

일반과제 20080015

발 간 등 록 번 호

11-1541000-000767-01

수산 중소 벤처기업 기술개발 지원사업 최종보고서

「외부순환식감압형분리막」 공법과 다단계 발효에 의한 해조류 유래의 기능성 약주의 개발

(Korean traditional wine containing GABA originated
Laminaria japonica by fermentation technology and
novel filtration process)

(주)마린바이오프로세스

농 립 수 산 식 품 부

제 출 문

농림수산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “외부순환식감압형분리막 공법과 다단계 발효에 의한 해조류 유래의
기능성 약주의 개발” 과제의 보고서로 제출합니다.

2010년 11월 30일

주관연구기관명 : (주)마린바이오프로세스

주관연구책임자 : 이 배 진

연 구 원 : 장 동 옥

연 구 원 : 강 영 미

연 구 원 : 이 광 덕

연 구 원 : 정 지 선

참여연구기관명 : 대선주조(주)

협동연구책임자 : 차 재 영

위탁연구기관명 : 전남대학교 식품수산생명의학부

협동연구책임자 : 제 재 영

요 약 문

I. 제 목 : 외부순환식 감압형 분리막 공법과 다단계 발효에 의한 해조류 유래의 기능성 약주의 개발

II. 연구개발의 목적

본 연구는 해조류 발효공법을 통하여 해조류를 발효함으로서 해조류의 고분자 다당류의 저분자화를 유도하고, 향미를 증진시키며, 해조류에 다량으로 함유되어 있는 glutamic acid를 GABA(gamma aminobutyric acid)로 전환시킴으로서 종래에는 찾아 볼 수 없었던 기능성 신소재를 해조류를 이용하여 개발하는데 1차적인 목적을 가진다. 따라서 발효를 통하여 개발된 해조류 발효 신소재를 생산하고 그 기능성을 과학적으로 검증함으로서, 국내의 해조류 가공산업 및 GABA산업의 획기적인 발전을 도모할 수 있다.

더 나아가, 본 연구에 의해 개발된 기능성 신소재를 첨가한 알코올 음료를 상용화함으로써, GABA를 함유하는 기능성 약주를 개발하는데 2차적인 목적이 있다. 개발되는 기능성 약주는 해조 추출발효물을 첨가한 발효주의 일종으로 해조류 유래의 발효조성물 및 GABA에 의해, 음주 후의 발생하는 숙취를 감소시킬 수 있다.

III. 연구개발 내용 및 범위

기능성 약주의 발효생산에 첨가되는 해조 추출발효물은 약주의 기능성을 부여하는데 중심이 되는 핵심 소재이다. 해조 추출발효물의 기능성을 대표하는 key material은 GABA로, 해조류의 발효를 통하여 다량의 GABA를 함유시키는 대량생산 공정을 개발하는 것이 중요하다. 때문에 본 연구에는 해조류 발효에 적합한 발효균주의 탐색 및 분리에서부터 발효조건의 검토 및 Scale-up에 따른 생산공정 개발이 필수적이다.

기능성 약주는 해조 추출발효물을 첨가하여 효모등의 발효균주를 통하여 제조되는 한국의 전통 발효주로, 약주의 개발 또한 발효균주가 중요하다고 할 수 있다. 따라서 기

능성 약주의 생산을 위한 발효균주의 탐색에서부터 약주의 Scale-up에 따른 생산 공정의 개발이 본 연구의 중요한 개발 내용이다. 뿐만 아니라 기능성 약주는 소재가 아닌 완제품에 준하는 개발품이기 때문에 소비트렌드에 맞게끔 맛과 향을 브랜딩하는 단계 및 약주의 병과 라벨의 디자인 또한 중요하다.

또한 본 연구에서는 해조 추출발효물을 비롯한 기능성 약주의 기능성을 검토 및 검증하기 위하여 다양한 실험이 수행되었다. 기능성 검토에는 항산화, 숙취해소, 인지기능 등을 비롯한 IN-VITRO 및 IN-VIVO test가 이루어졌으며, 이러한 실험 결과들이 본 연구의 성과인 해조 추출발효 분말과 약주의 기능성을 대변하고 있다.

IV. 연구개발결과

해조류 발효를 위한 발효균주로서 한국의 전통 발효식품인 젓갈류와 김치류를 대상으로 screening하여 우수한 GABA생성능을 가지는 유산균주인 *Lactobacillus brevis* BJ20(KCTC 11377BP)을 분리 및 동정하였으며, 본 유산균주를 통하여 발효한 해조 추출발효물로부터 다양한 기능성을 알아보았다. 뿐만 아니라 해조류는 그 추출액의 성상에 있어, 점성이 높기 때문에 가공하기에는 그 적성이 맞지 않는 어려움이 있다. 때문에 이를 해결하기 위하여 당사는 “외부순환식감압형 분리막 장치”를 개발(특허 제 10-0888897)하여 생산공정에 적용함으로써 효율적인 정밀여과공정을 확립하였다. 또한 기능성 검증과 함께 해조 추출발효액의 대량생산 공정을 개발하였으며, 개발된 해조 추출발효 분말은 기능성 약주를 개발하는데 제공되었다. 해조 추출발효물의 기능성에는 항산화, 숙취해소, 인지기능 개선 등의 효능이 있는 것으로 확인되었으며, 해조 추출발효물은 분말의 형태로, 5ton fermentor에서 시생산된 것을 동결건조하여 제조하였고, 본 연구에 의해 개발된 해조 추출발효 분말의 제품명은 “SLH-1”으로 정하였다.

해조 추출발효 분말(SLH-1)을 첨가하여 발효함으로써 기능성을 부여한 기능성 약주는 “꼭 가바”라는 이름으로 최종적으로 시생산되었으며, 알코올 함량은 13도로 웰빙시대 젊은이들이 선호하는 저도주의 컨셉으로 만들어졌다. 맛과 향은 현대 여성들의 입맛에 맞게끔 조향되었으며 관능검사 및 시음회를 통하여 그 맛과 향이 우수함을 검증하였을 뿐만 아니라 음주 후의 숙취현상도 없는 것으로 확인되었다.

V. 연구성과 및 성과활용 계획

당사는 본 연구개발을 통하여 외부순환식 감압형 분리막 공법을 이용한 고점도 다당류를 함유하는 해조류 추출액의 효과적인 정밀여과 공정을 확립하였으며, 개발된 발효균주(L. brevis BJ20)을 통한 발효공법 및 대량생산 공정개발에 의한 SLH-1을 개발하는데

성공하였다. 뿐만 아니라 SLH-1을 기능성 약주를 개발하는데 첨가함으로써 해조류 유래의 GABA를 다량으로 함유하는 발효주를 개발하는데 성공하였다.

당사는 이러한 연구성과를 바탕으로 동물실험에 머물 것이 아니라, 본 연구에서 검증된 기능성에 대하여 임상시험을 실시할 계획이며, “항산화 활성에 도움을 줍니다.” 및 “알코올성 간손상의 회복에 도움을 줍니다.”라는 claim으로 임상시험을 실시할 계획이다. 뿐만 아니라, 본 연구에서 숙취해소외에도 인지기능 개선에 대한 기능성도 확인된 바, 본 기능성에 대한 심도 있는 연구를 실시하여, 이 또한 임상시험을 추진할 계획이며, 기타 GABA에 관련된 다른 효능에도 관심을 기울일 것이다.

기능성 약주 또한 관능검사 및 시음회를 통하여 맛과 기능성(숙취해소)에 대한 우수성이 확인된 바, 향후, 효율적인 마케팅 전략을 세워, 소비자들의 소비트렌드에 부응하는 제품으로 상용화하여야 할 것이다. 뿐만 아니라, 알코올 음료 뿐만 아니라, 항산화, 숙취해소 등의 기능성을 보다 확대하여, 기능성 음료를 비롯한 다양한 생리기능성을 가지는 제품의 개발에 응용할 수 있을 것이다. 더 나아가 기능성의 개별인정을 통한 개별인정형 건강기능식품의 제조 및 상용화에도 본 연구의 성과가 큰 역할을 담당할 것으로 판단된다.



SLH-1 (해조 추출발효 분말)



꼭 가바 (GABA 함유 기능성 약주)

SUMMARY

Seaweeds provide essential bioactive compounds such as carotenoids, dietary fiber, protein, essential fatty acids, vitamins, and minerals, and are a nutritional food choice for growing children and pregnant women. In addition, many studies have reported that seaweed extracts possess biological activities such as anticoagulation, protection against oxidative cell damage, enzyme inhibition, and antioxidant and immunomodulatory effects. As a result, seaweeds are generally believed to be good candidates for the production of safe biologically active substances. Especially, *Laminaria japonica*, sea tangle, has long been used as Korean folk remedy to promote health. *L. japonica* contain a large amount of bioactive compounds such as fucoidan, oligo-saccharides, dietary fibre, vitamins, and minerals. Moreover, sea tangle provide glutamic acid for producing GABA(gamma aminobutyric acid) by fermentation process with *lactobacillus brevis* BJ20

In order to produce GABA-enriched fermented sea tangle (FST), *L. japonica* was fermented using *Lactobacillus brevis* BJ20 isolated from korean traditional foods. Fermentation process was carried out in fermentors controled at 37°C and pH 7. After fermentation process, FST was dried and produced to powder. This powder contains a large amount of GABA, approximately 5%(w/w), and named "SLH-1". SLH-1 was provided for manufacturing korean traditinal wine named "꼭 가바".

Korean traditional wine, 꼭 가바, have several functions such as DPPH free radical scavenging activity, fibrolytic activity, ADH and ALDH activity. This wine was tested by sensory test with two hundred college students and demonstrated excellence of taste and aroma. in addition, we found out that this wine did not cause any hangovers for many people drank 500ml(one bottle) of this wine.

The effects of GABA-enriched FST on alcohol-induced hepatotoxicity in Sprague-Dawley rats were investigated. Chronic alcohol administration leads to hepatotoxicity as monitored by the increase in the level of hepatic marker enzymes, and increased lipid droplets in numbers and volumes as the fatty liver progressions.

However, GABA-enriched FST reduced alcohol-induced hepatotoxicity and decreased the accumulation of lipid droplets, alcohol-induced mild inflammation and necrosis. In addition, GABA-enriched FST increased the activity of alcohol metabolizing enzymes such as alcohol dehydrogenase and acetaldehyde dehydrogenase, and reduced blood alcohol and acetaldehyde concentrations. These results demonstrated that GABA-enriched FST significantly protected alcohol-induced hepatotoxicity, and could be used as ingredient functional foods.

The effects of GABA-enriched fermented sea tangle (FST) on the ethanol-induced hepatotoxicity in Sprague-Dawley rats were investigated. Administration of ethanol to rats for 3 weeks induced liver damage with significant increase in hepatic malondialdehyde level and decrease in glutathione and antioxidant enzymes such as catalase, superoxide dismutase and glutathione peroxidase. However, pretreatment of rats with GABA-enriched FST inhibited the ethanol-induced oxidative stress in liver by suppressing the lipid peroxidation and maintain the levels of antioxidant enzymes and glutathione level. Further, GABA-enriched FST markedly decreased the lipid peroxidation in many vital organs such as kidney, heart, microsome, mitochondria, testis and spleen of rats. The biochemical changes were consistent with histopathological observations indicating marked hepatoprotective effect of GABA-enriched FST. Hence, these results suggested that GABA-enriched FST exhibit potent hepatoprotection against ethanol-induced liver damages in rats, and the effects of GABA-enriched FST could be attributed to the modulation of antioxidant enzymes activities and inhibition of lipid peroxidation.

목 차

제 1장. 연구개발과제의 개요 -----	11
1절. 연구개발의 목적 -----	11
2절. 연구개발의 필요성 -----	11
3절. 연구개발의 중요성 -----	12
4절. 연구개발의 범위 -----	14
제 2장. 국내외 기술개발 현황 -----	17
1절. 국내 기술개발 현황 -----	17
1. 국내 기술현황 -----	17
2. 국내의 특허현황 -----	18
2절. 국외 기술개발 현황 -----	19
1. 국외의 기술현황 -----	19
2. 국외의 특허현황 -----	20
3절. 국내외 연구수행 기관 -----	20
1. 국내의 연구수행 기관 -----	20
2. 국외의 연구수행 기관 -----	22
4절. 개발기술의 차별성 -----	22
제 3장. 연구개발 수행 내용 -----	24
1절. 해조 추출발효액의 제조 -----	24
1. 해조 추출액의 제조 공정개발 -----	24
가. 원료의 선별 및 전처리 공정 개발 -----	24
나. 해조류 추출공정 개발 -----	24
다. 해조류 추출액의 분리 및 정제기술 개발 -----	25
라. 해조류 추출액의 제조 및 분자량 분포 -----	27
2. 해조류 추출액에 적합한 발효균주의 개발 -----	28
가. 발효균주의 탐색 및 분리 -----	28
나. 발효균주의 동정 -----	28
다. 발효균주의 최적 생육조건 -----	28
3. 해조 추출발효액의 제조 및 특성 조사 -----	29
가. 해조 추출발효액의 샘플 및 시제품 제조 -----	29
나. 해조 추출발효액의 특성 조사 -----	30
4. 해조 추출발효액의 기능성 검토 -----	32
가. 해조 추출발효액의 DPPH 라디칼 소거 활성 -----	32
나. Hydrogen peroxide 소거 활성 -----	32
다. Reducing power 측정 -----	33
라. Fe ²⁺ 금속이온 킬레이팅 효과 -----	33
마. 해조 추출발효액의 ADH와 ALDH 활성 -----	33
바. AChE 저해 활성 -----	34
사. PEP 저해 활성 -----	34

아. ACE 저해 활성 -----	34
5. 기능성 검증을 위한 동물실험 -----	35
가. GABA-enriched fermented sea tangle decreases alcohol-induced hepatotoxicity via increase of antioxidant enzyme activities in Sprague-Dawley rats-----	35
(1) preparation of GABA-Enriched FST -----	35
(2) Animals and treatment -----	35
(3) Histopathological examination -----	36
(4) Preparation of liver homogenate -----	36
(5) Measurement of lipid peroxidation in liver tissue and plasma -----	36
(6) Determination of GSH -----	37
(7) Determination of Antioxidant enzymes in liver tissue -----	37
(가) SOD activity -----	37
(나) CAT activity -----	37
(다) GPx activity -----	37
(8) Statistical analysis -----	38
나. Effect of fermented sea tangle, on the alcoholic hepatotoxicity in Sprague-Dawley rats-----	38
(1) Animal and experimental design -----	38
(2) Analytical procedure -----	39
(3) Determination of ADH and ALDH -----	40
(4) Measurement of blood alcohol and acetaldehyde concentrations -----	40
(5) Pathological histology -----	40
(6) Statistical analysis -----	40
2절. 해조 추출발효액을 이용한 기능성 약주의 개발 -----	41
1. 실험 재료 및 사용 균주 -----	41
가. 실험 재료 -----	41
나. 사용 균주 -----	42
2. 약주의 제조 -----	42
가. 백미원료의 처리 -----	42
나. 입국의 제조 -----	42
다. 주모(밀술)의 제조 -----	43
라. 담금 방법 -----	43
마. 발효 -----	45
바. 제성 -----	45
사. 여과 -----	45
아. 저장 실험 -----	45
3. 성분분석 -----	46
(1) 발효 효모의 생육에 미치는 당질 종류별 영향 실험 -----	46
(2) 발효 효모의 알코올 농도별 및 온도별 내성 실험 -----	46
(3) 알코올 함량 측정 -----	46
(4) pH 및 산도 측정 -----	46
(5) 색도 -----	47
(6) 총 당도 측정 -----	47
(7) 환원당 측정 -----	47
(8) Mineral 함량 분석 -----	47
(9) 유기산 분석 -----	47

(10) 유리아미노산 분석 -----	50
(11) 유리당 분석 -----	50
(12) 주요 향기성분 분석 -----	52
(13) 환원력 검사 -----	54
(14) 항산화 활성 측정 -----	54
(15) 총 폴리페놀 함량 측정 -----	54
(16) 항혈전용해능 측정 -----	55
(17) ADH 및 ALDH 효소 활성 측 -----	55
(18) ADH 및 ALDH western blot analysis -----	56
(19) 관능검사 -----	56
제 4장. 연구개발 수행 결과 -----	57
1절. 해조 추출발효액의 제조 및 특성 조사 -----	57
1. 해조 추출발효액의 제조 -----	57
가. 정밀여과에 따른 해조 추출액의 분자량 분포 변화 -----	57
나. 최적 발효균주의 개발 -----	58
(1) 발효균주의 탐색 및 분리 -----	58
(2) 발효균주의 동정 -----	59
(3) 발효균주의 최적 생육 조건 -----	61
(4) <i>L. brevis</i> BJ20의 생육도 -----	63
다. 해조 추출발효액의 샘플 및 시제품 제조 -----	64
2. 해조 추출발효액의 특성 조사 -----	65
가. 발효에 따른 유리아미노산 조성의 변화 -----	65
나. 발효에 의한 향기성분 변화 -----	67
다. 고형분, polyphenol 및 일반성분 -----	69
라. 당당류 조성 변화 -----	69
3. 해조 추출발효액의 기능성 검토 -----	71
가. 해조 추출발효액의 항산화 활성 -----	71
나. 해조 추출발효액의 ADH 및 ALDH 활성 -----	75
(1) ADH activity -----	75
(2) ALDH activity -----	76
다. 해조 추출발효액의 AChE 및 PEP 저해 활성 -----	77
라. 해조 추출발효액의 ACE 저해 활성 -----	78
4. 기능성 검증을 위한 동물실험(in-vivo test) -----	80
가. GABA-enriched fermented sea tangle decreases alcohol-induced hepatotoxicity via increase of antioxidant enzyme activities in Sprague-Dawley rats -----	80
(1) Histopathological findings -----	80
(2) Effect of GABA-enriched FST on lipid peroxidation -----	81
(3) Effect of GABA-enriched on GSH -----	82
(4) Effect of GABA-enriched FST on antioxidant enzymes -----	83
나. Effect of fermented sea tangle, on the alcoholic hepatotoxicity in Sprague-Dawley rats -----	84
(1) Results and discussion -----	84
2절. 해조 추출발효액을 이용한 기능성 약주의 개발 -----	90
1. 균주별 입국(koji)의 일반성분 및 효모의 특성 -----	90
가. 증자 및 무증자 입국의 당도, 환원당, pH, 산도, 색도 측정 -----	90

나. 해조 발효분말 첨가 및 무첨가에 의한 알코올 발효 특성 조사 -----	91
(1) 발효 효모의 생육에 미치는 당질 종류별 영향 -----	91
(2) 발효 효모의 알코올 농도별 온도별 내성 실험 결과 -----	91
2. 해조 발효분말 첨가에 따른 약주 제조 -----	92
가. 약주 제조시 해조 발효분말 첨가의 최적 농도 -----	92
나. 발효 중 무게변화 측정 -----	93
다. 알코올 농도 -----	94
라. pH 및 적정 산도 -----	95
마. 색도 -----	97
바. 환원당 -----	96
사. Mineral 함량 -----	100
아. 유기산 -----	100
자. 유리아미노산 -----	103
차. 유리당 -----	106
카. 주요 향기성분 -----	108
파. 저장성 실험 -----	110
(1) 알코올 농도 -----	110
(2) pH -----	110
(3) 총산 -----	111
(4) 총당 -----	112
(5) 환원당 -----	113
(6) 색도 -----	113
3. 해조 발효분말 첨가에 따른 약주 제조 공정 개발 -----	115
4. 해조 발효분말 첨가 약주의 생리활성 -----	117
가. 환원력 -----	117
나. DPPH법에 의한 항산화 활성 -----	118
다. 총 폴리페놀 함량 -----	119
라. 항혈전용해능 -----	120
마. ADH 및 ALDH 효소 활성과 단백질 발현량 -----	121
5. 관능평가 및 시장조사 -----	124
제 5장. 목표달성도 및 관련분야에의 기여도 -----	131
1절. 연도별 연구목표 및 달성도 -----	131
2절 관련분야에의 기여도 -----	134
제 6장. 연구개발 결과의 활용계획 -----	136
1절. 추가연구의 필요성 -----	136
2절 개발 기술의 활용계획 -----	137
제 7장. 국내외 GABA관련 상품화 현황 -----	143
제 8장. 참고문헌 -----	144

제 1장. 연구개발과제의 개요

1절. 연구개발의 목적

본 연구는 해조류에 풍부하게 함유되어 있는 생리기능성 물질과 발효공법을 통한 고농도의 GABA를 함유하는 기능성 약주를 개발하여 사업화하는데 그 목적이 있다. 뿐만 아니라, 평소, 해조류로부터 발생하는 해조취(갯비린내)와 같은 이미, 이취를 제거하고 식감을 개선함으로써 건강을 생각하는 현대인에게 웰빙 트렌드에 부응하는 신개념의 해조류를 이용한 기능성 약주를 제공하는데 그 목적이 있다.

이를 위하여 당사는 “외부순환식 감압형 분리막 장치(특허 제 10-0888897)”을 이용하여 분리·분획공정을 확립하였으며, 이물질이 완전하게 제거된 맑고 깨끗한 해조추출액만을 발효공법에 적용하여 제조되는 해조발효액을 약주를 제조하는데 그 원료로 사용하였다. 따라서 본 연구는 약주를 개발함에 있어 국내 건강식품의 하나인 해조류를 적용하는데 그 목적이 있으며, 이를 통하여 해조류의 생리활성과 발효공법에 의하여 강화된 기능성을 가지는 약주를 제공하는데 그 목적이 있다.

2절. 연구개발의 필요성

최근 수년간 국내 약주 시장은 기능성을 무기로 다양한 신제품이 출시되고 있으며, 전통약주에 대한 관심과 수요가 지속적으로 성장하고 있으며 고품질, 고가의 주류가 지역적인 향토 주류 문화와 더불어 발전해 오고 있다. 한편 2008년도를 시작으로 전통주에 대한 주류세의 감면(50%)이 확정되어 전통약주 시장은 전체 시장규모에서 괄목할 성장에 예상된다. 기능성 약주시장에서 주류의 주원료는 쌀이지만 과실(즙)과, 식물 추출액에서부터 최근 벼섯(상황벼섯) 등 여러 가지 기호성과 기능성을 증대시키는 소재가 부 원료로 각광을 받고 있다.

한편 웰빙시대 건강식품 소재로써 해조류는 천연소재로써 그 기능성과 더불어 수요가 확대되고 있으며 특히 풍부한 미네랄 및 기능성 다당류로 인하여 항균, 항산화, 항바이러스, 항암활성을 비롯하여 동맥경화, 심근경색, 고혈압, 협심증, 뇌졸중 등의 생활 습관병 예방에 효과적이라는 보고들과 함께 해조류가 내재하고 있는 잠재적인 생리활성들을 엿볼 수 있다.

해조류 유래의 기능성 약주의 제조를 위하여 해조류 추출 공정상 필연적으로 발생되어 가공적성과 향미에 악영향을 미치는 알긴산 등의 점질 다당류와 고기능성 물질인 해

조다당류의 분리 분획시의 문제점과 원가 상승요인을 「외부순환식감압형 분리막 시스템」을 이용한 경제적 공정으로 해결할 수 있으며, 해조류를 이용한 2차 가공품 제조시의 한계점으로 지적되어온 해조 취(갯내음 등의 비린 취)가 해조발효액의 제조 및 기능성 약주의 제조공정 상의 다단발효를 통하여 완전히 제거되며 발효공정 중 생성된 대사산물의 결과로 얻어지는 기능성 물질 등에 의하여 고부가가치 기능성 소재로서의 조기 사업화가 가능하다.

3절. 연구개발의 중요성

1. 경제적 중요성

웰빙시대 자연 건강식품과 고기능성 식품에 대한 관심과 선호도는 지속적으로 증가되고 있으며, 이러한 웰빙 소비수요에 부합하는 기능성 천연 식품(소재)의 개발을 위한 연구개발이 진행되고 있으며, 주류시장에도 기능성과 기호성을 고려한 신제품 개발의 필요성이 대두되고 있다. 이에 스트레스 해소 및 혈행 개선, 숙취해소 작용에 관한 탁월한 임상 효능이 보고되고 있는 γ -aminobutyric acid (GABA)가 다량 함유된 주류의 제조방법을 개발함으로써 점차 규모가 확대되고 있는 약주시장 및 전통주 시장의 발전에 견인차 역할을 할 수 있다. 또한 전 세계적인 곡물 가 파동 등으로 식품 원료난이 가중되고 있는 현실에서 해조류를 원료로 하여 생성된 천연 GABA의 다양하고 우수한 효능과 풍부한 임상자료를 토대로 다양한 생리 효용성이 검증된 해조류 유래의 여러 가지 고기능성 다당류를 함께 이용함으로써 차세대의 기능성 주류를 제조할 수 있다.

현재 부산의 기장지역 및 전남 완도 등 국내 해조류 주산지에서 생산되는 해조류(다시마 등)관련제품은 양식에 의한 수확 후 염장 또는 건조에 의한 소분 등 단순가공에 지나지 않지만, 청정지역에서 양식된 해조류에 대하여 진일보된 수산가공기법 및 최첨단 분리, 분획기법과 다단 발효공법을 결합함으로써 안전성과 효능이 검증되어 의약품 및 건강기능식품 등으로 전 세계적으로 상용중인 GABA와 해조 올리고당의 생리활성을 동시에 부여하는 기능성 소재를 완성할 수 있다. 이러한 신소재를 이용한 「천연 GABA함유 기능성 약주」의 개발 및 조기 사업화의 추진은 양식어민(조합)과의 사전 계약에 의한 계획 재배를 통하여 확보된 원료 수급의 안전성과 경제성이 확보되어 제조업자의 경쟁력이 강화되며, 이를 바탕으로 고부가가치 제품의 안정적인 공급과 기능성의 향상으로 1차 양식어민의 소득 증대와 소비·유통 등 3차 산업의 상승효과를 통한 지역 경제발전을 도모할 수 있다.

2. 산업적 중요성

해조류는 식이섬유와 아미노산(Glutamic Acid, Aspartic Acid 등), 그리고 Carotenoid와 같은 천연 색소 등을 다량 함유하고 있으며, 생리활성 물질로 각광을 받고 있는 Fucoidan 등 기능성 해조 다당류와 올리고당 또한 풍부하여 이상적인 천연식품으로써 인식되고 있을뿐만 아니라 다양한 미네랄과 비타민 등이 풍부하게 함유되어 있고, 최근 해조류의 생리효용성에 관한 국내외 전문가들의 활발한 연구 수행 결과 해조류가 다이어트 작용, 정장 작용에 의한 변비치료, 중금속 및 방사능 물질의 체외 배출 작용 등에 깊이 관여하는 것으로 밝혀 지고 있다. 그리고 후코이단으로 통칭되는 함황 다당류의 경우는 항균, 항산화, 항바이러스, 항암활성을 비롯하여 동맥경화, 심근경색, 고혈압, 협심증, 뇌졸중 등의 성인병예방에 효과적이라고 보고되고 있다.

특히, 해조류 중에서 다시마는 전통적인 천연 조미료로 널리 이용되어 왔는데 이는 화학적 합성 조미료의 대명사로 널리 알려진 MSG(Mono Sodium Glutamate)의 대용품으로 다시마에 고 농도로 함유된(건다시마 기준 5%) 천연 아미노산인 글루탐산을 조미료의 정미성분으로 이용한 것이다. 한편 glutamic acid는 자가소화 효소나 미생물의 발효과정에서 탈탄산화 반응에 의해 GABA로 전환되는데, 이러한 GABA 생성 기작에 착안하여 미생물에 의한 해조류(다시마)의 발효공정을 개발함으로써 다시마에 다량으로 함유되어 있는 glutamic acid로부터 고농도의 GABA가 전환되는 것이다.

뿐만 아니라, 이 과정에서 해조류 가공 상의 한계 요소인 해조 취의 저감을 실현할 수 있으며, 식품소재로써 향미와(taste, flavour), 식감(texture)를 향상시키며, 젖산, 초산, 알코올 발효를 통하여 식품의 저장성을 향상시키고, 단백질, 필수아미노산, 필수지방산 및 비타민 등이 풍부한 식품을 제조할 수 있다. 또한 발효과정을 통한 독성물질 파괴 및 생리활성물질의 생산과 더불어 소화성을 증진하는데 탁월하다고 할 수 있다.

또한, 다시마는 웰빙시대 다이어트 식품 등 천연 건강식품으로 그 수요가 증가하고 있으며, 본 연구의 주요 기능성 물질인 GABA의 전구물질인 glutamic acid를 다량 함유한 천연의 원료로써, 고농도 GABA의 생산을 위한 종래의 생산방법인 MSG(화학적 합성품)의 인위적인 첨가에 따른 증량 없이도 천연 glutamic acid로부터 미생물에 의한 발효과정에서 천연의 GABA로 전환시킬 수 있다. 이와 동시에 미생물에 의한 발효과정에서 후코이단(fucoidan) 등 고분자 기능성 해조 다당류의 저분자화를 통하여 다시마 유래의 후코즈(fucose) 등의 단당류와 기능성 저분자 올리고당을 동시에 함유하는 해조류 발효액의 제조기술과 연속적인 다단 발효를 이용한 발효주 제조공정을 완성함으로써, 웰빙시대 소비자의 기호성과 기능성을 동시에 만족시킬 수 있다.

따라서 해조류(다시마) 추출액을 이용한 기능성 약주의 개발과 조기 사업화는 점차 그 중요성이 부각되고 있는 해조류 자원의 활용 뿐 만 아니라 고 기능성 천연 소재로서

식품산업에의 응용과 FTA 협약에 따른 양식 수산업의 경쟁력 향상을 위한 해조류산업의 육성을 위한 기반이 될 수 있으며, 최근 국가적 사업으로 진행되고 있는 바이오 에너지 생산을 위한 에너지원으로 해조류를 이용하기 위한 기반 연구의 측면에서도 본 과제 기술개발은 그 필요성이 인정된다 할 것이다.

4절. 연구개발의 범위(내용)

1. 1차년도 개발 내용

가. 기관별 개발 내용

▣ 주관기관

- ◆ 해조류 추출액의 추출 및 정밀 분리 분획기술의 완성
- ◆ 기능성 해조 추출 발효액의 제조 공정기술의 개발

▣ 참여기관(협동연구기관)

- ◆ 해조류 추출 발효액을 이용한 기능성 발효주 개발을 위한 기반기술의 개발

▣ 위탁기관

- ◆ 기능성 해조 추출 발효액의 물리 화학적 특성 규명
- ◆ 기능성 해조 추출 발효액의 기능성 탐색

나. 세부 개발 내용

▣ 주관기관

- ◆ 해조류 추출액의 추출 및 정밀 분리 분획기술의 완성
 - 외부순환식감압형 분리막공정의 설계와 PILOT-PLANT 완성
 - 해조류 추출액의 추출 및 분리 공정 확정
- ◆ 기능성 해조 추출 발효액의 제조 공정기술의 개발
 - 고분자 해조 다당류의 저분자 올리고당화 기술을 위한 미생물 발효공정 개발
 - 해조추출액의 해조 불쾌취의 제거와 향미의 개선을 위한 발효기술 개발
 - 해조류 유래의 Glutamic Acid의 GABA 전환 균주의 분리 및 확정
 - 해조류 최적 발효조건 탐색

■ 참여기관(협동연구기관)

- ◆ 헤조류 추출 발효액을 이용한 기능성 발효주 개발을 위한 기반기술의 개발
 - 곡류와 헤조추출 발효액의 당화공정 개발
 - 알코올 발효기술 및 숙성기술의 개발
 - 기능성 발효주의 품질관리기준 확립

■ 위탁기관

- ◆ 기능성 헤조 추출 발효액의 물리 화학적 특성 규명
 - 헤조추출 발효액의 일반성분, 아미노산조성, 분자량 분포, 당조성 분석
- ◆ 기능성 헤조 추출 발효액의 기능성 탐색
 - 항산화, 항혈액응고, 항고혈압 및 숙취해소 활성 탐색 (IN - VITRO TEST)

2. 2차년도 개발 내용

1. 기관별 개발 내용

■ 주관기관

- ◆ GABA 함유 기능성 헤조 발효액의 대량생산 제조공정 확정
- ◆ GABA 함유 기능성 헤조 발효액의 시제품 제조

■ 참여기관(협동연구기관)

- ◆ GABA 함유 기능성 발효주의 대량생산공정 개발 완성
- ◆ GABA 함유 기능성 발효주의 시제품 생산

■ 위탁기관

- ◆ GABA 함유 기능성 헤조 발효액의 기능성 검증
- ◆ GABA 함유 기능성 발효주의 기능성 검증
- ◆ GABA 함유 기능성 헤조 발효 분말 시제품의 물리 화학적 특성 분석

2. 세부개발내용

■ 주관기관

- ◆ GABA 함유 기능성 헤조 발효액의 대량생산 제조공정 확정
 - Scale-Up에 의한 헤조 추출액 제조공정 확정과 조업 자료 획득
 - Scale-Up에 대량생산용 발효공정의 확정과 조업 자료 획득

- ◆ GABA 함유 기능성 해조 발효분말 시제품 제조
 - 건조 공법의 확정
 - 시제품 제작과 성분규격 확정, 시험성적서 작성 , 제조원가계산서 작성

▣ 참여기관(협동연구기관)

- ◆ GABA 함유 기능성 발효주의 대량생산공정 개발 완성
 - 조향기술의 개발과 기능성 발효주의 생산 공정 개발 완성
 - Scale-Up에 기능성 발효주의 대량생산 공정 확정

- ◆ GABA 함유 기능성 발효주의 시제품 생산
 - 시제품 생산과 품질 규격 확정
 - 기능성 발효주의 기능성 검증

▣ 위탁기관

- ◆ GABA 함유 기능성 해조 발효 분말의 기능성 검증
 - 동물시험 (숙취유도 RAT모델에 의한 숙취해소 효능 검증)
- ◆ GABA 함유 기능성 해조 발효 분말 시제품의 물리 화학적 특성 분석
 - 일반성분, 아미노산조성, 당조성, 미네랄 함량 등 정성, 정량 분석
- ◆ GABA 함유 기능성 발효주의 생리활성 탐색
 - 항산화, 항혈액응고, 항고혈압 및 숙취해소 활성 탐색 (IN - VIVO TEST)

제 2장. 국내외 기술개발 현황

1절. 국내 기술개발 현황

1. 국내의 기술현황

해양생물을 소재로 한 주류개발은 해조류가 가지는 제한 요소로 인한 미개척 분야로써 해조류를 이용한 주류의 제조와 관련한 기술은 해조류의 조제 또는 열수 추출액을 주류 제조 시 당화공정에 소량 첨가한 사례가 있을 뿐이며, 구체적인 예로써 다시마를 누룩제조에 첨가하여 누룩곰팡이에 의해 다시마 분해를 유도함으로써 맛과 향이 높고 생리활성이 좋은 탁주, 청주, 증류주 개발이 특허(1건)로 공개되어 있으나 기호성의 부재로 사업화의 진행은 불가할 것으로 판단되며, 매생이의 추출액을 첨가한 막걸리로써 「매생이淸막걸리: (주)엔존, 2007년 7월」가 개발되어 시판되고 있는 정도이다.

본 과제와 관련된 기술에서는 해조류 유래의 기능성 약주의 개발을 위하여 목적하는 기능성 및 이에 따른 소재의 개발이 중요한데, 본 연구의 주요 기능성 물질인 GABA와는 달리 해조류를 이용한 기능성 소재의 개발은 후코이단 (Fucoidan)등 기능성 다당류를 중심으로 한 연구 및 상용화 기술개발이 대부분이며, 특히 해조류로부터 GABA소재의 개발에 관한 연구는 전무 하였다. 또한 해조류를 이용한 주류(약주 등)의 개발은 해조류가 가지는 특유의 불쾌 취 (해조 취, 갯 내음, 비린 취 등)와 다시마 등이 가지는 강한 지미 성분(glutamic acid 등) 등이 그 한계점으로 지적되어 사업화가 불가능 하였다. 전 세계적으로 혈압강하용 주사제 와 건강기능식품 소재로 상용되고 있는 GABA 소재의 경우 경제성의 확보를 위하여 화학적 합성품인 MSG(Mono Sodium Glutamate)로부터 미생물(유산균)의 발효과정을 통한 고농도 GABA를 제조 공급하고 있으나, 미 반응 잔여 MSG등의 분리 제거 등에서 한계점을 노출 하고 있다.

본 과제의 도출을 위한 당사의 선행연구에서는 해조류를 이용한 GABA 제조기술을 국내·외 최초로 개발하여 특허출원 하였으며(국제특허출원 진행 중), 해조류로부터 미생물 발효에 의한 GABA 제조 과정에서 해조취의 제거 및 향미의 개선효과를 검증하였다. 또한 다시마에 함유된 고 함량의 glutamic acid를 95%이상 GABA로 전환시킴으로써 해조류를 이용한 기능성 약주 개발의 한계점으로 지적되어온 단백질의 가수분해에 따른 아미노산의 정미성(지미 물질) 발현 문제점을 완벽히 해결 하였고, 발효과정에서 알코올의 생성또한 확인함으로써 본과제의 수행을 위한 기초 기반기술이 완성되었다.

해조류를 대상으로 한 GABA관련 발효기술은 전무하며 현미의 발아공정기술 및 유산균을 매개로한 MSG 발효를 이용한 GABA전환기술이 연구되고 있다. 국내에서 GABA는 그 동안 추출 공정이 까다롭고 고순도의 GABA를 생산하는 기술이 부족하여

고가의 일본 제품을 수입함으로써 원가 부담이 커져 널리 사용되지 못하였다. 그러나 최근 국내에서도 GABA 추출 및 제품 생산이 이루어지면서 “GABA 발아현미”를 중심으로 시장규모가 확대 되고 있는데, 한국식품공업협회 및 관련 업계에 의하면, 우리나라의 발아현미 시장규모는 2003년 약 50억원 정도인 것으로 파악되고 있다. 그러나 이 중에서 GABA 성분을 의도적으로 증대·함유시킨 제품은 거의 없으며, 국내 도입단계에 있는 GABA는 발아현미, 음료, 우유, 라면, 김치등의 다양한 식품에 적용되기 시작하였고, 이를 생산 및 활용하는 업체들이 증가되면서, 국내 GABA 관련 시장규모는 앞으로 크게 확대 될 가능성이 있는 것으로 생각된다. GABA는 식물, 곡물 등에 소량 함유되어 있는 GABA함량을 크게 증대시켜, 자연식품으로서 판매하거나 GABA 성분을 추출한 소재로 판매하여, 이를 건강기능성식품, 음료 등에 적용하여 판매할 수 있는데, 우리나라에서는 식품의약품안전청으로부터 식품 첨가물 및 기능성 물질로써 인정을 받지 못하고 있어, 주로 GABA 함량을 증대시킨 자연식품으로 판매되고 있다. 향후, 일본과 같이 식품의약품 안전청으로부터 식품 첨가물 및 기능성 물질로써 인정받게 되는 경우, GABA 성분을 이용할 수 있는 폭이 훨씬 넓어지면서, 국내 GABA 시장규모는 크게 증가될 가능성이 높은 것으로 생각된다.

국내 GABA 관련 제품을 보면 신창상역(주)의 발아현미 제품 “자연 미인”,(주)엘텍의 “쌀눈 플러스”, (주)가바월드의 “발아현미 미소”, (주)계명푸텍스의 현미발아 추출물 등을 비롯하여, GABA 성분을 활용한 CJ의 “햇반 발아현미밥”, 한국야쿠르트의 “뉴트리 라면”, 대상의 “참쌀고추장 발아현미”, (주)두산식품 BG의 “가바 김치” 등이 출시되었으며, 빙그레·남양·서울우유 등의 우유업계도 GABA의 효능을 이용하는 발아현미 우유를 출시하고 있다. 녹차음료 회사인 건영식품도 GABA 성분을 함유한 쌀배아 추출물 분말을 넣은 “가야 녹차발”이란 녹차음료를 출시하고 있다. (주)파마바이오는 김치로부터 GABA를 다량 생성하는생산시스템을 확립하여 식품소재인 고 순도의 “파마 GABA”를 저가에 공급하고 있어, 이를이용한 건강기능식품, 음료, 발효유, 드링크, 김치 등의 제품개발도 이루어지고 있다.

2. 국내의 특허현황

국내의 경우 1999년부터 GABA 식품관련 특허가 출원되기 시작하여 2001년에 5건이 출원되었으며 그 후에도 꾸준히 출원되고 있다. 국내의 경우 일본과 비교하면 관련 특허가 적은 편이지만 건강식품에 대한 관심의 증가로 GABA관련 특허의 출원이 꾸준히 증가되리라고 예상된다. 특히 식품 규제가 완화되어 식품 배합의 첨가제로서의 사용이 가능하게 되면 GABA 식품 관련 연구가 활발하게 진행되어 특허출원 수가 크게 증가될 것으로 예상된다.

국내의 주요 출원인을 살펴보면 오석홍 교수가 2건으로 가장 많은 특허를 출원하였고 출원업체로는 (주)태평양, (주)설원테크, (주)유진텍에서 각각 1건씩 출원하였고 외국 기업으로는 (주)롯데에서 1건을 출원하였으며, GABA를 고생산하는 유용 미생물 균주의 선발 및 활용을 통해 GABA 고함유소재를 개발하는 기술에 관한 특허들도 출원되고 있다. (주)과마푸드는 김치속에 존재하는 K-3균의 발효를 이용 GABA를 고농축시키는 기술을 활용하여 고농도 GABA를 포함한 식품소재 “과마 GABA”를 개발하였으며 이를 특허 등록하였다.

2절. 국외 기술개발 현황

1. 국외의 기술현황

일본 및 미국에서는 뇌혈류 개선용 의약품으로 승인되어 GABA성분이 주로 의약용으로 이용하고 있으나, 일본과 한국에서는 최근 식품 및 식품첨가물로 이용하려는 시도가 다양하게 이루어지고 있다. 일본에서 GABA는 경구 섭취로 혈압강하 및 안정작용 등의 효과를 발휘하는 것으로 알려지면서, 기능성식품소재로서 주목을 받게 되어 사업화가 이루어지고 있다. 식품의 기능성 성분으로서 혈압강하와 안정작용 효과가 발견되어 인기가 높아지고 있는 GABA 관련제품의 일본 시장규모는 2002년 100억엔 정도였던 것으로 추정되고 있다. 일본에서 GABA는 발아현미, 음료, 김치, 두부, 낫토, 두유, GABA떡밥, 레토르트 죽, 주먹밥, 도시락, 건강식품소재(분말·액·페이스트) 등으로 이용되고 있다. 일본에서 GABA 관련 제품을 취급하고 있는 업체로서는 (주)팬클, 오리자油化, 協和醱酵, (주)과마푸드, 池田糖化工業, 佐久間食品(株), 日清오일리오(株) 등이며, 현재 판매되고 있는 제품도 식품소재, 건강식품, 현미 등 수 십종에 달하고 있다. GABA 발아현미 분야에서 가장 큰 매출을 기록하고 있는 (주)팬클은 2001년 33억엔, 2002년 60억엔의 GABA 발아현미 매출을 달성하였다.

또한 오리자油化도 GABA 함량이 높은 “오리자가바”를 기능성식품소재로서 사업화하였다. 協和醱酵가 2002년 11월 발매한 순품 GABA는 13만엔/kg으로, 효과가 기대되는 1일 적정량인 수십 mg당 10엔 이하라는 저가격을 실현하여 GABA관련 제품의 이용을 확대시키고 있다. 대두 GABA를 중심으로 일본 업체들의 동향을 살펴보면 다음과 같다. 池田糖化工業(株)는 대두를 고체 발효시킨 GABA 함량 1% 이상의 소재인 “GABA 발효 대두”를 2001년부터 분말, 페이스트, 추출 엑키스 형태로 판매하고 있다. 밀솔류션고베도 GABA 발아현미와 GABA 성분을 증대시킨 대두를 혼합하여 분말화한 건강보조식품을 2002년 10월부터 판매하고 있으며, 山陽豆腐協業組合도 GABA 두부 “心配”를 2000년 개발하여 판매하고 있다. 또한, 두부제조 회사인 佐久間食品(株)는 혈압강하 작용과 치매 예방에 효과가 있는 것으로 알려진 GABA를 62mg 배합한 페트ボトル용 두유 “블로장생”을

500엔/500ml으로 2003년부터 발매하고 있다. 日清오일리오(株)(www.oilligroup.com)도 발아대두 제조 두유를 120엔/125ml의 가격으로 2003년11월부터 판매하기 시작하여 2004년 5억엔의 매출을 달성하였다.

2. 국외의 특허 현황

일본의 식품관련 GABA 특허의 연도별 출원 현황을 보면 식품·약품 구분의 규제 완화에 따라 GABA를 함유하는 식품소재로서 뿐만 아니라 식품에 배합하는 첨가제로서 사용이 가능하게 된1998년 이후 이후에는 매년 5건 정도의 특허가 꾸준히 출원되고 있다.

일본공개특허공보 평 7-213252호는 쌀배아에 함유되어 있는 GABA를 발아공정의 변환과 가공처리를 통해 GABA를 증가시킨 기술을 소개하고 있으며, 특허공보 평 9-238650호는 효모나 클로렐라를 이용하여 GABA를 100g 당 600mg 이상 함유한 식품소재를 제조하는 방법을 소개하고 있다.

일본특허공보 평 7-12296호는 토마토를 사용한 변환 반응을 기재하고 있다. 토마토, 당근 등 생야채의 분쇄물에 글루타민산 나트륨을 엮어 혼합하고 소정시간 방치하면 GABA를 생산할 수 있다는 연구 결과이다. 그러나 GABA의 생성량이 100g 당 32mg으로 매우 적으며, 최종생성물 중에 미반응 나트륨이 잔존하여 혈압상승 억제 작용을 저해할 가능성도 있다.

이상에서 기술한 바와 같이 GABA에 관한 연구 및 기술에 대한 개발은 국내외적으로 상당히 활발하게 진행되어 왔으면 현재에도 진행중에 있다. 그러나 국내 기술과 연구는 해외의 선진국에 비하여 아직 많이 부족한 상태이어서 본 연구가 국내 GABA관련 연구에 포석이 될것으로 판단된다. 참고로, 표 1은 국내외 GABA관련 제품과 그 기술에 대한 개요이다.

3절. 국내외 연구수행 기관

1. 국내의 연구수행 기관

우석대학교의 오석홍 교수팀은 벼를 대상으로 하여 확보된 GAD(glutamate decarboxylate) 및 endosperm specific promoter 유전자를 활용하여 GAD 고발현, GABA 함량이 증진된 벼씨를 얻었다. 생산된 벼 종자로 부터 GABA 고 함유 발아종자를 생산

표 1. 국내외 GABA관련 제품 및 개요

회 사 명	제 품	개 요	구분
協和醱酵	GABA 순품 분말	미생물을 이용하여 생산한 GABA 순품으로, 13만엔/kg의 저가격 실현	국외
(주)파마푸드	GABA 고탄유제품	김치의 유산균으로 생산한 파마GABA	국외
후지코	수퍼GABA	식물성 유산균과 효모로 발효한 GABA함유량이 5% 이상인 제품	국외
(주)팬클	발아 현미	일본 농림수산성 특허를 라이선스하여 상업화 추진	국외
군제(주)	홍국 엑키스	γ 아미노낙산 함유 홍국 엑키스	국외
池田糖化工業	GABA발효대두	대두를 고체 발효시킨 GABA 함량1% 이상인 소재	국외
(주) 건영 식품	가야 녹차발	GABA 성분을 함유한 쌀 배아 추출물 분말을 녹차에 첨가	국내
(주) 대상	찹쌀 고추장	GABA 성분을 함유한 현미 배아 추출물을 고추장에 첨가	국내
CJ제일제당(주)	발아현미	현미의 혐기적 발아를 통한 GABA 함량의 증대	국내
CJ제일제당(주)	발아현미밥	GABA 함량을 증대한 발아현미를 이용한 즉석밥 제품	국내

하고, 발아종자로부터 GABA를 비롯한 생리활성 물질을 얻어 향암 및 면역조절식품으로 개발하고자 하는 노력을 하고 있다.

(주)파마푸드에서는 발효식품의 출발물질로 사용되는 유산균에 주목하여 glutamic acid로부터 GABA의 생산을 목표로 각종 발효식품으로부터 GABA 생산능력이 높은 미생물을 검색하였다. 그 결과 김치로부터 분리한 유산균이 매우 높은 GABA 생산능력을 갖는다는 것을 발견하였다. 이와 같은 김치 유래 유산균에는 *Lactobacillus hilgardii* K-3 균주, *Lactobacillus brevis* OPK-3균주, *Lactobacillus sakei* B2-16균주 등이 있다.

2. 국외의 연구수행 기관

일본종합연구소의 Tsushida 등은 녹차 생엽의 전처리 과정에서 생엽을 혐기적으로 처리하였을 때 GABA가 고농도로 축적되는 것을 발견하였으며, 곡류의 발아 과정 중 생리활성을 활용하여 GABA의 함량을 크게 증진시킬 수 있다는 사실에 초점을 맞추어, 일본 농림수산성의 Saikusa 등은 현미를 물에 수시간 침적 시키면 배아중의 glutamic acid가 GAD의 활성화에 의해 다량의 GABA가 축적됨을 보고하였다.

大洋향료(주)에서는 발효식품의 출발물질로 사용되는 유산균 중에서 GABA를 고농도, 고효율로 생성하는 유산균주를 발견하여 유제품을 주성분으로 하는 GABA 고함유 식품인 GABA 락토엑기스를 개발하였다. GABA 락토엑기스는 유제품을 주원료로 하여 식용 유산균을 발효시켰기 때문에 범용성·기호성이 높아 일상적으로 섭취하는 것이 가능하다.

油田당화공업(주)에서는 glutamic acid를 풍부하게 함유한 대두를 원료로하여 발효법에 의한 GABA의 증강방안을 검토하였다. 그 결과 인도네시아의 전통적인 발효식품인 템페에 사용되고 있는 템페균을 사용, GABA 증강 발효대두식품의 개발에 성공하였다.

4절. 개발기술의 차별성

본 기술의 사업화와 관련된 핵심기술 및 혁신성은 천연의 원료에 의해 생성되는 고농도 천연GABA의 생산을 주축으로 하여, 신속한 분리 정제와 더불어 해조류의 가공적성을 개선하고 해조취 등의 이미 이취를 발효를 통하여 제거하는데 주요 착안점을 가진다.

또한, 당해 기술에 의해 생산되는 기능성 신소재를 대상으로 하여 제조되는 기능성

약주는 알코올성 간손상을 완화하며, 음용후에 발생하는 숙취를 줄여줄 수 있는 특징을 가진다. 표 2는 당해 기술의 독창적인 특성을 나타내고 있다.

표 2. 관련기술과 개발기술과의 차이점

구분	관련 기술 / 현행기술	개발 신기술의 혁신성
GABA 제조기술	<ul style="list-style-type: none"> ● GABA의 전구물질로합성MSG이용 (미 반응 잔존 MSG의 한계점) ● 천연물 소재 GABA의 경우 GABA농도는 극 미량 (0.5%이하) 	<ul style="list-style-type: none"> ● 해조류발효에 의한 천연GABA제조 <ul style="list-style-type: none"> - GABA의 전구물질로써 해조류 등에 함유된 천연글루타민산 이용 (특허 제 10-0888897호) - 고농도 천연 GABA소재 (5% 이상함유)
후코이단 제조기술	<ul style="list-style-type: none"> ● 후코이단의 추출을 위한 공정비용이 과다함 (열수추출/알콜추출/분리정제 공정 비용의 과다) ● 고분자해조다당류(M.W100KD이상)로써 인체내 소화흡수 불량 	<ul style="list-style-type: none"> ● 단일 발효공정에 의한 복합 기능성부여 <ul style="list-style-type: none"> - 저분자해조올리고당 (함황당:FUCOSE등) - 타우린, 해조식이섬유, 해조미네랄 함유
정밀여과 분리정제	<ul style="list-style-type: none"> ● 필터프레스 (Filter Press) <ul style="list-style-type: none"> - 정밀여과불가. 고점도물질 불가 - 슬러지 재활용 불가 ● 한외여과장치(UF System) <ul style="list-style-type: none"> - 과도한 설치비 및 운전경비, - 고점도 물질불가, 슬러지활용불가 	<ul style="list-style-type: none"> ● 외부순환식감압형분리막 공정기술 <ul style="list-style-type: none"> - 설치비/운전경비의 경제성 실현 - 여과 및 분리/분획 효율 우수 - 자동운전 (운전-휴지-역세-운전 등) - 고점도 물질(알긴산 등)의 분리가능 - 슬러지의 재 회수 및 활용 가능
가공적성 생산성	<ul style="list-style-type: none"> ● 액상발효공정 <ul style="list-style-type: none"> - 공정비용 과다, 제품수율 저조 ● 고상발효공정 <ul style="list-style-type: none"> - 멸균 및 살균 불가(안전성문제) 	<ul style="list-style-type: none"> ● 액상발효공정 <ul style="list-style-type: none"> - 발효공정 단순화 - 제품화 수율 100% ● 고상발효공정 <ul style="list-style-type: none"> - 멸균 및 살균 시스템 구축으로 안전성 확보

제 3장. 연구개발 수행 내용(재료 및 방법)

1절. 해조 추출발효액의 제조

1. 해조 추출액의 제조 공정개발

가. 원료의 선별 및 전처리 공정개발

해조류의 선별기준은 당해 연구에서 목적으로 하는 기능성 물질인 GABA(γ -aminobutyric acid)의 전구물질로 작용하는 glutamic acid를 다량으로 함유하고 있는 다시마를 선정하였다. 다시마를 추출하기 위한 전처리 공정에는 다시마에 붙어 있는 이물질 등을 제거하기 위한 수세공정과 다시마의 염분을 제거하는 탈염공정, 그리고 효율적인 추출을 위한 분쇄공정이 있다. 선별된 다시마의 수세를 위해 충분한 물을 취하여 수세한 후, 탈염 공정을 거치는데 탈염 공정에서는 앞서 수세한 다시마에 급수를 1:2의 비율로 혼합하여 30~60분 동안 침지시키는 과정을 2~3회 반복하였다. 탈염공정을 거친 원료를 습식 분쇄기를 이용하여 추출하기에 적합한 크기로 분쇄하였다. 즉, 수세와 탈염공정을 거쳐 추출에 적합한 크기로 분쇄함으로써 전처리된 다시마를 추출공정에 적용하였다. 최종 전처리된 다시마의 크기는 가로세로 0.5~1cm 내외의 크기로 추출후에 약 5배의 크기로 흡수하여 불어났는데 있어서의 추출탱크 및 발효조 내외로 투입 및 토출에 문제가 되지 않는 크기이다.

나. 해조류 추출공정 개발

추출을 위해 수세, 탈염, 분쇄공정을 거쳐 적당한 크기로 전처리한 다시마에 급수를 1:15의 비율로 혼합한 후, 70℃에서 30분간 열수추출 하였다. 추출이 끝난 후, 다시마 추출액과 다시마 박을 20mesh 망을 이용하여 분리한 후, 추출액을 취하여 정밀여과 공정에 적합한 온도(40℃ 이하)로 냉각 시켰으며, 이를 다음 공정인 정밀여과 공정에 적용하였다. 이 과정에서 다시마에 함유되어 있는 천연의 정미성분(glutamate 등) 뿐만 아니라 기능성 다당류(후코이단 등)가 추출된다. 상기의 방법에 의하여 제조된 추출액의 일반적인 특성은 아래의 표 3과 같다. 추출 배수가 낮을수록 추출액의 brix(%)가 높아 추출 수율 면에서는 양호하였지만 NaCl의 농도가 높고 해조취 등의 이미, 이취가 강하여 제품으로서의 기능에 악영향을 미치며, 추출 배수가 높을수록 brix(%)가 낮아, 추출수율이 떨어지는 단점을 나타낸다. 따라서 적합한 추출에 필요한 급수량은 15배수, 즉 다시마와 급수를 1:15의 비율로 추출하는 것이 가장 바람직한 것으로 나타났다. 또한 1:10의 비율 이하는 다시마가 추출과정에서 다시마의 섬유질 내로 흡수하는 수분에 비해 수득할 수 있는 추출액의 양이 적어 가공적성에는 맞지 않았다.

표 3. 급수량에 따른 다시마 추출액의 특성

구 분	pH	Brix(%)	NaCl(%)
추출 10배수	6.9~7.2	5.0~6.2	2.0~2.2
추출 15배수	6.5~7.2	3.5~4.5	0.9~1.3
추출 20배수	6.8~7.0	2.0~3.2	0.6~0.7

다. 해조류 추출액의 분리 및 정제 기술 개발(특허 제 10-0888897)

(1) “외부순환식 감압형 분리막(모듈)”의 개발

“외부순환식 감압형 분리막 장치”에 적용되는 모듈은 아래의 그림1과 같이 개발되었다. 현 단계에서는 1, 2, 6인치의 모듈을 개발하였으며 UF(inside-out)방식과 MF(out side-in)방식의 두가지 타입의 방식이며 세부 규격은 아래의 표 4와 같다. UF 방식의 모듈은 기존의 중공사막 한외여과(hollow fiber style)방식으로 가압방식의 여과 및 농축에 적용되며, MF 방식의 모듈은 감압방식의 마일드한 운전조건으로 여과 및 농축을 진행하면서, 압축공기(air bubble)을 이용하여 fouling 현상을 최대한 억제함으로써 일정한 분리 선속도를 유지시키는데 효과적이기 때문에 고점도 용액이나 미생물 배양 후의 농축 등에 효과적인 특징을 가지고 있다. 또한 모듈의 pore size의 종류를 달리하여 분자량별 분리 및 정제가 가능하다. 모듈의 pore size는 1KDa~10KDa으로 교체하여 사용이 가능하다.

표 4. 종류별 모듈의 세부규격

구 분	Membrane material	MWCO(pore size)	Membrane area
6 inch	PES	100kDa	0.80m ²
2 inch	PS	UF : 10kDa MF : 0.1um	1.20m ²
1 inch	PVDF	UF : 10kDa MF : 0.1um	0.90m ²

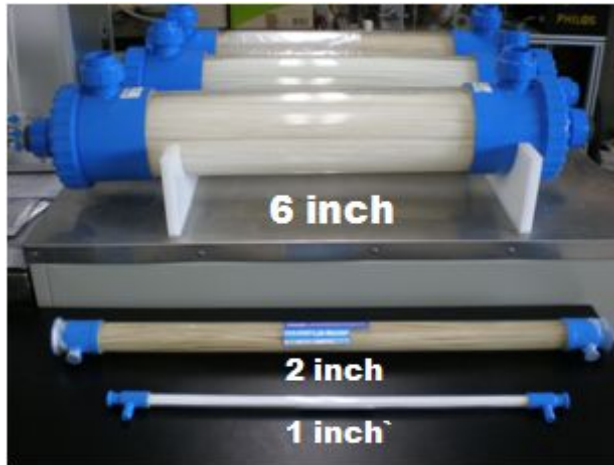


그림 1. 종류별 모듈 사진(위에서부터 6, 2, 1 inch module)

(2) 외부순환식 감압형 분리막 장치의 개발

상기의 개발된 모듈을 장착하여 운전하기 위한 장치의 개발은 아래의 그림 2와 같이 개발 되었다. 운전에는 순환펌프 및 감압펌프를 비롯한 압축공기를 이용한 aeration을 위한 콤프레셔 등을 필요로 하고 있다. 또한 이러한 부수적인 장치에 합당한 라인을 설치하였다. 뿐만 아니라 효율적인 작업 및 분리시간의 단축을 포함하는 안전성 및 운전의 단순화를 위하여 장치의 자동화된 운전 및 운영에 중점을 두었다. 운전시 필연적으로 발생하는 fouling 현상을 미연에 방지하기 위한 대책으로 압축공기를 이용한 aeration뿐만 아니라 역세공정을 도입하였으며, fouling 방지 공정(aeration and back washing process) 또한 자동적인 운영으로 이루어지게 설계되었다. 이러한 자동화 시스템은 2인치와 5인치 장비 즉, scale-up 장비에 적용되었으며 lab scale의 1인치 장치는 수동으로 운영된다. 이는 1인치 장치의 간소화를 도모하여 lab scale의 실험샘플을 처리하고자 compact하게 설계되었기 때문이다. 이러한 장치의 개발과 관련된 기술은 현재 특허등록까지 진행되었다.

또한“외부 순환식 감압형 분리막 시스템”은 외부의 환경과 격리된 막분리공정으로서 기존의 가압식 공정과는 달리 여과액이 나오는 부분에 자흡식 펌프를 부착하여 감압식으로 70mmHg~400mmHg 사이의 마일드한 조건에서 운전함으로써, 압력에 따른 막의 부담을 최소화 시킬 뿐만 아니라 여과액 방출부로부터 자흡식 펌프로 액을 흡입하여 여과하기 때문에 펌프와 농축액이 직접적으로 접촉하는 일이 없으며 항상 저압에서 운전하고 별도의 농축 탱크가 필요 없고, 배관, 밸브 및 시스템의 비용이 최소화 되어 매우 경제적이다. 또한 각각의 멤브레인(모듈)의 하단으로부터 지속적으로 공기를 방출하여 막의 외부 표면에 흡착 될 수 있는 오염물질을 지속적으로 떨어 낼 수 있도록 설계됨에 따라 여과공정이 진행되면서 막의 오염이 가속화되지 않고 지속적으로 안정한 투과성을 가지는 장점을 가지며, 또한 여과액을 분획분으로 분리하여 제조할 수 있다.

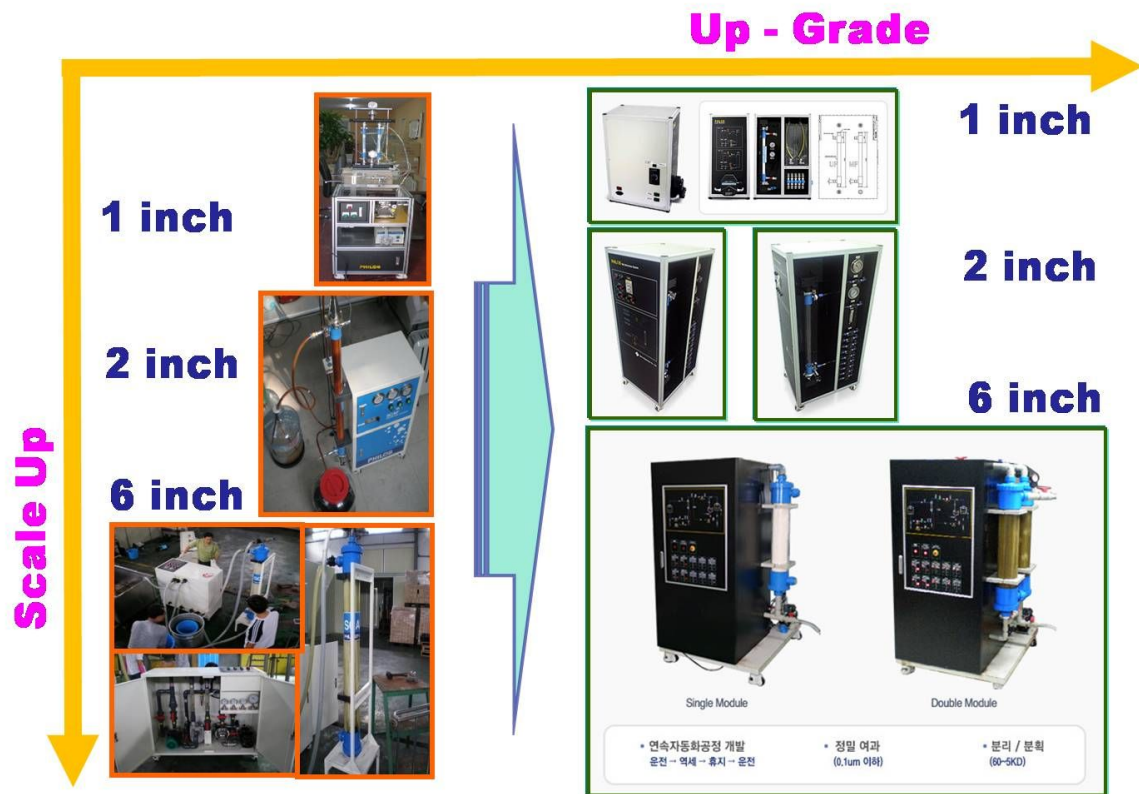


그림 2. 외부순환식감압형 분리막 장치의 개발과정(Up-grade & Scale-up)

라. 해조류 추출액의 제조 및 분자량분포

해조류 추출액은 상기의 방법에 의하여 추출한 후, 고액분리를 통하여 다시마의 조체를 제거한 추출액을 외부순환식 감압형 분리막 장치를 이용하여 정밀여과 하였다. 정밀여과는 pore size를 달리하여 두종류의 추출액을 제조하였다. 즉, pore size가 0.1μm인 모듈을 이용하여 여과한 1차 추출여과액과 1차 추출여과액을 MW(molecular weight)가 10kDa인 모듈을 이용하여 여과한 2차 추출여과액을 본 실험에 사용하였다.

외부순환식 감압형 분리막 장치에 의한 정밀여과에 따른 추출여과액, 1차(pore size 0.1μm) 및 2차(pore size 10kDa) 여과액 내의 분자량 분포를 알아보기 위하여, GPC(Gel Permeation Chromatography)법을 이용하여 분자량의 분포를 분석하였으며, GPC법에 의한 절대 분자량의 계산은 0.2 N NaNO₃를 완충용액으로하여 0.5% 내외의 농도로 조절한 수용액 상태의 샘플을 refractive index(RI), light scattering(LS), diffractive pressure(DP) 및 ultra violet(UV)의 검량곡선으로부터 절대 분자량이 자동으로 계산되어지는 GPC(Viscotek, USA) 장치를 사용하였다. 표준시료는 polyethyleneoxide(PEO, MW=110,000)를 사용하여 재현성 여부 및 기기의 안정한 상태를 파악하였다.

2. 해조류 추출액에 적합한 발효균주의 개발

가. 발효균주의 탐색 및 분리(Screening and Isolation)

본 연구에서 개발 목적으로 하는 기능성 물질인 GABA(γ -aminobutyric acid)를 생성하는 우수 발효균주를 탐색하기 위하여 젓갈 및 김치 등의 국내의 전통 발효식품으로부터 유산균을 탐색하였으며, 과수원의 토양 및 과일 외피 및 과육으로부터 효모를 탐색하였다. 상기의 시료를 멸균수에 희석한 후, 1차적으로 유산균과 효모를 각각 MRS와 YM agar에 도말하여 분리하였으며 각각의 colony를 MRS와 YM broth에 현탁하여 순수 분리 하였다. 순수 분리된 유산균과 효모를 MRS와 YM broth에 MSG(mono sodium glutamate)를 1%첨가한 배지에 접종하여 배양한 배양액을 TLC(thin layer chromatography)를 이용하여 순수 분리균의 GABA생성 유무를 판단하여, 이들 중에서 우수한 활성을 가지는 균주를 선별하였다. 상기의 시료로부터 유산균은 4종이 분리되어 그 중에서 가장 GABA생성능이 우수한 균주를 선별하여 "BJ20"으로 명명하였으며, 효모는 screening과정에서 12균주를 분리하였으나 모두 GABA생성능이 없는 것으로 나타났다. 때문에 당사에서 보유하고 있는 4종(저당효모, 고당효모, 와인효모, 빵효모)의 *Sacchalomyces cerevisiae*를 검토해 본 결과 저당효모에서 GABA생성능이 나타난 것을 확인할 수 있었다. 따라서 이후의 실험에서는 BJ 20으로 명명한 유산균과 *Sacchalomyces cerevisiae*을 각 1종을 선별하여 실험을 수행하였다.

나. 발효균주의 동정 (Identification)

GABA를 우수하게 생성하는 균주를 선별하여 동정하였으며, 동정은 분리한 균주의 배양액을 멸균 swab을 이용하여 멸균 증류수 2mL와 현탁배지 5mL에 현탁하여 API 50 CHL medium의 gallery에 각각 접종한 후 각 균주의 배양액(29°C±2°C에서 24시간)을 첨가한 후, 배양하고, API 50 CHL analytical profile index로 동정하였다. EH한 index에 없거나 혼동될 우려가 있을 때는 24시간 재배양하여 판독하였으며, 그 결과를 bergey's manual, Balows, Gibbs와 Skinner의 방법에 따라 형태학적, 배양학적 및 생리적인 특징을 비교하여 확인 및 동정하였다.

다 발효균주의 최적 생육 조건

(1) 최적 온도 조사

앞서 분리한 유산균의 최적 발효온도를 조사하기 위하여 당사가 고안한 배지로 MRS의 주요 배지성분에서 급수를 다시마의 1차 추출 여과액으로 대체한 배지(이후,

STM broth)를 사용하였다. STM broth에 분리균을 2% 접종하고, 각각의 온도를 달리하여 배양한 후, 균의 성장을 흡광도로 측정하여 비교하였다. 온도는 4, 15, 20, 25, 30, 37, 50℃에서 수행하였으며, 배양액은 spectrophotometer을 이용하여 640nm에서 측정하였다. pH와 rpm은 모두 동일한 조건으로 실험하였다.

(2) 최적 pH 조사

분리된 유산균의 최적 pH를 알아보기 위하여 동일 배지(STM broth)상에서 각각의 pH를 달리하여 배양한 후, 균의 성장을 흡광도로 측정하였다. 각각의 pH는 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11에서 수행하였으며, 배양액은 spectrophotometer을 이용하여 640nm에서 측정하였다. 온도와 rpm 및 유산균 접종량은 모두 동일한 조건으로 실험을 실시하였다.

(3) 최적 NaCl 농도 조사

상기의 분리된 유산균의 최적 NaCl 농도를 조사하기 위하여 동일 배지(STM broth)에 NaCl 농도를 달리하여 배양한 후, 균의 성장을 흡광도로 측정하여 비교하였다. 각각의 NaCl 농도는 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10%가 되도록 NaCl을 첨가하였으며, 배양액은 spectrophotometer을 이용하여 640nm에서 측정하였다. 온도, rpm, pH 및 유산균 접종량은 모두 동일한 조건으로 실험하였다.

(4) 최적 생육조건에 의한 Growth curve

상기의 방법에 의하여 확인된 최적 온도, pH, NaCl 농도를 적용하여 분리된 균을 배양한 후 시간의 경과에 따른 균의 생육도를 알아보았다. 시간별로 배양액을 채취하여 spectrophotometer로 640nm에서 균의 생육도를 측정하였다. 실험에 접종한 유산균의 양은 배지의 2%이며, 배지는 STM broth를 사용하였다.

3. 해조 추출발효액의 제조 및 특성 조사

가. 해조 추출발효액의 샘플 및 시제품 제조(Scale-up 공정개발)

해조류(다시마)를 추출하여 고액을 분리한 후, 추출액을 0.1um의 pore size를 가지는 모듈을 이용하여 외부순환식 감압형 분리막 장치로 여과한 추출 여과액을 이용하여 배지를 제조하였다. 발효에 사용된 배지는 다시마 추출 여과액(0.1um 이하)을 정제수 대신에

첨가하였으며, 이외에 영양 성분으로 yeast extract와 glucose 등을 첨가하여 제조하였다. 발효는 37°C, pH 7, 120rpm, 1% NaCl의 조건으로 MRS에 전배양된 유산균을 2~3%가 되도록 접종하였다.

우선적으로 lab scale(100mL)에서 발효시험을 마친 후, 점차적으로 scale-up하여 5L, 10L, 50L, 500L의 scale로 규모를 증가시켜 실험을 실시하였으며 최종적으로 500L fermentor를 이용하여 해조 추출발효액을 시생산 하였다. 또한 최종적으로는 시생산된 해조 추출발효액을 동결건조한 후, 분쇄하여 분말형태의 시제품을 생산하였다.

나. 해조 추출발효액의 특성 조사

(1) 해조 추출발효액의 유리아미노산 조성 변화

해조 추출여과액의 발효에 의한 유리아미노산 조성의 변화를 알아보기 위하여, 해조 추출여과액의 발효전과 발효후의 샘플을 제조하여 유리아미노산 분석기를 통하여 분석하였다. 즉, 발효 중 다시마 발효액의 유리아미노산 함량을 측정하기 위하여 다시마 발효액의 pH를 0.02 N HCl로 조정한 후 0.20 μ m membrane (DIS MIC 25CS, Toyo Roshi Kaisha, Japan)으로 여과하여 제조하였다. 이어서 유리아미노산의 분석은 시료의 일정량 (20 μ L)을 아미노산 자동분석기 (AAA L-8900, Hitachi High-Technologies Co., Japan)에 주입하고, 일정한 유속 (0.3 mL/min)으로 흘려서 실시하였다.

(2) 해조 추출발효액의 향기성분 변화

Flavor의 분석은 시료 채취 및 농축 주입 장치인 흡착-채취 열탈착시스템 (ATD 400, PerkinElmer, UK)을 이용하여 시료를 제조한 다음, 이를 GC-MS (GCMS QP-5050A, Shimadzu, Japan)로 실시하였다. 이 때 흡착-채취 열탈착시스템과 GC-MS의 분석조건은 아래의 표 5와 같다.

Flavor의 분석을 위하여 시료의 일정량 (5 mL)을 진공 vial에 넣고 휘발성 성분을 휘발시키기 위하여 약 30분 동안 고온 (99°C)처리한 다음 휘발성 성분을 흡착관에 흡착시키고 이를 흡착-채취 열탈착시스템에 장착시켰다. 이어서, 열과 운반가스에 의하여 수분 동안 열탈착 (heating rate, 30°C/sec)을 통하여 2차 트랩 (-30°C)으로 이동과 동시에 농축시킨 다음 열탈착과 운반가스에 의하여 GC 컬럼 (HP-1, 25 m \times 0.2 mm \times 0.33 μ m)으로 도입시켰다. 이 때 1차 트랩의 탈착 온도와 시간은 350°C에서 4분으로 하였으며, 2차 트랩의 농축온도는 -30°C, 2차 튜브의 탈착온도 및 시간은 350°C에서 1분으로 하였다. Flavor의 분석을 위하여 사용한 GC는 column (HP-1, 25 m \times 0.2 mm \times 0.33 μ m)을 장착한 Hewlett Packard에서 생성한 Series II (5890)를 사용하였고, 이의 유속은 3 mL/min, detector는 FID, oven temperature는 150°C에서 시작하여 2°C/min, 5°C/min 및

2°C/min의 속도로 각각 250°C, 270°C 및 300°C까지 각각 3단계 승온시키고 마지막 시간을 15분간 유지시켰다. 또한, GC/MS는 column (HP-5MS, 30 m × 0.32 mm × 0.25µm)을 장착한 GCMA / QP(5050A)를, detector는 TIC를 사용하였고, oven temperature는 130°C에서 시작하여 10°C/min, 3°C/min, 5°C/min 및 3°C/min의 속도로 각각 150°C, 250°C, 270°C 및 300°C까지 각각 4단계로 승온시키고 마지막 시간을 15분간 유지하였다. 이때 mass range는 50~550이고, mass spectrometer에서 얻은 chromatogram의 분자구조는 Wiley database로 확인하였다.

표 5. 흡착-채취 열탈착 시스템과 GC-MS의 분석조건.

Parameter		Conditions
ATD400 (PerkinElmer, UK)	Primary tubetype	Tenax-TA
	Cold trap type	Tenax-TA20 mg
	1st Desorption	350°C-4 min
	2nd Cryo temp.	-30°C
	2nd Desorption	350°C-1 min
	Desorb flow	50.2 mL/min
	In let split	No
	Out let split	11.5 mL/min
GC-MS (Shimadzu, Japan)	Oven temp.	35°C-10 min 8°C/min-120°C-10 min 12°C/min-80°C-7 min 15°C/min-230°C-10 min
	Column	ATI-60 m × 0.21 mm × 1.0 µm
	Interface temp.	230°C
	Mass range	20~350 m/z
	Column pressure	15.9 psi
	MS Detect temp.	250°C
	Carrier gas	He (99.9999%)
Mass filter type	Quadrupole	

(3) 고형분 및 polyphenol의 분석

고형분 함량은 미리 건조한 팬에 시료 1 mL를 넣고 105°C에서 5시간 가열건조한 다음 가열처리 전 무게에 대한 가열 전후 무게 차의 상대비율(%)로 하였다. Polyphenol 함량은 Shetty 등의 방법에 따라 측정하였다. 즉, polyphenol 함량의 측정을 위하여 각 시료 (1 mL)에 95% 에탄올 용액 1 mL와 증류수 5 mL를 각각 넣어 혼합한 후 50% Folin-Ciocalteu reagent (Sigma Aldrich Co., St. Louis, Mo) 0.5 mL를 넣고 5분간 반응시켰다. 이어서 반응물에 5% Na₂CO₃ 용액 1 mL를 가한 후 암소에서 1시간 동안 반응시킨 다음 725nm에서 흡광도를 측정하여 phenol 함량을 측정하였다. 탄수화물 함량은 AOAC 법에 따라 phenol-H₂SO₄ 방법으로 측정하였고, 단백질 함량은 Lowry 법으로 측정하였다.

(4) 단당류 조성 분석

다시마 발효액의 단당류 함량 및 조성을 측정하기 위해 발효액 0.75 mL와 4 M의 trifluoroacetic acid (TFA) 0.75 mL을 cryo tube에 넣고, 100°C에서 4시간 동안 산 가수분해 시켰다. 반응종료 후, 0.45 µm syringe filter로 여과하고 증류수 첨가 후 감압농축으로 용매를 제거하고, 증류수를 가하는 조작을 2~3회 반복하여 잔류 TFA를 제거하였다. 발효액의 단당류 함량 및 조성은 산 가수분해 처리에 의하여 제조한 산가수분해물 (20 µg)을 당 분석용 컬럼인 CarboPac™ PA1 (Dionex, USA)이 장착된 HPAEC-PAD (Dionex, USA)을 이용하였고, 이 때 시료 20 µL을 injection하여 1.0 mL/min 속도로, 이동상 용매로는 18 mM 수산화나트륨을 사용하였다. 이들 결과와 6종 표준물질 (fucose, galactose, glucose, mannose, xylose, arabinose)의 머무름 시간과 피크면적을 상호 비교 분석하고, 계산하여 사용하였다.

4. 해조 추출발효액의 기능성 검토

가. 해조 추출발효액의 DPPH 라디칼 소거 활성 측정

해조류 추출 발효액의 DPPH 라디칼 소거 활성은 Heo 등이 기술한 방법을 약간 변형하여 사용하였다. 즉, 각 시료를 다양한 농도로 제조한 다음 시료 0.1 mL와 실험 직전 1.5×10^{-4} M로 제조한 DPPH 용액 0.1 mL을 96-well plate에 첨가하여 잘 섞은 후 실온에서 30 분간 반응 시킨 후 UV 분광광도계를 이용하여 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. 대조군은 시료 대신 메탄올을 넣었고, 모든 실험은 3회씩 측정하여 평균을 구하였다. DPPH 라디칼 소거 활성은 다음과 같은 공식에 의해 계산하였다.

$$\text{DPPH 라디칼 소거 활성 (\%)} = [(\text{Abs.}_{\text{control}} - \text{Abs.}_{\text{sample}}) / \text{Abs.}_{\text{control}}] \times 100$$

Abs._{control} : Control의 흡광도

Abs._{sample} : Sample의 흡광도

나. Hydrogen peroxide 소거 활성

Hydrogen peroxide 소거 활성은 Muller (1985)의 방법을 이용하여 측정하였다. 즉 다양한 농도의 시료 0.1 mL와 0.02 mL hydrogen peroxide, 0.07 mL 0.1 M phosphate buffer (pH 5.0)를 96-well plate에 잘 섞은 후 37°C에서 5분간 반응시킨 후 0.03 mL 1.25 mM ABTS와 0.03 mL peroxidase (1 U/mL)를 첨가하여 37°C에서 10분간 반응시킨 후

405 nm에서 microplate reader를 이용하여 흡광도를 측정하였다. Hydrogen peroxide의 소거 활성은 다음과 같은 공식에 의해 계산하였다.

$$\text{Hydrogen peroxide 소거 활성 (\%)} = [(\text{Abs.}_{\text{control}} - \text{Abs.}_{\text{sample}}) / \text{Abs.}_{\text{control}}] \times 100$$

Abs._{control} : Control의 흡광도

Abs._{sample} : Sample의 흡광도

다. Reducing power (환원력) 측정

해조류 추출 발효액의 환원력은 Chu 등 (2000)의 방법을 약간 변형하여 측정하였다. 즉 0.3 mL 0.1 M phosphate buffer (pH 6.6), 0.5 mL 1% potassium ferricyanide를 다양한 농도의 시료 0.2 mL와 잘 혼합한 후 50°C에서 20분간 반응시킨 후 0.5 mL 10% TCA를 첨가하여 반응을 종결시킨다. 반응액을 3000 rpm에서 10분간 원심분리하여 상층액 0.5 mL를 취한 후 여기에 0.5 mL의 증류수와 0.1 mL 0.1% FeCl₃를 첨가한 후 잘 혼합하여 700 nm에서 흡광도를 측정하였다.

라. Fe²⁺ 금속 이온 킬레이팅 효과

Fe²⁺ 금속 이온 킬레이팅 활성은 Singl 및 Rajini (2004)의 방법에 따라 측정하였다. 즉 시료 용액을 0.1 mM FeCl₂와 잘 섞은 후 상온에서 30초간 방치한 후 0.25 mM ferrozine 용액을 첨가하여 10분간 반응 시킨 후 562 nm에서 흡광도를 측정하였다.

마. 해조 추출발효액의 ADH 및 ALDH 활성

(1) ADH(Alcohol dehydrogenase) 활성

효소원은 동결 건조된 S9 rat liver homogenate를 0.1% bovine serum albumin 용액 8 ml에 녹여 0.45 μm syringe filter로 여과한 후 사용하였다. ADH의 활성 측정은 흡광도 340 nm에서 NADH의 생성속도를 지표로 사용하였다. 반응액의 조성은 증류수 1.4 ml, 1.0 M tris-HCl buffer (pH 8.8) 0.75 ml, 20mM NAD⁺ 0.3 ml, ethanol 0.3 ml, 시료 0.1 ml의 혼합액과 효소원 0.15 ml을 cuvette에 넣어 총 3 ml이 되도록 조절하여 30°C에서 5분간 preincubation 한 후, 5분간 340nm에서의 흡광도의 변화를 측정하였다. 이때 시료를 첨가하지 않을 것을 대조군으로 하였다. 시료의 ADH 활성은 control에 대한 상대 활성(%)으로서 측정하였다.

(2) ALDH(Acetaldehyde dehydrogenase) 활성

효소원은 동결 건조된 S9 rat liver homogenate를 0.1% bovine serum albumin 용액 8 ml에 녹여 0.45 μ m syringe filter로 여과한 후 사용하였다. ALDH의 활성 측정은 흡광도 340 nm에서 NADH의 생성속도를 지표로 사용하였다. 반응액의 조성은 증류수 2.1 ml, 1.0 M tris-HCl buffer (pH 8.8) 0.3 ml, 20mM NAD⁺ 0.1 ml, 1.0 M acetaldehyde 0.1 ml, 3.0 M KCl 0.1 ml, 0.33 M 2-mercaptoethanol 0.1 ml, 시료 0.1 ml의 혼합액과 효소원 0.1 ml을 cuvette에 넣어 총 3 ml이 되도록 조절하여 30°C에서 5분간 preincubation 한 후, 5분간 340nm에서의 흡광도의 변화를 측정하였다. 이때 시료를 첨가하지 않을 것을 대조군으로 하였다. 시료의 ALDH 활성은 control에 대한 상대활성(%) 으로서 측정하였다.

바. Acetylcholinesterase(AChE) 저해 활성

AChE의 저해 활성은 Ellman et al. (1961)의 방법에 준하여 측정하였다. 즉 140 μ L 100 mM sodium phosphate buffer (pH 8.0), 20 μ L 시료 용액 및 20 μ L의 AChE (0.36 U/mL)를 잘 섞은 후 15 분간 상온에서 반응시킨 후 10 μ L DTNB (0.5 mM) 및 10 μ L ACh (0.6 mM)를 첨가하여 효소 반응을 시작하였다. ACh의 분해정도를 412 nm에서 15 분간 흡광도를 모니터하였다.

사. Prolyl endopeptidase(PEP) 저해 활성

PEP 저해 활성은 다음과 같은 방법으로 측정하였다. 즉 10 μ L 0.1 M sodium phosphate buffer에 200 μ L 시료 용액 및 PEP 기질 20 μ L를 첨가하여 잘 섞은 후 37°C에서 10분간 반응시켰다. 그런 다음 20 μ L 0.1 unit/mL PEP 용액을 첨가하여 효소 반응을 시작하여 30분간 반응시킨 후 410 nm에서 ELISA reader를 이용하여 흡광도를 측정하였다.

아. Angiotensin Converting Enzyme (ACE) 저해 활성

ACE 저해활성은 Cushman와 Cheung (1971)의 방법에 준하여 측정하였다. 즉, 일정한 발효액을 0.1 M sodium borate buffer (pH 8.3, 300 mM NaCl 함유)에 녹인 발효액 100 μ L에 25 mU/mL ACE용액 100 μ L를 가한 후, 37°C에서 30분간 항온처리 하였다. 여기에 25 mM Hip-His-Leu (107.4 mg/10 mL sodium borate buffer) 50 μ l를 넣고 37°C에서 60분간 반응시킨 후, 1 N HCl용액 0.5 mL를 가하여 반응을 정지시켰다. 반응용액

에 ethyl acetate 1.5 mL를 가하여 교반한 다음, 원심분리 (2,500×g, 5 min)시켜 상층액 1 mL를 분취하였다. 이 상층액을 완전히 건조시킨 다음 증류수 1 mL를 가하여 용해시키고, 228 nm에서 흡광도를 측정하였다. ACE 저해제의 농도는 ACE의 저해활성을 50% 저해시키는데 필요한 가수분해물의 농도를 계산하여 IC₅₀ (mg/mL)으로 정의하였다.

5. 기능성 검증을 위한 동물실험(IN-VIVO TEST)

가. GABA-enriched fermented sea tangle decreases alcohol-induced hepatotoxicity via increase of antioxidant enzyme activities in Sprague-Dawley rats

(1) Preparation of GABA-Enriched Fermented Sea Tangle (FST)

For the preparation of GABA-enriched FST, the sea tangle was added to water at a ratio of 1:15 (w/ v) and 2% (w/w) of rice flour based on the amount of sea tangle was also added to the mixture to aid fermentation [13]. After autoclaving at 121°C for 30 min, a sea tangle solution was obtained and the *Lactobacillus brevis* BJ20(Accession no. KCTC 11377BP) culture broth was added to the solution at a concentration of 2%(v/v), which was well mixed and then incubated at 37°C.

The GABA content in the culture broth was measured as follows. A 1 mL sample was taken and diluted using 0.02 N HCl to 20 times. The diluted solution (2 mL) was filtered through a 0.2 µm membrane filter (DISMIC-25CS, Toyo Roshi Kaisha, Tokyo, Japan). The filtered sample (20 µL) was subjected to an amino acids analyzer (AAA L-8900, Hitachi High-Technologies Co., Tokyo, Japan) with flow rate of 0.3 mL/min.

(2) Animals and Treatment

Seven-week old male Sprague Dawley rats were obtained from the Hyochang Science Animals Co. (Daegu, Korea). Animal was housed individually in the suspended wire-mesh stainless steel cage under room temperature between 21 to 24°C and lighting between 08:00 and 20:00. Animals were allowed to access freely to semi-purified basal diet for 1 week before the experiment. Animals were then randomly divided into 3 experimental groups based on dietary categories: the normal groups fed with water, the alcohol feeding control group fed with alcoholic beverage containing ethanol 30% (v/v), and the alcohol + FST group fed with alcohol and FST 5% (w/w). Overall, each group consisted of 6 rats that were fed appropriate diet for

3 week period. The food consumption and water intakes were measured with everyday and body weight gain was measured with once a week. Animal care was followed by the National Institute of Health guidelines on the care and use of laboratory animals, and the protocols for the animal study was approved by our Institutional Animal Care and Use Committee.

(3) Histopathological Examination

Liver tissue was fixed in 10% neutral buffered formalin solution and processed for histological examination according to the conventional method and staining with hematoxylin and eosin (H&E).

(4) Preparation of Liver Homogenate

The weighed frozen liver tissue was homogenized in a glass-Teflon homogenizer with 50 mM phosphate buffer at pH 7.4 to obtain 1: 9 (w/v) whole homogenate. Then, the homogenate was centrifuged at 10,000 g for 10 min at 4°C to discard any cell debris, and the supernatant was used for the determination of CAT, GPx and SOD. Total protein contents were determined by the method using BSA assay kit (BioRad, CA, USA), using bovine serum albumin as a standard.

(5) Measurement of Lipid Peroxidation in Liver Tissue and Plasma

The quantitative measurement of lipid peroxidation was assessed by measuring the concentration of thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) in plasma using the method described by Ohkawa et al. [14] with slight modifications. A 20 μ L of plasma sample were mixed with 800 μ L of 0.22% H₂SO₄. Then, 100 μ L of 10% phosphotungstic acid and 200 μ L of 0.67% TBA(in H₂O : glacial acetic acid = 1;1v/v) were added to the mixture, shaken, warmed for 1h in a boiling water bath followed by rapid cooling. Later, it was shaken in to a 600 μ L of n-butyl alcohol layer in a separation tube, and MDA content in the plasma were determined(excitation and emission wavelengths : 531nm vs 590nm) using spectrofluorometer(Spectra Max, CA, USA). MDA, a measure of lipid peroxidation, was calculated using an excitation coefficient of 1.56×10^5 /Mcm. The results were expressed as μ M/mg protein.

(6) Determination of Glutathione (GSH)

The concentration of reduced GSH in plasma and liver tissues was evaluated using GSH (0–100 μM) as the standard [15]. The diluted sample solution or standard (10 μL) was mixed with 95 μL of the reagent (2 U/mL glutathione reductase, 200 μM NADPH, and 2 mM EDTA in 50 mM phosphate buffer, pH 7.2), followed by the addition of 100 μL of the reagent (10 mM DTNB in 50 mM phosphate buffer, pH 7.2). The reaction mixture was then incubated at room temperature, and the absorbance at 405 nm was determined every 1 min up to 5 min using the ELISA reader (Spectra Max). The concentration was expressed as GSH mg/g.

(7) Determination of Antioxidant Enzymes in Liver Tissues

(7-1) Superoxide Dismutase (SOD) Activity

Superoxide dismutase (E.C.1.15.1.1) level in liver tissue was estimated using commercial kit supplied by Biovision (CA, USA). Xanthine and xanthine oxidase were used to generate superoxide anion, which react with tetrasolium chloride to form a yellow color formazan dye. SOD activity was measured at 450 nm. The enzyme activity was expressed as U/mg protein.

(7-2) Catalase (CAT) Activity

CAT (E.C. 1. 11. 1. 6) activity of liver tissues was determined using a commercially available kit, a product of Biovision. One unit of CAT was defined as the amount of enzyme required to decompose 1 μM of H_2O_2 in 1min. The rate of decomposition of H_2O_2 was measured spectrophotometrically at 570nm. The enzyme activity was expressed as mU/mg protein.

(7-3) Glutathione Peroxidase Activity (GPx)

The enzyme reaction in the tube, which contains NADPH, reduced glutathione, glutathione reductase, was initiated with the addition of cumene hydroperoxide, and the change in absorbance at 340 nm was monitored by a spectrophotometer. GPx

(E.C. 1.11.1.9) activity was determined using a commercial kit supplied by Biovision and the activity was given as Unit/mg protein.

(8) Statistical Analysis

The results were expressed as mean \pm SD, and all statistical comparisons were made by means of one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Duncan's test. The difference showing a *P* level of 0.05 was considered to be statistically significant.

4. Effect of fermented sea tangle, on the alcoholic hepatotoxicity in Sprague-Dawley rats

(1) Animal and experimental design

Seven-week old male Sprague Dawley rats were obtained from the Hyochang Science Animals Co. (Daegu, Korea). Animal was housed individually in the suspended wire-mesh stainless steel cage under room temperature between 21 to 24°C and lighting between 08:00 and 20:00. Animals were allowed to access freely to semi-purified basal diet for 1 week before the experiment. Animals were then randomly divided into 4 experimental groups based on dietary categories: the normal groups fed with water, the alcohol feeding control group fed with alcoholic beverage containing ethanol 30% (v/v), and the alcohol + FST group fed with alcohol and FST 5%(w/w)(table 6). Overall ,each group consisted of 6 rats that were fed appropriate diet for 3 week period. The food consumption and water intake were measured with everyday and body weight gain was measured with once a week. Animal care was followed by the National Institute of Health guide lines on the care and use of laboratory animals, and the protocols for the animal study was approved by our Institutional Animal Care and Use Committee.

Table 6. Compositions of experimental diets (%)

Group	Normal	Alcohol	Alcohol + FST
Casein	20	20	15
Cornstarch	10	10	10
Sucrose	50	50	50
Cellulose	5	5	5
Corn oil	10	10	10
Mineral mixture ¹⁾	3.5	3.5	3.5
Vitamin mixture ²⁾	1	1	1
Choline bitartrate	0.2	0.2	0.2
DL-Methionine	0.3	0.3	0.3
FST ³⁾	0	0	5

¹⁾ AIN 93 M-MX mineral mix, MP Biomedicals, Illkirch, France

²⁾ AIN 93 VX vitamin mix, MP Biomedicals, Illkirch, France

³⁾ Fermented sea tangle

(2) Analytical procedure

At the end of the experimental period, the rats were sacrificed by with drawing blood from the abdominal aorta under light diethyl ether anesthesia. Serum was obtained by centrifuging the blood at 1,026×g for 15 min at 4°C. The concentrations of total lipid, triglyceride, total cholesterol, and the activities of serum alanine

aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST) and lactate dehydrogenase (LDH) were measured by Chemiclinal Chemistry Analyzed in Neodin Medicinal Institute (Seoul, Korea).

(3) Determination of ADH and ALDH

ADH activity was measured using Bergmeyer's method (1974). The conversion of nicotinamide adenine dinucleotide (NAD) to nicotinamide adenine dinucleotide phosphate hydrogenase (NADPH) was followed by recording the changes in absorbance at 340 nm for 5 min after the initiation of the enzyme reaction. ALDH activity was measured using the method of Koivula and Koivusalo (1975).

(4) Measurement of blood alcohol and acetaldehyde concentrations

Blood alcohol concentration was determined using a commercial UV-test kit (R-Biopharm Co., Ltd., Darmstadt, Germany). This enzymatic test for alcohol utilized the coenzyme NDA and ADH. Formation of NADH can then be measured quantitatively by the increase in the absorbance at 378 nm. Blood acetaldehyde concentration was also measured using a commercial kit with ALDH as the enzyme.

(5) Pathological histology

Liver tissue was fixed in 10% neutral buffered formalin and processed for histological examination according to the conventional method and staining with hematoxylin and eosin (H&E).

(6) Statistical analysis

The results were expressed as mean \pm SD, and all statistical comparisons were made by means of one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Duncan's test. The difference showing a P level of 0.05 was considered to be statistically significant.

2절. 해조 추출발효액을 이용한 기능성 약주의 개발

1. 실험 재료 및 사용 균주

가. 실험 재료

양조용 원료 쌀은 시판 일반미를 마트에서 구입하여 사용하였다. 양조용수는 수질검사를 받아 음용할 수 있는 지하수(표 7)를 RO(Reverse Osmosis) 처리하여 담금 용수로 사용하였다.

표 7. Analysis of brewing water

Item	Brewing water	Value of drinking water	Item	Brewing water	Value of drinking water
Mesophilic bacteria	0	100 CFU/mL ↓	Cl ⁻	1	250 mg/L ↓
Total coliform group bacteria	None	불검출 CFU/mL	Mn ²⁺	None	0.3 mg/L ↓
pH	7.0	5.8~8.5	Fe ²⁺	None	0.3 mg/L ↓
NH ₄ -N	None	0.5 mg/L ↓	Evaporific residue	9.0	500 mg/L ↓
NO ₃ -N	0.2	10 mg/L ↓	Turbidity	0.046	1.0 NTU ↓
Cadmium	None	0.005 mg/L ↓	Aluminium	None	0.2 mg/L ↓
Hardness	4.2	300 mg/L ↓	SO ₄ ²⁻	None	200 mg/L ↓
Odor	Odorless	Odorless	Color	None	5 ↓°

나. 사용 균주

코지 제조용 균주 *Rhizopus oryzae* KCCM 11273, *Aspergillus oryzae* KCCM 11372, *Aspergillus kawachii* KCCM 32819 및 *Monascus purpureus* KCCM 12002를 KCCM으로부터 구입하여 각각 균사체를 고체배지에서 전배양 하여 포자를 사용하였다 (표 8). 약주 제조용 주모는 *Saccharomyces cerevisiae* KCCM 11350 효모 균주로 YPD 액체배지에서 30℃로 24시간 배양시켜 사용하였다.

표 8. Strains used in this study

No	KCCM No.	Strains
1	11273	<i>Rhizopus oryzae</i>
2	11372	<i>Aspergillus oryzae</i>
3	32819	<i>Aspergillus kawachii</i>
4	12002	<i>Monascus purpureus</i>



2. 약주의 제조

가. 백미원료의 처리

주원료인 백미의 원료처리는 일단 원료미에 포함된 불순물 등을 제거한 후 선별하여 수세하였다. 입국을 제조하기 위하여 일반미를 5시간 동안 13±2℃의 물에 침지하여 수분을 흡수시켰고, 침지된 원료미를 건져내어 30분 동안 절수하였다. 절수가 끝난 원료미를 고압증기 솥에 넣어 40분간 증자하여 고두밥(증미)을 만든 후 30℃로 방냉 하였다.

나. 입국의 제조

미리 배양된 종균을 증자된 쌀 표면에 접종하여 30℃ 국실에서 하루 두 번씩 섞어주면서 균사체가 완전히 퍼질 때까지 약 이틀간 국을 제조하였다. 또한 무증자 입국을 제조하기 위하여 물에 불린 쌀의 물기를 제거하고 분쇄기로 갈아 종균의 포자를 접종하여 3

0℃ 국실에서 균사체가 완전히 퍼질 때까지 약 이틀간 무증자 입국을 제조하였다(그림. 3). *Monascus purpureus*의 경우 포자의 생육속도가 느려 다른 입국보다는 좀 더 긴 시간으로 입국을 제조하였다.

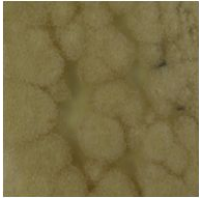
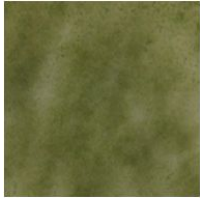
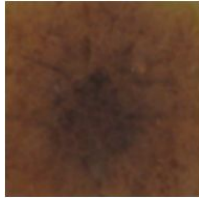

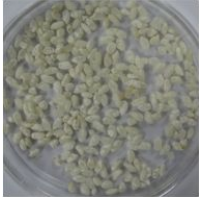
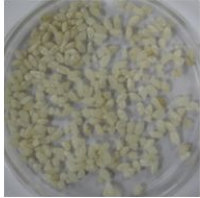
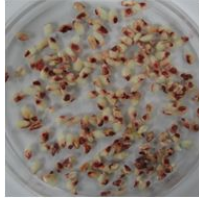

Classification	<i>Aspergillus kawachii</i>	<i>Aspergillus oryzae</i>	<i>Monascus purpureus</i>	<i>Rhizopus oryzae</i>
Culture				
<i>koji</i>				

그림 3. Potographs of the culture and *koji*.

다. 주모(밑술)의 제조

제조된 입국 100 g에 급수 150 mL, 건조효모 2 g을 첨가한 후 잘 혼합한 다음 25℃에서 48시간 배양한 후 4℃ 냉장고에 보관하면서 약주 주모로 사용하였다.

라. 담금 방법

발효 다시마 분말의 첨가 또는 무첨가 약주의 사입 배합과 담금 방법은 표 9와 같다. 1단 담금은 입국과 물을 혼합 한 후 주모(밑술)를 첨가하여 25±1℃에서 48시간 발효시켰다. 담금 조건 중 물은 입국 원료량의 150%이고, 주모(밑술) 사용량은 덧밥을 기준으로 총량의 5%를 사용하였다. 1단 담금 48시간 후 2단 담금을 실시하였는데 급수비율은 증미의 180%이고, 발효 다시마 분말은 총 급수량의 0.5%를 2단 담금에 첨가하였다.

즉, 전체 양조한 원료 쌀 무게에 대하여 입곡은 5%, 급수량은 172.5%, 발효 다시마 분말은 총 급수량의 0.5%를 첨가한 후 25℃에서 12일간 발효하여 약주를 제조하였다.

표 9. Addition ratio of FST(fermented sea tangle) and rice in making rice wine

Materials	Yeast starter	Addition		Total(g)
		1st	2nd	
Rice koji(g)	6.00	75.00	-	81
Steamed rice(g)	-	-	225.00	225
Fermented sea tangle(g)	-	-	2.63	2.63
Water(ml)	9.00	112.50	405.00	526.50
<i>S. cerevisiae</i> (g)	0.30			
Total(g)	15.00	187.50	632.63	835.13

마. 발효

알코올 발효시 발생하는 이산화탄소가 나올 수 있는 장치를 가진 용기로 입구를 막고 25℃에서 12일간 발효시켰다. 12일 동안 매일 2회 씩 교반하여 원만한 발효가 일어나도록 하였으며 이때의 발효 온도는 23~25℃ 이었다. 발효 완료 시기는 탄산가스의 발생이 정지하고 발효통의 무게 변화가 없는 때로 하였다. 이 때 발효 중 발생하는 CO₂ gas 생성량을 조사하기 위하여 1 L bottle에 4종류의 입국 400 g을 넣고 전 배양시킨 효모를 원심분리 하여 멸균수 500 mL로 헹군 후 발효주 bottle에 모두 넣고 발효 중 무게변화를 매일 일정한 시간에 측정하였다.



<1 L bottle>



<100 L bottle>

바. 제성

멸균된 얇은 먼천을 2겹으로 접어 제성하였다.

사. 여과

제성된 술덧은 원심분리(3000 rpm)로 주박을 제거한 후 Filter(7 μm) 여과하였다.

아. 저장 실험

약주는 발효 다시마 분말(FST) 첨가군과 무첨가군으로 구분하여 저온(4℃)에서 100일간 저장하면서 매 20일마다 시료를 취하여 pH, 총산, 총당, 환원당, 색도를 측정하였다.

3. 성분분석

(1) 발효 효모의 생육에 미치는 당질 종류별 영향 실험

S. cerevisiae 균주의 이용 가능한 당 종류를 조사하기 위하여 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 10.8 g/L, H_2KPO_4 5.0 g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.1 g/L 및 carbon source로 단당류 (glucose, fructose, galactose) 또는 이당류 (maltose, sucrose, lactose) 20 g/L을 각각 함유한 배양배지 100 mL를 만들어 살균시킨 후 효모를 접종 한 후 30°C, 150 rpm에서 48시간까지 진탕배양 하면서 660 nm에서 흡광도를 측정하여 균 생육도를 비교하였다.

(2) 발효 효모의 알코올 농도별 및 온도별 내성 실험

발효 효모의 알코올 농도별 및 온도별 내성도를 조사하기 위하여 알코올 0, 6, 12, 18%가 함유된 멸균수에 전 배양된 효모를 혼합하여 20°C, -20°C, -70°C 온도에서 각각 24시간 보관 한 후에 YMA plate에 도말하여 나타난 colony를 counting 하여 균 생육도를 나타내었다.

(3) 알코올 함량 측정

발효 술덧을 잘 교반 후, 100 mL 용량 메스플라스크 표선까지 취하고 이것을 500 mL 등근플라스크에 옮긴 다음 메스플라스크에 약 10 mL 증류수로 3회 세척하여 등근플라스크에 합하고 냉각기에 연결한 다음 100 mL 메스플라스크를 수기로 하여 증류하였다. 증류액이 약 80 mL이 되면 증류를 중지하고 증류수를 가하여 100 mL로 정용한 다음 잘 흔들어서 메스실린더로 옮긴 후 실온에서 주정계를 사용하여 그 표시도를 읽어 Gay-Lussac 표로서 15°C로 보정하여 알코올 함량을 계산하여 참고자료로 활용하였다. 또한 증류된 알코올을 0.45 μm filter (Milipore)로 여과하여 Density Meter (Anton Paar, DMA 4500, Hungary)로 15°C에서 알코올농도를 측정하였다.

(4) pH 및 산도 측정

약주의 pH는 pH meter (Methrohm 691, Swiss)로 직접 측정하였고, 산도는 시료액 10 mL에 각각 증류수 50 mL를 가한 후 잘 흔들어 1% phenol phthalein 용액 4~5 방울 떨어뜨리고 0.1 N NaOH로 적정한 후 그 소모량을 측정하여 총 산도로 환산하였다. 추출물의 총 산도는 citric acid 값인 0.0064를 계산식에 적용하였다(1).

[Total acidity (%)=(Consumed 0.1 N NaOH (mL) \times (0.0064) \times factor \times 100) /sample mL]

(5) 색도 (Color)

약주의 색도는 색차계 (Handy colorimeter NR-3000, Nippon enshoku, Japan)를 이용하여 Hunter's value L* (명도), a* (적색도), b* (황색도) 값을 측정하였다.

(6) 총 당도 측정

약주 여과액 0.5 mL씩을 취하고, 동시에 표준용액을 0.5 mL씩 각각 취하여 5% 정제 페놀수를 0.5 mL 가해 잘 혼합시키고, 여기에 농황산 2.5 mL를 순간적으로 가하여 발열 반응에 의하여 발색시켜 20분 경과 후 490 nm에서 흡광도를 측정하여 검량선으로부터 구해진 전당량의 비율로 총당 함량을 계산하였다.

(7) 환원당 측정

환원당(residual glucose)은 glucose를 standard로 하여 3,5-dinitro salicylic acid를 이용하여 측정하는 방법을 사용하였다. 10 mL를 250 mL로 희석한 후 Toyo No.2로 여과한 다음 여액 1 mL에 DNS시약 3 mL를 가한 후 5분 증탕하여 상온 냉각 후 550 nm에서 흡광도를 측정하고 glucose의 표준곡선을 이용하여 환산하였다(1).

(8) Mineral 함량 분석

발효 술덧을 잘 교반 한 후 100 mL 취하여 여과한 후 약주의 미네랄 함량을 AOAC 분석 방법에 준하여 측정하였다. 즉, 이들 약주의 1차 여과액을 다시 0.2 μm 필터로 여과시켜 원자흡광 분광광도계(AAnalyst 300, Perkin Elmer, Norwalk CT, USA)를 이용하여 측정하였다.

(9) 유기산 분석

표준품은 SUPELCO 사의 organic acids kit를 구매하여, 이중 oxalic acid, D-tartaric acid, formic acid, D-malic acid, L(+)-lactic acid, maleic acid, succinic acid, citric acid 등 8종의 시약을 검량선 작성 및 정량에 사용하였다. 각 약주 시료는 Vision scientific 사의 VS-24SMTi 고속원심분리기를 사용하여 4°C에서 7000 rpm으로 10분간 원심분리한 후 상등액을 Sartorius Stedim Biotech 사의 0.2 μm membrane syringe filter 로 여과하여 3차 정제수에 10배 희석하여 분석에 사용하였다.

분석장치는 Degasser, Binary Pump, Auto sampler, Column oven, DAD (Diode Array Detector)로 구성된 Agilent 사의 1200 series RRLC로 분석하였다. column은 Agilent 사의 Zorbax Eclipse plus C18 (4.6×250 mm, 5 micron) column을 사용하였으며, column oven 온도는 25℃로 분석하였으며, DAD는 210 nm와 254 nm 두 파장을 설정하여 분석하였다.

A용매는 20 mM H₃PO₄ (in water) 용액을 사용하였으며, B용매는 Acetonitrile을 사용하여 Gradient 조건으로 분석을 실시하였으며, 분석조건은 Table 10와 같다.

표 10. Analysis condition for organic acids

Time (min)	0	7	12	17	20	25	35	45
B solvent%	0	0	3	3	7	7	100	100
Flow rate (mL/min)	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8

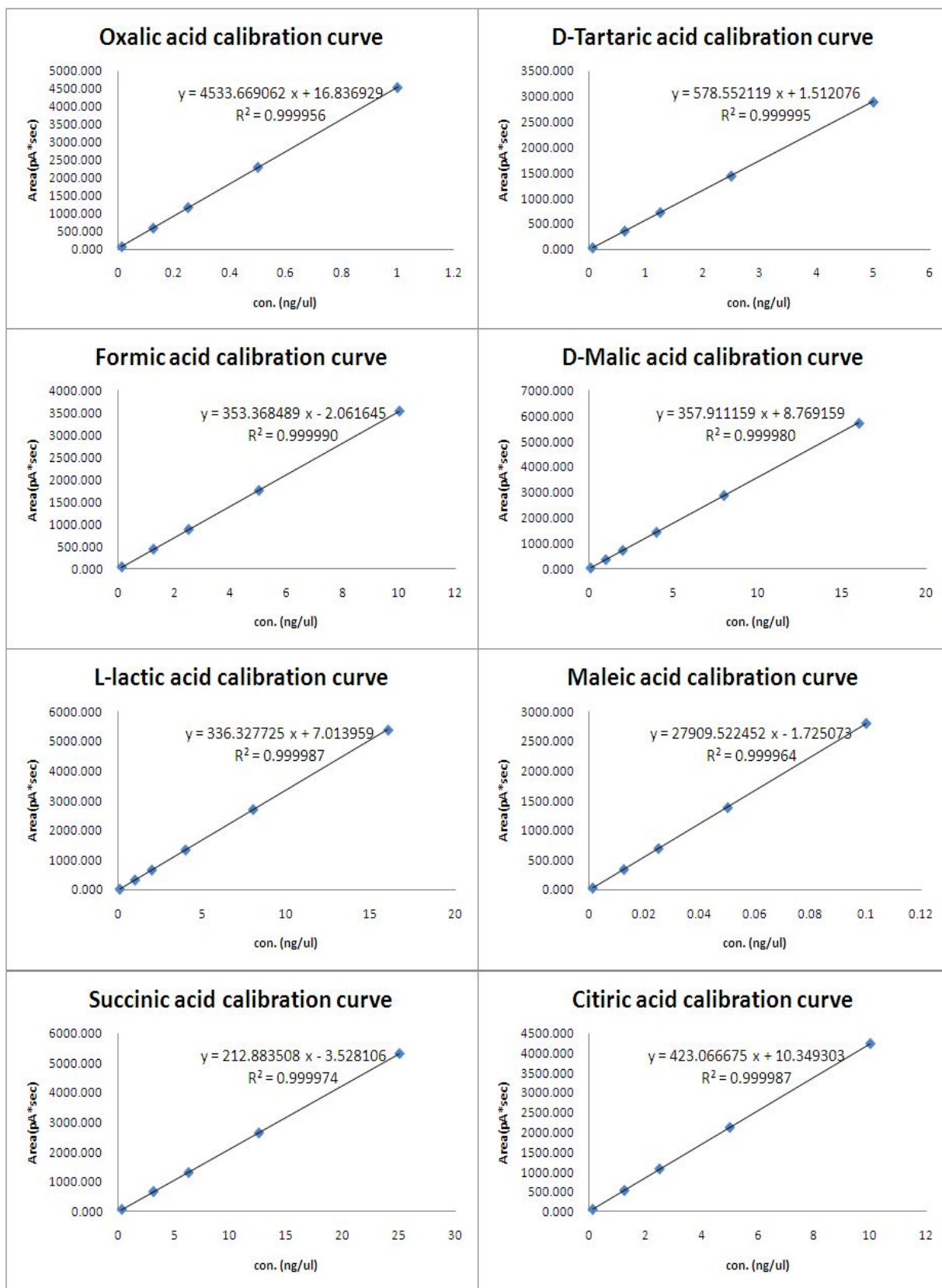


그림 4. Calibration curve of organic acids.

(10) 유리아미노산 분석

유리 아미노산 분석은 발효가 완료된 약주를 0.2 μm membrane syringe filter로 여과하여 아미노산 자동분석기 (Biochrom 30, Amersham Biosciences Ltd., Cambridge, UK)로 분석하였다(2).

(11) 유리당 분석

표준품은 Sigma-Aldrich 사의 fructose, glucose, sucrose, D-(+)-maltose를 구매하여 검량선 작성 및 정량에 사용하였다. 각 발효주 시료는 Vision scientific 사의 VS-24SMTi 고속원심분리기를 사용하여 4°C에서 7000 rpm으로 10분간 원심분리한 후 상등액을 Sartorius Stedim Biotech 사의 0.2 μm membrane syringe filter로 여과하여 3차 정제수에 2배 희석하여 분석에 사용하였다(2).

분석 장치는 Degasser, Binary Pump, Auto sampler, Column oven, RID (Refractive Index Detector), ELSD (Evaporative Light Scattering Detector)로 구성된 Agilent 사의 1200 series RRLC로 분석하였다. Column은 Agilent 사의 Zorbax Carbohydrate(4.6×150 mm, 5 micron) 것을 사용하였으며, column oven 및 RID 온도는 30°C로 분석하였다. ELSD는 온도 40°C, 공급가스 압력 3.5 bar로 분석하였으며, 공급 가스는 고순도 질소를 사용하였다.

용매는 75% Acetonitrile (in water) 용액을 사용하였으며, Isocratic 조건으로 Flow rate 1.4 mL/min으로 분석하였다.

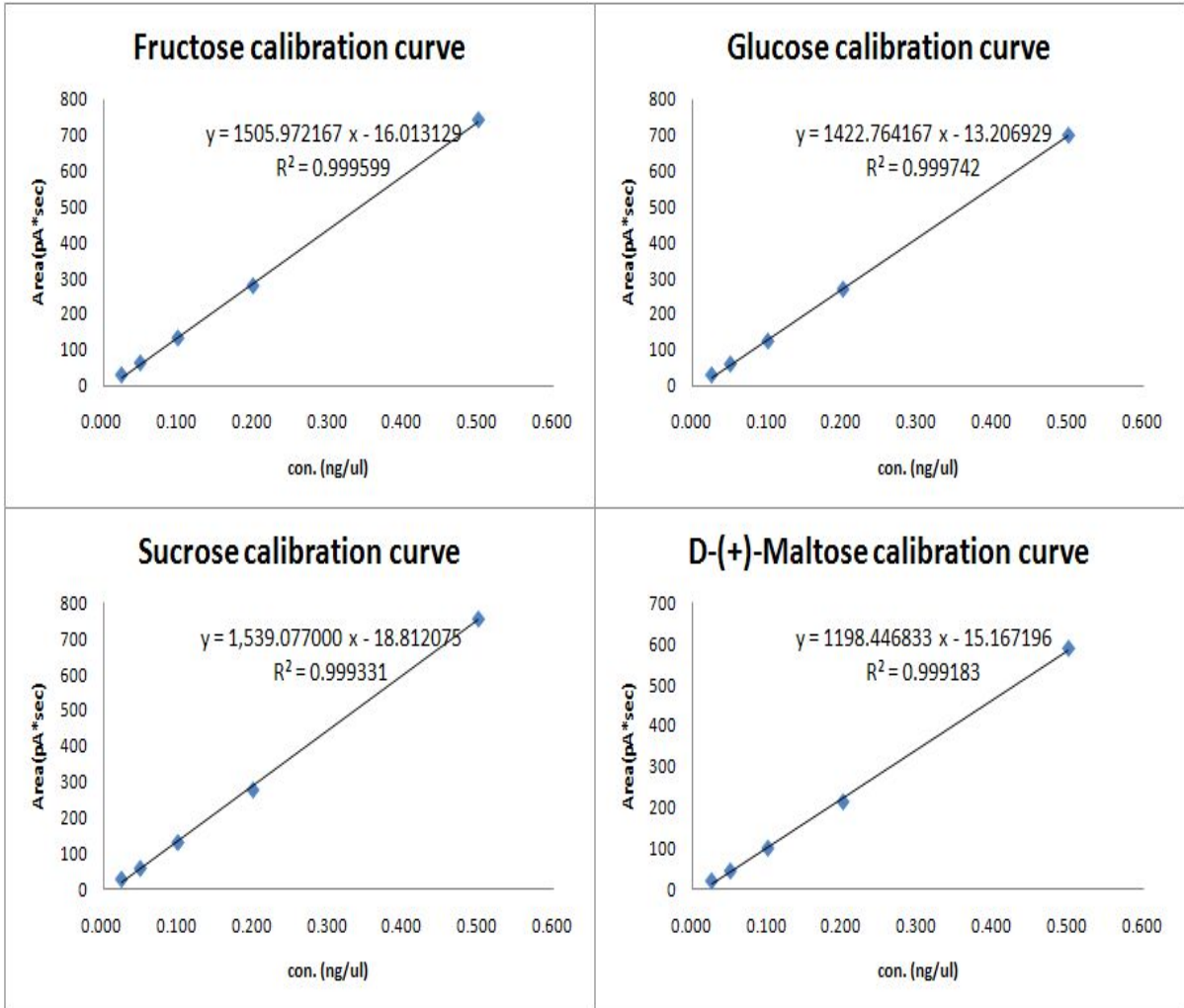


그림 5. Calibration curve of free sugars.

(12) 주요 향기성분 분석

(가) GC 분석을 위한 시료의 전처리

향기성분 분석은 국제청기술훈연구소의 주정분 분석법에 사용되는 증류방법을 거쳐서 회수된 시료를 GC를 통해서 분석하였다. 각 약주로부터 100 mL씩 매스플라스크에 취한 후 둥근바닥 플라스크에 붓고, 20 mL의 정제수로 매스플라스크를 헹군 다음 둥근바닥 플라스크에 붓고, 헹굼 과정을 2회 반복한다. 리비히냉각기 상부와 둥근바닥 플라스크를 연결한 후 둥근바닥 플라스크를 히팅맨틀에서 가열하여 증류한 후 95 mL 이상 증류액을 받은 후 나머지 부분을 정제수로 채워 100 mL까지 맞춘 후 이를 분석 시료로 사용하였다.

(나) GC를 통한 향기성분 분석

각 향기성분의 표준품은 주류에서 주로 검출되는 물질인 acetaldehyde, acetone, ethyl acetate, methanol, iso-butanol, iso-propanol, n-butanol, iso-amyl alcohol, 2-phenyl alcohol를 sigma-aldrich 제품으로 분석하여 검량선을 작성하여 정량에 사용하였다. 분석에 사용된 장비는 Agilent technology 사의 7890A GC system 이며, 사용된 Detector는 FID이다. 분석에 사용된 column은 Agilent technology 사의 J&W Scientific GC column인 DB-FFAP column(L: 50 m, I.D: 0.320 mm, Film: 0.50 μ m)이다. 이동상으로 N₂ gas를 사용하였다. Inlet 온도는 210°C, split 조건은 5:1로 설정하였으며, inlet liner는 glass wool liner를 사용하였다. FID 온도는 300°C로 분석을 진행하였으며, air는 350 mL/min, H₂ gas는 30 mL/min, makeup gas 28.214 mL/min로 설정하였다. Column flow rate은 2 mL/min으로 분석하였으며, column oven의 temperature rate는 5분 동안 50°C를 유지하고, 그 후 210°C가 될 때까지 8°C/min로 상승하고, 210°C에서 15분 동안 유지 후 분석을 끝나도록 설정하였다. 위의 조건으로 전처리한 시료와 표준품 1 μ l를 주입하여 분석하였다.

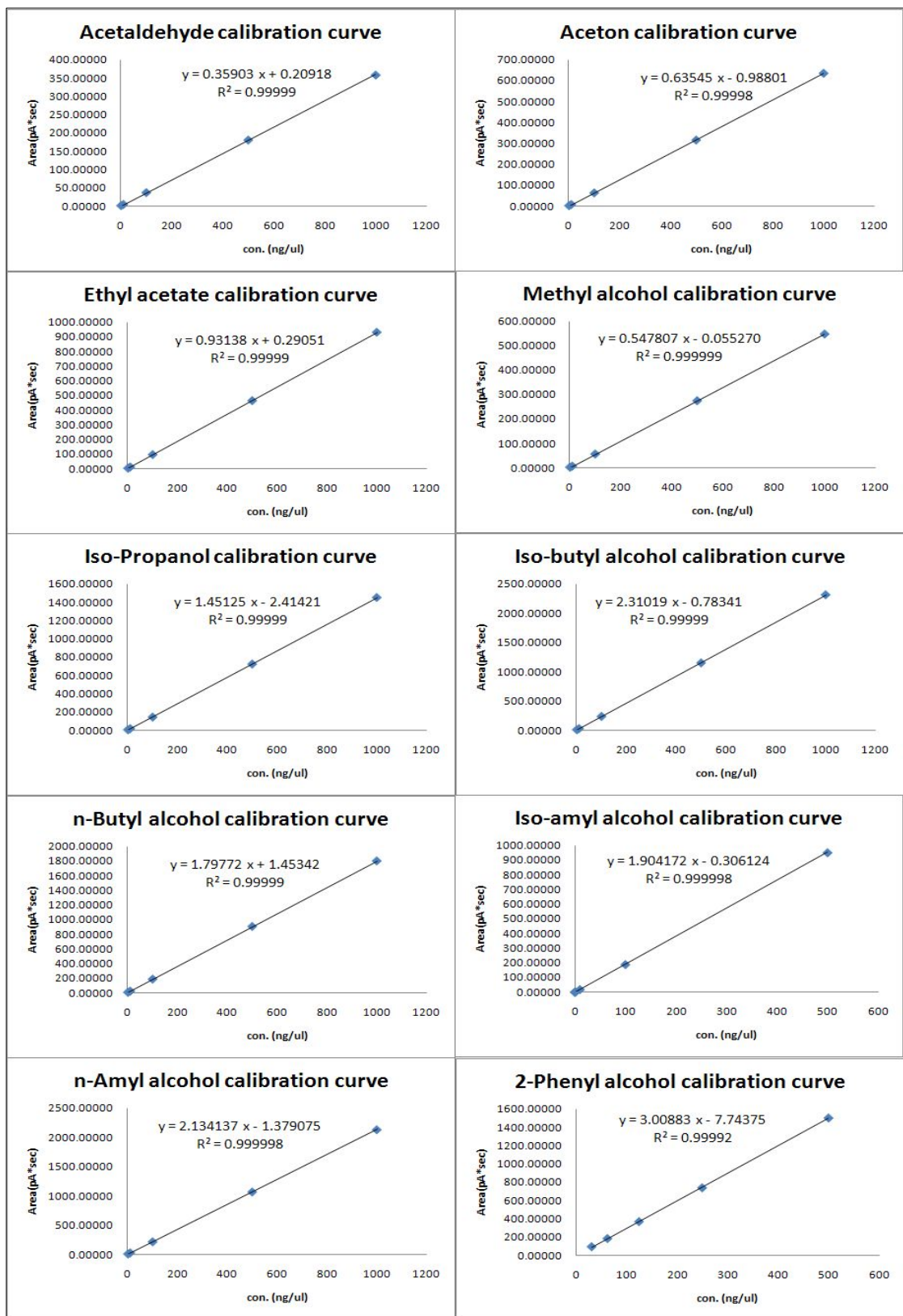


그림 6. Calibration curve of volatile compounds.

(13) 환원력 검사

약주의 환원력 검사는 시료 250 μ l에 200 mM sodium phosphate buffer (pH 6.6) 250 μ l 및 1% potassium phosphate buffer 250 μ l과 혼합하고 50°C 수욕 상에서 20분간 반응시켰다. 이 반응액에 1% trichloroacetic acid를 가한 후 2,090 \times g로 10분간 원심분리 하여 얻은 상층액 5 mL에 DW 5 mL을 가한 후 0.1% ferric chloride 1 mL을 잘 혼합하여 700 nm에서 흡광도를 측정하였다. 흡광도가 높을수록 환원력이 높은 것을 의미하며, 시판 되고 있는 항산화제 BHT, ascorbic acid 등이 대조구로 많이 사용되고 있어 본 실험에서도 대조구로 사용하였다.

(14) 항산화 활성 측정

약주 및 발효 다시마 분말의 항산화 활성은 DPPH 방법으로 측정하였다(3). DPPH (α, α' -diphenyl- β -picrylhydrazyl) 용액은 100 mL 에탄올에 DPPH 16 mg을 녹인 후 증류수 100 mL를 혼합하여 여과지(Whatman filter paper NO. 2)로 여과시켜 만들었다. DPPH 용액 5 mL에 약주 1 mL을 혼합하여 실온에서 30분간 반응시킨 후 528 nm에서 흡광도의 감소를 측정하였다. 대조구는 시판항산화 BHT를 사용하였고, 발효 다시마 분말은 0.1% 및 0.05% 수준으로 하여 상기와 동일한 방법으로 측정하였다. DPPH free radical scavenging activity는 시료 첨가군과 무첨가군의 흡광도차를 백분율(%)로 표시하였다.

$$\text{DPPH free radical scavenging activity(\%)} = \{ 1 - (\text{Abs}/\text{Abc}) \} \times 100$$

Abc : Absorbance of control treatment at 528 nm

Abs : Absorbance of sample treatment at 528 nm

(15) 총 폴리페놀 함량 측정

페놀성 화합물의 함량은 페놀성 물질이 phosphomolybdic acid와 반응하여 청색을 나타내는 원리를 이용한 Folin-Denis법으로 측정하였다(4). 즉, 0.1%(w/v) 시료 용액 0.5 mL에 Folin-ciocalteu's phenol reagent 2.5 mL를 첨가하여 잘 혼합하고 5분간 실온에서 방치하였다. 정확히 5분 반응시킨 후 7.5% Na₂CO₃ 2 mL를 가하여 혼합하고 50°C에서 5분간 발색시킨 후 spectrophotometer (HITACHI U-2900, Hitachi High-Technologies Co., Kyoto, Japan) 760 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이때 페놀성 화합물의 함량은 tannic acid를 0-500 μ g/mL 농도로 하여 시료와 동일한 방법으로 측정한 표준곡선으로부터 계산하였다.

(16) 항혈전용해능 측정

혈전용해 효소 활성은 fibrin plate 법을 변형하여 lysed zone으로 측정하였다(5). Fibrin plate는 0.06% fibrinogen (Sigma, St. Louis MO, USA)을 0.2 M borate buffer (pH 7.5)에 용해시킨 후 petri dish에 10 mL씩 분주하고 thrombin (5,000 unit, Sigma, St. Louis MO USA) 40 unit를 균일하게 섞이도록 가하면서 균일한 두께의 fibrin clot를 형성시킨 후 실온에서 30분간 방치한 후 사용하였다. 발효 다시마 분말 첨가 또는 무첨가 약주를 여과하여 fibrin plate 상에 50 μ L씩 점적하여 37°C에서 12시간 동안 반응시킨 후 생성된 투명한 부위의 직경을 측정하였다. 직경은 서로 수직인 두 개의 지름을 측정하였고, 투명대가 타원인 경우에는 가장 긴지름과 가장 짧은 지름을 측정하여 투명대의 면적 (mm^2)을 구하였다.

(17) ADH 및 ALDH 효소 활성 측정

발효 다시마 분말을 일정 농도로 첨가하여 배양한 *S. cerevisiae* 세포를 ice-cold potassium phosphate buffer 용액(0.1 mol/L potassium phosphate containing 1 mmol/L sodium EDTA and 1 mmol/L dithiothreitol, pH 7.4)을 첨가하여 IKA-ULTRA-TURRAX T25 basic homogenizer (IKA-WERKE GMBH & CO., KG, Staufen, Germany)를 이용하여 균질액을 제조하였다. 균질용액을 고속원심분리기 (VS-24SMTi, Vision Scientific Co., Ltd.)에서 10,000 \times g로 20분간 원심분리 하여 상층액을 얻어 효소 활성 측정에 사용하였다. 이 때 세포 파쇄액의 단백질 농도는 Lowry 방법에 준하여 bovine serum albumin을 표준품으로 하여 측정하였다(6). 효모 세포 유래의 ADH 활성 측정은 Bergmeyer's의 방법을 약간 변형하여 흡광도 340 nm에서 NADH의 생성속도를 측정하였다(7). 즉, 반응액 조성은 증류수 1.5 mL, 1.0 M Tris-HCl buffer (pH 8.8) 0.75 mL, 20 mM NAD^+ 0.3 mL, ethanol 0.3 mL, 효소원 0.15 mL를 cuvette에 넣고 총 3 mL이 되도록 조절하여 30°C에서 5분간 preincubation 시킨 후 5분 동안 340 nm에서 흡광도의 변화를 측정하였다. 발효 다시마 분말을 일정 농도로 첨가하여 배양한 효모 유래의 ALDH 활성 측정은 Koivula 등의 방법을 약간 변형하여 acetaldehyde에서 acetate를 생성하는 효소로 NAD로부터 NADH를 생성하는 원리를 이용하였다(8). 즉 반응액의 조성은 증류수 2.2 mL, 1.0 M Tris-HCl buffer (pH 8.0) 0.3 mL, 20 mM NAD^+ 0.1 mL, 0.1 M acetaldehyde 0.1 mL, 3.0 M KCl 0.1 mL, 0.33 M 2-mercaptoethanol 0.1 mL, 효소원 0.1 mL를 총 3 mL이 되도록 조절하여 cuvette에 넣고 30°C에서 5분간 preincubation 한 후, 5분 동안 340 nm에서 흡광도의 변화를 측정하였다.

(18) ADH 및 ALDH Western blot analysis

Western blot analysis를 위하여 정량된 ADH 및 ALDH 효소 단백질을 10% SDS-polyacryamide gel의 각 well당 각 100 μg 을 전보와 같이 전기영동 하였다(9). 분리된 단백질은 300/240 mA/cm^2 조건으로 4°C에서 16시간 동안 nitrocellulose membrane으로 transfer하였다. 이 membrane을 blocking agent인 10% fat-free milk가 함유된 TBST buffer (10 mM Tris pH 7.5, 100 mM NaCl, 0.1% Tween 20)로 1시간 동안 실온에서 non-specific binding protein을 blocking 한 후, TBST buffer로 5분 동안 세척하였다. 다시 blocking시킨 membrane을 실온에서 1시간 동안 primary 및 secondary antibody로 반응시킨 후 TBST buffer로 세척하였다. 세척된 membrane에 rabbit ADH 또는 ALDH1A1 conjugated HRP antibody (diluted 1:5,000, Abcam, England)로 4°C에서 overnight하였다. 다시 TBST buffer로 세척시킨 후 goat anti-mouse IgG-HRP (diluted 1:2,000, DB USA)로 incubation시켰다. Nitrocellulose membrane 상의 단백질은 SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate의 image analysis 방법으로 검출하였다. 각각 반응된 ADH 또는 ALDH protein band의 상대적 density는 densitometer (Lumi-Imager F1, Roche, Switzerland)로 정량하였다.

(19) 관능검사

개발된 약주의 관능검사는 시중에서 판매되고 있는 A사 및 B사 약주를 대상으로 실시하였다. 단맛, 신맛, 향, 색, 전체 기호도를 6단계 평점법으로 부산지역 4개 대학교 식품 관련 전공 대학생 200명을 대상으로 평가하였다. 이때 채점기준은“아주 좋음”6점, “좋음”5점, “보통 좋음”4점, “보통”3점, “나쁨”2점, “아주 나쁨”1점으로 평가하였다.

제 4장. 연구개발 수행 결과

1절. 해조 추출발효액의 제조 및 특성 조사

1. 해조 추출발효액의 제조

가. 정밀여과에 따른 해조 추출액의 분자량 분포 변화

다시마 추출원액과 정밀여과에 따른 1, 2차 여과액을 대상으로 GPC법을 통한 분자량의 분포를 비교하여 알아본 결과는 아래의 그림과 같았다. 그림 7과 같이 1차 추출 여과액과 2차 추출 여과액의 분자량 분포가 확연하게 다르게 나타나는 것을 알 수 있었다. 또한 발효에 의하여 고분자 다당류가 저분자화되는 것을 확연하게 확인할 수 있었다.

그래프에서 녹색은 2차 추출여과액의 분자량 분포를 나타낸 것으로 1차 추출여과액의 분자량 분포를 나타내는 파란색 그래프와는 달리 저분자의 분자량 분포를 가지는 것을 알 수 있었다. 1차 여과액은 MW가 3.4kDa 안팎인 물질이 대부분을 차지하였으며, 2차 여과액은 MW가 1.3kDa 안팎의 물질이 대부분을 차지하는 분포를 나타내었다. 이는 발효미생물이 저분자 물질을 분해하기에 용이하게 되어 발효효율을 높일 수 있음을 나타내고 있다. 하지만 2차에 의한 정밀여과는 장시간의 여과시간을 초래하는 단점이 있기에 여름철에는 실온이 상승하여 2차 오염을 야기시킬 경우, 생산에 큰 차질을 가져올 수 있어, 본 연구에서는 1차여과액을 이용하여 이후의 실험 및 시생산을 수행하였다.

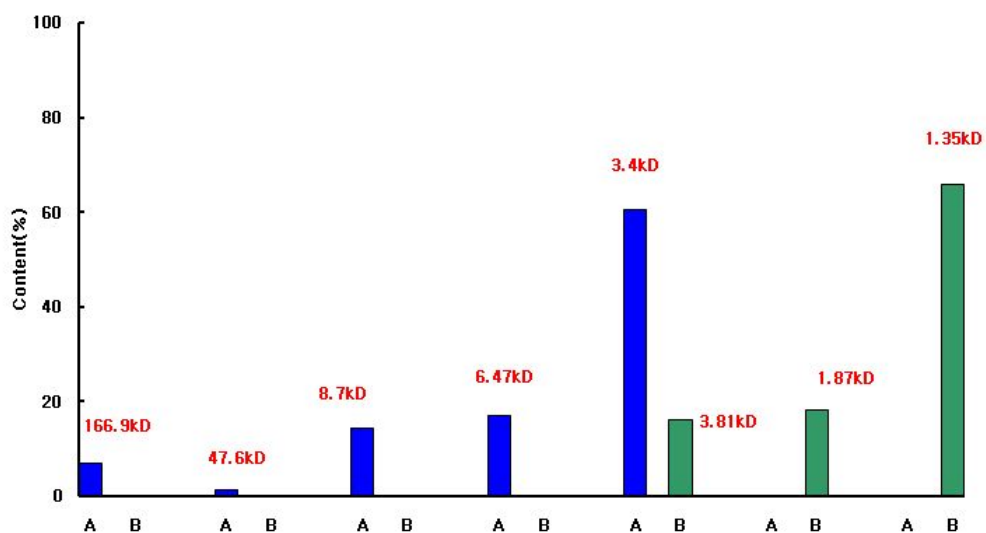


그림7. GPC법에 의한 발효 전과 후의 분자량 분포

A: 1차 추출여과액, B: 2차 추출여과액

나. 최적 발효균주의 개발

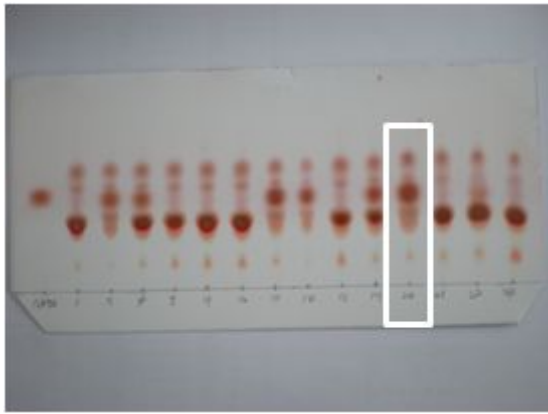
(1) 발효균주의 탐색 및 분리(Screening and Isolation)

국내의 전통 발효식품인 젓갈류와 김치류에서 분리한 유산균 중에서 6종의 균주가 GABA생성능을 가지는 것을 확인하였으며, 그림 7은 젓갈류 및 김치류에서 발효균주를 탐색하는 과정을 나타낸 것이다. 이 중에서 GABA생성능이 가장 우수한 균주를 "BJ20"으로 명명하였으며, 이후 동정을 위한 실험을 진행하였다. 본 연구에서 발효균주의 탐색은 발효를 위한 배지가 해조류 추출여과액인 것을 감안하여 염도가 높은 식품군에서 실시하였다. 본 실험에서 젓갈류에서 4종, 김치류에서 2종을 선별하였으며 젓갈류에서 분리한 균주 중 11번의 screening 번호를 가지는 균주가 GABA생성능이 가장 뛰어났다. 본 연구자들은 이 균주를 BJ20으로 명명하였으며, GABA생성능을 알아보기 위해 수행한 TLC 분석 결과는 그림8과 같다. GABA 250ppm과 비교하였을 때 농도가 더 진한 것을 확인하였으며 그 외의 3균주는 상대적으로 GABA생성능이 떨어지는 것을 확인하였다.

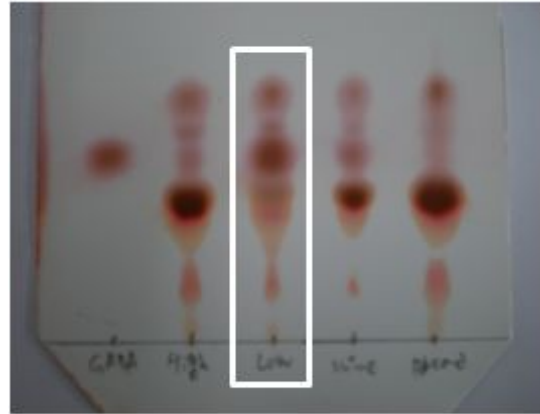
효모의 경우, 과수원의 토양과 과육 및 과피로부터 12종의 효모를 분리하였으나, TLC 분석 결과 GABA생성능은 없는 것으로 확인되었다. 때문에 당사가 보유하고 있는 효모 중에서 GABA생성능을 가지는 *Saccharomyces cerevisiae*를 본 연구에 사용하였다. 효모는 GABA생성능에 있어서 분리된 유산균에 비해 다소 낮은 활성을 가지지만 해조취를 제거하고 이미, 이취를 제거하는데 도움이 되어 유산균과 혼합발효시 활용하였다.



그림7. GABA생성 우수균주 개발 과정



유산균주



효모균주

그림 8. TLC를 이용한 분리된 유산균과 효모의 GABA 생성능 확인

(2) 발효균주의 동정

앞서 BJ20으로 명명한 유산균을 동정한 결과는 아래의 표와 그림과 같다. 젓갈에서 분리한 GABA생성균인 BJ20은 *Lactobacillus brevis*로 확인되었으며, 최종적으로 *Lactobacillus brevis* BJ20으로 명명하였다. 또한 KCTC에 특허기탁으로 보존중에 있으며, 향후 균주와 관련하여 특허를 출원할 예정이다.

아래의 그림 9는 *L. brevis* BJ20의 16S rRNA gene sequencing 결과를 나타낸 것이며, 그림 10은 이를 바탕으로 나타낸 계통도이다. 또한 그림은 동정된 *L. brevis* BJ20의 전자현미경 사진(그림 11)으로 간균의 형태를 나타내고 있다.

```
gtccattgtggaagattcctactgctgcctcccgtaggagtttgggccgtgtctcagtcccaatgtggccgattaccctctcagg
tcggctacgtatcatcgtcttgggtgggcctttacctaccaactaactaatacgcgcgggatcatccagaagtgatagccgaag
ccaccttcaaacaaaatccatgcggattttgtgttatacggattagcacctgtttcaa
```

그림 9. 16S rDNA gene sequence of *Lactobacillus brevis* BJ20

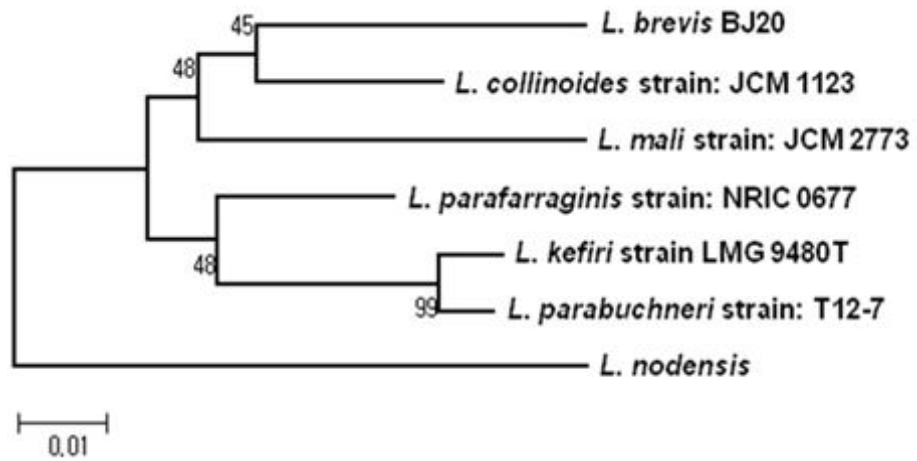


그림10. Genetic tree of *Lactobacillus brevis* BJ20

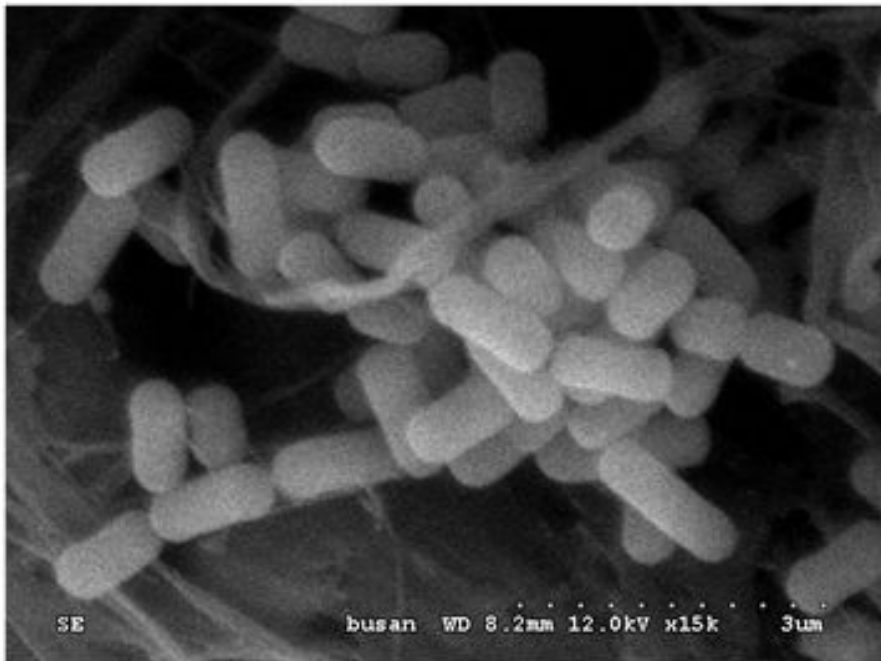


그림 11. Scanning electron microphotograph of *L. brevis* BJ20

(3) 발효균주의 최적 생육 조건

상기의 방법에 의해 분리 및 동정된 유산균주의 최적 생육 조건을 알아보기 위하여 온도, pH, NaCl농도에 따른 생육 특성을 알아보았다. 그림 12는 *L. brevis* BJ20의 최적 생육 온도를 알아본 결과를 그래프로 나타낸 것으로 37°C에서 최적의 생육을 나타내는 것으로 확인되었다. 이때의 OD값은 24시간 배양한 것으로 1.275로 동일 조건인 640nm에서 가장 높은 수치를 나타내었다. 그림 13은 생육에 필수적인 최적 pH를 알아본 그래프로 pH 7에서 가장 생육활성을 높게 갖는 것으로 나타났으며, 이때의 OD값은 1.384로 가장 높은 수치를 확인 할 수 있었다. 그림 14는 NaCl을 농도별로 첨가하였을 때의 생육도를 나타낸 것으로 2%를 첨가하였을 때 가장 높은 OD값을 나타내었다. 이때의 OD값은 1.277로 나타났으며, 이상의 실험결과는 5번의 측정결과를 평균한 값으로 정한 것이다. 즉, *L. brevis* BJ20의 최적의 생육온도는 37°C, 최적 생육 pH는 7, 최적 NaCl 농도는 2%로 이를 기준으로 $\pm 20\%$ 내외에서 생육이 되는 것으로 판단되었다.

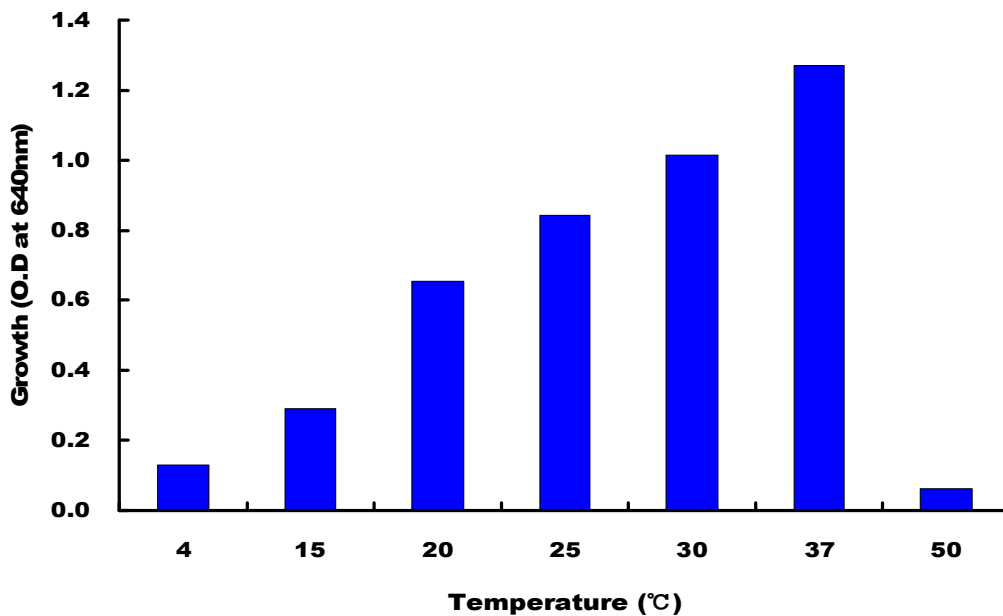


그림 12. 온도 범위에 따른 *L. brevis* BJ20의 생육특성

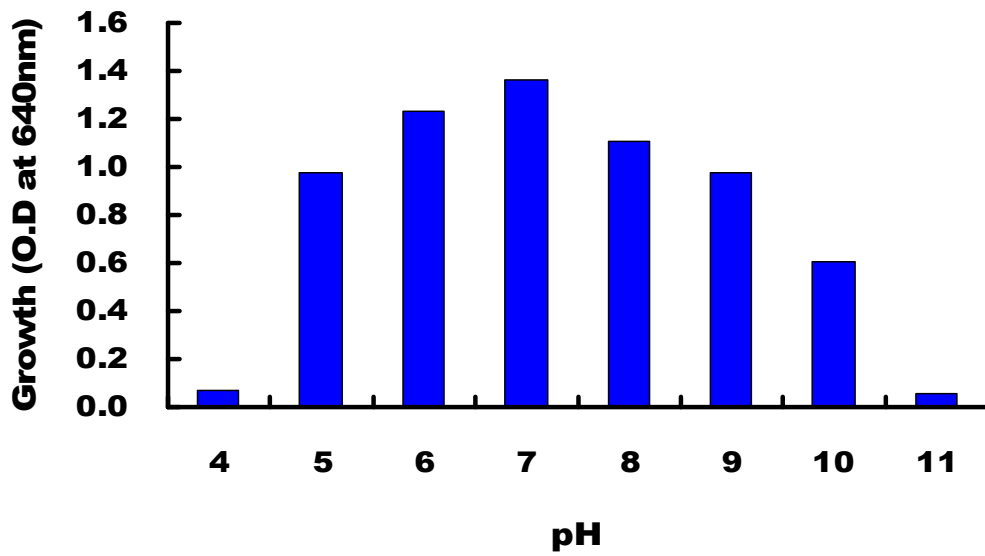


그림 13. pH 범위에 따른 *L. brevis* BJ20의 생육특성

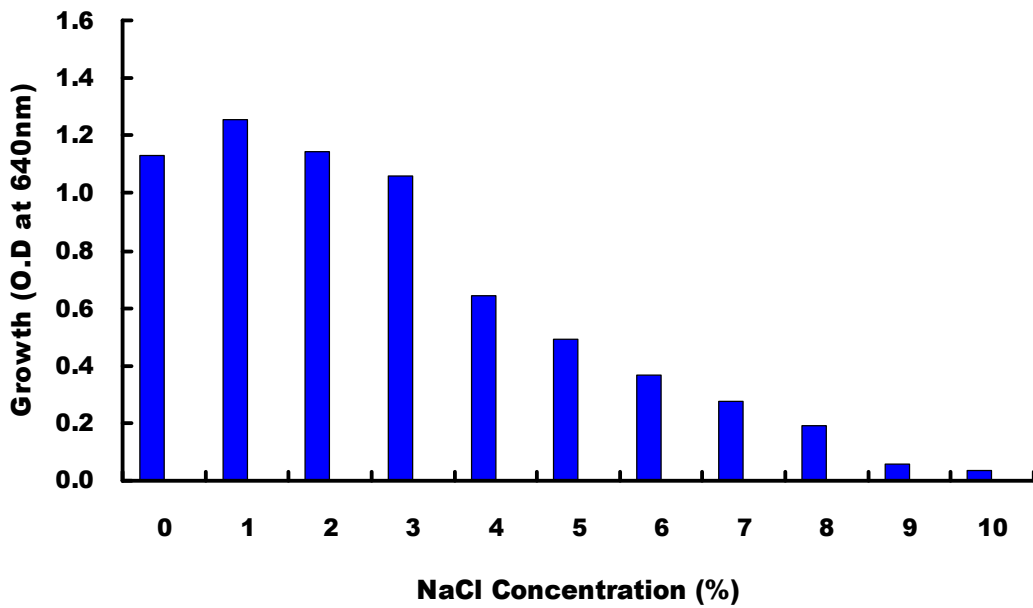


그림 14. NaCl 농도범위에 따른 *L. brevis* BJ20의 생육특성

(4) *L. brevis* BJ20의 생육도

상기의 최적조건에 의한 *L. brevis* BJ20의 시간의 경과에 따른 생육도를 알아보았다. 그림 15에서 보는 바와 같이 STM broth에 *L. brevis* BJ20를 2% 접종한 후, 시간의 경과에 따라 균의 생육이 확연한 차이를 나타내는 것을 확인하였다. *L. brevis* BJ20은 약 18시간의 유도기를 거친 이후, 28시간까지 대수증식기를 가지는 것으로 확인되었다. 이후, 안정기를 거쳐 사멸기로 접어드는 것으로 나타났다.

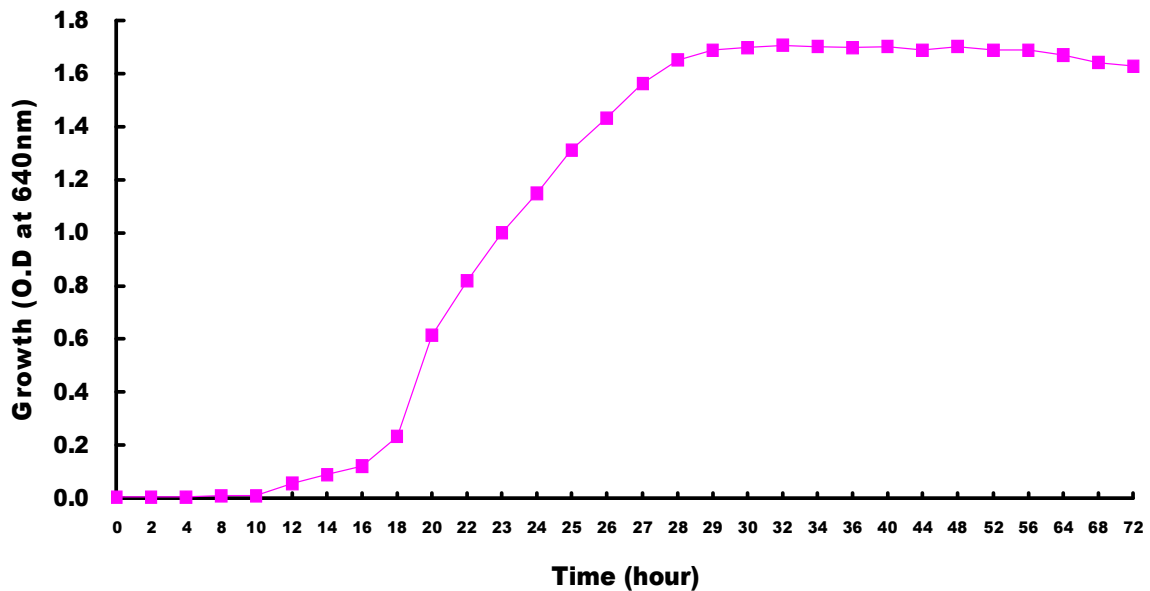


그림 15. 시간에 따른 *L. brevis* BJ20의 생육특성(Growth curve)

다. 해조 추출발효액의 샘플 및 시제품 제조

상기의 최적조건으로 다시마 추출여과액을 발효하여 다량의 GABA를 함유하는 기능성 해조 추출발효액을 제조하였다. 1차 다시마 추출여과액을 이용한 배지에 유산균 및 효모를 단일 또는 혼합발효하여 샘플을 제조하여, 이후의 실험을 수행하였다. 또한 유산균을 이용한 기능성 해조 추출발효액은 5L, 50L, 500L, 5ton의 scale-up하여 실험을 수행하였으며, 최종적으로 5ton 발효조에서 기능성 해조 추출발효액의 시제품을 생산하여, 해조류 유래의 기능성 약주를 제조하는데 사용하였다. 그림 16은 이러한 과정을 나타내는 모식도와 해조 추출발효액의 사진을 보여주고 있다. 기능성 약주를 제조하는데 소요되는 해조 추출발효액은 동결건조 및 분쇄공정을 거쳐 분말의 형태(그림 17)로 외부의 흡습을 방지하기 위하여 밀폐한 후, 본 연구의 참여기관인 대선주조(주)에 전달되었다. 즉, 5ton 발효조에서 생산된 시제품을 분말화하였으며, 이를 이용하여 해조류 유래의 기능성 약주를 제조하였다.



그림 16. 해조 추출 발효액의 제조 공정도(좌) 및 시제품 사진(우)



그림 17. 해조 추출 발효분말의 주요 생산 흐름도

2. 해조 추출발효액의 특성 조사

가. 발효에 따른 유리아미노산 함량의 변화

L. brevis BJ20에 의한 발효를 통하여 발효전과 발효후의 유리아미노산 함량의 변화를 분석한 결과는 아래의 표 11과 같다. 아래의 표 11에서와 같이 발효전과 발효후의 유리아미노산 함량의 변화에 있어서 가장 변화폭이 넓은 것은 glutamic acid와 GABA의 함

량이었다. 발효전의 glutamic acid는 2789.5ppm으로 전체 유리아미노산 중에서 가장 높은 수치를 나타내었다. 그러나 발효후에는 11.4ppm으로 잔존량이 거의 없는 것으로 나타난 반면, GABA는 발효전에는 존재하지 않았으나, 발효후에는 2465.4ppm으로 발효후의 전체 유리아미노산 함량 중에서 가장 높은 수치를 나타내었다. 이는 발효전의 glutamic acid가 *L. brevis* BJ20에 의해 GABA로 전환된 것을 나타낸다. 이외에도 몇몇 유리아미노산의 함량 변화가 있었으며, aspartic acid, serine, threonine는 줄어드는 반면, alanine, valine, glycine, leucine은 증가하는 것을 확인할 수 있었다.

표 11. Free amino acid contents of fermented sea tangle solutions with and without *L.brevis*BJ-20

Amino acid	Fermented sea tangle solution			
	Without <i>L. brevis</i> BJ-20		With <i>L. brevis</i> BJ-20	
	mg/ L sample	g/100g AA	mg/ L sample	g/100g AA
Phosphoserine	14.7	0.3	33.0	0.7
Taurine	21.6	0.4	26.3	0.5
Phosphoethanolamine	5.3	0.1	7.6	0.2
Aspartic acid	1606.1	33.4	1285.4	25.8
Threonine	14.8	0.3	4.4	0.1
Serine	28.0	0.6	1.7	0.0
Glutamic acid	2789.5	58.0	11.4	0.2
Glycine	9.6	0.2	30.2	0.6
Alanine	162.9	3.4	813.8	16.3
DL-2-Aminobutyric acid	5.5	0.1	33.3	0.7
Valine	10.2	0.2	44.9	0.9
Methionine	0.5	0.0	0.0	0.0
Cystathione	6.8	0.1	10.2	0.2
Isoleucine	4.2	0.1	11.3	0.2
Leucine	5.7	0.1	38.3	0.8
Tyrosine	4.4	0.1	0.0	0.0
Phenylalanine	3.4	0.1	26.7	0.5
β-Alanine	1.1	0.0	10.1	0.2
Aminoisobutyric acid	0.0	0.0	4.5	0.1
γ-Aminobutyric acid(GABA)	0.0	0.0	2465.4	49.5
Aminoethanol	9.0	0.2	14.2	0.3
Ornithine	4.3	0.1	2.8	0.1
Lysine	5.7	0.1	9.6	0.2
Histidine	0.9	0.0	0.0	0.0
Arginine	6.7	0.1	12.4	0.2
Proline	87.0	1.8	85.3	1.7
Total	4,720.9	99.8	4,897.5	100.0

나. 발효에 의한 향기성분 변화

L. brevis BJ-20의 발효에 의한 다시마 발효물의 flavor의 주성분을 GC/MS로 분석하여 그 주된 flavor 성분을 표 12에, 그리고, 그 chromatogram을 그림 18에 나타내었다. GABA 생성 유산균 첨가 발효물과 무첨가 다시마 발효물의 flavor를 GC/MS로 분석한 결과, 자극적이고 독하며 불쾌한 향을 나타내는 acetaldehyde, silane trimethyl(2-methylphenyl)-, 1H-Indole 2-phenyl-1-(trimethylsilyl)는 GABA 생성 유산균 첨가 다시마 발효물의 경우 각각 0.155%, 무검출 및 0.603%로, GABA 생성 유산균 무첨가 다시마 발효물의 각각 1.118%, 1.721% 및 1.729%에 비하여 확연히 감소하거나 완전히 제거되었다. 뿐만 아니라, 상쾌함을 나타내는 pentane 2-methyl-, pentane 3-methyl-은 GABA 생성 유산균 첨가 다시마 발효물의 경우 각각 22.343% 및 12.153%로, GABA 생성 유산균 무첨가 다시마 발효물의 각각 8.841% 및 4.078%에 비하여 확연히 증가하였다.

표 12. *L. brevis* BJ-20의 발효에 의한 향기성분의 변화.

Volatile flavor		(Area %)	
		발효 전	발효 후
Acetaldehyde	sting	1.118	0.155
Silane, trimethyl(2-methylphenyl)-	pungent	1.721	-
1H-Indole, 2-phenyl-1-(trimethylsilyl)	unpleasant	1.729	0.603
Pentane, 2-methyl-	pleasant	8.841	22.343
Pentane, 3-methyl-	pleasant	4.078	12.153

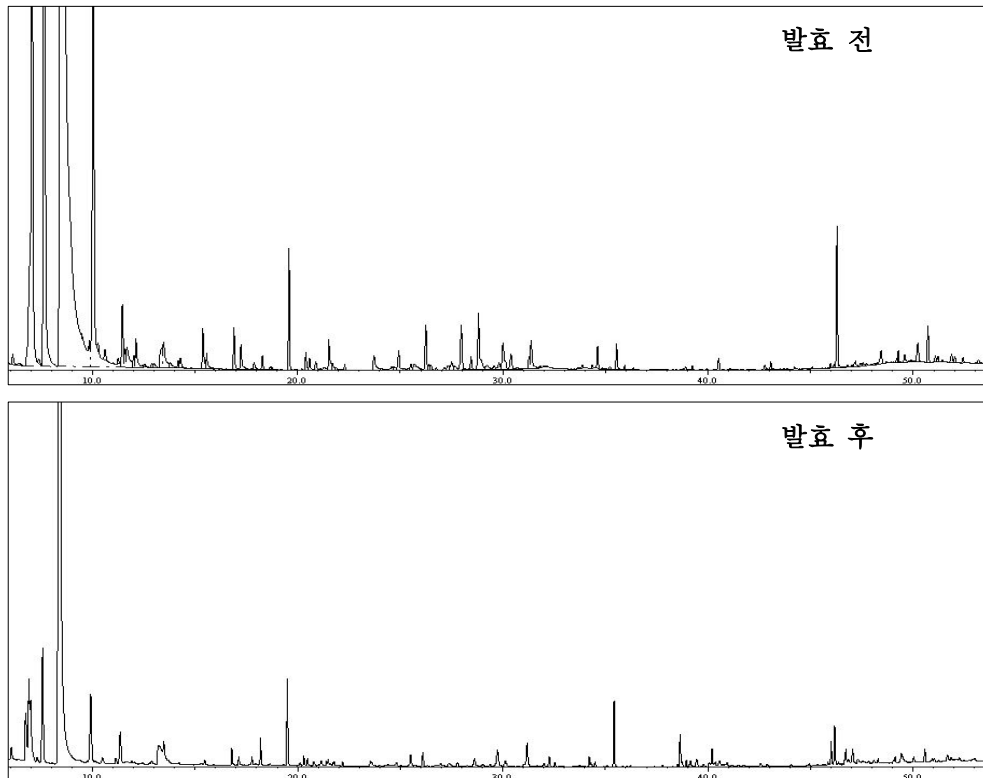


그림 18. *L. brevis* BJ-20의 발효에 의한 향기성분의 변화.

이와 같은 GABA 생성 유산균 첨가유무에 따른 다시마 발효물의 flavor 분석 결과로 미루어 보아 다시마에 GABA 생성 유산균을 첨가하여 발효시키는 경우 발효물의 flavor는 상당히 개선되었으며, GABA 생성 유산균의 경우 다시마 발효물의 건강 기능성 개선 이외에도 신제품 개발에 문제가 되고 있는 다시마 냄새에 대한 거부감을 개선할 가능성이 있는 우수한 소재로 판단되었다.

다. 고형분, polyphenol 및 일반성분

GABA 생성 유산균 첨가유무에 따른 다시마 발효물의 고형분, polyphenol, 단백질 및 탄수화물 함량은 비교한 결과는 다음과 같다.

표 13. *L. brevis* BJ-20의 발효에 의한 고형분, polyphenol, 단백질 및 탄수화물 함량 변화.

	발효 전	발효 후
고형분 (mg/mL)	43.02	44.56
Polyphenol (mg/g)	11.22	11.98
탄수화물 (mg/g)	65.01	67.54
단백질 (mg/g)	84.78	50.96

고형분 함량과 polyphenol 함량은 GABA 생성 유산균 첨가 발효물이 각각 44.56 mg/mL, 및 11.98 mg/g으로 무첨가 발효물의 각각 43.02 mg/mL 및 11.22 mg/g에 비하여 큰 차이가 없었다. 한편, 탄수화물은 GABA 생성 유산균 첨가 발효물이 67.54 mg/g로, 무첨가 발효물의 65.01 mg/g에 비하여 증가한 반면, 조단백질은 GABA 생성 유산균 첨가 발효물이 50.96 mg/g으로, 무첨가 발효물의 84.78 mg/g에 비하여 크게 감소하였다.

라. 단당류 조성

L. brevis BJ-20의 다시마 발효에 의해 생성된 다시마 발효물의 fucose, galactose, xylose, arabinose, mannose 및 glucose와 같은 단당류의 조성은 아래의 그림 19와 같다. GABA 생성 유산균 첨가유무에 관계없이 다시마 발효물들은 분석을 시도한 6종의 단당류가 모두 검출되었고, 이들의 조성은 GABA 생성 유산균 첨가 다시마 발효물의 경우 갈조류에 다량 함유되어 있는 fucose (40.8%)를 위시하여, galactose (22.6%), glucose (17.5%), mannose (12.8%), xylose (5.2%) 및 arabinose (4.3%) 등의 순이었으며, 무첨가 다시마 발효물의 경우 fucose (53.6%), galactose (28.7%), mannose (8.9%), xylose (6.5%), arabinose (1.8%) 및 glucose (1.6%) 등의 순으로 차이가 있었다. 즉, GABA 생성 유산균 첨가 유무에 따른 단당류의 함량 변화는 GABA 생성 유산균을 첨가하여 다시마 발효물을 제조한 경우 galactose와 xylose은 감소하였고, arabinose와 mannose는 증가하였으며, 그 차이는 미비한 수준이었다. 하지만 fucose와 glucose 함량은 GABA 생성 유산균 첨가 발효물과 무첨가 발효물 간에 큰 차이를 나타내었고, 특히, fucose 함량은 첨가 다시마 발효물이 39.2%로, 무첨가 다시마 발효물의 51.5%에 비하여 12.3%가 감소하는 경향을 나타내었다. 이는 GABA 생성 유산균이 세포대사를 위한 탄소원으로 fucose를 이용하기 때문인 것으로 사료된다. Glucose의 경우 GABA 생성 유산균 첨가 다시마

발효물의 glucose 함량이 17.7%로, 무첨가 다시마 발효물 (1.9%) 의 경우 보다 약 10배 정도 함량이 증가하였다. 이와 같은 결과는 다시마를 구성하는 주 단당류인 glucose가 GABA 생성 유산균에 의하여 다시마 발효물의 제조 중 다량 생성되었기 때문이라 판단되었다.

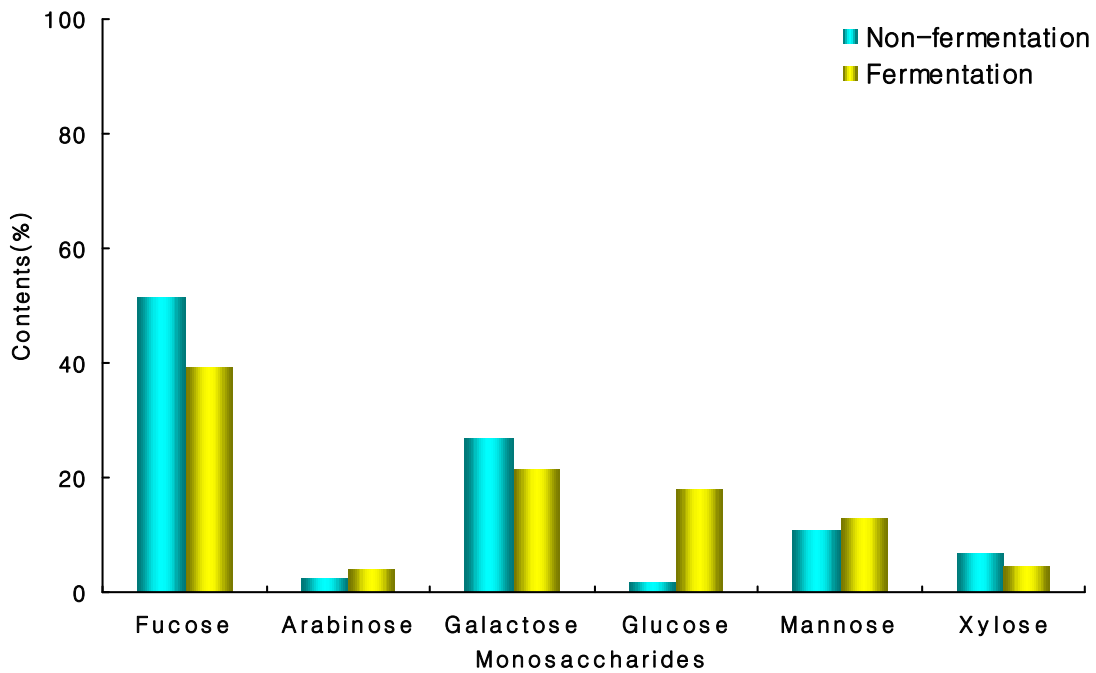


그림 19. *L. brevis* BJ-20의 발효에 의한 단당류 조성의 변화.
% : 총 단당량에 대한 함량을 백분율로 나타낸 것

3. 해조 추출발효액의 기능성 검토

가. 기능성 해조류 추출 발효액의 항산화 활성

DPPH 라디칼은 안정한 자유라디칼로 다른 원자 및 분자로부터 전자나 양성자를 받아들여 안정한 분자로 변하는 성질이 있다. 따라서 DPPH 라디칼 소거 활성 모델은 널리 사용되고 있으며, 비교적 빠른 시간에 자유라디칼의 소거 활성을 측정할 수 있다. 이 방법은 DPPH 라디칼의 보라색이 항산화제 존재 시 노란색으로 변화하여 쉽게 확인할 수 있기 때문에 항산화 활성 측정에 자주 이용되고 있다. 해조류 추출 발효액의 DPPH 소거 활성은 그림 20에 나타내었다. 발효액 A-G까지 모두 우수한 DPPH 소거 활성을 나타내었고 그 활성은 농도의존적으로 증가하였다. 특히 C, E, F 및 G 발효액의 DPPH 소거 활성이 우수하였다.

본 실험에 사용된 시료는 배지 성분 및 건조방법을 달리한 것으로 A~G까지의 내용을 살펴보면 표 14와 같다.

표 14. 해조 추출 발효액의 기능성 검토를 위한 발효조건

구 분	배지내 첨가량 (%)			배양 및 후처리 조건		
	다시마	Yeast extract	Glucose	발효균주	건조방법	탈염유무
A	6.25	0.5	0.5	유산균	F/D	유
B	6.25	0.5	0.5	유산균	S/D	무
C	6.25	0.1	0.5	효모	F/D	무
D	6.25	0.5	0.5	효모	F/D	무
E	6.25	0.1	0.5	유산균	F/D	무
F	6.25	0.5	0.5	유산균	F/D	무
G	6.25	1.0	0.5	유산균	F/D	무

Hydrogen peroxide 소거 활성 측정은 항산화제가 hydrogen peroxide와 같은 prooxidants의 함량을 감소시키는 능력을 측정하는 가장 유용한 방법 중에 하나이다. 항산화제에 의한 hydrogen peroxide 소거 활성은 항산화제의 전자 공여능과 관련이 있는 것으로 알려져 있다. 그림 21에 나타났듯이 발효액의 hydrogen peroxide 소거 활성은 농도 의존적으로 증가하였으며 90% 이상의 소거 활성을 나타내었다. 특히, E, F 및 G의 발효액이 높은 hydrogen peroxide 소거 활성을 나타내었다. Hydrogen peroxide는 약한 산

화제로 효소의 필수기인 thiol groups을 산화시켜 일부 효소의 활성을 직접적으로 감소시키는 것으로 알려져 있다. 또한 hydrogen peroxide는 반응성이 있는 비라디칼(non-radical) 물질로 생체막을 직접적으로 통과할 수 있기 때문에 매우 중요하다. 비록 hydrogen peroxide의 반응성은 그다지 크지 않지만 일단 생체막을 통과하면 다양한 반응을 통해서 반응성이 큰 singlet oxygen 및 hydroxyl 라디칼로 전환되어 지질과산화 또는 세포내에서 독성을 유발시킨다.

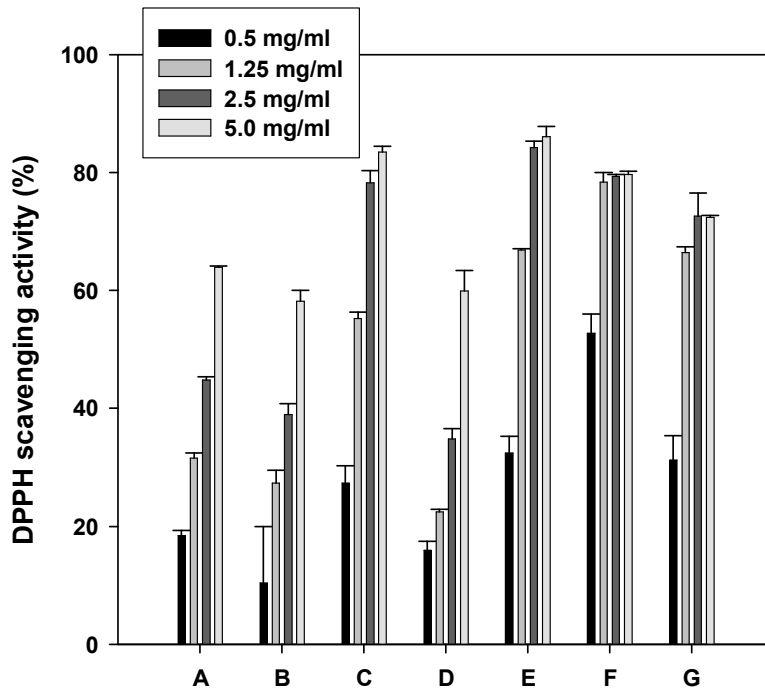


그림 20. DPPH radical scavenging activity of fermented sea tangle. Data are presented as means \pm S.E. from three independent determinations.

해조류 추출 발효액들의 Fe^{2+} 금속 이온 킬레이팅 효과를 그림 22에 나타내었다. Fe^{2+} 이온은 세포내에서 산화물 형성에 관여하는 결정적인 물질로서 지질 과산화를 촉진시킨다. 따라서 과생성된 Fe^{2+} 이온의 적절한 제거는 지질 과산화를 억제할 수 있는 중요한 요인 중에 하나이다. Fe^{2+} 이온의 킬레이팅 효과는 ferrozine을 이용하여 측정하였는데, ferrozine은 Fe^{2+} 이온과 complex를 이루어 보라색을 나타낸다. 따라서 보라색 complex의 형성은 적절한 Fe^{2+} 이온 킬레이팅제가 있으면 감소한다. Fig. 3에 나타났듯이 발효액들 간에 활성차이가 많이 나타났으며 대체적으로 활성이 낮았다.

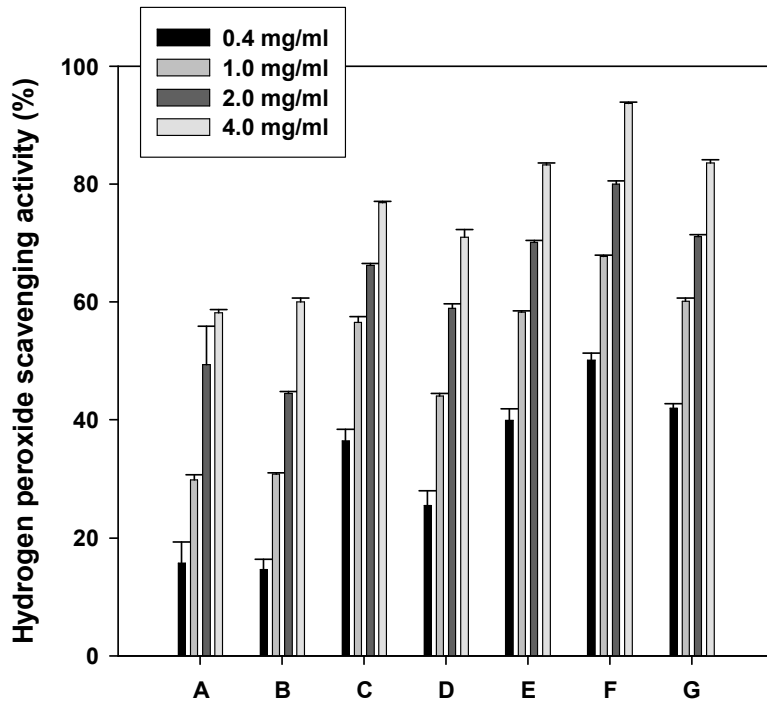


그림 21. Hydrogen peroxide scavenging activity of fermented sea tangle. Data are presented as means \pm S.E. from three independent determinations.

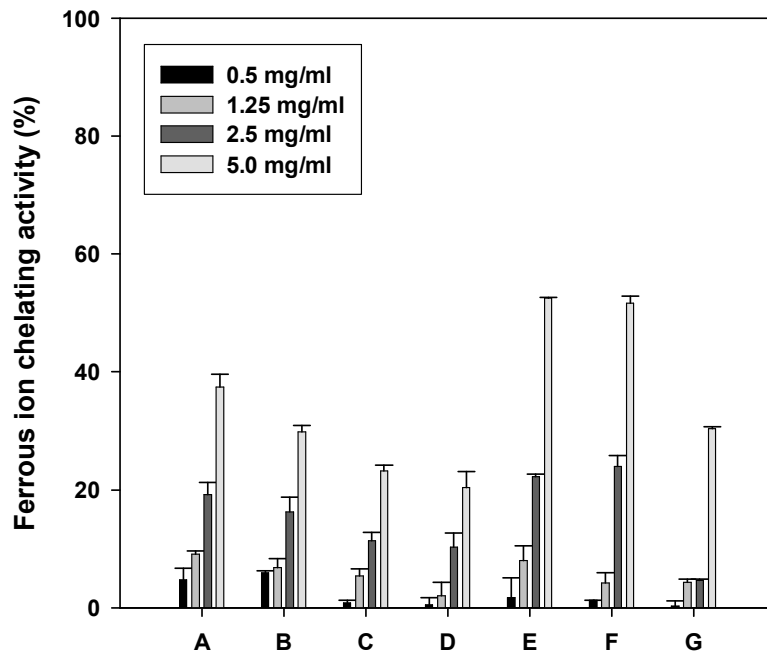


그림 22. Ferrous ion chelating activity of fermented sea tangle. Data are presented as means \pm S.E. from three independent determinations.

시료의 환원력의 측정은 Fe^{3+} 이온을 Fe^{2+} 이온으로 환원할 수 있는 능력을 나타내며, 본 실험은 산화-환원과 관련된 비색 반응으로 측정된다. 또한 환원력은 시료가 항산화제로서 사용될 수 있음을 나타내는 지표이기도 하. 해조류 추출 발효액의 환원력은 그림 23에 나타내었다. 700 nm에서의 흡광도 증가는 높은 환원력을 나타내는데 두 가지 추출물 모두 높은 흡광도 값을 나타내었고 농도 의존적으로 흡광도 값이 증가하였다.

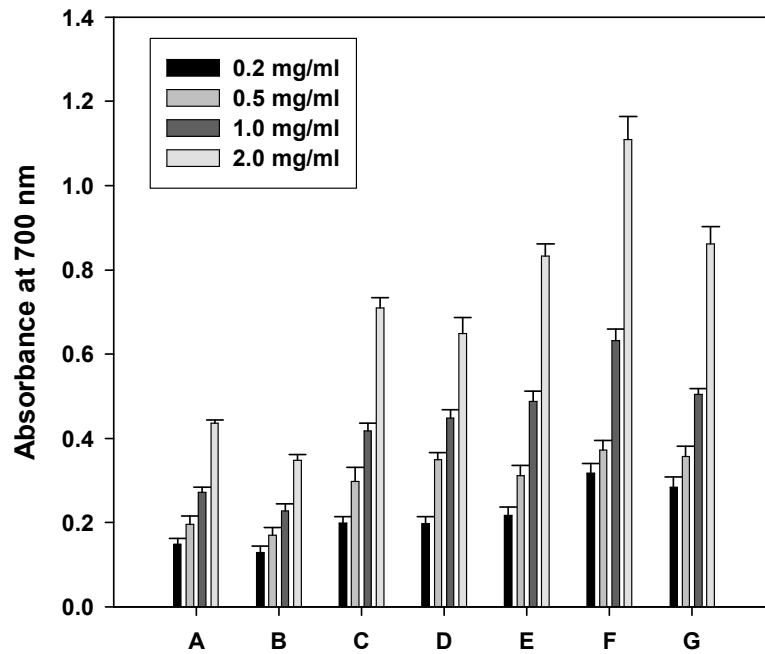


그림 23. Reducing power of fermented sea tangle. Data are presented as means \pm S.E. from three independent determinations.

나. 해조 추출발효액의 ADH 및 ALDH activity

(1) ADH activity

ADH 활성을 비교 측정하기 위해 현재 시판되고 있는 숙취해소음료인 D사 M제품, C사 C제품, D사 B제품, G사 Y제품의 원액을 대조군으로 사용하였으며, 다시마를 *L. brevis* BJ20으로 발효시킨 다시마 발효물(BJ-20)의 1% 수용액을 시험군으로 하였다. 그 결과 그림 24와 같이 대조군의 ADH 활성은 120%~150% 사이의 수치를 나타내는 반면, 다시마 발효물(BJ-20)의 ADH 활성은 160%이상으로 시판되는 숙취해소음료보다 높은 수치를 나타내었다. 이는 다시마 발효물이 숙취해소의 기준이 되는 ADH 활성이 높다고 할 수 있다. 때문에 본 연구에 의해 개발된 다시마 발효물을 기능성 약주를 제조하는데 첨가한다면, 음주 후의 숙취를 줄일 수 있을 것으로 사료된다.

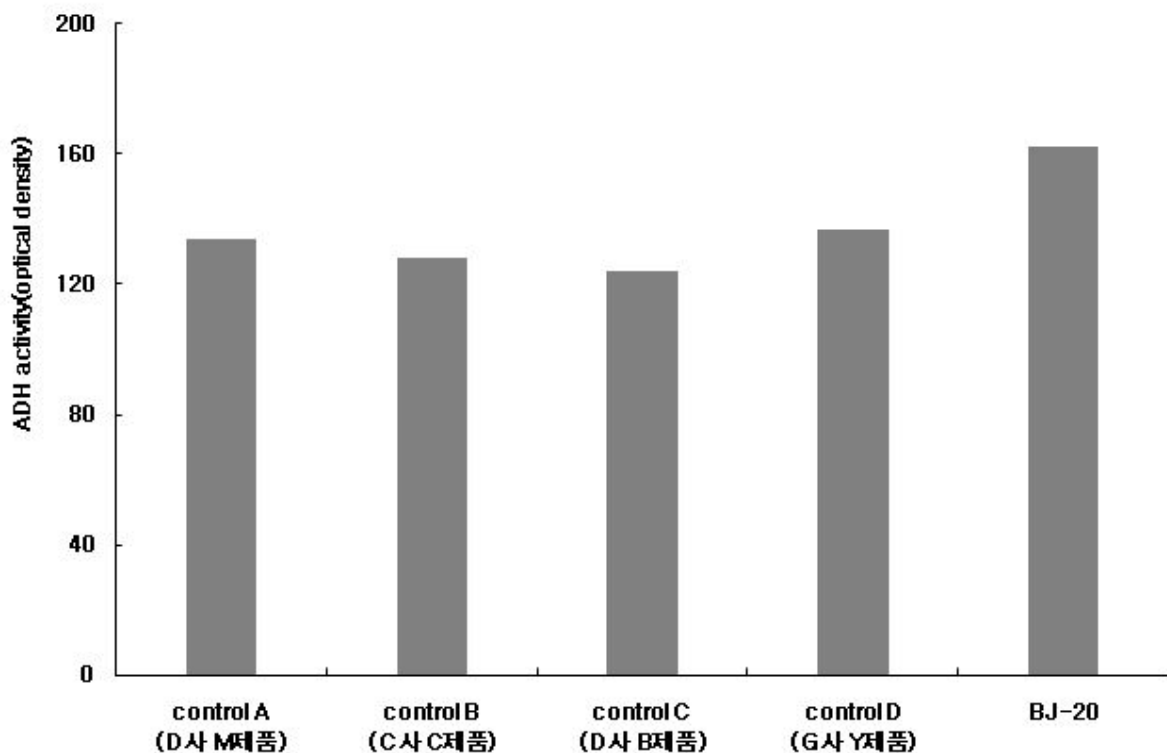


그림 24. 해조 발효물과 숙취해소음료의 ADH activity 비교

(2) ALDH activity

앞서 알아본 ADH 활성을 확인한 겨로가 시판되는 숙취해소음료 보다 높은 활성을 나타내지만, 실제 숙취의 주요 원인은 알코올 대사에서 발생하는 아세트알데하이드이다. 때문에 숙취해소 효능을 검증할 경우 ADH 활성 뿐만 아니라, ALDH 활성을 반드시 동반하여 확인하는 것이 바람직하다. ALDH 활성을 비교 측정하기 위해 현재 시판되고 있는 숙취해소음료인 D사 M제품, C사 C제품, D사 B제품, G사 Y제품의 원액을 대조군으로 사용하였으며, 다시마를 *L. brevis* BJ20으로 발효시킨 다시마 발효물(BJ-20)의 1% 수용액을 시험군으로 하였다. 그 결과 그림 25와 같이 대조군의 ALDH 활성은 50%~60% 사이의 수치를 나타내는 반면, 다시마 발효물(BJ-20)의 ADH 활성은 70%이상으로 시판되는 숙취해소음료보다 높은 수치를 나타내었다. 이는 다시마 발효물이 숙취의 주 원인이 되는 아세트알데하이드를 효율적으로 제거함으로써 숙취를 줄여줄수 있음을 나타낸다.

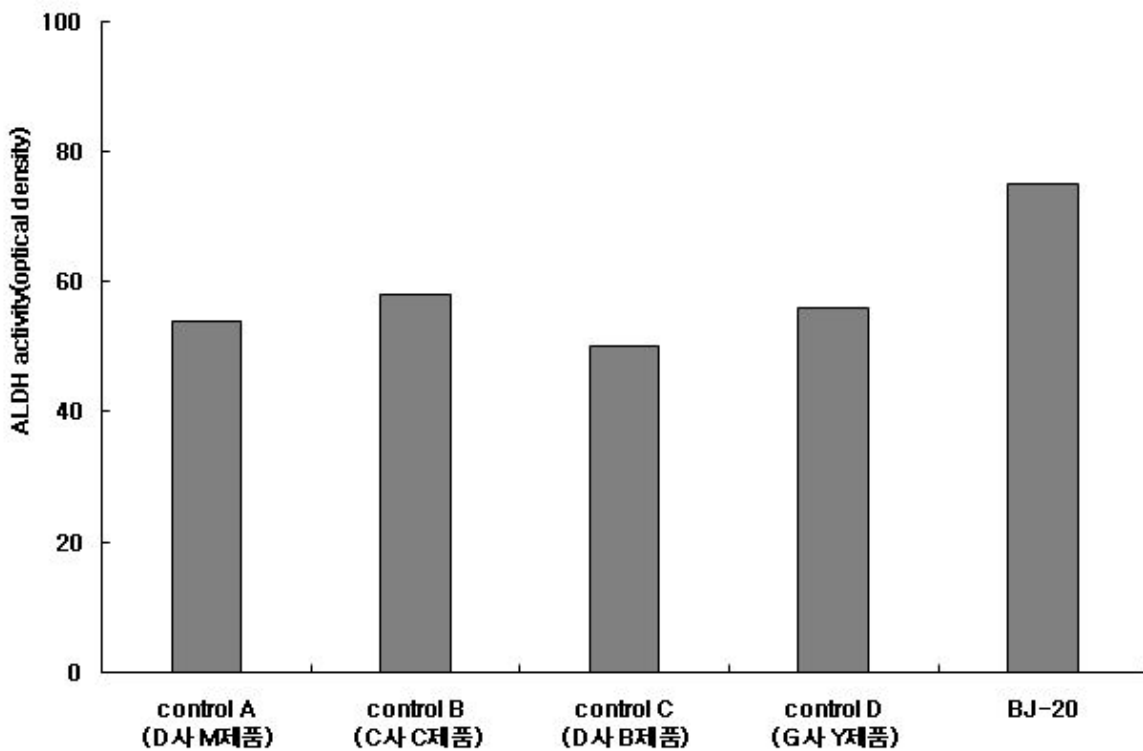


그림 25. 해조 발효물과 숙취해소음료의 ALDH activity 비교

다. 해조 추출발효액의 AChE 및 PEP 저해 활성

일반적으로 AChE 저해제는 잘 알려져 있으며 대부분의 알츠하이머성 치료 환자를 치료하기 위한 치료제로 인식되고 있다. 특히 AChE 저해제는 AChE가 ACh의 가수분해하는 것을 막음으로서 endogenous ACh의 함량을 높여주는 역할을 하며 결과적으로 알츠하이머성 치매 환자의 뇌에서 cholinergic neurotransmission을 향상시키는 역할을 한다. 결과적으로 tacrine, donepezil, rivastigmine, galanthamine, huperzine 및 대부분의 drugs들의 가역적인 AChE 저해제들이 치매환자의 치료제로 사용되고 있다. 그러나 몇몇 화학적으로 합성된 AChE 저해제들이 치매 환자의 치료과정에서 nausea, vomiting, bradycardia, anorexia 및 sweating 등의 부작용을 유발하여 문제가 되고 있다. 따라서 이러한 문제점을 해결하기 위해서 오랫동안 사용하고 있는 천연물로부터 부작용이 없는 약을 개발하려는 연구가 활발히 진행되고 있다. 그림 26에서 보는 바와 같이, 해조류 추출 발효액들이 AChE의 활성을 효율적으로 저해함을 알 수 있었고, 농도 의존적으로 활성을 저해하였다.

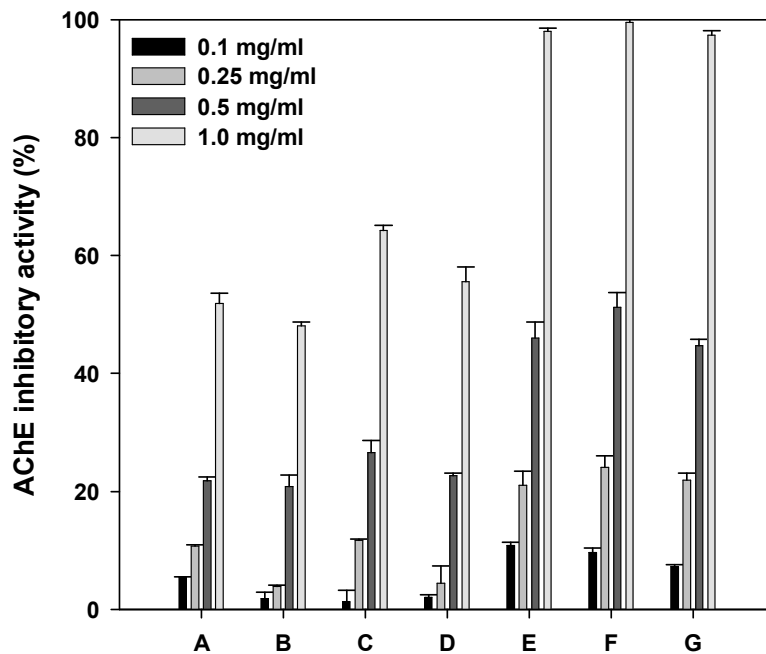


그림26. Acetylcholinesterase inhibitory activity of fermented sea tangle. Data are presented as means \pm S.E. from three independent determinations.

Prolyl endopeptidase (PEP)는 Walter 등에 의해 인간 자궁에서 처음으로 발견되어 초기에는 prolyl oligopeptidase로서 보고되었으며, in vitro, in vivo에서 carboxyl 말단 prolyl 잔기에 작용하여 peptide 결합을 분해하기 때문에 proline을 함유한 학습, 기억과 관계된 neuropeptide의 분해에 중추적인 역할을 담당하는 효소로 알려져 있다. 특히 인간 대뇌 피질층에서 그 활성이 높아 이부분에서 PEP가 중요한 기능을 담당하는 것으로 추

정하였다. 즉 PEP는 중추신경계의 neurotransmitter 또는 neuromodulator로서 중요한 기능을 담당하는 neuropeptide들을 분해할 수 있으며 이러한 neuropeptide들의 결핍은 다양한 행동이 장애나 인지력의 감소와 연관되어지는 것으로 알려져 있다. 따라서 PEP의 저해하는 저해제의 개발은 치매의 예방 및 치료를 위한 의약품 개발에 중요한 target이 된다. 그림 27에서 보는 바와 같이 해조류 추출 발효액의 PEP 저해 활성은 종류에 따라 상이하게 나타났으며 E, F 및 G 발효액에서 60% 이상의 저해 활성을 나타내었다.

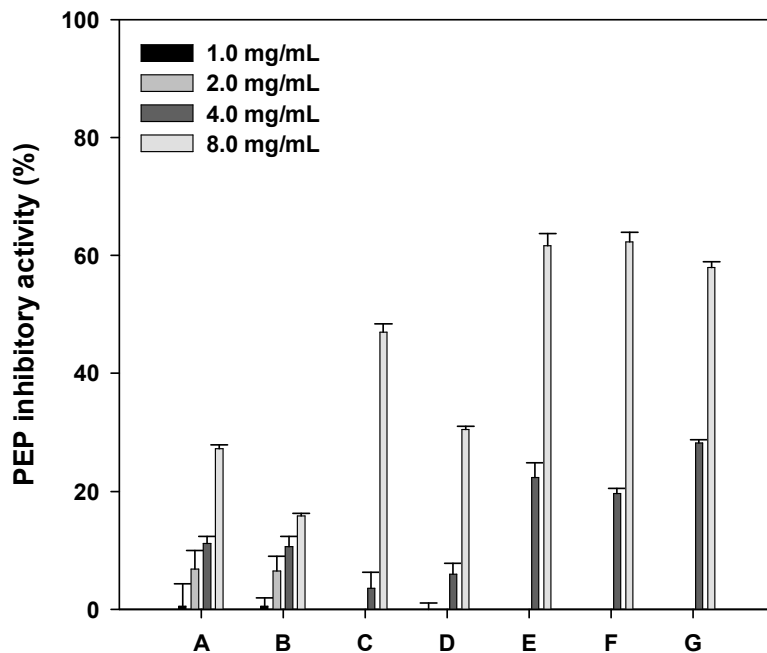


그림 27. Prolyl endopeptidase inhibitory activity of fermented sea tangle. Data are presented as means \pm S.E. from three independent determinations.

라. 해조 추출발효액의 ACE 저해 활성

체내 혈압 조절 기구는 renin-angiotensin system인데 angiotensinogen이 renin의 특이적 분해를 받아서 angiotensin I을 생성하는데, 이는 다시 angiotensin I converting enzyme (ACE)에 의하여 혈관 수축작용을 하는 angiotensin II를 생성한다. ACE는 또한 혈관이완작용을 가진 bradykinin을 분해하여 불활성화 시킴으로써 결과적으로 혈압을 상승하는 역할을 한다. 이와 같이 혈압의 상승에는 ACE의 관여가 크므로 혈압의 강하에는 ACE의 저해가 필수적이고, 또한 ACE 저해제들이 고혈압 치료제로서의 개발 가능성이 제시되면서 고혈압 예방 및 치료에 있어서 ACE 저해제의 중요성이 부각되고 있다. 따라서 본 연구에서도 해조류 추출 발효액의 ACE 저해 효과를 측정하였다. 그림 28에서 보는 바와 같이 해조류 추출 발효액의 ACE 저해 효과는 상이하게 나타났으며 E, F 및 G

에서 가장 우수한 저해 활성을 나타내었다.

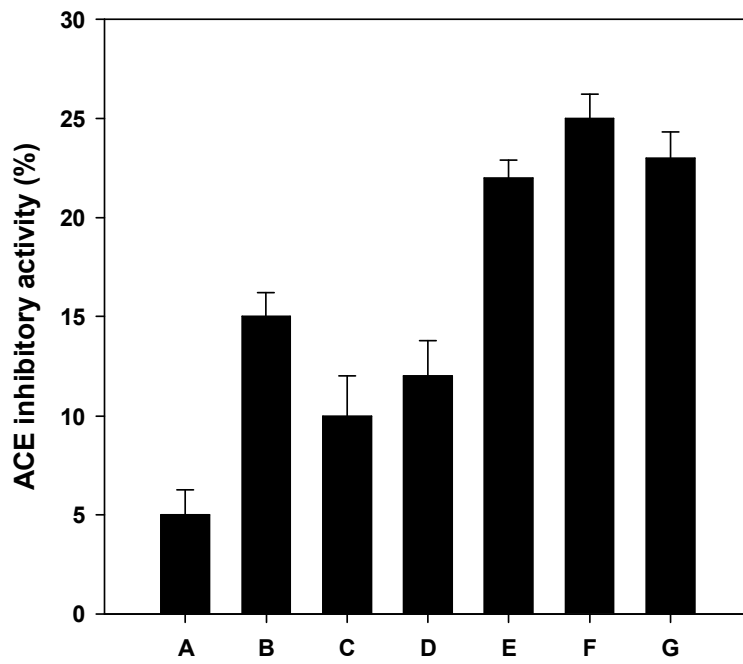


그림 28. ACE inhibitory activity of fermented sea tangle. Data are presented as means \pm S.E. from three independent determinations.

4. 기능성 검증을 위한 동물실험(IN-VIVO TEST)

가. GABA-enriched fermented sea tangle decreases alcohol-induced hepatotoxicity via increase of antioxidant enzyme activities in Sparague-Dawley rats

(1) Histopathological Findings

The results of hepatic histopathological examinations are shown in Fig.29. Liver tissues of control group showed normal histological appearance. When compared with normal liver tissues, liver tissues of the group treated with ethanol exhibited extensive injuries. The moderate to severe hepatocellular degenerations, fatty changes, hemorrhage and formation of regenerative nodules were observed. However, the histopathological changes observed in ethanol-treated group were markedly reduced or not found in the group treated with ethanol together with GABA-enriched FST. Hence, the protective effects exerted by GABA-enriched FST on ethanol-induced liver damage as indicated by the biochemical parameters were confirmed by the histopathological examinations.

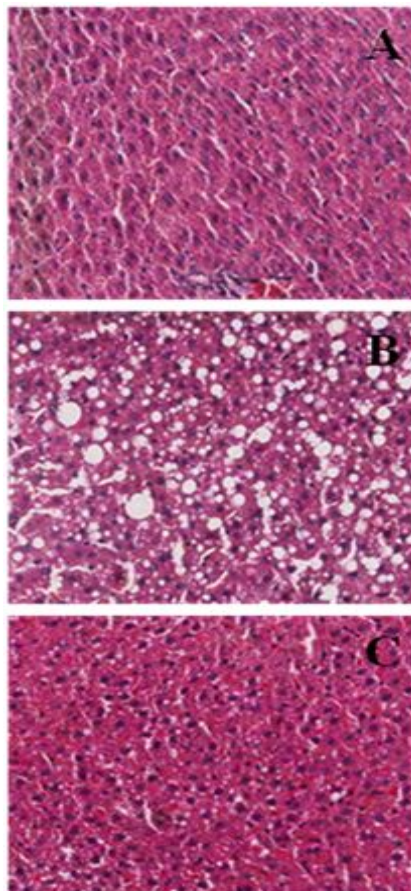


Fig. 29. Representative photomicrographs of liver sections. A: hepatic tissues of control rats B: hepatic tissues of ethanol treated rats C: hepatic tissues of rats treated with GABA-enriched FST together with ethanol

(2) Effect of GABA-enriched FST on Lipid Peroxidation

Table 15 indicates the lipid peroxidation results of serum and the different organs of rats. Lipid peroxidation measured by MDA levels significantly ($P < 0.05$) increased in rats administered with ethanol as compared with control group. This was clearly observed in serum and other organs tested. MDA content in serum was increased by nearly 2 times than that of control group. However, MDA content was significantly decreased in the group treated together with ethanol and GABA-enriched FST.

Table 15. Effect of GABA-enriched FST on ethanol-induced elevation of MDA levels in serum and organs.

Organ	MDA(nmol/g)		
	Control	EtOH	EtOH+FST
Serum*	58.97±4.13 ^a	103.74±10.93 ^b	69.94±2.56 ^a
Liver	180.96±7.03 ^a	214.66±3.37 ^b	193.18±8.78 ^a
Kidney	229.01±6.98 ^a	274.56±14.3 ^c	198.38±9.89 ^b
Heart	306.38±10.55 ^a	373.46±20.02 ^b	290.68±11.5 ^a
Microsome	2.05±0.07 ^a	3.19±0.35 ^b	2.79±0.17 ^b
Mitochondria	1.32±0.03 ^a	1.78±0.04 ^b	1.33±0.02 ^a
Testis	123.86±4 ^a	157.87±2.81 ^b	153.4±1.38 ^b
Spleen	229.01±3.14 ^a	290.47±14.51 ^b	270.92±3.64 ^b

Each value represents the mean± SD of six rats.

Values within a row followed by different letters are significant difference at <0.05 .

* rat serum.

(3) Effect of GABA-enriched FST on GSH

The effect of ethanol or treatment with a combination of ethanol with GABA-enriched FST on serum and hepatic GSH concentration is depicted in Fig. 30. Chronic ingestion of ethanol significantly decreased GSH concentration to 67.4% of control values in liver ($P<.05$) and to 59.8% of control values in serum($P<.05$). However, treatment of ethanol together with GABA-enriched FST increased the GSH level in liver and serum to 143.5% and 188.1% of non-treatment values indicating that rats have become to normal state.

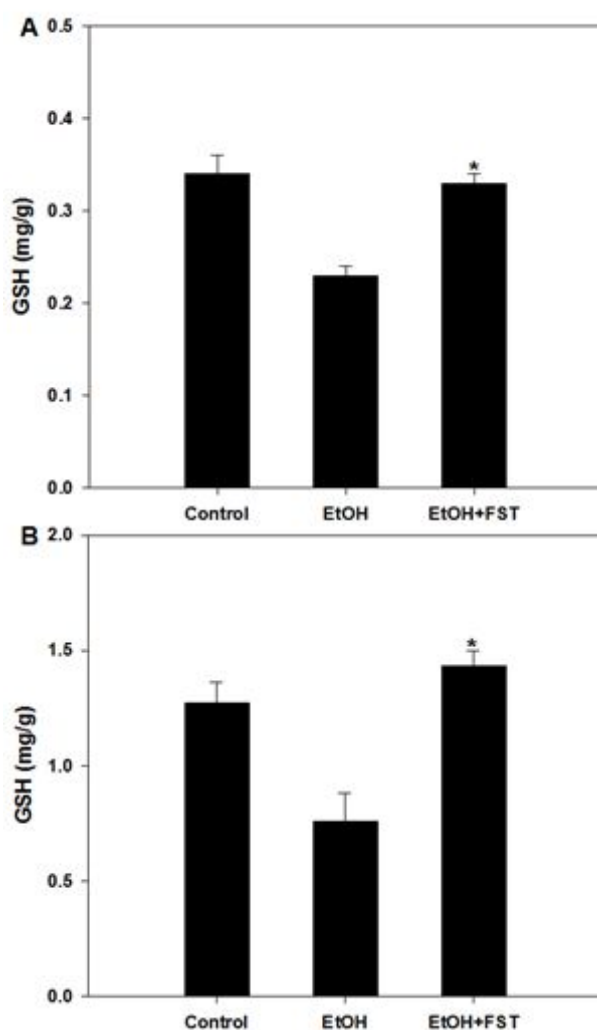


Fig. 30. Effect of GABA-enriched FST supplementation on (A) hepatic and (B) serum GSH concentrations in the ethanol-induced hepatotoxicity in Sprague-Dawley rats. Each bar represents the mean \pm SD of six rats.*Significant difference at <0.05 level compared with ethanol-induced group.

(4) Effect of GABA-enriched FST on Antioxidant Enzymes

Antioxidant enzymes such as CAT, GPx and SOD are essential for endogenous antioxidative defense system to scavenge reactive oxygen species (ROS) and maintain intracellular redox balance [1,16]. The alteration of the activities of rat liver enzyme with the ingestion of ethanol and treatment with combination of ethanol with GABA-enriched FST are shown in Fig. 31. As shown, GABA-enriched FST pretreatment inhibited ethanol-derived in activation of hepatic antioxidant enzymes. The activities of CAT, GPx and SOD of rats treated chronically with ethanol were significantly decreased by 75.7% ($P < 0.05$), 64% ($P < 0.05$) and 68.3% ($P < 0.05$) in comparison with the corresponding normal control, respectively. As compared with ethanol-treated group, GABA-enriched FST supplementation increased hepatic CAT activity by 121.6% ($P < 0.05$), GPx activity by 157.2% ($P < 0.05$) and SOD activity by 146.5% ($P < 0.05$). Thus, GABA-enriched FST protected liver toxicity from ethanol-derived in activation.

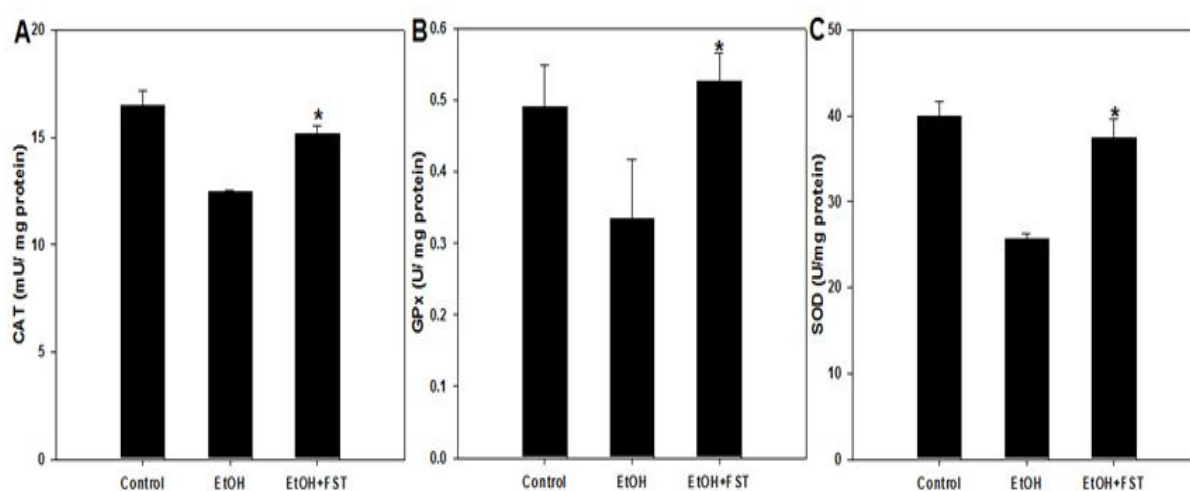


Fig. 31. Effect of GABA-enriched FST supplementation on (A) CAT, (B) GPx, and (C) SOD activities in the ethanol-induced hepatotoxicity in Sprague-Dawley rats. Each bar represents the mean \pm SD of six rats. *Significant difference at <0.05 level compared with ethanol-induced group.

4. Effect of fermented sea tangle, on the alcoholic hepatotoxicity in Sprague–Dawley rats

(1) Results and discussion

GABA-enriched FST was produced using *L. brevis* BJ20(Accession no.KCTC 11377BP) in our previous report(Lee et al., 2010). After fermentation, GABA content in FST was analyzed by aminoacids analyzer as 2465mg GABA / 4983mg of total free amino acids in FST. It is wellknown that GABA and / or GABA-enriched foods exhibited several biological activities such as immune cell-stimulating, antiproliferation activity against cancer cells, stimulation for cancer cell apoptosis, and lowering blood pressure(Oh & Oh, 2004; Oh & Oh, 2003; Inoue et al., 2003). In addition, our previous results also revealed that GABA-enriched FST showed high antioxidant activities. This stimulated our curiosity whether GABA-enriched FST could suppress alcohol-induced hepatotoxicity in rats.

Table 15 summarizes final body weight gain, food intake and water intake during experimental period. Animals with alcohol feeding group were significantly decreased final body weight gain, food intake, and water intake. However, alcohol with FST feeding group were slightly increased final body weight gain, food intake and water intake compared to alcohol feeding groups.

Table 15. Effects of FST on the body weight, food intake, and water intake in alcohol feeding rats

Group	Normal	Alcohol	Alcohol + FST
Final body weight gain (g)	211.23±9.17 ^a	98.78±21.02 ^b	127.28±34.09 ^{ab}
Food intake (g/day)	19.80±0.20 ^a	13.40±0.60 ^b	14.33±2.19 ^b
Water intake (mL/day)	35.60±1.47 ^a	14.60±0.81 ^b	19.33±2.85 ^c

Table 16 summarizes the relative tissues weights such as liver, testis, kidney, spleen, and heart, and all groups showed similar tissues weights.

Table 16. Effects of FST on the relative tissues weight (%) in alcohol feeding rats

Group	Normal	Alcohol	Alcohol + FST
Liver	2.67±0.03^a	2.66±0.07^a	2.75±0.10^a
Testis	0.76±0.03^{ab}	0.88±0.07^b	0.83±0.06^{ab}
Kidney	0.77±0.04^a	0.85±0.04^a	0.83±0.08^a
Spleen	0.18±0.01^a	0.18±0.01^a	0.17±0.02^a
Heart	0.84±0.47^a	0.39±0.01^a	0.42±0.03^a

Several hepatic enzymes in serum were used for the biochemical markers to understand the early hepatic injury, such as ALT, AST and LDH. ALT, AST and LDH are well-documented indicators of hepatic dysfunction, and may be detected efficiently with high concentrations in the liver and serum. ALT and AST levels also increased with alcohol intake. While the ratios may vary in different circumstances, liver damage due to chronic ethanol have been indicated by the ratio of AST to ALT of above two (Kojima et al., 2005). In our study, liver injury was sustained by individual rats due to the chronic ethanol treatment as indicated by the high concentration of the hepatic enzymes in the serum. However, alcohol with FST feeding group was effective in suppressing the injuries by decreasing the level of serum ALT, AST and LDH activities, and the reduction was reached to normal group (Fig. 32). The liver marker enzymes such as ALT, AST and LDH are cytoplasmic in nature; upon liver injury these enzymes enter into the circulatory system due to altered permeability of membrane by peroxidation process (Arun & Asha, 2007).

Therefore, the concentration of ALT, AST and LDH will increase in ethanol-induced rat serum. However, we demonstrated that GABA-enriched FST decreased the amounts of ALT, AST and LDH in serum. Recently, several studies also demonstrated that the supplementation of green algae, *Chlorella*, and fermented barley extracts attenuated chronic alcohol induced liver damage by the decrease levels of ALT and AST (Arimoto-Kobayashi et al., 1998; Giriwono et al., 2010). These effects may be presumed as the potential effect of antioxidant nature of phytochemicals, chlorophyll and so forth. Our previous data also suggested that

GABA-enriched FST showed high antioxidant activity, and it may be reduced the levels of ALT, AST and LDH by alcohol-induced liver damage(Lee et al., 2010).

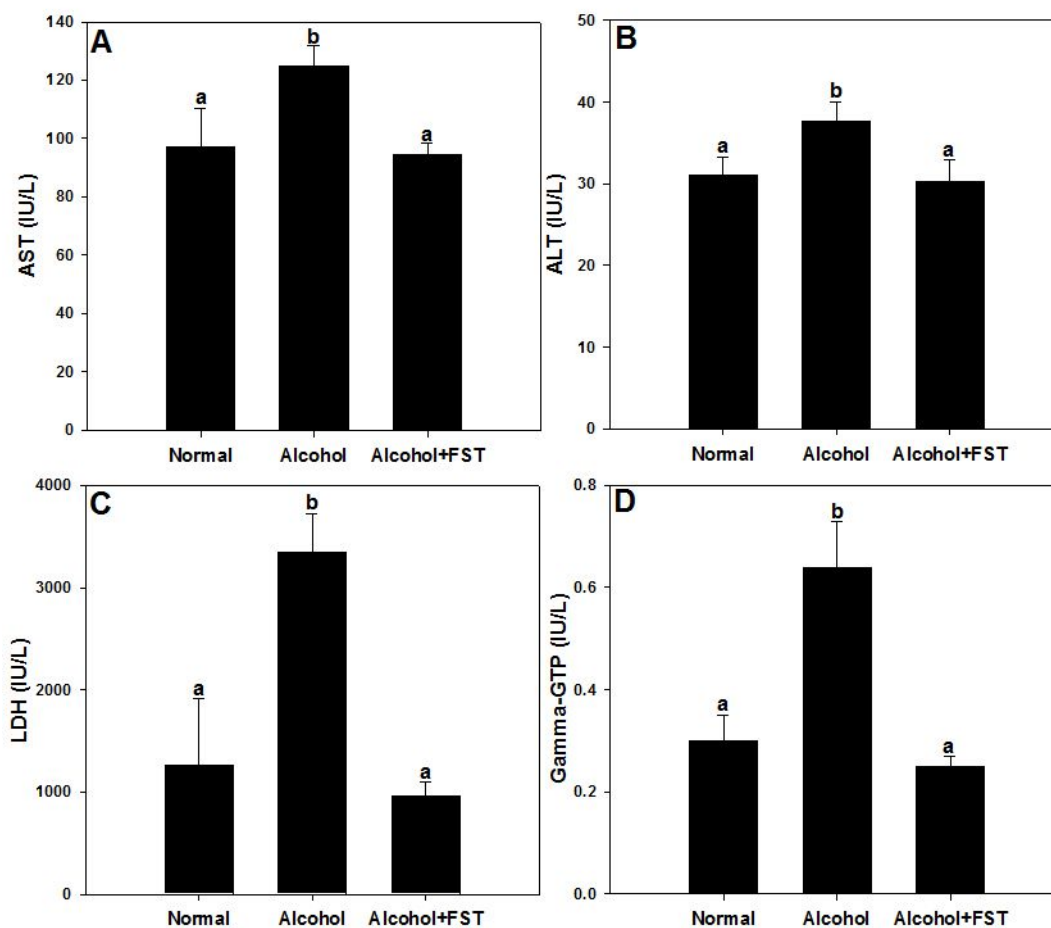


Fig. 32. Effects of FST on the serum activities of (A) AST, (B) ALT, (C) LDH and (D) γ -GTP in alcohol-induced hepatic damage rats. Values with different letters are significantly different at $p < 0.05$ (mean \pm SD, n=6).

The histological observations basically supported the results obtained from serum enzyme assays. As shown in Fig. 33, alcohol treatment induced the marked accumulation of lipid droplets in numbers and volumes as the fatty liver progressions. However, alcohol with FST feeding group showed the reduction of accumulation of lipid droplets, alcohol-induced mild inflammation and necrosis. Normal rats revealed clear-out hepatic lobules with the uniform pattern of the polyhedral hepatocytes radiating towards the periphery from the central vein.

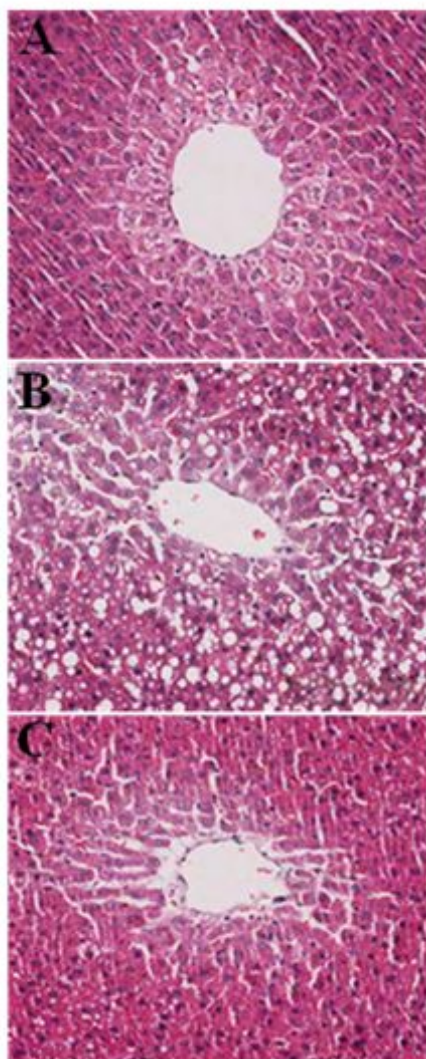


Fig. 33. Hepatic histopathologic changes in the normal (A), alcohol feeding control (B), and alcohol with FST feeding group (C). Hepatic histopathologic changes in alcohol treated rats (magnification x 200).

Table 17 shows the effects of FST on serum lipids concentration in alcohol feeding rats. Liver steatosis was related with chronic ethanol consumption and higher hepatic lipid concentrations caused liver injury. The concentration of serum total lipid showed a tendency to decrease slightly in alcohol feeding and alcohol with FST feeding groups in comparison to normal group. However, triglyceride and free fatty

acid were significantly increased in alcohol feeding group, but this increment of serum triglyceride by alcohol was decreased by FST supplementation. Several reports indicate that alcohol intake significantly increased serum triglyceride level resulting in hypertriglyceridemia (Giriwono et al., 2010; Park et al., 2002), and the increment of serum triglyceride was reduced by supplementation with *Sake* yeast, zinc-enriched yeast, and fermented barley (Giriwono et al., 2010; Izu et al., 2006; Cha et al., 2008). The total cholesterol in the serum was significantly decreased both alcohol and alcohol with FST feeding groups compared to normal groups.

Table 17. Effects of FST on serum lipids concentration in alcohol feeding rats

Group	Normal	Alcohol	Alcohol + FST
Total lipid	262.60±20.71^a	221.20±8.07^{ab}	192.33±21.67^b
Triglyceride	47.80±3.90^a	58.60±4.95^b	40.33±1.86^a
Cholesterol	64.40±1.66^a	56.00±2.83^b	48.00±2.65^c
Free fatty acid	0.83±0.11^a	1.17±0.14^b	0.65±0.04^a

ADH and ALDH enzymes are responsible for the metabolism of ethanol. Therefore, we investigated the effects of GABA-enriched FST on ADH and ALDH activity in alcohol-induced hepatic damage rats. As shown in Fig. 34, alcohol feeding group showed similar ADH activity compared to normal group, however, alcohol with FST feeding group significantly augmented ADH activity compared to alcohol feeding group. In addition, alcohol with FST feeding group also significantly increased ALDH activity compared to normal and alcohol feeding group. These results suggested that the administration of FST could rapidly detoxify the ethanol-induced hepatic damage by increment of ADH and ALDH. We also determined the blood alcohol and acetaldehyde concentrations because the adsorbed ethanol was metabolized to acetaldehyde by ADH and acetate by ALDH in liver. As shown in Fig. 35, the blood alcohol concentration in normal group was not detected, however, the blood alcohol of alcohol feeding group was recorded at 0.043%. The administration of FST decreased the blood alcohol concentration as 0.036%. In addition, the alcohol with FST feeding group was also decreased the acetaldehyde concentration compared to alcohol feeding group. These results were in agreement with the increased ADH and ALDH activity. In conclusion, the present study gives evidence of hepatic damage caused by chronic ethanol exposure and shows the capability of GABA-enriched FST to prevent this toxicity. In addition, the supplementation of GABA-enriched FST increased the

activity of alcohol metabolizing enzymes, ADH and ALDH, and reduced blood alcohol and acetaldehyde concentrations. The findings of this study suggest that GABA-enriched FST can be used as a ingredient functional foods. However, the accurate mechanism of GABA-enriched FST how to reduce alcohol-induced hepatic toxicity is needed.

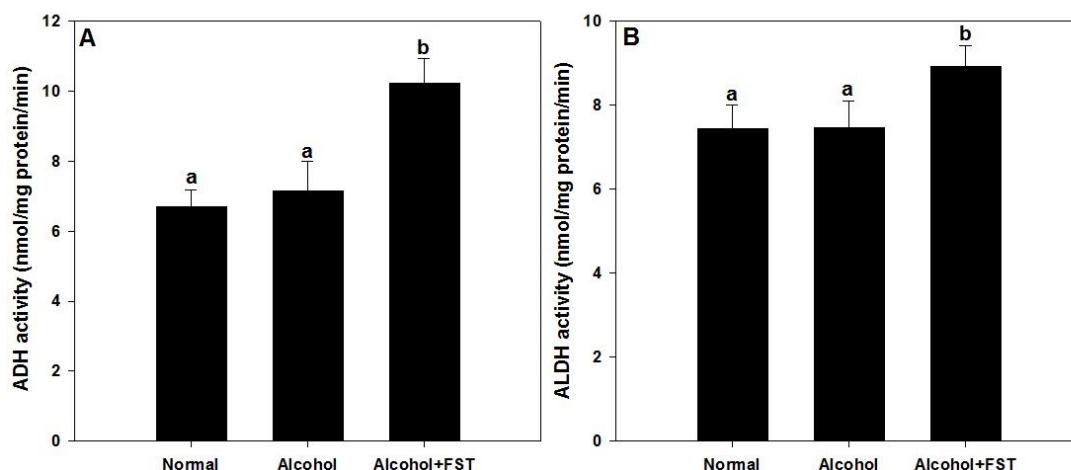


Fig. 34. Effects of FST on hepatic activities of (A) ADH and (B) ALDH in alcohol-induced hepatic damage rats. Values with different letters are significantly different at $p < 0.05$ (mean \pm SD, $n = 6$).

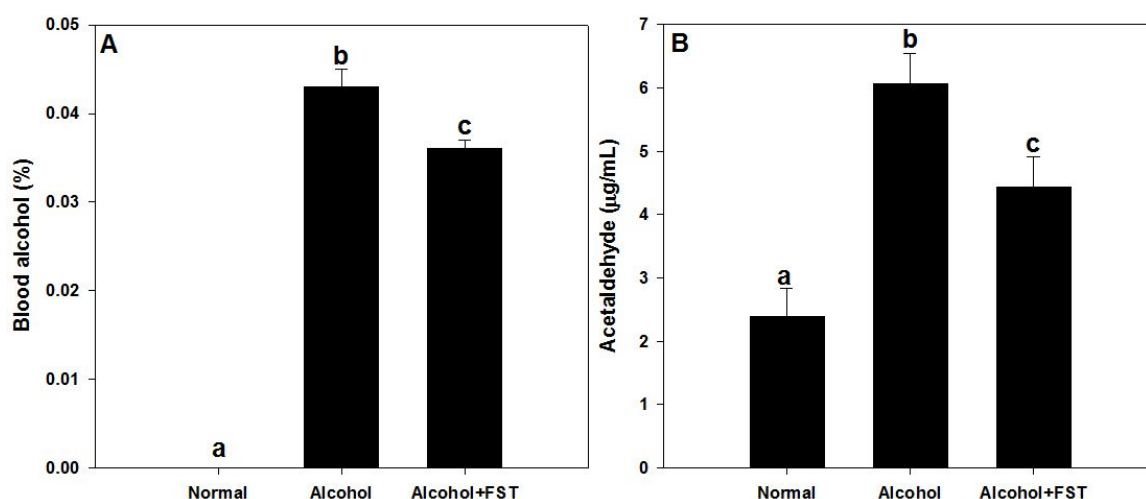


Fig. 35. Effects of FST on the serum concentrations of (A) alcohol and (B) acetaldehyde in alcohol-induced hepatic damage rats. Values with different letters are significantly different at $p < 0.05$ (mean \pm SD, $n = 6$).

2절. 해조 추출발효액을 이용한 기능성 약주의 개발

1. 균주별 입국(koji)의 일반성분 및 효모의 특성

가. 증자 및 무증자 입국의 당도, 환원당, pH, 산도, 색도 측정

20% 증자 및 무증자 입국 추출액의 산도는 각각 *Rhizopus oryzae* 및 *Aspergillus kawachii*에서 가장 높았다. *Aspergillus oryzae*는 증자 입국에서 높은 당화력을 나타내었으며, *Aspergillus kawachii*는 무증자 입국에서 높은 당화력을 나타내었다. 환원당은 증자 입국에서 *Aspergillus oryzae* 및 무증자 입국에서는 *Aspergillus kawachii*에서 가장 높은 것으로 나타났으며, 무증자 입국 보다 증자 입국에서 높았다. 홍국균인 *Monascus purpureus*에 의한 무증자 입국은 균 생육 속도가 느리기 때문에 잡균 오염으로 인해 만들어지지 않아 실험에 제공하지 못하였다. 따라서 약주 제조에 사용되는 최적 당화균 선별에서는 우선 증자 입국을 사용하기로 결정 하였다.

표 18. Effects of *kojis* on the pH, acidity, sugar, reducing sugar and color of korean traditional rice wines

Ingredients		control	<i>Aspergillus kawachii</i>	<i>Aspergillus oryzae</i>	<i>Rhizopus oryzae</i>	<i>Monascus purpureus</i>
Cooked <i>koji</i>	pH	6.05	3.73	5.89	3.44	3.82
	Acidity(%)	0.003	0.083	0.010	0.125	0.096
	Sugar(%)	0.1	2.5	2.4	0.8	2.4
	Reducing sugar(%)	0.029	0.906	1.363	0.276	1.204
	Color	L: 29.42 a: -3.04 b: -1.45	L: 28.95 a: -2.98 b: -0.59	L: 29.15 a: -3.2 b: -0.76	L: 29.39 a: -3.09 b: -0.95	L: 27.54 a: -2.88 b: 1.72
Uncooked <i>koji</i>	pH	5.18	4.10	5.56	4.53	
	Acidity(%)	0.006	0.096	0.022	0.05	
	Sugar(%)	0.1	2.5	1.6	1.4	
	Reducing sugar(%)	0	0.783	0.413	0.508	
	Color	L: 29.50 a: -2.83 b: -1.13	L: 27.47 a: -2.94 b: 0.74	L: 26.18 a: -2.11 b: 2.21	L: 27.88 a: -2.62 b: 0.38	

나. 해조 발효 분말 첨가 및 무첨가에 의한 알코올 발효 특성 조사

(1) 발효 효모의 생육에 미치는 당질 종류별 영향

발효에 사용한 *Saccharomyces cerevisiae* KCCM 11350 균주는 배양 24시간까지는 큰 차이 없이 균 생육도를 보였지만 48시간 배양에서는 fructose > galactose > maltose > sucrose > lactose > glucose 순으로 당을 이용하는 것으로 나타났다(그림 35).

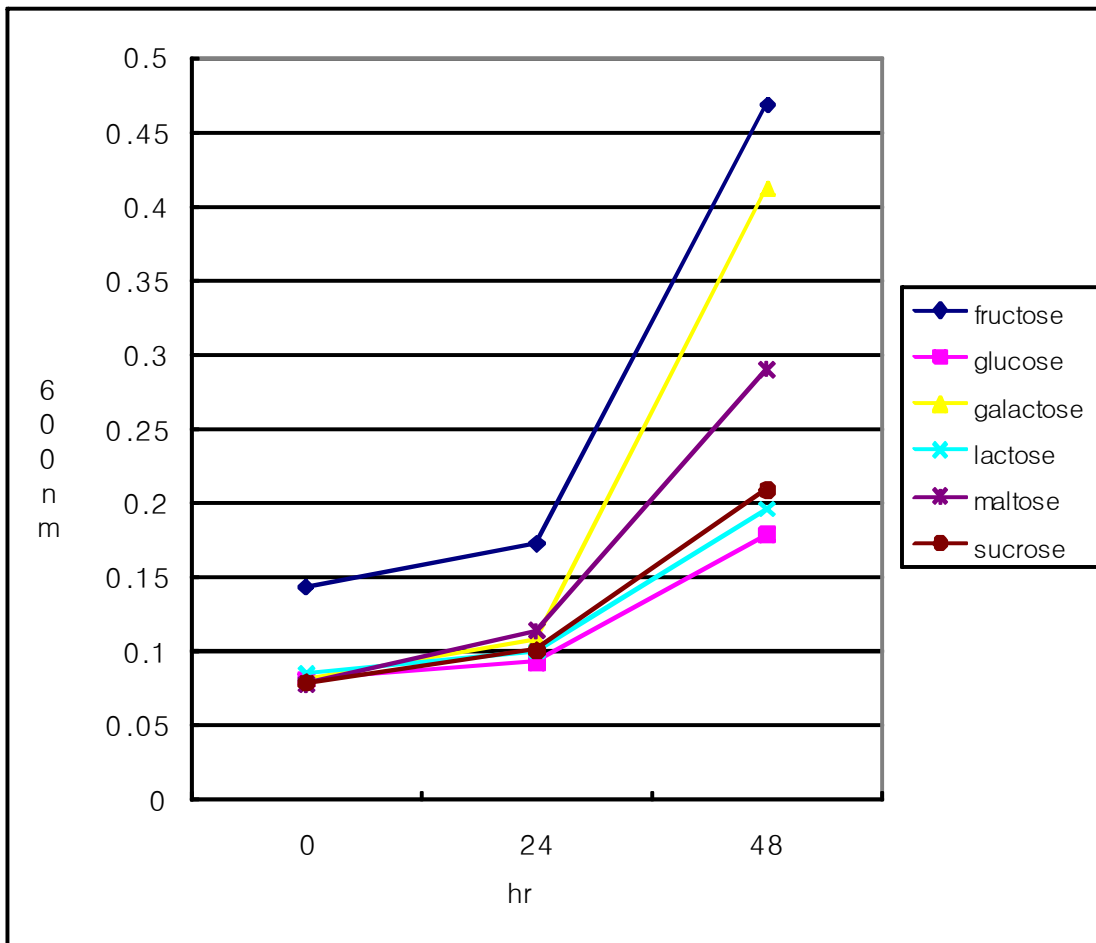


그림 35. Changes in free sugar in rice wine with *S. cerevisiae* KCCM 11350.

(2) 발효 효모의 알코올 농도별 온도별 내성 실험 결과

알코올 농도가 높아질수록 효모의 생육 활성은 떨어졌으며, 알코올 12%까지는 -20℃ 또는 -70℃에 24시간 보관한 후 도달하였을 경우 균 생육 활성은 조금 떨어졌지만 완전히 사멸하지는 않았다(표 19). 따라서 효모의 정미성분을 약주 내에 용출시켜 이를 이용하기 위해서는 알코올 농도가 적어도 12% 이상에서 낮은 온도로 숙성하게 되면 조

화로운 맛을 기대할 수 있을 것으로 사료되어 진다.

표 19. Ethanol tolerance of *Saccharomyces cerevisiae* KCCM 11350

Alcohol (%)	20°C	-20°C		-70°C	
		1st	2nd	1st	2nd
0	2.3×10^8	5.7×10^7	5.1×10^7	10^{-4} TNTC*	10^{-4} TNTC
6	1.3×10^8	5.5×10^7	2.5×10^7	2.5×10^7	1.3×10^7
12	8.3×10^7	2.0×10^7	1.0×10^7	2.4×10^7	1.4×10^7
18	5.3×10^7	NG**	NG	NG	NG

* TNTC; too numerous to count

** NG; not growth

2. 발효 다시마 분말 첨가에 따른 약주 제조

가. 약주 제조시 발효 다시마 분말 첨가의 최적농도

약주 제조에 발효 다시마 분말(FST(fermented sea tangle)을 농도별(0~1.5%)로 2단 담금에 첨가하였다. 발효 다시마 분말(FST)의 첨가 농도 기준은 약주 제조시 첨가된 총 급수량에 대한 비율로 나타내었다. 대조군은 4가지 균주별로 동일한 약주 제조방법으로 발효 다시마 분말(FST)를 첨가하지 않은 일반약주(0%, control)를 사용하였다. 대조군에서 알코올 수율이 가장 높게 생성한 균주는 *Aspergillus oryzae* 균으로 *Rhizopus oryzae* 균 보다는 2배 높았다.

발효 다시마 분말(FST)을 농도별 첨가하고 알코올 생성량을 비교한 결과, *Aspergillus kawachii* 균에 발효 다시마 분말(FST)를 0.5%로 첨한 실험군에서 알코올 생성량이 16.83%로 가장 높게 나타났다. 그리고 모든 실험군에서 발효 다시마 분말(FST) 농도가 0~0.5%까지는 알코올 생성량이 증가하였고, 0.5% 이상으로 첨가시 알코올 농도가 감소하는 동일한 경향을 보였다. 즉, 과량의 발효 다시마 분말(FST)을 약주 제조시 사용하면 알코올 발효에 저해를 주는 것으로 판단된다. 열처리한 인삼박을 0~6% 농도로 설탕 용액을 첨가한 potato dextrose broth에 첨가하여 알코올 발효한 결과에서도 3% 첨가 농도부터 알코올 생성량이 감소하는 것으로 나타났었다(10).

표 20. Ethanol contents of in rice wine with the FST(fermented sea tangle)

(Unit: %)

FST contents (%, w/w)	<i>Aspergillus kawachii</i>	<i>Aspergillus oryzae</i>	<i>Monascus purpureus</i>	<i>Rhizopus oryzae</i>
	alcohol(%)			
0.00 (Control)	14.88	16.22	11.21	7.45
0.25	16.34	16.27	11.51	8.56
0.50	16.83	16.74	11.56	8.97
0.75	16.71	16.61	11.50	8.63
1.00	16.24	15.72	10.98	8.08
1.25	15.01	14.37	9.85	7.66
1.50	14.17	13.87	8.54	7.19

나. 발효 중 무게변화 측정

Aspergillus kawachii 국균으로 만든 입국을 사용한 발효에서는 3일까지 최대 이산화탄소를 방출하여 발효가 이 기간에 급속히 이루어짐을 알 수 있었고, *Aspergillus oryzae*의 경우는 5일째까지 발효가 잘 이루어졌으며, *Monascus purpureus*의 경우는 12일째 까지도 발효가 꾸준히 이루어지고 있었으며, *Rhizopus oryzae*의 경우는 7일째에 발효가 거의 종료된 것으로 나타나 국균에 의해 만들어진 입국의 종류에 따라 발효기간이 달라지는 것을 알 수 있었다. 따라서 발효 시 소요되는 열 공급 등의 측면에서 경제적인 발효공정을 위해서는 초기 발효가 잘 이루어지는 *Aspergillus kawachii*와 같은 국균의 종류를 선택해야 할 것으로 생각된다.

표 21. Changes of weights in rice wine supplemented with FST(fermented sea tangle) during fermentation

(Unit; g)

Fermentation period (Days)	<i>Aspergillus kawachii</i>	<i>Aspergillus oryzae</i>	<i>Monascus purpureus</i>	<i>Rhizopus oryzae</i>
0	1511.08	1509.12	1512.11	1513.30
1	1468.75 (-42.33)	1461.39 (-47.73)	1501.16 (-10.95)	1480.65 (-32.65)
2	1435.76 (-32.99)	1429.09 (-32.3)	1492.54 (-8.62)	1459.65 (-21.0)
3	1425.07 (-10.69)	1414.39 (-14.7)	1484.77 (-7.770)	1447.84 (-11.81)
4	1423.17 (-1.9)	1408.29 (-11.81)	1477.89 (-6.88)	1440.01 (-19.67)
6	1421.57 (-1.6)	1402.58 (-5.71)	1465.62 (-12.27)	1428.17 (-11.84)
7	1421.34 (-0.23)	1401.61 (-0.89)	1460.67 (-4.95)	1424.79 (-3.38)
8	1421.71 (0.37)	1401.69 (0.08)	1456.66 (-4.01)	1423.90 (-0.89)
9	1421.12 (-0.59)	1400.99 (-0.7)	1451.66 (-5.0)	1422.75 (-1.15)
10	1420.77 (-0.94)	1400.54 (-0.36)	1447.62 (-4.04)	1422.11 (-0.64)
12	1420.10 (-0.67)	1399.76 (-0.78)	1444.31 (-3.01)	1421.10 (-1.01)

다. 알코올 농도

술덧 발효 중 알코올 생성량은 표 22와 같다. 발효기간 중 알코올 발효는 발효 시작 3~4일에 가장 활발하게 일어났으며, 특히 *Aspergillus kawachii* 와 *Aspergillus oryzae* 실험군에서 14.88%와 16.22%의 알코올 농도를 보였다. 반면 *Monascus purpureus* 와 *Rhizopus oryzae* 실험군은 발효 8~10일까지 알코올 생성이 느리게 진행되었으며, 최종 12일째 알코올 함량은 각각 11.25% 및 7.45%로 낮았다.

발효 다시마 분말을 0.5% 첨가한 *Aspergillus kawachii* 균은 알코올 생성량이 16.83%까지 증가하여 대조군에 비해 1.95% 높은 알코올 생산량을 보였다. 또한, 발효 다시마 분말을 0.5% 첨가한 *Aspergillus oryzae*, *Monascus purpureus*, *Rhizopus oryzae* 실험군의 알코올 함량은 무첨가 대조군에 비해 모두 높은 알코올 생산량을 보였다. 따라서 발효 다시마 분말을 약주 제조에 첨가할 경우 알코올 발효 12일째에 알코올 생산량이 높아지는 효과를 얻게 됨으로서 경제적인 측면에서도 유리한 것으로 생각된다. 즉, 발효 다시마 분말 첨가 약주에 가장 효율적인 균주는 *Aspergillus kawachii*임을 확인하였다.

표 22. Changes of ethanol contents in rice wine supplemented with FST(fermented sea tangle) during fermentation

(Unit; %)

Fermentation period (Days)	<i>Aspergillus kawachii</i>		<i>Aspergillus oryzae</i>		<i>Monascus purpureus</i>		<i>Rhizopus oryzae</i>	
	FST contents (% ,w/w)							
	0	0.5	0	0.5	0	0.5	0	0.5
0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	11.69	10.06	12.54	8.21	5.51	5.45	3.96	3.32
4	14.64	14.81	15.76	15.61	8.40	8.27	4.97	5.79
6	14.87	16.23	16.20	15.73	10.65	9.62	5.69	8.13
8	14.88	16.82	16.22	16.55	11.02	10.24	6.12	8.48
10	14.87	16.82	16.22	16.74	11.24	10.30	6.51	8.94
12	14.88	16.83	16.22	16.74	11.24	10.30	6.51	8.94

라. pH 및 적정산도

각 균주별 대조군 초기 pH는 4.18~5.48의 범위였으며, 발효 4일까지 감소하고 그 후 12일까지 약간 상승하거나 비슷한 수준으로 지속되었고, 발효기간이 경과한 12일째 pH는 3.99~4.72로서 거의 유사한 수준이었다.

발효 다시마 분말(0.5%) 처리군 발효 12일째 pH는 *Aspergillus kawachii*균만 대조군에 비해 높았고 나머지균 모두 대조군보다 낮았지만, 그 pH 범위는 거의 유사한 수준

이었고 발효 다시마 분말 첨가가 약주 발효에 있어 pH의 변화에 큰 영향을 주지 않는 것으로 분석된다(표 23).

국균의 종류를 달리한 탁주 양조에서 *Aspergillus* 속을 이용한 탁주 제조 발효 10일 후 pH가 4.0~4.2 였다는 보고는 본 실험결과와 일치하였으며(11), 원료를 달리하여 담금한 품질 특성 및 향기 성분에서 주모를 첨가하여 멥쌀로 제조한 탁주가 pH 3.47~3.60이 였다는 보고(12)는 본 실험에서 제조한 약주의 pH와 유사한 경향이였다(11, 12).

표 23. Changes of pH in rice wine supplemented with FST(fermented sea tangle) during fermentation

Fermentation period (Days)	<i>Aspergillus kawachii</i>		<i>Aspergillus oryzae</i>		<i>Monascus purpureus</i>		<i>Rhizopus oryzae</i>	
	FST contents (% , w/w)							
	0	0.5	0	0.5	0	0.5	0	0.5
0	4.18	4.47	5.48	5.28	5.08	5.57	4.61	3.70
2	3.54	3.83	3.80	4.20	4.09	4.47	3.86	3.68
4	3.87	4.03	4.22	4.29	4.06	4.15	4.05	3.74
6	3.96	4.28	4.62	4.41	4.07	4.11	4.18	3.80
8	3.97	4.37	4.73	4.61	4.07	4.22	4.36	3.89
10	4.01	4.36	4.78	4.69	4.25	4.22	4.51	3.93
12	3.99	4.40	4.79	4.72	4.46	4.30	4.57	3.99

발효과정 중의 각 처리군의 총산 변화는 표 24와 같다. 약주 발효 중 총산의 함량은 발효 기간이 경과함에 따라 모든 실험군에서 점차 증가하는 경향이었고, 담금 직후에는 0.048~0.205 수준이었으나 발효 12일 후에는 0.307~0.525로 높아졌다. 0.5% 발효 다시마 분말 첨가군 중 *Aspergillus kawachii*와 *Aspergillus oryzae* 균주를 사용한 실험군은 대조군에 비해 총산의 함량이 낮았고, *Monascus purpureus* 와 *Rhizopus oryzae* 균주를 사용한 실험군은 대조군 보다 총산의 함량이 높았다.

표 24. Changes of total acidity in rice wine supplemented with FST(fermented sea tangle) during fermentation

(Unit: %)

Fermentation period (Days)	<i>Aspergillus kawachii</i>		<i>Aspergillus oryzae</i>		<i>Monascus purpureus</i>		<i>Rhizopus oryzae</i>	
	FST contents (% , w/w)							
	0	0.5	0	0.5	0	0.5	0	0.5
0	0.205	0.186	0.058	0.064	0.048	0.109	0.058	0.365
2	0.454	0.314	0.314	0.154	0.122	0.224	0.262	0.448
4	0.506	0.346	0.326	0.192	0.179	0.275	0.294	0.480
6	0.518	0.384	0.333	0.246	0.218	0.336	0.304	0.515
8	0.544	0.384	0.333	0.253	0.262	0.336	0.346	0.518
10	0.525	0.397	0.339	0.262	0.282	0.349	0.339	0.525
12	0.544	0.397	0.352	0.275	0.307	0.362	0.352	0.538

마. 색도

술덧 발효 후 압착여과 하여 제조된 약주의 색차를 비교한 결과는 표 25와 같다. 발효 12일째 약주의 밝기를 나타내는 lightness는 모든 균주에서 대조군과 큰 차이는 보이지 않았다. 적색도를 나타내는 redness는 발효 다시마 분말(FST) 첨가 *Aspergillus kawachii*균주 처리군에서는 대조군과 같은 수치를 보이고 나머지 군에서는 발효 다시마 분말(FST) 첨가 균주의 적색도가 더 낮게 나타났다. 즉 적색도가 낮다는 것은 발효 다시마 분말(FST) 첨가균의 청색도가 높음을 의미한다. 황색도를 나타내는 yellowness는 발효 다시마 분말(FST) 첨가 *Aspergillus kawachii*, *Monascus purpureus* 균주 처리군의 황색도가 높았다. 반면 발효 다시마 분말(FST) 첨가 *Aspergillus oryzae* 균주 처리군의 황색도는 낮았고, 발효 다시마 분말(FST) 첨가 *Rhizopus oryzae* 균주 처리군은 큰 차이가 없었다.

표 25. Comparative of color in rice wine supplemented with FST(fermented sea tangle) during fermentation

Fermentation period (Days)	<i>Aspergillus kawachii</i>		<i>Aspergillus oryzae</i>		<i>Monascus purpureus</i>		<i>Rhizopus oryzae</i>	
	FST contents (% w/w)							
	0	0.5	0	0.5	0	0.5	0	0.5
0	L 32.14, a -4.53, b 1.88	L 27.59, a -3.55, b 4.23	L 27.96, a -3.62, b 1.74	L 27.99, a -4.61, b 3.33	L 28.10, a -3.44, b 2.30	L 27.31, a -2.89, b 7.83	L 27.79, a -2.52, b 2.30	L 28.28, a -4.01, b 3.56
2	L 27.60, a -3.47, b 2.29	L 30.03, a -5.38, b 3.76	L 28.54, a -4.04, b 2.83	L 28.53, a -3.52, b 2.39	L 28.11, a -3.74, b 2.84	L 29.04, a -5.37, b 7.56	L 28.26, a -3.48, b 2.04	L 29.76, a -5.46, b 4.20
4	L 27.8, a -2.77, b 3.86	L 28.76, a -4.18, b 4.87	L 28.41, a -4.29, b 2.96	L 28.18, a -4.27, b 2.87	L 28.30, a -3.01, b 2.62	L 27.86, a -4.16, b 7.32	L 27.79, a -3.45, b 2.26	L 29.93, a -5.70, b 4.93
6	L 27.71, a -3.46, b 4.42	L 28.23, a -4.25, b 5.55	L 27.47, a -3.58, b 4.46	L 27.91, a -3.83, b 3.42	L 27.62, a -2.92, b 2.81	L 26.96, a -3.71, b 7.30	L 28.89, a -3.60, b 3.79	L 29.95, a -4.54, b 4.64
8	L 30.15, a -5.29, b 5.37	L 27.97, a -3.92, b 5.67	L 29.34, a -4.81, b 5.11	L 27.69, a -3.81, b 3.91	L 27.71, a -3.12, b 3.08	L 26.95, a -3.62, b 7.23	L 28.00, a -3.67, b 3.82	L 28.65, a -4.49, b 4.79
10	L 28.41, a -3.85, b 4.67	L 28.52, a -4.53, b 6.06	L 28.00, a -3.57, b 5.41	L 28.72, a -4.40, b 4.44	L 27.60, a -3.20, b 3.52	L 26.80, a -3.43, b 7.92	L 28.16, a -3.68, b 4.54	L 28.15, a -4.56, b 5.14
12	L 28.45, a -4.11, b 4.55	L 28.37, a -4.11, b 5.83	L 27.57, a -3.46, b 5.31	L 27.85, a -4.00, b 4.24	L 27.70, a -3.28, b 4.51	L 27.39, a -3.80, b 7.09	L 27.99, a -3.54, b 4.93	L 28.42, a -4.47, b 4.91

* L; lightness, a; redness, b; yellowness

바. 환원당

술덧 발효 중의 환원당 함량을 측정한 결과는 표 26과 같다. 환원당은 2단 담금 첫째 날이 전 발효기간 중 가장 높았으며 2일째 급격히 감소하는 경향을 보였다. 발효기간 중

2단 담금 초기에 환원당의 함량이 높았던 것은 입국 미생물에서 생성한 amylase에 의해 효모가 알코올 발효보다는 증식을 하는 단계였기 때문에 알코올 생성이 상대적으로 낮고, 효모의 균체증식이 활발하였던 것으로 생각되며 담금 2일부터는 알코올 생성량이 급격히 많아지면서 상대적으로 환원당이 효모에 의해 이용되어 환원당의 함량이 낮아진 것으로 생각된다. 이상의 결과는 탁주 제조중 당류의 소장에 관한 연구에서 총당과 환원당은 담금 3일 후부터 급격히 감소하는 반면 알코올 생성량은 현저하게 증가한다는 보고와 일치하였다(13).

반면, 발효 다시마 분말(FST) 첨가 *Aspergillus kawachii*균주 처리군은 2단 담금 초기 환원당 함량이 5.033%에서 발효 2일째 급속히 감소하고, 발효가 진행하면서 5.836%으로 증가하여 다른 균주와 차이를 보였다.

표 26. Changes of reducing sugar contents in rice wine supplemented with FST(fermented sea tangle) during fermentation

(Unit; %)

Fermentation period (Days)	<i>Aspergillus kawachii</i>		<i>Aspergillus oryzae</i>		<i>Monascus purpureus</i>		<i>Rhizopus oryzae</i>	
	FST contents (% , w/w)							
	0	0.5	0	0.5	0	0.5	0	0.5
0	5.655	5.033	5.655	4.024	1.334	1.414	4.640	1.740
2	2.262	0.348	1.291	0.595	0.123	0.145	0.319	0.087
4	2.378	0.435	0.305	0.682	0.102	0.160	0.218	0.145
6	2.625	1.755	0.551	1.095	0.107	0.181	0.102	0.486
8	2.625	2.871	0.993	0.841	0.090	0.160	0.160	0.424
10	2.494	5.039	1.668	1.624	0.116	0.156	0.174	0.508
12	2.509	5.836	1.871	2.712	0.174	0.283	0.203	0.627

사. Mineral 함량

발효 다시마 분말(FST) 0.5% 첨가 실험군의 미네랄 함량은 K, Mg, Ca, Zn, Fe 순으로 높게 나타났다(표 27). 특히 K(칼륨), Mg(마그네슘), Ca(칼슘)의 함량은 *Rhizopus oryzae* 균에서 382.67±0.88, 42.00±1.00, 3.99±0.06 (ppm)로 가장 높게 나왔고, Zn(아연)은 *Aspergillus kawachii* 균에서 3.52±0.03(ppm)으로 가장 높게 나타났다. 그리고 모든 균에서 Fe(철)은 미량 검출되었다. 균주별로 미네랄 함량의 분포도는 유사한 경향을 보였다.

표 27. Contents of minerals in rice wine supplemented with FST(fermented sea tangle)

(unit; ppm)

Minerals	<i>Aspergillus kawachii</i>		<i>Aspergillus oryzae</i>		<i>Monascus purpureus</i>		<i>Rhizopus oryzae</i>	
	FST contents (% , w/w)							
	0	0.5	0	0.5	0	0.5	0	0.5
K	- *	322.67 ±1.86	-	353.00 ±0.05	-	239.67 ±1.45	-	382.67 ±0.88
Mg	-	33.67 ±0.33	-	34.33 ±0.33	-	31.00 ±0.58	-	42.00 ±1.00
Ca	-	3.77 ±0.06	-	3.93 ±0.05	-	3.09 ±0.07	-	3.99 ±0.06
Zn	-	3.52 ±0.03	-	2.89 ±0.02	-	1.63 ±0.02	-	3.26 ±0.02
Fe	-	0.17 ±0.00	-	0.09 ±0.01	-	0.20 ±0.00	-	0.12 ±0.00

* - ; no data

아. 유기산

발효 술덧의 유기산 분석은 표 28과 같이 oxalic acid, D-tartaric acid, formic acid, D-malic acid, L-lactic acid, maleic acid, succinic acid, citric acid가 검출 되었다. *Aspergillus kawachii* 균에서는 succinic acid 함량이 가장 높았으며, 특히 발효 다시마 분말(FST)을 첨가하지 않은 대조군에서 가장 높게 검출되었다. 그리고 약주의 중요한 유

기산으로 알려진 L-lactic acid, succinic acid의 함량도 *Aspergillus kawachii* 균에서 가장 높은 함량을 보였다.

*Aspergillus kawachii*균 분석결과를 고찰 해 보면 발효 다시마 분말(FST) 첨가하지 않은 실험군이 첨가한 실험군 보다 높은 유기산 함량을 보였다. 반면 *Aspergillus oryzae*, *Monascus purpureus*, *Rhizopus oryzae* 실험군은 발효 다시마 분말(FST)을 첨가한 실험군에서 유기산 함량이 높은 경향을 보였다.

표 28. Contents of organic acids in rice wine supplemented with FST(fermented sea tangle)

(unit; ng/ μ l)

organic acids	<i>Aspergillus kawachii</i>		<i>Aspergillus oryzae</i>		<i>Monascus purpureus</i>		<i>Rhizopus oryzae</i>	
	FST contents (% , w/w)							
	0	0.5	0	0.5	0	0.5	0	0.5
Oxalic acid	130.7	152.4	274.0	204.5	20.6	43.3	64.1	86.2
D-Tartaric acid	2044.7	2106.7	1246.0	1161.3	568.0	580.7	640.0	634.7
Formic acid	1421.3	1307.3	1983.3	1820.7	862.0	986.0	720.7	1371.3
D-Malic acid	2392.0	1964.0	2128.0	1780.0	833.3	940.0	593.3	693.3
L-Lactic acid	1142.7	1416.0	602.7	664.7	724.7	1053.3	606.0	306.0
Maleic acid	21.6	20.6	14.4	12.9	0.0	0.0	13.2	14.2
Succinic acid	4569.3	3906.0	639.3	639.3	616.0	770.7	0.0	0.0
Citric acid	0.0	303.3	208.0	270.7	270.7	311.3	0.0	0.0

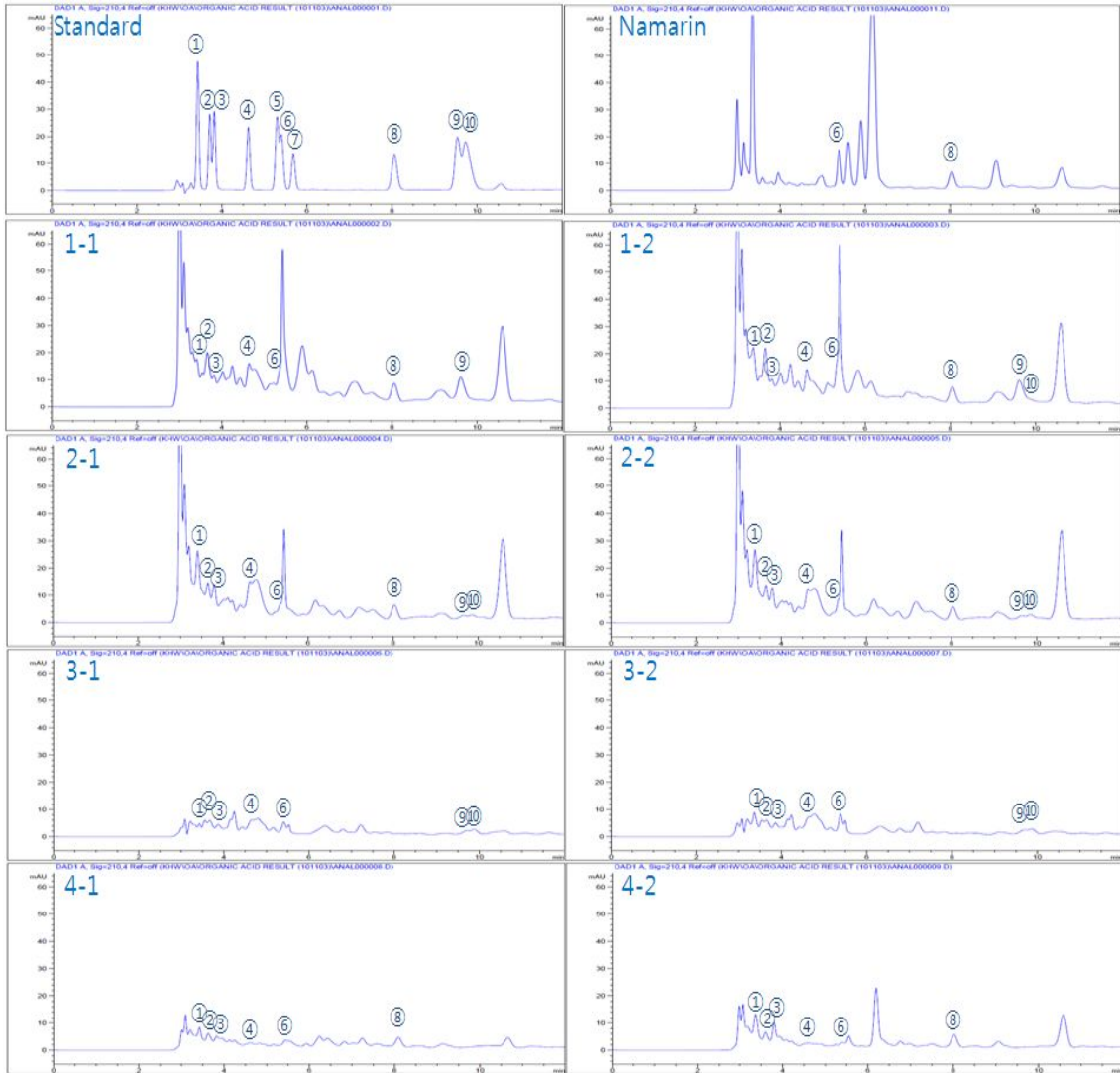


그림 36. HPLC chromatogram of organic acids in rice wine.

1-1; *A.Kawachii*, 1-2; *A.Kawachii* +FST, 2-1; *A.Oryzae*, 2-2; *A.Oryzae* +FST,
 3-1; *M.Purpureus*, 3-2; *M.Purpureus* +FST, 4-1; *R.Oryzae*, 4-2; *R.Oryzae* +FST

① Oxalic acid ② D-Tartaric acid ③ Formic acid ④ D-Malic acid ⑤ Malonic acid ⑥
 L-Lactic acid ⑦ Acetic acid ⑧ Maleic acid ⑨ Succinic acid ⑩ Citric acid

자. 유리아미노산

발효 다시마 분말 첨가 약주의 유리 아미노산 함량을 코지균 별로 비교 분석한 결과 Table 16과 같다. 유리 아미노산 총 함량은 발효 다시마 분말을 첨가한 약주가 무첨가 약주보다 사용한 모든 균주에서 높았다. *Aspergillus kawachii* 실험군에서는 발효 다시마 무첨가 약주에서 proline, arginine, alanine 순으로 높았으나, 첨가 약주에서는 proline, alanine, arginine 순으로 높았다. *Aspergillus oryzae* 균주를 사용한 실험군에서는 발효 다시마 분말 첨가 또는 무첨가 약주 모두 alanine, glutamic acid, proline 순으로 유리 아미노산을 함유하고 있었다. *Monascus purpureus* 균주의 경우는 발효 다시마 분말 첨가 또는 무첨가 약주 모두 alanine, ammonia, arginine 순서였고, *Rhizopus oryzae* 균주의 경우는 ammonia, arginine, alanine 순서로 나타났다. 특히 GABA-고함유 발효 다시마 분말을 첨가한 약주에서 모두 GABA 함량이 높은 것으로 나타나 발효 다시마 분말 첨가에 의해 함량이 증가된 것으로 여겨진다. Threonine과 serine은 단맛을 내는 아미노산으로 알려져 있는데, 본 실험에서는 *Aspergillus oryzae* 균주에서만 발효 다시마 분말 첨가 또는 무첨가 약주 모두 함유되어 있었으며, 그 함량은 첨가 약주에서 4.07배 높았다. 또한 *Aspergillus kawachii* 균주에서는 발효 다시마 분말 첨가 약주에서만 함유되어 있었고, 나머지 두 균주에서는 전혀 검출되지 않았다.

한편 아미노산 중에서 단맛을 내는 proline의 경우 *Rhizopus oryzae* 균주를 제외한 3균주 모두 발효 다시마 분말을 첨가한 약주에서 많이 함유된 것으로 나타나 균주별 유리 아미노산 조성에 영향을 미치는 것으로 생각된다. 인삼박을 첨가한 약주에서도 주요 유리 아미노산이 glutamic acid, proline, alanine, arginine으로 본 실험결과와 일치하였으며(14), Lee 등(15)도 glutamic acid, proline, alanine 등이 약주의 주된 유리 아미노산 성분이며 누룩이나 조효소제 등의 발효제와 증자미의 사용 여부에 따라 그 함량이 달라진다고 하였다.

㉟ 29. Free amino acids in rice wine

(unit; nmol)

Free amino acids	Sample Retention time	<i>Aspergillus kawachii</i>		<i>Aspergillus oryzae</i>	
		FST contents (% w/w)			
		0	0.5	0	0.5
Phosphoserine	4.333				
Taurine	6.933				0.21
Urea	10.599		0.45	3.05	3.27
Aspartic acid	20.965				
Threonine	26.898		10.45	3.87	15.76
Serine	28.865	14.25	16.59	24.64	25.17
Glutamic acid	34.564	29.94	32.70	34.87	35.61
AAAA(α -Aminoadipic acid)	42.497	0.92	1.06		
Proline	44.364	48.16	52.72	40.93	42.95
Glycine	46.130	16.66	20.95	34.82	34.93
Alanine	47.630	40.01	50.20	62.30	62.67
Citrulline	49.230				
AABA (α -Aminobutyric acid)	50.997	1.20	1.29	1.86	1.71
Valine	53.863	17.62	19.23	26.89	25.22
Cystien	58.163	1.56	1.97	3.32	2.84
Methionine	60.696	5.76	6.06	6.81	7.00
Cystachionine	63.263	0.82	0.62		
Isoleucine	65.429	8.97	9.68	15.75	15.34
Leucine	67.196	24.56	25.87	27.88	29.36
Tyrosine	70.329	12.42	12.80	17.68	15.97
β -Alanine	72.129				
Phenylalanine	73.562	13.72	15.51	16.75	17.03
α -Aminoisobutylic acid	75.295	0.20	0.26		
Homocysteine	77.528	0.68	0.79	0.60	0.52
GABA(γ-Aminobutyric acid)	80.128	5.01	11.73	13.18	10.40
Ethanolamine	83.795	2.13	6.92	8.92	10.82
Ammonia	87.128	25.89	28.78	30.17	31.87
Ornithine	94.494	4.31	6.44	3.31	3.03
Lysine	97.460	33.98	37.74	30.67	33.42
1-Methyl-histidine	99.260	0.27	0.45	0.23	0.26
Histidine	100.694	11.33	11.93	11.30	11.24
3-Methyl-histidine	104.027	0.31	0.43	1.74	1.53
Arginine	114.459	41.09	41.46	4.08	1.91
Total		388.07	451.63	446.28	452.45

표 30. Free amino acids

(unit; nmol)

Free amino acids	Sample Retention time	<i>Monascus purpureus</i>		<i>Rhizopus oryzae</i>	
		FST contents (% w/w)			
		0	0.5	0	0.5
Phosphoserine	4.333				
Taurine	6.933	0.02	0.03		
Urea	10.599	3.92	5.04		
Aspartic acid	20.965				
Threonine	26.898				
Serine	28.865				
Asn	32.731	2.04	2.68	7.14	7.55
Glutamic acid	34.564	2.87	4.07	6.82	7.97
AAAA(α-Aminoadipic acid)	42.497			0.95	0.81
Proline	44.364	6.17	22.58		
Glycine	46.130	5.50	8.06	6.08	7.03
Alanine	47.630	11.69	16.67	12.30	15.84
Citrulline	49.230	3.71	4.12	2.88	2.34
AABA (α-Aminobutyric acid)	50.997				
Valine	53.863	1.11	1.76	4.27	4.57
Cystien	58.163	0.13	0.20	0.66	0.58
Methionine	60.696	0.25	0.59	2.41	2.64
Cystachionine	63.263	0.55	0.54	0.63	0.55
Isoleucine	65.429	0.51	0.58	1.48	1.67
Leucine	67.196	0.80	1.27	9.43	9.78
Tyrosine	70.329	0.78	1.01	6.90	7.55
β-Alanine	72.129	1.98	1.47		
Phenylalanine	73.562	0.95	1.39	7.70	7.91
α-Aminoisobutylic acid	75.295	0.22	0.20		
Homocysteine	77.528	0.38	0.48	0.72	0.73
GABA(γ-Aminobutyric acid)	80.128	2.05	7.81	5.47	11.42
Ethanolamine	83.795	2.96	3.50	2.24	2.45
Ammonia	87.128	9.02	10.93	23.77	32.80
Ornithine	94.494	0.76	0.78	0.45	0.53
Lysine	97.460	5.73	6.78	11.43	13.58
1-Methyl-histidine	99.260				
Histidine	100.694	1.63	0.80	3.36	3.83
3-Methyl-histidine	104.027	0.20		0.45	0.34
Arginine	114.459	8.65	8.84	21.17	24.04
Total		76.91	114.44	153.40	186.05

차. 유리당

발효 다시마 분말(FST) 첨가량을 달리하여 제조한 약주의 유리당 함량을 측정한 결과는 표 31과 같다. 전체적인 주요 유리당 함량은 glucose > D-(+)-maltose > sucrose > fructose 순이었다. Glucose 함량이 가장 높은 약주는 발효 다시마 분말(FST)를 첨가하지 않은 *Aspergillus kawachii* 균이였으며, 발효 다시마 분말(FST) 첨가군에 비해 2배 정도 높은 함량을 보였다. 즉, 발효 다시마 분말(FST)의 첨가로 약주 발효 중 유리당을 많이 이용한 것으로 사료된다.

그리고 *Monascus purpureus* 균에서는 fructose가 검출되지 않았고, *Rhizopus oryzae* 균에서는 D-(+)-maltose가 검출되지 않았다.

표 31. Contents of free sugar in rice wine supplemented with FST(fermented sea tangle)

(unit; %)

Free sugar	<i>Aspergillus kawachii</i>		<i>Aspergillus oryzae</i>		<i>Monascus purpureus</i>		<i>Rhizopus oryzae</i>	
	FST contents (% , w/w)							
	0	0.5	0	0.5	0	0.5	0	0.5
Fructose	0.0370	0.0402	0.0500	0.0446	-	-	0.0353	0.0358
Glucose	5.0762	2.7605	0.3010	0.3011	0.1713	0.3015	0.3824	0.6491
Sucrose	0.0467	0.0415	0.0651	0.0617	0.0000	0.0000	0.0358	0.0362
D-(+)-Maltose	0.0825	0.0930	0.0991	0.1000	0.0421	0.0486	-	-

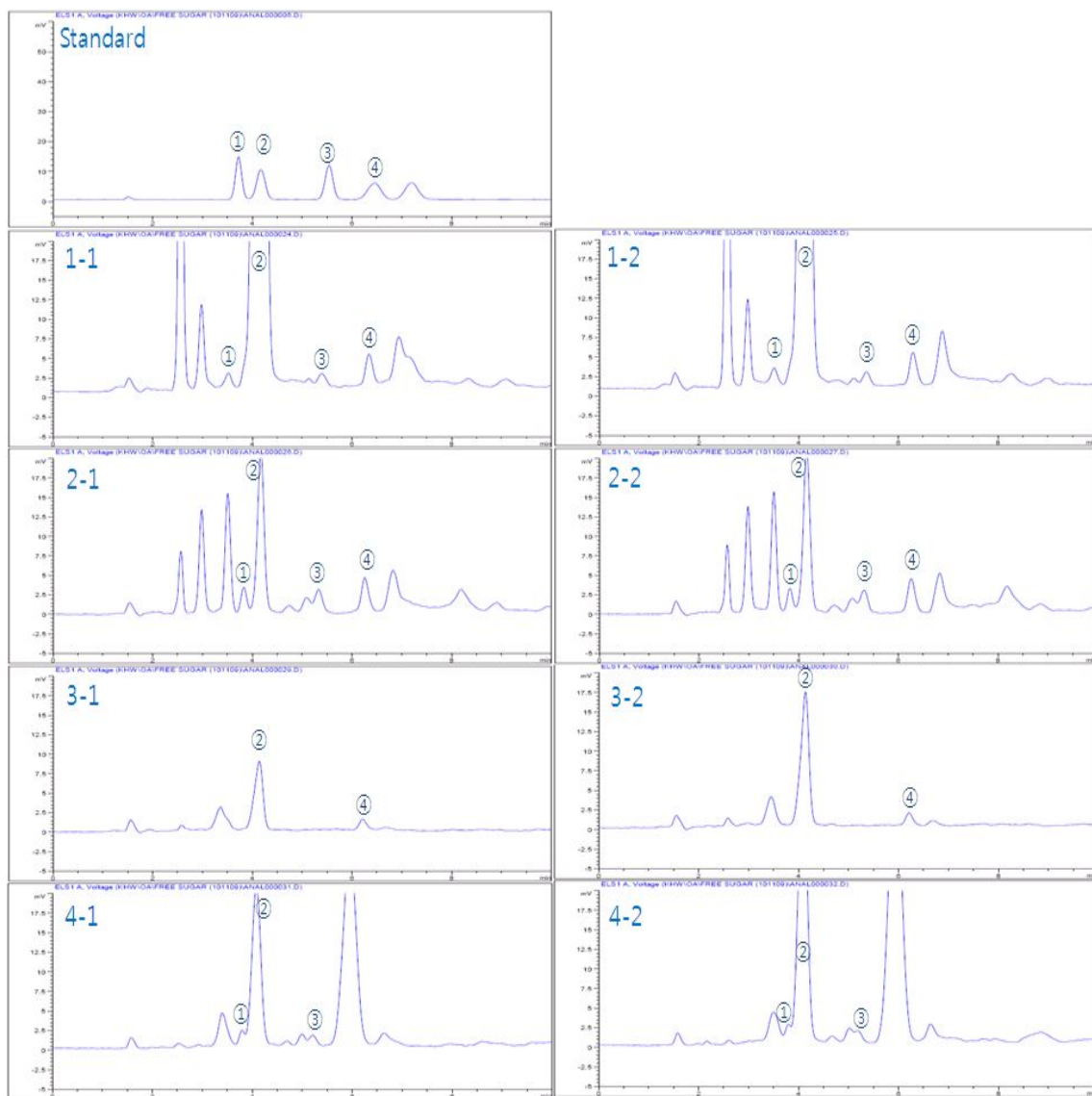


그림 37. HPLC chromatogram of free sugars in rice wine.

1-1; *A.Kawachii*, 1-2; *A.Kawachii* +FST, 2-1; *A.Oryzae*, 2-2; *A.Oryzae* +FST,
 3-1; *M.Purpureus*, 3-2; *M.Purpureus* +FST, 4-1; *R.Oryzae*, 4-2; *R.Oryzae* +FST
 ① Fructose ② Glucose ③ Sucrose ④ D-(+)-Maltose

카. 주요 향기성분

Aspergillus kawachii 입국으로 제조한 약주의 경우 숙취의 원인물질로 잘 알려진 acetaldehyde의 농도가 발효 다시마 분말 첨가로 196 ppm에서 134 ppm으로 감소하였다. Iso-amyl alcohol과 iso-butyl alcohol은 발효주, 증류주, 탁주 등의 주류에 알코올(ethyl alcohol) 다음으로 많이 함유된 주요 향기성분으로 약주의 향과 맛에 큰 영향을 주는 것으로 알려져 있다. 또한 Iso-amyl alcohol은 효모에 의해서 leucine으로부터 생성되며 자극적인 냄새가 난다는 보고도 있었다(16).

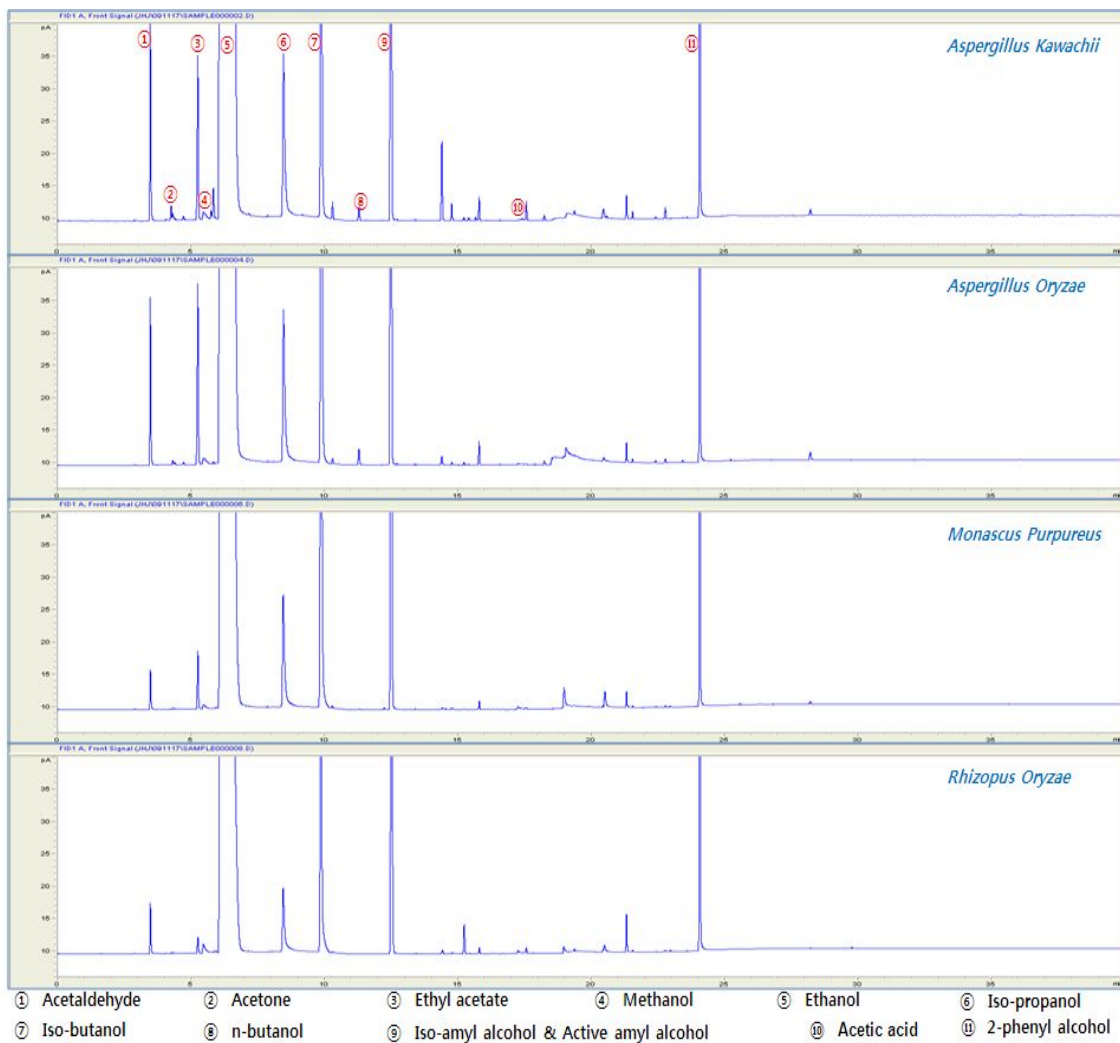


그림 38. GC chromatogram of volatile compounds in rice wine using various strains without FST(fermented sea tangle).

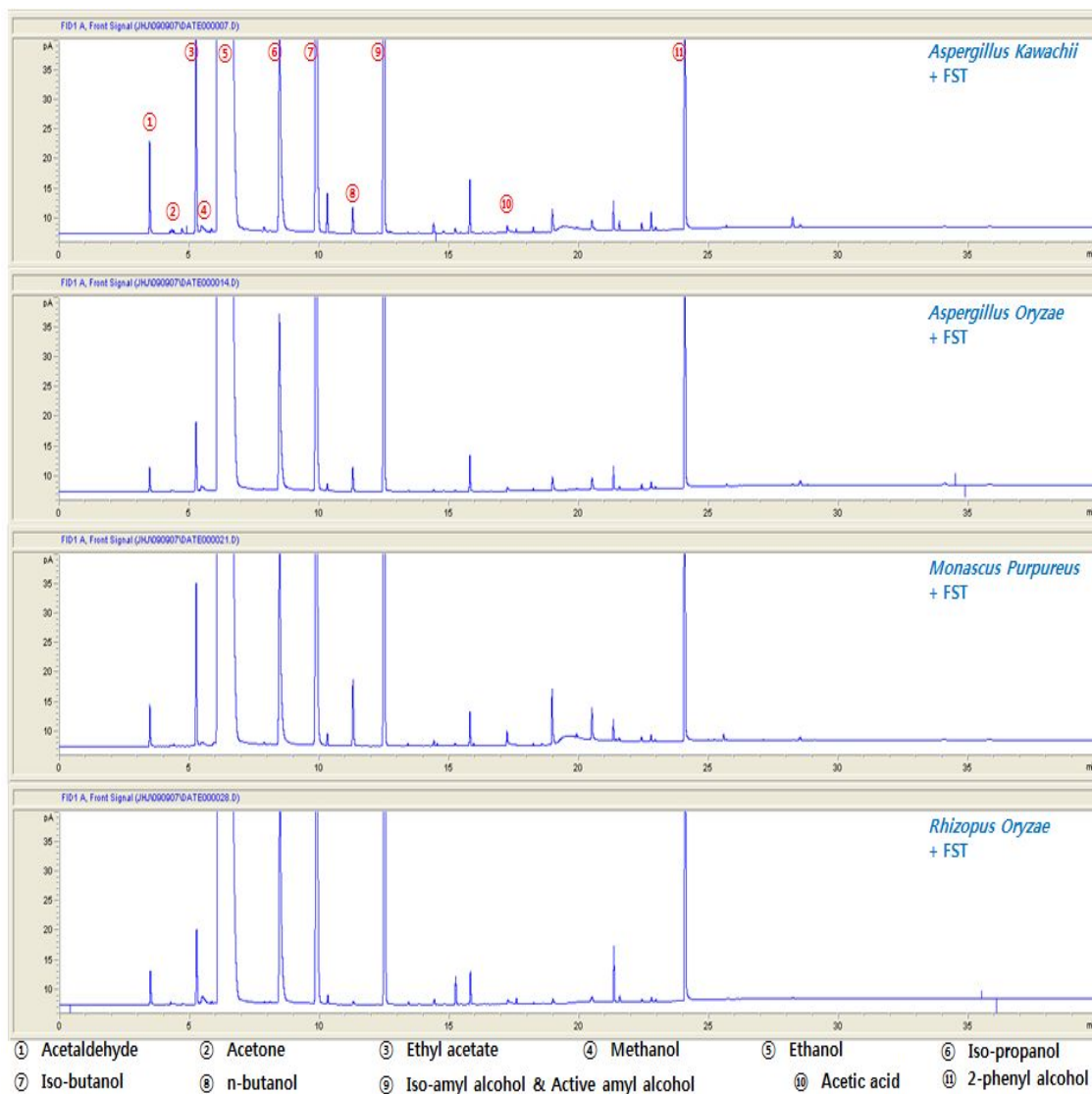


Fig. 39. GC chromatogram of volatile compounds in rice wine using various strains supplemented with FST (the product of marine algae fermented by *Lactobacillus brevis* BJ20 (KCTC 11377BP)).

파. 저장성 실험

(1) 알코올 농도

100일 저장성 실험 종료 후 측정된 각 실험시료의 알코올 농도는 큰 차이를 보이지 않았다. 발효 다시마 분말(FST)을 첨가한 *Aspergillus kawachii* 균에서 높은 알코올 농도를 보였으며 100일 저장 후에도 알코올 농도의 차이는 없는 것으로 나타났다(Table 9).

(2) pH

발효 다시마 분말 무첨가군에서 pH는 저장기간이 길어질수록 조금씩 상승하는 경향을 보였다. 발효 다시마 분말 첨가군에서는 저장 40일째 증가하는 경향을 보였지만, 60일 이후에는 큰 변화가 없었다(표 32).

표 32. Changes of pH in rice wine supplemented with FST(fermented sea tangle) during storage

Storage Period (day)	<i>Aspergillus kawachii</i>		<i>Aspergillus oryzae</i>		<i>Monascus purpureus</i>		<i>Rhizopus oryzae</i>	
	FST contents (% , w/w)							
	0	0.5	0	0.5	0	0.5	0	0.5
20	4.41	4.45	4.97	4.92	4.47	4.43	3.54	3.63
40	4.77	4.87	5.36	5.36	4.60	4.79	3.80	3.94
60	4.54	4.67	5.11	5.16	4.57	4.60	3.72	3.82
80	4.60	4.66	5.14	5.16	4.60	4.48	3.72	3.84
100	4.60	4.65	5.18	5.15	4.60	4.56	3.74	3.86

(3) 총산

약주 저장기간 중 총산은 발효 다시마 분말(FST) 무첨가 약주는 저장 40일까지 감소한 후 100일까지 다시 상승하였다. 발효 다시마 분말(FST) 첨가 약주는 40일까지 감소한 후 100일 까지 유지 되었으며, 그 변화는 크지 않았다(표 33).

표 33. Changes of total acidity in rice wine supplemented with FST(fermented sea tangle) during storage

(Unit; %)

Storage Period (day)	<i>Aspergillus kawachii</i>		<i>Aspergillus oryzae</i>		<i>Monascus purpureus</i>		<i>Rhizopus oryzae</i>	
	FST contents (%/, w/w)							
	0	0.5	0	0.5	0	0.5	0	0.5
20	0.403	0.390	0.230	0.256	0.173	0.186	0.749	0.730
40	0.358	0.358	0.192	0.224	0.166	0.179	0.704	0.710
60	0.371	0.352	0.192	0.218	0.163	0.173	0.698	0.698
80	0.384	0.352	0.192	0.221	0.166	0.179	0.704	0.704
100	0.384	0.355	0.205	0.224	0.173	0.179	0.749	0.704

(4) 총당

Aspergillus kawachii 균주를 이용한 발효 다시마 분말 무첨가군의 총당은 저장 40일까지 감소 후 일정하게 유지 되었고, 나머지 균주를 사용한 약주의 총당은 저장기간 중 조금씩 증가하는 경향을 보였다. 그리고 *Monascus purpureus* 균주를 이용한 발효 다시마 분말 첨가군의 총당은 조금씩 증가하였다. 반면, 나머지 발효 다시마 분말 처리군은 저장 중 큰 변화가 없었다(표 34).

표 34. Changes of total sugars in rice wine supplemented with FST(fermented sea tangle) during storage

(Unit; %)

Storage Period (day)	<i>Aspergillus kawachii</i>		<i>Aspergillus oryzae</i>		<i>Monascus purpureus</i>		<i>Rhizopus oryzae</i>	
	FST contents (%/, w/w)							
	0	0.5	0	0.5	0	0.5	0	0.5
20	3.698	2.610	2.393	2.465	0.192	0.268	0.073	0.145
40	3.045	2.501	2.574	2.465	0.239	0.286	0.105	0.152
60	3.118	2.429	2.646	2.574	0.261	0.341	0.112	0.152
80	3.081	2.465	2.646	2.574	0.261	0.341	0.109	0.152
100	3.081	2.538	2.683	2.465	0.261	0.337	0.091	0.149

(5) 환원당

Aspergillus kawachii 균주를 이용한 발효 다시마 분말 무첨가군의 환원당은 저장 40일까지 증가 후 저장 100일까지 유사한 값을 보였고, 나머지 균주를 사용한 약주의 환원당은 저장기간 중 조금씩 증가 후 다시 감소하는 경향을 보였다. 그리고 *Monascus purpureus* 균주를 이용한 발효 다시마 분말 첨가군의 환원당은 일정하게 증가하였다. 반면, 나머지 발효 다시마 분말 처리군은 저장 중 큰 변화가 없었다(표 35).

표 35. Changes of reducing sugar in rice wine supplemented with FST(fermented sea tangle) during storage

(Unit; %)

Storage Period (day)	<i>Aspergillus kawachii</i>		<i>Aspergillus oryzae</i>		<i>Monascus purpureus</i>		<i>Rhizopus oryzae</i>	
	FST contents (%/ , w/w)							
	0	0.5	0	0.5	0	0.5	0	0.5
20	2.755	2.233	2.349	2.465	0.183	0.261	0.099	0.142
40	3.498	2.103	2.284	1.994	0.221	0.254	0.163	0.105
60	3.154	2.066	2.610	2.538	0.243	0.272	0.091	0.141
80	3.190	2.066	2.574	2.538	0.239	0.286	0.083	0.141
100	3.480	1.994	2.465	2.429	0.232	0.312	0.073	0.138

(6) 색도

모든 실험군에서 밝기, 명도를 나타내는 L(lightness)는 유의적인 차이가 없었다. 적색도와 녹색도를 나타내는 a(redness)는 대부분 저장 초반에 비슷하다가 저장기간이 길어질수록 발효 다시마 분말(FST) 첨가군이 더 낮아지는 경향을 보였다. 그리고 황색도와 청색도를 나타내는 b(yellowness)는 발효 다시마 분말(FST) 첨가군이 무첨가군에 비해 값이 컸고, 저장시간이 길어질수록 상승하는 경향을 보였다(표 36).

㉟ 36. Changes of color in rice wine supplemented with FST(fermented sea tangle) during storage

Storage Period (day)	<i>Aspergillus kawachii</i>						<i>Aspergillus oryzae</i>						<i>Monascus purpureus</i>						<i>Rhizopus oryzae</i>					
	FST contents (%/, w/w)																							
	0			0.5			0			0.5			0			0.5			0			0.5		
	L	a	b	L	a	b	L	a	b	L	a	b	L	a	b	L	a	b	L	a	b	L	a	b
20	35.03	-3.63	5.29	34.69	-3.63	6.92	35.94	-4.42	6.63	34.72	-3.71	8.60	34.08	-2.84	5.58	33.84	-3.33	7.42	34.17	-3.04	3.15	33.65	-2.95	5.44
40	34.15	-2.97	4.84	34.61	-3.62	7.16	36.02	-4.76	6.98	34.81	-4.39	8.40	36.07	-4.32	6.00	33.54	-3.42	7.16	35.39	-4.33	4.12	34.36	-3.64	5.52
60	34.35	-3.45	4.96	35.13	-4.61	7.49	35.83	-4.44	6.59	35.11	-4.43	8.66	34.23	-3.44	5.29	34.71	-3.78	7.41	34.70	-3.45	3.74	35.27	-3.97	5.80
80	34.43	-3.43	5.04	35.03	-4.33	7.45	35.39	-4.21	6.81	35.06	-4.38	8.78	34.14	-3.34	5.66	34.44	-3.78	7.28	34.45	-3.31	3.89	35.04	-3.89	5.85
100	34.60	-3.41	5.11	34.99	-4.06	7.44	35.11	-3.97	6.87	34.99	-4.32	8.98	33.92	-3.22	5.51	34.18	-3.79	7.29	34.13	-3.25	4.01	34.86	-3.84	6.06

3. 발효 다시마 분말(FST) 첨가에 따른 약주제조 공정개발

발효 다시마 분말(FST)을 이용한 약주의 산업화를 위한 제조 공정을 확립하여 그림 40에 나타내었다. 특히 알코올 농도의 증가를 기대하기 위해서는 발효 다시마 분말(FST)을 1단 및 2단 담금으로 반드시 나누어서 첨가하는 제조공정이 필요한 것으로 나타났다. 그리고 대용량으로 주모, 1단 담금, 2단 담금 발효 중 주기적으로 교반기를 이용하는 방법이 채택되어야 한다. 대용량으로 약주 제조시 담금 비율은 표 37과 같다.

본 과제에서 발효 다시마 분말(FST)을 이용한 약주의 개발 및 약주의 기능성을 확인하였다. 본 연구 진행과정 및 결과는 미역, 김 등과 같이 다시마와 비슷한 해조류에 그대로 적용 가능하리라 사료된다.

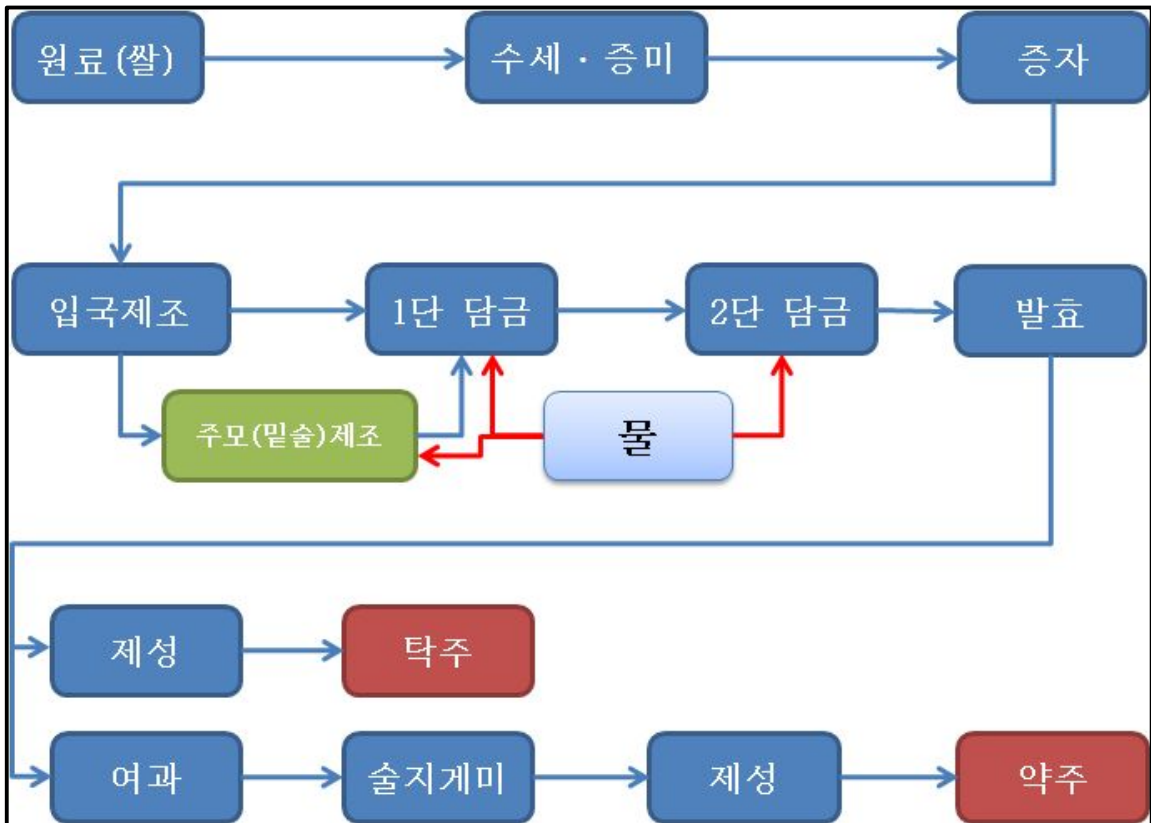


그림 40. Flow chart in brewing of rice wine supplemented with FST(fermented sea tangle).

표 37. Addition ratio of FST(fermented sea tangle) and rice in making rice wine

Materials	Yeast starter	Addition		Total(g)
		1st	2nd	
Rice koji(g)	600.00	7,500.00		8,100.00
Steamed rice(g)			22,500.00	22,500.00
Fermented sea tangle(g)			263.00	263.00
Water(ml)	900.00	11,250.00	40,500.00	52,650.00
<i>S. cerevisiae</i> (g)	30.00			
Total(g)	1,530.00	18,750.00	63,263.00	83,513.00

발효 다시마 분말(FST) 첨가한 약주를 1 L 제조, 100 L 제조시 일반성분분석을 표 38에서 비교하였다. 대용량(100 L)으로 제조시 1 L로 제조한 약주의 알코올 생성 시기보다 약간 늦었지만, 최종 알코올 생성량은 유사하였다. 그리고 다른 일반 성분 분석결과도 유사한 결과를 보여 대량생산에도 문제가 없는 것으로 판단된다.

표 38. Physico-chemical properties of rice wine supplemented with FST(fermented sea tangle)

Ingredients		<i>Aspergillus kawachii</i>	
		FST contents (0.5 %, w/w)	
		1 L	100 L
Alcohol (%)		16.83	16.79
pH		4.40	4.35
Total acidity (%)		0.397	0.389
Color	L	28.37	28.45
	a	-4.11	-4.26
	b	5.83	5.71

4. 해조 발효분말(SLH-1) 첨가 약주의 생리활성

가. 환원력

시판 항산화 물질인 BHT 및 ascorbic acid의 환원력은 첨가 농도 의존적으로 증가되는 것으로 나타났다(그림 41). 약주 담금시 첨가되는 발효 다시마 분말의 경우 0.1% 및 0.05% 농도에서 환원력은 거의 없는 것으로 나타났다. 약주의 환원력은 발효 다시마 분말 첨가에 의해 오히려 감소하는 경향을 보이고 있어 DPPH 라디칼 소거활성과는 다른 양상을 나타내었다. *Rhizopus oryzae* 입국을 사용한 약주에서 환원력이 가장 높았으며, 그 다음으로 *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus kawachii*, *Monascus purpureus* 순으로 나타났다. 흑마늘 발효주의 환원력은 흑마늘 첨가 농도가 증가함에 따라 그 활성이 증가하는 것으로 나타났으나, 동일 농도의 흑마늘 추출물보다 약간 낮은 활성을 보였으며, 무첨가 발효주 보다는 첨가 발효주에서 활성이 높게 나타나 발효주의 환원력 활성은 첨가되는 흑마늘에 의한 영향을 받는 것으로 판단되어진다(3).

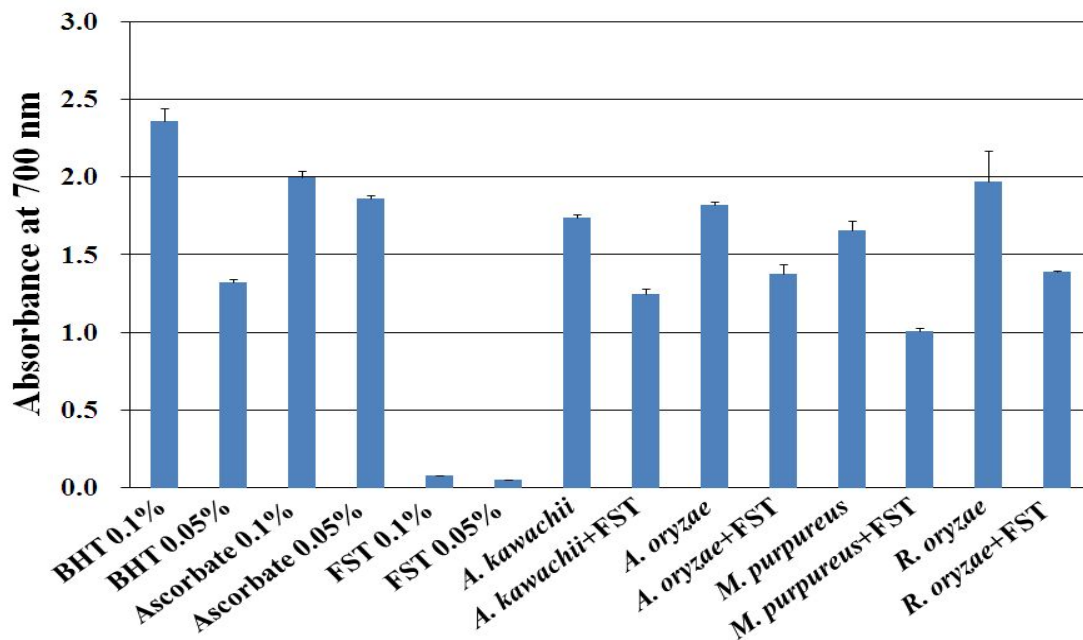


그림 41. Fe reduction rates of rice wine supplemented with or without FST(fermented sea tangle).

나. DPPH법에 의한 항산화 활성

시판 항산화 물질인 BHT 및 발효 다시마 분말의 DPPH 라디칼 소거활성은 첨가 농도 의존적으로 증가되는 것으로 나타났다(그림 42). 또한 발효 다시마 분말을 0.5% 첨가하여 제조한 약주의 경우 무첨가 대조구의 약주보다 항산화 활성이 모두 증가하는 것으로 나타나 발효 다시마 분말 첨가에 의한 영향이 있는 것으로 보여진다.

발효 다시마 분말 무첨가 약주의 항산화 활성은 *Aspergillus kawachii*, *Aspergillus oryzae*, *Monascus purpureus*, *Rhizopus oryzae* 순으로 높은 활성을 보였다. 그러나 발효 다시마 분말 첨가 약주의 경우 *Aspergillus oryzae*, *Rhizopus oryzae*, *Aspergillus kawachii*, *Monascus purpureus* 순으로 나타나 발효 다시마 첨가에 의해 항산화 활성이 다른 양상을 나타내는 것으로 밝혀졌다. 발효시킨 흑마늘을 첨가한 발효주의 DPPH 라디칼 소거 활성은 60.02~69.55%로 흑마늘 첨가 농도가 증가함에 따라 그 활성이 증가하였으며, 무첨가 발효주의 항산화 활성은 50.02%로 나타나 흑마늘 첨가에 의해 항산화 활성이 더욱 증가되는 것으로 보고하였다(3). 따라서 발효 다시마 분말 그 자체 보다는 약주 제조시 첨가에 의해 항산화 활성이 증가함으로써 기능성을 기대할 수 있을 것으로 사료되어진다.

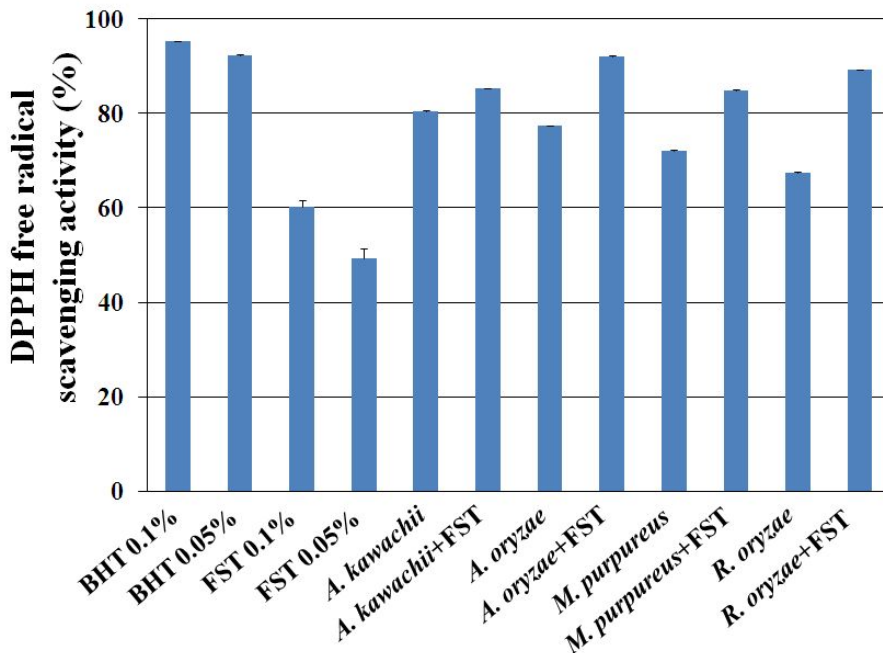


그림 42. DPPH free radical scavenging activity of rice wine supplemented with or without FST(fermented sea tangle).

다. 총 폴리페놀 함량

Aspergillus kawachi 균주를 이용한 약주의 경우 발효 다시마 분말 첨가에 의해 폴리페놀 함량이 약간 감소하는 경향을 보였으나, 나머지 균주에 의해서는 발효 다시마 분말 첨가에 의한 폴리페놀 함량 감소는 일어나지 않았다. 각 균주에 의해 제조된 약주의 폴리페놀 함량은 *Aspergillus kawachii*, *Aspergillus oryzae*, *Monascus purpureus*, *Rhizopus oryzae* 순으로 나타났다(그림 43). 흑마늘을 농도 별로 첨가하여 14일간 발효시킨 발효주의 총 폴리페놀 화합물 농도는 161.51~190.50 mg%로 흑마늘 첨가 농도가 높을수록 증가하는 것으로 나타났으며(3), 시판 전통 약주에서는 11.20~39.40 mg%였고(17), 일본 사케의 총 폴리페놀 함량은 155~204 mg%로 보고되었다(18).

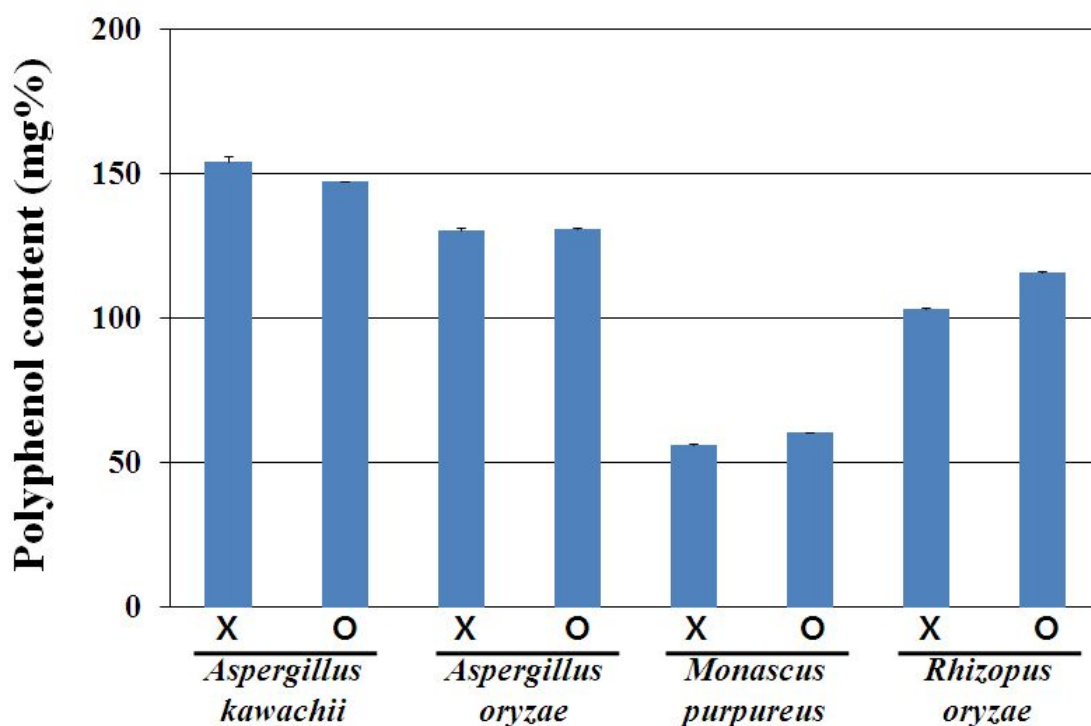


그림 43. Polyphenol content of rice wine supplemented with(O) or without(X) FST (fermented sea tangle).

라. 항혈전용해능

약주의 항혈전 활성은 *Rhizopus oryzae* 균주를 이용하여 발효 다시마 분말을 첨가하여 제조한 약주에서 231.51 mm²으로 가장 높은 활성을 보였으며, 발효 다시마 분말 무첨가 약주에서도 110.10 mm²으로 그 다음으로 높은 활성을 보였다(그림 44 및 그림 45). 또한 *Aspergillus kawachii* 균주 이용 약주에서도 발효 다시마 분말 첨가 또는 무첨가 실험구에서 각각 68.56 및 86.68 mm²으로 상당히 높은 항혈전 활성을 나타내었다. 그러나 *Monascus purpureus* 균주 이용 약주에서는 발효 다시마 분말 첨가 유무에 관계없이 항혈전 활성이 없는 것으로 나타나 균주마다 항혈전 작용에 대한 특성이 다른 것으로 사료되어 진다. 청국장, 된장, 멸치젓갈, natto(nattokinase) 및 절임식품인 shiokara (katauwokinase)와 같은 발효식품 유래의 혈전용해제 개발이 많이 이루어져 왔으며(19, 20), 열풍건조 누에 분말을 곰팡이 균주로 발효시킨 결과 *Aspergillus kawachii*에서 혈전용해 활성이 3.40 Unit/mL로 가장 높게 나왔으며, *Monascus purpureus* 균주 발효에 의해서는 0.34 unit/mL로 약한 혈전용해 활성을 나타내어 균주마다 다른 특성을 나타내었다(21).

우리나라 전통주 23종을 대상으로 항혈전 실험을 실시 한 결과 9종에서만 그 효과가 있는 것으로 나타나 약주 제조시 사용되는 코지균주의 종류나 첨가되는 물질에 따라서 항혈전 활성에 영향을 미치는 것으로 사료되어 진다(22). 따라서 코지균주를 이용한 약주 제조에서 혈전용해 활성을 기대하기 위해서는 *Rhizopus oryzae* 또는 *Aspergillus kawachii* 균주를 이용함으로써 혈관 관계 질환의 위험성을 낮출 수 있는 기능성 약주로 활용될 가능성이 있어 기대되어 진다.

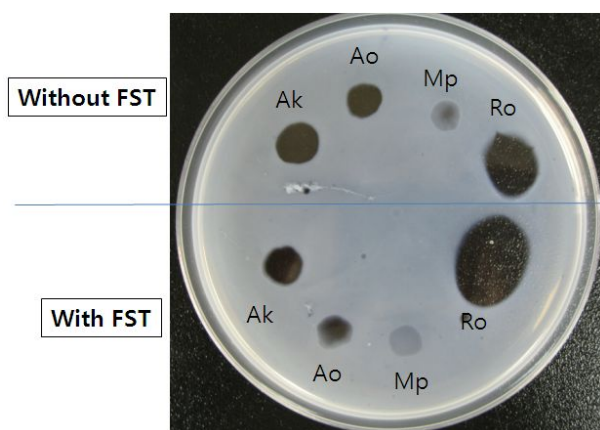


그림 44. Fibrinolytic activities of rice wine supplemented with or without FST (fermented sea tangle).

Ak; *Aspergillus kawachii*, Ao; *Aspergillus oryzae*, Mp; *Monascus purpureus*, Ro; *Rhizopus oryzae*.

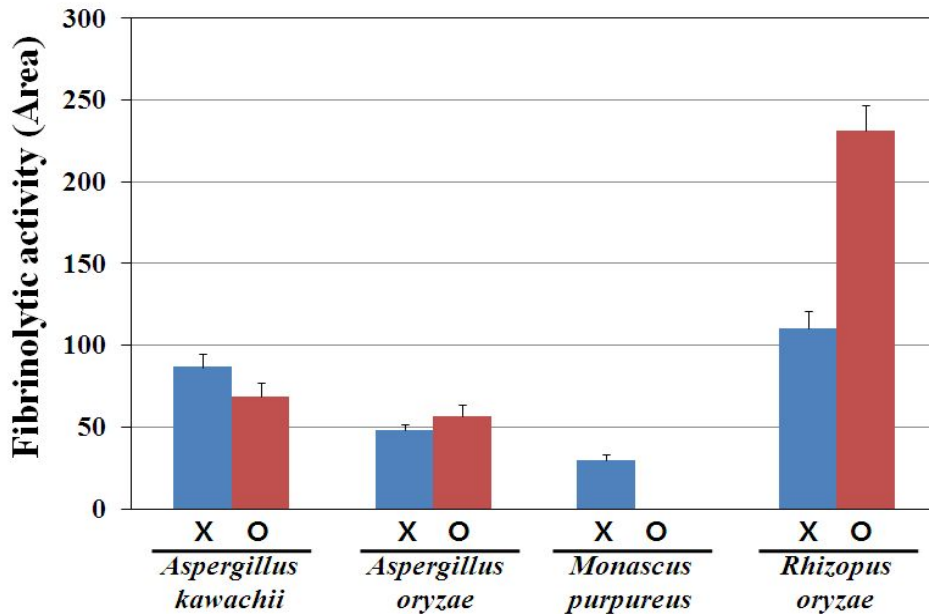


그림 45. Fibrinolytic activities of rice wine supplemented with(O) or without(X) FST (fermented sea tangle).

마. ADH 및 ALDH 효소 활성과 단백질 발현량

효모의 생육에 미치는 발효 다시마 분말의 첨가 농도별 영향을 검토한 결과 무첨가 보다 첨가에 의해 균 생육을 촉진하는 것으로 나타났으며, 0.8% 첨가 농도에서 가장 높은 균 생육도를 보였다(그림 46). 따라서 효모 배양 배지 중에 발효 다시마 분말 1.0% 첨가 농도까지는 균 생육에 아무런 영향을 미치지 않는 것으로 판단되어 이들 농도에서 배양된 효모의 알코올 관련 효소 ADH 및 ALDH 효소 활성과 단백질 발현량에 대하여 검토하였다.

발효 다시마 분말 무첨가 *S. cerevisiae* 균체내의 ADH 활성을 기준으로 상대 활성을 보면, 발효 다시마 분말 0.4% 첨가 농도에서 배양한 효모에서 가장 높았으나 그 이상의 첨가 농도가 증가함에 따라 약간씩 활성이 낮아지는 것으로 나타났다(그림 47). 한편 ALDH 활성은 발효 다시마 분말 0.8% 첨가 농도에서 배양한 효모에서 가장 높았으나 1.0% 첨가 농도에서는 오히려 약간 낮아지는 경향을 보였다. 이러한 결과에서 약주 제조시 사용되는 알코올 발효 균주인 *S. cerevisiae*의 배양에 발효 다시마 분말을 첨가한다면 알코올 발효와 깊이 관련되어 있는 ADH 활성을 촉진하여 높은 알코올 농도를 기대할 수 있을 것으로 생각된다.

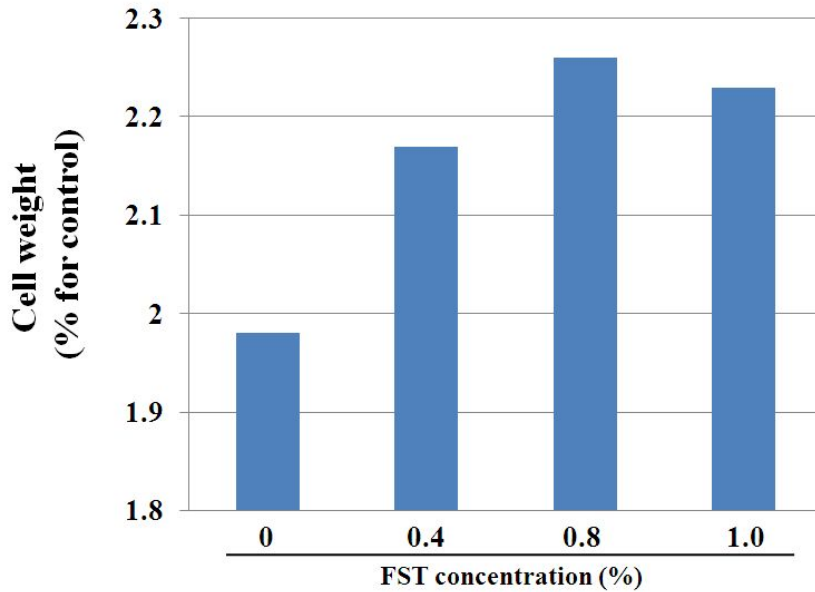


그림 46. Cell weight of FST (fermented sea tangle) concentration.

한편 음주 후 체내로 흡수된 알코올은 대부분 위장과 소장에서 흡수되어 간으로 이동된 후 대사과정을 거쳐 분해되는데, 간에서 대사되는 대부분의 알코올 분해는 ADH에 의해 acetaldehyde로 전환되고 ALDH에 의해 초산으로 전환 된다(8, 23). 이들 ADH 및 ALDH 효소 활성화는 체내 알코올 대사에서 필수적인 역할을 하기 때문에 최근 들어 천연 생리활성 성분에 의한 활성 증가를 통해 인체 내에서 음주로 인한 숙취증상을 해소 시킬 수 있는 숙취해소 음료가 다양하게 개발되어 시판되고 있는 실정이다. 숙취해소 음료의 주요 소재로 사용되고 있는 것을 보면 매실즙(24), 헛개나무 추출물(25), 칩뿌리(26), 오갈피(27) 등이 알려져 있다. 따라서 본 실험에서 발효 다시마 분말을 약주 제조에 첨가한다면 알코올 발효 균주인 효모의 ADH 및 ALDH 효소 활성을 촉진시켜 높은 알코올 농도를 발효할 뿐만 아니라 숙취해소 효과도 기대되어 진다.

ADH 및 ALDH 단백질 발현량도 이들 효소 활성화와 마찬가지로 발효 다시마 분말 무첨가에 비해 첨가한 배양 효모에서 증가한 것으로 나타났다(그림 48). ADH 및 ALDH 단백질 발현량은 발효 다시마 분말 0.4% 및 0.8% 첨가 농도에 각각 가장 높은 것으로 나타나 효소 활성화와 높은 정의 상관관계를 보여주는 것이다. ADH 효소 활성화와 단백질 발현량은 알코올이나 다른 생리활성 성분에 의해 크게 영향을 받는 것으로 알려져 있으나, ALDH 효소의 경우는 이들에 의해 크게 영향을 받지 않고 약간씩 변화되는 것으로 보고되었다(28, 29, 30). 따라서 발효 다시마 분말은 알코올 대사에 관련된 ADH 효소 활성화와 단백질 발현량뿐만 아니라 ALDH 효소 활성화와 단백질 발현량에 대해서는 큰 영향을 미치는 것으로 나타나 이를 첨가한 약주

의 경우 숙취해소와 같은 기능성을 기대할 수 있을 것으로 판단되며, 또한 이를 응용한 숙취해소 음료 개발도 가능할 것으로 사료되어 진다.

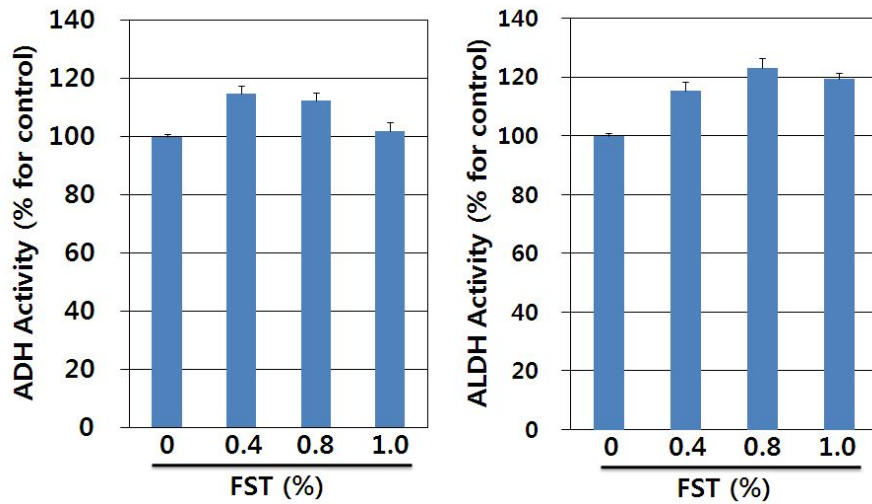


그림 47. ADH and ALDH activities of FST (fermented sea tangle) concentration.

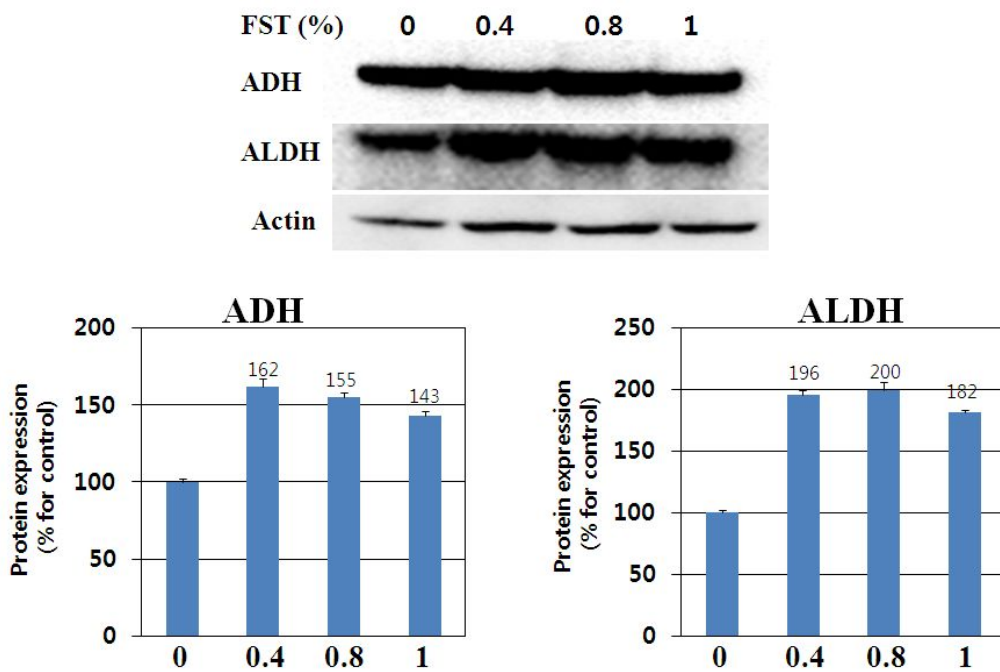


그림 48. Effect of FST (fermented sea tangle) on ADH and ALDH western blot analysis in *S. cerevisiae*.

5. 관능평가 및 시장조사

가. 약주 시제품의 관능평가

- (1) 관능평가 대상: 대학생 200명
 - 부경대(50명), 경성대(50명), 부산대(50명), 동아대(50명) 학생
- (2) 표본 연령: 20대(92.5%), 30대(7.5%)
- (3) 표본 성별 비율: 남자(63%), 여자(37%)
- (4) 조사 방법: 약주 음용 후 설문지를 이용한 1:1 면접 조사
- (5) 조사 샘플: 3가지 약주
 - 해조 발효분말(SLH-1)첨가 약주(꼭가바), A사 제품, B사 제품
- (6) 발효 다시마 분말(FST) 첨가 약주 라벨 및 시제품



(7) 표본 주요내용

구분	남	여	연령대		주량 (소주, 병)		음용횟수 (횟수/주)			신호주류			
			20대	30대	~0.5	1~	~1	2~3	4~	소주	맥주	과실주	약주
인원 (명)	126	74	185	15	29	171	79	104	17	172	25	2	1
비율 (%)	63%	37%	92.5%	7.5%	14.5%	85.5%	39.5%	52%	8.5%	86%	12.5%	1%	0.5%

나. 관능평가 결과

발효 다시마 분말(FST) 첨가 약주와 시판중인 약주 2제품(A사, B사)을 6점 만점으로 비교 관능평가를 실시하였다. 약주의 향기성분 관능평가는 A사 제품이 가장 우수하였으며, 꼭가바, B사 제품 순서로 기호도가 높았다. 단맛은 꼭가바 시제품(3.8점), A사 제품(3.2점), B사 제품(2.9점)이었고, 신맛은 꼭가바 시제품(3.7점), A사 제품(3.1점), B사 제품(2.8점) 순서로 기호도가 높았다.

그리고 3가지 약주의 색깔은 꼭가바 시제품(3.7점), A사 제품(3.1점), B사 제품(2.8점) 순서로 인공색소를 첨가하지 않은 꼭가바 제품이 가장 좋은 평가를 받았다. 전체적인 기호도 역시 꼭가바 시제품이 가장 우수하였다(그림 49.)

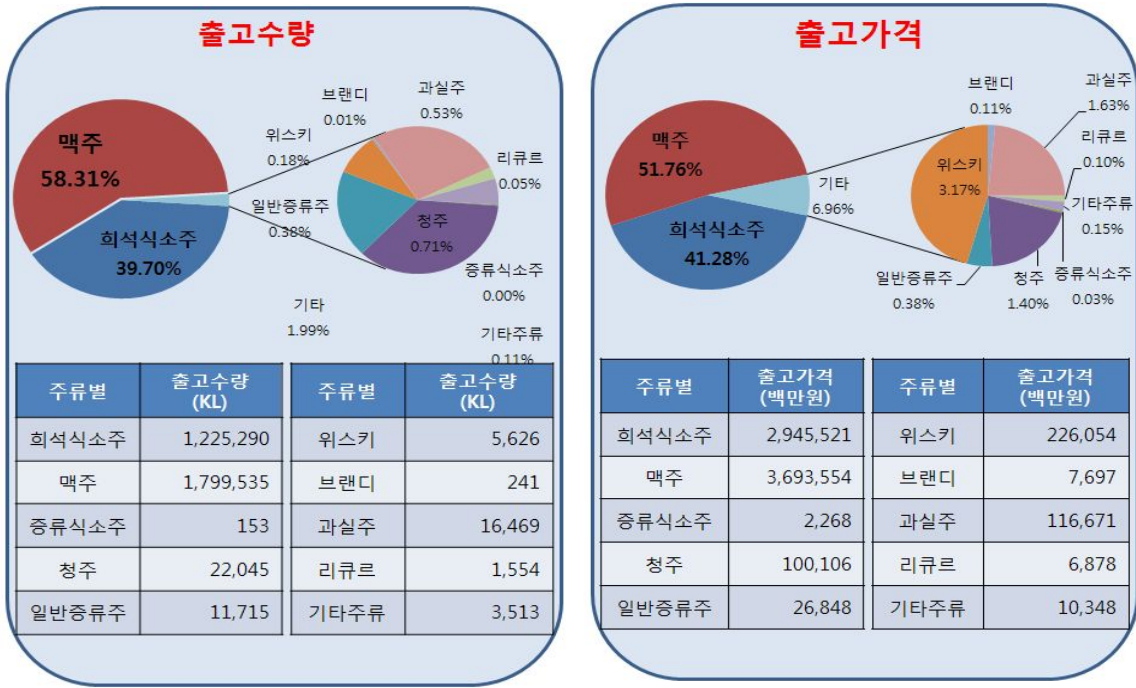
시제품 제조 후 음용자 20명을 대상으로 음식점에서 실제 관능 평가 결과 1인당 500 mL를 마셨을 경우 음주 후 숙취증상이 전혀 없는 것으로 나타났다. 이는 발효 다시마 분말(FST) 첨가 약주에서 숙취증상을 일으키는 주요 성분인 acetaldehyde 및 methanol 농도가 낮았고, 알코올 분해에 관련된 ADH 및 ALDH 활성을 촉진시켜 인체 내에서 빠른 acetaldehyde의 분해에 의한 것으로 생각되어진다. 따라서 본 연구에서 개발된 GABA 고함유 발효 다시마 분말(FST) 첨가 약주는 일반적으로 인식되고 있는 약주 음용 후 느끼는 숙취 증상을 완화 또는 해소시키는 기능성 약주로 인식될 가능성이 커지기 때문에 향후 매출액 향상에 지대한 영향을 미칠 것으로 판단된다.



그림 49. The quantitative descriptive analysis(QDA) profile for tastes of rice wine supplemented with FST(fermented sea tangle).

다. 약주의 시장조사

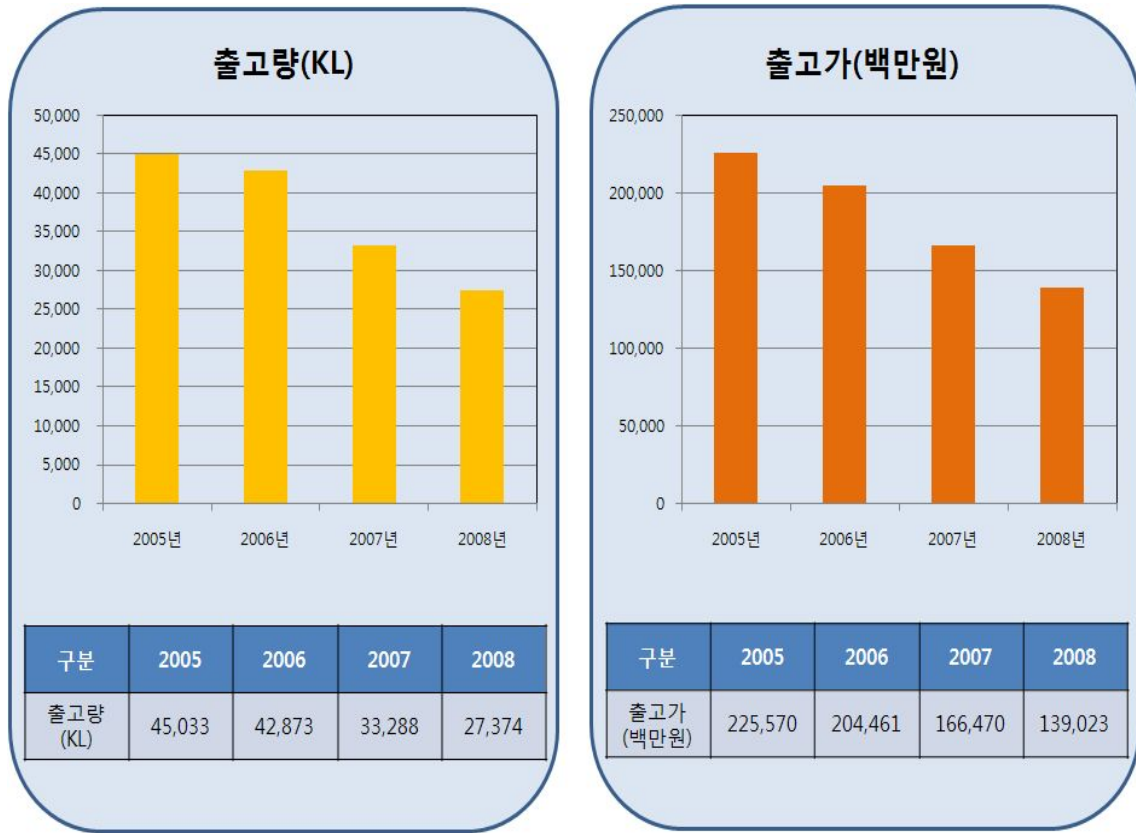
(1) 2009년 주류별 출고수량 및 출고가격 (자료출처; 한국주류산업협회)



2009년 우리나라를 비롯한 많은 국가들이 세계 금융위기 여파가 진정되어 주가를 비롯해 환율 등 금융시장이 안정을 되찾아가면서 경기회복 기대가 소비 경기에 긍정적으로 작용하였다. 그러나 최근 몇 년동안 위축되어 온 소비경기를 빠르게 회복시키기에는 부족했다. 주류업계는 2009년 다양한 소비행태 변화와 경쟁, 신종인플루엔자 등 다수의 외적요인으로 인해 경기부진에 따라 전체 출고량은 약 312만 kL 되어 2008년 대비 약 5%의 마이너스 성장을 기록했으며 매출액은 약 7조 1천978억 원으로 약 1% 감소를 보였다.

2009년도 주류별 출고수량은 맥주(58.31%)와 소주(39.70%)가 90%이상을 상회하고, 다양한 마케팅 활동과 제품개발에도 불구하고 2009년은 2008년 대비 각각 6%와 3% 감소를 보였다. 그리고 소주, 맥주 및 기타주류의 저도화, 막걸리의 열풍과 소비자의 욕구 변화로 다양한 신제품이 출시되었다.

(2) 약주 출고량 및 출고가격 (자료출처; 국세청 국세통계연보)



약주의 출고량은 2005년 45,033 kL에서 2008년 27,374 kL으로 점차 감소하는 경향을 보였다. 마찬가지로, 약주의 매출액도 2005년 2,255억에서 1,390억으로 감소하였다. 반면, 주류시장에서 약주와 비슷한 소비층을 가진 청주의 2009년 수입은 2008년 대비 49% 증가하였다. 일본식주점 확산에 따른 결과로 우리나라 청·장년층 위주로 청주(사케)를 찾는 횟수가 늘어나고 있기 때문이다.

또 한 번의 약주시장 도약을 위해서는 약주의 품질향상과 신제품 개발이 필요하며, 우리나라가 추진하고 있는 한식의 세계화와 같이 약주를 한식의 하나로 우리 음식과 함께 소개하고 음용하도록 하는 방식이 필요하겠다.

(3) 지역별 약주 출고수량, 민속주 · 농민주 중 약주 출고수량

[단위 : kl, 백만원]

구분 Classification	지역별 약주 (Yakju)		민속주 중 약주 출고량		농민주 중 약주 출고량	
	출고량	과세표준	출고량	과세표준	출고량	과세표준
	Delivered Quantity	Tax Base	Delivered Quantity	Tax Base	Delivered Quantity	Tax Base
2005년	45,033	157,728	515	3,105	723	2,297
2006년	42,873	142,980	411	1,982	179	515
2007년	33,288	116,413	467	2,209	199	629
2008년	27,374	97,370	511	2,445	192	774
지역별	27,374	97,370	511	2,445	192	774
서울	158	142	-	-	-	-
인천	252	386	-	-	-	-
경기	6,027	20,071	54	286	2	8
강원	15,017	52,771	1	2	-	-
대전	10	9	-	-	-	-
충북	261	288	6	23	2	6
충남	983	2,485	364	1,621	19	70
광주	-	-	-	-	-	-
전북	317	860	4	15	39	132
전남	230	437	45	127	20	57
대구	-	2	-	2	-	-
경북	2,972	15,399	28	329	1	1
부산	565	2,133	-	-	-	-
울산	-	-	-	-	-	-
경남	581	2,381	9	40	108	494
제주	1	6	-	-	1	6

(4) 시판 약주제품의 특징

제품명	알코올	용량(ml)	제조사	출고가격(원)	주요특징
백세주	13%	300 375	국순당	2,035 2,222	- 양조전용쌀 설갱미, 누룩사용 - 12가지 한약재 사용
산사춘	14%	300 375	배상면주가	2,510	- 산수유 사용
천년약속	14%	300 375	천년약속	2,222	- 상황버섯균사체로 만든 술 - 100% 쌀 사용
가을국화	13.5%	330	(주)무학	2,340	- 국내 야생국화 꽃잎과 찹쌀로 발효 - 생쌀 발효, 비타민 필수아미노산 첨가
대포	14%	425	배상면주가	2,230	- 은행, 달맞이꽃씨 사용



<백세주>



<산사춘>



<천년약속>



<가을국화>



<대포>

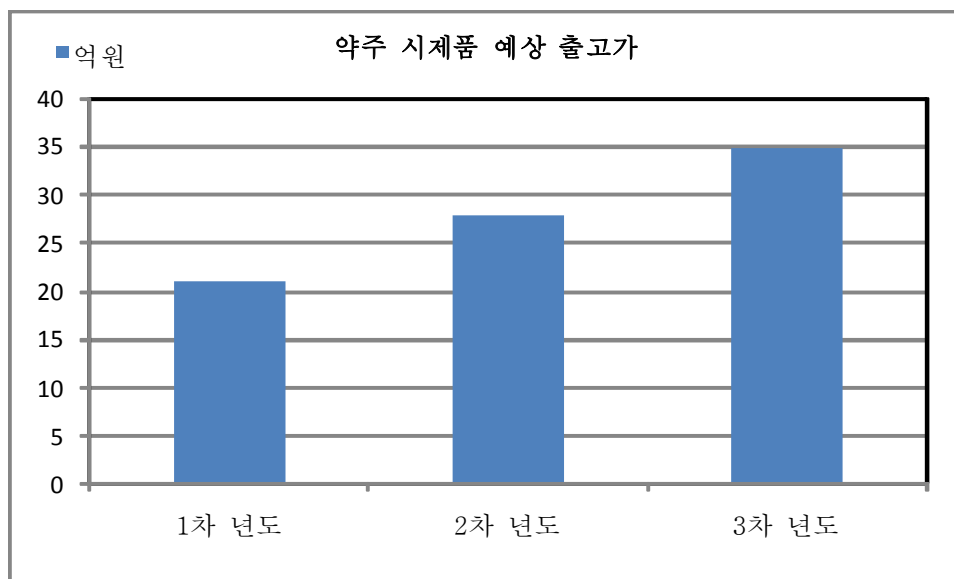
(5) 부산지역 약주 시제품 예상 판매출고가

1. 기준(2008년)

- 1) 전국 약주 과세표준액; 1005.6억원
- 2) 부산, 경남, 울산지역 약주 과세표준액; 50.5억원
→ 전국시장 대비 점유율; 5.02% (50.5억원/1005.6억원)
- 3) 전국 약주 출고가; 1390.2억원
- 4) 예상 부산, 경남, 울산지역 약주 출고가; 69.8억원
→ 1390.2억원 × 5.02% = 69.8억원

2. 부산, 경남, 울산지역 약주 시제품 예상 출고가

- 1) 부산, 경남, 울산지역 약주 시제품 예상 시장 점유율(%)
 - 1차년도; 30%, 2차년도; 40%, 3차년도; 50% 예상
- 2) 부산, 경남, 울산지역 약주 시제품 예상 출고가(억원)
 - 1차년도; 20.9억원, 2차년도; 27.9억원, 3차년도; 34.9억원 예상



제 5장. 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

1절. 연도별 연구목표 및 달성도

본 연구는 해조 추출발효액을 개발하고 그 기능성을 검토하며, 이를 분말화하여 기능성 약주를 개발하는데 사용하는 것을 내용으로 하고 있다. 해조 추출발효액은 해조류에 다량으로 함유된 글루탐산을 발효공법을 통해 GABA로 전환시키는 것을 목적으로 하며, 이는 기능성 약주 내의 GABA함량을 증가하는데 큰 역할을 한다. 따라서 본 연구는 해조 추출발효액의 제조 및 생산공정 확립과 기능성 약주의 제조 및 생산공정 확립, 즉, 기능성 약주와 이를 위한 기능성 소재의 개발에 중점을 두고 진행 되었으며, 소재와 약주의 기능성을 탐색하고 검증하는데 본 연구의 의의가 있다고 할 수 있다.

1. 1차년도 연구목표 및 달성도

본 연구의 1차년도에서는 해조류 추출액의 제조 공정확립 및 추출액의 정밀여과 공정에 필요한 외부순환식감압형 분리막과 장치의 개발에 초점을 맞추어 진행하였다. 또한 기능성 약주(발효주)의 개발을 위한 기반기술을 개발하는데 중점을 두었으며, 2차년도에 진행될 발효공정을 위한 균주의 탐색 및 발효조건의 검토가 이루어졌다. 본 연구의 핵심이 되는 생리활성물질인 GABA를 다량으로 함유하는 기능성 약주를 개발하기 위하여 우선적으로 해조류의 선별 및 전처리 공정이 확립되어 다시마를 이용한 해조 추출액을 제조하였으며, 고점도의 성상을 가지는 해조 추출액의 정밀여과를 위하여 외부순환식 감압형 분리막 장치에 장착되는 모듈의 개발이 이루어 졌다. 모듈은 scale별로 개발되었으며 규격은 pore size, 분자량을 고려하여 개발되었다(표 39).

해조 추출여과액의 개발에 따른 발효균주를 탐색하기 위하여 젓갈과 김치류로부터 유산균을 분리 및 동정하였으며, 분리된 유산균을 *Lactobacillus brevis* BJ20으로 명명하였다. *L. brevis* BJ20을 이용한 발효조건을 검토하였으며 최적의 발효조건을 확립하였다. 이에 따라 해조류를 이용한 발효공정을 개발하였으며, 개발된 해조 추출발효액의 기능성을 in-vitro상에서 검토하였다.

기능성 약주의 개발에 필요한 해조 추출발효물이 준비됨에 따라, 기능성 약주의 발효를 위한 균주가 검토되었고 발효조건에 대한 개발이 진행되었다. 또한 발효주의 개발을 위한 당화공정을 비롯한 숙성조건에 대한 검토가 이루어졌다.

표 39. 1차년도 연구목표 대비 달성도

평가항목	개발목표치	달성도	개발전 국내수준	비고
해조 추출액의 제조	100%	100%	정밀여과 공정 미비	15배수에 의한 추출(3~3Bx)
정밀여과 공정개발	100%	100%	필터프레스 여과	미세여과 가능
module 개발	pore size : 0.1um MW : 10kDa	100%	한외여과 시스템	여과효율 증대
외부순환식감압형 분리막 장치	Pilot plant 개발	90%	미개발	Auto system 미비
해조 추출여과액의 발효균주 개발	유산균, 효모	100%	해조 발효기술 미비	L. BJ20 GABA생성 효모
해조 추출발효액의 해조취 제거 기술	100%	100%	미개발	향미 개선
해조 추출여과액의 최적 발효조건 개발	100%	100%	미개발	37°C, 120rpm 등
채조 추출발효액 의 제조	100%	100%	미개발	500L Fermentor Scale
천연 GABA농도	1500ppm	1800ppm	0.1~1.0%(w/w)	분말대비 3%(w/w)
해조 추출발효액의 기능성 검증	항산화 활성	100%	미개발	in vitro test
	숙취해소			
	인지기능 개선			
기능성 발효주의 발효균주 개발	100%	100%	해조류 유래 주류 미개발	fungi 및 yeast
발효주 개발을 위한 기반기술 확립	당화공정 개발	100%	GABA 함유 기능성 주류 미개발	
	알코올 발효기술			
	숙성기술			
	품질관리기준			

2. 2차년도 연구목표 및 달성도

2차년도에서는 해조류 추출액을 이용한 발효공정이 확립됨에 따라, scale-up에 의한 공정 개발이 이루어졌으며, scale-up은 lab scale에서부터 pilot plant를 거쳐 500L fermentor에서 이루어졌다. 최종 해조 추출발효액의 시제품은 5ton fermentor

에서 수행하였으며, 동결건조를 거쳐 분말화 함으로써 분말형태의 SLH-1을 생산하였다. 외부순환식감압형 분리막 장치는 자동화 시스템을 완벽하게 갖춘 pilot plant의 개발을 완성하였으며, 실험용 및 샘플제조용으로 1inch 및 2inch의 모듈을 장착하는 scale의 장치도 개발되었다. 해조 추출발효액의 제조공정이 확립됨에 따라, 제조된 SLH-1의 기능성을 검증하기 위한 동물실험이 진행되었다(표 40).

기능성 약주의 개발을 위한 발효공정이 확립되었으며, 확립된 발효공정에 의한 scale-up test가 이루어졌다. 기능성 약주의 시제품이 제조됨에 따라 기능성 약주에 대한 기능성에 대한 검증이 이루어졌다. 또한 "꼭 가바"라는 이름으로 기능성 약주의 병을 비롯한 라벨이 디자인되어 해조류 유래의 천연 GABA를 다량으로 함유하는 기능성 약주가 완성되었다. 완성된 꼭 가바와 시판되는 약주 2종을 대상으로 관능검사를 실시하여 기능성 약주의 맛과 향에 대한 기호성을 알아보았으며, 시음회를 통하여 숙취에 대한 음주 후의 양상을 알아보았다.

표 40. 2차년도 연구목표 대비 달성도

평가항목	개발목표치	달성도	비고
외부순환식감압형 분리막 장치의 개발	자동화 시스템 구축	100%	"운전-역세-휴지-운전" 자동화 구축
Scale-up에 따른 발효공정 개발	5, 10, 50, 500L fermentation	100%	
해조 추출발효액의 시제품 제조	5ton fermentation	100%	
건조조건 확립 및 분말제형 개발	동결건조에 의한 분말화	100%	SLH-1 완성
천연 GABA 농도	1800ppm	2400ppm	분말 대비 5%(w/w)
SLH-1의 기능성 검증	항산화, ADH 등	100%	in-vivo test
기능성 약주의 제조공정 개발	100%	100%	당화 및 숙성 공정 확립
기능성 약주의 시제품 제작	100%	100%	디자인 확정
기능성 약주의 알코올 농도	12~14%	13%	저도주 concept
기능성 약주의 총산 농도	0.7% 이하	0.7% 이하	기준규격 확립
기능성 약주의 보존료	0.05% 이하	0.05% 이하	기준규격 확립
기능성 약주의 관능검사	200명	200명	현 남녀 대학생 대상
특허 출원	2건	100%	
논문 투고	2건	100%	

2절. 관련분야에의 기여도(과급효과)

1. 기술적 과급효과

가. 당해 기술의 향상

- 고점도 해조 다당류의 추출 및 분리 정제를 위한 신 분리/분획 기술의 완성
(외부순환식 감압형 분리막 기술)
- 미생물에 의한 발효공정을 통하여 해조류 특유의 불쾌 취의 제거와 향미 개선
⇒ 갯비린내, 해조 잔내 등의 제거
⇒ 발효에 의한 향기 생성 및 정미성 개선
- 미생물 분리, 동정기술
⇒ GABA생성능이 우수한 미생물 분리 동정기술 등
- 해조류로부터 GABA생성 및 GABA함유 기능성 약주의 제조공법 완성
⇒ 단발효기법, 다단발효기법, 복발효기법
- 유효성 평가 기술
⇒ 숙취해소(알콜대사촉진), 혈행개선(항혈액응고, 항고혈압), 간기능보호 효능 등
- 안전성 평가 기술 (M.T.T assay)

나. 관련 기술의 향상

- 외부순환식 감압형 분리막장치 개발에 의한 농축, 분리, 분획기술의 발전
⇒ 미세조류와 유용 미생물 배양 후 농축 공정기술 향상
⇒ 고점도 물질의 분리,분획 기술의 향상
(과울링 현상에 의한 분리, 분획의 효율성 저하 방지 등)
⇒ 정밀여과기술의 개선에 의한 병원성 미생물의 필터링 기술 향상
(0.1미크론 이하)
- 발효공정기술에 의한 기능성 신물질 개발 기술의 향상
⇒ 발효기질 및 배지의 조성 변경에 의한 기능성 신소재의 개발 기술
⇒ 고분자 다당류의 저 분자화 올리고당 분해기술
⇒ 고분자 단백질(폴리펩티드)의 가수분해 기술
⇒ 정미성의 개선 및 생리활성의 증대 기술

2. 경제산업적 파급효과

가. 기능성 식·의약 소재개발을 위한 천연 대체 원료 공급

전 세계적으로 그 효능이 입증된 기능성 물질인 GABA는 혈압강화 치료용 주사제로 상용되고 있으며, 최근 일본을 중심으로 건강식품 등 및 기능성 식품소재로 각광을 받고 있지만 GABA의 순도를 높이기 위한 방편으로 합성 MSG(Mono Sodium Glutamate)를 주원료로 하여 생산을 하고 있는 실정이며 GABA를 생산할 수 있는 대체 천연 원료의 개발이 필요하다. 천연물 소재로써 다시마는 다량의 Glutamate를 함유하고 있어 GABA 제조를 위한 원료로써 최적의 조건을 갖추고 있을 뿐만 아니라, 기능성 해조다당류인 후코이단을 다량 함유하고 있어 당해 신기술의 개발에 의한 해조추출발효액은 전 세계적으로 안전성과 효능이 입증된 GABA와 후코이단의 특성인 뇌세포 대사촉진, 알콜대사 촉진작용, 혈행개선 및 혈당치의 상승억제 등의 효용성을 동시 만족시키는 신소재로써 각광을 받을 것이다.

나. 관련산업에의 파급효과

국내에서 GABA는 그 동안 추출 공정이 까다롭고 고 순도의 GABA를 생산하는 기술이 부족하여 고가의 일본 제품을 수입함으로써 원가 부담이 커져 널리 사용되지 못하였다. 그러나 최근 국내에서도 GABA에 관한 관심의 증대와 수요가 확대됨에 따라 식약청은 GABA를 고시형 기능성식품소재 후보로 검토 중인 바 국내 GABA 시장규모는 크게 증가될 가능성이 높은 것으로 생각된다. 따라서 당해 기술의 개발은 GABA에 대한 수입대체 효과와 함께 향후 기능성식품 및 의약품 원료에 이르기까지 큰 영향을 미칠 것으로 판단됨.

- ☞ 고부가가치의 기능성 제품 개발로 지역 및 국제경쟁력을 강화한다.
- ☞ 지역 내 해조류의 계약재배를 포함한 1,2,3차 산업의 동반발전 효과 향유
- ☞ 천연 자원의 개발로 기능성 소재의 수입대체 효과와 국민보건 향상에 기여

다. 계약재배에 의한 국내 양식어가의 소득증대와 환경 개선 효과 향유

해조류를 이용한 다양한 식의약품의 상용화에 의한 해조류의 수요증대는 1차 생산자인 양식어가의 소득증대와 함께 해조류의 대량생산(양식)에 따른 이산화탄소 저감효과 뿐 아니라, 당해기술개발의 핵심요소인 해조류 발효기술을 완성함으로써 현재 주목받고 있는 해조류를 이용한 바이오에너지 개발과도 연계할 수 있을 것이다.

제 6장. 연구개발 결과의 활용계획

1절. 추가연구의 필요성

본 연구에서는 다량의 GABA를 함유하는 해조 추출발효분말 SLH-1을 개발하는데 성공하였다. SLH-1은 분말형태의 기능성 소재로 5%이상의 천연 GABA를 함유하고 있다. GABA는 해조류에 다량으로 함유되어 있는 글루탐산으로부터 본 연구에서 분리된 GABA생성 우수균주인 *L. brevis* BJ20에 의해 전환된 것이다. GABA를 생산하는 방법에는 여러 가지가 있으며, 발효에 의한 생산이 가장 일반적이다. 세계적으로 일본이 GABA생산의 강국으로 가장 다양한 제품이 개발되어 판매되고 있다. 하지만 대부분의 제품이 인위적으로 MSG를 첨가하여 GABA를 생산하고 있으며, 그 외 미국이나 중국 또한 같은 방법으로 GABA를 생산하고 있다.

최근에는 천연의 소재를 선호하는 추세에 있어 본 연구에 의해 개발된 SLH-1은 천연의 GABA를 5%이상 함유하고 있어 상당한 이점을 가지고 있다. 별도의 분리정제공정을 거치지 않고, 천연의 GABA를 5%이상 함유하고 있는 제품은 세계적으로 전무하다. 따라서 본 연구에서 개발된 SLH-1은 기능성 소재로서 국내보다는 국외의 소재시장 진입에 큰 장점을 가지고 있다.

한편 국내 시장에서 GABA는 식품첨가물로 등재되어 있지 않은 관계로 반드시 개별인정을 받아야 하는 제약이 있다. 하지만 개별인정형 제품의 개발은 국내시장의 독점을 야기할 수 있어 상당한 수익을 낼 수 있다. 때문에 본 연구에서 알아본 향산화 활성을 비롯한 알코올 섭취에 의한 간기능 개선과 같은 클레임으로 개별인정을 받는다면 SLH-1은 기능성 식품 소재로 발전할 수 있다. 뿐만 아니라 그림 50과 같은 GABA의 효능에 대한 추가적인 in-vitro 및 in vivo test가 이루어져야 할 것이 자명하다.

또한 현재 5%의 천연 GABA농도에 대한 추가적인 실험이 이루어져야 한다. 국내외 적으로 고혈압에 대한 개선 효과를 GABA 20mg을 일일 섭취량으로 권장하고 있다. 하지만 그 외의 대부분의 제품에는 GABA가 50mg이상, 많게는 500mg을 함유하는 제품이 출시되고 있다. 따라서 해조류에서 확보할 수 있는 전구물질의 양을 극복할 수 있는 방안을 마련하여야 하며, 증강된 전구물질의 전량을 GABA로 전환할 수 있는 발효공정을 연구할 필요가 있다. 추가적으로 본 연구에 의해 개발된 SLH-1은 지표물질이 GABA로, GABA이외에도 후코이당을 비롯한 해조 올리고당과 미네랄을 풍부하게 함유하고 있어, 이들과의 시너지효과에 대한 연구가 이루어져야 할 것이다.

What is GABA ?

Gamma AminoButyric Acid

- 중추신경계 신경전달물질 중 30% 차지
- 비단백질성 아미노산
- 흥분 억제성 신경전달물질



그림 50. 다시마의 발효에 의한 GABA의 전환원리 및 일반적인 GABA의 효능

2절. 개발 기술의 활용계획

1. 활용분야 : 식품산업, 바이오산업, 공정장치산업
2. 활용방안 : 전통발효주, 기능성 음료, 의약품 원료 등의 중간소재
3. 구체적인 활용계획

당해 개발기술의 활용을 통한 성공적인 조기 사업화의 완성을 위하여는 분야별 축적된 핵심원천기술(해조류추출, 분리정제, 발효, 공정설계)과 실용화기술 (산업화 공정기술)과 경제적 원료 공급 및 마케팅 등 실제적인 사업화를 위한 보완적 결합이 요구된다.

가. 기능성 발효주의 개발

주류 제조과정 중 단 발효 및 다단발효를 위하여 당화 및 제국(코지, COZY) 등의 발효공정에 해조 추출액 또는 해조 추출발효액을 첨가함으로써 기능성 해조올리고당과 GABA성분을 함유한 기능성 약주(발효주) 개발

☞ 약주 제조용 해조추출액의 1차 발효 시, 발효 균주는 주류 제조공정의 연속성을 고려하여 결정

나. 기능성 음료(해조발효음료) 개발

☞ GABA와 후코올리고당의 기능성을 활용한 건강기능음료의 핵심소재

☞ GABA, Fucoidan 등에 대한 식약청의 고시형 건강기능식품소재의 인정을 예상

☞ 축적된 안전성 및 효능성에 관한 검증 DATA의 사전 준비로 식약청의 고시형 기능성 원료인정 이 지연될 경우 자체 개별인정을 위한 대관업무 시작

다. 기능성 천연조미료의 개발

외부순환식감압형분리막 방식에 의한 해조(다시마)추출액의 정밀여과(0.1미크론 이하)를 통하여 정미성이 개선된 추출액만을 분리해내고, 향미(flavour, taste)의 개선을 위하여 서로 다른 검증된 발효균주에 의한 다단발효 및 복발효 공정을 도입함으로써 정미성이 현저히 개선되며, 기능성이 보강된 천연조미료의 개발이 가능함.

4. 판매계획

가. 제품의 형태

해조류로부터 천연GABA와 저분자해조올리고당을 다량 함유한 기능성 해조발효액 또는 해조 발효 분말로서 기능성 식품소재 / 식품첨가물 / 건강기능식품소재에 적용.

나. 제품의 효능 : 스트레스해소, 집중력향상, 불면증해소, 혈행개선, 항고혈압, 항당뇨, 항산화, 숙취해소, 항비만 등

다. 제품의 종류 (예정)

- ☞ 기능성 약주(발효주)소재 (참여기관과의 공동 개발 예정)
 - 무미, 무취, 저 염도, 발효균주(효모, 또는 유산균과 혼합 또는 다단발효)

- ☞ 기능성 음료 소재 (현재 대기업과 숙취해소 음료 공동개발 진행 중)
 - 무미, 또는 산미, 감미, 발효균주 (주 :B 유산균, 또는 효모와 혼합발효)

- ☞ 기능성 천연조미료 (또는 소재)
 - 강한 정미성, 감미, 효모 엑기스, 발효균주(효모)

- ☞ 기능성 스낵/베이커리 용 다이어트 소재
 - 해조류 자체의 발효분말로써 상기의 기능성을 함유한 증량제, 해조식이섬유를 다량 함유하여 다이어트 및 건강식품 소재로 활용

나. 판매 전략

(1) 홍보 및 마케팅 전략

- ☞ 국내외 박람회를 통한 제품홍보(동경 기능성식품 첨가물 박람회 등)

- ☞ 참여기관인 대선주조(주)에 의한 시제품의 기능성 홍보와 광고행사 동시 진행
 - MSG가 첨가되지 않은 순수 천연 GABA소재임을 주 홍보

- ☞ 동물시험 및 임상시험 결과의 발효 (국내.외 학회 논문, 관련 잡지 투고)

- ☞ 원료의 기능성 인정을 위한 전략
 - 1단계 숙취해소 기능을 중점 홍보(DATA확보 후, 기능성 승인 불필요)
 - 2단계 식약청의 기능성 인정 지연시, 개별인정을 위한 단계 추진
(기능성 및 안전성에 관한 DATA 축적으로 개별인정 승인 유리함)

(2) 상품화 전략

- ☞ 참여기관인 대선주조(주)으로 하여금 기능성 약주(발효주)의 조기 상품화 유도
 - 숙취해소기능 우수, 스트레스해소, 등의 효능 우선 광고

☞ 기능성 음료의 사업화 조기 사업화 추진(CJ제일제당(주) : 공동개발 진행 중)
- 숙취해소 음료의 상품화 유도로 기능성 약주와의 시너지 효과 창출

☞ 기능성 천연조미료, 건강 다이어트 스낵의 상품화를 위한 적용 연구
- 배합비 조정에 의한 샘플의 제조를 통한 마케팅 진행

☞ 소재 품목의 다양화로 관련 개발자의 소비 수요 충족
- 맛, 향, 기능성, 물성조정 등의 조정에 의한 다양한 품목 개발
- 다양한 GABA 함량 등에 의한 1차 소비자 (상품 개발자)선택의 폭을 확대

5. 기술개발 후의 개발완제품의 경쟁력 및 목표시장 점유율 예상

가. GABA소재를 이용한 상품화 현황 및 시장형성 예상

지난해 야쿠르트 본사가 GABA음료를 발매한 것을 계기로 일본에서는 대기업의 신제품 발매가 증가하고 있다. 지난해 발매된 상품을 보면 롯데의 타블렛 타입의 GABA특정보건용식품, 글리코의 GABA초콜렛, 다카라 주조의 GABA 드링크, 갯케이칸(月桂冠)의 GABA배합 감주 등이 있다. 또한 메르잔이 GABA가 첨가된 와인을, 일본 코카콜라는 GABA커피를, DHC도 GABA분말 제품을 발매하였다. 일본에서는 제품시장이 활성화되는 만큼 원료시장도 성장세를 보이고 있으며, GABA 함유소재는 10%미만의 저농도 타입에서 순도가 높은 타입까지 다양한데, 고농도 타입을 중심으로 수요가 확대되고 있는 추세로 2007년도 순수소재로써 일본내 GABA 시장이 100억엔 이상으로 추산된다.

한편 GABA의 성장호르몬 분비 촉진효과 및 중성지방 저하효과를 이용하여 미국에서는 성장 호르몬 분비를 촉진시킴으로서 어린이 성장발육에 도움을 주는 GABA함유 건강보조식품(Dietary supplement)이 판매되고 있으며, 다이어트용 식품 소재로도 이용이 기대된다. 특히 GABA의 정신안정효과는 2차 수면을 유도하는 작용이 있어, 급격히 팽창하고 있는 불면증환자를 위한 식품소재로 이용할 경우 시장 규모는 급격히 확대 될 것이다.

그러나 현재 국내의 형성된 기존의 GABA소재 시장은 GABA함량의 증가를 위하여 화학적 합성품인 MSG를 주원료로 사용하고 있어 미반응 잔존 MSG에 의한 안전성의 문제와 잔존 MSG가 발현하는 지미(旨味)등에 의한 적용상의 한계점을 가

지고 있다. 그러므로 당사가 제안한 천연원료인 해조류 내 다량 함유된 GLUTAMATE를 이용한 GABA전환기술은 상가에서 지적된 한계점을 해결함으로써 웰빙시대 소비 수요의 기호성을 충족시킬 뿐 아니라 적용범위를 확대하는데 일조를 할 것이다.

나. 개발예정 소재의 목표시장 점유율 예상

비고	국내 GABA소재시장	국제(일본) GABA소재시장
예상 시장 점유율	50%	20%
점유율 예상 근거(경쟁력)	<ul style="list-style-type: none"> - MSG의 무첨가로 천연GABA 소재에 대한 웰빙 수요를 충족 - 천연 해조추출발효액으로 표기 (국내 GABA표기의 문제 회피 수단) - 기능성 해조올리고당과의 생리효능 상승작용 	<ul style="list-style-type: none"> - 해조류 유래의 천연GABA 소재로 인한 비교우위 선점 - 해조류를 선호하는 식습관 - Fucoidan에 대한 선호도와 이에 따른 GABA소재와의 시너지 효과

다. 산업의 특성 및 시장 위험 회피수단

최근 전체적인 상품경향은 국내의 사정이 판이하여, 국내는 GABA표기의 한계로 인하여 발아현미와 같이 GABA를 함유한 소재를 그대로 상품화하는 경우가 많은 반면, GABA의 표기가 가능한 외국에서는 고함량의 GABA소재를 일반가공식품 및 건강기능식품 등에 첨가하여 상품화 하는 경우가 늘고 있다. 또 정제, 타블렛 등의 상품형태보다는 기능성을 부가한 일반가공식품 및 음료 등의 형태가 주류가 되고 있다.

일본의 경우 야크르트(GABA음료), 롯데의 타블렛 타입의 특정보건용식품, 글리코의 GABA초코렛, 다카라주조의 GABA 드링크, 갯케이칸의 GABA배합 감주 등의 제품이 개발 상용화 되었으며, 07년도에 메르잔의 GABA함유 와인, 등이 발매되는 등 GABA시장의 가능성 및 방향을 제시하고 있음.

국내의 경우 중소 벤처기업을 중심으로 GABA의 개발을 진행하고 있으나, GABA 표기 문제로 인한 마케팅의 장벽으로 시장형성이 되지 않아 본격적인 사업화의 진행이 어려운 환경이지만, 최근 식약청의 고시형 기능성 후보물질에 GABA

를 포함시키는 등 멀지 않아 기능성원료의 표기 문제는 해결 될 것이며, 국내시장의 상황변화를 예상할 때 본 과제에서 제안한 연구개발 대상 기술은 향후 관련시장에 효율적이면서 경쟁력을 보유하기 위한 기반이 될것임을 확신한다.

식약청에 의한 GABA소재의 기능성 원료 인정이 지연될 경우엔 저분자 후코올리고당(Fuco-Oligosaccharide)이 함유된 해조추출 발효액 그 자체로써 기능성 원료 표기가 가능하며, 개발과정에서의 안전성 및 생리효용성 검증을 위한 임상시험 자료 등은 향후 개별인정을 위한 자료로 축적됨으로 기능성 인정 및 이에따른 표기상의 문제점에 관한 위험성을 회피할 수 있을 것이다.

라. 최종제품의 제품경쟁력 수준

- 청정지역 국내산 자연산 해조류로부터 안전성과 생리효용성이 검증된 천연 GABA소재 개발에 따른 경쟁력 확보(MSG 미첨가)
- 기능성과 안전성이 검증된 저분자 후코올리고당(Fuco-Oligosaccharide)과 GABA 소재의 상승작용에 의한 시너지효과에 따른 경쟁력 확보.
- 미생물 발효에 의한 해조취의 제거와 혼합발효에 의한 향미의 개선, 해조류 유래의 필수 천연 미네랄과 유기산 등의 함유로 웰빙 수요를 충족시킴

제 6장. 국내외 GABA관련 상품화 현황

그림 51은 연구개발 과정에서 수집된 국내외 GABA관련 제품을 나타내고 있다. 세계적으로 GABA소재 및 제품에 대한 시장은 일본이 가장 크며, 이는 아래의 사진에서 보는 바와 같이 생리기능성별로 다양한 제품이 판매되고 있다. 일본에서는 건강식품을 비롯한 미용제품 등이 활발하게 출시되고 있으며, 현재에도 그 시장이 계속적으로 성장하고 있는 단계이다. 반면 국내 시장은 아직 형성되지 않은 상태로 LG생명과학에서 출품한 개별인정형 제품인 "가바플러스"가 있으며, 그 외의 대부분의 제품은 GABA와 관련된 기능성에 의한 마케팅 전략이 이루어지고 있다. 때문에 국내의 GABA관련 홍보 및 기능성에 대한 검증이 시급한 실정이다.



그림 51. 국내외 GABA관련 제품

제 7장. 참고문헌

1. Requisition analysis of alcoholic liquors. Kuk Se Chung Technique Research. 5: 365, 368, 369.
2. Industrialization and quality improvement of traditional alcoholic beverages and *Nuruk* brewed. *Ministry of Science & Technology* (1998).
3. Lee HH, Kim IJ, Kang ST, Kim YH, Lee JO, Ryu CH. Development of black garlic *Yakju* and its antioxidant activity. *Korean J. Food Sci. Technol.* 42: 69-74 (2010).
4. Swain, T., W. E. Hillis and M. Oritega. Phenolic constituents of *Ptunus domestica*. I. Quantitative analysis of phenolic constituents. *J. Sci. Food Agric.* 10: 83-88 (1959).
5. Astrup T, Mullertz S. The fibrin plate method for estimating fibrinolytic activity. *Arch. Biochem. Biophys.* 40: 346-351 (1991).
6. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RS. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-275 (1951).
7. Bergmeyer HU. *Methods of Enzymatic Analysis.* Academic Press, New York, 28 (1974).
8. Koivula T, Koivusalo M, Lindros KO. Liver aldehyde and alcohol dehydrogenase activities in rat strains genetically selected for their ethanol preference. *Biochem. Pharmacol.* 24: 1807-1811 (1975).

9. Koivisto T, Eriksson CJ. Hepatic aldehyde and alcohol dehydrogenases in alcohol-preferring and alcohol-avoiding rat lines. *Biochem Pharmacol.* 48: 1551-8155 (1994).
10. Lee JK, Jung DW, Kim CJ, Ahn BH. The delay of ginseng wine fermentation: the effects of ginseng extrusion temperature, sugar source, fermentation temperature and diammonium phosphate on the fermentation. *Food Sci. Biotechnol* 16: 812-816 (2007).
11. Kim CJ. Microbiological and enzymological studies on *Takju* brewing. *J. Korean Agricultural Chemical Society* 10: 69-100 (1968).
12. Lee J. Quality characteristics flavor components of *Takju* prepared by different raw materials. *Seoul Women's University. Master thesis* (1982).
13. Kim CJ. A study on the possession of organic acids and sugars in the process for the Korean traditional alcoholic rice beverage. *J. Korean Agricultural Chemical Society* 4(33): 123 (1963).
14. Lee IS, Yang EJ, Jeong YJ, Seo JH. Fermentation process and physiochemical characteristics of *Yakju*(Korean cleared rice wine) with addition of ginseng powder. *Korean J. Postharvest Sci. Technol.* 6: 464-468 (1999).
15. Lee MK, Lee SW, Yoon TH. Quality assessment of *Yakju* brewed with conventional *Nuruk*. *J. Korean Soc. Food Nutr.* 23: 78-89 (1994).

16. Lee DY. Characterization of the bittenss and burnt flavor compounds in heated *Takju*. *Korean University, doctotal* (1998).
17. Ryu HY, Kum EJ, Bae KH, Kim YK, Kwun IS, Sohn HY. Evaluation for the antimicrobial, antioxidant and antithrombois activity of Korean traditioanl liquors. *Korean J. Microbiol Biotechnol.* 35: 238-244 (2007).
18. Nose A, Myojin M, Hojo M, Ueda T. Proton nuclear magnetic resonance and raman spectroscopic studies of Japanese sake, an alcoholic beverage. *J. Biosci. Bioeng.* 99: 493-501 (2005).
19. Sumi H, Hamada H, Tsushima H, Mihara H, Muraki H. A novel fibrinolytic enzyme (Nattokinase) in the vegetable che in Natto: a typical and popular soybean food in the Japanese diet. *Experimentia.* 43: 1110-1111 (1978).
20. Kim IJ, Kim HK, Jong JH, Jeong YK, Ryu CH. Study of functional *Chungkukang* contain fibrinolytic enzyme. *Korean J. Life Sci.* 12: 357-362 (2002).
21. Cha JY, Kim YS, Kang PD, Ahn HY, Eom KE, Cho YS. Biological activity and chemical characteristics of fermented silkworm powder by mold. *J. Life Sci.* 20: 237-244 (2010).
22. Yu HE, Lee DH, Lee JH, Choi SY, Lee JS. Quality characteristics and cardiovascular activities of Korean traditional wines and liquors. *Food Sci. Biotechnol.* 14: 772-777 (2005).

23. Gueeri H. Influence on prolonged ethanol intake on the level and turnover of alcohol and aldehyde dehydrogenase and glutathione. *Advances in Experimental Medicine and Biology* 23: 12 - 14 (1995).
24. Hwang JY, Ham JW, Nam SH. Effect of Maesil (*Prunus mume*) juice on the alcohol metabolizing enzyme activities. *Korean J. Food Sci. Technol.* 36: 329-332 (2004).
25. Park EM, Ye EJ, Kim SJ, Choi HI, Bae MJ. Eliminatory effect of health drink containing *Hoveia dulcis* Thunb extract on ethanol-induced hangover in rats. *Korean J. Food Cult.* 21: 71-75 (2006).
26. McGregor NR. *Pueraria lobata* (Kudzu root) hangover remedies and acetaldehyde-associated neoplasm risk. *Alcohol* 41: 469-478 (2007).
27. Lee KS, Kim GH, Seong BJ, Kim HH, Kim MY, Kim MR. Effects of aqueous medicinal herb extracts and aqueous fermented extracts on alcohol-metabolizing enzyme activities. *Korean J. Food Preserv* 16: 259-265 (2009).
28. Kano M, Ishikawa F, Matsubara S, Kikuchi-Hayakawa H, Shimakawa Y. Soymilk products affect ethanol absorption and metabolism in rats during acute and chronic ethanol intake. *J. Nutr.* 132: 238-244 (2002).
29. Cha JY, Heo JS, Cho YS. Effect of zinc-enriched yeast FF-10 strain on the alcoholic hepatotoxicity in alcohol feeding rats. *Food Sci.*

Biotechnol. 17: 1207-1213 (2008).

30. Seo HJ, Jeong KS, Lee MK, Park YB, Jung UJ, Kim HJ, Choi MS.
Role of naringin supplement in regulation of lipid and ethanol
metabolism in rats. *Life Sci.* 73: 933-469 (2003).