허를 출원한 바 있으며, 주요 제품으로는 듀오락 시리즈가 있음
- (주)셀바이오텍의 뒤를 이어 미생물 발효기술과 공정 및 제조기술을 보유한 CJ제일제당과 일동제약이 맹추격을 하고 있음
- CJ제일제당은 유산균 전문브랜드 'Byo유산균'을 2015년 런칭하며 본격적인 사업 확대에 나섰다으며, 같은 해 일동제약도 '지큐랩' 브랜드를 선보이고 프로바이오틱스 사업에 본격적으로 뛰어들었음
- 식약처(2018)에 따르면, 현재 프로바이오틱스 관련 93개 회사가 총 1,812개(원료성 포함)의 제품에 대해 허가를 받았고, 프로바이오틱스 시장이 더욱 확대되고 있는 만큼 원료의 단순 수입보다는 장기적으로 차별화된 기능성 제품을 만들 수 있는 기술력이 우수한 업체가 시장을 선도할 것으로 전망하고 있음

4) 지식재산권현황

- 장 등(2016)은 돌연변이 *Bacillus subtilis* sp 균주를 배양 24시간 후, 5.8 g/l의 균체를 수득하였고, 21.8 mg/l의 MK-7을 생산하여 생산성은 시간(hr)당 MK-7이 0.91 mg/l(0.91 mg MK-7/l/hr)이었으며, 균체 당 MK-7 specific yield는 3.8 mg MK-7/g cell 이었음
- 이 등(2011)은 메나퀴논 생성 대사경로에 관여하는 *ubiC*(chorismate-pyruvate lyase) 및 *ubiA*(4-hydroxybenzoate octaprenyl transferase) 유전자를 결실시키는 것을 특징으로 하는 메나퀴논 고생산능 재조합 대장균으로부터 배양 48시간 후 균체 당 MK-7 specific yield는 150~180 ug MK-7/g cell 이었음
- 이 등(1998)이 항진균성 항생물질을 생산하는 *Bacillus* sp. LAM 97-44 균주가 *Bacillus* 속 세균의 전형적인 isoprenoid 색소가 7개인 menaquinone(MK-7)을 가지고 있었음을 밝힌 바 있음

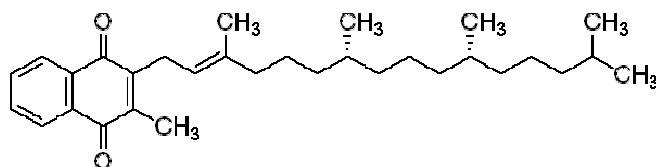
5) 표준화현황

- 식품의약품안전처는 고시형 원료인 비타민 K는 K1(phyloquinone), K2(menaquinone)을 총칭하고 혈액응고와 뼈건강에 도움을 주며, 식품원료를 사용하여 비타민 K를 보충할 수 있도록 제조&가공한 것으로 정의하고 있음



- 규격으로서 성상은 고유의 색택과 향미를 가지며, 이미·이취가 없어야 하고, 비타민 K 표시량의 80~180%가 되어야 하며, 대장균균은 음성이어야 함(인용 : 건강기능식품의 기준 및 규격 고시전문, 제3. 개별기준 및 규격, 1-5 비타민 K)
- 식품공전의 제4장 식품별 기준 및 규격내의 9.음료류 중 9-6 발효음료류는 ‘유가공품 또는 식물성원료를 유산균, 효모 등 미생물로 발효시켜 가공한 것을 말한다. 다만, 발효유류에 해당되지 않는 것을 말한다. 또한 식품유형(1) 유산균음료는 유가공품 또는 식물성원료를 유산균으로 발효시켜 가공(살균포함)한 것을 말한다. (3) 기타발효음료 유가공품 또는 식물성 원료를 미생물 등으로 발효시켜 가공(살균포함)한 것을 말한다. 로 정의되어 있는바 개발하는 소재 및 제품의 산업화에 용이함
- 다만, 시험법에서 표준물질을 비타민 K1(phyloquinone)으로 정하고 있고, 표시량 또한 비타민 K 총칭에 대해서만 언급하고 있으며, 비타민 K의 영양소 기준치는 55ug으로 설정하고 있으나, 비타민 K2의 량은 없음. 다만, 일일 섭취권장량을 21~1,000ug임

[비타민 K1 분자식 : C₃₁H₄₆O₂, 분자량 : 450.70, CAS No. : 84-80-0]



6) 기타현황

- 식품원료 중 시금치가 비타민 K1 함량이 가장 많고, 대두유, 양배추, 상추, 브로콜리 순으로 많이 함유되어 있으나, 이들은 MK-4 및 MK-7을 포함하는 비타민 K2는 함유하고 있지 않음. 다만, 이들 원료의 섭취를 통해 장내 균총에 의해 비타민 K1이 K2로 변환되면서 체내에 흡수됨
- 미생물에 의한 비타민 K2 생산 시 배지 내에 방향족 아미노산인 L-phenylalanine, L-tryptophan, L-tyrosine의 농도가 높으면 퀴논 골격의 생성을 저해하기 때문에(Tsukamoto et al., 2001), 소재개발에 사용되는 원료의 선발에 고려 사항으로 여기고자 함
- 이에 본 연구에서는 천연 비타민 K2를 생산하기 위한 원료로 비타민 K1이 고함유된 시금치, 양배추, 브로콜리 등 야채류를 선정하고자 하며, 이들을 활용하여 비타민 K2 생산 유산균발효 최적조건확립 및 전환효소 활성 촉진기술을 개발할 계획임

[식품원료 내 비타민 K 함량]

Table 1. Vitamin K content of food supply unit : µg/100g

Food	Vitamin K ₁ (phyloquinone)	Vitamin K ₂ (MK-4)	Vitamin K ₂ (MK-7)
Brocoli, raw	102±20	N.D	N.D
Cabbage, raw	127±20	1±1	N.D
Spinach, raw	369±54	N.D	N.D
Lettuce, raw	127±15	N.D	N.D
Soybean oil	234±48	N.D	N.D
Butter	2±1	21±7	N.D
Margarine	67±68	0.3±0.6	0.1±0.1
Curry powder	93±23	1±2	6±3
Beef, chuck, raw	0.6±0.1	15±7	N.D
Pork, thigh, raw	N.D	6±2	N.D
Chicken, thigh, raw	N.D	27±15	N.D
Whole egg, raw	0.6±0.3	7±3	N.D
Yogurt, plain	0.3±0.2	1±0.1	0.1±0.2
Processed cheese	2±1	5±2	0.3±0.1
Natto(fermented soybeans)	45±20	2±3	939±753
Black bean natto	50±45	N.D	796±93

N.D : not detectable

[식품원료 내 방향족아미노산 함량]

식품 번호 Item No.	식품명 Description	단위 g/100g Protein g/100g edible portion	아미노산 mg/100g 식품가식부							
			이 소 부 신	류 Leu	라 이 신	합계 메 티 오 닌	합계 시스 테인	합계 페 닐 알 라 닌	합계 아 미 노 산 AAA	
051	배추	Chinese cabbage	1.0	23	56	51	26	5	28	26
052	브로콜리	Broccoli	5.4	211	361	356	85	75	195	152
053	비트	Beet	2.9	12	17	31	1	2	10	3
	부추	Chinese chive								
054	그린벨트	Greenbelt	4.7	9	13	12	3	3	10	4
055	두레 흰색부위 마른 것	Dume, white part, dried	4.3	25	37	4	7	1	21	5
056	두레 녹색부위 마른 것	Dume, green part, dried	6.9	2	4	∅	1	∅	3	1
071	양배추	Cabbage	1.0	33	53	59	21	1	27	27
072	양상추	Head lettuce	1.2	36	48	35	11	8	35	27

나. 국외 기술 수준 및 시장 현황

1) 기술 현황 및 수준

- Berenjian 등(2011)은 natto에서 분리한 Bacillus subtilis natto 균주를 발효조건 최적화를 통해 5% 효모추출물, 5% glycerine, 18.9% 대두펩톤, 0.06% 제2인산칼륨 배지에서 120시간 배양하여 226 mg/l의 MK-7을 얻었고, 생산성은 시간당 1.8 mg/l, 단위세포 당 specific productivity는 16 mg MK7/g-cell이었음(Aydin et al., 2014)
- Puri 등(2015)은 Bacillus subtilis MTCC 2756를 10% 대두분, 0.5% 효모 추출물, 0.05% 제2인산칼륨, 5% glycerine이 함유된 배지에서 상기 균주를 16시간 성장시킨 후, MK-7의 전구체인 1-naphthol과 tween 80을 각각 배지 내에서 농도가 0.2% 및 0.1%가 되도록 첨가한 후 8시간 추가 배양하여 14.4 mg/l의 MK-7을 얻었으며, 생산성은 시간(hr)당 0.6 mg/l이었음

- Tani 등(1986)은 *Flavobacterium meningosepticum* mutant가 배양액 L당 MK 함량이 34 mg이었고, Sato 등(2001)은 natto 분리 균주인 *B. subtilis* MH-1와 diphenylamine 내성 돌연변이 균주인 D200-41을 10% 대두추출물, 5% glycerol, 0.5% yeast extract와 0.05% K₂HPO₄(pH 7.3)배지에 37°C에서 1일 교반 배양 후 45°C, 5일 정지 배양했을 때 최대 MK 함량이 60 mg/L 이었다고 보고함
- Tsukamoto 등(2001)은 비타민 K₂(MK-7)가 골단백인 osteocalcin의 카르복실화에 중요한 역할을 하며, 나토제품이 다른 식품에 비해 높은 MK-7을 함유하고 있고, *B. subtilis* mutant 균주로 생산된 나토제품의 MK-7 함량이 1,719 μ g/100g natto으로서 상업균주로 제조된 natto 제품에 비해 2배 더 높은 함량을 보였다고 보고함
- Hojo 등(2007)은 *Propionibacteria*가 주요 menaquinone인 tetrahydro menaquinone-9(MK-9(4H))을 생산한다고 밝혔으며, *propionibacteria*로 발효시킨 치즈 중 Norwegian Jarlsberg 치즈와 에멘탈 치즈가 아펜젤라 치즈나 그루웨어 치즈보다 MK-9함량이 200-650ng/g으로서 매우 높은 함량을 나타내었다고 보고함
- 비타민 K를 생산하는 젖산균에 관한 연구로는 Morishita 등(1999)이 발표하였는데 *Lactococcus lactis* sp. *cremoris* YIT 2001과 *Leuconostoc lactis* YIT 3001균주가 환원탈지 유나 두유배지에 배양되었을 때 menaquinone 함량이 29-123 μ g/L으로 나타나 유제품이나 기타 식품 발효용 스타터로 사용될 수 있음을 시사하였음
- MK-7은 osteoblast 형성을 촉진시키고 osteoclast를 감소시켜, 골형성을 돕고 골흡수는 막아주며, 뿐만 아니라, 체내 칼슘 이용에 특별한 단백질인 osteocalcin 및 matrix Gla protein(MGP)을 활성화 시켜 혈관에 발생하는 칼슘 경화 방지, 뼈 골절 방지 및 골다공증 예방에 사용되고 있음(Koshihara et al., 2008)
- 비타민 K₂는 조골세포를 활성화하고, 뼈의 형성을 촉진하는 역할을 하는데 그 기전은 γ -carboxylase의 cofactor로써 osteocalcin의 glutamine acid residue를 γ -carboxyl glutamic acid를 갖는 γ -carboxylated osteocalcin을 만들고 이는 hydroxyapatite와 결합하여 뼈의 석회화를 촉진함(Hauschka 등, 1989; Shearer, 1995)
- Szulc 등(1994)은 혈액의 undercarboxylatedosteocalcin의 농도가 높은 그룹이 낮은 그룹에 비하여 골밀도가 낮은 것으로 보고하였고, Lambert 등(1986)과 Sadowski 등(1993)의 연구에서는 혈액 내 비타민 K 농도가 연령과 상관성이 있다고 보고한 바 있어 비타민 K가 골밀도에 영향을 미치는 중요한 인자임을 시사하고 있음

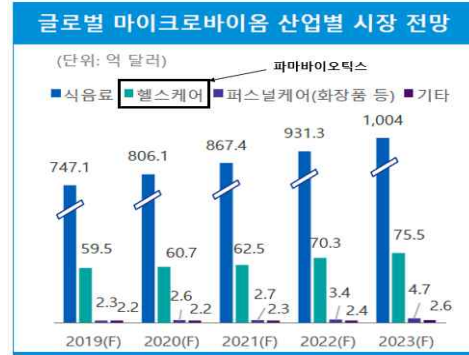
2) 시장현황

- 세계 건강기능식품 시장규모는 '15년 기준 1,179억 달러로 추정되며, 연평균 7.3% 성장하여 2020년에는 1,677억 달러에 이를 것으로 전망하고 있음(농림부 보도자료, 2017)

[세계 건강기능식품 시장 규모]



[글로벌 마이크로바이옴 산업시장]



- 세계시장에서 가장 큰 규모를 보이고 있는 곳은 미국으로 약 404억 달러 규모이며, 중국은 약 163억 달러, 일본은 약 109억 달러 순임

[국가별 건강기능식품 시장규모 및 전망 (단위 : 억 달러 / %)]

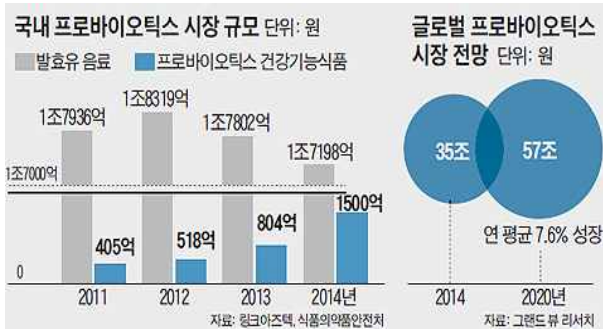
구 분	2015년	2020년	연평균 성장률	점유율 (2015기준)
미국	404	568	7.1	34.3
서유럽	168	190	2.5	14.2
중국	163	267	10.4	13.8
아시아(중국, 일본 제외)	118	187	9.5	10.0
일본	109	122	2.3	9.2
남미	89	155	11.7	7.5
기타	127	188	8.2	10.8
합 계	1,179	1,677	7.3	100.0

※ 건강기능식품 시장 동향, 연구성과실용화진흥원, 2016.10

(원자료 : NBJ's global supplement & nutrition industry report, Nutrition Business Journal, 2014)

- 한편 일본은 지난 '15년부터 사업자가 식품의 기능을 입증하면 관련 사업자의 책임하에 건강 효과를 제품 전면에 표기할 수 있는 '기능성표시 식품제도'를 도입하여 시행하고 있음
 - 우리나라의 건강기능식품과 유사한 종전의 특정보건용도 식품의 경우 임상실험을 통해 정부의 허가를 받기까지 약 5년의 시간과 비용이 소요됨에 따라 신청업체들이 대기업에 국한된다는 지적이 있었음
- 일본 야노경제연구소에 따르면, 기능성표시 식품시장 규모가 '15년 446억엔에서 '16년에는 1,483억엔으로 3배 이상 확대될 것으로 전망하고 있음
 - 日 기능성표시 식품제도 시행 2년, 시장규모 급성장(KOTRA 해외시장뉴스, 2017.4)
- 기능성 식품료, 식품보조제, 가축사료에 프로바이오틱스를 이용하기 위한 개발은 Hansen Holdings A/S(덴마크), Danone(프랑스), Nestle S.A.(스위스) 등의 유럽 회사와 일본의 Yakult Honsha Co. Ltd., 미국의 E. I. DuPont de Nemours 등이 있음
- 프로바이오틱스 재료 시장의 규모는 '15년 기준 약 330억불(약 36조원)에 달하며, 2020년까지 매년 7%씩 증가하여 470억불(한화 53조원)에 이를 것으로 예측됨

[국내·외 시장 비교]



[세계 프리바이오틱스 시장]



- BioGaia AB(스웨덴), Lifeway Foods, Inc.(미국), Probi AB(스웨덴), Nebraska Cultures Inc.(미국) Probiotics International Ltd(영국)과 같은 중소 업체들이 독자적인 엔지니어링을 통해 건강에 유익한 미생물 균주 특허를 확보하고 프로바이오틱스 시장에 진출을 시도하고 있음
- 비타민 및 무기질 건강기능식품 시장의 판매규모는 2014년 1,415억 원에서 2017년 2,259억 원으로 연평균 16.9% 성장 함
- 비국내 음료류 시장은 성장세를 지나 성숙기로 웰빙 등의 트렌드를 접목한 신제품이 출시되고 있어 음료류 시장은 2012년 44,337억 원에서 2016년 51,049억 원으로(8.8% 연평균) 증가
- 야채즙 중 농축 채소즙 시장은 2014년 1,267억 원에서 2017년 1,630억 원으로(8.8% 연평균) 증가 됨

[국내 비타민 및 무기질 건강기능식품 시장과 농축 채소즙 규모(단위 : 억원)]

구분	2014	2015	2016	2017	CAGR
비타민 및 무기질 건강기능식품	1,415	2,079	1,843	2,259	16.9%
농축 야채즙	1,267	1,387	1,499	1,630	8.8%
합 계	2,682	3,466	3,342	3,889	13.2%

- 건강기능식품의 유통채널은 인터넷몰, 다단계, 방문판매, 대리점, 약국 대형할인점 등이 있으며 대형마트나 백화점 등의 자유판매와 신고의무 완화로 진입가능성 높음

3) 경쟁기관현황

- 낙농이 발달한 유럽에서는 이미 1982년부터 <Biotech G Program>에 의해 유산균 유전자에 대한 체계적인 연구가 진행 되어왔고, 지금은 60여 개의 연구단체가 참여한 STARLAB (Strategic & Applied Research in Lactic Acid Bacteria) 프로젝트를 통해 균주의 개량, 대사회로의 규명과 수식, 유용물질의 생산개발을 추진하고 있음(임번삼, 프로바이오틱스의 기술 및 시장 동향. KISTI 기술동향보고서, 2003)
- 이 밖에도 Nordic Program과 유럽연합행사(EU Fair CT96 Probdemo)를 통해 프로바이오틱

유산균에 대한 기준을 마련한바 있고, 현재 서유럽에서는 프로바이오틱과 항산화제가 기능성 식품 시장을 주도하고 있으며, 이에 부응한 제품들이 개발됨

- 이들에게 관심이 많은 건강요인은 면역증강, 변비예방, 콜레스테롤 저하, 암 예방, 튼튼한 뼈, 에너지 충전, 소화기 건강 등으로 프로바이오틱의 효능과 관련된 것이 많음
- 미국에서는 청장년을 대상으로 부상하고 있는 맞춤형식품은 식이섬유, 기능성 물질(비타민, 무기질, 호르몬), 저열량 감미료 및 면역강화나 병원성 억제용 유산균 음료가 주류를 이루고 있음
- Danone, Nestle, Child-Hansen 등은 특정 균주와 개인건강을 연계한 제품을 출시하였고, Syonny Field Farm은 6종의 프로바이오틱을 혼합한 “Nutrica”를 발매하여, 소화증진, 유당 불내증 완화, 칼슘흡수능 개선, 면역 향상, 암 예방 등을 모두 해결하려고 시도하여 인기를 얻고 있음
- 일본에서 건강기능식품 시장은 소화기계 제품이 주도하고 있고, Snow Brand, Yakult, Meiji Dairy Product 등의 유가공업체가 중심이 되어 요구르트 등의 다양한 유산균 음료를 개발 출시 하였음
- 전문 발효기업인 Kyowa Hakko는 유산균의 종균을 공급하는 스타터 비즈니스를 주도하고 있으며, Ajinomoto는 유산균 음료인 칼피스를 녹차와 혼합한 제품을 개발하여 크게 히트함

4) 지식재산권현황

- 콩빠니 자베 다노느 등(2009)은 ‘유산균에 의한 비타민 K2의 생산 촉진을 위한 배양 방법 및 식품제조에서의 이의 적용(10-2009-0094235)’에 관한 기술을, 그노시스 등(이탈리아, 2014)은 ‘비타민 K2의 제조방법’에 관한 기술을 보유하고 있음
- Tani 등(1989)은 Flavobacterium에 의해 MK-4, MK-5 및 MK-6의 효과적인 생산이 보고되고 있고, 생산된 MK-4의 최대 농도는 192mg/l이었다(Tani, Y. et al. 1989). Morishita 등(1999)에 따르면, 긴 이소프렌 곁가지(side chain)를 갖는 MKs의 산업 생산은 최근까지 보고되지 않았다.
- 젓산 박테리아로부터 MK-7 29~123 μ g/L이 생산되었고, Bacillus subtilis로부터 생산된 발효된 콩식품인 "나또"는 일본에서 인기가 있는 것으로, MK(600~900 μ g/100g)을 다량 함유하고 있다(Sakano, T. 등1988).
- 나또를 제조하는 데 사용되는 Bacillus subtilis는 식용이 가능하며, 그것은 식품 산업에서 MK의 가장 유리한 원료들 중 하나이다. Yoshinori Tsukamoto 등(2001)에 따르면, 건조 중량을 기준으로 1,719 μ g/100g의 생산량을 갖는 Bacillus subtilis "나또"의 유사체 저항성 변이주(analogous resistant mutant)를 발견하였고, 다음과 같은 목록의 몇몇 특허 또는 특허 출원에 따르면, 비타민 K2(MK-7)는 건조 중량을 기준으로 약 1.0 μ g/g 또는 그 이하로 생산된다(US 2004/043015; US 2005/0025759; US 2002/0146786; US 2001/0046697).

제 3 절 연구개발의 범위

3-1. 최종 개발목표 및 내용

가. 최종목표

○ 원료(야채류) 고유의 성분(비타민K1)과 부가적으로 기능성분을 향상시켜 비타민 K2 강화 식품소재를 개발하기 위해 생물전환공정 기반의 (1)유산균발효를 통한 천연 비타민 K2 생산기술을 개발하고, (2)개발된 생산기술을 적용하여 천연비타민K 소재 제조공정을 확립하고자 함

- 생산공정기술개발:

- ① 야채류(비타민K1) ② 비타민K2생산 유산균선별, ③ 72시간 이내 배양 (MK2 specific yield: 50 ug 이상/100mL 음료파우치)

- 천연비타민K 함유 시제품 성분 정량화

비타민K1(500ug/100mL), 비타민K2(50ug/100mL)

- 천연비타민K 소재의 전임상 결과(마우스 실험)

- 비타민K1, K2 함유 제품 개발

3-2. 연차별 개발목표 및 내용

최종목표		생물전환공정 기반 천연 비타민(K) 생산 및 소재화 기술 개발		
Time span	분류	1차년도 (2019)	2차년도 (2020)	3차년도 (2021)
연도별 목표		소재개발 및 효능평가	소재평가 및 효능검증	표준화 및 제품화
핵심요소기술	소재생산 및 산업적용을 위한 유산균 발효기술	소재생산 균주의 실험실 수준 발효조건 확립	소재생산을 위한 발효공정 확립	파일럿 스케일의 발효공정 확립
	소재생산 및 산업적용을 위한 DoE 기술 확립	전환효소 발현 활용 DoE 발효 조건 확립	전환효소 발현 활용 DoE 발효 시스템화	DoE 기반 대량생산공정확립
	소재의 효능 평가 및 검증 기술	세포수준의 in vitro 활성평가조건 확립	바이오마커기반 in vitro 평가법 확립 및 효능 검증	in vitro 평가기반 in vivo 수준 효능 검증
	소재의 안전성 확보 및 표준화 기술	안전성평가 기반 확보 지표성분설정	안전성평가 기반 확보 원재료 표준화	소재의 독성평가 제조공정 표준화
	소재 가공 기술	발효/추출 조건 확립	건조/분쇄 조건 확립	소재의 안정화 조건 확립
	소재 대량생산 시스템 구축 기술	소규모 생산 조건 확립	프로토타입 생산조건 확립 및 경제성 평가	대량생산공정 확립 및 최적화
	면역기능개선,골건강증강 식품 적용 기술	복합기능소재 발굴 및 확보	소재 안정성 검증 및 최적 배합조건 확립	제형화 기술 확립을 통한 시제품 생산

가. 1차년도(2019년)

① 연구개발 목표

- 주관연구기관(동의보급(주)): 야채비타민발효공정 조건 확립 및 비타민함유물 소재화
- 협동연구기관(한동해산업연구원): 유산균의 비타민K2 표준발효공정 확립과 지표성분분석
- 협동연구기관(한국식품연구원): 세포기반 비타민 K 성분 강화 소재의 면역 및 이상지질혈증 개선 효능평가

② 개발 내용 및 범위 (시스템 구성도, 구조 등을 그림으로 구체적 표현)

- 주관연구기관(동의보급(주))
 - 과채(양배추, 브로콜리) 또는 기타 액즙의 전처리 공정 구축
 - 미생물활용 소규모 발효공정 조건 확립
 - 발효물 제조 및 성분분석, 효능평가를 위한 발효물 제공
 - 액상, 분말 상태의 제형화
- 협동연구기관(경북해양바이오산업연구원)
 - Lp, Wp 등의 비타민 K2 전환효소 발현 기반 DoE 작성
 - 전환효소의 정제, 분리 및 생산과 활용(FPLC 등)
 - DoE기반 비타민 K1에서 K2 전환 효율 확인(TLC, HPLC, ELISA kti 등) W
 - 효소발현 기반 최적발현 조건 설정
- 협동연구기관(한국식품연구원)
 - 세포내 NO 생성량 측정
 - 세포접착단백질(ICAM-1, VCAM-1) 발현 억제 효과 분석
 - 세포내 염증성 사이토카인(IL-6, TNF-a 등), 케모카인(MCP-1) 발현억제효과 분석



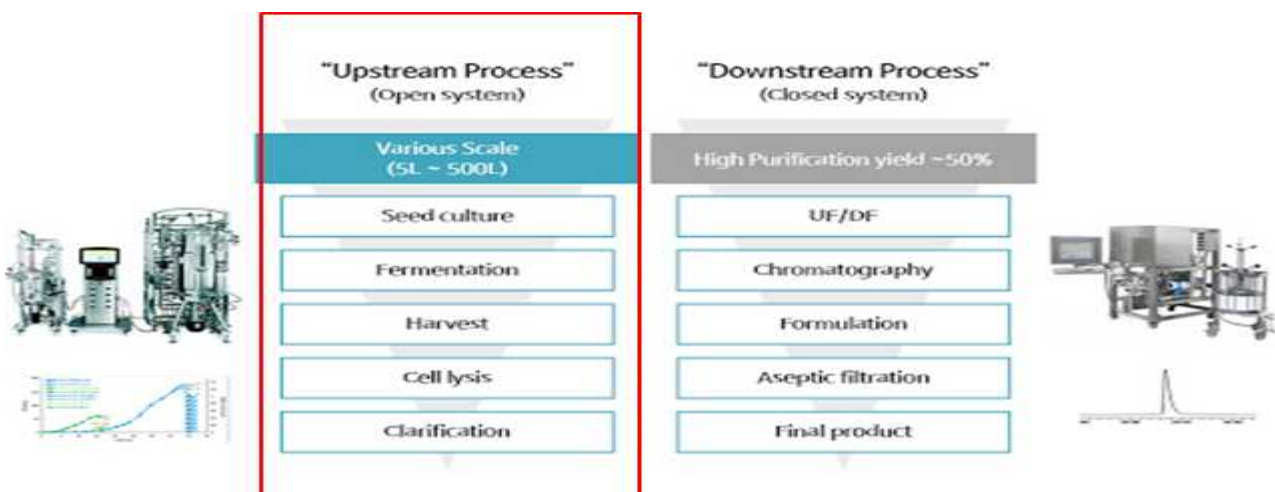
나. 2차년도(2020년)

① 연구개발 목표

- 주관연구기관(동의보급(주)): 과채즙 식품의 천연 비타민 K2 대량생산 및 제품화
- 협동연구기관(환동해산업연구원): MEN 효소발현 기반 표준공정 확 (VitK1, K2 성분정량)
- 협동연구기관(한국식품연구원): 도출된 소재의 in vitro/in vivo 기반 대사성 질환 개선 효능평가

② 개발 내용 및 범위 (시스템 구성도, 구조 등을 그림으로 구체적 표현)

- 주관연구기관(동의보급(주))
 - 고수율 전처리에 따른 과채 또는 기타 액즙의 천연 비타민 K2 함량 조사
 - 유산균발효 및 효소반응조건을 접목한 파일럿 수준의 공정 구축
 - 성분분석 및 효능평가를 위한 발효물의 제조 및 제공
 - 소재의 제형화를 위한 건조, 분쇄 등 조건 확립
- 협동연구기관(환동해산업연구원)
 - 선발균주와 비타민 K2 전환효소 생산 시스템화(지속생산)
 - 양배추, 대추 등 천연물 활용 Pilot scale에 의한 천연 비타민 K 생산 조건 확립
 - 천연 비타민 K1, K2 전환 표준 성분 확인(TLC, HPLC 등)
 - pilot scale 배양 후 전 성분분석(조단백, 조지방, 열량, 무기염류 등)
 - 안정성 및 안전성 분석(MTT 및 온도)
- 협동연구기관(한국식품연구원)
 - 표준품(또는 경쟁품)과의 대사질환 개선 효능 비교
 - 후보소재의 세포독성 유무 확인
 - 도출된 소재에 대한 in vitro 기반 대사질환 효능 평가 연구
 - 도출된 소재 활용 전임상 기반 효능 평가 연구



다. 3차년도(2021년)

① 연구개발 목표

- 주관연구기관(동의보급): 비타민 K2 과채 소재 제품의 대량생산공정 확립 및 시제품 생산
- 협동연구기관(한동해산업연구원): 비타민 K1,2 발효공정생산 안정화 및 성분 표준화
- 협동연구기관(한국식품연구원) : 도출된 소재의 in vitro/in vivo 기반 골건강 증진 효능 평가

② 개발 내용 및 범위 (시스템 구성도, 구조 등을 그림으로 구체적 표현)

• 주관연구기관(동의보급(주))

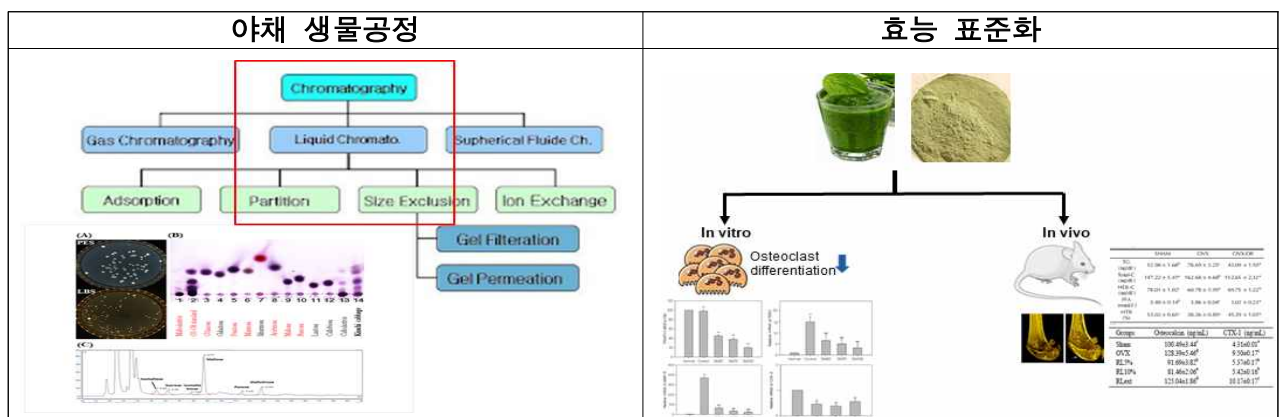
- 표준 발효 및 효소반응공정을 도입한 대량생산공정 구축
- 야채혼합 발효 및 효소반응 공정을 도입한 대량생산공정 확립
- 소재의 제형화 조건 확립
- 시제품 생산 및 경제성 분석
- 비타민 K2 함유 소재 및 제품의 상용화를 위한 식품적용 기술 개발 및 양산 최적화

• 협동연구기관(한동해산업연구원)

- 비타민 K2 전환효소(Men) 대량 정제 생산(FPLC, excel column)
- 야채혼합 천연물 활용 천연 비타민 K2 대량 생산 및 성분 확인
- 배양발효에 의한 천연 비타민 K2 성분의 표준서 작성
- 배양발효물의 성분분석(조단백, 조지방, 열량, 무기염류 등)
- 안정성 및 안전성 분석(MTT 및 온도)

• 협동연구기관(한국식품연구원)

- 표준품(또는 경쟁품)과의 골대사 증진 효능 비교
- 후보소재의 세포독성 유무 확인
- 도출된 소재에 대한 in vitro 기반 골건강 효능 평가 연구
- 도출된 소재 활용 전임상 기반 효능 평가 연구



3-3. 연구개발 성과 및 평가방법

- 기술개발 목표

- 1) 비타민K 발효야채음료 1종 개발
- 2) 비타민K 발효야채분말 1종 개발
- 3) 특허출원 2건

(단위 : 건수, 백만원, 명)

성과목표	연구기반지표1											기타 (타 연구 활용 등)							
	지식 재산권 ²⁾			기술 ²⁾ 실시 (이전)		사업화 ³⁾					기술 인증		학술성과			교육 지도	인력 양성	정책 활용 홍 보	
	특 허 출 원	특 허 등 록	품 종 등 록	건 수	기 술 료	제 품 화	매 출 액	수 출 액	고 용 창 출	투 자 유 치			논문		학 술 발 표			정 책 활 용	홍 보 전 시
													SC I	비 SC I					
단위	건	건	건	건	백만 원	건	백만 원	백만 원	명	백 만 원	건	건	건	명	건	건			
가중치	10	5		5	5	30	20		10				10			5			
최종목표	2	1		1	10	2	10		2		4	1	6			1			
1차연도																			
2차연도	1								1		2		3						
3차연도	1	1		1	10	2	10		2		2	2	3			1			
소 계	2	1		1	10	2	10		3		4	2	6			1			
종료 1차연도		1				1	20		1		1		1			1			
종료 2차연도		1				1	30		1										
종료 3차연도							50	50	1										
종료 4차연도							100	50											
종료 5차연도							200	100											
소 계		2				2	400	200	3		1		1			1			
합 계	2	3				4	410	200	6		5	2	7			1			

* 단계별 연구성과 목표는 향후 중간/최종/추적평가 등의 정량적 평가지표로 활용됨

제 2 장 연구개발과제의 수행 과정 및 수행 내용

제 1 절 연구개발의 추진 계획

1. 연구개발 추진 전략

1) 야채류로부터 유산균발효 및 효소반응촉진을 통한 비타민 K2 강화 소재의 개발

• 동의보감(주)(주관기관, HACCP인증기관)

- * 원료확보 및 공급: 주관기관은 야채류 원료를 확보하여 협동기관인 경북해양바이오산업연구원(이하 경북바이오)에 제공함
- * 파일럿 및 대량발효공정 구축: 경북바이오에서 기본적으로 제공하는 유산균을 확보하여 소규모 발효 및 생산 모델을 확립하고, 이로부터 생산된 발효액은 성분분석 및 세포실험을 위해 경북바이오 및 한국식품연구원(이하 식품연)에게 제공함
- * 대량생산공정 확립: 원료(야채류)의 대량확보로 지속적 생산체계를 구축함
- * 소재의 산업적 활용을 위한 기술(건조, 분쇄, 제형화)개발 담당

• 환동해산업연구원(지자체 출연연구원)

- * 최적배양조건확립: 주관기관으로부터 제공받은 원료로 공배양조건 설정과 지표물질에 대한 함량분석을 실시함
- * 유산균 발효 및 효소반응촉진 기술을 개발함
- * 개발된 기술은 파일럿 수준 및 대량생산공정을 확립할 수 있도록 체계화 함

• 한국식품연구원(출연연구원)

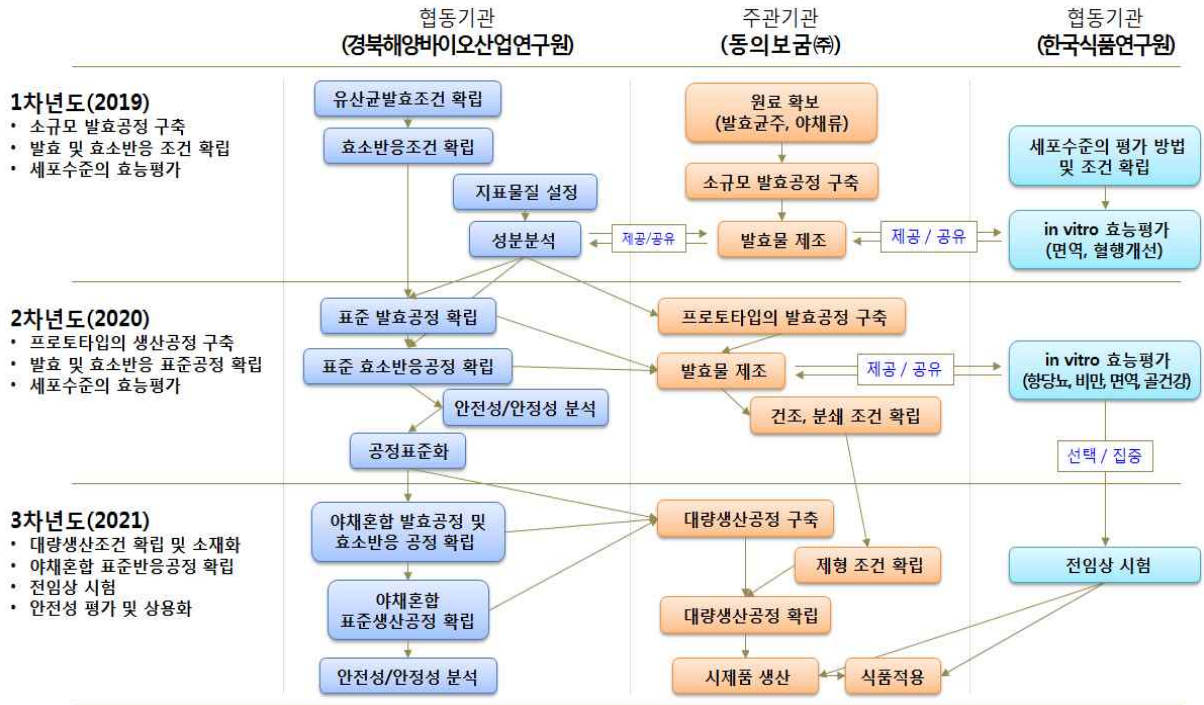
- * 소규모, 파일럿 및 대량생산공정으로 얻어진 소재의 세포수준 효능평가 결과물은 주관기관 및 경북바이오와 공유하여 전임상 단계 진입 시 선택과 집중할 수 있도록 함

2) 소재의 생산·가공·제조·유통과 관련된 산·학·연 전문가 확보 및 기술정보 수집

- 사업운영진을 중심으로 정기적인 워크숍 및 세미나를 통해 결과공유, 추진전략 보강, 기술개발 및 사업화에 관한 자문 등으로 사업목표를 달성할 수 있도록 추진함

2. 연구개발 추진 세부 흐름도

< 연구개발 협력 추진 체계도 >



< 테스트베드 구축방안 >

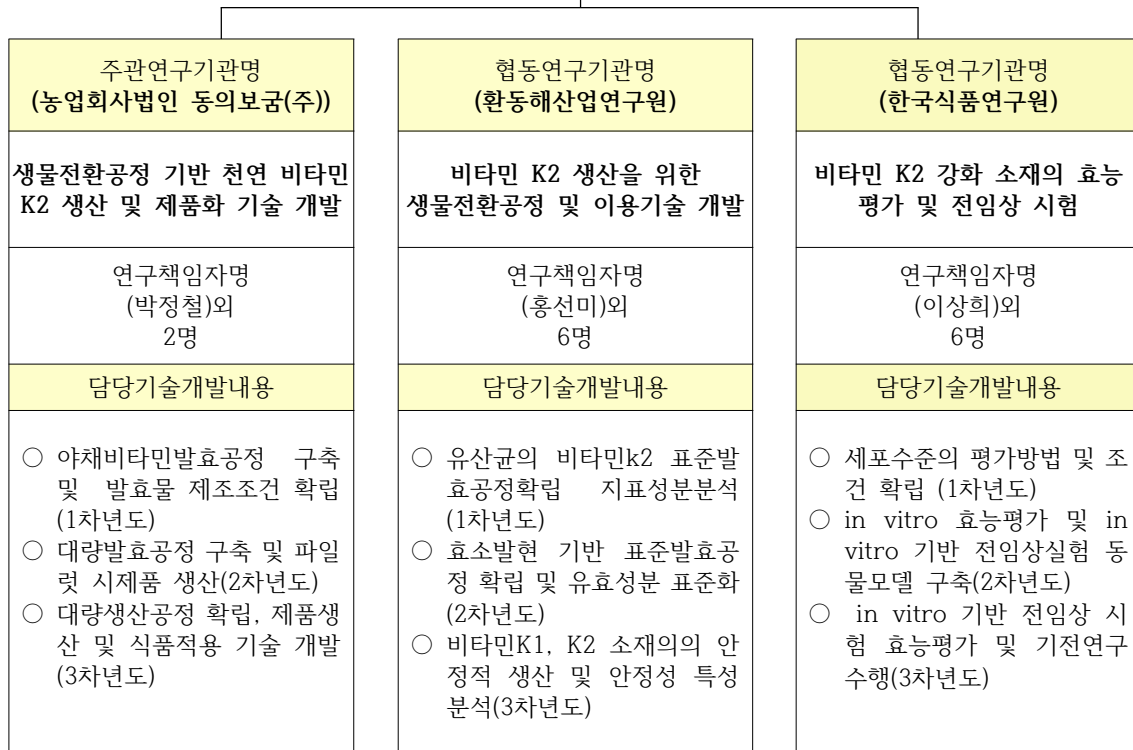
- 테스트 베드 구축 및 시범서비스를 통한 기술홍보 및 상용화 추진 등
 - 동의보감(주)(주관기관)이 갖추고 있는 발효, 여과, 농축, 건조, 분쇄 등 설비를 이용하여 소재를 생산하기 위한 테스트 베드를 구축하고 및 시범서비스 추진함
 - 개발소재 및 이를 응용한 제품은 국내·외 식품관련 전시회 참가 등으로 기술홍보를 추진함
 - 주관연구기관(동의보감)의 안전관리인증(HACCP) 인증 기관으로 식품 위해 요소 중점관리 기준에 따른 위생적 생산 가능

3. 연구개발 추진 체계

1) 연구개발 추진체계

연구개발과제		총 참여 연구원
과제명	생물전환공정 기반 천연 비타민 K2 생산 및 소재화 기술 개발	주관연구책임자 (박정철)외 총 16명

기관 별 참여 현황		
구 분	연구기관수	참여연구원수
대 기 업		
중견기업		
중소기업	1	3
대 학		
국공립(연)		
출 연 (연)	2	14
기 타		



2) 추진 일정

1차년도																
일련 번호	연구내용	월별 추진 일정												연구 개발비 (단위: 천원)	책임자 (소속 기관)	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12			
1	원료확보 및 착증공정 구축					■	■	■	■	■	■	■	■	■	50,000	박정철 (동의보급(주))
2	발효물 제조 및 제공									■	■	■	■	■	32,500	박정철 (동의보급(주))
3	효소발현기반 발효공정 구축					■	■	■	■	■	■	■	■	■	40,000	홍선미 (환동해산업연구원)
4	지표물질 설정 및 성분분석									■	■	■	■	■	20,000	홍선미 (환동해산업연구원)
6	세포수준의 평가방법 및 조건 확립					■	■	■	■	■	■	■	■	■	40,000	이상희 (한국식품연구원)
7	in vitro 효능평가 (면역, 혈행개선)									■	■	■	■	■	20,000	이상희 (한국식품연구원)
2차년도																
1	대량발효공정 구축 및 조건 확립	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	100,000	박정철 (동의보급(주))
2	파일럿 시제품 생산									■	■	■	■	■	41,800	박정철 (동의보급(주))
3	효소발현기반 표준발효공정 확립	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	51,000	홍선미 (환동해산업연구원)
4	유효성분 표준화							■	■	■	■	■	■	■	30,000	홍선미 (환동해산업연구원)
5	in vitro 효능평가 및 안정성 분석	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	51,000	이상희 (한국식품연구원)
6	전임상 및 안정성 분석							■	■	■	■	■	■	■	30,000	이상희 (한국식품연구원)
3차년도																
1	야채 발효 대량생산 및 제품생산	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	90,000	박정철 (동의보급(주))
2	식품화 기술 적용 및 마케팅			■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	30,000	박정철 (동의보급(주))
3	제품홍보 및 판매처 확보				■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	21,800	박정철 (동의보급(주))
4	비타K의 안정적 발효생산 및 확인	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	41,000	홍선미 (환동해산업연구원)
5	비타K의 안정성 및 특성분석	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	40,000	홍선미 (환동해산업연구원)
6	비타K 함유 야채 발효물의 전임상실험	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	41,000	이상희 (한국식품연구원)
7	비타K소재의 기전연구		■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	40,000	이상희 (한국식품연구원)

제 2 절 연구개발의 수행 내용

1. 생물전환공정 기반 천연비타민K2 제품화 기술개발(주관)

1) 채소 착즙 전처리

경북지역(또는 국내) 채소 착즙액을 생산하고자 시금치, 양배추, 브로콜리를 선별하여 대량의 채소들을 기계의 컨베이어벨트로 이동시켜 깨끗한 물로 고압 살포하여 세척하였다. 세척된 채소는 착즙기를 이용하여 파쇄와 동시에 압착하여 즙을 생산하였다. 파쇄와 착즙을 동시에 진행하여 공정시간을 줄이고 유통과정에서의 변질 우려를 최소화하였다. 시금치, 양배추, 브로콜리는 각 10 kg을 구입(영천)하여 흐르는 물에서 2-3회 세척하여 이물질을 제거하였다. 이후 30분 정도 바구니에서 자연 건조에 의해 탈수 과정을 거친 후 스큐류타입의 착즙기(대구 가톨릭대)에서 각각을 착즙하여 착즙액은 각 18.5kg, 19.3kg, 11.1kg 얻었다. 이때 액상 상태와 착즙 후 생기는 물질은 분리하여 수거하였다.

이 후 연구와 실험에 사용을 용이하게 하기 위해 착즙액 자체의 장기 보관은 변질 우려가 있어 모든 액상 즙을 동결건조로 분말화하였으며 동결건조 후의 시금치, 양배추, 브로콜리 분말은 각 988.5g, 910.3g, 661g이었다. 모든 동결건조 분말은 -72℃에 보관하여 실험에 사용하였다.

2) 채소착즙액의 미생물 안정성 분석

채소 착즙액의 천연 비타민K1 손실을 최소화하고 배양 배지로 활용하기 위한 멸균 조건을 3M 바이오필름 대장균용 (3M, USA)을 통해 확인하였다. 유산균 배양하기 전 반드시 진행되어야 하는 고온고압멸균을 121℃에서 5분간 진행한 결과 멸균 전 착즙액과 달리 모든 미생물이 제거되었음을 확인하였다. 멸균된 채소배지에 유산균을 배양한 후 배양 착즙액의 장기 보관을 위하여 유산균을 사멸시키고자 80℃에서 20분간 열을 가였고 유산균이 사멸되었음을 확인하였다.

3) 파일럿 배양 공정

착즙 동결건조 분말을 멸균 증류수에 녹여 시금치, 양배추, 브로콜리 순서대로 5:4:1 비율이 되도록 혼합하여 3L를 제조하였다. 이를 멸균된 5L 발효조에 주입하고 121℃에서 5분간 멸균하여 고온에 의한 비타민K 손실을 최소화하였다. 유산균 3종을 동일한 비율로 섞어 1% 접종한 후 26℃에서 24시간동안 200rpm으로 배양하였으며 냉각수를 이용하여 발효조 내의 온도를 일정하게 유지하였다. 이 때, 산소 주입과 pH 조절은 이루어지지 않았다. 배양 후의 착즙액은 80℃에서 20분간 열처리를 통해 유산균을 사멸시킨 후 저온 보관 및 동결건조를 통해 분말로 저장되었다.

4) 시제품 제작을 위한 음료배합물 조성 실험

시금치, 양배추, 브로콜리에 있어 제1협동(환동해산업연구원)에서 확인된 비타민 K1과 K2 함량에 따라 순서대로 5:4:1 비율이 되도록 혼합하여 3L를 제조하였다. 이를 멸균된 5L 발효조에 주입하고 121℃에서 5분간 멸균하여 고온에 의한 비타민K 손실을 최소화하였다. 유산균 3종을 동일한 비율로 섞어 1% 접종한 후 26℃에서 24시간동안 200rpm으로 배양하였으며 냉각수를 이용하여 발효조 내의 온도를 일정하게 유지하였다. 제작된 착즙 배양물은 맛을 확인하기 위해 기존의 시판 제품 6종과 비교하여 맛, 향, 색 등을 3회(2020. 05월, 08월 10월)에 걸쳐 실험하였다.

2. 비타민K2 생산을 위한 생물전환공정 및 이용기술개발(공동1)

1) 비타민K 유도 효소유전자 발현 유산균의 선별

해양 심층수, 해양어류 및 발효톱밥에서 항균성 유산균의 선발에 있어 비타민K의 전구체인 DHNA생산 유전자를 보유하는 *Lactobacillus. sp*, *Weissella sp*, *Lactococcus sp*, *Leuconostoc citreum* 등을 분리하여 관련 유전자를 16s DNA 시퀀싱 분석을 통해 확인 함 상기 분리된 각 유산균 균주는 16S rRNA의 염기서열 분석을 이용하여 동정되었다. 3종의 균주를 동정하기 위해, 우선 mini genomic DNA extraction kit(Promega)를 이용하여 각 균주의 유전체 DNA(genomic DNA)를 분리하였다. 상기 분리된 유전체 DNA를 주형으로, 하기의 27F 및 1492R 프라이머 세트 및 AccPower PCR premix kit(Bioneer, Korea)를 이용하여 TaKaRa PCR Thermal Cycler(Japan)으로 상기 균주 3종의 16S rRNA 유전자 부위를 증폭하였다.

27F 프라이머 (서열번호 1): 5'- AGAGTTTGATCMTGGCTCAG -3'

1492R 프라이머 (서열번호 2): 5'- GGTTACCTTGTTACGACTT-3'

상기 PCR 산물은 PCR clean-up Gel extraction(Macherey Nagel, USA)로 정제하여 ABI3730 DNA analyzer(Applied Bioxyxtems, USA)로 유전자 서열을 분석하였다.

2) 선발 유산균의 야채배지에서의 발효 조건 최적화

유산균 배양액(발효 원료)으로는 제조된 야채착즙액과 상기 열수추출물과 혼합식물 추출액의 배합물(시금치, 브로콜리, 양배추)을 각각 1L 이용하였다. 원료를 5% (w/v)로 넣어 121℃로 20분간 멸균 후 식혀 배지를 제조하고, 대조군으로는 유산균 배양에 일반적으로 이용되는 MRS 배지를 이용하였다. 유산균은 전체 부피의 1%(1×10^8 cfu/ml)를 준비하였다. 상기 제조된 각각의 발효 원료에 *L.plantarum* (KCCM12299P), *W.paramesenteroides* (KCCM12300P), *W.paramesenteroides* (KCCM12301P)을 각각 1×10^8 cfu/ml농도로 1mL씩 접종하고 30℃에서 24시간 동안 배양하였다. 24시간, 48, 71 시간 후의 LAB Counts(log cfu/ml)를 측정하여 최적 발효물 배양 조건을 확인하였다. 발효 후에 비타민K1 및 K2의 안정성을 확인하고 유산균을 생균 또는 사균의 조건도 확인하였다.

3) 야채즙에서의 비타민K 분석

각 유산균 배양액에 동량의 이소프로판올(isopropanol)를 첨가하여 스피인 다운 후 하부의 물을 제거하고, 상층의 이소프로판올을 부분만을 진공 농축하였다. 상기 농축된 부분을 메틸알코올(Methyl alcohol, MeOH) 500ul에 용해하여 제조하였으며, 상기 용매를 3ul씩 TLC 플레이트에 점적하여 사용하였다. 대조군으로는 Vit K1, K2 0.1%(w/v, 1mg/mL, 100ppm) 표준 용액을 Merck TLC silica GEL(TLC silica gel 60 F254, Merck)에 3 ul씩 점적한 후 용매로 분리하여 각 시료 내 DHNA의 유무를 확인하였다. 상기 TLC에서 분리에 사용된 용매는 메탄올(methanol):아세톤(acetone) 비율이 1:1의 부피비가 되도록 혼합하여 이용하였다.

용매 분리 후 결과는 UV램프로 발색하여 확인하였으며, 발색 결과 나타내었다.

4) 선발 유산균의 야채배지에서의 발효 조건 최적화

유산균 배양액(발효 원료)으로는 제조된 야채착즙액과 상기 열수추출물과 혼합식물 추출액의 배합물(PbTea)을 각각 1L 이용하였다. 원료에 각각 2%(w/v) 덱스트로스(D-glucose, Sigma, USA) 80mL, 1%(w/v) 전분(starch, Sigma, USA) 80mL, 2%(w/v) 수크로오스(sucrose, Sigma, USA) 80mL, 또는

2%(w/v) 말토오스(maltose, Sigma, USA) 80mL를 첨가하여 각 배지를 제조하고, 대조군으로는 유산균 배양에 일반적으로 이용되는 MRS 배지를 이용하였다. 상기 제조된 각각의 발효 원료에 *L.plantarum* (KCCM12299P), *W.paramesenteroides* (KCCM12300P), *L.lactis* (KCCM 12759), *Leuconostoc mesenteroides* (KCCM 12756P)을 각각 1×10^8 cfu/ml농도로 1mL씩 접종하고 26°C 또는 30°C에서 24시간, 48시간, 72시간 동안 배양하였다. 각 시간별 24, 48, 72시간 후의 LAB Counts(log cfu/ml)를 측정하여 최적 발효물 배양 조건을 확인하였다. 유산균의 생균수는 각 배양액에 상기 LAB Counts는 각 배양액에 아가로스 (BD Difco, USA)를 첨가하여 제작한 고체 배지에 배양물을 1%(v/v)로 희석하여 1 ml을 LAB 플레이트에 도말 후 30°C에서 24시간 배양하여 형성된 콜로니의 수를 측정하여 수행하였다.

5) 야채즙에서의 비타민K1과 K2(MK4)의 확인

양배추(Cabbage, Ca), 시금치(Spinach, Sp), 브로콜리(Broccoli, Br) 착즙액에 *L. lactis*(KCCM 12759P) 유산균을 각 배양액으로는 사용된 양배추, 시금치, 브로콜리 48시간 배양액 (200 mL)을 사용하였으며, TLC 수행시 양성대조군으로는 비타민K1(Sigma USA; V3051)과 비타민K2(MK-4; V042; Sigma USA) 각 5 ug/mL(0.05%; w/v)을 이용하였다.

또한 생산향상 기능을 높이기 위해 양배추(Cabbage, Ca), 시금치(Spinach, Sp), 브로콜리(Broccoli, Br)의 6:3:1과 5:4:1의 배합을 달리하여 배양하여 생균수, 비타민 K1과 K2 정량을 진행하였다.

각 배양액에는 *L. lactis*(KCCM 12759P)를 접종하여 30°C에서 호기 상태로 48시간 동안 유산균을 배양(발효)하였고, 48 시간의 유산균 배양 완료 후 유산균을 3,000-5,000 rpm으로 10-15분 원심분리하여 유산균만을 수집한 후 TLC 시료로 이용하였다. 배양 된 유산균을 1 x PBS 버퍼(phosphate buffered saline)로 2번 정도 세정하고 lysozyme(10 mg/mL; Roche, USA) 을 포함하는 6 mL의 PBS를 넣고 37°C에서 1시간 동안 방치한 후, 볼텍스 또는 혼합기를 이용하여 10-30분동안 충분히 섞어준다. 3,000-5,000 rpm에서 10-15분간 원심분리하여 상층액은 버린 후 24mL 추출버퍼 (n-hexane: isopropanol = 2:1; v/v)를 더하고 30초 동안 볼텍스로 혼합한 후, 3,000 - 5,000 rpm에서 10-15분 동안 원심분리하여 상층액을 회수하고 아래층에 isopropanol을 동량의 24mL를 첨가하여 30초 동안 볼텍스로 혼합한 후, 3,000 - 5,000 rpm에서 10-15분 동안 원심분리하여 상층액을 회수한다. 상기 단계를 총 2번 반복하여 얻어진 용매 추출물을 진공 농축(ratary)하고 2 mL의 iso-propanol에 용해하여 제조하여 사용하였다. 상기 용매를 3ul씩 TLC 플레이트에 점적하여 사용하였다. 대조군으로는 K1(Sigma USA; V3051)과 비타민K2(MK-4; V042; Sigma USA) 각 5 ug/mL(0.05%) 표준 용액을 Merck TLC silica GEL(TLC silica gel 60 RP F254, Merck)에 3 ul씩 점적한 후 용매로 분리하여 각 시료 내 비타민K1과 K2의 유무를 확인하였다. 상기 TLC에서 분리에 사용된 용매는 메탄올(methanol): 아세톤(acetone) 비율이 1:1의 부피비가 되도록 혼합하여 이용하였다. 용매 분리 후 결과는 UV램프로 발색하여 확인하였으며, 발색 결과 나타내었다.

6) 야채착즙액의 유산균 발효에 의한 비타민K1과 K2 정량분석

3종의 야채 착즙액에 각 유산균 또는 공배양하여 제조된 발효물에 대한 HPLC(high performance liquid chromatography)를 이용하여 정량분석하였다. 먼저 비타민K1과 K2(sigma, USA) 표준물질 을 이용해 각각의 비타민K1과 K2의 표준선을 얻었다. 제조된 양배추 착즙액, 시금치 착즙액, 브로콜리 착즙액 200 mL에 각 1×10^8 cfu/ml 농도로 0.2mL씩 접종한 후 30°C에서 호기적인 조건으로 48시간 배양과 양배추, 시금치, 브로콜리 착즙액 제조하였다. 48 시간의 유산균 배양 완료 후 유산균을 3,000-5,000 rpm으로 10 - 15분 원심분리 하여 유산균만을 수집한 후 HPLC 시료로 이용하였다. 시료에서 배양 된 유산균을 1 x PBS 버퍼(phosphate buffered saline)로 2번 정도 세정하고 lysozyme(10 mg/mL; Roche, USA) 을 포함하는 6 mL의 PBS를 넣고 37°C에서 1시간 동안 방치한

후, 볼텍스 또는 혼합기를 이용하여 10-30분동안 충분히 섞어준다. 3,000-5,000 rpm에서 10-15분간 원심분리하여 상층액은 버린 후 24mL 추출버퍼(n-hexane: isopropanol = 2:1; v/v)를 더하고 30초 동안 볼텍스로 혼합한 후, 3,000 - 5,000 rpm에서 10-15분 동안 원심분리하여 상층액을 회수하고 아래층에 isopropanol을 동량의 24mL을 첨가하여 30초 동안 볼텍스로 혼합한 후, 3,000 - 5,000 rpm에서 10-15분 동안 원심분리하여 상층액을 회수한다. 상기 단계를 총 2번 반복하여 얻어진 용매 추출물을 진공 농축(ratary)하고 3 mL의 iso-propanol에 용해하여 제조하여 사용하였다. HPLC용 컬럼은 Agilent HC-C18(4.6 x 150 mm, 5 um; Agilent Tech, USA)를 사용하였고 이동상 A 용액은 메탄올(methanol)과 이동상 B 용액은 이소프로파놀(isopropanol: hexane = 1:1)가 되도록 혼합하여 사용하였다. 컬럼의 온도는 40°C로 유지시켰으며 유속은 0.4 ml/min으로 하였고, 시료 주입량과 검출파장은 각각 50 ul와 254 nm로 하였다.

7) 혼합야채착즙액의 유산균 발효에 의한 비타민K1 및 K2 정량분석

두 종류의 혼합 착즙액 (착즙액 4 및 5)과 상기 두 착즙액 각각에 *Lactobacillus plantarum* (L.plantarum; Lp) (KCCM12299P), *Weissella paramesenteroides* (W.paramesenteroides; Wp) (KCCM 12300P) 및 *Lactococcus lactis* (L.lactis; Li) (KCCM 12759P)를 접종하여 공배양시킨 배양 배지의 배양시간에 따른 비타민 K2 (MK4) 생성능 및 비타민 K1의 정량분석을 실시하였다.

구체적으로, HPLC (high performance liquid chromatography)를 이용해 비타민 K1 및 K2의 정량분석을 실시하였고, 먼저, 비타민 K1과 비타민 K2 (sigma, USA) 표준물질을 이용해 각각의 비타민 K1과 비타민 K2의 표준선을 얻었다. 또한, 상기 착즙액 4 및 5의 착즙액을 각각 200mL씩 준비하여 HPLC 시료 (대조군)로 사용하였고, 상기 두 착즙액을 각각 200mL씩 준비하고, 각각에 *Lactobacillus plantarum* (L.plantarum; Lp) (KCCM12299P), *Weissella paramesenteroides* (W.paramesenteroides; Wp) (KCCM 12300P) 및 *Lactococcus lactis* (L.lactis; Li) (KCCM 12759P) 1x10⁸ cfu/ml 농도로 0.2mL 0.7 mL씩 혼합하여 전체가 2mL (Total 1%; v/v) 이 되도록 접종한 후 26°C에서 호기적인 조건으로 24시간, 48시간, 72시간동안 공배양하고, 상기 배양한 유산균을 3,000 ~ 5,000 rpm으로 10 ~ 15분 원심분리 하여 유산균만을 수집한 후 HPLC 시료로 사용하였다 (실험군). 상기 시료에서 배양 된 유산균을 1 x PBS 버퍼(phosphate buffered saline)로 2번 정도 세정하고 lysozyme(10 mg/mL; Roche, USA) 을 포함하는 6 mL의 PBS를 넣고 37°C에서 1시간 동안 방치한 후, 볼텍스 또는 혼합기를 이용하여 10-30분동안 충분히 섞어준다. 3,000-5,000 rpm에서 10-15분간 원심분리하여 상층액은 버린 후 24mL 추출버퍼(n-hexane: isopropanol = 2:1; v/v)를 더하고 30초 동안 볼텍스로 혼합한 후, 3,000 - 5,000 rpm에서 10-15분 동안 원심분리하여 상층액을 회수하고 아래층에 isopropanol을 동량의 24mL을 첨가하여 30초 동안 볼텍스로 혼합한 후, 3,000 - 5,000 rpm에서 10-15분 동안 원심분리하여 상층액을 회수한다. 상기 단계를 총 2번 반복하여 얻어진 용매 추출물을 진공 농축(ratary)하고 3 mL의 iso-propanol에 용해하여 제조하여 사용하였다.

HPLC용 컬럼은 Agilent HC-C18 (4.6 x 150 mm, 5 um; Agilent Tech, USA)를 사용하였고 이동상 용액의 경우 이동상 A 용액인 메탄올 (methanol)과 이동상 B 용액인 이소프로파놀 (isopropanol: hexane = 1:1)을 1:1 부피비로 혼합하여 사용하였다. 컬럼의 온도는 40°C로 유지시켰으며 유속은 0.4 ml/min으로 하였고, 시료 주입량과 검출파장은 각각 50ul와 254nm로 하였다.

8) 비타민K2 전환효소 유전자의 클로닝

해양에서 분리한 유산균의 선발에 있어 비타민K의 전구체인 비타민K2(menaquinone)생산 유전자(Men)를 보유하는 *Lactobacillus*. sp, *Weissella* sp, *Lactococcus* sp, *Leuconostoc citreum* 등을 분리하여 관련 유전자를 NCBI의 in silico 분석을 통해 유전자를 조사한 후, 프라이머 (menB, C, D, E, H, G 등)를 전사하여 시퀀싱 분석을 통해 확인 함 상기 분리된 각 유산균 균주의 우선 mini genomic DNA extraction kit(Promega)를 이용하여 각 균주의 유전체

DNA(genomic DNA)를 분리하였다. 상기 분리된 유전체 DNA를 주형으로, 각 유산균의 각 계층 내에서 확인된 men 유전자의 프라이머 세트 및 AccPower PCR premix kit(Bioneer, Korea)를 이용하여 TaKaRa PCR Thermal Cycler(Japan)으로 상기 균주의 Me 유전자 부위를 증폭하였다. 상기 PCR 산물은 PCR clean-up Gel extraction(Macherey Nagel, USA)로 정제하여 ABI3730 DNA analyzer(Applied Bioxytems, USA)로 유전자 서열을 분석하였다.

9) 비타민K2 전환효소의 재조합 단백질 생산 및 정제

유산균에서 확인된 클로닝된 men 유전자는 BmNPV DNA에 도입한 후, 알카리법에 의해 분리되고 누에세포(BmN) 세포에 Fugene(Promega, USA) 도입하여 형질전환시킨 후, 이를 4일간 배양하여 *L. mensenedius*의 MenG와 *Lactobacillus plantarum* MenA를 생산하는 세포를 제조하였다. BmN 세포는 10% FBS를 포함하는 TNM-FH(WeiGene, Korea) 곤충세포배지로 SPL(T-75, Korea) 플라스크를 이용하여 24-25 °C에서 배양하였다. 플라스크의 70%정도에 세포배양이 완성되면 FuGENE HD(transfection reagent, Promega, USA)를 이용하여 감염한 후 4일 후, JaLH를 발현하는 세포배양액을 확보하였다. 이와 같이 형질전환 세포에서 배양된 바이러스 용액은 8,000 rpm에서 10분간 원심에 의해 세포를 침전시킨 후, MILLEX AA 컬럼을 이용하여 필터과정을 거쳐 누에유충 및 번데기 감염바이러스로 제공하기 위해 4 °C에 보관하였다.

MenG, MenA 발현은 재조합바이러스 0.5x10⁵ PFU (Plaqueformingunit, 플라크형성단위)가 포함된 세포배양액 20 ul를 유충 1일에 실린저(Hamilton, USA)를 이용하여 주사하여 24-25 °C에서 효소발현의 최대치가 되는 72시간까지 방치하였다. 이때 유충은 상업으로 사육하는 반면, 번데기는 섭식을 하지 않는 상태이므로 주사 후 온도처리만으로 쉽게 MenG, MenA를 얻을 수 있다.

단백질 용출은 상기 단백질의 생물학적 기능에 손상이 없고 마쇄를 통한 추출 동안 단백질이 안정하게 존재할 수 있는 중성(pH 7-8), 20-50 mM 정도의 인산(Phosphate acid buffer)을 기본으로 해서 프로테아제 저해제; PMSF(Phenylmethane sulfonyl fluoride, 세린프로테아제 저해제), AEEBSF(4-2-aminoethyl-benzenesulfonyl fluoride, 세린프로테아제 저해제), Leupeptin(세린, 시스테인 프로테아제 저해제), Pepstatin(산성프로테아제 저해제), Chymostatin(카이모스립신 저해제) 몇 개의 프로테아제가 혼합되어 시판되는 protease inhibitor cacktail(Roche, Germany), 산화방지를 위한 환원제; 2-mercaptoethanol, DTT(Dithiothreitol), 금속 프로테아제 저해를 위해 대표적으로 사용하는 EDTA(Ethylenediaminetetraacetic acid)에서 대표 PMSF, Protease inhibitor cocktail, 0.1 mM EDTA를 완충액을 사용하였다. 세포 및 번데기 지방체 세포의 마쇄를 위해 폴리트론 호모게나이저(polytron homogenizer)를 이용하여 28-30 pulse로 5초간 마쇄 하고 5초간 휴지하는 것을 5분간 지속하였다.

마쇄에 의한 열발생으로부터 단백질안정을 위해 저온에서 진행하였다. 세포 마쇄가 완료되면 13,000rpm에서 20분간 원심 하여 침전물과 지질을 제거하였다. 이 과정을 두 번 반복하여 진행한 후 MILLEX-AA 컬럼을 이용하여 불순물을 제거하였다. 세포배양액과 혈액의 경우, 혈액을 침전시켜 얻어진 상등액에 PMSF, Protease inhibitor cocktail, 0.1 mM EDTA를 첨가하였다.

10) 추출물과 추출발효물의 비타민K의 분리 정제

시금치 및/또는 시금치, 브로콜리, 양배추 혼합물의 추출물과 추출발효물에서 비타민K 복합물을 분리 정제하기 위해 에탄올, 메탄올, 이소프로판올, 헥산의 유기용매를 사용하여 분리하여 각 용매에서 비타민K1과 K2를 정량과 정성 분석에 사용하였다.

10mL 의 메탄올로 미리 세척한 C18 Sep-Pak 컬럼에 시료용액 10mL을 통과시켜 모으고 이후 5회 정도 같은 방법으로 프랙션을 모아 ELISA와 HPLC 분석 시료로 사용하였다.

11) 재조합단백질 투여에 의한 유산균 발효에 의한 비타민K1과 K2 정량분석

재조합단백질로 생산된 *L. mesenteroides*의 MenG와 *Lactobacillus plantarum* MenA의 단백질을 BSA에 의해 단백질 정량하였다. 정량된 단백질은 시금치 발효시점에 1mg/ml의 농도로 접종하고 12시간 후에 재접종하였다. 재조합된 비타민K1과 K2 ELISA kit를 이용하여 측정하였다. ELISA kit는 (Mybiosource, USA)를 사용하였고 시료 100 μ l를 넣어 1시간 반응하고, 1xPBS로 3회 세척하고 96-well microplate에 100 μ l의 VitK1 및/또는 VitK2 항체(capture antibody)를 분주하여 실온에서 1시간 동안 정치하여 다음 날 washing buffer로 각 well을 3번씩 세척하였다. Assay buffer(1X) 200 μ l씩 분주하여 1시간 동안 블로킹(blocking)하고 washing buffer로 세척한 후 배양 상층액과 standard을 100 μ l씩 분주하였다. 2시간 뒤에 washing buffer로 5회 세척 후, 검출 항체(detection antibody)와 enzyme(HRP)이 conjugation된 Avidin을 100 μ l를 분주한 후에 상온에서 1시간 동안 반응하고, 다시 washing buffer로 7번 세척한 다음, substrate 용액을 100 μ l 처리하였음. 상온에서 10분 동안 암반응시킨 후, stop solution을 50 μ l씩 분주하여 반응을 종결시켰으며, ELISA reader (BioTek Instruments Inc., USA)를 사용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

12) 탄소원 접종에 의한 유산균 발효에 의한 비타민K1과 K2 정량분석

글루코스, 말토스, 갈락토스의 탄소원은 시금치 발효시점에 1mg/ml의 농도로 접종하고 12시간 후에 재접종하였다. 재조합된 비타민K1과 K2 ELISA kit를 이용하여 측정하였다.

ELISA kit는 (Mybiosource, USA)를 사용하였고 시료 100 μ l를 넣어 1시간 반응하고, 1xPBS로 3회 세척하고 96-well microplate에 100 μ l의 VitK1 및/또는 VitK2 항체(capture antibody)를 분주하여 실온에서 1시간 동안 정치한 다음 washing buffer로 각 well을 3번씩 세척하였다. Assay buffer(1X) 200 μ l씩 분주하여 1시간 동안 블로킹(blocking)하고 washing buffer로 세척한 후 배양 상층액과 standard을 100 μ l씩 분주하였다. 2시간 뒤에 washing buffer로 5회 세척 후, 검출 항체(detection antibody)와 enzyme(HRP)이 conjugation된 Avidin을 100 μ l를 분주한 후에 상온에서 1시간 동안 반응하고, 다시 washing buffer로 7번 세척한 다음, substrate 용액을 100 μ l 처리하였음. 상온에서 10분 동안 암반응시킨 후, stop solution을 50 μ l씩 분주하여 반응을 종결시켰으며, ELISA reader (BioTek Instruments Inc., USA)를 사용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

13) 비타민K1, K2 함유 시금치 착즙액 발효물의 항균효과 분석

유산균, 시금치 추출물의 발효물의 항균활성을 확인하기 위한 실험을 수행하였다. 항균효과를 확인하기 위한 시험균주인 리스테리아(*Listeria monocytogenes*, *L. monocytogenes*, ATCC 15313), 황색포도상구균(*Staphylococcus aureus*, *S. aureus*, ATCC 12600), 대장균(*Escherichia coli*, *E. coli*, ATCC 11775), 바실러스(*Bacillus megaterium*, *B. megaterium*, ATCC 14579), 비브리오(*Vibrio parahaemolyticus*, *V. parahaemolyticus*, ATCC 17802), 및 형광균(*Pseudomonas fluorescens*, *P. fluorescens*, ATCC 13525)을 준비하였다. 각각의 시험균주를 LB 배지에 접종하고 37°C에서 24시간 동안 전배양(pre-culture)하였다. 이어서, 페트리디쉬에 1%의 LB agar를 20mL씩 분주하고 응고하여 평판배지를 제조한 후, 앞서 전배양한 시험균주 각각을 200 μ l씩 첨가하고 멸균된 유리봉으로 배지 위에 고르게 도포한 후, 30분 동안 건조시켰다. 건조된 배지위에 페이퍼 디스크(8 mm, Toyo Roshi Kaicha Ltd, Japan)를 올렸다. 동일한 실험 방법을 사용해, HePbLp) 및 HePbWp1, 및 열수추출물(HePb)의 여드름균(*Propionibacterium acnes*, ATCC 6919), 및 비듬균(*Malassezia furfur*, ATCC 14521)에 대한 항

균활성을 확인하였다. 총치균에 대한 항균효과를 확인하기 위해 총치균 스트렙토코커스 뮤탄스 (Streptococcus mutans, ATCC3065) 를 준비하였다. 상기 총치균은 BHI 배지에 접종하고 37℃ 에서 24시간 동안 전배양(pre-culture)하였다. 이어서, 페트리디쉬에 1%(w/v)의 LB agar를 20mL 분주하고 응고하여 평판배지를 제조한 후, 앞서 전배양한 총치균을 200 mL씩 첨가하고 멸균된 유리병으로 배지 위에 고르게 도포한 후, 30분 동안 건조시켰다.

14) 유산균과 시금치 추출발효물의 항산화 분석

시금치 추출물의 발효물의 보관온도 및 보관기간에 따른 항산화 효과를 확인하기 위해 DPPH(2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl)를 이용하여 자유라디칼 소거 활성 분석을 수행하였다. 앞서 제조한 Pb, HePb 분말, HePbLP, HePbWp1, 및 HePbLp/Wp1 각각을 보관온도 4℃(냉장온도) 또는 30℃ 에서 30일간 보관하였다. 각 온도에서 보관한 날로부터 1일, 30일 후의 분말을 채취해 10mg/ml씩 멸균수 1mL에 희석하여 0.1% 시료용액을 조제하였다. 저장(Stock) 용액 (100mM Tri-HCl, Ph 7.4)은 메탄올 1mM에 DPPH를 용해하여 제조하였으며, 분석 실험에서는 100 µM 농도로 희석해 사용하였다. 이어서, 96 웰 플레이트에 앞서 제조한 0.1% 농도의 각각의 시료용액을 10µL씩 분주하고, 시간경과에 따른 항산화 효과의 변화를 DPPH 억제율(%)로 측정하였다. 대조군으로 아스코르브산(vit C), 및 BHT(butyl hidroxytoluene)를 사용하였다.

항산화 효과는 상기 웰 플레이트에 100 µM DPPH를 100 µL씩 첨가하고 차광한 후에 실온에서 10-30 분간 방치한 다음에, 517 nm 파장의 빛을 조사해 흡광도를 측정하여 확인하였다. 음성 대조군으로 메탄올 또는 물에 100 uL DPPH를 처리하여 흡광도를 측정하여 영점 처리를 수행하였다. 상기 흡광도를 측정한 후 아래 식으로 계산하였다.

scavenging activity (%) = (1-OD sample/OD blind) x 100

15) 유산균과 시금치 추출발효물의 미백효과 분석

시금치 추출물의 발효물의 멜라닌 색소 감소효능을 확인하기 위해, B16F10 세포에 시금치 추출물의 발효물을 처리하고 멜라닌(Melanin)의 함량을 정량 분석하였다. 실험에 사용할 세포를 준비하게 위해, 쥐의 B16F10세포를 10% FBS가 포함된 DMEM 배지에서 배양하였다. 배양한 B16F10세포 3 x 10⁵cell/ml량을 6 웰 플레이트에 분주하고 12 ~ 24 시간 동안 배양하였다. 이어서, 대조시료와 실험시료, 아무런 시료를 처리하지 않은 무처리세포 각각을 4℃ 에서 1일, 30일간 보관한 후, 보관일로부터 1일째, 30일째의 분말을 채취해, 1mg/ml씩 물에 용해하여, 0.1%의 시료용액을 제조하였다. 비교예로 알부틴(albutin 0.1%)을 사용하였다. 앞서 준비한, B16F10 세포가 배양된 6웰 플레이트에 앞서 제조한 각각의 0.1%시료용액을 처리하고, 37℃의 인큐베이터에서 12 ~ 24 시간동안 배양하였다. 배양을 완료한 세포를 수집하여 10% DMSO 가 첨가된 1N NaOH 에서 용해시킨 후, 80℃에서 1시간 동안 배양하고 475 nm에서 흡광도를 측정하였다.

16) 파일럿/대량 배양 및 특성 분석

파일럿 배양(3L) 실험을 통해 발효조건을 확인하고, 대량 배양(100L)을 위해, 시금치 착즙액(또는 분말 5%; w/v)을 121℃에서 5~10분 멸균 후 40℃ 이하까지 냉각 후, 전체 부피에 1% 농도로 유산균을 접종하여 24시간 발효 후, 90℃에서 사균 하여 제조하였다.

pH와 염도는 시금치 추출 발효물을 물에 희석한 다음, pH meter(Pettler Tolendo, USA) 및 염도측정기 (PTAGO salt meter, USA)를 이용하여 측정하였다. 당도는 희석 과정 없이 원액을 그대로 당도계(ATAGO Refractometer, USA)로 측정하였다. 표 5에 각 시료의 당도, 염도 및 pH 분석 결과를 나타내었다.

3. 비타민 K2강화소재의 효능평가 및 전임상 시험(공동2)

1) 세포 배양

마우스 유래 RAW264.7 세포는 한국세포주은행 (Seoul, Korea)에서 분양받아 사용하였으며, 10% FBS와 penicillin (100 U/mL)과 streptomycin (100 µg/mL)을 넣은 DMEM 배지를 사용하여 37°C, 5% CO₂ incubator에서 배양하였으며, 2~3일에 한 번씩 계대 배양을 수행하였다.

- HUVEC 세포는 2% fetal bovine serum (FBS)와 vascular endothelial growth factor (VEGF)가 포함되어있는 Endothelial Growth Medium-2 (EGMTM-2 Medium)을 사용하여 37°C, 5% CO₂ 조건에서 배양하였다.

2) 세포 생존율

세포 생존율은 Cell Counting Kit-8 (CCK-8; Dojindo Molecular Technologies Inc., Japan) 분석법을 이용하였다. RAW 264.7 세포와 HUVEC 세포를 48-well plate에 각각 2×10⁵ cells/well, 1×10⁵ cells/well을 분주하여 24시간 배양하고 양배추, 브로콜리, 시금치 착즙액 및 발효물을 농도별로 처리한 다음, 1시간 뒤 대조군(CON)을 제외한 모든 그룹에 LPS를 1 µg/mL 처리하였다. 24시간 배양 후 CCK-8 시약을 첨가하여 2 h 동안 5% CO₂, 37°C 배양기에서 배양하였다. ELISA reader (BioTek Instruments Inc., USA)를 사용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 대조군 대비 백분율로 나타내었다.

3) NO 발현 저해능 측정

RAW 264.7 세포를 48-well plate에 2×10⁵ cells/well을 400 µL로 분주하여 24시간 배양하였다. 양배추, 브로콜리, 시금치 착즙액 및 발효물을 농도별로 처리한 다음, 1시간 뒤 대조군(CON)을 제외한 모든 그룹에 LPS를 1 µg/mL 처리하였음. 24시간 배양 후 상등액을 모아 각 well의 상등액 100 µL와 nitrite ion standard solution(0, 5, 10, 15, 20, 30, 50 µM) 100 µL씩을 동량의 Griess reagent와 혼합하여 상온에서 호일로 차광하고 15분간 반응시킨 다음 540nm에서 흡광도를 측정하였음. 생성된 NO의 농도는 nitrite ion standard solution에서 얻어진 standard curve를 이용하여 산출하였다.

4) 사이토카인 발현 저해능 측정

RAW264.7 세포를 48-well plate에 2×10⁵ cells/well을 400 µL로 분주하여 24시간 배양하였다. 양배추, 브로콜리, 시금치 착즙액 및 발효물을 농도별로 처리한 다음, 1시간 뒤 대조군(CON)을 제외한 모든 그룹에 LPS를 1 µg/mL 처리하였음. 24시간 배양 후 상등액을 모아 ELISA kit (TNF-α, IL-6, MCP-1)의 protocol을 따라 실험 후 450nm에서 흡광도를 측정하였다.

세포 배양액 내의 TNF-α, IL-6, MCP-1의 농도는 ELISA kit를 사용하여 측정하였다. 96-well microplate에 100 µL의 포획 항체(capture antibody)를 분주하여 4°C에서 하룻밤 동안 정치하여 다음 날 washing buffer로 각 well을 3번씩 세척하였음. Assay buffer(1X) 200 µL씩 분주하여 1시간 동안 블로킹(blocking)하고 washing buffer로 세척한 후 배양 상등액과 standard을 100 µL씩 분주하였다. 2시간 뒤에 washing buffer로 5회 세척 후, 검출 항체(detection antibody)와 enzyme(HRP)이 conjugation된 Avidin을 100 µL를 분주 한 후에 상온에서 1시간 동안 반응시킴. 다시 washing buffer로 7번 세척한 다음, substrate 용액을 100 µL 처리하였음. 상온에서 10분 동안 암반응시킨 후, stop solution을 50 µL씩 분주하여 반응을 종결시켰으며, ELISA reader (BioTek Instruments Inc.,USA)를 사용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

5) Western blot analysis

RAW 264.7 세포와 HUVEC 세포(1.0×10^6 cells/well)를 각각 24시간 배양 후 시료를 농도별로 처리한 다음, 1시간 뒤 대조군(CON)을 제외한 모든 그룹에 LPS ($1 \mu\text{g}/\text{mL}$)를 22시간 처리하였음. 이후 세포 세척 후, lysis buffer를 이용하여 lysis 시킨 후 원심분리하여 단백질 상등액만 분리하였다.

단백질 농도는 BCA kit (Bio-Rad, USA)를 이용하여 정량하였음. 정량한 단백질을 12%의 polyacrylamide gel에 전기영동하고 Poly-vinylidene difluoride (PVDF) membrane (Milipore, USA)에 200 mA, 2시간 동안 전이시켰다. 단백질이 전이된 membrane을 5% 탈지분유를 포함한 0.05% Tween 20/Tris-buffered saline (0.05% T/TBS)에 넣고 상온에서 blocking 시킨 후, 1차 항체와 반응시켰음. 1차 항체 반응은 iNOS antibody (1:5K, Calbiochem, USA), COX-2 antibody (1:1K, BD Biosciences Pharmingen, USA), β -actin antibody (1:10K, Sigma, USA), ICAM-1 antibody (1:10K, CST, USA), VCAM-1 antibody (1:10K, CST, USA)를 이용하여 4°C에서 24시간 반응시킨 후 TBST로 세척한 다음 2차 항체 (JacksonImmunoResearch, USA)를 1:10으로 희석하여 1시간 반응한 뒤 TBST로 세척하였음. 단백질은 ECL kit(Bio-Rad, USA) 사용하여 imaging densitometer (model GS-700, Bio-rad, USA)를 통해 측정하였다.

6) 실험동물 및 식이 공급

본 실험에 사용한 실험동물은 KFRI-IACUC(Korea Food Research Institute, Institutional Animal Care and Use Committee)의 승인을 받아 사용지침에 의해 관리되었다. 5주령 암컷 C57BL/6 마우스를 구입하여 실험동물용 사육케이지에서 1주일 동안 주위 환경에 적응시킨 후, 본 실험에 사용하였다. 실험동물 사육은 온도 $22 \pm 1^\circ\text{C}$ 및 습도 $55 \pm 5\%$ 를 유지하였다. 사료(Teklad Certified Irradiated Global 18 % Protein Rodent Diet, Harlan Co. Ltd., USA) 및 음수는 자유 급여의 조건을 유지하였다. 반입된 실험동물의 환경 적응기간 1주가 종료된 후, 생후 6주령에 난소적출(ovariectomy, OVX) 모델을 제작하였다. 난소 적출 모델 제작을 위해, 마취제인 isoflurane으로 호흡마취를 하였으며, 좌우측 마지막 늑골부터 1 cm 떨어진 위치를 절개하여 양측의 난관과 난소 주위를 결찰하고, 난소를 절제한 다음 지혈 후 피부를 봉합하였다. 수술 부위는 소독 후 감염 방지를 위해 연고를 도포한 다음 사육케이지에 옮겨 회복시켰으며, 매일 실험동물의 이상 유무를 확인하여 완전히 치유된 이후 실험에 사용하였다. Sham군은 난소절제와 동일한 스트레스를 주기 위해 동일하게 절개 후 난소 부분을 외부로 꺼낸 뒤 난소를 절제하지 않은 채로 다시 봉합하여 대조군으로 사용하였다. 실험군의 설계는 Sham+corn oil, OVX+corn oil, OVX+vitamin K2_low 0.9 mg/kg, OVX+vitamin K2_high 6.3 mg/kg, OVX+시금치 발효물(spinach_TS95)_low 49 $\mu\text{g}/\text{kg}$, OVX+시금치 발효물(spinach_TS95_high) 98 $\mu\text{g}/\text{kg}$, OVX+SJ 0.9 mg/kg으로 5마리씩 총 7개 군으로 나누어 실험을 진행하였다. 모든 시료는 매일 1회 15주간 경구투여 하였으며, OVX 수술 이후 치유기간 2주 후 부터 매주 일정한 시간에 체중 및 사료섭취량을 측정하였다.

7) 혈청 내 지질 성분 농도 분석

혈액을 채취하여 4°C에서 1시간 응고시킨 후 원심분리하여 혈청을 분리하였고 사용 시까지 -80°C 에서 보관하였다. 혈청 내 총 콜레스테롤(TC), 중성 지방(TG), LDL-C 농도는 측정용 kit를 사용하여 측정하였다.

8) TRAP 염색 분석

TRAP 활성 변화를 확인하기 위해 분화가 끝난 배양액에 TRAP solution을 1:1로 혼합하여 3시간 이상 37°C 에서 배양한 후, 550 nm에서 흡광도를 측정하였다. 분화가 끝난 파골 세포는

PBS로 세척 후 4% formalin을 사용하여 10분 동안 세포를 고정하고 PBS로 세척한 뒤 methanol:acetone = 1:1 solution에서 다시 1분간 고정하였다. 용액을 제거 후 TRAP solution을 분주하여 37°C에서 30분 이상 배양 후 D.W를 이용해 3번 이상 세척 하여 염색된 세포를 현미경으로 관찰하여 다핵세포 유무 및 세포 수를 확인하였다.

9) Real-time PCR 분석

RAW 264.7 세포를 6 well plate에 5×10^4 cells/well로 분주한 뒤, 농도별 시료와 RANKL 50 ng/ml을 함께 처리하여 37°C에서 5% CO₂에서 5일간 분화를 유도하여 실험에 사용하였다. TRIzol 추출법을 이용해 세포로부터 total RNA를 얻었고, cDNA는 RNase Inhibitor (BioFACT™, Cat RI152-20h, Korea) 을 이용하여 1 ug total RNA로부터 만들어 사용하였다. Real-time PCR은 2X Real-Time PCR Master mix (BioFACT™, Cat DQ383-40h, Korea)을 이용해 수행하였다. Real-time PCR(TaKaRa, TP600, Japan)에 사용되어진 Primer는 table 2에 표기하였다.

Table 2. Primers for osteoclast differentiation markers

Gene	Primer sequence	
	Sense	Anti-sense
NFATc1	CTC GAA AGA CAG CAC TGG AGC AT	CGG CTG CCT TCC GTC TCA TAG
Oscar	GGG GTA ACG GAT CAG CTC CCC AGA	CCA AGG AGC CAG AAC GTC GAA ACT
CtsK	ACG GAG GCA TTG ACT CTG AAG ATG	GTT GTT CTT ATT CCG AGC CAA GAG
GAPDH	TGC CAG CCT CGT CCC GTA GAC	CCT CAC CCC ATT TGA TGT TAG

10) 갱년기 동물모델(ovariectomy animal model) 제작 및 식이 공급

본 실험에 사용한 실험동물은 KFRI-IACUC(Korea Food Research Institute, Institutional Animal Care and Use Committee)의 승인 (KFRI-M-20047)을 받아 사용지침에 의해 관리되었다. 14~16 g의 5주령 암컷 C57BL/6 마우스를 (주)코아텍 (Pyeongtaek, Korea)으로부터 구입하여 실험동물용 아크릴 사육케이지에서 1주일 동안 주위 환경에 적응시킨 후, 본 실험에 사용하였다. 실험동물 사육은 온도 22±1 °C 및 습도 55±5 %를 유지하였으며, 명암주기는 12시간(조도 300 Lux), 암모니아 농도는 20 ppm 이하, 환기횟수는 시간 당 10-15회로 설정하였다. 반입된 실험동물의 환경 적응기간 1주가 종료된 후, 생후 6주령에 난소적출 (ovariectomy, OVX) 모델을 제작하였다. 난소 적출 모델 제작을 위해, 마취제인 isoflurane으로 호흡마취를 하였으며, 좌우측 마지막 늑골부터 1 cm 떨어진 위치를 절개하여 양측의 난관과 난소 주위를 걸찰하고, 난소를 절제한 다음 지혈 후 피부를 봉합하였다. 수술 부위는 소독 후 감염방지를 위해 연고를 도포한 다음 사육케이지에 옮겨 회복시켰으며, 매일 실험동물의 이상 유무를 확인하여 완전히 치유된 이후 실험에 사용하였다. Sham군은 난소절제와 동일한 스트레스를 주기 위해 동일하게 절개 후 난소 부분을 외부로 꺼낸 뒤 난소를 절제하지 않은 채로 다시 봉합하여 대조군으로 사용하였다. 사료 (Teklad Certified Irradiated Global 18 % Protein Rodent Diet, Harlan Co. Ltd., USA) 및 음수는 자유 급여의 조건을 유지하였다. 실험군의 설계는 Sham+corn oil, OVX+corn oil, OVX+시금치 발효물(S_TS95) 49 µg/ kg, OVX+시금치 발효물 (S_TS95) 98 µg/ kg로 5마리 씩 총 4개 군으로 나누어 실험을 진행하였다. 모든 시료는 매일 1회 15주간 경구투여 하였으며, OVX 수술 이후 치유기간 2주 후 부터 매주 일정한 시간에 체중 및 사료 섭취량을 측정하였다.

11) Alkaline phosphatase 활성 분석

골격 형성 지표인 혈청 중 ALP 활성은 ELISA kit (BioSource)를 사용하였다. serum은 2uL에 sample diluent 198 uL로 100배 희석하여 사용하였고 ALP표준품은 6000 rpm에서 30초간 원심 분리한 후 1 mL sample diluent로 녹여 1000 pg/mL을 만들었고 2배씩 희석하여 8 point를 만들어 사용하였다. 시료와 표준품은 well에 100 uL씩 넣은 후 2시간동안 37°C에서 반응하였다. Wash buffer로 wash 후 100배 희석한 biotin-conjugate를 100 uL 넣고 1시간동안 37°C에서 반응하였다. 다시 wash buffer로 wash한 후 100배 희석한 streptavidin-HRP를 100 uL 넣고 1시간 동안 37°C에서 반응하였다. 다시 wash buffer로 wash 후 substrate solution을 넣고 빛을 차단한 상태에서 15~20분 동안 37°C에서 반응하였다. 색이 파랗게 변한 것을 확인하면 stop solution을 넣고 microplate reader를 이용하여 450 nm에서 측정하였다.

12) 미세전산 단층촬영 시스템(micro-CT)을 이용한 대퇴골의 골부피 및 골밀도 분석

투여 종료 후 실험동물을 희생시킨 다음 대퇴골을 절취하여 근육, 건 및 인대들을 제거하여 10% neutral buffered formalin에 고정시켰다. 이후 고해상도 미세전산 단층촬영 시스템(micro-CT, GE eXplore CT 120, GE Healthcare, Milwaukee, WI)을 이용하여 대퇴골을 측정하였다. 획득한 미세영상 이미지를 gray scale levels로 재건하였으며, 재건한 영상은 MicroView® version 2.5 software (GE Healthcare) 분석 프로그램을 이용하여 골밀도 및 골다공증과 관련된 구조적 변수들을 측정하였다. 골다공증 관련 측정 지표로 골밀도(bone mineral density, BMD), 골무기질 함량(bone mineral contents BMC), 뼈 잔기둥 수(trabecular number, Tb.N), 뼈 잔기둥 간 간격(trabecular separation, Tb.Sp), 뼈 잔기둥 뼈 잔기둥 두께(trabecular thickness, Tb.Th)를 측정하였다.

제 3 장 연구개발과제의 수행 결과 및 목표 달성 정도

제 1 절 연구수행 결과

1. 정성적 연구개발성과

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	연구개발 수행내용	연구결과
1차 년도 (2019년)	생물전환공정 기반 천연비타민K2 생산 및 제품화기술개발 (세부:동의보급)	야채비타민발효공 정 조건 확립	-과채(양배추, 브 로콜리) 전처리 공정 구축 -비타K 생산용 야채착즙조정	- 양배추, 브로콜리, 시금치의 착즙, 동결건조 후 샘플 10kg stock 완료 - 기타 야채류 등의 착즙 후의 소재활용 비교에 있어 양배추의 불용성 식이섬유량이 많음
		비타민 함유물 소재화	-야채 발효물제조 및 성분분석 -액상상태 유지 조건 검토	- 야채발효를 위한 동결건조품 또는 착즙액의 적정성에 있어 동결건조도 유효 함 - 불용성 식이섬유, 수용성 식이섬유 조합에 따른 발효검토 결과 불용성식이섬유 유효 함
	비타민K2 생산을 위한 생물전환공정 및 이용기술 개발 (협동1: MIRE)	유산균비타민K2 표준발효공정 확립	-LP,Wp 등의 비타민K2 전환효소발현기반 DoE 작성(RT-PCR) -전환효소의 확인 및 생산	- 비타민K2 전구체 발현유전자 Men 분리 동정 (Lp3종, Wp3종) 완료 - MenA,A1,A2 및 MenC, E, H 발현단백질 중 - RT-PCR에 의해 각유전자 전사체 발현 확인 완료 - Lactobacillus sp 신규 3종, Weissella sp 2종, Lactococcus sp 1종 유효종 선발 후 KCTC 등록 3종 진행
		지표성분분석	- 비타민K1,K2 발효전환확인(TL C) - 최적생물전환 공정조건설정(L AB viability)	- 3종의 야채(양배추,시금치,브로콜리) 내의 비타민 K1 성분분석결과 기존의(국립농업과학원) 7차식품분석결과와 양적차이 있으며 본 연구의 결과 시금치, 브로콜리, 양배추 순으로 확인 됨 - 3종의 야채와 유산균 배양에 따른 생균수와 비타민K TLC 분석
	비타민K2 강화소재의 효능평가 및 전임상 시험 (협동2: kfri)	세포기반 비타민K 성분강화 소재의 면역	-세포내 NO생성량 측정 -염증성 사이토카인 발현 억제효과 -세포접착단백질 발현 억제 효과	- 세포독성 없음 - 세포 내 염증성 사이토카인 분석결과, 면역증강 효능은 없었음. 그러나, 표준품인 비타민 K1, K2 처리 시 TNF-a발현량이 감소시켜 일부 지표에서는 염증 억제 효능이 있었으나, 야채착즙액 및 발효물에서는 염증 억제 효능이 관찰되지 않았음. -비타민 K1, K2표준품에서는 염증 반응인 NO생성에 관여하는 iNOS 및 COX-2 발현량은 40%이하로

				<p>감소시킴. 그러나, 양배추발효물(LTS90,WD12), 브로콜리 착즙액, 시금치 착즙액에서만 iNOS발현량을, 브로콜리 착즙액과 그 발효물(LDSW, LTSS33)만이 COX-2 발현량을 감소시킴. - 비타민 K2가 VCAM-1, ICAM-1의 발현량을 감소시켜 혈관 염증을 억제하는 효능을 확인함. - 야채발효물에서의 VCAM-1, ICAM-1 발현 억제 효과는 분석중에 있음.</p>
2차 년도 (2020년)	<p>생물전환공정 기반 천연비타민K2 생산 및 제품화기술개발 (주관:동의보급)</p>	<p>식물 비타민K1 고수율 전처리 및 파일럿 발효공정</p>	<p>-과채(양배추,브 로콜리) 전후처리 온도, pH 분석 -5파일럿 배양 조건 구축</p>	<p>- 양배추, 브로콜리, 시금치의 착즙공정 완료 1건 - 전처리 온도에 따른 멸균 또는 비타민K 안정성 조건 완료 1건 - 파일럿 발효 후 제형 실험 2건</p>
		<p>시제품생산</p>	<p>- 비타민K함유 환 시제품 제형화 -시제품 제작 (3차년도 초기)</p>	<p>- 야채착즙발효 조성물 맛, 향 등 시제품 제형 - 시금치발효물(비타민K1/K2) 함유 시제품 (포스트바이오틱스K환)제작</p>
	<p>비타민K2 생산을 위한 생물전환공정 및 이용기술 개발 (협동1: MIRE)</p>	<p>유산균비타민K2 표준발효공정 확립</p>	<p>1. 유산균 4종에 따른 비타민 K1과 K2의 생산능 비교 2. 선발 채소 3종 에 대한 비타민 K1과 K2 생산능 비교 3. 유효채소(시금 치)에서의 비타민 K2 생산 조건 확립 4. 공정별 비타민 K1,K2 성분 확인 전환효소발현기반 5. 시제품 제작을 위한 채소배합 별 비타민K2 생산조건 확립</p>	<p>- 1-1)L.lactis(menB,C,D,E,H)L.plant arum(menA) L.mesenteroides(menG) 선발 에 따른 시금치, 브로콜리, 양배추 배양 조건 확립(C/N add or ND) - 1-2)해양유래 우수 균주 국제기탁 3건 - 2-1)비타민K1(필라퀴논)함유 식물배지의 발효 후 정량, 정성 분석 완료(TLC, HPLC;시금치, 브로콜리, 양배추3건) - 3-1)유효 배지 시금치의 발효 후 비타민K2(메나퀴논; MK4, MK7) 정량, 정성 분석 완료(TLC, HPLC; 3건) 특허출원 1건 - 3-2) 우수균주 L.lactis 기반 공배양 (L.plantarum, L.mesenteroides) 시간에 따른 비타민 K1 및 K2 의 정량, 정성분석(TLC/HPLC) - 4-1)L.lactis(menB,C,D,E,H)L.plant arum(menA) L.mesenteroides(menG) 유전자클로닝 및 재조합 효소 분리 완료(효소 2건/유전자 9건)</p>

			6. 안전성,안정성 및 효능 분석	<ul style="list-style-type: none"> 5-1) 선발 채소배합 별 비타K2 생산 조건 확립(양배추:시금치:브로콜리=5:4:1) 6-1)비타민K1, K2 함유 발효물의 온도, pH안정성 분석(TLC) 6-2)비타민K1, K2 함유 발효물의 세포안정성 분석(Raw cell, 3T3L1) 6-3)비타민K1, K2 함유 발효물의 항균평가(S.mutans)
	비타민K2 강화소재의 효능평가 및 전임상 시험 (협동2: kfri)	세포기반 비타민K 성분강화 소재의 대사성질환 효능 평가	<ul style="list-style-type: none"> -후보소재의 세포 독성 유무 확인 -도출된 소재에 대한 in vitro 기반 대사질환 효능 평가 연구 -도출된 소재 활용 전임상 기반 효능 평가 연구 	<ul style="list-style-type: none"> -세포독성 없음 -비타민 K1, K2가 VCAM-1, ICAM-1 및 염증성 사이토카인의 발현량을 감소시켜 혈관 염증을 억제하는 효능을 확인함. -Raw 264.7cell 및 HUVEC cell에서의 야채발효물 스크리닝에서 LTS95발효물이 항염효능 및 혈관염증 효능이 높은 후보소재로 도출됨. -In vitro기반 실험에서 야채혼합발효물 또한 혼합착즙액보다 염증성 사이토카인 및 ICAM-1, VCAM-1 발현량을 감소시킴. -ApoE knockout mouse로 aorta와 heart 부위의 plaque 형성을 확인하여 혈관질환 모델을 구축함.
3차 년도 (2021년)	생물전환공정 기반 천연비타민K2 생산 및 제품화기술개발 (주관:동의보급)	식물 비타민K1 고수율 전처리 및 파일럿 발효공정	<ul style="list-style-type: none"> -시금치 전후처리 온도, pH 분석 -대량 배양 조건 구축 	<ul style="list-style-type: none"> - 시금치의 착즙공정 완료 1건 - 전처리 온도에 따른 멸균 또는 비타민K 안정성 조건 완료 1건 - 대량 발효 후 제형 실험 2건
		2차 시제품생산	<ul style="list-style-type: none"> - 비타민K 음료 시제품 제형화 -시제품 제작 -성분분석 -식품품목보고 	<ul style="list-style-type: none"> - 야채착즙발효 조성물 맛, 향 등 시제품 제형 및 안전성 확인 - 시금치발효물(비타민K1/K2) 함유 음료시제품 제작 - 시제품 성분분석 및 품목보고
	비타민K2 생산을 위한 생물전환공정 및 이용기술 개발 (협동1: MIRE)	유산균비타민K2 표준발효공정 확립	<ol style="list-style-type: none"> 1. LI/Lm 공배양 비타민 K1과 K2의 생산능 비교 2.혼합야채 발효 비타민 K1과 K2 생산능 비교 3. 시금치발효물의 비타민K복합물 	<ul style="list-style-type: none"> 1-1) 공배양(LI/Lm) 의 공정 확립(30℃, 24h, Dark, air, 100rpm) 2-1)선발 채소배합 별 비타K2 생산 조건 확립(양배추:시금치:브로콜리=5:4:1) 3-1) 비타민K2(메나퀴논; MK4, MK7) 정량, 정성 분석 완료(TLC, HPLC; 3건) 특허출원 1건










		<p>분리정제</p> <p>4. 시금치 발효물의 비타민K복합물 분리정제</p> <p>5. 시금치 발효 파일럿 및 대량 생산 MKn 및 VitK1 규격화</p> <p>6. 시금치 발효물의 항산화 및 항균효능</p> <p>7. 재조합효소에 의한 비타민K2 생산능 확인</p> <p>8. 탄소원 부가에 따른 비타민K2 생산능 확인</p>	<p>4-1) 식물 비타민K 추출 및 분리법 확인(이소프로판올 등)</p> <p>4-2) 겔크로마토그래피에 의한 비타민K복합물 정량 (순도 80%)</p> <p>5-1) 단일야채 및 혼합야채 발효의 비타민K1 및 MK4, MK7, MK9 (780ug/100g; 78ug/100mL)</p> <p>6-1) 시금치 추출 발효물의 항산화 효과(IC50= 4%)</p> <p>6-2) 시금치 추출 발효물의 항균 효과(Listeria IC50 0.01%; Staphylococcus IC50 0.05%)</p> <p>7-1) Lm MenG 및 Lp MenA 효소첨가에 따른 비타민K2 생산효능</p> <p>8-1) 탄소원 부가에 따른 비타민K2 생산 효능 확인 완료</p>	
<p>비타민K2 강화소재의 효능평가 및 전임상 시험 (협동2: kfri)</p>	<p>세포기반 비타민K성분 강화 소재의 골건강 효능 평가</p>	<p>1. 후보소재의 세포 독성 유무 확인</p> <p>2. 도출된 소재에 대한 in vitro 기반 골건강 효능 평가 연구</p> <p>3. 도출된 소재 활용 전임상 기반 효능 평가 연구</p>	<p>-세포독성 없음, -In vitro 기반 실험에서 시금치 발효물(SP_TS95)은 RANKL에 의해 유도되는 파골세포의 생성을 억제함</p> <p>-시금치 발효물(SP_TS95)는 RANKL 처리로 인하여 증가하는 NAFTc1, CSTK, OSCAR 유전자 발현을 억제시킴</p> <p>-골다공증 유발 전임상 실험에서 시금치 발효물(SP_TS95)은 혈중 ALP 농도 감소시킴</p> <p>-mico-CT 결과 시금치 발효물(SP_TS95)은 골부피와 골밀도를 증가시킴으로 에스트로겐 결핍에 의해 유발된 골 손실을 완화시키는 효과가 있음.</p>	

2. 연구개발 결과

2-1. 생물전환공정 기반 천연비타민K2 생산 및 제품화(주관)

1) 비타민K 함유 채소 발효 소재 발굴을 위한 착즙 조건 검토

경상북도에서 주로 생산되는 녹황색 채소로 시금치, 브로콜리, 양배추, 피망, 깻잎, 당근, 호박, 토마토 등을 1차로 선별하였으며 그 중에서 비타민K 함량이 높은 채소 3가지로 브로콜리, 시금치, 양배추를 선정하였다. 선정된 채소를 경북 지역 마트에서 각 5, 4, 4 kg을 구입하였고 흐르는 물에 깨끗하게 행구는 세척 작업을 3회 반복하여 이물질을 완전히 제거하였다. 세척된 재료를 자연 건조시켜 물기를 완벽히 제거한 후, 착즙기를 이용하여 착즙액을 제조하였다. 이 때, 기존 제품인 양배추와 브로콜리 원물 자체에서 비타민K1 성분이 확인되지 않았기에 착즙을 통해 불용성 식이섬유와 수용성 식이섬유 부분 전체를 포함하여 진행하고자 착즙을 진행하였다. 착즙한 후 얻어진 착즙액은 브로콜리, 시금치, 양배추 순으로 각 4.0, 2.5, 2.0kg 이었다. 착즙 시 발생하는 찌꺼기는 별도로 보관하였으며, 양배추의 경우에 회수된 착즙액과 착즙찌꺼기를 비교하였을 때, 약 50%가 유실되는 것으로 확인되어 이를 활용하는 방법에 대해서는 차후 검토하기로 하였다. 착즙액을 분말화하였을 때 액상형보다 저온에서 장기간 보관할 수 있는 장점이 있기에 샘플의 보관성과 안정성을 향상시키기 위하여 유산균 발효 소재로 착즙액 자체(액상형)과 동결건조 분말(분말형) 2가지 형태로 준비하였다. 동결 건조 분말은 동결건조 장비를 이용하여 착즙액을 건조시켜 분말로 제조하였다. 브로콜리, 시금치, 양배추 착즙액 순으로 각 4.0, 2.5, 2.0kg를 동결건조 하였을 때 약 110, 140, 200 g의 동결건조 분말을 얻을 수 있었다. 동결 건조된 착즙분말은 약 -72℃의 초저온냉동고에 보관하였으며 액상은 약 4℃의 냉장고에서 한 달간 보관하여 발효 배지로 이용하였다.

	Law (kg)	Juice Extraction (L)	Lyophilization (g)
Broccoli			
Spinach			
Cabbage			

[그림 1. 비타민K1 함유 채소 착즙 및 동결건조 결과]

2) 채소별 착즙액의 미생물 분포도 확인

시금치, 양배추, 브로콜리 착즙액이 유산균 발효 소재로써 적합한지 확인하기 위하여 건조 필름 배지(3M Petrifilm)시험법을 시행하였다. 건조필름은 미생물이 증식할 수 있도록 영양성분을 필름에 코팅하여 건조한 것으로 시료를 접종하면 수분을 흡수하여 한천배지와 같이 겔을 형성함으로써 미생물이 증식할 수 있도록 처리한 것으로 분석 샘플을 처리 시 미생물의 검출 여부를 확인할 수 있다. 세균 오염으로 판정되는 대표적 미생물은 대장균, 일반세균, 황색포도상구균, 효모 및 곰팡이, 환경리스테리아로 이에 해당하는 4종류의 건조필름 배지를 사용하여 착즙액 내 미생물을 분석하였다. 샘플은 멸균하지 않은 양배추, 브로콜리, 시금치 착즙액을 대조군으로 설정하였으며, 해당 샘플을 고온고압멸균기를 이용하여 121℃에서 15분간 멸균한 것을 실험군으로 설정하여 실험을 진행하였다. 각각의 샘플을 멸균생리식염수로 10배 희석한 후 각각의 건조필름배지에 1ml 씩 분주하고 37℃에서 24시간~48시간 배양하여 나타나는 콜로니를 관찰하였다. 멸균 전 양배추 착즙액에서는 일반세균, 시금치는 대장균과 일반세균, 브로콜리에서도 일반세균이 확인되었다. 반면에 실험군으로 설정된 멸균 후의 착즙액에서는 어떠한 샘플에서도 미생물이 관찰되지 않았다. 착즙액을 고온고압멸균방법으로 멸균을 하였을 때 미생물에 의한 오염원이 제거되었고 모두 멸균되었음이 확인되었기에 고온고압으로 멸균된 착즙액이 유산균 발효 배지로 적합하고 판단하였고, 이를 최종 발효 배지로 선정하였다. 하기 그림 2에 해당 결과를 나타내었다.

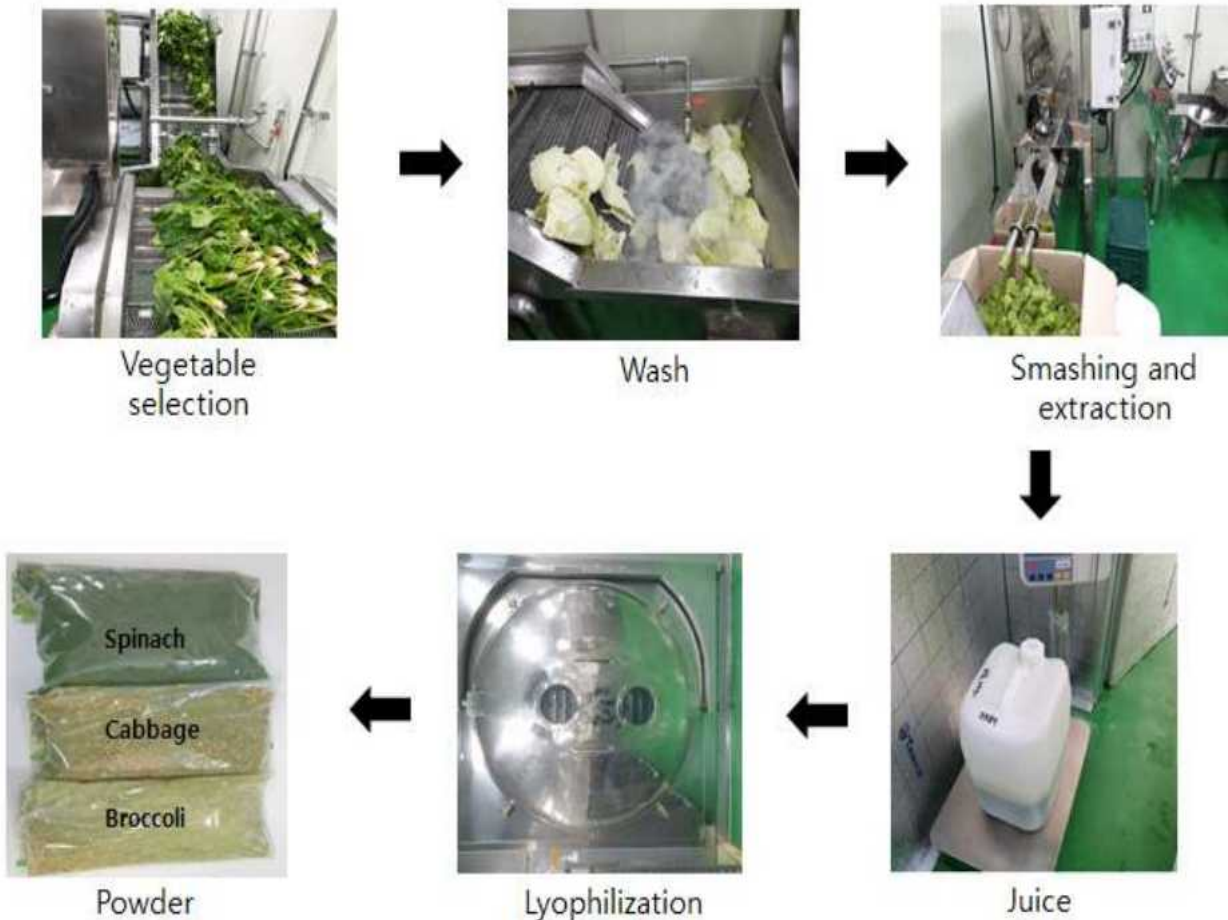
	Ohters	Listeria	STX(Staphylococcus)	CC (E. coli)	YM (Yeast&Fungi)
Cabbage					
Spinach					
Broccoli					

	Ohters	Listeria	STX(Staphylococcus)	CC (E. coli)	YM (Yeast&Fungi)
Cabbage					
Spinach					
Broccoli					

[그림 2. 멸균 전 후양배추, 시금치, 브로콜리 착즙액의 미생물 분석 결과]

3) 비타민K 함유 채소 착즙 전처리 공정 확립

경북 지역에서 생산된 채소 착즙액 제조 공정을 확립하고자 시금치, 양배추, 브로콜리를 인근 지역에서 선별하여 각 10kg씩 구입하였다. 이 때 각 채소들은 사업화를 위하여 국내, 지역, 계절별로 입수가 용이하면서 비타민K1 함유량이 풍부하고 일반적으로 상품화된 것을 소재화하였다. 구입된 채소들은 흐르는 물에서 2~3회 세척하여 이물질들을 완전히 제거하였으며, 세척 기계의 컨베이어벨트로 이동시킨 후 깨끗한 물로 고압 살포하여 한 번 더 세척 과정을 거쳤다. 세척된 채소는 건조대에 약 30분 정도 방치하여 자연 건조시켜 탈수 과정을 거쳐 수분을 완전히 제거하였다. 건조된 채소들은 대구가톨릭대학교의 스크류타입의 착즙기를 이용하여 파쇄와 동시에 압착 과정을 거쳐 착즙액으로 제조하였다. 스크류를 이용하여 착즙할 때 발생하는 waste를 최소화하기 위해 스크류의 속도, 압력 등을 조정하여 최적 조건을 확립하였다. 착즙액은 시금치, 양배추, 브로콜리 순으로 각 18.5kg, 19.3kg, 11.1kg을 수거하였으며, 이때 생산되는 착즙액과 착즙찌꺼기는 분리하여 회수하였다. 착즙 시, 채소 파쇄와 착즙을 동시에 진행함으로써 공정 시간과 비용을 줄였으며 유통 과정에서의 제품 변질 우려를 최소화하였다. 이후 회수된 착즙액을 연구와 실험에 용이하게 사용하고자 착즙액 자체의 장기 보관은 변질 우려가 있어 모든 착즙액을 동결건조장비를 이용하여 분말화하였다. 동결건조 이후의 시금치, 양배추, 브로콜리 분말은 미세저울로 정량한 결과 각 988.5g, 910.3g, 661g으로 나타났으며, 모든 동결건조 분말 약 200g씩 소분하여 지퍼백에 담은 후 -72℃에 보관하여 이후 모든 실험에 적용할 수 있도록 하였다. 해당 과정은 아래 그림 3에 나타내었다.



[그림 3. 시금치, 양배추, 브로콜리의 착즙액 및 분말 제조 공정 단계]

4) 채소별 유산균 발효 배지 조건 확립

양배추 원물 5.3kg을 착즙하였을 때 4L의 착즙액이 제조되었으며 양배추 착즙액을 동결건조하였을 때 약 200g의 분말을 회수하였다. 해당 무게를 이용하여 총 산출량을 계산해보았을 때 회수율이 5%로 나타났다. 이에 따라 양배추 동결건조 분말을 이용하여 착즙액을 제조할 때는 20ml 액상을 기준으로 분말 1mg을 첨가하는 것으로 진행하였다. 시금치의 경우, 원물 4kg을 착즙하였을 때 2.5L의 착즙액이 제조되었으며 이를 동결건조하였을 때 약 140g의 분말이 회수되었다. 이에 따른 시금치의 착즙액 회수율은 5.6%로 시금치 동결건조 분말을 이용하여 시금치 착즙액을 제조할 때는 20ml 액상을 기준으로 분말 1.1mg을 넣는 것으로 진행하였다. 브로콜리의 경우에는 원물 4kg을 착즙하였을 때 2L의 착즙액이 제조되었고 이를 동결 건조하였을 시 약 110g의 분말이 회수되었다. 이에 따른 회수율은 5.5%로, 브로콜리 동결건조 분말을 이용하여 착즙액을 제조할 시 20ml 액상을 기준으로 1.1mg 분말을 첨가하는 것으로 진행하였다. 또한 해당 착즙액에 발효시킬 유산균은 협동기관인 환동해산업연구원에서 지원한 비타민K2 생산 균주인 *Lactobacillus plantarum*, *Weissella paramesenteroides*, *Lactococcus lactis*로 해당 샘플에 대하여 1%씩 접종하기로 하였으며 유산균 접종 조건은 각각 접종, 2종 씩 접종, 3종 모두 동시 접종 등으로 균주별로 접종 조건을 달리하여 샘플을 제조하였다. 아래 표 1에 양배추, 시금치, 브로콜리의 착즙 전과 착즙 후, 그리고 동결건조 전과 후의 무게, 발효 유산균에 대한 정보를 기입하였다.

[표1]

	Cabbage	Spinach	Broccoli
Raw(Kg)	5.3	4	4
Juice(L)	4	2.5	2
Powder(g)	200g	140g	110g
Yield(%)	5%	5.6%	5.5%
Vol of powder	1mg/20ml	1.1mg/20ml	1.1mg/20ml
LAB	Lp, Wp, LI Lp+Wp Wp+LI Lp+LI Lp+Wp+LI	Lp, Wp, LI Lp+Wp Wp+LI Lp+LI Lp+Wp+LI	Lp, Wp, LI Lp+Wp Wp+LI Lp+LI Lp+Wp+LI

5) 채소 배지 착즙액의 안정성을 위한 멸균 공정 확립

채소 착즙액을 배지로 활용하기 위하여 고온고압멸균기를 이용한 멸균법으로 121℃에서 15분간 멸균 처리를 진행하였을 때, 모든 미생물이 제거되고 어떠한 오염원도 발견되지 않음을 이전 단계에서 확인하였다. 고온고압멸균법을 이용하여 미생물 오염원을 제거하는 것은 좋은 방법이나 고온과 고열에 의해 비타민K가 손실될 수 있다는 논문을 참고하여 기반으로 하여 멸균 조건을 새로이 확립하기로 하였다. 고온고압멸균조건인 121℃에서 15분을 기준으로 하여 멸균 온도를 100℃로 설정하고 멸균 시간을 5분, 10분, 20분, 30분으로 설정하였고 반응 온도는 26℃, 30℃, 37℃로 설정하여 실험을 진행하였다. 그 결과 모든 조건에서 미생물이 검출되어 유산균 멸균 공정으로 확립하지 못하였다. 이 결과를 토대로 멸균 온도를 조정하는 것이 아니고 멸균 시간을 조정해야한다는 판단 하에 121℃에서 5분, 10분, 15분으로 멸균 조건을 설정하여 미생물 검출 여부를 확인하였다. 그 결과, 121도℃에서 5분을 멸균조건으로 하였을 때도 10분, 15분간 열처리 하는 결과와 동일하게 미생물이 제거됨을 확인할 수 있었다. 이를 통해 최종적으로 착즙액을 유산균 발효 배지로 사용하기 전 121℃에서 5분간 고온고압으로 가열하는 것을 멸균 최적 조건으로 확립하였다. 하기 그림4와 5에 해당 결과를 나타내었다.

	24h incubation				48h incubation			
AC	100℃ 5min	100℃ 10min	100℃ 20min	100℃ 30min	100℃ 5min	100℃ 10min	100℃ 20min	100℃ 30min
26℃								
30℃								
37℃								

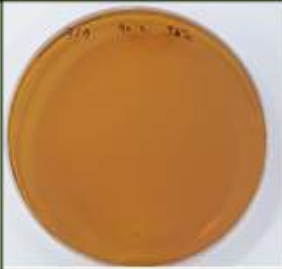
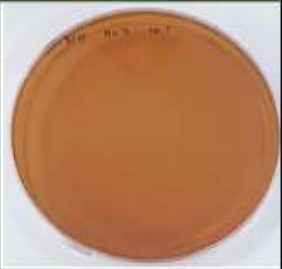

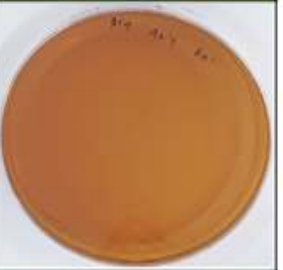
[Fig 4. 멸균 온도 100℃에서의 미생물 검출 여부 결과]

멸균 전	멸균 후		
CON	121℃ 5min	121℃ 10min	121℃ 15min

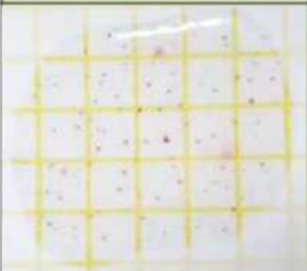
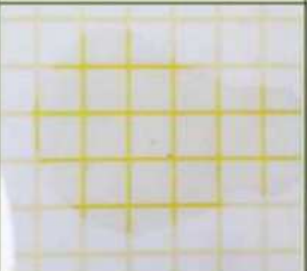
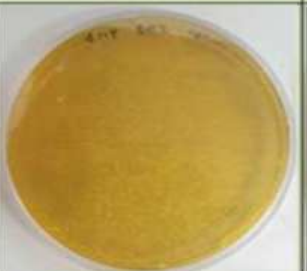
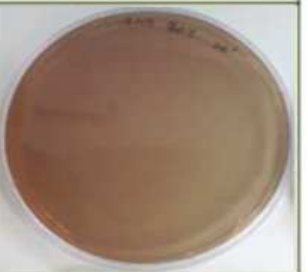
[Fig 5. 멸균 온도 121℃에서의 미생물 검출 여부 결과]

6) 채소 착즙 유산균발효액 장기보관 방법 구축

채소 착즙액 멸균 최적 조건인 121℃에서 5분 간 멸균한 후 유산균을 발효시켜 만들어진 채소착즙유산균발효액은 유산균이 생균으로 존재하고 있기 때문에 장기간 보관이 어려우며, 항상 저온에 보관하여야 한다. 그러나 이를 상품화하여 제품으로 판매하고자 하였을 시에는 저온 보관과 보관 기간이 짧은 것에 대한 문제가 발생할 수도 있기 때문에 사전에 해당 문제를 해결하고자 하였다. 채소착즙유산균발효액을 장기간 보관할 수 있는 방안으로 생균으로 존재하는 유산균을 사멸시켜 제품 내 사균으로 존재하도록 하여 보관과 유통이 용이하게 하였다. 유산균을 사멸시키고 비타민K의 열에 의한 손실을 최소화하고자 저온살균법을 토대로하여 저온에서부터 시간별로 발효액에 열을 처리하였다. 60℃와 80℃에서 5분, 10분, 20분, 30분 간 열을 가하여 유산균의 생존 여부를 확인하였다. 그 결과, 60℃에서 열처리를 하였을 때 일시적으로는 유산균이 사라지는 것처럼 보였지만 그대로 48시간 방치하였을 때 해당 유산균이 다시 자라는 것으로 확인되었다. 이를 통해 60℃는 유산균의 성장 속도를 지연시키는 것으로만 확인되고 유산균 사멸온도로 적확하지 않은 것으로 사료된다. 반면에 80~90℃에서 동일한 시간으로 열처리를 하였을 때는 24시간, 48시간, 72시간 보관하여도 유산균이 나타나지 않고 그대로 사멸됨을 확인하였다. 이를 통해 최종적으로 유산균 사멸 조건을 80~90℃도에서 20~30분간 열처리하는 것으로 확립하였으며 유산균 발효 후 저장 기간을 증대시키고 장기 보관 방법을 구축하였다. 이에 해당하는 결과를 하기 그림 6과 그림 7에 나타내었다.

24h /48h	5min	10min	20min	30min
60℃				

[그림 6. 채소 착즙발효액의 저온(60℃) 가열 시간에 따른 유산균 사멸 결과]

Sterilization before culture		Sterilization after culture	
CON	121℃ 5min	80℃ 10min	80℃ 20min
			

[그림 7. 채소 착즙발효액의 유산균 사멸 최종 조건 결과]

7) 파일럿(3L) 배양 조건 확립

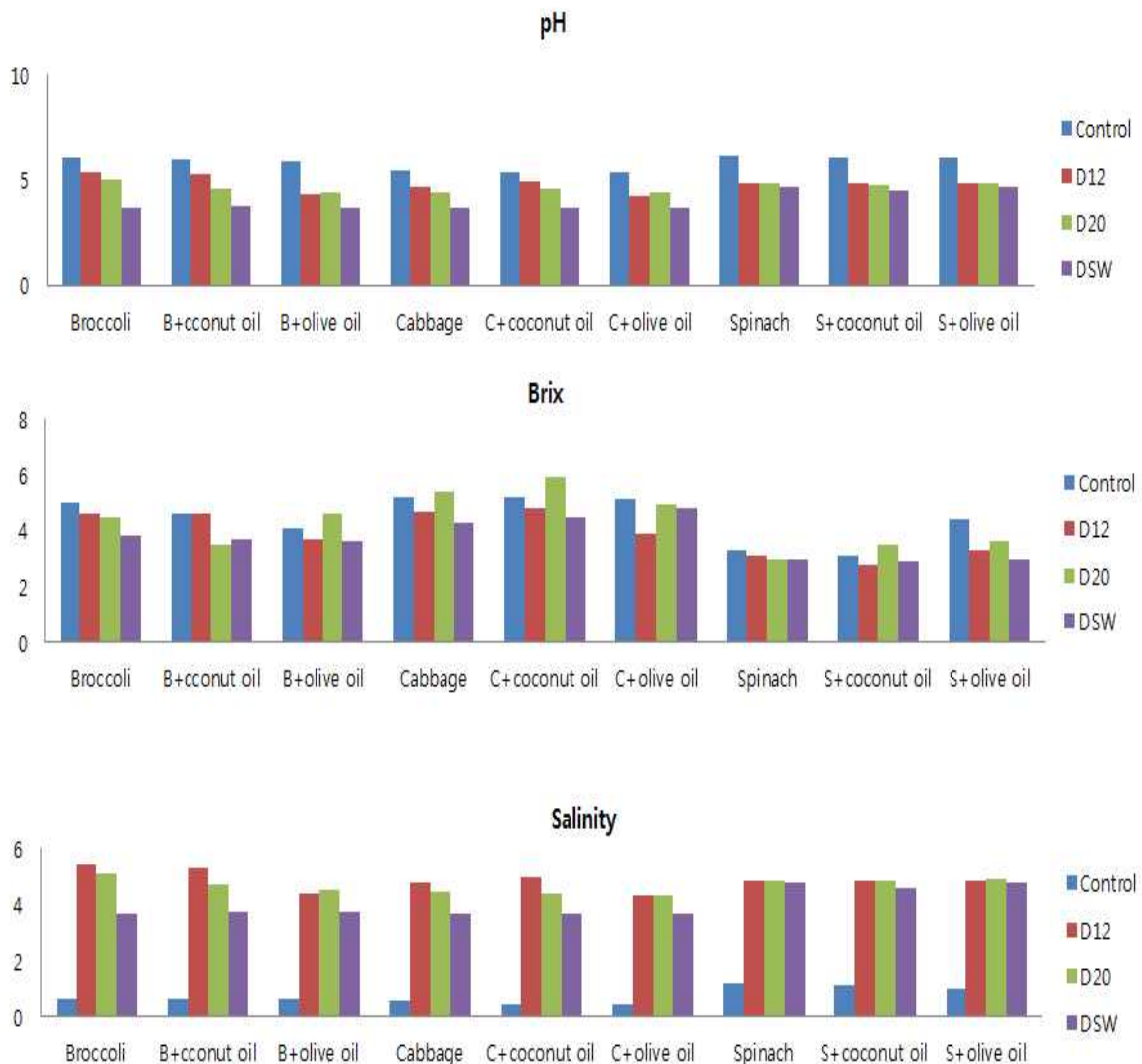
시금치, 양배추, 브로콜리별로 착즙액 내에 존재하는 비타민K1 함량을 분석한 결과, 시금치가 비타민K1 함유량이 제일 높았다. 채소 착즙액의 비타민K1 함량을 증대시키기 위하여 협동기관인 환동해산업연구원, 한국식품연구원과 논의한 결과, 채소별 함량 비율을 조절하기로 하였으며 비타민K1 함량이 제일 높은 시금치를 기준으로 하여 시금치, 양배추, 브로콜리 순으로 5:4:1, 6:3:1 비율인 2가지 조건으로 실험을 진행하기로 결정하였다. 착즙 동결건조 분말을 멸균된 증류수에 녹여 시금치, 양배추, 브로콜리 순서대로 5:4:1, 6:3:1 비율이 되도록 혼합하여 총 3L가 되도록 제조하였다. 이를 미리 멸균시켜 놓은 5L 발효조에 주입하고 121℃에서 5분간 멸균하여 고온에 의한 비타민K1 손실을 최소화하였다. 멸균 후 냉각수를 이용하여 착즙액 내부 온도를 26℃까지 떨어뜨린 후, 유산균을 1종 또는 2종, 3종을 동일한 비율로 섞어 1% 접종하였으며 26℃에서 24 시간동안 200rpm으로 배양하였다. 발효를 진행하는 동안 외부에 의한 온도 변화를 최소화하기 위하여 냉각수를 이용하여 발효조 내부 온도를 26℃로 일정하게 유지하였다. 실험실 규모에서 배양할 때의 rpm과 달리 5L 발효조에 맞게 rpm을 조정하였으며 이 때, 버블이 생기는 것을 제어하기 위해 실리кон 소포제(LS-303) 2g을 멸균 증류수에 녹여 액상으로 만들어 6시간 경과 후 첨가하여 진행하는 것으로 하였다. 이때 소포제의 사용은 전체 용량의 1-2g (30-60%; w/w)으로 진행하는 것이 유효하다. 발효하는 동안 산소 주입과 pH 조절은 이루어지지 않았으며, 발효 후의 착즙액은 80-90℃에서 20-30분간 열처리를 통해 유산균을 사멸시켰으며, 사균 처리가 완료된 착즙발효액은 동결건조기를 이용하여 약 72시간 동안 건조 시켜 분말화하였으며 건조된 분말은 약 -72℃에 저장하여 보관하였다. 해당 파일럿 배양 조건을 향후 대량 배양에 적용하여 진행하는 것으로 결정하였다. 파일럿 배양 과정은 아래 그림 8에 나타내었다.



[그림 8 채소 착즙액 발효 전 후 형태 비교 및 파일럿(3L) 배양]

8) 오일 첨가에 따른 제품 비교

비타민K는 지용성 영양소로 완전한 수용상태보다 기름이 섞인 상태에서 비타민K 용합력이 더 좋다는 내용을 기반으로 하여 시금치, 브로콜리, 양배추의 단일 착즙액에 식품첨가물로 판매되고 있는 코코넛오일과 올리브오일을 각각 첨가한 후 유산균을 종별로 각각 1% 접종하고 26℃에서 24시간 발효시켜 총 9개의 샘플을 제작하였다. 그리고 식품의 맛과 향, 품질 등에 영향을 미칠 수 있는 pH, 당도, 염도를 각 샘플별로 측정하여 결과를 비교하였다. pH의 경우에는 오일 첨가와 상관없이 발효하기 전과 비교하였을 때 발효 후에 현저히 감소하는 것을 확인하였으며 그중에서도 *Lactobacillus plantarum* 발효 샘플이 pH 4.0~4.5 정도로 제일 낮게 측정되었고, *Weissella paramesenteroides* 2종의 발효 샘플은 그보다 높은 pH 4.5~5.0 으로 측정되었다. 당도의 경우에 브로콜리 샘플에서는 오일을 첨가하지 않은 샘플이 오일 첨가 샘플보다 당도가 높게 측정되었지만, 시금치와 양배추의 경우에는 그와 반대로 오일을 첨가하여 발효시켰을 때 당도가 더 높아지는 것을 확인하였다. 염도의 경우에는 오일 첨가 유무와 상관없이 발효 후의 샘플에서 염도의 수치가 확연하게 증가하는 것을 확인하였다. 이는 유산균이 발효하는 과정에서 생산해내는 산물에 의해 작용하는 것으로 파악된다. 해당 결과는 아래 그림 9에 나타내었다.



[그림 9. 채소 착즙액의 오일 첨가에 따른 pH, 당도, 염도 비교]

9) 대량 배양 진행(500L)

경북 지역에서 생산되는 녹황색 채소들 중 비타민K 함유량이 높은 채소로 선별된 양배추, 시금치, 브로콜리 중에서도 비타민K 함유량이 제일 많은 채소가 시금치임을 협동기관인 환동해산업연구원으로부터 전달받았으며, 이들 중 착즙 시 유실되는 양이 상대적으로 가장 적은 것이 시금치였기 때문에 시금치, 양배추, 브로콜리를 6:3:1, 5:4:1 비율로 혼합하여 사용하지 않고, 시금치만 단일로 사용하여 최종 발효 소재로 진행하기로 결정하였다. 경북 소재의 시금치를 구매하여 3번의 세척과정과 자연건조 탈수 과정을 거친 후 착즙기를 통해 총 600kg의 시금치 착즙액을 회수하였다. 발효조(500L) 2대에 시금치 착즙액 250L씩 넣은 후 멸균 작업을 수행하였다. 이 때, 멸균은 121℃에서 5분간 가열하는 것으로 진행하여 시금치 착즙액 내의 비타민K1 손실을 최소화하였다. 멸균 작업을 수행하고 냉각수를 이용하여 시금치 착즙액을 포함한 발효조 내부를 26℃로 식힌 후, 환동해산업연구원에서 공급받은 유산균인 *Lactococcus lactis* KCCM 12759와 *Leuconostoc mesenteroides* KCCM 12756P 배양액을 동일한 비율로 총 1%(v/v)가 되도록 접종한 후 26℃에서 24시간 동안 발효시켰다. 발효하는 동안 외부 온도의 영향을 받지 않도록 냉각수를 이용하여 발효조 내부의 온도를 25℃~26℃로 일정하게 유지하였다. 발효 시 산소 주입과 pH 조절은 이루어지지 않았으며, 유산균에 의해 생성될 수 있는 버블을 제어하기 위하여 실리콘 소포제(LS-303)를 30~60%(v/v)로 첨가하였다. 발효 후 유산균 유무 확인을 위하여 약 1ml를 덜어 냉장 보관하였으며, 나머지 발효물은 저장 기간 증대를 위하여 80~100℃에서 20분간의 열처리를 통해 유산균을 사멸시켰다. 사균처리 된 배양액 1ml를 덜어 심진희석법을 통해 희석한 후 0.05% BCP가 첨가된 MRS 고체배지에 0.1ml 도말하여 30℃ 배양기에서 24시간동안 배양하였다. 24시간 뒤에 배양된 플레이트를 관찰한 결과, 어떠한 미생물도 검출되지 않았다. 해당 결과를 통해 사균 처리가 완벽하게 진행되었음을 확인하였고 확인된 결과를 토대로 해당 배양 샘플은 동결건조기를 통해 수분을 완전히 제거하여 분말로 저장하였다. 아래 그림8은 500L 발효조 2대를 이용하여 대량 배양한 배양 공정 사진과 시금치유산균발효물을 동결건조기를 이용하여 분말화한 사진을 나타냈다. 대량 배양 공정 과정과 동결건조 분말 형태는 아래 그림 10에 나타내었다.



[Fig 10. 시금치착즙유산균발효물 500L 제작 및 동결건조 분말 사진]

10) 시금치착즙유산균발효물 내 유효 균주 확인

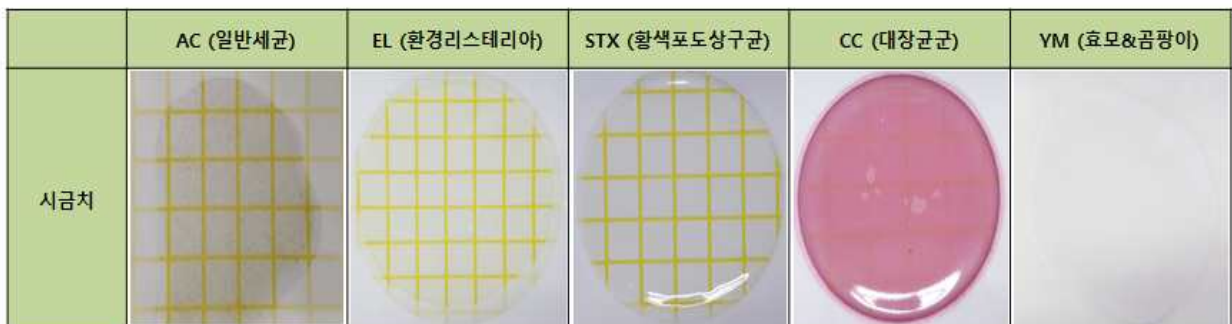
앞선 500L 발효조를 이용하여 제작된 시금치착즙유산균발효물 내에서 비타민K2를 생산하는 유효균주인 *Lactococcus lactis* KCCM 12759와 *Leuconostoc mesenteroides* KCCM 12756P이 발효 후에도 유효하게 존재하는지에 대한 유무를 확인하기 위하여 실험을 진행하였다. 시금치착즙유산균발효물을 사균처리 하기 전 미리 회수한 발효액 1ml를 십진희석법을 이용하여 멸균된 증류수로 10배씩 희석하여 희석된 샘플 12개를 제조하였다. 희석한 샘플들을 MRS 액체 배지에 1.5% 아가로스과 0.05% BCP를 첨가하여 제작된 MRS-BCP 고체 배지에 0.1ml씩 분주한 후 도말하여 30℃ 배양기에서 24시간 배양하였다. 배양 24시간 뒤 배지에 형성된 콜로니를 무작위로 채취하여 27F 와 1492R 프라이머 세트 및 AccPower PCR premix kit (Bioneer, Korea)를 이용하여 TaKaRa PCR Thermal Cycler (Japan)으로 각 균주의 16S rRNA 유전자 부위를 증폭하였다. PCR 산물은 PCR clean-up Gel extraction (Macherey Nagel, USA)으로 정제하여 ABI3730 DNA analyzer (Applied Bioxyxtems, USA)로 유전자 서열을 분석하여 샘플에 나타난 균주를 비교 동정하였다. 콜로니의 염기 서열을 분석한 결과, 샘플에서 분리된 균주는 모두 *Lactococcus lactis* 와 *Leuconostoc mesenteroides*로 확인되었다. 이를 통해 발효 24시간 이후에도 발효물 내에 존재하는 유산균은 변화가 없고 일정하게 유지됨을 확인하였다. 해당 결과는 아래 그림 11에 나타내었다.

Length	Start	End	AC	Gene	Ref.	Length	Start	End	Bit	Raw	EValue	Match	Total	Pct.(%)
1274	6	1159	GQ33788	<i>Lactococcus lactis</i> strain K	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucl...	1487	8	1161	2049	1109	0.0	1143	1158	99
1268	7	1268	HF562944	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucl...	1446	2	1265	2167	1173	0.0	1238	1268	98

[그림 11. 시금치유산균발효물 내 유효 균주 확인]

11) 시금치착즙유산균발효물의 미생물 안정성 분석

시금치착즙유산균발효물을 80-100℃에서 20분간 열처리를 진행하고 동결건조기를 이용하여 분말화하여 시제품을 제작하기 전 기타 오염 미생물에 대한 존재 유무를 확인하기 위하여 일반세균, 환경리스테리아, 황색포도상구균, 대장균군, 효모 및 곰팡이를 검출하는 속성 건조필름 배지를 이용하여 미생물 분석 검사를 시행하였다. 분석할 샘플 1ml을 멸균된 증류수 9ml와 혼합하여 10배 희석한 뒤 속성 건조 필름 배지 5종에 각각 1ml 씩 분주하였다. 이후 필름은 37℃에서 24시간~72시간까지 보관하였으며 시간별로 관찰하였다. 그 결과, 24시간, 48시간, 72시간째에 5종의 필름에서 어떠한 미생물도 검출되지 않음을 확인하였다. 해당 결과는 아래 그림 12에 나타내었다.



[그림 12. 시금치유산균발효물분말의 기타 미생물 검출 분석 결과]

12) 시금치착즙유산균발효물분말의 성분 분석

시금치착즙유산균발효물분말을 시제품으로 제작하고자 샘플 내 성분 분석을 시행하였다. 성분 분석 항목은 비타민K1, 비타민K2, 열량, 탄수화물, 당류, 조단백질, 조지방, 포화지방, 나트륨, 비타민D2, 비타민E, 비타민B1, 비타민B2, 비타민B3, 비타민9으로 분석 국제공인기관인 한국건강기능식품협회와 (주)래스주식회사에 의뢰하여 분석하였다. 분석한 결과, 열량 265.78 kcal/100g, 탄수화물 23.75%, 당류 38.11 mg/g, 조단백질 35.09%, 조지방 3.38%, 포화지방 0.27 g/100g, 나트륨 1074.28 mg/100g, 비타민D2 39.88 ug/100g, 비타민E 15.59 mg α-TE/100g, 비타민B1 0.28 mg/100g, 비타민B2 0.32 mg/100g, 비타민B3 5.69 mg/100g, 비타민B9 4295.29 ug/100g, 비타민K1 103.9 ug/100ml, 비타민K2 2.6 ug/100ml로 확인되었다. 해당 결과는 아래 표2에 나타내었다.

[표2]

성분명	함량
열량(kal/100g)	265.78
탄수화물(%)	23.75
당류(mg/g)	38.11
조단백질(%)	35.09
조지방(%)	3.38
포화지방(g/100g)	0.27
나트륨(mg/100g)	1074.28
비타민D2(ug/100g)	39.88
비타민E(mg α-TE/100g)	15.59
비타민B1(mg/100g)	0.28
비타민B2(mg/100g)	0.32
비타민B3(mg/100g)	5.69
비타민B9(ug/100g)	4295.29
비타민K1(ug/100ml)	103.9
비타민K2(ug/100ml)	2.6

13) 시금치유산균발효물 환 시제품 제조

13-1) 시금치유산균발효물 환 제조 및 품목보고

시금치유산균발효물의 시제품에 기입될 내용을 위하여 식품·식품첨가물 품목보고를 진행하였다. 제품명은 발효시금치유산균 포스트바이오틱스K로 하였으며, 식품 유형은 과·채가공품, 유통기한은 제조일로부터 24개월로 보고하였다. 또한 제품의 원재료명 또는 성분명 및 배합비율로 시금치추출물분말 88%, 시금치분말 8%, *Leuconostoc mesenteriodes* 2%, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* 2% 함유로 보고하였다. 보고일로부터 일주일 이내로 보고 완료되었으며 품목제조보고번호 201755535233을 발급받았다.

앞서 제작된 시금치착즙유산균발효물 동결 건조 분말을 분쇄기를 이용하여 고운 입자로 분쇄한 후 시금치건조분말을 5% 첨가하여 혼합한 뒤 반죽하였다. 그 다음, 혼합된 분말을 제환기에 넣어 환을 제조하였으며, 최종 제작된 환의 크기는 2 mm이다. 제조가 끝난 환은 환 내의 중금속 유무를 확인하기 위하여 중금속검출기를 통과시켰다. 분석 결과 어떠한 중금속도 검출되지 않음을 확인하였다. 중금속 검출 유무를 확인한 뒤 최종적으로 80℃~90℃에서 20분간 살균 처리를 진행하였다. 살균처리를 완료한 후 환을 각 2g씩 무게를 측정하여 시제품 용지에 넣어 포장하였다. 시제품 1박스 당 60포가 되도록 제품을 제작하였다. 해당 시제품의 사진은 아래 그림 12에 나타내었다.

제품명	제품사진	제품용도	제품출시일	해당 기술의 제품출시 기여율(%)
발효시금치유산균환_포스트바이오틱스K		발효시금치유산균 환	2021.10.30	100

[Fig 12. 시금치착즙유산균발효물 환 시제품 환 사진 추가]



식품 · 식품첨가물 품목제조보고서

보고인	성명 신명화	생년월일 1977년 11월 30일		
	주소 경상북도 영천시 금호읍 남성길 27-16	전화번호 휴대전화	01034065025	
영업소	명칭(상호)	영업등록번호		
	농업회사법인(주)동의보궁	20170555352		
	소재지 경상북도 영천시 금호읍 남성길 27-16			
제품정보	식품의 유형	과, 채 가공품	품목제조보고번호 2017055535233	
	제품명	발효시금치유산균 포스트바이오틱스K		
	유통기한	제조일로부터 24개월		
	품질유지기한			
	원재료명 또는 성분명 및 배합비율	덧장에 기재		
	용도 용법	덧장에 기재		
	보관방법 및 포장재질	덧장에 기재		
	포장방법 및 포장단위	덧장에 기재		
	성상	짙은 녹갈색의 환		
	품목의 특성			
	■ 고열량 · 저영양 식품 해당 여부 []에 []아니오 [0]해당 없음 ■ 영, 유아를 섭취대상으로 표시 판매하는 식품 해당 여부 []에 [0]아니오 ■ 고령친화식품으로 표시해 판매하는 식품의 해당 여부 []에 [0]아니오 ■ 살균 · 멸균 제품의 해당 여부 []비살균 [0]살균 []멸균			
	기타			

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

2021년 10월 12일
보고인 신명화

경상북도 영천시장 귀하

품목보고번호 : 2017055535233

처리부서	보건소 보건위생과	처리자성명	한미란	처리일자	2021년 11월 09일
------	-----------	-------	-----	------	---------------



13-2) 시금치유산균발효물 환의 성분분석

제 D2021051800 호 문서확인 WM34-6655-L3FX				시험·검사성적서	
제품명		SPLILm_proto		제조일자 (유통기한)	2021-05-04
의뢰인	업체명	농업회사법인주식회사동희보양		성명	신명화
	주소	경상북도 영천시 금호읍 남성길 27-16			
제조번호			접수년월일	2021-05-18	
검사의뢰목적		참고용	접수번호	D2021051800	
<p style="text-align: center;">귀하가 우리 연구원에 시험·검사의뢰한 결과는 다음과 같습니다.</p> 시험·검사 완료일 : 2021-06-01 시험·검사 책임자 : 이순영 검사관련 총 책임자 : 김전희					
시험·검사항목		시험·검사 결과		시험·검사원	
열량(Kcal/100g)		265.78 Kcal/100g		허준	
탄수화물(%)		23.75 %		허준	
조단백질(%)		35.09 %		배정환	
조지방(%)		3.38 %		장세인	
나트륨(mg/100g)		1074.28 mg/100g		김지현	
당류(과당,포도당,사당,맥아당,유당)(mg/g)		38.11 mg/g		박윤진	
포화지방산(g/100g)		0.27 g/100g		김관영	
트랜스지방산(g/100g)		불검출		김한영	
콜레스테롤(mg/100g)		불검출		윤재인	
비타민A(μg RE/100g)		불검출		김세미	
비타민D(μg/100g)		39.88 μg/100g		김혜윤	
비타민E(mg α-TE/100g)		15.59 mg α-TE/100g		조미주	
비타민B1(mg/100g)		0.28 mg/100g		이선정	
비타민B2(mg/100g)		0.32 mg/100g		송지은	
나이아신(mg/100g)		5.69 mg/100g		박해빈	
판토텐산(mg/100g)		불검출		송지은	
비오틴(μg/100g)		불검출		김혜윤	
엽산(μg/100g)		4295.29 μg/100g		박해빈	
글.					



유산균 시금치 발효 1차시제품 성분분석 결과

제조일자: 2021-05-04

제품명: SPLLM_Prototype

성분명	농도
열량	265.78 Kcal/100g
탄수화물	23.75%
조단백질	35.09%
조지방	3.38%
나트륨	1074.28 mg/100g
당류	38.11 mg/g
포화지방산	0.27 g/100g
비타민D2	39.88 µg/100g
비타민E	15.59 mg α-TE/100g
비타민B1	0.28 mg/100g
비타민B2	0.32 mg/100g
나이아신(비타민B3)	5.69 mg/100g
엽산(비타민B9)	4295.29 µg/100g

비타민K1		771.48 µg/100g
비타민K2	3.84	7.68 µg/100g
	MK7	0.78 µg/100g
	MK9	0.42 µg/100g
비타민K 총량		780.36 µg/100g

유산균 접종량	1 % (v/v)
접종 유산균 종류	<i>Lactococcus lactis</i> , <i>Leuconostoc mesenteroides</i>

환 제조 시 첨가된 성분 및 성분 정보	시금치분말 5%
-----------------------	----------

14) 시금치유산균발효물 대량발효 및 특성 확인

시금치착즙유산균발효물 한 시제품에 이어 시금치유산균발효물 액상형태의 시제품을 제작하기 위하여 경북 지역 내에서 제작된 시금치건조분말 약 50kg을 구매하였다. 시금치건조분말 50kg에 멸균된 증류수 940L를 첨가한 후 121℃에서 5분간 멸균을 진행하였다. 멸균 후 발효조 내부 온도를 26℃로 식힌 다음 협동기관인 환동해산업연구원에서 전달 받은 유산균 *Lactococcus lactis* KCCM 12759P와 *Leuconostoc mesenteriodes* KCCM12756P를 동일한 비율로 혼합하여 최종적으로 1%가 되도록 접종하였다. 접종 후 26℃에서 24시간동안 발효하였고 발효가 끝난 다음, 80~90℃에서 20분간 열을 가하여 발효물 내 유산균을 모두 사멸시켰다. 이후 해당 샘플은 상온에서 보관하였다.



[그림 . 시금치유산균발효물 제작 공정]

15) 시금치유산균발효물의 미생물 안정성 분석

시금치착즙유산균발효물을 80~100℃에서 20분간 열처리를 진행하고 동시제품을 제작하기 전 기타 오염 미생물에 대한 존재 유무를 확인하기 위하여 일반세균, 환경리스테리아, 황색포도상구균, 대장균군, 효모 및 곰팡이를 검출하는 속성 건조필름 배지를 이용하여 미생물 분석 검사를 시행하였다. 분석할 샘플 1ml을 멸균된 증류수 9ml와 혼합하여 10배 희석한 뒤 속성 건조 필름 배지 5종에 각각 1ml 씩 분주하였다. 이후 필름은 37℃에서 24시간~72시간까지 보관하였으며 시간별로 관찰하였다. 그 결과, 24시간, 48시간, 72시간째에 5종의 필름에서 어떠한 미생물도 검출되지 않음을 확인하였다. 해당 결과는 아래 그림 14에 나타내었다.

대장균군	황색포도상구균	일반세균	효모 및 곰팡이	환경리스테리아

[Fig 14. 시금치유산균발효물 기타 미생물 검출 여부]

16) 시금치유산균발효물의 성분 분석

시금치유산균발효물을 시제품으로 제작하고자 샘플 내 성분 분석을 시행하였다. 성분 분석 항목은 비타민K1, 비타민K2, 열량, 탄수화물, 당류, 조단백질, 조지방, 포화지방, 트랜스지방, 콜레스테롤, 나트륨을 분석 전문 기관에 의뢰하여 분석하였다. 분석한 결과, 열량 15.77 kcal/100g, 탄수화물 1.78%, 당류 0.07mg/g, 조단백질 1.15%, 조지방 0.45%, 포화지방 0.00 g/100g, 나트륨 92.31 mg/100g, 비타민K1 103.9 ug/100ml, 비타민K2 2.6 ug/100ml로 확인되었다. 해당 결과는 아래 표3에 나타내었다.

[표3]

성분명	함량
열량(kal/100g)	15.77
탄수화물(%)	1.78
당류(mg/g)	0.07
조단백질(%)	1.15
조지방(%)	0.45
포화지방(g/100g)	0.00
트랜스지방(g/100g)	0.00
콜레스테롤(g/100g)	0.00
나트륨(mg/100g)	92.31
비타민K1(ug/100ml)	103.9
비타민K2(ug/100ml)	2.6

18) 시금치유산균발효물 액상 주스 시제품 제조

시금치유산균발효물 액상 주스 시제품에 기입될 내용을 위하여 식품·식품첨가물 품목보고를 진행하였다. 제품명은 발효시금치유산균 포스트바이오틱스K더블로 하였으며, 식품 유형은 액상차, 유통기한은 제조일로부터 2년, 보관방법은 직사광선을 받지 아니하는 서늘한 곳에서 보관 및 유통(실온보관)으로 보고하였다. 또한 제품의 원재료명 또는 성분명 및 배합비율로 시금치분말 5%, 정제수 91%, Leuconostoc mesenteroides 2%, Lactococcus lactis subsp. lactis 2% 함유로 보고하였다. 보고일로부터 일주일 이내로 보고 완료되었으며 품목제조보고번호 2017055535234를 발급받았다. 해당 품목제조보고서는 아래 그림 15에 나타내었다.

제품명	제품사진	제품용도	제품출시일	해당 기술의 제품출시 기여율(%)
발효시금치유산균-포스트바이오틱스 K		발효시금치유산균 주스	2021.12.28	100

[Fig 12. 시금치착즙유산균발효물 한 시제품 한 사진 추가]



식품·식품첨가물 품목제조보고서

보고인	성명 신명화	생년월일 1977년 11월 30일	
	주소 경상북도 영천시 금호읍 남성길 27-16	전화번호 휴대전화	01034085025
영업소	영칭(상호)	영업등록번호	
	농업회사법인(주)동의보궁	20170555352	
	소재지 경상북도 영천시 금호읍 남성길 27-16		
제품정보	식품의 유형	역상차	품목제조보고번호 2017055535234
	제품명	발효시금치유산균 포스트바이오틱스K더블	
	유통기한	제조일로부터 2년	
	품질유지기한		
	원재료명 또는 성분명 및 배합비율	덧장에 기재	
	용도 용법	덧장에 기재	
	보관방법 및 포장재질	덧장에 기재	
	포장방법 및 포장단위	덧장에 기재	
	성상	고유의 색상과 향미를 가지며, 이미?이취가 없어야 함.	
	품목의 특성	<ul style="list-style-type: none"> ■ 고열량·저영양 식품 해당 여부 []예 []아니오 [0]해당 없음 ■ 영, 유아를 섭취대상으로 표시 판매하는 식품 해당 여부 []예 [0]아니오 ■ 고령친화식품으로 표시해 판매하는 식품의 해당 여부 []예 [0]아니오 ■ 살균·멸균 제품의 해당 여부 []비살균 [0]살균 []멸균 	
기타			

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

2021년 12월 28일

보고인 신명화

경상북도 영천시장 귀하

품목보고번호 : 2017055535234

처리부서	보건소 보건위생과	처리자성명	한미란	처리일자	2021년 12월 29일
------	-----------	-------	-----	------	---------------



19) 시금치유산균발효물의 성분 분석

시금치유산균발효물 1ton을 액상 주스 제품으로 제작하기 위하여 식품첨가물을 발효물에 혼합하여 맛과 향미를 조정하였다. 식품첨가물로 인정되는 제품들 중 무수결정포도당, 비타민B군 믹스, 청사과향을 최종 첨가물로 선정하였으며 해당 첨가물 함량을 여러 군으로 선정하여 맛과 향미 등을 검토한 결과, 최종적으로 무수결정포도당 5%, 비타민B군 믹스 0.001%, 청사과향 0.05%를 함유하기로 결정하였다. 해당 비타민B군 믹스는 니코틴산아미드, 판토텐산칼슘, 비타민B2, 비타민B6 염산염, 비타민B1 염산염을 포함한다. 아래 표4는 함량과 100L 제조 시 함유되는 양을 표시하였다.

[표4]

	품명	함량(%)	100(L)배합기준
1	건조 시금치분말	5.000%	5.000(Kg)
2	무수결정포도당	5.000%	5.000(Kg)
3	비타민 B군믹스	0.001%	0.001(Kg)
4	청사과향	0.050%	0.050(Kg)
5	정제수	89.949%	89.949(Kg)
	합 계	100.000%	100.000

2-2. 비타민K2 생산을 위한 생물전환공정 및 이용기술개발(공동1)

1) 야채류와 시판 야채즙내의 비타민K 분석

1-1) 야채류내의 비타민K1 분석

양배추, 브로콜리, 시금치 등에서의 비타민K1 함량을 조사한 결과, 양배추는 14.29, 12.26 ug/100g이며 브로콜리는 182.46, 175.1 ug/100g 으로 측정되었으며, 시금치는 생것은 449.57 ug/100g이며 삶은 경우 551.96 ug/100g으로 좀더 함량이 높은 것으로 확인되었다(Fig 1). 경북에서 생산판매 되는 양배추, 브로콜리, 시금치(2019.09)에서의 비타민k1을 TLC와 HPLC로 확인한 결과 브로콜리 27.95 ug/100g, 시금치 116.1 ug/100g, 양배추는 15.62 ug/100g 였으며 현재 판매하고 있는 양배추즙(순*식품)에서는 확인되지 않았다. 이는 기존의 보고 된 야채류의 비타민 K함량보다 적은 양이라 이는 지역별, 계절별, 보관법, 조리법에 영향이 있는 것으로 판단 된다.

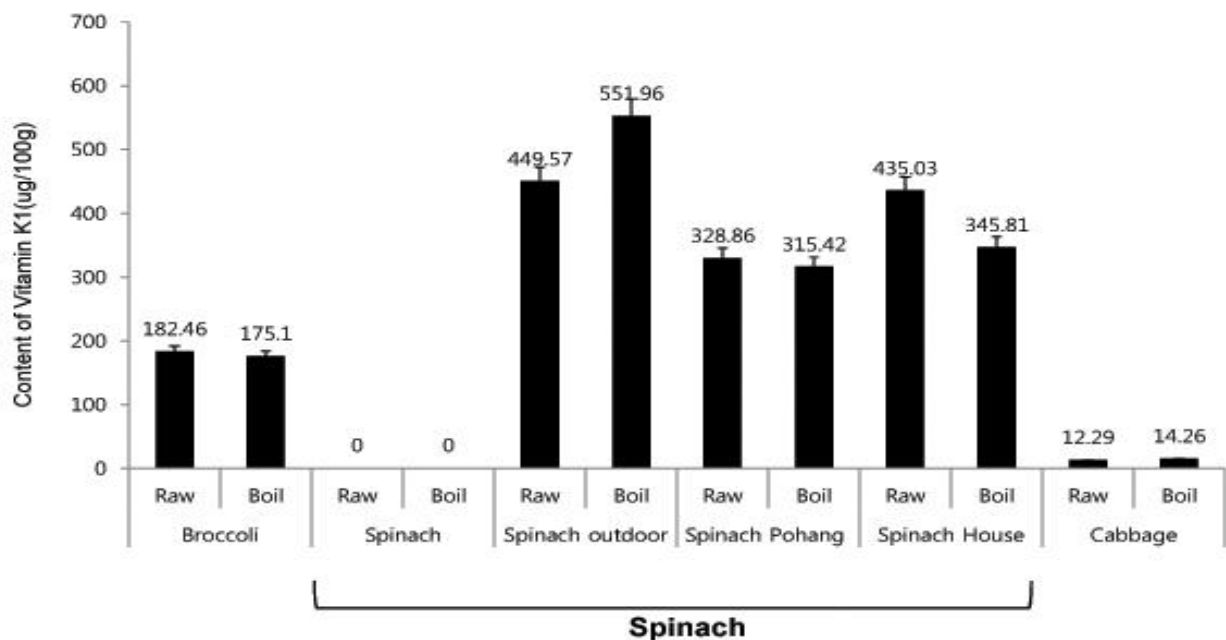


Fig 1 브로콜리, 시금치, 양배추의 계절, 조리법에 따른 비타민K1의 함량 비교

각 유산균 배양액에 동량의 이소프로판올(isopropanol)를 첨가하여 스피인 다운 후 하부의 물을 제거하고, 상층의 이소프로판올 부분만을 진공 농축하였다. 상기 농축된 부분을 메틸알코올 (Methyl alcohol, MeOH) 500ul에 용해하여 제조하였으며, 상기 용매를 3ul씩 TLC 플레이트에 점적하여 사용하였다. 대조군으로는 DHNA 0.1%(w/v, 1mg/mL, 100ppm), VitK1 0.1%(w/v, 1mg/mL, 100ppm), MK4 0.1%(w/v, 1mg/mL, 100ppm)표준 용액을 Merck TLC silica GEL(TLC silica gel 60 F254, Merck)에 3 ul씩 점적한 후 용매로 분리하여 각 시료 내 DHNA, 비타민 K1, K2의 유무를 확인하였다.

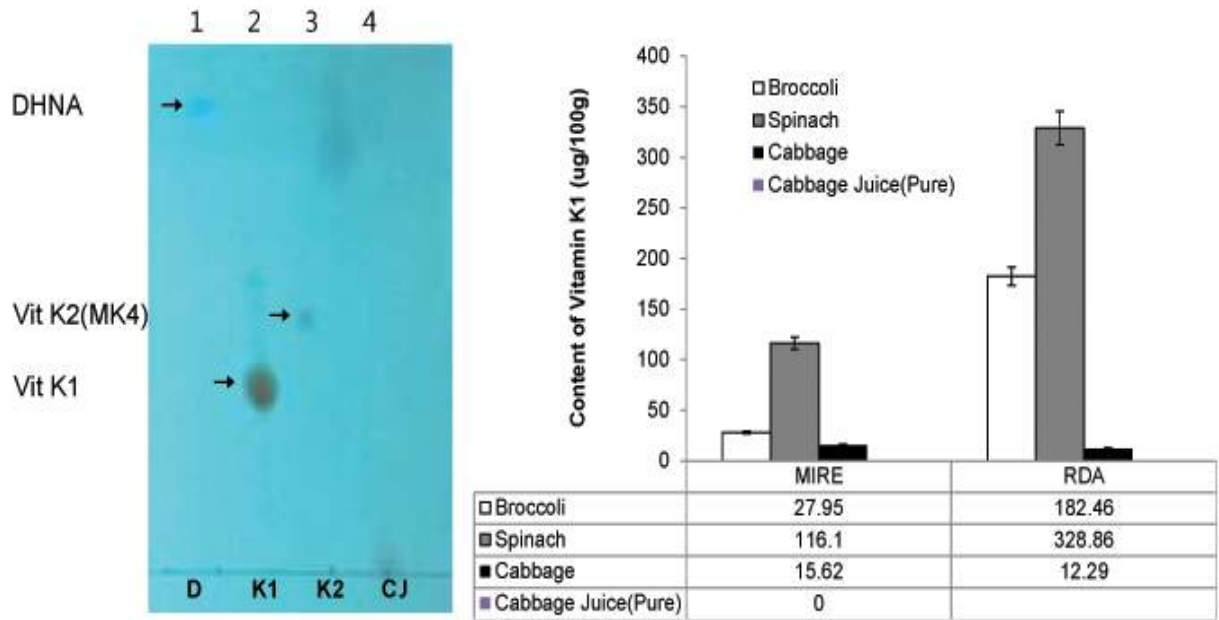


Fig 2. 비타민 K1, K2의 TLC와 HPLC에 의한 정량

1-2) 야채류내의 비타민K1 분석

시중에 판매되고 있는 양배추, 브로콜리, 시금치 등의 착즙액 또는 착즙발효액을 대상으로 비타민K1 유무를 TLC로 확인하였다. 이소프로판올(isopropanol)을 첨가하여 스피인 다운 후 하부의 물을 제거하고, 상청의 이소프로판올 부분만을 진공 농축하였다. 상기 농축된 부분을 메틸알코올(Methyl alcohol, MeOH) 500ul에 용해하여 제조하였으며, 상기 용매를 3ul씩 TLC 플레이트에 점적하여 사용하였다. 대조군으로는 DHNA 0.1%(w/v, 1mg/mL, 100ppm), VitK1 0.1%(w/v, 1mg/mL, 100ppm), MK4 0.1%(w/v, 1mg/mL, 100ppm)표준 용액을 Merck TLC silica GEL(TLC silica gel 60 F254, Merck)에 3 ul씩 점적한 후 용매로 분리하여 각 시료 내 DHNA, 비타민 K1, K2의 유무를 확인하였다. 판매 되는 양배추, 브로콜리, 시금치의 비타민k1을 TLC로 확인한 결과 양배추즙, 양배추발효즙, 양배추브로콜리즙에서는 확인되지 않았다. 시금치즙과 통양배추즙에서 유사한 위치의 밴드가 희미하게 보이는 하지만 HPLC 결과 확인되지 않았다. 이는 기존의 보고 된 야채류의 비타민K함량보다 적은 양이라 이는 지역별, 계절별, 보관법, 조리법에 영향이 있는 것으로 판단 된다.



2) 야채류내의 비타민K2 생산을 위한 유산균의 선발 및 발효 조건

유산균 배양액(발효 원료)으로는 제조된 양배추, 브로콜리, 시금치 착즙액을 각각 1L 이용하였다. 착즙액 원료에 각각 2%(w/v) 덱스트로스(D-glucose, Sigma, USA) 80mL, 1%(w/v) 전분(starch, Sigma, USA) 80mL, 2%(w/v) 수크로오스(sucrose, Sigma, USA) 80mL, 또는 2%(w/v) 말토오스(maltose, Sigma, USA) 80mL를 첨가하여 각 배지를 제조하고, 대조군으로는 유산균 배양에 일반적으로 이용되는 MRS 배지를 이용하였다. 제조된 각각의 발효 원료에 *L.plantarum* (KCCM12299P), *W.paramesenteroides* (KCCM12300P), *W.paramesenteroides* (KCCM12301P)을 각각 1×10^8 cfu/ml농도로 1mL씩 접종하고 30°C에서 24시간 동안 배양하였다. 24시간 후의 LAB Counts(log cfu/ml)를 측정하여 최적 발효물 배양 조건을 확인하였다.

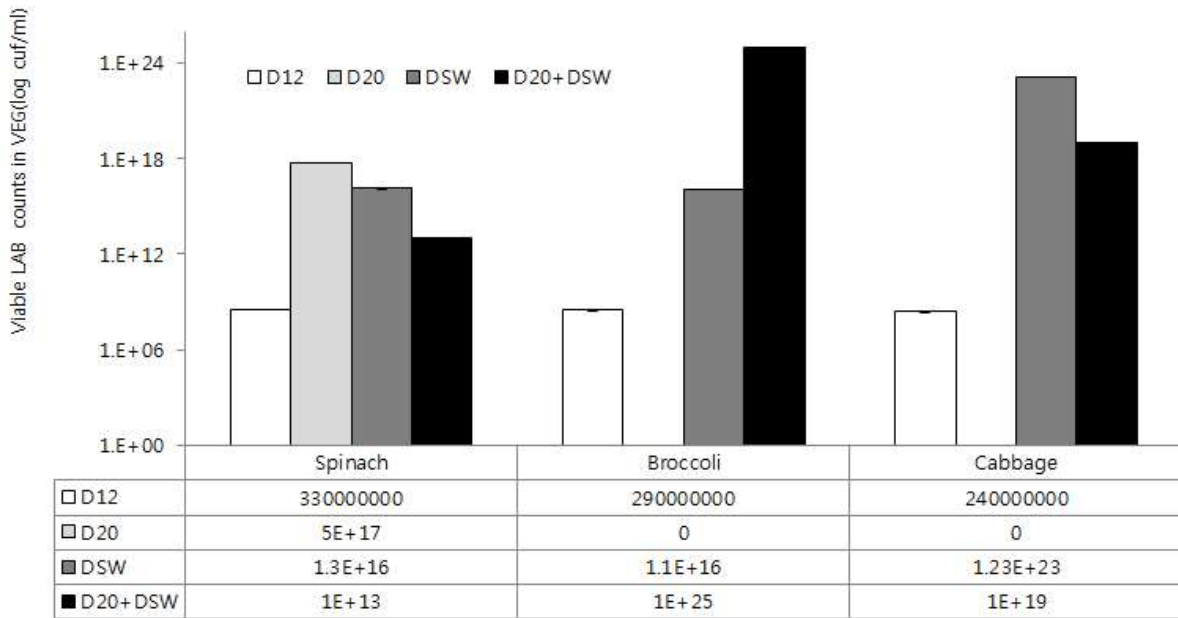


Fig 3. 야채착즙액 내에서의 유산균 생균수 분석

제조된 각각의 발효 원료에 *L.plantarum* (KCCM12299P), *W.paramesenteroides* (KCCM12300P), *W.paramesenteroides* (KCCM12301P)을 각각 1×10^8 cfu/ml 농도로 1mL씩 접종하고 30°C에서 24시간 동안 배양하였다. 24시간 후의 LAB Counts(log cfu/ml)를 측정하여 최적 발효물 배양 조건을 확인하였다. 시간별 발효에 따른 생균수를 조사하여 야채배지내의 성장에 유효한 유산균을 선발하였다. *L.plantarum* (KCCM12299P) 경우는 3가지의 야채배지에서 성장이 모두 우수하며 *W.paramesenteroides* 중에서는 (KCCM12301P)의 경우가 (KCCM12300P)보다 48시간에 성장이 유효한 것으로 보인다. 성장은 모두 1×10^8 cfu/ml 이상이였다.

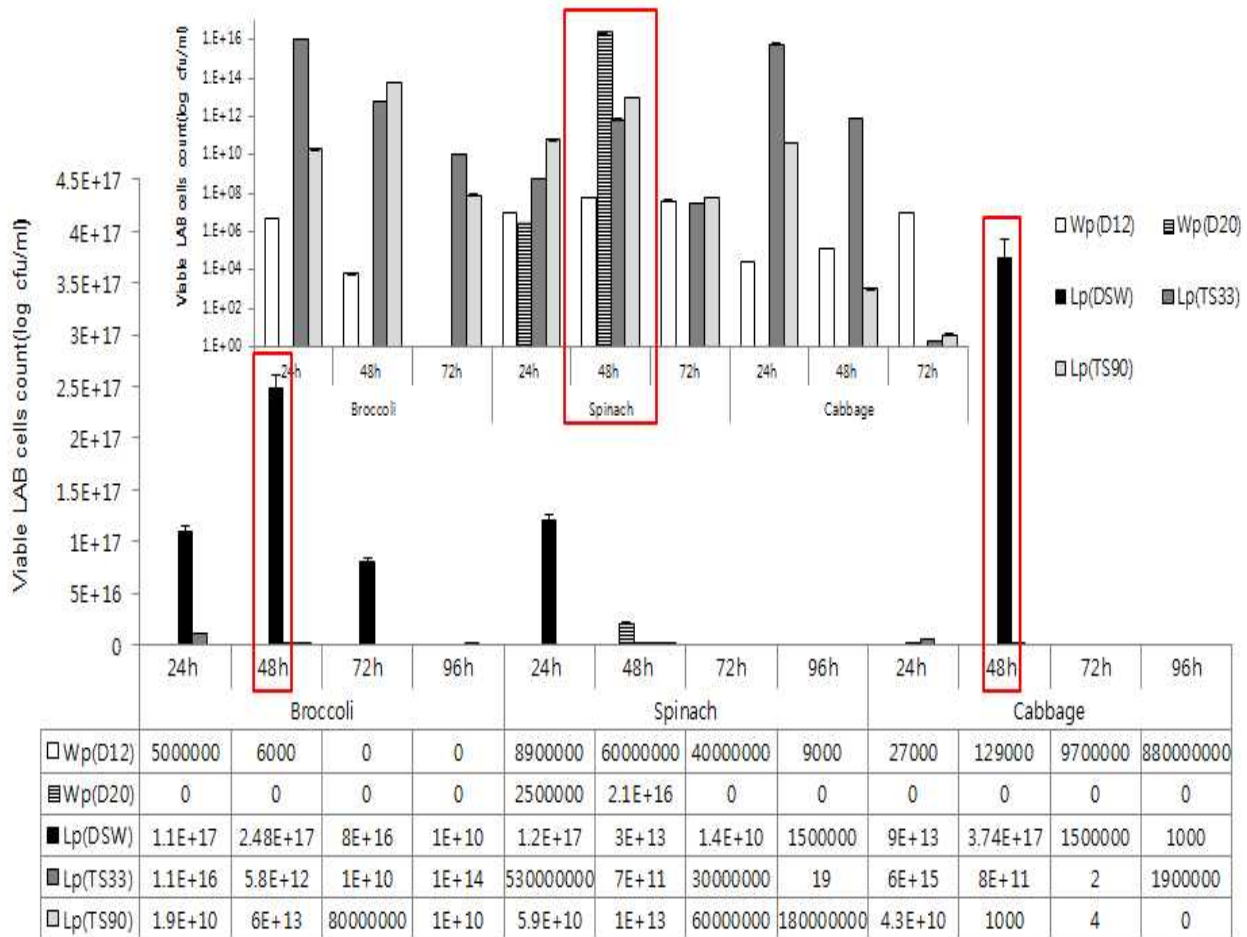


Fig 4. 야채착즙액 내에서의 발효시간에 따른 유산균 생균수 분석

3) 야채류내의 비타민K2 생산을 위한 배지의 성분분석

3-1) 야채류 배지의 성분분석

비타민K2 생산배지로의 적합 타당성 검토를 위해 야채류와 대두, 오일류의 탄소원, 질소원으로 단백질, 탄수화물과 지방을 분석하였다. 조단백질 함량은 단백질분석기(Tector kjelte)을 이용, 조지방은 지방분석(Soxtec systemr 1046)으로 탄수화물은 등을 조사하였다. 지용성 비타민K 생산에 있어 지방의 영향을 알아보았다. 브로콜리는 0.37, 시금치 0.12, 양배추0.12로 지방함량이 낮아 이는 이전 유산균의 비타민K2 생산 배지로 사용되는 우유, 대두와 비교할 경우 10,1배에서 40배 차이가 있는 것으로 확인 되었다. 코코넛오일과 올리브오일을 첨가배양을 고려하였다. 단백질과 탄수화물의 경우 브로콜리와 양배추의 경우 탄수화물 함량은 시금치보다 많은 것으로 확인 되었다. 다음으로 각 야채류에 오일류의 첨가에 따른 생균수를 조사하였다.(Fig 5)

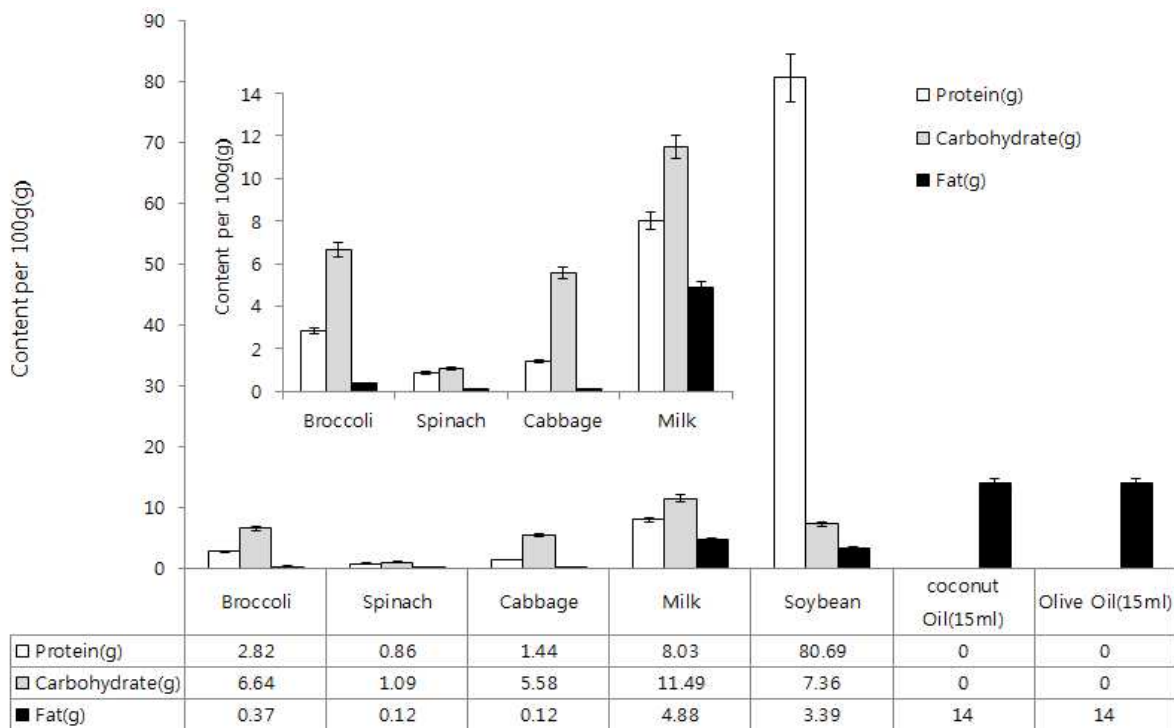


Fig 5. 야채착즙액 내에서의 적정배지 조성을 위한 성분분석

제조된 각각의 발효 원료에 올리브오일과 코코넛오일을 첨가하여 *L.plantarum* (KCCM12299P), *W.paramesenteroides* (KCCM12300P), *W.paramesenteroides* (KCCM12301P)을 각각 1×10^8 cfu/ml 농도로 1mL씩 접종하고 30°C에서 24시간 동안 배양하였다. 24시간 후의 LAB Counts(log cfu/ml)를 측정하여 최적 발효물 배양 조건을 확인하였다. 시간별 발효에 따른 생균수를 조사하여 야채배지내의 성장에 유효한 유산균을 선발하였다. *L.plantarum* (KCCM12299P) 경우는 3가지의 야채배지에서 성장이 모두 열세하며 *W.paramesenteroides* 중에서는 (KCCM12301P)의 경우가 (KCCM12300P)보다 48시간에 성장도 열세한 것으로 보인다.

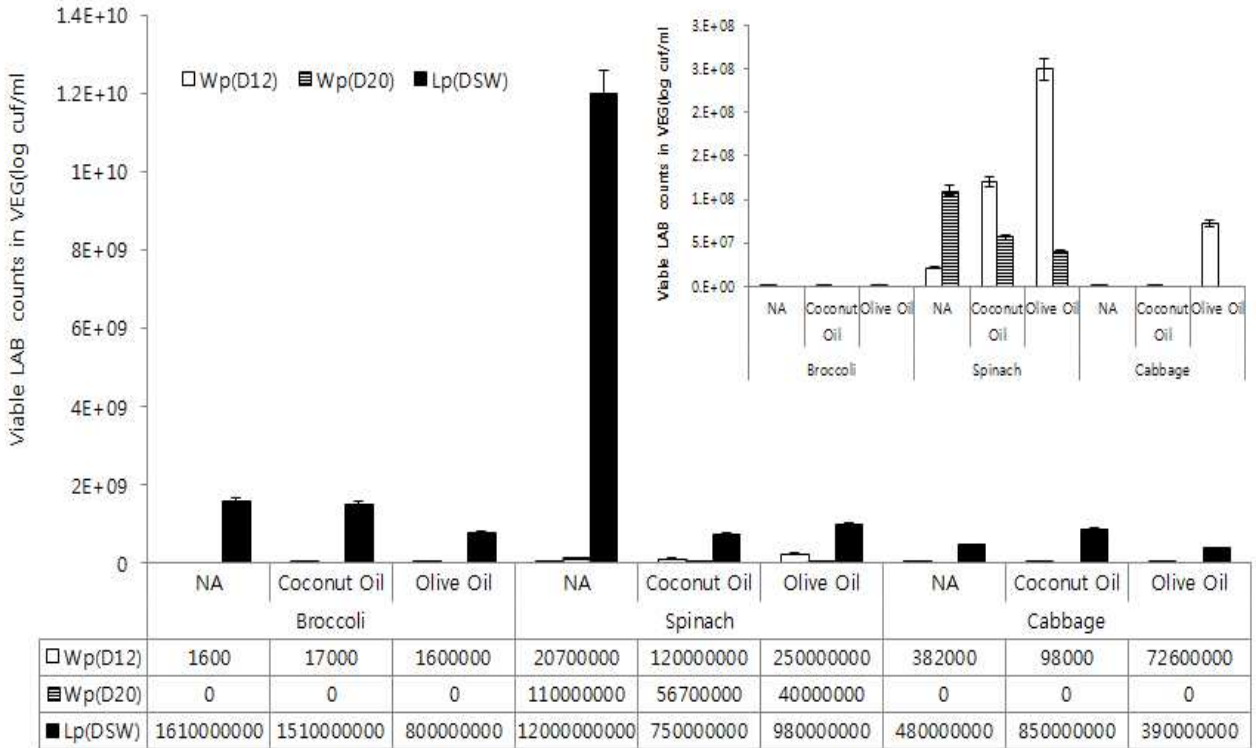
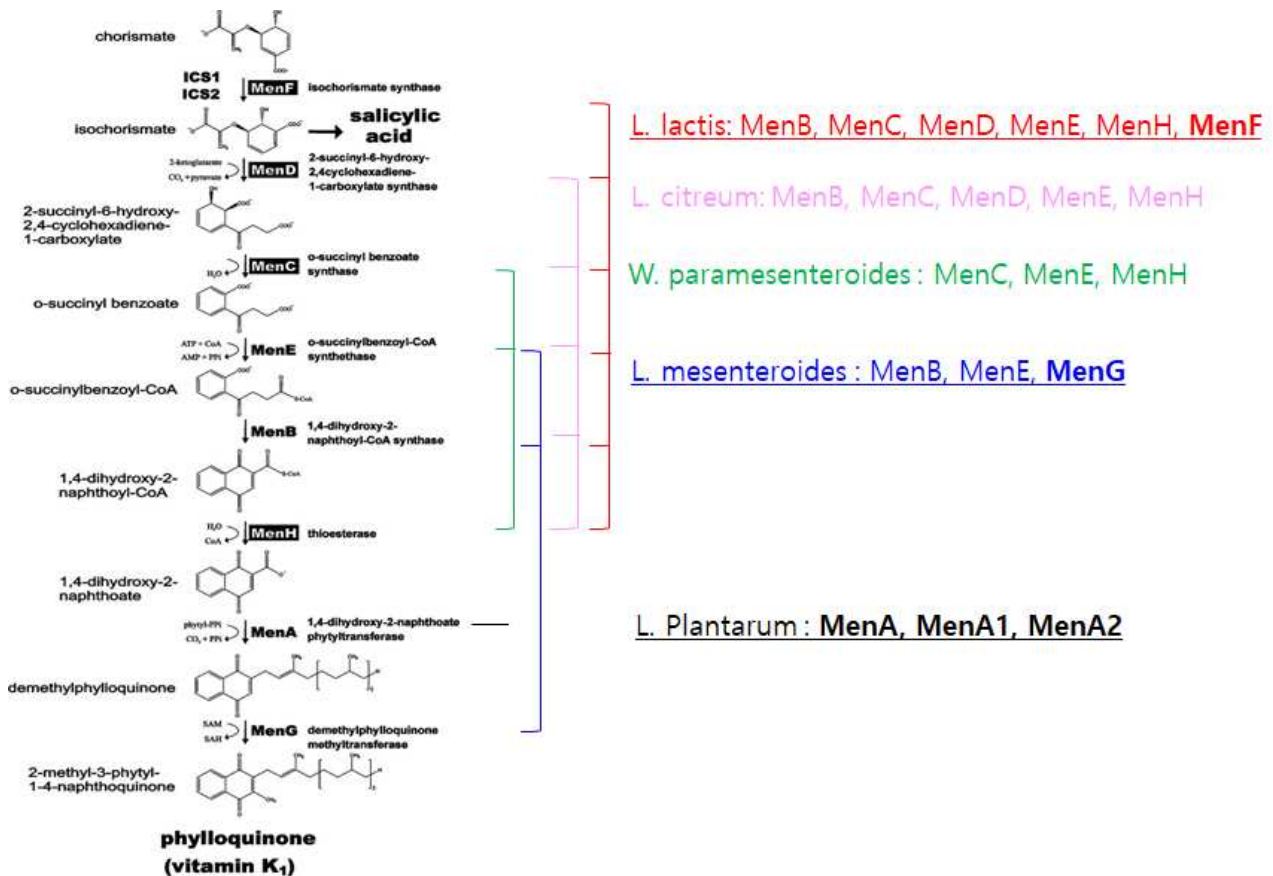


Fig 6. 야채착즙액 오일 첨가배지에서의 생균수 분석

4) 비타민K2 생산을 위한 선발 유산균의 유전자의 확인

4-1) 유산균의 바이오공정에 따른 Men 유전자 전사체 분석

비타민 K1 은 식물내의 생화학 중간산물인 코리스믹산 (chorismic acid; chorismate; C₁₀H₁₀O₆) 생합성 경로로, 비타민 K2 는 박테리아 (유산균 포함)내의 중간산물인 코리스믹산 생합성 경로를 통해 생산된다 (Nowicka B., 2010). 코리스믹산은 펜토스 인산 경로 (pentose phosphate pathway)와 당화과정 (glycolysis)에서의 전구체를 제공하는 시킴산 (shikimic acid; shikimate) 경로에서 생산되는 중간대사체이다. 그러므로 이들 합성 경로에는 에너지 대사체 뿐만 아니라 탄소원 (carbon)이 식물과 박테리아 내에서 비타민 K1과 비타민 K2 생산에 영향을 주는 것으로 알려져 있다 (Hermann KM., 1999). 또한 이들 비타민 K1과 비타민 K2 생산 경로에 참여한 생합성 효소 유전자가 관련되고 있으며 이들 유전자는 대장균 (*Escherichia coli*; *E. coli*)과 *B. subtilis*에서 클로닝 되었으며 몇몇의 유산균에서도 확인되었다 (Sharma V., 1992; Hill K., 1990). 코리스믹산을 필로퀴논과 메나퀴논으로 합성에 대한 확실한 연구 보고는 없지만 유사한 경로로 진행되는 것으로 생각되고 있다. 경로에 관련 된 유전자는 *menF* (siochorismate synthase), *menD* (2-succinyl-6-hydroxy-2,4-cyclohexadiene-1-carboxylate synthase), *menE* (O-succinylbenzoic acid-CoA ligase), *menB* (dihydroxynaphthoate synthase)와 *menA* (phytyl transferase), *menC* (DHNA thioesterase) 등이 알려져 있다. 일반적으로 인간이 섭취한 식물의 비타민 K1이 장내에서 장내 세균의 작용을 통해 비타민 K2로 전환하여 체내 공급이 되었으나 최근 결핍 등이 초래되거나 골다공증, 지혈제 또는 염증 환자들에게 처방에 의해 공급되는 의약품으로 구분되고 있다.



4-2) 유산균의 바이오공정에 따른 Men 유전자 전사체 분석

MRS배지(DB, USA)와 일반 곤충배지에서 유산균을 배양 후, 유산균을 모아 RNA를 추출하였으며 추출된 RNA를 이용하여 cDNA 합성을 위해 역전사를 cDNA synthesis kit를 이용하여 시행하였다. 실시간 중합효소연쇄반응 검사는 ABI PRISM 7000(Applied Biosystem)을 사용하여 시행하였다. PCR 반응액은 2xSYBR GREEN pcr mix를 사용하여 합성하였다.

MRS배지(DB, USA)와 일반 곤충배지에 접종한 *W. paramensenteroides* 두 종 D12와 D20의 비타민K2 생산에 관여하는 MenC, MenE, MenH 모두 발현하였으나 D12의 경우 48, 72시간에 강한 발현이 확인되었다.

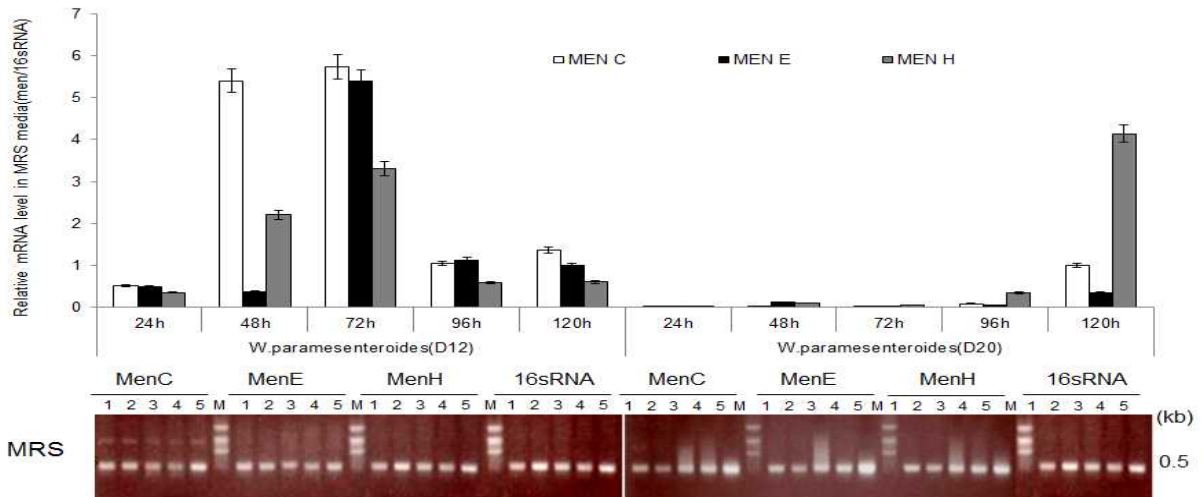


Fig 7. MRS배지에서 *Weissella* sp 균내의 Men C, E, H 와 *Lactobacillus* sp MenA 유전자의 발현

MRS배지(DB, USA)와 일반 곤충배지에 접종한 *L. plantarum* DSW 종은 비타민K2 생산에 관여하는 MenA, MenA1, MenA2가 D12의 경우 24시간과 72시간에 강한 발현이 확인되었다.

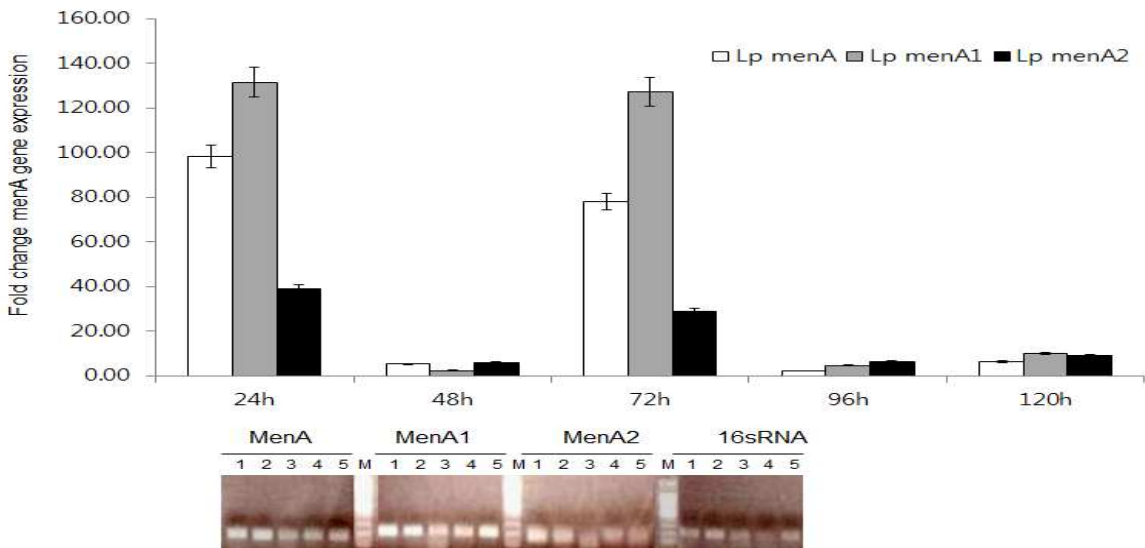


Fig 8. MRS배지에서 *Weissella* sp 균내의 Men C, E, H 와 *Lactobacillus* sp MenA 유전자의 발현

5) 선발 프로(유산균)과 프리(야채)에 따른 비타민K2 생산 효능 평가

해수에서 분리 및 동정 된 락토코쿠스 락티스(*Lactococcus lactis*, Li), 락토바실러스 플란터룸(*Lactobacillus. plantarum*, Lp), 류코노스톡 메센테로이데스(*Leuconostoc mesenteroides*; Lm)을 이용하였다. 이는 1차년도에 사용 된 균주 77종 중 유사균주에 대해 재분석을 실시한 후 선발하여 사용하였다. 또한 NCBI 사이트를 통해 동종의 유산균의 menaquinone 효소를 in silico 로 분석하여 분리한 균주에서 확인함으로써 본 공정에 유효함을 재확인하였다.

락토코쿠스 락티스(*Lactococcus lactis*, Li), 락토바실러스 플란터룸(*Lactobacillus. plantarum*, Lp), 류코노스톡 메센테로이데스(*Leuconostoc mesenteroides*; Lm)은 동해의 해수로부터 분리 하였다. 상기 락토코쿠스 락티스(*Lactococcus lactis*, Li)와 류코노스톡 메센테로이데스(*Leuconostoc mesenteroides*;Lm)는 2018년 6월 경북수산자원연구원의 양식장 해수에서 락토 바실러스 플란터룸(*L. plantarum*, Lp)은 2015년 11월부터 12월까지 울릉도 태하, 저동 및 현포 의 해양심층수(표층으로부터 수심 200m의 바닷물)를 취수하여 냉장 상태로 운반하였다. 상기 해 수 및 해양심층수를 0.1%(v/v) BCP가 첨가된 MRS agar 배지에 도말하여 37°C에서 1일간 배양 하였다. 이후 BCP와의 반응에 의해 형성된 노란색 콜로니의 선별을 반복하여 단일 종을 분리하 였다.

해수에서 분리 및 동정 된 락토코쿠스 락티스(*Lactococcus lactis*, Li), 락토바실러스 플란터룸 (*Lactobacillus. plantarum*, Lp), 류코노스톡 메센테로이데스(*Leuconostoc mesenteroides*; Lm) 을 이용하였다. 락토바실러스 플란터룸 균주는 한국미생물보존센터(KCCM)에 2018년 8월 10일 자로 기탁되었으며, *Lactobacillus plantarum* DSW #2-4 수탁번호는 KCCM12299P이다. 상기 락토코쿠스 락티스 균주와 류코노스톡 메센테로이드 균주는 한국미생물보존센터(KCCM)에 2020 년 7월 3일자로 기탁되었으며, *Lactococcus lactis* TS95와 *Leuconostoc mesenteroides* TS49 수탁번호는 각각 KCCM 12759P와 KCCM 12756P이다.

표 1. 해수에서 분리 된 비타민K2 생산 기능의 유산균

번호	분리균주	근접종	identity(%)
1	<i>Lactococcus lactis</i> TS95	<i>Lactococcus lactis</i> MG754653.1	99
2	<i>Lactobacillus plantarum</i> DSW#2-4	<i>Lactobacillus plantarum</i> KR184825.1	99
3	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> TS49	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> MT544830.1	99

6) 비타민K2 생산 기능 프리바이오틱스 전처리 및 후처리 공정

식물이 포함하고 있는 비타민K1의 손실은 최소화하고, 기타 외부의 미생물에 대한 오염을 방지하기 위한 멸균 전처리로 60 내지 70℃, 70 내지 80℃, 80 내지 90℃, 90 내지 100℃ 또는 100 내지 121℃에서 5 내지 10분간 처리하면 비타민K1은 최소화 가능하며 상기의 식물에서 48시간 동안 사는 미생물 즉, 리스테리아(Listeria), 황색포도상구균(Staphylococcus aureus), 대장균(Escherichia coli), 바실러스(Bacillus), 비브리오(Vibrio), 슈도모나스 균(Pseudomonas), 효모(Yeast), 곰팡이(Fungi) 등으로 이루어진 균을 미생물을 멸균 하여 사용하였다(표 2). 표 2에서 곰팡이(Fungi) 등으로 이루어진 균을 미생물을 멸균하여 사용하였다(표 2).

표2.

Sterilization	Temp (°C)	Cont	80			90			100			121		
	Time (min)		5	10	20	5	10	20	5	10	20	5	10	20
Vitamin	K1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-
	K2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-
Microorganism (30°C)	24h	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
	48h	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
LAB (30°C)	24h	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	48h	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

멸균 후의 유산균 배양으로 비타민K2 생성 후에 비타민K1과 K2(MK4)의 손실은 최소화하면서 사균 및/또는 생균 형태로 제품화하기 위해 50 내지 60℃, 60 내지 70℃, 6 -12 시간, 12 - 24시간 24- 36 시간 또는 70 내지 80℃에서 5 - 10분 처리하여 사균하여 사용하거나 생균으로도 사용할 수 있으며 한정되지 않는다.

Sterilization	Temp (°C)	Cont	70				80				90				100			
	Time (min)		5	10	20	30	5	10	20	30	5	10	20	30	5	10	20	30
Vitamin	K1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-
	K2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-
LAB(30°C)	24h	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	48h	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

7) 비타민K2 생산 기능 프리바이오틱스 내에서의 바이오컨버전 조건 최적화

7-1) 프리(식물) 및 프로(유산균)바이오틱스의 공정 조건 확립

시금치, 브로콜리, 양배추를 포함한 발효 원료의 발효 조건 최적화를 위해, 유산균 발효를 효과적으로 일어나게 할 수 있는 최적조건의 확인하기 위한 실험을 수행하였다. 유산균 배양액으로는 제조된 시금치, 브로콜리, 양배추 착즙액 또는 착즙액 동결건조 분말 0.1g/200 mL(0.5%; v/v) 제조하고, 대조군으로는 유산균 배양에 일반적으로 이용되는 MRS 배지를 이용하였다.

제조된 각각의 발효 원료에 *L.lactis*(KCCM 12759P), *L.plantarum* (KCCM12299P), *L.mesenteroides*(KCCM 12756P)을 각각 1x10⁸ cfu/ml 농도로 0.2 mL(1%; v/v)씩 접종하고 26°C에서 24, 48, 72시간 동안 배양하였다. 24시간 후의 LAB Counts(log cfu/ml)를 측정하여 최적 발효물 배양 조건을 확인하였다. 이때 발효온도는 25 - 30°C 에서 진행해도 무관하나 이전 실험에서(출원번호10-2019-0157749)에서 비타민K2의 전구체인 1, 4-디히드록시-2나프토산(1,4-dihydroxy-2naphthoic acid; DHNA)의 생성능 실험에서 최적온도인 26°C로 실험을 진행하였다.

LAB Counts는 각 배양액에 아가로스 (BD Difco, USA)를 첨가하여 제작한 고체 배지에 배양물을 1%(v/v)로 희석하여 1 ml을 LAB 플레이트에 도말 후 30°C에서 24시간 배양하여 형성된 콜로니의 수를 측정하여 수행하였다. 각 배양액에서의 유산균 배양 후 LAB Counts 측정결과를 도 1 및 하기 표 3에 나타냈다.

배양액	유산균	LAB Counts (log cfu/ml)		
		24h	48h	72h
MRS (대조군)	<i>L.lactis</i> KCCM 12759P	1.94E+11	1.13E+11	7.30E+10
	<i>L.plantarum</i> KCCM12299P	6.26E+10	3.27E+09	2.27E+09
	<i>L.mesenteroides</i> KCCM 12756P	2.27E+10	1.85E+09	2.75E+08
시금치 (실험군1)	<i>L.lactis</i> KCCM 12759P	2.10E+11	3.50E+10	3.74E+10
	<i>L.plantarum</i> KCCM12299P	1.76E+09	1.69E+09	2.00E+09
	<i>L.mesenteroides</i> KCCM 12756P	3.30E+09	1.43E+08	3.74E+07
브로콜리 (실험군2)	<i>L.lactis</i> KCCM 12759P	5.40E+10	3.30E+09	4.20E+08
	<i>L.plantarum</i> KCCM12299P	5.59E+10	3.68E+09	7.70E+08
	<i>L.mesenteroides</i> KCCM 12756P	2.40E+10	3.00E+09	3.90E+08
양배추 (실험군3)	<i>L.lactis</i> KCCM 12759P	4.50E+10	4.40E+08	3.00E+07
	<i>L.plantarum</i> KCCM12299P	7.80E+10	3.06E+09	8.50E+08
	<i>L.mesenteroides</i> KCCM 12756P	9.70E+10	5.70E+08	1.00E+06

MRS 배지에 *L.lactis* KCCM12759P, *L.plantarum* KCCM12299P, *L.mesenterodes* KCCM12756P를 각각 접종한 경우, 24시간동안 배양한 후 LAB Counts가 1.94x10¹¹/ml(1.94E+11), 6.26x10¹⁰/ml(6.26E+10), 2.27x10¹⁰/ml(2.27E+10)로 측정되었고, 48시간 동안 배양한 후 LAB Counts는 1.13x10¹¹/ml(1.13E+11), 3.27x10⁹/ml(3.27E+09), 1.85x10⁹/ml(1.85E+09)로 측정되었고, 72시간동안 배양한 후의 LAB Counts는 7.30x10¹⁰/ml(7.30E+10), 2.27x10⁹/ml(2.27E+09), 2.75x10⁸/ml(2.75E+08)로 측정되었다

Fig 1에서 확인한 바와 같이, *L. lactis*를 시금치 착즙액 배지에 접종하고 24, 48, 72 시간 동안 배양한 배양물의 유산균 수는 각 2.10x10¹¹/ml(2.10E+11), 3.50x10¹⁰/ml(3.5E+10), 3.74x10¹⁰/ml(3.74E+10)으로 증식이 활발히 일어났다. 브로콜리 착즙액 배지에서 24, 48, 72 시간 동안 배양한 배양물의 유산균 수는 각 5.40x10¹⁰/ml(5.40E+10), 3.30x10⁹/ml(3.30E+09), 4.20x10⁸/ml(4.20E+08)이었고, 양배추 착즙액 배지의 24, 48, 72 시간 동안 배양한 배양물의 유산균 수는 각 4.50x10¹⁰/ml(4.50E+10), 4.40x10⁸/ml(4.40E+08), 3.00x10⁷/ml(3.00E+07)이었다. *L. lactis*는 시금치, 브로콜리, 양배추 착즙액 배지 모두 24시간 배양에 있어 유산균 성장이 가장 활발하였으며, 특히 시금치 착즙액 이 경우가 가장 높았다.

L. plantarum 의 경우는 시금치 착즙액 배지에 24, 48, 72 시간 동안 배양한 배양물의 유산균 수는 각 1.76x10⁹/ml(1.76E+09), 1.69x10⁹/ml(1.69E+09), 2.00x10⁹/ml(2.00E+09)으로 증식이 거의 비슷하게 일어났다. 브로콜리 착즙액 배지에서 24, 48, 72 시간 동안 배양한 배양물의 유산균 수는 각 5.59x10¹⁰/ml(5.59E+10), 3.68x10⁹/ml(3.68E+09), 7.70x10⁸/ml(7.70E+08)이었고, 양배추 착즙액 배지의 24, 48, 72 시간 동안 배양한 배양물의 유산균 수는 각 7.80x10¹⁰/ml(7.80E+10), 3.06x10⁹/ml(3.06E+09), 8.50x10⁸/ml(8.50E+08)이었다. *L. plantarum*은 시금치보다는 브로콜리, 양배추 착즙액 배지의 24시간 배양에 있어 유산균 성장이 가장 활발하고 48, 72시간에서 감소하였다

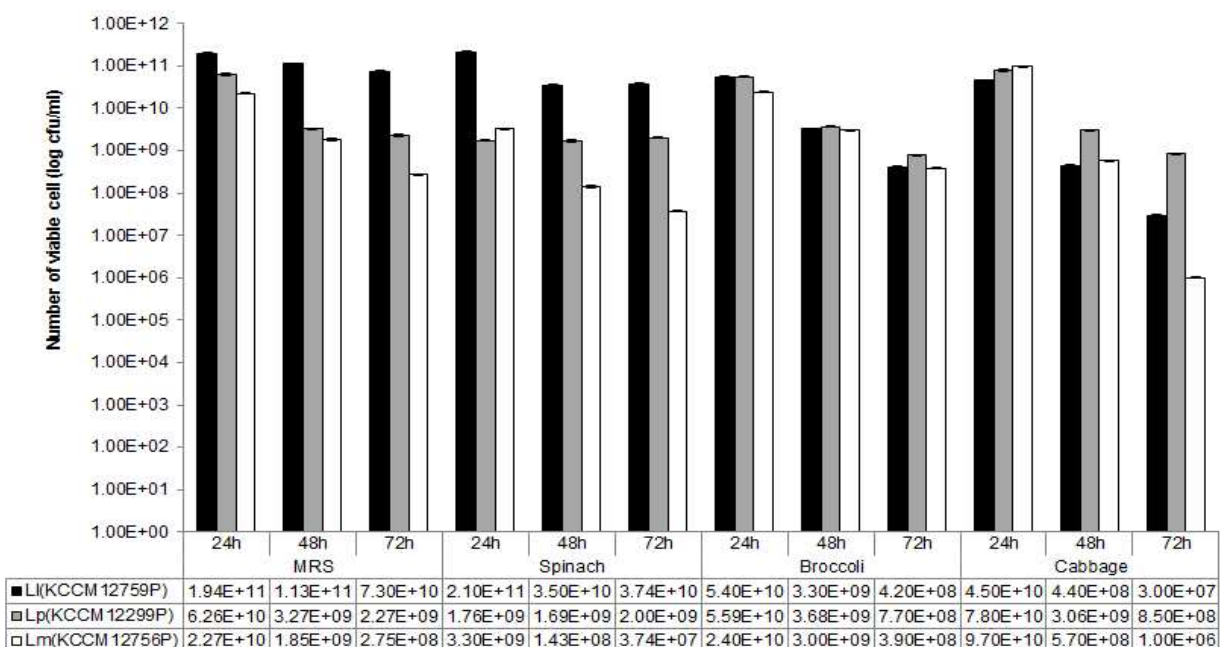


Fig. 1 Changes in viable cell counts of *L.lactis* (KCCM12759P), *L.plantarum* (KCCM12299P), and *L.mesenteroides* (Kmmc12756P) in MRS, spinach, Broccoli, and Cabbage juice

L. mesenteroides의 경우는 L. plantarum에서처럼 시금치보다는 브로콜리, 양배추 착즙액 배지의 24시간 배양에 있어 유산균 성장이 가장 활발하였다. 시금치 착즙액 배지에 24, 48, 72 시간 동안 배양한 배양물의 유산균 수는 각 $3.30 \times 10^9/\text{ml}$ ($3.30\text{E}+09$), $1.43 \times 10^8/\text{ml}$ ($1.43\text{E}+08$), $3.74 \times 10^7/\text{ml}$ ($3.74\text{E}+07$)으로 증식이 시간경과에 따라 감소하였다. 브로콜리 착즙액 배지에서도 24, 48, 72 시간 동안 배양한 배양물의 유산균 수는 각 $2.40 \times 10^{10}/\text{ml}$ ($2.40\text{E}+10$), $3.00 \times 10^9/\text{ml}$ ($3.00\text{E}+09$), $3.90 \times 10^8/\text{ml}$ ($3.90\text{E}+08$)이었고, 양배추 착즙액 배지의 24, 48, 72 시간 동안 배양한 배양물의 유산균 수는 각 $9.70 \times 10^{10}/\text{ml}$ ($9.70\text{E}+10$), $5.70 \times 10^8/\text{ml}$ ($5.70\text{E}+08$), $1.00 \times 10^6/\text{ml}$ ($1.00\text{E}+06$)이었다. L. mesenteroides 역시 시금치보다는 브로콜리, 양배추 착즙액 배지의 24시간 배양에 있어 유산균 성장이 가장 활발하고 48, 72시간에서 감소하였다. 이에, 시금치, 브로콜리, 양배추에서의 유산균 발효한 경우, 덱스트로스, 전분, 수크로오스, 말토오스의 탄소원 또는 이스트(yeast) 소고기 추출물(meat extract) 등의 첨가 없이도 26°C에서 24시간 동안 유산균 증식이 더 활발하여 유산균 배양에 적절함을 확인할 수 있었다.

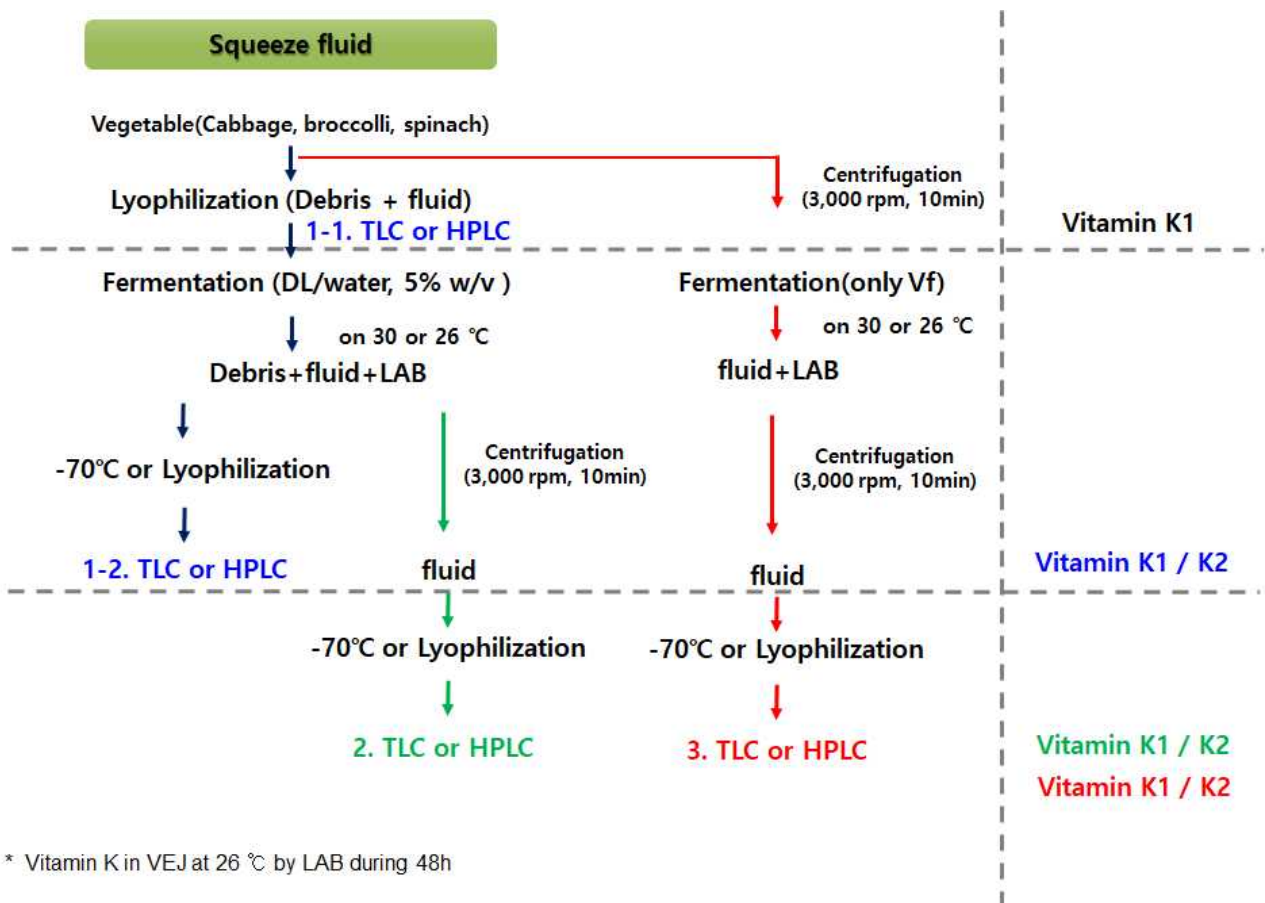
Table 2. The content of phyloquinone (Vit K1) and menaquinone (Vit K2; MK4) in vegetable fermented by LAB in this study.

LAB	Media	C/N	Temp	Time	Air	Vit K1(ug/ml)	VitK2(MK4;ug/ml)
LI	Cabbage	-	26°C	48h	aerobic	0.12	0.0
	Broccoli	-	26°C	48h	aerobic	1.06	0.40
	Spinachi	-	26°C	48h	aerobic	1.09	0.99
	Spinachi	-	26°C	24h	aerobic	0.93	0.68
LILm	Spinachi	-	26°C	24h	aerobic	1.09	1.39
LILp	Spinachi	-	26°C	24h	aerobic	1.05	1.41
LmLp	Spinachi	-	26°C	24h	aerobic	1.02	1.27
LILmLp	Spinachi	-	26°C	24h	aerobic	1.02	1.32

이 후 실험에서 탄소원 첨가에 따른 실험을 진행하고 메나퀴논 생산의 증량을 조사하였다(미발표).

7-2) 3종의 야채 유산균 발효물의 비타민K2과 K1 분석을 위한 공정화

시금치, 브로콜리, 양배추를 포함한 발효 원료의 발효 조건 최적화를 위해, 유산균 발효를 효과적으로 일어나게 할 수 있는 최적조건의 확인하기 위한 실험을 수행하였다. 식물 배지에 *L.lactis* KCCM12759P, *L.plantarum* KCCM12299P, *L.mesenterodes* KCCM12756P를 각각 접종한 경우 유산균의 성장은 MRS와 유사하였다. 이를 기반으로 비타민K1과 K2 TLC 및 HPLC(LC 및 MS/MS) 분석 샘플은 다음과 같은 공정을 통해 얻어졌다.



8) *L.lactis* 유산균 발효에 의한 비타민K2 생성과 K1 유무확인

8-1) 3종의 야채 유산균 발효물의 비타민K2 생성능 및 K1 확인

양배추(Cabbage, Ca), 시금치(Spinach, Sp), 브로콜리(Broccoli, Br) 착즙액에 *L. lactis*(KCCM 12759P) 유산균을 배양하여 제조한 발효물에서의 비타민K2(Menaquinone-4; MK4)의 생성 여부를 확인하기 위해, 얇은막 크로마토그래피(Thin layer chromatography, TLC) 분석을 수행하였다.

구체적으로, 각 배양액으로는 사용된 양배추, 시금치, 브로콜리 48시간 배양액 (200 mL)을 사용하였으며, TLC 수행시 양성대조군으로는 비타민K1(Sigma USA; V3051)과 비타민K2(MK-4; V042; Sigma USA) 각 5 ug/mL(0.05%; w/v)을 이용하였다.

각 배양액에는 *L. lactis*(KCCM 12759P)를 접종하여 26°C에서 호기 상태로 48시간 동안 유산균을 배양(발효)하였고, 48 시간의 유산균 배양 완료 후 유산균을 3,000-5,000 rpm으로 10-15분 원심분리 하여 유산균만을 수집한 후 TLC 시료로 이용하였다.

구체적으로 상기 시료에서 배양 된 유산균을 1 x PBS 버퍼(phosphate buffered saline)로 2번 정도 세정하고 lysozyme(10 mg/mL; Roche, USA) 을 포함하는 6 mL의 PBS를 넣고 37°C에서 1시간 동안 방치한 후, 볼텍스 또는 혼합기를 이용하여 10-30분동안 충분히 섞어준다. 3,000-5,000 rpm에서 10-15분간 원심분리하여 상층액은 버린 후 24mL 추출버퍼(n-hexane: isopropanol = 2:1; v/v)를 더하고 30초 동안 볼텍스로 혼합한 후, 3,000 - 5,000 rpm에서 10-15분 동안 원심분리하여 상층액을 회수하고 아래층에 isopropanol을 동량의 24mL를 첨가하여 30초 동안 볼텍스로 혼합한 후, 3,000 - 5,000 rpm에서 10-15분 동안 원심분리하여 상층액을 회수한다. 상기 단계를 총 2번 반복하여 얻어진 용매 추출물을 진공 농축(ratary)하고 2 mL의 iso-propanol에 용해하여 제조하였으며, 상기 용매를 3ul씩 TLC 플레이트에 점적하여 사용하였다. 대조군으로는 K1(Sigma USA; V3051)과 비타민K2(MK-4; V042; Sigma USA) 각 5 ug/mL(0.05%) 표준 용액을 Merck TLC silica GEL(TLC silica gel 60 RP F254, Merck)에 3 ul씩 점적한 후 용매로 분리하여 각 시료 내 비타민K1과 K2의 유무를 확인하였다. 상기 TLC에서 분리에 사용된 용매는 메탄올(methanol): 아세톤(acetone) 비율이 1:1의 부피비가 되도록 혼합하여 이용하였다.

용매 분리 후 결과는 UV램프로 발색하여 확인하였으며, 도 2에 발색 결과 사진을 나타내었다. 도 2에서 확인할 수 있는 바와 같이, 착즙액에서는 시금치 착즙액에서만 비타민K1이 확인되었으며 *L. lactis* 착즙액 배양액에서도 시금치 배양액에서 비타민K1과 K2(MK4)가 더 뚜렷하게 확인되었으나, 양배추와 브로콜리에서는 착즙액과 배양액 시료에서 DHNA가 확인되지 않았다.

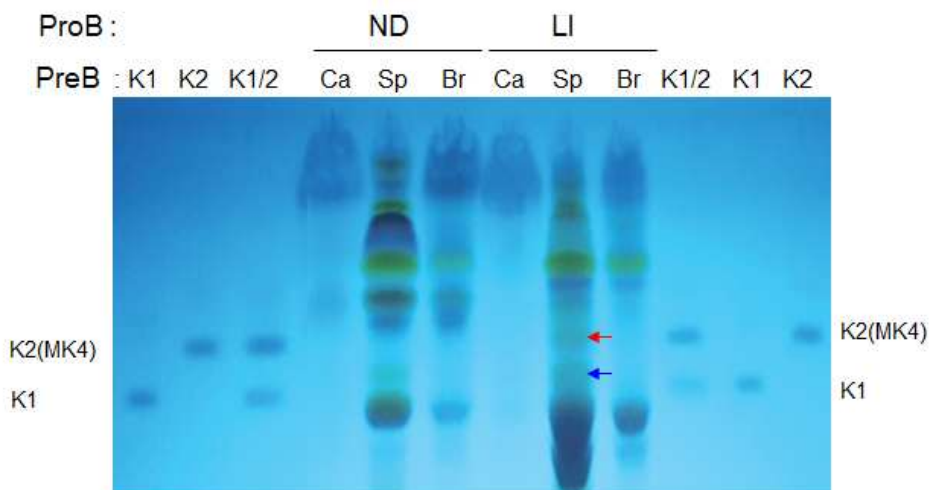


Fig. 2 Thin layer chromatography of phytaquinone (Vit K1) and menaquinone (Vit K2; MK4) obtained from growing culture in spinach, Broccoli, and Cabbage juice by *L.lactis* (KCCM12759P) during 48 h culture.

8-2) L. lactis 유산균 발효에 의한 비타민K2 생성능과 K1 정량분석

상기에서 제조되어 비타민K1과 K2의 생성으로 사용된 착즙액과 L.lactis 유산균을 배양하여 제조된 발효물의 2종에 대해 HPLC(high performance liquid chromatography)를 이용해 비타민K1과 K2의 정량 분석을 실시하였다. 이때 실시예 2-3에서 제조된 MRS 배지 시료를 음성대조군으로 사용하였다(도 3).

먼저, 비타민K1과 K2(sigma, USA) 표준물질을 이용해 각각의 비타민K1과 K2의 표준선을 얻었다. 실험군으로는, 실시예 2-3에서 제조된 양배추 착즙액, 시금치 착즙액, 브로콜리 착즙액 200 mL에 각 1×10^8 cfu/ml 농도로 0.2mL씩 접종한 후 26°C에서 호기적인 조건으로 48 시간 배양(시료1, 시료2, 시료3)과 양배추, 시금치, 브로콜리 착즙액(비교시료-무배양) 제조하였다. 48 시간의 유산균 배양 완료 후 유산균을 3,000-5,000 rpm으로 10 - 15분 원심분리 하여 유산균만을 수집한 후 HPLC 시료로 이용하였다.

구체적으로 상기 시료에서 배양 된 유산균을 1 x PBS 버퍼(phosphate buffered saline)로 2번 정도 세정하고 lysozyme(10 mg/mL; Roche, USA) 을 포함하는 6 mL의 PBS를 넣고 37°C에서 1시간 동안 방치한 후, 볼텍스 또는 혼합기를 이용하여 10-30분동안 충분히 섞어준다. 3,000-5,000 rpm에서 10-15분간 원심분리하여 상층액은 버린 후 24mL 추출버퍼(n-hexane: isopropanol = 2:1; v/v)를 더하고 30초 동안 볼텍스로 혼합한 후, 3,000 - 5,000 rpm에서 10-15분 동안 원심분리하여 상층액을 회수하고 아래층에 isopropanol을 동량의 24mL을 첨가하여 30초 동안 볼텍스로 혼합한 후, 3,000 - 5,000 rpm에서 10-15분 동안 원심분리하여 상층액을 회수한다. 상기 단계를 총 2번 반복하여 얻어진 용매 추출물을 진공 농축(ratary)하고 2 mL의 iso-propanol에 용해하여 제조하여 사용하였다.

HPLC용 컬럼은 Agilent HC-C18(4.6 x 150 mm, 5 um; Agilent Tech, USA)를 사용하였고 이동상 A 용액은 메탄올(methanol)과 이동상 B 용액은 이소프로판올(isopropanol: hexane = 1:1) 가 되도록 혼합하여 사용하였다. 컬럼의 온도는 40°C로 유지시켰으며 유속은 0.4 ml/min으로 하였고, 시료 주입량과 검출파장은 각각 50 ul와 254 nm로 하였다. 도 3에 비타민K1과 K2의 HPLC 결과 그래프를, 하기 표 4에 각 조건별 비타민K1과 K2 함량을 나타내었다.

[표 4]

구분	명명	배지성분	발효조건	비타민K농도(ug/ml)	
				K1	K2
비교시료1 시료1	Ca	양배추 착즙액	-	0.35	0
	Ca/LI	양배추 착즙액	LI(KCCM12759 P) 48시간 발효물	0.12	0
비교시료2 시료2	Sp	시금치 착즙액	-	1.75	0.04
	Sp/LI	시금치 착즙액	LI(KCCM12759 P) 48시간 발효물	1.77	1.89
비교시료3 시료3	Br	브로콜리 착즙액	-	0.98	0.02
	Br/LI	브로콜리 착즙액	LI(KCCM12759 P) 48시간 발효물	1.06	0.40
음성대조시료 1	MRS	MRS 배지	-	0	0
음성대조시료 2	MRS	MRS 배지	LI(KCCM12759 P) 48시간 발효물	0	0

비타민K1과 K2(sigma, USA) 표준물질을 이용해 각각의 비타민K1과 K2의 표준선을 작성하고 시료의 값을 대비하여 얻었다. 음성대조군인 MRS배지와 MRS배지에 *L.lactis*를 접종하여 얻어진 유산균에서는 비타민K1과 K2(MK4)는 정량 되지 않았다. 양배추 착즙액(비교시료1)과 착즙액 발효액(시료1)에서는 비타민K1은 각 0.35 ng/mL과 0.12 ng/mL 이었으나 비타민 K2는 확인되지 않았다. 반면 양배추 착즙액(비교시료1)과 착즙액 발효액(시료1)에서는 비타민K1은 각 0.35 ug/mL과 0.12 ug/mL 이었으나 비타민 K2는 확인되지 않았다. 반면 시금치 착즙액(비교시료2)과 시금치 착즙액 발효액(시료2)은 비타민K1은 각 1.75 ug/mL과 1.77 ug/mL 이었고 비타민 K2는 각 0.04 ug/mL과 1.89 ug/mL 로 *L.lactis* 배양에 따라 비타민 K2(MK4)가 생성됨을 확인하였다. 브로콜리 착즙액(비교시료3)과 브로콜리 착즙액 발효액(시료3)은 비타민K1은 각 0.98 ug/mL과 1.06 ug/mL 이었고 비타민 K2는 각 0.02 ug/mL과 0.40 ug/mL 로 *L.lactis* 배양에 따라 비타민 K2(MK4)가 약하지만 생성됨을 확인하였다.

따라서 시금치와 브로콜리 착즙액의 *L.lactis* 발효물(Sp/LI, Br/LI)에있어 비타민K2(MK4)의 생산이 유도되며, 특히 시금치 착즙액 발효물(Sp/LI)은 보다 높은 비타민 K1과 K2(MK4) 함량을 보여 비타민 K 복합물 생산에 있어서는 시금치의 *L. lactis*(KCCM12759P)의 발효물의 효율이 보다 높음을 확인하였다(도 3).

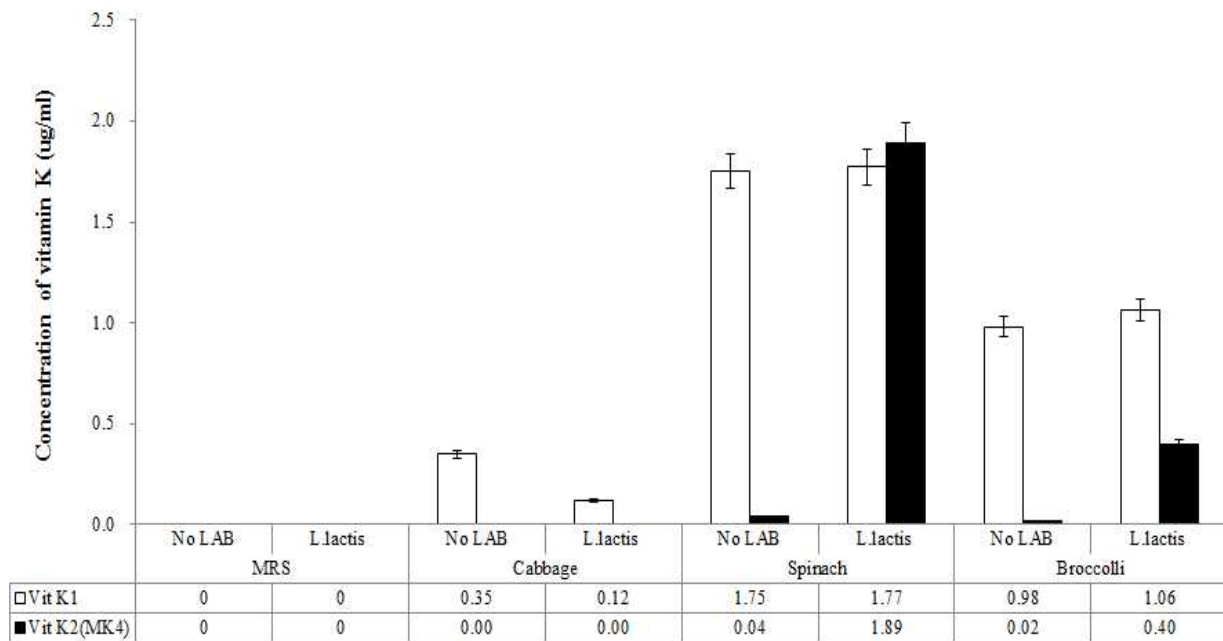


Fig. 3 HPLC quantification of phyloquinone (Vit K1) and menaquinone (Vit K2; MK4) obtained from growing culture in spinach, Broccoli, and Cabbage juice by *L.lactis* (KCCM12759P) during 48 h culture.

8-3) 3종의 유산균 배양에 따른 비타민K2 생성능 및 비타민 K1의 확인

시금치 착즙액에 3종의 유산균을 각각 접종하여 발효 배양한 발효물 내에서 발효(48시간)에 따른 비타민K2 생성량과 비타민K1 유무를 TLC 분석으로 확인하였다.

상기 실시예 2-3에서 제조된 시금치 착즙액 및/또는 건조 물 배합물(Sp)에 대해 *L. lactis*(KCCM12759P), *L. plantarum* (KCCM12299P), *L. mesenteroides* (KCCM12756P)를 각각 접종해 배양하여, 발효물을 제조한 후, 각 발효물 내에서의 비타민 K2 생성 여부 및 비타민 K1 유무를 얇은 막 크로마토그래피(TLC)를 이용해 확인하였다.

구체적으로, 상기 시금치 착즙액 및 건조분말 물 배합물에 각각 *L. lactis*(KCCM12759P), *L. plantarum* (KCCM12299P) 및 *L. mesenteroides*(KCCM12756P)를 개별적으로 접종하여 26°C에서 호기 상태로 48시간 동안 배양해 발효물을 제조하였다.

상기 발효물은 TLC 분석을 위해 상기 실시예 3-1과 실질적으로 동일한 방법으로 TLC 분석용 시료를 제조하였으며, 대조군으로는 비타민K1(Sigma USA; V3051)과 비타민K2(MK-4; V042; Sigma USA) 각 5 ug/mL(0.05%; w/v) 표준 용액을 사용하였다. 각 시료와 대조군은 Merck TLC silica GEL(TLC silica gel RP 60 F254, Merck)에 3 ul씩 점적한 후 용매로 분리하여 각 시료 내 비타민 K1과 K2(MK4)의 유무를 확인하였다. TLC 분석 방법은 상기 실시예 3-1과 실질적으로 동일한 방법으로 수행되었다.

도 4에 UV 램프로 발색 확인한 TLC 결과를 나타내었다. 시금치 착즙액의 *L. lactis*(KCCM12759P), *L. plantarum* (KCCM12299P) 및 *L. mesenteroides*(KCCM12756P)각각의 발효물에서 비타민K1과 K2(MK4)가 확인되었으나, 시금치 착즙액의 미발효물에서는 비타민K1은 확인되었으나 K2(MK4)는 확인되지 않았다.

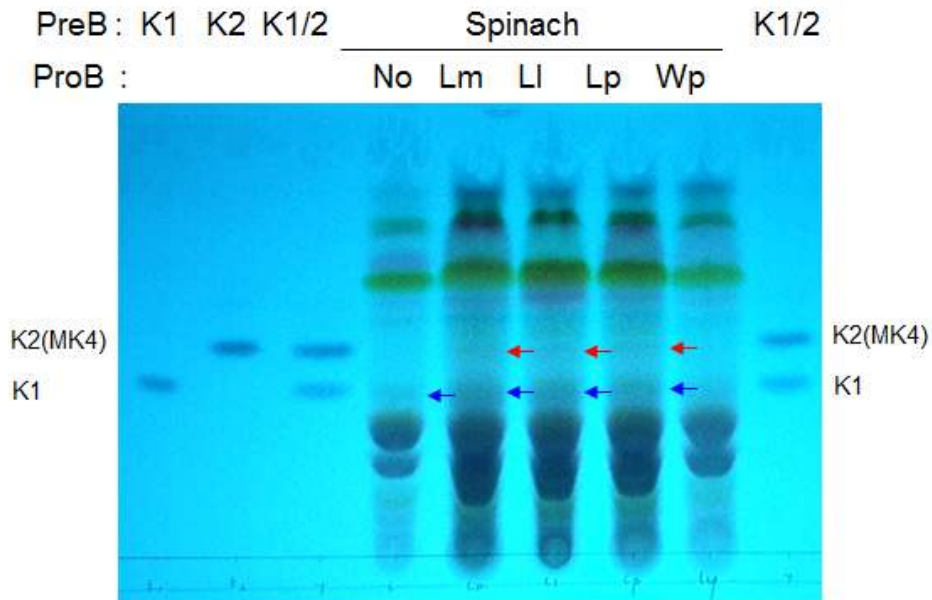


Fig. 4 Thin layer chromatography of phylloquinone (Vit K1) and menaquinone (Vit K2; MK4) obtained from growing culture in spinach juice by *L. lactis* (KCCM12759P), *L. plantarum* (KCCM12299P), and *L. mesenteroides* (Kmmc12756P) during 48 h culture.

8-4) 3종의 유산균 배양에 따른 비타민K1과 K2(MK4)의 정량

시금치 착즙액에 3종의 유산균을 각각 접종하여 발효 배양한 발효물 내에서 발효 24, 48시간에 따른 비타민 K1과 비타민K2(MK4)정량을 HPLC 분석으로 확인하였다.

구체적으로 상기 실시 예 3-2와 같이 비타민K1과 K2(sigma, USA) 표준물질을 이용해 각각의 비타민K1과 K2의 표준선을 얻었다. 실험군으로는, 실시예 2-3에서 제조된 시금치 착즙액 200 mL에 각 L.lactis(KCCM12759P), L.plantarum (KCCM12299P) 및 L. mesenterodes (KCCM12756P) 1x10⁸ cfu/ml 농도로 0.2mL씩 접종한 후 26°C에서 호기적인 조건으로 24, 48 시간 배양과 시금치 착즙액(비교시료-무배양) 제조하였다. 24시간, 48 시간의 유산균 배양 완료 후 각 시간별 유산균을 3,000-5,000 rpm으로 10 - 15분 원심분리 하여 유산균만을 수집한 후 HPLC 시료로 이용하였다.

HPLC용 컬럼은 Agilent HC-C18(4.6 x 150 mm, 5 um; Agilent Tech, USA)를 사용하였고 이동상 A 용액은 메탄올(methanol)과 이동상 B 용액은 이소프로판올(isopropanol: hexane = 1:1) 가 되도록 혼합하여 사용하였다. 컬럼의 온도는 40°C로 유지시켰으며 유속은 0.4 ml/min으로 하였고, 시료 주입량과 검출파장은 각각 50 ul와 254 nm로 하였다. 도 3에 비타민K1과 K2의 HPLC 결과 그래프를, 하기 표 5와 도 5에 각 조건별 비타민K1과 K2 함량을 나타내었다

[표 5]

구분	명명	배지성분	발효조건	비타민K농도(ug/ml)	
				K1	K2
비교시료2	Sp	시금치 착즙액	-	1.418	0.04
시료2-1	Sp/Ll 24h	시금치 착즙액	Ll(KCCM12759P) 24시간 발효물	1.012	0.784
시료2-2	Sp/Ll 48h	시금치 착즙액	Ll(KCCM12759P) 48시간 발효물	1.052	1.117
시료2-3	Sp/Lp 24h	시금치 착즙액	Lp(KCCM12299P) 24시간 발효물	1.270	0.692
시료2-4	Sp/Lp 48h	시금치 착즙액	Lp(KCCM12299P) 48시간 발효물	1.201	0.923
시료2-5	Sp/Lm 24h	시금치 착즙액	Lm(KCCM12756P) 24시간 발효물	1.060	0.844
시료2-6	Sp/Lm 48h	시금치 착즙액	Lm(KCCM12756P) 48시간 발효물	0.852	0.586

비타민K1과 K2(sigma, USA) 표준물질을 이용해 각각의 비타민K1과 K2의 표준선을 작성하고 시료의 값을 대비하여 얻었다. 대조시료인 시금치 착즙액에 무접종하여 얻어진 비타민K1은 1.418 ug/mL과 K2(MK4) 0.040 ug/mL으로 측정되었다. 시금치 착즙액 *L.lactis*(KCCM12759P)의 24시간 발효액(시료1-1)과 착즙액 48시간 발효액(시료1-2)에서는 비타민K1은 각 1.012 ug/mL과 1.052 ug/mL 이었고, 비타민 K2(MK4)는 각 0.784 ug/mL과 1.117 ug/mL로 비타민K2는 배양 시간 경과에 따라 증가하였다. 시금치 착즙액 *L.plantarum*(KCCM12299P) 의 24시간 발효액(시료2-1)과 착즙액 48시간 발효액(시료2-2)에서는 비타민 K1은 각 1.270 ug/mL과 1.201 ug/mL 이었고, 비타민 K2는 각 0.692 ug/mL과 0.923 ug/mL로 비타민K1은 유지되었고 비타민K2(MK4)는 배양 시간 경과에 따라 증가하였으나 *L.lactis* 보다는 생성능이 낮았다. 반면 시금치 착즙액 *L.mesenteroides*(KCCM12756P) 의 24시간 발효액(시료3-1)과 착즙액 48시간 발효액(시료3-2)에서는 비타민K1은 각 1.060 ug/mL과 0.852 ug/mL 이었고, 비타민 K2(MK4)는 각 0.844 ug/mL과 0.586 ug/mL로 비타민K1과 K2 모두 배양 시간 경과에 따라 감소하였다. 이에 결과에 따라 시금치 착즙액의 *L.lactis* 발효(Sp/Li) 시간 경과에 따라 비타민K2(MK4)의 생산이 유도되며, 특히 시금치 착즙액 발효물(Sp/Li)은 *L.plantarum*(KCCM12299P)과 *L.mesenteroides* (KCCM12756P) 배양보다 보다 높은 비타민 K2(MK4) 생성능을 보여 비타민K2(MK4) 생산에 있어서는 시금치의 *L. lactis*(KCCM12759P)의 활용이 높음을 확인하였다(도 5).

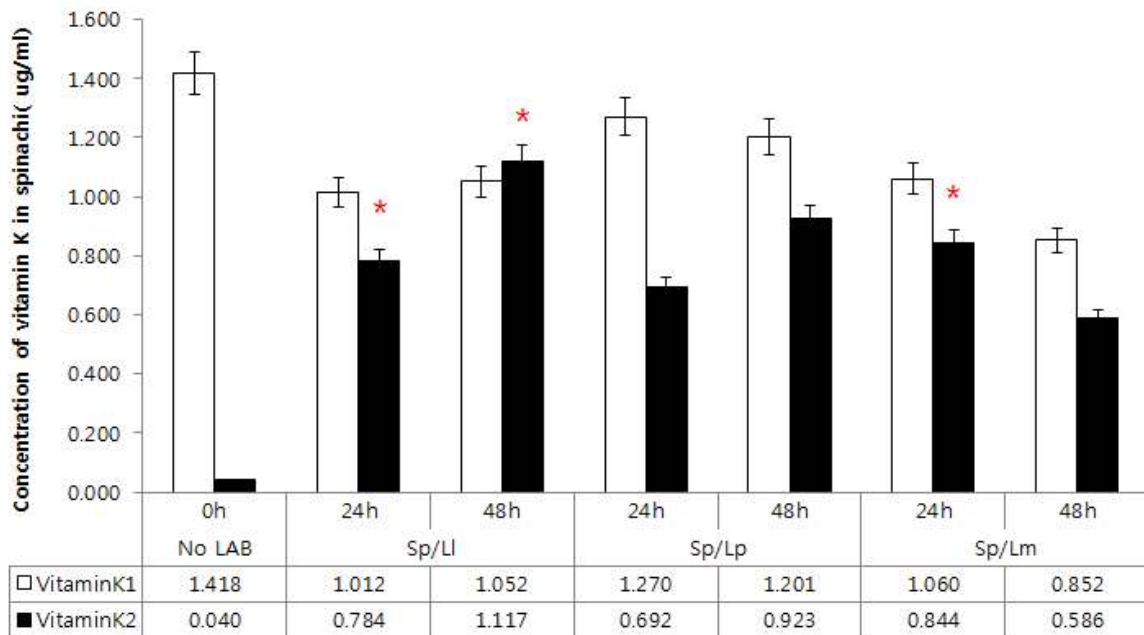


Fig. 5 HPLC quantification of phylloquinone (Vit K1) and menaquinone (Vit K2; MK4) obtained from growing culture in spinach juice by *L.lactis* (KCCM12759P), *L.plantarum* (KCCM12299P), and *L.mesenteroides* (Kmmc12756P) during 48 h culture.

8-5) 유산균 공배양에 따른 비타민K2 생성능 및 비타민 K1의 확인

시금치 착즙액에 3종의 유산균을 각각 2종 또는 3종 공접종하여 발효 배양한 발효물 내에서 발효 시간의 경과(24시간, 48시간, 및 72시간)에 따른 비타민K2 생성량과 비타민K1 유무를 TLC 분석으로 확인하였다. 구체적으로, 상기 시금치 착즙액에 *L.lactis*(KCCM12759P)와 *L.plantarum* (KCCM12299P), *L.lactis*(KCCM12759P)와 *L. mesenterodes*(KCCM12756P), *L.plantarum* (KCCM12299P)과 *L. mesenterodes*(KCCM12756P) 각 2종을 공배양 또는 상기의 3종을 공배양 접종하여 26°C에서 호기 상태로 48시간 동안 배양해 발효물을 제조하였다.

상기 제조된 시금치 착즙액 및/또는 건조 물 배합물(Sp)에 대해 *L. lactis*(KCCM12759P), *L.plantarum* (KCCM12299P), *L.mesenteroides* (KCCM12756P)를 2종 또는 3종 모두 접종 배양하여, 발효물을 제조한 후, 각 발효물 내에서의 비타민 K2 생성 여부 및 비타민 K1 유무를 얇은 막 크로마토그래피(TLC)를 이용해 확인하였다.

상기 발효물은 TLC 분석을 위해 상기 실질적으로 동일한 방법으로 TLC 분석용 시료를 제조하였으며, 대조군으로는 비타민K1(Sigma USA; V3051)과 비타민K2(MK-4; V042; Sigma USA) 각 5 ug/mL(0.05%; w/v) 표준 용액을 사용하였다. 각 시료와 대조군은 Merck TLC silica GEL(TLC silica gel RP 60 F254, Merck)에 3 ul씩 점적한 후 용매로 분리하여 각 시료 내 비타민 K1과 K2(MK4)의 유무를 확인하였다. TLC 분석 방법은 상기 실질적으로 동일한 방법으로 수행되었다(도 6).

도 6에 UV 램프로 발색 확인한 TLC 결과를 나타내었다. 시금치 착즙액의 *L.lactis*(KCCM12759P), *L.plantarum* (KCCM12299P) 및 *L. mesenterodes*(KCCM12756P)각각의 2종 및 3종 발효물의 24시간, 48 시간, 72시간에서 비타민K1과 K2(MK4)가 확인되었으나, 시금치 착즙액 미발효물에서는 비타민K1만 확인되었고 K2(MK4)는 확인되지 않았으며 MRS배지에서는 전혀 확인되지 않았다.

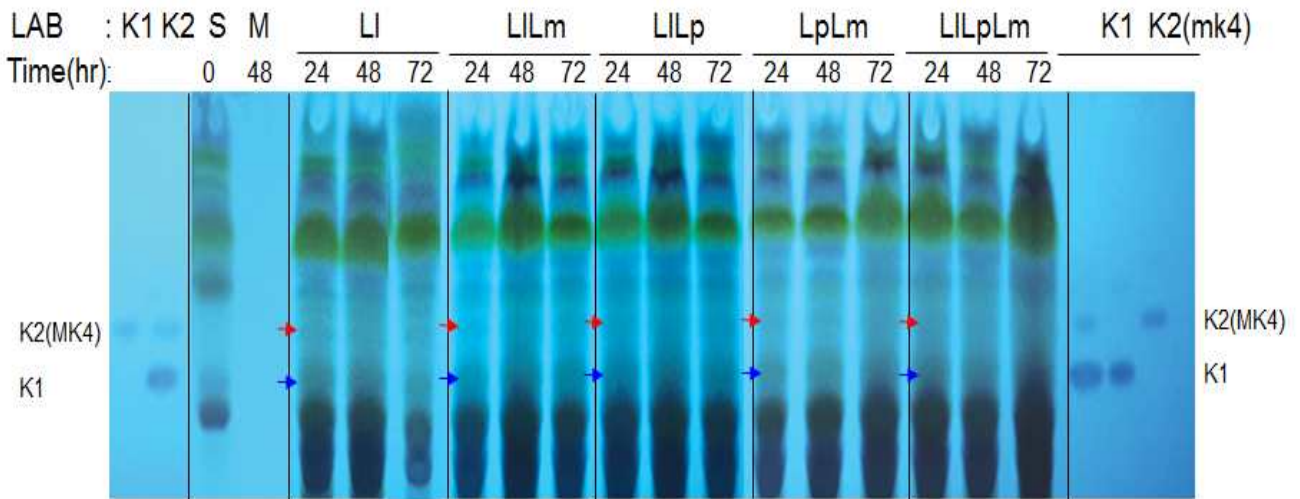


Fig. 6 Thin layer chromatography of phytaquinone (Vit K1) and menaquinone (Vit K2; MK4) obtained from growing culture in spinach juice by co-culture of *L.lactis* (KCCM12759P), *L.plantarum* (KCCM12299P), and *L.mesenteroides* (Kmmc12756P) during 24 h, 48 h, and 72 h culture.

8-6) 유산균 공배양에 따른 비타민K1과 K2(MK4)의 정량

시금치 착즙액에 3종의 유산균을 각각 2종 또는 3종 공접종하여 발효 배양한 발효물 내에서 발효 시간의 경과(24시간, 48시간, 및 72시간)에 따른 비타민K1과 K2(MK4) 생성량을 HPLC 분석으로 확인하였다.

구체적으로, 상기 동일하게 *L.lactis*(KCCM12759P) 1종과, 각 2종 공배양 또는 상기의 3종을 공배양 접종하여 26°C에서 호기 상태로 24시간, 48시간, 72시간 동안 배양해 발효물을 얻었다.

구체적으로 상기 같이 비타민K1과 K2(sigma, USA) 표준물질을 이용해 각각의 비타민K1과 K2의 표준선을 얻었다. 실험군으로는 제조된 시금치 착즙액 200 mL에 각 *L.lactis*(KCCM12759P), *L.plantarum* (KCCM12299P) 및 *L. mesenterodes* (KCCM12756P) 1x10⁸ cfu/ml 농도로 2종의 경우는 0.1mL씩 0.2mL 이

되도록 접종하였고 3종의 경우는 0.67mL씩 0.2mL이 되도록 접종 후 26°C에서 호기적인 조건으로 24시간, 48시간, 72 시간 배양과 시금치 착즙액(비교시료-무배양) 제조하였다. 24시간, 48시간, 72시간의 유산균 배양 완료 후 각 시간별 유산균을 3,000-5,000 rpm으로 10 - 15분 원심분리 하여 유산균만을 수집한 후 HPLC 시료로 이용하였다.

HPLC용 컬럼은 Agilent HC-C18(4.6 x 150 mm, 5 um; Agilent Tech, USA)를 사용하였고 이동상 A 용액은 메탄올(methanol)과 이동상 B 용액은 이소프로판올(isopropanol: hexane = 1:1) 가 되도록 혼합하여 사용하였다. 컬럼의 온도는 40°C로 유지시켰으며 유속은 0.4 ml/min으로 하였고, 시료 주입량과 검출파장은 각각 50 ul와 254 nm로 하였다. 도 3에 비타민K1과 K2의 HPLC 결과 그래프를, 하기 표 6과 도 7에 각 조건별 비타민K1과 K2 함량을 나타내었다.

[표 6]

명명	유산균	배지	발효 시간(h)	비타민K농도(ug/ml)	
				K1	K2
Sp/LI	LI(KCCM12759P)	시금치 착즙액	24	0.93	0.68
			48	1.09	0.99
			72	1.19	1.35
Sp/LILm	LI(KCCM12759P)· Lm(KCCM12756P)	시금치 착즙액	24	1.09	1.39
			48	1.25	1.01
			72	1.05	1.21
Sp/LILp	LI(KCCM12759P)· Lp(KCCM12299P)	시금치 착즙액	24	1.05	1.41
			48	1.04	1.20
			72	0.78	1.22
Sp/LpLm	Lp(KCCM12299P)· Lm(KCCM12756P)	시금치 착즙액	24	1.02	1.27
			48	0.91	0.90
			72	1.06	0.84
Sp/LILpLm	LI(KCCM12759P)· Lp(KCCM12299P)· Lm(KCCM12756P)	시금치 착즙액	24	1.02	1.32
			48	1.06	1.28
			72	0.91	1.48
	-	시금치 착즙액	0	1.05	0.00

비타민K1과 K2(sigma, USA) 표준물질을 이용해 각각의 비타민K1과 K2의 표준선을 작성하고 시료의 값을 대비하여 얻었다. 대조시료인 시금치 착즙액에 무접종하여 얻어진 비타민K1은 1.05 ug/mL과 K2(MK4) 0.0 ug/mL으로 측정되었다. 시금치 착즙액 *L.lactis*(KCCM12759P)의 24시간 발효액과 착즙액 48시간 발효액, 72시간 발효액(시료1-3)에서는 비타민K1은 각 0.93 ug/mL, 1.09 ug/mL과 1.19 ug/mL 이었고, 비타민 K2(MK4)는 각 0.68 ug/mL, 0.99 ug/mL과 1.35 ug/mL 로 비타민K2는 72시간 배양 경과에 따라 증가하였다. 시금치 착즙액 *L.lactis*(KCCM12759P)과 *L.mesenteroides*(KCCM12756P) 공배양 의 24시간 발효액과 착즙액 48시간 발효액(시료4-2), 72시간 발효액에서는 비타민K1은 각 1.09 ug/mL, 1.25 ug/mL과 1.05 ug/mL 이었고, 비타민 K2는 각 1.39 ug/mL, 1.01 ug/mL과 1.21 ug/mL 로 공배양 24 시간에 비타민 K2(MK4)양이 높게 확인되었다. 또한 시금치 착즙액 *L.lactis*(KCCM12759P)와 *L.plantarum*(KCCM12299P) 의 공배양 의 24시간 발효액(시료5-1)과 착즙액 48시간 발효액, 72시간 발효액(시료5-3)에서는 비타민K1 은 각 1.05 ug/mL, 1.04 ug/mL과 0.78 ug/mL 이었고, 비타민 K2는 각 1.41 ug/mL, 1.20 ug/mL과 1.22 ug/mL 로 시료4의 경우에서 처럼 공배양 24 시간에 비타민K2(MK4)양이 높게 확인되었다. 또한 시금치 착즙액 *L.plantarum*(KCCM12299P)과 *L.mesenteroides*(KCCM12756P)의 공배양 의 24시간 발효액(시료6-1) 과 착즙액 48시간 발효액(시료6-2), 72시간 발효액(시료6-3)에서는 비타민K1은 각 1.02 ug/mL, 0.91 ug/mL과 1.06 ug/mL 이었고, 비타민 K2는 각 1.27 ug/mL, 0.90 ug/mL과 0.84 ug/mL 로 시료4와 5의 경우에서처럼 공배양 24 시간(시료6-1)에 비타민K2(MK4)양이 높게 확인되었으나 시료4와 5보다는 조금 낮았다. 다음으로 시금치 착즙액 *L.lactis*(KCCM12759P), *L.plantarum*(KCCM12299P)과 *L.mesenteroides*(KCCM12756P)의 3종의 공배양 의 24시간 발효액과 착즙액 48시간 발효액(시료7-2), 72 시간 발효액(시료7-3)에서는 비타민K1은 각 1.02 ug/mL, 1.06 ug/mL과 0.91 ug/mL 이었고, 비타민 K2는 각 1.32 ug/mL, 1.28 ug/mL과 1.48 ug/mL 로 공배양 2시간 경과에 따라 비타민K2(MK4)양이 증가되는 것이 확인되었었다. 이에 결과에 따라 시금치 착즙액의 *L.lactis* 발효(Sp/LI) 단일균주의 배양보다 Sp/LILm 및/또는 Sp/LILp 및/또는 Sp/LmLp 의 2종의 공배양시에 비타민K2 생성을 위한 배양시간을 24시간으로 단축할 수 있으며. 특히 시금치 착즙액 3종 발효물(Sp/LILpLm)은 2종의 공배양이 48시간 72시간에 비타민K2 생성능이 감소하는 것에 반해 발효 시간 경과에 따라 보다 높은 비타민 K2(MK4) 생성능을 보여 비타민 K2(MK4) 생산에 있어서는 시금치의 *L.lactis*(KCCM12759P)의 단일 배양보다 공배양의 경우 공정시간을 단축을 위해 활용할 수 있다(도 7).

8-7) *L.lactis* 시금치 착즙액 배양물내의 비타민K1과 K2의 산안정성

시금치 착즙액에 *L.lactis*(KCCM12759P) 유산균을 접종하여 발효 배양한 발효물(48시간)의 비타민K1과 K2의 pH에 따른 안정성을 얇은 막 크로마토그래피(TLC)를 이용해 확인하였다.

구체적으로, 상기 실시예 2-3에서 제조된 시금치 착즙액 및/또는 건조 물 배합물(Sp)에 대해 *L.lactis*(KCCM12759P)를 접종 배양하여, 발효물을 제조한 후, pH 2(Sodium citric buffer), pH 3(Sodium citric buffer), pH 4(Sodium acetate buffer), pH 5(Sodium acetate buffer), pH 6(Sodium phosphate buffer), pH 7(Sodium phosphate buffer), pH 8(Tris buffer), pH 9(Tris buffer) 버퍼와 1:1로 섞어 비타민 K1과 K2의 pH 안정성을 얇은 막 크로마토그래피(TLC)를 이용해 확인하였다. 또한 표준품 비타민K1과 K2(MK4)도 상기의 pH 버퍼와 1:1로 혼합한 후 같은방법으로 TLC로 안정성을 확인하였다.

상기 발효물은 TLC 분석을 위해 상기 실시예 3-1과 실질적으로 동일한 방법으로 TLC 분석용 시료를 제조 하였으며, 대조군으로는 비타민K1(Sigma USA; V3051)과 비타민K2(MK-4; V042; Sigma USA) 각 5 ug/mL(0.05%; w/v) 표준 용액을 사용하였다. 각 시료와 대조군은 Merck TLC silica GEL(TLC silica gel RP 60 F254, Merck)에 3 ul씩 점적한 후 용매로 분리하여 각 시료 내 비타민 K1과 K2(MK4)의 유무를 확인하

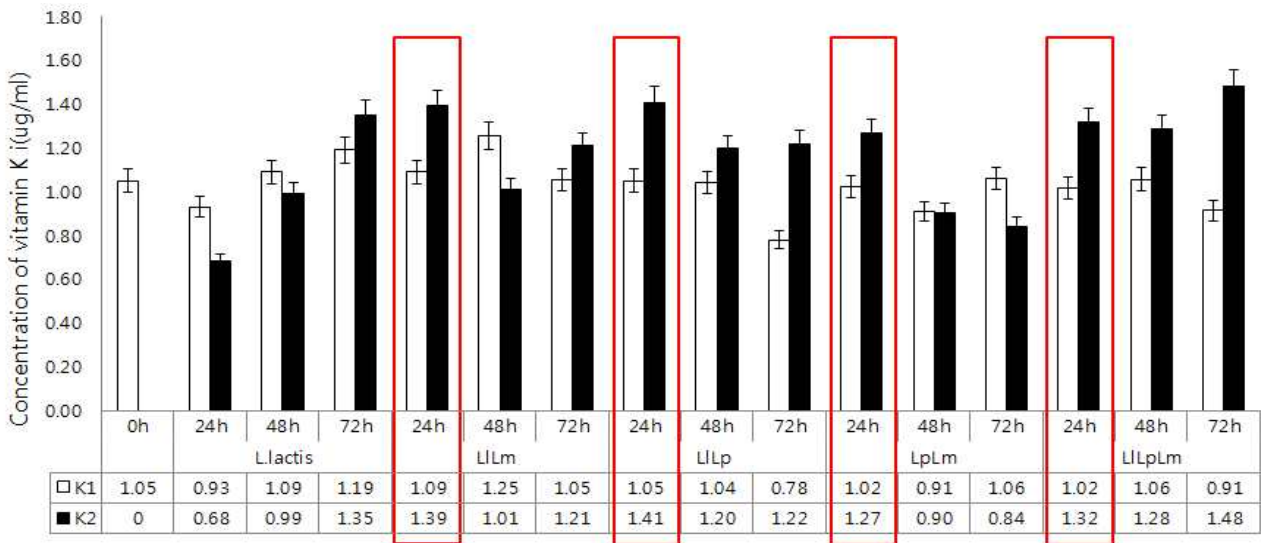


Fig. 7 HPLC quantification of phyloquinone (Vit K1) and menaquinone (Vit K2; MK4) obtained from growing culture in spinach juice by co-culture of *L.lactis* (KCCM12759P), *L.plantarum* (KCCM12299P), and *L.mesenteroides* (Kmmc12756P) during 24 h, 48 h, and 72 h culture.

였다. TLC 분석 방법은 상기 실시예 3-1과 실질적으로 동일한 방법으로 수행되었다(도 8). 도 8에 UV 램프로 발색 확인한 TLC 결과를 나타내었다. 대조시료인 표준품 비타민K1과 K2는 pH 2-9 에서 모두 안정한 것으로 확인되었다(도8). 반면 시금치 착즙액의 Sp/Li 48시간 배양물은 pH 2-8의 버퍼내에서 는 비타민K1과 K2(MK4)가 안정한 것으로 확인되었으나, pH 9에서는 비타민K1만이 약하게 확인되었다(도 8).

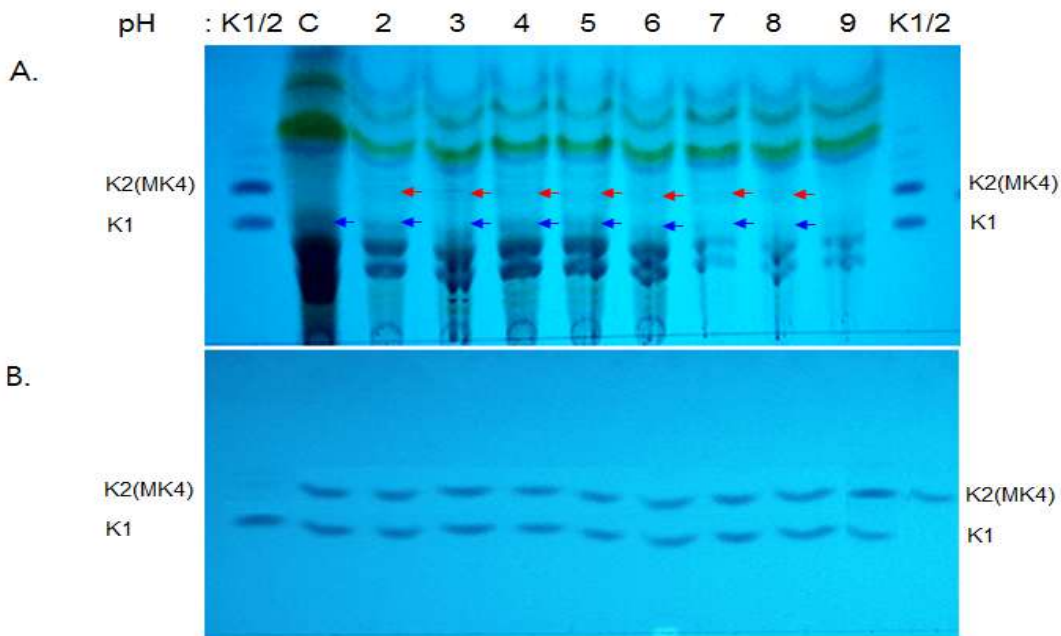


Fig. 8 The pH stability of phyloquinone (Vit K1) and menaquinone (Vit K2; MK4) obtained from growing culture in spinach juice by *L.lactis* (KCCM12759P) during 48 h culture (A) and standard phyloquinone (Vit K1) and menaquinone (Vit K2; MK4) (B).

8-9) 식물체 기반의 유산균 배양에 의한 비타민 k2의 MK 종류 확인

시금치 착즙액에 3종의 유산균을 각각 2종 또는 3종 공접종하여 발효 배양한 발효물 내에서 발효 시간의 경과(24시간, 48시간, 및 72시간)에 따른 비타민K2 생성량과 비타민K2의 이성질체 MK4, MK7, MK9 유무를 TLC 분석으로 확인하였다.

구체적으로, 상기 시금치 착즙액에 *L.lactis*(KCCM12759P)와 *L.plantarum* (KCCM12299P), *L.lactis*(KCCM12759P)와 *L. mesenterodes*(KCCM12756P), *L.plantarum* (KCCM12299P)과 *L. mesenterodes*(KCCM12756P) 각 2종을 공배양 또는 상기의 3종을 공배양 접종하여 26°C에서 호기 상태로 24시간 동안 배양해 발효물을 제조하였다.

상기 제조된 시금치 착즙액 및/또는 건조 물 배합물(Sp)에 대해 *L. lactis*(KCCM12759P), *L.plantarum* (KCCM12299P), *L.mesenteroides* (KCCM12756P)를 2종 또는 3종 모두 접종 배양하여, 발효물을 제조한 후, 각 발효물 내에서의 비타민 K2 생성 여부 및 비타민 K1 유무를 얇은 막 크로마토그래피(TLC)를 이용해 확인하였다.

상기 발효물은 TLC 분석을 위해 상기 실질적으로 동일한 방법으로 TLC 분석용 시료를 제조하였으며, 대조군으로는 비타민K1(Sigma USA; V3051)과 비타민K2(MK-4, MK7, MK9; V042; Sigma USA) 각 5 ug/mL(0.05%; w/v) 표준 용액을 사용하였다. 각 시료와 대조군은 Merck TLC silica GEL(TLC silica gel RP 60 F254, Merck)에 3 ul씩 점적한 후 용매로 분리하여 각 시료 내 비타민 K1과 K2(MK4)의 유무를 확인하였다. TLC 분석 방법은 상기 실질적으로 동일한 방법으로 수행되었다(도 6).

도 6에 UV 램프로 발색 확인한 TLC 결과를 나타내었다. 시금치 착즙액의 *L.lactis*(KCCM12759P), *L.plantarum* (KCCM12299P) 및 *L. mesenterodes*(KCCM12756P)각각의 2종 및 3종 발효물의 24시간, 에서 비타민K1과 K2(MK4, MK7, MK9)으로 추정되는 밴드가 확인되었으나, 시금치 착즙액 미발효물에서는 비타민K1만 확인되었고 K2(MK4)는 확인되지 않았으며 MRS배지에서는 전혀 확인되지 않았다.

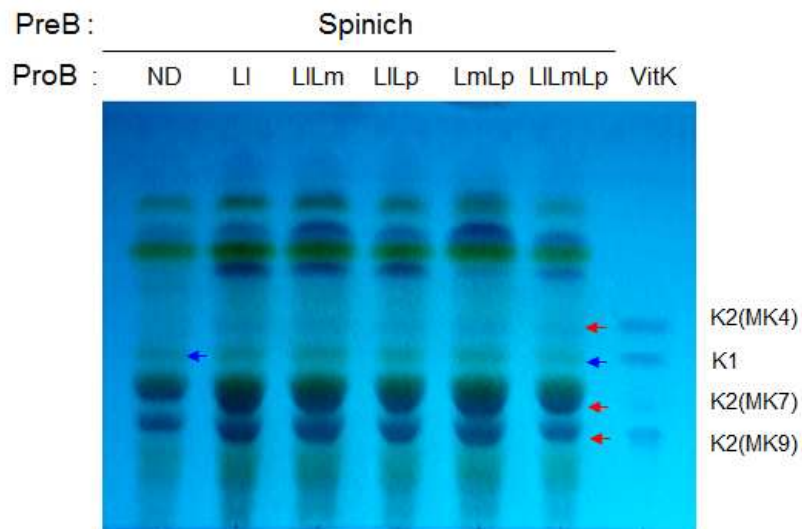
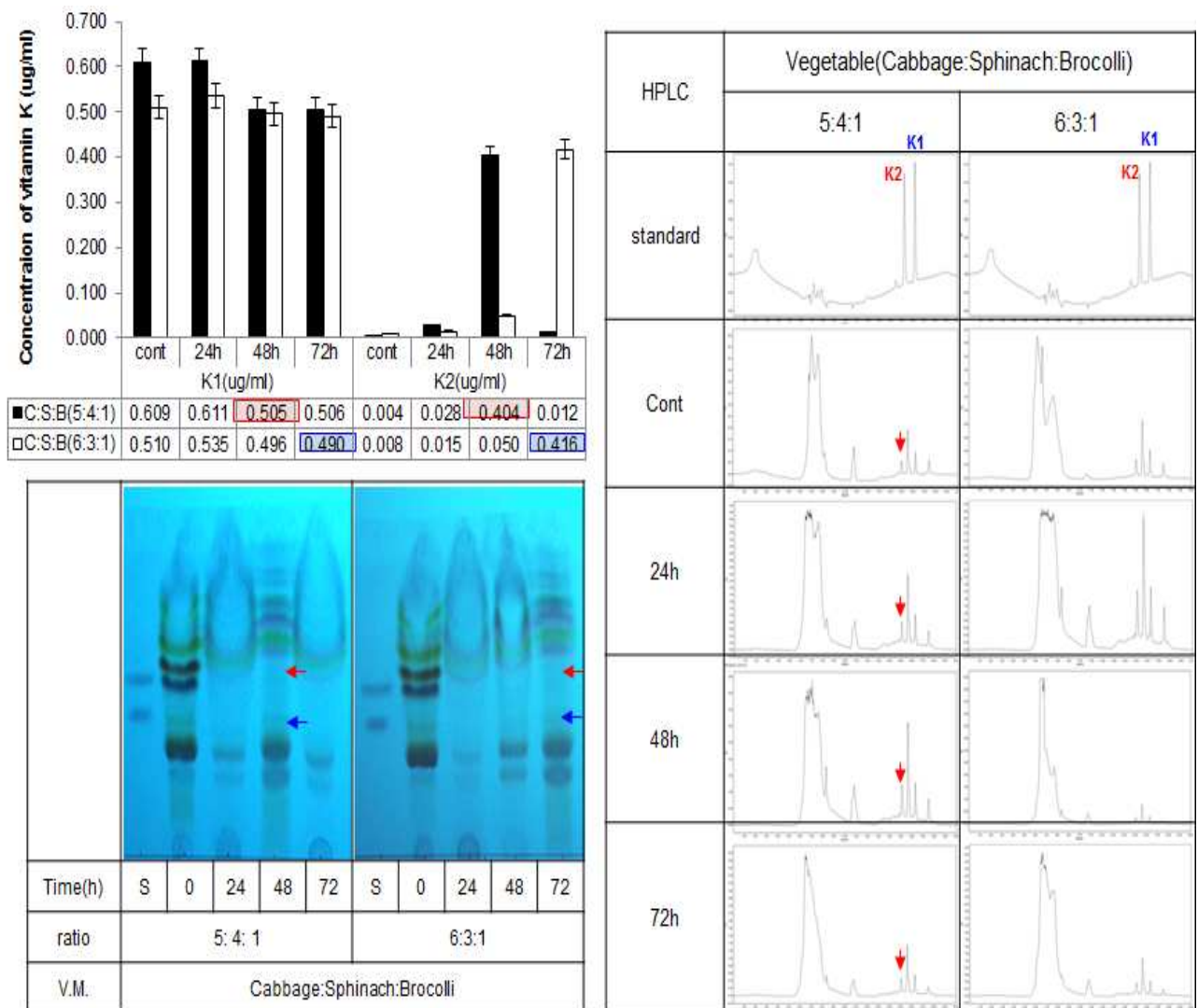


Fig. 9 Thin layer chromatography of phytaquinone (Vit K1) and menaquinone (Vit K2; MK4, MK7, MK9) obtained from growing culture in spinach juice by co-culture of *L.lactis* (KCCM12759P), *L.plantarum* (KCCM12299P), and *L.mesenteroides* (Kmmc12756P) during 24 h culture.

9) 프리(야채)바이오틱스의 배합에 따른 비타민K2 생산 효능 평가

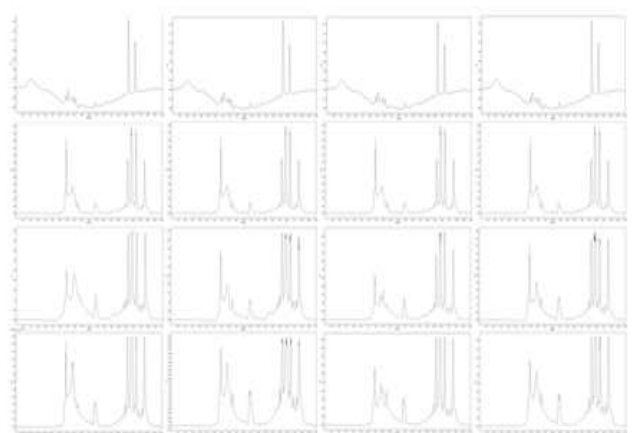
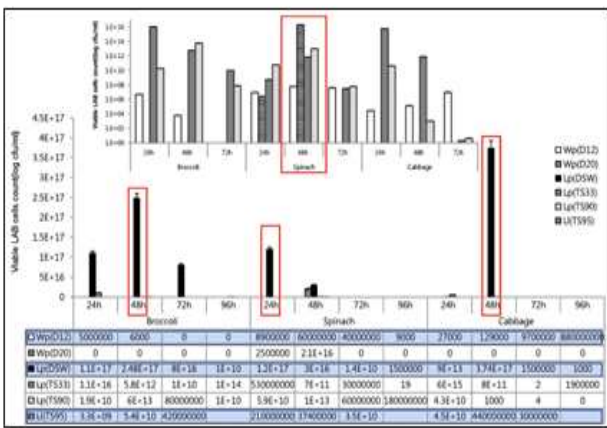
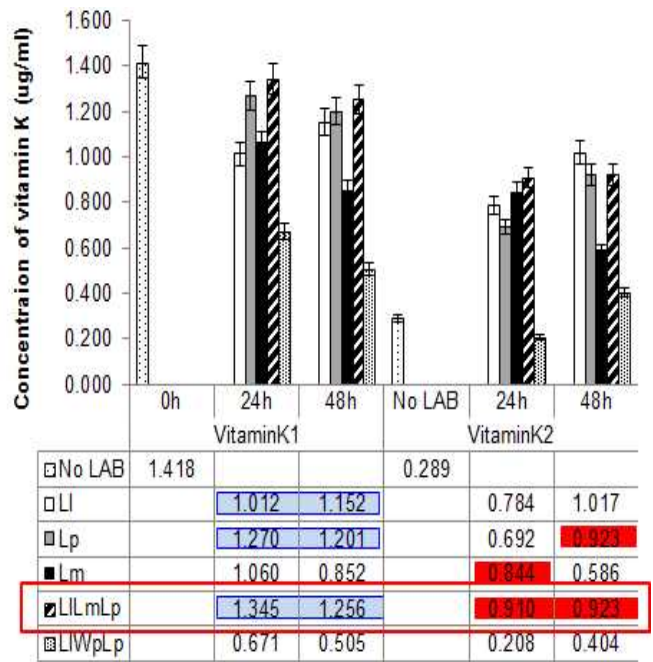
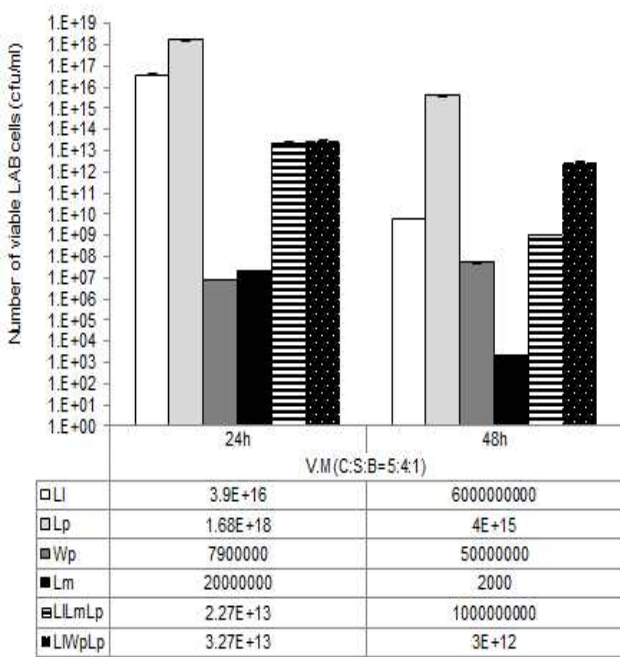
9-1) L. lactis, L.plantarum, W.mesenteroides의 프리바이오틱스의 배합에 따른 비타민K 평가

대조시료인 양배추, 시금치, 브로콜리 착즙액의 6:4:1과 5:3:1의 배합물에 L.lactis(KCCM12759P), L.plantarum, W.mesenteroides 3종의 24시간 발효액과 착즙액 48시간 발효액, 72시간 발효액에서는 비타민K1은 각 0.93 ug/mL, 1.09 ug/mL과 1.19 ug/mL 이었고, 비타민 K2(MK4)는 각 0.68 ug/mL, 0.99 ug/mL과 1.35 ug/mL 로 비타민K2는 72시간 배양 경과에 따라 증가하였다. 특히 양배추, 시금치, 브로콜리 착즙액의 5:3:1의착즙액 3종 발효물(Sp/LiLpLm)은 2종의 공배양이 48시간에 비타민K2 생성능이 증가하여 비타민K2(MK4) 생산에 있어서는 5:3:1의착즙액의 공배양의 경우 공정시간을 단축을 위해 활용할 수 있다 (도 7).



9-2) *L. lactis*, *L.plantarum*, *L.mesenteroides*의 프리바이오틱스의 배합에 따른 비타민K 평가

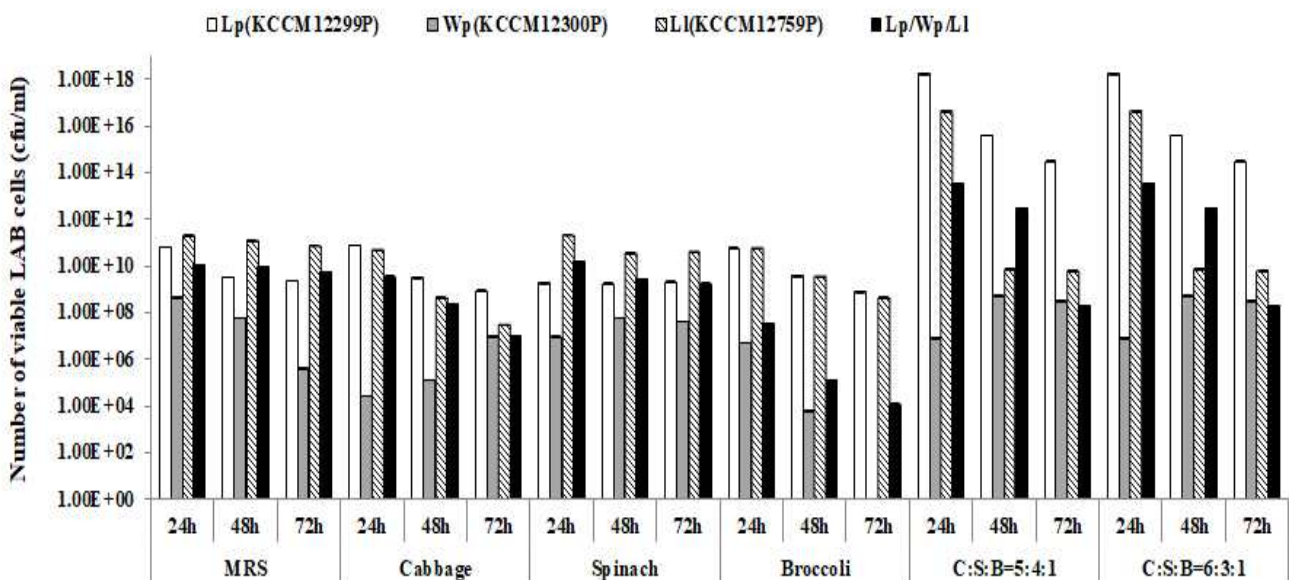
대조시료인 양배추, 시금치, 브로콜리 착즙액의 6:4:1과 5:3:1의 배합물에 *L.lactis*(KCCM12759P), *L.plantarum*, *L.mesenteroides* 3종의 24시간 발효액과 착즙액 48시간 발효액, 72시간 발효액에서는 비타민K1은 각 0.93 ug/mL, 1.09 ug/mL과 1.19 ug/mL 이었고, 비타민 K2(MK4)는 각 0.68 ug/mL, 0.99 ug/mL과 1.35 ug/mL 로 비타민K2는 72시간 배양 경과에 따라 증가하였다. 특히 양배추, 시금치, 브로콜리 착즙액의 5:3:1의착즙액 3종 발효물(Sp/LiLpLm)은 2종의 공배양이 48시간에 비타민K2 생성능이 증가하여 비타민K2(MK4) 생산에 있어서는 5:3:1의착즙액의 공배양의 경우 공정시간을 단축을 위해 활용할 수 있다 (도 7). *Weissella* 균주보다 *L. mesenterodius* 종의 경우 공정시간 단축에 더 유의한 것으로 판단된다.



10) 식물 혼합물 배지의 비타민K1과 K2 생산 최적화

10-1) 식물 혼합물 배지와 유산균 바이오공정 최적화

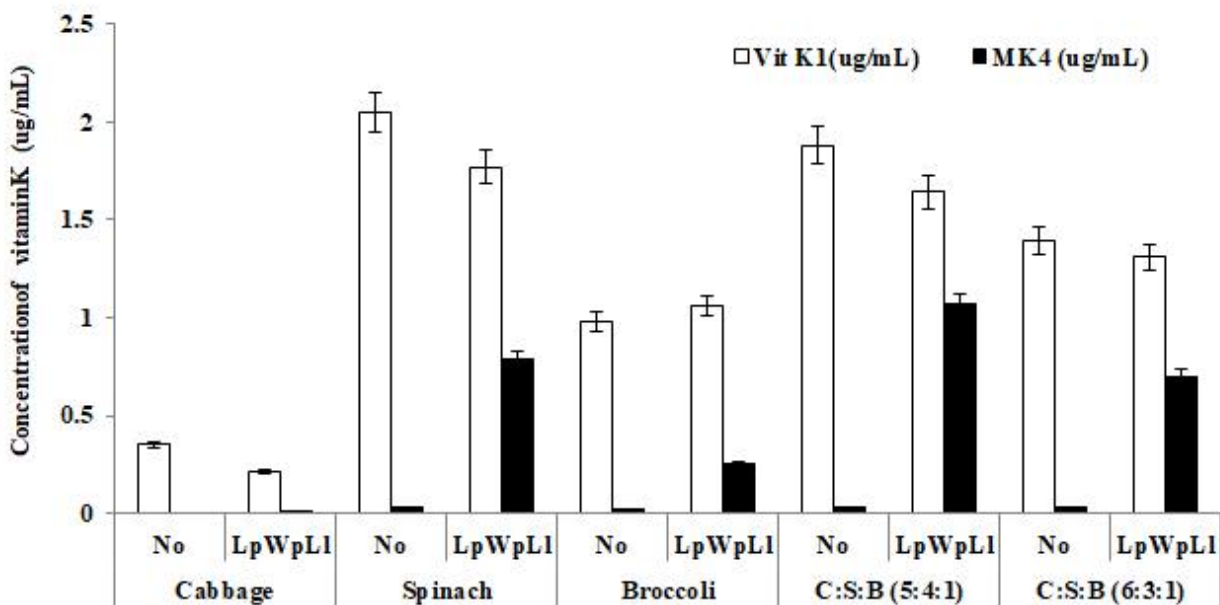
양배추 착즙액, 시금치 착즙액 및 브로콜리 착즙액을 포함한 발효 원료의 발효 조건 최적화를 위해, 유산균 발효를 효과적으로 일어나게 할 수 있는 최적조건의 확인하기 위한 실험을 하였다. 유산균 배양 배지 (발효 원료)로는 실시예 1에서 제조된 양배추 착즙액 (착즙액 1), 시금치 착즙액 (착즙액 2) 및 브로콜리 착즙액 (착즙액 3)을 실험군으로 사용하였고, 대조군으로는 유산균 배양에 일반적으로 이용되는 MRS 배지를 이용하였다. 또한, 추가적으로 상기 양배추 착즙액, 시금치 착즙액 및 브로콜리 착즙액을 부피 기준으로, 5:4:1의 비율로 혼합한 혼합 착즙액 (착즙액 4) 또는 6:3:1의 비율로 혼합한 혼합 착즙액 (착즙액 5)을 실험군으로 사용하였다. 발효 원료 200mL에 *Lactobacillus plantarum* (*L.plantarum*; Lp) (KCCM12299P), *Weissella paramesenteroides* (*W.paramesenteroides*; Wp) (KCCM 12300P), *Lactococcus lactis* (*L.lactis*; Li) (KCCM 12759P)를 각각 1×10^8 cfu/ml 농도로 2mL (1%; v/v)씩 접종하고 26°C에서 24, 48, 72시간 동안 배양하였고, 추가적으로 상기 착즙액 4 및 5의 발효 원료에는 상기 세 유산균을 각각을 1×10^8 cfu/ml 농도로 동일한 부피로 혼합하여 전체가 2mL (Total 1%; v/v) 이 되도록 접종한 후 26°C에서 호기적인 조건으로 24, 48, 72시간 동안 배양하였다. 배양하고 24시간 후의 LAB (Lactic Acid Bacteria) Counts (log cfu/ml)를 측정하여 최적 발효물 배양 조건을 확인하였다. 이때 발효온도 30°C에서 실험을 진행하였다. 그 결과, Lp, Li 및 Lp/Wp/Li (공배양)의 경우, 착즙액 4 또는 착즙액 5에서 24시간 또는 48시간 배양하는 경우, 다른 조건에서 배양하는 경우보다 유의적으로 유산균 생균수가 높게 측정되어, 해당 조건에서 배양하는 것이 최적의 조건인 것을 확인하였다.



10-2) 식물 혼합물 발효액 내의 비타민 K2 생성능과 비타민 K1 확인

제조한 양배추 착즙액 (착즙액 1), 시금치 착즙액 (착즙액 2), 브로콜리 착즙액 (착즙액 3), 상기 실시예 2-3에서 준비한 양배추 착즙액, 시금치 착즙액 및 브로콜리 착즙액을 부피 기준으로, 5:4:1의 비율로 혼합한 혼합 착즙액 (착즙액 4) 또는 6:3:1의 비율로 혼합한 혼합 착즙액 (착즙액 5) 조성물 내의 비타민 K1 (필라퀴논) 함량을 확인하였다. 추가적으로, 상기 착즙액 4 및 5에 각각 *Lactobacillus plantarum* (*L.plantarum*; Lp) (KCCM12299P), *Weissella paramesenteroides* (*W.paramesenteroides*; Wp) (KCCM 12300P) 및 *Lactococcus lactis* (*L.lactis*; Li) (KCCM12759P) 세 유산균을 접종한 배양 배지 내의 비타민 K1 함량을 확인하였다. HPLC (high performance liquid chromatography)를 이용해 비타민 K1의 정량 분석을 실시하였고, 먼저 비타민 K1 (sigma, USA) 표준물질을 이용해 비타민 K1의 표준선을 얻었다. 실험군으로는 상기 준비한 착즙액 1 내지 5 각각 200mL를 HPLC 시료로 사용하였다. 또한, 추가적으로 상기 착즙액 4 200mL와 착즙액 5 200mL에 각각 상기 세 유산균 각각을 1x10⁸ cfu/ml 농도로 동일한 부피로 혼합하여 전체가 2mL (Total 1%; v/v) 이 되도록 한 후 26°C에서 호기적인 조건으로 24시간 공배양하고 상기 배양한 유산균을 3,000 ~ 5,000 rpm으로 10 ~ 15분 원심분리 하여 유산균만을 수집한 후 HPLC 시료로 사용하였다. 상기 시료에서 배양된 유산균의 경우 1 x PBS 버퍼 (phosphate buffered saline)로 2번 정도 세정하고 lysozume (10 mg/mL; Roche, USA)을 포함하는 6 mL의 PBS를 넣고 37°C에서 1시간 동안 방치한 후, 볼텍스 또는 혼합기를 이용하여 10 ~ 30분동안 충분히 섞어준다. 다음으로 24 mL 추출버퍼 (n-hexane: isopropanol = 2:1; 부피비)를 더하고 30초 동안 볼텍스로 혼합한 후, 3,000rpm에서 10 ~ 15분 동안 원심분리하여 상층액은 버리고 아래층에 n-hexane을 동량의 24mL을 첨가하여 진공 농축 (ratary)하고 3 mL의 iso-propanol에 용해하여 제조하여 사용하였다.

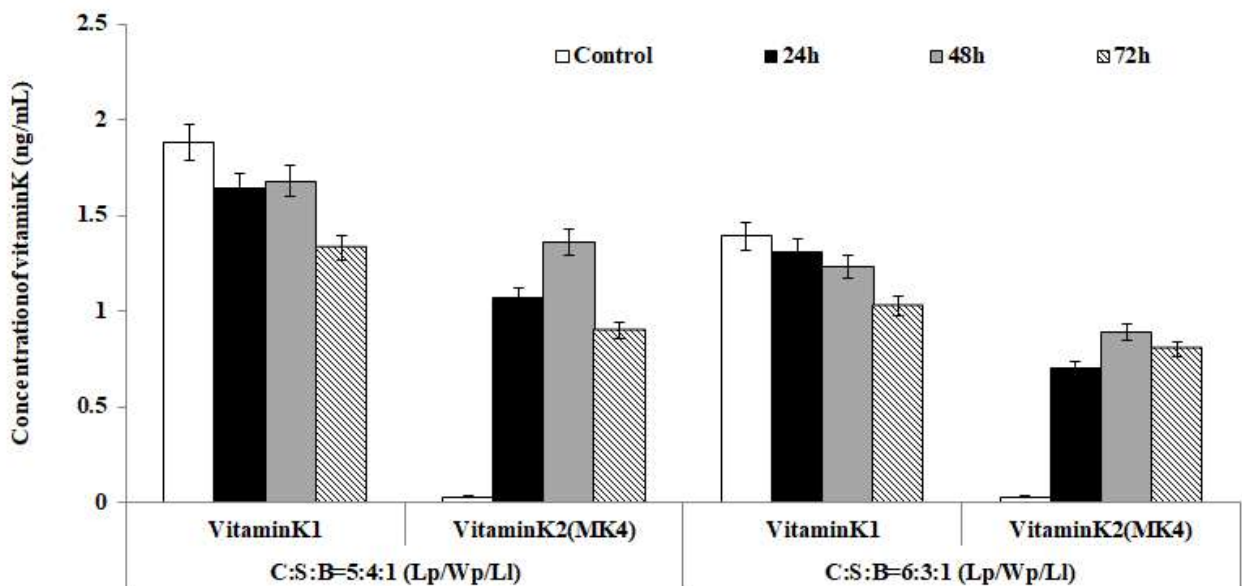
그 결과, 유산균 투여 여부와 관계없이 착즙액 4 및 5의 착즙액의 비타민 K1 함량은 거의 변화가 없었고, 시금치 착즙액을 제외한 단일 착즙액 (착즙액 1 및 3)보다 혼합 착즙액의 비타민 K1 함량이 높게 측정되었다, 상기 두 혼합 착즙액에 유산균을 접종하더라도, 비타민 K1의 함량이 그대로 유지되거나 증가하는 것을 확인하였다.



10-3) 혼합 착즙액의 유산균 발효 시간에 따른 비타민 K2 생성능과 비타민 K1 정량분석

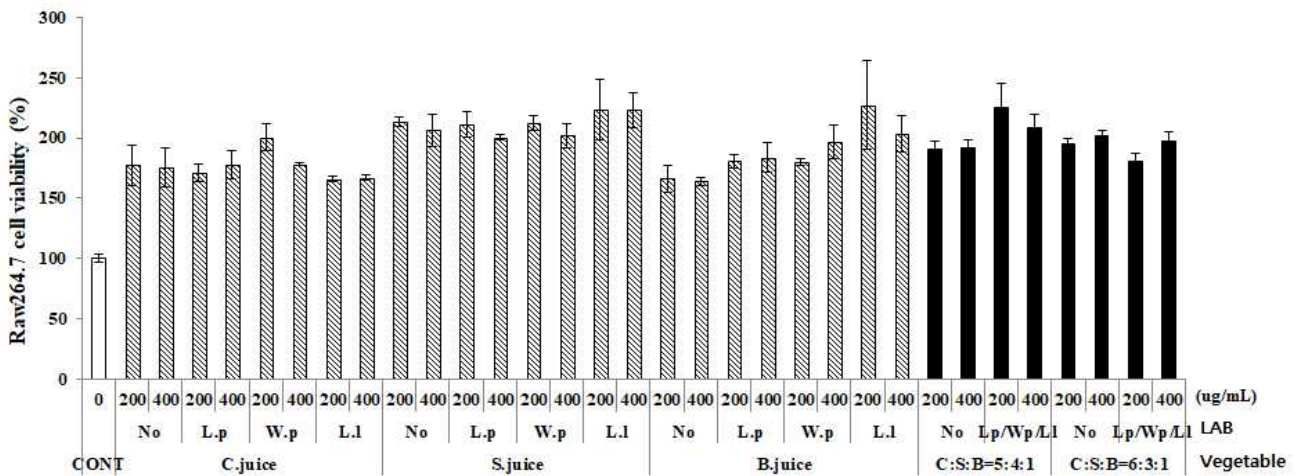
두 종류의 혼합 착즙액 (착즙액 4 및 5)과 상기 두 착즙액 각각에 *Lactobacillus plantarum* (*L.plantarum*; Lp) (KCCM12299P), *Weissella paramesenteroides* (*W.paramesenteroides*; Wp) (KCCM 12300P) 및 *Lactococcus lactis* (*L.lactis*; Ll) (KCCM 12759P)를 접종하여 공배양시킨 배양 배지의 배양시간에 따른 비타민 K2 (MK4) 생성능 및 비타민 K1의 정량분석을 실시하였다. HPLC (high performance liquid chromatography)를 이용해 비타민 K1 및 K2의 정량분석을 실시하였고, 먼저, 비타민 K1과 비타민 K2 (sigma, USA) 표준물질을 이용해 각각의 비타민 K1과 비타민 K2의 표준선을 얻었다. 또한, 상기 착즙액 4 및 5의 착즙액을 각각 200mL씩 준비하여 HPLC 시료 (대조군)로 사용하였고, 상기 두 착즙액을 각각 200mL씩 준비하고, 각각에 *Lactobacillus plantarum* (*L.plantarum*; Lp) (KCCM12299P), *Weissella paramesenteroides* (*W.paramesenteroides*; Wp) (KCCM 12300P) 및 *Lactococcus lactis* (*L.lactis*; Ll) (KCCM 12759P) 1x10⁸ cfu/ml 농도로 동일한 부비로 혼합하여 전체가 2mL (Total 1%; v/v) 이 되도록 접종한 후 26℃에서 호기적인 조건으로 24시간, 48시간, 72시간동안 공배양하고, 상기 배양한 유산균을 3,000 ~ 5,000 rpm으로 10 ~ 15분 원심분리 하여 유산균만을 수집한 후 HPLC 시료로 사용하였다.

그 결과, 착즙액 4의 착즙액을 공배양시킨 경우, 48시간 배양하는 경우 비타민 K1 함량 및 비타민 K2 생성이 가장 높은 것을 확인하였고, 공배양시키지 않은 착즙액 4의 착즙액에 비해 비타민 K2의 생성이 매우 많은 것을 확인하였다. 착즙액 5의 착즙액을 공배양시킨 경우, 배양시간이 흐를수록 비타민 K1의 함량이 낮아진 것을 확인하였으나 큰 유의성은 없었고, 착즙액 4의 착즙액과 마찬가지로 48시간 배양하는 경우 비타민 K2 생성이 많아지고, 공배양시키지 않은 착즙액 5의 착즙액에 비해 비타민 K2의 생성이 매우 많은 것을 확인하였다. 이를 통해, 비타민K2 생산기능을 가진 유산균의 공배양을 통해 비타민 K2 생성량이 높아지는 것을 확인하였다.

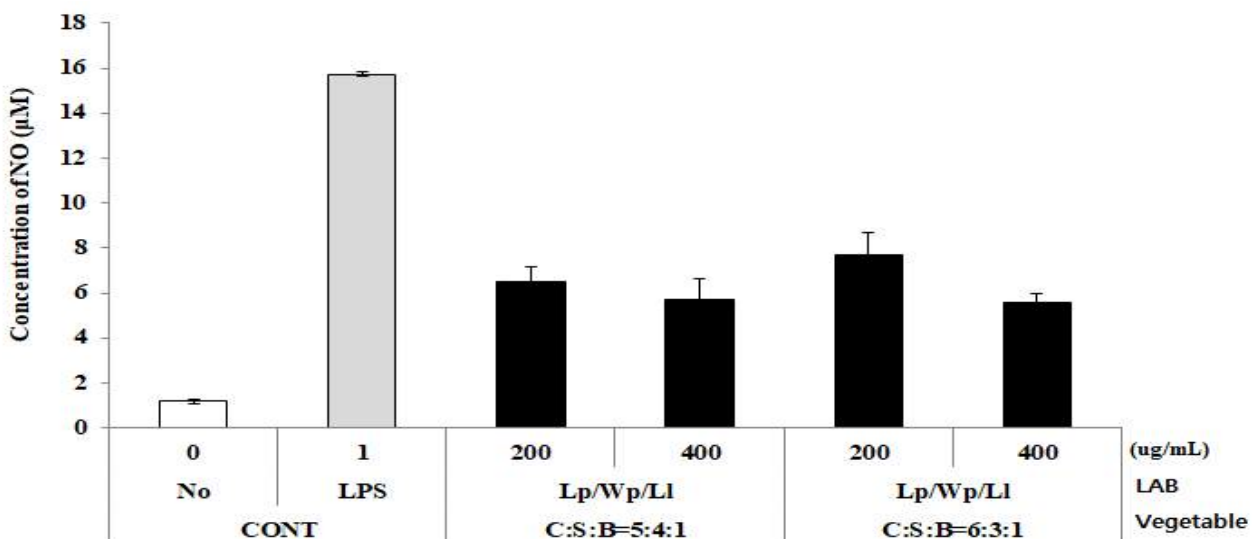


10-4) 혼합 착즙액 발효물의 염증 완화 효능 분석

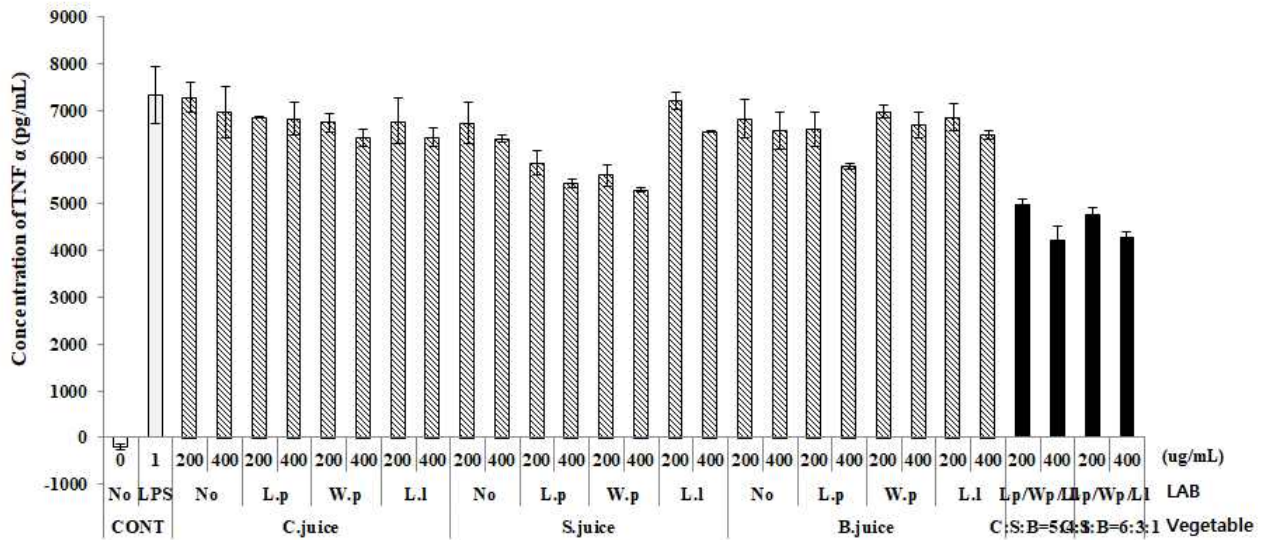
마우스 대식세포 (mouse macrophage cell) Raw 264.7 (ATCC TIB-71)는 본 발명의 비타민 K1 과 비타민 K2 (MK4)를 함유하는 시금치 발효물의 염증반응에 관여하는 일산화 질소 (Nitric oxide; NO) 생성 억제 효능, COX2 박현 억제, TNF- α , iNOS 값 및 IL-6 제어 기능을 확인하기 위해 사용하였다. 시금치 착즙액 및 브로콜리 착즙액에 *Lactobacillus plantarum* (*L.plantarum*; Lp) (KCCM12299P), *Weissella paramesenteroides* (*W.paramesenteroides*; Wp) (KCCM 12300P) 및 *Lactococcus lactis* (*L.lactis*; Ll) (KCCM 12759P) 세 유산균을 각각 접종하여 배양한 배양액과 실험군에서 준비한 혼합 착즙액에 상기 세 유산균을 공배양한 배양액을 준비하였고, 세포주 독성 실험을 진행하였다. 그 결과, 식물 단일배지에 상기 세 유산균을 각각 접종하는 경우와 혼합야채에 상기 세 유산균을 공배양하는 경우 세포 생존력 수치는 거의 유사하게 측정되었고, 대조군 대비 모두 세포 생존력 수치가 높게 나와, 단일식물배지의 유산균 배양물과 혼합야채 발효의 착즙액에 상기 세 유산균을 공배양하여도, 특별히 세포 독성 위험이 증가하지 않는 것을 확인하였다.



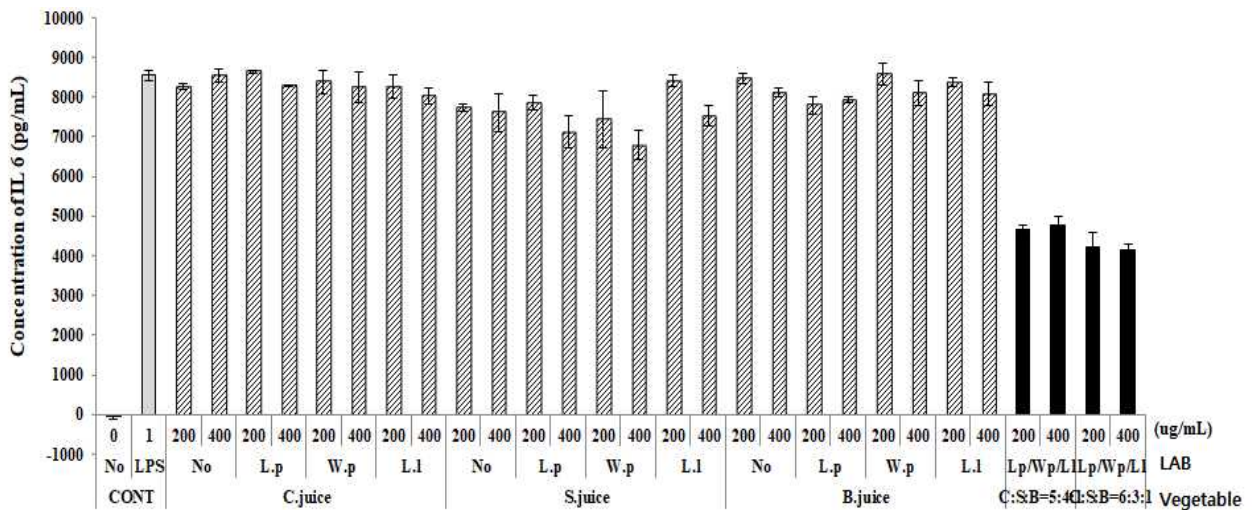
상기 준비한 배양액 및 대조군의 상등액을 취하여 시료처리 후에 NO 농도는 nitrite ion standard solution에서 얻어진 standard curve를 이용하여 산출하였고, NO 농도 측정 값을 하기 표 7 및 도 5에 나타내었다. 그 결과, 착즙액 4 및 5의 착즙액에 상기 세 유산균을 공배양하는 경우, LPS 처리를 한 대조군 2에 비해 NO 농도가 감소된 것을 확인하여, 혼합 착즙액에 상기 세 유산균을 공배양하는 경우 염증 완화 효능을 보이는 것을 확인하였다.



양배추 착즙액, 시금치 착즙액, 브로콜리 착즙액 및 혼합 착즙액 발효물의 TNF- α 생성 억제 효능을 확인하기 위해, 실험하였다. 그 결과, 착즙액 4 및 5의 착즙액에 상기 세 유산균을 공배양하는 경우, 착즙액 1 내지 3에 상기 세 유산균을 각각 배양하는 경우, LPS 처리를 한 대조군 2 및 비교군보다 TNF- α 농도가 감소된 것을 확인하여, 혼합 착즙액에 세 유산균을 공배양하는 경우 염증 완화 효능을 보이는 것을 확인하였다.



위의 동일 배양액 (착즙액 1 내지 5의 배양액), 비교군 및 대조군을 준비하였고, 사이토카인 IL-6 생성을 확인하였다. 그 결과, 착즙액 4 및 5의 착즙액에 상기 세 유산균을 공배양하는 경우, 착즙액 1 내지 3에 상기 세 유산균을 각각 배양하는 경우, 대조군 및 비교군보다 IL-6 농도가 감소된 것을 확인하여, 혼합 착즙액에 세 유산균을 공배양하는 경우 염증 완화 효능을 보이는 것을 확인하였다.



11) 식물기반의 비타민K1과 비타민K2 분리와 정제

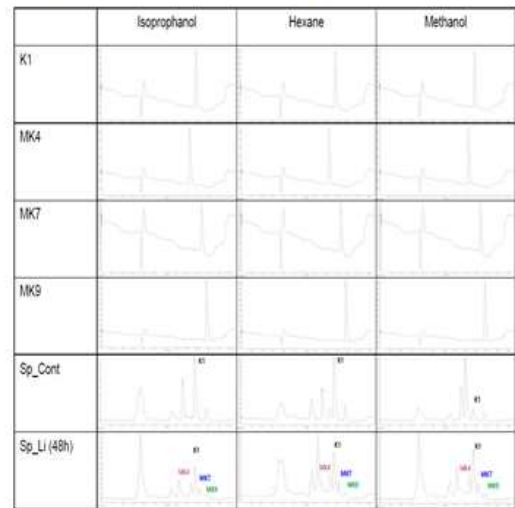
11-1) 식물기반의 비타민K1과 비타민K2 추출 용매 조건 확인

본 실험에 사용한 추출용매는 100% 에탄올, 메탄올, 헥산, 이소프로판올을 사용하였다. 시금치 착즙액 및/또는 시금치 착즙발효액의 동량의 용매를 넣고 3회 반복하여 얻어진 용매전체를 비타민K 정량과 정성분석을 하기 위해 사용하였다. 시금치 포스트바이오틱스K 분석을 위한 전처리 용매 후 HPLC로 확인하였다. 이소프로판올과 헥산을 1:2로 혼합용매에 1회 추출하고 이소프로판올로 2, 3회 추출한 용액의 경우가 전처리 용매로 용이하였다.

Table 1. List of most suitable solvents for isolation of phillaquinone and menaquinones

Buffer	I	II	III	IV
Extraction	Isopropanol : Hexane(1:2)	Isopropanol Hexane(1:2)	Methanol	Ethanol
	Hexane	Isopropanol	Methanol	Ethanol
	Hexane	Isopropanol	Methanol	Ethanol
Elution	Isopropanol	Isopropanol	Isopropanol	Isopropanol

Fig 1. HPLC of phillaquinone and menaquinones



각 용매로 추출한 시금치 추출액과 시금치 발효(L.lactis TS95) 추출액의 비타민K1과 K2(MK_n)의 HPLC로 정량한 결과 시금치 추출액의 경우는 비타민K1이 주로 확인되었으며 미량의 MK9이 확인되었으나 기타 물질로 예상된다. 시금치 발효 추출액의 경우는 이소프로판올의 경우 비타민K1은 2 ug/ml, MK4 1ug/ml, MK7 0,76 ug/ml, 0.11 ug/ml로 확인되었다. 다음으로는 에탄올, 메탄올 헥산 순으로 정량의 순서가 되었다.

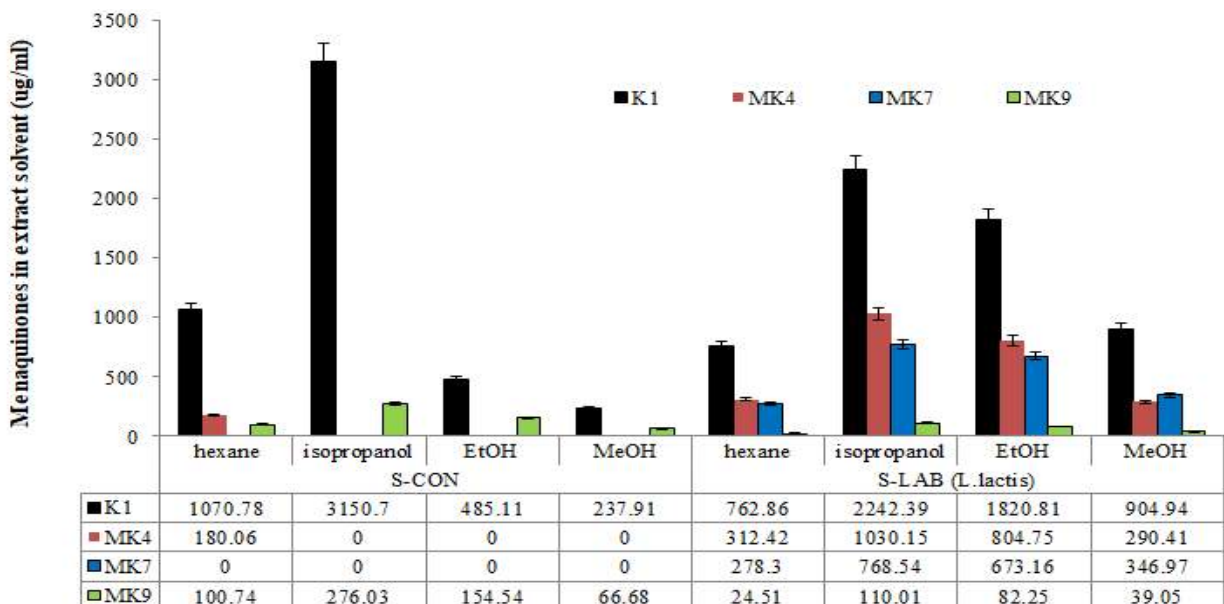
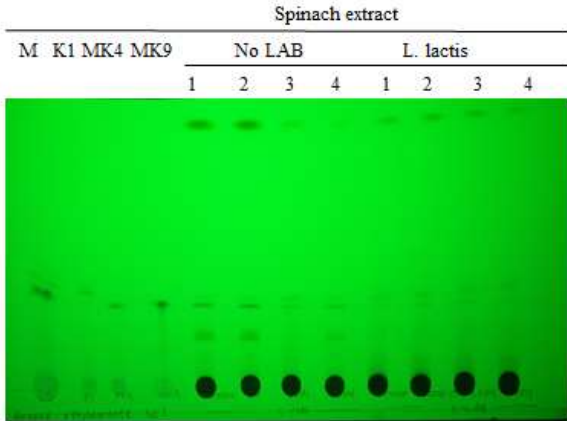


Fig 2. Concentration of phillaquinone and menaquinones obtained using different extract solvents. Extraction was carried out three times with 20 mL of each organic solvent in total 200mL sample.

11-2) 식물기반의 비타민K1과 비타민K2 겔크로마토 그래피를 위한 이동상 확립

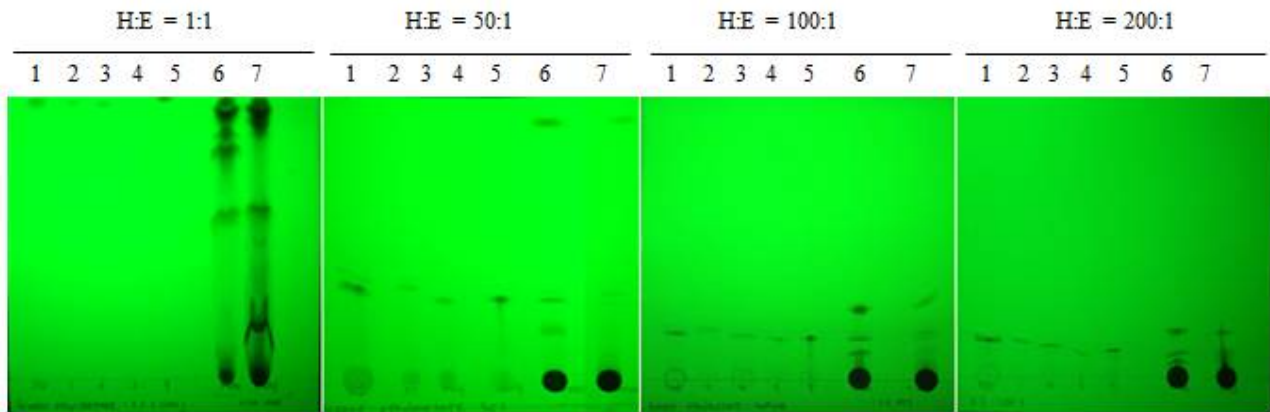
상기에 사용한 추출용매는 이소프로판올과 헥산을 1:2로 혼합용액에 1회 추출하고 이소프로판올로 2, 3회 추출한 용액으로 얻어진 시금치 추출발효물의 시금치 복합추출물(rich fraction)이라 명명하였다. 먼저 순상크로마토그래피(NP C-18 silica gel)에 대한 용매로 메탄올(PI 5.1), 클로로포름(PI 4.1), 에틸아세테이트(PI 4.4), 헥산(PI 0)을 비율별로 실험하여 R_f(Retention factor)값을 구하였다. 이동상으로는 헥산과 에틸아세테이트 50:1을 사용하였을 때 R_f 0.1~0.2로 적정하였다.

Mobile phase: n-hexane : ethylacetate = 50:1



1, Hexane; 2, isopropanol; 3, EtOH; 3, MeOH

Solvent	PI	Ratio	
MeOH	5.1	fix	-
Chloroform	4.1	increase	increase
Ethylacetate	4.4	-	Fix (1)
n-hexane	0		increase
R _f		no	no



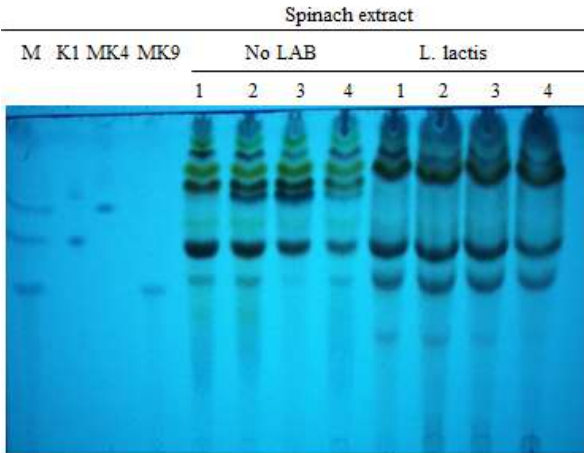
1. Marker mix; 2, Vit K1; 3, Vit K2(MK4); 4, Vit K2(MK7); 5, Vit K2(MK9); 6, Spinach extract (Sp); 7, fermentation in spinach extract by *L. lactis* during 48h (Sp_LI)

Table 1. Representative R_f value of menaquinones and phyloquinone by the ratio of hexane and ethylacetate

VitaminK	1:1	100:1	100:1	200:1
Vit K ₁	1	0.36	0.18	0.12
MK4	1	0.31	0.17	0.11
MK7	1	-	0.16	0.08
MK9	1	0.32	0.17	0.09

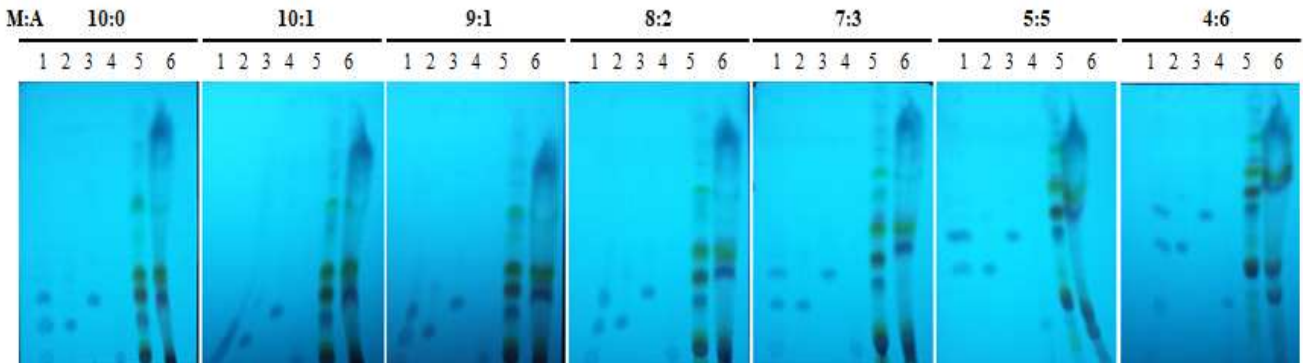
상기에 사용한 추출용매는 이소프로판올과 헥산을 1:2로 혼합용액에 1회 추출하고 이소프로판올로 2, 3회 추출한 용액으로 얻어진 시금치 추출발효물의 시금치 복합추출물(rich fraction)이라 명명하였다. 먼저 역상크로마토그래피(RP C-18 silica gel)에 대한 용매로 메탄올(PI 5.1), 아세톤(PI 5.1), 물(PI 9)을 비율별로 실험하여 R_f(Retention factor)값을 구하였다. 이동상으로는 메탄올과 아세톤 5:1을 사용하였을 때 R_f 0.1~0.2로 적정하였다.

Mobile phase: methanol : acetone = 5:1



Solvent	PI	Ratio		
MeOH	5.1	increase	Fix (1)	increase
Acetone	5.1	Fix (1)	increase	-
H2O	9	-	-	Fix (1)
R _f		0.1~0.2	>0.5	<0.1

1, Hexane; 2, isopropanol; 3, EtOH; 3, MeOH



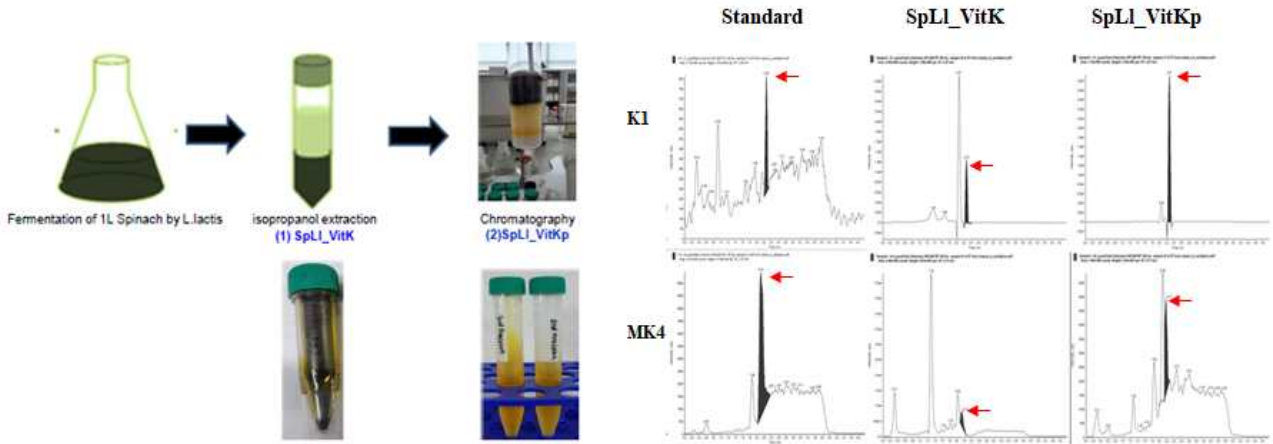
1. Marker mix; 2, Vit K₁; 3, Vit K₂(MK₄); 4, Vit K₂(MK₉); 5, Spinach extract (Sp); 6, fermentation in spinach extract by *L. lactis* during 48h (Sp_LI)

Table 1. Representative R_f value of menaquinone and phyloquinone by the ratio of methanol and acetone

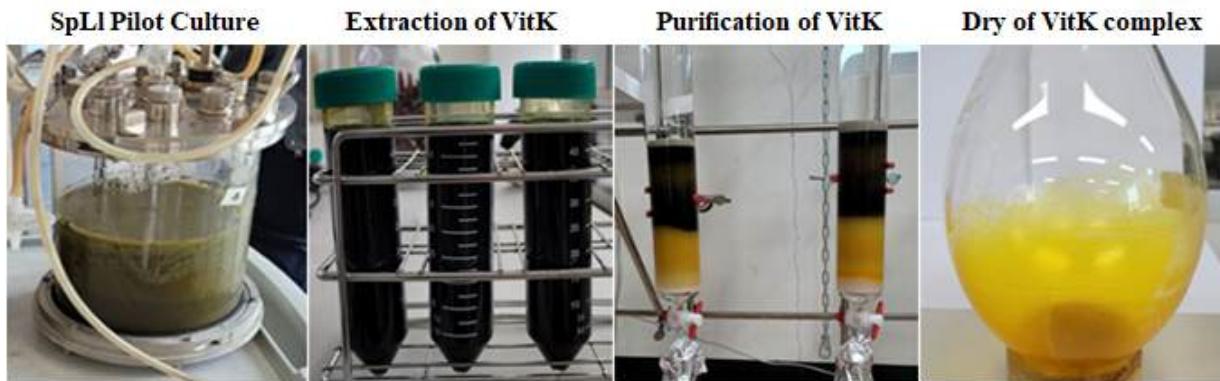
MeOH: Acetone	10:0	10:1	9:1	8:2	7:3	5:5	4:6
Vit K ₁	0.15	0.11	0.13	0.15	0.21	0.34	0.43
MK ₄	0.24	0.21	0.22	0.27	0.32	0.48	0.55
MK ₉	0.01	0.02	0.03	0.04	0.05	0.16	0.22

11-3) 식물기반의 비타민K1과 비타민K2 겔 크로마토그래피를 순수 분리

상기에서 확인한 순상의 용매 헥산과 에틸아세테이트 50:1를 이용하여 긴 원통에 용매와 혼합한 실리카겔을 컬럼에 부어 패킹을 한다. 이동상을 넣어 천천히 흘려주고 시료액을 흘려 넣어준 후 분리를 시작하였다. 나온 용액을 10mL 단위로 10개를 모아 TLC 등으로 확인하여 5번 6번의 프랙션을 비타민K 순수 분리물(Puri Fraction)으로 명기하여 정량, 정성 분석에 활용하였다.



초기에 소량 발효추출물로 다음은 파일럿 배양한 (3L)의 시금치 발효 추출물을 추출분리, 정제 하여 표준정량화를 시행하였다.



	SpLlM_VitK($\mu\text{g}/0.7\text{g}$)	SpLlM_VitK($\mu\text{g}/0.123\text{g; tube}/1\text{L}$)
VitK1	385.74 \pm 8.25	385.74 \pm 8.25
VitK2_MK4	3.84 \pm 0.14	3.84 \pm 0.14
VitK2_MK7	0.39 \pm 0.01	0.39 \pm 0.01
VitK2_MK9	0.21 \pm 0.01	0.21 \pm 0.01
Total	390.18	390.18

11-4) 식물기반의 비타민K1과 비타민K2의 질량분석

액체 크로마토그래피 탠덤형 질량분석계 (LC-MS/MS)를 이용한 메타볼롬 분석계를 구축하여 시금치 발효(L.lactis)의 2차 대사산물의 추출, 분리, 정제에 포함 된 비타민K1과 비타민K2(MK4, MK7, MK9) MS/MS spectrometry를 종합적으로 얻어 내었다. 그 결과, 2차 대사산물 비타민K의 구조를 분석하였다. 시금치 발효물의 추출 정제물의 필라퀴논과 메나퀴논의 지금까지 알려지지 않았던 2차 대사산물이 다수 포함되어 있다는 사실을 확인하였다. 또한, 이로써 2차 대사산물 중에 비타민K1 451.2g/mol, 비타민K2의 MK4 445.6g/mol, MK7 649.6g/mol, MK9 786.6g/mol 예측하는 것이 가능하게 되었다.

앞으로 보다 많은 식물 종에 대하여 위와 같은 비타민K2 생산 유산균주를 활용하여 새로운 유용 성분이나 그 대사에 관여하는 유전자의 발굴을 통하여 기능 예측으로까지 연결될 수 있을 것으로 보인다. 또한, 이로써 식물로부터 보다 효과적으로 의학, 식품, 공업 소재 등에 이용 가능한 유용 성분을 획득할 수 있을 것으로 기대된다.

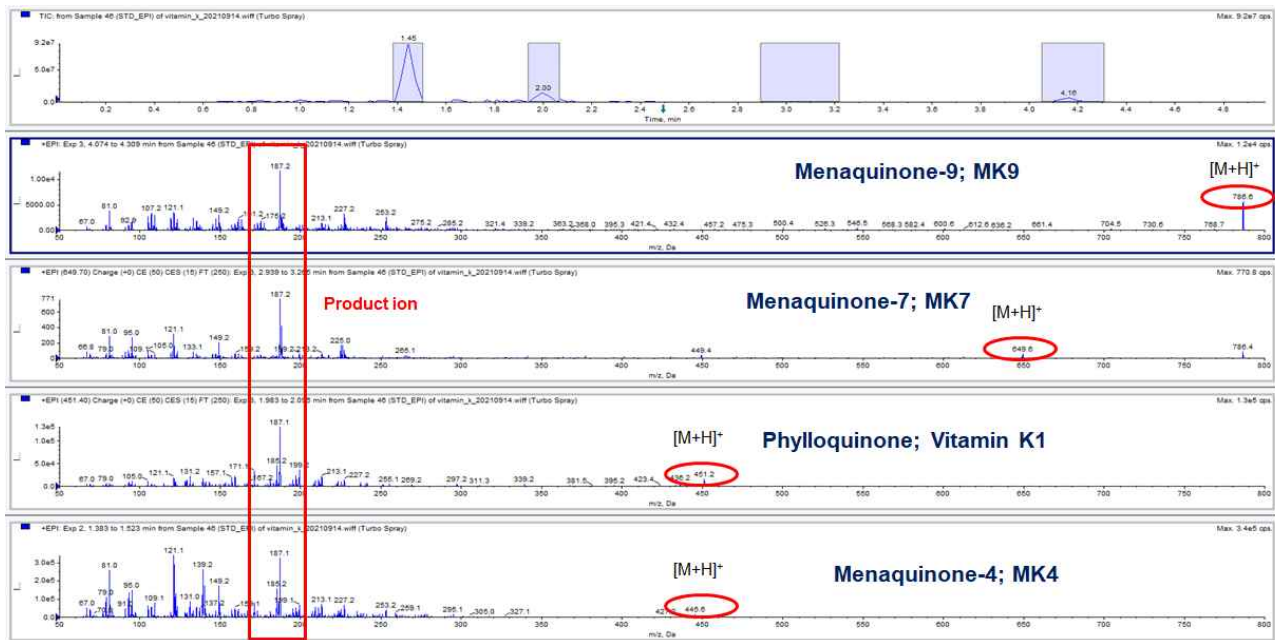


Table 5. Differences in the amount of vitamin K complex according to the condition of fermented spinach

(ng/mL)	SpL1_RF	SpL1_PF
Vit K1	107.13±5.63	203.67±7.60
MK4	1.79±0.31	3.51±0.30
MK7	0.14±0.02	0.27±0.02
MK9	ND	0.20±0.02

1)SpL1_RF: solvent extracted from spinach fermented with *Lactococcus lactis*

2)SpL1_PF: purified SpL1_RF with column chromatography

3)Vit K1; vitamin K1, MK4; menaquinone 4, MK7; menaquinone 7, MK9; menaquinone 9

12) 시금치 발효물의 추출물(RF)과 정제물(PF)의 특성 분석

12-1) 시금치 발효추출물과 정제물의 세포 안전성

시금치 발효물의 안전성을 확인하기 위해, 마우스 세포주인 B16F10 세포주에서 용매추출물과 정제물의 독성 실험을 수행하였다. 세포 생존율(Cell viability, % of control)은 동일한 방법으로 측정하여, 유산균을 첨가하지 않은 천일염 흰점박이꽃무지 추출물과 진액발효물을 제외하고는 유산균을 첨가하여 발효숙성을 수행한 시료 모두에서 세포수가 대조군 대비 100% 정도로 유지되거나 소폭으로 감소하여, 세포가 증식됨을 확인할 수 있었다. 따라서, 본 발명의 시금치발효물 추출물과 정제물은 B16F10에 대해 독성이 낮고 안전함을 확인하였다.

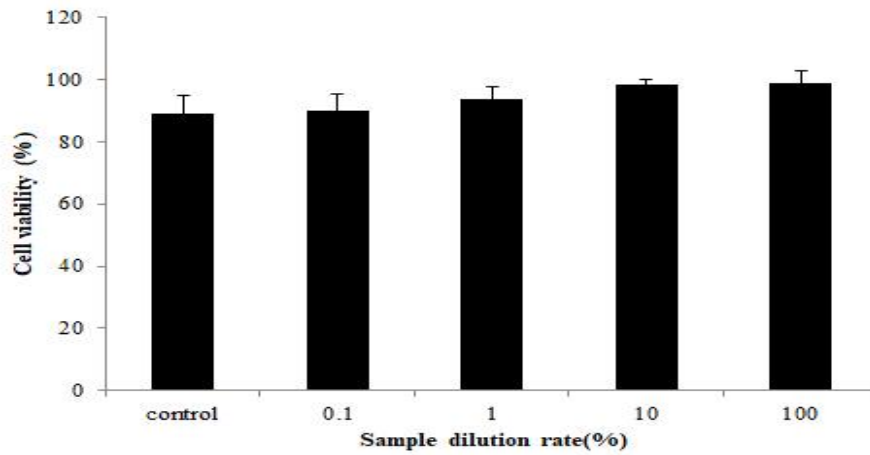


Table 6. Effects of Vitamin K complex in fermented spinach on cell viability of B16F10 according to sample dilution rate.

Sample dilution rate (%)	Control	0.1	1	10	100
Viability (%)	88.99 ± 5.71	90.10 ± 5.28	93.79 ± 3.72	98.46 ± 1.63	98.97 ± 3.76

¹⁾Control: isopropanol; used to dissolve the vitamin K complex

12-2) 시금치 발효 정제물의 Tyrosinase 저해 활성

Tyrosinase에 의해 tyrosine이 dopaquinone으로 산화되면서 피부에서는 색소침착이 일어난다 (Lee & Sim, 2012). 이렇게 피부를 검게 만드는 tyrosinase에 대해 시금치 발효 비타민K1/K2 정제물이 억제 효과를 갖는지 확인하기 위해 B16F10 세포에 독성이 없는 농도 범위에서 시금치 발효 비타민K1/K2 정제물을 처리한 후, tyrosinase 저해 활성을 측정하였다. 시금치 발효 비타민K1/K2 정제물을 5, 10, 50, 100 % 농도로 처리한 후 tyrosinase 저해 활성을 측정한 결과를 나타내었다. 시금치 발효 비타민K1/K2 정제물을 100%의 농도로 B16F10 세포에 처리하였을 때 tyrosinase 의 활성은 64%로 저해되었다.

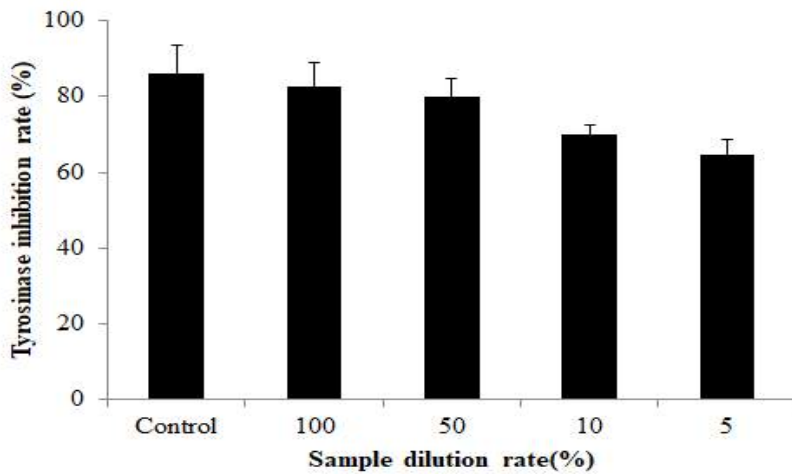


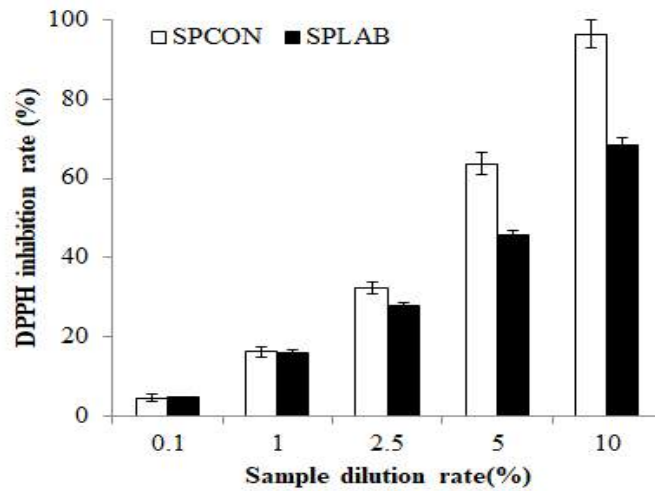
Table 7. Tyrosinase inhibition activity of vitamin K complex in fermented spinach according to sample dilution rate.

Sample dilution rate (%)	Control	5	10	50	100
Tyrosinase inhibition rate (%)	85.97 ± 7.42	82.71 ± 6.29	80.01 ± 4.75	69.83 ± 2.75	64.64 ± 3.90

¹⁾Control: Arbutin; positive control

12-3) 시금치 발효 정제물의 항산화 효능

시금치 발효 비타민K1/K2 정제물이 억제 효과를 갖는지 확인하기 위해 항산화 기능을 DPPH(2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) 자유라디칼 소거 활성 분석을 이용해 확인하였다. 웰 플레이트에 100 μM DPPH를 100 μL씩 첨가하고 차광한 후에 실온에서 10 내지 30 분간 반응을 수행하였다. 이후 517 nm 파장의 빛을 조사해 각 샘플의 흡광도를 측정하였으며, 음성 대조군으로는 메탄올 또는 물에 100uL DPPH를 처리하여 흡광도를 측정하여 영점 처리를 수행하였다. 상기 흡광도를 이용해 하기 수학적 식 1을 이용해 DPPH 억제율(scavenging activity, %)을 측정하여 발효 시간에 따른 항산화 효과의 변화를 확인하였다. 시금치 착즙액보다 시금치 발효물일 경우 항산화 기능이 더 높게 확인되었다.



IC50 value

- SP_RF: 3.32 %
- SPLAB_RF: **4.11 %**

Table 8. DPPH inhibition rate of vitamin K complex in fermented spinach according to sample dilution rate.

Sample dilution rate (%)	0.1	1	2.5	5	10
SPCON	4.56±0.85	16.22±1.18	32.26±1.52	63.68±2.70	96.45±3.38
SPLAB	4.73±0.17	15.88±0.84	27.87±0.84	45.61±1.18	68.58±1.52

12-4) 시금치 발효 정제물의 항균 분석

시금치 발효 비타민K1/K2 정제물을 각각 0.01g/ml씩 물에 희석하여 1%의 균질용액 시료를 제조한 후, 각각의 1% 균질용액 시료 30 μ L씩을 앞서 준비한 페이퍼 디스크에 주입하였다. 주입 후 37°C에서 24시간 동안 배양하고 페이퍼 디스크 주변의 억제환(inhibition clear zone)의 직경을 측정하여 항균성을 분석하였다. 따라서, 본 발명의 발효물의 시험균주에 대한 항균 효과가 우수함을 확인할 수 있었다. 유산균 접종 후 발효단계를 거침으로써, 유산균자체의 항균성이 유지되며 리스테리아, 황색포도상구균, 대장균, 및 슈도모나스 균에 대한 항균 활성이 존재함을 확인할 수 있었다.

		10	25	50	75	100	isopropanol
<i>E. coli</i>	L1 24hr	ND	ND	ND	ND	ND	
	L1Lm 24hr	ND	ND	ND	ND	ND	+
	L1 48hr	ND	ND	ND	ND	ND	
<i>S. enteritidis</i>	L1 24hr	ND	ND	ND	ND	ND	
	L1Lm 24hr	ND	ND	ND	ND	ND	+
	L1 48hr	ND	ND	ND	ND	ND	
<i>S. aureus</i>	L1 24hr	+	++	++	++	++	
	L1Lm 24hr	++	++	++	++	++	
	L1 48hr	++	++	+++	+++	+++	
<i>L. monocytogenes</i>	L1 24hr	++	++	+++	+++	+++	-
	L1Lm 24hr	+++	+++	+++	+++	+++	
	L1 48hr	++	+++	+++	+++	+++	

*Growth inhibition size of clear zone

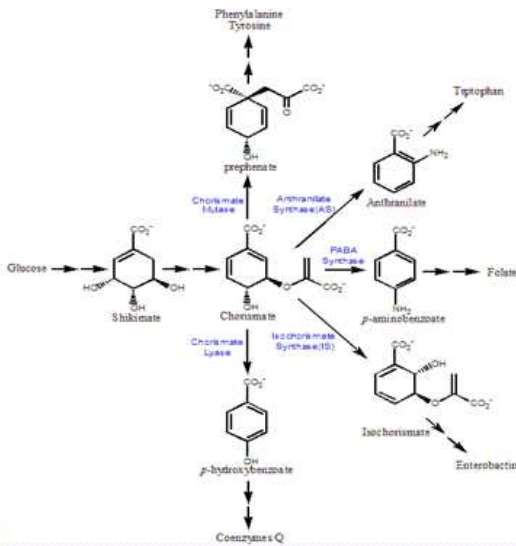
: -, not detected; + smaller than 1 mm; ++, 1~2mm; +++, larger then 2 mm

13) 유산균의 비타민K2 생산 효소단백질 생산

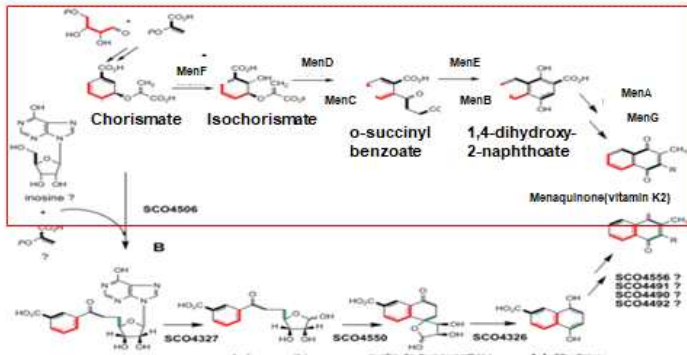
13-1) *L. mesenterodius* 에서의 MenG 유전자의 클로닝 및 재조합단백질 분리정제

Menaquinone(MK: 비타민 K)은 인간에 있어서는 혈액응고나 뼈의 대사에 필수적인 비타민으로 작용하며 미생물에서는 호흡을 할 때 전자전달계 성분으로서 생육에 필요한 작용을 한다. MK의 생합성은 1980년대까지는 주로 대장균을 이용해서 연구되었으며, Chorismic 산에서 O-Succinyl 안식향산(OSB)을 지나가는 경로가 밝혀지게 되었다. 추적실험을 통해서 생물 정보학(Bio-informatics), 변이주의 분리와 상보유전자의 취득, 유전자 파괴실험, 중간체의 정제와 구조결정, 형질전환효소를 이용한 in vitro 실험 등 새로운 기술과 기존의 기술, 분야가 다른 기술을 서로 융합시킴으로써 미생물에서 발견되는 MK의 신규의 생합성 경로가 밝혀지게 되었다.

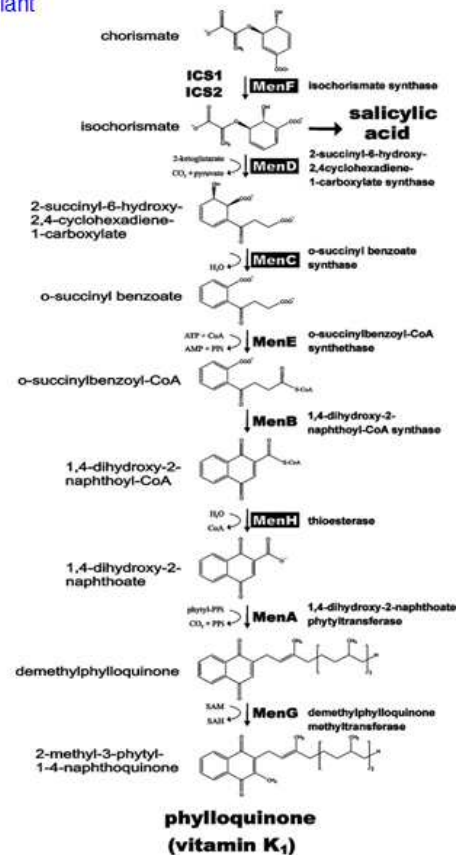
생합성 신규경로는 병원균에 특이적인 경로이며, 유산균 등 유용한 장내세균균은 이미 알고 있는 경로만을 가지고 있다. 본 리뷰에 의한 연구 성과는 *Helicobacter pylori*와 같이 신속한 진단방법이 확립되고 있는 병원균에서는 이 신규경로의 저해제를 탐색함으로써 부작용이 없는 유용한 항생물질의 개발이 기대될 것으로 생각된다. 새로운 작용메커니즘을 가진 의약품의 개발이 그리 쉽지 않으며, 또한, 비 특이적인 항생물질의 사용은 여러 가지 항생제내성 내성균이 출현하게 되는 것과 연관이 있으므로 이번에 발견하게 된 생합성 신규경로와 같이 특성의 균주만이 갖고 있는 특성의 대사경로를 목표로 하여 항생물질을 개발하게 된다면 앞으로의 항생물질 약제개발을 위한 하나의 방향성을 제시하는 것이라고 할 수 있다.



Microorganism



Plant



13-2) 선발 된 유산균의 메나퀴논 유전자 서열

해양에서 분리한 유산균의 선발에 있어 비타민K의 전구체인 비타민K2(menaquinone) 생산 유전자(Men)를 보유하는 *Leuconostoc mesenteroides* 등을 분리하여 관련 유전자를 NCBI의 in silico 분석을 통해 유전자를 조사한 결과 MenA ~ I가 확인되었으나 클로닝은 MenB, MenC, MenC, MenE, MenH가 클로닝되었다. 또한 *Lactobacillus plantarum*에서는 MenA, MenA1, MenA2 가 확인되었다. *Lactococcus lactis*에서는 MenA ~ I가 확인되었으나 클로닝은 MenB, MenC, MenE, MenG가 확인되었다. PCR 산물은 PCR clean-up Gel extraction(Macherey Nagel, USA)로 정제하여 ABI3730 DNA analyzer(Applied Bioxytems, USA)로 유전자 서열을 분석하였다.

Men	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i> (KCCM12299P)			Name
	Size (bp)	nucleotide	Amino acid	
A	915	100% (acc no CP053912.1)	100% (WP_003641332.1)	1,4-dihydroxy-2-naphthoate polyprenyltransferase
A1	969	100% (acc no CP053571.1)	100% (WP_003640302.1)	UbiA family prenyltransferase
A2	918	100% (acc no CP053571.1)	100% (WP_003640452.1)	prenyltransferase

Men	<i>L. mseenteroides</i> (KCCM12756P)			Name
	Size (bp)	nucleotide	Amino acid	
A	833	100% (acc no CP028251.1)	100% (WP_011679033.1)	1,4-dihydroxy-2-naphthoyl-CoA synthase
B				
C				
D				
E	1,439	99 (acc no CP028251.1)	100% (WP_011680537.1)	o-succinylbenzoate-CoA ligase
F	711	100 (acc no CP028251.1)	100% (WP_011680536.1)	bifunctional demethylmenaquinone methyltransferase/2-methoxy-6-polyprenyl-1,4-benzoquinol methylase UbiE
G				
H				
I				

Men	<i>L. Lactis</i> (KCCM12759P)			Name
	Size (bp)	nucleotide	Amino acid	
A	843	100% (acc no CP015902.1)	100% (WP_058208750.1)	1,4-dihydroxy-2-naphthoyl-CoA synthase
B				
C	458	99 (acc no CP015902.1)	100% (WP_058221068.1)	o-succinylbenzoate synthase
D	1,683	99 (acc no CP015902.1)	100% (WP_058221070.1)	2-succinyl-5-enolpyruvyl-6-hydroxy-3-cyclohexene-1-carboxylic-acid synthase
E	1,356	99 (acc no CP015902.1)	99% (WP_058221069.1)	o-succinylbenzoate-CoA ligase
F	815	99 (acc no CP015902.1)	99% (WP_058221074.1)	2-succinyl-6-hydroxy-2,4-cyclohexadiene-1-carboxylate synthase
G				
H				
I				

13-3) *L. mesenteroides* 에서의 MenG 유전자의 클로닝 및 재조합단백질 분리정제

해양에서 분리한 유산균의 선발에 있어 비타민K의 전구체인 비타민K2(menaquinone) 생산 유전자(Men)를 보유하는 *Leuconostoc mesenteroides* 등을 분리하여 관련 유전자를 NCBI의 in silico 분석을 통해 유전자를 조사한 후, 프라이머(men G 등)를 조사하여 시퀀싱 분석을 통해 확인 함 상기 분리된 각 유산균 균주의 우선 mini genomic DNA extraction kit(Promega)를 이용하여 각 균주의 유전체 DNA(genomic DNA)를 분리하였다. 상기 분리된 유전체 DNA를 주형으로, 각 유산균의 각 계통내에서 확인 된 menG 유전자의 프라이머 세트 및 AccPower PCR premix kit(Bioneer, Korea)를 이용하여 TaKaRa PCR Thermal Cycler(Japan)으로 상기 균주의 MenG 708 bp 유전자 부위를 증폭하였다. PCR 산물은 PCR clean-up Gel extraction(Macherey Nagel, USA)로 정제하여 ABI3730 DNA analyzer(Applied Bioxytems, USA)로 유전자 서열을 분석하였다.

유산균에서 확인 클로닝 된 menG 유전자는 BmNPV DNA에 도입한 후, 알카리법에 의해 분리되고 누에세포(BmN) 세포에 Fugene(Promega, USA) 도입하여 형질전환시킨 후, 이를 4일간 배양하여 *L. mensenedius* 의 MenG를 생산하는 세포를 제조하였다.

FPLC를 이용하여 33 kDa의 효소단백질을 분리정제하여 이후 실험에 활용할 것이다.

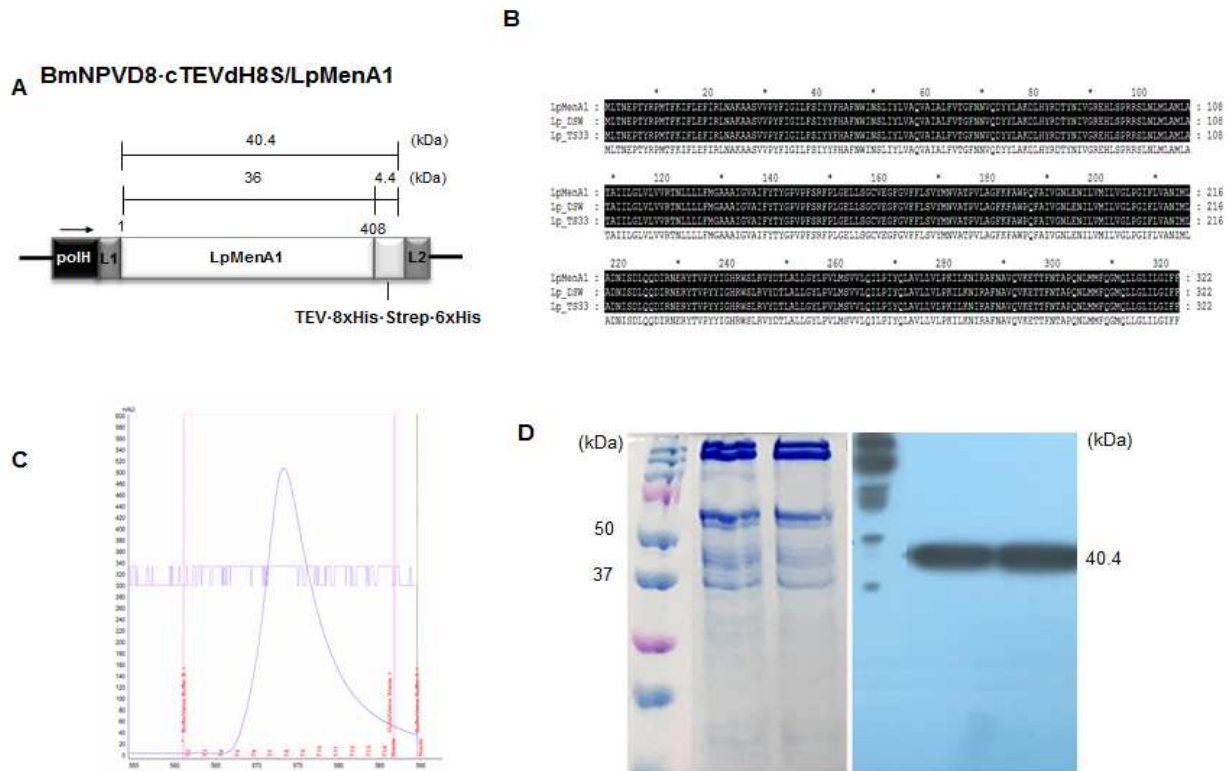


Fig. 11 . Immunoblot analysis of the purified recombinant LpMenA1with His-antibody. M, molecular weight marker; Schematic illustration of recombinant baculovirus constructs and structure of LpMenA1(A); sequence align (B); FPLC (C); arrow, purified LmMenG; CBB, Coomassie brilliant blue R-250 staining and His antibody (D)

13-4) *L. plantarum* 에서의 MenA 유전자의 클로닝 및 재조합단백질 분리정제

해양에서 분리한 유산균의 선발에 있어 비타민K의 전구체인 비타민K2(menaquinone) 생산 유전자(Men)를 보유하는 *Leuconostoc mesenteroides* 등을 분리하여 관련 유전자를 NCBI의 in silico 분석을 통해 유전자를 조사한 후, 프라이머(men A 등)를 조사하여 시퀀싱 분석을 통해 확인 함 상기 분리된 각 유산균 균주의 우선 mini genomic DNA extraction kit(Promega)를 이용하여 각 균주의 유전체 DNA(genomic DNA)를 분리하였다. 상기 분리된 유전체 DNA를 주형으로, 각 유산균의 각 계놈내에서 확인 된 menG유전자의 프라이머 세트 및 AccPower PCR premix kit(Bioneer, Korea)를 이용하여 TaKaRa PCR Thermal Cyclor(Japan)으로 상기 균주의 MenA 966 bp 유전자 부위를 증폭하였다. PCR 산물은 PCR clean-up Gel extraction(Macherey Nagel, USA)로 정제하여 ABI3730 DNA analyzer(Applied Bioxytems, USA)로 유전자 서열을 분석하였다.

유산균에서 확인 클로닝 된 menG 유전자는 BmNPV DNA에 도입한 후, 알카리법에 의해 분리되고 누에세포(BmN) 세포에 Fugene(Promega, USA) 도입하여 형질전환시킨 후, 이를 4일간 배양하여 *L. mensenedius*의 MenG를 생산하는 세포를 제조하였다.

FPLC를 이용하여 40.4 kDa의 *L. plantarum* MenA효소단백질을 분리정제하여 이후 실험에 활용하였다.

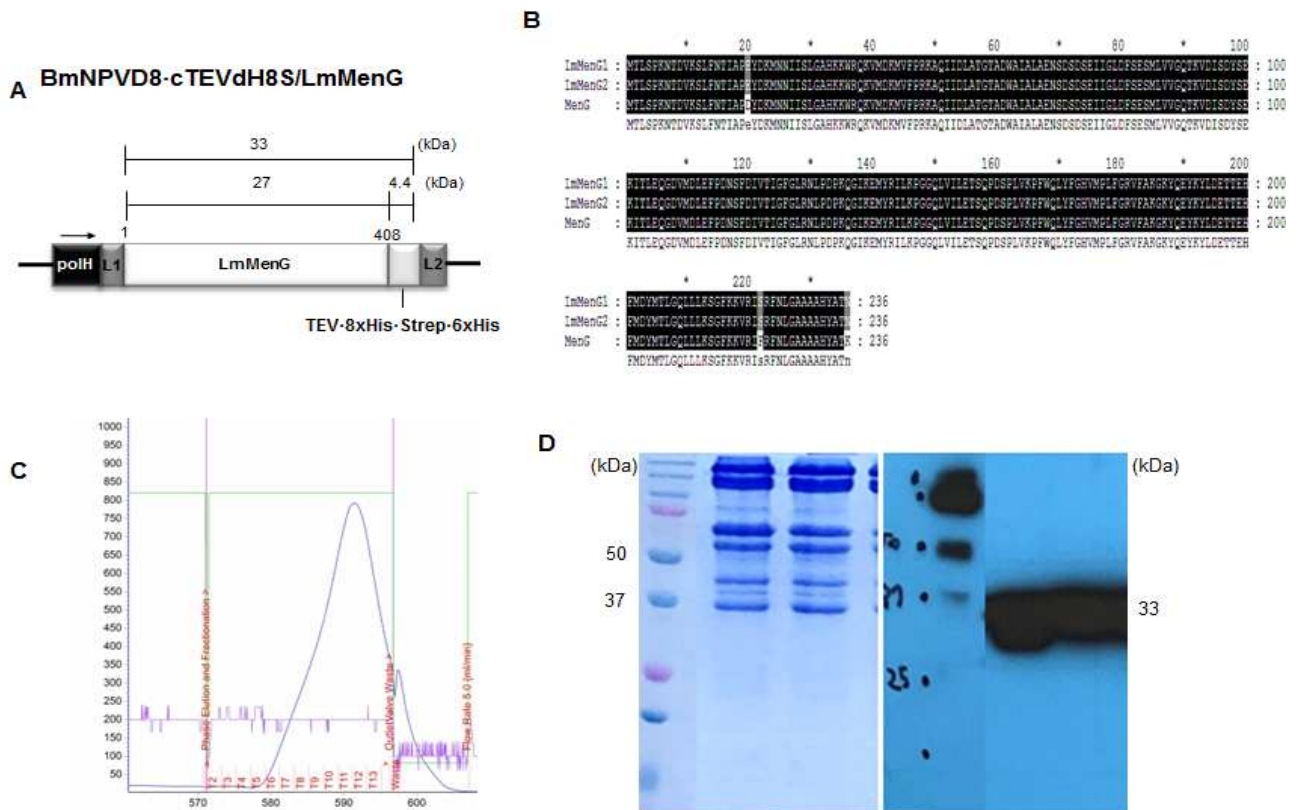


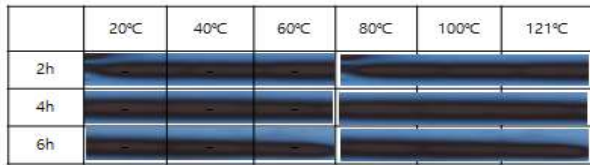
Fig. 10 . Immunoblot analysis of the purified recombinant LmMenG with His-antibody. M, molecular weight marker; Schematic illustration of recombinant baculovirus constructs and structure of LmMenG (A); sequence align (B); FPLC (C); arrow, purified LmMenG; CBB, Coomassie brilliant blue R-250 staining and His antibody (D)

13-5) *L. plantarum*의 MenA와 *L. mesenteroides* MenG 효소의 특성 분석

유산균에서 확인 클로닝 된 menG 유전자는 BmNPV DNA에 도입한 후, 알카리법에 의해 분리되고 누에세포 (BmN) 세포에 Fugene(Promega, USA) 도입하여 형질전환시킨 후, 이를 4일간 배양하여 *L. mensenedius*의 MenG를 생산하는 세포를 제조하였다.

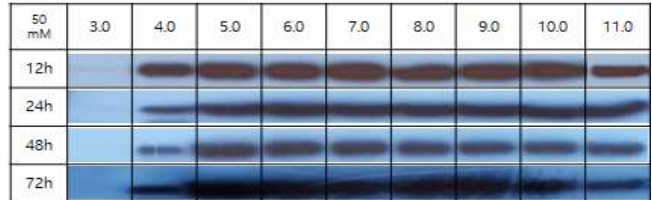
FPLC를 이용하여 33 kDa의 효소단백질을 분리정제 된 효소는 온도, pH, Metal 및 계면활성제에 높은 안정성을 보였다.

I. Temperature

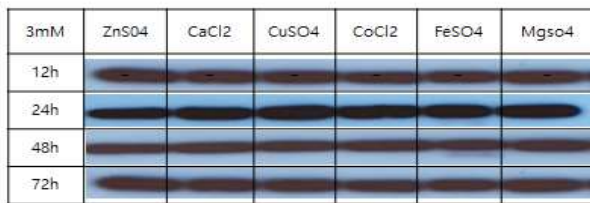


(재확인 필요.)

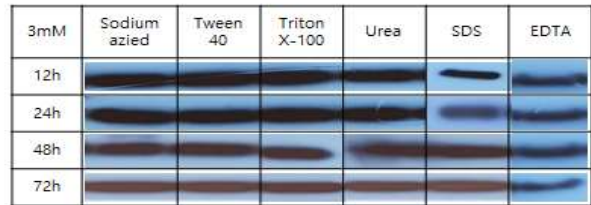
II. pH



III. Metal ions



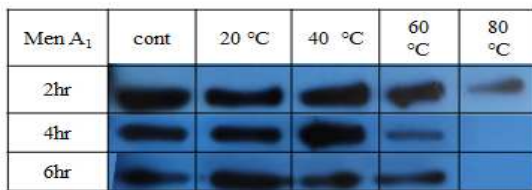
V. Surfactants



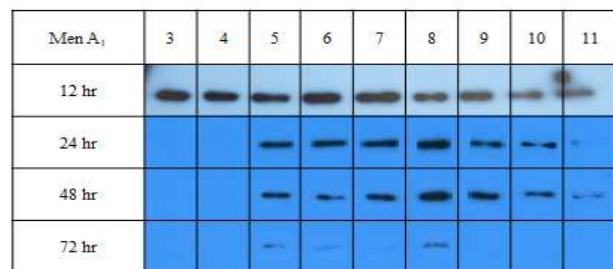
유산균에서 확인 클로닝 된 menG 유전자는 BmNPV DNA에 도입한 후, 알카리법에 의해 분리되고 누에세포 (BmN) 세포에 Fugene(Promega, USA) 도입하여 형질전환시킨 후, 이를 4일간 배양하여 *L. plantarum*의 MenA를 생산하는 세포를 제조하였다.

FPLC를 이용하여 35 kDa의 효소단백질을 분리정제 된 효소는 온도, pH, Metal 및 계면활성제에 높은 안정성을 보였다.

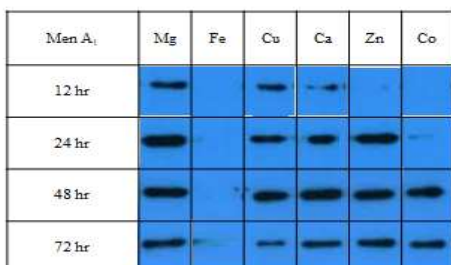
I. Temperature



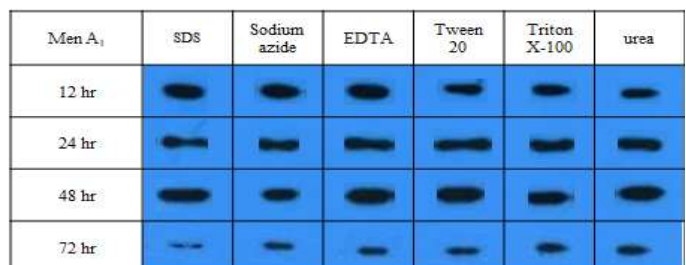
II. pH



III. Metal ions



V. Surfactants



13-6) *L. plantarum*의 MenA와 *L. mesenteroides* MenG 효소에 따른 비타민K2 생산 영향

유산균 *L. plantarum*의 MenA, MenA1와 *L. mesenteroides* MenG의 효소 단백질의 농도를 BSA에 의해 확인한 결과 0.05%에서 *L. plantarum*의 MenA 0.3 ug/mL, MenA1 0.4 ug/mL, 이고 *L. mesenteroides* MenG 3.5 ug/mL이었다.

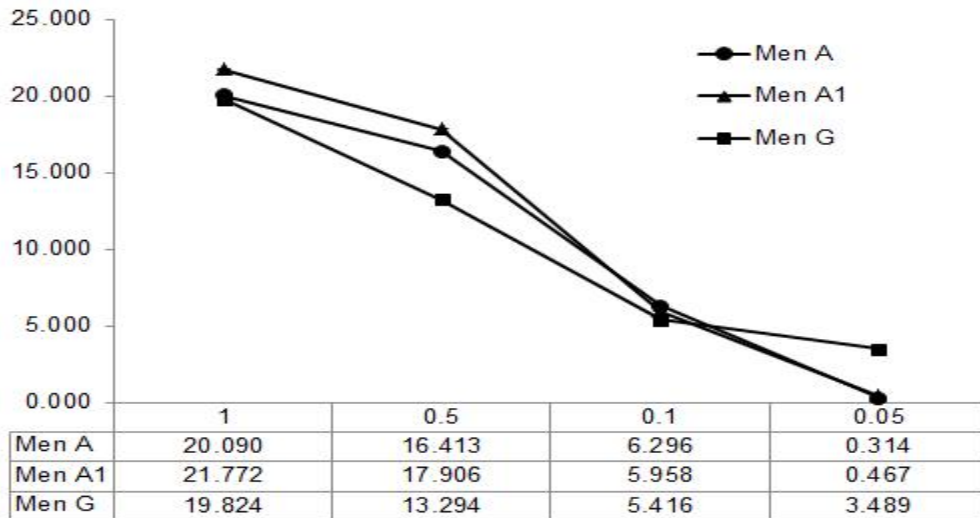


Figure. Protein content according to enzyme type and concentration

유산균 *L. plantarum*의 MenA, MenA1와 *L. mesenteroides* MenG의 효소 단백질을 시금치 배지에 *L. lactis* 접종에 있어 발효 전과 발효 후 12시간에 더하여 실험 결과, 발효전에 투여한 결과 비타민K2의 증가가 확인되었다. 이는 비타민K2 ELISA kit를 사용하여 확인하였다.

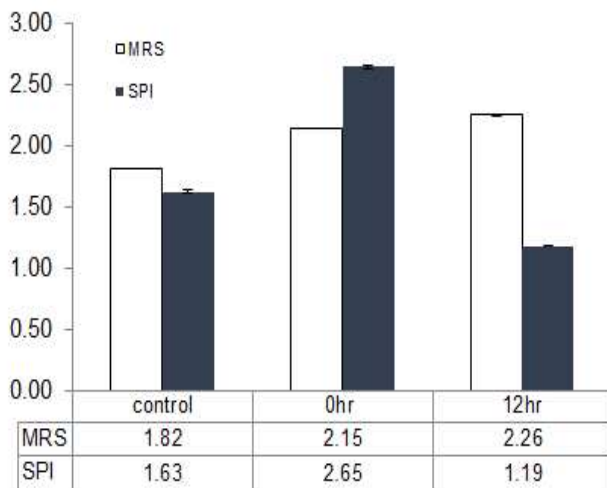


Figure 1. VitK2 production of TS95 according to addition time of MenG.

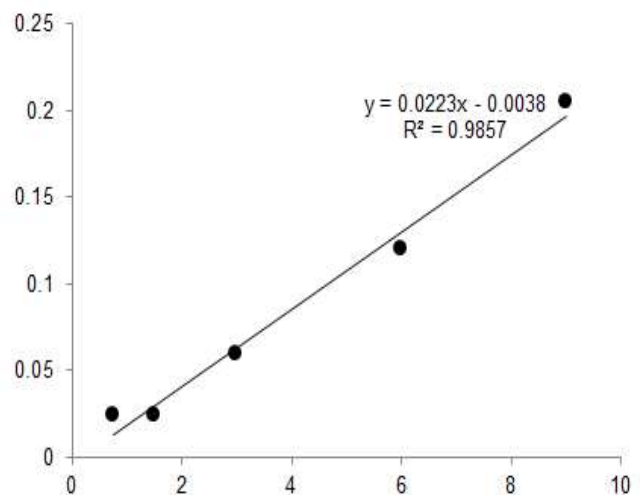
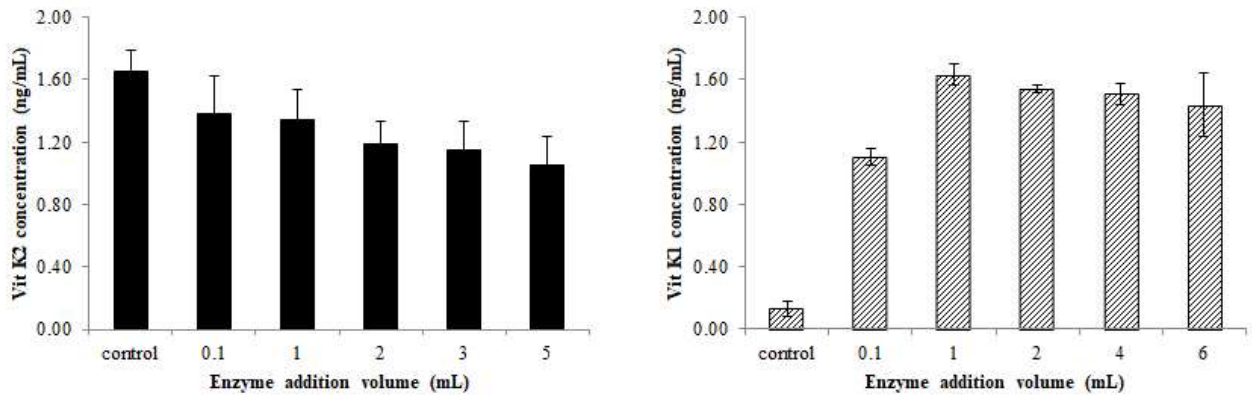


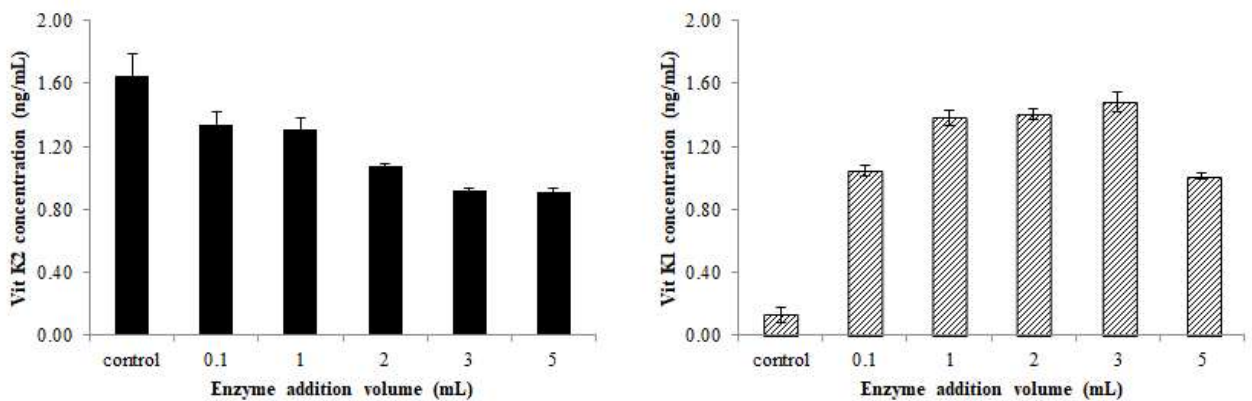
Figure 2. VitK2 standard curve(ELISA).

유산균 *L. mesenteroides* MenG의 효소 단백질을 시금치 배지에 *L.lactis* 접종에 있어 발효 전과 발효 후 12시간에 대하여 실험 결과, 발효전에 투여한 결과 비타민K2의 증가가 확인되었다. 이는 비타민K2 ELISA kit를 사용하여 확인하였다. 결과적으로는 크게 영향은 없는 것으로 확인되었다.



	9.9			0.5g		
	9.8			0.1mL / 24h		
DW (mL)	9.9	9.8	8.9	7.9	5.9	3.9
menG/DW (0.1%; 5.5µg/ml)	0	0.1	1(5.5ug)	2(11ug)	4(22ug)	6(33ug)
Final menG Cont (/mL)	0	0.055	0.55	1.1	2.2	3.3
VitK1 (ng/mL)	0.13 ± 0.05	1.10 ± 0.05	1.63 ± 0.07	1.54 ± 0.03	1.51 ± 0.07	1.44 ± 0.20
VitK2 (MK4; ng/mL)	1.65 ± 0.14	1.39 ± 0.24	1.35 ± 0.19	1.18 ± 0.15	1.14 ± 0.19	1.05 ± 0.19

유산균 *L. plantarum*의 MenA, MenA1의 효소 단백질을 시금치 배지에 *L.lactis* 접종에 있어 발효 전과 발효 후 12시간에 대하여 실험 결과, 발효전에 투여한 결과 비타민K2의 증가가 확인되었다. 이는 비타민K2 ELISA kit를 사용하여 확인하였다. 결과적으로는 *L. plantarum*의 MenA, MenA1의 효소 단백질크게 영향은 없는 것으로 확인되었다.



	9.9			0.5g		
	9.8			0.1mL / 24h		
DW (mL)	9.9	9.8	8.9	7.9	6.9	4.9
menA/DW (0.1%; 6µg/ml)	0	0.1	1(6ug)	2(12ug)	3(18ug)	5(30ug)
Final menA Cont (/mL)	0	0.06	0.6	1.2	1.8	3.0
VitK1 (ng/mL)	0.13 ± 0.05	1.05 ± 0.03	1.38 ± 0.05	1.40 ± 0.04	1.48 ± 0.06	1.01 ± 0.02
VitK2 (MK4; ng/mL)	1.65 ± 0.14	1.34 ± 0.08	1.31 ± 0.07	1.07 ± 0.02	0.92 ± 0.01	0.91 ± 0.03

2-3. 비타민K2 강화소재의 효능평가 및 전임상 시험(공동2)

1) 세포 기반 면역 및 이상지질혈증 개선 소재 도출을 위한 비타민 K 성분 강화 소재 스크리닝

1-1) 세포기반 비타민 K2성분 강화 소재의 면역 및 항염증 효능평가

(1) 비타민 K1과 K2 표준품에서의 면역 및 항염 효능 조사

(1-1) 세포독성

Raw 264.7 세포에서 비타민 K1, K2 표준품을 다양한 농도로 1시간 처리 후 미처리군 (NC)을 제외한 모든 그룹에 LPS (1 µg/mL)을 처리 후 24시간 동안 배양한 후 MTT assay를 이용하여 세포독성을 확인하였다 (Fig. 1). 비타민 K1, K2 표준품에서 세포독성은 모든 농도에서 정상군(NC군)과 비교할 경우 세포독성이 나타나지 않음을 확인하였다.

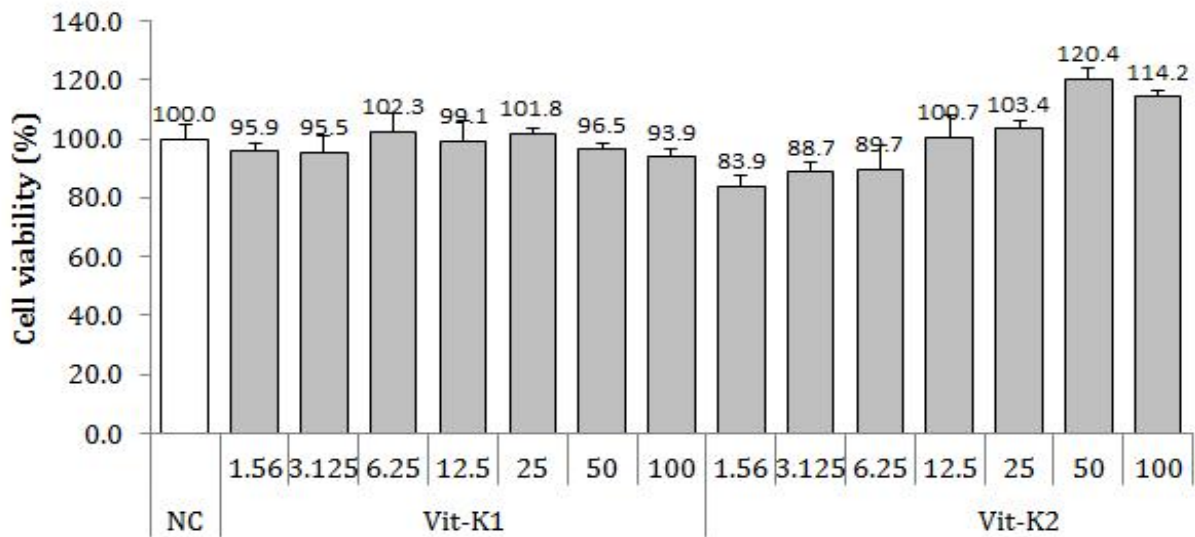


Fig. 1. Effects of different concentrations of vitamin K1, K2 on RAW264.7 cell.

- The cell viability of Raw 264.7 cells treated with vitamin K1, K2 for 24 h was determined by CCK-8 assay.
- The data shown are means \pm SEM (n = 6).

(1-2) 비타민 K1, K2 표준품을 처리한 세포 내 cytokine 발현

비타민 K1, K2 표준품 처리에 따른 Raw 264.7 세포의 염증성 사이토카인 TNF- α 와 IL-6 분비량을 평가하기 위하여 표준품 비타민 K1, K2와 LPS를 각각 24시간 동안 처리하여, ELISA assay로 분석하였다. 또한, 항염증성 사이토카인 MCP-1 생성량을 조사하기 위하여 비타민 K1, K2, LPS를 동시에 처리하여 ELISA assay로 분석하였다. 본 실험에서는 LPS 처리 및 비타민 K1, K2를 통해 유도된 RAW 264.7 세포주로부터 분비된 각 사이토카인의 양을 측정하여 대식세포의 면역 증강 또는 억제 영향에 대한 지표로 제시하고자 하였다. 비타민 K1, K2를 각각 처리하였을 경우, 대조군인 LPS (1 μ g/ml)군의 TNF- α , IL-6의 분비량과 비교하였을 때 NC와 비슷한 수준으로 면역 증강 효능은 없음을 확인하였다 (Fig. 2. A, B). 한편, LPS와 함께 처리한 비타민 K1, K2 사이토카인 수준을 분석한 결과, 세포 내 IL-6, MCP-1 수준은 LPS 단독처리군과 비슷한 수준을 나타냄으로써 염증 억제능이 관찰되지 않았다. 한편 TNF- α 수준은 LPS 처리군(4231.4 pg/mL) 대비 비타민 K1(100 μ g/ml) 처리군은 3397.5 pg/mL (80.3%), 비타민 K2(100 μ g/ml) 처리군은 3186.8 pg/mL (75.3%)로 감소하였다 (Fig 2. C, D, E). 이것으로 비타민 K1, K2가 TNF- α 의 발현에 관여함으로써 염증 반응을 억제할 수 있음을 시사한다.

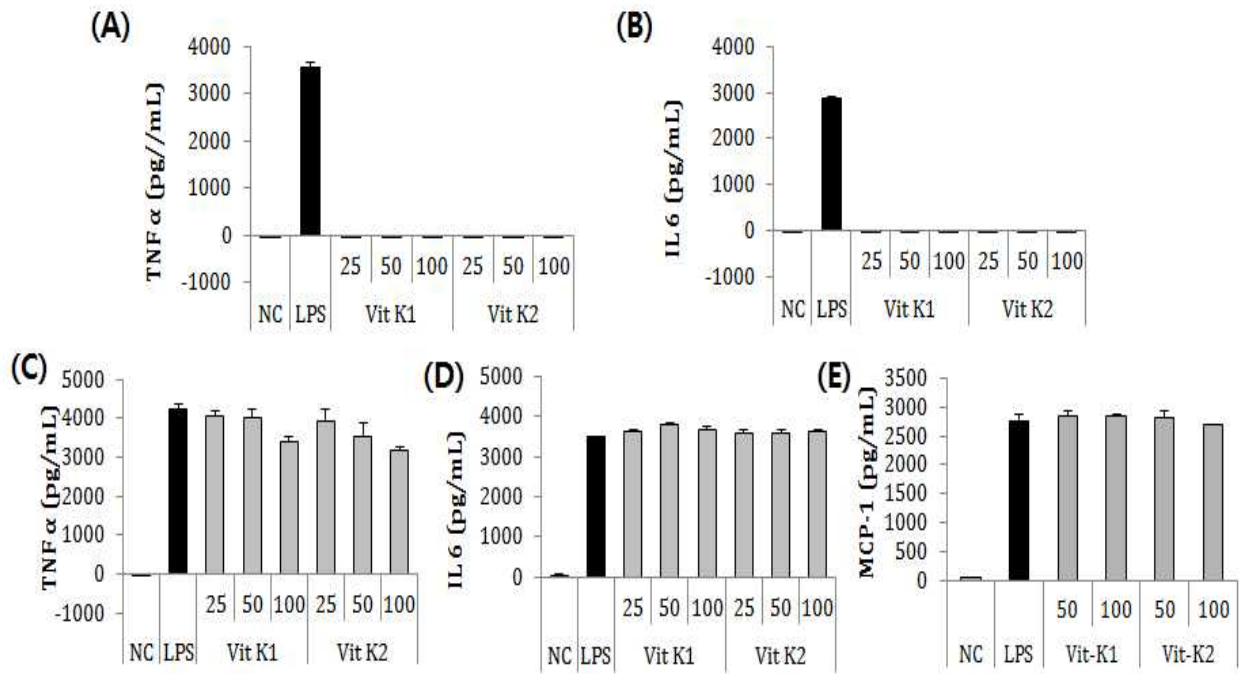


Fig. 2 Effect of vitamin K1 and K2 on cytokine production in LPS-stimulated RAW 264.7 macrophages.

- (A) and (B): Raw 264.7 cells were treated with treated with various concentrations of the vitamin K1, K2 and LPS for 24 h.
- (C), (D) and (E): Raw 264.7 cells were pretreated with vitamin K1, K2 for 1h, and treated with LPS for 24h.
- The secretion levels of TNF α , IL-6, and MCP-1 were measured by ELISA.

(1-3) Western blot을 통한 iNOS 및 COX-2 단백질 발현 억제 효과 측정

염증 반응에서 비타민 K1, K2가 NO생성에 관여하는 iNOS 단백질의 발현에 미치는 영향을 조사하기 위해 western blot을 실시한 결과, iNOS의 발현량은 LPS처리군 대비 비타민 K1, K2에 의해 농도 의존적 감소하였고, 특히 비타민 K2는 LPS 처리군 대비 iNOS 발현량을 절반 이하로 감소시켰다. 또한 LPS로 유도된 COX-2의 발현량은 비타민 K1, K2가 비슷한 수준으로 40% 가량 감소시켰다 (Fig. 3).

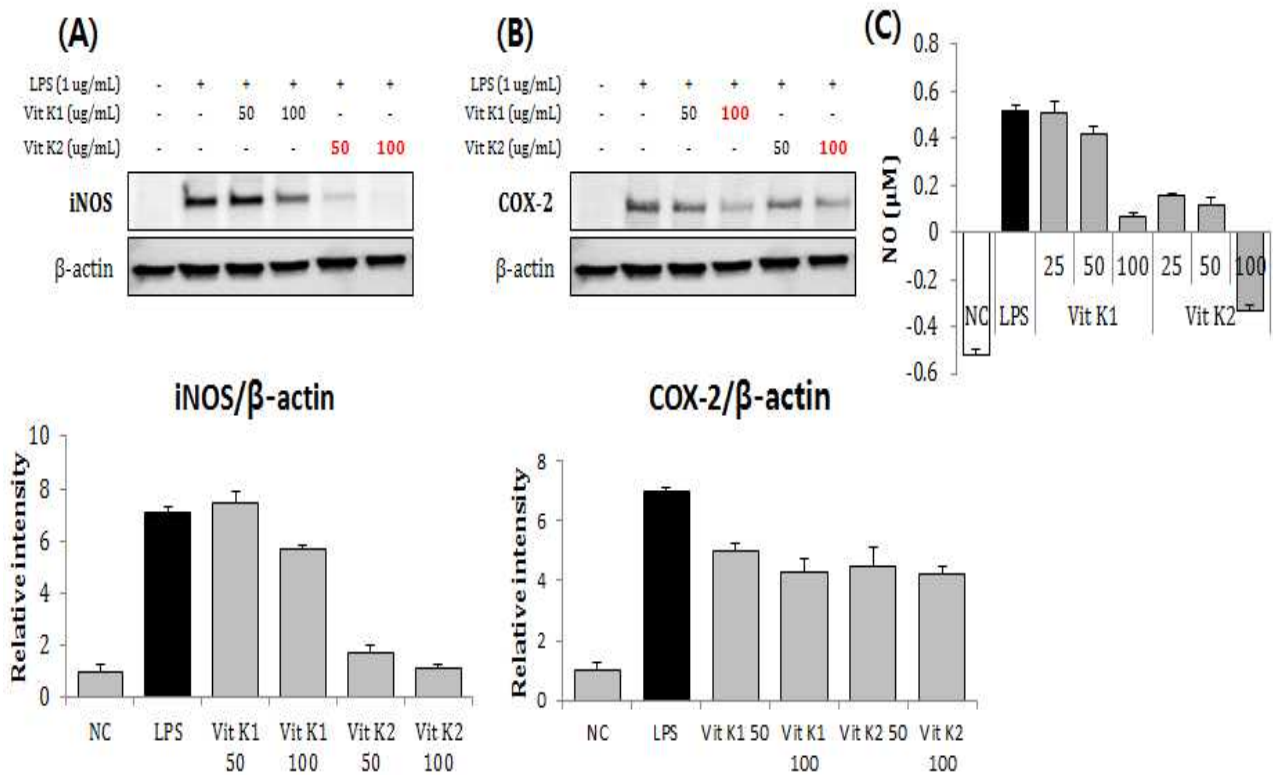


Fig. 3. Effects of vitamin K1 and K2 on the mRNA and protein expression levels of iNOS and COX-2 in LPS-stimulated RAW264.7 cells.

- Cells were pre-treated with vitamin K1 and K2 (50, 100 ug/mL), and treated with LPS (1 ug/mL) for 24 h.
- Total proteins were isolated and analyzed by Western blot.

(2) 야채(양배추, 브로콜리, 시금치)발효물의 항염효능 평가

(2-1) 세포독성

Raw 264.7 세포에서 양배추, 브로콜리, 시금치 및 그 발효물을 200, 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 농도로 시간 처리 후 미처리군(NC)을 제외한 모든 그룹에 LPS (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$)을 처리 후 24시간 동안 배양한 후 CCK-8 assay를 이용하여 세포 독성을 확인하였다. Fig. 4에서 보는 것과 같이, 양배추, 브로콜리, 시금치 및 그 발효물의 세포독성은 모든 농도에서 NC와 비교할 경우 세포독성이 나타나지 않음을 확인하였고 LPS처리군 및 시료처리군은 LPS 처리로 인한세포증식 효능을 보였다.

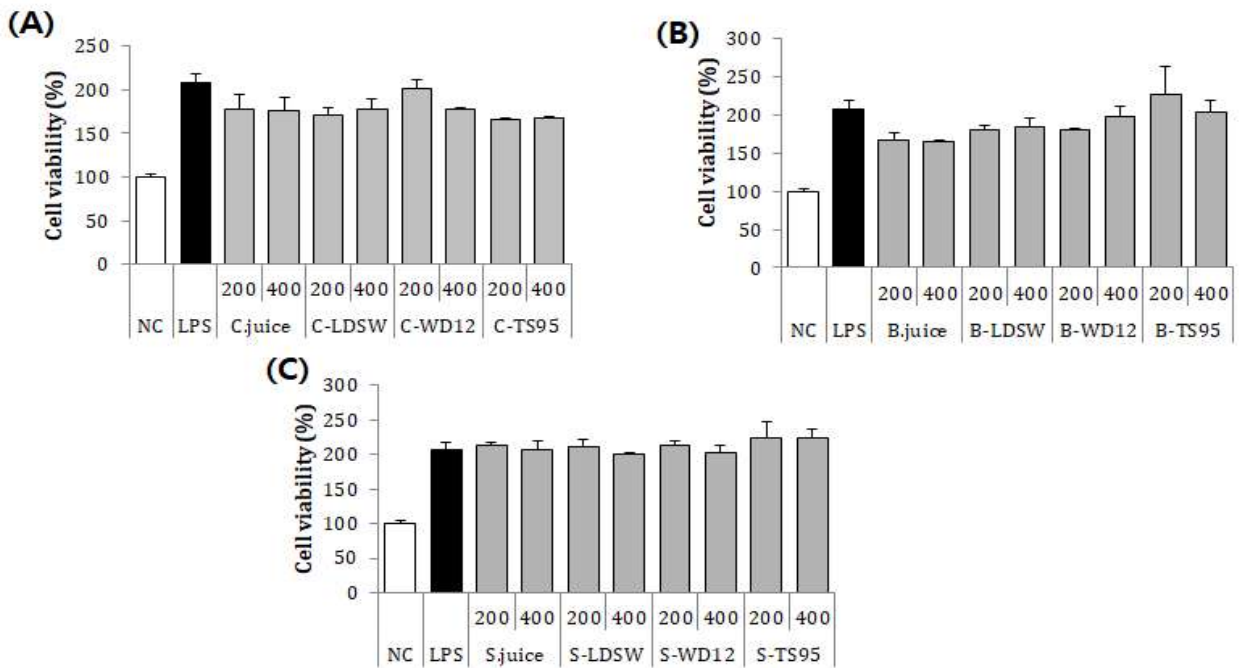


Fig. 4. Effects of juice and fermented cabbage, broccoli, and spinach on Raw 264.7 cells.

•The cell viability of Raw 264.7 cells treated with and fermented juices for 24 h was determined by CCK-8 assay.

(2-2) 염증성 Cytokine 발현 억제 효능

양배추, 브로콜리, 시금치 및 그 발효물의 처리에 따른 Raw 264.7 세포의 염증성 사이토카인 TNF- α 와 IL-6 분비량을 조사하기 위하여 상등액으로 ELISA assay를 분석하였다. 본 실험에서는 LPS 및 시료들의 처리를 통해 유도된 RAW 264.7 세포로부터 분비된 각 사이토카인의 양을 측정 한 결과, 양배추 착즙액 및 발효물 처리군들이 LPS 처리군에 비해 TNF- α , IL-6의 발현을 억제하지 못함을 확인하였다 (Fig. 5. A, B). 브로콜리 발효물 처리군 중 LDSW처리군이 고농도(400 μ g/mL)에서 LPS 및 착즙액 처리군에 비해 TNF- α 억제 효능이 있었다 (Fig. 5. C, D). 시금치 발효물 처리군과 대조군인 LPS (1 μ g/ml)군의 TNF- α , IL-6의 분비량과 비교하였을 때 LDSW와 WD12처리군이 LPS처리군 대비 두 사이토카인 모두 억제하는 효능이 보였고, 착즙액 처리군과 비교했을 때도 억제효능이 더 큼을 확인할 수 있었다 (Fig. 5. E, F).

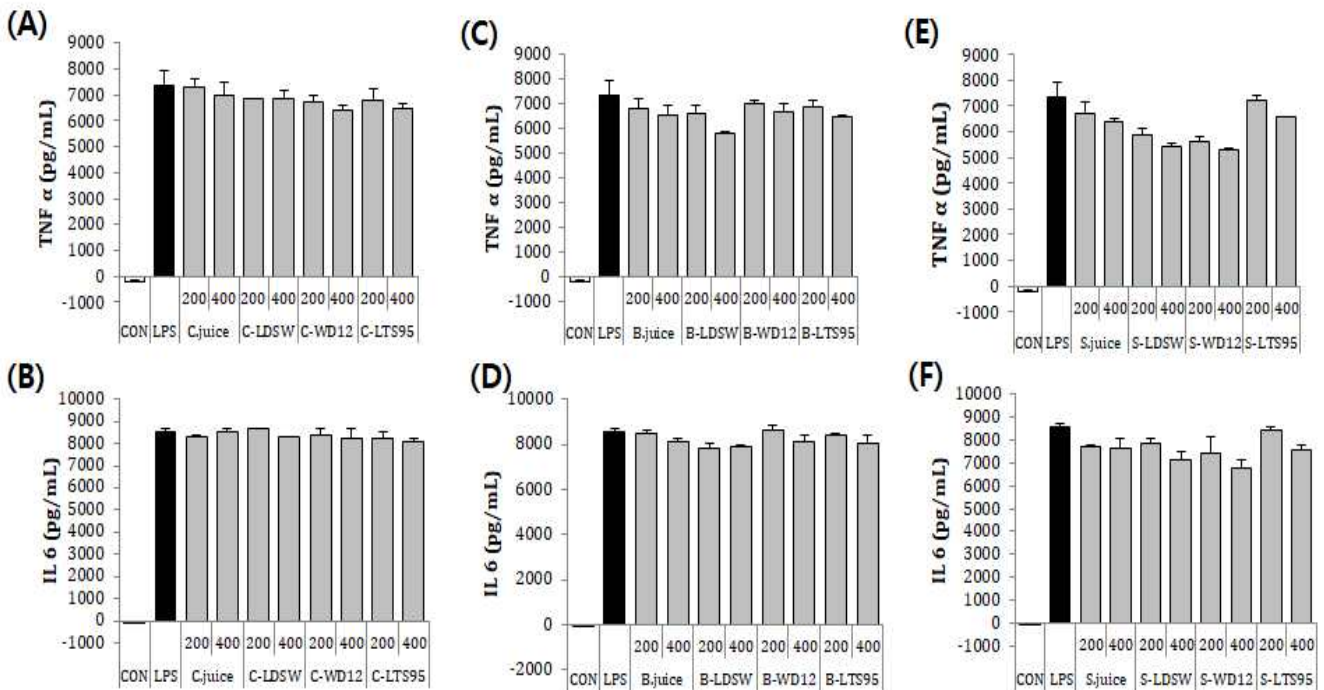


Fig. 5. Effect of (A), (B) fermented cabbage, (C), (D) fermented broccoli, and (E), (F) fermented spinach by *Lactobacillus plantarum*(Lp), *W. parameseneroides*(Wp), and *Lactococcus lactis*(LI) on cytokine production in LPS-stimulated RAW 264.7 macrophages.

- Cells were pre-treated with fermented cabbage or soinach (200, 400 μ g/mL) for 1 h, and treated with LPS (1 μ g/mL) for 24 h.

- The secretion levels of TNF- α and IL-6 were measured by ELISA.

(2-3) Western blot을 통한 iNOS 및 COX-2 단백질 발현 및 NO 생성 억제 효능 측정

염증 반응에서 양배추 착즙액 및 발효물이 NO 생성에 관여하는 iNOS 단백질의 발현에 미치는 영향을 조사하기 위해 western blot을 실시한 결과(Fig 6), (A)에서 iNOS의 발현량은 LPS처리군 대비 양배추 착즙액(C.Juice)에서 농도 의존적으로 감소하는 경향을 보였고, 양배추 발효물 중에서는 LTS95 처리군이 LPS 처리군 대비 저농도(200 µg/mL), 고농도 처리군(400 µg/mL)에서 iNOS 발현을 억제하는 효과가 있었다. (B)에서는 LTS95처리군이 LPS처리군 및 착즙액 처리군에 비해 COX-2의 발현을 억제하는 효과를 나타내었다. (C)에서 발현된 NO 생성은 CON제외 착즙액 및 발효물 처리군에서 LPS처리군보다 감소하는 경향을 나타내었다.

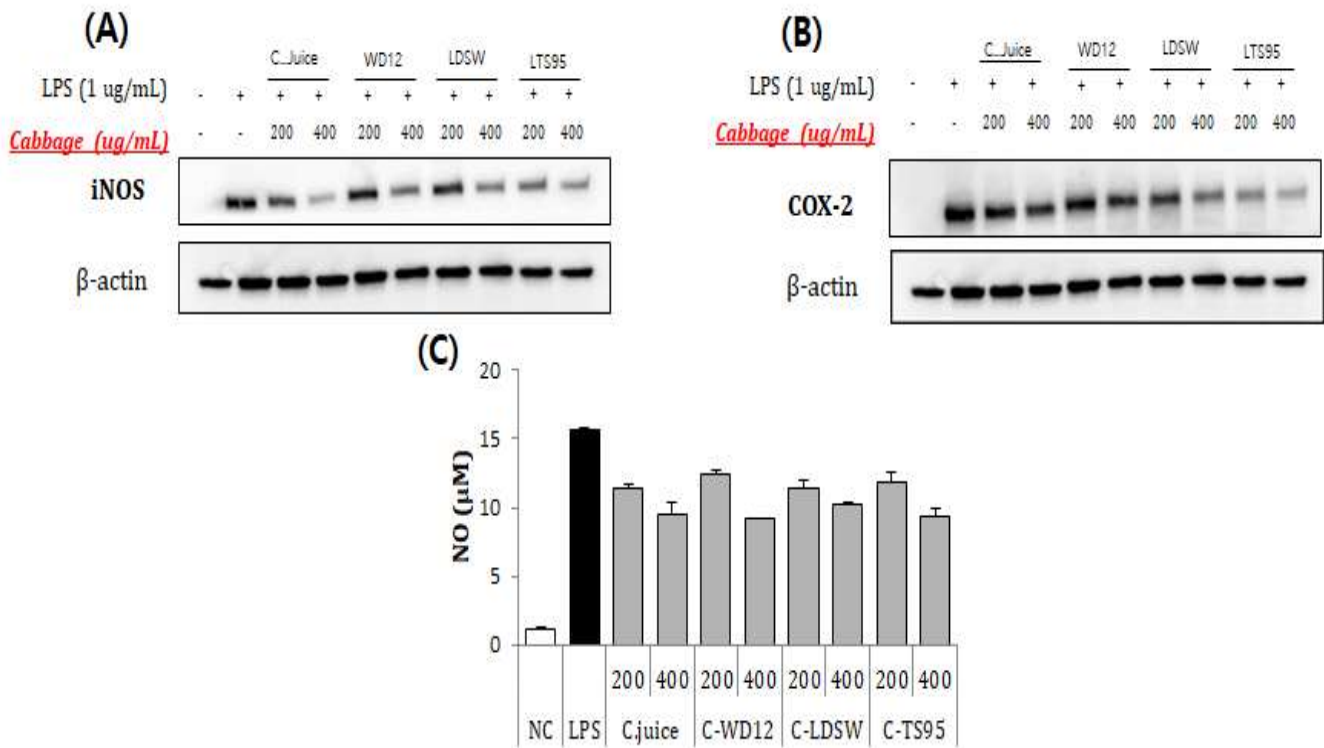


Fig. 6. Effects of fermented cabbage by *Lactobacillus plantarum*(Lp), *W. parameseneroides*(Wp), and *Lactococcus lactis*(LI) on the protein expression levels of (A) iNOS, (B) COX-2, and (C) NO in LPS-stimulated RAW264.7 cells.

- Cells were pre-treated with fermented cabbage (200, 400 µg/mL) and LPS (1 µg/mL) for 24 h.
- Total proteins were isolated and analyzed by Western blot, Supernatant was analyzed by NO assay.

브로콜리 착즙액 및 발효물이 NO 생성에 관여하는 iNOS 단백질의 발현에 미치는 영향을 조사하기 위해 western blot을 실시한 결과(Fig 7), (A)에서 iNOS의 발현량은 LPS처리군 대비 브로콜리 착즙액(B.Juice) 고농도 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서 눈에 띄게 감소하는 경향을 보였고, LTS95 처리군은 저농도 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서도 LPS 처리군 대비 유의적인 차이를 나타내었다. (B)에서 브로콜리 발효물 중에서는 LDSW 고농도 처리군(400 $\mu\text{g}/\text{mL}$)과 LTS95 처리군 (200,400 $\mu\text{g}/\text{mL}$)이 LPS 처리군과 착즙액 처리군 대비 COX-2 발현을 억제하는 효과가 있음을 확인하였다. (C)에서 발현된 NO 생성은 착즙액 및 발효물 처리군에서 LPS처리군보다 감소하는 경향을 나타내었다.

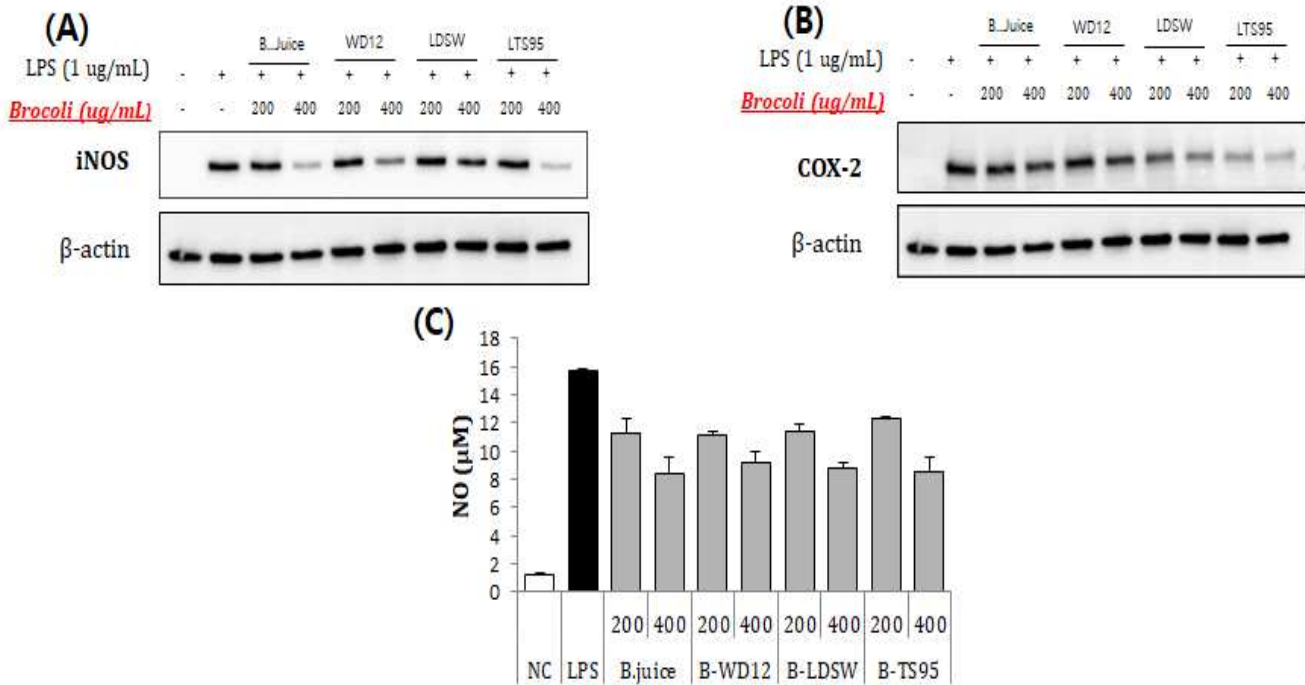


Fig. 7. Effects of fermented broccoli by *Lactobacillus plantarum*(Lp), *W. parameseneroides*(Wp), and *Lactococcus lactis*(Ll) on the protein expression levels of (A) iNOS, (B) COX-2, and (C) NO in LPS-stimulated RAW264.7 cells.

- Cells were pre-treated with fermented spinach (200, 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$) and LPS (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) for 24 h.
- Total proteins were isolated and analyzed by Western blot, Supernatant was analyzed by NO assay.

시금치 착즙액 및 발효물이 NO 생성에 관여하는 iNOS 단백질의 발현에 미치는 영향을 조사하기 위해 western blot을 실시한 결과(Fig 8), (A)에서 iNOS의 발현량은 LPS처리군 대비 시금치 착즙액(S.Juice)과 발효물 처리군에서 모두 유의하게 감소하는 경향을 보였고, (B)에서 COX-2의 발현량은 LTS95 처리군이 LPS 처리군 대비 농도 의존적으로 감소하는 경향을 나타내었다. (C)에서 발현된 NO 생성은 시금치 착즙액 및 발효물 처리군에서 LPS처리군보다 감소하는 경향을 나타내었고, 발효물 모두 착즙액보다 NO 생성 억제 효능이 더 큼을 확인할 수 있었다. 전반적으로, TS95로 발효한 발효물에서 염증 효능이 우수함을 확인할 수 있었다.

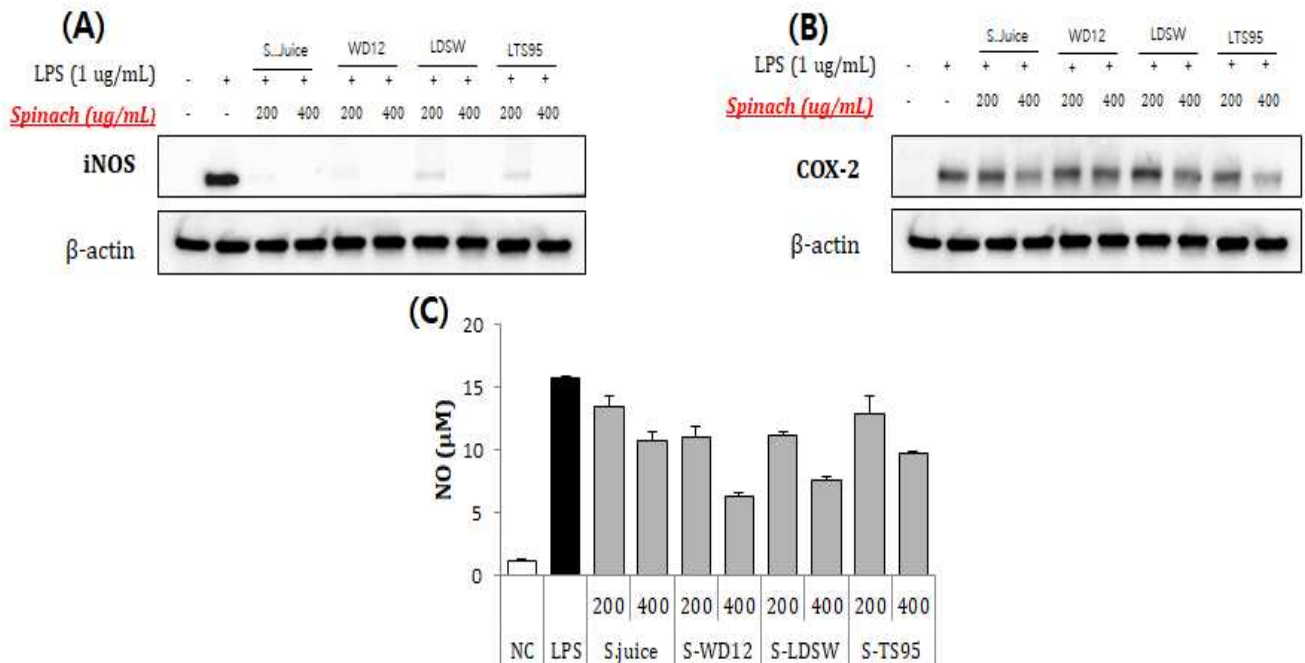


Fig. 8. Effects of fermented spinach by *Lactobacillus plantarum*(Lp), *W. parameseneroides*(Wp), and *Lactococcus lactis*(Ll) on the protein expression levels of (A) iNOS, (B) COX-2, and (C) NO in LPS-stimulated RAW264.7 cells.

- Cells were pre-treated with fermented spinach (200, 400 µg/mL) and LPS (1 µg/mL) for 24 h.
- Total proteins were isolated and analyzed by Western blot, Supernatant was analyzed by NO assay.

(3) 야채(양배추, 브로콜리, 시금치)혼합 발효물의 항염효능 평가

RAW 264.7 세포에 앞에서 스크리닝한 혼합배양균(*Weissella paramesenteroides*(D12)+*Lactobacillus plantarum*(DSW)+*Lactococcus lactis*(TS95), 1:1:1)으로 혼합배양하고 배양액을 양배추, 시금치, 브로콜리의 혼합착즙액으로 각각 5:4:1과 6:3:1의 비율로 조건을 나눠서 배양한 후 CCK-8 assay를 이용하여 세포 독성을 확인하였다. Fig. 9에서 보는 것과 같이, 혼합착즙액으로 각각 5:4:1과 6:3:1의 발효물에서 세포독성은 모든 농도에서 CON과 비교할 경우 세포 독성이 나타나지 않았다.

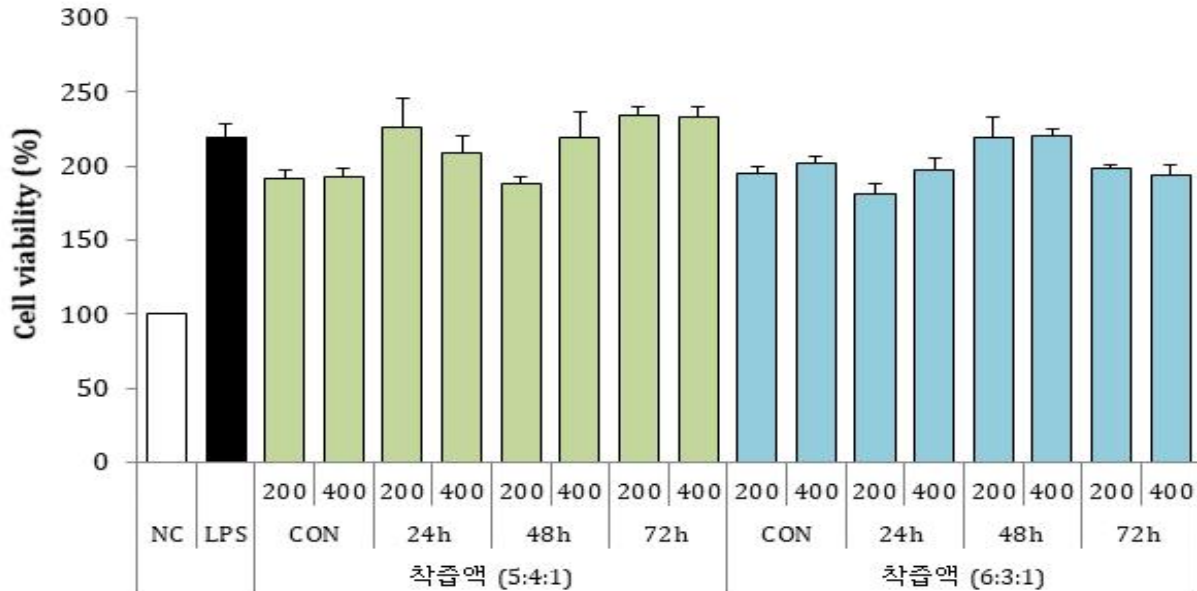


Fig. 9. Effects of mixed fermentation by *Lactobacillus plantarum*(Lp), *W. parameseneroides*(Wp), and *Lactococcus lactis*(Ll) in LPS-stimulated RAW264.7 cells.

- Cells were pre-treated with mixed fermented juice (200, 400 µg/mL) and LPS (1 µg/mL) for 24 h.
- The data shown are means ± SEM (n = 6).

Raw 264.7에서 야채혼합 발효물 (양배추:시금치:브로콜리=5:4:1과 6:3:1)에서 NO 생성에 관여하는 iNOS 단백질의 발현에 미치는 영향을 조사하기 위해 western blot을 실시한 결과(Fig 10), (A)에서 iNOS의 발현량은 LPS처리군 대비 야채혼합 착즙액 (양배추:시금치:브로콜리=5:4:1보다 야채혼합 발효물(5:4:1)에서 눈에 띄게 감소하는 경향을 보였다. Fig 11의 (B)에서 COX-2의 발현량은 야채혼합 발효물(5:4:1) 처리군이 LPS 처리군 대비 농도 의존적으로 감소하는 경향을 나타내었다. 결과적으로, 24시간 야채혼합 발효물 (양배추:시금치:브로콜리=5:4:1)이 야채 혼합착즙액보다 더 염증 억제 효능이 큼을 확인하였다.

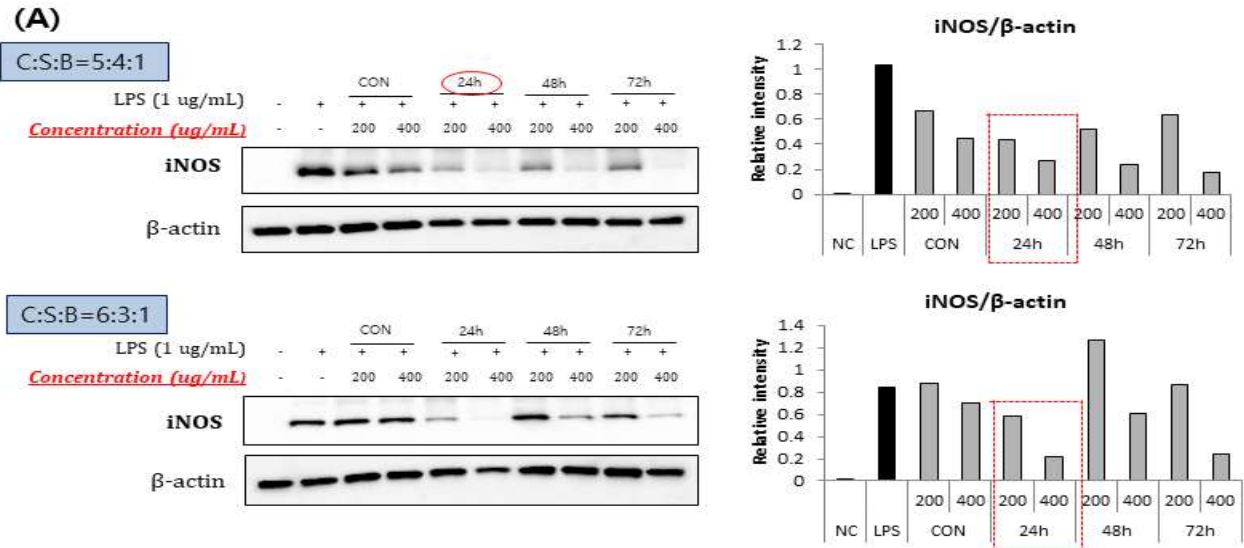


Fig. 10. Effects of mixed fermentation by *Lactobacillus plantarum*(Lp), *W. parameseneroides*(Wp), and *Lactococcus lactis*(LI) on the protein expression levels of iNOS in LPS-stimulated RAW264.7 cells.

- Cells were pre-treated with mixed fermented juice (200, 400 μ g/mL) and LPS (1 μ g/mL) for 24 h.
- Total proteins were isolated and analyzed by Western blot.

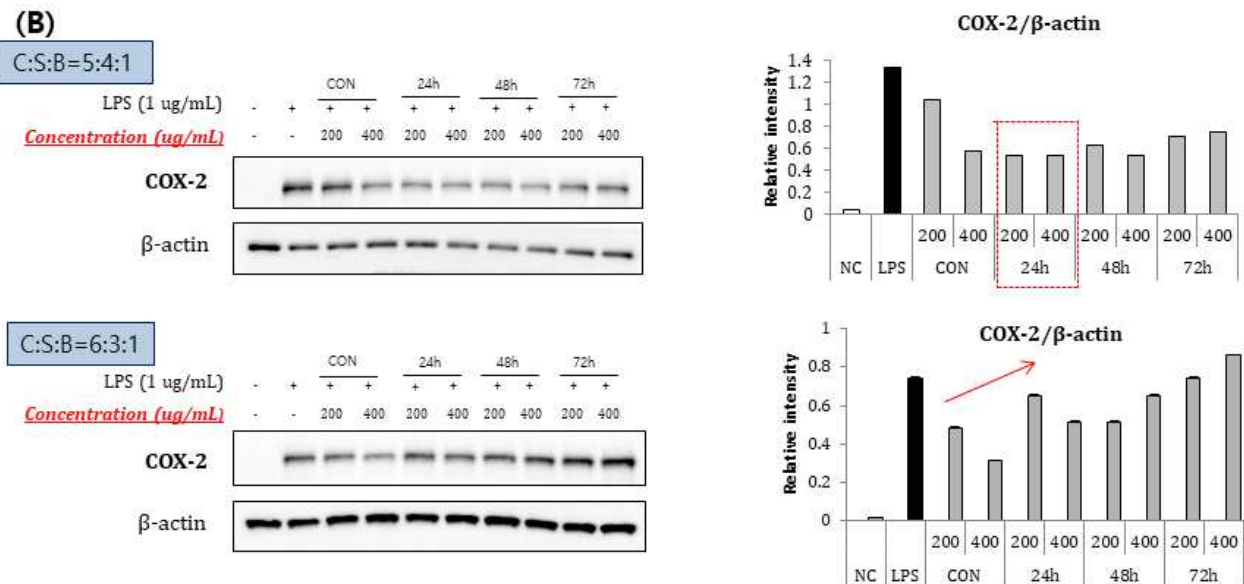


Fig. 11. Effects of mixed fermentation by *Lactobacillus plantarum*(Lp), *W. parameseneroides*(Wp), and *Lactococcus lactis*(LI) on the protein expression levels of COX in LPS-stimulated RAW264.7 cells.

- Cells were pre-treated with mixed fermented juice (200, 400 μ g/mL) and LPS (1 μ g/mL) for 24 h.
- Total proteins were isolated and analyzed by Western blot.

Raw 264.7에서 야채혼합 발효물 (양배추:시금치:브로콜리=5:4:1과 6:3:1)에서 염증성 사이토카인인 TNF- α 와 IL-6 분비량을 조사하기 위하여 상등액으로 ELISA assay로 분석하였다. 그 결과, Fig. 12의 (A), (B)에서는 야채혼합 착즙액(6:3:1) 및 야채혼합 발효물 (6:3:1) 처리군들이 LPS처리군에 비해 TNF- α , IL-6의 발현을 억제하지 못하였지만, 야채혼합 착즙액(5:4:1)과 이의 혼합 발효물(5:4:1)에서는 발현을 억제함을 관찰하였다. (C)에서 발현된 NO 생성은 야채발효 착즙액 및 그 발효물 처리군에서 LPS처리군보다 농도의존적으로 감소하는 경향을 나타냄을 확인하였다. 결과적으로, 야채혼합 발효물 (양배추:시금치:브로콜리=5:4:1)에서 염증 억제 효능이 더 큼을 확인하였으며, 그 중에서도 24시간 발효물이 최적의 배양조건임을 확인하였다.

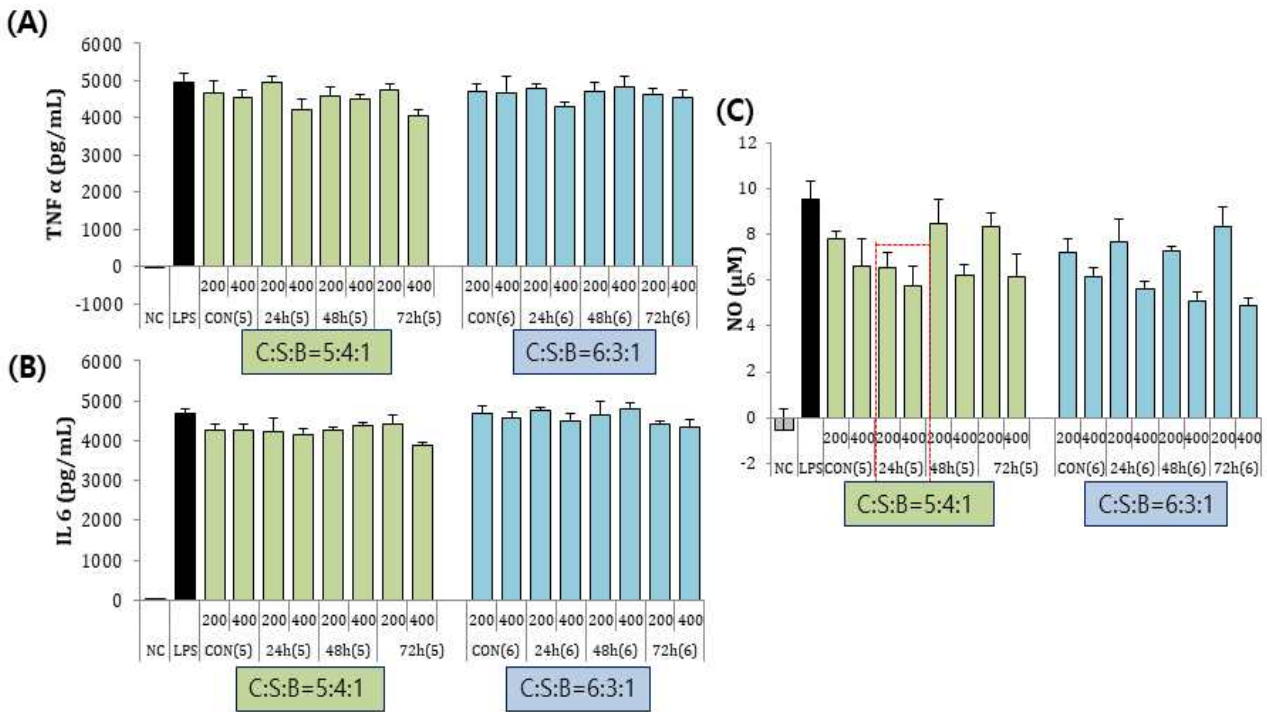


Fig. 12. Effect of mixed fermentation by *Lactobacillus plantarum*(Lp), *W. parameseneroides* (Wp), and *Lactococcus lactis*(LI) on cytokine and NO production in LPS-stimulated RAW 264.7 cells.

- Cells were pre-treated with mixed fermentation (200, 400 ug/mL) for 1h, then LPS (1 μ g/mL) for 24 h.
- The secretion levels of TNF α and IL-6 were measured by ELISA.

2) 비타민 K2 성분 강화 소재의 대사성 질환 개선 효능평가

2-1) HUVECs 세포기반 야채착즙액 및 야채발효물의 혈관 염증 억제 효능 검증

(1) LPS 농도 조건 설정

이상지질혈증으로 인해 동맥경화를 유발하는 세포부착 인자[vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1), intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1)는 위험인자로 보고된 바 있으므로, 본 연구에서는 LPS로 혈관염증반응을 유도시키기 위한 LPS의 처리농도 조건을 설정하기 위해 LPS를 CON 제외 각각 1 µg/mL, 10 µg/mL로 처리한 뒤 18시간동안 배양하였다. HUVEC 세포에서 LPS로 유도된 VCAM-1 및 ICAM-1의 발현량은 처리한 LPS의 농도에 의존적으로 증가하였고, 앞으로 처리할 LPS의 처리농도를 10 µg/mL로 설정한 뒤 본 실험을 진행하였다.

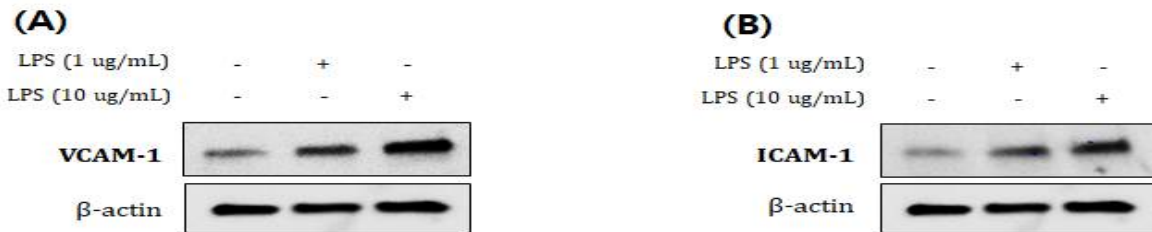


Fig. 13. Protein expression levels of (A) VCAM-1 and (B) ICAM-1 in LPS-stimulated HUVEC cells.

- Cells were treated with LPS (1 µg/mL, 10 µg/mL) for 18 h.
- Total proteins were isolated and analyzed by Western blot.

(2) 비타민 K1, K2 표준품에서의 혈관염증억제 효능 확인

Raw 264.7에서 비타민 K1, K2의 항염효능을 확인한 뒤, HUVEC에서 혈관염증억제 효능을 검증하기 위해 LPS로 유도된 염증성 사이토카인 IL-6, MCP-1 분비량(Fig 14. A, B)을 평가하기 위하여 ELISA assay로 분석하였다. 결과로는 IL-6, MCP-1 모두 CON 대비 발현이 증가하였고, 비타민 K1, K2 처리군 모두 LPS처리군에 비해 농도 의존적으로 감소하는 경향을 나타내었으며 억제 효능은 K2가 K1보다 큼을 확인하였다. LPS로 염증반응을 유도한 혈관내피세포에서 세포부착단백질 ICAM-1, VCAM-1의 발현을 Western blot으로 확인한 결과, 비타민 K1, K2처리군이 LPS처리군 대비 유의적으로 감소되었다.

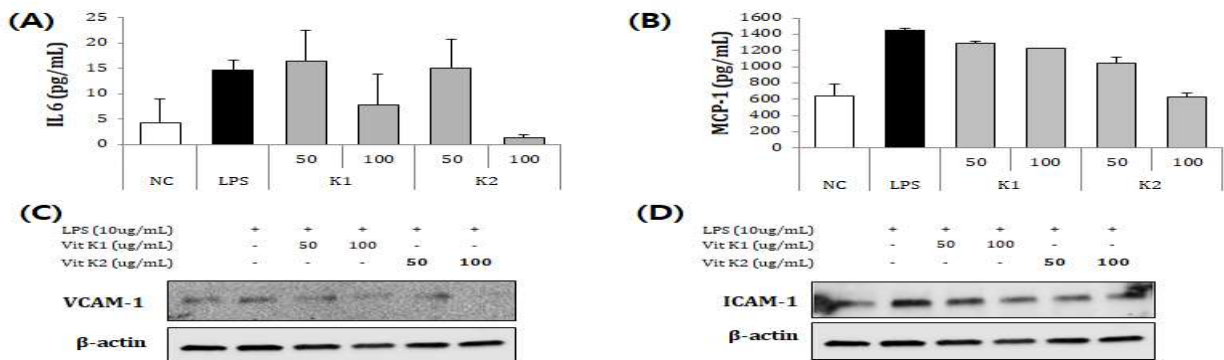


Fig. 14. Effect of vitamin K1, K2 on (A), (B) cytokine production and (C) VCAM-1, (D) ICAM-1 in LPS-stimulated HUVEC cells.

- HUVEC cells were pretreated with vitamin K1, K2 for 1h, then LPS(10 µg/mL) for 18 h.
- (A) and (B): The secretion levels of IL-6 and MCP-1 were measured by ELISA
- (C) and (D): Total proteins were isolated and analyzed by Western blot.

(3) 도출된 야채발효물(LTS95)의 혈관염증억제 효능

Raw 264.7에서 항염 효능이 높았던 *Lactococcus lactis* 발효물(LTS95)이 HUVEC에서의 혈관염증 억제 효능 유무를 검증하기 위해 LPS로 염증반응을 유도한 혈관내피세포에서 세포부착단백질 ICAM-1, VCAM-1의 발현을 Western blot으로 확인하였다. LPS로 유도된 VCAM-1, ICAM-1을 양배추 착즙액 및 발효물(LTS95)이 유의적으로 감소시켰고(Fig 15. A,B), 브로콜리 착즙액 및 발효물에서도 같은 경향을 나타내었다 (Fig 15. C,D). 시금치 소재의 결과로 보면, 착즙액 및 발효물 처리군에서 모두 LPS 대비 감소되었고, 발효물이 착즙액보다 혈관염증억제효능이 더 큼을 확인하였다 (Fig 15. E, F).

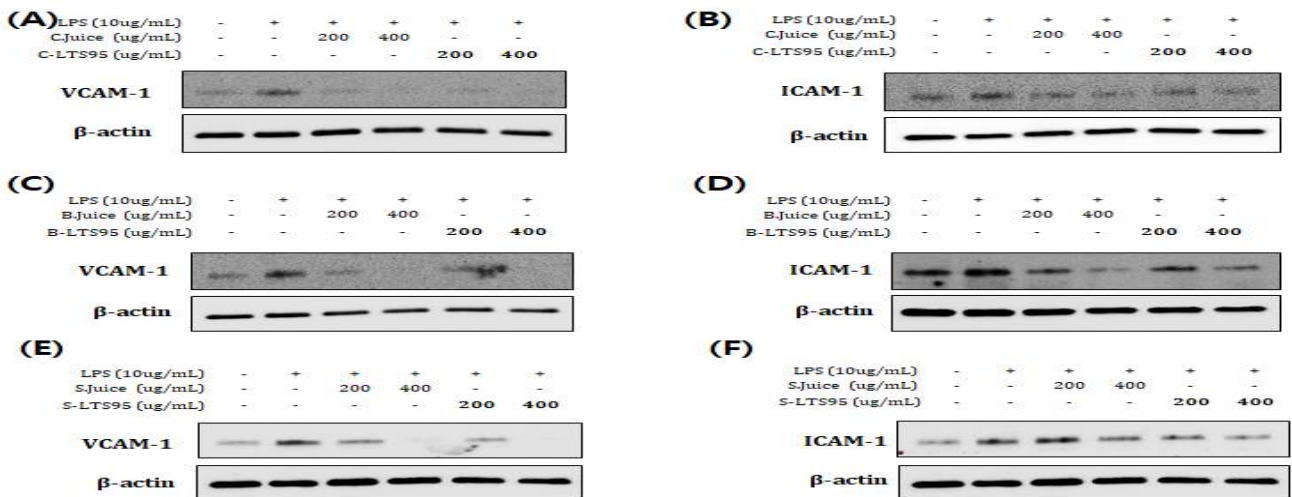


Fig. 15. Effect of (A), (B) fermented cabbage, (C), (D) fermented broccoli and (E), (F) fermented spinach by *Lactococcus lactis*(LTS95) on the protein expression levels of ICAM-1 and VCAM-1 in LPS-stimulated HUVEC cells.

- HUVEC cells were pretreated with fermented juice (200, 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$) for 1h, then LPS(10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) for 18 h.
- Total proteins were isolated and analyzed by Western blot.

소재별(양배추, 브로콜리, 시금치) 착즙액 대비 발효물(TS95)의 효능을 확인하기 위해 LPS로 유도된 염증성 사이토카인 IL-6, MCP-1 분비량을 ELISA assay로 분석하였다. 그 결과, LPS처리군 대비 야채착즙액 및 발효물 처리군에서 IL-6, MCP-1 분비량이 모두 유의적으로 감소됨을 확인하였고, 그 중 시금치 발효물(TS95)이 다른 소재의 발효물보다 고농도(400 $\mu\text{g}/\text{mL}$)처리군에서 혈관염증억제효능이 큼을 확인하였다 (Fig 16. A, B).

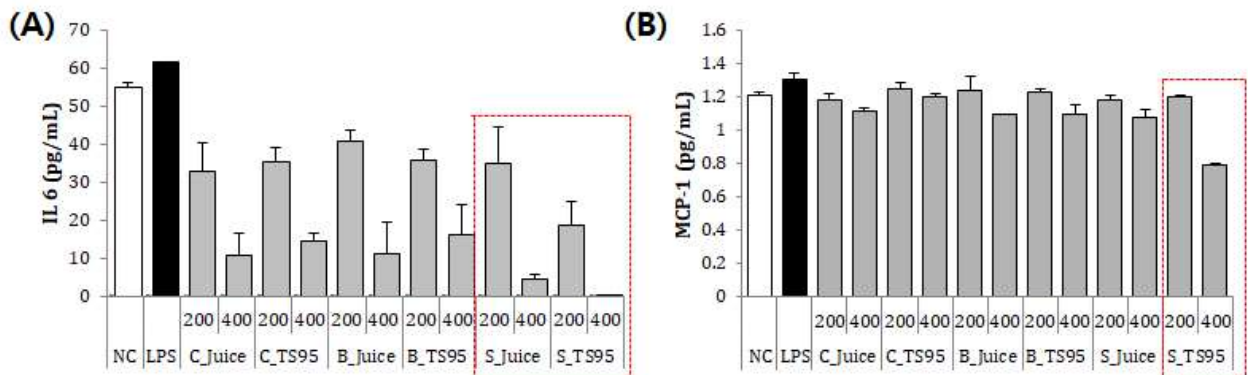


Fig. 16. Effect of fermented juice by *Lactococcus lactis*(TS95) on cytokine expression in LPS-stimulated HUVEC cells.

- HUVEC cells were pretreated with fermented juice (200, 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$) for 1h, then LPS(10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) for 18 h.
- (A) and (B): The secretion levels of IL-6 and MCP-1 were measured by ELISA.

(4) 선정된 시금치 발효물(TS95)의 항염증 기전(NF-κB) 확인

NF-κB는 염증 및 자가 면역 반응을 조절함에 있어 중요한 역할을 하는 전사인자로 알려져 있으며, 염증성 자극에 의해 활성화되어 염증발현을 유도하는 유전자의 발현을 촉진시켜 염증반응을 일으킨다. 본 실험에서는 시금치 추출물 및 시금치 발효물(TS95)이 LPS로 유도된 혈관내피세포에서의 염증 반응을 억제하는데 있어 NF-κB와의 관련성을 알아보기 위하여 분석한 결과는, LPS 처리로 NF-κB의 구성인자인 p65의 인산화가 된 것으로 보아 혈관염증을 유도시켰고, 시금치 착즙액(S.juice) 처리군은 LPS로 유도된 P65의 인산화가 억제되지 않았고, 시금치 발효물(S-LTS95)을 처리하였을 때는 p65의 발현이 농도 의존적으로 감소하였다 (Fig 17.A). 또한 LPS를 처리한 군에서 IκBα의 degradation이 무처리군과 비교하여 뚜렷이 나타났으며, 시금치 착즙액과 시금치 발효물 (S-TS95)에서는 LPS 처리 군과 비교하여 IκBα의 degradation의 농도 의존적으로 발현을 감소하였다 (Fig 17.B). 결과적으로 시금치 발효물 (S-TS95)은 전사 인자인 NF-κB의 활성화를 감소시키고, downstream signaling molecule인 iNOS와 COX-2의 전사를 억제하며, NO의 생성을 감소시켜 항염증 효과를 나타냄을 유추할 수 있었다.

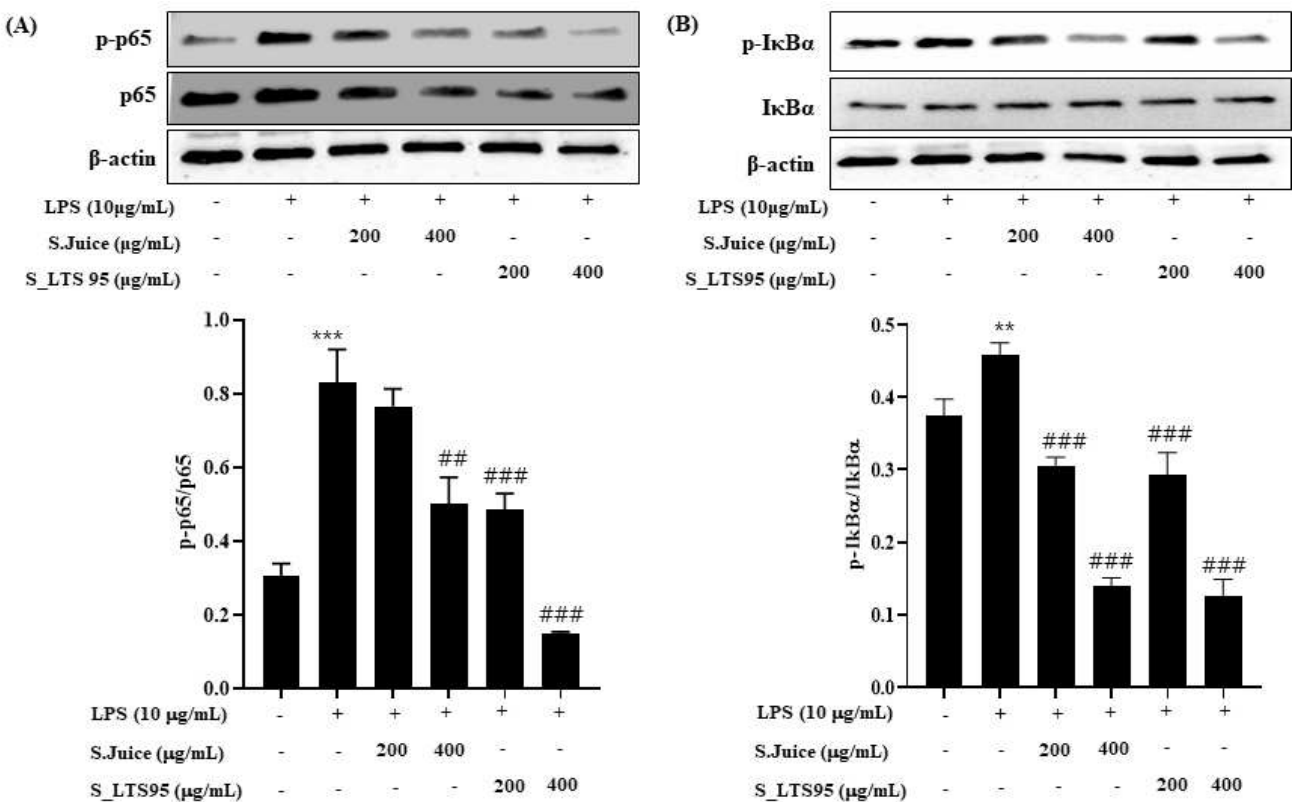


Fig. 17. Effect of spinach juice and SP_TS95 on NF-κB signaling. Spinach juice and fermented spinach juice inhibit LPS-induced activation of NF-κB (A) and degradation of inhibitor of NF-κB (IκB-a) (B).

•HUVEC cells were pretreated with fermented juice (200, 400 μg/mL) for 1h, then LPS(10 μg/mL) for 18 h.
 •**P* < 0.05 and ***P* < 0.01 vs. the control group. #*P* < 0.05 and ###*P* < 0.01 vs. the LPS-treated group.

3) 전임상실험을 위한 대사성질환모델 구축

3-1) 에스트로겐 결핍 mouse에서 시금치 발효물(TS95)의 효과

(1) 에스트로겐 결핍 마우스의 Phenotype 측정

폐경 전 에스트로겐은 골 대사, 지질 대사 및 혈관 보호 효과를 나타내는 반면, 폐경 후에는 혈중 콜레스테롤이 상승하고 지방조직의 증가는 내장 지방량을 증가시켜 복부비만으로 이어지며, 골다공증 및 심혈관계 질환의 발생률이 높아진다. 이에 대사성질환모델로 에스트로겐 결핍 갱년기 증후군을 유도하였다. 실험기간 동안 실험동물의 체중 변화량은 난소를 절제한 실험대조군(OVX)이 난소를 절제하지 않은 정상군(Sham)에 비해 체중이 증가하였다. 갱년기 동물모델에서 저농도 시금치 발효물(TS95)을 투여한 군의 체중이 실험대조군(OVX)보다 감소하였음을 볼 수 있었다. 그러나 저농도로 시금치 발효물(TS95)을 투여한 군의 체중은 통계적으로는 유의하지 않았다. 그 결과, body weight은 처음에는 비슷했으나 난소절제 한 OVX군에서 증가하는 경향을 관찰할 수 있었으며, 지방, 간 무게는 정상군에 비해 OVX군에서 유의하게 증가하는 것을 확인할 수 있었다. 또한, OVX군에 비해 저농도 시금치 발효물 투여군에서는 모두 유의성 있는 차이를 보였으나, 고농도 투여군에서의 간 무게를 제외하고는 유의성 있는 차이를 보이지 않았다 (Table 1).

Table 1. Effect of fermented spinach on body, fat, and liver weight

	SHAM	OVX	OVX+TS95_low	OVX+TS95_high
Initial body weight (g)	18.06±0.66	18.45±0.77	18.71±0.65	18.66±0.64
Final body weight (g)	21.23±1.35	27.21±2.17 ^{###}	23.78±0.83 ^{***}	24.93±1.47
Fat weight (g)	0.44±0.19	0.95±0.32 ^{###}	0.75±0.23 [*]	1.19±0.21
Liver weight (g)	0.92±0.07	1.07±0.10 [#]	0.93±0.07 [*]	0.92±0.05 [*]

(2) 에스트로겐 결핍 마우스의 혈중 지질 농도에 미치는 영향

폐경 후 여성들은 체성분에 변화로 인하여 심혈관질환 등의 유병률이 증가되는데, 심혈관질환은 나이가 증가함에 따라 난소기능 부전으로 인해 에스트로겐 분비저하로 인한 지질단백 구성의 변화와 동맥혈관벽의 변화, 혈관 수축력의 변화, 혈소판 응집력의 변화에 기인한다. 이를 통해 콜레스테롤(total-cholesterol; TC), 저밀도 지단백 콜레스테롤 (low density lipoprotein; LDL), 중성지방(triglyceride; TG) 농도가 상승하며, 고밀도 지단백 콜레스테롤 (high density lipoprotein; HDL) 농도는 변화가 없거나 감소하게 된다. 이에, serum 내 TC, TG, LDL 및 HDL을 측정한 결과, TC, TG와 LDL 분석결과는 정상군 대비 OVX군에서 유의적인 증가를 나타낸 반면 HDL-C는 정상군에 비해 OVX군에서 유의적인 차이를 나타내지는 않았다. 한편, TC와 LDL-C는 OVX군 대비 시금치 발효물(TS95) 투여군에서는 유의적인 감소를 보였으나, TG는 감소하는 경향을 나타내었다 (Fig.18).

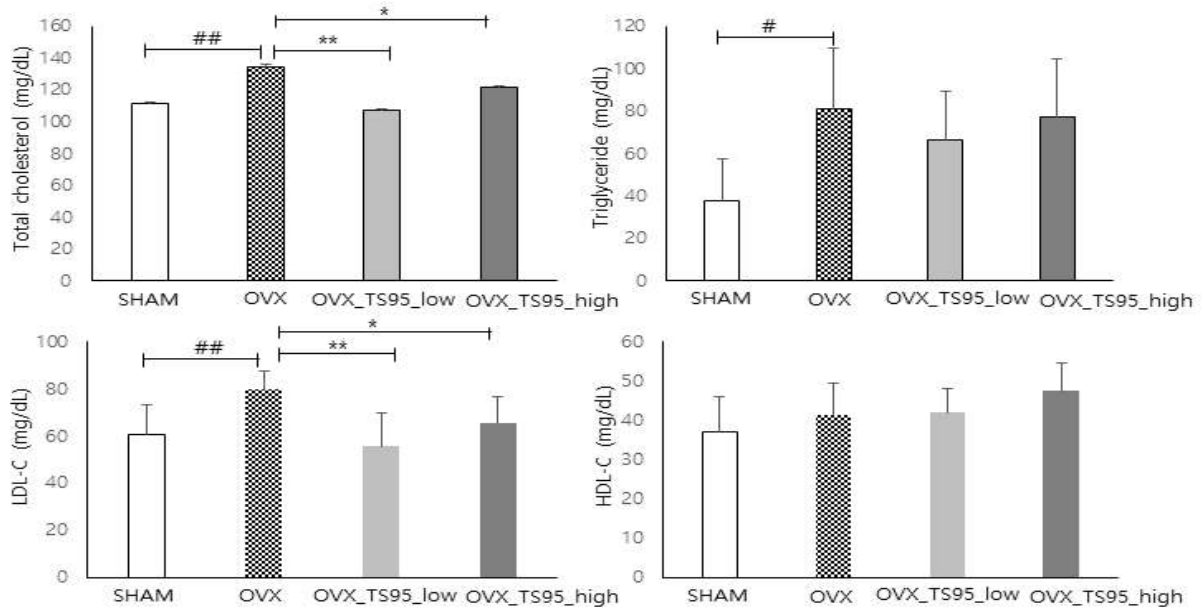


Fig. 18. Effects of SP_TS95 on serum lipids in ovariectomized mice (OVX).

(3) 에스트로겐 결핍 마우스의 체성분 변화

DEXA를 이용하여 체성분을 이미지로 관찰한 결과, 정상군 대비 난소 적출 한 OVX군에서 체지방이 현저히 증가하였으나, 시금치 발효물(TS95) 투여군에서는 OVX군 대비 현저히 감소하는 경향을 나타내었다 (Fig.19).

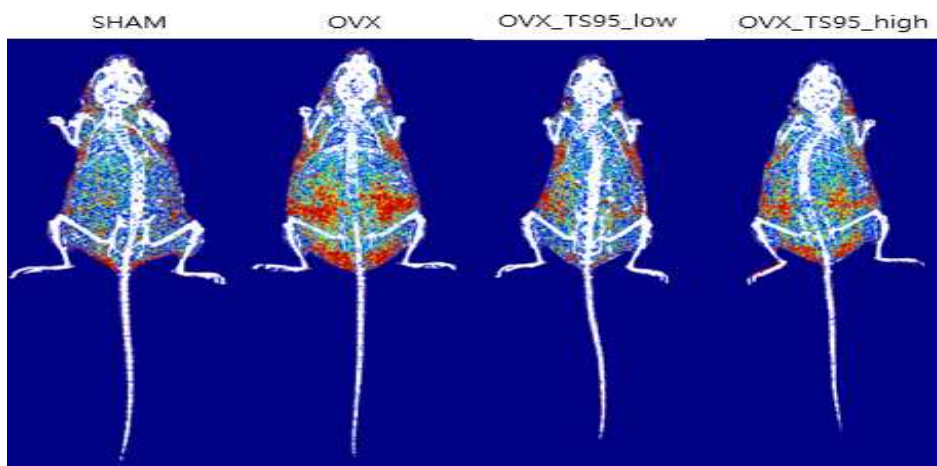


Fig. 19. Representative body composition images of ovariectomized mice (OVX).

•red: fat tissue, blue: lean tissue

4) 도출된 비타민 K2 성분 강화 소재의 골건강 질환 개선 효능평가

4-1) 세포기반 골건강 효능 검증

(1) 세포 생존율

파골세포는 조혈모세포로부터 유래된 전구세포인 단핵 및 대식 세포에서 분화되어 발생하는 다핵 세포로서 조골세포와 함께 뼈의 형성 및 흡수를 담당하므로 골격계 형성에 필수적인 세포이며, 실험에 사용된 Raw264.7 세포는 파골세포 전구체로 주로 사용 되고 있으며 RANKL의 자극에 의해 파골세포로 분화된다. 본 연구에서 소재 처리에 따른 Raw264.7 세포 생존율을 분석한 결과 비타민 K2 처리군은 모든 농도에서 세포독성이 나타나지 않음을 확인하였으나, 시금치 발효물인 (SP_TS95)을 처리 후 24시간이 경과한 시점에서 Raw264.7 세포 생존율은 25 µg/ml까지만 세포 독성이 나타나지 않는 것으로 조사되었다 (Fig. 20).

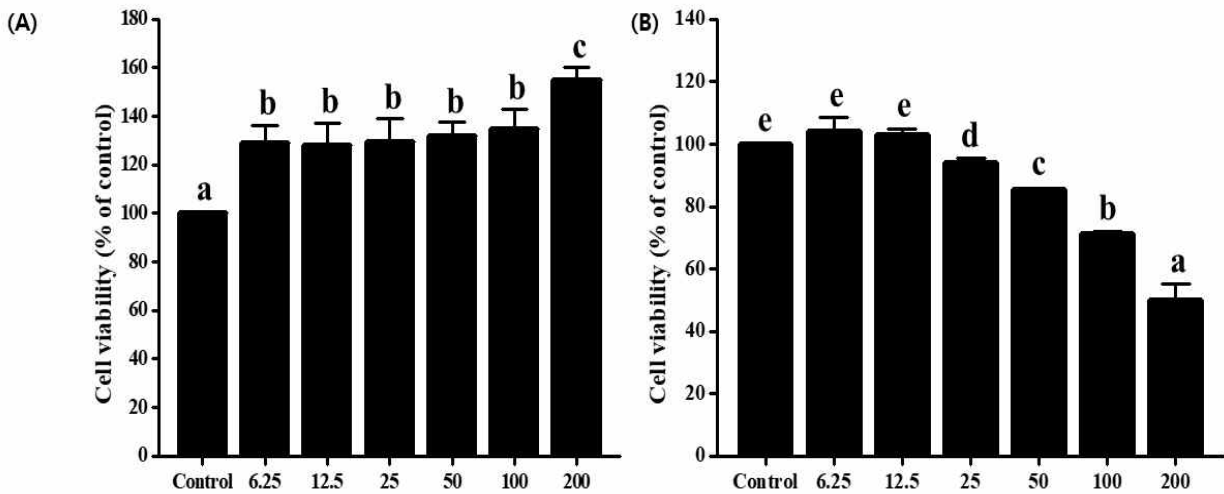


Fig. 20. Effect of vit K2 and SP_TS95 on the cell viability of Raw264.7.

(2) TRAP 발현에 미치는 영향

Tartrate-Resistant Acid Phosphate (TRAP)은 파골세포의 리소좀에 다량 분포하며 TRAP 활성은 골 조직에서 다핵세포를 인식하는 세포화학적 마커로 알려져 있다. RANKL 50 ng/ml로 파골세포의 분화를 유도한 결과, 비타민 K2 처리군, 시금치 발효물인(SP_TS95) 처리군은 농도 의존적으로 TRAP activity가 감소하였다 (Fig. 21).

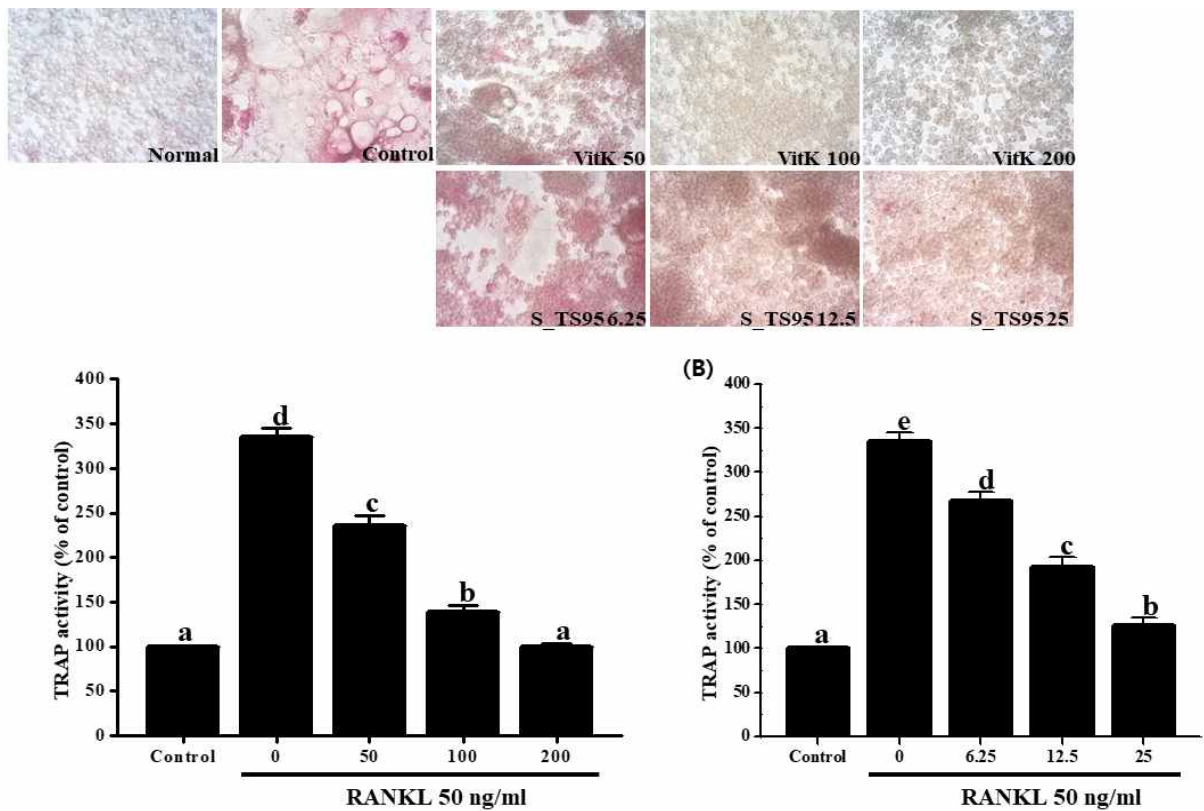


Fig. 21. Effect of vit K2 and SP_TS95 in RANKL stimulated osteocalst.

•Raw264.7 cells differentiated into osteocalst in the presence of RANKL (50 ng/ml) and SP_TS95 for 5 days. Then cells were fixed with 4% paraformaldehyde for 10 min and stained by TRAP.

(3) 파골세포 분화 관련 인자에 미치는 영향

c-Fos는 뼈 파괴세포 분화의 초기 단계에 작용하는 중요한 전사인자로 NFATc1의 발현을 촉진한다. 이에 파골세포의 중요한 전사인자인 NFATc1의 발현에 도출된 소재인 비타민 K2강화 시금치 발효물(TS95)이 미치는 영향을 관찰하였다. NFATc1 발현에 미치는 영향 실험 결과, 시금치 발효물(TS95) 모든 군에서 RANKL 처리된 파골세포 분화과정에서 증가하는 NFATc1의 발현을 유의성 있게 억제하는 효과를 나타내었다 (Fig. 22).

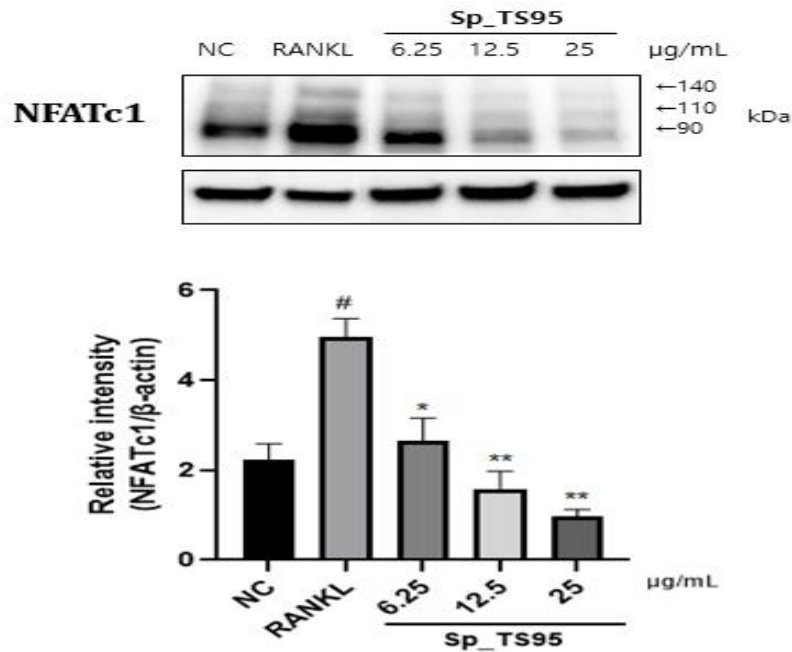


Fig. 22. Effect of SP_TS95 on the expression of NFATc1 in RANKL stimulated osteoclast. [#] $P < 0.05$ and ^{**} $P < 0.01$ vs. the control group. ^{*} $P < 0.05$ and ^{**} $P < 0.01$ vs. the RANKL-treated group.

(4) 파골세포 융합 관련인자에 미치는 영향

파골세포 분화에 대한 비타민 K2 강화 시금치 발효물(TS95)의 효과를 확인하기 위하여 시금치 발효물(TS95)에 의한 성숙한 파골세포의 지표유전자들의 발현양상을 확인하였다. 파골세포의 지표유전자로 잘 알려진 NFATc1, OSCAR과 CtsK의 mRNA 발현 양상을 살펴 본 결과, RANKL이 함유되지 않은 정상군에서는 파골세포로의 분화 시 나타나는 NFATc1, OSCAR과 CtsK 발현이 거의 나타나지 않았으며, RANKL 만을 처리한 대조군은 NFATc1, OSCAR과 CtsK 발현이 정상군에 비해 현저히 증가하였다. 시금치 발효물(TS95) 처리 시 RANKL 처리된 파골세포 분화 과정에서 증가하는 NFATc1, OSCAR과 CtsK의 발현을 유의성 있게 억제함을 확인하였다(Fig. 23) 파골세포에서는 RANKL 자극으로 인한 TRAF 활성화, MAPK pathway 활성화 및 Src나 Akt 등의 활성화를 통해 transcription factor들인 NF- κ B, NFATc1이 활성화된다. NFATc1은 파골전구세포에서 파골세포로 분화를 촉진하는 TRAP과 osteoclast-associated receptor (OSCAR)의 발현을 조절하는 중요한 전사인자이다. 따라서 TRAP의 발현이 억제되는 것은 시금치 발효물(TS95)이 NFATc1의 발현을 억제시키기 때문인 것으로 추정되었고, OSCAR의 발현도 시금치 발효물(TS95)에 의해 억제될 것으로 예상되었다. 시금치 발효물(TS95)은 NFATc1의 발현을 억제시킴으로써, 하위 단계의 유전자들인 OSCAR, CSTK 등의 발현을 모두 억제시키는 것으로 판단하였다. 이상의 연구 결과를 바탕으로 시금치 발효물(TS95)은 파골세포 분화를 차단하고, 기능을 억제할 수 있는 것으로 판명되었으며, 파골세포의 신호전달 과정에서 관련 유전자 발현을 억제하는 것으로 판단되었다.

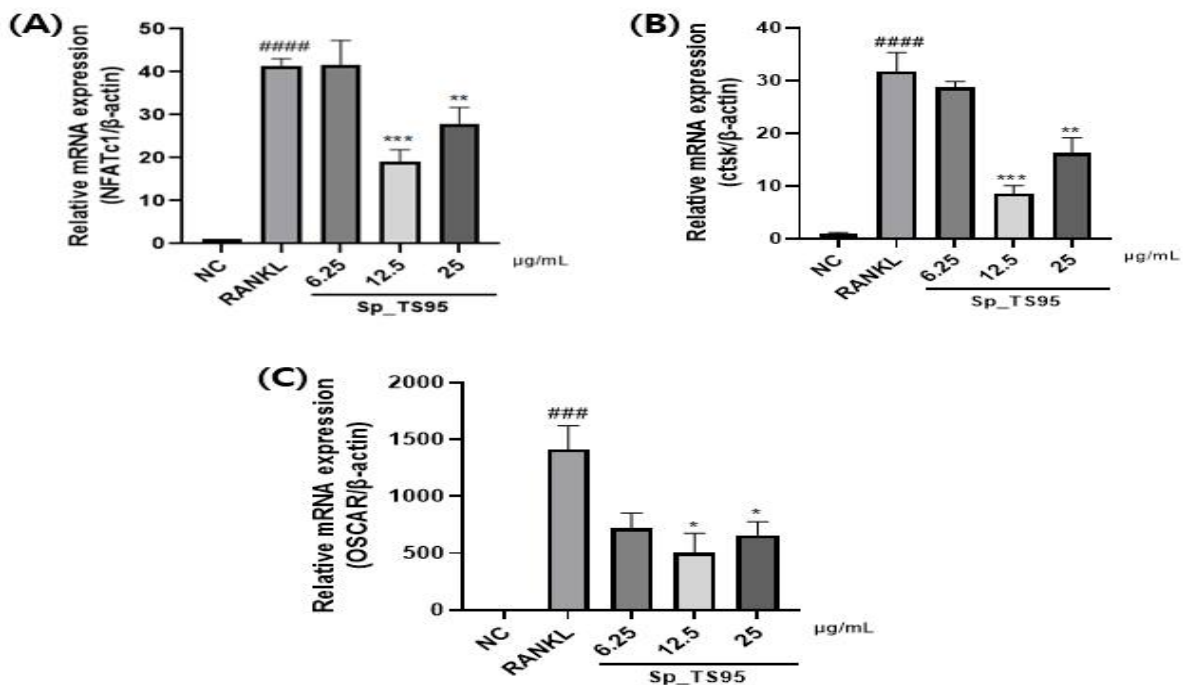


Fig. 23. Effect of SP_TS95 on the expression of NFATc1, CSTK, and OSCAR in RANKL stimulated osteocalst.

$P < 0.05$ and ** $P < 0.01$ vs. the control group. * $P < 0.05$ and ** $P < 0.01$ vs. the RANKL-treated group.

4-2) 전임상실험 기반 골건강 효능 평가

(1) 에스트로겐 결핍 마우스의 장기 무게 변화

(1-1) 자궁 무게 측정

자궁의 무게 변화는 정상군 대비 난소를 절제한 OVX군의 자궁은 많이 얇아진 것을 확인할 수 있었고 이는 무게를 측정한 결과와도 비슷하였다 (Table 3). OVX군은 정상군에 비하여 무게가 유의하게 감소하였으며, 시금치 발효물군(TS95) 투여군에서는 OVX군에 비해 더 비대해진 것을 육안으로 확인할 수 있었다 (Fig. 24). 에스트로겐 결핍은 혈중 에스트로겐 감소 및 자궁 무게 감소를 유발시킨다고 보고되어 있다.

Table 3. Effect of fermented spinach and spinach juice on uterine weight

	SHAM	OVX	OVX+TS95_low	OVX+TS95_high
Uterine weight (g)	0.19±0.04	0.12±0.03 ^{###}	0.23±0.09*	0.17±0.11

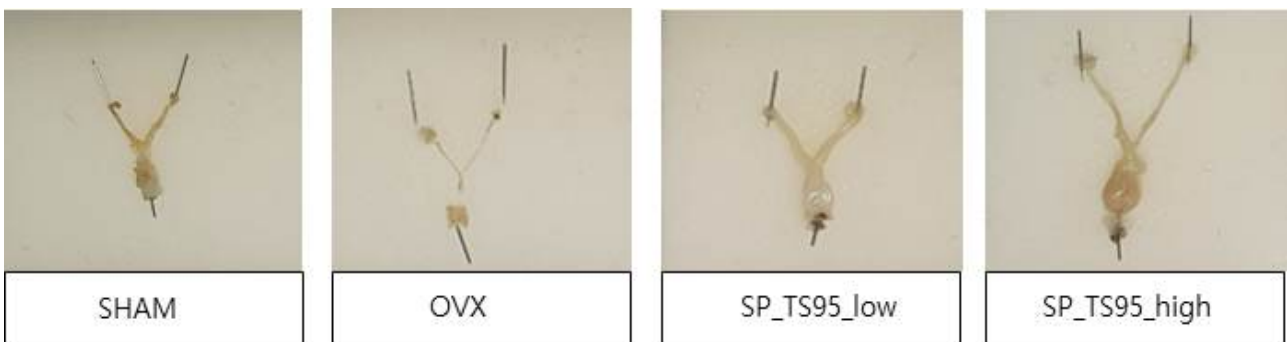


Fig. 24. Picture of uterine in mice to represent the size and shape.

(1-2) 혈중 ALP 농도

골 형성 지표로 혈청 Alkaline phosphatase(ALP)를 측정하였다. Fig. 25은 시금치 발효물군(TS95)이 ALP함량에 미치는 영향을 나타내었다. OVX군이 정상군에 비해 혈청 중의 ALP활성이 높아지는 경향을 나타내었고, OVX 후 시금치 발효물군(TS95) 투여로 인해 정상(SHAM)군보다 유의적으로 감소하였다. ALP는 조골 대사와 관련이 깊은 것으로 대사성 골 질환 등 골 대사 회전이 빠를 때, 즉 골격 형성 시 조골 세포의 활동이 증가하여 골 교체율이 빠를 때 혈장 내에서의 농도가 증가한다. 결과적으로, 시금치 발효물군(TS95) 투여군의 ALP 활성이 낮아져 앞으로 폐경 후 골 대사에 유의한 효과가 기대된다.

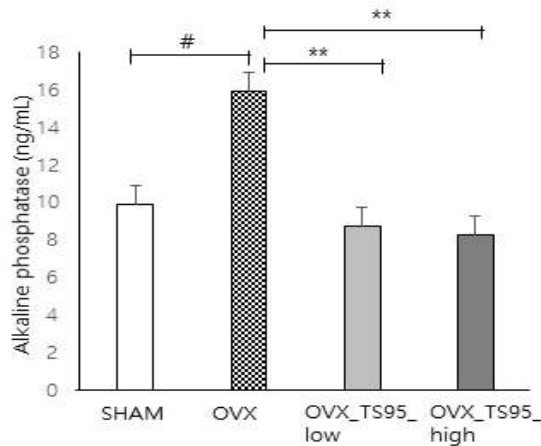


Fig. 25. Serum alkaline phosphatase (ALP) levels after 15 weeks of treatment with SP_TS95.

(1-3) 대퇴골의 골형태학적 계측 결과

에스트로겐의 감소로 파골세포의 분화를 억제하는 osteoprotegerin(OPG)가 감소함으로써 골 교체율 균형이 깨져 골다공증 증상이 나타나는 것으로 골질의 밀도가 낮아지며 골 감소는 대부분 해면골(trabecular bone)에서 일어난다고 보고되었다. 따라서 해면골 부피와 무기질 밀도 함량 측정은 골다공증 진단에 가장 유용한 지표이다. Mice의 대퇴골(femur)부분 해면골 절단면의 micro-CT 사진을 보면(Fig. 26), 정상군은 해면골의 밀도가 높았고, 폐경기 모델을 유도한 OVX군은 해면골의 밀도가 상당히 낮아 빈 공간이 많았다. OVX군과 대조하여 시금치 발효물(TS95)군은 해면골의 밀도가 증가한 것을 육안으로 확인할 수 있었고 이는 골 부피와 골밀도 수치와 유사한 결과를 나타내었다. 골의 부피 대비 골 표면적(Bone Surface Area /Bone Volume)과 가지 모양의 작은 기둥으로 이루어진 중앙부의 해면 골소주(잔기둥)의 간격(Trabecular Separation, Tb. Sp)은 정상군과 비교하여 OVX-CON 군에서 증가하였으며 시금치 발효물군(TS95)은 유의적으로 감소하였다. 또한 골 밀도(BMD), 골의 용적비(Bone Volume / Total Volume, BV / TV), 해면 골소주 수(Trabecular Number, Tb. No), 해면 골소주 두께(Trabecular Thickness, Tb. Th)는 OVX군이 SHAM군과 비교해 감소하였으며, 시금치 발효물(TS95)군에서 유의적으로 증가하였다(Table 4). 따라서 본 연구에서의 시금치 발효 발효물(TS95)은 에스트로겐의 결핍에 의해 유발된 골 손실을 완화시키는데 효과가 있는 것으로 판단된다.

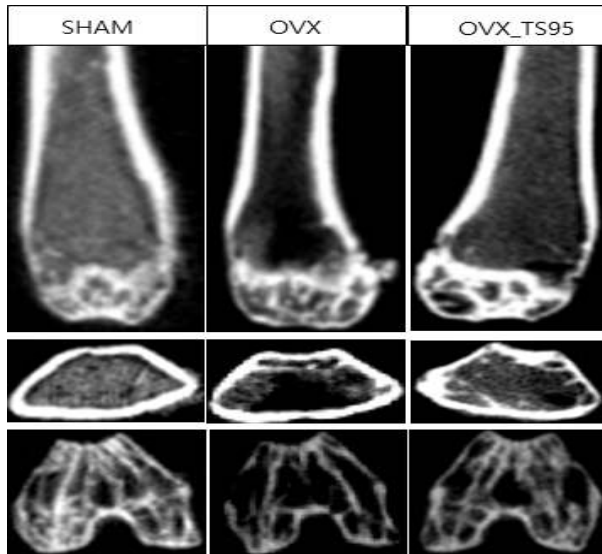


Fig. 26. Micro-CT analysis of the femur of ovariectomized mice.

결과적으로, 본 연구는 비타민 K2강화된 시금치 발효물(TS95)의 골 형성 효능을 골다공증을 유발한 mice를 통해 확인하고자 실시하였다. 실험물질 투여 15주 후 OVX군의 체중은 정상군에 비하여 증가하였으며, 시금치 발효물 투여군은 감소함을 확인하였다. 난소 적출 후 골다공증이 유발되면, 에스트로겐의 결핍으로 인해 자궁 무게는 감소한다. 본 결과에서도 자궁의 무게는 정상군에 비하여 OVX군이 감소하였으며, 시금치 발효물(TS95)군에서는 유의적인 효과가 관찰되었다. 혈중 ALP는 골대사 마커로서, 골의 순환이 증가하면 그 결과로 증가하게 되는데, OVX군에서 정상군에 비해 ALP가 증가하며, 시금치 발효물(TS95)군에서 유의하게 감소함을 확인하였다. 대퇴골의 골부피는 FSP군이 OVX군에 비하여 유의적으로 증가되었고, 골밀도는 OVX군에 비하여 시금치 발효물(TS95)군이 유의적으로 증가되었으며, 해면골의 밀도가 증가한 것을 micro-CT를 통해서도 확인할 수 있었다. 이상의 결과를 통해 비타민 K2강화된 시금치 발효물(TS95)은 골부피와 골밀도를 증가시킬 수 있는 인자로 골 형성에 효과가 있다고 판단되었다.

Table 4. Effect of SP_TS95 on the bone morphometric parameters BMD (mg/cc), BV/TV (%), Tb.Th (mm), Tb.N (1/mm) and Tb.Sp (mm)

	SHAM	OVX	OVX+TS95_low
BMD (mg/cc)	97.00±4.74	48.80±7.26 ^{###}	84.00±7.48 ^{***}
BMC (mg)	1.91±0.18	1.13±0.15 ^{###}	1.60±0.18 ^{**}
BV/TV (mm ³ /mm ³)	0.29±0.01	0.23±0.02 ^{###}	0.27±0.00 ^{**}
BS/BV (mm ³ /mm ³)	7.34±0.46	8.00±0.19 ^{##}	7.52±0.19 [*]
Tb.Th (mm)	0.27±0.02	0.21±0.01 ^{###}	0.25±0.01 ^{***}
Tb.N (g/cm ²)	1.08±0.06	0.89±0.09 ^{###}	1.04±0.02 ^{**}
Tb.Sp (M/m)	0.66±0.04	0.87±0.11 ^{###}	0.70±0.02 ^{**}
BS/TV (mm ² /mm ³)	2.13±0.13	1.78±0.19 ^{###}	2.07±0.04 ^{**}

3. 정량적 연구개발성과

1) 정량적 연구개발성과 요약

< 정량적 연구개발성과표(예시) >

(단위 : 건, 천원)

성과지표명	연도		1단계 (2019~2020)	계	가중치 (%)	
	전담기관 등록·기탁 지표 ¹⁾	논문	목표(단계별)	6	6	
실적(누적)			6	6	100	
특허		목표(단계별)	3	3		
		실적(누적)	7	7	233	
보고서원문		목표(단계별)				
		실적(누적)	4	4	400	
생명자원		목표(단계별)				
		실적(누적)	4	4	400	
학술발표		목표(단계별)	6	6		
		실적(누적)	22	22	367	
연구개발과제 특성 반영 지표 ²⁾		기술실시 (이전)	목표(단계별)	1	1	
			실적(누적)	3	3	
	기술료	목표(단계별)	10,000	10,000		
		실적(누적)	15,000	15,000	150	
	시제품	목표(단계별)	2	2		
		실적(누적)	3	3	150	
	매출액	목표(단계별)	10,000	10,000		
		실적(누적)	146,517.749	146,517.749	146	
	고용창출	목표(단계별)	3	3		
		실적(누적)	5	5	167	
	홍보	목표(단계별)	1	1		
		실적(누적)	5	5	500	
	교육지도	목표(단계별)				
		실적(누적)	1	1	100	
	수상	목표(단계별)				
		실적(누적)	3	3	300	
	타연구활용	목표(단계별)				
		실적(누적)	1	1	100	
계	목표(단계별)	22	22	100		
	실적(누적)	64	64	291		

< 연구개발성과 성능지표(예시) >

평가 항목 (주요성능 ¹⁾)	단위	전체 항목에서 차지하는 비중 ²⁾ (%)	세계 최고		연구개발 전 국내 성능수준	연구개발 목표치	목표설정 근거	
			보유국/보유기관	성능수준	성능수준	1단계 (2019~2021)		
1	VitK1	ug/100g	20	미국	500	500	771.48	HPLC
2	MK4	ng/100g	20	미국	-	-	7,680	HPLC
3	MK7	ng/100g	20	미국	-	-	780	HPLC
4	MK9	ng/100g	20	미국	-	-	420	HPLC
5	LAB	cfu/mL	20	미국	1x10 ⁸	1x10 ⁸	1x10 ¹⁰	생균수
계			100					

* 1) 정밀도, 인장강도, 내충격성, 작동전압, 응답시간 등 기술적 성능판단기준이 되는 것을 의미합니다.

* 2) 비중은 각 구성성능 사양의 최종목표에 대한 상대적 중요도를 말하며 합계는 100%이어야 합니다.

※ 치즈 등의 동물성 유래의 비타민K2 외의 식물기반 중심

2) 세부 정량적 연구개발성과 (Fris 사이트에 업로드 완료)

[과학적 성과]

논문(국내외 전문 학술지) 게재

번호	논문명	학술지명	주저자명	호	국명	발행기관	SCIE 여부 (SCIE/비SCIE)	게재일	등록번호 (ISSN)	기여율
1	Benzoic and propionic acids in fishery products on the korean market	Food additives and Contaminants : PartB	GwangJu Jang Miyong Yoo Sanghee Lee	13	UK	Taylor Francis	SCI(IF3.2)	2020.05.01	1939-3210	50
2	Constitutive activation and inactivation of mutations iuducing cell surface loss receptor	Internationa Journal of Molecular Sciences	Munkhzaya Byam, SunMee Hong, KwanSik Min	21	Switzerland	MDPI	SCI(IF:4.5)	2020.09.25	2119-7075	20
3	Charactrization of LAB-inoculated salt fermented Protactia Brvitaris sauce	jKAI	HyunSol Jo TaeHa Kim SunMee Hong	22(9)	Korea	jKAI	비SCIE	2021.09.30	1975-4701	50
4	Effect of Dietary supplementation of fermented mealworm on the growth of juvenile stone flounder	jKAI	HyunSol Jo MuEuk Park SunMee Hong	22(4)	Korea	jKAI	비SCIE	2021.04.30	1975-4701	50
5	Saururus chinensis Prevents Estrogen Deficiency-Induced Osteoporosis in Rats: A Metabolomic Study Using UPLC/Q-TOF MS	Applied Sci	SangHee Lee GwangJu Jang	11(4)	Switzerland	MDPI	SCI(IF2.6)	2021.02.04	2076-3417	60
6	Lactococcus lactis-fermented spinach juicd enhances anti-inflammation activity on human umbilical vein endothelial cells	Exp Ther Med	SangHee Lee ArRam Han SunMee Hong	acceted	UK	Spandidos	SCI(IF2.4)	2021.12.	1792-1015	100

국내 및 국제 학술회의 발표

번호	회의 명칭	발표자	발표 일시	장소	국명
1	한국미생물생명공학회	조현술, 홍선미	2021.02.17	부산아쿠아	발효유산균 사료급이 장내마이크로바이옴 분석
2	한국미생물생명공학회	박수정, 조현술, 홍선미	2021.02.17	부산아쿠아	발효시금치에서 메나퀸은 생산 및 특성 분석
3	한국수산과학회	박수정, 조현술, 홍선미	2021.04.29	부산백스코	발효유산균의 문치가자미 성장 효과
4	한국수산과학회	조현술, 홍선미	2021.04.29	부산백스코	해양유산균의 항균성을 이용한 항펩타이드 특성분석
5	한국미생물학회	조현술, 홍선미	2021.06.23	부산백스코	어류 장내 미생물 마이크로바이옴 분석
6	한국미생물학회	박수정, 조현술, 홍선미	2021.06.23	부산백스코	장내 비피도균 축진 DHNA 확인
7	한국식품과학회	조현술, 홍선미	2021.07.07	대전컨벤션	식품저장 및 산패방지를 위한 유산균 적용
8	한국식품과학회	박수정, 조현술, 홍선미	2021.07.07	대전컨벤션	Men 유전자 포함 유산균의 메나퀸은 생산
9	한국미생물생명공학회	조현술, 홍선미	2021.08.25	창원CECO	식품산패 방지를 위한 유산균의 활용 및 특성 분석
10	한국해양바이오학회	조현술, 홍선미	2021.11.04	대전선샤인	문치가자미의 유산균 장내 마이크로비타 분석
11	한국해양바이오학회	조현술, 홍선미	2021.11.04	대전선샤인	돌가자미 유산균사료첨가물에 의한 성장 촉진
12	한국분자세포생물학회	조현술, 조윤래, 홍선미	2020.01.15	강원도용평	해양미생물에서 분리한 항균성단백질의 분리 특성
13	한국생물공학회(춘계)	김정아, 조현술, 홍선미	2020.06.24	수원컨벤션	유산균생산 DHNA(비타K전구체)의 특성분석
14	한국생물공학회(춘계)	조현술, 김정아, 홍선미	2020.06.24	수원컨벤션	유산균항균펩타이드 분리 및 기능해석
15	한국산학기술학회	최주영, 조현술, 홍선미	2020.07.15	제주컨벤션	가바생산 유산균의 지방세포 성장 억제 효과
16	한국산학기술학회	조현술, 최주영, 홍선미	2020.07.15	제주컨벤션	항균성 해양유산균의 스크리닝과 항균기능 분석
17	한국생물공학회(추계)	최주영, 조현술, 홍선미	2020.10.21	서울라마다	DHNA(비타K전구체)의 장내비피도균성장효과
18	한국생물공학회(추계)	조현술, 최주영, 홍선미	2020.10.21	서울라마다	Tm배지에서 항균유산균 배양과 양어사료기능
19	미생물산업유전학회	홍선미, 주은신	2019.09.09	이페리피사	비타민K전구체인 DHNA 생산 발효 조건
20	한국영양과학회	주은신, 김정아, 홍선미	2019.10.23	제주컨벤션	유산균 생산 DHNA 특성 및 효능 분석
21	한국생물공학회(추계)	김태하, 주은신, 홍선미	2019.10.10	대구엑스코	DHNA 생산 유산균별 정량정성 분석
22	일본분자세포생물학회	주은신, 김태하, 홍선미	2019.12.03	후쿠오카	비타민K전구체인 DHNA 생산 발효 조건

□ 기술 요약 정보

연도	기술명	요약 내용	기술 완성도	등록 번호	활용 여부	미활용사유	연구개발기관 외 활용여부	허용방식
2020	비타민K2함유 유산균 발효물	비타민K2함유 유산균 발효물	완성	10-2020-0143424	부	예정	공동연구	통상
2021	비타민K식물혼합물 염증개선	비타민K2함유 유산균 발효물	완성	10-2021-0167733	부	예정	공동연구	통상
2020.07	김치유산균 활용 장내유산균 성장촉진 엑기스 제조	비타민K전구체D HNA 활용	완성	10-2275731-0000	부	예정	완성	통상
2020.07	젖산균 활용 염장발효촉진	꽃병이 활용 기능성 가바생산	완성	10-2335219-0000	부	예정	완성	통상

□ 보고서 원문

연도	보고서 구분	발간일	등록 번호
2019	사전경제성분석 보고서	2019. 09	농업기술실용화재단
2019	연차보고서(1차년)	2019. 12	농림수산기술기획평가원
2020	연차보고서(2차년)	2020. 12	농림수산기술기획평가원
2020	경상북도 바이오생명 혁신기술 발굴 기획 보고서	2020. 11	경상북도 바이오생명산업과

□ 생명자원(생물자원, 생명정보)/화합물

번호	생명자원(생물자원, 생명정보)/화합물 명	등록/기탁 번호	등록/기탁 기관	발생 연도
1	Lactobacillus plantarum TS33	KCCM12757P	한국미생물보존센터	2020.07.03
2	Lactobacillus plantarum TS90	KCCM12758P	한국미생물보존센터	2020.07.03
3	Leuconostoc mesenteroides TS49	KCCM12756P	한국미생물보존센터	2020.07.03
4	Lactococcus lactis TS95	KCCM12759P	한국미생물보존센터	2020.07.03

[기술적 성과]

□ 지식재산권(특허, 실용신안, 의장, 디자인, 상표, 규격, 신제품, 프로그램)

번호	지식재산권 등 명칭 (건별 각각 기재)	국명	출원			등록			기여율	활용 여부
			출원인	출원일	출원 번호	등록인	등록일	등록 번호		
1	비타민K1과 K2(MK4)를 함유하는 식물혼합물의 유산균 발효물 및 이를 포함하는 염증개선 또는 치료용 조성물	대한민국	환동해산업연구원/ 한국식품연구원	2021. 11.29	10-2021-0167733				100	가
1	비타민K1과 K2(MK4)를 함유하는 식물혼합물의 유산균 발효물 및 이를 포함하는 염증개선 또는 치료용 조성물	대한민국	환동해산업연구원/ 한국식품연구원	2021. 11.05	10-2021-0151582				100	가
2	비타민K2를 함유하는 유산균 발효물 및 이를 포함하는 염증예방 또는 치료용 조성물	대한민국	환동해산업연구원/ 한국식품연구원/ 동의보급	2020. 10.30	10-2020-0143424				100	가
3	흰점박이꽃무지 발효물을 포함하는 미생물의 성장 촉진용 조성물	대한민국	환동해산업연구원/ 동의보급	2019. 11.29	10-2019-0157749	환동해산업연구원/ 동의보급	2021. 07.05	10-2275731-0000	50	가
4	흰점박이꽃무지 추출물의 발효물 이의 제조방법 및 용도	대한민국	환동해산업연구원	2019. 06.04	10-2019-0066242	환동해산업연구원	2021. 05.31	10-2260782-0000	50	가
5	해방풍 추출물의 유산균 발효물 그 제조방법 및 용도	대한민국	환동해산업연구원	2019.0 05.09	10-2019-0054488	환동해산업연구원	2021. 06.09	10-2265388-0000	50	부
6	갈색거저리 발효물을 포함하는 사료첨가제 및 이를 포함하는 사료조성물	대한민국	환동해산업연구원	2019. 10.30	10-2019-0136813	환동해산업연구원	2021. 10.13	10-2314881-0000	50	가
7	흰점박이꽃무지 염장발효식품 및 이의 제조방법	대한민국	환동해산업연구원	2019. 10.01	10-2019-0121784	환동해산업연구원	2021. 11.30	10-2335219-0000	50	부

○ 지식재산권 활용 유형

※ 활용의 경우 현재 활용 유형에 √ 표시, 미활용의 경우 향후 활용 예정 유형에 √ 표시합니다(최대 3개 중복선택 가능).

번호	제품화	방어	전용실시	통상실시	무상실시	매매/양도	상호실시	담보대출	투자	기타
1	포스트바이오틱스K			√		√				
2	포스트바이오틱스K			√		√				
3	동의보급프리미엄			√		√				
4	PbLAB			√		√				
5	GABALAB			√		√				
6	TmLAB			√		√				
7	PbGABA			√		√				

- 저작권(해당사항없음)
- 신기술 지정(해당사항없음)
- 기술 및 제품 인증(해당사항없음)
- 표준화(해당사항없음)

[경제적 성과]

시제품 제작

번호	시제품명	출시/제작일	제작 업체명	설치 장소	이용 분야	사업화소요기간	인증기관 (해당 시)	인증일 (해당 시)
1	포스트바이오틱스K 환	2021.10.12	동의보급	동의보급	식품	2년		
2	포스트바이오틱스K 주스	2021.12.29	동의보급	동의보급	식품	2년		
3	포스트바이오틱스K 세정제	2021.12.29	튜링겐	한동해산업연구원	화장품	-		

기술 실시(이전)

번호	기술 이전 유형	기술 실시 계약명	기술 실시 대상 기관	기술 실시 발생일	기술료 (해당 연도 발생액)	누적 징수 현황
1	통상/혼합	흰점박이꽃무지 유산균발효 식품	시그널케어	21.10.15	5,000,000	
2	통상/혼합	갈색거저리 유산균발효 사료첨가물	시그널케어	21.12.17	5,000,000	
3	통상/혼합	동애 등에 유산균발효 사료첨가물	시그널케어	21.12.17	5,000,000	

* 내부 자금, 신용 대출, 담보 대출, 투자 유치, 기타 등

사업화 투자실적(해당사항없음)

사업화 현황

번호	사업화 방식 ¹⁾	사업화 형태 ²⁾	지역 ³⁾	사업화명	내용	업체명	매출액		매출 발생 연도	기술 수명
							국내 (천원)	국외 (달러)		
1	기술이전	신제품	국내	포스트바이오틱스K환	환	동의보급	0		2021	
2	기술이전	신제품	국내	포스트바이오틱스K주스	주스	동의보급	0		2021	
3	자가실시	기존제품개선	국내	동의보급진액 플러스	한방발효	동의보급	128,563.966		2020	
4	자가실시	기존제품개선	국내	동의보급장	발효장	동의보급	0		2020	

매출 실적((해당사항없음))

사업화명	발생 연도	매출액		합계	산정 방법
		국내(천원)	국외(달러)		
동의보급진액	2021	128,563.966		128,563.966	
합계		128,563.966		128,563.966	

사업화 계획 및 무역 수치 개선 효과(해당사항없음)

성과				
사업화 계획	사업화 소요기간(년)	2022 ~ 2024 (2년)		
	소요예산(천원)	30,000		
	예상 매출규모(천원)	현재까지	3년 후	5년 후
		0	150,000	500,000
	시장 점유율	단위(%)	현재까지	3년 후
국내			1	2
국외				
향후 관련기술, 제품을 응용한 타 모델, 제품 개발계획				
무역 수치 개선 효과(천원)	수입대체(내수)	현재	3년 후	5년 후
	수 출			

고용 창출

순번	사업화명	사업화 업체	고용창출 인원(명)		합계
			2020년	2021년	
1	비타K사업	동의보급	0	2	2
2	비타K사업	환동해산업연구원	2	1	3
합계			2	3	5

고용 효과

구분		고용 효과(명)	
고용 효과	개발 전	연구인력	2
		생산인력	0
	개발 후	연구인력	3
		생산인력	2

비용 절감((해당사항없음))

경제적 파급 효과

[사회적 성과]

법령 반영 (해당사항없음)

정책활용 내용(해당사항없음)

설계 기준/설명서(시방서)/지침/안내서에 반영(해당사항없음)

전문 연구 인력 양성(해당사항없음)

산업 기술 인력 양성(해당사항없음)

다른 국가연구개발사업에의 활용

번호	중앙행정기관명	사업명	연구개발과제명	연구책임자	연구개발비
1	농림식품기술기획평가원	유용농생명자원 산업화기술개발	생물강화기술 활용 동애 등애를 이용한 비타민B2/B9 증강 파라바이오틱스 사료첨가물 개발	홍 선 미	567,500,000

국제화 협력성과(해당사항없음)

홍보 실적

번호	홍보 유형	매체명	제목	홍보일
1	전시회	식품페스티벌 및 심포지엄	동의보급 진액 식품 전시	2019.06.05
2	박람회	2021 대구국제식품산업전	동의보급진액 프리미엄 외 다수	2021.09.02
3	지방일간지	스페셜타임스	해양유산균 활용 포스트바이오틱스 사업	2021.10.20
4	지방일간지	영남매일	포스트바이오틱스 어류반려동물 사료개발	2021.10.20
5	지방일간지	매일신문	탄소저감형 포스트바이오틱스 사업화	2021.10.20

포상 및 수상 실적

번호	종류	포상명	포상 내용	포상 대상	포상일	포상 기관
1	수상	농업인표창장	농업산업 발전 공로	박정철	2019.06.05	국립농업과학원장
2	수상	우수포스터상	해양유산균 특성	조현술	2020.11.12	한국해양바이오학회장
3	수상	우수포스터상	해양유산균 항균효과	조현술	2021.04.29	한국수산학회장

[인프라 성과]

연구시설·장비(해당사항없음)

[그 밖의 성과](해당 시 작성합니다)

-
1. 경영혁신형 중고기업(Main-Biz) 인증 (제210301-00808호/2021.04.21._중소벤처기업부)
 2. 벤처기업확인서 (제20211125030263호/2021.11.24._벤처기업확인기관장)
-

3) 계획하지 않은 성과 및 관련 분야 기여사항(해당없음)

-
3. 메나퀀논 합성 효소 유전자 10종 클로닝 및 재조합 단백질 생산 완료
 4. 메나퀀논 재조합 효소 단백질의 열, pH, 금속 안정성 분석 완료
-

제 2 절 연구 목표 달성 정도

추진 목표	달성 내용	달성도(%)
<ul style="list-style-type: none"> 식물기반 비타민K1/K2 비이오공정 확립 	<ul style="list-style-type: none"> 비타민K1 원료: 시금치, 브로콜리, 양배추 비타민K2 생산유산균: LI, Lm, Lp, Wp 최적공정: 30°C, 24h, Dark, air 전후공정: 멸균 및 비타민K1/K2 유지 	<ul style="list-style-type: none"> 100
<ul style="list-style-type: none"> 천연비타민K 함유 시제품 정량분석 	<ul style="list-style-type: none"> 비타민K1 (35ug/100mL; 7ug/g), 비타민K2; MKn (1ug/100mL; 200ng/g) 시금치비타민K1(C₃₁H₄₅O₂; 451.2g/mol) 시금치 MK₄(C₃₁H₄₀O₂; 445.6g/mol) 시금치 MK₇(C₄₆H₆₄O₂; 649.6g/mol) 시금치 MK₉(C₅₆H₈₀O₂; 786.6g/mol) 	<ul style="list-style-type: none"> 100
<ul style="list-style-type: none"> 천연비타민K 소재의 전임상 효능 입증 	<ul style="list-style-type: none"> 항염(세포): IL6, iNOS, COX2 억제 혈관 항염(세포): NF-κB 기전 확인 비만 억제(마우스): 체중 억제 중성지방 억제(마우스) 파골세포 분화(마우스) 효능 	<ul style="list-style-type: none"> 100
<ul style="list-style-type: none"> 비타민K1/K2 함유 (시)제품 개발 2건 	<ul style="list-style-type: none"> 포스트바이오틱스K환 (식품품목보고) 포스트바이오틱스K주스 (식품품목보고) 포스트바이오틱스K 세정제 	<ul style="list-style-type: none"> 100

제 4 장 목표 미달 시 원인분석

1) 목표 미달 원인(사유) 자체분석 내용

- 해당사항 없음
-

2) 자체 보완활동

- 메나퀴논 합성 재조합 효소를 활용한 메나퀴논(MKn) 합성 및 정량 분석
 - 탄소원 활용에 의한 메나퀴논(MKn) 합성 및 정량, 정성 분석
※비타민K2 양산법은 특허출원 진행 이전이라 보고서 미기재
 - 시금치의 Ca, VitD2, VitK1/K2의 함량 및 비율에 따른 골다공증 기전 연구 진행
(에스트로겐 결핍 마우스)
 - 복합야채 유산균 발효물의 장내 염증 완화 입증 실험
-

3) 연구개발 과정의 성실성

(정성적 성과)

- 식물(비타민K1)기반의 비타민K2 생산 바이오공정 표준화 확립
- 필라퀴논 및 메나퀴논 추출, 분리 및 정제법 확립 완료
(현재 국내에서는 필라퀴논 정량은 가능하나 메나퀴논 분석 기관 부재)
- 식물 비타민K1/K2의 항염, 혈관항염, 비만억제, 중성지방 억제, 파골세포 분화 입증
- 식물 비타민K1/K2의 생산의 파일럿(3L) 및 대량생산(500L) 발효 공정 확립
- 식물 비타민K1/K2 함유 식품소재화의 전처리, 후처리 안전성 및 안정성 구축

(정량적 성과) : 목표 이상 성과 도출

- 시제품 2건 이상
- 고용창출 5건 이상
- 매출 1,000만원 이상 완료
- 기술이전 3건(기술료1,500 만원)
- 논문 5건 및 학술발표 22건
- 국제균주 기탁 4건
- 특허출원 3건 및 특허등록 5건

- 연구개발의 정성적 및 정량적 성과는 계획 목표를 상회하며, 연차별 목표와 추진일정에 성실하게 임함
 - 연구개발의 세부 및 공동연구기관은 상호 유기적 관계로 성실하게 임함
-

제 5 장 연구개발성과의 관련 분야에 대한 기여 정도

(식품분야)

- 식물(필라퀴논; VitK1)기반의 천연 비타민K2 생산 바이오공정 표준화 확립
- 시금치 기반의 천연비타민K1과 유산균이 생산하는 천연비타민K2 식품 소재화
- 미량영양소로 간과되었던 비타민K1과 K2의 신소재화 제시
- GRAS 유산균주로 생산된 천연안심 비타민K 추출, 분리, 정제 및 정량법 확립
- 비타민K 일일권장량 남자 65ug/day, 여자75ug/day 섭취양의 적정 주스(2포/day) 제품화
- 천연 비타민K1과 K2의 효능 제시(항염, 항비만, 중성지방 저감, 파골분화 및 조골 효능)

(농산분야)

- 시금치, 브로콜리, 양배추 등의 유효물질 중 필라퀴논의 기능성 소재로 제시
- 야채류의 착즙 및 건조분말의 프리바이오틱스 원료로의 국내 농산물의 신소재화
- 본 연구에서 사용한 원료 이외 필라퀴논 과채류에 확대 적용하여 기능 확대 가능

(융복합분야)

- 필라퀴논 함유 식물기반의 메나퀴논 생산 프로바이오틱스 새로운 융복합 기술 개발
 - 프로바이오틱스의 유효물질 생산으로의 포스트바이오틱스 및 파라바이오틱스 적용
 - 천연비타민K1과 K2의 식의약소재 적용을 위한 파마바이오틱스 소재화
-

제 6 장 연구개발성과의 관리 및 활용 계획

< 연구개발성과 활용계획표(예시) >

구분(정량 및 정성적 성과 항목)		연구개발 종료 후 5년 이내	
국외논문	SCIE	1	
	비SCIE		
	계	1	
국내논문	SCIE		
	비SCIE	1	
	계	1	
특허출원	국내	1	
	국외		
	계	1	
특허등록	국내	2	
	국외		
	계	2	
인력양성	학사		
	석사		
	박사		
	계		
사업화	상품출시	1	
	기술이전	1	
	공정개발	1	
제품개발	시제품개발	1	
비임상시험 실시			
임상시험 실시 (IND 승인)	의약품	1상	
		2상	
		3상	
	의료기기		
진료지침개발			
신의료기술개발			
성과홍보			
포상 및 수상실적			
정성적 성과 주요 내용		식물(필라퀴논) 기반 메나튀논 생산 바이오공정법	

< 별첨 자료 >

중앙행정기관 요구사항	별첨 자료
1. 농림식품기술기획평가원(IPET)	1) 연구개발보고서 초록
	2) 자체평가의견서
	3) 연구성과 활용계획서
	4) 평가의견 조치 및 개인정보 삭제 확인서
	5) 최종보고 제출 양식
	6) 최종보고 배포결과
	7) 배포결과 증빙자료(등기우편 영수증 사본)
2.	1)
	2)

뒷면지

주 의

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