

119020-
3

보안 과제(), 일반 과제(O) / 공개(), 비공개(O)발간등록번호(O)
맛춤형혁신식품 및 천연안심소재기술개발 2022년도 최종보고서

발간등록번호

11-1543000-004190-01

감각 및 in vitro 단맛 수용체 평가법에 기반한 우수 감미질의 신규 천연 유래 감미료 개발

2022.11.3.

주관연구기관 / 서울대학교
협동연구기관 / 서울대학교
협동연구기관 / 씨제이제일제당(주)
협동연구기관 / 이화여자대학교

농림축산식품부
(전문기관)농림식품기술기획평가원

우수 감미질의 신규 천연 유래 감미료 개발
감각 및 in vitro 단맛 수용체 평가법에 기반한

2022

농림식품기술기획평가원
농림축산식품부

제출문

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “감각 및 in vitro 단맛 수용체 평가법에 기반한 우수 감미질의 신규 천연 유래 감미료 개발”(개발기간 : 2019.05.20.~ 2022.04.30)과제의 최종보고서로 제출합니다.

주관연구기관명 : 서울대학교 산학협력단 최해천 (인) 2022. 11. 3.

공동연구기관명 : 서울대학교 산학협력단 최해천 (인)

공동연구기관명 : 씨제이제일제당(주) 최은석

공동연구기관명 : 이화여자대학교 산학협력단 이향숙 (인)

주관연구책임자 : 홍재희

공동연구책임자 : 김양

공동연구책임자 : 박성희

공동연구책임자 : 김유리

국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정 제18조에 따라 보고서 열람에 동의합니다.

< 요약 문 >

사업명	맞춤형혁신식품 및 천연안심소재기술개발					총괄연구개발 식별 번호 (해당 시 작성)			
내역사업명 (해당 시 작성)						연구개발과제번호		119020-3	
기술 분류	국가과학기술 표준분류	1순위 소분류 LB1704식품가공 학	50%	2순위 소분류 LB1709효소/ 생물전환반응	20%	3순위 소분류 LB1707기기분석/ 관능검사	20%	4순위 소분류 LB1801기능성식품	10%
	농림식품 과학기술분류	1순위 소분류 PA0103식품가공 공정	60%	2순위 소분류 PA0103식품화학	20%	3순위 소분류 PA0199기타식품 공학	10%	4순위 소분류 PA0201기능성소재	10%
총괄연구개발명 (해당 시 작성)									
연구개발과제명		감각 및 in vitro 단맛 수용체 평가법에 기반한 우수 감미질의 신규 천연 유래 감미소재 개발							
전체 연구개발기간		2019. 05. 20 - 2022. 04. 30 (3년 개월)							
총 연구개발비		총 1,854,000 천원 (정부지원연구개발비: 927,000천원, 기관부담연구개발비 : 927,000천원)							
연구개발단계		기초[] 응용[] 개발[<input checked="" type="checkbox"/>] 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		<ul style="list-style-type: none"> ▪ 바이오전환기술을 활용한 다수의 천연 유래 신규 고감미료 개발 ▪ 1:1로 설탕 대체가 가능한 신규 고감미료/저감미 기능성 당류 혼합물의 대량생산 공정 확립 ▪ 다각적 관능평가법을 적용한 기존 고감미료 대비 탁월한 감미질의 신규 감미료 조성물 개발 ▪ 혁신기술인 <i>in vitro</i> 단맛수용체를 활용한 신규고감미료의 선별 및 항당뇨, 항염증 기능성 규명 						
	전체 내용		본 연구에서는 천연 유래의 고감미료에 바이오전환기술을 적용하여 다수의 신규 고감미료를 개발하고, 다각적인 관능평가 방법을 적용하여 기존의 고감미료에 비해 감미질이 현저히 개선된 신규 감미료 조성물을 개발하는 것을 목표로 함. 또한, 다수의 천연 유래 신규 고감미료의 상대당도 선별에 국내에서 이전에 적용된 바 없는 혁신 기술인 <i>in vitro</i> 단맛수용체를 개발하여 활용하고, 천연유래 감미료에 의해 나타나는 항당뇨 및 항염증 기능성을 평가하여, 감미질이 우수하며 생리기능성을 동반한 신규 고감미료를 제조하고, 저감미 기능성 당류와 혼합하여 설탕을 1:1로 대체할 수 있는 신규 감미료 조성물의 대량 생산 공정을 확립하는 것을 최종 목표로 함.						
	1단계 [2019.5.20-2022.4.30]	목표	<ul style="list-style-type: none"> ○ 1차년도 (주관(1세부), 2세부, 1협동, 2협동 순) <ul style="list-style-type: none"> ▪ 신규 스테비오사이드 당전이체의 감미특성 및 조합물의 감미질 향상 효과 규명 ▪ 생촉매를 이용한 신규 고감미료 NHDC 당전이체 개발, 정제 및 표준시료 확보 ▪ 핵심 고감미료 소재 standard 및 당전이 활성 효소/균주 pool 확보 ▪ <i>in vitro</i> 단맛수용체 활성분석 및 <i>in vitro</i> 지방세포분화역제, 항염증 효과 screening ○ 2차년도 <ul style="list-style-type: none"> ▪ NHDC 당전이체 및 스테비오사이드 당전이체의 감미특성 및 조합물의 감미질 향상효과 규명 ▪ NHDC 당전이체 생산공정 최적화, 대량공정화 및 이화학적 특성 분석 ▪ Rebaudioside-A로부터 Rebaudioside-D 전환 활성 보유 효소 선별 및 확보 ▪ 감미소재의 단맛수용체 활성분석, <i>in vivo</i> 항당뇨, 항염증 기능평가 및 분자적 기전 규명 						

		<p>○ 3차년도</p> <ul style="list-style-type: none"> NHDC 당전이체/스테비오사이드 당전이체 기반 신규감미료의 식품 적용 시 소비자수용도 평가 국내산 감귤류로부터 전구체의 추출 및 NHDC 생산, 정제 공정 최적화 소반응/분리정제 scale-up, 시제품 제조 및 NHDC당전이체와 복합솔루션 개발 <i>in vitro</i> 단맛수용체 활성/상대당도의 상관성 분석, <i>in vivo</i> 향당뇨, 항염증 및 장미생물군집영향 분석 <hr/> <p>○ 1차년도</p> <ul style="list-style-type: none"> 주관(1세부):신규 스테비오사이드 당전이체의 감미특성 및 조합물의 감미질 향상 효과 규명 신규 스테비오사이드 당전이체의 상대당도 및 감미 특성 분석 신규 스테비오사이드 당전이체 상호/기타 저열량 감미료와 조합물의 상대당도 및 미질 분석 2세부: 생축매를 이용한 신규 고감미료 NHDC 당전이체 개발, 정제 및 표준품 확보 효소 및 기질 선별을 통한 효율적 NHDC 당전이체 생합성 조건 탐색 prep-HPLC를 이용한 고순도 NHDC 당전이체 고순도 분리, 정제 조건 확립 및 구조 동정 1협동: 핵심 고감미료 소재 standard 및 당전이 활성 효소/균주 pool 확보 상용화 고감미도 스테비아 감미료 소재 3건 이상 확보(Rebaudioside-A, -D, -M) 포도당전이 Rebaudioside-A 및 포도당전이 스테비오사이드 제조 확보 신규 전환효소 후보 서열 확보 및 보유 가능한 미생물 또는 genomic DNA pool 확보 2협동: <i>in vitro</i> 단맛수용체 활성분석 및 <i>in vitro</i> 지방세포분화억제, 항염증 효과 screening 단맛수용체(TAS1R3, TAS1R2)의 stable cell line 구축 및 <i>in vitro</i> 단맛수용체 활성평가 스테비오사이드 신규감미소재 농도에 따른 단맛수용체 활성변화 비교분석 신규감미물질의 <i>in vitro</i> 지방세포 분화억제 및 항염증 효과 screening <p>○ 2차년도</p> <ul style="list-style-type: none"> 주관(1세부):NHDC/스테비오사이드당전이체의 감미특성 및 조합물의 감미질 향상효과 규명 NHDC 당전이체, 스테비오사이드 당전이체의 상대당도 및 감미 특성 분석 NHDC 당전이체, 스테비오사이드 당전이체 상호/저열량 당류조합물의 상대당도 및 감미질 분석 2세부: NHDC 당전이체 생산공정 최적화, 대량공정화 및 이화학적 특성 분석 반응표면분석을 활용한 NHDC 당전이체 최적화 생합성 조건 확립 대량 생합성을 위한 최적화 생합성 공정 scale-up, 대량제조 및 이화학적 특성 분석 1협동:Rebaudioside-A로부터 Rebaudioside-D 전환 활성 보유 효소 선별 및 확보 스테비올 배당체(Rebaudioside-A, -D, -M)별 분리분석 조건 확보 Reb-D 전환 효소 후보군 선정 및 효소발현/생전환을 위한 조건 확보 전환효소 선별 및 반응특성 조사를 통한 최종 우량 효소 선정 2협동: 감미소재의 단맛수용체 활성분석, <i>in vivo</i> 향당뇨, 항염증 기능평가 및 분자적 기전 규명 NHDC 신규감미소재 농도에 따른 단맛수용체 활성변화 비교분석 신규감미소재의 <i>in vivo</i> 향당뇨 및 항염증 모델 구축, 기능성 평가 및 분자적 기전 규명 <p>○ 3차년도</p> <ul style="list-style-type: none"> 주관(1세부):신규 NHDC 당전이체와 스테비오사이드 당전이체 기반 신규 감미료의 식품 적용 시 소비자 수용도 평가 신규 NHDC 당전이체와 스테비오사이드 당전이체 기반 감미료를 적용한 상용제품의 기호도 및 소비자가 인지하는 감미특성 규명 2세부: 국내산 감귤류로부터 전구체의 추출 및 NHDC 생산, 정제 공정 최적화
	내용	

		<p>NHDC 전구체 고탐유 국내산 감귤류 미숙과 선별 및 확보 초음파 등을 활용한 NHDC 전구체 추출 최적화 NHDC 전구체 정제과정 및 NHDC 제조과정 최적화</p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ 1협동: 소반응/분리정제 scale-up, 시제품 제조 및 NHDC당전이체와 복합솔루션 개발 발현 벡터/생산균주 등 효소발현 시스템 개발 및 정제효소 대비 생산성 효율검토 선발 당전이효소의 반응조건 적용한 고순도 분리정제 개발 및 효소반응액의 단위공정조건 확보 공정 조합설계 형태별 공정 시뮬레이션을 통한 생산 효율성 및 수율 평가 시제품 제조 및 시제품 적용 상용제품 개발 (table-top 감미료 1건, 음료 3건) ▪ 2협동: 감미소재 혼합물의 <i>in vitro</i> 단맛수용체 활성-관능적 상대당도의 상관성 분석, <i>in vivo</i> 항당뇨, 항염증 기능평가 및 장관미생물 군집영향 분석 <i>in vitro</i> 단맛수용체 활성분석과 관능적 상대당도의 상관성 분석 신규 감미소재 혼합물의 <i>in vivo</i> 항당뇨, 항염증 기능성 평가 및 대장 미생물군집 영향 규명
--	--	--

연구개발성과	<p>○ 주관(1세부)</p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ 감각검사를 활용하여 당전이 Reb A와 저열량 감미료 말티톨의 1:1 혼합물이 향미 향상 효과를 나타냄을 규명하여 우수한 감미질을 가진 스테비오사이드 당전이체와 배합비를 성공적으로 발굴하였음. ▪ 신규 당전이 Reb A와 저열량 감미료 3종(설탕, 말티톨, 에리스리톨)의 다양한 배합비 중 가장 감미질이 우수한 배합비를 규명하였음. ▪ 0.03% NHDC 당전이체의 상대당도를 측정하고 NHDC 당전이체와 스테비오사이드당전이체 또는 설탕 2성분 혼합물의 설탕 10% 수용액에 해당하는 감미상승/억제 효과를 측정하여 NHDC 3.5:설탕 6.5배합이 설탕에 비해 감미 향상 효과를 가짐을 규명하는 등 성실히 연구를 수행하여 산업적으로 활용도가 높은 결과를 산출하였음. ▪ NHDC 당전이체와 스테비오사이드 기반 감미료 및 감미료 배합을 table-top 감미료, 요구르트, 밀크티, 레모네이드, 두유라테, 가향 두유, 가향 우유 등 7종에 적용하여 설탕 대비 감미 특성 및 기호성을 규명하여 다양한 제품에 적용가능한 산업적 파급력이 높은 결과를 산출하였음. <p>○ 2세부</p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ 경제성 및 상용화 측면에서 가장 효율적인 상업적 효소 및 기질이 선정됨. ▪ 반응 온도, 시간 및 효소, 기질 비율을 탐색하여 경제성이 있으며 최대도 NHDC 당전이체를 생성할 수 있는 조건이 확립됨. ▪ Recycling preparative HPLC를 이용한 분리, 정제 조건을 확립하여 당전이체 5종 이상을 99% 이상 고순도로 분리, 정제하여 구조를 규명하여 성공적으로 목표를 달성하였음. ▪ NHDC 당전이체 중 물성이 뛰어나고 다량으로 생합성이 가능한 NHDC 당전이체를 최종 생산할 신규 감미료로 선정하고, 대량공정화하였으며, 이화학적 특성을 분석하였음. ▪ 대량 분리, 정제를 통하여 공동연구기관에 공급하여 성공적으로 협력 과제를 수행하였음, ▪ 국내산 감귤류인 당유자 미숙과 과피를 재료로 반응표면분석 방법을 이용하여 전구체 용매 추출 조건을 최적화하였으며, 상업적 섬유분해효소를 이용하여 추출 증진 방안을 모색하였음. ▪ 국내산 감귤류 미숙과 5종 내의 전구체의 함량을 분석하고, 전구체를 이용한 NHDC 제조공정을 확립하여 성실히 과제를 수행하였음. <p>○ 1협동</p> <ul style="list-style-type: none"> ▪ 상용화 스테비아 감미료 RebA, RebD, RebM을 비롯하여, 자체 개발 당전이스테비아(G-RebA, G-STV)의 표준 시료 제작 및 확보 ▪ 각각의 성분을 분리 및 정량 분석할 수 있는 국제 공인 HPLC 분석법 확립 ▪ 스테비아 생합성과 유사한 기작을 가질 것으로 예상되는 유전자/미생물 탐색 및 서열/구조 상동성 적용하여 유전자 pool 제작 및 유전자 개량 ▪ 당전이스테비아, RebD, RebM을 생합성할 수 있는 신규한 서열의 효소 발현하여 스테비아 생합성 반응 조건 확보 및 우수 전환율 보유 효소 확보 ▪ 신규 효소로부터 만들어지는 물질 identification ▪ 신규 확보 효소 서열의 독창성과 활성의 특수성을 인정받아 국내외 특허 37건 출원(국내 17, 해외 20), ▪ 효소발현 벡터 및 생산균주 제작 ▪ 저가의 추출물 원료로부터 당전이스테비아, RebD, RebM을 제조할 수 있는 효소반응 개발하여 효소 전환율 85% 이상 ▪ 효소반응액의 탈색, 탈염, 흡착정제, 농축, 결정화 등 단위 공정별 시뮬레이션 ▪ 스테비아 적용 복합 포뮬러로 당류 50% 저감된 시제품 4종 (음료 3건 및 테이블탑 1건) 제조하여 성적서 확보
--------	--

	<ul style="list-style-type: none"> ○ 2협동 <ul style="list-style-type: none"> ▪ <i>in vitro</i> 단맛수용체 시스템을 구축하고 스테비오사이드 당전이체 단맛수용체 활성을 분석함 ▪ 스테비오사이드 및 네오헤스페리딘 디하이드로칼콘 당전이체의 <i>in vitro</i> 지방세포분화억제 효과와 <i>in vitro</i> 항염증 효과를 스크리닝함 ▪ <i>in vitro</i> 단맛수용체 시스템을 구축하고 네오헤스페리딘 디하이드로칼콘 당전이체 단맛수용체 활성을 분석함 ▪ <i>in vivo</i> 항당뇨 및 항염증 모델을 구축하고 스테비오사이드 및 네오헤스페리딘 디하이드로칼콘 당전이체의 항당뇨, 항염증 효과를 규명하고 각 항당뇨 및 항염증 모델에서의 분자적 기전을 규명함 ▪ <i>in vitro</i> 단맛수용체 시스템을 구축하고 스테비오사이드 및 네오헤스페리딘 디하이드로칼콘 신규감미물질 혼합물의 단맛수용체 활성을 분석하고 관능검사 결과와의 상관관계를 분석함 ▪ <i>in vivo</i> 항비만, 항당뇨 및 항염증 모델을 구축하고 스테비오사이드 및 네오헤스페리딘 디하이드로칼콘 신규감미물질 혼합물의 항비만, 항당뇨 및 항염증 효과와 분자적 기전을 규명하고 장관미생물군총 군집에 미치는 영향을 규명함 ○ 전체 성과 <ul style="list-style-type: none"> ▪ 정부의 당류저감 정책의 목표에 부합하는 솔루션 제시 ▪ BT 기술을 기반한 기능성 식품소재의 세계일류상품화 성공사례 제시 ▪ 국내산 저이용 감귤류 및 감귤가공부산물을 이용한 고부가가치 신규 고감미료 개발 ▪ 미국/유럽 등 선진국 기업 중심의 대체감미료 시장에서 독점 및 차별화 가능한 기술영역 확보 ▪ 다각적 감미 특성 및 신규 스테비오사이드 와 NHDC 당전이체 간의 상승/보완 작용 평가 기술 및 기초 자료 확보 ▪ 식품 산업을 이끌 수 있는 기술 개발과 전문가 인력 양성으로 다양한 R&D 기반을 구축 ▪ <i>in vitro</i> 단맛수용체 affinity assay로부터 상대당도 예측 기술은 새로운 예측 모형 원리를 기반으로 한 다양한 연구 분야의 활성화 가능성을 제시함. <p>항당뇨, 항염증 효과가 검증된 기능성 감미료의 활용으로 국민 보건 및 건강에 실질적 기여</p>
--	---

연구개발성과 활용계획 및 기대 효과	<ul style="list-style-type: none"> ○ 활용계획 <ul style="list-style-type: none"> ▪ 당저감정책에 부합하는 바람직한 감미 및 기호특성 보유 신규 감미 조성물 개발에 적용 ▪ 소재기술개발을 통한 글로벌 기술경쟁력 확보 및 신규 감미소재 분야에서 독점 영역 구축 ▪ <i>in vitro</i> 단맛수용체 및 감각 평가시스템의 혁신 기술 확립으로 향후 감미료 개발에 활용 ▪ 스테비오사이드 및 NHDC 당전이체 항당뇨/항염증기능성 규명으로 기능성감미료 개발기술 확보 ○ 기대효과 <ul style="list-style-type: none"> ▪ 국내외 신규시장 창출 및 당류 저감 가공식품 개발과 유통의 확장 ▪ 천연 유래 고감미료 개발로 관련 산업 발전 및 국민 건강 증진에 기여 ▪ 저활용감귤류의 활용으로 농가수익 증대에 기여 및 환경적 문제 개선 ▪ 신규 고감미료의 해외 수출 및 수입 대체 효과 기대 ▪ 전문 지식인력 양성으로 관련 산업계에 기여 및 신규 산업 활성화로 일자리 창출 기대
---------------------	--

연구개발성과의 비공개여부 및 사유
본 연구의 주요 성과물은 당류저감 복합 포물러 제조 노하우로 구성되어 있음. 당류저감 포물러의 배합비의 경우 다양한 방법에 의하여 쉽게 카피(개량화)를 통한 우회(회피) 설계가 용이하므로 출원 특허의 등록 완료 및 기술이전까지 기술개발의 방향(컨셉) 및 노하우 또한 주요한 기술 자산으로 보호되어야 함. 따라서 본 연구과제의 성과는 종료 후 1년 6개월의 보안 유지가 필요하다고 판단됨.

연구개발성과의 등록·기탁 건수	논문	특허	보고서 원문	연구시설·장비	기술 요약 정보	소프트웨어	표준	생명자원		화합물	신품종	
								생명 정보	생물 자원		정보	실물
	7	37										
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)	스테비오사이드당전이체			NHDC 당전이체		단맛수용체		천연유래 감미료		바이오전환		
영문핵심어 (5개 이내)	glycosyl stevioside			glycosyl NHDC		sweetness receptor		natural sweeteners		bioconversion		

최종보고서										보안등급			
										일반[<input checked="" type="checkbox"/>], 보안[<input type="checkbox"/>]			
중앙행정기관명		농림축산식품부			사업명		사업명		맞춤형혁신식품 및 천연안심소제기술개발				
전문기관명 (해당 시 작성)		농림식품기술기획평가원					내역사업명 (해당 시 작성)						
공고번호					총괄연구개발 식별번호 (해당 시 작성)								
					연구개발과제번호			119020-3					
기술분류	국가과학기술 표준분류		1순위 소분류 LB1704식품가공학	50%	2순위 소분류 LB1709효소/생물전환반응	20%	3순위 소분류 LB1707기기분석/관능검사	20%	4순위 소분류 LB1801기능성식품	10%			
	농림식품과학기술분류		1순위 소분류 PA0103식품가공학	60%	2순위 소분류 PA0103식품화학	20%	3순위 소분류 PA0199기타식품공학	10%	4순위 소분류 PA0201기능성소재	10%			
총괄연구개발명 (해당 시 작성)		국문											
		영문											
연구개발과제명		국문		감각 및 in vitro 단맛 수용체 평가법에 기반한 우수 감미질의 신규 천연 유래 감미소재 개발									
		영문		Development of novel natural sweeteners with superior sweetness quality driven by sensory and in vitro sweet receptor-based evaluation									
주관연구개발기관		기관명		서울대학교 산학협력단			사업자등록번호		1198203684				
		주소		서울특별시 관악구 관악로1 서울대학교			법인등록번호		1143710009224				
연구책임자		성명		홍재희			직위		부교수				
		연락처		직장전화					휴대전화				
				전자우편					국가연구자번호				
연구개발기간		전체		2019. 05. 20 - 2022. 04. 30 (3년 개월)									
		단계		1단계[<input type="checkbox"/>]		2019. 05. 20 - 2019. 12. 31 (년 8개월)							
				2단계[<input type="checkbox"/>]		2020. 01. 01 - 2021. 04. 30 (1년 4개월)							
				3단계[<input type="checkbox"/>]		2021. 05. 01 - 2022. 04. 30 (1년 개월)							
연구개발비 (단위: 천원)		정부지원 연구개발비		기관부담 연구개발비		그 외 기관 등의 지원금		합계			연구개발비 외 지원금		
		지방자치단체		기타 ()									
		현금	현금	현물	현금	현물	현금	현물	합계				
총계		927,000	139,050	787,950					1,066,050	787,950	1,854,000		
1단계		1년차	236,000	35,400	200,600				271,400	200,600	472,000		
		2년차	337,000	50,550	286,450				387,550	286,450	674,000		
		3년차	354,000	53,100	300,900				407,100	300,900	708,000		
		4년차											
		5년차											
공동연구개발기관 등 (해당 시 작성)		기관명		책임자		직위		휴대전화		전자우편		비고	
공동연구개발기관		서울대학교 산학협력단		홍재희		부교수						역할	기관유형
		서울대학교 산학협력단		김 양		연구교수						공동	대학
		씨제이제일제당(주)		박성희		부장						공동	대기업
		이화여자대학교		김유리		교수						공동	대학
연구개발담당자 실무담당자		성명		김여홍			직위		학생연구원				
		연락처		직장전화					휴대전화				
									국가연구자번호				

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

2022 년 8 월 10 일

연구책임자: 홍 재 희



주관연구개발기관의 장: 최해천 (직인)



공동연구개발기관의 장: 최해천 (직인)



공동연구개발기관의 장: 최해천 (직인)



공동연구개발기관의 장: 최은석



공동연구개발기관의 장: 이항숙



농림축산식품부장관·농림식품기술기획평가원장 귀하

< 목 차 >

1. 연구개발과제의 개요	2
1) 연구개발의 목표	2
2) 기관별 세부 목표	3
2. 연구개발과제의 수행 과정 및 수행내용	5
I. 주관연구기관	5
II. 제 2세부연구기관	100
III. 제 1협동연구기관	124
IV. 제 2협동연구기관	203
3. 연구개발과제의 수행 결과 및 목표 달성 정도	254
1) 연구수행 결과	254
2) 목표 달성 수준	271
4. 목표 미달 시 원인분석(해당 시 작성)	274
1) 목표 미달 원인(사유) 자체분석 내용	274
2) 자체 보완활동	274
3) 연구개발 과정의 성실성	275
5. 연구개발성과 및 관련 분야에 대한 기여 정도	276
6. 연구개발성과의 관리 및 활용 계획	277

<연구개발성과 최종목표 대비 실적>

(단위 : 건수, 백만원, 명)

성과 목표	사업화지표											연구기반지표									
	지식 재산권				기술 실시 (이전)		사업화					기술인 증	학술성과			교육 지도	인력 양성	정책 활용 홍보		기 타 (타 연구 활용 등)	
	특허 출원	특허 등록	품 종 등 록	S M A R T	건 수	기 술 료	제 품 화	매 출 액	수 출 액	고 용 창 출	투 자 유 치		논 문		논 문 평 균 I F			학 술 발 표	정 책 활 용		홍 보 전 시
													S C I	비 S C I							
단 위	건	건	건	건	백 만 원	건	백 만 원	백 만 원	명	백 만 원	건	건	건	명	건	건					
가 중 치	5	5			15	10	30			30				2		3					
최 종 목 표	8	7	1		4	40	6	1500	6480	11				5	2	3	7		2		
연 구 연 도	1	4								1											
	2	14												1	1		4		2		
	3	19	3		1	15	4			2				4	1	3.24	4		3		
달 성 률 (%)	462	42.8 ₁₎	0	-	25 ₂₎	37.5 ₃₎	66.6 ₄₎	0 ₅₎	0 ₆₎	27.2 ₇₎				100 ₈₎	100	100	114		250		

1) 연구계획서 상 최종목표 7건 중 종료 1-5차년에 6건 예정되어 있음. 3차년까지의 목표는 1건으로, 연구기간 내 목표달성율은 300%임.

2) 연구계획서 상 최종목표 4건 중 종료 1-5차년에 2건 예정되어 있음. 3차년까지의 목표는 2건으로, 연구기간 내 목표달성율은 50%임.

3) 연구계획서 상 최종목표 4천만원 중 종료 1-5차년에 천만원 예정되어 있음. 3차년까지의 목표는 3천만원으로, 연구기간 내 목표달성율은 50%임.

4) 연구계획서 상 최종목표 6건 중 종료 1-5차년에 4건 예정되어 있음. 3차년까지의 목표는 4건으로, 연구기간 내 목표달성율은 100%임.

5) 연구계획서 상 연구 성과를 활용하여 과제 종료 후 2년간 국내외 인허가준비 및 물질 등록 진행하여 과제 종료 3차년도 이후 제품 출시 착수하므로 종료 5차년에 실적 발생.

6) 연구계획서 상 연구 성과를 활용하여 과제 종료 후 2년간 국내외 인허가준비 및 물질 등록 진행하여 과제 종료 3차년도 이후 제품 출시 착수하므로 종료 3차년 이후 실적 발생.

7) 연구계획서 상 최종목표 11명 중 종료 1-5차년에 10명 예정되어 있음. 3차년까지의 목표는 1명으로, 연구기간 내 목표달성율은 300%임.

8) 연구계획서 상 최종목표 5건 중 종료 1-5차년에 1건 예정되어 있음. 3차년까지의 목표는 4건으로, 연구기간 내 목표달성율은 125%임.

1. 연구개발과제의 개요

1) 연구개발의 목표

본 연구에서는 천연 유래의 고감미료에 바이오전환기술을 적용하여 다수의 신규 고감미료를 개발하고, 다각적인 관능평가 방법을 적용하여 기존의 고감미료에 비해 감미질이 현저히 개선된 신규 감미료 조성물을 개발하는 것을 목표로 함. 또한, 다수의 천연 유래 신규 고감미료의 상대당도 선별에 국내에서 이전에 적용된 바 없는 혁신 기술인 *in vitro* 단맛수용체를 개발하여 활용하고, 천연 유래 감미료에 의해 나타나는 항당뇨 및 항염증 기능성을 평가하여, 감미질이 우수하며 생리기능성을 동반한 신규 고감미료를 제조하고, 저감미 기능성 당류와 혼합하여 설탕을 1:1로 대체할 수 있는 신규 감미료 조성물의 대량 생산 공정을 확립하는 것을 최종 목표로 함.

○ **주관연구기관 (제 1세부 서울대학교):** 최적 천연 혼합 감미료 개발을 위한 NHDC 당전이체와 스테비오사이드 당전이체의 종합적 감미 특성 및 배합시의 향미 증진 효과 분석.

○ **세부연구기관 (제 2세부 서울대학교):** 국내산 감귤류 및 바이오전환기술을 이용한 신규 고감미료 NHDC당전이체 생합성 및 정제 공정 기술 개발

○ **협동연구기관 (제 1협동 CJ제일제당㈜):** 기능성 감미료를 이용한 저칼로리 복합감미제 개발

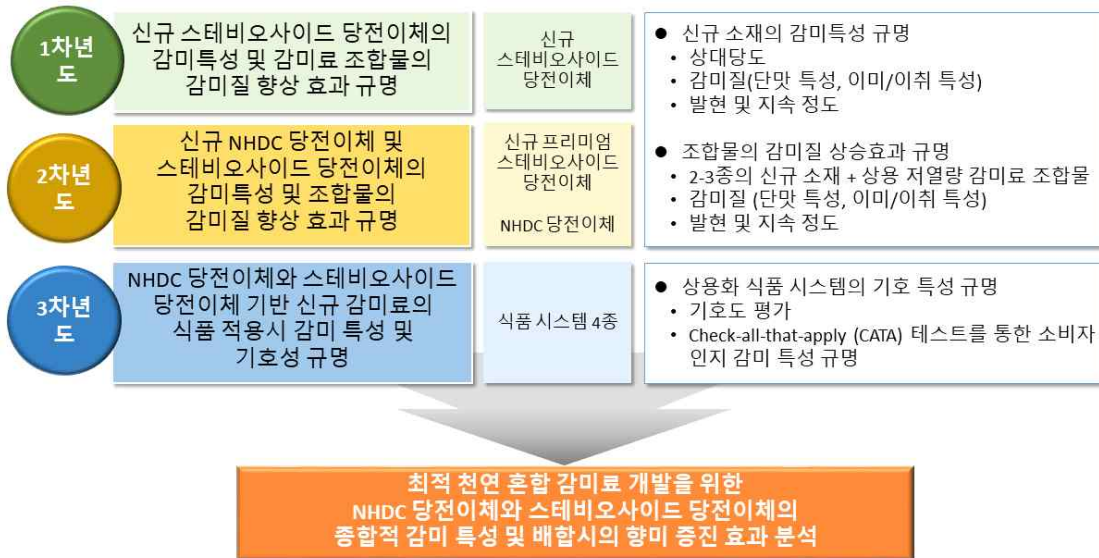
○ **협동연구기관 (제 2협동 이화여자대학교):** 신규감미물질의 단맛수용체의 활성분석을 통한 관능적 상대당도와의 상관관계 분석 및 항당뇨, 항염증 효능 규명



2) 기관별 세부 목표

○ 주관연구기관(서울대학교)

- NHDC당전이체와 스테비오사이드 당전이체 등 저열량 감미료의 감미 특성 분석
- NHDC당전이체, 스테비오사이드당전이체 및 기타 저열량 감미소재 배합에 따른 향미증진효과 규명
- NHDC당전이체 및 스테비오사이드당전이체 기반 신규 감미료의 식품 적용 시 소비자 수용도 평가



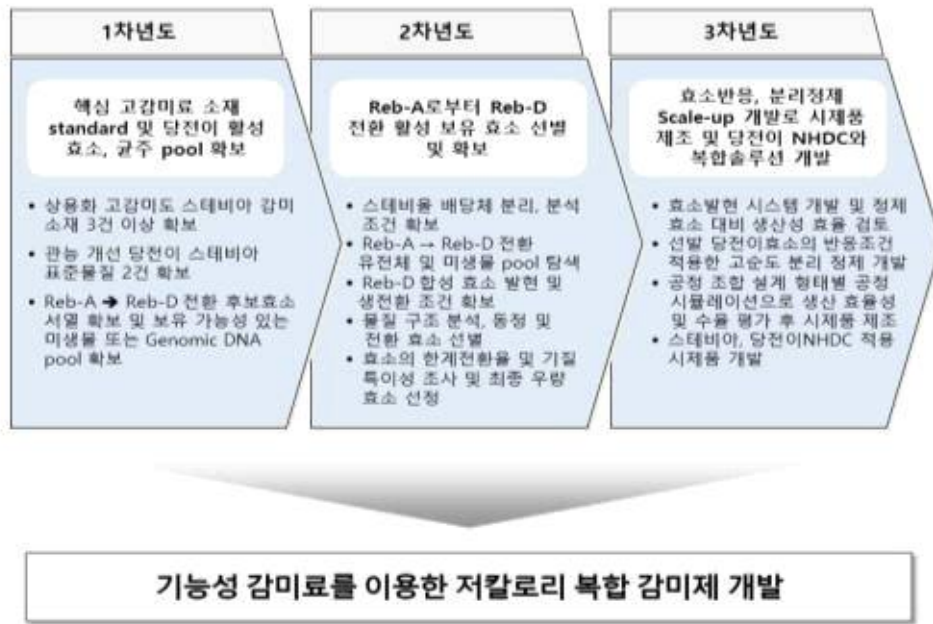
○ 제 2세부기관(서울대학교)

- 생촉매를 이용한 신규 고감미료 NHDC 당전이체 개발, 정제 및 표준시로 확보
 - 신규 고감미료 후보 5종
- NHDC 당전이체 생산 공정 최적화, 대량 공정화 및 이화학적 특성 분석
 - 생산 및 정제 최적화 공정 3건, 이화학적 특성 분석 6종
- 국내산 감귤류로부터 전구체의 추출, NHDC 제조 및 정제 공정 최적화
 - 국내산 감귤류 전구체 함량 분석 5종, 전구체 추출, NHDC 제조 및 정제 최적화공정 3건



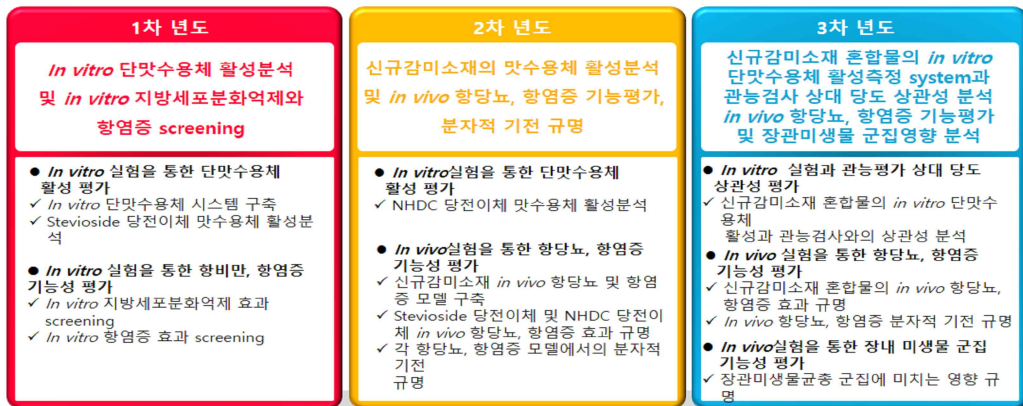
○ 제1협동기관(CJ제일제당㈜)

- 신규 감미소재 상용화 1건 및 신규 감미소재 적용한 시제품 개발 4건
 - 연구 종료 후 3년 내 신규 감미소재 혹은 개발 솔루션 적용한 제품 출시(리뉴얼 포함) 1건
 - 시제품 : Table-top 감미료 1종, 음료 3종
- 기존 상용화 효소처리스테비아 대비 이미/이취가 유의적으로 감소한 신규 스테비아 개발
- 효소 탐색 및 효소생산 균주 시스템 확보
- 효소 및 소재 생산 기술 최적화 및 신규 원료 소재 등록
- 기존 설탕 적용시과 동등수준 이상의 관능기호도 확보된 복합천연감미 포물러 확보
 - 당류저감 50%



○ 제2협동기관(이화여자대학교)

- 신규 감미소재의 단맛수용체 활성도 분석 및 관능검사와의 상관관계 분석
- 신규 감미소재의 항당뇨, 항염증 효능 규명
- 신규 감미소재의 장내미생물균총의 프로파일 변화 조사를 통한 영향분석



신규 천연 유래 감미소재 단맛수용체활성분석 및 항당뇨, 항염증 기능성 규명

2. 연구개발과제의 수행 과정 및 수행 내용

1. 주관연구기관 (서울대학교)

[1차년도]

1. 신규 스테비오사이드 당전이체의 상대당도 분석

본 실험에서는 2-alternative forced choice method (2-AFC) 를 이용하여 5% 설탕 수용액과 동일한 상대당도를 확립하였음.

1.1. 실험방법

1.1.1. 시료

- 총 8종류의 시료를 평가에 사용함(Table I-1).
- Glycosyl Rebaudioside A (G-Reb A), Glycosyl Stevioside (G- stevia), Rebaudioside A (Reb A), Rebaudioside D (Reb D), Rebaudioside M (Reb M), Allulose, Maltitol, Sucralose의 농도를 5수준으로 제조하여 각 시료마다 5% 설탕 수용액과 비교함 (Table I-2).

Table I-1. Sample information

Sample	Product name	Manufacturer	Purity(%)
Glycosyl Rebaudioside A	Glycosyl Rebaudioside A	CJ Cheiljedang	99
Glycosyl Stevioside	Steviol Glycosides	CJ Cheiljedang	95
Rebaudioside A	RA97%	Shandong Huaxian Stevia Co., LTD	97.3
Rebaudioside D	RD95	Shandong Haigen Bio-Tech	97.2
Rebaudioside M	RM95	Shandong Haigen Bio-Tech	95.64
Allulose	Allulose(Crystalline form)	CJ Cheiljedang	99.26
Maltitol	481101 G SWEETPEARL P200 - MALTITOL	LIANYUNGANG	99.5
Sucralose	4,1,6-trichloro-galactose-ucrose	TATE&LYLE	95

Table 1-2. Concentration of samples used in 2-AFC.

Sample	Concentration
Glycosyl Rebaudioside A	0.01%, 0.02%, 0.03%, 0.04%, 0.05%
Glycosyl Stevioside	0.02%, 0.04%, 0.06%, 0.08%, 0.1%
Rebaudioside A	0.01%, 0.02%, 0.03%, 0.04%, 0.05%
Rebaudioside D	0.005%, 0.011%, 0.017%, 0.023%, 0.029%
Rebaudioside M	0.005%, 0.011%, 0.017%, 0.023%, 0.029%
Allulose	6%, 7.5%, 9%, 10.5%, 12%
Maltitol	5.5%, 6.5%, 7.5%, 8.5%, 9.5%
Sucralose	0.004%, 0.006%, 0.008%, 0.01%, 0.012%

1.1.2. 시료의 준비

- 시료는 분량의 감미료를 실온의 정수에 magnetic stirrer로 10분간 교반하여 완전히 용해시켜 제조함.
- 하루 동안의 냉장($2\pm 1^\circ\text{C}$) 저장기간 동안 관능적 특성 및 품질에 변화가 없는 것으로 확인되어 하루 전에 시료를 농도별로 제조한 뒤 냉장 보관하여 사용함.
- 시료의 온도 차이가 시료 평가에 미치는 영향을 최소화하기 위하여 평가가 있기 최소 3시간 전에 실온($22\pm 2^\circ\text{C}$)에서 방냉함. 관능적 특성 및 품질에 변화가 없는 것으로 확인 후, 평가 2시간 전에 시료는 흰색 일회용 플라스틱 컵에 10mL씩 소분하여 실온으로 제시함

1.1.3. 시료의 제시

- 시료는 난수표에서 추출한 세 자리 숫자로 표기함.
- 입가심 물은 온수와 정수를 제시하였음. 온수는 보온병에서 $46\pm 1^\circ\text{C}$ 로 유지하였고, 정수는 실온($22\pm 2^\circ\text{C}$)의 정수를 물병에 담아 제시하였음. 예비실험을 통하여 구강 내 온도 변화를 최소화함을 위해 온수로 입가심 후에 정수로 입가심을 하도록 설정되었음.

1.1.4. 검사요원

- 서울대학교 감각과학 연구실의 소비자 검사 요원 pool을 대상으로 한 전화 모집과 서울대학교 온라인 게시글에 참가자 모집문을 공지하여 자발적인 참여 지원자 20대 138명을 선발함.

1.1.5. 평가 절차

- 1 session당 한 종류의 감미료 시료 5쌍을 평가함.
- Session 별 제공되는 시료의 종류 및 농도 제시 순서는 William Latin Square Design에 의해 결정되었음.
- 5% 설탕 수용액과 감미료 시료 1쌍 내에서의 시료 평가 순서는 counter-balanced, randomized 되었음.
- 검사 요원의 피로를 막기 위하여 1회 4종류의 시료를 평가하도록 하였으며, 138명의 검사 요원을 4종류의 시료에 랜덤 배정하였음. 시료당 54-69명의 검사 요원이 평가하였음. (g-stevia:61명, g-reb

A;69명, reb A;63명, reb D;62명, reb M; 53명, sucralose;54명, allulose;67명, maltitol;65명)

- 제시된 시료 전체를 5초 동안 머금고 제시된 타구 컵에 뱉은 후 5초 동안의 맛을 느껴 총 10초 동안 느껴지는 총체적인 단맛을 평가함.
- 5 농도 수준으로 제조된 시료를 각각 5% 설탕 수용액과 비교하여 단맛이 더 강한 시료를 선택하도록 함.
- 감미료의 섭취로 인해 발생할 수 있는 건강상의 문제를 최소화하기 위하여 시료를 삼키지 않고 뱉도록 하였음.
- 한 쌍의 시료를 평가한 후 다음 시료 쌍의 평가 전 1~2분간의 휴식과 함께 제시된 입가심용 온수와 정수로 충분히 입을 헹구도록 함.
- 한 종류의 감미료 5쌍을 평가한 후에는 5분간 휴식을 취하여 검사 시 피로감을 최소화함.
- 검사는 서울대학교 강의실에서 개별적으로 실시함.

1.1.6. 결과 분석

- 시료를 5% 설탕 용액보다 더 달다고 평가한 응답 수를 세어 concentration - response (C-R curve)을 구하고 회귀식($\% \text{ response} = a \times \text{concentration}(\%) + b$)을 구하여 응답률이 50%일 때의 감미료 농도를 구함.
- 상대 당도 = 설탕 용액 농도 (5%) / 응답률 50%일 때의 감미료 농도

1.2. 실험결과

- 각 감미료의 C-R curve(Fig. I-1)에서 구해진 상대 당도는 Table I-3과 같음.
- 각 시료의 회귀식에 대한 R²값은 0.91-0.99로, 회귀선이 결과값에 잘 적합됨.
- Stevioside는 남미 파라과이가 원산지인 국화과 다년생 초본인 Stevia rebaudiana BERTONI로부터 추출한 감미성분으로 최근 가장 주목을 받고 있는 고감미료임. Stevia의 단맛 성분으로는 Stevioside, Rebaudioside A, Rebaudioside C, D, E, Dulcoside A 등이 알려져 있음. 이 중 본 연구에 사용된 Stevioside는 Glycosyl Stevioside, Glycosyl Rebaudioside A, Rebaudioside A, D, M 임.
- Glycosyl Stevioside와 Glycosyl Rebaudioside A는 제 1 협동기관(CJ)에서 개발한 신규 Stevioside 당전이체임. Glycosyl Stevioside의 상대당도는 10Brix 기준 75로 보고되었으나, 5%에서는 상대당도가 증가, 5% 설탕용액 대비 102배의 단맛을 나타내어 낮은 농도에서는 상대당도가 더 증가하는 경향을 보였음.
- 나머지 시료들은 대부분 문헌에서 보고된 바와 유사한 값을 나타내어 본 연구에서 사용된 방법이 효율적으로 상대당도를 측정하는 것으로 나타남.

Table I-3. Relative sweetness of 8 sweeteners calculated from dose-response curves

Samples	Relative Sweetness	
	Determined in this study	From Literature
Glycosyl Stevioside	102	75(10Brix 기준)
Glycosyl Rebaudioside A	155	165
Rebaudioside A	235	233-300
Rebaudioside D	239	221
Rebaudioside M	263	250
Sucralose	596	562
Allulose	0.53	0.57
Maltitol	0.65	0.67

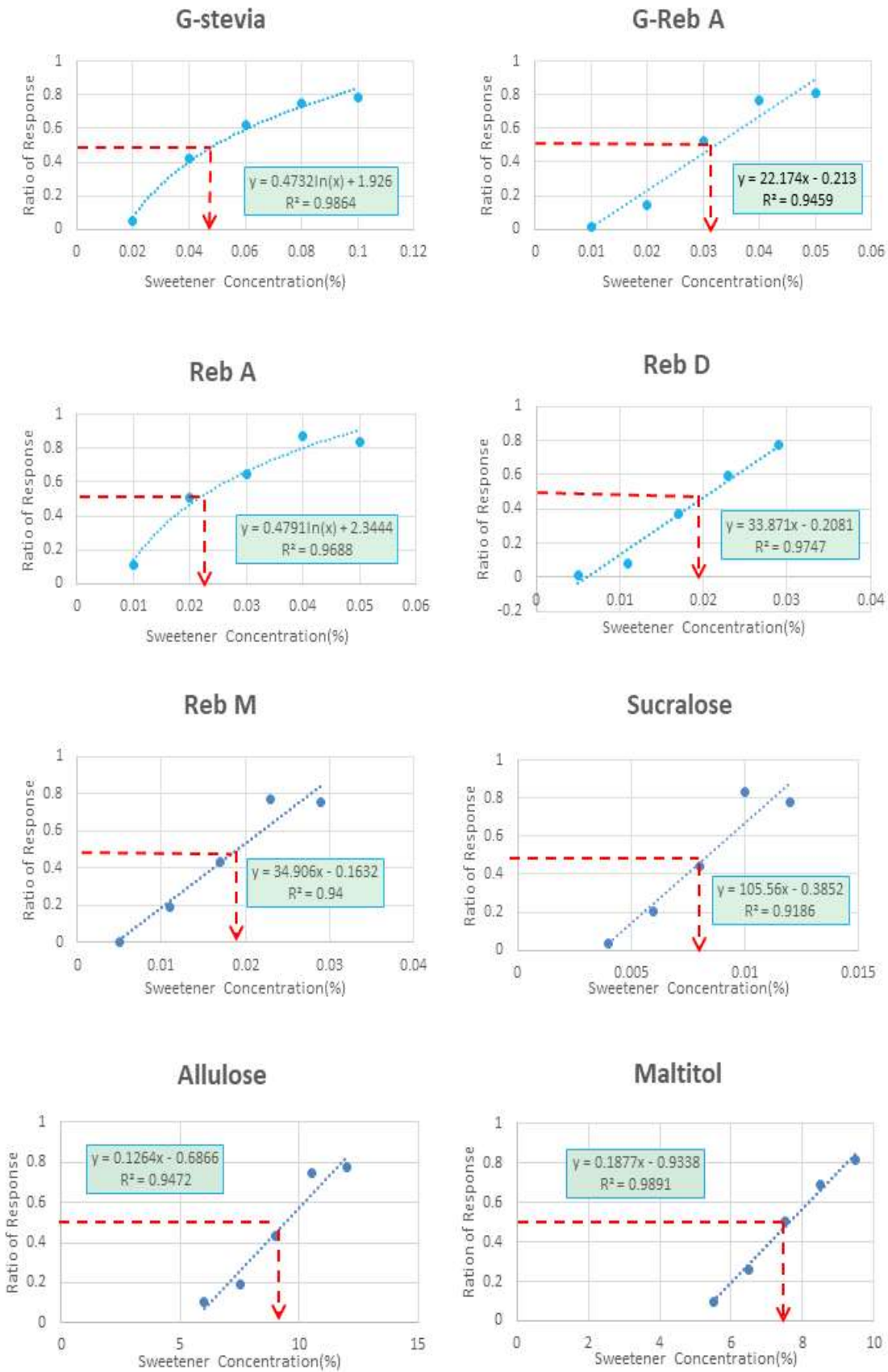


Figure I-1. Dose-response curves of 8 sweeteners.

2. 신규 스테비오사이드 당전이체 및 혼합물의 감미질 분석

본 실험은 정량적 묘사분석을 이용하여 감미 특성을 규명하기 위해 실시하였음.

2.1. 실험방법

2.1.1. 시료

- 2-AFC를 통해 확립된 5% 설탕 수용액과 동일한 감미도를 갖는 농도를 이용함(Table I-4).
- 혼합 감미료 수용액 시료들은 고감미료(Glycosyl stevioside, Glycosyl Rebaudioside A) 수용액 및 bulk 감미료(Allulose, Maltitol) 수용액과 1:1 비율로 혼합하여 사용, 총 13종류의 시료로 묘사분석을 진행함.

Table I-4. The information of sample concentration used in descriptive analysis.

Abbreviation	Sample	Concentration
Suc	Sucrose	5.0000 %
G-stev	Glycosyl Stevioside	0.0491 %
G-rebA	Glycosyl Rebaudioside A	0.0322 %
RebA	Rebaudioside A	0.0213 %
RebD	Rebaudioside D	0.0209 %
RebM	Rebaudioside M	0.0190 %
Sucral	Sucralose	0.0084 %
Allul	Allulose	9.3877 %
Mal	Maltitol	7.6388 %
G-stev+Al	Glycosyl Stevioside + Allulose	1:1 mixture of G-stevia 0.0491% : Allulose 9.3877%
G-Stev+Mal	Glycosyl Stevioside + Maltitol	1:1 mixture of G-stevia 0.0491% : Maltitol 7.6388%
G-rebA+Al	Glycosyl Rebaudioside A + Allulose	1:1 mixture of G-reb A 0.0322% : Allulose 9.3877%
G=RebA+Mal	Glycosyl Rebaudioside A + Maltitol	1:1 mixture of G-reb A 0.0322% : Maltitol 7.6388%

2.1.2. 시료의 준비

- 시료는 당일 제조하였으며, 사용 시까지 상온보관함.
- 시료는 평가 2시간 전 흰색 일회용 플라스틱 컵에 40mL씩 소분하여 실온(22±2℃)으로 제시함.
- 패널들이 입을 헹굴 수 있는 실온(22±2℃)의 정수와 온수(46±1℃)를 제시하였음.
- 시료는 난수표에서 추출한 세 자리 숫자로 표기함.

2.1.3. 패널 선발 및 훈련

- 패널 선발
 - 검사요원은 서울대학교 감각과학 연구실의 소비자 검사 요원 pool을 대상으로 한 전화 모집과 서울대학교 온라인 게시글에 참가자 모집문을 공지하여 자발적인 참여 지원자 8명을 선발함(20-30대 남자 3명, 여자 5명).

○ 패널 훈련

- 패널 훈련은 주 3-5회 진행되었으며, 회당 1.5hr 소요됨
- 용어 및 표준 시료, 평가 방법 개발
 - Orientation : 검사 목적, 관능검사 및 묘사분석의 소개
 - 특성 용어 도출 ; 예비실험을 거쳐 시료간의 차이를 잘 설명하는 용어 특성 목록을 제공 후, 패널 들 간의 토의를 거쳐 용어 목록을 개발함 (Table I-5).
 - 정의 및 표준시료 확립 ; 특성 용어에 대한 정의 및 표준시료, 평가 방법을 확립하였으며 (Table I-6), 15점 선척도(1.25cm; 매우 약하다, 13.75cm; 매우 강하다) 사용법을 훈련함.
- 패널들의 수행 능력 평가
 - 확립된 방법에 의하여 4회 모의 평가 후 통계분석을 통해 패널들 간의 consensus와 각 패널 요원 의 재현성을 평가함.
 - 재현성이 낮거나 평가 경향이 다른 패널 요원은 재훈련을 실시함.

2.1.4. 평가 절차

- 본 실험은 3회 진행됨.
- 하나의 시료를 평가한 후 다음 시료를 평가하는 monadic 방법을 사용함.
- 시료사이에 30초 휴식과 함께 제시된 물로 충분히 입을 헹구도록 함.
- 4개의 시료 평가 후 5분의 휴식을 취하여 검사 시의 피로감을 최소화함.
- 시료는 first sample effect를 막기 위해 Williams Latin square design에 따라 제시됨.

Table I-5. Definitions of descriptive attributes of sweetener samples.

Attributes		Definition
Taste	sweet	Fundamental taste sensation of which sucrose is typical
	bitter	Fundamental taste sensation of which caffeine and quinine is typical
	sour	Fundamental taste sensation of which citric is typical
Flavor	honey	Honey flavor typically found in Acacia honey
Trigeminal senses	astringent	The feeling which shrivels the tongue associated with aluminium potassium sulfate
	acridness	Sharp, irritating, or biting sensation on the tongue
Mouthfeel	Body	Rate of sample flows on the tongue
Aftertaste	Sweet	Sweet taste of 5 seconds after expectorate
	Bitter	Bitter taste of 5 seconds after expectorate
Onset	Sweet	The time when maximum sweetness was first perceived

Table I-6. Reference materials for the descriptive attributes of sweetener samples.

Attributes		Reference materials
Taste	sweet	2% (w/v) sucrose (CJ CheilJedang Co., Ltd., Korea) , 5% and 10% sucrose in water
	bitter	0.03% (w/v) caffein (sigma-Aldrich, st.Lous, MO, USA) in water.
	sour	0.03% (w/v) citric acid (RZBC Co., Ltd., China) in water.
Flavor	honey	2% (w/v) acacia honey (Seoraksanmilbongwon, Korea) in water.
Trigeminal senses	astringent	0.1% (w/v) aluminium potassium sulfate (Daejung Chemicals & metals Co., Gyeonggi-do, Korea.) in water.
	acridness	10% (w/v) erythritol (Zibo Zhongshi green biotech Co., Ltd., China) in water.
Mouthfeel	Body	1.5g potato starch (potato starch, Sunginfood, Gyeonggi-do, Korea) and 500mL water boiled using low heat with stir about 5 minutes.
Aftertaste	Sweet	0.05% (w/v) aspartame (the nutrasweet Co., USA) in water.
	Bitter	0.03% (w/v) caffein (sigma-Aldrich, st.Lous, MO, USA) in water.
Onset	Sweet	The time when maximum sweetness was first perceived with holding in the oral cavity.

2.1.5. 통계분석

○ 평균 및 표준편차

- 각 시료의 특성에 대한 데이터의 평균 및 표준편차를 구하였음.

2.2. 실험 결과

- 각 감미료에서 도출된 감미 특성을 요약한 결과는 Table. I-7과 같음. 시료의 관능특성을 보다 종합적이며 다각적으로 관찰하기 위하여 감미 출현 및 후미 역시 분석에 포함되었음.
- 단맛특성이 가장 강한 시료는 G-Stev+Mal 시료임(Table I-7). 또한 말티톨과 혼합한 경우 단독 시료보다 단맛이 증가하는 상승 작용을 보여주었으나, 알룰로오스와 혼합하는 경우에는 이러한 상승 작용이 나타나지 않았음.
- G-Stev과 G-RebA는 단맛 후미가 강하였으며, RebA보다 쓴맛과 떫은맛이 약하게 나타났음.
- RebA는 쓴맛, 떫은맛, 쓴맛 후미가 강했으며 단맛 출현 정도가 늦게 나타났음. 가장 특징적인 시료는 Allul로 쓴맛, 쓴맛 후미, 신맛, 아린느낌, 꿀 향미등이 강하게 나타났음.
- Mal은 꿀향미, 바디감이 강하며 단맛 출현 정도가 늦게 나타났음.
- G-Stev, G-RebA가 Allul과 혼합하였을때 보다 Mal과 혼합하였을 때 쓴맛, 떫은맛 등이 약하게 나타났음.

Table I-7. Mean intensities of descriptive sensory attributes elicited from the 13 sweetener samples

	Suc	G-Ste v	G-Reb A	RebA	RebD	RebM	Sucral	Allul	Mal	G-stev + Al	G-stev + Mal	G-Reb A + Al	G-Reb A + Mal
Sweet taste	7.39 (0.47) ¹	8.59 (0.91)	7.81 (0.80)	6.86 (1.72)	6.77 (0.58)	7.10 (1.67)	6.94 (0.98)	8.36 (0.79)	7.46 (1.79)	8.31 (1.19)	9.49 ² (0.91)	7.85 (0.63)	8.09 (1.10)
Bitter taste	0.60 (1.59)	3.67 (3.07)	2.79 (1.99)	5.46 (2.12)	2.49 (2.19)	3.69 (2.30)	1.55 (1.20)	5.05 (2.55)	1.87 (2.14)	3.51 (1.80)	2.91 (3.03)	5.01 (2.12)	1.96 (2.16)
Sour taste	1.08 (1.53)	2.47 (2.21)	2.63 (1.79)	2.89 (2.31)	2.12 (1.21)	3.11 (1.35)	2.83 (2.25)	5.86 (1.93)	1.89 (0.88)	5.05 (2.58)	2.96 (1.51)	2.55 (1.98)	4.52 (3.30)
Honey flavor	1.64 (1.56)	2.46 (2.22)	3.51 (2.35)	2.59 (2.40)	1.32 (1.70)	2.08 (2.44)	2.02 (2.16)	6.44 (2.19)	6.19 (2.00)	3.69 (1.96)	4.49 (2.13)	2.36 (2.20)	3.94 (1.85)
Astringent	0.62 (0.63)	3.13 (1.90)	2.89 (2.00)	5.59 (0.94)	2.70 (1.52)	5.13 (1.66)	2.36 (1.56)	5.46 (1.27)	2.31 (1.70)	5.07 (1.23)	2.80 (2.08)	5.02 (1.38)	2.25 (1.57)
Acridness	0.45 (0.60)	5.94 (1.69)	3.66 (1.63)	2.77 (2.35)	2.26 (2.06)	2.73 (1.89)	2.70 (2.73)	6.66 (1.24)	4.29 (1.88)	5.24 (1.49)	5.57 (1.37)	3.94 (1.56)	3.69 (2.22)
Body	3.22 (1.16)	5.66 (2.72)	3.04 (0.99)	3.18 (1.54)	2.99 (1.04)	3.55 (0.73)	2.41 (1.67)	3.23 (1.22)	5.82 (1.93)	3.18 (2.18)	3.54 (1.90)	3.97 (1.18)	5.52 (2.52)
Sweet aftertaste	3.15 (2.51)	6.83 (3.10)	7.22 (1.98)	4.16 (1.99)	3.72 (1.46)	4.50 (2.91)	3.77 (2.25)	4.11 (2.43)	4.23 (2.38)	6.46 (2.33)	6.29 (1.88)	4.52 (1.74)	7.70 (2.06)
Bitter aftertaste	0.46 (0.82)	2.77 (2.12)	2.39 (1.65)	5.06 (1.64)	1.66 (1.44)	2.39 (2.38)	1.06 (0.91)	4.36 (1.76)	1.43 (1.46)	4.14 (1.84)	1.84 (2.16)	1.89 (1.88)	1.52 (1.44)
Onset of sweetness	2.16 (1.57)	4.06 (2.57)	4.01 (1.50)	6.07 (2.88)	4.88 (2.76)	3.79 (1.42)	5.91 (2.87)	4.25 (1.33)	5.28 (2.66)	4.35 (1.82)	3.54 (1.75)	4.35 (2.88)	3.84 (1.17)

¹Standard deviation²Highest values are highlighted by shading

[2차년도]

1. 신규 스테비오사이드 당전이체의 상대당도 분석

본 실험에서는 2-alternative forced choice method (2-AFC) 를 이용하여 7% 설탕 수용액과 동일한 상대당도를 확립하였음.

1.1. 실험방법

1.1.1. 검사요원

- 서울대학교 감각과학 연구실의 소비자 검사 요원 pool을 대상으로 한 전화 모집과 서울대학교 온라인 게시글에 참가자 모집문을 공지하여 자발적인 참여 지원자 20~40대 105명(남자 42명, 여자 63명)을 선발함.

1.1.2. 시료

- 총 6종류의 시료를 평가에 사용함(Table I-8).
- 4종류의 고감미료[Glycosyl Rebaudioside A (G-Reb A), Rebaudioside A (Reb A), Rebaudioside M (Reb M), sucralose]와 두 종류의 혼합용 bulk 감미료 Erythritol, Maltitol가 사용됨.
- 설탕은 대조군으로 사용됨

Table I-8. Sample information

Sample abbreviation	Sample	Manufacturer	Purity(%)
G-Reb A	Glycosyl Rebaudioside A	CJ Cheiljedang, Seoul, Korea	99
Reb A	Rebaudioside A	Shandong Huaxian Stevia Co., LTD, Jining, China	97.3
Reb M	Rebaudioside M	Shandong Haigen Bio-Tech, Shandong, China	95.64
Erythritol	Erythritol (Crystalline form)	Zibo Zhongshi Green Biotech Co., LTD, Shandong, China	99.93
Maltitol	Maltitol (Sweetrearl P35)	Roquette China Co., LTD, Lianyungang, China	99.5
Sucralose	Sucralose	TATE&LYLE, London, England, UK	95

1.1.3. 시료의 준비

- 모든 감미료 시료들의 농도를 예비실험을 통해 설정한 5수준으로 제조하여 각 시료마다 7% 설탕 수용액과 비교함 (Table I-9).
- 시료는 분량의 감미료를 실온의 정수에 magnetic stirrer로 1100rpm에서 10분간 교반하여 완전히 용해시켜 제조함.
- 모든 시료는 당일 제조하여 평가가 있기 전까지 실온(22±2℃)에 보관함.
- 시료는 세 자리 난수로 표기한 흰색 일회용 플라스틱 컵에 10mL씩 소분하여 실온으로 제시함.

Table I-9. The range of concentrations for sweetener samples used in 2-AFC test

Sample	Concentration
G-reb A	0.02%, 0.03%, 0.04%, 0.05%, 0.06%
Reb A	0.03%, 0.04%, 0.05%, 0.06%, 0.07%
Reb M	0.0165%, 0.03%, 0.0435%, 0.057%, 0.0705%
Sucralose	0.01%, 0.0125%, 0.015%, 0.0175%, 0.02%
Erythritol	9.6%, 10.8%, 12%, 13.2%, 14.4%
Maltitol	7.55%, 8.62%, 9.67%, 10.77%, 11.85%

1.1.4. 평가 절차

- 1 session당 한 종류의 감미료 시료 5쌍을 평가함.
- Session 별 제공되는 시료의 종류 및 농도 제시 순서는 William Latin Square Design에 의해 결정되었음.
- 7% 설탕 수용액과 감미료 시료 1쌍 내에서의 시료 평가 순서는 counter-balanced, randomized 되었음.
- 검사 요원의 피로를 막기 위하여 1회 4종류의 시료를 평가하도록 하였으며, 105명의 검사 요원을 4종류의 시료에 랜덤 배정하였음. 시료당 51-55명의 검사 요원이 평가하였음.(G-reb A;53명, Reb A;51명, Reb M;53명, Sucralose;53명, Erythritol;55명, Maltitol;51명)
- 제시된 시료 전체를 5초 동안 머금고 제시된 타구 컵에 뱉은 후 5초 동안의 맛을 느껴 총 10초 동안 느껴지는 총체적인 단맛을 평가함.
- 5 농도 수준으로 제조된 시료를 각각 7% 설탕 수용액과 비교하여 단맛이 더 강한 시료를 선택하도록 함.
- 감미료의 섭취로 인해 발생할 수 있는 건강상의 문제를 최소화하기 위하여 시료를 삼키지 않고 뱉도록 하였음.
- 입가심 물은 온수와 정수를 제시하였음. 온수는 보온병에서 $46\pm 2^{\circ}\text{C}$ 로 유지하였고, 정수는 실온 ($22\pm 2^{\circ}\text{C}$)의 정수를 물병에 담아 제시하였음. 예비실험을 통하여 구강 내 온도 변화를 최소화함을 위해 온수로 입가심 후에 정수로 입가심을 하도록 설정되었음.
- 한 쌍의 시료를 평가한 후 다음 시료 쌍의 평가 전 2분간의 휴식과 함께 제시된 입가심용 온수와 정수로 충분히 입을 행구도록 함.
- 한 종류의 1 session(감미료 5쌍)을 평가한 후에는 10분간 휴식을 취하여 검사 시 피로감을 최소화함.
- 검사는 서울대학교 강의실에서 개별적으로 실시함.

1.1.5. 결과 분석

- 시료를 7% 설탕 용액보다 더 달다고 평가한 응답 수를 세어 concentration - response (C-R curve)을 구하고 회귀식($\% \text{ response} = a \times \text{concentration}(\%) + b$)을 구하여 응답률이 50%일 때의 감미료 농도를 구함.
- 상대 당도 = 설탕 용액 농도 (7%) / 응답률 50%일 때의 감미료 농도

1.2. 결과

- 각 감미료의 C-R curve(Figure I-2)에서 구해진 상대 당도는 Table I-10과 같음.
- 각 시료의 회귀식에 대한 R²값은 0.94-0.98로, 회귀선이 결과값에 잘 적합됨.
- Glycosyl Rebaudioside A는 제 1 협동기관(CJ)에서 개발한 신규 Stevioside 당전이체임.
- 고감미료의 경우 작년 5% 설탕용액 대비 상대당도 결과와 비교해보면, G-reb A, Reb A, Reb M, sucralose의 상대당도는 감소하는 경향을 보였다. 이는 농도가 증가함에 따라 쓴맛이 증가하여 나타난 결과임.
- 나머지 bulk 시료들은 대부분 문헌에서 보고된 바와 유사한 값을 나타냄.

Table I-10. Relative sweetness of 7 sweeteners calculated from dose-response curves

Samples	Relative Sweetness	
	Determined in this study	From Literature
G-reb A	147	155 at 5% sucrose
Reb A	132	235 at 5% sucrose
Reb M	159	263 at 5% sucrose
Sucralose	489	596 at 5% sucrose
Erythritol	0.6	0.53-0.63 at 5% sucrose
Maltitol	0.73	0.65-0.7 at 5% sucrose

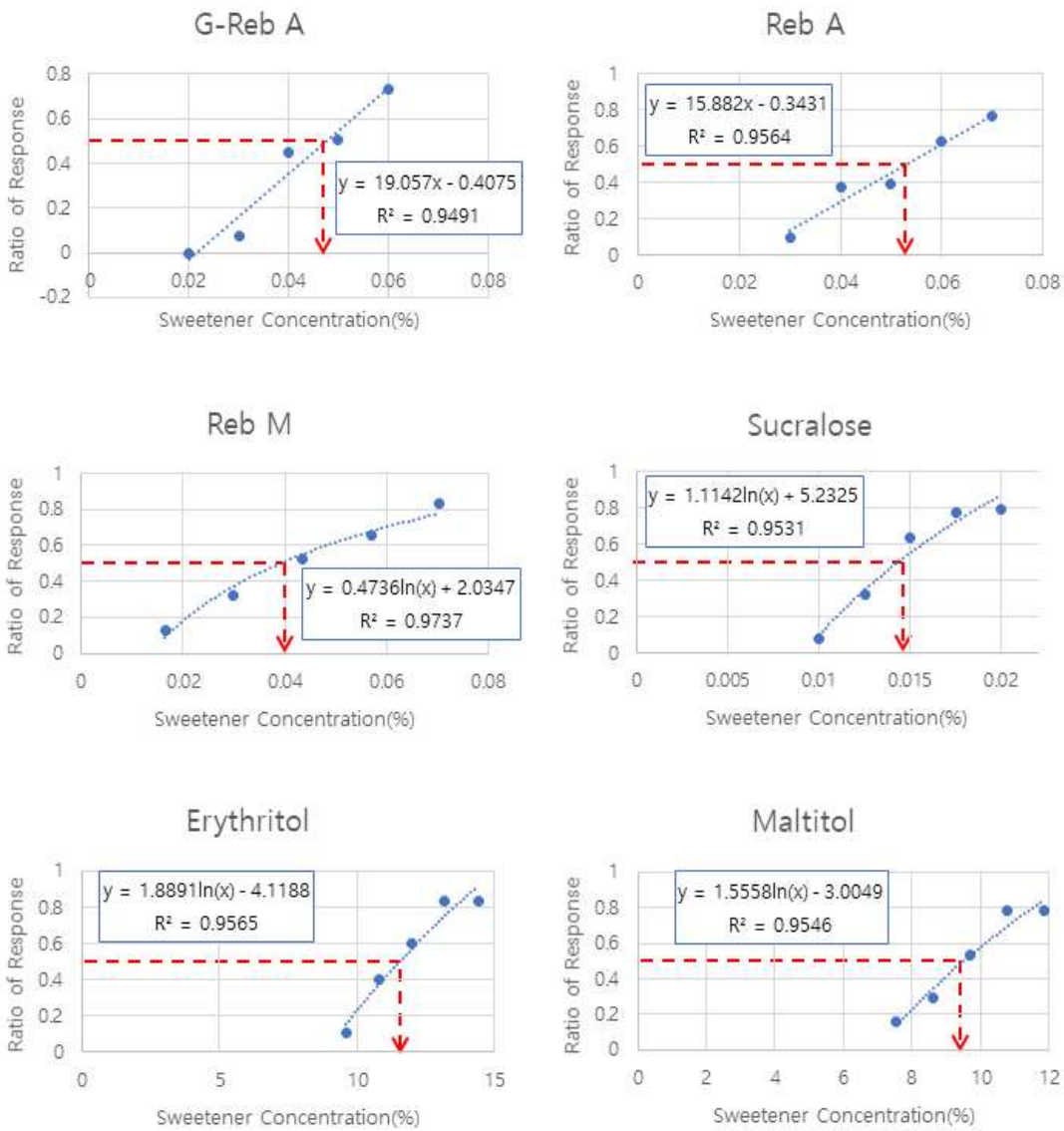


Figure I-2. Dose-response curves of 6 sweeteners.

2. 신규 스테비오사이드 당전이체 및 혼합물의 감미질 분석

2.1. 실험방법

2.1.1. 패널 선발

- 검사요원은 서울대학교 감각과학 연구실의 소비자 검사 요원 pool을 대상으로 한 전화 모집과 서울대학교 온라인 게시글에 참가자 모집문을 공지하여 자발적인 참여 지원자 8명(20-30대 남자 3명, 여자 5명)을 선발함.

2.1.2. 시료의 준비

- 7 종류의 단일 감미료 (설탕, G-reb A, Reb A, Reb M, sucralose, erythritol, maltitol)과 2 종류의 혼합 감미료(G-reb A+erythritol, G-reb A+maltitol)의 총 9 종류의 시료가 사용됨 (Table I-11).
- 2-AFC를 통해 확립된 7% 설탕 수용액과 동일한 감미도를 갖는 농도를 이용함 (Table I-11).
- 혼합 감미료 수용액 시료들은 고감미료(G-reb A) 수용액 및 bulk 감미료(erythritol, maltitol) 수용액과 1:1 비율로 혼합하여 사용함.

- 시료 제조 및 보관 방법은 2-AFC 실험과 동일함.
- 시료는 평가 2시간 전 흰색 일회용 플라스틱 컵에 70mL씩 소분하여 실온(22±2℃)으로 제시함.

Table I-11. The information of sample concentration used in descriptive analysis

Abbreviation	Sample	Concentration
Sucrose	Sucrose	7.0000%
G-Reb A	Glycosyl Rebaudioside A	0.0476%
Reb A	Rebaudioside A	0.053%
Reb M	Rebaudioside M	0.044%
Sucralose	Sucralose	0.0143%
Erythritol	Erythritol	11.529%
Maltitol	Maltitol	9.513%
GE	Glycosyl Rebaudioside A + Erythritol	1:1 mixture of 0.0476% G-Reb A solution and 11.529% erythritol solution
GM	Glycosyl Rebaudioside A + Maltitol	1:1 mixture of 0.0476% G-Reb A solution and 9.513% maltitol solution

2.1.3. 패널 훈련 및 평가

○ 패널 훈련

- 패널 훈련은 1달 반동안 주 3~4회 진행되었으며, 회당 1hr 소요, 총 19시간 실시되었음
- 용어 및 표준시료, 평가 방법 개발
 - Orientation : 검사 목적, 관능검사 및 묘사분석의 소개
 - 특성 용어 도출 ; 예비실험을 거쳐 시료간의 차이를 잘 설명하는 용어 특성 목록을 제공 후, 패널들 간의 토의를 거쳐 용어 목록을 개발함 (Table I-12, I-13).
 - 정의 및 표준시료 확립 ; 특성 용어에 대한 정의 및 표준시료, 평가 방법을 확립하였으며 (Table I-12, I-13), 15점 선척도 (1.25cm; 매우 약하다/매우 빠르다, 13.75cm; 매우 강하다/매우 느리다) 사용법을 훈련함.
 - 한 쌍의 시료를 평가한 후 다음 시료 쌍의 평가 전 2분간의 휴식과 함께 제시된 입가심용 온수 (46±2℃)와 정수(22±2℃)로 충분히 입을 행구도록 함.
 - 확립된 방법에 의하여 3회 모의 평가 후 통계분석을 통해 패널들 간의 consensus와 각 패널 요원들의 재현성을 평가함.
 - 재현성이 낮거나 평가 경향이 다른 패널 요원은 재훈련을 실시함.

○ 본 실험 평가

- 본 실험은 3회 진행됨.
- 하나의 시료를 평가한 후 다음 시료를 평가하는 monadic 방법을 사용함.
- 시료사이에 30초 휴식과 함께 제시된 물로 충분히 입을 행구도록 함.
- 4개의 시료 평가 후 5분의 휴식을 취하여 검사 시의 피로감을 최소화함.
- 시료는 first sample effect를 막기 위해 Williams Latin square design에 따라 제시됨.

2.1.4. 통계 분석

- 분산분석(Analysis of variance; ANOVA)
 - 각 시료의 특성에 대한 데이터의 평균 및 표준편차를 구하였음.
- 주성분 분석(Principal component analysis; PCA)
 - 정량적 묘사분석으로 도출된 관능 특성들과 각 시료간의 관계를 알아냄.

Table I-12. Definitions of sensory attributes of nine sweetener samples in aqueous solution

Attributes		Definition	Reference materials
Taste	Sweetness	Fundamental taste sensation of which sucrose is typical	2% (w/v) sucrose (CJ CheilJedang Co., Ltd., Korea) , 5% , 7% sucrose in water
	Bitterness	Fundamental taste sensation of which caffeine and quinine is typical	7% (w/v) sucrose (CJ CheilJedang Co., Ltd., Korea) and 0.03% (w/v) caffeine (sigma-Aldrich, st.Louis, MO, USA) in water.
Flavor	Honey	The flavor associated with acasia honey	2% (w/v) acacia honey (Seoraksanmilbongwon, Korea) in water.
	Menthol	The flavor associated with menthol	0.002% (w/v) menthol flavor (ES Food, Korea) in water.
Trigeminal senses	Astringency	The feeling which shrivels the tongue associated with aluminium potassium sulfate	0.02% (w/v) aluminium potassium sulfate (Daejung Chemicals & metals Co., Gyeonggi-do, Korea.) in water.
Mouthfeel	Body	Rate of sample flows on the tongue	1.5g potato starch (potato starch, Sunginfood, Gyeonggi-do, Korea) and 500mL water boiled using low heat with stir about 5 minutes.
Aftertaste	Sweet	Sweet taste perceived 5 seconds after expectorate	7% (w/v) sucrose (CJ CheilJedang Co., Ltd., Korea) and 0.1% (w/v) aspartame (the nutrasweet Co., USA) in water.
	Bitter	Bitter taste perceived 5 seconds after expectorate	0.03% (w/v) caffeine (sigma-Aldrich, st.Louis, MO, USA) in water.

Table I-13. Definitions and tasting methods of the onset of initial sweetness and the time of maximum sweetness

Attributes		Definition	Tasting method
Temporal aspect	Onset of initial sweetness	The time when sweetness was first perceived	The time when sweetness of sample solution was first perceived while holding in the oral cavity Very fast(scale value : 1.25) - 0-1 second Very slow(scale value : 13.75) - 2 seconds
	Time to maximum sweetness	The time when sweetness was perceived strongest	The time when maximum sweetness of sample solution was first perceived while holding in the oral cavity Very fast(scale value : 1.25) - 0-1 second Very slow(scale value : 13.75) - 4 seconds

2.2. 결과

- 각 감미료에서 도출된 감미 특성을 요약한 결과는 Table I-14과 같음. 시료의 관능특성을 보다 종합적이며 다각적으로 관찰하기 위하여 감미 출현 및 후미 역시 분석에 포함되었음.
- Figure I-3는 PCA의 결과로, 시료와 특성들의 관계를 나타낸 것임.
- G-Reb A는 단맛 후미, 쓴맛, 쓴맛 후미, 떫음이 강하고 단맛 출현속도는 느리지만, Reb A보다는 쓴맛, 쓴맛 후미, 떫음, 멘톨 향미가 약한 것으로 보아, 당전이는 부정적인 특성 감소 효과가 있음 (Table I-14).
- Figure I-3B의 신뢰타원으로 보아, G-reb A와 Reb M은 전반적인 특성에서 차이가 없는 것으로 보임.
- Erythritol은 쓴맛, 쓴맛 후미, 떫음, 멘톨 향미가 강하며, 전반적으로 Reb M과 비슷함 (Table I-14, Figure I-3B).
- G-reb A는 maltitol, erythritol과 혼합하였을 때 쓴맛, 쓴맛 후미, 떫음과 같은 부정적인 특성들의 강도가 낮아짐 (Table I-14).
- Table 14과 Figure I-3B를 보면, GE는 멘톨 향미를 제외하곤 설탕과 전반적인 특성에서 차이가 없음.
- Maltitol과 GM은 꿀 향미, 단맛 후미가 강함 (Table I-14).
- GM은 단맛 강도가 다른 시료들에 비해 유의적으로 강한 것으로 보아, G-reb A는 maltitol과 혼합하면 단맛 상승 효과가 나타남을 알 수 있음 (Table I-14).
- G-reb A, Reb A, Reb M의 단맛 출현 정도는 설탕보다 느린 것으로 보아, 당전이는 단맛 출현 정도에 영향을 미치지 않음 (Table I-14).
- G-reb A와 maltitol, erythritol을 혼합하면 단맛 출현 정도가 설탕과 가까워지는 모습을 보임 (Table I-14).

Table I-14. Mean intensity of descriptive sensory attributes elicited from 9 sweetener samples in aqueous solution

	Sucrose	G-reb A	Reb A	Reb M	Sucralose	Erythritol	Maltitol	GE	GM
Sweetness	6.03 ^{ab1} (0.78) ²	5.54 ^a (0.70)	5.53 ^a (1.09)	6.02 ^{ab} (0.89)	5.73 ^{ab} (0.79)	6.05 ^{ab} (0.95)	6.21 ^b (0.76)	6.33 ^b (0.99)	7.89 ^c (0.76)
Bitterness	1.19 ^a (0.88)	2.41 ^b (0.94)	4.98 ^c (1.36)	2.49 ^b (0.99)	1.30 ^a (1.02)	2.36 ^b (1.24)	0.68 ^a (0.72)	1.07 ^a (0.96)	0.65 ^a (0.75)
Honey flavor	2.63 ^{bc} (1.96)	1.93 ^{ab} (1.37)	1.61 ^a (1.27)	2.82 ^c (1.93)	2.11 ^{abc} (1.57)	2.75 ^c (2.14)	6.25 ^d (2.40)	2.50 ^{bc} (1.61)	5.95 ^d (1.95)
Menthol flavor	1.91 ^a (1.53)	2.83 ^b (1.97)	5.15 ^c (2.00)	2.67 ^{ab} (1.62)	2.13 ^{ab} (1.43)	4.52 ^c (2.30)	1.82 ^a (1.48)	3.03 ^b (2.05)	1.77 ^a (1.44)
Astringency	1.68 ^a (1.50)	4.19 ^d (2.59)	5.96 ^e (2.12)	2.75 ^{bc} (1.82)	2.52 ^{abc} (2.09)	2.87 ^c (2.49)	1.77 ^a (1.76)	2.26 ^{abc} (2.01)	1.84 ^{ab} (1.91)
Body	3.46 ^{ab} (1.98)	3.30 ^a (1.71)	3.61 ^{ab} (1.78)	3.47 ^{ab} (1.78)	3.30 ^a (1.89)	3.64 ^{ab} (1.83)	4.01 ^b (1.59)	3.40 ^{ab} (1.87)	3.85 ^{ab} (1.83)
Sweet aftertaste	6.42 ^b (1.18)	7.28 ^c (1.18)	5.50 ^a (1.42)	6.04 ^{ab} (1.44)	6.05 ^{ab} (1.30)	6.25 ^{ab} (1.55)	7.35 ^c (1.60)	6.16 ^{ab} (1.36)	8.47 ^d (1.00)
Bitter aftertaste	0.94 ^{ab} (0.94)	3.24 ^d (1.58)	5.68 ^e (1.52)	2.83 ^d (1.63)	1.43 ^{bc} (1.29)	1.77 ^c (1.34)	0.58 ^a (0.75)	0.93 ^{ab} (0.94)	0.67 ^{ab} (0.94)
Onset of initial sweetness	4.05 ^a (1.73)	6.43 ^{bc} (2.84)	7.52 ^c (2.48)	6.48 ^{bc} (2.37)	5.22 ^{ab} (2.25)	3.82 ^a (2.11)	3.93 ^a (1.64)	3.65 ^a (1.62)	3.82 ^a (1.52)
Time to maximum sweetness	5.18 ^a (1.70)	8.87 ^b (2.18)	5.44 ^a (1.63)	7.53 ^b (2.15)	4.68 ^a (1.60)	7.87 ^b (3.14)	4.76 ^a (1.32)	4.32 ^a (1.71)	4.41 ^a (1.71)

¹Different alphabet letters indicate a significant difference among the samples (Tukey's honestly significant difference test, $p < 0.05$).

²Standard deviation

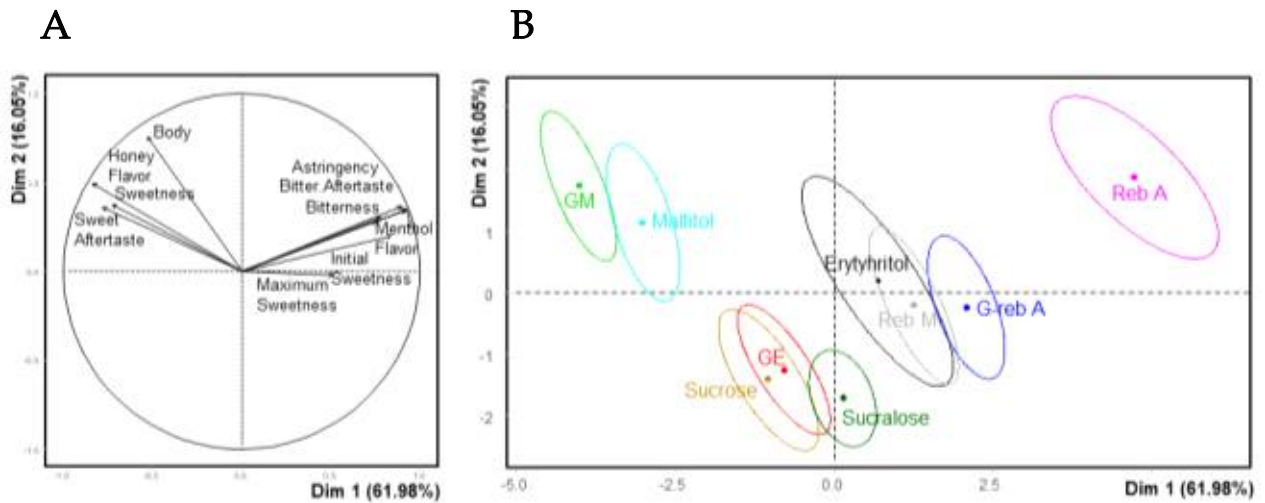


Figure 1-3. Principal component (PC) loading of the sensory attributes (A) and scores of the samples (B) from nine sweeteners in the aqueous solution on dim 1 and dim 2 (See Table 12 for sample abbreviations)

3. G-reb A와 bulk 감미료 혼합물의 최적 혼합비율 규명

3.1. 순위검사

본 실험에서는 순위검사를 이용하여 G-reb A와 bulk 감미료를 혼합한 혼합물의 최적 혼합비율을 규명하였음.

3.1.1 방법

○ 검사요원

- 서울대학교 커뮤니티 사이트(<https://snulife.com>) 또는 생활과학대학 및 인근 건물 게시판에 검사 참여자 모집문을 게시하여 당이나 대체 감미료를 섭취했을 때 문제가 없는 18-52세의 일반인 총 80명 (여 51, 남 29)을 선발함.

○ 시료

- 총 4종류의 시료를 혼합하여 사용함.
- 한 종류의 고감미료 : Glycosyl Rebaudioside A (G-Reb A; CJ Cheiljedang Co., Suwon, Korea) 와 혼합할 감미료로 3 종류의 bulk 감미료 sucrose (White sugar, CJ Cheiljedang Co., Incheon, Korea), maltitol (Roquette China Co., Lianyungang, China), erythritol(Cargil polyols LLC., NE, USA)이 사용됨.

○ 시료의 준비

- 혼합 감미료 수용액 시료들은 고감미료(G-reb A) 수용액을 bulk 감미료 (설탕, 말티톨, 에리스리톨) 수용액과 3가지 혼합비율(7:3, 5:5, 3:7)로 혼합하여 사용함 (Table 1-15).
- 시료의 제조방법은 각 감미료를 상온의 정수($18 \pm 2^\circ\text{C}$)에 첨가한 후 교반기 (MS300HS, Misung Scientific Co., Ltd., Yangju, Korea)를 이용하여 1100rpm으로 10분간 교반하여 실험 전까지 냉장 ($2 \pm 1^\circ\text{C}$) 보관해 평가에 사용함.
- 시료는 평가 3시간 전에 실온 ($22 \pm 2^\circ\text{C}$)에서 방냉한 뒤, 평가 2시간 전 3자리 난수 번호가 부여된 흰색 플라스틱 컵(지름 7cm, 높이 3cm, Taesanpack Co., Gwangju-si, Gyeonggi-do, Korea)에 10mL씩 소분하여 준비함.

- 입행금 물로는 온수(46±2℃) 와 실온의 정수(22±2℃)가 제공됨.

○ 평가 절차

- G-reb A와 bulk 감미료인 설탕, 말티톨과 에리스리톨을 각각 3:7, 5:5 및 7:3의 비율로 혼합한 3종의 혼합물과 G-reb A를 포함한 총 4가지 시료에 대하여 3가지 특성(단맛, 단맛후미, 쓴맛)의 순위를 비교하게 함.
- 하나의 session에서 한 가지 특성에 대한 평가를 진행했으며, 3가지의 특성에 대해 총 3 session의 실험이 설계됨.
- 하나의 session에 포함된 검사 set 수는 3 set이며, 1 set에서 G-reb A 100%와 G-reb A와 bulk 감미료를 3수준으로 혼합한 시료 3종을 포함한 총 4개 시료에 대한 순위검사를 진행함.
- 한 검사요원당 2 session만 평가했으며, 모든 검사 요원은 2개 session에 랜덤하게 배정됨.
- 각 session내 제시되는 시료 제공 순서 및 한번에 제시되는 시료의 제시 순서는 Williams Latin square design(MacFie *et al.*, 1989)을 따름.
- 각 session의 특성 평가 시 특성에 대한 평가는 다음과 같음(단맛: 시료를 5초 동안 머금고 있을 때 느껴지는 단맛의 강도를 평가, 단맛 후미: 시료를 뱉고 나서 5초 후의 시점에서 느껴지는 단맛의 강도를 평가, 쓴맛: 시료를 5초간 머금고 있을 때 느껴지는 쓴맛의 강도를 평가)
- 시료와 시료 사이 온수와 정수 순으로 입을 깨끗이 헹구도록 하였으며, 평가한 모든 시료는 별도로 함.
- 한 set 사이 3분간의 휴식과 함께 입을 충분히 헹구도록 하였으며, 감각 둔화 및 피로를 최소화하기 위하여 1 session이 끝난 후, 다음 session이 시작되기 전까지 5분간 휴식을 취하도록 함.
- 검사요원들에게 평가가 있기 1시간 전, 양치 및 물 이외의 음식물 섭취를 삼가게 했으며 향이 강한 화장품이나 향수의 사용을 금지함.

Table I-15. Concentration of samples used in Ranking test

Sample	Sample abbreviation	Concentration (w/v ¹)
Glycosyl Rebaudioside A	G-reb A	0.0322%
Sucrose	Suc	5.0000%
Maltitol	Mal	7.6388%
Erythritol	Ery	7.8000% ²
3:7 mixture of G-reb A + Suc	GS37	3:7 mixture of 0.0322% G-reb A solution and 5.0000% Suc solution
5:5 mixture of G-reb A + Suc	GS55	5:5 mixture of 0.0322% G-reb A solution and 5.0000% Suc solution
7:3 mixture of G-reb A + Suc	GS73	7:3 mixture of 0.0322% G-reb A solution and 5.0000% Suc solution
3:7 mixture of G-reb A + Mal	GM37	3:7 mixture of 0.0322% G-reb A solution and 7.6388% Mal solution
5:5 mixture of G-reb A + Mal	GM55	5:5 mixture of 0.0322% G-reb A solution and 7.6388% Mal solution
7:3 mixture of G-reb A + Mal	GM73	7:3 mixture of 0.0322% G-reb A solution and 7.6388% Mal solution
3:7 mixture of G-reb A + Ery	GE37	3:7 mixture of 0.0322% G-reb A solution and 7.8000% Ery solution
5:5 mixture of G-reb A + Ery	GE55	5:5 mixture of 0.0322% G-reb A solution and 7.8000% Ery solution
7:3 mixture of G-reb A + Ery	GE73	7:3 mixture of 0.0322% G-reb A solution and 7.8000% Ery solution

¹Weight per volume

²Adopted from Park *et al.* (2017)

○ **결과 분석**

- 시료간 특성의 순위차이는 Friedman’s test(Friedman, 1937)을 이용하여 분석하였으며, Friedman 검정 및 사후검정인 Dunn-Bonferroni test(Dunn, 1964)는 SPSS (ver 25.0, IBM inc., Armonk, NY, USA)를 이용하여 수행함(p<0.05).

3.1.2 결과

- 본 순위 검사결과는 Table I-16에 나타냄.
- 단일 G-reb A에 에리스리톨을 제외한 bulk 감미료를 30% 혼합하였을 때 단맛에서 유의적이지는 않지만 상승효과가 나타나기 시작함.
- 대개 bulk 감미료의 혼합비율을 늘릴수록 단맛, 단맛 후미, 쓴맛을 종합적으로 고려하였을때 바람직한 감각특성을 내기 시작하였으며 고감미료의 70% 정도를 bulk 감미료로 대체하여 혼합물 이루었을 경우 가장 우수한 감각특성이 나타남.
- 따라서 묘사분석 실험에서 고감미료와 bulk 감미료를 혼합하는 비율을 3:7 및 7:3으로 정하여 감각 특성의 차이를 비교 분석함.

Table I-16. Rank sum of sweetness, sweet aftertaste, and bitterness perceived from the mixtures of G-reb A and sugar, maltitol, and erythritol at different ratio

Sample ¹	Sweetness	Sweet aftertaste	Bitterness
GS 73	138 ^{b2}	154 ^a	142 ^{ab}
GS 55	152 ^b	136 ^a	130 ^{ab}
GS 37	145 ^b	123 ^a	107 ^a
G-reb A	95 ^a	127 ^a	151 ^b
Chi-square value	23.956	7.385	13.756
p-values	<0.001	0.061	0.003
GM 73	128 ^b	147 ^b	127 ^a
GM 55	145 ^{bc}	155 ^b	125 ^a
GM 37	165 ^c	137 ^b	127 ^a
G-reb A	92 ^a	101 ^a	151 ^a
Chi-square value	34.600	20.520	6.028
p-values	<0.001	<0.001	0.110
GE 73	135 ^{ab}	138 ^b	116 ^a
GE 55	115 ^a	119 ^{ab}	136 ^{ab}
GE 37	121 ^a	102 ^a	161 ^b
G-reb A	159 ^b	181 ^c	117 ^a
Chi-square value	14.422	40.702	16.622
p-values	0.002	<0.001	0.001

¹ See Table I-15 for sample abbreviations

² Different lowercase letters indicate significant differences among the sweetener samples (p < 0.05, Dunn-Bonferroni test)

3.2. G-reb A와 bulk 감미료 혼합물의 감각특성 측정

3.2.1. 실험방법

○ 패널 선발

- 서울대학교 생활과학대학 및 인근 건물 게시판에 검사 참여자 모집문을 공지하거나 감미료 맛 평가에 참여한 경험이 있는 평가자 중 묘사분석 연구에 자발적인 참여의사를 밝힌 패널 8명을 선발함 (20-32세 연령의 여성 4명, 남성 4명).

○ 시료의 준비

- 4 종류의 단일 감미료; G-reb A, 설탕, 에리스리톨, 말티톨과 6종류의 혼합 감미료; GS37, GS73, GM37, GM73, GE37, GE73의 총 10 종류의 시료가 사용됨 (Table I-17).
- 시료는 순위 검사에서 사용한 시료 제조 방법과 동일한 방법으로 평가 당일 제조됨.
- 평가 2시간 전 세 자리 난수 번호가 부여된 흰색 일회용 플라스틱 컵(지름 7.5cm, 높이 7cm, Taesanpack Co., Gwangju-si, Gyeonggi-do, Korea)에 40mL씩 소분하여 준비함.

Table I-17. The information of sample concentration used in descriptive analysis

Sample ¹	Concentration (w/v ²)
G-reb A	0.0322%
Suc	5.0000%
Mal	7.6388%
Ery	7.8000%
GS37	3:7 mixture of 0.0322% g-reb solution A and 5.0000% suc solution
GS73	7:3 mixture of 0.0322% g-reb A solution and 5.0000% suc solution
GM37	3:7 mixture of 0.0322% g-reb A solution and 7.6388% mal solution
GM73	7:3 mixture of 0.0322% g-reb A solution and 7.6388% mal solution
GE37	3:7 mixture of 0.0322% g-reb A solution and 7.8000% ery solution
GE73	7:3 mixture of 0.0322% g-reb A solution and 7.8000% ery solution

¹See Table I-15 for sample abbreviations

²Weight per volume

○ 패널 훈련 및 평가

- 패널 훈련은 1달동안 주 3~4회 진행되었으며, 회당 1hr 소요됨; 총 11시간의 훈련
- 용어 및 표준 시료, 평가 방법 개발
 - Orientation : 검사 목적, 관능검사 및 묘사분석의 소개
 - 특성 용어 도출 ; 예비실험을 거쳐 시료간의 차이를 잘 설명하는 용어 특성 목록을 제공 후, 패널들 간의 토의를 거쳐 용어 목록을 개발함 (Table I-11).
 - 정의 및 표준시료 확립 ; 특성 용어에 대한 정의 및 표준시료, 평가 방법을 확립하였으며 (Table I-18), 16점 항목척도(0점: None, 1점: Weak, 15점: Strong)로 사용법을 훈련함.
 - 한 쌍의 시료를 평가한 후 다음 시료 쌍의 평가 전 2분간의 휴식과 함께 제시된 입가심용 온수 (46±2℃)와 정수(22±2℃)로 충분히 입을 행구도록 함.
 - 확립된 방법에 의하여 3회 모의 평가 후 통계분석을 통해 패널들 간의 consensus와 각 패널 요원들의 재현성을 평가함.
 - 재현성이 낮거나 평가 경향이 다른 패널 요원은 재훈련을 실시함.
- 본 실험 평가
 - 본 실험은 4회 진행됨.

- 하나의 시료를 평가한 후 다음 시료를 평가하는 monadic 방법을 사용함.
- 시료사이에 2분간의 휴식과 함께 제시된 물로 충분히 입을 헹구도록 함.
- 시료는 first sample effect를 막기 위해 Williams Latin square design에 따라 제시됨.

○ 통계 분석

- 분산분석(Analysis of variance; ANOVA)
 - 각 시료의 특성에 대한 데이터의 평균 및 표준편차를 구하였음.
 - 모형으로 시료, 패널, 반복과 이들의 2차 상호작용이 포함되었으며, 사후분석으로는 Tukey HSD test ($p < 0.05$)를 수행함.
 - ANOVA와 사후분석 결과는 SPSS (ver 25.0, IBM inc., Armonk, NY, USA)를 이용하여 분석함.
- 주성분 분석(Principal component analysis; PCA)
 - 각 시료와 특성간의 다변량 상관관계를 알아보기 위해 각 특성의 평균값을 이용하여 주성분 분석 (principal components analysis, PCA)을 실시함.
 - R 통계소프트웨어(ver 3.3.2, R foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria) 기반의 FactoMineR package를 이용하여 분석함.

Table I-18. Definitions and reference materials for descriptive attributes of sweetener samples

Attributes		Definition	Reference materials	Scale value (0 to 15)
Taste	Sweetness	Fundamental taste sensation of which sucrose is typical	2% (w/v ¹) sucrose (CJ CheilJedang Co., Ltd., Korea), 5% and 10% sucrose in water.	1, 7 and 13
	Bitterness	Fundamental taste sensation of which caffeine and quinine is typical	0.03% (w/v) caffeine (sigma-Aldrich, st.Louis, MO, USA) in water.	14
Flavor	Honey flavor	Honey flavor typically found in Acacia honey	5% (w/v) acacia honey (Seoraksanmilbongwon, Korea) in water.	10
Trigeminal	Astringency	The feeling which shrivels the tongue associated with aluminium potassium sulfate	0.1% (w/v) aluminium potassium sulfate (Daejung Chemicals & metals Co., Gyeonggi-do, Korea.) in water.	15
Senses	Cooling	Cooling sensation associated with menthol	0.005% (w/v) menthol flavor (ES Food, Korea) in water.	12
Temporal aspect	Body	Rate of sample flow on the tongue	1.5g potato starch (potato starch, Sunginfood, Gyeonggi-do, Korea) boiled in 500mL water on low heat with stirring for 5 min	N/A ²
	Sweet aftertaste	Sweet taste for 5 s after expectoration	0.05% (w/v) aspartame (the nutrasweet Co., USA) in water.	8
	Bitter aftertaste	Bitter taste for 5 s after expectoration	0.03% (w/v) caffeine (sigma-Aldrich, st.Louis, MO, USA) in water.	15
	Time to maximum sweetness	The time when maximum sweetness was first perceived	Time check using a timer; Rating was increases by 1 point for every 0.5 s delay	2 : 1 s and 10 : 5 s

1 Weight per volume

2 N/A: the reference standard of the sensory attribute did not have a specific scale value because the reference sample was only used for the panelists' concept alignment

3.2.2. 실험 결과

- 각 감미료에서 도출된 감미 특성을 요약한 결과는 Table I-19와 같음. 시료의 관능특성을 보다 종합적이며 다각적으로 관찰하기 위하여 감미 출현 및 후미 역시 분석에 포함되었음.
- Figure I-4은 PCA의 결과로, 시료와 특성들의 관계를 나타냈음.
- PCA 결과의 dim 1, dim 2는 각각 전체 변동의 60.13%, 25.81%를 설명함 (Figure I-4).
- Dim 1의 양의 방향으로 꿀향미, 단맛, 바디감이, 음의 방향으로는 짙음, 쓴맛, 쓴맛 후미, 화한 느낌이 높게 부하됨.
- Dim 2의 양의 방향으로는 단맛 후미, 최대단맛 출현정도가 높게 부하되었음.
- G-reb A와 설탕, 말티톨과의 혼합물이 에리스리톨과의 혼합물보다 단맛, 꿀 향미, 바디감 등이 강했으며, 혼합물의 최대 단맛 출현 정도와 단맛 후미는 설탕보다는 높았으나 에리스리톨과 혼합한 경우, 그리고 낮은 농도의 설탕과 말티톨 사용시 G-reb A보다는 감소하는 것으로 나타남 (Figure I-4, Table I-19).
- Dim 1의 음의 방향에 높게 부하된 G-reb A는 설탕과 비교하여 단맛의 유의적 차이는 없었으나 (Table I-19), 쓴맛, 쓴맛 후미, 짙은 느낌이 유의적으로 강했음.
- Ery는 쓴맛, 쓴맛 후미, 짙음이 강했으며, G-reb A와 비교했을 때 유의적인 차이가 없었음. 반면, 화한 느낌이 G-reb A 뿐 아니라 다른 시료에 비해 유의적으로 강하게 나타났으나, 단맛 출현속도와 지속성은 설탕과 유의적 차이가 없었음 (Figure I-4B, Table I-19).
- G-reb A와 Ery 혼합시 단맛 상승 효과는 나타나지 않았음 (Table I-19).
- G-reb A에 Ery를 혼합하였을 때 짙음, 단맛후미, 최대 단맛 출현정도가 유의적으로 감소하였음 (Table I-19).
- 본 연구에서 GE37 및 GE73는 G-reb A, Ery 시료보다 유의적으로 더 쓴맛이 강하지 않았음.
- GE73시료의 쓴맛 후미가 G-reb A와 비교하여 유의적으로 감소되었으며, Ery를 30%혼합한 시료에 비해 70%를 혼합할 경우 쓴맛과 쓴맛 후미가 증가됨 (Table I-19).
- G-reb A와 설탕을 혼합하였을 경우, 설탕과 G-reb A 단독 시료보다 단맛이 유의적으로 상승하였음.
- G-reb A에 설탕을 혼합하였을 때 단맛 상승 효과 외에도 쓴맛, 쓴맛 후미, 짙음 등이 감소되는 등 복합적인 변화가 나타남 (Table I-19).
- GS시료들과 G-reb A의 단맛 후미는 유의적 차이가 보이지 않아, 설탕과의 혼합이 G-reb A의 단맛 후미 감소에 영향을 주지 않는 것으로 나타남 (Table I-19).
- Dim 1의 양의 방향에 위치한 GM37, GM73은 단맛, 단맛후미, 꿀향미, 바디감이 다른 시료에 비해 유의적으로 강하게 나타남 (Table I-19, Figure I-4).
- GM37 및 GM73은 100% G-reb A와 비교하여 쓴맛, 쓴맛 후미, 짙음 특성이 유의적으로 감소하였음.
- GM혼합물과 G-reb A의 단맛 후미는 유의적인 차이가 없었음 (Table I-19).
- 결론적으로 G-reb A에 설탕 또는 말티톨을 혼합하였을 경우 단맛 증가 및 쓴맛, 쓴맛 후미, 짙음 특성이 감소한 반면, 단맛의 시간에 따른 변화에는 영향을 미치지 않거나 단맛 후미를 증가시켰음.
- 반면, 에리스리톨을 혼합하였을 경우 단맛과 쓴맛의 변화는 없으나 짙음, 단맛 후미, 최대 단맛 출현 정도에서 G-reb A보다 유의적으로 감소하였음.

Table I-19. Mean intensities of descriptive sensory attributes elicited by sucrose and 9 sweeteners

Sample ¹	G-reb A	Suc	Mal	Ery	GS37	GS73	GM37	GM73	GE37	GE73
Sweetness	7.3 ^{b2} (1.2) ³	7.0 ^{ab} (0.7)	7.8 ^b (1.1)	6.3 ^a (0.9)	10.2 ^{cd} (1.3)	9.6 ^c (1.6)	10.3 ^{cd} (0.8)	10.5 ^d (1.0)	7.2 ^b (1.4)	7.6 ^b (1.6)
Bitterness	4.5 ^{cd} (1.3)	1.2 ^a (1.0)	1.9 ^{ab} (1.8)	5.0 ^d (1.6)	2.1 ^b (1.6)	2.5 ^b (1.6)	1.7 ^{ab} (1.5)	2.3 ^b (2.0)	4.5 ^{cd} (1.6)	4.0 ^c (1.4)
Honey flavor	2.2 ^{ab} (1.8)	2.3 ^{bc} (1.6)	5.5 ^e (2.0)	1.4 ^a (1.3)	3.4 ^d (2.0)	3.1 ^{cd} (2.0)	5.9 ^e (1.2)	5.8 ^e (1.7)	2.4 ^{bc} (1.7)	2.5 ^{bc} (2.0)
Astringency	3.9 ^e (1.6)	0.8 ^a (0.9)	1.8 ^b (1.8)	4.0 ^e (1.6)	1.9 ^{bc} (1.4)	2.3 ^{bcd} (1.8)	1.8 ^b (1.5)	1.9 ^{bc} (1.7)	2.8 ^d (1.7)	2.7 ^{cd} (1.7)
Cooling	1.0 ^a (1.0)	0.6 ^a (0.8)	0.9 ^a (0.9)	4.3 ^d (1.6)	0.8 ^a (1.0)	1.0 ^a (1.3)	0.7 ^a (1.0)	0.8 ^a (2.3)	3.3 ^c (1.3)	2.5 ^b (1.6)
Body	2.4 ^a (2.6)	2.1 ^a (2.5)	3.4 ^b (2.6)	2.1 ^a (2.5)	2.4 ^a (2.2)	2.3 ^a (2.5)	3.8 ^b (2.5)	3.6 ^b (2.3)	2.3 ^a (2.5)	2.3 ^a (2.3)
Sweet aftertaste	4.5 ^{ef} (1.3)	1.6 ^a (1.0)	3.2 ^{cd} (1.3)	1.8 ^{ab} (1.2)	4.3 ^{ef} (1.3)	4.0 ^{de} (1.2)	4.9 ^f (1.1)	4.6 ^{ef} (1.2)	2.6 ^{bc} (1.2)	3.1 ^c (1.4)
Bitter aftertaste	3.7 ^d (1.5)	0.8 ^a (1.0)	1.2 ^{ab} (1.3)	3.7 ^d (1.7)	1.4 ^{ab} (1.2)	1.9 ^{bc} (1.8)	1.2 ^{ab} (1.5)	1.7 ^{bc} (1.7)	3.3 ^d (1.6)	2.2 ^c (1.6)
Time to maximum sweetness	6.3 ^{de} (2.1)	3.2 ^a (1.5)	4.3 ^{bc} (1.5)	3.6 ^{ab} (1.8)	5.3 ^{cd} (2.2)	4.7 ^c (2.5)	6.4 ^e (2.5)	4.8 ^c (2.1)	4.3 ^{bc} (1.8)	4.5 ^{bc} (2.0)

¹See Table I-15 for sample abbreviations

²Different alphabet letters indicate a significant difference among the samples (p<0.05).

³Standard deviation

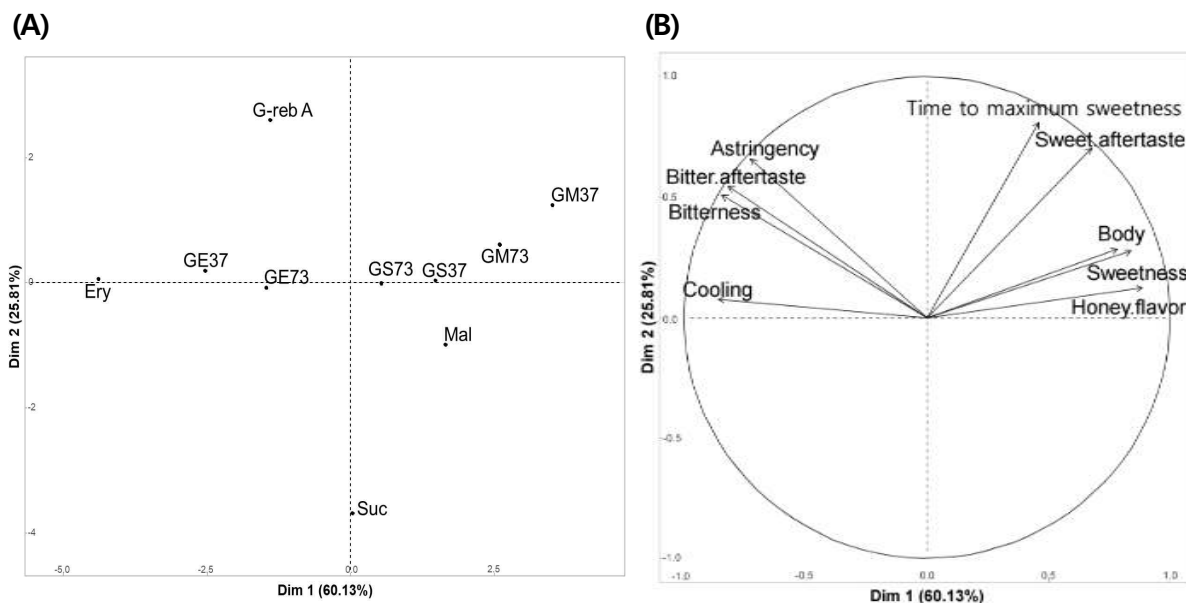


Figure I-4. Principal component loading scores of the samples (A) and sensory attributes (B) from 10 sweeteners on Dim 1 and Dim 2.

4. 신규 NHDC 당전이체의 상대감미도 및 감미특성 측정

4.1. 연구목적

- 신규 NHDC 당전이체의 설탕 대비 상대감미도 측정

4.2. 실험방법

- 본 실험에서는 2-alternative forced choice method (2-AFC) 를 이용하여 4개 농도 수준으로 제조된 설탕 수용액과 0.03% NHDC 당전이체 수용액의 단맛 강도를 비교하여 0.03% NHDC 당전이체의 설탕대비 상대감미도를 측정함

4.2.1 검사요원

- 패널은 평소 감미소재에 대한 알레르기사 없는 만 20세 이상 40대 미만의 여성을 대상으로 이화여자대학교 온라인 게시판에 모집 공고문을 업로드하여 모집
- 모집문을 공지하여 자발적인 참여 지원자 30명 선발

4.2.2. 시료

- 제2세부에서 생산된 신규 NHDC 당전이체를 시료로 사용.
- 설탕의 농도를 4개 수준(2%, 3%, 4%, 5%)으로 제조하여 각 농도마다 0.03% NHDC 당전이체 수용액과 단맛 강도를 비교.

4.2.3 평가 절차 및 내용

- 검사요원들이 0.03% NHDC 당전이체과 4개 농도 수준의 설탕 용액 시료 총 4쌍을 평가함 .
- 제시된 시료 전체를 5초 동안 머금고 제시된 타구 컵에 뱉은 후 5초 동안의 맛을 느껴 총 10초 동안 느껴지는 총체적인 단맛을 평가함.
- 4 농도 수준으로 제조된 설탕 용액을 0.03% NHDC 당전이체 수용액과 비교하여 단맛이 더 강한 시료를 선택하도록 함.
- 한 쌍의 시료를 평가한 시간은 약 4분이었으며 다음 시료 쌍의 평가 전 2분간 휴식과 함께 제시된 입가심용 온수와 크래커로 충분히 입을 헹구도록 함.
- 실험은 이화여자대학교 생활환경관 510-2호 관능실에서 실시

4.2.4. 시료의 준비

- 본 실험에서 NHDC 당전이체의 상대감미도를 100으로 가정, 정수물에 magnetic stirrer로 10분간 50도로 가열 및 교반하여 완전히 용해시켜 제조함.
- 감각평가 18시간 전에 시료를 농도별로 제조한 뒤 실온에서 (18℃) 보관, 사용
- 실험 평가 2시간 전 시료를 일회용 플라스틱 컵에 약 30ml씩 소분하여 제시

4.2.5 시료의 제시

- 4개의 평가 쌍에 대해 제시되는 순서는 Williams Latin Square Design에 의해 결정
- 0.03% NHDC 당전이체 수용액과 설탕 용액 1쌍 내에서의 시료 평가 순서는 counter-balanced로 결정

- 시료는 난수표에서 추출한 세 자리 숫자로 표기
- 입가심용 온수 및 크레커를 제시

4.3. 통계분석

- 설탕 용액을 0.03% NHDC 당전이체 용액보다 더 달다고 평가한 응답 수를 세어 concentration - response (C-R curve)을 구하고 회귀식($\% \text{ response} = a \times \text{concentration}(\%) + b$)을 구하여 응답률이 50%일 때의 설탕농도를 계산함.
- 상대 감미도 = 응답률 50%일 때의 설탕 농도/ NHDC 당전이체 용액 농도 (0.03%)

4.4. 실험결과

- NHDC 당전이체의 C-R curve Figure I-5와 같음.
- 시료의 회귀식에 대한 R^2 값은 0.91-0.99로, 회귀선이 결과값에 잘 적합됨.
- 응답률50%일 때 0.03%의 NHDC 당전이체는 설탕 용액의 3.5%로 상응하였음.
- 회귀식은 $y = 0.2226x - 0.2871$, $R^2 = 0.92$ 임.
- NHDC 당전이체의 상대당도는 117.86이였음.

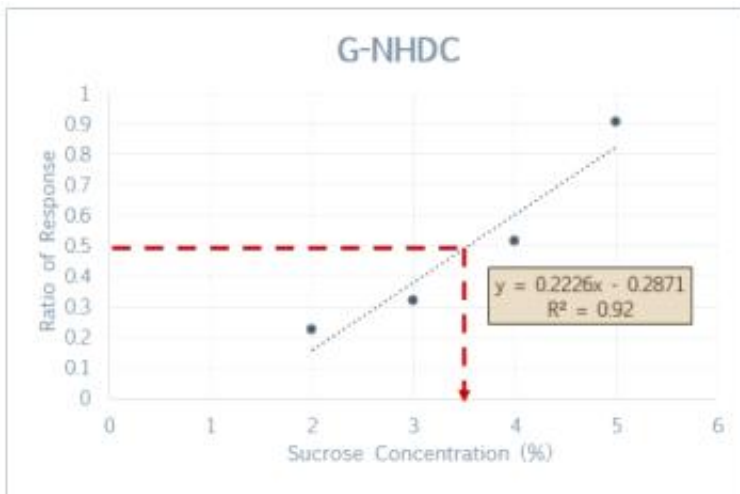


Figure I-5. Concentration-response Curve of G-NHDC

5. 신규 NHDC 당전이체-스테비오사이드 당전이체 혼합물 및 신규 NHDC 당전이체-저열량 감미료 혼합물의 감미 특성 분석

5.1. 연구목적

- 본 실험은 NHDC 당전이체와 다양한 감미료를 조합하여 묘사분석으로 단맛 상승작용 및 감미적 특성을 분석함.

5.2. 실험설계

- 이를 위해 먼저 혼합물에 적용할 여러 저열량 감미료의 상대감미도를 측정함. 도출된 상대감미도를 기반으로 설탕 10% 수용액에 해당하는 2종 혼합물(binary mixture)을 조합하여 혼합물의 감미 특성 및 감미질 향상 효과를 규명함.

5.2.1. 저열량 감미료의 상대감미도 측정

○ 실험방법

- 실험은 묘사분석 패널의 훈련과 본 실험으로 나뉘어 진행. 이후 훈련 후 본 실험은 1차적으로 G-Rebaudioside A, Aspartame, Acesulfame-K, Saccharine의 상대 감미도를 측정하고 농도별 상대 감미도 회귀식을 도출하였음.
- 2차적으로는 도출된 회귀식을 이용하여 설탕 수용액 6%에 해당하는 G-Rebaudioside A, Aspartame, Acesulfame-K, Saccharine의 상대감미도를 예측함.
- **묘사분석 패널**
 - 패널은 평소 감미소재에 대한 알레르기가 없는 만 20세 이상 40대 미만의 여성을 대상으로 모집 진행
 - 만 20세부터 36세까지의(평균 24.2, 표준편차 4.6) 총 10명의 패널이 묘사분석 실험에 참여하였다.
- **시료**
 - G-Rebaudioside A, Aspartame, Acesulfame-K, Saccharine의 상대 감미도 및 감각적 특성 평가
 - 설탕 수용액은 시료의 상대감미도를 도출하기 위한 비교 시료로 사용

Table I-20. Sweetener samples

Samples	Manufacturer
Sucrose	CJ CheilJedang Co., Ltd., Korea
G-Rebaudioside A	CJ CheilJedang Co., Ltd., Korea
Aspartame	Vitasweet Co., Ltd., China
Acesulfame-K	Vitasweet Co., Ltd., China
Saccharin	JMC Corporation., Korea

▪ 묘사분석 평가 절차 및 내용

- 패널은 이화여자대학교 생활환경관 510-2호에서 5주동안 1회에 2시간, 총 25회에 걸쳐 본 연구에 참여
- 묘사분석 방법은 훈련과 본 실험으로 나뉘며, 패널의 훈련 과정은 맛에 대한 예민도 훈련, 시료의 감각적 특성을 도출하는 묘사 용어 개발, 도출된 각각의 묘사용어에 상응하는 표준시료를 확립하는 단계로 구성됨
- 패널이 전체적인 평가 절차와 평가 방법을 숙지하도록 훈련 세션 진행
- **묘사분석 패널 훈련**
 - ✓ 기본맛 훈련은 감미료 수용액에 대해 보다 정확하고 재현성 있는 감각적 평가를 위한 것으로, 여러 농도의 단맛과 쓴맛, 떫은맛에 대해 진행 함
 - ✓ 단맛은 설탕 수용액, 쓴맛은 caffeine 수용액, 떫은 맛은 tannin 수용액으로 훈련
 - ✓ 훈련에 사용된 시료 별 농도는 다음과 같음 (Table I-21). 기본맛 훈련은 기본맛 (단맛, 쓴맛, 떫은맛)의 종류별로 4개 수준의 농도를 제공하고 강도 순위를 맞히는 순위법으로 진행
 - ✓ 이후 척도법을 익히기 위해 시료강도에 따라 점수를 척도에 체크하는 척도법으로 기본맛 훈련 진행

Table I-21. 기본맛 훈련 시료별 농도

기본 맛	농도			
단맛_설탕	1%	2%	3.5%	5%
단맛_설탕	5%	7%	9%	11%
쓴맛_caffeine	0.01%	0.02%	0.04%	0.08%
떫은맛_tannin	0.01%	0.03%	0.05%	-

- 묘사분석 용어 도출

- ✓ 용어도출은 본 실험에 사용할, sucrose 기준 여섯 개 수준의 농도(1%, 2%, 3.5%, 5%, 7%, 9%) 중, 중간 수준인 5%의 농도로, sucrose에 상응하는 각 시료의 용어도출을 진행
- ✓ 용어도출 실험에 사용된 시료와 농도는 다음과 같음(Table I-22).
- ✓ 용어도출은 checkbox를 이용하여 시료를 맛보고 느껴지는 항목에 체크하도록 하고, 추가적인 의견을 적도록 함
- ✓ 후에 토론을 통해 패널들과 합의를 하여 용어를 확정함. 실험을 진행하고 시료에서 도출된 맛의 특성은 다음과 같음 (Table I-23).
- ✓ 기본맛 훈련과 본 실험에 사용한 단맛 표준 척도는 Ko, Won-Whi, Seong-Bo Kim, and Seo-Jin Chung (2020)1의 연구를 참고하고, 0.5%, 3.5%, 7.5%, 12% 농도 수준의 설탕 수용액을 이용하였음(Table I-24).
- ✓ 다른 특성은 수용액 상태로 제공하고 2 반복으로 강도를 체크하도록 함
- ✓ 표준점수는 패널이 평가한 강도를 평균 내어 표준점수화 함

Table I-22. 용어도출 실험에 사용된 시료와 농도

Samples	Expected relative sweetness	농도 (%)
Sucrose	-	5
Glycosyl Rebaudioside A	160	0.031
Aspartame	190	0.026
Acesulfame-K	190	0.026
Saccharin	420	0.012

Table I-23. 시료에서 도출해낸 특성

관능적 특성	묘사용어	정의	표준물질
맛/향미	단맛 0.3점	설탕 농도 0.5%의 수용액	설탕 5g + 물 995g
	단맛 3점	설탕 농도 3.5%의 수용액	설탕 35g + 물 965g
	단맛 9점	설탕 농도 7.5%의 수용액	설탕 75g + 물 925g
	단맛 14점	설탕 농도 12%의 수용액	설탕 120g + 물 880g
	쓴맛 7점	Caffeine 농도 0.04%의 수용액	Caffeine 0.4g + 물 999.6g
	인공적인 단맛 8점	설탕의 단맛이 아닌 인공적으로 느껴지는 단맛	그린스위트(청정원) 20g + 물 980g
	이온음료 향미 8점	이온음료에서 느껴지는 향미	Pocari sweat 400g + 물 600g
	꿀 향미 11점	꿀에서 느껴지는 향미	꿀 120g + 물 820g
입안감촉	뽀음/텁텁함 7점	미각신경의 말초를 마비시키는 듯한, 마르고 거친 느낌	탄닌 1g + 물 999g
	청량감 5점	탄산수에서 느껴지는 입안감촉	페리에 200g + 물 800g
후미	단맛 0.3점	설탕 농도 0.5%의 수용액	설탕 5g + 물 995g
	단맛 3점	설탕 농도 3.5%의 수용액	설탕 35g + 물 965g
	단맛 9점	설탕 농도 7.5%의 수용액	설탕 75g + 물 925g
	단맛 14점	설탕 농도 12%의 수용액	설탕 120g + 물 880g
	쓴맛 6점	Caffeine 농도 0.04%의 수용액	Caffeine 0.4g + 물 999.6g

Table I-24. 설탕 수용액 이용한 단맛 표준 척도

농도	0.5%	3.5%	7.5%	12%
점수	0.3점	3점	9점	14점

- 농도-반응함수 측정(본실험)

- ✓ 총 4종의 감미소재 (G-Rebaudioside A, Aspartame, Acesulfame-K, Saccharine)에 대해 농도-반응 함수를 도출하여 다양한 농도 수준에서 설탕대비 상대 감미도를 측정하기 위해 Table I-25 와 같이 시료를 제조
- ✓ 측정 방법은 6개수준 농도(G-Rebaudioside A만 4개수준)의 sucrose 수용액과 그에 상응하는 6개 수준 농도(G-Rebaudioside A만 4개수준)의 감미료 수용액을 한 세트로 평가하는 SSC방법 이용
- ✓ 실험을 통해 농도-반응 함수 측정과 상대감미도 도출을 위해서 본 실험에서는 훈련 과정 중 확립한 묘사용어를 이용하여 4 세트 시료에 대해 감각적 특성 강도를 15점 강도 척도로 평가
- ✓ 강도 척도에서 0점은 "느껴지지 않음", 7점은 "보통", 14점은 "매우 강함"으로 표시하고 패널은 시료를 평가할 때 각각의 감각적 특성 강도를 적합한 위치에 표시
- ✓ 한 개의 시료에 대한 평가를 마친 후 다음 시료를 제시하며 시료와 시료 사이에는 물과 무염 크래커로 입가심 함
- ✓ 각 세트 별로 3반복 평가 진행

Table I-25. 본 실험에서 사용된 설탕 및 감미 소재의 농도 수준

Sample(expected relative sweetness)	Concentration(%)					
Sucrose	1%	2%	3.5%	5%	7%	9%
Aspartame (200)	0.005%	0.01%	0.018%	0.025%	0.035%	0.045%
Acesulfame-K (200)	0.005%	0.01%	0.018%	0.025%	0.035%	0.045%
Saccharin (420)	0.067%	0.133%	0.233%	0.333%	0.467%	0.6%

Sample(expected relative sweetness)	Concentration(%)			
Sucrose	2%	3.5%	5.5%	8%
Glycosyl Rebaudioside A (165)	0.012%	0.021%	0.033%	0.048%

- 시료의 동일 감미수준에서의 감미질 평가농도-반응함수 측정(본실험)

- ✓ 1차 실험에서 시료에 대해 도출한 농도별 상대 감미도 회귀식을 이용하여 설탕 수용액 6%에 해당하는 시료의 상대당도를 예측하고 이때의 감미질 특성 분석
- ✓ 시료의 종류와 농도는 다음과 같음 (Table I-26). 평가 절차는 앞서 언급한 묘사분석 본 평가 방법 및 용어와 동일

Table I-26. 설탕6%수용액 대비 동일 감미수준의 시료 감미질 평가

시료	감미제별 상대감미도	농도 (%)
Sucrose	-	6
Glycosyl Rebaudioside A	147.2817	0.0407
Aspartame	153.3946	0.0391
Acesulfame-K	112.0928	0.0535
Saccharin	292.506	0.0205

○ 통계분석

- 묘사분석을 통해 획득한 연구 자료는 회귀분석과 시료간 감각적 특성 강도 간의 유의적 차이를 검증하기 위해 일반선형모형을 이용한 분산분석을 실시
- 시료 효과에 대한 유의적 차이가 나타난 경우, 각 감각적 특성 강도의 개별 시료 간의 유의성을 검증하기 위해 사후분석 중 Duncan's Multiple Range Test 실시 ($\alpha=0.05$)
- 통계분석에는 IBM SPSS Statistics 21(SPSS Inc., Chicago, USA), R Statistical System 3.6.1 (R Development Core Team, 2011)을 사용

○ 연구결과

▪ Sucrose와 각 시료의 회귀식 및 농도별 상대당도

- **G-Reb A** : 설탕 대응 농도(sucrose equivalent concentration)로 환산하였을 설탕 2~5% 정도에 상응하는 G-Reb A농도의 경우 약 763~160배의 상대 감미도를 나타냄. 설탕대비 상대 감미도는 0.002~0.02%에서 설탕의 약 763~170배 정도를 보이거나 0.03~0.06%에서는 약 160~130배의 감미도를 발현 (Figure I-6).
- **Aspartame**: 설탕 대응 농도(sucrose equivalent concentration)로 환산하였을 설탕 2~4.5% 정도에 상응하는 Aspartame농도의 경우 약 236~163배의 상대 감미도를 보임. 설탕대비 상대 감미도는 0.008~0.04%에서 설탕의 약 236~168배 정도를 보이거나 높은 농도를 사용할 경우 153~144 정도의 설탕 대비 상대 감미도를 나타냄 (Figure I-7).

- **Acesulfame-K**: 설탕 대응 농도(sucrose equivalent concentration)로 환산하였을 설탕 2~6% 정도에 상응하는 Acesulfame-K농도의 경우 약 250~100배의 상대 감미도를 보임. 설탕대비 상대 감미도는 0.01~0.05%에서 설탕의 약 250~110배의 감미도를 발현하였음. 높은 농도를 사용할 경우 50 정도의 설탕 대비 상대 감미도를 나타냄(Figure I-8).
- **Saccharin**: 설탕 대응 농도(sucrose equivalent concentration)로 환산하였을 설탕 2~5% 정도에 상응하는 Saccharin농도의 경우 약 430~302배의 상대 감미도를 보임. 설탕대비 상대 감미도는 0.004~0.02%에서 설탕의 약 430~292배의 감미도를 발현함. 높은 농도를 사용할 경우 270정도의 설탕 대비 상대 감미도를 나타냄 (Figure I-9).

Table I-27. 각 시료 별 sucrose 용액의 회귀식과 해당 감미료의 회귀식

Sample	Sucrose 용액의 회귀식	해당 감미료 회귀식
Glycosyl Rebaudioside A	$y = 1.3567x - 0.9904$ $R^2 = 0.9993$	$y = 142.36x + 1.3503$ $R^2 = 0.9312$
Aspartame	$y = 1.3612x - 0.8665$ $R^2 = 0.9964$	$y = 177.7x + 0.35$ $R^2 = 0.9781$
Acesulfame-K	$y = 1.2726x + 0.5381$ $R^2 = 0.9974$	$y = 2.7253\ln(x) + 15.076$ $R^2 = 0.9392$
Saccharin	$y = 1.2999x - 0.5753$ $R^2 = 0.995$	$y = 327.66x + 0.503$ $R^2 = 0.9804$

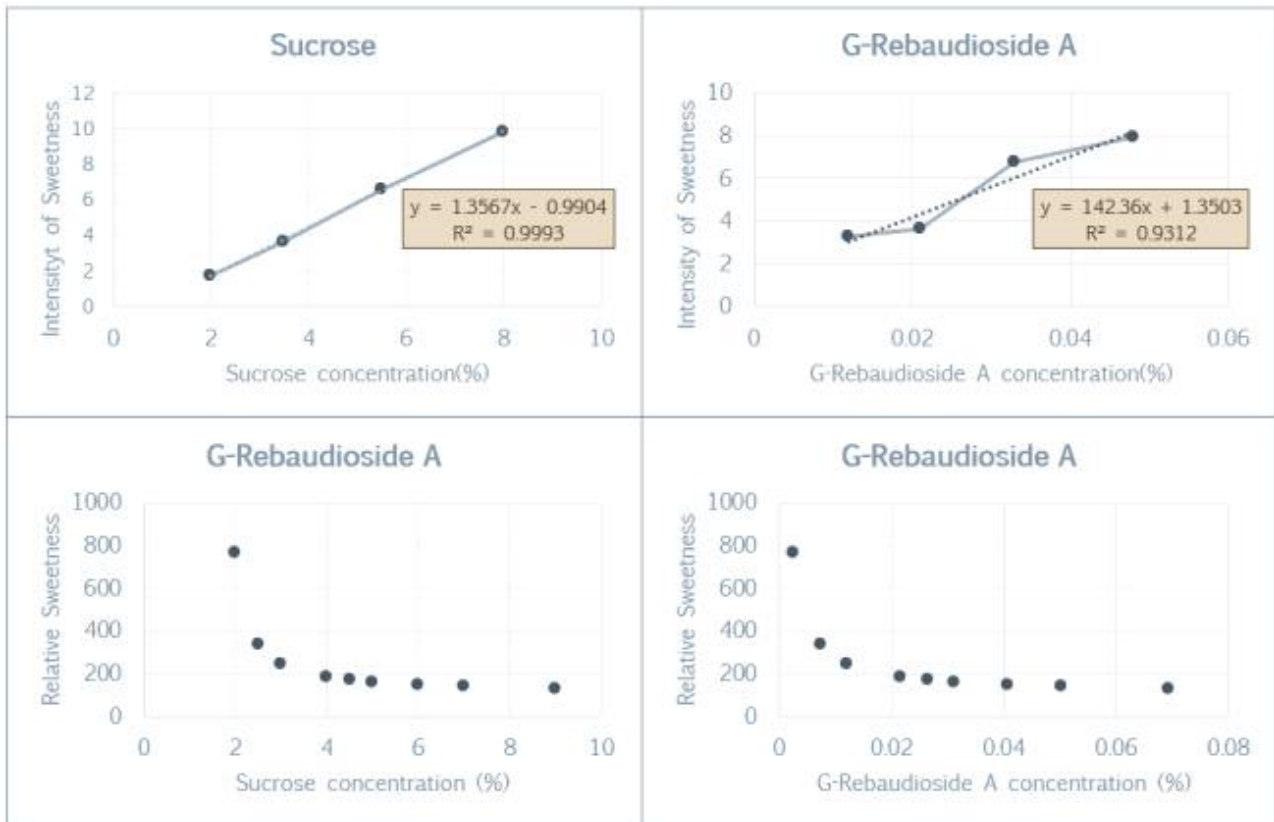


Figure I-6. Glycosyl Rebaudioside A의 상대감미도

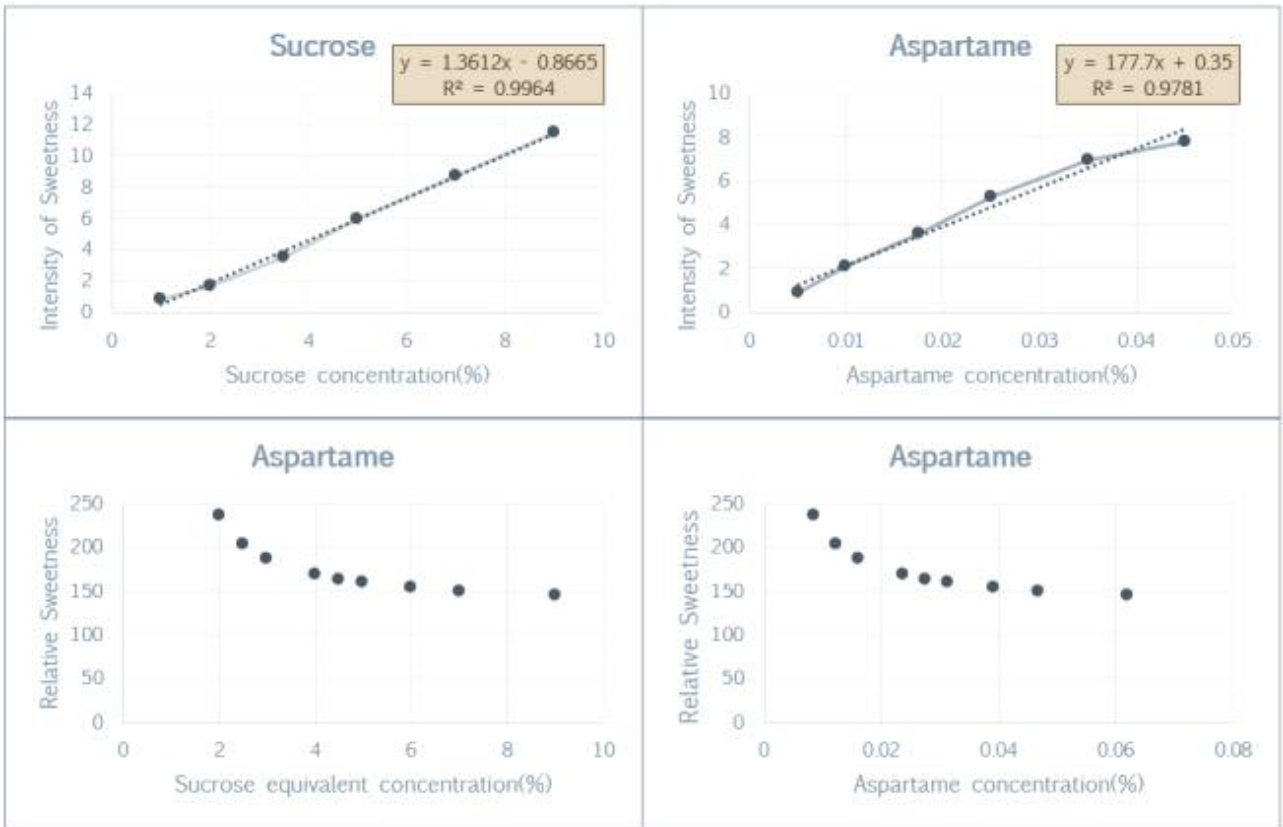


Figure I-7. Aspartame의 상대감미도

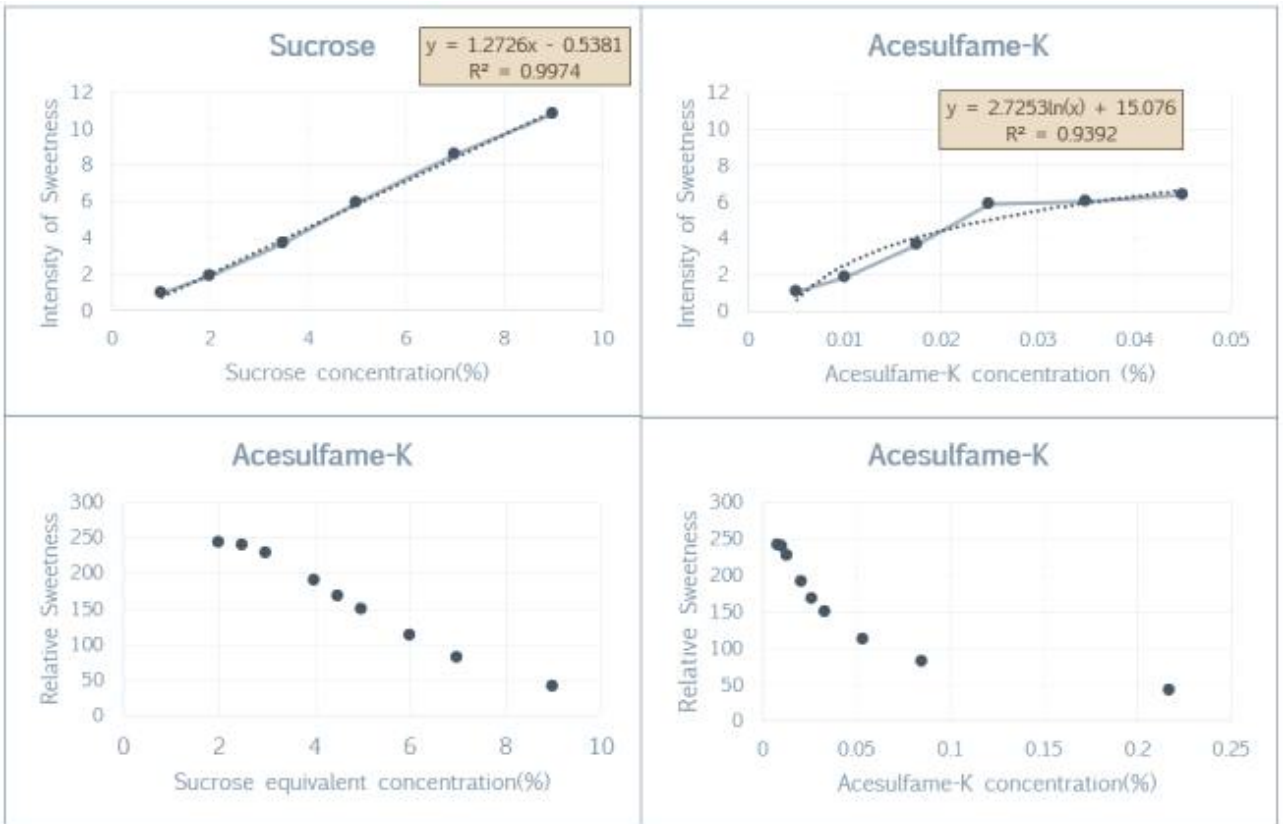


Figure I-8. Acesulfame-K의 상대감미도

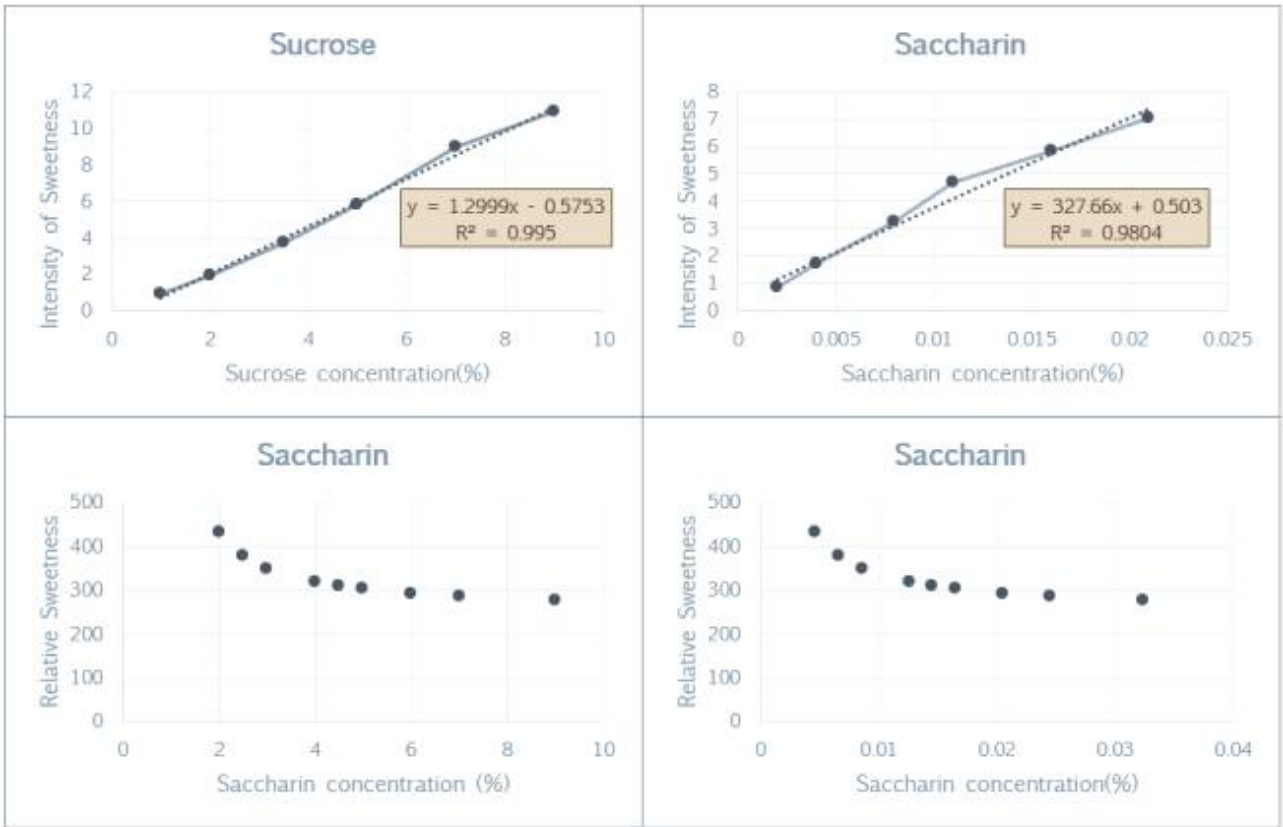


Figure I-9. Saccharin의 상대감미도

▪ 감미료의 각 농도별 관능적 특성 항목의 평균과 표준 편차

Table 1-28. 감미료의 각 농도별 관능적 특성 항목의 평균과 표준 편차

G-Rebaudioside A	단맛	쓴맛	인공적인단맛	이온음료향미	꿀향미	떫음/텃텃함	청량감	후미단맛	후미쓴맛
0.012%	3.3±1.9	0.5±0.9	1.0±1.5	0.4±0.6	0.1±0.3	0.5±0.7	0.6±0.8	2.9±1.9	0.3±0.7
0.021%	4.4±1.5	0.5±1.0	1.1±1.6	0.5±0.9	0.1±0.4	0.5±0.8	0.7±1.0	3.8±2.0	0.3±0.8
0.033%	6.6±1.4	0.4±0.9	2.5±2.4	0.3±0.8	0.5±1.0	0.5±0.9	0.6±1.1	5.8±1.8	0.4±0.8
0.048%	8.1±1.3	0.5±1.0	3.3±2.8	0.2±0.6	0.6±1.2	0.3±0.7	0.4±0.7	7.7±2.2	0.4±0.9

Aspartame	단맛	쓴맛	인공단맛	이온음료향미	꿀향미	떫음텃텃함	청량감	후미단맛	후미쓴맛
0.005%	0.9±0.6	0.7±1.1	0±0	0.4±0.8	0.0±0.0	0.7±1.1	0.8±1.5	0.5±0.6	0.6±1.0
0.010%	2.1±0.7	0.4±0.8	0.2±0.5	0.4±0.9	0.1±0.3	0.5±0.8	0.5±1.0	1.7±1.0	0.4±0.8
0.018%	3.6±0.9	0.2±0.5	0.5±0.8	0.3±0.7	0.3±0.7	0.2±0.4	0.5±0.8	3.2±1.1	0.1±0.4
0.025%	5.3±1.1	0.3±0.6	1.3±1.4	0.3±0.7	0.2±0.5	0.4±0.6	0.7±0.9	4.5±1.6	0.1±0.4
0.035%	6.9±1.4	0.3±0.7	1.8±1.7	0.6±1	0.6±1.0	0.6±0.8	0.9±1.2	6.3±1.8	0.3±0.6
0.045%	7.8±1.7	0.5±0.8	2.0±2.3	0.5±0.8	0.6±1.1	0.3±0.5	0.7±1.0	7.2±2.0	0.4±0.7

Acesulfame-K	단맛	쓴맛	인공단맛	이온음료향미	꿀향미	떫음텃텃함	청량감	후미단맛	후미쓴맛
0.005%	1.0±0.6	0.5±0.9	0.0±0.0	0.3±0.5	0.0±0.0	0.7±0.9	0.9±1.4	0.6±0.7	0.3±0.4
0.010%	1.8±0.5	0.3±0.6	0.1±0.5	0.6±0.9	0.1±0.3	0.6±1.0	0.9±1.1	1.2±0.7	0.3±0.6
0.018%	3.3±1.0	0.7±1.0	0.6±1.2	0.6±1.2	0.2±0.6	0.6±0.9	0.7±1.3	2.4±1.4	0.6±0.9
0.025%	4.8±1.1	0.8±1.0	0.6±1.0	0.6±1.2	0.4±0.8	0.8±1.1	0.9±1.3	3.7±1.9	0.7±1.3
0.035%	5.8±1.2	1.2±1.6	0.8±1.2	0.6±1.1	0.2±0.5	0.5±0.9	0.8±1.3	4.7±1.9	0.9±1.2
0.045%	6.4±1.6	1.8±1.9	1.6±2	0.4±0.9	0.5±0.9	0.5±1.0	0.8±1.4	4.7±2.4	1.3±1.6

Saccharin	단맛	쓴맛	인공단맛	이온음료향미	꿀향미	떫음텃텃함	청량감	후미단맛	후미쓴맛
0.002%	0.9±0.5	0.6±1.0	0.0±0.0	0.3±0.7	0.0±0.0	0.5±0.8	0.8±1.2	0.6±0.6	0.5±0.9
0.004%	1.7±0.7	0.5±0.8	0.2±0.4	0.5±0.9	0.0±0.2	0.4±0.8	0.8±1.1	1.1±0.8	0.4±0.7
0.008%	3.3±1.0	0.5±0.7	0.2±0.4	0.5±0.9	0.2±0.6	0.4±0.6	0.7±1.2	2.6±1.0	0.6±0.7
0.011%	4.7±1.1	0.9±1.1	0.7±1.2	0.4±0.9	0.2±0.5	0.4±0.7	0.8±1.2	3.8±1.4	0.6±0.9
0.016%	5.8±1.4	0.9±1.1	0.9±1.2	0.3±0.5	0.1±0.5	0.5±0.7	0.6±0.8	5.2±1.5	0.7±0.9
0.021%	7.0±1.5	1.2±1.4	1.5±1.5	0.6±1.1	0.3±0.5	0.4±0.8	0.9±1.3	6.1±2.0	1.0±1.3

▪ **설탕 6%농도에서 감미료의 감각적 특성 항목의 평균과 표준편차**

- 타당성 평가를 실시하였을 때 다양한 감미료 동일 감미수준(sucrose용액 기준 6%)에서의 감미질 평가는 다음(Table I-29)과 같음.
- 타당성 평가 결과 시료간 단맛 강도의 유의적 차이는 없는 것으로 분석됨. G-Rebaudioside A와 Saccharin의 경우, 실험을 따로 진행함.

Table I-29. 설탕 6%농도 기준으로 각 감미료의 관능적 특성 항목의 평균과 표준편차

Sample	단맛	쓴맛	인공단맛	이온음료향미	꿀향미	떫음/텁텁함	청량감	후미단맛	후미쓴맛
Sucrose	7.2±0.8	0.0±0.2	1.2±1.7	0.5±0.9	0.8±1.0	0.3±0.6	0.9±1.0	6.5±1.6	0.0±0.2
Aspartame	6.9±0.9	0.4±0.9	1.5±2.0	0.7±1.2	0.5±0.8	0.4±0.7	1.2±1.6	6.3±1.7	0.2±0.5
Acesulfame-K	6.9±1.1	2.1±1.8	1.1±1.7	0.8±1.1	0.5±0.8	0.6±0.9	0.7±1.1	5.7±1.9	1.7±1.6

Sample	단맛	쓴맛	인공단맛	이온음료향미	꿀향미	떫음텁텁함	청량감	후미단맛	후미쓴맛
Sucrose	6.1±1.3	0.1±0.3	1.7±2.0	0.4±0.9	0.2±0.4	0.3±0.5	0.9±1.4	5.4±1.5	0.0±0.0
G-Rebaudioside A	6.4±1.8	0.4±0.9	1.9±2.5	0.4±0.8	0.5±0.7	0.3±0.5	0.9±1.5	6±2.2	0.3±0.6
Saccharin	5.5±1.3	1.0±1.1	0.9±1.5	0.5±1.0	0.1±0.3	0.5±0.8	1.0±1.7	5±1.6	0.8±0.9

5.2.2. NHDC 당전이체- 스테비오사이드 당전이체 및 저열량 감미료 혼합물의 감미 특성 분석

○ 실험 방법

- 설탕 10% 수용액을 기준으로 이에 상응하는 단맛 강도를 지닌 혼합 감미 조합을 NHDC당전이체, G-Rebaudioside A, sucrose, Acesulfame-K 등을 이용하여 2성분 혼합물을 제조하여 시너지 및 감미질을 평가함.
- 실험방법은 앞서 실험1. 의 묘사분석 실험과 동일한 절차로 묘사분석 진행
- **묘사분석 패널**
 - 패널은 평소 감미소재에 대한 알레르기가 없는 만 20 세 이상 40대 미만의 여성을 대상으로 모집
 - 만 20세부터 25세까지의(평균 22.2, 표준편차 1.8) 총 9명의 패널이 묘사분석 실험에 참여
- **시료**
 - g-NHDC base로 하여 bulk 감미 소재 (Sucrose) 또는 고감미소재 (G-Rebaudioside A)를 3.5: 6.5의 2성분 조합으로 구성하여 설탕10% 대비 감미도와 감미질을 평가함(Table I-30).
 - G-Rebaudioside A base로 하여 bulk 감미 소재 (Sucrose) 또는 1종 고감미소재 (Aspartame, Acesulfame-K, Saccharin)를 3.5: 6.5, 5:5의 2성분 조합으로 구성하여 설탕10% 대비 감미도와 감미질을 평가함.

Table I-30. 2성분 조합

Base	비율	시료 (농도)	Abbr.
		설탕 10%	Suc10
g-NHDC	3.5 : 6.5	g-NHDC + g-reb A	g-Ng-Reb3565
		g-NHDC + sucrose	g-Nsuc3565
g-Rebaudioside A	3.5 : 6.5	g-reb A + sucrose	g-RebSuc3565
		g-reb A + aspartame	g-RebAsp3565
		g-reb A + acesulfame-K	g-RebAce3565
		g-reb A + saccharin	g-RebSacc3565
	5:5	g-reb A + sucrose	g-RebSuc55
		g-reb A + aspartame	g-RebAsp55
		g-reb A + acesulfame-K	g-RebAce55
		g-reb A + saccharin	g-RebSacc55

▪ 묘사분석 평가 절차 및 내용

- 패널은 이화여자대학교 생활환경관 511호에서 2주동안 1회에 2시간, 총 8회에 걸쳐 본 연구에 참여
- 앞서 실험1. 의 묘사분석 실험과 동일한 절차로 묘사분석을 진행하였으며, 실험은 3반복을 진행
- 묘사분석 패널 훈련
 - ✓ 기본맛 훈련은 실험1. 의 기본맛 훈련과 동일한 절차로 진행하였으나 단맛 훈련의 시료농도는 타겟 혼합물 농도 설탕 10%쯤으로 훈련함 (Table I-31).

Table I-31. 기본 맛 훈련 시료별 농도

기본 맛	농도			
	9%	10%	10.5%	11%
단맛_설탕	9%	10%	10.5%	11%
단맛_설탕	10%	10.5%	11%	12%
쓴맛_caffeine	0.01%	0.02%	0.04%	0.08%
떫은맛_tannin	0.01%	0.03%	0.05%	-

- 묘사분석 용어 도출

- ✓ 용어도출은 실험1.과 동일한 절차로 진행하였음. 단지, 용어도출 사용한 시료는 본 실험에 사용할 각 조합을 진행

Table 1-32. 시료에서 도출해낸 맛의 특성

관능적 특성	묘사용어	정의	표준물질
맛/향미	단맛 4점	설탕 농도 6%의 수용액	설탕 60g + 물 940g
	단맛 7점	설탕 농도 10%의 수용액	설탕 100g + 물 900g
	단맛 10점	설탕 농도 14%의 수용액	설탕 140g + 물 860g
	쓴맛 7점	Caffeine 농도 0.04%의 수용액	Caffeine 0.4g + 물 999.6g
	인공적인 단맛 8점	설탕의 단맛이 아닌 인공적으로 느껴지는 단맛	그린스위트(청정원) 20g + 물 980g
입안감촉	뽀음/텃텃함 6점	미각신경의 말초를 마비시키는 듯한, 마르고 거친 느낌	탄닌 1g + 물 999g
	점도 9점	우유에서 느껴지는 점도	네스퀵 초코우유
후미	단맛 4점	설탕 농도 0.5%의 수용액	설탕 60g + 물 940g
	단맛 7점	설탕 농도 3.5%의 수용액	설탕 100g + 물 900g
	단맛 10점	설탕 농도 7.5%의 수용액	설탕 140g + 물 860g
	쓴맛	Caffeine 농도 0.04%의 수용액	Caffeine 0.4g + 물 999.6g

○ 통계분석

- 묘사분석을 통해 획득한 연구 자료는 회귀분석과 시료간 감각적 특성 강도 간의 유의적 차이를 검증하기 위해 일반선형모형을 이용한 분산분석을 실시. 시료 효과에 대한 유의적 차이가 나타난 경우, 각 감각적 특성 강도의 개별 시료 간의 유의성을 검증하기 위해 사후분석 중 Duncan's Multiple Range Test를 실시 ($\alpha=0.05$).
- 통계분석에는 IBM SPSS Statistics 21(SPSS Inc., Chicago, USA), R Statistical System 3.6.1 (R Development Core Team, 2011)을 사용

○ 연구결과

- **2성분 조합시료의 관능적 특성 항목의 평균과 표준편차 분석**
 - 각 시료의 관능적특성과 표준편차는 다음 표 14와 같음. 조합시료간 단맛, 인공적인 단맛 및 후미 단맛은 유의적인 차이가 나타나지 않았으나 쓴맛, 올리고당향미, 뽀음/텃텃함, 점도와 후미 단맛은 유의적인 차이가 나타남
 - Control과 각 조합의 단맛특성 유의적 차이 나타나지 않지만 g-NHDC + sucrose (3.5:6.5)와 g-Reb A + sucrose (5:5)는 약간의 상승효과를 보임
 - g-NHDC base로 조합하는 시료에서 올리고당 향미를 잘 느껴지는 경향을 보임.g-NHDC + g-Rebaudioside A는 뽀음/텃텃한 감각은 강하게 평가되지만 단맛강도는 g-NHDC + sucrose과 평균0.1의 차이가 보임
 - G-Rebaudioside A + Acesulfame-K 조합이 쓴맛강도는 강하게 평가됐으며G-Rebaudioside A + Acesulfame-K 3.6:6.5비율로 조합하는 시료는 후미쓴맛강도도 강하게 평가됨
 - G-Rebaudioside A의 비율이 증가할수록 단맛 상승 작용이 더 잘 발현됨을 볼 수 있음. Sucrose (control)과 비교하여 모든 조합의 인공적인 단맛은 유사하게 나타남

Table 1-33. 조합 시료의 관능적 특성 항목의 평균과 표준편차

Sample	단맛	쓴맛	인공단맛	올리고당향미	떫음/텁텁함	점도	후미단맛	후미쓴맛
P-value	0.171	0.000***	0.788	0.000***	0.000***	0.003**	0.096	0.000***
Suc10 (control)	7.3±1.1 ^a	0.3±0.8 ^a	2.6±3.0 ^a	1.6±2.5 ^{bcd}	0.6±1.1 ^a	0.9±1.5 ^{abc}	6.7±1.8 ^a	0.2±0.6 ^a
g-Ng-Reb3565	8.1±2.1 ^{ab}	2.2±2.3 ^d	3.3±3.7 ^a	2.0±3.2^{cd}	2.0±2.5^d	1.2±1.8 ^{bc}	7.4±2.3 ^{abc}	1.7±2.3 ^{ef}
g-Nsuc3565	8.2±1.7^b	1.1±1.4 ^{bc}	2.9±3.7 ^a	2.5±2.9^d	0.9±1.7 ^{ab}	1.4±2.4^c	7.4±2.5 ^{abc}	1.1±2.0 ^{cde}
g-RebSuc3565	7.7±1.3 ^{ab}	0.5±1.1 ^{ab}	3.3±3.2 ^a	1.0±1.8 ^{abc}	0.8±1.2 ^a	0.6±1.5 ^{ab}	7.7±1.5 ^{bc}	0.3±0.8 ^{ab}
g-RebAsp3565	7.9±1.3 ^{ab}	1.3±2.0 ^c	3.5±3.2 ^a	1.0±1.9 ^{abc}	1.1±1.6 ^{ab}	0.6±1.3 ^{ab}	7.5±1.3 ^{abc}	1.0±1.8 ^{bcd}
g-RebAce3565	7.7±1.6 ^{ab}	3.2±2.1^e	2.8±2.8 ^a	0.3±0.8 ^a	1.8±1.7^{cd}	0.7±1.3 ^{ab}	7.1±1.9 ^{abc}	2.9±1.9^h
g-RebSacc3565	7.5±1.2 ^{ab}	2.3±2.0 ^d	2.7±2.7 ^a	0.4±0.9 ^a	1.5±1.9^{bed}	0.5±1.4 ^a	6.9±1.5 ^{ab}	2.7±2.0^{gh}
g-RebSuc55	8.3±1.5^b	1.0±1.6 ^{bc}	3.0±3.4 ^a	1.6±2.2^{bcd}	1.1±1.7 ^{ab}	0.8±1.6 ^{ab}	7.4±1.6 ^{abc}	0.7±1.3 ^{abc}
g-RebAsp55	8.1±1.1 ^{ab}	1.2±1.7 ^c	2.7±3.0 ^a	1.7±2.3^{bcd}	1.2±1.6 ^{ab}	0.4±0.8 ^a	7.9±1.4 ^c	0.9±1.3 ^{bcd}
g-RebAce55	7.9±1.2 ^{ab}	2.4±1.9 ^d	3.1±3.0 ^a	0.4±1.0 ^a	1.9±1.9 ^{cd}	0.4±0.8 ^a	7.0±1.5 ^{abc}	2.0±1.5 ^{fg}
g-RebSacc55	7.6±1.3 ^{ab}	2.0±1.8 ^d	2.7±2.7 ^a	0.7±1.4 ^{ab}	1.4±1.6 ^{bc}	0.4±0.7 ^a	7.3±1.7 ^{abc}	1.5±1.5 ^{def}

1) :NS. ***: p<.001, **:0.001≤p<.01, *:0.01≤p≤.05

2) Design: panel + sample + panel*sample

3) Duncan's 사후분석 : a<b<c<d<e<f<g

4) Suc10과 비교해 관능적 특성의 강도가 강한 시료는 파란색으로 표시

▪ 2성분 시료조합시 감미질의 시각적 도표화 (주성분분석, PCA)

- 시료조합에 대한 주성분 분석을 실시한 결과, 주성분1과 주성분2가 총 분산의 약 72%를 설명
- 제1주성분 양의 방향에 의치한 g-Nsuc3565, g-Ng-Reb3565, RebSuc3565, g-RebAsp3565, g-RebSuc55, g-RebAsp55시료는 단맛과 관련된 속성(단맛, 인공적인 단맛, 올리고당 향미, 후미단맛)이 높게 나타남
- 그와 반대로, 제1 주성분 음의 방향에 위치하한 g-RebAce3565, g-RebSacc3565, g-RebAce55, g-RebSacc55는 쓴맛, 후미쓴맛, 떫은/텁텁한 특성과 관련 있음.
- glycosyl NHDC-스테비오사이드 당전이체 조합 시료의 감각적 특성은 설탕을 100% 대체하였을 때의 특징임. 설탕을 30%~50% 수준으로 첨가 후 glycosyl NHDC-스테비오사이드 당전이체 조합의 감각적 특성의 경우 100% 대체시 보다는 이미가 감소할 것으로 판단됨. 이에 3차년도는 설탕 100% 대체가 아닌 50% 대체시 glycosyl NHDC-스테비오사이드 당전이체 조합의 감미 기능성을 실제 식품 시스템에서 평가하고자 함.

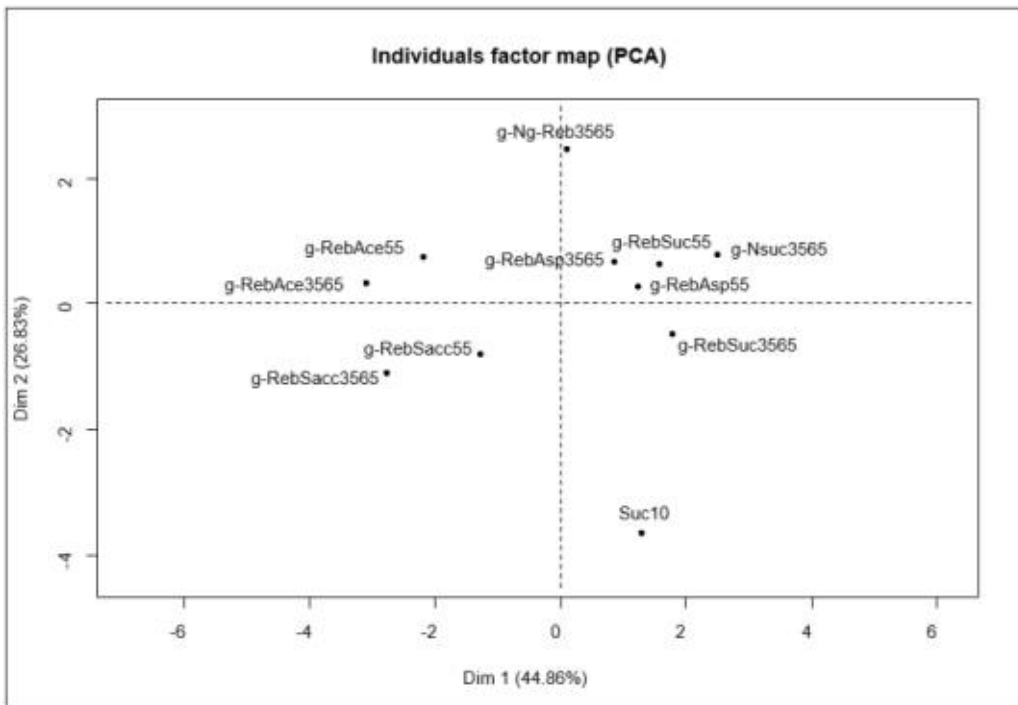
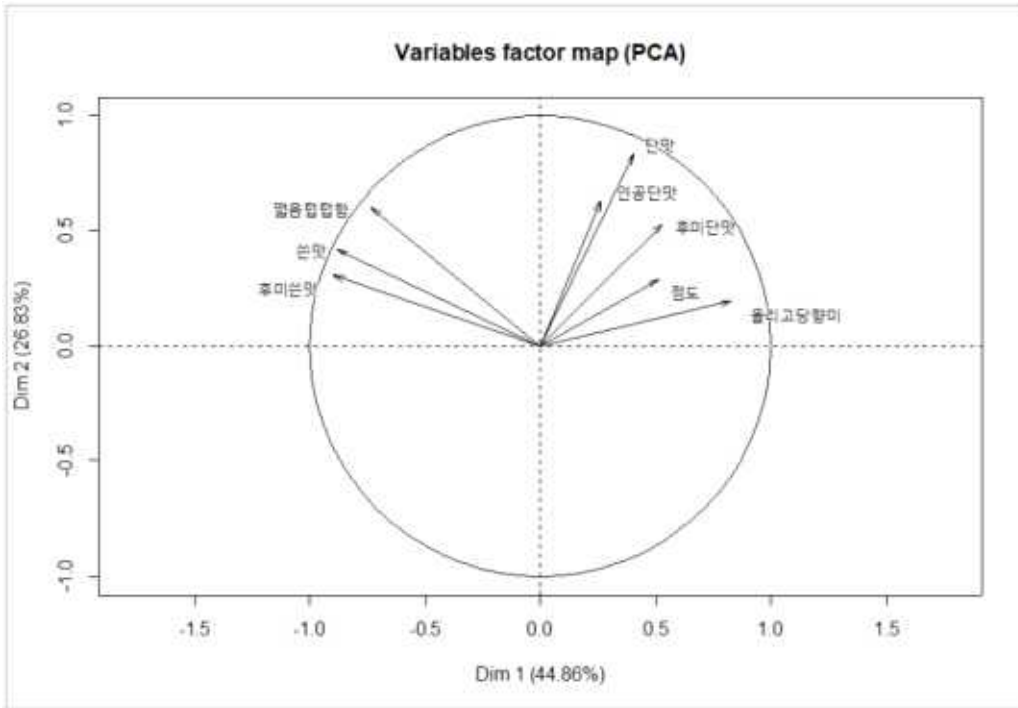


Figure I-10. 2성분 조합 시료의 관능적 특성에 대한 시각적 도표화(PCA)

[3차년도]

1. 신규 스테비오사이드 당전이체 및 혼합물을 적용한 레모네이드의 감미질 분석

1.1. 실험방법

1.1.1. 패널 선발

- 검사요원은 서울대학교 감각과학 연구실의 소비자 검사 요원 pool을 대상으로 한 전화 모집과 서울대학교 온라인 게시글에 참가자 모집문을 공지하여 자발적인 참여 지원자 8명(20-30대 남자 3명, 여자 5명)을 선발함.

1.1.2. 시료의 준비

- 7종류의 단일 감미료 (설탕, G-reb A, Reb A, Reb M, sucralose, erythritol, maltitol)과 2종류의 혼합 감미료(G-reb A+erythritol, G-reb A+maltitol)의 총 9 종류의 시료가 사용됨 (Table I-34).
- 2-AFC를 통해 확립된 7% 설탕 수용액과 동일한 감미도를 갖는 농도를 이용함 (Table I-34).
- 레몬 농축액(Lemon plus, EUROFOOD s.r.l, Messina, Italy)을 7% 감미료 수용액에 3% 수준으로 희석하여 제조함.
- 시료 제조 및 보관 방법은 2-AFC 실험과 동일함.
- 시료는 평가 2시간 전 흰색 일회용 플라스틱 컵에 80mL씩 소분하여 실온(22±2℃)으로 제시함.

Table I-34. The information of sample concentration used in descriptive analysis

Abbreviation	Sample	Concentration
Sucrose	Sucrose	7.0000%
G-Reb A	Glycosyl Rebaudioside A	0.0476%
Reb A	Rebaudioside A	0.053%
Reb M	Rebaudioside M	0.044%
Sucralose	Sucralose	0.0143%
Erythritol	Erythritol	11.529%
Maltitol	Maltitol	9.513%
GE	Glycosyl Rebaudioside A + Erythritol	1:1 mixture of 0.0476% G-Reb A solution and 11.529% erythritol solution
GM	Glycosyl Rebaudioside A + Maltitol	1:1 mixture of 0.0476% G-Reb A solution and 9.513% maltitol solution

1.1.3. 패널 훈련 및 평가

- 패널 훈련
 - 패널 훈련은 1달 동안 주 3-4회 진행되었으며, 회당 1시간 소요, 총 19시간 실시되었음
 - 용어 및 표준 시료, 평가 방법 개발
 - Orientation : 검사 목적, 관능검사 및 묘사분석의 소개

- 특성 용어 도출 ; 예비실험을 거쳐 시료간의 차이를 잘 설명하는 용어 특성 목록을 제공 후, 패널들 간의 토의를 거쳐 용어 목록을 개발함 (Table I-35, I-36).
- 정의 및 표준시료 확립 ; 특성 용어에 대한 정의 및 표준시료, 평가 방법을 확립하였으며 (Table I-35, I-36), 15cm 선척도 (1.25cm; 매우 약하다/매우 빠르다, 13.75cm; 매우 강하다/매우 느리다) 사용법을 훈련함.
- 하나의 시료를 평가한 후 다음 시료 평가 전 2분간의 휴식과 함께 제시된 입가심용 온수($46 \pm 2^\circ\text{C}$)와 정수($22 \pm 2^\circ\text{C}$)로 충분히 입을 행구도록 함.
- 확립된 방법에 의하여 3회 모의 평가 후 통계분석을 통해 패널들 간의 consensus와 각 패널 요원들의 재현성을 평가함.
- 재현성이 낮거나 평가 경향이 다른 패널 요원은 재훈련을 실시함.

○ 본 실험 평가

- 본 실험은 3회 진행됨.
- 하나의 시료를 평가한 후 다음 시료를 평가하는 monadic 방법을 사용함.
- 시료사이에 30초 휴식과 함께 제시된 물로 충분히 입을 행구도록 함.
- 4개의 시료 평가 후 5분의 휴식을 취하여 검사 시의 피로감을 최소화함.
- 시료는 first sample effect를 막기 위해 Williams Latin square design에 따라 제시됨.

1.1.4. 통계 분석

○ 분산분석(Analysis of variance; ANOVA)

- 각 시료의 특성에 대한 데이터의 평균 및 표준편차를 구하였음.

○ 주성분 분석(Principal component analysis; PCA)

- 정량적 묘사분석으로 도출된 관능 특성들과 각 시료간의 관계를 알아냄.

Table I-35. Definitions of sensory attributes of 9 sweetener samples in lemonade systems

Attributes		Definition	Reference materials
Taste	Sweetness	Fundamental taste sensation of which sucrose is typical	2% (w/v) sucrose (CJ CheilJedang Co., Ltd, Seoul, Korea) , 5% , 7% sucrose in water
	Bitterness	Fundamental taste sensation of which caffeine and quinine is typical	7% (w/v) sucrose (CJ CheilJedang Co., Ltd, Seoul, Korea) and 0.03% (w/v) caffeine (Sigma-Aldrich, St. Lous, MO, USA) in water.
	Sourness	Fundamental taste sensation of which citric acid is typical	0.15% (w/v) citric acid (RZBC Co. Ltd, Korea) in water
Flavor	Lemon	The flavor associated with lemon	10% (v/v) fresh lemon juice in water
Trigeminal senses	Astringency	The feeling which shrivels the tongue associated with aluminium potassium sulfate	0.02% (w/v) aluminium potassium sulfate (Daejung Chemicals & metals Co., Gyeonggi-do, Korea.) in water.
	Artificial	Sensation of artificial sweetener associated with aspartame	0.1% (w/v) aspartame (the nutrasweet Co., USA) in water.
Mouthfeel	Body	Rate of sample flows on the tongue	1.5g potato starch (potato starch, Sunginfood, Gyeonggi-do, Korea) and 500mL water boiled using low heat with stir about 5 minutes.
Aftertaste	Sweet	Sweet taste perceived 5 seconds after expectorate	7% (w/v) sucrose (CJ CheilJedang Co., Ltd., Korea) and 0.1% (w/v) aspartame (the nutrasweet Co., USA) in water.
	Bitter	Bitter taste perceived 5 seconds after expectorate	0.03% (w/v) caffeine (sigma-Aldrich, st.Lous, MO, USA) in water.
	Lemon flavor	Lemon flavor perceived 5 seconds after expectorate	10% (v/v) fresh lemon juice in water.

Table I-36. Definitions and tasting methods of the onset of initial sweetness and the time of maximum sweetness

Attributes		Definition	Tasting method
Temporal aspect	Onset of initial sweetness	The time when sweetness was first perceived	The time when sweetness of sample solution was first perceived while holding in the oral cavity Very fast(scale value : 1.25) - 0-1 second Very slow(scale value : 13.75) - 2 seconds
	Time to maximum sweetness	The time when sweetness was perceived strongest	The time when maximum sweetness of sample solution was first perceived while holding in the oral cavity Very fast(scale value : 1.25) - 0-1 second Very slow(scale value : 13.75) - 4 seconds

1.2. 실험 결과

- 각 감미료에서 도출된 감미 특성을 요약한 결과는 Table I-37와 같음. 시료의 관능특성을 보다 종합적이며 다각적으로 관찰하기 위하여 감미 출현 및 후미 역시 분석에 포함되었음.
- Figure I-11는 PCA의 결과로, 시료와 특성들의 관계를 나타낸 것임.
- PCA 결과의 dim 1, dim 2는 각각 전체 변동의 37.37%, 29.17%을 설명함 (Figure I-11).
- 레모네이드 시스템에서 G-reb A와 Reb M는 Reb A에 비해 쓴맛과 쓴맛 후미 강도가 유의적으로 낮고, 단맛 후미 강도가 유의적으로 강함 (Table I-37).
- 짙은 느낌에서는 Reb A과 Reb M간에 유의적인 차이가 없었음 (Table I-37).
- Dim2의 음의 방향에 위치한 Sucralose, Erythritol, Maltitol은 짙은 느낌, 최대 단맛 출현 정도에서 유의적인 차이가 없음 (Figure I-11, Table I-37).
- Maltitol은 단맛과 쓴맛을 제외한 대부분의 특성에서 Erythritol과 큰 차이를 보이지 않음 (Table I-37).
- Figure I-11B의 신뢰타원으로 보아, GM와 Sucralose는 전반적인 특성에서 차이가 없는 것으로 보임.
- Figure I-11B의 신뢰타원으로 보아, GE와 Sucrose는 전반적인 특성에서 차이가 없는 것으로 보임.
- 레모네이드 시스템 상에서 G-reb A에 erythritol을 혼합하면 신맛과 레몬 향미, 레몬향미 후미를 증가시킴 (Table I-37).
- 레모네이드 시스템 상에서 G-reb A에 maltitol을 혼합하면 쓴맛과 짙음 등 바람직하지 못한 특성은 감소시키고 단맛은 상승시키는 효과를 보임(Table I-37).
- 레모네이드 시스템에서 신규 당전이체인 G-Reb A를 Reb A와 비교했을 때 쓴맛, 쓴맛 후미, 짙은 느낌이 유의적으로 감소되어, 당전이가 스테비오사이드 계 감미료의 감미질을 개선하는데 효과가있는 것으로 나타남.
- 당 전이 및 당 알코올(erythritol, maltitol)과의 혼합은 Reb A 감미질 개선 전략으로 활용될 수 있음.

Table I-37. Mean intensity of descriptive sensory attributes elicited from 9 sweetener samples in lemonade

	Sucrose ¹⁾	G-reb A	Reb A	Reb M	Sucralos e	Erythrit ol	Maltitol	GE	GM
Sweetness	5.65 ^{b2)} (1.43) ³⁾	6.14 ^{bc} (0.81)	6.00 ^{bc} (1.41)	6.52 ^{cd} (1.15)	5.97 ^{bc} (1.16)	4.50 ^a (1.61)	5.38 ^b (1.39)	6.09 ^{bc} (1.08)	6.98 ^d (1.17)
Bitterness	1.80 ^a (0.93)	2.02 ^a (1.25)	3.83 ^b (1.44)	2.19 ^a (1.18)	1.91 ^a (1.18)	3.72 ^b (1.13)	1.84 ^a (0.98)	2.57 ^a (1.26)	1.90 ^a (0.98)
Sourness	3.18 ^a (1.23)	3.41 ^a (1.05)	3.18 ^a (1.16)	3.11 ^a (0.97)	3.16 ^a (1.01)	3.83 ^a (1.00)	3.11 ^a (1.07)	4.70 ^b (0.88)	3.11 ^a (1.12)
Lemon flavor	3.39 ^{ab} (1.36)	3.73 ^{ab} (1.34)	3.15 ^{ab} (1.16)	3.86 ^{bc} (0.93)	3.89 ^{bc} (1.14)	3.18 ^{ab} (1.54)	3.05 ^a (1.33)	4.49 ^c (1.20)	3.74 ^{abc} (1.19)
Astringency	3.87 ^a (2.35)	4.05 ^a (2.36)	5.65 ^c (2.33)	4.90 ^{bc} (2.23)	4.05 ^a (2.38)	4.30 ^{ab} (2.43)	3.95 ^a (2.03)	4.15 ^{ab} (2.37)	3.75 ^a (2.07)
Artificial	2.30 ^a (0.96)	2.41 ^a (1.11)	2.57 ^a (1.13)	3.25 ^b (1.00)	3.13 ^b (0.97)	2.28 ^a (1.17)	2.31 ^a (1.21)	2.34 ^a (0.97)	2.32 ^a (0.99)
Body	3.00 ^{ab} (1.13)	2.89 ^a (1.12)	2.90 ^a (1.07)	3.25 ^{ab} (1.26)	3.46 ^b (1.41)	2.78 ^a (1.18)	2.92 ^{ab} (1.42)	3.08 ^{ab} (1.11)	3.04 ^{ab} (1.23)
Sweet aftertaste	5.13 ^{bc} (1.42)	6.28 ^{de} (1.47)	5.44 ^{bc} (1.64)	7.26 ^f (1.13)	6.86 ^{ef} (1.09)	4.28 ^a (1.61)	4.93 ^{ab} (1.48)	5.33 ^{bc} (1.16)	5.77 ^{cd} (1.39)
Bitter aftertaste	1.85 ^a (1.16)	1.91 ^a (1.48)	4.02 ^b (1.40)	1.87 ^a (1.66)	1.73 ^a (1.24)	2.62 ^a (1.56)	1.82 ^a (1.23)	2.00 ^a (1.12)	1.64 ^a (1.28)
Lemon flavor aftertaste	2.88 ^{ab} (1.36)	3.18 ^{ab} (1.25)	2.74 ^a (1.45)	3.39 ^{bc} (1.07)	3.09 ^{ab} (1.22)	2.76 ^{ab} (1.16)	2.75 ^{ab} (1.16)	3.89 ^c (1.36)	3.16 ^{ab} (1.44)
Onset of initial sweetness	4.07 ^a (2.08)	6.64 ^b (2.79)	6.71 ^b (2.54)	6.20 ^b (2.12)	4.37 ^a (2.22)	4.40 ^a (2.40)	4.77 ^a (2.30)	4.29 ^a (2.10)	4.33 ^a (2.13)
Time to maximum sweetness	5.88 ^{ab} (2.09)	7.80 ^c (2.98)	7.68 ^{bc} (2.29)	7.96 ^c (2.43)	7.30 ^{abc} (2.72)	5.50 ^a (2.40)	5.87 ^{ab} (2.49)	6.23 ^{abc} (2.48)	7.43 ^{bc} (3.01)

¹⁾See table 1 for sample abbreviation.

²⁾Different alphabet letters indicate a significant difference among the samples (Tukey's honestly significant difference test, $p < 0.05$)

³⁾Standard deviation.

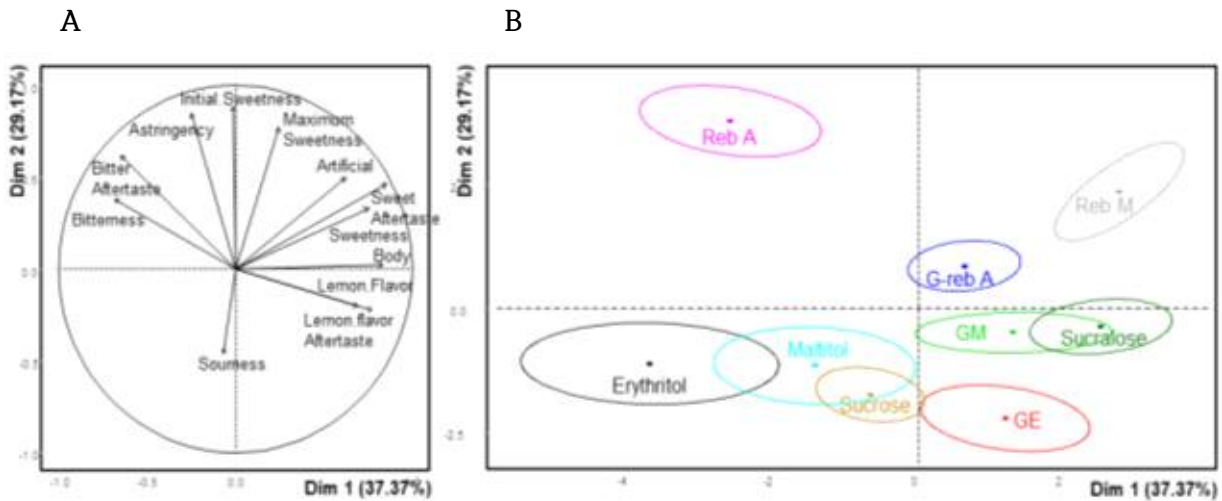


Figure I-11. Principal component (PC) loading of the sensory attributes (A) and scores of the samples (B) from nine sweeteners in the lemonade system on dim 1 and dim 2 (See Table I-34 for sample abbreviations)

2. 가향 두유/가향 우유 (초콜렛, 바닐라)

2.1. 상대당도 분석

본 실험에서는 2-alternative forced choice method (2-AFC) 를 이용하여 각각 7% 설탕 대비 농도를 적용한 두유 및 우유와 동일한 상대당도를 확립하였음.

2.1.1. 실험방법

○ 검사요원

- 서울대학교 감각과학 연구실의 소비자 검사 요원 pool을 대상으로 한 전화 모집과 서울대학교 온라인 게시글에 참가자 모집문을 공지하여 자발적인 참여 지원자 20~40대 40명 (남자 22명, 여자 18명)을 선발함.

○ 시료

- 총 2종류의 시료를 평가에 사용함(Table I-38).
- 총 2종류의 음료 시스템을 평가에 사용함(Table I-39).
- 설탕은 대조군으로 사용됨

Table I-38. Sample information

Sample abbreviation	Sample	Manufacturer	Purity(%)
Reb A	Rebaudioside A	Shandong Huaxian Stevia Co., LTD, Jining, China	97.3
Reb M	Rebaudioside M	Shandong Haigen Bio-Tech, Shandong, China	95.64

Table I-39. Beverage system information

Sample	Product	Manufacturer
Soy milk	Maeil soy milk 99.9	Maeil Co. LTD, Seoul, Korea
Milk	Lactose-free milk	Maeil Co. LTD, Seoul, Korea

○ 시료의 준비

- 모든 감미료 시료들의 농도를 예비실험을 통해 설정한 5수준으로 제조하여 각 시료마다 7% 설탕 대비 농도를 적용한 두유 및 우유와 비교함 (Table I-40).
- 시료는 분량의 감미료를 실온의 두유 및 우유에 magnetic stirrer(모델명, 로 1100rpm에서 10분간 교반하여 완전히 용해시켜 제조함.
- 모든 시료는 당일 제조하여 평가가 있기 전까지 실온(22±2℃)에 보관함.
- 시료는 세 자리 난수로 표기한 흰색 일회용 플라스틱 컵에 10mL씩 소분하여 실온으로 제시함.

Table I-40. The range of concentrations for sweetener samples used in 2-AFC test

Beverage system	Sample	Concentration
Soy milk	Reb A	0.06%, 0.07%, 0.08%, 0.09%, 0.10%
	Reb M	0.03%, 0.0435%, 0.057%, 0.0705%, 0.084%
Milk	Reb A	0.04%, 0.05%, 0.06%, 0.07%, 0.08%
	Reb M	0.03%, 0.0435%, 0.057%, 0.0705%, 0.084%

○ 평가 절차

- 1 session당 한 종류의 감미료 시료 5쌍을 평가함.
- Session 별 제공되는 시료의 종류 및 농도 제시 순서는 William Latin Square Design에 의해 결정 되었음.
- 7% 설탕 대비 농도의 두유 및 우유와 감미료 시료 1쌍 내에서의 시료 평가 순서는 counter-balanced, randomized 되었음.
- 검사 요원은 1회 4 session의 시료를 평가하도록 하였으며, session 평가 순서는 counter-balanced, randomized 되었음.
- 제시된 시료 전체를 5초 동안 머금고 제시된 타구 컵에 뱉은 후 5초 동안의 맛을 느껴 총 10초 동안 느껴지는 총체적인 단맛을 평가함.
- 5 농도 수준으로 제조된 시료를 각각 7% 설탕 대비 농도의 두유 및 우유와 비교하여 단맛이 더 강한 시료를 선택하도록 함.
- 감미료의 섭취로 인해 발생할 수 있는 건강상의 문제를 최소화하기 위하여 시료를 삼키지 않고 뱉도록 하였음.
- 입가심 물은 온수와 정수를 제시하였음. 온수는 보온병에서 46±2℃로 유지하였고, 정수는 실온 (22±2℃)의 정수를 물병에 담아 제시하였음. 예비실험을 통하여 구강 내 온도 변화를 최소화할 을 위해 온수로 입가심 후에 정수로 입가심을 하도록 설정되었음.
- 한 쌍의 시료를 평가한 후 다음 시료 쌍의 평가 전 2분간의 휴식과 함께 제시된 입가심용 온수와 정수로 충분히 입을 헹구도록 함.
- 한 종류의 1 session(감미료 5쌍)을 평가한 후에는 10분간 휴식을 취하여 검사 시 피로감을 최소화 함.

○ 결과 분석

- 시료를 7% 설탕 용액보다 더 달다고 평가한 응답 수를 세어 concentration - response (C-R curve)을 구하고 회귀식(% response = a × concentration(%) + b)을 구하여 응답률이 50%일 때의 감미료 농도를 구함.
- 상대 당도 = 설탕 용액 농도 (7%) / 응답률 50%일 때의 감미료 농도

2.1.2. 실험 결과

- 각 시료의 회귀식에 대한 R²값은 Reb A를 적용한 우유 시스템을 제외하고 0.83-0.85로, 회귀선이 결과값에 잘 적합됨.
- Reb A를 적용한 우유 시스템은 R²값이 0,58로 회귀선이 결과값에 적합하지 않아 추가적인 실험을 진행함.
- Reb A를 적용한 우유 시스템에 0.09%, 0.10% 농도로 2-AFC를 진행했지만 여전히 적합한 회귀선이 나오지 않고 오히려 상대당도는 감소하는 경향을 보였음.
- Reb A를 적용한 우유 시스템의 경우 Two-sided Directional Difference Test에서 N=40 일 때 13-26명이 응답해야 유의적인 차이가 없음(α=0.05)을 확인함.
- Reb A를 적용한 우유 시스템에서 13명이 응답한 ratio of response를 계산해 0.042% 농도로 2-AFC를 추가적으로 실시해 7% 설탕 대비 농도의 우유와 상대당도의 유의적인 차이가 없음을 확인함.
- 각 감미료의 C-R curve(Figure I-12, Figure I-13)에서 구해진 상대 당도는 Table I-41과 같음.
- 고감미료의 경우 작년 5% 설탕용액 대비 상대당도 결과와 비교해보면, Reb A과 Reb M의 상대당도는 감소하는 경향을 보였음. 이는 농도가 증가함에 따라 쓴맛이 증가하여 나타난 결과임.

Table I-41. Relative sweetness calculated from concentration-response curves

Beverage system	Sample	Regression equation	R ²	Relative sweetness determined using 2-AFC
Soy milk	Reb A	y = 10.256x - 0.2967	0.83	90
	Reb M	y = 0.4955ln(x) + 2.0708	0.81	167
Milk	Reb A	Unavailable	-	167
	Reb M	y = 0.4932ln(x) + 1.9719	0.85	345

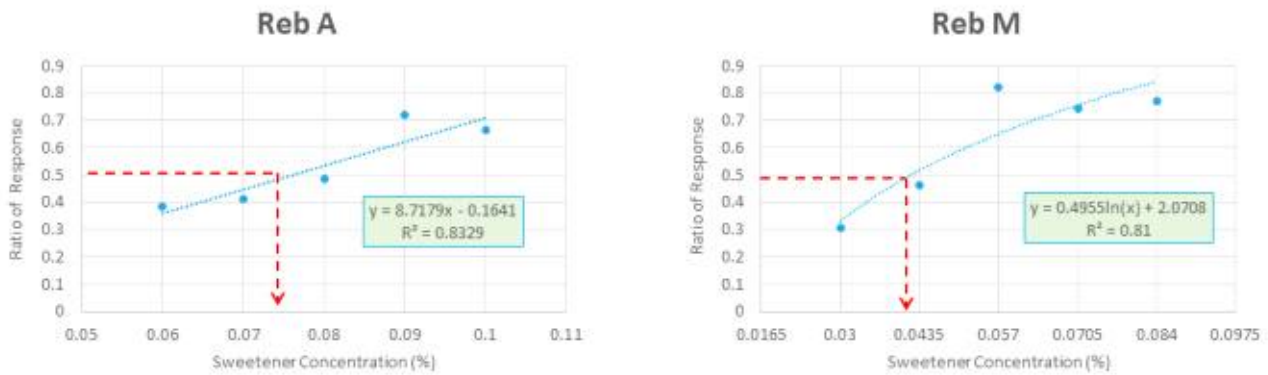


Figure I-12. Dose-response curves of 2 sweeteners in soymilk system

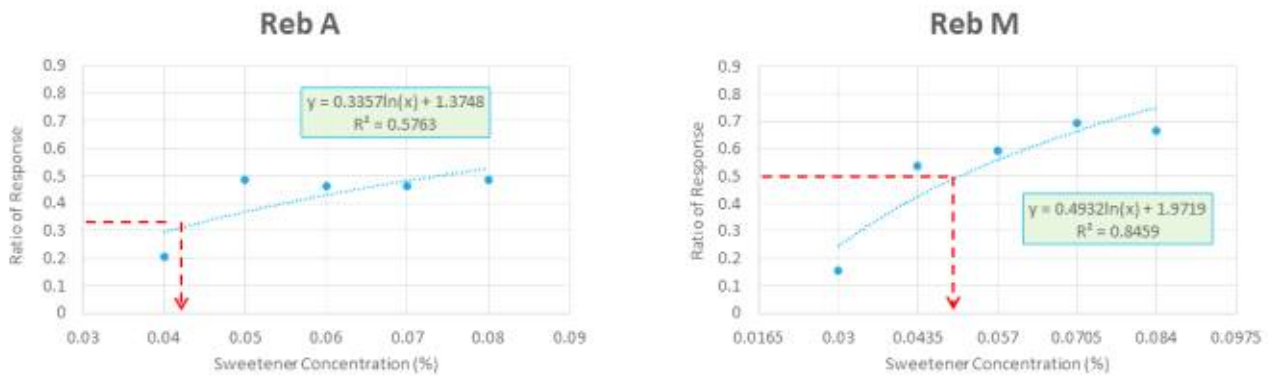


Figure I-13. Dose-response curves of 2 sweeteners in milk system

2.2. Rebaudioside계 감미료를 적용한 가향 두유 시스템의 감미질 분석

2.2.1. 실험방법

○ 패널 선발

- 검사요원은 서울대학교 감각과학 연구실의 소비자 검사 요원 pool을 대상으로 한 전화 모집과 서울대학교 온라인 게시글에 참가자 모집문을 공지하여 자발적인 참여 지원자 9명(20-30대 남자 2명, 여자 7명)을 선발함.

○ 시료의 준비

- 두유에 3 종류의 단일 감미료 (설탕, Reb A, Reb M)과 2 종류의 향료(Vanilla, Chocolate) 첨가 및 향료 무첨가(대조군) 총 9 종류의 시료가 사용됨 (Table I-42).
- 2-AFC를 통해 확립된 7% 설탕 수용액과 동일한 감미도를 갖는 농도를 이용함 (Table I-42).
- 향료는 Vanilla와 Chocolate 향미를 인지할 수 있을 정도의 1.3% 농도로 적용함.
- 시료 제조 및 보관 방법은 2-AFC 실험과 동일함.
- 시료는 평가 2시간 전 흰색 일회용 플라스틱 컵에 70mL씩 소분하여 실온(22±2℃)으로 제시함.

Table I-42. The information of sample concentration used in descriptive analysis

Abbreviation	Sweetener	Flavor	Concentration	
			Sweetener	Flavor
SN		None		-
SV	Sugar	Vanilla	7.0000%	1.3%
SC		Chocolate		1.3%
AN		None		-
AV	Reb A	Vanilla	0.0778%	1.3%
AC		Chocolate		1.3%
MN		None		-
MV	Reb M	Vanilla	0.0420%	1.3%
MC		Chocolate		1.3%

○ 패널 훈련 및 평가

- 패널 훈련
 - 패널 훈련은 1달 동안 주 5회 진행되었으며, 회당 1hr 소요, 총 20시간 실시되었음
 - 용어 및 표준 시료, 평가 방법 개발
 - ✓ Orientation : 검사 목적, 감각검사 및 묘사분석의 소개
 - ✓ 특성 용어 도출 ; 예비실험을 거쳐 시료간의 차이를 잘 설명하는 용어 특성 목록을 제공 후, 패널들 간의 토의를 거쳐 용어 목록을 개발함 (Table I-43).
 - ✓ 정의 및 표준시료 확립 ; 특성 용어에 대한 정의 및 표준시료, 평가 방법을 확립하였으며 (Table I-43), 15cm 선척도 (1.25cm; 매우 약하다/매우 빠르다, 13.75cm; 매우 강하다/매우 느리다) 사용법을 훈련함.
 - ✓ 하나의 시료를 평가한 후 다음 시료 평가 전 2분간의 휴식과 함께 제시된 입가심용 온수(46±2℃)와 정수(22±2℃)로 충분히 입을 헹구도록 함.
 - ✓ 확립된 방법에 의하여 3회 모의 평가 후 통계분석을 통해 패널들 간의 consensus와 각 패널 요원들의 재현성을 평가함.
 - ✓ 재현성이 낮거나 평가 경향이 다른 패널 요원은 재훈련을 실시함.
- 본 실험 평가
 - 본 실험은 3회 진행됨.
 - 하나의 시료를 평가한 후 다음 시료를 평가하는 monadic 방법을 사용함.
 - 시료사이에 30초 휴식과 함께 제시된 물로 충분히 입을 헹구도록 함.
 - 4개의 시료 평가 후 5분의 휴식을 취하여 검사 시의 피로감을 최소화함.
 - 시료는 first sample effect를 막기 위해 Williams Latin square design에 따라 제시됨.

○ 통계 분석

- 분산분석(Analysis of variance; ANOVA)
 - 각 시료의 특성에 대한 데이터의 평균 및 표준편차를 구하였음.
- 주성분 분석(Principal component analysis; PCA)
 - 정량적 묘사분석으로 도출된 감각 특성들과 각 시료간의 관계를 알아냄.

Table I-43. Definitions of sensory attributes of 9 samples in soymilk system

Attributes	Definition	Reference materials	
Aroma	Soymilk odor	Smell associated with soymilk	Soymilk (Maeil Co. LTD, Seoul, Korea)
	Vanilla odor	Smell associated with vanilla	7% (w/v) white table sugar (CJ CheilJedang Co., Ltd, Seoul, Korea) and 1.5% (w/v) vanilla flavor (ES Food, Seoul, Korea) in soymilk.
	Chocolate odor	Smell associated with chocolate	7% (w/v) white table sugar (CJ CheilJedang Co., Ltd, Seoul, Korea) and 1.5% (w/v) chocolate flavor (Serim Food, Gyeonggi-do, Korea) in soymilk.
Taste	Sweetness	Fundamental taste sensation of which sucrose is typical	5% (w/v) white table sugar (CJ CheilJedang Co., Ltd, Seoul, Korea) , 7% , 10% white table sugar in soymilk.
	Bitterness	Fundamental taste sensation of which caffeine and quinine is typical	7% (w/v) white table sugar (CJ CheilJedang Co., Ltd, Seoul, Korea) and 0.03% (w/v) caffeine (Sigma-Aldrich, St. Lous, MO, USA) in soymilk.
Flavor	Soymilk	The flavor associated with soymilk	Soymilk (Maeil Co. LTD, Seoul, Korea)
	Vanilla	The flavor associated with vanilla	7% (w/v) white table sugar (CJ CheilJedang Co., Ltd, Seoul, Korea) and 1.5% (w/v) vanilla flavor (ES Food, Seoul, Korea) in soymilk.
	Chocolate	The flavor associated with chocolate	7% (w/v) white table sugar (CJ CheilJedang Co., Ltd, Seoul, Korea) and 1.5% (w/v) chocolate flavor (Serim Food, Gyeonggi-do, Korea) in soymilk.
Trigeminal senses	Astringency	The feeling which shrivels the tongue associated with aluminium potassium sulfate	0.05% (w/v) aluminium potassium sulfate (Daejung chemicals & metals Co., Gyeonggi-do, Korea.) in soymilk.
Aftertaste	Sweet	Sweet taste perceived 5 seconds after expectorate	0.1% (w/v) aspartame (The nutrasweet Co. Augusta, USA) in soymilk.
	Bitter	Bitter taste perceived 5 seconds after expectorate	0.03% (w/v) caffeine (Sigma-Aldrich, St. Lous, MO, USA) in soymilk.

2.2.2. 실험 결과

- Table I-44은 감미료, 향료, 감미료와 향료의 상호작용의 효과가 유의적인지를 나타냄. 감미료는 바닐라 향, 바닐라 향미, 초콜렛 향, 초콜렛 향미를 제외한 모든 특성에 유의적인 영향을 미쳤음. 향료는 측정된 모든 특성에 유의적인 영향을 미쳤으며, 향료와 감미료의 상호작용은 두유 향미를 제외하고 모든 특성에 유의적인 영향을 미쳤음.
- 두유에서 Reb A 첨가는 쓴맛, 쓴맛 후미, 떫은 느낌과 같은 부정적인 특성과 단 후미를 설탕보다 유의적으로 강하게 발현함(Table I-45). Reb M 첨가시 쓴맛, 쓴맛 후미, 떫은 느낌이 Reb A보다 유의적으로 약하게 나타났으나 설탕보다는 유의적으로 강했음. Reb M의 첨가는 설탕보다 유의적으로 약한 단맛을 나타냈으나, 단맛 후미는 설탕과 유의적인 차이를 나타내지 않았음. Reb A와 M의 첨가는 두유 향미를 감소시켰음.
- 바닐라 향료의 단 향은 단맛의 상승 효과를 가지는 것으로 알려졌으나, Table I-45의 결과 바닐라 향료 첨가는 단맛 상승 효과 뿐 아니라 쓴맛과 쓴맛 후미, 떫은 느낌을 증가시켰음. 이는 바닐라 향료에 포함된 알코올에 의한 것으로 보임.
- 초콜렛 향료는 단맛과 단맛 후미의 상승 효과를 나타내었으며, 쓴맛과 쓴맛 후미, 떫은 느낌을 억제하였음 (Table I-45).

- 향료와 감미료의 상호작용은 Table I-46와 같음. 설탕을 첨가한 두유에서는 바닐라 향료의 첨가가 단맛을 감소시키고 단맛 후미를 증가시켰으나, Reb A와 Reb M을 넣은 두유에서는 단맛을 향상시키고 단맛 후미를 감소시켰음. 이러한 효과는 Reb M보다 Reb A에서 더 크게 나타났음. 반면, 바닐라 향료 첨가는 설탕과 Reb A를 첨가한 두유에서 쓴맛, 쓴맛 후미, 떫은 느낌을 증가시켰으나, Reb M을 첨가한 두유에서는 쓴맛만을 증가시켰음.
- 초콜렛 향료는 Reb A와 Reb M을 첨가한 두유에서 단맛과 단맛 후미 상승 효과와 쓴맛, 떫은 느낌, 쓴맛 후미를 감소시켰음. 특히 이러한 효과는 Reb A에서 뚜렷이 나타났음. 설탕을 첨가한 두유에서는 쓴맛, 쓴맛 후미, 떫은 느낌을 증가시켰음.
- Figure I-14는 PCA의 결과로, 시료와 특성들의 관계를 나타낸 것임.
- Figure I-14B의 신뢰타원으로 보아 설탕과 Reb M은 chocolate 향료를 첨가하면 감각적으로 구별하기 어려워짐.
- 결론적으로, 두유에 Reb A와 Reb M을 적용하였을 때 초콜렛 향료를 첨가하면 감미료의 혼합 사용 없이도 감미 향상 효과와 쓴맛 억제 효과를 얻을 수 있으며, 이러한 효과는 Reb A에서 더 크게 나타나기 때문에, Reb A 상용화를 위해 향의 적절한 활용이 필요함.

Table I-44. F-values associated with ANOVA that shows the effect of sweetener, flavor, and their 2-way interaction

Attributes	Factors		
	Sweetener	Flavor	Sweetener × Flavor
Soy milk odor	8.539 ^{***1)}	560.006 ^{***}	1.333 ^{NS}
Vanilla odor ²⁾	0.517 ^{NS}	- ³⁾	-
Chocolate odor ⁴⁾	0.093 ^{NS}	-	-
Sweetness	9.4000 ^{***}	356.588 ^{***}	23.801 ^{***}
Bitterness	817.462 ^{***}	16.600 ^{***}	10.327 ^{***}
Soy milk flavor	4.361 ^{***}	275.497 ^{***}	3.601 ^{***}
Vanilla flavor ²⁾	0.021 ^{NS}	-	-
Chocolate flavor ⁴⁾	0.005 ^{NS}	-	-
Astringency	574.911 ^{***}	30.871 ^{***}	8.482 ^{***}
Sweet aftertaste	219.734 ^{***}	59.858 ^{***}	20.960 ^{***}
Bitter aftertaste	805.133 ^{***}	13.850 ^{***}	10.412 ^{***}

¹⁾ *** p<0.001, ** p<0.01, * p<0.05, ^{NS} p>0.05.

²⁾ Accessed only in the samples containing vanilla flavoring.

³⁾ Not available.

⁴⁾ Accessed only in the samples containing chocolate flavoring.

Table I-45. Mean ratings that illustrate the effect of sweetener and flavor from the post-hoc analysis of the ANOVA

	Sweetener			Flavor		
	Sucrose	Rebaudioside A	Rebaudioside M	Control	Vanilla	Chocolate
Soy milk odor	5.7a ¹⁾	5.2b	5.4b	6.9a	6.2b	3.2c
Sweetness	8.2a	8.3a	7.8b	6.7c	7.9b	9.7a
Bitterness	3.3c	7.3a	3.7b	4.6b	5.1a	4.6b
Soy milk flavor	5.7a	5.2b	5.4b	7.8a	6.7b	4.6c
Astringency	3.1c	6.4a	3.9b	4.4b	4.9a	4.2c
Sweet aftertaste	4.5b	7.0a	4.5b	5.0b	4.8b	6.2a
Bitter aftertaste	3.1c	7.4a	4.2b	4.8b	5.2a	4.7b

¹⁾ Different alphabet letters indicate a significant difference among the samples (Duncan's multiple range test, p<0.05).

Table I-46. Mean intensity of descriptive sensory attributes elicited from 9 sweetener samples in soymilk system

	Sucrose			Rebaudioside A			Rebaudioside M		
	Control (SN) ¹⁾	Vanilla (SV)	Chocolate (SC)	Control (AN)	Vanilla (AV)	Chocolate AC	Control (MN)	Vanilla (MV)	Chocolate (MC)
Soymilk odor	7.3a ²⁾ (0.8) ³⁾	6.5c (1.0)	3.3e (0.9)	6.6bc (1.1)	6.1d (0.8)	3.0e (0.7)	6.9ab (1.2)	5.9d (1.0)	3.2e (0.9)
Vanilla odor ⁴⁾	- ⁵⁾	7.3a (1.0)	-	-	7.1a (0.8)	-	-	7.1a (0.9)	-
Chocolate odor ⁶⁾	-	-	6.9a (0.9)	-	-	6.8a (0.6)	-	-	6.9a (1.1)
Sweetness	7.2e (0.7)	5.0d (1.0)	9.4b (0.7)	6.1g (1.1)	8.7c (0.9)	10.1a (0.9)	6.8f (0.7)	7.0ef (0.9)	9.7b (0.9)
Bitterness	2.9f (0.6)	3.4e (0.7)	3.6e (0.6)	7.4b (0.7)	8.0a (0.7)	6.6c (1.0)	3.4e (0.8)	4.0d (1.1)	3.6e (1.0)
Soymilk flavor	7.8ab (0.9)	6.3d (1.4)	4.9e (1.3)	7.4b (0.9)	6.8c (0.9)	4.3f (1.0)	8.1a (0.8)	7.0c (1.0)	4.6ef (1.2)
Vanilla flavor ⁴⁾	-	5.8a (0.9)	-	-	5.8a (0.8)	-	-	5.8a (1.0)	-
Chocolate flavor ⁶⁾	-	-	7.8a (0.9)	-	-	7.8a (0.9)	-	-	7.8a (1.0)
Astringency	2.7f (0.5)	3.5e (0.7)	3.2e (0.8)	6.4b (0.9)	6.9a (1.1)	6.0c (0.8)	4.1d (0.9)	4.4d (1.2)	3.3e (0.7)
Sweet aftertaste	3.6g (0.8)	4.9ef (0.9)	5.2e (1.5)	6.9b (1.2)	6.4c (0.9)	7.8a (0.9)	4.6f (1.2)	3.1g (0.7)	5.7d (1.2)
Bitter aftertaste	2.6g (0.5)	3.2f (0.6)	3.4f (0.7)	7.5b (1.1)	8.0a (1.2)	6.8c (1.2)	4.2d (1.1)	4.5d (1.3)	3.8e (0.9)

¹⁾See table I-42 for sample abbreviation.

²⁾Different alphabet letters indicate a significant difference among the samples (Duncan's multiple range test, $p < 0.05$).

³⁾Standard deviation.

⁴⁾Accessed only in the samples containing vanilla flavoring.

⁵⁾Not available.

⁶⁾Accessed only in the samples containing chocolate flavoring.

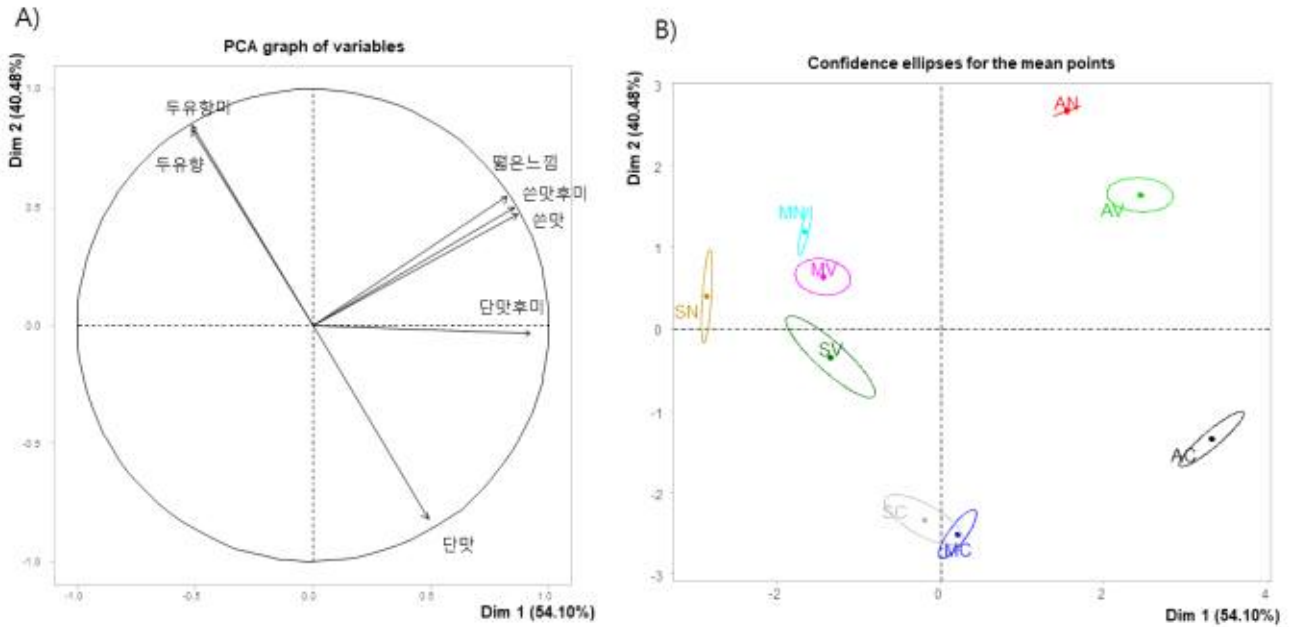


Figure I-14. Principal component (PC) loading of the sensory attributes (A) and scores of the samples (B) from sweeteners in the soymilk system on dim 1 and dim 2 (See Table I-42 for sample abbreviations)

2.3. Rebaudioside계 감미료를 적용한 가향 두유 시스템의 소비자 기호도 규명

2.3.1. 실험방법

○ 패널 선발

- 검사요원은 서울대학교 감각과학 연구실의 소비자 검사 요원 pool을 대상으로 한 전화 모집과 서울대학교 온라인 게시글에 참가자 모집문을 공지하여 자발적인 참여 지원자 70명(20-50대 남자 38명, 여자 32명)을 선발하였음.

○ 시료의 준비

- 묘사분석에 사용된 시료와 동일한 방식으로 준비되었음.

○ 평가 절차

- 본 검사는 총 2회 진행하며, 그 중 1회는 시료에 대한 정보를 제공하지 않고 진행하며 1회는 시료에 대한 정보를 제공하고 진행함.
- 시료에 대한 정보는 감미료의 종류 및 특성을 라벨로 제작하여 검사 요원들에게 제공함.
- 평가는 클라우드 기반 감각검사 수행 소프트웨어인 Compusense @20 (<https://compusense.com/>, Compusense Inc., Guelph, Canada) 사이트를 이용해 온라인으로 이루어졌음.
- 전반적인 기호도 (1=지극히 싫다, 6=좋지도 싫지도 않다, 11=지극히 좋다), 맛/향미 기호도 (1=지극히 싫다, 6=좋지도 싫지도 않다, 11=지극히 좋다는 11점 항목 척도로 평가하게 하였음.
- 단맛 강도 (1=매우 약하다, 8=약하지도 강하지도 않다, 15=매우 강하다), 쓴맛 강도 (1=매우 약하다, 8=약하지도 강하지도 않다, 15=매우 강하다), 단맛 후미 강도 (1=매우 약하다, 8=약하지도 강하지도 않다, 15=매우 강하다)는 15점 항목 척도로 평가하게 하였음.
- 시료는 무작위로 추출한 3자리 숫자로 표시하며 제공되는 시료의 종류 및 제시 순서는 William Latin Square Design에 의해 sequential monadic 방법으로 제시되었음.

- 감미료의 섭취로 인해 발생할 수 있는 건강상의 문제를 최소화하기 위하여 시료를 삼키지 않고 뱉도록 하였음.
- 입가심 물은 온수와 정수를 제시하였음. 온수는 보온병에서 $46\pm 2^{\circ}\text{C}$ 로 유지하였고, 정수는 실온 ($22\pm 2^{\circ}\text{C}$)의 정수를 물병에 담아 제시하였음. 예비실험을 통하여 구강 내 온도 변화를 최소화함을 위해 온수로 입가심 후에 정수로 입가심을 하도록 설정되었음.
- 한 개의 시료를 평가한 후 다음 시료 쌍의 평가 전 2분간의 휴식과 함께 제시된 입가심용 온수와 정수로 충분히 입을 행구도록 함.
- 검사는 시료에 대한 편견을 최소화하기 위해 적색조명을 켜고 실시함.

○ 통계 분석

- 분산분석(Analysis of variance; ANOVA)
 - 각 시료간 기호도 및 특성 강도 차이에 대한 데이터의 평균 및 표준편차를 구하였음.
 - 사후검정으로 Duncan's multiple range test와 Tukey's multiple comparison test를 실시하였음.
 - 모든 분석의 유의성 판별 기준은 $p < 0.05$ 로 설정하였음.

2.3.2. 실험 결과

- Table I-47은 평가 특성에 유의적인 영향을 미친 요인들을 나타내었음. 감미료와 향료, 이들의 2차 상호작용은 모든 특성에 유의적 영향을 미쳤으며, 정보는 쓴맛을 제외한 모든 특성에 유의적 영향을 미쳤음. 감미료와 정보의 상호작용은 전반적 기호도와 향미 기호도에만 유의적인 영향을 미쳤음. 감미료, 정보, 향의 3차 상호작용은 단 후미에만 영향을 미쳤음. 향미와 정보간의 상호작용은 모든 특성에서 유의적인 영향을 나타내지 않아 Table I-47에는 표시하지 않았음.
- 동일한 향료를 첨가한 두유끼리 비교하였을 때 감미료 간 전반적인 기호도와 맛/향미 기호도는 Reb A 두유가 유의적으로 낮게 나타나거나 낮은 경향을 나타내었음(Table I-48). 단맛의 경우 Reb A 두유가 설탕 두유나 Reb M 두유보다 유의적으로 낮거나 낮은 경향을 보였고, 쓴맛의 경우 Reb A 두유가 유의적으로 강했음.
- 동일한 감미료를 첨가한 두유끼리 비교하였을 때 향료 간 전반적인 기호도와 맛/향미 기호도는 무향이 가장 높았음. 초콜렛 향 첨가는 단맛을 증가시켰으며, 쓴맛은 감미료 시료마다 다른 경향을 보여주었음 (Table I-48). 바닐라 향 첨가는 단맛에 큰 영향을 주지 않았으며 쓴맛을 증가시켰는데, 이는 바닐라 향료에 포함된 알코올에 의한 것으로 보임.

Table I-47. p-values indicating significance of the effect of factors in ANOVA model of soymilk samples

	p-value ¹⁾					
	Sweetener	Flavor	Information	S × F ²⁾	S × I ³⁾	S × F × I ⁴⁾
Overall liking	<0.001	<0.001	<0.001	0.001	0.001	0.701
Taste/Flavor liking	<0.001	<0.001	<0.001	0.011	<0.001	0.869
Sweetness	0.003	0.001	0.001	0.002	0.876	0.509
Bitterness	<0.001	<0.001	0.994	0.001	0.716	0.522
Sweet aftertaste	0.055	<0.001	0.003	0.200	0.503	0.035

¹⁾ p-value associated with ANOVA of which model included sweetener, flavor, and information as main factors, and their 2-way and 3-way interactions

²⁾ S × F, interaction between sweetener and flavor

³⁾ S × I, interaction between sweetener and information

⁴⁾ S × F × I, interaction among sweetener, flavor and information

Table I-48. Mean liking and perceived intensity ratings of flavored soymilk

	Flavor	Sweetener		
		Sucrose	Rebaudioside A	Rebaudioside M
Overall liking	Control	10.3a ¹⁾ (3.2) ²⁾	8.1bc (3.6)	10.4a (3.2)
	Vanilla	8.8b (3.6)	5.9d (3.5)	8.2bc (3.4)
	Chocolate	8.6b (3.7)	7.5c (3.8)	8.4b (4.0)
Taste/Flavor liking	Control	10.0a (3.2)	8.0b (3.5)	9.7a (3.1)
	Vanilla	8.3b (3.5)	6.2c (3.9)	7.8b (3.3)
	Chocolate	8.6b (3.9)	7.8b (3.9)	8.2b (4.2)
Sweetness	Control	9.8bc (2.5)	8.7ef (2.9)	9.2de (2.6)
	Vanilla	9.4cd (2.7)	8.4f (3.2)	9.4cd (2.7)
	Chocolate	10.5a (2.4)	10.4ab (2.7)	10.5a (2.3)
Bitterness	Control	3.6e (3.0)	7.4b (4.2)	4.3de (3.0)
	Vanilla	4.8cd (3.5)	9.3a (4.4)	5.3c (3.6)
	Chocolate	4.2de (3.3)	6.9b (4.1)	4.9cd (3.6)

¹⁾ Different alphabet letters indicate a significant difference among the samples (Duncan's multiple range test, p<0.05).

²⁾ Standard deviation.

○ 상호작용을 보다 뚜렷이 시각화하기 위해 Figure I-15와 같이 나타내었음. 초콜렛 향은 Reb A의 전반적 기호도, 향 기호도를 향상시키는 것으로 나타났음. 초콜렛 향의 단맛 상승 효과와 쓴맛 억제 효과는 Reb A에서 설탕과 Reb M보다 강하게 나타났음.

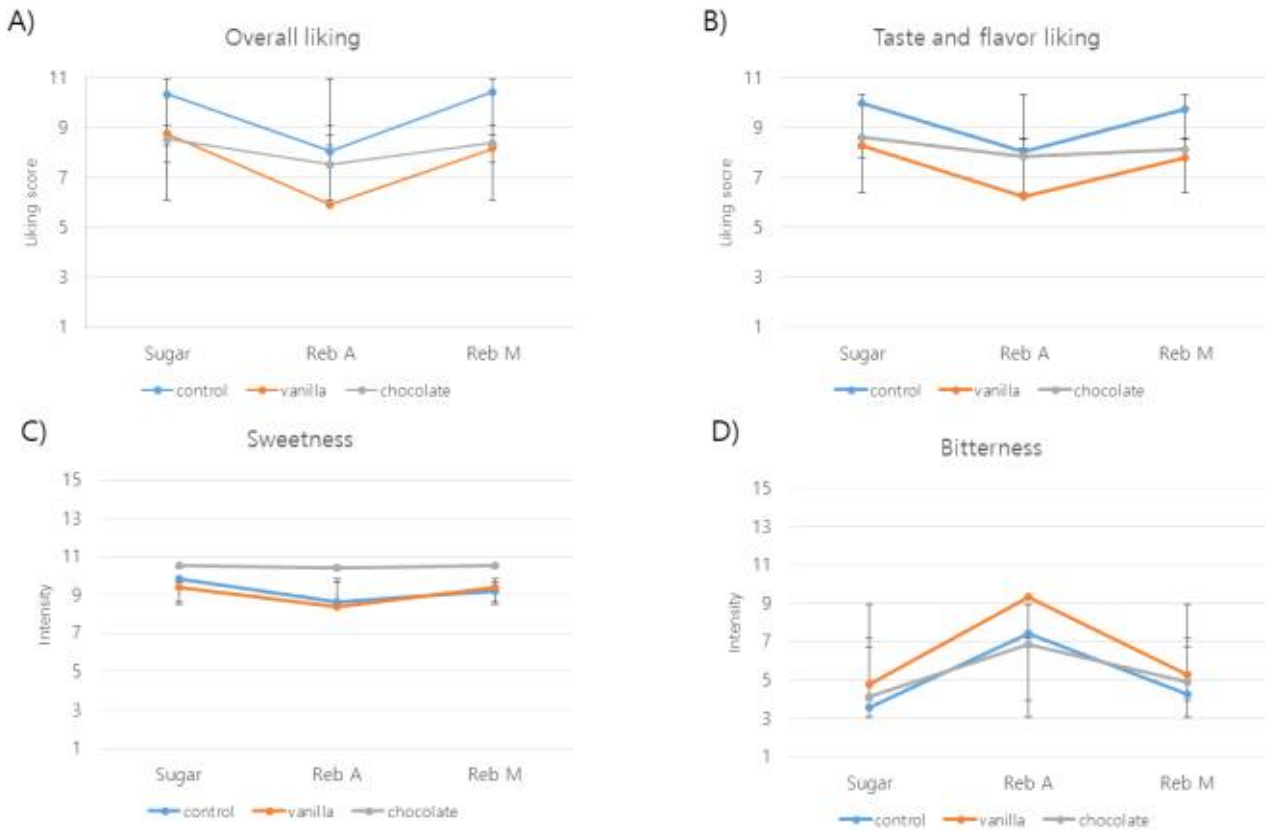


Figure I-15. The two-way interaction effect of sweetener and flavor on (A) overall liking, (B) taste and flavor liking, (C) sweetness, and (D) bitterness.

○ 감미료의 종류를 라벨로 제공하였을 때 동일한 감미료를 사용한 두유 시료들을 비교하면 감미료 종류 정보가 제공되었을 때 전반적인 기호도와 맛/향미 기호도가 증가하였음. 정보에 의한 기호 향상 효과는 설탕보다 Reb A와 Reb M에서 크게 나타났음 (Figure I-16).

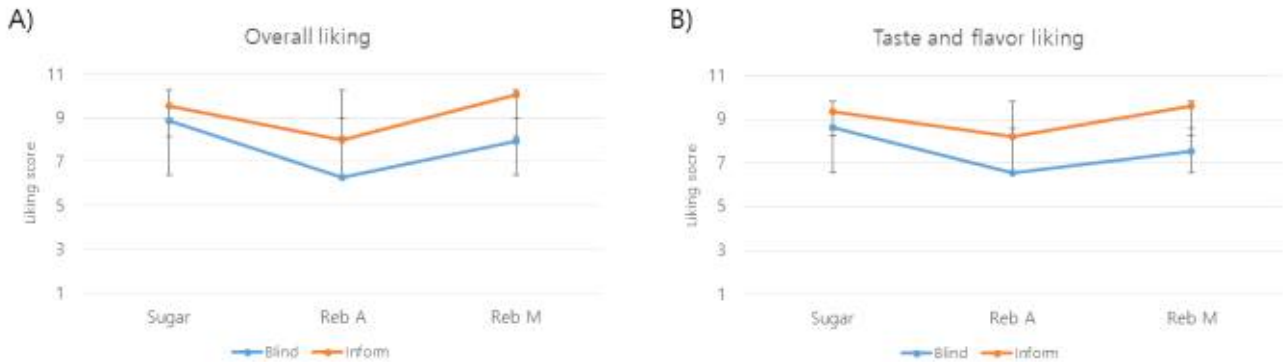


Figure I-16. The effect of sweetener, information and their interaction on (A) overall liking, and (B) taste and flavor liking

○ 감미료의 종류를 라벨로 제공하였을 때 향 첨가가 감미료를 달리한 두유의 단맛 후미에 미치는 영향이 정보를 제공하지 않았을 때와 달라짐 (Table I-49). 정보를 제공하지 않았을 때는 가향 두유에서 Reb M의 단맛 후미가 Reb A 및 설탕과 유의적 차이를 나타내지 않았으나, 정보 제공시 바닐라 향의 첨가는 Reb M의 단맛 후미를 Reb A보다 유의적으로 증가시켰음.

Table I-49. Mean ratings that illustrate the 3-way interaction effect of sweetener, flavor, and information from the post-hoc analysis of the ANOVA

Flavor	Blind			Informed		
	Sucrose	Rebaudioside A	Rebaudioside M	Sucrose	Rebaudioside A	Rebaudioside M
Control	8.6 ^{defg} ₁₎	7.7 ^g	8.2 ^{efg}	8.7 ^{cdef}	8.7 ^{defg}	8.7 ^{defg}
	(3.0) ²⁾	(2.7)	(3.3)	(2.9)	(3.3)	(2.5)
Sweet aftertaste	8.3 ^{efg}	8.1 ^{efg}	8.0 ^{fg}	8.7^{defg}	7.9^{fg}	9.5^{abcd}
	(2.5)	(3.5)	(3.4)	(3.0)	(3.4)	(2.4)
Chocolate	9.1 ^{bcde}	9.3 ^{abcd}	9.7 ^{abc}	10.0 ^{ab}	9.7 ^{abc}	10.3 ^a
	(2.6)	(2.6)	(2.7)	(2.5)	(2.7)	(2.4)

¹⁾ Different alphabet letters indicate a significant difference among the samples (Duncan's multiple range test, p<0.05).

²⁾ Standard deviation.

2.4. Rebaudioside계 감미료를 적용한 가향 우유 시스템의 감미질 분석

2.4.1. 실험방법

○ 패널 선발

- 검사요원은 서울대학교 감각과학 연구실의 소비자 검사 요원 pool을 대상으로 한 전화 모집과 서울대학교 온라인 게시글에 참가자 모집문을 공지하여 자발적인 참여 지원자 8명(20-30대 남자 4명, 여자 4명)을 선발함.

○ 시료의 준비

- 우유에 3 종류의 단일 감미료 (설탕, Reb A, Reb M)과 2 종류의 향료(Vanilla, Chocolate) 첨가 및 향료 무첨가(대조군) 총 9 종류의 시료가 사용됨 (Table I-50).
- 2-AFC를 통해 확립된 7% 설탕 수용액과 동일한 감미도를 갖는 농도를 이용함 (Table I-50).
- 향료는 Vanilla와 Chocolate 향미를 인지할 수 있을 정도의 각각 1.3%, 1.0% 농도로 적용함.
- 시료 제조 및 보관 방법은 2-AFC 실험과 동일함.
- 시료는 평가 2시간 전 흰색 일회용 플라스틱 컵에 70mL씩 소분하여 실온($22\pm 2^\circ\text{C}$)으로 제시함.

Table I-50. The information of sample concentration used in descriptive analysis

Abbreviation	Sweetener	Flavor	Concentration	
			Sweetener	Flavor
SN		None		-
SV	Sugar	Vanilla	7.0000%	1.3%
SC		Chocolate		1.0%
AN		None		-
AV	Reb A	Vanilla	0.0420%	1.3%
AC		Chocolate		1.0%
MN		None		-
MV	Reb M	Vanilla	0.0203%	1.3%
MC		Chocolate		1.0%

○ 패널 훈련 및 평가

- 패널 훈련
 - 패널 훈련은 1달 동안 주 5회 진행되었으며, 회당 1hr 소요, 총 18시간 실시되었음
 - 용어 및 표준 시료, 평가 방법 개발
 - ✓ Orientation : 검사 목적, 관능검사 및 묘사분석의 소개
 - ✓ 특성 용어 도출 ; 예비실험을 거쳐 시료간의 차이를 잘 설명하는 용어 특성 목록을 제공 후, 패널들 간의 토의를 거쳐 용어 목록을 개발함 (Table I-51).
 - ✓ 정의 및 표준시료 확립 ; 특성 용어에 대한 정의 및 표준시료, 평가 방법을 확립하였으며 (Table I-46), 15cm 선척도 (1.25cm; 매우 약하다/매우 빠르다, 13.75cm; 매우 강하다/매우 느리다) 사용법을 훈련함.
 - ✓ 하나의 시료를 평가한 후 다음 시료 평가 전 2분간의 휴식과 함께 제시된 입가심용 온수($46\pm 2^\circ\text{C}$)와 정수($22\pm 2^\circ\text{C}$)로 충분히 입을 행구도록 함.
 - ✓ 확립된 방법에 의하여 3회 모의 평가 후 통계분석을 통해 패널들 간의 consensus와 각 패널 요원들의 재현성을 평가함.
 - ✓ 재현성이 낮거나 평가 경향이 다른 패널 요원은 재훈련을 실시함.

- 본 실험 평가
 - 본 실험은 3회 진행됨.
 - 하나의 시료를 평가한 후 다음 시료를 평가하는 monadic 방법을 사용함.
 - 시료사이에 30초 휴식과 함께 제시된 물로 충분히 입을 헹구도록 함.
 - 4개의 시료 평가 후 5분의 휴식을 취하여 검사 시의 피로감을 최소화함.
 - 시료는 first sample effect를 막기 위해 Williams Latin square design에 따라 제시됨.

○ 통계 분석

- 분산분석(Analysis of variance; ANOVA)
 - 각 시료의 특성에 대한 데이터의 평균 및 표준편차를 구하였음.
- 주성분 분석(Principal component analysis; PCA)
 - 정량적 묘사분석으로 도출된 관능 특성들과 각 시료간의 관계를 알아냄.

Table I-51. Definitions of sensory attributes of 9 samples in milk system

Attributes		Definition	Reference materials
Aroma	Milk odor	Smell associated with milk	Easily Digested Milk (Maeil Co. LTD, Seoul, Korea)
	Vanilla odor	Smell associated with vanilla	7% (w/v) white table sugar (CJ CheilJedang Co., Ltd, Seoul, Korea) and 1.5% (w/v) vanilla flavor (ES Food, Seoul, Korea) in milk.
	Chocolate odor	Smell associated with chocolate	7% (w/v) white table sugar (CJ CheilJedang Co., Ltd, Seoul, Korea) and 1.5% (w/v) chocolate flavor (Serim Food, Gyeonggi-do, Korea) in milk.
Taste	Sweetness	Fundamental taste sensation of which sucrose is typical	5% (w/v) white table sugar (CJ CheilJedang Co., Ltd, Seoul, Korea) , 7% , 10% white table sugar in milk.
	Bitterness	Fundamental taste sensation of which caffeine and quinine is typical	7% (w/v) white table sugar (CJ CheilJedang Co., Ltd, Seoul, Korea) and 0.03% (w/v) caffeine (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) in milk.
Flavor	Milk	The flavor associated with milk	Easily Digested Milk (Maeil Co. LTD, Seoul, Korea)
	Vanilla	The flavor associated with vanilla	7% (w/v) white table sugar (CJ CheilJedang Co., Ltd, Seoul, Korea) and 1.5% (w/v) vanilla flavor (ES Food, Seoul, Korea) in milk.
	Chocolate	The flavor associated with chocolate	7% (w/v) white table sugar (CJ CheilJedang Co., Ltd, Seoul, Korea) and 1.5% (w/v) chocolate flavor (Serim Food, Gyeonggi-do, Korea) in milk.
	Menthol	The flavor associated with menthol	0.002% (w/v) menthol flavor (ES Food, Seoul, Korea) in milk.
Aftertaste	Sweet	Sweet taste perceived 5 seconds after expectorate	0.1% (w/v) aspartame (The nutrasweet Co. Augusta, USA) in milk.
	Bitter	Bitter taste perceived 5 seconds after expectorate	0.03% (w/v) caffeine (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) in milk.

2.4.2. 실험 결과

- Table I-52은 감미료, 향료, 감미료와 향료의 상호작용의 효과가 유의적인지를 나타냄. 감미료는 단맛, 쓴맛, 화한느낌, 단맛 후미, 쓴맛 후미에 유의적인 영향을 미쳤음. 향료는 측정된 모든 특성에 유의적인 영향을 미쳤으며, 향료와 감미료의 상호작용은 쓴맛, 화한느낌, 쓴맛 후미에 유의적인 영향을 미쳤음.
- Reb A는 쓴맛, 쓴맛 후미, 화한 느낌과 같은 부정적인 특성들과 단맛 후미가 설탕보다 유의적으로 강함 (Table I-53). Reb M은 이러한 특성들이 Reb A보다는 유의적으로 약했으나, 설탕보다는 유의적으로 강했음.
- 바닐라 향료의 단 향은 단맛의 상승 효과를 가지는 것으로 알려졌으나, Table I-53의 결과 바닐라 향료 첨가는 단맛 후미만을 증가시켰으며, 쓴맛과 쓴맛 후미, 화한 느낌을 증가시켰음. 이는 바닐라 향료에 포함된 알코올에 의한 것으로 보임.
- 초콜렛 향료는 단맛과 단맛 후미의 상승 효과를 나타내었음. 쓴맛, 쓴맛 후미, 화한 느낌등을 바닐라 향료에 비해 유의적으로 감소시켰으나, 설탕과 같은 수준으로 감소시키지는 않았음(Table I-53).
- 향료와 감미료의 상호작용은 Table I-54와 같음. 향의 첨가는 설탕 우유에서는 쓴맛을 증가시켰으나, Reb A와 Reb M을 첨가한 우유의 쓴맛은 설탕 우유보다 유의적으로 약하거나 유의적으로 차이가 없었음. 바닐라 향의 첨가는 모든 감미료 첨가 우유에서 쓴맛 후미와 화한 느낌을 증가시켰으나, 초콜렛 향의 첨가는 Reb A와 Reb M 첨가 우유에서 쓴맛 후미와 화한 느낌을 설탕과 같은 수준으로 발현시켰음.
- 결론적으로, 두유에 Reb A와 Reb M을 적용하였을 때 초콜렛 향료를 첨가하면 감미료의 혼합 사용 없이도 감미 향상 효과와 쓴맛 억제 효과를 얻을 수 있었음. Figure I-17는 PCA의 결과로, 시료와 특성들의 관계를 나타낸 것임. 전반적으로 MC와 MV가 SC와 SV에 가깝게 위치하여, Reb M에 향을 적용하면 설탕 가향 두유와 유사한 감각 특성을 나타내는 것으로 보임. 그러나, 향의 효과는 두유에 비해 덜 뚜렷하게 나타났음.

Table I-52. F-values associated with ANOVA that shows the effect of sweetener, flavor, and their 2-way interaction

Attributes	Factors		
	Sweetener	Flavor	Sweetener × Flavor
Milk odor	0.780 ^{NS1)}	767.803 ^{***}	0.857 ^{NS}
Vanilla odor ²⁾	0.111 ^{NS}	- ³⁾	-
Chocolate odor ⁴⁾	0.329 ^{NS}	-	-
Sweetness	285.138 ^{***}	118.363 ^{***}	2.254 ^{NS}
Bitterness	1053.856 ^{***}	21.550 ^{***}	3.561 ^{**}
Milk flavor	1.456 ^{NS}	539.759 ^{***}	0.857 ^{NS}
Vanilla flavor ²⁾	0.161 ^{NS}	-	-
Chocolate flavor ⁴⁾	0.593 ^{NS}	-	-
Menthol flavor	884.040 ^{***}	6.282 ^{**}	20.969 ^{***}
Sweet aftertaste	703.643 ^{***}	30.443 ^{***}	2.362 ^{NS}
Bitter aftertaste	1278.919 ^{***}	24.717 ^{***}	5.696 ^{***}

1) *** p<0.001, ** p<0.01, * p<0.05, ^{NS} p>0.05.

2) Accessed only in the samples containing vanilla flavoring.

3) Not available.

4) Accessed only in the samples containing chocolate flavoring.

Table I-53. Mean ratings that illustrate the effect of sweetener and flavor from the post-hoc analysis of the ANOVA

	Sweetener			Flavor		
	Sucrose	Rebaudioside A	Rebaudioside M	Control	Vanilla	Chocolate
Milk odor	4.6	4.7	4.5	6.7a	4.4b	2.7c
Sweetness	7.7a ¹⁾	5.9c	6.9b	6.6b	6.5c	7.5a
Bitterness	2.6c	6.3a	2.9b	3.6c	4.2a	4.0b
Milk flavor	5.1	4.9	5.1	7.3a	4.5b	3.3c
Menthol flavor	3.1c	6.5a	3.5b	4.3b	4.5a	4.3b
Sweet aftertaste	3.4c	7.7a	3.7b	4.5c	4.9b	5.5a
Bitter aftertaste	2.8c	7.6a	3.4b	4.3c	5.0a	4.6b

¹⁾Different alphabet letters indicate a significant difference among the samples (Duncan's multiple range test, $p < 0.05$).

Table I-54. Mean intensity of descriptive sensory attributes elicited from 9 sweetener samples in milk system

	Sucrose			Rebaudioside A			Rebaudioside M		
	Control (SN) ¹⁾	Vanilla (SV)	Chocolate (SC)	Control (AN)	Vanilla (AV)	Chocolate AC	Control (MN)	Vanilla (MV)	Chocolate (MC)
Milk odor	6.8a ²⁾ (1.2) ³⁾	4.3b (0.9)	2.7c (0.5)	6.7a (0.9)	4.6b (1.0)	2.7c (0.6)	6.6a (0.7)	4.4b (1.0)	2.6c (0.6)
Vanilla odor ⁴⁾	- ⁵⁾	6.6a (1.2)	-	-	6.5a (1.3)	-	-	6.5a (1.1)	-
Chocolate odor ⁶⁾	-	-	7.7a (1.2)	-	-	7.8a (1.0)	-	-	7.8a (1.0)
Sweetness	7.5b (0.5)	7.2c (0.4)	8.5a (0.8)	5.7e (0.5)	5.7e (0.5)	6.5d (0.4)	6.6d (0.6)	6.6d (0.5)	7.6b (0.7)
Bitterness	2.1e (0.5)	2.8d (0.6)	2.9d (0.7)	6.6a (0.9)	6.1b (0.9)	6.2b (1.0)	2.7d (0.5)	3.3c (0.6)	2.8d (0.7)
Milk flavor	7.6a (1.2)	4.6c (1.1)	3.1d (0.5)	7.0b (1.0)	4.4c (1.2)	3.4d (0.8)	7.2ab (1.0)	4.6c (0.9)	3.4d (1.0)
Vanilla flavor ⁴⁾	-	6.4a (1.3)	-	-	6.4a (1.2)	-	-	6.3a (1.2)	-
Chocolate flavor ⁶⁾	-	-	6.9a (1.1)	-	-	7.0a (1.1)	-	-	6.8a (1.1)
Menthol flavor	2.4f (0.5)	3.5e (0.6)	3.3e (0.7)	6.5b (0.5)	6.9a (0.6)	6.2c (0.6)	3.9d (0.7)	3.2e (0.7)	3.3e (0.8)
Sweet aftertaste	2.7e (0.6)	3.5d (0.6)	4.2c (0.7)	7.4b (0.9)	7.5b (1.1)	8.1a (1.0)	3.4d (0.6)	3.6d (0.8)	4.1c (1.0)
Bitter aftertaste	2.3e (0.5)	3.1d (0.6)	3.1d (0.7)	7.5b (0.6)	8.0a (0.7)	7.2b (0.6)	3.1d (0.7)	3.8c (0.8)	3.4d (0.8)

¹⁾See table I-50 for sample abbreviation.

²⁾Different alphabet letters indicate a significant difference among the samples (Duncan's multiple range test, $p < 0.05$).

³⁾Standard deviation.

⁴⁾Accessed only in the samples containing vanilla flavoring.

⁵⁾Not available.

⁶⁾Accessed only in the samples containing chocolate flavoring.

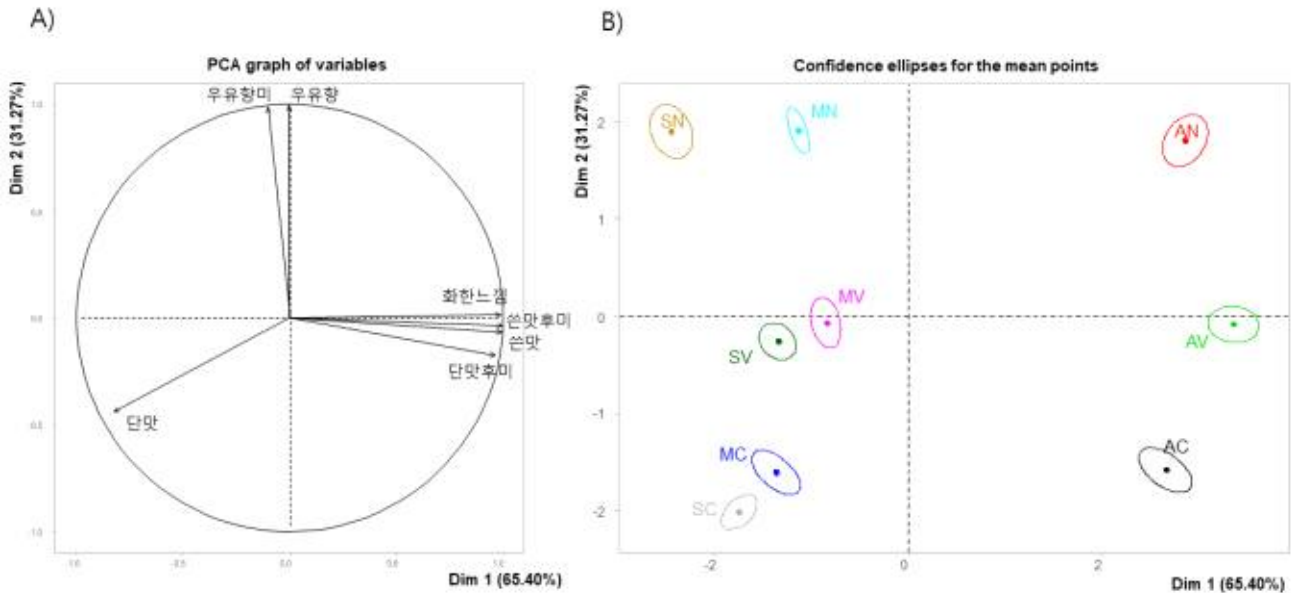


Figure I-17. Principal component (PC) loading of the sensory attributes (A) and scores of the samples (B) from sweeteners in the soymilk system on dim 1 and dim 2 (See Table I-50 for sample abbreviations)

2.5. Rebaudioside계 감미료를 적용한 가향 두유 시스템의 소비자 기호도 규명

2.5.1. 실험방법

○ 패널 선발

- 검사요원은 서울대학교 감각과학 연구실의 소비자 검사 요원 pool을 대상으로 한 전화 모집과 서울대학교 온라인 게시글에 참가자 모집문을 공지하여 자발적인 참여 지원자 70명(20-50대 남자 34명, 여자 36명)을 선발함.

○ 시료의 준비

- 묘사분석에 사용된 시료와 동일한 방식으로 준비되었음 (Table I-50).

○ 평가 절차

- 본 검사는 총 2회 진행하며, 그 중 1회는 시료에 대한 정보를 제공하지 않고 진행하며 1회는 시료에 대한 정보를 제공하고 진행함.
- 시료에 대한 정보는 감미료의 종류 및 특성을 라벨로 제작하여 검사 요원들에게 제공함.
- 평가는 클라우드 기반 감각검사 수행 소프트웨어인 Compusense @20 (<https://compusense.com/>, Compusense Inc., Guelph, Canada) 사이트를 이용해 온라인으로 이루어졌음.
- 전반적인 기호도 (1=지극히 싫다, 6=좋지도 싫지도 않다, 11=지극히 좋다), 맛/향미 기호도 (1=지극히 싫다, 6=좋지도 싫지도 않다, 11=지극히 좋다는 11점 항목 척도로 평가하게 하였음.
- 단맛 강도 (1=매우 약하다, 8=약하지도 강하지도 않다, 15=매우 강하다), 쓴맛 강도 (1=매우 약하다, 8=약하지도 강하지도 않다, 15=매우 강하다), 단맛 후미 강도 (1=매우 약하다, 8=약하지도 강하지도 않다, 15=매우 강하다)는 15점 항목 척도로 평가하게 하였음.
- 시료는 무작위로 추출한 3자리 숫자로 표시하며 제공되는 시료의 종류 및 제시 순서는 William Latin Square Design에 의해 sequential monadic 방법으로 제시되었음.
- 감미료의 섭취로 인해 발생할 수 있는 건강상의 문제를 최소화하기 위하여 시료를 삼키지 않고 뱉도록 하였음.

- 입가심 물은 온수와 정수를 제시하였음. 온수는 보온병에서 $46 \pm 2^\circ\text{C}$ 로 유지하였고, 정수는 실온 ($22 \pm 2^\circ\text{C}$)의 정수를 물병에 담아 제시하였음. 예비실험을 통하여 구강 내 온도 변화를 최소화함을 위해 온수로 입가심 후에 정수로 입가심을 하도록 설정되었음.
- 한 개의 시료를 평가한 후 다음 시료 쌍의 평가 전 2분간의 휴식과 함께 제시된 입가심용 온수와 정수로 충분히 입을 행구도록 함.
- 검사는 시료에 대한 편견을 최소화하기 위해 적색조명을 켜고 실시함.

○ 통계 분석

- 분산분석(Analysis of variance; ANOVA)
 - 각 시료간 기호도 및 특성 강도 차이에 대한 데이터의 평균 및 표준편차를 구하였음.
 - 사후검정으로 Duncan's multiple range test와 Tukey's multiple comparison test를 실시하였음.
 - 모든 분석의 유의성 판별 기준은 $p < 0.05$ 로 설정하였음.

2.5.2. 실험 결과

- Table I-55은 평가 특성에 유의적인 영향을 미친 요인들을 나타내었음. 감미료와 향료는 모든 특성에 유의적 영향을 미쳤으며, 이들의 2차 상호작용은 단맛과 단맛 후미를 제외한 모든 특성에 유의적 영향을 미쳤음. 정보는 쓴맛과 단맛 후미를 제외한 모든 특성에 유의적 영향을 미쳤음. 향과 정보의 상호 작용은 전반적인 기호도 및 맛/향미 기호도에만 유의적 영향을 미쳤음. 감미료, 정보, 향의 3차 상호작용은 맛/향미 기호도에만 유의적인 영향을 미쳤음. 감미료와 정보간의 상호작용은 모든 특성에서 유의적인 영향을 나타내지 않아 Table I-55에는 표시하지 않았음.
- 동일한 향료를 첨가한 우유끼리 비교하였을 때 감미료 간 전반적인 기호도와 맛/향미 기호도는 Reb A두유가 유의적으로 낮게 나타나거나 낮은 경향을 나타내었음(Table I-56).
- 동일한 감미료를 첨가한 우유끼리 비교하였을 때 향료 간 전반적인 기호도와 맛/향미 기호도는 무향이 가장 높았음. 모든 감미료에서 초콜렛 향을 첨가한 시료가 전반적인 기호도가 가장 낮았음.

Table I-55. p-values indicating significance of the effect of factors in ANOVA model of milk samples

	p-value ¹⁾					
	Sweetener	Flavor	Info	S × F ²⁾	F × I ³⁾	S × F × I ⁴⁾
Overall liking	<0.001	<0.001	<0.001	0.001	0.013	0.185
Taste/Flavor liking	<0.001	<0.001	<0.001	0.001	0.024	0.047
Sweetness	<0.001	0.001	0.032	0.194	0.281	0.954
Bitterness	<0.001	<0.001	0.670	<0.001	0.069	0.822
Sweet aftertaste	<0.001	0.001	0.935	0.071	0.090	0.647

¹⁾ p-value associated with ANOVA of which model included sweetener, flavor, and information as main factors, and their 2-way and 3-way interactions

²⁾ S × F, interaction between sweetener and flavor

³⁾ F × I, interaction between flavor and information

⁴⁾ S × F × I, interaction between sweetener, flavor and information

Table I-56. Mean liking and perceived intensity ratings of flavored milk

	Flavor	Sweetener		
		Sucrose	Rebaudioside A	Rebaudioside M
Overall liking	Control	10.6a ¹⁾ (3.4) ²⁾	8.7cd (0.7)	10.4a (3.1)
	Vanilla	10.0ab (3.6)	7.3e (4.1)	9.5bc (3.4)
	Chocolate	8.6d (3.9)	7.7e (4.1)	8.2de (3.6)
Taste/Flavor liking	Control	10.4a (3.3)	8.4bc (3.5)	10.1a (3.4)
	Vanilla	10.0a (3.7)	7.0e (4.1)	8.8b (3.8)
	Chocolate	8.0bcd (4.3)	7.2de (4.0)	7.8cde (3.8)
Sweet aftertaste	Control	9.4c (2.9)	8.8de (2.8)	8.1f (2.8)
	Vanilla	10.2ab (2.8)	8.7def (3.1)	8.4ef (3.1)
	Chocolate	10.3a (2.9)	9.6bc (2.9)	9.1cd (2.9)

¹⁾ Different alphabet letters indicate a significant difference among the samples (Duncan's multiple range test, $p < 0.05$).

²⁾ Standard deviation.

○ 상호작용을 보다 뚜렷이 시각화하기 위해 Figure I-18와 같이 나타내었음.

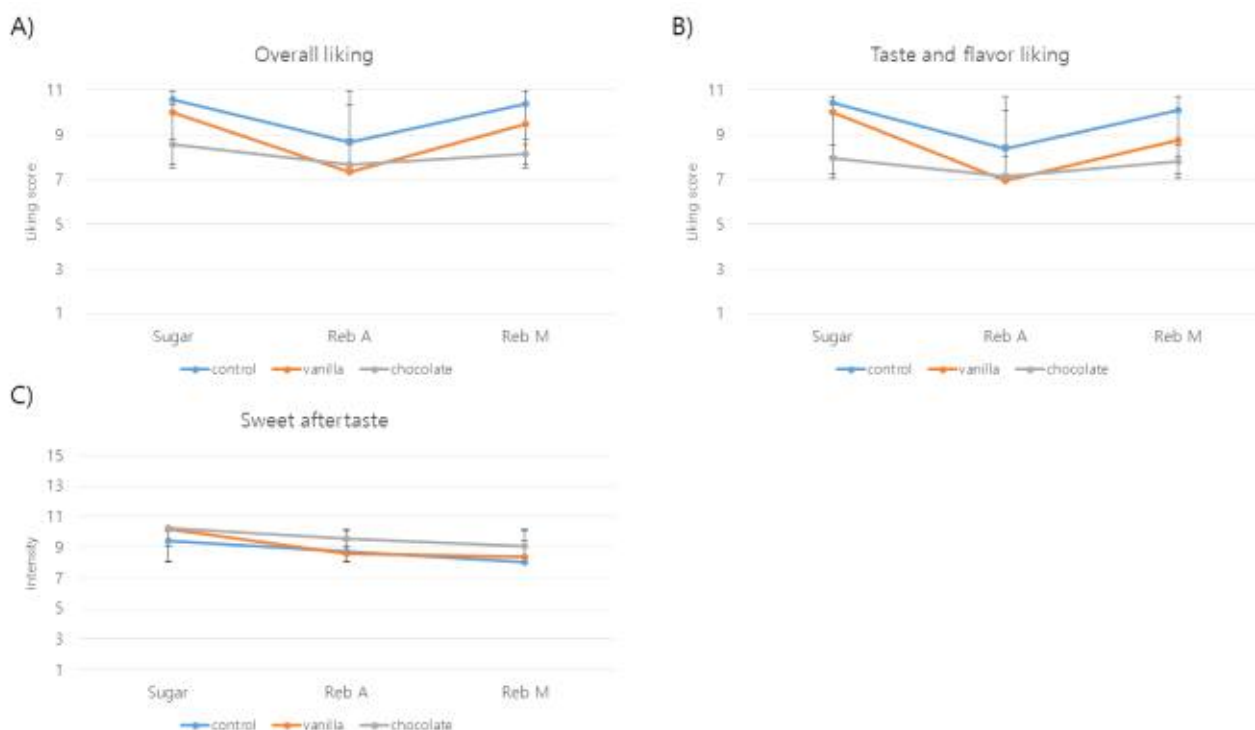


Figure I-18. The two-way interaction effect of sweetener and flavor on (A) overall liking, (B) taste and flavor liking, and (C) sweet aftertaste

- 감미료의 종류를 라벨로 제공하였을 때 동일한 감미료를 사용한 두유 시료들을 비교하면 감미료 종류 정보가 제공되었을 때 전반적인 기호도와 맛/향미 기호도가 증가하였음. 정보에 의한 기호 향상 효과는 설탕보다 바닐라와 초콜릿 향을 첨가한 시료에서 크게 나타났음 (Figure I-19).

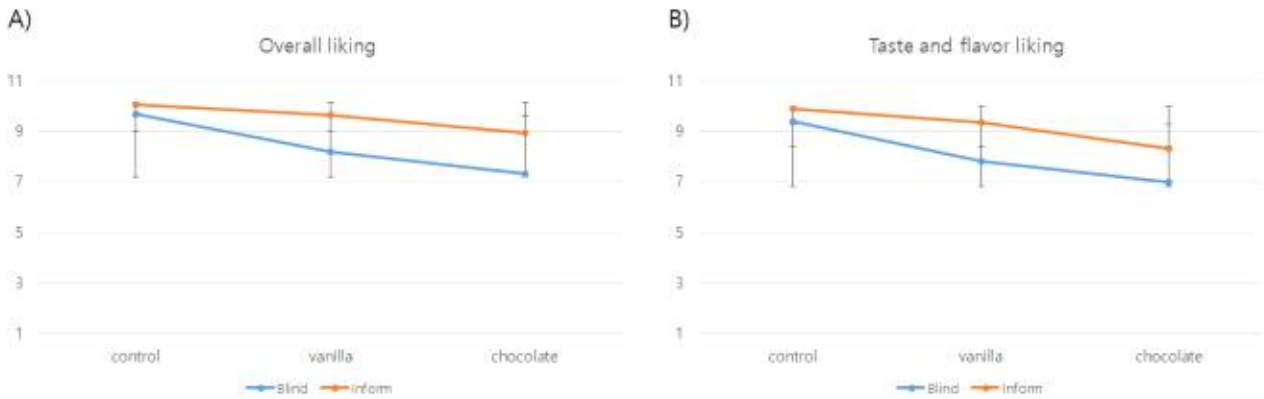


Figure I-19. The effect of flavor, information and their Interaction on (A) overall liking, and (B) taste and flavor liking

- 감미료의 종류를 라벨로 제공하였을 때 향 첨가가 감미료를 달리한 우유의 맛/향미 기호도에 미치는 영향이 정보를 제공하지 않았을 때와 달라짐 (Table I-57). 정보를 제공하지 않았을 때는 초콜릿 향을 첨가했을 때 제외하고 Reb A의 맛/향미 기호도가 유의적으로 가장 낮았음. 바닐라 향료를 첨가했을 때는 Reb A와 ,Reb M의 맛/향미 기호도가 유의적으로 증가함. 초콜릿 향료 첨가 시 설탕의 맛/향미 기호도가 유의적으로 증가함.

Table I-57. Mean ratings that illustrate the 3-way interaction effect of sweetener, flavor, and information from the post-hoc analysis of the ANOVA

Flavor	Blind			Inform		
	Sucrose	Rebaudioside A	Rebaudioside M	Sucrose	Rebaudioside A	Rebaudioside M
Control	10.3ab ¹⁾	8.1efgh	9.8abc	10.6a	8.7cdef	10.4ab
	(3.4) ²⁾	(3.6)	(3.7)	(3.3)	(3.5)	(3.0)
Taste/ Flavor liking	9.5abcd	6.1i	7.9efgh	10.5a	7.8efgh	9.7abc
	(3.9)	(4.2)	(4.0)	(3.4)	(3.9)	(3.4)
Chocolate	6.9hi	6.9hi	7.2ghi	9.1bcde	7.5fgh	8.4defg
	(4.3)	(4.0)	(3.9)	(3.9)	(4.1)	(3.7)

¹⁾ Different alphabet letters indicate a significant difference among the samples (Duncan's multiple range test, p<0.05).

²⁾ Standard deviation.

3. 두유라테

3.1. 두유라테에 첨가된 rebaudioside 계 저열량 감미료의 상대당도 규명

○ 본 실험에서는 2-alternative forced choice method (2-AFC) 를 이용하여 10% 의 설탕 농도를 적용한 두유라테와 동일한 상대당도를 확립하였음.

3.1.1. 실험방법

○ 검사요원

- 서울대학교 감각과학 연구실의 소비자 검사 요원 pool을 대상으로 한 전화 모집과 서울대학교 온라인 게시글에 참가자 모집문을 공지하여 자발적인 참여 지원자 20~50대 72명(남자 27명, 여자 45명)을 선발함.

○ 시료

- 총 6종류의 시료를 평가에 사용함(Table I-58).
- 네 종류의 고감미료; Rebaudioside A (Reb A), Rebaudioside M (Reb M), Rebaudioside D (Reb D), sucralose와 두 종류의 bulk 감미료; Erythritol, Maltitol가 사용됨.
- 두유라테 음료 시스템을 평가에 사용함. 두유라테는 실온의 무가당 두유, 정수, 블랙커피 분말을 사용하여 제조함 (Table I-59).
- 설탕은 control 시료로 사용됨.

Table I-58. Sample information

Sample abbreviation	Sample	Manufacturer	Purity(%)
Reb A	Rebaudioside A	CJ Cheiljedang, Seoul, Korea	97.3
Reb M	Rebaudioside M	CJ Cheiljedang, Seoul, Korea	95.64
Reb D	Rebaudioside D	CJ Cheiljedang, Seoul, Korea	96.5
Sucralose	Sucralose	TATE&LYLE, London, England, UK	95
Erythritol	Erythritol (Crystalline form)	Zibo Zhongshi Green Biotech Co., LTD, Shandong, China	99.93
Maltitol	Maltitol (Sweetrearl P35)	Roquette China Co., LTD, Lianyungang, China	99.5

Table I-59. Beverage system information

Material	Product	Manufacturer
Soymilk	Maeil soymilk 99.9	Maeil Co. LTD, Seoul, Korea
Black coffee powder	Kanu mild roast americano	Dongsuh Foods Co, Incheon, Korea

○ 시료의 준비

- 모든 감미료 시료들의 농도를 예비실험을 통해 설정한 5수준으로 제조하여 각 시료마다 10%의 설탕 농도를 적용한 두유라테와 비교함 (Table I-60).
- 시료는 분량의 감미료를 제조해둔 두유라테에 자석교반기(MS300HS, Misung Sciecntific Co., Ltd., Yangju, Korea)로 1100rpm에서 10분간 교반하여 완전히 용해시켜 제조함.
- 두유라테는 1L의 무가당 두유에 블랙커피 분말 10g을 정수 0.5L에 용해시킨 2% 커피 원액을 첨가하여 자석교반기로 1100rpm에서 5분간 교반하여 제조함. (두유라테 1.5L기준)
- 모든 시료는 당일 제조하여 평가가 있기 전까지 실온(22±2℃)에 보관함.
- 시료는 세 자리 난수로 표기한 흰색 일회용 플라스틱 컵에 10mL씩 소분하여 실온으로 제시함.

Table I-60. The range of concentrations for sweetener samples used in the 2-AFC test

Sample	Concentration
Reb A	0.08%, 0.105%, 0.13%, 0.155%, 0.18%
Reb M	0.065%, 0.075%, 0.085%, 0.095%, 0.105%
Reb D	0.085%, 0.95%, 0.105%, 0.115%, 0.125%
Sucralose	0.01%, 0.015%, 0.02%, 0.025%, 0.03%
Erythritol	14%, 15%, 16%, 17%, 18%
Maltitol	12%, 13.5%, 15%, 16.5%, 18%

○ 평가 절차

- 1 session당 한 종류의 감미료 시료 5쌍을 평가함.
- Session 별 제공되는 시료의 종류 및 농도 제시 순서는 William Latin Square Design에 의해 결정되었음.
- 10% 설탕 농도를 적용한 두유라테와 감미료 시료 1쌍 내에서의 시료 평가 순서는 counter-balanced, randomized 되었음.
- 검사 요원의 피로를 막기 위하여 1회 4종류의 시료를 평가하도록 하였으며, 72명의 검사 요원을 4종류의 시료에 랜덤 배정하였음. 시료당 35-36명의 검사 요원이 평가하였음.(Reb A;35명, Reb M;36명, Reb D;36명, Sucralose;35명, Erythritol;35명, Maltitol;35명)
- 제시된 시료 전체를 5초 동안 머금고 제시된 타구 컵에 뱉은 후 5초 동안의 맛을 느껴 총 10초 동안 느껴지는 총체적인 단맛을 평가함.

- 5 농도 수준으로 제조된 시료를 각각 10% 설탕 농도를 적용한 두유라테와 비교하여 단맛이 더 강한 시료를 선택하도록 함.
- 감미료의 섭취로 인해 발생할 수 있는 건강상의 문제를 최소화하기 위하여 시료를 삼키지 않고 빨도록 하였음.
- 입가심 물은 온수와 정수를 제시하였음. 온수는 보온병에서 $46\pm 2^{\circ}\text{C}$ 로 유지하였고, 정수는 실온 ($22\pm 2^{\circ}\text{C}$)의 정수를 물병에 담아 제시하였음. 예비실험을 통하여 구강 내 온도 변화를 최소화함을 위해 온수로 입가심 후에 정수로 입가심을 하도록 설정되었음.
- 한 쌍의 시료를 평가한 후 다음 시료 쌍의 평가 전 제시된 입가심용 온수와 정수로 충분히 입을 행구도록 함.
- 한 종류의 1 session(감미료 5쌍)을 평가한 후에는 5분간 휴식을 취하여 검사 시 피로감을 최소화 함.
- 검사는 서울대학교 식품영양학과 감각검사실에서 개별적으로 실시함.

○ 결과 분석

- 시료를 10% 설탕 농도를 적용한 두유라테보다 더 달다고 평가한 응답 수를 세어 concentration - response (C-R curve)을 구하고 회귀식($\% \text{ response} = a \times \text{concentration}(\%) + b$)을 구하여 응답률이 50%일 때의 감미료 농도를 구함.
- 상대 당도 = 10% 설탕 농도 적용 두유라테 (10%) / 응답률 50%일 때의 감미료 농도

3.1.2. 실험 결과

- 각 감미료의 C-R curve(Figure I-20)에서 구해진 상대 당도는 Table I-61과 같음.
- 각 시료의 회귀식에 대한 R^2 값은 0.92-0.98로, 회귀선이 결과값에 잘 적합됨.
- 에리스리톨과 말티톨은 대부분 문헌에서 보고된 바와 유사한 값을 나타냄.

Table I-61. Relative sweetness of 6 sweeteners calculated from dose-response curves

Samples	Relative Sweetness		
	Determined in this study	Regression equation	R^2
Reb A	67	$y = 3.3143x + 0.0034$	0.9262
Reb M	119	$y = 14.167x - 0.6875$	0.952
Reb D	87	$y = 11.389x - 0.8125$	0.9508
Sucralose	410	$y = 38.286x - 0.4343$	0.9818
Erythritol	0.65	$y = 0.1371x - 1.6171$	0.9412
Maltitol	0.69	$y = 0.1181x - 1.2114$	0.9678

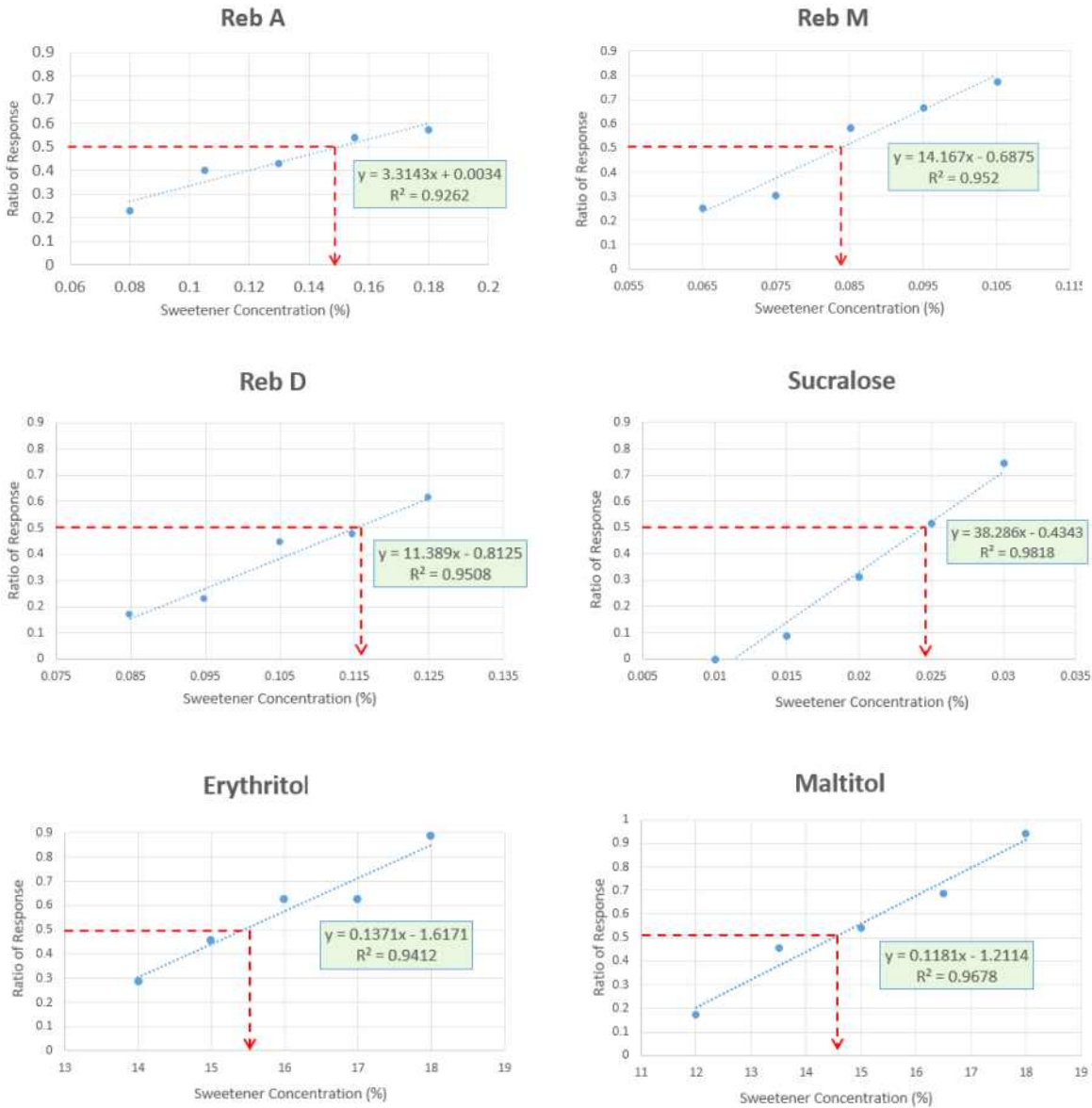


Figure I-20. Dose-response curves of 6 sweeteners.

3.2. 소비자가 지각하는 rebaudioside 계 저열량 감미료가 첨가된 두유라테의 감각, 감정, 인지적 특성과 기호도 평가

3.2.1. 실험방법

○ 검사요원

- 서울대학교 감각과학 연구실의 소비자 검사 요원 pool을 대상으로 한 전화 모집과 서울대학교 온라인 게시글에 참가자 모집문을 공지하여 자발적인 참여 지원자 20~50대 72명(남자 30명, 여자 42명)을 선발함.

○ 시료

- 5종류의 단일 감미료: 설탕, Reb-A, Reb-M, Reb-D, sucralose와 Reb-A와 erythritol, 또는 Reb-A와 maltitol을 5:5 비율로 혼합한 감미료 혼합물 2종 등 총 7종류의 감미료 시료들을 사용함.

- 2-AFC를 통해 확립된 10% 설탕 농도가 적용된 두유라테와 동일한 감미도를 갖는 농도를 이용함. Reb-A와 erythritol 또는 maltitol의 5:5 혼합물일 경우 설탕 10% 상대당도에 해당하는 농도를 가진 Reb-A 시료와 설탕 10% 상대당도에 해당하는 농도를 가진 erythritol 또는 maltitol 시료를 각각 5:5의 비율로 혼합하여 제조함 (Table I-62).
- 두유라테 음료 시스템을 평가에 사용함. 두유라테는 실온의 무가당 두유, 정수, 블랙커피 분말을 사용하여 제조함 (Table I-59).

Table I-62. The information of sample concentration used in consumer test

Abbreviation	Sample	Concentration
S	Sucrose	10.0000%
RebA	Rebaudioside A	0.149%
RebM	Rebaudioside M	0.084%
RebD	Rebaudioside D	0.114%
Sucral	Sucralose	0.0243%
RebAM	Rebaudioside A + Maltitol	1:1 mixture of 0.149% Reb A solution and 6.9% maltitol solution
RebAE	Rebaudioside A + Erythritol	1:1 mixture of 0.149% Reb A solution and 6.5% erythritol solution

○ 시료의 준비

- 시료는 분량의 감미료를 제조해둔 두유라테에 자석교반기(MS300HS, Misung Scientific Co., Ltd., Yangju, Korea)로 1100rpm에서 10분간 교반하여 완전히 용해시켜 제조함.
- 두유라테 제조 및 보관 방법은 2-AFC 실험과 동일함.
- 시료는 평가 1시간 전 세 자리 난수로 표기한 흰색 일회용 플라스틱 컵에 40mL씩 소분하여 실온으로 제시함.

○ 평가 절차

- 평가원들은 순차적으로 시료를 맛보고 평가를 하며, 총 7가지 시료를 평가함.
- 본 실험은 총 2 Session으로 진행됨.
- Session 1에서 연구 참여자는 각 시료에 대한 전반적 기호도를 11점 항목척도로 평가하고, 좋은 점/ 싫은점 등을 자유롭게 기술함.
- 이후 참여자는 각 시료를 섭취했을 때 느껴지는 모든 감정 용어(위안이 되는, 답답한, 걱정되는, 편안한, 반가운, 색다른, 행복한, 죄책감이 드는 등)와 인지적 개념 용어(친환경적인, 건강한, 고급스러운, 신뢰할 수 있는, 활력을 주는, 젊은, 영양이 풍부한 등)를 선택함.
- 감정용어, 인지적 개념용어 평가 이후 시료에서 느껴지는 감각특성 용어(단맛, 쓴맛, 단맛 후미, 쓴맛 후미, 두유향미, 커피향미, 날콩 향미, 화한 느낌, 인공적인 향미, 텁텁함)들에 대해 그 특성이 얼마나 강하게 느껴지는지 16점 항목척도('0'느껴지지 않는다, '1'매우 약하다, '3'약하지도 강하지도 않다, '5'매우 강하다)로 강도를 평가함.
- 감각 용어, 감정 용어 및 인지적 개념용어는 예비실험을 통해 시료간에 차이를 설명할 수 있는 단어로 구성했음. 감정용어는 The EsSense profile과 PANAS 용어를 합한 리스트에서, 인지적 개념용어는 Thomson(2010) 논문의 conceptual lexicon으로부터 도출해냈음.
- Session 2에서 인구통계학적 정보 및 식품 섭취 빈도 관련 설문을 진행함.
- Session 1에서 제공되는 시료는 William Latin Square Design에 따라 sequential monadic 방법으로 제시함.

- 감미료의 섭취로 인해 발생할 수 있는 건강상의 문제를 최소화하기 위하여 시료를 삼키지 않고 뱉도록 하였음.
- 입가심 물은 온수와 정수를 제시하였음. 온수는 보온병에서 $46\pm 2^{\circ}\text{C}$ 로 유지하였고, 정수는 실온 ($22\pm 2^{\circ}\text{C}$)의 정수를 물병에 담아 제시하였음. 예비실험을 통하여 구강 내 온도 변화를 최소화함을 위해 온수로 입가심 후에 정수로 입가심을 하도록 설정되었음.
- 하나의 시료를 평가한 후 다음 시료를 평가하기 전 제시된 입가심용 온수와 정수로 충분히 입을 행구도록 함.
- 검사는 서울대학교 식품영양학과 감각검사실에서 개별적으로 실시함.

○ 통계 분석

- 분산분석(Analysis of variance; ANOVA)
 - 각 시료의 기호도와 감각적 특성에 대한 데이터의 평균 및 표준편차를 구하였음.
 - 모형으로 시료, 패널이 포함되었으며, 사후분석으로는 Duncan's multiple range test test ($p < 0.05$)를 수행함.
 - ANOVA와 사후분석 결과는 SPSS (ver 26.0, IBM inc., Armonk, NY, USA)를 이용하여 분석함.
- 주성분 분석(Principal component analysis; PCA)
 - 각 시료와 감각적 특성간의 다변량 상관관계를 알아보기 위해 각 특성의 평균값을 이용하여 주성분 분석 (principal components analysis, PCA)을 실시함.
 - R 통계소프트웨어(ver 4.2.0, R foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria) 기반의 FactoMineR package를 이용하여 분석함.
- 대응분석(Correspondence Analysis; CA)
 - 각 시료와 감정 용어/인지적 개념 용어간의 상관관계를 시각화 하기 위해 범주형 변수를 합산한 값을 이용하여 대응분석(Correspondence Analysis, CA)을 실시함.
 - R 통계소프트웨어(ver 4.2.0, R foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria) 기반의 FactoMineR package를 이용하여 분석함.

3.2.2. 실험 결과

- 각 감미료에서 도출된 감미 특성 및 전반적인 기호도를 요약한 결과는 Table I-63과 같음.
- Figure I-21는 PCA의 결과로, 시료와 특성들의 관계를 나타냈음.
- PCA 결과의 dim 1, dim 2는 각각 전체 변동의 46.32%, 29.83%를 설명함 (Figure I-21).
- Dim 1의 양의 방향으로 쓴맛, 쓴맛 후미, 커피 향미, 화한 느낌, 인공적 느낌이 높게 부하됨.
- Dim 2의 양의 방향으로는 날콩향미, 텁텁함, 두유향미가, 음의 방향으로는 단맛이 높게 부하되었음.
- 단맛 후미, 쓴맛, 쓴맛 후미, 인공적 느낌과 시료에 대한 기호도는 음의 상관관계를 나타냄.
- Dim 1의 양의 방향에 높게 부하된 Reb A는 설탕과 비교하여 단맛이 유의적으로 약했지만 단맛 후미, 쓴맛, 쓴맛 후미, 커피향미, 화한 느낌, 인공적 느낌이 유의적으로 강했음(Table I-63, Figure I-21).
- Dim 2의 양의 방향에 높게 부하된 Reb M과 Reb D는 다른 시료와 두유향미, 날콩향미가 유의적으로 차이하지 않았으며, 설탕과 수크랄로스과 비교하여 텁텁함이 유의적으로 강했음(Table I-63, Figure I-21).
- Reb A에 말티톨 또는 에리스리톨 혼합시 Reb A와 비교하여 기호도가 유의적으로 증가하였음(Table I-63).
- Reb A에 말티톨을 혼합한 시료는 설탕과 기호도에서 유의적인 차이가 없었음(Table I-63).
- Reb A에 말티톨 또는 에리스리톨 혼합시 Reb A와 비교하여 단맛이 유의적으로 증가하였음(Table I-63).

- Reb A에 말티톨 또는 에리스리톨 혼합시 Reb A와 비교하여 쓴맛과 쓴맛 후미가 유의적으로 감소하였음(Table I-63).
- Reb A에 말티톨 또는 에리스리톨을 혼합한 시료와 Reb A의 단맛 후미는 유의적 차이가 보이지 않아, 말티톨과 에리스리톨과의 혼합이 Reb A의 단맛 후미 감소에 영향을 주지 않는 것으로 나타남 (Table I-63).
- Reb A에 말티톨을 혼합하였을 경우 화한 느낌과 인공적 느낌이 감소함(Table I-63).
- Reb A에 말티톨 또는 에리스리톨을 혼합하였을 경우 설탕과의 dim1, dim2 상에서 거리가 더 가까워짐(Figure I-21).
- Reb A에 말티톨 또는 에리스리톨을 혼합한 시료와 Reb A의 커피향미는 유의적 차이가 없었음 (Table I-63).
- 결론적으로 Reb A에 말티톨 또는 에리스리톨을 혼합하였을 경우 단맛 증가 및 쓴맛, 쓴맛 후미가 감소한 반면, 단맛 후미에는 영향을 미치지 않음.
- 설탕과 Reb A 사이의 감각적 특성 차이보다 설탕과 Reb A에 말티톨 또는 에리스리톨을 혼합한 시료와의 감각적 특성 차이가 더 적은 것을 알 수 있음.(Table I-63, Figure I-21).
- 기호도 검사 결과 RebAM과 Sucral은 설탕을 첨가한 두유라테와 전반적 기호도에 유의적 차이가 없어, Reb A와 말티톨의 1:1혼합은 설탕을 대체할 수 있음을 나타내었음. 반면, Reb A와 에리스리톨의 1:1혼합은 설탕보다 기호도가 낮았으며, 이는 설탕보다 쓴맛, 쓴 후미, 멘톨 향미, 인공적 향미 등이 유의적으로 강하게 평가되었기 때문임 (Table I-63).

Table I-63. Mean intensities of overall liking and sensory attributes elicited by sucrose and 6 sweeten

Sample ¹	S	RebA	RebM	RebD	Sucral	RebAM	RebAE
Liking	7.4 ^{a2} (2.2) ³	5.2 ^c (2.7)	6.2 ^b (2.0)	6.1 ^b (2.2)	7.1 ^a (2.2)	7.2 ^a (2.3)	6.1 ^b (2.3)
Sweetness	10.9 ^{ab} (3.2)	9.6 ^{cd} (3.9)	9.2 ^d (3.9)	8.7 ^d (3.5)	10.2 ^{bc} (3.4)	11.7 ^a (3.0)	11.2 ^{ab} (3.3)
Sweetness _aftertaste	8.2 ^c (3.3)	9.4 ^{ab} (4.2)	9.4 ^{abc} (3.7)	9.5 ^{ab} (3.8)	8.4 ^{bc} (4.0)	10.2 ^a (3.3)	9.2 ^{abc} (3.8)
Bitterness	4.9 ^c (3.5)	10.1 ^a (4.1)	5.4 ^{bc} (5.6)	6.3 ^b (6.4)	6.1 ^b (3.9)	5.8 ^{bc} (3.8)	6.1 ^b (3.9)
Bitterness_aftertaste	5.1 ^c (4.1)	9.5 ^a (4.9)	6.2 ^{bc} (4.4)	6.2 ^{bc} (4.2)	6.1 ^{bc} (4.4)	5.6 ^{bc} (3.7)	6.5 ^b (4.3)
Coffee_flavor	9.6 ^{bc} (3.5)	10.9 ^a (3.6)	9.8 ^{abc} (3.9)	10.0 ^{abc} (3.6)	9.2 ^c (4.0)	10.5 ^{ab} (3.8)	10.0 ^{abc} (4.0)
Soymilk_flavor	7.0 (4.1)	6.5 (4.5)	7.6 (4.4)	7.3 (4.5)	7.2 (4.1)	6.8 (4.3)	7.1 (4.2)
Rawbean_flavor	5.0 (3.9)	5.6 (4.9)	6.4 (4.9)	6.0 (4.6)	5.7 (4.3)	5.2 (3.9)	5.2 (4.1)
Menthol_flavor	4.0 ^d (4.2)	6.3 ^a (4.8)	4.4 ^{cd} (4.2)	4.7 ^{cd} (4.2)	5.2 ^{bc} (4.6)	4.5 ^{cd} (4.1)	6.1 ^{ab} (4.4)
Artificial_flavor	5.7 ^c (4.2)	10.9 ^a (4.8)	8.7 ^b (4.5)	9.2 ^b (4.2)	8.7 ^b (4.2)	8.6 ^b (4.7)	9.6 ^{ab} (4.2)
Chalky	6.8 ^d (4.0)	7.3 ^{bcd} (3.8)	8.6 ^a (4.3)	8.5 ^{ab} (4.3)	7.1 ^{cd} (4.1)	8.0 ^{abc} (4.1)	7.6 ^{abcd} (4.4)

¹See Table I-62 for sample abbreviations

²Different alphabet letters indicate a significant difference among the samples (p<0.05).

³Standard deviation

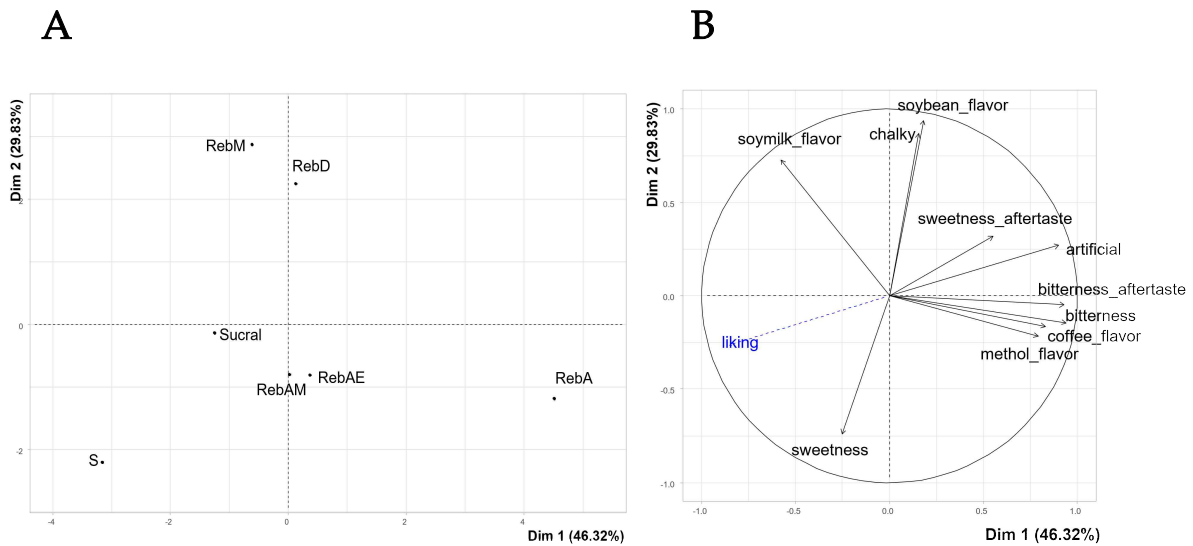
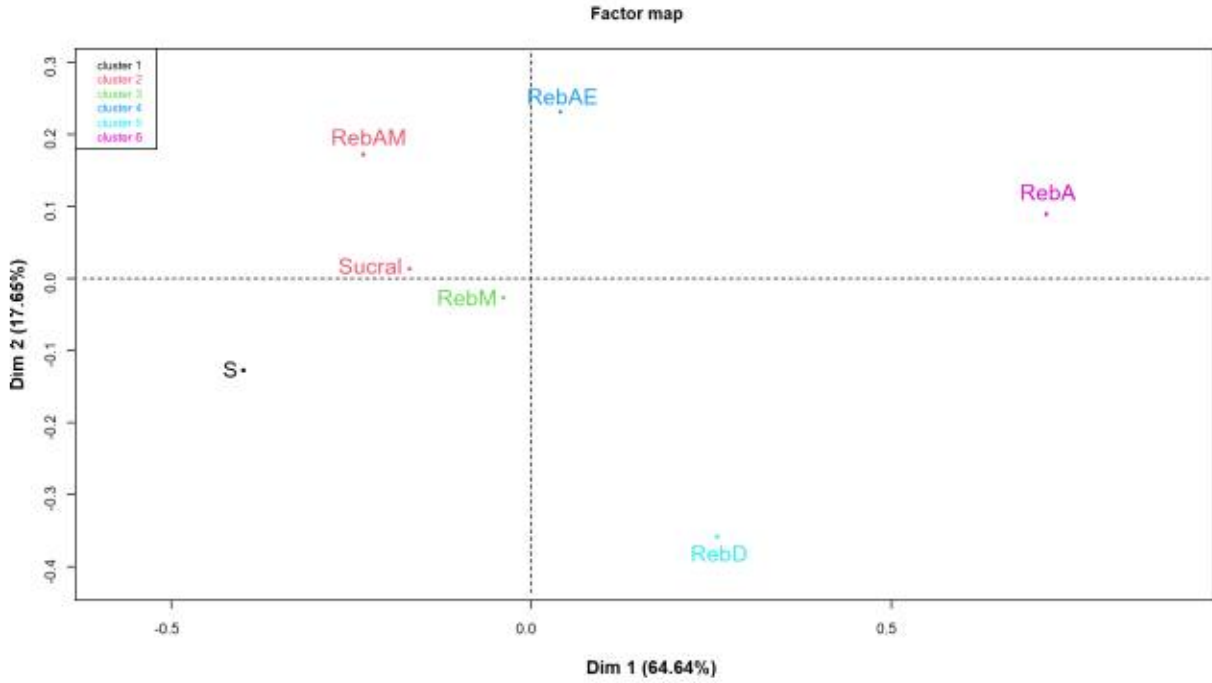


Figure I-21. Principal component loading scores of the samples (A) and sensory attributes (B) from 7 sweeteners on Dim 1 and Dim 2.

- Figure I-22는 CA의 결과로, 각 시료와 감정 특성간의 상관관계를 요약한 결과임.
- CA 결과의 dim 1, dim 2는 각각 전체 변동의 64.64%, 17.65%를 설명함 (Figure I-22).
- Dim 1의 양의 방향에 높게 부하된 Reb A는 ‘신경질적인’, ‘화가 나는’, ‘예민한’, ‘걱정되는’, ‘짜증스러운’ 감정 특성을 나타냄(Figure I-22).
- Dim 1의 음의 방향에 높게 부하된 설탕은 ‘만족스러운’, ‘포근한’, ‘평온한’, ‘행복한’, ‘안심할 수 있는’ 감정 특성을 나타냄(Figure I-22).
- Dim 2의 음의 방향에 높게 부하된 Reb D는 ‘지루한’ 감정 특성과 연관성이 높았음(Figure I-22).
- 수크랄로스는 ‘즐거운’, ‘좋은’, ‘정성이 느껴지는’, ‘흡족한’, ‘친근한’ 감정 특성을 유발했음(Figure I-22).
- RebAM, RebAE, RebD의 신뢰타원은 수크랄로스의 신뢰타원과 겹쳐 감정적 특성에서 시료간의 유의적 차이가 없음(Figure I-22).
- Dim1, dim2 상에서 설탕과 Reb A 사이의 거리보다 설탕과 Reb A에 말티톨 또는 에리스리톨을 혼합한 시료와 설탕 사이의 거리가 더 가까워, 혼합에 의한 감미질 개선이 부정적인 감정보다는 긍정적인 감정을 유발하였음을 보여줌. (Figure I-22).
- 결과적으로 Reb A에 말티톨을 혼합함으로써 수크랄로스가 유발하는 감정 특성과 유사한 감정특성을 유발 할 수 있다는 것을 알 수 있음.

A



B

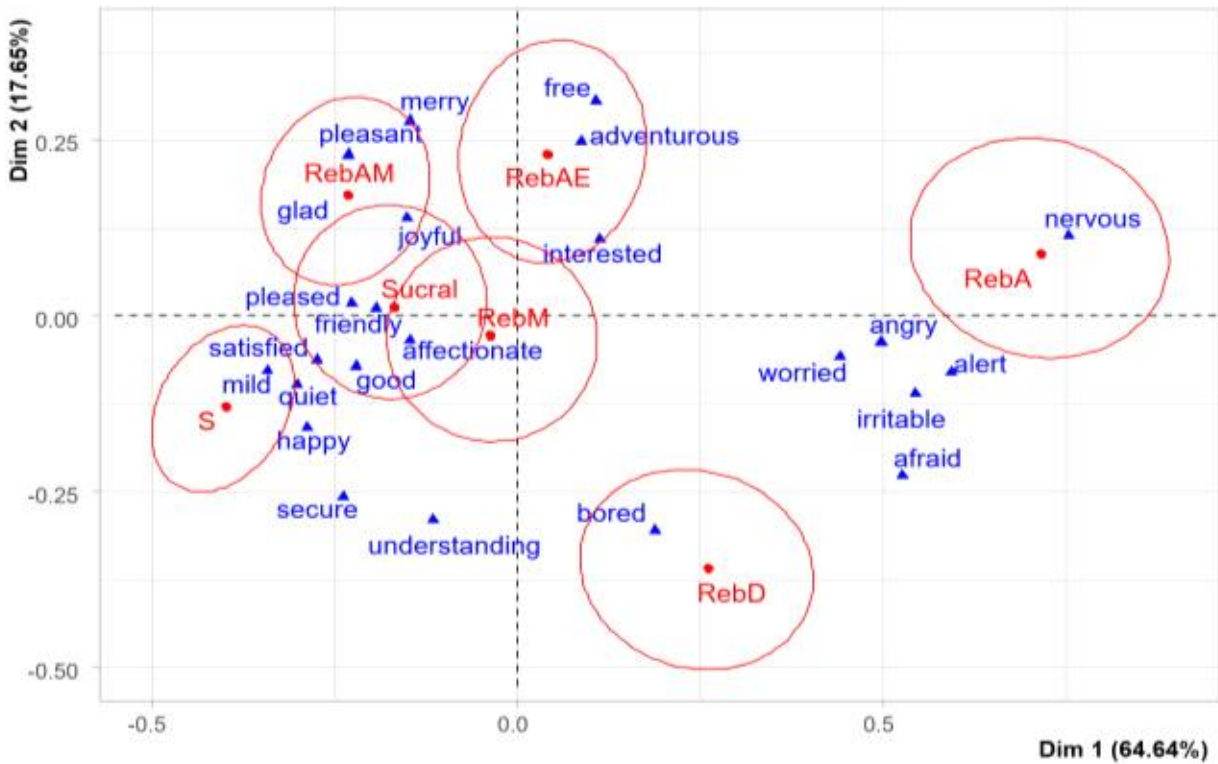
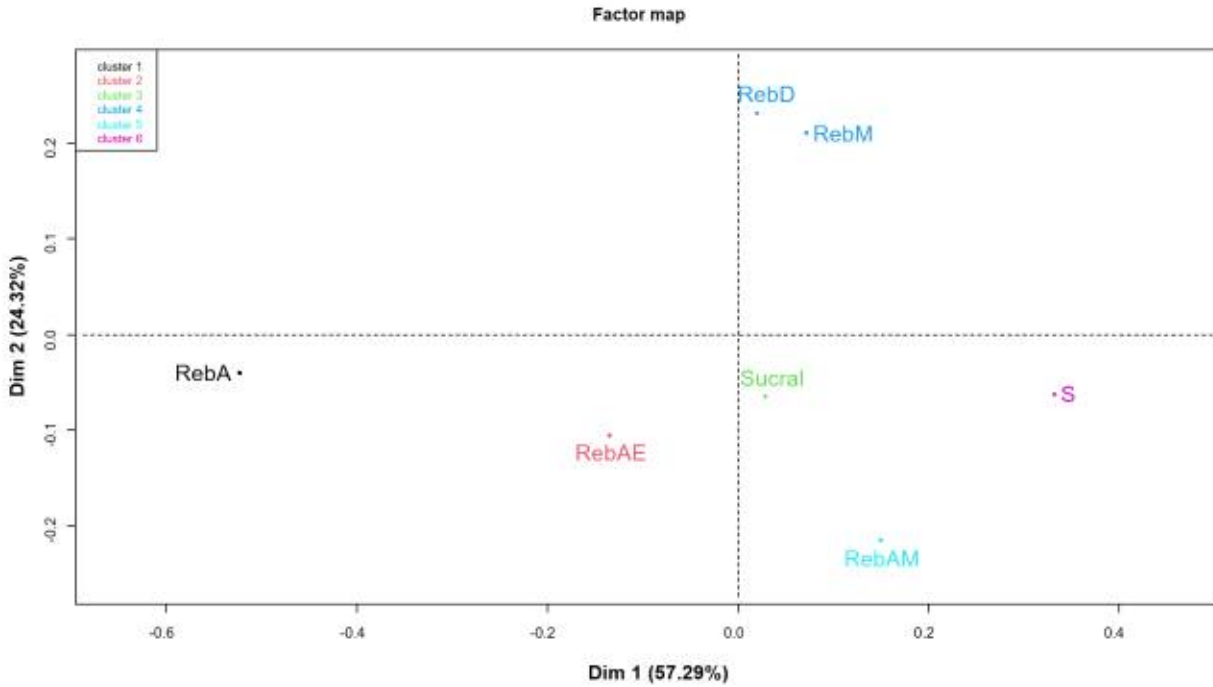


Figure I-22. Biplot representation of 7 samples (A) and 95% confidence ellipses with emotion attributes used to describe them, in the first two dimensions of Correspondence Analysis (CA) on the frequency presented on the CATA question.

- Figure I-23는 CA의 결과로, 각 시료와 인지적 개념용어 간의 상관관계를 요약한 결과임.
- CA 결과의 dim 1, dim 2는 각각 전체 변동의 57.29%, 24.32%를 설명함 (Figure I-23).
- Dim 1의 양의 방향에 높게 부하된 설탕은 ‘위안을 주는’, ‘평범한’, ‘친숙한’ 개념을 유발했음(Figure I-23).
- Dim 1의 음의 방향에 높게 부하된 Reb A는 ‘이상한’, ‘모험적인’과 같은 개념을 유발했음(Figure I-23).
- Dim 2의 양의 방향에 높게 부하된 Reb M과 Reb D는 신뢰타원이 겹쳐있어 유발되는 개념용어간의 유의적 차이가 없으며, ‘지속가능한’, ‘건강한’, ‘유익한’, ‘영양이 풍부한’ 개념용어를 유발했음.(Figure I-23).
- Dim 2의 음의 방향에 높게 부하된 Reb A에 말티톨을 혼합한 시료는 ‘활력을 주는’ 개념용어를 유발했음(Figure I-23).
- Reb A에 에리스리톨을 혼합한 시료의 신뢰타원은 수크랄로스의 신뢰타원과 겹쳐 유발되는 개념용어에서 시료간의 유의적 차이가 없으며, ‘신선한’, ‘최신유행의’, ‘인공적인’, ‘개인맞춤형’, ‘젊은’과 같은 개념용어를 유발했음(Figure I-23).
- dim1, dim2 상에서 설탕과 Reb A 사이의 거리보다 설탕과 Reb A에 말티톨을 혼합한 시료와 설탕 사이의 거리가 더 가까운 것을 알 수 있음(Figure I-23).
- 결과적으로 Reb A에 말티톨을 혼합함으로써 설탕에서 떠올릴 수 있는 인지적 개념용어와 유사한 용어를 떠올릴 수 있다는 것을 알 수 있음.

A



B

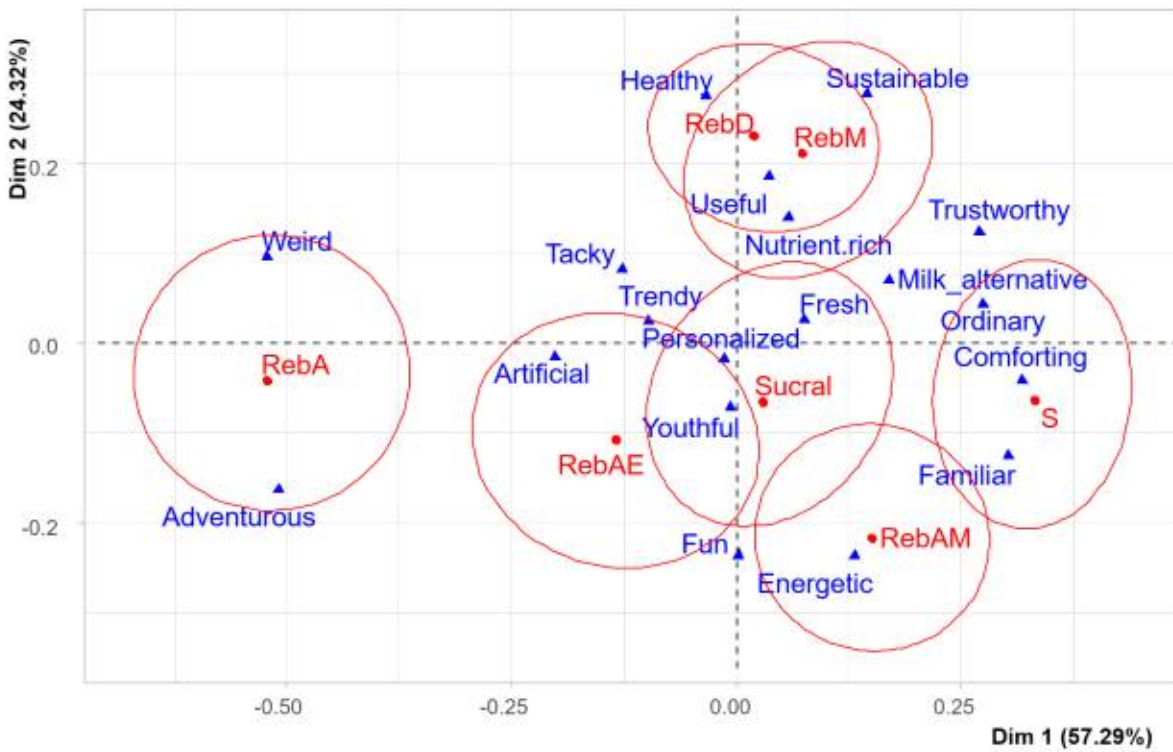


Figure I-23. Biplot representation of 7 samples (A) and 95% confidence ellipses with concept attributes used to describe them, in the first two dimensions of Correspondence Analysis (CA) on the frequency presented on the CATA question.

4. 신규 NHDC 당전이체 식품의 소비자 기호성 분석 / 스테비오사이드 식품의 소비자 기호성 분석

4.1. 요구르트 소비자 기호도 조사

4.1.1. 연구목적

- 소화성 당 저감화를 위한 NHDC 당전이체와 Reb A 또는 저열량 감미료 조합을 요구르트에 적용하여 소비자 기호도 조사하였음.

4.1.2. 실험방법

- 본 실험에서는 NHDC 당전이체와 Reb A 또는 저열량 감미료 조합을 선정하여 당 함량 기준을 기존 대비 50%~70% 저감할 수 있도록 요구르트에 적용하여 소비자 기호도 조사 실시하였음.

4.1.3. 검사요원

- 패널은 평소 감미소재 및 유제품에 대한 알레르기가 없는 만 19세 이상 40대 미만의 여성을 대상으로 이화여자대학교 온라인 게시판에 모집 공고문을 업로드하여 모집하였음.
- 만 21세부터 36세까지의(평균 24.85, 표준편차 3.1) 총 60명의 패널이 소비자 기호도 분석 실험에 참여하였음.

4.1.4. 시료

- 본 연구에서 총 7종의 요구르트를 평가하였음. 시중에서 판매율이 제일 높은 요구르트의 당함량을 참고하여 모든 시료에 설탕 7%에 상응하는 농도로 감미료 혼합물을 무첨가당 요구르트제품 (Table I-64)에 적용하였음.

Table I-64. 저감 요구르트 만드는 재료

Ingredients	Manufacturer
파스퇴로 오직우유100%를 유산균으로 발효한 요구르트	(주)우리F&B
Sucrose	CJ CheilJedang Co., Ltd., Korea
Rebaudioside A	CJ CheilJedang Co., Ltd., Korea
Aspartame	Vitasweet Co., Ltd., China
G NHDC	제 2세부에서 제작
Acesulfame-K	Vitasweet Co., Ltd., China
Saccharin	JMC Corporation., Korea

- 저감 시료의 감미료혼합물 당 함량 기준은 control시료 대비 50%~70% 저감하였음.
- 혼합감미료는 NHDC 당전이체, G-Rebaudioside A, Sucrose, Aspartame, Acesulfame-k, Saccharin를 시료로 사용하였음(Table I-65).

Table I-65. 요구르트에 적용한 혼합감미료 조합

혼합감미료 조합 (Sucrose equivalent conc. %)	시료(농도)
Control	설탕 7%
g-nhdc (1.05%)+reb A(2.45%)	설탕 3.5% + g-NHDC 0.008% + reb A 0.009%
g-nhdc (1.05%)+sucrose(2.45%)	설탕 3.5% + g-NHDC 0.008% + sucrose 2.45%
reb A(2.45%)+sucrose(2.45%)	설탕 2.1% + reb A 0.009% + sucrose 2.45%
reb A(2.45%)+aspartame(2.45%)	설탕 2.1% + reb A 0.009% + aspartame 0.0119%
Reb A(2.45%)+acesulfame-K(2.45%)	설탕 2.1% + reb A 0.009% + acesulfame-k 0.010%
reb A(2.45%)+saccharin(2.45%)	설탕 2.1% + reb A 0.009% + saccharin 0.006%

- G-NHDC를 base로 하여 bulk 감미 소재 (Sucrose) 또는 고감미 소재 (G-Rebaudioside A)를 2성분 조합으로 control 대비 50% 저감하여 요구르트에 적용하였음. 또한 G-Rebaudioside A base로 하여 bulk 감미 소재 (Sucrose) 또는 1종 고감미소재 (Aspartame, Acesulfame-K, Saccharin)를 2성분 조합으로 control 대비 50% 저감하여 요구르트에 적용하였음(Table I-66).

Table I-66. 저감 요구르트 만드는 레시피

당류저감	Sample(ratio)	Recipe (2000ml기준)	
-	Control	설탕 140g	요구르트1860g
50%	설탕+ g-nhdc+ reb A (5: 1.5: 3.5)	설탕 70g + g-NHDC 0.178g + reb A 0.187g	요구르트1964.6g
	설탕+ g-nhdc+ sucrose (5: 1.5: 3.5)	설탕 70g + g-NHDC 0.178g + sucrose 49g	요구르트1915.8g
70%	설탕+ reb A+sucrose (3: 3.5: 3.5)	설탕 42g + reb A 0.187g + sucrose 49g	요구르트1887.8g
	설탕+ reb A+aspartame (3: 3.5: 3.5)	설탕 42g + reb A 0.187g + aspartame 0.238g	요구르트1936.6g
	설탕+reb A+acesulfame-K (3: 3.5: 3.5)	설탕 42g + reb A 0.187g + acesulfame-k 0.204g	요구르트1936.6g
	설탕+ reb A+saccharin (3: 3.5: 3.5)	설탕 42g + reb A 0.187g + saccharin 0.129g	요구르트1936.7g

- 시료를 만드는 방법은 요구르트와 감미료혼합물을 mixer에 넣고 Mixer 1단계 40초 돌리고, 시료컵에 담아서 냉장고에서 -1도 보관하였음. 한 개 시료에 대한 시료 제공량은 45g-50g 이었음.

4.1.5. 시료 평가 절차 및 내용

- 모든 소비자는 7종의 요구르트 시료를 평가하였음. 시료는 serving order effect를 제어하기 위해 7종 요구르트의 평가 순서는 William's Latin Square 방법으로 정하여 제공하였음. 하나의 시료를 평가한 후 다음 시료 평가하는 monadic방법을 사용하였다.
- 소비자는 시료를 맛본 후 시료의 전반적인 기호도, 맛과 향미, 단맛 기호도, 단맛 강도, 쓴맛 기호도 및 쓴맛강도를 9점 척도로 평가하였음. 또한 check-all-that-apply (CATA) 기법으로 시료에서 발현되는 좋은 점과 싫은 점을 평가하였음. CATA에 사용되는 특성은 아몬드 음료 시료에서 발현되는 감각적 속성과 감정적 속성으로 구성되었으며 각 시료를 맛본 후, 느낀 좋은 점과 싫은 점을 모두 고

르게 하였음.

- 한 개의 시료에 대한 평가를 마친 후 다음 시료를 제시하며 시료와 시료 사이에는 물(삼다수 이용)로 입가심을 하게 하였음. 시료와 시료 사이의 간격은 약 6분이었음.

4.1.6. 통계분석

- 7종 요구르트 시료의 기호도(전반적인, 맛과 향미, 단맛 기호도, 단맛 강도, 신맛 기호도 및 신맛강도) 간의 유의적 차이를 검증하기 위해 일반선형모형을 이용한 분산분석을 실시하였음.
- CATA로 설문한 시료의 좋은 점과 싫은 점은 빈도분석을 이용하여 분석하였으며 평가 시료의 좋은 점과 싫은 점의 유의성을 검증하기 위해 교차분석을 실시하였음. 또한, 평가 시료 좋은 점과 싫은 점 선택 경향을 시각적으로 살펴보기 위해 대응분석(Correspondence analysis)를 실시하였음.
- 통계분석에는 IBM SPSS Statistics 26(SPSS Inc., Chicago, USA), R Statistical System 4.0.4 (R Development Core Team, 2011)을 사용하였음.

4.1.7. 연구결과

○ 요구르트 시료의 기호도 분산분석 결과

- 각 시료의 기호도 간의 유의적 차이를 검증하기 위하여 일반선형모형을 이용한 분산분석을 실시하였으며 그 결과는 Table I-67과 같음. 그 결과, 시료에서는 단맛강도의 유의적인 차이가 나타났으며 전반적 기호도, 단맛 기호도, 신맛 기호도, 신맛 강도는 유의적인 차이를 보이지 않았음 ($p>.05$).

Table I-67. 시료의 기호도 및 특성 분산분석 결과

	기호도	F-value	P-value1)
시료	전반적인 기호도	1.74	0.110
	단맛 기호도	1.868	0.085
	단맛 강도	5.175	0.000***
	신맛 기호도	0.99	0.431
	신맛 강도	1.184	0.314

1)*는 $p<0.05$, **는 $p<0.01$, ***는 $p<0.001$

○ 요구르트시료의 기호도 평균 및 표준편차 결과

- 7종 시료의 기호도 및 특성 평균과 표준편차는 다음 Table I-68과 같음.
- 시료의 전반적인 기호도, 맛과향미 기호도 및 단맛 강도는 Reb A + Sucrose 가장 높았으며, Reb A + Saccharin는 가장 낮은 점수를 보였음.
- 단맛 강도의 경우에는 모든 시료가 control보다 높게 평가하였으며 g-nhdc + Reb A 가장 점수가 높았음. 신맛 기호도는 모든 시료 control보다 약간 낮게 평가하였음. Reb A + acesulfame-K 의 신맛 기호도는 가장 낮은 점수로 평가되었으며 신맛 강도는 가장 높게 평가되었음.
- 신맛 강도는 g-nhdc + reb A, reb A + sucrose, reb A+ aspartame는 control보다 낮은 점수로 평가되었음.

Table I-68. 각 시료의 평균 및 표준편차 결과

Yogurt	Overall liking	Taste/flavor liking	Sweet taste liking	Sweetness Intensity ¹⁾	Sour taste liking	Sourness intensity
p-value	0.110	0.121	0.085	0.000***	0.431	0.314
control	6.3±1.4	6.3±1.2	6.1±1.3	4.9±1.1a	6.0±1.3	5.1±1.2
gnhdc+rebA	6.0±1.7	6.1±1.7	5.7±1.8	5.8±1.5b	5.9±1.6	4.9±1.5
gnhdc+suc	6.3±1.5	6.3±1.4	6.2±1.3	4.9±1.2a	5.8±1.5	5.1±1.4
rebA+acek	5.9±1.7	5.9±1.7	5.8±1.5	5.3±1.4ab	5.6±1.4	5.2±1.3
rebA+aspt	6.0±2.0	6.2±1.9	6.1±2.1	5.8±1.6b	6.0±1.6	4.6±1.6
rebA+sacc	5.6±1.7	5.6±1.8	5.6±1.6	5.7±1.5b	5.6±1.5	5.0 ±1.3
rebA+suc	6.4±1.7	6.4±1.7	6.4±1.6	5.5±1.1b	6.0±1.8	4.9±1.6

1) 유의확률 0.05 수준에서 유의적 차이가 있는 경우 굵은 글씨로 표시하였음.

○ 요구르트 시료의 좋은 점 분석 결과

- 시료의 좋은 점을 Check-All-That-Apply(CATA) 기법으로 평가함. CATA에 사용된 용어는 7종의 요구르트 시료에서 발현되는 감각적 속성과 감정적 속성 31개로 구성되었음.
- 각 시료의 좋은 점 선택 빈도와 퍼센트는 Table I-69과 같으며 30% 이상 선택된 속성들은 다음과 같음.
- Control 시료의 좋은 점으로는 색상(36.7), 조화로운 맛(48.3), 목 넘김이 부드럽다(55), 익숙/친숙해서 좋다(31.7), 부담 없는 맛(51.7), 만족스럽다(31.7)의 속성이 선택되었음. 조화로운 맛 및 고급스러운 맛의 속성이 두드러지게 좋아하는 속성으로 분석되었음.
- G-nhdc + reb A 조합된 시료의 좋은 점으로는 조화로운 맛(35.0), 목 넘김이 부드럽다(51.7), 익숙/친숙해서 좋다(33.3), 부담없는 맛(36.7)의 속성이 선택되었음.
- G-nhdc + sucrose 조합된 시료의 좋은 점으로는 색상(35.0), 단맛(35.0), 가벼운 맛(38.3), 입 안 감 촉(31.7), 목 넘김이 부드럽다(53.3), 익숙/친숙해서 좋다(41.7), 부담없는 맛(43.3)의 속성이 선택되었음.
- Reb A +acesulfame-K 조합된 시료의 좋은 점으로는 색상(36.7), 단맛(33.3), 가벼운 맛(31.7), 목 넘김이 부드럽다(55.0), 익숙/친숙해서 좋다(33.3), 부담없는 맛(41.7)의 속성이 선택되었음.
- Reb A+ aspartame 조합된 시료의 좋은 점으로는 색상(36.7), 윤기(31.7), 단맛(46.7), 가벼운 맛(36.7), 조화로운 맛(31.7), 목 넘김이 부드럽다(61.7), 익숙/친숙해서 좋다(33.3), 부담없는 맛(33.3), 더 먹고싶다(33.3)의 속성이 선택되었음. 더 먹고 싶은 속성이 두드러지게 좋아하는 속성으로 분석되었음.
- Reb A+ saccharin 조합된 시료의 좋은 점으로는 색상(38.3), 입안 감촉(35.0), 목 넘김이 부드럽다(51.7), 부담없는 맛(38.3)의 속성이 선택되었음.
- Reb A+ sucrose 조합된 시료의 좋은 점으로는 단맛(41.7), 목넘김이 부드럽다(50.0), 익숙/친숙해서 좋다(31.7), 부담없는 맛(51.7)의 속성이 선택되었음.
- 시료간의 좋은 점의 유의적 차이를 알아보기 위해 교차분석을 실시하였음. 그 결과, 조화로운 맛, 고급스러운 맛, 더 먹고 싶다는 속성에서 유의적 차이가 있는 것으로 분석되었음.

Table I-69. 7종 요구르트의 좋은 점 결과

시료 감각적 및 감정적 속성	P-value ¹⁾	control	gnhdc +rebA	gnhdc +suc	rebA +acek	rebA +aspt	rebA +sacc	rebA +suc
색상	0.835	22(36.7)	17(28.3)	21(35)	22(36.7)	22(36.7)	23(38.3)	17(28.3)
윤기	0.921	14(23.3)	16(26.7)	14(23.3)	18(30)	19(31.7)	18(30)	16(26.7)
되직함	0.64	6(10)	3(5)	6(10)	2(3.3)	4(6.7)	6(10)	6(10)
묽음	0.596	11(18.3)	11(18.3)	14(23.3)	11(18.3)	18(30)	13(21.7)	10(16.7)
단맛	0.157	17(28.3)	18(30)	21(35)	20(33.3)	28(46.7)	15(25)	25(41.7)
신맛	0.937	16(26.7)	13(21.7)	12(20)	11(18.3)	12(20)	11(18.3)	12(20)
쓴맛	1	0(0)	1(1.7)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)
뒷맛	0.488	7(11.7)	3(5)	4(6.7)	2(3.3)	4(6.7)	2(3.3)	6(10)
진한 맛	0.832	5(8.3)	9(15)	5(8.3)	4(6.7)	6(10)	6(10)	6(10)
가벼운 맛	0.693	17(28.3)	17(28.3)	23(38.3)	19(31.7)	22(36.7)	16(26.7)	16(26.7)
조화로운 맛	0.009	29(48.3)	21(35)	15(25)	12(20)	19(31.7)	12(20)	17(28.3)
입안 감촉	0.64	18(30)	16(26.7)	19(31.7)	15(25)	12(20)	21(35)	18(30)
촉감_되직함	0.335	7(11.7)	7(11.7)	6(10)	1(1.7)	4(6.7)	8(13.3)	7(11.7)
촉감_묽음	0.422	11(18.3)	10(16.7)	16(26.7)	15(25)	16(26.7)	8(13.3)	12(20)
넘김이 부드럽다	0.908	33(55)	31(51.7)	32(53.3)	33(55)	37(61.7)	31(51.7)	30(50)
땀은 감촉	0.159	0(0)	2(3.3)	3(5)	0(0)	2(3.3)	0(0)	3(5)
그냥 좋다	0.167	4(6.7)	5(8.3)	5(8.3)	2(3.3)	10(16.7)	3(5)	7(11.7)
익숙/친숙해서 좋다	0.89	19(31.7)	20(33.3)	25(41.7)	20(33.3)	20(33.3)	18(30)	19(31.7)
새로워서 좋다	0.534	1(1.7)	1(1.7)	1(1.7)	0(0)	0(0)	1(1.7)	3(5)
독특해서 좋다	0.229	1(1.7)	1(1.7)	0(0)	3(5)	0(0)	3(5)	3(5)
중독성있다	0.104	8(13.3)	9(15)	5(8.3)	5(8.3)	14(23.3)	4(6.7)	8(13.3)
부담없는 맛	0.278	31(51.7)	22(36.7)	26(43.3)	25(41.7)	20(33.3)	23(38.3)	31(51.7)
고급스러운 맛	0.004	8(13.3)	4(6.7)	1(1.7)	0(0)	3(5)	0(0)	4(6.7)
만족스럽다	0.151	19(31.7)	12(20)	13(21.7)	8(13.3)	17(28.3)	9(15)	15(25)
포만감이 든다	0.459	6(10)	5(8.3)	6(10)	2(3.3)	5(8.3)	4(6.7)	9(15)
갈증이 해소된다	0.457	15(25)	7(11.7)	9(15)	10(16.7)	12(20)	8(13.3)	13(21.7)
건강에 좋을것같다	0.782	9(15)	6(10)	12(20)	8(13.3)	11(18.3)	10(16.7)	8(13.3)
더 먹고싶다	0.038	11(18.3)	17(28.3)	14(23.3)	8(13.3)	20(33.3)	8(13.3)	18(30)
기분이 좋아진다	0.589	9(15)	8(13.3)	7(11.7)	6(10)	11(18.3)	6(10)	12(20)
인공적이지 않다	0.678	9(15)	4(6.7)	6(10)	5(8.3)	6(10)	4(6.7)	4(6.7)
좋은 점이 없다	0.421	2(3.3)	1(1.7)	2(3.3)	1(1.7)	4(6.7)	5(8.3)	1(1.7)

1) Pearson 카이제곱의 유의확률을 나타냄. 5보다 작은 기대 빈도를 가지는 항목이 있는 경우 Fisher의 정확검정 값을 나타냄. 유의확률 0.05 수준에서 유의적 차이가 있는 경우 굵은 글씨로 표시하였음

2) N= 60

○ 요구르트시료의 싫은 점 분석 결과

- 시료의 싫은 점을 Check-All-That-Apply(CATA) 기법으로 평가하였다. CATA에 사용된 용어는 7종의 요구르트 시료에서 발현되는 감각적 속성과 감정적 속성 37개로 구성되었음.
- 각 시료의 싫은 점 선택 빈도와 퍼센트는 Table 1-70와 같으며 30% 이상 선택된 속성들은 다음과 같음.
- Control 시료의 싫은 점으로는 30% 이상 선택된 속성은 없지만 약한 단 맛, 가벼운 맛의 속성이 두드러지게 싫어하는 속성으로 분석되었음.
- G-nhdc + reb A 조합된 시료의 싫은 점으로는 30% 이상 선택된 속성은 없지만 강한 단맛의 속성이 두드러지게 싫어하는 속성으로 분석되었음.
- G-nhdc + sucrose, Reb A + saccharin, Reb A+ sucrose 시료의 싫은 점은 없음.
- Reb A +acesulfame-K 조합된 시료의 싫은 점으로는 뒷맛(31.7)의 속성이 선택되었음.
- Reb A+ aspartame 조합된 시료의 싫은 점으로는 뒷맛(31.7)의 속성이 선택되었음. 인공적인 단맛의 속성이 두드러지게 싫어하는 속성으로 분석되었음.
- 시료의 싫은 점의 유의적 차이를 알아보기 위해 교차분석을 실시하였음. 그 결과, 강한 단맛, 인공적인 단맛, 약한 단맛, 가벼운 맛의 속성에서 유의적 차이가 있는 것으로 분석되었음.

Table I-70. 7종 요구르트의 싫은 점 결과

시료감각적 및 감정적 속성	P-value ^{b)}	control	gnhdc+reb A	gnhdc+su c	rebA+ace k	rebA+asp t	rebA+sac c	rebA+su c
색상	0.141	2(3.3)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)
윤기	0.141	0(0)	0(0)	2(3.3)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)
되직함	1	0(0)	1(1.7)	0(0)	1(1.7)	0(0)	0(0)	0(0)
묽음	0.429	4(6.7)	2(3.3)	7(11.7)	6(10)	3(5)	3(5)	7(11.7)
강한 단 맛	0.01	3(5)	13(21.7)	1(1.7)	8(13.3)	10(16.7)	11(18.3)	7(11.7)
강한 신 맛	0.521	3(5)	8(13.3)	10(16.7)	5(8.3)	6(10)	7(11.7)	6(10)
강한 쓴 맛	0.852	1(1.7)	2(3.3)	1(1.7)	3(5)	2(3.3)	4(6.7)	2(3.3)
인공적인 단맛	0.002	3(5)	16(26.7)	6(10)	17(28.3)	18(30)	15(25)	12(20)
진한 맛	0.994	1(1.7)	1(1.7)	1(1.7)	2(3.3)	1(1.7)	0(0)	1(1.7)
조화롭지 않은 맛	0.143	3(5)	6(10)	5(8.3)	9(15)	7(11.7)	13(21.7)	8(13.3)
이상한 맛/냄새	0.72	3(5)	2(3.3)	2(3.3)	6(10)	4(6.7)	3(5)	5(8.3)
약한 단 맛	0.022	9(15)	4(6.7)	10(16.7)	4(6.7)	2(3.3)	5(8.3)	1(1.7)
약한 신 맛	0.887	6(10)	8(13.3)	5(8.3)	6(10)	6(10)	4(6.7)	8(13.3)
약한 쓴 맛	0.193	1(1.7)	3(5)	0(0)	4(6.7)	1(1.7)	2(3.3)	0(0)
느끼한 맛	0.715	1(1.7)	2(3.3)	1(1.7)	4(6.7)	1(1.7)	3(5)	3(5)
가벼운 맛	0.046	9(15)	2(3.3)	5(8.3)	1(1.7)	3(5)	4(6.7)	1(1.7)
뒷맛	0.225	8(13.3)	13(21.7)	15(25)	19(31.7)	19(31.7)	16(26.7)	18(30)
입 안 감촉	0.504	6(10)	4(6.7)	2(3.3)	1(1.7)	3(5)	2(3.3)	4(6.7)
촉감_되직함	0.099	1(1.7)	0(0)	0(0)	2(3.3)	2(3.3)	0(0)	4(6.7)
촉감_묽음	0.516	4(6.7)	3(5)	1(1.7)	5(8.3)	4(6.7)	4(6.7)	1(1.7)
잔여감	0.978	10(16.7)	12(20)	14(23.3)	13(21.7)	11(18.3)	13(21.7)	13(21.7)
땀은 감촉	0.779	16(26.7)	16(26.7)	10(16.7)	17(28.3)	14(23.3)	13(21.7)	16(26.7)
그냥 싫다	0.139	0(0)	0(0)	0(0)	1(1.7)	0(0)	3(5)	2(3.3)
익숙/친숙하지 않다	0.934	2(3.3)	2(3.3)	4(6.7)	3(5)	1(1.7)	3(5)	2(3.3)
너무 새롭다	1	0(0)	0(0)	1(1.7)	1(1.7)	1(1.7)	1(1.7)	0(0)
너무 독특하다	0.645	0(0)	0(0)	0(0)	2(3.3)	0(0)	1(1.7)	1(1.7)
질린다	0.163	1(1.7)	4(6.7)	7(11.7)	3(5)	7(11.7)	8(13.3)	4(6.7)
부담스러운 맛	0.341	1(1.7)	7(11.7)	2(3.3)	3(5)	2(3.3)	3(5)	2(3.3)
저렴한 맛	0.22	1(1.7)	4(6.7)	8(13.3)	9(15)	6(10)	5(8.3)	6(10)
만족스럽지 않다	0.92	5(8.3)	7(11.7)	9(15)	9(15)	7(11.7)	9(15)	8(13.3)
포만감이 들지 않는다	0.999	5(8.3)	3(5)	4(6.7)	4(6.7)	4(6.7)	4(6.7)	5(8.3)
갈증이 해소되지 않는다	0.891	2(3.3)	4(6.7)	6(10)	5(8.3)	4(6.7)	4(6.7)	5(8.3)
건강에 나쁠 것 같다	0.043	1(1.7)	7(11.7)	1(1.7)	6(10)	7(11.7)	6(10)	2(3.3)
더 먹고 싶지 않다	0.193	6(10)	12(20)	6(10)	13(21.7)	11(18.3)	13(21.7)	6(10)
기분이 나빠진다	0.565	1(1.7)	2(3.3)	3(5)	1(1.7)	4(6.7)	4(6.7)	1(1.7)
매스껍다/역겹다	0.252	0(0)	2(3.3)	0(0)	3(5)	2(3.3)	0(0)	2(3.3)
싫은 점이 없다	0.43	13(21.7)	12(20)	12(20)	5(8.3)	12(20)	8(13.3)	12(20)

1) Pearson 카이제곱의 유의확률을 나타냄. 5보다 작은 기대 빈도를 가지는 항목이 있는 경우 Fisher의 정확검정 값을 나타냄. 유의확률 0.05 수준에서 유의적 차이가 있는 경우 굵은 글씨로 표시하였음

2) N= 60

○ 요구르트 시료의 좋은 점, 싫은 점 시각적 도표화

- 각 시료에 따라 CATA로 설문한 시료의 좋은 점과 싫은 점을 시각적으로 도표화하기 위해 대응분석(CA, Correspondence Analysis)을 실시한 결과는 Figure I-24와 같음.
- 대응분석에 사용한 좋은 점, 싫은 점 속성은 패널 30% 이상이 선택한 모든 속성을 포함하여 분석하였음. 그 결과, 성분 1(Dim 1)이 44.4%, 성분 2(Dim 2)가 31.6%를 설명하는 것으로 나타났음.
- Control는 주성분 1의 양의 방향, 성분 2의 음의 방향에 위치하며 좋은 점으로 부담없는 맛, 조화로운 맛의 선택 빈도가 높았음.
- 주성분 1의 양의 방향, 성분 2의 양의 방향에 위치한 Reb A + aspartame는 좋은 점으로 단맛과 더 먹고싶다는 특성의 선택 빈도가 높았음. 같은 방향의 위치한 Reb A+ sucrose의 경우 좋은 점으로 가벼운 맛, 단맛 특성의 선택 빈도가 높았으며 g-nhdc + Reb A의 경우 좋은 점으로 목 넘김이 부드럽다, 익숙/친숙해서 좋다, 부담 없는 맛은 특성의 선택 빈도가 높았음.
- 주성분 1의 음의 방향, 성분 2의 음의 방향에 위치한 Reb A+ acesulfame-k는 좋은 점으로 윤기와 색상인 특성의 선택 빈도가 높았으며 싫은 점으로 뒷맛 특성의 선택 빈도가 높았음. 같은 방향의 Reb A+ saccharin는 좋은 점으로 입안 감촉과 색상인 특성의 선택 빈도가 높았음.
- 도표에 거의 중간 방향의 g-nhdc+ sucrose는 좋은 점으로 윤기, 색상, 가벼운 맛, 목 넘김이 부드럽다, 익숙/친숙해서 좋다는 특성의 선택 빈도가 높았음.

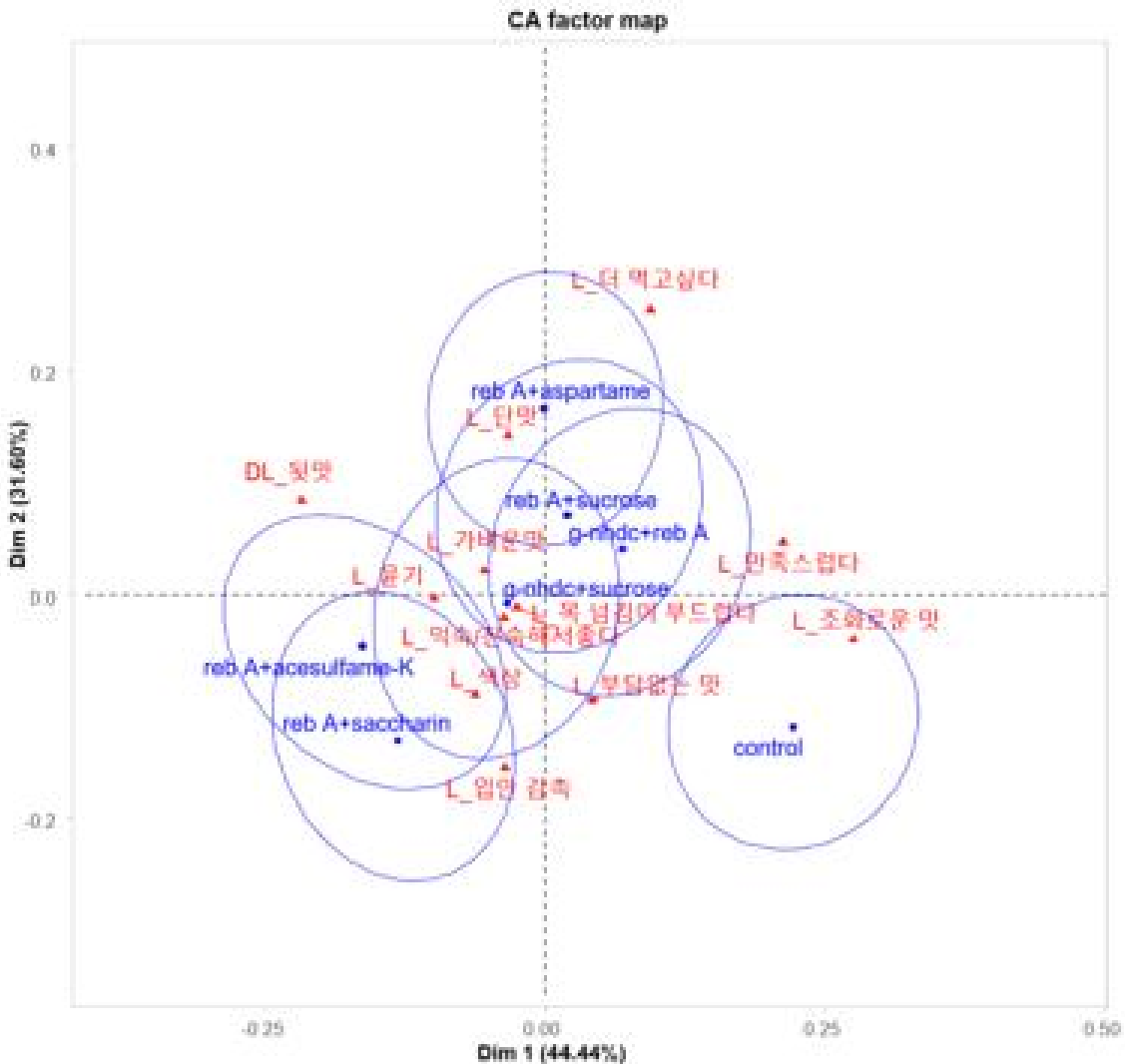


Figure I-24. 요구르트 시료의 좋은 점, 싫은 점 시각적 도표화

4.2. 밀크티 소비자 기호도 조사

4.2.1. 연구목적

- 소화성 당 저감화를 위해 NHDC 당전이체와 Reb A 또는 저열량 감미료 조합을 밀크티에 적용하여 소비자 기호도 조사하였음.

4.2.2. 실험방법

- 본 실험에서는 NHDC 당전이체와 Reb A 또는 저열량 감미료 조합을 선정하여 당 함량 기준을 기존 대비 50%~70% 저감할 수 있도록 밀크티에 적용하여 소비자 기호도 조사를 실시함.

4.2.3. 검사요원

- 패널은 평소 감미소재, 홍차 및 우유에 대한 알레르기가 없는 만 19세 이상 40대 미만의 여성을 대상으로 이화여자대학교 온라인 게시판에 모집 공고문을 업로드하여 모집하였음.
- 만 21세부터 36세까지의(평균 25.46, 표준편차 3.3) 총 61명의 패널이 소비자 기호도 분석 실험에 참여하였음.

4.2.4. 시료

- 본 연구에서 총 7종의 밀크티를 평가하였음. 시중에서 판매율이 제일 높은 밀크티의 당 함량을 참고하여 모든 시료에 설탕 7%에 상응하는 농도로 감미료 혼합물을 Milk tea base에 적용하였음(Table I-71).

Table I-71. 저감 밀크티 만드는 재료

Ingredients	Manufacturer
립톤 옐로우 라벨 홍차 tea bag	Fabrique par Unilever Russia, Russia
서울우유 멸균 흰우유	Seoul Dairy Cooperative, Korea
제주삼다수	Jeju Province Development Co, Korea
Sucrose	CJ CheilJedang Co., Ltd., Korea
G-Rebaudioside A	CJ CheilJedang Co., Ltd., Korea
G NHDC	제 2세부에서 제작
Aspartame	Vitasweet Co., Ltd., China
Acesulfame-K	Vitasweet Co., Ltd., China
Saccharin	JMC Corporation., Korea

- 저감 시료의 감미료 혼합물에서 소화성 당의 비율은 control시료 대비 50%~70% 저감하였음.
- 혼합감미료 조합 및 배합은 요구르트실험과 동일함.
- 밀크티 시료 만드는 레시피는 Table I-72와 같음. 시료 만드는 방법은 Milk tea base (2L 기준) 만들때 tea bag 20개를 끓인 물 1000ml에 7분 타고 우유와 1:1 비율로 섞었음. Milk tea base 및 감미료를 beaker에 놓고 교반기에 5단계 2분 돌리고 냉장고에서 -1도 보관하였음. 한 시료 제공량은 75g~80g 이었음.

Table 1-72. 저감 밀크티 만드는 레시피

당류저감	Sample(ratio)	Recipe (2000ml 기준)	
-	설탕+g-nhdc+rebA (5: 1.5: 3.5)	설탕 70g + g-NHDC 0.178g + rebA 0.187g	Milk tea base 1860g
50%	설탕+g-nhdc+sucrose (5: 1.5: 3.5)	설탕 70g + g-NHDC 0.178g + sucrose 49g	Milk tea base 1964.6g
	설탕+rebA+sucrose (3: 3.5: 3.5)	설탕 42g + rebA 0.187g + sucrose 49g	Milk tea base 1915.8g
70%	설탕 +rebA+aspartame (3: 3.5: 3.5)	설탕 42g + rebA 0.187g + aspartame 0.238g	Milk tea base 1887.8g
	설탕 +rebA+acesulfame-K (3: 3.5: 3.5)	설탕 42g + rebA 0.187g + acesulfame-k 0.204g	Milk tea base 1936.6g
	설탕+ rebA+saccharin (3: 3.5: 3.5)	설탕 42g + rebA 0.187g + saccharin 0.129g	Milk tea base 1936.6g
	설탕+ g-nhdc+ rebA (5: 1.5: 3.5)	설탕 70g + g-NHDC 0.178g + rebA 0.187g	Milk tea base 1936.7g

4.2.5. 시료 평가 절차 및 내용

- 모든 소비자는 7종의 밀크티시료를 평가하였음. 7종 밀크티의 평가 순서는 William's Latin Square 방법으로 정하여 제공하였음. 하나의 시료를 평가한후 다음 시료 평가하는 monadic방법을 사용함.
- 소비자는 시료를 맛본 후 시료의 전반적인 기호도, 맛과 향미, 뒷맛 기호도, 홍차향미 기호도, 홍차향미 강도, 단맛 기호도, 단맛 강도, 쓴맛 기호도 및 쓴맛강도를 9점 척도로 평가하였음. 또한 check-all-that-apply (CATA) 기법으로 시료에서 발현되는 좋은 점과 싫은 점을 평가하였음. CATA에 사용되는 특성은 아몬드 음료 시료에서 발현되는 감각적 속성과 감정적 속성으로 구성되었으며 각 시료를 맛본 후, 느낀 좋은 점과 싫은 점을 모두 고르게 하였음.
- 한 개의 시료에 대한 평가를 마친 후 다음 시료를 제시하며 시료와 시료 사이에는 물(삼다수 이용)로 입가심을 하게 하였음. 시료와 시료 사이의 간격은 약 6분이었음.

4.2.6. 통계분석

- 통계방법은 요구르트실험과 동일함. 7종 시료의 기호도(전반적인 기호도, 맛과 향미, 뒷맛 기호도, 홍차향미 기호도, 홍차향미 강도, 단맛 기호도, 단맛 강도, 쓴맛 기호도 및 쓴맛강도) 간의 유의적 차이를 검증하기 위해 일반선형모형을 이용한 분산분석을 실시하였음.
- CATA로 설문한 시료의 좋은 점과 싫은 점은 빈도분석을 이용하여 분석하였으며 평가 시료의 좋은 점과 싫은 점의 유의성을 검증하기 위해 교차분석을 실시하였음. 또한, 평가 시료 좋은 점과 싫은 점 선택 경향을 시각적으로 살펴보기 위해 대응분석(Correspondence analysis)를 실시하였음.
- 통계분석에는 IBM SPSS Statistics 26(SPSS Inc., Chicago, USA), R Statistical System 4.0.4 (R Development Core Team, 2011)을 사용하였음.

4.2.7. 연구결과

○ 밀크티 시료의 기호도 분산분석 결과

- 각 시료의 기호도 간의 유의적 차이를 검증하기 위하여 일반선형모형을 이용한 분산분석을 실시하였으며 그 결과는 Table I-73과 같음. 그 결과, 시료에서는 뒷맛 기호도 및 단맛강도의 유의적인 차이가 나타났으며 전반적 기호도, 맛과 향미 기호도, 홍차향미 기호도, 홍차향미 강도, 단맛 기호도, 쓴맛 기호도, 쓴맛 강도는 유의적인 차이를 보이지 않았다($p>.05$).

Table I-73. 시료의 기호도 및 특성 분산분석 결과

	기호도	F-value	P-value ¹⁾
시료	전반적인 기호도	1.399	0.213
	맛과 향미 기호도	0.85	0.532
	뒷맛 기호도	2.17	0.045*
	홍차향미 기호도	0.509	0.802
	홍차향미 강도	0.778	0.587
	단맛 기호도	2.021	0.062
	단맛 강도	5.712	0.000***
	쓴맛 기호도	0.392	0.884
	쓴맛 강도	1.875	0.084

1)*는 $p<0.05$, **는 $p<0.01$, ***는 $p<0.001$

○ 시료의 기호도 평균 및 표준편차 결과

- 7종 밀크티의 기호도 특성 평균과 표준편차는 다음 Table I-74과 같음.
- 시료의 전반적인 기호도 및 맛과향미 기호도는 Reb A+ sucrose가 control보다 높게 평가되었음. Reb A + acesulfame-k의 전반기호도는 가장 낮게 평가되었으며 Reb A+ aspartame의 맛과 향미 기호도는 가장 낮게 평가되었음.
- 뒷맛 기호도의 경우에는 Reb A + sucrose시료는 control과 같은 높은 점수로 평가되었으며 Reb A + aspartame 가장 낮은 점수를 보였음.
- 홍차 향미기호도의 경우에는 Reb A + sucrose시료 control보다 높게 평가되었으며 Reb A + aspartame 가장 낮은 점수로 평가되었음.
- 홍차향미의 기호도 경우에는 control보다 Reb A + acesulfame-k 가장 높게 평가되었으며 g-nhdc+ reb A는 가장 낮게 평가되었음.
- 단맛 기호도는 control 가장 높았으며 g-nhdc+ reb A 가장 낮은 점수를 보였음. 반면에 단맛강도의 경우에는 control시료가 가장 낮게 평가되었으며 g-nhdc+ reb A 시료가 가장 높게 평가되었음. 쓴맛 기호도 및 쓴맛 강도의 경우에는 Reb A + sucrose가 가장 낮게 평가되었으며 g-nhdc+ reb A가 가장 낮은 점수를 보였음.

Table 1-74. 각 시료의 평균 및 표준편차 결과

Milktea	Overall liking	Taste/flavor liking	Aftertaste liking	Black tea flavor liking	Intensity of black tea flavor	Sweet taste liking	Sweetness intensity	Bitter taste liking	Bitterness intensity
p-value	0.213	0.532	0.045*	0.802	0.587	0.062	0.000***	0.884	0.084
control	6.3±1.6	6.2±1.7	6.1±1.5 ^b	6.4±1.4	5.1±1.7	6.0±1.5	5.3±1.6 ^a	6.0±1.6	4.4±1.6
gnhdc+reb _A	5.8±2.0	5.9±1.9	5.4±1.9 ^a	6.2±1.5	4.7±1.7	5.0±2.0	6.7±1.5 ^c	5.9±1.5	4.0±1.7
gnhdc+suc	6.2±1.8	6.1±1.6	6.0±1.7 ^{ab}	6.3±1.5	5.1±1.7	5.7±1.6	5.7±1.4 ^{ab}	6.0±1.5	4.2±1.5
rebA+acek	5.7±2.0	5.9±1.8	5.7±1.7 ^{ab}	6.2±1.6	5.2±1.4	5.5±1.8	5.7±1.5 ^{ab}	6.0±1.8	4.6±1.6
rebA+aspt	6.0±1.6	5.8±1.6	5.4±1.7 ^a	6.2±1.5	4.9±1.7	5.5±1.6	6.1±1.4 ^b	5.9±1.6	4.5±1.5
rebA+sacc	5.8±1.6	5.9±1.6	5.7±1.7 ^{ab}	6.1±1.7	5.1±1.5	5.3±1.9	6.0±1.5 ^b	5.9±1.5	4.7±1.4
rebA+suc	6.4±1.6	6.3±1.6	6.1±1.5 ^b	6.5±1.4	4.8±1.4	5.7±1.7	5.7±1.3 ^{ab}	6.3±1.5	4.7±1.3

○ 시료의 좋은 점 분석 결과

- 시료의 좋은 점을 Check-All-That-Apply(CATA) 기법으로 평가함. CATA에 사용된 용어는 7종의 밀크티 시료에서 발현되는 감각적 속성과 감정적 속성 28개로 구성되었음.
- 각 시료의 좋은 점 선택 빈도와 퍼센트는 Table 1-75과 같으며 30% 이상 선택된 속성들은 다음과 같음.
- Control시료의 좋은 점으로는 색상(44.3), 단맛(36.1), 홍차 향미(42.6), 가벼운 맛(31.1), 조화로운 맛(32.8), 목 넘김이 부드럽다(37.7), 익숙/친숙해서 좋다(37.7), 부담 없는 맛(37.7)의 속성이 선택되었음.
- G-nhdc + reb A 조합된 시료의 좋은 점으로는 색상(45.9), 홍차 향미(47.5), 목 넘김이 부드럽다(45.9)의 속성이 선택되었음.
- G-nhdc + sucrose 조합된 시료의 좋은 점으로는 색상(49.2), 단맛(31.1), 홍차 향미(54.1), 조화로운 맛(36.1), 목 넘김이 부드럽다(39.3), 부담 없는 맛(34.4)의 속성이 선택되었음.
- Reb A +acesulfame-K 조합된 시료의 좋은 점으로는 색상(50.8), 단맛(31.1), 홍차 향미(45.9), 목 넘김이 부드럽다(32.8)의 속성이 선택되었음.
- Reb A+ aspartame 조합된 시료의 좋은 점으로는 색상(50.8), 단맛(34.4), 홍차 향미(39.3), 목 넘김이 부드럽다(42.6), 익숙/친숙해서 좋다(31.1), 부담 없는 맛(34.4)의 속성이 선택되었음.
- Reb A+ saccharin 조합된 시료의 좋은 점으로는 색상(45.9), 홍차 향미(63.9), 목 넘김이 부드럽다(34.4), 부담 없는 맛(32.8)의 속성이 선택되었음.
- Reb A+ sucrose 조합된 시료의 좋은 점으로는 색상(50.8), 홍차 향미(50.8), 조화로운 맛(37.7), 목 넘김이 부드럽다(36.1), 익숙/친숙해서 좋다(36.1), 부담 없는 맛(45.9)의 속성이 선택되었음. 조화로운 맛의 속성이 두드러지게 좋아하는 속성으로 분석되었음.
- 시료간의 좋은 점의 유의적 차이를 알아보기 위해 교차분석을 실시하였음. 그 결과, 조화로운 맛의 속성에서 유의적 차이가 있는 것으로 분석되었음.

Table I-75. 7종 밀크티의 좋은 점 결과

시료감각적 및 감정적 속성	P-value ¹⁾	control	gnhdc +rebA	gnhdc +suc	rebA +acek	rebA +aspt	rebA +sacc	rebA +suc
색상	0.979	27(44.3)	28(45.9)	30(49.2)	31(50.8)	31(50.8)	28(45.9)	31(50.8)
단맛	0.674	22(36.1)	17(27.9)	19(31.1)	19(31.1)	21(34.4)	13(21.3)	18(29.5)
쓴맛	0.619	4(6.6)	3(4.9)	7(11.5)	7(11.5)	3(4.9)	5(8.2)	7(11.5)
뒷맛	0.520	14(23)	6(9.8)	10(16.4)	11(18)	7(11.5)	10(16.4)	11(18)
홍차 향미	0.138	26(42.6)	29(47.5)	33(54.1)	28(45.9)	24(39.3)	39(63.9)	31(50.8)
우유 향미	0.476	8(13.1)	7(11.5)	11(18)	11(18)	5(8.2)	7(11.5)	12(19.7)
진한맛	0.451	3(4.9)	9(14.8)	8(13.1)	10(16.4)	8(13.1)	11(18)	7(11.5)
가벼운 맛	0.284	19(31.1)	13(21.3)	12(19.7)	8(13.1)	17(27.9)	13(21.3)	12(19.7)
조화로운맛	0.025	20(32.8)	12(19.7)	22(36.1)	16(26.2)	9(14.8)	13(21.3)	23(37.7)
입안감촉	0.185	16(26.2)	10(16.4)	7(11.5)	7(11.5)	14(23)	11(18)	15(24.6)
목넘김이 부드럽다	0.77	23(37.7)	28(45.9)	24(39.3)	20(32.8)	26(42.6)	21(34.4)	22(36.1)
땀은 감촉	0.849	2(3.3)	2(3.3)	2(3.3)	3(4.9)	2(3.3)	5(8.2)	2(3.3)
그냥좋다	0.443	5(8.2)	1(1.6)	3(4.9)	2(3.3)	2(3.3)	4(6.6)	6(9.8)
익숙/친숙해서 좋다	0.276	23(37.7)	12(19.7)	17(27.9)	18(29.5)	19(31.1)	14(23)	22(36.1)
새로워서좋다	0.246	0(0)	2(3.3)	0(0)	4(6.6)	1(1.6)	2(3.3)	1(1.6)
독특해서좋다	0.289	1(1.6)	5(8.2)	1(1.6)	3(4.9)	1(1.6)	4(6.6)	1(1.6)
중독성있다	0.562	8(13.1)	5(8.2)	8(13.1)	7(11.5)	4(6.6)	3(4.9)	8(13.1)
부담없는맛	0.087	23(37.7)	15(24.6)	21(34.4)	13(21.3)	21(34.4)	20(32.8)	28(45.9)
고급스러운맛	0.952	6(9.8)	4(6.6)	4(6.6)	6(9.8)	3(4.9)	5(8.2)	4(6.6)
만족스럽다	0.126	14(23)	5(8.2)	12(19.7)	12(19.7)	5(8.2)	8(13.1)	12(19.7)
갈증이해소된다	0.342	10(16.4)	5(8.2)	8(13.1)	4(6.6)	10(16.4)	8(13.1)	4(6.6)
전문점에서 만든 것 같다	0.127	12(19.7)	8(13.1)	5(8.2)	8(13.1)	2(3.3)	7(11.5)	5(8.2)
건강에 좋을것같다	0.695	2(3.3)	2(3.3)	1(1.6)	1(1.6)	3(4.9)	3(4.9)	0(0)
더 먹고싶다	0.147	13(21.3)	6(9.8)	14(23)	15(24.6)	8(13.1)	8(13.1)	15(24.6)
기분이 좋아진다	0.689	12(19.7)	5(8.2)	9(14.8)	9(14.8)	8(13.1)	11(18)	9(14.8)
인공적이지 않다	0.121	10(16.4)	3(4.9)	6(9.8)	3(4.9)	3(4.9)	2(3.3)	3(4.9)
이국적이다	0.331	2(3.3)	4(6.6)	1(1.6)	6(9.8)	1(1.6)	2(3.3)	2(3.3)
좋은점이 없다	0.253	5(8.2)	6(9.8)	1(1.6)	4(6.6)	1(1.6)	2(3.3)	2(3.3)

1) Pearson 카이제곱의 유의확률을 나타냄. 5보다 작은 기대 빈도를 가지는 항목이 있는 경우 Fisher의 정확검정 값을 나타냄. 유의확률 0.05 수준에서 유의적 차이가 있는 경우 굵은 글씨로 표시하였음

2) N= 61

○ 시료의 싫은 점 분석 결과

- 시료의 싫은 점을 Check-All-That-Apply(CATA) 기법으로 평가하였다. CATA에 사용된 용어는 7종의 밀크티 시료에서 발현되는 감각적 속성과 감정적 속성 31개로 구성되었다.
- 평가 시료 개수에 따른 타겟 시료의 싫은 점 선택 빈도와 퍼센트는 Table 1-76와 같으며 30% 이상 선택된 속성들은 다음과 같음.
- Control 시료의 싫은 점은 없음.
- G-nhdc + reb A 조합된 시료의 싫은 점으로는 강한 단 맛(47.5), 인공적인 단맛(42.6)의 속성이 선택되었음. 강한 단맛, 부담스러운 맛, 만족스럽지 않다, 건강에 나쁠 것 같다, 더 먹고 싶지 않다는 속성이 두드러지게 싫어하는 속성으로 분석되었음.
- G-nhdc + sucrose 조합된 시료의 싫은 점으로는 강한 단 맛(32.8)의 속성이 선택되었음.
- Reb A + acesulfame-K 조합된 시료의 싫은 점으로는 인공적인 단맛(31.1)의 속성이 선택되었음.
- Reb A+ aspartame 조합된 시료의 싫은 점으로는 인공적인 단맛(47.5)의 속성이 선택되었음. 인공적인 단맛의 속성이 두드러지게 싫어하는 속성으로 분석되었음.
- Reb A+ saccharin 조합된 시료의 싫은 점으로는 인공적인 단맛(36.1)의 속성이 선택되었음.
- Reb A+ Sucrose 시료의 싫은 점은 없음.
- 시료간의 싫은 점의 유의적 차이를 알아보기 위해 교차분석을 실시하였음. 그 결과, 강한 단맛, 인공적인 단맛, 부담스러운 맛, 만족스럽지 않다, 건강에 나쁠 것 같다, 더 먹고 싶지 않다는 등의 속성에서 유의적 차이가 있는 것으로 분석되었음.

Table I-76. 7종 밀크티의 싫은 점 결과

시료 감각적 및 감정적 속성	P-value ¹⁾	control	gnhdc +rebA	gnhdc +suc	rebA +acek	rebA +aspt	rebA +sacc	rebA +suc
색상	0.32	0(0)	1(1.6)	2(3.3)	1(1.6)	0(0)	0(0)	3(4.9)
강한 단 맛	0.004	8(13.1)	29(47.5)	20(32.8)	17(27.9)	17(27.9)	18(29.5)	14(23)
강한 쓴 맛	0.106	3(4.9)	1(1.6)	2(3.3)	7(11.5)	6(9.8)	5(8.2)	1(1.6)
인공적인 단맛	0.002	12(19.7)	26(42.6)	12(19.7)	19(31.1)	29(47.5)	22(36.1)	14(23)
진한 맛	0.4	1(1.6)	3(4.9)	1(1.6)	1(1.6)	0(0)	4(6.6)	2(3.3)
뒷맛	0.057	7(11.5)	16(26.2)	9(14.8)	15(24.6)	17(27.9)	8(13.1)	8(13.1)
조화롭지 않은 맛	0.656	4(6.6)	9(14.8)	5(8.2)	7(11.5)	8(13.1)	7(11.5)	4(6.6)
이상한 맛/냄새	0.281	5(8.2)	1(1.6)	2(3.3)	3(4.9)	3(4.9)	4(6.6)	0(0)
약한 단 맛	0.372	3(4.9)	1(1.6)	3(4.9)	3(4.9)	1(1.6)	0(0)	4(6.6)
약한 쓴 맛	0.876	5(8.2)	4(6.6)	4(6.6)	2(3.3)	4(6.6)	6(9.8)	3(4.9)
느끼한 맛	0.712	2(3.3)	4(6.6)	4(6.6)	2(3.3)	2(3.3)	1(1.6)	1(1.6)
가벼운 맛	0.172	11(18)	5(8.2)	6(9.8)	6(9.8)	5(8.2)	4(6.6)	2(3.3)
홍차향미	0.473	2(3.3)	1(1.6)	5(8.2)	5(8.2)	3(4.9)	4(6.6)	6(9.8)
우유향미	0.209	5(8.2)	1(1.6)	4(6.6)	7(11.5)	4(6.6)	5(8.2)	1(1.6)
입안 감촉	0.367	3(4.9)	2(3.3)	5(8.2)	2(3.3)	0(0)	4(6.6)	2(3.3)
잔여감	0.572	6(9.8)	10(16.4)	14(23)	12(19.7)	10(16.4)	10(16.4)	8(13.1)
땀은 감촉	0.609	12(19.7)	5(8.2)	9(14.8)	12(19.7)	9(14.8)	8(13.1)	10(16.4)
그냥 싫다	1	1(1.6)	1(1.6)	1(1.6)	0(0)	1(1.6)	1(1.6)	0(0)
익숙/친숙하지 않다	0.744	1(1.6)	2(3.3)	2(3.3)	0(0)	3(4.9)	3(4.9)	2(3.3)
너무 새롭다	—	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)
너무 독특하다	0.39	2(3.3)	2(3.3)	0(0)	1(1.6)	3(4.9)	3(4.9)	0(0)
질린다	0.761	3(4.9)	8(13.1)	4(6.6)	6(9.8)	4(6.6)	5(8.2)	4(6.6)
부담스러운맛	0.003	1(1.6)	9(14.8)	4(6.6)	6(9.8)	0(0)	5(8.2)	1(1.6)
저렴한맛	0.286	10(16.4)	9(14.8)	6(9.8)	4(6.6)	13(21.3)	7(11.5)	10(16.4)
만족스럽지 않다	0.04	7(11.5)	13(21.3)	1(1.6)	12(19.7)	9(14.8)	7(11.5)	10(16.4)
갈증이 해소되지 않는다	0.968	2(3.3)	2(3.3)	3(4.9)	4(6.6)	4(6.6)	4(6.6)	3(4.9)
건강에나쁠것같다	0	1(1.6)	15(24.6)	7(11.5)	2(3.3)	7(11.5)	4(6.6)	5(8.2)
더 먹고싶지 않다	0.012	4(6.6)	16(26.2)	4(6.6)	12(19.7)	9(14.8)	12(19.7)	6(9.8)
기분이나빠진다	0.335	3(4.9)	6(9.8)	1(1.6)	5(8.2)	3(4.9)	4(6.6)	1(1.6)
매스껍다/역겹다	0.735	1(1.6)	0(0)	0(0)	1(1.6)	2(3.3)	2(3.3)	2(3.3)
싫은점이없다	0.239	15(24.6)	6(9.8)	12(19.7)	6(9.8)	9(14.8)	12(19.7)	11(18)

1) Pearson 카이제곱의 유의확률을 나타냄. 5보다 작은 기대 빈도를 가지는 항목이 있는 경우 Fisher의 정확검정 값을 나타냄. 유의확률 0.05 수준에서 유의적 차이가 있는 경우 굵은 글씨로 표시하였음

2) N=61

○ 시료의 좋은 점, 싫은 점 시각적 도표화

- 각 시료에 따라 CATA로 설문한 시료의 좋은 점과 싫은 점을 시각적으로 도표화하기 위해 대응분석(CA, Correspondence Analysis)을 실시한 결과는 Figure I-25와 같음.
- 대응분석에 사용한 좋은 점, 싫은 점 속성은 패널 30% 이상이 선택한 모든 속성을 포함하여 분석하였음. 그 결과, 성분 1(Dim 1)이 57.32%, 성분 2(Dim 2)가 22.95%를 설명하는 것으로 나타났음.
- Control는 주성분 1의 양의 방향, 성분 2의 양의 방향에 위치하며 좋은 점으로 익숙/친숙해서 좋다, 부담없는 맛, 가벼운 맛, 단맛의 선택 빈도가 높았음.
- 주성분 1의 양의 방향, 성분 2의 음의 방향에 위치한 Reb A + sucrose는 좋은 점으로 조화로운 맛 특성의 선택 빈도가 높았으며 같은 방향의 위치한 g-nhdc + sucrose의 경우 좋은 점으로 홍차향미와 조화로운 맛 특성의 선택 빈도가 높았음.

- 주성분 1의 음의 방향, 성분 2의 양의 방향에 위치한 Reb A+ aspartame는 싫은 점으로 인공적인 단맛 특성의 선택 빈도가 높았음.
- 주성분 1의 음의 방향, 성분 2의 음의 방향에 위치한 Reb A + acesulfame-k와 Reb A+ saccharin는 좋은 점으로 목 넘김이 부드럽다, 색상, 홍차향미 특성의 선택 빈도가 높았으며 g-nhdc + Reb A의 경우 싫은 점으로 강한 단맛은 특성의 선택 빈도가 높았음.

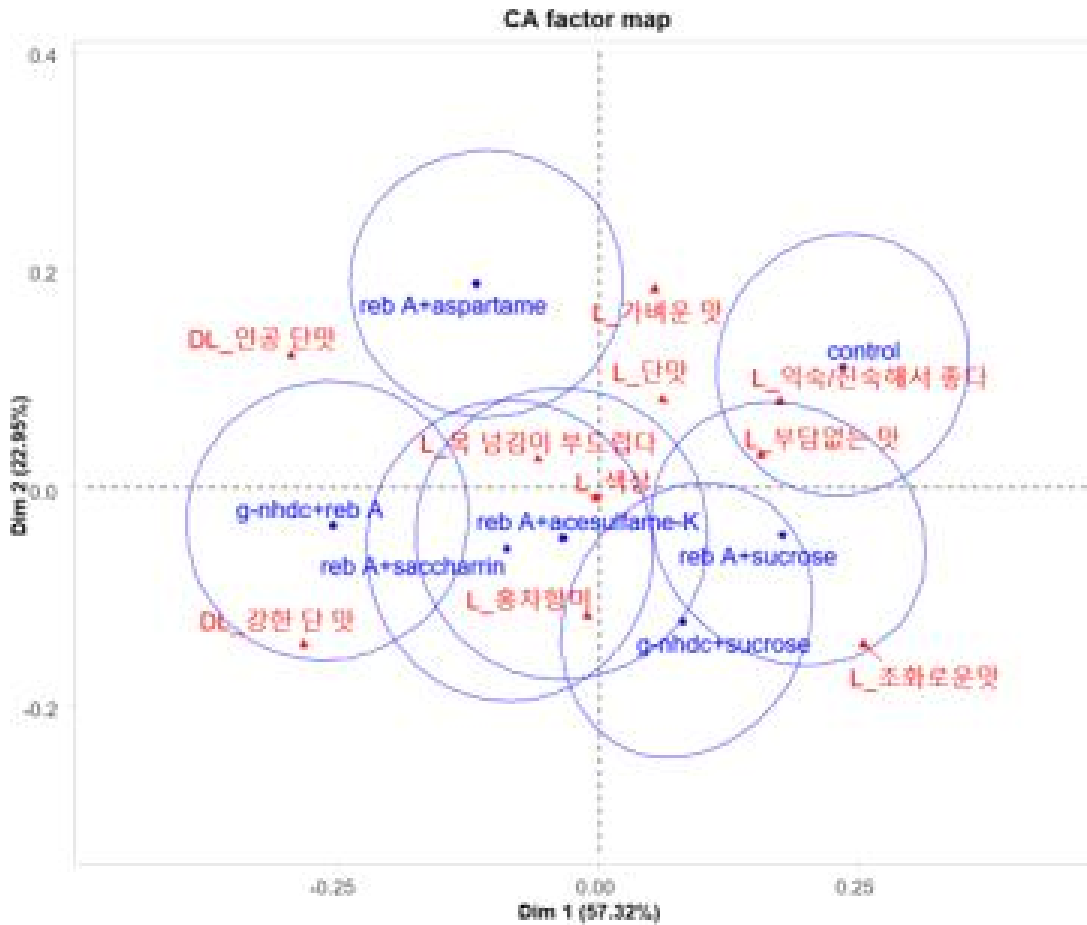


Figure I-25. 밀크티 시료의 좋은 점, 싫은 점 시각적 도표화

5. 신규 감미료를 당류 50% 저감 수준으로 적용한 최저 당 함량 제품 도출

5.1. 연구목적

- Table top 설탕을 대체할 수 있는 NHDC 당전이체와 Reb A 또는 Sucrose를 조합하여 table-top sweetener를 개발하고 이에 대한 소비자 기호도 조사를 실시함.

5.2. 실험방법

- 본 실험에서는 NHDC 당전이체와 Reb A 또는 저열량 감미료 조합을 선정하여 당 함량 기준을 기존 대비 15%~50% 저감할 할 수 있도록 table-top sweetener 조합하여 식빵을 동반 식품으로 하여 소비자 기호도 조사 실시함.

5.3. 검사요원

- 패널은 평소 감미소재 및 비소화성 maltodextrin에 대한 알레르기가 없는 만 19세 이상 40대의 여성을 대상으로 이화여자대학교 온라인 게시판에 모집 공고문을 업로드하여 모집하였음.
- 만 20세부터 41세까지의(평균 25, 표준편차 4.2) 총 59명의 패널이 소비자 기호도 분석 실험에 참여하였음.

5.4. 시료

- 본 연구에서 총3종의 table-top sweetener시료와 동반 음식-식빵을 평가하였음.
- 저감 시료의 감미료혼합물 당 함량 기준은 control시료 대비 30%-50% 저감하였음.
- 혼합감미료는 NHDC 당전이체, G-Rebaudioside A 및 Sucrose를 시료로 사용하였음(Table I-77).

Table I-77. 실험용 재료

Ingredients	Manufacturer
곰곰 우유식빵	(주) 아워홈, 충남 계룡시
Maltodextrin	(주) 대상, 전북 군산시
Sucrose	CJ CheilJedang Co., Ltd., Korea
G NHDC	제 2세부에서 제작
Rebaudioside A	CJ CheilJedang Co., Ltd., Korea

- g-NHDC 와 고감미소재 (Rebaudioside A) 2성분 조합으로 control 대비 50% 저감하여 maltodextrin에 적용하여 table-top sweetener 만들었음.
- 또한, g-NHDC 와 bulk감미 소재 (Sucrose) 2성분 조합으로 control 대비 30% 저감하여 maltodextrin에 적용하여 table-top sweetener 만들었음 (Table I-78).

Table I-78. Table-top sweetener 제조한 레시피

저감	Sample (ratio)	설탕 100%/100g 기준	
0%	Control	설탕 100g	
50%	설탕+g-nhdc+reb A (5: 1.5: 3.5)	설탕 50g + g-NHDC 0.127g + reb A 0.151g	Maltodextrin 49.721g
30%	설탕+g-nhdc (7:3)	설탕 70g + g-NHDC 0.254g	Maltodextrin 29.745g

- 시료를 만드는 방법은 Maltodextrin과 감미료혼합물을 mixer에 넣고 Mixer 1단계 40초 돌리고, 시료컵에 담아서 냉장고에 보관하였음. 한 시료 제공량은 2.8g-3.2g이었음.
- 동반 평가하는 식빵 준비할 때는 오븐 240도에서 10분간 예열하고, 식빵은 240도 5분 동안 오븐에 4장을 넣고 2.5분후에 한 번 뒤집힌 후에 토스토 만들었음. 한 시료 3조각 제공하였음.

5.5. 시료 평가 절차 및 내용

- 모든 소비자는 3종의 table-top sweetener 시료와 식빵을 평가하였음. 3종 table-top sweetener의 평가 순서는 무작위방법으로 정하여 제공하였음. 하나의 시료를 평가한 후 다음 시료 평가하는 monadic방법을 사용하였음.
- 소비자는 시료를 맛본 후 시료의 전반적인 기호도, 단맛, 단맛 강도, 인공적인 단맛 강도, 쓴맛 강도, 떫은맛강도 및 뒷맛을 9점 척도로 평가하였음.

- 한 개의 시료에 대한 평가를 마친 후 다음 시료를 제시하며 시료와 시료 사이에는 무염 크래커 (Carr's original table water, CARR'S OF CARLISLE Ltd., England)와 물(삼다수 이용)로 입가심을 하게 하였음. 시료와 시료 사이의 간격은 약 5분이었음.

5.6. 통계분석

- 통계방법은 3종 시료의 기호도(전반적인 기호도, 단맛, 단맛 강도, 인공적인 단맛 강도, 쓴맛 강도, 짙은맛강도 및 뒷맛) 간의 유의적 차이를 검증하기 위해 일반선형모형을 이용한 분산분석을 실시하였음.
- 통계분석에는 IBM SPSS Statistics 26(SPSS Inc., Chicago, USA)을 사용하였음.

5.7. 연구 결과

5.7.1. table-top sweetener의 기호도 분산분석 결과

- 각 시료의 기호도 간의 유의적 차이를 검증하기 위하여 일반선형모형을 이용한 분산분석을 실시하였으며 그 결과는 Table 1-79과 같음. 그 결과, 시료에서는 단맛강도, 쓴맛 강도와 뒷맛은 유의적인 차이가 나타났으며 인공적인 단맛, 단맛, 인공적인 단맛강도, 쓴맛 강도 및 짙은 맛 강도는 유의적인 차이가 나타나지 않았다($p > .05$).

Table 1-79. 시료의 기호도 및 특성 분산분석 결과

		기호도	F-value	P-value ¹⁾
시료	전반적 기호도_감미료		2.003	0.138
	단맛		1.814	0.166
	단맛 강도		9.628	0.000***
	인공적인 단맛_강도		0.206	0.814
	쓴맛 강도		1.810	0.167
	짙은맛 강도		0.882	0.416
	뒷맛		4.605	0.011*

1)*는 $p < 0.05$, **는 $p < 0.01$, ***는 $p < 0.001$

5.7.2. table-top sweetener의 기호도 평균 및 표준편차 결과

- 3종 시료의 기호도 및 특성 평균과 표준편차는 다음 Table 1-80과 같음. 시료의 단맛 전반적인 기호도, 단맛, 단맛강도, 인공적인 단맛강도, 뒷맛에는 모든 시료 control보다 약간 낮게 평가되었으며 reb A + sucrose 가장 낮은 점수로 평가하였음.
- 쓴맛 강도는 Reb A + Sucrose 가장 높았으며, Control은 가장 낮은 점수를 보였음.
- 짙은 맛 강도는 Reb A + Sucrose 가장 높았으며, g-nhdc + sucrose는 가장 낮은 점수를 보였음.

Table I-80. 각 시료의 평균 및 표준편차 결과

	전반적기호도 -단맛	단맛	단맛강도	인공적인 단맛-강도	쓴맛 강도	떫은맛 강도	뒷맛
P-value	0.138	0.166	0.000***	0.814	0.167	0.416	0.011*
control	6.5±1.4	6.4±1.5	6.2±1.3 ^b	4.9±1.8	1.7±1.1	2.2±1.8	6.0±1.4 ^b
suc+g-nhdc +rebA	6.3±1.4	6.4±1.3	5.5±1.6 ^a	4.8±1.6	2.1±1.8	2.1±1.7	5.3±1.5 ^a
suc+g-nhdc	6.0±1.6	6.0±1.5	5.0±1.8 ^a	4.6±1.9	2.2±2.0	2.5±1.9	5.2±1.4 ^a

- 1) 유의확률 0.05 수준에서 유의적 차이가 있는 경우 굵은 글씨로 표시하였음.
- 2) 기호도 및 특성의 최소값과 최대값은 다른 색깔로 표시하였음.

5.7.3. 동반 식빵과 시료 같이 평가하는 전반적인 기호도 평균과 표준편차 결과

- 각 시료의 전반적 기호도 간의 유의적 차이를 검증하기 위하여 일반선형모형을 이용한 분산분석을 실시하였으며 그 결과는 Table I-81과 같음. 그 결과, 시료간에 전반적 기호도 유의적인 차이가 나타나지 않았음($p>.05$).

Table I-81. 동반 식빵과 시료 같이 평가하는 전반적인 기호도

P-value	0.226
Control + 식빵	6.6±1.4
suc+g-nhdc+reb A	6.3±1.4
suc+g-nhdc	6.2±1.4

II. 제 2세부 연구기관 (서울대학교)

[1차년도]

1. 바이오전환기술을 이용한 신규 고감미료 NHDC 당전이체 개발

1.1. 효소 및 기질 선별을 통한 효율적 생합성 조건 탐색

1.1.1. 연구방법

○ 상업적으로 판매되는 cyclodextrin glycosyltransferase(CGTase)인 Toruzyme[®] (Novozyme) 및 maltogenic amylase (Sigma Aldrich)의 효소 2종과 α -cyclodextrin(CD), β -CD, maltotriose, rice starch (일품벼)의 기질 4종을 탐색하여 NHDC 당전이체를 효율적으로 합성할 수 있는 효소 및 기질을 선별함.

○ 효소반응은 55℃에서 실시하였고, 10% ethanol을 포함한 10mM sodium citrate buffer를 이용하여 pH 6에서 각각 1, 3, 6, 24, 48, 72 시간 동안 반응하여 NHDC 당전이체의 합성 추이를 조사함.

○ 효소 반응 시 기질 종류 및 기질에 따른 NHDC 당전이체 생합성 조사는 NHDC 3%와 5%, α -CD, β -CD 및 rice starch 1%와 2%를 사용하고, 40ml 반응액에 대하여 Toruzyme 및 maltogenic amylase 60ul를 사용함. 또한 효소량에 따른 당전이체 생합성을 비교하기 위해서는 CGTase를 5배 사용하여 결과를 비교분석함.

○ NHDC 당전이체의 검출은 HPLC-PAD system(Waters 2695, PDA detector)를 사용하고, column은 J'sphere ODS-H80(YMC), UV 280nm에서 검출함. 용매는 acetonitrile(ACN)과 10mM H₃PO₄를 1mL/min속도로 사용하였고, ACN 농도를 0-2min 20%, 3min에 25%, 13min에 30%, 14min에 100%로 조절하여 생성된 다수의 NHDC 당전이체를 고농도에서도 효율적으로 용리할 수 있는 검출조건을 확립함.

1.1.2. 연구결과

○ CGTase 및 maltogenic anylase를 이용한 NHDC 당전이체 합성

- Figure II-1에 나타난 바와 같이 3% NHDC 및 1% α -CD를 기질로 하였을 때 NHDC의 당전이체는 약 6종 생성됨을 알 수 있었으며, 이중 NHDC와 가장 가깝게 나타나는 당전이체가 주된 합성 물질로 72시간까지 반응 중 지속적으로 증가함을 알 수 있음.
- 반면 maltosyl unit을 NHDC에 부가할 것으로 생각되었던 maltogenic amylase의 경우 maltotriose, β -CD 및 전분 등의 기질을 사용하여 72시간 반응시켰을 경우에도 전혀 당전이체를 합성하지 않는 것으로 나타남(Figure II-2). 따라서 향후 연구는 Toruzyme을 이용한 NHDC 당전이체 생합성을 위주로 진행함.

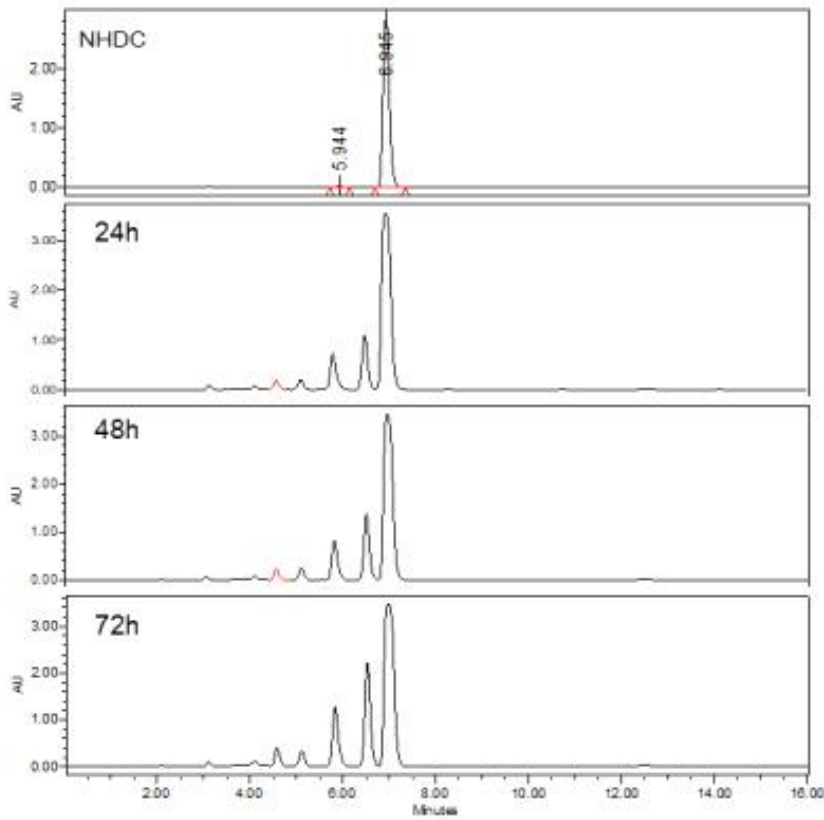


Figure II-1. Transglycosylation profile of NHDC using CGTase at 0, 24, 48 and 72h reaction.

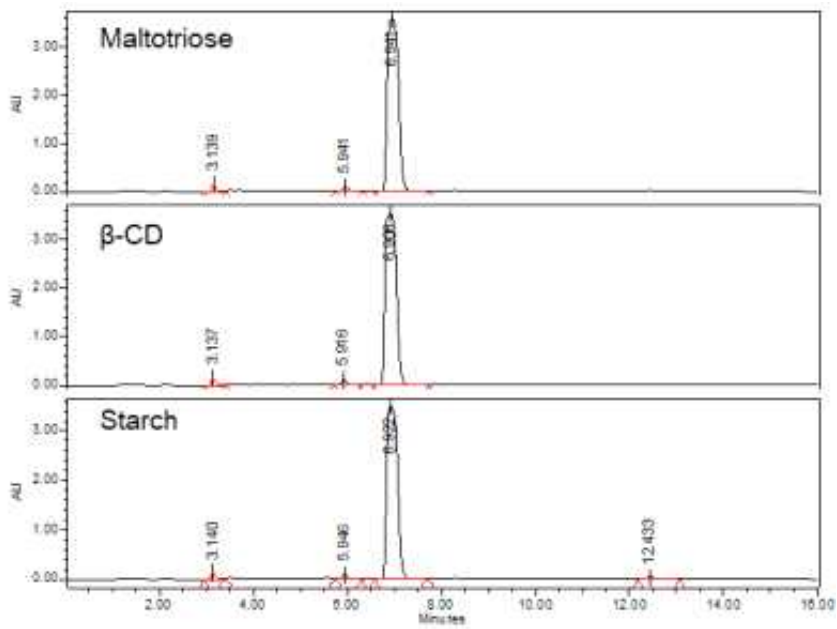


Figure II-2. Transglycosylation of NHDC using maltogenic amylase with various substrates after 72h reaction.

- CGTase 및 효소반응시간, 기질의 농도와 비율, 효소/기질의 비율에 따른 NHDC 당전이체의 생성
 - α -CD, β -CD 및 rice starch 등 기질에 따른 CGTase의 NHDC 당전이체 생성은 Figure II-3에 나타냄. 세 종류의 기질 모두에서 4종의 주된 당전이체가 생합성됨을 알 수 있었으며 기질에 따라 4종의 당전이체 생성 양상은 조금씩 다르게 나타남.
 - 주요하게 생성되는 peak a의 당전이체는 기질 농도 및 반응 시간이 같은 조건일 때 α -CD 및 β -CD가 다소 높게 나타났으나 (Table II-1), kg당 가격이 저렴한 중국산의 경우에도 α -CD 약 200달러, β -CD 약 150 달러임을 감안하면 전분을 기질로 사용하는 것은 가격 경쟁력에 있어 매우 뛰어나. 따라서 전분을 glucose 공여체로 하여 NHDC 당전이체 생합성을 증진하는 조건을 확립하고 향후 연구에 활용하는 것을 일차적으로 고려함.

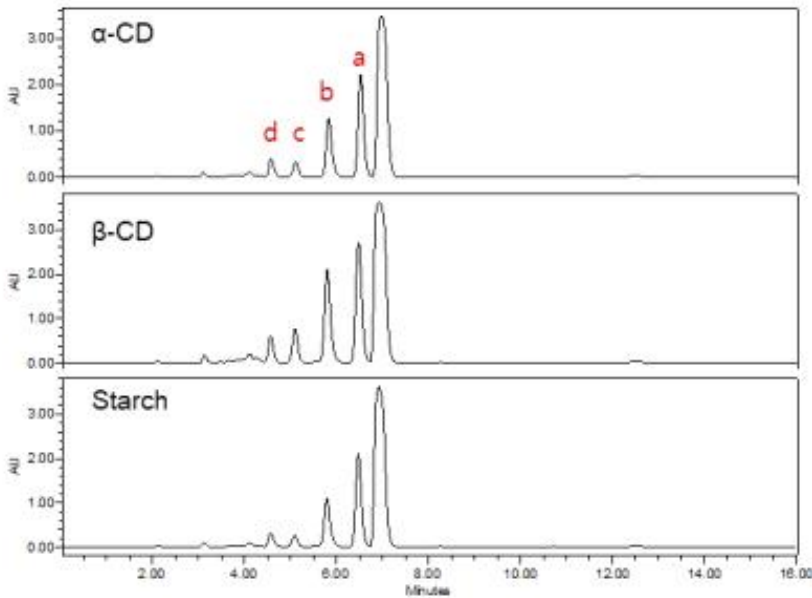


Figure II-3. Transglycoslation of NHDC using CGTase with various substrates at 72h reaction.

- NHDC와 glucose 공여체 비율에 따른 NHDC 당전이체 생합성 profile은 Figure II-4에 나타냄. 이전 연구 결과를 바탕으로 glucose 공여체의 농도는 NHDC농도보다 낮게 하고, NHDC와 glucose 공여체의 비율을 선정함. 향후 대량 합성 공정에 활용하는 것이 가능하도록 NHDC 농도를 3, 5%로 가급적 높게 하고 기질이 되는 α -CD, β -CD 및 쌀전분의 양을 1, 2%로 하여 비율을 달리하였을 때 NHDC 농도에 따라 당전이체의 생성량이 유의적으로 증가하였으나, glucose 공여체인 α -CD, β -CD 및 전분의 양이 2배로 증가되어도 유의적인 증가는 없는 것으로 나타남. 따라서 효소량을 현 수준으로 유지한다면 향후 반응에서의 NHDC와 glucose 공여체의 비율은 공정상의 편의에 따라 5:1 정도로 결정하는 것이 적절하다고 사료되었음.

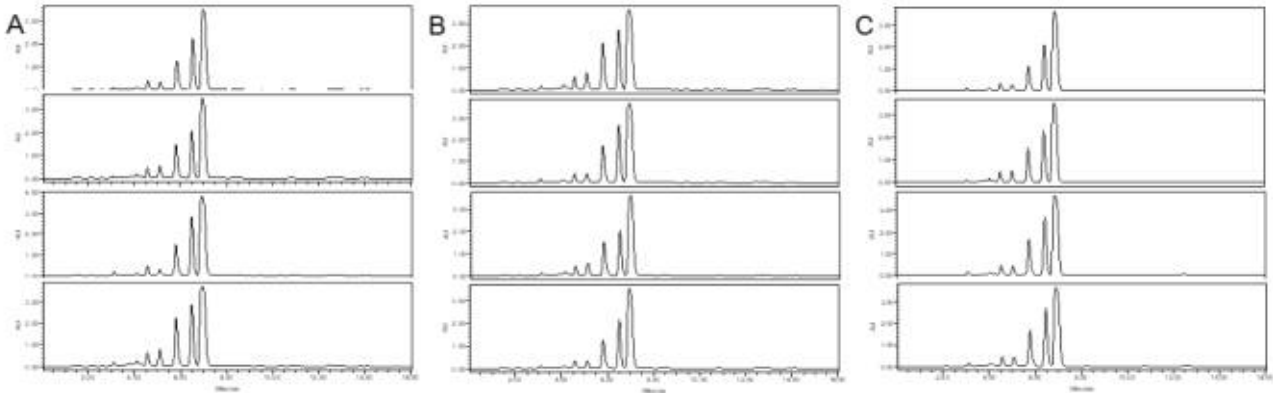


Figure II-4. Transglycosylation of NHDC using CGTase with different substrates and concentrations(ratios) at 72h reaction. From top to bottom: NHDC : glucose donor =3:1, 3:2, 5:1, 5:2. Glucose donor: A. α -CD; B. β -CD; C. rice starch.

○ CGTase와 기질의 비율에 따른 NHDC 당전이체의 생성

- 효소인 CGTase와 기질인 NHDC 수용체, glucose 공여체의 비율을 달리하여 반응을 시켰을 때 효소의 증가는 NHDC 당전이체 합성을 현저히 증가시킴(Table II- 1). 특히 효소의 비율이 낮은 경우 glucose 공여체의 양이 당전이체 생합성에 영향을 미치지 못하였으나(Figure II-4, Table II- 1), 효소 비율이 증가할 경우 glucose 공여체의 증가 시 당전이체의 생합성이 현저히 증가하는 것으로 나타남.

○ NHDC 당전이체 생합성 전환율 60%의 효소반응 조건의 확립

- 위의 다양한 효소 반응 조건으로부터 NHDC 10%와 각각 α -CD, β -CD 및 rice starch 3%를 적용하고 반응액 40ml 당 300ul의 Toruzyme을 첨가하여 72시간 반응하였을 때 각각 59.9, 61.0 및 58.6의 NHDC 당전이체 생합성율을 얻어 효율적인 생합성 조건을 확립함.

Table II-1. Conversion rate of NHDC (5%) to glycosylated NHDCs using CGTase with different enzyme substrate ratio at 48h reaction.

Toruzyme (ul)	Conversion rate (%)					
	α -CD (%)		β -CD (%)		Rice starch (%)	
	1	2	1	2	1	2
60	31.67	33.57	32.62	33.86	30.33	32.46
300	32.22	37.02	30.91	35.64	28.58	39.65

1.2. Preparative HPLC를 이용한 고순도 NHDC 당전이체 분리, 정제 조건 확립

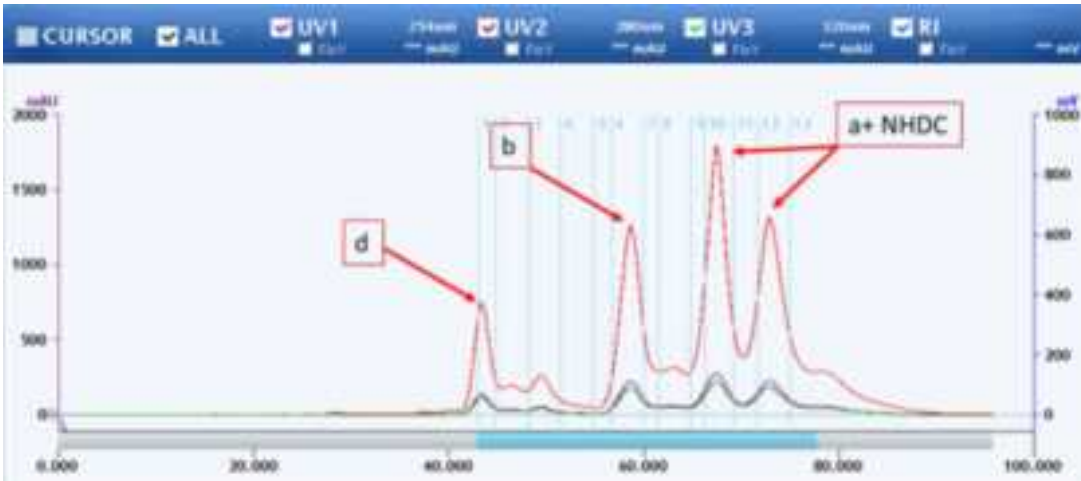
1.2.1. 연구방법

- NHDC와 α -CD의 CGTase 효소 반응액으로부터 다양한 NHDC 당전이체의 효율적인 분리정제 조건을 확립하기 위하여 80℃에서 진공농축한 후 여과한 후 recycling preparative HPLC (LC-Forte, YMC Inc., Japan) 및 YMC-Actus C₁₈ column (20 × 500 mm, YMC Inc., Japan)을 사용하여 분리함. 이동상은 28% acetonitrile을 isocratic 모드로 30 mL/min의 유속으로 사용하여 UV 280 nm에서 검출함. 수집된 분획을 동결건조한 후 상기 Waters 2695 HPLC 및 PDA detector를 이용하여 순도를 확인함.

1.2.2. 연구결과

○ Figure II-5A 크로마토그램에 나타난 바와 같이 첫 번째 cycle에서 peak b와 d를 분리하였으며, Figure II-4B의 두 번째 cycle에서 peak a를 기질인 NHDC와 분리하여 순도를 분석함. 분리정제된 a, b, d peak의 순도는 각각 99.06, 99.35 및 98.84%였으며 이를 LC-MS를 이용한 구조 동정을 위한 시료로 사용함.

A.



B.

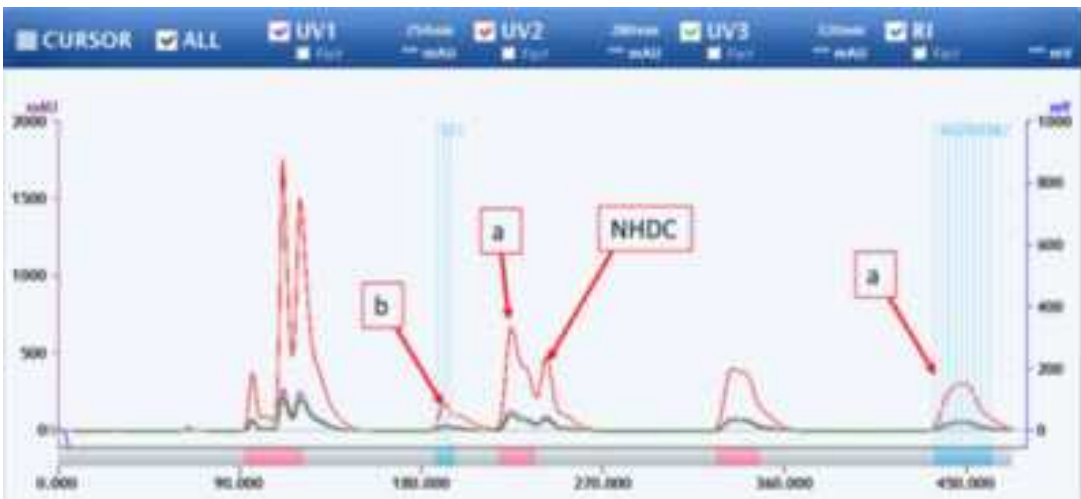


Figure II-5. Recycling preparative HPLC chromatogram of CGTase reaction solution of NHDC and α -CD. First(A) and second(B) cycle, respectively.

1.3. LC-MS를 이용한 NHDC 당전이체의 구조 동정

1.3.1. 연구방법

- NHDC 당전이체의 동정은 LCsystem(Ultimate 3000 RS system (Thermo fisher scientific Inc.))를 사용함. 용매로는 0.1% formic acid를 포함한 ACN을 0.2mL/min의 유속으로 사용함. 시료는 column을 사용하지 않고 직접 주입하였으며 LTQ(Thermo fisher scientific Inc.)를 사용하여 electrospray ionization 방식으로 분자량을 분석하였고 source voltage는 3.5kV, negative mode를 적용하여 100~2000m/z 범위를 full scan함.

1.3.2. 연구결과

- NHDC 및 이의 α -CD와 CGTase 효소 반응 후 preparative HPLC를 사용하여 분리정제한 주 당전이체 중 3종의 LC-MS chromatogram은 Figure II-6에 나타냄. 분자량이 612인 NHDC는 negative mode로 분석하여 분자량이 1 감소된 m/z 611이 주 피크로 나타났으며, m/z 1223인 이량체와 1834인 삼량체도 소량 존재하는 것으로 보임(Figure II-6A). 특이적으로 단량체, 이량체 및 삼량체 모두 분자량 36의 adduct가 존재하는 것으로 나타났으며 이는 생산 시 부가된 염 등으로 사료됨. 이 물질에 대해서는 향후 연구를 위하여 이온 분석 등을 추가로 진행할 계획임.
- CGTase 당전이 반응의 주산물인 peak a(Figure II-6A insert)의 LC-MS spectra는 주된 peak가 m/z 773.8 및 이에 +36이 로 나타나 glucose 한 분자가 NHDC에 부가된 형태로 나타났으며, NHDC에 존재하는 glucose moiety에 CGTase의 주 반응인 α -1,4형태로 glucose 한 분자가 부가된 형태(+162)로 사료됨(Figure II-6B).
- CGTase 당전이 반응의 산물 중 peak b(Figure II-6A insert)의 LC-MS spectra는 주된 peak가 m/z 935.6 및 이에 +36의 분자량을 가지는 m/z 991로 나타났으며, CGTase 반응에 의해 2분자의 glucose 즉 maltose 가 NHDC의 glucose moiety에 부가된 물질로 사료됨(Figure II-6C). 이 chromatogram에서 m/z 773.8 peak가 상당히 크게 나타난 것은 ionization voltage에 의해 일부 glucose 한 분자가 떨어져 나가 생긴 분해물의 peak로 여겨짐. 따라서 m/z 935.6의 peak이 상대적으로 적게 나타난 것은 이의 상당량이 분해되어 m/z 773.8로 나타난 것에서 기인함.
- CGTase 당전이 반응의 주산물인 peak c(Figure II-6A insert)의 LC-MS spectra는 주된 peak가 m/z 773.8 및 이에 +36의 분자량을 가지는 m/z 809로 나타나 glucose 한 분자가 NHDC에 부가된 물질로 나타남. CGTase는 주 반응인 α -1,4형태의 당전이 산물 이외에 α -1,3형태의 산물을 소량 만드는 것으로 알려져 있으며, 따라서 peak d는 NHDC의 glucose moiety에 α -1,3로 glucose 한 분자가 부가된 물질로 사료됨(Figure II-6D).
- Peak a, b, d의 구조에 대한 검증은 NHDC 및 α -CD의 CGTase 당전이 반응물에 exo type의 amylase인 glucoamylase를 처리하여 실시함. Glucoamylase처리 후 glucose peak b에 전이된 maltosyl unit중 한 분자의 glucose는 대부분 분해되어 peak b는 현저히 감소되고 peak a가 상당량 증가된 반면, peak d의 경우 변화가 없는 것을 통해 위에서 동정된 각 분자의 구조가 검증됨(Figure II-7).

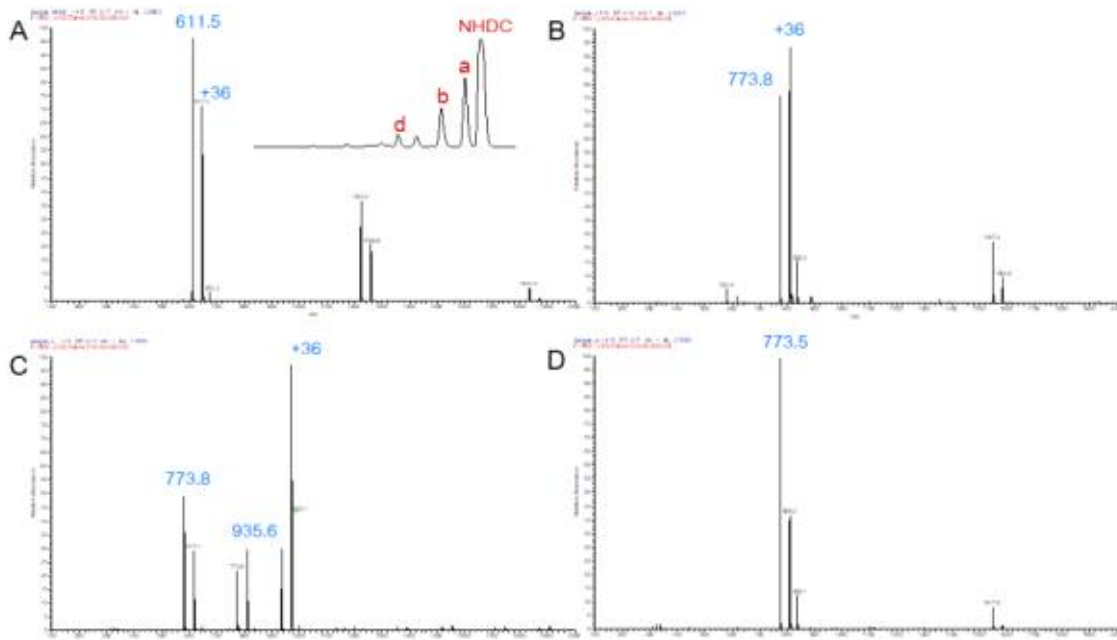


Figure II-6. LC/MS spectra of NHDC(A) and glycosylated NHDC peak a(B), peak b(C) and peak d(D) of the inserted chromatogram in A.

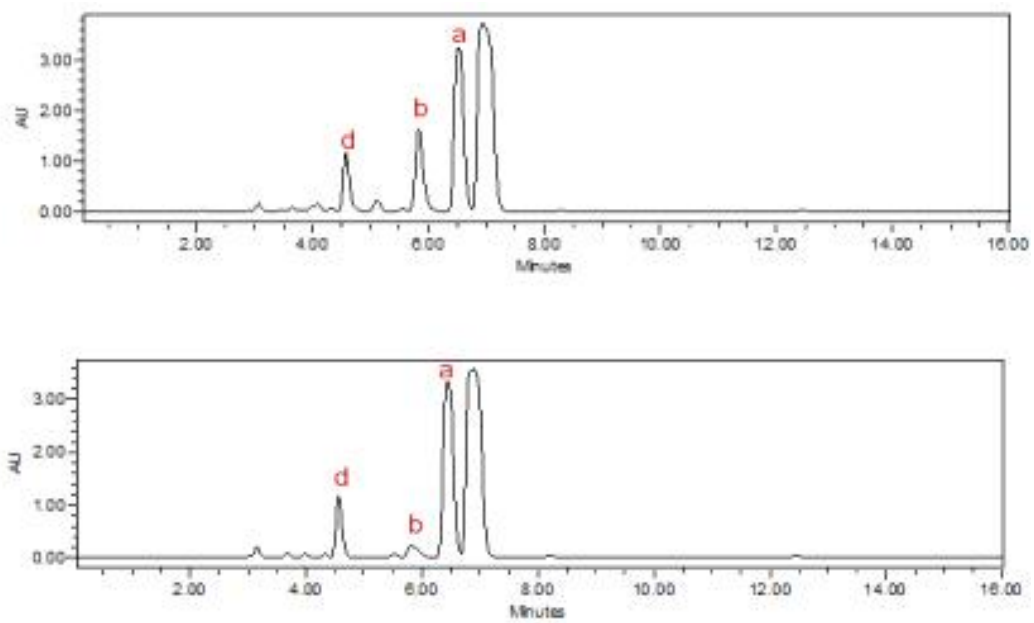


Figure II-7. HPLC chromatogram of CGTase treated 10% NHDC and 3% rice starch solution. Before(top) and after(bottom) glycoamylase treatment, respectively.

[2차년도]

1. NHDC 당전이체 생산공정 최적화, 대량공정화 및 이화학적 특성 분석

1.1. 생합성한 다수의 NHDC 당전이체 중 신규 감미료 후보군 선정

1.1.1. 연구방법

- 상업적으로 판매되는 cyclodextrin glycosyltransferase(CGTase)인 Toruzyme[®] (Novozyme) 및 α-cyclodextrin(CD), β-CD, rice starch(일품벼)의 기질 3종을 탐색하여 NHDC 당전이체를 효율적으로 합성할 수 있는 기질을 선별함.
- 생합성 반응은 55℃에서 실시하였고, 10% ethanol을 포함한 10mM sodium citrate buffer (pH 6)를 이용하여 72 시간 동안 반응하면서 NHDC 당전이체의 합성 추이를 조사함.
- 반응 시 기질 종류 및 기질에 따른 NHDC 당전이체 생합성 조사는 NHDC 3%와 5%, α-CD, β-CD 및 rice starch 1%와 2%를 사용하고, 40ml 반응액에 대하여 Toruzyme 60ul를 사용함.
- NHDC 당전이체의 검출은 HPLC-PAD system(Waters 2695, PDA detector)를 사용하고, column은 J'sphere ODS-H80(YMC), UV 280nm에서 검출함. 용매는 acetonitrile(ACN)과 10mM H₃PO₄를 1mL/min속도로 사용하였고, ACN 농도를 0-2min 20%, 3min에 25%, 13min에 30%, 14min에 100%로 조절하여 생성된 다수의 NHDC 당전이체를 효율적으로 검출함.

1.1.2. 연구결과

- Toruzyme 및 당전이 반응으로 생성된 NHDC 당전이체는 모두 6종이었으며 1차년도에 구조가 동정됨. 이들 중 당전이 생합성율이 가장 높은 포도당 1개가 α-1,4 결합으로 전이된 당전이체인 1-(4-((2-O-[6-Deoxy-α-L-mannopyranosyl])-(4-O-α-D-glucopyranosyl))-α-D-glucopyranosyl)oxy)-2,6-dihydroxyphenyl)-3-[3-hydroxy-4-methoxyphenyl]-1-propanone (glycosyl-NHDC)을 최종 생산할 신규 감미료로 선정함. 이 당전이체는 생합성시 수율이 가장 높을 뿐 아니라 다수의 당이 전이된 당전이체에 대한 연속적 amyloglucosidase 처리로 수율을 상당히 증진하는 것이 가능한 장점이 있으며, 산업적으로 이화학적 특성이 가장 좋을 것으로 예상되었음. 생합성 기질로 사용된 NHDC 및 생합성 대상 신규 고감미료로 선정된 당전이 NHDC의 구조는 Figure II-8와 같음.

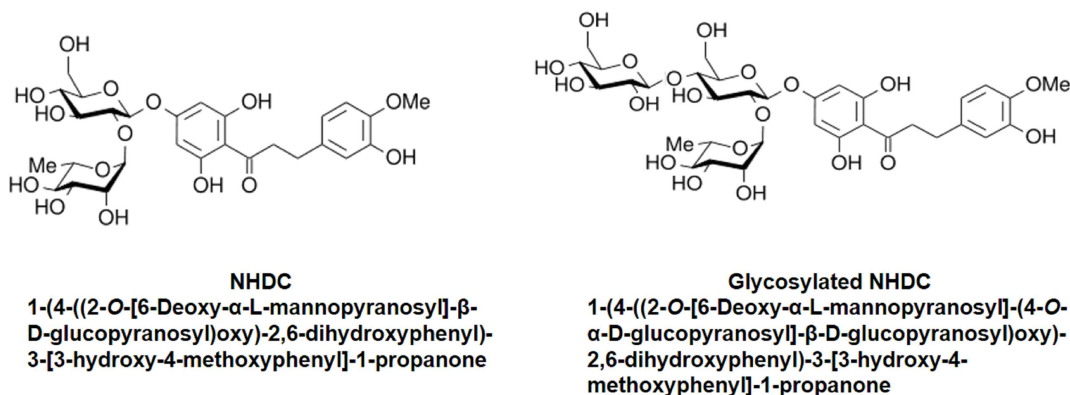


Figure II-8. Structure of NHDC and glycosylated NHDC

1.2. 신규 감미료 후보 최적화 생합성 조건 확립 및 대량 생합성을 위한 최적화 생합성 공정 scale-up

1.2.1. 연구방법

- 1차년도 연구결과로부터 상업적으로 판매되는 효소인 cyclodextrin glycosyltransferase (CGTase)인 Toruzyme[®] (Novozyme), maltogenic amylase, transglucosidase와 기질로 α -cyclodextrin(CD), β -CD, rice starch(일품벼)의 기질 3종을 탐색하여 효소 및 기질을 선별함.
- 반응은 55°C에서 10% ethanol을 포함한 10mM sodium citrate buffer를 이용하여 pH 6에서 각각 72시간 동안 반응하여 NHDC 당전이체의 합성 추이를 조사함.
- 반응 시 기질 종류 및 기질에 따른 NHDC 당전이체 생합성 조사는 NHDC 3%, 5%, 10%에 대하여 α -CD, β -CD 및 rice starch 1%, 2%, 3%를 사용하고, 40ml 반응액에 대하여 Toruzyme 60 또는 300ul를 사용함.
- Toruzyme 반응 후 pH를 5로 맞추고 amyloglucosidase를 각각 50uL 및 100uL 첨가하여 5시간 반응하여 신규 합성 대상 고감미료 함량의 증진을 조사함.
- NHDC 당전이체의 검출은 HPLC-PAD system(Waters 2695, PDA detector)를 사용하고, column은 J'sphere ODS-H80(YMC), UV 280nm에서 검출함. 용매는 acetonitrile(ACN)과 10mM H₃PO₄를 1mL/min속도로 사용하였고, ACN 농도를 0-2min 20%, 3min에 25%, 13min에 30%, 14-16min에 100%로 조절하여 생성된 다수의 NHDC 당전이체를 고농도에서도 효율적으로 용리할 수 있는 검출 조건을 확립함.

1.2.2. 연구결과

- NHDC와 glucose 공여체 비율에 따른 NHDC 당전이체 생합성 profile은 Figure II-9에 나타냄. 이전 연구 결과를 바탕으로 glucose 공여체의 농도는 NHDC농도보다 낮게 하고, NHDC와 glucose 공여체의 비율을 선정함. 향후 대량 합성 공정에 활용하는 것이 가능하도록 NHDC 농도를 10%로 가급적 높게 하고 기질이 되는 α -CD, β -CD 및 쌀전분의 양을 3%까지 증가하여 비율을 달리하였을 때, NHDC의 양을 5%, 전분을 1, 2% 기질로 사용했을 때 각각 18.6, 39.7% 생성된 것이 비하여 55.6%의 NHDC가 glycosyl NHDC로 전환되었음.

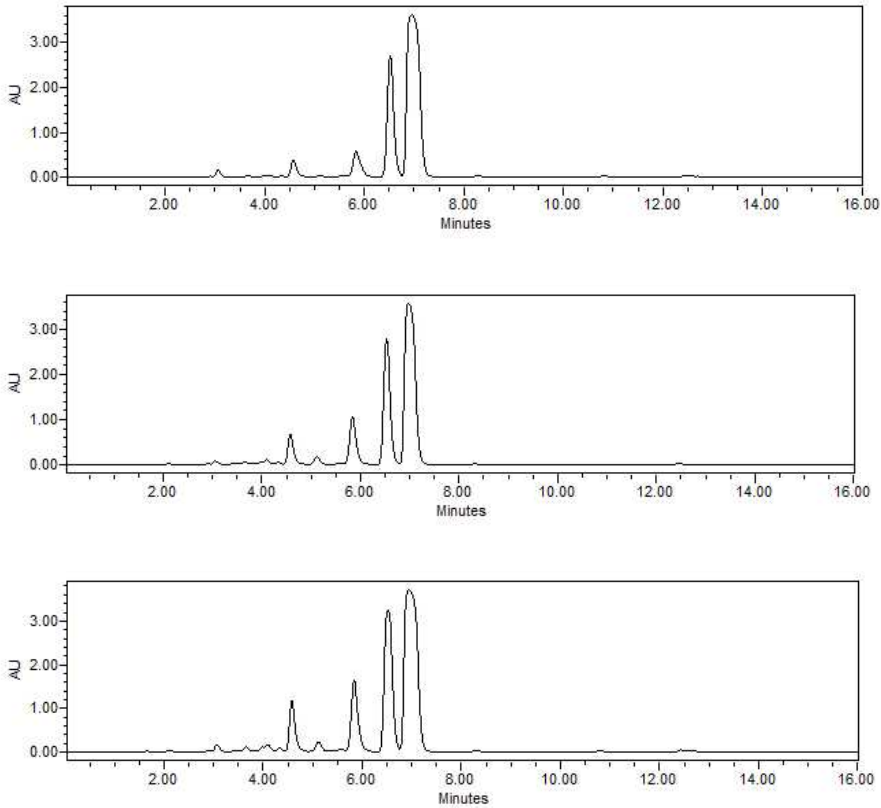
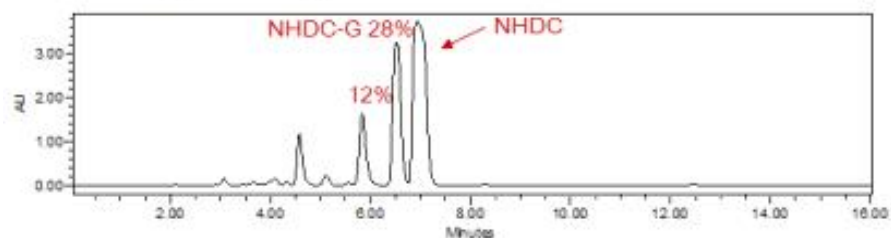


Figure II-9. HPLC chromatograms of a reaction solution of NHDC 5% with starch 1 and 2%, NHDC 10% with starch 3% for 48hrs (from top to bottom).

- 연구결과로부터 상업적으로 판매되는 효소인 Toruzyme® (Novozyme), maltogenic amylase (Sigma aldrich), transglucosidase (megazyme)와 기질로 α -CD, β -CD, rice starch(일품벼)의 기질 3종을 탐색하여 NHDC 당전이체를 효율적으로 합성할 수 있는 효소 및 기질은 가장 많은 glycosylated NHDC를 생합성하는 Toruzyme® 및 가격적으로 경쟁력이 있는 쌀전분을 기질로 선정하였음.
- 위의 다양한 효소반응조건으로부터 NHDC 10%와 각각 α -CD, β -CD 및 rice starch 3%를 적용하고 실험실 scale인 반응액 40ml 당 300ul의 Toruzyme을 첨가하여 72시간 반응하였을 때 NHDC로부터 각각 59.9, 61.0 및 58.6의 glycosyl NHDC의 생전환율을 얻어 효율적인 생합성 조건을 확립함.
- 또한, Toruzyme 반응 후 다수의 포도당이 전이된 NHDC 당전이체에 연속적으로 amyloglucosidase를 첨가하여 신규 합성 대상 고감미료인 glycosyl NHDC로의 전환을 추구하였으며, 함량의 증진이 확인되었음(Figure II-10)
- 이와 같이 40mL 수준의 실험실 scale에서 NHDC로부터 glycosyl NHDC로의 생합성 최적 조건이 확립되었으며, scale을 500mL, 1000mL, 2000mL로 단계적으로 증가시켜 최종적으로 40mL의 100배인 4L의 대량 생합성 공정을 확립하였음. Figure II-11는 4L 공정으로 2회 반복 생산된 반응물의 크로마토그램이며, 수율은 각각 59.3 및 57.8%로 40mL 수준의 반응물과 유사한 수율을 확보하였음.

NHDC 10%, Starch 3%, 48h



+ Amyloglucosidase

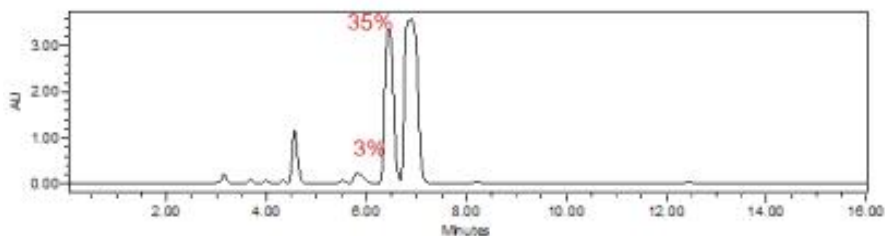


Figure II-10. Increase of glycosyl NHDC using consecutive treatments of CGTase and amyloglucosidase. Top and bottom: before and after amyloglucosidase treatment

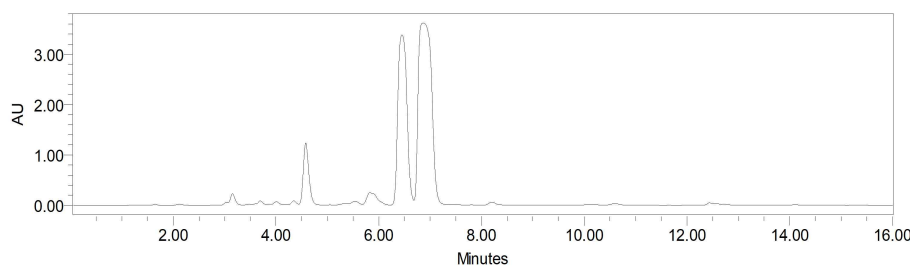
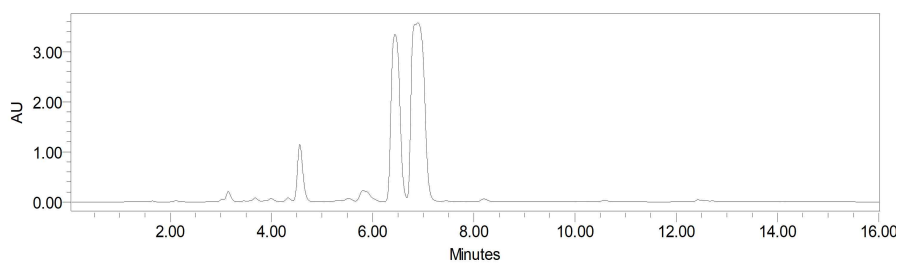


Figure II-11. Chromatograms of 4L reaction solutions of consecutive treatments of CGTase (72hr) and amyloglucosidase (5hr).

1.3. 관능평가, *in vitro* 단맛수용체 및 기능성 평가를 위한 대량 제조

1.3.1. 연구방법 및 결과

- 1차년도에 구조 동정을 위해 소량의 NHDC 당전이체의 효율적인 분리정제는 80℃에서 recycling preparative HPLC (LC-Forte, YMC Inc., Japan) 및 YMC-Actus C₁₈ column (20 × 500 mm, YMC Inc., Japan)을 사용하여 분리함. 이동상은 28% acetonitrile을 isocratic 모드로 30 mL/min의 유속으로 사용하여 UV 280 nm에서 검출함. 수집된 분획을 동결건조한 후 상기 Waters 2695 HPLC 및 PDA detector를 이용하여 순도를 확인함.
- 1차년도에 사용한 LC Forte/R을 이용하여 ODS-AQ 충전제로 Recycle을 통해 분리한 경우 장시간 recycle이 필요하며, 시간 및 용매 사용이 매우 높아 정제 장비 및 정제 조건을 최적화하여 고순도 분리 정제를 진행함.
- 장비는 YMC K-Prep LAB 300G를 사용하였고 컬럼은 YMC DAU column packed with YMC Triart C18 GEL (10um) (50mmi.d. X 400mm), 용매는 25% Acetonitrile in water isocratic(23~25℃)으로 90mL/min의 유속으로 사용하였음. 주입량은 30mL였으며 검출은 UV 210nm에서 검출하였음. 1, 2, 3차 정제 크로마토 그래프는 Figure II-12에 나타내었음. 1차 분획을 받고 고순도 구간을 얻어 농축하여 동결건조하였으며, 2차로 저순도 구간을 모아 재정제하여, 최종 순도 99%이상의 주관의 관능평가 및 2협동의 생리기능성 평가를 위해 시료를 공급하였음.

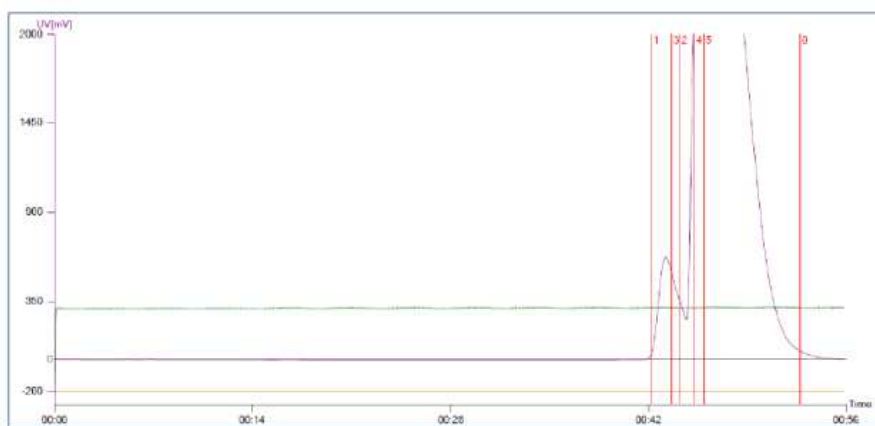
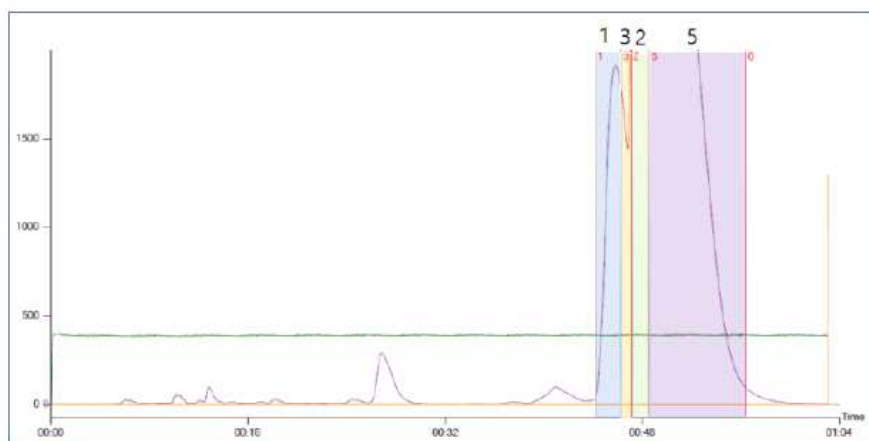
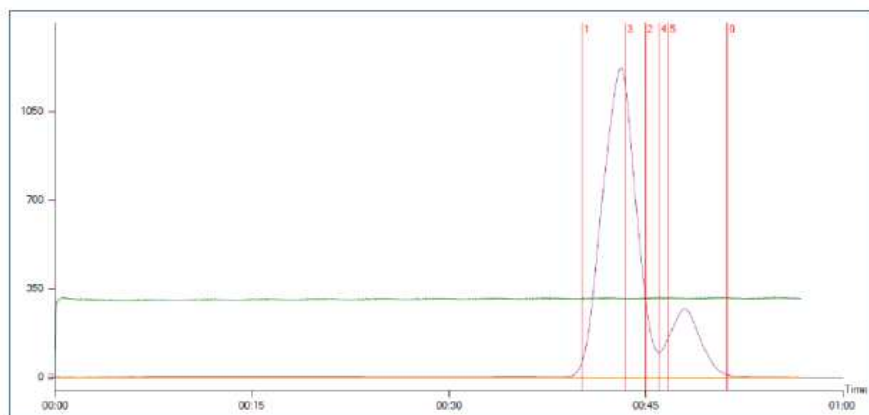


Figure II-12. Fractions collected from preparative HPLC. Top: Fractions collected from the first elution, middle: Fraction 3 collected from the first elution, bottom: Fraction 2 collected from the second elution.

1.4. NHDC 당전이체의 이화학적 특성 분석

1.4.1. 연구방법

- 수용해도는 Benavente-García 등(2001, *J Agric. Food Chem.* 2001, 49, 189-191)의 방법을 변형하여 측정함. 탈이온수의 온도를 20°C로 유지하면서, 5분간 교반한 후 spectrometer (UV-1800, Shimadzu Inc., Kyoto, Japan)를 이용하여 660nm에서 흡광도를 측정함.
- 열적 특성은 differential scanning calorimeter (DSC4000, Perkin-elmer)를 사용하여 측정하였음.
- 내열성, 내산성, 내알칼리성은 sodium acetate buffer pH3, tris-NaOH pH7, glycine-NaOH pH10에 0.1% glycosyl NHDC를 용해시키고, 미생물의 성장을 저해하고자 0.02% sodium azide를 첨가하였음. 이를 20°C 및 60°C에 저장하면서 14일간 잔류하는 양을 HPLC를 이용하여 측정하였음. HPLC는 HPLC-PAD system(Waters 2695, PDA detector)를 사용하고, column은 J'sphere ODS-H80(YMC), UV 280nm에서 검출함. 용매는 acetonitrile과 10mM H₃PO₄를 1mL/min 유속으로 사용하였고, acetonitrile 농도를 0-2min 20%, 3min에 25%, 13min에 30%, 14-16min에 100%로 조절하여 생성된 다수의 NHDC 당전이체를 고농도에서도 효율적으로 용리할 수 있는 검출조건을 확립함.

1.4.2. 연구결과

- 수용해도 결과는 Figure II-13에 나타내었음. 일반적으로 spectrophotometer를 이용한 흡광도 측정에서는 흡광도 1 이하에서 참용액을 이루었다고 판단하며, 흡광도 1 이상일 때 녹지 않고 suspension 형태의 부유물이 존재하는 것으로 판단함. 이 기준을 적용하면, NHDC는 약 0.02g/10mL가량의 용해도를 가지고 NHDC-G는 6g/10mL 이상의 현저히 높은 수용해도를 나타내어, 당전이를 통해 신규 감미료의 높은 수용성을 확보하는 목적이 충분히 달성되었음을 알 수 있음.

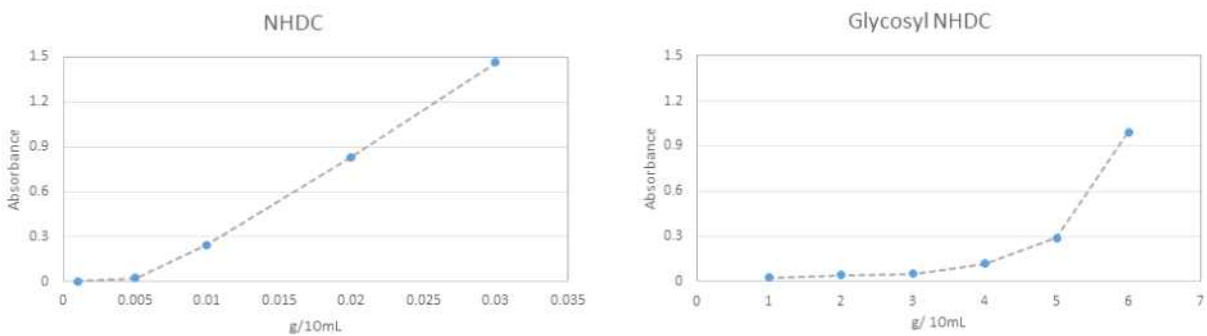


Figure II-13. Water solubility of NHDC and glycosyl NHDC (absorbance at 660nm)

○ 열적 특성

- NHDC와 glycosyl NHDC의 열적 특성은 Table II-2에 나타내었음. 열 변성 시작 온도는 glycosyl NHDC가 NHDC에 비해 약 3°C가량 낮은 것을 알 수 있고, 종결온도는 유사하였음. 열 변성 범위 및 엔탈피는 glycosyl NHDC가 NHDC에 비해 낮아, 열 변성에 좀 더 취약한 것을 알 수 있음.

Table II-2. Thermal properties of NHDC and glycosyl NHDC.

	To	Tpp	Tc	Delta H	Tc-To
Glycosyl NHDC	64.7±0.2	70.9±0.2	79.4±0.2	32.6±1.7	14.8±0.4
NHDC	67.5±0.2	75.6±0.7	90.1±0.2	54.4±0.2	22.6±0.4

○ 내열성, 내산성, 내알칼리성

- Glycosyl NHDC의 내열성, 내산성, 내알칼리성은 Figure II-14에 나타내었음. 20°C저장 시 pH 3에서 2주간 glycosyl NHDC는 분해되지 않고 함량이 유지되었으나, pH 7에서는 2주 저장 시 26.4%가 분해되었음. pH 10에서는 저장 1일에 52.9%가 분해되었으며 저장 3일에는 90%가 분해되었음. 60°C에서 저장 시 pH 3에서는 저장 1일에 10%가 분해되었으나 저장 2주간 변함없이 유지되었으며, pH 7에서는 저장 1일에 28.7%가 분해되었으며 이후 점차 분해되어 2주에는 57.1%가 분해되었음. pH 10에서는 저장 1일에 80% 이상이 분해되었으며 6일에는 거의 전량 분해되었음. 연구 결과로부터 glycosyl NHDC는 알칼리에 매우 취약하며, 열에도 다소 취약한 것으로 나타났으며, 이와 같은 양상은 기질인 NHDC와 매우 유사하였음. 알칼리에 의한 glycosyl NHDC 분해 양상은 Figure II-15에 나타난 것과 같이, 초기에는 retention time이 짧은 친수성인 물질이 많이 생성되는 것으로 보이고, 뒤로 갈수록 전이된 당이 떨어져 나가며 소수성 분해물질이 점차 생성되는 것으로 여겨짐.

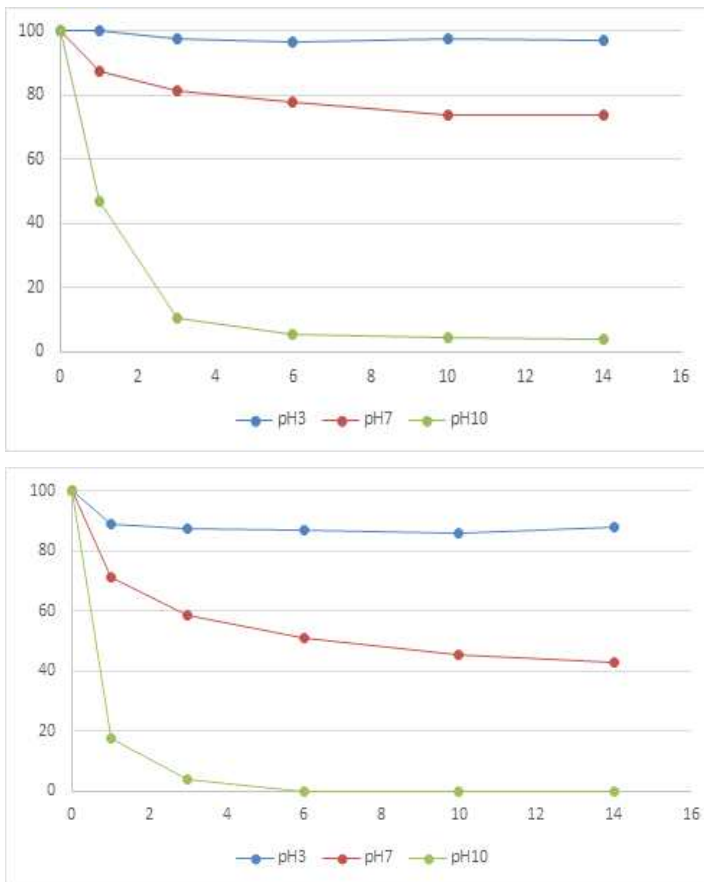


Figure II-14. Resistance to heat, acid and alkali at 20°C(top) and 60°C(bottom).

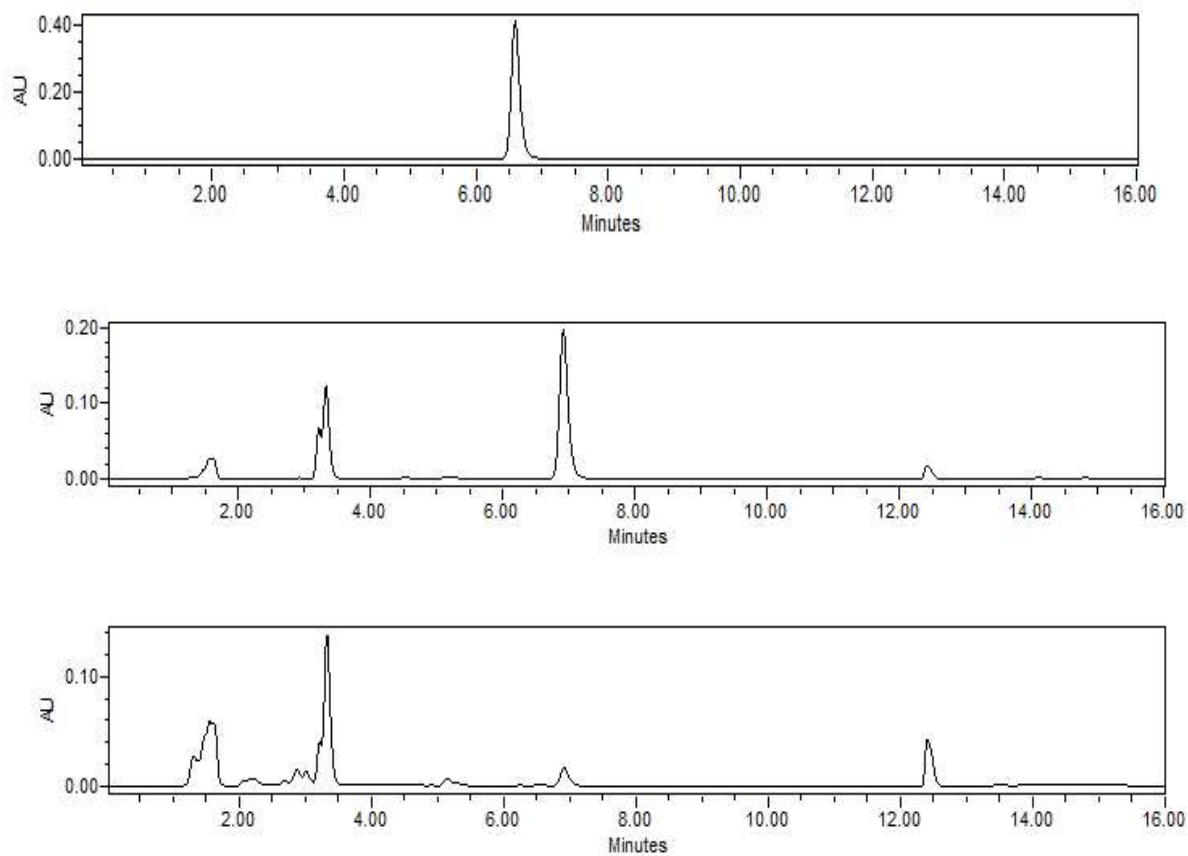


Figure II-15. HPLC chromatograms of glycosyl NHDC dissolved in glycine NaOH buffer pH 10 stored at 20°C for 0, 1 and 14 days (from top to bottom).

[3차년도]

1. 국내산 감귤류로부터 전구체의 추출, NHDC 제조 및 정제 공정 최적화

1.1. 국내산 감귤류로부터 NHDC 전구체 추출 최적화

1.1.1. 용매를 이용한 NHDC 전구체 네오헤스페리딘(neohesperidin) 및 나린진(naringin) 추출 최적화

○ 재료

- 기존의 연구에서 네오헤스페리딘 및 나린진의 함량이 높은 것으로 알려진 당유자 (*Citrus grandis* Osbeck)의 미숙과는 2021년 9월에 제주도에서 수확한 것을 구입하여 사용하였음. 당유자 미숙과의 껍질을 세척 후 동결건조한 후 blender를 이용하여 분말화하고 35 mesh 표준체를 통과시켜 시료를 준비함. 추출에 이용된 99.9% ethyl alcohol은 Daejung chemicals & Materials Co. (Siheung, Korea)의 것을 사용함.

○ 연구방법

- 반응표면분석(Response surface methodology, RSM) 계획에 따라 추출용매의 에탄올 함량(X1) 및 추출시간(X2)을 요인으로 하여 2요인 5수준 중심합성반응표면계획에 따라 추출액을 제조함 (Table II-3). 추출액은 분쇄한 시료 0.5 g을 40 mL의 추출 용매로 초음파세척기 (Branson series CPX-8800H, Branson Co., USA)을 이용하여 50°C에서 추출함. 추출 후 0.45um의 syringe filter를 이용하여 여과하였으며, 2회 반복 추출함.
- 추출액 중의 네오헤스페리딘과 나린진의 검출은 HPLC-PAD system(Waters 2695, PDA detector)를 사용하고, column은 J'sphere ODS-H80 (YMC), UV 280nm에서 검출함. 용매는 메탄올과 10mM H₃PO₄를 1mL/min 속도로 사용하였고, 메탄올 농도를 0-1 min 60%, 이후 20 min에 35%, 22 min에 100%로 조절하여 flavonoids를 효율적으로 용리할 수 있는 검출조건을 확립함.
- 반응표면분석은 SAS software (Version 12.0, SAS institute Inc., Cary, NC, USA)를 이용하여 수행함.

○ 연구결과

- 반응표면 실험계획에 따라 추출된 추출액의 네오헤스페리딘 및 나린진 함량은 Table II-3에 나타냄. 추출액의 네오헤스페리딘 및 나린진 함량은 에탄올 함량 및 추출 온도에 따라 유의적인 차이를 나타내었으며, 12개 추출액의 측정값으로부터 얻어진 반응표면 분석 결과 회귀와 잔차의 분산 분석 결과 R² 값은 네오헤스페리딘과 나린진 각각 0.99 및 0.98로 유의성이 인정되었음(p<0.001, Table II-4).
- 추출액의 네오헤스페리딘과 나린진 회귀분석 결과 일차적(linear), 이차적(quadratic) 영향이 모두 99.9%의 신뢰수준 이상으로 유의하였고, 네오헤스페리딘 및 나린진 함량 예측 모형의 계수는 상수, 에탄올 농도의 일차항 및 이차항이 유의한 것으로 나타나(p<0.001), 이 요인에 의해 추출액의 총 네오헤스페리딘과 나린진 함량에 유의적인 영향이 있음을 알 수 있음(Table II-5). 회귀에 대한 ANOVA에서는 일차항 및 이차항이 모두 유의적으로 나타났으며, 네오헤스페리딘과 나린진 모두 에탄올의 영향은 p<0.001 수준으로 유의적이었으나, 추출 시간의 경우 유의적이지 않은 것으로 나타나 (p<0.05) 추출 시간에 의한 영향보다는 에탄올 농도의 영향이 큼을 알 수 있음.
- 네오헤스페리딘과 나린진 함량에 대해 에탄올 농도 및 추출 온도의 이차항 계수는 모두 음의 값을 나타내어 이들의 함량은 실험 범위 내에서 증가하다가 감소하는 이차적 변화를 보임을 알 수 있음 (Figure II-16).
- 에탄올 농도는 두 변수 모두에 99.9% 신뢰수준으로 영향을 미쳤으며(Table II-6), 반응표면분석 결과로부터 네오헤스페리딘 함량은 에탄올 농도 80.39%, 추출 시간 40.19분 추출 시 최대값 3.84%로 예측되었으며, 나린진 함량은 79.15%에서 38.22분 추출 시 4.20%로 예측되었음. 이로부터 에탄올을 이용한 네오헤스페리딘 및 나린진 추출의 최적 조건은 80% 에탄올을 사용하여 40

분간 추출하는 것으로 확립되었음. 이 조건에서 추출한 당유자 추출액의 네오헤스페리딘 및 나린진 함량은 각각 3.80% 및 3.99%로 예측값과 유사한 값을 나타냄(Table II-7).

- 이전 연구에서 Flavonoids의 분석을 위한 추출용매로는 dimehtyl sulfoxide, 끓는 물, methanol, DMSO/methanol, 고온의 N, N-dimethyl formamide 등이 사용되었음.

Table II-3. Neohesperidin and naringin contents¹⁾ in extracts of Dangyooja powder

Extraction conditions				Neohesperidin (%)	Naringin (%)
Coded		Actual			
EtOH (%)	Time (min)	EtOH (%)	Time (min)		
0	-1.414	30	24.65	0.62 ± 0.00	0.69 ± 0.00
1.414	0	51.21	60	3.45 ± 0.06	4.00 ± 0.08
-1	1	15	85	3.49 ± 0.03	4.04 ± 0.03
-1	-1	15	35	1.61 ± 0.09	1.84 ± 0.11
0	0	30	60	3.50 ± 0.16	4.06 ± 0.20
-1.414	0	8.79	60	3.39 ± 0.01	3.93 ± 0.01
1	-1	45	35	1.73 ± 0.10	1.98 ± 0.05
0	1.414	30	95.35	3.70 ± 0.01	4.28 ± 0.13
0	0	30	60	3.39 ± 0.01	3.92 ± 0.01
0	0	30	60	3.36 ± 0.00	3.89 ± 0.00
1	1	45	85	3.47 ± 0.02	4.01 ± 0.02
0	0	30	60	3.33 ± 0.04	3.85 ± 0.05

¹⁾ Means of duplicate.

Table II-4. Analysis of variance of the regression parameters of the predicted response surface quadratic models¹⁾

Regression	DF	Neohesperidin			Naringin		
		R ²	F	P	R ²	F	P
Linear	2	0.77	237.25	***	0.73	111.37	***
Quadratic	2	0.22	69.27	***	0.24	36.96	***
Cross product	1	0.00	0.07	NS	0.00	0.07	NS
Total Model	5	0.99	122.62	***	0.98	59.35	***

¹⁾ *** represent significance at $p < 0.001$. NS, not significant.

Table II-5. Regression coefficients of predicted quadratic polynomial models for responses¹⁾

β	Neohesperidin		Naringin	
Intercept	-3.328	***	-3.912	**
X ₁	0.031		0.032	
X ₂	0.163	***	0.193	***
X ₁ X ₁	-0.000		-0.000	
X ₁ X ₂	-0.000		-0.000	
X ₂ X ₂	-0.001	***	-0.001	***

¹⁾ ** and *** represent significance at $p < 0.01$ and $p < 0.001$, respectively.

²⁾ X₁ and X₂ represent extraction concentration of ethanol (%) and time(min) of extraction medium, respectively.

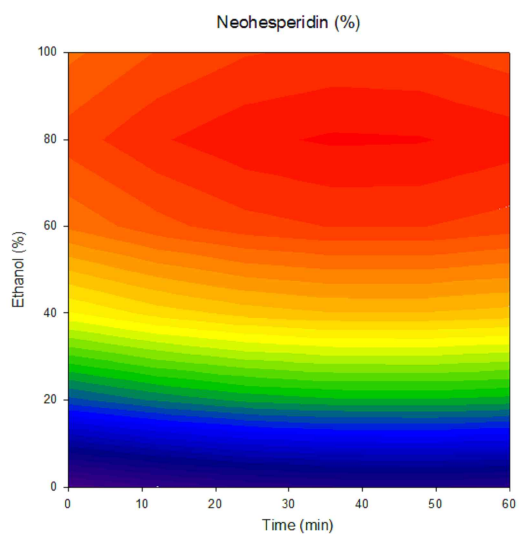
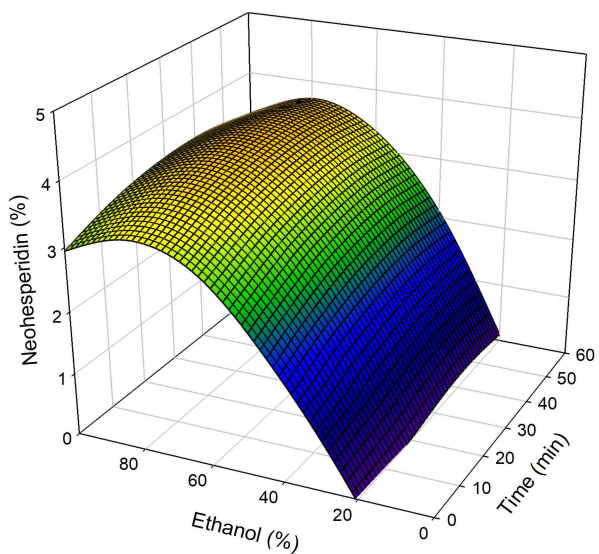
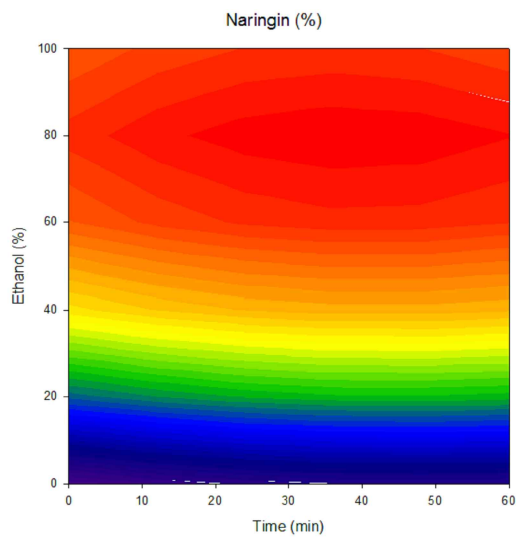
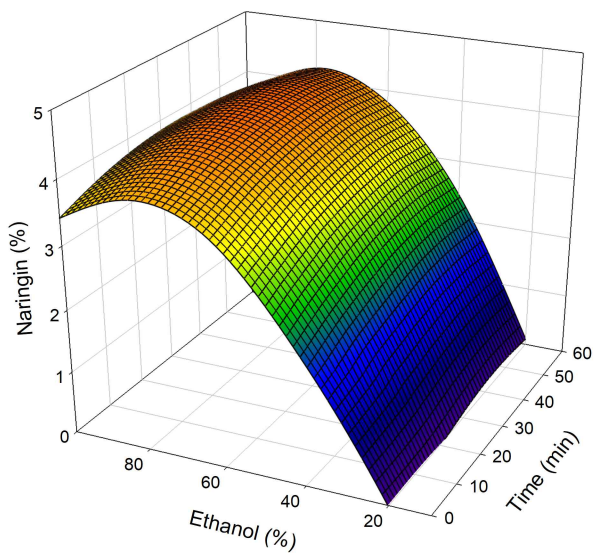


Figure II-16. Response surface and contour plots of neohesperidin and naringin contents in extracts of Dangyooja powder

Table II-6. Analysis variance of the factors of the response surface¹⁾

Sample	Factor	F-value	
		Neohesperidin	Naringin
Dangyooja	Ethanol	202.07***	98.06***
	Time	2.70	0.87

¹⁾ *** represents significance at $p < 0.001$.

Table II-7. Predicted and actual values for the maximum responses

Sample	Response	Ethanol (%)	Time (min)	Predicted	Actual (%)
Dangyooja	Neohesperidin	80.39	40.19	3.84	3.80±0.01
	Naringin	79.15	38.22	4.20	3.99±0.01

1.1.2. 최적 추출 조건에서 국내산 감귤류 5종 전구체 함량 분석

○ 재료

- 국내산 감귤류는 2021년 9월 제주도에서 수확된 당유자, 팔삭(Hassaku, *Citrus hassaku* Hort. ex Tanaka), 황금하귤(Natsumikan, *Citrus natsudaikai* Hayata), 유자(Yuzu, *Citrus junos* Sieb. ex Tanaka), 금귤(Kumquat, *Citrus japonica*) 5종의 미숙과의 껍질을 세척 후 동결건조하였음. 이후 blender를 이용하여 분말화하고 35 mesh 표준체를 통과시켜 시료를 준비함.

○ 연구방법

- 위의 연구에서 선정된 용매를 이용한 NHDC전구체 최적 추출 방법으로 5종의 국내산 감귤로부터 네오헤스페리딘 및 나린진을 추출하였음. 0.5g의 시료에 40mL의 80% 에탄올을 첨가하여 초음파 세척기(Bransonic series CPX-8800H, Branson Co.,CT, USA)를 사용하여 50℃에서 40분간 추출하여 HPLC로 검출하였음.



Figure II-17. Kumquat, yuzu, dangyooja, hssaku harvested in September, 2021 in Aewol, Jeju, Korea.

- 추출액 중의 네오헤스페리딘과 나린진의 검출은 HPLC-PAD system(Waters 2695, PDA detector)를 사용하고, column은 J'sphere ODS-H80(YMC), UV 280nm에서 검출함. 용매는 메탄올과 10mM H₃PO₄를 1mL/min 속도로 사용하였고, 메탄올 농도를 0-1 min 60%, 이후 20 min 35%, 22 min 100%에 이르도록 조절하여 flavonoids를 효율적으로 용리할 수 있는 검출조건을 확립함.

○ 연구결과

- 2021년 9월에 수확한 국내산 감귤류의 미숙과 5종의 껍질에 존재하는 네오헤스페리딘 및 나린진 함량은 Table II-8와 같음. 네오헤스페리딘 함량은 당유자, 팔삭, 황금 하귤 순으로 높았으며, 나린진 함량은 팔삭, 당유자, 황금하귤 순으로 높게 나타남. 유자는 소량의 나린진과 네오헤스페리딘을 함유하고 있었으나 금귤에서는 동일한 추출 및 검출 조건에서 검출되지 않았음.
- 감귤류의 flavonoids는 대부분 과실이 미성숙한 상태에서 빠르게 합성되고 침착되며 숙성에 따라 점차 감소하는 것으로 알려져 있음. 이전의 연구(류미라, 2000)에서 당유자에서 9월 수확 미숙과의 네오헤스페리딘과 나린진 함량은 각각 2.96 및 1.88%로 나타났으며 본 연구에서는 추출 최적화 등을 통하여 이에 비해 높은 값인 3.80 및 3.99%로 나타남.
- 본 연구에서 활용된 당유자, 팔삭, 황금하귤 등은 특용작물로 소량 재배되거나 관상용으로 사용되는 경우가 대부분이므로 이를 활용하여 NHDC의 전구체를 추출하여 활용하는 것은 새로운 경제성 창출이 가능함.
- 연구결과로부터 감귤류의 품종, 수확시기에 따라 NHDC 당전이체 제조를 위한 전구체의 양과 질이 달라 품질관리의 어려움이 예상됨에 따라 향후 감귤농축액 제조 후 폐기되는 감귤가공부산물로부터 전구체를 추출하는 방안을 검토 중임.

Table II-8. Neohesperidin and naringin contents in the peel of unripe domestic citrus fruits.

Citrus fruit	Neohesperidin(%)	Naringin (%)
Dangyooja (<i>Citrus grandis</i> Osbeck)	3.80 ± 0.01	3.99 ± 0.01
Natsumikan (<i>Citrus natsudaidai</i> Hayata)	1.22 ± 0.01	2.68 ± 0.03
Hassaku (<i>Citrus hassaku</i> Hort. ex Tanaka)	2.13 ± 0.01	4.59 ± 0.02
Yuzu (<i>Citrus junos</i> Sieb. ex Tanaka)	0.53 ± 0.00	0.85 ± 0.01
Kumquat (<i>Citrus japonica</i>)	ND ¹⁾	ND

1.1.3. 효소를 이용한 전구체 추출 효율 증진

○ 재료

- 국내산 감귤류는 2021년 제주도에서 재배되어 9월에 수확된 당유자 미숙과를 구입하여 껍질을 세척 후 동결건조하여 분말화하고 35 mesh 표준체를 통과시켜 시료를 준비함. Shearzyme® Plus(Novozyme), Pectinex®Ultra SP(Novozyme) 및 Viscozyme® (Novozyme) 3종의 상업적 섬유질 분해 효소를 사용함.

○ 연구방법

- 1g의 당유자 가루에 100mM citrate buffer pH5.0을 20mL 첨가하고 상업적 섬유질 분해효소인 Shearzyme® Plus(Novozyme), Pectinex®Ultra SP(Novozyme), Viscozyme® (Novozyme)을 20mL, 50uL 첨가한 후 40℃에서 1, 3, 6, 24시간 동안 반응시킨 후 1mL을 취하여 10분간 원심분리하고 supernatant를 취하여 동량의 ethanol로 효소 반응을 종결시킴.
- 추출액 중의 네오헤스페리딘과 나린진의 검출은 HPLC-PAD system(Waters 2695, PDA detector)를 사용하고, column은 J'sphere ODS-H80(YMC), UV 280nm에서 검출함. 용매는 메탄올과

10mM H₃PO₄를 1mL/min 속도로 사용하였고, 메탄올 농도를 0-1 min 60%, 이후 20 min에 35%가 되게 하고, 22 min에 100%가 되도록 조절하여 flavonoids를 효율적으로 용리할 수 있는 검출 조건을 사용함.

○ 연구결과

- 당유자 분말에 섬유분해효소를 처리하였을 때 반응액 중의 네오헤스페리딘 및 나린진 함량은 Table II-9에 나타내었음. 3종의 효소 모두 24시간 반응 후에는 용매를 이용한 초음파 추출보다 더 많은 양의 네오헤스페리딘 및 나린진 함량을 나타내었음. 그러나 Pectinex®Ultra SP의 경우에는 1시간 반응 후 즉각적으로 네오헤스페리딘 및 나린진의 함량이 높아지는 것을 확인하였음. Viscozyme®의 경우도 3시간 후에는 Pectinex®Ultra SP와 유사한 수준의 함량을 나타내었음. 이전 연구들로부터 메탄올을 이용한 네오헤스페리딘의 정제 과정에서 펙틴을 제거하는 단계가 있으며, 펙틴 분해 효소인 Pectinex®Ultra SP를 1시간 처리하면 용매없이 고효율 추출이 가능하며 정제 과정에서 또한 효율성을 더할 수 있을 것으로 사료됨.

Table II-9. Neohesperidin and naringin contents of unripe Dangyooja powder treated with various commercial cellulytic enzyme.

Enzyme	Flavonoid	1h	3h	6h	24h
Pectinex®Ultra SP	Neohesperidin	6.36±0.02	6.38±0.00	6.41±0.22	6.37±0.02
	Naringin	6.88±0.02	6.75±0.00	6.79±0.20	6.71±0.04
Viscozyme®	Neohesperidin	5.72±0.10	6.33±0.09	6.25±0.02	6.33±0.01
	Naringin	5.93±0.13	6.65±0.08	6.58±0.02	6.65±0.03
Shearzyme®Plus	Neohesperidin	1.52±0.15	2.10±0.22	2.72±0.03	6.10±0.50
	Naringin	1.72±0.17	2.15±0.22	3.06±0.04	6.72±0.49

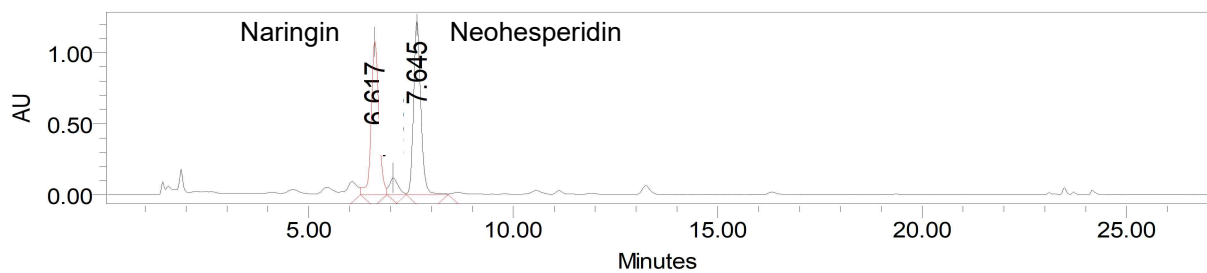


Figure II-18. Representative chromatogram of naringin and neohesperidin in enzyme treated dangyooja peel powder

1.2. NHDC 제조 공정 최적화

1.2.1. 연구방법

- 네오헤스페리딘 3g 에 30mL의 2N NaOH를 가하고 촉매로서 Raney nickel 28% slurry(Sigma co.)를 각각 0.1, 0.5, 1mL 가하여 24, 48 및 72시간 동안 반응시키고, 촉매를 여과한 후 ice bath에서

6N HCl를 이용하여 pH 6-7로 서서히 적정하고 영하 20℃의 냉동실에서 72시간 동안 결정화를 유도하였음. 얻어진 결정을 흡입장치 및 Whatman No. 1 여과지를 이용하여 여과하고, 물로 세척한 후 진공건조하여 최종 생산된 NHDC의 무게를 측정함.

1.2.2. 연구결과

- 0.1, 0.5 및 1mL의 Raney nickel slurry를 추가하여 48시간까지 반응 및 48시간 냉동 결정화의 경우는 결정을 잘 형성하지 못했음. 72시간 동안 반응 후 72시간 동안 -20℃에서 냉동하였을 경우, 세 시료에서 회수된 NHDC 양은 각각 2.67, 2.55 및 2.65g으로 촉매의 양에 의한 영향은 없었으며 수율은 89%에 달하였음.
- NHDC 제조과정은 널리 알려져 있으며, 무수 Raney nickel을 사용하였을 때 36시간 알칼리 반응으로 98%의 수율을 얻은 특허가 등록되어 있으나(등록번호10-0771081-0000) 본 연구에서 Raney nickel 28% slurry를 사용한 경우 수율이 이에 미치지 못하였음.

III. 제 1협동 연구기관 (CJ제일제당㈜)

[1차년도]

1. 원료 탐색 및 확보

1.1. 스테비아 원료 제조사 조사

1.1.1. 중국내 스테비아 제조업체의 생산량, 취급품목 조사하여 리스트 작성함

사명	사명(영문)	홈페이지	가공CAPA (스테비아 일)	제품 가용 (수거 처리량)	SG/STV 등급	RA등급	요추처리 스테비아
曲阜天然绿色工程有限公司	Sunwin Stevia International, Inc.	https://www.sunwinintermar	8,000	500	0	0	
逸天药业有限公司	Zhucheng Haotian Pharm	http://www.zcht.cc/English/		4,800	0	0	
南通中康甜菊糖有限公司	Nantong Huakang Steviosinum	http://www.chinahuakang.com.cn/		300		0	
济宁奥星甜菊制品有限公司	Aoxing Stevia	http://www.steviactn.com/	5,000	500	0	0	0
济宁华元甜菊有限公司	HuaYuan Stevia	http://huayuanstevia.foodm	5,000	400		0	
兴化格林生物制品有限公司	GL stevia	http://www.greenbio.cn/	5,000	400	0	0	
山东华信甜菊股份有限公司	Shandong Huaxian Stevia	http://www.steviachina.com	4,000	1,000	0	0	0 (Non-GM)
曲阜新琪甜菊制品有限公司	XinWangXing	http://www.sdhaigen.com/	3,000	300	0	0	
济宁运同甜菊糖有限公司	HAIGEN Bio-tech	http://www.sdhaigenstevia	2,000	300		0	
济宁博纳甜菊制品有限公司			2,000	100		0	
曲阜香州甜菊制品有限公司/ 曲阜圣香达生物科技有限公司	SZY Stevia	http://www.sdstevia.com/	2,000	200	0	0	
农垦丹徒海林甜菊糖有限责任公司 (海林农场甜菊糖厂)	HUJIE HAILIN STEVIA SUGAR CO, LTD	http://www.hljt.cn/#page1		1,500	0	0	
青岛润浩科技有限公司	QINGDAO RUNDE BIOTECHNOLOGY CO., LTD	http://www.glg-runde.com/		2,000	0	0	X
安徽蚌埠惠农甜叶菊高科技发展有限公司	ANHUI BENGBU HN STEVIA	http://www.gjghuainong.com	X	X	X	X	X
安徽滁州润海甜叶菊高科技有限公司	Chuzhou RUNHAO STEVIA	http://www.gjgrunhai.com/		1,000	0	0	X
东台润洋甜叶菊高科技有限公司	Dongtai Runyang STEVIA	http://www.gjgrunyang.com/		1,000	0	X	X
健民药业有限公司	JianJia Pharmaceutical Industry	http://www.dtfbm.com/		300	0	0	
诸青科江西生物技术有限公司	Pure Circle	https://purecircle.com/		4,500	0	0	
赣州简隆高科技实业有限公司	GanZhou JuLong	http://abcgz.qianyan.biz/		4,500	0	0	
江西北洋食品添加剂有限公司	Jiang Xi Bei Yang	https://baike.baidu.com/item/%E6%B1%9F%		2,000	0	0	
浙江绿世界生物工程技术有限公司	Zhejiang LvShiJie	http://zjhjyw.yellowurl.cn/		200		0	
新产业南城甜菊制品有限公司		-		5,000	0	0	
天津南大凯泰药业有限公司	NAN DA KAI TAI	http://killboyy.foodmate.net//		500	0	0	
晋华甜菊糖有限公司	Gansu Puhua STEVIA	http://www.gspuhua.com/		1,000			
深圳市兴产业食品原料有限公司	XING CHAN YE	http://chinastevia.5lfood.com/		400	0	0	
安徽明光惠众甜叶菊实业公司	HUI ZHONG	http://www.11467.com/chuzhou/co/26206.htm					
利健甜菊糖生物科技有限公司	Boli Lijian Stevia Biological Technology			500			

1.2. 방문 미팅 업체 선정을 위한 세부조사 진행하였으며 아래 업체 미팅 진행함.

1.2.1. Shandong Hua Xian, 山东花仙

- 1895년 설립, 중국 최초의 스테비아 생산, 가공, 수출 업체
- 중국 동북지역 요녕성, 화동지역안위성에 공장 운영 中
- 스테비아 잎가공 Capa 10,000톤/년, 제품 생산 Capa 600-700톤/년
- 일본, 한국, 홍콩, 대만, 미국, 브라질 등 30개 국가 판매 中
- RA 생산 후 부산물은 효소처리 STV 원료로 사용
- 효소처리스테비아 연간 200톤 판매 및 수출(한국, 미국, 인도, 캐나다, 호주 등)
- 효소처리스테비아 제조시 사용 효소 NovoZymes社의CGTase

1.2.2. NanJing Joyfulchem

- Haigen Shandong Biological Technology Co., Ltd의 수출 전문 회사
- RA97, RA60(SG95) (50%이상) 효소처리 스테비아(30%), 기타(20%) 판매
- 효소처리 스테비아 생산량/연간 250톤
- 효소처리 스테비아판매비율(국내 50톤(20%) /수출200톤(80%))
- 효소처리 스테비아 수출 국가 비율 (미국 80%, 한국 15%, 기타 국가 5%).
- OEM 형식의 생산도 가능

1.2.3. Jining Aoxing Stevia

- Huaxian 에서 2000년 독립
- 사무실/공장 위치: 산둥 지닝
- 스테비아 제품 생산 Capa 1,000톤/년
- RM/RD/RC/RA/STV/효소처리 스테비아 판매中,
- 판매비율: RA 60-70%, STV와 효소처리 스테비아 20-30%
- RA 생산 후 부산물(STV 약 60%)은 효소처리 스테비아로 사용
- OEM 생산 가능, 현재 효소처리 스테비아 연간 200톤 생산가능
- 효소처리 스테비아 capa 200톤, 실 생산량 60톤
- 효소처리스테비아 수출 (중국 30%, 미국 50%, 인도 20%, 동남아 20%)
- 효소처리스테비아 16년 중국 식품첨가제 GB등록 이후 매년15-20% 성장 중.

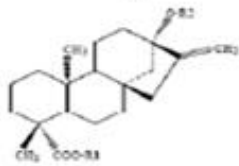
1.2.4. Shandong Shengxiangyuan Biotechnology

- RM/RD/RC/RA/STV/효소처리 스테비아 판매中,
- 판매 비율: RA 50%, TSG 27%, 효소처리 스테비아 20%, STV 2%, RM 1%
- 효소처리 스테비아 생산량 500톤/연간
- 효소처리 스테비아 판매비율: 중국 20%, 수출 80%
- 수출국 한국/일본 25%, 미국 20%, 동남아 20%, 유럽 10%
- 중국 효소처리 스테비아 시장은 현재 초기발전 단계임
- 현재는 TSG위주의 시장이나, 향후 효소처리 스테비아 고성장 예상

1.3. 원료 확보 및 평가

1.3.1. 스테비아 원료 내 배당체 분석

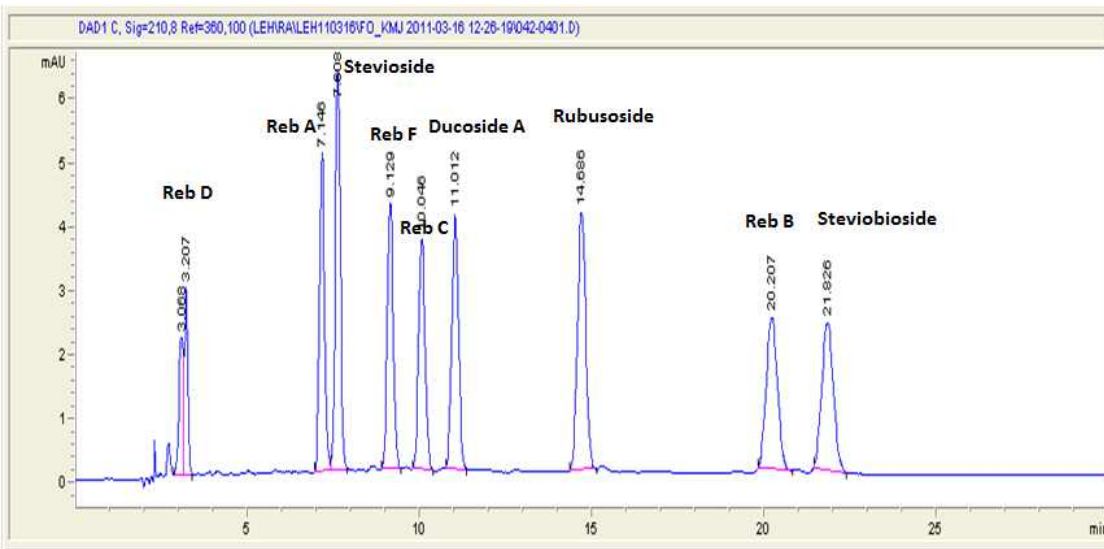
○ 분석항목 배당체 총 9종



Compound name	R1	R2
Stevioside	β -Glc	β -Glc- β -Glc(2 \rightarrow 1)
Rebaudioside A	β -Glc	β -Glc- β -Glc(2 \rightarrow 1) β -Glc(3 \rightarrow 1)
Rebaudioside B	H	β -Glc- β -Glc(2 \rightarrow 1) β -Glc(3 \rightarrow 1)
Rebaudioside C	β -Glc	β -Glc- α -Rha(2 \rightarrow 1) β -Glc(3 \rightarrow 1)
Rebaudioside D	β -Glc- β -Glc(2 \rightarrow 1)	β -Glc- β -Glc(2 \rightarrow 1) β -Glc(3 \rightarrow 1)
Rebaudioside F	β -Glc	β -Glc- β -Xyl(2 \rightarrow 1) β -Glc(3 \rightarrow 1)
Dulcoside A	β -Glc	β -Glc- α -Rha(2 \rightarrow 1)
Rubusoside	β -Glc	β -Glc
Steviobioside	H	β -Glc- β -Glc(2 \rightarrow 1)

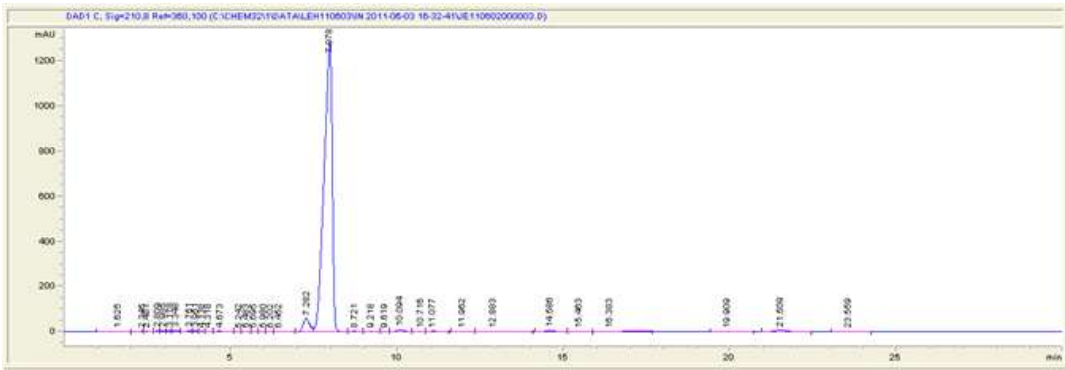
Steviol (R1 = R2 = H) is the aglycone of the steviol glycosides. Glc, Rha and Xyl represent, respectively, glucose, rhamnose and xylose sugar moieties.

Stevioside: 804.88
Rebaudioside A: 957.03



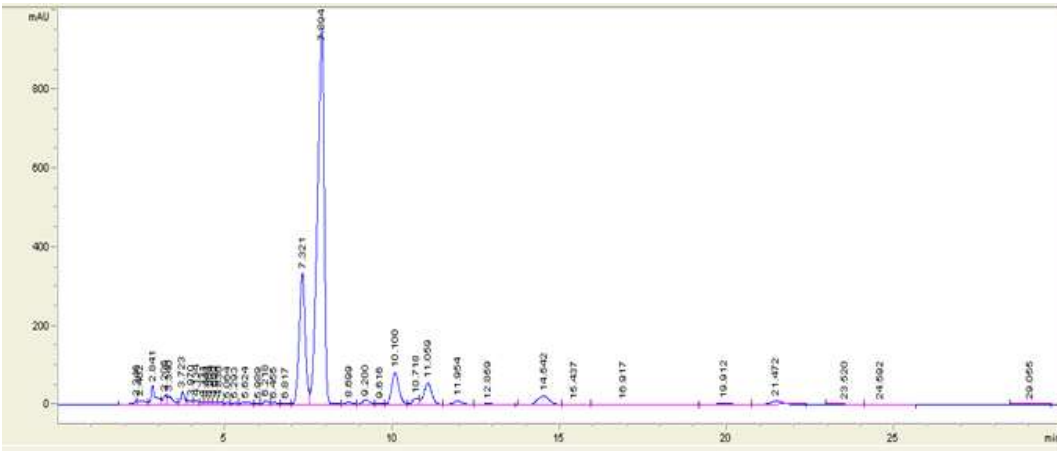
1.3.2. 스펙별 원료 확보하여 배당체별 함량 분석 진행함

○ STV90(Stevioside 90)



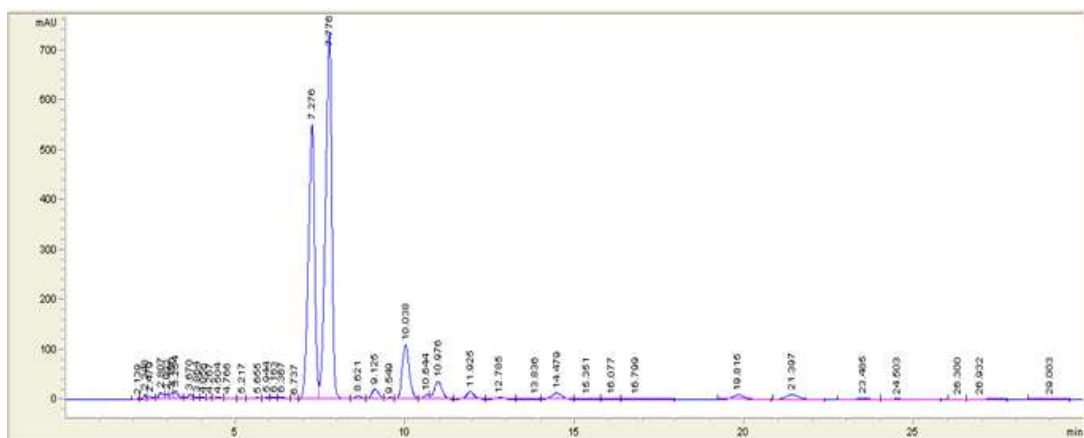
	Area %
Reb A	3.33
Stevioside	91.62

○ RA20(RebaudiosideA 20)



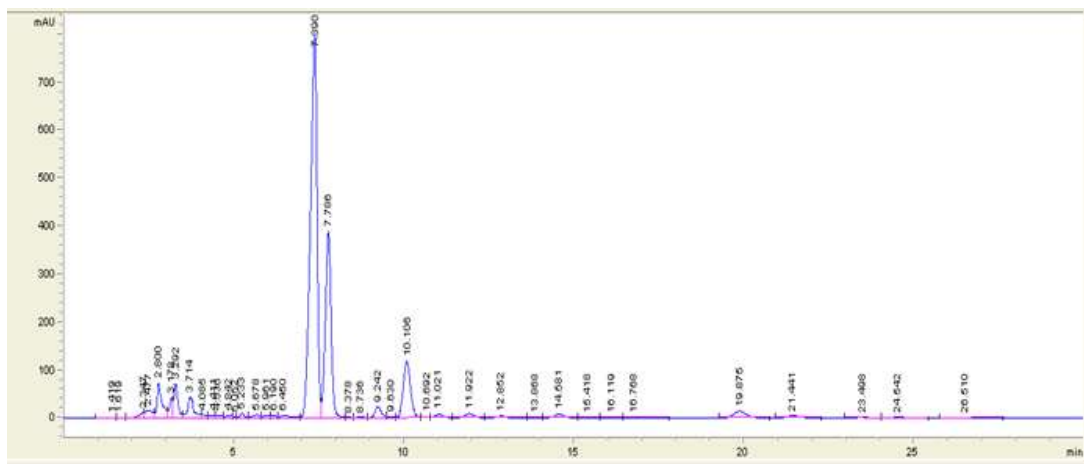
	Area %
Reb A	17.38
Stevioside	55.82
Reb F	0.8
Reb C	5.13
Ducoside A	3.72
Rubusoside	2.37
Steviobioside	1.05

○ RA40(RebaudiosideA 40)



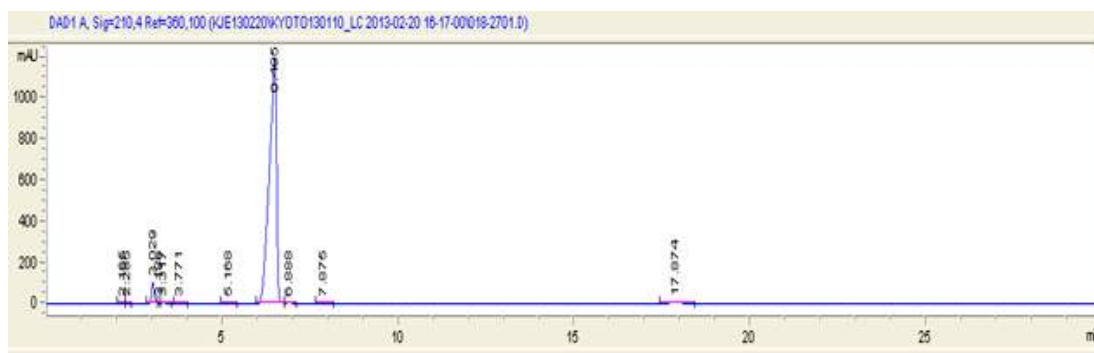
	Area %
Reb A	32.07
Stevioside	42.77
Reb F	1.44
Reb C	7.55
Ducoside A	2.72
Rubusoside	1.39
Reb B	1.1
Steviobioside	1.27

○ RA60(RebaudiosideA 60)



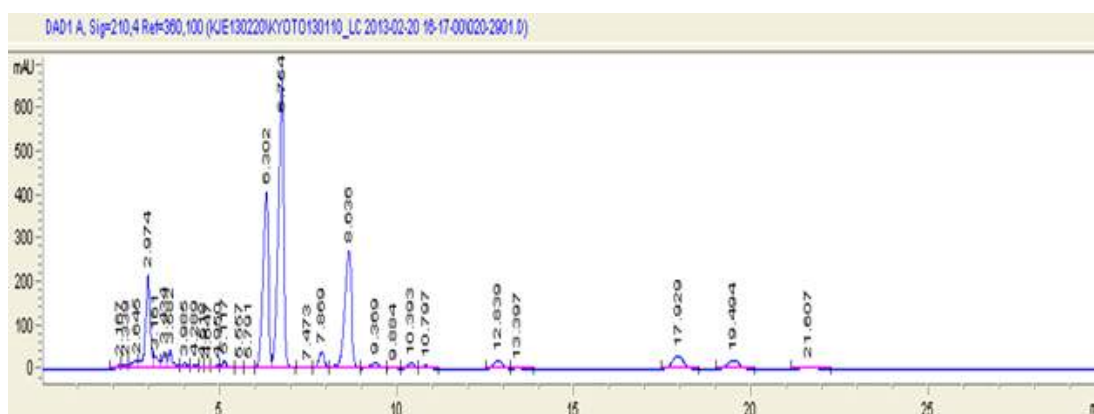
	Area %
Reb D	3.94
Reb A	48.6
Stevioside	20.51
Reb F	1.43
Reb C	8.01
Ducoside A	0.82
Rubusoside	0.76
Reb B	1.67

○ RA97(RebaudiosideA 97)



	Area %
Reb A	95.4
Stevioside	0.22

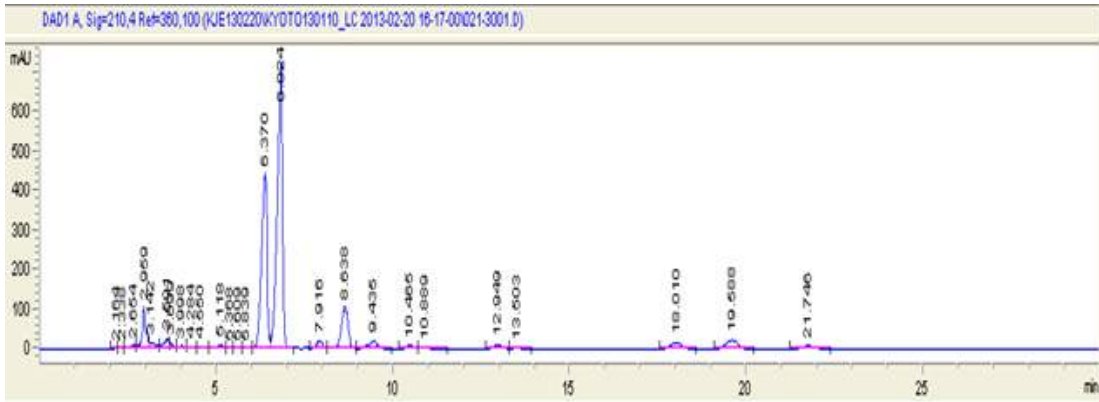
○ SG80(Steviol glucoside 80)



	Area %
Reb D	0.58
Reb A	19.16
Stevioside	33.38
Reb F	2.09
Reb C	16.26
Ducoside A	1.1
Rubusoside	1.5
Reb B	2.13
Steviobioside	0.64

76.84

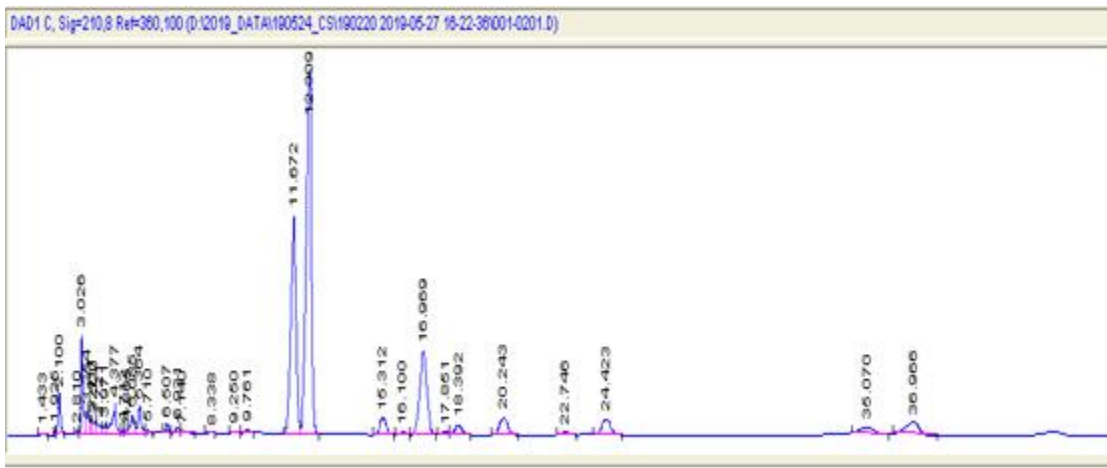
○ SG90(Steviol glucoside 90)



	Area %
Reb D	0.72
Reb A	26.66
Stevioside	43.38
Reb F	1.18
Reb C	7.46
Ducoside A	0.65
Rubusoside	0.26
Reb B	2.88
Steviobioside	1.02

84.21

○ 부산물(모액당)



	Area(%)
RD	2,471
RA	21,928
STV	35,563
RF	1,974
RC	11,255
Dul	1,275
Rub	2,581

○ RebaudiosideD



Time	Area	Area%
1,8	9,6	1,243
4,258	748,8	97,414
4,996	10,3	1,343

○ RebaudiosideM



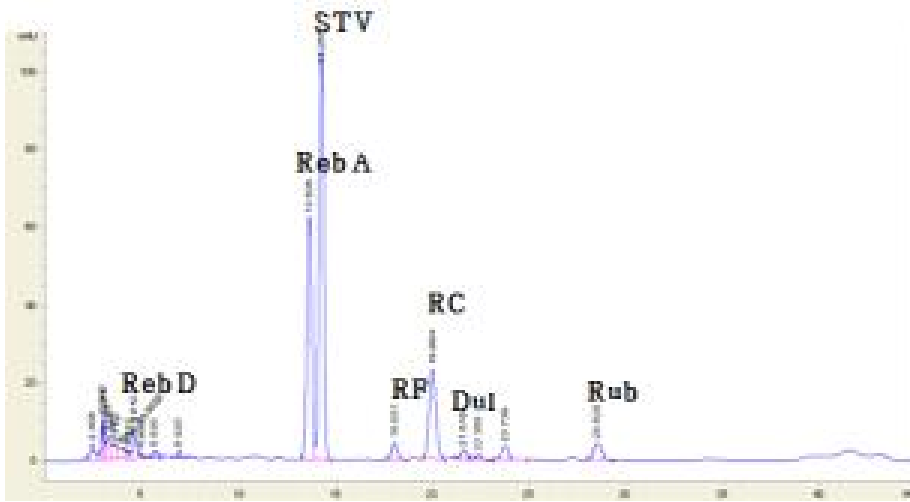
Time	Area	Area%
4,411	15,3	0,556
5,34	2649,4	96,138
7,606	17,1	0,619
12,158	74,1	2,687

2. 당전이스테비아 제조기술 개발

2.1. 효소반응 평가

2.1.1. 저가원료 당전이스테비아(G-Stevia) 제조 위한 당전이 효소 반응 평가

- 중국 S社모액당을 이용, 당전이 스테비아를 제조하였으며 하기 조건을 바탕으로 효소 반응을 수행
 - 원료의 RebA 함량은 24.29%, Stevioside는 40.15%
 - 효소 반응 19시간 이후에 전환율 92.22% 확인
- S社 모액당 원료 분석



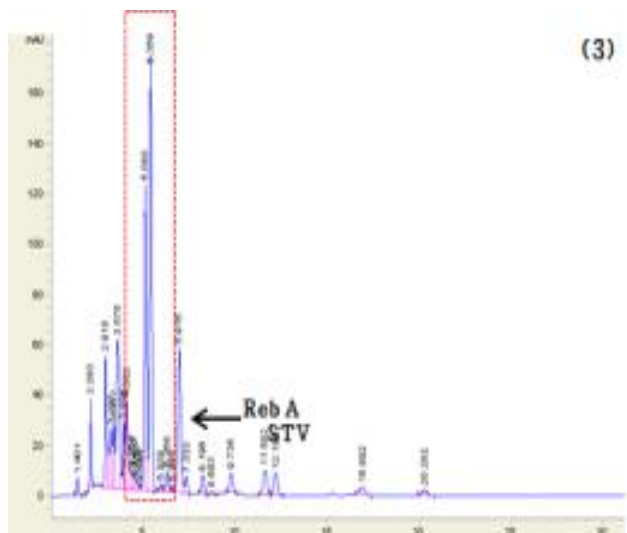
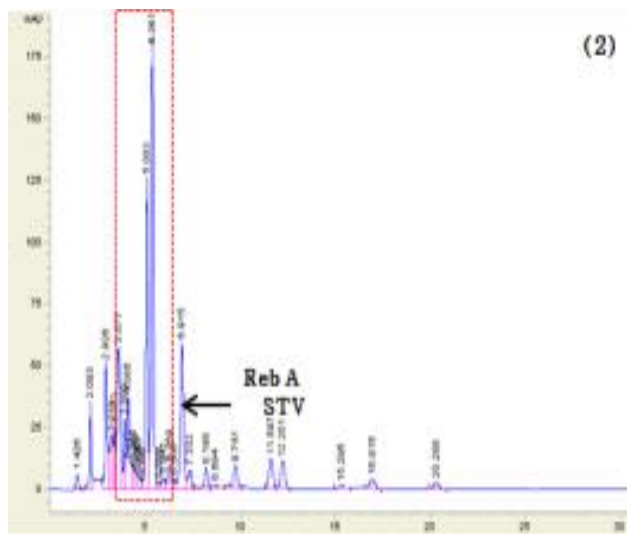
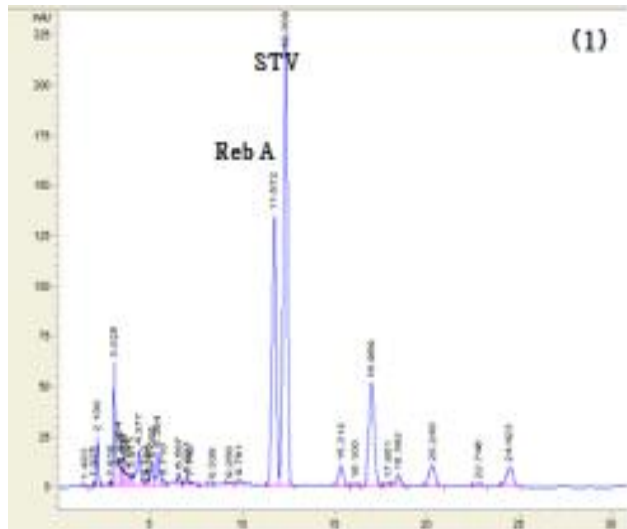
배당체 구분	함량 (%)
RebD	2.26
RebA	24.29
STV	40.15
RebC	12.33
RebF 외 2종	6.46
총 스테비올배당체 함량(%)	85.49

- 효소 반응 조건 확보

구분	조건
농도	10%
원료:설탕 비율	1:1 (중량 기준)
효소 활성	0.5U/ml이하
반응 시간	0~24시간 이내
반응 온도	40°C
반응 pH	pH 5.0

○ 반응시간별 당전이스테비아 반응액 내 스테비올 배당체 함량 및 전환을 평가

- (1) 반응 0시간(control), (2) 반응 19시간, (3) 반응 24시간



원료	배당체	반응시간별 스테비올 배당체 함량 (%)		
		0시간	19시간	24시간
S社 모액당	RebA	24.19	2.61	2.37
	STV	39.22	2.42	2.11
	RebC	12.14	1.08	0.94
	RebF 외 2종 (RD제외)	6.43	0.29	-
	전환율 (%)	-	92.22	93.41

2.1.2. 고가원료 당전이스테비아 (G-RebA) 제조 위한 당전이 효소 반응 평가

○ RA97을 이용하여 고순도 당전이 스테비아를 제조하였으며 하기 조건을 바탕으로 효소 반응을 수행하였음. 효소 반응 6시간 이내에 80.21%의 전환율을 보였고, 24시간내에 전환율 91.19%를 보이는 것을 확인하였음.

○ 효소 반응 조건

구분	조건
농도	10%
원료:설탕 비율	1:1 (중량 기준)
효소 활성	0.5U/ml 이하
반응 시간	0~24시간
반응 온도	40°C
반응 pH	pH 5.0

○ 시간별 당전이 스테비아 반응액 내 스테비올 배당체 함량 및 전환율

원료	배당체	반응시간별 당전이스테비올배당체 함량 (%)			
		0시간	6시간	21시간	24시간
RA97	RA	94.18	18.64	7.99	8.3
	RA-Glu(1)	-	57.52	52.85	52.56
	RA-Glu(2)	-	9.11	11.01	11.03
	RA-Glu(3)	-	6.64	11.61	11.55
	RA-Glu(4)	-	2.61	6.77	6.79
	RA-Glu(5) 이상	-	2.69	6.44	6.76
	전환율(%)	-	80.21	91.52	91.19

○ 공인성적서 확보

- 순도 95%이상 및 미반응 스테비올배당체 4%이하 등, 제품규격 확보 완료 (순조 80% 이상, 미반응 배당체 15% 이하)

제 L2019100089 호 공시확인 18AM-18C5-179K																											
시험·검사성적서																											
제품명	CJ사료	제조일자 (공통기원)	2019-10-09																								
제외인	업체명	씨제이비임세일(주)BLOSSOM PARK	성명																								
	주소	경기도 수원시 영통구 왕곡로 42번길 50 CJ Blossom park																									
제조번호		발수날짜	2019-10-17																								
검사의뢰유래	연구시험	접수번호	L2019100089																								
<p>귀하가 우리 연구원에 시험·검사뢰하신 견본은 다음과 같습니다.</p> <p>시험·검사 완료일 : 2019-10-30 시험·검사 책임자 : 김미연, 이장구, 이원성 검사관련 총 책임자 : 김원희</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>시험·검사항목</th> <th>시험·검사 결과</th> <th>시험·검사항</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>성상</td> <td>측정은 냉각과 가열의 정당한 감기를 갖는 백색의 분말</td> <td>양호인</td> </tr> <tr> <td>확인시험</td> <td>확인</td> <td>양호인</td> </tr> <tr> <td>비소(ppm)</td> <td>0.0009 ppm</td> <td>정다운</td> </tr> <tr> <td>납(ppm)</td> <td>0.0005 ppm</td> <td>정다운</td> </tr> <tr> <td>잔류항생제</td> <td>3.58 %</td> <td>양호인</td> </tr> <tr> <td>항생항류물(%)</td> <td>0.04 %</td> <td>양호인</td> </tr> <tr> <td>함량(%)</td> <td>스테비올배당체 : 29.48 %, 해당제당당량 : 65.62 % 미반응스테비올배당체 : 3.61 %</td> <td>양호인</td> </tr> </tbody> </table> <p>사용일자/호소처리상태</p> <p>※ 이 분석은 의뢰한 시험·검사 항목만을 대상으로 한 것입니다. ※ 시간이 부족한 경우 시험·검사 및 결과안내 별지로 하일 가능합니다. ※ 분석하지는 않으나 정확이 없습니다. 시험·검사뢰하신 시험·검사목적 이외의 결과 및 정보 등에 사용될 수 있으며, 재사용될 수 있는 경우 기존 의 제출 용도의 활용될 수 있습니다.</p> <p style="text-align: center;">2019년 10월 30일</p> <p style="text-align: center;">한국농수산식품연구원</p> <p style="text-align: center;">(19)한국농수산식품연구원 한국농수산식품연구원 http://www.knfr.or.kr 연락처: 02-111028-0400-1</p>				시험·검사항목	시험·검사 결과	시험·검사항	성상	측정은 냉각과 가열의 정당한 감기를 갖는 백색의 분말	양호인	확인시험	확인	양호인	비소(ppm)	0.0009 ppm	정다운	납(ppm)	0.0005 ppm	정다운	잔류항생제	3.58 %	양호인	항생항류물(%)	0.04 %	양호인	함량(%)	스테비올배당체 : 29.48 %, 해당제당당량 : 65.62 % 미반응스테비올배당체 : 3.61 %	양호인
시험·검사항목	시험·검사 결과	시험·검사항																									
성상	측정은 냉각과 가열의 정당한 감기를 갖는 백색의 분말	양호인																									
확인시험	확인	양호인																									
비소(ppm)	0.0009 ppm	정다운																									
납(ppm)	0.0005 ppm	정다운																									
잔류항생제	3.58 %	양호인																									
항생항류물(%)	0.04 %	양호인																									
함량(%)	스테비올배당체 : 29.48 %, 해당제당당량 : 65.62 % 미반응스테비올배당체 : 3.61 %	양호인																									

2.2. 관능평가

2.2.1. CJ제조 당전이 스테비아 1종과 상용 스테비아 소재(RebA, RebD, RebM)에 대한 관능 비교평가 진행함

○ 관능평가 설계 개요

실험단계/목적	Action	Sensory approach	비고
예비실험 단계 특정 설탕 농도와 동일한 감미도를 가지는 감미료의 농도 규명 실험	감미료별 단맛에 대한 Concentration-response curve의 규명	감미료 농도별 단맛 강도 규명	감미료의 시간에 따른 profile을 우선 분석하여 20-30%에서 단맛이 최고강도에 이르는 것을 우선 규명.
	설탕 10 bric에 상응하는 감미료 4종의 농도수준 규명	이항비교 검사 (Paired comparison test)	해당 시간대에서 단맛강도 분석 및 이항비교 검사 진행
본 평가 단계 동일 감미도일 때, 4종의 감미료의 sensory profile 분석	동일 감미도 (설탕 10bric) 일 때, 4종의 감미료에 대한 sensory profile 분석	묘사분석	단맛 시간-강도 분석 쓴맛 시간-강도 분석 세부속성 묘사분석

○ 시료의 정보

Abbreviation	Compound	Purity (%)	실측감미 (설탕 10Bx 기준)
RA	Rebaudioside A (Steviol glycoside)	≥ 95	75
CJ 당천이스테비아	Enzyme-modified steviol glycoside	≥ 95	75
RM	Rebaudioside M	≥ 95	115
RD	Rebaudioside D	≥ 95	115

○ 예비실험 1단계(단맛 강도의 감미료별 Concentration-Response curve)

- 훈련된 패널 7인을 이용하여 단맛 강도를 평가함
- 예비실험 1단계에 사용한 시료에 대한 정보 (% , w/w)

Abbreviation	conc1	conc2	conc3	conc4	conc5	conc6
RA	0.01	0.02	0.04	0.06	0.08	0.10
CJ	0.02	0.04	0.08	0.12	0.16	0.20
RM	0.01	0.02	0.04	0.06	0.08	0.10
RD	0.01	0.02	0.04	0.06	0.08	0.10

- 단맛강도에 대한 표준물질

단맛강도 점수	1	3	5	7	9	11	13
설탕용액 (% , w/w)	0.2	3	5.8	8.5	11.3	14.1	16.9

- 시료 준비/제시 방법

60 ml 플라스틱 소주컵에 10 ml 제공 (실온)

패널들은 동일 감미료의 6개의 농도별 시료를 한번에 제공받았으며 (=set), Set를 평가하는 순서는 randomize함.

동일 set 내에서는 강도가 증가하는 순서로 시료를 제공받음. (conc1 → conc2 → conc3 → conc4 → conc5 → conc6)
(참고) Lingering 효과가 order effect보다 더 클 것으로 판단되어 저농도에서 고농도 순서대로 제공

- 개별 부스에서 형광등 아래에서 각 시료의 peak 단맛 강도를 평가함
- Rinsing 방법

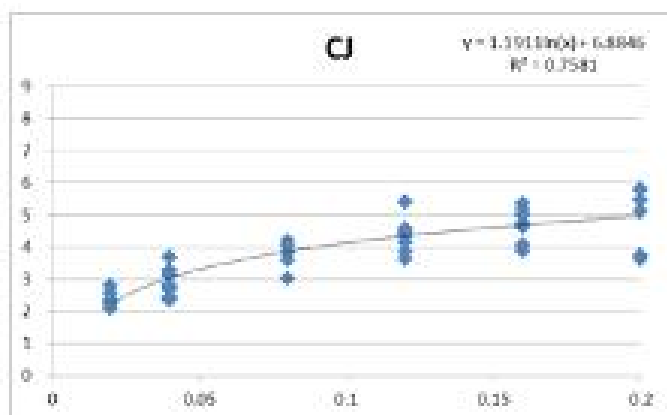
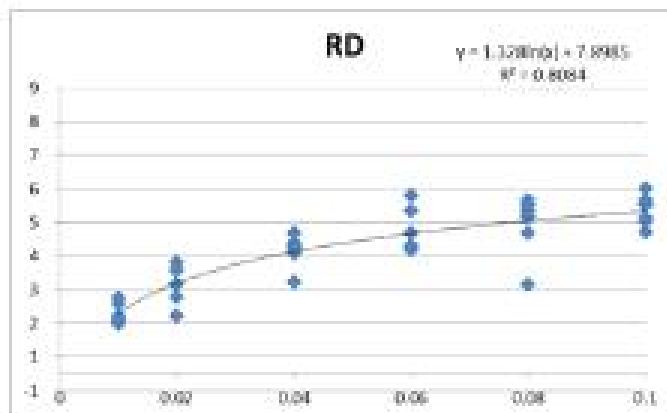
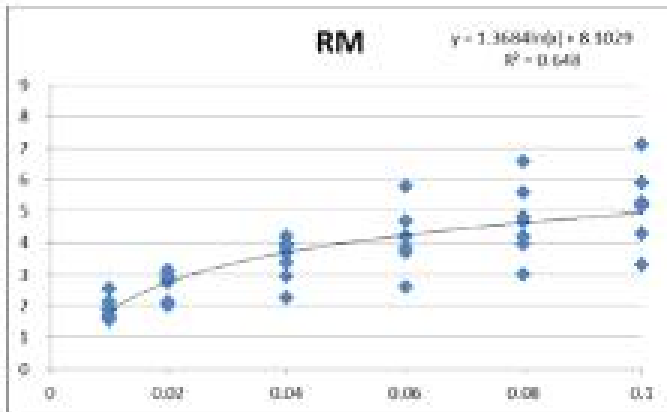
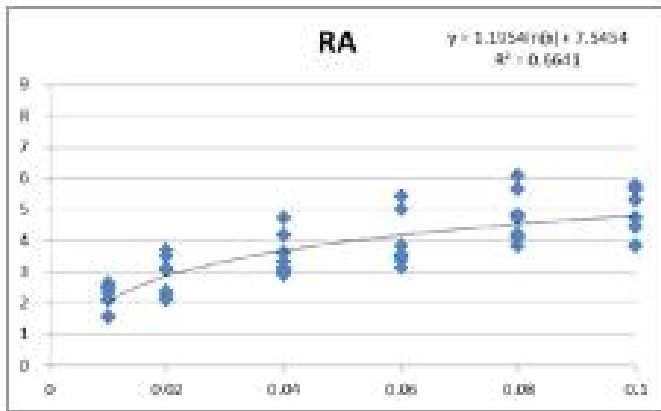
물(20-25°C) 2회 헹굼 + 휴식

한 세트 내 농도가 다른 시료간에는 평가 후 2분씩 휴식; 세트간에는 5분씩 휴식

- R-C curve규명 결과

■ 본 실험의 결과 도출된 R-C function을 통해서도 설탕 10bx 수준의 감미도 농도 규명이 불가능했음.
이는 문헌상의 정보와 다소 차이를 보여, 아래의 사항들을 보완하여 감미료별 SE 10%에 해당하는 농도를 재규명하기로 함
=> 일반적으로 감미료 profile 차이를 documentation 할 때 사용하는 감미도인 sucrose 10% equivalent로 지정하여,
이에 상응하는 감미도를 가지는 감미료의 농도를 규명하고자 함. → 이점비교 검사 수행

	R-C function equation	R square
RA	$y = 1.1954 \ln(x) + 7.5454$	$R^2 = 0.6641$
CJ	$y = 1.1911 \ln(x) + 6.8846$	$R^2 = 0.7581$
RD	$y = 1.328 \ln(x) + 7.8985$	$R^2 = 0.8084$
RM	$y = 1.3684 \ln(x) + 8.1029$	$R^2 = 0.6480$



○ 예비실험 2단계(감미료別 sucrose 10% equivalent 감미도를 가지는 농도 규명, 이점비교 검사)

- 이점비교검사에 사용한 시료에 대한 정보 (% , w/w)

Abbreviation	conc1	conc2	conc3	conc4	conc5
RA	0.053	0.093	0.133	0.173	0.213
CJ	0.053	0.093	0.133	0.173	0.213
RM	0.027	0.047	0.067	0.087	0.107
RD	0.027	0.047	0.067	0.087	0.107

- 시료 준비 및 제시방법

60 ml 플라스틱 소주컵에 10 ml 제공 (실온)

패널들은 동일 감미료 내에서 설탕 10%와 pair를 이루는 5 수준의 농도별 시료를 한번에 제공받았으며 (=set) (그림 1).

Set를 제공받는 순서는 randomize함.

동일 set 내에서는 pair를 평가하는 순서는 randomize함 (다만 conc5 pair 직후에 conc1 pair는 오지 않도록 함)

한 pair 내에서 평가하는 순서는 randomize 함

- 평가방법-제공받은 pair의 두개 시료 중 각각 맛을 보고, 더 “달다”고 생각하는 시료를 고름 (forced choice question)

- Rinsig방법

물(20~25°C) 2회 헹굼 + 휴식

한 pair 내에서 시료간에는 30초 휴식/ pair 간에는 2분씩 휴식/ 세트간에는 5분씩 휴식

- 데이터 분석

각 pair별로 두 개의 비교 시료 중 더 강하다고 평가한 패널요원의 수를 세어 시료간 인지 차이를 나타내는 d' 값으로 환산함.

d' 값이 가장 적은 값 = 설탕시료와 차이가 가장 적은 단맛 농도로 판단함.

- Set구성 예시

	pair 내에서 선시식	pair 내에서 후시식
pair 평가순서 1	RM conc4	설탕 10%
pair 평가순서 2	설탕 10%	RM conc2
pair 평가순서 3	설탕 10%	RM conc1
pair 평가순서 4	RM conc3	설탕 10%
pair 평가순서 5	설탕 10%	RM conc5

■ 이점비교검사 결과

- ReBA

	응답결과		응답 proportion		d'
	RA	선택 10%	RM	선택 10%	
conc1	0	14	0.00%	100.00%	15.10
conc2	1	13	7.14%	92.86%	2.07
conc3	2	12	14.29%	85.71%	1.51
conc4	8	6	57.14%	42.86%	0.25
conc5	4	10	28.57%	71.43%	0.80

* Total number of trials = 14

- ReBD

	응답결과		응답 proportion		d'
	RD	선택 10%	RM	선택 10%	
conc1	1	14	6.67%	93.33%	2.12
conc2	6	9	40.00%	60.00%	0.36
conc3	6	9	40.00%	60.00%	0.36
conc4	10	5	66.67%	33.33%	0.61
conc5	5	10	33.33%	66.67%	0.61

* Total number of trials = 15

- ReBM

	응답결과		응답 proportion		d'
	RM	선택 10%	RM	선택 10%	
conc1	1	14	6.67%	93.33%	2.12
conc2	6	9	40.00%	60.00%	0.36
conc3	5	10	33.33%	66.67%	0.61
conc4	8	7	53.33%	46.67%	0.12
conc5	10	5	66.67%	33.33%	0.61

* Total number of trials = 15

- CJ당전이스테비아

	응답결과		응답 proportion		d'
	CJ	선택 10%	RM	선택 10%	
conc1	1	14	6.67%	93.33%	2.12
conc2	6	9	40.00%	60.00%	0.36
conc3	9	6	60.00%	40.00%	0.36
conc4	12	3	80.00%	20.00%	1.19
conc5	13	2	86.67%	13.33%	1.57

* Total number of trials = 15

두 시료간의 perceptual difference를 의미하는 지표인 d'을 계산하여, 선택 10%와 가장 감미도 차이가 적은 감미료의 농도를 규명함.

compound	최소 d' range	Min. d' value	조정여부	최종 결정 농도
RA	Conc. 4	0.25	- d' 값이 가장 작은 농도인 conc.4으로 패널에게 확인하였을 때, 단맛이 다소 높은 수준으로 평가됨. 이에 conc. 3와 conc. 4를 두 시료를 10% sucrose와 내부적으로 비교하여, conc. 3으로 결정	Conc. 3 (0.133%)
CJ	Conc. 2-3	0.36	- conc. 2와 conc. 3를 두 시료를 10% sucrose와 내부적으로 비교하여, conc. 3으로 결정	Conc. 3 (0.133%)
RM	Conc. 4	0.12	-	Conc. 4 (0.067%)
RD	Conc. 2-3	0.36	- d' 값이 가장 작은 농도 중 conc.3으로 패널에게 확인하였을 때, 단맛이 다소 높은 수준으로 평가됨. 이에 conc. 3와 conc. 4를 두 시료를 10% sucrose와 내부적으로 비교하여, conc. 4으로 결정	Conc. 4 (0.067%)

○ 본실험(동일 감미도, 설탕 10brix기준일 때, 4종의 감미료에 대한 sensory profile 분석-묘사분석)

- 본실험에 사용된 시료의 정보(w/v %)

Abbreviation	Conc. (% w/v)
RA	0.133
CJ	0.133
RM	0.087
RD	0.087

- 시료준비/제시방법/평가방법

60 ml 플라스틱 소주컵에 10ml 제공 (실온) ※1회 섭취량

패널들은 한 시료당 10ml 분량의 시료 3 잔 (단맛평가용, 쓴맛평가용, 세부속성 평가용)을 제공받음 (총 30ml / 시료)

패널별로 시료를 평가하는 순서를 randomize함.

- 표준척도 단맛

단맛 표준척도 설탕용액 (% w/w)	0.2	3	5.8	8.5	11.3	14.1	16.9
단맛강도 점수	1	3	5	7	9	11	13

- 표준척도 쓴맛

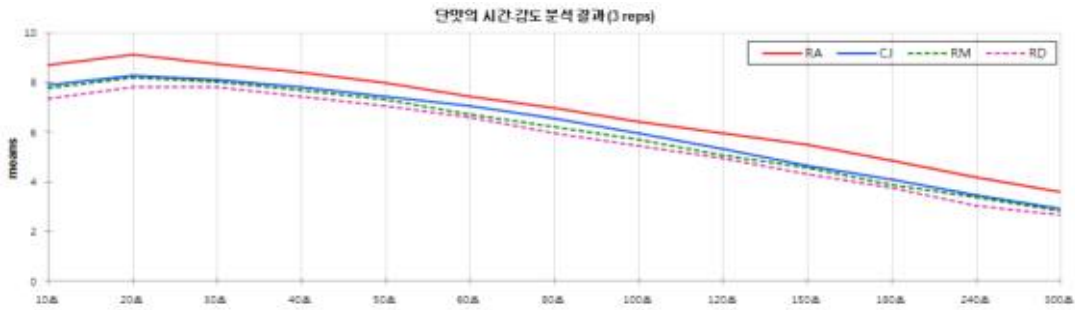
쓴맛 표준척도 카페인 용액 (% w/w)	0.009	0.021	0.033	0.046	0.058	0.071
쓴맛강도 점수	1	3	5	7	9	11

- 기타속성

Sensory Attribute	Definition	표준물질
정향/팔각 향미	정향/팔각/아말감 등에서 느껴지는 특유의 향미	팔각, 정향
금속성	철 등의 금속성 물질에서 느껴지는 특유의 향미	<u>스테인레스</u>
떫은 감각	<u>탄닌</u> 등을 먹었을 때 혀가 오그라드는 감각	Tannic Acid 0.021% solution
<u>바디감</u>	입안에서 느껴지는 액체가 묻어지는 느낌	Weak: <u>포카리스웨트</u> low sugar Strong: <u>포카리스웨트</u>

○ 관능 비교분석 최종결과

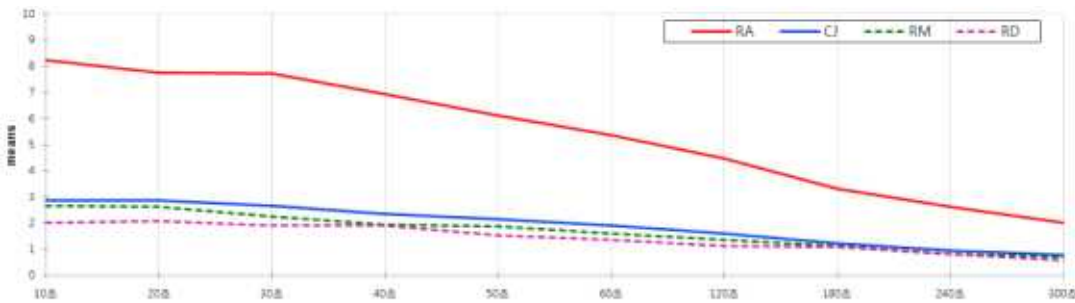
■ 소재별 시간에 따른 단맛 강도 변화



	10초	20초	30초	40초	50초	60초	80초	100초	120초	150초	180초	240초	300초
RA	8.689 a	9.142 a	8.738 a	8.418 a	8.004 a	7.443 a	6.970 a	6.425 a	5.946 a	5.486 a	4.849 a	4.172 a	3.585 a
CJ	7.913 b	8.260 b	8.119 b	7.810 b	7.450 b	7.074 ab	6.557 ab	5.957 ab	5.330 b	4.628 b	4.118 b	3.471 b	2.909 b
RM	7.782 b	8.212 b	8.010 b	7.710 b	7.327 b	6.723 b	6.205 bc	5.717 bc	5.049 b	4.545 b	3.900 b	3.398 bc	2.825 b
RD	7.366 c	7.831 c	7.816 b	7.435 b	7.054 b	6.608 b	5.954 c	5.441 c	4.936 b	4.295 b	3.773 b	3.052 c	2.649 b

■ 4종의 감미료에 대해 300초까지 단맛 패턴에 있어서는 큰 차이가 나타나지 않음.
 ■ Peak 단맛 강도의 경우, 동일한 강도가 될 수 있도록 맞추었으나, 약간의 강도 차이가 나타남
 - RA > CJ = RM > RD 순으로 유의적인 차이가 나타남.
 : RA는 예상보다 다소 높은 단맛 강도로 나타났으며, RD는 다소 낮은 단맛 강도로 나타남 (※10% 설탕의 단맛은 약 8.4점 수준임)
 : CJ 및 RM 시료는 예측한 수준의 단맛 강도로 평가됨.

■ 소재별 시간에 따른 쓴맛 강도 변화

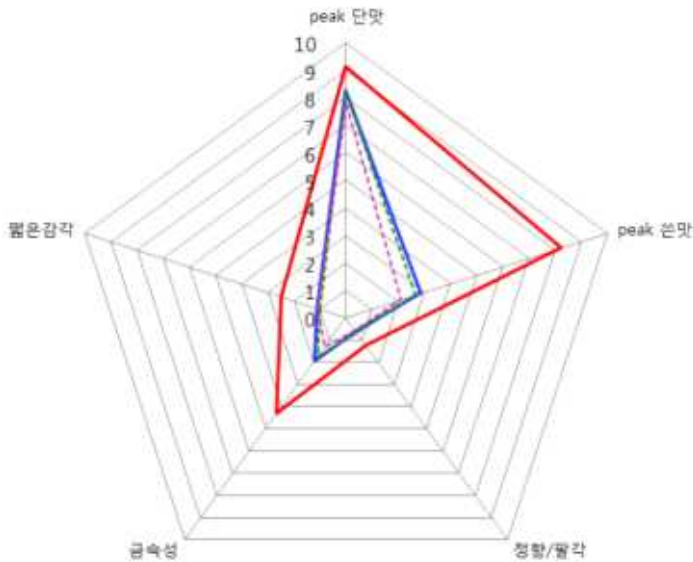


	10초	20초	30초	40초	50초	60초	120초	180초	240초	300초
RA	8.221 a	7.762 a	7.714 a	6.927 a	6.124 a	5.349 a	4.459 a	3.325 a	2.643 a	2.023 a
CJ	2.870 b	2.851 b	2.649 b	2.370 b	2.165 b	1.923 b	1.603 b	1.221 b	0.954 b	0.767 b
RM	2.660 b	2.612 b	2.262 bc	1.948 bc	1.883 bc	1.595 bc	1.361 bc	1.124 b	0.808 b	0.717 b
RD	2.023 c	2.091 c	1.920 c	1.894 c	1.539 c	1.377 c	1.131 c	1.086 b	0.830 b	0.588 b

■ 4종의 감미료에 대해 300초까지 쓴맛 패턴에 있어, 약간의 차이는 보였으나 두드러지는 차이는 나타나지 않음.
 : RA, CJ, RM은 10초에서 peak 쓴맛 강도를 보였으나, RD의 경우 20초에서 peak 쓴맛 강도를 보임
 ■ Peak 쓴맛 강도의 경우,
 - RA > CJ = RM > RD 순서의 경향을 120초대까지 보인 후, 이후부터 300초까지는 RA > CJ=RM=RD의 경향을 보임.
 - RA에 비해 CJ 시료의 쓴맛은 크게 감소하여, 전반적으로 RM 시료와 유사한 수준의 쓴맛 강도/패턴을 보임.

▪ Sensory profile 분석결과(강도)

	peak 단맛	peak 쓴맛	정향/팔각	금속성	뽕은감각
RA	9.142	8.221	1.250 a	4.283 a	2.501 a
CJ	8.260	2.870	0.625 b	1.942 b	1.135 b
RM	8.212	2.660	0.691 b	1.743 bc	1.017 b
RD	7.831	2.091	0.558 b	1.323 c	1.082 b



▪ Sensory profile 분석결과(바디감)

	바디감	바디감 (4 brix)※
RA	1.424 d	2.5
CJ	1.930 c	4.0
RM	2.484 b	2.5
RD	4.141 a	3.0

※ 에멀전을 넣지 않고 RD를 완전 용해시킬 수 있는 최고 농도 = 4 brix 하에서 평가하였으며, 해당 결과는 consensus rating 결과임

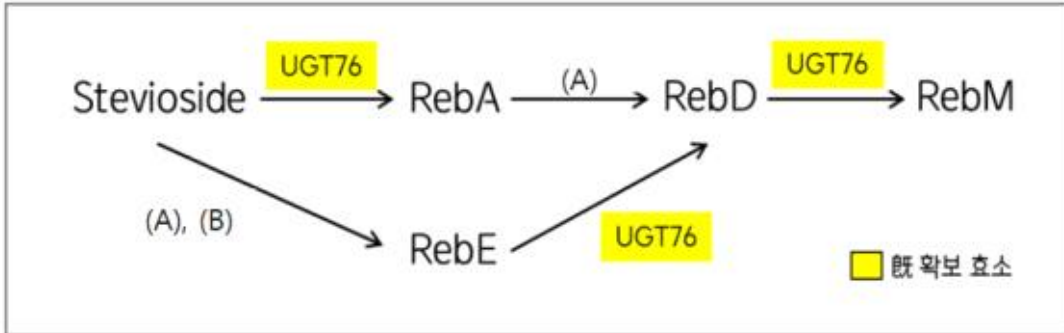
- 종합적으로 spider web plot의 형태를 보았을 때,
 - (1) 기존 제품인 RA에 비해 CJ 시료는 target 제품인 RM 및 RD의 형태에 많이 유사해진 것을 알 수 있음.
 - (2) CJ 시료는 target 제품들 중 RM와 상당히 유사한 profile을 지니는 것으로 나타남.
 - (3) CJ 시료는 RD에 비해 peak 쓴맛 및 금속성이 약간 높은 것으로 나타남.
- 바디감의 경우,
 - 10 brix에서는 RD가 높게 나타났으나, 이는 RD의 용해도가 낮아 용액의 에멀전화(분산형태)에 기인한 결과인 것으로 보임.
 - RD가 완전 용해되는 4brix에서는 CJ 시료의 바디감이 가장 높게 나타남, 설탕과 유사한 입촉감을 가장 잘 구현하고 있는 것으로 나타남.

3. RebD/M 제조기술 개발

3.1. 특허분석

3.1.1. 선행 특허 조사 및 기술개발 전략 수립

- 저가 스테비아 원료로부터 RebD/M 개발 효소반응 pathway 확보



- 특허 회피 可 (서열 A identity 65% 미만, 서열 B 90% 미만) 유전자 8종 확보
- Stevioside를 RebA로 전환하는 효소에 대한 기술개발 및 특허를 既 확보함
- 효소 1종을 신규로 개발하여 stevioside를 RebD/M으로 전환하는 기술을 완성하고자 함

3.2. 서열 상동성 기반 후보효소 탐색

3.2.1 효소(A) 서열 상동성 기반 효소 탐색

- 타겟(A) 아미노산 서열

```

MDSGYSSSYAAAAAGMHVVICPWLAFGHLLPCLDLAQLASRGHRVSEFVSTPRNISRLLPPVRPALAPLIVAFVAL
PLPRVEGLPDGAESTNDVPHDRPDMVELHRRAPDGLAAPFSEFLGTACADWVIVDVFHHWAAAAALEHKVPCA
MMLLGSAMHIASIADRRLERAETESPAAGQGRPAAAPTFEVARMKLIIRTKGSSGMSLAERFSLTLRSSSLV
GRSCVEFEFETVPLLSTLRGKPIITFLGIMPPLHEGRREDGEDATVRWLDAQPAKSVVYVALGSEVPLGVEKVH
ELALGLELAGTRFLWALRKPTGVSDADLLPAGFEERTRGRGVVATRWVPMQMSILAHAAVGAFLTHCGWNSTIE
GLMFGHPLIMLP IFGDQGPNARLIEAKNAGLQVARNDGDGSGFDREGVAAAI RAVAVEEESKVFQAKAKLQE
IVADMACHERYIDGFIQQLRSYKD
  
```

- 선정 후보 (A)-1

```

MDDAGYSSAYSPLHVVICPWLAFGHQLPCLDLAERLASRGHRVSEFVSTPRIIARLPPVRPTAAQLINLVALPL
PSVDGLPEGAESTNDVPDFKELHRKAFDGLALPFSEFLGAACAKQGHPDWILVDIFHHWAAAAAVEHKVF
HENLVLVSYFHPCLYSFNSSHVHDQLMYTTCQVPCAMLLLGAASFIASGAGQLFEHAASGVVQVQERPSSTEPK
FEIEMRELIITQRASGMSIAERVSLTLQRSNLAAMRSCVEWEPESVPLVASLGVGGKPVVPLGLLPPSPGGGR
GVCKDGKDDATVKWLDVQPAKSVVYVAMGTEVPLPAEQVHELAFGIELAGTRFLWALRKPSGGAPDADILPPG
FEDRTAGRGLVRTGWVPMQMSILGHDAVGAFLTHCGWNSIIEGLLFGHPLVMLPILGDQGPNARLMEGKKGVG
VQRDNGDGSFNREGVAMAVRAVMVEEESKIFKANAKKMQEIVADTERHERYIDGFIQQLRSYKE-
  
```

- 선정 후보 (A)-2

```

MDETGSPPPLHVVICPWLAFGHLLPCLDLAERLASRGHRVSLVSAAPRNIAARLPPVRPAVAPFVGLVALPFPRV
AGLPDGAESTNDLPDFKELHRKAADGLTAPFSDYLESLCAEPGGKRPDWIIVDYFNDWAAAAAIQHKVPCAM
LALLAATVVATLDILLERTASRSAGAPRFATEKTGLMSLQCKWMSIAEQVSSTLQRCCLVAMRSCSEWEPF
SVAAHAATFGGKPVVPLGLLPPSPDGRRGDSGKDDTAVRWLDAQLAKSVVYVALGSEVPLRPEEVRELALGLQ
LAGTRFLWALRKPPGVDADVLLPQGFEECTRGRGLVITGWVPMQMSILGHDAVGAFLTHCGLSSTIEGLLFGRP
LVMLPIMGDQVPNARLMECRKVGVLVPRNEKDCSFDREGVATAIQAVAVEEERVRFTANAKKLEVVSDTEC
HERYIDRFIQQLRCYK-
  
```


○ 선정 후보 (A)-3

MDAAGSSSSSPLRIAIVPWLAFGHLLPYLELAERLAARGHRVSVFVSTPRNLARLPPLRPAAPRVDLVALPLP
RVEGLPDGAESTNDVPPDEREPLWKAFDGLAAPFAGFLTAACADEGTRPHWI IADSFHHWAAAAALEHKVPSK
VQCPNREPMSLTSWFHTSI PCISKTSMDFSIGHQVPCAMLLPTAALIAASAGAGRPSFEEHAEQQPQPRYEQE
GRATLLTGDGMSGMSIMQRSVLTLEKCKLTAIRSCVWEVEPECLPLVSEFIGKPVVPLGLLPSPDGGRRRAANT
NGEDATIRWLDAQPPNSVVYVALGSEVPLPVEQTHELALGLELSKTRFLWALRKP SGVLD AEMLP MGFQERIH
GHGLVTTGWVPQMSILAHGAVGSFLTHOGRNSLIEGLLFGHPLIMLP IFGDQGP NARLM EGK KVG LQVARNEN
DGSFDRKALRAQSGASC-

○ 선정 후보 (A)-4

MDAAGSSRSRSPRPLRIVIPCWLAFGHMLPYLELAERLASRGGHVSFVSTPRNLARLP PRRHVIDLVALSLPRV
EGLPDGAESTNDVPSDRRELLWEAFDALAAPFAEFLAAACAIDADNGNSKRDPDWVLADTFHHWAPAAAREHG
PCAMLLPSAAVIAAFACGAQGHAEAAADTTVGGRRPPGMPPRYEWEGDAPLFAVLAASGLSIARRTSILTLEKCT
IAAIRSCPEWELDAFPLAAALLGKPLVPLGLLPSPDGGRRATDAHRDDAAVRWLDVQPKSVVYVALGSEVPL
RVELVHELALGLELAGTRFLWALRKP RGVSDADVLPAGFLERTHGHGLVTMGWVPQIAIILAHGAVGAFTHCG
RNSLIEGLLYGHPLIMLP IFGDQGP NARLM ERK VGLQVERND DGSFDRHG IASAVRAVMVEEDTRKVFVAN
AMKMQEIVADKELHERYVDFVQELRSYITDGNSSSTPADEM-

3.2.2. 효소(B) 서열 상동성 기반 효소 탐색

○ (B) 아미노산 서열

MATSDSIVDDRKQLHVATFPWLAFGHI LPYLQLSKLIAEKGHKVSFLSTTRNIQRLSSHISPLINVVQLTLPR
VQELPEDAEATTDVHPEDI PYLKKASDGLQPEVTRFLEQHS PDWIIYDYTHYWLPSIAASLGISRAHF SVTTP
WAIAYMGPSADAMINGSDGRTTVEDLTTTPPKWFPFPFTKVCWRKHDLARLV P YKAPG I SDGYRMGLVLRGSDCL
LSKCYHEFGTQWLPLETTLHQVPVVPVGLLPEI PGDEKDET WVS IKKWL D GKQKGSVVYVALGSEVLVSQTE
VVELALGLELSGLPFVWAYRKP KGP AKSDSVELPDGFVERTDRGLVWTSWAPQLRILSHE SVCGFLTHCGSG
SIVEGLMFGHPLIMLP IFGDQPLNARLLEDKQVGIEI PRNEEDGCLTKESVARSLRSVVVEKEGEIYKANARE
LSKIYNDTKVEKEYVSQFVDYLEKNARAVAIDHES

○ 선정 후보 (B)-1

MPTTETDSLHGRKQLHVAMFPWLAFGHI IPFLELSKLFIAQKGHKVSFLSTTRNIQRLPTLPSHLSPLINLVKL
TLPHVPELPRNAEATMDVHTDDI PYLKKAFDGLLPEVTRFLEEE SPDWIIYDFAPYWLPSVAAGLGISRAYS
IVNAWFGAFIGPSSDDLINSSDGRTKAEDFLT PPKWVPFPSKLCYRKHEASWLLGGFSVNASGVSDTYRSGMV
LKGSDCMFIRHCYEFEPQWLTLLERLHQLPVI PVGLMPPETPTTVGEEKNDTWMTVKAWLDGQKGHVVYVAL
GSEVMVSKSELAEALGLELSGLPFFWALRKPAGSNESNSVELPDGFLETRHRRAVVWTSWAPQLQILSHASV
GGFLTHCGWSSIVEGLMFGHPLIMLPFLVDQGLNARILVDRKQVGIEVPRNEEDGSFTKESVARALRSVVVSD
GRIYKANAMELSEIFGDTKLEKRYINNFIDYLEKKRRVVAINNET-

○ 선정 후보 (B)-2

MAAIDDHKQLHVAMFPWLAFGHI IPFLELSKLFIAQKGHKVSFLSTTRNIQRLPTLPSHLSPLIYLVLKTLPHV
QELPHNAEATMDLRTGETHEYLKKA FDGLQPEVTRFLEEE SPDWIIYDFAPYWLPSVAAGLGISRAFLSMPNA
WFIAFRGSPSMDLINNTDGRTTAEDFMT PPKWVTFPSKLYRKHEAKWMDRLSVNASGVSDAYRSGMVLKGS
CLFIRHSYEFEPQWLTLLLEELHHPVVPVGLMPPETPTNVGDETWVT IKKWL D GKQKGHVVYVALGSEVMSK
SELAELAVGLELSGLPFFWALRKPVGSTELSLPDGFSERTSDRGVVWKS WAPQLKILRHESVGGFLTHCGWSS
IVEGLMFSHPLIMLPFVVEQGLNARILVDRKQVGIEI PRNEEDGSFTKESVARSVRSVVVEDEGKIYKANAMKL
SQIFGDTELEQNYINNFIDYLEKKRRVVSM-

○ 선정 후보 (B)-3

MATTETDSLHGRKQLHVAMFPWLAFGHI LPFLELSKLFIAQNGHKVSFLSTTRNIQRLPTLPSHLSPLINLVKL
TLPHVQELPQNAEATMDLRTGETHDHLKRAFDGLQPEVTRFLEEE SPDWIIYDFAPYWLPSVAAGLGISR
SIVTPWFIAFLGASADDLINGSDDRTTAEDIMAPPKVVFPFSKLCYRKHEANLVMCHYSSNASEVSDAYRLGM
ILNGSDCMFMRICYELEPQWLTLLLEKLHQLPVVPVGLLPPPTNIGDEKDET WVT V K K W L D S Q Q K G H V V Y V A L G S
EFMVSKSELDELALGLELSGLPFFWALRKPVGSTELNSVELPNGFLERTRDRGVVWTSWVPQLQVLSHESVGG
FLTHCGWSSSTVEGLMFGHPLIMLPFLVDQGLIARILVDRKQVGVEVPRNEEDGSFAKESVARSVRSVVVDDEGK
IYKANAMAWSNVFGDTKLQKKYIDDFIDYLEKKRRVVA-

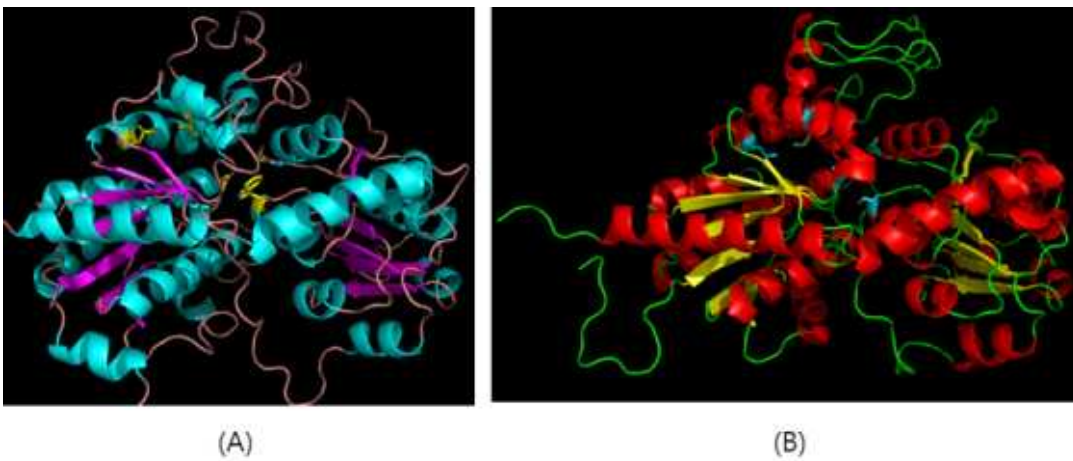
○ 선정 후보 (B)-4

```
MATTGSSNDRKQLHVAMFPWLAFGHI I PFLELSKSI AQNGHKV SFLSTTRNI QRLPTLPSHLSPLINLVKLTLL
PHVQELPLNAEATMDVVRTDDIHYLKKAFDGLQPQVTRFLEEESPDWII YDFAPYWLPPVAAGLGISRAFFLMV
NAWFMAFMGSSPEDLINGS DYRKTAADFLT PPKWIPFPPTNI CYRKHEASWMVGNISVNASGVSDAYRSGMVLK
GSDCIFI RHCYEFEPQWLILLEKLHRLPVV PVGLMPPEPTPTNVEDGAWMEVKKWLDGQQKGRVVYVALGSEVI
VSKSELSELALGLELSGLPFFFWALRE PAGSTESDSVELPDGFLETRTRGRGMVWTSWVPQLQILSHE SVGGFLT
HCGWSSVVEGLMFGRPLIMLPFLVDQGLNARGLVDKQVGI E VPRSEEDGSITKDSVARSVSSVVVND EGKIYK
ANAMELSRI FGDTKLQKKYVDDFIDYLA KWKGVA AFDH-
```

3.3. 구조분석 및 핵심 아미노산 선정

3.3.1. 타겟 효소 (A), (B)의 3차원 구조 분석 및 핵심 아미노산 선별

○ GT-B fold에 속하는 단백질 구조 확인 및 기질 docking으로 binding 관여 핵심 아미노산 선정함



3.4. 구조기반 후보효소 탐색

3.4.1. 구조 유사성 기반 후보효소 선정 및 변이주 설계(특허권리 확보 및 정보보호를 위하여 Blank 처리)

○ 후보효소 4종 및 핵심 아미노산 잔기 5곳 선정함



3.4.2. 구조 유사성 후보효소별 변이주 설계(특허권리 확보 및 정보보호를 위하여 Blank 처리)

○ 후보효소 서열 1의 핵심 아미노산 잔기별 변이주 설계

[후보효소 서열번호: 46001]

2-4	2-4
2-5	2-5
2-6	2-6
2-7	2-7
2-8	2-8
2-9	2-9
2-10	2-10
2-11	2-11
2-12	2-12
2-13	2-13
2-14	2-14
2-15	2-15
2-16	2-16
2-17	2-17
2-18	2-18
2-19	2-19
2-20	2-20
2-21	2-21
2-22	2-22
2-23	2-23
2-24	2-24
2-25	2-25
2-26	2-26
2-27	2-27
2-28	2-28
2-29	2-29
2-30	2-30
2-31	2-31
2-32	2-32
2-33	2-33
2-34	2-34
2-35	2-35
2-36	2-36
2-37	2-37
2-38	2-38
2-39	2-39
2-40	2-40
2-41	2-41
2-42	2-42
2-43	2-43
2-44	2-44
2-45	2-45
2-46	2-46
2-47	2-47
2-48	2-48
2-49	2-49
2-50	2-50
2-51	2-51
2-52	2-52
2-53	2-53
2-54	2-54
2-55	2-55
2-56	2-56
2-57	2-57
2-58	2-58
2-59	2-59
2-60	2-60
2-61	2-61
2-62	2-62
2-63	2-63
2-64	2-64
2-65	2-65
2-66	2-66
2-67	2-67
2-68	2-68
2-69	2-69
2-70	2-70
2-71	2-71
2-72	2-72
2-73	2-73
2-74	2-74
2-75	2-75
2-76	2-76
2-77	2-77
2-78	2-78
2-79	2-79
2-80	2-80
2-81	2-81
2-82	2-82
2-83	2-83
2-84	2-84
2-85	2-85
2-86	2-86
2-87	2-87
2-88	2-88
2-89	2-89
2-90	2-90
2-91	2-91
2-92	2-92
2-93	2-93
2-94	2-94
2-95	2-95
2-96	2-96
2-97	2-97
2-98	2-98
2-99	2-99
2-100	2-100

Confidential

○ 후보효소 서열 2의 핵심 아미노산 잔기별 변이주 설계

[후보효소 서열번호: 46002]

2-1	2-1
2-2	2-2
2-3	2-3
2-4	2-4
2-5	2-5
2-6	2-6
2-7	2-7
2-8	2-8
2-9	2-9
2-10	2-10
2-11	2-11
2-12	2-12
2-13	2-13
2-14	2-14
2-15	2-15
2-16	2-16
2-17	2-17
2-18	2-18
2-19	2-19
2-20	2-20
2-21	2-21
2-22	2-22
2-23	2-23
2-24	2-24
2-25	2-25
2-26	2-26
2-27	2-27
2-28	2-28
2-29	2-29
2-30	2-30
2-31	2-31
2-32	2-32
2-33	2-33
2-34	2-34
2-35	2-35
2-36	2-36
2-37	2-37
2-38	2-38
2-39	2-39
2-40	2-40
2-41	2-41
2-42	2-42
2-43	2-43
2-44	2-44
2-45	2-45
2-46	2-46
2-47	2-47
2-48	2-48
2-49	2-49
2-50	2-50
2-51	2-51
2-52	2-52
2-53	2-53
2-54	2-54
2-55	2-55
2-56	2-56
2-57	2-57
2-58	2-58
2-59	2-59
2-60	2-60
2-61	2-61
2-62	2-62
2-63	2-63
2-64	2-64
2-65	2-65
2-66	2-66
2-67	2-67
2-68	2-68
2-69	2-69
2-70	2-70
2-71	2-71
2-72	2-72
2-73	2-73
2-74	2-74
2-75	2-75
2-76	2-76
2-77	2-77
2-78	2-78
2-79	2-79
2-80	2-80
2-81	2-81
2-82	2-82
2-83	2-83
2-84	2-84
2-85	2-85
2-86	2-86
2-87	2-87
2-88	2-88
2-89	2-89
2-90	2-90
2-91	2-91
2-92	2-92
2-93	2-93
2-94	2-94
2-95	2-95
2-96	2-96
2-97	2-97
2-98	2-98
2-99	2-99
2-100	2-100

Confidential

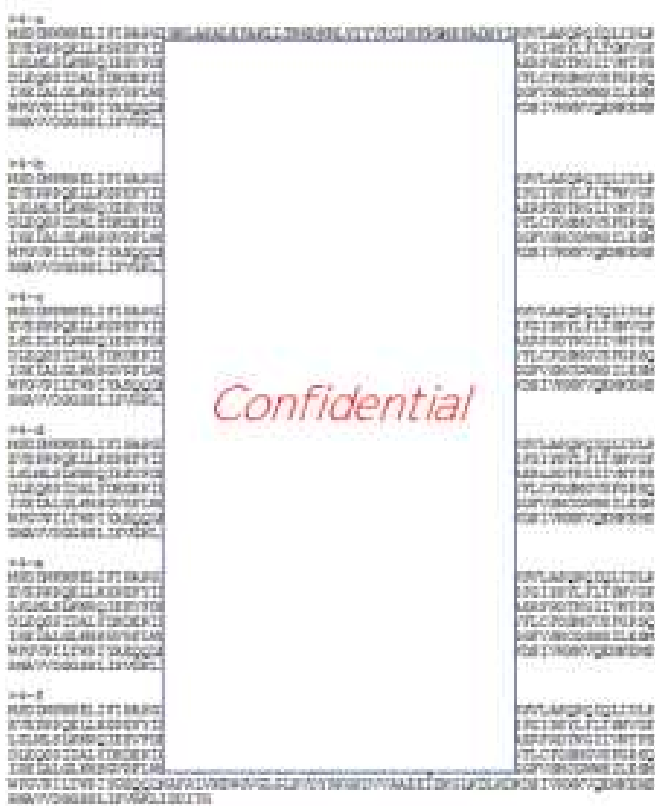
○ 후보효소 서열 3의 핵심 아미노산 잔기별 변이주 설계

【후보효소 3의 핵심 아미노산 잔기별 변이주 설계】



○ 후보효소 서열 4의 핵심 아미노산 잔기별 변이주 설계

【후보효소 4의 핵심 아미노산 잔기별 변이주 설계】



[2차년도]

1. 스테비올배당체 분석 조건 확보

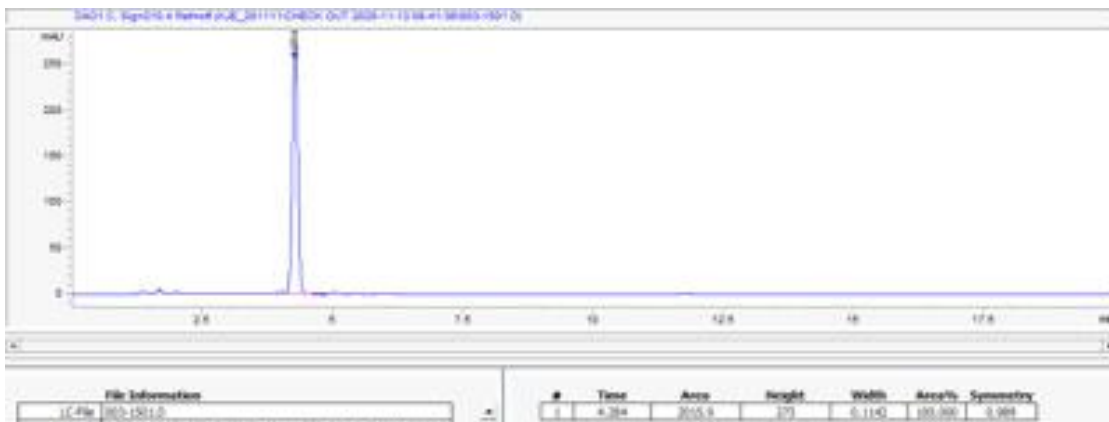
1.1. Reb-A → Reb-D 전환효소 탐색을 위한 LC 분석 조건 수립

1.1.1. 스테비아 배당체 STD 확보

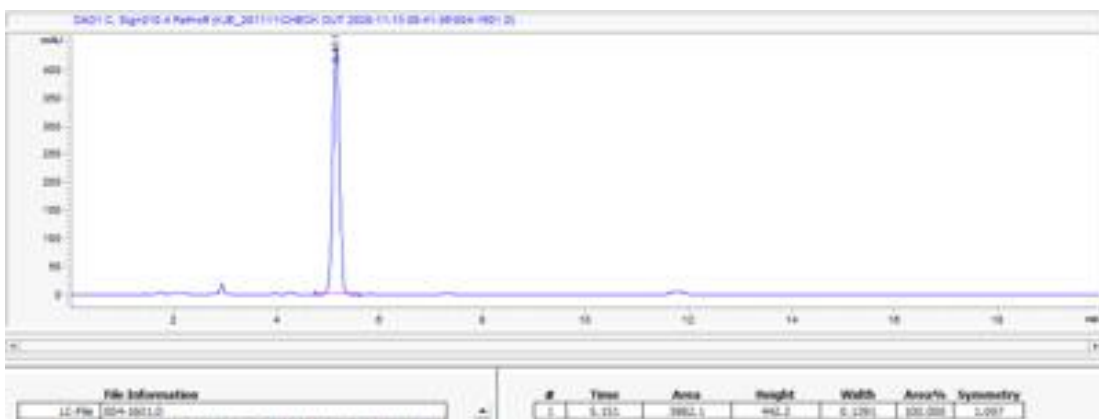
1.1.2. 분리분석을 위한 LC 조건 확보 (Reb-A, Reb-D, Reb-M)

- Column: Capcell pak C18 MG II (Shiseido, 250 X 4.6 mm, particle size: 5 μ m)
- Mobile phase: Acetonitrile :10mM sodium phosphate buffer (pH 2.6) = 32 : 68
- Temperature: 40 $^{\circ}$ C □
- Injection volume:10 μ l
- Flow rate: 1.0 ml/min
- Run time: 30 min
- UV detection wavelength: 210 nm

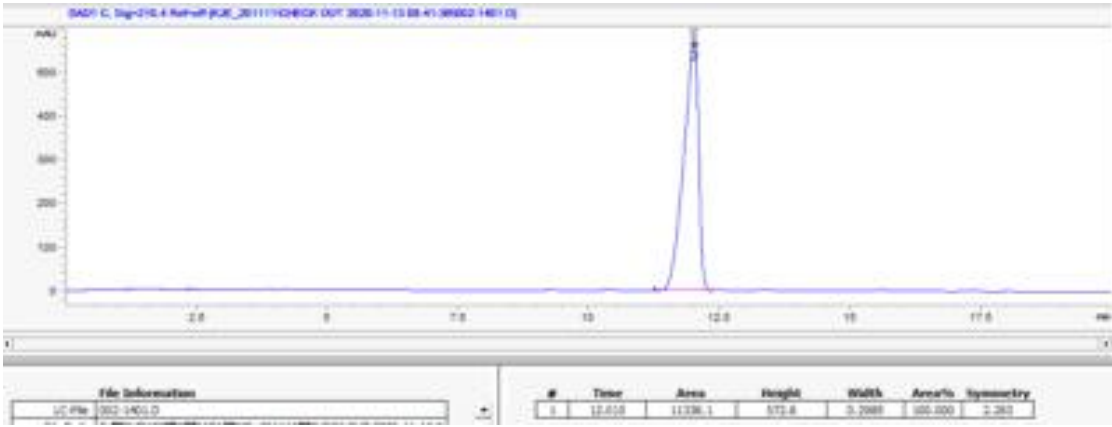
▪ <Rebaudioside A>



▪ <Rebaudioside D>



▪ <Rebaudioside M>

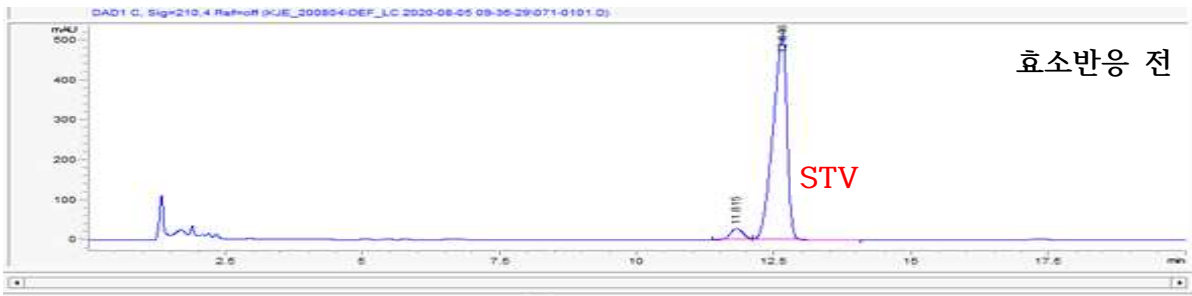


2. Reb-D 전환 유전체 및 미생물 pool 탐색

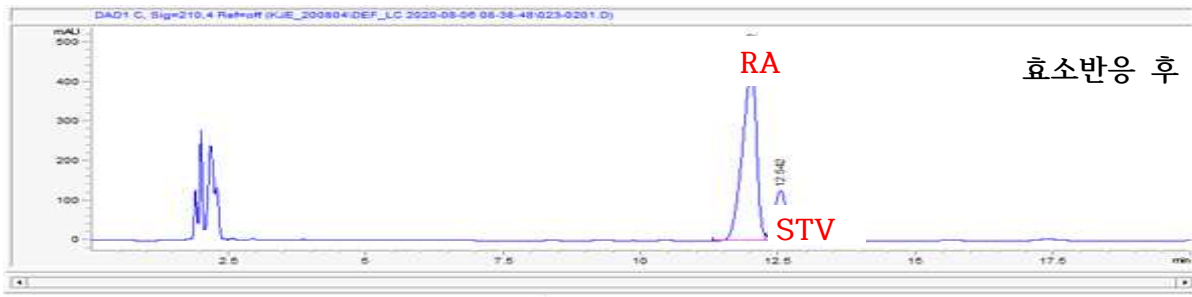
2.1. 경쟁사 효소 평가

2.1.1. 스테비오사이드로부터 Reb-M 생합성을 위한 target 후보 효소 2종 (EUGT11, UGT91D2e) 선정 및 평가

- 예상반응경로1) 스테비오사이드에서 Reb-E를 거쳐 Reb-M 생합성
- 예상반응경로2) 스테비오사이드에서 Reb-A를 거쳐 Reb-M 생합성
 - UGT76G1이용, STV → Reb-A 전환 반응

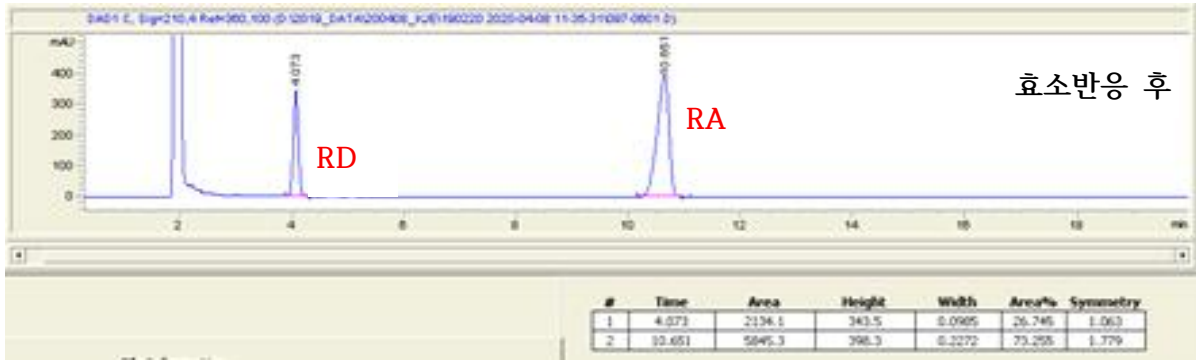
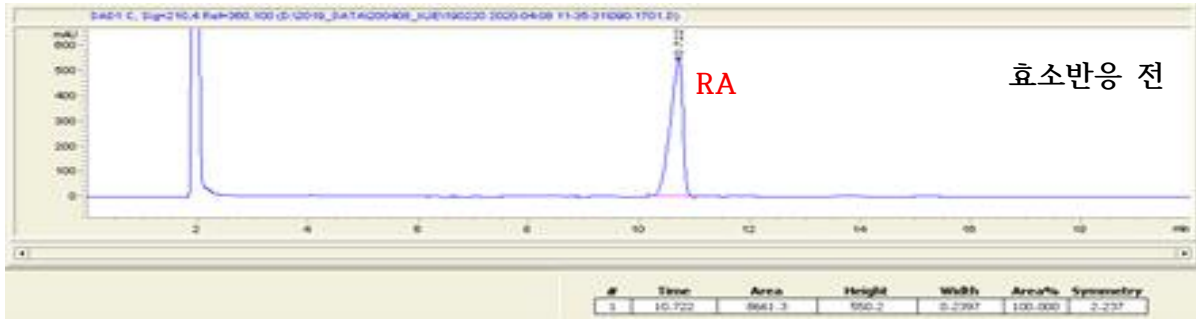


#	Time	Area	Height	Width	Area%	Symmetry
1	11.815	487.9	28.9	0.261	5.082	0.922
2	12.646	9112.4	512.4	0.2675	94.918	1.926

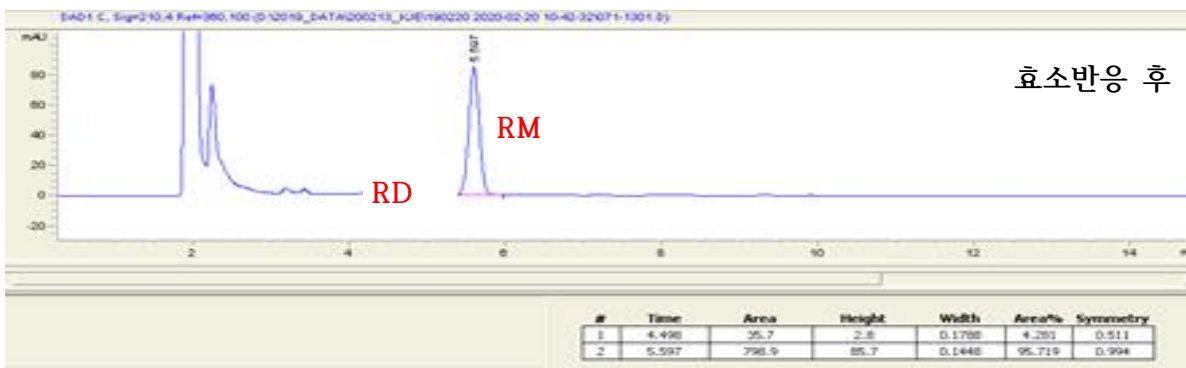


#	Time	Area	Height	Width	Area%	Symmetry
1	12.012	7839.6	441.9	0.271	80.187	1.784
2	12.542	1937	126.9	0.2361	19.813	1.06

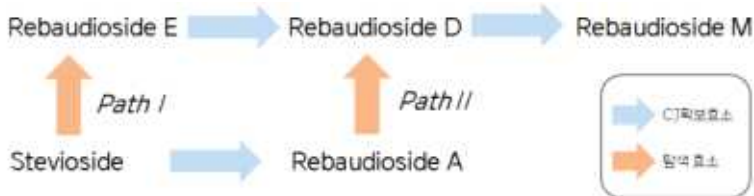
▪ UGT 이용, Reb-A → Reb-D 전환 반응



▪ UGT76G1 이용, Reb-D → Reb-M 전환 반응



○ Reb-M 생합성 예상 반응 경로



- Path I : STV → Reb-E → Reb-D → Reb-M
- Path II : STV → Reb-A → Reb-D → Reb-M

○ 타겟 후보 활성 평가

	Path I	Path II
EUGT11	○	○
UGT91D2e	△	×

- 효소 2종 반응경로 활성평가 결과, EUGT11이 반응경로 I, II에 모두 작용하며, UGT91대비 활성 우수
- EUGT11을 최종 후보로 선정하였으며, 추가 효소 탐색 및 개량을 위한 단백질 구조분석 진행 (GT-B fold)

2.2. 타겟 효소 (EUGT11) 개량

2.2.1. EUGT11 개량은 Point mutation & Domain swapping으로 진행

○ Point mutation

- EUGT11과 구조적 유사성 **高**/서열 상동성 **低** 후보 4종 선정 (2C1X, 2ACV, 2VCH, 2PQ6) 및 핵심 아미노산 선정
- EUGT11 핵심 아미노산 잔기 기반하여, 2~5 point mutation 변이주 총 34종 설계

○ Domain swapping

- 스테비아 생합성 경로에 관여하는 두 효소 사용하여 Domain swapping
- UGT76G1 (N-terminal domain)과 EUGT11(C-terminal domain)의 linker design 4종 설계

<특허권리 우선 확보를 위하여 효소 서열은 비공개 처리함>

- Point mutation_후보군 34종 아미노산 서열

1. 2C1X_2P-1 MSQTTNPHVAVLAFPPSTH PVSCLVADAFIWFADMGAAE EELDDSLTNDLKSRLKTYLQ PQAEVLAHEAVGAFVTHCGE TLVDLVSKPRDV-	<i>Confidential</i>	AAPESFRQGMVMAVAETGR LHRMGQVLPKATAVFINSF LPEGFLEKTRGYGMVVPWA RETADRAVGFPGSSTENFI
2. 2C1X_2P-2 MSQTTNPHVAVLAFPPSTH PVSCLVADAFIWFADMGAAE EELDDSLTNDLKSRLKTYLQ PQAEVLAHEAVGAFVTHCGE TLVDLVSKPRDV-		AAPESFRQGMVMAVAETGR LHRMGQVLPKATAVFINSF LPEGFLEKTRGYGMVVPWA RETADRAVGFPGSSTENFI
3. 2C1X_2P-3 MSQTTNPHVAVLAFPPSTH PVSCLVADAFIWFADMGAAE EELDDSLTNDLKSRLKTYLQ PQAEVLAHEAVGAFVTHCGE TLVDLVSKPRDV-		AAPESFRQGMVMAVAETGR LHRMGQVLPKATAVFINSF LPEGFLEKTRGYGMVVPWA RETADRAVGFPGSSTENFI
4. 2C1X_2P-4 MSQTTNPHVAVLAFPPSTH PVSCLVADAFIWFADMGAAE EELDDSLTNDLKSRLKTYLQ PQAEVLAHEAVGAFVTHCGE TLVDLVSKPRDV-		AAPESFRQGMVMAVAETGR LHRMGQVLPKATAVFINSF LPEGFLEKTRGYGMVVPWA RETADRAVGFPGSSTENFI
5. 2PQ6_2P-1 MGNFANRKPVMIPYPVQC HSTNVFPVTCVSDCQMSFI VNKDTTILNTPNELESDVI DLVIGGSVIPSSSEPTNEIAL MKQKAMELKKKAZENTRPGG		QSVRKNFLKPYCELLRLN RTTNFNDIMLEFFIEVADR EFAWGLANCKKSLWIIIRP REELARLINEVIAGDKGK

6. 2PQ6_2P-2

MGNFANRKP HVVMI PYPVQ
HSTNVFPVTC LVSDCCMSFI
LNKDTTILLNTFNELES DVI
DLVIGGSVIFSSSEFTNEIAI
MKQKAMELKKKAEZENTRPGG

QSVRKNFLKPYCELLTRLN
RTTNPNNDIMLEFFIEVADR
EFAWGLANCKKSFLWIIIRP
REELAKLINEVIAGDKGKK

7. 2PQ6_2P-3

MGNFANRKP HVVMI PYPVQ
HSTNVFPVTC LVSDCCMSFI
LNKDTTILLNTFNELES DVI
DLVIGGSVIFSSSEFTNEIAI
MKQKAMELKKKAEZENTRPGG

QSVRKNFLKPYCELLTRLN
RTTNPNNDIMLEFFIEVADR
EFAWGLANCKKSFLWIIIRP
REELAKLINEVIAGDKGKK

8. 2PQ6_2P-4

MGNFANRKP HVVMI PYPVQ
HSTNVFPVTC LVSDCCMSFI
LNKDTTILLNTFNELES DVI
DLVIGGSVIFSSSEFTNEIAI
MKQKAMELKKKAEZENTRPGG

QSVRKNFLKPYCELLTRLN
RTTNPNNDIMLEFFIEVADR
EFAWGLANCKKSFLWIIIRP
REELAKLINEVIAGDKGKK

9. 2PQ6_2P-5

MGNFANRKP HVVMI PYPVQ
HSTNVFPVTC LVSDCCMSFI
LNKDTTILLNTFNELES DVI
DLVIGGSVIFSSSEFTNEIAI
MKQKAMELKKKAEZENTRPGG

QSVRKNFLKPYCELLTRLN
RTTNPNNDIMLEFFIEVADR
EFAWGLANCKKSFLWIIIRP
REELAKLINEVIAGDKGKK

10. 2PQ6_2P-6

MGNFANRKP HVVMI PYPVQ
HSTNVFPVTC LVSDCCMSFI
LNKDTTILLNTFNELES DVI
DLVIGGSVIFSSSEFTNEIAI
MKQKAMELKKKAEZENTRPGG

QSVRKNFLKPYCELLTRLN
RTTNPNNDIMLEFFIEVADR
EFAWGLANCKKSFLWIIIRP
REELAKLINEVIAGDKGKK

Confidential

11. 2PQ6_3P-1

MGNFANRKP HVVMI PYPVQ
HSTNVFPVTC LVSDCCMSFI
LNKDTTILLNTFNELES DVI
DLVIGGSVIFSSSEFTNEIAI
MKQKAMELKKKAEZENTRPGG

QSVRKNFLKPYCELLTRLN
RTTNPNNDIMLEFFIEVADR
EFAWGLANCKKSFLWIIIRP
REELAKLINEVIAGDKGKK

12. 2PQ6_3P-2

MGNFANRKP HVVMI PYPVQ
HSTNVFPVTC LVSDCCMSFI
LNKDTTILLNTFNELES DVI
DLVIGGSVIFSSSEFTNEIAI
MKQKAMELKKKAEZENTRPGG

QSVRKNFLKPYCELLTRLN
RTTNPNNDIMLEFFIEVADR
EFAWGLANCKKSFLWIIIRP
REELAKLINEVIAGDKGKK

13. 2PQ6_3P-3

MGNFANRKP HVVMI PYPVQ
HSTNVFPVTC LVSDCCMSFI
LNKDTTILLNTFNELES DVI
DLVIGGSVIFSSSEFTNEIAI
MKQKAMELKKKAEZENTRPGG

QSVRKNFLKPYCELLTRLN
RTTNPNNDIMLEFFIEVADR
EFAWGLANCKKSFLWIIIRP
REELAKLINEVIAGDKGKK

14. 2PQ6_4P-1

MGNFANRKP HVVMI PYPVQ
HSTNVFPVTC LVSDCCMSFI
LNKDTTILLNTFNELES DVI
DLVIGGSVIFSSSEFTNEIAI
MKQKAMELKKKAEZENTRPGG

QSVRKNFLKPYCELLTRLN
RTTNPNNDIMLEFFIEVADR
EFAWGLANCKKSFLWIIIRP
REELAKLINEVIAGDKGKK

15. 2ACV_2P-1

MSMSDINKNSELI FIPAPGI
SNEVVGLVLDFFCVSMIDVQ
LEQSSIDALYDHDKERI PFI
GMICGKAPQVEVLAHKAIGG
VDGSSSLISVGLIDDTGSM-

LTFLES LI PHVKATIKTIL
KLAERFRDTG LI VNTFSO
REKRVFPEG FLEWNELEGK
DSIVHKKVQEMKMSRNAV

Confidential

16. 2ACV_ 2P-2

MSMSDINKNSELIPIAPG1
SNKVVGLVLDFFFCVSMIDVQ
LEQSSIDALYDHDDEKIPPI1
GMICGWAPQVEVLAHKAIGQ
VDGSSLSISVGLIDDITG4

LTFLESLI PHVKATIKTIL
KLAERLRDTKGIIVNTFSD
AEKKVFFEGFLEWMELEK
DSIVHKKVQEMKEMSRNAV

17. 2ACV_ 2P-3

MSMSDINKNSELIPIAPG1
SNKVVGLVLDFFFCVSMIDVQ
LEQSSIDALYDHDDEKIPPI1
GMICGWAPQVEVLAHKAIGQ
VDGSSLSISVGLIDDITG4

LTFLESLI PHVKATIKTIL
KLAERFRDTKGIIVNTFSD
AEKKVFFEGFLEWMELEK
DSIVHKKVQEMKEMSRNAV

18. 2ACV_ 2P-4

MSMSDINKNSELIPIAPG1
SNKVVGLVLDFFFCVSMIDVQ
LEQSSIDALYDHDDEKIPPI1
GMICGWAPQVEVLAHKAIGQ
VDGSSLSISVGLIDDITG4

Confidential

LTFLESLI PHVKATIKTIL
KLAERLRDTKGIIVNTFSD
AEKKVFFEGFLEWMELEK
DSIVHKKVQEMKEMSRNAV

19. 2ACV_ 2P-5

MSMSDINKNSELIPIAPG1
SNKVVGLVLDFFFCVSMIDVQ
LEQSSIDALYDHDDEKIPPI1
GMICGWAPQVEVLAHKAIGQ
VDGSSLSISVGLIDDITG4

LTFLESLI PHVKATIKTIL
KLAERFRDTKGIIVNTFSD
AEKKVFFEGFLEWMELEK
DSIVHKKVQEMKEMSRNAV

20. 2ACV_ 2P-6

MSMSDINKNSELIPIAPG1
SNKVVGLVLDFFFCVSMIDVQ
LEQSSIDALYDHDDEKIPPI1
GMICGWAPQVEVLAHKAIGQ
VDGSSLSISVGLIDDITG4

LTFLESLI PHVKATIKTIL
KLAERLRDTKGIIVNTFSD
AEKKVFFEGFLEWMELEK
DSIVHKKVQEMKEMSRNAV

21. 2ACV_ 3P-1

MSMSDINKNSELIPIAPG1
SNKVVGLVLDFFFCVSMIDVQ
LEQSSIDALYDHDDEKIPPI1
GMICGWAPQVEVLAHKAIGQ
VDGSSLSISVGLIDDITG4

LTFLESLI PHVKATIKTIL
KLAERLRDTKGIIVNTFSD
AEKKVFFEGFLEWMELEK
DSIVHKKVQEMKEMSRNAV

22. 2ACV_ 3P-2

MSMSDINKNSELIPIAPG1
SNKVVGLVLDFFFCVSMIDVQ
LEQSSIDALYDHDDEKIPPI1
GMICGWAPQVEVLAHKAIGQ
VDGSSLSISVGLIDDITG4

LTFLESLI PHVKATIKTIL
KLAERFRDTKGIIVNTFSD
AEKKVFFEGFLEWMELEK
DSIVHKKVQEMKEMSRNAV

23. 2ACV_ 3P-3

MSMSDINKNSELIPIAPG1
SNKVVGLVLDFFFCVSMIDVQ
LEQSSIDALYDHDDEKIPPI1
GMICGWAPQVEVLAHKAIGQ
VDGSSLSISVGLIDDITG4

Confidential

LTFLESLI PHVKATIKTIL
KLAERLRDTKGIIVNTFSD
AEKKVFFEGFLEWMELEK
DSIVHKKVQEMKEMSRNAV

24. 2ACV_ 4P-1

MSMSDINKNSELIPIAPG1
SNKVVGLVLDFFFCVSMIDVQ
LEQSSIDALYDHDDEKIPPI1
GMICGWAPQVEVLAHKAIGQ
VDGSSLSISVGLIDDITG4

LTFLESLI PHVKATIKTIL
KLAERLRDTKGIIVNTFSD
AEKKVFFEGFLEWMELEK
DSIVHKKVQEMKEMSRNAV

25. 2VCH_ 2P-1

MEESKTPHYAIIIPSPGMGHI
TALVVDLFGTDAFDVAVEFF
IKALQEPGLDKPPVYVPGPI
ERTKRGFVIFWAPQAQVI
AACRVLRDDGTSTKALSLVALKWKAKKKELEQWGNH*

SNPELRKVFDSFVEGGRLP
YKEAEGILVNTFFELEPNA
YFDSHSQTDPLIFLPPGFL
LMEGEGKQVRRKMELEKE

26. 2VCH_2P-2
MEESKTPHVAIIPSPGMGHI
TALVVDLFGTDAFDVAVEFH
IKALQEPGLDKPPVYFVGPPI
ERTKRGFVIPPWAPQAOVI
AACRVLKDDGTSTKALSLSVA

SNPELAKVFDSPVEGGRLP
LKEAEGILVNTFFLEPNA
YFDSSHQTDPLTFLPPGFL
LMEGEEGKGVRRNMKELKE

27. 2VCH_2P-3
MEESKTPHVAIIPSPGMGHI
TALVVDLFGTDAFDVAVEFH
IKALQEPGLDKPPVYFVGPPI
ERTKRGFVIPPWAPQAOVI
AACRVLKDDGTSTKALSLSVA

SNPELAKVFDSPVEGGRLP
LKEAEGILVNTFFLEPNA
YFDSSHQTDPLTFLPPGFL
LMEGEEGKGVRRNMKELKE

28. 2VCH_2P-4
MEESKTPHVAIIPSPGMGHI
TALVVDLFGTDAFDVAVEFH
IKALQEPGLDKPPVYFVGPPI
ERTKRGFVIPPWAPQAOVI
AACRVLKDDGTSTKALSLSVA

SNPELAKVFDSPVEGGRLP
LKEAEGILVNTFFLEPNA
YFDSSHQTDPLTFLPPGFL
LMEGEEGKGVRRNMKELKE

29. 2VCH_2P-5
MEESKTPHVAIIPSPGMGHI
TALVVDLFGTDAFDVAVEFH
IKALQEPGLDKPPVYFVGPPI
ERTKRGFVIPPWAPQAOVI
AACRVLKDDGTSTKALSLSVA

SNPELAKVFDSPVEGGRLP
LKEAEGILVNTFFLEPNA
YFDSSHQTDPLTFLPPGFL
LMEGEEGKGVRRNMKELKE

30. 2VCH_2P-6
MEESKTPHVAIIPSPGMGHI
TALVVDLFGTDAFDVAVEFH
IKALQEPGLDKPPVYFVGPPI
ERTKRGFVIPPWAPQAOVI
AACRVLKDDGTSTKALSLSVA

SNPELAKVFDSPVEGGRLP
LKEAEGILVNTFFLEPNA
YFDSSHQTDPLTFLPPGFL
LMEGEEGKGVRRNMKELKE

Confidential

31. 2VCH_3P-1
MEESKTPHVAIIPSPGMGHI
TALVVDLFGTDAFDVAVEFH
IKALQEPGLDKPPVYFVGPPI
ERTKRGFVIPPWAPQAOVI
AACRVLKDDGTSTKALSLSVA

SNPELAKVFDSPVEGGRLP
LKEAEGILVNTFFLEPNA
YFDSSHQTDPLTFLPPGFL
LMEGEEGKGVRRNMKELKE

32. 2VCH_3P-2
MEESKTPHVAIIPSPGMGHI
TALVVDLFGTDAFDVAVEFH
IKALQEPGLDKPPVYFVGPPI
ERTKRGFVIPPWAPQAOVI
AACRVLKDDGTSTKALSLSVA

SNPELAKVFDSPVEGGRLP
LKEAEGILVNTFFLEPNA
YFDSSHQTDPLTFLPPGFL
LMEGEEGKGVRRNMKELKE

33. 2VCH_3P-3
MEESKTPHVAIIPSPGMGHI
TALVVDLFGTDAFDVAVEFH
IKALQEPGLDKPPVYFVGPPI
ERTKRGFVIPPWAPQAOVI
AACRVLKDDGTSTKALSLSVA

SNPELAKVFDSPVEGGRLP
LKEAEGILVNTFFLEPNA
YFDSSHQTDPLTFLPPGFL
LMEGEEGKGVRRNMKELKE

34. 2VCH_4P-1
MEESKTPHVAIIPSPGMGHI
TALVVDLFGTDAFDVAVEFH
IKALQEPGLDKPPVYFVGPPI
ERTKRGFVIPPWAPQAOVI
AACRVLKDDGTSTKALSLSVA

SNPELAKVFDSPVEGGRLP
LKEAEGILVNTFFLEPNA
YFDSSHQTDPLTFLPPGFL
LMEGEEGKGVRRNMKELKE

Confidential

- Domain swapping _후보군 4종 아미노산 서열

1. EU-1
MENKTETT VRRRRRIILFFV
SEEDDEVSLITDALWYFAG
KELEESELETVIREIPAPSE
VVATRWPQMSILAAHAAVGA
CHERYIDGFIQQLRSYKD-

INENGADELRRLELLMLA
LGRMIKQTRASSGVIWNSF
VSDADLLPAGFEERTRGRG
SKVFQAKAKFLQEIADMAC

2. EU-2
MENKTETT VRRRRRIILFFV
SEEDDEVSLITDALWYFAG
KELEESELETVIRERKPII
VATRWPQMSILAAHAAVGA
HERYIDGFIQQLRSYKD-

INENGADELRRLELLMLA
LGRMIKQTRASSGVIWNSF
SDADLLPAGFEERTRGRG
KVFQAKAKLQEIADMAC

3. EU-3
MENKTETT VRRRRRIILFFV
SEEDDEVSLITDALWYFAG
KELEESELETVIREIPAPSE
VVATRWPQMSILAAHAAVGA
CHERYIDGFIQQLRSYKD-

INENGADELRRLELLMLA
LGRMIKQTRASSGVIWNSF
VSDADLLPAGFEERTRGRG
SKVFQAKAKFLQEIADMAC

4. EU-4
MDSGYSSSYAAAAGMHVVIC
PFSEFLGTACADWIVDVFI
ELEESELETVIREIPAPSE
IVRHWVQQEVLAAHGAIGAFI
ESLESLSVSYISSL-

HDRPDMVELHRRRAFDGLAA
LAERFSLTLSRSSLVVGNS
KGSTWVEPLPDGFLGERGR
ARVLKQFADVSIIMEGGSSY

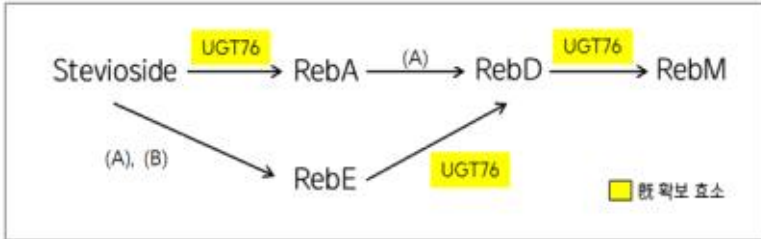
Confidential

2.2.2. EUGT11 핵심 아미노산 잔기 기반 point mutation 변이주 34종 , Domain swapping 기반 설계 4종 모두 *Reb-A*로부터 *Reb-D* 전환 활성 확인되지 않음

2.3. Reb-D 전환 활성 보유 신규 효소 스크리닝

2.3.1. Reb-A로부터 Reb-D 전환활성 보유 신규효소 (A) 선별

○ Reb-D 전환 유전체 및 미생물 pool 탐색 및 확보



▪ Reb-D 전환 활성 보유 서열 조사

No.	Target	Protein ID	Origin	상동성 기준
1	Ob_UGT91B1	XP_006650455.1	<i>Oryza brachyantha</i>	85%
2	Hv_UGT_v1	BAJ94055.1	<i>Hordeum vulgare</i>	
3	UGTSL2	XP_004250485.1	<i>Solanum lycopersium</i>	90%
4	Sr_UGT_e252778	Sequence ID 3	<i>Stevia rebaudiana</i>	80%
5	EUGT11	XP_015629141.1	<i>Oryza sativa</i>	65%
6	Bd_UGT10840	XP_003560669.1	<i>Brachypodium distachyon</i>	
7	Bd_UGT10850	XP_010230871.1	<i>Brachypodium distachyon</i>	80%

▪ Reb-D 전환 유전체 후보군 선정

- 서열 상동성 기반 후보군 15종 (경쟁사 특허 권리범위 회피 可)
- Domain swapping 설계 후보군 48종
- 선행 특허 wild type 유전자 6종

▪ Reb-D 전환 유전체 및 미생물 pool 확보

No.	유전자명	Vector
1	UGTSL2(wild)	pET24a
2	UGTSL2_1	pET24a
3	UGTSL2_2	pET24a
4	UGTSL2_3	pET24a
5	UGTSL2_4	pET24a
6	UGTSL2_5	pET24a
7	1-2-LC	pBT7-N-his
8	2-1-L1	pBT7-N-his
9	2-1-LC	pBT7-N-his
10	1-4-LC	pBT7-N-his
11	4-1-LC	pBT7-N-his
12	1-5-L-C	pBT7-N-his
13	5-1-L-C	pBT7-N-his
14	2-4-L-C	pBT7-N-his
15	4-2-L-C	pBT7-N-his
16	2-5-L-C	pBT7-N-his
17	5-2-L-C	pBT7-N-his
18	4-5-L-C	pBT7-N-his

19	5-4-L-C	pBT7-N-his
20	1-6-L-C	pBT7-N-his
21	6-1-L-C	pBT7-N-his
22	1-7-L-C	pBT7-N-his
23	7-1-L-C	pBT7-N-his
24	2-6-L-C	pBT7-N-his
25	6-2-L-C	pBT7-N-his
26	2-7-L-C	pBT7-N-his
27	7-2-L-C	pBT7-N-his
28	4-6-L-C	pBT7-N-his
29	6-4-L-C	pBT7-N-his
30	4-7-L-C	pBT7-N-his
31	7-4-L-C	pBT7-N-his
32	5-6-L-C	pBT7-N-his
33	6-5-L-C	pBT7-N-his
34	5-7-L-C	pBT7-N-his
35	7-5-L-C	pBT7-N-his
36	6-7-L-C	pBT7-N-his
37	7-6-L-C	pBT7-N-his
38	Ob_UGT91B1_1	pBT7-N-his
39	Ob_UGT91B1_2	pBT7-N-his
40	Ob_UGT91B1_3	pBT7-N-his
41	Ob_UGT91B1_4	pBT7-N-his
42	Ob_UGT91B1_5	pBT7-N-his
43	Sr.UGT e252778_1	pBT7-N-his
44	Sr.UGT e252778_2	pBT7-N-his
45	Sr.UGT e252778_3	pBT7-N-his
46	Sr.UGT e252778_4	pBT7-N-his
47	Sr.UGT e252778_5	pBT7-N-his
48	Bd_UGT10840_1	pBT7-N-his
49	Bd_UGT10840_2	pBT7-N-his
50	Bd_UGT10840_3	pBT7-N-his
51	Bd_UGT10840_4	pBT7-N-his
52	Bd_UGT10840_5	pBT7-N-his
53	1-3-L-C	pBT7-N-his
54	3-1-L-C	pBT7-N-his
55	2-3-L-C	pBT7-N-his
56	3-2-L-C	pBT7-N-his
57	3-4-L-C	pBT7-N-his
58	4-3-L-C	pBT7-N-his
59	3-5-L-C	pBT7-N-his
60	5-3-L-C	pBT7-N-his
61	3-6-L-C	pBT7-N-his
62	6-3-L-C	pBT7-N-his
63	3-7-L-C	pBT7-N-his
64	7-3-L-C	pBT7-N-his
65	XP_006650455.1 (Wild)	pBT7-N-his
66	BAJ94055.1 (Wild)	pBT7-N-his
67	Sequence ID 3 (Wild)	pBT7-N-his
68	XP_003560669.1 (Wild)	pBT7-N-his
69	XP_010230871.1 (Wild)	pBT7-N-his

후보군 69종 아미노산 서열

1. UGTSL2_wild
 MATNLRVLMFPW
 PNFSRILQNLKPF
 MCTSRTIEAKYII
 LEDALPKGFLEK
 LKSVVTGETGEII

LNPTLHKALFMSK
 GGRLDDEGNKQML
 IWVARFPKGEERN
 DDGKIHRGEIAET

2. UGTSL2_1
 MATNLRVLMFPW
 PNFSRILQNLKPF
 MCTSRTIEAKYII
 LEDALPKGFLEK
 LKSVVTGETGEII

LNPTLHKALEMSK
 GGRLDDEGNKQIML
 IWVARFPKGEEQN
 DDGKIHRGEIAET

3. UGTSL2_2
 MATNLRVLMFPW
 PNFSRILQNLKPF
 MCTSRTIEAKYII
 LEDELPKGFLEK
 LKSVVTGETGEII

LNLTLHKALFMSK
 VGRLDDEGNKQVML
 IWVARFPKGEEQN
 DDGKIHRGEIAET

4. UGTSL2_3
 MATLRVLMFPW
 NFSKILQNLKPDF
 CTSRTIEAKYLDY
 EDVLPKGFLEK
 KDVITGETGEILK

NHTLHKALKMSKP
 DRLAEGNMQIMLM
 WVARFPKGEEQNL
 DGNIHRGEITETL

5. UGTSL2_4
 MATLKVLMFPFL
 NFSKILQNLKPDF
 MLMSTSRTEAKY
 RNLEDALPKGFLE
 ETLKGVITGKTGG

NHILQKALKMSKP
 DDDDLVVDGNMQI
 NFIWVARFPKGE
 RDDGKIHRGEIA

Confidential

6. UGTSL2_5
 MDVKNTINVM
 SAGPAFASKILOTI
 RQSRDIIILVKDF
 QDEKISIDDVLPQ
 EEIAKAIREVVIS

PHLKETLVEAFF
 SNINIKDTFMESI
 LSKVMFVWVIRFF
 VEALRDENKELQS

7.1-2-LC
 MENGSSPLHVVI
 LAAPFSAFLDAAQ
 SIMTRFSLTLKW
 LSGARFLWALRKI
 VPRDESDGSFRA

FEKFEHHRKAFDG
 NTEEYGTAGASGV
 RAEOVHELALGLE
 NARIMEGRKVMQ

8.2-1-L1
 MDGDGNSSSSSI
 RKAFDGLAAPFSI
 QNASGMTVAERYI
 LLRELAHGLELAC
 RFLEGRKVGVAVI

STNDVPYDRFELH
 PSFETERKIMTT
 YVALGSEAFVSAD
 IMLPIIGDQGPNA

Confidential

9. 2-1-LC
 MDGDGNSSSSSI
 RKAFDGLAAPFSI
 QNASGMTVAERYI
 LLRELAHGLELAC
 RFLEGRKVGVAVI

STNDVPYDRFELH
 PSFETERKIMTT
 YVALGSEAFVSAD
 IMLPIIGDQGPNA

10.1-4-LC
 MENGSSPLHVVI
 LAAPFSAFLDAAQ
 SIMTRFSLTLKW
 ELSGLFFWALRI
 GIEIPRNEEDGW

FEKFEHHRKAFDG
 NTEEYGTAGASGV
 VSKDELGELALGL
 QIMNAQVLADQV

11. 4-1-LC

MATNDDDRKQLHY
LQPEVTRFLEEE
SDCILIRCCYE
ALRRPAGVMDGD
GSFDRSGVAGAV

HDDQDHLNNSDG
QGDLYRLTMACNG
AHGLELAGTRFLW
RKVGVAVPRNHAD

12. 1-5-L-C

MENGSSPLHVVI
LAAPFSAFLDAA
SIMTRFSLTLKWS
AGTRFLWALRKP
ARNDGGSFDRE

FEKFEHRKAFDG
NTEYGTAGASGV
VEKVHELALGLE
ARLIEARNAGLQV

13. 5-1-L-C

MDSGYSSSYAAA
VELHRRAFDGLA
KGSSGMSLAERF
LLRELAHGLELA
RFLGRKVGVAV

ESTNDVPHDRPDM
PTFEVARMKLIRT
YVALGSEAPVSAD
IMLPFIIGDQGFNA

14. 2-4-L-C

MDGDGNSSSSS
RKAFDGLAAPP
QNASGMTVAERY
ELALGLELSGLP
LADKQVGIIPR

STNDVPYDKFELM
PSFETERKLMIT
LGSEAMVSKDELG
LPFPGDQIMNAQV

15. 4-2-L-C

MATNDDDRKQLHY
LQPEVTRFLEEE
SDCILIRCCYE
PTDAPDAAVLP
EDVAATVRAVA

HDDQDHLNNSDG
QGDLYRLTMACNG
ELSGARFLWALRK
QVPRDESDDGSFRR

Confidential

16.2-5-L-C

MDGDGNSSSSS
RKAFDGLAAPP
QNASGMTVAERY
ALGLELAGTRFLW
NAGLQVARNDGD

STNDVPYDKFELH
PSFETERKLMIT
SEVPLGVEKVHEL
GDQGNARLIEAK

17. 5-2-L-C

MDSGYSSSYAAA
VELHRRAFDGLA
KGSSGMSLAERF
LALGLELSGARF
RKVGMOVPRDES

ESTNDVPHDRPDM
PTFEVARMKLIRT
GSEVPLRAEQVHE
SSDQGNARLIMEG

18. 4-5-L-C

MATNDDDRKQLHY
LQPEVTRFLEEE
SDCILIRCCYE
TGVSDADLLPAG
GVAAAIRAVAVE

HDDQDHLNNSDG
QGDLYRLTMACNG
LAGTRFLWALRKP
VARNDGGSFDRE

Confidential

19. 5-4-L-C

MDSGYSSSYAAA
VELHRRAFDGLA
KGSSGMSLAERF
ELALGLELSGLP
LADKQVGIIPR

ESTNDVPHDRPDM
PTFEVARMKLIRT
LGSEAMVSKDELG
LPFPGDQIMNAQV

20. 1-6-L-C

MENGSSPLHVVI
LAAPFSAFLDAA
SIMTRFSLTLKWS
LAGTRFLWALRKP
VPRDESNGSFDRE

FEKFEHRKAFDG
NTEYGTAGASGV
GAKEVHELALGLE
NARMMEGRKVGVO

21. 6-1-L-C

MDNGSSSSSSSP
KAFDGLAVPFSEI
PSKHVTSQOQEQ
DGAIRWLDQQA
HCGWGSVVEGLQ
HLTSWNELEA*X

TNDVPYEFELHR
LGAAGLIVAWATQ
PEGGRGVKNGED
SILAHAAVCAFLT
RERDERCTDGFH

22. 1-7-L-C

MENGSSPLHVVI
LAAPFSAFLDAA
SIMTRFSLTLKWI
HGLELAGTRFLW
KVGVSVPREDK

FEKFEHRKAFDG
NTEEYGTAGASGV
EAPLRAELLRELA
GDQGNARIMEER

23. 7-1-L-C

MDAAGSSSPMHI
DGLAAPFAFLDM
SGSSSGLSVLSRI
RELAHGLELAGTI
LEGRKVGAVPRM

VPADKFDLHRQAF
AEQAMEEFAEDA
ALGSEAPVSADLL
LPIIGDQGNARF

24. 2-6-L-C

MDGGDNSSSSSI
RKAFDGLAAPFSI
QNASGMTVAERYI
LALGLELAGTRFT
RKVGQVPRDESI

STNDVPYDKFELH
PSFETERAKLMTT
GSEVFLGAKVHE
FGDQGNARMMEG

25. 6-2-L-C

MDNGSSSSSSSP
KAFDGLAVPFSEI
PSKHVTSQOQEQ
VRWLDAQPAKSV
STIEGLLFGHPL
YEA*X

TNDVPYEFELHR
LGAAGLIVAWATQ
PEGGRGVSKEDAA
GAVAAFLTHCGWN
ERCIDGFIQQLRS

26. 2-7-L-C

MDGGDNSSSSSI
RKAFDGLAAPFSI
QNASGMTVAERYI
LLRELAHGLELAG
RLMEERKVGVSVI

STNDVPYDKFELH
PSFETERAKLMTT
YVALGSEAPLRAE
IMLPIAGDQGNNA

27. 7-2-L-C

MDAAGSSSPMHI
DGLAAPFAFLDM
SGSSSGLSVLSRI
LGLELSGARFLWA
VGMQVPRDESDG

VPADKFDLHRQAF
AEQAMEEFAEDA
EVPLRAEQVHELA
DQGNARLMEGRK

28. 4-6-L-C

MATNDDDRKQLH
LQPEVTRFLEES
SDCILIRCCYEF
PSGVSDADILPSC
EGVATTVRAVAVI

HDDQDHLNNSDG
QGDLYRLTMACNG
ELAGTRFLWSLAK
QVPRDESNGSPDR

29. 6-4-L-C

MDNGSSSSSSSP
KAFDGLAVPFSEI
PSKHVTSQOQEQ
VKEWLDGQHKGH
GVSSIVEGLMFG
MMEIVKT*X

TNDVPYEFELHR
LGAAGLIVAWATQ
PEGGRKDDOTWVS
LSHESVCGFLTHC
LGKKYISHFIDPL

30. 4-7-L-C

MATNDDDRKQLH
LQPEVTRFLEES
SDCILIRCCYEF
ALRKFVGVQDGD
GSFTRGGVAGAI

HDDQDHLNNSDG
QGDLYRLTMACNG
AHGLELAGTRFLW
RKVGVSVPREDK

Confidential

Confidential

31. 7-4-L-C

MDAAGSSSPMHIV
DGLAAPPFAAFLDM
SGSSSGLSVLSRA
ALGLELGLPFFV
DKQVGIPIRNEI

VPADKFDLHRQAF
AEQAMEEFAAEDA
SEAMVSKDELGEL
IFGQIIMNAQVLA

32.5-6-L-C

MDSGYSSSYAAA
VELHRRAPFDGLAJ
KSSSGMSLAERFS
LALGLELAGTRFI
RKVGQVPRDESN

ESTNDVPHDRPDM
PTFEVARMKLIRT
GSEVFLGAKEVHE
FGDQGNARMMEG

33.6-5-L-C

MDNGSSSSSSP
KAFDGLAVPFSEI
PSKNVTSEQQEQ
RWLDAQPAKSVV
TIEGLMFGHPLIM
KD*X

TNDVPYEFELHR
LGAAGLIVAWATO
REGGREGEDATV
AVGAFLIHCGWNS
RYIDGFIQQLRSY

Confidential

34. 5-7-L-C

MDSGYSSSYAAA
VELHRRAPFDGLAJ
KSSSGMSLAERFS
LLRELAHGLELAC
RLMEERKVGVSVI

ESTNDVPHDRPDM
PTFEVARMKLIRT
YVALGSEAPLRAE
IMLPDIAGDQGNPNA

35. 7-5-L-C

MDAAGSSSPMHIV
DGLAAPPFAAFLDM
SGSSSGLSVLSRA
GLELAGTRFLWAI
GLQVARNDGDSI

VPADKFDLHRQAF
AEQAMEEFAAEDA
VFLGVEKVHELAL
QGNARLIKAKNA

36. 6-7-L-C

MDNGSSSSSSP
KAFDGLAVPFSEI
PSKNVTSEQQEQ
DEAIRKWLNAQPA
HCGWGSVVEGLQ
HLRCK*X

TNDVPYEFELMR
LGAAGLIVAWATO
REGGREGTRSRGMD
SILAHGAVGAFLT
RECHERCIDGFIO

37. 7-6-L-C

MDAAGSSSPMHIV
DGLAAPPFAAFLDM
SGSSSGLSVLSRA
LGLELAGTRFLWAI
VGVQVPRDESNGS

VPADKFDLHRQAF
AEQAMEEFAAEDA
EVPFLGAKEVHOLA
DQGNARMMEGRK

38. Ob_UGT91E

MDGADDSAMHIV
GLAAPPFAAFLDAI
SGPSIISSFVQTI
LANGLELAGTRFI
RQVVALVPRNEKI

PYDKFELHRKAFD
AQQAELFAAEGA
GTEAPLRAELLRE
FGDQGNARIMEG

Confidential

39. Ob_UGT91E

MDASESESSPLHY
FDGLAAPPFAFLM
GLSINGRFFMTLE
ANGLELSGTRFLA
KVGVLVPRDEKDC

DVPPDKFHLHRVA
ELTTEEFAAEDAS
SEAPLRAELLREL
GDQGNARIMEER

40. Ob_UGT91E

MDAADDSTMHIV
DALAAPPFAFLDAI
GVSLGPSLISRFY
VELLRELAHGLEI
ARLMEGRQVGVVY

VPYDKFELHRNAF
FEAQQAAREAFATE
VVYVALGTEAPVR
LIMLPIDGQGNPNA

41. Ob_UGT91B1_4

MDAAGSSSPMHIV
DGLAAPPFAAFLD
SGSSSGLSVLSRI
RELANGLELAGTE
MEERKVGVSVPRI

VPADKFDLHRQAF
AEQAMEEFAAEDA
ALGSEAPLRAELL
LPIAGDQGNARL

42. Ob_UGT91B1_4

MHIVIFPWLAFGE
FLDAACAADVGGG
IISRFVQTLARSI
GLELAGTRFLWAL
GLOAARNETDSSI

RKAFDGLAAPPFAA
AELFATVGDSSGFS
APLRVELLRELAH
QGNARLMEGKVV

43. Sr.UGT e252778_4

MATTETDSLHGRF
HLKRAFQGLQPEV
ANLVMCHYSSNAG
MVSSELELALAL
DOGLIARILVDRK

EATMDLRTGETHD
VPFSPKLCYRKHE
KGVVYVALGSEF
MFGHPLIMLFFLV

Confidential

44. Sr.UGT e252778_4

MATSDSIVDDRK
VDGLQPEVTRFLA
PYEAPGISDGYRA
ELALGLELSGLFI
LEDKQVGEIIPRI

DVHPEDIQYLKKA
KVCWRKHDLARME
LGSEALVSQTEVV
LPLFGDQPLNARL

45. Sr.UGT e252778_4

MGNQQHVIYRSI
VKLTLPHVPELFI
GRTRKEDFLTPFI
EKNDTMMTKAMI
VGGELTHCGWSSI
INHPIDYLEKRRVYKINNEL

PTLPSHLSPLINL
IGPSSDDLINSSD
GLMPPEPTTIVGE
SWAPQLQILSHAS
SEIFGDTKLEKRY

46. Sr.UGT e252778_4

MPTTETDSLHGRF
LKKAFDGLLPEV
SWLLGGFSVNASG
EVMVSKSELAELA
LVDQGLNARILVI

EATMDVHTDOIPIY
PFPSKLCYRKHEA
QKGVVYVALGGS
GLMFGHPLIMLFF
AINNET-

47. Sr.UGT e252778_4

MNLLLFNYSYKCF
PHVQELPLNAEAF
ADFLTPFKWIPFI
VKKWLDGQKGRF
GWSSVVEGLMFGF
AKWKGVAAFDH-

HLSPLINLVKLT
EDLINGSDYRRTA
ETFTNVEGAWMT
LSHESVGGFLTHC
LQKKYVDDFIDYL

Confidential

48. Bd_UGT106

MDGNSSSPMLVY
DGLAAPPSEFLRA
GMTVAERYPLTIA
LELSGARFLWALA
MQVPRDES DGSSE

VPYDKFELHRRAF
TERRKLMITONAS
PLRAEQVHELALG
GPNARLMEGRKVG

49. Bd_UGT106

MDGDGNSSSSSI
RKAFDGLAAPPSE
QNASGMTVAERYI
LALGLELSGARFI
RKVGMQVPRDESI

STNDVPYDKFELM
PSPETERKIMTT
GSEVPLRAEQVHE
SSDQGNARLMEG

50. Bd_UGT106

MDDAGYSSAYSPI
KAFDGLALPFSFI
QLFEHAASGVQVY
CKDGRKDAIVKWI
GAPLTHCGWNSII
IDGFIQQLASYKE-

TNDVFFDKFELHR
LLGAASFIASGAG
GLLPPSPGGRGV
WVPQMSILGHDAV
QEIIVADTHERERY

51. Bd_UGT10840_4

MDETGSSPPLHV
DGLTAPFFSDYLE
QVSSTLQRCKLV
GTRFLWALRKP
RNEKDCSFDREGV

LFFDKFELHRKAA
MSLQCKWGMSTAE
EEVRELALGLQLA
RLMECRKVGVLVP

52. Bd_UGT10840_4
MDETGSSPSPGHI
LESLECAEPGGRK
LVAMRSCNEWEPE
PPAVDADVLLPQ
EGVATAIRAVAVE

KAADGLTAPFSEY
IAEQVSSTLQRCK
QLAGTRFLWALRK
LVPRNENDCSFDQ

53. 1-3-L-C
MENGSSPLHVVI
LAAPPSAFLDAA
SIMTRFSLTLKW
LSNVNFIWVARF
VEIVRDDGKIHE

Confidential

FEKFELHRKAFDG
NTEYGTAGASGV
SKEDMEEVAFAL
PIHNDQPINAKIM

54. 3-1-L-C
MATNLRVLMFPW
PNFSRILQNLKPF
MCTSRTIEAKYII
VNDGDSILPNGFI
VAGAVRAVAVEE

LNPTLHKALKMSK
GGRLDEGNKQML
GTRFLWALRRPAG
PRNHADGSDRSG

55. 2-3-L-C
MDGDGNSSSSSS
RKAFDGLAAPFS
QNASGMTVAERY
VAFALSNVNF
VELGVAVEIVRDE

STNDVPYDKFELH
PSFETERKLMIT
GSEYFLSKEDMEE
PIHNDQPINAKIM

56. 3-2-L-C
MATNLRVLMFPW
PNFSRILQNLKPF
MCTSRTIEAKYII
AVLPPGFEEETR
RAVAVEEDGRRV

LNPTLHKALKMSK
GGRLDEGNKQML
LWALRKPDTAPDA
DGSFRREDVAATV

57. 3-4-L-C
MATNLRVLMFPW
PNFSRILQNLKPF
MCTSRTIEAKYII
SDSVELPDGFME
KSLRSVVVDEGE

LNPTLHKALKMSK
GGRLDEGNKQML
FFWALRKPFGSTE
NEEDGWFTRESVA

58. 4-3-L-C
MATNDDRRKQLHV
LQFEVTRFLEES
SDCILIRCCYEF
PKGEERNLEDALE
RGEIAETLKSVM

Confidential

HDDQDHLNADSG
QGDLVRLTMACNG
ELSNVNFIVVARF
AVEIVRDDGKIHE

59. 3-5-L-C
MATNLRVLMFPW
PNFSRILQNLKPF
MCTSRTIEAKYII
LLPAGFEERTRG
AVAVEEESKVP

LNPTLHKALKMSK
GGRLDEGNKQML
WALRKPFGVSDAD
GSFDREGVAAAIR

60. 5-3-L-C
MDSGYSSSYAAA
VELHRRAFDGLA
KGSSGMSLAERF
VAFALSNVNF
VELGVAVEIVRDE

ESTNDVPHDRPDM
PTFEVARMKLIRT
GSEYFLSKEDMEE
PIHNDQPINAKIM

61. 3-6-L-C

MATNLRVLMFPW
PNFSRILQNLKPE
MCTSRTEAKYII
DILPSSGFEEETRO
RAVAVEEENRIE

LNPTLHKALMSK
GGRLDEGNKQML
LWSLRKPSSGVSDA
NGSFDREGVATTY

62. 6-3-L-C

MDNGSSSSSSSP
KAFDGLAVPFSE
PSKHVTSEQQEQ
IDWLGTKHENSTV
WNSAMESIDFGV
RNSNRSK*X

TNDVPYKFFELHR
LGAAGLIVAWATO
REGGRNDADNREL
NHPSTGGFISHCG
EMDAVAEELIQLC

63. 3-7-L-C

MATNLRVLMFPW
PNFSRILQNLKPE
MCTSRTEAKYII
VQDGDVLPDGFV
VAGAIRAVVVEE

LNPTLHKALMSK
GGRLDEGNKQML
GTRFLWALRKPVG
PRDEKDGSTFRGG

64. 7-3-L-C

MDAAGSSSPMHIV
DGLAAPPFAFLD
SGSSSGLSVLRS
FALELSNVNFIWV
LGVAVEIVRDDDC

VPADKFDLHRQAF
AEQAMEEPAEEDA
EYFLSKEDMEEVA
HNDQPINAKLMVE

65. XP_006650

MENGSSPLHVVIS
LAAPFSAFLDAA
SIMTRFSLTLKWS
HGLELAGTRFLWA
KVGVAVPRNHAD

FEKFFELHRKAFDG
NTEEYGTAGASGV
EAPVVSADLLRELA
GDQGFNARFLEGR

Confidential

66. BAJ94055.1 (wild)

MDGGSSSSSSPLHVVIC
SEFLRAACAEGAGSRPE
LVAIRSCAEWEPESVAAL
GFEERTSRGLVVTGWVE
NAKEMQEIIVADGACHERC

ASGMTVAERYFLTLMSRD
LWALRRPTDAPDAAVLPP
ATVRAVAVEEDGRRVFTA

67. Sequence ID3 (

MATNDDRRQLHVAMFPW
EESPDWIFDYSYYWLP
EKLLPVVFPVGLLPP
WAPQLRILSHESVCGFLE
KYISHFIDFLMMEIVRT-

HLINASDGLQPEVTRFLE
CILIRCCYEPFQWLTL
LPDGFMEERTNRGVTWTS
KANARELSKIFSDTDLGR

68. XP_003560669.1

MDNGSSSSSSPLHVVIC
SEFLRAACAEGGKRPDWI
ETERRRLATTPRASGMSI
LALGLELAOTRFLWBLRR
ESNGSFDREGVATTVRAV

YEKFFELHRKAFDGLAVPF
KHTVSEQQEQSAEPFRF
VYVALGSEVFLGAKREVHE
PNARMMEGRVGVQVFRD

69. XP_010230871.1 (

MDAAGSSSPMHIVIFFWL
LDADVGGKKRPDWIVADE
FVVALRSCPELEFDAPFL
LPDGFVERTSRRLVVARV
AANAEKREIVASRECHERCIDGFIQHLROCK-

FDLHRQAFDGLAAPPFAAF
SSSGLSVLSRFYMTLARC
RFLWALRKPVGQDGDSDV

Confidential

▪ Reb-A로부터 Reb-D 전환 활성 한계 전환을 평가 (%)

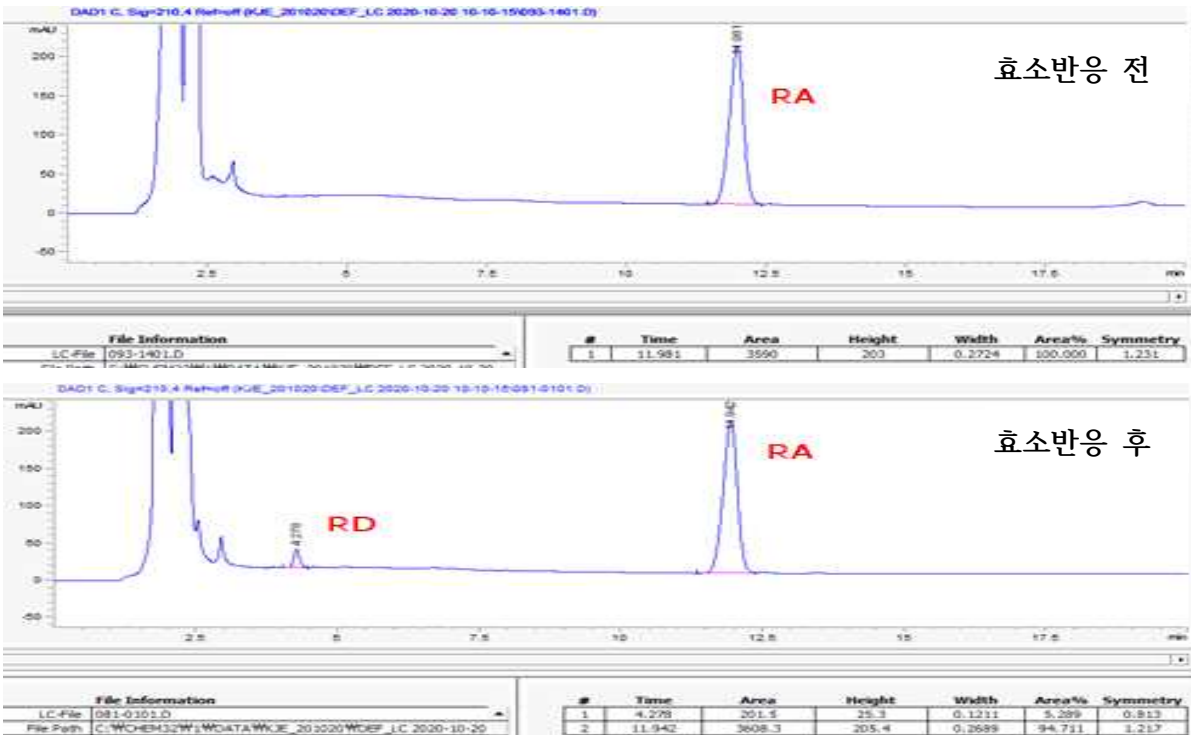
No.	샘플명	Vector	RebA→RebD 전환율 (%)	STV→RebE 전환율 (%)
4	UGTSL2_3	pET24a	5	2.1
5	UGTSL2_4	pET24a	87	24.8
9	2-1-LC	pBT7-N-his	8	無
16	2-5-L-C	pBT7-N-his	44	無
24	2-6-L-C	pBT7-N-his	60	無
39	Ob-UGT91B1_2	pBT7-N-his	13	無

- 63종(wild type 제외) 모두 형질전환된 *E.coli* crude enzyme으로 평가하였으며, Reb-A로부터 Reb-D 전환활성 보유 유전자는 **총 63종 중 6종으로 확인** 전환율(%)은 Reb-A 감소량으로 산출

- 사용 기질은 RebA 1mM, UDP-glucose 3mM, 버퍼는 50mM sodium phosphate [pH 7.2], 온도 37도, O/N 반응

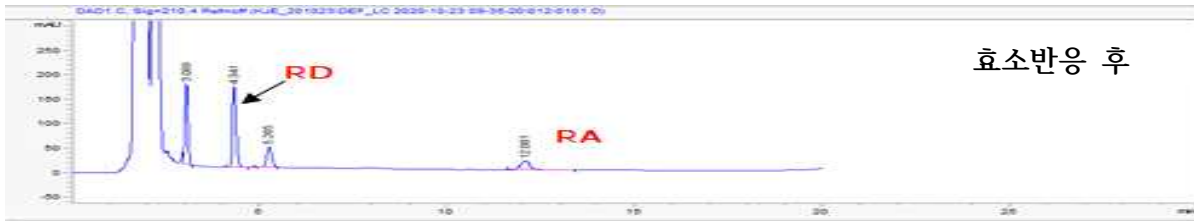
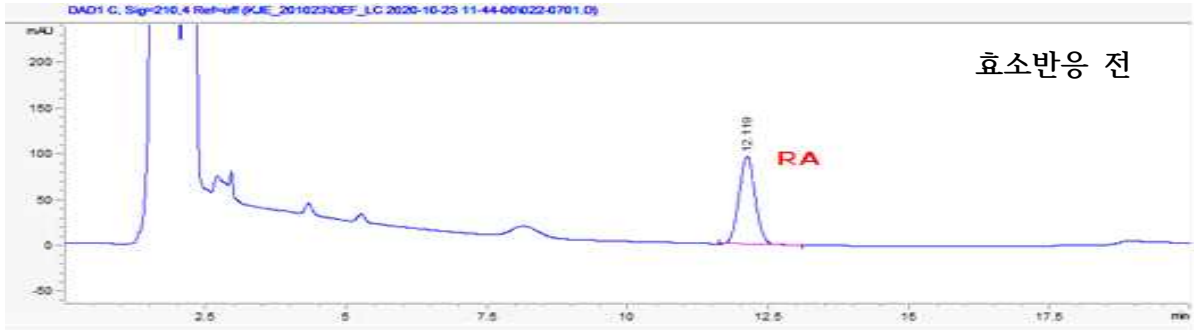
▪ Reb-A로부터 Reb-D 전환 활성 평가_ HPLC 결과

- UGTSL2_3



✓ Reb-A → Reb-D 전환율 약 5% 확인

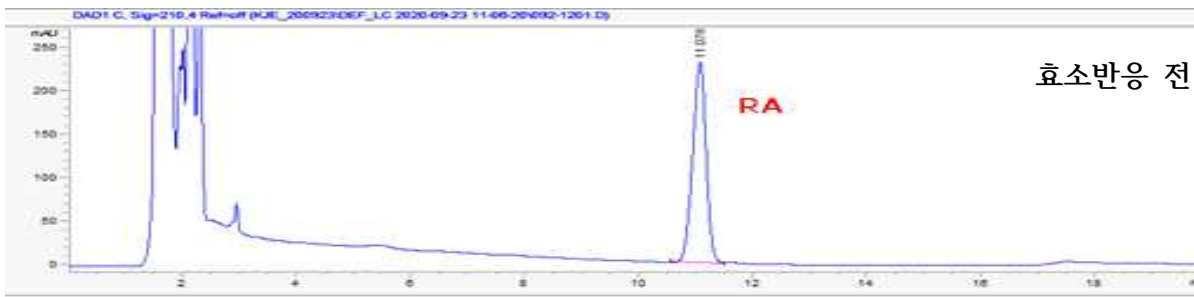
- UGTSL2_4



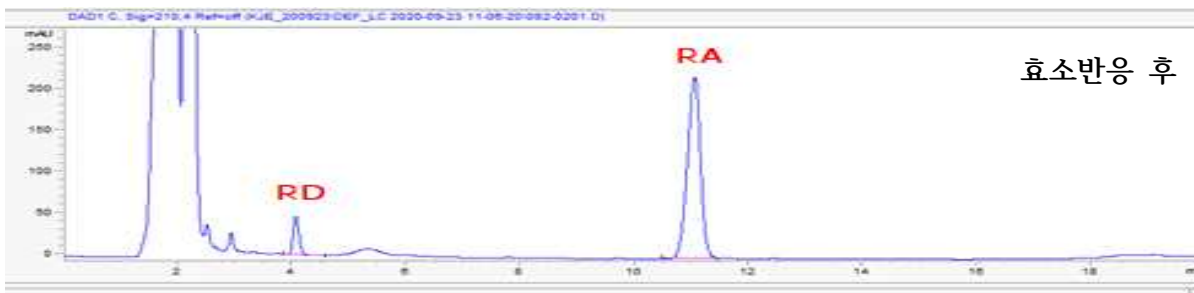
File Information		#	Time	Area	Height	Width	Area%	Symmetry
LC-File	012-0201.D	1	2.069	362.2	165.4	0.0808	30.732	0.912
File Path	C:\WC1EM32W\1\WDATA\MSD_201023\WDEF_LC 2020-10-23 09	2	4.341	1223.5	183.9	0.1131	43.413	0.918
Date	23-Oct-20 09:36:43	3	5.265	288.5	42.7	0.1403	11.840	0.914
Sample	RebD성당효소 함량 @5.0% #5_0% #5_0%	4	12.081	531.3	38.4	0.2804	11.807	0.897

✓ Reb-A → Reb-D 전환을 약 87% 확인

- 2-1-LC



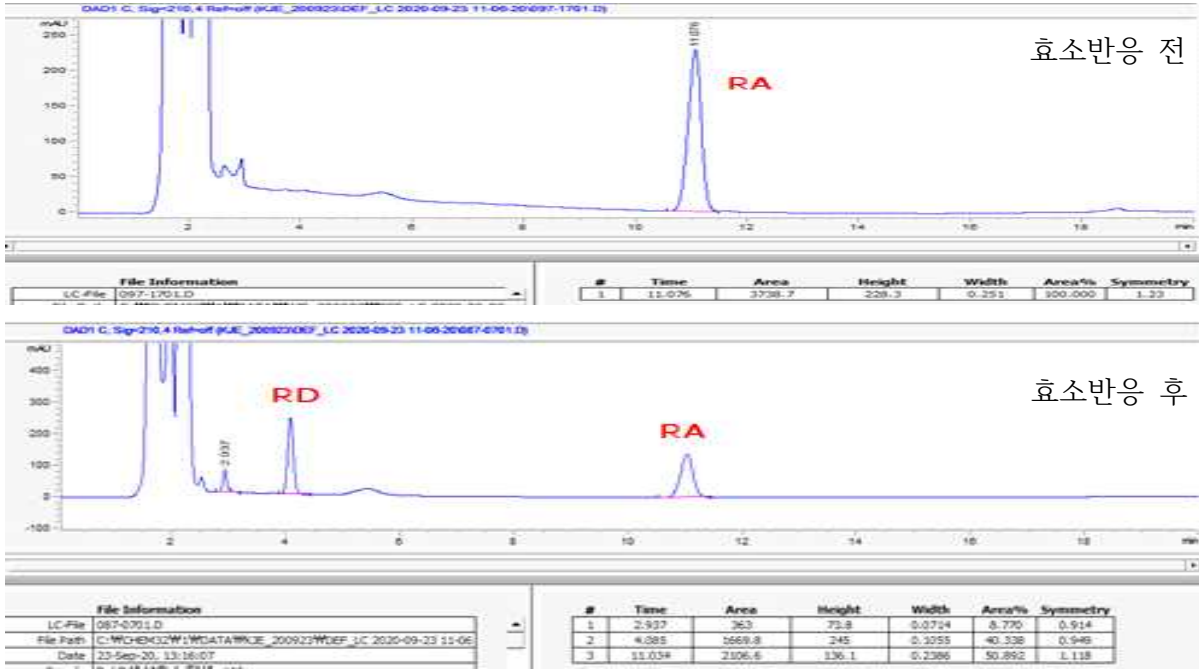
#	Time	Area	Height	Width	Area%	Symmetry
1	11.078	3757.4	230.6	0.1521	100.000	1.22



#	Time	Area	Height	Width	Area%	Symmetry
1	4.079	336.5	48.3	0.1072	8.846	0.96
2	11.065	3465.7	229.4	0.2423	91.154	1.24

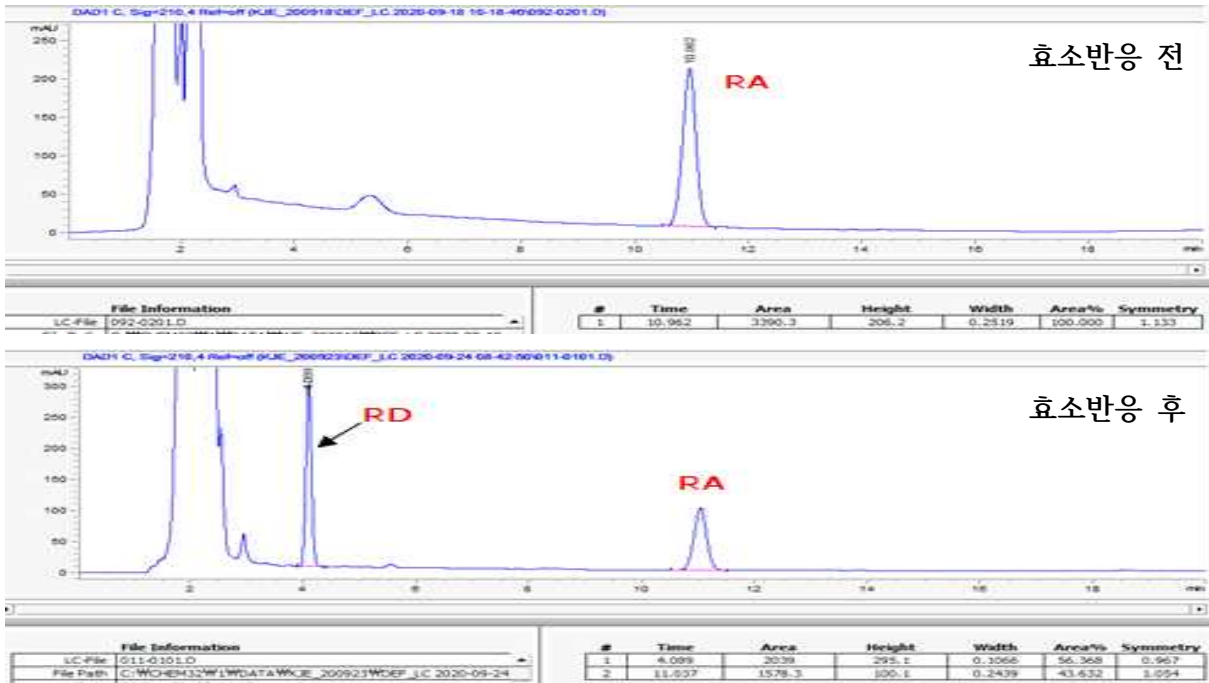
✓ Reb-A → Reb-D 전환을 약 8% 확인

- 2-5-L-C



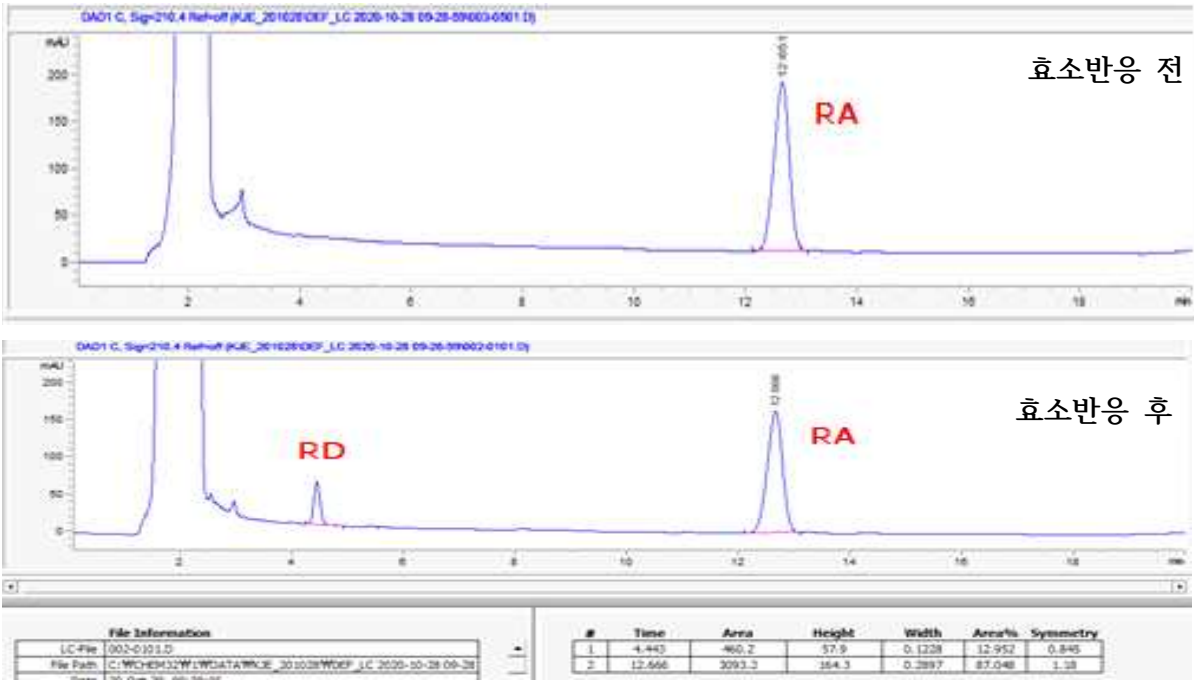
✓ Reb-A → Reb-D 전환을 약 44% 확인

- 2-6-L-C



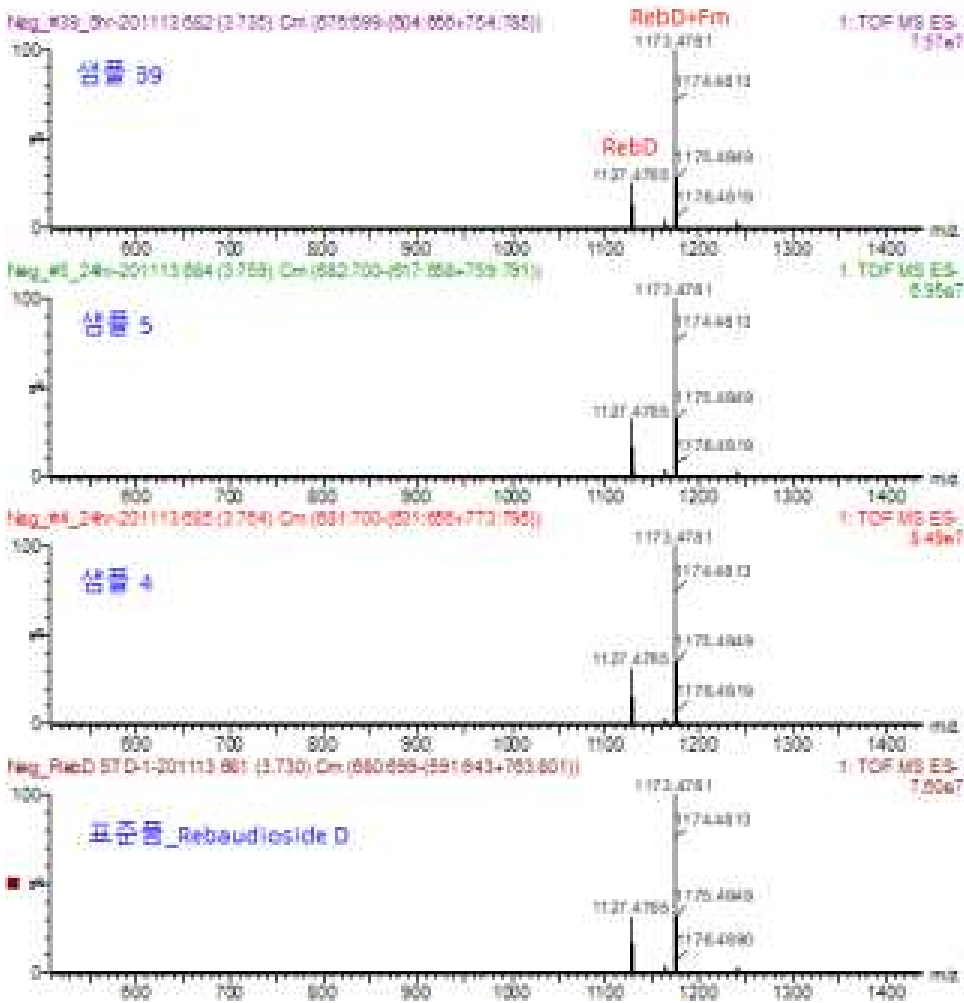
✓ Reb-A → Reb-D 전환을 약 60% 확인

- Ob-UGT91B1_2



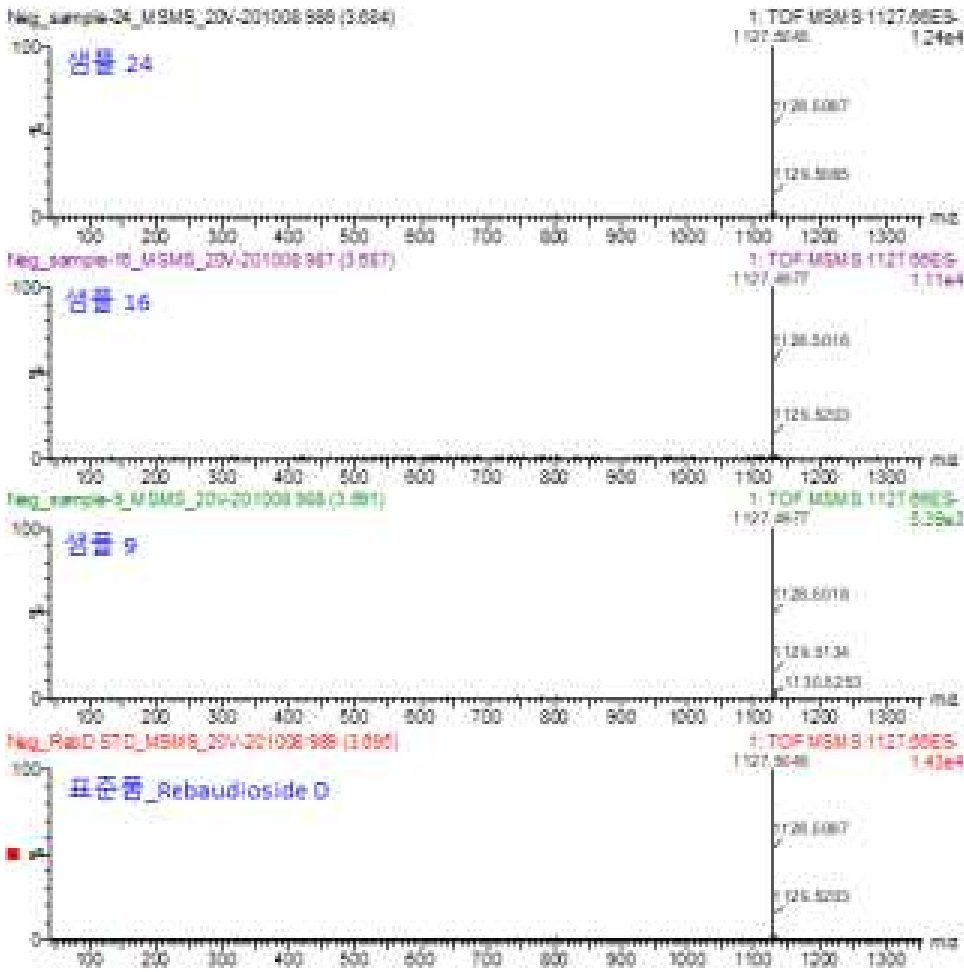
✓ Reb-A → Reb-D 전환을 약 13% 확인

- 효소 반응 생성물 동정을 위한 LC-MS 분석
 - MS spectrum

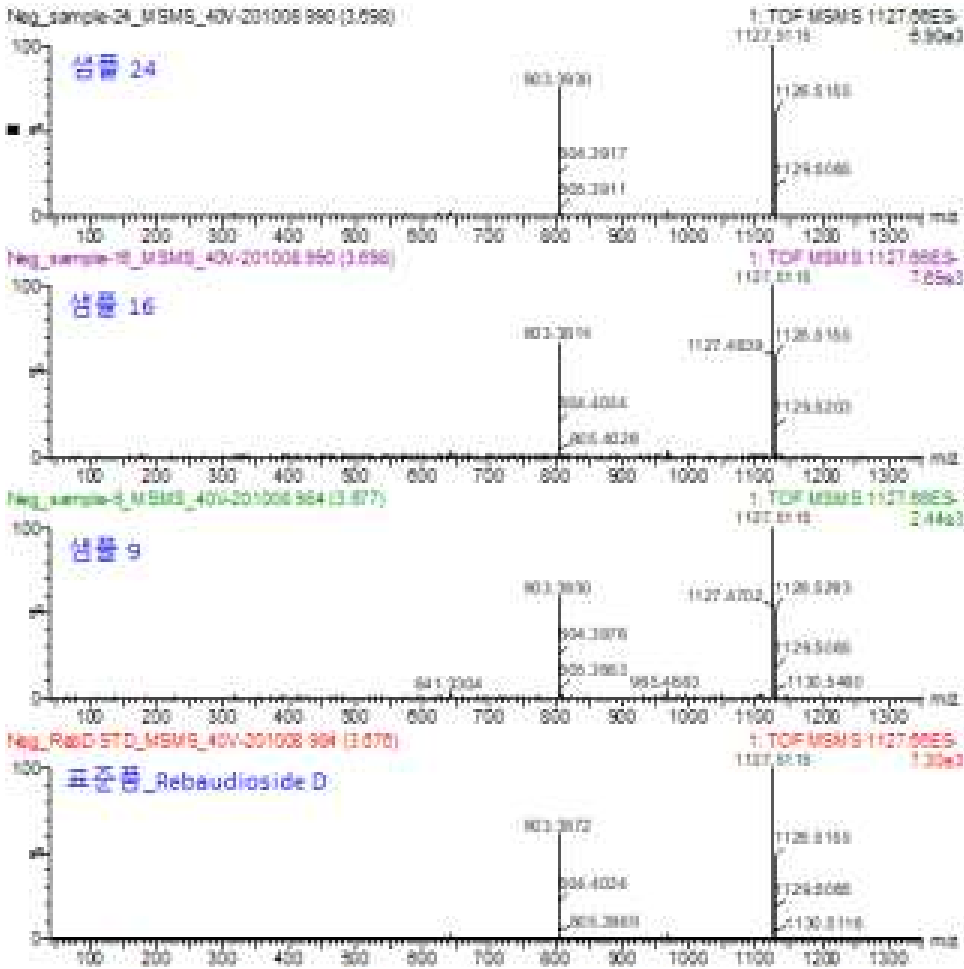


✓ LC-MS 분석 결과, 효소 반응 생성물의 분자량은 1127로 확인되며, 표준품 (Rebaudioside D)과 일치

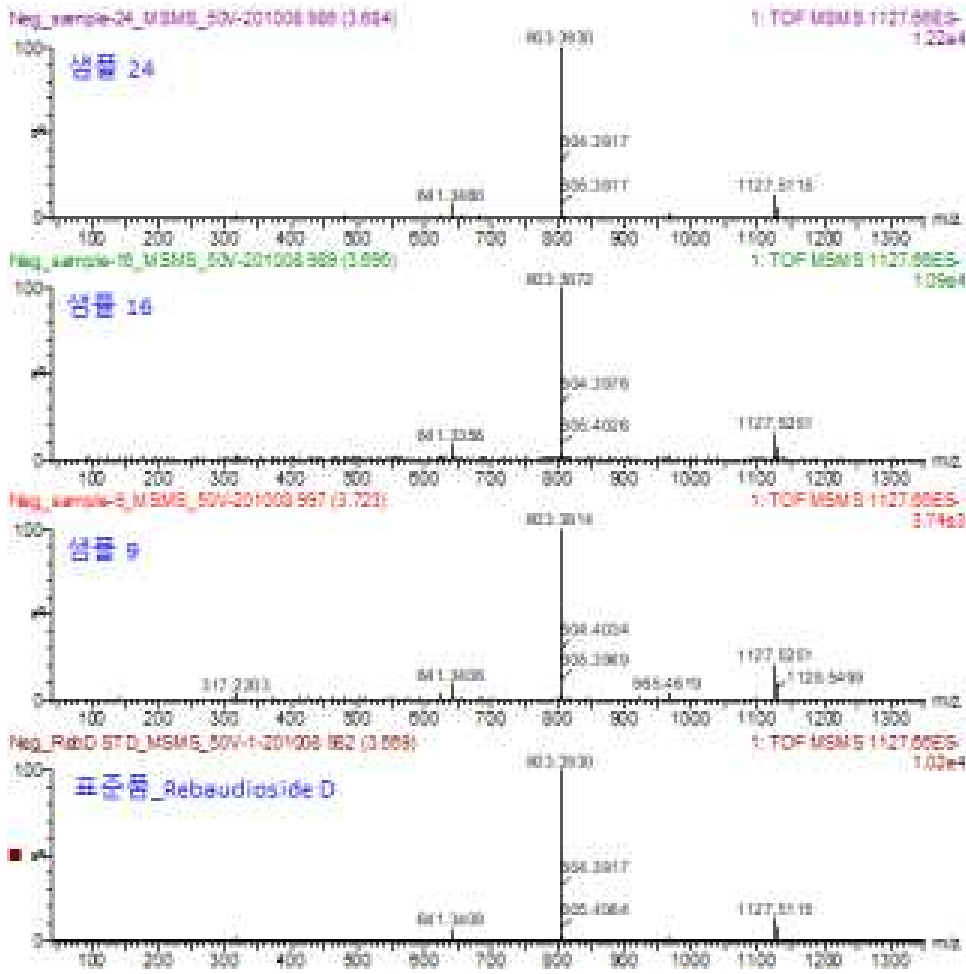
- 효소 반응 생성물 동정을 위한 MS / MS 분석
 - Collision energy = 20V



- Collision energy = 40V



- Collision energy = 50V



[3차년도]

1. Reb-D/M 생산균주 효소발현 시스템 개발

1.1. *E.coli* UDP 생산성 평가 및 효소 반응

1.1.1. 실험방법

○ 재조합 균주 배양

- Seed culture : 유전자 도입된 재조합 균주(*E.coli*)를 10µg/ml 농도의 카나마이신을 포함한 LB배지에 접종 후, 37도, 180rpm, O/N 배양
- Main culture : seed 배양액 1%를 10µg/ml 농도의 카나마이신을 포함한 LB배지에 접종 및 2~3시간 배양 후, 0.1mM IPTG (Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside) 첨가하여 20도,120rpm, O/N 배양
- 배양액을 8000rpm, 10분간 원심분리 후 cell 회수
- 50mM sodium phosphate buffer pH 7.2에 lysis 후, sonication 수행
- 13000rpm, 10분간 원심분리 후 상등액 회수
- 상등액 內 생산된 UDP량 측정 (HPLC 분석)

○ 생산된 UDP 활용, STV → Reb-A 효소 전환 반응

- 사용 기질 STV 5mM, Sucrose, 50mM, 버퍼 50mM sodium phosphate [pH 7.2], 온도 37도, cell 농도 5~30%, 반응 시간 0~48h

1.1.2. 실험결과

○ Cell 농도별 STV → Reb-A 전환 평가

	RebA 함량 (%)			
	5%	10%	20%	30%
0h	5.6	6.4	6.6	6.8
2h	26.9	49.8	57.0	86.2
16h	54.1	89.0	94.1	97.5
24h	54.1	89.0	94.0	97.2
48h	54.1	89.0	94.0	97.5

- *E.coli* 생산 UDP의 효소반응 테스트 결과, STV→ Reb-A 전환을 약 90%로 당전이 반응에 적용

2. 당전이 스테비아 고순도 분리 정제 기술 개발

2.1. 당전이 스테비아(G-RebA) 샘플 제조 및 품질 평가

2.1.1. RebA 97 원료 (대평社) 이용하여, 당전이 스테비아 제조

○ *L.mali* 유래 효소 제조 및 효소 반응 평가

▪ 실험방법

- 효소 제조를 위한 *L.mali* 배양 조건

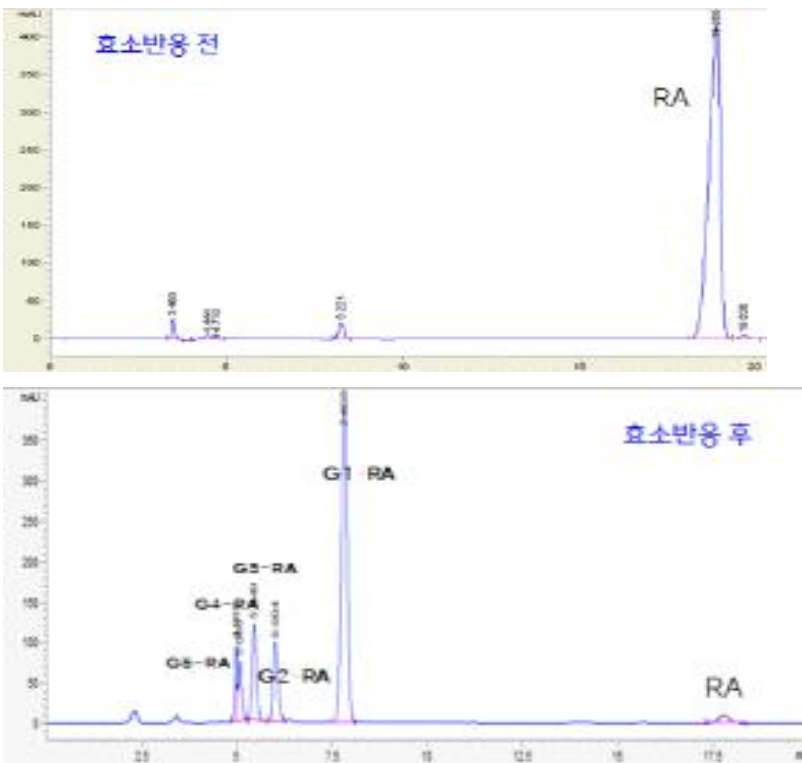
Seed 양(%)	5
온도 (°C)	30
pH	5
RPM	300
배양 시간 (hr)	24

- *L.mali* 유래 당전이 효소를 이용한 효소 반응

원료	RA 97
농도	10% (DS 기준)
원료:생량비율	1:1 (중량 기준)
효소 활성	0.5U/ml
반응시간	24hr
RPM	120RPM (shaking incubator 반응)
배양 VOLUME	500ML+9
반응 온도	40°C(반응후 100°C 20분 멸균)
반응pH	3차 중류수 반응 (pH 보정無)

▪ 실험결과

- 효소 반응 전후 HPLC 결과

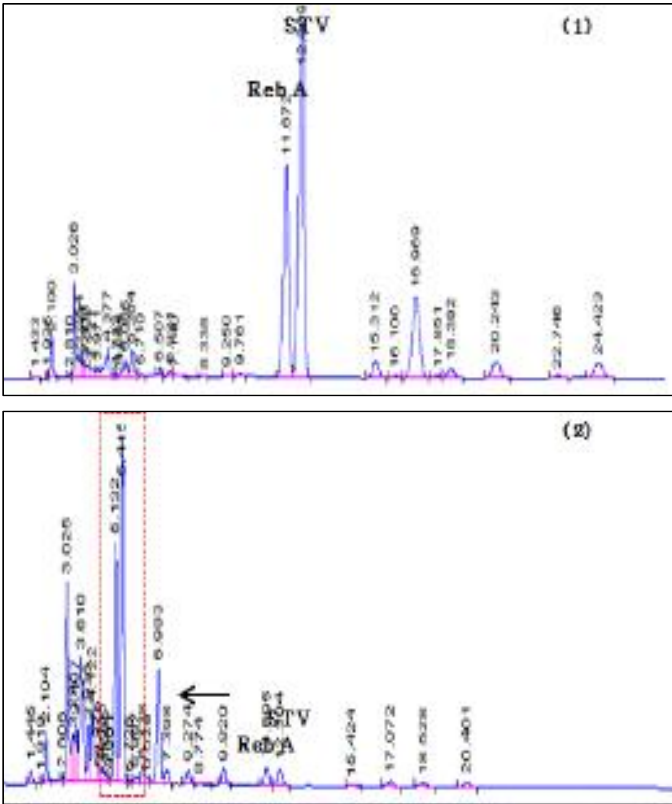


반응시간	전환율	RA 함량	RA-Glu(1)	RA-Glu(2)	RA-Glu(3)	RA-Glu(4)	RA-Glu(5) 이상
0	-	95.32	-	-			
20	96.95	2.90	58.37	17.28	13.62	7.46	5.38

2.2. 공정 예비평가 및 샘플제조

2.2.1. G-stevia 분리정제 및 고순도 샘플 제조

- 상기 조건을 바탕으로 제조한 대용량 효소반응액을 사용하여 제품 고순도화 진행
 - 반응 부피는 총 5L, 최종 전환율(반응 24시간)은 93.14% 확보
 - 효소 반응 전 후 HPLC 크로마토그램 (1) 반응 전 (2) 반응 후 (24시간)



- 분리·정제 프로세스는 해외 수지 전문업체인 S社 컬럼 이용, 방법은 하기 공정단계를 바탕으로 진행 하였으며, 단위공정별 주요지표는 Brix%, 색가 %, 전도도(us/cm), pH 확인하였음.



○ G-stevia 분리 정제 단계별 주요 지표 분석

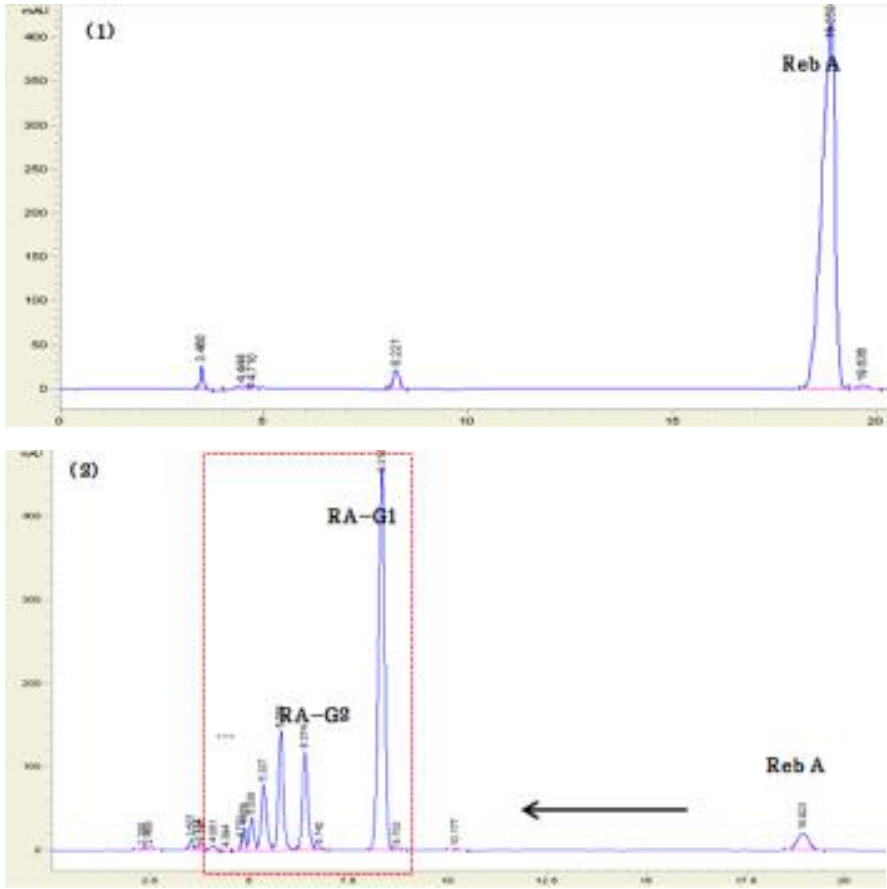
항목	단위	당전이 반응액	반응액 희석	1차 흡착수지 농축	1차 흡착수지 희석	2차 흡착수지 농축
Vol	ml	5,000	10,000	5,050	10,250	4,000
Weight	g	5,056	10,109	5,155	10,424	4,060
Brix	%	21.7	10.18	9.27	4.59	6.63
pH	(Bx10)	5.10		4.42		6.65
전도도	us/cm	2,060		23		26

○ G-stevia 분리 정제 단계별 스테비올배당체 함량

스테비올배당체 구분	분리정제 단계			
	당전이 반응액	1차 흡착수지 농축	2차 흡착수지 농축	분무건조 (최종)
RA-Glu(1)	17.25	12.19	13.81	14.71
STV-Glu(1)	22.25	21.08	23.71	25.69
Rebaudioside	1.53	3.55	3.83	3.47
Stevioside	1.94	2.89	3.06	4.29

2.2.2. G-RebA 샘플 제조

- 상기 조건을 바탕으로 제조한 대용량 효소반응액 사용하여 분리정제 진행하였음. 반응 부피는 총 5L, 최종 전환율(반응 24시간)은 96.49% 확보.
- 효소 반응 전 후 HPLC 크로마토그램 (1) 반응 전 (2) 반응 후 (24시간)



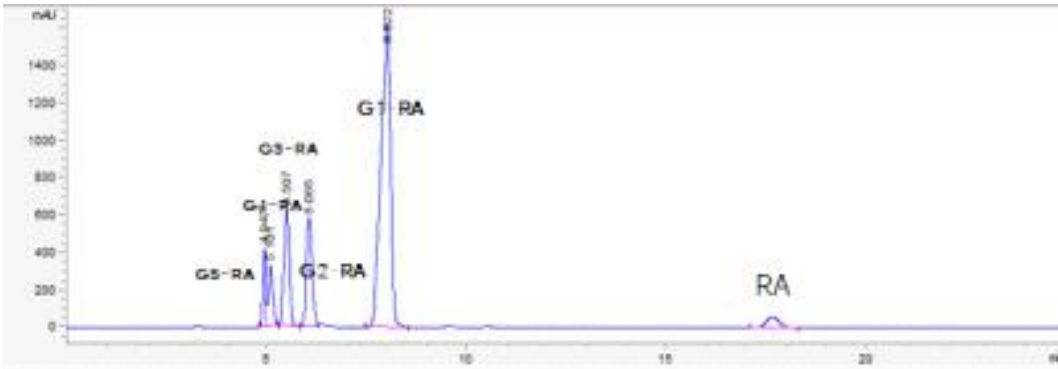
- G-RebA 분리 정제 단계별 주요 지표 분석

항목	단위	당전이 반응액	반응액 희석	1차 흡착수지 농축	1차 흡착수지 희석	2차 흡착수지 농축
Vol	ml	5,000	10,212	6,660	9,435	4,170
Weight	g	5,268	10,380	6,621	9,848	4,571
Brix	%	22.67	10.39	6.75	4.44	10.51
pH	(Bx10)	5.0		5.18		6.10
전도도	us/cm	1,832		15		14

○ G-RebA 분리 정제 단계별 스테비올배당체 함량

스테비올배당체 구분	분리정제 단계			
	당전이 반응액	1차 흡착수지 농축	2차 흡착수지 농축	분무건조 (최종)
Rebaudioside	3.30	6.91	7.62	7.66
RA-Glu(1)	52.54	69.18	71.17	71.46
RA-Glu(2)	11.88	7.64	7.47	7.47
RA-Glu(3)	13.68	5.96	5.48	5.51
RA-Glu(4)	8.40	3.20	2.80	2.95
RA-Glu(5)	3.47	1.36	1.14	1.39

○ 정제 후 최종 G-RebA HPLC 결과



RA 함량	RA-Glu(1)	RA-Glu(2)	RA-Glu(3)	RA-Glu(4)	RA-Glu(5) 이상
2.92	61.70	12.85	12.35	6.08	4.11

○ 당전이스테비아 (G-RebA) 시험· 검사 성적서 확보

제 L2020070055 호 문서번호 2020-TW90-9112		시험·검사성적서	
제품명	디제료	제조일자 (유통기한)	2020-07-01
제뢰인	업체명	비베이제일제빙사(BLOSSOM PARK)	장소
	주소	충남도 우천서 행정구 생곡로42번길 33 (서치동, CJBLOSSOMPARK)	
제조번호		검사년월일	2020-07-23
검사의뢰처	검교용	접수번호	L20200325

귀하가 우리 연구원에 시험·검사의뢰한 제품은 다음과 같습니다.
 시험·검사 완료일 : 2020-07-23
 시험·검사 목적지 : 가미면·감영길, 이봉구
 검사유형 중 해당지 : 김원희

시험·검사항목	시험·검사결과	시험·검사기준
감염균부양(%)	0.03 %	제한됨
진균감염(%)	3.53 %	제한됨
질소(ppm)	0.0193 ppm	제한없음
치르(ppm)	0.0038 ppm	제한없음
이상	이외, 이의가 없고 조유치 양이 되는 성격의 분말	유니트
불량(%)	스테인을 포함 36.17 % 미만세정의 불량량 00.30 % 미만중스테인을제외한 2.65 %	제한없음
확인사항	적합	제한없음

식품첨가물/포스트비즈스테비아

※ 본 문장은 제뢰인 시험·검사 목적만을 해당하며 증명합니다.
 ※ 본 문장은 참고용 일지입니다. 시험·검사의뢰하는 시험·검사의뢰처에서 참고 및 통보 등에 이용될 수 없습니다.
 ※ 검사를 위한 모든 항목의 결과에 대한 통보도 통보될 수 없습니다.
 ※ 본 문장은 KS Q ISO 9001:2015 및 ISO 14001:2015 기준에 준하여 작성되었습니다.
 ※ 시험에 부속된 경우 시험·결과 및 판독사항은 별도로 제공 가능합니다.

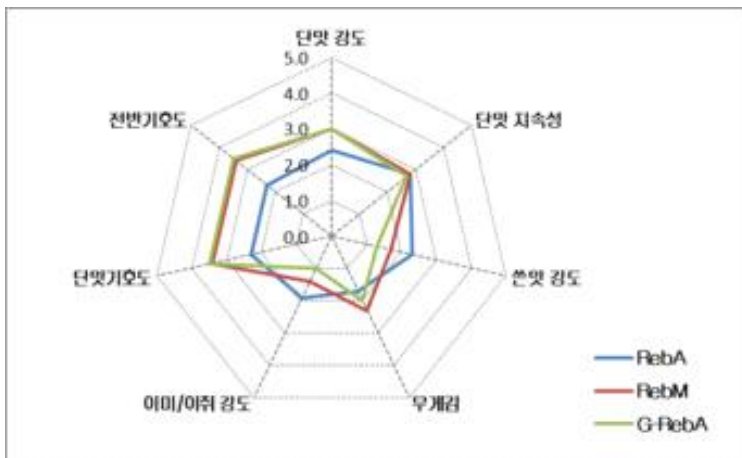
2020년 07월 23일
한국기능식품연구원

(사)한국기능식품연구원 (주)한국기능식품연구원 http://www.khfi.co.kr 전화번호 043-820-0450-1 (1)KHSI-0450-1



○ 당전이스테비아(G-RebA) 관능평가 결과

	RebA	RebM	G-RebA	p-value
단맛 강도	2.4	3.0	3.0	0.19
단맛 지속성	2.8	2.8	2.7	0.76
쓴맛 강도	2.3	1.7	1.3	0.07
무게감	1.7	2.3	2.0	0.20
이미/이취 강도	1.9	1.4	1.0	0.04
단맛기호도	2.3	3.4	3.5	0.03
전반기호도	2.3	3.4	3.5	0.00



- RebA 比 G-RebA 쓴맛 감소 (P-Value=0.073, 경향성 확인), 이미/이취 감소 (P-Value=0.042)
- RebA 比 G-RebA 단맛기호도 상승 (P-Value=0.03), 전반기호도 상승 (P-Value=0)

3. 제조 시제품 적용 가공식품 시제품 개발

3.1. Table-top 감미료 1건, 음료 3건 개발

3.1.1. 당류 50%저감된 음료 및 테이블탑 시제품 개발

○ 당류 저감을 위한 시제품 개발 방향 수립

- 신규 스테비오사이드 적용을 위한 카테고리 선정
 - Reb M 및 D는 기존 스테비아의 단점(쓰고 끌리는 맛)을 보완한 고품질 제품임
 - ✓ 목적: 일반적인 당류(설탕, 과당 등)을 대체하여 50% 수준의 당류를 절감한 음료 시제품을 개발함으로써 향후 성장이 예상되는 저열량 감미료 시장에 적절히 대응하기 위함
 - ✓ 목표: 당류 50% 이하로 저감된 식품 시제품을 제조함에 있어 설탕 적용 제품과 동등 수준의 관능 선호도 확보
- 기대 효과
 - ✓ 국민들이 많이 섭취하는 음료류 및 테이블탑에 함유된 당류 수준을 낮춤으로서 삶의 질 향상
 - ✓ 향후 대체 감미료를 활용한 다양한 당류저감 식품 카테고리에 응용/확장

가공식품 당류섭취량 순위

구분	가공식품군	당섭취 비율
1위	탄산음료	12.96%
2위	설탕류	9.73%
3위	빙류	8.24%
4위	커피	7.86%
5위	과채음료	7.03%

(2019 식품의약품안전처 식품의약품안전평가원 보고서)



- 타겟 선정
 - ✓ 스테비아의 주요 타겟인 음료 카테고리 중 국내 생산량 상위 3개 생산 제품군인 탄산음료, 커피, 과채음료 및 가공 식품 중 탄산음료에 이어 당류 섭취량 2위인 Table-top 감미료를 선정함
 - ✓ 타겟 제품 이미지

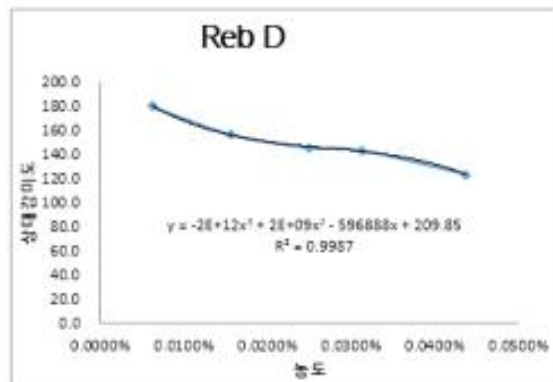
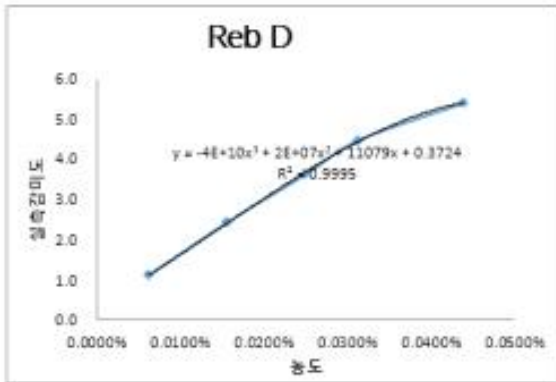


- Reb M 및 D는 기존 스테비아의 단점(쓰고 끌리는 맛)을 보완한 고품질 제품임
- ✓ 목적: 일반적인 당류(설탕, 과당 등)을 대체하여 50% 수준의 당류를 절감한 음료 시제품을 개발함으로써 향후 성장이 예상되는 저열량 감미료 시장에 적절히 대응하기 위함

○ 당류 저감을 위한 신규 스테비오사이드 활용 Formula

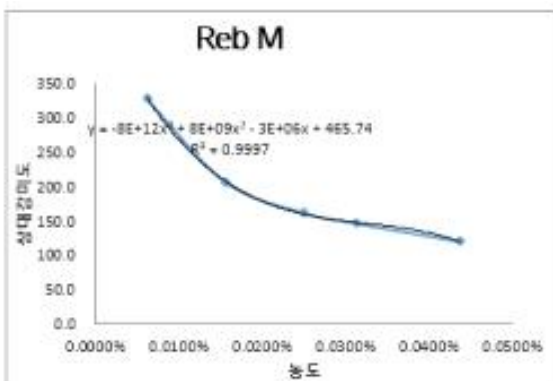
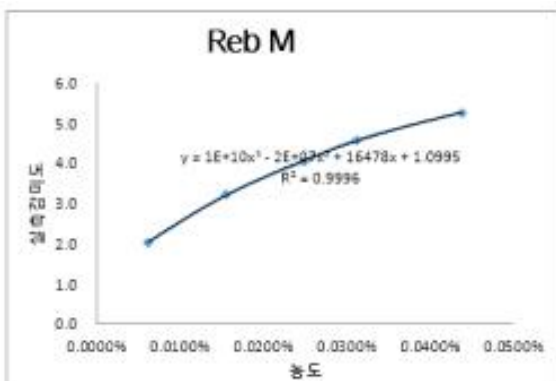
- Formula 개발 방법
 - 신규 스테비오사이드 관능 특성 파악
 - ✓ Rebaudiose D: 설탕을 기준으로 실측 감미도 5수준에서의 상대 감미도는 약 143배 수준으로 파악되며 쓴맛강도 및 이미취의 경우 RM보다 다소 높은 경향성 나타냄, 상대감미도의 표준편차 (20)는 M보다는 적어서 농도의 영향이 적음

구분	원료명	Reb D				
	제조사	하이젠				
	농도	0.0063%	0.0156%	0.0250%	0.0313%	0.0438%
	실측 감미도	1.12	2.44	3.63	4.47	5.39
상대 감미도	179.56	156.27	145.20	143.04	123.20	
평가 항목	단맛 풀림 지속성(Lingering)	2.55	3.55	4.08	4.08	4.92
	바디감 강도	7.08	7.13	6.67	6.42	6.29
	쓴맛 강도	0	1.61	1.87	2.83	3.10
	아린맛 강도	1.65	1.92	2.06	2.27	2.36
	물기 (상쾌) 강도	1.18	1.28	1.37	1.56	1.78
	끈적성 및 강도	1.44	1.29	1.39	1.44	1.69
	단맛 발현시점	7.35	7.09	6.50	6.58	6.73
	의견	에미(고무맛), 끈적미등이 다소 나타나나, 양호한 감미질				



- ✓ Rebaudiose M: 설탕을 기준으로 실측 감미도 5수준에서의 상대 감미도는 약 147배 수준으로 파악되며 감미질의 정성평가는 RD보다 양호한 경향성이 있음, 상대감미도의 표준편차(80)는 D 보다는 커서 농도가 낮을 때 감미 효율이 좋음

구분	원료명	Reb M				
	제조사	하이젠				
	농도	0.0063%	0.0156%	0.0250%	0.0313%	0.0438%
	실측 감미도	2.05	3.23	4.05	4.58	5.26
상대 감미도	327.27	206.55	162.00	146.56	120.19	
평가 항목	단맛 풀림 지속성(Lingering)	3.54	4.92	4.53	5.15	4.67
	바디감 강도	5.73	6.15	5.80	5.77	6.50
	쓴맛 강도	1.65	2.03	1.77	2.06	1.71
	아린맛 강도	2.15	2.27	2.05	2.15	2.38
	물기 (상쾌) 강도	1.54	1.85	1.87	2.01	2.02
	끈적성 및 강도	1.92	1.87	1.67	2.04	1.50
	단맛 발현시점	6.58	7.04	7.27	7.08	6.96
	의견	바디감이 있고 크레미즘 부도 없고 농도감 있는 감미질				



▪ Application 시제품 개발

- Table Top

- ✓ Table Top 배합비는 시중의 설탕(Table Top)을 Control로 설정
- ✓ 설탕은 탁상용 감미료 제품 중 가장 기본적인 제품이며 차, 커피, 각종 요리 등에 가장 많이 활용되는 감미료이다. 설탕은 당액 또는 원당을 정제, 가공한 것으로 결정, 분말, 덩어리의 것을 말함(당액 또는 원당 100%)
- ✓ 따라서 세부 배합비는 Figure III-1을 참조

- 탄산음료

- ✓ 사이다 타겟 제품 평가

구분	내용	비고
표시 당함량	10.8 g/ 100mL	본실험에는 10g/100mL 설정
가용성 고형분	10.41 Brix°	
pH	2.95	

- ✓ 타겟 배합비율

구분	배합비율(%)	비고
설탕	10.00	본 Formula는 Control(대조군) 배합으로 정하였으며, 여기서 감미료 부분(설탕)을 대체감미료 및 복합 Formula로 조정하여 관능평가를 실시하였다.
라임농축액	0.50	
구연산	0.08	
구연산삼나트륨	0.04	
사이다향	0.05	
정제수	89.33	
합계	100.00	

- ✓ 제조 방법

- ㉠ 제조 전 사용되는 기구 류는 가공 기준에 적합하게 세척, 건조, 살균한다.
- ㉡ 제조에 투입되는 원료는 식품공전 및 식품첨가물공전에 적합한 것으로 사용한다.
- ㉢ 성분 미 배합비율에 따라 원재료를 차례로 투입하여 용해한다.
- ㉣ 정제수는 80%수준까지 투입하여 용해 후, 최종적으로 향료를 배합 표선까지 정용한 후, 배합 별로 살균한다. (살균은 알루미늄 파우치를 활용하여 배치살균)
- ㉤ 살균된 배합액은 미리 살균된 용기에 담아 과냉각 시킨다.
- ㉥ 과냉각 된 배합액을 탄산 주입기를 활용해 탄산 주입 후, 밀봉하여 냉장보관한 후 관능평가 시료로 활용한다.

- 사과음료

- ✓ 사과음료 타겟 제품 평가

구분	내용	비고
표시 당함량	7.9 g/ 100mL	본실험에는 7.5g/100mL 설정
가용성 고형분	7.93 Brix°	
pH	2.92	

✓ 타겟 배합비율

구분	배합비율(%)	비고
사과농축액(72bx)	1.43	본 Formula는 Control(대조군) 배합으로 정하였으며, 여기서 감미료 부분(설탕)을 대체감미료 및 복합 Formula로 조정하여 관능평가를 실시하였다.
백설탕	6.50	
효소처리스테비아	0.0132	
비타민C	0.07	
구연산	0.3	
구연산삼나트륨	0.05	
사과향	0.1	
정제수	91.5368	
합계	100.00	

✓ 제조 방법

- ㉠ 제조 전 사용되는 기구 류는 가공 기준에 적합하게 세척, 건조, 살균한다.
- ㉡ 제조에 투입되는 원료는 식품공전 및 식품첨가물공전에 적합한 것으로 사용한다.
- ㉢ 성분 미 배합비율에 따라 원재료를 차례로 투입하여 용해한다.
- ㉣ 정제수는 80%수준까지 투입하여 용해 후, 최종적으로 향료를 배합 표선까지 정용한 후, 배합 별로 살균한다. (살균은 알루미늄 파우치를 활용하여 배치살균)
- ㉤ 살균된 배합액은 미리 살균된 용기에 담아 밀봉하여 냉장보관한 후 관능평가 시료로 활용한다.

- 커피

✓ 커피음료 타겟 제품 평가

구분	내용	비고
표시 당함량	8 g/ 100mL	본실험에는 8 g/100mL 설정
가용성 고형분	13.93 Brix°	
pH	6.67	

✓ 타겟 배합비율

구분	배합비율(%)	비고
원유(우유)	52.000	본 Formula는 Control(대조군) 배합으로 정하였으며, 여기서 감미료 부분(설탕)을 대체감미료 및 복합 Formula로 조정하여 관능평가를 실시하였다.
에스프레소 추출액(SD6%)	10.680	
정제수	30.525	
백설탕	6.400	
커피추출분말	0.230	
커피향	0.110	
탄산수소나트륨	0.050	
유화제	0.005	
합계	100.000	

✓ 제조 방법

- ㉠ 제조 전 사용되는 기구 류는 가공 기준에 적합하게 세척, 건조, 살균한다.
- ㉡ 제조에 투입되는 원료는 식품공전 및 식품첨가물공전에 적합한 것으로 사용한다.
- ㉢ 원두는 깨끗한 것으로 준비하여 고압 에스프레소 머신으로 정해진 비율대로 추출한다.
- ㉣ 성분 및 배합비율에 따라 원재료를 차례로 투입하여 용해한다. 특히 우유의 경우 고속유화기로 충분히 교반하면서 유화제와 함께 충분히 유화되도록 한다.
- ㉤ 정제수는 80%수준까지 투입하여 용해 후, 최종적으로 향료를 배합 표선까지 정용한 후, 배합 별로 살균한다. (살균은 알루미늄 파우치를 활용하여 배치살균)
- ㉥ 살균된 배합액은 미리 살균된 용기에 담아 밀봉하여 냉장보관한 후 관능평가 시료로 활용한다.

○ 당류 저감 Formula 소비자 관능평가

- 비교 샘플군 선정
 - Objective: 설탕 比 Reb M, Reb D, Reb A, Reb M+D, Reb M+D+ α (복합)의 기호도 분석
 - Reb M과 D를 각각 적용 시킨 시료와 단순 혼합한 시료, 복합 Formula를 적용한 시료로 나누어 평가하여 최종적인 선호 정도를 확인하기 위함
- 관능평가 단계

단계	분석 지표	Sensory Approach
Phase I	설탕사용 제품과 동일 감미도 규명	이점비교 검사 (2개 시료 제시 후 더 달다고 느끼는 시료를 forced-choice 하도록 하는 방법)
Phase II	기호도 조사	설탕과 동일 감미도의 감미료(5종)에 대한 소비자 기호도 분석

- 시료 구성
 - 대조군: 설탕
 - 실험군: RebM, RebD, RebA, D+M, R+D+M(복합)
 - Food systems: ① Table Top(solution), ② 커피 ③ 과채주스 ④ 사이다
- Phase 1
 - 목적: Food system별 x 감미료별 대조군(설탕)과 동일한 감미 강도를 제공하는 농도 규명
 - 재료 및 방법
 - ✓ Test method: 2-AFC (alternative forced choice) test - 제공된 pair 중 더 달다고 하는 시료를 선택하도록 함.
 - ✓ Samples: 대조군: 설탕/ 실험군: Reb M, Reb D, Reb A, Reb M+D, Reb M+D+ α (복합)
 - ✓ Food systems: ① solution, ② 커피 ③ 과채주스 ④ 사이다
 - 실험 디자인
 - ✓ Food system별 x 감미료 종류별 총 5개의 이점검사 pair로 구성함 (pair = 감미료 vs. 대조군 pair)
 - ✓ 이때, 대조군 농도는 고정하였으며, 감미료의 농도를 conc1~conc5으로 하여 pair를 구성함. (Figure III-1참고)
 - ✓ 세부 감미 강도 구분 배합: (Figure III-2 참고)

Solution system		pair 1	pair 2	pair 3	pair 4	pair 5
	Reb M	Reb M-conc1	Reb M-conc2	Reb M-conc3	Reb M-conc4	Reb M-conc5
	머조근	검량 10%	검량 10%	검량 10%	검량 10%	검량 10%
		pair 1	pair 2	pair 3	pair 4	pair 5
	Reb D	Reb D-conc1	Reb D-conc2	Reb D-conc3	Reb D-conc4	Reb D-conc5
	검량 10%	검량 10%	검량 10%	검량 10%	검량 10%	검량 10%
		pair 1	pair 2	pair 3	pair 4	pair 5
	Reb A	Reb A-conc1	Reb A-conc2	Reb A-conc3	Reb A-conc4	Reb A-conc5
	검량 10%	검량 10%	검량 10%	검량 10%	검량 10%	검량 10%
		pair 1	pair 2	pair 3	pair 4	pair 5
	Reb D+M	Reb DM-conc1	Reb DM-conc2	Reb DM-conc3	Reb DM-conc4	Reb DM-conc5
	검량 10%	검량 10%	검량 10%	검량 10%	검량 10%	검량 10%
		pair 1	pair 2	pair 3	pair 4	pair 5
	R+D+M	Reb RDM-conc1	Reb RDM-conc2	Reb RDM-conc3	Reb RDM-conc4	Reb RDM-conc5
검량 10%	검량 10%	검량 10%	검량 10%	검량 10%	검량 10%	

Figure III-1. Food system별 이점검사 시료 구성 방법 (solution system을 예시로 함)

감미 원료	Table Top Solution (%)																											
	Con	RM1	RM2	RM3	RM4	RM5	RD1	RD2	RD3	RD4	RD5	RDM1	RDM2	RDM3	RDM4	RDM5	RA1	RA2	RA3	RA4	RA5	복합1	복합2	복합3	복합4	복합5		
백설탕	100	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	
알룰로스	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Reb M	-	0.0051	0.0153	0.0255	0.0360	0.0460	-	-	-	-	-	0.0026	0.0077	0.0129	0.0180	0.0230	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Reb D	-	-	-	-	-	-	0.0048	0.0144	0.0240	0.0340	0.0430	0.0024	0.0072	0.0120	0.0168	0.0216	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Reb A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.0100	0.0300	0.0500	0.0700	0.0900	-	-	-	-	-	-	-
효소처리스테비아	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
NHDC	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
식이섬유	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
정제염(소금)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

감미 원료	Coffee (%)																											
	Con	RM1	RM2	RM3	RM4	RM5	RD1	RD2	RD3	RD4	RD5	RDM1	RDM2	RDM3	RDM4	RDM5	RA1	RA2	RA3	RA4	RA5	복합1	복합2	복합3	복합4	복합5		
백설탕	6.4	1.9	1.9	1.9	1.9	1.9	1.9	1.9	1.9	1.9	1.9	1.9	1.9	1.9	1.9	1.9	1.9	1.9	1.9	1.9	1.9	1.9	1.9	1.9	1.9	1.9	1.9	
알룰로스	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Reb M	-	0.0025	0.0127	0.0228	0.0330	0.0431	-	-	-	-	-	0.0013	0.0063	0.0114	0.0165	0.0216	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Reb D	-	-	-	-	-	-	0.0024	0.0120	0.0220	0.0317	0.0415	0.0012	0.006	0.011	0.016	0.021	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Reb A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.0050	0.0250	0.0450	0.0650	0.0850	-	-	-	-	-	-	-
효소처리스테비아	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
NHDC	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
식이섬유	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
정제염(소금)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

감미 원료	Apple Juice (%)																											
	Con	RM1	RM2	RM3	RM4	RM5	RD1	RD2	RD3	RD4	RD5	RDM1	RDM2	RDM3	RDM4	RDM5	RA1	RA2	RA3	RA4	RA5	복합1	복합2	복합3	복합4	복합5		
백설탕	6.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	
알룰로스	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Reb M	-	0.0073	0.0175	0.0277	0.0378	0.0480	-	-	-	-	-	0.0037	0.0088	0.0138	0.0189	0.0240	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Reb D	-	-	-	-	-	-	0.0071	0.0168	0.0266	0.0363	0.0461	0.0035	0.0084	0.0133	0.0182	0.0230	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Reb A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.0145	0.0345	0.0545	0.0745	0.0945	-	-	-	-	-	-	-
효소처리스테비아	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
NHDC	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
식이섬유	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
정제염(소금)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	

감미 원료	Cider (%)																										
	Con	RM1	RM2	RM3	RM4	RM5	RD1	RD2	RD3	RD4	RD5	RDM1	RDM2	RDM3	RDM4	RDM5	RA1	RA2	RA3	RA4	RA5	복합1	복합2	복합3	복합4	복합5	
백설탕	10.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0	5.0
알룰로스	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Reb M	-	0.0051	0.0152	0.0254	0.0355	0.0457	-	-	-	-	-	0.0025	0.0076	0.0127	0.0178	0.0228	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Reb D	-	-	-	-	-	-	0.0049	0.0146	0.0244	0.0341	0.0439	0.0024	0.0073	0.0122	0.0171	0.0220	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Reb A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.0100	0.0300	0.0500	0.0700	0.0900	-	-	-	-	-	-
효소처리스테비아	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
NHDC	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
식이섬유	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
정제염(소금)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Figure III-2. Food system별 이점검사 시료 세부 감미료별 Dosage

- 제공방법 및 검사 과정

- ✓ 각 소비자는 1 종류의 food system 평가에만 참여함
- ✓ 각 소비자는 한 감미료 종류(ex.Reb M)에 대한 이점검사를 수행한 후, 5분 or 10분 휴식 후, 다음 감미료 종류(ex.Reb D)에 대한 이점검사를 수행함. 이때 감미료 종류의 제공순서는 패널별 랜덤화함.(Figure III-3 참고)

	Solution system									
	10 ml	1st Set 10 min	5 min break	2nd Set 10 min	5 min break	3rd Set 10 min	10 min break	4th Set 10 min	5 min break	5th Set 10 min
panel 1		Reb M		Reb D		R+D+M		Reb A		Reb D+M
panel 2		Reb D		Reb A		Reb M		Reb D+M		R+D+M
panel 3		Reb A		Reb D+M		Reb D		R+D+M		Reb M
panel 4		Reb D+M		R+D+M		Reb A		Reb M		Reb D
panel 5		R+D+M		Reb M		Reb D+M		Reb D		Reb A

Figure III-3. 패널별 감미료 종류에 따른 평가 순서 (예시)

- ✓ 각 감미료는 set 내에는 5개의 이점검사 pair로 구성됨. 평가하는 pair의 순서는 랜덤화하였으며, contrast effect의 효과를 최소화하고자 conc1 와 conc5 : pair는 근접순서로 제공되지 않도록 설계함.
- ✓ 각 pair내 시료제공 순서는 랜덤화하여 제시함.
- ✓ 모든 시료는 10 ml씩 제공함.
- ✓ 시료의 평가온도는 소비자가 일반적으로 해당 식품을 취식하는 온도로 설계함 (solution- 20-2 5°C; 커피, 주스, 사이다 - 10 °C)

- 통계 처리

- ✓ 2-AFC 조사에 대한 critical value table을 활용함. (Lawless and Heymann, 2010). Critical value의 의미는 2-AFC test 에서 untrained panel 이 차이를 인지한다고 결론내리는 최소 정답 수 (critical value, 2-tailed, P=0.05)이며, critical value 보다 정답수가 높을 때에는 untrained panel 이 인지할 수 있는 수준의 차이라고 결론내릴 수 있음. 반대로, critical value보다 낮은 정답수에 대해서는 untrained panel 이 차이를 인지한다고 판단할 근거가 없다고 결론내릴 수 있음

■ Phase 1 결과

- Table Top Solution

- ✓ N=63, Critical value for 2-tailed test = 40
- ✓ Reb D 의 경우, conc 2에서 대조군과 유의적인 차이가 나타나지 않아서, Phase 2 소비자조사에서 활용할 농도로 선정함.
- ✓ 나머지 감미료의 경우, 제공된 농도에서 대조군과 동일한 (=단맛 차이를 인지함에 있어 유의적으로 차이가 없음) 감미농도 발견되지 않음.
- ✓ 이에 역전이 일어나는 농도 범위를 기준으로 내부시식을 진행하여 소비자조사에 사용될 농도를 최종 결정함.

	Reb M	대조군		Reb D	대조군		Reb A	대조군
conc1	3	60	NS	3	60	NS	10	53
conc2	20	43		30	33		43	20
conc3	46	17		41	22		46	15
conc4	54	9		52	11		49	14
conc5	58	5		49	14		54	9

	Reb D+M	대조군		R+D+M	대조군
conc1	3	60	NS	10	53
conc2	22	41		42	21
conc3	46	18		51	12
conc4	47	16		59	4
conc5	51	12		63	0

구분	판단필요 감미료	내부 taste 시료	내부 농도의 결정사항
Table Top Solution	Reb M	Conc 3 vs. Conc3 75% (vs. 대조군)	Conc. 3 시료 비 75% 수준으로 소비자조사용 시료 결정
	Reb A	Conc 2 vs. Conc2 75% (vs. 대조군)	Conc. 2 시료 비 75% 수준으로 소비자조사용 시료 결정
	Reb D+M	Conc 3 vs. Conc3 75% (vs. 대조군)	Conc. 3 시료 농도로 결정
	Reb R+D+M	Conc 2 vs. Conc2 75% (vs. 대조군)	Conc. 2 시료 농도로 결정

*두 농도의 감미료 중, 최대한 대조군과 더 유사한 감미도를 나타낸다고 판단되는 농도로 최종 결정함.

Figure III-4. Table top solution system: 이점검사 평가 결과 (각 pair 내 시료별 단맛이 더 강하다고 응답한 응답수)

- Coffee System

- ✓ N=63, Critical value for 2-tailed test = 40
- ✓ 각 감미료별 대조군과 유의적인 차이가 나타나지 않는 농도로 소비자조사를 위한 농도로 결정함.
- ✓ Reb M = conc. 3 / Reb D = conc. 3 / Reb A = conc 2 / Reb D+M = conc 3 / Reb R+D+M = conc 3

	Reb M	대조군		Reb D	대조군		Reb A	대조군
conc1	2	63	NS	2	63	NS	3	62
conc2	13	52		7	58		28	37
conc3	38	27		34	31		51	14
conc4	50	15		48	17		57	8
conc5	60	5		48	17		62	3

	Reb D+M	대조군		R+D+M	대조군
conc1	0	65	NS	0	65
conc2	14	51		1	64
conc3	41	24		28	37
conc4	50	15		59	6
conc5	58	7		59	6

Figure III-5. Coffee system: 이점검사 평가 결과 (각 pair 내 시료별 단맛이 더 강하다고 응답한 응답수)

- Juice System

- ✓ N=60, Critical value for 2-tailed test = 39
- ✓ 각 감미료별 대조군과 유의적인 차이가 나타나지 않는 농도로 소비자조사를 위한 농도로 결정함.
- ✓ Reb M = conc. 2 / Reb D = conc. 2 / Reb D+M = conc 2 / Reb R+D+M = conc 3
- ✓ Reb A 의 경우, 제공된 농도에서 대조군과 동일한(=단맛 차이를 인지함에 있어 유의적으로 차이가 없음) 감미농도 발견되지 않음. 이에 역전이 일어나는 농도 범위를 기준으로 내부시식을 진행하여 소비자조사에 사용될 농도를 최종결정함.

	Reb M	대조군			Reb D	대조군			Reb A	대조군
conc1	7	53	NS	conc1	5	55	NS	conc1	14	46
conc2	31	29		conc2	23	37		conc2	41	19
conc3	43	17		conc3	37	23		conc3	42	18
conc4	54	6		conc4	52	8		conc4	48	12
conc5	57	3		conc5	55	5		conc5	53	7

	Reb D+M	대조군			R+D+M	대조군	
conc1	7	53	NS	conc1	5	55	NS
conc2	25	35		conc2	13	47	
conc3	45	15		conc3	34	26	
conc4	46	14		conc4	45	15	
conc5	58	2		conc5	51	9	

Figure III-6. Juice system: 이점검사 평가 결과 (각 pair 내 시료별 단맛이 더 강하다고 응답한 응답수)

구분	판단필요 감미료	내부 taste 시료	내부 논의 결정사항
과당류스	Reb A	Conc 2 vs. Conc2 75% vs. 대조군	Conc. 2 시료 vs 75% 수준으로 소비자조사용 시료 결정

*두 농도의 감미료 중, 최대한 대조군과 더 유사한 감미도를 나타낸다고 판단되는 농도로 최종 결정함.

- Cider System

- ✓ N=65, Critical value for 2-tailed test = 41
- ✓ 각 감미료별 대조군과 유의적인 차이가 나타나지 않는 농도로 소비자조사를 위한 농도로 결정함.
- ✓ Reb M = conc. 2 / Reb D+M = conc 2 / Reb R+D+M = conc 3
- ✓ Reb D 및 Reb A 의 경우, 제공된 농도에서 대조군과 동일한(=단맛 차이를 인지함에 있어 유의적으로 차이가 없음) 감미농도 발견되지 않음. 이에 역전이 일어나는 농도 범위를 기준으로 내부시식을 진행하여 소비자조사에 사용될 농도를 최종 결정함

	Reb M	대조군			Reb D	대조군			Reb A	대조군
conc1	4	59	NS	conc1	0	63	NS	conc1	7	56
conc2	35	28		conc2	18	45		conc2	41	22
conc3	49	14		conc3	48	15		conc3	51	12
conc4	56	7		conc4	53	10		conc4	57	6
conc5	57	6		conc5	56	7		conc5	55	8

	Reb D+M	대조군			R+D+M	대조군	
conc1	2	61	NS	conc1	2	61	NS
conc2	24	39		conc2	9	54	
conc3	39	24		conc3	31	32	
conc4	60	3		conc4	50	13	
conc5	54	9		conc5	55	8	

Figure III-7. Cider system: 이점검사 평가 결과 (각 pair 내 시료별 단맛이 더 강하다고 응답한 응답수)

구분	판단필요 감미료	내부 taste 시료	내부 논의 결정사항
사이다	Reb D	Conc 3 vs. Conc3 75% vs. 대조군	Conc. 3 시료 vs 75% 수준으로 소비자조사용 시료 결정
	Reb A	Conc 2 vs. Conc2 75% vs. 대조군	Conc. 2 시료 vs 75% 수준으로 소비자조사용 시료 결정

*두 농도의 감미료 중, 최대한 대조군과 더 유사한 감미도를 나타낸다고 판단되는 농도로 최종 결정함.

▪ Summary of Phase 1

- Concentrations determined for each sweetener that provides equivalent sweetness per each food system according to the result of 2-AFC tests

시료 종류	Table Top Solution	Coffee	Juice	Cider
Reb M	0.0191%	0.0288%	0.0175%	0.0152%
Reb D	0.0144%	0.0220%	0.0169%	0.0183%
Reb A	0.0225%	0.0250%	0.0259%	0.0225%
Reb D+M	D: 0.0120% M: 0.0128%	D: 0.0110% M: 0.0114%	D: 0.0085% M: 0.0088%	D: 0.0073% M: 0.0076%
Reb D+M+ α (복합 Formula)	알룰로스: 3.30% RD: 0.0031% RM: 0.0027% NHDC: 0.002% G1: 0.0027% 식이섬유: 0.020% 정제염: 0.010%	알룰로스: 4.50% RD: 0.0030% RM: 0.0020% NHDC: 0.0002% G1: 0.0020% 식이섬유: 0.050% 정제염: 0.008%	알룰로스: 4.0% RD: 0.0060% RM: 0.0030% NHDC: 0.0005% G1: 0.0040% 식이섬유: 0.020% 정제염: 0.010%	알룰로스: 5.0% RD: 0.0033% RM: 0.0024% G1: 0.0020% 식이섬유: 0.01% 정제염: 0.01%

▪ Phase II: 다양한 감미료에 대한 설탕 比 소비자 기호도 분석

- 목적: Food system별 x 감미료별 실제 소비자의 기호도를 통해 최적의 배합비 산출
- 재료 및 방법
 - ✓ Test method: Consumer Acceptance Test (정량적 소비자조사), 각 패널이 각각의 시료에 대한 기호수준 평가함
 - ✓ Samples: 대조군: 설탕/ 실험군: Reb M, Reb D, Reb A, Reb M+D, Reb M+D+α(복합)
 - ✓ Food systems: ① solution, ② 커피 ③ 과채주스 ④ 사이다
- 실험 디자인
 - ✓ CLT (Central Location Test, in-lab test)로 진행함.
 - ✓ 각각의 소비자는 3 종류의 food system을 평가하도록 함. 이때, food system의 평가순서 Lingering 영향 등을 고려하여, Solution은 가장 먼저 평가하였으며, 커피는 가장 마지막 순서로 평가하도록 설계함. 과채주스와 사이다의 평가순서는 counter-balance함. (Figure III-8 참고)
- 패널: 일반적인 소비자 총 124명 참여함 (각 패널은 총 3개의 food system 평가하도록 설계함, 이때 특정제품에 대한 rejecter는 해당 식품군을 평가하지 않도록 설계함)
 - ✓ Table top solution 92명; 커피 93명; 주스 93명 ; 사이다 94명

9/8 10:00		Day 1 - 오전 (9/8일 10시 Target N=20)						
		Solution, coffee, 과채주스						
		1st	2nd	3rd				
		10 min	20 min	10 min break	20 min	10 min break	20 min	10 min break
panel 1-12		Solution	과채주스	커피				
panel 13-24		Solution	과채주스	커피				

9/8 14:00		Day 1 - 오전 (9/8일 14시 Target N=20)						
		Solution, coffee, 사이다						
		1st	2nd	3rd				
		10 min	20 min	10 min break	20 min	10 min break	20 min	10 min break
panel 1-12		Solution	사이다	커피				
panel 13-24		Solution	사이다	커피				

9/8 16:30		Day 1 - 오전 (9/8일 16:30 Target N=20)						
		Solution, 사이다, 과채주스						
		1st	2nd	3rd				
		10 min	20 min	10 min break	20 min	10 min break	20 min	10 min break
panel 1-12		Solution	과채주스	사이다				
panel 13-24		Solution	사이다	과채주스				

Figure III-8. 패널별 Food system평가 순서 (예시)

- 제공 및 평가 방법
 - ✓ 각 Food system 내에서 6개의 시료는 랜덤한 순서로 제공되었으며, sequential monadic evaluation procedure 로 평가 진행함.
 - ✓ 모든 시료는 20 ml씩 제공함.
 - ✓ 시료의 평가온도는 소비자가 일반적으로 해당 식품을 취식하는 온도로 설계함 (solution- 20-25℃; 커피, 주스, 사이다 - 10 ℃)
- 통계처리 방법
 - ✓ 기호도평가 결과에 대해 분석분석(ANOVA, with main effect 'sample' and 'panel')을 수행하여 결과에 시료에 따른 차이가 있는지 검증함. 'Sample' effect가 확인된 경우, 사후분석을 수행하였으며, 사후분석으로는 기준제품(대조군-설탕)과 평균값의 차이의 유의성을 검증하는 Dunnett's test (2-tailed, 5%:)를 수행함.
 - ✓ 가장 선호하는 시료 및 비선호하는 시료를 선택하도록 한 결과에 대해서는, 시료별 응답비율을 contingency table로 정리하였으며, 응답비율에 대해 chi-test를 수행하여 응답비율의 유의성을 검증함

▪ Phase 2 결과 및 결론

- 설탕 比 감미료에 대한 소비자 기호도 결과 - Overall liking

✓ 기준제품(대조군-설탕)과 평균값의 차이의 유의성을 검증하는 Dunnett's test (2-tailed, 5%;)를 통해 사후분석을 수행한 결과,

- ㉠ [R+D+M]의 경우, 모든 식품 시스템에서 대조군인 설탕 比 소비자 전반기호도에 있어 유의적인 차이를 보이지 않음.
- ㉡ [R+D+M]을 제외한 대부분 감미료는 Coffee 시스템에서 대조군인 설탕 比 소비자 전반기호도에 있어 유의적인 차이를 보임.
- ㉢ Coffee 시스템을 제외 시, [Reb M]이 나머지 식품 시스템에서 대조군인 설탕 比 전반기호도에 있어 유의적인 차이를 보이지 않음.

Overall-liking	Table Top Solution (N=92)			Coffee (N=93)			Juice (N=93)			Cider (N=94)		
	Liking score	Control vs. (difference)	Sig. of diff.	Liking score	Control vs. (difference)	Sig. of diff.	Liking score	Control vs. (difference)	Sig. of diff.	Liking score	Control vs. (difference)	Sig. of diff.
Reb D	5.0	0.1	No	5.8	0.7	Yes	5.1	0.8	Yes	5.2	0.7	Yes
Reb M	4.9	0.2	No	5.5	1.0	Yes	6.0	0.0	No	5.6	0.3	No
Reb A	4.8	0.3	No	5.6	0.9	Yes	5.7	0.2	No	5.2	0.7	Yes
D+M	4.7	0.4	No	5.7	0.8	Yes	5.4	0.5	Yes	5.3	0.6	Yes
R+D+M	4.7	0.4	No	6.6	-0.1	No	6.2	-0.3	No	6.1	-0.2	No
대조군(설탕)	5.1			6.5			5.9			5.9		

Figure III-9. Dunnett's test result: (대조군과의 평균차이에 대한 유의성 검증)

- 설탕 比 감미료에 대한 소비자 기호도 결과

✓ 가장 선호하는 시료 및 가장 비선호하는 시료에 대한 평가 결과

✓ 6개의 시료 중, 가장 선호하는 시료를 선택하도록 응답한 비율을 비교한 결과,

- ㉠ [복합 Formula: R+D+M]이 29.8% (net avg.)로 가장 높게 나타남. 이는 chi-test를 통한 유의분석 결과 (전체 평균 기준 분석), p-value 0.001로 나타나, [R+D+M]은 가장 선호하는 시료로 유의적으로 많이 선택된 것을 확인함
- ㉡ 가장 선호하는 시료로서 [R+D+M]의 응답비율은 대조군인 설탕보다도 높은 비율이었으며 (23.4%, net avg.), table top을 제외한 모든 식품 시스템에서 설탕보다 높은 비율로 응답됨

✓ 6개의 시료 중, 가장 비선호하는 시료를 선택하도록 응답한 비율을 비교한 결과,

- ㉠ chi-test를 통한 유의분석 결과 (전체 평균 기준 분석), p-value 0.768로 나타나, 시료들 간 응답비율의 유의미한 차이는 없는 것으로 나타남
- ㉡ 다만 경향상 [대조군-설탕]과 [R D+M+α: 복합Formula]이 비선호하는 시료로 가장 적은 비율로 응답된 것을 확인할 수 있었음.

	선호시료					비선호시료				
	Table top	Coffee	Juice	Cider	평균	Table top	Coffee	Juice	Cider	평균
대조군(설탕)	25.0	24.7	21.5	22.3	23.4	13.0	8.6	17.2	16.0	13.7
Reb M	10.9	7.5	19.4	17.0	13.7	16.3	29.0	6.5	14.9	16.7
Reb D	20.7	12.9	8.6	7.4	12.4	10.9	19.4	32.3	21.3	20.9
Reb A	15.2	8.6	9.7	13.8	11.8	16.3	12.9	14.0	18.1	15.3
D+M	7.6	9.7	7.5	10.6	8.9	15.2	23.7	21.5	17.0	19.3
복합 Formula	20.7	36.6	33.3	28.7	29.8	28.3	6.5	8.6	12.8	14.0
					100.0					100.0

Figure III-10. 각 시료에 대해 소비자가 가장 선호하는/비선호하는 시료로 응답한 비율 (%)

▪ Phase 2. 요약 및 결론

개발된 당류 저감 복합Formula가 대조군인 설탕과 대등하거나 더 높은 수준의 기호도를 나타내, **품질 측면에서 설탕 대체제로서 높은 가능성을 확인함**

- Reb M와 Reb D를 다양하게 활용한 감미료에 대해, 실제 식품 시스템에서 설탕 대비 기호수준을 분석한 결과, **[Reb D+M+ α : 복합 Formula]이 대조군인 설탕과 대등하거나 더 높은 수준의 기호도를 나타내, 품질측면에서 설탕 대체제로서 높은 가능성을 확인함.** 그 다음으로는 [Reb M]이 많은 가능성을 잠재하는 것으로 나타났으며, [Reb D] 및 [Reb A]는 설탕을 대체하기에는 품질적인 측면에서 비선호되는 경향이 있음을 확인함
- 4가지 식품 시스템 중, **쓴맛과 단맛이 함께 어우러지는 커피 시스템이 가장 대체가 어려운 시스템**인 것으로 본 조사 결과 나타남. 그럼에도 불구하고 [Reb D+M+ α : 복합 Formula]은 커피시스템에서도 설탕과 유사한 수준의 전반기호 수준으로 분석되었음.
- 속성으로 봤을 때에는 **뒷맛기호도가 식품시스템이 가지는 특징에 따라 장점을 가지는 감미료도 다소 상이할 수 있는 것으로 보임.** 식품시스템이 전반적으로 단맛이 지배적인 주스의 경우, 뒷맛기호도에 있어 설탕과 감미료 간 차이가 크지 않았던 반면, 식품시스템이 쓴맛과 단맛이 함께 어우러지는 커피 시스템의 경우, 대부분의 감미료가 설탕 대비 차이를 많이 보이는 것으로 나타남

이점 비교 검사

날짜: _____ 이점: _____

1. 제공된 Set의 시료 번호를 위대사구의 아래에 순서대로 알맞게 기록하십시오.
 2. Set 내 두 시료를, **반복한 뒤** **교차하고** **반복**한 시료번호를 **작성**하십시오.
 * 시료는 **반복** 시료부터 시작하길 권장합니다.
 * 시료는 **반복**할 때 **일단** **일단**에서 **2회** **공해** 후 **실험**하십시오.
 * 시료에 **대한** **평가** **결과**를 **기록**하십시오.
 다른 시료를 평가 전, 실험 전후에 한 번이고 **사구**에 **넣어**주세요.
 * 다른 시료 역시 **일단** **일단**에서 **2회** **공해** 후 **실험**하십시오.

3. Set 내의 **상대** 평가가 끝나시면 **일단** **일단** **평가** **결과** **30초** **간** **휴식**하십시오.
 4. 동일한 방식으로 **3대** **Set**을 **교차** **평가**하십시오.
 5. Set 내의 **상대** 평가가 끝나시면 **30초** **간** **휴식**하십시오. 다음 시료를 **교차** **평가**하십시오.

SET 1 시료 번호: _____

V 표시: () ()

-중수로 일종 2번 평가 후 30초간 휴식하십시오-

SET 2 시료 번호: _____

V 표시: () ()

-중수로 일종 2번 평가 후 30초간 휴식하십시오-

SET 3 시료 번호: _____

V 표시: () ()

-중수로 일종 2번 평가 후 30초간 휴식하십시오-

SET 4 시료 번호: _____

V 표시: () ()

-중수로 일종 2번 평가 후 30초간 휴식하십시오-

SET 5 시료 번호: _____

V 표시: () ()

-중수로 일종 2번 평가 후 30초간 휴식하십시오-

Figure III-11 소비자 관능평가 설문지:감미도 설정을 위한 이점 비교 평가

첨단형 [태양] 소비자 기호도 조사

항목 _____

1. 설문지상의 시료번호와 똑같은 시료 번호가 있는지 확인하십시오.
 2. 꼭 시료에 대해 질문이나 문의사항이 있으신지 알려주시면 답변 드리겠습니다.
 * 시료에 대한 질문은 제품명, 용량, 색상, 용도, 크기, 구조 등에 대하여입니다.
 * 시료에 대한 질문은 받고, 질문에 의거 시료 설명을 해 드립니다.
 * 시료 시도를 할 수 있는 용도를 알려드립니다.
 * 기타 문의사항은 다시 연락할 수 있으며, 문의 용어를 이해할 수 없습니다.
 3. 꼭 시료에 대한 질문이 끝난 후 제품 시도를 부탁드립니다.
 * 제품 시도를 하시기 전에 손을 씻으시기 바랍니다.

1. 외관 및 작동감 등을 사진/동영상으로 촬영하시거나 촬영하십시오.

작성 목적으로 질문을 나누어 놓았으며, 1번 목적으로 질문을 나누어 놓았을 때에는
 2번은 '불가능'으로, 3번은 '불가능'으로 적어주세요.

목적용	1번	2번	3번	4번	5번	6번	7번	8번	9번	10번
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11

-불가능-

2. 해당 시료의 단점을 알려주세요.

작성 목적으로 질문을 나누어 놓았으며, 1번 목적으로 질문을 나누어 놓았을 때에는
 2번은 '불가능'으로, 3번은 '불가능'으로 적어주세요.

목적용	1번	2번	3번	4번	5번	6번	7번	8번	9번	10번
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11

3. 해당 시료의 장점들을 알려주세요.

작성 목적으로 질문을 나누어 놓았으며, 1번 목적으로 질문을 나누어 놓았을 때에는
 2번은 '불가능'으로, 3번은 '불가능'으로 적어주세요.

목적용	1번	2번	3번	4번	5번	6번	7번	8번	9번	10번
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11

4. 해당 시료의 특징을 알려주세요.

작성 목적으로 질문을 나누어 놓았으며, 1번 목적으로 질문을 나누어 놓았을 때에는
 2번은 '불가능'으로, 3번은 '불가능'으로 적어주세요.

목적용	1번	2번	3번	4번	5번	6번	7번	8번	9번	10번
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11

-불가능-

작성하신 의견이 기호도 평가에 반영되는 이유를 고지시키고 해당 기호도를 반영하는 이유를 기재해 주시고 이에 감사드립니다.

작성 번호	반영하는 이유

-불가능-

작성하신 의견이 기호도 평가에 반영되는 이유를 고지시키고 해당 기호도를 반영하는 이유를 기재해 주시고 이에 감사드립니다.

작성 번호	반영하지 않는 이유

Figure III-12. 소비자 관능평가 설문지: 기호도 평가를 위한 선호도 조사

당류 저감 시제품 검사 성적서

▪ 당류 함량 영양성분 정량분석 결과

- 실제 분석결과 모든 Formula 50% 당류저감 기준 충족
- 영양성분 표시 등 실제 당류 저감 비율을 표시 가능하여 시중에 당류저감 음료들의 패키지에 “50% 당 감소”, “당류 저감” 표시로 소비자 특장점 소구 가능

분석 검체 (/100g)	Table Top		컵커피		사과드링크		사이다	
	열량(kcal)	당류(g)	열량(kcal)	당류(g)	열량(kcal)	당류(g)	열량(kcal)	당류(g)
대조군(설탕)	400	99.9	60	9.4	38	9.5	42	10.3
복합 Formula	191	51.1	41	4.5	13	3.5	19	5.2
당류 저감율	-	48.9%	-	51.8%	-	63.7%	-	49.9%

[참고] 주요 국가 별 당류저감 기준

구분	대한민국	미국	일본	중국
‘저당’ 표시	당류 25g/100g 미만	0.5g 이하	당류 25g/100g 미만	당류 25g/100g 미만
‘무당’ 표시	당류 0.5g/100g 미만	100% 정제수 또는 당류 0.5g 이하	당류 0.5g 이하	당류 0.5g 이하
‘저칼’ 표시	당류 25g/100g 미만	당류 0.5g 이하	당류 25g/100g 미만	당류 25g/100g 미만
정기 사항	단산성류 “당아연도” 표시 (2021.11.10. 개정)			

식약처 식품첨가물 표시기준 개정(당류저감) 관련 정보(영양성분 표시)
 품명: [제품명] / 품명: [제품명] / 품명: [제품명] / 품명: [제품명]
 품명: [제품명] / 품명: [제품명] / 품명: [제품명] / 품명: [제품명]
 품명: [제품명] / 품명: [제품명] / 품명: [제품명] / 품명: [제품명]
 품명: [제품명] / 품명: [제품명] / 품명: [제품명] / 품명: [제품명]
 품명: [제품명] / 품명: [제품명] / 품명: [제품명] / 품명: [제품명]
 품명: [제품명] / 품명: [제품명] / 품명: [제품명] / 품명: [제품명]
 품명: [제품명] / 품명: [제품명] / 품명: [제품명] / 품명: [제품명]
 품명: [제품명] / 품명: [제품명] / 품명: [제품명] / 품명: [제품명]

✓ 최근 식약처 표시기준 개정으로 “무가당”, “설탕 무첨가” 표시 가능하도록 변경

「식품의약품안전처 고시 제 2021-88 호 식품등의 표시기준

「식품등의 부당한 표시 또는 광고의 내용 기준」 일부개정고시(제 2021-89 호, 2021.11.10)

다) 다음의 모두에 해당하는 경우 “설탕 무첨가”, “무가당”을 표시할 수 있다.
 (1) 당류를 첨가하지 않은 제품 / (2) 당류를 기능적으로 대체하는 원재료를 사용하지 않은 제품
 (3) 당류가 첨가된 원재료 미사용 제품 / (4) 농축, 건조 등으로 당함량이 높아진 원재료 미사용 제품 등

- 식품 유형에 따른 규격검사 결과
 - 실제 분석결과 모든 Formula 식품공전 규격 ‘적합’

구분	Table Top	컵커피	사과드링크	사이다
식품의 유형	당류가공품	커피	과채음료	탄산음료
중금속류	-	적합	적합	적합
타르색소	-	적합	-	-
미생물류	적합	적합	적합	적합

* “-“ 하이픈 표시는 기준 미설정 규격임

- 성적표 결과
- 영양성분 결과
- ✓ <Table Top 오리지널 / 50% 당류저감>

페이지 11 / 총 11

제 D022110031 호
부속확인 0221-023-0422

참고용 시험성적서

본 성적서는 식품의약품안전처 『식품-화학분야 시험·검사 결과 관련 법률』에 따른 것이 아닙니다.

제품명	Table Top-원산지(100%당류)	제조일자 (유통기한)	2021-11-08
원산지	업체명	업체명	업체명
주 소	주 소	주 소	주 소
제조번호	제조번호	제조번호	제조번호
시험목적	시험목적	시험목적	시험목적

귀하가 우리 연구원에 시험뢰하신 결과는 다음과 같습니다.

시험 - 검사 완료일 : 2021-11-12
 시험 - 검사 책임자 : 이현정
 시험관련 총 책임자 : 김민희

시험 항목	시험 결과	시험-검사항
열량(Kcal/100g)	389.89 Kcal/100g	에너지
탄수화물(%)	59.95 %	당류
포화지방(%)	29.08 %	지방산
트리아실글리세롤(%)	29.01 %	지방산
수분(%)	5.28 %	수분
회분(%)	0.51 %	회분
당류(과당,포도당,사당,케이당,소당)(mg/g)	389.28 mg/g	당류

2021년 11월 12일
한국기농식품연구원

111021-0422-1



페이지 11 / 총 11

제 D022110030 호
부속확인 0221-023-0422

참고용 시험성적서

본 성적서는 식품의약품안전처 『식품-화학분야 시험·검사 결과 관련 법률』에 따른 것이 아닙니다.

제품명	Table Top-당류저감(50%당류저감)	제조일자 (유통기한)	2021-11-08
원산지	업체명	업체명	업체명
주 소	주 소	주 소	주 소
제조번호	제조번호	제조번호	제조번호
시험목적	시험목적	시험목적	시험목적

귀하가 우리 연구원에 시험뢰하신 결과는 다음과 같습니다.

시험 - 검사 완료일 : 2021-11-12
 시험 - 검사 책임자 : 이현정
 시험관련 총 책임자 : 김민희

시험 항목	시험 결과	시험-검사항
열량(Kcal/100g)	389.89 Kcal/100g	에너지
탄수화물(%)	37.26 %	당류
포화지방(%)	31.1 %	지방산
트리아실글리세롤(%)	31.1 %	지방산
수분(%)	5.23 %	수분
회분(%)	0.51 %	회분
당류(과당,포도당,사당,케이당,소당)(mg/g)	194.64 mg/g	당류

2021년 11월 12일
한국기농식품연구원

111021-0422-1



- ✓ <컵컵피 오리지널 / 50% 당류저감>

페이지 11 / 총 11

제 D022110034 호
부속확인 0221-023-0422

참고용 시험성적서

본 성적서는 식품의약품안전처 『식품-화학분야 시험·검사 결과 관련 법률』에 따른 것이 아닙니다.

제품명	컵컵피(100%당류)	제조일자 (유통기한)	2021-11-08
원산지	업체명	업체명	업체명
주 소	주 소	주 소	주 소
제조번호	제조번호	제조번호	제조번호
시험목적	시험목적	시험목적	시험목적

귀하가 우리 연구원에 시험뢰하신 결과는 다음과 같습니다.

시험 - 검사 완료일 : 2021-11-12
 시험 - 검사 책임자 : 이현정
 시험관련 총 책임자 : 김민희

시험 항목	시험 결과	시험-검사항
열량(Kcal/100g)	391.84 Kcal/100g	에너지
탄수화물(%)	51.77 %	당류
포화지방(%)	1.22 %	지방산
트리아실글리세롤(%)	1.22 %	지방산
수분(%)	39.24 %	수분
회분(%)	2.25 %	회분
당류(과당,포도당,사당,케이당,소당)(mg/g)	391.28 mg/g	당류

2021년 11월 12일
한국기농식품연구원

111021-0422-1



페이지 11 / 총 11

제 D022110035 호
부속확인 0221-023-0422

참고용 시험성적서

본 성적서는 식품의약품안전처 『식품-화학분야 시험·검사 결과 관련 법률』에 따른 것이 아닙니다.

제품명	컵컵피(50%당류저감)	제조일자 (유통기한)	2021-11-08
원산지	업체명	업체명	업체명
주 소	주 소	주 소	주 소
제조번호	제조번호	제조번호	제조번호
시험목적	시험목적	시험목적	시험목적

귀하가 우리 연구원에 시험뢰하신 결과는 다음과 같습니다.

시험 - 검사 완료일 : 2021-11-12
 시험 - 검사 책임자 : 이현정
 시험관련 총 책임자 : 김민희

시험 항목	시험 결과	시험-검사항
열량(Kcal/100g)	391.84 Kcal/100g	에너지
탄수화물(%)	22.24 %	당류
포화지방(%)	1.24 %	지방산
트리아실글리세롤(%)	1.24 %	지방산
수분(%)	39.22 %	수분
회분(%)	2.25 %	회분
당류(과당,포도당,사당,케이당,소당)(mg/g)	195.64 mg/g	당류

2021년 11월 12일
한국기농식품연구원

111021-0422-1



- 규격검사 결과
 ✓ <Table Top> / <컵커피>

페이지 1 / 총 3

제 D2021101687 호
 용어확인 Y330-Q27-4800

참고용 시험성적서

본 성적서는 식품의약품안전처 「식품-의약품관리 사항-검사 등에 관한 법률」 제 58조 제 2항에 의합니다.

제품명	Table Top(테이블상면제품)	제조일자 (유통기한)	2021-10-18
소재명	테레프탈산(PET)	장명	최은희, 조영희, 장민호
주 소	서울특별시 양구 동로로 330(양정동)		
제조번호		양수인원명	2021-10-18
시험목적	중금속	검수번호	D2021101687

귀하가 후의 연구원에 시험의뢰한 결과는 다음과 같습니다.
 시험 - 검사 번호명 : 2021-10-28
 시험 - 검사 책임자 : 장민호, 이영진, 장영준
 시험관련 총 책임자 : 장민호

시험 항목	시험 결과	시험-검사항목
중금속(Cd)	0	검사항목
중금속(Cr)	0	검사항목

※ 본 성적서는 식품의약품안전처 「식품-의약품관리 사항-검사 등에 관한 법률」 제 58조 제 2항에 의합니다.
 ※ 본 성적서는 검사 결과에 따라 유통기한, 검사 일자, 검사 일자 및 장소, 검사방법등이 달라질 수 있습니다.
 ※ 본 성적서는 검사 결과에 따라 유통기한, 검사 일자, 검사 일자 및 장소, 검사방법등이 달라질 수 있습니다.
 ※ 본 성적서는 검사 결과에 따라 유통기한, 검사 일자, 검사 일자 및 장소, 검사방법등이 달라질 수 있습니다.
 ※ 기타의 부속품 등 시험 결과에 따라 유통기한, 검사 일자, 검사 일자 및 장소, 검사방법등이 달라질 수 있습니다.

2021년 10월 28일
한국기능식품연구원

1차(한국기능식품연구원) 부속 분자기능식품연구원 http://www.kfci.or.kr 등록번호 011-9228-0400-1

페이지 1 / 총 3

제 D2021101688 호
 용어확인 Y330-Q27-4071

참고용 시험성적서

본 성적서는 식품의약품안전처 「식품-의약품관리 사항-검사 등에 관한 법률」 제 58조 제 2항에 의합니다.

제품명	커피종료(300ml당용제품)	제조일자 (유통기한)	2021-10-18
소재명	테레프탈산(PET)	장명	최은희, 조영희, 장민호
주 소	서울특별시 양구 동로로 330(양정동)		
제조번호		양수인원명	2021-10-18
시험목적	중금속	검수번호	D2021101688

귀하가 후의 연구원에 시험의뢰한 결과는 다음과 같습니다.
 시험 - 검사 번호명 : 2021-10-28
 시험 - 검사 책임자 : 장민호, 이영진, 장영준
 시험관련 총 책임자 : 장민호

시험 항목	시험 결과	시험-검사항목
중금속(Cd)	0.0001 mg/kg	검사항목
중금속(Cr)	중금속	검사항목
중금속(Cu)	0	검사항목
중금속(Mn)	0	검사항목

※ 본 성적서는 식품의약품안전처 「식품-의약품관리 사항-검사 등에 관한 법률」 제 58조 제 2항에 의합니다.
 ※ 본 성적서는 검사 결과에 따라 유통기한, 검사 일자, 검사 일자 및 장소, 검사방법등이 달라질 수 있습니다.
 ※ 본 성적서는 검사 결과에 따라 유통기한, 검사 일자, 검사 일자 및 장소, 검사방법등이 달라질 수 있습니다.
 ※ 본 성적서는 검사 결과에 따라 유통기한, 검사 일자, 검사 일자 및 장소, 검사방법등이 달라질 수 있습니다.
 ※ 기타의 부속품 등 시험 결과에 따라 유통기한, 검사 일자, 검사 일자 및 장소, 검사방법등이 달라질 수 있습니다.

2021년 10월 28일
한국기능식품연구원

1차(한국기능식품연구원) 부속 분자기능식품연구원 http://www.kfci.or.kr 등록번호 011-9228-0400-1

✓ <사과드링크> / <사이다>

페이지 1 / 총 3

제 D2021101686 호
 용어확인 Y330-Q27-5000

참고용 시험성적서

본 성적서는 식품의약품안전처 「식품-의약품관리 사항-검사 등에 관한 법률」 제 58조 제 2항에 의합니다.

제품명	테레프탈산-사과드링크(300ml당용제품)	제조일자 (유통기한)	2021-10-18
소재명	테레프탈산(PET)	장명	최은희, 조영희, 장민호
주 소	서울특별시 양구 동로로 330(양정동)		
제조번호		양수인원명	2021-10-18
시험목적	중금속	검수번호	D2021101686

귀하가 후의 연구원에 시험의뢰한 결과는 다음과 같습니다.
 시험 - 검사 번호명 : 2021-10-28
 시험 - 검사 책임자 : 장민호, 이영진, 장영준
 시험관련 총 책임자 : 장민호

시험 항목	시험 결과	시험-검사항목
중금속(Cd)	0.0007 mg/kg	검사항목
중금속(Cr)	0.0001 mg/kg	검사항목
중금속(Cu)	0	검사항목
중금속(Mn)	0	검사항목
중금속(Ni)	중금속	검사항목
중금속(Pb)	중금속	검사항목
중금속(Hg)	중금속	검사항목
중금속(V)	중금속	검사항목
중금속(Zn)	중금속	검사항목

※ 본 성적서는 식품의약품안전처 「식품-의약품관리 사항-검사 등에 관한 법률」 제 58조 제 2항에 의합니다.
 ※ 본 성적서는 검사 결과에 따라 유통기한, 검사 일자, 검사 일자 및 장소, 검사방법등이 달라질 수 있습니다.
 ※ 본 성적서는 검사 결과에 따라 유통기한, 검사 일자, 검사 일자 및 장소, 검사방법등이 달라질 수 있습니다.
 ※ 본 성적서는 검사 결과에 따라 유통기한, 검사 일자, 검사 일자 및 장소, 검사방법등이 달라질 수 있습니다.
 ※ 기타의 부속품 등 시험 결과에 따라 유통기한, 검사 일자, 검사 일자 및 장소, 검사방법등이 달라질 수 있습니다.

2021년 10월 28일
한국기능식품연구원

1차(한국기능식품연구원) 부속 분자기능식품연구원 http://www.kfci.or.kr 등록번호 011-9228-0400-1

페이지 1 / 총 3

제 D2021101685 호
 용어확인 Y330-Q27-5000

참고용 시험성적서

본 성적서는 식품의약품안전처 「식품-의약품관리 사항-검사 등에 관한 법률」 제 58조 제 2항에 의합니다.

제품명	테레프탈산-사이다(300ml당용제품)	제조일자 (유통기한)	2021-10-18
소재명	테레프탈산(PET)	장명	최은희, 조영희, 장민호
주 소	서울특별시 양구 동로로 330(양정동)		
제조번호		양수인원명	2021-10-18
시험목적	중금속	검수번호	D2021101685

귀하가 후의 연구원에 시험의뢰한 결과는 다음과 같습니다.
 시험 - 검사 번호명 : 2021-10-28
 시험 - 검사 책임자 : 장민호, 이영진, 장영준
 시험관련 총 책임자 : 장민호

시험 항목	시험 결과	시험-검사항목
중금속(Cd)	0.0001 mg/kg	검사항목
중금속(Cr)	0.0007 mg/kg	검사항목
중금속(Cu)	0.0001 mg/kg	검사항목
중금속(Mn)	0	검사항목
중금속(Ni)	0	검사항목
중금속(Pb)	중금속	검사항목
중금속(Hg)	중금속	검사항목
중금속(V)	중금속	검사항목
중금속(Zn)	중금속	검사항목

※ 본 성적서는 식품의약품안전처 「식품-의약품관리 사항-검사 등에 관한 법률」 제 58조 제 2항에 의합니다.
 ※ 본 성적서는 검사 결과에 따라 유통기한, 검사 일자, 검사 일자 및 장소, 검사방법등이 달라질 수 있습니다.
 ※ 본 성적서는 검사 결과에 따라 유통기한, 검사 일자, 검사 일자 및 장소, 검사방법등이 달라질 수 있습니다.
 ※ 본 성적서는 검사 결과에 따라 유통기한, 검사 일자, 검사 일자 및 장소, 검사방법등이 달라질 수 있습니다.
 ※ 기타의 부속품 등 시험 결과에 따라 유통기한, 검사 일자, 검사 일자 및 장소, 검사방법등이 달라질 수 있습니다.

2021년 10월 28일
한국기능식품연구원

1차(한국기능식품연구원) 부속 분자기능식품연구원 http://www.kfci.or.kr 등록번호 011-9228-0400-1

4. Reb-D 합성 효소 발현 및 생전환 조건 확보

4.1. 효소반응액 제조 및 Lab 규모 고순도 제품 제조 순도 80% 이상 확보

- STV → RebA 전환효소 (UGT76), RebA → RebD 전환효소(UGT24), UDP recycle 효소 (RSS)
- 3종 효소, 원료 농도 비율별 복합 반응 진행하여 **RebDM 전환율 90% 이상 전환 조건 확보**
- 원료 농도 비율 STV : UDP : Sucrose = 1 : 2 : 20 조건에서 최대 전환율 확인
- 3종 효소 농도 비율 RSS (2~4): UGT76 (8): UGT24 (5) 조건에서 최대 전환율 확인
- 최적 조건에서 Lab 시제품 제조를 위한 효소반응액 10L 제조

4.1.1. 복합 반응 원료 (STV, UDP, Sucrose) 비율 최적화

- 복합반응에 필요한 원료 (STV, UDP, Sucrose) 에 대한 비율 최적화
- UGT24 효소 사용, **STV 원료 0.5% STV 고정, UDP, Sucrose 비율 조정**하여 실험 설계

STV : UDP : SUC 비율 (몰 농도 기준)				
1 : 3 : 10	1 : 3 : 8	1 : 3 : 6	1 : 3 : 4	1 : 3 : 2
1 : 2 : 10	1 : 2 : 8	1 : 2 : 6	1 : 2 : 4	1 : 2 : 2
1 : 1 : 10	1 : 1 : 8	1 : 1 : 6	1 : 1 : 4	1 : 1 : 2

[원료 비율별 RebD+M 생성량 (%), 24 시간 반응]

STV : UDP : SUC	1:3:10	1:3:8	1:3:6	1:3:4	1:3:2
RebD+M 함량 (%)	78.6	66.9	62.8	45.7	24.2
STV : UDP : SUC	1:2:10	1:2:8	1:2:6	1:2:4	1:2:2
RebD+M 함량 (%)	79.2	66.9	63.9	46.7	28.2
STV : UDP : SUC	1:1:10	1:1:8	1:1:6	1:1:4	1:1:2
RebD+M 함량 (%)	66.2	62.3	54.6	46.9	26.1

- STV : UDP 최적 비율은 1:2 로 확인, Sucrose 농도는 증가할수록 반응 속도 빠름
STV : UDP : SUC 최적 비율은 1 : 2 : 10↑ 으로 확인됨

4.1.2. 설탕과량 조건, 복합반응 평가

- 기존 실험 결과, 설탕 사용량 증가할수록 RebD/M 생성량 증가함을 확인함
- 농도 0.5~3% 조건에서 **STV : SUC 비율을 1:20 으로 증가시켜, 복합반응 최대 전환율을 확인**

STV 농도 (%)	Sucrose 농도(%)	STV : Sucrose 비율
0.5	10	1:20
1	20	1:20
2	40	1:20
3	60	1:20

[설탕 과량 조건에서 원료 농도별 RebD+M 생성량(%), 24 시간반응]

원료 투입량		반응 후 생성물						비고
STV 농도 (%)	SUC 농도 (%)	Unknown (4.0min)	RebD	RebM	RebI	RebA	STV	
0.5	5	0.0	50.1	18.8	0.8	30.2	0.0	대조군 STV : UDP : SUC = 1 : 2 : 10
0.5	10	0.0	32.0	33.4	4.7	29.9	0.0	
1	20	0.0	24.2	16.9	3.7	55.2	0.0	실험군 STV : UDP : SUC = 1 : 2 : 20
2	40	0.0	17.0	4.5	0.9	77.6	0.0	
3	60	6.1	6.1	0.0	0.0	37.8	50.0	

[설탕 과량 조건에서 원료 농도별 RebD+M 생성량 (%), 68 시간반응]

원료 투입량		반응 후 생성물					
STV 농도 (%)	설탕농도(%)	Unknown (4.0min)	RebD	RebM	RebI	RebA	STV
0.5	10	0.0	3.5	91.0	5.5	0.0	0.0
1	20	0.0	23.7	70.1	5.5	0.7	0.0
2	40	0.0	42.6	19.8	2.3	35.3	0.0
3	60	13.3	20.5	0.0	0.0	40.6	25.6

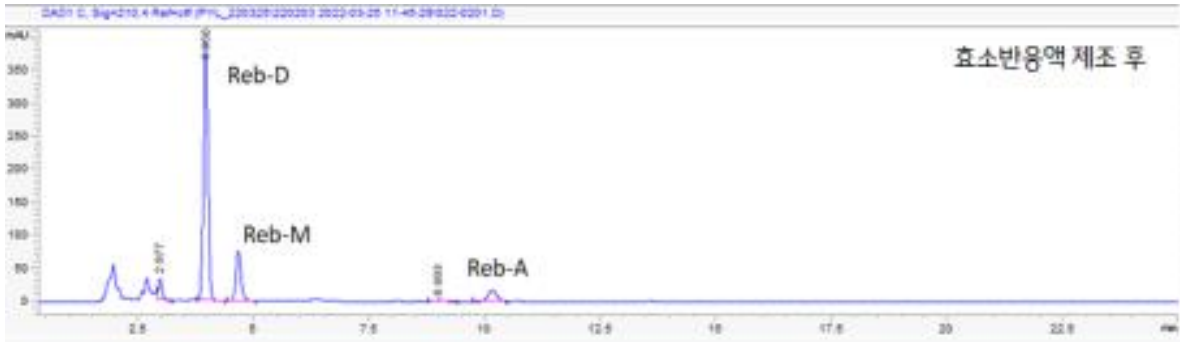
- STV 농도 0.5% 조건에서 대조군, 실험군 비교 결과 RebD+M 함량은 유사하나, **설탕 과량 조건에서 RebD → RebM 전환 속도 빠른 것을 확인** 설탕 40% 이상 조건에서는 반응액 흐름성 문제로 효소반응 inhibition
- 원료 비율 최적화를 통해, **STV 0.5%, STV : Sucrose=1:20 조건에서 RebM 생성량 약 90% 확보**

[기질농도 0.5%_3종 효소 농도 비율별 복합반응 RebDM 전환율 (%)]

STV 0.5%	RT	3.014	3.954	4.666	8.904	10.03	10.587	Reb DM (%)
RSS : UGT76 : UGT24	No.	Unknown	Reb D	Reb M	Reb I	Reb A	STV	
4 : 4 : 10	1	32.2	22.5	44.7	0.7	0.0	0.0	67.2
2 : 4 : 10	2	37.5	19.6	42.3	0.5	0.0	0.0	61.9
1 : 4 : 10	3	35.3	17.9	46.2	0.6	0.0	0.0	64.1
0.5 : 4 : 10	4	35.0	17.4	47.0	0.6	0.0	0.0	64.5
4 : 8 : 5	5	13.7	9.0	74.5	2.8	0.0	0.0	83.5
2 : 8 : 5	6	15.8	9.7	71.8	2.6	0.0	0.0	81.5
1 : 8 : 5	7	15.8	9.1	72.4	2.6	0.0	0.0	81.5
0.5 : 8 : 5	8	14.0	11.9	71.6	2.4	0.0	0.0	83.5

[기질농도 1%_3종 효소 농도 비율별 복합반응 RebDM 전환율 (%)]

STV 1%	RT	3.014	3.954	4.666	8.904	10.03	10.587	Reb DM (%)
RSS : UGT76 : UGT24	No.	Unknown	Reb D	Reb M	Reb I	Reb A	STV	
4 : 4 : 10	9	21.7	54.0	23.3	0.5	0.5	0.0	77.4
2 : 4 : 10	10	18.8	57.9	22.3	0.5	0.5	0.0	80.2
1 : 4 : 10	11	20.2	56.9	22.0	0.5	0.5	0.0	78.8
0.5 : 4 : 10	12	18.9	59.0	21.2	0.4	0.5	0.0	80.2
4 : 8 : 5	13	10.7	65.2	22.5	0.9	0.7	0.0	87.7
2 : 8 : 5	14	7.2	52.4	37.3	2.0	1.1	0.0	89.7
1 : 8 : 5	15	8.2	52.2	36.8	1.9	0.9	0.0	89.0
0.5 : 8 : 5	16	7.6	54.4	35.0	1.9	1.1	0.0	89.4



IV. 제 2협동 연구기관 (이화여자대학교)

[1차년도]

1. in vitro 단맛수용체 활성 측정 system의 구축 및 신규감미소재 스테비오사이드 당전이체의 맛수용체 활성 분석

1.1. 신규감미소재 당전이체를 이용한 in vitro 항당뇨 및 항염증 효과 스크리닝

1.1.1. 실험방법

○ in vitro 단맛수용체 활성측정 system을 이용한 스테비오사이드 당전이체의 단맛수용체 활성 분석

▪ in vitro human 단맛수용체 활성 측정 시스템 구축

- Stable cell line selection 및 확인

- ✓ HEK293 cell에 entry vector와 hTAS1R3 gene을 48시간 동안 transfection시킨 뒤, pCMV6-Entry vector의 selection marker인 G-418을 cytotoxicity를 보이는 1 mg/ml 농도로 3개월간 selection함. 이를 통해 항생제에 저항성을 가지는 hTAS1R3 gene을 발현하는 single cell colony를 선별하고, 단계적으로 배양하여 stable cell line을 구축함. Stable expression을 확인하기 위하여 cell membrane fraction 방법을 이용하여 G418 1 mg/ml으로 selection한 TAS1R3 stable cell에서 hTAS1R3의 단백질 발현을 western blot으로 확인함. loading control로는 α -tubulin이 사용됨.

- in vitro human 단맛수용체 구축 및 활성 평가

- ✓ TAS1R3 stable cell에 GFP tag를 가진 hTAS1R2 gene을 48시간 동안 transfection시켰을 때, TAS1R3 stable cell 내에서 TAS1R2-GFP tag gene이 transient co-transfection된 것을 형광현미경으로 확인함. TAS1R3 stable cell에 TAS1R2와 G α 15를 transient transfection시켜 단맛수용체를 동시에 발현시킨 후, Fura-2 QBT Calcium kit를 이용하여 단맛수용체로서 활성을 평가함. 감미 물질로는 TAS1R2와 TAS1R3를 모두 ligand로 가지는 sucrose를 이용함.

- 스테비오사이드 당전이체의 in vitro human 단맛수용체 활성 측정

- ✓ TAS1R3 stable cell에 TAS1R2와 G α 15를 transient transfection시켜 단맛수용체를 동시에 발현시킨 후, rebaudioside A, rebaudioside M, G-stevia를 처리하여 calcium mobilization assay를 수행함. 단맛수용체의 단맛 감지 기능을 수행하기 위해 rebaudioside A, rebaudioside M, G-stevia의 용해도를 높이는 최적의 조건을 찾기 위해 5%, 7%, 10% 에탄올을 용매로 사용하여 확인함.

- 스테비오사이드 당전이체 농도에 따른 단맛수용체 활성 변화 측정

- ✓ TAS1R3 stable cell에 TAS1R2와 G α 15를 transient transfection시켜 단맛수용체를 동시에 발현시킨 후, rebaudioside A, rebaudioside M, G-stevia를 여러 농도로 처리하여 calcium mobilization을 수행함. 이를 통해 rebaudioside A, rebaudioside M, G-stevia의 농도에 따라 단맛수용체가 dose-dependent하게 활성을 보이는 농도를 확인하고, rebaudioside A, rebaudioside M, G-stevia 각각의 maximum intensity를 나타내는 농도의 50%농도인 EC50 값을 계산함.

- 스테비오사이드 및 Neohesperidin dihydrochalcone (NHDC) 당전이체를 이용한 in vitro 지방세포 분화 억제 및 항염증 효과 screening
 - in vitro 실험을 통한 지방세포 억제효과와 분자적 기전 규명
 - 지방세포의 분화 유도 및 morphology 관찰을 통한 lipid accumulation 정도 측정
 - ✓ 분화 inducer (insulin, dexamethasone, 3-isobutyl-1-methylxanthine)를 통해 총 8일간 분화와 동시에 rebaudioside A (5, 10, 20 uM), rebaudioside M (3, 10, 30 uM), G-stevia (3, 10, 30 uM), NHDC (30, 50, 100 uM) 및 G-NHDC (30, 50, 100 uM)를 처리함. Low glucose group에는 지방세포 성장에 필요한 5 mM의 glucose가 포함되어 있으며, high glucose group에는 glucose 20 mM을 추가하였음. 8일간의 분화를 마친 adipocyte에 oil red o staining을 실시하여 지방구만 염색되게 함. 염색된 plate를 microscopic analysis를 통해 측정된 지방세포의 크기와 개수를 비교함. 또한 염색된 plate의 oil red dye를 녹여 지방이 분화된 정도를 흡광도를 측정하여 물질 처리 유무에 따라 lipid accumulation 정도를 비교함.
 - Cell viability 측정
 - ✓ Preadipocyte 상태의 3T3-L1 cell에 rebaudioside A (5, 10, 20 uM), rebaudioside M (3, 10, 30 uM), G-stevia (3, 10, 30 uM), NHDC (30, 50, 100 uM) 및 G-NHDC (30, 50, 100 uM)를 24시간 동안 처리하여 MTT assay를 이용하여 cell viability에 미치는 시료 독성을 평가함. Low glucose group에는 세포성장에 필요한 5 mM의 glucose가 포함되어 있으며, high glucose group에는 glucose 20 mM을 추가함.
 - 지방세포 분화와 관련 있는 유전자 마커를 PCR을 통해 측정
 - ✓ 총 8일간의 분화기간 동안 rebaudioside A (5, 10, 20 uM), rebaudioside M (3, 10, 30 uM), G-stevia (3, 10, 30 uM), NHDC (30, 50, 100 uM) 및 G-NHDC (30, 50, 100 uM)를 처리함. 8일간의 분화를 마친 adipocyte의 RNA를 extraction하여 3T3-L1 cell의 분화에 관여하는 PPAR γ , SREBP-1C marker들을 PCR을 통해 mRNA level에서 분화 유전자 marker의 발현 정도를 측정함.
 - in vitro 실험을 통한 항염증 효과와 분자적 기전 규명
 - MTT를 이용한 cell viability 측정 및 비교
 - ✓ 대식세포 (RAW 264.7)에서 rebaudioside A, rebaudioside M, G-stevia, NHDC, G-NHDC를 3, 10 uM dose로 treat하였고, high glucose group에는 glucose 20 mM을 treat함. Control group 이외의 모든 group에는 LPS 500 ng/ml를 treat하였음. Treat 24시간 후에 culture media와 섞은 MTT 용액을 200 uL씩 넣어주고, 3시간 후 DMSO 100 uL을 넣어줌. 5분 뒤 560 nm의 흡광도로 값을 읽어줌.
 - 대식세포 (RAW 264.7) 염증 유도 후, NO production 측정 및 비교
 - ✓ NO production 측정은 RAW 264.7 murine macrophage cell에서 macrophage의 중요 기능 중 하나인 phagocytosis와 관련된 활성측정의 한 방법임. RAW 264.7 cell에 rebaudioside A, rebaudioside M, G-stevia, NHDC, G-NHDC를 3, 10 uM treat 하였고, high glucose group에는 glucose 20 mM을 treat함. Control group 이외의 모든 group에는 LPS 500 ng/ml를 treat하였음. Treat 24시간 후에 각 group의 media를 100 uL씩 뽑아내어 Griess reagent를 100 uL씩 넣어준 다음 5분 뒤 560 nm의 흡광도로 값을 읽어줌.
 - RT-PCR을 이용하여 대식세포 (RAW 264.7)에서 pro-inflammatory cytokine의 발현 측정 및 비교
 - ✓ RAW 264.7 cell에 rebaudioside A, rebaudioside M, G-stevia, NHDC, G-NHDC 를 3, 10 uM treat 하였고, high glucose group에는 glucose 20 mM을 treat함. Control group 이외의 모든 group에는 LPS 500 ng/ml를 treat 하였음. Treat 24시간 후에 RNA isolation을 통해 RNA

sample을 얻음. 얻은 RNA sample에서의 pro-inflammatory cytokine인 IL-1 β , IL-6의 발현을 RT-PCR을 통해 측정함. Loading control로는 GAPDH가 사용됨.

- Western blot을 이용하여 대식세포 (RAW 264.7)에서 pro-inflammatory mediator의 발현 측정 및 비교

- ✓ RAW 264.7 cell에 rebaudioside A, rebaudioside M, G-stevia, NHDC, G-NHDC를 3, 10uM treat 하였고, high glucose group에는 glucose 20 mM을 treat함. Control group 이외의 모든 group에는 LPS 500 ng/ml를 treat 하였음. Treat 24시간 후에 protein isolation을 통해 protein sample을 얻음. 얻은 protein sample에서의 pro-inflammatory mediator인 COX2의 발현을 western blot을 통해 측정함. Loading control로는 β -actin이 사용됨.

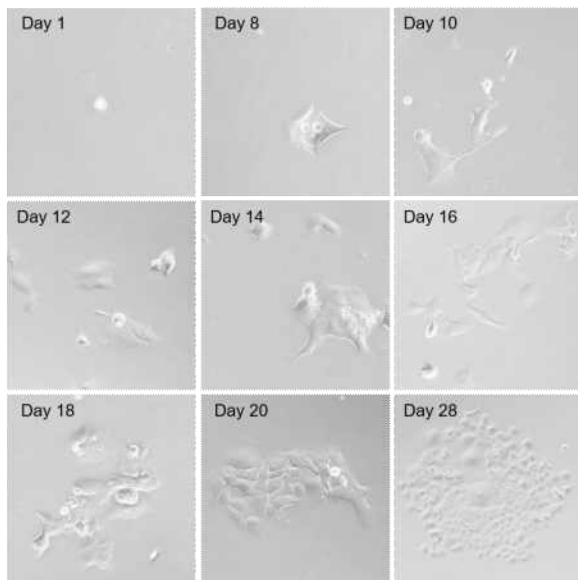
1.1.2. 실험결과

○ in vitro human 단맛수용체 활성 측정 시스템 구축

▪ Stable cell line selection 및 확인

- G-418을 1 mg/ml 농도로 한 달간 selection하여 G-418 resistant single cell colony를 선별하고 (Figure IV-1A), 단계적으로 배양하여 얻은 TAS1R3 stable cell에서 hTAS1R3의 단백질 발현을 western blot으로 확인함 (Fig IV-1B)

A



B

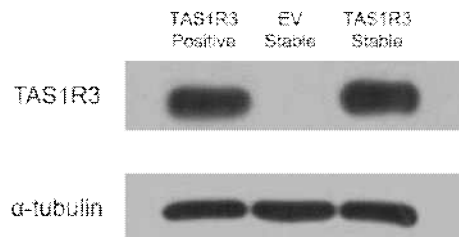


Figure IV-1. Confirmation TAS1R3 stable cell. A.G-418 resistant cell colony were selected for a month. B. The protein expression of hTAS1R3 in TAS1R3 stable cell line (selected by 1 mg/ml G-418) was analyzed by western blot.

▪ in vitro human 단맛수용체 구축 및 활성 평가

- in vitro human 단맛수용체 구축 확인

- ✓ TAS1R3 stable cell에 GFP tag를 가진 hTAS1R2 gene을 48시간 동안 transient transfection시켜 hTAS1R2와 hTAS1R3의 heterodimer를 유도하여 TAS1R3 stable cell에서의 hTAS1R2의 발현을 형광현미경을 통해서 확인함 (Figure IV-2).

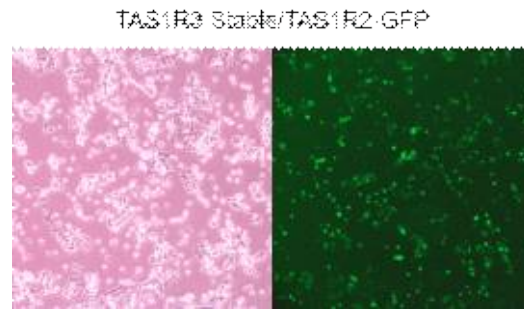


Figure IV-2. Fluorescence image of GFP-tagged hTAS1R2 expressed in the hTAS1R3 stable cells. TAS1R3 stably transfected cells were transiently co-transfected with hTAS1R2 gene fused with GFP for 48h.

- in vitro human 단맛수용체 활성 확인

- ✓ TAS1R3 stable cell에 TAS1R2와 Gα15를 transient transfection시켜 단맛수용체를 동시에 발현시킨 후, TAS1R2와 TAS1R3의 ligand로 알려진 sucrose를 처리하여 단맛수용체로서 감미 물질에 의한 단맛 감지 기능 수행을 확인함.
- ✓ 20 mM sucrose 감미 물질 처리로 변화하는 calcium flix에 따른 Ca²⁺-bound dye 340 nm 파장이 증가 및 Ca²⁺-unbound dye 380 nm 파장이 감소로 생겨나는 피크를 확인함 (Figure IV-3A).
- ✓ 감미 물질을 용해하기에 사용한 assay buffer인 HBSS+20 mM HEPES 용매를 처리하였을 때, 340 nm과 380 nm 두 파장의 변화가 없음을 확인함 (Figure IV-3A).

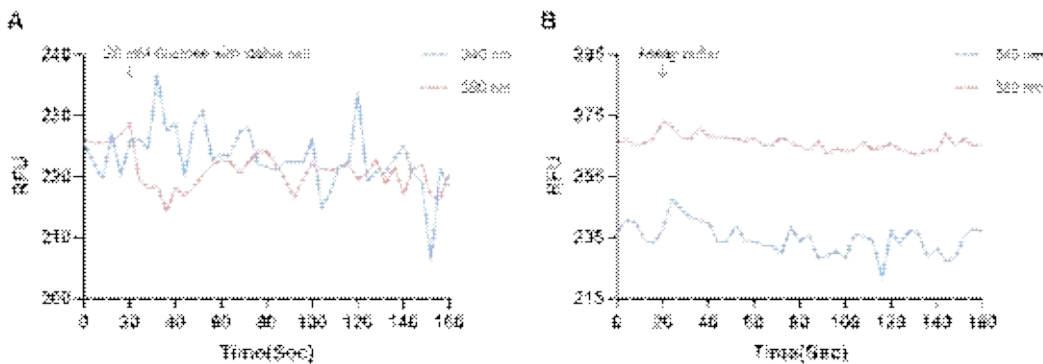


Figure IV-3. Ca²⁺ signal analysis using hTAS1R2/hTAS1R3/Gα15-expressed cells upon the addition of 20 mM of sucrose.

Ca²⁺-bound Fura-2 is excited at 340 nm, and the unbound form at 380 nm.

A. Changes in intracellular calcium concentration analysis using sweet taste receptor subunits expressed cells upon addition of 20 mM sucrose. B. Changes in intracellular calcium concentration analysis using sweet taste receptor subunits expressed cells upon the addition of assay buffer (HBSS+20 mM HEPES).

- in vitro human 단맛수용체 활성 평가 (stable vs. transient transfected 단맛수용체 비교)

- ✓ TAS1R3 stable cell에 TAS1R2와 Gα15를 transient transfection시켜 단맛수용체를 동시에 발현시킨 단맛수용체 stable condition과 HEK293 cell에 TAS1R2와 TAS1R3, Gα15를 transient transfection시켜 단맛수용체를 동시에 발현시킨 단맛수용체 transient condition 각각에 20 mM sucrose 감미 물질로 변화하는 fluorescence ratio (340/380 nm ratio)를 확인함.
- ✓ TAS1R3 stable cell을 이용하여 구축한 단맛수용체 stable condition에서만 20 mM sucrose 감미 물질 처리하는 즉시 증가하는 fluorescence ratio (340/380 nm ratio)를 확인하고, TAS1R3 stable cell없이 구축한 단맛수용체 transient condition에서는 20 mM sucrose 감미 물질을 처리하여 fluorescence ratio (340/380 nm ratio)에 변화가 없음을 확인함 (Figure IV-4A).

- ✓ 단맛수용체 stable condition가 단맛수용체 transient condition보다 더 sensitive한 활성으로 더 적은 농도에서의 단맛 감기 기능으로 약 2배 낮은 EC50 값을 가짐 (Figure IV-4B).

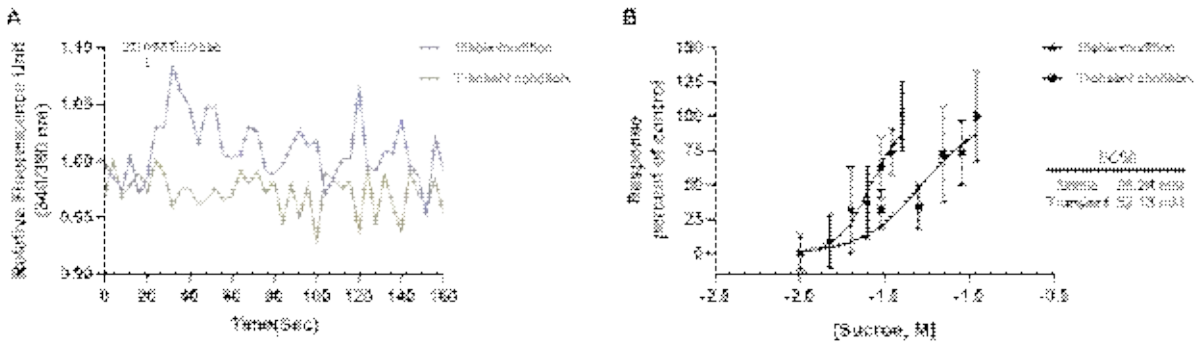


Figure IV-4. Comparison of response from the sweet taste receptor stable and transient conditions to sucrose.

A. Changes in fluorescence ratio (ratio of the fluorescence at 340 nm and 380 nm) analysis using sweet taste receptor stable condition and transient condition upon addition of 20 mM sucrose. B. Dose-dependent responses of sucrose concentrations in sweet taste receptor stable condition and transient condition.

▪ 스테비오사이드 당전이체의 in vitro human 단맛수용체 활성 측정

- in vitro human 단맛수용체 활성 측정 조건 확인

- ✓ rebaudioside A, rebaudioside M, G-stevia를 용해하기에 적절한 용매를 찾기 위해 5%, 7%, 10% 에탄올을 처리로 변화하는 calcium flix에 따른 340 nm와 380 nm 파장의 변화를 확인 및 비교함.
- ✓ 5% 에탄올 용매 처리 시, assay buffer인 HBSS+20 mM HEPES 용매를 처리하였을 때와 동일하게 fluorescence ratio (340/380 nm ratio) 변화가 없음을 확인함.

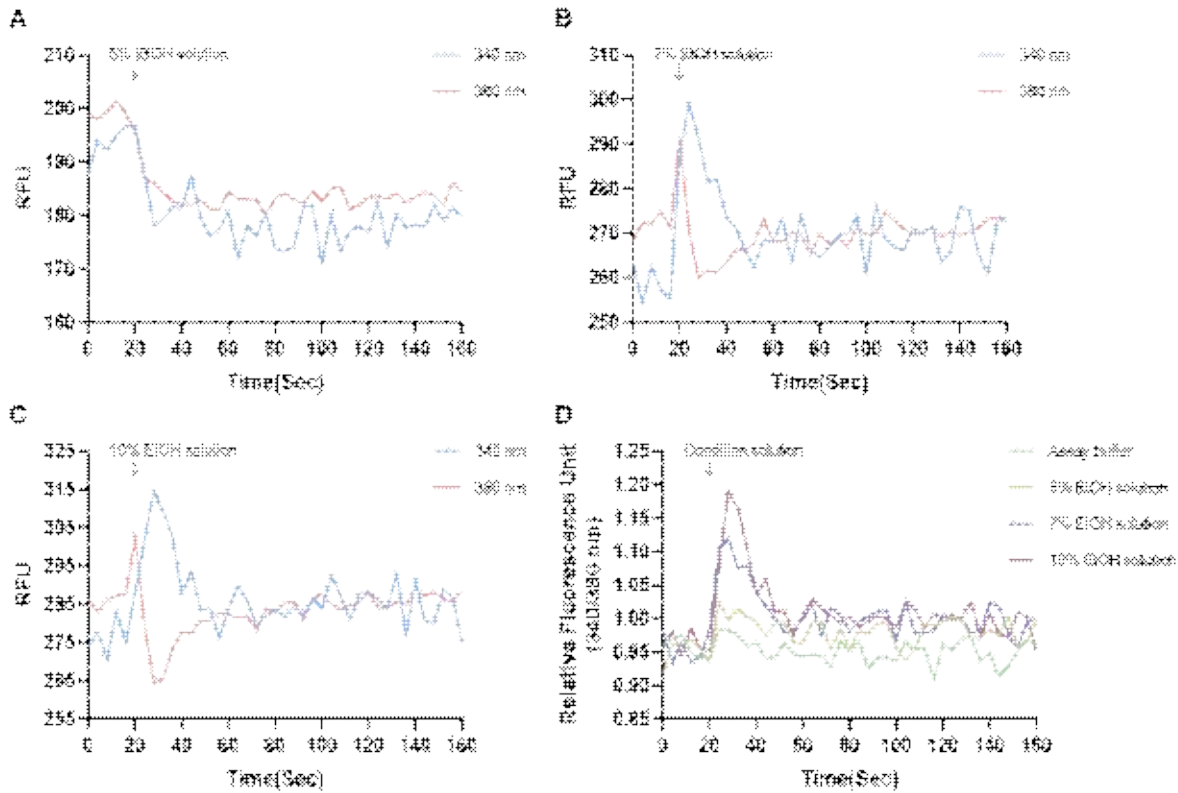


Figure IV-5. Analysis of calcium mobilization in different assay solutions.

Changes in intracellular calcium concentration analysis using sweet taste receptor subunits expressed cells upon addition of 5% ethanol (A), 7% ethanol (B), and 10% ethanol (C). D. Changes in fluorescence ratio (ratio of the fluorescence at 340 nm and 380 nm) analysis using sweet taste receptor subunits expressed cell upon various solutions.

- Rebaudioside A의 in vitro human 단맛수용체 활성 측정

- ✓ 5% 에탄올용매에 용해한 200 uM rebaudioside A 감미 물질 처리로 변화하는 calcium flux에 따른 Ca^{2+} -bound dye 340 nm 파장이 증가 및 Ca^{2+} -unbound dye 380 nm 파장이 감소로 생겨나는 피크를 확인함 (Figure IV-6A).
- ✓ Assay buffer인 HBSS+20 mM HEPES 용매에 용해한 200 uM rebaudioside A 감미 물질 처리로 변화하는 calcium flux에 따른 Ca^{2+} -bound dye 340 nm 파장 및 Ca^{2+} -unbound dye 380 nm 파장의 변화가 없음을 확인함 (Figure IV-6B).
- ✓ 5% 에탄올용매에 용해한 200 uM rebaudioside A 감미 물질을 처리하는 즉시 증가하는 fluorescence ratio (340/380 nm ratio)를 확인하고, assay buffer인 HBSS+20 mM HEPES 용매에 용해한 200 uM rebaudioside A 감미 물질을 처리하여 fluorescence ratio (340/380 nm ratio)에 변화가 없음을 비교함 (Figure IV-6C).

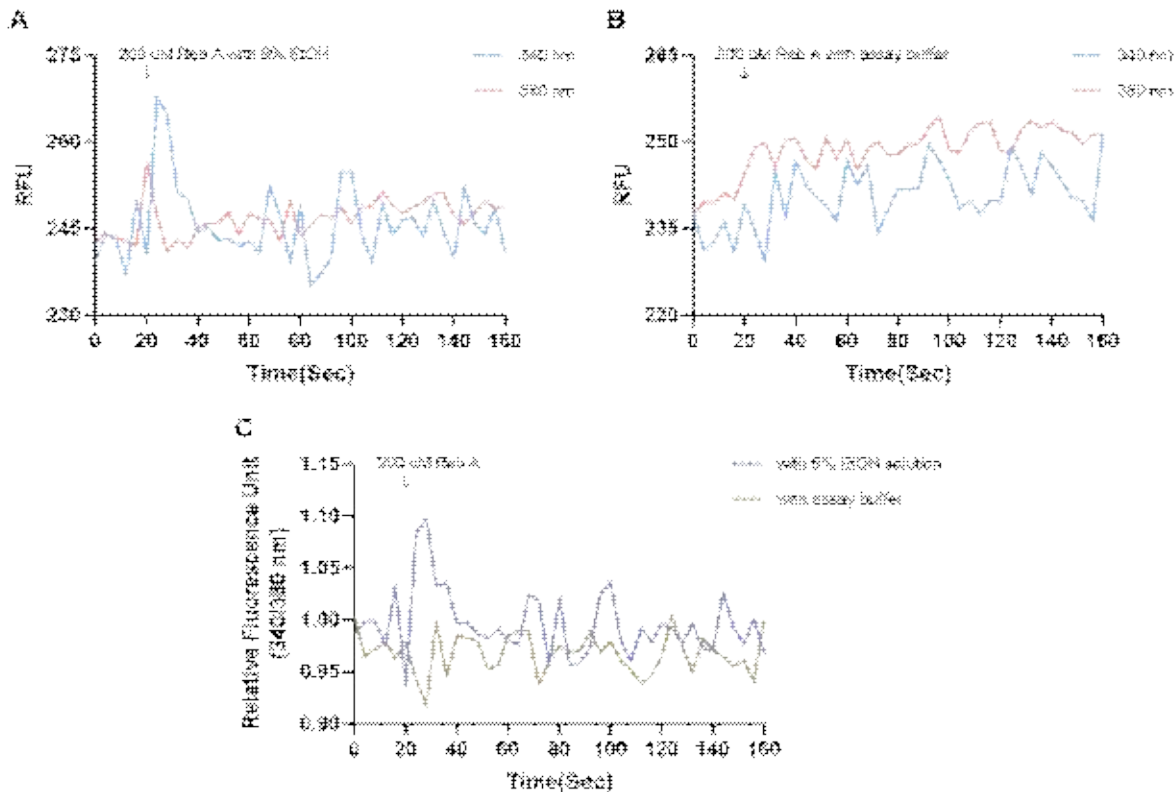


Figure IV-6. Ca^{2+} signal analysis upon the addition of 200 μM of rebaudioside A.

A. Changes in intracellular calcium concentration analysis using sweet taste receptor subunits expressed cells upon addition of 200 μM rebaudioside A with 5% ethanol solution. B. Changes in intracellular calcium concentration analysis using sweet taste receptor subunits expressed cells upon addition of 200 μM rebaudioside A with assay buffer (HBSS+20 mM HEPES). C. Changes in fluorescence ratio (ratio of the fluorescence at 340 nm and 380 nm) analysis using sweet taste receptor subunits expressed cell upon addition of 200 μM rebaudioside A with 5% ethanol or assay buffer. Reb A, rebaudioside A.

- Rebaudioside M의 in vitro human 단맛수용체 활성 측정

- ✓ 5% 에탄올용매에 용해한 200 μM rebaudioside M 감미 물질 처리로 변화하는 calcium flux에 따른 Ca^{2+} -bound dye 340 nm 파장이 증가 및 Ca^{2+} -unbound dye 380 nm 파장이 감소로 생겨나는 피크를 확인함 (Figure IV-7A).
- ✓ Assay buffer인 HBSS+20 mM HEPES용매에 용해한 200 μM rebaudioside M 감미 물질 처리로 변화하는 calcium flux에 따른 Ca^{2+} -bound dye 340 nm 파장 및 Ca^{2+} -unbound dye 380 nm 파장의 변화가 없음을 확인함 (Figure IV-7B).
- ✓ 5% 에탄올용매에 용해한 200 μM rebaudioside M 감미 물질을 처리하는 즉시 증가하는 fluorescence ratio (340/380 nm ratio)를 확인하고, assay buffer인 HBSS+20 mM HEPES용매에 용해한 200 μM rebaudioside M 감미 물질을 처리하여 fluorescence ratio (340/380 nm ratio)에 변화가 없음을 비교함 (Figure IV-7C).

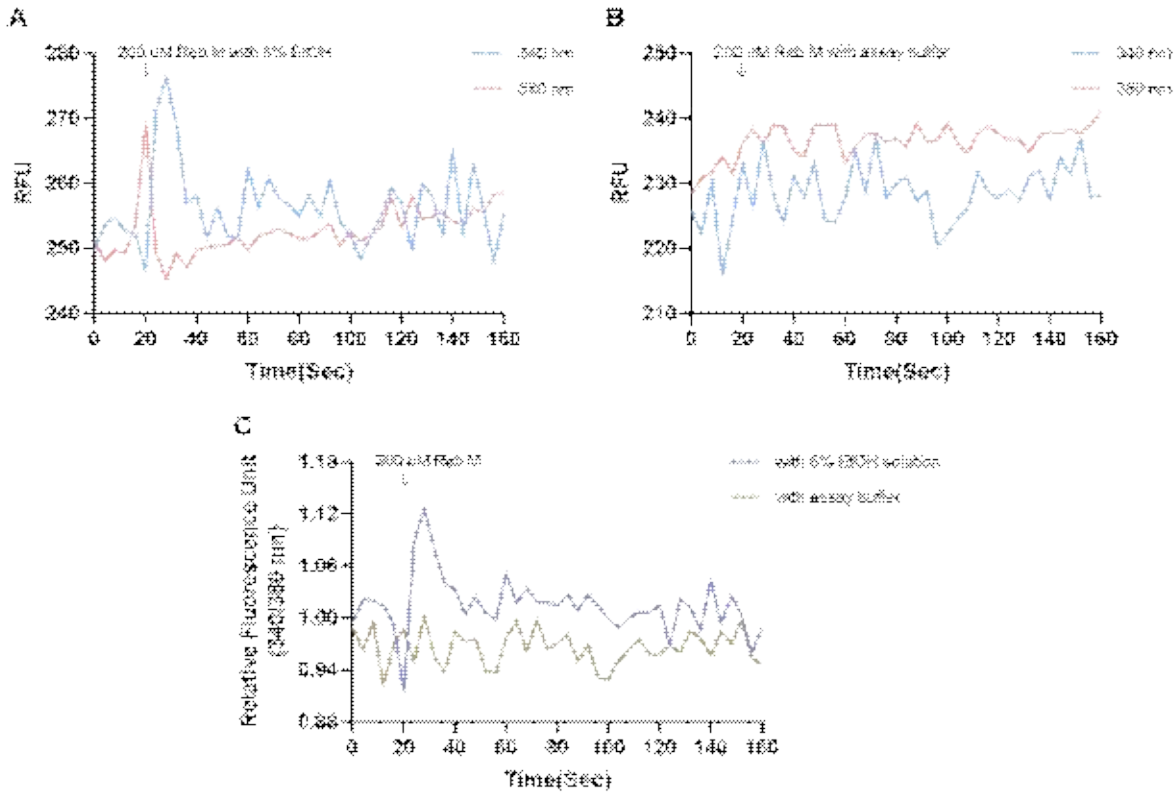


Figure IV-7. Ca²⁺ signal analysis upon the addition of 200 uM of rebaudioside M.

A. Changes in intracellular calcium concentration analysis using sweet taste receptor subunits expressed cells upon addition of 200 uM rebaudioside M with 5% ethanol solution. B. Changes in intracellular calcium concentration analysis using sweet taste receptor subunits expressed cells upon addition of 200 uM rebaudioside M with assay buffer (HBSS+20 mM HEPES). C. Changes in fluorescence ratio (ratio of the fluorescence at 340 nm and 380 nm) analysis using sweet taste receptor subunits expressed cell upon addition of 200 uM rebaudioside M with 5% ethanol or assay buffer. Reb M, rebaudioside M.

- G-stevia의 in vitro human 단맛수용체 활성화 측정

- ✓ 5% 에탄올 용매에 용해한 200 uM G-stevia 감미 물질 처리로 변화하는 calcium flux에 따른 Ca²⁺-bound dye 340 nm파장이 증가 및 Ca²⁺-unbound dye 380 nm파장이 감소로 생겨나는 피크를 확인함 (Figure IV-8A).
- ✓ Assay buffer인 HBSS+20 mM HEPES 용매에 용해한 200 uM G-stevia 감미 물질 처리로 변화하는 calcium flux에 따른 Ca²⁺-bound dye 340 nm파장 및 Ca²⁺-unbound dye 380 nm파장의 변화가 없음을 확인함 (Figure IV-8B).
- ✓ 5% 에탄올 용매에 용해한 200 uM G-stevia 감미 물질을 처리하는 즉시 증가하는 fluorescence ratio (340/380 nm ratio)를 확인하고, assay buffer인 HBSS+20 mM HEPES용매에 용해한 200 uM G-stevia 감미 물질을 처리하여 fluorescence ratio (340/380 nm ratio)에 변화가 없음을 비교함 (Figure IV-8C).

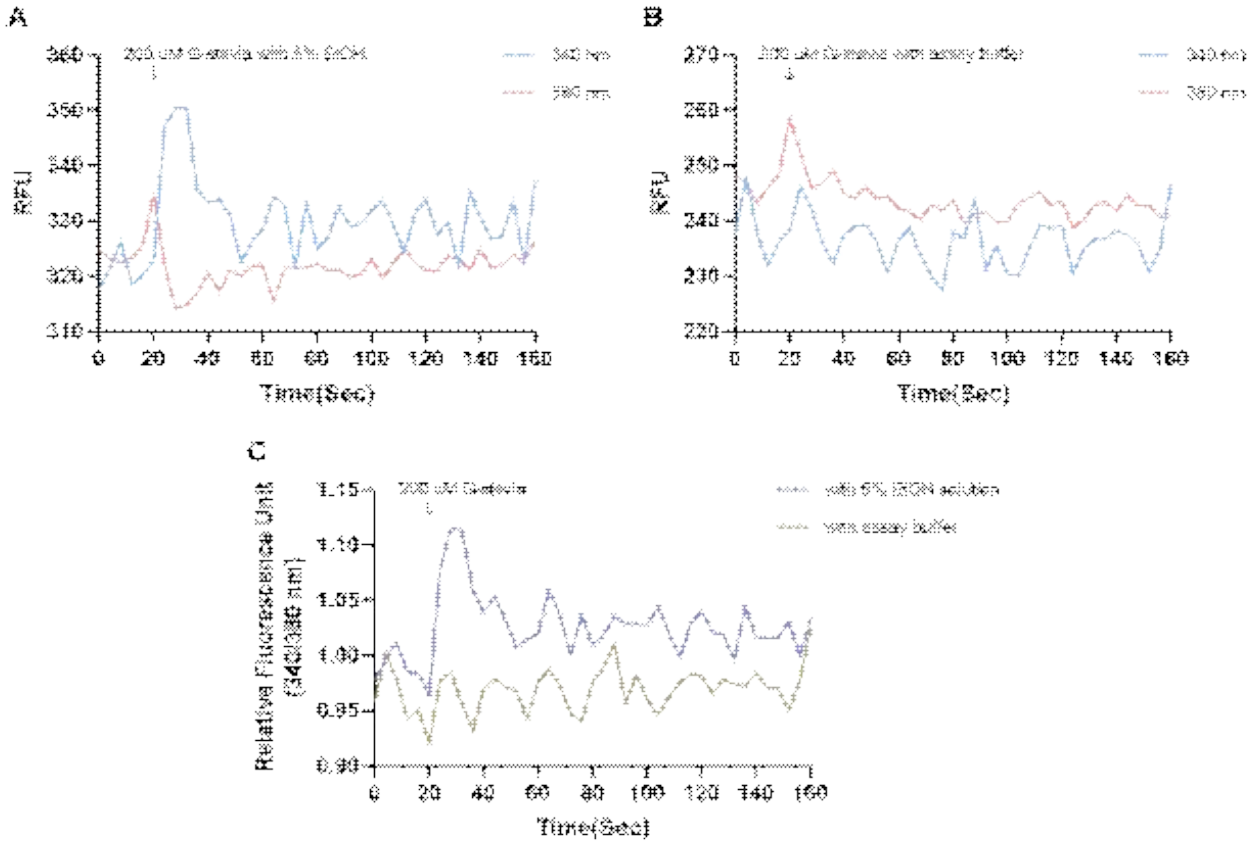


Figure IV-8. Ca²⁺ signal analysis upon the addition of 200 uM of G-stevia. A. Changes in intracellular calcium concentration analysis using sweet taste receptor subunits expressed cells upon addition of 200 uM G-stevia with 5% ethanol solution. B. Changes in intracellular calcium concentration analysis using sweet taste receptor subunits expressed cells upon addition of 200 uM G-stevia with assay buffer (HBSS+20 mM HEPES). C. Changes in fluorescence ratio (ratio of the fluorescence at 340 nm and 380 nm) analysis using sweet taste receptor subunits expressed cell upon addition of 200 uM G-stevia with 5% ethanol or assay buffer.

- 스테비오사이드 당전이체 농도에 따른 단맛수용체 활성 변화 측정
 - Rebaudioside A의 농도에 따른 단맛수용체 활성 변화 측정
 - ✓ 1, 10, 25, 50, 75, 100, 150, 300 uM의 여러 농도로 rebaudioside A를 처리하여 rebaudioside A 감미 물질의 농도에 따라 단맛수용체가 dose-dependent하게 활성을 보임을 확인하고, rebaudioside A의 maximum intensity를 나타내는 농도의 50%농도인 19.43 uM의 EC50 값을 계산함 (Figure IV-9).

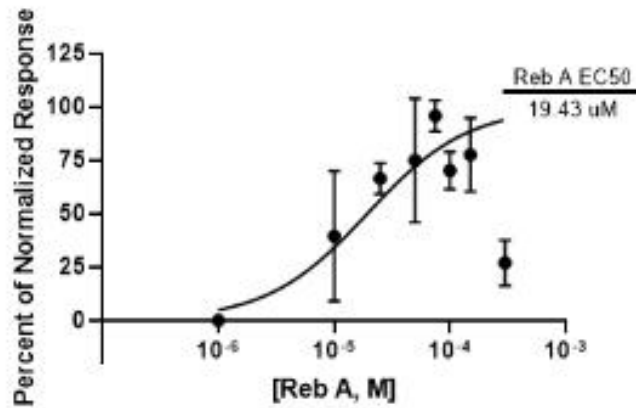


Figure IV-9. Dose-dependent response of rebaudioside A concentrations.

The normalized sensor sensitivity was increased as the concentrations of rebaudioside A increased, The activity was saturated at a high concentration dose of 300 uM. Reb A, rebaudioside A.

- Rebaudioside M의 농도에 따른 단맛수용체 활성 변화 측정

- ✓ 1, 10, 25, 50, 75, 100, 150, 300 uM의 여러 농도로 rebaudioside M를 처리하여 rebaudioside M 감미 물질의 농도에 따라 단맛수용체가 dose-dependent하게 활성을 보임을 확인하고, rebaudioside M의 maximum intensity를 나타내는 농도의 50%농도인 29.54 uM의 EC50 값을 계산함 (Figure IV-10).

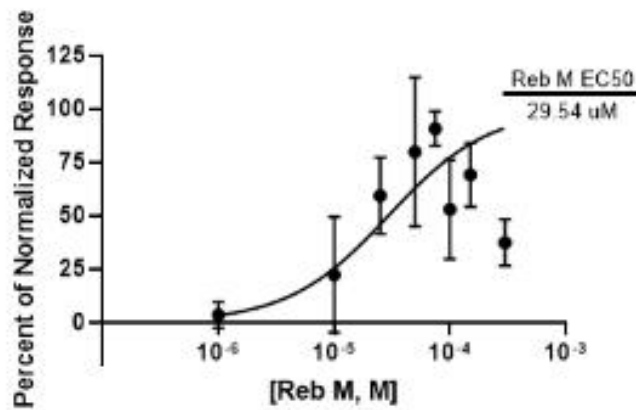


Figure IV-10. Dose-dependent response of rebaudioside M concentrations.

The normalized sensor sensitivity was increased as the concentrations of rebaudioside M increased, The activity was saturated at a high concentration dose of 300 uM. Reb M, rebaudioside M.

- 스테비오사이드 당전이체 G-stevia의 농도에 따른 단맛수용체 활성 변화 측정

- ✓ 1, 10, 25, 50, 75, 100, 150, 300 uM의 여러 농도로 G-stevia를 처리하여 G-stevia 감미 물질의 농도에 따라 단맛수용체가 dose-dependent하게 활성을 보임을 확인하고, G-stevia의 maximum intensity를 나타내는 농도의 50%농도인 26.23 uM의 EC50 값을 계산함 (Figure IV-11).

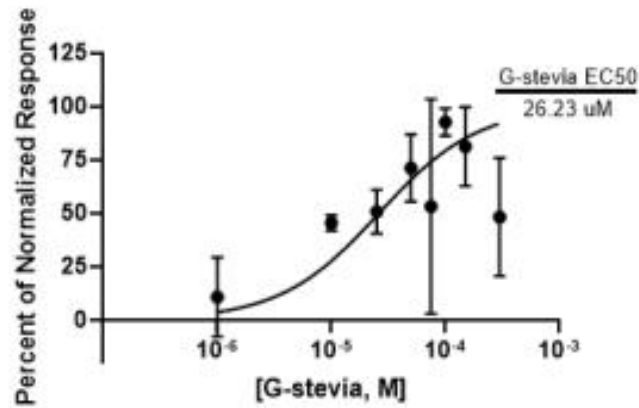


Figure IV-11. Dose-dependent response of G-stevia concentrations.

The normalized sensor sensitivity was increased as the concentrations of G-stevia increased. The activity was saturated at a high concentration dose of 300 uM.

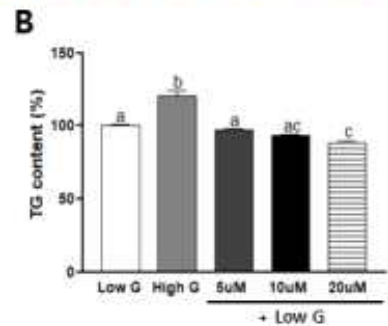
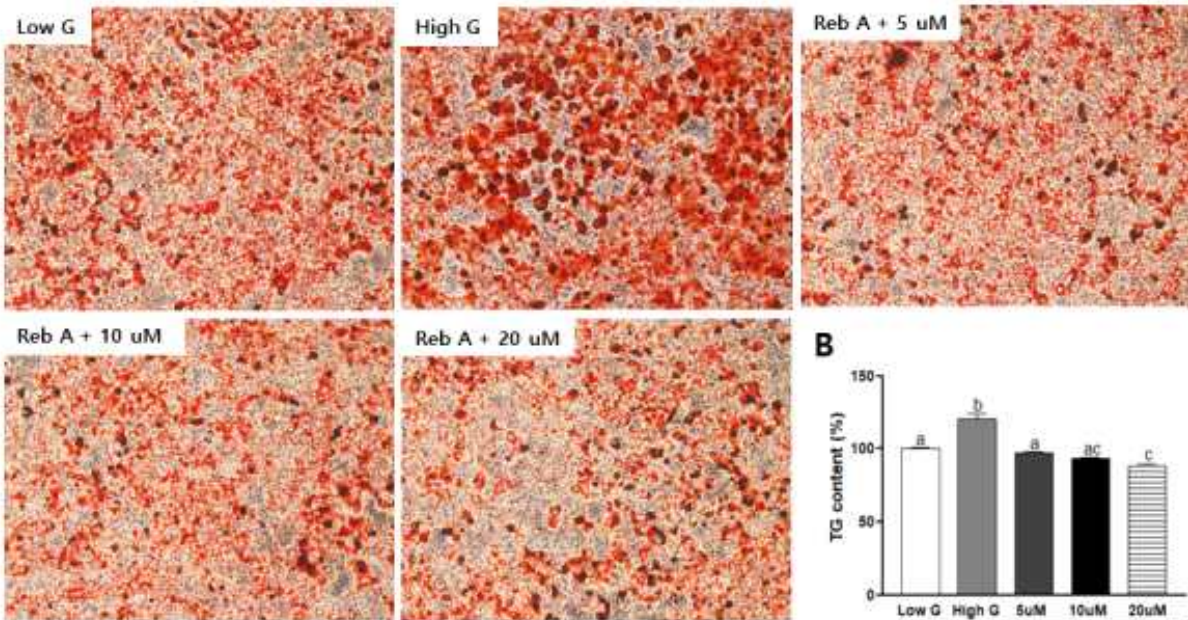
○ in vitro 실험을 통한 지방세포 억제효과와 분자적 기전 규명

- 3T3-L1 분화 유도 및 morphology 관찰 (또는 지방세포의 분화 유도 및 morphology 관찰을 통한 lipid accumulation 정도 측정)

- Rebaudioside A, Rebaudioside M, G-stevia

- ✓ Glucose 5mM (Low G) 보다 20 uM rebaudioside A와 10 uM, 30 uM G-Stevia 처리군에서 lipid accumulation이 감소하는 결과를 확인함 (Figure IV-12A-B, 12E-F).
- ✓ Rebaudioside M은 어떠한 dose에서도 유의적으로 감소하였음 (Figure IV-12C-D).

A



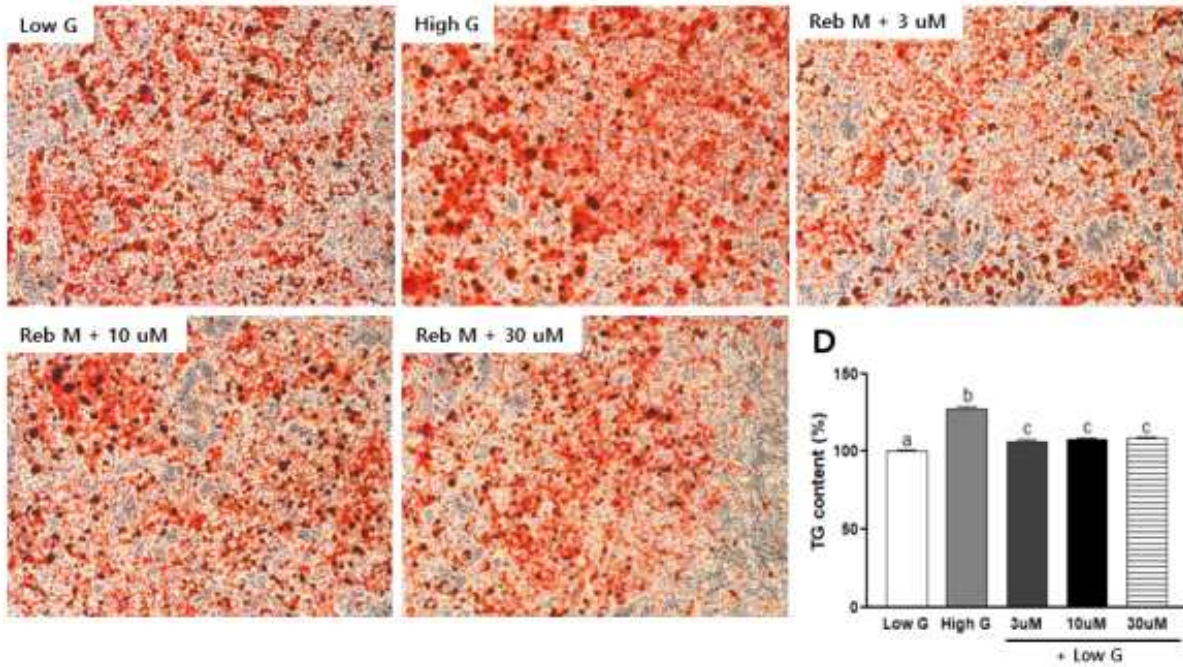
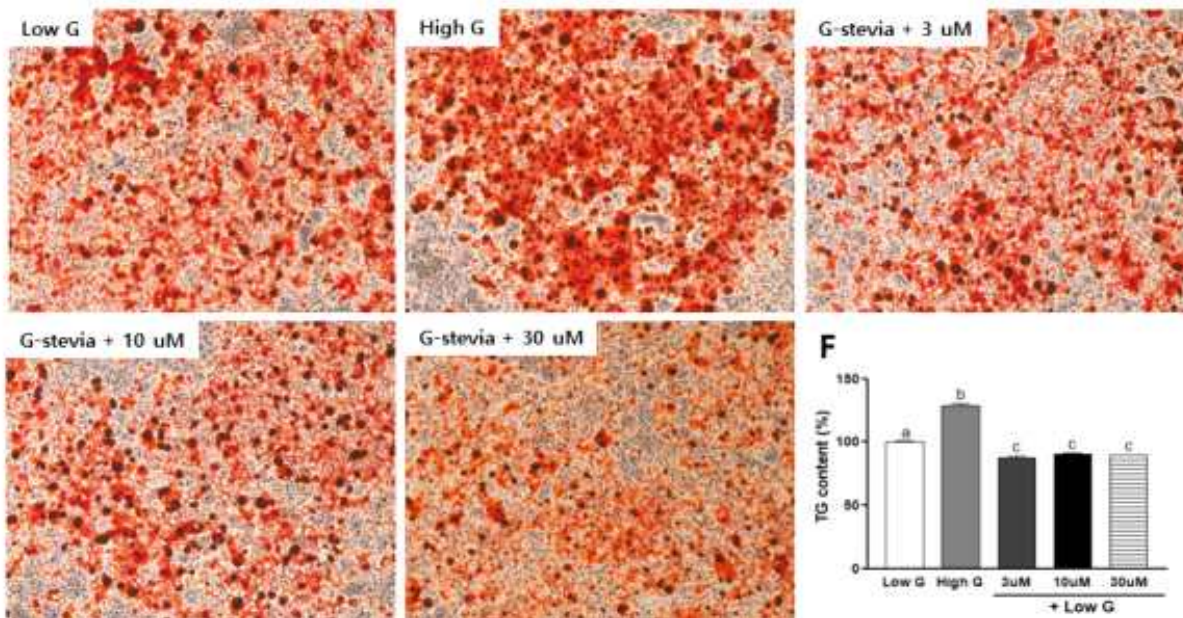
C**E**

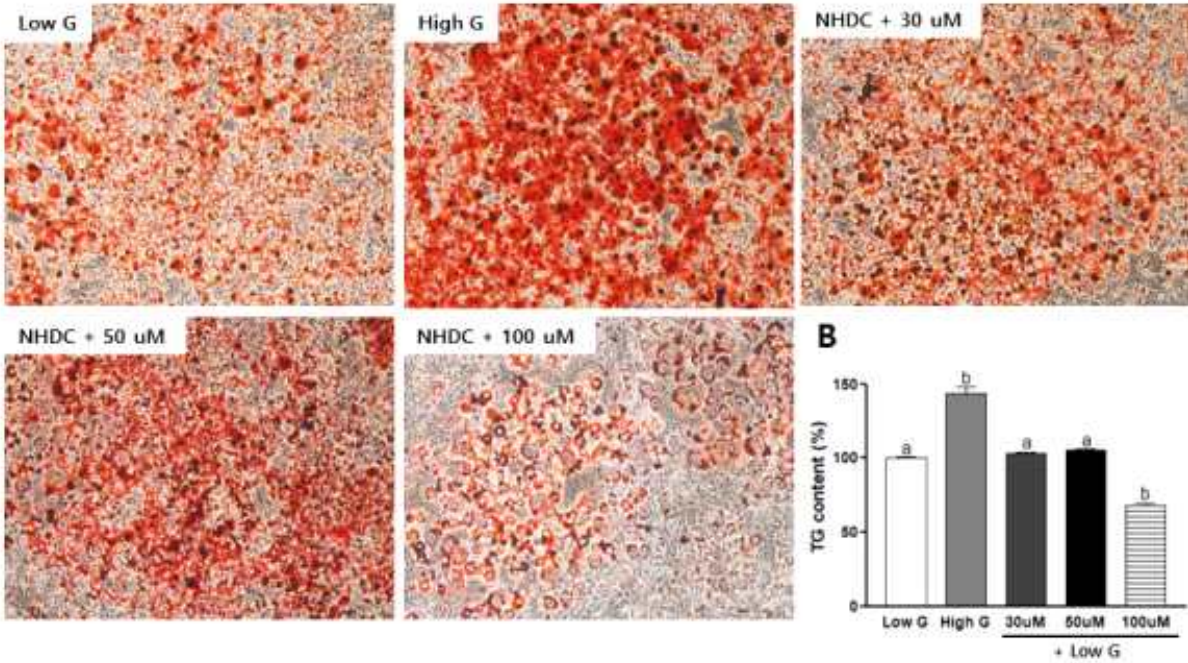
Figure IV-12. Inhibitory effects of rebaudioside A, rebaudioside M, or G-stevia on lipid accumulation in 3T3-L1 adipocytes.

Representative images lipid accumulation by Rebaudioside A (A-B), Rebaudioside M (C-D), and G-stevia (E-F) treatment and cellular lipid accumulation was quantified by measuring the absorbance at 492 nm. Data were shown as the mean \pm SEM. Different letters for given bars means that those values are significantly different from each other (P < 0.05) using One-way ANOVA. Low G, glucose 5 mM; High G, glucose 25 mM.

- NHDC, G-NHDC

- ✓ Glucose 5 mM보다 100 uM NHDC와 30uM, 50uM, 100uM G-NHDC에서 lipid accumulation이 감소하는 결과를 확인함 (Figure IV-13A-B).
- ✓ G-NHDC는 모든 dose에서 lipid accumulation이 감소하였음 (Figure IV-13C-D).

A



C

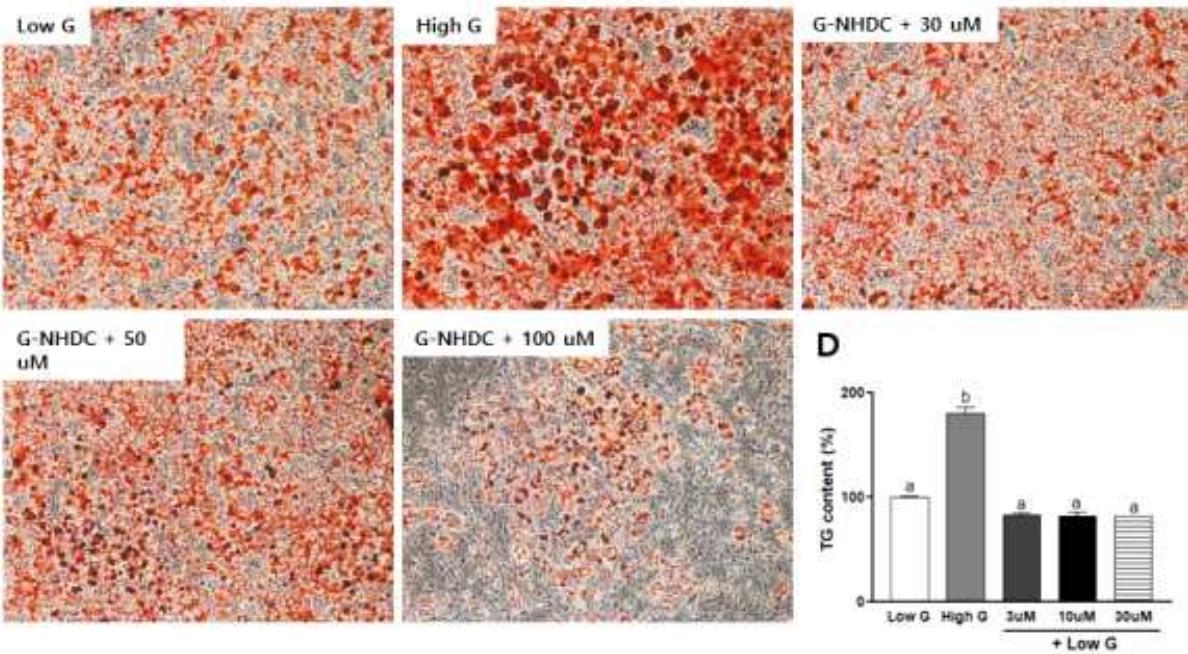


Figure IV-13. Inhibitory effects of NHDC or G-NHDC on lipid accumulation in 3T3-L1 adipocytes. Representative images of lipid accumulation by NHDC (A-B), and G-NHDC (C-D) treatment. Cellular lipid accumulation was quantified by measuring the absorbance at 492 nm. Data were shown as the mean SEM. Different letters for given bars means that those values are significantly different from each other ($P < 0.05$). Low G, glucose 5 mM; High G, glucose 25 mM.

▪ 3T3-L1 cell에서의 스테비오사이드 또는 NHDC와 이들의 당전이체가 cell viability에 미치는 영향

- Rebaudioside A, Rebaudioside M, G-stevia

- ✓ 스테비오사이드와 스테비오사이드 당전이체를 24시간 동안 처리하였을 때, rebaudioside A, rebaudioside M, G-stevia 모두 어떠한 농도에서도 유의적인 차이를 보이지는 않음. 이를 통해 물질이 세포독성에 영향을 미치지 않는 것으로 보임 (Figure IV-14A-C).

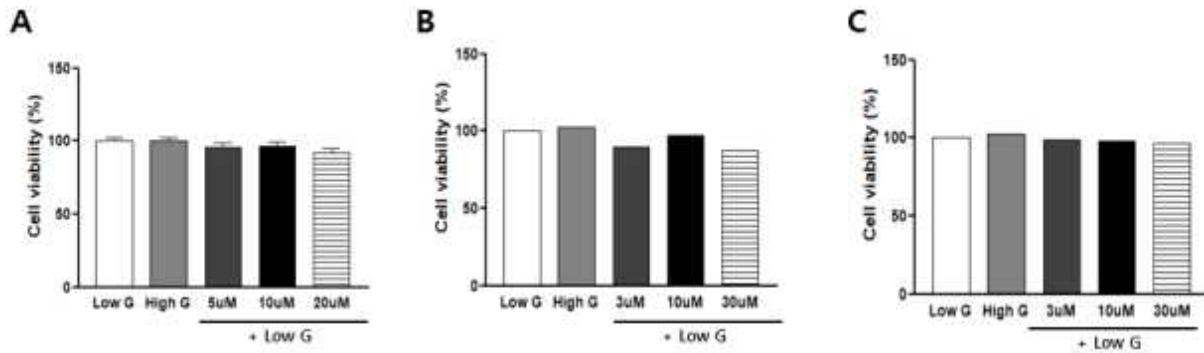


Figure IV-14. Effects of rebaudioside A, rebaudioside M, G-stevia on 3T3-L1 cell viability for 24 h.

3T3-L1 preadipocytes were incubated with various doses of Rebaudioside A (A), Rebaudioside M (B), or G-stevia (C) for 24 h and cell viability was measured by MTT assay. Data were shown as the mean \pm SEM and expressed as percentage of untreated control cells. Low G, glucose 5 mM; High G, glucose 25 mM.

- NHDC, G-NHDC

- ✓ NHDC와 NHDC 당전이체를 24시간 동안 처리하였을 때, NHDC, G-NHDC 모두 어떠한 농도에서도 유의적인 차이를 보이지는 않음. 이를 통해 물질이 세포독성에 영향을 미치지 않는 것으로 보임 (Figure IV-15A-B).

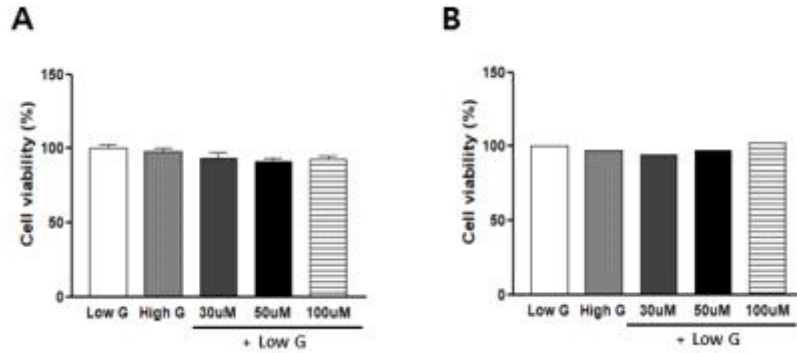


Figure IV-15. Effects of NHDC or G-NHDC on 3T3-L1 cell viability for 24 h.

3T3-L1 preadipocytes were incubated with various doses of NHDC (A) or G-NHDC (B) for 24 h and cell viability was measured by MTT assay. Data were shown as the mean \pm SEM and expressed as percentage of untreated control cells. Low G, glucose 5 mM; High G, glucose 25 mM.

▪ RT-PCR을 이용하여 adipocyte (3T3-L1)에서 adipogenesis marker의 발현 측정 및 비교

- Rebaudioside A, Rebaudioside M, G-stevia

- ✓ Rebaudioside A, rebaudioside M, G-stevia를 처리한 지방세포에서 adipogenesis 과정의 key regulator인 PPAR γ 와 SREBP-1C를 RT-PCR로 확인한 결과, rebaudioside M과 G-stevia의 경우 Low G (glucose 5 mM) group과 물질 처리군과의 발현 차이가 보이지 않았으나 High G (glucose 25 mM) group보다 물질 처리군에서 각 유전자의 발현이 감소함을 확인할 수 있었음 (Figure IV-16A-C).

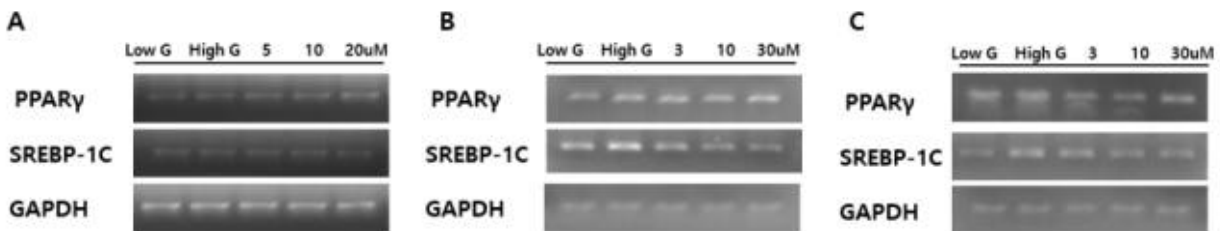


Figure IV-16. Effect of rebaudioside A, rebaudioside M, and G-stevia on adipogenesis-related gene in 3T3-L1 cell.

RNA expression of PPAR γ and SREBP-1C in 3T3-L1 cell were measured by RT-PCR analysis. GAPDH was used as loading control. A. Rebaudioside A, B. Rebaudioside M, C. G-stevia. Low G, glucose 5 mM; High G, glucose 25 mM.

- NHDC, G-NHDC

- ✓ NHDC, G-NHDC를 처리한 지방세포에서 adipogenesis 과정의 key regulator인 PPAR γ 와 SREBP-1C를 RT-PCR로 확인한 결과, NHDC와 G-NHDC를 처리하였을 때 SREBP-1C의 발현이 High G (glucose 25 mM)에 비해 감소되었음. 하지만 Low G (glucose 5 mM)와는 차이가 보이지 않음 (Figure IV-17A-B).

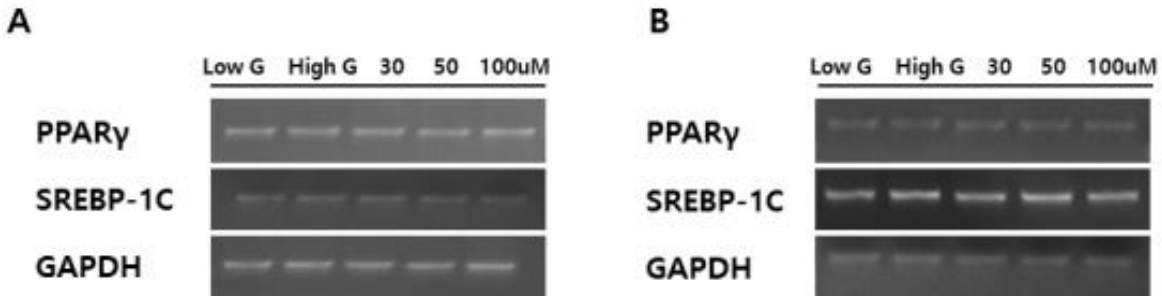


Figure IV-17. Effect of NHDC and G-NHDC on adipogenesis-related gene in 3T3-L1 cell. RNA expression of PPAR γ and SREBP-1C in 3T3-L1 cell were measured by RT-PCR analysis. GAPDH was used as a loading control. A. NHDC, B. G-NHDC. Low G, glucose 5 mM; High G, glucose 25 mM.

○ in vitro 실험을 통한 항염증 효과와 분자적 기전 규명

- 대식세포(RAW 264.7 cell)에서 cell viability 측정

- Rebaudioside A, Rebaudioside M, G-stevia

- ✓ RAW 264.7 cell에서 rebaudioside A, rebaudioside M, G-stevia 시료 독성실험 결과 LPS control에 비하여 low glucose 함유량 (Low G-L, 5 mM glucose), high glucose 함유량 (High G-L, 25 mM)에 상관없이 cell viability가 감소하지 않았으며, 이로 인한 독성도 나타나지 않음 (Figure IV-18A-C).

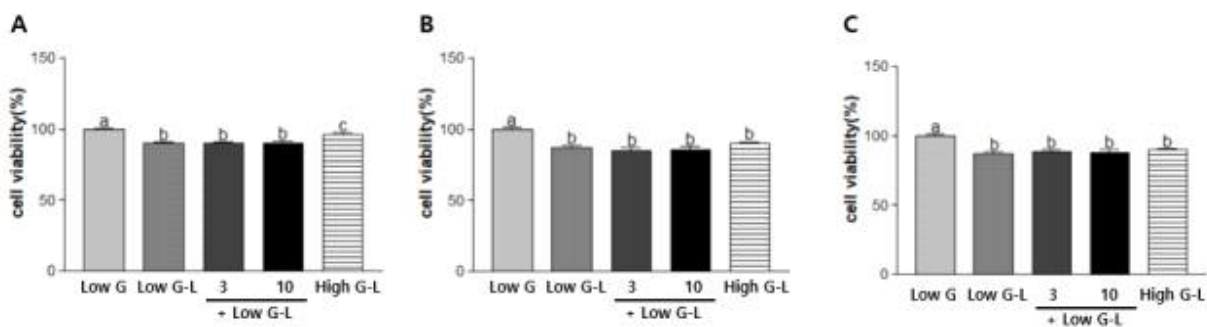


Figure IV-18. Effect of rebaudioside A, rebaudioside M, G-stevia on RAW 264.7 cell viability.

A. Rebaudioside A treatment. B. Rebaudioside M treatment. C. G-stevia treatment. The cells were treated with 500 ng/ml LPS and each of the components for 24 h. Cell viability was analyzed by using MTT assay. Values shown are the mean \pm SEM. Different letters for given bars indicate that those values are significantly different from each other ($P < 0.05$). Low G, control; Low G-L, low glucose (5 mM) + lipopolysaccharide; 3, each component 3 μ M; 10, each component 10 μ M; High G-L, low glucose (5 mM) + glucose 20 mM.

- NHDC, G-NHDC

- ✓ RAW 264.7 cell에서 NHDC, G-NHDC 시료 독성실험 결과 LPS control에 비하여 low glucose 함유량 (Low G-L, 5 mM glucose), high glucose 함유량 (High G-L, 25 mM)에 상관없이 cell viability가 감소하지 않았으며, 이로 인한 독성도 나타나지 않음 (Figure IV-19A-B).

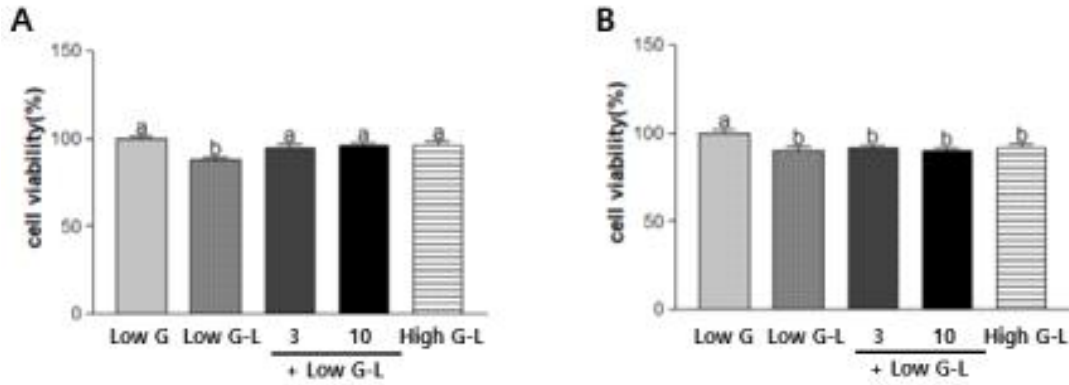


Figure IV-19. Effect of NHDC, G-NHDC on RAW 264.7 cell viability.

A. NHDC treatment. B. G-NHDC treatment. The cells were treated with 500 ng/ml LPS and each of the components for 24 h. Cell viability was analyzed by using MTT assay. Values shown are the mean \pm SEM. Different letters for given bars indicate that those values are significantly different from each other ($P < 0.05$). Low G, control; Low G-L, low glucose (5 mM) + lipopolysaccharide; 3, each component 3 μ M; 10, each component 10 μ M; High G-L, low glucose (5 mM) + glucose 20 mM.

▪ 대식세포(RAW 264.7 cell)에서 NO production 측정

- Rebaudioside A, Rebaudioside M, G-stevia

- ✓ LPS를 기준으로 glucose 25 mM (High G-L) 에서 NO의 생성이 유의적으로 증가하는 것을 확인.
- ✓ LPS를 기준으로 rebaudioside A, rebaudioside M, G-stevia 각각 3, 10 μ M에서 Low G-L과 비교하여 NO 생성의 유의적인 변화가 보이지 않음을 확인. 그러나 신규감미물질 개발의 본 목적인 설탕 대체 측면에서는, glucose 25 mM (High-G-L)에 비해 low glucose에서 신규감미물질 처리한 group에서 NO 생성이 유의적으로 감소한 것을 확인함 (Figure IV-20A-C).

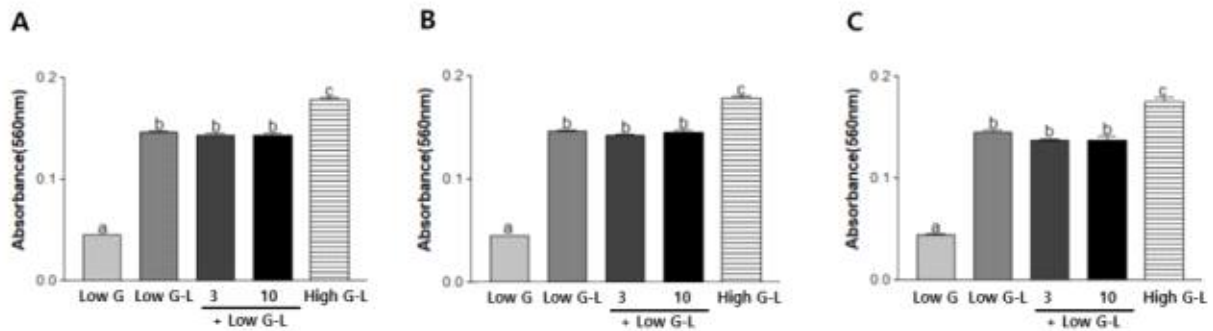


Figure IV-20. Effect of rebaudioside A, rebaudioside M, G-stevia on NO production in RAW 264.7 cell.

A. Rebaudioside A treatment. B. Rebaudioside M treatment. C. G-stevia treatment. The cells were treated with 500 ng/ml LPS and each of the components for 24 h. Values shown are the mean \pm SEM. Different letters for given bars indicate that those values are significantly different from each other ($P < 0.05$). Low G, control; Low G-L, low glucose (5 mM) + lipopolysaccharide; 3, each component 3 μ M; 10, each component 10 μ M; High G-L, low glucose (5 mM) + glucose 20 mM.

- NHDC, G-NHDC

- ✓ LPS를 기준으로 glucose 25 mM (High G-L) 에서 NO의 생성이 유의적으로 증가하는 것을 확인.
- ✓ LPS를 기준으로 NHDC, G-NHDC 각각 3, 10 μ M에서 Low G-L과 비교하여 NO 생성의 유의적인 변화가 보이지 않음을 확인. 그러나 신규감미물질 개발의 본 목적인 설탕 대체 측면에서는, glucose 25 mM (High-G-L)에 비해 low glucose에서 신규감미물질 처리한 group에서 NO 생성이 유의적으로 감소한 것을 확인함 (Figure IV-21A-B).

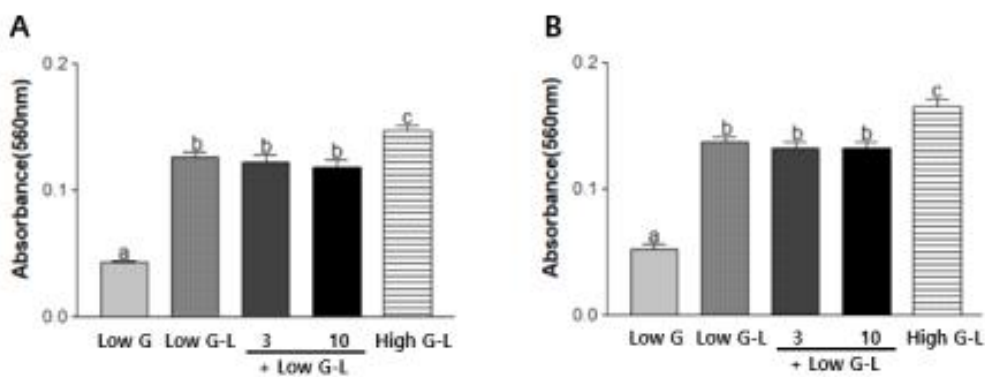


Figure IV-21. Effect of NHDC, G-NHDC on NO production in RAW 264.7 cell.

A. NHDC treatment. B. G-NHDC treatment. The cells were treated with 500 ng/ml LPS and each of the components for 24 h. Values shown are the mean \pm SEM. Different letters for given bars indicate that those values are significantly different from each other ($P < 0.05$). Low G, control; Low G-L, low glucose (5 mM) + lipopolysaccharide; 3, each component 3 μ M; 10, each component 10 μ M; High G-L, low glucose (5 mM) + glucose 20 mM.

- RT-PCR을 이용하여 대식세포(RAW 264.7 cell)에서 pro-inflammatory cytokine의 발현 측정 및 비교
 - Rebaudioside A, Rebaudioside M, and G-stevia
 - ✓ LPS를 기준으로 glucose 20 mM (High G-L)에서 control 군에 비해 IL-1 β , IL-6가 증가하는 것 확인함.
 - ✓ LPS를 기준으로 rebaudioside A, rebaudioside M, G-stevia 각각 3, 10 uM에서 Low G-L group과 비교하여 pro-inflammatory cytokine인 IL-1 β , IL-6의 유의적인 변화가 보이지 않음을 확인. 그러나 신규감미물질 개발의 본 목적인 설탕 대체 측면에서는, glucose 20 mM (High G-L)에 비해 low glucose에서 신규감미물질 처리한 group에서 pro-inflammatory cytokine인 IL-1 β , IL6의 생성이 감소한 것을 확인함 (Figure IV-22A-C).

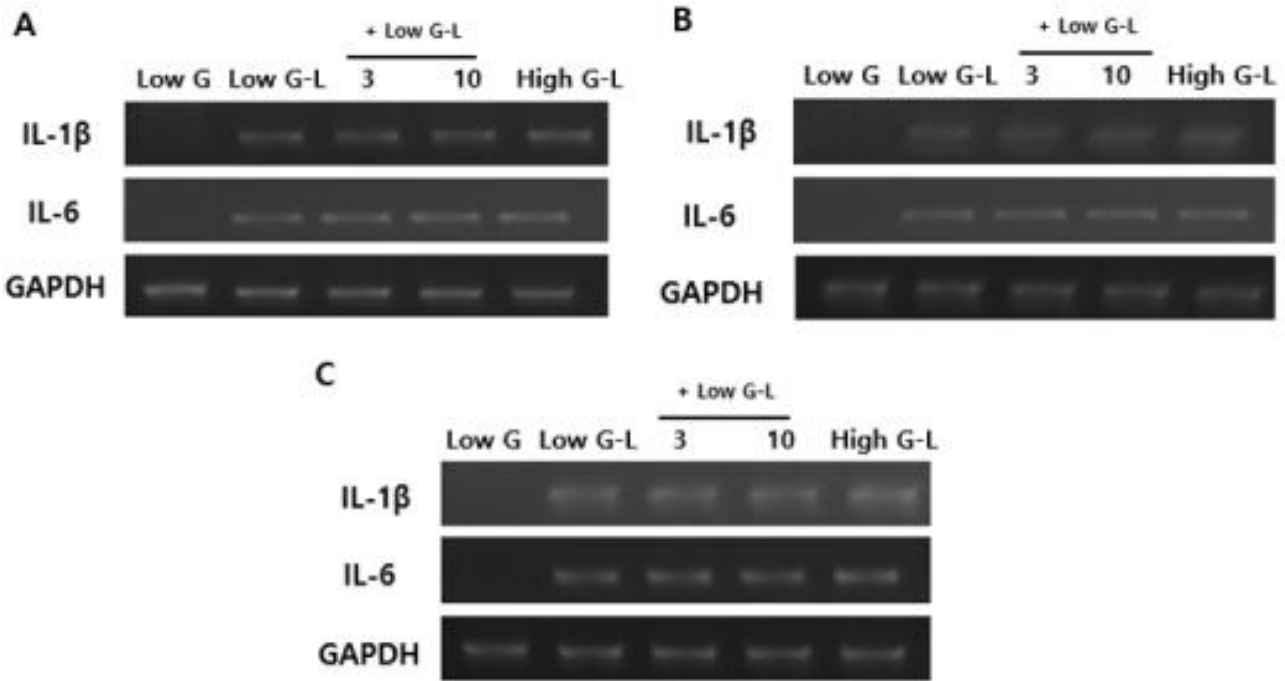


Figure IV-22. Effect of rebaudioside A, rebaudioside M, and G-stevia on pro-inflammatory cytokine in RAW 264.7 cell.

RNA expression of IL-1 β and IL6 in RAW 264.7 cell were measured by RT-PCR analysis. GAPDH was used as a loading control. A. Rebaudioside A, B. Rebaudioside M, C. G-stevia. The cells were treated with 500 ng/ml LPS and each of the components for 24 h. Low G, control; Low G-L, low glucose (5 mM) + lipopolysaccharide; 3, 3 uM each sweetener; 10, each component 10 uM; High G-L, high glucose (20 mM) + lipopolysaccharide.

- NHDC and G-NHDC

- ✓ LPS를 기준으로 glucose 25 mM (High G-L)에서 control 군에 비해 IL-1 β 와 IL-6 발현이 증가하는 것을 확인함.
- ✓ LPS를 기준으로 NHDC, G-NHDC 각각 3, 10 uM에서 Low G-L group과 비교하여 pro-inflammatory cytokine인 IL-1 β 과 IL-6의 유의적인 변화가 보이지 않음을 확인. 그러나 신규감미물질 개발의 본 목적인 설탕 대체 측면에서는 glucose 25 mM (High G-L)에 비해 low glucose (5 mM)에서 신규감미물질 처리한 group에서 pro-inflammatory cytokine인 IL-1 β , IL-6의 mRNA 발현이 감소한 것을 확인함 (Figure IV-23A-B).

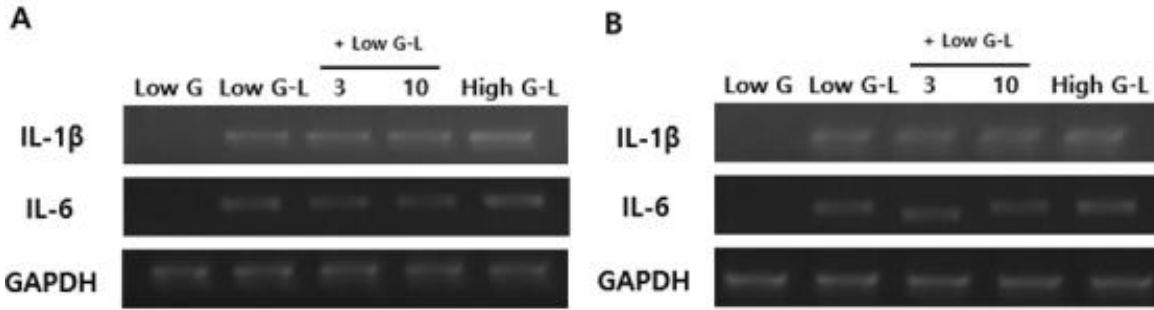


Figure IV-23. Effect of NHDC and GNHDC on pro-inflammatory cytokine in RAW 264.7 cell. RNA expression of IL-1 β and IL6 in RAW 264.7 cell were measured by RT-PCR analysis. GAPDH was used as a loading control. A. NHDC, B. GNHDC. The cells were treated with 500 ng/ml LPS and each sweetener for 24 h. Low G, control; Low G-L, low glucose (5 mM) + lipopolysaccharide; 3, 3 μ M each sweetener; 10, 10 μ M each sweetener; High G-L, glucose (20 mM) + lipopolysaccharide .

▪ **대식세포(RAW 264.7 cell)에서 pro-inflammatory mediator의 단백질발현 측정 및 비교**

– **Rebaudioside A, Rebaudioside M, and G-stevia**

- ✓ LPS를 기준으로 glucose 20 mM (High G-L) 에서 COX2 발현이 증가하는 것 확인함.
- ✓ LPS를 기준으로 rebaudioside A, rebaudioside M, G-stevia 각각 3, 10 μ M에서 Low G-L group과 비교하여 pro-inflammatory mediator인 COX2의 유의적인 변화가 보이지 않음을 확인. 그러나 신규감미물질 개발의 본 목적인 설탕 대체 측면에서는, glucose 25 mM (High G-L)에 비해 low glucose (5 mM)에서 신규감미물질 처리한 group에서 pro-inflammatory mediator인 COX2의 생성이 감소한 것을 확인함 (Figure IV-24A-C).

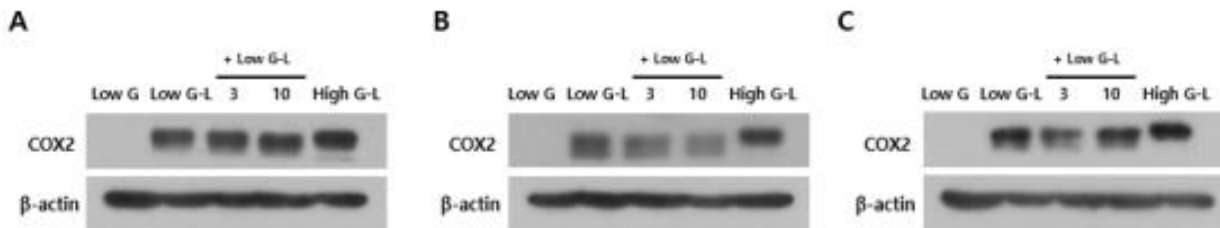


Figure IV-24. Effect of rebaudioside A, rebaudioside M, and G-stevia on pro-inflammatory mediator in RAW 264.7 cell.

Protein expression of COX2 in RAW 264.7 cell were measured by western blot analysis. β -actin was used as a loading control. A. Rebaudioside A, B. Rebaudioside M, C. G-stevia. The cells were treated with 500 ng/ml LPS and each sweetener for 24 h. Low G, control; Low G-L, low glucose (5 mM) + lipopolysaccharide; 3, 3 μ M ; 10, 10 μ M each sweetener; High G-L, glucose (20 mM) + lipolysaccharide.

– **NHDC and G-NHDC**

- ✓ LPS를 기준으로 glucose 20 mM (High G-L)에서 COX2가 증가하는 것 확인함.
- ✓ LPS를 기준으로 NHDC, NHDC 당전이체 각각 3, 10 μ M에서 Low G-L group과 비교하여 pro-inflammatory mediator인 COX2의 유의적인 발현변화가 보이지 않음을 확인. 그러나 신규 감미물질 개발의 본 목적인 설탕 대체 측면에서는, glucose 20 mM (High G-L)에 비해 low glucose (5 mM)에서 신규감미물질 처리한 group에서 pro-inflammatory mediator인 COX2의 생성이 감소한 것을 확인함 (Figure IV-25A-B).

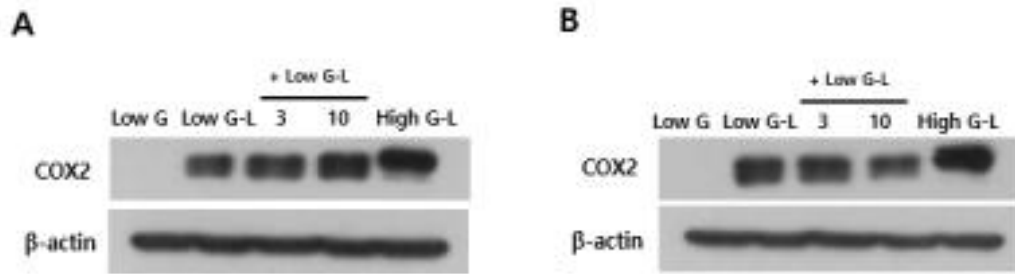


Figure IV-25. Effect of NHDC and GNHDC on pro-inflammatory mediator in RAW 264.7 cell. Protein expression of COX2 in RAW 264.7 cell were measured by western blot analysis. β -actin was used as a loading control. A. NHDC, B. GNHDC. The cells were treated with 500 ng/ml LPS and each sweetener for 24 h. Low G, control; Low G-L, low glucose (5 mM) + lipopolysaccharide; 3, 3 μ M each sweetener; 10, 10 μ M each sweetener; High G-L, low glucose (20 mM) + lipopolysaccharide.

[2차년도]

1. in vitro 단맛수용체 측정 system의 구축, 신규 고감미료 NHDC 당전이체의 단맛수용체 활성 분석

1.1. in vivo db/db 마우스 모델을 이용한 stevioside 및 NHDC 당전이체의 항당뇨 및 항염증 모델 구축 및 효과 규명

1.1.1. 실험방법

○ in vitro 단맛수용체 활성측정 system을 이용한 NHDC 당전이체의 단맛수용체 활성 측정

▪ in vitro human 단맛수용체 활성 측정 시스템 구축

- NHDC 당전이체의 in vitro human 단맛수용체 활성 측정

- ✓ TAS1R3 stable cell에 TAS1R2와 Gα15를 transient transfection시켜 단맛수용체를 동시에 발현시킨 후, NHDC, GNHDC를 처리하여 calcium mobilization assay를 수행함. 단맛수용체의 단맛 감지 기능을 수행하기 위해 NHDC, GNHDC의 용해도를 높이는 최적의 조건을 찾기 위해 5% 에탄올을 용매로 사용하여 확인함.

- NHDC 당전이체 농도에 따른 단맛수용체 활성 변화 측정

- ✓ TAS1R3 stable cell에 TAS1R2와 Gα15를 transient transfection시켜 단맛수용체를 동시에 발현시킨 후, NHDC, GNHDC를 여러 농도로 처리하여 calcium mobilization을 수행함. 이를 통해 NHDC, GNHDC의 농도에 따라 단맛수용체가 dose-dependent하게 활성을 보이는 농도를 확인하고, NHDC, GNHDC 각각의 maximum intensity를 나타내는 농도의 50%농도인 EC50 값을 계산함.

○ in vivo db/db 마우스 모델을 이용한 stevioside 및 NHDC 당전이체의 항당뇨 및 항염증 기능성 평가 및 분자적 기전 규명

▪ in vivo db/db 마우스모델을 이용한 stevioside 및 NHDC 당전이체 항당뇨 및 항염증 모델 구축

- 식이섭취량, 식수섭취량 및 체중 측정

- ✓ Stevia, 이당체 그룹: 5주령 C57BL/6 db/db 마우스를 당뇨 Ctrl 대조군, Reb A 섭취군, G-Reb A 섭취군, G-stevia 섭취군으로 배정함. 해당 실험에서는 마우스를 랜덤으로 나누고 그룹을 설정하여 진행함. 당뇨 ctrl 대조군은 1.5% CMC (carboxymethyl cellulose)를, Reb A, G-Reb A, G-stevia 섭취군은 1.5% CMC 에 각 물질을 킬로그램 무게 단위 당 40 mg씩 섞어 경구 투여함.
- ✓ NHDC, 이당체 그룹: 5주령 C57BLKS/J db/db 마우스를 당뇨 Ctrl 대조군, NHDC 섭취군, NHDC 당전이체 (GNHDC) 섭취군으로 랜덤으로 나누어 그룹을 설정하여 진행함. Ctrl 대조군은 PBS를, NHDC와 GNHDC 섭취군은 각 시료를 킬로그램 무게 단위 당 100 mg을 경구 투여함.
- ✓ 전체 실험 기간 중 일주일에 2회씩 식이섭취량, 식수섭취량 및 체중을 측정하여 식이 효율 (Food Efficiency Ratio)을 산출하여 비교함.

- 혈당 측정 및 Oral glucose tolerance test (OGTT) 분석

- ✓ 매주 또는 격주에 1회씩 마우스의 공복 혈당을 측정함. 12시간의 공복 이후 혈당 측정 기계를 이용하여 꼬리 정맥의 혈액을 채취함. 2주차 각 킬로그램 무게 단위 당 1 g의 포도당을 경구 투여한 뒤, 0, 30, 60, 90, 120분 뒤 혈액을 채취하여 혈당을 측정하는 OGTT 분석을 시행함. 혈당 변화 곡선을 바탕으로 Area under curve (AUC)를 계산하여 stevioside 당전이체의 혈당 회복 능력을 평가함.

- 조직 무게 측정 및 tissue histopathology 관찰

- ✓ 희생 시 마우스의 피하지방 조직과 간 조직을 분리하여 무게를 측정함. 이후 포르말린에 고정시킨 뒤 파라핀 슬라이드를 통해 H&E Staining을 통해 염색된 지방구의 크기 및 모양을 관찰함. 현미경을 통해 촬영한 피하지방 조직의 adipocyte area를 계산함.

- 호르몬 및 lipid profile 측정

- ✓ 희생 시 채취한 전혈에서 원심분리를 통해 혈장을 얻어 non-esterified fatty acid (NEFA), leptin, adiponectin, insulin을 ELISA 분석함. 간 조직과 혈장에서의 지질 농도를 평가하여 중성 지방 및 총 콜레스테롤, TG, LDL-콜레스테롤, HDL-콜레스테롤의 정도를 비교함.

- 간 조직 또는 피하지방 조직에서의 당 및 비만 대사 기전 규명

- ✓ 피하지방 조직에서 RNA를 분리하여 샘플을 얻은 뒤, 비만 대사와 관련된 유전자 마커의 발현 정도를 평가함. 당 신생합성에 관여하는 효소인 PEPCK, G6Pase의 발현과 지방산화에 관여하는 PPAR α 를 RT-PCR로 측정함. 지방산의 세포내 유입을 조절하는 CD36, LPL, 지방 세포 분화 단계에서 중요한 역할을 하는 PPAR γ , C/EBP α , 지방 생합성을 조절하는 SREBP1C, FAS의 발현을 측정함. 또한 지방 산화에 관여하는 CPT1 α , ACSL1, ACOX1와, 갈색 지방화에 관여하는 UCP1, PGC1 α , PRDM16의 발현을 Quantitative real-time PCR을 통해 측정함. 모든 분석에서의 loading control로는 β -actin 또는 GAPDH가 사용됨.

- 피하지방 조직에서의 염증 마커 확인

- ✓ 마우스의 피하지방 조직에서 단백질을 분리하여 pro-inflammatory mediator인 COX2의 발현을 western blot을 통해 확인함. Loading control로는 β -actin이 사용됨.

1.1.2. 실험결과

○ in vitro human 단맛수용체 활성 측정 시스템 구축

▪ NHDC 당전이체의 in vitro human 단맛수용체 활성 측정

- NHDC의 in vitro human 단맛수용체 활성 측정

- ✓ 5% 에탄올용매에 용해한 40 μ M NHDC 감미 물질 처리로 변화하는 calcium flux에 따른 Ca²⁺-bound dye 340 nm 파장이 증가 및 Ca²⁺-unbound dye 380 nm 파장이 감소로 생겨나는 피크를 확인함 (Figure IV-26A).
- ✓ Assay buffer인 HBSS+20 mM HEPES용매에 용해한 40 μ M NHDC 감미 물질 처리로 변화하는 calcium flux에 따른 Ca²⁺-bound dye 340 nm 파장 및 Ca²⁺-unbound dye 380 nm 파장의 변화가 없음을 확인함 (Figure IV-26B).
- ✓ 5% 에탄올용매에 용해한 40 μ M NHDC 감미 물질을 처리하는 즉시 증가하는 fluorescence ratio (340/380 nm ratio)를 확인하고, assay buffer인 HBSS+20 mM HEPES용매에 용해한 40 μ M NHDC 감미 물질을 처리하여 fluorescence ratio (340/380 nm ratio)에 변화가 없음을 비교함 (Figure IV-26C).
- ✓ 이로서 5% 에탄올용매를 추후 실험에 사용하기로 함.

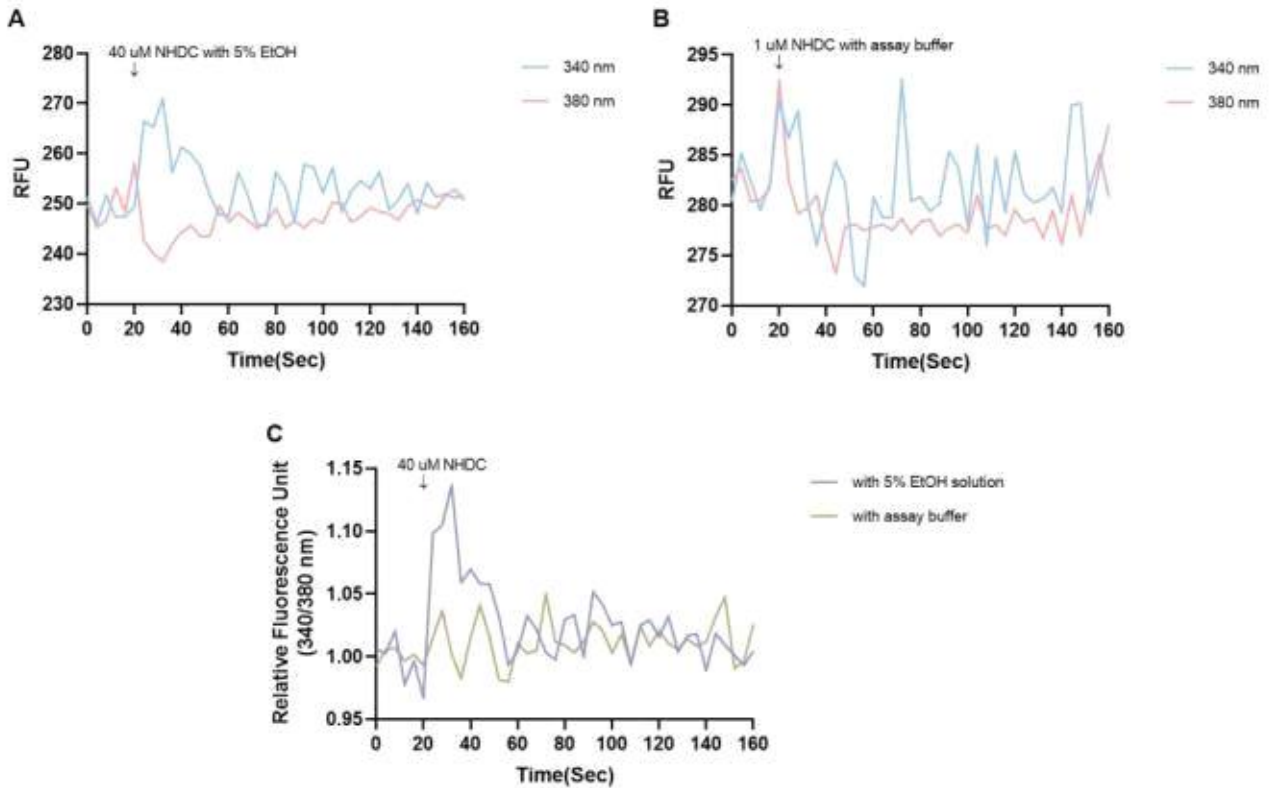


Figure IV-26. Ca²⁺ signal analysis by adding 40 uM of NHDC.

A. Changes in intracellular calcium concentration analysis using sweet taste receptor subunits expressed cells upon addition of 40 uM NHDC with 5% ethanol solution. B. Changes in intracellular calcium concentration analysis using sweet taste receptor subunits expressed cells upon addition of 40 uM NHDC with assay buffer (HBSS+20 mM HEPES). C. Changes in fluorescence ratio (ratio of the fluorescence at 340 nm and 380 nm) analysis using sweet taste receptor subunits expressed cell upon addition of 40 uM NHDC with 5% ethanol or assay buffer. Neohesperidin dihydrochalcone, NHDC.

- GNHDC의 in vitro human 단맛수용체 활성 측정

- ✓ 5% 에탄올용매에 용해한 40 uM GNHDC 감미 물질 처리로 변화하는 calcium flux에 따른 Ca²⁺-bound dye 340 nm 파장이 증가 및 Ca²⁺-unbound dye 380 nm 파장이 감소로 생겨나는 피크를 확인함 (Figure IV-27A).
- ✓ Assay buffer인 HBSS+20 mM HEPES용매에 용해한 40 uM GNHDC 감미 물질 처리로 변화하는 calcium flux에 따른 Ca²⁺-bound dye 340 nm 파장 및 Ca²⁺-unbound dye 380 nm 파장의 변화가 없음을 확인함 (Figure IV-27B).
- ✓ 5% 에탄올용매에 용해한 40 uM GNHDC 감미 물질을 처리하는 즉시 증가하는 fluorescence ratio (340/380 nm ratio)를 확인하고, assay buffer인 HBSS+20 mM HEPES용매에 용해한 40 uM GNHDC 감미 물질을 처리하여 fluorescence ratio (340/380 nm ratio)에 변화가 없음을 확인하여 비교함 (Figure IV-27C).
- ✓ 이로써 5% 에탄올용매를 추후 실험에 사용하기로 함.

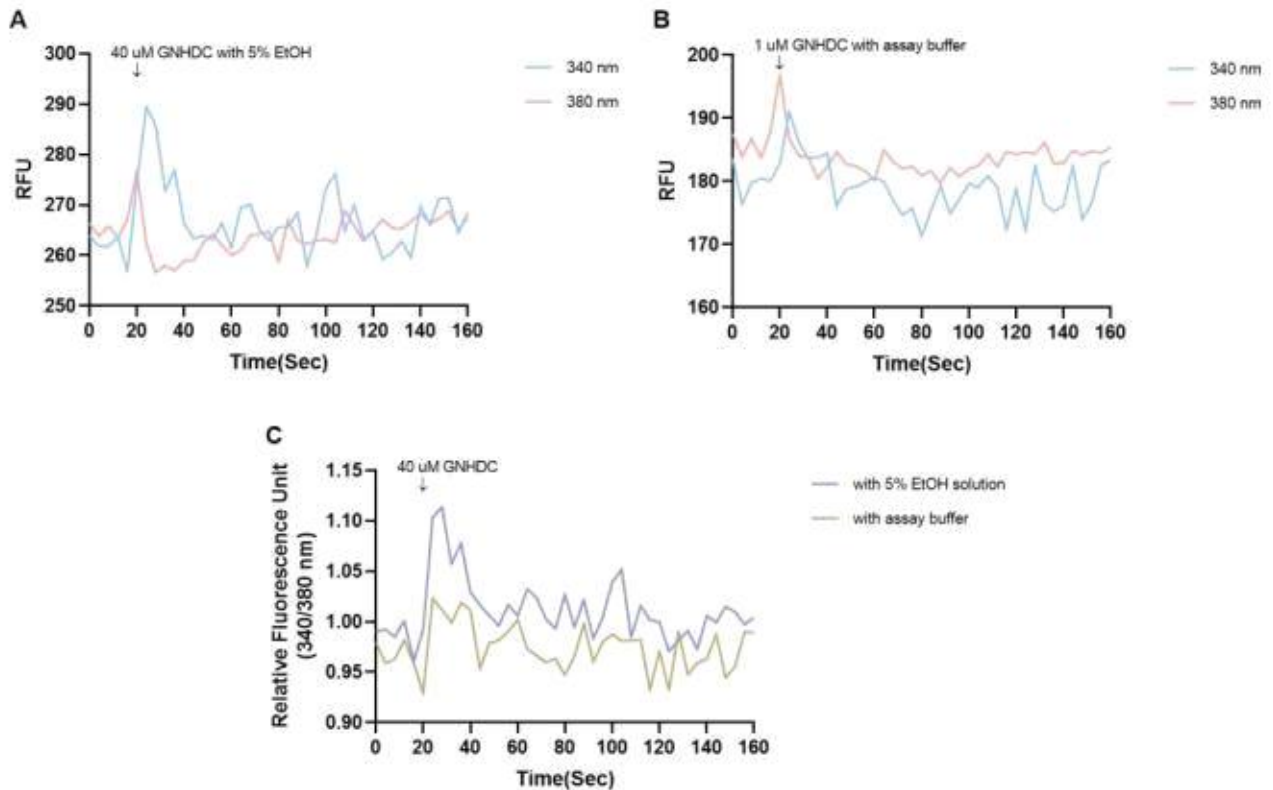


Figure IV-27. Ca²⁺ signal analysis by adding 40 uM of GNHDC.

A. Changes in intracellular calcium concentration analysis using sweet taste receptor subunits expressed cells upon addition of 40 uM GNHDC with 5% ethanol solution. B. Changes in intracellular calcium concentration analysis using sweet taste receptor subunits expressed cells upon addition of 40 uM GNHDC with assay buffer (HBSS+20 mM HEPES). C. Changes in fluorescence ratio (ratio of the fluorescence at 340 nm and 380 nm) analysis using sweet taste receptor subunits expressed cell upon addition of 40 uM GNHDC with 5% ethanol or assay buffer.

▪ NHDC 당전이체 농도에 따른 단맛수용체 활성 변화 측정

- NHDC의 농도에 따른 단맛수용체 활성 변화 측정

- ✓ 1, 5, 10, 20, 40, 60, 80, 100 uM의 여러 농도로 NHDC를 처리하여 NHDC 감미 물질의 농도에 따라 단맛수용체가 dose-dependent하게 활성을 보임을 확인하고, NHDC의 maximum intensity를 나타내는 농도의 50%농도인 14.15 uM의 EC50 값을 계산함 (Figure IV-28).

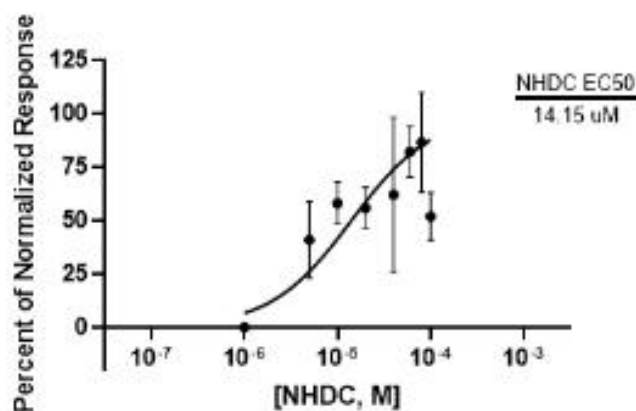


Figure IV-28. Dose-dependent response of NHDC concentrations.

The normalized sensor sensitivity was increased as the concentrations of NHDC increased, The activity was saturated at a high concentration dose of 100 uM. Neohesperidin dihydrochalcone, NHDC.

- GNHDC의 농도에 따른 단맛수용체 활성 변화 측정

- ✓ 1, 5, 10, 20, 40, 60, 80, 100 uM의 여러 농도로 GNHDC를 처리하여 GNHDC 감미 물질의 농도에 따라 단맛수용체가 dose-dependent하게 활성을 보임을 확인하고, GNHDC의 maximum intensity를 나타내는 농도의 50%농도인 8.255 uM의 EC50 값을 계산함 (Figure IV-29).

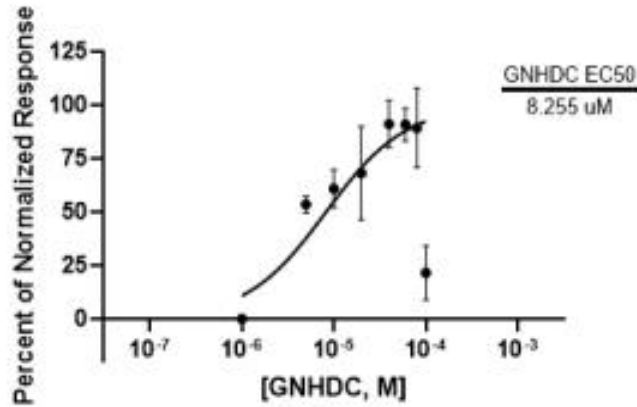


Figure IV-29. Dose-dependent response of GNHDC concentrations.

The normalized sensor sensitivity was increased as the concentrations of GNHDC increased, The activity was saturated at a high concentration dose of 100 uM.

○ in vivo db/db 마우스모델을 이용한 Stevioside 당전이체 항당뇨 및 항염증 모델 구축

▪ 식이섭취량, 식수섭취량 및 체중 측정

- 식이섭취량과 식수섭취량은 Reb A, G-Reb A, G-stevia 모든 섭취군에서 Ctrl군과 비교했을 때, 감소하는 경향은 확인하기 어려움.
- 식이섭취량을 바탕으로 산출한 식이 효율의 경우, Ctrl군에 비해 G-stevia 군에서 감소하는 경향이 나타남 (Table IV-1). 또한 최종 체중이 감소하는 경향을 확인하였으나 유의성은 나타나지 않음.

Table IV-1. Effects on food intake, water intake, and body weight in db/db mice.

	Ctrl	Reb A	G-Reb A	G-stevia
Food intake (g/day)	5.88 ± 0.30 ^a	5.85 ± 0.21 ^a	6.21 ± 0.26 ^a	6.01 ± 0.20 ^a
Food efficiency ratio (%)	4.98 ± 0.41 ^a	6.02 ± 0.41 ^a	5.80 ± 0.74 ^a	4.93 ± 0.76 ^a
Water intake (ml/day)	20.01 ± 1.79 ^a	19.05 ± 1.68 ^a	22.09 ± 1.86 ^a	20.19 ± 1.83 ^a
Final body weight (g)	32.59 ± 0.96 ^a	32.97 ± 1.38 ^a	33.74 ± 1.75 ^a	33.08 ± 1.28 ^a
Body weight gain (g)	11.01 ± 0.86 ^a	12.28 ± 1.37 ^a	12.01 ± 1.97 ^a	10.83 ± 1.30 ^a

All data were presented with mean ± SEM and analyzed by one-way ANOVA with Newman-Keuls test. Each alphabet letter indicates significant difference each other ($P < 0.05$). Ctrl, db/db mice control; Reb A, db/db mice with rebaudioside A supplement; G-Reb A, db/db mice with glycosyl rebaudioside A supplement; G-stevia, db/db mice with G-Stevia supplement.

▪ **혈당 측정 및 OGTT 분석**

- Reb A, G-Reb A, G-stevia 모든 섭취군의 경우, 혈당측정을 시작한 2주차부터 4주차까지는 공복혈당이 Ctrl 대조군 대비 감소하는 경향이 관찰됨. 5주차와 6주차에서는 Ctrl 군에서 비정상적으로 급격한 혈당 감소 현상이 관찰됨 (Figure IV-30A).
- Reb A, G-Reb A, G-stevia 모든 군에서 경구 포도당 투여에 따른 혈당 회복능력은 개선되지 않았음을 확인함. OGTT AUC 분석 결과에서도 Ctrl 대조군 대비 개선 효과를 확인할 수 없었음 (Figure IV-30B).

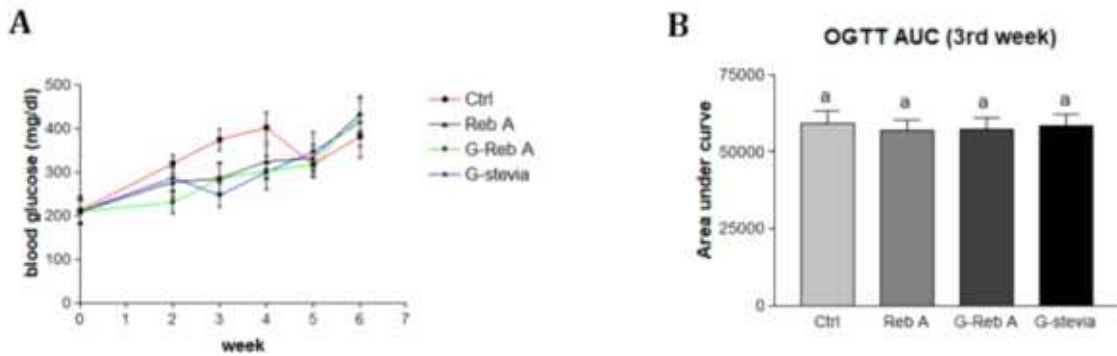


Figure IV-30. Effects on blood glucose levels and OGTT in db/db mice.

A. Blood glucose levels were measured for 6 weeks. B. OGTT was performed after 3 weeks and AUC was calculated. All data were presented with mean ± SEM and analyzed by one-way ANOVA with Newman-Keuls test. Ctrl, db/db mice control; Reb A, db/db mice with rebaudioside A supplementation; G-Reb A, db/db mice with glycosyl rebaudioside A supplementation; G-stevia, db/db mice with G-stevia supplementation.

▪ **조직 무게 측정 및 tissue histopathology 관찰**

- Reb A, G-Reb A, G-stevia 섭취군 모두에서 Ctrl군 대비 피하지방 조직의 무게가 유의적으로 감소함을 확인함. 모든 섭취군에서의 간 조직 무게는 감소하는 경향을 확인하기 어려움 (Table IV-2).

Table IV-2. Effects on tissue weight in db/db mice.

	Ctrl	Reb A	G-Reb A	G-stevia
Subcutaneous adipose tissues (g)	1.19 ± 0.12 ^a	0.99 ± 0.10 ^b	0.96 ± 0.08 ^b	0.97 ± 0.09 ^b
Total adipose tissues (g)	1.19 ± 0.12 ^a	0.99 ± 0.10 ^b	0.96 ± 0.08 ^b	0.97 ± 0.09 ^b
Liver tissues (g)	1.89 ± 0.14 ^a	2.02 ± 0.11 ^a	1.91 ± 0.10 ^a	1.89 ± 0.05 ^a

All data were presented with mean ± SEM and analyzed by one-way ANOVA with Newman-Keuls test. Each alphabet letter indicates significant difference each other ($P < 0.05$). Ctrl, db/db mice control; Reb A, db/db mice with rebaudioside A supplementation; G-Reb A, db/db mice with glycosyl rebaudioside A supplementation; G-stevia, db/db mice with G-stevia supplementation.

- H&E Staining 분석 결과를 통해 adipocyte area를 측정하여 비교함 (Figure IV-31A).
- G-stevia군에서 Ctrl군 대비 adipocyte area의 감소 경향을 확인하였으나, 유의성이 도출되지는 않음 (Figure IV-31B).

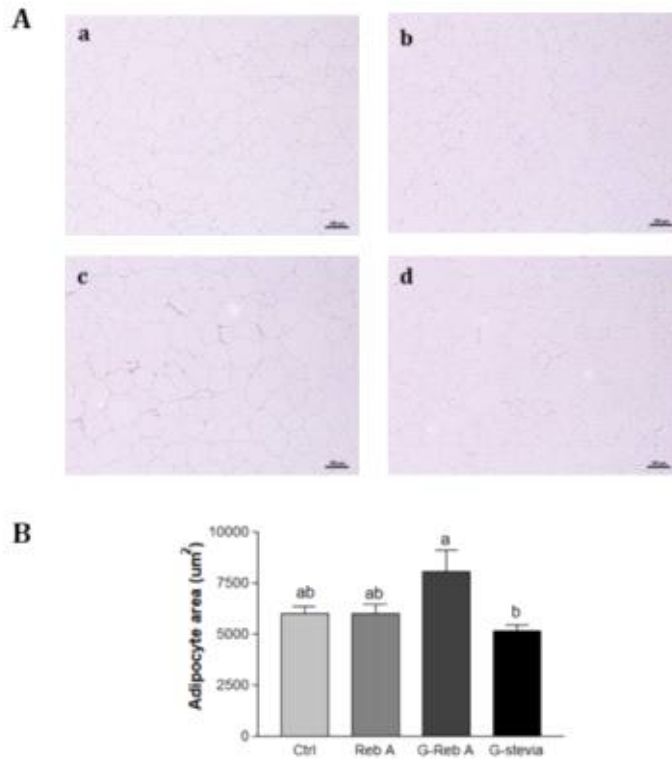


Figure IV-31. Effects on adipocyte area of subcutaneous adipose tissues.

A. Subcutaneous adipose tissues of (a) Ctrl, (b) Reb A, (c) G-Reb A, (d) G-stevia were assessed by H&E staining. B. Adipocyte area of subcutaneous adipose tissues was calculated. All data were presented with mean \pm SEM and analyzed by one-way ANOVA with Newman-Keuls test. Each alphabet letter indicates significant difference each other ($P < 0.05$). Ctrl, db/db mice control; Reb A, db/db mice with rebaudioside A supplementation; G-Reb A, db/db mice with glycosyl rebaudioside A supplementation; G-stevia, db/db mice with G-stevia supplementation.

▪ **Lipid profile 측정**

- Reb A, G-Reb A, G-stevia 모든 섭취군에서 Ctrl군 대비 총 콜레스테롤 및 TG (Triglyceride)의 감소 경향을 확인하기 어려움 (Table IV-3).

Table IV-3. Effects on lipid profiles in db/db mice.

	Ctrl	Reb A	G-Reb A	G-stevia
Total cholesterol (mg/dl)	177.26 \pm 2.56 ^a	180.29 \pm 4.49 ^a	175.67 \pm 3.91 ^a	175.67 \pm 5.68 ^a
Triglyceride (mg/dl)	179.12 \pm 21.2 ^a	185.03 \pm 7.58 ^a	207.11 \pm 7.54 ^a	211.1 \pm 2.84 ^a

All data were presented with mean \pm SEM and analyzed by one-way ANOVA with Newman-Keuls test. Each alphabet letter indicates significant difference each other ($P < 0.05$). Ctrl, db/db mice control; Reb A, db/db mice with rebaudioside A supplementation; G-Reb A, db/db mice with glycosyl rebaudioside A supplementation; G-stevia, db/db mice with G-stevia supplementation.

■ 간 조직 또는 피하지방 조직에서의 당 및 비만 대사 기전 규명

- 간 조직에서 G6Pase 의 발현이 G-stevia 섭취군에서 Ctrl 대비 감소하는 경향을 확인하였으나, 큰 표준오차로 인하여 유의성이 도출되지 않음 (Figure IV-32A).
- PEPCK의 발현은 G-Reb A와 G-stevia에서 Ctrl 대조군 대비 감소한 경향을 확인하였으나 큰 표준오차로 인하여 유의성이 도출되지 않음 (Figure IV-32B).

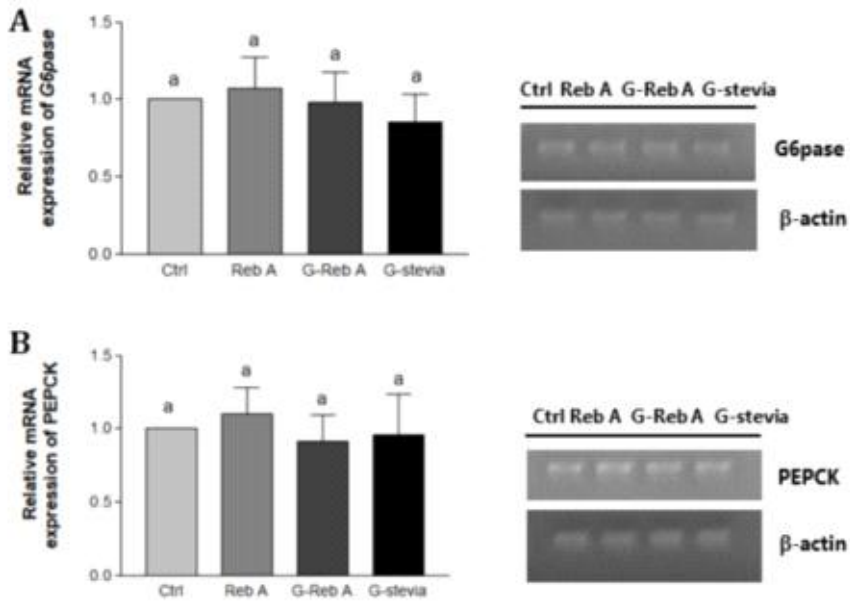


Figure IV-32. Effects on gluconeogenesis in liver tissues.

Expression of mRNA was assessed for (A) G6Pase and (B) PEPCK. All data were presented with mean \pm SEM and analyzed by one-way ANOVA with Turkey test. Each alphabet letter indicates significant difference each other ($P < 0.05$). G6Pase, Glucose-6-phosphatase; PEPCK, phosphoenolpyruvate carboxylase; Ctrl, db/db mice control; Reb A, db/db mice with rebaudioside A supplementation; G-Reb A, db/db mice with glycosyl rebaudioside A supplementation; G-stevia, db/db mice with G-stevia supplementation.

- C/ebp α 의 발현을 피하지방에서 확인한 결과, 모든 군에서 DB ctrl에 비교하였을 때 발현이 증가하는 경향을 보임 (Figure IV-33A).
- Ppar γ 의 발현을 피하지방에서 확인한 결과, 모든 군에서 DB ctrl에 비교하였을 때 발현이 증가하는 경향을 보임 (Figure IV-33B).

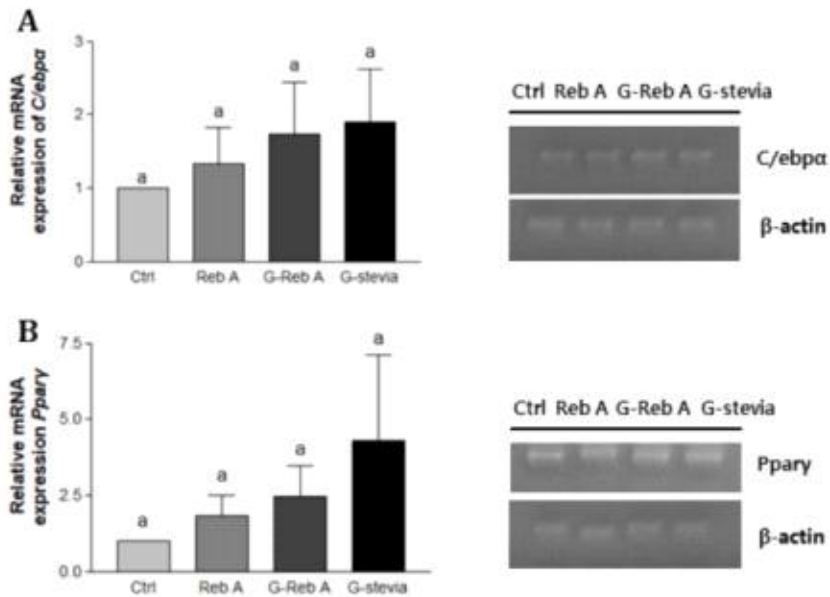


Figure IV-33. Effects on adipogenesis in subcutaneous adipose tissues.

Expression of mRNA was assessed for (A) Pparγ and (B) C/ebpa. All data were presented with mean ± SEM and analyzed by one-way ANOVA with Turkey test. Each alphabet letter indicates significant difference each other ($P < 0.05$). C/ebpa, CCAAT/enhancer binding protein alpha; Pparγ, peroxisome proliferator-activated receptor gamma; Ctrl, db/db mice control; Reb A, db/db mice with rebaudioside A supplementation; G-Reb A, db/db mice with glycosyl rebaudioside A supplementation; G-stevia, db/db mice with G-stevia supplementation.

- Cpt1α는 피하지방, Ppara는 간 조직에서 해당 발현을 관찰함.
- Reb A, G-stevia 섭취군에서는 Ctrl 대비 다소 감소하는 경향을 나타내고 있음(Figure IV-34A).
- Reb A, G-Reb A, G-stevia 섭취군을 Ctrl 과 비교하였을 때 Cpt1α의 발현이 증가하는 경향을 확인할 수 있음. 각 섭취군에서의 큰 표준오차로 인하여 유의성이 도출되지 않음 (Figure IV-34B).

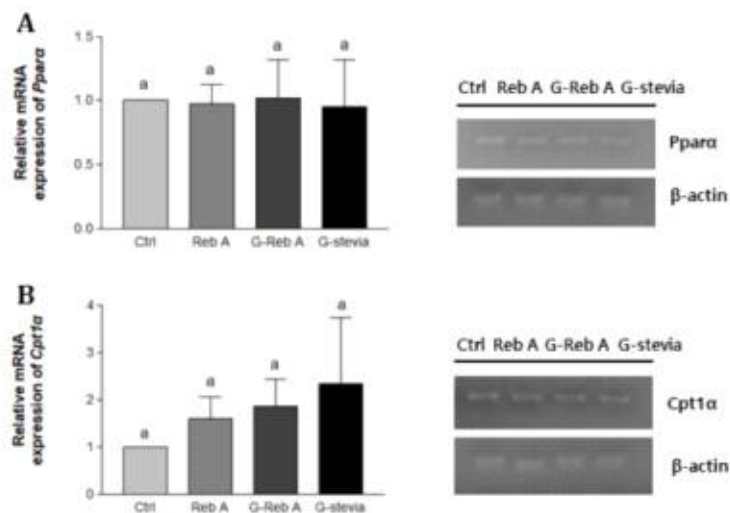


Figure IV-34. Effects on β-oxidation in liver and subcutaneous adipose tissues.

Expression of mRNA was assessed for (A) Ppara, (B) Cpt1α. All data were presented with mean ± SEM and analyzed by one-way ANOVA with Turkey test. Each alphabet letter indicates significant difference each other ($P < 0.05$). Ppara, peroxisome proliferator-activated receptor alpha; Cpt1α, carnitine palmitoyltransferase 1 alpha; Ctrl, db/db mice control; Reb A, db/db mice with rebaudioside A supplementation; G-Reb A, db/db mice with glycosyl rebaudioside A supplementation; G-stevia, db/db mice with G-stevia supplementation.

▪ 지방 조직에서의 염증 마커 확인

- COX2는 피하지방 조직에서 해당 발현을 관찰함. Reb A, G-Reb A, G-stevia 섭취군 모두에서 Ctrl 대조군과 비교하여 pro-inflammatory mediator인 COX2의 유의적인 변화가 보이지 않음을 확인함. G-stevia 섭취군에서 증가하는 경향을 보이지만 유의성은 도출되지 않음 (Figure IV-35).

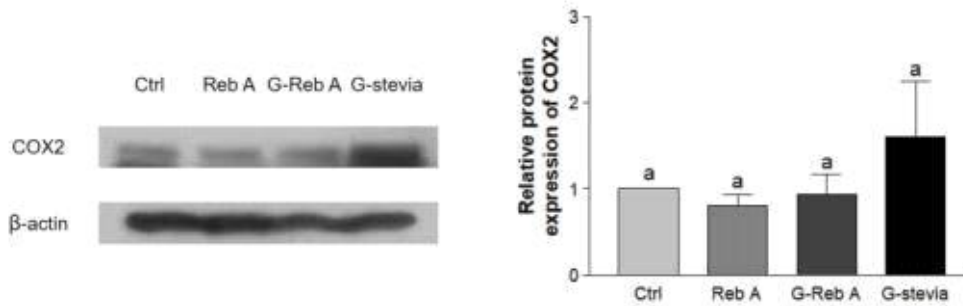


Figure IV-35. Effect on pro-inflammatory mediator in subcutaneous adipose tissues.

Protein expression of COX2 in subcutaneous adipose tissues were measured by western blot analysis. β -actin was used as a loading control. All data were presented with mean \pm SEM and analyzed by one-way ANOVA with Tukey test. Each alphabet letter indicates significant difference each other ($P < 0.05$). COX2, cyclooxygenase 2; Ctrl, db/db mice control; Reb A, db/db mice with rebaudioside A supplementation; G-Reb A, db/db mice with glycosyl rebaudioside A supplementation; G-stevia, db/db mice with G-stevia supplementation.

○ in vivo db/db 마우스모델을 이용한 NHDC당전이체 항당뇨 및 항염증 모델 구축

▪ 식이섭취량, 식수섭취량 및 체중 측정

- NHDC와 GNHDC 섭취군 모두에서 Ctrl 대조군 대비 식이섭취량과 식수섭취량이 감소하는 경향을 확인함. 식이섭취량을 바탕으로 산출한 식이 효율 역시 두 섭취군 모두에서 감소 경향이 나타남 (Table IV-4).

- 두 섭취군 모두에서 최종 체중이 감소하는 경향을 확인함. GNHDC 섭취군에서는 유의적인 체중 증가량 감소가 나타남.

Table IV-4. Effects on food intake, water intake and body weight in db/db mice.

	Ctrl	NHDC	GNHDC
Food intake (g/day)	6.25 \pm 0.20 ^a	5.90 \pm 0.20 ^a	6.00 \pm 0.27 ^a
Food efficiency ratio (%)	5.86 \pm 0.46 ^a	5.13 \pm 0.54 ^a	4.29 \pm 0.46 ^a
Water intake (ml/day)	18.31 \pm 1.47 ^a	14.68 \pm 1.65 ^a	14.92 \pm 1.68 ^a
Final body weight (g)	37.75 \pm 1.38 ^a	35.23 \pm 0.64 ^a	35.32 \pm 1.26 ^a
Body weight gain (g)	9.80 \pm 0.67 ^a	8.01 \pm 0.69 ^a	6.95 \pm 0.79 ^b

All data were presented with mean \pm SEM and analyzed by one-way ANOVA with Newman-Keuls test. Each alphabet letter indicates significant difference each other ($P < 0.05$). Ctrl, db/db mice control; NHDC, db/db mice with neohesperidin dihydrochalcone supplementation; GNHDC, db/db mice with glycosyl NHDC supplementation.

▪ **혈당 측정 및 OGTT 분석**

- NHDC와 GNHDC 섭취군 모두에서 Ctrl 대조군 대비 공복혈당이 감소하는 경향을 확인함. 2주차에서 유의적인 감소가 나타났으나, 3주차 이후 유의성이 나타나지 않음. 이를 통해 물질이 단기간의 혈당 조절 능력은 보이지만, 장기간으로 이어지지 않는 것으로 보임 (Figure IV-36A).
- 두 섭취군 모두에서 경구 포도당 투여에 따른 혈당 회복능력은 개선되지 않았음을 확인함. 유의적인 공복혈당 감소와는 달리, OGTT AUC 분석 결과 Ctrl 대조군 대비 개선 효과를 확인할 수 없음 (Figure IV-36B).

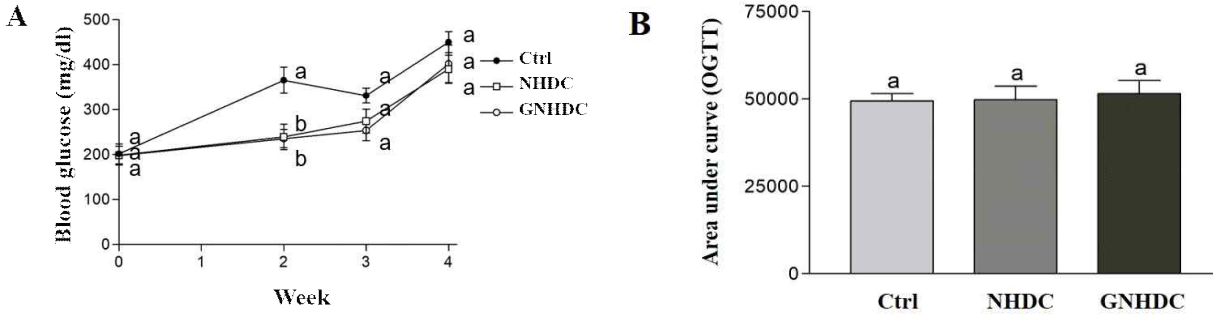


Figure IV-36. Effects on blood glucose levels and OGTT in db/db mice.

A. Blood glucose levels were measured for 4 weeks. B. OGTT was performed after 2 weeks and AUC was calculated. All data were presented with mean ± SEM and analyzed by one-way ANOVA with Newman-Keuls test. Each alphabet letter indicates significant difference each other ($P < 0.05$). Ctrl, db/db mice control; NHDC, db/db mice with neohesperidin dihydrochalcone supplementation; GNHDC, db/db mice with glycosyl NHDC supplementation.

▪ **조직 무게 측정 및 tissue histopathology 관찰**

- NHDC와 GNHDC 섭취군 모두에서 Ctrl 대조군 대비 피하지방 조직의 무게가 유의적으로 감소함을 확인함. 두 섭취군 모두에서 간 조직의 무게는 감소하는 경향을 확인하였으나, 유의성이 도출되지는 않음 (Table IV-5).

Table IV-5. Effects on tissue weight in db/db mice.

	Ctrl	NHDC	GNHDC
Subcutaneous adipose tissues (g)	2.46 ± 0.47 ^a	1.27 ± 0.16 ^b	1.49 ± 0.19 ^b
Total adipose tissues (g)	5.66 ± 0.49 ^a	4.42 ± 0.20 ^b	4.57 ± 0.24 ^b
Liver tissues (g)	2.31 ± 0.05 ^a	2.13 ± 0.09 ^a	2.08 ± 0.12 ^a

All data were presented with mean ± SEM and analyzed by one-way ANOVA with Newman-Keuls test. Each alphabet letter indicates significant difference each other ($P < 0.05$). Ctrl, db/db mice control; NHDC, db/db mice with neohesperidin dihydrochalcone supplementation; GNHDC, db/db mice with glycosyl NHDC supplementation.

- 두 섭취군 모두에서 Ctrl 대조군 대비 피하지방 조직에서의 지방구 크기가 유의적으로 감소함을 확인함. H&E Staining 분석 결과를 통해 adipocyte area를 측정하여 비교함 (Figure IV-37).

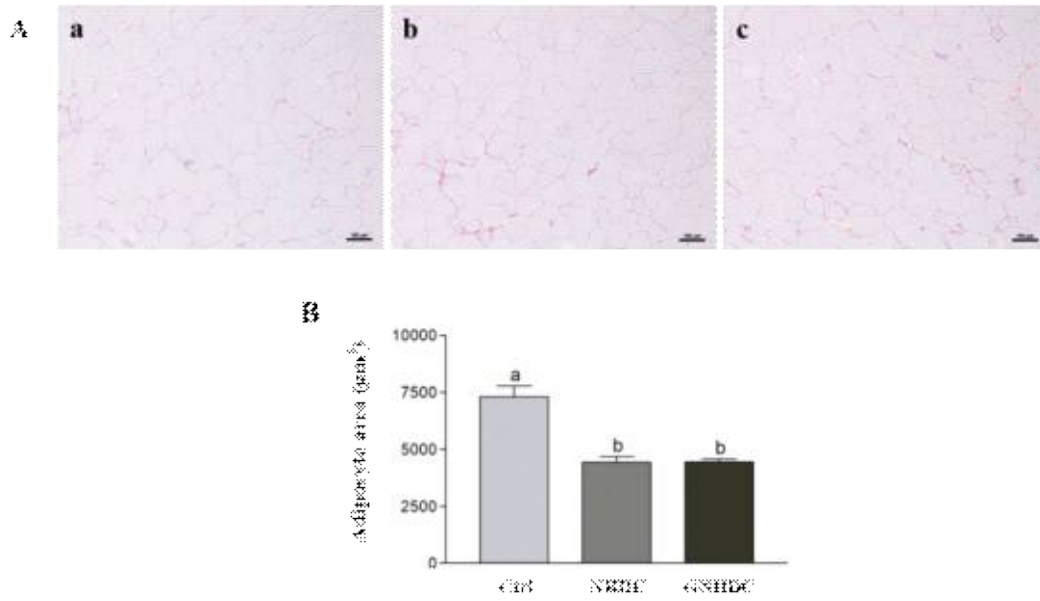


Figure IV-37. Effects on adipocyte area of subcutaneous adipose tissues.

A. Subcutaneous adipose tissues of (a) Ctrl, (b) NHDC, and (c) GNHDC were assessed by H&E staining. B. Adipocyte area of subcutaneous adipose tissues was calculated. All data were presented with mean \pm SEM and analyzed by one-way ANOVA with Newman-Keuls test. Each alphabet letter indicates significant difference each other ($p < 0.05$). Ctrl, db/db mice control; NHDC, db/db mice with neohesperidin dihydrochalcone supplementation; GNHDC, db/db mice with glycosyl NHDC supplementation.

- 두 섭취군 모두에서 Ctrl 대조군 대비 간 조직에서의 지방구 크기와 중성지방이 감소하는 경향을 확인하였으나, 유의성이 도출되지는 않음 (Figure IV-38).

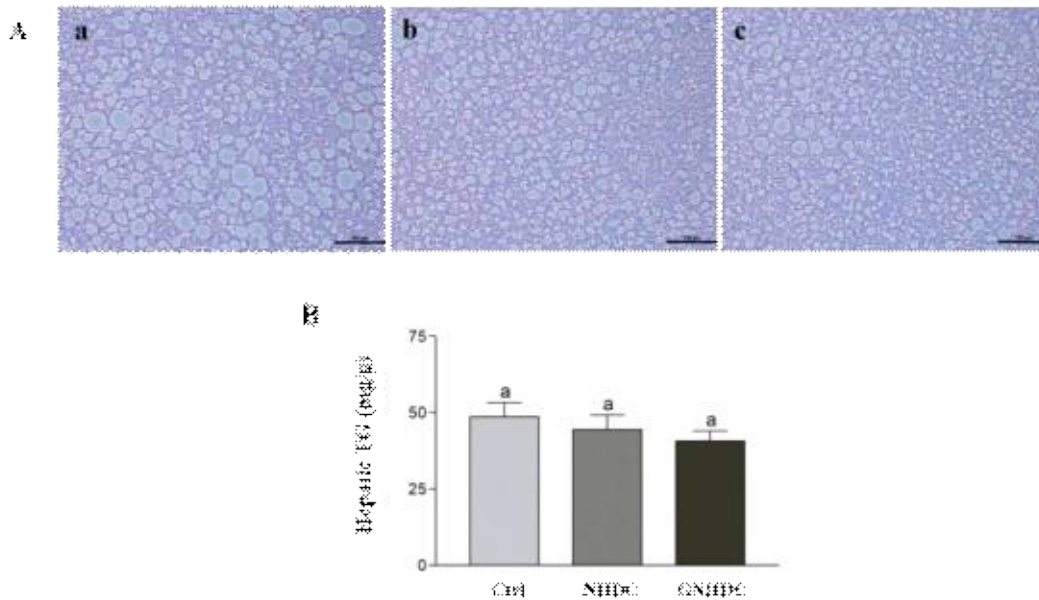


Figure IV-38. Effects on hepatic triglyceride in liver tissues.

A. Liver tissues of (a) Ctrl, (b) NHDC, and (c) GNHDC were assessed by H&E staining. B. Hepatic triglyceride was quantified. All data were presented with mean \pm SEM and analyzed by one-way ANOVA with Newman-Keuls test. Each alphabet letter indicates significant difference each other ($P < 0.05$). TG, triglyceride; Ctrl, db/db mice control; NHDC, db/db mice with neohesperidin dihydrochalcone supplementation; GNHDC, db/db mice with glycosyl NHDC supplementation.

▪ 호르몬 및 lipid profile 측정

- GNHDC 섭취군에서 Ctrl 대조군 대비 비에스테르화 유리 지방산과 총 콜레스테롤이 유의적으로 감소함을 확인함. NHDC 섭취군에서는 감소하는 경향을 확인하였으나, 유의성이 도출되지는 않음 (Table IV-6).
- GNHDC 섭취군에서 Ctrl 대조군 대비 렙틴이 감소하고, 아디포넥틴이 증가하는 경향이 나타남. 반대로 NHDC 섭취군에서는 Ctrl 대조군 대비 렙틴이 증가하고, 아디포넥틴이 감소하는 경향이 나타남. 두 섭취군에서 모두 유의성이 도출되지는 않음.
- GNHDC 섭취군에서 Ctrl 대조군 대비 인슐린이 감소하는 경향이 나타났으며, 반대로 NHDC 섭취군에서는 Ctrl 대조군 대비 인슐린이 증가하는 경향이 나타남. NHDC 섭취군에서만 유의적 결과가 나타남. 이는 장기간으로 이어지지 않은 혈당 조절 능력과 일치하는 결과로 보임.

Table IV-6. Effects on lipid profiles and cytokines in db/db mice.

	Ctrl	NHDC	GNHDC
NEFA (mEq/l)	0.73 ± 0.04 ^a	0.63 ± 0.02 ^a	0.61 ± 0.04 ^b
Total cholesterol (mg/dl)	159.39 ± 3.60 ^a	158.81 ± 2.57 ^a	146.17 ± 4.03 ^b
LDL-cholesterol (mg/dl)	76.50 ± 4.80 ^a	73.47 ± 2.06 ^a	61.29 ± 6.37 ^a
HDL-cholesterol (mg/dl)	53.54 ± 3.02 ^a	53.82 ± 2.10 ^a	54.77 ± 5.21 ^a
Triglyceride (mg/dl)	146.78 ± 3.77 ^a	157.61 ± 7.09 ^a	149.91 ± 11.81 ^a
Leptin (ng/dl)	30.05 ± 1.24 ^a	31.27 ± 1.74 ^a	25.67 ± 3.37 ^a
Adiponectin (ng/dl)	0.54 ± 0.02 ^{ab}	0.50 ± 0.02 ^a	0.62 ± 0.04 ^b
Insulin (ng/dl)	1.77 ± 0.28 ^a	2.95 ± 0.36 ^b	1.42 ± 0.24 ^a

All data were presented with mean ± SEM and analyzed by one-way ANOVA with Newman-Keuls test. Each alphabet letter indicates significant difference each other ($P < 0.05$). NEFA, non-esterified fatty acid; Ctrl, db/db mice control; NHDC, db/db mice with neohesperidin dihydrochalcone supplementation; GNHDC, db/db mice with glycosyl NHDC supplementation.

■ 지방 조직에서의 비만 대사 기전 규명

- GNHDC 섭취군에서 Ctrl 대조군 대비 Cd36의 발현이 유의적으로 감소함을 확인함. NHDC 섭취군에서는 큰 표준오차로 인하여 유의성이 도출되지 않음 (Figure IV-39A).
- GNHDC 섭취군에서 Ctrl 대조군 대비 Lpl의 발현이 유의적으로 감소함을 확인함. NHDC 섭취군에서는 큰 표준오차로 인하여 유의성이 도출되지 않음 (Figure IV-39B).

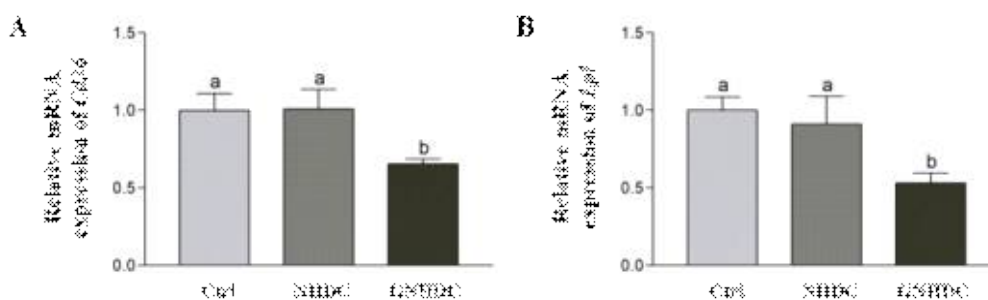


Figure IV-39. Effects on fatty acid uptake in subcutaneous adipose tissues.

Expression of mRNA was assessed for (A) Cd36 and (B) Lpl. All data were presented with mean ± SEM and analyzed by one-way ANOVA with Newman-Keuls test. Each alphabet letter indicates significant difference each other ($P < 0.05$). Cd36, cluster of differentiation 36; Lpl, lipoprotein lipase; Ctrl, db/db mice control; NHDC, db/db mice with neohesperidin dihydrochalcone supplementation; GNHDC, db/db mice with glycosyl NHDC supplementation.

- NHDC와 GNHDC 섭취군 모두에서 Ctrl 대조군 대비 Ppar γ 의 발현이 감소하는 경향을 확인하였으나, 유의성이 도출되지 않음 (Figure IV-40A).
- NHDC와 GNHDC 섭취군 모두에서 Ctrl 대조군 대비 C/ebp α 의 발현이 감소하는 경향을 확인하였으나, 유의성이 도출되지 않음 (Figure IV-40B).

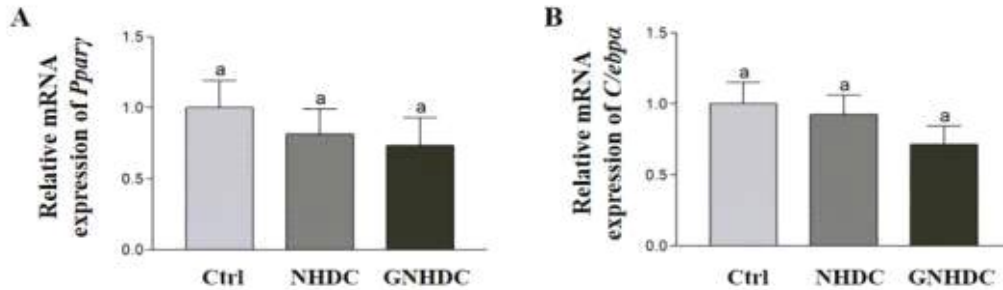


Figure IV-40. Effects on adipogenesis in subcutaneous adipose tissues.

Expression of mRNA was assessed for (A) Ppar γ and (B) C/ebp α . All data were presented with mean \pm SEM and analyzed by one-way ANOVA with Newman-Keuls test. Each alphabet letter indicates significant difference each other ($P < 0.05$). C/ebp α , CCAAT/enhancer binding protein alpha; Ppar γ , peroxisome proliferator-activated receptor gamma; Ctrl, db/db mice control; NHDC, db/db mice with neohesperidin dihydrochalcone supplementation; GNHDC, db/db mice with glycosyl NHDC supplementation.

- GNHDC 섭취군에서 Ctrl 대조군 대비 Srebp1c의 발현이 유의적으로 감소하는 경향을 확인하였으나, NHDC 섭취군에서는 큰 표준오차로 인하여 유의성이 도출되지 않음 (Figure IV-41A).
- GNHDC 섭취군에서 Ctrl 대조군 대비 Fas의 발현이 유의적으로 감소하는 경향을 확인하였으나, NHDC 섭취군에서는 큰 표준오차로 인하여 유의성이 도출되지 않음 (Figure IV-41B).

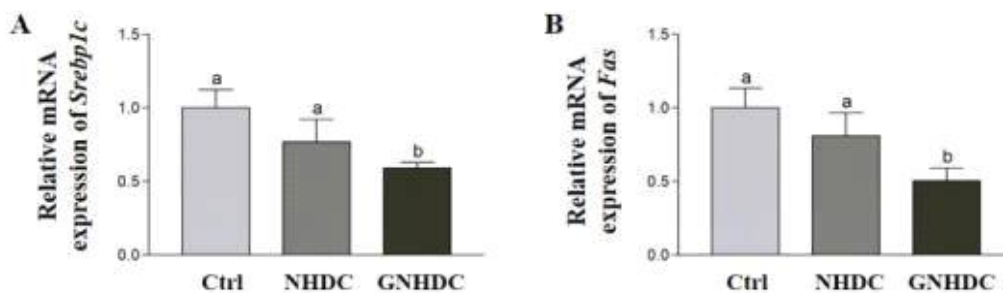


Figure IV-41. Effects on lipogenesis in subcutaneous adipose tissues.

Expression of mRNA was assessed for (A) Srebp1c and (B) Fas. All data were presented with mean \pm SEM and analyzed by one-way ANOVA with Newman-Keuls test. Each alphabet letter indicates significant difference each other ($P < 0.05$). Fas, fatty acid synthase; Srebp1c, sterol regulatory element-binding protein 1; Ctrl, db/db mice control; NHDC, db/db mice with neohesperidin dihydrochalcone supplementation; GNHDC, db/db mice with glycosyl NHDC supplementation.

- NHDC와 GNHDC 섭취군 모두에서 Ctrl 대조군 대비 Hsl의 발현이 유의적으로 다르지 않음을 확인함 (Figure IV-42).

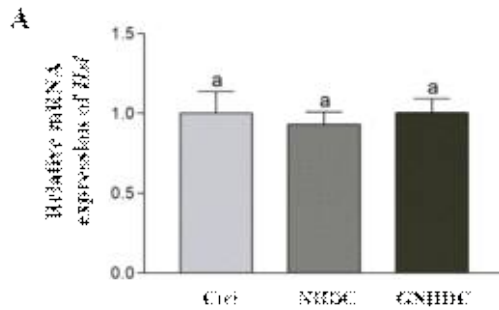


Figure IV-42. Effects on lipolysis in subcutaneous adipose tissues.

Expression of mRNA was assessed for (A) Hsl. All data were presented with mean \pm SEM and analyzed by one-way ANOVA with Newman-Keuls test. Each alphabet letter indicates significant difference each other ($P < 0.05$). Hsl, hormone sensitive lipase; Ctrl, db/db mice control; NHDC, db/db mice with neohesperidin dihydrochalcone supplementation; GNHDC, db/db mice with glycosyl NHDC supplementation.

- NHDC와 GNHDC 섭취군 모두에서 Ctrl 대조군 대비 Acs1의 발현이 유의적으로 증가함을 확인함 (Figure IV-43A).
- NHDC와 GNHDC 섭취군 모두에서 Ctrl 대조군 대비 Acox1의 발현이 대체로 증가하는 경향을 확인하였으나, 유의성이 도출되지는 않음 (Figure IV-43B).
- GNHDC 섭취군에서 Ctrl 대조군 대비 Cpt1 α 의 발현이 유의적으로 증가함을 확인함. NHDC 섭취군에서는 큰 표준오차로 인하여 유의성이 도출되지 않음 (Figure IV-43C).

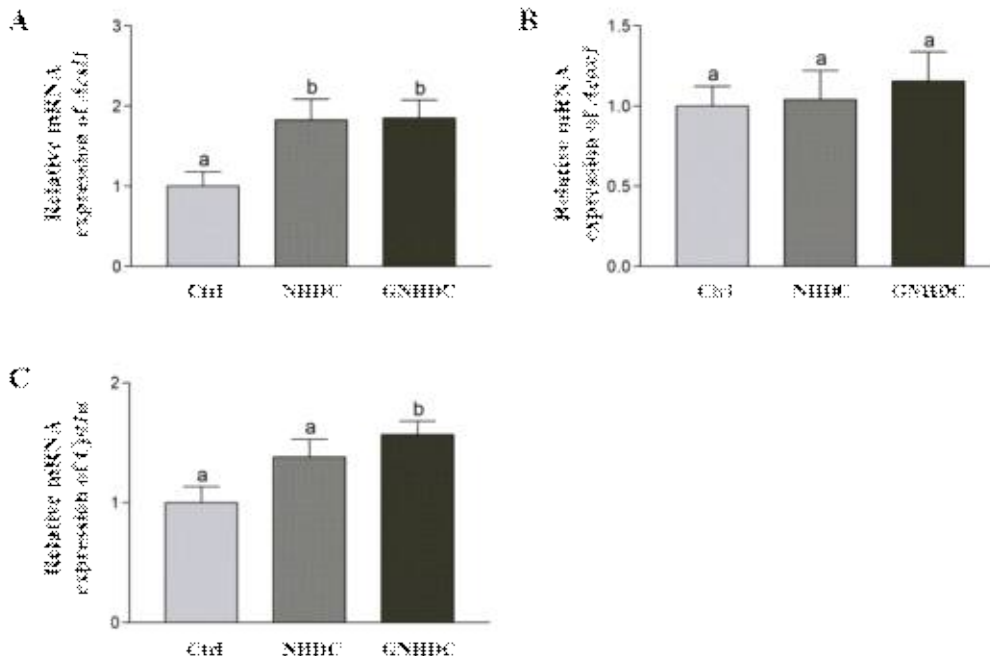


Figure IV-43. Effects on β -oxidation in subcutaneous adipose tissues.

Expression of mRNA was assessed for (A) Acs1, (B) Acox1, and (C) Cpt1 α . All data were presented with mean \pm SEM and analyzed by one-way ANOVA with Newman-Keuls test. Each alphabet letter indicates significant difference each other ($P < 0.05$). Acox1, acyl-CoA oxidase 1; Acs1, acyl-CoA synthetase long-chain family member 1; Cpt1 α , carnitine palmitoyltransferase 1 alpha; Ctrl, db/db mice control; NHDC, db/db mice with neohesperidin dihydrochalcone supplementation; GNHDC, db/db mice with glycosyl NHDC supplementation.

- NHDC와 GNHDC 섭취군 모두에서 Ctrl 대조군 대비 Ucp1의 발현이 유의적으로 증가함을 확인함 (Figure IV-44A).
- GNHDC 섭취군에서 Ctrl 대조군 대비 Pgc1 α 의 발현이 유의적으로 증가함을 확인함. NHDC 섭취군에서는 큰 표준오차로 인하여 유의성이 도출되지 않음 (Figure IV-44B).
- NHDC와 GNHDC 섭취군 모두에서 Ctrl 대조군 대비 Prdm16의 발현이 유의적으로 증가함을 확인함 (Figure IV-44C).

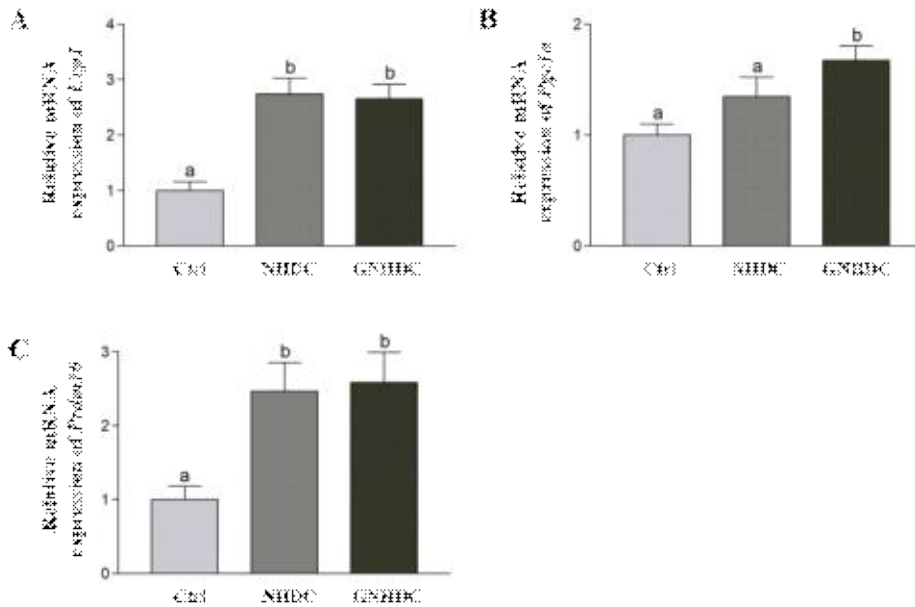


Figure IV-44. Effects on fat browning in subcutaneous adipose tissues.

Expression of mRNA was assessed for (A) Ucp1, (B) Pgc1 α . and (C) Prdm16. All data were presented with mean \pm SEM and analyzed by one-way ANOVA with Newman-Keuls test. Each alphabet letter indicates significant difference each other ($P < 0.05$). Pgc1 α , peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1 alpha; Prdm16, positive regulatory domain 16; Ucp1, uncoupling protein 1; Ctrl, db/db mice control; NHDC, db/db mice with neohesperidin dihydrochalcone supplementation; GNHDC, db/db mice with glycosyl NHDC supplementation.

[3차년도]

1. 신규감미소재 혼합물의 in vitro 단맛수용체 활성측정 system과 관능검사 감미특성과의 상관성 분석

1.1. in vivo ob/ob 마우스 모델을 이용한 stevioside 및 NHDC 당전이체 혼합물의 항비만, 항당뇨 및 항염증 기능성 평가 및 분자적 기전 규명

1.1.1. 실험방법

○ in vitro 단맛수용체 활성측정 system을 이용한 신규고감미소재 혼합물의 단맛수용체 활성 측정

▪ in vitro human 단맛수용체 활성 측정 시스템 구축

- 단맛 기여도 고려 배합 비율 측정

- ✓ 신규 고감미소재 혼합물에 따른 단맛수용체 활성 변화를 측정하기 위해 단맛 기여도를 고려한 배합 비율 방식을 적용함. Positive control인 sucrose의 최대 활성 10 (100 mM)을 기준으로 9 (90 mM), 7 (70 mM), 5 (50 mM), 3 (30 mM), 1 (10 mM), 0 (0 mM) 각각의 유사한 활성을 나타내는 감미소재의 농도를 receptor-ligand binding 시스템을 고려한 relative potency (sucrose EC50/sweetener EC50)를 활용하여 계산함.

- 신규 고감미소재 혼합물 배합 비율에 따른 단맛수용체 활성 변화 측정

- ✓ TAS1R3 stable cell에 TAS1R2와 Gα15를 transient transfection시켜 단맛수용체를 동시에 발현시킨 후, 신규고감미소재 혼합물을 여러 배합 비율로 처리하여 calcium mobilization을 수행함. 이를 통해 단맛 감각 특성에 따른 단맛수용체의 활성 변화를 분석함.

- 신규 고감미소재 혼합물의 in vitro 단맛수용체 활성과 관능 감미특성과의 상관성 분석

- ✓ in vitro human 단맛수용체 활성 측정 system을 통한 신규 고감미소재 혼합물의 affinity assay로부터 계산된 relative fluorescence unit과 관능검사를 통한 단맛 감미특성과 상관관계를 확인하기 위해 sucrose 10 대비 신규감미소재 혼합물의 relative fluorescence unit 값을 나눈 ratio 과 sucrose 10 대비신규 감미소재 혼합물의 관능 단맛 값을 나눈 ratio를 상관분석을 적용하여 조사함.

○ in vivo ob/ob 마우스 모델을 이용한 신규감미소재 혼합물의 항비만, 항당뇨 및 항염증 기능성 평가 및 분자적 기전 규명

▪ in vivo ob/ob 마우스모델을 이용한 stevioside 및 NHDC 당전이체 혼합물의 항비만, 항당뇨 및 항염증 모델 구축

- 식이섭취량, 식수섭취량 및 체중 측정

- ✓ 5주령 C57BL/6J 및 C57BL/6J-ob/ob 마우스를 Ctrl 대조군(normal ctrl), OB 대조군(obesity ctrl), Reb A 섭취군, NHDC 섭취군, COMB 섭취군(combination of RebA and NHDC) 으로 배정함.
- ✓ 해당 실험에서는 9일간의 적응기간 후, 체중 및 공복혈당을 고려하여 랜덤으로 나누고 그룹을 설정하여 진행함. Ctrl 대조군 및 OB 대조군은 각각 PBS를, RebA와 NHDC 섭취군은 시료를 각각 50mg/kg, 100mg/kg 씩 경구 투여함. COMB 섭취군은 RebA 50mg/kg 및 NHDC 100mg/kg을 혼합하여 경구 투여함.
- ✓ 4주의 전체 실험 기간 중 일주일에 2회씩 식이섭취량, 식수섭취량 및 체중을 측정하여 그룹별로 차이를 비교함.

- **혈당 측정 및 Oral glucose tolerance test (OGTT) 분석**

- ✓ 실험 3주차에 12시간 공복 후, 마우스 꼬리 정맥의 혈액을 채취하여 OGTT 분석을 시행하였음. 각 킬로그램 무게 단위 당 1 g의 포도당을 경구 투여하여 0, 30, 60, 90, 120분 뒤 혈액을 채취하여 혈당을 측정함. 혈당 변화 곡선을 바탕으로 Area under curve (AUC)를 계산하여 RebA, NHDC, COMB 섭취군의 혈당 회복능력을 평가함.

- **조직 무게 측정 및 tissue histopathology 관찰**

- ✓ 희생 시 마우스의 피하지방, 신장지방 조직과 간 조직을 분리하여 무게를 측정함. 해부 시 적출한 조직을 포르말린에 고정시킨 뒤 H&E Staining을 통해 조직학적인 변화들을 관찰함. 현미경을 통해 각 조직의 지방구 크기와 모양을 관찰하였고 피하지방의 경우, adipocyte area를 계산하여 그룹별로 차이를 비교함.

- **호르몬 및 lipid profile 측정**

- ✓ 희생 시 얻은 간 조직 내에서의 TG level뿐 아니라, 혈장에서 총 콜레스테롤, TG, LDL-콜레스테롤, HDL-콜레스테롤을 측정하여 lipid profile을 분석함. ELISA kit를 이용하여 leptin 호르몬 수치를 측정하였음. 또한 간수치를 나타내는 GOT (glutamic pyruvic transaminase), GPT (glutamic oxaloacetic transaminase)을 측정함.

- **간 조직에서의 당 및 비만 대사 기전 규명**

- ✓ 간 조직에서 RNA를 분리하여 샘플을 얻은 후, 비만 대사 관련 유전자의 발현 정도를 분석함. 지방 세포 분화 단계에서 중요한 역할을 하는 PPAR γ , aP2 및 지방 생합성을 조절하는 FAS, ACC의 발현을 측정함. 지방산화에 관여하는 PPAR α , ACO와 당 신생합성에 관여하는 효소인 G6Pase의 발현을 RT-PCR로 측정함. 모든 분석에서의 loading control로는 GAPDH가 사용되었음.

- **간 조직에서의 염증 마커 확인**

- ✓ 마우스의 간 조직에서 MCP-1, IL1 β 의 발현을 RT-PCR을 통해 확인함. Loading control로는 GAPDH가 사용됨.

- **신규감미소재 혼합물이 대장미생물 군집에 미치는 영향 규명**

- ✓ 희생 전날 마우스의 분변을 채취하여 soil genomic DNA assay kit를 이용하여 DNA를 추출함. DNA의 quality를 확인한 후, 16s rRNA amplicon Sequencing을 진행함. 이를 통해 각 군의 microbial compositional 차이를 확인하고 PICRUSt 예측 프로그램을 통해 그룹 별로 OB 대조군과 비교하여 유의미하게 차이를 보일 것으로 예상되는 대사경로를 분석함.

1.1.2. 실험결과

○ in vitro human 단맛수용체 활성 측정 시스템 구축

▪ 단맛 기여도 고려 배합 비율 측정

- 감미소재별 EC50와 relative potency 값을 활용하여 계산하면 sucrose 10 (100 mM)과 유사한 활성을 나타내기 위해 G-Reb A 10의 경우 100 mM/934.92 (G-Reb A relative potency) = 107 uM 농도임 (Table IV-7).
- 예시) sucrose : G-Reb A = 10 (100 mM) : 0 (0 uM), 9 (90 mM) : 1 (11 uM), 7 (70 mM) : 3 (32 uM), 5 (50mM) : 5 (54 uM), 3 (30 mM) : 7 (75 uM), 1 (10 mM) : 9 (96 uM), 0 (0 mM) : 10 (107uM)임.

Table IV-7. Relative potency of sweeteners to sucrose in affinity assay.

Sweeteners	EC50	Relative potency ¹ in affinity assay relative to sucrose
Sucrose	26 mM	1.00
G-Reb A	27.81 uM	934.92
G-NHDC	8.255 uM	3,149.61
Aspartame	56.51 uM	460.10
Saccharin	171.6 uM	151.52
Acesulfame K	178.8 uM	145.41

¹Relative potency = EC50 in affinity assay (sucrose)/EC50 in affinity assay (compound)

▪ 신규고감미소재 혼합물 배합 비율에 따른 단맛수용체 활성 변화 측정

- Stevioside 및 NHDC 당전이체와 bulk 감미료 혼합물 조합의 단맛수용체 활성 변화 비교

- ✓ G-Reb A 및 G-NHDC와 sucrose를 10 : 0, 9 : 1, 7 : 3, 5 : 5, 3 : 7, 1 : 9, 0 : 10의 여러 배합 비율의 혼합물 처리로 변화하는 calcium flux에 따른 Ca²⁺-bound dye 340 nm 파장이 증가 및 Ca²⁺-unbound dye 380 nm 파장이 감소로 생겨나는 피크를 확인함.
- ✓ G-Reb A가 열세하게 작용하여 sucrose 배합 비율의 portion이 증가할수록 ratio가 증가함 (Figure IV-45A).
- ✓ G-NHDC가 열세하게 작용하여 sucrose 배합 비율의 portion이 증가할수록 ratio가 증가함 (Figure IV-45B).

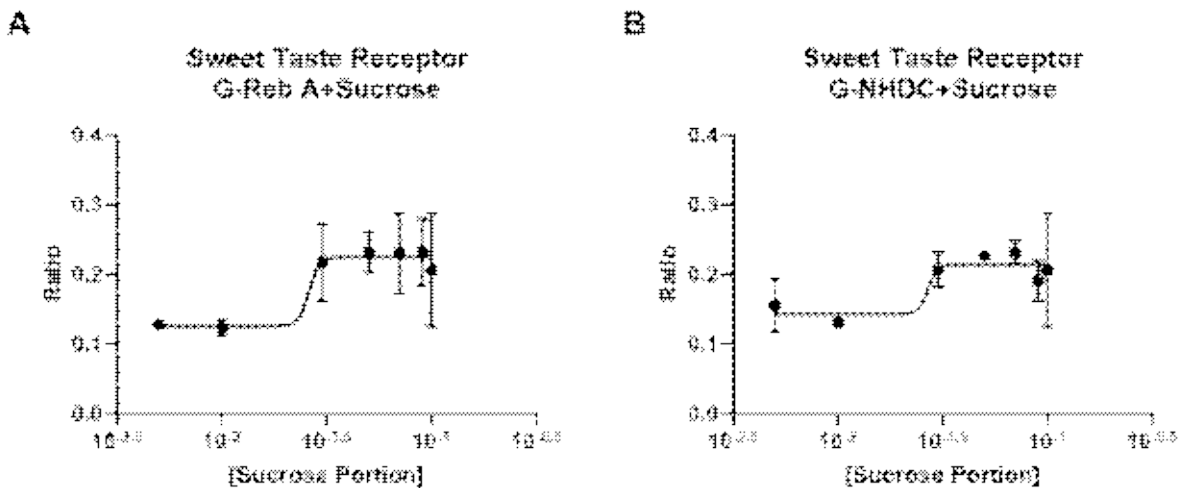


Figure IV-45. Addition of responses by bulk sweeteners mixing ratio.

A. Activity in fluorescence ratio (ratio of the fluorescence at 340 nm and 380 nm) analysis using sweet taste receptor subunits expressed cells upon G-Reb A and sucrose mixing ratio. B. Activity in fluorescence ratio (ratio of the fluorescence at 340 nm and 380 nm) analysis using sweet taste receptor subunits expressed cells upon G-NHDC and sucrose mixing ratio. The normalized sensor sensitivity was increased as the proportion of sucrose increased. G-NHDC, Glycosyl neohesperidin dihydrochalcone.

- Stevioside 및 NHDC 당전이체와 고감미료 혼합물 조합의 단맛수용체 활성 변화 비교

- ✓ G-Reb A 및 G-NHDC와 saccharin, aspartame, acesulfame K를 10 : 0, 9 : 1, 7 : 3, 5 : 5, 3 : 7, 1 : 9, 0 : 10의 여러 배합 비율의 혼합물 처리로 변화하는 calcium flux에 따른 Ca^{2+} -bound dye 340 nm 파장이 증가 및 Ca^{2+} -unbound dye 380 nm 파장이 감소로 생겨나는 피크를 확인함.
- ✓ G-Reb A가 열세하게 작용하여 saccharin 배합 비율의 portion이 증가할수록 ratio가 증가함 (Figure IV-46A).
- ✓ G-Reb A가 열세하게 작용하여 G-NHDC 배합 비율의 portion이 증가할수록 ratio가 증가함 (Figure IV-46B).
- ✓ G-Reb A가 열세하게 작용하여 aspartame 배합 비율의 portion이 증가할수록 ratio가 증가함 (Figure IV-46C).
- ✓ G-Reb A가 우세하게 작용하여 acesulfame K 배합 비율의 portion이 증가할수록 ratio가 감소함 (Figure IV-46D).
- ✓ 고감미료간의 2종 혼합 시, 배합 비율이 증가할수록 단맛 ratio에 영향을 주는 감미료는 saccharin (0.489 ratio), G-NHDC (0.284 ratio), aspartame (0.268 ratio), G-Reb A (0.226 ratio), acesulfame K (0.170 ratio) 순임.

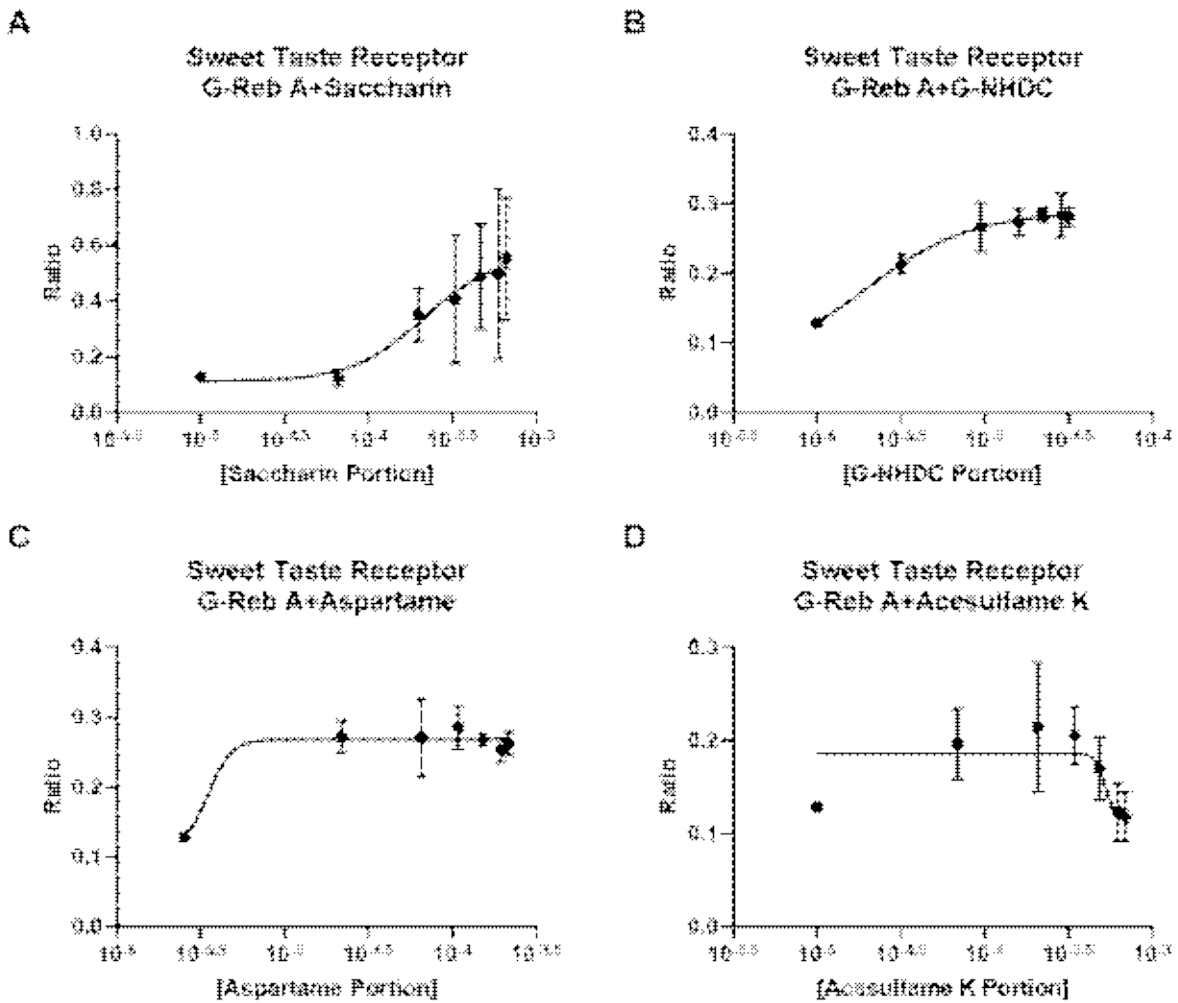


Figure IV-46. Mixing ratio by combining two high-intensity sweeteners

A. Activity in fluorescence ratio (ratio of the fluorescence at 340 nm and 380 nm) analysis using sweet taste receptor subunits expressed cells upon G-Reb A and saccharin mixing ratio. B. Activity in fluorescence ratio (ratio of the fluorescence at 340 nm and 380 nm) analysis using sweet taste receptor subunits expressed cells upon G-Reb A and G-NHDC mixing ratio. C. Activity in fluorescence ratio (ratio of the fluorescence at 340 nm and 380 nm) analysis using sweet taste receptor subunits expressed cells upon G-Reb A and aspartame mixing ratio. D. Activity in fluorescence ratio (ratio of the fluorescence at 340 nm and 380 nm) analysis using sweet taste receptor subunits expressed cells upon G-Reb A and acesulfame K mixing ratio. The normalized sensor sensitivity was increased as the proportion of various high-intensity sweeteners increased. G-NHDC, Glycosyl neohesperidin dihydrochalcone.

- 신규고감미소재 혼합물의 in vitro 단맛수용체 활성과 관능 감미특성과의 상관성 분석
 - Sucrose 10 기준값 대비 신규감미소재 혼합물의 affinity assay로부터 계산된 relative fluorescence unit값을 나눈 ratio와 관능 단맛 값을 나눈 ratio를 상관분석을 적용하여 조사한 결과, 상관계수 $r=0.7016$ 로 강한 양의 상관관계를 가짐을 확인함 (Figure IV-47).

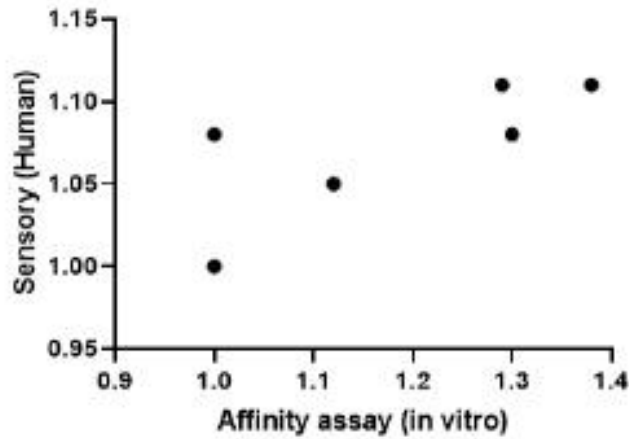


Figure IV-47. Correlation analysis between relative fluorescence unit in affinity assay and their sensory qualities values.

Ratio of calculated G-Reb A + sucrose, G-Reb A + G-NHDC, G-Reb A + aspartame, G-Reb A + acesulfame K to sucrose 10 by human sweet taste receptor and by human sensory evaluation showed positive correlation.

Log numbers of calculated relative potency of sucrose, saccharin, D-fructose, NHDC to sucrose by human sweet taste receptor and mean MRS (molar relative sweetness) values showed positive correlation. G-NHDC, Glycosyl neohesperidin dihydrochalcone.

○ in vivo ob/ob 마우스모델을 이용한 stevioside와 NHDC 당전이체 혼합물의 항비만, 항당뇨 및 항염증 모델 구축

▪ 식이섭취량, 식수섭취량 및 체중 측정

- 식이섭취량과 식수섭취량을 측정하여 비교한 결과, RebA, NHDC, COMB 모든 섭취군에서 OB 대조군과 비교했을 때 유의미한 결과는 관찰하지 못함 (Table IV-8).
- 식이섭취량을 바탕으로 산출한 식이 효율의 경우, NHDC 및 COMB 섭취군에서 유의적으로 감소하는 결과를 보임.
- 체중의 경우, NHDC, COMB 그룹은 OB 그룹에 비해 유의적으로 감소하였고, RebA 군은 감소하는 경향성을 보였음. 특히 체중 증가량은 모든 감미료군에서 OB 군에 비해 유의적 감소를 보임.
- FER도 NHDC, COMB 그룹에서 OB 군에 비해 유의적으로 감소함.

Table IV-8. Effects on food intake, water intake, and body weight in ob/ob mice.

	Ctrl	OB	RebA	NHDC	COMB
Final body weight (g)	24.41±0.22 ^a	38.39±0.52 ^b	35.39±0.92 ^{bc}	34.37±1.23 ^c	32.89±1.36 ^c
Body weight gain (g)	3.55±0.22 ^a	7.12±0.42 ^b	4.96±0.60 ^{abc}	3.79±0.70 ^{ac}	2.83±1.03 ^{ac}
Food intake (g/day)	3.64±0.07 ^a	6.44±0.45 ^a	5.80±0.20 ^a	6.11±0.29 ^a	6.34±0.22 ^a
Water intake (ml/day)	6.29±0.65 ^a	23.37±5.17 ^b	17.79±1.58 ^b	20±2.52 ^b	20.29±1.65 ^b
FER (%)	3.77±0.23 ^{ab}	4.55±0.29 ^a	3.20±0.41 ^{ab}	2.34±0.48 ^b	1.77±0.59 ^b

All data were presented with mean ± SEM and analyzed by one-way ANOVA with Tukey-test. Each alphabet letter indicates significant difference each other ($P < 0.05$). Ctrl, normal mice control; OB, ob/ob mice control; RebA, ob/ob mice with RebA supplement; NHDC, ob/ob mice with NHDC supplement; COMB, ob/ob mice with a combination of RebA and NHDC supplement.

▪ **혈당 측정 및 OGTT 분석**

- 공복혈당 및 OGTT AUC 분석 결과, OB 대조군 대비 RebA, NHDC, COMB 섭취군에서 혈당차이가 없었음 (Figure IV-48).

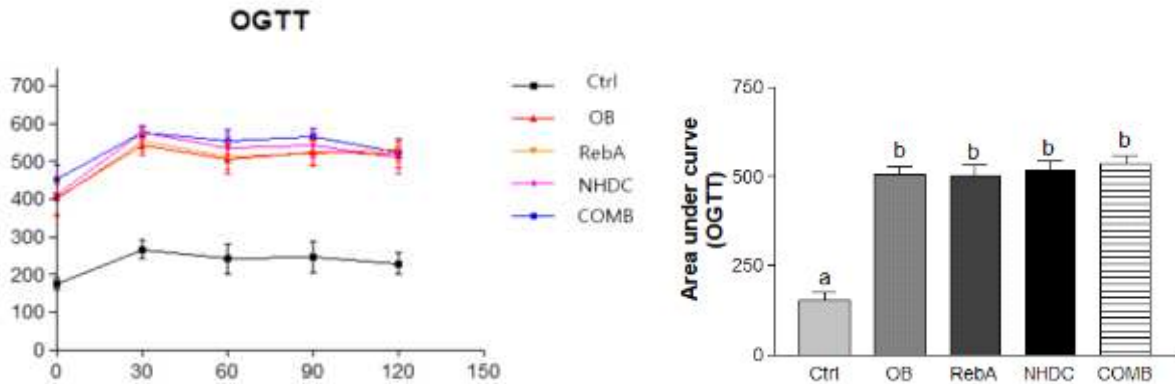


Figure IV-48. Effects on blood glucose levels and OGTT in ob/ob mice.

A. OGTT was measured for every 30 minutes for 2 hours. B. OGTT area under curve was calculated. All data were presented with mean ± SEM and analyzed by one-way ANOVA with Tukey-test. Each alphabet letter indicates significant difference each other ($P < 0.05$). Ctrl, normal mice control; OB, ob/ob mice control; RebA, ob/ob mice with RebA supplementation; NHDC, ob/ob mice with NHDC supplementation; COMB, ob/ob mice with a combination of RebA and NHDC supplementation.

▪ **조직 무게 측정 및 tissue histopathology 관찰**

- 피하지방 조직 및 신장지방 조직의 무게가 COMB 섭취군에서 OB ctrl 대조군 대비 유의적으로 감소했음을 관찰함. 간 조직의 무게는 감소하는 경향성을 확인하였으나 유의성은 도출되지 않았음 (Table IV-9).
- RebA 및 NHDC 섭취군에서는 OB ctrl 대조군 대비 각 조직 무게가 감소하는 경향성을 보임. 특히 RebA의 경우 신장지방 조직 무게가 유의적으로 감소했음.

Table IV-9. Effects on tissue weight in ob/ob mice.

	Ctrl	OB	RebA	NHDC	COMB
Subcutaneous adipose tissues (g)	0.14±0.02 ^a	2.11±0.12 ^b	1.62±0.12 ^{bc}	1.58±0.16 ^{bc}	1.43±0.14 ^c
Perirenal adipose tissues (g)	0.04±0.01 ^a	1.19±0.09 ^b	0.83±0.06 ^c	0.89±0.12 ^{bc}	0.75±0.05 ^c
Liver tissues (g)	0.77±0.02 ^a	2.63±0.13 ^b	2.46±0.16 ^b	2.11±0.22 ^b	2.09±0.19 ^b

All data were presented with mean ± SEM and analyzed by one-way ANOVA with Tukey-test. Each alphabet letter indicates significant difference each other ($P < 0.05$). Ctrl, normal mice control; OB, ob/ob mice control; RebA, ob/ob mice with RebA supplementation; NHDC, ob/ob mice with NHDC supplementation; COMB, ob/ob mice with a combination of RebA and NHDC supplementation.

- 피하지방 및 간 조직의 H&E staining 분석결과를 통해 tissue histopathology를 관찰함. 피하지방 조직의 adipocyte area를 측정된 결과, RebA, NHDC, COMB 모든 섭취군에서 지방구 크기가 OB ctrl 대조군 대비 유의적으로 감소했음을 확인함 (Figure IV-49).

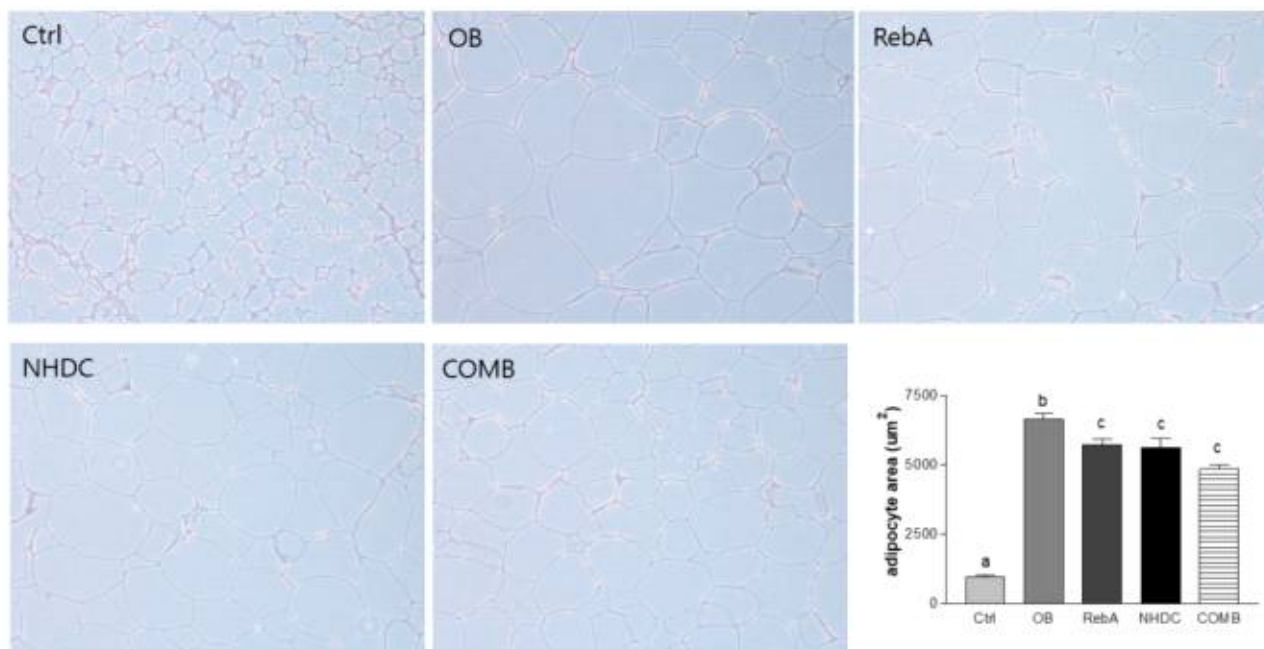


Figure IV- 49. Effects on adipocyte area of subcutaneous adipose tissues.

A. Subcutaneous adipose tissues of (a) Ctrl, (b) OB, (c) RebA, (d) NHDC and (e) COMB were assessed by H&E staining. B. Adipocyte area of subcutaneous adipose tissues was calculated. All data were presented with mean ± SEM and analyzed by one-way ANOVA with Tukey-test. Each alphabet letter indicates significant difference each other ($P < 0.05$). Ctrl, normal mice control; OB, ob/ob mice control; RebA, ob/ob mice with RebA supplementation; NHDC, ob/ob mice with NHDC supplementation; COMB, ob/ob mice with a combination of RebA and NHDC supplementation.

- 간 조직에서는 지방구 크기 및 수가 감소하였으며, hepatic TG 측정을 통해 해당 수치가 COMB 섭취군에서 유의적으로 감소했음을 확인함. 한편, RebA 및 NHDC 섭취군은 감소하는 경향성을 나타내었지만 유의성이 도출되지는 않음 (Figure IV-50).

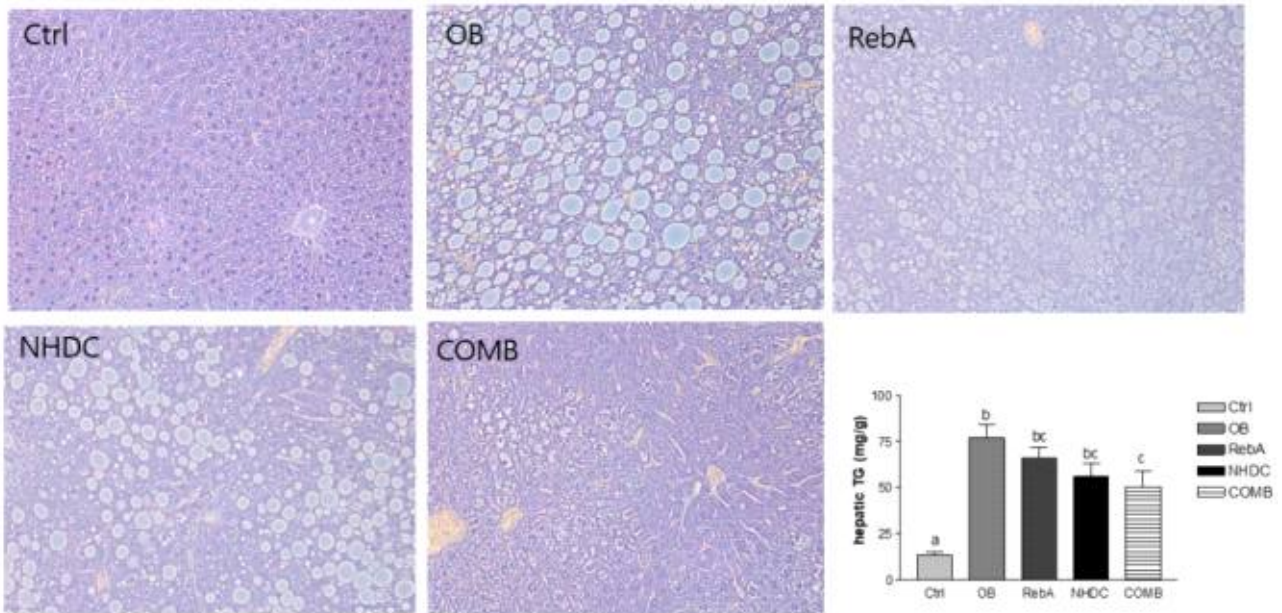


Figure IV-50. Effects on hepatic triglyceride in liver tissues.

A. Liver tissues of (a) Ctrl, (b) OB, (c) RebA, (d) NHDC and (e) COMB were assessed by H&E staining. B. Hepatic triglyceride was measured. All data were presented with mean \pm SEM and analyzed by one-way ANOVA with Tukey-test. Each alphabet letter indicates significant difference each other ($P < 0.05$). Ctrl, normal mice control; OB, ob/ob mice control; RebA, ob/ob mice with RebA supplementation; NHDC, ob/ob mice with NHDC supplementation; COMB, ob/ob mice with a combination of RebA and NHDC supplementation.

▪ 호르몬 및 lipid profile 측정

- 혈장에서 측정한 Total cholesterol, LDL-cholesterol, Triglyceride의 경우 각 섭취군들이 OB 대조군 대비 감소하는 경향을 나타냈으며, HDL-cholesterol은 증가하는 경향을 나타내었으나 큰 표준편차로 유의성을 도출되지는 않음 (Table IV-10).
- ELISA로 측정한 leptin 수치는 OB 대조군 대비 COMB 섭취군에서 유의적으로 감소했음을 관찰함.
- 간 기능 지표인 GPT와 GOT에서 OB 대조군 대비 COMB 섭취군에서 유의적인 차이를 나타냄. RebA 섭취군은 각 지표에서 경향성을 보였으며, NHDC 섭취군은 GOT에서 유의성을 보임.

Table IV-10. Effects on lipid profiles and cytokines in ob/ob mice.

	Ctrl	OB	RebA	NHDC	COMB
GPT	46.78±4.11 ^a	92.70±5.60 ^b	82.20±2.28 ^{bc}	77.00±6.06 ^{bc}	71.67±4.67 ^c
GOT	96.23±15.44 ^a	260.6±14.89 ^b	216.61±7.25 ^{bc}	211.16±7.14 ^c	201.50±8.49 ^{ac}
Total cholesterol (mg/dl)	109.78±4.60 ^a	212.6±12.07 ^a	209.61±10.22 ^a	201.21±13.41 ^a	189.57±13.86 ^a
LDL-cholesterol (mg/dl)	26.13±3.31 ^a	107.66±12.56 ^b	97.90±8.15 ^b	89.42±11.04 ^b	80.65±8.39 ^b
HDL-cholesterol (mg/dl)	66.92±2.60 ^a	84.33±2.46 ^{ab}	91.28±2.80 ^b	89.74±5.65 ^b	90.34±8.31 ^b
Triglyceride (mg/dl)	83.63±1.30 ^a	103.16±4.41 ^b	102.15± 2.83 ^b	92.62±3.66 ^{ab}	92.88±3.94 ^{ab}
Letptin (mg/dl)	0.56±0.11 ^a	1.06±0.60 ^a	0.68±0.11 ^a	0.33±0.13 ^a	0.03±0.05 ^b

All data were presented with mean ± SEM and analyzed by one-way ANOVA with Tukey-test. Each alphabet letter indicates significant difference each other ($P < 0.05$). GPT, glutamic oxaloacetic transaminase; GOT, glutamic pyruvic transaminase; Ctrl, normal mice control; OB, ob/ob mice control; RebA, ob/ob mice with RebA supplementation; NHDC, ob/ob mice with NHDC supplementation; COMB, ob/ob mice with a combination of RebA and NHDC supplementation.

▪ 간 조직에서의 비만 대사 기전 규명

- COMB 섭취군에서 Ctrl 대조군 대비 lipogenesis 마커인 ACC, FAS, PPAR γ 의 발현이 모두 유의적으로 감소함을 확인함.
- aP2 마커에서는 발현이 감소되는 경향성을 나타내었지만, 유의성은 도출되지 않음 (Figure IV-51).
- RebA 및 NHDC 섭취군에서는 해당 마커들의 발현이 감소하는 경향을 보였지만, 큰 표준오차로 인하여 유의성이 도출되지 않음.

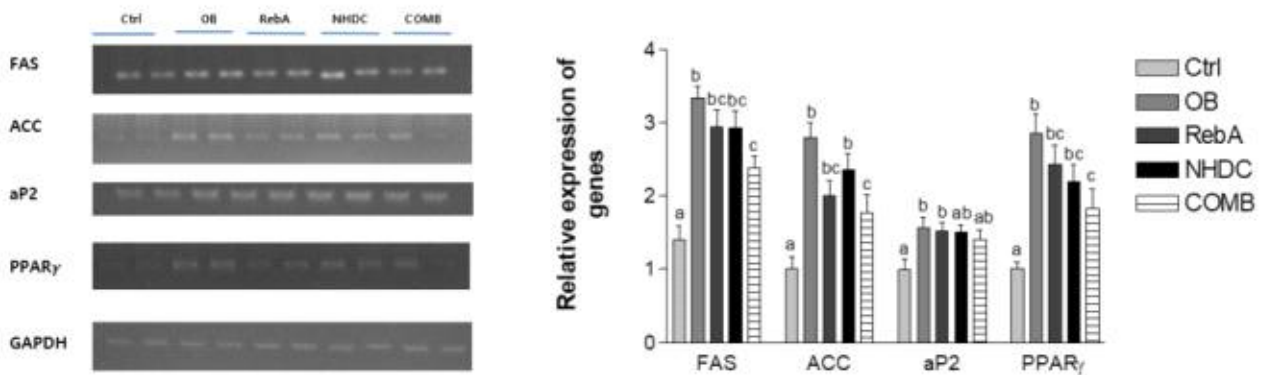


Figure IV-51. Effects on lipogenesis in liver tissues.

Expression of mRNA was assessed for FAS, ACC, aP2 and PPAR_γ. All data were presented with mean ± SEM and analyzed by one-way ANOVA with Tukey-test. Each alphabet letter indicates significant difference each other ($P < 0.05$). FAS, fatty acid synthase; ACC, acetyl-CoA carboxylase; aP2, adipocyte fatty acid binding protein 2; PPAR_γ; peroxisome proliferator-activated receptor; Ctrl, normal mice control; OB, ob/ob mice control; RebA, ob/ob mice with RebA supplementation; NHDC, ob/ob mice with NHDC supplementation; COMB, ob/ob mice with a combination of RebA and NHDC supplementation .

- RebA, NHDC, COMB 섭취군 모두에서 OB 대조군 대비 beta-oxidation 마커인 PPAR_α의 발현이 증가함을 확인함. 특히 COMB 섭취군에서 유의적인 발현 차이를 보임 (Figure IV-52).
- RebA, NHDC, COMB 섭취군 모두에서 ACO 발현은 OB 대조군 대비 차이가 나타나지 않음.

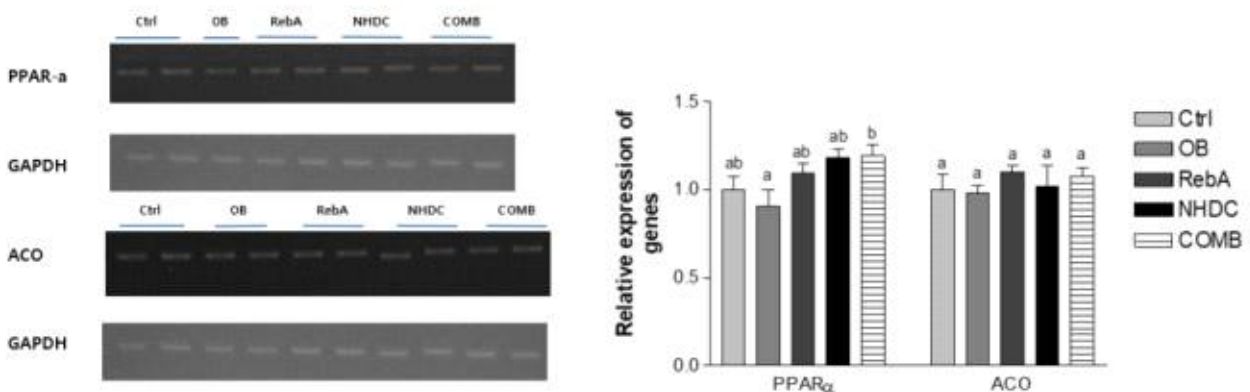


Figure IV-52. Effects on β-oxidation in liver tissues.

Expression of mRNA was assessed for PPAR_α and ACO. All data were presented with mean ± SEM and analyzed by one-way ANOVA with Tukey-test. Each alphabet letter indicates significant difference each other ($P < 0.05$). PPAR_α, peroxisome proliferator-activated receptor; ACO, acyl-CoA oxidase; Ctrl, normal mice control; OB, ob/ob mice control; RebA, ob/ob mice with RebA supplementation; NHDC, ob/ob mice with NHDC supplementation; COMB, ob/ob mice with a combination of RebA and NHDC supplementation.

■ 간 조직에서의 염증 마커 확인

- proinflammatory cytokine, IL1β 발현의 경우, OB 대조군의 큰 표준 오차로 그룹 간 유의성이 도출되지 않았음 (Figure IV-53).
- RebA 섭취군과 COMB 섭취군에서 mcp1 발현이 OB 대조군에 비해 유의적으로 감소되었음을 확인함.

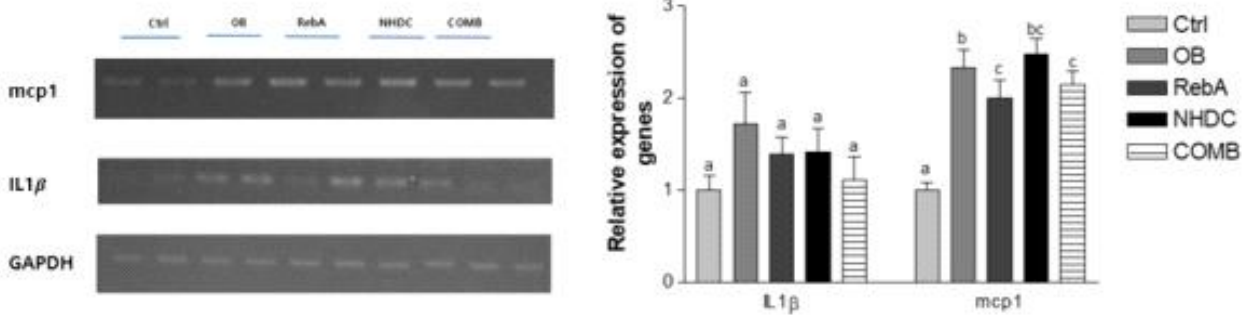


Figure IV-53. Effects on hepatic inflammation in liver tissues.

Expression of mRNA was assessed for mcp1 and IL1 β . All data were presented with mean \pm SEM and analyzed by one-way ANOVA with Turkey test. Each alphabet letter indicates significant difference each other ($P < 0.05$). mcp1, Monocyte chemoattracted protein-1; IL1 β , Interleukin 1 Beta; Ctrl, normal mice control; OB, ob/ob mice control; RebA, ob/ob mice with RebA supplementation; NHDC, ob/ob mice with NHDC supplementation; COMB, ob/ob mice with a combination of RebA and NHDC supplementation.

▪ 간 조직에서의 당 대사 기전 규명

- OB 대조군에 비해 RebA, NHDC, COMB 섭취군에서 G6pase 발현이 감소하는 경향을 나타냈음을 확인함. 모든 섭취군에서 유의성을 도출하지는 못함 (Figure IV-54).

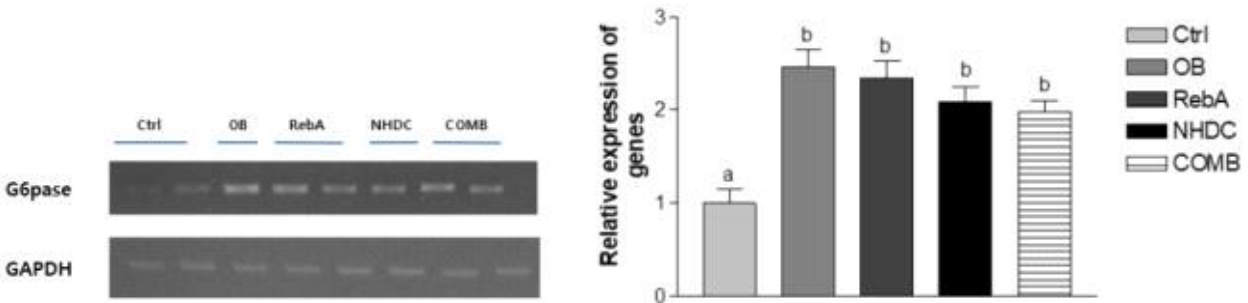


Figure IV- 54. Effects on gluconeogenesis in liver tissues.

Expression of mRNA was assessed for G6Pase. All data were presented with mean \pm SEM and analyzed by one-way ANOVA with Turkey test. Each alphabet letter indicates significant difference each other ($P < 0.05$). G6Pase, Glucose-6-phosphatase; Ctrl, normal mice control; OB, ob/ob mice control; RebA, ob/ob mice with RebA supplementation; NHDC, ob/ob mice with NHDC supplementation; COMB, ob/ob mice with a combination of RebA and NHDC supplementation.

▪ ob/ob 마우스에서 신규감미소재 혼합물이 대장미생물 군집에 미치는 영향 규명

- OB 대조군에 비해 NHDC 섭취군에서 *Firmicutes.g_Faecalibaculum*가 유의적으로 감소한 반면, *Bacteroidota.g_Parabateroides* 및 *Firmicutes.g_Blautia*는 유의적으로 증가한 것으로 관찰됨 (Figure IV-55).
- COMB 섭취군의 경우에는 OB 대조군에 비해 *Firmicutes.g_Faecalibaculum*, *Deferribaterota.g_Mucispirillum*가 유의적으로 감소함. *Firmicutes.g_Blautia*, *Bacteroidota.g_Parabacteroides*는 유의적으로 증가한 것으로 확인됨.

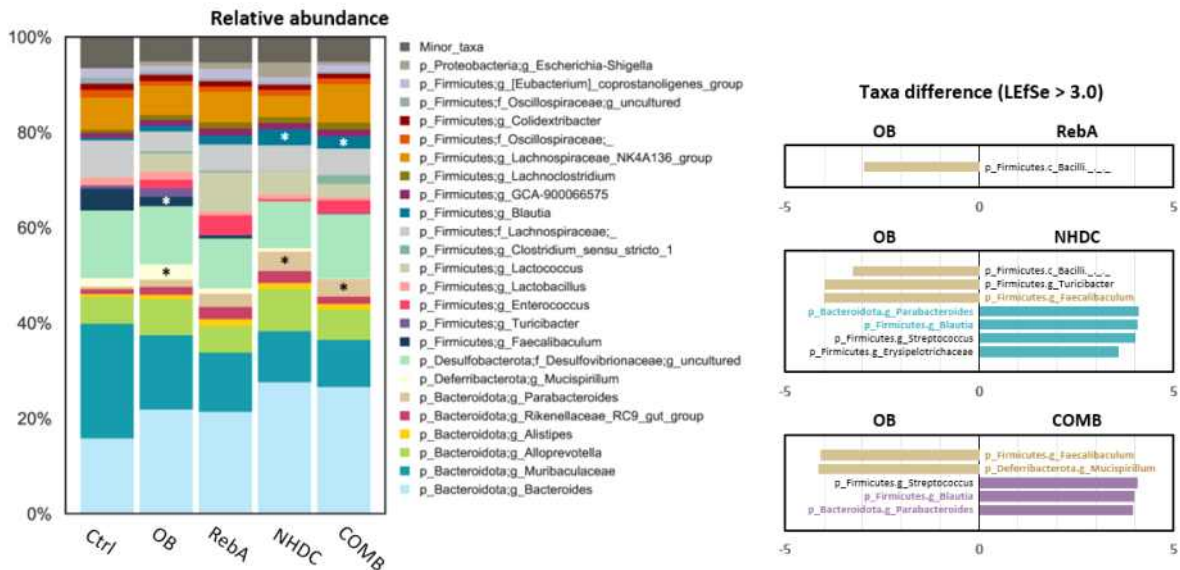


Figure IV-55. Relative abundance of gut microbiome.

Each alphabet letter indicates significant difference each other ($P < 0.05$). Ctrl, normal mice control; OB, ob/ob mice control; RebA, ob/ob mice with RebA supplementation; NHDC, ob/ob mice with NHDC supplementation; COMB, ob/ob mice with a combination of RebA and NHDC supplementation.

- 예측모델 프로그램 (PICUSt2)을 통해 그룹 간 미생물 기능 변화를 예측함 (Figure IV-56).
- OB 대조군과 NHDC 섭취군 사이에서는 lipotic acid metabolism, COMB 섭취군 사이에서는 pyruvate metabolism 이 유의미하게 차이나는 것으로 분석됨.

• Predicted functional difference

PICRUSt2 results (OB vs. RebA; LEfSe > 2.0)

L1	L2	L3	OB	p-value	RebA
No significant difference					

PICRUSt2 results (OB vs. NHDC; LEfSe > 2.0)

L1	L2	L3	OB	p-value	NHDC
Metabolism	Metabolism of cofactors and vitamins	Lipoic acid metabolism		0.037	3.052

PICRUSt2 results (OB vs. COMB; LEfSe > 2.0)

L1	L2	L3	OB	p-value	COMB
Metabolism	Carbohydrate metabolism	Pyruvate metabolism		0.037	2.554

Figure IV-56. PICRUSt-based metabolic difference analyses.

Each alphabet letter indicates significant difference each other ($P < 0.05$). Ctrl, normal mice control; OB, ob/ob mice control; RebA, ob/ob mice with RebA supplementation; NHDC, ob/ob mice with NHDC supplementation; COMB, ob/ob mice with a combination of RebA and NHDC supplementation.

3. 연구개발과제의 수행 결과 및 목표 달성 정도

1) 연구수행 결과

(1) 정성적 연구개발성과

연구기관	세부과제명	세부연구목표	연구개발 수행내용	연구결과
제 1세부 (서울대학교)	[1차년도] 최적 천연 혼합 감미료 개발을 위한 스테비오사이드 당전이체의 종합적 감미 특성 및 배합시의 향미 증진 효과 분석	신규 스테비오사이드당전이체의 감미특성 및 혼합물의 감미질 향상효과 규명	시료별 상대 당도 측정	• 상대 당도 측정 방법 (2-AFC)를 활용한 5% 설탕 수용액 대비 상대당도 규명
			시료별 감미 특성 측정	• 감미질 측정 방법(QDA)를 활용하여 상대당도 방법 (2-AFC)에서 규명한 5% 설탕 대비 시료별 5% 상대당도 수용액의 감미질을 설탕 및 고감미 감미료 2종, bulk 감미료 2종과 혼합한 혼합물 4종의 감미질과 비교 분석함
			혼합물의 감미질 측정	
	[2차년도] 최적 천연 혼합 감미료 개발을 위 한 NHDC 당전이 체와 스테비오사 이드 당전이체의 종합적 감미 특성 및 배합시의 향미 증진 효과 분석	신규 스테비오사이드당전이체 의 감미특성 및 혼합물의 감 미질 향상효과 규명	신규 스테비오사이드 당전이 체의 상대당도 규명	• 상대 당도 측정 방법 (2-AFC)를 활용한 7% 설탕 수용액 대비 상 대당도 규명
			신규 스테비오사이드 당전이 체 및 혼합물의 감미질 측정	• 묘사분석을 활용하여 신규 스테비 오사이드 7% 상대당도 수용액의 감미질을 설탕, 고감미 감미료 3 종, 저열량 감미료 2종과 혼합물 2종 비교 분석
			G-reb A와 bulk 감미료 혼 합물의 최적 혼합비를 규명	• 순위검사를 이용하여 5% 설탕 수 용액의 상대당도에 해당하는 신규 스테비오사이드 당전이체 1종과 저열량 감미료(설탕, 말티톨, 에리 스리톨)를 혼합한 혼합물의 최적 혼합비를 규명
			G-reb A와 bulk 감미료 혼 합물의 감각특성 측정	• 묘사분석을 활용하여 5% 설탕 수 용액에 해당하는 신규 스테비오사 이드 당전이체 1종과, 저열량 감 미료 3종(설탕, 말티톨, 에리스리 톨)의 단일 감미료와 이들을 각각 3:7 및 7:3으로 혼합한 혼합물의 감각특성 측정
		신규 NHDC 당전이체 및 스테 비오사이드당전이체의 감미특 성 및 조합물의 감미질 향상 효과 규명	신규 NHDC 당전이체 상 대당도 측정	• 상대 당도 측정 방법(2-AFC)를 이용하여 4농도 수준으로 제조된 설탕 용액 및 0.03% NHDC 당전이체 수용액과 동일한 상대당도 규명
			신규 NHDC 당전이체-스테 비오사이드 당전이체 혼합물 의 감미 특성 분석	• NHDC 당전이체와 스테비오이체 또는 저열량 감미료의 설탕 10% 수용액에 해당하는 2성분 혼합물의 감미상승/ 억제 효과를 규명하여 각 혼합물의 감미 특성을 분석함.
			신규 NHDC 당전이체-저열 량 감미료 혼합물의 감미 특 성 분석	

연구기관	세부과제명	세부연구목표	연구개발 수행내용	연구결과
제 1세부 (서울대학교)	[3차년도] NHDC 당전이체와 스테비오사이드 기반 신규 감미료의 식품 적용시 감미 특성 및 기호성 규명	신규 NHDC당전이체의 식품 적용시 감미 특성 및 소비자 기호성 분석	NHDC 당 전이체와 Reb A 또는 저열량 감미료 조합을 적용한 당 저감 요구르트의 감미 특성 및 소비자 기호성 분석	<ul style="list-style-type: none"> 7종의 감미료 조합을 적용, 상대 당도 7% 수준의 기존 대비 50-70% 당 저감 요구르트 배합비를 개발하였음. 소비자 기호도 및 CATA 검사 결과 7종 감미료 조합 모두 설탕과 유사한 전반적 기호도와 감각 특성 나타내었음.
			NHDC 당 전이체와 Reb A 또는 저열량 감미료 조합을 적용한 당 저감 밀크티 감미 특성 및 소비자 기호성 분석	<ul style="list-style-type: none"> 7종의 감미료 조합을 적용, 상대 당도 7% 수준의 기존 대비 50-70% 밀크티 배합비를 개발하였음. 소비자 기호도 및 CATA 검사 결과 7종 감미료 조합 모두 설탕과 유사한 감각 특성과 기호도를 나타내었음.
		스테비오사이드의 식품 적용시 감미 특성 분석	스테비오사이드 기반 감미료 및 저열량 감미료 조합을 적용한 당 저감 레모네이드의 감미 특성과 소비자 기호성 분석	<ul style="list-style-type: none"> Reb A, M, D 등과 에리스리톨, 말티톨 조합 감미료를 적용, 상대 당도 7% 수준의 기존 대비 100% 당 저감 레모네이드 배합비를 개발하였음. 묘사분석 및 소비자 기호도 검사 결과 당전이 Reb A와 말티톨 조합의 감각 특성과 기호도가 설탕과 가장 유사하였음.
			스테비오사이드 기반 감미료 및 저열량 감미료 조합을 적용한 두유라떼의 감미 특성과 소비자 기호성 분석	<ul style="list-style-type: none"> Reb A, M, D 등과 에리스리톨, 말티톨 조합 감미료를 적용, 상대 당도 10% 수준의 기존 대비 100% 당 저감 두유라떼 배합비를 개발하였음. 소비자 기호도 및 CATA 검사 결과 Reb A와 말티톨 조합의 감각 특성과 기호도가 설탕과 가장 유사하였음.
			스테비오사이드 기반 감미료 및 저열량 감미료 조합을 적용한 가향 두유의 감미 특성과 소비자 기호성 분석	<ul style="list-style-type: none"> Reb A, M과 바닐라/초콜렛 향을 적용, 상대당도 7% 수준의 기존 대비 100% 당 저감 가향 두유 배합비를 개발하였음. 묘사분석 및 소비자 기호도 검사 결과 초콜렛 가향 Reb M두유는 같은 향의 설탕 두유와 기호도 및 감각특성이 유사하였음.
			스테비오사이드 기반 감미료 및 저열량 감미료 조합을 적용한 가향 우유의 감미 특성과 소비자 기호성 분석	<ul style="list-style-type: none"> Reb A, M과 바닐라/초콜렛 향을 적용, 상대당도 7% 수준의 기존 대비 100% 당 저감 가향 두유 배합비를 개발하였음. 묘사분석 및 소비자 기호도 검사 결과 초콜렛 가향 Reb M두유는 같은 향의 설탕 두유와 기호도 및 감각특성이 유사하였음.
		신규 감미료를 당류 50% 저감 수준으로 적용한 최저당 함량 제품 도출	Table top 설탕을 대체할 수 있는 NHDC 당전이체와 Reb A 조합 table-top sweetener 개발	<ul style="list-style-type: none"> g-NHDC + Rebaudioside A + maltodextrin 조합 table-top sweetener 개발 (당 50% 저감 효과) g-NHDC + Sucrose + maltodextrin 조합 table-top sweetener 개발 (당 30% 저감 효과)
			개발된 table-top sweetener의 소비자 기호도 분석	<ul style="list-style-type: none"> 개발된 2종 tabletop sweetener의 기호도를 단독 또는 동반식품과 함께 설탕과 비교, 동반식품 제시 시 설탕과 동일 기호도를 나타냄

연구기관	세부과제명	세부연구목표	연구개발 수행내용	연구결과
제 2세부 (서울대학교)	[1차년도] 바이오전환기술을 이용한 신규 고감미료 NHDC 당전이체 개발 및 특성규명	다양한 당전이 효소 및 기질 탐색	효소 4종 및 기질 4종 탐색	<ul style="list-style-type: none"> 비용 및 상용화 측면에서 가장 효율적인 상업적 효소인 CGTase 및 국내산 일품벼 쌀전분을 기질로 선정
		효소 및 기질 선별을 통한 효율적 NHDC 당전이체 생합성 조건 탐색	온도, 시간 및 효소/기질 비율 등	<ul style="list-style-type: none"> 반응 온도, 시간 및 효소, 기질 비율을 탐색하여 경제성이 있으며 최대 NHDC 당전이체를 생성할 수 있는 조건으로 선정
		preparative HPLC를 이용한 고순도 NHDC 당전이체 분리, 정제 조건 확립	용매 조성, 유속, 주입량 등	<ul style="list-style-type: none"> Recycling preparative HPLC를 이용하고 24% acetonitrile를 이용한 분리, 정제 조건을 확립하였음.
		NHDC 당전이체의 구조 동정을 위한 고순도 분리 및 정제	preparative HPLC를 이용한 당전이체 다수 고순도 분리 정제	<ul style="list-style-type: none"> 위의 확립된 분리, 정제 조건에서 확립된 조건에서 당전이체 5종 이상을 99%이상 고순도로 분리, 정제하였음.
		NMR 및 LC-MS 등을 이용한 NHDC 당전이체의 구조 동정	NMR, LC-MS를 이용하여 구조 동정	<ul style="list-style-type: none"> NMR, LC-MS를 이용하여 효소에 의해 생성된 다양한 NHDC 당전이체의 구조를 동정하고, 주생성 물질의 구조는 효소를 이용한 분해로 확인.
	[2차년도]	신규 감미료 후보군 선정 및 최적화 생합성	1차년도 결과 생성된 다수의 NHDC 당전이체 중 신규 감미료 후보를 선정하여 최적화 생합성 조건 확립	<ul style="list-style-type: none"> NHDC 당전이체 중 물성이 뛰어나고 다량으로 생합성이 가능한 포도당 1개가 추가된 1-(4-((2-O-[6-Deoxy-α-L-mannopyranosyl)-(4-O-α-D-glucopyranosyl)-α-D-glucopyranosyl)oxy)-2,6-dihydroxyphenyl)-3-[3-hydroxy-4-methoxyphenyl]-1-propanone (glycosyl-NHDC)을 최종 생산할 신규 감미료로 선정함. 다수의 당이 전이된 당전이체에 대한 연속적 amyloglucosidase 처리로 해당 NHDC 당전이체 생전환율을 60% 이상으로 하는 조건을 확립하였음.
	NHDC 당전이체 생산공정 최적화, 대량공정화 및 이화학적 특성 분석	대량 생합성을 위한 최적화 생합성 공정 scale-up	단계적 scale-up을 통한 pilot scale 생합성 공정 확립	<ul style="list-style-type: none"> 실험실 scale 100배 용량인 4L 반응 대량 생합성 공정을 확립하였으며 생전환율은 55% 이상으로 확인됨.
		관능평가, <i>in vitro</i> 단맛수용체 및 기능성 평가를 위한 대량 제조(평가 소요량)	Preparative HPLC를 이용하여 대량 생합성 시료를 분리, 정제하여 공급	<ul style="list-style-type: none"> 1차년도 recycling을 이용한 정제는 용매 소모가 심하여 고순도 구간 1차 정제 및 저순도 구간 2차 정제를 통해 99% 고순도의 NHDC 당전이체를 1세부기관의 관능평가 및 2공동기관의 <i>in vivo</i> 기능성 평가를 위해 공급함.
		NHDC 당전이체의 이화학적 특성 5종 분석	내열성, 내산성, 내알칼리성, 수용해도 및 열적 특성 분석	<ul style="list-style-type: none"> Glycosyl NHDC은 산성 및 중성에서는 안정하였으나 알칼리에 매우 약하였고, 산성 및 중성에서는 60°C에서도 안정하였으나 알칼리에서는 6일에는 거의 전량 분해되었음.

연구기관	세부과제명	세부연구목표	연구개발 수행내용	연구결과
제 2세부 (서울대학교)	[3차년도] 국내산 감귤류로 부터 전구체의 추 출, NHDC 제조 및 정제 공정 최 적화	NHDC 전구체 추출 최적화 (추출 조건 3건 이상)	NHDC의 전구체인 나린진 및 네오헤스페리딘 용매 추 출 및 효소를 이용한 추출 최적화	<ul style="list-style-type: none"> 국내산 감귤류인 당유자 미숙과 과피를 재료로 반응표면분석 방법을 이용하여 추출액의 에탄올 함량 및 추출시간을 최적화하였으며, 상업적섬유분해효소인 Pectinex,Viscozyme, Shearzyme을 이용하여 추출 증진 방안을 모색하였음.
		최적추출조건에서 국내산 감 귤류 5종 전구체 함량 분석	최적 용매 추출 조건에서 국 내산 감귤류 5종의 나린진 및 네오헤스페리딘 함량을 조사	<ul style="list-style-type: none"> 국내산 당유자, 팔삭, 황금 하귤, 유자, 금귤 5종의 미숙과 과피에 존재하는 나린진과 네오헤스페리 딘 함량을 최적 용매 추출 조건인 80% 에탄올을 이용하여 40분간 추출하여 조사하였으며 당유자가 두 전구체 모두 함량이 가장 높았 으며 다음으로 팔삭, 황금하귤, 유자 순으로 함량이 높은 것으로 나타났음.
		정제 전구체를 활용한 NHDC 제조 공정 최적화	정제 네오헤스페리딘에 2N NaOH 및 Raney nickel 28% slurry를 농도별로 첨가 하여 1, 2, 3일간 반응시킴.	<ul style="list-style-type: none"> NHDC의 생성량은 Raney nickel slurry 첨가량 100uL~ 1mL 사이 에서 차이가 없었으며, 72시간 반 응시켰을 때 최대 생성량 89%를 나타내었음.

연구기관	세부과제명	세부연구목표	연구개발 수행내용	연구결과
제 1협동 (CJ제일제당)	[1차년도] 핵심 고감미료 소재 standard 및 당전이 활성 효소/균주 pool 확보	핵심 고감미료 소재 standard 및 당전이 활성 보유 효소/균주 pool 확보	천연 고감미료 표준품 확보 및 평가	<ul style="list-style-type: none"> Rebaudioside A, Rebaudioside D, Rebaudioside M 등 상용화 고순도 스테비아 및 효소처리스테비아 등 감미료 소재 4건 이상 확보 글로벌 표준 분석방법 확보하여 수집된 표준시료의 스테비올배당체 종류별 분리 분석법 수립
			당전이스테비아 품질 비교용 표준물질 제조	<ul style="list-style-type: none"> 감미도, 감미질, 이미-이취에 대한 품질 경쟁력 비교용 표준 당전이스테비아 제조 포도당전이 RebaudiosideA 및 포도당전이 스테비오사이드 제조 확보
			RebaudiosideD 전환 신규효소 탐색을 위한 pool 확보	<ul style="list-style-type: none"> UDP-glucose를 당 공여체로 하여 RebaudiosideA로부터 RebaudiosideD를 생합성하는 전환효소의 유전체 기반 탐색 당전이활성 보유 가능성 있는 미생물 및 genomic DNA pool 60종 이상 확보
	[2차년도] Rebaudioside-A로부터 Rebaudioside-D 전환 활성 보유 효소 선별 및 확보	Reb-A로부터 Reb-D 전환 활성 보유 효소 선별 및 확보	스테비올 배당체 분리 분석 조건 확보	<ul style="list-style-type: none"> 스테비올배당체 분리 수지(이온교환수지, 흡착수지) 탐색하여 고순도 분리정제 공정 개발 준비
			RebD 전환 유전체 및 미생물 pool 탐색	<ul style="list-style-type: none"> 후보 유전체 합성 및 단백질 생합성 효소 한계 전환을 평가, 기질 특이성 조사 및 최종 우량 효소 선정
			RebD 생합성 효소 발현 및 생전환 조건 최적화	<ul style="list-style-type: none"> 온도, 시간, pH, 염 등 조건에 따른 반응 최적화 최적 기질(원료) 선정 및 최대 전환을 평가
			생성물질 동정	<ul style="list-style-type: none"> 신규 확보 효소로부터 생합성 물질의 identification
			신규 확보 효소 서열 및 제조법의 지식재산권 확보	<ul style="list-style-type: none"> 신규 우수 활성 보유 효소 2종의 특허 출원
	[3차년도] 소반응/분리정제 scale-up, 시제품 제조 및 NHDC당전이체와 복합솔루션 개발	스테비올배당체 제조공정 및 복합솔루션 개발	효소 발현 시스템 개발 및 정제 효소 대비 생산성 효율 검토	<ul style="list-style-type: none"> 발현 벡터, 생산 균주에 따른 생산 효율 비교
			선발 당전이 효소 반응 조건 적용한 고순도 분리 정제 공정 개발	<ul style="list-style-type: none"> 탈색, 탈염, 크로마토분리, 흡착정제, 농축, 분말화
			개발 공정 시뮬레이션 통한 생산 효율성 및 수율 평가	<ul style="list-style-type: none"> 최적 Scale-up 공정 조합에 따른 cost 비교 및 생산 수율 산출
			스테비올배당체, 당전이NHDC 적용한 가공식품 시제품 개발	<ul style="list-style-type: none"> Table-top 분말 감미료, 탄산음료, 과즙음료, RTD 커피 4건의 당류 50% 저감 복합 포뮬러 개발 소비자 패널(90명) 대상 관능 선호도 조사하여 설탕과 유사 관능품질 구현
		시제품 4종의 영양성분 및 식품 안전지표 확보	<ul style="list-style-type: none"> 공인 분석기관 성적으로 당류 함량 저감과 안전성 확인함 	

연구기관	세부과제명	세부연구목표	연구개발 수행내용	연구결과	
제 2협동 (이화여대)	[1차년도] <i>in vitro</i> 단맛수용체 활성분석 및 <i>in vitro</i> 지방세포분화억제 와 항염증 효과 screening	<i>in vitro</i> 단맛수용체 활성 분석	<i>in vitro</i> 단맛수용체 활성 분석 system 구축	• Stable cell line을 이용한 <i>in vitro</i> human 단맛수용체 구축 및 활성 확인	
			스테비오사이드 신규감미물질 농도에 따른 단맛수용체 활성 평가 비교분석	• Rebaudioside A, glycosyl Rebaudioside A, G-stevia의 농도에 따른 단맛수용체 활성 비교 분석 및 EC50 확인	
		<i>in vitro</i> 지방세포분화억제 효과 screening	스테비오사이드 및 네오헤스페리딘 디하이드로칼콘 신규감미물질의 <i>in vitro</i> 지방세포분화억제 효과 스크리닝	• 3T3-L1 cell을 이용하여 Rebaudioside A, glycosyl Rebaudioside A, G-stevia, NHDC, glycosyl NHDC의 지방세포분화억제 효과를 morphology 관찰, lipid accumulation 측정, 지방세포분화관련 유전자 마커 RT-PCR로 확인	
	[2차년도] 신규감미물질의 단맛수용체의 활성분석 및 <i>in vivo</i> 항당뇨, 항염증 기능평가 및 분자적 기전 규명	<i>in vitro</i> 항염증 효과 screening	<i>in vitro</i> 항염증 효과 screening	스테비오사이드 및 네오헤스페리딘 디하이드로칼콘 신규감미물질의 <i>in vitro</i> 항염증 효과 스크리닝	• Raw264.7 cell을 이용하여 Rebaudioside A, glycosyl Rebaudioside A, G-stevia, NHDC, glycosyl NHDC의 항염증 효과를 NO production 측정, pro-inflammatory cytokine 및 mediator를 western blot, RT-PCR로 확인
				<i>in vitro</i> 단맛수용체 활성 분석	네오헤스페리딘 디하이드로칼콘 신규감미물질 농도에 따른 단맛수용체 활성 평가 비교분석
		<i>in vivo</i> 항당뇨, 항염증 기능 평가 및 분자적 기전 규명	스테비오사이드 신규감미물질의 <i>in vivo</i> 항당뇨, 항염증 기능 평가 및 분자적 기전 규명	네오헤스페리딘 디하이드로칼콘 신규감미물질의 <i>in vivo</i> 항당뇨 기능평가 및 분자적 기전 규명	• db/db 마우스모델을 이용하여 Rebaudioside A, glycosyl Rebaudioside A, G-stevia의 항당뇨, 항염증 효과를 혈당 측정, OGTT 분석, lipid profile 측정, 간 조직 및 피하지방 조직에서 당 및 비만대사, 염증관련 mediator를 western blot, RT-PCR로 확인 • db/db 마우스모델을 이용하여 NHDC, glycosyl NHDC의 항당뇨, 항염증 효과를 혈당 측정, OGTT 분석, 호르몬 및 lipid profile 측정, 피하지방 조직에서 비만대사관련 mediator를 RT-qPCR로 확인

연구기관	세부과제명	세부연구목표	연구개발 수행내용	연구결과
제 2협동 (이화여대)	[3차년도] 신규감미소재 혼합물의 <i>in vitro</i> 단맛수용체 활성측정 system과 관능검사 상대당도 상관성을 분석, <i>in vivo</i> 항비만, 항당뇨, 항염증 기능 평가 및 장관미생물 군집 영향 분석	<i>in vitro</i> 단맛수용체 활성측정 system과 관능검사 감미특성 과의 상관성 분석	스테비오사이드 및 네오헤스 페리딘 디하이드로칼콘 신규 감미물질 혼합물의 배합 비 율에 따른 단맛수용체 활성 평가 비교분석	glycosyl Rebaudioside A 및 glycosyl NHDC와의 bulk 감미료 및 high-intensity 감미료 혼합물 의 배합 비율에 따른 단맛수용체 활성 비교 분석
			스테비오사이드 및 네오헤스 페리딘 디하이드로칼콘 신규 감미물질 혼합물의 <i>in vitro</i> 단맛수용체 활성측정 system 과 관능검사 감미특성과의 상관성 분석	glycosyl Rebaudioside A 및 glycosyl NHDC와의 bulk 감미료 및 high-intensity 감미료 혼합물 의 배합 비율에 따른 단맛수용체 활성과 관능검사 감미특성과의 상 관관계 확인
		<i>in vivo</i> 항비만, 항당뇨, 항염 증 기능평가 및 분자적 기전 규명	스테비오사이드 및 네오헤스 페리딘 디하이드로칼콘 혼합 물의 <i>in vivo</i> 항비만, 항당뇨, 항염증 기능평가 및 분자적 기전 규명	ob/ob 마우스모델을 이용하여 Rebaudioside A, NHDC의 각각 및 혼합물의 항비만, 항당뇨, 항 염증 효과를 혈당 측정, OGTT 분석, lipid profile 측정, 간 조직 및 피하지방 조직에서 당 및 비만 대사, 염증관련 mediator를 western blot, RT-PCR로 확인, 대장미생물 군집 영향 확인

(2) 정량적 연구개발성과(해당 시 작성하며, 연구개발과제의 특성에 따라 수정이 가능합니다)

<정량적 연구개발성과표>

(단위 : 건, 천원)

성과지표명			연도		계	가중치 (%)	
			1차년 (19.04.01~19.12.31)	2차년 (20.01.01~21.04.30)			
전담기관 등록·기탁 지표 ¹⁾	논문 (SCI)	목표(단계별)	-	1	3	4	
		실적(누적)	-	1	5	5	
	논문 (비SCI)	목표(단계별)	-	1	1	2	
		실적(누적)	-	1	2	2	
	학술발표	목표(단계별)	-	3	3	6	2
		실적(누적)	-	4	8	8	
	특허출원	목표(단계별)	-	4	4	8	5
		실적(누적)	4	18	37	37	
	특허등록	목표(단계별)	-	-	1	1	5
		실적(누적)	-	1	3	3	
연구개발과제 특성 반영 지표 ²⁾	기술이전	목표(단계별)	-	1	1	2	15
		실적(누적)	-	-	1	1	
	기술실시	목표(단계별)	-	1500	1500	3000	10
		실적(누적)	-	-	1500	1500	
	인력양성	목표(단계별)	-	1	1	2	3
		실적(누적)	-	3	5	5	
	시제품	목표(단계별)	-	-	4	4	30
		실적(누적)	-	-	4	4	
	고용창출	목표(단계별)	1	-	-	1	30
		실적(누적)	1	-	3	3	
계							

* 1) 전담기관 등록·기탁 지표: 논문[에스시아이 Expanded(SCIE), 비SCIE, 평균Impact Factor(IF)], 특허, 보고서원문, 연구시설·장비, 기술요약정보, 저작권(소프트웨어, 서적 등), 생명자원(생명정보, 생물자원), 표준화(국내, 국제), 화합물, 신물질 등을 말하며, 논문, 학술발표, 특허의 경우 목표 대비 실적은 기재하지 않아도 됩니다.

* 2) 연구개발과제 특성 반영 지표: 기술실시(이전), 기술료, 사업화(투자실적, 제품화, 매출액, 수출액, 고용창출, 고용효과, 투자유치), 비용 절감, 기술(제품)인증, 시제품 제작 및 인증, 신기술지정, 무역수지개선, 경제적 파급효과, 산업지원(기술지도), 교육지도, 인력양성(전문 연구인력, 산업연구인력, 졸업자수, 취업, 연수프로그램 등), 법령 반영, 정책활용, 설계 기준 반영, 타 연구개발사업에의 활용, 기술무역, 홍보(전시), 국제화 협력, 포상 및 수상, 기타 연구개발 활용 중 선택하여 기재합니다 (연구개발과제 특성별로 고유한 성과지표를 추가할 수 있습니다).

(3) 세부 정량적 연구개발성과(해당되는 항목만 선택하여 작성하되, 증빙자료를 별도 첨부해야 합니다)

[과학적 성과]

□ 논문(국내외 전문 학술지) 게재

번호	논문명	학술지명	주저자명	호	국명	발행기관	SCIE 여부 (SCIE/비SCIE)	게재일	등록번호 (ISSN)	기여율
1	설탕 대체 Neohesperidin dihydrochalcone를 첨가한 양갱의 품질 특성	Food Eng. Prog.	정경아 김양 이창주	35(1)	대한민국	한국산업 식품공학 회	비SCIE	2021.2	1226-4768	100
2	Sweetness profiles of glycosylated rebaudioside A and its binary mixtures with allulose and maltitol	Food Science and Biotechnology	Jinsil Jung, SooHyun Kim, Sunghee Park, Jae-Hee Hong	30(3)	대한민국	Korean Society of Food Science and Technology	SCI	2021.3	1226-7708	100%
3	Correlation between in vitro binding activity of sweeteners to cloned human sweet taste receptor and sensory evaluation	Food Science and Biotechnology	Yoonha Choi, Yang Kim, Yuri Kim	30(5)	대한민국	Korean Society of Food Science and Technology	SCI	2021.05.18	1226-7708	100%
4	Neohesperidin dihydrochalcone를 첨가한 딸기잼의 품질 특성	Food Eng. Prog.	정경아 김양 이창주	6(1)	대한민국	한국산업 식품학회	비SCIE	2022.02.02	1226-4768	100%
5	Neohesperidin dihydrochalcone and neohesperidin dihydrochalcone-O-glycoside attenuate subcutaneous fat and lipid accumulation by regulating PI3K/AKT/mTOR pathway in vivo and in vitro	Nutrients	Minseo Kwon, Yang Kim, Yuri Kim	14(5)	Switzerland	MDPI	SCI	2022.03.04	2072-6643	100%
6	Sweetness profiles of glycosyl rebaudioside A and binary mixtures with sugar alcohols in aqueous solution and a lemonade model system	Journal of the Science of Food and Agriculture	Soo Hyun Kim, Sunghee Park and Jae-Hee Hong	102(5)	USA	Blackwell-Wiley	SCI	2021.10.01	0022-5142	100%
7	Correlation between in vitro binding activity of sweeteners to cloned human sweet taste receptor and sensory evaluation	Food Science and Biotechnology	Yoonha Choi, Yang Kim, Yuri Kim	30 (5)	대한민국	Korean Society of Food Science and Technology	SCI	2021.05.18	2092-6456	100%

□ 국내 및 국제 학술회의 발표

번호	회의 명칭	발표자	발표 일시	장소	국명
1	2020 KOSFOST International Symposium and Annual Meeting	김 양, John A Manthey, 김유리, 홍재희, 정서진, 이창주	2020.7.2	광주 김대중컨벤션센터	대한민국
2	2020 KOSFOST International Symposium and Annual Meeting	정진실	2020.7.2	광주 김대중컨벤션센터	대한민국
3	2020 한국식품영양과학회 국제심포지엄 및 정기학술대회 KFN International Symposium and Annual Meeting	최윤하	2020.10.22	오프라인(제주국제컨벤션센터) 및 온라인 개최	대한민국
4	2020 한국영양학회 국제 학술대회 Nutrition and the Microbiome for Human Health: Current Understanding and Future Perspectives	권민서	2020.11.6	온라인 개최	대한민국
5	2021 KOSFOST International Symposium and Annual Meeting	김여홍	2021.7.7	대전컨벤션센터	대한민국
6	14th Pangborn Sensory Science Symposium 2021	김여홍	2021.8.9	온라인 개최	캐나다
7	14th Pangborn Sensory Science Symposium 2021	Wong Run Rou	2021.8.11	온라인 개최	캐나다
8	Sensesia 2021:The 4th Asian Sensory and Consumer Research Symposium	Wong Run Rou	2021.12.6	온라인 개최	호주

□ 기술 요약 정보

연도	기술명	요약 내용	기술 완성도	등록 번호	활용 여부	미활용사유	연구개발기관 외 활용여부	허용방식

□ 보고서 원문

연도	보고서 구분	발간일	등록 번호

□ 생명자원(생물자원, 생명정보)/화합물

번호	생명자원(생물자원, 생명정보)/화합물 명	등록/기탁 번호	등록/기탁 기관	발생 연도

[기술적 성과]

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

번호	지식재산권 등 명칭 (건별 각각 기재)	국명	출원				등록			기여율	활용 여부
			출원인	출원일	출원 번호	등록 번호	등록인	등록일	등록 번호		
1	네오헤스페리딘 디하이드로칼콘 당전이체를 포함하는 감미료 조성물 및 이의 제조방법	대한민국	김 양 홍재희	2020-06-11	10-2020-0071068	10-2203086	김 양 홍재희	2021.01.08	2203086	80%	기술이 전활용
2	당전이 스테비오사이드 및 당전이 리바우디오사이드 A를 포함하는 조성물	파라과이	CJ 제일제당	2020-03-06	2015735					100%	
3	당전이 스테비오사이드 및 당전이 리바우디오사이드 A를 포함하는 조성물	특허협력 조약(PT)	CJ 제일제당	2020-03-12	PCT/KR 2020/003417					100%	
4	당전이 스테비오사이드 및 당전이 리바우디오사이드 A를 포함하는 조성물	대한민국	CJ 제일제당	2019-03-14	10-2019-0029392					100%	
5	당전이 스테비오사이드 및 당전이 리바우디오사이드 A를 포함하는 조성물	일본	CJ 제일제당	2021-08-20	2021-549254					100%	
6	당전이 스테비오사이드 및 당전이 리바우디오사이드 A를 포함하는 조성물	유럽특허 기구	CJ 제일제당	2021-08-06	20769880.4					100%	
7	당전이 스테비오사이드 및 당전이 리바우디오사이드 A를 포함하는 조성물	중국	CJ 제일제당	2021-09-01	202080018233.8					100%	
8	신규한 당전이 효소 및 이의 용도	대한민국	CJ 제일제당	2021-10-19	10-2021-0139474					100%	
9	리바우디오사이드 D 및 리바우디오사이드 M을 제조하는 방법	대한민국	CJ 제일제당	2021-10-19	10-2021-0139473					100%	
10	포도당 전이 스테비아를 포함하는 감미질이 개선된 조성물	대한민국	CJ 제일제당	2020-11-25	10-2020-01603304					100%	
11	신규한 효소 활성 측정방법	파라과이	CJ 제일제당	2021-06-23	2150987					100%	
12	신규한 효소 활성 측정방법	특허협력 조약(PT)	CJ 제일제당	2021-04-21	PCT/KR 2021/005035					100%	
13	신규한 효소 활성 측정방법	대한민국	CJ 제일제당	2020-10-19	10-2020-0135340					100%	
14	포도당 전이 효소를 포함하는 포도당 전이 스테비올 배당체 생산용 조성물 및 이를 이용한 포도당 전이 스테비올 배당체 제조방법	파라과이	CJ 제일제당	2020-06-14	2025967					100%	
15	포도당 전이 효소를 포함하는 포도당 전이 스테비올 배당체 생산용 조성물 및 이를 이용한 포도당 전이 스테비올 배당체 제조방법	특허협력 조약(PT)	CJ 제일제당	2020-06-08	PCT/KR 2020/007396					100%	
16	포도당 전이 효소를 포함하는 포도당 전이 스테비올 배당체 생산용 조성물 및 이를 이용한 포도당 전이	대한민국	CJ 제일제당	2019-06-14	10-2019-0070925	10-2303661	CJ제일제 당	2021-09-13	2303661	100%	

	스테비올 배당체 제조방법											
17	포도당 전이 효소를 포함하는 포도당 전이 스테비올 배당체 생산용 조성물 및 이를 이용한 포도당 전이 스테비올 배당체 제조방법	대한민국	CJ 제일제당	2021-09-13	10-2303661-0000							100%
18	감미 소재 조성물 및 이의 제조 방법	미국	CJ 제일제당	2021-07-23	17/425631							100%
19	감미 소재 조성물 및 이의 제조 방법	파라과이	CJ 제일제당	2020-06-11	2025735							100%
20	감미 소재 조성물 및 이의 제조 방법	특허협력조약(PT)	CJ 제일제당	2020-05-22	PCT/KR2020/006678							100%
21	감미 소재 조성물 및 이의 제조 방법	대한민국	CJ 제일제당	2019-06-14	10-2019-0070876	10-2303415	CJ제일제당	2021-09-13	2303415			100%
22	감미 소재 조성물 및 이의 제조 방법	대한민국	CJ 제일제당	2021-09-13	10-2303415-0000							100%
23	감미 소재 조성물 및 이의 제조 방법	일본	CJ 제일제당	2021-07-26	2021-543213							100%
24	감미 소재 조성물 및 이의 제조 방법	유럽특허기구	CJ 제일제당	2021-07-15	20822854.4							100%
25	감미 소재 조성물 및 이의 제조 방법	중국	CJ 제일제당	2021-08-13	202080014538.1							100%
26	과당전이 스테비올 배당체를 포함하는 조성물	미국	CJ 제일제당	2021-09-17	17/440,409							100%
27	과당전이 스테비올 배당체를 포함하는 조성물	파라과이	CJ 제일제당	2020-05-06	2018536							100%
28	과당전이 스테비올 배당체를 포함하는 조성물	특허협력조약(PT)	CJ 제일제당	2020-04-09	PCT/KR2020/004809							100%
29	과당전이 스테비올 배당체를 포함하는 조성물	대한민국	CJ 제일제당	2021-08-30	10-2021-0114879							100%
30	과당전이 스테비올 배당체를 포함하는 조성물	일본	CJ 제일제당	2021-10-08	2021-559901							100%
31	과당전이 스테비올 배당체를 포함하는 조성물	유럽특허기구	CJ 제일제당	2021-09-10	20790935.9							100%
32	과당전이 스테비올 배당체를 포함하는 조성물	대한민국	CJ 제일제당	2019-04-19	10-2019-0046300							100%
33	락토바실러스 말리를 이용하여 포도당전이 스테비올 배당체를 제조하는 방법	대한민국	CJ 제일제당	2021-09-03	10-2021-0117571							100%
34	네오헤스페리딘 디하이드로칼콘 당전이체를 포함하는 비만 예방, 개선 또는 치료용 조성물	대한민국	김유리, 권민서, 김양	2021.04.14	10-2021-0048798							100%

○ 지식재산권 활용 유형

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

번호	제품화	방어	전용실시	통상실시	무상실시	매매/양도	상호실시	담보대출	투자	기타
2-39	√	√	√							

□ 저작권(소프트웨어, 서적 등)

번호	저작권명	창작일	저작자명	등록일	등록 번호	저작권자명	기여율

□ 신기술 지정

번호	명칭	출원일	고시일	보호 기간	지정 번호

□ 기술 및 제품 인증

번호	인증 분야	인증 기관	인증 내용		인증 획득일	국가명
			인증명	인증 번호		

□ 표준화

○ 국내 표준

번호	인증구분 ¹⁾	인증어부 ²⁾	표준명	표준인증기구명	제안주체	표준종류 ³⁾	제안/인증일자

- * 1) 한국산업규격(KS) 표준, 단체규격 등에서 해당하는 사항을 기재합니다.
- * 2) 제안 또는 인증 중 해당하는 사항을 기재합니다.
- * 3) 신규 또는 개정 중 해당하는 사항을 기재합니다.

○ 국제 표준

번호	표준화단계구분 ¹⁾	표준명	표준기구명 ²⁾	표준분과명	의장단 활동여부	표준특허 추진여부	표준개발 방식 ³⁾	제안자	표준화 번호	제안일자

- * 1) 국제표준 단계 중 신규 작업항목 제안(NP), 국제표준초안(WD), 위원회안(CD), 국제표준안(DIS), 최종국제표준안(FDIS), 국제표준(IS) 중 해당하는 사항을 기재합니다.
- * 2) 국제표준화기구(ISO), 국제전기기술위원회(IEC), 공동기술위원회1(JTC1) 중 해당하는 사항을 기재합니다.
- * 3) 국제표준(IS), 기술시방서(TS), 기술보고서(TR), 공개활용규격(PAS), 기타 중 해당하는 사항을 기재합니다.

[경제적 성과]

□ 시제품 제작

번호	시제품명	출시/제작일	제작 업체명	설치 장소	이용 분야	사업화 소요 기간	인증기관 (해당 시)	인증일 (해당 시)
1	당류저감 사이다	2021년 10월	CJ제일제당	-	스테비아 시장 진입을 위한 고객사 확보	3년 내외	한국기능식품 연구원 (성적서)	2021년 11월
2	당류저감 사과주스	2021년 10월	CJ제일제당	-	스테비아 시장 진입을 위한 고객사 확보	3년 내외	한국기능식품 연구원 (성적서)	2021년 11월
3	당류저감 컵커피	2021년 10월	CJ제일제당	-	스테비아 시장 진입을 위한 고객사 확보	3년 내외	한국기능식품 연구원 (성적서)	2021년 11월
4	당류저감 Table-top	2021년 10월	CJ제일제당	-	스테비아 시장 진입을 위한 고객사 확보	3년 내외	한국기능식품 연구원 (성적서)	2021년 11월

□ 기술 실시(이전)

번호	기술 이전 유형	기술 실시 계약명	기술 실시 대상 기관	기술 실시 발생일	기술료 (해당 연도 발생액)	누적 징수 현황
1	통상실시계약	특허 라이선싱 계약 (네오헤스페리딘 디하이드로칼콘당전이체를 포함하는 감미료 조성물 및 이의 제조방법)	CJ제일제당	21년 6월	15백만원	단회 (지급완료)

* 내부 자금, 신용 대출, 담보 대출, 투자 유치, 기타 등

□ 사업화 투자실적

번호	추가 연구개발 투자	설비 투자	기타 투자	합계	투자 자금 성격*

□ 사업화 현황

번호	사업화 방식 ¹⁾	사업화 형태 ²⁾	지역 ³⁾	사업화명	내용	업체명	매출액		매출 발생 연도	기술 수명
							국내 (천원)	국외 (달러)		

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

□ 매출 실적(누적)

사업화명	발생 연도	매출액		합계	산정 방법
		국내(천원)	국외(달러)		
합계					

□ 사업화 계획 및 무역 수지 개선 효과

성과		스테비아 고감미료 제조기술 확보 및 사업화		
사업화 계획	사업화 소요기간(년)	과제종료(22년 4월) 후 3년*		
	소요예산(천원)	-		
	예상 매출규모(천원)	현재까지	3년 후	5년 후
			1,980,000	3,900,000
	시장 점유율	단위(%)	현재까지	3년 후
국내			-	10
국외			0.5	0.6
향후 관련기술, 제품을 응용한 타 모델, 제품 개발계획				
무역 수지 개선 효과(천원)	수입대체(내수)	현재	3년 후	5년 후
	수출			

*본 연구에서 개발된 감미료는 향후 2년간 미국 식품, 의약 및 화장품 연방법(the Federal Food, Drug, and Cosmetic Act)의 안전 규칙을 준수한 안전평가보고서를 준비하여 미국 FDA 승인을 받은 후 국내 승인을 받아 연구종료 3차년에 해당하는 2025년 이후 사업화를 실시할 예정임.

□ 고용 창출

순번	사업화명	사업화 업체	고용창출 인원(명)		합계
			2019년	2022년	
1	스테비아	CJ제일제당	1	2	3
합계					

□ 고용 효과

구분			고용 효과(명)
고용 효과	개발 전	연구인력	1
		생산인력	
	개발 후	연구인력	2
		생산인력	

□ 비용 절감(누적)

순번	사업화명	발생연도	산정 방법	비용 절감액(천원)
합계				

□ 경제적 파급 효과

(단위: 천원/년)

구분	사업화명	수입 대체	수출 증대	매출 증대	생산성 향상	고용 창출 (인력 양성 수)	기타
해당 연도							
기대 목표							

□ 산업 지원(기술지도)

순번	내용	기간	참석 대상	장소	인원

□ 기술 무역

(단위: 천원)

번호	계약 연월	계약 기술명	계약 업체명	계약업체 국가	기 징수액	총 계약액	해당 연도 징수액	향후 예정액	수출/ 수입

[사회적 성과]

□ 법령 반영

번호	구분 (법률/시행령)	활용 구분 (제정/개정)	명 칭	해당 조항	시행일	관리 부처	제정/개정 내용

□ 정책활용 내용

번호	구분 (제안/채택)	정책명	관련 기관 (담당 부서)	활용 연도	채택 내용

설계 기준/설명서(시방서)/지침/안내서에 반영

번호	구분 (설계 기준/설명서/지침/안내서)	활용 구분 (신규/개선)	설계 기준/설명서/ 지침/안내서 명칭	반영일	반영 내용

전문 연구 인력 양성

번호	분류	기준 연도	현황										
			학위별				성별		지역별				
			박사	석사	학사	기타	남	여	수도권	충청권	영남권	호남권	기타
1	석사졸업	2021		3				3	3				
2	석사졸업	2022	박사	석사	학사	기타	남	여	수도권	충청권	영남권	호남권	기타
				2				2	2				

산업 기술 인력 양성

번호	프로그램명	프로그램 내용	교육 기관	교육 개최 횟수	총 교육 시간	총 교육 인원

다른 국가연구개발사업에의 활용

번호	중앙행정기관명	사업명	연구개발과제명	연구책임자	연구개발비

국제화 협력성과

번호	구분 (유치/파견)	기간	국가	학위	전공	내용

홍보 실적

번호	홍보 유형	매체명	제목	홍보일

포상 및 수상 실적

번호	종류	포상명	포상 내용	포상 대상	포상일	포상 기관

[인프라 성과]

연구시설·장비

구축기관	연구시설/ 연구장비명	규격 (모델명)	개발여부 (○/×)	연구시설·장비 종합정보시스템* 등록여부	연구시설·장비 종합정보시스템* 등록번호	구축일자 (YY.MM.DD)	구축비용 (천원)	비고 (설치 장소)

* 「과학기술기본법 시행령」 제42조제4항제2호에 따른 연구시설·장비 종합정보시스템을 의미합니다.

[그 밖의 성과](해당 시 작성합니다)

2020 농식품 R&D 우수성과 54선 선정 - 과학적 성과 우수

(4) 계획하지 않은 성과 및 관련 분야 기여사항(해당 시 작성합니다)

구분	대상	등록 및 기탁 범위
등록	논문	국내외 학술단체에서 발간하는 학술(대회)지에 수록된 학술 논문(전자원문 포함)
	특허	국내외에 출원 또는 등록된 특허정보
	보고서원문	연구개발 연차보고서, 단계보고서 및 최종보고서의 원문
	연구시설·장비	국가연구개발사업을 통하여 취득한 3천만 원 이상 (부가가치세, 부대비용 포함) 연구시설·장비 또는 공동활용이 가능한 모든 연구시설·장비
	기술요약정보	연차보고, 단계보고 및 최종보고가 완료된 연구개발성과의 기술을 요약한 정보
	생명자원 중 생명정보	서열·발현정보 등 유전체정보, 서열·구조·상호작용 등 단백질체정보, 유전자(DNA)칩·단백질칩 등 발현체 정보 및 그 밖의 생명정보
	소프트웨어	창작된 소프트웨어 및 등록에 필요한 관련 정보
	표준	「국가표준기본법」 제3조에 따른 국가표준, 국제표준으로 채택된 공식 표준정보[소관 기술위원회를 포함한 공식 국제표준화기구(ISO, IEC, ITU)가 공인한 단체 또는 사실표준화기구에서 채택한 표준정보를 포함한다]
기탁	생명자원 중 생물자원	세균, 곰팡이, 바이러스 등 미생물자원, 인간 또는 동물의 세포·수정란 등 동물자원, 식물세포·종자 등 식물자원, DNA, RNA, 플라스미드 등 유전체자원 및 그 밖의 생물자원
	화합물	합성 또는 천연물에서 추출한 유기화합물 및 관련 정보
	신품종	생물자원 중 국내외에 출원 또는 등록된 농업용 신품종 및 관련 정보

2) 목표 달성 수준

세부과제명	추진 목표	달성 내용	달성도(%)
[제 1세부]	○ 신규 스테비오사이드당전이체 및 혼합물의 상대 당도 측정	<ul style="list-style-type: none"> 상대 당도 측정 방법 (2-AFC)를 활용한 5% 설탕 수용액 대비 상대당도 규명 	100
	○ 신규 스테비오사이드당전이체의 감미특성 측정	<ul style="list-style-type: none"> 감미질 측정 방법(QDA)를 활용하여 상대당도 방법 (2-AFC)에서 규명한 5% 설탕 대비 시료별 5% 상대당도 수용액의 감미질을 설탕 및 고감미 감미료 2종, bulk 감미료 2종과 혼합한 혼합물 4종의 감미질과 비교 분석함 	100
	○ 혼합물의 감미질 측정	<ul style="list-style-type: none"> 상대 당도 측정 방법(2-AFC)를 활용한 7% 설탕 수용액 대비 상대당도 규명 	100
	○ 신규 스테비오사이드 당전이체의 감미특성 및 조합물의 감미질 향상효과 규명	<ul style="list-style-type: none"> 요사분석을 활용하여 신규 스테비오사이드 7% 상대당도 수용액의 감미질을 설탕, 고감미 감미료 3종, 저열량 감미료 2종과 혼합물 2종 비교 분석 	100
		<ul style="list-style-type: none"> 순위검사를 이용하여 5% 설탕 수용액의 상대당도에 해당하는 신규 스테비오사이드 당전이체 1종과 저열량 감미료(설탕, 말티톨, 에리스리톨)를 혼합한 혼합물의 최적 혼합비율 규명 	100
		<ul style="list-style-type: none"> 요사분석을 활용하여 5% 설탕 수용액에 해당하는 신규 스테비오사이드 당전이체 1종과, 저열량 감미료 3종(설탕, 말티톨, 에리스리톨)의 단일 감미료와 이들을 각각 3:7 및 7:3으로 혼합한 혼합물의 감각특성 측정 	100
	○ 신규 NHDC 당전이체 및 스테비오사이드당전이체의 감미특성 및 조합물의 감미질 향상효과 규명	<ul style="list-style-type: none"> 상대 당도 측정 방법(2-AFC)를 이용하여 4농도 수준으로 제조된 설탕 용액 및 0.03% NHDC 당전이체 수용액과 동일한 상대당도 규명 	100
		<ul style="list-style-type: none"> NHDC 당전이체와 스테비오사이드당전이체 또는 저열량 감미료의 성탕 10% 수용액에 해당하는 2성분 혼합물의 감미 상승/ 억제 효과를 규명하여 각 혼합물의 감미 특성 분석 	100
	○ 신규 NHDC당전이체의 식품 적용시 감미 특성 및 소비자 기호성 분석	<ul style="list-style-type: none"> NHDC 당전이체와 저열량 감미료를 혼합한 7종의 감미료 조합을 적용, 상대당도 7% 수준의 기존 대비 50-70% 당 저감 요구르트와 밀크티 배합비 개발. 소비자 기호도 및 CATA 검사 결과 7종 감미료 조합 모두 설탕과 유사한 전반적 기호도와 감각 특성 나타내었음. 	100
	○ 스테비오사이드의 식품 적용시 감미 특성 분석	<ul style="list-style-type: none"> Reb A, M, D 등과 저열량 감미료를 혼합한 감미료 조합을 적용, 상대당도 7% 수준의 100% 당 저감 레모네이드 및 상대당도 10% 수준의 두유라떼 배합비 개발. 소비자 기호도 및 묘사분석 또는 CATA 검사 결과 레모네이드의 경우 당전이 Reb A와 말티톨 조합, 두유라떼의 경우 Reb A와 말티톨 조합이 설탕과 유사한 기호도와 감각 특성 나타내었음. 	100
<ul style="list-style-type: none"> Reb A, M과 바닐라/초콜렛 향을 적용, 상대당도 7% 수준의 100% 당 저감 가향 우유, 가향 두유 배합비 개발 소비자 기호도 및 묘사분석 결과 Reb M과 초콜렛 향을 적용한 가향 두유와 우유가 설탕과 유사한 기호도와 감각특성을 나타내었음. 		100	
○ 신규 감미료를 당류 50% 저감 수준으로 적용한 최저 당 함량 제품 도출	<ul style="list-style-type: none"> g-NHDC + Rebaudioside A + maltodextrin 조합 table-top sweetener 개발 (당 50% 저감효과) g-NHDC + Sucrose + maltodextrin 조합 table-top sweetener 개발 (당 30% 저감 효과) 개발된 2종 tabletop sweetener의 기호도를 단독 또는 동반 식품과 함께 설탕과 비교, 동반식품 제시시 설탕과 동일 기호도를 나타냄 	100	

세부과제명	추진 목표	달성 내용	달성도(%)
[제 2세부]	○ 바이오전환기술을 이용한 신규 고감미료 NHDC 당전이체 개발 및 특성 규명	▪ 다양한 당전이 효소 및 기질 탐색	100
		▪ 효소 및 기질 선별을 통한 효율적 NHDC 당전이체 생합성 조건 탐색	100
		▪ preparative HPLC를 이용한 고순도 NHDC 당전이체 분리, 정제 조건 확립	100
		▪ NHDC 당전이체의 구조 동정을 위한 고순도 분리 및 정제	100
		▪ NMR 및 LC-MS 등을 이용한 NHDC 당전이체의 구조 동정	100
	○ NHDC 당전이체 생산공정 최적화, 대량공정화 및 이화학적 특성 분석	▪ 신규 감미료 후보군 선정 및 최적화 생합성	100
		▪ 대량 생합성을 위한 최적화 생합성 공정 scale-up	100
		▪ 관능평가, <i>in vitro</i> 단맛수용체 및 기능성 평가를 위한 대량 제조	100
		▪ NHDC 당전이체의 이화학적 특성 5종 분석	100
	○ 국내산 감귤류로부터 전구체의 추출, NHDC 제조 및 정제 공정 최적화	▪ 반응표면분석을 이용한 NHDC 전구체 용매 추출 최적화	100
		▪ 효소를 이용한 NHDC 전구체 추출 효율 증진	100
		▪ 최적 추출 조건에서 국내산 감귤류 5종 전구체 함량 분석	100
▪ 정제 전구체를 활용한 NHDC 제조 공정 최적화		100	
[제 1협동]	○ 핵심 고감미료 소재 standard 및 당전이 활성 보유 효소/균주 pool 확보	▪ 천연 고감미료 표준품 확보 및 평가 - Rebaudioside A, Rebaudioside D, Rebaudioside M 등 상용화 고순도 스테비아 및 효소처리스테비아 등 감미료 소재 4건 이상 확보 - 글로벌 표준 분석방법 확보하여 수집된 표준시료의 스테비올배당체 종류별 분리 분석법 수립	100
		▪ 당전이스테비아 품질 비교용 표준물질 제조 - 포도당전이 RebaudiosideA 및 포도당전이 스테비오사이드 제조 확보	100
		▪ RebaudiosideD 전환 신규효소 탐색을 위한 pool 확보 - RebaudiosideA로부터 RebaudiosideD를 생합성하는 전환효소의 유전체 기반 탐색 - 당전이활성 보유 가능성 있는 미생물 라이브러리 확보	100
	○ Reb-A로부터 Reb-D 전환 활성 보유 효소 선별 및 확보	▪ 스테비아 생합성 유전체 및 미생물 pool 탐색 - 후보 유전체 합성 및 효소단백질 제작 - 효소 한계 전환을 평가, 기질 특이성 조사 및 최종 우량 효소 선정	100
		▪ 효소 발현 및 생전환 조건 최적화 - 온도, 시간, pH, 염 등 조건에 따른 반응 최적화 - 최적 기질(원료) 선정 및 전환율 평가	100
		▪ 생성물질 동정 - 신규 확보 효소로부터 생합성 물질의 identification	100
		▪ 신규 확보 효소 서열 및 제조법의 지식재산권 확보 - 신규 우수 활성 보유 효소 특허 출원	100

세부과제명	추진 목표	달성 내용	달성도(%)
[제 1협동]	○ 스테비올배당체 제조공정 및 복합솔루션 개발	▪ 효소 발현 시스템 개발 생산성 효율 검토	100
		▪ 스테비올배당체 분리정제 조건 확보 - 효소반응 혼합물로부터 스테비올배당체를 분리할 수 있는 특이적 수지(이온교환수지, 흡착수지) 탐색	100
		▪ 선발 당전이 효소 반응 조건 적용한 고순도 분리 정제 공정 개발 - 탈색, 탈염, 크로마토분리, 흡착정제, 농축, 분말화	100
		▪ 선발 당전이 효소 반응 조건 적용한 고순도 분리 정제 공정 개발 - 탈색, 탈염, 크로마토분리, 흡착정제, 농축, 분말화	100
		▪ 스테비올배당체, 당전이NHDC 적용한 가공식품 시제품 개발 - Table-top 분말 감미료, 탄산음료, 과즙음료, RTD 커피 - 4건의 당류 50% 저감 복합 포물러 개발 - 소비자 패널(90명) 대상 관능 선호도 조사하여 설타과 유사 관능품질 구현	100
		▪ 시제품 4종의 영양성분 및 식품 안전지표 확보 - 공인 분석기관의 당류 함량 저감과 안전성 확보	100
[제 2협동]	○ <i>in vitro</i> 단맛수용체 시스템 구축	▪ <i>in vitro</i> human 단맛수용체 시스템 구축	100
	○ 스테이오사이드 당전이체의 단맛수용체 활성 측정	▪ 스테비오사이드 당전이체의 단맛수용체 활성측정분석	100
	○ 신규감미소재의 지방세포분화억제 효과 스크리닝	▪ 스테비오사이드 및 NHDC 당전이체 <i>in vitro</i> 지방세포분화억제 효과 규명 및 분자적 기전 규명	100
	○ 신규감미소재의 항염증 효과 스크리닝	▪ 스테비오사이드 및 NHDC 당전이체 <i>in vitro</i> 항염증 효과 규명 및 분자적 기전 규명	100
	○ NHDC 당전이체의 단맛수용체 활성 측정	▪ NHDC 당전이체의 단맛수용체 활성측정분석	100
	○ 신규감미소재의 항당뇨 모델구축 및 효과규명	▪ 신규감미소재 당전이체 <i>in vivo</i> 항당뇨 모델 구축과 스테비오사이드 및 NHDC 당전이체 <i>in vivo</i> 항당뇨 효과 규명 및 분자적 기전 규명	90
	○ 신규감미소재의 항염증 효과 규명	▪ 신규감미소재 당전이체 <i>in vivo</i> 항염증 모델 구축과 스테비오사이드 및 NHDC 당전이체 <i>in vivo</i> 항염증 효과 규명 및 분자적 기전 규명	90
	○ 신규감미소재 혼합물의 단맛수용체 활성 측정	▪ 신규감미소재 혼합물의 단맛수용체 활성평가 비교분석	100
	○ <i>in vitro</i> human 단맛수용체 시스템과 관능검사 감미특성과의 상관관계 분석	▪ 신규감미소재 혼합물의 <i>in vitro</i> 단맛수용체 활성측정 system과 관능검사 감미특성과의 상관성 분석	100
	○ 신규감미소재 혼합물의 항비만, 항당뇨, 항염증 효과 규명	▪ 신규감미소재 혼합물의 <i>in vivo</i> 항비만, 항당뇨, 항염증 모델 구축과 스테비오사이드, NHDC 각각 및 혼합물의 항비만, 항당뇨, 항염증 효과 규명 및 분자적 기전 규명	100
○ 신규감미소재 혼합물의 장내미생물 군집 영향 분석	▪ 신규감미소재 혼합물의 <i>in vivo</i> 항비만, 항당뇨, 항염증 모델 구축과 스테비오사이드, NHDC 각각 및 혼합물의 장관미생물 균총 군집에 미치는 영향 규명	100	

4. 목표 미달 시 원인분석(해당 시 작성합니다)

1) 목표 미달 원인(사유) 자체분석 내용

- 본 과제 수행기간인 3차년도 內 학교로부터 기업체로의 기술 이전 2건을 계획하였으나, 현재 서울대학교에서 CJ제일제당으로 기술 이전 1건 달성함.
 - 기술 개발 및 원천 특허 출원을 성실히 수행하여 2차년도에 1건 등록 완료 및 기술이전을 달성하였으나, 추가적인 특허의 등록 심사가 지연 중임. 기술 이전은 개발 기관의 지식재산 권리가 형성된 이후 가능하므로, 신규로 개발된 기술의 연내 특허 등록 후 기술 이전 예정임.
 - 특허, 코로나 19로 인하여 실험실 사용 인원 제한, 출입 불가능 등으로 연구 시간이 감소하였으며 핵심 장비 고장으로 수리가 필요한 상황이 발생하였으나 수리에 필요한 부품 수입 및 수리 업체 출입이 어려워 수리가 지연되는 등 연구 진행에 차질을 빚었음.
 - 2차년도 *in vivo* 활성 시험에서 일부 항목을 제외하고 대부분의 바이오마커 항목에서 경향만 보이고 통계적 유의성을 보이지 않음. 혈당 측정 시 3주차에서 혈당이 낮아지다가 이후 혈당이 증가하는 것으로 보아 단기적인 혈당 감소를 확인할 수 있음. *in vivo* 활성 시험에서 혈당이 감소하다 증가하는 4주차 이후 샘플이 사용되어 대부분의 바이오마커 항목에서 경향만 보이고 통계적 유의성을 확인하지 못한 것으로 사료됨.
-

2) 자체 보완활동

- 코로나 19로 연구 진행이 지연되어 특허 출원 및 등록 역시 지연되었으나, 사회적 거리두기 단계가 완화된 기간 중 최대한 이를 만회하기 위해 노력을 경주하였음. 현재 특허 등록을 위한 심사가 3건 진행중이며 그 외 특허 출원 및 기 출원된 특허들의 등록을 위한 보완 절차를 지속적으로 성실히 수행하여, 지식재산권 확보이후 기업체로 기술이전을 수행하겠음. 특히 참여기업인 CJ제일제당에서 기술 권리 확보를 적극 추진하겠음.
 - 2차년도 실험 결과로 보아, 혈당은 초기에 영향이 있고, 항비만 효과가 그 이후에 효과가 있으므로, 혈당 측정 스크리닝을 통해 단기적인 혈당 감소 효과는 초기에, 그 이후엔 항비만 효과에 초점을 맞추어 3차년도에는 ob/ob 마우스를 활용하여 항비만 효과 및 분자기전 등의 연구를 진행하였음.
-

3) 연구개발 과정의 성실성

- 코로나 19로 연구 진행이 지연되어 특허 출원 및 등록 역시 지연되었으나, 사회적 거리두기 단계가 완화된 기간 중 최대한 이를 만회하기 위해 노력을 경주하였음.
 - 1세부의 경우 코로나 19로 인하여 감각검사요원 모집에 어려움을 겪었으나, 1회 검사 참여 인원을 최소화하는 대신 검사 횟수 및 시간을 연장하고, 개인 방역을 강화하기 위한 조치들을 도입하는 등 노력을 통하여 계획에 맞게 차질 없이 연구를 성실하게 수행하였음. 현재 특허 등록 심사가 진행중이므로, 지식재산권 확보이후 기술이전을 추진하여 연구 목표를 달성할 계획임.
 - 연구개발 계획에 맞추어 천연유래 (semi-natural) 신규 고감미료 물질인 NHDC 당전이체의 효율적 합성을 위한 조건들을 확립하고, pilot scale 대량화, 이화학적 특성 분석 및 기질이 되는 NHDC 제조공정 확립 및 국내산 감귤류로부터 전구체 추출 최적화 연구를 수행하였음.
 - 또한, 2, 3차년도에 1세부 관능평가 및 2공동 *in vivo* 연구에 필요한 다량의 NHDC 당전이체를 원활하게 공급하기 위하여, 2차 정제를 통한 분리, 정제법을 신규로 확립하여 원활한 공동연구가 될 수 있도록 노력하였으며 3차년도에는 당초 계획되었던 Pectinex® Ultra SP 효소 이외에 추가적 섬유 분해 효소의 활용가능성을 탐색하여 연구과제를 성실히 수행하였음.
 - *in vivo* 예비 실험을 진행하여 혈당 감소 효과와 항당뇨, 항염증 생리활성 효과 및 분자기전 규명에 대한 초기 자료를 구축하고자 하였으며, 모든 계획된 연구 내용을 수행하였고, 당뇨, 항염증 뿐 아니라 피하지방 감소에 의한 항비만 효과까지 규명하였음.
-

5. 연구개발성과의 관련 분야에 대한 기여 정도

- 신규 감미 소재 및 기존 저열량 감미 소재의 농도별 상대 감미도 확보로 실제 식품에서 당 저감화를 위해 적용될 수 있는 농도별 감미 소재 첨가 함량 도출 및 적용 가능.
 - 신규 감미 소재와 저열량 감미 소재의 혼합 시 감미질 향상 효과 및 식품에서의 특성을 규명하여 당 저감화 식품 개발의 기초 자료를 확보함.
 - 기존 식품의 당 저감을 위해 천연소재의 신규 감미료 적용을 위한 기초자료 확보로 본 연구 결과를 바탕으로 실제 식품 내 당의 첨가 수준을 30% 이상 저감할 것으로 판단됨.
 - 본 연구개발의 성과물인 천연 유래 고감미료인 NHDC 당전이체는 국내 기술 기반의 신소재 기술로서 글로벌 환경에서 기술 경쟁력을 확보하고 독점적 영역을 구축하는 것에 기여할 수 있음.
 - 신규 고감미료인 NHDC 당전이체는 기존의 감미료에 대비 우수한 감미 특성을 가진 천연 기반 저열량 감미료로서 국내외 관련 식품산업에서 원천 기술을 확보하였으며, 전 세계적으로 이슈가 되고 있는 당저감화 소재로서 바람직한 기호 특성을 가진 감미료 대체 식품 제조에 활용 가능함.
 - 국내산 저이용 감귤류 중 NHDC의 전구체인 네오헤스페리딘 및 나린진 함량이 높은 당유자, 팔삭 등을 원료로 활용하는 것이 가능하여 저이용 감귤류의 활용을 증대하여 농가 소득 증대에 기여하는 것이 가능함.
 - 스테비아 유래 천연 고감미료 제조 핵심 기술과 이를 활용한 당류저감 복합 포뮬러 개발 및 제품화를 중점 추진함
 - 스테비아는 국내에 비하여 북미, 유럽, 호주 등의 선진국 시장에서 특히 지속적으로 수요가 증가하고 있으며, 원료의 주요 경작지 역시 해외에 주로 위치하고 있음
 - 본 연구에서 개발한 효소적 고품질 스테비아 제조기술을 활용하여 원료 의존도가 높은 전통적 스테비아 감미료의 제조 한계를 극복하고 해외 원료 보유 업체와의 다양한 기술기반 사업 협력 모델이 가능할 것으로 기대함
 - *in vitro* 단맛수용체 affinity assay를 이용한 예측 기술은 새로운 예측 모형 원리를 기반으로 한 다양한 연구 분야의 활성화 자료로 사용될 수 있음. *in vitro* 단맛수용체 감지기작 및 상대당도 상관성 조사를 통한 평가시스템 기술 확립으로 향후 감미료 개발 분야에 활용될 수 있으며, 감미료 개발 시 감미소재를 관능검사 전에 신속히 선별하여 불필요한 관능검사를 줄이고 감미료 개발을 더욱 신속하고 정량할 수 있도록 함.
 - *in vivo* 항당뇨, 항염증 모델에서의 항비만, 항염증 효과가 검증된 기능성 감미료 자료로 사용될 수 있음. 스테비오사이드 및 NHDC 당전이체 항비만, 항염증 기능성 규명으로 기능성 감미료 개발기술 분야에 활용될 수 있으며, 당뇨 및 비만 환자의 식이 조절에 기여하는 감미료 및 활용 식품 개발에 따른 의료비 절감 효과를 기대할 수 있음.
-

6. 연구개발성과의 관리 및 활용 계획

< 연구개발성과 활용계획표 >

구분(정량 및 정성적 성과 항목)		연구개발 종료 후 5년 이내	
국외논문	SCIE	1편	
	비SCIE		
	계		
국내논문	SCIE		
	비SCIE		
	계		
특허출원	국내		
	국외		
	계		
특허등록	국내	6건	
	국외		
	계		
인력양성	학사		
	석사		
	박사		
	계		
사업화	상품출시	1500만원(매출액) 및 6480만원(수출액)	
	기술이전		3건
	공정개발		
제품개발	시제품개발	2건	
비임상시험 실시			
임상시험 실시 (IND 승인)	의약품	1상	
		2상	
		3상	
	의료기기		
진료지침개발			
신의료기술개발			
성과홍보			
포상 및 수상실적			
정성적 성과 주요 내용			

-
- 본 연구 성과를 활용하여 과제 종료 후 2년간 국내외 인허가준비 및 물질 등록 진행하여 과제 종료 3차년도 이후 제품 출시 착수
 - 본 연구 성과물은 지속적으로 특허로 출원하여 지식재산권을 확보할 것임.
 - 상기 국가별 특허관리 확보 및 물질 인허가로 글로벌 사업화에 대비하겠음.
 - 국가별 인허가 전략 확보를 위하여 국제 컨설팅 전문기관과 협의 중이며, 과제 종료 1년간 미국 FDA GRAS 우선 추진 및 이를 바탕으로 국내 물질 등록 진입, 이후 유럽 등 각국 인허가를 순차적으로 진행하겠음.
 - 본 연구 성과물은 지속적으로 SCI 및 KCI 논문으로 게재하여 학술 성과를 확산함으로써 관련 분야의 학문적 발전을 활성화 할 것임.
 - 본 연구개발의 성과물은 국내 기술 기반의 신소재 기술, 특히 식품 신소재가 글로벌 환경에서 기술 경쟁력을 확보하고 독점적 영역을 구축할 수 있는 활용 사례로 기대됨.
 - 신규 천연 감미 소재에 대한 감미 특성 profile을 구축하여 관련 식품산업에서 기타 저열량/당뇨 식품 제조에 활용이 가능함.
 - 신규 천연 감미 소재와 타 감미 소재와의 감미 상승 및 감미질 개선에 대한 기초 자료를 구축하여 관련 식품산업에서 우수한 감미 특성을 가진 천연 저열량 감미료 개발에 활용 가능함.
 - 기존의 감미료에 비해 보다 바람직한 감미 및 기호 특성을 가진 감미료 대체 식품 제조에 활용 가능함.
 - 스테비오사이드 및 NHDC 당전이체 항비만, 항당뇨와 항염증 가능성을 규명함으로써 SCI 논문 게재를 통한 학술 활용으로 과학적 기초 자료를 제시함.
 - *in vitro* 단맛수용체 활성평가 시스템개발로 신규 감미료의 기능성 및 활성화를 측정할 수 있는 *in vitro* 및 종합감각평가시스템을 확립하여 향후 기타 대체감미료의 감미 특성 스크리닝 평가에 활용할 수 있음.
 - *in vitro* 단맛수용체 활성과 관능검사와의 상관성 분석기술로 단일 감미 물질 뿐만 아니라 2종의 감미 물질 혼합물에 대한 맛 보완 등의 신규 천연 감미 소재의 감미 특성 profile을 구축하여 식품산업에서 건강기능성 신규 감미 소재 식품 제조에 활용할 수 있음.
 - *in vivo* 항비만, 항당뇨, 항염증 모델 구축을 통한 신규감미소재 혼합물의 *in vivo* 항비만, 항당뇨, 항염증 기능평가 기술로 스테비오사이드 및 NHDC 당전이체 항비만, 항당뇨, 항염증 가능성을 분자 기전 수준에서 규명함으로써 추후 기능성감미료 개발과 국민건강증진에 기여할 수 있음.
-

주 의

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