

1190
16-3

식물성

원료를

이용한

유가공

대체제품

개발

2021

농림축산식품부

농림식품기술기획평가원

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

맞춤형혁신식품 및 천연안심소재기술개발사업 2021년도 최종보고서

발간등록번호

11-1543000-004064-01

식물성 원료를 이용한 유가공 대체제품 개발

2022.04.25

주관연구개발기관 / 태경농산(주)
공동연구개발기관 / 고려대학교

농림축산식품부
(전문기관)농림식품기술기획평가원

제출문

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “식물성 원료를 이용한 유가공 대체제품 개발”(개발기간 : 2019.05.20 ~ 2021.12.31.)과제의 최종보고서로 제출합니다.

2022. 04. 25

주관연구개발기관명 : 태경농산(주) (대표자) 천영규 (인)
공동연구개발기관명 : 고려대학교 (대표자) 정용우 (인)

주관연구책임자 : 유흥훈
협동연구책임자 : 오남수
협동연구책임자 : 김영완



국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정 제18조에 따라 보고서 열람에 동의합니다.

< 요약 문 >

사업명				총괄연구개발 식별번호 (해당 시 작성)			
내역사업명 (해당 시 작성)				연구개발과제번호			
기술분류	국가과학기술 표준분류	LB1704	100%				
	농림식품 과학기술분류	PA0103	100%				
총괄연구개발명 (해당 시 작성)							
연구개발과제명		식물성 원료를 이용한 유가공 대체제품 개발					
전체 연구개발기간		2019.05.20~2021.12.31					
총 연구개발비		총 1,175,500 천원 (정부지원연구개발비:705,000 천원, 기관부담연구개발비 :현금 61,500천원, 현물 409,000천원)					
연구개발단계		기초[] 응용[] 개발[√] 기타(위 3가지에 해당되지 않는 경우)[]		기술성숙도 (해당 시 기재)		착수시점 기준() 종료시점 목표()	
연구개발과제 유형 (해당 시 작성)							
연구개발과제 특성 (해당 시 작성)							
연구개발 목표 및 내용	최종 목표		- 동물성 우유를 이용하는 치즈를 대체하기 위하여 향미, 물성 개선을 위한 식물성 원료의 배합을 개발하고, 유산균 발효를 통해 우유 대체 유제품 생산 기술을 시제품 생산단계까지 올리며 나아가 식물성 치즈에 건강 기능성을 부여한 제품 개발 연구까지 진행하고자 함				
	전체 내용		- 유가공 대체제품의 향미 개선을 위한 소재 배합 개발 - 식물성 유산균 스타터를 적용한 발효 공정 개발 - 유가공 대체제품 texture 개선을 위한 물성 조절 소재 개발 - 식물성 치즈 유형별 3종 Lab, Plant scale 시제품 개발 - 항비만 및 synbiotics 기능 강화 식물성 유제품 개발, 기능성 평가				
	1단계	목표	- 국내 최초 발효 공정 등을 적용한 다양한 식물성 치즈의 유형별 연구와 이를 활용한 제품의 관능 품질과 영양적 우수성 확보				
내용		- Block, Spread, Dipping type의 Lab, Plant scale 시제품 제조 및 품질평가 - 식물성 치즈의 항비만 기능성 연구					
연구개발성과	[1차년도] - 시판제품의 관능, 물성 특성 연구 후 치즈 유형별 타겟 및 목표점 설정 - 식물성 단백질 기반 유산균, 반응조건 등 발효공정 정립 - 치즈 유형별 물성 구현 연구 및 기본 배합비 확립						
	[2차년도] - 식물성 치즈 유형별(Block, Spread, Dipping type) 처방/공정 정립 및 Lab 시제품 제조, 품질평가 1) Block : 단백질 4.9%, 경도 8.86N로 목표비 97%, 응집력은 0.14로 목표비 64%수준 달성 2) Spread : 단백질 4.5%, 응집력 0.26, 점착성 0.16로 목표비 100% 달성 3) Dipping : 식물성 치즈풍미소재 개발 및 이를 적용한 체다치즈소스 구현 - 선별 프로바이오틱스의 항산화, 콜레스테롤 저하 활성 등 확인						

연구개발성과	<p>[3차년도]</p> <p>- 식물성 치즈 유형별(Block, Spread, Dipping type) 현장공정 정립 및 시제품 제조 완료</p> <p>1) Block : 국내 최초 및 글로벌 수준의 블럭형 치즈 단백질 10%로 구현으로 2차년도 대비 2배 증가, 경도 12.36N로 목표비 100%, 응집력은 0.21로 목표비 95%수준 달성</p> <p>2) Spread : 단백질 4.09%로 동물성 타겟 69% 수준, 응집력 0.35, 점착성 0.15로 목표비 100% 달성</p> <p>3) Dipping : 단백질 2.79%로 동물성 타겟 보다 높은 함량 구현, 점도 23.25로 목표비 96%, Rate index 0.55로 목표비 73%수준 달성 제조</p> <p>- 선정 프로바이오틱스(<i>Lactobacillus plantarum</i> KML34)가 함유된 식물성 치즈 제품의 항비만 기능성 확인 → 균주 2종 기탁 완료</p>
--------	--

연구개발성과 활용계획 및 기대 효과	<p>[활용 계획]</p> <p>1. 제품 개발 단계에서 결과 활용방안 - 본 연구를 활용하여 식물성 치즈 상품화 및 양산을 위한 핵심자료로 활용</p> <p>2. 판로 확보 및 마케팅 단계에서 결과 활용방안 - 제품 개발이 완료되어 양산화가 진행될 경우, 현재 다양한 채널에 공급중인 유통망을 통하여, 판매가 가능함 - 당사는 현재 비건제품에 대한 시장 선점 상태이며 다양한 제품군을 출시, 판매하고 있으므로 제품간 콜라보 및 소재로서의 활용이 가능함. 또한 구축된 B2B, B2C 판매 경로를 통해 보다 쉽게 상품화 진입이 가능함 - 개발 제품은 향후 해외 시장의 유통망을 활용하여 판매할 경우, 매출 증대를 이룰 수 있어, 이에 대한 수출 추진을 검토할 예정임</p> <p>[기대 효과]</p> <p>1. 기술적 측면 - 식물성 원료 가공기술(발효, 효소 등) 및 적용 방법 개발 - 식물성 단백질원료 이용을 통한 기능적 효능 검증 및 대체제품 안정적 산업 기반 구축 - 식물성 대체제품 산업 증가 트렌드에 부합하는 지속가능 식품 개발</p> <p>2.경제적·산업적 측면 - 식물성 원료를 이용한 제품의 소비 확대로, 소비자 신뢰 구축 및 산업 활성화 - 국내에서 식물성 원료를 이용한 제품에 대해 한정적이고 맛이 없다는 소비자들의 인식 개선 및 새로운 개념의 유제품 개발을 통해 신 소비시장을 형성할 수 있을 것으로 기대됨 - 식물성 원료를 이용한 유제품 대체제품 개발을 통해 수입 의존적 국내 시장 내 제품 다양화와 안정화에 기여 및 국제경쟁력 강화에 기여</p> <p>3. 사회적 측면 - 점차 증가하는 환경오염에 대한 우려와 이에 따른 식물성 원료를 이용한 식품을 비롯한 다양한 지속가능 제품에 대한 관심이 증가되고, 미국, 유럽 등 서구에서는 다양한 종류의 제품을 출시. 국내에서도 이와 같은 관심은 증가하지만 공급은 부족한 현실이므로 새로운 종류의 제품을 선보임으로서 식물성 대체시장에 새로운 산업군을 확대시키는 역할을 함</p>
---------------------	---

연구개발성과의 비공개여부 및 사유	비공개
--------------------	-----

연구개발성과의 등록·기탁 건수	논문	특허	보고서 원문	연구 시설·장비	기술 요약 정보	소프트웨어	표준	생명자원		화합물	신제품	
								생명 정보	생물 자원		정보	실물
2								2				
연구시설·장비 종합정보시스템 등록 현황	구입 기관	연구시설·장비명	규격 (모델명)	수량	구입 연월일	구입가격 (천원)	구입처 (전화)	비고 (설치장소)	ZEUS 등록번호			
국문핵심어 (5개 이내)	식물성		유가공 대체제품		치즈대체제품		발효		비만예방			
영문핵심어 (5개 이내)	Plant-based		Alternative Dairy Products		Cheese Alternative		Fermentation		Anti-obesity			

최종보고서										보안등급		
										일반[], 보안[]		
중앙행정기관명		농림축산식품부			사업명		사업명					
전문기관명 (해당 시 작성)		농림식품기술기획평가원			사업명		내역사업명 (해당 시 작성)					
공고번호					총괄연구개발 식별번호 (해당 시 작성)							
					연구개발과제번호							
기술분류	국가과학기술 표준분류	LB1704	100%	-								
	농림식품과학기술분류	PA0103	100%	-								
총괄연구개발명 (해당 시 작성)		국문										
		영문										
연구개발과제명		국문		식물성 원료를 이용한 유가공 대체제품 개발								
		영문		Development of plant-based alternative dairy products								
주관연구개발기관		기관명		태경농산(주)			사업자등록번호		118-81-10754			
		주소		(무)07057 서울 동작구 여의대방로 112 도연관 13층			법인등록번호		134111-0005814			
연구책임자		성명		유홍훈			직위					
		연락처		직장전화					휴대전화			
		전자우편					국가연구자번호					
연구개발기간		전체		2019.05.20 - 2021.12.31. (2년 6개월)								
		단계 (해당 시 작성)		1단계								
		n단계										
연구개발비 (단위: 천원)		정부지원		기관부담		그 외 기관 등의 지원금				합계		연구개발비 외 지원금
		연구개발비		연구개발비		지방단체		기타()				
		현금		현금		현금		현금		현금		현금
		현물		현물		현물		현물		현물		현물
		합계		합계		합계		합계		합계		합계
총계		705,000		61,500		409,000				766,500		409,000
1차년도		184,000		16,000		106,700				200,000		106,700
2차년도		245,000		21,500		142,300				266,500		142,300
3차년도		276,000		24,000		160,000				300,000		160,000
공동연구개발기관 등 (해당 시 작성)		기관명		책임자		직위		휴대전화		전자우편		비고
		고려대학교 세종산학협력단		오남수		교수						역할 기관유형
		고려대학교 세종산학협력단		김영환		교수						공동 대학
위탁연구개발기관		한양대학교 산학협력단		이현규		교수						위탁 대학
연구개발담당자 실무담당자		성명		박상은			직위					
		연락처		직장전화					휴대전화			
		전자우편					국가연구자번호					

이 최종보고서에 기재된 내용이 사실임을 확인하며, 만약 사실이 아닌 경우 관련 법령 및 규정에 따라 제재처분 등의 불이익도 감수하겠습니다.

2022년 4월 25일

연구책임자: 유 홍 훈 (인)

주관연구개발기관의 장: 천 명 규 (인)

공동연구개발기관의 장: 정 용 (인)

농림축산식품부장관·농림식품기술기획평가원장 귀하



< 목 차 >

- I. 연구개발과제의 개요
- II. 연구개발과제의 수행 과정 및 수행내용
- III. 연구개발과제의 수행 결과 및 목표 달성 정도
- IV. 목표 미달 시 원인분석
- V. 연구개발성과 및 관련 분야에 대한 기여 정도
- VI. 연구개발성과의 관리 및 활용 계획
- VII. 참고 문헌

1. 연구개발과제의 개요

1. 연구개발의 추진 배경

1) 연구개발 목적

- 본 과제의 연구개발 목표는 식물성 원료 및 발효 공법을 이용한 유가공 대체제품(식물성 치즈제품)을 개발하여 친환경적이고 건강한 제품을 소비자에게 공급하고 관련 식품 및 소재 산업을 활성화하며 더 나아가 인류의 지속 가능한 소비에 기여하는데 있음
- 유가공 대체제품을 제품화하기 위해서 현재 식물성 탄수화물, 식물성 지방만을 활용한 원료한계성을 벗어나 식물성 단백질의 응고, 발효, 분해 등의 가공기술 개발을 통해 기존 동물성 치즈 제품과의 물성, 관능 차이를 최소화하고 영양성까지 확보하는 것을 목적으로 함
- 비만에 대해 예방 효과를 나타내고 동물성 치즈를 대체할 수 있는 식물성 치즈의 제조를 위해 항비만 기능을 나타내는 신규 프로바이오틱스를 발굴하여 선별된 프로바이오틱스가 첨가된 식물성 치즈 제품을 제조.

2) 연구개발의 필요성

① 유제품(치즈/발효유) 시장의 성장 및 소비자 니즈의 다양화

- 세계 버터/치즈/발효유 시장규모는 2017년 기준 2,271억 달러이며, 2018년 이후 꾸준히 증가하여 2021년에는 2,612억 달러의 규모를 형성할 것으로 전망되고 있음. 2017년 기준 버터/치즈/발효유 시장 중에서 치즈가 56.4%로 가장 많은 비중을 차지하고, 그 다음으로 발효유가 36.3%, 버터가 7.3% 순으로 나타남
- 발효유, 치즈 시장이 확대됨과 동시에 글로벌 트렌드에 맞춰 소비자들의 니즈도 다양화되고 있음. 치즈의 경우 맥주와 페어링하기 좋은 식품이라는 점에서 맥주 안주로서 치즈 소비 확대가 예측되고 있으며, 전 세계적으로 건강을 지키고 지구 환경까지 살리는 채식에 대한 인식이 확산됨에 따라 우유를 넣지 않고도 맛있고 영양성분이 풍부한 비건 치즈의 수요가 늘어나고 있음

② 동물성 단백질 섭취 문제와 식물성 대체식품의 대두

- 동물성 단백질이 식물성 단백질보다 맛, 물성 등에서 좋다는 것은 일반적으로 인정받고 있지만, 동물성 단백질은 가격 상승이나 광우병 및 조류인플루엔자 등 질병으로 인한 안전성 및 알레르기 문제, 환경오염, 종교적 문제 등이 사회적 이슈로 대두되고 있으며 이에 따라 동물성 단백질을 식물성으로 대체하려는 움직임이 계속되고 있음
- 전 세계적으로 육류의 소비는 지속적으로 증가하고 있음. 국제연합식량농업기구(FAO)에서 발간한 보고서에 따르면 세계 인구는 2018년 7월 기준, 76억 4천만명에서 2050년 92억 명으로 매년 0.6%씩 증가할 것으로 예측하고 있음. 이에 따라 향후 육류 소비량은 2018년 304만톤에서 매년 1.3%씩 증가하여 2050년에는 455만톤에 이를 것으로 전망
- 이와 같이 증가하는 육류소비량에 따라 가축을 키우기 위한 사료 소비도 증가해 빠른 속도로 육류섭취를 늘리다보면 사료로 쓸 식물자원이 부족해져서 목초의 사막화가 점점 더 진행될 것이라고 예상하고 있음. 또한 낙농가 소의 1/4은 온실가스 배출에 대해 3% 정도의 책임이 있음. 따라서 우유를 식물성으로 대체할 경우 약 24~84% 에너지 사용 감소, 98% 물 사용 감소, 77~91% 목축지 감소, 35~65% 온실가스 감소를 가능하게 하므로 환경적으로 우수하며 인류에게 지속가능한 삶을 제공할 수 있음
- 채식주의자 및 종교(할랄, 코셔, 불교, 힌두교)를 이유로 동물성 식품 섭취가 어려운 이들

에게는 식물성 대체식품이 걸핍되기 쉬운 영양성분을 보충하고 먹는 즐거움을 제공하는 대안이 될 수 있음

③ 식물성 대체식품 시장의 성장 및 글로벌 트렌드

- 대체식품 시장규모는 17년 15조에서 25년 37조 수준으로 증기한다고 추정하고 있으며 크게 육류, 계란, 유제품으로 구분되어 제품이 출시되고 있음. 17년부터 25년까지 성장률은 계란 5.8%, 육류 6.7%, 유제품 13.1%으로 예상되고 있음

- 유제품을 만들기 위해서는 기본이 되는 우유가 필요한데, 이는 이것을 생산할 수 있는 젖소의 개체수가 절대적으로 중요하며, 또한 생산량 및 원가를 고려하면 원유를 꾸준히 공급해줄 수 있어야 함. 그렇게 하기 위해서는 젖소에서 발생할 수 있는 질병을 예방하기 위해 항생제를 사용하게 되고, 이런 성분이 우유에 함유되면 결국 사람에게 그 영향이 미치게 됨. 이에 따라 식약처에서 유제품 원료를 조사한 결과 원유에서 항생물질이 잔류 허용 기준치를 초과하는 결과도 나타나게 되는 현실임. (경향신문) 이렇게 항생제가 포함된 우유를 반복해서 마시게 되면 항생제 내성 부작용이 생길 수 있음. 이에 따라 유제품역시 환경오염 및 사료의 부족 등에서 안전하지 못할 뿐 아니라 인체에까지 미칠 수 있는 영향 등을 고려했을 때, 유제품 대체재에 대한 필요성을 국내,외 적으로 확대되고 있음

- 최근 식품 글로벌트렌드 및 빅데이터 분석에서도 식물성 대체식품은 지속 가능한 식품의 new wave로 주목받고 있음. 과거에 비해 건강, 환경에 대한 전 세계적인 관심은 점차 증가하고 있으며 해외에서는 이미 고기, 계란, 유제품 대체식품이 다양하게 출시되고 있음.

- 국내에서는 아직 대체식품에 대한 거부감이 있는 것도 사실이지만 지속적인 동물성 식품의 섭취는 환경의 악순환 뿐만 아니라 사람들이 안전하게 섭취할 수 있는 먹거리를 점차 줄어들게 하므로 대체식품이라는 키워드는 국내에서도 점점 더 많이 등장할 수밖에 없음

(서울대 푸드비즈랩, 푸드위크)

④ 유가공 대체제품의 필요성 및 용도

- 제시된 해외의 육류, 계란 대체품들을 살펴보면 실제 소고기, 계란과 유사한 수준의 풍미와 조직감을 제공하기 위한 시도들이 진행되고 있으며 미국의 경우 푸드테크 기반 기업들의 활발한 활동으로 상용화 기술과 제품 품질이 많이 향상됨. 국내에서는 육류 대체식품의 경우 해외의 기술력 및 품질 수준보다는 떨어지지만 콩고기를 기반으로 식감, 맛을 향상시키는 시도가 과거부터 진행되어 왔음

- 이와는 달리 유가공 대체제품 개발에 대한 국내 상용화 시도는 전무한 상태이며 해외에서도 시판되는 발효유, 치즈 대체재는 육류, 계란과 비교했을 때 품질 수준이 크게 떨어짐. 이러한 이유는 사용된 원료가 한정적이고 혼합 등의 단순한 공정으로 제조되었기 때문임. 따라서 유제품 대체재에 대한 보다 근본적이고 체계적인 연구를 통해 원료, 공정에서 차별화된 제품 개발이 진행 필요

- 또한, 용도 측면에서 유가공 대체제품 개발이 필요한 실정임. 자사에서는 대체식품 개발의 필요성을 인지하여 육류, 계란 대체재 개발의 경우 선행 연구를 진행 중이지만 육류, 계란 대체식품의 상용화 진행 시 햄버거, 제과/제빵 등 조리 활용도 측면에서 치즈와 같은 유가공 대체제품이 함께 사용되므로 이에 대한 기초(분석등), 상용화에 연구 진행이 필요

제품명	Home style Meatless meatloaf	Home style Beefless ground	A healthy protein Mince	Meat free Burgers	Beyond meat (Beyond burger)	Beyond meat (chicken strips grilled)
제품 사진						
제조사	Gardein (USA)	Gardein (USA)	Quorn (UK)	Quorn (UK)	Beyond meat (USA)	Beyond meat (USA)
특징	<ul style="list-style-type: none"> 고기없는 미트로프 짭짤한 육즙스프 함유 4분안에 조리 가능 Non GMO Soy, wheat, and canola 콜레스테롤 프리 	<ul style="list-style-type: none"> 식물성 단백질로 제조 4분안에 조리 가능 글루텐, 유제품 프리 콜레스테롤 프리 110 칼로리 (저칼로리) 	<ul style="list-style-type: none"> 스파게티에 들어가는 다진고기 형태 육류 대비 지방함량 낮 단시간에 조리 가능 	<ul style="list-style-type: none"> 햄버거 패티 전용 미트 프리 육류 대비 지방함량 낮 그릴에 10분 조리 냄비에 8분 조리 	<ul style="list-style-type: none"> 햄버거 패티 형태 완두콩 베이프로 만든 제품 100% vegan 글루텐, GMO 프리 	<ul style="list-style-type: none"> 햄버거의 치킨 패티 형태로 들어가는 제품 글루텐, GMO 프리 콜레스테롤, 항생제, 포화지방산 없음

제품명	Egg replacer	Neat egg	Vegan egg	Egg replacer	Just egg
제품 사진					
제조사	EnerG (USA)	Neat (USA)	Follow your heart (USA)	Red mill (USA)	JUST (USA)
특징	<ul style="list-style-type: none"> 제빵용 주요 원료 : 베이킹파우더 	<ul style="list-style-type: none"> 제과용 주요 원료 : 아마씨분말 	<ul style="list-style-type: none"> 스크램블, 제과용 조류에서 기인한 원료 사용 계란 특유의 황냄새 발생 	<ul style="list-style-type: none"> 제빵용 주요 원료 : 감자전분, 식이섬유 등 계란의 부품성 부여 	<ul style="list-style-type: none"> 스크램블용 전란액과 유사한 성상 냉동보관

그림1. 시판중인 육류, 계란 대체제품

- 또한 육류 및 유제품 대체재 개발은 식량문제 해결, 영양학적 우수성과 기존제품 대비 환경 부하 경감 등에서 장점을 가지고 있음. 채식주의자 증가와 함께 식물성 단백질 대체재 시장의 규모도 커지고 있지만, 식미감 측면에서 대체 축산물 및 유제품은 아직 한계가 존재하는 실정임

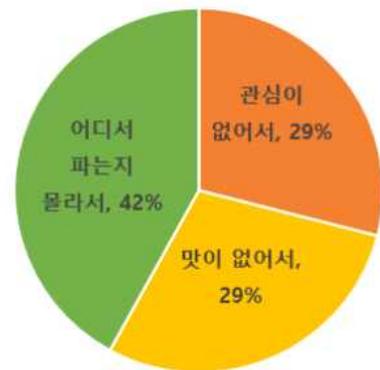


그림2. 식물성 단백질 대체제품을 자주 먹지 않는 이유 (출처: Lee et al., 2018)

⑤ 식물성 치즈의 물성 연구

- 유제품 중 치즈의 조직감 특성은 소비자 선호도를 결정하는데 중요한 요소로 알려져 있으며, 치즈는 식품 매트릭스에 따라 조직감 차이가 존재함. 이러한 이유를 이해하기 위해서 물성 측정이 반드시 필요하기 때문에 지속적으로 과학적 측정 방법을 개발하고 개선하는 것이 중요함
- 치즈는 종류에 따라 texture profile analysis(TPA)나 rheological properties를 측정하여 물성특성을 확인함. 그러나 같은 유형의 치즈일 경우라도 물성 측정방법이 매우 다양하여 명

확한 평가체계가 없음(그림 3). 이에 다양한 측정항목 및 평가방법 적용하여 정확한 물성학적 결과해석을 통한 평가방법 확립이 매우 필요한 실정임(그림 4). 따라서, 본 연구에서는 유가공 대체제품의 조직감 및 물리화학적 특성 연구를 통해 물성의 평가 체계를 구축하고자 함

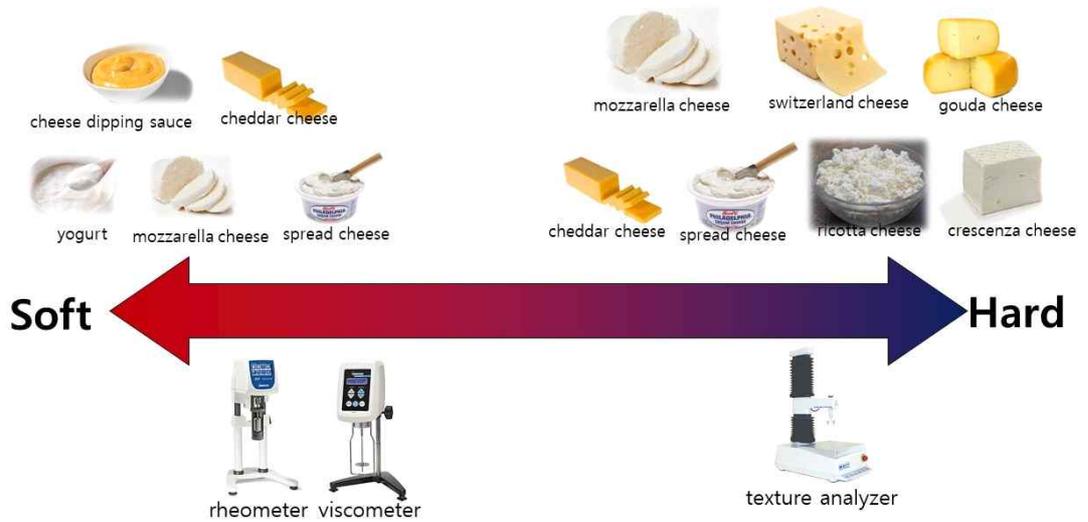
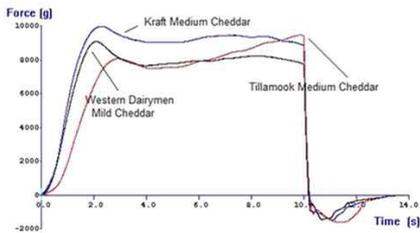
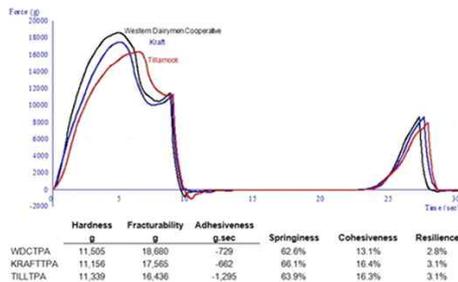


그림3. 치즈 종류별 물성 측정 방법 분류



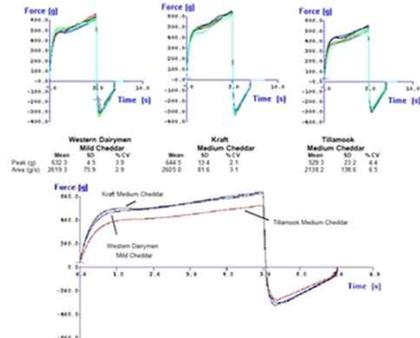
1. Cut Test

관련 물성학적 용어: Surface Hardness, Work to Cut



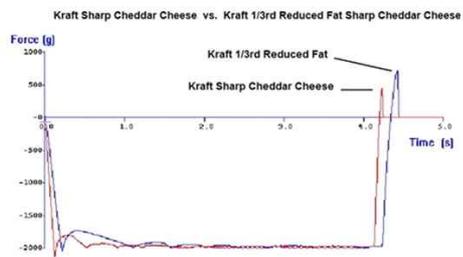
3. TPA test

관련 물성학적 용어: Hardness, Fracturability, adhesiveness, springiness, cohesiveness, resilience



2. Puncture Test

관련 물성학적 용어: Hardness, stickiness



4. Adhesiveness test

관련 물성학적 용어: Adhesiveness, work of adhesion

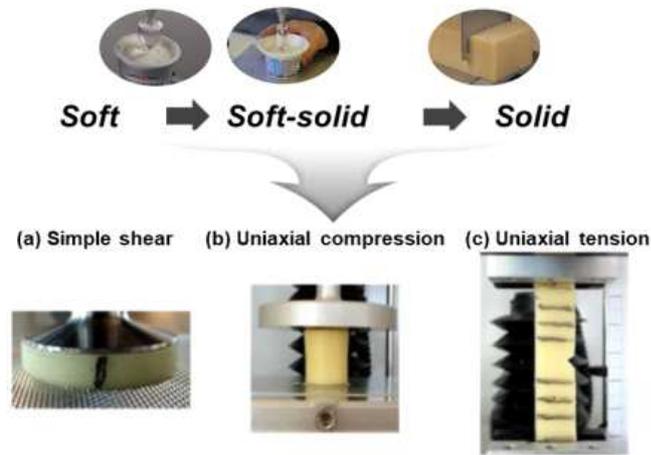


그림4. 체다 치즈(cheddar cheese)에 적용 가능한 다양한 물성학적 측정방법

⑥ 프로바이오틱스와 비만

- 국내에서 프로바이오틱스 시장은 2012년 519 억원이던 시장 규모가 2017년 전후로 급격히 성장해 2019년 6,444 억까지 성장하였고 2020년에는 시장 규모 2위를 기록하며 건강식품계의 최강자인 홍삼의 자리를 위협하고 있음. 전 세계적으로도 프로바이오틱스 시장은 매년 7%의 성장률을 보이며 2023년에 69억3000만달러까지 성장할 것으로 예측됨
- 2015년 세계 비만 인구는 약 7억 명으로, 세계비만연맹은 이러한 비만 인구 증가 추세가 계속되면 2025년에는 전 세계 인구의 3분의 1이 비만 환자가 될 것이라고 예측함. 국내에서도 비만 인구가 급속하게 증가하고 있으며 2025년에는 국내 성인 인구 2명중 1명(46.4%)이 비만 환자가 될 것으로 예측하고 있음. 비만은 심혈관 질환, 당뇨와 같은 대사질환 및 각종 성인병을 유발하는 원인이므로 세계보건기구에서는 비만을 '질병'으로 규정하고 있으며, 이를 예방하기 위한 대안이 필요한 실정임
- 현재 많은 probiotics가 gut microbiota라고 하는 장내 균총을 조절을 통해 질환을 예방할 수 있다는 연구가 많이 진행되어 있음. 특히, 많은 probiotics가 장내에 존재하는 Bacteroidetes와 Firmicutes의 비율을 조절할 수 있고, Bacteroidetes의 비율을 높여줌으로써 비만을 예방 할 수 있다는 것을 확인함. 따라서, 비만을 예방하기 위한 대안으로 probiotics를 이용한 연구 진행이 필요

2. 연구개발 대상의 국내·외 현황

1) 국내 기술 수준 및 시장 현황

① 기술현황

- 식물성 원료를 이용하여 유제품 제조, 개발에 대한 연구는 식물성 대체제품 관심에 대한 증가에 따라 점차적으로 증대되고 있음. 기존에 연구되었던 부분은 두유를 이용한 치즈대체 제품 개발, 요거트 대체제품 개발 등의 연구가 진행되고 있음
- 국내 유가공 대체제품은 치즈는 국내에서는 생산하고 있는 곳이 전무함. 개발 정도도 식물성 원료를 이용한 치즈 소재 개발은 아직 기초 단계에 불과함

- Transglutaminase(TGase)는 단백질의 glutamyl기와 lysine의 ε-amino group간 공유가교 결합의 형성을 촉매하는 효소이며, MTGase가 처리된 단백질은 수분 유지능(water holding capacity)를 증가시킴으로써 단백질 겔의 탄력성이 증가하는 특징을 나타냄. 이러한 특성을 바탕으로 소세지, 치즈 제품의 최종 조직감을 개선하는데 사용되어 왔으며, 식물성 단백질을 이용한 유사치즈 제품에 적절한 조직감을 부여하기 위해서는 사용되는 단백질의 효소적 구조 변형을 통해 조직감 개선을 위한 연구가 요구됨

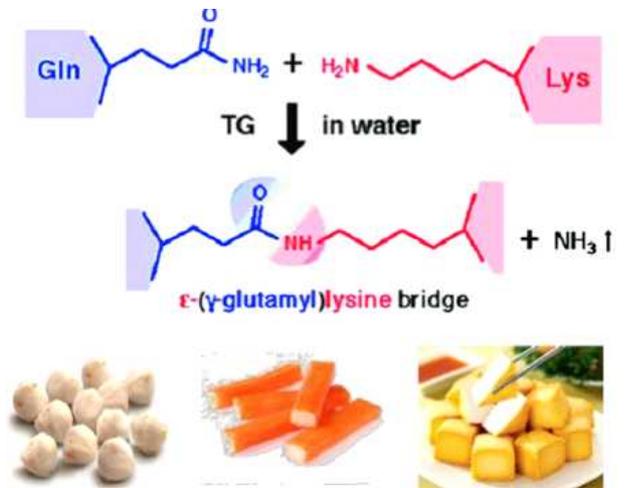


그림5. TGase의 작용메카니즘 및 적용 제품

- 식량과학원에서는 식물성 단백질에 대한 적용으로는 쌀가공 제품 개발을 위해 트랜스글루타미나제(TG)를 이용한 연구기술 개발이 진행되었음. 쌀가공제품에 적합한 품종을 선정하고, 다양한 가공제품 제조를 위한 레시피 확립을 통하여 제품을 개발하는 연구가 진행되었으며, 쌀단백질의 가교결합을 통해 식품 개발 연구가 진행되었음

- 치즈의 경우 지방함량을 줄이기 위한 노력이 진행되고 있으며, 이를 위해 다양한 지방대체 소재들이 사용되고 있음. 이들 중 탄수화물 기반의 지방대체제의 경우 수분 유지능을 바탕으로 줄어든 지방의 중량 대비 적은 양의 탄수화물 소재와 물로 지방을 대체함. 또한 저지방 치즈의 경우 조직감의 보완을 위해서 겔을 형성하는 하이드로콜로이드류를 사용하고 있음

② 시장현황

- 식품의약품안전처의 ‘축산물 가공품 생산실적 통계’에 따르면, 국내 치즈시장 규모는 2015년도 1조 1,381억원에서 2018년도 1조 1,504억원으로 연평균 0.4% 성장하였음. 같은 기간 국내 생산액은 5,392억원에서 6,022억원으로 연평균 0.5%씩 증가하였으며, 수입액도 5,450억원에서 5,484억원으로 소폭 증가함. 수출액은 아주 소액에 그치는 등 통계적 의미는 없을 정도로 미미한 수준임. 국내 치즈 시장은 저성장기의 성숙기 시장 특성을 보이고 있으며, 향후에도 이러한 추세는 지속될 것으로 예상됨

표1. 국내 치즈 시장 규모

(단위 : 억 원)

구 분	2015	2016	2017	2018	CAGR
생산액	5,932	5,585	6,180	6,022	0.5%
수입액	5,450	4,758	6,099	5,484	0.2%
수출액	1	3	6	2	26.0%
시장규모	11,381	10,340	12,273	11,504	0.4%

자료 : 식품의약품 안전처, 축산물 가공품 생산실적, 2019

- 식물성 치즈시장의 규모나 성장전망에 대한 통계자료는 아직 찾아보기 어려움. 그러나 최근 채식주의자의 증가, 생활습관병의 증가, 친환경 식품에 대한 선호도 증가 등의 영향으로 동물성 단백질 대체식품산업과 유사한 성장전망을 보일 것으로 예상되기에 동물성 치즈를 대체하면서 시장을 확대해 나갈 것으로 예상됨. 농업기술 실용화재단에서 아래와 같은 고려사항을 바탕으로 시장규모를 추정한 결과, 기존 치즈 시장('18년 1조 1,504억원)의 약 3%를 대체한 약 345억원으로 추정하였음. 본 추정값은, 채식주의자나 비건소비자만 대체육에 대한 수요가 있을 것이라는 가정하에 기존 대체육제품의 확산속도, 채식주의자와 비건소비자의 인구비중 등을 고려하여 식물성치즈의 대체율을 추정하였음

표2. 식물성 치즈의 대체율 추정 (자료 : 농업기술실용화재단 사전경제성평가)

구 분	고려 사항	시장규모 추정
국내 시장상황	<ul style="list-style-type: none"> - 국내 식물성 대체육 시장은 초기 시장으로 시장규모 통계나 수입제품의 판매현황에 대한 통계를 찾기 어려움. - 한국채식연합에 따르면, 국내 핵심고객인 채식주의자는 150만명(총인구 3%), 비건 50만명(총인구 1%)로 추정됨. - 식생활의 서구화에 따른 육류소비의 증가 등으로 인하여 생활습관병 환자수는 2018년 1,630만명으로 총인구의 1/3수준, 매년 5%씩 증가(보건의료빅데이터) 	<ul style="list-style-type: none"> - 세계 식물성 대체육 시장은 2018년 육류시장에서 1.95%를 차지하고 있으며, 2025년 10%까지 성장할 것으로 예상되어 매년 1%P 이상 급격한 성장이 예상됨. - 국내시장도 세계시장과 비슷한 추세를 보일 것으로 예상되며, 초기 시장 형성 이후 급격한 성장이 예상된다.
해외 시장상황	<ul style="list-style-type: none"> - 해외시장에서도 식물성 대체육에 대한 통계나 관련 제품의 판매액에 대한 통계를 찾기 어려움. - 동물성 단백질의 대체시장에 대한 간접적인 통계를 활용하였음. 글로벌 경영컨설팅 회사인 A.T Kearney의 'How will cultured meat and meat alternatives disrupt the agricultural and food industry(2019)' 보고서에 따르면, 식물성 대체육 시장은 2018년도 현재 전체 육류시장에서 약 1.95%수준이며, 2025년 10%, 2030년 18%, 2035년 23%, 2040년 25%로 대체될 것으로 예상 	<ul style="list-style-type: none"> - 현재 시점의 국내 대체육 시장에는 최소한 채식주의자의 수요가 있을 것으로 판단됨. 따라서 총인구 대비 채식주의자 비중인 3%를 적용함.

③ 경쟁기관현황

- 최근 사회적 이슈에 따라 식물성 원료를 이용한 고기대체제품, 계란대체제품 및 유제품 대체제품에 대한 관심이 높아지며 일부 트렌드 기반 레스토랑에서 개별 제조 또는 수입해서 판매하거나 개인적으로 제조를 하는 경우는 있으나 가공제품으로 판매하고 있는 제품은 거의 없는 실정임

- 현재 식물성 치즈는 해외제품이 주류로 일부 온라인상 구입 가능함. 그러나 그마저도 회사 및 제품 종류가 한정적이라 채식하기 위한 소비자들이 선택할 수 있는 제품 종류가 한정적임

④ 지식재산권현황

- 식물성치즈 및 그 제조방법/2012/특허

쌀단백질, 콩단백질 및 밀단백질로 이루어진 식물성 단백질을 단백질 가수분해 효소로 분해

하여 체내 흡수가 용이하고 맛이 우수한 치즈를 제조할 수 있으며 결합력을 보완하기 위하여 밀단백질 또는 글루텐을 사용한 식물성 치즈 및 그 제조방법에 관한 특허

- 용융성 및 견고성이 향상된 가공레시피 치즈 제품 및 제조방법/2012/특허

식물성오일, 옥수수 유래 전분 및 감자 유래 전분을 포함한 레시피로 기존 치즈대체재가 갖는 단점인 과도한 끈적임, 불량한 용융성을 개선시킨 제조방법임

- 쌀을 이용한 가공치즈 및 그의 제조방법/2013/특허

치즈의 주원료인 우유 대신 쌀을 이용한 것으로 쌀을 물에 호화시킨 후 첨가물과 유화제를 투입하여 유화시킨 후 살균, 냉각, 교반, 숙성한 쌀 치즈 제조방법에 관한 특허임

- 식물성 유산균 또는 바실러스균을 이용한 발효음료의 제조방법/2007/특허

식물성 유산균 및 바실러스균을 전처리한 콩에 접종, 배양함으로써 특유의 풍미를 갖고 각종 생리활성을 보유한 콩 발효음료를 제조하는 방법에 관한 것

2) 국외 기술 수준 및 시장 현황

① 기술현황

- 세계 각국에서 식물성 원료 이용 제품의 주도권 선점을 위한 다양한 연구를 수행하고 있음. 식물성 치즈를 제조하기 위한 용도로 주로 이용하는 단백질 공급원은 현재 연구되어 있는 것은 땅콩단백, 콩단백임. 이런 콩 원료를 이용해서 삶는 등의 공정을 이용해서 가공한 후 효소처리를 통해 단백질을 분리시켜 응고를 위한 소재로 사용함. 그리고 이와 같은 단백질 원료 외에도 전분을 이용해서 단백질을 대체하는 연구를 실시함. 또한 유지방을 대체하기 위한 원료로는 콩, 땅콩, 팜유, 코코넛유 등의 식물성기름을 이용하여 유지방을 대체하는 치즈 제품을 개발하는 연구가 계속됨

- Processed cheese 및 크림치즈 등에서 milk fat을 canola oil 혹은 다른 식물성 오일로 대체할 경우 oat fiber(Ramel, 2018, Food Res Int. 107:110) 및 rice bran wax 또는 ethylcellulose와 같은 다당체가 요구되는 것이 일반적임 (Bermer et al. 2016. Food Res. Int. 85:67)

- 식물성 오일과 기타 고형분을 섞어서 oleogels(lipophilic liquid in solid emulsion)이 지방의 감소는 물로 식물성 오일로의 대체가 가능함 (Bermer et al. 2016. Food Res. Int. 85:67)

- 치즈의 물성 개선 및 지방 저감화를 위한 탄수화물 소재로 카라기난에 대한 연구가 다수 발견되며, 음 하전을 띄는 카라기난은 양성 하전을 띄는 whey protein과 결합하여 whey protein의 응집을 유도하여 커드 형성 시 소량 첨가를 통해서 커드 수율이 증가함 (Dybing and Smith 1998 J. Dairy Sc. 81:309 외 다수). 이와 같은 기능의 대체제로 변성전분, low methoxyl pectin, locust bean gum, κ-carrageenan 및 ι-carrageenan 등과 같은 하이드로 콜로이드 다당체가 많이 사용됨 (Transglutaminase 기반 치즈 및 치즈 유사 제품의 물성 개선)

② 시장현황

- 전 세계적으로 유가공 대체시장은 2017년 11.8조에서 2025년 31.6조로 매출 규모가 증가할 것이라 예상. 이것은 현재 식물성 대체제품 종류 중 가장 많은 육류대체소재 제품과 비교해보아도 2017년 2.4조에서 2025년 4.1조로 매출규모가 증가할 것이라는 예상치 대비 약 8배 정도 많은 규모임

- 세계시장에서 식물성 유가공품은 아직까지 많은 편은 아니나 점차 제품들이 다양하게 출

시되며 초기 시장을 형성하고 있는 중임. 더불어 식물성 치즈에 대한 검색량이 증가하고 있고, 연관된 시장인 채식주의자의 증가, 동물성 지방으로 인한 유병율의 증가 등으로 식물성 대체 유가공품에 대한 선호도는 점차 높아질 것으로 예상됨

③ 경쟁기관현황

- 국외에서는 몇 가지 종류의 유제품이 출시되어 판매되고 있음.

제품명	두유에서 만든 요거트	두유구루토	Plain Dairy-Free Yogurt Alternative	Plain Almond Dairy-Free Yogurt Alternative	Plain Yogurt Alternative
사진					
회사	포카	베지타블 하트	silky	silky	daiya
주원료	두유	두유	두유, 사탕수수당, 감자 전분, 펙틴, 삼인산칼슘	아몬드밀크, 사탕수수당, 펙틴	코코넛크림, 완두단백, 감자단백, 치커리추출물, 젖산, 검류, L. plantarum, L. casei
특징	유산균 발효 non-콜레스테롤 특정 보건용 식품으로 인정	유산균 발효 콜레스테롤 0% 설탕 미사용	콜레스테롤, 글루텐, 카라기난 프리 인공색소, 향료 사용 X	콜레스테롤, 글루텐, 카라기난 프리 인공색소, 향료 사용 X	트랜스지방 0g 콜레스테롤 0mg 대두, 글루텐, 땅콩 프리
국가	일본	일본	미국	미국	캐나다

제품명	Creemy sheese	Mozzarella style shreds	Pizza cheese	VEGANE GENIEßER -SCHEIBEN natural	Creamy smooth-cheddar style
사진					
회사	sheese	daiya	violife	simply V	Tofutti
주원료	코코넛오일, 대두농축단백, 젖산, 카라기난	카놀라유, 코코넛오일, 완두단백, 타피오카전분, 잔탄검	코코넛오일, 전분, 변성전분, 올리브농축액	아몬드베이스, 코코넛오일, 전분, 변성전분	팜유, 두부, 대두단백, 말토덱스트린, 옥수수전분, 대두레시틴
국가	영국	미국	그리스	독일	미국

그림6. 국외에서 판매중인 유가공 대체제품

- 미국, 유럽 등에서는 체다, 모짜렐라 등 점차 다양한 종류의 제품들이 판매되고 있지만 이들은 유단백질이 가진 물성, 풍미 특성을 식물성 단백질로 구현할 수 있는 기술이 충분히 제품에 적용되지 않았음. 따라서 식물성 전분을 사용하여 치즈향, 색상을 단순 배합하는 공정에 한정되어 있으므로 본연의 치즈와 비교 시 영양, 풍미, 물성이 저하되어 제품 경쟁력이 떨어지게 됨. 따라서 본 연구에서는 동물성 치즈를 제조하는 발효공정을 적용하되 식물성 단백질이 유단백질과 다르게 구현되는 특성은 신규 물성/풍미 소재로 보완하여 기존 식물성 치즈가 가진 낮은 단백질 함량, 풍미 저하 등의 문제점을 해결하여 소비자 니즈에 부합하는 제품을 개발하고자 함

④ 지식재산권현황

- [유럽] NON-DAIRY RICOTTA CHEESE REPLICIA/2018/특허

견과류 우유를 transglutaminase, *Lactococcus lactis lactis*, *Lactococcus lactis cremoris*를 이용해 응고시킴으로 리코타치즈 대체제품을 만드는 방법임

- [유럽] Effect of milk fat replacement by polyunsaturated fatty acids on the

microbiological, rheological and sensorial properties of fermented milks/1995/논문

본 발명은 발효유 제조 시 유지방 대체재로 오메가3 지방을 이용하여 set-type 제품을 만들어 관능적인 특성을 확인하고, 제조 공정에 농축유청 단백질을 추가하여 물성을 단단하게 만드는 방법에 대한 것임

- [유럽] Preparing vegetable soft/hard cheese products made from soybeans/lupine seeds with natural flavor differentiation by e.g. natural oils and herbs, where oil/fat containing e.g. soybean milk is prepared by emulsifying natural oil/fat/2002/특허
본 발명은 콩이나 루핀에서 추출한 식물성 오일을 이용하여 연성, 경성 치즈를 제조하는 방법에 대한 것임

- [미국] The modification and analysis of vegetable oil for cheese making/2000/논문
본 발명은 콩이나 루핀에서 추출한 식물성 오일을 이용하여 연성, 경성 치즈를 제조하는 방법에 대한 것임

- 전분유래의 하이드로콜로이드를 사용한 특허로 호화된 아밀로스(U.S. 4,608,265 and 4,695,475), 호화되지 않은 입자형 hydroxypropylated, high amylose starch(U.S. 5,486,375), 일반전분 (US5,807,601)을 이용하여 카제인 단백질을 일부 혹은 전량 대체한 유사치즈제품을 제작한 예가 발견되며, Xanthan 혹은 Locust Bean Gum 과 같은 비전분 다당체도 함께 사용하고 있음

II. 연구개발과제의 수행 과정 및 수행 내용

제1세부. 시판 치즈제품 관능품질 연구 및 유형별 치즈 3종 개발

[1차년도 : 시판 치즈제품 관능품질 분석 및 목표 설정]

1. 연구개발 수행과정

1) 시판 동물성, 식물성 조사 및 샘플 선정

- 시판되는 동물성, 식물성치즈 중 판매량이 높고 인지도가 있는 유명 제품으로 원료 및 특징을 조사하여 분석 샘플로 선정하였음 (표A-1,A-2,A-3,A-4)

- 샘플명은 아래와 같은 순서로 표기함

[치즈 type(BS=Block Slice, BC=Block Cube, S=Spread, D=Dipping)_ 동식물성 (A=animal, P=plant)_ 치즈 종류(CH=Cheddar, OR=Original, CG=Cheddar와Gouda, P=Parmesan, M=Mozzarella, CR=Cream_ 제조사 첫2글자]

표A-1. Block slice type 치즈 제품

샘플명	BS_A_CH_SE	BS_P_CH_DA	BS_P_CH_FO	BS_P_CH_VI	BS_P_OR_FI
품미특징	- 체다 품미 - 가공치즈 (자연치즈80%)	- 강한 체다품미	- 마일드 체다품미 - 아메리칸스타일	- 숙성 체다치즈 품미	- 크림리한 품미 (오리지널 치즈)
주요원료	자연치즈(체다, 원유, 식염, 유산균건조물, 우유응고효소), 청계수, 산도조절제, 파프리카추출색소	청계수, 코코넛오일, 감자전분, 타피오카 전분, 천연색소, 소금, 삼인산칼슘 등	청계수, 코코넛오일, 변성전분, 감자전분, 소금, 천연향 등	청계수, 코코넛오일, 변성전분, 전분, 소금, 숙성체다향 등	청계수, 코코넛오일, 변성옥수수, 감자 전분, 발효두부 등

표A-2. Block cube type 치즈 제품

샘플명	BC_A_CH_AL	BC_A_CH_PA	BC_A_CH_SC	BC_A.CG_SE	BC_P.P_VI	BC_P.M_VI
품미특징	- 마일드 체다 (영국) - 자연치즈	- 마일드 체다 (미국) - 자연치즈	- 마일드 체다 (미국) - 자연치즈	- 체다와 고다 품미 - 가공치즈 (자연치즈80%)	- 파마산 품미	- 모짜렐라 품미
주요원료	우유, 소금, 배양액, 렌넷, 안나토 색소	우유, 배양액, 청계수, 렌넷, 안나토색소	우유, 치즈칼처, 청계수, 효소, 수용성안나토	자연치즈, 유청분말, 조철제	청계수, 전분, 변성전분, 산도 조절제	청계수, 코코넛오일, 전분, 변성전분, 소금, 모짜렐라향 등

표A-3. Spread type 치즈 제품

샘플명	S_A_CR_PH	S_P_CR_DA	S_P_CR_TO	S_P_CR_KI	S_P_CR_FO
풍미특징	- 부드러운 크림치즈 (범용/인기 제품) - 자연치즈99%	- 달콤함 크림치즈향	- 크림치즈 풍미 약함 - 부드러운 질감	- 크림치즈 풍미	- 크림치즈 풍미 약함
주요원료	자연치즈(우유, 크림, 무지유고형분, 스타터 컬처), 소금, 로커스트 풍점 등	청계수, 코코넛오일, 타피오카전분, 카놀라유, 아자열매, 올리브, 감자전분, 분리원두단백, 트린, 대두단백, 두부, 젓산 등	물, 압착천연오일(대두, 아몬드우유, 소금, 효소, 식초, 잔탄검, 로커스트 풍점, 컬처 등	이론드우유, 소금, 효소, 청계수, 팜유, 대두유, 이눌린, 대두, 대두단백, 아가베시럽 등	청계수, 팜유, 대두유, 이눌린, 대두, 대두단백, 아가베시럽 등

표A-4. Dipping type 치즈 제품

샘플명	D_A_CR_BE	D_A_CH_FR
풍미특징	- 크림미한 치즈 풍미	- 마일드 체다풍미의 딥소스
주요원료	수화탈지유, 치즈, 버터, 미네랄농축액, 유단백 등	청계수, 탈지우유, 카놀라유, 아세틸인산이전분, 체다치즈, 말토덱스트린, 천연치즈향, 크림, 우유, 등

2) 시판 동물성, 식물성 치즈 제품(Block, Spread, Dipping)의 관능품질 분석

① 전자코 분석

- 전자코(Heracles II, Alpha MOS)는 Gas chromatography 기반의 기기로 샘플간 향 패턴/강도 차이를 MTX-5 column 및 flame ionization detector로 분석하며 library를 바탕으로 차이가 발생하는 원인성분을 유추할 수 있도록 data를 제시함
- 하기의 조건으로 분석 실시하였으며 Block type의 경우만 약 5x5x5mm³이하 크기로 세절하여 샘플링 하였음
 - (가) 샘플양 1g
 - (나) 주입구 온도 200℃
 - (다) 유속 30 ml/min
 - (라) Acquisition duration 340초

② 맛센서(전자혀) 분석

- 맛센서(α-Astree, Alpha MOS)는 인간이 인지하는 기본 맛인 신맛(SRS), 짠맛(STS), 쓴맛(BRS), 단맛(SWS)외에 감칠맛(UMS), 미지의 맛(GPS, SPS)을 나타내는 장비로 샘플의 맛패턴/강도 차이를 분석함
- 시료의 전처리 방법은 다음과 같으며 단일샘플 분석 후 센서 행균 과정을 진행하였음
 - (가) Block type만 약 3x3x3mm³ 이하 크기로 세절하였고, Spread, Dipping type은 제품 특성상 세절 없이 사용함
 - (나) 0.5g으로 샘플링한 후 100배 희석배수로 60℃ 온수를 가한 후 1분간 교반(vortex)함
 - (다) 85-87℃ 열수에서 30분간 반응시키고 1시간동안 sonication하여 샘플을 추출 및 용해시킴
 - (라) 여과지(No.2, Advantec)로 여과한 후 분석에 사용함

3) 타겟제품 선정

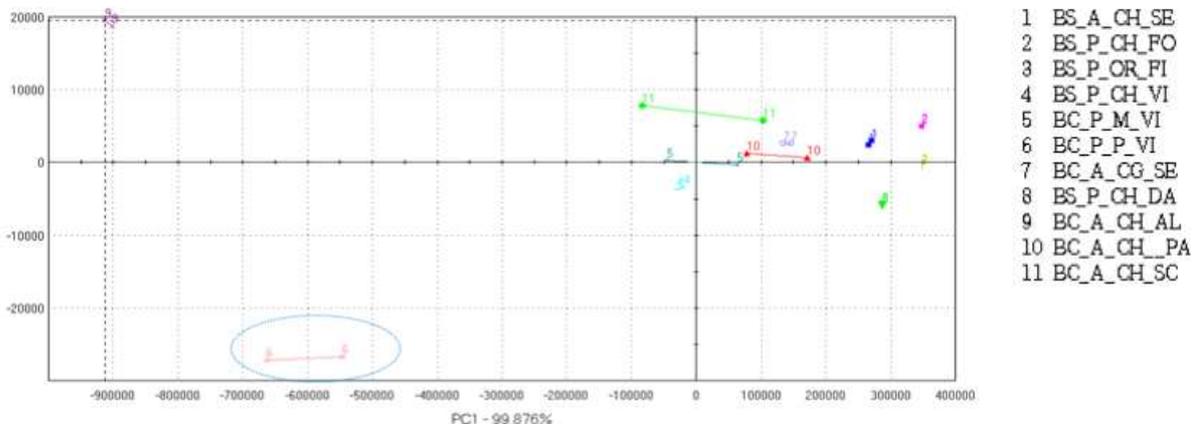
- 시판 제품 중 목표하는 타겟을 선정하기 위해 치즈제품의 관능평가를 진행하였음. 평가 전 유의적 상대 비교를 위해 1세트당 샘플 3개로 제한하였으며 연구원, 마케팅 평가를 통해 1차 스크리닝을 진행함
- Block type의 경우 샘플수가 11종으로 가장 많았기 때문에 먼저 체다 풍미가 아닌 제품은 제외하였으며 동물성 치즈 3종과 식물성치즈 3종을 1차 선정하였음. Spread type은 1차 평가에서 모든 평가자들의 의견이 일치할 정도로 품질차이가 확인했으므로 동물성 치즈1종, 식물성치즈 1종을 선정하고 추가 평가는 진행하지 않았음. Dipping type은 식물성으로는 시판되는 제품을 찾아볼 수 없었고 동물성은 치즈풍미가 다른 2종이었으므로 범용성을 고려하여 체다 1종을 선정하였음
- 1차 선정된 Block type 치즈의 타겟 선정은 개발제품의 품질수준 평가가 아니라 소비자 입장에서 치즈 선호도에 대한 판단이므로 순위법을 실시하였음. 식품 연구원 15명을 대상으로 실시하였으며 가장 선호하는 치즈제품부터 낮은 제품까지 1,2,3위를 평가하였고 해당 결과 및 기기분석 데이터를 참고하여 동물성 1종, 식물성 1종을 최종 타겟으로 선정하였음

2. 연구개발 수행내용

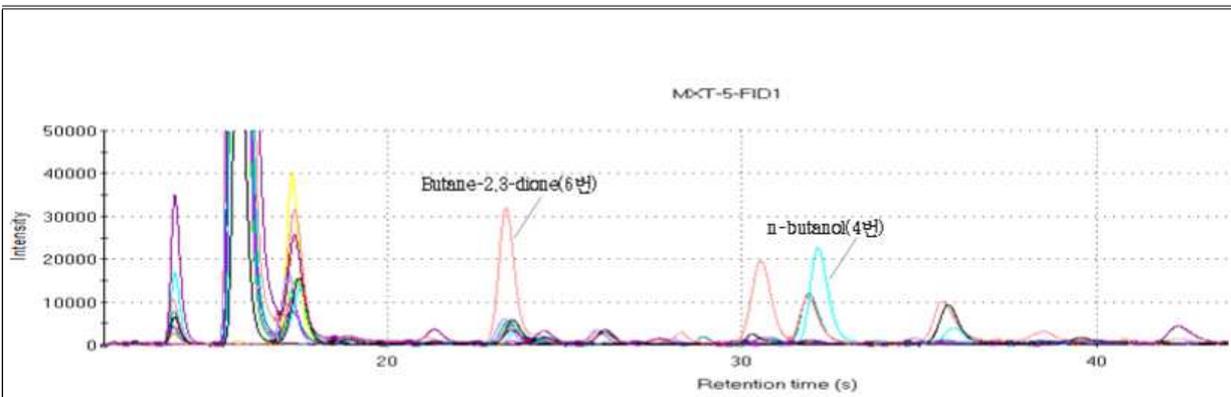
1) 시판 동물성 및 식물성 치즈 제품(Block, Spread, Dipping)의 향 분석

① Block type 치즈 제품 전자코 분석 결과

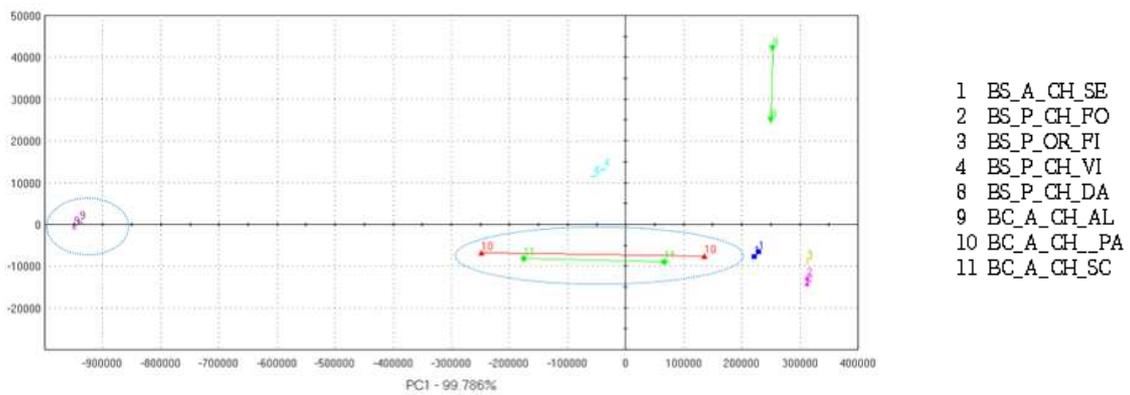
- Block type의 cube, slice 치즈제품 11종을 종합적으로 분석한 결과, PCA결과(그림A-1)에서 6번(BC_P_M_VI) 샘플이 타 샘플과는 확연히 다른 향 패턴을 나타냄. 6번 샘플은 파마산치즈 향 type으로 체다 보다 독특하고 강한 치즈풍미가 있으므로 다른 향 패턴의 결과가 나타났으며 특히 Butane-2,3-dione 성분에서 큰 함량차이가 있는 것으로 확인됨 (그림A-2)
- Block type에서 체다 풍미에 속하는 치즈제품만 살펴본 결과, PCA에서 가장 큰 향 패턴 차이는 9번(BC_A_CH_AL) 동물성(영국)치즈였으며 가공치즈가 아닌 자연치즈였기 때문에 관능평가에서도 자연치즈 특유의 숙성풍미가 가장 강하게 나타남. 또한, 동물성치즈 계열은 acetaldehyde, Butane-2,3-dione와 같은 성분이 주로 확인되었으며 식물성치즈 계열은 4(BS_P_CH_VI), 8번(BS_P_CH_DA) 샘플의 향 강도가 강했으며 동물성치즈에는 없는 다른 peak들이 확인되어 원료 또는 천연/합성향에서 기인되는 풍미가 있을 것으로 판단됨 (그림A-3, 표A-5)



그림A-1. Block type 치즈제품 PCA결과



그림A-2. Block type 치즈제품 크로마토그램 결과



그림A-3. Block type 중 체다치즈 PCA결과

표A-5. Block type 중 체다치즈 크로마토그램 결과

Compound	Sensory description	Peak area
Acetaldehyde	Fruity, Pungent	9>11>4>10
Butane-2,3-dione	Butter, caramelized	8,10>9>
n-butanol	Cheese, Fermented	4>>
Pentan-2-one	Fruity	8>4
propylenglycol	Caramelized	9>
3-Heptanone	Sweet, creamy	8>4
(Z)-4-heptenal		
Myrcene	Balsamic, Sweet	4>>

② Spread type 치즈 제품 전자코 분석 결과

- Spread type의 치즈제품을 분석한 결과(표A-6), 치즈 및 크림함량과 연계된 butan-2-one 성분 등은 동물성 크림치즈인 1번(S_A_CR_PH)에서 가장 높게 나타났으며 이와는 다른peak들이 2번(S_P_CR_DA)에만 특이적으로 확인됨

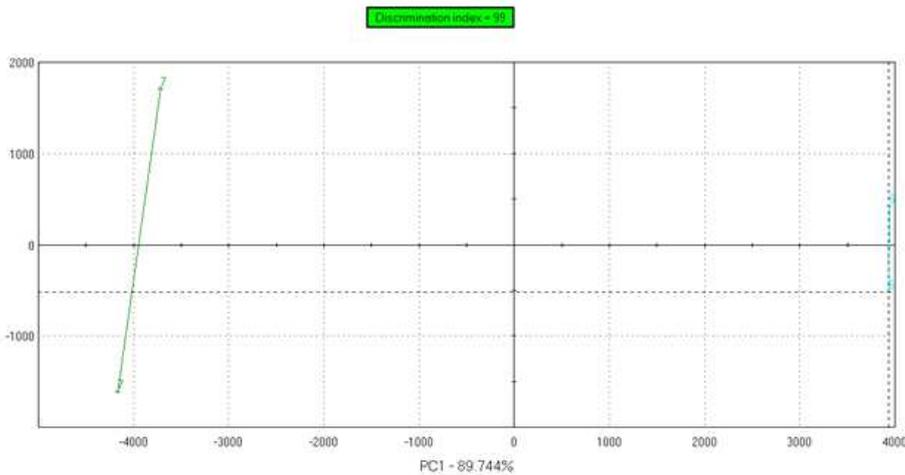
표A-6. Spread type 치즈제품 크로마토그램 결과

Compound	Sensory description	Peak area
butan-2-one	Cheese, butter	1>2>3>4
butane-2,3-dione	creamy	
Propyl propanoate	apple	2>>
Hexanal	Cheese Fruity	
2-methylpropanoic acid		
Butanoic acid	Cheese	

1 S_A_CR_PH
2 S_P_CR_DA
3 S_P_CR_FO
4 S_P_CR_TO

③ Dipping type 치즈 제품 전자코 분석 결과

- Dipping type의 치즈제품을 분석한 PCA결과(그림A-4)에서는 두 샘플간 향 패턴이 다르게 나타났으며 크로마토그램(표A-7)에서는 버터, 크리미와 연계된 성분이 크림치즈풍미인 1번 (D_A_CR_BE) 제품에서만 특징적으로 높게 나타났고 마일드체다 디핑소스인 2번 (D_A_CH_FR)은 이와는 다른 peak의 성분들이 확인됨. 이러한 결과는 치즈풍미가 크림, 체다로 서로 다른 종류이며 관능에서도 향 차이가 인지됐으므로 기기분석에서도 동일한 경향으로 나타남



그림A-4. Dipping type 치즈제품 PCA결과

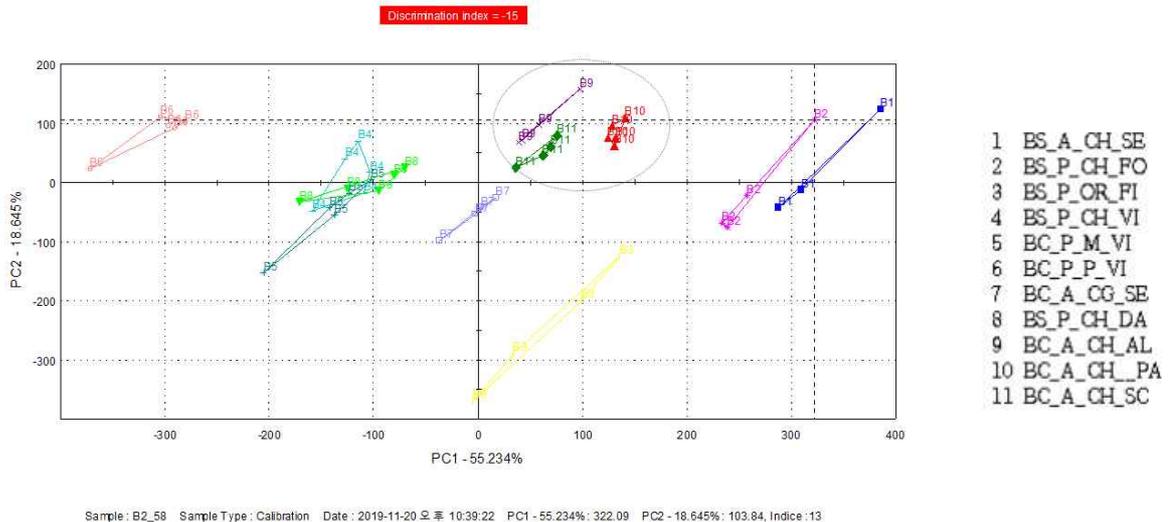
표A-7. Dipping type 치즈제품 크로마토그램 결과

Compound	Sensory description	Peak area
Acetaldehyde	Pungent, Fruity, Fresh	2>>
butan-2-one	Butter, Cheese, Creamy	1>>
butane-2,3-dione		
Ethyl Acetate		
3-Heptanone	Sweet, Fruity, Cheese	2>>
isoamyl acetate		
pentanoic acid		

2) 시판 동물성 및 식물성 치즈 제품(Block, Spread, Dipping)의 맛 분석

① Block type 치즈 제품 맛센서 분석 결과

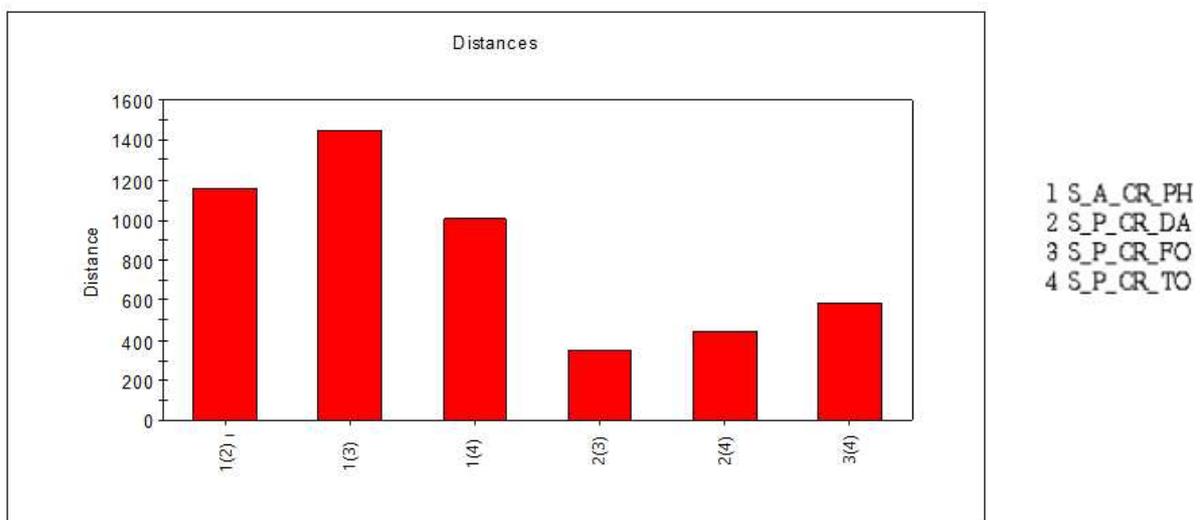
- Block type의 cube, slice 치즈제품을 분석한 PCA(그림A-5) 및 Distance(시료별 유사정도) 결과를 살펴봤을 때 가장 높은 유사도를 나타낸 샘플은 원료조성이 비슷하며 미국으로 제조국이 동일한 10,11번(BC_A_CH_PA, 11 BC_A_CH_SC)으로 확인됨. 전자코와는 달리 9번 (BC_A_CH_AL) 제품도 10,11번과 유사도가 높았는데 맛센서의 경우 주로 수용성성분을 센서가 감지하므로 원료조성이 다소 영향을 끼치는 것으로 추정됨
- 또한, 종합적인 관능품질의 적합성은 전자코, 관능평가와 함께 판단해야 할 것으로 사료됨



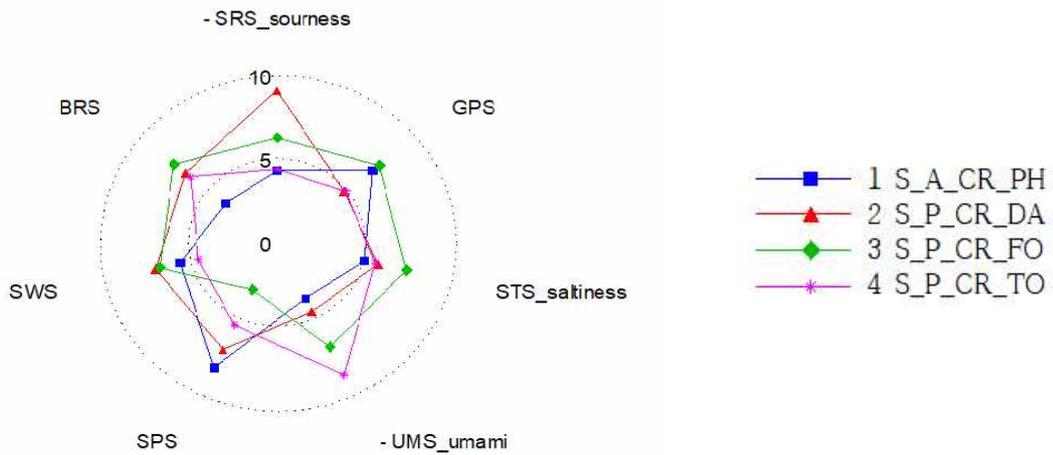
그림A-5. Block type 치즈제품 PCA결과

② Spread type 치즈 제품 맛센서 분석 결과

- Spread type 치즈 제품의 유사성을 알아보기 위해 Distance결과(그림A-6)를 살펴보았을 때 식물성 크림치즈인 2,3,4번(S_P_CR_DA, S_P_CR_FO, S_P_CR_TO)이 유사도가 높았고 동물성 크림치즈는 다른 맛 패턴을 보였음
- 세부적인 맛 차이를 확인하기위해 taste screening (그림A-7)을 살펴본 결과 1번 (S_A_CR_PH) 동물성 크림치즈가 식물성에 비해 쓴맛이 적은 경향이 있었으며 미지의 맛 항목이 확인됨



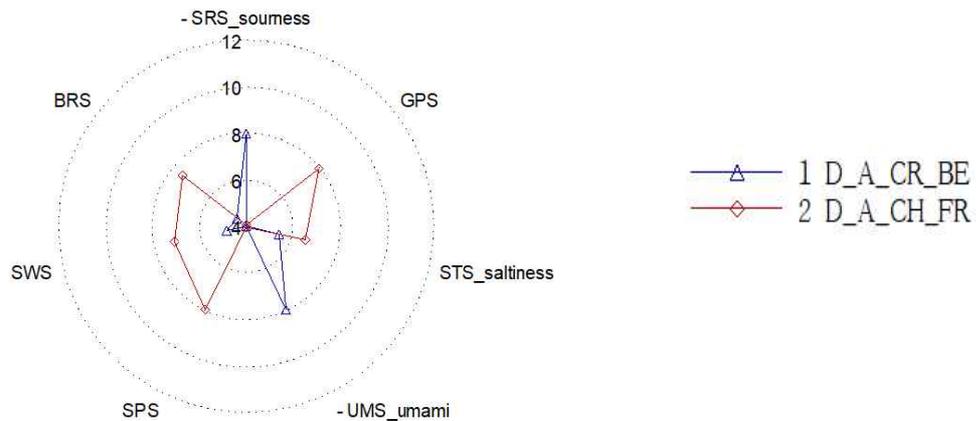
그림A-6. Spread type 치즈제품 PCA결과



그림A-7. Spread type 치즈제품 Taste screening

③ Dipping type 치즈 제품 맛센서 분석 결과

- Dipping type의 경우 치즈 풍미가 다른 제품이므로 PCA결과(생략) 및 taste screening (그림A-8)에서 맛 패턴이 매우 다른 것으로 나타남. 1번(D_A_CR_BE) 제품은 크림치즈 풍미로 신맛, 감칠맛이 높았으며 체다치즈 풍미의 소스인 2번(D_A_CH_FR) 제품은 짠맛, 쓴맛, 단맛이 비교적 높은 것으로 확인됨



그림A-8. Dipping type 치즈제품 Taste screening

3) 관능품질 목표 설정

① Block type 치즈 제품

- 국내에서 판매되는 Block type 중 가장 대중적이고 범용적인 치즈는 체다슬라이스이며 본 과제에서도 식물성 고기, 계란의 연계성과 상품성을 감안하였을 때 체다풍미의 식물성 치즈 개발을 목표로 하고자 함

- 동물성 치즈 평가 시 BC_A_CH_AL인 영국치즈가 미국치즈인 BC_A_CH_SC 보다 치즈 특유의 숙성향이 강했으며 전자코에서도 유사한 경향을 확인하였음. 하지만 선호도에서는 오히려 치즈향이 강한제품은 범용으로 익숙한 맛이 아니다, 햄버거등 요리활용 시 향이 강해서 조화롭지 않다 등의 이유로 BC_A_CH_SC 순위가 가장 높게 평가되었음. 따라서 관능품질의 타겟은 향/맛 패턴 및 성분의 유사성이 최대 BC_A_CH_SC, 최소 BS_P_CH_VI 로

하며 해당 목표치는 시판되는 식물성치즈보다 품질력이 우수한 수준이라고 볼 수 있음

- 타겟제품의 풍미 특성을 살펴보면 BC_A_CH_SC 제품은 향의 경우 butane-2,3-dione 성분이 비교적 많이 확인되었으며 맛센서는 동물성 자연치즈 제품간 유사한 경향을 나타냄. BS_P_CH_VI는 식물성치즈 중에서 선호도가 가장 높았으며 n-butanol, pentan-2-one 등의 성분이 확인되고 타 제조사의 식물성 체다치즈 제품과 맛 패턴이 유사함
- 맛센서 결과를 관능평가와 연계해서 살펴보면 원료 혼합인 식물성과 달리 동물성 치즈는 단백질, 유지가 발효로 인해 숙성, 분해되면서 기인되는 중미, 후미의 감칠맛이 있었으므로 제품개발 시 이러한 부분을 참고하여 관능품질 수준을 높여야 함

② Spread type 치즈 제품

- Spread type의 용도는 베이글, 스낵 등에 발라서 먹는 형태가 가장 일반적임. 해당 용도 및 기기분석, 선호도를 참고하였을 때 인지도 및 판매량이 가장 높은 S_A_CR_PH를 최대, 식물성 크림치즈 중에서 풍미가 비교적 강해 선호도가 높았던 S_P_CR_DA를 최소 타겟 제품 수준으로 함
- 전자코 분석결과에서 Spread 4종에 공통적으로 검출된 butan-2-one, butane-2,3-dione 성분은 크림치즈와 연관된 향 특성이므로 개발제품에서도 구현할 수 있도록 해야함

③ Dipping type 치즈 제품

- 국내/외에 시판되는 식물성 Dipping type 치즈는 찾아보기 어렵지만 스낵, 피자 등의 연계 활용성이 높아 개발이 요구됨. 나초에 찍어먹는 형식의 체다치즈가 보다 범용적이므로 체다 풍미인 D_A_CH_FR를 타겟으로 설정함
- D_A_CH_FR의 향 성분은 acetaldehyde, 3-heptanone 등이 확인되었고 맛센서에서는 짠맛, 쓴맛, 단맛이 비교적 높은 것으로 나타났는데 딥핑소스 특성상 체다를 포함한 다양한 원료에서 기인한 것으로 판단됨

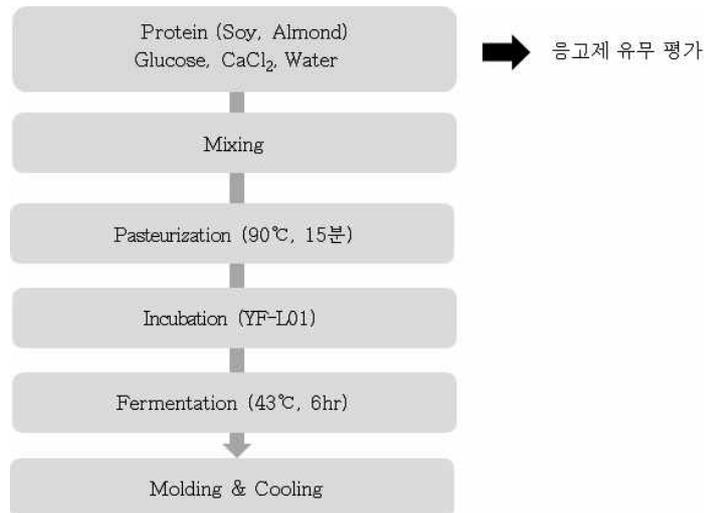
[2차년도 : 치즈풍미소재개발 및 Lab scale 식물성치즈 3종 개발]

1. 연구개발 수행과정

1) 식물성치즈 유형별 제조방법 확립

① 응고제 유무에 따른 식물성 단백질 발효액 평가

- 1협동에서 1차 선정된 대두, 아몬드 발효액 단품 평가 시 치즈 제품에서 식감을 저하시키는 분말감 감소가 필요함. 따라서 응고제 유무에 따른 차이를 검증하기 위해 그림A-9 공정으로 단백질 발효액 제조 후 6시간 후 pH 측정 및 단품평가를 실시함



그림A-9. 식물성 단백질 발효액 제조 공정

② Block type 식물성치즈 제조

가. 단백질 발효액 활용 Block type 기본 배합비 정립

- 단백질 발효액을 그림A-9의 공정으로 제조한 후 50mesh 여과한 응고물을 식물성 치즈 제조에 활용함

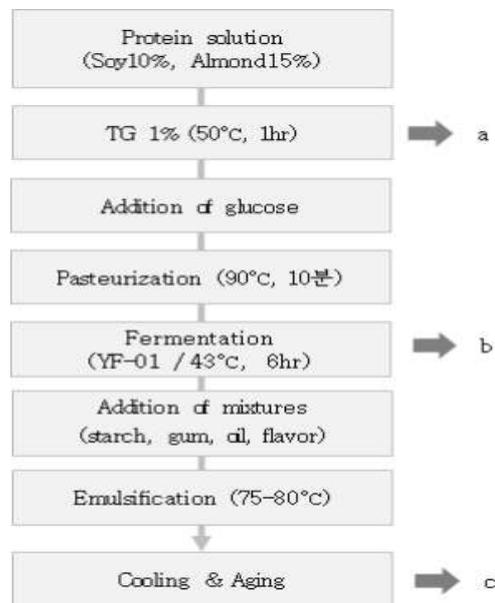
- 고체화 형태로 식물성 치즈를 제조하기 위해 상기 단백질 발효액에 식물성 전분 및 검류를 1차 선정하여 조직감에 미치는 영향을 살펴보았으며 풍미 성분은 식물성으로 최소한의 치즈 풍미를 발현할 수 있는 원료들로 설정함. 표A-8의 처방으로 원료를 배합한 후 가열 및 혼합, 냉각하여 Block type으로 제조하여 조직감, 관능 및 단백질 함량을 평가함

No.	Fermented solution	Gum	Starch	Yeast	Lactic acid
1	55	0.7	15	0.1	0.4
2	45	0.2	25	0.1	0.1
3	45	0.2	15	0.6	0.1
4	55	0.7	25	0.1	0.1
5	45	0.7	25	0.6	0.1
6	45	0.2	25	0.6	0.4
7	45	0.7	15	0.1	0.1
8	55	0.2	25	0.6	0.1
9	45	0.7	25	0.1	0.4
10	55	0.2	15	0.6	0.4
11	55	0.7	25	0.6	0.4
12	55	0.7	15	0.6	0.1
13	45	0.2	15	0.1	0.4
14	45	0.7	15	0.6	0.4
15	55	0.2	25	0.1	0.4
16	55	0.2	15	0.1	0.1

표A-8. Block type 실험 배합비

나. 단백질 가교결합 적용 단계 검토

- 동물성 치즈는 렌넷 공정에 의해 겔 형성이 나타나 제품에도 탄력있고 단단한 식감이 구현됨. 식물성 단백질의 겔화 특성을 구현할 수 있는 효소는 TG(Transglutaminase)로 글루타민과 라이신의 공유결합을 촉매하여 견고한 단백질 가교결합을 형성하도록 함. 따라서 이러한 원리를 활용하여 겔화 특성이 제품에 최적으로 활용될 수 있는 공정을 검토함
- 식물성단백에 TG를 처리하는 조건은 위탁기관 예비실험을 참고하였고 TG처리 공정 적용 단계에 대한 효과를 확인하기 실험을 그림A-10와 같이 진행함. 식물성 전분, 오일, 풍미성분의 배합비는 표A-1 참고하여 설정
- 제조 단계에서 변수에 대한 효과를 평가하였는데 그림A-10 a에서는 단백질 종류별 TG결합 특성, b는 단백질 TG 처리 후 발효하였을 때의 단품 특성, c는 단백질 TG 처리 및 발효 후 Block type 제품 특성을 살펴봄



그림A-10. 단백질 가교단계 적용 공정

③ Spread type 식물성치즈 제조

- 식물성치즈 유형 중 Spread type은 Block 보다 크림함량이 높아 잔여감 없이 입에 녹는 식감과 조리 활용도 측면에서 퍼짐성이 중요한 특성임
- 1협동의 발효공정과 2협동의 원료를 참고하여 발효풍미는 구현하고 입에 녹는 식감을 강화하고자 함

가. 아몬드단백 발효액 활용 Spread type 제조실험

- 아몬드단백 발효액 처방 및 공정은 Block type 제조방법이 최적이므로 동일하게 적용하였고 발효에 의해 생성된 응고물은 응고제만을 사용하여 응고물을 제조한 경우보다 인위적이지 않은 자연유래 발효풍미가 구현되어 선호됨
- 아몬드단백 발효액에 크림리한 풍미와 스프레드 치즈 물성을 증대시키기 위해 표A-9와 같이 기본 배합비를 설정하고 카라기난 첨가 유무에 따라 원료를 배합한 후 가열(70-75°C) 및 고속유화(3000rpm, 8분)하여 Spread type 치즈를 제조함

표A-9. 아몬드단백 발효액 적용 Spread type 제조

Ingredient	a (%)	b (%)
Fermented solution (Almond)	65.0	64.3
Coconut oil	29.7	29.4
Emulsifier	5.3	5.2
Carrageenan	0.0	1.0
Total	100.0	100.0

나. 두유 발효액 활용 Spread type 제조실험

- 두유 발효액은 먼저 주원료인 시판 무가당 두유의 수분, 조단백 분석을 진행한 후 원료의 고형분 및 유수분리 특성을 감안하여 발효공정을 진행함. 두유 900g에 glucose 9g을 넣은 후 혼합 및 살균(90℃, 10분)하고 스타터 YF-L01 0.01%를 접종함. 43℃, 6시간 동안 배양하고 3500rpm, 10분의 조건으로 원심분리하여 두유 발효액을 제조함
- 표A-9 카라기난 첨가구를 기본배합비로 하여 가열(70-75℃) 및 고속유화(3000rpm, 8분)하여 Spread type 치즈를 제조함. Spread type을 제조한 후 TPA 및 영양성분 등의 품질평가를 진행하였음

표A-10. 시판 무가당두유의 이화학성분 결과

	Soy milk (%)
Moisture	89.69
Crude protein	4.18

④ Dipping type 식물성치즈 제조

- Dipping type은 범용성이 높은 체다 풍미를 구현하고 안정된 에멀전 및 소스 특유의 매끈하고 밀도감 있는 소스물성을 재현하고자 함
- 식물성치즈 유형 중 Dipping type은 체다치즈 풍미의 강도가 높고 시판 동물성 체다 치즈 소스 처방분석 시 치즈 함량이 높은 유형으로 맛과 향의 구현이 매우 중요함

가. 체다 풍미소재 개발

- 맛의 발란스를 top, middle, base로 구성하여 자연치즈 풍미를 발현하는 것으로 설계한 후 비건치즈소스 레시피 및 단품 평가를 통해 각 단계에 적합한 원료를 스크리닝 함. 특히 top의 경우 치즈향 종류 및 강도에 따라 풍미가 다양하여 전자코 분석을 통해 향 패턴 및 강도를 확인하였음

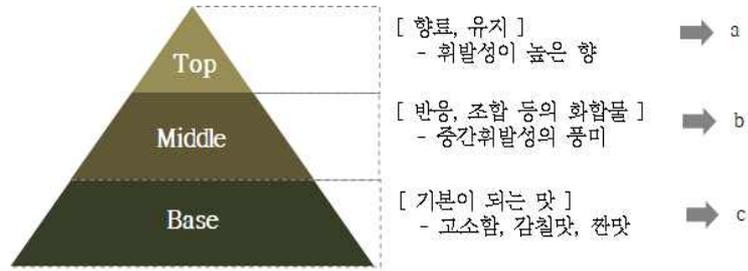


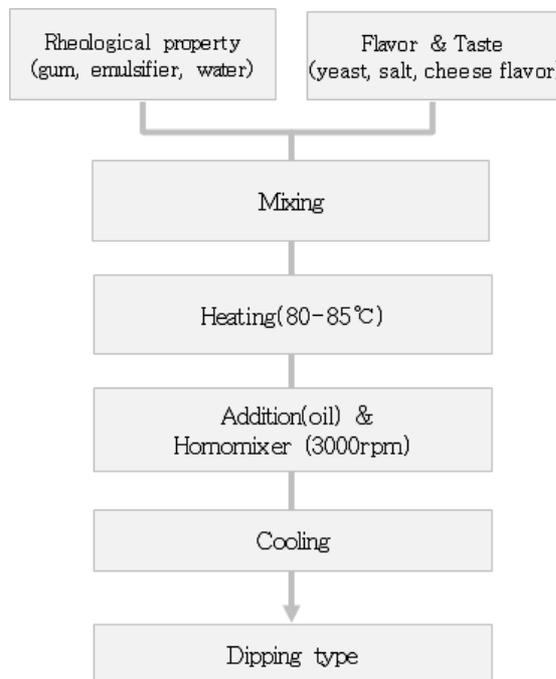
그림 A-11. 식물성 치즈풍미의 설계

나. Dipping type 기본배합비 정립

- 2협동 실험에서 양호한 결과를 나타낸 구아검을 적용하고 선정된 체다 풍미소재를 참고하여 정제수 50~80%, 식물성유지 15~35%, 유화제 0.5~7%, 검류 0.4~4%로 주 원료의 배합을 조정하는 예비실험을 진행함
- 외관으로 유분리가 발생하지 않고 체다 풍미가 구현되는 기본 배합비를 하기와 같이 설정하였으며 그림 A-12의 방법으로 견본을 제조한 후 품질평가 함

표A-11. Dipping type 기본배합비

Ingridient	(%)
Water	52.6
Plant based oil	32.0
Emulsifier	6.0
Flavor & Taste	6.0
Guar gum	3.0
Carotrne	0.4
Total	100.0



그림A-12. Dipping type 식물성치즈 제조과정

2) 식물성치즈 품질분석

① 단백질 발효액 분석

가. pH 측정

- pH meter는 시료 측정 전 buffer solution(pH 4.00, 7.01, 9.21)을 사용하여 보정하고 시료 50g을 유리전극이 잠기도록 한 후 pH meter(METTLER)로 측정함

나. 전자코 분석

- 전자코(Heracles II)는 Gas chromatography 기반의 기기로 샘플간 향 패턴/강도 차이를 분석하며 library를 바탕으로 차이가 발생하는 원인성분을 유추할 수 있도록 data를 제시함
- 분석은 샘플 1g/vial, Injector temperature 200℃, Injector vent flow 30ml/min의 조건으로 실시함

② 치즈향 소재 전자코 분석

- Dipping용 체다 풍미에 적합한 비건 치즈향을 선정하고자 전자코를 실시하여 향 5종의 패턴 및 성분을 확인하고자 함. 향 강도가 높은 샘플임을 감안하여 예비실험 후 분석 조건을 다음과 같이 설정함
- 샘플 0.05g/vial, 주입구 온도 200℃, 유속 30ml/min의 조건으로 분석 실시함

③ 식물성치즈 Lab 시제품 영양성분 분석

가. 열량

- 식품의 에너지는 에트워터 계수를 사용하여 검체 100g 중의 조단백질, 조지방 및 탄수화물 또는 당질의 함량에 단백질 지방 9, 당질 4의 계수를 곱하여 각각의 에너지를 킬로칼로리(Kcal)단위로 산출하고 그 총계로 나타냄
- 단위는 킬로칼로리 또는 킬로주울(KJ)로 하고 킬로칼로리 단위에서 킬로주울 단위로의 환산은 $1\text{Kcal} = 4.184\text{KJ}$ 과 같음

나. 조단백

- 식품공전 제 2020-98호 2.1.3.1 총질소 및 조단백질 분석방법 중 Auto Kjeldahl법에 준하여 실시함

다. 조지방

- 식품공전 제 2020-98호 2.1.5.1.2 산분해법 분석방법에 준하여 실시함

라. 탄수화물

- 식품공전 제 2020-98호 2.1 일반성분 시험법에 준하여 실시함

마. 콜레스테롤

- 식품공전 제 2020-98호 2.1.5.5 콜레스테롤 분석방법에 준하여 실시함

바. 포화지방, 트랜스지방

- 식품공전 제 2020-98호 2.1.5.4 지방산 분석방법에 준하여 실시

2. 연구개발 수행내용

1) 응고제 유무에 따른 식물성 단백질 발효액 평가 결과

- 응고제(CaCl_2) 첨가 유무에 따라 대두단백 및 아몬드단백 발효공정에 미치는 영향을 평가하기 위해 6시간 후 pH를 측정한 결과, 응고제에 따른 발효종료 시점의 pH는 유의적 차이가 없었음
- 단품 평가의 경우 아몬드단백 발효액이 대두단백 발효액 보다 분말감이 적었으며 응고제를 첨가하지 않은 샘플의 식감이 가장 양호함

표A-12. 식물성단백질 발효액 pH 측정 결과

Soy protein	Addition of CaCl ₂	6.35
	No additive	6.60
Almond protein	Addition of CaCl ₂	4.77
	No additive	4.77

2) Block type 식물성치즈 개발

① Block type 기본배합비 정립

- 단백질발효액, 젤란검, 감자전분 등 원료 배합에 따라 Block type 식물성치즈 형태 및 물성에 영향을 미치는지 평가를 진행하였으며 TPA는 위탁기관에서 1차년도 확립된 조건에 따라 분석을 진행함
- 경도는 Block type의 정량적 지표로 형태를 유지하는데 중요한 역할을 하는데 결과값이 다양하게 나타나 변수로 설정한 해당 원료가 단단함에 미치는 영향이 크다고 판단됨. 또한, 8번 샘플은 응집력은 다소 낮지만 경도는 7.45N으로 16종의 배합비 중 목표치에 가장 근접한 형태를 구성하는 기본 배합비인 것으로 확인됨
- 하지만 관능평가에서 16종 샘플 모두 분말감이 높고 부서지는 식감이 나타나며 단백질 함량이 4% 수준으로 목표치보다 낮아 전분류 배합비를 감소시키고 단백질 유래의 탄성있는 조직감을 갖춘 원료의 적용이 필요함

표A-13. Block type 배합비에 따른 TPA 분석결과

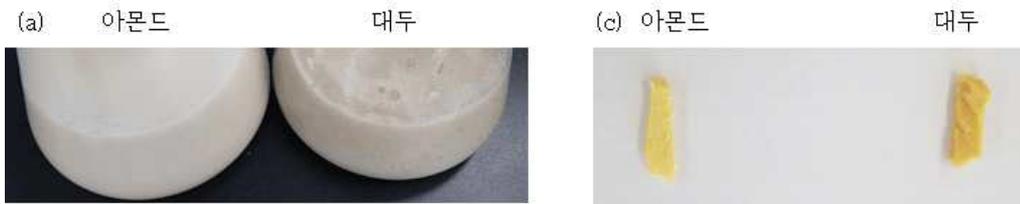
No.	Fermented solution	Gum	Starch	Yeast	Lactic acid	Hardness(N)	Cohensiveness
1	55	0.7	15	0.1	0.4	4.80±0.33	0.14±0.02
2	45	0.2	25	0.1	0.1	2.08±0.59	0.14±0.02
3	45	0.2	15	0.6	0.1	2.80±0.11	0.17±0.01
4	55	0.7	25	0.1	0.1	2.53±0.54	0.13±0.01
5	45	0.7	25	0.6	0.1	4.44±0.21	0.14±0.02
6	45	0.2	25	0.6	0.4	2.90±0.24	0.14±0.02
7	45	0.7	15	0.1	0.1	2.93±0.30	0.14±0.01
8	55	0.2	25	0.6	0.1	7.45±0.85	0.10±0.02
9	45	0.7	25	0.1	0.4	4.33±0.32	0.13±0.02
10	55	0.2	15	0.6	0.4	1.76±0.23	0.15±0.02
11	55	0.7	25	0.6	0.4	3.01±0.78	0.12±0.01
12	55	0.7	15	0.6	0.1	3.50±0.13	0.13±0.01
13	45	0.2	15	0.1	0.4	4.24±0.29	0.10±0.01
14	45	0.7	15	0.6	0.4	1.31±0.04	0.18±0.02
15	55	0.2	25	0.1	0.4	2.81±0.15	0.15±0.01
16	55	0.2	15	0.1	0.1	4.57±0.28	0.11±0.01



그림A-13. Block type 배합비에 따른 성상

② 단백질 가교결합 적용 단계 검토

- Block type 기본 배합비(표A-1)를 바탕으로 관능 품질 및 단백질 함량을 증대하고자 식물성 단백질에 TG처리를 검토함
- 분리대두단백, 아몬드단백을 각각 TG 반응 후 발효 진행하여 단품 평가한 결과(그림 A-14), 분리대두단백의 경우 TG반응에 따라 점성이 높아지고 겔화되는 특성이 나타났지만 오히려 발효 후 겔화 특성이 감소되는 현상이 나타남. 아몬드단백은 TG처리에 따른 물성 변화 및 겔화 특성이 나타나지 않았으며 두 가지 처리구 모두 TG처리 유무에 따라 발효 pH에 미치는 유의적 영향은 없었음
- Block type 식물성 치즈로 제조한 결과에서는 분리대두단백, 아몬드단백 모두 TG처리에 따른 관능 및 조직감 개선효과는 나타나지 않음



그림A-14. TG처리 후 성상(a) 및 Block type 제조 샘플(c)

표A-14. 단백질 종류 및 TG처리에 따른 pH변화

구분		0 h	6h
분리대두단백 (10%)	TG 무처리	7.26	6.35
	TG 처리	7.03	6.22
아몬드단백 (15%)	TG 무처리	6.14	4.77
	TG 처리	6.00	4.70

③ Block type 식물성치즈 개발 및 품질평가

- 상기 결과에 따라 pH 저하 경향 및 응고물 단품 평가를 고려하였을 때 발효는 아몬드단백이 적합하였고 TG처리에 따른 겔화특성은 분리대두단백이 양호한 것으로 확인됨
- 따라서 단백질 종류에 최적화된 공정을 그림 A-15과 같이 정립하고 단품 특성을 평가한 결과 아몬드단백 발효물은 38% 수율로 농후한 크림치즈 물성이 나타났으며 전자코 분석을 통해(그림A-16) 발효공정 적용에 따라 치즈와 연관된 향 성분인 butane-2,3-dione, butan-2-one의 성분이 발효 전보다 증가한 것을 확인함. TG처리한 대두단백물은 푸딩 유사 물성의 겔화 특성이 유지됨
- Block type의 식물성치즈로 제조한 경우에도 분말감이 낮고 조직감이 양호하여 TPA 측정이 가능한 수준으로 형태가 구현되었으며 경도(Hardness)는 8.86N, 단백질은 4.9%로 시판 식물성 치즈 0.2%와 비교 시 약 24배 높아져 영양적 가치가 향상됨을 확인함
- 과제 목표수준과 비교 시 단백질 함량 및 응집력(Cohenciveness) 증대를 위한 개선실험을 3차년도에 반영할 예정이며 경도는 과제 목표 97% 달성하여 향후 상품화에 대중적으로 수요가 높은 체다치즈 슬라이스 및 큐브로도 활용 가능함을 확인함

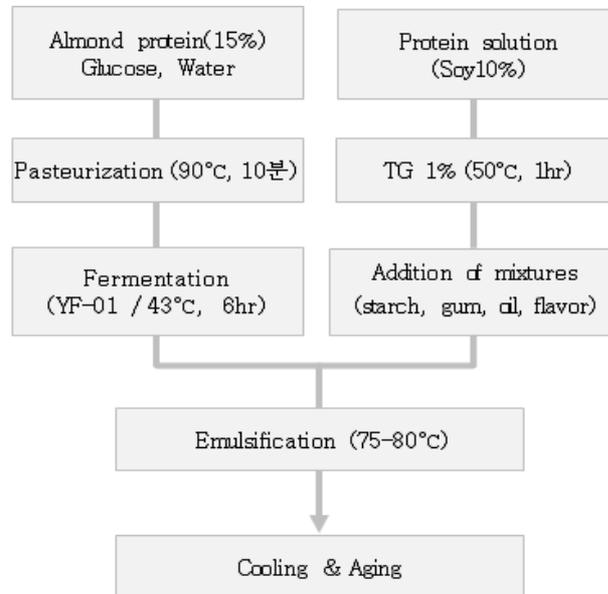
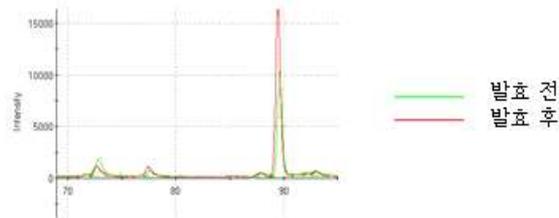


그림 A-15. Block type 식물성치즈 제조 공정



RT	Compound	Sensory description	Peak area
89.59	butane-2,3-dione	Butter, Caramelized	발효 후>
	butan-2-one	Butter, Cheese	

그림 A-16. 아몬드단백 발효액의 발효 전, 후 전자코 분석결과

표A-15. Block type 식물성치즈 개발품 분석 결과

Analysis		Target range	Vegan	
			Target(Min) (BS_P_CH_VI)	Lab prototype
Nutritional compositions	Calorie(Kcal)	-	314.56	293.71
	Crude protein(%)	15	0.19	4.89
	Crude fat(%)	-	25.68	20.83
	Carbohydrate(%)	-	20.67	21.67
	Cholesterol(g/100g)	-	0.0	0.0
	Saturated fat(g/100g)	-	23.1	17.8
	Transfat(g/100g)	-	0.02	0.03
TPA	Hardness(N)	9.15~22.39	12.60	8.86
	Cohensiveness	0.22~0.48	0.51	0.14



그림A-17. Block type 식물성치즈(Lab) 개발품

3) Spread type 식물성치즈 개발

① 아몬드단백 발효액 활용 Spread type 제조결과

- 카라기난 유무에 따라 두 종류의 Spread 치즈를 제조하여 TPA를 측정한 결과(표 A-16, 위탁기관 분석) 점착성이 약 2배로 카라기난 첨가구가 더 높았으며 발림성 평가에서도 a는 부드러운 특성, b는 꾸덕한 물성이 나타남
- Spread type의 대표적인 형태인 크림치즈는 시판품 대부분이 꾸덕한 물성으로 베이글 등의 빵에 두께감 있게 발림성이 나타나므로 카라기난 첨가구가 상품화에 적합한 것으로 판단함
- 관능평가에서는 신선치즈 중 하나인 크림치즈 특성상 지방 원료와 발효에서 기인하는 맛과 향이 대부분을 차지하므로 아몬드단백 발효액 풍미가 이취, 이미가 없어 양호하였지만 식감에서 분말감이 잔존하여 기호도가 저하됨

표A-16. 아몬드단백 발효액 활용 Spread type TPA 분석결과

TPA	a	b
Cohensiveness	0.202±0.039	0.154±0.016
Gumminess	0.196±0.035	0.380±0.075

② 두유 발효액 활용 Spread type 제조결과

- 아몬드 발효액 적용 시 발생했던 분말감을 개선하기 위해 두유를 발효한 후 Spread type 식물성치즈로 제조하여 평가한 결과 두유의 경우 불용성성분들이 제거된 상태이므로 분말감이 없어 식감이 우수하고 발효에 의해 생성된 풍미도 양호함
- 표 A-17의 영양성분 분석 결과를 살펴보면 개발품의 조단백 함량은 4.51%로 식물성 시판제품 0.22%와 비교 시 약 21배 높은 함량임을 알 수 있으며 시판제품 최대 타겟제품인 동물성 5.97%와 비교 했을 때도 약 76% 수준에 도달하는 단백질 함량이 있다는 것을 확인함. 또한, 개발품은 단백질 발효물 등의 식물성 성분이 주원료로 구성되어 콜레스테롤 함량 0으로 시판 동물성 제품 90.2g 보다 낮은 함량이 나타나 소비자들의 건강에 대한 니즈 반영 및 영양적 가치가 우수하다고 할 수 있음
- TPA결과에서도 개발품은 응집력(cohesiveness) 0.26, 점착성(gumminess) 0.16으로 시판제품을 분석하여 설정한 목표범위 100% 수준인 응집력 0.17~0.42와 점착성 0.09~0.37 범위를 만족하여 물성 목표수준을 달성함

표A-17. Spread type 식물성치즈 개발품 분석 결과

Analysis	Target range	Dairy	Vegan		
		Target(Max) S_P_CR_PH	Target(Min) S_P_CR_VI	Lab prototype	
Nutritional compositions	Calorie(Kcal)	-	352.20	235.29	339.52
	Crude protein(%)	-	5.97	0.22	4.51
	Crude fat(%)	-	32.44	21.37	32.80
	Carbohydrate(%)	-	9.09	10.52	6.57
	Cholesterol(g/100g)	-	90.2	0	0
	Saturated fat(g/100g)	-	22.02	19.51	27.60
	Transfat(g/100g)	-	1.43	0.02	0.07
TPA	Cohensiveness	0.17~0.42	0.17	0.17	0.26
	Gumminess	0.12~0.37	0.12	0.18	0.16

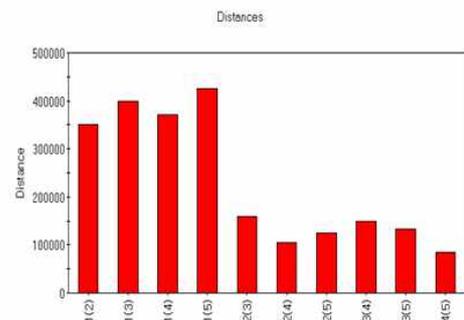
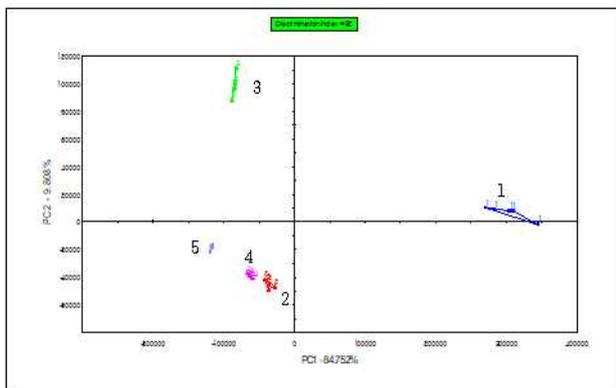


그림A-18. Spread type 식물성치즈(Lab) 개발품

4) Dipping type 식물성치즈 개발

① 체다 풍미소재 개발

- 업체 및 치즈향 종류별 5종 샘플에 전자코 분석을 실시하여 그림 A-19의 PCA 및 Distance (시료별 유사정도) 결과를 살펴봤을 때 가장 높은 유사도를 나타낸 샘플은 업체가 동일한 4,5번으로 나타남
- 크로마토그램(표 A-18)에서는 1번 샘플의 향 강도가 높게 나타났으며 치즈, 버터와 연관된 butane-2,3-dione, butan-2-one 성분은 1, 3번에서 높게 나타남. 0.03% 수용액으로 단품 평가한 결과와 함께 비교하였을 때 1번은 인위적인 향이 다소 잔존하여 3번이 natural cheddar cheese flavor에 가장 적합하다고 판단됨
- 상기 결과에 따라 맛 구성 단계에서 a는 3번의 치즈향으로 선정하였으며 b는 비건 용도로 사용 가능하며 숙성 치즈맛을 구현해주는 조미소재, c는 이스트분말, 정제염 등을 사용하여 기본 치즈맛인 감칠맛, 짠맛을 구현함



그림A-19. 치즈향 종류별 PCA 결과

표A-18. 치즈향 종류별 크로마토그램 결과

RT	Compound	Sensory description	Peak area
29.47	butane-2,3-dione	Butter, Caramelized, Creamy	1,3>>
	butan-2-one	Cheese, Chocolate	
32.14	Ethyl Acetate	Acidic, Butter, Caramelized, Sweet	1>>
44.33	Acetoin	Butter, Coffee, Creamy	1>>
58.18	Butanoic acid	Butter, Cheese, Rancid, Sweaty	2>1>4
	2-methylpropanoic acid	Acidic, Butter, Cheese, Fatty	

② Dipping type 기본 배합비 정립 결과

- Dipping type 식물성 치즈로 제조한 견본은 치즈소스 특유의 질감 및 색상이 재현되었으며 관능에서도 체다 풍미가 강하고 인위적이지 않아 선호도가 높음
- 일반성분의 경우 조지방 22.6%로 확인되어 동물성 체다치즈 소스(D_A_CH_FR)의 지방 함량 10% 수준과 비교 시 높은 함량이지만 해외에서 시판되는 식물성 체다스타일 소스가 16% 수준임을 감안하였을 때 식물성으로 소스 재현 시 물성과 지방 특유의 풍미를 구현하기 위한 차이라고 판단됨
- 조단백 함량은 2.05%로 동물성 2.43%로 유사하였으며 점성은 43.50, Rate index 0.28로 타겟 물성범위에 적합하여 물성이 목표 수준만큼 구현된 것을 확인함



그림A-20. Dipping type 식물성치즈(Lab) 개발

[3차년도 : 식물성치즈 품질향상 및 Pilot/Plant Scale 3종 개발]

1. 연구개발 수행과정

1) 주요 해결 과제

- 치즈는 밝은 색상과 숙성된 감칠맛, 고소한 풍미, 부드럽게 녹는 식감이 중요한 관능 지표로 단백질 분말감, 원료에서 기인되는 색상 등의 특징과 상반되어 첨가량을 높일수록 상품성을 저해하는 문제가 확인됨
- 이를 해결하고자 2차년도 연구까지 발효, 효소 공정을 활용하여 단백을 가공하는 기술을 개발 및 적용하였고 그 결과 상품성을 저해하지 않는 수준에서 Block , Spread, Dipping type 치즈의 단백질함량을 시판 식물성 치즈 이상 수준까지 구현하였음
- 하지만 초기 연구계획에서 설정한 Block type 단백질 함량을 동물성 치즈 수준까지 추가 증대하기 위한 아이디어 도출 및 문제해결이 필요하며 Spread, Dipping type에서도 상품성 향상 및 Plant scale 공정 정립을 위한 개선사항이 도출됨

2) Block type 치즈 개선실험 설계

- 고체형인 Block type 치즈는 구조유지 측면에서 단백질 향상이 가장 어려움 품목이며 현재 단백질 5%에서 목표인 동물성치즈 15% 수준으로 2배 이상 증가시키기 위해서는 새로운 기술의 접근이 요구됨. 단백질의 분말감이 첨가량을 높이는 가장 큰 저해요소로 확인되어 단백질 수용화에 대한 가능성을 검토함

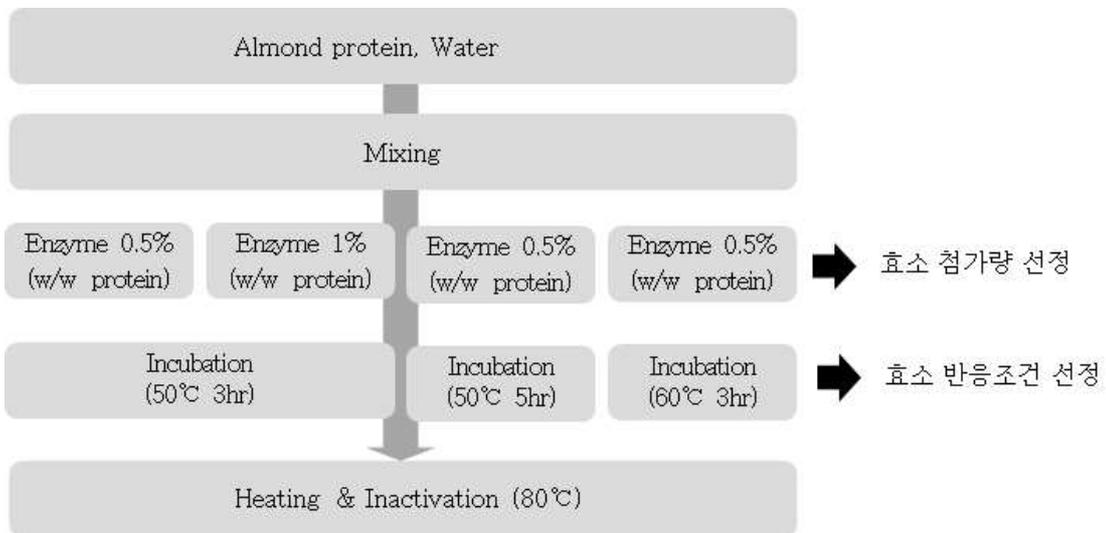
① 식물성단백 분해물 적용

- 단백질은 펩타이드, 아미노산 단위로 분해될수록 맛 강도는 강해지며 수용성이 높아지는 효과가 있음. 예비실험에서 아미노산 소재를 적용할 경우 단백질 향상에는 기여하지만 단맛, 쓴맛 등 특정 맛 강도가 높아져 치즈 풍미를 저해하는 결과가 나타남. 따라서 아미노산보다 맛 강도가 낮은 펩타이드형 소재를 스크리닝하고 이를 Block type 치즈에 적용하는 실험을 실시함
- 식물성 단백질에서 기인한 가수분해물, 펩타이드형 원료 5종을 종류별, 업체별(쌀, 대두, 완두, 효모)로 수배한 후 2차년도 연구에서 정립된 처방과 공정(그림 A-15)에 5% 수준의 배합비로 동량 적용한 후 무첨가 대조구와 단백질 함량, 관능 특성을 비교 및 평가함

② 아몬드단백 발효액 용해성 향상

가. 신규 효소 적용

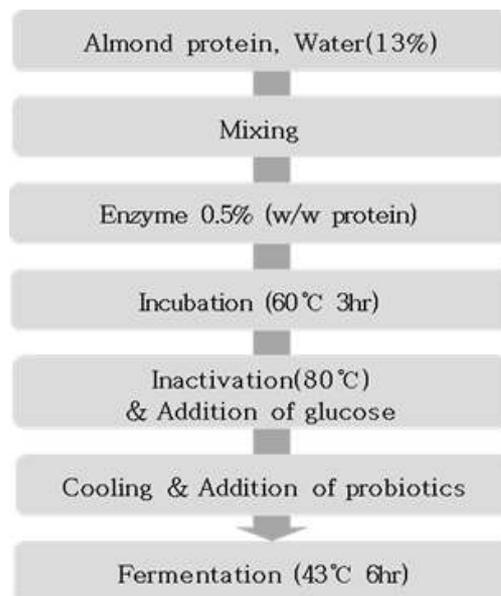
- 기존 아몬드단백 발효액에 잔존하는 분말감을 감소시켜 투입량을 증가하고 궁극적으로 단백질 함량을 높이고자 함. 예비실험으로 수용화에 효과가 있는 단백질전환효소를 선정한 후 효소량, 반응조건 등의 공정 정립을 위해 그림 A-21의 방법으로 실험을 진행하고 관능 평가를 실시함



그림A-21.신규 효소 제조공정 정립

나. 아몬드단백 발효액 개선

- 가에서 정립된 효소 조건을 아몬드단백 발효액 제조공정에 적용하여 개선효과를 검증하고자 함. 아몬드단백 발효액 개선품은 각각의 효소 및 유산균 활성 온도를 고려하여 그림 A-22의 방법으로 제조한 후 이화학 성분 분석 및 관능평가를 실시함



그림A-22.아몬드단백 발효액 개선 공정

③ Block type 식물성치즈 제조

- 상기 식물성단백 분해물 및 아몬드단백 발효액 개선품을 적용하여 다양한 배합비로 Blocktype 치즈 제조(그림A-15)에 대한 예비실험을 실시함(고체화 형성 단계는 아닌 기본 배합비 참고로 결과값은 제외함)
- 이를 바탕으로 단백질 8% 이상 및 고체화 형성에 적합한 수준에 도달한 처방을 선정 후 세부 최적화(표A-19)를 위해 Block type 치즈를 제조한 후 물성, 이화학 분석 및 관능평가를 진행함

표A-19. Block type 처방 배합비

No.	Ingredient(%)				
	Fermented almond solution	Soy solution	Hydrolysis (Rice)	Starch	Oil
1	41.4	18.4	4.2	14.2	14.5
2	40.6	17.0	5.3	13.7	16.0
3	40.0	16.8	3.6	13.5	15.8
4	41.0	16.7	5.7	13.4	15.8

3) Dipping type 치즈 개선실험 설계

① 두유 추가 업체 탐색

- 2차년도에서 주요 베이스로 확정된 두유발효액의 경우 Plant scale test 진행을 위해서는 벌크형 두유 공급이 필수적임. 기존 원료로 확정되었던 시판 무가당두유 업체와 협의 시 벌크 공급이 불가함을 확인하여 공급 가능한 무가당두유 업체를 표A-2와 같이 추가적으로 검토함

② 아몬드단백 발효액 개선품 활용 및 Dipping type 식물성치즈 제조

- 선행 연구에서 아몬드단백 발효액을 dipping, spread type에 적용하지 못한 이유는 분말감이 잔존하였기 때문임. 3차년도 Block type 단백질 증대 연구에서 기존 아몬드단백 발효액의 문제였던 분말감 이슈를 수용화로 개선하였으므로 이를 dipping, spread type에 수평전개하여 활용 가능성을 테스트함

- 두유발효액은 2차년도 정립된 공정을 활용하였고 아몬드단백 발효액 개선품은 3차년도 그림A-22의 방법으로 각각 제조한 후 주요 지표를 비교하기 위해 pH, 이화학 성분을 분석 및 비교 평가함

- 아몬드단백 발효액의 제품 적용에 따른 Dipping type 처방 정립을 위해 표A-20의 배합비 및 2차년도 그림A-12의 제조공정을 활용하여 견본을 제조한 후 품질평가를 위해 물성 및 관능평가를 실시함

표A-20. Dipping type 처방 배합비

No.	Ingredient(%)				
	Fermented Soy milk	Fermented almond solution	Water	Starch	Oil
1	27	-	40	5	19
2	-	27	40	5	19
3	-	30	34	5	21
4	-	29	33	6	21

4) Spread type 치즈 개선실험 설계

- 크림치즈 형태인 Spread type은 2차년도 연구까지 정량 물성 목표 도달하여 조직감 구현은 양호하였지만, 타겟 동물성 크림치즈 대비 우유에서 기인하는 크림치즈 특유의 풍미가 약하다는 VOC가 확인됨. 따라서 풍미 강화를 위해 크림치즈 계열 신규 Flavor를 단품으로 1차 검토 후 크림치즈 처방 내 적용 추진함

① 크림치즈 Flavor 스크리닝

- 신선치즈에 해당되는 크림치즈 풍미 특성을 고려하여 숙성이 아닌 우유, 밀크, 크림치즈 계열의 flavor로 업체/종류별로 수배하여 총 23종의 향 소재를 0.1% solution으로 제조한 후 단품 관능평가를 진행함

② Spread type 식물성치즈 제조

- Dipping type에서 두유 대체재로 아몬드단백 발효액의 가능성을 확인하여 이를 활용하여 표A-21의 배합비로 원료를 준비함. 준비된 원료를 배합하고 가열(80-85℃) 및 고속유화(3000rpm, 5분)한 후 냉장실에서 냉각하여 Spread type 치즈를 제조함

표A-21. Spread type 처방 배합비

No.	Ingredient(%)				
	Fermented almond solution	Oil	Plant based cream	Gum	Tapioca starch
1	45	33	18	-	-
2	43	32	20	0.4	-
3	43	32	20	-	0.6

5) 치즈 유형별 Scale-up test

- Lab에서 최적화된 처방 및 공정을 활용하여 주요 소재 및 치즈 유형별로 생산 공정 정립을 진행함

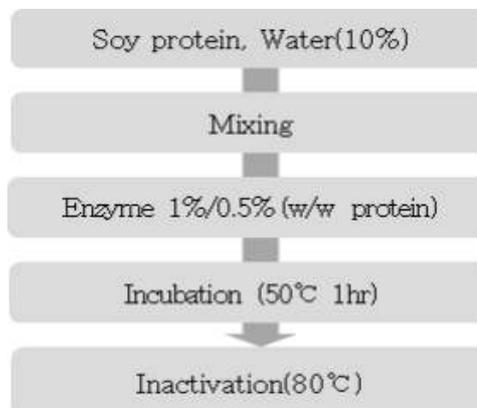
① Block type Plant test

가. 아몬드단백 발효액

- 커드를 생성하는 제품 특징상 배출 이슈가 있으므로 설비 적합성을 확인하기 위해 발효조, 효소분해조를 각각 배치당 약 1톤 물량으로 비교하여 현장실험을 실시함. 제조방법은 그림 A-22의 순서로 진행되었으며 생산 시 미생물 안전성을 증대하기 위해 실할 및 살균조건만 90℃, 10분으로 강화하였고 발효시간별 pH 측정을 진행함

나. 대두단백물

- Block type 치즈의 경도 증대를 위해 사용되는 대두단백물의 공정 정립을 위해 효소분해조를 사용하여 배치당 약 977kg의 물량으로 현장실험을 진행함. 겔화 특성이 있는 소재로 Lab 설비와의 교반력, 온도 상승과 하락시간의 차이 등의 Gap으로 배출문제를 고려하여 효소량을 현장공정에 맞게 2type 검토하였으며 제조방법은 그림A-23으로 진행함



그림A-23. 대두단백물 제조 공정

다. Block type 식물성치즈

- 쿠키 설비를 사용하여 원료(상기 가, 나에서 제조한 소재 2종 포함)를 투입하여 배치당 약 40kg의 물량으로 진행함. 교반(1500-2100rpm) 및 가열 (80-85℃)한 후 3kg/ea의 중량으로 충전, 밀봉하였으며 냉장고에서 냉각 및 숙성하여 시제품을 제조한 후 물성, 영양성분, 미생물 분석 및 관능평가를 실시함

② Spread type Plant test

- 쿠키 설비를 사용하여 배치당 약 37kg의 물량으로 원료(상기 가의 아몬드단백 발효액 및 표A-3, No.2)를 투입함. 교반(1500-2100rpm) 및 가열(80-85℃)한 후 120-150g/ea의 중량으로 충전 및 상단 은박 실링하여 밀봉함. 현장실험용 부자재는 시판 크림치즈 형태를 고려하여 크림치즈용 PP용기를 수배하여 사용하였으며 밀봉한 시제품은 냉장고에서 냉각 및 숙성한 후 물성, 영양성분, 미생물 분석 및 관능평가를 실시함

③ Dipping type Plant test

- 호모믹서를 사용하여 배치당 165kg의 물량으로 원료(표A-2 No.4)를 준비하였으며 공정은 2차년도 그림A-24 공정 순서의 호모믹서까지 진행함. 이후 포장형태는 상품성을 고려하여 로타리포장기로 1kg 캡파우치 포장한 후 냉장보관 하였으며 품질평가를 위해 물성, 영양성분, 미생물 분석 및 관능평가 실시함

6) 식물성치즈 품질분석

① pH 측정

- pH meter는 시료 측정 전 buffer solution(pH 4.00, 7.01, 9.21)을 사용하여 보정하고 시료 50g을 유리전극이 잠기도록 한 후 pH meter(METTLER)로 측정함

② 조단백

- 식품공전 제 2020-98호 2.1.3.1 총질소 및 조단백질 분석방법 중 Auto Kjeldahl법에 준하여 실시함

③ 열량

- 식품의 에너지는 에트워터 계수를 사용하여 검체 100g 중의 조단백질, 조지방 및 탄수화물 또는 당질의 함량에 단백질 지방 9, 당질 4의 계수를 곱하여 각각의 에너지를 킬로칼로리(Kcal)단위로 산출하고 그 총계로 나타냄

- 단위는 킬로칼로리 또는 킬로주울(KJ)로 하고 킬로칼로리 단위에서 킬로주울 단위로의 환산은 1Kcal = 4.184KJ과 같음

④ 조지방

- 식품공전 제 2020-98호 2.1.5.1.2 산분해법 분석방법에 준하여 실시함

⑤ 콜레스테롤

- 식품공전 제 2020-98호 2.1.5.5 콜레스테롤 분석방법에 준하여 실시함.

⑥ 포화지방, 트랜스지방

- 식품공전 제 2020-98호 2.1.5.4 지방산 분석방법에 준하여 실시함

⑦ 물성(TPA) 분석

- 치즈 유형별 물성 분석은 위탁 내용으로 한양대에서 실시함

⑧ 관능평가

- 최종 시제품에 대한 관능평가는 연구원 36명을 대상으로 9점 척도법을 실시함. 치즈 유형별로 외관, 풍미, 조직감, 전체기호도 항목에 대해 기호도를 평가하였으며 각 항목에 대한

기호도 평균값과 6점 이상의 비율(6점이상 인원수/총 평가한 인원수x100)로 품질 기호도를 확인함

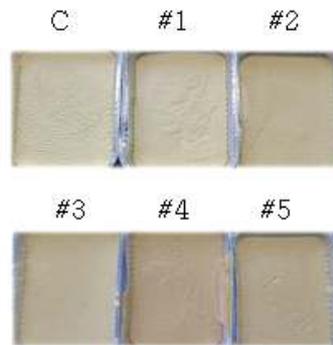
2. 연구개발 수행내용

1) Block type 치즈 개선실험 결과

① 식물성단백 분해물 적용 Block type 제조 및 평가

- 다양한 식물성단백 분해물을 적용하여 Block type 치즈를 제조한 결과, 대조구(무첨가) 대비 모든 첨가구에서 단백질 함량 증가에는 효과가 있었으나 2-5번 샘플의 경우 원료에서 기인한 쓴맛, 강한 정미력, 어두운 색상이 제품까지 영향을 미쳐 풍미 등의 관능적 요소를 저해하는 것으로 나타남
- RiceA를 적용한 2번 샘플의 경우 9% 높은 수준으로 단백질 함량을 증가시키면서 비교적 외관 색상 및 조직감이 양호하여 가장 적합한 것으로 확인되었음. 하지만 과량 첨가 시 지미감이 높아져 맛의 균형, 조직감, 색상이 저하되어 이후 배합비 조정 및 최적화가 필요한 것으로 확인됨

Sample	Protein(%)
C (Control)	4.87
#1 (RiceA)	8.97
#2 (Soy)	9.47
#3 (Pea)	8.14
#4 (RiceB)	7.85
#5 (Yeast)	7.40



그림A-24.식물성단백 분해물 적용 Block type 조단백 함량(원) 및 외관 사진(오)

② 아몬드단백 발효액 용해성 향상 추진 내용

가. 아몬드단백 신규 효소 적용 및 조건 정립

- 아몬드단백 수용액을 제조하여 효소 첨가량, 반응 온도별로 실험한 결과 약 75%의 높은 비율로 4번 샘플구가 1위를 나타내어 가장 분말감이 낮은 것으로 확인되었으며 특히, 무처리구 대비 처리구의 용해도가 향상되어 층분리 현상이 없어진 것을 육안으로 확인할 수 있었음. 따라서 효소처리 조건은 첨가량 0.5%, 반응조건은 60℃, 3시간으로 정립하여 이후 실험에 활용하였음

나. 아몬드단백 발효액 개선

- 가의 조건을 적용하여 발효를 실시한 후 pH 변화를 살펴본 결과 1시간 후 pH 6.41, 발효 3시간 후 pH 6.07, 발효 6시간 후 pH 4.78로 최종 pH 목표범위인 4.75±0.15에 도달하였으며 변화 추이도 양호한 것으로 나타남. 관능평가에서도 기존 효소 무처리구 보다 분말감이 감소하여 처방 투입량을 증량할 수 있을 것으로 확인됨



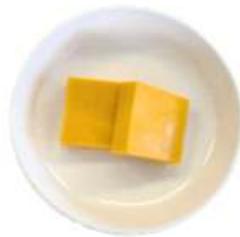
그림A-25.아몬드단백 발효액 개선품

③ Block type 식물성치즈 개선

- 배합비별 Block type 치즈 Lab 견본을 분석한 결과, 4종 모두 냉각 후 고체화된 block 형태는 나타났으나 1번 샘플의 경우 낮은 경도만큼 절단 시 형태가 다소 변형되는 현상이 나타남. 4번 샘플은 hardness 11.18, cohesiveness 0.29로 각각 정량 물성 목표인 9.15~22.39 및 0.22~0.48 범위에 적합한 것을 확인함
- 4번 샘플의 물성 적합치를 확인한 후 조단백 함량을 분석한 결과 10%로 2차년도 대비 약 2배 증가한 것을 확인할 수 있었으며 관능평가에서도 색상, 외관이 양호하고 동물성 가공치즈 보다 자연 숙성치즈에 유사한 풍미 및 식감이 나타나 선호된다는 의견이 나타남

표A-22. Block type 배합비에 따른 TPA 분석 결과

No.	Result	
	Hardness (TPA)	Cohensiveness (TPA)
1	6.39±0.16	0.22±0.01
2	8.25±0.24	0.19±0.01
3	10.97±0.20	0.20±0.01
4	11.18±0.79	0.29±0.01



그림A-26. Block type 개선 시제품

2) Dipping type 치즈 개선실험 결과

① 두유 업체 조사 결과

- 현장공정 테스트용 벌크형 두유 공급처를 찾기 위해 표A-23와 같이 9개의 업체와 협의를 진행함. 국내 두유 제조처의 경우 테트라팩, 병입 등 B2C를 주로 생산하므로 kg 또는 톤 단위 공급이 가능한 생산 라인을 갖춘 업체가 확인되지 않음. 일부 탱크로리 운영이 가능한 업체도 있었지만 기존 생산라인과 별도로 운영되어 불가하거나 당사에서 별도 두유를 수령할 수 있는 옥외탱크, 냉장시설이 필요하여 두유 외 별도의 방안을 검토하는 것으로 결정함

표A-23. 벌크형 두유 공급업체 협의 내용

No.	업체	협의 내용
1	A	운송 불가
2	B	파이프 관 (외부 공급 불가)
3	C	탱크로리 (전 두유만 가능)
4	D	탱크로리 이송
5	E	운송 불가
6	F	탱크로리 이송
7	G	탱크로리 이송
8	H	운송 불가
9	I	운송 불가

② 아몬드단백 발효액 개선품 활용 가능성 검토 및 Dipping type 치즈 제조, 평가

- 두유발효액을 아몬드단백 발효액 개선품으로 대체 가능한지 살펴보기 위해 pH, 수분 및 조단백 함량을 분석한 결과, 아몬드의 경우 pH는 목표 범위 내 도달하여 유사한 산미를 나타냈으며 색상 및 관능은 명도가 높고 콩취가 저감되어 치즈 베이스에 더욱 적합하였음 또한, 수분 함량은 유사하면서 두유 보다 아몬드 발효액의 단백질 함량이 높아 대체가 가능함을 확인함

- 아몬드단백 발효액을 적용하여 다양한 배합비로 Dipping type 견본 4종을 제조한 후 표A-25와 같이 물성을 분석함. 아몬드단백 발효액 적용 샘플의 경우 두유 대비 점성이 낮은 경향을 보였는데 이화학 지표 외 유화력, 점성 등의 원료 차이로 인한 결과로 예상됨. 외관 물성은 4번 샘플이 가장 양호하였는데 점도는 29.94로 목표 24.16~63.26 내 적합하였으며 Rte index는 목표 범위의 67% 수준이었으나 저장 중 유분리가 발생하지 않아 가장 양호한 배합비로 선정됨. 관능은 인위적이지 않은 진한 체다치즈 풍미 및 꾸덕한 물성이 선호된다고 평가됨

표A-24. 두유 및 아몬드단백 발효액 분석 결과

Product	pH	Moisture(%)	Crude protein(%)
Fermented Soy milk	4.90	88.68	4.90
Fermented almond solution	4.78	87.12	6.77

표A-25. Dipping type 배합비에 따른 물성 분석 결과

No.	Result	
	Viscosity	Rate index
1	142.27±57.30	0.20±0.06
2	45.31±0.34	0.53±0.00
3	27.93±1.72	0.61±0.01
4	29.94±0.06	0.61±0.00



그림A-27. Dipping type 개선 시제품

3) Spread type 치즈 개선실험 결과

① 크림치즈 Flavor 스크리닝

- 식물성으로 활용 가능한 크림치즈 계열 Flavor를 A업체 3종, B업체 2종, C업체 3종, C업체 4종을 수배하여 단품 평가한 결과, 인위적인 용매향이 없고 자연스러운 우유 풍미가 발현되는 C업체 향이 가장 선호되어 선정된 후 Spread type에 적용 진행함

② Spread type 식물성치즈 제조 및 평가

- Spread type 3종을 처방별로 제조한 후 물성을 분석한 결과, 2번 샘플의 경우 cohesiveness 목표인 0.17~0.42 대비 결과값 0.17, gumminess 목표인 0.12~0.37 대비 결과값 0.21로 각각의 목표를 달성하였음. 유분리 없이 빵에 스프레드 가능한 물성이 재현되었으며 외관 색상이 밝아 양호하고 깔끔한 크림치즈 풍미가 선호된다는 평가를 받음

표A-26. Spread type 배합비에 따른 물성 분석 결과

No.	Result	
	Cohesiveness (TA)	Gumminess (TA)
1	0.11±0.02	0.10±0.01
2	0.17±0.01	0.21±0.01
3	0.15±0.01	0.28±0.03



그림A-28. Spread type 개선 시제품

4) 치즈 유형별 Scale-up test

① Block type Plant test

가. 아몬드단백 발효액

- 현장설비 적합성을 검토하기 위해 발효조, 효소분해조에서 각각 실험한 결과, 커드화가 진행되는 과정 및 발효에 따른 pH 변화는 두 설비 모두 양호함. 하지만 교반 속도, 교반력이 낮은 발효조의 경우 배출되지 않아 생산이 불가능하였고 효소분해조는 비교적 교반력이 높아 제품의 배출 및 포장이 가능함. 따라서 설비는 효소분해조로 선정하였으며 최종 pH 종료점을 고려하여 발효시간만 6.5시간으로 증가하여 공정을 정립함

- 효소분해조에서 생산한 제품의 이화학 분석결과에서는 최종 pH 4.9, 수분 87.17%, 조단

백 7.5%로 Lab 수준의 품질 구현을 확인하였으며 미생물 안전성도 양호한 수준으로 나타남

표A-27. 아몬드단백 발효액(효소분해조) 발효시간별 pH 분석 결과

Reaction time	pH
0	6.50
1	6.46
2	6.41
3	6.25
4	5.71
5	5.23
6	4.97
6.5	4.90

표A-28. 아몬드단백 발효액 이화학 및 미생물 안전성 분석 결과

Analysis	Result
Moisture(%)	87.17
Crude protein(%)	7.50
<i>Clostridium perfringens</i>	negative
<i>Bacillus cereus</i>	<10
Coliform	<10

나. 대두단백물

- 현장조건을 감안하여 효소량을 2type으로 검토한 결과, Lab과 동일처방은 효소 1%로 진행한 경우 온도 상승 및 냉각시간의 증대, 교반력 차이 등으로 인하여 겔화 활성이 높아져 배출되지 않는 문제가 발생함. 0.5% 효소 첨가량의 경우 배출 및 겔화정도가 양호하였으며 이화학성분 지표인 수분 89.86%, 조단백 8.74%로 Lab과 유사한 경향을 나타냄. 미생물의 분석에서도 대장균군, 일반세균수가 적합한 수준으로 확인됨

표A-29. 아몬드단백 발효액 이화학 및 미생물 안전성 분석 결과

Analysis	Result
Moisture(%)	89.86
Crude protein(%)	8.74
Total count	<10
Coliform	<10

다. Block type 식물성치즈

- Lab 최종 배합비에 준하여 시제품을 제조한 후 분석한 결과, 조단백 9.97%로 식물성 타겟 0.19% 보다 52배 높은 단백질 함량이 나타났으며 글로벌한 수준의 block type 고단백 식물성 치즈를 구현하였음

- TPA 측정에서는 시제품의 경우 hardness 목표 9.15~22.39 대비 결과값 12.36, cohesiveness 목표 0.22~0.48 대비 결과값 0.21로 측정되어 물성 목표를 각각 100%, 95% 수준을 달성하였음. 시판 block type 치즈와 유사한 수준으로 제조되어 조직감이 양호하고 상품화 시 절단, 포장 등의 가공 공정도 문제 없을 것으로 판단됨
- 9점 척도법을 실시한 관능평가 결과에서는 항목별 평균 점수가 외관 7.1, 풍미 6.8, 조직감 7.1, 전체기호도 6.8 이었으며 6점 이상을 차지한 비율은 94%, 92%, 89%, 92%로 나타남. 시판 식물성 치즈의 경우 인위적인 풍미가 있고 맛 패턴이 단순하지만 본 연구의 block type 치즈는 발효, 효소 등의 공정을 활용하여 숙성 치즈의 풍미와 보다 유사하다는 의견이 있었음
- 미생물 분석결과에서는 기타가공품 유형으로 검토하였을 때 모든 항목에서 규격 내 적합한 것을 확인함

표A-30. Block type Plant scale 시제품 영양성분 및 물성 분석 결과

Analysis		Target range	Vegan	
			Target(Min) (BS_P_CH_VI)	Plant prototype
Nutritional compositions	Calorie(Kcal)	-	314.56	248.66
	Crude protein(%)	15	0.19	9.97
	Crude fat(%)	-	25.68	18.98
	Cholesterol(g/100g)	-	0.0	0.0
	Saturated fat(g/100g)	-	23.1	13.13
	Transfat(g/100g)	-	0.02	0.04
TPA	Hardness(N)	9.15~22.39	12.60	12.36
	Cohensiveness	0.22~0.48	0.51	0.21

표A-31. Block type Plant scale 시제품 미생물 분석 결과

Analysis	Result
<i>Clostridium perfringens</i>	negative
<i>Bacillus cereus</i>	<10
<i>Staphylococcus aureus</i>	negative
Coliform	<10
Total count	30



그림A-29. Block type Plant scale 시제품

② Spread type Plant test

- 생산용 쿠키를 사용하여 시제품의 영양성분 분석결과에서는 조단백 4.09%로 식물성 타겟 대비 약 19배였으며 동물성 타겟과 비교 시에도 69% 수준으로 식물성 크림치즈로는 높은 단백질 함량을 구현하였음. 또한 현장 시제품에서 콜레스테롤은 검출되지 않아 콜레스테롤이 함유된 동물성 크림치즈 대비 콜레스테롤은 없고, 식물성 크림치즈 대비 단백질은 높아 영양적 측면의 우수성을 상품화 포인트로 활용할 수 있다고 판단됨
- TPA결과에서도 시제품의 경우 cohesiveness 목표 0.17~0.42 대비 결과값 0.35, gumminess 목표 0.12~0.37 대비 결과값 0.15로 측정되어 물성 목표 100% 수준을 달성하였음
- 9점 척도법을 실시한 관능평가 결과에서는 항목별 평균 점수가 외관 7.8, 풍미 6.8, 조직감 7.3, 전체기도도 7.1 이었으며 6점 이상을 차지한 비율은 94%, 86%, 97%, 92%로 크림치즈로서의 기호도가 높은 것을 알 수 있었음. 전반적으로 깔끔한 풍미 및 발림성이 좋아서 베이글 등의 베이커리와 함께 먹었을 때 느끼하지 않아 좋다는 의견이 나타남
- 미생물 분석결과에서는 소스류 유형으로 검토하였을 때 모든 항목에서 규격 내 적합한 것을 확인함

표A-32. Spread type Plant scale 시제품 영양성분 및 물성 분석 결과

Analysis	Target range	Dairy	Vegan		
		Target(Max) S_P_CR_PH	Target(Min) S_P_CR_VI	Plant prototype	
Nutritional compositions	Calorie(Kcal)	-	352.20	235.29	374.61
	Crude protein(%)	-	5.97	0.22	4.09
	Crude fat(%)	-	32.44	21.37	36.57
	Cholesterol(g/100g)	-	90.2	0	0
	Saturated fat(g/100g)	-	22.02	19.51	32.81
	Transfat(g/100g)	-	1.43	0.02	0.06
TPA	Cohensiveness	0.17~0.42	0.17	0.17	0.35
	Gumminess	0.12~0.37	0.12	0.18	0.15

표A-33. Spread type Plant scale 시제품 미생물 분석 결과

Analysis	Result
<i>Clostridium perfringens</i>	negative
<i>Bacillus cereus</i>	310
<i>Staphylococcus aureus</i>	negative
Coliform	<10
Total count	1,400



그림A-30. Spread type Plant scale 시제품

③ Dipping type Plant test

- 시제품의 영양성분 분석결과에서는 조단백 2.79%로 동물성 타겟 2.43% 보다 높은 단백질 함량이 나타남. 콜레스테롤은 동물성 타겟 58.6g과 비교하였을 때 검출되지 않아 無 콜레스테롤 등의 영양정보를 상품화 진행 시 활용할 수 있을 것으로 판단됨
- 점도 측정에서는 시제품의 경우 점도 목표 24.16~63.26 대비 결과값 23.25, Rate index 목표 0.23~0.40 대비 결과값 0.55로 측정되어 물성 목표는 각각 96%, 73% 수준을 달성하였음. 현재 유통기한 중 유분리 발생은 없었으며 관능평가 시 물성에 대한 평가는 양호했으므로 목표치에 대한 물성 조정은 협의 후 필요 시 진행 예정
- 9점 척도법을 실시한 관능평가 결과에서는 항목별 평균 점수가 외관 7.7, 풍미 7.8, 조직감 7.6, 전체기호도 7.8 이었으며 6점 이상을 차지한 비율은 97%, 97%, 94%, 94%로 나타남. 따라서 치즈소스로의 활용 가치 및 기호도가 높은 것을 알 수 있었으며 진한 체다치즈 풍미 및 꾸덕한 물성이 좋다는 관능 의견이 있었음.
- 미생물 분석결과에서는 소스류 유형으로 검토하였을 때 모든 항목에서 규격 내 적합한 것을 확인함

표A-34. Dipping type Plant scale 시제품 영양성분 및 물성 분석 결과

Analysis	Target range	Dairy	Vegan	
		Target(Max) D_A_CH_FR	Plant prototype	
Nutritional compositions	Calorie(Kcal)	-	134.23	268.04
	Crude protein(%)	-	2.43	2.79
	Crude fat(%)	-	9.39	23.20
	Cholesterol(g/100g)	-	58.6	0
	Saturated fat(g/100g)	-	1.8	3.85
	Transfat(g/100g)	-	0.05	0.08
Rheometer	Viscosity(Pa.s)	24.16~63.26	63.26	23.25
	Rate index	0.23~0.40	0.33	0.55

표A-35. Dipping type Plant scale 시제품 미생물 분석 결과

Analysis	Result
<i>Clostridium perfringens</i>	negative
<i>Bacillus cereus</i>	<10
<i>Staphylococcus aureus</i>	negative
<i>E. coli</i>	<10
Total count	200



그림A-31. Dipping type Plant scale 시제품

제1위탁. 치즈 유형별 물성평가 체계 구축 및 시제품 분석

[1차년도 : 시판 치즈 제품의 품질특성 평가 및 평가체계구축]

1. 연구개발 수행과정

1) 치즈 제품 형태에 따른 물성 분석 방법 문헌 조사(총 29편)

① Block type

- Block type 치즈와 관련된 11편의 논문을 찾았으며 각 논문을 분석한 결과(표B-1), 11편 모두 texture를 측정하였으나 동적점탄성 분석은 1편만 있음. 대부분 동물성 치즈연구로 11편중에 1편만이 식물성 치즈 연구였음.

- Texture 측정 방법으로는 texture analyzer(TA)를 이용하여, texture profile analysis (TPA), 단일 압축, 침투 test와 같은 여러 평가 방법이 사용되었고, 그 중 TPA로 물성을 평가한 논문이 8편으로 가장 많았음.

- 샘플의 전처리는 대부분 cube형태 혹은 기구(cork borer, mould)를 사용하여 채취하였음.

표B-1. Block type 치즈 관련 주요 논문(11편)의 물성 분석

Type	동-식물성	Cheese	Added	Sample	Texture	Rheology	Reference
Block type	식물성	Soy cheese	Soy	15 x 15 x 20 mm	Hardness, Adhesiveness, Cohesiveness, Springiness * 20 mm round adapter * load cell: 10kg * clearance: 10 mm	-	Korean Society of Food and Cookery Science. 17: 65-79 (2001)
	동물성	Cheddar cheese	-	25 x 25 x 25 mm	Firmness, Springiness, Cohesiveness, Adhesiveness, Chewiness * TPA test * 75 mm compression plate * load cell 100 kg	-	Journal of the Science of Food and Agriculture. 87: 641-650 (2007)
	동물성	Cheddar cheese	-	50 x 50 x 10 mm	Firmness, Adhesiveness, Springiness, Cohesiveness, Chewiness, Resilience * TPA test * 25mm diameter cylinder * load cell 10 kg * trigger force 0.020 g	-	Journal of Chemistry. Article ID 8690380 (2016)
	동물성	Crescenza cheese	-	* Cheese mould 사용	Hardness, Adhesiveness * 단일 압축 test * stainless steel spherical probe with a 12.7mm(0.5") diameter * load cell 30 kg * trigger force of 5 g	-	Journal of Food Quality. Article ID 5062124 (2018)
	동물성 + 식물성	Swiss cheese	Sunflower oil	* Cork borer 사용 25 mm diameter x 23 mm height	Hardness, Adhesiveness, Cohesiveness, Springiness, Chewiness, Gumminess * TPA test * 37mm dia flat plate probe * 5 kg loading cell	-	Journal of the American Oil Chemists' Society. 77: 917-924 (2000)
	동물성 + 식물성	white fresh cheese	Canola oil	* Cork borer 사용 10 mm diameter x 10 mm height	Hardness, Adhesiveness, Cohesiveness, Springiness * TPA test * 50% 압축	-	Food Research International. 40: 529-537 (2007)
	동물성	Cheese analogue	-	표면으로부터 10 mm	Hardness, Adhesiveness, Cohesiveness, Springiness * TPA test * A flat plate probe (P / 0.5-Delrin cylinder probe) with 0.5 inches of diameter. * Trig force was 20 g	G', G'', tan (δ)	International Journal of Food Science and Technology. 43: 1581-1592 (2008)
	동물성	Cheddar cheese	-	* Cork borer 사용 10 mm diameter x 10 mm height	Firmness, Fracturability, Elasticity, Cohesiveness 80% 압축	-	International Dairy Journal. 12: 435-446 (2002)
	동물성	Gouda cheese	-	20 x 20 x 20 mm	Hardness, Adhesiveness, Cohesiveness, Springiness, Chewiness, Gumminess, Resilience * TPA test 직경 5 mm probe	-	Journal of Milk Science and Biotechnology. 34(4): 245-254 (2016)
	동물성	Gouda cheese	-	* Cheese mould 사용 23 mm diameter x 21.5 mm height	Hardness, Adhesiveness, Cohesiveness, Springiness, Chewiness, Gumminess * TPA test load cell of 0-500 and 0-50 N	-	Journal of Food Engineering. 79: 1364-1373 (2007)
	동물성	Mozzarella	-	-	Hardness, Fracturability, Adhesiveness, Cohesiveness, Springiness, Chewiness, Gumminess * TPA test	-	Journal of Milk Science and Biotechnology. 33(4): 247-252 (2015)

② Spread type

- Spread type 치즈 논문 13편 조사 결과(표B-2), texture를 측정 한 논문은 11편, 동적점탄성 특성을 연구한 논문은 7편이었음. Texture 측정 방법 중 TPA가 8편으로 가장 많았고, texture와 동적점탄성을 둘 다 연구한 논문은 6편으로 조사됨.
- 동적점탄성은 대부분 rheometer에 평판 plate를 사용하여 측정함.
- 샘플의 전처리는 대부분 기구(cork borer, mould, syringe)를 사용하여 채취하였음.

표B-2. Spread type 치즈 관련 주요 논문(13편)의 물성 분석

Type	동·식물성	Cheese	Added	Sample	Texture	Rheology	Reference		
Spread type	식물성	Soy cheese	Soy	—	Firmness, Consistency, Cohesiveness	* cylindrical back extrusion cell (50 mm diameter and 60 mm deep) * 50 kgf load cell	G', G'', complex viscosity	* 25-mm parallel plate geometry with a gap of 1800 μm * The dynamic oscillatory test. All tests were conducted in triplicate at 70 °C temperature	Journal of Food Science and Technology. 55: 1667-1674 (2018)
	식물성	Soy cheese	Soy	* Cork borer 사용 15 mm diameter x 15 mm height	1. Firmness 2. Hardness, Fracturability, Springiness, Cohesiveness	1. Heavy duty plate, form (HDP/90) and cone perspex probe of 90° angle 2. * TPA test 80% compression	G', G'', phase angle (δ)	* 20 mm diameter parallel plate with a gap of 1 mm * 0.1 to 100 Hz at a constant of 5 Pa shear stress over a period of 15 min, and 20 Pa shear stress over a period of 12 min for 25 °C and 4 °C	British Food Journal. 113: 1147-1172 (2011)
	식물성	Spread cheese	Peanut milk	—	—	—	—	—	Journal of Biotechnology, Computational Biology and Biotechnology. 99(4): 435-441 (2018)
	동물성 식물성	Requeijão cremoso	hydrogenated vegetable fat	—	Hardness, Elasticity, Adhesiveness	* TPA test * load cell 5.0 kg	—	—	Food Research International. 43: 723-729 (2010)
	동물성	Processed cheese	Inulin	* Cheese mould 사용 65 mm diameter x 50 mm height	Hardness, Adhesiveness, Cohesiveness, Springiness, Chewiness, Gumminess	* TPA test * Cone Probe of 25 mm diameter * load cell 25 N * 60 mm back-off distance * trigger force 0.15 N	—	—	International Journal of Dairy Science. 14(1): 12-20 (2019)
	동물성	young cheddar, five-year old cheddar, mozzarella pizza-style cheese, feta, sliced processed cheese, cream cheese, light cream cheese, parmesan, and stabilized camembert	—	* Cylinder 사용 10 mm diameter x 10 mm height	Hardness, Fracturability, Adhesiveness, Cohesiveness, Springiness, Resilience	* TPA test * penetration 4 mm cylindrical probe * compression 25 mm acrylic cylinder	—	—	Food Research International. 121: 269-277 (2019)
	동물성	Cream cheese	—	Gel - 30 mm penetration Cheese - 20 mL syringes with an internal diameter of 16 mm	Hardness	1. Gel - penetration test * 5 kg cell * 45 mm cylindrical stainless steel flat probe 2. Cheese - TPA test * 50 mm aluminum cylindrical probe	* storage modulus (G')	25-mm serrated parallel plate * 5 to 80°C, 80°C, 5 to 10°C A frequency of 0.1 Hz and a strain of 0.05% were used	Journal of Dairy Science. 101: 6762-6775 (2018)
	동물성	Goat cheese	—	—	—	—	G', G'', complex viscosity	* 25 mm stainless steel parallel plate (gap size of 1 mm) * 1-100 Hz set at 1.5 Pa	Food Science and Technology. 33(2): 233-238 (2013)
	동물성 식물성	Cheese analogue	Sunflower oil	* Cylinder 사용	Hardness, Adhesiveness	* 15 mm 길이 Penetration test * stainless steel conical probe (P6)	—	—	International Journal of Dairy Technology. 68: 576-584 (2016)
	동물성	Myzithra cheese	—	* Cheese mould 사용 22 mm diameter x 22 mm height	Hardness, Cohesiveness, Adhesiveness, Springiness, Stringiness, Gumminess	* TPA test * compression between two metal discs (Ø = 100 mm) * 300-N maximum load force cell two consequent compression-decompression cycles	—	—	European Food Research and Technology. 241: 737-748 (2015)
	동물성	Spreadable ricotta cheese	—	* Cheese mould 사용 30 mm height	Hardness, Adhesiveness, Cohesiveness, Springiness	* TPA test * Cylindrical glass containers (38.8 mm ID) * cylinder probe (25.4 mm diameter) * 50% 변형	G', G'', tan (δ)	* parallel plates geometry (50 mm diameter, 1 mm gap) 10 to 30°C	International Dairy Journal. 94: 7-15 (2019)
	동물성 식물성	Myzithra cheese	Olive oil	* Cheese mould 사용 51 mm diameter x 0.98 mm height	Distance, Force	* flat disk shaped metal plunger attached to the cell whose diameter was 0.1 m * 30 kg maximum load force cell. * 50% 압축	Elongational viscosity, Shear creep recovery modulus of Elasticity (G) values, viscosity	* 등니모양 plate * 25 °C에서 진행	LWT - Food Science and Technology. 107: 318-324 (2019)
	동물성	Cream cheese	β-glucan and phytosterols	* Cheese mould 사용 54 mm diameter x 44 mm height	Firmness, Spreadability, Adhesiveness	* TPA test * cone shaped acrylic probe (TA15/1000, 45° angle, 30 mm diameter) * distance 20 mm * trigger force 4.0 g	G', G''	* 40 mm stainless geometry gap distance of 1,000 μm * 0.01 to 100 Hz	Journal of Texture Studies. 49: 11-22 (2018)

③ Dipping type

- Dipping type 치즈의 5편 논문 조사 결과(표B-3), texture를 측정 한 논문은 3편, 유변학적 특성을 연구한 논문은 4편이었음.
- 유변학적 특성은 4편 모두 rheometer를 사용하여 동적점탄성 특성을 연구함.
- 샘플의 전처리는 대부분 기구(cork borer, mould, syringe)를 사용하여 채취하였음.

표B-3. Dipping type 치즈 관련 주요 논문(5편)의 물성 분석

Type	동-식물성	Cheese	Added	Sample	Texture	Rheology	Reference
Dipping type	식물성	Petit-suisse cheese	Soy	50 g samples contained in individual plastic pots	Hardness, Adhesiveness, Springiness, Cohesiveness, Gumminess * TPA test 25 mm acrylic cylinder probe 5 반복	—	LWT - Food Science and Technology, 59: 411-417 (2014)
	동물성	Yogurt	—	—	—	G', G'', tan (δ)	* cone-plate geometry * 0.1 mL yogurt 샘플을 inset plate에 loading cone-plate geometry (CP25-1, 12.5 mm diameter, 1° angle, and 0.05-mm gap) Journal of Dairy Science, 94: 5330-5340 (2011)
	동물성	Cheese fondue	—	—	—	G', G''	* Couette geometry (32mm cup diameter, 29 mm bob diameter, and 44 mm bob length) 사용. American Chemical Society Omega, 1103-1109 (2019)
	동물성	Yogurt	—	—	Firmness, Adhesiveness, Cohesiveness * TPA test * cylindrical probe with a flat base of 12.7 mm diameter	shear stress, viscosity, G', G'', tan (δ)	* parallel-plate geometry Journal of Food Engineering, 245: 11-17 (2019)
	동물성	Processed cheese sauce	—	transferred into cylindrical polypropylene pots (52 mm in diameter; 50 mm high)	Hardness * penetration event (cylindrical probe P20 with 20 mm) * trigger force 5g * realized at 6 ± 2°C * each pot was measured immediately after removing from the fridge	G', G'', G*	* plate-plate geometry (35mm diameter, 1 mm gap) * control shear stress mode at a frequency ranging from 0.01 to 10.00 Hz (at 20.0 ± 0.1°C) LWT - Food Science and Technology, 107: 178-184 (2019)

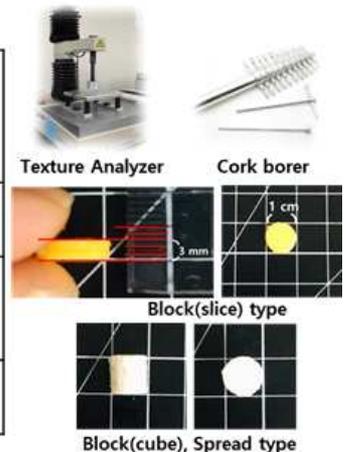
2) 치즈 제품 형태별 물성측정 항목 및 평가방법 확립

① TPA

- Block, Spread type의 조직감 측정(texture)은 문헌조사 자료를 기반으로 다수의 논문에서 분석한 TPA를 우선적으로 평가방법으로 선정하였으며, 구체적인 조건들은 예비 실험을 통하여 결정하였음.
- 샘플은 cork borer를 이용하여 10 mm 지름의 cylinder 형태로 채취하였고, Block (cube) 과 Spread type 치즈는 위, 아래 표면 부분을 절단하여 높이를 10 mm로 맞춤. Block (slice) type의 경우는 시판 제품마다 높이가 2~3 mm로 상이하였지만, 물리적으로 변형을 시킬 경우 샘플이 변형될 우려가 있기 때문에 원형 그대로의 물성을 측정함(그림B-1).
- 측정기기(texture analyzer)의 probe는 샘플 사이즈를 고려하여 35 mm cylinder로 결정함.
- 측정항목은 경도(hardness), 부착성(adhesiveness), 응집력(cohesiveness), 탄력성(springness), 씹힘성(chewiness), 점착성(gumminess), 복원성(resilience)을 측정함(n=9).

▪ Texture profile analysis (Block, spread type)

시료 전처리 (직경 X 높이) mm	<ul style="list-style-type: none"> • Cork borer를 이용하여 sample 채취 • 10 mm X 10 mm (Cube, spread 형태) • 10 mm X 2~3 mm (Slice 형태, 제품에 따라 높이는 상이함) • 3분간 실온에 방치 후 측정 		
사용 기기 Probe	<ul style="list-style-type: none"> • Stable micro system TA-XT2i • 35 mm 지름의 cylinder probe (P/35) 		
측정 조건	<ul style="list-style-type: none"> • 25 kg load cell • 50% compression 	Test speed	<ul style="list-style-type: none"> • Pre test speed : 3 mm/s • Test speed : 1 mm/s • Post test speed : 3 mm/s
측정 항목	Hardness, Adhesiveness, Cohesiveness, Springness, Chewiness, Gumminess, Resilience		



그림B-1. TPA 평가방법 및 조건과 샘플 전처리 방법.

② 동적점탄성

- Spread, Dipping type의 동적점탄성(dynamic viscoelasticity)은 rheometer에 40 mm 평판 geometry를 장착하여 측정함.
- 문헌조사와 치즈 샘플의 예비실험을 거쳐 측정 조건을 설정하였음(그림B-2). 진동수의 범위는 0.1에서 10 Hz까지 0.1%의 변형률로 25°C의 고정된 온도에서 샘플을 측정함.
- 샘플은 1스푼(3~4 g)을 plate에 올린 후 geometry로 눌러 1 mm의 gap으로 고정시킴. 압착되어 외부로 나온 샘플은 제거하고, plate와 geometry 사이의 수분증발 방지를 위해 실리콘 오일을 도포함.
- 측정항목으로는 탄성을 나타내는 지표인 저장계수(G'), 점성을 나타내는 지표인 손실계수(G'')를 측정하고, 손실계수를 저장계수로 나눈 탄젠트(δ)를 평가함. 이와 같이 진동수에 따른 복소 점도(complex viscosity)를 측정함($n=3$).

▪ Dynamic viscoelasticity test (Spread, Dipping type)

사용 기기 Geometry	<ul style="list-style-type: none"> • Discovery hybrid rheometer-1 – Peltier plate • 40 mm 지름의 평판 geometry
측정 조건	<ul style="list-style-type: none"> • Frequency - 0.1 to 10 Hz • Strain - 0.1% • 수분증발을 막기 위해 실리콘 오일 도포 • Gap - 1 mm • Temperature - 25°C
측정 항목	Storage modulus(G'), Loss modulus(G''), Loss tangent(δ) Complex viscosity(η^*)



그림B-2. 동적점탄성 측정 조건 및 측정 항목.

③ 점도

- Dipping type 치즈의 점도는 rheometer(DHR)에 40 mm 평판 geometry를 장착하여 측정하였고, 측정 조건은 25°C의 고정된 온도에서 전단 속도는 0.01~100(1/s)의 범위로 설정되었으며, 샘플의 준비는 동적점탄성 조건과 동일하게 준비함(그림B-3).
- 전단속도(shear rate)에 따른 전단응력(shear stress)을 구하여 점도(viscosity)를 측정함.
- 예비실험 결과를 여러 가지 모델식을 이용한 결과, Herschel-Bulkley 모델의 R^2 이 가장 높게 나타나 선정하였고, 모델식에 대입하여 유동지수(rate index)를 구함($n=3$).

◎ Herschel-Bulkley model

$$\tau - \tau_0 = K(\dot{\gamma})^n$$

τ = Shear stress(Pa)

τ_0 = Yield stress(Pa)

K = Consistency coefficient(Pa sⁿ) $\dot{\gamma}$ = Shear rate(s⁻¹)

n = Flow behaviour index

▪ Shear-rate sweep test (Dipping type)

사용 기기 Geometry	<ul style="list-style-type: none"> • Discovery hybrid rheometer-1 – Peltier plate • 40 mm 지름의 평판 geometry
측정 조건	<ul style="list-style-type: none"> • Shear rate: 0.01~100 (1/s) • 수분증발을 막기 위해 실리콘 오일 도포 • Gap - 1 mm • Temperature - 25°C
측정 항목	Shear rate에 따른 shear stress를 구하여 viscosity 측정 Herschel-Bulkley 모델식에 대입하여 viscosity와 rate index 계산



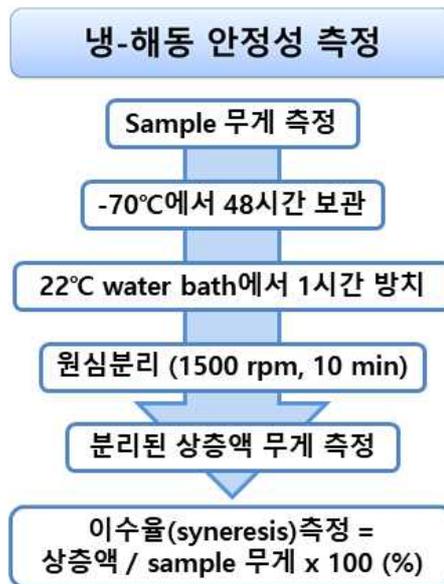
그림B-3. 점도 측정 조건 및 측정 항목.

3) 개발제품 물성 목표점 설정

- 개발 식물성 치즈의 물성 목표점을 시판 동식물성 치즈의 물성 특성을 각 항목의 범위로 나타내, 최대한 동물성 치즈의 값에 가깝고 최소 시판 식물성 치즈 사이의 값을 갖도록 함.
- TPA의 경우 각 type별 주요 평가항목(Block-경도/응집력, Spread-점착성/응집력)을 목표 항목으로 설정하고, Dipping type의 유동특성은 점도와 유동지수를 목표 항목으로 설정함.
- 동적점탄성은 G', G''을 측정하여 탄성과 점성의 특성을 확인하도록 함.

4) 시판 치즈 냉해동 안정성 분석

- 시판 치즈 제품(Block, Spread, Dipping)의 냉해동 안정성을 평가하기 위해 이수율 측정을 하기 방법에 따라 실시함.- 각 샘플 10 g을 -70°C의 온도에서 48시간 동결한 함. 샘플을 22°C water bath에서 1시간 해동한 뒤, 1500 rpm에서 10분간 원심분리하여 분리된 상층액의 무게를 측정하여 이수율을 계산하였음(그림B-4).



그림B-4. 냉해동 안정성 실험 디자인.

2. 연구개발 수행내용

1) 시판 치즈 제품 물성 분석

- 샘플명은 아래와 같은 순서로 표기함.

[치즈 type _ 동식물성(A=animal, P=plant) _ 치즈 종류(CH=cheddar, P=parmesan, M=mozzarella, CR=cream) _ 제조사]

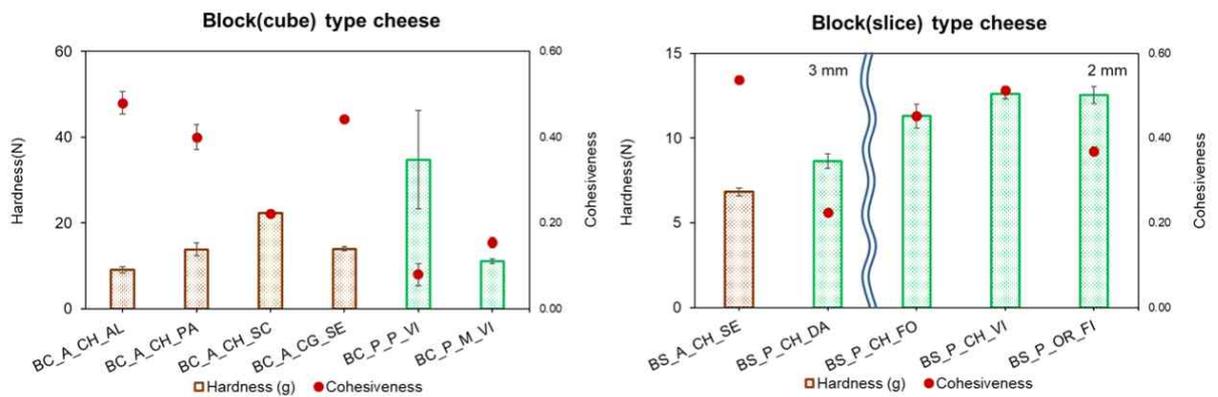
① Block(cube, slice) type 치즈의 TPA

- Block type 치즈의 TPA는 경도(hardness)와 응집력(cohesiveness)을 중점으로 동식물성 치즈 간 물성 특성을 비교함.
- 총 6종의 시판 cube 형태 치즈의 경도는 9.15~34.76 N의 범위로 측정되었고, 이 중 동물성 체다 치즈 4종은 9.15~22.39 N의 범위로 제조사에 따라 2배 이상의 차이를 보였음. 응집력은 0.08~0.48의 범위로 측정되었는데, 6가지 치즈 중 BC_A_CH_AL이 가장 높은 값을 보였음.- 시판 slice 형태 중 동물성 치즈는 3 mm 두께만 존재하나, 식물성은 2~3 mm로 다양함. 경도는 3 mm에서 6.82~8.64 N, 2 mm에서 11.30~12.60 N의 값을 나타내서, 2 mm 치즈의 경도가 2.66~5.78 N 가량 높은 것을 확인하였고, 전체 5종 중 BS_A_CH_SE가 가장 낮은 경도를 가짐. 응집력은 두께의 차이에서 상관성을 보이지는 않았고, 경도와는 반

대로 BS_A_CH_SE가 가장 높은 응집력을 가진 것으로 확인됨(표B-4, 그림 B-5).

표B-4. Block(cube, slice) 치즈의 TPA 측정 결과

Sample	Texture profile analysis							
	Hardness(N)	Adhesiveness	Springiness	Cohesiveness	Gumminess	Chewiness	Resilience	
Block type (cube)	BC_A_CH_AL	9.15±0.68 ^e	-40.20±4.64 ^d	0.75±0.03 ^a	0.48±0.03 ^a	4.39±0.31 ^d	3.28±0.32 ^c	0.20±0.02 ^b
	BC_A_CH_PA	13.87±1.45 ^c	-54.15±6.89 ^a	0.65±0.05 ^b	0.40±0.03 ^c	5.52±0.31 ^b	3.59±0.28 ^b	0.13±0.01 ^c
	BC_A_CH_SC	22.39±0.55 ^b	-29.89±12.85 ^e	0.52±0.03 ^d	0.22±0.01 ^e	4.98±0.27 ^c	2.57±0.23 ^d	0.06±0.01 ^a
	BC_A.CG_SE	14.02±0.51 ^c	-21.50±1.12 ^b	0.75±0.02 ^a	0.44±0.01 ^b	6.20±0.20 ^a	4.63±0.18 ^a	0.24±0.01 ^a
	BC_P_P_VI	34.76±11.49 ^a	-1.84±2.44 ^a	0.60±0.08 ^{bc}	0.08±0.03 ^f	2.63±0.75 ^e	1.57±0.46 ^e	0.06±0.02 ^a
	BC_P_M_VI	11.10±0.59 ^c	-5.99±3.20 ^a	0.55±0.15 ^{cd}	0.15±0.01 ^a	1.72±0.21 ^f	0.94±0.23 ^f	0.01±0.01 ^c
Block type (3 mm slice)	BS_A_CH_SE	6.82±0.23	-13.49±0.85	0.80±0.02	0.54±0.01	3.66±0.12	2.94±0.14	0.19±0
	BS_P_CH_DA	8.64±0.42	-13.22±3.60	0.71±0.06	0.22±0.01	1.94±0.14	1.38±0.20	0.08±0.01
Block type (2 mm slice)	BS_P_CH_FO	11.30±0.70 ^b	-12.89±3.97 ^{ab}	0.92±0.03 ^b	0.45±0.01 ^b	5.11±0.35 ^b	4.68±0.30 ^b	0.22±0.02 ^b
	BS_P_CH_VI	12.60±0.29 ^a	-10.16±2.22 ^a	0.97±0.01 ^a	0.51±0.01 ^a	6.45±0.18 ^a	6.23±0.18 ^a	0.26±0.01 ^a
	BS_P_OR_FI	12.53±0.51 ^a	-13.49±2.66 ^b	0.85±0.03 ^c	0.37±0.01 ^c	4.62±0.28 ^c	3.92±0.30 ^c	0.15±0.01 ^c



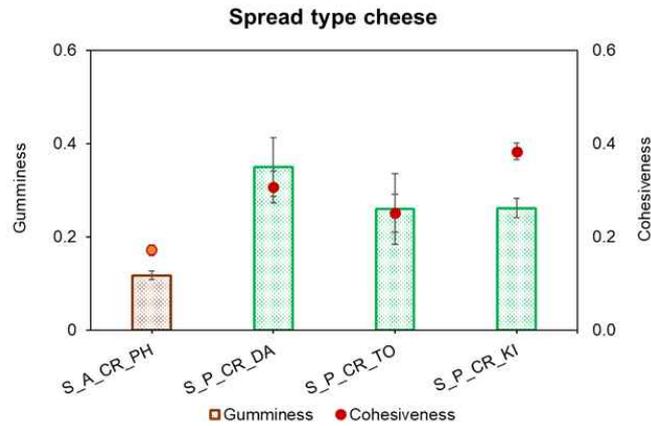
그림B-5. Block(cube, slice) type 치즈의 경도와 응집력.

② Block(cube, slice) type 치즈의 TPA

- 반고체(semi-solid) 형태인 Spread type 치즈의 TPA 분석은 점착성(gumminess)과 응집력(cohesiveness)을 중심으로 동식물성 치즈 간 물성 특성을 비교함.
- 점착성은 0.12~0.35, 응집력은 0.17~0.38의 범위로 측정되었으며, 두 항목 모두 동물성인 S_A_CR_PH이 식물성 치즈에 비해 낮게 나타남(표B-5, 그림B-6).

표B-5. Spread 치즈의 TPA 측정 결과

Sample	Texture profile analysis							
	Hardness(N)	Adhesiveness	Springiness	Cohesiveness	Gumminess	Chewiness	Resilience	
Spread type	S_A_CR_PH	0.68±0.03 ^c	-19.74±2.95 ^a	0.28±0.03 ^c	0.17±0.01 ^d	0.12±0.01 ^c	0.03±0.01 ^c	0.03±0 ^c
	S_P_CR_DA	1.13±0.10 ^a	-95.93±30.17 ^b	0.73±0.11 ^a	0.31±0.03 ^b	0.35±0.06 ^a	0.26±0.09 ^a	0.06±0.01 ^b
	S_P_CR_TO	1.02±0.16 ^b	-17.21±8.47 ^a	0.53±0.09 ^b	0.25±0.04 ^c	0.26±0.08 ^b	0.14±0.07 ^b	0.07±0.01 ^b
	S_P_CR_KI	0.68±0.07 ^c	-8.12±1.62 ^a	0.72±0.07 ^a	0.38±0.02 ^a	0.26±0.08 ^b	0.16±0.01 ^b	0.16±0.01 ^a



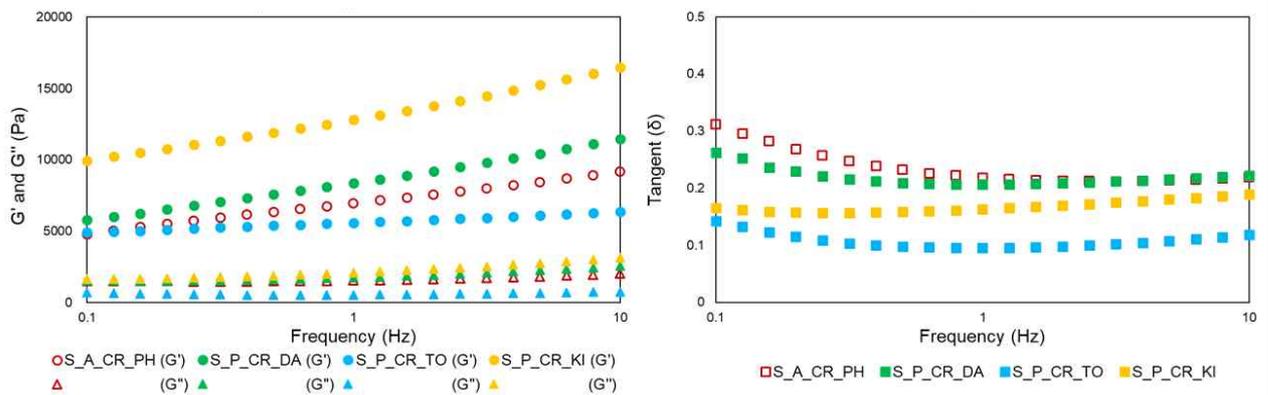
그림B-6. Spread type 치즈의 점착성과 응집력.

③ Spread type 치즈의 동적점탄성

- 진동수 1 Hz 상 동적점탄성 저장계수(G')와 손실계수(G'')에서 동식물성 간의 유의적인 차이는 나타나지 않았으나, 탄젠트는 동물성인 S_A_CR_PH가 가장 높은 것으로 측정됨(표 B-6).
- 진동수 0.1~10 Hz 범위에서 4가지 Spread 치즈 제품 모두 G' 값이 G'' 보다 높게 나타나, 탄성적인 특성을 갖는 것을 확인함(그림B-7).

표B-6. Spread type 치즈의 동적점탄성 측정 결과(1 Hz frequency)

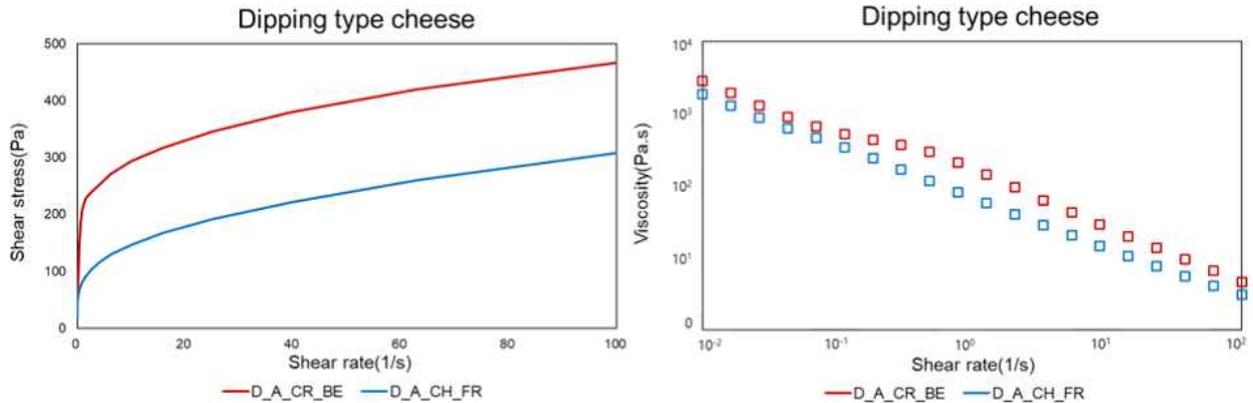
Sample	Dynamic viscoelasticity at 1 Hz (frequency)			
	Storage modulus(G') (Pa)	Loss modulus(G'') (Pa)	Tangent (δ)	Complex viscosity (Pa.s)
S_A_CR_PH	6953.81±535.61 ^c	1518.39±114.50 ^c	0.22±0 ^a	1132.81±87.17 ^c
S_P_CR_DA	8356.40±203.20 ^b	1725.44±40.22 ^b	0.21±0 ^b	1358.02±32.94 ^b
S_P_CR_TO	5591.82±105.07 ^d	534.25±13.53 ^d	0.10±0 ^d	894.02±16.74 ^d
S_P_CR_KI	12801.10±674.26 ^a	2090.10±111.07 ^a	0.16±0 ^c	2064.34±108.75 ^a



그림B-7. Spread type 치즈의 진동수에 따른 동적점탄성.

④ Dipping type 치즈의 점도

- Dipping type 치즈는 전단 속도가 증가할수록 전단응력이 증가하는 pseudoplastic 경향을 보였으며(그림B-8), 이를 Herschel-Bulkley 모델식에 대입한 결과 D_A_CR_BE의 점도는 450.67 Pa.s, D_A_CH_FR의 점도는 63.26 Pa.s으로 나타나 D_A_CH_FR가 더 묽은 것으로 측정됨.
- 유동지수는 D_A_CR_BE이 0.10, D_A_CH_FR이 0.33으로 나타났음(표B-7).
- 두 제품 모두 전단 속도가 올라감에 따라 점도가 감소하며, 유동지수의 값이 1보다 작기 때문에 전단 희석(shear thinning)의 거동 특성을 가지는 것을 확인함.



그림B-8. Dipping type 치즈의 전단 속도에 따른 전단 응력 및 점도.

표B-7. Herschel-Bulkley 모델 식을 이용한 dipping type 치즈의 점도 측정

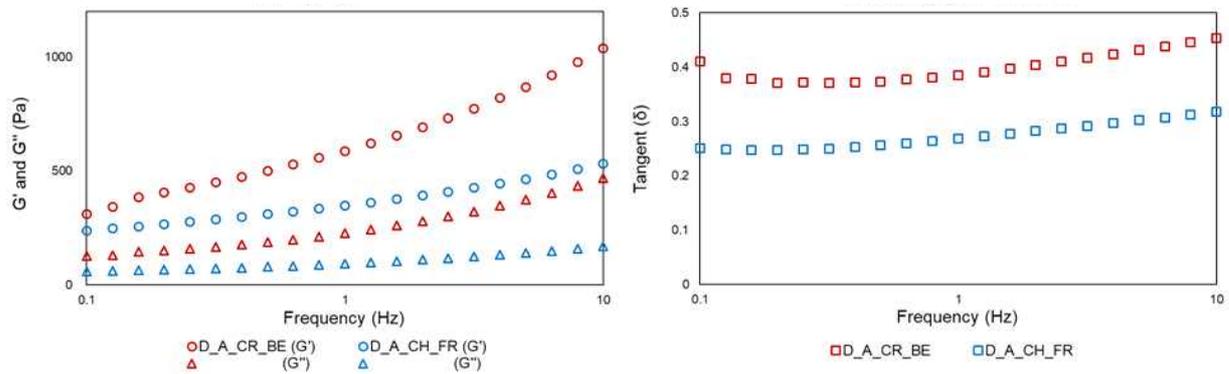
	Sample	Viscosity (Pa.s)	Rate index	R ²
Dipping type	D_A_CR_BE	450.67±97.56	0.10±0.02	0.9864
	D_A_CH_FR	63.26±1.08	0.33±0	0.9972

⑤ Dipping type 치즈의 동적점탄성

- Dipping type 치즈의 동적점탄성 결과는 진동수 0.1~10 Hz 범위에서 G'값이 G''보다 높게 나타나, 탄성적인 특성을 갖는 것을 확인함(그림B-9).
- D_A_CR_BE가 모든 측정 항목에서 높은 값을 보였으며, 이 중 탄젠트의 값이 높은 것은 갖고 있는 점탄성 성질 중 점성이 차지하고 있는 비중이 높다고 볼 수 있음(표B-8).
- D_A_CR_BE는 D_A_CH_FR에 비해 점도와 동적점탄성 모두 높은 수치를 가져 더 끈적거리는 물성을 갖고 있으나, 두 치즈 모두 pseudoplastic 경향과 전단 희석의 거동 특성을 갖고 있으며 점탄성 특성이 유사한 것을 확인함.

표B-8. Dipping type 치즈의 동적점탄성 측정 결과(1 Hz frequency)

Sample	Dynamic viscoelasticity at 1 Hz (frequency)			
	Storage modulus(G') (Pa)	Loss modulus(G'') (Pa)	Tangent (δ)	Complex viscosity (Pa.s)
Dipping type D_A_CR_BE	587.03±21.13	226.41±8.63	0.39±0	100.14±3.63
Dipping type D_A_CH_FR	348.14±5.54	93.32±1.33	0.27±0	57.36±0.90



그림B-9. Dipping type 치즈의 진동수에 따른 동적점탄성.

2) 시판 치즈 제품 물성 분석을 통한 개발 치즈의 목표점 설정

- Block type 치즈의 주요 평가 항목인 경도와 응집력을 시판되고 있는 동식물성 치즈 제품들의 물성 측정 결과로 목표 범위를 설정함(표B-9).
- Cube 형태의 물성 목표점은 동물성 체다 치즈 제품 4종의 경도 9.15~22.39 N과 응집력 0.22~0.48 범위로 설정함.
- Slice 형태의 경우 목표 범위는 경도 6.82~8.64 N과 응집력 0.22~0.54 범위로 설정하며, 시중에 판매되고 있는 식물성 치즈보다 동물성 치즈의 경도가 낮고, 응집력은 높은 것을 확인하여, 최대한 동물성에 가깝도록 개발 치즈의 물성 목표점을 설정함.
- Spread type 치즈의 물성 목표 범위는 점착성이 0.12~0.35 와 응집력 0.17~0.38 범위로 설정하고, 두 항목 모두 동물성 치즈가 식물성보다 낮은 것이 확인되어, 측정된 시판 치즈의 물성 목표 범위 내에서 값을 낮추도록 목표점을 설정함.
- Dipping type 치즈의 목표점은 점도 63.26~450.67 Pa.s, 유동지수 0.10~0.33의 범위로 설정함.

표B-9. Type별 개발 치즈의 물성 목표 범위

Type	Hardness(N)	Cohesiveness	Gumminess	Viscosity(Pa.s)/ Rate index
Block(cube)	9.15 ~ 22.39	0.22 ~ 0.48	-	-
Block (3 mm slice)	6.82 ~ 8.64	0.22 ~ 0.54	-	-
Spread	-	0.17~0.38	0.12 ~ 0.35	-
Dipping	-	-	-	63.26~450.67 / 0.10~0.33

3) 시판 치즈 제품의 냉해동 cycle에 따른 이수율(syneresis) 측정

- 시판 치즈의 냉해동 안정성 실험 결과 Block type 치즈의 경우 냉동시킨 제품을 원심분리 하여도 빠져나오는 물이 거의 없고, 방치 후에도 수분의 분리가 극소량으로 되는 것을 확인함.
- Spread, Dipping type 치즈는 해동 후에 이수가 거의 나타나지 않았고, 원심분리 후에도 침전물과 부유물 외에 수분이 나오지 않아 이수율이 없었음.
- 논문 검색 결과 치즈의 냉해동 사이클을 거쳐 안정성을 본 논문은 없으며, 대부분 전분 gel로 실험을 진행함.

[2차년도 : 주요 인자에 따른 식물성 단백질 gel의 물성 변화 및 주요 요인 분석]

1. 연구개발 수행과정

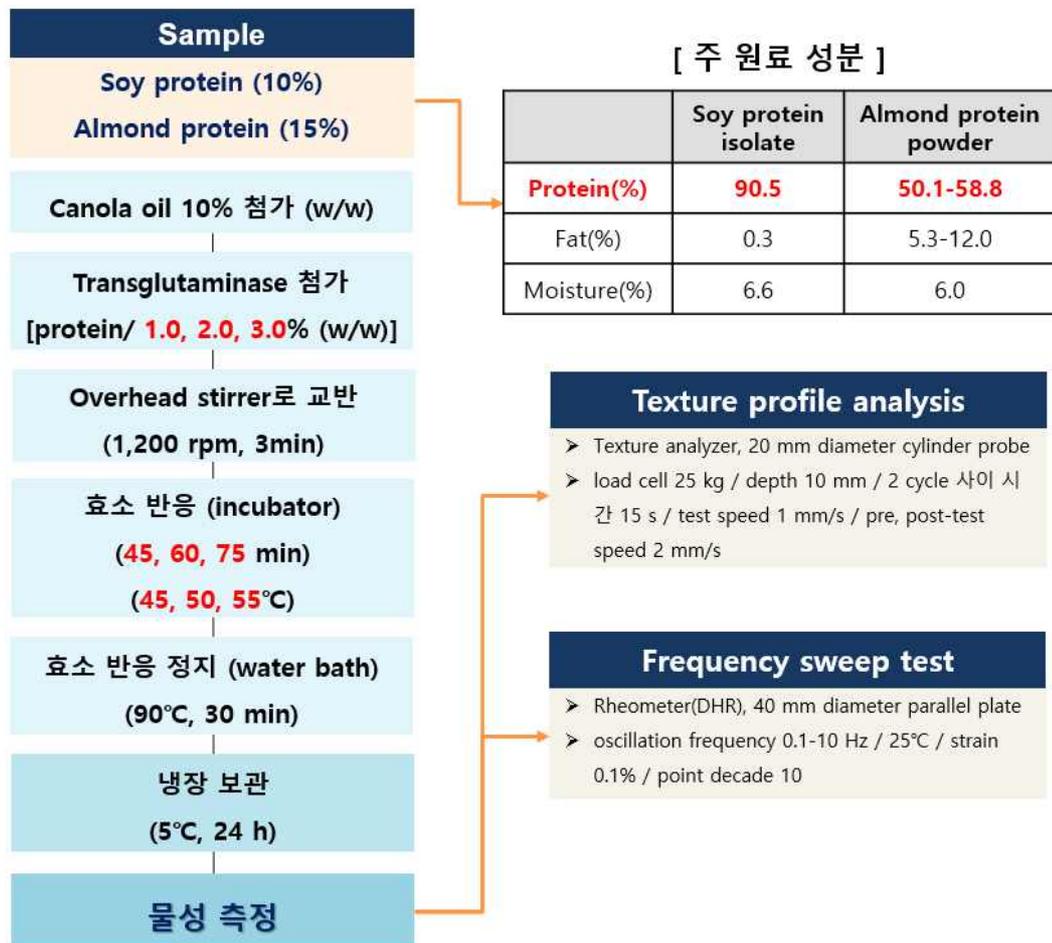
1) 시판 동물성 및 식물성 spread type 치즈 제품의 물성 평가

- 1차년에 물성 목표점으로 설정한 시판 spread type 치즈 제품 중 일부가 국내 수급이 어려워짐에 따라 물성목표점 재설정이 필요.
- 따라서 국내외 시판 spread type 치즈 6종의 물성 특성을 분석하고, 이에 따른 개발 제품의 물성 목표점 재설정을 진행함. - 샘플명은 아래와 같은 순서로 표기함.
[치즈 type _ 동식물성(A=animal, P=plant) _ 치즈 종류(CH=cheddar, P=parmesan, M=mozzarella, CR=cream) _ 제조사]
- 시판 치즈와 lab scale 개발 치즈의 texture profile analysis (TPA), 동적점탄성의 측정 조건 및 항목은 1차년도에 구축된 물성 평가 방법과 동일하게 진행함.

2) Transglutaminase(TGase) 첨가 농도, 반응 시간, 온도에 따른 식물성 단백질 원료 gel의 물성 측정

① TGase 반응 요인별 물성 평가 실험 디자인

- 식물성 단백질 원료(분리 대두 단백질, 아몬드 단백질)에 TGase 반응 요인(첨가량 0~3%, 반응 온도 45~55°C, 반응 시간 45~75 min)별 gel texture의 영향을 분석함(그림B-10).



그림B-10. TGase 반응 단백질 gel 제조방법 및 물성 측정 조건.

3) 반응표면분석(RSM)을 이용한 식물성 단백질 원료 함량 및 TGase 처리 조건에 따른 물성 분석

① 분리 대두 단백질(SPI)

- SPI gel에 미치는 SPI 함량, TGase 첨가량 및 반응 시간의 영향을 중심복합계획을 사용하여 설계함(표B-10).

- 예비실험을 통한 요인 수준을 설정함.

: SPI 함량(10~12%), TGase 첨가량(1.0~6.0%), 반응 시간(1.0~7.0 h)

표B-10. 중심복합계획 및 TGase 반응 SPI gel의 경도

Run Number	Coded variables			Process variables			Texture
	X ₁	X ₂	X ₃	X ₁	X ₂	X ₃	Hardness
1	-2	0	0	10.0	3.50	4.0	26.42
2	-1	-1	-1	10.5	2.25	2.5	28.43
3	-1	-1	1	10.5	2.25	5.5	36.59
4	-1	1	-1	10.5	4.75	2.5	38.02
5	-1	1	1	10.5	4.75	5.5	39.14
6	0	0	0	11.0	3.50	4.0	47.31
7	0	0	0	11.0	3.50	4.0	45.71
8	0	-2	0	11.0	1.00	4.0	31.77
9	0	2	0	11.0	6.00	4.0	51.05
10	0	0	-2	11.0	3.50	1.0	33.62
11	0	0	2	11.0	3.50	7.0	50.42
12	1	-1	-1	11.5	2.25	2.5	56.52
13	1	-1	1	11.5	2.25	5.5	60.60
14	1	1	-1	11.5	4.75	2.5	66.94
15	1	1	1	11.5	4.75	5.5	68.29
16	2	0	0	12.0	3.50	4.0	75.64

X1: 단백질 원료 농도(%), X2: 효소 농도(%/단백질 원료), X3: 효소 반응 시간(h)

② 아몬드 단백질

- 아몬드 단백질 gel에 미치는 아몬드 단백질 함량, TGase 첨가량 및 반응 시간의 영향을 중심복합계획을 사용하여 설계함(표B-11).

- 예비실험을 통한 요인 수준을 설정함.

: 아몬드 단백질 함량(15~25%), TGase 첨가량(1.0~3.0%), 반응 시간(1.0~4.0 h)

표B-11. 중심복합계획 및 TGase 반응 아몬드 단백질 gel의 경도

Run Number	Coded variables			Process variables			Texture
	X ₁	X ₂	X ₃	X ₁	X ₂	X ₃	Hardness
1	-2	0	0	15.0	2.0	2.50	28.65
2	-1	-1	-1	17.5	1.5	1.75	29.68
3	-1	-1	1	17.5	1.5	3.25	32.87
4	-1	1	-1	17.5	2.5	1.75	35.26
5	-1	1	1	17.5	2.5	3.25	37.44
6	0	0	0	20.0	2.0	2.50	39.44
7	0	0	0	20.0	2.0	2.50	39.86
8	0	-2	0	20.0	1.0	2.50	35.99
9	0	2	0	20.0	3.0	2.50	48.52
10	0	0	-2	20.0	2.0	1.00	34.61
11	0	0	2	20.0	2.0	4.00	51.28
12	1	-1	-1	22.5	1.5	1.75	50.09
13	1	-1	1	22.5	1.5	3.25	56.49
14	1	1	-1	22.5	2.5	1.75	60.29
15	1	1	1	22.5	2.5	3.25	54.82
16	2	0	0	25.0	2.0	2.50	78.92

X1: 단백질 원료 농도(%), X2: 효소 농도(%/단백질 원료), X3: 효소 반응 시간(h)

4) *In vitro* 단백질 소화율 평가체계 구축

① 유제품 및 식물성 단백질의 *in vitro* 단백질 소화율 분석 문헌조사

- *In vitro* 단백질 소화율 연구 중 유제품 및 식물성 단백질에 대한 사용 소화효소, 측정 방법 관련하여 문헌조사를 진행함(표B-12).
- 소화율 측정 방법으로는 Kjeldahl method를 이용하여 소화시간에 따른 질소의 방출량, 소화 전 후 질소량을 정량하여 측정하는 방법이 10편 중 5편으로 가장 많았고, 소화액의 pH 측정을 통한 분해율 측정법, 소화액의 탁도를 흡광도로 측정하는 방법 등이 있음. - 소화율 측정 시 소화 조건으로 인공 장액(simulated intestinal fluid, SIF)을 이용하여 소화율을 측정 한 논문이 2편, 인공 위액(simulated gastric fluid, SGF)와 장액(simulated intestinal fluid, SIF)을 모두 이용한 소화율 분석이 8편인 것을 확인함. 소화시간은 인공 장액을 단독 이용 시 15분 동안 분석하였으며, 인공 위액과 장액을 병용 시 각각 2시간 동안 처리함.
- 단백질 소화율 실험에서 소화효소로는 pepsin, pancreatin, trypsin, chymotrypsin이 사용 됨. 조사한 10편의 논문에서 사용된 소화효소는 pepsin(3편), pepsin+pancreatin(3편), pepsin+trypsin(2편), pepsin+chymotrypsin(2편)임을 확인함.

표B-12. 유제품 및 식물성 단백질의 *in vitro* 단백질 소화율 분석 관련 주요 논문(10편)

Protein	Method	Enzyme	Reference
Milk, egg	Non protein nitrogen (NPI)	Pepsin, pancreatin	Journal of the East Asian Society of Dietary Life, 11(2): 104-111 (2001)
Milk	Duma method-Non protein nitrogen (NPN)	Pepsin, pancreatin	Journal of Agricultural and Food Chemistry, 63: 6787-6798 (2005)
Sorghum protein	Turbidity assay (absorbance 562 nm)	Pepsin	Plant Breeding, 127: 579-586 (2008)
Buckwheat protein	Kjeldahl method (Nitrogen release)	Pepsin, trypsin	Journal of Food Engineering, 82(4): 568-576 (2007)
Soy protein	Kjeldahl method (Nitrogen release)	Pepsin, trypsin	Plant foods for human nutrition, 68: 124-130 (2013)
Soy protein, rice protein	Kjeldahl method (Nitrogen release)	Pepsin, pancreatin	International Journal of Food Properties, 17(8): 1797-1804 (2014)
Soy protein	Kjeldahl method	Pepsin	Journal of Agricultural and Food Chemistry, 53: 6340-6346 (2005)
Soy, milk (cheese)	Kjeldahl method	Pepsin	International Food Research Journal, 20(6): 3373-3380 (2013)
Quinoa	pH 측정 (Multi enzyme protein digestibility)	Trypsin, chymotrypsin, peptidase	Annals of Agricultural Sciences, 60(2): 297-305 (2015)
Soybean (Tufu)	pH 측정 (Multi enzyme protein digestibility)	Trypsin, chymotrypsin, peptidase	Journal of Food Technology, 3(2): 182-187 (2005)

② 예비실험을 통한 *in vitro* 단백질 소화율 효소 및 조건 확립

- 본 실험에는 우유(단백질 함량 3 g/100 mL)를 사용하였으며, 효소미처리균, 위 환경만을 조성한 pepsin 처리균, 위와 장 환경을 모두 조성한 pepsin+pancratin 처리균, 위와 장 환경을 모두 조성한 pepsin+trypsin 처리균으로 실험군을 나누어 실험함.
- 실험방법은 시료를 37°C에서 1 M HCl를 이용하여 pH 2로 조절함. 2% pepsin이 첨가된 1 mM HCL를 제조함. 시료에 제조된 1mM HCL을 1:12.5 (pepsin:protein) (w/w)의 비율로 첨가함. 37°C에서 140rpm으로 2시간동안 교반 후, 이를 0.5 M NaOH를 이용해 pH 7.0으로 조절하여 pepsin의 효소활성을 불활성화시킴. 0.4% pancreatin이 첨가된 0.1 M NaHCO₃을 제조하여 장관의 효소용액을 제조 후 1:62.5(pancreatin:protein) (w/w)의 비율로 효소용액을 첨가함. 37°C에서 140rpm으로 2시간동안 교반 후, 동량의 10% trichloro acetic acid(TCA)를 첨가하여 9,900 g에서 15분간 원심분리한 뒤, TCA 가용성 분획의 흡광도를 280nm에서 측정함. 소화율은 일정시간동안의 흡광도로 함.

2. 연구개발 수행내용

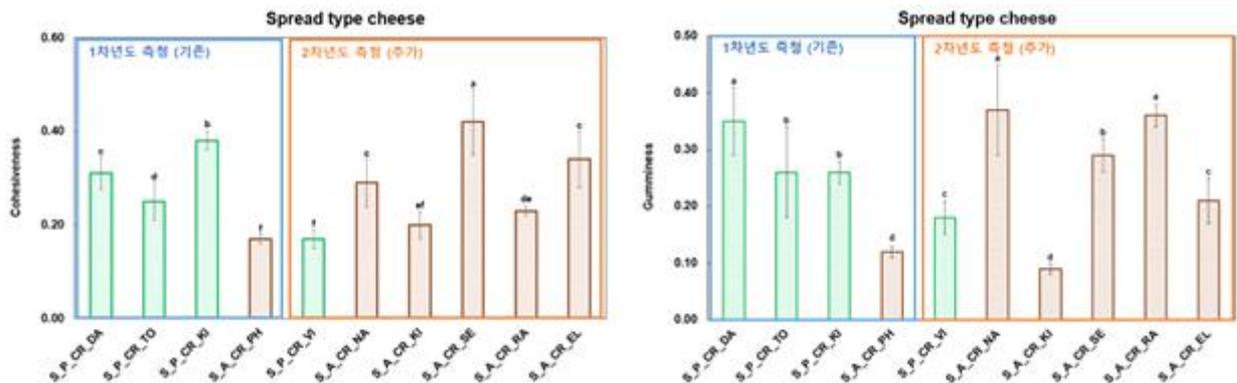
1) 시판 동물성 및 식물성 spread type 치즈 제품의 물성 평가

① 시판 spread type 치즈의 TPA

- 반고체(semi-solid) 형태인 spread type 치즈의 TPA 분석은 점착성(gumminess)과 응집력(cohesiveness)을 중심으로 동식물성 치즈 간 물성 특성을 비교함(표B-13, 그림B-11).
- 1차년에 측정 완료한 4가지 spread type 치즈에 추가로 6가지 제품의 TPA 측정을 진행함.
- 총 10종류(동물성 6종, 식물성 4종)의 시판 spread 치즈의 점착성은 0.12~0.37, 응집력은 0.17~0.42의 범위로 측정되었으며, 두 항목 모두 동·식물성 그룹간 차이는 나타나지 않음.

표B-13. 시판 spread type 치즈의 TPA 측정 결과

Sample	Texture profile analysis						
	Hardness(N)	Adhesiveness	Springiness	Cohesiveness	Gumminess	Chewiness	Resilience
S_P_CR_DA	1.13±0.10 ^c	-95.93±30.17 ^d	0.73±0.11 ^a	0.31±0.03 ^c	0.35±0.06 ^a	0.26±0.09 ^a	0.06±0.01 ^c
S_P_CR_TO	1.02±0.16 ^d	-17.21±8.47 ^{bc}	0.53±0.09 ^c	0.25±0.04 ^d	0.26±0.08 ^b	0.14±0.07 ^c	0.07±0.01 ^b
S_P_CR_KI	0.68±0.07 ^e	-8.12±1.62 ^{ab}	0.72±0.07 ^a	0.38±0.02 ^b	0.26±0.02 ^b	0.19±0.02 ^b	0.16±0.01 ^a
S_A_CR_PH	0.68±0.03 ^e	-19.74±2.95 ^c	0.28±0.03 ^f	0.17±0.01 ^f	0.12±0.01 ^d	0.03±0.01 ^e	0.03±0.00 ^g
S_P_CR_VI	1.01±0.07 ^d	-0.36±0.11 ^a	0.46±0.04 ^{cd}	0.17±0.02 ^f	0.18±0.03 ^c	0.08±0.02 ^{de}	0.04±0.00 ^{fg}
S_A_CR_NA	1.29±0.09 ^b	-0.74±0.30 ^a	0.50±0.12 ^c	0.29±0.05 ^c	0.37±0.08 ^a	0.20±0.09 ^b	0.04±0.00 ^{ef}
S_A_CR_KI	0.43±0.03 ^f	-0.10±0.03 ^a	0.39±0.06 ^{de}	0.20±0.03 ^{ef}	0.09±0.01 ^d	0.03±0.01 ^e	0.05±0.00 ^d
S_A_CR_SE	0.70±0.09 ^e	-0.96±0.27 ^a	0.79±0.14 ^a	0.42±0.07 ^a	0.29±0.03 ^b	0.23±0.06 ^{ab}	0.04±0.00 ^{fg}
S_A_CR_RA	1.61±0.09 ^a	-0.39±0.05 ^a	0.33±0.02 ^{ef}	0.23±0.01 ^{de}	0.36±0.02 ^a	0.12±0.01 ^{cd}	0.05±0.00 ^e
S_A_CR_EL	0.61±0.03 ^e	-0.56±0.23 ^a	0.63±0.14 ^b	0.34±0.06 ^c	0.21±0.04 ^c	0.14±0.05 ^{cd}	0.04±0.00 ^f



그림B-11. TGase 반응 단백질 gel 제조방법 및 물성 측정 조건.

② 시판 spread type 치즈의 동적점탄성 측정 결과

- 진동수 0.1~10 Hz의 모든 범위에서 10가지 시판 spread type 치즈 제품 모두 저장계수(G') 값이 손실계수(G'')보다 높게 나타나, 탄성적인 특성을 갖는 것을 확인함.
- Tangent는 치즈의 탄성과 점성 특성의 비로, 값이 클수록 점성 특성의 비중이 높아지는 것을 나타냄. 시판 spread type 치즈 중 동물성인 S_A_CR_PH, SE, NA가 유의적으로 높게 측정되었으며, 식물성인 S_P_CR_VI가 가장 낮게 측정됨(표B-14).

표B-14. 시판 spread type 치즈의 동적점탄성 측정 결과(1 Hz frequency)

Sample	Dynamic viscoelasticity at 1 Hz (frequency)			
	Storage modulus(G')	Loss modulus(G'')	Tangent	Complex viscosity
	(Pa)	(Pa)	(δ)	(Pa.s)
S_P_CR_DA	8356.40±203.20 ^d	1725.44±40.22 ^f	0.21±0.00 ^b	1358.02±32.94 ^d
S_P_CR_TO	5591.82±105.07 ^f	534.25±13.53 ^h	0.10±0.00 ^e	894.02±16.74 ^f
S_P_CR_KI	12801.10±674.26 ^c	2090.10±111.07 ^e	0.16±0.00 ^d	2064.34±108.75 ^c
S_A_CR_PH	6953.81±535.61 ^e	1518.39±114.50 ^g	0.22±0.00 ^a	1132.81±87.17 ^e
S_P_CR_VI	1418.71±127.89 ^g	120.96±0.38 ⁱ	0.09±0.01 ^e	226.62±20.28 ^g
S_A_CR_NA	24601.17±1645.66 ^a	5351.85±392.70 ^a	0.22±0.01 ^a	4007.09±266.56 ^a
S_A_CR_KI	7200.17±385.49 ^h	1348.11±74.75 ^g	0.19±0.00 ^c	1165.86±62.49 ^h
S_A_CR_SE	16199.07±625.52 ^b	3663.07±160.68 ^c	0.23±0.01 ^a	2643.28±101.88 ^b
S_A_CR_RA	24785.10±877.38 ^a	4878.53±300.39 ^b	0.20±0.01 ^c	4020.43±144.90 ^a
S_A_CR_EL	12075.23±200.57 ^c	2495.65±127.11 ^d	0.21±0.01 ^b	1962.48±35.12 ^c

③ 개발 spread type 치즈의 물성 목표점 재설정

- 개발 식물성 치즈의 물성 목표점은 측정된 시판 동·식물성 치즈의 물성 값을 각 항목의 범위로 나타냄(표B-15).
- Spread type 치즈의 물성 목표 범위는 기존 범위(점착성: 0.12~0.35/응집력: 0.17~0.38)에서 수정 범위(점착성: 0.12~0.37/응집력: 0.17~0.42)로 재설정함.

표B-15. Type별 개발 치즈의 물성 목표점(spread type 치즈의 물성 목표점 재설정)

Type	Hardness(N)	Cohesiveness	Gumminess	Viscosity(Pa.s)/Rate index
Block(cube)	9.15 ~ 22.39	0.22 ~ 0.48	-	-
Block (3 mm slice)	6.82 ~ 8.64	0.22 ~ 0.54	-	-
Spread	-	0.17~0.42	0.12 ~ 0.37	-
Dipping	-	-	-	63.26~450.67 / 0.10~0.33

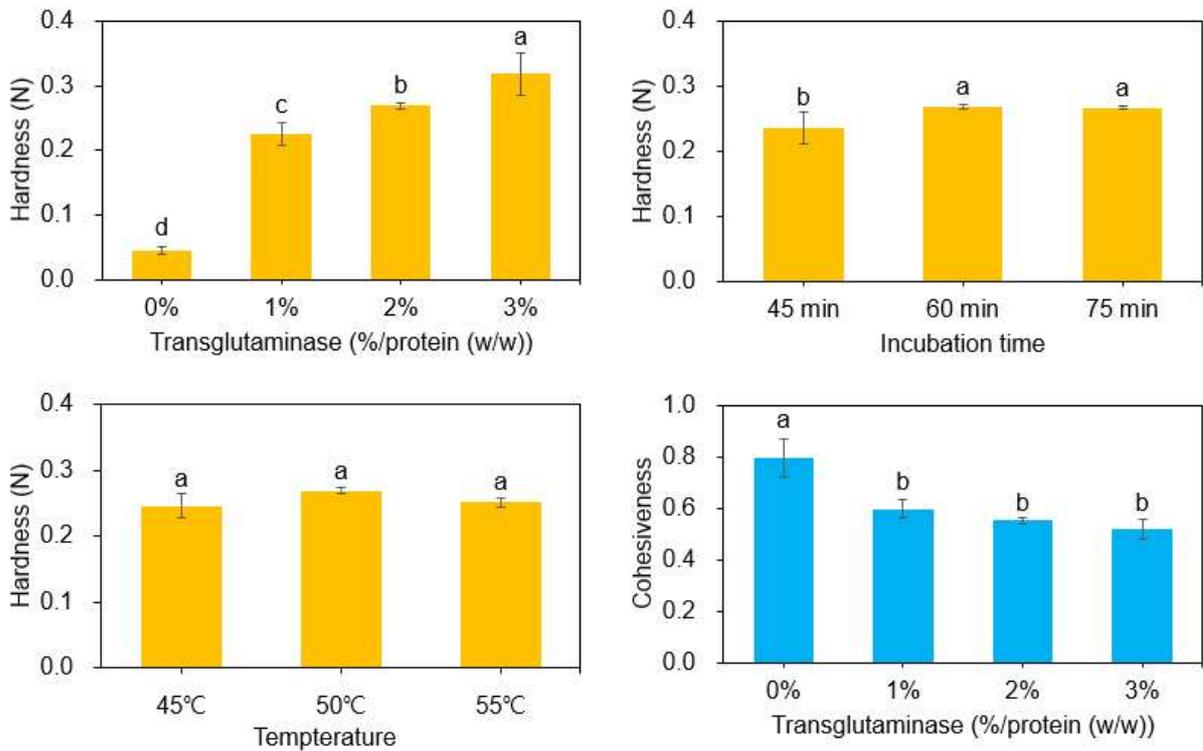
2) Transglutaminase(TGase) 첨가 농도, 반응 시간, 온도에 따른 식물성 단백질 원료 gel의 물성 측정

① 분리 대두 단백질(SPI)

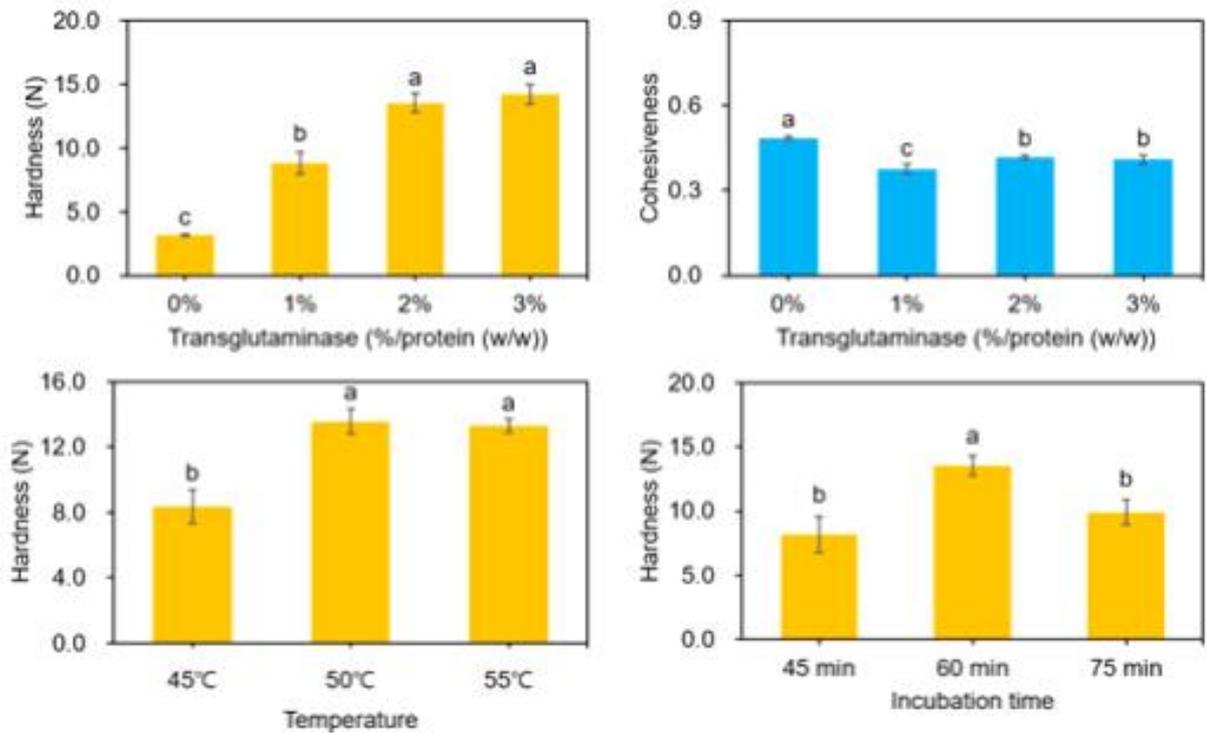
- TPA 측정 결과, gel의 경도는 TGase 첨가량 증가에 따라 유의적으로($p < 0.05$) 증가하였으나, 응집력은 첨가 후 감소하였으며, 첨가량 증가에 따른 유의성은 나타나지 않음(그림 B-12).
- TGase 반응 온도에서는 gel의 경도와 응집력 모두 유의적인 차이가 나타나지 않음.
- TGase 반응 시간이 60분까지 증가함에 따라 경도도 증가하였으나, 60분과 75분간의 유의적인 ($p < 0.05$) 차이는 나타나지 않음.

② 아몬드 단백질

- TPA 측정 결과, gel의 경도는 TGase 첨가량 증가에 따라 증가하였으나, 2와 3%간의 유의적인 ($p < 0.05$) 차이는 나타나지 않았음(그림B-13).
- 효소 반응 온도 45℃에 비해 50, 55℃에서 gel의 경도가 유의적으로($p < 0.05$) 높음.
- 효소 반응 시간 60분에서 gel은 가장 높은 경도를 나타냄($p < 0.05$).- 효소 반응 시간 및 온도에서 gel의 응집력은 유의적인($p < 0.05$) 차이가 나타나지 않음.



그림B-12. TGase 첨가 요인에 따른 SPI gel의 경도와 응집력.



그림B-13. 아몬드 단백질 gel의 TGase 첨가 요인에 따른 경도와 응집력.

3) 반응표면분석(RSM)을 이용한 식물성 단백질 원료 함량 및 TGase 처리 조건에 따른 물성 분석

① 분리 대두 단백질(SPI)

- TPA 측정 결과 SPI gel의 경도는 26.42 N(1번 주행)에서 75.64 N(16번 주행)까지의 범위로 측정됨.
- Gel의 경도에 관한 모델은 p -값이 0.0007로 매우 적절하였으며, 종속변수에 대한 높은 수준의 상관관계를 설명하기 위해 정의된 계수(R²)는 0.9691로 계산됨(표B-16).
- 다중 회귀 분석을 적용함으로써 gel의 경도에 대한 예측 반응 Y 를 Eq(1)으로 계산함.

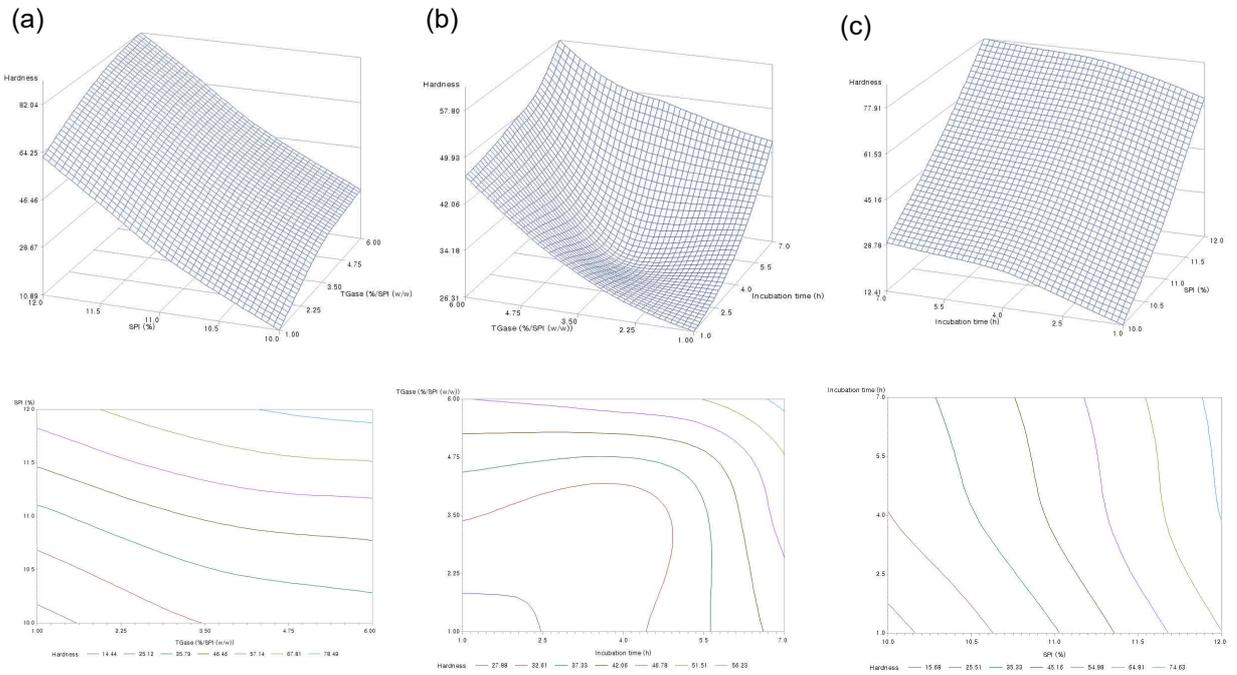
$$\begin{aligned} \text{Hardness (N)} = & 48.55 + 4.30X_1^* + 13.04X_2^* + 3.02X_3^{**} - 1.28X_1^2 + 1.13X_2^2 \\ & - 1.12X_3^2 + 0.75X_1X_2 - 0.48X_2X_3 - 1.22X_1X_3 \end{aligned} \quad \text{Eq(1)}$$

(* $p < 0.01$, ** $p < 0.05$)

표B-16. TGase 반응 SPI gel의 경도에 대해 계산된 회귀 계수의 값

Independent variable	Coefficient	Standard Error	t-value	Significance Level (p)
Constant	48.54919	2.76972	17.53	<.0001
Linear				R ² =0.9284
X ₁	4.299563	1.046856	4.11	0.0063
X ₂	13.038	1.046856	12.45	<.0001
X ₃	3.019625	1.046856	2.88	0.0279
Quadratic				R ² =0.0353
X ₁ ²	-1.27594	1.046856	-1.22	0.2687
X ₂ ²	1.129375	1.046856	1.08	0.3221
X ₃ ²	-1.12306	1.046856	-1.07	0.3246
Interaction				R ² =0.0054
X ₁ X ₂	0.74575	1.480478	0.5	0.6324
X ₂ X ₃	-0.48038	1.480478	-0.32	0.7566
X ₁ X ₃	-1.22138	1.480478	-0.82	0.4409
r ²				0.9691
F				20.91
Probability of F				0.0007

- TGase 농도 증가에 따른 경도의 경향을 분석하면 전반적으로 TGase 농도가 증가됨에 따라 경도는 증가하는 경향을 나타냄. 그러나 TGase 농도가 약 4.1% 이하에서는 이러한 경향이 뚜렷하게 관측되었으나 약 4.1에서 6.0%까지 증가됨에 따라서는 TGase 농도가 경도에 미치는 영향이 다소 감소하는 경향을 나타냄(그림B-14a).
- 효소 반응 시간 증가에 따른 경도의 경향을 분석하면 전반적으로 효소 반응 시간이 증가됨에 따라 경도는 증가하는 경향을 나타냄. 그러나 효소 반응 시간이 약 4.2 h 이하에서는 이러한 경향이 뚜렷하게 관측되었으나 약 4.2에서 7.0 h까지 증가됨에 따라서는 효소 반응 시간이 경도에 미치는 영향이 다소 감소하는 경향을 나타냄(그림B-14c).
- 반응표면분석에 따르면, SPI gel의 경도를 최대로 하는 최적 SPI 함량, TGase 농도 및 반응 시간은 각각 12%, 4.1%, 4.2 h로 산출됨.



그림B-14. 단백질 원료 농도, 효소 농도 및 반응 시간에 대한 SPI gel의 경도 영향에 대한 반응표면도와 등고선도.

② 아몬드 단백질

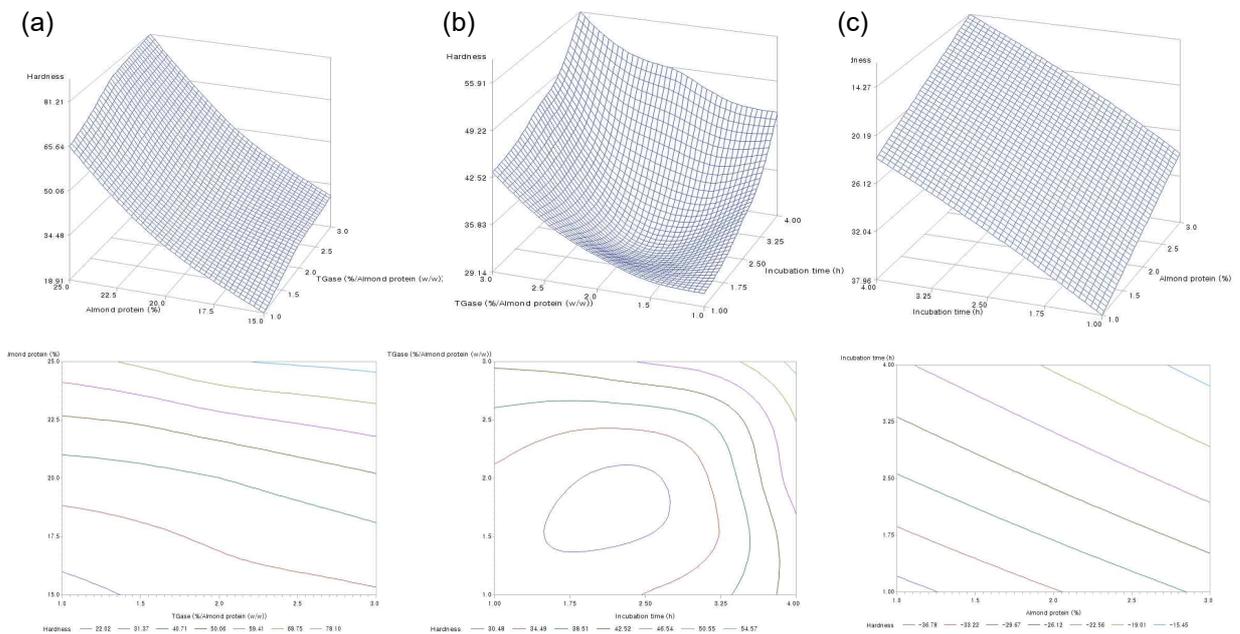
- TPA 측정 결과 아몬드 단백질 gel의 경도 값은 28.65 N(1번 주행)에서 78.92 N(16번 주행)까지의 범위로 측정됨.
- Gel의 경도에 관한 모델은 p -값이 0.0005로 매우 적절하였으며, 종속변수에 대한 높은 수준의 상관관계를 설명하기 위해 정의된 계수(R²)는 0.9724로 계산됨(표B-17).
- 다중 회귀 분석을 적용함으로써 gel의 경도에 대한 예측 반응 Y를 Eq(2)으로 계산함.

$$\begin{aligned} \text{Hardness (N)} = & 39.63 + 11.69X_1^* + 2.73X_2^{**} + 2.47X_3^{**} + 3.53X_1^2 \\ & + 0.65X_2^2 + 0.82X_3^2 - 0.20X_1X_2 - 1.61X_2X_3 - 0.56X_1X_3 \quad \text{Eq(2)} \\ & (* p < 0.01, ** p < 0.05) \end{aligned}$$

표B-17. TGase 반응 아몬드 단백질 gel의 경도에 대해 계산된 회귀 계수의 값

Independent variable	Coefficient	Standard Error	t-value	Significance Level (p)
Constant	39.632103	2.346803	16.89	<.0001
Linear $R^2=0.8782$				
X_1	11.685678	0.887008	13.17	<.0001
X_2	2.733928	0.887008	3.08	0.0216
X_3	2.476271	0.887008	2.79	0.0315
Quadratic $R^2=0.0855$				
X_1^2	3.532375	0.887008	3.98	0.0073
X_2^2	0.651312	0.887008	0.73	0.4905
X_3^2	0.822875	0.887008	0.93	0.3894
Interaction $R^2=0.0086$				
X_1X_2	-0.203356	1.254419	-0.16	0.8765
X_2X_3	-1.609541	1.254419	-1.28	0.2468
X_1X_3	-0.556416	1.254419	-0.44	0.6729
r^2				0.9724
F				23.48
Probability of F				0.0005

- TGase 농도 증가에 따른 경도의 경향을 분석하면 전반적으로 TGase 농도가 증가됨에 따라 경도는 증가하는 경향을 나타냄. 그러나 TGase 농도가 약 2.1% 이하에서는 이러한 경향이 뚜렷하게 관측되었으나 약 2.1에서 3.0%까지 증가됨에 따라서는 TGase 농도가 경도에 미치는 영향이 다소 감소하는 경향을 나타냄(그림B-15a).
- 효소 반응 시간 증가에 따른 경도의 경향을 분석하면 전반적으로 효소 반응 시간이 증가됨에 따라 경도는 증가하는 경향을 나타냄. 그러나 효소 반응 시간이 약 2.6 h 이하에서는 이러한 경향이 뚜렷하게 관측되었으나 약 2.6에서 4.0 h까지 증가됨에 따라서는 효소 반응 시간이 경도에 미치는 영향이 다소 감소하는 경향을 나타냄(그림B-15c).
- 반응표면분석에 따르면, 아몬드 단백질 gel의 경도를 최대로 하는 최적 아몬드 단백질 함량, TGase 농도 및 반응 시간은 각각 25%, 2.1%, 2.6 h로 산출됨.

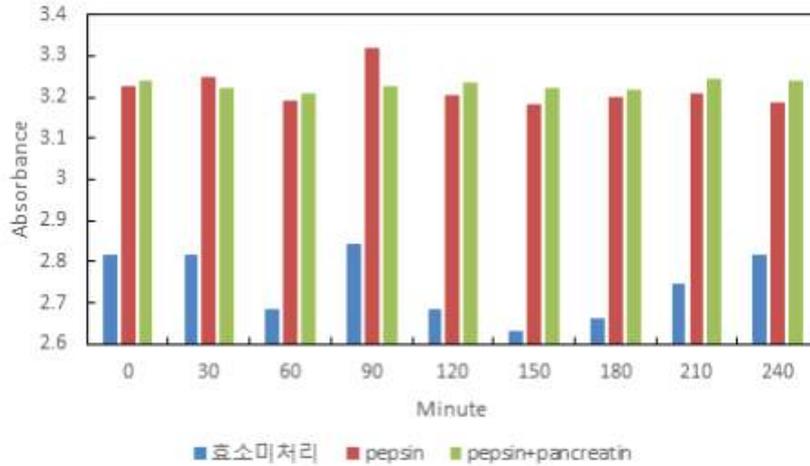


그림B-15. 단백질 원료 농도, 효소 농도 및 반응 시간에 대한 아몬드 단백질 gel의 경도영향에 대한 반응표면도와 등고선도.

4) *In vitro* 단백질 소화를 평가체계 구축

① 예비실험을 통한 *in vitro* 단백질 소화를 효소 및 조건 확립

- 각 군에 따른 소화 처리 후, TCA에 의한 단백질을 침전시킨 결과 효소 미처리군, pepsin 효소 처리군, pepsin+pancreatin 효소 처리군 순으로 단백질의 침전정도가 적게 나타났으며, 이는 인체의 점차적인 소화 환경에 따른 단백질의 분해정도를 보여줌으로써 본 실험의 소화 환경 조성을 검증하였음.
- TCA 가용성 분획의 흡광도를 280 nm에서 측정한 결과, 효소미처리군은 효소처리군 pepsin, 효소처리군 pepsin+pancreatin에 비해 흡광도가 낮게 나타났으며, pancreatin을 넣은 120 min이후에는 효소처리군 pepsin에 비해 효소처리군 pepsin+pancreatin의 흡광도가 더 높게 나타났으며, 하기의 결과와 같이 점차적인 소화 환경에 따른 단백질의 분해정도를 보여줌으로써 본 실험의 소화 환경 조성을 검증하였음(그림B-16).
- TCA 가용성 분획의 흡광도를 280 nm에서 측정한 결과, 장 환경을 조성한 120분째 이후로 효소처리군 pepsin+trypsin은 효소처리군 pepsin+pancreatin에 비해 흡광도가 낮게 나타났음. 따라서 본 실험에서는 pepsin+pancreatin을 소화효소로서 이용 하는 것이 적합하다고 판단함.



그림B-16. 소화 효소별 소화 시간에 따른 단백질 분해

② *In vitro* 단백질 소화율 측정법 확립

- 흡광도를 이용한 단백질 소화율 측정법은 소요 시간이 짧고 단백질 변성이 없다는 이점이 있음에도 불구하고 buffer, pH, salt, purines, pyrimidines, nucleic acids 등에 영향을 받아 Kjeldahl method와 비교하였을 때, 미량 분석 등의 정확도가 높지 않아 데이터가 불안정한 것을 확인함. 따라서 본 *in vitro* 단백질 소화율의 실험방법은 Kjeldahl method법을 사용하는 것으로 결정함.
- Kjeldahl method를 이용한 질소정량법은 시료에 황산을 가해 유기성 질소를 분해한 후 발생된 암모니아를 알칼리 용액으로 적정하여 질소량을 산출하는 원리로 본 실험에는 자동화된 장치를 이용하여 분석함.
- 실험방법은 시료 3 g을 300 ml 킬달 분해 플라스크에 넣고 분해촉진제(황산, 황산칼륨)와 진한 황산 12 mL를 넣음. 분해장치에서 약 50 분 분해하여 분해액의 색이 투명한 연푸른 색이 될 때 상온으로 냉각시킴. 냉각 후 분해된 시험용액에 80 mL의 증류수를 첨가하고 25 mL 혼합지시약이 섞인 포집용액을 플라스크에 넣고 수산화나트륨 용액 50 mL를 넣음. 증류장치에서 약 4분간 증류하여 증류액의 색이 녹색으로 변하면, 0.1 M 염산용액을 이용해 종말점이 옅은 핑크색에 달할 때까지 적정함. 적정에 사용된 산의 양을 기록하며 같은 방법으로 시료를 제외한 공시험(blank test)를 병행하여 분해, 증류, 적정을 실시함.
- 시료 중의 질소함량(%)은 다음 식에 의해 계산함.

$$\text{질소함량(\%)} = \frac{(\text{HCl 소비량} - \text{blank 소비량}) \times \text{HCl 몰농도} \times 14.01}{\text{검체량(mg)}} \times 100$$

1. 연구개발 수행과정

1) 시판 동물성 dipping type 치즈 제품의 물성 평가

- 1차년에 물성 목표점으로 설정한 시판 dipping type 치즈 제품은 총 3종으로 다른 type의 제품에 비해 목표점 설정에 사용된 제품 수가 부족하므로 추가적으로 시판 제품의 물성을 측정하여 물성목표점 재설정이 필요.
- 추가적으로 1차년에 측정한 D_A_CR_BE는 개발 목표로 하는 제품의 특성과 상이한 것으로 판단됨에 따라 해당 제품의 물성 측정 결과를 물성 목표점 설정에서 제외하였음.
- 따라서 국내외 시판 dipping type 치즈 2종의 물성 측정을 분석하고, 이에 따른 개발 제품의 물서어 목표점 재설정을 진행함.
- 샘플명은 아래와 같은 순서로 표기함.
[치즈 type _ 동식물성(A=animal, P=plant) _ 치즈 종류(CH=cheddar, P=parmesan, M=mozzarella, CR=cream) _ 제조사]
- 시판 치즈의 동적점탄성, 유동특성의 측정 조건 및 항목은 1차년도에 구축된 물성 평가 방법과 동일하게 진행함.

2) Pilot scale 및 최종 개발 제품의 물성 평가

- 각 type별(Block, spread, dipping type) pilot scale 및 최종 개발 제품의 물성 평가(TPA, 동적점탄성, 유동특성)의 측정 조건 및 항목은 1차년도에 구축된 물성 평가 방법과 동일하게 진행함.

① Block type 치즈의 TPA 측정

- Texture analyzer를 사용하여 경도(hardness), 응집력(cohesiveness), 점착성(Adhesiveness), 탄력성(springness), 점착성(gumminess), 씹힘성(chewiness), 복원성(resilience)을 35 mm cylinder probe를 이용하여 측정함.

② Spread와 Dipping type 치즈의 동적점탄성 측정

- Rheometer를 사용하여 진동수(frequency)에 따른 저장계수(storage modulus, G'), 손실계수(loss modulus, G'') 및 복소점도(complex viscosity)와 같은 점탄성 수치를 측정하여 점성과 탄성의 특성을 확인함.

③ Dipping type 치즈의 유동특성 측정

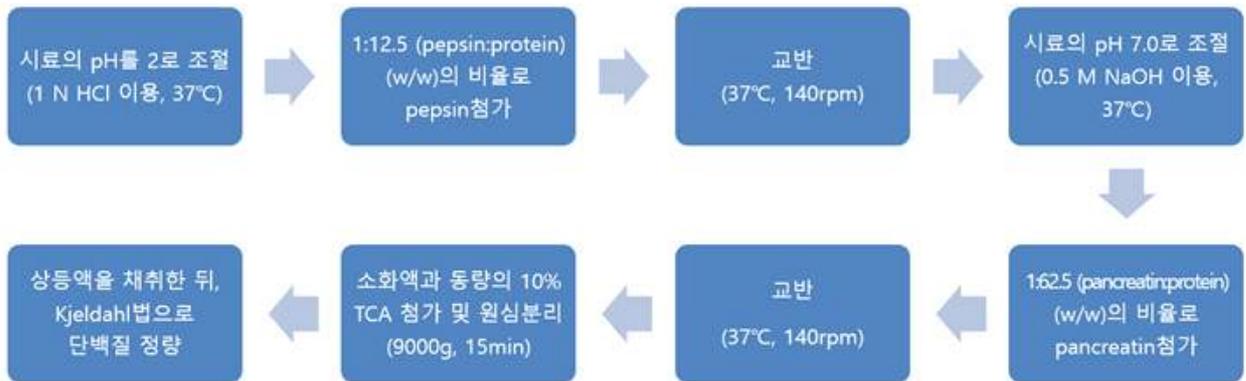
- Rheometer를 사용하여 전단 속도(shear rate)에 따른 전단 응력(shear stress)을 측정하여 점도(viscosity)와 유동지수를 측정함.

3) 시판 동물성 치즈와 식물성 치즈 개발 제품의 *in vitro* 단백질 소화율 평가

① 질소정량법(Kjeldahl method)를 이용한 *in vitro* 단백질 소화율 측정

- 시료 3 g을 300 ml 킬달 분해 플라스크에 넣고 분해촉진제(황산, 황산칼륨)와 진한 황산 12 mL를 넣음.
- 분해장치에서 약 50 분 분해하여 분해액의 색이 투명한 연푸른색이 될 때 상온으로 냉각 시킴.

- 냉각 후 분해된 시험용액에 80 mL의 증류수를 첨가하고 25 mL 혼합지시약이 섞인 포집 용액을 플라스크에 넣고 수산화나트륨 용액 50 mL를 넣음.
- 증류장치에서 약 4분간 증류하여 증류액의 색이 녹색으로 변하면, 0.1 M 염산용액을 이용해 종말점이 옅은 핑크색에 달할 때까지 적정함.
- 적정에 사용된 산의 양을 기록하며 같은 방법으로 시료를 제외한 공시험(blank test)를 병행하여 분해, 증류, 적정을 실시함.



그림B-17. Kjeldahl method를 이용한 *in vitro* 단백질 소화율 측정 실험 디자인.

2. 연구개발 수행내용

1) 시판 동물성 dipping type 치즈 제품의 물성 평가

① 시판 dipping type 치즈의 동적 점탄성

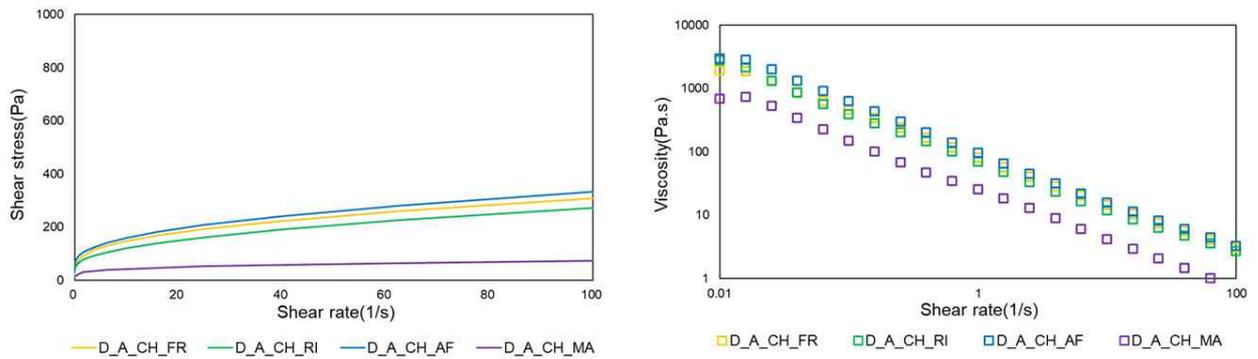
- 진동수 0.1~10 Hz의 모든 범위에서 4가지 시판 dipping type 치즈 제품 모두 저장계수(G') 값이 손실계수(G'')보다 높게 나타나, 탄성적인 특성을 갖는 것을 확인함.
- Tangent는 치즈의 탄성과 점성 특성의 비로, 값이 클수록 점성 특성의 비중이 높아지는 것을 나타냄. 시판 dipping type 치즈 중 D_A_CH_RI가 유의적으로 높게 측정되었으며, D_A_CH_AF, MA가 가장 낮게 측정됨(표B-18).

표B-18. 시판 dipping type 치즈의 동적점탄성 측정 결과(1 Hz frequency)

Sample	Dynamic viscoelasticity at 1 Hz (frequency)				
	Storage modulus(G') (Pa)	Loss modulus(G'') (Pa)	Tangent (δ)	Complex viscosity (Pa.s)	
Dipping type	D_A_CH_FR	196.19±7.32 ^b	95.35±3.18 ^c	0.49±0.03 ^b	34.73±0.85 ^b
	D_A_CH_RI	183.55±2.54 ^c	102.65±0.78 ^b	0.56±0.01 ^a	33.47±0.37 ^b
	D_A_CH_AF	293.99±7.00 ^a	110.38±0.72 ^a	0.38±0.01 ^c	49.98±1.05 ^a
	D_A_CH_MA	64.39±5.13 ^d	22.35±0.82 ^d	0.35±0.02 ^c	10.85±0.81 ^c

② 시판 dipping type 치즈의 점도

- Dipping type 치즈는 전단 속도가 증가할수록 전단응력이 증가하는 pseudoplastic 경향을 보였으며(그림B-18), 이를 Herschel-Bulkley 모델식에 대입한 결과 점도는 D_A_CH_FR 63.26 Pa.s, D_A_CH_RI 38.45 Pa.s, D_A_CH_AF 55.66 Pa.s, D_A_CH_MA 24.16 Pa.s로 나타나 D_A_CH_MA가 가장 묽은 것으로 측정됨.
- 유동지수는 D_A_CH_FR 0.33, D_A_CH_RI 0.40, D_A_CH_AF 0.36, D_A_CH_MA 0.23으로 나타났음(표B-19).
- 두 제품 모두 전단 속도가 올라감에 따라 점도가 감소하며, 유동지수의 값이 1보다 작기 때문에 전단 희석(shear thinning)의 거동 특성을 가지는 것을 확인함(그림B-18).



그림B-18. Dipping type 치즈의 전단 속도에 따른 전단 응력 및 점도.

표B-19. Herschel-Bulkley 모델 식을 이용한 dipping type 치즈의 점도 측정

Sample	Viscosity	Rate index	R ²
Dipping type D_A_CH_FR	63.26±1.08 ^a	0.33±0.00 ^c	0.9972
Dipping type D_A_CH_RI	38.45±4.03 ^c	0.40±0.02 ^a	0.9975
Dipping type D_A_CH_AF	55.66±3.49 ^b	0.36±0.01 ^b	0.9957
Dipping type D_A_CH_MA	24.16±1.61 ^d	0.23±0.01 ^d	0.9961

③ 개발 dipping type 치즈의 물성 목표점 재설정

- 개발 식물성 치즈의 물성 목표점은 측정된 시판 동·식물성 치즈의 물성 값을 각 항목의 범위로 나타냄(표B-20).
- Dipping type 치즈의 물성 목표 범위는 기존 범위(점도: 38.45~450.67/유동지수: 0.10~0.40)에서 수정 범위 (점도: 24.16~63.26/유동지수: 0.23~0.40)로 재설정함.

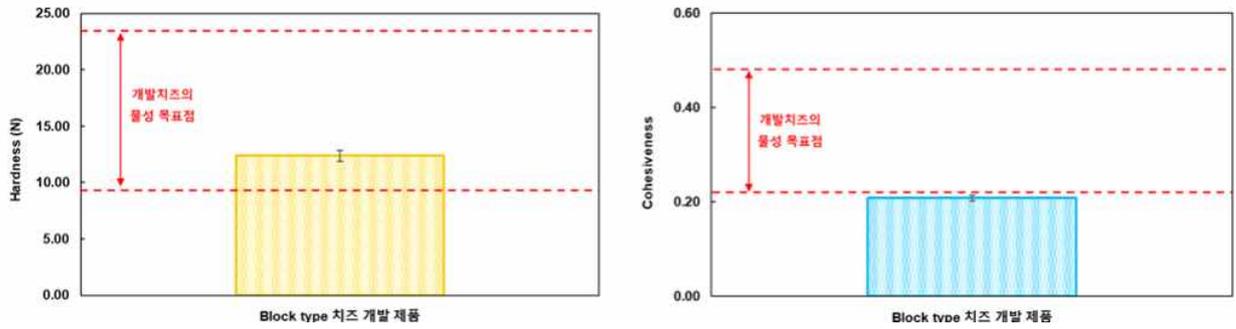
표B-20. Type별 개발 치즈의 물성 목표점(dipping type 치즈의 물성 목표점 재설정)

Type	Hardness(N)	Cohesiveness	Gumminess	Viscosity(Pa.s)/ Rate index
Block(cube)	9.15 ~ 22.39	0.22 ~ 0.48	-	-
Block (3 mm slice)	6.82 ~ 8.64	0.22 ~ 0.54	-	-
Spread	-	0.17~0.42	0.12 ~ 0.37	-
Dipping	-	-	-	24.16~63.26 / 0.23~0.40

2) Pilot, Plant scale 및 최종 개발 제품의 물성 평가

① Block type 치즈 개발 제품

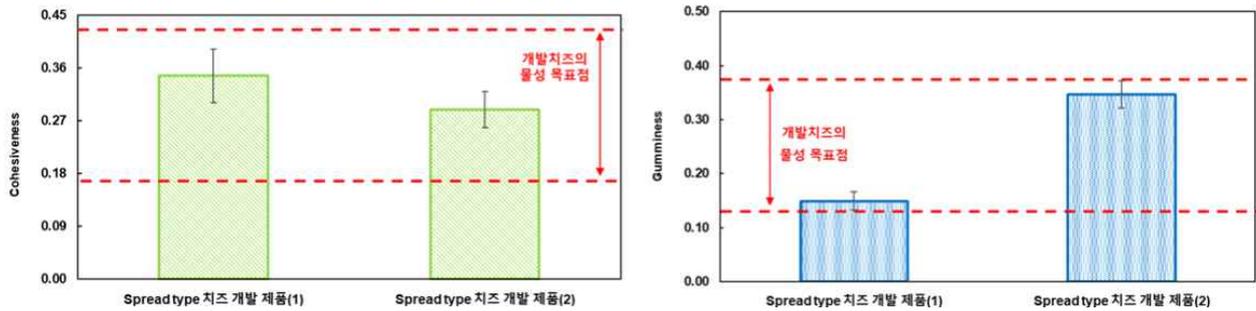
- Block type 치즈 개발 제품의 TPA 결과, 경도는 12.36 ± 0.49 N를 나타내어 물성 목표점 범위 내의 값으로 측정되며, 응집력은 0.21 ± 0.01를 나타내어 95.5% 수준으로 물성 목표점 범위에 근접함(그림B-19).



그림B-19. Block type 치즈 개발 제품의 경도와 응집력.

② Spread type 치즈 개발 제품

- Spread type 치즈 개발 제품(1) 과 (2)의 TPA 결과, 응집력은 각각 0.35 ± 0.05 와 0.29 ± 0.03 이며 점착성은 각각 0.15 ± 0.02 와 0.35 ± 0.02 로 응집력과 점착성 모두 물성 목표점 범위 내의 값으로 측정됨(그림B-20).
- Spread type 치즈 개발 제품(1) 과 (2)의 동적점탄성 측정 결과, 진동수 0.1~10 Hz의 모든 범위에서 두 개발 제품 모두 저장계수(G') 값이 손실계수(G'')보다 높게 나타나, 탄성적인 특성을 갖는 것을 확인함(표B-21).



그림B-20. Spread type 치즈 개발 제품의 응집력과 점착성.

표B-21. Spread type 치즈 개발 제품(1)과 (2)의 동적점탄성 측정 결과(1 Hz frequency)

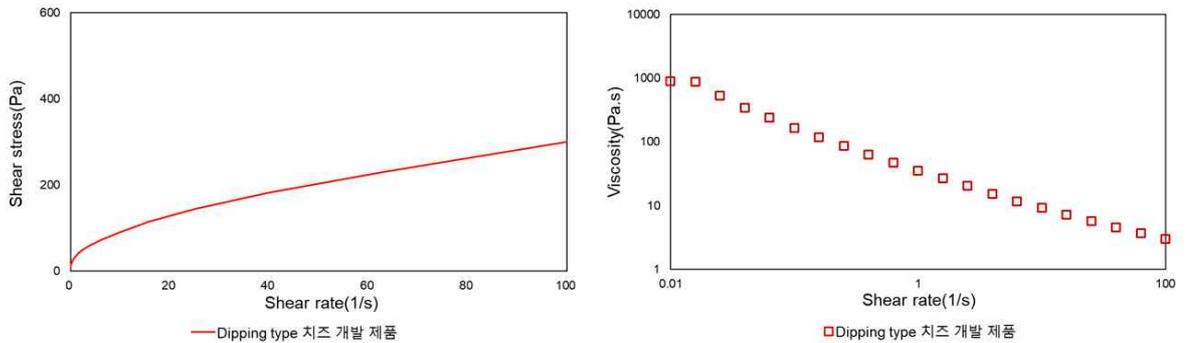
Sample	Dynamic viscoelasticity at 1 Hz (frequency)			
	Strage modulus(G') (Pa)	Loss modulus(G'') (Pa)	Tangent (δ)	Complex viscosity (Pa.s)
Spread type 치즈 개발 제품(1)	361.40 ± 31.12	82.20 ± 13.66	0.23 ± 0.02	59.00 ± 5.29
Spread type 치즈 개발 제품(2)	413.89 ± 43.03	99.66 ± 10.10	0.24 ± 0.00	67.75 ± 7.04

③ Dipping type 치즈 개발 제품

- Dipping type 치즈 개발 제품의 동적점탄성 측정 결과, 진동수 0.1~10 Hz의 모든 범위에서 저장계수(G') 값이 손실계수(G'')보다 높게 나타나, 탄성적인 특성을 갖는 것을 확인함(표B-22).
- 전단 속도가 증가할수록 전단응력이 증가하는 pseudoplastic 경향을 보였으며(그림 B-21), 이를 Herschel-Bulkley 모델식에 대입한 결과, 점도는 23.25 Pa.s를 나타내어 96.23% 수준, 유동지수는 0.55를 나타내어 72.73% 수준으로 물성 목표점 범위에 근접함(표B-23).

표B-22. Dipping type 치즈 개발 제품의 동적점탄성 측정 결과(1 Hz frequency)

Sample	Dynamic viscoelasticity at 1 Hz (frequency)			
	Storage modulus(G')	Loss modulus(G'')	Tangent	Complex viscosity
	(Pa)	(Pa)	(δ)	(Pa.s)
Dipping type 치즈 개발 제품	272.91±22.93	131.72±12.20	0.48±0.00	48.23±4.13



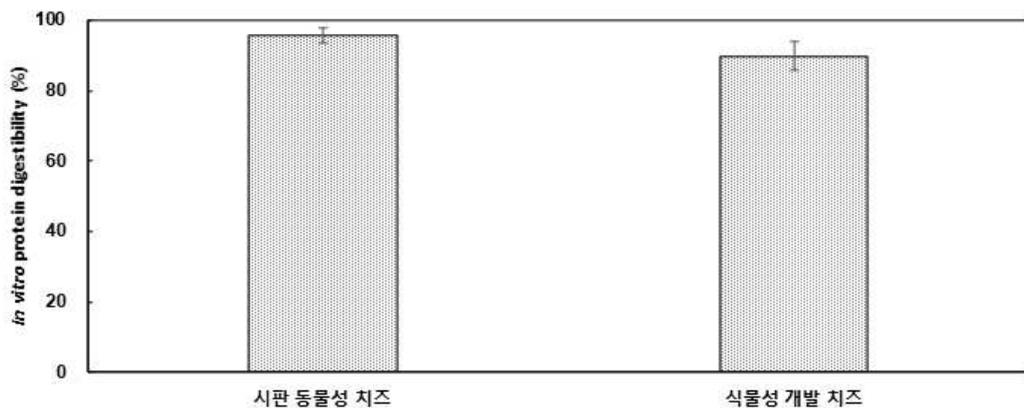
그림B-21. Dipping type 치즈 개발 제품의 전단 속도에 따른 전단 응력 및 점도.

표B-23. Herschel-Bulkley 모델 식을 이용한 dipping type 치즈 개발 제품의 점도 측정

Sample	Viscosity (Pa.s)	Rate index	R ²
Dipping type 치즈 개발 제품	23.25±0.53	0.55±0.01	0.9996

3) 시판 동물성 치즈와 식물성 치즈 개발 제품의 *in vitro* 단백질 소화율 평가

- 본 실험에는 시판 동물성 치즈(BS_A_CH_SE)와 식물성 개발 치즈를 사용함.
- 각 시료를 잘게 다진 후, 50°C 증류수에 현탁하여 *in vitro* 단백질 소화율 평가를 위한 시료를 준비함.
- *In vitro* 단백질 소화율 측정 결과, 시판 동물성 치즈는 95.79%, 식물성 개발 치즈는 89.89%로 측정되며, 두 제품군 간 *in vitro* 단백질 소화율의 차이는 5.90%로 확인됨(그림 B-22)



그림B-22. 시판 동물성 치즈와 식물성 치즈 개발 제품의 *in vitro* 단백질 소화율

제1협동. 식물성 유제품의 발효공정 및 항비만 기능성 연구

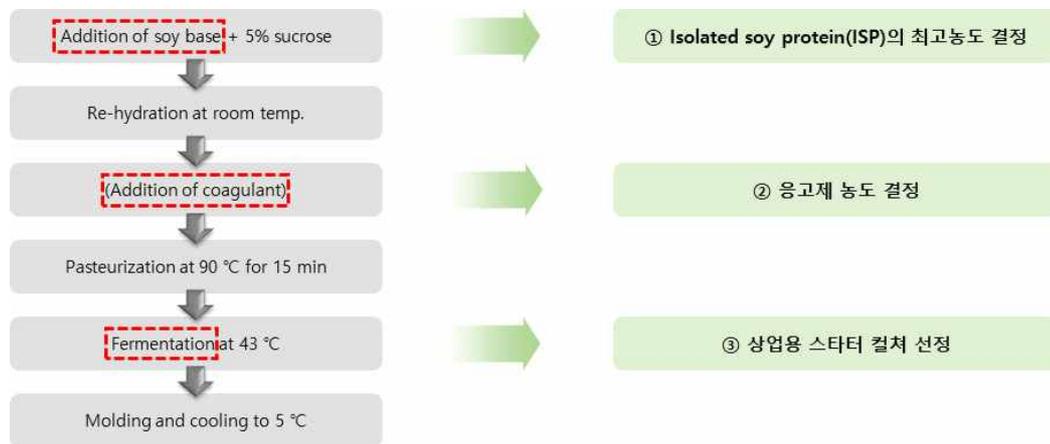
[1차년도 : ISP를 이용한 식물성 치즈제품의 제조 공정 확립 및 항비만 기능성 신규 프로바이오틱스 선정]

1. 연구개발 수행과정

1) 식물성 치즈제품 발효를 위한 발효균주 선정

① 유가공 제조공정과 유사 발효공정을 위한 상업용 스타터 컬처 탐색

- 상업용 스타터 컬처는 Chr. Hansen에서 제공받은 식물성 식품원료의 발효제조 공정에 사용되는 세 가지 종류의 스타터 컬처(F-DVS YF-L01 DA, F-DVS YF-L02 DA, F-DVS BY-01 DA)를 사용



그림C-1. 식물성 단백질(Isolated soy protein)을 이용한 치즈의 제조 공정

(가) Isolated soy protein(ISP)의 기질 첨가 농도 결정

- ISP의 발효 가능 최대농도를 결정하기 위해 ISP의 농도를 각각 4%, 8% 첨가하여 제조한 발효원료액을 사용하여 Figure 1과 같은 공정으로 실험을 진행
- ISP의 농도는 발효 중 pH의 변화와 총 유산균 수를 통해 결정
- (1) 상온에서 정수된 물 700 mL에 ISP 4%(28 g) 및 8%(56 g), pectin 1%(7 g)와 sucrose 5%(35 g)을 넣어 homogenizer를 이용하여 균질하여 혼합
- (2) 90°C water bath에서 15 min 동안 살균
- (3) 스타터 컬처 (F-DVS YF-L02 DA) 0.01%(0.07 g) 접종
- (4) 43°C incubator에서 pH가 4.6 수준이 될 때까지 발효 진행
- 8% 이상의 ISP는 발효 중 pH의 변화 속도가 현저히 저하되어 접종 스타터컬처의 성장을 억제하는 결과를 보임
- 따라서 분리대두단백 발효를 위한 ISP의 최대 적정농도를 결정하기 위해 최대 7%의 ISP 농도로 조정하여 재실험 진행
- (1) 상온에서 정수된 물 700 mL에 ISP, pectin 1%(7 g)와 sucrose 5%(35 g)을 넣어 homogenizer를 이용하여 homogenization
- (2) 90°C water bath에서 15 min 동안 살균
- (3) 스타터 컬처 (F-DVS YF-L02 DA) 0.01%(0.07 g) 접종
- (4) 43°C incubator에서 pH가 4.6 정도로 될 때까지 발효 진행

- (5) pH가 4.6 정도로 떨어지면 식혀준 후 형성된 커드를 깨줌
- (6) 치즈몰드에 커드를 넣은 후 5℃ 냉장고에서 cooling

(나) 기질 첨가 응고제의 농도 결정

- (가)에서 결정된 ISP의 농도(7%)에 동물성 치즈 제조 시 사용되는 응고제인 염화칼슘 (CaCl₂, Namyung COMMERCIAL CO.)을 각각 0.5%, 1% 및 2%의 농도를 첨가하여 Figure 1과 같은 공정으로 실험을 진행
- 응고제의 농도는 발효 중 pH의 변화와 총 유산균 수를 통해 결정
- (1) 상온에서 정수된 물 700 mL에 ISP 7%(49 g), pectin 1%(7 g)와 sucrose 5%(35 g)을 넣어 homogenizer를 이용하여 homogenization
- (2) 응고제(CaCl₂)를 각각 0.5%, 1%, 2% 첨가하여 균질 및 혼합
- (3) 90℃ water bath에서 15 min 동안 살균
- (4) 스타터 컬처 (F-DVS YF-L02 DA) 0.01%(0.07 g) 접종
- (5) 43℃ incubator에서 6시간까지 발효를 진행하고 2시간마다 pH 측정
- (6) 6시간 이후 식혀준 후 형성된 커드를 깨줌
- (7) 치즈몰드에 커드를 넣은 후 5℃ 냉장고에서 cooling

(다) 상업용 스타터 컬처 선정

- (가)과(나)에서 결정된 ISP와 응고제의 농도(각각 7%, 1%)에 세 가지 스타터 컬처 (F-DVS YF-L02 DA, F-DVS YF-L02, F-DVS BY-01 DA)를 접종하여 Figure 1과 같은 공정으로 실험을 진행
- 상업용 스타터 컬처는 발효 중 pH의 변화와 총 유산균 수를 통해 결정
- (1) 상온에서 정수된 물 700 mL에 ISP 7%(49 g), pectin 1%(7 g)와 sucrose 5%(35 g)을 넣어 homogenizer를 이용하여 homogenization
- (2) 응고제(CaCl₂)를 각각 0.5%, 1%, 2% 첨가하여 섞어줌
- (3) 90℃ water bath에서 15 min 동안 멸균
- (4) 상업용 스타터 컬처 세 가지(F-DVS YF-L01 DA, F-DVS YF-L02 DA, F-DVS BY-01 DA)를 각각 0.01%(0.07 g) 접종
- (5) 43℃ incubator에서 6시간까지 발효 진행하며 2시간마다 pH 측정
- (6) 6시간 이후 식혀준 후 형성된 커드를 깨줌
- (7) 치즈몰드에 커드를 넣은 후 5℃ 냉장고에서 cooling

(라) 최종 공정



그림C-2. 상업용 스타터 컬처를 이용한 식물성 치즈의 최종 제조 공정

② 스타터컬처별 발효유제품 대체제품의 기초공정 개발 및 발효특성 평가

(가) ISP 농도(3%, 5%, 7%)에 따른 이화학적 특성을 평가하기 위해 발효 전, 발효 후의 당 분석을 진행

- 당류 중 glucose, fructose, sucrose를 추출하여 HPLC와 시차 굴절률 검출기를 사용하여 분석
- 증류수와 acetonitrile을 25:75 비율로 혼합하여 이동상으로 하고, 1.2 mL/min 유속으로 분리하여 분석
- (1) 모든 시료 4 g을 쟀 후 20 mL까지 증류수를 첨가하여 진탕기를 이용해 진탕(300 rpm, 10 min)
- (2) Acetonitrile(merck millipore) 20 mL을 첨가한 후 진탕기를 이용해 진탕(300 rpm, 10 min)
- (3) 원심분리(3,000 rpm, 10 min, 4°C, 10 min)를 한 후 상등액을 0.45 um 멤브레인 필터로 여과한 후 분석

2) 항비만 기능성 김치 및 인체유래 신규 프로바이오틱스 후보균주 탐색

① 김치 및 인체유래 영유아 분변으로부터 유산균주 분리

- 김치는 포기김치, 동치미, 묵은지를 사용하여 유산균을 분리하였음
- 분변 시료는 14일 이내의 영유아 분변을 산후조리원에서 직접 수령 후 냉동 보관하여 운반하고 당일 혹은 익일 시험에 사용하였음
- (1) 김치 및 분변 시료를 각각 멸균생리식염수 및 peptone water를 이용하여 stomacher로 균질화를 함
- (2) 두 시료는 모두 멸균생리식염수로 serial dilution하여 김치 시료는 MRS, BCP, BS 및 Rogosa agar, 분변 시료는 MRS 및 Rogosa agar에 streaking 및 평판도말을 함
- (3) 배양 후 각 배지에 나타난 콜로니는 형태나 크기 등이 상이한 것들을 선택하여 순수분리 함
- (4) 순수분리된 균은 37°C 호기조건으로 MRS broth를 사용해 18 h 동안 배양하고 보관하여

이후 실험에 사용함

② 김치 및 인체유래 유산균주의 프로바이오틱스능 검증

- 유산균주의 내산, 내담 및 장 부착능 평가

(가) 분리한 유산균주의 내산성 평가

- (1) 분리한 모든 유산균주는 3회 계대배양 후 원심분리(7,000×g, 4℃, 10 min)를 해줌
- (2) 원심분리 후 얻은 pellet을 PBS(pH 7.2)로 2회 세척 후 10 mL의 PBS에 suspension
- (3) 1,000 unit의 pepsin을 함유하고 pH를 2.5로 낮춘 MRS broth에 2% 접종
- (4) 37℃에서 2시간 동안 배양
- (5) MRS agar에 pour plate method를 사용하여 37℃, 48시간 배양 후 유산균수 측정

(나) 분리한 유산균주의 내담증성 평가

- (1) 분리한 모든 유산균주는 3회 계대배양 후 원심분리(7,000×g, 4℃, 10 min)를 해줌
- (2) 원심분리 후 얻은 pellet을 PBS(pH 7.2)로 2회 세척 후 10 mL의 PBS에 suspension
- (3) 0.3% bile bovine을 함유한 MRS broth에 2% 접종
- (4) 37℃에서 2시간 동안 배양
- (5) MRS agar에 pour plate method를 사용하여 37℃, 48시간 배양 후 유산균수 측정

(다) 분리한 유산균주의 장 부착능 평가

- 유산균의 장 부착능 평가는 사람의 장내 상피세포인 HT-29 cell을 사용
- 장 부착능 평가를 위해서 모든 분리한 유산균주는 3회 계대배양 후 사용
- (1) 10% FBS를 첨가한 McCoy's 5A 배지를 사용하여 37℃ in a 5% CO₂ 인큐베이터에서 monolayer를 형성할 때까지 배양
- (2) 유산균 배양액을 원심분리(4,000 rpm, 4℃, 15 min)한 후 pellet을 PBS(pH 7.2)로 3회 세척
- (3) 유산균을 10⁸ CFU/mL농도로 조절하여 HT-29 cell에 처리하여 37℃ in a 5% CO₂ 인큐베이터에서 2시간 배양
- (4) 배양 후 PBS로 5회 세척 후, trypsin-EDTA를 이용하여 부착된 유산균을 모아줌
- (5) MRS agar에 pour plate method를 사용하여 37℃, 48시간 배양 후 유산균수 측정



그림C-3. 신규 프로바이오틱스 후보균주 발굴 및 프로바이오틱스 특성 평가 개요

③ 선별 유산균주의 항비만 활성 평가 (*in vitro*)

- 선별된 유산균주의 항산화 및 콜레스테롤 저하 활성 평가

(가) ABTS assay

- 2, 2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)(ABTS) assay
- ABTS assay를 통한 radical scavenging activity 평가는 균주 배양액을 원심분리(9,950×g, 4°C, 10 min) 한 후 상등액을 사용함
- (1) 7 mM ABTS, 2.45 mM potassium persulfate를 deionized water에 녹여줌
- (2) 상온에서 16시간 방치한 후 734 nm에서 흡광도를 약 1.4정도로 희석
- (3) 96-well plate에 균주 배양액의 상등액 20 ul, (나)에서 만든 ABTS solution 180 ul을 넣어 상온에서 6분간 암반응
- (4) Microplate reader(multiskan sky, Thermo Fisher Scientific)을 사용하여 734 nm에서 흡광도를 측정 후 radical scavenging activity를 계산

(나) FRAP assay

- Ferric reducing antioxidant power(FRAP) assay
- FRAP assay를 통한 환원력 평가는 균주 배양액을 원심분리(9,950×g, 4°C, 10 min) 한 후 상등액을 사용함
- (1) FRAP reagent 제조; 0.3 M sodium acetate buffer(pH 3.6) : 10 mM TPTZ in 40 mM HCl : 20 mM FeCl₃·6H₂O = 10 : 1 : 1(v/v/v)
- (2) 96-well plate에 균주 배양액의 상등액 6 ul, FRAP reagent 180 ul을 넣어 37°C에서 30 min 동안 암반응
- (3) Microplate reader(multiskan sky, Thermo Fisher Scientific)을 사용하여 562 nm에서 흡광도를 측정
- (4) Iron(II) sulfate heptahydrate(FeSO₄·7H₂O)를 이용하여 표준곡선을 만든 후 균주의 환원력을 계산(mM FeSO₄·7H₂O)

(다) Growing cells의 콜레스테롤 저하 활성 평가

- 콜레스테롤과 bile bovine이 함유된 MRS broth에 유산균주를 배양한 후 배지에 남아있는 콜레스테롤을 측정
- (1) 모든 유산균주는 3회 계대배양 후 0.1 g/L 콜레스테롤(Kanto Chemical Co.), 0.5% bile bovine(Sigma-Aldrich)이 함유된 MRS broth에 접종하고 rectangular jar, anaero pack, anaero indicator(MGC)를 사용해 혐기조건으로 37°C, 18시간 배양
- (2) 배양액을 원심분리(9,950×g, 4°C, 5 min)하여 상등액 1 mL을 새로운 conical tube로 옮김
- (3) 33%(w/v) potassium hydroxide(Sigma-Aldrich) 2 mL과 95% ethanol(Samchun Chemicals) 3 mL을 첨가 후 1분간 섞어줌
- (4) 60°C water bath에서 10분간 반응
- (5) 찬물에서 식혀준 후 hexane(Junsei) 5 mL을 첨가
- (6) 섞어준 후 증류수 1 mL을 첨가
- (7) 섞어준 후 층 분리를 위해 10 min 동안 상온에 방치
- (8) hexane층(upper phase)층 3 mL을 다른 conical tube로 옮김

- (9) 50℃에서 질소가스를 이용해 농축
 - (10) 4 mL의 O-phthalaldehyde(OPA, 0.5 mg O-phthalaldehyde/mL acetic acid, Sigma-Aldrich)를 첨가 한 후 상온에서 10 min 동안 반응
 - (11) 2 mL의 진한 황산(Merck millipore)을 첨가 후 상온에서 10 min 동안 반응
 - (12) Microplate reader(multiskan sky, Thermo Fisher Scientific)을 사용하여 550 nm에서 흡광도를 측정
- 콜레스테롤이 각각 0.1, 0.05, 0.025, 0.0125, 0 g/L 함유된 MRS broth를 이용해 표준 곡선을 만든 후 각 균주의 콜레스테롤 저하 활성을 계산

- $cholesterol\ lowering\ activity = \frac{0.1 - residual\ cholesterol}{0.1} \times 100$

2. 연구개발 수행내용

1) 식물성 치즈제품 발효를 위한 발효균주 선정

① 유가공 제조공정과 유사 발효공정을 위한 상업용 스타터 컬처 탐색

(가) Isolated soy protein(ISP)의 기질 첨가 농도 결정

- 표C-1에 나타난 발효 중 pH의 변화를 보았을 때 기질 내 고농도(8%)의 ISP 함량은 상대적으로 저농도(4%)의 ISP 함량과 비교하여 접종 스타터컬처의 성장을 지연시키는 결과를 나타내어 8% 이하의 적정농도에 대한 탐색을 진행

표C-1. ISP 농도(4% vs. 8%)에 따른 발효 속도

	4% ISP	8% ISP
0 h	6.61	6.56
10 h	4.69	5.62
18 h	-	5.25
24 h	-	5.18

- 발효가 가능한 ISP의 적정 최종 농도를 결정하기 위해 최대 7%의 ISP를 기질에 첨가한 결과 표C-2에서 나타난 바와 같이 정상적인 발효가 진행되었으며, 5%와 7%의 ISP의 농도 중 표C-3에서 나타난 총 유산균수에서도 발효 종료 후 유사한 총 균수의 성장을 보여 식물성 치즈 공정을 위한 기질 내 분리대두단백의 최종 농도는 7%로 결정

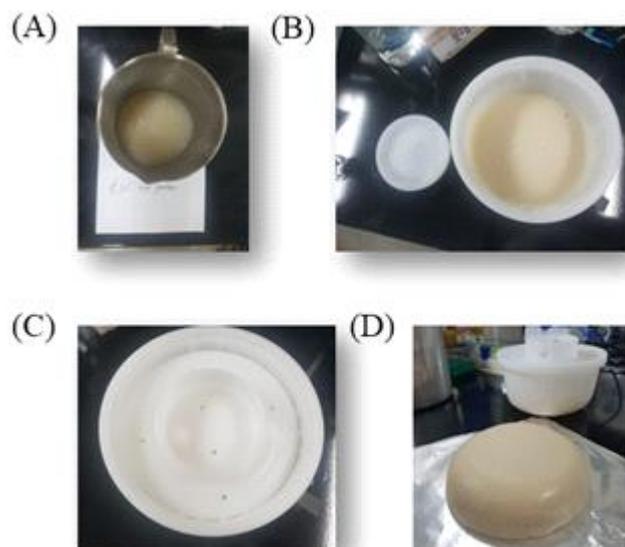
표C-2. ISP 농도(5% vs. 7%)에 따른 발효 속도

	5% ISP	7% ISP
0 h	6.52	6.58
7.5 h	4.86	5.25
8.5 h	4.7	-
10 h	-	4.71

표C-3. 5% ISP와 7% ISP의 발효 종료 후 총 유산균수

	5% ISP	7% ISP
총 유산균 수 (CFU/mL)	38,000,000	21,000,000

- 발효가 가능한 ISP의 적정 최종 농도를 결정하기 위해 최대 7%의 ISP를 기질에 첨가한 결과 표C-2에서 나타난 바와 같이 정상적인 발효가 진행되었으며, 5%와 7%의 ISP의 농도 중 표C-3에서 나타난 총 유산균수에서도 발효 종료 후 유사한 총 균수의 생장을 보여 식물성 치즈 공정을 위한 기질 내 분리대두단백의 최종 농도는 7%로 결정



그림C-4. 7%의 ISP의 발효 종료 후 제조 공정에 따른 형태

(나) 응고제(CaCl₂)의 농도 결정

- 7%의 ISP를 첨가한 기질 내 CaCl₂를 농도별로 첨가(0.5%, 1% 및 2%)하여 발효한 결과는 표C-4와 표C-5에 나타냄
- 0.5, 1 및 2%의 CaCl₂의 경우 발효 속도, pH 및 총 유산균 수에서 유사한 결과를 나타내었으며 세 가지 농도 모두 커드가 형성됨을 나타내 응고제가 발효를 저해하지 않는 것으로 확인. 하지만 1%의 CaCl₂에서 현재 시판되고 있는 동물성 단백질을 사용한 치즈와

가장 비슷한 물성을 나타내어 응고제의 최종 농도로 결정

표C-4. 응고제 농도에 따른 발효 속도

	0.5% CaCl ₂	1% CaCl ₂	2% CaCl ₂
0 h	6.63	6.47	6.34
2 h	6.45	6.26	6.13
4 h	5.8	5.4	5.14
6 h	4.95	4.81	4.85

표C-5. Table 5. 응고제 농도에 따른 발효 속도

	0.5% CaCl ₂	1% CaCl ₂	2% CaCl ₂
0 h	6.63	6.47	6.34
2 h	6.45	6.26	6.13
4 h	5.8	5.4	5.14
6 h	4.95	4.81	4.85

표C-6. 응고제 농도와 발효 시간에 따른 총 유산균 수

	0.5% CaCl ₂	1% CaCl ₂	2% CaCl ₂
0 h	630,000	650,000	1,100,000
2 h	6,700,000	8,700,000	5,400,000
4 h	24,000,000	24,000,000	16,000,000
6 h	24,500,000	71,000,000	54,000,000



0.5% CaCl₂



1% CaCl₂



2% CaCl₂

그림C-5. CaCl₂ 농도(0.5%, 1%, 2%)에 따른 식물성 치즈 응고제 농도와 발효 시간에 따른 총 유산균 수

	0.5% CaCl ₂	1% CaCl ₂	2% CaCl ₂
0 h	630,000	650,000	1,100,000
2 h	6,700,000	8,700,000	5,400,000
4 h	24,000,000	24,000,000	16,000,000
6 h	24,500,000	71,000,000	54,000,000



0.5% CaCl₂



1% CaCl₂



2% CaCl₂

그림C-6. CaCl₂ 농도(0.5%, 1%, 2%)에 따른 식물성 치즈

(다) 상업용 스타터 컬처 결정

- (가)과 (나)에서 결정된 ISP와 CaCl₂의 농도에 식물성 식품원료의 발효제조공정에 사용되는 스타터 컬처 3가지를 각각 접종하여 발효를 진행하면서 pH의 변화와 총 유산균수를 측정한 결과 F-DVS YF-L01 DA와 F-DVS BY-01 DA 빠르게 발효가 진행(표C-7) 되었으며, 표C-8에서 보이는 것처럼 총 유산균 수가 약 1 log CFU/mL정도 높게 나타남
- 표C-7에서 세 가지 스타터 컬처에 따른 발효 속도 및 pH를 측정한 결과 유사하게 나타났지만, 표C-8에서 6시간까지 발효 후 총 유산균수가 F-DVS YF-L01 DA에서 다른 두 가지 스타터 컬처에 비해 약 1 log CFU/mL 높게 나타남. 따라서 최종 식물성 식품원료 이용한 치즈의 제조 공정에서는 F-DVS YF-L01 DA를 접종하여 발효를 진행

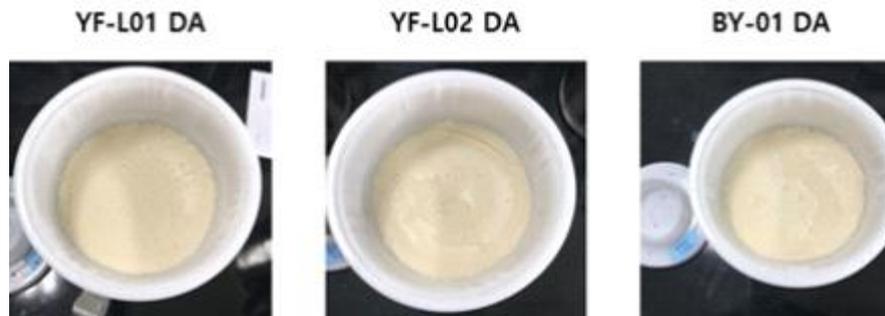
표C-7. 상업용 스타터 컬처에 따른 발효 속도

	YF-L01	YF-L02	BY-01
0 h	6.57	6.49	6.57
2 h	6.1	6.38	6.22
4 h	5.22	5.68	5.24
6 h	4.9	5.02	4.88

표C-8. 상업용 스타터 컬처와 시간에 따른 총 유산균수

	YF-L01	YF-L02	BY-01
0 h	1,800,000	400,000	4,000,000
2 h	24,000,000	3,400,000	10,200,000
4 h	330,000,000	37,000,000	30,000,000
6 h	400,000,000	49,000,000	57,000,000

- 상업용 스타터 컬처 세 가지를 각각 접종하였을 때, 세 가지 모두 curd의 형성을 확인할 수 있었으나 F-DVS YF-L01 DA와 F-DVS BY-01 DA를 접종한 것에서 발효 속도가 빠르게 나타났으며 F-DVS YF-L02 DA에서 총 유산균 수가 가장 높게 나타남



그림C-7. 상업용 스타터 컬처에 따른 식물성 치즈

② 스타터 컬처별 발효유제품 대체제품의 기초공정 개발 및 발효특성 평가

(가) ISP 농도와 발효시간에 따른 당 분석

- 발효 후 세 가지 농도에 대한 당 분석을 진행하였을 때, 표C-9와 같이 sucrose의 함량이 가장 많이 분해되었으며 표C-10에서 나타나는 것과 같이 Fructose의 함량이 가장 높게 나타남

표C-9. 발효 전과 발효 후의 Sucrose 함량 분석

	3% ISP	5% ISP	7% ISP	
발효 전	5.709	5.458	5.32	
발효 후	5.544	5.205	4.85	단위 : %

표C-10. 발효 전과 발효 후의 Fructose 함량 분석

	3% ISP	5% ISP	7% ISP	
발효 전	-	-	-	
발효 후	0.057	0.094	0.106	단위 : %

2) 항비만 기능성 신규 프로바이오틱스 후보균주 탐색

① 김치 및 인체유래 유산균주 분리

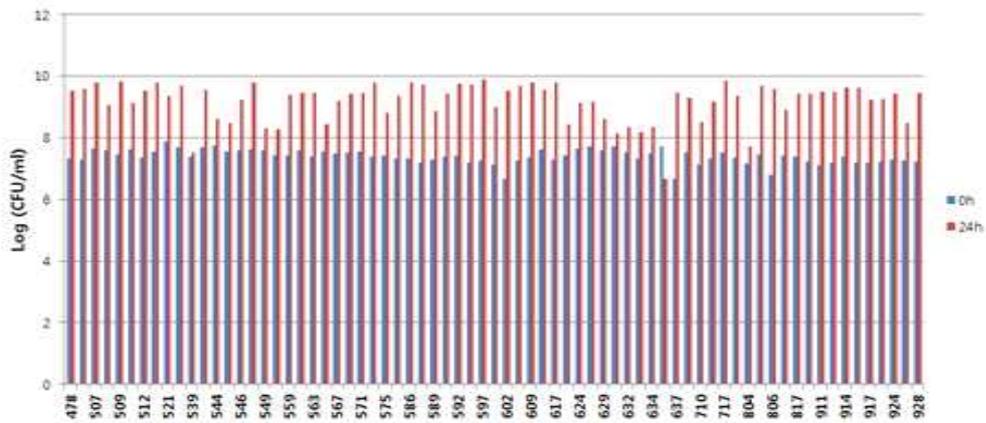
- 김치 시료로부터 38종 및 영유아 분변 시료(인체 유래)로부터 29종 분리하여 총 67종의 유산균을 분리함

② 김치 및 인체유래 유산균주의 프로바이오틱스능 검증

- 유산균주의 내산, 내담 및 장 부착능 평가

(가) 유산균주의 내산성 평가

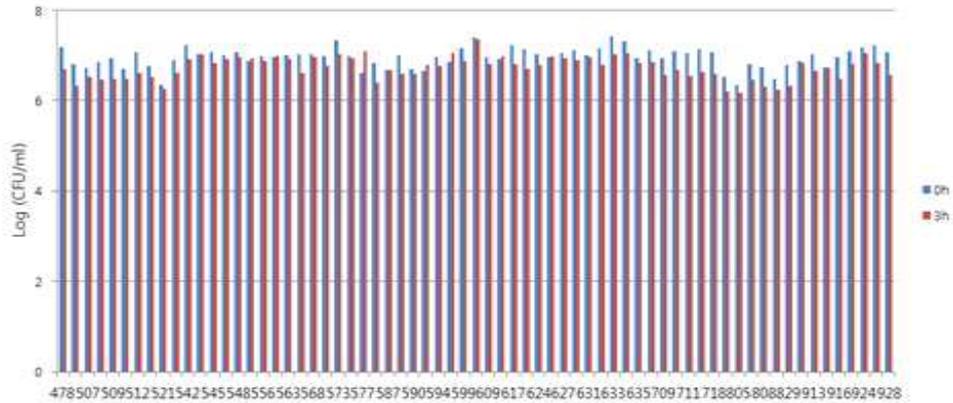
- 그림C-7에서 나타나는 것처럼 분리한 67개의 유산균주에서 모두 내산성을 나타냄



그림C-8. 분리한 유산균주의 내산성

(나) 유산균주의 내담증성 평가

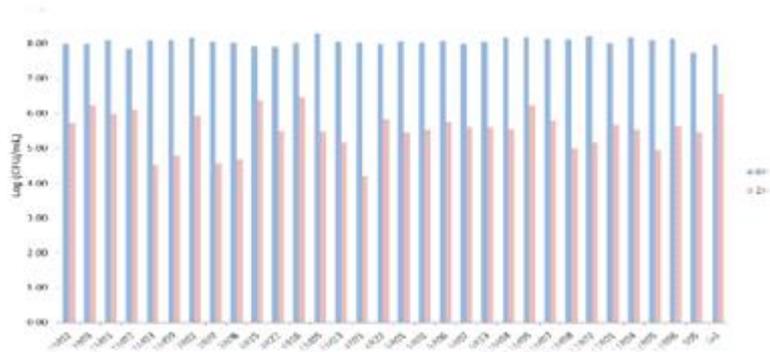
- 그림C-8에서 나타나는 것처럼 분리한 67개의 유산균주에서 모두 내담증성을 나타냄



그림C-9. 분리한 유산균주의 내담증성

(다) 유산균주의 장 부착능 평가

- 그림C-9에서 나타난 장 부착능 실험 결과 60~70%의 효능을 보이는 유산균 11종, 70~80% 유산균 12종, 80~90%의 장부착능을 보인 유산균 2종으로 확인

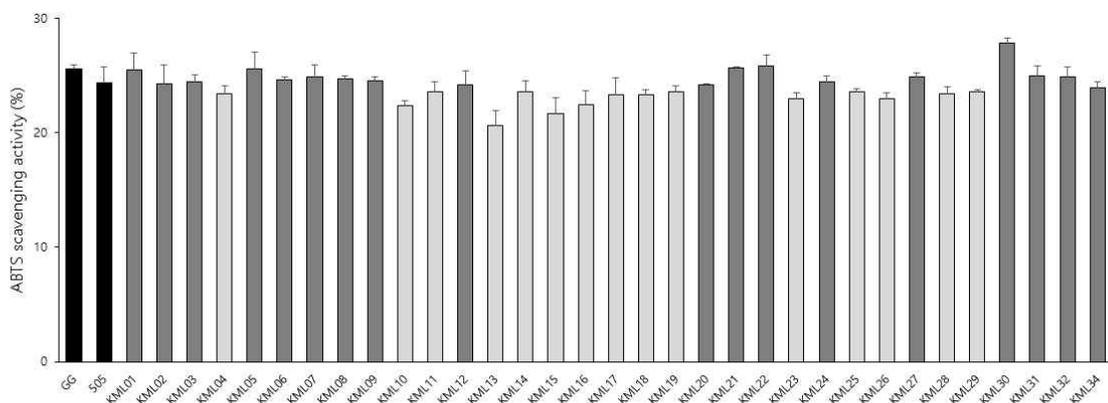


그림C-10. 분리한 유산균주의 장 부착능

② 선별 유산균주의 항비만 활성 평가 (*in vitro*)

(가) ABTS assay

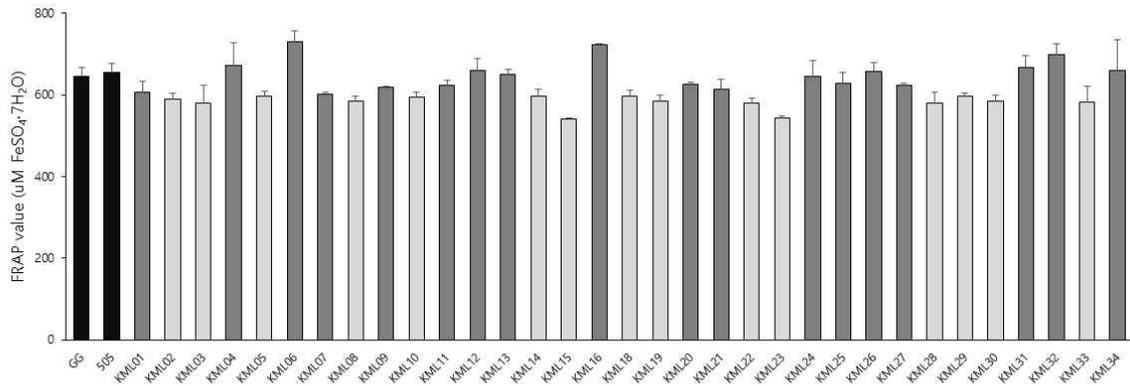
- 프로바이오틱스능(내산성, 내담증성, 장 부착능)평가에서 높은 값을 나타낸 유산균 중 그림C-10에서 나타난 것처럼 높은 radical scavenging activity를 갖는 균주가 총 18종으로 확인



그림C-11. 유산균의 ABTS radical scavenging activity

(나) FRAP assay

- 프로바이오틱스 능(내산성, 내담즙성, 장 부착능)평가에서 높은 값을 나타낸 유산균 중 그림C-11에서 나타난 것처럼 높은 환원력을 갖는 균주가 총 18종으로 확인

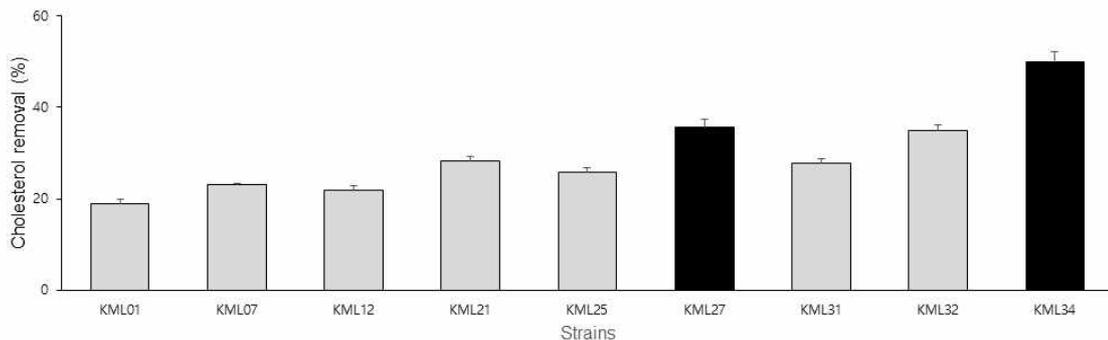


그림C-12. 유산균의 Ferric reducing antioxidant power

- (가)의 ABTS radical scavenging activity와 (나)의 환원력에서 모두 높은 값을 나타낸, 항산화활성이 높은 유산균 9종 선별

(다) Growing cells의 cholesterol assimilation

- 높은 항산화 활성을 갖는 9종의 유산균 중 그림C-12에서 나타난 것처럼 growing cell에서 높은 cholesterol assimilation을 나타냄



그림C-13. Cholesterol assimilation of LAB of growing cells

- 최종적으로 KML27과 KML34가 높은 콜레스테롤 저하 활성을 나타냈으며, 이후에 2가지 균주를 사용해 연구 진행 예정

[2차년도 : ISP와 Almond protein을 이용한 식물성 치즈제품의 제조 공정 확립 및 선정 프로바이오틱스를 이용한 식물성 기질 발효물의 항비만 기능성 평가]

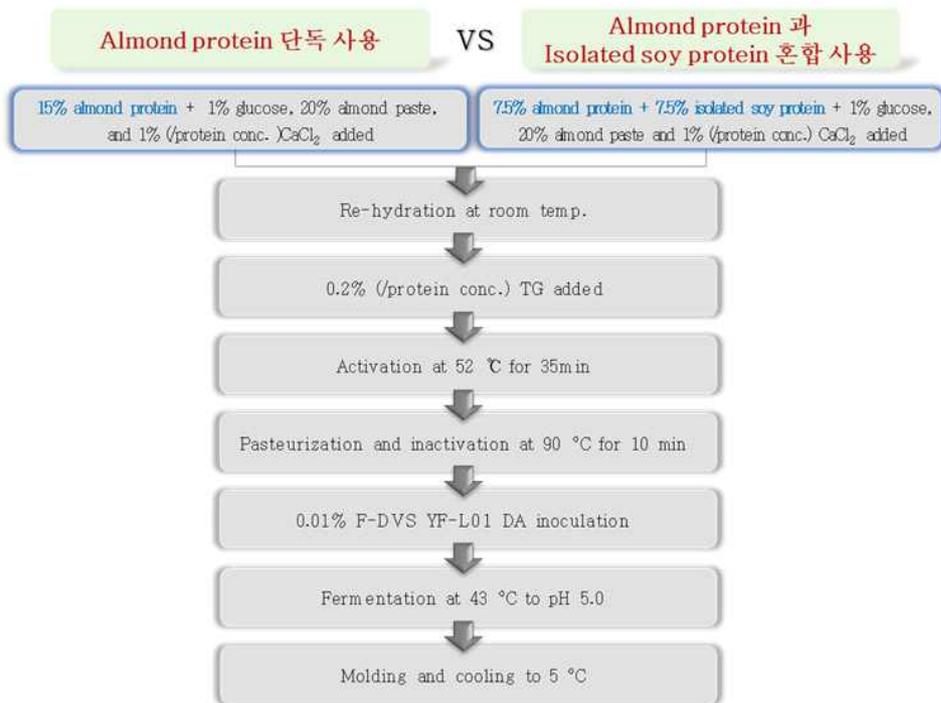
1. 연구개발 수행과정

1) Lab-scale 식물성 치즈제품의 발효특성 평가

① 식물성 단백질을 이용한 치즈제품의 공정 확립

(가) 아몬드 단백질과 ISP의 발효특성 비교

- (1) 2개의 스테인리스 비커(A,B)에 각각 다음과 같이 배합하고 homogenizer를 이용하여 균질 및 혼합
 - A : 상온에서 정수된 물 500 g에 almond protein 15%(75 g), almond paste 20%(100 g), Glucose 1%(5 g), CaCl₂ 1%/protein conc (0.75 g)
 - B : 상온에서 정수된 물 500 g에 ISP 7.5%(37.5 g), almond protein 7.5%(37.5g), almond paste 20%(100 g), Glucose 1%(5 g), CaCl₂ 1%/protein conc (0.75 g)
- (2) 0.3 g(0.2%/protein)의 TG를 1.2 g의 ice water에 1:6으로 희석하여 A, B에 넣고 섞어줌
- (3) 52°C water bath에서 35분간 TG activation
- (4) 90°C water bath에서 10분간 살균 및 inactivation
- (5) 스타터 컬처 (F-DVS YF-L01 DA) 0.01% 접종
- (6) 43°C incubator에서 배양



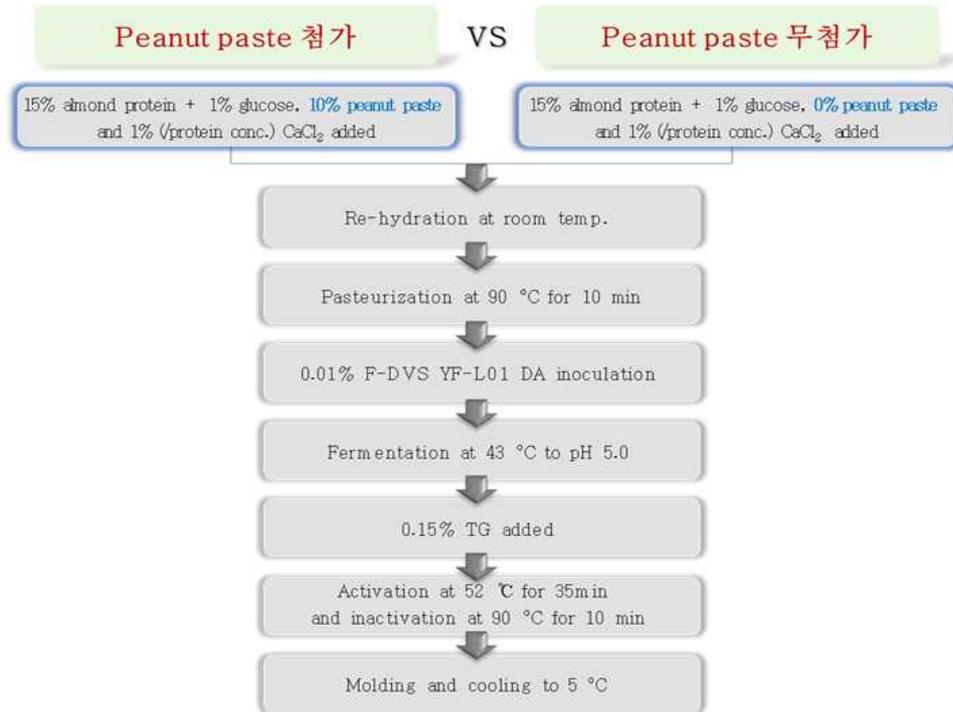
그림C-14. 아몬드 단백질과 ISP를 혼합하여 사용한 식물성 치즈제품의 발효특성 비교를 위한 공정도

(나) TG 첨가 시점에 따른 발효특성 비교

- (1) 2개의 스테인리스 비커(A,B)에 각각 다음과 같이 배합하고 homogenizer를 이용하여 균질 및 혼합
A : 상온에서 정수된 물 500 g에 almond protein 15%(75 g), peanut paste 10%(50 g), Glucose 1%(5 g), CaCl₂ 1%/protein conc (0.75 g)
B : 상온에서 정수된 물 500 g에 almond protein 15%(75 g), peanut paste 10%(50 g), Glucose 1%(5 g), CaCl₂ 1%/protein conc (0.75 g)
- (2) 1 g(0.15%/total volume)의 TG를 6 g의 ice water에 1:6으로 희석하여 A에 넣고 섞어줌
- (3) A만 52°C water bath에서 35분간 TG activation
- (4) A와 B 모두 90°C water bath에서 10분간 살균 및 inactivation
- (5) 스타터 컬처 (F-DVS YF-L01 DA) 0.01% 접종
- (6) 43°C incubator에서 배양
- (7) 발효가 끝난 후, A는 mold에 담아 냉장
- (8) 1 g(0.15%/total volume)의 TG를 6 g의 ice water에 1:6으로 희석하여 B에 넣고 섞어줌
- (9) B만 52°C water bath에서 35분간 TG activation하고 90°C water bath에서 10분간 inactivation
- (10) 52°C water bath에서 10분간 식히고 mold에 담아 냉장

(다) Paste 첨가에 따른 발효특성 비교

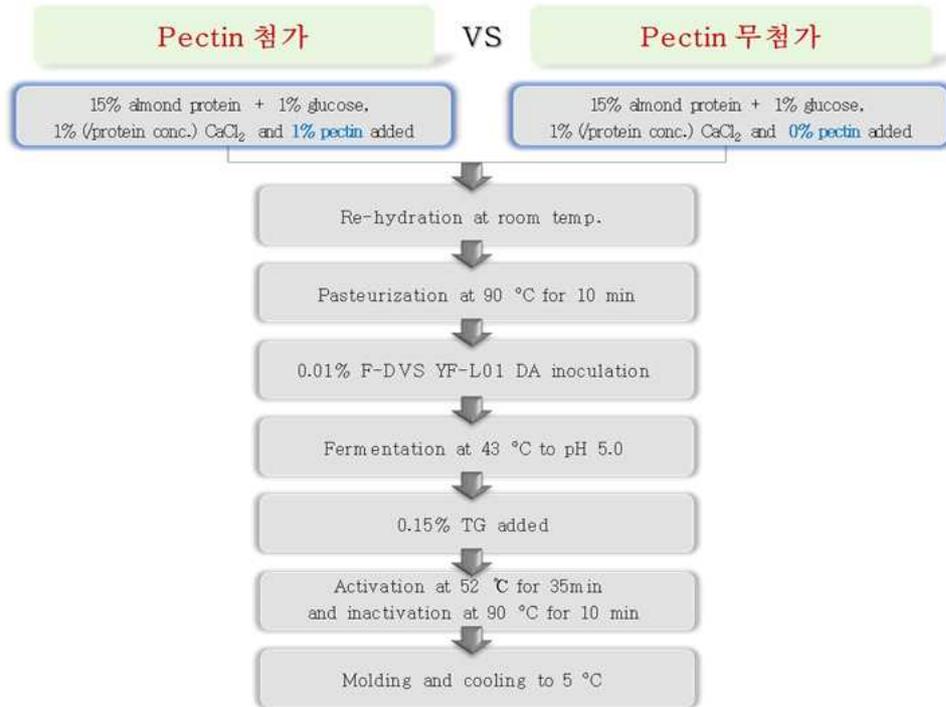
- (1) 2개의 1L Bottle(A, B)에 각각 다음과 같이 배합하고 stirrer를 이용하여 균질혼합
A : 상온에서 정수된 물 200 g에 almond protein 15%(30 g), peanut paste 10%(20 g), Glucose 1%(2 g), CaCl₂ 1%/protein conc (0.3 g), pectin 1%(2 g)
B : 상온에서 정수된 물 200 g에 almond protein 15%(30 g), Glucose 1%(2 g), CaCl₂ 1%/protein conc (0.3 g), pectin 1%(2 g)
- (2) 90°C water bath에서 10분간 살균
- (3) 스타터 컬처 (F-DVS YF-L01 DA) 0.01% 접종
- (4) 43°C incubator에서 배양
- (5) 0.375 g(0.15%/total volume)의 TG를 2.25 g의 ice water에 1:6으로 희석하여 A, B에 넣고 섞어줌
- (6) 52°C water bath에서 35분간 TG activation하고 90°C water bath에서 10분간 inactivation
- (7) 52°C water bath에서 10분간 식히고 mold에 담아 냉장



그림C-15. Paste 첨가에 따른 식물성 치즈제품의 발효특성 비교를 위한 공정도

(라) Pectin 첨가에 따른 발효특성 비교

- (1) 2개의 50 mL conical tubes (A,B)에 각각 다음과 같이 배합하고 vortexing
 - A : 상온에서 정수된 물 40 g에 almond protein 15%(6 g), Glucose 1%(0.4 g), CaCl₂ 1%/ISP conc(0.06 g)
 - B : 상온에서 정수된 물 40 g에 almond protein 15%(6 g), Glucose 1%(0.4 g), CaCl₂ 1%/ISP conc(0.06 g), pectin 1%(0.4 g)
- (2) 90°C water bath에서 10분간 살균
- (3) 스타터 컬처 (F-DVS YF-L01 DA) 0.01% 접종
- (4) 43°C incubator에서 배양
- (5) 0.06 g(0.15%/total volume)의 TG를 0.36 g의 ice water에 1:6으로 희석하여 A,B에 넣고 섞어줌
- (6) 52°C water bath에서 35분간 TG activation하고 90°C water bath에서 10분간 inactivation
- (7) 52°C water bath에서 10분간 식히고 mold에 담아 냉장

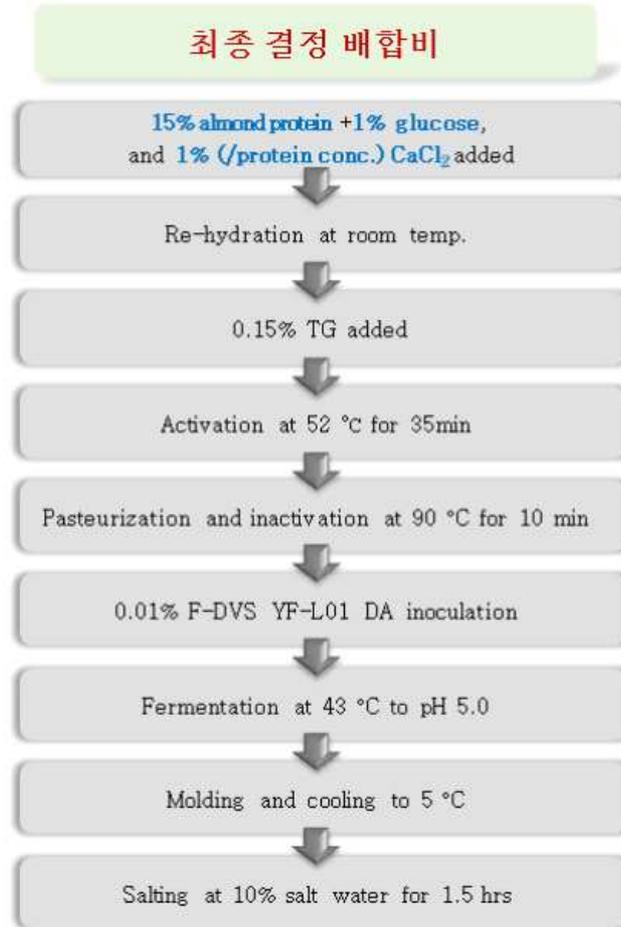


그림C-16. Pectin 첨가에 따른 식물성 치즈제품의 발효특성 비교를 위한 공정도

(마) Salting을 통한 치즈 염도 부여

- (1) 스테인리스 비커에 다음과 같이 배합하고 homogenizer를 이용하여 균질 및 혼합
A : 상온에서 정수된 물 700 g에 almond protein 15%(105 g), Glucose 1%(7 g),
CaCl₂ 1%/protein conc (1.05 g)
- (2) 90°C water bath에서 10분간 살균
- (3) 스타터 컬처 (F-DVS YF-L01 DA) 0.01% 접종
- (4) 43°C incubator에서 배양
- (5) 1.215 g(0.15%/total volume)의 TG를 7.29 g의 ice water에 1:6으로 희석하여 A에
넣고 섞어
- (6) 52°C water bath에서 35분간 TG activation하고 90°C water bath에서 10분간
inactivation
- (7) 52°C water bath에서 10분간 식히고 mold에 담아 냉장
- (8) 10% salt water에 mold를 담가 3시간 냉장

(바) 최종 배합비 결정



그림C-17. 식물성 치즈제품의 최종공정도

② 식물성 치즈제품의 이화학적 발효특성 평가

- 최종 확립된 공정 과정을 이용한 식물성 치즈제품으로 이화학적 발효특성 평가를 진행

(가) 일반성분 분석

- 상압건조가열법을 이용하여 발효액 제조 시 또는 저장 중 수분함량을 분석
- 수분함량 분석은 식품공전 일반성분시험법의 수분 건조감량법 중 상압가열건조법을 이용하여 분석
- 시료 3 g을 정제해사가 있는 항량에 도달한 도가니에 정확히 측정하여 100°C dry oven에서 건조시키며 시료가 항량에 도달할 때의 무게를 측정 후 수분 함량을 계산

(나) 당 분석

- 발효액 제조 시 또는 저장 중 유산균의 생육에 사용되는 fructose, glucose 및 sucrose의 함량을 분석
- 분석을 위한 시료의 전처리는 시료 1 g을 conical tube에 정확히 칭량하고 50% acetonitrile 9 mL로 추출하며, 추출액은 원심분리(3,000rpm, 10 min) 후 0.2 µm 필터로 여과한 것을 시험용액으로 사용
- HPLC-RID 및 Carbohydrate Cartridge column(250 x 4.6 mm, Waters)을 사용하였고, 주입량은 20 µL, 이동상으로써 75% acetonitrile을 1.2 mL/min 유속에서 분리 후 분석하였음. 분석된 성분은 표준 물질의 분석 데이터와 spectrum 등을 비교하여 확인

(다) 유기산 분석

- 발효액 제조 시 또는 저장 중 생성되는 citric acid 및 lactic acid의 함량을 분석
- 분석을 위한 시료의 전처리는 시료 2 g을 conical tube에 정확히 칭량하고 0.005 N 황산 6 mL로 추출하며, 추출액은 원심분리(5,000rpm, 10 min) 후 0.2 um 필터로 여과한 것을 시험용액으로 사용
- HPLC-PDA 및 Aminex HPX-87H column(300 x 7.8 mm, Bio-Rad)을 사용하였고, 컬럼 온도는 65°C, 주입량은 25 uL, 이동상으로써 0.005 N H₂SO₄를 0.6 mL/min 유속 및 UV 220 nm에서 분리 후 분석하였음. 분석된 성분은 표준물질의 분석 데이터와 spectrum 등을 비교하여 확인

③ 식물성 치즈제품의 이화학적 발효특성 평가

- 최종 확립된 공정 과정을 이용한 식물성 치즈제품의 총 유산균 수를 측정
- 식물성 치즈제품을 멸균한 saline을 이용하여 순차 희석법을 이용하여 희석한 후 BCP agar에 도말평판법을 이용하여 총 유산균 수를 측정

2) 선별 프로바이오틱스의 항비만 기능성 검증

① 1차년도에 선별한 프로바이오틱스 후보균주를 이용한 식물성 발효물 제조

- (1) 백태콩과 물을 (500 g/1,500 g) 두부제조기(SoyLove)를 이용해 10 min 동안 끓인 후 5회 분쇄
- (2) 분쇄된 콩물을 130 mesh 천을 이용해 여과
- (3) 여과한 콩물을 90°C water bath에서 15 min 살균
- (4) 찬물에서 식혀준 후 3회 계대한 유산균주(KML21, KML32)를 접종(3%, v/v)
- (5) 43°C incubator에서 48 h 동안 발효 진행 (각 발효시간마다 pH 측정)

② 1차년도 선별 후보균주를 이용한 식물성 단백질 발효물의 발효시간별 항산화 및 콜레스테롤 저하 활성 비교

- 각각의 시료는 0, 24, 48 h 발효를 진행한 발효물을 사용

(가) DPPH assay

- 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl(DPPH) assay
- DPPH assay를 통한 radical scavenging activity 평가는 식물성 단백질 발효물을 10,000 MWCO centrifugal concentrator(Vivaspin® 6, Sartorius)를 통해 원심분리(8,000×g, 4°C, 10 min)하여 filtering한 후 다시 0.2 um syringe filter로 filtering 한 것을 시료로 사용
- (1) 200 uM DPPH를 ethanol에 녹여줌
- (2) 96-well plate에 시료 100 uL와 (가)에서 만든 DPPH 100 uL를 넣어 섞어준 후 37°C에서 30 min 동안 암반응
- (3) Microplate reader(Gen 5, BioTek)을 사용하여 517 nm에서 흡광도를 측정 후 radical scavenging activity(%)를 계산

(나) FRAP assay

- Ferric reducing antioxidant power(FRAP) assay
- FRAP assay를 통한 환원력 평가는 식물성 단백질 발효물을 10,000 MWCO centrifugal concentrator(Vivaspin® 6, Sartorius)를 통해 원심분리(8,000×g, 4°C, 10min)하여 filtering한 후 다시 0.2 um syringe filter로 filtering 한 것을 시료로 사용
- (1) FRAP reagent 제조 ; 0.3 M sodium acetate buffer(pH 3.6) : 10 mM TPTZ in 40 mM HCl : 20 mM FeCl₃·6H₂O = 10 : 1 : 1(v/v/v)
- (2) 96-well plate에 시료 6 uL와 (가)에서 만든 FRAP reagent를 180 uL 넣어 섞어준 후 37°C에서 30 min동안 암반응
- (3) Microplate reader(Gen 5, BioTek)을 사용하여 593 nm에서 흡광도를 측정
- (4) Iron(II) sulfate heptahydrate(FeSO₄·7H₂O)를 이용하여 표준곡선을 만든 후 시료의 환원력을 계산(mM FeSO₄·7H₂O equivalent)

(다) 식물성 단백질 발효물의 콜레스테롤 저하 활성 평가

- 콜레스테롤과 bile bovine이 함유된 MRS broth에 식물성 단백질 발효물을 접종한 후 배지에 남아있는 콜레스테롤을 측정
- (1) 각 발효시간별 시료를 0.1 g/L 콜레스테롤(Kato Chemical Co.), 0.5% bile bovine(Sigma-Aldrich)이 함유된 MRS broth에 접종하고 rectangular jar, anaero pack, anaero indicator(MGC)를 사용해 혐기조건으로 37°C, 18 h 배양
- (2) 배양액을 원심분리(8,000×g, 4°C, 10 min)하여 상등액 1 mL을 새로운 conical tube로 옮김
- (3) 33%(w/v) potassium hydroxide(Sigma-Aldrich) 2 mL과 95% ethanol (Samchun Chemicals) 3 mL을 첨가 후 1분간 섞어줌
- (4) 60°C water bath에서 10분간 반응
- (5) 찬물에서 식혀준 후 n-hexane(Junsei) 5 mL과 증류수 1 mL 첨가
- (6) 섞어준 후 층 분리를 위해 10분간 상온에 방치
- (7) n-hexane층(upper phase) 3 mL을 다른 conical tube로 옮김
- (8) 50°C heating block에서 질소가스를 이용해 농축
- (9) 4 mL의 O-phthalaldehyde(0.5 mg O-phthalaldehyde/mL acetic acid (Sigma-Aldrich)를 첨가한 후 상온에서 10분간 반응
- (10) 2 mL의 진한 황산(Merck millipore)을 첨가한 후 상온에서 10분간 반응
- (11) Microplate reader(Gen5, BioTek)을 사용하여 550 nm에서 흡광도를 측정
- 콜레스테롤이 각각 0.1, 0.05, 0.025, 0.0125, 0 g/L 함유된 MRS broth를 이용해 표준곡선을 만든 후 각 균주의 콜레스테롤 저하 활성을 계산

$$- \text{cholesterol lowering activity} = \frac{0.1 - \text{residual cholesterol}}{0.1} \times 100$$

③ 식물성 치즈제품의 이화학적 발효특성 평가

- 최적 발효조건 설정을 위해 발효 온도에 따른 발효특성 비교 (37°C vs. 43°C)
- (1) 백태콩과 물을 (500 g/1,500 g) 두부제조기(SoyLove)를 이용해 10 min 동안 끓인 후 5회 분쇄
- (2) 분쇄된 콩물을 130 mesh 천을 이용해 여과

- (3) 여과한 콩물을 90°C water bath에서 15 min 살균
- (4) 찬물에서 식혀준 후 3회 계대한 유산균주(KML21, KML32)를 접종(0.5%, v/v)
- (5) 37°C, 43°C incubator에서 각각 48 h 동안 발효 진행 (각 발효시간마다 pH 측정)

(가) FRAP assay

- Ferric reducing antioxidant power(FRAP) assay
- FRAP assay를 통한 환원력 평가는 식물성 단백질 발효물을 10,000 MWCO centrifugal concentrator(Vivaspin® 6, Sartorius)를 통해 원심분리(8,000×g, 4°C, 10min)하여 filtering한 후 다시 0.2 um syringe filter로 filtering 한 것을 시료로 사용
- (1) FRAP reagent 제조; 0.3 M sodium acetate buffer(pH 3.6) : 10 mM TPTZ in 40 mM HCl : 20 mM FeCl₃·6H₂O = 10 : 1 : 1(v/v/v)
- (2) 96-well plate에 시료 6 uL와 (가)에서 만든 FRAP reagent를 180 uL 넣어 섞어준 후 37°C에서 30 min동안 암반응
- (3) Microplate reader(Gen 5, BioTek)을 사용하여 593 nm에서 흡광도를 측정
- (4) Iron(II) sulfate heptahydrate(FeSO₄·7H₂O)를 이용하여 표준곡선을 만든 후 시료의 환원력을 계산(mM FeSO₄·7H₂O equivalent)

(나) 식물성 단백질 발효물의 콜레스테롤 저하 활성 평가

- 콜레스테롤과 bile bovine이 함유된 MRS broth에 식물성 단백질 발효물을 접종한 후 배지에 남아있는 콜레스테롤을 측정
- (1) 각 발효시간별 시료를 0.1 g/L 콜레스테롤(Kato Chemical Co.), 0.5% bile bovine(Sigma-Aldrich)이 함유된 MRS broth에 접종하고 rectangular jar, anaero pack, anaero indicator(MGC)를 사용해 혐기조건으로 37°C, 18 h 배양
- (2) 배양액을 원심분리(8,000×g, 4°C, 10 min)하여 상등액 1 mL을 새로운 conical tube로 옮김
- (3) 33%(w/v) potassium hydroxide(Sigma-Aldrich) 2 mL과 95% ethanol (Samchun Chemicals) 3 mL을 첨가 후 1분간 섞어줌
- (4) 60°C water bath에서 10분간 반응
- (5) 찬물에서 식혀준 후 n-hexane(Junsei) 5 mL과 증류수 1 mL 첨가
- (6) 섞어준 후 층 분리를 위해 10분간 상온에 방치
- (7) n-haxane층(upper phase) 3 mL을 다른 conical tube로 옮김
- (8) 50°C heating block에서 질소가스를 이용해 농축
- (9) 4 mL의 O-phthalaldehyde(0.5 mg O-phthalaldehyde/mL acetic acid (Sigma-Aldrich)를 첨가한 후 상온에서 10분간 반응
- (10) 2 mL의 진한 황산(Merck millipore)을 첨가한 후 상온에서 10분간 반응
- (11) Microplate reader(Gen5, BioTek)을 사용하여 550 nm에서 흡광도를 측정
- 콜레스테롤이 각각 0.1, 0.05, 0.025, 0.0125, 0 g/L 함유된 MRS broth를 이용해 표준 곡선을 만든 후 각 균주의 콜레스테롤 저하 활성을 계산

$$- \text{cholesterol lowering activity} = \frac{0.1 - \text{residual cholesterol}}{0.1} \times 100$$

(다) 식물성 단백질 발효물의 콜레스테롤 저하 활성 평가

- 콜레스테롤과 bile bovine이 함유된 MRS broth에 식물성 단백질 발효물을 접종한 후 배지에 남아있는 콜레스테롤을 측정
- (1) 각 발효시간별 시료를 0.1 g/L 콜레스테롤(Kato Chemical Co.), 0.5% bile bovine(Sigma-Aldrich)이 함유된 MRS broth에 접종하고 rectangular jar, anaero pack, anaero indicator(MGC)를 사용해 혐기조건으로 37°C, 18 h 배양
- (2) 배양액을 원심분리(8,000×g, 4°C, 10 min)하여 상등액 1 mL을 새로운 conical tube로 옮김
- (3) 33%(w/v) potassium hydroxide(Sigma-Aldrich) 2 mL과 95% ethanol (Samchun Chemicals) 3 mL을 첨가 후 1분간 섞어줌
- (4) 60°C water bath에서 10분간 반응
- (5) 찬물에서 식혀준 후 n-hexane(Junsei) 5 mL과 증류수 1 mL 첨가
- (6) 섞어준 후 층 분리를 위해 10분간 상온에 방치
- (7) n-hexane층(upper phase) 3 mL을 다른 conical tube로 옮김
- (8) 50°C heating block에서 질소가스를 이용해 농축
- (9) 4 mL의 O-phthalaldehyde(0.5 mg O-phthalaldehyde/mL acetic acid (Sigma-Aldrich)를 첨가한 후 상온에서 10분간 반응
- (10) 2 mL의 진한 황산(Merck millipore)을 첨가한 후 상온에서 10분간 반응
- (11) Microplate reader(Gen5, BioTek)을 사용하여 550 nm에서 흡광도를 측정
- 콜레스테롤이 각각 0.1, 0.05, 0.025, 0.0125, 0 g/L 함유된 MRS broth를 이용해 표준곡선을 만든 후 각 균주의 콜레스테롤 저하 활성을 계산

④ 최적 발효조건에서 KML21의 발효 시간별 발효 특성 평가

- (1) 백태콩과 물을 (500 g/1,500 g) 두부제조기(SoyLove)를 이용해 10 min 동안 끓인 후 5회 분쇄
- (2) 분쇄된 콩물을 130 mesh 천을 이용해 여과
- (3) 여과한 콩물을 90°C water bath에서 15 min 살균
- (4) 찬물에서 식혀준 후 3회 계대한 유산균주(KML21)를 접종(0.5%, v/v)
- (5) 37°C incubator에서 48 h 동안 발효 진행
- 시료는 48 h 동안 발효를 진행하면서 매 6 h마다의 발효물을 사용 (각 발효시간마다 pH 측정)

(가) DPPH assay

- 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl(DPPH) assay
- DPPH assay를 통한 radical scavenging activity 평가는 식물성 단백질 발효물을 10,000 MWCO centrifugal concentrator(Vivaspin® 6, Sartorius)를 통해 원심분리(8,000×g, 4°C, 10 min)하여 filtering한 후 다시 0.2 um syringe filter로 filtering 한 것을 시료로 사용
- (1) 200 uM DPPH를 ethanol에 녹여줌
- (2) 96-well plate에 시료 100 uL와 (가)에서 만든 DPPH 100 uL를 넣어 섞어준 후 37°C에서 30 min 동안 암반응
- (3) Microplate reader(Gen 5,BioTek)을 사용하여 517 nm에서 흡광도를 측정 후 radical

scavenging activity(%)를 계산

(나) FRAP assay

- Ferric reducing antioxidant power(FRAP) assay
- FRAP assay를 통한 환원력 평가는 식물성 단백질 발효물을 10,000 MWCO centrifugal concentrator(Vivaspin® 6, Sartorius)를 통해 원심분리(8,000×g, 4℃, 10min)하여 filtering한 후 다시 0.2 um syringe filter로 filtering 한 것을 시료로 사용
- (1) FRAP reagent 제조; 0.3 M sodium acetate buffer(pH 3.6) : 10 mM TPTZ in 40 mM HCl : 20 mM FeCl₃·6H₂O = 10 : 1 : 1(v/v/v)
- (2) 96-well plate에 시료 6 uL와 (가)에서 만든 FRAP reagent를 180 uL 넣어 섞어준 후 37℃에서 30 min동안 암반응
- (3) Microplate reader(Gen 5,BioTek)을 사용하여 593 nm에서 흡광도를 측정
- (4) Iron(II) sulfate heptahydrate(FeSO₄·7H₂O)를 이용하여 표준곡선을 만든 후 시료의 환원력을 계산(mM FeSO₄·7H₂O equivalent)

(다) Hydroxyl radical scavenging activity 평가

- Hydroxyl radical scavenging activity는 식물성 단백질 발효물을 10,000 MWCO centrifugal concentrator(Vivaspin® 6, Sartorius)를 통해 원심분리(8,000×g, 4℃, 10min)하여 filtering한 후 다시 0.2 um syringe filter로 filtering 한 것을 시료로 사용
- (1) 20 mM PBS(pH 7.4) : 2.5 mM 1,10-phenanthroline : 2.5 mM FeSO₄ : 20 mM H₂O₂ = 2:1:1:1 로 reagent 제조
- (2) 96-well plate에 시료 33 uL와 (가)에서 만든 reagent 165 uL을 넣어 섞어준 후 37℃에서 1 h 동안 반응
- (3) Microplate reader(Gen 5,BioTek)을 사용하여 536 nm에서 흡광도를 측정
- (4) $hydroxyl\ radical\ scavenging\ activity = \frac{As - Ac}{Ao - Ac} \times 100$

(As : sample 존재; Ac : control, sample 존재하지 않음; Ao : sample과 H₂O₂ 존재하지 않음)

(라) 식물성 단백질 발효물의 콜레스테롤 저하 활성 평가

- 콜레스테롤과 bile bovine이 함유된 MRS broth에 식물성 단백질 발효물을 접종한 후 배지에 남아있는 콜레스테롤을 측정
- (1) 각 발효시간별 시료를 0.1 g/L 콜레스테롤(Kato Chemical Co.), 0.5% bile bovine(Sigma-Aldrich)이 함유된 MRS broth에 접종하고 rectangular jar, anaero pack, anaero indicator(MGC)를 사용해 혐기조건으로 37℃, 18 h 배양
- (2) 배양액을 원심분리(8,000×g, 4℃, 10 min)하여 상등액 1 mL을 새로운 conical tube로 옮김
- (3) 33%(w/v) potassium hydroxide(Sigma-Aldrich) 2 mL과 95% ethanol(Samchun Chemicals) 3 mL을 첨가 후 1분간 섞어줌
- (4) 60℃ water bath에서 10분간 반응
- (5) 찬물에서 식혀준 후 n-hexane(Junsei) 5 mL과 증류수 1 mL 첨가
- (6) 섞어준 후 층 분리를 위해 10분간 상온에 방치
- (7) n-haxane층(upper phase) 3 mL을 다른 conical tube로 옮김

- (8) 50°C heating block에서 질소가스를 이용해 농축
- (9) 4 mL의 O-phthalaldehyde(0.5 mg O-phthalaldehyde/mL acetic acid (Sigma-Aldrich))를 첨가한 후 상온에서 10분간 반응
- (10) 2 mL의 진한 황산(Merck millipore)을 첨가한 후 상온에서 10분간 반응
- (11) Microplate reader(Gen5, BioTek)을 사용하여 550 nm에서 흡광도를 측정
- 콜레스테롤이 각각 0.1, 0.05, 0.025, 0.0125, 0 g/L 함유된 MRS broth를 이용해 표준 곡선을 만든 후 각 균주의 콜레스테롤 저하 활성을 계산

$$- \text{cholesterol lowering activity} = \frac{0.1 - \text{residual cholesterol}}{0.1} \times 100$$

(마) 총 유산균 수 측정 및 발효 중 pH 변화 확인

- 매 6 h마다의 발효물을 멸균한 saline을 이용하여 순차 희석법을 이용하여 0 h, 6 h는 10⁻⁶ 까지, 12 h ~ 48 h는 10⁻⁸까지 희석한 후 MRS agar에 도말평판법을 이용하여 총 유산균 수 측정

(바) Soy isoflavones 분석

- 발효가 진행되는 동안 유산균에 의해 isoflavone glycoside(daidzin, genistin)가 isoflavone aglycone(daidzein, genistein)으로 bioconversion되는 것을 분석
- 시료의 전처리
 - (1) 시료 2 mL에 acetonitrile 10 mL, 0.1 M HCl 2 mL, deionized water 2 mL 첨가
 - (2) 잘 섞어준 후 2 hr 동안 water bath에서 shaking (200 rpm, room temp.)
 - (3) Centrifugation (430×g, 30 min, room temp.)
 - (4) 상등액 1 mL을 새로운 tube에 옮겨 질소 농축
 - (5) HPLC grade methanol을 1 mL 넣어준 후 resuspension
 - (6) Sonication
 - (7) 0.2 um syringe filter를 이용하여 filtering
- HPLC-PDA 및 CAPCELL PAK C18 column(250 x 4.6 mm, SHISEIDO)을 사용하였고, 컬럼 온도는 25°C, 주입량은 20 µL, 이동상으로써 gradient system으로 용매 A로는 0.1% acetic acid in deionized water, 용매 B로는 0.1% acetic acid in acetonitrile을 사용하였으며, 2.5 min 80% A(20% B), 10 min 70% A(30% B), 20 min 65% A(35% B), 25min 60% A(40% B), 30 min 60% A(40% B), 32 min 80% A(20% B), 42 min 80% A(20% B)로 0.8 mL/min 유속 및 200 nm ~ 300 nm에서 분리 후 분석하였음. 분석된 성분은 표준물질의 분석 데이터와 spectrum 등을 비교하여 확인

2. 연구개발 수행내용

1) Lab-scale 식물성 치즈제품의 발효특성 평가

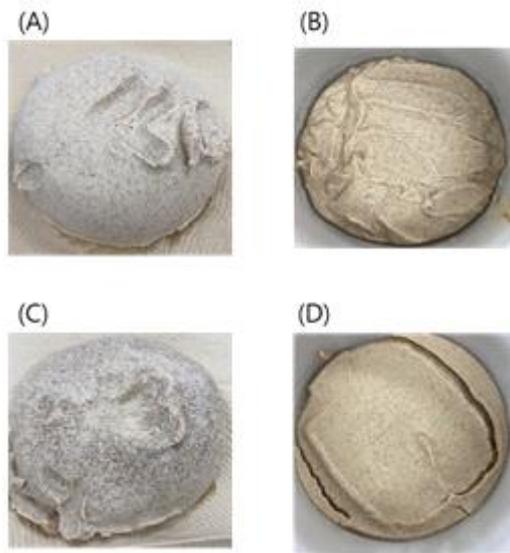
① 식물성 단백질을 이용한 치즈제품의 공정 확립

(가) 아몬드 단백질과 ISP의 발효특성 비교

표C-11. 아몬드 단백질을 이용한 발효물과 아몬드 단백질과 ISP를 혼합한 발효물의 발효 중 pH 변화

	A	B
0 h	5.72	5.97
2 h	5.71	5.8
4 h	5.04	5.01

A : 15% almond protein, B : 7.5% almond protein + 7.5% ISP



그림C-18. 아몬드 단백질을 이용한 발효물과 아몬드 단백질과 ISP를 혼합한 발효물 비교
 (A, B : 15% almond protein을 첨가한 발효물)
 (C, D : 7.5% almond protein과 7.5% ISP를 첨가한 발효물)

- 아몬드 단백질만을 사용하여 제조한 A는 beany flavor가 없고 sandness가 적지만 물성이 paste에 가깝고 산미나 식감은 spreadable cheese와 비슷하였음. ISP와 아몬드 단백질을 혼합하여 제조한 B는 A에 비하여 beany flavor와 sandness가 높으며 잘 굳지 않고 치즈 느낌이 나지 않음. 따라서 추후 실험에서는 아몬드 단백질을 단독으로 사용.
- 좀 더 단단한 물성으로 제조하기 위해 추후 실험에서 pectin 첨가 및 TG 농도 조정, 발효 전후 TG를 첨가 비교 실험을 진행.
- A,B 모두에서 나타나는 sandness의 이유가 almond paste에 almond peel이 혼합되어 있으며, paste의 농도가 높았기 때문이라고 사료되어 peel이 없는 peanut paste로 대체하고 농도를 낮추어서 진행.

(나) TG 첨가 시점에 따른 발효특성 비교

표C-12. TG 첨가 시점에 따른 발효 중 pH 변화

	A	B
0 h	5.83	5.87
2 h	5.91	5.80
4 h	4.91	4.81

A : 발효 전 TG 첨가, B : 발효 후 TG 첨가

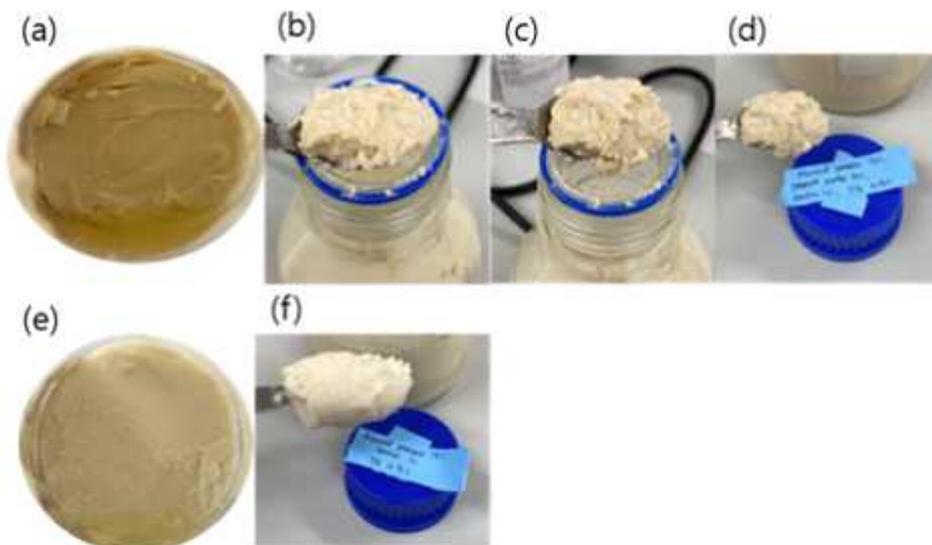
- 발효 후 TG를 첨가하는 것이 좀 더 단단하게 굳음
- 따라서, 추후 실험에서 TG 첨가는 모두 발효 후 첨가로 진행

(다) Paste 첨가에 따른 발효특성 비교

표C-13. paste 첨가에 따른 발효 중 pH 변화

	A	B
0 h	5.73	5.77
2 h	5.61	5.52
4 h	4.84	4.78

A : 땅콩 페이스트 10% 첨가, B : 땅콩 페이스트 무첨가



그림C-19. Paste 첨가에 따른 발효물 비교

(a, b, c, d : 땅콩 페이스트 10%, 펙틴 1%, TG 0.15% 첨가한 발효물)

(e, f : 펙틴 1%, TG 0.15% 첨가한 발효물)

- paste를 첨가하지 않은 B가 paste를 첨가한 A보다 sandness도 덜 하고, 조금 더 단단하였음.
- 따라서, 추후 실험에서 paste는 첨가하지 않는 것으로 결정

(라) Pectin 첨가에 따른 발효특성 비교

표C-14. pectin 첨가에 따른 발효 중 pH 변화

	A	B
0 h	5.90	5.79
2 h	5.67	5.59
4 h	4.96	4.94

A : Pectin 1% 첨가, B : Pectin 무첨가

(a)



(b)



(c)



그림C-20. Pectin 첨가에 따른 발효물 비교

(a : b, c 사진 비교 / b : 펙틴 무첨가 발효물 / c : 펙틴 1% 첨가 발효물)

- pectin을 첨가하지 않은(TG만 첨가) 발효물이 pectin을 첨가한 발효물 보다 잘 굳음
- 섭취 시 아몬드 단백질 특유의 냄새가 심하고 산미가 있어서 치즈의 느낌이 부족
- 따라서, pectin과 paste를 모두 첨가하지 않고 발효 후에 TG를 첨가한 발효물을 제조하여 salting을 통해 치즈와 비슷한 염도를 부여

(마) Salting을 통한 치즈 염도 부여

표C-15. 아몬드 단백질을 이용한 발효물의 발효 중 pH 변화

아몬드 단백질을 이용한 발효물	
0 h	5.81
2 h	5.61
2.5 h	5.41
3 h	5.05

- 짠맛이 너무 강해서 7% salt water로 변경

② 식물성 치즈제품의 이화학적 발효특성 평가

(가) 일반성분 분석

표C-16. 최종 식물성 치즈제품의 발효 전·후, 저장기간 동안의 고형분 함량

고형분 함량 (%)	
Almond protein	
0 h	5.81
2 h	5.61
2.5 h	5.41
3 h	5.05

표C-17. 최종 식물성 치즈제품의 발효 전·후, 저장기간 동안의 당 함량

Almond protein을 이용한 발효물				
Sugar	발효 전	발효 후	저장 1주차	저장 2주차
Fructose	ND	0.269	0.322	0.305
Glucose	0.903	0.872	0.661	0.652
Sucrose	1.188	0.958	0.705	0.719

표C-18. 최종 식물성 치즈제품의 발효 전·후, 저장기간 동안의 유기산 함량

Almond protein을 이용한 발효물				
Organic acid	발효 전	발효 후	저장 1주차	저장 2주차
Lactic acid	5.741	6.479	7.715	7.548
Citric acid	0.548	0.584	0.614	0.625

- 발효 전후 고형분 함량의 변화는 없지만, 발효 후 냉장보관을 하는 동안 수분이 증발하여 고형분 함량이 15% 이상으로 증가
- 발효가 진행되는 동안 유산균이 성장하면서 당(fructose, glucose, sucrose)을 사용하고, 그에 따라 유기산 함량도 증가
- 발효 후 냉장에서 보관을 하는 중에 후발효(post-fermentation)으로 인해 당이 감소하고 유기산이 추가적으로 생성

③ 식물성 치즈제품의 미생물학적 발효특성 평가

표C-19. 최종 식물성 치즈제품의 발효 전·후, 저장기간 동안의 총 유산균 수

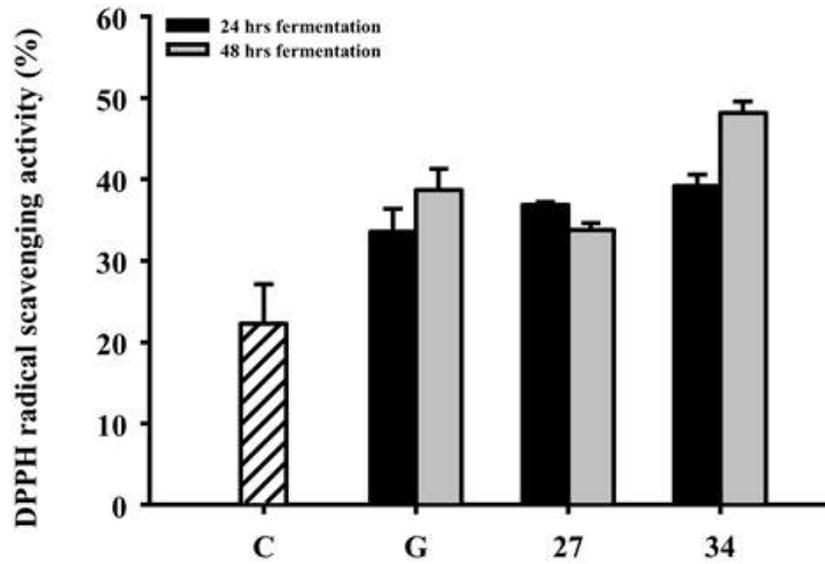
총 유산균 수	Almond protein을 이용한 발효물
발효 전	24,700,000
발효 후	153,000,000
저장 1주차	266,000,000
저장 2주차	201,000,000

- 발효가 진행되는 동안 총 유산균 수가 약 1 log CFU 정도 증가했으며, 발효 후 후발효(post-fermentation)이 진행되어 추가적으로 유산균이 성장하여 유산균 수가 증가

2) 선별 프로바이오틱스의 항비만 기능성 검증

① 선별 후보균주를 이용한 식물성 단백질 발효물의 발효시간별 항산화 및 콜레스테롤 저하 활성 비교

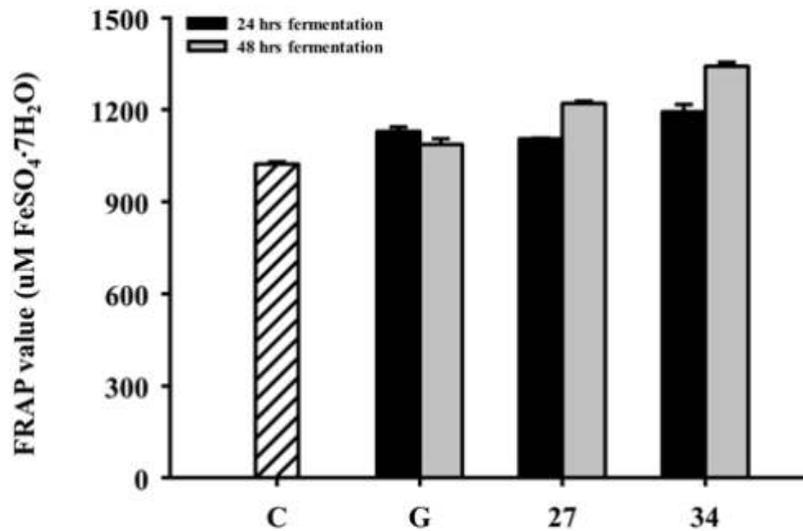
(가) DPPH radical scavenging activity



그림C-21. KML27, KML34 균주를 이용한 식물성 단백질 발효물의 0, 24, 48 h 발효 시간에서의 DPPH radical scavenging activity

C : Control(non-fermented); G : *Lactobacillus rhamnosus* GG; 27 : KML27; 34 : KML34

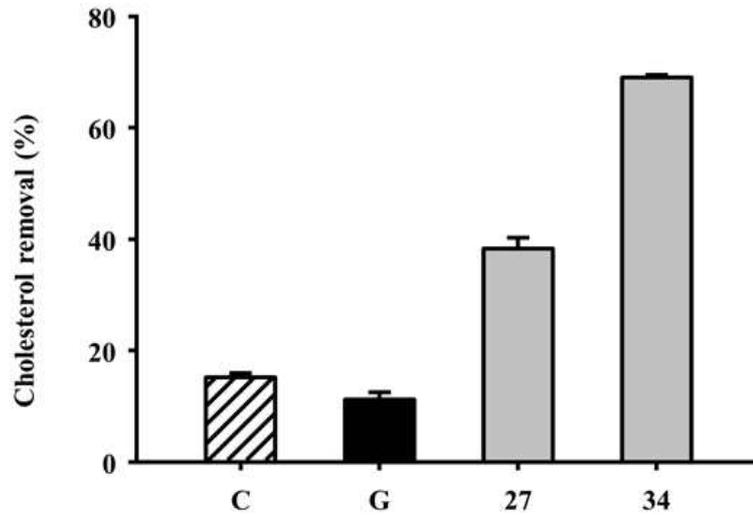
(나) FRAP assay



그림C-22. KML27, KML34 균주를 이용한 식물성 단백질 발효물의 0, 24, 48 h 발효 시간에서의 FRAP value

C : Control(non-fermented); G : *Lactobacillus rhamnosus* GG; 27 : KML27; 34 : KML34

(다) 식물성 단백질 발효물의 콜레스테롤 저하 활성 평가



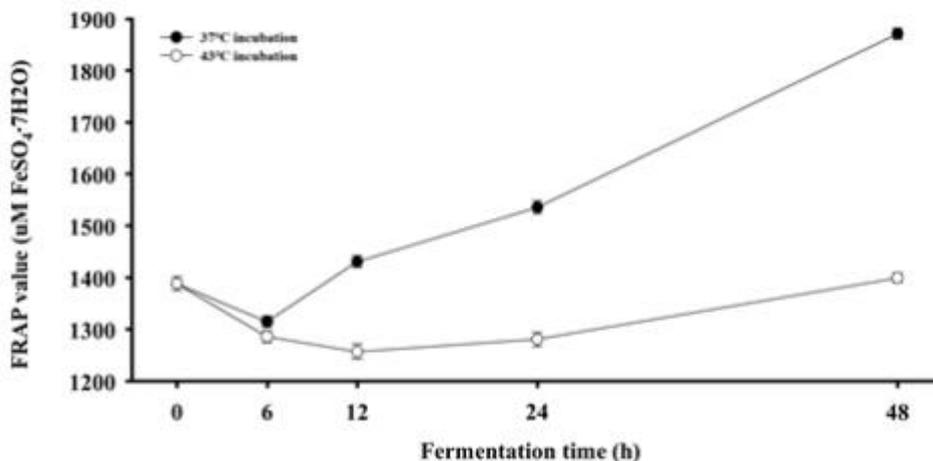
그림C-23. KML27, KML34 균주를 이용한 식물성 단백질 발효물의 0, 24 h 발효시간에서의 cholesterol removal.

C : Control(non-fermented); G : *Lactobacillus rhamnosus* GG; 27 : KML27; 34 : KML34

- DPPH와 FRAP assay의 결과에서 나타나듯이 식물성 단백질의 발효를 두 가지 유산균 (KML27, KML34)으로 발효를 진행했을 때 발효를 하지 않은 것보다 높은 라디칼 소거능과 환원력을 나타냄
- 두 가지 유산균(KML27, KML34)으로 발효를 진행했을 때 발효하지 않은 것보다 높은 콜레스테롤 저하 활성을 나타냄

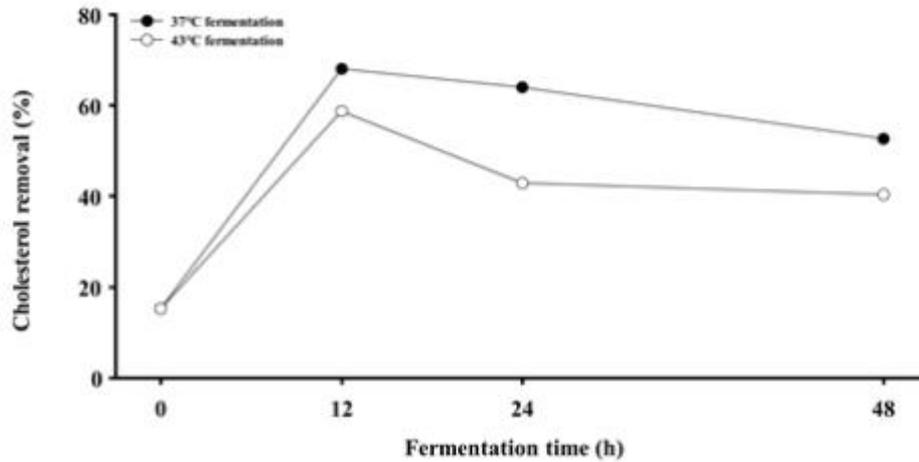
② 발효 조건 확립

(가) FRAP assay



그림C-24. KML34 균주를 이용한 식물성 단백질 발효물의 발효 온도, 시간별 FRAP value

(나) 식물성 단백질 발효물의 콜레스테롤 저하 활성 평가

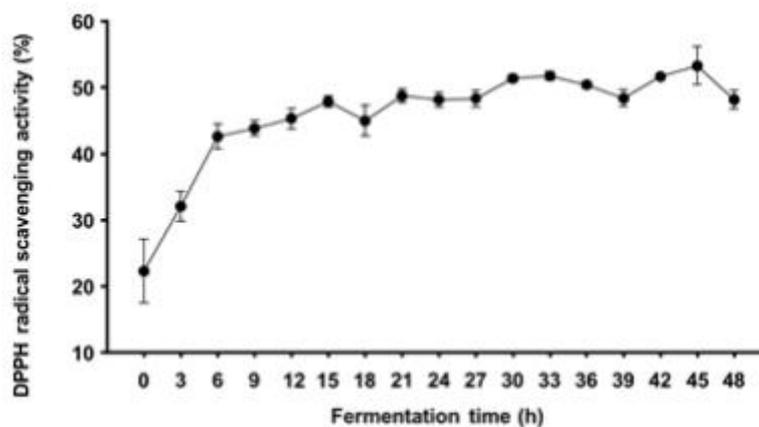


그림C-25. KML34 균주를 이용한 식물성 단백질 발효물의 발효 온도, 시간별 cholesterol removal

- FRAP assay를 통한 항산화 활성과 콜레스테롤 제거능을 보았을 때 발효 온도를 37°C로 했을 때가 43°C에서 발효를 진행했을 때보다 발효가 진행되면서 더 높은 항산화 및 콜레스테롤 저하 활성을 나타내어 발효 온도를 37°C로 설정

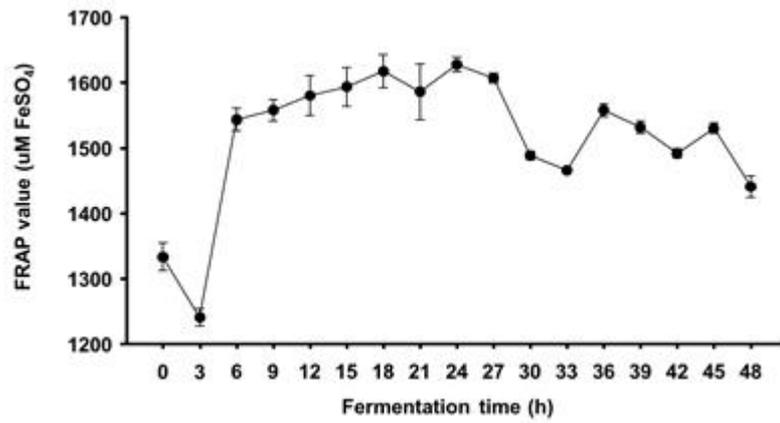
③ 최적 발효조건에서 KML34의 발효 시간별 발효 특성 평가

(가) DPPH radical scavenging activity



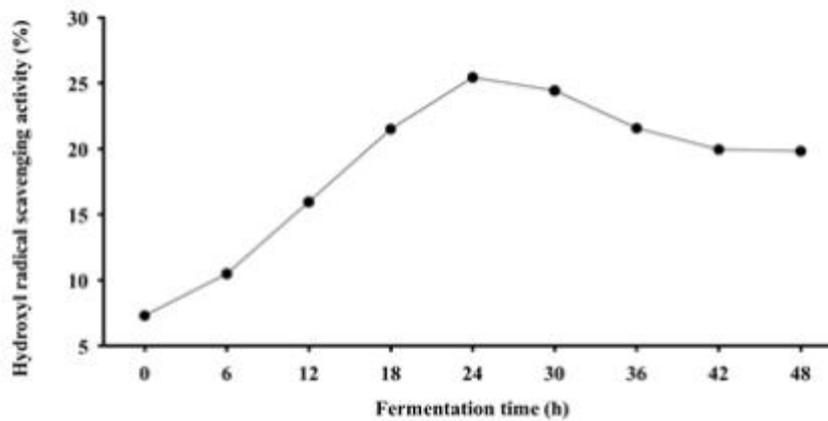
그림C-26. KML34 균주를 이용한 식물성 단백질 발효물의 발효시간별 DPPH radical scavenging activity

(나) FRAP assay



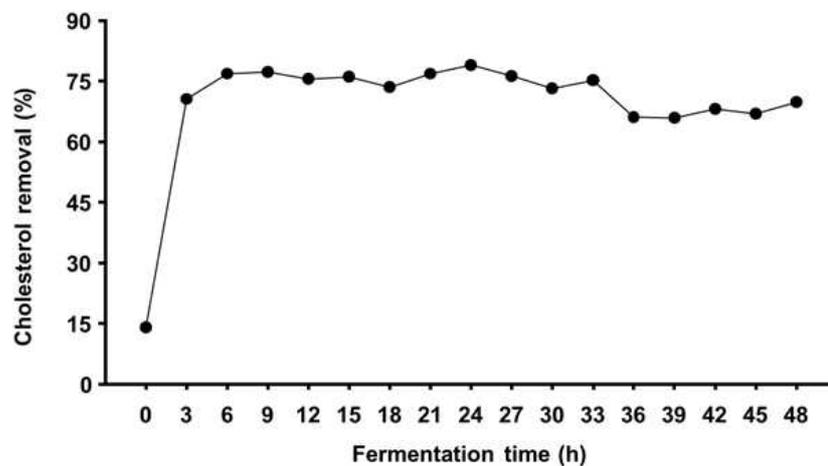
그림C-27. KML34 균주를 이용한 식물성 단백질 발효물의 발효시간별 FRAP value

(다) Hydroxyl radical scavenging activity



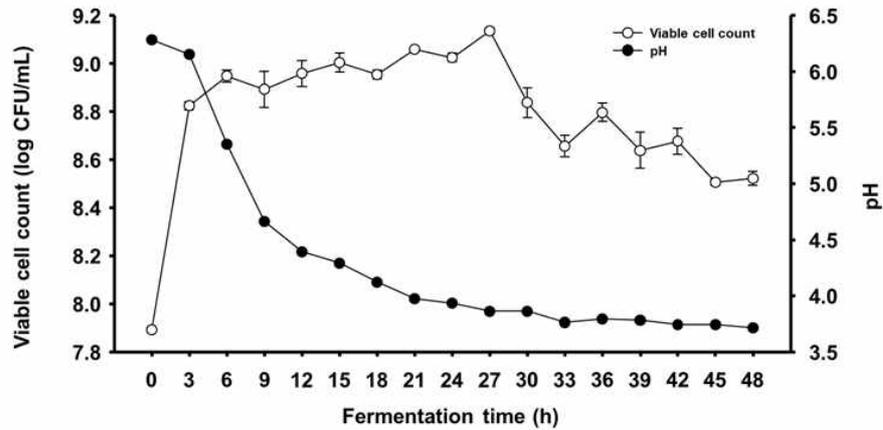
그림C-28. KML34 균주를 이용한 식물성 단백질 발효물의 발효시간별 hydroxyl radical scavenging activity

(라) 식물성 단백질 발효물의 콜레스테롤 저하 활성 평가



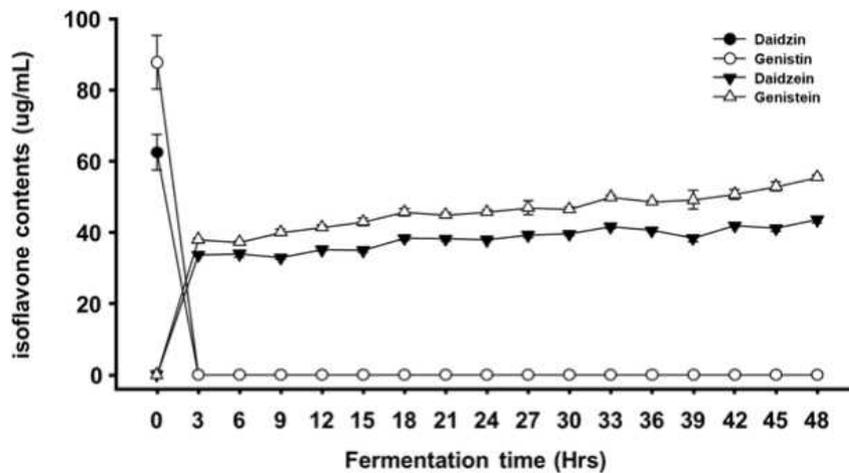
그림C-29. KML34 균주를 이용한 식물성 단백질 발효물의 발효시간별 cholesterol removal

(마) 총 유산균 수 측정 및 발효 중 pH 변화 확인



그림C-30. KML34 균주를 이용한 식물성 단백질 발효물의 발효시간별 pH 변화 및 총 유산균 수

(바) Soy isoflavone 분석



그림C-31. KML34 균주를 이용한 식물성 단백질 발효물의 발효시간별 soy isoflavones의 bioconversion

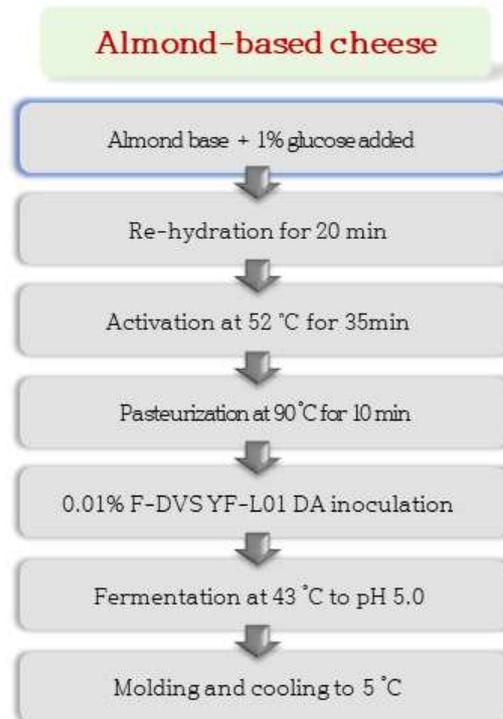
- 두 가지 유산균(KML27, KML34) 중 항산화 및 콜레스테롤 저하 활성에서 더 높은 활성을 나타낸 KML34의 추가 연구를 통해 최적의 발효시간을 알아내기 위함
- 항산화 활성 중 DPPH radical scavenging activity는 발효가 진행됨에 따라 증가하는 경향을 나타내고, FRAP value는 발효 27 h 이후부터 감소하는 경향을 나타냈으며, hydroxyl radical scavenging activity는 발효 24 h 이후부터 감소하는 경향을 나타냄
- 콜레스테롤 저하 활성은 발효가 진행되는 동안 증가하고, 발효 33 h 이후부터 감소하는 경향을 나타냄
- pH는 발효가 진행되는 동안 계속 감소하고, 총 유산균 수는 발효가 진행되면서 증가하다가 발효 27 h 이후부터 감소하는 경향을 나타냄
- Isoflavones의 bioconversion을 통한 isoflavone aglycones는 발효가 진행되면서 계속 증가하는 경향을 나타냄
- 최적의 발효시간은 24 h ~ 27 h로 판단되어 24 h 발효물을 식물성 치즈제품의 발효시간으로 설정

[3차년도 : Almond protein의 함량별 발효 특성 평가 및 선정 프로바이오틱스와 식물성 치즈의 항비만 기능성 평가(*in vivo*)]

1. 연구개발 수행과정

1) 아몬드 단백을 이용한 식물성 치즈 제조

① Almond protein 함량별 발효 특성 평가



그림C-32. 식물성 단백질(Almond protein)을 이용한 치즈의 제조 공정

(가) 5%, 10% 및 15% (Protein/TS) Almond protein의 발효 특성 평가

- Almond protein의 발효 가능 최대농도를 결정하기 위해 almond protein의 농도를 각각 5%, 10% 및 15% 첨가하여 제조한 발효원료액을 사용하여 그림C-31과 같은 공정으로 실험을 진행
- (1) 스테인리스 비커에 다음과 같이 배합하고 homogenizer를 이용하여 균질 및 혼합
A : 상온에서 정수된 물 400 g에 almond protein 5%(45.085 g), Glucose 1%(4 g), CaCl₂ 1%/protein conc (0.2 g)
B : 상온에서 정수된 물 400 g에 almond protein 10%(90.170 g), Glucose 1%(4 g), CaCl₂ 1%/protein conc (0.4 g)
C : 상온에서 정수된 물 400 g에 almond protein 15%(135.256 g), Glucose 1%(4 g), CaCl₂ 1%/protein conc (0.6 g)
- (2) 90 °C water bath에서 10분간 살균
- (3) 스타터 컬처를 접종하기 위해 냉각
- (4) 스타터 컬처 (F-DVS YF-L01 DA) 0.01% 접종
- (5) 43 °C incubator에서 배양
- (6) 2시간 간격으로 pH 측정 및 50 mL conical tube에 소분

(나) 15%, 20% 및 25% (Protein/TS) Almond protein의 발효 특성 평가

- Almond protein의 발효 가능 최대농도를 결정하기 위해 almond protein의 농도를 각각 15%, 20% 및 25% 첨가하여 제조한 발효원료액을 사용하여 그림C-31과 같은 공정으로 실험을 진행
- (1) 스테인리스 비커에 다음과 같이 배합하고 homogenizer를 이용하여 균질 및 혼합
A : 상온에서 정수된 물 400 g에 almond protein 5%(45.085 g), Glucose 1%(4 g), CaCl₂ 1%/protein conc (0.2 g)
B : 상온에서 정수된 물 400 g에 almond protein 10%(90.170 g), Glucose 1%(4 g), CaCl₂ 1%/protein conc (0.4 g)
C : 상온에서 정수된 물 400 g에 almond protein 15%(135.256 g), Glucose 1%(4 g), CaCl₂ 1%/protein conc (0.6 g)
- (2) 90°C water bath에서 10분간 살균
- (3) 스타터 컬처를 접종하기 위해 냉각
- (4) 스타터 컬처 (F-DVS YF-L01 DA) 0.01% 접종
- (5) 43°C incubator에서 배양
- (6) 2시간 간격으로 pH 측정 및 50 mL conical tube에 소분

(다) 5%, 10%, 15%, 20% 및 25% (TS) Almond protein의 발효 특성 평가

- Almond protein의 발효 가능 최대농도를 결정하기 위해 almond protein의 농도를 각각 5%, 10%, 15%, 20% 및 25% 첨가하여 제조한 발효원료액을 사용하여 그림C-31과 같은 공정으로 실험을 진행
- (1) 스테인리스 비커에 다음과 같이 배합하고 homogenizer를 이용하여 균질 및 혼합
A : 상온에서 정수된 물 400 g에 almond protein 5%(20 g), Glucose 1%(4 g)
B : 상온에서 정수된 물 400 g에 almond protein 10%(40 g), Glucose 1%(4 g)
C : 상온에서 정수된 물 400 g에 almond protein 15%(60 g), Glucose 1%(4 g)
D : 상온에서 정수된 물 400 g에 almond protein 20%(80 g), Glucose 1%(4 g)
E : 상온에서 정수된 물 400 g에 almond protein 25%(100 g), Glucose 1%(4 g)
- (2) 90°C water bath에서 10분간 살균
- (3) 스타터 컬처를 접종하기 위해 냉각
- (4) 스타터 컬처 (F-DVS YF-L01 DA) 0.01% 접종
- (5) 43°C incubator에서 배양
- (6) 2시간 간격으로 pH 측정

2) 선별 프로바이오틱스의 항비만 기능성 검증

① 시료 준비

(가) Fermented cheese

- (1) 두유 1.2 L와 glucose 1% (12 g)을 잘 섞어준 후 90°C water bath에서 15 min 살균
- (2) 스타터 컬처 (F-DVS YF-L01 DA) 1.212 mL (0.04 g/mL) 접종
- (3) 43°C incubator에서 6 h 동안 fermentation 진행
- (4) 동결건조

(나) Fermented cheese + KML34

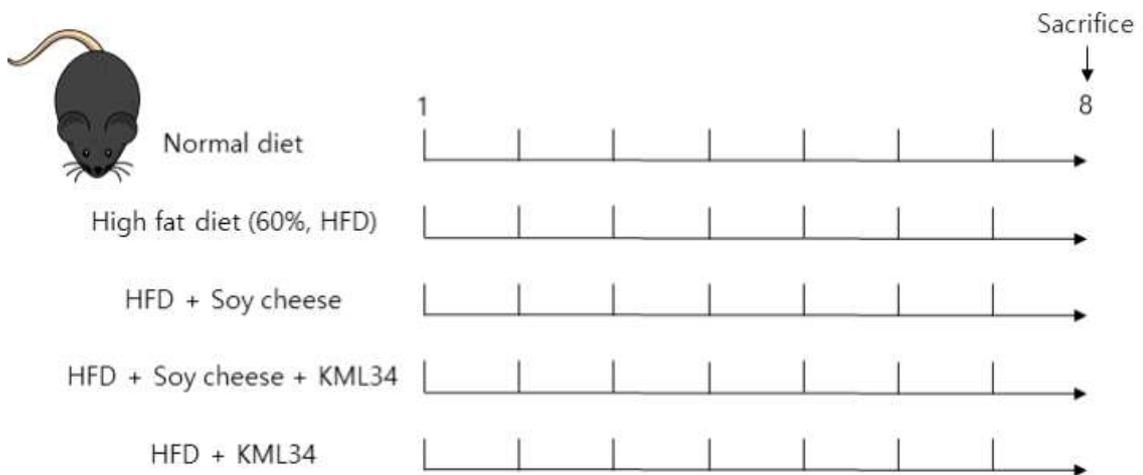
- (1) 두유 1.2 L와 glucose 1% (12 g)을 잘 섞어준 후 90°C water bath에서 15 min 살균
- (2) 스타터 컬처 (F-DVS YF-L01 DA) 1.212 mL (0.04 g/mL)과 KML34 균주를 5×10^8 CFU/mL로 접종
- (3) 43°C incubator에서 6 h 동안 fermentation 진행
- (4) 동결건조

(다) KML34

- MRS broth에 KML34를 3회 계대배양

② 질환 유도 동물 모델 적용

- 4주령 C57BL/6N 마우스에 8주 동안 60%kcal high fat diet 식이로 비만을 유도
- 주 1회 마우스의 체중을 측정
- Fermented cheese, Fermented cheese + KML34 및 KML34를 시료로 이용하여 동물실험 진행
- 시료는 8주간 경구투여를 이용하여 동물에게 먹임
- Fermented cheese와 Fermented cheese + KML34는 1,500 mg/kg body weight로, KML34는 10^8 CFU로 먹임
- 분변을 채취하여 장내 microbiome 분석
- Group : Normal control (Normal diet + PBS)
Negative control (60%kcal high fat diet + PBS)
FC (60%kcal high fat diet + Fermented cheese)
FC+34 (60%kcal high fat diet + Fermented cheese + KML34)
KML34 (60%kcal high fat diet + KML34)



그림C-33. 항비만 기능성 평가를 위한 동물실험 계획

③ 질환 유도 동물 모델 적용

- Body weight 측정
- Tissue weight (Liver, epididymal white adipose tissue)
- Colon length

- 혈액 파라미터 분석 : Total cholesterol(TC), Triglyceride(TG), HDL-cholesterol(HDL-c), LDL-cholesterol(LDL-c), glutamic oxaloacetic transaminase(GOT), glutamic pyruvic transaminase(GPT)
- Gene expression (EWAT) : PPAR γ , C/EBP α , FAS, SREBP-1
- Histological analysis (Liver) : H&E staining

(가) Gene expression

- 지방조직의 RT-qPCR을 통해 비만 관련 유전자의 발현량을 확인 (PPAR γ , C/EBP α , FAS, SREBP-1)
- cDNA 합성
 - (1) EWAT 50~100 mg에 TRIzol™ 1mL과 bead 4개를 넣고 homogenization
 - (2) 원심분리 (12,000×g, 5 min, 4°C) 후 상등액(fat)을 제외하고 아래층의 TRIzol™ 층을 새로운 tube로 옮겨줌
 - (3) 5 min 방치 후 1 mL TRIzol™ 당 0.2 mL의 chloroform을 넣어준 후 vortexing
 - (4) 3 min incubation 후 원심분리 (12,000×g, 15 min, 4°C)
 - (5) 상등액을 새로운 tube에 옮겨준 후 1:1 비율로 isopropanol을 넣어 상온 10 min방치
 - (6) 원심분리 (12,000×g, 15 min, 4°C) 후 상등액을 조심히 부어서 버려줌
 - (7) 70% EtOH 1 mL을 넣어 RNA pellet을 washing 해줌 (7,500×g, 5 min, 4°C)
 - (8) Suction하여 EtOH를 제거하고 air dry로 남아있는 EtOH가 완전히 날아가도록 함
 - (9) Ultra pure water 20 ul를 넣어 inverting 하여 잘 섞어줌
 - (10) 1.5 ul를 이용하여 RNA 농도 측정
 - (11) total RNA 농도가 1 ug이 되도록 ultra pure water로 희석하여 cDNA synthesis kit(BIOFACT CO., LTD.)에 넣어 cDNA 합성
- RT-qPCR
 - (1) 합성한 cDNA를 1:30으로 희석
 - (2) 각 well에 SYBR green (2X) 8 ul, Forward 및 Reverse primer 각 1ul, cDNA 6 ul를 넣어줌
 - (3) Well을 sealing한 후 spin down
 - (4) 50°C 2 min 후 95°C 15 min -> 95°C 15 sec 후 60°C 1min (40 cycle) -> melting 표C-20. The primer sequence used for real-time PCR

Gene name	Primer	Sequence
PPAR γ	Forward	TTTTCAAGGGTGCCAGTTTC
	Reverse	AATCCTTGGCCCTCTGAGAT
C/EBP α	Forward	TTACAACAGGCCAGGTTTCC
	Reverse	GGCTGGCGACATACAGTACA
FAS	Forward	GCTTGCTGGCTCACAGTTAAG
	Reverse	AGGTTGGTGTACCCCATTC
SREBP-1	Forward	TGTTGGCATCCTGCTATCTG
	Reverse	AGGGAAAGCTTTGGGGTCTA
GAPDH	Forward	ATCTTCCAGGAGCGAGACCCCACTA
	Reverse	TGAGCCCTTCCACAATGCCAAAGTT

(나) Histological analysis

- 간 조직을 채취하여 지방구의 형태학적인 변화 관찰 (H&E staining)
- (가) 간을 냉각 생리식염수로 세척하고 4% 포르말린에 고정
 - (나) 조직을 적절한 크기로 잘라 카세트에 넣어준 후 dehydration 진행
 - (다) Vacuum dry oven에서 paraffin에 1.5 h동안 넣어놓음
 - (라) Embedding하여 block을 만듦
 - (마) Trimming 후 Microtome을 이용하여 5 um의 두께로 슬라이드에 부착 후 슬라이드 건조
 - (바) Wax 제거 (탈 파라핀)
 - (사) Re-hydration
 - (아) Hematoxylin으로 staining 진행
 - (자) PBS를 이용하여 bluing 진행
 - (차) Eosin으로 staining
 - (카) Rinse, dehydration, Mounting 진행
 - (타) 현미경으로 관찰

3) 동물모델에서 장내 균총 변화에 따른 비만 억제 활성의 연관성 규명

- 2) 선별 프로바이오틱스 및 식물성 치즈의 항비만 기능성 검증 (*in vivo*) 연구의 동물 모델에서 분변을 수집

① DNA 추출 및 정량

- (1) 제조사의 지시에 따라 DNeasyPowerSoil Kit (Qiagen, Hilden, Germany)를 사용하여 DNA를 추출
- (2) 추출된 DNA는 Quant-IT PicoGreen (Invitrogen)을 사용하여 정량화

(가) Fermented cheese

- (1) 두유 1.2 L와 glucose 1% (12 g)을 잘 섞어준 후 90°C water bath에서 15 min 살균
- (2) 스타터 컬처 (F-DVS YF-L01 DA) 1.212 mL (0.04 g/mL) 접종
- (3) 43°C incubator에서 6 h 동안 fermentation 진행

② Library construction and Sequencing

- (가) 시퀀싱 라이브러리는 V3 및 V4 영역을 증폭하기 위해 Illumina 16S Metagenomic Sequencing Library protocols에 따라 준비
 - (나) Input gDNA 2 ng은 5x reaction buffer, 1mM of dNTP mix, 500nM each of the universal F/R PCR primer, and Herculase II fusion DNA polymerase (Agilent Technologies, Santa Clara, CA)를 사용하여 PCR 증폭
 - (다) The cycle condition for 1st PCR : 3 min at 95°C for heat activation, and 25 cycles of 30 sec at 95°C, 30 sec at 55°C and 30 sec at 72°C, followed by a 5-min final extension at 72°C
 - (라) 첫 번째 증폭에 사용된 Illumina adapter overhang sequences가 있는 universal primer pair :

V3-F :

5'-TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGCCTACGGGNGGCWGCAG-3'

V4-R :

5'-GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTGTATAAGAGACAGGACTACHVGGGTATCTAATCC-3'

(마) 1차 PCR 생성물을 AMPure 비드 (Agencourt Bioscience, Beverly, MA)로 정제

(바) 정제 후, NexteraXT Indexed Primer를 사용하여 인덱스를 포함하는 최종 라이브러리
구축을 위해 1차 PCR 산물 2 uL를 PCR 증폭

(사) The cycle condition for 2nd PCR : 10 사이클을 제외하고 1차 PCR 조건과 동일

(아) PCR 생성물을 AMPure 비드로 정제

(자) 최종 정제된 생성물은 qPCR Quantification Protocol Guide (IKAPA Library
Quantificatoin kits for IlluminaSequecing platforms)에 따라 qPCR을 사용하여 정
량화되고 TapeStation D1000 ScreenTape (Agilent Technologies, Waldbronn,
Germany)를 사용하여 qualifying

(차) MiSeq™ 플랫폼 (Illumina, San Diego, USA)을 사용하여 paired-end (2x300 bp) 시
퀀싱을 수행

2. 연구개발 수행내용

1) 아몬드 단백을 이용한 식물성 치즈 제조

① Almond protein 함량별 발효 특성 평가

(가) 5%, 10% 및 15% (Protein/TS) Almond protein의 발효 특성 평가

표C-21. 아몬드 단백 함량에 따른 발효물의 pH 변화

	A	B	C
0 h	6.02	5.89	5.85
2 h	5.95	5.82	5.79
4 h	5.25	5.47	5.59
6 h	4.66	4.88	5.04

A : 5% almond protein, B : 10% almond protein, C : 15% almond protein



<발효 전>



<발효 후>

그림C-34. 아몬드 단백을 이용한 식물성 치즈의 발효 전·후 비교

A : 5% almond protein, B : 10% almond protein, C : 15% almond protein

- A, B, C 기질 모두 균질화가 잘 되었으나, 15% almond protein에서 발효 후 비교적 단단한 물성을 나타냄

(나) 15%, 20% 및 25% (Protein/TS) Almond protein의 발효 특성 평가

표C-22. 아몬드 단백 함량에 따른 발효물의 pH 변화

	A	B	C
0 h	5.78	5.81	5.79
2 h	5.75	5.9	5.72
4 h	5.58	5.56	5.6
6 h	5.18	5.23	5.46

A : 15% almond protein, B : 20% almond protein, C : 25% almond protein



<발효 전>



<발효 후>

그림C-35. 아몬드 단백을 이용한 식물성 치즈의 발효 전·후 비교

A : 15% almond protein, B : 20% almond protein, C : 25% almond protein

- 20%, 25% almond protein의 기질은 균질화가 잘 되지 않음

(다) 5%, 10%, 15%, 20% 및 25% (TS) Almond protein의 발효 특성 평가

표C-23. 아몬드 단백질 함량에 따른 발효물의 pH 변화

	A	B	C	D	E
0 h	6.44	6.25	6.26	6.20	6.04
2 h	6.22	6.14	6.12	5.92	5.99
4 h	5.25	4.98	5.28	5.61	5.65
6 h	4.65	4.49	4.70	4.82	4.85

A : 5% almond base, B : 10% almond base, C : 15% almond base,
D : 20% almond base, E : 25% almond base



<발효 전>

<발효 후>

그림C-36. 아몬드 단백질을 이용한 식물성 치즈의 발효 전·후 비교

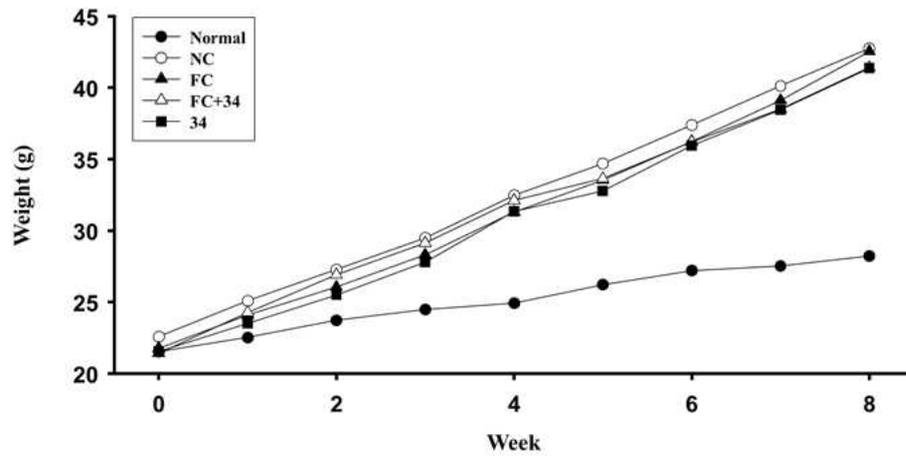
A : 5% almond base, B : 10% almond base, C : 15% almond base,
D : 20% almond base, E : 25% almond base

- 모든 기질에서 발효가 잘 진행 되었으나, D와 E 에서 발효 후 응고가 되어 다른 기질보다 비교적 단단한 물성을 나타냄

2) 선별 프로바이오틱스 및 식물성 치즈의 항비만 기능성 검증 (*in vivo*)

① 질환 유도 동물 모델 적용

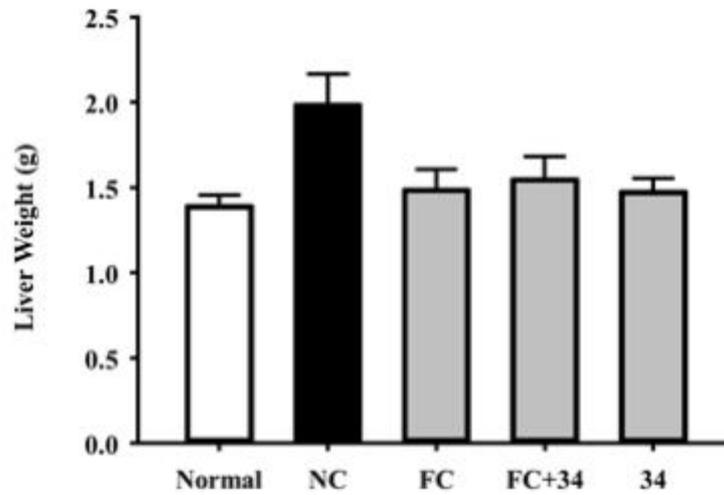
(가) Body weight



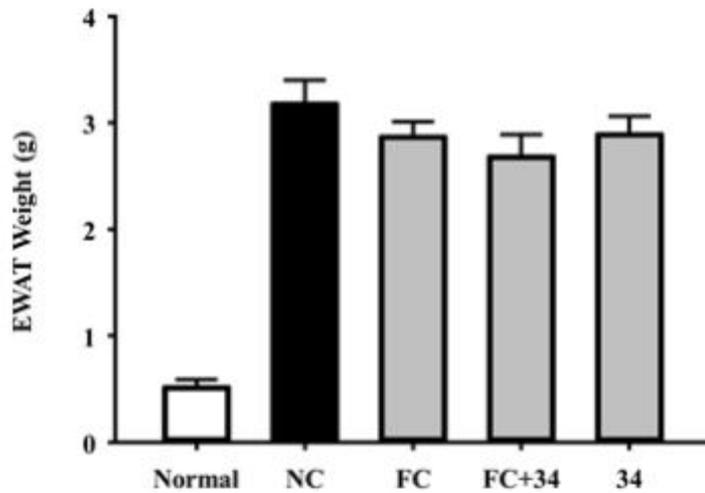
그림C-37. Body weight of mice during the experiment

- Normal diet 식이를 섭취한 Normal 그룹에 비해 60%kcal high fat diet를 섭취한 NC 그룹에서 body weight이 증가함
- FC, FC+34, KML34 식이를 섭취한 그룹이 NC 그룹에 비해 body weight이 감소함

(나) Tissue weight (Liver, EWAT)



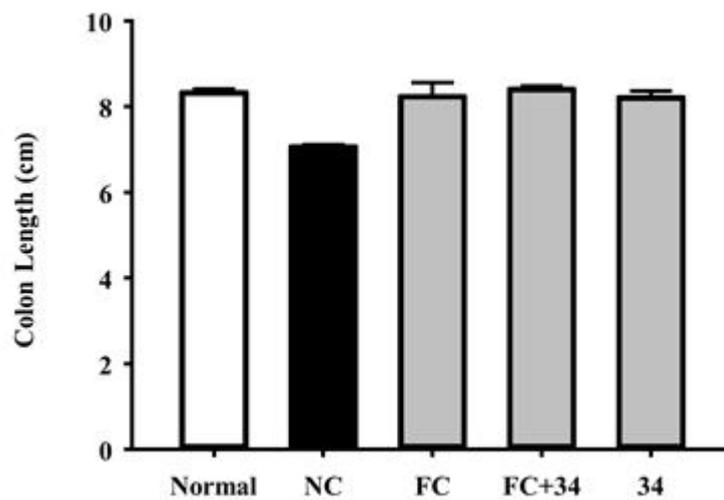
그림C-38. 실험 종료시점에서 각 그룹의 liver 무게



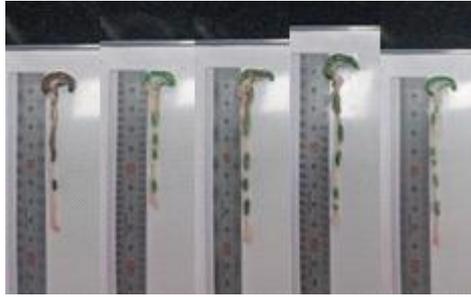
그림C-39. 실험 종료시점에서 각 그룹의 EWAT 무게

- Normal 그룹에 비해 NC 그룹에서 liver와 EWAT의 무게가 증가함
- FC, FC+34, KML34 식이를 섭취한 그룹이 NC 그룹에 비해 liver와 EWAT의 무게가 감소하였으며, 특히 모든 그룹에서 liver의 무게는 Normal 그룹과 유사한 수준으로 감소함

(다) Colon length



그림C-40. 실험 종료시점에서 각 그룹의 colon 길이

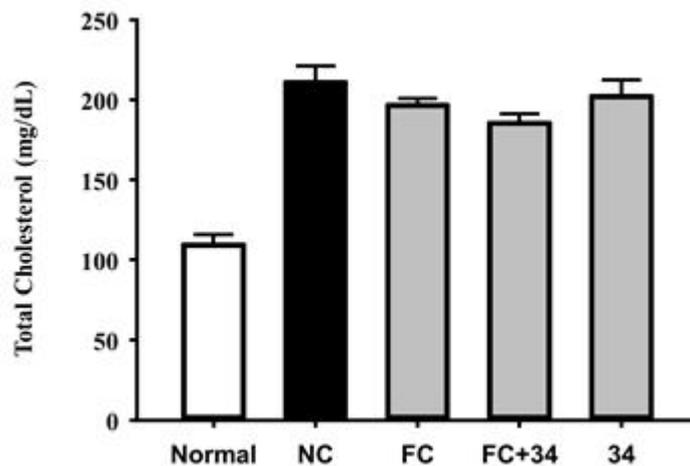


그림C-41. 각 그룹의 colon 길이 비교 사진
(왼쪽부터 Normal, NC, FC, FC+34, KML34)

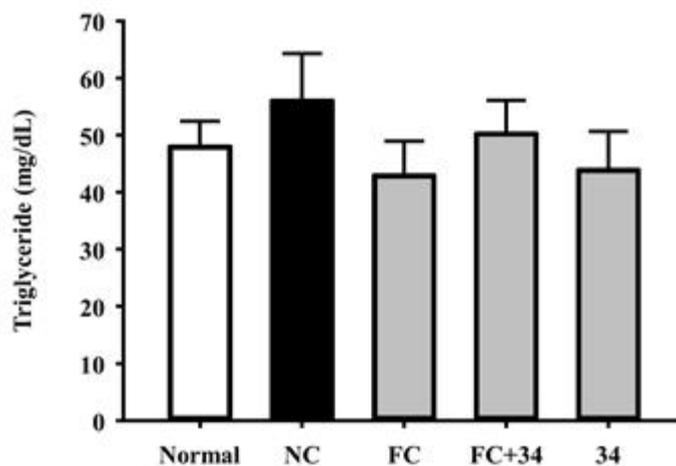
- Normal 그룹에 비해 NC 그룹에서 colon의 길이가 증가함
- FC, FC+34, KML34 식이를 섭취한 그룹이 NC 그룹에 비해 colon의 길이가 감소하였으며, 모든 그룹에서 Normal 그룹과 유사한 수준으로 감소함

② 비만 개선 효과 평가 및 검증

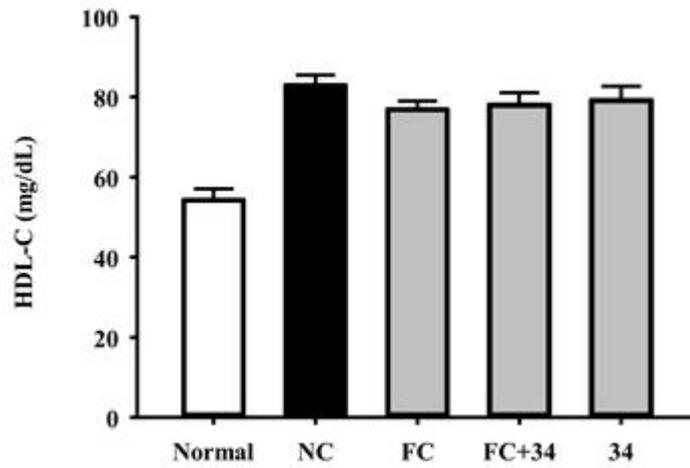
(가) 혈액 파라미터 분석 (TC, TG, HDL-c, LDL-c, GOT, GPT)



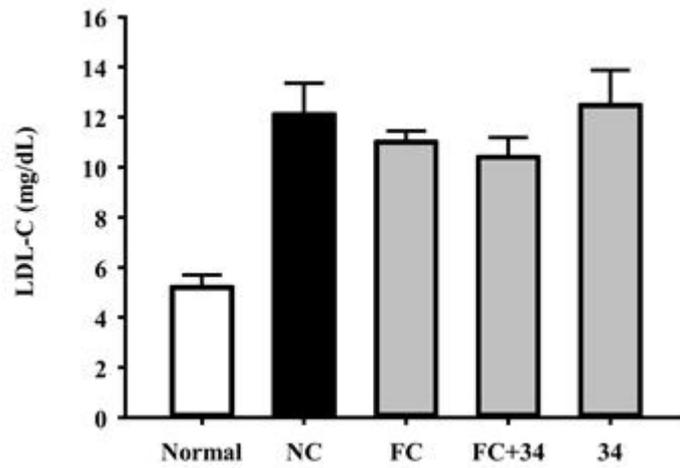
그림C-42. 각 그룹에서 마우스 혈액의 total cholesterol level



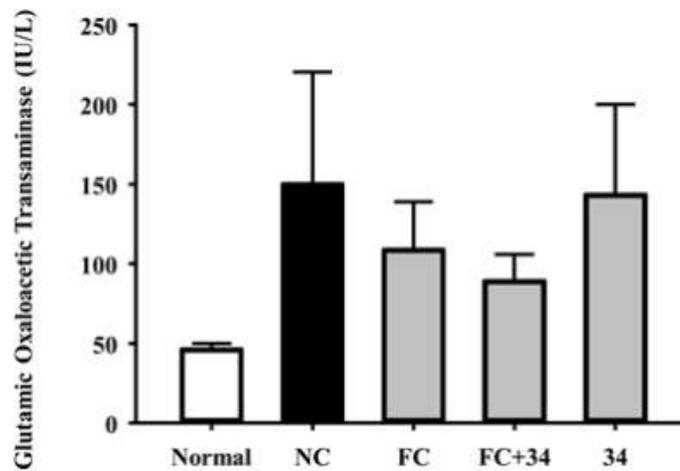
그림C-43. 각 그룹에서 마우스 혈액의 triglyceride level



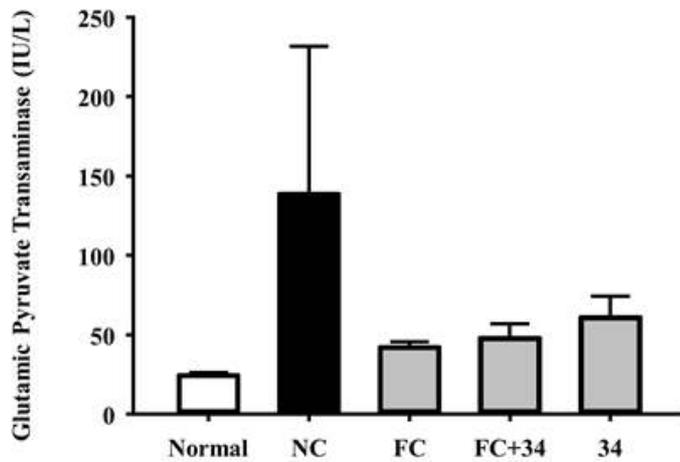
그림C-44. 각 그룹에서 마우스 혈액의 HDL-cholesterol level



그림C-45. 각 그룹에서 마우스 혈액의 LDL-cholesterol level



그림C-46. 각 그룹에서 마우스 혈액의 glutamic oxaloacetic transaminase level

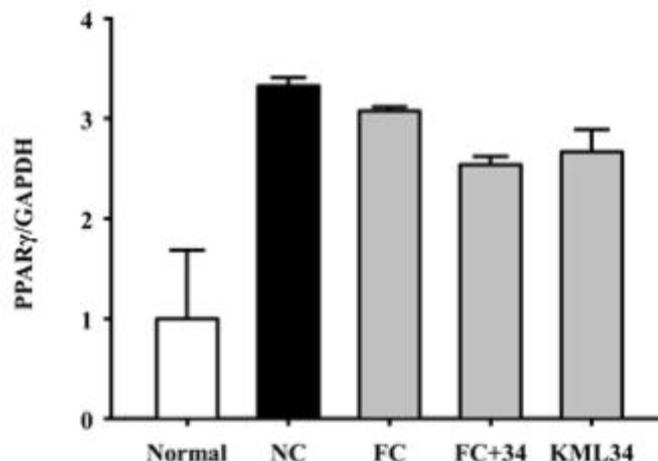


그림C-47. 각 그룹에서 마우스 혈액의 glutamic pyruvate transaminase level

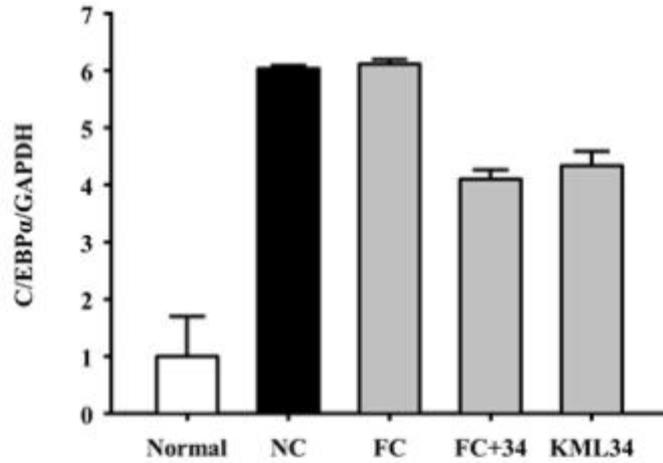
- Normal 그룹에 비해 NC 그룹에서 serum total cholesterol 함량이 증가하였으며, FC, FC+34, KML34 식이를 섭취한 그룹이 NC 그룹에 비해 serum total cholesterol 함량이 감소함
- Normal 그룹에 비해 NC 그룹에서 serum triglyceride 함량이 증가하였으며, FC, FC+34, KML34 식이를 섭취한 그룹이 NC 그룹에 비해 serum total cholesterol 함량이 감소함
- Normal 그룹에 비해 NC 그룹에서 LDL-cholesterol이 증가하였으며, FC, FC+34 식이를 섭취한 그룹이 NC 그룹에 비해 serum total cholesterol이 감소함
- Normal 그룹에 비해 NC 그룹에서 serum GOT 함량이 증가하였으며, FC, FC+34, KML34 식이를 섭취한 그룹이 NC 그룹에 비해 serum GOT 함량이 감소함
- Normal 그룹에 비해 NC 그룹에서 serum GOT 함량이 증가하였으며, FC, FC+34, KML34 식이를 섭취한 그룹이 NC 그룹에 비해 serum GPT 함량이 감소함
- HDL-cholesterol은 NC 그룹에서 high fat diet 식이로 인한 적절한 유도가 이루어지지 않은 것으로 확인

(나) Gene expression

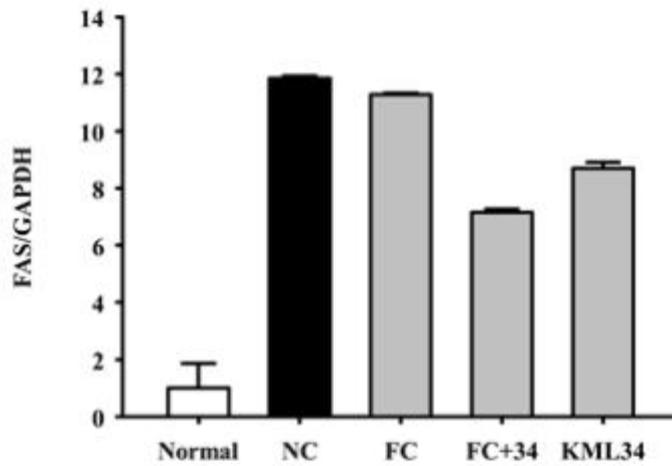
- qRT-PCR을 통해 지방조직에서 비만 관련 유전자 (PPAR γ , C/EBP α , FAS, SREBP-1)의 발현을 확인함



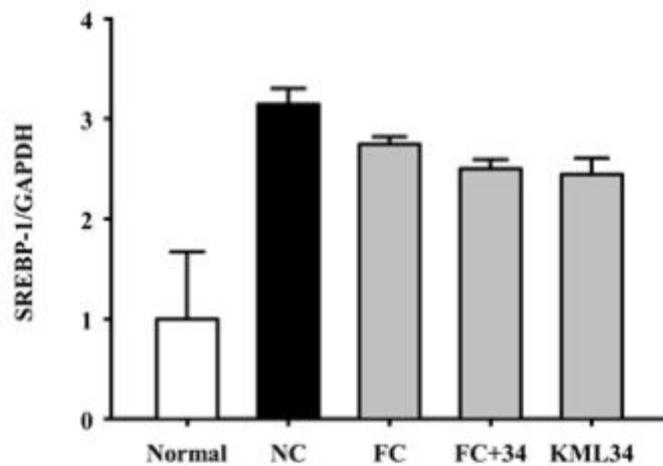
그림C-48. 각 그룹별 지방조직에서의 PPAR γ 의 발현량



그림C-49. 각 그룹별 지방조직에서의 C/EBP α 의 발현량



그림C-50. 각 그룹별 지방조직에서의 FAS의 발현량



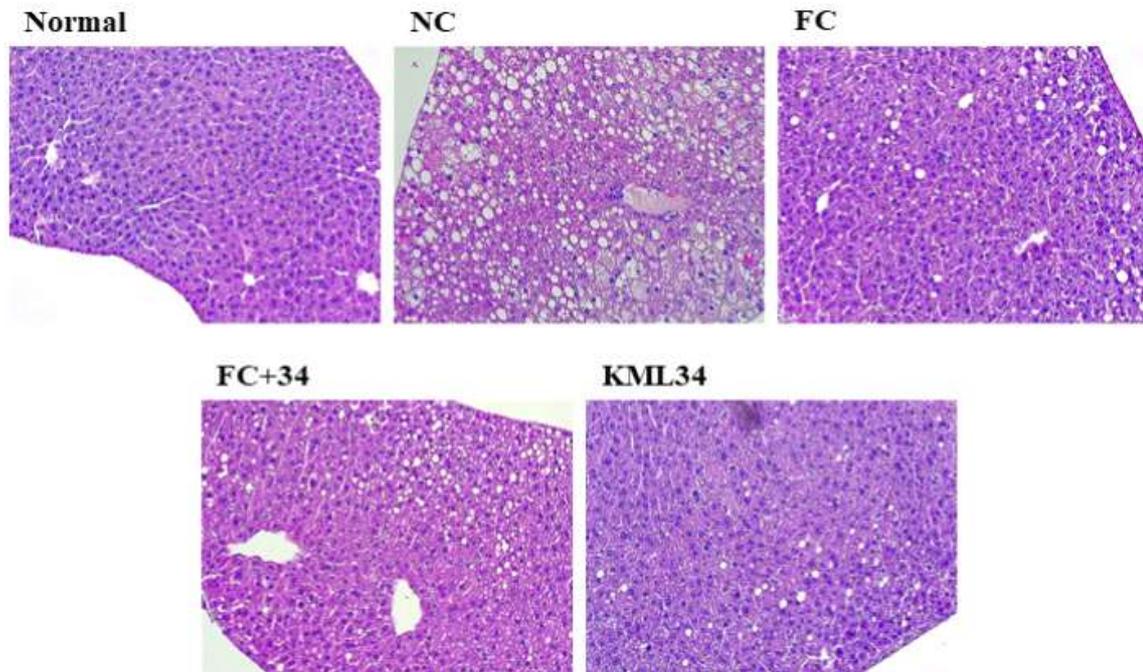
그림C-51. 각 그룹별 지방조직에서의 SREBP-1의 발현량

- 지방조직에서 RT-qPCR을 통한 비만 관련 유전자를 확인하였을 때, Normal 그룹에 비해 NC 그룹에서 PPAR γ , C/EBP α , FAS, SREBP-1의 발현이 모두 증가하는 것을 확인함
- 각 그룹의 지방조직에서 RT-qPCR을 통한 비만 관련 유전자를 확인하였을 때, PPAR γ ,

C/EBP α , FAS, SREBP-1 모두 NC 그룹에 비해 FC, FC+34, KML34 식이를 섭취한 그룹에서 발현량이 감소하는 것을 확인하였으며, 특히 FC+34가 비만 관련 유전자의 발현이 가장 많이 감소하는 것으로 확인함

(다) Histological analysis

- H&E staining을 통해 간 조직에서 지방구의 형태학적인 변화 관찰함

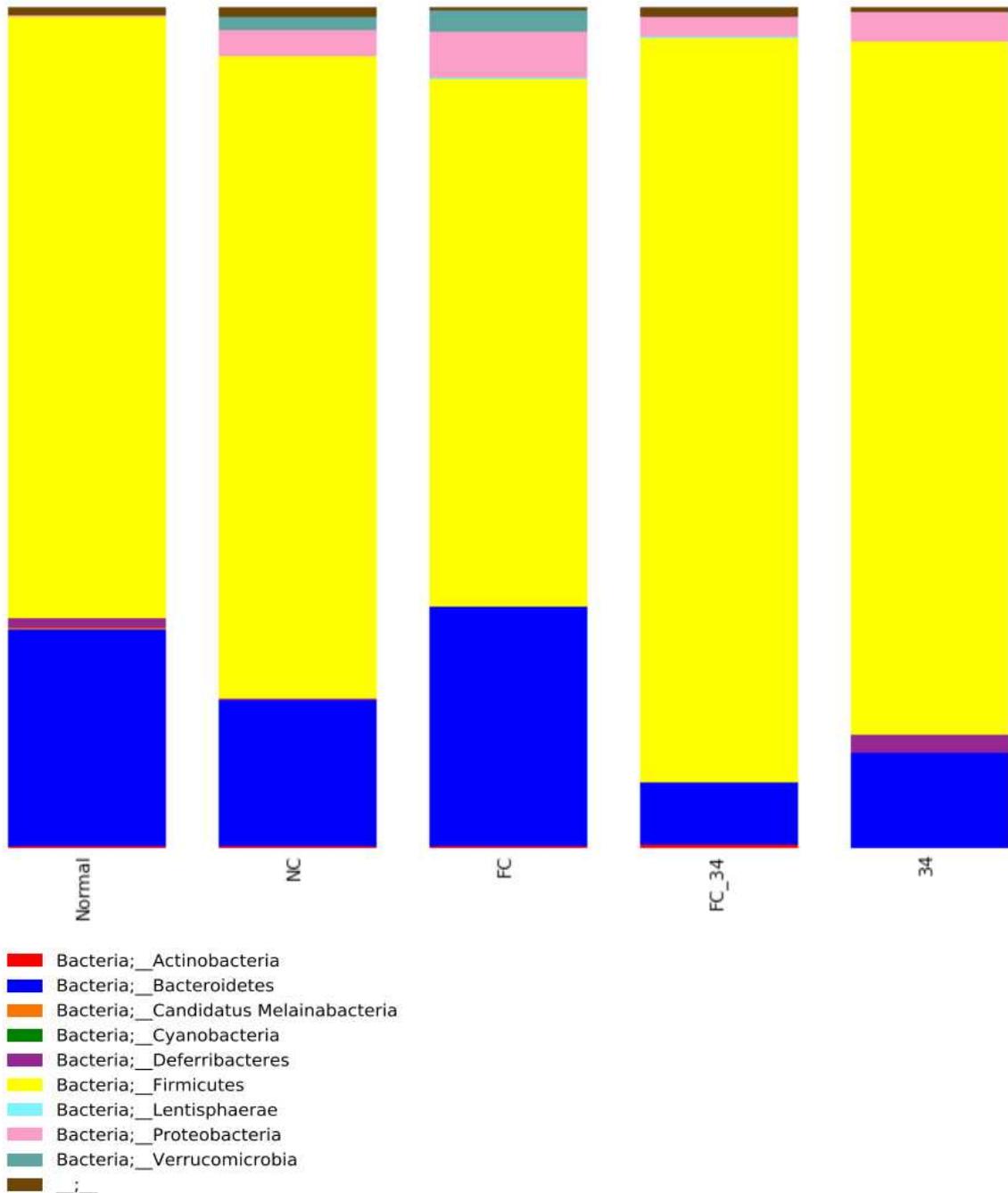


그림C-52. Histological changes in the liver

- Normal 그룹에 비해 NC 그룹에서 lipid droplets 수가 증가하는 것을 확인함
- FC, FC+34, KML34 식이를 섭취한 그룹이 NC 그룹에 비해 lipid droplets 수가 감소하는 것을 확인함

3) 동물모델에서 장내 균총 변화에 따른 비만 억제 활성의 연관성 규명

① Gut microbiota diversity



그림C-53. Diversity of gut microbiota in each group

- Normal group에 비해 NC group에서 *Firmicutes* 문이 증가하며, *Bacteroidetes* 문이 감소하는 것으로 나타났지만, FC group에서만 *Firmicutes* 문이 감소하고, *Bacteroidetes* 문이 증가하는 것으로 나타남
- 일반적으로 비만이 유도된 쥐에서는 *Proteobacteria* 문 및 *Verrucomicrobia* 문의 대부분인 *Akkermansia* 속이 감소하는 것으로 나타남
- *Proteobacteria* 및 *Verrucomicrobia* 문 또한 NC group과 비교하였을 때 FC group에서만 증가한 것으로 나타남

제2협동. 식물성 치즈제품 3종에 대한 물성개선 및 기능성 강화

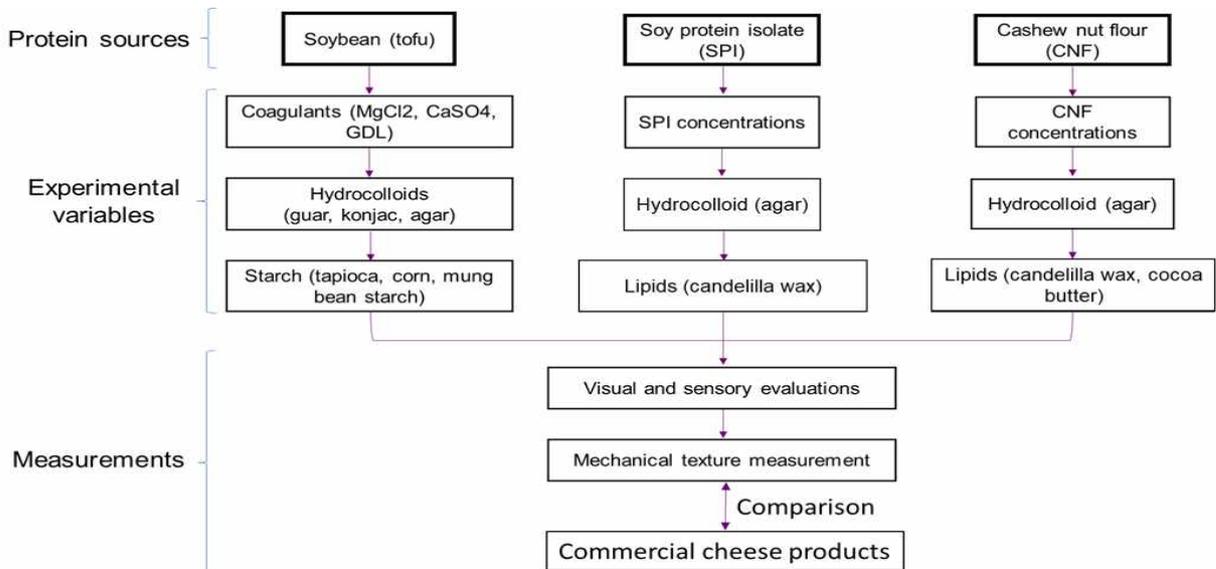
[1차년도 : 식물성 블록치즈 및 스프레드 치즈 기본 공정 결정]

1. 연구개발 수행과정

1) 식물성 블록치즈 제조공정 수립

① 고체형 겔 형성을 위한 식물성 원료 탐색

- 고체형 겔화를 위한 식물성 원료로 1차적으로 콩에서 추출한 두유, 분리대두단백(SPI), 및 캐슈넛분말(CNF)을 선발하여 진행하였음. (그림D-1)
- 식물성 원료의 고체형 겔화를 위한 응고제의 경우 두유는 $MgCl_2$, $CaCl_2$, 및 glucano- δ -lactone (GDL)을 사용하였으며, 분리대두단백의 경우 NaCl을 사용하였고, CNF의 경우 응고제를 사용하지 않았음.
- 각 처리군의 겔화를 돕기 위한 하이드로콜로이드로는 한천(agar), 구아검(guar gum), 곤약(konjac), 타피오카, 옥수수, 녹두 유래 전분류 등을 사용하였음.
- 아울러, 온도에 따른 치즈 물성 구현 및 겔 강도 제어를 위해 다양한 지방 소재(올레오젤, 코코아 버터, 팜유 등)를 선택하여 상호 비교함.



그림D-1. 식물성 고체형 겔의 제조를 위한 식물성 원료 탐색 전략

② 두유를 이용한 고체형 단백질 겔 제조

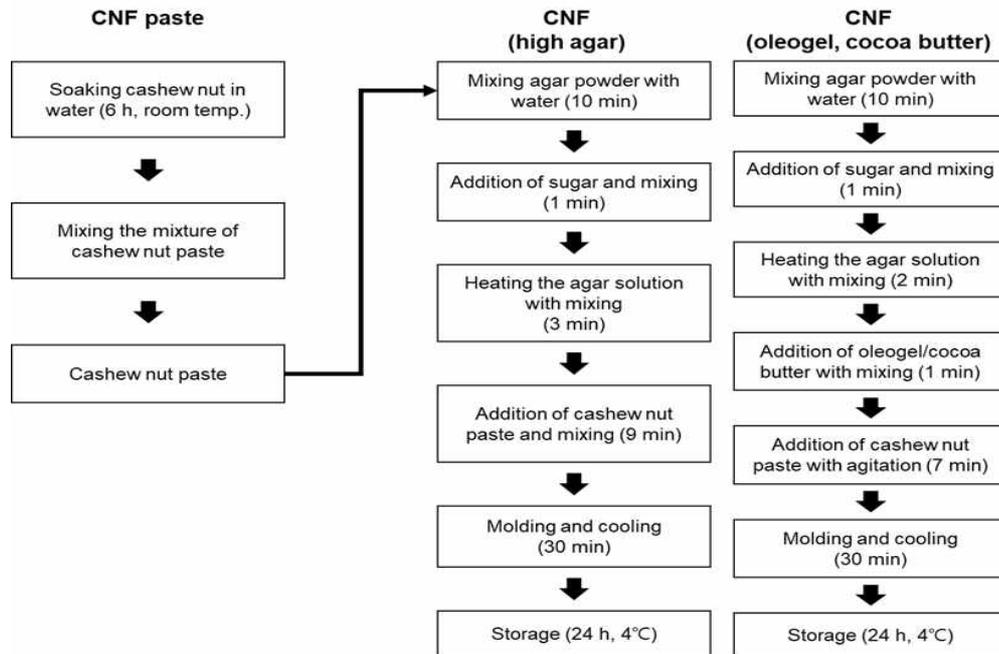
- 하루동안 불린 콩 400 g을 물 1200 g과 섞고 가정용 두부제조기(AFC-100A, Ronic, Korea)를 이용하여 가열된 두유를 제조하였음. 거즈를 이용하여 비지를 제거한 후 응고제 ($MgCl_2$, $CaSO_4$, 혹은 GDL 20% (w/w)) 용액 50 g을 첨가하고 상온에서 15분간 응고시켰음. 이를 두부틀에 옮긴 후 2.5 kg의 무게추로 압착하여 whey를 제거하고 두부를 제조하였음.
- 고체형 겔의 강도 강화를 위해서 전분을 첨가할 때는 GDL 27.3% (w/w) 용액 55 g을 가열한 두유에 첨가하여 응고한 후, 호화된 3%(w/w) 하이드로콜로이드 용액 20 g을 첨가한 후 혼합하고 이를 두부틀에 옮긴 후 2.5 kg의 무게로 20시간 압착하여 성형하였음.

③ 분리대두단백(SPI)를 이용한 고체형 단백질 겔 제조

- SPI를 활용한 겔 제조를 위해 우선 SPI를 다양한 농도 (5, 10, 15%, w/w)로 물과 혼합한 후 가열하여 겔 형성 패턴을 파악하고 아울러, NaCl 사용유무에 따른 SPI 겔의 강도 변화를 측정하기 위해 물 대신 0.4 M NaCl 용액에 넣은 후, Rapid Visco Analyzer (RVA-4, Newport Scientific, Australia)를 이용하여 임펠러로 160 rpm으로 교반하면서 온도를 50°C에서 95°C까지 9°C/min의 속도로 가열하는 동안 점도변화를 통해 단백질의 응고정도를 측정함.
- 추가적인 강도 개선을 위해 SPI 용액에 다양한 oleogel (candelilla wax, carnauba wax, beeswax 3 g + 카놀라 오일 27 g)을 혼합한 후 Homogenizer(HG-15A, Daihan Scientific, Korea)로 1 분동안 2000 rpm으로 균질화하여 겔을 제조함.
- 이 후, 분리대두단백을 활용한 겔 제조를 위해 SPI 100 g을 물 290 g, salt 5 g, tapioca starch 30 g, lemon juice 20 mL과 섞은 후 믹서기를 이용하여 페이스트 형상이 될 때까지 혼합하였음. 이후 분리대두단백 페이스트 (SPI paste) 300 g과 미리 제조한 agar gum 용액 (13.5 g agar gum + 24 g sucrose in 180 g water), Candelilla wax기반의 oleogel (51 g)을 넣어 7분간 혼합하고 얼음물에서 30 분 냉각하여 고체형 겔을 제조하였음.

④ 캐슈넛 분말을 이용한 고체형 단백질 겔 제조(그림D-2)

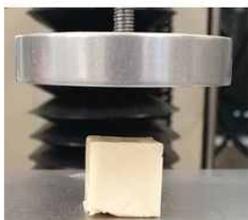
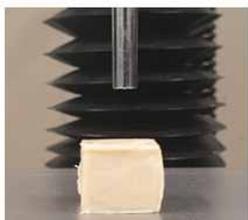
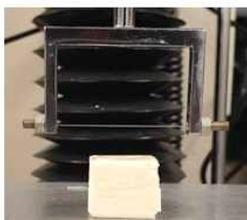
- 캐슈넛 분말(CNF) 200 g을 물 290 g, salt 5 g, tapioca starch 30 g, lemon juice 20 mL과 섞은 후 믹서기를 이용하여 페이스트 형상이 될 때까지 혼합하였음. 이후 캐슈넛 페이스트 (CNF paste) 300 g과 미리 제조한 agar gum 용액 (13.5 g agar gum + 24 g sucrose in 180 g water)을 섞고 9분간 혼합하고 얼음물에서 30 min 간 냉각하여 고체형 겔을 제조하였음.
- 캐슈넛의 함량을 250 g으로 늘려 제조한 paste를 이용해서 high CNF 시료를 제조하였음. High agar 시료의 경우 대조군과 동일한 CNF paste를 사용하나 2차 agar gum과의 혼합단계에서 agar gum을 녹이는데 사용하는 물의 양을 121.5 g으로 줄여서 제작하였음.
- 추가적인 강도 개선을 위해 SPI의 단백질 겔 강도를 높이는데 기여한 Candelilla wax기반 식물성 오일의 oleogel과 코코아버터를 추가하는 실험을 진행하였음. CNF paste는 CNF 300 g 기준으로 제조하였으며, 물의 함량을 줄인 high agar CNF를 기본으로 하여 oleogel(51 g) 혹은 코코아버터(51 g)를 추가하여 제조하였음.



그림D-2. 캐슈넛 분말을 이용한 식물성 블록치즈 대체품 제조 공정

⑤ 식물성 블록치즈 대체품의 텍스처 분석(그림D-3)

- 개발된 식품성 블록치즈 대체품의 텍스처 분석을 위해 Texture analyzer (TA-XT plus, Stable Micro Systems, Surrey, UK)를 사용하여 compression test, puncture test, cutting-shear test를 실시함.
- Compression test: 프로브는 실린더 타입(D : 50 mm x H : 10 mm)를 이용하여 프로브의 하강속도는 분당 10 cm, 변형율은 최대 60%까지로 설정하였음. 시료의 크기는 17 x 17 x 17 (mm)가 되도록 절단하여 분석하였음.
- Puncture test: 프로브는 Rod 타입(D : 5 mm)를 이용하여 프로브의 하강속도는 분당 10 cm, 프로브의 이동거리는 10 mm로 설정하였음.
- Cutting-shear test: 프로브는 wire cutter (0.25 mm)를 이용하여 프로브의 하강속도는 분당 10 cm, 프로브의 이동거리는 10 mm로 설정하였음. 시료의 크기는 17 x 17 x 17 (mm)가 되도록 절단하여 분석함.

<p>Test type : Compression test Probe: Cylinder probe (D : 50 mm) Crosshead speed : 100 mm/min Strain : 60% Sample size : 17 x 17 x 17 (mm)</p> 	<p>Test type : Puncture test Probe: Rod probe (D : 5 mm) Crosshead speed : 100 mm/min Distance : 10 mm</p> 	<p>Test type : Cutting-shear test Probe: Wire cutter (0.25 mm) Crosshead speed : 100 mm/min Distance : 10 mm Sample size : 17 x 17 x 17 (mm)</p> 
---	---	--

그림D-3. 시판 블록치즈 대체품 및 식물성 고체형 젤의 물성측정 조건

2) 식물성 스프레드치즈 대체품 제조 공정 수립

① 시판되는 동물성 크림치즈의 물성 분석

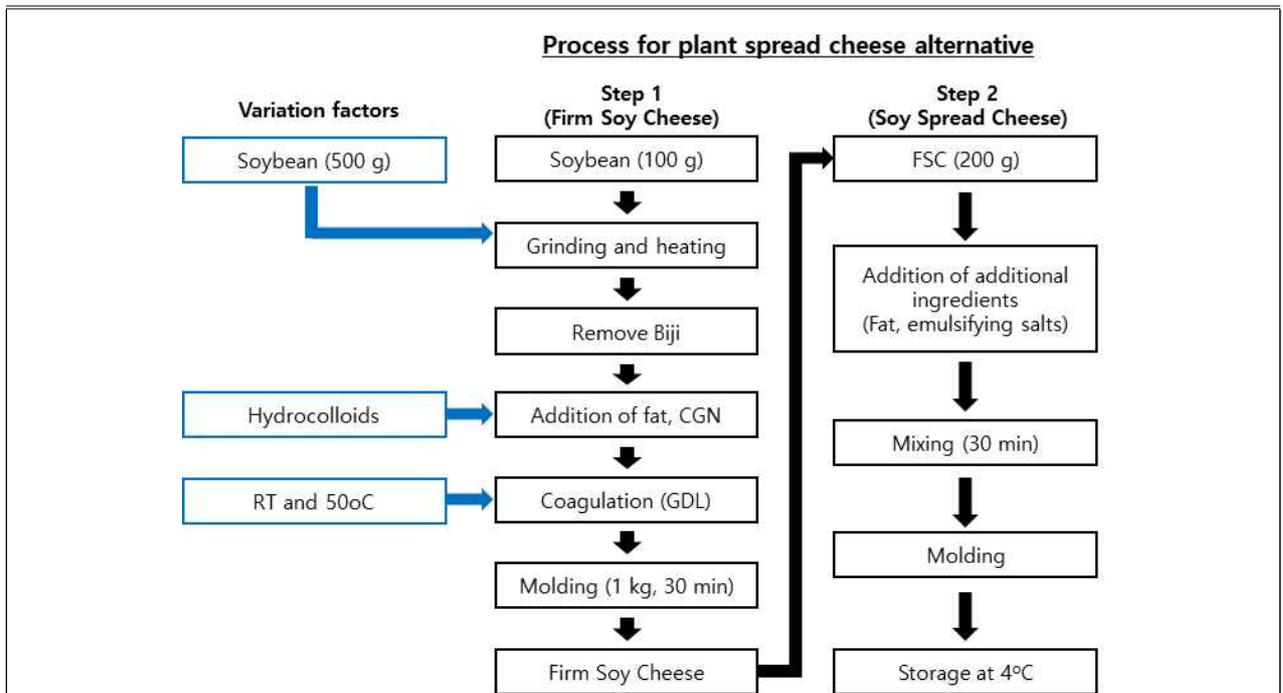
- 식물성 스프레드치즈 제품의 강도 기준을 잡기위해 시판되는 크림치즈 3개 (Arla Natural light cream cheese, Philadelphia cream cheese, Mascarpone cream cheese)를 구매하여 puncture test를 통해서 강도를 측정하였음.
- 크림치즈 및 식물성 반고체 겔의 텍스처 분석을 위한 functure test: Texture Analyzer를 이용하였으며, 프로브는 Rod 타입(D : 5 mm)를 이용하였음. 프로브의 하강속도는 분당 10 cm, 프로브의 이동거리는 10 mm로 설정하였음.

② 두유를 이용한 식물성 반고체 겔 제조 (그림D-4)

- 콩을 하루 동안 상온에서 불린 후, soybean : water = 100:1500 비율로 두유 제조 후 거름망을 이용하여 비지를 제거한 후, 두유를 확보하였음.
- 두유를 중탕가열하여 두유의 품온을 70℃ 이상 가열하고, coconut oil 37.5 g, 3%(w/v) 카라기난 용액 50 g 넣고 혼합하였음. 400 mL 당 GDL 용액을 넣어주고 응고 후 두부틀에 넣고 1 kg 무게로 압착하여 성형하였음. 이렇게 제조된 시료를 firm soy cheese (FSC)라고 명명함.
- FSC 200 g을 기준으로 coconut oil 20 g, emulsifying salt 4 g과 물 4 g을 넣고 혼합하여 최종 스프레드 제품을 제조하였음. 이 단계의 시료를 Soy Spread Cheese (SSC)라고 명명하였음.
- 제조된 시료를 시판 동물성 크림치즈의 물성 분석과 동일한 방법으로 경도를 측정하였음.

③ 단백질 함량 증가에 따른 강도 개선 (그림D-4)

- 식물성 스프레드 치즈 대체품의 강도를 높이기 위해 콩 양을 500 g으로 증가시켜 단백질 함량을 증가시킨 후 firm soy cheese를 제조하고 Texture analyzer (TA-XT plus)를 이용한 compression test를 통해 강도를 측정하였음. 실험 조건은 식물성 블록치즈 대체품의 텍스처 분석과 동일한 방법을 사용하였음.
- 단백질양의 증가에 따라 GDL의 양을 7.5% GDL solution 25 g (GDL 1.75 g)의 이전 조건 대비 4.2배 증가시킨 27.3% GDL solution 27.5 g (GDL 7.51 g)을 넣은 firm soy cheese를 제조하고 강도를 비교하였음.
- 단백질 응고 조건을 상온 15분 응고 조건과 50oC 3시간 조건에서 firm soy cheese를 제조하고 강도를 비교하였음.
- 하이드로콜로이드 11종 (아가, 아라비아검, 로커스트콩검, 구아검, 아가 검 + 로커스트콩검, 펙틴, 카라기난, 카파카라기난, 타피오카전분, 변성전분(아세틸아디핀산이전분), 하이드록시프로필메틸셀룰로스)를 첨가하여 50oC 3시간 조건에서 firm soy cheese를 제조하고 강도를 비교하였음.



그림D-4. 식물성 반고체 겔 제조 공정

2. 연구개발 수행내용

1) 식물성 블록치즈 대체품 제조 공정 수립

① 두유를 이용한 고체형 겔 제조

- 우선적으로 콩단백질의 응고제의 선정을 위해 간수의 원료인 $MgCl_2$, $CaSO_4$, 및 GDL을 이용하여 두유를 이용한 고체형 겔을 제조하였음(그림D-1).
- $MgCl_2$ 사용 시 수율이 가장 높았지만, 제품 조직감이 거칠어 치즈 식감과 큰 차이를 보임. 반면, GDL의 경우 수율은 낮지만 가장 부드러운 관능학적 식감을 나타냈음(표 D-1).
- $MgCl_2$ 사용 시 고체형 겔은 단단한 텍스처 특성과 굵은 입자로 인해 치즈라기 보다는 두부특성이 강하였으나 GDL의 경우는 상대적으로 입자의 굵기가 작아서 부드러운 텍스처를 나타냈음.

표 D-1. 응고제 종류에 따른 두유로부터 고체형 겔의 제조 수율 및 물성 분석

	GDL	$MgCl_2$	$CaSO_4$
Hardness (N)	9.69±0.17 ^c	15.89±0.46 ^b	17.78±1.27 ^a
Adhesiveness (N·mm)	0.76±0.13 ^a	0.33±0.11 ^b	0.34±0.14 ^b
Springiness	0.78±0.06 ^b	0.89±0.02 ^a	0.77±0.03 ^b
Cohesiveness	0.35±0.04 ^b	0.46±0.02 ^a	0.37±0.02 ^b
Chewiness (N·mm)	7.41±1.27 ^c	18.15±0.56 ^a	14.18±2.22 ^b
Resilience	0.08±0.01 ^c	0.15±0.01 ^a	0.13±0.01 ^b
weight (g)	161.70	235.47	202.97
Yield (%)	40.43	58.87	50.74

(Means with different in the same row differ significantly at $p < 0.05$)

- 이 결과를 바탕으로 추후 실험에서는 염류 응고제 대신 GDL를 응고제로 사용하였으며, 고체형 겔의 강도 개선이 필요하다고 판단하여 하이드로콜로이드 및 전분 소재를 첨가하였음.

- 총 3가지 하이드로콜로이드와 3종의 전분을 적용한 결과 하이드로콜로이드 및 전분 종류에 따라 다른 강도를 보였지만, 외관이 치즈라기보다는 두부에 가까운 외관을 나타냈으며, 압축 시 물이 스며 나오는 문제점이 관찰됨(그림 D-5).

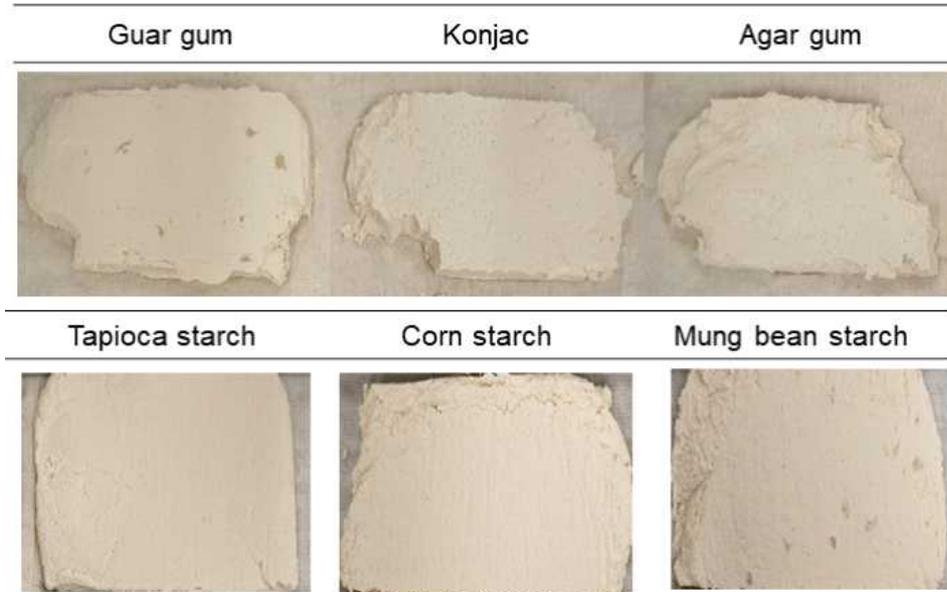


그림 D-5. 하이드로콜로이드가 첨가된 두유 유래 고체형 겔의 외형

- TPA 분석을 통해 하이드로콜로이드 류 중에서는 agar gum이 고체형 겔의 강도를 높이는 효과가 있었음(표 D-2). 전분류의 경우는 강도 개선에 보다 효과적이었으며, 이중 mung bean starch가 가장 높은 강도를 나타내었음(표 D-3).
- Agar gum 및 mung bean starch 첨가를 통해서 고체형 겔의 강도를 높일 수 있었으나, 실제 치즈 보다는 낮은 강도를 보여주는 것으로 판단됨.

표 D-2. 하이드로콜로이드 첨가에 따른 고체형 겔의 물성 분석

TPA parameter	Guar gum	Konjac	Agar gum
Hardness (N)	4.57±0.11 ^b	3.47±0.14 ^c	8.15±0.41^a
Adhesiveness (N·mm)	0.55±0.32 ^a	0.59±0.04 ^a	0.55±0.09 ^a
Springiness	0.3±0.01 ^b	0.25±0.02 ^b	0.68±0.08 ^a
Cohesiveness	0.22±0.02 ^b	0.19±0.01 ^c	0.28±0.01 ^a
Chewiness (N·mm)	0.49±0.03 ^b	0.27±0.04 ^b	2.56±0.39 ^a
Resilience	0.07±0.01 ^b	0.06±0.00 ^c	0.08±0.00 ^a

(Means with different in the same row differ significantly at $p < 0.05$)

표 D-3. 전분류 첨가에 따른 고체형 겔의 물성 분석

TPA parameter	Tapioca starch	Corn starch	Mung bean starch
Hardness (N)	5.77±0.35 ^c	7.99±0.34 ^b	9.66±1.03^a
Adhesiveness (N·mm)	1.07±0.29 ^a	0.42±0.11 ^b	0.23±0.08 ^b
Springiness	0.27±0.02 ^c	0.43±0.07 ^b	0.52±0.05 ^a
Cohesiveness	0.23±0.01 ^b	0.21±0.01 ^c	0.25±0.01 ^a
Chewiness (N·mm)	0.61±0.04 ^c	1.22±0.22 ^b	2.09±0.35 ^a
Resilience	0.05±0.00 ^c	0.06±0.00 ^b	0.08±0.01 ^a

(Means with different in the same row differ significantly at $p < 0.05$)

② 분리대두단백(SPI)를 이용한 고체형 겔 제조

- 두유에 간수를 첨가하여 얻은 고체형 겔의 강도가 너무 낮았기 때문에 강도 개선을 목적으로 식물성 단백질을 분리대두단백(SPI)로 대체하여 고체형 겔을 제조하였음(그림 D-1)
- RVA를 이용한 점도 측정 시 NaCl을 첨가한 SPI 용액에서 보다 높은 점도가 관찰되었으며 외형적으로도 단백질이 응고되는 것을 육안으로 확인할 수 있었음 (그림 D-6A).
- SPI 겔의 강도 개선을 위해 지방원료로서 다양한 oleogel을 첨가하여 겔을 제조함. Oleogel은 불포화지방산이 많은 액체 오일에 소량의 oleogelator를 첨가하여 제조한 고체 fat을 의미함. 본 연구에서는 다양한 식품에 식물성 유지로 보편적으로 사용되고 있는 Palm oil과, 식물성 유래 oleogelator로서 Candelilla wax, Beeswax Carnauba wax를 카놀라유와 10%(w/v)로 혼합하여 만든 oleogel을 사용하여 SPI 고체형 겔을 제조하였음.
- 4개 지방 중 candelilla wax oleogel을 사용하여 만든 시료가 가장 높은 강도를 보여줌(그림 D-6B, 표 D-4).

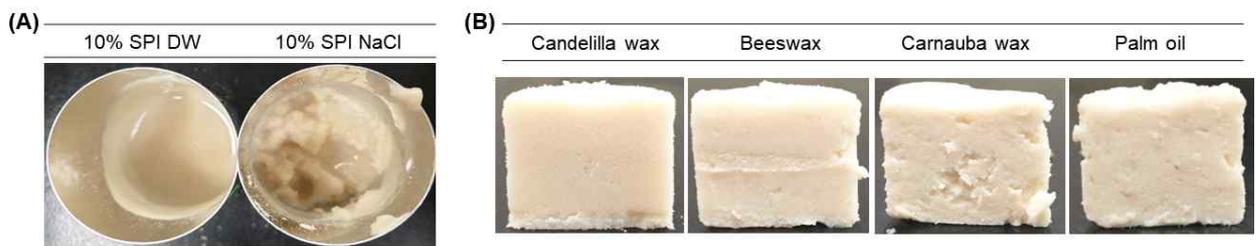


그림 D-6. SPI를 이용하여 제조한 고체형 겔의 형상. (A) SPI를 물과 NaCl 용액에 분산시킨 결과, (B) 다양한 지방 원료 사용에 따른 고체형 겔의 형상

표 D-4. SPI를 이용한 고체형 겔의 텍스처에 대한 NaCl과 Oleogel의 영향

TPA parameter	Sample 1 (Water)	Sample 2 (0.4M NaCl)	Sample 3 (0.4M NaCl + candelilla wax)
Hardness (N)	3.84±0.07 ^c	5.46±0.39 ^b	19.16±1.35^a
Fracturability (N)	0.97±0.48 ^b	0.82±0.07 ^b	3.24±0.61 ^a
Adhesiveness (N·mm)	0.72±0.15 ^b	0.89±0.04 ^a	0.30±0.08 ^c
Springiness	0.25±0.01 ^b	0.31±0.05 ^a	0.10±0.00 ^c
Cohesiveness	0.96±0.02 ^b	1.70±0.38 ^a	1.96±0.14 ^a
Chewiness (N·mm)	1.16±0.25 ^b	2.54±0.65 ^a	0.95±0.20 ^b
Resilience	0.09±0.00 ^b	0.12±0.01 ^a	0.03±0.00 ^c

(Means with different in the same row differ significantly at $p < 0.05$)

③ 캐슈넛 분말을 이용한 고체형 겔 제조

- 분리대두단백(SPI)을 NaCl로 응고시키고, Oleogel을 첨가함으로써 고체형 겔의 강도를 높일 수 있었으나 시료의 외관이 매우 거칠어서 상용치즈와는 상당한 차이를 나타내었음. 이를 개선하기 위해 캐슈넛 분말을 이용한 고체형 겔을 제조하였음(그림 D-1)
- Agar gum을 넣은 시료의 외관이 매끈하고 균일하여 치즈와 비슷하게 관찰되었음(그림 D-7A).
- 텍스처 분석 결과 agar gum이 첨가된 고체형 겔에서는 첨가하지 않은 시료에 비해서 부서짐성과 경도가 동시에 관찰되었으며, 실험값으로 측정된 강도의 크기는 유사하였음 (그림 D-7B, 표 D-5).

- 외관 및 강도를 근거로 고체치즈제품을 만들기 위한 고체형 겔의 식물성 원료로 캐슈넛을 선정하고 agar gum을 첨가하는 공정을 선택하였음.

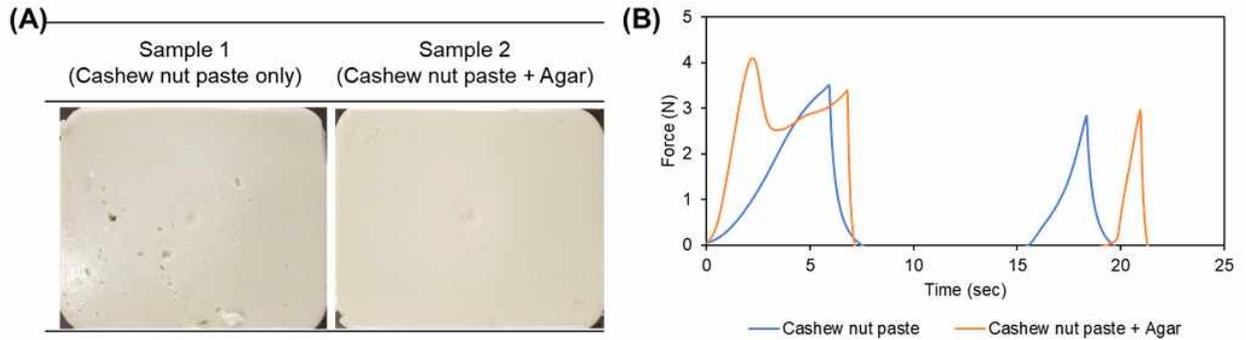


그림 D-7. 캐슈넛 분말을 이용한 고체형 겔의 외관 (A) 및 texture profile analysis 결과 (B)

표 D-5. CNF를 이용한 고체형 겔의 텍스처에 대한 agar gum의 영향

TPA parameter	Sample 1 (Cashew nut paste only)	Sample 2 (Cashew nut paste + Agar)
Hardness (N)	3.57±0.17*	3.33±0.15
Adhesiveness (N·mm)	0.80±0.08	1.40±0.49
Springiness	0.50±0.01*	0.24±0.03
Cohesiveness	0.36±0.02*	0.12±0.00
Chewiness (N·mm)	1.08±0.11*	0.16±0.02
Resilience	0.13±0.01*	0.03±0.00

(* Asterisk indicates a significant difference between the samples by t-test at $p < 0.05$)

④ 캐슈넛 분말을 이용한 고체형 겔 제조의 조성 조정

- 고체형 겔 제조를 위한 식물성 원료 중 캐슈넛 분말(CFN)이 가장 좋은 물성과 외관을 보였으므로, 이의 추가적인 강도 개선을 위해 CNF의 양을 늘린 시료와 agar gum의 농도를 높인 시료를 기존의 대조군과 비교하였음(그림 D-2).
- TPA 분석 결과 agar gum을 추가로 넣어준 시료에서 강도가 소폭 향상하였음을 확인하였음(표 D-6).

표 D-6. CNF 함량과 agar gum의 농도차에 따른 고체형 겔의 텍스처 분석

	Control	Sample 1 (high CNF)	Sample 2 (high agar)
Hardness (N)	3.33±0.15 ^b	3.97±0.17 ^a	4.11±0.19^a
Fracturability(N)	4.10±0.02 ^c	4.75±0.23 ^a	4.51±0.10 ^b
Adhesiveness (N·mm)	1.40±0.49 ^a	1.07±0.36 ^a	1.13±0.11 ^a
Springiness	0.24±0.03 ^b	0.32±0.05 ^a	0.31±0.06 ^a
Cohesiveness	0.12±0.00 ^b	0.15±0.01 ^a	0.15±0.01 ^a
Chewiness (N·mm)	0.16±0.02 ^b	0.31±0.05 ^a	0.32±0.08 ^a
Resilience	0.03±0.00 ^c	0.03±0.00 ^b	0.04±0.00 ^a

(Means with different in the same row differ significantly at $p < 0.05$)

- 추가적인 강도 개선을 위해 SPI의 단백질 겔 강도를 높이는데 기여한 Candelilla wax oleogel과 코코아버터를 추가하는 실험을 진행하였음. 코코아버터의 경우 강도를 높이는 데 기여하지 못하였으나 oleogel의 경우 강도를 2배 이상 향상시켰음(표 D-7)

표 D-7. Oleogel과 코코아버터 첨가에 따른 고체형 겔의 텍스처 분석

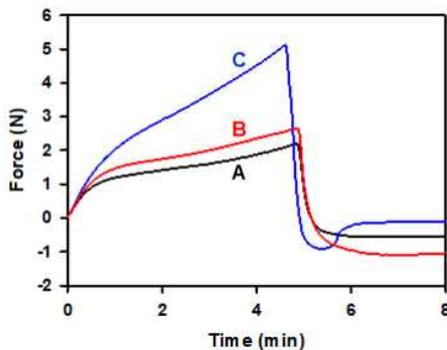
	CNF	CNF(oleogel)	CNF(cocoa butter)
Hardness (N)	3.87±0.16 ^b	8.04±0.22^a	4.03±0.13 ^b
Fracturability(N)	4.13±0.10 ^b	7.72±0.57 ^a	3.63±0.19 ^c
Adhesiveness (N·mm)	1.50±0.82 ^b	2.41±0.43 ^a	1.12±0.29 ^b
Springiness	0.23±0.02 ^a	0.29±0.06 ^a	0.27±0.08 ^a
Cohesiveness	0.14±0.01 ^b	0.15±0.00 ^a	0.14±0.01 ^{ab}
Chewiness (N·mm)	0.20±0.03 ^b	0.58±0.11 ^a	0.26±0.09 ^b
Resilience	0.03±0.00 ^b	0.04±0.00 ^a	0.03±0.00 ^b

(Means with different in the same row differ significantly at $p < 0.05$)

2) 스프레드치즈

① 시판되는 동물성 크림치즈의 물성 분석

- 3개 제품 중 Mascarpone의 경우 상대적으로 단단함이 강하였으나(그림D-8), 강도측정 시 에러범위가 너무 넓고 다른 2개 제품에 비해 2배 가까운 차이를 보였음.
- 반면 다른 2개의 시료는 2.22±0.05 및 2.67±0.18 N 값을 나타내었으므로 평균값이 2.44을 기준강도로 선정하고 식물성 반고체 겔의 목표 강도를 수립하였음.

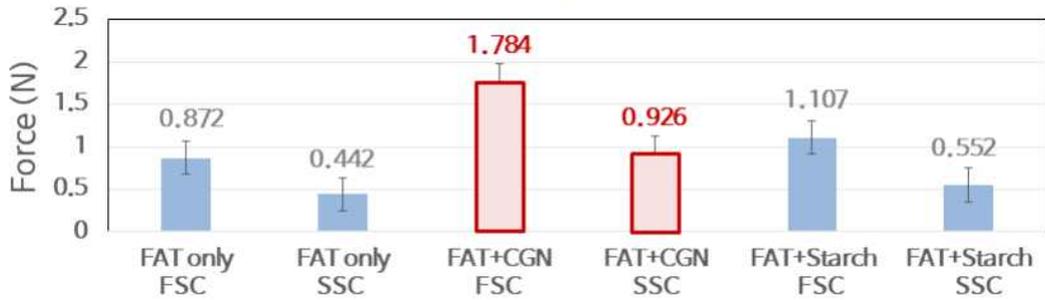


그림D-8. 시판 동물성 크림치즈의 물성분석 결과 (Puncture test).

- A, Arla Natural light cream cheese
- B, Philadelphia cream cheese
- C, Mascarpone cream cheese

② 식물성 반고체 겔의 제조

- 기기 설명서에 따라 콩 100 g 기준으로 두유를 제조하고, 일반 식물성 유지에 비해 녹는 점이 높은 코코넛오일을 유지방 대신 사용하여 크림성을 부여하고자 하였으며, 하이드로 콜로이드를 첨가하여 유화안정성을 개선하고자 하였음.
- 각 시료의 강도를 puncture test를 통해서 측정한 결과를 통해서 카라기난이 첨가된 시료의 강도가 가장 높았음. 세가지 경우 모두 SSC의 강도가 FSC에 비해 절반 수준으로 떨어지는 경향을 나타내었음 (그림D-9).
- 따라서 시판되는 크림치즈의 강도를 가지기 위해서는 FSC의 강도가 시판 크림치즈 강도의 2배 수준인 4 내지 5 N을 가지도록 조정해야 함을 확인하였음.



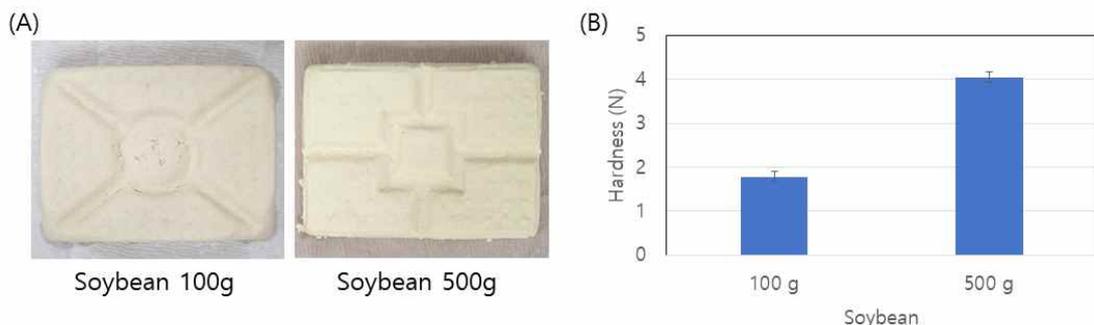
그림D-9. FSC와 SSC에 대한 functure test 결과

③ 콩 양 증가에 따른 GDL 첨가량 증가 및 응고 조건에 따른 FSC의 강도 변화 분석

- FSC의 강도 강화 및 수율 개선을 목적으로 두유 내 단백질 양 증가시키기 위해 콩 사용량을 100 g에서 500 g으로 증가시켰음. 비지를 걸러내는 과정에서 두유의 온도 하강으로 인해 응고가 잘 일어나지 않았음.
- 개선을 위해 두유를 증탕 가열하는 공정 (80℃, 10분, 70℃ 10분)을 추가하였음. 또한 두유 내 단백질양 증가에 따른 GDL 양은 27.3% GDL solution 20g으로 늘리고, 응고조건을 상온 15분과 50℃ 3시간으로 구분하여 firm soy cheese를 제조하였음 (표D-8).
- A1과 B1를 비교했을 때 단단한 정도는 비슷하나, 수율은 B1가 더 높기 때문에 응고 시간은 상온 15분보다 50℃, 3시간이 더 효율적이었음. A2, B2 경우도 동일한 결과를 나타내었음.
- 가열 온도가 더 높은 1번 조건이 2번 조건에 비해 FSC의 수율이 높았음. 응고 시 두유의 온도가 수율에 영향을 미침을 확인하였으며 이후 증탕가열로 80℃ 10분 가열 공정을 추가하였음.
- 콩 양 증가에 따른 수율의 경우 수율이 32.2%로 100g 콩 사용 시 수율 28.5%보다 약 15% 증가하였고, FSC의 강도도 4 N으로 2배 이상 증가하였음 (그림D-10).

표D-8. 응고 공정화에 따른 FSC 수율 변화

		A1	B1	A2	B2
처리 조건	가열조건	80℃ 10분		70℃ 10분	
	응고조건	상온 15분	50℃ 3시간	상온 15분	50℃ 3시간
FSC	height(cm)	2.5	3	2.0	2.1
	weight(g)	126.7	161.16	105.07	121.8
	yield(%)	31.675	40.29	26.2675	30.45



그림D-10. 콩단백질양의 증가에 따른 FSC의 강도 비교

④ Hydrocolloid 종류에 따른 FSC의 강도 분석

- Hydrocolloid 첨가하지 않은 대조군을 포함하여 하이드로콜로이드가 FSC의 강도에 미치는 영향을 비교하였음. 하이드로콜로이드의 양은 기존과 동일(두유 400 mL 대비 3% 하이드로콜로이드 용액 6 g)하게 사용하였음.
- 사용한 하이드로콜로이드는 총 10 종(아가검, 아라비아검, 로커스트콩검, 구아검, 펙틴, 카라기난, 카파카라기난, 타피오카전분, 변성전분(아세틸아디핀산이전분), 하이드록시프로필메틸셀룰로스)과 아가검과 로커스트콩검이 1:1 비율로 혼합한 하이드로콜로이드 포함 총 11종에 대해서 실험하였음
- 하이드로콜로이드 미첨가 시료의 경우 단면이 매우 거칠고 덩어리져있는 부위가 발생하였음(그림 D-11).
- 제조한 firm soy cheese를 일정한 길이의 큐빅모양으로 잘라서 compression test를 진행하였음.
- 하이드로콜로이드가 첨가되지 않은 시료의 강도가 가장 높았으며, 그 다음으로 구어검, 로커스트콩검과 아가검 혼합시료, 아가검, 및 카라기난의 순서로 강도가 나타났음. 전분류 및 히드록시메틸셀룰로오스는 상대적으로 FSC의 강도를 낮추었음 (그림D-12)



그림D-11. 하이드로콜로이드 첨가에 따른 FSC의 절단 단면



그림D-12. 하이드로콜로이드 첨가에 따른 FSC의 강도 비교

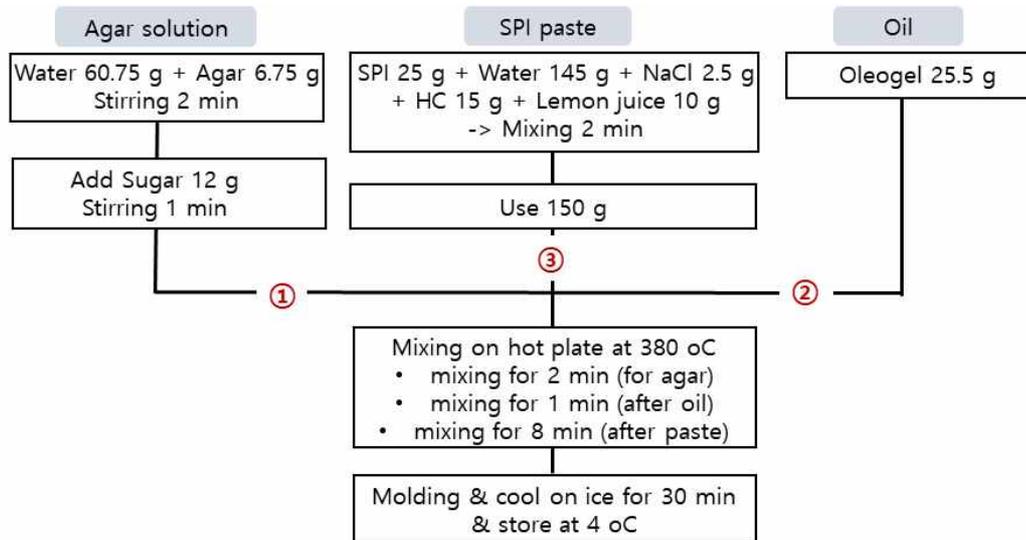
[2차년도: 식물성 치즈대체품 3종의 물성 개선]

1. 연구개발 수행과정

1) 식물성 블록치즈 물성 개선

① 하이드로콜로이드를 이용한 SPI 식물성 블록치즈 대체품의 물성 개선

- SPI와 식물성유지를 이용한 식물성 블록치즈 제조공정은 그림 D-13에 나타내었으며, 물성 개선을 위해 하이드로콜로이드(HD)의 종류 및 양을 변경하였으며, 식물성 유지로는 팜유 혹은 야자유를 사용하였음.
- 식물성 블록치즈의 물성 개선에 사용한 하이드로콜로이드로는 타피오카 전분, 선믹스-T, 아세틸 아디페이트 전분(acetylated distarch adipate), 히스록시프로필 메틸 셀룰로오스(hydroxypropyl methyl cellulose, HPMC), k-카라기난(k-carageenan, k-CGN), 로커스트 콩 검(locust bean gum, LBG), 구아 검(guar gum, GG)를 사용하였음.
- 하이드로콜로이드 단독 첨가 시료의 경우 전분 및 HPMC는 SPI paste 제조 시 15 g을 첨가하였고, k-CGN, LBG, GG은 전분 대비 0.75X를 사용하였음.



그림D-13. SPI와 야자유를 이용한 식물성 블록치즈 대체품 제조 공정

② Transglutaminase 처리에 따른 물성 개선

- SPI 25 g 기준 물 145 g과 transglutaminase 1.7 g (1% w/w))를 넣고 섞은 후, 55 °C에서 30, 60, 및 90 min 동안 두어 반응을 시켰음. 핫 플레이트를 이용하여 90 °C에서 10 min 동안 가볍게 저으면서 가열하여 효소를 불활성화 시켰음.
- 효소 불활성화 과정을 거친 SPI paste를 이용하여 식물성 블록치즈를 배합하고, 틀에 부은 후 4°C에서 저장한 후, 물성분석기를 이용하여 시료의 물성을 분석하였음.
- Transglutaminase의 활성 검증을 위해 SPI 용액에 1% transglutaminase를 첨가한 후 시간대별로 시료를 채취하고, SDS-PAGE 분석을 통해 분석하였음. SDS-PAGE gel의 농도는 13%를 사용하였음.

③ 골드클로렐라 소재를 이용한 식물성 블록치즈 대체품 제조

- SPI paste 제작 시 골드클로렐라를 20, 30, 50 g을 첨가한 후 2분간 혼합 후 SPI paste를 제조하였음.

- 식물성 블록치즈 배합을 틀에 붓고 4°C에서 저장한 후, 물성분석기를 이용하여 시료의 물성을 분석하였음.

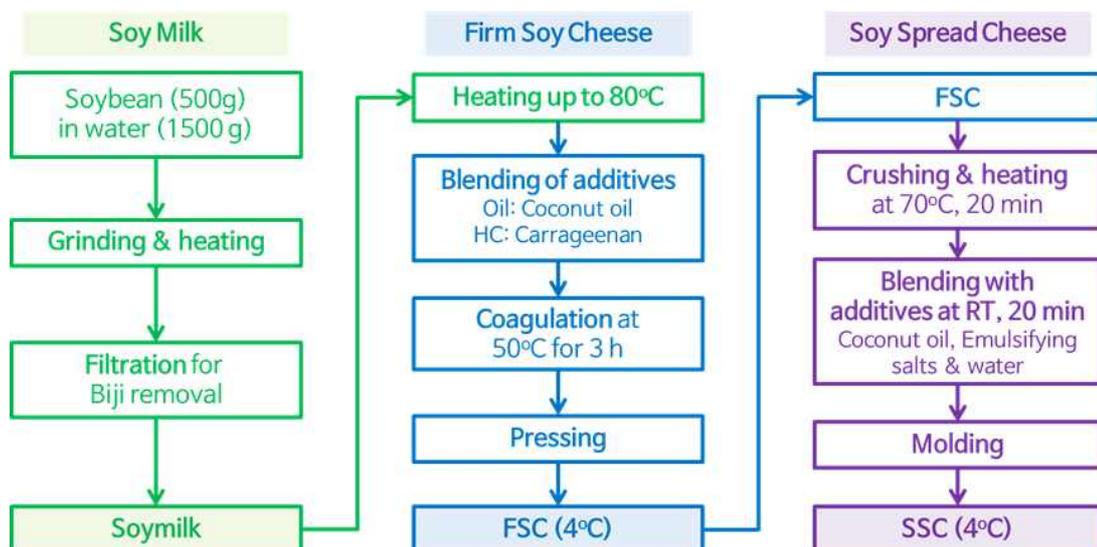
④ 식물성 블록치즈 대체품의 텍스처 분석

- 개발된 식물성 블록치즈 대체품의 텍스처 분석을 위해 Texture analyzer (TA-XT plus, Stable Micro Systems, Surrey, UK)를 사용하여 texture profile analysis를 실시하였음.
- Texture profile analysis: 프로브는 실린더 타입(D : 50 mm x H : 10 mm)를 이용하여 프로브의 하강속도는 분당 10 cm, 변형율은 최대 60%까지로 설정하였음. 시료의 크기는 17 x 17 x 17 (mm)가 되도록 절단하여 분석하였음.

2) 식물성 스프레드 치즈 대체품이 물성 개선

① 백테콩을 이용한 식물성 스프레드치즈 대체품 제조 공정 (그림D-14)

- 콩을 하루 동안 상온에서 불린 후, soybean : water = 150:1500 (1X soymilk) 비율로 soymilk 제조 후 거름망을 이용하여 비지를 제거한 후, soymilk를 확보하였음.
- 두유를 중탕 가열하여 두유의 품온을 70°C 이상 가열하고, coconut oil 37.5 g 및 3%(w/v) 카라기난 용액 50 g(1X Oil&CGN)을 넣고 혼합하고 균질화 하였음. 이를 균질화한 formulated soymilk라고 명명하였음.
- 균질화한 formulated soymilk 400 mL 당 GDL 용액을 넣어주고 응고 후 두부틀에 넣고 1 kg 무게로 압착하여 성형하였음. 이렇게 제조된 시료를 firm soy cheese (FSC)라고 명명함.
- FSC 200 g을 기준으로 coconut oil 20 g (1x oil), emulsifying salt 4 g 및 물 4 g을 넣고 혼합하여 성형틀에 담은 후 4°C에서 균혀 최종 스프레드 제품을 제조하였음. 이 단계의 시료를 Soy Spread Cheese (SSC)라고 명명하였음.



그림D-14. 식물성 블록치즈 대체품 생산 공정

② 단백질 함량 증가에 따른 강도 개선

- 동물성 스프레드치즈 시판제품 기준 hard type 제품에 대한 물성을 만족하는 대체품의 경도와 발림성 개선을 위해 기준 soymilk(1X soymilk) 및 콩 300 g을 1.5 L 물로 제조한 2X soymilk를 이용하였음.

- Formulated soymilk 제조 시 기준양 (1X Oil&CGN) 또는 2배(2X Oil&CGN; coconut oil 75 g, 6%(w/v) 카라기난 용액 50 g)을 넣고 혼합하였음.
- 균질화한 formulated soymilk 400 mL 당 GDL 용액을 기준양(1X, 15.6% GDL 용액 6 g), 1.5X, 2X, 2.5X 및 3X를 사용하거나, 레몬즙을 기준양(1X, 47 g), 0.5X, 및 0.25X를 넣어주어 응고과정을 거친 후 FSC를 제조하였음.
- FSC 100 g을 기준으로 coconut oil 10 g (1X Oil) 또는 20 g (2X Oil)과 emulsifying salt 2 g 및 물 2 g을 넣고 혼합하여 SSC를 제조하였음(그림 D-15).

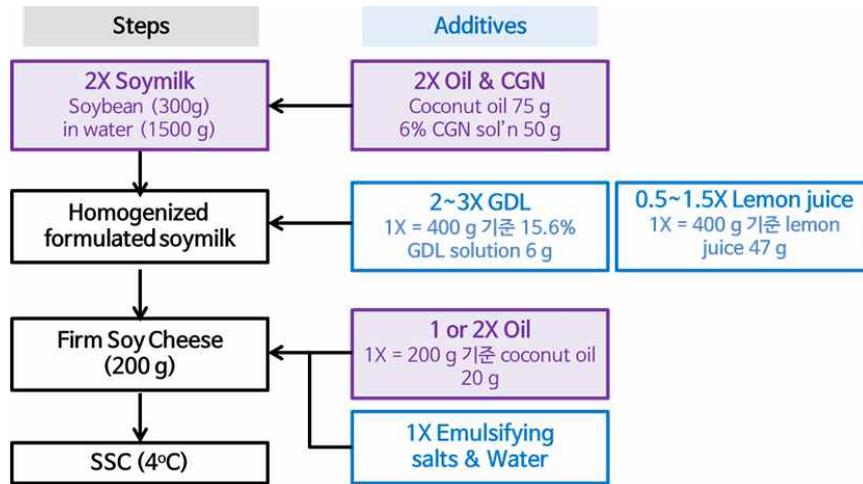


그림 D-15. 고경도(high hardness) 식물성 스프레드치즈 대체품 제조 공정

③ 시판 스프레드 치즈 제품 및 식물성 대체품의 물성 분석

- 식물성 스프레드치즈 제품의 기준 물성 결정을 위해 시판 스프레드치즈 6개를 구매하여 puncture test를 통해서 경도(hardness) 및 spreadability test를 통한 발림성 (spreadability)과 부착성(adhesiveness)를 측정하였음.
- Functure test: Texture Analyzer를 이용하였으며, 프로브는 Rod 타입(D : 5 mm)를 이용하였음. 프로브의 하강속도는 분당 10 cm, strain은 60%로 설정하였음.
- Spreadability test: Texture Analyzer를 이용하였으며, 프로브는 Corn 타입(D: 32 mm; H: 16 mm)를 이용하였음. 프로브의 하강속도는 분당 10 cm, tool separation은 5 mm로 설정하였음.
- 시료의 동적 점탄성(G', G'')을 분석하기 위해 rheometer (Discovery HR-2 hybrid rheometer, TA instrument, New castle, DE, USA)를 사용하여 frequency-sweep test를 실시함. 40 mm parallel plate 가 사용되었으며, frequency는 0.1에서 10 Hz, strain은 0.1%, 그리고 온도는 25°C를 유지하였음.

3) 식물성 디핑 치즈 대체품의 제조를 위한 원료 탐색

① 식물성 원료 탐색

- 식물성 디핑치즈 개발을 위한 식물성 주원료로 4 종의 식물성원료(분리대두단백(SPI), 농축대두단백(SPC), 분리완두단백(PPI), 그리고 캐슈넛분말(CNF))를 사용하였음.
- 단백질원과 물, 전분, salt, 및 레몬즙을 첨가한 후 혼합하고 단백질 응고를 위한 열처리 후 냉각하여 반고체형 이멀전을 제조하였음. 초기 기본 배합비 탐색을 위한 배합 비율은 표 D-9에 나타내었음.

표D-9 식물성 반고체형 이멀전 겔 제조를 위한 성분 배합표

(Unit : g)

	SPI 5%	SPI 10%	SPC 5%	SPC 10%	PPI 5%	PPI 10%	CNF 20%	CNF 40%
SPI*	25	50	-	-	-	-	-	-
SPC**	-	-	25	50	-	-	-	-
PPI***	-	-	-	-	25	50	-	-
CNF****	-	-	-	-	-	-	100	200
Water					500			
Salt					5			
Tapioca starch					30			
Lemon juice					20			
Paste					300			

*SPI : Soy protein isolate **SPC : Soy protein concentrate ***PPI: Pea protein isolate ****CNF : Cashew nut flour

② 식물성 이멀전겔의 경화 및 상분리 개선을 위한 단백질 및 하이드로콜로이드 탐색

- 상분리 개선의 효과를 보인 로코스트 콩 검과 구어검을 포함하는 식물성 이멀전겔을 아래 표D-10와 같이 제조하고 RVA를 이용하여 온도에 따른 점도 변화를 관찰하였음.
- Brookfield viscometer (모델명 DV2T): Spindle은 HB-05를 사용하였으며, 회전 속도는 200 rpm, 1분간 점도 변화를 측정하였음.
- 만들어진 식물성 이멀전 겔을 40C에서 하루동안 보관한 후 저장직후 및 상온에서 1시간 방치 후의 흐름성 변화를 관찰하였음.

표D-10. 물성 이멀전겔의 경화 및 상분리 개선을 위한
식물성 반고체형 이멀전 겔 성분 배합표

(Unit : g)

	10% SPI + 0.8% Locust	10% SPC + 0.8% Locust	10% PPI + 0.8% Locust	10% SPI + 0.5% Guar	10% SPC + 0.5% Guar	10% PPI + 0.5% Guar
SPI*	2.55	-	-	2.55	-	-
SPC**	-	2.55	-	-	2.55	-
PPI***	-	-	2.55	-	-	2.55
Locust bean gum	0.2	0.2	0.2	-	-	-
Guar gum	-	-	-	0.13	0.13	0.13
Water	25.25	25.25	25.25	25.32	25.32	25.32

*SPI: soy protein isolate **SPC: soy protein concentrate ***PPI: pea protein isolate

③ 시판 스프레드 치즈 제품 및 식물성 대체품의 물성 분석

- 동물성 디핑치즈 시판 제품을 3종 (KODANO 사, RICOS 사, IAM 사 제품)을 구입하여 물성실험을 진행하였음.

- Brookfield viscometer (모델명 DV2T): Spindle은 HB-05를 사용하였으며, 회전 속도는 200 rpm, 1분간 점도 변화를 측정하였음.
- Rheometer (모델명 , Discovery HR-2 hybrid rheometer): Shear-rate sweep test의 경우 40 mm parallel plate 프로브를 사용했으며, shear rate는 0.01-1000/s로 설정하고 25°C에서 측정하였음. Frequency sweep test의 경우 동일한 프로브를 이용하여 25°C 조건하에서 0.1-10 Hz의 frequency, 0.1% 변형율(strain)을 가하여 실험하였음.

2. 연구개발 수행내용

1) 식물성 블록치즈 물성 개선

① 캐슈넛 분말을 이용한 식물성 블록치즈 대체품과 상용 블록치즈 제품간의 물성 분석

- 제조된 시료에 대한 강도 및 외형적 특성 분석 결과를 토대로 식물성 원료로서 SPI 및 CNF를 선정하였고, 강도 제어를 위해 agar gum 및 candelilla wax 기반 oleogel를 활용한 배합비를 결정하였음.
- 개발된 2 가지의 식물성 고체형 겔 제품과 시판되는 블록타입 치즈 5종 (1차년도) 및 6종 (2차년도)에 대한 경도 test를 통해 식물성 고체형 겔의 물성과 상호 비교하였음(그림 D-16A).
- SPI와 CNF 기반 시료의 물성 분석 시 SPI 시료가 좀 더 높은 강도를 보였고, CNF 시료는 좀 더 치즈와 유사한 외형을 보여줌. 1차년도에서 비교한 5종의 시판 동물성 치즈제품과 경도 비교 시, SPI 기반 시료가 시판 제품 압축경도의 83.6% 수준이었음(그림 D-16B 파란박스).
- 그러나 2차년도에 제품의 수를 늘려 얻은 시판 치즈의 물성을 분석한 결과 1차년도에 분석한 시료 1-3번까지의 물성이 평균 대비 너무 낮은 값을 나타내었음(그림 D-16A 파란박스). 또한 제품 11의 경우 너무 높은 경도를 나타내어 시판 치즈의 물성을 대변하는데 무리가 있다고 판단하고, 제품 4-10까지의 평균값을 식물성 블록치즈 대체품의 목표물성으로 설정하였음.
- 새로 설정된 시판치즈의 물성과 비교했을 때 SPI 고체 겔의 압축경도가 37.3%에 불과하였음(그림 D-16B 붉은 박스)

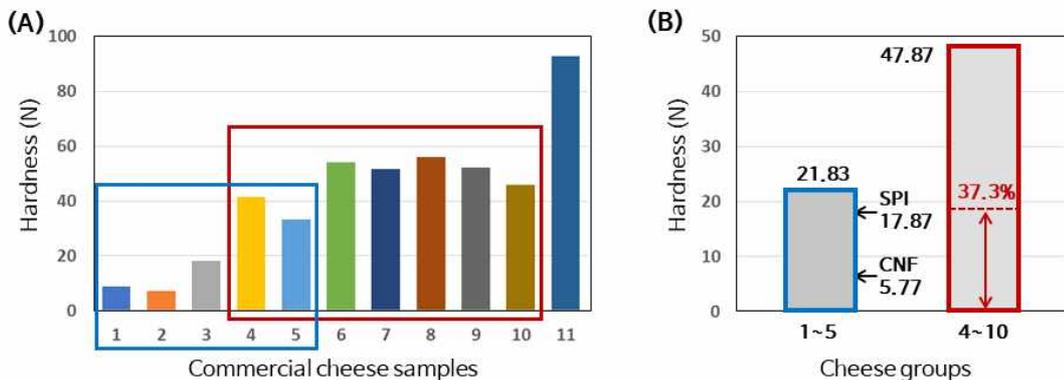


그림 D-16. (A) 동물성 블록치즈 시판 제품의 경도 분석, (B) 동물성 블록치즈 시판 제품 경도 평균값 대비 SPI 및 캐슈넛분말을 이용한 식물성 블록치즈 대체품의 경도 비교

② SPI 식물성 블록치즈 제조를 위한 SPI의 전처리 및 식물성 oil 선정

- 앞선 연구에서 얻은 시료의 경우 물성이 시판치즈에 비해 많은 차이를 나타냈으며, 캐슈

넷 분말의 경우 안정적인 수급에 문제가 있으며, 고체형 겔의 강도 개선을 위해 사용한 Oleogel의 경우 아직까지 상용화에 문제가 있어서 SPI를 기본 식물성 단백질로 선정하고, Oleogel 대신 식물성 오일을 사용하며 하이드로콜로이드를 이용하여 물성 개선을 이루는 방향으로 전환하였음.

- 기존 SPI를 이용한 고체형 겔 제조 공정(그림 D-1)과 캐슈넛 분말을 이용한 식물성 블록 치즈 대체품 제조공정(그림 D-2)을 수정하여 SPI를 이용한 식물성 블록치즈 대체품 제조 공정을 수립하였음(그림 D-13).
- 수용성이 낮은 SPI의 gel 형성을 용이하게 하기 위해 10%(wt/v)으로 침지한 후 고체형 겔을 제조하였으나 침지 이전과 경도의 차이가 발견되지 않았음. 따라서 공정의 편리성을 위해 침지 없이 진행하기로 결정하였음(그림 D-14A).
- 식물성 유지의 경우 팜유나 야자유를 사용한 시료에서 크게 경도 개선이 발견되지는 않았으나 야자유를 사용한 시료가 oleogel을 사용한 기존 시료에 비해서 경도가 소폭 개선되어 야자유를 선택하였음 (그림 D-14B)

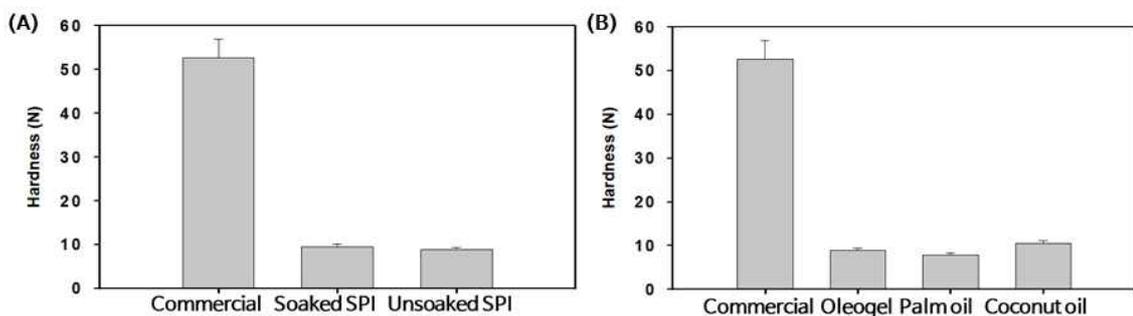


그림 D-14. (A) SPI 전처리에 따른 경도 변화; (B) 식물성 오일에 따른 경도 변화

③ 하이드로콜로이드 첨가에 따른 SPI 식물성 블록치즈 대체품의 물성 분석

- SPI와 야자유를 하이드로콜로이드에 의한 블록치즈 대체품 제조 시 전분류 및 HPMC의 경우 기존 타피오카 전분양 대비 동일양 (1X = 15 g)을 첨가하였음. 반면 카라기난 류의 경우 SPI paste의 물성이 지나치게 경화되어 타피오카 전분 대비 0.75X를 첨가하였으며, BF-100의 경우 경도가 지나치게 높아서 실험에서 제외하였음.
- 경도의 경우 k-카라기난만이 시판 제품의 경도 기준에 적합(경도 기준값 대비 113%)하였으며, 전분류 및 HPMC는 매우 약한 경도값을 나타내었음(그림 D-15A).
- 부착성(adhesiveness)의 경우 기존 시판 제품에 비해서 전분 및 HPMC를 사용한 시료는 높게 나왔으며, 특히 HPMC에 의한 점착성 강화(기존 시료 대비 386%)가 특징적이었음. 반면 카라기난을 사용한 시료에서는 점착성이 시판 제품에 비해 매우 낮게 측정되었음(그림 D-15B).
- 응집성(cohesiveness)의 경우 HPMC를 사용한 시료가 시판치즈 대비 109%의 응집성을 보였으나 다른 시료는 모두 낮은 값을 보였음(그림 D-15C).
- 상기 결과로부터 식물성 치즈대체품의 경도 개선을 위해서는 k-카라기난을 사용하는 것이 유리하지만 부착성은 낮추는 단점이 있음. 이러한 단점은 부착성을 증가시키는 HPMC 또는 전분류와의 혼합 처리를 통해 개선할 수 있을 것으로 예상하였음.

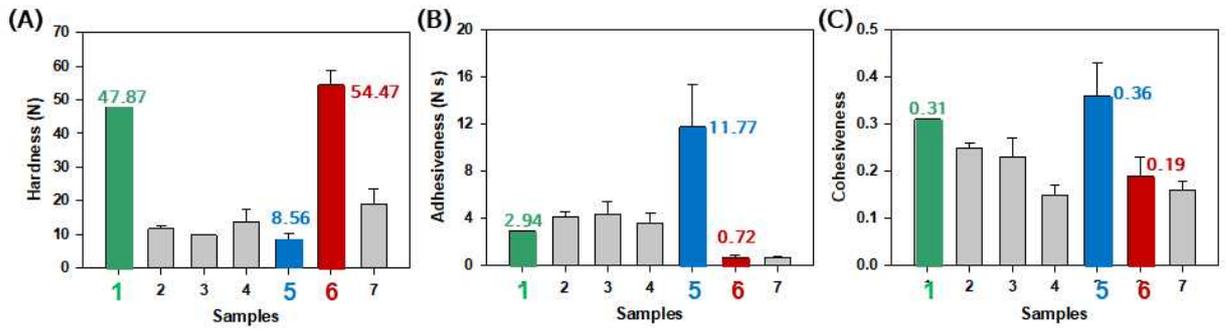


그림 D-15. 하이드로콜로이드 전량 교체에 따른 블록치즈 대체품의 물성 분석 결과. (A) 경도; (B) 부착성; (C) 응집성. 1, 상용 블록치즈 제품의 평균 물성 값; 2, tapioca starch; 3, Sunmix-T; 4, acetylated distarch adipate ; 5, HPMC; 6, k-carrageenan; 7, i-carrageenan

④ 하이드로콜로이드 혼합 사용에 따른 SPI 식물성 블록치즈 대체품의 물성 분석

- k-카라기난 만 사용한 시료 대비 낮은 경도를 보인 전분류와 HPMC를 혼합 사용 시 치즈 대체품의 경도를 낮추는 기능을 하였으며, 가장 낮은 경도를 보인 HPMC 혼합 사용(K+H)가 가장 낮은 경도를 나타내었음(그림 D-16A).
- 부착성의 경우 단일 사용 시 가장 높은 부착성을 나타낸 HPMC가 혼합 사용 시에도 높은 값을 나타내었으나, k-카라기난의 영향으로 값은 크게 내려와 상용치즈의 점착성과 비교에서 133.8% 수준으로 낮아졌음(그림 D-16B).
- 응집성의 경우 단독사용 시 HPMC가 가장 높았으나 혼합 사용 시 가장 낮았고, 전분 첨가 시료의 경우 k-카라기난 단독 사용 시료와 비교 시 차이를 나타내지 않았음(그림 D-16C).

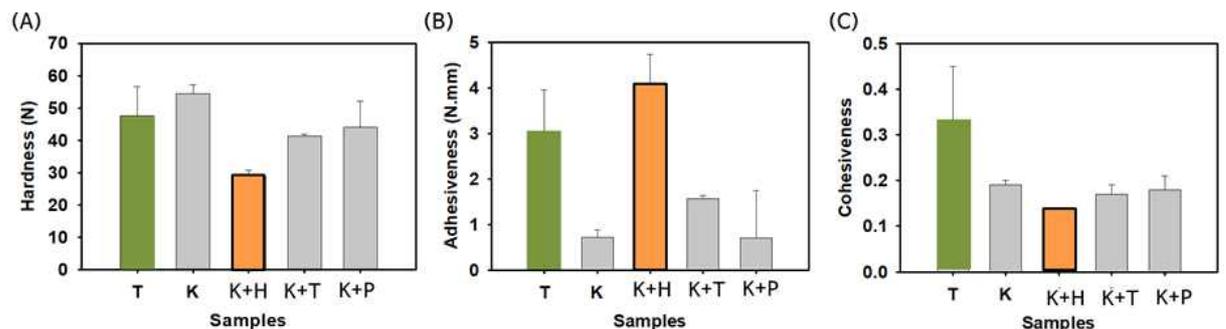


그림 D-16. k-카라기난 기반 하이드로콜로이드 추가 사용에 따른 식물성 블록치즈 대체품의 물성 분석 결과. (A) 경도; (B) 점착성; (C) 응집성. T, 상용 블록치즈 제품의 평균 물성 값; K, k-carrageenan(0.75X); K+H, k-carrageenan + HPMC(3.75 g); K+T, k-carrageenan + Tapioca starch(3.75 g); K+P, k-carrageenan + Potato starch(3.75 g)

- 상기 결과로부터 k-카라기난을 주요 경도 개선 하이드로콜로이드로 첨가한 SPI 식물성 블록치즈 대체품에 HPMC의 양을 조절하면 강도와 점착성을 조정할 수 있을 것으로 판단하였음.
- k-CGN을 첨가한 SPI 식물성 블록치즈 대체품에 Adhesiveness를 높일 수 있는 HPMC를 농도별로 첨가하여 0.75X k-카라기난과 HPMC (0, 1.5, 2, 2.5, 3, 및 3.75 g)을 섞어서 물성을 비교하였음.
- 이전 실험(그림 D-15A)에서와는 달리 k-카라기난 단독첨가 시료의 경도가 경도 시판치

즈 경도 평균값의 68%로 낮게 측정되었으며, HPMC가 첨가될수록 경도값이 낮아지는 이유로 목표 물성치에 비해 낮게 측정되었음(그림 D-17A).

- 부착성(adhesiveness)의 경우 HPMC를 첨가할수록 증가하였으며, HPMC 3.5 g 첨가하면 시중 제품의 부착성을 맞출 수 있을 것으로 예상함. 하지만 HPMC를 3.5 g 첨가하면 경도의 약화가 예상되므로 경도 개선을 위해 BF-100 카라기난과 같이 경도 개선에 영향이 큰 소재를 소량 첨가함으로써 조정해야 할 것으로 판단함(그림 D-17B).
- 응집성(Cohesiveness)의 경우 HPMC를 첨가하면 감소하였고, 특이하게 첨가하는 양에 상관없이 거의 동일한 값을 나타내었음(그림 D-17C).

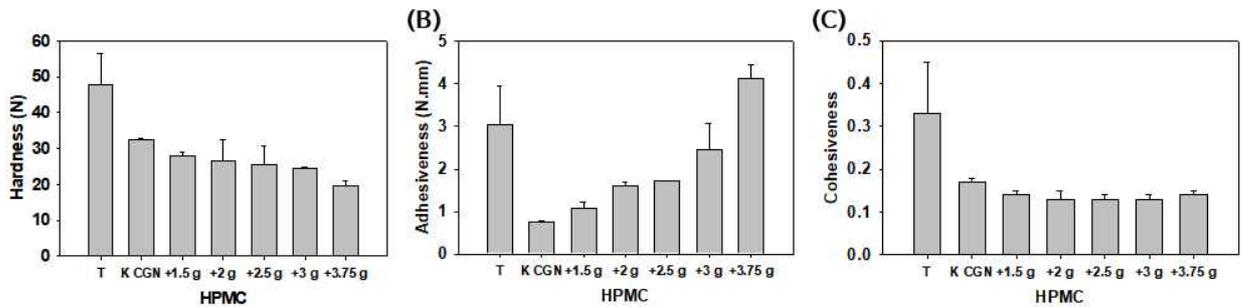


그림 D-17. HPMC 첨가 농도에 따른 k-카라기난 기반 식물성 블록치즈 대체품의 물성 분석 결과. (A) 경도; (B) 부착성; (C) 응집성. T, 상용 블록치즈 제품의 평균 물성 값; K, k-carrageenan (0.75X); +1.5 g, K+H, K + 1.5 g HPMC; +2 g, K+H, K + 2 g HPMC; +2.5 g, K+H, K + 2.5 g HPMC; +3 g, K+H, K + 3 g HPMC; +3.75 g, K+H, K + 3.75 g HPMC

⑤ Transglutaminase 처리에 따른 식물성 블록치즈 물성 개선

- 응집성을 개선하기 위해서는 소재보다 단백질간의 가교형성반응을 촉매하는 transglutaminase 처리를 통해 개선하는 방향을 수립하였음.
- 응집성을 개선하기 위해 transglutaminase (TG) 처리 후 제조된 식물성 블록치즈 대체품의 물성을 분석하였으나 반응시간 별로 물성 변화가 크게 나타나지 않았음. (그림 D-18)

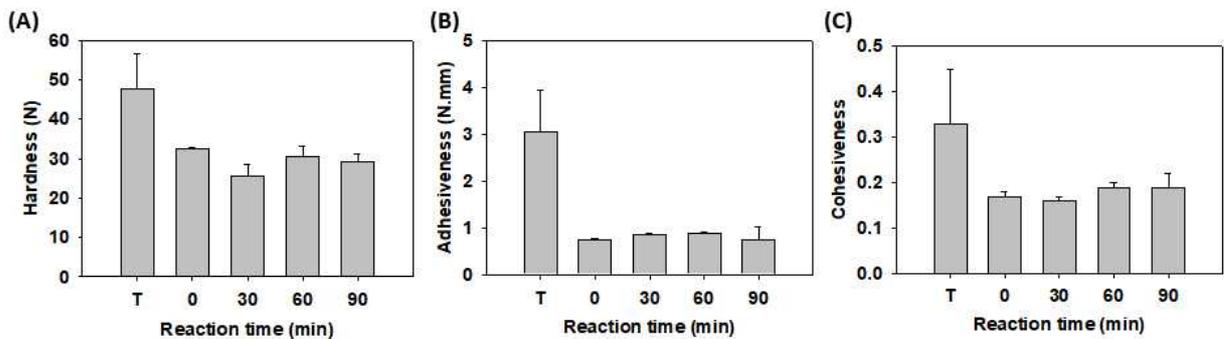
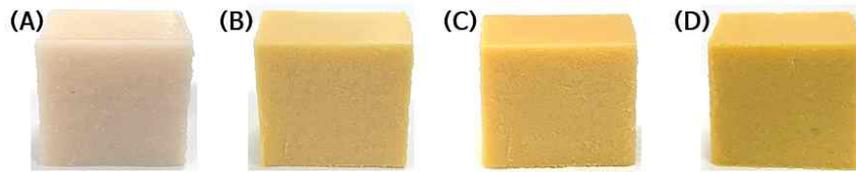


그림 D-18. Transglutaminase 처리에 따른 시간 별 k-카라기난 기반 식물성 블록치즈 대체품의 물성 분석 결과. (A) 경도; (B) 부착성; (C) 응집성. T, 상용 블록치즈 제품의 평균 물성 값; 0, 효소 미 처리; 30, 효소 처리 30분; 60, 효소 처리 60분; 90, 효소 처리 90분

⑥ 단백질 함량 증대를 위한 단백질 소재 추가

- 시판 블록치즈제품의 경우 단백질 함량이 13-15% 수준이나 식물성 블록치즈 대체 시료의 경우 단백질 함량이 7.45% 수준임. 단백질 함량의 증대를 위해서 (주)대상의 황금클로렐라 (단백질 함량 60% 이상)을 첨가한 시료를 제작하였음.
- 첨가량이 증가할수록 노란색 색상이 진해지면서 블록치즈와 유사한 색을 나타냈으며(그림 D-19), 황금클로렐라 50 g을 추가적으로 첨가하더라도 제조공정상에서 점도 증가 등

의 변화가 나타나지 않았기 때문에 단백질 함량 증가를 위한 적절한 소재로 판단됨.



그림D-19. 골드클로렐라 첨가에 따른 식물성 블록치즈 대체품 외형. (A) k-카라기난 첨가 식물성 치즈 대체품(control, 단백질 함량 7.45%); (B) 황금클로릴라 20 g 첨가 시료 (단백질 함량 10.4%); (C) 30 g 첨가 시료 (단백질 함량 11.7%); (D) 50 g 첨가 시료 (단백질 함량 14.5%)

- 골드클로렐라를 첨가하면 경도는 감소하고, 점착성은 증가하며, 응집성은 감소하나 사용 양에 민감하지 않는 HPMC가 나타내는 경향과 동일하였음(그림 D-20).

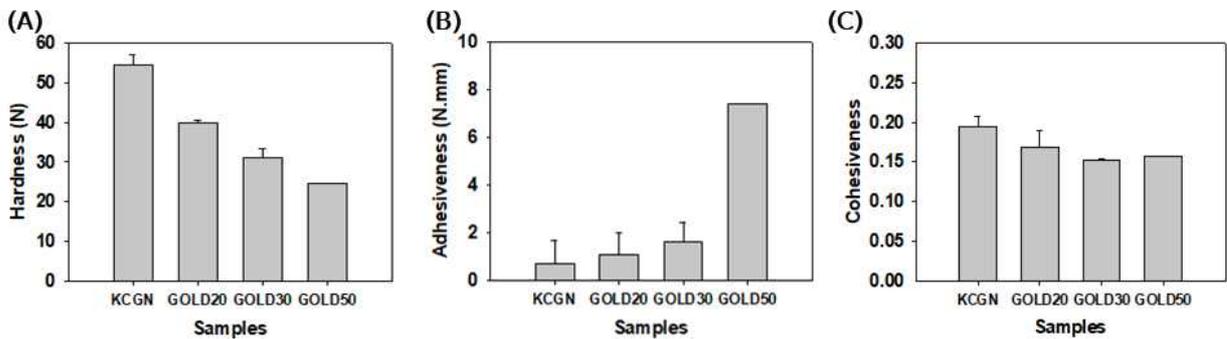


그림 D-20. HPMC 첨가 농도에 따른 k-카라기난 기반 식물성 블록치즈 대체품의 물성 분석 결과. (A) 경도; (B) 점착성; (C) 응집성. KCGN k-카라기난 첨가 식물성 치즈대체품(control); GOLD20, 황금클로릴라 20 g 첨가 시료; (C) GOLD30, 황금클로릴라 30 g 첨가 시료; (D) GOLD50, 황금클로릴라 50 g 첨가 시료

2) 식물성 스프레드치즈 대체품의 물성 개선

① 경도 강화를 위한 단백질 함량 증가에 따른 SSC 물성 변화

- 시판 스프레드치즈 제품 중 경도가 강한 “고경도 스프레드 치즈제품”에 상응하는 경도를 가지는 식물성 스프레드치즈 대체품의 개발을 목적으로 2X soymilk(300 g soybean in 1.5 L water)를 사용하였으며, 1차 oil과 카라기난 첨가후 균질화를 거친 formulated soymilk 400 g 기준 15.6% GDL 용액 6 g을 기준양(1X)으로 하여 2배(2X), 3배(3X)의 GDL을 첨가한 후 FSC를 제조하고, 이를 이용하여 제조한 SSC에 대한 물성분석을 실시하였음.
- 1X soymilk를 사용한 경우 1X GDL 첨가만으로도 FSC가 효과적으로 만들어졌으나, 2X soymilk를 사용한 경우 1X 및 1.5X GDL 첨가로는 FSC 제조가 용이하지 않았으며, 2X 이상의 GDL를 첨가한 경우만 FSC를 제조할 수 있었음. 그러나 이를 이용해 제조한 SSC의 모든 물성치가 고경도(high hardness) 시판 스프레드치즈 제품에 비해 매우 낮았음.(그림 D-21)

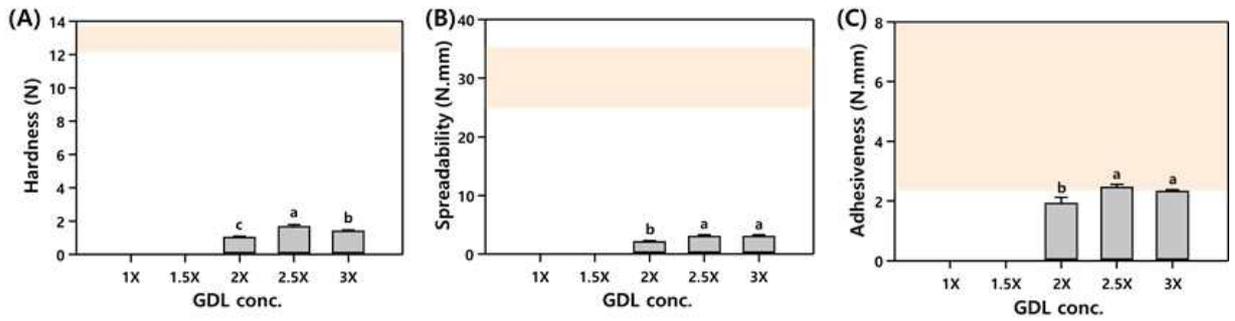


그림 D-21. GDL 함량에 따른 2X soymilk 사용 시 SSC(1X oil&CGN in 1st step + 1X oil in 2nd step)의 물성 변화. (A) 경도, (B) 발림성, (C) 부착성

- GDL을 이용한 단백질 응고는 GDL에 의한 pH 감소가 원인인 것으로 알려져 있음. 2X soymilk 사용 시 단백질 응고가 잘 일어나지 않는 이유를 찾기 위해 시간에 따른 soymilk 응고액의 pH 변화를 관찰하였음.
- 1X soymilk의 경우 GDL의 농도 의존적으로 시간에 따른 pH 감소가 관찰되었음. 반면 2X soymilk의 경우 반응 3시간 후 최종 pH가 1X soymilk의 최종 pH에 비해 높았으며, pH의 감소가 원활하지 못하였음(그림 D-22).
- 따라서 2X soymilk의 경우 GDL 첨가에 따른 pH 감소가 원활히 이루어지지 못함에 따라 단백질 응고가 잘 진행되지 않은 것으로 판단하였음.

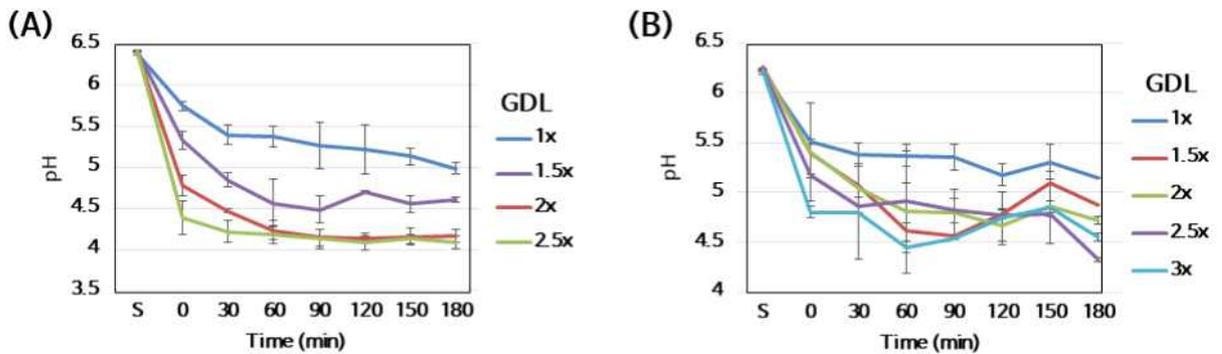


그림 D-22. GDL 함량에 따른 응고과정 중 soymilk pH 변화. (A) 1X soymilk, (B) 2X soymilk

- 약한 경도를 강화하기 위해서 지방함량을 늘리고자 하였으며, 이로 인해 FSC 내 지방 회수율에 기여하는 k-CGN의 요구량도 늘어날 것으로 예상하였음. 따라서 FSC 제조 시(1st step) 아자유와 k-CGN의 양을 2배로 늘려주고, SSC 제조 시(2nd step) 첨가하는 아자유 양을 1X 또는 2X 첨가하여 제조한 SSC의 물성을 비교하였음(그림 D-23).

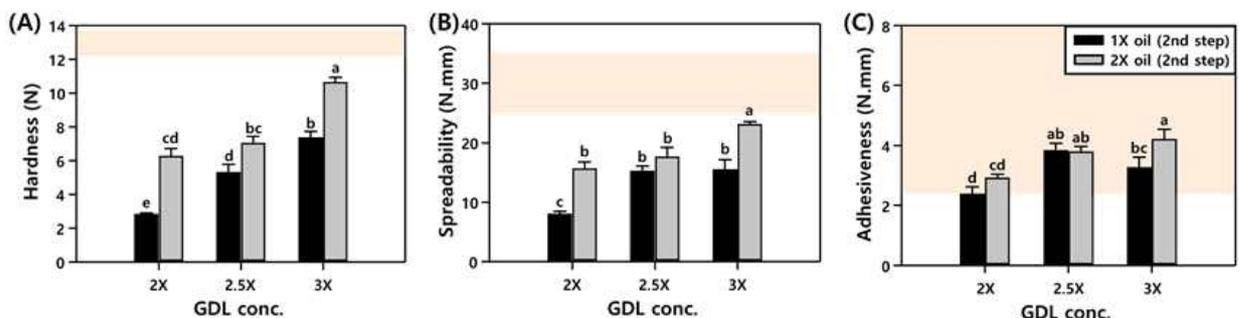


그림 D-23. GDL, 아자유 및 k-CGN의 함량 변화에 따른 2X soymilk 사용 시 SSC의 물성 변화. (A) 경도, (B) 발림성, (C) 부착성. Black bars, SSC(2X oil&CGN in 1st step + 1X oil in

2nd step); gray bars, SSC(2X oil&CGN in 1st step + 2X oil in 2nd step)

- 그림 D-23에서 보여지는 바와 같이 지방함량의 증가는 모든 물성치의 증가를 유도하였으나, 부착성을 제외한 경도 및 발림성은 여전히 고경도 시판 스프레드치즈 제품 대비 낮았음.

② 유기산을 응고제로 사용한 SSC의 물성 변화

- 상기 결과처럼 단백질 함량이 높은 경우 GDL을 이용하여 제조한 SSC의 물성이 고경도 스프레드치즈 제품 대비 너무 낮은 값을 나타내므로 이를 개선하기 위해 산 응고제로 유기산을 사용하였음.
- 유기산으로는 레몬즙(주로 구연산 함유)을 사용하였으며 400 g의 균질화된 formulated soymilk를 기준으로 47 g을 기준양(1X)으로 하여 0.25X(11.75 g), 0.5X(23.5 g)을 사용하였음.
- 그림 D-24에서 볼 수 있듯이 1X 및 2X soymilk에서 pH 변화가 안정적으로 이루어짐을 확인하였음. 단백질 함량이 높을수록 동일한 레몬즙 처리 조건에서 응고 후 최종 pH가 높았는데, 이는 단백질에 의한 완충효과 때문으로 예상됨.

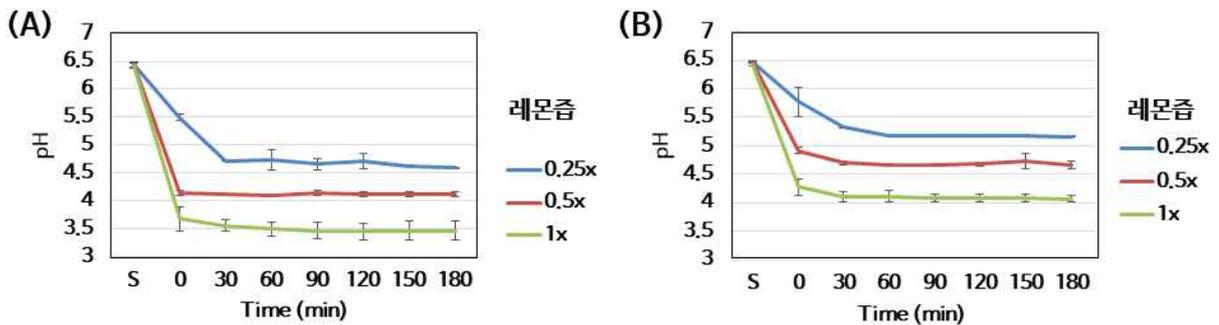


그림 D-24. 유기산 함량에 따른 응고과정 중 soymilk pH 변화. (A) 1X soymilk/1X Oil&CGN/1X Oil; (B) 2X soymilk/1X Oil&CGN/1X Oil

- 유기산에 의한 안정적인 pH 감소를 확인하고 유기산을 응고제로 1X 및 2X soymilk를 이용하여 SSC를 제조하였음.
- 레몬즙의 함량을 달리하여 1X soymilk를 이용하여 제조한 SSC의 경우 2X soymilk를 이용하고 야자유와 k-CGN 함량이 증가한 SSC(2X oil&CGN in 1st step + 2X oil in 2nd step)와 거의 유사한 물성 경향을 나타내었음(그림 D-25).

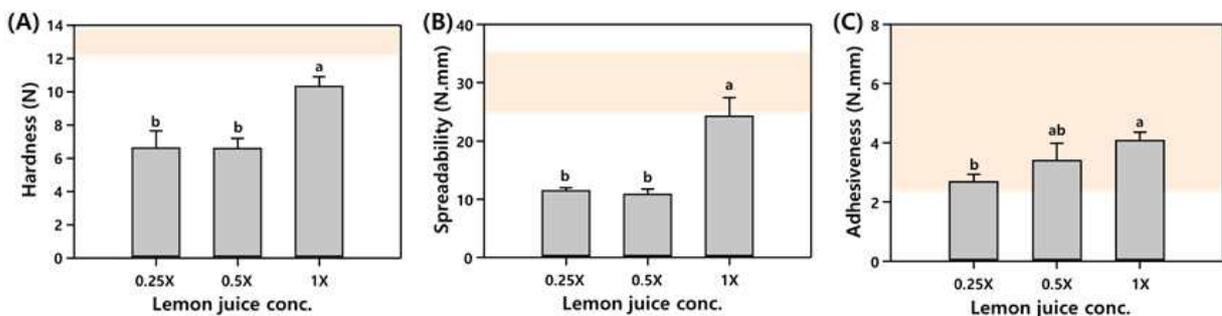


그림 D-25. 유기산 함량에 따른 1X soymilk로 제조한 SSC(1X oil&CGN in 1st step + 1X oil

in 2nd step)의 물성 변화. (A) 경도, (B) 발림성, (C) 부착성

- 2X soymilk를 이용하여 동일한 실험을 진행한 결과 GDL의 경우와 마찬가지로 낮은 농도의 레몬즙을 첨가한 경우 FSC가 만들어지지 않았으며, 0.5X 이상의 레몬즙을 첨가한 경우에만 FSC가 형성되어 SSC를 제조할 수 있었음.
- SSC의 물성 역시 1X soymilk를 사용한 경우보다 낮은 값을 나타내었음 (그림 D-26).

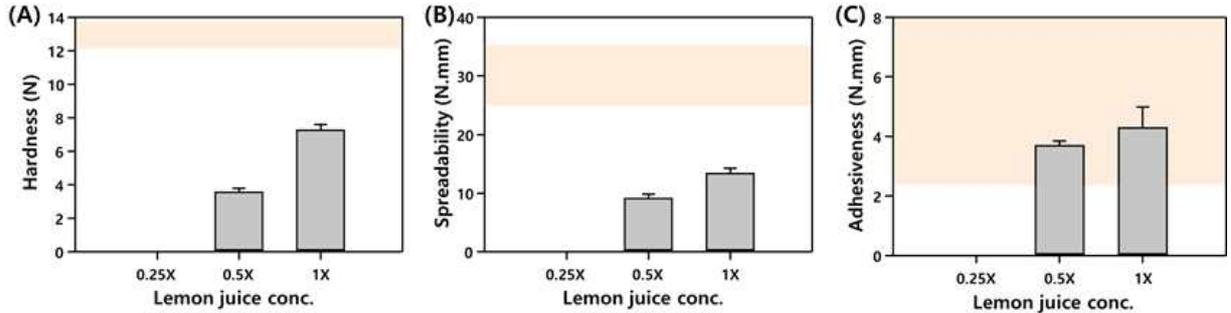


그림 D-26. 유기산 함량에 따른 2X soymilk로 제조한 SSC(1X oil&CGN in 1st step + 1X oil in 2nd step)의 물성 변화. (A) 경도, (B) 발림성, (C) 부착성

- 따라서 GDL의 경우와 같이 지방함량의 증가에 의해 물성 개선이 예상되었고, 2X soymilk를 사용하고 FSC 제조 시(1st step) 야자유와 k-CGN의 양을 2배로 늘려주고, SSC 제조 시(2nd step) 첨가하는 야자유를 1X 또는 2X 첨가하여 제조한 SSC의 물성을 비교하였음
- 지방함량 증가에 따른 물성 개선 효과가 나타났으며, 2X oil&CGN in 1st step + 2X oil in 2nd step 제조 공정을 통해 제작된 SSC의 물성이 보다 고경도 시판 스프레드치즈 대체품과 유사하였음 (그림 D-27).

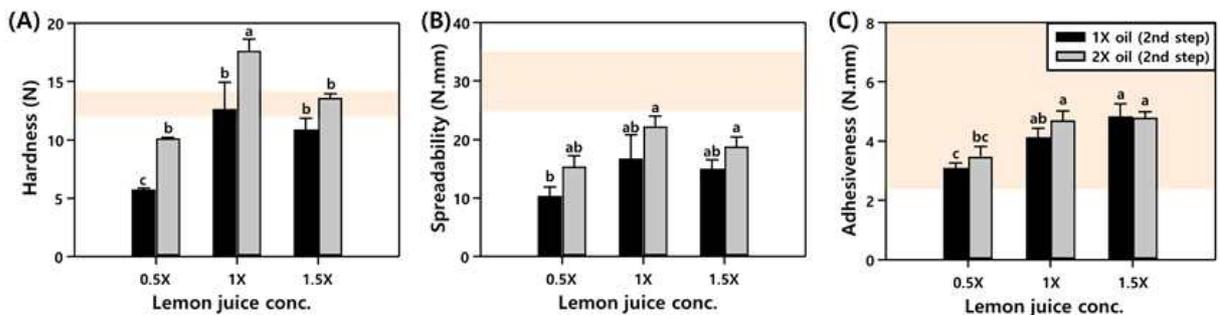


그림 D-27. 유기산, 야자유 및 k-CGN의 함량 변화에 따른 2X soymilk 사용 시 SSC의 물성 변화. (A) 경도, (B) 발림성, (C) 부착성. Black bars, SSC(2X oil&CGN in 1st step + 1X oil in 2nd step); gray bars, SSC(2X oil&CGN in 1st step + 2X oil in 2nd step)

- 결론적으로 경도 강화 식물성 스프레드치즈 대체품을 개발함에 있어 soymilk 내 단백질 함량의 증가가 필수적이며, 이로 인해 FSC 형성 시 보다 많은 양의 산 응고제를 요구하였으며, 산 응고제로는 유기산이 GDL 보다 유리하며, 오일 함량의 증가를 통해 물성 강화를 유도할 수 있음을 확인하였음.
- 또한 2X soymilk/ 1.5X lemon juice/ 2X oil & CGN in 1st step/ 2X oil in 2nd step의 공정을 통해 제조된 SSC가 가장 고경도 시판 스프레드치즈 제품의 물성과 유사하였으며, 경도 강화 식물성 스프레드치즈 대체품의 경도, 발림성, 및 부착성이 각각 13.59 N,

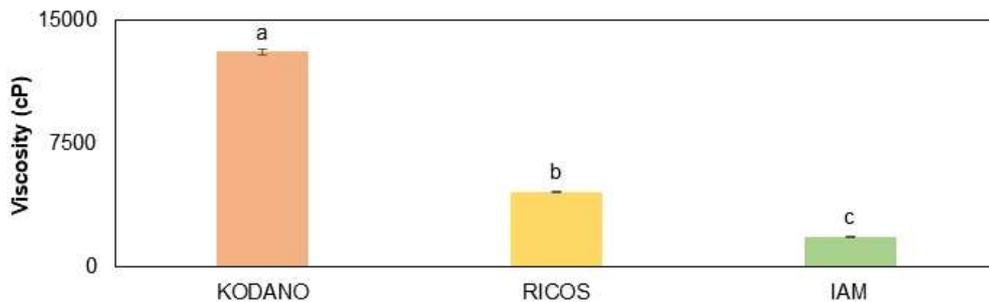
18.84 N·mm, 및 4.80 N·mm로 고경도 시판 스프레드치즈 제품의 평균 물성 대비 각각 104%, 62%, 및 93.3%를 나타내었음.

3) 식물성 디핑 치즈 개발을 위한 원료 탐색

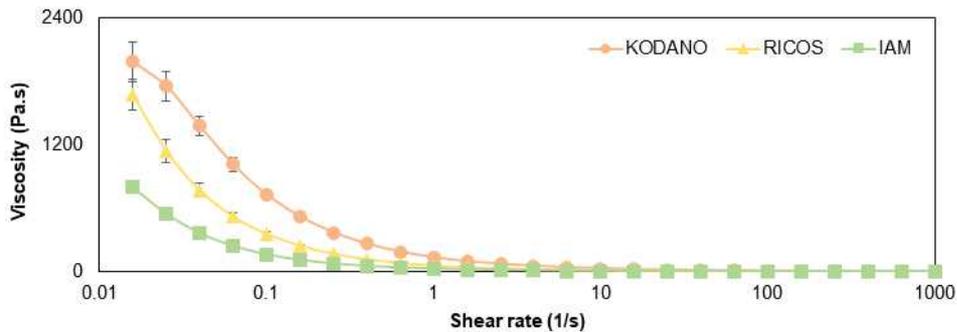
① 시판 디핑치즈 물성 분석

- 총 3개의 제품을 대상으로 viscometer를 이용한 점도 실험, rheometer를 이용한 shear-rate sweep test를 통한 점도 실험, 및 frequency sweep test를 통한 G' , G'' , 및 $\tan\delta$ 를 결정하였음.

- KODANO가 가장 높은 점도를 보였고, 3개 치즈 모두 shear-thinning 형태(shear rate 증가에 따른 점도 감소)의 유동 특성을 나타내었음(그림D-28, D-29).



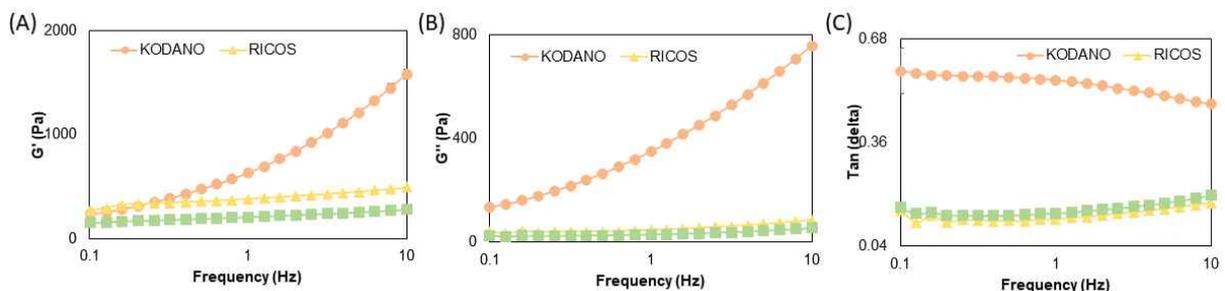
그림D-28. Brookfield viscometer를 이용한 점도 결과



그림D-29. Rheometer를 이용한 shear-rate sweep test 결과

- Frequency sweep test를 통한 점탄성 실험에서도 KODANO의 경우 다른 2개의 제품에 비해 높은 점탄성으로 흐름성을 거의 나타내지 않았음(그림D-30).

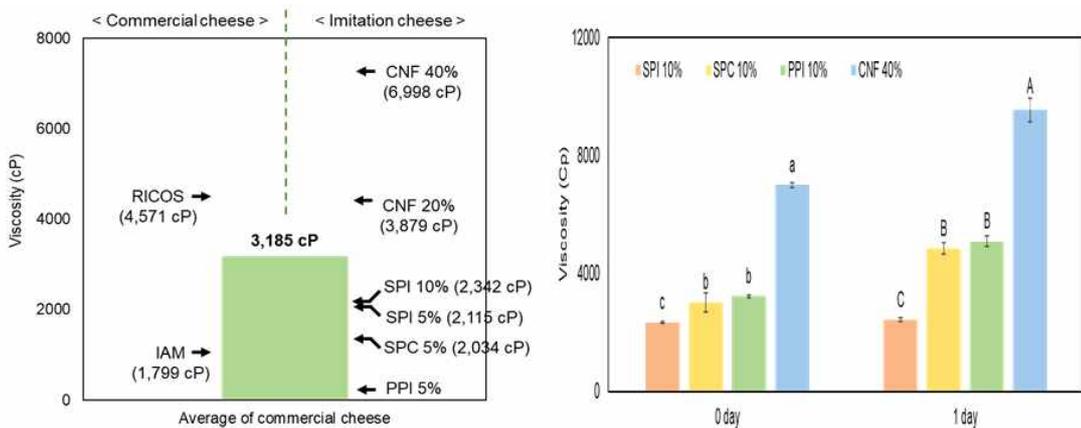
- 따라서 식물성 디핑치즈 대체품의 기준 물성을 설정함에 있어서 KODANO 제품은 제외하고 다른 2개의 제품의 평균값으로 설정하였음.



그림D-30. Rheometer를 이용한 frequency sweep test 결과. (A) 점탄성 중 탄성을 나타내는 G' ; (B) 점탄성 중 점성을 나타내는 G'' ; (C) $\tan\delta$ 의 변화

② 식물성 단백질 종류 및 사용량에 따른 반고체형 이멀전 물성 분석

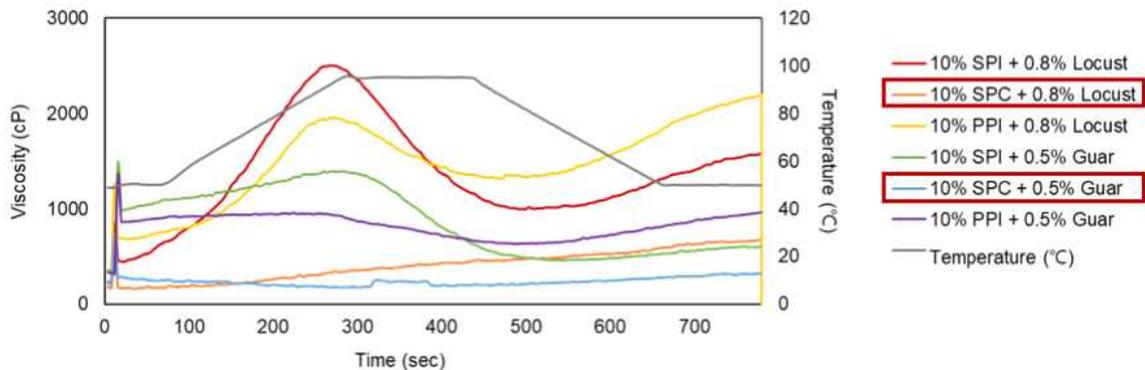
- 표D-9 배합비율에 따라 제조한 반고체형 이멀전의 점도를 측정한 결과 단백질 종류 및 사용량에 따라 다양한 범위의 점도를 가지는 제품을 제조할 수 있음을 확인하였음(그림 D-31).
- 제조 직후 SPI, SPC, PPI 5 내지 10% 사용 시료의 점도는 2000-2300 cP로, IAM과 RICOS 제품의 평균 점도인 3,185 cP의 65-75% 수준의 점도를 나타내었음(그림D-31A).
- 하지만 저장 중 상 분리가 일어나고, 젤화되어 점도가 크게 증가하는 문제점이 발견되었음(그림D-31B). 따라서 제품의 상분리 및 젤화 현상을 억제하기 위한 소재 탐색이 요구됨.



그림D-31. 식물성 단백질을 이용한 반고체형 이멀전의 물성 분석 결과 (A) Viscometer를 이용한 점도 비교; (B) 저장 중 반고체형 이멀전의 점도 변화

③ 단백질 및 하이드로콜로이드 별 겔화/상분리 특성 분석

- 제품의 상분리를 막기 위해 하이드로콜로이드를 첨가하였고, RVA를 이용 가열 후 냉각과정에서의 점도 상승을 통해 겔형성 성질 비교하였음(그림D-32).
- 하이드로콜로이드 중 locust bean gum(LBG)과 guar gum(GG)이 가열 후 냉각 시 겔형성 정도가 가장 낮았으며(Data not shown), 사용량은 LBG 0.8%, GG 0.5%가 적절하였음.
- 배합 후 가열 및 냉각에 따른 점도 분석 시, SPC (soy protein concentrate)가 가장 낮은 점도를 보였으며, 가열에 따른 점도 변화가 미비하였음



그림D-32. 단백질과 하이드로콜로이드 별 식물성 이멀전의 온도에 따른 겔화 특성 분석 결과

- 표D-10에 나타낸 레시피에 식물성 단백질 종류별(SPI, SPC, PPI)로 hydrocolloid(LBG

[3차년도 : 식물성 치즈 대체품 3종의 물성 개선 및 기능성 평가]

1. 연구개발 수행과정

1) 식물성 고체치즈의 이화학적 특성 분석 및 Prebiotics 기능성 평가

① 물성 개선을 위한 하이드로콜로이드 재탐색

- 식물성 블록치즈 대체품의 응집성 개선을 목적으로 하이드로콜로이드를 재차 선발하였으며, 제조공정 및 분석은 2차년도 블록치즈 제조 및 분석법과 동일함.

② 식물성 블록치즈 대체품의 일반성분 분석

- 수분함량은 MA 160 infrared moisture analyzer (Sartorius, Göttingen, Germany)를 이용하여 측정하였음.
- 조단백 함량은 Kjeltac protein analyzer (Kjeltac™ 8100, Foss, Hillerod, Denmark)을 이용하여 측정하였으며, % nitrogen과 % crude protein은 각각 아래의 식 1과 식 2로 계산하였음.

$$\text{Nitrogen, \%} = [(V_s - V_b) \times N \times 14.007 \times 100] / W \quad \text{-----} \quad (\text{식 1})$$

(V_s 및 V_b , 각각 시료와 blank의 적정에 사용된 HCl 부피(mL); N , HCl 용액의 노르말 농도; W , 시료의 무게(mg)).

$$\text{Crude protein, \%} = \text{Nitrogen (\%)} \times \text{factor} \quad \text{-----} \quad (\text{식 2})$$

(식물성 블록치즈 대체품 및 시판 블록치즈의 factor= 각각 5.71 and 6.38)

- 조단백 함량은 ST 243 Soxtec solvent extraction system (FOSS)를 이용하여 측정하였으며, % Crude Fat은 아래의 식 3을 이용하여 계산하였음.

$$(\text{추출된 지방이 담긴 추출컵의 무게} - \text{추출컵의 무게}) / (\text{시료의 무게}) \times 100 \quad \text{---} \quad (\text{식 3})$$

③ 식물성 블록치즈 대체품의 water holding capacity(WHC) 분석

- 각 시료 10 g을 Whatman No.1 filter paper로 싼 후 50 mL centrifuge tube에 담고, 1,600×g, 4°C 조건에서 15분간 원심분리하고, filter paper의 무게를 달아서 흡수된 물의 양을 측정하였음.
- WHC는 아래 식 4에 따라서 계산하였음.

$$\text{WHC, \%} = ((W_t - W_r)) / W_t \times 100 \quad \text{-----} \quad (\text{식 4})$$

(W_t , 원심분리 이전 시료의 무게 (g), W_r , 원심분리 후 빠져나온 물의 양 (g))

④ 식물성 블록치즈 대체품의 meltability 분석

- 2 g의 시료를 test tube에 넣고 105°C에서 60분간 가열한 후 10분간 상온에서 냉각한 후 시료가 늘어난 길이를 측정하여, 하기의 식 5에 따라서 meltability를 측정하였음.

$$\text{Meltability (\%)} = L_a / L_b \times 100 \quad \text{-----} \quad (\text{식 5})$$

(L_a , 가열 후 시료의 길이 (cm); L_b , 가열 전 시료의 길이(cm))

⑤ 식물성 블록치즈 대체품의 prebiotics 기능성 분석

- 각 시료는 M. Minekus et al and L. Li 등의 방법에 따라서 in-vitro digestion을 실시 한 후, 12명의 지원자에게서 공급받은 분변과 섞은 후 배지와 혼합한 후 24시간 동안 혐기배양하였음.

- 이후 metagenome kit를 이용하여 각 배양액 유래의 metagenome을 추출한 후 16s

rRNA 분석을 통해서 분변 내 미생물의 분포를 분석하였음.

2) 유산균 발표를 통한 식물성 스프레드 치즈의 점탄성 개선

① FSC 제조 시 지방회수율 증대를 위한 하이드로콜로이드 선발

- 식물성 스프레드 치즈 대체품의 물성개선을 위해서는 지방의 첨가가 필수적이라고 판단하고 FSC 제조 시 지방 회수율 증대를 위해 하이드로콜로이드를 첨가하는 공정을 추가하고, 적합한 하이드로콜로이드를 탐색하였음.
- 지방회수율 증대를 위한 하이드로콜로이드로는 아라빅검, 펙틴, HPMC, 잔탄검, k-CGN 을 각각 3% 용액으로 제조하여 1.5 L soymilk 당 50 g을 첨가하였음.
- 식물성 스프레드 치즈 대체품 제조 공정은 그림D-14에 따라서 진행하였으며, 일반 성분 분석은 식물성 블록치즈 대체품 분석과 동일하게 실시하였음.

② 산 응고제 종류에 따른 응고 pH 별 FSC 제조

- 2차년도에 GLD과 다른 반고체 겔 형성의 특성을 나타낸 lemon juice를 citric acid와 lactic acid로 대체하여 제조하여 특성을 분석하였음.
- 응고 중 두유액의 pH를 4, 4.5, 및 5가 되도록 GDL, citric acid 및 lactic acid의 양을 조절하고 그림D-14에 나타낸 바와 같이 제조하였음.

③ 유산균 발효를 통한 식물성 스프레드치즈 대체품의 물성 개선

- 식물성 스프레드치즈 대체품의 물성 개선을 위한 유산균 발효에는 유제품용 상용 스타터인 YF-L01과 1협동에서 항비만 활성을 나타내는 *Lactobacillus plantarum* 11B02을 분양 받아 공정에 적용하였음.
- 균주는 MRS 배지에 접종한 후 2차레에 걸친 계대배양을 통해 활성형 균주를 확보하고 이를 formulated soymilk에 접종하고 pH가 4.5에 도달할 때까지 배양하였음.
- 발효과정을 거친 후 제조된 FSC를 fermented FSC (fFSC)라고 명명하였으며, fFSC를 이용하여 제조한 SSC를 fermented SSC (fSSC)라고 명명하였음 (그림 D-34).

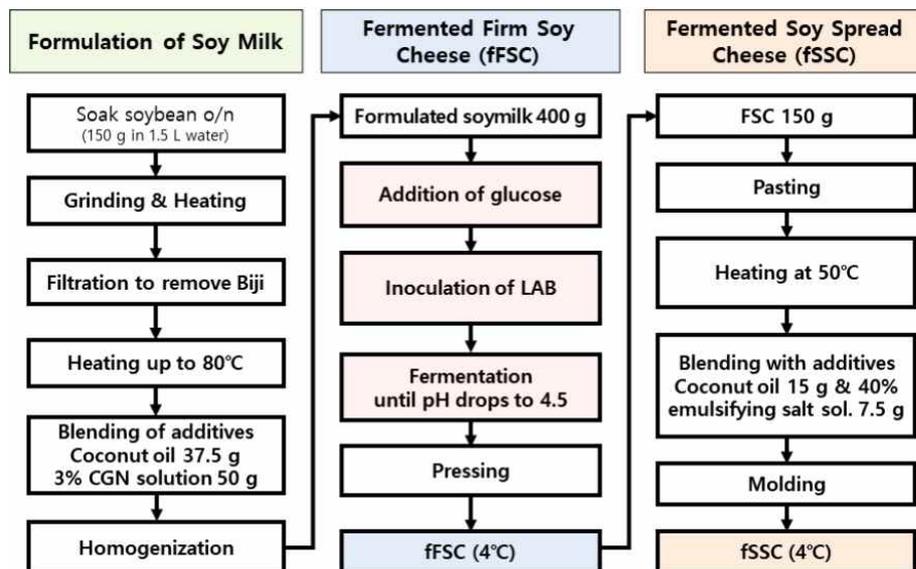


그림 D-34. 발효과정을 거치는 식물성 스프레드치즈 대체품의 제조 공정

3) 식물성 디핑 치즈 물성 개선

① 식물성 디핑치즈 제조 공정

- 4가지 단백질원(SPI, SPC, PPI, CNF)을 각각 50 g, 물 520 g, 소금 5 g, 타피오카 전분 30 g 과 섞은 후 믹서기를 이용하여 페이스트 형상이 될 때까지 혼합함. 이후 5분간 교반하며 가열 후 얼음물에서 30 min 간 냉각하여 시료를 제조하였음.
- 전분의 사용에 따른 영향을 보기 위해 두 가지 전분(tapioca, α -tapioca starch)을 3, 6%(w/w) 농도로 디핑치즈를 제조하였음.
- 이 후, 추가적인 물성 개선을 위해 세 가지의 유화제(SMS, GMS, Sugar ester) 0.14 g, PPI 2.55 g, 물 25.45 g을 70°C의 water bath에서 혼합하여 제조하였음.
- 상분리를 막기 위해 세 종류의 하이드로콜로이드 (guar gum, locust bean gum, xanthan gum)을 다양한 농도(0.2, 0.4, 1, 3%, w/w)로 적용하여 상분리에 미치는 영향을 평가하였음.
- 선택된 하이드로콜로이드를 토대로 SPC를 사용하여 식물성 단백질 함량을 높인 후 시판 치즈와 물성을 비교분석하였음.

② 식물성 디핑치즈 제품의 점도 및 점탄성 분석

- 개발된 식물성 디핑치즈 제품의 점도 분석을 위해 Brookfield viscometer (DV2T, Brookfield Engineering Laboratories, Middleboro, USA)를 사용하였으며, 프로브는 HB-05, 프로브의 회전 속도는 200 rpm으로 하여 1 min 동안 250 mL 비커에 담겨있는 시료의 점도를 분석하였음.
- 시료의 온도에 따른 점도 영향 분석을 위해 Rapid visco analyzer (RVA-4, Newport Scientific, Maryland, USA)를 사용함. 50°C에서 1 min 동안 패들이 교반 후 95°C까지 9°C/min 속도로 가열하면서 95°C에서 150 sec 간 유지한 후 다시 9°C/min의 속도로 50°C까지 온도를 강하시키고, 이후 50°C에서 1 min 간 교반하며 온도에 따른 점도 변화를 분석하였으며, 패들의 속도는 160 rpm으로 고정하였음.
- 시료의 정상유동 점도 특성은 rheometer (Discovery HR-2 hybrid rheometer, TA instrument, New castle, DE, USA)의 shear-rate sweep test를 실시하여, 40 mm parallel plate를 사용하여 25°C에서 0.01 - 1000 /s shear rate 범위로 측정하였음.
- 식물성 디핑치즈 제품의 동적 점탄성(G' , G'')을 분석하기 위해 rheometer를 사용하여 frequency- sweep test를 실시함. 40 mm parallel plate 가 사용되었으며, frequency는 0.1에서 10 Hz, strain은 0.1%, 그리고 온도는 25°C를 유지하였음.

2. 연구개발 수행내용

1) 식물성 블록치즈 물성 개선 및 prebiotics 기능성 분석

① 식물성 블록치즈 대체품의 물성 개선을 위한 하이드로콜로이드 재 탐색

- k-CGN을 주요 경도 개선 하이드로콜로이드로 선택한 SPI 식물성 블록치즈 대체품의 물성에 있어서 응집성의 개선이 요구되었음. 이를 위해 추가적인 하이드로콜로이드의 탐색이 요구되었음.
- Locust bean gum과 guar gum을 추가로 적용하여 물성을 비교한 결과, LBG를 단독 사용한 SPI 식물성 블록치즈 대체품의 경도의 경우 k-CGN을 사용한 것보다 우수한 경도를 나타내었으며, k-CGN처럼 부착성을 매우 낮추는 특성은 동일하였으나, 응집성이 k-CGN 단독 사용 SPI 식물성 블록치즈 대체품에 비해 높은 값을 나타냈으며, 시판 동물성 블록치

즈의 경도와 매우 유사한 값을 나타내었음(그림 D-35).

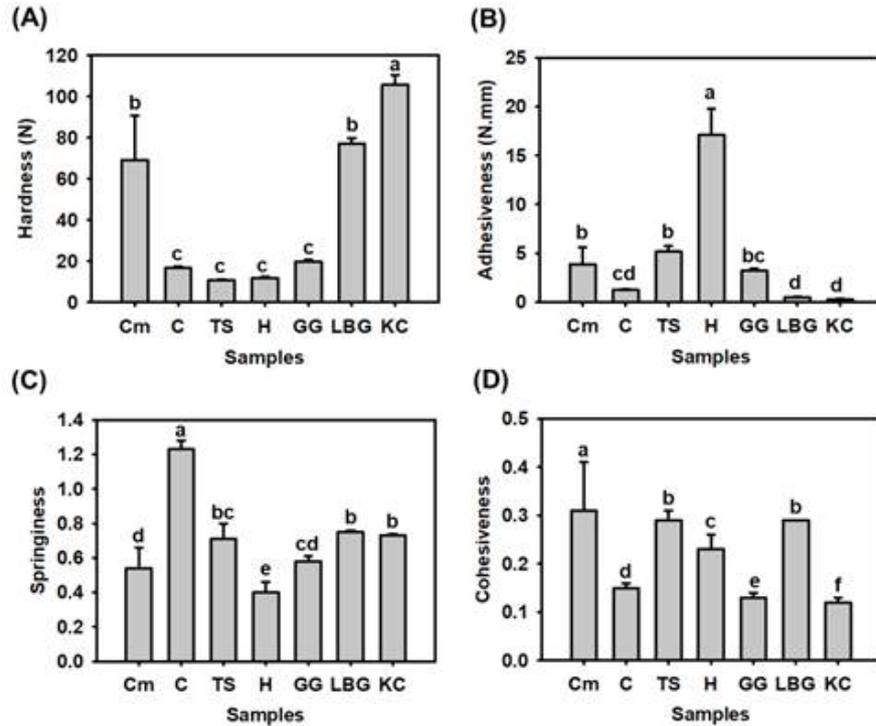


그림 D-35. 하이드로콜로이드가 첨가된 식물성 블록치즈 대체품의 물성 비교 (A) 경도, (B) 부착성, (C) 탄성, (D) 응집성. Cm: 상용 블록치즈 제품의 평균값; C, 하이드로콜로이드가 첨가되지 않은 식물성 블록치즈 대체품, TS, tapioca starch; H, HPMC; GG, guar gum; LBG, locus bean gum; KC, k-CGN

② LBG와 HPMC의 복합 사용에 따른 SPI 식물성 블록치즈 대체품의 부착성 개선

- 식물성 블록치즈 대체품의 경도 개선 하이드로콜로이드로 이전의 k-CGN을 LBG로 바꾸고 이전과 동일하게 낮아진 부착성을 HPMC를 이용하여 개선하고자 LBG 사용량을 고정하고 HPMC의 양을 변화시켜 적절한 HPMC의 양을 결정하고자 하였음.
- 앞선 실험결과에서와 같이 HPMC의 첨가는 경도를 낮추고 부착성은 높이는 효과를 나타냈음. 반면 응집성의 경우 HPMC의 첨가와 무관하게 일정한 값을 나타내었음(그림 D-36).
- 부착성에 있어서 HPMC 7.5 g 첨가한 시료가 시판 치즈 대비 100%의 물성치를 보였으나, 경도가 너무 낮아서 LBG 및 HPMC가 각각 5 g 첨가된 시료를 선택하고 부족한 경도를 k-CGN의 첨가를 통해 보완하고자 하였음.

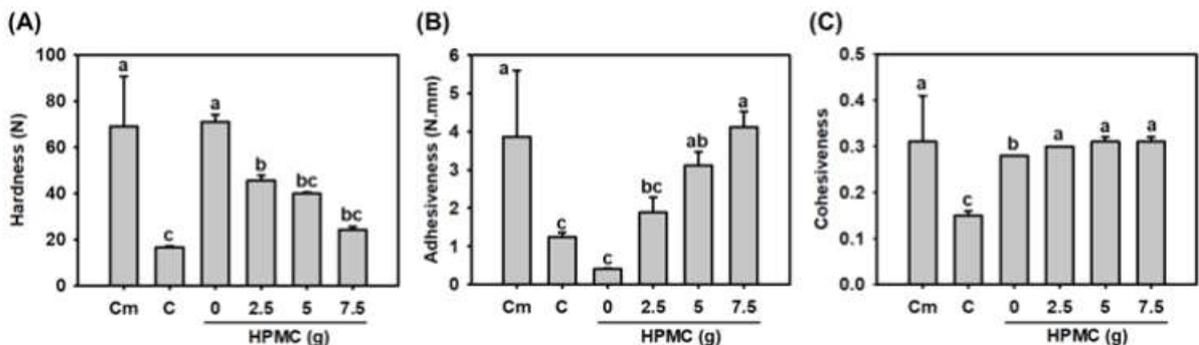


그림 D-36. HPMC 추가에 따른 LBG 첨가 식물성 블록치즈 대체품의 물성 비교 (A) 경도, (B) 부착성, (C) 응집성. Cm: 상용 블록치즈 제품의 평균값; C, 하이드로콜로이드가 첨가되지 않은

③ LBG HPMC 및 k-CGN 혼합 사용에 따른 식물성 블록치즈 대체품의 경도 개선

- LBG와 HPMC을 첨가한 식물성 블록치즈 대체품의 물성에서 경도가 상용 블록치즈 대비 낮았으며, 앞선 실험결과에서 경도 개선에 가장 좋은 효과를 나타낸 k-CGN을 첨가하여 최종 물성을 맞추고자 하였음.
- k-CGN을 첨가하면 농도 의존적으로 경도가 증가함을 확인하였으며, 부착성의 경우 소폭 감소함을 확인하였음. 반면 응집성의 경우 k-CGN 첨가에 영향을 받지 않았음(그림 D-37),
- 상기의 결과로부터 k-CGN의 첨가는 식물성 블록치즈 대체품의 경도개선에 효과적이었으며, 부착성 및 응집성에는 큰 영향을 주지 않음을 확인하였음.
- 최종적으로 LBG, HPMC, 및 k-CGN의 동시 적용을 통해 제조된 최종 식물성 블록치즈 대체품의 물성은 상용 블록치즈 제품 대비 경도, 부착성, 응집성에 있어서 108.9, 87.1, 및 96.8%에 해당하였음.

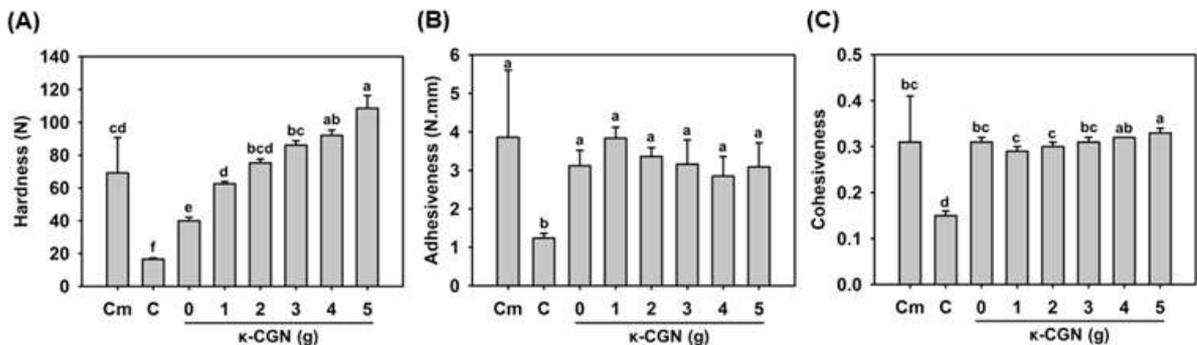


그림 D-37. k-CGN 추가에 따른 LBG-HPMC 첨가 식물성 블록치즈 대체품의 물성 비교 (A) 경도, (B) 부착성, (C) 응집성. Cm: 상용 블록치즈 제품의 평균값; C, 하이드로콜로이드가 첨가되지 않은 식물성 블록치즈 대체품

④ 최종 식물성 블록치즈 대체품의 이화학적 특성 비교

- 일반성분 분석 결과 수분함량의 경우 상용 블록치즈에 비해 7.5 배 높았으며, 지방은 4.22%, 단백질 함량은 32.46%로 나타났음(그림 D-38).
- 상기의 결과로부터 SPI 기반 식물성 블록치즈 대체품의 물성 개선을 위해 첨가한 하이드로콜로이드가 지방대체제로서의 기능을 수행하면서 지방함량이 낮은 저칼로리 제품임을 확인하였음.
- 비록 단백질 함량은 상용치즈 대비 30% 수준이었으나 기존의 단백질 강화 식물성 블록치즈 대체품 대비 3배 이상의 단백질 함량이 강화된 식물성 블록치즈임을 확인하였음.

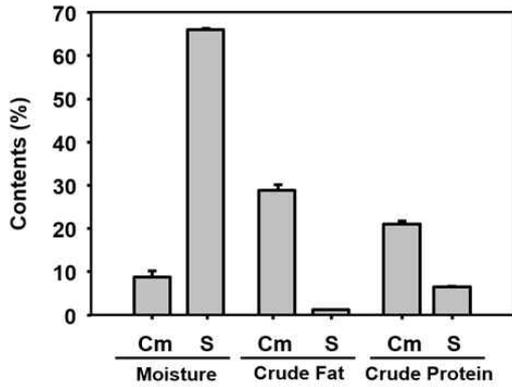


그림 D-38. 식물성 블록치즈 대체품의 일반성분 분석 결과. Cm: 상용 블록치즈 제품의 평균값; S, 최종 식물성 블록치즈 대체품

- 상용 블록치즈 제품의 경우 수분함량이 10% 미만이었으나 식물성 블록치즈 대체품의 경우 67%로 7.5 배 이상의 수분함량을 가지고 있음에도 상용 블록치즈 대비 98.32%의 WHC를 나타내어 수분이 안정적으로 단백질 겔에 존재하며 저장 중 이수현상을 우려하지 않아도 될 것으로 판단하였음(그림 D-39).
- 하이드로콜로이드의 조합을 달리하여 제조한 식물성 치즈 대체품에 대한 분석 결과 첨가한 하이드로콜로이드들이 모두 WHC 개선에 기여하였으며, 이중 HPMC의 기여도가 가장 큼을 확인하였음.

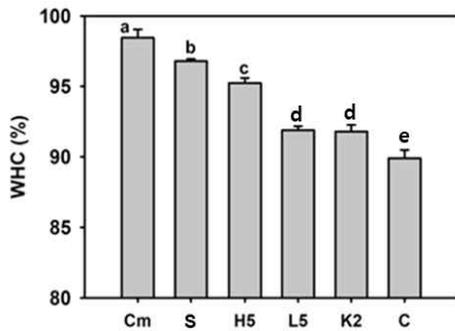


그림 D-39. 식물성 블록치즈 대체품의 water holding capacity 분석 결과. Cm: 상용 블록치즈 제품의 평균값; S, 최종 식물성 블록치즈 대체품, H5, HPMC 첨가 식물성 블록치즈 대체품; L5, LBG 첨가 식물성 블록치즈 대체품; K2, k-CGN 첨가 식물성 블록치즈 대체품; C, 하이드로콜로이드 미첨가 식물성 블록치즈 대체품

- 블록치즈 제품의 중요한 물성 중 하나인 열에 의해 녹아서 늘어나는 성질인 meltability의 경우 하이드로콜로이드 미첨가 식물성 블록치즈 대체품의 경우 agar의 열에 의한 녹는 성질로 인해 meltability가 지나치게 높았으나, 하이드로콜로이드의 첨가에 의해서 감소하였음.
- k-CGN의 효과는 가장 낮았으나, HPMC 및 LBG의 첨가에 의한 meltability의 감소가 보다 효과적이었음. 최종 식물성 치즈 대체품의 경우 상용치즈 대비 70.34%의 meltability를 보였음(그림 D-40).

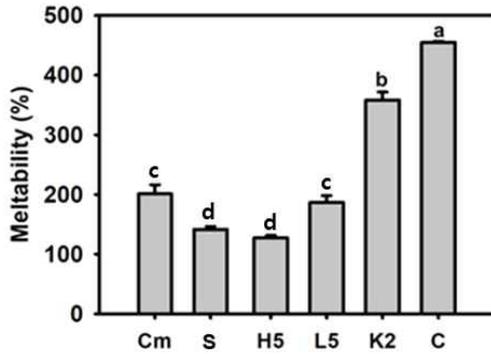


그림 D-40. 식물성 블록치즈 대체품의 meltability 분석 결과. Cm: 상용 블록치즈 제품의 평균값; S, 최종 식물성 블록치즈 대체품, H5, HPMC 첨가 식물성 블록치즈 대체품; L5, LBG 첨가 식물성 블록치즈 대체품; K2, k-CGN 첨가 식물성 블록치즈 대체품; C, 하이드로콜로이드 미첨가 식물성 블록치즈 대체품

⑤ SPI 식물성 블록치즈의 기능성 분석: prebiotics effect

- 식물성 블록치즈 대체품 첨가 배지 및 미첨가 배지에 인체 분변 시료를 넣고 혐기배양한 후 NGS를 통해 시료 첨가 여부에 따른 장내미생물 분포의 변화를 관찰하였음.
- 시료 내 미생물의 다양성을 나타내는 alpha diversity의 경우 식물성 치즈 대체품 첨가 실험군에서 비록 유의적이지 않으나 감소함을 확인하였음(그림 D-28A).
- 또한 미생물 분포 변화의 방향성을 분석하는 beta diversity의 경우 시료 첨가군에서 유의적인 증가를 나타내었음(그림 D-28B).
- 이러한 결과는 식물성 블록치즈 시료의 첨가를 통해 장내 미생물 중 특정 미생물들의 분포도가 증가함을 의미함.

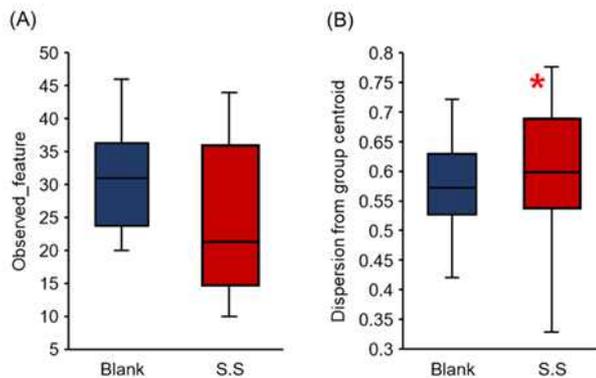


그림 D-28. 식물성 블록치즈 대체품 첨가 유무에 따른 인체 유래 분변 미생물 군총의 변화 분석 결과 (A) Alpha diversity, (B) beta diversity. * denote significant differences by T-test ($P < 0.05$). blank, 식물성 블록치즈 대체품 미 첨가군; S.S. 식물성 블록치즈 대체품 첨가군

- 어떤 미생물들이 증가했는지 알아보기 위하여 미생물 속 별로 상대적인 분포도를 분석한 결과 *Bacteroides*, *Parabacteroides*와 같은 *Bacteroidota* 속과 *Clostridium_sensu_stricto_1*, *Paenibacillus* 및 *Paraclostridium* 미생물의 감소하였으며, *Bifidobacterium*, *Faecalibacterium*, *Lactobacillus*, 및 *Subdoligranulum* 속의 미생물은 증가하였음을 확인하였음(그림 D-29).

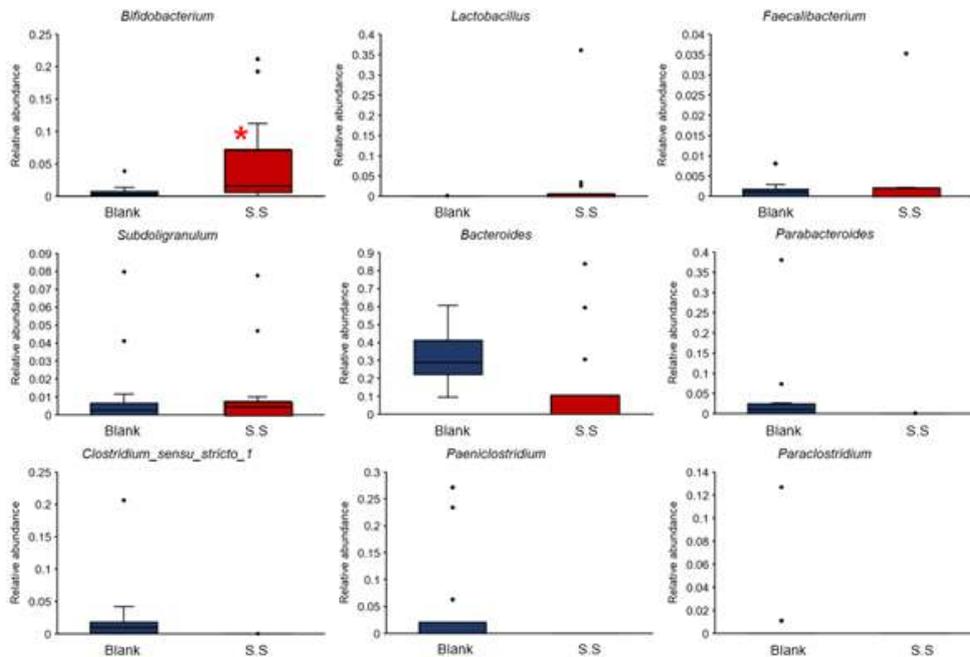
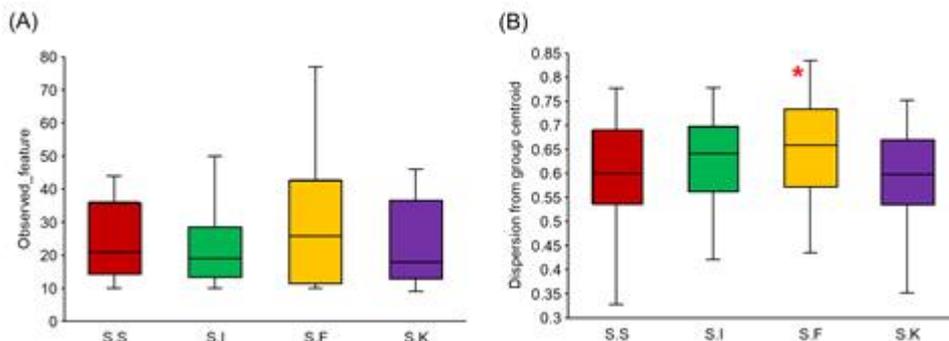


그림 D-29. 식물성 블록치즈 대체품 첨가 유무에 따른 인체 유래 분변 미생물 균의 상대적 분포도 분석 결과 * denote significant differences by T-test ($P < 0.05$). blank, 식물성 블록치즈 대체품 미 첨가군; S.S. 식물성 블록치즈 대체품 첨가군

- 특히 *Bifidobacterium* 속의 증가는 시료 첨가군이 미첨가 실험군에 비해 유의적으로 증가하였으며, 비록 유의적인 증가는 아니었으나 장내 유익균으로 분류되는 *Faecalibacterium*, *Lactobacillus* *Subdoligranulum* 속 미생물의 증가는 식물성 블록치즈 대체품이 장내 미생물의 균총을 보다 건강하게 만드는 기능을 가짐을 의미한다고 할 수 있음.

⑥ 추가적인 prebiotics 첨가에 따른 식물성 블록치즈 대체품의 기능성 강화

- 추가적인 prebiotics 기능 강화를 위해 prebiotics 활성이 검증된 inulin, 프락토올리고당 (FOS), 케스토오스(kestose)를 첨가한 식물성 블록치즈 대체품을 제조하고 prebiotics 미첨가 식물성 블록치즈 대체품과의 균총 변화를 비교하였음.
- Alpha diversity의 경우 유의적이진 않았으나 inulin과 케스토오스 첨가 대체품 군에서 감소하는 경향을 보였으며(그림 D-30A), 균총 변화의 방향성을 나타내는 beta diversity의 경우 FOS에서 유의적인 증가가 관찰되었음 (그림 D-30B).



(C)

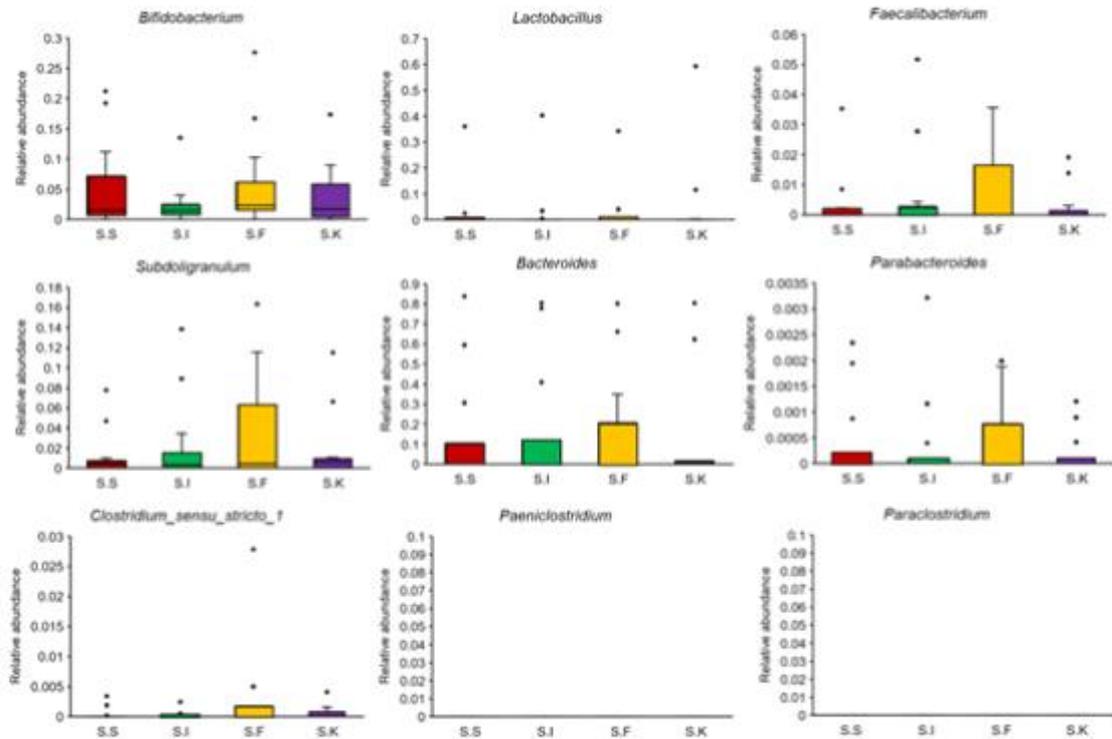


그림 D-30. 프리바이오틱스 첨가 유무에 따른 식물성 블록치즈 대체품의 인체 유래 분변 미생물 균의 변화 분석 (A) Alpha diversity, (B) beta diversity, (C) 상대적 분포도 분석 결과 * denote significant differences by T-test ($P < 0.05$). SS, 식물성 블록치즈 대체품 첨가군; S.I, inulin 첨가 식물성 블록치즈 대체품 첨가군; S.F, 플렉토올리고당 첨가 식물성 블록치즈 대체품 첨가군; S.K, stachyose 첨가 식물성 블록치즈 대체품 첨가군

- 상대적 분포도 비교에서는 prebiotics 첨가군과 미첨가군 사이에서 유의적인 차이를 보이는 미생물은 발견되지 않았으나, FOS 첨가군의 경우 유익균에 해당하는 *Faecalibacterium*와 *Subdoligranulum* 속의 증가가 관찰되었으며, 보다 많은 인체 유래 분변 시료에 대한 분석 시 유의적인 증가가 관찰될 수 있었을 것으로 예상되었음(그림 D-30C).

2) 식물성 스프레드치즈 대체품의 물성 개선

① FSC 내 지방 잔존량 분석

- 제조한 FSC의 단백질, 지질, 수분 함량을 측정하고 FSC 내 단백질 및 지질 회수율을 계산하여 야자유 첨가 이전과 이후를 비교하였음.
- 단백질 회수율은 지방을 첨가하는 것에 의해서 60%대에서 80%대를 상회하는 회수율로 향상되었음(그림 D-31A). 지방회수율 역시 지방 첨가에 의해서 회수율이 증가하였으나 넣어준 지방 함량 대비 3.4%에 불과하였음(그림 D-31B). 지방은 식물성 스프레드 치즈 대체품의 물성에 매우 중요한 지표 성분으로서 FSC 제조 시 soymilk에 첨가한 식물성 지방 야자유가 FSC 내에 거의 남지 않고 모두 whey로 빠져나갔음을 의미함.

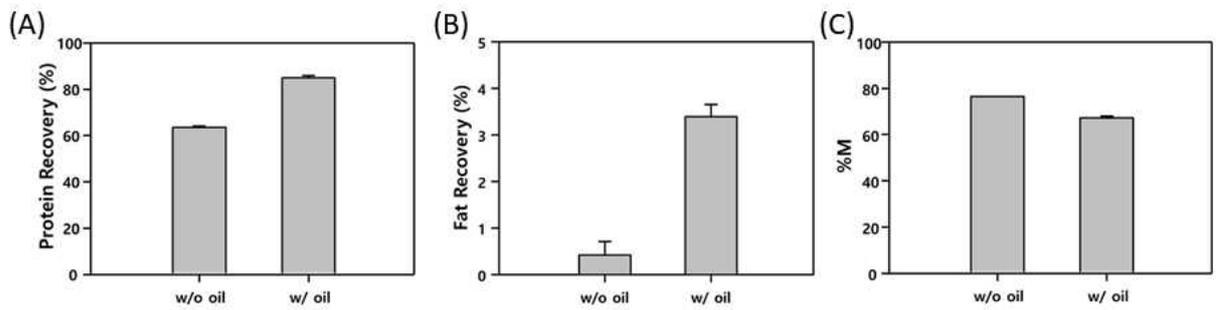


그림 D-31. 야자유 첨가 유무에 따라 제조된 FSC 내 일반성분 분석 결과 (A) 단백질 회수율, (B) 지방회수율, (C) 수분 함량

② FSC 제조 시 지방회수율 증대를 위한 하이드로콜로이드 선별

- 하이드로콜로이드의 첨가에 의해서 단백질 회수율은 모두 감소하였으나, 다른 하이드로콜로이드 첨가 FSC에서 60% 수준의 회수율을 보인 반면 k-CGN을 첨가한 FSC는 72.3%의 단백질 회수율을 나타내어 가장 우수하였음(그림 D-32A).
- 지방 회수율에 있어서는 잔탄검, k-CGN 등이 개선효과를 나타내었으며, 이중 k-CGN의 회수율이 50.6%로 첨가 이전에 비해 약 15배 가량의 지방회수율 개선효과를 나타내었음(그림 D-32B).
- 수분 함량의 경우 하이드로콜로이드 첨가에 의해서 유의적인 증가를 나타내지는 않았음(그림 D-32C).

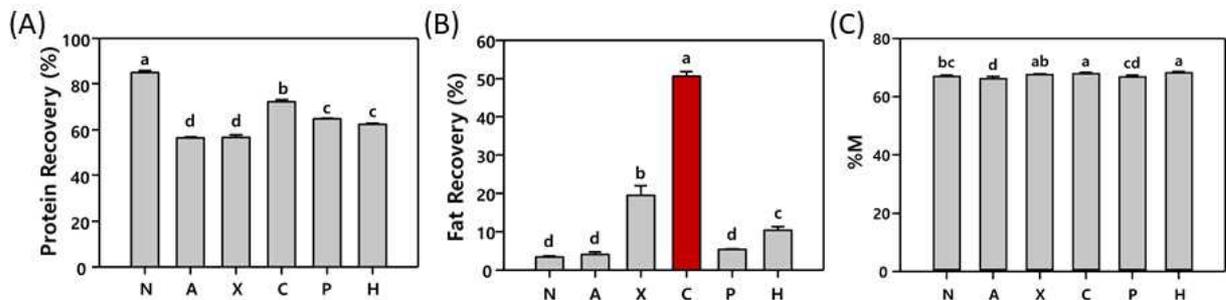


그림 D-32. 야자유가 첨가된 soymilk에 하이드로콜로이드 첨가한 후 제조한 FSC 내 일반성분 분석 결과 (A) 단백질 회수율, (B) 지방회수율, (C) 수분 함량

③ 산 응고제 종류에 따른 응고 pH 별 FSC 제조

- GDL 첨가에 의한 콩 단백질의 응고는 soymilk의 pH를 낮추어 단백질을 응고시키는 acid gelation mechanism임. 따라서 유기산에 의해서도 동일한 효과를 나타낼 수 있을 것으로 판단하고 유기산 응고제로 citric acid와 lactic acid를 선별하였음.
- 또한 단백질이 응고되는 pH에 대한 영향을 살펴보기 위하여 첨가하는 산의 양을 달리하여 최종 pH를 4.0, 4.5, 및 5.0이 되도록 조정하였음(그림 D-33).

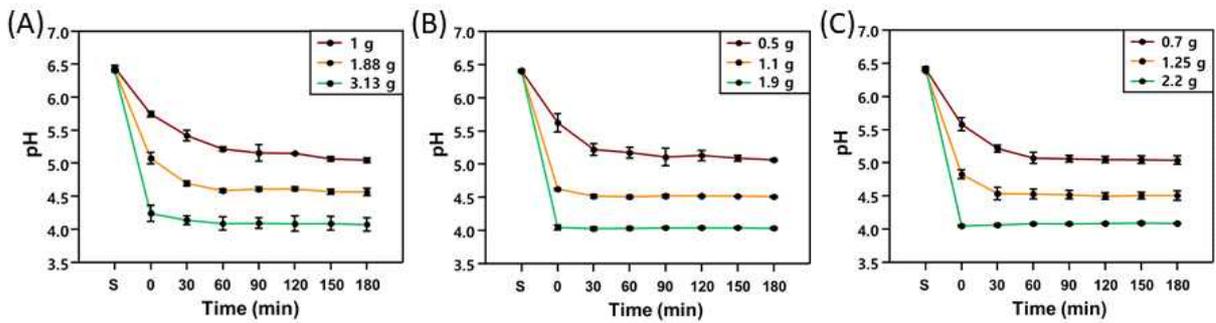


그림 D-33. 산응고제 첨가량에 따른 soymilk pH의 시간별 변화 (A) GDL, (B) citric acid, (C) lactic acid

- 각 산 응고제에 따른 pH 별로 제조된 FSC의 일반성분 분석 결과 pH 4.5와 pH 4.0에서의 단백질 회수율이 대체로 우수하였으나, 수분함량의 경우 반대로 pH 5.0이 가장 우수하였음 (그림 D-34A, C).
- 지방회수율의 경우 pH 4.5에서만 50% 대의 회수율을 보였으며, 다른 pH에서는 10% 미만의 지방회수율을 나타내었음(그림 D-34B).
- 성분 비율로 살펴보면 모든 FSC에서 단백질 함량은 상용 스프레드 치즈에 비해 2배 가량 높았음. 지방회수율이 높았던 pH 4.5에서 제조된 FSC의 지방함량의 경우 GDL로 제조한 FSC의 지방함량이 가장 낮았으며, citric acid로 제조한 FSC의 경우가 가장 높았다. 하지만 상용 스프레드 치즈가 가지는 지방함량 평균값에 비해 46.7% 수준이어서 추가적인 지방의 첨가가 필요함을 확인하였음(그림 D-35).

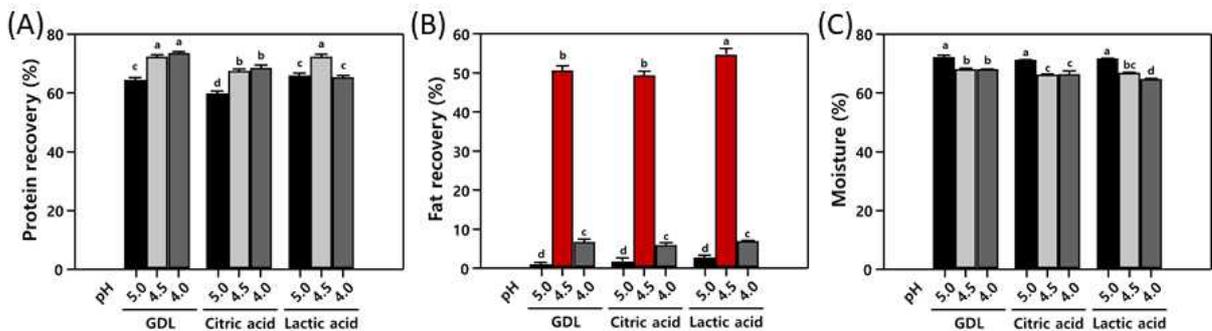


그림 D-34. 산응고제 및 최종 pH 별로 제조된 FSC 내 일반성분 분석 결과 (A) 단백질 회수율, (B) 지방회수율, (C) 수분 함량

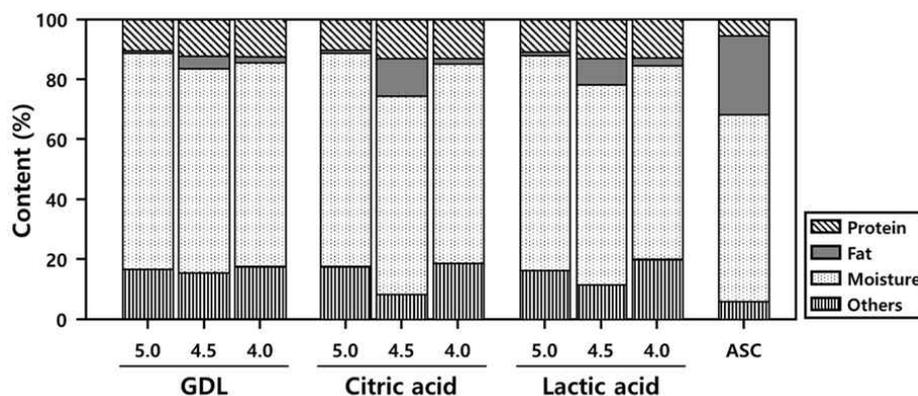


그림 D-35. 산응고제 및 최종 pH 별로 제조된 FSC 내 일반성분 조성 비교. ASC, average values of spread cheese

④ 상용 스프레드치즈 제품과 식물성 스프레드치즈 대체품의 물성 비교

- 총 6개의 동물성 스프레드 시판치즈를 구매하고 물성분석기를 통해 puncture test를 통한 경도와 spreadability test를 통한 발림성(spreadability)을 분석하였음.
- 너무 높거나 낮은 물성치를 보이는 2개의 제품을 제외하고 4개 제품의 평균값을 이용하여 목표 물성치를 결정하였으며, 경도(hardness), 발림성(spreadability) 및 부착성(adhesiveness) 목표 범위를 각각 1.7~3.1 N, 14.5~27 N.mm, 및 7.6~15.5 N.mm로 설정하였음(표 D-11).

표 D-11. 동물성 스프레드치즈 시판제품의 경도 및 발림성 분석 결과

Methods	Texture parameters	Product 1	Product 2	Product 3	Product 4
Puncture test	Hardness (N)	3.12±0.07	1.68±0.19	1.74±0.16	2.76±0.14
	Firmness (N)	9.68±0.56	5.37±0.52	5.57±0.32	7.06±0.17
Spreadability test	Spreadability (N.mm)	27.00±1.63	15.44±1.38	14.48±1.03	18.89±0.95
	Adhesiveness (N.mm)	15.52±0.31	9.53±0.31	7.56±0.26	9.28±0.66

- 제조한 FSC에 추가적인 지방을 첨가한 시료를 “Soy spread cheese (SSC)”라고 명명하고 GDL, citric acid, 및 lactic acid를 최종 pH 4.5가 되도록 첨가한 FSC 150 g 당 10 g의 야자유를 첨가하는 식물성 스프레드치즈 대체품 제조공정을 수립하였음.
- GDL을 산응고제로 첨가하여 제조한 SSC는 약한 겔을 형성하였으며, 경도, 발림성, 부착성 등 모든 물성치에서 유기산을 첨가한 SSC에 비해 낮은 값을 나타내었음(그림 D-36).
- 경도에 있어서는 GDL만이 상용 스프레드치즈 제품의 물성치 범위에 있었으나, 퍼짐성과 점착성에서는 유기산을 산응고제로 사용한 SSC 역시 목표 물성치 범위에 들어옴을 확인하였음.

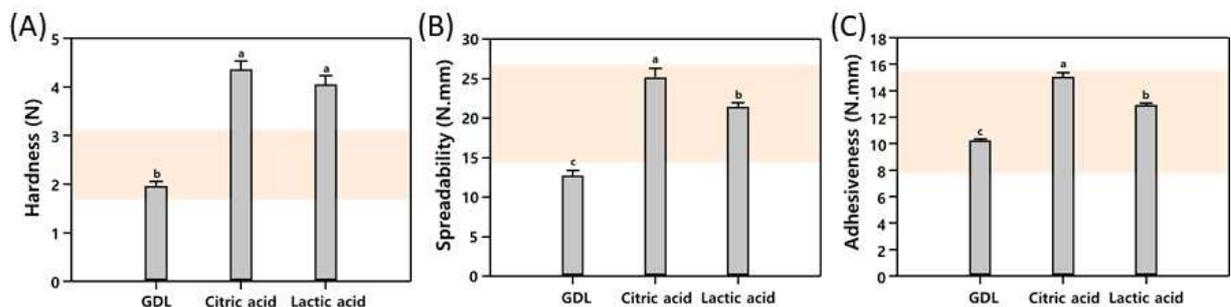


그림 D-36. 산응고제 종류에 따른 식물성 스프레드치즈 대체품의 물성 (A) 경도, (B) 발림성, (C) 부착성

- 추가적인 물성비교를 위해 레오미터를 이용하여 점탄성을 비교분석하였음. 분석 결과 모든 SSC가 상용치즈의 점탄성 지표에 비해서 낮은 값을 나타내었음(그림 D-37).
- 유기산을 산응고제로 사용한 SSC 경우 GDL로 제조한 SSC에 비해 보다 상용 스프레드치즈 제품의 물성 범위에 근접하였음.

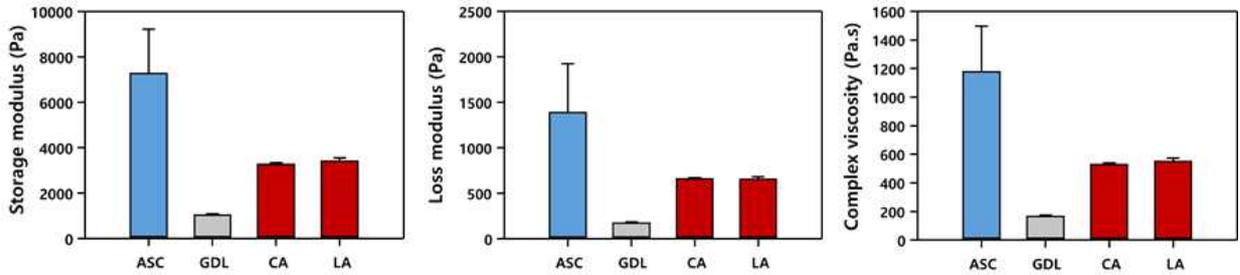


그림 D-37. 상용 스프레드치즈 제품 및 SSC의 점탄성 지표 비교 결과 (A) storage modulus, (B) loss modulus, (C) complex viscosity. ASC, average values of spread cheese

⑤ 유산균 발효를 통한 식물성 스프레드치즈 대체품의 점탄성 개선

- 유산균 첨가에 의한 단백질의 응고를 유산균을 이용한 발효로 대체하는 공정을 수립하고, 유제품용 스타터인 YF-L01과 1협동에서 항비만 활성을 나타내는 *Lactobacillus plantarum* 11B02을 분양받아 공정에 적용하였음.
- 야자유와 k-CGN을 첨가한 soymilk에 각 유산균을 접종하고 pH가 4.5까지 떨어지는 발효 시간을 결정하였음. YF-L01의 경우 6 시간 만에 pH 4.5에 도달하였으나, *Lb. plantarum* 11B02의 경우 9.5 시간이 되어서야 pH가 4.5까지 떨어졌음(그림 D-38).

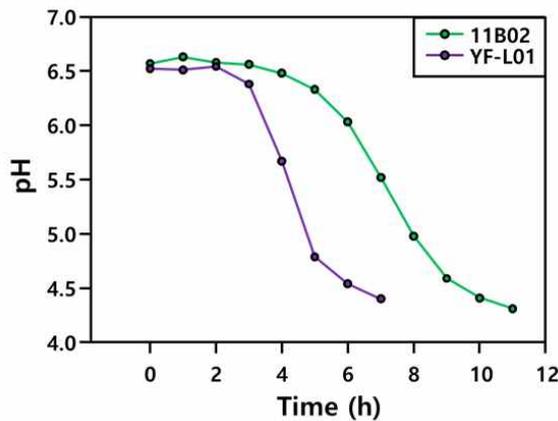


그림 D-38. 유산균 발효 동안 pH 변화

- 발효가 완료된 soymilk를 압착하여 fermented FSC (fFSC)를 제조하였으며, 추가적인 야자유 첨가를 통해 fermented SSC (fSSC)를 제작하였음.
- fFSC 내 일반성분 분석 결과 단백질회수율과 수분함량은 큰 차이를 보이지 않았으나(그림 D-39A, C), 지방회수율의 경우 YF-L01은 낮은 회수율을 보인 반면, 11B02의 경우 비발효 FSC와 유사한 값을 나타내었음(그림 D-39B)

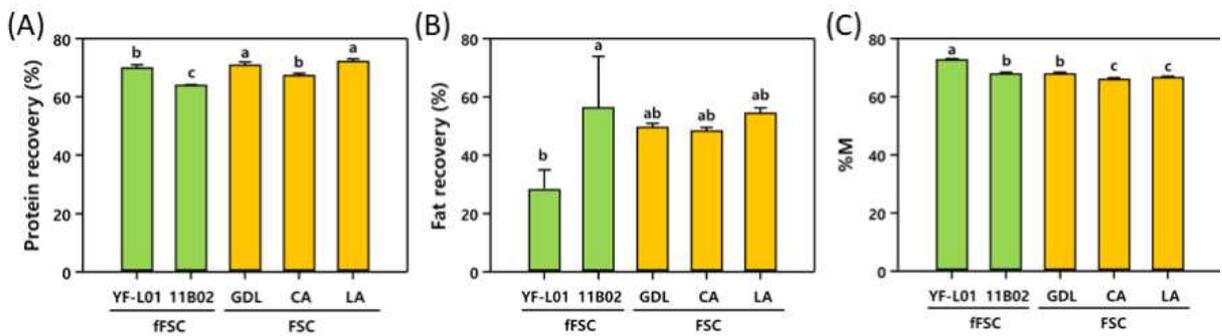


그림 D-39. 유산균 발효를 통해 제조한 fFSC와 산응고제 첨가를 통해 제조한 FSC 간의 일반 성분 분석 결과 (A) 단백질 회수율, (B) 지방회수율, (C) 수분 함량

- fSSC에 대한 물성분석 결과는 두 유산균간의 차이가 매우 극명하게 나타났음. 유제품용 상용 스타터인 YF-L01의 경우 모든 물성치에서 낮은 값을 보인 반면, 11B02로 제조한 fSSC의 경우 모든 물성치에서 상용 스프레드치즈 제품의 물성 범위를 만족하였음(그림 D-40).
- fSSC의 경도, 발림성, 및 부착성은 상용 스프레드치즈 제품의 평균 물성 대비 95.6, 62.0, 및 95.3%이었음.

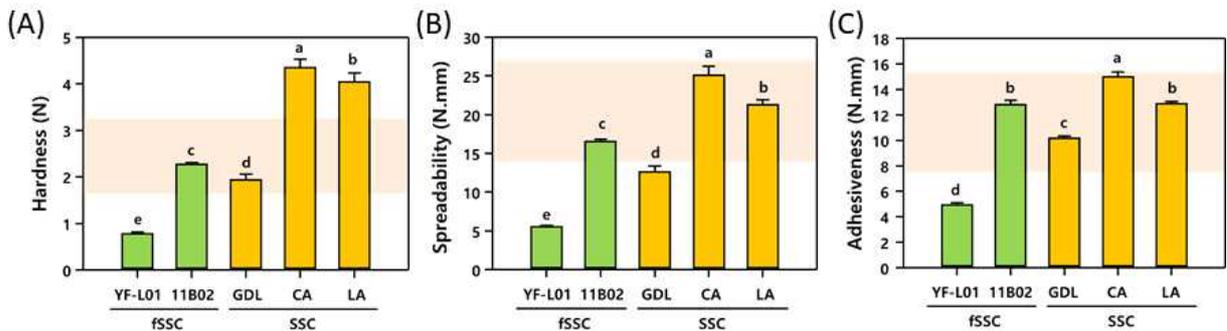


그림 D-40. 유산균 발효를 통해 제조한 fFSC와 산응고제 첨가를 통해 제조한 FSC 간의 물성 분석 결과 (A) 경도, (B) 발림성, (C) 부착성

- 레오미터를 이용한 점탄성 분석의 경우 모든 점탄성 지표가 비 발효 SSC에 비해 크게 증가하였으며, 상용 스프레드 치즈의 범위에 거의 육박하였으며, 1 Hz frequency에서의 물성치를 비교하면 시판 제품 2 대비 storage modulus, loss modulus, 및 complex viscosity 값이 각각 92, 117, 및 93%에 해당하였음(그림 D-41)

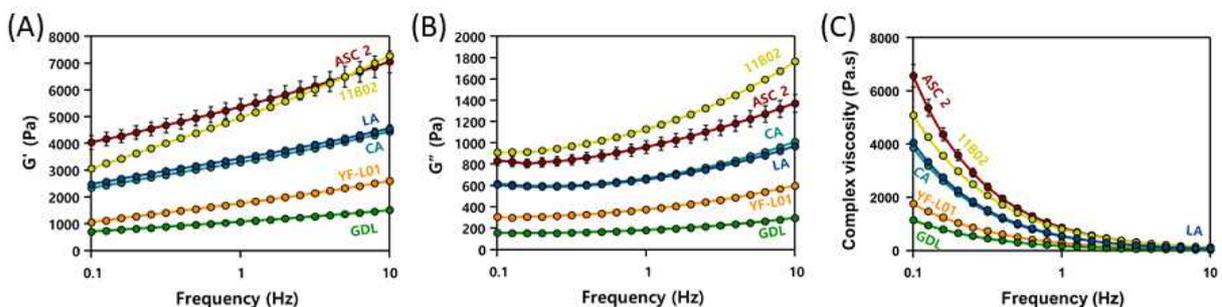


그림 D-41. 유산균 발효를 통해 제조한 fSSC와 산응고제 첨가를 통해 제조한 SSC 간의 물성 분석 결과 (A) storage modulus, (B) loss modulus, (C) complex viscosity. ASC2, viscoelasticity parameter for commercial spread cheese 2

3) 식물성 디핑 치즈 대체품 물성 개선

① 식물성 단백질의 종류에 따른 점도 분석

- 식물성 디핑치즈에 적합한 단백질원 선정하기 위해 SPI, SPC, PPI, CNF를 이용하여 디핑 타입의 시료를 제조하였음.
- CNF 시료가 매우 높은 점도가 측정되었고 특히, 저장 중 점도가 높아지고 젤화되어 유동성이 없어지는 현상이 모든 시료에서 관찰되었음(표 D-12).

표 D-12. 단백질 종류에 따른 시료의 점도 분석 및 저장 중 시료의 점도 변화

Viscosity (cP)	SPI 10%	SPC 10%	PPI 10%	CNF 40%
0 day	2,342±26 ^c	3,014±326 ^b	3,230±38 ^b	6,998±92 ^a
1 day	2,424±63 ^c	4,839±195 ^b	5,094±163 ^b	9,545±404 ^a

(Means with different in the same row differ significantly at $p < 0.05$)

- 이 결과를 바탕으로 추후 실험에서 단백질원으로 CNF를 제외한 SPI, SPC, 그리고 PPI를 선정하였으며, 식물성 디핑치즈 대체품 시료가 젤화 되는 현상이 전분에서 기인한 것으로 판단되어, 전분에 따른 영향을 분석하였음.
- 총 2 가지의 전분을 가열, 냉각 후 점도 변화를 분석한 결과, 호화전분보다는 생전분에서 점도가 현격히 증가되는 현상이 발견되었고 특히, 모든 시료에 대해 유동성이 없는 젤화되는 현상이 관찰되었음 (그림 D-42).

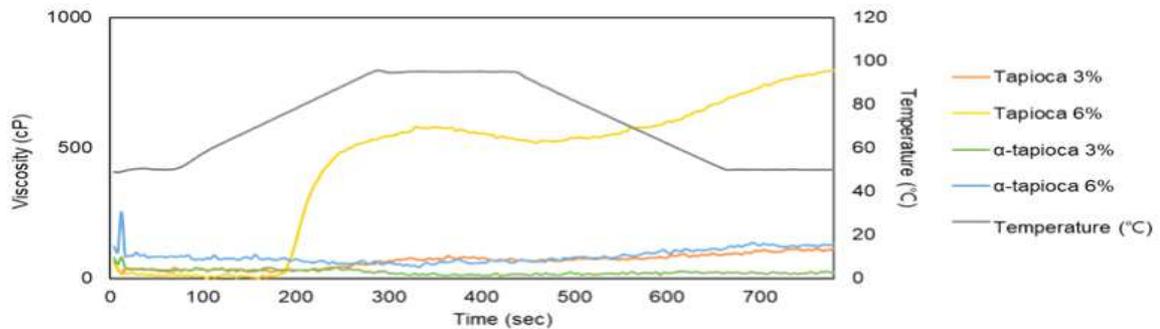


그림 D-42. 전분 사용에 따른 점도 분석

- 따라서, 전분 사용 시 치즈 시료가 젤화되어 디핑치즈로서 요구되는 유동특성을 잃어버린다고 판단되어, 추후 실험에서 전분을 배제하였음.
- 또한, 디핑치즈 시료를 제조 후 일정시간 동안 방치 시 상분리 현상이 관찰되었으며, 상분리를 억제하기 위한 방법으로 세 종류의 유화제를 적용해 보았으나, 모든 시료에서 상분리가 관찰되어(그림 D-43), 유화제는 상분리 억제에 도움이 되지 않는 것으로 판단하였음

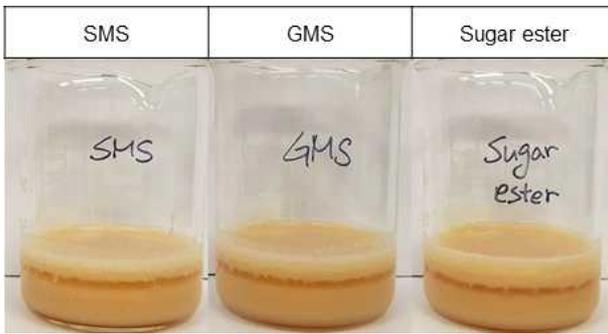


그림 D-43. 유화제가 첨가된 시료의 외관

② 단백질 및 하이드로콜로이드 별 겔화/상분리 특성 분석

- 제품의 상분리를 막기 위해 하이드로콜로이드를 첨가하였고, RVA를 이용 가열 후 냉각 과정에서의 점도 상승을 통해 겔형성 성질 비교하였음(그림 D-44).
- 디핑치즈의 상분리 현상을 억제하기 위해 예비실험을 통해 세 종류의 하이드로콜로이드를 선정하고 하이드로콜로이드 적용 시 점도 상승에 따른 물성 영향을 최소화하기 위해 두 농도 (1, 3%, w/w)로 적용하여 점도에 미치는 영향을 분석하였음.
- 그 결과, 3% 농도에서는 젤화가 일어나거나 높은 점도를 보였으며, xanthan gum 이 다른 하이드로콜로이드에 비해 물성에 미치는 영향이 크게 나타났음. 따라서 좀 더 유동성이 있는 locust bean gum과 guar gum을 최종 선정하였음(그림 D-44).

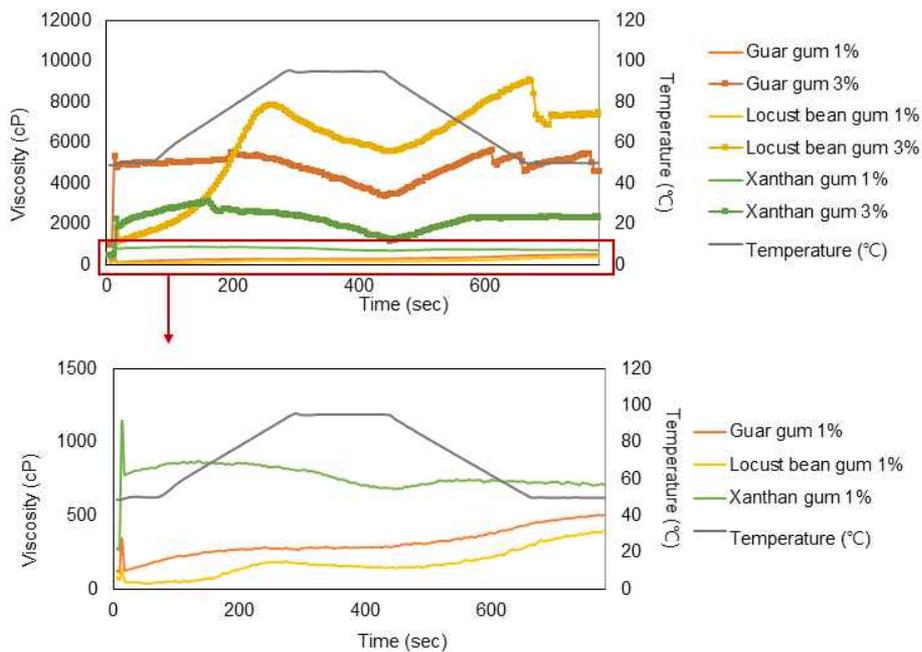


그림 D-44. 하이드로콜로이드에 따른 온도별 점도 분석

- SPI, SPC, PPI 및 locust bean gum, guar gum을 조합하여 점도 특성을 분석한 결과, SPC와 0.2% 하이드로콜로이드 용액의 점도가 가장 낮았음(그림 D-45)

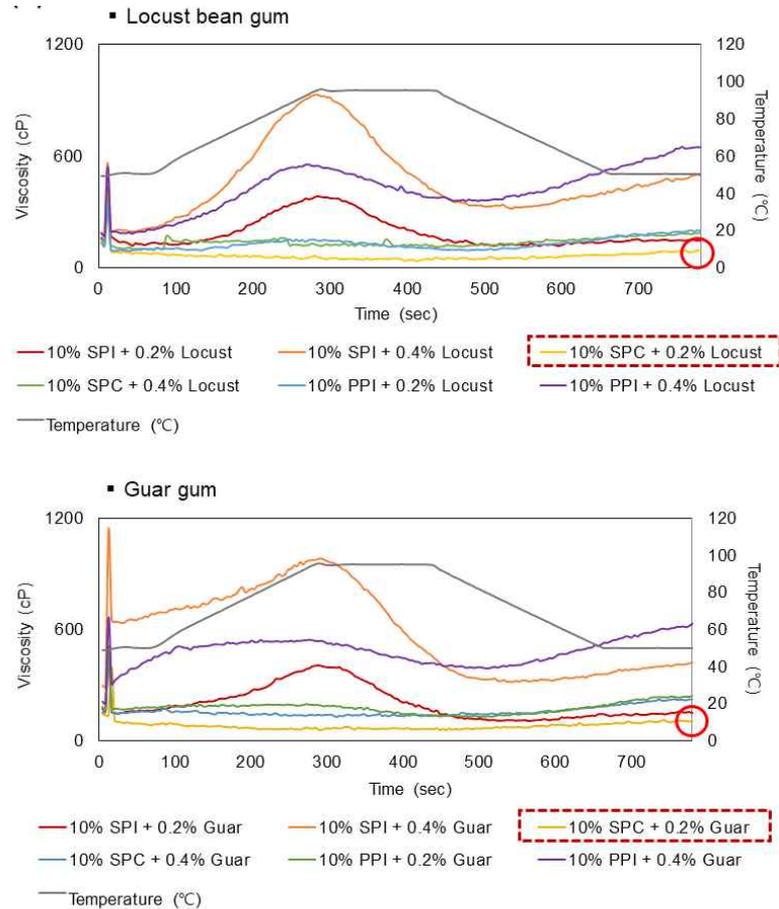


그림 D-45. Locust bean gum 및 guar gum 첨가에 따른 식물성 디핑치즈 대체품의 물성

- LBG 및 GG를 적용한 모든 시료에서 상분리는 관찰되지 않았으며, 0.2% guar gum 사용 시 디핑치즈에 적합하다고 판단되는 유동 특성을 나타내었음(그림 D-46).
- 상기의 결과를 바탕으로 농축대두단백 (SPC) 와 0.2% guar gum을 선택하여 단백질 함량을 좀 더 증가시키는 실험을 진행함.

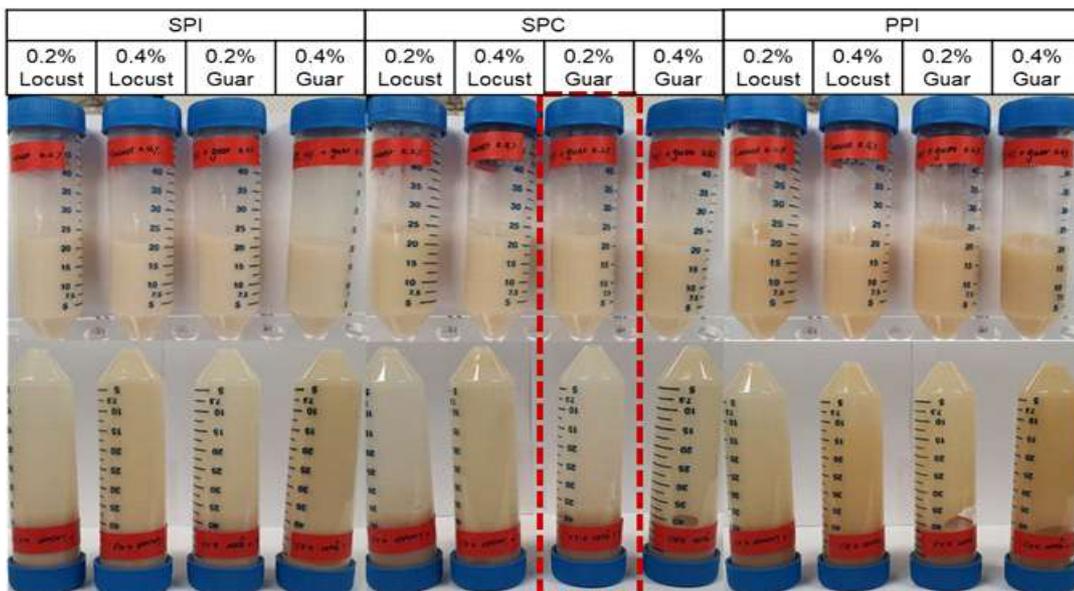


그림 D-46. Locust bean gum 및 guar gum 첨가에 따른 식물성 디핑치즈 대체품의 유동성

③ 식물성 디핑치즈 대체품의 물성 분석

- 선정된 원료를 토대로 4 가지 배합비로 단백질 함량을 높은 시료를 제조하였음 (표 D-13).

표 D-13. SPC와 guar gum을 사용한 배합비 선정 (Unit : g)

	Sample 1	Sample 2	Sample 3	Sample 4
Soy protein concentrate (SPC)	3.22	3.22	3.22	3.22
Guar gum	0.05	0.05	0.05	0.05
Water	24.95	24.73	24.52	24.30

- 제조된 4 가지의 식물성 디핑치즈 대체품과 시판 디핑치즈 제품의 물성 (점도, 점탄성 등)을 상호 비교한 결과 시판되는 디핑치즈의 경우 870 - 4,571 cP 점도 범위로 평균 2,785 cP를 보였고, 제조된 식물성 디핑치즈 대체품의 경우 971 - 3,923 cP 점도 값을 나타내었음(표 D-14).
- 제조된 식물성 디핑치즈 대체품 중 sample 3의 점도가 가장 시판 디핑치즈와 유사하였음(시판 디핑치즈제품 대비 96.9%)

표 D-14. 시판 치즈 제품과 제조 시료의 점도 비교 분석

	Commercial cheese					Imitation cheese			
	Nacho cheese sauce	Cheese dipping sauce	Garlic dipping sauce	PAPA JOHN'S	Average	Sample 1	Sample 2	Sample 3	Sample 4
Viscosity (cP)	4,571±29 ^a	1,799±32 ^d	3,899±69 ^b	870±5 ^g	2,785	971±3 ^f	1,566±9 ^e	2,698±26 ^c	3,923±9 ^b

(Means with different in the same row differ significantly at $p < 0.05$)

- 전단 속도에 따른 정상유동점도 분석 결과에서도 전단 속도가 증가함에 따라 모든 시료의 점도가 감소하는 전단 희석 (shear thinning) 유체임을 확인할 수 있음. 또한, sample 3과 sample 4의 경우 시판 치즈의 점도 범위 내에 포함됨을 확인하였음(그림 D-47).

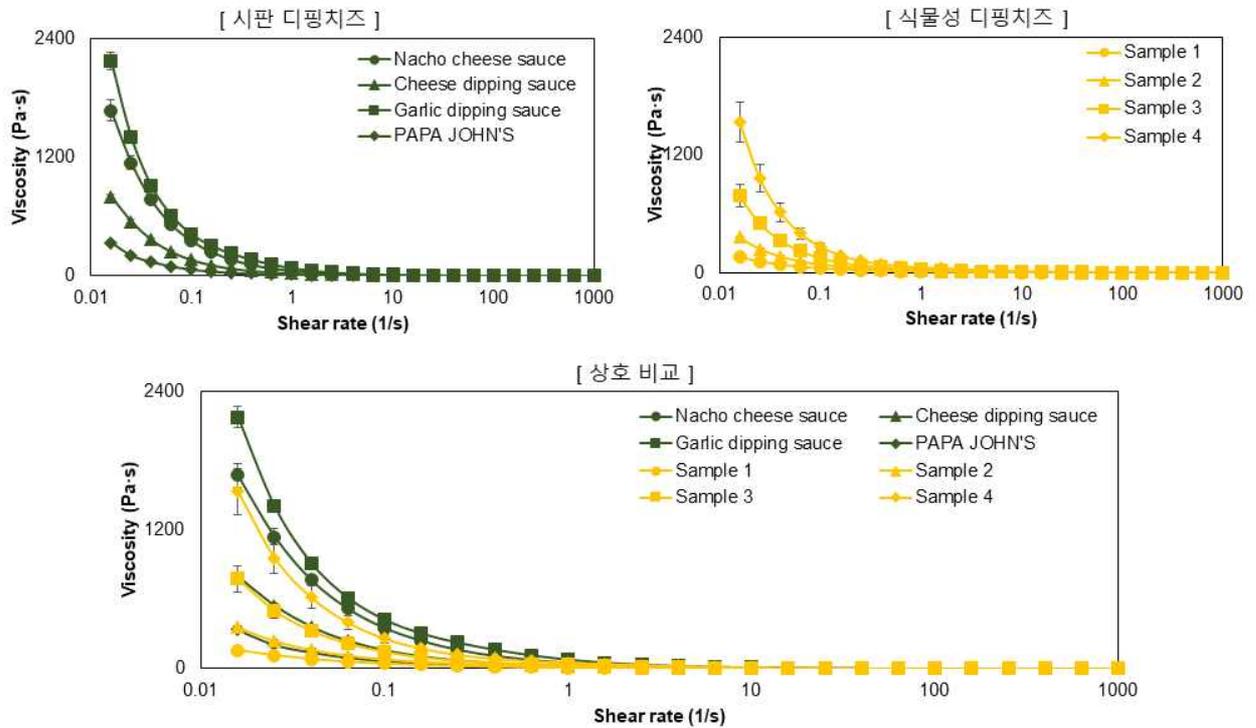


그림 D-47.시판 디핑치즈 및 식물성 디핑치즈 대체품의 정상유동 점도 특성 비교 분석

- 시판 디핑치즈와 제조 시료의 동적 점탄성 비교를 한 결과, sample 3과 sample 4 시료의 탄성 계수 (G') 및 점성 계수 (G'') 모두가 시판 치즈의 80 - 120% 범위 내에 위치함을 확인하였음(그림 D-48).

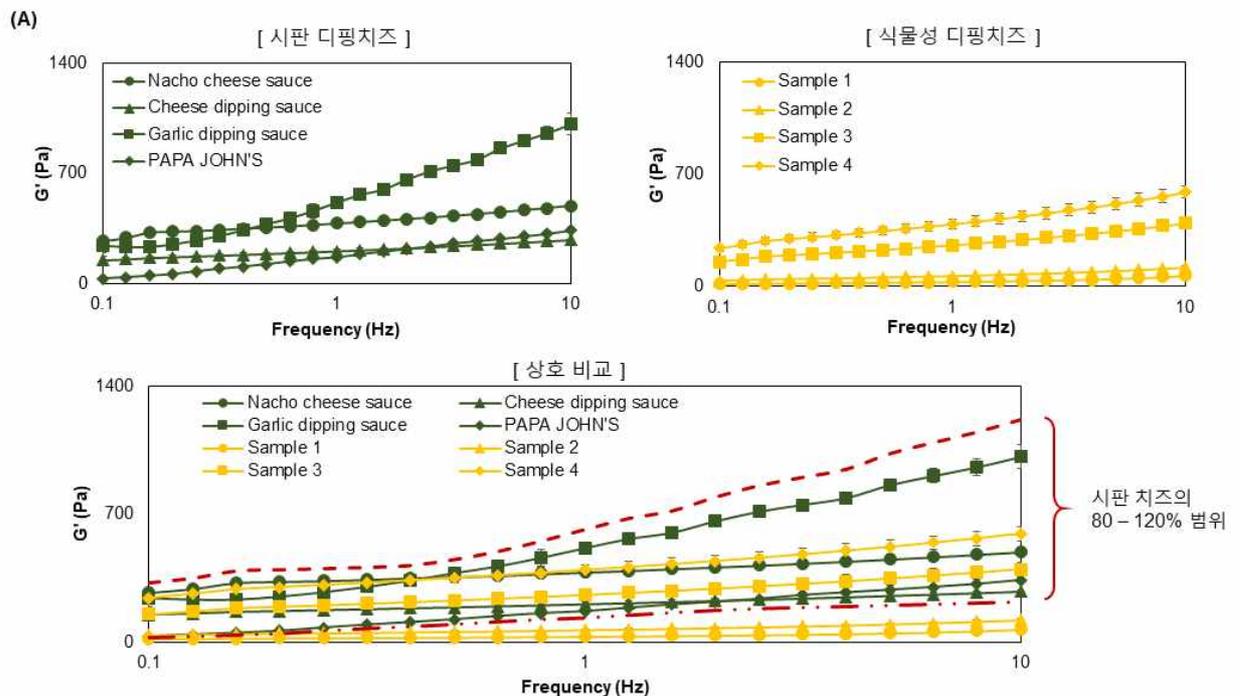


그림 D-48. 시판 디핑치즈 및 식물성 디핑치즈 대체품의 점탄성 (탄성 (A), 점성 (B)) 비교 분석

III. 연구개발과제의 수행 결과 및 목표 달성 정도

1. 연구수행 결과

1) 정성적 연구개발성과

구분	세부과제명	정성적 연구개발 성과
[주관] 태경농산	시판 치즈제품 관능품질 분석 및 타겟 선정	- 동, 식물성 치즈제품 18종 전자코, 맛센서 분석 및 관능평가를 통한 유형별 타겟 선정 완료
	식물성치즈 Lab scale 3종 개발 (Block, Spread, Dipping)	- Block type 아몬드발효액 및 단백질 가교결합 활용 처방/공정 정립 (단백 4.9%, 경도 8.86N로 목표비 97%, 응집력은 0.14로 목표비 64%수준 달성) - Spread type은 두유발효액 활용 크림치즈 형태 Lab시제품 제조(단백 4.5%, 응집력 0.26, 점착성 0.16로 목표비 100% 달성) - Dipping type은 식물성 원료기반 치즈풍미소재 개발/적용으로 체다치즈소스 질감, 색상, 풍미를 재현한 시제품 제조
	단백질 향상을 위한 기술/소재 개발 및 제품 개선	- 식물성단백 분해물 및 아몬드단백 수용화 공정 개발, 제품 적용에 따른 단백질 2배 향상(Block) 완료
	식물성치즈 Plant scale 3종 개발 및 품질평가 (Block, Spread, Dipping)	- 아몬드단백 발효액 및 대두단백물 공정 정립함 이를 활용하여 각 치즈 유형별 Plant scale 설비 적합성을 확인하고 처방/공정 최적화 및 시제품 제조 완료 - Block type 시제품 품질 평가 (단백 10%로 2차년도 대비 2배 증가, 경도 12.36N로 목표비 100%, 응집력은 0.21로 목표비 95%수준 달성) - Spread type 시제품 품질 평가 (단백 4.09%로 동물성 타겟 69% 수준, 응집력 0.35, 점착성 0.15로 목표비 100% 달성) - Dipping type 시제품 품질 평가 (단백 2.79%로 동물성 타겟 보다 높은 함량 구현, 점도 23.25로 목표비 96%, Rate index 0.55로 목표비 73%수준 달성) - 최종 시제품 3종 모두 단백질 증가 및 콜레스테롤 0으로 상품화 추진 시 영양성 측면의 강점이 있을 것으로

		판단됨
[위탁] 한양대학교	시판 치즈 제품들의 형태에 따른 물성 평가 체계 구축 및 목표점 설정	<ul style="list-style-type: none"> - Block type 은 TPA, Spread type 은 TPA 와 동적점탄성, Dipping type 은 점도와 동적점탄성을 평가항목으로 결정 - 치즈 형태별 물성 목표점 범위 설정완료
	Lab, Plant scale 시제품 물성 평가	<ul style="list-style-type: none"> - Block, Spread, Dipping 치즈 유형별 설정된 정량 물성 값에 도달할 수 있도록 주관기관과 협력하여 다양한 배합비 및 공정개선 시제품들의 TPA, 점성을 측정함
	주요 인자(원료, 공정, 첨가물 등)에 따른 식물성 단백질 gel 의 물성 변화 및 주요 요인 분석	<ul style="list-style-type: none"> - RSM 을 활용하여 SPI 와 아몬드 단백질의 단백질 함량, 효소농도, 반응시간에 따른 경도 분석 - SPI 에 비해 아몬드 단백질이 높은 함량으로 첨가 가능하고 TGase 에서 반응이 높게 나타남
	시판 동물성 치즈와 식물성 치즈 개발 제품의 <i>In vitro</i> 단백질 소화율 평가 체계 구축 및 평가	<ul style="list-style-type: none"> - 유제품 및 식물성 단백질의 <i>in vitro</i> 단백질 소화율 분석 문헌 조사 및 예비실험을 통한 평가 체계 확립 - 시판 동물성 치즈와 식물성 개발 치즈의 소화율은 각각 95.79%, 89.89%이며, 두 제품군 간 <i>in vitro</i> 단백질 소화율의 차이는 5.90%로 확인
[제 1 협동] 고려대학교	식물성 치즈 제조를 위한 발효 공정의 기초 확립	<ul style="list-style-type: none"> - 원료의 농도, 응고제, 스타터컬처별 발효특성 평가를 통해 식물성 치즈의 발효공정 수립 - 최종적으로 ISP 및 Almond protein 과 상업용 스타터컬처 F-DVS YF-L01 DA 를 이용한 최종 단백질 함량이 15%인 식물성 치즈의 제조 공정 확립
	항비만 기능을 신규 프로바이오틱스 발굴	<ul style="list-style-type: none"> - 김치 및 인체 유래 유산균의 위장관 내 생존 안정성 (내산성, 내담즙성 및 장부착능) 평가를 통해 우수 유산균 선별 - 항산화 및 콜레스테롤 저하 활성에서 모두 높은 활성을 나타내는 유산균선별 - 최종적으로 항비만 기능을 나타내는 김치 및 인체 유래 프로바이오틱스 2 종 (<i>Lactobacillus</i>

		<p><i>gasseri</i> KML27, <i>Lactobacillus plantarum</i> KML34) 발굴</p> <ul style="list-style-type: none"> - 선정 프로바이오틱스(<i>Lactobacillus plantarum</i> KML34)가 함유된 식물성 치즈제품의 제조 - 비만 유도 동물모델에서 Body weight, 조직(Liver, EWAT) 무게, Colon 길이, 혈액 parameter (TC, TG, HDL-C, LDL-C, AST, ALT), 비만 관련 유전자 발현(EWAT), H&E staining 등의 항비만 활성 평가를 통해 효용성 검증
	<p>항비만 활성을 나타내는 선정 프로바이오틱스 함유 식물성 치즈제조</p>	
<p>[제 2 협동] 고려대학교</p>	<p>식물성 치즈제품의 유형별 원료 베이스 연구 및 물성 개선</p>	<ul style="list-style-type: none"> - 식물성 블록치즈 대체품의 물성은 상용 블록치즈 제품 대비 경도, 부착성, 응집성에 있어서 108.9, 87.1, 및 96.8% 수준을 구현 - 유산균 발효를 거친 식물성 스프레드치즈 대체품의 경도, 발림성, 및 부착성은 상용 제품의 평균 대비 95.6, 62.0, 및 95.3%. 점탄성을 나타내는 storage modulus, loss modulus, 및 complex viscosity 값은 시판 제품 2 대비 각각 92, 117, 및 93%에 해당 - 식물성 디핑치즈 대체품 3 과 4 시료의 탄성 계수 (G') 및 점성 계수 (G'') 모두가 시판 치즈의 80 - 120% 범위 내에 위치함 - 3 종의 치즈 대체품의 기준물성이 상용제품 대비 80 - 120% 범위로 조정하는 목표치 달성
	<p>식물성 치즈의 기능성 강화 연구</p>	<ul style="list-style-type: none"> - 식물성 블록치즈 대체품이 prebiotics 기능을 보유하고 있음을 확인하였음.

2) 정량적 연구개발성과

성과 목표	사업화지표										연구기반지표						
	지식 재산권			기술 실시 (이전)		사업화					기술 인증	학술성과			교육 지도	인력 양성	
	특허 출원	특허 등록	품 종 등 록	건 수	기술 료	제 품 화	매 출 액	수 출 액	고 용 창 출	투 자 유 치		문		논 문 평 균 IF			학 술 발 표
												SC I	비 SC I				
단위	건	건	건	건	백 만 원	건	백 만 원	백 만 원	명	백 만 원	건	건		건		명	
가중치	10	10	10			60								5		5	
최종목표 (종료3년 포함)	2	2	2			3						3		5		4	
1차 연도	목 표													1		2	
	실 적													1		1	
2차 연도	목 표	1										1		2		2	
	실 적	0										0		3		3	
3차 연도	목 표	1	1	2		1						1		2			
	실 적	1	0	2		2			1			1	1	5		3	
소계 (연구 기간 내)	목 표	2	1	2		1						2		5		4	
	실 적	1	0	2		2			1			1	1	9		7	
종료 1년	목 표											1					
종료 2년	목 표		1			2											
종료 3년	목 표																

[과학적 성과]

□ 논문(국내외 전문 학술지) 게재

번호	논문명	학술지명	주저자명	호	국명	발행기관	SCIE 여부 (SCIE/비SCIE)	게재일	등록번호 (ISSN)	기여율
1	동물성과 식물성 시판 체다 치즈의 향미 특성 및 조직감 분석	한국식품과학회지	권병수	53(5)	대한민국	한국식품과학회	비SCIE	2021.10.31	0367-6293	100%
2	Solid Fat Replacement with Canola Oil-Carnauba Wax Oleogels for Dairy-Free Imitation Cheese Low in Saturated Fat	Foods	김영완	Volume 10 Issue 6	온라인 (스위스)	MPDI	SCIE	2021.06.11	2304-8158	50%

□ 국내 및 국제 학술회의 발표

번호	회의 명칭	발표자	발표 일시	장소	국명
1	한국식품영양과학회	한지승	2019.10.25	제주ICC	대한민국
2	한국식품과학회	이재현	2020.07.02	광주 컨벤션센터	대한민국
3	한국식품과학회	조은지	2020.07.02	광주 컨벤션센터	대한민국
4	한국미생물생명공학회	한지승	2020.09.23	온라인 개최	대한민국
5	한국축산식품과학회	한지승	2021.05.27	온라인 개최	대한민국
6	한국식품과학회	권병수	2021.07.09	대전컨벤션센터	대한민국
7	한국식품과학회	송민주	2021.07.07	대전컨벤션센터	대한민국
8	KFN 국제심포지움	조은지	2021.10.29	부산 벅스코	대한민국
9	KFN 국제심포지움	송민주	2021.10.28	부산 벅스코	대한민국

□ 생명자원(생물자원, 생명정보)/화합물

번호	생명자원(생물자원, 생명정보)/화합물 명	등록/기탁 번호	등록/기탁 기관	발생 연도
1	<i>Lactobacillus gasseri</i> KML27	KCTC14728BP	한국생명공학연구원 생물자원센터 KCTC	2021
2	<i>Lactobacillus plantarum</i> KML34	KCTC14729BP	한국생명공학연구원 생물자원센터 KCTC	2021

[기술적 성과]

□ 지식재산권(특허)

번호	지식재산권 등 명칭 (건별 각각 기재)	국명	출원				등록			기여율	활용 여부
			출원인	출원일	출원 번호	등록 번호	등록인	등록일	등록 번호		
1	아몬드 단백질 발효물 및 콩 단백질 효소 반응물을 주 단백질원으로 함유하는 식물성 치즈 및 그의 제조방법	대한민국	김서진	2021.06.14	10-2021-0076780	-	-	-	-	100%	

[경제적 성과]

□ 사업화 현황

번호	사업화 방식 ¹⁾	사업화 형태 ²⁾	지역 ³⁾	사업화명	내용	업체명	매출액		매출 발생 연도	기술 수명
							국내 (천원)	국외 (달러)		
1	자기실시	신제품개발	국내	베지가든	베지가든 체다치즈 향소스 (혼합형)	태경농산	-	-	2021	
2	자기실시	신제품개발	국내	베지가든	식물성 체다치즈 향소스 (발효형)	태경농산	-	-	2022	

- * 1) 기술이전 또는 자기실시
- * 2) 신제품 개발, 기존 제품 개선, 신공정 개발, 기존 공정 개선 등
- * 3) 국내 또는 국외

□ 전문 연구 인력 양성

번호	분류	기준 연도	현황											
			학위별				성별		지역별					
			박사	석사	학사	기타	남	여	수도권	충청권	영남권	호남권	기타	
1	인력양성	2019			1		1			1				
2	인력양성	2020		1	2		1	2		3				
3	인력양성	2021		3			2	1		3				

[계획하지 않은 성과 및 관련 분야 기여사항]

□ 고용 창출

순번	사업화명	사업화 업체	고용창출 인원(명)		합계
			2021년		
1	베지가든	태경농산 연구소	1명		1명

2. 목표 달성 수준

추진 목표	달성 내용	달성도(%)
○ 시판 치즈제품 관능품질 분석 및 개발 타겟 선정	○ 소비자 선호도가 높은 동, 식물성 제품 전자코, 맛센서 분석 및 관능평가 진행하여 Block, Spread, Dipping 유형에 따른 타겟 선정 완료	○ 100
○ 식물성치즈 Lab scale 3종 개발/개선	○ 치즈 유형별 Lab 처방 및 공정을 정립한 후 Gap 분석 후 주요해결 과제를 선정하여 목표 물성, 관능 수준 등을 달성하고 시제품을 제조함	○ 100
○ 식물성치즈 3종 Plant scale 공정 정립 및 시제품 제조	○ Lab에서 추진된 연구를 바탕으로 Plant scale 소재 2종, 제품 3종의 처방/공정 최적화를 완료하고 시제품을 제조 및 평가함	○ 100
○ 시판 치즈 제품(Block, Spread, Dipping type)의 품질특성 평가 및 평가체계구축	○ 치즈 형태별 물성 평가체계 구축 및 국내외 시판 치즈 26종(동물성 16종, 식물성 10종)의 물성 평가를 통한 치즈 형태별 물성 목표점 범위 설정	○ 100
○ 주요 인자(원료, 공정, 첨가물 등)에 따른 lab scale 개발 제품의 물성 변화 및 주요 요인 분석	○ 반응표면분석을 활용하여 단백질 결합 효소(TGase) 반응 조건에 따른 SPI, 아몬드 단백질의 최대 경도 조건 확인	○ 100
○ 최종 개발 시제품의 물성 분석 및 <i>in vitro</i> 소화율 평가	○ 치즈 형태별 개발 제품의 물성 특성 분석 및 동물성 시판 치즈와 식물성 개발 치즈의 <i>in vitro</i> 단백질 소화율 평가	○ 100
○ 식물성 치즈 제품 발효를 위한 발효 균주 선정	○ ISP를 이용한 식물성 치즈 제품에서 ISP 농도, 응고제 농도 및 발효 균주(스타터컬처) 선정 및 최적화, 최적화된 식물성 치즈 제품의 이화학적 특성 (당 분석) 평가	○ 100
○ 식물성 치즈 제품 발효를 위한 발효 균주 선정	○ ISP를 이용한 식물성 치즈 제품에서 ISP 농도, 응고제 농도 및 발효 균주(스타터컬처) 선정 및 최적화, 최적화된 식물성 치즈 제품의 이화학적 특성 (당 분석) 평가	○ 100
○ Lab-scale 식물성 치즈 제품의 발효특성 평가	○ 식물성 단백질(almond protein)을 이용한 치즈제품의 공정 확립	○ 100

추진 목표	달성 내용	달성도(%)
○ 항비만 기능성 인체유래 신규 프로바이오틱스 후보균주 탐색	○ 항비만 기능을 나타내는 프로바이오틱스 후보균주 2종 선별 (KML27, KML34)	○ 100
○ 선별 프로바이오틱스의 항비만 기능성 검증	○ 식물성 기질에서 선별 프로바이오틱스 후보균주 2종의 발효 조건 확립 및 발효를 통한 프로바이오틱스 후보균주 2종의 항비만 기능성 확인	○ 100
○ 선별 프로바이오틱스 및 식물성 치즈의 항비만 기능성 검증 (<i>in vivo</i>)	○ High fat diet 식이를 통해 비만을 유도한 동물모델에서 식물성 치즈 및 KML34의 항비만 기능성 확인	○ 100
○ 동물모델에서 장내 균총 변화에 따른 비만 억제 활성의 연관성 규명	○ High fat diet 식이를 통해 비만을 유도한 동물모델에서 분변 샘플을 통한 식물성 치즈 및 KML34의 장내 균총 변화 확인 및 비만 억제 활성의 연관성 규명	○ 100
○ 식물성 원료를 이용한 동물성 치즈 대체품으로 블록 치즈, 스프레드 타입 치즈, 디핑 치즈 타입의 제품 개발	○ 분리대두단백을 이용한 단백질 겔 시스템에 식물성 하이드로콜로이드 원료 탐색을 통해 3종의 치즈 대체품 개발 완료	○ 100
○ 대조 블록 치즈 대비 압축 경도, 뚫기 경도, 및 전단경도 80~120% 범위	○ 식물성블록치즈 대체품의 경도, 부착성, 응집성 = 상용 블록치즈 평균 대비 108.9, 87.1, 및 96.8%	○ 100
○ 대조 스프레드 치즈 제품 대비 경도, 전단면적, 부착성 80~120% 범위	○ 식물성 스프레드치즈 대체품의 경도, 발림성, 및 부착성 = 상용 스프레드치즈 평균 대비 95.6, 62.0, 및 95.3%	○ 100
○ 대조 디핑 치즈 제품 대비 탄성계수 및 점성계수 80~120% 범위	○ 식물성 디핑치즈 대체품 sample 3과 4 시료의 탄성 계수 (G') 및 점성 계수 (G'') = 시판 제품의 80 - 120% 범위	○ 100
○ 비만예방 probiotics의 기능강화를 위한 Synbiotics 함유 식물성 치즈 대체품 개발	○ 비만예방의 기능을 가지는 <i>Lb plantarum</i> 을 이용한 스프레드치즈 대체품의 물성개선 ○ Synbiotics 함유 식물성 치즈 대체품 미개발 ○ 식물성 블록치즈 대체품이 prebiotics로서의 기능을 보유함을 확인하고 prebiotics 기능 함유 식물성 치즈 대체품 개발 완료	○ 75

IV. 목표 미달 시 원인분석

1) 목표 미달 원인(사유) 자체분석 내용

○ 식물성 치즈 대체품을 개발함에 있어서 기능성 강화를 위해 제1공동과 협동으로 기능성 probiotics를 함유하는 대체품을 개발하고자 하였음. 그러나 식물성 단백질을 이용하여 매트릭스를 형성하는 단계에서 가열과정이 들어가는 이유로 살아있는 probiotics를 함유하는 제품개발이 불가능하였음

2) 자체 보완활동

○ 당초 목표였던 synbiotics 함유 기능성 강화제품의 개발은 진행하지 못하였으나, 물성개선을 위해 첨가한 히드로콜로이드에 의해 prebiotics 기능이 동시에 담보된 식물성 블록치즈를 개발하였으며, 제1공동에서 선발한 항비만 유산균이 SPI를 이용한 식물성 스프레드치즈 대체품의 점탄성을 개선하는 기능이 있음을 밝히고 콩단백질 이용 제품의 발효스타터로서의 기능을 확인하였음.

3) 연구개발 과정의 성실성

○ 본 연구에서는 기존 제품의 물성을 최대한 구현하고자 하였음. 시판 치즈의 물성 측정 결과를 바탕으로 개발 식물성 치즈의 물성 목표점을 시판 동식물성 치즈의 물성 특성을 각 항목의 범위로 나타내어 개발 식물성 치즈의 물성이 최대한 동물성 치즈의 값에 가깝고 최소 시판 식물성 치즈 사이의 값을 갖도록 하였음

○ 본 연구에서는 김치 및 인체 유래 유산균을 분리하여 위장관 내에서의 안정성 및 항비만 기능성 평가를 통해 우수한 활성을 나타내는 잠재적인 프로바이오틱스 균주 2종을 선별 및 기탁하였으며, 식물성 단백질을 이용한 치즈의 제조 공정에서 활용됨

○ 본 연구의 결과물 중 사업화에 가장 중요한 식물성 치즈를 Plant scale 수준까지 개발 완료하였으며, 당초 계획했던 Block, Spread, Dipping 3종의 시제품을 모두 제조하여 이를 활용한 사업화 및 제품 라인업에 기여할 것으로 판단됨

V. 연구개발성과의 관련 분야에 대한 기여 정도

- SPI 등 식물성 단백질은 카제인과 같은 우유단백질과는 차이를 가짐. 따라서 현재 개발된 유제품 스타터의 경우 식물성 단백질 함유 식품의 발효에 적합하지 않을 수 있음. 본 연구를 통해 선별된 *Lb. plantarum* 11B02의 경우 항비만 기능성과 더불어서 콩단백질에 대한 발효능이 기존 유제품 스타터에 비해 우수함을 확인하였으므로 향후 동물성 단백질 대체 식품 개발에 있어서 확장성을 가질 것으로 기대함
 - 유제품 중 치즈의 물성 특성은 소비자 선호도를 결정하는데 중요한 요소로 알려지나, 같은 유형의 치즈일 경우라도 물성 측정 방법이 다양하여 명확한 평가체계가 없음. 본 연구에서는 치즈의 종류에 따라 texture profile analysis나 rheological properties를 통한 물성 평가 체계를 구축하였음. 이러한 기계적 측정은 관능 평가보다 수행하기 쉬우며 표준화와 재현성을 높일 수 있고, 관능평가를 예측하는 데 좋은 지표로 활용될 수 있음
 - 본 연구를 통해 선별된 *Lactobacillus plantarum* KML34는 위장관 내에서의 안정성을 나타냈으며 우수한 콜레스테롤 저하 활성을 나타냈음. 또한, 식물성 기질을 발효하였을 때 우수한 항비만 활성을 나타내는 것으로 확인하였으며, 비만 유도 동물모델에서 우수한 활성을 나타내는 것으로 확인하였으므로 향후 항비만 기능성을 나타내는 신규 프로바이오틱스로 제재로의 사용과 식물성 기질을 활용한 발효식품에서의 사용이 가능할 것으로 기대됨
 - 식물성 Block, Spread, Dipping 치즈 3종의 시제품을 상용화 수준까지 제조하였으며, 특히 기술적으로 고 단백질 구현이 어려운 블록형태의 치즈에서 단백질 10% 수준을 재현하여 국내 독자기술로 글로벌 수준의 식물성 치즈제품 개발에 기여함
-

VI. 연구개발성과의 관리 및 활용 계획

- 제2협동은 식물성 치즈 대체품 개발과 관련된 연구성과를 과제 종료 후 2년 내 SCIE 학술 논문 2건 발표할 예정임
 - 제2협동은 인력양성에 있어서 과제 종료 1년 석사 2명, 2년 석사 2명 배출 예정임
 - 위탁은 인력양성에 있어서 과제 종료 1년 석사 1명, 2년 석사1명 및 박사 1명 배출 예정임
 - 제1협동은 인력양성에 있어서 과제 종료 1년 석사 2명 배출 예정임
 - 주관에서는 과제 종료 후에도 본 연구내용 및 결과물의 우수성을 활용하여 순차적 제품 출시 및 라인업을 진행할 예정이며, 해외 제품과 경쟁 시 영양적 우수성을 마케팅 포인트 등으로 활용할 예정임
-

VII. 참고 문헌

- Alinovi M, Rinaldi M, Mucchetti G. Spatiotemporal characterization of texture of Crescenza cheese, a soft fresh Italian cheese. *J. Food Qual.* 2018: 5062124 (2018)
- Bertsch P, Savorani L, Fischer P. Rheology of Swiss cheese fondue. *ACS omega.* 4: 1103–1109 (2019)
- Brighenti M, Govindasamy–Lucey S, Jaeggi JJ, Johnson ME, Lucey JA. Effects of processing conditions on the texture and rheological properties of model acid gels and cream cheese. *J. Dairy Sci.* 101: 6762–6775 (2018)
- Boateng, L., et al., Coconut oil and palm oil's role in nutrition, health and national development: A review. *Ghana Medical Journal*, 2016. 50(3): p. 189–196
- Cavallieri, A.L.F. and R.L. da Cunha, The effects of acidification rate, pH and ageing time on the acidic cold set gelation of whey proteins. *Food Hydrocolloids*, 2008. 22(3): p. 439–448
- Černíková, M., et al., Replacement of traditional emulsifying salts by selected hydrocolloids in processed cheese production. *International Dairy Journal*, 2010. 20(5): p. 336–343
- Chatziantoniou SE, Thomareis AS, Kontominas MG. Effect of chemical composition on physico–chemical, rheological and sensory properties of spreadable processed whey cheese. *Eur. Food Res. Technol.* 241: 737–748 (2015)
- Choi AJ, Lee SY. Quality characteristics of soybean cheese prepared with low lipoxidase soybean variety and defatted soybean meal by fermenting after proteolytic enzyme hydrolysis. *Korean J. Food Cook. Sci.* 17: 65–79 (2001)
- Choi, E.A. and H.C. Chang, *Cholesterol–lowering effects of a putative probiotic strain Lactobacillus plantarum EM isolated from kimchi.* *LWT–food Science and Technology*, 2015. 62(1): p. 210–217
- Cunha CR, Dias AI, Viotto WH. Microstructure, texture, colour and sensory evaluation of a spreadable processed cheese analogue made with vegetable fat. *Food Res. Int.* 43: 723–729 (2010)
- Dickinson, E., Hydrocolloids acting as emulsifying agents – How do they do it? *Food Hydrocolloids*, 2018. 78: p. 2–14
- Dimitreli G, Thomareis AS. Texture evaluation of block–type processed cheese as a function of chemical composition and in relation to its apparent viscosity. *J. Food Eng.* 79: 1364–1373 (2007)
- El–Assar MA, Abou–Dawood SA, Sakr SS, Younis NM. Low–fat processed cheese spread with added inulin: Its physicochemical, rheological and sensory characteristics. *Int. J. Dairy Sci.* 14: 12–20 (2019)

- Elsouhaimy SA, Refaay TM, Zaytoun MAM. Physicochemical and functional properties of quinoa protein isolate. *Ann. Agric. Sci.* 60: 297–305 (2015)
- Everard CD, O'Donnell CP, O'Callaghan DJ, Sheehan EM, Delahunty CM, O'Kennedy BT, Howard V. Prediction of sensory textural properties from rheological analysis for process cheeses varying in emulsifying salt, protein and moisture contents. *J. Sci. Food Agric.* 87: 641–650 (2007)
- Fernandes, P.B., M.P. Goncalves, and J.L. Doublier, Influence of locust bean gum on the rheological properties of kappa-carrageenan systems in the vicinity of the gel point. *Carbohydrate Polymers*, 1993. 22: p. 99–106
- Florencia FS. Rheology of spreadable goat cheese made with autochthonous lactic cultures differing in their ability to produce exopolysaccharides. *Food Sci. Technol.* 33: 233–238 (2013)
- Fooks, L.J. and G.R. Gibson, In vitro investigations of the effect of probiotics and prebiotics on selected human intestinal pathogens. *FEMS Microbiology Ecology*, 2002. 39: p. 67–75
- Giri SK, Tripathi MK, Kotwaliwale N. Effect of composition and storage time on some physico-chemical and rheological properties of probiotic soy-cheese spread. *J. Food Sci. Technol.* 55: 1667–1674 (2018)
- Guinot L, Rioux LE, Labrie S, Britten M, Turgeon SL. Identification of texture parameters influencing commercial cheese matrix disintegration and lipid digestion using an in vitro static digestion model. *Food Res. Int.* 121: 269–277 (2019)
- Han NR, Park SY, Lim SD. Physicochemical characteristics and immunomodulating activity by Mozzarella cheese made with *Streptococcus macedonicus* LC743. *J. Milk Sci. Biotechnol.* 33: 247–252 (2015)
- Hul, M.V., et al., From correlation to causality: the case of *Subdoligranulum*. *Gut Microbes*, 2020. 12(1): p. 1–13
- Jeong EJ. Changes in allergenicity and digestibility of egg and milk by heat treatment. *J. East Asian Soc. Dietary Life.* 11: 104–111 (2001)
- Kheadr EE, Vachon JF, Paquin P, Fliss I. Effect of dynamic high pressure on microbiological, rheological and microstructural quality of Cheddar cheese. *Int. Dairy J.* 12: 435–446 (2002)
- Kontou V, Dimitreli G, Raphaelides SN. Elongational flow studies of processed cheese spreads made from traditional greek cheese varieties. *LWT–Food Sci. Technol.* 107: 318–324 (2019)
- Lea, E., D. Crawford, and A. Worsley, Public views of the benefits and barriers to the consumption of a plant-based diet. *European Journal of Clinical Nutrition*, 2006. 60: p. 828–837

- Lee JS, Moon JY, Nam KT, Park SM, Park SY, Jung MY, Son YS. Effects of milling system on Gouda cheese characteristics made from farmstead milk-processing plant. *J. Milk Sci. Biotechnol.* 34: 245–254 (2016)
- Leylabadlo, H.E., et al., The critical role of *Faecalibacterium prausnitzii* in human health: An overview. *Microbial Pathogenesis*, 2020. 149: p. 104344–104355
- Li, L., et al., An in vitro model maintaining taxon-specific functional activities of the gut microbiome. *Nature Communications*, 2019. 10: p. 4146–4156
- Li H, Zhu K, Zhou H, Peng W, Guo X. Comparative study about some physical properties, in vitro digestibility and immunoreactivity of soybean protein isolate for infant formula. *Plant Foods Hum. Nutr.* 68: 124–130 (2013)
- Lim TJ, Easa AM, Karim AA, Bhat R, Liong MT. Development of soy-based cream cheese via the addition of microbial transglutaminase, soy protein isolate and maltodextrin. *Br. Food J.* (2011)
- Liu H, Xu XM, Guo SD. Comparison of full-fat and low-fat cheese analogues with or without pectin gel through microstructure, texture, rheology, thermal and sensory analysis. *Int. J. Food Sci. Technol.* 43: 1581–1592 (2008)
- Lobato-Calleros C, Reyes-Hernández J, Beristain CI, Hornelas-Urbe Y, Sánchez-García JE, Vernon-Carter EJ. Microstructure and texture of white fresh cheese made with canola oil and whey protein concentrate in partial or total replacement of milk fat. *Food Res. Int.* 40: 529–537 (2007)
- Marafon AP, Sumi A, Granato D, Alcântara MR, Tamime AY, de Oliveira MN. Effects of partially replacing skimmed milk powder with dairy ingredients on rheology, sensory profiling, and microstructure of probiotic stirred-type yogurt during cold storage. *J. Dairy Science.* 94: 5330–5340 (2011)
- Marazza, J.A., M.S. Garro, and G.S. de Giori, *Aglycone production by Lactobacillus rhamnosus CRL981 during soymilk fermentation*. *Food microbiology*, 2009. 26(3): p. 333–339.
- Matias NS, Bedani R, Castro IA, Saad SM. A probiotic soy-based innovative product as an alternative to petit-suisse cheese. *LWT-Food Sci. Technol.* 59: 411–417 (2014)
- McLoughlin, R.F., et al., Relationship of prebiotics and food to intestinal microflora. *European Journal of Nutrition*, 2002. 106: p. 930–945
- Mu, Q., V.J. Tavella, and X.M. Luo, Role of *Lactobacillus reuteri* in human health and diseases. *Frontiers in Microbiology*, 2018. 9: p. 757–773
- Nazim MU, Mitra K, Rahman MM, Abdullah ATM, Parveen S. Evaluation of the nutritional quality and microbiological analysis of newly developed soya cheese. *Int. Food Res. J.* 20: 3373 (2013)
- Ningtyas DW, Bhandari B, Bansal N, Prakash S. Texture and lubrication properties of

- functional cream cheese: Effect of β -glucan and phytosterol. *J. Texture Stud.* 49: 11–22 (2018)
- Oboh G, Omotosho OE. Effect of types of coagulant on the nutritive value and in vitro multienzyme protein digestibility of tofu. *Int. J. Food Sci. Technol.* 3: 182–187 (2005)
- Oh, N., et al., *Preventive effect of fermented Maillard reaction products from milk proteins in cardiovascular health.* *Journal of dairy science*, 2014. 97(6): p. 3300–3313
- Pang Z, Xu R, Luo T, Che X, Bansal N, Liu X. Physicochemical properties of modified starch under yogurt manufacturing conditions and its relation to the properties of yogurt. *J. Food Eng.* 245: 11–17 (2019)
- Perez-mateos, M., et al., Interactions of k-carrageenan plus other hydrocolloids in fish myosystem gels. *Journal of food science*, 2001. 66(6): p. 838–843
- Pinto MDS, Lajolo FM, Genovese MI. Effect of storage temperature and water activity on the content and profile of isoflavones, antioxidant activity, and in vitro protein digestibility of soy protein isolates and defatted soy flours. *J. Agric. Food Chem.* 53: 6340–6346 (2005)
- Rivière, A., et al., *Bifidobacteria* and butyrate-producing colon bacteria: Importance and strategies for their stimulation in the human gut. *Frontiers in Microbiology*, 2016. 7: p. 979–999
- Rubel IA, Iraporda C, Gallo A, Manrique GD, Genovese, DB. Spreadable ricotta cheese with hydrocolloids: Effect on physicochemical and rheological properties. *Int. Dairy J.* 94: 7–15 (2019)
- Salek RN, Vašina M, Lapčík L, Černíková M, Lorencová E, Li P, Buňka F. Evaluation of various emulsifying salts addition on selected properties of processed cheese sauce with the use of mechanical vibration damping and rheological methods. *LWT–Food Sci. Technol.* 107: 178–184 (2019)
- Saha, D. and S. Bhattacharya, Hydrocolloids as thickening and gelling agents in food: a critical review. *Journal of Food Science and Technology*, 2010. 47(6): p. 587–597
- Shabani J, Sarfarazi M, Mirzaei H, Jafari SM. Influence of the sunflower oil content, cooking temperature and cooking time on the physical and sensory properties of spreadable cheese analogues based on UF white-brined cheese. *Int. J. Dairy Technol.* 69: 576–584 (2016)
- Sharma P, Sharma D, Amin A. Development of a functional fermented peanut-based cheese analog using probiotic bacteria. *BioTechnologia*: 99 (2018)
- Singh, P., et al., Functional and edible uses of soy protein products. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 2008. 7(1): p. 14–28

- Shin, W.-K., L. Wicker, and Y. Kim, HPMC(hydroxypropyl methylcellulose) as a fat replacer improves the physical properties of low-fat tofu. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2017. 97: p. 3720–3726
- Tang CH. Functional properties and in vitro digestibility of buckwheat protein products: Influence of processing. *J. Food Eng.* 82: 568–576 (2007)
- Tesso T, Hamaker BR, Ejeta G. Sorghum protein digestibility is affected by dosage of mutant alleles in endosperm cells. *Plant Breeding*, 127: 579–586 (2008)
- Wada Y, Lönnerdal B. Effects of industrial heating processes of milk-based enteral formulas on site-specific protein modifications and their relationship to in vitro and in vivo protein digestibility. *J. Agric. Food Chem.* 63: 6787–6798 (2015)
- Wexler, H.M., Bacteroides: the Good, the Bad, and the Nitty-Gritty. *Clinical Microbiology Reviews*, 2007. 20(4): p. 593–621
- Xiao, Y., et al., *Enhancement of the antioxidant capacity of soy whey by fermentation with Lactobacillus plantarum B1-6*. *Journal of Functional Foods*, 2015. 12: p. 33–44
- Yang, X., et al., Differences in the physicochemical, digestion and microstructural characteristics of soy protein gel acidified with lactic acid bacteria, glucono- δ -lactone and organic acid. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2021. 185: p. 462–470
- Yousefi, M. and S.M. Jafari, Recent advances in application of different hydrocolloids in dairy products to improve their techno-functional properties. *Trends in Food Science&Technology*, 2019. 88: p. 468–483
- Yu L, Hammond EG. Production and characterization of a Swiss cheese-like product from modified vegetable oils. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 77: 917–924 (2000)
- Zhang, Y.C. and S.J. Schwartz, *Analysis of Isoflavones in Soy Foods*. *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*, 2003. 10(1): p. 11.6.1–11.6.17.
- Zhao Q, Selomulya C, Xiong H, Chen XD, Li X, Wang S, Sun W. Rice dreg protein as an alternative to soy protein isolate: Comparison of nutritional properties. *Int. J. Food Prop.* 17: 1791–1804 (2014)
- Zheng Y, Liu Z, Mo B. Texture profile analysis of sliced cheese in relation to chemical composition and storage temperature. *J. Chem.* 2016: 8690380 (2016)
- Zulkurnain, M., et al., Development of a soy-based cream cheese. *Journal of Texture Studies*, 2008. 39(6): p. 635–654

주 의

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