

# 최 종 보 고 서

<p style="text-align: center;">주 의</p>	<p style="writing-mode: vertical-rl; text-orientation: upright;">향미가 증진된 고기능성 현미발효물과 응용제품 개발</p> <p style="writing-mode: vertical-rl; text-orientation: upright;">농림축산식품부</p>	<table border="1" data-bbox="572 436 831 526"><tr><td style="text-align: center;">발간등록번호</td></tr><tr><td style="text-align: center;">11-1543000-000615-01</td></tr></table> <p style="text-align: center;">향미가 증진된 고기능성 현미발효물과 응용제품 개발 (Development of function and flavor-enriched fermented brown rices and applications)</p> <p style="text-align: center;">샘표식품(주) 기술연구소</p> <p style="text-align: center;">농림축산식품부</p>	발간등록번호	11-1543000-000615-01
발간등록번호				
11-1543000-000615-01				

# 제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “향미가 증진된 고기능성 현미발효물과 응용제품 개발에 관한 연구” 과제의  
보고서로 제출합니다.

2014년 09월 18일

# 연 구 진

주관연구기관명 : 샘표식품(주)

주관연구책임자 : 김 종 호

세부연구책임자 : 김 종 호

연 구 원 : 최 용 호

연 구 원 : 김 동 석

연 구 원 : 김 종 민

연 구 원 : 장 효 순

연 구 원 : 이 종 열

연 구 원 : 문 명 주

연 구 원 : 김 경 옥

연 구 원 : 전 종 은

연 구 원 : 최 유 진

연 구 원 : 조 민 지

연 구 원 : 권 창

연 구 원 : 백 은 종

연 구 원 : 김 오 철

협동연구기관명 : 고려대학교

협동연구책임자 : 이 성 준

연 구 원 : 이 지 혜

연 구 원 : Jia Yaoyao

연 구 원 : 김 세 영

연 구 원 : 오 현 석

연 구 원 : 김 여 진

연 구 원 : 남 보 라

연 구 원 : 이 정 규

협동연구기관명 : 경기대학교

협동연구책임자 : 신 광 순

연 구 원 : 신 명 속

연 구 원 : 이 수 정

연 구 원 : 김 동 수

# 요 약 문

## I. 제 목: 향미가 증진된 고기능성 현미발효물과 응용제품 개발

## II. 연구개발의 목적 및 필요성

- 식물성 천연원료인 현미에 미생물 발효기술을 접목한 현미발효물 소재기술 및 응용제품군 개발하고, 현미발효물의 건강 기능성 평가를 통한 고부가가치 창출하고자 함.
- 현미가 가지는 영양학적, 생리학적 가치의 제고(提高)를 통해 현미(쌀)섭취 증대를 유도하여 국민들의 건강증진 및 농가의 쌀 생산기반 유지 및 수급구조 안정화가 필요함.
- 현미의 미생물 발효를 통해 각종 영양성분 및 유효성분을 새롭게 구명(究明)하고, 체내이용률을 향상시키므로, 건강 증진에 도움이 되는 곡물 발효소재 및 다양한 응용제품군의 개발이 필요함.
- 현미발효소재 및 응용제품군의 건강 기능적 효능 평가를 통한 과학적인 근거 마련과 이를 효율적으로 생산할 수 있는 공정기술개발이 필요함.
- 현미발효소재 및 응용제품군의 개발 및 상품화로 경제적 고부가가치를 가진 신규 사업 개발하여 농가 소득 증대와 농산물의 수요창출을 일으키는 녹색산업의 확장이 필요함.

## III. 연구개발 내용 및 범위

<제1세부기관: 샘표식품(주)>

- 연구목표: 향미가 증진된 고기능성 현미발효물과 응용제품 개발
  - 향미가 뛰어나고 기능성이 우수한 현미발효물 소재기술개발을 개발하고, 최적화하여 대량 생산 안정화를 확립하고, 응용제품을 개발하고자 함.
- 연구내용:
  1. 기능성 현미발효물 소재기술개발
    - 현미(쌀) 발효에 적합한 고역가 효소 곰팡이 분리 및 개량
    - 현미의 발효 최적화 기술 개발
    - 현미발효물의 영양학적 성분 분석 및 수율 측정
    - 분리 곰팡이를 이용한 현미발효물의 발효 scale-up
    - 현미발효물의 대량 생산 안정화
  2. 현미발효물 제품화 기술개발
    - 현미발효물 적용 제품의 최적 가공 기술 및 최적화 제조 기술 개발

- 현미발효물 적용 제품의 Scale-up 및 시제품 제작
- 기능성 현미발효물이 풍부하게 함유된 제품개발 완료

<제1협동기관: 고려대학교>

- 연구목표: 현미발효물의 당 및 지질대사 개선 효능 평가
  - 현미발효물의 당 및 지질대사에서의 유효성 평가를 통한 건강기능성 연구
- 연구내용: 핵수용체 PPARs 및 LXRs 조절을 통한 현미발효물의 당 및 지질대사 개선 효능 연구
  1. 당 및 지질대사 조절 활성을 나타내는 최적의 발효 조건을 갖는 현미발효물 및 그 유래 생리활성분획물 선별
  2. 배양세포 및 동물실험에서 현미발효물 유래 생리활성분획물의 당 대사 조절 효능 및 기작 연구
  3. 배양세포 및 동물실험에서 현미발효물 유래 생리활성분획물의 지질 대사 조절 효능 및 기작 연구

<제2협동기관: 경기대학교>

- 연구목표: 현미발효물로부터 장관면역계 활성화 다당체의 분리 및 특성 평가
  - 현미발효물에 존재할 것으로 기대되는 장관면역 활성화 우수한 신규 다당체를 분리, 정제하고 다양한 장관면역기능을 평가하며, 활성 다당체의 상세 구조를 분석함으로써 고부가가치 생리기능성 소재의 생산을 위한 기초자료로 활용하고자 함.
- 연구내용:
  1. 장관면역 활성화 다당체가 풍부한 현미발효물 선별 및 활성다당체의 분리, 정제
  2. 현미발효물 유래 활성 다당체의 장관면역 활성화 특성 평가 및 구조예비 실험
  3. 현미발효물 유래 장관면역 활성화 다당체의 상세 구조 해명

IV. 연구개발결과

- 향미가 증진된 고기능성 현미발효물과 응용제품 개발
 

현미 발효에 적합한 고역가 효소 곰팡이 분리 및 개량하고자 하였다. Starch를 glucose로 전환시키는 효소인 amylase (α-amylase, glucoamylase) 활성이 높은 곰팡이 균주를 target 하여, aflatoxin을 생성하지 않고, 전분 액화 효소인 α-amylase와 탄수화물 전분 당화 효소인 glucoamylase 효소 활성이 높은 곰팡이를 enzyme assay를 통해 2종을 최종 selection 하였다. Selection 된 곰팡이의 amylase 효소의 최대 활성을 나타내는 발효 조건 설정하였으며, 곰팡이 효소 활성 최적 발효 온도, 최적 발효 시간 설정 후 발효 수율 측정을 통해 기술을 설정하였다.

현미발효물의 영양학적 성분 분석 및 수율 측정하였는데, 현미발효물의 체내 유효 영양학적 성분을 분석 장비를 통해 방법을 setting하여 분석하였다. 현미발효물의 단백질, 무기질, 구성당, arabinoxylan, 비타민 성분을 기기분석을 통해 정량적으로 분석하여 영양학적 유용 가치

를 판단하였다. 현미발효물 소재의 scale-up을 진행하기 위해 cellulose, starch의 성분을 분해하는 효소 활성이 뛰어난 곰팡이를 대량 생산하는 공정 및 조건을 설정하였다. 현미의 cellulose, starch 등의 성분을 분해하는 효소를 생산하는 곰팡이 2종을 대량 생산하고, 안정화하였다. 그리고 대량 배양된 곰팡이를 사용하여 pilot scale로 현미 발효를 실시하여 발효수율을 측정하였으며, 100 L 열교환 반응기를 사용하여 현미발효물을 제조하고 현미발효물의 발효수율을 측정하여 대량 생산 안정화에 기여하고자 하였다.

현미발효물 적용 제품의 최적 가공 기술 및 최적화 제조 기술 개발을 진행하였다. 오리엔탈 드레싱을 기본배합비로 액상과당을 현미발효물과 말티톨로 대체하여 제조공정 중 열처리에 의한 갈변현상을 최소화하는 배합비 개발 완료하였다. 보존성 테스트를 통한 안전성이 확인된 살균 공정 조건을 설정하였으며, 가열살균이 완료된 배합물의 병 충전시 Cold filling 조건을 설정하였으며 충전 공정 조건을 설정하였다. 현미발효물을 적용한 머스터드 드레싱에는 액상과당 대신 현미발효물, 벌꿀, 말티톨 시럽을 사용하였으며 머스타드 풍미를 위해 사용되는 조제겨자를 현미발효물, 벌꿀, 말티톨 시럽에 혼합시에 조제겨자의 용해도가 향상됨을 확인하였다. 드레싱 제품과 달리 현미발효물을 적용한 바비큐 소스는 오일이 별도로 사용되지 않기 때문에 냉각 후 충전과정에서 2차 오염이 가능성이 있으므로 Hot filling 공정을 적용하였으며 보존료 대신 주정을 85℃ 살균 종료 직후 투입하여 미생물 안전성을 향상시키는 공정 조건을 확정하였다.

현미발효물 적용 제품의 Scale-up 및 시제품 제작을 진행하였는데, 현미발효물을 적용한 오리엔탈 드레싱은 분말원료와 액상원료를 정제수와 혼합하여 85℃까지 살균 후 양조식초를 첨가하여 80℃에서 살균 종료하고 배합물이 30℃이하로 냉각되면 수상부 배합물과 유상부 배합물을 각각 정량대로 병에 충전하는 공정 조건을 설정하였으며 Scale up시에는 배합물을 30kg로 시생산시에는 실제 생산 배합물량인 700kg으로 제조 완료하였다. 현미발효물을 적용한 오리엔탈 드레싱의 Scale up 시제품의 전문패널 대상 관능검사 결과, 전반적 만족도 3.8점 (Top2, 71%)로 확인되었다. 시생산 제품에 대한 35℃ 항온 보관에 따른 품질 체크 결과, 10주 보관시에도 한도건본와 유사한 품질이 확인되어 유통기간을 상온 10개월로 설정하였다.

현미발효물을 적용한 오리엔탈 드레싱의 품질 평가 방법과 검사 방법을 확립하여 기본규격 항목(내용량,라벨 부착상태,이물질), 관능규격(관능검사 방법, 색상, 이미와 이취, 풍미), 일반규격 검사방법(당도,염도,pH), 특별검사 식품공전 규격(보존료,대장균군,바실러스 세레우스,타르색소)를 설정하여 현미발효물 적용 머스터드 드레싱과 현미발효물 적용 바비큐 소스 제품개발을 완료하였다.

현미발효물의 건강 기능성 컨셉적 활용 방안 검토 결과, 본 과제를 통해 개발된 오리엔탈 드레싱, 머스터드 드레싱, 바비큐 소스는 액상과당을 사용하는 시중 제품과는 차별화되게 향미가 증진된 현미발효물을 사용하여 건강하면서 맛있는 단맛이 구현 가능함을 확인하였으며 건강 기능성 컨셉을 간접적으로 활용하기 위해 제품 라벨에 “액상과당 무첨가”, 제품명으로 “현미 발효” 표시와 함께 제품 라벨 전면에 현미발효물 사용량을 표시하였고 현미의 건강적인 측면을 식품 표시법 기준에 맞도록 ‘미네랄, 식이섬유가 풍부한 현미를 발효하여 더 건강하고 맛있게 만들었습니다.’라는 문구를 표시하였다.

- 현미발효물의 당 및 지질대사 개선 효능 평가평가

본 연구에서는 핵수용체 PPARs 및 LXR<sub>s</sub> 조절을 통한 현미발효물의 당 및 지질대사 개선 효능을 평가하였다. 당 및 지질 대사 조절 기전에는 여러 가지 방법이 알려져 있으나, 최근 10년 간 세포 내 핵수용체 조절을 통한 기전이 새로이 알려지고 있다. 세포질에 존재하는 핵수용체에 리간드가 결합하여 활성화 되면, 핵수용체는 핵으로 이동한 후 일련의 타겟 유전자 프로모터에 결합하여 유사한 대사과정에 관여하는 유전자들의 발현을 한 번에 조절하게 된다. 이러한 핵수용체 가운데 peroxisome proliferator-activated proteins(PPARs;  $\alpha$ ,  $\gamma$ ,  $\beta/\delta$  forms)와 liver X-receptors(LXR<sub>s</sub>;  $\alpha$  and  $\beta$  forms)는 당 및 지질 대사를 조절하는 대표적인 핵수용체로 알려져 있다. 주관연구기관인 샘표에서 제공받은 두 종의 현미발효물 시료(미강이 없는 일반 현미발효물, 미강이 포함된 현미발효물)의 핵수용체 LXR<sub>s</sub> 및 PPAR<sub>s</sub> 활성조절능을 평가하기 위하여 luciferase assay을 실시하였다. 그 결과, 두 종의 현미발효물 시료 모두 LXR<sub>s</sub>를 활성화 시켰고, 특히 일반 현미발효물 A시료에서 농도 의존적으로 LXR<sub>s</sub>의 활성을 증가시키는 것으로 나타났다. 이후 인간 간암세포주인 HepG2세포에 일반 현미발효물 시료를 분자량 500 이하(아미노산-펩타이드) 분획물, 분자량 1000이하(다당류 식이섬유) 분획물을 처리하여 세포 내 지질강하효능을 평가한 결과 분자량 500이하 일반 현미발효물이 세포 내 콜레스테롤 및 중성지방을 감소시키는 것으로 나타났다. 또한 일반 현미발효물을 3가지 군(일반 현미발효물군, 아미노산-펩타이드군, 다당류 식이섬유군)으로 나누어 10주 동안 마우스에 경구투여 후 OGTT 및 ITT를 통하여 현미발효물의 당대사 효능을 평가하였다. 그 결과, 다당류 식이섬유 형태의 현미발효물군에서 뛰어난 당대사 개선 효능을 확인하였고 이는 마우스 간 조직 유전자 발현 분석을 통해 포도당 신생합성 및 염증 관련 유전자 발현이 저해를 통하여 인슐린 저항성 완화 효과가 나타나는 것으로 사료된다.

일반 현미발효물의 지질대사 효능을 평가하기 위하여 C57BL/6/Bkl 마우스에 고지방사료(HFD) 대조군 및 3가지 일반 현미발효물군(일반 현미발효물군, 아미노산-펩타이드군, 다당류 식이섬유군)으로 나누어 4주 동안 마우스에 경구투여 하였다. 그 결과 대조군 대비 모든 현미발효물군에서 체중감소 효과 및 지질대사 개선효능을 확인하였으며, 특히 다당류 식이섬유 형태의 발효 현미물의 효능이 뛰어났다. 이러한 현미발효물의 지질대사 개선 효능은 간 조직 유전자 발현을 분석한 결과 PPAR $\alpha$  및 지방산 산화와 및 콜레스테롤 대사와 관련한 하위 유전자 발현을 증가시키는 반면 지방산 합성 관련 유전자의 발현을 감소시키는 것으로 나타났다. 현미발효물의 지방산 산화 증가는 인간 간암세포주에서 방사성 동위원소를 이용한 실험에서도 확인할 수 있었다. 따라서 현미발효물은 PPAR $\alpha$  및 LXR $\alpha/\beta$ 를 활성화하여 당·지질대사와 관련한 유전자 발현을 조절하여 대사증후군에 의한 지방축적을 저해하고 인슐린 저항성 및 혈중 지질 프로파일을 개선시키는 효능을 가지는 것으로 평가된다.

추가적으로 현미에 다량 함유되어 있는 단백질의 분해산물인 펩타이드의 PPAR<sub>s</sub> 및 LXR<sub>s</sub> 조절 활성을 평가하였다. 현미발효물에 존재할 수 있는 다이펩타이드는 총 400종으로 현재 국내에서 천연 추출물 내 존재하는 다이펩타이드를 모두 분석할 수 있는 기술이 없으므로, 문헌 조사를 통하여 PPAR $\gamma$  antagonistic activity가 있다고 알려진 다이펩타이드 4종(WE, WD, WR, WL)을 선별하여 3가지 subtype의 PPAR와의 결합 유무를 SPR로 확인하였다. 다이펩타이드 WD는 PPAR $\gamma$ 와 다이펩타이드 WL은 PPAR $\delta$ 와 가장 잘 결합하는 것으로 확인되었으며, 다이펩타이드 WE 및 WR 모두 지질대사를 조절하는 핵수용체 PPAR $\alpha$ 에 결합하여 활성화

하는 것을 확인하였다. 이 실험 결과로 이미 알려진 다이헵타이드 4종(WE, WD, WR, WL)의 PPAR $\gamma$  antagonistic activity와의 다른 기능성을 예상할 수 있으며, 현미발효물에 포함된 이러한 다이헵타이드들은 복합적인 대사조절 효능을 유발할 수 있을 것으로 기대할 수 있다.

- 현미발효물로부터 장관면역계 활성화 다당체의 분리 및 특성 평가

최근 과잉생산과 소비 축소로 생산 농가에 어려움을 주고 있는 현미를 대상으로 고부가가치의 신 기능소재를 개발할 목적으로 현미발효물을 조제하고 이로부터 다당(FBR-0)을 분리하여 면역 증진 기능에 대해 조사하였다. 현미발효물 유래 조다당 FBR-0는 효소처리, DEAE-Sepharose FF 및 Sephadex G-100를 이용한 두 차례의 연속적 chromatography를 행하여 FBR-4a 및 FBR-4b로 정제하고 이들이 갖는 화학적 특성을 살펴본 결과, FBR-4a는 분자량 약 62 kDa, 중성당 88.3%, 산성당 11.7%을 가진 고분자다당체이며 구성당 분석결과, galactose(43.2%)와 arabinose(21.7%)가 높은 비율로 구성되어 있었으며, FBR-4b는 분자량 약 20 kDa, 중성당 50.8%, 산성당 47.6%을 가진 저분자다당체로 galactose, arabinose 및 mannose를 함유하고 있었으나 상대적으로 높은 산성당을 가진 다당체였다. 또한  $\beta$ -glucosyl Yariv reagent를 이용한 젤확산 실험을 통해 FBR-4a는 식물세포벽의 pectin 다당에서 분리된 Type-II형의 arabinogalactan이 높은 비율로 함유되어 있음을 확인할 수 있었다. 현미발효물 유래 정제다당 FBR-4a 및 FBR-4b를 복강 유래 macrophage, RAW 264.7 세포주, Caco-2 세포주에 처리한 결과, 두 다당 모두 세포독성을 나타내지 않았으나, 특히 FBR-4a의 경우 복강 유래 macrophage, RAW 264.7 세포주로부터 NO와 IL-6, IL-12 및 TNF- $\alpha$ 와 같은 다양한 cytokine의 생산을 농도의존적으로 유도하였으며, IL-6 및 TNF- $\alpha$ 의 mRNA 발현량을 측정된 결과에서도 FBR-4a는 FBR-4b에 비해 우수한 활성을 보였다. 또한 Peyer's patch를 통한 장관면역 활성화 실험을 행한 결과, FBR-4a는 Peyer's patch 세포를 자극하여 IL-6의 생산을 농도의존적으로 증가시켰으며, Peyer's patch를 경유한 골수세포 증식 실험에서는 FBR-4a만이 높은 골수세포 증식활성을 나타내었다. 또한 FBR-4a는 Peyer's patch 세포에 존재하는 T<sub>reg</sub> 세포를 자극하여 IL-10 및 TGF- $\beta$ 의 생산을 유도하였으며, IgA의 생산을 농도의존적으로 증가시켰다. 또한 Caco-2 세포와 대식세포의 혼합배양계에서, FBR-4a는 Caco-2 세포를 통과하여 RAW 264.7 세포로부터 IL-6의 생산을 유도함이 확인되었다. 한편 현미발효물 조다당 FBR-0 및 FBR-E를 mouse에 경구 투여한 결과, Peyer's patch 세포로부터 IgA 및 IL-6의 생산을 증가시켰으며 분변 중 잔여 IgA와 혈청 내 IL-6 또한 증가시켰다. 하지만 FBR-E를 경구투여한 군에서 장관면역관련 각 지표들은 상대적으로 우수한 것으로 나타났다. 이상의 결과를 종합할 때, 현미발효물에는 이제까지 알려진 건강에 유익한 성분 이외에도 활성 다당체가 존재하며 이들이 인체의 건강에 유익한 대식세포 활성화 및 장관면역활성을 나타냄을 알 수 있었다. 또한 현미발효물을 이용, 건강기능식품의 소재로 개발하기 위해선 재료에 대한 효소처리 공정의 도입이 필수적임을 확인하였다. 한편 활성 다당 획분 FBR-4a의 구조분석을 행한 결과, 총 13 종의 서로 다른 당쇄결합을 가지는 것으로 나타났으며, 크게 두종류의 다당 즉,  $\beta$ -arabino-(3,6)-galactan을 축쇄로 갖는 rhamnogalacturonan(RG)-I (약 90%)과  $\beta$ -glucan (약 10%)의 혼합물 형태로 존재함을 알 수 있었다. FBR-4a 중 RG-I 다당은 rhamnogalacturonan 주쇄가  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 5)-arabinan,  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4)-galactan 및  $\beta$ -arabino-(3,6)-galactan의 3종의 당쇄로 치환되어 있는 구조로 구성되어 있었지만  $\beta$



-arabino-(3,6)-galactan 측쇄가 풍부한 형태를 하고 있었다. 따라서 FBR-4a의 우수한 면역 증진 활성은 발효과정 중 현미의 pectin류에서 유리된  $\beta$ -arabino-(3,6)-galactan 측쇄가 풍부한 RG-I 구조에 기인함을 추정할 수 있었다. 산업적으로 응용가능한 시료 형태인 현미발효물 유래 면역활성다당체 FBR-E-1의 기능 지표성분을 설정하기 위해, 3차례에 걸쳐 FBR-E-1을 조제하고 구성당 분석을 행한 결과, FBR-E-1은 36.8%의 총당을 함유하고 있었으며 주로 Glc (29.6%)와 함께 Gal 및 Ara (각 2.4%, 2.0%)를 포함하였다. 따라서 FBR-E-1은 기능 지표성분으로 Gal 및 Ara의 함량을 4.0% 이상으로 설정함이 적절하다고 판단되었다.

## V. 연구성과 및 성과활용 계획

- 연구성과
  - 실용화·산업화 성과
    - 향미가 증진된 고기능성 현미발효물 소재 개발 완료
    - 탄수화물(전분) 분해 효소 활성을 가진 미생물 (곰팡이) 분리 2종 확보
    - 현미발효물 소재를 적용한 시제품 개발 3종 완료: 현미 발효 오리엔탈 드레싱, 현미 발효 머스타드 드레싱, 현미 발효 바비큐 소스
    - 현미발효물 소재의 적용범위 확대 예정 (장류, 소스류, 기호성 음료 등)
  - 교육·지도·홍보 등 성과
    - 2011 생명산업대전참가, 포스터발표 및 개발기술 관련 홍보 (11.10.13, 샘표식품(주), 생명산업대전, aT 센터)
    - 2012 생명산업대전참가, 포스터발표 및 개발기술 관련 홍보 (12.09.20, 샘표식품(주), 생명산업대전, aT 센터)
    - 2013 생명산업대전참가, 포스터발표 및 개발기술 관련 홍보 (13.09.26, 샘표식품(주), 생명산업대전, aT 센터)
    - <퓨처스클럽> 쌀·보리 등 가공... 기능성건강식품 개발 박차, 신문홍보 (13.07.30, 고려대학교, 헤럴드경제 뉴스 게재)
  - 특허·논문 등 지식재산권 확보
    - <특허>
      - 알파-아밀라아제 및 글루코아밀라아제고활성능을 가지는 아스퍼질러스 균주 및 그 배양방법(2011, 샘표식품(주), 대한민국, 출원번호 10-2011-012775)
      - 알파-아밀라아제 및 글루코아밀라아제고활성능을 가지는 리조푸스 균주 및 그 배양방법(2011, 샘표식품(주), 대한민국, 출원번호 10-2011-0127759)
      - PPAR 활성을 지닌 자생 불레기말 추출물을 함유하는 조성물(2012, 고려대학교산학협력단, 대한민국, 등록번호 10-1193730)
      - 전분 분해 효소 활성을 지니는 균주의 생산 방법(2013, 샘표식품(주), 대한민국, 출원번호 10-2013-0042296)
      - 혈중콜레스테롤 및 혈당강하효능을 가지는 현미발효물; 그 제조방법 및 용도 (2014, 고려대학교산학협력단, 대한민국, 출원번호 10-2014-0055758)

<논문 SCI 6건, 비SCI 1건, 투고진행중 5건>

#### SCI

- Iristectorigenin B isolated from *Belamcanda chinensis* is a liver X receptor modulator that increases ABCA1 expression in macrophage RAW 264.7 cell (Biotechnology Letters, 34:2213-2221, 2012)
- Taurine is a liver X receptor- $\alpha$  ligand and activates transcription of key genes in the reverse cholesterol transport without inducing hepatic lipogenesis (Molecular Nutrition & Food Research, 56(6), 1613-4125)
- Fucosterol is a liver X receptor agonist that regulates the expression of key genes in cholesterol homeostasis in macrophage, hepatocytes, and intestinal epithelium (Journal of Agricultural and Food Chemistry, 60:11567-11575, 2012)
- Ombuine-3-O-beta-D-glucopyranoside from *Gynostemma pentaphyllum* is a dual ligand of peroxisome proliferator-activated receptor alpha and beta/delta (Biochemical and Biophysical Research Communications, 430:1322-1328, 2013)
- The dipeptide H-Trp-Glu-OH (WE) shows agonistic activity to peroxisome proliferator-activated protein- $\alpha$  and reduces hepatic lipid accumulation in lipid-loaded H4IIE cells (Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters 24, 24 : 2957-2962, 2014)
- Ethyl 2,4,6-trihydroxybenzoate is an agonistic ligand for liver X receptor that induces cholesterol efflux from macrophages without affecting lipid accumulation in HepG2 cells (Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 22(12), 4094-4099)

#### 비SCI

- Hypolipidemic and anti-inflammatory activities of fermented soybean fibers from meju in C57BL/6J mice (Phytotherapy Res, Epub, 2014)

#### 투고진행중

- The hypolipidemic and hypoglycemic activities of fermented brown rice fibers in C57BL/6J mice (Life Sciences, Accepted, 2014)
- Effect of enzyme treatment on isolation of immuno-stimulating polysaccharide from fermented brown rices (한국식품영양과학회 심사 중, 2014년 43권)
- Structural characterization of intestinal immune-modulating polysaccharide purified from fermented brown rices (Phytotherapy Research 투고 중 2014년 28권)
- Macrophage-stimulating activities and chemical properties of polysaccharides purified from fermented brown rices (한국식품과학회지 투고 예정, 작성 중)
- In vitro and in vivo of the polysaccharides purified from fermented brown rices on intestinal immune system (Carbohydrate Polymers 투고 예정, 작성 중)

#### <학술발표 7건>

- C-FBM-1, a Natural Flavonoid, is a Ligand for Liver X Receptors (12.06.13, 고려대학교, 한국식품과학회, 대전)

- Small dipeptides, FBS-W1 and FBS-W2, are agonistic ligands for peroxisome proliferator-activated receptor- $\alpha$  (12.10.31, 고려대학교, The Korean Society of Food Science and Nutrition(KFN), 제주도)

- Fermented brown rice extracts activate liver X receptor activates in vitro (12.10.31, 고려대학교, The Korean Society of Food Science and Nutrition(KFN), 제주도)

- Isolation and characterization of immuno-stimulating polysaccharide from fermented brown rices (12.11.01, 경기대학교, 41th Anniversary 2012 International Symposium and Annual Meeting, 제주 ICC)

- Macrophage-stimulating activities and chemical properties of polysaccharides from fermented brown rices (13.08.29, 경기대학교, 2013 Annual Meeting of Korean Society of Food Science and Technology, 천안 예술의전당)

- Intestinal immune-modulating activity of polysaccharides Isolated from fermented brown rices (13.11.15, 경기대학교, 2013 International Symposium and Annual Meeting of the KFN, 광주 김대중 컨벤션센터)

- Rhamnogalacturonan, a promising immuno-active polysaccharide(14.07.02, 경기대학교, 2014 한국당과학회 하계학술대회, 대천 한화콘도)

• 성과활용계획

- 미생물발효기술을 기반으로 현미의 외피를 구성하는 주성분인 hemicellulose 성분을 분해하는 국균을 선별하였고, 이를 영양학적, 공정상의 최적화된 현미발효 기술 확보하였음.
- 신제품으로 개발될 향후 다양한 소스와 드레싱에 액상과당을 사용하지 않고 현미발효물을 적용하는 연구를 추가 진행할 계획이며, 상품화도 검토할 예정임. 추가 상품화 진행에 따라 당 연구결과를 적극적으로 활용하여 소비자들에게 건강에 대한 상식과 현미의 장점을 부각시켜 시장진입에 활용할 계획임.
- “현미발효물” 소재를 산업용으로 다양하게 이용하기 위해서는 목적에 부합하는 다양한 제형의 연구개발이 추가적으로 필요함.
- 국균 이외에도 건강기능성을 부여하고 풍미를 증진시키는 다양한 미생물의 적용을 통한 확장 연구를 통해 고부가가치를 부여할 수 있으므로, 당 연구에서 적용된 소스류 뿐 아니라 기호성 음료, 장류, 가공/즉석 식품 등 무궁무진하게 영역을 넓혀서 적용가능함.
- 당 연구결과를 활용하여 현미발효물에 다양한 미생물군 (국균, 유산균, 효모 등)을 적용하여 발효에 따른 향미성분분석 및 적용가능성 탐색이 가능함. 또한 해외 시장을 타겟으로 한 수출용 제품류에 현미발효물 소재 적용시 가공적성 연구 및 안정성 유지 탐색이 가능함.
- 현미발효물 소재의 향미성분 분석을 통한 타 당류/감미료 소재와의 우위성 확인 연구
- 유아용/노인용 기호성 음료에 적용하여, 생애주기별 영양소 공급에 도움을 줄 수 있는 제품 개발 가능성 탐색 가능함.

## SUMMARY

- **Development of function and flavor-enriched fermented brown rices and applications**

We studied the microbial fermentation technology to the brown rice which is natural plant families and developed applications. Separated the mold suitable for brown rice fermentation showed high enzymes activity. Studies have shown that separated mold strains did not produce the aflatoxins and high amylase activity( $\alpha$ -amylase and glucoamylase) to convert starch into glucose. Two kinds of mold producing enzymes that break down components such as the brown rice cellulose have been produced in mass scale and stabilized. After it was carried out in pilot scale fermentation brown rice, the mass manufacture of brown rice fermentation was been in 100L reactor heat exchange using a mass culture and fungal fermentation yield was measured.

Also, the development of the product which applied a brown rice fermentation production and process optimization techniques was studied. Developing a recipe that minimizes the browning phenomenon due to heat treatment in the manufacturing process was completed. Fructose syrup was replaced by a liquid fermented brown rice syrup in developing products. Safety sterile process conditions and the filling process conditions was set.

After reviewing the functional concept application of the rice fermentation, the developed products that oriental dressing, mustard dressing and BBQ was applied "No added fructose syrup" in label. Because of delicious flavor is enhanced with healthy brown rice, it can be differentiated with commercial products that use fructose syrup. The fermented brown rice usage was displayed on the front of the product label with the product name.

- **The evaluation of effects of fermented-brown rices on glucose and lipid metabolism**

Biological effects of fermentation of brown rice on the glucose metabolism and lipid metabolism were investigated. We examined whether fermentation of brown rice extracts (FBR) activate LXR and PPAR activity in luciferase assay. Results showed that FBR without hull components showed significant activation of LXR but not PPARs, thus selected as a target extracts for further study. In cultured cells, the selected FBR (no hull components) revealed significant lipid reduction suggesting potential

hypolipidemic activities. In animal studies, we isolated fiber fraction (FBRF) and peptide/amino acid fraction (FBRP) from the selected FBR then fed high-fat-diet fed C57BL/6J mice with 500 mg/kg body weight of each extract (FBR, FBRF, FBRP) for 4 weeks. Results showed that three extracts showed hypolipidemic and hypoglycemic effects with the greatest activity with FBRF. The oral administration of FBRF to C57BL/6J mice reduced their plasma cholesterol, triglycerides, LDL cholesterol, levels, the hepatic lipid accumulation, and the adipocyte size, resulting in a body weight reduction. In addition, FBRF improved glucose tolerance and insulin sensitivity. The expression levels of genes associated with cholesterol metabolism, fatty acid synthesis, fatty acid oxidation, glycolysis, and gluconeogenesis were significantly regulated in mouse livers. FBRF feeding reduced the levels of pro-inflammatory cytokines, which could improve insulin resistance. These results demonstrate that FBR, especially the fiber fraction, shows potent hypolipidemic and anti-diabetic activities that regulate the hepatic expression of genes associated with lipid and glucose metabolism and inflammatory cytokines.

- **Isolation and characterization of intestinal immune system modulating polysaccharide from ferments of brown rice**

This study designed to elucidate the intestinal immune system modulating activity of the polysaccharides purified from fermented brown rices. FBR-4a and FBR-4b have been purified by enzyme digestion(FBR-E) and subsequent two-successive chromatographies on DEAE-Sephadex FF and Sephadex G-100 from the crude polysaccharide(FBR-0) in the fermented brown rices. FBR-4a and FBR-4b were eluted as almost single HPLC peaks and their molecular weights were estimated to be 62 kDa and 20 kDa, respectively. The high molecular weight polysaccharide, FBR-4a mainly consisted of neutral sugar(88.3%) such as galactose(43.2%) and arabinose(21.7%), and uronic acid(11.7%), whereas the low molecular weight polysaccharide, FBR-4b mainly consisted of neutral sugar(50.8%) such as galactose, arabinose and mannose, and rich in uronic acid(47.6%). Only FBR-4a strongly reacted with  $\beta$ -glucosyl Yariv reagent, suggesting the presence of an arabino- $\beta$ -3,6-galactan moiety. FBR-4a and FBR-4b did not affect the growth of on murine peritoneal macrophages, RAW 264.7 murine macrophage cell line and Caco-2 intestinal epithelial cell line. Murine peritoneal macrophages and RAW 264.7 cells stimulated by FBR-4a and FBR-4b showed enhanced production of nitric oxide(NO) and various cytokines such as IL-6, IL-12 and TNF- $\alpha$ . However, macrophage-stimulating activity of FBR-4a was higher than that of FBR-4b at the same dosages. And only FBR-4a showed enhanced expressions of mRNA expression for IL-6 and TNF- $\alpha$  by dose dependent manner. In an *in vitro* assay for intestinal immune modulating activity, FBR-4a augmented the production of IL-6 by Peyer's patch cells and also showed the highest

bone marrow cell proliferation activity through Peyer's patch cells. And FBR-4a also augmented the production of IL-10 and TGF- $\beta$  which induced the production of IgA, in a dose dependent manner. In macrophage activation by permeation through Caco-2 cell layer, FBR-4a showed significantly higher productions of IL-6. To examine the *in vivo* effects of polysaccharides on intestinal immune system, FBR-0 and FBR-E were administered orally into the mice for 30 days. Oral administration of FBR-0 and FBR-E induced the enhanced productions of IL-6 and IgA by Peyer's patches and increased the excretion of IgA into mouse feces and the production of IL-6 in mouse sera. However, oral administration of FBR-E was more effective at the same dosages. These results suggest that enzyme digestion process are indispensable to prepare polysaccharide with higher immuno-stimulating activity from fermented brown rices. On the other hand, methylation analysis indicated that FBR-4a comprised 13 different glycosyl linkages and it existed as the mixture composed of two different polysaccharides such as  $\beta$ -arabino-(3,6)-galactan-containing rhamnogalacturonan (RG)-I (about 90%) and  $\beta$ -glucan (about 10%). A RG-I residue in FBR-4a was composed of rhamnogalacturonan core substituted with neutral carbohydrate side chains such as  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 5)-arabinan,  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4)-galactan and  $\beta$ -arabino-(3,6)-galactan. However, the RG-1 residue of FBR-4a was rich in  $\beta$ -arabino-(3,6)-galactan side chain. It supposed that the potent immuno-stimulating activity of FBR-4a may be due to the  $\beta$ -arabino-(3,6)-galactan-rich RG-I which was released from the pectin of brown rices during fermentation process. To determine the functional/marker compound, three batches of FBR-E-1 (industrially applicable sample) were prepared and their component sugars were analyzed. Total sugar content in FBR-E-1 was 36.8% in dry basis and it contained Glc (29.6%) in addition to Gal and Ara (2.4 and 2.0%). The result suggests that immunostimulating polysaccharides, FBR-E-1 should contain more than 4.0% of Gal and Ara as marker compounds.

## CONTENTS

Chapter 1.	Introduction .....	16
Part 1.	Aim of research .....	16
Part 2.	Background and needs of research .....	16
Chapter 2.	Local and international trends in technology development .....	20
Part 1.	Local trends in technology development .....	20
Part 2.	International trends in technology development .....	22
Chapter 3.	Contents and results of research and development .....	23
Part 1.	Development of function and flavor-enriched fermented brown rices ..	23
Part 2.	Development of function and flavor-enriched fermented brown rices applications .....	35
Part 3.	The evaluation of effects of fermented-brown rices on glucose and lipid metabolism .....	94
Part 4.	Isolation and characterization of intestinal immune system modulating polysaccharide from ferments of brown rice .....	127
Chapter 4.	Level of target accomplishment and contribution to related fields .....	191
Chapter 5.	Achievements of research and development and plans for utilizing research results .....	198
Chapter 6.	Information on international scientific technology collected during research results .....	202
Chapter 7.	Research equipment status .....	203
Chapter 8.	References .....	204

# 목 차

제 1 장	연구개발과제의 개요 .....	16
1절	연구개발의 목적 .....	16
2절	연구개발의 필요성 및 범위 .....	16
제 2 장	국내외 기술개발 현황 .....	20
1절	국내·외 기술개발현황 .....	20
2절	국내·외 기술개발전망 .....	22
제 3 장	연구개발수행 내용 및 결과 .....	23
1절	향미가 증진된 현미발효물 소재 개발 .....	23
2절	향미가 증진된 현미발효물을 활용한 응용제품 개발 .....	35
3절	현미발효물의 당 및 지질대사 개선 효능 평가 .....	94
4절	현미발효물로부터 장관면역계 활성화 다당체의 분리 및 특성 평가 .....	127
제 4 장	목표달성도 및 관련분야에의 기여도 .....	191
1절	연구개발목표 달성도 .....	191
2절	기술발전 기여도 .....	196
제 5 장	연구개발 성과 및 성과활용 계획 .....	198
1절	실용화·산업화 계획(기술실시 등) .....	198
2절	교육·지도·홍보 등 기술확산 계획 등 .....	199
3절	특허, 품종, 논문 등 지식재산권 확보계획 등 .....	199
4절	추가연구, 타연구에 활용 계획 등 .....	201
제 6 장	연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보 .....	202
제 7 장	연구시설·장비 현황 .....	203
제 8 장	참고문헌 .....	204



# 제1장 연구개발과제의 개요

## 1절 연구개발의 목적

본 연구는 식물성 천연원료인 현미에 미생물 발효기술을 접목하여 소재를 개발하고, 이를 응용한 제품군을 개발하며 현미발효물의 건강 기능성 평가를 통한 고부가가치를 창출하는 것을 최종목표로 하였다. 현미에 미생물 발효기술을 접목하면 맛, 영양학적, 기능학적 성분이 강화된 현미의 미생물 발효기술을 최적화할 수 있고 식물성 원료가 지닌 영양학적 성분의 손실이 전혀 없는 식품 소재 개발로 생리활성 및 장관 면역 기능 강화 제품 개발에 기여하게 될 것이다. 이를 통해서 국내 쌀 소비를 촉진할 수 있는 다양한 신수요 창출로 농가 소득 증대 및 쌀 재고 소진 등 농업 관련 산업 발전에 기여할 수 있다. 또한 현미발효물 응용제품을 고객 요구 맞춤형 제품으로 개발하여 마케팅, 홍보, 유통/영업을 적극 활용함으로써 수입소재 대체 및 세계 소재 식품산업 시장 공략 가능함으로 본 연구를 통해 관련 산업의 기초 연구자료 및 제품 응용 가능성을 제안하고자 한다.

## 2절 연구개발의 필요성 및 범위

### 1. 연구개발의 필요성

현미는 주요 식량작물이며, 한국인이 즐겨 섭취하는 먹는 곡류 중 하나이다. 현대 한국인들은 곡류의 식품 섭취비율이 가장 높으며, 그 중 현미는 건강기능성에 관한 연구결과들이 많이 보고되고 있는데, 특히 콜레스테롤 조절 기능, 혈당조절 기능, 항산화 기능, 혈압조절 기능 및 면역력 활성화 기능까지 인체 내 생리활성에 있어 중요한 역할을 하고 있다. 현미의 미강에는 이러한 생리활성물질 및 영양성분이 많이 함유되어 있는데, 식감이 좋지 않아 잡곡으로써 섞어 먹는 현미의 소비 비율은 2.1%로 굉장히 낮은 수준이다 (2007년, 주요 식량작물, 화훼 소비패턴, 농수산물유통공사).

국민의 소득 향상으로 식생활이 서구화되면서 육류, 어류, 과일류, 빵 등의 소비량이 급증하고 있으며, 1인당 쌀 소비량은 지속적으로 감소하고 있다. 또한 일본 0.6%('98-'07), 대만 1.8%('98-'07)에 비해 한국의 쌀소비 연평균 감소율은 2.4%('98-'08)로 더욱 빠르며, 연간 쌀 소비의 지속적인 감소로 재고미가 증가추세에 있다. 쌀 가공식품 산업은 쌀 소비를 확대시키는 유력한 수단이면서도 건강에 기여함으로써 소비자에게 만족을 줄 수 있는 성장가능성이 있는 분야로 인식되고 있다(한국농촌경제연구원, 2011). 이에 쌀 소비 촉진을 위한 쌀 가공기술 혁신과 제품 다양화의 필요성이 주목되었다. 쌀의 감소를 보상하기 위하여 다양한 가공식품을 개발하려는 시도가 활발히 이루어지고 있으며, 떡과 주류 이외에도 스낵류, 국수, 빵 등 여러 유형의 쌀가공 제품이 시중에 유통되고 있다. 가공용 쌀은 연간 27만톤(국내 생산량의 6%)이 소모되며, 2008년 쌀가공 식품 시장 규모는 총 1조 8천억 원이었다.

쌀 재고량의 증가로 인해 쌀 가공식품 활성화가 일어났고, 식품업계에서는 국내산 쌀을 첨가

한 다양한 제품을 출시하였다. 청정원이 내놓은 ‘참작 우리김치 햄·소시지’의 경우, 밀가루 대신 국내산 쌀가루를 넣은 점이 특징이다. 웅진식품의 어린이용 시리얼 제품인 ‘오곡 담은 카카오링’과 ‘오곡 담은 카라멜링’에는 쌀과 보리, 조 등 100% 국내산 오곡을 넣었다. 오뚜기의 경우, 국내산 쌀로 빚은 ‘쌀막걸리 식초’와 국내산 쌀가루를 넣은 ‘핫케이크 믹스’와 ‘케이크 믹스’를 출시하였다. 쌀의 우수한 건강기능성(콜레스테롤 저하, 당뇨병과 비만 개선, 노화방지, 혈압 조절 등)에 대하여 지속적으로 보고되고 있으나 기능성 소재를 확보하는 기술의 부족과 용도에 관한 소재화 기술이 부족하여 고부가가치를 갖는 2차 쌀 가공품 개발이 매우 제한적인 상태이다.

식이습관의 중요성과 더불어 건강을 추구하는 소비자의 욕구를 충족시키고자, 식품 전반에 기능성의 중요성이 부각되고 있다. 기능성을 부각시킨 식품이 고부가가치 상품으로 급부상하고 있으며, 쌀, 특히 도정하지 않은 현미의 건강기능성 및 효능은 많은 연구에서도 보고되고 있다. 소비자들이 쌀가공식품을 구입하는 가장 큰 이유는 ‘건강에 유익을 줄 것 같아서’가 58.9%로 가장 높은 비중을 차지했으며, 밀로 제조된 제품에 비해 ‘맛이 더 좋아서’ 30.4%, 그리고 ‘쌀 소비촉진 운동에 동참’ 7.1% 순으로 나타났다. 국민들의 식성이 서구화되면서 빵, 피자 등의 밀가루 중심의 외식식품에 대한 선호도가 높아졌으며, 밀가루 중심의 식사로 이행하고 있음을 반영하였다. 쌀 중심의 식사와 밀가루 중심의 식사의 영양·생리적 가치를 비교하는 많은 연구들은 이러한 서구화된 식사에 대한 우려를 표하고 있다. 이에 쌀 가공식품은 로하스-웰빙 트렌드의 확산 및 밀가루에 대한 대체 상품으로써 시장에 자리를 잡기 시작하며 양적성장을 이루었으며, 정부의 쌀 가공식품산업 육성정책 추진과 쌀 가공식품 진흥을 위한 법률제정 추진 등 긍정적 요인으로 인하여 20% 이상 소비증가율이 예상된다.

쌀의 일반 영양성분은 전분으로서 약 75~80%를 차지하고 있으며, 단백질이 6~8%, 지방, 섬유질, 회분이 각각 1~3%정도 함유되어 있다. 또한 무기질로서는 인과 칼륨, 칼슘, 마그네슘, 나트륨, 철분 등이 함유되어 있으며, 비타민으로서는 비타민 B 복합체가 풍부하게 함유되어 있다. 쌀은 옥수수, 밀가루 등에 비해 양질의 단백질을 갖고 있으며, 특히 현미에는 헤미셀룰로오스라는 식이섬유가 많이 함유되어 있어 체내지질함량 감소 등 다양한 기능을 하는 것으로 보고되고 있다. 현미는 도정한 쌀에 비해 각종 비타민, 미네랄 및 식이섬유소가 풍부하게 들어있는 것이 특징인데, 이는 쌀겨 및 배아의 영양소적 가치가 배유에 비해 월등히 높기 때문인 것으로 알려져 있다. 또한 현미에 존재하는 여러 가지 생리활성 물질(대표적인 단일성분에는 아라비노자이란(Arabinoxylan), 감마오리자놀( $\gamma$ -Oryzanol), 옥타코사놀(Octacosanol) 등)이 그 영양학적 가치를 더욱 높여주고 있다. 또한, 수용성 다당류(soluble polysaccharide)는 장내세균에 의해 자화되어 유기산으로 변화하면서 장내 pH를 저하시켜 장내 체류시간을 단축하여 정장작용에 도움을 주며, 간내 콜레스테롤을 저하시키는 효과가 있다. 또한 칼슘대사에도 관여하여 칼슘의 흡수촉진작용과 대퇴골의 칼슘 농도저하 방지효과가 확인되어 골다공증 예방 및 치료에 도움이 되고, 미네랄을 흡수촉진하여 미네랄 보충에 도움을 준다고 보고되어 있다. 식물성 원료의 발효 숙성 과정에 생성되는 수용성 다당류는 항알러지 기능을 가지는 것으로도 보고되고 있다. 도정된 쌀에 비해 현미의 혈중 콜레스테롤 저하 기능, 혈당조절기능, 항산화 기능이 더욱 뛰어난 것으로 보고되고 있으며, 이는 쌀뿐 아니라 미강에 존재하는 많은 영양학적 성분들(미강 속 hemicellulose, oryzanol, unsaturated fat, protein, tocotrienol 등 지용성성분 페놀화합물 등) 때문인 것으로 나타나있다. 건강식품으로서 식물의 식이섬유가 주목을 받고 있으나, 이는 곡류의 외피에 주로 존재하기 때문에 이를 미분화해도 입안에서 식감을 해치는 결점이

있으므로, 외피로 난소화성 성분인 hemicellulose를 추출하여 수용성 다당류나 arabinoxylan 등 생리활성물질을 얻고자 하는 방법이 다양하게 연구되고 있다. 따라서 현미가 가진 소화 및 흡수가 어렵다는 단점을 보완하고 영양학적, 기능성을 증가시키기 위한 발효기술의 적용이 대두되고 있다. 미생물을 이용한 발효는 각종 유기산, 카보닐 물질, 에스테르, 에탄올, 케톤, 락톤 등의 향기물질과 미생물 단백질(microbial protein), 아미노산, 지질, 비타민 등을 새롭게 형성하고 체내 이용률을 높여서 건강에 유익한 작용을 하는데 도움이 된다.(예, 아미노산의 가수분해로 인한 단백질의 이용률 상승). 반면에 소화를 방해하거나 영양소의 생체내이용을 저해하는 항영양소(antinutrient)는 발효과정이나 효소에 의한 분해과정을 통해 제거된다. 곡물은 발효 과정을 통해 더 높은 영양적 가치를 나타낼 수 있을 것으로 보고되고 있으나, 이러한 건강기능성에서의 우수성에도 불구하고, 현미를 비롯한 곡물 발효에 대한 연구 및 제품화기술을 통한 상품화는 아직까지 매우 미흡한 상태이다. 식물 세포벽에만 smart하게 작용하여 hemicellulose를 효과적으로 분해하여 벼과 식물이 지닌 단백질, 미네랄, 아미노산펩타이드, 수용성 다당류와 arabinoxylan 등의 맛과 기능성 물질의 손실이 없는 미생물 발효 기술 개발이 필요한 실정이다.

현미는 과피, 종피 및 호분층으로 구성된 미강과 배아, 배유로 이루어져, 백미에 비하여 지방, 단백질, 비타민 B군, 비타민 E 등이 풍부하고, 식이섬유의 함량이 높으며, 칼슘과 철분을 비롯한 각종 무기질의 함량이 높다. 또한 발아에 의하여 GABA와 유리형태의 ferulic acid의 함량이 크게 증진되고, 수용성 식이섬유의 함량이 증가하고, 단백질이 저분자화되어 혈압강화 효과 등을 나타내는 것으로 미루어 볼 때, 우리의 기술로 발효시켜 분해한 ‘현미발효물’ 또한 분해로 인한 수용성 물질이 많아지고, 이로 인해 발아현미와 유사한 효능 혹은 더 뛰어난 효능을 나타낼 것이라고 예상할 수 있다. 또한 아직까지 현미발효물에 대한 적절한 효능 평가가 미흡하므로, 현미에 미생물 발효기술을 적용하여 개발된 현미발효물의 지질대사, 당대사 조절능 평가 및 면역 세포 활성능 평가 등 건강 기능성 효능 평가 및 기작 연구를 통해 보다 객관적이고 과학적인 근거를 마련하여 고부가가치화 할 수 있는 연구 실행이 필요하다. 기능성이 입증된 현미발효물은 식품 소재로써 oat meal 혹은 rice pudding 등 시대의 trend에 맞는 제품을 창출할 수 있는 잠재력이 있으며, 그 외에도 스프레드&잼류, 발효유, 장류, 음료, 토마토케첩, 소스류&양념장류 및 드레싱류에 다량 첨가되는 감미료를 대체할 수 있는 범용성이 가능한 것으로 예상된다. 따라서 현미발효물을 제품에 적용하고, 상품화하여 경제적 고부가가치를 창출하여 소득 증대 및 수요 창출을 일으킬 수 있는 제품화 기술개발이 필요하다.

국내 설탕 시장의 현황을 보면, 국제 유가 상승의 영향(설탕 원료 사탕수수의 바이오에탄올 생산에 사용 등)으로 인해 원당가격이 지속적으로 상승하고 있으며, 현재 원당 100% 수입으로 환율과 국제가격에 영향이 크다. 국내 설탕 생산량은 연간 약 130만톤 규모이며, 2008년 Non GMO 옥수수를 도입하여 과당, 물엿이 설탕으로 대체되었다. 또한 국내 설탕 생산량이 꾸준히 증가하고 있으며, 가정용 설탕 소비는 감소하고 있지만 가공식품용 설탕 사용량은 증가하고 있는 추세이다. 국내 과당은 연간 약 25만톤 규모이며, 중국산 수입 물엿으로 대체되고 있는 물엿의 생산량은 연간 35만톤 규모이나 전분당 사용 감소 추세에 따라 생산량의 감소가 예상된다. 고감미료는 2005년 전후부터 연간 약 1,600톤을 유지하고 있으며, 그 외 당알콜류 등이 시장에서 감미료로써 사용되고 있다.

오늘날의 당류 산업은 원료의 가격 및 수급 측면에서 불안정성이 확대되고, 무설탕, 천연감미료 등 보다 빠르게 소비자의 식품 선호 추세가 변화하고 있다. 저칼로리, 저 GI(Glycemic

Index), 생리적인 기능성 등에 단편적으로 무게를 두고 올리고당류, 당알코올류 및 고감미료류 등의 다양화와 시장 정착을 목표로 한 노력들이 당류의 개발 트렌드를 대변하였다면 법적 규제 강화로 이러한 노력의 가속화는 물론 Multi Sweetner 또는 Blended Sweetner형태로의 방향 전환이 필요한 시점이다. 현재 시판중인 비우호적 감미료를 대체할 수 있으며, 기능적 차별성 및 가격 경쟁력이 우수하여 수요 창출을 유도할 수 있는 천연 소재의 multi sweetner 소재 개발이 필요하다. 국내산 천연 원료(현미)에 전통 식품산업과 바이오 기술을 접목하여 고부가가치 감미료 대체소재이자 식품 소재 개발을 이룰 수 있으며, 이를 통해 수입산 감미료를 대체하고, 국내의 기술로 세계의 감미료 시장을 선점할 수 있다는 점에서 괄목할만한 성과가 예상된다.

최근 소비자들은 로하스-웰빙 트렌드가 정착됨에 따라 농산물 및 가공식품에 대한 요구가 건강 지향과 천연(자연) 지향적인 특성을 보인다. 국내 농산물 수요 정체 및 해외 농산물 수입 증대에 따라 국내 농업환경의 급격한 변화에 대비하기 위해서는 고객의 욕구, 라이프 스타일 변화 흐름을 파악해야 하고, 시장 및 유통의 흐름, 글로벌 시장의 동향을 파악할 필요가 있다. 국내 소비자들도 천연유래의 자연에 가까운 식품에 대한 요구가 증가하고 있다. 이렇듯 정보의 확산이 빠르고, 시대의 가치가 급변하는 시대를 맞이하여, 좋은 품질의 제품인 고부가가치의 천연유래 식품(소재)를 생산할 수 있는 새로운 기술의 개발이 시급하다.

장류 발효 기술이 접목된 탄수화물 중심의 미생물 발효기술을 통해 현미 전곡(全穀)의 유익한 영양성분 (섬유소, 무기질, 비타민, phenol 화합물류, phytoestrogen류 및 불포화지방산 등)을 유지·강화하고, 풍미와 감미질이 우수하며, 건강 증진에 도움이 되는 천연발효물소재 및 제품개발이다. 본 연구에서의 현미발효물은 현미 자체로 자사에서 선별된 미생물 소재 및 발효 기법을 통한 최적화 단계를 거쳐 개발됨으로서, 현미가 보유하고 있는 영양 성분들을 소실하지 않고, 기능 활성을 유지·강화하여 기타 대체 소재와 차별화된 우수한 기능성 소재로 개발하고자 한다. 현미 자체의 기능성인 당 대사, 지질대사의 유효성으로 인해 대사증후군에 도움을 줄 뿐 아니라 다당류가 가지고 있는 면역 활성능을 평가하여 스트레스, 과로, 흡연, 음주 등 잘못된 생활습관으로 인해 떨어진 면역 세포 활성화에 도움을 주어 면역력 조절 및 강화에도 도움이 되는 기능성 현미발효물 소재를 개발하고자 한다. 현미가 미생물발효를 통해 영양성분 강화 및 기능성 획득하게 됨은 물론이며, 깔끔한 맛을 구현하여 소비자들에게 건강에 좋은 제품을 맛있게 섭취할 수 있도록 상품화 단계까지 진행하고자 한다.

## 제2장 국내외 기술개발 현황

### 1절 국내·외 기술개발 현황

#### 1. 국내·외 환경 변화

정부가 쌀 가공업체들에 공급한 가공용 쌀의 소진 물량은 2008년까지 10만톤 안팎이었으나 2009년 13만여톤, 2010년 18만여톤으로 매년 30% 가까운 고성장을 하고 있어 쌀가공 식품의 수요가 꾸준히 증가되고 있다. 가공용 쌀에서 수입쌀이 차지하는 비중은 2008년 99.3%였고 2009년에도 98%를 기록했으나, 2010년 82%, 2011년에는 전체 소비된 가공용 쌀(24만 2559톤)의 50% 수준으로 감소되는 추세이다. 쌀가공 식품의 원산지 표시제의 의무화(쌀과자류 1996년, 막걸리 등 주류 2009년, 떡 2010년 원산지 표시제 적용)와 국내산 쌀을 선호하는 소비자들의 기호에 맞춰 식품업체들의 쌀가공식품에 국내산 쌀 사용 비중이 증가되고 있다. 2008년보다 지난해 설탕 판매량이 15% 이상 감소한 반면, 대체 감미료 시장은 같은 기간 약 61%가 증가한 것으로 조사되어 식품업체의 설탕을 대체할 새로운 감미료 개발 및 출시가 증가하였다.

대표적인 대체 감미료인 올리고당 시장은 2008년 106억원 규모에 그쳤지만 2011년에는 222억원에 달하며 성장세가 지속되고 있다. 코코넛 껍질에서 자일리톨 원료인 자일로스 추출한 설탕 감미료(타가토스)로 식후 혈당 조절에 도움이 되어 식품의약품안전청으로부터 기능성을 인정받은 설탕 대체 감미료 출시되고 있다. 옥수수 전분 100%로 만들어진 이소말토 올리고당을 주원료로 한 설탕 없는 올리고당 제품 출시되었다. 당도가 설탕보다 1.5배 가량 높지만 혈당상승지수(GI)는 3분의 1 수준인 멕시코산 블루아가베 선인장 열매를 착즙해 만든 천연 유기농 아가베 시럽 제품 출시되었다.

관세청에 따르면 2009년 1195t이었던 설탕 대체 감미료의 수입중량은 2010년 1893t으로 약 58% 증가되었으며 2011년에는 2507t으로 32%의 증가율을 보인다. 지나치게 많은 과당 섭취시 요산을 만들어 고혈압을 일으키거나 간에서 지방으로 전환되어 중성지방 수준을 상승시키고 인슐린 저항성을 부여하는 등의 부작용이 있다는 사실이 계속 밝혀지고 있다. 식품업체는 과당이 없고 칼로리는 설탕보다 낮으며 물성은 설탕과 비슷하면서 당도도 너무 높지 않은 감미료 대체제의 개발과 출시가 활발히 진행되고 있다.

#### 2. 국내·외 기술개발 현황

본 연구는 탄수화물을 미생물을 기반으로 발효하는 기술과 특정 texture를 가진 감미소재를 활용하여 다양한 응용제품을 개발하는 제품기술을 대표적인 기술로 볼 수 있다. 이에 관련기술 최고 보유국의 기술을 100%로 기준하였을 때, 당 연구개발팀의 국내·외 기술개발수준은 다음과 같다.

Table 1. 본 연구관련 국내·외 기술수준 비교

개발기술명	관련기술 최고보유국	현재 기술수준	
		우리나라	연구개발팀
탄수화물 원료 최적 발효 미생물 분리 및 개발법	일본	50%	80%
현미를 이용한 아라비노 자일란 강화 발효 기술	-	50%	80%
곰팡이에서 분리한 효소로 arabinoxylan 강화	네덜란드	50%	80%
현미 발효 식품 소재를 활용한 스프레드 제품 개발	프랑스	70%	90%
현미 발효 식품 소재를 활용한 드레싱 제품 개발	미국	60%	80%
현미 발효 식품 소재를 활용한 케찹 제품 개발	미국	70%	80%
현미발효물을 이용한 당대사 개선 효능 제품 개발	일본	20%	50%
현미발효물을 이용한 지질대사 개선 효능 제품 개발	일본	20%	50%

특허분석을 통한 기술개발 현황을 살펴보면 벼의 껍질에서의 다당류(polysaccharide)의 순수 분리 정제에 한정되어 있어 벼과 식물의 영양, 기능적인 측면은 고려되지 않았으며, 또한, 탄수화물을 발효하여 생성되는 산물의 맛적인 요소가 고려되지 않았다. 따라서 본 연구에서는 물리, 화학적인 정제 작용 없이 안정적인 미생물 발효 방법을 도입하여 정제하여 인위적으로 만들어진 당이 아닌 발효를 통해 만들어진 식품 소재 제조 기술을 개발할 예정이다.

드레싱에 관련한 특허 분석 결과 다양한 종류의 드레싱에 대한 제조법에 대한 특허에 치중되어 있으므로 본 연구과제에서는 드레싱의 기름함량을 줄이고 현미발효물로 유화 및 물성을 보완한 칼로리가 낮은 드레싱 제조기술을 확보한 ‘기존 당류를 현미발효물로 대체하여 부드러운 단맛과 기름함량을 줄여 칼로리가 낮은 기능성 드레싱’에 대한 기술을 확보할 수 있다.

현미발효물의 건강기능성과 관련된 특허는 미비한 실정이다. 현미발효물을 이용한 당 및 지질대사 조절 효능에 관한 기존 특허의 경우, 현미를 포함한 곡물 혼합물의 발효를 이용하거나 미강만을 사용하였다. 현미에서 기능성을 나타내는 유력한 부위인 미강 발효에 관한 연구 또한, 거의 이루어진 바가 없고 당 및 지질 대사 조절을 통한 기능성에 초점을 맞춘 특허가 보고되지 않았다. 본 연구과제에서는 현미발효물의 당 및 지질대사 효능 및 기작을 밝혀 주요 바이오마커를 타겟으로 한 국내 특허 출원을 도모하고자 한다.

논문분석을 통한 기술개발 현황을 살펴보면, arabinoxylan의 효소분해, 분리, 정제하는 연구와 상기 물질을 이용한 항암효과, 항염증효과 등의 면역조정 작용에 관한 연구 분야에 치중되어 있었다. 본 연구를 통해 곡류에서의 arabinoxylan을 분리, 정제한 단일물질이 아닌 미생물 발효 방법에 의해 곡류의 영양학적인 물질과 arabinoxylan의 함량을 강화시키고자 한다.

현미에 미생물 발효기술을 접목하여 생성되는 우수한 기능성을 가진 당류를 적용하여 기존 당류의 부정적 측면을 해결하는 제품기술개발 방향으로 연구를 추진하고자 하며, 본 결과물은 국내외 학술지에 게재하거나 마케팅/홍보용으로 제품관측에 활용가능하다. 현미에서 기능성을

나타내는 유력한 부위인 미강 추출물의 지질 강하 효능에 대해서 보고된 바는 있었지만, 이를 이용한 현미발효물의 당 및 지질대사 조절 건강기능성에 대한 연구결과는 발표된 바가 없었다. 본 연구과제는 현미발효물과 그 생리활성분획물의 당 및 지질대사 조절 효능과 기작을 *in vitro*와 *in vivo*에서 밝혀내고자 한다.

## 2절 국내외 기술개발 전망

인간에게 “단맛”은 우리몸의 세포가 살아 움직이도록 해주는 에너지를 공급해준다고 한다(식품의약품안전처, 식품첨가물바로알기 중 발취). 최근 식품의약품안전처에서는 당류섭취줄이기 캠페인을 강력하게 추진하고 있다. 이는 한국인의 당류섭취가 증가함에 따라 비만, 당뇨 등 대사증후군 뿐만 아니라 다양한 질병의 원인이 되기 때문이다. 국내·외 산업계에서도 sugar free, gluten free, MSG free, yeast free 등 allergen과 무첨가 컨셉으로 식품 연구 및 상품개발 트렌드가 이어지고 있는 추세와도 연결된다. 천연감미료/인공감미료에 대한 관심이 증가하고 있으며, 건강하고 맛있게 식품을 제공하고자 하는 정책/산업계/학계의 연구 필요성이 대두되며, 세계적으로 널리 이용되는 설탕 또는 high fructose corn syrup을 대체할 수 있는 다양한 소재들이 개발될 것으로 전망된다.

본 미생물 발효 기술이 적용된 현미발효물로 기존 설탕 및 과당을 전량 대체가 가능하면서도 현미 유래 기능 성분의 섭취가 가능한 차별화된 제품 개발 및 상품화 가능성이 높다고 판단된다. 수입에 100% 의존하는 사탕수수 원당과 옥수수를 기반으로 하는 설탕 및 과당 제조 산업을 재고량이 급증하고 있는 가공용 쌀에 미생물 발효 기술이 접목된 새로운 천연 감미료 시장으로 패러다임을 바꿈으로써 수입 대체 효과 및 가공용 쌀소비 촉진에 이바지할 수 있다.

또한, 비만, 당뇨 유발 등 최근 연구 결과에 의해 위해성의 논란이 되고 있는 설탕 및 과당 등 정제된 당류를 현미발효물의 비정제되어 몸에 좋은 천연 감미료로 대체함으로써 국민건강에 이바지할 수 있다. 현미발효물로 기름을 감량하더라도 물성 및 유화안정성을 향상시킬 수 있어서 저지방, 저칼로리 마요네즈와 드레싱에 우수한 관능특성을 부여하여 야채를 더욱 맛있게 먹을 수 있도록 도와줌으로써 소스/드레싱 관련 시장 규모 확대가 기대된다. 한국적인 컨셉과 건강기능성이 부여된 풍미가 좋은 제상품들은 향후 글로벌 시장에서 성공 가능성이 예측된다.

## 제3장 연구개발수행 내용 및 결과

### 1절 향미가 증진된 현미발효물 소재 기술 개발

본 연구는 탄수화물 발효 중심의 미생물 발효기술 최적화를 통해 향미가 뛰어난 고기능성 소재를 개발하고자 하였으며, 이에 기능적으로 우수한 현미발효물 소재 기술 개발을 위해 탄수화물 발효 미생물을 탐색하고, 이를 적용한 최적 발효 방법을 설정하여 대량 생산 안정화를 목표로 하였다.

곡물은 발효 과정을 통해 더 높은 영양적 가치를 나타낼 수 있는 것으로 보고되고 있으나, 이러한 건강 기능성은 곡류의 외피에 주로 존재한다. 따라서 hemicellulose 계열의 식물세포벽에 효과적으로 작용하여 벼과 식물(현미, 쌀 등)이 지닌 단백질, 미네랄, 아미노산펩타이드, 수용성 다당류와 arabinoxylan 등 맛과 기능성 물질의 손실이 없는 미생물 발효 기술을 정립하였다. 현미(쌀)가 가진 단점인 식감과 소화·흡수가 어려운 점을 보완하고자 본 연구를 통해 이를 개선하는 미생물을 개발하였고, 발효 공정을 정립하여 영양학적, 기능학적 손실의 발생이 없는 현미발효물 제조 기술을 개발하였고, 대량 생산 안정화를 실시하였다.

#### 1. 실험재료 및 방법

가. 현미발효물에 적합한 고역가 효소 곰팡이 분리 및 개량

(1) 국균의 스크리닝 및 hemicellulose 분해 최적 효소 활성 국균 선택

현미는 외피를 포함하고 있기 때문에 도정된 곡류에 비해 미강 및 배아에 영양학적 및 기능적 물질이 다량 포함하고 있다. 그러나 이러한 외피 성분으로 인해 식감을 해치는 단점이 있어 이러한 단점을 극복하고, 난소화성 물질인 외피의 hemicellulose를 추출하여 수용성 다당류나 arabinoxylan 등 생리활성 물질로 전환하는 고역가 효소 곰팡이(국균)를 분리하였다. 국균의 분리는 전통 누룩에서 aflatoxin을 생성하지 않는 균을 대상으로 1차 선별을 실시하였고, 탄수화물 발효에 적합한 효소를 생산하는 국균을 high-throughput screening법으로 modify하여 균주 선별 작업에 적용하였다. 국균의 스크리닝에서는 현미의 외피 성분을 구성하는 hemicellulose 계열을 효과적으로 분해하고, 현미가 가진 영양학적, 기능적인 유용성분이 국균의 발효 과정 동안 손실이 발생하지 않게 하기 위한 균주의 선별에 주안점을 두었다. 고역가 효소 활성을 지닌 곰팡이(국균) 스크리닝 과정을 통해 미생물 독소의 생성이 없으면서, 탄수화물 발효에 가장 적합한 2종의 국균을 선별하였고, 이에 대한 특성을 파악하고자 하였다.

나. 미생물을 이용한 현미 발효 최적화 발효 기술 개발

미생물을 이용한 발효는 각종 유기산, 방향성 향기 물질과 단백질, 아미노산, 지질, 비타민, 미네랄 등을 새롭게 형성하여 체내 흡수율을 높이는데 도움을 주어 건강에 유익한 작용을 할 수 있게 한다. 발효 과정 중 유용성분은 체내 흡수율을 높이는데 도와줄 수 있게 물질을 전환시켜주고, 반면 소화를 방해하거나 영양소의 생체 내 이용률을 저해하는 물질은 발효 과정이나



미생물이 생산하는 효소에 의해 분해되어 제거되게 된다. 본 연구에서는 현미(쌀)가 가진 성분으로 인해 소화 및 흡수가 어려운 단점을 보완하고 영양학적, 기능성을 증가시키기 위해 미생물을 이용한 발효 기술을 개발하고, 이를 최적화 하였다.

미생물 발효 조건은 탄수화물 발효를 중심으로 국균이 생산하는 효소 반응의 최적화에 착안을 두었으며, 식품에 응용 적용과 대량 생산 적용을 고려하여 발효 기술을 개발하고자 하였다. 따라서 미생물 발효에 적합한 온도, 반응 시간을 발효 수율로 측정하고 이를 정립하였다.

#### 다. 현미발효물의 영양학적 성분 분석 및 수율 측정

미생물은 발효 과정 중 에너지를 필요로 한다. 또한 발효 조건에 따라 원료가 가진 유용성분의 파괴는 불가피한 것으로 이를 최소화 하는 발효 기술을 본 연구를 통해 개발하였다. 현미(쌀)가 지닌 영양학적, 기능학적 성분을 발효 과정을 통해 체내 흡수율이 증가된 물질로 전환시켰으며, 또한 벼과 식물이 지닌 단백질, 미네랄, 아미노산 등 정미 물질과 기능성 물질의 손실이 없는 미생물 발효 기술을 정립하였다. 이에 따라 현미발효물 성분의 유효값을 분석하였으며, 미생물 발효 안정화를 입증하였다.

#### 라. 분리 곰팡이를 이용한 현미발효물의 발효 scale-up

현미(쌀)의 미생물 발효를 통해 각종 영양성분 및 유효 성분이 함유된 현미발효물을 응용 제품화로의 다각화에 기여하고자 대량 생산을 적용하였다. 단계별 scale-up 과정시 발효 수율을 측정하여 발효 공정 최적화를 재검증 하였고, 또한 현미발효물을 대량 생산하기 위해 필요한 국균 2종에 대해 안정적인 최적 효소 농도를 생산하고, 또한 장기 보관을 실시하기 위해 고체 발효법(Solid-State Fermentation)을 도입하여, 이에 안정화를 동시에 실시하고자 하였다.

## 2. 결과 및 고찰

#### 가. 현미발효물에 적합한 고역가 효소 곰팡이 분리 및 개량

현미(쌀)의 외피를 구성하는 주성분인 hemicellulose 성분을 분해하여 현미가 가진 유용성분을 용출하기 위해 이에 적합한 효소를 고농도로 생산하는 국균의 분리 및 개량을 다음과 같이 실시하였다.

국균의 분리원은 전통 누룩에서 agar plating하여 곰팡이 포자 생성 최적 온도인 30℃에서 5일간 정치 배양을 실시하였다. 정치 배양시 매 24시간 마다 곰팡이 morphology를 토대로 각 형태가 다른 곰팡이 30종을 1차 선별하고 계대 배양을 실시하여 순수 분리 과정을 거쳤다. 이렇게 순수 분리된 곰팡이를 1차 선별시 30℃에서 배양이 느린 것 15종을 배제하고 aflatoxin 생성 여부를 확인하였다. 현미발효물은 식품 응용제품군에 적용될 것으로, 발효 과정중에 미생물 독소인 aflatoxin이 생성되면 안된다. 따라서, aflatoxin을 생성하는 곰팡이 2종 (sequencing 확인 결과 *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavous*)을 제외한 선별된 13종에 대해 미생물이 생산하는 hemicellulase 계열의 효소 생산능을 확인하였고, 이중 2종을 최종 선별하였다.

**Table 2. 최종 선별 2종 곰팡이의 효소 활성 측정 결과**

(단위 : U/g)

항 목	Feruloric esterase	Cellulase	Pectinase	Neutral Protease	alpha -amylase	gluco -amylase
SMF136 ( <i>Rhizopus delemer</i> )	0.0	27.2	25.5	980.0	173.8	11458.0
SMF138 ( <i>Aspergill us oryzae</i> )	36.8	280.1	45.7	110.0	11390	520.2

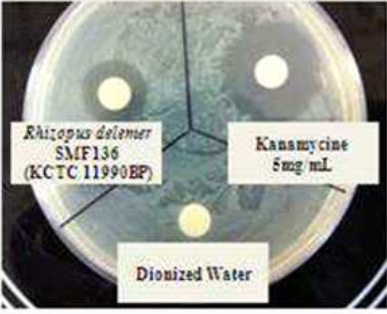
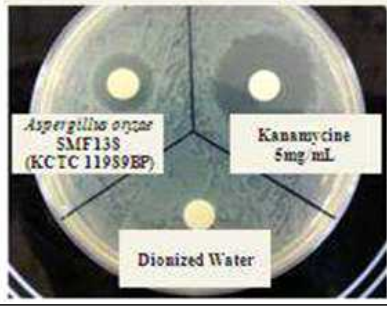
최종 선별된 2종에 대해 다음과 같이 sequencing을 통하여 학명을 확인하였다. MEB배지에 균을 포자 상태로 접종한 후 30℃에서 5일간 진탕배양 후 균사체를 Nalgene filtration kit을 통하여 균사체만을 harvest하였다. 포집된 균사체의 genomic DNA 추출을 위해 freezing dryer를 사용하여 건조 작업을 거친 후 QIAGEN DNease Plant Mini Kit (Cat. No69106)을 사용하여 genomic DNA를 추출하였다. Nuclear rDNA상에 존재하는 ITS1-5.8S-ITS2 rDNA의 염기 서열에 의한 계통 분리학적 분석에 의하여 동정하였으며, universal primer pair는 ITS1F-ITS4 primer를 사용하여 확인하였다. 염기 서열 확인 결과 SMF136은 *Rhizopus delemer*, SMF138은 *Aspergillus oryzae*로 각각 판명되었고, 분리된 2종의 균에 대해 KCTC에 관리 수탁하였으며, 특히 2건을 출원하였다.

**Table 3. 선별 2종에 대한 특허 출원권**

항 목	학명	KCTC 수탁번호	특허출원번호
SMF136	<i>Rhizopus delemer</i>	11990BP	10-2011-0127759
SMF138	<i>Aspergillus oryzae</i>	11989BP	10-2011-01227758

2종(SMF136, SMF138)을 선별함에 있어 항균 활성을 지니는지의 여부도 함께 평가하기 위하여 다음과 같이 진행하였다. 항균 활성 측정에 사용하는 표준 미생물인 *Pseudomonas* sp. 균주는 농촌진흥청 한국농업미생물보존센터(Korean Agriculture Culture Collection)에서 분양받아 사용하였으며, 영양배지(nutrient broth)를 사용하여 37℃에서 24시간 배양하여 사용하였다. 항균활성 측정은 한천배지(Nutrient Agar)에 배양된 *Pseudomonas* sp. 균주 0.2mL을 도말 평판법으로 접종한 후, 디스크여지법 (paper dish assay)를 통해 만들고, 각 2종의 균주를 고체배양하여 얻어진 추출액에 대해, 항균 대표 항생제인 Kanamycine 5mg/mL을 실험균으로, D.W를 대조균으로 사용하여 항균 활성을 측정하였다.

Table 4. 선별 2종 국균에 대한 항균활성 결과

항목	항균 측정 결과	부연 설명
SMF136	<p style="text-align: center;"><i>Pseudomonas sp.</i></p> 	<p>SMF136 국균은 항균 표준물질로 사용되는 Kanamycine과 비교시 <i>Pseudomonas</i>에 대해 항균성이 있는 것으로 확인되었음.</p>
SMF138	<p style="text-align: center;"><i>Pseudomonas sp.</i></p> 	<p>SMF138 국균은 항균 표준물질로 사용되는 Kanamycine과 비교시 <i>Pseudomonas</i>에 대해 항균성이 있는 것으로 확인되었음.</p>

나. 현미 발효 최적화 발효 기술 개발

선별된 2종의 국균을 사용하여 현미(쌀)이 가진 영양학적, 기능학적인 유용 성분에 대해 미생물 대사 과정에 의한 손실이 없고, 발효를 통해 체내 흡수율이 용이하도록 미생물 효소 작용에 의한 물질 변환을 해줄 수 있는 발효 기술을 다음과 같이 개발하고 이를 최적화 하였다.

미생물 발효 조건은 탄수화물 발효를 중심으로 국균이 생산하는 효소 반응의 최적화에 착안을 두었으며, 식품에 응용 적용과 대량 생산 적용을 고려하여 발효 기술을 개발하였다.

(1) 현미(쌀)의 탄수화물 최적 발효 온도 조건 확립

미생물 국균이 탄수화물 발효에 최적의 활성을 나타낼 수 있는 효소 반응 온도 조건을 설정하기 위해 다음과 같이 실시하였다. 적용 국균은 밀브랜 배지를 수분 함량 50%로 조정 후 멸균과정을 통해 멸균 후 포자 상태를 접종하여 30℃에서 5일간 정치 배양 후 사용하였다. 효소 작용을 용이하게 하기 위해 우선 현미를 호화시켜주었다. 현미 수세 후 침지 5시간을 거치는 호화조건으로 진행 후, 약 1시간 가량 스팀을 이용하여 호화작업을 실시하였다. 미생물 효소 반응을 실시하기 위하여 이중 자켓 타입의 Pyrex Glass Reactor에 증류수를 현미 함량 대비 1.5배 첨가 후 각 온도를 30, 45, 60, 80℃로 설정하여 증류수의 가운을 실시하고, 고체 배양 완료된 국균 2종을 각각 0.5%씩 첨가한 후 호화된 현미를 투입하여 24시간 반응을 실시하면서 시간별로 starch가 glucose로 물질 전환되는 수율을 확인하였다.

각 온도 조건별 발효 시간별 glucose 함량을 측정하고 최종 반응 완료 후 발효 수율을 측정한 결과 현미발효물 제조에 있어 미생물을 사용한 최적 발효 온도 조건은 60℃로 설정되었다.

Table 5. 반응 온도별 glucose 측정 측정 결과

(단위 : %)

반응 누적 시간(h)	30℃	45℃	60℃	80℃
0	1.0	0.9	1.1	1.3
1	2.0	4.0	4.5	6.7
3	2.5	4.7	6.7	8.5
5	5.0	7.5	10.9	12.9
7	7.1	10.1	12.9	15.9
9	7.9	12.9	19.7	17.9
11	10.5	15.9	22.5	19.1
13	11.2	16.7	25.7	20.9
15	11.5	20.5	26.1	23.1
18	12.8	20.7	26.5	24.8
21	15.9	21.5	26.4	24.5
24	16.0	22.7	26.5	24.6
최종 발효수율	59.8	84.9	99.1	91.9

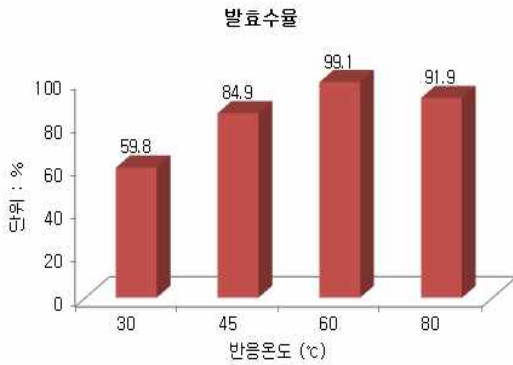


Fig. 1. 반응 온도별 발효 수율 그래프

(2) 현미(쌀)의 최적 발효 시간 확립

미생물 국균에 의한 최적 발효 시간은 최적 발효 온도 조건 60℃에서 약 18시간대에 발효 수율이 99%로 도출됨을 확인하였다. 따라서 현미발효물 제조에 있어 미생물을 사용한 최적 발효 시간은 18시간으로 설정하였다.

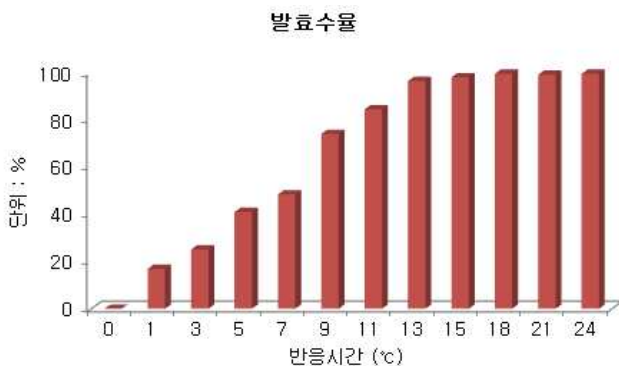


Fig. 2. 발효 시간에 따른 발효 수율 측정 결과



(2) 현미의 일반 성분 분석

미생물 발효를 통해 제조된 현미발효물과의 영양학적, 기능학적인 성분 비교를 실시하고자 시판 현미의 일반 성분 분석을 실시하였다. 현미의 일반성분 분석은 한국식품연구소에 분석 의뢰를 실시하였다. 분석 결과, 국내산 현미와 수입산 현미의 일반성분 함량에 큰 차이점은 없었으나, 현미발효물을 이용한 제품의 이미지 제고를 위해 국내산 현미를 모든 실험에 적용하였다.

**Table 6. 현미 일반 성분 분석 결과**

항목	국내산 현미	수입산 현미
외관	미황색 고형물	미황색 분말
탄수화물(%)	73.4	74.3
조단백질(%)	7.6	7.5
조지방(%)	2.2	3.4
당류(g/100g)	1	0.3
식이섬유(%)	3.8	5
나트륨(mg/100g)	26.25	34.5
마그네슘(mg/100g)	110.98	165.99
칼슘(mg/100g)	9.88	12.75
철(mg/100g)	0.89	1.58
칼륨(mg/100g)	221.01	298.06

(3) 현미발효물의 일반 성분 분석

제조된 현미발효물의 일반 성분 함량과 현미발효물의 특징을 알아보기로 성분 분석을 실시하였다. TN(총질소)함량은 단백질 정량에 사용하는 Kjeldahl법을 사용하여 측정하였다. Kjeltac Analyzer Unit, Foss Tech. 기기를 사용하여 검체를 분해촉진제인 Hg, HgSO<sub>4</sub> 또는 HgO와 CuSO<sub>4</sub> 및 K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>의 존재하에서 분해제인 c-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 또는 발연황산 혼액과 가열하여 유기물을 완전히 산화분해하고, 동시에 질소분을 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>로 하고 NaOH 알칼리성에서 생성되는 NH<sub>3</sub>을 일정과량의 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>에 흡수하여 과잉의 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>를 NaOH액으로 역적정하여, NH<sub>3</sub>에 소비된 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>량에서 NH<sub>3</sub>량을 구해 총 질소 함량을 산출하였고, 이에 대한 단백질 함량은 총질소 함량에 단백질가 6.25를 적용하여 계산하였다. AN(아미노태질소) 함량은 Formalin 시약을 사용하여 소비된 0.1N NaOH 함량으로 계산하였다. 점도는 Brookfield, DV-II viscometer를 사용하여 상온에서 측정하였다.

**Table 7. 현미발효물의 일반 성분 분석값**

TN (%)	단백질(%)	AN (%)	pH	점도 (cP)
0.38	2.4	0.1	3.8	250

(4) 현미(쌀) 발효물의 무기질 함량 측정

원료로 사용된 현미가 가진 무기질 함량이 발효 과정 중 손실이 발생하지 않고, 현미발효물에 존재하는지의 여부를 알아보기 위해 무기질 함량을 측정하였다. 무기질 함량 측정은 한국식품연구소에 분석 의뢰를 실시하였다. Table 8과 같이, 현미발효물에 무기질이 다량 존재함을

확인할 수 있으며, 이는 발효 과정중에 미생물 대사에 의한 무기질의 파괴 및 소비가 일어나지 않는 발효 공정이 확립되었음을 확인할 수 있다.

**Table 8. 현미발효물의 무기질 함량 측정값**

구분	함량 (단위: mg/100g)
칼슘	28.3
인	56.2
철	0.07
나트륨	15.13
칼륨	71.10
vit.B1	0.07
Vit.B2	0.03
니아신	0.43
Vit.E	0.60
Vit.B6	0.04
엽산	673.93
아연	0.18
망간	0.14

(5) 현미(쌀) 발효물의 다당류 및 arabinoxylan 함량 측정

현미발효물을 구성하는 다당류와 장내 면역활성에 영향이 있는 arabinoxylan의 함량을 알아보았다. 현미발효물을 구성하는 다당류를 알아보기 위해 soluble polysaccharide를 분리 정제를 실시하였다. 현미발효물 시료 3배의 증류수를 가하여 상온에서 30분간 추출 후 6000rpm에서 30분간 centrifuge하여 상등액만을 취하였다. 상등액에 최종 농도 75%가 되게 Et-OH를 가하여 주고 상온에서 overnight reaction을 실시하여 soluble polysaccharide가 침전형태로 발생하게 하였다. 6000rpm에서 30분간 centrifuge를 실시하여 pellet만을 수거하여 동량의 증류수에 pellet을 녹인후 M.W 12,000 dialysis tube(Sigma Cat. No. D9402-100FT, Avg.flat width 76mm(3.0in))을 사용하여 overnight dialysis를 실시하고, 동결건조를 통해 powder형태로 시료를 취하였다. 구성 다당류 분석은 Gas Chromatography를 통해 분석실시하였고, 분석 조건은 table 9와 같다.

**Table 9. 구성 다당 분석을 위한 Gas Chromatography 조건**

Instrument	GC equipped for use capillary columns
Detection	F.I.D
Capillary column	Supelco 2380 Capillary column(Cat.No 24110-U) : 30m, 0.25mm, 0.2um film thickness
Carrier, Flow rate	Helium at 1mL/min
Split ratio	100:1
Zone Temperature	Injector 250°C, Detector 270°C

구성 다당체과 장관면역 활성 물질로 여겨지는 arabinoxylan의 분석 결과는 다음과 같이 도출되었고, 현미발효물의 95% 이상이 glucose로 구성되고 있음을 확인하였다. 이는 탄수화물 발효 중심으로 선별된 미생물 국균 2종이 starch에서 glucose로 물질 전환하는 수율이 95% 이상임을 확인 할 수 있었다.

**Table 10. 현미발효물의 구성다당과 arabinoxylan 분석값**

항 목	RT(min)	면적(mV*s)	면적(%)	함량 (ppm)	Arabinoxylan (mg/dL)
Rhamnose	11.7	0	0	0	22
Fucose	12.15	0	0	0	
Arabinose	14.51	387.69	0.96	2.1	
Xylose	17.26	301.31	0.75	1.7	
Mannose	21.11	498.12	1.24	3430.4	
Galactose	21.97	498.53	1.24	3430.4	
Glucose	23.49	38382.06	95.79	265000	

라. 분리 곰팡이를 이용한 현미발효물의 발효 scale-up

분리 미생물 국균 2종을 사용하여 탄수화물 중심 최적 발효 조건을 실험실 조건에서 설정한 결과, 발효 최적 온도 60℃, 발효 시간 18시간에서 발효 수율 99%이상 도출됨을 확인하였다. 실험실 단계에서 안정적인 발효가 완료되었음을 확인하였고, 이에 현미발효물의 영양학적, 기능학적 성분 분석을 완료하여 식품 소재 응용제품으로의 활용을 위해 대량 생산 적용이 필요하였다. 따라서 대량 생산시 발생하는 문제점을 사전에 파악하고, 발효 수율 적정화를 통해 응용제품 및 건강 기능적 성분을 *in vivo*, *in vitro*상에서 측정하고자 시료 확보를 위해 단계별 scale-up을 실시하였다. 단계별 scale-up 에서는 다음과 같이 2가지 측면에 주안점을 두었다.

(1) 분리 곰팡이의 대량 생산 배양 기술 확립 및 안정화

현미발효물 대량 생산을 하기에 앞서, 현미발효물 제조시 사용되는 미생물 국균 2종의 배양이 필수적이다. 따라서 곰팡이 대량 배양 안정화를 우선 실시하였다. 곰팡이 대량 배양 안정화는 효소 생산을 주목적으로 하였기 때문에, 곰팡이 배양시 효소 생산을 최대로 하고, 또한 장기 보관이 용이한 Solid-State Fermentation(고체배양법)을 적용하였다. 곰팡이 고체 배양에 사용된 배지는 밀브랜(동아원 제품 사용)을 사용하여 멸균 후 수분함량 50%, pH7.0이 되도록 가수한 후 원형 종국기(일본 제조, Max. capacity 140kg)를 사용하여 배양 시간 및 발열 조건에 따라 배양 온도 조건을 달리하여 5일간 배양을 실시하였고, 최종 생산된 미생물의 효소 역가 측정시 실험실 조건의 배양시와 동일한 효소 활성 결과를 얻었다.



**Table 11. 분리 미생물 국균 2종의 대량 배양 온도 조건**

배양 누적시간(h)	Step	온도 (°C)
0	0	35.5
1.0	1	35.0
2.0	2	35.0
12.0	3	35.0
21.0	4	35.0
26.0	5	35.5
30.0	6	35.5
33.0	7	35.5
43.0	8	36.5
47.0	9	36.5
50.0	10	34.5
50.5	11	30.5
60.5	12	30.5
70.5	13	30.5
71.0	14	30.5
71.5	15	27.5
91.5	16	27.5
101.5	17	27.5
121.5	18	27.5
141.5	19	27.5

(2) 현미(쌀)의 미생물 발효 수율 측정 및 pilot test

대량 배양된 미생물 국균 2종을 사용하여 150L pilot scale로 발효를 실시하였다. 1batch 생산량은 최종 working volume 100kg으로 150kg reactor를 사용하여 현미 함량 1 : 가수 1.5 : 분리 미생물 국균 각 0.5% (현미함량 대비 w/w)의 원료비로 설정하여 60°C에서 18시간 교반 실시하였다. 이후 시간별로 시료를 채취하여 미생물 국균 효소 작용에 의해 starch가 glucose로 전환되는 물질전환 수율을 측정하였다.

**Table 12. 100kg Pilot scale 발효시 glucose 전환율**

반응 누적 시간(h)	Glucose 함량 (%)	발효 수율 (%)
0	1.1	4.0
1	7.5	27.5
3	10.6	38.9
5	11.9	43.7
7	12.9	47.4
9	15.8	58.0
11	19.5	71.6
13	23.6	86.6
15	25.8	94.7
18	27.0	99.1
21	27.2	99.1
24	27.1	99.1
최종 발효수율	99.5	99.1

마. 현미발효물의 대량 생산 안정화

현미발효물을 공장단위 대량 생산 적용을 위해 단계별 scale-up을 거쳐 대량 발효시 발생될 문제점을 파악하였으며, 이러한 조건을 바탕으로 공장 단위 생산을 적용하였다. 공장단위 생산 시 1batch 생산량은 최종 working volume 70ton으로 100ton reactor를 사용하여 현미 함량 1 : 가수 1.5 : 분리 미생물 국균 각 0.5% (현미함량 대비 w/w)의 원료비로 설정하여 60℃에서 18시간 교반 실시하였다. 현미발효물 대량 배양을 통해 제품화에 응용을 용이하게 하기 위해 3가지 type으로 발효 완료 후 제성을 실시하였다. 현미발효물 원물 그대로 적용되는 제품에 적용 용이성을 위해 데칸터 여과 후 cloud type을 제조하였고, 소스 및 첨가제 형태로 사용 편의성을 제공하고자 filter press 및 MF 여과 장치를 사용하여 clear type 외 농축 type으로 총 3가지 형태의 현미발효물을 제조하였다.

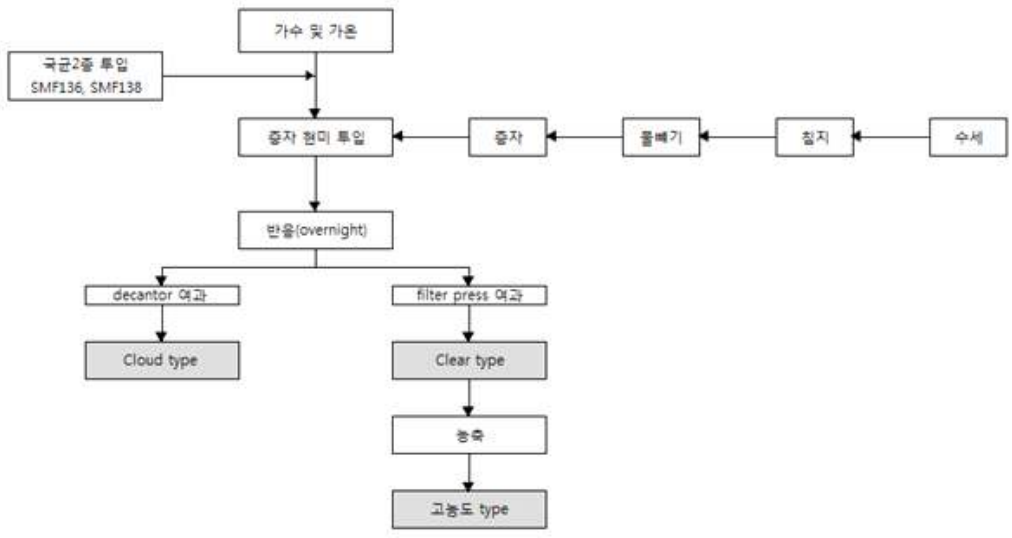


Fig. 4. 현미발효물 대량 생산 scheme

현미발효물 대량 생산 결과 glucose 함량은 27.5%로 도출되었으며, 이때 발효 수율은 99.5%였다. 대량생산된 현미발효물의 아미노산 조성을 측정된 결과는 다음과 같이 도출되었다. 분석에 사용된 현미발효물은 데칸터로 여과된 cloud type을 사용하였으며, Sechem Amino Analyzer를 사용하여 아미노산 조성을 분석하였다.

Table 13. Cloud type 현미발효물의 아미노산 조성

(단위 : ppm)

세부 항목	총아미노산	유리아미노산
ASP	15	8
THR	4	0
SER	8	2
GLU	23	10
PRO	8	2
GLY	7	1
ALA	8	5
CYS	2	0
VAL	4	1
MET	3	0
ILE	3	1
LEU	9	5
TYR	5	2
PHE	6	3
HIS	3	1
LYS	4	2
ARG	12	9
합계(%)	124	52

## 제 2절 향미가 증진된 현미발효물의 응용 제품 개발

### 1. 현미발효물 응용 제품의 선정 배경 및 시중 제품 분석

#### 가. 오리엔탈 드레싱

최근 건강식 및 채식 요리에 대한 관심이 높아지면서 샐러드의 취식 빈도가 증가하고, 샐러드의 맛을 더해 주기 위해 곁들이는 드레싱의 이용률이 증가하고 있다. 드레싱 시장은 2011년 약 368억 원에서 2013년 약 456억 원으로 해당 기간 내 약 120%의 성장을 보였다. 드레싱은 건강을 지향하는 소비자들이 채소를 맛있게 섭취할 수 있도록 돕는 제품으로 2010년 약 300억 원으로 시장을 형성하고 있고 그 중 분리액상 드레싱은 56억 시장으로 성장률(81.5%)이 높으며 분리액상 드레싱 중 오리엔탈 드레싱이 매출의 90% 이상을 차지하고 있고 83% 이상의 성장률을 보이고 있다. 오리엔탈 드레싱은 유화형(마요네즈) 드레싱 대비 칼로리가 낮고, 간장을 사용하여 한국인의 입맛에 맞다는 장점으로 분리액상 드레싱에서 높은 판매율을 차지하는 제품이 되었다.



Fig. 5. 드레싱 시장 규모의 변화(출처 : AC Nielsen Data, 2013)

시중에서 판매되고 있는 오리엔탈 드레싱 7종에 대해 원재료 및 함량, 제품 컨셉, 가격(단량)을 조사한 결과, 시판 중인 오리엔탈 드레싱 제품들 대부분은 단맛을 부여하기 위해 주로 과당(액상과당)이 사용되고 있었다. 과당(액상과당)은 설탕보다 약 1.5배 더 달면서 가격이 싸기 때문에 단맛을 내기 위해 각종 가공식품에 사용된다. 최근 연구 결과에 의하면, 과당(액상과당)은 비만을 일으킬 뿐만 아니라 알코올처럼 간에 작용해 간을 손상시키고 지방간을 유발하며 고혈압과 당뇨, 고지혈증을 일으키고 노화를 촉진하는 것으로 알려져 있다.

이와 같이 오리엔탈 드레싱에 과당(액상과당)을 사용한 제품은 건강을 위해 채소를 섭취하고자 하는 소비자에게 있어 오히려 건강을 해치는 요인으로 작용하게 된다. 이에 채소를 맛있고 건강하게 섭취하는데 도움을 주기 위하여 원료 중의 과당(액상과당)을 현미발효물로 전량 대체 적용한 오리엔탈 드레싱 제품을 개발하고자 한다.

Table 14. 시판 오리엔탈 드레싱 제품 분석

브랜드	제품명	제품사진	원재료명 및 함량	제품 컨셉	가격(단량)
풀무원	생오리엔탈 드레싱		간장 베이스[양조간장(미국산/밀, 대두), 정백당, 과당], 정제수, 양조식초[맥아엑기스(겉보리, 미국산), 정제수, 주정, 발효영양원], 양념 베이스(야채농축액, 양조간장, <b>액상과당</b> , 식물성가수분해단백, 조미양조간장), 옥배유, 조미액(약주, 과당, 포도당, 정백당, 호모추출분말), 합수결정포도당, 조미베이스(밀), 참기름 1.94%, 마늘 다진 것(국산), 볶음참깨 0.85%	쉐프메이드. 두부소스, 토마토 버섯 샐러드 드레싱에 사용 가능	3,590원 (250g)
CJ 제일제당	오리엔탈 드레싱		양조간장[양조간장원액(탈지대두(인도산), 소맥(밀:미국산)), 천일염(호주산), <b>액상과당</b> , 주정, 호모추출분말], 백설탕, 발효식초{주정, 맥아엑기스(겉보리:미국산), 발효영양원}, 옥수수기름(옥수수배아, 규소수지), 미림(주정, 백설탕, 멧쌀, 단백질분해효소, 액화효소), 레드와인, 지중해산 레몬으로 만든 레몬식초, 마늘, 레몬농축액, 볶음참깨, 참기름, 타마린드검, 잔탄검, 소스류, 유산균음료	참깨를 넣어 고소한 드레싱	4,280원 (250g)
CJ 제일제당	빔스오리엔탈 드레싱		발효식초[주정, 레몬농축액(레몬:이스라엘산), 혼합제제{주정, 레몬향(합성착향료), 초산리니틸}, 발효영양원], 양조간장[32℃ 숙성 양조간장원액(대만산/대두, 밀), 백설탕, 정제소금(국산), 주정, 호모추출분말], 백설탕, 정제수, 사과퓨레 8%[사과(국산), 영양강화제, 산도조절제], 양과 8%(국산), 파인애플청크 7%(파인애플, 설탕, 산도조절제), 쌀눈유, 옥수수기름, 파인애플농축액, 진한참기름, 소스류, 마늘(국산), 볶음참깨, 레몬퓨레, 잔탄검	합성감미료와 합성보존료를 첨가하지 않고, 사과퓨레와 쌀눈유가 들어간 드레싱	4,280원 (250g)
이마트 PB	이마트오리엔탈드레싱		정제수, 혼합간장 11%(탈지대두(수입산), 액상과당, 천일염(호주산), 소맥(밀), 효소처리스테비아), 오타비오포도씨유 10%(이탈리아산/포도씨유 100%), 백설탕, <b>액상과당</b> , 발효식초(주정, 발효영양원), 양조간장 6%(밀, 대두, 식염), 맥아엑기스, 레몬농축액, 사과청정농축액, 참기름, 양과농축액기스, 양과, 마늘농축액, 볶음참깨, 다시마엑기스, 마늘 ,아	포도씨유와 간장의 조화로운 맛 샐러드를 더욱 맛있게 해준다.	2,800원 (270g)

			몬드, 잔탄검, 카라멜색소, 효모추출물, 머스타드에센셜오일		
오뚜기	오리엔탈 논오일소스		정제수, 혼합간장[탈지대두(인도산), 소맥(밀:미국산), 정제염, 고과당, 효소처리스테비아], 백설탕, 발효식초[주정(국내산 51%, 수입산 49%), 발효영양원], 연겨자, 연와사비, 주정, 홀그레인머스타드, 양파농축액, 시즈닝분말, 식물성분해단백, 결정구연산, 감칠맛베이스(복합조미식품)	기름을 넣지 않고 우리 입맛에 맞게 만든 한국형 소스로 매콤하고 깔끔한 맛	2,780원 (205g)
대상	스파이시 오리엔탈 드레싱소스		정제수, 매콤프리믹스 15.6% [(해선장소스(중국산)), 굴소스(굴추출농축액(국산), 정제소금(국산), 양조간장(대두, 밀), 향미증진제, 자몽종자추출물), 크러쉬드레드페퍼, 코리엔더, 청양고추분], 발효식초, <b>과당</b> , 양조간장{천일염(호주산 60.6%, 국산 39.4%), 탈지대두(인도산), 소맥(밀), 과당, 주정}, 카놀라유, 미정, 양파, 양파분, 마늘분, 간장조미분말(대두), 혼합제제이스트엑기스, 저염분말정제소금, 변성전분, 잔탄검(순후추)	쉐프의 오리지널 레시피로 생양파와 청양고추를 넣어 느끼하지 않고 매콤한 맛	2,510원 (325g)
피코크 (이마트)	피코크 오리엔탈드 레싱		현미식초[현미당화농축액(현미:국산), 주정, 발효영양원], 정제수, 양조간장(일본산/탈지대두, 밀, 정제소금, 주정, 감초추출물), 옥수수기름, 미립(쌀, 주정), 양파, 발사믹비네가, 백설탕, 결정포도당, 사과퓨레, 콩발효맛내기, 마늘, 볶음참깨, 참기름, 효모추출물, 타마린드검, 잔탄검	간장의 진한 맛에 야채, 과일을 더해 산뜻한 드레싱	2,780원 (210g)

#### 나. 머스터드 드레싱

2013년 머스터드 소스 시장 규모는 114억 원으로 2012년 104억원 대비 109%의 성장을 보였다. 다양한 머스터드 풍미의 시중 제품 중 대부분은 허니머스터드 소스 제품이다. 허니머스터드 소스는 샐러드 드레싱 용도 보다는 주로 딥핑 소스 용도로 사용된다. 특히 치킨 너겟, 햄, 소시지 등 아이들의 간식과 함께 취식하는 경우가 많다. 허니머스터드 소스 제품 특성상 꿀에서 나오는 강한 단맛이 특징이며 단맛을 보조하기 위해서 대부분의 제품에 과당(액상과당)이 사용되고 있어서 기존 머스터드 드레싱 제품은 아이들이 간식을 섭취하면서 자연스럽게 과당(액상과당)의 유해성에 노출되는 문제를 안고 있다.

따라서 원료 중의 과당(액상과당)을 현미발효물로 전량 대체하여 과당(액상과당)의 강한 단맛이 아닌 현미발효물의 부드러운 단맛으로 머스터드 본연의 맛을 살리면서도 아이들이 간식을 건강하게 취식할 수 있도록 머스타드 드레싱 제품을 개발하고자 한다.

Table 15. 시판 머스터드 풍미 제품 분석 자료

브랜드	제품명	제품사진	원재료명 및 함량	제품 컨셉	가격(단량)
CJ 제일제당	허니 머스터드 소스		디종머스터드 30%(프랑스산/겨자씨 29%, 주정식초, 정제소금, 구연산), 조제머스터드 14.4%(미국산/식초, 겨자 14.5%, 정제소금, 심황, 파프리카), 벌꿀(국산), <b>액상과당</b> , 정제수, 백설탕, 사과농축액(사과:국산), 혼합제제(변성전분, 말토덱스트린), 정제소금, 산도조절제, 잔탄검, 유산균음료, 혼합제제(주정, 영양강화제)	프랑스 디종 지역의 머스터드를 사용한 정통 프렌치 머스터드 소스. 국산 사과농축액을 넣어, 겨자 맛을 살려줌.	4,250원 (320g)
CJ 제일제당	허니 머스터드 드레싱		마요네즈(식물성유지(대두:수입산), 난황액(난황(계란:국산), 정제소금(국산), 발효식초, 백설탕, 정제소금), 모야하우스머스타드 15.4%(미국산/식초, 겨자 14.5%, 정제소금, 심황, 파프리카), <b>액상과당</b> , 발효식초[주정, 사과농축액, 구연산, 발효영양원, 사과향(합성착향료)], 벌꿀 9.5%(국산), 정제수, 쌀눈유, 홀그레인머스타드 3.6%(프랑스/겨자씨 29%), 농축사과과실즙, 천일염, 백설탕, 잔탄검, 자몽종자추출물	프리미엄 원재료로 만든 프레시안 by VIPS 드레싱	4,280원 (240g)
대상	허니 머스터드 소스		대두유(대두:수입산), <b>과당</b> , 겨자 페이스트 16.5%(식초(미국산), 겨자씨(미국산, 캐나다산), 정제소금, 심황, 향신료), 정제수, 저감미당, 발효식초, 백설탕, 에이치엠프리믹스, 잡화꿀 1.5%(국산), 난황액E(계란:국산), 잔탄검, 양파페이스트, 구연산, 정제소금, 겨자향오일, 혼합제제(대두유, 파프리카추출색소, 유화제), 혼합제제(옥수수오일, 베타카로틴, 디엘알파토크코페롤), 이.디.티.에이칼슘이나트륨(산화방지제)	머스터드의 매콤함과 꿀의 달콤함이 어우러진 매콤달콤한 소스	2,290원 (320g)
오뚜기	허니 머스터드		정제수, 식물성유지(대두:수입산), 조제겨자 13%(미국산/식초, 머스타드, 소금, 터메릭, 파프리카), <b>액상과당</b> , 아카시아꿀 8%(국산), 백설탕, 발효식초(주정, 발효영양원), 머스타드페이스트 2.5%(미국산), 연겨자 1.29%(겨자분:캐나다산), 난황액(계란), 정제소금, 오렌지식이섬유, 잔탄검, 겨자분 0.4%(캐나다산), 향미유, 건조당밀, 피쉬콜라겐, 효소제제, 향신료, 영양강화제	야채야 친해지자! 피쉬콜라겐 첨가, 산화방지제 무첨가 제품으로 각종 튀김요리에 잘 어울리는 소스	1,400원 (265g)

다. 마리네이드: 바비큐용 소스

육류 소스 시장은 2012년 기준 총 450억원의 시장을 형성하고 있으며 매출액 기준 연 15~20%, 물량 기준 연 10~15%의 성장률을 보이고 있다. 가정 내 서양식 요리 취식 빈도 증가 및 캠핑 활동 증가 등으로 육류 소스 시장은 앞으로도 지속적인 성장이 예상된다. 육류 소스 시장 중 한식 육류 소스가 76%, 서양식 육류 소스가 24% 비중을 차지하며 서양식 육류 소스 시장 중 바비큐 소스는 8.6%를 차지하고 있다. 바비큐 소스 시장에서 제조업체별 판매액 변화를 살펴보면 업소용인 목우촌 제품을 제외하면 소비자용으로 판매되는 바비큐 소스는 대부분 수입 제품이었다.

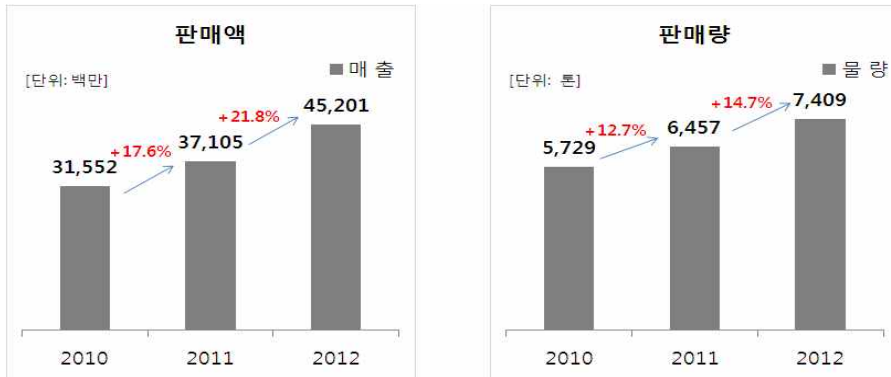


Fig. 6. 육류 소스 시장 판매액 및 판매량(출처 : AC Nielsen Data, 2013)



Fig. 7. 바비큐 소스 시장 제조사별 판매액 변화(출처 : Link Aztec, 2014)


또한, 서양식 육류 요리를 월 1회 이상 취식하는 주부 8명을 대상으로 FGI를 실시한 결과, 가족단위 캠핑시에 바비큐 폭립을 조리하기 위하여 주로 바비큐 소스를 사용하는 것으로 조사되었다(n=8, 2013.12.18). 이처럼 바비큐 소스는 주로 가족단위로 취식되는 소스이지만 시중에 판매되고 있는 대부분의 제품들에 단맛을 내기 위한 원료로 과당(액상과당)이 사용되고 있고 수입 제품의 경우에는 과당(액상과당)이 고과당콘시럽, 콘시럽고형분 등 익숙하지 않은 표현으로 표기되어 있어서 소비자들이 과당(액상과당)으로 인지하지 못하고 제품을 구입하게 될 수도 있다.

따라서 원료 중의 과당(액상과당)을 현미발효물로 전량 대체 적용하여 온 가족이 건강하고 맛있게 고기 요리를 즐길 수 있도록 바비큐 소스 제품을 개발하고자 한다.



Table 16. 시판 마리네이드(바비큐 소스) 제품 분석

브랜드	제품명	제품사진	원재료명 및 함량	제품 컨셉	가격(단량)
Hunt	헌트 히코리 바비큐 소스		토마토쥬스농축(정제수, 토마토 페이스트), <b>고과당콘시럽</b> , 콘시럽, 증류식초, 당밀, 정제소금, 천연착향료(마늘향, 고추향, 히코리향), 겨자, 토마토식이섬유, 양과분말, 양념류(흑후추, 양과분말, 겨자, 펙틴, 올레오레진오니온, 대두레시틴), 구아검, 펙틴, 로커스트콩검	마리네이드, 디핑, 베이스팅 소스로 활용	4,100원 (510g)
Yoshida	요시다 바비큐 소스		정제수, 토마토페이스트, 당밀, 설탕, <b>고과당콘시럽</b> , 재제소금, 변성찰옥수수진분, 레몬쥬스농축액, 스모크향, 식초, 양념류(바질, 흑후추, 파슬리, 겨자가루, 쿠민, 카엔후추, 셀러리씨, 고수, 로즈마리, 오레가노, 타임, 마조람), 건조마늘, 건조양파, 건조효모	정통 아메리칸 스타일의 바비큐 소스	10,400원 (1250g)
Branding	브랜딩 아이언 히커리 바비큐 소스		토마토농축액(토마토페이스트), <b>고과당콘시럽</b> , 정제수, 증류식초, 혼합양념(파프리카, 스모크분말, 카라멜분말, 마늘분말, 양과분말, 천연향(콘시럽고형분, 레몬주스고형분), 당밀, 정제소금, 변성진분(히드록시프로필진분), 히코리스모크향, 잔탄검, 비트분말, 카라멜색소	히코리 스모크향의 바비큐 소스	4,200원 (794g)
A1	A1 브라운		토마토 39%, 맥아식초 22%(정제수, 보리맥아), 주정식초 14%(정제수, 당밀, 주정), 설탕 11%, 대추야자, 정제소금, 로커스트콩검, 생강, 카라멜색소, 양과분말, 육두구, 흑후추, 고춧가루, 토마토피레 3%	보존료 무첨가 제품으로 신선한 과일, 향신료, 맥아식초로 만들어 건강하고 훌륭한 소스	6,000원 (240g)
이마트	핫 앤 스파이시 비비큐 소스		토마토피레 57.25%(토마토페이스트 30.5%, 정제수), 설탕, 맥아분말, 벌꿀, 사과쥬스농축액, 정제소금, 증류식초(발효주정), 건고추 1.5%, 스모크향, 당밀, 타마린드, 향신료(타임, 고수, 쿠민), 카라멜색소, 건조마늘 0.87%, 건조양파 0.85%, 흑후추, 구연산, 잔탄검	토마토, 꿀, 신선한 향신료로 만든 스테이크, 치킨, 버거 등 다양한 요리에 어울리는 매운 소스	4,600원 (340g)

이마트	허브 바비큐 소스		정제수, 크리쉬드토마토(이탈리아산/토마토, 토마토쥬스, 식염, 구연산, 백설탕, 발효식초(맥아엑기스(겔보리:미국산), 주정, 발효영양원), 건조분말당밀(사탕수수당밀, 말토텍스트린), <b>액상과당</b> , 맥아엑기스, 양파, 변성전분, 정제소금, 가공버터(우유), 타마린드검, 천연스모크향, 카라멜, 혼합분말S, 오레가노분 0.05% (터키산)	토마토와 허브가 듬뿍 들어간 정통 레스토랑 요리사의 맛	2,190원 (285g)
-----	-----------------	---	---	--	------------------

## 2. 현미발효물을 이용한 오리엔탈 드레싱 제품 개발

### 가. 실험재료 및 방법

Lab-scale의 현미발효물을 적용한 오리엔탈 드레싱의 제조공정 설정 및 갈변 최소화 테스트를 목적으로 테스트를 진행하였으며 그 결과를 바탕으로 설정된 제조 공정과 갈변 최소화 조건을 적용하여 scale-up 및 본생산을 진행하면서 배합비와 제조공정을 최적화하였다.

#### (1) 실험재료 및 scale-up 테스트 장비

Lab-scale 현미발효물을 적용한 오리엔탈 드레싱 제품 개발 실험에 사용된 원재료로는 샘표식품(주)에서 제조한 현미발효물(Brix 70)과 진장(샘표식품(주)), 건조마늘플레이크(은진물산), 복합향신료(향원스페이스), 잔탄검(동원홈푸드), 레몬농축액(진성에프엠), 마늘농축액(동원홈푸드), 냉동마늘, 소금(한주소금), 고추엑기스(제일후드), 아가베시럽(수입원 교토), 말티톨시럽(삼양제넥스), 흑초(천연식품), 양조식초(샘표식품(주)), 해바라기오일(샘표식품(주)), 참기름(샘표식품(주)), 물(정제수)을 사용하였다.

현미발효물을 적용한 오리엔탈 드레싱 scale-up 시제품 제작 및 본생산에 사용된 원재료로는 샘표식품(주)에서 제조한 현미발효물(Brix 52)과, 양조간장501(샘표식품(주)), 양조식초(샘표식품(주)), 함수결정포도당(대상), 소금(한주소금), 카놀라유(웰가), 백설탕(큐원), 잔탄검(동원홈푸드), 타마린드검(한국카라젠), 미향(오뚜기), 엑스트라버진올리브유(동원홈푸드), 로스티드갈릭분말(동원홈푸드), 참기름(오뚜기), 건조마늘플레이크(은진물산), 볶음검정깨(오뚜기), 연두순(샘표식품(주)), 야채즙(화창식품), 화이트와인(롯데칠성음료), 레몬농축액(동원홈푸드), 향미증진제(대상), 물(정제수)을 사용하였다.

본 실험에서 사용된 lab 샘플 제조 및 과일렛 테스트 장비로는 자사 및 협력업체 장비를 활용하였으며, 원료 계량시 전자저울을 사용하였다. Lab-scale 샘플 제조시 2kg 용량의 배합용기에 원료를 계량하여 가스레인지로 가열하였으며, Scale-up 시제품 제조시에는 100kg 용량의 리본믹서를 사용하였고, 700kg 본생산시에는 1,000kg 용량의 배합탱크와 850kg 용량의 서비스 탱크를 사용하였다.

#### (2) 실험방법 및 제조

분말원료(소금, 잔탄검, 타마린드검, 로스티드갈릭분말, 건조마늘플레이크, 볶음검정깨, 향미증진제, 함수결정포도당, 백설탕)를 액상원료(현미발효물, 양조간장501, 미향, 연두순, 야채즙, 화이트와인, 레몬농축액)와 정제수에 용해한 후 85℃까지 살균 처리 하고 양조식초를 첨가하여

80℃에 도달하는 시점에 살균 공정을 종료하였다. 살균 종료 후 이화학적 분석과 관능검사를 실시하여 규격에 적합할 경우에 냉각하였다. 배합물이 30℃ 이하로 냉각되었을 때 수상부 배합물과 유상부 원재료(참기름, 카놀라유, 엑스트라버진올리브유)를 각각 정량대로 병에 충전하였다.

### (3) 규격 검사 방법

#### (가) 이화학적 분석

pH와 산도는 산/염도 측정계(877 Titrino Plus, Metrohm)의 산도용 전극을 사용하여 3회 반복 측정 후 평균값을 표시하였다.

염도는 산/염도 측정계(877 Titrino Plus, Metrohm)의 염도용 전극을 사용하여 3회 반복 측정 후 평균값을 % 단위로 표시하였다.

흡광도(갈변도)는 시료를 체에 걸러 고형물을 제거한 후 흡광도를 측정하였다. 흡광도 측정은 UV-VIS Spectrophotometers(UVmini-1240, Shimadzu, Japan)를 이용하여 420nm에서 3회 반복 측정하여 평균값을 구하였다.(이근보, 양종범, 고명수 외(2006) 유한문화사, p.325)

당도는 당도계(ATAGO SMART-1, Japan)를 이용하여 3회 반복 측정 후 Brix 값으로 표시하였다.

#### (나) 관능검사 방법

오리엔탈 드레싱의 관능검사는 동반식품인 양상추를 함께 제공하여 진행하였고, 이때 사용된 양상추는 1회 찬물에 씻어서 물기를 빼고 먹기 좋은 크기로 잘라 테스트할 시료인 드레싱 30g과 함께 제공하여 드레싱을 찍어 먹을 수 있도록 하였다. 또한 시중에 판매중인 오리엔탈 드레싱 중 M/S 1위 제품인 A사 제품을 선정하여 현미발효물을 적용한 오리엔탈 드레싱과 비교 시식하였다. 관능 검사 항목으로는 향(flavor), 맛(taste), 질감(texture), 색(color), 전반적 기호도(overall quality)를 선정하였으며 5점 척도법(1=매우 나쁘다, 5=매우 좋다)으로 평가하였고 단맛과 신맛 적당도를 3점에 가까울수록 적당도가 양호한 것으로 평가하였다. 관능평가의 요원은 샘플식품의 전문패널 9명을 대상으로 진행하였다(샘플전문패널 : 6개월 이상 꾸준히 각 항목별 맛 특성에 대하여 인지된 패널).

## 나. 결과 및 고찰

### (1) Lab-scale 현미발효물을 적용한 오리엔탈 드레싱 제품 개발

간장과 식초를 베이스로 제조하는 오리엔탈 드레싱에 과당(액상과당)을 현미발효물로 전량 대체하여 부드럽고 깊은 단맛을 내고 유통기간 상온 10개월이 확보되면서 풍미 열화를 최소화할 수 있는 제조공정을 설정하여 풍미를 증진시킨 제품 개발을 목표로 하였다.

#### (가) 배합비율 설정

Lab-scale 현미발효물을 적용한 오리엔탈 드레싱 제품 개발시 깊고 풍부한 맛을 내는 진장과 향산화 효과가 뛰어난 흑초를 적용하였다. 참기름을 5% 적용하여 고소한 맛을 강화하였으

며, 생마늘, 다진깨 등 신선한 생물 원료를 사용하였다. 일반적으로 오리엔탈 드레싱에 사용되는 과당(액상과당) 대비 현미발효물의 당도가 낮아서 아가베 시럽을 추가적으로 적용하였다.

**Table 17. Lab-scale 현미발효물을 적용한 오리엔탈 드레싱 제품의 배합비율**

제조공정	원재료명	배합비율(%)
A	정제수	4.13
	건조마늘플레이크	0.70
	복합향신료	0.04
	잔탄검	0.13
	다진깨	0.50
B	현미발효물	30.00
	진장	25.00
	다진마늘	1.00
	마늘농축액	0.50
	레몬농축액	1.00
	아가베시럽	8.00
	흑초	5.00
양조식초	14.00	
C	해바라기유	5.00
	참기름	5.00
합계		100.00

(나) 제조 공정 설정

드레싱의 점도 부여를 위해서 사용되는 검류는 단독으로 정제수에 용해시킬 경우 잘 용해되지 않고 뭉쳐지는 성질이 있기 때문에 건조마늘플레이크, 복합향신료, 참깨 등의 분말 원료와 혼합하여 투입한다. 정제수와 분말 원료를 교반하면서 92℃까지 가열한 후 액상 원료인 현미발효물, 진장, 마늘, 마늘농축액, 아가베시럽, 레몬농축액, 흑초를 투입하여 교반하면서 90℃에서 20분간 살균 처리한다. 살균이 종료되면 배합물을 30℃ 이하로 냉각하여 각각 정량대로 병에 충전한다.



Fig. 8. Lab-scale 현미발효물을 적용한 오리엔탈 드레싱 제품의 제조 공정

(다) Lab-scale 현미발효물을 적용한 오리엔탈 드레싱 제품의 관능검사 결과

Lab-scale 현미발효물을 적용한 오리엔탈 드레싱 제품 개발과 시중에서 판매되고 있는 M/S 1위인 A사의 오리엔탈 드레싱 제품에 대하여 전문패널 9명 대상으로 관능검사를 2회 반복 실시하였다. 그 결과, 시중 M/S 1위 제품(A사) 대비 향, 맛, 전반적인 만족도에서 동등 수준 이상의 관능 품질을 확인할 수 있었다. 또한 응답자의 Top2의 비율도 64%로 A사의 29% 대비 높게 나타났다.

그리고 짠맛, 단맛, 신맛에 대한 적당 여부에 대한 관능검사 결과, 시중 M/S 1위 제품인 A사 제품이 lab-scale 현미발효물을 적용한 오리엔탈 드레싱 제품 대비 단맛이 더 강한 것으로 나타나 현미발효물로 과당(액상과당)을 대체할 경우 단맛 적당도가 향상된 것으로 확인되었다.

Table 18. Lab-scale 현미발효물을 적용한 오리엔탈 드레싱 제품의 기호도 조사 결과

제품	전반적 만족도	응답비율(%)					기호도		
		불만족	불만족한 편	보통	만족한 편	매우만족	외관	향	맛
현미발효물 적용 오리엔탈 드레싱	3.6	0	7	29	57	7	3.1	3.4	3.8
A사 오리엔탈 드레싱	3.1	0	14	57	29	0	3.4	3.4	3.3
유의차	0.07						0.33	0.79	0.08

Table 19. Lab-scale 현미발효물을 적용한 오리엔탈 드레싱 제품의 맛 적당도 조사 결과

제품	짠맛 적당도	단맛 적당도	신맛 적당도
현미발효물 적용 오리엔탈 드레싱	3.6	3.1	3.3
A사 오리엔탈 드레싱	3.1	3.8	2.6
유의차	0.01	0.00	0.00

\* 출처:전문패널 대상(n=9, 2회 반복, 2012.04.17)

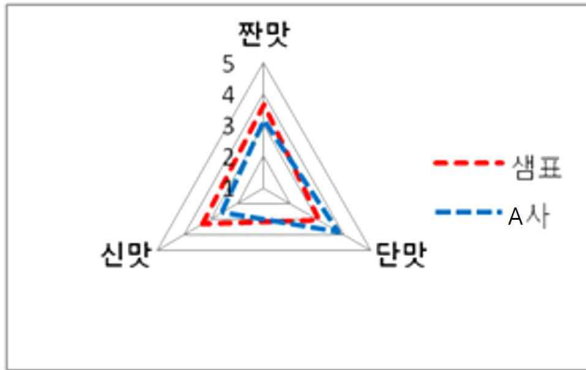


Fig. 9. Lab-scale 현미발효물을 적용한 오리엔탈 드레싱 제품의 맛 특성 그래프

(라) Lab-scale 현미발효물을 적용한 오리엔탈 드레싱 제품의 보존성 테스트

Lab-scale 현미발효물을 적용한 오리엔탈 드레싱 제품을 35°C Incuvator에서 10주간 저장하면서 1주 단위로 저장기간에 따른 pH, 산도, Brix 및 흡광도를 측정하여 보존성을 확인하였다. 1주차에서 10주차까지 pH, 산도, Brix 값에는 변화가 없었으나 흡광도(갈변도) 측정 결과, 10주 동안 35°C Incuvator에 저장하였을 때 시간이 경과함에 따라 점차적으로 흡광도 값이 증가되어 제품의 갈변이 심해지는 것을 확인할 수 있었다. 따라서 목표로 하는 lab-scale 현미발효물을 적용한 오리엔탈 드레싱 제품의 상온 유통기한 10개월 내의 보존성을 확보하기 위하여 갈변을 최소화하기 위한 추가 실험이 필요하였다.

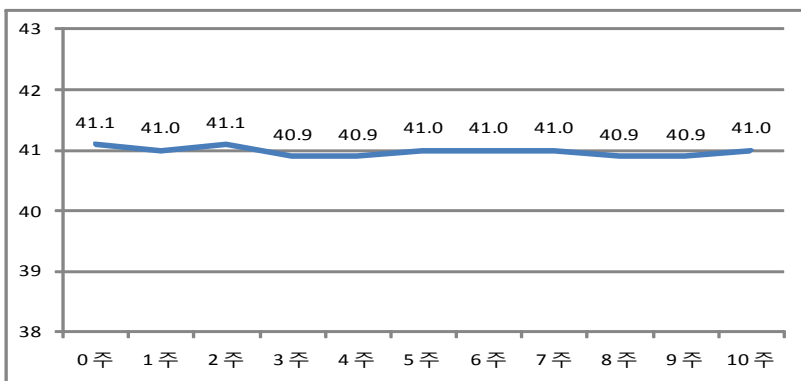


Fig. 10. Lab-scale 현미발효물을 적용한 오리엔탈 드레싱 제품의 저장기간에 따른 Brix 변화

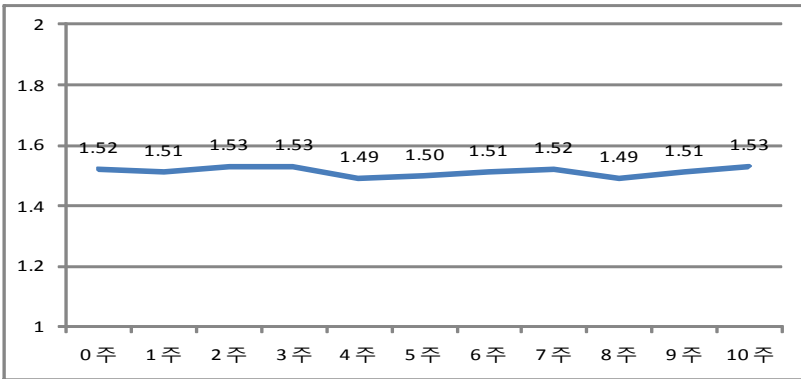


Fig. 11. Lab-scale 현미발효물을 적용한 오리엔탈 드레싱 제품의 저장기간에 따른 산도(%) 변화

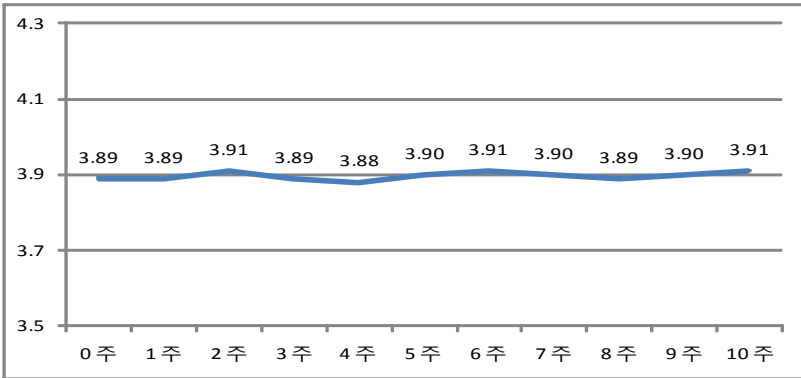


Fig. 12. Lab-scale 현미발효물을 적용한 오리엔탈 드레싱 제품의 저장기간에 따른 pH 변화

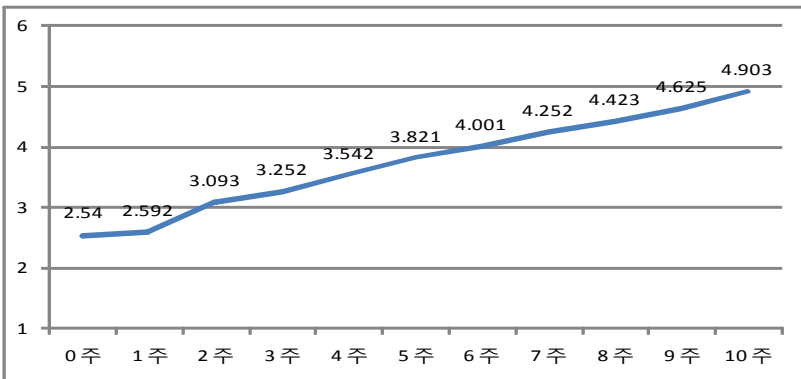


Fig. 13. Lab-scale 현미발효물을 적용한 오리엔탈 드레싱 제품의 저장기간에 따른 흡광도 변화

**Table 20. Lab-scale 현미발효물을 적용한 오리엔탈 드레싱 제품의 저장기간에 따른 이화학적 분석 결과 (35°C, 10주)**

저장기간	0주	1주	2주	3주	4주	5주	6주	7주	8	9주	10주
Brix	41.1	41.0	41.1	40.9	40.9	41.0	41.0	41.0	40.9	40.9	41.0
산도	1.52	1.51	1.53	1.53	1.49	1.50	1.51	1.52	1.49	1.51	1.53
pH	3.89	3.89	3.91	3.89	3.88	3.90	3.91	3.90	3.89	3.90	3.91
흡광도	2.540	2.592	3.093	3.252	3.542	3.821	4.001	4.252	4.423	4.625	4.903

(마) Lab-scale 현미발효물을 적용한 오리엔탈 드레싱 제품의 갈변 최소화 실험

보존성 테스트에서 시간이 경과함에 따라 갈변이 심해지는 것으로 확인되어 갈변을 최소화하기 위하여 세 가지 조건의 실험 계획을 수립하여 보완 실험을 진행하였다.

실험군 1은 원료 중 열에 의해서 쉽게 갈변되는 것으로 확인된 아가베시럽을 내열성이 일반 당류에 비해 강하면서도 pH가 낮은 제품에서도 안정한 당알콜류인 말티톨시럽으로 대체하여 실험하였다.

실험군 2는 살균 처리 중 열에 의한 갈변을 최소화하기 위해서 현미발효물을 다른 원료인 액상 및 분말 원료와는 별도로 90°C 살균 처리하여 혼합하는 방식으로 실험하였다.

실험군 3은 원료 중 아가베시럽을 내열성이 일반 당류에 비해 강하면서도 pH가 낮은 제품에도 안정한 당알콜류인 말티톨시럽으로 대체하고, 현미발효물을 다른 원료인 액상 및 분말 원료와는 별도로 90°C 살균 처리하여 혼합하는 방식으로 실험하였다.

**Table 21. 실험군 1, 2, 3의 배합 비율**

원재료명	실험군 1		실험군 2		실험군 3	
	제조공정	배합비(%)	제조공정	배합비(%)	제조공정	배합비(%)
정제수	A	4.13	A	4.13	A	4.13
건조마늘플레이크	A	0.7	A	0.7	A	0.7
복합향신료	A	0.04	A	0.04	A	0.04
잔탄검	A	0.13	A	0.13	A	0.13
다진깨	A	0.5	A	0.5	A	0.5
현미발효물	B	30	C	30	C	30
진장	B	25	B	25	B	25
다진마늘	B	1	B	1	B	1
마늘농축액	B	0.5	B	0.5	B	0.5
레몬농축액	B	1	B	1	B	1
말티톨시럽	B	8	B*	8	B	8
흑초	B	5	B	5	B	5
양조식초	B	14	B	14	B	14
해바라기유	C	5	D	5	D	5
참기름	C	5	D	5	D	5
합계		100		100		100

\* 말티톨 시럽을 아가베 시럽으로 대체하였음.



**Table 22. 실험군 1의 제조 공정**

공정명	공정 조건	비고
1차 원료 혼합 및 가열	A의 잔탄검, 건조마늘플레이크, 복합향신료, 참깨를 물에 용해 혼합한 후 92℃까지 가열한다.	분말원료 용해 및 분말원료 살균
2차 원료 혼합	B의 현미발효물, 진장, 마늘, 마늘농축액, 말티톨시럽, 레몬농축액, 흑초를 넣고 혼합한다.	액상원료를 투입하여 혼합
살균	1차 및 2차 원료를 혼합한 후 90℃, 20분간 살균한다.	원료혼합 후 살균목적으로 가열
냉각	살균된 배합물을 30℃까지 냉각시킨다.	풍미 열화 방지 목적
충전 및 캡핑	냉각된 수상부 배합물과 C의 해바라기유와 참기름을 병에 충전한 후 캡핑한다.	

**Table 23. 실험군 2의 제조 공정**

공정명	공정 조건	비고
1차 원료 혼합 및 가열	A의 잔탄검, 건조마늘플레이크, 복합향신료, 참깨를 물에 용해 혼합한 후 92℃까지 가열한다.	분말원료 용해 및 분말원료 살균
2차 원료 혼합	B의 진장, 마늘, 마늘농축액, 아가베시럽, 레몬농축액, 흑초를 넣고 혼합한다.	액상원료를 투입하여 혼합
살균	1차 및 2차 원료를 혼합한 후 90℃, 20분간 살균한다.	원료혼합 후 살균목적으로 가열
3차 원료 투입	C의 현미발효물을 90℃까지 별도로 가열살균 한 후 투입한다.	가열 중 다른 원료와의 갈변 반응 최소화
냉각	살균된 배합물을 30℃까지 냉각시킨다.	풍미 열화 방지 목적
충전 및 캡핑	냉각된 수상부 배합물과 D의 해바라기유와 참기름을 병에 충전한 후 캡핑한다.	

**Table 24. 실험군 3의 제조공정**

공정명	공정 조건	비고
1차 원료 혼합 및 가열	A의 잔탄검, 건조마늘플레이크, 복합향신료, 참깨를 물에 용해 혼합한 후 92℃까지 가열한다.	분말원료 용해 및 분말원료 살균
2차 원료 혼합	B의 진장, 마늘, 마늘농축액, 말티톨시럽, 레몬농축액, 흑초를 넣고 혼합한다.	액상원료를 투입하여 혼합
살균	1차 및 2차 원료를 혼합한 후 90℃, 20분간 살균한다.	원료혼합 후 살균목적으로 가열
3차 원료 투입	C의 현미발효물을 90℃까지 별도로 가열살균 후 투입한다.	가열 중 다른 원료와의 갈변 반응 최소화
냉각	살균된 배합물을 30℃까지 냉각시킨다.	풍미 열화 방지 목적
충전 및 캡핑	냉각된 수상부 배합물과 D의 해바라기유와 참기름을 병에 충전한 후 캡핑한다.	

실험군별로 현미발효물을 적용한 오리엔탈 드레싱을 제조한 후 이화학적 분석을 실시한 결

과, 말티톨시럽을 적용한 실험군 1의 흡광도가 1.704로 가장 낮은 값을 나타내어 갈변을 최소화하기 위한 실험군 1, 실험군 2, 실험군 3의 세가지 조건 중에서는 원료 중 아가베시럽을 말티톨 시럽으로 대체 적용한 실험군 1이 갈변억제 효과가 가장 좋았다.

갈변억제 효과가 가장 좋았던 실험군 1을 대조군과 함께 35℃ 10주간 항온 보관하면서 주 단위별로 Brix, 산도, pH 및 흡광도를 측정된 결과, 말티톨 시럽을 적용한 실험군 1은 35℃ 10주차 보관시에도 대조군 대비 49.7% 수준의 흡광도를 나타내어 보존 기간 중 발생되었던 갈변 문제가 개선되었음을 확인할 수 있었다.

**Table 25. 갈변 최소화 실험 실험군별 이화학적 분석 결과**

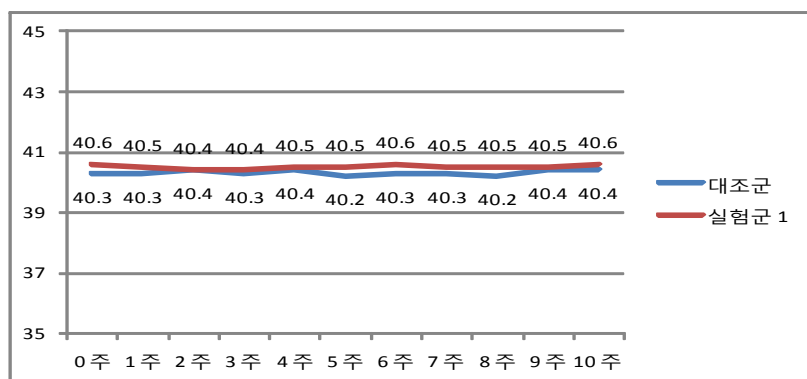
샘플번호	적용 내용	pH	Brix(%)	산도(%)	흡광도(갈변도)
대조군	(기존) 아가베시럽 적용	3.83	40.3	1.50	2.203
실험군 1	말티톨시럽 적용	3.85	40.6	1.50	1.704
실험군 2	현미발효물 별도 살균 후 투입	3.85	40.1	1.50	2.096
실험군 3	말티톨시럽 적용 + 현미발효물 별도 살균 후 투입	3.82	40.3	1.50	1.960

**Table 26. 대조군의 35℃ 항온 보관 10주간 이화학적 분석 결과**

	0주	1주	2주	3주	4주	5주	6주	7주	8주	9주	10주
Brix	40.3	40.3	40.4	40.3	40.4	40.2	40.3	40.3	40.2	40.4	40.4
산도	1.50	1.49	1.47	1.48	1.51	1.52	1.47	1.53	1.54	1.51	1.52
pH	3.83	3.79	3.85	3.82	3.80	3.84	3.84	3.82	3.83	3.85	3.83
흡광도 (갈변도)	2.203	2.459	2.767	3.126	3.245	3.354	3.517	3.745	4.101	4.306	4.567

**Table 27. 실험군 1의 35℃ 항온 보관 10주간 이화학적 분석 결과**

	0주	1주	2주	3주	4주	5주	6주	7주	8주	9주	10주
Brix	40.6	40.5	40.4	40.4	40.5	40.5	40.6	40.5	40.5	40.5	40.6
산도	1.50	1.52	1.48	1.47	1.51	1.48	1.50	1.50	1.50	1.51	1.51
pH	3.85	3.80	3.79	3.81	3.83	3.86	3.84	3.85	3.86	3.86	3.84
흡광도 (갈변도)	1.704	1.838	1.915	2.027	2.038	2.158	2.173	2.225	2.540	2.595	2.676



**Fig. 14. 대조군과 실험군 1의 저장기간에 따른 Brix 변화**

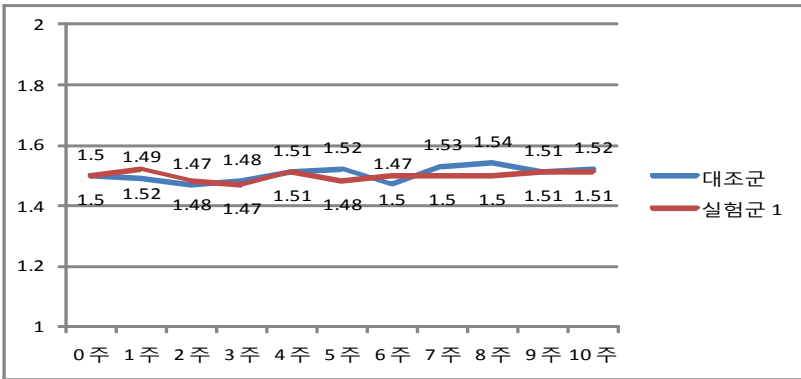


Fig. 15. 대조군과 실험군 1의 저장기간에 따른 산도 변화

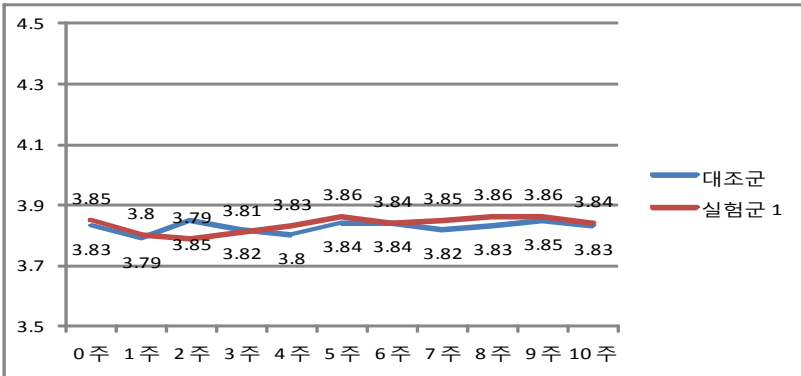


Fig. 16. 대조군과 실험군 1의 저장기간에 따른 pH 변화

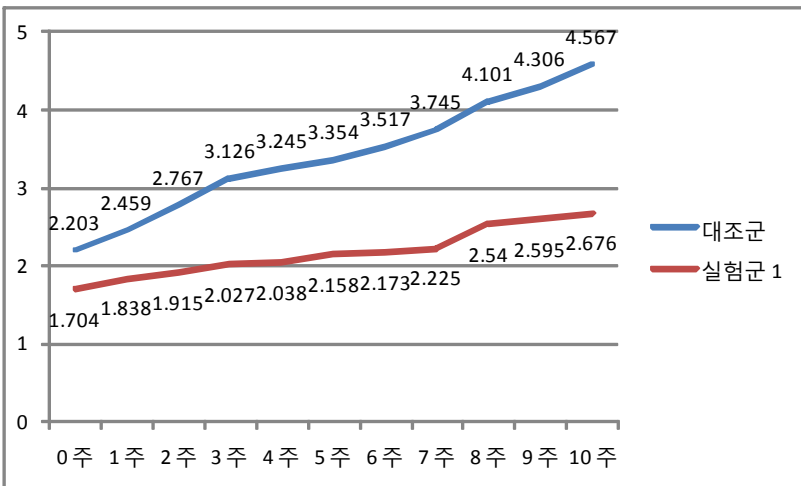


Fig. 17. 대조군과 실험군 1의 저장기간에 따른 흡광도 변화

(바) 저장 중 갈변발생을 최소화한 Lab-scale 현미발효물 적용 오리엔탈 드레싱 제품의 관능검사 결과

저장 중 갈변억제에 효과적이었던 말티톨 시럽을 사용한 현미발효물 적용 오리엔탈 드레싱 제품과 시중에서 판매되고 있는 M/S 1위인 A사의 오리엔탈 드레싱을 전문패널과 연구원 15명을 대상으로 관능검사를 실시한 결과, 현미발효물 적용한 오리엔탈 드레싱 제품이 시중 M/S 1위제품(A사) 대비 향, 맛, 전반적인 만족도에서 동등 수준 이상의 관능 품질임을 확인하였다.

**Table 28. 갈변을 최소화한 Lab-scale 현미발효물 적용 오리엔탈 드레싱 제품의 관능검사 결과**

제품	전반적 만족도	응답비율(%)					기호도		
		불만족	불만족한 편	보통	만족한 편	매우만족	외관	향	맛
현미발효물 적용 오리엔탈 드레싱	3.7	0	7	23	60	10	3.5	3.4	3.8
A사 오리엔탈 드레싱	3.3	0	17	57	20	7	3.5	3.1	3.2
유의차	0.04						0.61	0.04	0.003

\* 출처 : 연구원/전문패널 대상(n=15, 2012.10.25.)

(사) Lab-scale 현미발효물을 적용한 오리엔탈 드레싱 제품 개발 결론 요약

과당(액상과당)을 현미발효물과 말티톨시럽으로 전량 대체하여 시중 M/S 1 위 제품인 A사 오리엔탈 드레싱과 기호도 조사를 실시한 결과, 동등 이상의 풍미 수준을 확인하였고 35℃ 항온 보관하며 10주간 매주 pH, 산도, Brix 및 흡광도를 측정하여 결과, 상온 10개월의 유통기간을 확보하였으며 갈변현상 또한 개선된 것으로 나타났다. 이를 통해 lab-scale 수준에서 현미발효물을 적용한 오리엔탈 드레싱의 제품 가능성을 확인하였으나 scale-up 및 본생산시의 풍미 열화 최소화를 위한 배합비율 및 제조공정 최적화 연구가 진행되어야 한다.

(2) 현미발효물을 적용한 오리엔탈 드레싱의 scale-up, 본생산시 배합비 및 제조 공정 조건 최적화

Lab-scale 현미발효물을 적용한 오리엔탈 드레싱 제품 개발을 통해 시중에 판매 중인 M/S 1위인 A사의 오리엔탈 드레싱 제품과 비교하여 기호도 동등 수준 이상의 풍미와 상온 10개월의 유통기간이 확보된 배합비율과 제조공정을 개발하였다. lab-scale에서 설정된 제조 공정과 갈변 최소화 조건을 바탕으로 현미발효물을 적용한 오리엔탈 드레싱의 scale-up 및 본생산시 배합비와 제조공정 조건을 최적화하기 위한 연구를 실시하였다.

(가) 배합비율 설정

① 현미발효물 종류별 특성 비교 및 선정

샘표식품(주)에서 제조한 2가지 타입의 현미발효물과 1가지 타입의 쌀 발효물에 대해 각 원료별 특성 및 관능검사를 실시하였다.

오리엔탈 드레싱 제품에 현미발효물 A, 현미발효물 B, 쌀발효물 C를 동일함량으로 적용한 후 5점 척도로 외관 및 관능검사를 실시하였다. 그 결과, 현미발효물 A를 적용한 오리엔탈 드레싱의 외관 및 풍미 선호도가 가장 우수하여 현미발효물 A을 scale-up과 본생산시에 적용하기로 하였다.

**Table 29. 현미/쌀 발효물 종류별 특성 및 시식 결과**

원료	현미발효물 A	현미발효물 B	쌀 발효물 C
Brix	50.0	52.0	56.6
주요 특성	-Clear type -원심 분리 후 농축 (Continuous centrifuge) -백년동안(음료베이스) 제품 적용 예정 -포도당함량 10.9%	-Cloud type -50mesh 조여과 후 농축 -스프레드 베이스 목적으로 제조되어 점성 있음 -제조공정 및 제품 스펙 미확정	-Cloud type -발효 후 Brix 36 상태에 서grinding 하여 농축 -100% 수율 -포도당함량 30%
외관 및 관능	-맑고 투명한 갈색 -드레싱 색상으로 적합 -쌀엿의 고소한 풍미와 감칠맛 느껴짐 -냉장 보관 시 결정 발생 현상 없음	-탁한 아이보리색 -약한 점성을 띠 -50mesh 조여과로 거친 입자감(수율 상승되나 식 감 떨어짐), 풀죽향(이취)	-탁한 아이보리색 -약한 점성, 거친 입자감 -고소한 맛 -냉장 보관 시 결정 발생

\* 출처 : 연구원/전문패널 대상(n=15, 2013.02.26)

**Table 30. 현미/쌀 발효물 적용 오리엔탈 드레싱별의 관능검사 결과**

적용 원료	현미발효물 A	현미발효물 B	쌀발효물 C
선호도	3.8점	3.3점	3.4점
시식의견	-외관 양호 -맛이 부드럽고 드레 싱으로 조화된 맛(등글 어짐) -단맛, 신맛 강도 적당	-외관 불투명 갈색 (흔들면 더 혼탁해짐) -원료에서 유래된 풀죽 향미 인공적임(이취) -점도가 높아 걸쭉해짐	-외관 불투명 갈색 (흔들면 더 혼탁해짐) -드레싱의 신선한 풍미 없고 텁텁한 맛 느껴짐 - 점도가 높아 걸쭉해짐

\* 출처 : 연구원/전문패널 기호도 조사 결과(n=15, 2회 반복, 2013.03.08)

② 현미발효물 A와 말티톨시럽의 적정 사용량 검토

설탕 대비 현미발효물 A의 감미 수준을 확인하여 현미발효물 A의 적정 사용량을 선정하고  
자 실험을 실시하였다. 현미발효물 A의 20%, 25%, 30%, 35%, 40% 희석액을 순차적으로 제공  
하여 설탕 10% 용액과의 단맛 강도를 비교하도록 하였다 (이점비교검사, 샘플 전문패널 대상,  
n=9, 3회 반복, 2013.03.14). 비교 테스트 결과, 설탕 10% 용액의 단맛 강도 대비 현미발효물 A  
30~35% 샘플에서 동등 수준의 단맛 강도를 인지하여 설탕의 감미 수준을 1로 하였을 때, 현  
미발효물 A 감미 수준은 0.33으로 확인되었다. 이는 현미발효물 A의 이론적인 감미 수준 0.35  
(포도당 감미도 0.7 \* 현미발효물 내 포도당 함량 50%)와도 유사한 결과였다.

시중에 판매되는 오리엔탈 드레싱 제품의 Brix는 23.3~45.2의 범위를 가지고 있다. 현미발효  
물 A의 원료 특성상 Brix(50) 대비 감미도(0.33)가 낮아 Brix 기준으로 사용량을 산출하지 않  
고 감미도를 기준으로 적정 사용량을 산출하였다. 시중에 판매되는 오리엔탈 드레싱 제품의 액  
상과당 사용량은 약 8% 정도이며 액상과당 감미도 1.4를 현미발효물 A의 감미도 0.33과 말티  
톨시럽의 감미도 0.7로 환산하여 현미발효물 A 10%, 말티톨시럽 11.4%로 적정 사용량을 산출  
하였다.

③ 짠맛, 신맛, 감칠맛의 원료 선정

오리엔탈 드레싱의 짠맛을 내는 간장으로는 샘표식품(주)의 양조간장501을 사용하였다. 일반적으로 양조간장은 맛이 깊고 향이 좋아 회나 야채 등의 생식 요리에 적합하다. 신맛을 내는 식초는 샘표식품(주)의 양조식초를 사용하였다. 일반적으로 과일 드레싱에는 과일 향미가 있는 사과식초를, 일반 드레싱에는 깔끔한 풍미의 양조식초를 사용한다. 오리엔탈 드레싱의 감칠맛을 내는 원료로는 콩을 미생물 발효하여 아미노산 펩타이드 함량을 증가시킨 샘표식품(주)의 연두 제품을 사용하였다.

**Table 31. 현미발효물 A를 적용한 오리엔탈 드레싱 제품의 배합비율**

배합 순서	원재료명	배합비율(%)
A	정제수	6.76
	백설탕	6.00
	정제소금	0.30
	건조마늘플레이크	0.50
	볶음김정깨	0.50
	잔탄검	0.15
	타마린드검	0.12
	향미증진제	0.07
	함수결정포도당	10.00
	로스티드갈릭분말	1.00
B	레몬농축액	0.70
	미향	3.00
	현미발효물 A	10.00
	말티톨시럽	11.40
	양조식초	20.00
	야채즙	0.30
	양조간장501	21.00
	연두순	0.40
화이트와인	0.10	
C	카놀라유	5.00
	참기름	0.70
	엑스트라버진올리브유	2.00
	합계	100.00

(나) 현미발효물 적용 오리엔탈 드레싱의 scale-up을 위한 풍미열화 최소화 공정 조건 설정

살균온도와 식초 투입 시기에 따른 풍미 차이를 비교하여 풍미열화 최소화 공정 조건을 설정하였다. 살균온도는 90℃에서 85℃로 하향 조정하였다. 식초 투입 시기는 기존의 식초를 포함한 액상 원료를 투입한 후 85℃까지 가열하는 공정에서 향미 성분의 휘발성이 있는 식초를 85℃까지 가열이 끝난 다음 후투입하여 80℃에서 살균 종료하는 것으로 변경하였다.

현미발효물 적용 오리엔탈 드레싱 scale-up 제품의 살균 과정 중 풍미 열화 최소화를 위해 살균 온도 하향 조정 테스트를 진행하였다. 오리엔탈 드레싱 1차 개발 제품에 사용되었던 생마늘, 천연향신료 등 미생물에 취약한 일부 원료가 로스티드갈릭분말 등으로 대체되면서 최종 살균온도를 90℃에서 85℃로 조정하였다.

**Table 32. 오리엔탈 드레싱 살균 온도 최적화 실험시 제조 공정 비교**

공정명	기존 공정 조건	변경 공정 조건
1차 원료 혼합 및 가열	A의 분말 원료를 혼합한 후 물에 용해 92℃까지 가열한다.	A의 분말 원료를 혼합한 후 물에 용해 92℃까지 가열한다.
2차 원료 혼합	B의 현미발효물, 말티톨시럽, 레몬농축액, 야채즙, 양조간장501, 연두순, 화이트와인, 양조식초를 넣고 액상 원료를 넣고 90℃에서 20 분간 살균한다.	B의 현미발효물, 말티톨시럽, 레몬농축액, 야채즙, 양조간장501, 연두순, 화이트와인, 양조식초를 넣고 액상 원료를 넣고 85℃ 까지 살균한다.
규격 검사	배합물의 일반규격 및 관능을 분석한다.	배합물의 일반규격 및 관능을 분석한다.
냉각	살균된 배합물을 30℃까지 냉각시킨다.	살균된 배합물을 30℃까지 냉각시킨다.
충전 및 캡핑	냉각된 배합물과 유상부를 병에 충전한 후 캡핑한다.	냉각된 배합물과 유상부를 병에 충전한 후 캡핑한다.

현미발효물 적용 오리엔탈 드레싱 scale-up 제품 개발에 있어 풍미열화 최소화 공정 조건 별 살균 온도와 식초 투입 순서 변경 샘플에 대한 관능검사를 진행하였다. 기존의 2차 원료 혼합 시 양조식초를 함께 투입하여 90℃까지 살균하는 방법(실험군 1)과 동일한 순서로 85℃까지 살균하는 방법(실험군 2), 양조식초를 제외한 액상원료를 85℃ 가열 후 양조식초를 투입하여 80℃에서 살균 종료(실험군 3)하는 3가지 방법으로 샘플을 제조하여 연구원 8명 대상으로 5점 척도로 기호도 조사를 실시하였다. 관능검사 결과, 액상원료를 85℃ 가열 후 양조식초를 투입하여 80℃에서 살균 종료한 실험군 3이 기호도 3.9점으로 가장 높게 평가되었다.

**Table 33. 살균 온도와 양조식초 투입 시기에 따른 기호도 조사 결과**

적용 공정	실험군 1	실험군 2	실험군 3
기호도	3.5점	3.6점	3.9점
시식의견	- 전체적인 맛 강도가 약한 편임 - 맛이 가볍게 느껴짐	-신맛이 약해 단맛 강하게 느껴짐 -상큼한 풍미가 약해짐	-신선하고 상큼한 맛 -신맛 강도 적당 -풍미가 조화로움

\*출처 : 샘플 연구원 대상 평가,(n=8, 2회 반복, 2013.03.13)



Fig. 18. 현미발효물 적용 오리엔탈 드레싱 Scale-up 제품의 제조과정

(다) 풍미 열화 최소화를 위한 충전 조건 최적화 실험

현미발효물 적용 오리엔탈 드레싱 scale-up 제품의 충전 온도별 물성, 풍미, 흡광도(갈변도) 분석을 통해 풍미 열화를 최소화하는 최적의 충전 조건을 설정하였다. Cold-filling 조건은 실제 공정에서의 규격 분석 및 서비스 탱크 이송 시간을 고려하여 80°C 살균 종료 후 70°C 항온수조에 1시간 동안 보관하고 냉각수를 이용하여 냉각한 뒤 병에 충전하였다. Hot-filling 초기 충전 제품은 Cold-filling 조건과 동일하게 80°C 살균 종료 후 70°C 항온수조에 1시간 보관한 뒤 병에 충전하여 냉각하였다. Hot-filling 말기 충전 제품은 충전이 시작된 뒤 서비스 탱크 내에서 대기하는 시간을 포함하여 초기 충전 제품 대비 70°C에서 2시간을 더 보관한 뒤 충전하여 냉각하였다. Cold-filling, Hot-filling 초기, Hot-filling 말기 제품의 점도와 흡광도 및 풍미 기호도를 조사한 결과, Hot-filling 초기 충전 제품은 Cold-filling 제품과 큰 차이를 보이지 않았으나 Hot-filling 말기 충전 제품에서는 70°C 이상의 고온 보관 시간 증가로 인해 점도가 약화되었고, 흡광도가 다소 증가하였음을 확인하였다. 풍미 또한 Hot-filling 초기 충전 샘플은 Cold-filling 샘플과 동일하게 나타났으나 Hot-filling 말기 충전 샘플은 Cold-filling 샘플 대비 풍미열화가 진행되었음을 확인할 수 있었다. 따라서 풍미 열화 최소화를 위해서는 Cold-filling 충전 방식이 Hot filling 충전 방식 대비 더 적합함을 확인하였다.



**Table 34. 충전 조건에 따른 품질 특성 확인 결과**

충전 방식	점도	풍미	흡광도(갈변도)
Cold-filling	2,971	3.8	3.025
Hot-filling(초기)	2,444	3.8	3.066
Hot-filling(말기)	1,257	3.6	3.167

\* 점도(SP. No.3, 30RPM, Brookfield Engineering Labs, Middleboro, USA), 흡광도(시료를 체에 걸러 고형물을 제거한 후 측정, 420nm에서 흡광도 UV-VIS Spectrophotometers, Japan)를 3회 반복 측정하여 평균값 산출하였고, 관능풍미는 5점 기호도 평가하였음(연구원 대상 평가, n=8, 2013.03.19).

Cold-filling 충전 중 대기 시간별 샘플에 대한 관능검사를 실시하여 풍미 열화를 최소화하는 냉각 대기시간 최적 조건을 설정하였다. Cold-filling은 배합탱크 내에서 배합물의 수상부를 가열 살균 후 서비스탱크로 이송 한 뒤 냉각 칠러를 연결하여 냉각수 순환에 의한 간접 냉각 방식으로 실시된다. 가열 살균 종료 후 냉각 칠러에 연결되기까지의 냉각 대기 시간에 따른 풍미 차이를 확인하여 풍미 열화를 최소화하는 최적의 냉각 대기 시간을 설정하였다. 이 테스트를 위해 샘플 제조 후 초기 냉각한 제품과, 70℃ 항온수조에서 각각 2시간, 3시간 대기한 후 냉각한 제품을 제조하여 냉각 대기 시간에 따른 초기 냉각 제품과의 풍미 차이를 확인하였다. 조사 방법은 대조군(초기 냉각 제품)과의 차이 검사(샘표전문패널 n=9, 2회 반복 평가, 2013.03.21)로 진행하였다. 대조군과의 차이 검사는 대조군(초기 냉각 제품)과 실험군간의 풍미 차이여부를 측정하여 대조군과 얼마나 다른지를 평가하는 조사 방법이다. 조사 결과, 냉각 대기시간 2시간 적용 샘플은 대조군과 풍미 차이가 없었으나, 냉각 대기시간 3시간 적용 샘플은 대조군과의 풍미가 유의적으로 차이있음을 확인하였다. 따라서 제조공정상 가열 살균 종료 후 Cold-filling 충전시 대기시간은 2시간 이내로 실시하는 것이 풍미 열화를 최소화하는 냉각 대기시간 최적 조건임을 확인할 수 있었다.

**Table 35. 냉각 대기시간별 샘플과 대조군과의 차이 검사 결과**

공정 대기 시간	초기(C)	2시간	3시간	유의차
대조군(C)과의 차이	0.9 <sup>a</sup>	0.7 <sup>a</sup>	1.6 <sup>b</sup>	0.02

\* 출처 : 샘플 전문패널(n=9, 3회 반복, 2013.03.21)

\* 대조군과의 차이 검사 : 기존 검사물(대조군)과의 실험군간의 차이 여부를 측정하여 검사물로부터 얼마나 다른지를 평가함. 기준 검사물로부터의 평균 차이를 계산하여 그 결과를 분산 분석함(단, 실험군 안에는 검사물과 동일한 샘플을 항시 제공), 차이 정도는 7점 척도로 0 점 차이 없음~7점 완전히 다른 제품으로 점수를 부여하며 기준 검사물끼리의 차이 정도와 기준 검사물과 검사물의 차이 정도가 유사하면 두 제품 간 유의적 차이가 없는 것으로 해석함.

(라) 현미발효물 적용 오리엔탈 드레싱 Scale-up을 위한 공정 최적화 샘플의 관능검사 결과

Lab-scale 현미발효물을 적용한 오리엔탈 드레싱 제품과 동일하게 시중 유통 제품 중 오리엔탈 드레싱 MS 1위 제품인 A사 오리엔탈 드레싱과의 기호도 조사를 실시하였다. 경쟁사 제품은 시중 판매 제품을 구매하여 제공하였으며, 자사 제품은 설정된 최종 가공조건을 적용하여 제조된 scale-up 샘플을 제공하되 경쟁사 제품의 제조일자를 확인하여 자사 제품과 동일한 일

자 제품을 선정하였다(2013.03.07 제조). 조사 방법은 상기 2가지 드레싱 30g을 양상추와 함께 제공하여 전반적 만족도 및 외관, 맛, 향미 기호도와 단맛, 신맛, 감칠맛의 적당한 정도를 5점 척도로 평가하도록 하였다. 기호도 조사 시 사용된 설문지는 아래와 같다.

**오리엔탈 드레싱 질문지**

**1. 이 제품을 드셔보셨을 때 전반적 만족도는 어떠하십니까?**

좋지 않다      좋지 않은 편이다      보통이다      좋은 편이다      매우 좋다  
 1-----2-----3-----4-----5

**1-1. 위와 같이 응답하신 이유는 무엇인가요? 그에 대한 이유를 자세히 적어주시시오.**

좋은 점(장점 등)	개선 점(단점 등)

**2. 이 제품을 드셔보셨을 때 외관에 대한 기호도는 어떠하십니까?( )**

좋지 않다      좋지 않은 편이다      보통이다      좋은 편이다      매우 좋다  
 1-----2-----3-----4-----5

**3. 이 제품을 드셔보셨을 때 맛에 대한 기호도는 어떠하십니까?( )**

좋지 않다      좋지 않은 편이다      보통이다      좋은 편이다      매우 좋다  
 1-----2-----3-----4-----5

관능검사 결과, A사 오리엔탈 드레싱 대비 현미발효물 적용 오리엔탈 드레싱 scale-up 공정 최적화 샘플의 전반적 만족도가 유의적으로 우위의 결과를 얻었고(유의차 0.01, Top2 7%), 외관과 맛 기호도에서도 동등 수준임이 확인되었다.

**Table 36. 현미발효물 적용 오리엔탈 드레싱 Scale-up 공정 최적화 샘플의 경쟁사 제품 대비 기호도 조사 결과**

구분	전반적 만족도	응답비율(%)					기호도	
		불만족	불만족한편	보통	만족한편	매우만족	외관	맛
현미발효물 적용 오리엔탈 드레싱	<b>3.8</b>	0	0	29	64	7	3.6	<b>3.8</b>
A사 오리엔탈 드레싱	<b>3.3</b>	0	14	43	43	0	3.7	<b>3.4</b>
유의차	<b>0.01</b>						0.71	<b>0.09</b>

\*출처: 샘플 전문패널/연구원 대상 평가,(n=14, 2회 반복, 2013.03.26)

(마) 현미발효물을 적용한 오리엔탈 드레싱 Scale-up 시제품 제작

현미발효물 적용 오리엔탈 드레싱의 본생산에 따른 품질 변화 여부 점검 및 이화학/관능 규격 설정을 목적으로 30kg scale-up 시제품 제작을 2회 진행하였으며 협력업체(B사)의 100kg 규모 배합 설비를 이용하였다.

**Table 37. 현미발효물 적용 오리엔탈 드레싱 Scale-up 시제품 배합비율**

배합 순서	원재료명	배합비율(%)	30kg 생산시 투입량(g)
A	정제수	6.76	2,028.00
	백설탕	6.00	1,800.00
	정제소금	0.30	90.00
	건조마늘플레이크	0.50	150.00
	볶음검정깨	0.50	150.00
	잔탄검	0.15	45.00
	타마린드검	0.12	36.00
	향미증진제	0.07	21.00
	함수결정포도당	10.00	3,000.00
	로스티드갈릭분말	1.00	300.00
B	레몬농축액	0.70	210.00
	미향	3.00	900.00
	현미발효물	10.00	3,000.00
	말티톨시럽	11.40	3,420.00
	양조식초	20.00	6,000.00
	야채즙	0.30	90.00
	양조간장501	21.00	6,300.00
	연두순	0.40	120.00
C	화이트와인	0.10	30.00
	카놀라유	5.00	1,500.00
	참기름	0.70	210.00
	엑스트라버진올리브유	2.00	600.00
	합계	100.00	30,000.00

**Table 38. 현미발효물 적용 오리엔탈 드레싱 Scale-up 시제품 제조공정**

공정명	공정 조건	비고
1차 원료 혼합 및 가열	분말 원료를 혼합한 후 물에 용해 92℃까지 가열한다.	정제수 함량이 적어 양조간장 등 일부 액상원료 함께 투입
2차 원료 혼합	현미발효물, 말티톨시럽, 미향, 레몬 농축액, 야채즙, 양조간장501, 연두순, 화이트와인을 넣고 85℃ 까지 살균한다.	-
양조식초 투입	양조식초 투입 후 80℃까지 살균한다.	-
규격 검사	배합물의 일반규격 및 관능을 분석한다.	-
냉각	살균된 배합물을 30℃까지 냉각시킨다.	소량 생산으로 인해 서비스탱크 미사용, 5kg 파우치에 나누어 담은 후 냉각수에 침지하여 냉각함
충전 및 캡핑	냉각된 배합물과 유상부를 병에 충전한 후 캡핑한다.	-

현미발효물 적용하여 제조된 오리엔탈 드레싱 scale-up 시제품에 대한 Brix, 염도 및 pH 측정 결과, 한도 견본과 유사한 수치로 확인되어 Brix  $43 \pm 1$ , 염도  $3.7 \pm 0.2\%$ , pH  $3.6 \pm 0.2$ 로 일반 규격을 설정하였다. 관능검사 결과, Lab에서 제조된 한도견본 대비 배합량 증가(30kg)로 인해 scale-up 시제품의 풍미 열화가 확인되었다. 따라서 본생산 규모의 생산 시(700kg) 풍미 열화 최소화를 위한 테스트가 필요함을 확인하였다. 또한 Scale-up 시제품을 35℃ 항온 보관하며 이화학적 분석과 관능 규격 확인 및 미생물 검사를 진행하여 상온 10 개월 유통기한을 확보하였다.

**Table 39. Scale-up 시제품 이화학적 분석 결과**

측정 샘플	Brix	염도(%)	pH
한도견본	43.2	3.75	3.66
Scale-up 시제품	43.2	3.65	3.60

\* Brix(당도계, ATAGO SMART, Japan), 염도/pH(METROHM 877 TITRINO PLUS, Swiss)는 3회 반복 측정 후 평균값 산출함.

**Table 40. Scale-up 시제품의 이화학적 수치 변화 및 미생물/관능검사 결과(35℃, 10 주)**

	0주	1주	2주	3주	4주	5주	6주	7주	8주	9주	10주
Brix	43.2	43.1	43.3	43.5	43.5	43.4	43.5	43.5	43.4	43.6	43.4
염도	3.65	3.67	3.70	3.65	3.68	3.70	3.71	3.70	3.72	3.69	3.72
pH	3.60	3.60	3.62	3.65	3.64	3.69	3.70	3.66	3.68	3.68	3.65
흡광도	3.036	3.042	3.042	3.066	3.107	3.124	3.176	3.185	3.197	3.225	3.259
미생물	적합	적합	적합	적합	적합	적합	적합	적합	적합	적합	적합
풍미	적합	적합	적합	적합	적합	적합	적합	적합	적합	적합	적합

\* Brix(당도계, ATAGO SMART, Japan), 염도/pH Japan), 염도/pH(METROHM 877 TITRINO PLUS, Swiss)는 3회 반복 측정 후 평균값 산출하였음.

\* 흡광도(갈변도)는 시료를 체에 걸러 고형물질을 제거한 후 UV-VIS Spectrophotometers(UVmini-1240, Shimadzu, Japan)를 이용하여 420 nm에서 3회 반복 측정한 후 평균값을 산출하였음.

\* 식품공전 식품일반 식중독균 기준 바실러스세레우스g 당  $10^4$  이하, 드레싱 규격 대장균균 음성.

\* 풍미 관능검사 기준 5점 척도 이미/이취 여부 3점 이상(이미/이취 없을시 5점), 기호도 3점 이상(연구원 대상 평가, n=5 이상)

(바) 본생산을 위한 풍미 열화 최소화 공정 조건 설정

분리 액상형 드레싱은 상층의 오일부와 하층의 수상부로 구성되어 있다. 오일부는 미생물 안전성이 있어서 별도의 살균 과정을 거치지 않는다. 그러나 수상부는 가열 살균을 거치게 되고 이 과정에서 휘발성을 가진 풍미 성분들의 손실에 의해 풍미가 저하되게 된다. 즉, 제품의 풍미 열화는 수상부에 의해 발생하게 되고 이에 따라 충전시의 수상부의 비율을 줄이고 오일부의 비율을 높여 풍미 열화 정도를 최소화하였다.

현미발효물을 적용한 오리엔탈 드레싱 scale-up 시제품 제작을 위해 30kg으로 배합물 양을 증가시켰을 때, 후투입되는 액상 원료의 양이 많아서 액상 원료 투입 시에 배합물의 품온이 70℃까지 하강하여 살균온도까지 가열시키는 데 소요되는 시간이 증가되어 제품의 풍미 열화에 영향을 미치게 됨을 확인할 수 있었다. 따라서 분말 원료와 액상 원료, 정제수를 한 번에 혼합한 후 85℃까지 가열하도록 제조 공정을 변경하였다.

**Table 41. 현미발효물을 적용한 오리엔탈 드레싱 Scale-up 시제품 배합비율**

배합 순서	원재료명	기존 배합비율(%)	개선 배합비율(%)
A	정제수	6.76	4.46
	백설탕	6.00	6.00
	정제소금	0.30	0.30
	건조마늘플레이크	0.50	0.50
	볶음검정깨	0.50	0.50
	잔탄검	0.15	0.15
	타마린드검	0.12	0.12
	향미증진제	0.07	0.07
	합수결정포도당	10.00	10.00
	로스티드갈릭분말	1.00	1.00
B	레몬농축액	0.70	0.70
	미향	3.00	3.00
	현미발효물	10.00	10.00
	말티톨시럽	11.40	11.40
	양조식초	20.00	20.00
	야채즙	0.30	0.30
	양조간장501	21.00	21.00
	연두순	0.40	0.40
화이트와인	0.10	0.10	

C	카놀라유	5.00	7.30
	참기름	0.70	0.70
	엑스트라버진올리브유	2.00	2.00
	합계	100.00	100.00

**Table 42. 현미발효물을 적용한 오리엔탈 드레싱 Scale-up 시제품 제조 공정**

공정명	기존 공정 조건	개선 공정 조건
1차 원료 혼합 및 가열	분말 원료를 혼합한 후 물에 용해 92℃까지 가열한다.	물과 액상 원료를 넣고 가열하면서 분말 원료를 투입하여 85℃ 까지 가열한다.
2차 원료 혼합	현미발효물, 말티톨시럽, 미향, 레몬농축액, 야채즙, 양조간장501, 연두순, 화이트와인을 넣고 85℃ 까지 살균한다.	
양조식초 투입	양조식초 투입 후 80℃까지 살균한다.	양조식초 투입 후 80℃까지 살균한다.
규격 검사	배합물의 일반규격 및 관능을 분석한다.	배합물의 일반규격 및 관능을 분석한다.
냉각	살균된 배합물을 30℃까지 냉각시킨다.	살균된 배합물을 30℃까지 냉각시킨다.
충전 및 캡핑	냉각된 배합물과 유상부를 병에 충전한 후 캡핑한다.	냉각된 배합물과 유상부를 병에 충전한 후 캡핑한다.

**Table 43. 현미발효물을 적용한 오리엔탈 드레싱 Scale-up 시제품 미생물 검사 결과**

	0주	1주	2주	3주	4주	5주	6주	7주	8주	9주	10주
바실러스 세레우스	적합	적합	적합	적합	적합	적합	적합	적합	적합	적합	적합
대장균군	적합	적합	적합	적합	적합	적합	적합	적합	적합	적합	적합

\* 식품공전 식품일반 식중독균 기준 바실러스세레우스 g 당  $10^4$  이하, 드레싱 규격 대장균군 음성.

Scale-up 시제품 생산 이후 대량 본생산에 따른 풍미 열화를 최소화하기 위해서 수상부 배합비율을 줄이고 오일부 배합비율을 상향 조정하였으며, 분말 원료와 액상 원료 및 정제수를 혼합 가열하여 가열시간을 단축하고 살균 온도를 85℃로 하향 조정하였다. 변경된 배합비율 및 제조공정을 적용하여 샘플을 제조한 후 기존 대비 기호도 조사를 실시하여 개선 여부를 점검하였다. 기호도 조사 결과, 개선 샘플이 전반적 만족도 3.8점(Top2 71%)로 유의적 차이는 아니나 기존 대비 동등 이상의 만족도를 보였다. 따라서 개선 배합비율 및 제조공정을 적용하여 700kg 본 생산을 진행하였다.

**Table 44. 개선 샘플 기존 대비 품미수준 시험**

구분	전반적 만족도	응답비율(%)					기호도	
		불만족	불만족한편	보통	만족한편	매우만족	외관	맛
오리엔탈 드레싱 (기존 조건 적용)	<b>3.7</b>	0	0	35	54	11	3.7	<b>3.7</b>
오리엔탈 드레싱 (개선 조건 적용)	<b>3.8</b>	0	0	29	60	11	3.7	<b>3.8</b>
유의차	<b>0.73</b>						1.00	<b>0.57</b>

\*출처: 샘플 전문패널/연구원 대상 평가,(n=14, 2회 반복, 2013.06.04)

(사) 현미발효물을 적용한 오리엔탈 드레싱의 본생산 실시

현미발효물을 적용한 오리엔탈 드레싱 scale-up 시제품 생산 시, 품미 열화 최소화를 위한 배합비율과 공정 조건을 확정하였다. scale-up 시제품 생산 시 최적화된 배합비율과 공정 조건을 적용하여 700kg 본생산을 실시하였다. 본생산은 협력업체의 설비를 이용하여 진행되었으며 수상부 원액 제조시 1,000kg 규모의 배합탱크를 이용하였고, 냉각 시 850kg 규모의 서비스탱크로 원료를 이송하여 냉각하였다. 충전은 오일 자동충전기를 이용하여 오일을 충전하였고, 수상부는 충전 밸브를 이용하여 수동 충전하였다. 수율 85% 적용 270g 기준 약 2,200EA 생산하였다.

**Table 45. 현미발효물 적용 오리엔탈 드레싱 700kg 본생산시 배합비율**

배합 순서	원재료명	배합비율(%)	700kg 배합시 투입량(g)
A	정제수	4.46	31,220.00
	백설탕	6.00	42,000.00
	정제소금	0.30	2,100.00
	건조마늘플레이크	0.50	3,500.00
	볶음검정깨	0.50	3,500.00
	잔탄검	0.15	1,050.00
	타마린드검	0.12	840.00
	향미증진제	0.07	490.00
	함수겔정포도당	10.00	70,000.00
	로스티드갈릭분말	1.00	7,000.00
B	레몬농축액	0.70	4,900.00
	미향	3.00	21,000.00
	현미발효물	10.00	70,000.00
	말티톨시럽	11.40	79,800.00
	양조식초	20.00	140,000.00
	야채즙	0.30	2,100.00
	양조간장501	21.00	147,000.00
	연두순	0.40	2,800.00
C	화이트와인	0.10	700.00
	카놀라유	7.30	51,100.00
	참기름	0.70	4,900.00
	엑스트라버진올리브유	2.00	14,000.00
	합계	100.00	700,000.00

Table 46. 현미발효물 적용 오리엔탈 드레싱 700kg 본생산에 따른 부자재 수량

품목	수량(EA)	비고
유리병	2,200	-
캡	2,200	-
라벨	2,200	-
수축필름(롯데)	2,200	-
외박스	184	12 병입
간지	184	박스 수량과 동일



Fig. 19. 현미발효물 적용 오리엔탈 드레싱 700kg 본생산시 제조 공정



Fig. 20. 병 충전 후 캡핑 공정까지 완료된 제품(A), 라벨포장까지 완료된 최종 제품(B)



(아) 현미발효물을 적용한 오리엔탈 드레싱 제품 상품화 검토

① 제품 표시사항

Table 47. 현미발효물을 적용한 오리엔탈 드레싱 제품의 표시사항

항 목	표시 내용
제품명	현미 발효 오리엔탈 드레싱
내용량	270g
무첨가 표시	액상과당, 합성착색료, 합성착향료
주원료 함량 표시	현미발효물 10%(현미:국산)
식품의 유형	드레싱
원재료명 및 함량	정제수, 양조간장[탈지대두(인도산), 소맥(밀, 미국산), 천일염, 액상과당, 주정], 양조식초[정제수, 주정, 맥아(국산), 포도당], 말티톨시럽, 현미발효물[현미(국산), 정제수], 함수결정포도당, 카놀라유, 백설탕, 미향, 엑스트라버진올리브유, 로스티드갈릭분말, 건조마늘플레이크, 볶음검정깨, 레몬농축액, 연두순, 정제소금, 야채즙, 백포도주, 잔탄검, 타마린드검, 참기름, 향미증진제  ※ 이 제품은 난류, 우유, 메밀, 땅콩, 고등어, 게, 새우, 돼지고기, 복숭아, 토마토를 사용한 제품과 같은 제조시설에서 제조하고 있습니다.
유통기한	상단표시일까지
포장재질	용기-유리, 뚜껑(내면)-폴리에틸렌
제조원	(주)동원홈푸드 / 충남아산시 영인면 신봉길 288
유통전문판매원	샘표식품주식회사 / 서울시 중구 충무로 2
반품 및 교환처	판매원 및 구입처
고객지원실	080-996-7777(요금은 샘표가 부담합니다.)
사용 및 보관시 주의사항	직사광선을 피하여 실온 보관하십시오. 개봉 후 냉장 보관하시고 가급적 바로 드십시오. 반드시 흔들어 드십시오. 유리병이 파손될 수 있으니 취급시 주의하십시오.
소비자 기본법	본 제품은 소비자 기본법의 일반적 소비자 분쟁해결기준에 의거, 교환 등 보상을 받을 수 있습니다.
분리 배출	부정 불량식품 신고는 국번없이 1399 유리, 뚜껑:PP/라벨:PP
과제 사사 문구	본 제품은 농림축산식품부 고부가가치식품기술개발사업에 의해 개발되어진 것입니다.

② 라벨 디자인



Fig. 21. 현미 발효 오리엔탈 드레싱 라벨 디자인 및 상품

(자) 표준 배합비율, 표준제조법 및 규격 확립

**Table 48. 현미발효물을 적용한 오리엔탈 드레싱 제품의 표준 배합비율**

배합 순서	원재료명	배합비율(%)
A	정제수	4.46
	백설탕	6.00
	정제소금	0.30
	건조마늘플레이크	0.50
	볶음검정깨	0.50
	잔탄검	0.15
	타마린드검	0.12
	향미증진제	0.07
	함수결정포도당	10.00
	로스티드갈릭분말	1.00
B	레몬농축액	0.70
	미향	3.00
	현미발효물	10.00
	말티톨시럽	11.40
	양조식초	20.00
	야채즙	0.30
	양조간장501	21.00
	연두순	0.40
	화이트와인	0.10
C	카놀라유	7.30
	참기름	0.70
	엑스트라버진올리브유	2.00
	합계	100.00

정제수, 분말 원료 및 액상 원료를 함께 투입하여 85℃까지 가열하는 것으로 공정 조건을 적용하였다. 본생산 제품에 대한 관능검사 결과, 대량 본생산에도 풍미 열화가 최소화되었으며 미생물 안전성이 확인되었으므로 표준 제조법으로 설정하였다.



Fig. 22. 현미발효물을 적용한 오리엔탈 드레싱 제품의 표준 제조법

본생산 제품의 분석 결과를 바탕으로 pH, Brix, 염도 등 이화학적 규격 설정, 타르색소, 대장균군, 보존료, 바실러스 세레우스, 이물질 등 식품공전 규격에 의거한 규격 설정, 유통기한 설정 기준에 따른 유통기한 설정 등을 포함한 표준 제조 규격을 설정하였다.

Table 49. 현미발효물을 적용한 오리엔탈 드레싱 제품의 표준 제조 규격

항 목	규격	검사주기	비고
성상	고유의 색택과 향미를 가지고 이미, 이취가 없으며 오일이 분리된 상태여야 한다.	매입고시	한도건본 보관 및 비교
pH	3.6 ± 0.2	매입고시	자가규격/pHmeter
Brix	43 ± 1.0	매입고시	자가규격/reprectometer
염도(%)	3.7 ± 0.2	매입고시	자가규격/식품공전 시험법
타르색소	불검출	년 1회	식품공전 시험법
대장균군	음성	분기 1회	식품공전 시험법
보존료	불검출	분기 1회	식품공전 시험법
바실러스 세레우스 (cfu/g)	10 <sup>4</sup> 이하	분기 1회	식품공전 시험법
이물질	불검출	매입고시	식품공전 규격
내용량	270g이상(3개의 평균값)	매입고시	
유통기간	제조일로부터 상온 10 개월	매입고시	35°C 항온보관 10주 테스트 실시

## (차) 품질 평가 방법 및 검사 방법 확립

### ① 기본 규격 항목

- 내용량 : 빈 용기에 제품 내용물을 부어 저울로 무게를 측정한다. 3개를 측정하여 평균값이 표시량(270g) 이상이어야 적합 판정한다.
- 라벨 부착상태 : 육안으로 확인하여 라벨이 빠지지 않고 반듯하게 부착되어 있으며 병과 라벨 사이에 기포가 들어있지 않아야 한다.
- 이물질 : 육안으로 확인하여 비닐, 돌, 종이 등의 이물질이 있는지 확인한다.

### ② 관능 규격

#### ※ 관능검사 방법

1. 제품을 1분간 잘 흔들어 오일부와 수상부가 충분히 혼합되도록 한다.
2. 용기(접시)에 1회 제공량인 약 30g을 담는다. 색상 평가를 위해 흰 용기를 사용한다.
3. 시료를 먹기 전 입안을 물로 헹군다.
4. 한도건본 샘플과 비교 해가며 티스푼으로 관능검사를 실시한다.

#### ○ 색상

흰 접시에 담아 색상을 평가한다. 오리엔탈 드레싱은 특성상 주원료인 양조간장이 색상에 미치는 영향이 크며 오래된 간장을 사용하면 색상이 짙어지는 경향이 있다. 이를 감안하여 평가한다. 일반적으로 신선한 양조간장을 사용하였을 때 제품은 짙은 갈색이 된다. 한도건본과의 차이 정도를 판단하여 차이가 거의 없는 경우 5점, 매우 차이가 있을 경우 1점으로 하여 3점 이상 적합으로 평가한다.



<그림 > 현미발효물을 적용한 오리엔탈 드레싱 제품의 한도건본 색상

**Fig. 23. 현미발효물을 적용한 오리엔탈 드레싱 제품의 한도건본 색상**

#### ○ 이미와 이취

한도건본 대비 이미와 이취의 정도를 5점 척도로 평가한다. 이미와 이취가 전혀 없는 경우 5점, 이미와 이취가 매우 심한 경우 1점으로 한다. 오일의 산패취 등 오리엔탈 드레싱 고유의 맛과 향이 아닌 것은 모두 이미와 이취로 평가한다. 한도건본과 유사한 수준일 경우 3점으로 하며, 3점 이상인 경우 적합으로 평가하고 2점 미만인 경우 부적합으로 평가한다.

○ 풍미

한도건본 대비 드레싱 고유의 풍미를 5점 척도로 평가한다. 한도건본 대비 고유의 신선한 풍미가 매우 유사한 경우 5점, 신선한 풍미가 양호한 경우 4점, 신선한 풍미가 다소 약해진 경우 3점, 신선한 풍미가 약해진 경우 2점, 고유의 풍미가 사라진 경우 1점으로 평가하여 2점 이상 적합, 2점 미만 부적합으로 평가한다.

③ 일반 규격 검사 방법

- 당도(Brix) : 당도계(ATAGO SMART, Japan)를 이용하여 측정한다.
- 염도 : 산/염도 측정계(877 Titrino Plus, Metrohm)의 염도용 전극을 사용하여 측정한다.
- pH : 산/염도 측정계(877 Titrino Plus, Metrohm)의 산도용 전극을 사용하여 측정한다.

④ 특별 검사 식품 공전 규격

- 보존료 : 파라옥시안식향산으로써 0.2g/kg 이하
- 대장균군 : 음성
- 바실러스 세레우스 :  $10^4$  이하
- 타르색소 : 불검출

(카) 유통기간 및 유통 조건 설정

현미발효물을 적용한 오리엔탈 드레싱 본생산 제품을 35℃ 가혹 조건에서 항온 보관하여 10주간의 Brix, 염도, pH, 흡광도(갈변도) 측정 결과 초기 값 대비 유사 수준으로 나타났으며 미생물 분석 결과 식품 공전 규격 내 적합하여 유통기간을 상온 10개월로 설정하였다.

**Table 50. 현미발효물을 적용한 오리엔탈 드레싱 2차 개발 제품 35℃ 항온 보관에 따른 품질 지표 변화**

	0주	1주	2주	3주	4주	5주	6주	7주	8주	9주	10주
Brix	43.2	43.1	43.3	43.5	43.5	43.4	43.5	43.5	43.4	43.6	43.4
염도	3.65	3.67	3.70	3.65	3.68	3.70	3.71	3.70	3.72	3.69	3.72
pH	3.60	3.60	3.62	3.65	3.64	3.69	3.70	3.66	3.68	3.68	3.65
흡광도 (갈변도)	3.036	3.042	3.042	3.066	3.107	3.124	3.176	3.185	3.197	3.225	3.259
미생물	적합	적합	적합	적합	적합	적합	적합	적합	적합	적합	적합
풍미	적합	적합	적합	적합	적합	적합	적합	적합	적합	적합	적합

\* Brix(당도계, ATAGO SMART, Japan), 염도/pH(METROHM 877 TITRINO PLUS, Swiss)는 3 회 반복 측정 후 평균값 산출하였음.

\* 흡광도(갈변도)는 시료를 체에 걸러 고형물질을 제거한 후 UV-VIS Spectrophotometers(UVmini-1240, Shimadzu, Japan)를 이용하여 420nm에서 3회 반복 측정 후 평균값을 산출하였음.

\* 식품공전 식품일반 식중독균 기준 바실러스세레우스 g 당  $10^4$  이하, 드레싱 규격 대장균군 음성.

\* 풍미 관능검사 기준 5점 척도 이미/이취 여부 3점 이상(이미/이취 없을시 5점), 기호도 3점 이상(연구원 대상 평가, n=5 이상)

### 3. 현미발효물을 적용한 머스터드 드레싱 제품 개발

#### 가. 실험재료 및 방법

##### (1) 실험재료

현미발효물을 적용한 머스터드 드레싱 제품 개발 실험에 사용된 원재료로 샘표식품(주)에서 제조한 현미발효물, 조제겨자(Morehouse Food), 양조식초(샘표식품(주)), 말티톨시럽(큐원), 벌꿀(세일양봉원), 카놀라유(웰가), 정제소금(한주소금), 백설탕(큐원), 건조마늘플레이크(은진물산), 겨자원두(동원홈푸드), 엑스트라버진올리브유(동원홈푸드), 잔탄검(동원홈푸드), 천연향신료(향원스파이스), 물(정제수)을 사용하였다.

##### (2) 실험방법 및 제조

현미발효물을 적용한 머스터드 드레싱 제품의 제조공정은 분말 원료(정제소금, 건조마늘플레이크, 겨자원두, 잔탄검, 천연향신료, 백설탕)와 액상 원료(조제겨자, 현미발효물, 말티톨시럽, 벌꿀)를 정제수와 혼합하여 85℃까지 살균 후 양조식초를 첨가하여 80℃에서 살균 종료하는 것으로 설정하였다. 살균 종료 후 이화학적 분석 및 관능검사를 실시하여 규격에 적합할 경우 냉각을 진행하였다. 배합물이 30℃이하로 냉각 되면, 수상부 배합물과 유상부 원료(엑스트라버진올리브유, 카놀라유)를 각각 정량대로 병에 충전한 후 라벨 포장하였다.

##### (3) 규격 검사 방법

###### (가) 이화학적 분석

pH와 산도는 산/염도 측정계(877 Titrino Plus, Metrohm)의 산도용 전극을 사용하여 3회 반복 측정 후 평균값을 표시하였다.

염도는 산/염도 측정계(877 Titrino Plus, Metrohm)의 염도용 전극을 사용하여 3회 반복 측정 후 평균값을 %단위로 표시하였다.

흡광도(갈변도)는 시료를 체에 걸러 고형물질을 제거한 후 흡광도를 측정하였다. 흡광도 측정은 UV-VIS Spectrophotometers(UVmini-1240, Shimadzu, Japan)를 이용하여 420nm에서 3회 반복 측정하여 평균값을 구하였다.(이근보, 양종범, 고명수 외(2006) 유한문화사, p.325)

당도는 당도계(ATAGO SMART-1, Japan)를 이용하여 3회 반복 측정 후 Brix 값으로 표시하였다.

###### (나) 관능검사 방법

관능검사는 동반식품인 양상추를 함께 제공하여 진행하였고, 이때 사용된 양상추는 1회 찬물에 씻어서 물기를 빼고 먹기 좋은 크기로 잘라 드레싱 30g과 양상추를 제공하여 찍어 먹도록 하였다. 비교제품으로는 시중 머스터드 드레싱 중 M/S 1위인 C사 제품과 비교하여 시식하였다. 관능항목으로는 맛, 외관, 전반적 기호도에 대하여 5점 척도법(1=매우 나쁘다, 5=매우 좋다)으로 평가하였으며, 맛의 적당도를 평가하기 위하여 단맛, 신맛 적당도를 평가하였다. 관능평가의 요원은 샘표식품의 전문패널 9명을 대상으로 진행하였다(샘표전문패널 : 6개월 이상 꾸준히 각 항목별 맛 특성에 대하여 인지된 패널).

나. 결과 및 고찰

머스터드 본래의 맛과 현미발효물의 깊은 단맛으로 풍미를 증진시켜 유통기간 상은 10개월이 확보된 제품을 목표로 하여 개발을 진행하였다.

(1) 배합비율 설정

시중에서 판매되는 머스터드 소스와 드레싱 제품의 이화학적 분석하였다. 시중에서 판매되는 허니머스터드 소스 3종과 머스터드 드레싱 1종에 대한 이화학적 수치를 분석한 결과, 염도는 1.86~3.39% 사이로 분포하였고, Brix는 35.6~46.8 수준이었다. pH는 2.79~3.09 로 유사한 수치를 보였으며, 산도는 0.90~1.38% 수준이었다.

Table 51. 시중 판매중인 머스터드 소스와 드레싱 제품의 이화학적 분석 결과

브랜드명	제품명	형태	Brix	pH	염도(%)	산도(%)
CJ 제일제당	백설 허니 머스터드 소스	점성있는 액체	46.8	3.09	3.39	1.30
CJ 제일제당	VIPS 허니 머스터드 드레싱	점성있는 액체	35.6	3.03	2.87	1.38
대상	허니 머스터드 소스	점성있는 액체	44.5	3.07	2.00	0.93
오뚜기	허니 머스터드	점성있는 액체	35.7	2.79	1.86	0.90

시중에 판매되는 제품의 주요 원재료인 머스터드와 꿀 함량을 확인 후 시중에서 판매되는 제품과 유사한 수준인 조제겨자 함량 16%, 꿀 함량 10%로 초기 배합비율을 설정하였다. 현미발효물, 말티톨시럽 함량은 기 개발 완료된 현미발효물을 적용한 오리엔탈 드레싱과 유사한 수준인 현미발효물 10%, 말티톨시럽 10.5%로 초기 배합비율을 설정하였다.

Table 52. 시중 판매중인 머스터드 소스와 드레싱 제품의 머스터드 및 꿀 함량

브랜드명	제품명	머스터드 함량(%)	꿀 함량(%)
CJ 제일제당	백설 허니 머스터드 소스	44.4	14.0
CJ 제일제당	VIPS 허니 머스터드 드레싱	15.4	9.5
대상	허니 머스터드 소스	16.5	1.5
오뚜기	허니 머스터드	15.5	8.0

Table 53. 현미발효물을 적용한 머스터드 드레싱 초기 배합비율

	원재료명	배합비율(%)
A	정제수	21.43
	잔탄검	0.07
	건조마늘플레이크	1.00
	겨자원두	1.00
B	조제겨자	16.00
	현미발효물	10.00
	말티톨시럽	10.50
	벌꿀	10.00
C	양조식초	20.00

D	카놀라유	9.00
	엑스트라버진올리브유	1.00
	합계	100.00

초기 배합비율을 적용하여 머스터드 드레싱 샘플을 제조한 후 연구원 11명을 대상으로 관능 검사를 실시한 결과, 신맛이 강하고 맛이 단조롭게 느껴져 신맛을 내는 원료인 양조식초의 함량을 하향 조정 하였으며 복합미를 부여하기 위해 천연향신료(바질, 타임, 오레가노, 후추 분말)를 첨가하여 풍미를 개선하였다.

**Table 54. 현미발효물을 적용한 머스터드 드레싱과 시판 제품 기호도 비교 결과**

시료	현미발효물을 적용한 머스터드 드레싱	C사 머스터드 드레싱
기호도	3.1점	3.3점
시식의견	- 풍미 밸런스가 맞지 않음 - 신맛이 강하게 느껴짐 - 맛이 단조로움	- 기름 맛이 강해 느끼함 - 단맛이 강하게 느껴짐

**Table 55. 현미발효물을 적용한 머스터드 드레싱 개선 배합비율**

	원재료명	배합비율(%)
A	정제수	25.38
	정제소금	2.00
	백설탕	2.00
	천연향신료	0.05
	잔탄검	0.07
	건조마늘플레이크	1.00
	겨자원두(건조물기준)	1.00
B	조제겨자	16.00
	현미발효물	10.00
	말티톨시럽	10.50
	벌꿀	10.00
C	양조식초	12.00
D	카놀라유	9.00
	엑스트라버진올리브유	1.00
	합계	100.00

(2) 제조 공정 설정

조제겨자는 W/O 유화형 원료로 정제수에 잘 용해되지 않는 원료이다. 일반적으로 조제겨자를 원료로 사용하는 머스터드 소스와 드레싱 제품의 경우 조제겨자를 액상과당 등 점성이 있는 원료와 미리 혼합하여 용해시킨다. 현미발효물을 적용한 머스터드 드레싱 제품은 액상과당을 사용하지 않기 때문에 벌꿀, 말티톨시럽 등의 점성이 있는 원료에 조제겨자를 혼합하여 잘 용해되었음을 육안으로 확인하였다.



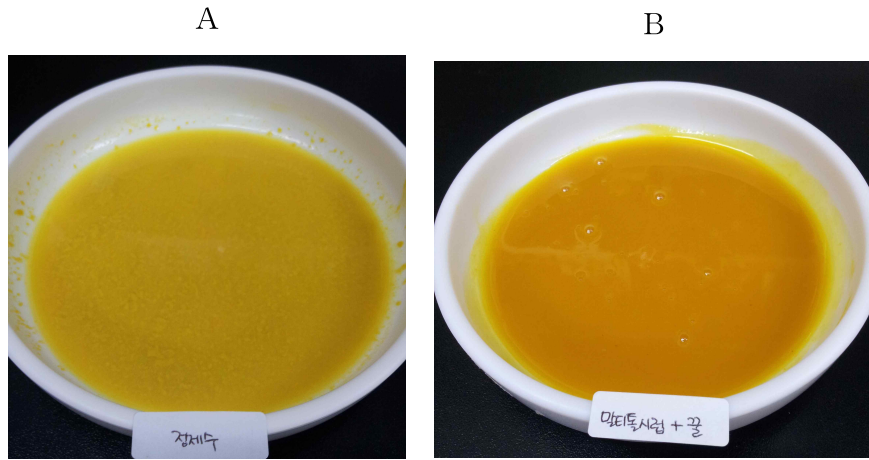


Fig. 24. 머스타드드레싱 제조시 현미발효물의 용해성 확인 (A. 조제겨자를 정제수에 혼합시 용해도 낮음, B. 조제겨자를 말티톨시럽과 벌꿀에 혼합시 용해도 향상)

드레싱의 점도 부여를 위해 사용되는 잔탄검은 용해도 향상을 위해 다른 분말 원료(정제소금, 천연향신료, 건조마늘플레이크, 백설탕, 겨자원두)와 혼합하며, 조제겨자는 용해도 향상을 위해 벌꿀, 말티톨시럽과 혼합한다. 살균조건은 분말 원료와 액상 원료를 정제수와 혼합하여 85℃ 까지 살균 후 양조식초를 첨가하여 80℃에서 살균 종료하는 것으로 설정하였다. 살균 종료 후 이화학적 분석 및 관능검사를 실시하여 규격에 적합할 경우 냉각을 진행한다. 배합물이 30℃ 이하로 냉각 되면, 수상부 배합물과 유상부 원료(엑스트라버진올리브유, 카놀라유)를 각각 정량대로 병에 충전한 후 라벨 포장한다.



Fig. 25. 현미발효물을 적용한 머스타드 드레싱의 제조 공정

(3) 현미발효물을 적용한 머스타드 드레싱의 관능검사 결과

현미발효물을 적용한 머스타드 드레싱의 배합비율을 적용하여 샘플을 제조한 후 시중에서

판매중인 경쟁사 제품과 관능검사를 실시하였다. 경쟁사 제품은 시중 판매중인 제품 중 디핑용 소스가 아닌 드레싱 제품으로 M/S 1위인 C사 머스터드 드레싱을 선정하여 비교 조사를 실시하였다. 시료는 30g 용기에 담아 양상추와 함께 제공하였고 전반적 만족도와 외관, 맛 기호도를 5점 만점으로 평가하였다. 조사 결과, 전반적 만족도 3.8점(Top 2, 70%), 맛 기호도 3.7점으로 경쟁사 제품 대비 유의적으로 좋게 평가되었다.

**Table 56. 현미발효물을 적용한 머스터드 드레싱 관능검사 결과**

구분	전반적 만족도	응답비율(%)					기호도	
		불만족	불만족 한편	보통	만족한편	매우만족	외관	맛
현미발효물 적용 머스터드 드레싱	3.8	0	5	25	55	15	3.2	3.7
C사 머스터드 드레싱	2.7	5	40	40	10	5	3.2	2.7
유의차	0.000						0.755	0.002

\* 출처 : 샘플 연구원/전문패널 대상(n=20, 2013.12.10)

(4) 현미발효물을 적용한 머스터드 드레싱의 상품화 검토

① 제품 표시사항

**Table 57. 현미발효물을 적용한 머스터드 드레싱 표시사항**

항 목	표시 내용
제품명	현미 발효 머스터드 드레싱
내용량	270g
무침가	액상과당, 합성착색료, 합성착향료
주원료 함량 표시	조제겨자 16%, 현미발효물 10%(현미 : 국산)
식품의유형	드레싱
원재료명 및 함량	정제수, 조제겨자 16%[미국산, 식초, 겨자씨 14.5%, 정제소금, 강황, 계피], 양조식초[정제수, 주정, 맥아(국산), 포도당], 말티톨시럽, 현미발효물[현미(국산), 정제수], 벌꿀, 카놀라유, 백설탕, 정제소금, 엑스트라버진 올리브유, 건조마늘플레이크, 겨자씨 1%(캐나다산), 잔탄검, 천연향신료

	※ 이 제품은 난류, 우유, 메밀, 땅콩, 고등어, 계, 새우, 돼지고기, 복숭아, 토마토를 사용한 제품과 같은 제조시설에서 제조하고 있습니다.
유통기한	상단표시일까지
포장재질	용기-유리, 뚜껑(내면)-폴리에틸렌
제조원	(주)동원홈푸드 / 충남아산시 영인면 신봉길 288
유통전문판매원	샘표식품주식회사 / 서울시 중구 충무로 2
반품 및 교환처	판매원 및 구입처
고객지원실	080-996-7777(요금은 샘표가 부담합니다.)
사용 및 보관시 주의사항	직사광선을 피하여 실온 보관하십시오. 개봉 후 냉장 보관하시고 가급적 바로 드십시오. 반드시 흔들어 드십시오. 유리병이 파손될 수 있으니 취급시 주의하십시오.
소비자 기본법	본 제품은 소비자 기본법의 일반적 소비자 분쟁해결기준에 의거, 교환 등 보상을 받을 수 있습니다.
	부정 불량식품 신고는 국번없이 1399
분리 배출	유리, 뚜껑:PP/라벨:PP
과제 사사 문구	본 제품은 농림축산식품부 고부가가치식품기술개발사업에 의해 개발되어진 것입니다.



Fig. 26. 현미 발효 머스터드 드레싱 라벨 디자인

(5) 표준 배합비율, 표준제조법 및 규격 확립

Table 58. 현미발효물을 적용한 머스터드 드레싱 표준 배합비율

	원재료명	배합비율(%)
A	정제수	25.38
	정제소금	2.00
	백설탕	2.00
	천연향신료	0.05
	잔탄검	0.07
	건조마늘플레이크	1.00
	겨자원두(건조물기준)	1.00
B	조제겨자	16.00
	현미발효물	10.00
	말티톨시럽	10.50
	벌꿀	10.00
C	양조식초	12.00
D	카놀라유	9.00
	엑스트라버진올리브유	1.00
	합계	100.00



Fig. 27. 현미발효물을 적용한 머스터드 드레싱의 표준 제조법

pH, Brix, 염도 등 이화학적 규격 설정, 타르색소, 대장균군, 보존료, 바실러스 세레우스, 이물질 등 식품공전 규격에 의거한 규격 설정, 유통기한 설정 기준에 따른 유통기한 설정 등을 포함한 표준 제조 규격을 설정하였다.

**Table 59. 현미발효물을 적용한 머스터드 드레싱 일반 규격**

항 목	규격	검사주기	비고
성상	고유의 색택과 향미를 가지고 이미, 이취가 없으며 오일이 분리된 상태여야 한다.	매입고시	한도건본 보관 및 비교
pH	3.3 ± 0.2	매입고시	자가규격/pHmeter
Brix	34 ± 1.0	매입고시	자가규격/repectometer
염도(%)	2.8 ± 0.2	매입고시	자가규격 /식품공전 시험법
타르색소	불검출	년 1회	식품공전 시험법
대장균군	음성	분기 1회	식품공전 시험법
보존료	불검출	분기 1회	식품공전 시험법
바실러스 세레우스 (cfu/g)	10 <sup>4</sup> 이하	분기 1회	식품공전 시험법
이물질	불검출	매입고시	식품공전 규격
내용량	270g 이상(3개의 평균값)	매입고시	
유통기간	제조일로부터 10개월	매입고시	35℃ 항온보관 10주 테스트 실시

(6) 품질평가방법 및 검사 방법 확립

① 기본 규격 항목

- 내용량 : 빈 용기에 제품 내용물을 부어 저울로 무게를 측정한다. 3개를 측정하여 평균값이 표시량(270g) 이상이어야 적합 판정한다.
- 라벨 부착상태 : 육안으로 확인하여 라벨이 빠지지 않고 반듯하게 부착되어 있으며 병과 라벨 사이에 기포가 들어있지 않아야 한다.
- 이물질 : 육안으로 확인하여 비닐, 돌, 종이 등의 이물질이 있는지 확인한다.

② 관능 규격

※ 관능검사 방법

1. 제품을 1분간 잘 흔들어 오일부와 수상부가 충분히 혼합되도록 한다.
2. 용기(접시)에 1회 제공량인 약 30g을 담는다. 색상 평가를 위해 흰 용기를 사용한다.
3. 시료를 먹기 전 입안을 물로 헹군다.
4. 한도건본 샘플과 비교 해가며 티스푼으로 관능검사를 실시한다.

○ 색상

흰 접시에 담아 색상을 평가한다. 머스터드 드레싱 특유의 짙은 노란색을 한도건본과 비교하여 평가한다. 한도건본과의 차이 정도를 판단하여 차이가 거의 없는 경우 5점, 매우 차이가 있을 경우 1점으로 하여 3점 이상 적합으로 평가한다.



Fig. 28. 현미발효물을 적용한 머스터드 드레싱의 한도건본 색상

○ 이미와 이취

한도건본 대비 이미와 이취의 정도를 5점 척도로 평가한다. 이미와 이취가 전혀 없는 경우 5점, 이미와 이취가 매우 심한 경우 1점으로 한다. 오일의 산패취 등 머스터드 드레싱 고유의 맛과 향이 아닌 것은 모두 이미와 이취로 평가한다. 한도건본과 유사한 수준일 경우 3점으로 하며, 3점 이상인 경우 적합으로 평가하고 2점 미만인 경우 부적합으로 평가한다.

○ 풍미

한도건본 대비 머스터드 드레싱 고유의 풍미를 5점 척도로 평가한다. 한도건본 대비 고유의 신선한 풍미가 매우 유사한 경우 5점, 신선한 풍미가 양호한 경우 4점, 신선한 풍미가 다소 약해진 경우 3점, 신선한 풍미가 약해진 경우 2점, 고유의 풍미가 사라진 경우 1점으로 평가하여 3점 이상인 경우 적합으로 평가하고 2점 미만인 경우 부적합으로 평가한다.

③ 일반 규격 검사 방법

- 당도(Brix) : 당도계(ATAGO SMART, Japan)를 이용하여 측정한다.
- 염도 : 산/염도 측정계(877 Titrino Plus, Metrohm)의 염도용 전극을 사용하여 측정한다.
- pH : 산/염도 측정계(877 Titrino Plus, Metrohm)의 산도용 전극을 사용하여 측정한다.

④ 특별 검사 식품 공전 규격

- 보존료 : 파라옥시안식향산으로써 0.2g/kg 이하
- 대장균군 : 음성
- 바실러스 세레우스 :  $10^4$  이하
- 타르색소 : 불검출

(7) 유통기간 및 유통 조건 설정

현미발효물을 적용한 머스터드 드레싱 개발 제품을 35℃ 가혹 조건에서 항온 보관하여 10주간의 Brix, 염도, pH, 흡광도(갈변도) 측정 결과, 초기 값 대비 유사 수준으로 나타났으며, 미생물 분석 결과, 식품 공전 규격 내 적합하여 유통기간을 상온 10개월로 설정하였다.

Fig. 29. 현미발효물을 적용한 머스터드 드레싱의 35℃ 항온 보관에 따른 품질 지표 변화

	0주	1주	2주	3주	4주	5주	6주	7주	8주	9주	10주
Brix	34.5	34.7	34.6	34.6	34.7	34.7	34.6	34.6	34.6	34.7	34.7
염도(%)	2.78	2.75	2.78	2.81	2.75	2.80	2.79	2.76	2.78	2.79	2.80
pH	3.25	3.25	3.25	3.24	3.26	3.26	3.26	3.25	3.25	3.25	3.26
흡광도 (갈변도)	2.643	2.704	2.754	2.775	2.801	2.843	2.872	2.859	2.896	3.010	3.122
미생물	적합	적합	적합	적합	적합	적합	적합	적합	적합	적합	적합
풍미	적합	적합	적합	적합	적합	적합	적합	적합	적합	적합	적합

\* Brix(당도계, ATAGO SMART, Japan), 염도/pH(METROHM 877 TITRINO PLUS, Swiss)는 3회 반복 측정 후 평균값 산출함.

\* 흡광도(갈변도)는 시료를 체에 걸러 고형물질을 제거한 후 UV-VIS

Spectrophotometers(UVmini-1240, Shimadzu, Japan)를 이용하여 420nm에서 3회 반복 측정 후 평균값을 산출하였음.

\* 식품공전 식품일반 식중독균 기준 바실러스세레우스 g 당  $10^4$  이하, 드레싱 기준 대장균군 음성.

\* 풍미 관능검사 기준 5점 척도 이미/이취 여부 3점 이상(이미/이취 없을시 5점), 기호도 3점 이상(연구원 대상 평가, n=5 이상)

#### 4. 현미발효물을 적용한 바비큐 소스 제품 개발

##### 가. 실험재료 및 방법

###### (1) 실험재료

현미발효물을 적용한 바비큐 소스 제품 개발 실험에 사용된 원재료로 샘표식품(주)에서 제조한 현미발효물, 토마토 페이스트(미국산), 사과식초(샘표식품(주)), 당밀(동원홈푸드), 양조간장501(샘표식품(주)), 파인애플(Dole), 정제소금(한주소금), 변성전분(대상), 스모키파우더(동원홈푸드), 카라멜색소(동원홈푸드), 잔탄검(동원홈푸드), 허브믹스(동원홈푸드), 흑설탕(큐원), 백설탕(큐원), 물(정제수) 을 사용하였다.

###### (2) 실험방법 및 제조

현미발효물을 적용한 바비큐 소스 제조시 분말 원료(정제소금, 스모키파우더, 잔탄검, 허브믹스, 흑설탕, 백설탕)와 액상 원료(토마토 페이스트, 현미발효물, 당밀, 사과식초, 양조간장501, 파인애플, 카라멜색소)를 정제수와 혼합하여 교반하면서 85℃까지 가열한 후 전분과 정제수를 섞어 투입하여 85℃까지 가열하여 살균 종료한다. 가열 살균 종료 후 주정을 투입하여 2분간 교반하여 추가 살균한다. 살균 종료 후 이화학적 분석 및 관능검사를 실시하여 규격에 적합할 경우 70℃ 이상 조건에서 병에 충전한 후 30℃까지 냉각하여 라벨 포장하였다.

###### (3) 규격 검사 방법

###### (가) 이화학적 분석

pH와 산도는 산, 염도 측정계(877 Titrino Plus, Metrohm)의 산도용 전극을 사용하여 3회 반복 측정 후 평균값을 표시하였다.

염도는 산, 염도 측정계(877 Titrino Plus, Metrohm)의 염도용 전극을 사용하여 3회 반복 측정 후 평균값을 %단위로 표시하였다.

흡광도(갈변도)는 시료를 체에 걸러 고형물질을 제거한 후 흡광도를 측정하였다. 흡광도 측정은 UV-VIS Spectrophotometers(UVmini-1240, Shimadzu, Japan)를 이용하여 420nm에서 3회 반복 측정하여 평균값을 구하였다.(이근보, 양종범, 고명수 외(2006) 유한문화사, p. 325)

당도는 당도계(ATAGO SMART-1, Japan)를 이용하여 3회 반복 측정 후 Brix 값으로 표시하였다.

###### (나) 관능검사 방법

관능검사 시료는 현미발효물을 적용한 바비큐 소스를 돼지 등갈비와 함께 조리하여 제공되었고, 조리 방법은 2시간 동안 찬물에 담가 핏물을 뺀 등갈비를 월계수 잎, 대파, 마늘과 함께 40분간 삶아 현미발효물을 적용한 바비큐 소스에 20분간 재운 후 후라이팬에 구워 제공하였다. 소스의 양은 삶기 전 생고기 무게의 25%를 적용하였다. 비교 제품으로는 시중 바비큐 소스 제품 중 M/S 1위 제품인 D사 제품(수입 제품)과 비교하여 시식하였다. 관능항목으로는 맛, 외관, 전반적 기호도에 대하여 5점 척도법(1=매우 나쁘다, 5=매우 좋다)으로 평가하였으며, 맛의 적당도를 평가하기 위하여 단맛, 신맛, 향의 적당도를 평가하였다. 관능검사는 샘표식품의 전문패



널 9명을 대상으로 진행하였다(샘표전문패널 : 6개월 이상 꾸준히 각 항목별 맛특성에 대하여 인지된 패널).

#### 나. 결과 및 고찰

한식 불고기 등 고기요리 조리시 양념에 채워 조리하는 것처럼 서양 요리에서도 고기를 엑스트라버진올리브유, 허브, 소금, 후추 등으로 제조된 소스에 채워서 조리하는데 이것을 마리네이드라고 하며 여기에 사용되는 소스를 마리네이드 소스라고 한다. 현미발효물 적용 바비큐 소스 개발에 앞서, 적용 가능 제품군에 대하여 검토하였다. 쇠고기 스테이크, 돼지고기 폭립, 닭 요리, 오리요리 등 재료에 따라 다양한 마리네이드 소스 레시피가 있다. 4명의 셰프에게 자문을 구해 폭립 바비큐 소스를 개발하기로 하였으며, 목표는 시중에 판매되는 M/S 1위 제품 대비 동등 이상의 기호도와 상온 유통 10개월 보존성 확보를 목표로 하였다.

##### (1) 셰프 인터뷰 진행

서양식 정통 바비큐 소스의 기본이 되는 주요 원재료 및 원재료의 특성에 대해 이해하기 위해 4차례 서양식 전문 셰프와 인터뷰를 진행하였다.

2013.11.22 이찬오 셰프(로테펠트 티하우스 수석 셰프)

2013.11.28 김성모 셰프(벨라메종 수석 셰프)

2013.12.12 임석 셰프(SPC컬리너리 아카데미 르노 뜨르 요리과정 교수)

2014.03.05 김경태 셰프(샘표식품(주) 장프로젝트팀)

##### ○ 폭립 바비큐 소스의 기원

폭립 바비큐 소스의 발생지는 남미, 텍사스 지역으로 알려져 있다. 원주민인 인디언들은 고기를 장기 보관하기 위해 고기를 훈연하여 보관하였다. 여기에 이주민들이 즐겨 먹던 당밀, 럽주, 토마토케첩 등의 소스 재료들이 인디언들의 훈연 기술과 더해져 만들어진 것이 지금의 폭립 바비큐 소스의 기원이다.

##### ○ 당밀(Molasses)

당밀은 설탕을 제조하기 위해 사탕수수를 짤 때 처음 나오는 진한 액체를 뜻한다. 바비큐 소스의 중요한 맛 중 하나는 단맛인데 당밀의 단맛은 설탕처럼 단순한 단맛이 아니라 정제되지 않은 풍부한 단맛을 내기 때문에 전통적으로 바비큐 소스의 중요한 원료로 사용되었다. 특히 당이 열에 노출되어 카라멜화 되면 훈연 향과 비슷한 카라멜 향미를 갖게 되어 풍미가 향상된다.

##### ○ 훈연 향미(Smoky flavor)

고기를 구울 때 참나무(Oak) 숯을 태워 그 향이 고기와 소스에 배이도록 한다. 레스토랑에서는 고기를 오븐에 구울 때 스모킹 칩을 넣고 태우는 방법으로 그 향이 고기와 소스에 배이도록 한다. 가격이 비싼 참나무 대신 사과나무, 히코리나무 등도 향이 좋아 많이 사용 된다.

##### ○ 그 외 맛내기 원료

신맛을 내는 식초 역시 중요한 원료이다. 정통 폭립 바비큐에는 주로 사과식초(Apple cider

vinegar)를 사용한다. 또한 갈릭파우더, 후추(Crushed black pepper), 허브류 등이 많이 사용되는 원료이다. 현재 미국에서는 커피, 코코아, 초콜릿, 머스터드, 엔초비, 맥주, 콜라 등 제약 없이 다양한 재료들이 사용되고 있다.

○ 조리 방법

정통 폭립 바비큐 조리 방법은 오븐에 굽는 것이다. 서양식 정통 조리법은 오븐에 굽는 것과 팬프라이нг 두 가지가 기본이다. 삶는 방법은 서양식 조리에는 많이 사용되지 않는다. 하지만 레스토랑 조리시에는 육질을 부드럽게 하고 뼈에서 잘 분리되게 하기 위해 삶는 방법을 많이 사용한다. 우리나라의 경우, 대부분의 가정에 오븐이 없으므로 고기를 삶아서 소스에 재운 뒤 팬에 살짝 굽는 방법으로 간편하게 제시하는 방법을 셰프들로부터 추천 받았다.

(2) 배합비율 설정

셰프 인터뷰 결과를 바탕으로 바비큐 소스의 풍미 특성에 맞게 주요 원재료 선정 및 초기 배합비율을 설정하였다. 인공적인 조미가 강한 토마토케첩 대신 토마토 페이스트(토마토 100%)를 사용하여 신선한 토마토의 향미를 살리도록 하였다. 정통 바비큐 소스의 신맛을 구현하기 위해 셰프 인터뷰에서 언급된 사과식초를 사용하였다. 당밀과 현미발효물의 복합적인 단맛이 유사하여 당밀과 현미발효물을 함께 사용하였으며 가열 조리시 현미발효물과 당밀에 함유된 당이 카라멜화되어 훈연향과 유사한 향을 내도록 하였다. 또한 분말화된 히코리 향을 사용하여 고기를 훈연한 듯한 향미를 부여하였다.

고기에 발라서 굽는 바비큐 소스 제품 특성상 조리시 소스가 흘러내리지 않고 육 표면에 묻어있도록 바비큐 소스는 점도와 결착력을 동시에 가져야 한다. 검류 사용으로 점도는 증가시킬 수 있지만 결착력 유지에는 한계가 있어서 전분을 넣고 호화시켜 결착력을 향상시켰다.

**Table 60. 현미발효물을 적용한 바비큐 소스 초기 배합비율**

제조공정	원재료명	배합비율(%)
A	정제수	36.51
	정제소금	2.80
	스모키파우더	0.80
	잔탄검	0.14
	흑설탕	10.00
B	토마토페이스트	20.00
	현미발효물	10.00
	당밀	8.00
	사과식초	10.00
C	아세틸아디핀산전분	1.75
	합계	100.00

현미발효물을 적용한 바비큐 소스 초기 배합비율을 적용하여 제조한 샘플로 관능검사를 실시하였다. 관능검사 결과, 맛 기호도 3.0점으로 단맛에 비해 신맛이 강하고 맛이 단조로운 것으로 나타났다. 신맛이 강해 맛이 상대적으로 다른 맛의 강도가 약해지는 경향이 있어, 사과식초 함량을 12%로 하향 조정하였으며 서구 풍의 바비큐 소스의 맛을 더 풍부하게 하기 위해 허브믹스 0.9%를 첨가하였다.

**Table 61. 현미발효물을 적용한 바비큐 소스 초기 배합비율 적용 샘플 기호도 및 맛 적당도 평가 결과**

항목	기호도		적당도		
	맛	외관	단맛	신맛	향
현미발효물을 적용한 바비큐 소스	3.0	3.4	2.5	3.5	3.1
D사 바비큐 소스	3.7	3.7	3.6	3.5	3.2

\* 출처 : 연구원/전문패널 대상(n=16, 2014.03.18)

**Table 62. 현미발효물을 적용한 바비큐 소스 개선 배합비율**

제조공정	원재료명	배합비율(%)
A	정제수	25.60
	정제소금	2.00
	스모키파우더	0.80
	허브믹스	0.90
	잔탄검	0.05
	흑설탕	8.00
	백설탕	5.00
B	토마토페이스트	20.00
	현미발효물	10.00
	당밀	6.50
	사과식초	12.00
	양조간장501	3.00
	파인애플(8mm)	4.00
	카라멜색소	0.40
C	변성전분	1.75
	합계	100.00

### (3) 제조공정 설정

현미발효물을 적용한 바비큐 소스 제품에 점도와 걸착력을 부여하기 위해 전분을 넣고 호화시키도록 하였다. 소스의 점도가 강할수록 교반이 힘들고 온도 상승이 느려지기 때문에 전분 투입 시기는 다른 분말 원료와 액상 원료의 가열이 끝난 후로 설정하였다.

분리액상 드레싱 제품의 경우 오일 함량이 10% 정도로 높기 때문에 미생물 오염에 대한 안전성이 높다. 하지만 바비큐 소스의 경우 제조시 오일이 투입되지 않기 때문에 냉각 후 충전 과정에서 2차 오염의 가능성이 있다. 그렇기 때문에 최소 70℃ 이상 고온에서 충전하여 냉각하는 것(Hot-filling)으로 공정을 설정하였다. 또한 보존료를 사용하지 않기 때문에 주정을 투입하여 미생물 안전성을 향상시켰다. 주정은 휘발성이 강하기 때문에 85℃ 살균 종료 직후 투입하여 휘발되는 양이 최소화 되도록 설정하였다.

분말 원료(정제소금, 스모키파우더, 잔탄검, 허브믹스, 흑설탕, 백설탕)와 액상 원료(토마토페이스트, 현미발효물, 당밀, 사과식초, 양조간장501, 파인애플, 카라멜색소)를 정제수와 혼합하여 교반하면서 85℃까지 가열한 후 전분과 정제수를 섞어 투입하여 85℃까지 가열하여 살균 종료한다. 가열 살균 종료 후 주정을 투입하여 2분간 교반하였다. 살균 종료 후 이화학적 분석 및 관능검사를 실시하여 규격에 적합할 경우 70℃ 이상 조건에서 병에 충전한 후 30℃까지 냉

각하여 라벨 포장하였다.



Fig. 30. 현미발효물을 적용한 바비큐 소스 제품의 제조 공정

Table 63. 현미발효물을 적용한 바비큐 소스의 배합 비율

제조공정	원재료명	배합비율(%)
A	정제수	24.10
	정제소금	2.00
	스모키파우더	0.80
	허브믹스	0.90
	잔탄검	0.05
	흑설탕	8.00
	백설탕	5.00
B	토마토페이스트	20.00
	현미발효물	10.00
	당밀	6.50
	사과식초	12.00
	양조간장501	3.00
	파인애플(8mm)	4.00
	카라멜색소	0.40
C	변성전분	1.75
D	주정	1.50
	합계	100.00

(4) 현미발효물을 적용한 바비큐 소스 관능검사 결과

현미발효물을 적용한 바비큐 소스 샘플을 제조한 후 경쟁사 제품 대비 기호도 조사를 실시하였다. 경쟁사 제품으로는 시중에 판매중인 M/S 1위 제품인 D사 히코리 바비큐 소스(수입 제품)을 선정하였다. 관능검사는 소스를 이용해 바비큐 폭립을 조리하여 제공하였으며 소스의 양은 조리 전 고기 무게의 25%로 동일하게 적용하였다.

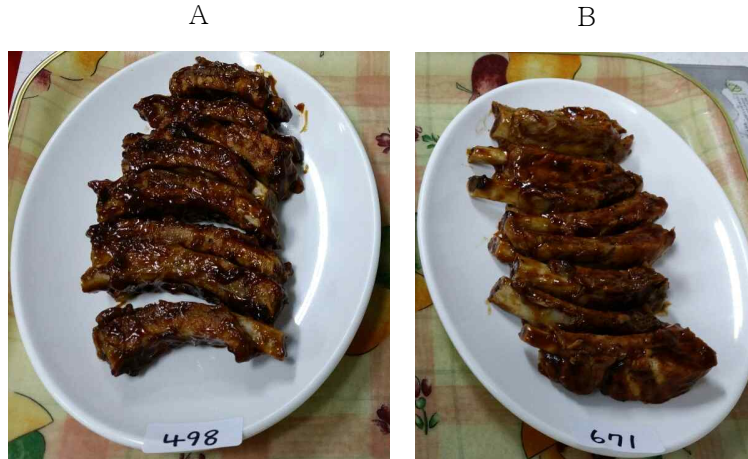


Fig. 31. 관능검사 진행 샘플 (A.H사 히코리 바비큐 소스적용, B.현미발효물을 적용한 바비큐 소스)

관능검사 결과, 전반적 만족도 3.9점(Top 2, 71%)로 경쟁사 제품 대비 유의적으로 좋게 평가되었다. 외관, 맛, 향미에 대한 기호도 수준도 동등 이상으로 평가되었다. 맛 적당도에서도 단맛, 신맛 및 향 강도가 시중에 판매중인 M/S 1위 제품 대비 적당한 것으로 평가되어 최종 배합비율로 선정하였다.

Table 64. 현미발효물을 적용한 바비큐 소스 경쟁사 제품 대비 관능검사 결과

구분	전반적 만족도	응답비율(%)					기호도		
		불만족	불만족한편	보통	만족한편	매우만족	외관	맛	향미
현미발효물 적용 바비큐 소스	3.9			29	52	19	3.9	3.9	3.7
D사 히코리 바비큐 소스	3.6		14	38	43	5	3.8	3.4	3.3
유의차	0.030						0.639	0.108	0.085

Table 65. 현미발효물을 적용한 바비큐 소스 맛 적당도 조사 결과

구분	적당도		
	단맛	신맛	향
현미발효물 적용 바비큐 소스	2.9	2.9	3.1
D사 히코리 바비큐 소스	3.4	3.7	3.1

\* 출처 : 샘플 연구원/전문패널 대상(n=21, 2014.04.08)

(5) 현미발효물을 적용한 바비큐 소스 상품화 검토

① 제품 표시사항

Table 66. 현미발효물을 적용한 바비큐 소스 표시사항

항 목	표시 내용
제품명	현미 발효 바비큐 소스
내용량	275g
무첨가 표시	액상과당, 합성착색료
주원료 함량 표시	현미발효물 10%(현미 : 국산)
식품의 유형	드레싱
원재료명 및 함량	정제수, 토마토페이스트(미국산/토마토 100%), 사과식초[농축사과즙(사과, 중국산), 정제수, 주정, 포도당], 현미발효물[현미(국산), 정제수], 흑설탕, 당밀, 백설탕, 파인애플, 양조간장(밀, 대두), 정제소금, 변성전분, 주정, 허브믹스, 잔탄검, 카라멜색소, 스모키파우더  ※ 이 제품은 난류, 우유, 메밀, 땅콩, 고등어, 게, 새우, 돼지고기, 복숭아를 사용한 제품과 같은 제조시설에서 제조하고 있습니다.
유통기한	상단표시일까지
포장재질	용기-유리, 뚜껑(내면)-폴리에틸렌
제조원	(주)동원홈푸드 / 충남아산시 영인면 신봉길 288
유통전문판매원	샘표식품주식회사 / 서울시 중구 충무로 2
반품 및 교환처	판매원 및 구입처
고객지원실	080-996-7777(요금은 샘표가 부담합니다.)
사용 및 보관시 주의사항	직사광선을 피하여 실온 보관하십시오. 개봉 후 냉장 보관하시고 가급적 바로 드십시오. 반드시 흔들어 드십시오. 유리병이 파손될 수 있으니 취급시 주의하십시오.
소비자 기본법	본 제품은 소비자 기본법의 일반적 소비자 분쟁해결기준에 의거, 교환 등 보상을 받을 수 있습니다.
분리 배출	부정 불량식품 신고는 국번없이 1399 유리, 뚜껑:PP/라벨:PP
과제 사사 문구	본 제품은 농림축산식품부 고부가가치식품기술개발사업에 의해 개발되어진 것입니다.

② 라벨 디자인



Fig. 32. 현미 발효 바비큐 소스 라벨 디자인 및 제품

(6) 표준 배합비율, 표준제조법 및 규격 확립

Table 67. 현미발효물을 적용한 바비큐 소스의 표준 배합비율

제조과정	원재료명	배합비율(%)
A	정제수	24.10
	정제소금	2.00
	스모키파우더	0.80
	허브믹스	0.90
	산탄검	0.05
	흑설탕	8.00
	백설탕	5.00
B	토마토페이스트	20.00
	현미발효물	10.00
	당밀	6.50
	사과식초	12.00
	양조간장501	3.00
	파인애플(8mm)	4.00
	카라멜색소	0.40
C	변성전분	1.75
D	주정	1.50
	합계	100.00



Fig. 33. 현미발효물을 적용한 바비큐 소스 제품의 표준제조법

**Table 68. 현미발효물을 적용한 바비큐 소스의 일반 규격**

항 목	규격	검사주기	비고
성상	고유의 색택과 향미를 가지고 이미, 이취가 없어야 한다.	매입고시	한도건본 보관 및 비교
pH	3.7 ± 0.2	매입고시	자가규격/pHmeter
Brix	35 ± 1.0	매입고시	자가규격/repectometer
염도(%)	3.2 ± 0.2	매입고시	자가규격 /식품공전 시험법
타르색소	불검출	년 1회	식품공전 시험법
대장균군	음성	분기 1회	식품공전 시험법
보존료	파라옥시안식향산으로서 0.2g/kg 이하	분기 1회	식품공전 시험법
바실러스 세레우스 (cfu/g)	10 <sup>4</sup> 이하	분기 1회	식품공전 시험법
이물질	불검출	매입고시	식품공전 규격
내용량	275g 이상(3개의 평균값)	매입고시	
유통기간	제조일로부터 10개월	매입고시	35℃ 항온보관 10주 테스트 실시

(7) 품질평가방법 및 검사 방법 확립

① 기본 규격 항목

- 내용량 : 빈 용기에 제품 내용물을 부어 저울로 무게를 측정한다. 3개를 측정하여 평균값이 표시량(275g) 이상이어야 적합 판정한다.
- 라벨 부착상태 : 육안으로 확인하여 라벨이 빠지지 않고 반듯하게 부착되어 있으며 병과 라벨 사이에 기포가 들어있지 않아야 한다.
- 이물질 : 육안으로 확인하여 비닐, 돌, 종이 등의 이물질이 있는지 확인한다.

② 관능 규격

<p>※ 관능검사 방법</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. 제품을 1분간 잘 흔들어 충분히 혼합되도록 한다.</li> <li>2. 용기(접시)에 약 30g을 담는다. 색상 평가를 위해 흰 용기를 사용한다.</li> <li>3. 시료를 먹기 전 입안을 물로 헹군다.</li> <li>4. 한도건본 샘플과 비교 해가며 티스푼으로 관능검사를 실시한다.</li> </ol>
--

○ 색상

흰 접시에 담아 색상을 평가한다. 바비큐 소스 특유의 짙은 갈색을 한도건본과 비교하여 평가한다. 한도건본과의 차이 정도를 판단하여 차이가 거의 없는 경우 5점, 매우 차이가 있을 경우 1점으로 하여 3점 이상 적합으로 평가한다.





Fig. 34. 현미발효물을 적용한 바비큐 소스의 한도건본 색상

○ 이미와 이취

한도건본 대비 이미와 이취의 정도를 5점 척도로 평가한다. 이미와 이취가 전혀 없는 경우 5점, 이미와 이취가 매우 심한 경우 1점으로 한다. 바비큐 소스 고유의 맛과 향이 아닌 것은 모두 이미와 이취로 평가한다. 한도건본과 유사한 수준일 경우 3점으로 하며, 3점 이상인 경우 적합으로 평가하고 2점 미만인 경우 부적합으로 평가한다.

○ 풍미

한도건본 대비 바비큐 고유의 풍미를 5점 척도로 평가한다. 한도건본 대비 고유의 신선한 풍미가 매우 유사한 경우 5점, 신선한 풍미가 양호한 경우 4점, 신선한 풍미가 다소 약해진 경우 3점, 신선한 풍미가 약해진 경우 2점, 고유의 풍미가 사라진 경우 1점으로 평가하여 3점 이상인 경우 적합으로 평가하고 2점 미만인 경우 부적합으로 평가한다.

③ 일반 규격 검사 방법

- 당도(Brix) : 당도계(ATAGO SMART, Japan)를 이용하여 측정한다.
- 염도 : 산/염도 측정계(877 Titrino Plus, Metrohm)의 염도용 전극을 사용하여 측정한다.
- pH : 산/염도 측정계(877 Titrino Plus, Metrohm)의 산도용 전극을 사용하여 측정한다.

④ 특별 검사 식품 공전 규격

- 보존료 : 파라옥시안식향산으로써 0.2g/kg 이하
- 대장균군 : 음성
- 바실러스 세레우스 :  $10^4$  이하
- 타르색소 : 불검출

(8) 유통기간 및 유통 조건 설정

현미발효물을 적용한 바비큐 소스 제품을 35℃ 가혹 조건에서 항온 보관하여 10주간의 Brix, 염도, pH, 흡광도(갈변도) 측정 결과, 초기 값 대비 유사 수준으로 나타났으며, 미생물 분석 결과 식품 공전 규격 내 적합하여 유통기간을 상온 10개월로 설정하였다.

**Table 69. 현미발효물을 적용한 바비큐 소스 35℃ 항온 보관에 따른 주요 품질 지표 확인**

	0주	1주	2주	3주	4주	5주	6주	7주	8주	9주	10주
Brix	43.2	43.1	43.3	43.5	43.5	43.4	43.5	43.5	43.4	43.6	43.4
염도	3.65	3.67	3.70	3.65	3.68	3.70	3.71	3.70	3.72	3.69	3.72
pH	3.60	3.60	3.62	3.65	3.64	3.69	3.70	3.66	3.68	3.68	3.65
흡광도 (갈변도)	3.036	3.042	3.042	3.066	3.107	3.124	3.176	3.185	3.197	3.225	3.259
미생물	적합	적합	적합	적합	적합	적합	적합	적합	적합	적합	적합
풍미	적합	적합	적합	적합	적합	적합	적합	적합	적합	적합	적합

\* Brix(당도계, ATAGO SMART, Japan), 염도/pH(METROHM 877 TITRINO PLUS, Swiss)는 3회 반복 측정 후 평균값 산출함.

\* 식품공전 식품일반 식중독균 기준 바실러스 세레우스 g 당  $10^4$  이하, 드레싱 기준 대장균군 음성.

\* 풍미 관능검사 기준 5점 척도 이미/이취 여부 3점 이상(이미/이취 없을시 5점), 기호도 3점 이상(연구원 대상 평가, n=5 이상)

## 5. 현미발효물 건강 기능성 컨셉적 활용 방안 검토

본 연구 과제를 통하여 현미발효물을 오리엔탈 드레싱, 머스타드 드레싱 및 바비큐 소스에 적용하여 풍미열화를 최소화하는 상온 유통 제품을 개발 완료하였다. 현미발효물의 상품화 연구 결과, 기존 소스나 드레싱에 사용되는 액상과당을 전혀 사용하지 않고 현미발효물을 사용하여 건강하면서 맛있는 단맛을 구현할 수 있음을 확인할 수 있었다. 또한, 본 과제의 협동 기관 연구에 의하면 현미발효물안에 있는 식이섬유가 장관면역과 당,지질 대사에 바람직한 영향을 미친다는 결과를 얻었다.

이러한 연구 결과를 상품화시에 컨셉적으로 어떻게 활용할 것인가에 대해서 선포식품 마케팅 팀과의 협의(2013.7.31)를 통해서 검토하였다.

현미발효물을 적용하여 상품화하려고 하는 품목은 크게 드레싱과 바비큐 소스로 나눌 수 있다. 드레싱은 건강을 생각하면서 채소를 맛있게 취식하고자 하는 소비자의 니즈가 뚜렷한 품목이라고 볼 수 있는데, 시중에 판매되고 있는 제품에는 드레싱의 단맛을 내기 위해서 건강 유해성의 논란이 되고 있는 과당(액상과당)을 사용하고 있어서 이 과당(액상과당)을 전혀 사용하지 않았다는 표현을 제품에 표기하는 것이 현미발효물을 적용한 드레싱의 건강 기능성 컨셉을 간접적으로 잘 활용하는 방법이라 판단하여 제품 라벨에 “액상과당 무첨가” 표시를하기로 결정하였다.

또한, 고기를 맛있게 취식하도록 도와주는 바비큐 소스 또한 고기를 먹으면서 함께 먹는 소스 제품에 사용된 과당(액상과당)을 현미발효물로 대체하여 “액상과당 무첨가” 표시가 제품 컨셉 차별화에 도움이 될 것이라 판단하여 제품 라벨에 “액상과당 무첨가” 표시를하기로 결정하였다.

그리고 현미에 대한 일반 소비자의 건강적 이미지가 분명하다고 판단하여 제품명에 “현미발효” 표시와 제품 라벨 전면에 제품별로 현미발효물 사용량을 표시하였으며 제품 라벨 후면에는 현미의 건강적인 측면을 식품 표시법 기준에 맞도록 ‘미네랄, 식이섬유가 풍부한 현미를 발

효하여 더 건강하고 맛있게 만들었습니다' 라고 표시하였다.

본 연구 결과를 우선 적용할 제품이 드레싱, 소스 등 일반 식품인 관계로 협동 기관 연구 결과인 장관면역과 당,지질 대사에 효과적이었던 컨셉은 차후 건강을 더 강조하는 신제품 개발시에 추가로 검토할 예정이다.

◆ 부 록

Table 70. 현미발효물을 적용한 제품의 요리 적용 방안

제품명	제품 외관	제품 성상	적용 요리
오리엔탈 드레싱			  두부샐러드    오리엔탈 누들 샐러드
머스터드 드레싱			 케이준 치킨 샐러드   머스터드크림소스 닭가슴살 구이
바비큐 소스			 바비큐 폭립

◆ 현미발효물 오리엔탈 드레싱을 이용한 조리법 개발

1. 두부 샐러드

<재료> 두부 반 모, 식용유, 양상추, 적배추, 파프리카, 당근, 현미발효물 오리엔탈 드레싱

제조방법

- 1) 두부를 한 입 크기로 작게 자른다.
- 2) 식용유를 약간 두르고 두부를 부친다.
- 3) 양상추를 먹기 좋은 크기로 잘라 준비한다.
- 4) 적배추, 파프리카, 당근을 채 썰어 준비한다.
- 5) 준비된 재료들 위에 현미발효물 오리엔탈 드레싱을 뿌린다.



Fig. 35. 두부샐러드

## 2. 오리엔탈 누들 샐러드

<재료> 메밀면(건면) 100g, 양배추 100g, 어린잎 한 줌, 현미발효물 오리엔탈 드레싱 5큰술

### 제조방법

- 1) 양배추는 아주 가늘게 채 썰고, 어린잎은 물에 헹궈 물기를 제거하여 준비한다.
- 2) 메밀면은 삶아서 물기를 뺀다.
- 3) 볼에 메밀면, 양배추, 어린잎을 담고 현미발효물 오리엔탈 드레싱을 넣고 버무린다.



Fig. 36. 오리엔탈 누들 샐러드

## ◆ 현미발효물 머스터드 드레싱을 이용한 조리법 개발

### 1. 머스터드 크림 소스 닭가슴살 구이

<재료> 닭가슴살 2쪽(200g), 생크림 100ml, 머스터드 드레싱 70ml, 소금, 후추 약간, 파슬리 약간

### 제조 방법

- 1) 머스터드 드레싱을 냄비에 붓고 반으로 줄어들 때까지 끓인다.
- 2) 생크림을 넣고 같이 끓여, 머스터드 크림소스를 만든다.
- 3) 닭가슴살은 소금과 후추를 약간 뿌리고, 달군 팬에 엑스트라버진올리브유를 두른 뒤 앞뒤로 노릇하게 구워낸다.

4) 구운 닭가슴살을 어슷하게 썰어 접시에 담고, 끓여둔 머스터드 크림소스를 끼얹어 완성한다.

#### ◆ 현미발효물 바비큐 소스를 이용한 조리법 개발

##### 1. 바비큐 폭립

<재료> 돼지 등갈비 1줄(약 400g), 바비큐 소스 100g, 마늘 5개, 통후추 약 5개, 파 1단, 월계수 잎 1장

제조 방법

- 1) 등갈비 안쪽 뼈 부분에 붙어있는 흰 막을 제거한다.
- 2) 물에 약 2시간 담가 핏물을 제거한다.
- 3) 파를 크게 썰어 준비한 뒤 끓는 물에 마늘, 파, 통후추, 월계수 잎과 함께 등갈비를 넣고 40분간 삶는다.
- 4) 삶아진 등갈비를 썰고, 바비큐 소스를 골고루 발라 10~20분간 재워 둔다.
- 5) 달궈진 팬에 올리고, 중간 중간 남은 소스를 덧발라가며 굽는다.
- 6) 잘 구워진 바비큐 폭립을 접시에 담으면 완성

### 3절 현미발효물의 당 및 지질대사 개선 효능 평가

#### 1. 당 및 지질대사 조절 효능을 나타내는 현미발효물의 선별

##### 가. 연구배경 및 기작

당 및 지질 대사 조절 기전에는 여러 가지 방법이 알려져 있으나, 최근 10년 간 세포 내 핵수용체 조절을 통한 기전이 새로이 알려지고 있다. 세포질에 존재하는 핵수용체에 리간드가 결합하여 활성화 되면, 핵수용체는 핵으로 이동한 후 일련의 타겟 유전자 프로모터에 결합하여 유사한 대사과정에 관여하는 유전자들의 발현을 한 번에 조절하게 된다. 이러한 핵수용체 가운데 peroxisome proliferator-activated proteins(PPARs;  $\alpha$ ,  $\gamma$ ,  $\beta/\delta$  forms)와 liver X-receptors(LXRs;  $\alpha$  and  $\beta$  forms)는 당 및 지질 대사를 조절하는 대표적인 핵수용체로 알려져 있다.

PPAR $\alpha$ 는 주로 간 조직에서 주요한 역할을 하며, 지방산과 중성지질 합성 및 분해 관련 유전자 발현을 조절한다. PPAR $\gamma$ 는 지방 및 근육조직에서 혈당 흡수 촉진 등을 통해 인슐린 민감도(insulin sensitivity)를 증가시킨다. PPAR $\beta/\delta$ 는 주로 지방조직에서 발현되며 지방산화와 열발생(thermogenesis)을 촉진시키는 것으로 알려지고 있다(Fig. 37).

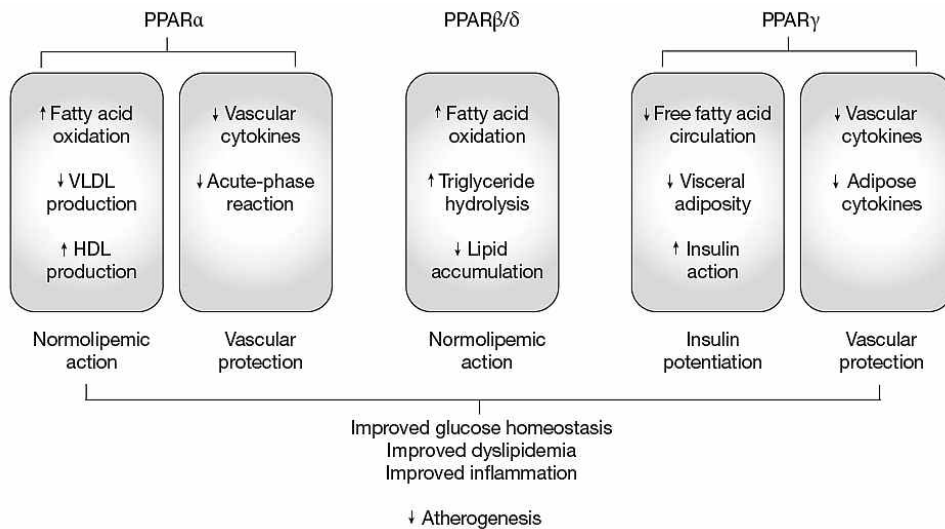


Fig. 37. PPARs 활성을 통한 당 및 지질대사 조절(Gervois et al. Nature. 2007)

LXRs는 간 조직에서 담즙산 합성을 통해 콜레스테롤 배설을 촉진시키고, 소장 내 콜레스테롤 흡수를 저해한다. 또한 말초조직의 콜레스테롤을 HDL로 전달하는 콜레스테롤 역수송을 유도하여 혈중 HDL-콜레스테롤의 양을 높임. LXRs는 지질대사뿐만 아니라 당대사에도 관여한다. 간에서 포도당신생합성 관련 유전자의 발현을 감소시키고, 인슐린 분비량 및 민감도를 향상시킨다(Fig. 38).

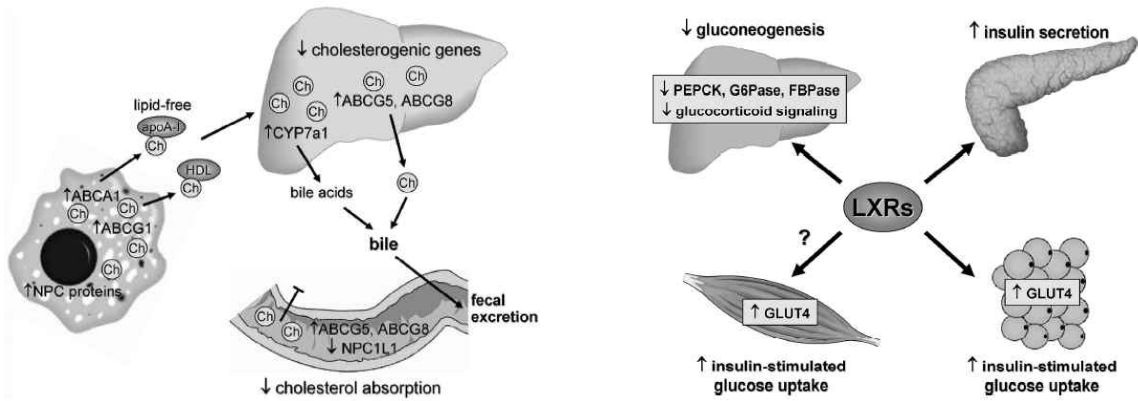


Fig. 38. LXRs 조절을 통한 지질(좌) 및 당 대사(우) 조절

PPARs 및 LXRs 조절을 통한 지질 및 당 대사 개선용 식품은 개발된 바가 없다. 또한 국제 저널에 발표된 현미발효물의 건강기능성은 항암, 장내 세균 억제 등과 같은 효능이 보고 (Katara et al. 2007; Tomita et al. 2008; Shibata et al. 2006 등) 되었으나, 당 및 지질 대사 조절 효능에 대한 연구는 전무하다.

따라서 본 연구에서는 핵수용체 PPARs 및 LXRs 조절을 통한 현미발효물의 당 및 지질대사 개선 효능을 평가하였고, 주관연구기관 샘플에서 제공받은 두 가지 현미발효물(미강이 없는 일반 현미발효물, 미강이 포함된 현미발효물)의 PPARs 및 LXRs에 대한 활성조절 효과를 평가하였다.

**< 추가연구진행 >**

- 현미에는 단백질이 다량 함유되어있으며, 이를 발효시킨 현미발효물에는 식이섬유 및 단백질 분해산물인 아미노산, 펩타이드가 많이 포함되어 있을 것으로 예상된다.
- 단백질 가수분해 산물인 다이펩티드(dipeptide)는 두 종의 아미노산이 펩타이드 결합으로 연결된 아미노산 중합체이며 유리 아미노산 보다 빠르게 소장을 통해 흡수되고 혈액으로 운반될 수 있으므로 영양학적, 생리학적으로 효능을 가질 수 있는 것으로 알려져 있다. 특히 다이펩티드는 생체독성이 낮고 질병표적 단백질에 대한 선택성이 우수할 뿐만 아니라 화학적 합성이 가능하여 의약에서부터 신소재, 나노과학, 분자영상, 약물전달 등 다양한 분야의 연구와 응용에 광범위하게 쓰인다.
- 현미발효물에 존재할 수 있는 다이펩타이드는 총 400종으로 현재 국내에서 천연 추출물 내 존재하는 다이펩타이드를 모두 분석할 수 있는 기술이 없으므로, 문헌조사를 통하여 당·지질대사 활성이 있을 것으로 예상되는 다이펩타이드를 수 종 선정하여 이에 대한 다이펩타이드의 PPARs 및 LXRs 조절 활성을 추가적으로 평가하였다.

나. 현미발효물의 LXRs와 PPARs에 대한 활성능 평가

(1) Reporter gene assay 실험을 통한 현미발효물의 LXRs와 PPARs에 대한 활성능 평가

(가) 실험방법



샘포식품(주)에서 제공받은 두 종의 현미발효물 시료 A(미강이 없는 일반 현미발효물), B(미강이 포함된 현미발효물)는 원심분리를 통하여 불순물을 침전시킨 후 0.2  $\mu\text{m}$  필터를 이용하여 실험에 사용하였다.

현미발효물의 LXRs 활성 검증을 위하여 reporter gene assay를 실시하였다. 특정 기질을 산화하여 빛을 방출하는 작용을 촉매하는 효소인 luciferase가 리포터 유전자로 사용되었다. CHO-K1 세포를 24-well plate에  $2 \times 10^5$ /well 농도로 분주하여 24시간 배양한 후, Hilymax형질 감염시약을 이용하여 pCMV-3 $\times$ LXRE-Luc 벡터를 24시간 동안 형질감염시켰다. 이후 두 종의 현미발효물 A, B 그리고 양성대조군으로 LXRA와 LXRB의 리간드로 알려진 T0901317를 24시간 동안 처리하였으며 Firefly luciferase assay kit를 사용하여 luciferase 활성을 측정하였다.

PPARs 활성 검증은 LXRs 활성 실험과 동일한 방법으로 수행하였으며, 양성 대조군으로 PPAR- $\beta/\delta$ 의 리간드인 GW0742를 사용하였다.

#### (나) 실험결과

미강이 포함되지 않은 A시료에서 LXR, PPAR 프로모터 활성이 각각 73%와 25% 증가, 미강을 포함한 B시료에서는 각각 26%, 13% 증가하였다 (Fig. 39).

현미발효물 A, B시료의 PPARs에 대한 활성효과는 작고 유의성은 확인할 수 없었던 반면, LXRs에 대한 활성효과는 A, B시료 모두에서 확인할 수 있었고 A시료가 B시료보다 좀 더 나은 효과를 보여주었다.

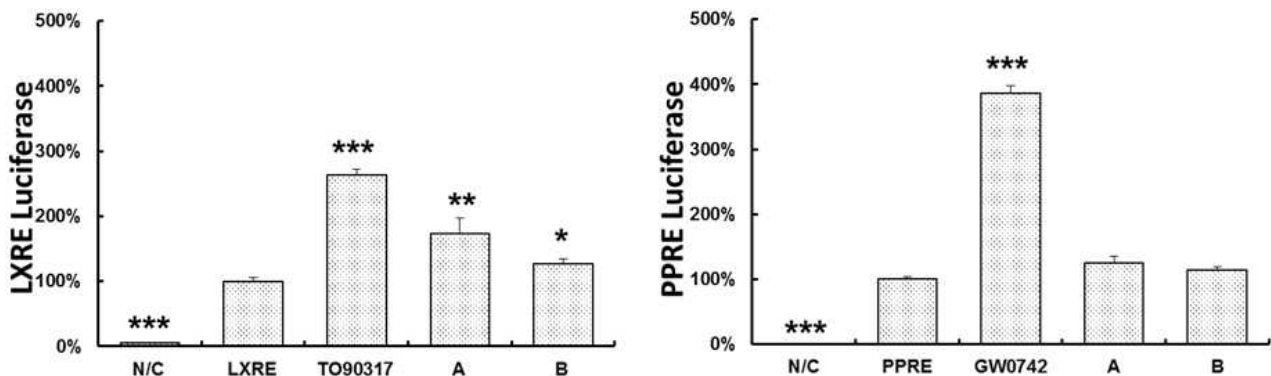
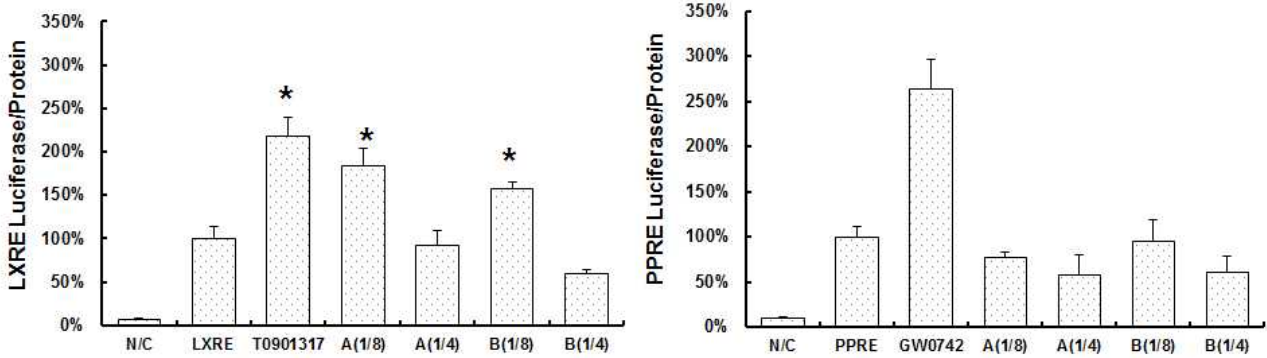


Fig. 39. 현미발효물의 LXRE와 PPARE에 대한 효능

(A: 일반 현미발효물, B: 미강포함 현미발효물)

이후 현미발효물의 농도에 의한 LXRs와 PPARs에 대한 활성을 확인하기 위하여 각 시료와 배지를 1/8(12.5%), 1/4(25%)농도로 섞어 세포에 처리하였으며 실험방법은 앞서 수행한 방법과 동일하였다.

실험결과, 1/8농도로 처리한 현미 발효 처리군 A와 B에서 LXRs의 활성이 각각 83%, 57% 유의적으로 증가되었으나 1/4농도 처리군의 경우 LXRs의 활성이 오히려 줄어드는 결과를 보였는데 이는 농도에 따른 배지의 양이 줄어들어 영양분의 공급이 부족해 cell이 정상적인 대사가 이루어지지 못한 결과라고 생각된다. 또한 현미발효물 처리군 A, B 모두 PPARs 활성에는 효과가 없는 것으로 나타났다 (Fig. 40).



**Fig. 40. 현미발효물의 LXRE와 PPRE에 대한 농도별 효능**  
(A: 일반 현미발효물, B: 미강포함 현미발효물)

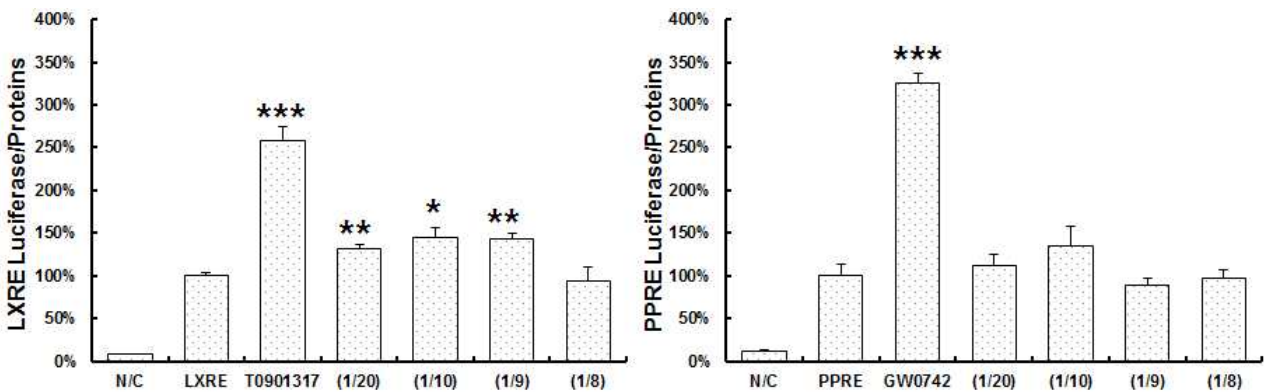
결과를 종합하여 볼 때, 현미발효물 시료는 LXR 활성 효과가 있으며, 특히 미강이 포함되어 있지 않은 일반 현미발효물(A)이 미강포함 현미발효물(B)보다 당 및 지질대사 조절에 더 우수한 것으로 사료된다.

(2) 미강이 제거된 일반 현미발효물(A)의 LXRs 및 PPARs 활성효능 평가

앞의 실험을 통하여, 두 종류 현미발효 시료 중 더 좋은 효과를 보인 미강이 제거된 현미발효물(A)을 선정하였으며 선정된 A시료를 배지와 농도별로 희석(1/20, 1/10, 1/9, 1/8)하여 luciferase assay를 통해 LXRs와 PPARs의 활성 효능을 평가하였다.

실험결과, 시료 농도의 증가함에 따라 LXRs 프로모터의 발현이 증가함을 확인할 수 있었으나 PPARs의 활성은 거의 관찰되지 않았다 (Fig. 41).

또한 시료를 고농도(1/8) 처리 시 LXRE에서 유의성은 없으나 LXR 활성이 다소 줄어드는 경향을 보였다. 그 이유를 배지의 혼합과정에서 배지의 비율이 달라 생긴 차이로 보고 이를 보정하기 위하여 샘플을 PBS에 섞어 농도별 stock을 제조하고 배지 80%에 stock 20%를 섞어 샘플을 처리하였다.



**Fig. 41. 일반 현미발효물(A)의 농도별 LXRE, PPRE 발현 측정-1**

일반 현미발효물 시료의 최종 농도가 8%, 12%, 16%, 20%가 되도록 하여 실험을 진행하였고 그 결과 (Fig. 42)과 같은 결과를 얻었다.

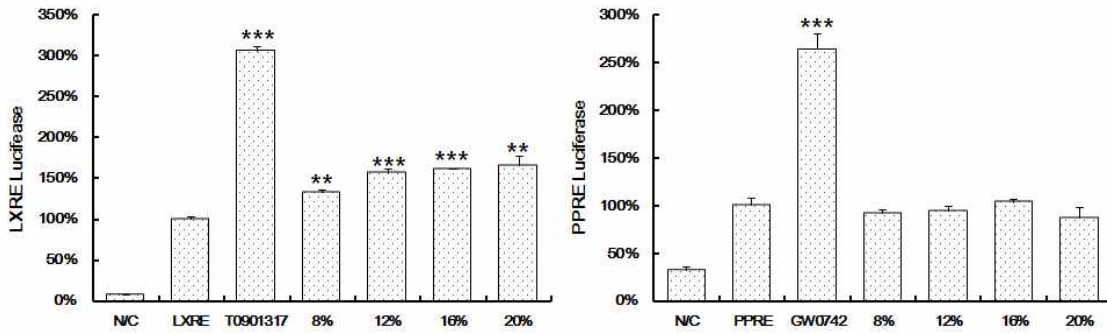


Fig. 42. 일반 현미발효물(A)의 농도별 LXRE, PPRE 발현 측정-2

일반 현미발효물의 LXR 프로모터 발현이 각 농도별로 33.0%, 56.8%, 61.3%, 65.7% 씩 증가하는 것을 확인할 수 있었고, PPAR 프로모터 활성은 거의 관찰되지 않았다.

결론적으로 미강이 없는 일반 현미발효물의 LXRs 활성 효능을 확인할 수 있었으며, 일반 현미발효물을 분자량 500이하와 500~1000, 두 가지 분획물로 나누어 2차년도에 일반 현미발효물의 당 및 지질대사 조절을 분석 평가하기로 하였다.

#### 다. 다이펩타이드의 LXRs와 PPARs에 대한 활성능 평가

현미발효물에는 단백질이 분해 산물인 아미노산, 다이펩타이드, 폴리펩타이드가 함유되어있다. 본 연구에서는 추가적으로 다이펩타이드에 대한 LXRs와 PPARs에 대한 활성능을 평가하였다.

아미노산의 조합에 따른 다이펩타이드는 400종이며, 현재 국내에 천연 추출물의 다양한 펩타이드 함량의 측정/분석 하는 기술이 없어 문헌조사를 통하여 다이펩타이드를 선정하였으며, 합성한 다이펩타이드에 대한 효능을 추가로 평가하였다.

PPAR $\gamma$ 의 antagonist에는 halofenate, metaglidasen, T0070907 등이 알려져 있으며 최근 다이펩타이드 중 WE(Trp-Glu)가 PPAR $\gamma$ 의 antagonist로 밝혀져 G3335 라는 명칭으로 시판되고 있다.

그런데 WE 다이펩타이드는 지금까지 보고된 antagonist들과 구조가 다르다. 이 때문에 WE와 비슷한 구조를 갖는 다이펩타이드를 합성하여 실험한 결과 WD(Trp-Asp), WR (Trp-Arg), WL(Trp-Leu) 또한 PPAR $\gamma$  antagonistic activity를 갖는 것으로 밝혀졌다. (Deng GH et al.)

따라서 본 연구에서는 PPAR $\gamma$ 의 antagonist로 알려진 다이펩타이드 중 WD(Trp-Asp), WL(Trp-Leu) 다이펩타이드에 대한 PPAR의 다른 subtype인 PPAR $\alpha$ ,  $\delta$ 와의 결합능을 SPR 실험을 통해 평가하고, TR-FRET 실험을 통해 PPAR 단백질에 대한 다이펩타이드의 활성효능 및 저해효능에 대하여 평가하였다.

#### (1) SPR 실험을 통한 다이펩타이드의 PPARs에 대한 결합능 평가

##### (가) 실험방법

다이펩타이드가 직접적으로 PPAR LBD(ligand binding domain)와 결합하는지 확인하기 위해 Biacore 2000 기기를 이용하여 표면 플라즈몬 공명(surface plasmon resonance, SPR) 실험

을 수행하였다. 구체적으로, human-PPAR LBD(ligand binding domain) 단백질을 CM5 센서칩에 고정시키고 다이펩타이드를 주입시켜 주었으며 이 때 분석환경은 25°C로 유지하였다. SPR 실험에서 시료주입 후, 물질이 human-PPAR LBD와 결합하면 SPR 신호인 RU(response unit)가 증가하게 되며, 신호강도 (RU)-시간과의 그래프로 나타내게 된다. 일정시간 후, 테스트 물질이 제외된 버퍼(10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 3 mM EDTA, 0.005% (v/v) surfactant P20, 1% DMSO, pH 7.4)만을 다시 흘려보내주면, human-PPAR LBD와 물질사이의 결합이 해제되며 RU 값이 감소된다. 이 해당반응에서의 결합능( $K_a$  값) 과 해제능( $K_d$  값)을 이용하여 결합정수( $KD$ ) 값을 계산하였다.

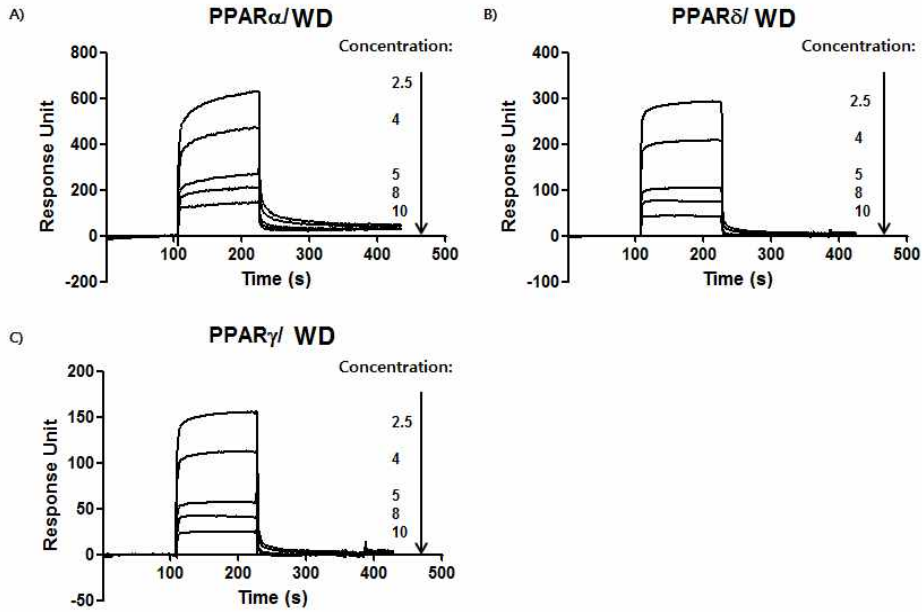


Fig. 43. SPR로 측정된 PPAR에 대한 WD의 binding affinity 농도는(mM) 화살표 옆에 표시

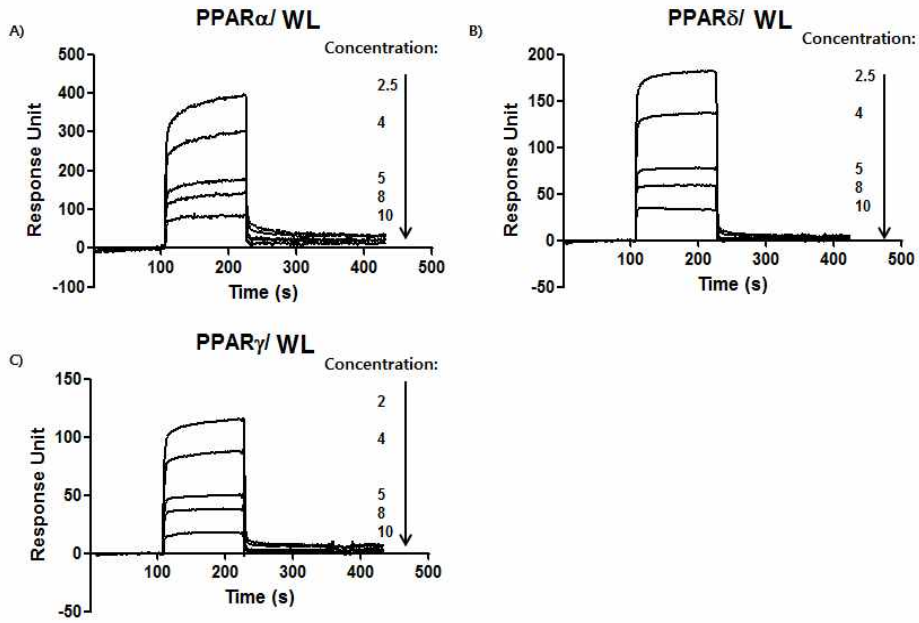


Fig. 44. SPR로 측정된 PPAR에 대한 WL의 binding affinity 농도는(mM) 화살표 옆에 표시

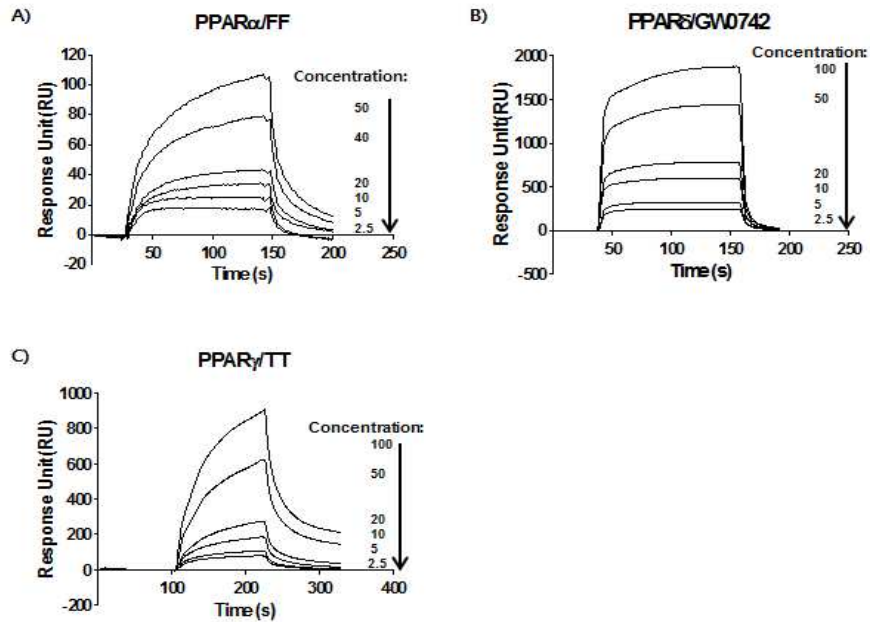


Fig. 45. SPR로 측정된 PPAR에 대한 agonist의 binding affinity 농도는(mM) 화살표 옆에 표시. FF는 Fenofibrate, TT는 Troglitazone.

**Table 71. SPR로 측정된 PPAR에 대한 WD, WL과 PPAR agonist들의 결합능(K<sub>D</sub>)**

Compound	Equilibrium dissociation constant(K <sub>D</sub> )		
	PPAR $\alpha$	PPAR $\delta$	PPAR $\gamma$
WD	74.2mM	37mM	6.82uM
WL	6.46mM	110uM	25.2mM
Fenofibrate	301.02nM	-	-
GW0742	-	44.80nM	-
Troglitazone	-	-	254.03nM

실험결과, table 71을 보면 WD와 PPAR $\gamma$ 와의 K<sub>D</sub>값은 PPAR $\gamma$  antagonist로 알려진 WE의 K<sub>D</sub>값인 8.34 uM(Ye F et al.)와 유사한 것으로 나타났다. WD의 PPAR $\gamma$  단백질과의 결합능은 6.82 uM으로 나타났다. 따라서 WD는 WE와 비슷한 정도로 PPAR $\gamma$ 와 결합하는 것을 알 수 있다 (Table 71).

WL 다이펩타이드의 경우 PPAR $\gamma$  단백질과의 결합능은 25.2 mM로 나타났으며, WE와 보다는 낮은 K<sub>D</sub>값을 갖는 것으로 확인하였다. 다이펩타이드 WD 보다 PPAR $\delta$  단백질과의 결합능이 110 uM로 높은 결합능을 가지는 것으로 평가되었다.

SPR에서 결합능이 확인된 다이펩타이드의 길항제 또는 저해제의 효능을 알기 위하여 추가적으로 TR-FRET assay 실험을 진행하였다.

(2) TR-FRET 실험을 통한 다이펩타이드의 LXRs와 PPARs에 대한 활성 평가

(가) 실험방법

다이펩타이드의 PPAR $\alpha$ 에 대한 직접적인 리간드로 작용할 수 있는지 평가하고자, 공활성제 (coactivator)를 사용하여 길항제(agonist)혹은 저해제(antagonist)로서의 활성효능을 평가하는 시험법인 TR-FRET 실험을 수행하였다.

PPAR $\alpha$ 에 리간드가 결합하면, PPAR $\alpha$ 의 입체구조가 변화하여 공활성제의 결합이 용이하게 되고, 이는 PPAR $\alpha$ 에 의한 전사를 유도하게 되는데, GST 항체를 통해 테르븀이 표지된 PPAR $\alpha$ 에 리간드가 결합하면 PPAR $\alpha$ 에 형광으로 표지된 공활성제의 펩타이드 결합이 이루어진다. Terbium은 340 nm 파장에서 들뜬 상태가 되고, 이 에너지는 공활성제 펩타이드의 형광신호로 전이되는데, 이 신호를 520 nm에서 측정하였다. 따라서 PPAR $\alpha$ 에 리간드 결합이 증가할수록 TR-FRET 시그널은 증가하게 된다.

본 연구에서는 형광표지된 PGC1 $\alpha$  펩타이드를 PPAR $\alpha$ 에 대한 공활성제로 사용하였으며, Spectra Max 기기를 사용하여 형광파장을 측정하였다. (excitation 340 nm, emission 520 nm). 그래프와 EC50값은 GraphPad™ Prism® 5.0 프로그램을 사용하였으며 양성대조군으로는 PPAR $\alpha$ 의 길항제(agonist)로 개발된 GW7647을 사용하여 다이펩타이드 WE 효능을 비교분석하였다.

(나) 실험결과

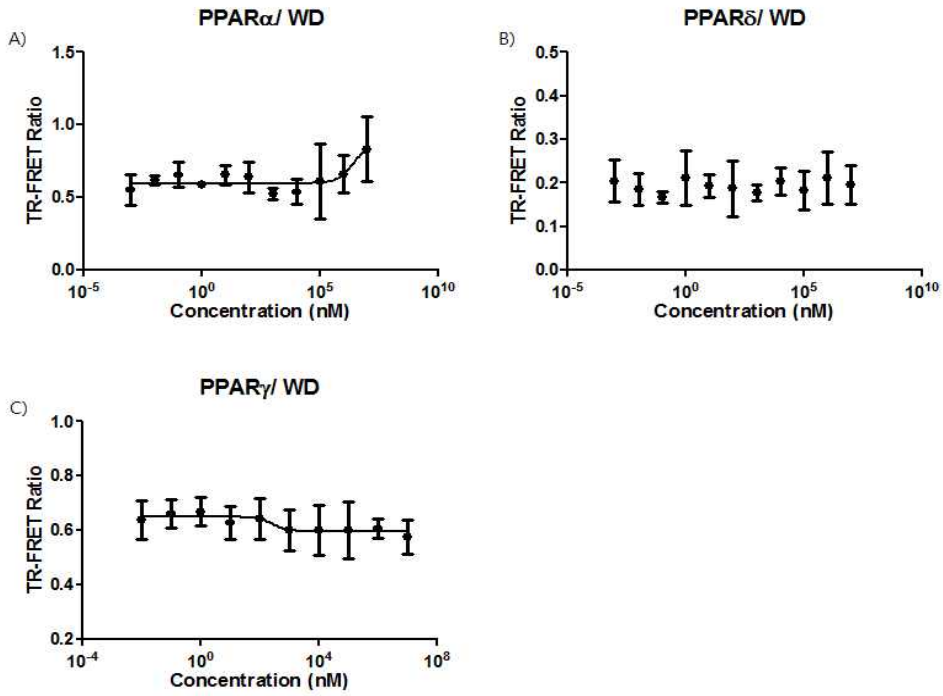


Fig. 46. 다이펩타이드 WD의 TR-FRET 측정 결과

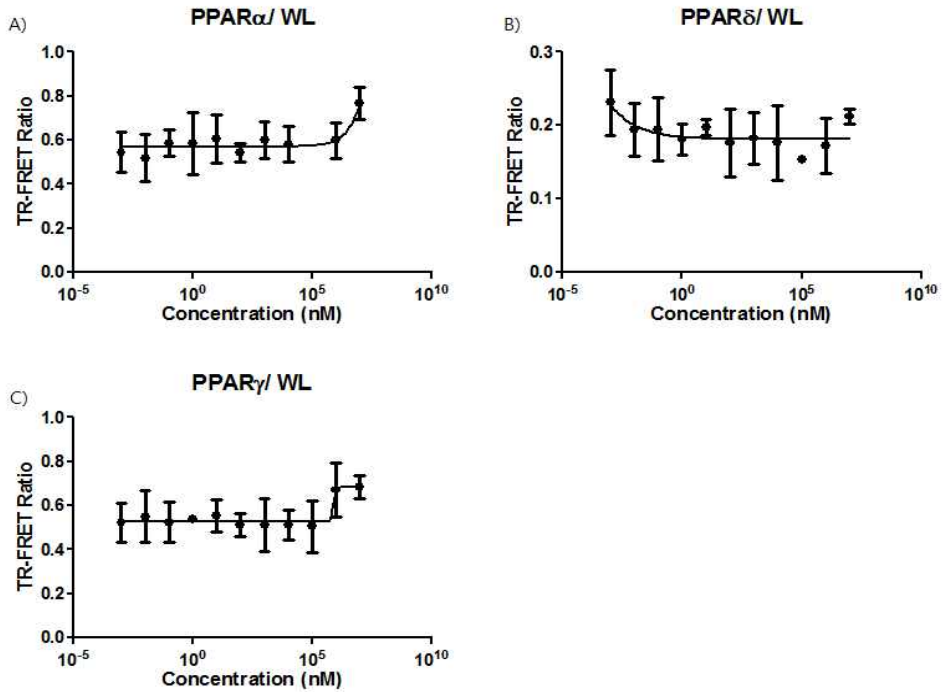


Fig. 47. 다이펩타이드 WL의 TR-FRET 측정 결과

**Table 72. TR-FRET으로 측정 한 PPAR에 대한 WD, WL의 half maximal effective concentration(EC<sub>50</sub>)**

Compound	EC <sub>50</sub> value		
	PPAR $\alpha$	PPAR $\delta$	PPAR $\gamma$
WD	2.7mM	-	-
WL	88.7M	-	0.77mM

실험결과, 다이펩타이드와 PPAR $\alpha$ 와 활성 효능 평가에서는 WD의 경우 활성 효능을 갖는 최고농도의 50%에 해당하는 EC<sub>50</sub> 값이 2.7 mM로 나타났으며 WL은 88.7 M으로 나타났다 (Table 72)

다이펩타이드의 PPAR $\delta$ 와의 활성 효능 평가에서는 2종의 다이펩타이드 모두 EC<sub>50</sub>값을 구할 수 없었으며, 이전 SPR 실험결과와 종합해 볼 때 PPAR $\delta$  단백질과는 낮은 결합능을 갖지만 활성은 나타나지 않는 것으로 평가되었다.

분석기술의 한계로 현미발효물 내 다이펩타이드의 농도를 측정할 수 없으나, 현미발효물의 경우 단백질 분해 결과로 이러한 다이펩타이드가 생성될 수 있어 현미발효물의 후보 효능물질로 생각해 볼 수 있다.

라. 결론

샘표식품(주)에서 제공받은 두 종의 현미발효물 시료 A(미강이 없는 일반 현미발효물), B(미강이 포함된 현미발효물)의 LXRs, PPARs 활성능력을 luciferase assay를 통해 확인한 결과, 미강이 없는 일반 현미발효물 A시료에서 뛰어난 LXR 활성조절능이 확인되었다.

일반현미발효물의 농도별 LXRs, PPARs 의 활성능력을 평가한 결과, LXRs의 활성은 발효물의 농도가 증가함에 따라 함께 증가했으나, PPARs에 대한 활성은 확인할 수 없었다.

추가적으로 실시한 PPAR $\gamma$  antagonistic activity가 있다고 알려진 다이펩타이드 중 WD, WL과 3가지 subtype의 PPAR와의 결합 유무를 SPR로 확인한 결과 WD는 PPAR $\gamma$ 와 WL은 PPAR $\delta$ 와 가장 잘 결합하는 것으로 확인되었다.

이 실험 결과로 이미 알려진 WL의 PPAR $\gamma$  antagonistic activity외의 다른 기능성을 예상할 수 있으며, 현미발효물에 포함된 이러한 다이펩타이드들은 복합적인 대사조절 효능을 유발할 수 있을 것으로 기대된다.

2. 현미발효물 유래 생리활성분획물의 당 대사 조절 효능 및 기작 연구

가. 연구내용

샘표식품(주)으로부터 전달받은 두 가지 시료인 미강이 없는 일반 현미발효물과 미강이 포함된 현미발효물 중 미강이 없는 일반 현미발효물의 당·지질대사 개선효능이 더 뛰어난 것으로 평가되었다. 따라서 미강이 없는 일반 현미발효물군과 일반 현미발효물 중 분자량이 500이하인 분획물 군, 분자량이 500~1000 사이인 분획물 군, 총 3가지 군으로 나누어 독성평가와 주요효능을 평가하고 동물실험을 진행하였다 (Fig. 49).



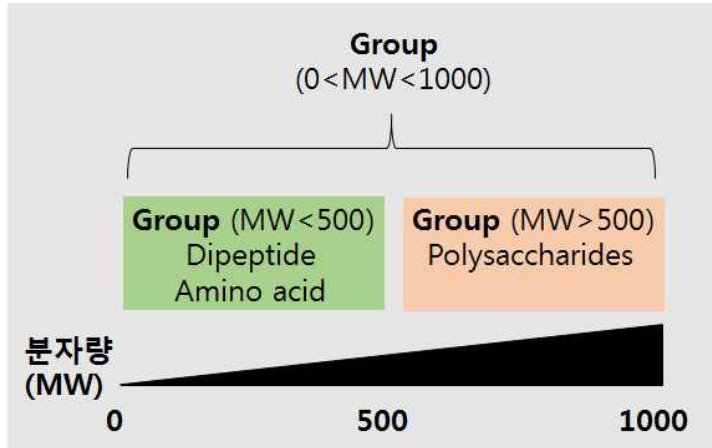


Fig. 48. 현미발효물의 분자량별 시료 구분

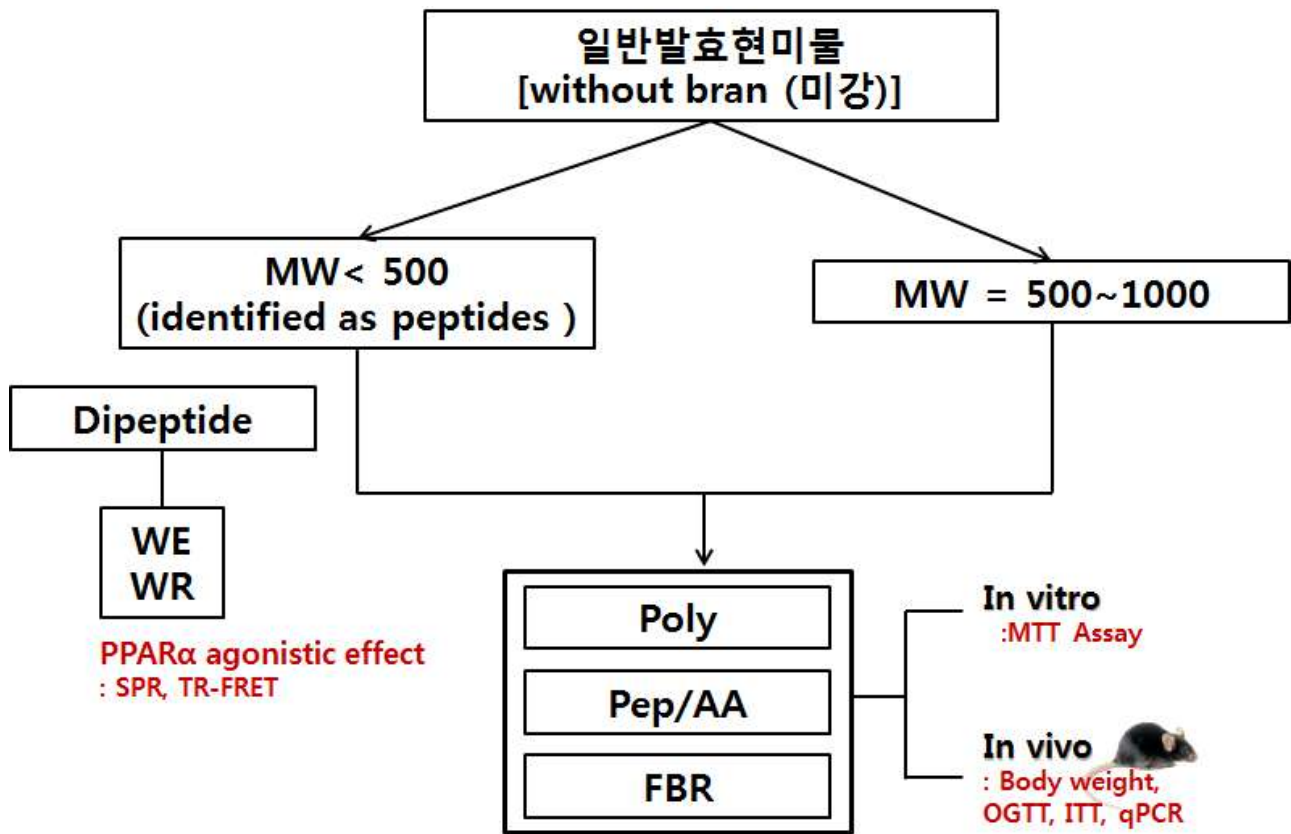


Fig. 49. 현미발효물의 당대사 조절 효능 실험 계획

나. 현미발효물로부터 분리한 여러 분획물의 효능 스크리닝

(1) 현미발효 분획물의 활성탐색 및 배양 세포계에서 당대사 조절 효능 평가

(가) 현미발효물의 독성평가(MTT assay)

① 실험방법

H4IIE 세포를 seeding하고 24시간 후에 현미발효물을 다당류 식이섬유(Poly), 분자량이 500 이하인 펩타이드/아미노산(Pep/AA), 현미발효(FBR)의 형태 3종류로 나누어 각각 100 ug/ml , 500 ug/ml의 농도로 처리하고 24시간 후에 MTT assay로 세포 생존률을 ANOVA로 통계 분석하였다.

② 실험결과

다당류 식이섬유(Poly), 분자량이 500이하인 펩타이드/아미노산(Pep/AA), 현미발효(FBR)의 형태의 시료를 처리한 결과, 세포 생존률에 영향을 미치지 않았다. 이는 3가지 시료 모두 세포에 독성이 없음을 의미한다 (Fig. 50).

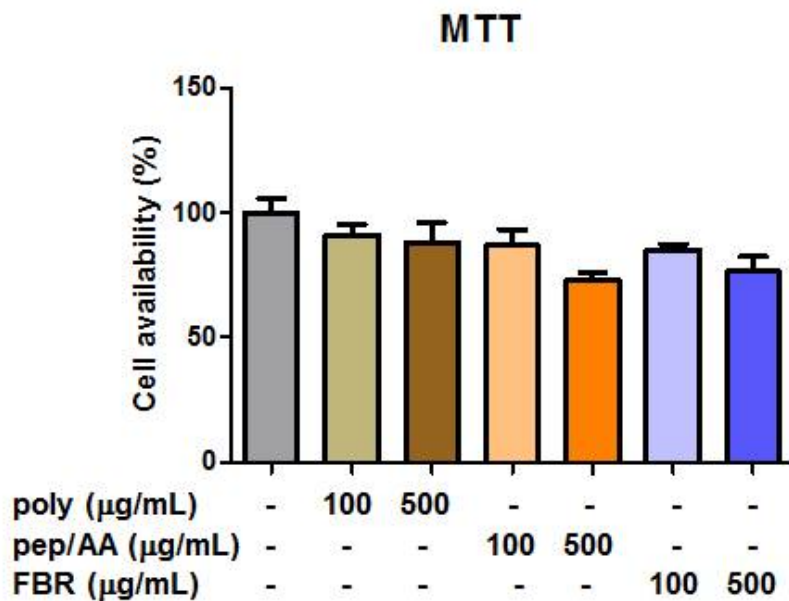


Fig. 50. 3가지 현미발효물 시료의 독성 평가

Data are presented as mean±SEM. A value of P<0.05 was considered to be statistically significant by one-way ANOVA.

**Poly:** polysaccharide, **Pep/AA:** peptide/amino acid with molecular weight less than 1000 g/mol, **FBR:** fermented brown rice

(나) 현미발효물의 지질 강화효능평가

① 실험방법

본 실험을 위해, H4IIE 세포에 지질을 축적시키고 분자량이 500~1000인 현미발효물 (MW1000으로 표기)과 분자량이 500이하인 현미발효물(MW500으로 표기)을 처리하여 세포 콜레스테롤 함량과 중성지방 함량을 분석하였다. 세포내 지질농도는 시료 중 단백질함량으로 나누어 보정하였다.

MW1000인 현미발효물과 MW500인 현미발효물은 각각 총 두 가지 농도(500, 1000 $\mu$ M)로 시험하였다.

② 실험결과

MW1000인 현미발효물 처리결과, 두 가지 농도 모두에서 세포 내 콜레스테롤과 중성지방을 감소시키는 효과는 나타나지 않았다 (Fig. 51)

MW500인 현미발효물 처리결과, 두 가지 농도 모두에서 세포 내 콜레스테롤을 유의성 있게 감소시키는 효과가 나타났고, 중성지방은 고농도(1000  $\mu$ M) 처리 군에서 세포 내 중성지방 함량이 유의성 있게 감소함을 확인하였다.

이는 주로 현미발효물의 구성성분 중, 분자량이 적은 아미노산, 다이펩타이드에 의한 효과로 사료되며, 따라서 이후 배양세포주를 이용하여 다이펩타이드의 지질강화 효능을 평가하였다.

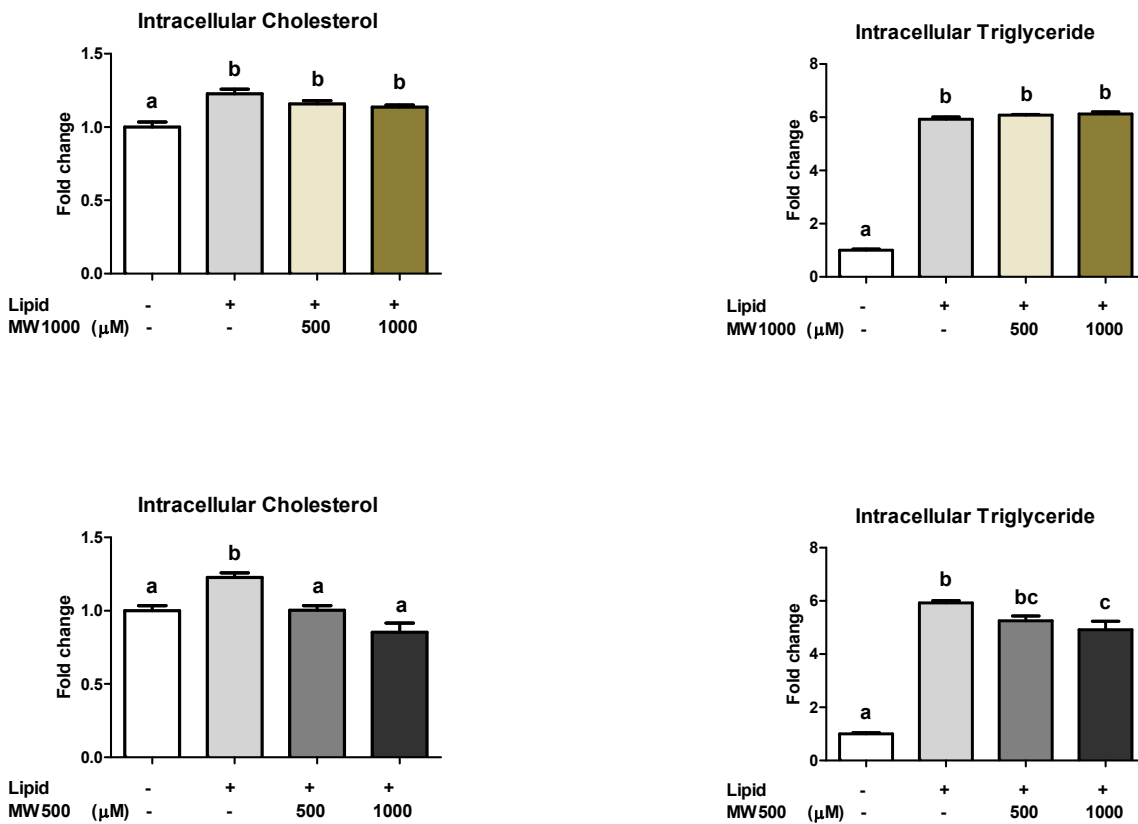


Fig. 51. 현미발효물 처리 후, H4IIE의 중성지질 콜레스테롤 측정

Data are presented as mean $\pm$ SEM. A value of P<0.05 was considered to be statistically significant by one-way ANOVA.

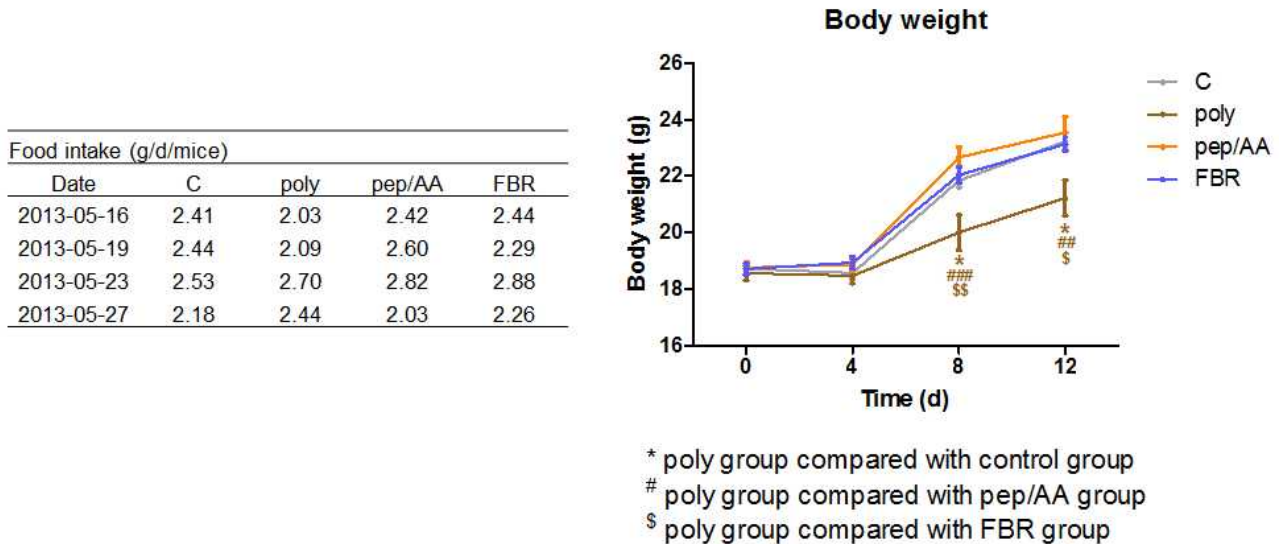
(2) 마우스에서 현미발효 분획물의 당대사 조절 효능 평가

현미발효물의 in vivo 효능 평가를 위해 현미발효물을 다당류 식이섬유(Poly)군, 분자량이 1000이하인 펩타이드/아미노산(Pep/AA)군, 현미발효(FBR)군, 총 세 가지 군으로 나누었으며, 실험을 위해 각 시료는 동결건조하고 각각 500 mg/kg body weight의 농도로 D.W에 녹여 시료를 만들었다. 각 시료는 고지방사료(HFD)를 섭취시킨 C57BL/6/Bkl 마우스에 10일 동안

200 uL씩 경구 투여하였다. C57BL/6/Bkl 마우스는 비만, 당뇨 및 동맥경화에 감수성이 높은 종으로 알려져 있다. 음성대조군은 200 uL의 D.W를 경구 투여하였다.

(가) 체중측정

10일 동안 마우스가 섭취한 먹이의 양과 마우스의 무게를 저울을 이용하여 측정하였다. 측정 결과, 10일 동안 마우스의 먹이 섭취량은 크게 차이가 나지 않았다. 몸무게 변화를 분석한 결과 다당류 식이섭유(poly)군에서 유의적으로 몸무게가 감소하였다 (Fig. 52)



**Fig. 52. 10일 동안 마우스의 먹이 섭취량과 몸무게 변화**

**C:** control group(D.W), **Poly:** polysaccharide(500 mg/kg body weight),

**Pep/AA:** peptide/amino acid with molecular weight less than 1000 g/mol(500 mg/kg body weight), **FBR:** fermented brown rice(500 mg/kg body weight)

Data are presented as mean±SEM. A value of P<0.05 was considered to be statistically significant by one-way ANOVA.

(나) 혈액분석(baseline)

시료를 경구 투여하기 전 baseline으로 혈액 내 혈당, 콜레스테롤, 중성지방, HDL, LDL의 농도를 지질자동화 분석기기인 COBAS C111 기기를 사용하여 분석하였다. 분석결과, 음성대조군을 포함한 4가지 실험군 모두 혈당, 콜레스테롤, 중성지방, HDL, LDL의 농도에 있어 차이가 없었으므로 실험 시작 전 동일한 조건으로 군이 구성됨을 확인하였다 (Fig. 53).

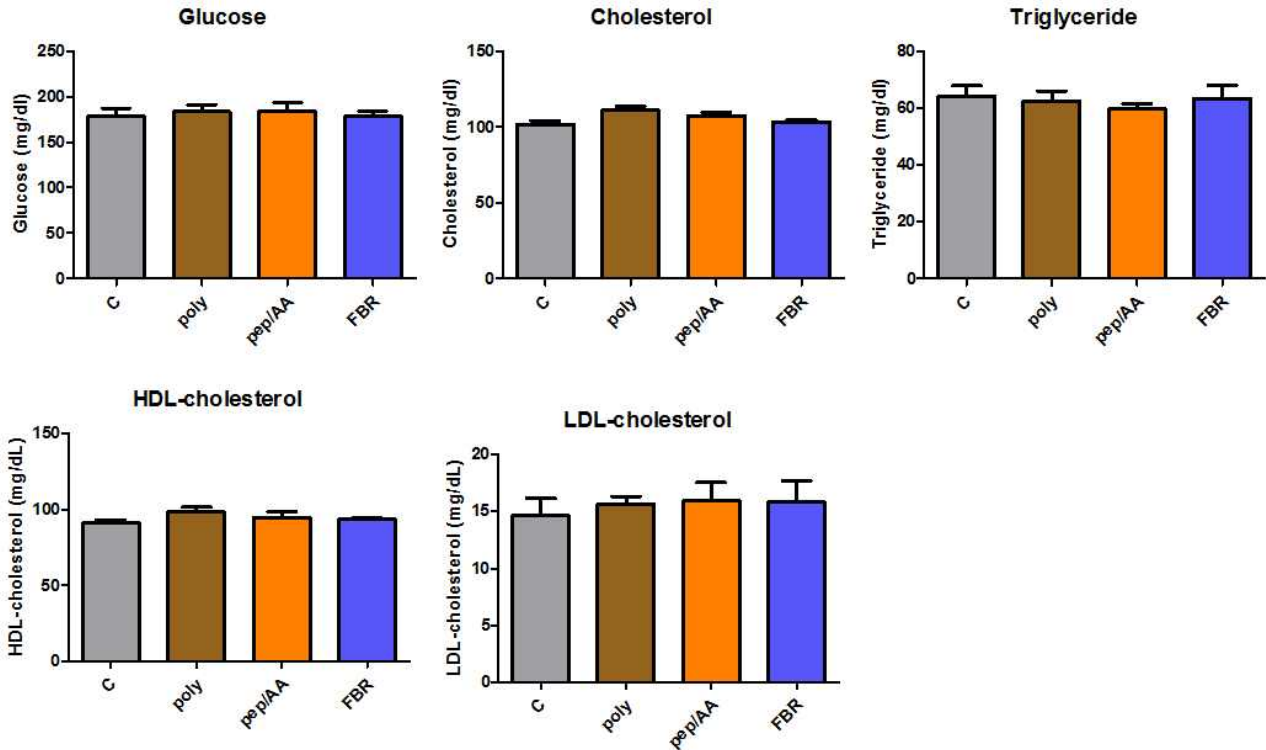


Fig. 53. 경구투여 전 혈액 내 글루코즈, 콜레스테롤, 중성지방, HDL, LDL의 농도

C: control group(D.W), Poly: polysaccharide(500 mg/kg body weight),

Pep/AA: peptide/amino acid with molecular weight less than 1000 g/mol(500 mg/kg body weight), FBR: fermented brown rice(500 mg/kg body weight)

Data are presented as mean±SEM. A value of P<0.05 was considered to be statistically significant by one-way ANOVA.

(다) OGTT(Oral glucose tolerance test)

실험 전 15시간 금식한 마우스 꼬리에서 채혈하여 혈당측정기로 혈당을 측정하고, 글루코즈를 3.5 g/kg body weight의 농도로 D.W에 녹여 100 uL씩 경구 투여 후 15분, 30분, 60분, 90분, 120분마다 혈당을 측정하였다.

분석결과, 다당류 식이첨유(poly)군의 경우 글루코즈 경구 투여 15분, 30분, 60분 후에 혈당이 다른 군에 비해 유의성 있게 낮았다. 이는 현미발효물을 다당류 식이첨유 형태로 섭취한 마우스가 다른 군 대비 혈당변화에 대한 인슐린이 민감하게 반응하여 혈당을 낮춘 것으로 확인된다 (Fig. 54).

OGTT 그래프의 면적을 계산한 AUC 값에서는 다당류 식이첨유 투여그룹이 대조군에 비해 30%까지 유의성 있게 감소하였음을 확인하였다.

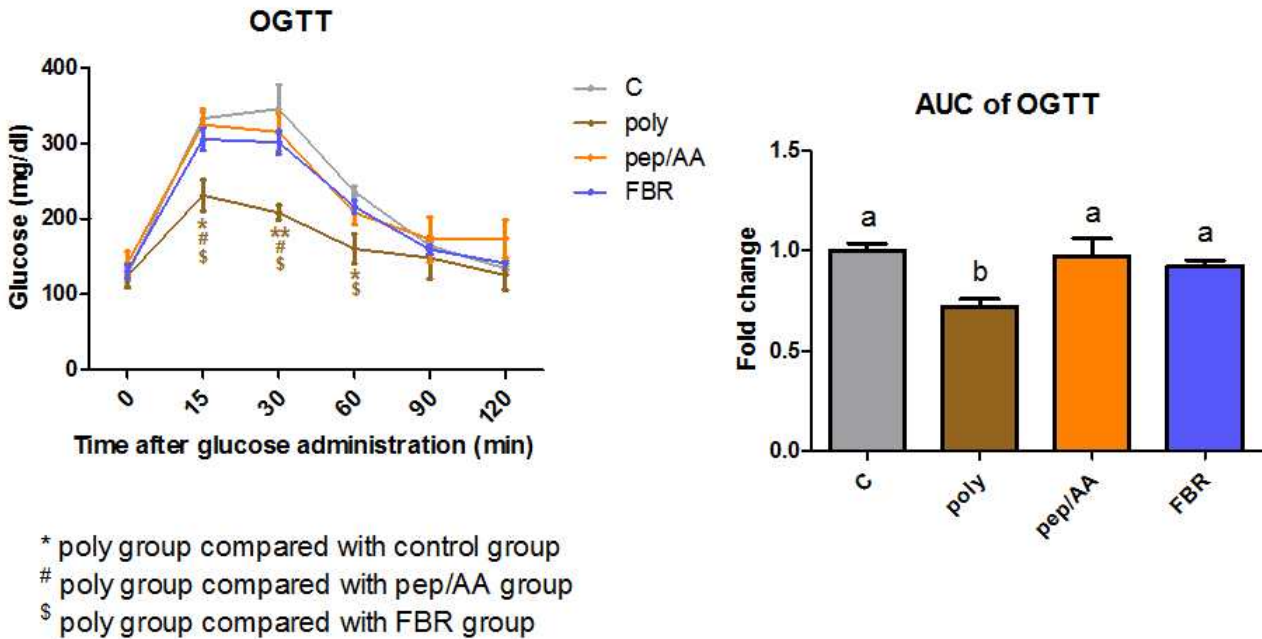


Fig. 54. 글루코즈 경구 부하 검사 결과

C: control group (D.W), **Poly**: polysaccharide(500 mg/kg body weight),  
**Pep/AA**: peptide/amino acid with molecular weight less than 1000 g/mol(500 mg/kg body weight), **FBR**: fermented brown rice(500 mg/kg body weight)

Data are presented as mean±SEM. A value of P<0.05 was considered to be statistically significant by one-way ANOVA.

(라) ITT(Insulin tolerance test)

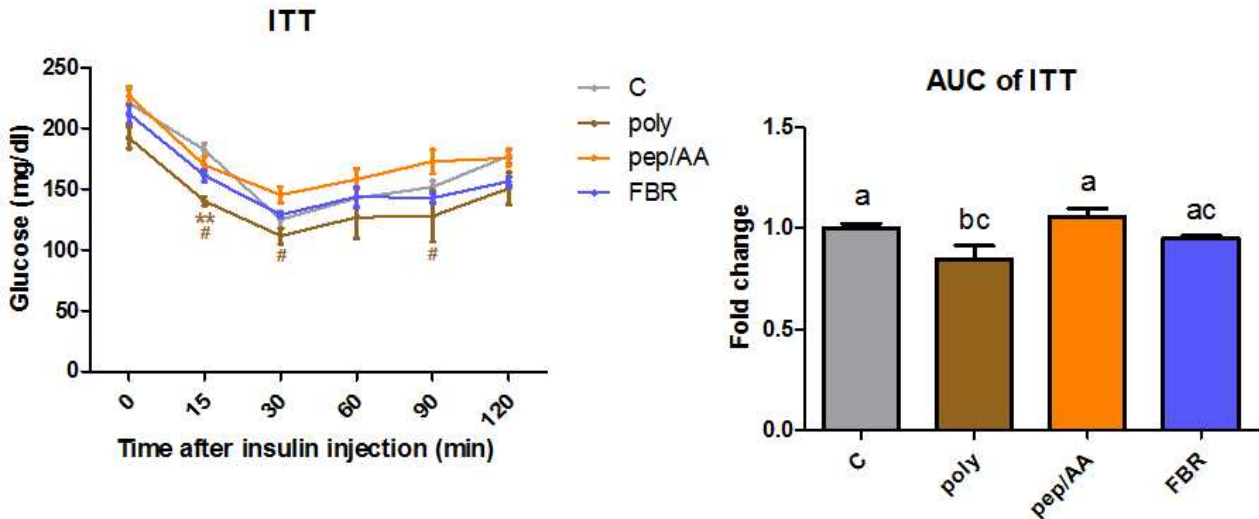
실험 전 4시간 금식한 마우스 꼬리에서 채혈하여 혈당측정기로 혈당을 측정하고, 인슐린 (Sigma Cat #I1882-100MG)을 0.35 unit/kg body weight의 농도로 PBS에 녹여 200 uL씩 복강 주사 후 15분, 30분, 60분, 90분, 120분마다 혈당을 측정하였다.

분석결과, 다당류 식이섭유(poly)군에서 인슐린 복강 주사 후 15분, 30분, 90분 후에 혈당이 다른 군에 비해 유의성 있게 낮았다. 이는 현미발효물을 다당류 식이섭유 형태로 섭취한 마우스가 다른 군에 비해 인슐린에 대해 민감하게 반응하여 혈당을 낮춘 것으로 사료된다 (Fig. 55).

ITT 그래프의 면적을 계산한 AUC값에서는 다당류 식이섭유 투여군이 대조군에 비해 15% 감소한 것으로 나타났다.

동물실험결과를 종합하여 볼 때, 다당류 식이섭유, 펩타이드/아미노산, 현미 발효 총 추출물 투여 군 중, 다당류 식이섭유를 섭취한 군의 당대사 조절 효능이 뛰어난 것으로 나타났다.





\* poly group compared with control group  
 # poly group compared with pep/AA group

**Fig. 55. 인슐린 부하 검사 결과**

**C:** control group(D.W), **Poly:** polysaccharide(500 mg/kg body weight),  
**Pep/AA:** peptide/amino acid with molecular weight less than 1000 g/mol(500 mg/kg body weight), **FBR:** fermented brown rice(500 mg/kg body weight)  
 Data are presented as mean±SEM. A value of P<0.05 was considered to be statistically significant by one-way ANOVA.

(마) 마우스 간 조직 유전자 발현 확인

① 실험방법

10일 동안 현미발효물을 경구 투여한 마우스에서 적출한 간을 RNA isoplus를 넣고 균질화하여 chloroform과 isopropanol을 이용하여 RNA를 추출하였다. 추출한 RNA를 이용하여 cDNA를 합성한 후, 합성된 cDNA 1 µL, SYBR Green PCR Master Mix 10 µL, 농도가 10 pmol인 순방향 프라이머(forward primer)와 역방향 프라이머(reverse primer) 각각 1 µL, 멸균된 증류수 8 µL를 섞고 qRT-PCR(quantitative real-time PCR)을 실시하였다. 각 유전자의 발현은 GAPDH(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase)를 기준 유전자(reference gene)로 표준화하여 수치화하였다.

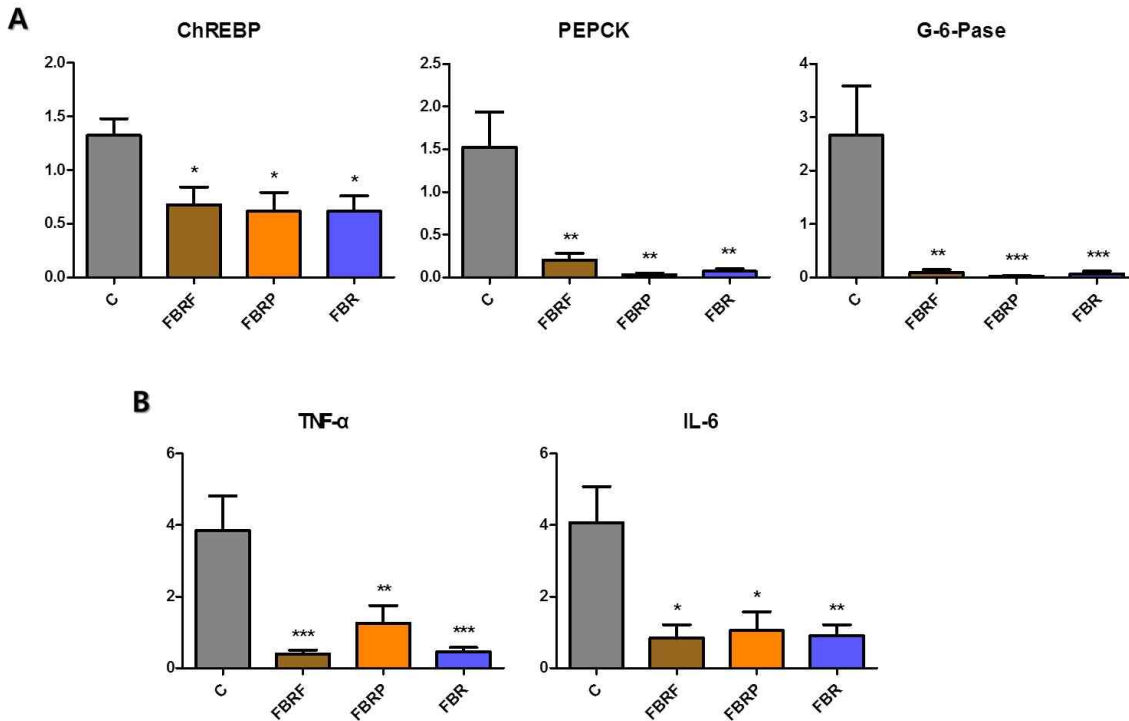
② 실험결과

간세포와 지방세포에서 분비하는 염증 유도 사이토카인은 인슐린 저항성과 연관성이 있다. 현미발효를 투여한 마우스의 간에서 염증과 관련한 유전자 tumor necrosis factor α(TNF-α)와 interleukin 6(IL-6)의 발현은 음성대조군에 비해 FBRF군, FBRP군, FBR군 모두 통계적으로 유의성 있게 감소하였다 (Fig. 56).

또한 간에서의 포도당 신생 합성이 감소하면 혈당 조절과 인슐린 저항성을 개선하였다. 현미발효를 투여한 마우스의 간에서 포도당 신생 합성의 주요 유전자 carbohydrate-responsive element binding proteins(ChREBP), phosphoenolpyruvate carboxykinase(PEPCK), 그리고

glucose 6-phosphatase(G6Pase)의 발현은 FBRF군, FBRP군, FBR군 모두 음성대조군 대비 통계적으로 유의성 있게 감소하였다.

당 대사 및 염증과 관련한 유전자 발현 분석을 통해 현미발효물의 투여가 염증 유전자 및 포도당 신생 합성 관여 유전자의 발현을 감소시켜 인슐린 저항성을 개선하고 혈당 조절에 기여하는 것으로 사료된다.



**Fig. 56.** 10일 동안 현미발효물을 투여한 마우스 간의 염증 및 당 대사 관련 유전자 발현

**A:** 당 대사 관련 유전자 발현 **B:** 염증 관련 유전자 발현 **C:** control group(D.W), **FBRF:** fermented brown rice fiber(500 mg/kg body weight),

**FBRP:** fermented brown rice peptide and amino acid with molecular weight less than 1000 g/mol(500 mg/kg body weight), **FBR:** fermented brown rice(500 mg/kg body weight)

Data are presented as mean±SEM. A value of P<0.05 was considered to be statistically significant by one-way ANOVA.

### (3) 다이펩타이드 WE와 WR의 효능 평가

연구결과에서 효능을 보인 미강이 없는 일반 현미발효물에 대한 생리활성 분획물 선별을 계획하였다. 현미발효물의 다당류 식이섬유 성분 분석은 경기대학교에서 진행하였다. 현미발효물의 아미노산/펩타이드 성분 분석을 시도하였으나 기술적으로 아직 국내에서 혼합물 내 펩타이드 성분 분석을 수행할 수 있는 연구팀/연구기관이 없어 이에 관한 분석은 수행하지 못하였다. 따라서 본 연구팀에서는 차선택으로 논문검색을 통해 효능이 있을 것으로 예상되는 다이펩타이드를 선정하였다.



### < 논문내용요약 >

- PPAR $\gamma$ 는 당뇨, 염증, 이상지질혈증, 고혈압, 암 등 주요 질환 약물의 표적이 되는 핵수용체로 알려져 있다. 최근연구결과에 의하면 PPAR $\gamma$ 의 antagonist, 혹은 부분적 agonist의 경우에는 기존의 당뇨병 치료제에 비해 인슐린 민감도를 유지시키고 부작용이 적은 것으로 알려져 새로운 당뇨병 치료제로써의 적용 가능성이 높은 것으로 평가되고 있다.
- 다양한 다이펩타이드들 중, tryptophan을 함유하고 있는 다이펩타이드의 경우 PPAR $\gamma$ 의 antagonist로 적용되는 것으로 알려져 있다.
- 따라서 본 연구팀에서는 문헌 조사를 통하여 tryptophan 함유 다이펩타이드 4종(WL, WD, WE, WR)을 선별하였으며, 다이펩타이드 2종(WE, WR)의 효능 분석을 수행하고, 이 중 효능이 뛰어난 다이펩타이드 2종을 선별하여 보다 구체적인 실험을 실시하였다.

### <참고문헌 >

- The dipeptide H-Trp-Glu-OH shows highly antagonistic activity against ppar $\gamma$ : Bioassay with molecular modeling simulation. *Chembiochem*. 2006 Jan;7(1):74-82.
- Tryptophan-containing dipeptide derivatives as potent PPAR $\gamma$  antagonists: design, synthesis, biological evaluation, and molecular modeling. *Eur J Med Chem*. 2008 Dec;43(12):2699-716.

#### (가) 다이펩타이드 WE(Tryptophan-Glutamic acid)의 효능 평가

앞선 실험에서 분자량이 500이하인 현미발효물을 처리하였을 때, 세포내 콜레스테롤과 중성지방의 함량이 감소하는 효과를 본 것을 토대로 분자량이 333 g/mol인 다이펩타이드(WE)를 세포에 처리 했을 때의 PPAR $\alpha$  활성화에 의한 지질대사 조절효능 연구를 수행하였다.

#### ① WE의 PPAR $\alpha$ 활성 효능 평가

##### ㉞ 실험방법

PPAR $\alpha$ 는 리간드 결합에 의해 활성화되며 표적 유전자의 프로모터자리에 결합하여 전사를 조절하는 핵수용체 일종으로 지질대사, 지단백대사, 콜레스테롤대사에 관여하는 유전자들의 발현에 집중적으로 연관되어있다. WE의 PPAR $\alpha$  활성 효능평가를 위해 WE를 세포에 4가지 농도(10, 50, 100, 500  $\mu$ M)로 처리 후 PPAR $\alpha$  유전자 발현을 확인하였다. 양성대조군으로는 PPAR $\alpha$ 의 agonist로 개발된 GW7647을 사용하여 WE와 효능을 비교분석하였다.

직접적으로 PPAR $\alpha$ -ligand binding domain과 WE의 결합효능을 확인하기 위해 Biacore 2000 기기(GE healthcare)를 이용하여 SPR실험을 하였다. human-PPAR $\alpha$  LBD 단백질을 CM5 센서칩에 고정 시키고 WE를 고농도 5 mM부터 저농도 순으로 주입시켜주었다. 분석환경은 25 $^{\circ}$ C로 유지되었으며, HBS running 버퍼(10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 3 mM EDTA, 0.005% (v/v) surfactant P20, 1% DMSO, pH 7.4)는 25  $\mu$ L/min의 속도로 일정하게 흘러보냈다. WE 주입 후, 물질이 human-PPAR $\alpha$  LBD과 결합하면 SPR 신호(RU)가 증가하게 되며, 신호강도(RU)-시간과의 그래프로 나타내게 된다. 일정시간 후, 테스트 물질이 제외된 버퍼만을 다시 흘러보내주면, human-PPAR $\alpha$  LBD와 물질사이의 결합이 해제되며, RU 값이 감소되었다.

즉, 해당반응에서의 결합능( $K_a$  값)과 해제능( $K_d$  값)을 이용하여 결합정수( $K_D$ ) 값을 계산하였다. 양성대조군으로는 PPAR $\alpha$  agonist로 알려진 GW7647을 사용하여 비교 분석하였다.

WE의 PPAR $\alpha$  리간드 효능 분석을 위한 TR-FRET 실험을 수행하였다. TR-FRET 실험은 coactivator를 사용하여 agonist 혹은 antagonist로서의 활성효능을 평가하는 시험법이다. PPAR에 리간드가 결합하면, PPAR의 입체구조가 변화하여 coactivator의 결합이 용이하게 된다. 본 원리를 바탕으로, GST 항체를 사용하여 terbium이 표지된 PPAR에 리간드가 결합하면 형광으로 표지된 coactivator의 펩타이드 결합이 이루어진다. Terbium은 340 nm파장에서 들뜬 상태가 되고, 이 에너지는 보조인자 펩타이드의 형광신호로 전이되는데, 이 신호를 520 nm에서 측정하였다. PPAR에 리간드 결합이 증가할수록 TR-FRET 시그널은 증가함. 본 연구에서는 PGC1 $\alpha$ 를 PPAR $\alpha$ 에 대한 coactivator로 사용하였으며, 실온에서 두 시간 반응시킨 후, Spectra Max 기기를 사용하여 형광파장을 측정하였다(excitation 340 nm, emission 520 nm). 그래프와  $EC_{50}$ 값은 GraphPad<sup>TM</sup> Prism<sup>®</sup> 5.0 프로그램을 사용하였다. 양성대조군으로는 PPAR $\alpha$ 의 agonist로 개발된 GW7647을 사용하여 WE와 효능을 비교분석하였다.

#### ㉔ 실험결과

WE의 PPAR $\alpha$  활성 효능평가 결과, 음성대조군과 비교하였을 때 100  $\mu$ M, 500  $\mu$ M의 농도로 WE 처리하였을 때 유의성 있게 PPAR $\alpha$  LBD 단백질과의 결합이 증가하였다 (Fig. 57).

SPR 실험 분석한 결과, 양성대조군인 GW7647은 100  $\mu$ M~25  $\mu$ M, WE는 5 mM~1 mM 범위에서 PPAR $\alpha$ -LBD 단백질과 결합하는 것으로 나타남. 결합정수( $K_D$ )값은 GW7647이 약 96.4 nM, WE가 약 120  $\mu$ M로 나타났다.

TR-FRET 실험결과, 양성대조군인 GW7647과 시험물질인 WE 모두 PPAR $\alpha$ 의 agonist로 작용하고 있는 것으로 나타났다. 그러나 활성효능을 갖는 최고농도의 50%에 해당하는  $EC_{50}$ 값이 GW7647은 18.6 nM, WE은 83.4  $\mu$ M로 계산되어, SPR실험결과와 마찬가지로, PPAR $\alpha$  agonist로 개발된 합성 GW7647에 비하여 WE의 효과가 낮은 것으로 나타났다 (Table 73).

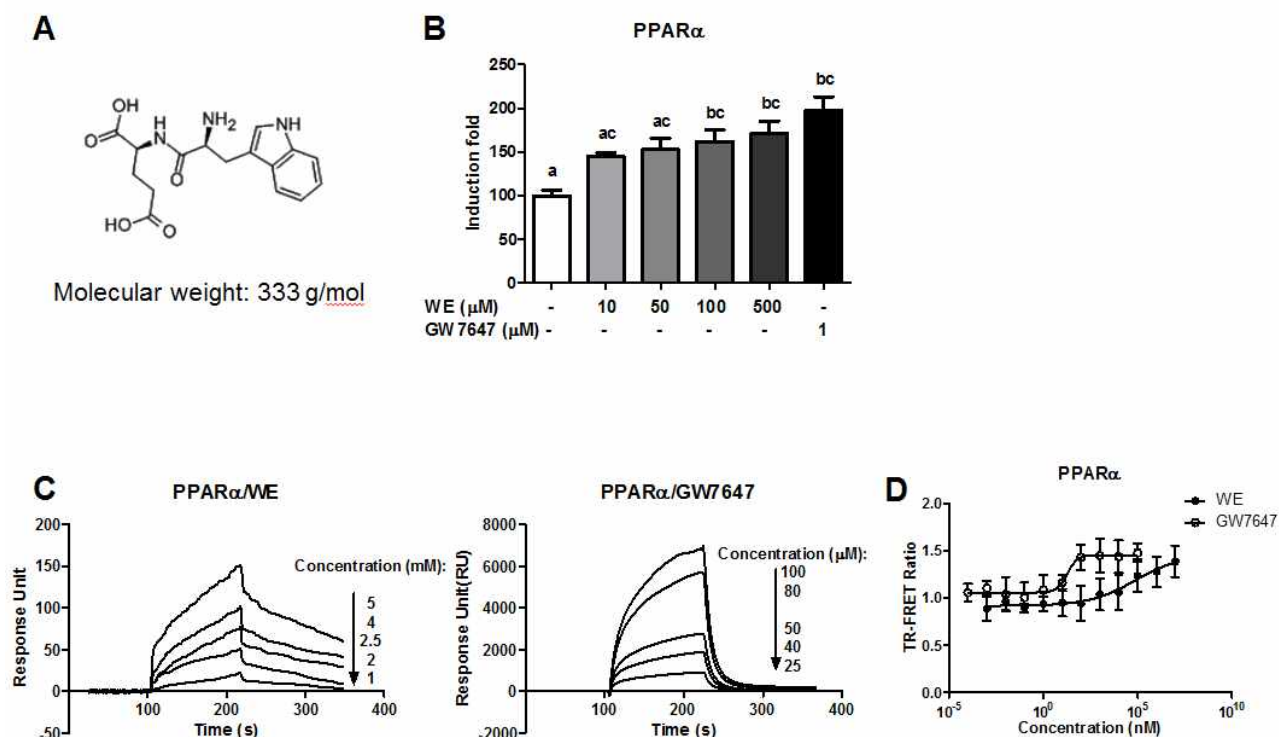


Fig. 57. WE의 PPAR $\alpha$  활성 효능 검증

A) WE structure, B) Reporter gene assay, C) SPR D) TR-FRET  
 Data are presented as mean $\pm$ SEM. A value of P<0.05 was considered to be statistically significant by one-way ANOVA.

Table 73. The equilibrium dissociation constants( $K_D$  values) measured by SPR and half-maximal effective concentration( $EC_{50}$  values) of WE and GW7647 to PPAR $\alpha$  measured by TR-FRET assay

Table . The equilibrium dissociation constants ( $K_D$  values) measured by SPR and half-maximal effective concentration ( $EC_{50}$  values) of WE and GW7647 to PPAR $\alpha$  measured by TR-FRET assay.

PPAR $\alpha$	WE	GW7647
$K_D$ values (SPR)	120 $\mu$ M	96.4 nM
$EC_{50}$ values (TR-FRET assay)	83.4 $\mu$ M	18.6 nM

(나) 다이펩타이드 WR(Tryptophan-Arginine)의 효능 평가

① WR의 PPAR $\alpha$  활성 효능 평가

㉞ 실험방법

WR의 PPAR $\alpha$  활성 효능평가를 위해 WR을 세포에 4 가지 농도(50, 100, 500, 1000  $\mu$ M)로 처리 후 PCR을 통해 분석하였다. 양성대조군으로는 PPAR $\alpha$ 의 agonist로 개발된 GW7647을 사용하여 WR과 효능을 비교분석하였다.

직접적으로 PPAR $\alpha$ -ligand binding domain과 WR의 결합효능을 확인하기 위해 동일하게

Biacore 2000 기기(GE healthcare)를 이용하여 SPR실험을 하였다.

WR의 PPAR $\alpha$  리간드 효능 분석을 위한 TR-FRET 실험을 동일하게 수행하였다.

㉔ 실험결과

WR의 PPAR $\alpha$  활성 효능평가 결과, 음성대조군과 비교하였을 때 고농도(1000  $\mu$ M)로 WR 처리하였을 때 유의성 있게 PPAR $\alpha$  활성이 증가하였다 (Fig. 58).

SPR 실험을 분석한 결과, 양성대조군인 GW7647은 100  $\mu$ M~25  $\mu$ M, WR은 10 mM~2.5 mM 범위에서 PPAR $\alpha$ -ligand binding domain과 결합하는 것으로 나타났다. K<sub>D</sub>값은 GW7647이 약 96.4 nM, WR이 약 604  $\mu$ M로 나타났다. 이는 두 시험물질 모두 PPAR $\alpha$ -LBD 단백질과 결합가능하나, GW7647의 결합효율이 WR보다 뛰어난을 의미한다.

TR-FRET 실험결과, 양성대조군인 GW7647과 시험물질인 WR 모두 PPAR $\alpha$ 의 agonist로 작용하고 있는 것으로 나타났다. 그러나 활성효능을 갖는 최고농도의 50%에 해당하는 EC<sub>50</sub>값이 GW7647은 5.9 nM, WR은 437  $\mu$ M로 계산되어, SPR실험결과와 마찬가지로, PPAR $\alpha$  agonist로 개발된 합성 GW7647에 비하여 WR의 효과가 낮은 것으로 나타났다.

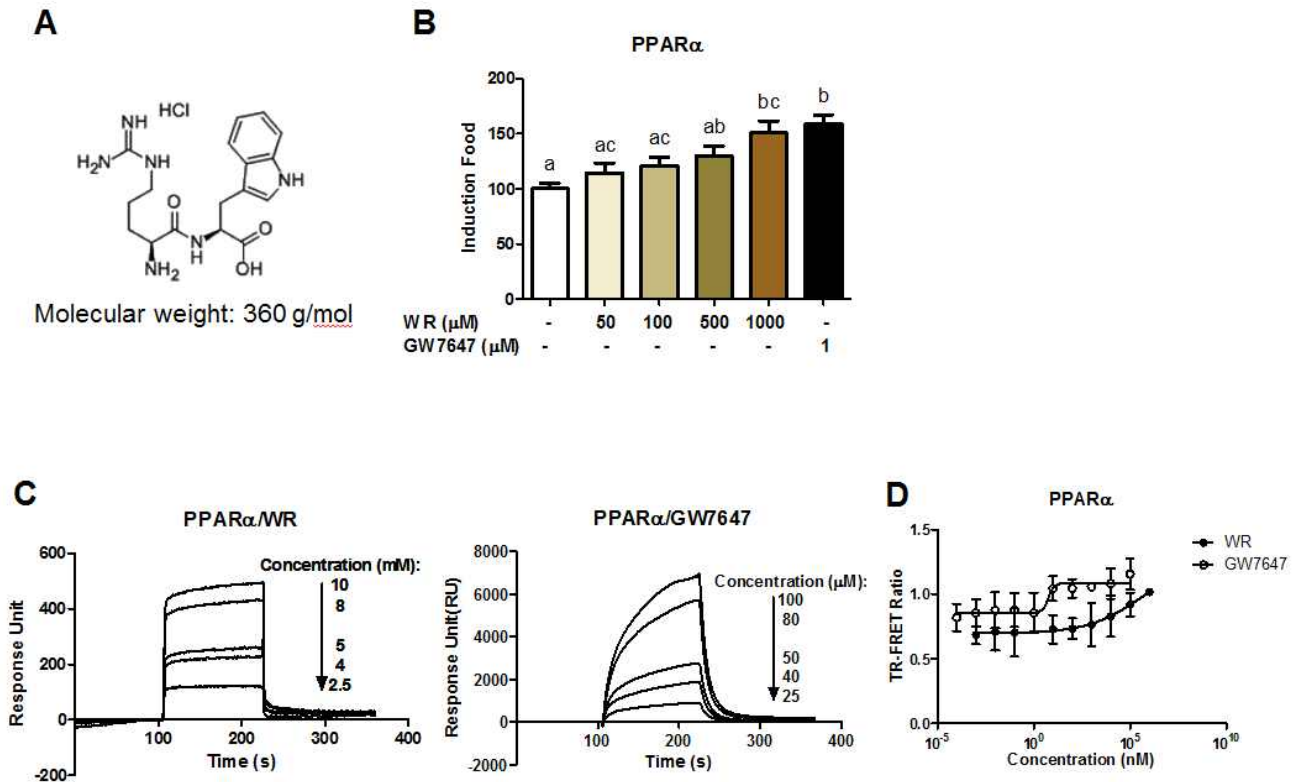


Fig. 58. WR의 PPAR $\alpha$  활성 효능 검증

A) WE structure, B) Reportergene assay, C) SPR, D) TR-FRET

Data are presented as mean $\pm$ SEM. A value of P<0.05 was considered to be statistically significant by one-way ANOVA.

**Table 74. The equilibrium dissociation constants( $K_D$ s) measured by SPR and half-maximal effective concentration( $EC_{50}$ ) of WR and GW7647 to PPAR $\alpha$  measured by TR-FRET assay**

Table . The equilibrium dissociation constants ( $K_D$ s) measured by SPR and half-maximal effective concentration ( $EC_{50}$ ) of WR and GW7647 to PPAR $\alpha$  measured by TR-FRET assay.

PPAR $\alpha$	WR	GW7647
$K_D$ (SPR)	604 $\mu$ M	96.4 nM
$EC_{50}$ (TR-FRET assay)	437 $\mu$ M	5.9 nM

**< 논문내용요약 >**

- 주요 다이펩타이드 분석결과, Tryptophan-Glutamic acid(WE), Tryptophan-Arginine(WR) 의 경우 PPAR $\alpha$ 활성 효능이 뛰어난 것으로 나타났음. PPAR $\alpha$ 는 주로 지방산대사에 관여하는 것으로 알려져 있으나 포도당 대사에 관여하는 효소(PEPCK, glyceol kinase 등)의 발현 또한 직/간접적으로 조절하는 것으로 연구되어오고 있음. PPAR $\alpha$ 의 agonist인 fenofibrate를 처리한 경우 인슐린 민감도가 개선되는 연구결과도 이미 발표된 바가 있으므로 PPAR $\alpha$  활성효능을 보인 2종의 다이펩타이드 WE, WR 역시 당 대사 조절에 긍정적 영향을 미칠 것으로 예상됨. (J Endocrinol August 1, 2002 174 321-329)

**다. 결론**

분자량 1000이하인 현미발효물 중 분자량 500의 현미발효물은 세포 내 콜레스테롤 중성지방을 감소시켰다.

현미발효물을 3가지 종류로 나누어 10일 동안 마우스에 경구투여 한 결과, 다당류 식이섭유 형태의 현미발효물의 경우 체중을 감소시키는 효과를 가졌다. 또한 OGTT 및 ITT를 통해 현미발효물의 당 대사 개선 효능을 평가한 결과 역시 다당류 식이섭유 형태의 현미발효물이 당 대사 개선에 뛰어난 효능을 가졌다.

현미발효물을 경구투여 한 마우스의 간 조직 유전자 발현을 분석한 결과 포도당 신생합성 및 염증과 관련한 유전자 발현을 저해하여 인슐린 저항성을 완화하는 것으로 생각된다.

다이펩타이드 WE 및 WR 모두 지질대사를 조절하는 핵수용체 PPAR $\alpha$ 에 결합하여 활성화한다. 현미발효물의 대사효능 중 최소 일부는 이러한 다이펩타이드의 효능일 가능성이 있다.

**3. 현미발효물로부터 분리한 생리활성 분획물의 지질대사 조절 효능 평가**

**가. 연구내용**

배양세포계 및 동물실험을 수행하여 현미발효물의 지질 대사 개선 효능을 평가하였다.

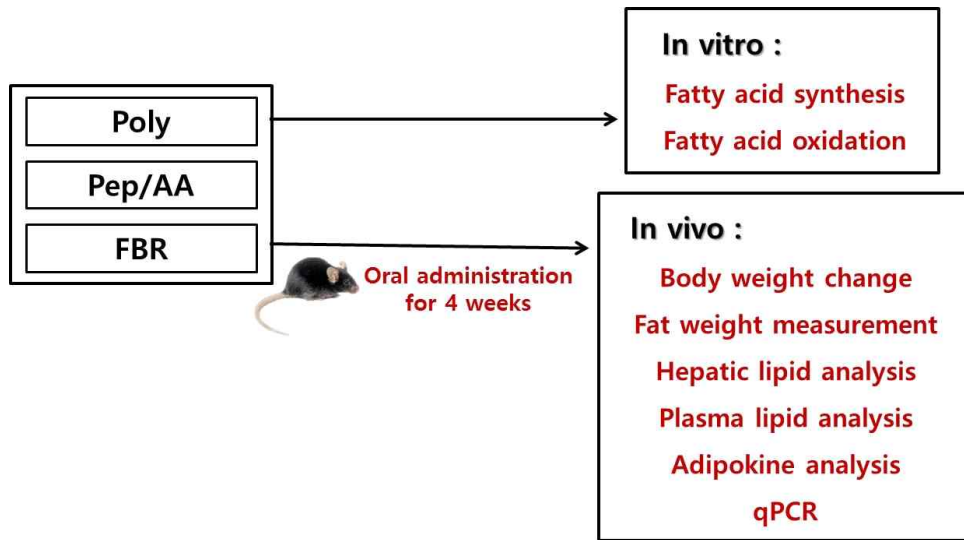


Fig. 59. 현미발효물의 지질 대사 개선 효능 실험 계획

나. 배양세포계에서 현미발효 분획물의 지질대사 조절 효능 평가

(1) 지방산 산화 및 합성률 측정

① 실험방법

본 실험을 위해, 인간 간암세포주인 HepG2 세포를 seeding하고 24시간 후 지질을 축적시킨 뒤, 다당류 식이섬유(FBRF), 분자량이 1000이하인 현미발효물(FBRP), 현미발효물(FBR)를 처리하여 방사성 동위원소를 이용한 지방산 산화 및 합성을 분석하였다.

지방산 산화의 경우 (1-<sup>14</sup>C)palmitate를 축적시키고 한 시간 동안 배양 후 배지를 모아 CO<sub>2</sub>를 NaOH와 HCl을 이용하여 추출하여 <sup>14</sup>CO<sub>2</sub>를 액체섬광계수기로 측정하였다.

지방산 합성의 경우 지질을 축적하고 (1-<sup>14</sup>C)aceticacid를 첨가하여 한 시간 동안 배양 후 지방산을 추출하고 <sup>14</sup>C를 액체섬광계수기로 측정하였다.

② 실험결과

지방산 산화는 음성대조군에 비해 FBRF군은 19.5%, FBRP군은 43.1%(P<0.05), FBR군은 41.1%(P<0.01) 증가하였으나 FBRF군은 통계적인 유의성이 없었다 (Fig. 60).

반면 지방산 합성은 음성대조군에 비해 FBRF군은 28.2%, FBRP군은 25.5%, FBR군은 11.1% 감소하였으나 통계적인 유의성이 없었다.

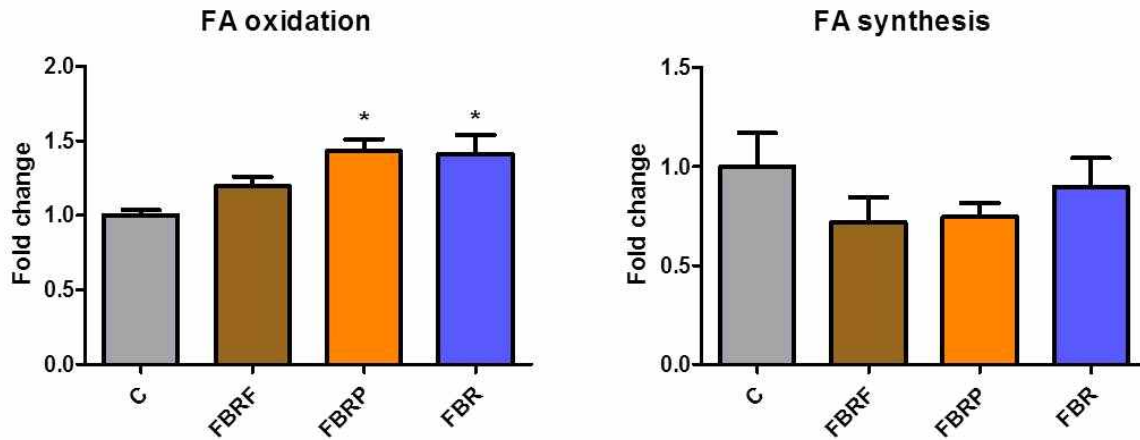


Fig. 60. 현미발효물을 처리한 HepG2 세포에서의 지방산 산화 및 합성률

C: control group(D.W), **FBRF**: fermented brown rice fiber(500 mg/kg body weight), **FBRP**: fermented brown rice peptide and amino acid with molecular weight less than 1000 g/mol(500 mg/kg body weight), **FBR**: fermented brown rice(500 mg/kg body weight)

Data are presented as mean±SEM. A value of P<0.05 was considered to be statistically significant by one-way ANOVA.

다. 마우스에서 현미발효 분획물의 지질 및 당대사 조절 효능 평가

현미발효물의 in vivo 효능 평가를 위해 현미발효물을 다당류 식이섬유(FBRF)군, 분자량이 1000이하인 펩타이드/아미노산(FBRP)군, 현미발효(FBR)군, 총 세 가지 군으로 나누었으며, 실험을 위해 각 시료는 동결건조하고 각각 500 mg/kg body weight의 농도로 D.W에 녹여 시료를 만들었다. 각 시료는 고지방사료(HFD)를 섭취시킨 C57BL/6/Bkl 마우스에 4주 동안 200 uL씩 경구 투여하였다. C57BL/6/Bkl 마우스는 비만, 당뇨 및 동맥경화에 감수성이 높은 종으로 알려져 있다. 음성대조군(C)은 200 uL의 D.W를 경구 투여하였다.

#### (1) 체중측정

4주 동안 마우스가 섭취한 먹이의 양과 마우스의 무게를 저울을 이용하여 측정하였다 (Fig. 61).

실험결과, 4주 동안 마우스의 먹이 섭취량은 크게 차이가 나지 않았다. 몸무게 변화를 분석한 결과 현미발효물을 다당류 식이섬유(FBF), 펩타이드/아미노산(FBRP), 현미발효(FBR) 형태로 섭취한 마우스의 경우 음성대조군(C)에 비해 유의적으로 몸무게가 감소하였다.



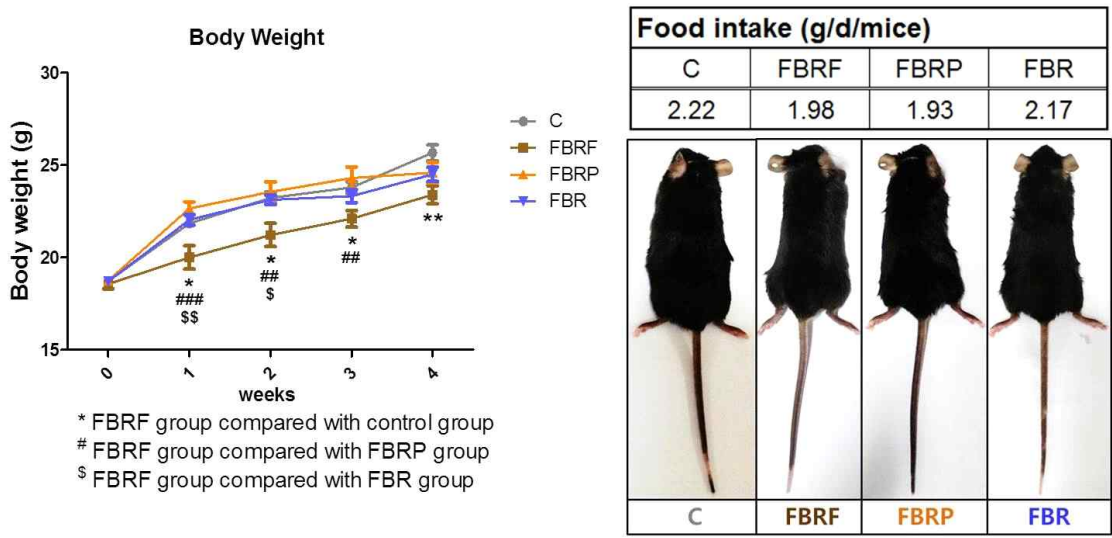


Fig. 61. 4주 동안 마우스의 먹이 섭취량과 몸무게 변화

C: control group(D.W), **FBRF**: fermented brown rice fiber(500 mg/kg body weight), **FBRP**: fermented brown rice peptide and amino acid with molecular weight less than 1000 g/mol(500 mg/kg body weight), **FBR**: fermented brown rice(500 mg/kg body weight)

Data are presented as mean±SEM. A value of P<0.05 was considered to be statistically significant by one-way ANOVA.

## (2) 간 및 지방 조직 무게 측정

4주 동안 현미발효물을 경구 투여한 마우스를 해부하여 간, 복부지방, 내장지방, 콩팥지방을 적출하여 무게를 저울을 이용하여 측정하였다.

실험결과, 간의 무게의 경우 음성대조군과 현미 발효 투여군 간의 유의적인 차이는 없었다. 반면 복부지방의 경우 FBRF군은 46.2%(P<0.001), FBRP군은 19.7%, FBR군은 38.49%(P<0.01) 음성대조군에 비해 유의성 있게 감소하였지만 FBRP군은 통계적 유의성은 없었다. 내장지방의 경우 FBRF군은 32.8%, FBRP군은 9.7%, FBR군은 18% 음성대조군에 비해 감소하였지만 모두 통계적 유의성은 없었다. 또한 콩팥지방은 FBRF군이 60%(P<0.01), FBRP군이 22.8%, FBR군이 29% 음성대조군에 비해 감소하였지만 FBRP와 FBR군은 통계적 유의성은 없었다. 총 지방의 무게를 합하여 비교했을 때 FBRF군은 45.9%(P<0.001), FBRP군은 17.8%, FBR군은 31%(P<0.01) 음성대조군에 비해 감소하였지만 FBRP군은 통계적 유의성은 없었다 (Fig. 62).

이를 통해 현미발효물이 고지방 식이 섭취에 의한 간 조직 무게에는 영향을 주지 않았으나 간 조직 지방 축적 저해 효과가 있는 것이 확인되었다. 특히 FBRF은 다른 현미발효물군에 비해 지방 축적을 감소시키는 효능이 뛰어난 것으로 사료된다.



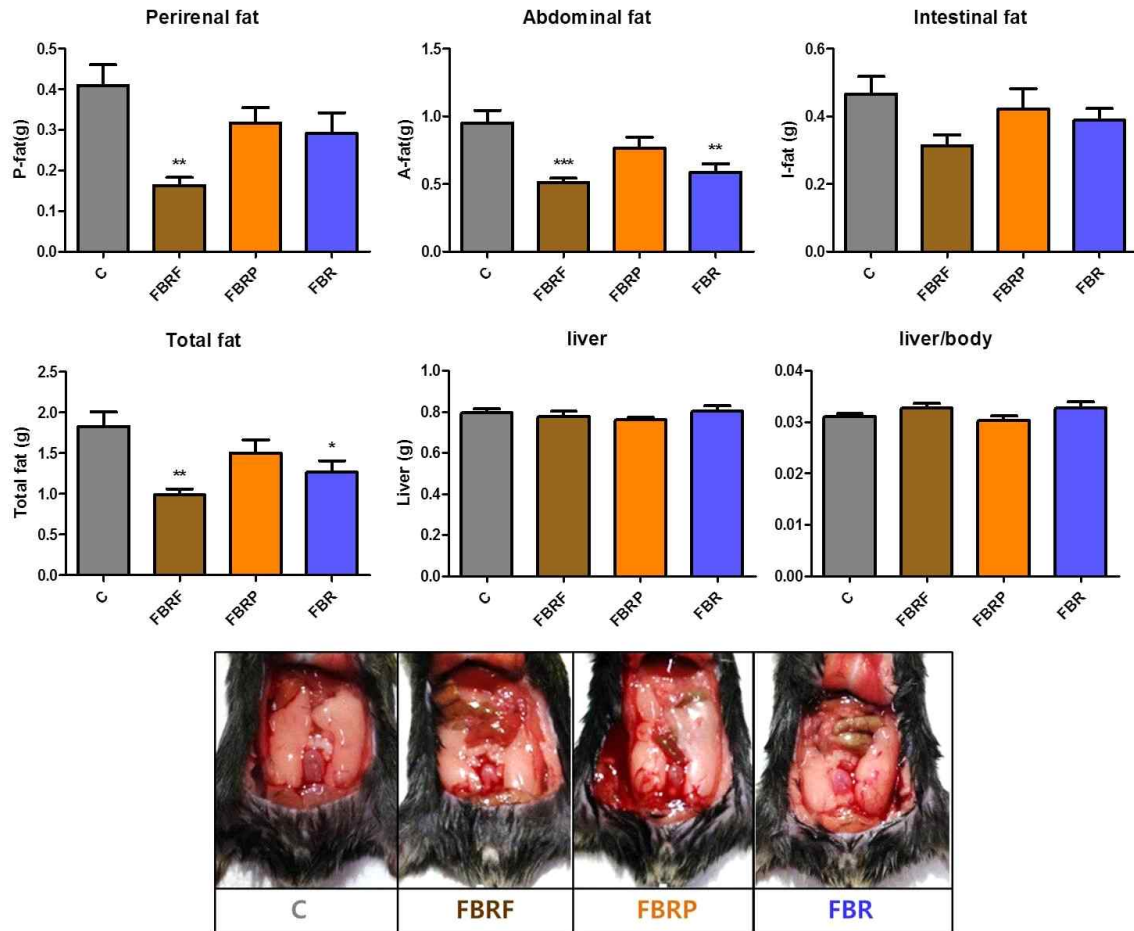


Fig. 62. 4주 동안 현미발효물 투여한 마우스 군의 간 및 지방 무게

C: control group(D.W), **FBRF**: fermented brown rice fiber(500 mg/kg body weight), **FBRP**: fermented brown rice peptide and amino acid with molecular weight less than 1000 g/mol(500 mg/kg body weight), **FBR**: fermented brown rice(500 mg/kg body weight)

Data are presented as mean±SEM. A value of P<0.05 was considered to be statistically significant by one-way ANOVA.

### (3) 간 및 지방 세포 관찰

4주 동안 현미발효물을 경구 투여한 마우스를 해부하여 간과 지방조직을 적출하여 슬라이드를 제작 후 H&E 염색을 하여 간 조직에 있는 축적된 지질과 지방세포의 면적을 형광 도립 현미경 Axio Observer D1으로 400배율로 측정하였다.

간 조직에 chloroform과 methanol을 2:1의 비율로 넣어 균질화하여 추출한 지질을 80% ethanol에 녹인 후 혈액자동화분석기기인 COBAS C111을 사용하여 중성지방 및 콜레스테롤을 측정하였다.

실험결과, 간 조직 H&E 염색 결과 현미발효물군은 간 조직 지질 축적이 현저히 감소하였다. 또한 지방세포의 경우, 지방세포 크기가 음성대조군 대비 현미발효물(FBRF, FBRP, FBR)군에서 크게 감소하였으며 측정된 지방세포 면적이 대조군에 비해 FBRF군은 56.3%(P<0.001), FBRP군은 55.3%(P<0.001), FBR군은 56.7%(P<0,001) 로 감소하였다 (Fig. 63).

간 조직의 지질 농도 측정 결과 중성지방의 농도는 음성대조군에 비해 FBRF군은 43.5%( $P<0.001$ ), FBRP군은 34.8%( $P<0.01$ ), FBR군은 33.7%( $P<0.01$ ) 통계적으로 유의성 있게 낮았고, 콜레스테롤의 농도는 음성대조군에 비해 FBRF군은 36.2% ( $P<0.05$ ) 낮았지만 FBRP군과 FBR군은 통계적으로 유의한 차이를 보이지 않았다.

이를 통해 현미발효물을 섭취하면 간 조직 및 지방조직에 지질이 축적되는 것을 억제해주는 효과가 있는 것으로 사료된다. 고지방 섭취에 의해 지방세포가 비대해지고 간에 지질이 축적되는 것을 저해한다고 사료되어 이는 지방간 예방 효과가 있을 것으로 기대된다.

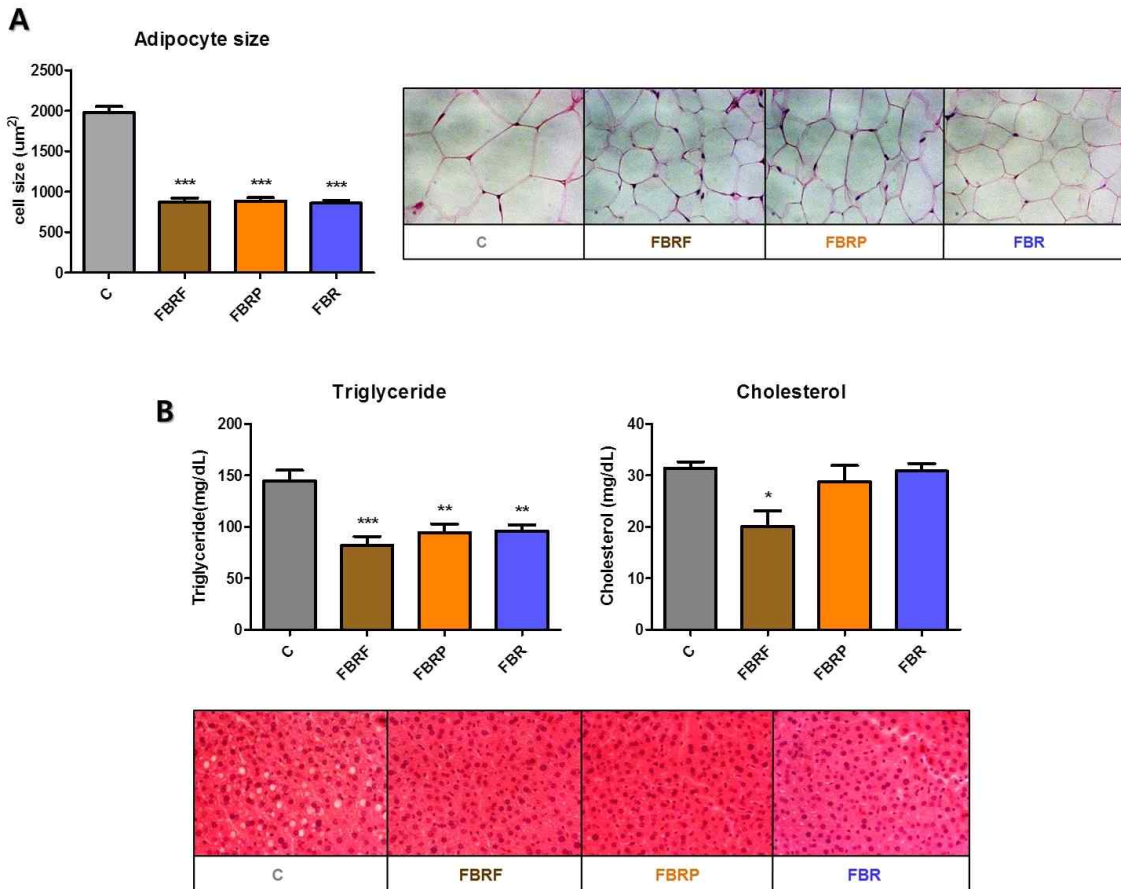


Fig. 63. 4주 동안 현미발효물 투여한 마우스 군의 간 및 지방 조직

A: 지방 조직 H&E 염색 사진 및 지방 세포 크기

B: 간 조직 H&E 염색 사진 및 간 내 지질 농도

C: control group(D.W), **FBRF**: fermented brown rice fiber(500 mg/kg body weight), **FBRP**: fermented brown rice peptide and amino acid with molecular weight less than 1000 g/mol(500 mg/kg body weight), **FBR**: fermented brown rice(500 mg/kg body weight)

Data are presented as mean±SEM. A value of  $P<0.05$  was considered to be statistically significant by one-way ANOVA.

#### (4) 혈액분석

4주 동안 현미발효물을 경구 투여한 후 마우스를 해부하여 심장채혈한 후 ,혈액 내 콜레스테

콜, 중성지방, LDL, HDL 및 혈당의 농도를 혈액자동화 분석기기인 COBAS C11기기를 사용하여 분석하였다.

분석 결과, 현미발효물 경구 투여 전에는 콜레스테롤, 중성지방, LDL, HDL 및 혈당 농도가 군 간 차이가 없었으나, 4주 투여 후에는 군 간 차이가 나타남. 혈중 콜레스테롤 농도는 음성대조군 대비 FBRF군은 30.3%( $P<0.001$ ), FBRP군은 24.7%( $P<0.01$ ), FBR군은 16.5%( $P<0.05$ ) 통계적으로 유의성 있게 감소하였다.

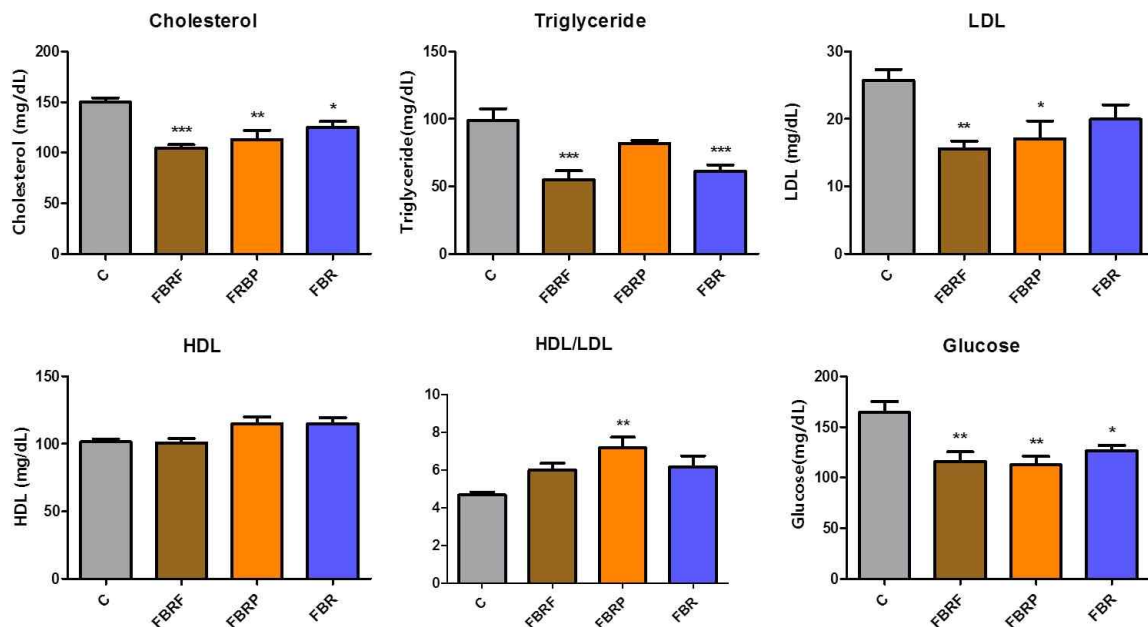
혈중 중성지방 농도는 음성대조군 대비 FBRF군은 44.1%( $P<0.001$ ), FBRP군은 16.9%, FBR군은 38%( $P<0.001$ ) 낮았지만 FBRP군은 통계적으로 유의성이 없었다.

LDL 농도는 음성대조군 대비 FBRF군은 39.3%( $P<0.01$ ), FBRP군은 33.6%( $P<0.05$ ), FBR군은 22.3% 낮았지만 FBR군은 통계적으로 유의성이 없었다. 반면 HDL 농도는 그룹 간 유의적인 차이가 없었지만, LDL에 대한 HDL의 비율은 FBRP군이 대조군에 비해 유의적으로 증가하였다( $P<0.01$ , Fig. 64).

고지방 식이 섭취 마우스에서 나타나는 혈중 포도당 농도 증가현상은 인슐린 민감도 감소로 인한 대사증후군 증상이며, 현미발효물을 투여한 경우 공복 혈당농도가 FBRF군은 36.2%( $P<0.01$ ), FBRP군은 31.5%( $P<0.01$ ), FBR군은 23.1%( $P<0.05$ ) 음성대조군에 비해 유의적으로 감소하였다.

현미발효물의 투여는 혈중 콜레스테롤, 중성지방, LDL 농도를 감소시키는 효능이 있는 것이 확인되었고 특히 FBRF는 다른 현미발효물에 비해 혈중 지질 농도 감소 효능이 뛰어난 것으로 사료된다.

내당능 검사와 인슐린 부하 검사를 통해 현미발효물이 인슐린 저항성을 개선하는 효능이 있는 것을 확인한 것과 같이 4주 간 발효 현미 투여가 혈당의 농도를 감소시켜 당 대사를 개선시키는 효능이 있는 것을 확인하였다. 이는 콜레스테롤 대사를 조절하는 PPAR $\alpha$  및 LXR $\alpha$ 의 발현과 연관이 있을 것으로 사료된다.



**Fig. 64. 4주 동안 현미발효물 투여한 마우스 혈액 분석**

**C:** control group (D.W), **FBRF:** fermented brown rice fiber(500 mg/kg body weight), **FBRP:** fermented brown rice peptide and amino acid with molecular weight less than 1000 g/mol(500 mg/kg body weight), **FBR:** fermented brown rice(500 mg/kg body weight)

Data are presented as mean±SEM. A value of P<0.05 was considered to be statistically significant by one-way ANOVA.

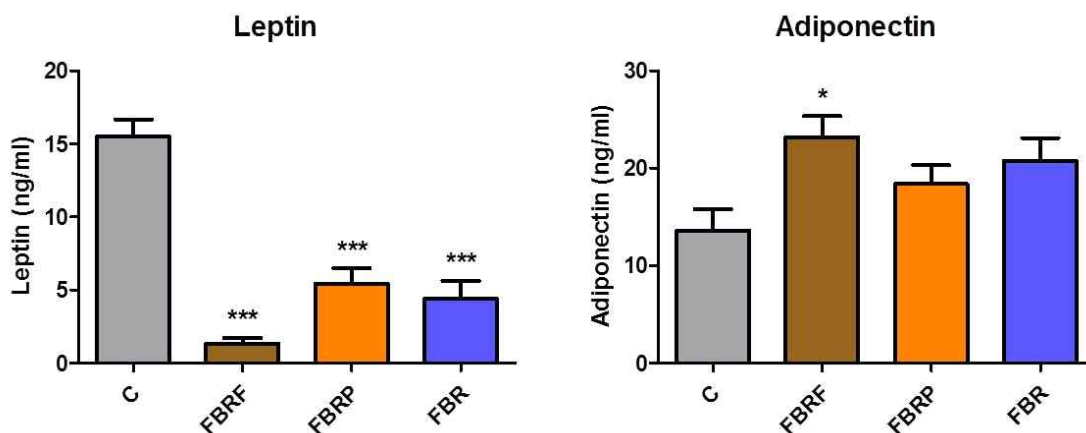
(5) 혈중 아디포카인(Adipokine:지방세포분비호르몬) 분석

4주 동안 현미발효물을 경구 투여한 후 마우스의 혈액을 채취하여 원심 분리 후 혈장 내 렙틴과 아디포넥틴의 양을 분석하였다. 렙틴의 경우 Millipore 사의 Mouse Leptin 96-well Plate assay kit를 사용하였고, 아디포넥틴의 경우 abcam 사의 Adiponectin Mouse ELISA kit를 사용하였다.

혈장 내 렙틴의 농도는 FBRF군은 91.3%(P<0.001), FBRP군은 65%(P<0.001), FBR군은 717%(P<0.001) 음성대조군에 비해 통계적으로 유의성 있게 감소하였다. 반면 혈장 내 아디포넥틴의 농도는 FBRF군은 70.1%(P<0.05), FBRP군은 34.9%, FBR군은 52.5% 음성대조군에 비해 증가하였지만 FBRP군과 FBR군은 통계적 유의성이 없었다 (Fig. 65).

혈액 내 렙틴 농도가 대조군에서 더 높은 것은 고지방식이에 의해 지방 세포가 비대해지면서 음성피드백의 기작으로 먹이 섭취를 억제하기 위해 많은 양의 렙틴을 분비시킨 것으로 사료된다.

혈액 내 아디포넥틴의 경우 대조군에 비해 현미발효물 투여군이 더 많이 분비되어 지방산 산화와 당 대사를 활성화 시키면서 혈중 지질농도를 감소시키고 체내 지방이 축적되는 것을 저해하는 데 기여한 것으로 사료된다.



**Fig. 65. 4주 동안 현미발효물 투여한 마우스 혈액 내 아디포카인 분석**

**C:** control group(D.W), **FBRF:** fermented brown rice fiber(500 mg/kg body weight), **FBRP:** fermented brown rice peptide and amino acid with molecular weight less than 1000 g/mol(500 mg/kg body weight), **FBR:** fermented brown rice(500 mg/kg body weight)

Data are presented as mean±SEM. A value of P<0.05 was considered to be statistically significant by one-way ANOVA.

## (6) 마우스 간 조직 유전자 발현 확인

### ① 실험방법

4주 동안 현미발효물을 경구 투여한 마우스에서 적출한 간을 RNA isopulus를 넣고 균질화하여 chloroform과 isopropanol을 이용하여 RNA를 추출하였다. 추출한 RNA를 이용하여 cDNA를 합성한 후, 합성된 cDNA 1  $\mu$ L, SYBR Green PCR Master Mix 10  $\mu$ L, 농도가 10 pmol인 순방향 프라이머(forward primer)와 역방향 프라이머(reverse primer) 각각 1  $\mu$ L, 멸균된 증류수 8  $\mu$ L를 섞고 qRT-PCR(quantitative real-time PCR)을 실시하였다. 각 유전자의 발현은 GAPDH(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase)를 기준 유전자(reference gene)로 표준화하여 수치화하였다.

### ② 실험결과

PPAR $\alpha$ 는 간에서 지질의 항상성을 조절하는 주요 전사 인자로 지방산 산화와 관련한 신호 전달 기작에 관여한다. 현미발효물 투여를 한 마우스의 간에서 PPAR $\alpha$ 유전자 발현이 유의성 있게 증가한다 (Fig. 66).

PPAR $\alpha$ 의 하위 유전자이자 지방산 산화에 관여하는 유전자의 발현을 분석한 결과, fattyacid-binding protein 1(FABP1), carnitine palmitolytransferase-1a(CPT1a), 그리고 lipoprotein lipase(LPL)의 발현은 음성대조군에 비해 FBRF군의 경우 통계적으로 유의성 있게 증가하였다.

배양세포계 실험에서 지방산 합성은 그룹 간 유의적인 차이가 없었던 반면, 현미발효물을 투여한 마우스의 간에서 지방산 합성과 관련한 유전자들의 발현은 음성대조군에 비해 유의적인 차이가 있었다.

지질대사 조절에 관여하는 핵수용체 LXR $\alpha$ 의 발현은 군 간 차이가 없으나 그 몇몇 하위 유전자의 발현에는 효과가 있음을 확인하였다. 지방산 합성에 있어 중요한 기질인 manlonyl-CoA를 제공하는 역할을 하는 Acetyl-CoA carboxylase-1(ACC1)와 지방산 합성 단백질 fatty acid synthase(FAS)의 발현은 음성대조군에 비해 FBRF군, FBRP군, FBR군 모두 통계적으로 유의성 있게 감소하였다. 나아가 sterol regulatory element binding protein(SREBP)의 번역 후 가공을 지연시키는 역할을 insulin-induced gene 2a(Insig-2)의 발현은 음성대조군에 비해 FBRF군의 경우 통계적으로 유의성 있게 감소하였다. 또한 스테롤 합성과 관련한 효소의 발현을 증가시키는 SREPP1c의 발현은 음성대조군에 비해 FBRF군과 FBR군의 경우 통계적으로 유의성 있게 감소하였다.

콜레스테롤 대사와 관련하여 LXR $\alpha$ 의 하위유전자이며 세포막에서 LDL 콜레스테롤과 결합하여 세포 내로 유입시키는 LDL-receptor(LDLR)와 담즙산 생성을 증가시키고 간세포 내 콜레스테롤을 감소하는 역할을 하는 CYP7A1의 발현은 음성대조군에 비해 FBRF군의 경우 통계적으로 유의성 있게 증가하였다.

지질대사와 관련한 유전자 발현의 분석을 통해, 마우스에 현미발효물을 투여할 경우 간에서 지방산 산화 및 콜레스테롤 대사와 관련된 유전자 발현이 증가하는 반면 지방산 합성과 관련된 유전자 발현이 감소하는 것을 확인하였다. 이러한 유전자 발현의 변화는 현미발효물의 투여가 체내 지방 축적 및 혈중 지질 농도를 감소 효능에 기여하는 것으로 사료된다.

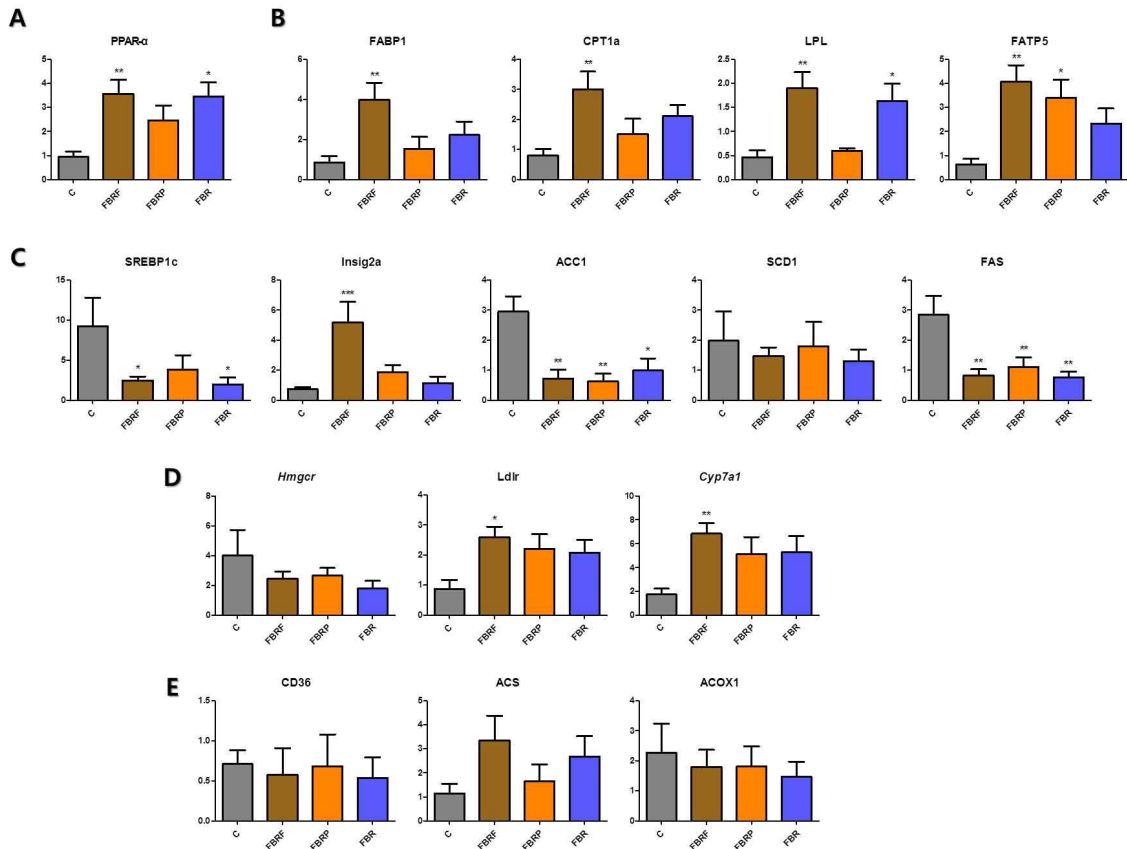


Fig. 66. 4주 동안 현미발효물 투여한 마우스 간의 지질대사 관련 유전자 발현

A: PPAR $\alpha$  발현

B: 지방산 산화 관련 유전자 발현

C: 지방산 합성 관련 유전자 발현

D, E: 콜레스테롤 대사 관련 유전자 발현

C: control group(D.W), **FBRF**: fermented brown rice fiber(500 mg/kg body weight), **FBRP**: fermented brown rice peptide and amino acid with molecular weight less than 1000 g/mol(500 mg/kg body weight), **FBR**: fermented brown rice(500 mg/kg body weight)

Data are presented as mean $\pm$ SEM. A value of P<0.05 was considered to be statistically significant by one-way ANOVA.

#### 4. 최종 결론

배양세계포계에서 현미발효물은 지방산 산화를 증가시킨다.

현미발효물을 마우스에 경구투여 한 결과, 현미발효물은 마우스의 체중 및 지방 축적을 감소시키고 콜레스테롤 및 지질 대사에 관여하는 LXR $\alpha$ 와 관련하여 간 조직 및 혈액 내 중성지방 및 콜레스테롤 등을 감소시켜 지질 프로파일을 개선시켰고 이는 유전자 발현 분석을 통해 확인하였다. 또한 현미발효물의 투여는 실험동물의 혈중 렙틴 농도를 감소시킨 반면, 아디포넥틴 농도를 증가시킨다.

현미발효물을 4주 동안 경구투여 한 마우스의 간 조직 유전자 발현을 분석한 결과, 지질 대사 조절 유전자인 PPAR $\alpha$  및 지방산 산화와 및 콜레스테롤 대사와 관련한 하위 유전자 발



현을 증가시키는 반면 지방산 합성 관련 유전자의 발현을 감소시킨다.

동물 실험에서 현미발효물의 PPAR $\alpha$  및 LXR $\alpha$  발현 활성 효능은 단일화합물이 아닌 발효를 시킨 식품의 혼합물로 다양한 기능성분이 들어있기 때문에 배양 세포실험과는 차이가 있는 것으로 생각된다.

종합하면, 현미발효물은 PPAR $\alpha$ 의 발현을 조절하여 지방산 산화 및 합성, 그리고 콜레스테롤 대사를 조절하고, LXR $\alpha$ 의 발현을 조절하여 당 대사와 콜레스테롤 대사를 조절한다.

따라서 현미발효물은 지질 및 당 대사를 조절하여 대사증후군에 의한 지방축적을 저해하고 인슐린 저항성 및 혈중 지질 프로파일을 개선시키는 효능을 기대할 수 있다.

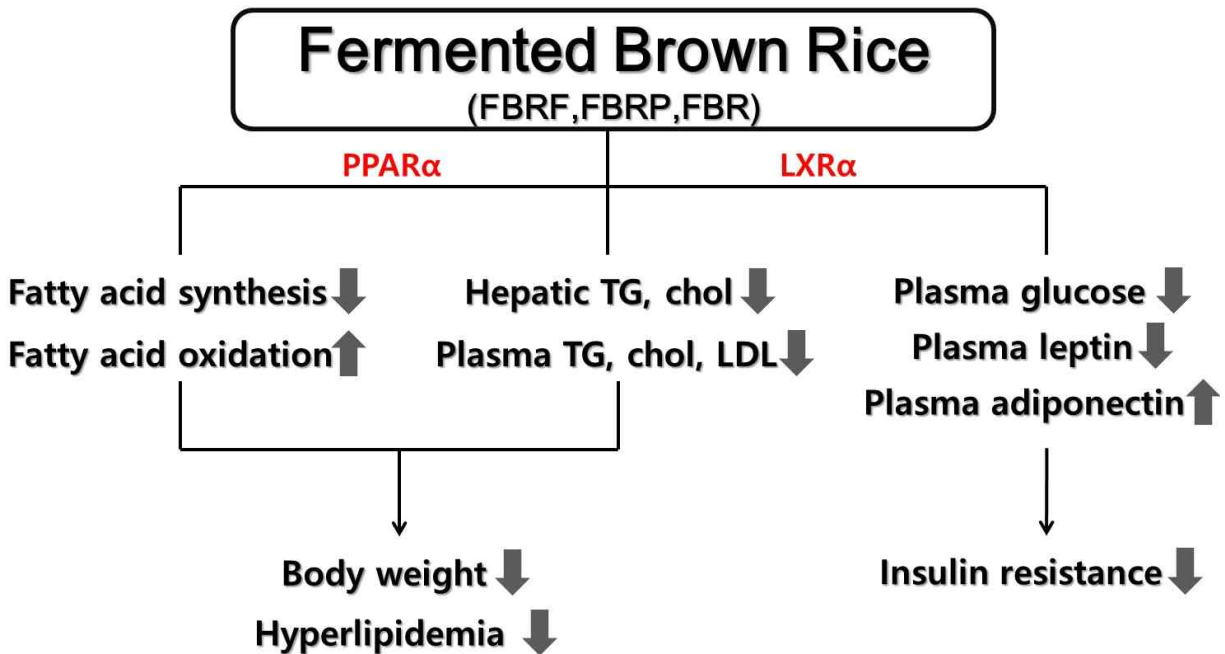


Fig. 67. 최종 결론

## 4절 현미발효물로부터 장관면역계 활성화 다당체의 분리 및 특성 평가

### 1. 연구방법

#### 가. 현미발효물 유래 다당의 분리·정제

##### (1) 현미발효물로부터 조다당의 분리

샘표식품(주)에서 공급받은 현미발효물은 1 L당 3배 부피(v/v%)의 에탄올을 가하고 하루 동안 교반하면서 다당을 침전시켰다. 이후 원심분리(6000 rpm, 30 min, 4°C)를 통해 상등액과 침전물을 분리시킨 다음 상등액은 흡입기를 통해 제거하고 침전물만을 회수하였다. 회수된 침전물은 1 L의 증류수를 가해 재용해시킨 후 재차 4배 부피의 에탄올을 가하고 하루 동안 교반하면서 다당을 침전시켰다. 이 때 침전된 다당을 원심분리기(6000 rpm, 30 min, 4°C)를 이용하여 분리 및 회수하고, 이를 소량의 물에 용해시킨 후 dialysis tubing(MWCO 12000~14000, Sigma)을 이용하여 2~3일간 투석을 행하여 저분자 물질을 제거하였다. 이를 농축한 후, 동결 건조하여 조다당 FBR-0를 분리하였다.

##### (2) $\beta$ -Amylase 및 $\alpha$ -glucoamylase에 의한 가수분해

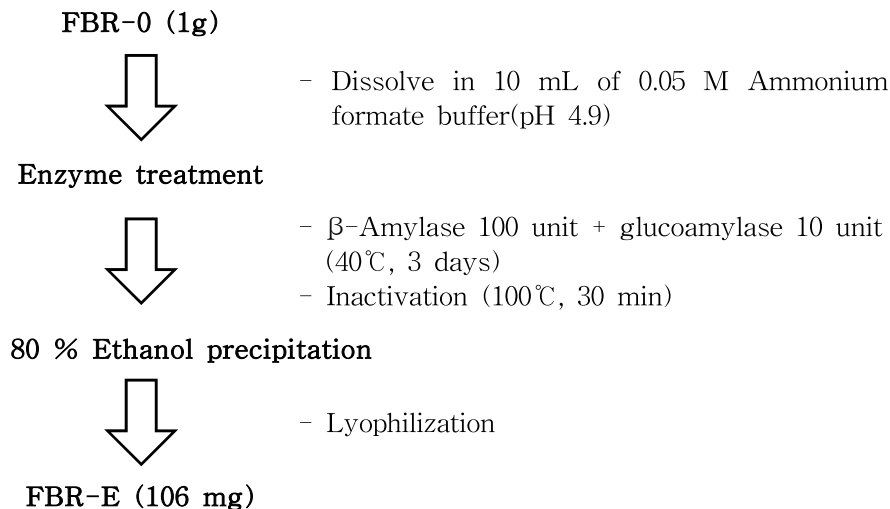


Fig. 68. Procedure of enzyme treatment for removing of limit dextrin in FBR-0.

현미발효물에서 분리한 조다당 FBR-0은 구성당 분석 결과 높은 비율의 glucose가 구성되어 있음이 확인되었고, 이는 많은 양의 전분이 포함되어 있는 것으로 사료되었다. 따라서 FBR-0를 소량의 50 mM ammonium formate buffer (pH 4.9)에 녹인 후, 100 U의  $\beta$ -amylase(Sigma, from barley), 10 U의  $\alpha$ -glucoamylase(Fluka, from *Aspergillus niger*)를 제조사가 제공한 처리조건을 실험실 조건에 맞게 응용하여 사용하였으며, 효소처리 후 실활, 농축, 투석 및 동결건



조를 행하여 현미발효물 유래 효소처리 조다당 FBR-E를 제조하였다(Fig. 68).

(3) 현미발효물 유래 조다당의 정제

(가) Anion exchange chromatography(AEC)

효소처리 조다당 FBR-E는 소량의 증류수에 용해한 후, 증류수로 평형화된 DEAE-Sepharose FF(Cl<sup>-</sup> form, 5.5×30 cm) 음이온 교환수지에 흡착시킨 후, 증류수를 용출하여 비흡착획분을 분리하였으며, 이후 0.05 M~2.0 M NaCl 용액으로 단계적으로 용출시켜 흡착획분을 각각 분리하였다. 음이온 교환수지를 통해 용출된 각각의 획분은 fraction collector(1200 series, EYELA, Tokyo, Japan)를 이용하여 분획하고, 중성당, 산성당 및 단백질 함량을 측정하여 elution pattern을 작성하였다. Peak pattern을 통해 확인된 FBR-E는 1개의 비흡착획분(FBR-1)과 6개의 흡착획분(FBR-2~7)으로 분리되었으며, 각각의 획분들은 농축, 투석 및 동결건조를 통해 현미발효물 유래 효소처리 조다당의 정제획분으로 조제되었다(Fig. 69).

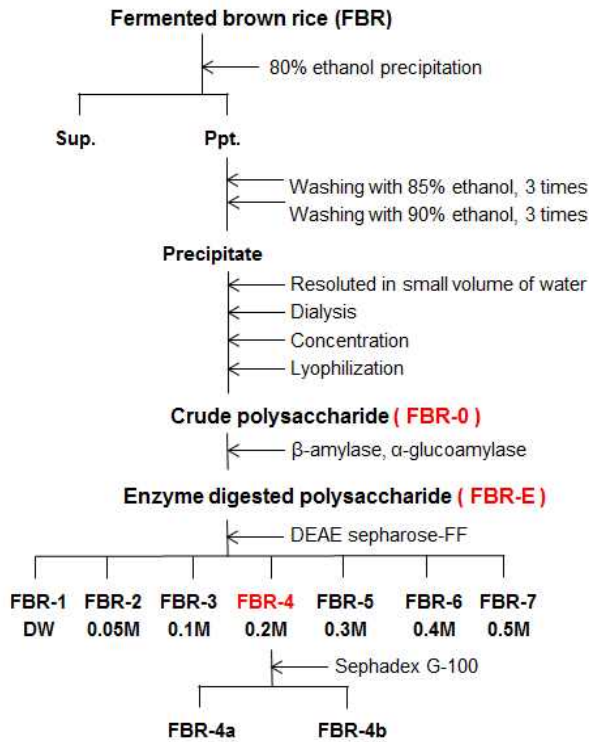


Fig. 69. Isolation and purification scheme for immuno-stimulating polysaccharide from fermented brown rice. The column(5.5×25 cm) was eluted with DIW until sugar was no longer detected and then eluted with stepwise elevated 0.05 M~2.0 M NaCl solution by stepwise gradient.

(나) Gel permeation chromatography (GPC)

Anion exchange chromatography를 이용한 정제과정에서 수율과 면역활성이 우수했던 FBR-4 획분은 한번 더 정제과정을 진행하기로 하였다. 즉, FBR-4 정제획분 0.5 g을 소량의 증류수에 용해한 후 50 mM ammonium formate buffer (pH 5.5)로 평형화된 Sephadex G-100 column(5×100 cm)을 이용, gel permeation chromatography(GPC)를 행하였다. 용출액은 5 mL 씩 120개의 획분으로 분획하였으며, 각각의 획분은 중성당, 산성당 및 단백질 함량 분석실험을 거쳐 분자량이 상이한 2개의 획분 FBR-4a과 FBR-4b를 얻을 수 있었다(Fig. 69).

## 나. 현미발효물 유래 다당의 특성 및 화학적 조성

### (1) 일반 분석 방법

현미발효물 유래 다당의 일반 성분을 분석하기 위해 중성당의 함량은 galactose를 표준물질로 하여 phenol-sulfuric acid법으로, 산성당의 함량은 D-galacturonic acid를 표준물질로 하여 *m*-hydroxybiphenyl법으로, 단백질의 함량은 bovine serum albumin을 표준물질로 하여 Bradford법으로, TBA-positive material의 함량은 2-keto-3-deoxy-D-*manno*-octulosonic acid(KDO)를 표준물질로 하여 thiobarbituric acid법으로 각각 정량 분석하였다.

### (2) 구성당 분석

구성당 분석은 Albersheim 등의 방법을 일부 변형하여 가수분해 후 각 구성당을 alditol acetate로 유도체화하여 GC를 이용하여 분석하였다.

**Table 75. Analytical conditions of gas-liquid chromatography for component sugar analysis**

Apparatus	GC ACME-6100 (Young-Lin Co. Ltd., Korea)
Detector	Flame ionization detector (FID) (Young-Lin Co. Ltd., Korea)
Column	SP-2380 capillary column (Supelco, USA)
Column size	0.25 mm×30 m, 0.2 mm film thickness
Oven temp.	60°C(1 min) → 220°C(12 min) → 250°C(15 min) 30°C/min                      8°C/min
Injector temp.	240°C
Detector temp.	260°C
Carrier gas	N <sub>2</sub> (1.5 mL/min)

즉, 다당 시료를 2 M TFA (trifluoroacetic acid) 중에서 121°C, 1.5시간 반응시켜 가수분해한 후, 1 mL의 1 M NH<sub>4</sub>OH 용액에 용해하여 10 mg의 NaBH<sub>4</sub>로 4시간 환원시켰다. Acetic acid를 적당량 가하여 잔존 NaBH<sub>4</sub>를 제거한 후, methanol을 가하며 반복 건조함으로써 과량으로 가해진 acetic acid를 제거하여 각 구성당에 상당하는 alditol로 전환하였다. 이 후 각각의

alditol은 1 mL의 acetic anhydride를 가하여 121°C에서 30분 동안 반응시켜 alditol acetate로 전환시켰으며 이를 chloroform/H<sub>2</sub>O 2상 용매계로 분리하여 추출하고, 추출물은 건조 후 소량의 acetone에 용해하여 GC 분석용 시료로 사용하였다. Alditol acetate 유도체의 GC분석 조건은 Table 1과 같으며, 각 구성당의 mole%는 각 유도체의 peak면적, 분자량 및 FID에 대한 molecular response factor를 각각 산출하여 계산하였다.

### (3) HPLC에 의한 정제 다당의 분자량 측정

현미발효물에서 정제한 FBR-4a 및 FBR-4b의 분자량 측정을 위해 Superdex<sup>TM</sup> 200 GL (GE Healthcare Bio-Sciences, Piscataway, NJ, USA)을 이용하여 Table 2의 분석조건으로 HPLC (High performance liquid chromatography)를 행하였다. 분자량 측정 시 이용된 표준 물질인 pullulan series (P-200, 100, 50, 20 및 10)를 이용하여 각각의 retention time을 구한 후, 각 분자량에 대한 Kav 값을 산출하여 얻은 표준곡선으로부터 환산하여 분자량을 결정하였다.

**Table 76. Analytical conditions of HPLC for the determination of molecular weight of polysaccharides**

Pump	SP-930D (YOUNG-LIN Co. Ltd., Korea)
Detector	Refractive index (356-LC, Varian, USA)
Column	Superdex <sup>TM</sup> 200 GL (GE Healthcare Bio-Sciences, Piscataway, NJ, USA)
Column size	10 × 306 mm
Column temp.	25°C
Flow rate	0.5 mL/min
Eluent	50 mM ammonium formate buffer (pH 5.5)
Injection vol.	20 µL
Integrator	Autochro data module (Young-Lin Co. Ltd., Korea)

$$K_{av} = \frac{V_e - V_o}{V_t - V_o}$$

V<sub>t</sub> : total volume  
 V<sub>o</sub> : void volume  
 V<sub>e</sub> : elution volume of sample

### (4) β-Glucosyl Yariv reagent를 이용한 arabino-β-3,6-galactan (type-II)의 존재 확인 및 정량

Arabino-β-3,6-galactan의 존재를 확인하기 위한 β-glucosyl Yariv reagent (Biosupplies, Parkville, Australia)와의 반응성 검토는 Holst와 Clarke의 방법에 따라 single radical 젤 확산법으로 측정하였다. 요약하면 β-Glucosyl Yariv reagent 10 mg/mL를 함유한 0.15 M NaCl agarose 평판을 조제하고 직경 2.5 mm의 well을 만들어 농도별로 희석한 표준물질 gum

arabic과 시료 5 mg을 함유한 용액을 well에 각각 주입하였다. 이 평판을 습윤상태에서 25 °C에서 15시간 정치시켜 반응시키고, 생성된 붉은색 침전환을 관찰하여 arabino- $\beta$ -3,6-galactan의 존재 유무를 관찰하였다. 시료와  $\beta$ -glucosyl Yariv reagent와의 반응성은 생성된 침전환의 넓이를 계산하여 상호 비교하였다.

## (5) Methyl화 분석에 의한 구조 및 결합위치 결정

### (가) Methylsulfinyl carbanion의 조제

Methylsulfinyl carbanion은 유기화학에서 염기로 작용하거나, 또는 친핵체(nucleophile)로 작용하여 에테르 합성(R-O-R')을 자극하는 물질로 잘 알려져 있다. 이러한 carbanion은 음전하가 주로 탄소원자에 위치해 있는 유기화합물로 주로 중성 유기분자들로부터 양전하를 띤 원자나 원자단을 제거해서 얻으며, 유기화학에서 다른 물질의 반응을 유도하는 화학적 중간물질로서 주로 사용되는 화합물이다. Methylsulfinyl carbanion을 조제하기 위해 무수 NaH 1.26 g에 무수 DMSO(dimethylsulfoxide) 20 mL을 첨가한 후 질소로 충전하며 90°C oil bath 상에서 약 10~15분간 반응시켰다. 반응액이 옅은 녹색을 띠는 시점을 종말점으로 하여 반응을 종결하고 상온까지 냉각시킨 후 3,000 rpm에서 원심분리하였으며, methylsulfinyl carbanion이 함유된 상등액은 공기의 접촉이 없도록 질소로 치환하여 소량씩 분주한 후 냉동보관 (-70°C)하며 실험에 사용하였다.

### (나) Methylation

다당 시료의 결합위치를 결정하기 위한 Methyl화는 Hakomori 방법을 이용하여 실시하였다. 데시케이터에서 1~2일간 충분히 건조한 각 다당 시료(1 mg)에 1 mL의 무수 DMSO를 가하고 교반하여 완전히 용해시킨 후, 500  $\mu$ L의 methylsulfinyl carbanion (MSCA)를 가하여 4시간 동안 반응시켰다. 이때 다당이 완전히 polyalkoxide로 전환될 수 있도록 필요한 경우 MSCA를 수차례 첨가하였으며, 미반응 MSCA의 잔존 여부는 triphenylmethane으로 확인하였다. Polyalkoxide로 전환된 시료는 과량의  $\text{CH}_3\text{I}$ 를 가하여 methyl화 하였으며, 잔존  $\text{CH}_3\text{I}$ 는  $\text{N}_2$  gas flushing을 통해 제거 후 Sep-pak  $\text{C}_{18}$  cartridge를 이용하여 전환된 methyl화 다당을 회수하였다.

### (다) Methyl화 다당의 가수분해 및 acetyl화

Methyl화된 다당은 2 M TFA 1 mL을 가하여 121°C, 1.5시간 반응시켜 가수분해를 행한 후 건조하였다. 가수분해한 시료는 25%  $\text{NH}_4\text{OH}$ 가 수 drop 첨가된 ethanol에 용해하고 10 mg의  $\text{NaBH}_4$ 를 가하여 4시간 동안 개환 및 환원하였으며, acetic acid를 적당량 가하여 잔존  $\text{NaBH}_4$ 를 제거하고, methanol을 가하며 반복 건조함으로써 과량으로 가해진 acetic acid를 제거하였다. 이 후 1 mL의 acetic anhydride를 가하고, 121°C에서 3시간 동안 반응시켜 partially methylated alditol acetate로 전환하였으며, 이는 2상 용매계(hexane,  $\text{H}_2\text{O}$ )로 분리, 추출하여 acetone에 용해시켜 GC 및 GC-MS로 분석하였다(Fig. 70).

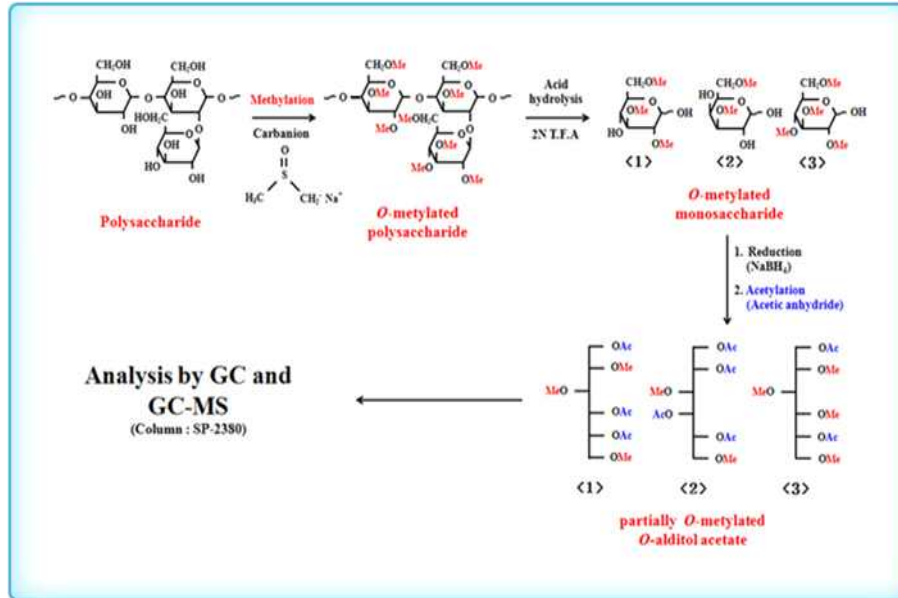


Fig. 70. Scheme of methylation analysis of polysaccharide for the determination of linkage formula.

#### (라) Partially methylated alditol acetate의 GC 및 GC/MS 분석

GC 분석은 SP-2380 capillary column(0.25 mm×30 m, 0.2 μm film thickness)이 장착된 Young-Lin ACME-6100 GC를 사용하여 최적온도 조건 [60℃(1min), 60℃→180℃(30℃/min), 180℃→250℃(1.5℃/min), 250℃(5min)]에서 split injection mode (1:20)로 분석하였으며 이때 carrier gas (N<sub>2</sub>)의 압력은 1.5 mL/min로 조정하였다.

한편, GC-MS는 SP-2380 capillary column을 장착한 Agilent 6890N GC system과 5973N Mass spectrophotometer를 이용하여 GC 분석과 동일한 최적온도 조건에서 splitless injection mode로 분석하였다 (He pressure : 1.5 mL/min). Methylated alditol acetate는 Mass에 의한 fragment ion 분석과 GC의 relative retention time을 조합하여 동정하였으며 각 peak의 molar %는 peak area 및 molecular response factor로 부터 환산하였다.

### 다. 현미발효물 유래 다당의 면역증진 활성

#### (1) 항보체 활성

##### (가) 정상인 혈청(Normal human serum, NHS)의 제조

건강한 성인의 혈액을 채취하여 실온에서 약 15분간 방치하여 응고시킨 후, 응고된 혈액을 절단하고 약 5분간 상온에서 방치시켰다. 이 혈액을 다시 4℃에서 약 20분간 방치한 다음 원심분리(2,200 rpm, 15 min, 4℃)하여 혈청만을 분리한 뒤 미량 원심분리용 튜브에 1 mL씩 분주하여 -70℃에서 냉동 보관하면서 실험에 사용하였다.

## (나) 항보체 활성 측정

항보체 활성은 Meyer법을 이용하여 시료에 의한 보체 소비(complement consumption) 후 잔존하는 보체에 의한 적혈구 용혈 정도에 근거를 둔 complement fixation test 방법으로 측정하였다. 여러 농도로 증류수에 용해시킨 시료를 GVB<sup>++</sup>(gelatin veronal buffer, pH 7.4, 0.1% gelatin, 0.15 mM Ca<sup>++</sup>, 0.5 mM Mg<sup>++</sup> 함유) 및 정상인의 혈청과 각각 50 mL씩 혼합하여 37°C에서 30분간 1차 반응시켰다. 이 반응액에 GVB<sup>++</sup> 350 mL를 가하고, 이를 10배에서 160배까지 연속 희석시킨 후, 750 mL의 GVB<sup>++</sup>와 양의 감작적혈구(IgM-sensitized sheep erythrocyte, EA cell, 1×10<sup>8</sup> cells/mL)를 250 mL를 가하여 37°C에서 60분간 2차 반응시키고, PBS(phosphate buffered saline, pH 7.4) 2.5 mL를 가하여 반응을 정지시켰다. 반응액은 2,000 rpm에서 10분간 원심분리하였으며, 얻어진 상등액을 412 nm에서 흡광도를 측정하여 잔존 용혈활성을 측정하였다. 항보체 활성은 정상인의 혈청과 GVB<sup>++</sup>, 증류수만을 반응시킨 음성대조군의 총 보체용혈(50% total complement hemolysis, TCH<sub>50</sub>, %)에 대한 저지율(inhibition of 50% total complement hemolysis, ITCH<sub>50</sub>, %)으로써 나타내었다. 양성대조군으로는 운지버섯 유래 면역증강제인 PSK (polysaccharide-K)를 사용하여 비교하였다(Fig. 71).

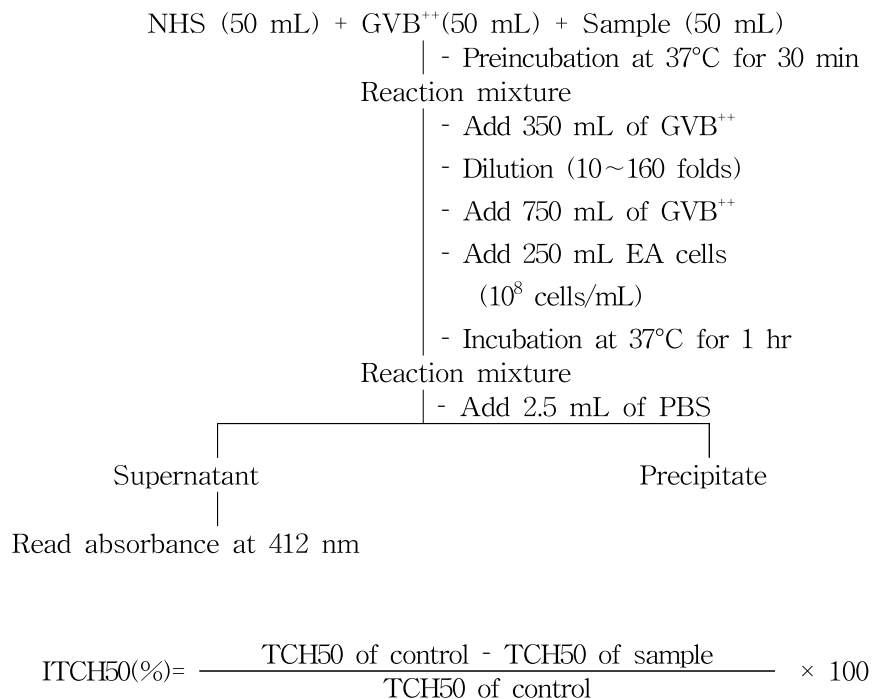


Fig. 71. Scheme of complement fixation test of polysaccharide for the determination of anti complement activity.

## (다) 금속이온 존재에 의한 보체계 활성화능 비교

보체계의 활성 경로를 확인하기 위해 GVB<sup>++</sup> buffer와 Ca<sup>++</sup>이온이 선택적으로 제거된

Mg<sup>++</sup>-EGTA-GVB<sup>-</sup> buffer, Ca<sup>++</sup>과 Mg<sup>++</sup> 이온이 모두 제거된 EDTA-GVB<sup>-</sup> buffer를 제조하여 시료 및 NHS와 각각 혼합하여 37°C에서 30분간 반응시켰다. 각 반응액은 37°C에서 60분간 재차 보체를 활성화 시키고, PBS 2.5 mL를 가한 후 2,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 상등액을 412 nm에서 흡광도를 측정하여 잔존 용혈활성을 측정함으로써 보체계 활성화능을 비교하였다.

#### (라) 2차원 면역전기영동에 의한 보체계 활성화 경로의 검토

보체계 활성화 경로의 확인을 위한 2차원 면역전기영동은 Morrison 등의 방법에 따라 실시하였다. GVB<sup>++</sup> buffer, Mg<sup>++</sup>-EGTA-GVB<sup>-</sup> buffer와 EDTA-GVB<sup>-</sup> buffer에 각각 정상인의 혈청과 정제 다당 시료를 동량(50 mL) 혼합하여 37°C에서 30분간 반응시킨 후 냉각하였다. 반응액을 barbital buffer(pH 8.6)에 용해시켜 만든 1% agarose gel plate(5×5 cm)의 well에 5 mL씩 loading하고, 4°C에서 약 3시간 동안 1차 전기영동(75 mA/plate)을 실시하였다. 이 후 1% anti-human C<sub>3</sub>가 함유된 agarose gel plate 상에서 4°C, 약 15시간 동안 2차 전기영동(25 mA/plate)을 실시하였다. 전개된 gel은 bromophenol blue로 약 10분간 염색 후 탈색하여 침강선(precipitation line)을 확인함으로써 C<sub>3</sub>의 활성화 여부를 관찰하였다.

### (2) 현미발효물 유래 다당의 대식세포 활성화

#### (가) 세포배양 및 독성 측정

일반세포에 대한 시료의 세포독성 여부를 확인하고자 C3H/HeN, C3H/HeJ 및 Balb/c 마우스에 5% thioglycollate medium 1 mL을 주입하여 96시간동안 유도된 복강 대식세포, RAW 264.7 대식세포주 및 Caco-2 소장 점막 상피 세포주는 각각 2.5×10<sup>6</sup> cells/mL의 농도로 계수한 후 flat-bottomed 96 well plate에 100 μL씩 분주하였다. 농도별로 조제된 다당시료는 동일 plate에 100 μL씩 첨가하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 3일간 배양한 후, 세포 독성은 세포배양을 모두 제거한 후 Phenol free-MEM(Minimum Essential Medium Eagle, Welgene Co. Inc., Daegu, Korea)에 5배 희석된 CCK-8(cell counting kit-8, Dojindo Co. Ltd., Kumamoto, Japan)을 well당 100 μL씩 가한 후 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 30~60분간 반응시키고 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

#### (나) 대식세포의 Nitric oxide(NO) 및 reactive oxygen species(ROS) 생산 유도 활성화

상기에 제시된 방법으로 조제된 복강 대식세포, RAW 264.7 대식세포는 24시간동안 배양하고 900 rpm, 4°C에서 5분간 원심분리 후 세포 배양액을 회수하였으며, 배양액 중 생성된 NO 및 ROS 생산능을 확인하였다. 세포 배양액 내의 NO는 Griess reagent(Promega Co., Madison, WI, USA)를 이용, 제조사의 지침에 따라 측정하였으며, ROS는 2',7'-dichlorofluorescein diacetate(DCFH-DA, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)가 활성화 산소에 의해 2',7'-dichlorofluorescein(DCF)을 형성하는 반응을 이용, 배양 후의 세포에 10 μM의 DCFH-DA를 첨가하여 2시간동안 배양시킨 후 세포를 용해시켜 상등액의 형광도를 형광측정

기(Victor-2, Perkin Elmer, Wellesley, MA, USA)를 이용해 excitation 450 nm, emission 530 nm에서 측정하였다.

#### (다) 대식세포의 cytokine 생산 유도 활성화

마우스의 복강에서 5% thioglycollate medium으로 유도된 대식세포와 RAW 264.7 세포주에 의해 생산된 cytokine인 tumor necrosis factor- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ ), interleukin-6(IL-6) 및 interleukin-12(IL-12)의 함량은 sandwich ELISA set(BD biosciences Co., Ltd., San Diego, CA, USA)를 이용한 제조사의 지침에 따라 분석하였다.

### (3) RAW 264.7 세포로부터 cytokine mRNA 발현 측정

#### (가) RAW 264.7 세포로부터 RNA의 추출

RAW 264.7 세포를  $1 \times 10^6$  cells/mL의 농도로 하여 flat-bottomed plate에 1 mL을 분주한 후, 배지에 희석시킨 시료를 농도별로 1 mL씩 처리하였다. 음성대조군(negative control, NC)으로는 시료 대신 배지 1 mL만을 첨가하였으며, 양성대조군(positive control, PC)으로는 lipopolysaccharide(LPS, 5  $\mu$ g/mL)을 사용하였다. Cytokine mRNA 발현의 변화는 다당시료와 함께 2시간 배양된 세포를 cold-PBS로 3회 세척하고 Trizol(Molecular Research Center Inc., Cincinnati, OH, USA) 500  $\mu$ L를 처리하여 얻어진 세포 용해액에 chloroform 200  $\mu$ L를 혼합하여 상온에서 3분간 정치하였다. 이후 12,000 rpm, 4  $^{\circ}$ C에서 15분간 원심분리하여 상등액을 조심스럽게 취한 후 동량의 isopropanol을 넣고 상온에서 10분간 정치시켰다. 원심분리하여 얻어진 침전물은 70% 에탄올로 세척하고, 0.1% diethylpyrocarbonate(DEPC)가 첨가된 탈이온수 20 mL에 녹이고 spectrophotometer(Nanodrop 2000, Thermo fisher scientific Inc., Waltham, MA, USA)를 이용, 흡광도를 측정하여 total RNA의 농도를 측정하였다.

#### (나) First-strand cDNA 합성

1  $\mu$ g(10  $\mu$ L)의 RNA에서 RevertAid First Strand cDNA Synthesis kit(Fermentas, Ontario, Canada)를 이용하여 first-strand cDNA를 합성하였다. 즉, RNA sample 1  $\mu$ g(10  $\mu$ L)에 oligo dT 1  $\mu$ g(2  $\mu$ L)를 혼합하여 65 $^{\circ}$ C에서 5분간 가열하고 신속하게 냉각시킨다. 그 후 5x reaction buffer 4  $\mu$ L, RNase inhibitor 1  $\mu$ L, dNTP 2  $\mu$ L, reverse transcriptase 1  $\mu$ L가 혼합된 mixture를 8  $\mu$ L씩 분주한 후 42 $^{\circ}$ C에서 1 시간 반응시킨 후 온도를 72 $^{\circ}$ C로 올려 5분간 반응시켜 cDNA를 합성시켰다. 합성된 cDNA는 1 mM tris-buffer에 10배 희석하여 역전사 중합효소 연쇄반응(RT-PCR)에 이용하였다.

#### (다) Real-time PCR (polymerase chain reaction)

DNA 정량을 실시간으로 정확하게 측정하기 위해서 CFX96<sup>TM</sup> Real-time PCR Detection System(Bio-Rad, Hercules, CA, USA)을 이용하여 IL-6, TNF- $\alpha$  cytokine의 DNA 발현량을



측정하였다. 2x SYBR Green Mix(Bio-Rad, Hercules, CA, USA), sense primer, antisense primer, template DNA를 넣고 탈이온수를 첨가하여 총 25  $\mu$ L로 하며 real-time PCR를 수행하였다. 사용한 primer는 IL-6 sense primer 5'-GAGAGGAGACTTCACAGAGGATACC-3'와 antisense primer 5'-CTCCAGCTTATCTGTTAGGAGAGC-3', TNF- $\alpha$  sense primer는 5'-GGCAGGTCTACTTTGGAGTCATTG-3' 와 antisense primer 5'-GGTAGGAAGGCCTGAGATCTTATC-3', glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) sense primer 5'-ACCACAGTCCATGCCATCAC-3'와 antisense primer 5'-TCCACCACCCTGTTGCTGTA-3'를 사용하였다. PCR 조건은 95°C-3분, 95°C-30초 (denaturation), 60°C-30초(annealing), 72°C-30초(extension)으로 39회 목적 DNA를 증폭하였으며, melting curve 분석은 증폭과정 후 95°C-10초, 60°C-5초, 95°C-10초로 sample data의 comparative  $C_T$ 값을 구한 후, 표준물질로 GAPDH 유전자 cDNA의 일부를 같은 방법으로 증폭하여  $2^{-\Delta\Delta CT}$  방법을 통하여 계산하여 정량하였다.

#### (라) Reverse transcription-PCR(RT-PCR)

RT-PCR은 Taq DNA polymerase kit(Komabiotech, Seoul, Korea)를 이용, cDNA 2  $\mu$ L, 5 unit/mL Taq polymerase 1  $\mu$ L, 10 $\times$ Taq PCR buffer 2  $\mu$ L, 2.5 mM 10 $\times$ dNTP mixture 2  $\mu$ L 및 10 pM primer 1  $\mu$ L을 섞고 증류수로 전체를 20  $\mu$ L 맞춰 PCR 증폭시켜 관련된 mRNA의 발현을 확인하였다.

primer는 IL-6 (sense, 5'-GAGAGGAGACTTCACAGAGGATACC-3'; antisense, 5'-CTCCAGCTTATCTGTTAGGAGAGC-3'), TNF- $\alpha$  (sense, 5'-GGCAGGTCTACTTTGGAGTCATTG-3'; antisense, 5'-GGTAGGAAGGCCTGAGATCTTATC-3'), Fc receptor I (sense, 5'-TTACCACGCCAGTGCTGAGAG-3'; antisense, 5'-ACTGAGCTTCGAGGTCCATC-3'), Fc receptor II (sense, 5'-TGGATCCAGGTGCTCAAGGAA-3', antisense, 5'-CTTCCTTTGCAGTAGTAGTCC-3')를 Genotech사(Daejeon, Korea)에서 제작하여 사용하였다.

Cytokine의 PCR은 94°C-5분, 94°C-30초(denaturation), 60°C-30초(annealing), 72°C-30초(extension)으로 35회 증폭 후 72°C-7분(re-extension)으로 작동하였으며, Fc receptor I(FcR I)은 94°C-5분, 94°C-30초(denaturation), 63°C-1분(annealing), 72°C-1분(extension)으로 25회 증폭 후 72°C-10분(re-extension)으로 작동하였다. Fc receptor II (FcR II)는 94°C-5분, 94°C-1분(denaturation), 57°C-1분(annealing), 72°C-1분(extension)으로 33회 증폭 후 72°C-10분(re-extension)으로 DNA thermal cycler(Takara bio., Shiga, Japan)를 이용하여 수행하였다. PCR 반응 산물은 GelRed<sup>TM</sup> (Biotium Co., Hayward, CA, USA)를 포함한 1% agarose gel 상에서 100 V에서 15분, 50 V에서 15분간 전기영동한 후 Gel-doc system(Bio-Rad Lab., Hercules, CA, USA)에서 중합효소 반응 띠의 밝기를 정량하였다.

#### (4) 현미발효물 유래 다당의 장관면역 활성화

##### (가) Peyer's patch 세포로부터 IgA 및 관련 cytokine의 생성능

6주령의 C3H/HeN 마우스의 소장 외벽에 돌기형태로 존재하는 Peyer's patch를 회수하여 PBS가 담겨진 petri dish에 옮기고 100 mesh의 stainless 금속체를 이용하여 조직을 파쇄하였으며, Peyer's patch로부터 세포를 방출시켜 세포현탁액을 조제하였다. 세포현탁액은 200 mesh 금속체로 여과하였으며, 10% FBS/MEM(Welgene Inc., Daegu, Korea)으로 세척하여  $1 \times 10^7$  cells/mL로 세포농도를 조정한 후 flat-bottomed 96 well plate에 100  $\mu$ L씩 분주하였다. 장관면역 활성을 측정하고자 하는 시료는 다양한 농도로 희석하여 동량 첨가한 후 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 3일간 배양하였다. 배양 종료 후 상등액을 회수하여 Peyer's patch 세포로부터 생성되는 IL-6, IL-10, GM-CSF(BD biosciences Co., Ltd., San Diego, CA, USA), TGF- $\beta$  (eBioscience Inc., San Diego, CA, USA) 및 IgA(Bethyl Laboratories, Montgomery, TX, USA)는 ELISA kit를 사용하여 제조사의 지침에 따라 분석하였다.

(나) 골수세포 증식활성 측정

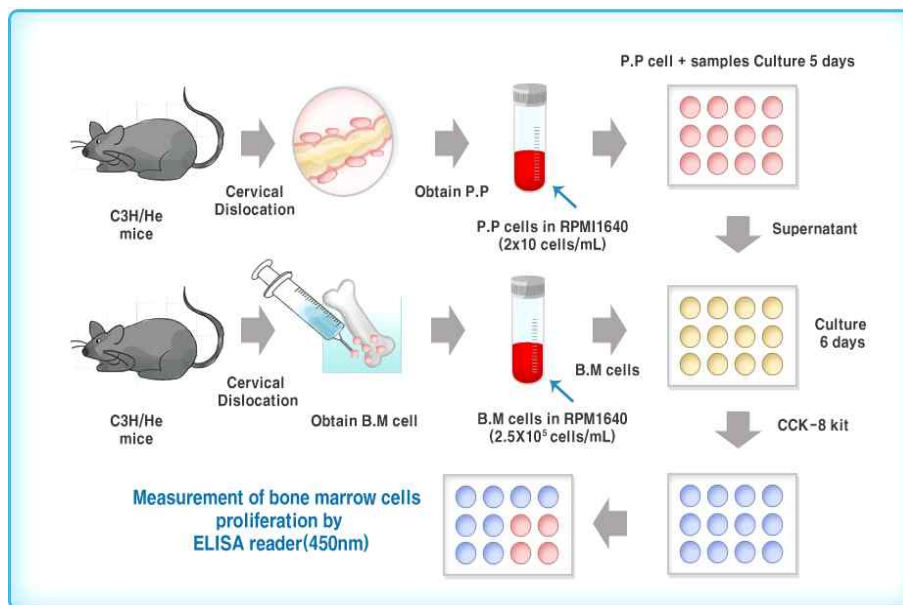


Fig. 72. Assay for intestinal immune system modulating activity by measurement of bone marrow cell proliferation.

골수세포 증식활성은 Yu 등의 방법을 실험실 여건에 따라 일부 변형하여 측정하였다. 6주령의 C3H/HeN 마우스의 소장 외벽에 돌기형태로 존재하는 Peyer's patch를 회수하여 PBS가 담겨진 petri dish에 옮기고 100 mesh의 stainless 금속체를 이용하여 조직을 파쇄하였으며, Peyer's patch로부터 세포를 방출시켜 세포현탁액을 조제하였다. 세포현탁액은 200 mesh 금속체로 여과하였으며, 10% FBS/MEM(Welgene Inc., Daegu, Korea)으로 세척하여  $1 \times 10^7$  cells/mL로 세포농도를 조정한 후 flat-bottomed 96 well plate에 100  $\mu$ L씩 분주하였다. 한편, 골수세포는 동일종 마우스의 대퇴부 뼈로부터 회수하여 여과, 세척하고  $2.5 \times 10^5$  cells/mL의 세포농도로 조정한 후 96 well plate에 100  $\mu$ L씩 분주하였다. 분주된 골수세포에 위에서 언급한 Peyer's patch 세포와 시료의 반응으로부터 회수한 상등액과 10% FBS/MEM을 각각 50  $\mu$ L씩

첨가하고 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 6일간 배양하였다. 장관면역 활성화도는 시료와 Peyer's patch 세포와의 반응 후 회수한 상등액을 골수세포와 반응시켜 골수세포가 증식되는 정도로 나타내는데, 증식도 측정은 WST-8법에 의해 살아 있는 골수세포의 전자전달계에서 방출되는 전자에 의해 환원되어 발색되는 측정법을 사용하였다(Fig. 72).

**(5) Caco-2 세포와 면역세포의 혼합배양계를 이용한 면역세포의 자극활성**

다당의 장관상피세포를 통과하여 흡수된 후 체내 면역세포들과의 반응, 활성화 여부를 판단하기 위해 Transwell® insert가 장착된 12-well plate를 이용하여 장관 *in vitro* 혼합배양계를 제조하였다. 장관상피세포주 Caco-2 세포를 배양하여 3×10<sup>5</sup> cells/mL로 조정된 후 Transwell® insert가 장착된 12 well plate 상층부에 100 µL씩 분주하고 10~15일간 배양하여 monolayer를 형성시켰다. 하층부에는 대식세포주인 RAW 264.7 세포를 배양하여 3×10<sup>5</sup> cells/mL로 조정하고 세포 혼탁액 200 µL와 MEM배지 300 µL씩 분주한 후 상층부의 Caco-2 세포를 PBS로 세척, 여과한 후 활성을 측정하고자 하는 시료를 적당한 농도로 희석하여 500 µL씩 처리하였다. 24시간 배양한 후 하층부의 RAW 264.7 세포 배양액을 회수하여 IL-6 생성능을 확인하였는데, 시료 대신 동량의 배지가 첨가된 음성대조군으로는 LPS(5 µg/mL)가 첨가된 양성대조군을 사용하였으며, 다양한 농도별로 조제된 다당 시료를 RAW 264.7 세포에 직접 처리하였다. 따라서 본 실험에서는 경구투여된 활성다당이 장관 상피세포를 통과하여 흡수된 후, 체내 면역세포들과 반응, 그들을 활성화시킬 수 있다는 가설을 증명하기 위해 Transwell® insert가 장착된 12 well plate를 이용하여 실험을 실행하였다(Fig. 73).

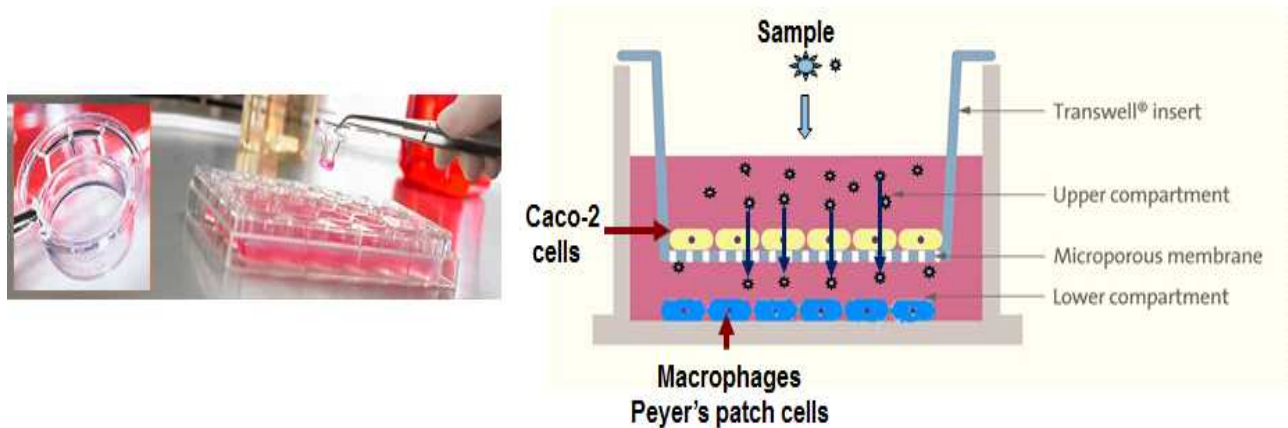


Fig. 73. Appearance and application of well cluster plate equipped with Transwell® insert.

**(6) 장관면역계 활성화에 미치는 현미발효물 유래 조다당획분의 마우스 경구 투여에 따른 면역활성 자극 효과(*in vivo*)**

**(가) 실험동물과 현미발효물 유래 조다당획분의 경구 투여**

식품소재로서의 현미발효물 유래 다당의 장관면역 활성화에 대한 가능성을 타진하고자 경구투

여를 통한 실험동물의 면역증진 효과를 검토하였는데, 실험동물은 6주령의 C3H/HeN 마우스를 중앙실험동물로부터 구입한 후 1주일간 정상식으로 적응기간을 가진 후 실험에 사용하였다. 실험군으로는 시료가 포함되지 않은 생리식염수(saline)를 투여한 대조군(negative control, NC)과 현미발효물 유래 조다당획분(FBR-0) 및 이를 효소처리한 획분(FBR-E)으로, 각각 10, 100, 1,000 µg/mouse 농도로 투여된 총 7개의 group으로 나누고 각 group당 6마리씩 1일 1회 총 20일간 투여하였다. 식수는 자유롭게 섭취하도록 하였고 모든 실험식은 사육기간 동안 냉장 보관하였다. 사육실의 온도는 23±1°C, 습도는 50~60%로 유지하였으며 조명은 12시간 주기로 하였다.

#### (나) 현미발효물 유래 조다당의 경구 투여가 Peyer's patch cell의 IgA 및 cytokine 생산에 미치는 효과

경구투여가 완료되면 마우스의 소장 내벽에 존재하는 Peyer's patch를 분리한 후, 10% FBS가 함유된 MEM이 담겨진 petri dish에 옮기고 100 mesh의 stainless 금속체를 이용하여 조직을 파쇄하여 Peyer's patch로부터 세포를 방출시켜 세포현탁액을 조제하였다. 세포현탁액은 200 mesh 금속체로 여과한 후, 배지로 수차례 세척하고 1×10<sup>7</sup> cells/mL로 세포농도를 조정 한 후 flat-bottomed 12 well plate에 1 mL씩 분주하고 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 5일간 배양하였다. Peyer's patch 세포로부터 유도된 IgA와 cytokine(IL-6 및 GM-CSF)은 배양 상등액을 회수한 후 ELISA set를 사용하여 제조사의 지침에 따라 분석하였다.

#### (다) 현미발효물 유래 조다당의 경구 투여가 혈액 중 IL-6 및 분변 중 IgA 함량에 미치는 효과

경구투여가 종료된 동일마우스는 26 G needle을 이용하여 심장채혈을 실시하였고, 혈액 1.5~2 mL을 채취하여 냉장고에 30분 보관 후 원심분리(2,000 rpm, 20분, 4°C)하여 혈청을 회수하였다. 분리한 혈청에 분비되어 있는 IL-6의 양은 ELISA set를 사용하여 제조사의 지침에 따라 분석하였다. 또한, 경구투여 24시간 전부터 각 group별로 분변을 회수하여 2시간동안 자연 건조하여 수분을 제거한 다음, PBS에 100 mg/mL의 농도로 분변을 희석하였다. 희석된 분변액은 충분히 교반하고 냉장고에서 하루동안 방치한 다음, 원심분리(2,000 rpm, 20분, 4°C)하여 상등액을 회수하였다. 상등액에 분비되어 있는 IgA의 양은 ELISA set를 사용하여 제조사의 지침에 따라 분석하였다.

### 라. 통계처리

실험결과는 IBM SPSS Statistics 21을 이용하여 통계처리하였으며 모든 측정 항목에 대한 평균(mean)과 표준편차(standard deviation, SD)로 나타내었다. 시료 간 및 처리농도 간 유의적인 차이는 p<0.05 수준에서 Duncan 일원배치 분산분석으로 실시하였다.

## 2. 연구결과

### 가. 면역활성 다당체가 풍부한 현미발효물의 선별

#### (1) 다양한 현미발효물이 Peyer's patch 세포에 미치는 영향 평가(*in vitro*)

본 연구에서는 현미발효물에 존재할 것으로 기대되는 장관면역 활성이 우수한 신규 다당체를 분리·정제한 후 다양한 장관면역 기능을 평가하고 활성 다당체의 상세 구조를 분석함으로써 고부가가치 생리기능성 소재의 생산을 위한 기초자료를 얻기 위해 수행되었다. 1차년도에서는 주관기관인 샘표식품(주)에서 확보하고 있는 다양한 양조 균주로 발효한 현미발효물과 미강을 포함한 발효물을 대상으로 진행하였다.

각종 현미발효물에 존재하는 활성 다당체의 분리를 위해 공여받은 발효물의 상등액에 4배 부피 (v/v)의 95% ethanol을 가하여 다당을 침전시키고 2~3일간 투석을 행하여 각각의 발효물 조다당 핵분[fermented brown rice(FBR-0), rice bran(RB-0) 외 다수, sample-F1, F2, F3]을 조제하였다.

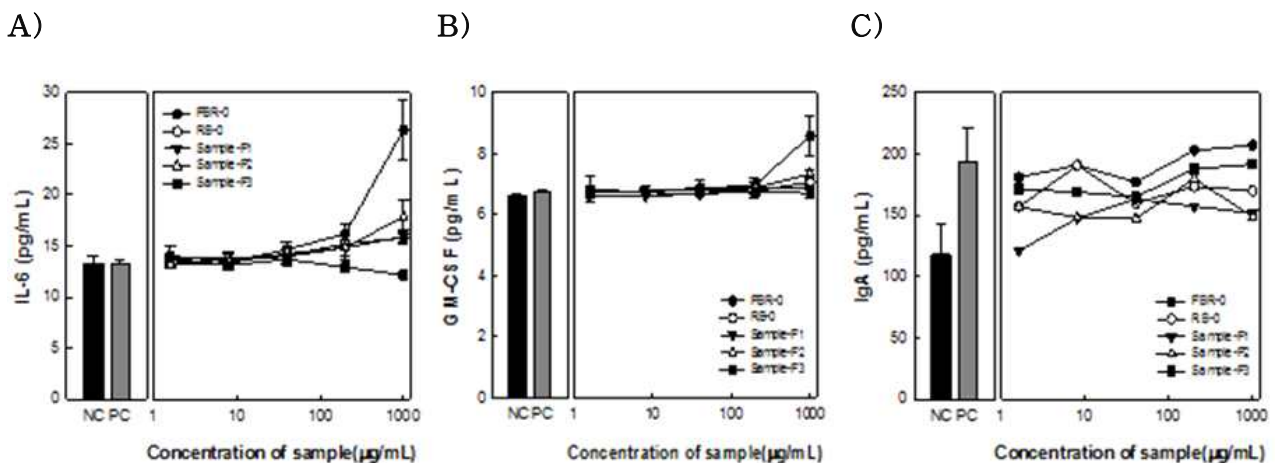


Fig. 74. Effect of the crude polysaccharides from fermented brown rices on immunoglobulin A(IgA) and cytokine production by Peyer's patch cells from C3H/HeJ mice. A, Interleukin-6(IL-6); B, Granulocyte macrophage-colony stimulating factor(GM-CSF); C, Immunoglobulin A(IgA).

장(주로 소장)의 넓은 내강(lumen)은 외부 환경에 노출되어 있기 때문에, 그곳에는 많은 종류의 병원성 미생물들이 잠재적으로 거주해 있으며, Peyer's patch는 장 내강에 위치하고 있는 둥근형태의 세포집단이다. Peyer's patch는 장의 내강에 있는 면역 감시에서 중요성을 띄고, 점막 내에서 면역반응을 촉진하는 역할을 하는데, 주로 공장 및 회장에 존재하는 면역기관으로 우리 몸 전체에서 가장 최초로 면역반응이 일어나는 조직이라는 것이 이미 많은 연구결과에서 증명되었다. 이러한 Peyer's patch는 T 세포와 B 세포 등으로 구성되어 있으며, T세포는 macrophage와 함께 작용하여 다양한 cytokine을 생산하고, 이중 골수의 증식과 함께 IgA 항체의 생산을 자극하는 interleukin-6(IL-6) 및 granulocyte/monocyte-colony stimulating factor(GM-CSF) 등과 같은 cytokine에 의해 전신면역으로 확대가 일어나게 된다고 알려져 있

다.

한편, immunoglobulin A(IgA)는 인체에서 생산되는 총 면역글로불린의 약 6%를 차지하는 대표적 분비형 항체로서 주로 타액, 눈물 그리고 점막면역계(mucosal-associated lymphoid tissues; MALT)에서 분비되며 점막을 통하여 인체로 침입하는 병원균의 제거를 담당하는 생체방어의 최일선을 담당하는 항체로 인간은 1일 평균 약 3 g의 IgA를 생산하는 것으로 보고되어 있다. 따라서 본 실험에서는 각각의 발효물 조다당 획분을 대상으로 장관면역에서 중추한 역할을 담당하고 있는 Peyer's patch 세포에 대한 자극 활성을 측정하고자 하였다.

각각의 조다당 시료를 농도별로 세포와 함께 배양하고 이들이 생산하는 IgA와 대표적 cytokine인 IL-6 및 GM-CSF의 생산능을 측정하였는데, 그 결과 C3H/HeJ mouse에서 분리한 Peyer's patch 세포에 대해서 대부분의 발효물 시료는 활성자극 경향을 나타내지 않은 반면, 고농도의 현미발효물(FBR-0) 조다당 획분의 경우 유일하게 IgA를 비롯하여 IL-6 및 GM-CSF의 생산량을 증가시키는 양상을 보였다(Fig. 74). 본 실험에 사용된 C3H/HeJ 마우스는 세포 표면의 수용체 중 toll like receptor 4(TLR4)가 변이된 종으로, TLR4 특이적인 LPS 처리에 비감수성임을 고려했을 때 현미발효물의 활성은 LPS의 혼입에 의한 것이 아님을 추측할 수 있었다.

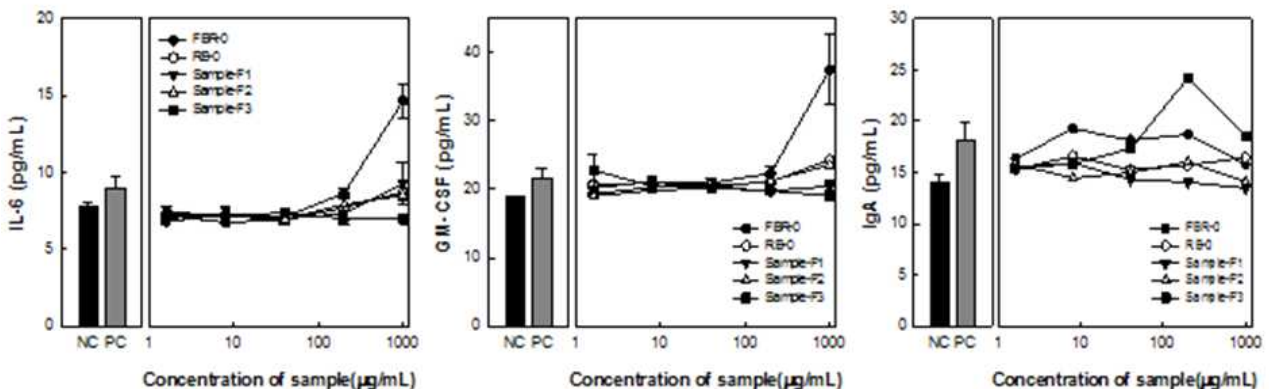


Fig. 75. Effect of the crude polysaccharides from fermented brown rices on immunoglobulin A(IgA) and cytokine production by Peyer's patch cells from Balb/c mice. A, Interleukin-6(IL-6); B, Granulocyte macrophage-colony stimulating factor(GM-CSF); C, Immunoglobulin A(IgA).

한편, TLR4가 변이된 C3H/HeJ 마우스가 아닌 BALB/c mouse를 대상으로 동일한 실험을 진행한 결과, 현미발효물의 IgA 및 cytokine류의 생산은 다른 발효물 유래 조다당에 비해 양호한 활성을 보였다(Fig. 75). 따라서 현미발효물 유래 면역 활성다당은 인체의 항상성 유지에 중요 역할을 담당하는 장관면역계에 유효하게 관여함을 재차 확인할 수 있었다.

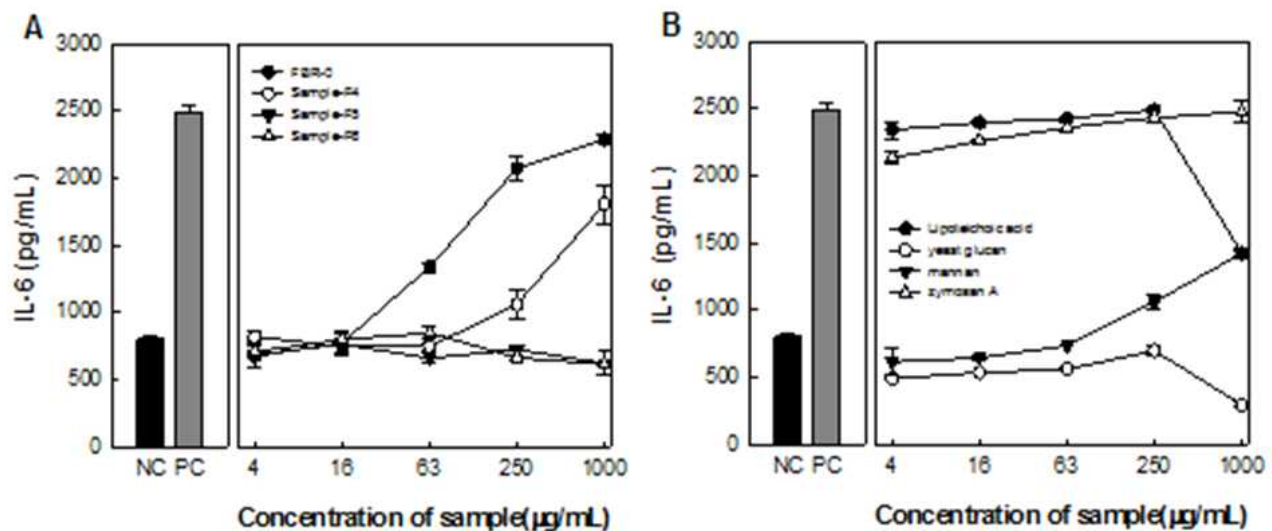
## (2) 다양한 현미발효물이 복강 대식세포(macrophage)의 cytokine 생산에 미치는 영향(*in vitro*)

Macrophage는 세균이나 이물질을 탐식, 제거하는 과정에서 다양한 cytokine을 분비하여 면



역현상을 조절하며, 항원에 대한 면역작용의 증추적인 역할을 하는 세포로서, 항원제시와 림프구의 비특이적 면역작용에 관계하며, 종양세포에 대해서는 직접적인 상해활성을 나타낸다. 또한 TLR(toll-like receptor)에 반응하는 물질(LPS 혹은 천연물)은 macrophage를 활성화하여 T 세포와 B 세포의 증식, 식균 작용을 위한 대식세포의 활성화, 미생물 감염에 대한 방어 등의 2차 면역반응을 조절할 수 있는 IL-1, IL-6, IL-10, IL-12 및 TNF- $\alpha$ 와 같은 cytokine을 생산한다. IL-1, IL-6 및 TNF- $\alpha$ 는 macrophage에 의해 유도되는 대표적인 cytokine으로 세균감염에 따른 염증반응에 있어서 증추적인 역할을 하며 염증병소에서 그 양이 증가되는 것으로 알려져 있는데, IL-6는 IL-1과 협동적으로 작용하여 T 세포와 B 세포의 분화에 관여하고 항암효과가 있다고 보고되었으며, TNF- $\alpha$ 은 특정암세포에 대한 세포독성과 항 바이러스성 작용이 있고, 급성 및 만성 염증질환에서 일어나는 여러 가지 생체반응에도 중요한 역할을 한다. 한편, IL-12는 NK cell의 활성화 및 Th1 type의 면역 반응을 유도하는 cytokine으로, 암세포와 같은 세포성 외래물질에 대한 반응성을 높이는 작용을 한다고 알려져 있다.

각종 현미발효물 유래 조다당 시료의 직접적인 자극에 의한 macrophage의 cytokine 생산능을 측정하기 위해, Balb/c 마우스에서 회수한 peritoneal macrophage를 회수하여 실험을 진행한 결과, 현미발효물 FBR-0는 타 발효물 시료와는 달리 IL-6, TNF- $\alpha$  및 IL-12의 생산을 농도 의존적으로 증가시켰다(Fig. 76A, 77A 및 78A).



**Fig. 76.** Effect of the crude polysaccharides from fermented brown rices on interleukin-6(IL-6) by peritoneal macrophage from Balb/c mice. A, crude polysaccharides from fermented brown rices; B, extracts from commercial immuno-stimulating products.

IL-6 생산능의 경우, FBR-0는 시료농도 63 µg/mL에서부터 농도 의존적인 증가를 나타내었으며, TNF- $\alpha$ 는 250 µg/mL의 시료농도에서부터 같은 경향을 나타내었다. IL-12의 경우에는 TNF- $\alpha$ 와 거의 유사한 경향을 나타내었는데, FBR-0는 250 µg/mL에서부터 농도 의존적인 생산 증가를 나타내었다. 이는 현미발효물 유래 다당체가 NK cell의 활성화 및 Th1 type의 면역 반응 유도를 통한 cytotoxic T lymphocyte(CTL)의 활성화와 같은 세포매개성 면역에 있어 활

성을 갖으리라 예상 할 수 있었다. IL-12는 암세포에 대한 치사작용을 하는 NK cell의 활성화에 직접 관여하는 항암 활성 유도 cytokine으로 알려져 있기 때문에, 현미발효물 유래 다당체 FBR-0는 암세포에 대해서도 높은 항암 효과를 나타낼 수 있을 것으로 기대되었다.

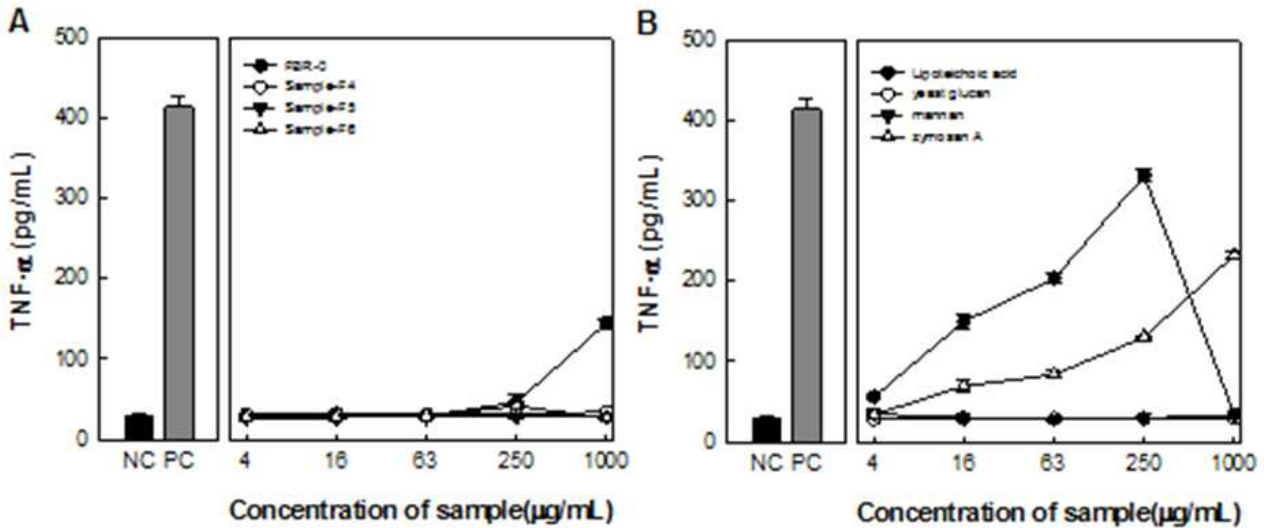


Fig. 77. Effect of the polysaccharides from fermented brown rices on tumor necrosis factor- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ ) by peritoneal macrophage from Balb/c mice. A, crude polysaccharides from fermented brown rices; B, extracts from commercial immuno-stimulating products.

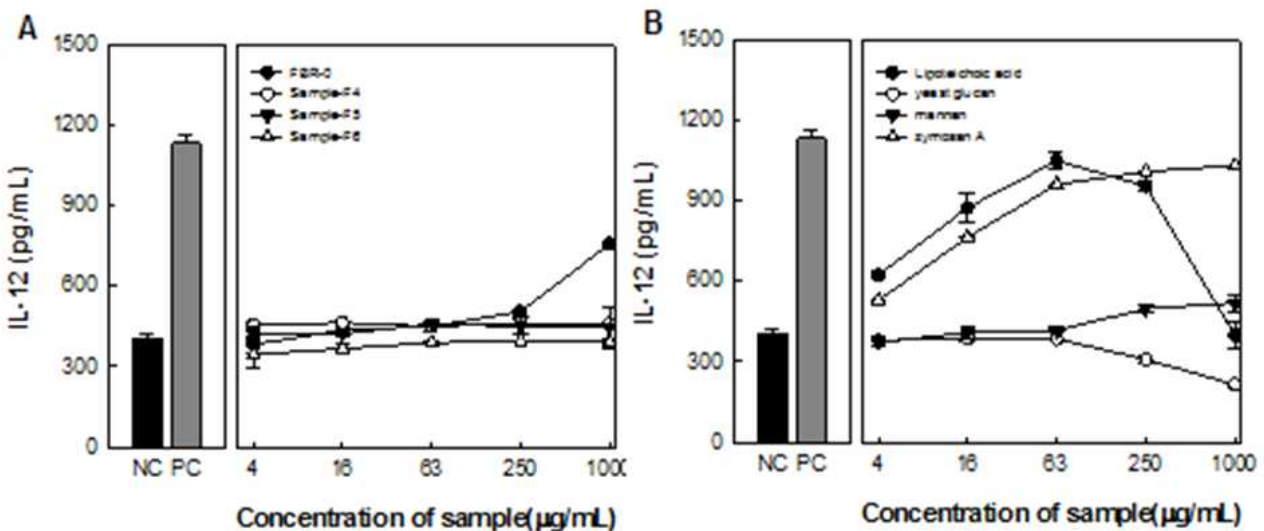


Fig. 78. Effect of the polysaccharides from fermented brown rices on interleukin-12(IL-12) by peritoneal macrophage from Balb/c mice. A, crude polysaccharides from fermented brown rices; B, extracts from commercial immuno-stimulating products.

또한 시판되고 있는 면역 증진 제품인 lipoteichoic acid, zymosan A, yeast glucan 및 mannan



과도 비교실험을 진행하였는데, 시판제품의 경우 용해도가 시료마다 상이하여 다양한 활성 경향을 나타내었다. 특히 거의 물에 용해되지 않았던 yeast glucan은 모든 실험에서 활성을 나타내지 않은 반면, 용해도가 우수한 lipoteichoic acid 및 zymosan A는 양호한 활성 경향으로 보였다. 이는 시판 면역활성 물질도 조제법에 따라 다양한 활성 경향을 나타내는 것으로 사료될 수 있었다 (Fig. 76B, 77B 및 78B).

### (3) 현미발효물 유래 조다당 및 미강발효물 유래 조다당의 화학적 특성

장관면역계인 Peyer's patch 세포 활성화와 선천면역계 세포인 macrophage 활성화가 가장 우수했던 현미발효물 조다당(FBR-0)과 이에 대한 대조군으로 미강발효물 유래 조다당(RB-0)의 일반성분을 분석한 결과, FBR-0는 중성당(91.5%)과 함께 소량의 산성당(7.0%) 및 단백질(1.5%)로 구성된 중성다당류로 확인되었다. 대조군인 RB-0도 FBR-0와 유사한 조성을 가지는 것으로 나타났는데, 즉, 91.3%의 중성당과 함께 소량의 산성당(6.2%) 및 단백질(2.5%)을 함유하는 다당체로 확인되었다. 한편, 두 조다당 시료는 모두 식물체 추출물에서 발견되는 TBA-positive material(KDO)는 함유되어 있지 않았다(Table 77).

**Table 77. Chemical properties of FBR-0 and RB-0 prepared from fermented brown rices and fermented rice brans**

Sample	FBR-0	RB-0
Chemical property(%) <sup>1)</sup>		
Neutral sugar	91.5 ± 0.01	91.3 ± 0.02
Uronic acid	7.0 ± 0.01	6.2 ± 0.01
KDO <sup>2)</sup> -like material	-	-
Protein	1.5 ± 0.02	2.5 ± 0.02
Sugar component(mole%) <sup>3)</sup>		
Rhamnose	-	-
Fucose	-	-
Arabinose	3.6	1.5
Xylose	2.5	1.3
Mannose	2.9	1.2
Galactose	4.1	1.4
Glucose	86.9	94.7
Total	100	100

<sup>1)</sup>Percentage (%) against of the dried crude polysaccharide

<sup>2)</sup>KDO means 2-*keto*-3-deoxy-D-*manno*-octulosonic acid.

<sup>3)</sup>Monosaccharides were analyzed using alditol acetate method and Mole% was calculated from the detected neutral sugar.

한편, Table 77에 보이는 바와 같이 두 조다당 시료의 구성당 분포는 alditol acetate 유도체화를 통한 GC로 분석하였는데, FBR-0는 arabinose, xylose, mannose 및 galactose를 각각 3.6, 2.5,



(polysaccharide K)를 사용하였고, 음성대조군으로써 시료를 첨가하지 않은 증류수를 이용하였으며 음성대조군에서의 활성화 정도를  $ITCH_{50}(\%)$ 로 하여 각 시료의 활성화능을 상대 비교하였다. 현미발효물 유래 FBR-0의 경우 1,000  $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서 동일 농도를 가한 PSK(약 60%)보다 낮은 활성을 나타내었으나, 상대적으로 양호한 약 42%의 활성을 보였다(Fig. 80).

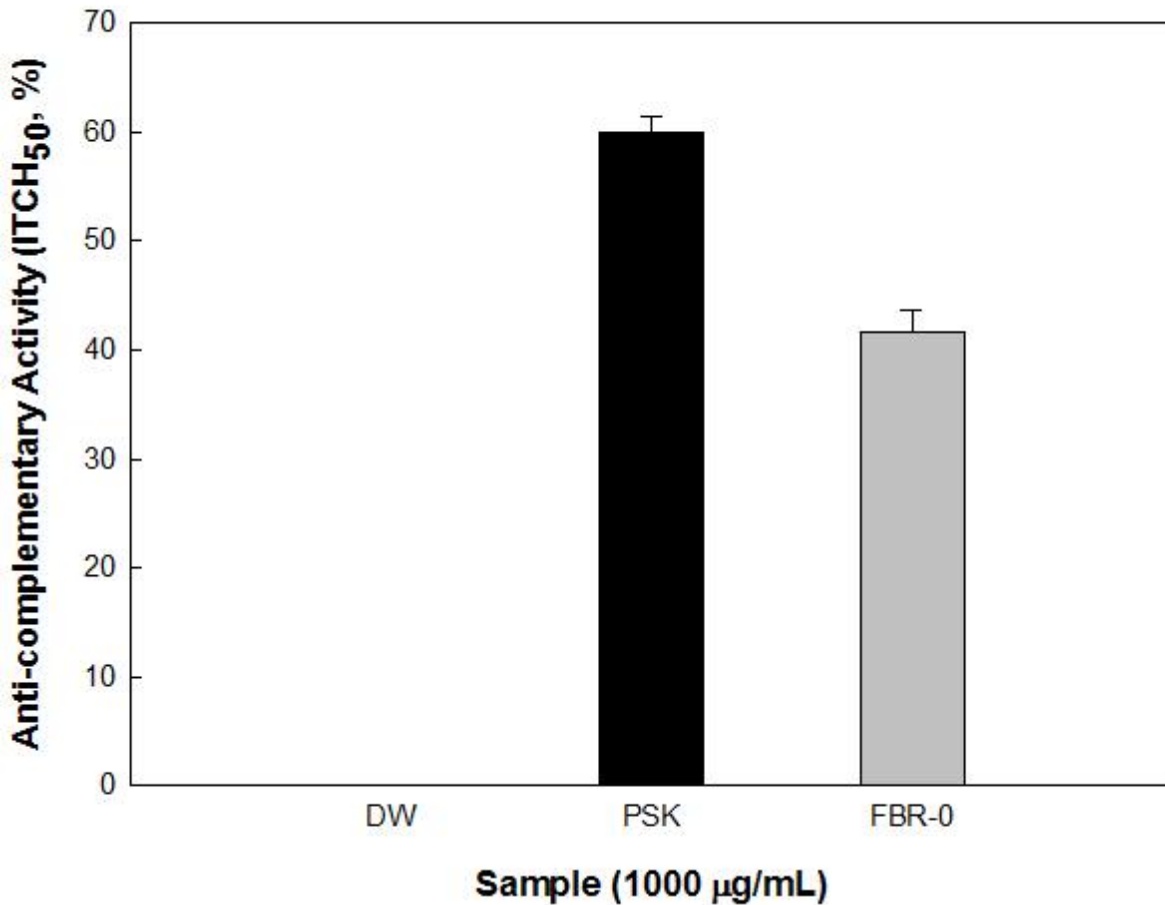


Fig. 80. Anti-complementary activity of FBR-0 prepared from the fermented brown rice. Anti-complementary activity was presented as the inhibition of 50% total complementary hemolysis by Mayer's method. Polysaccharide K(PSK), a known immuno-active polysaccharide from *Coriolus versicolor* was used as a positive control.

## (2) 현미발효물 유래 FBR-0 다당의 세포 독성

Balb/c mouse의 복강으로부터 회수한 macrophage를 대상으로 현미발효물 유래 다당 FBR-0의 세포 독성 여부를 검토하였다. 실험에 적용한 모든 농도의 FRB-0에 있어 macrophage에 대한 독성은 확인되지 않았으며, 증식활성도 확인되지 않았다(Fig. 81).

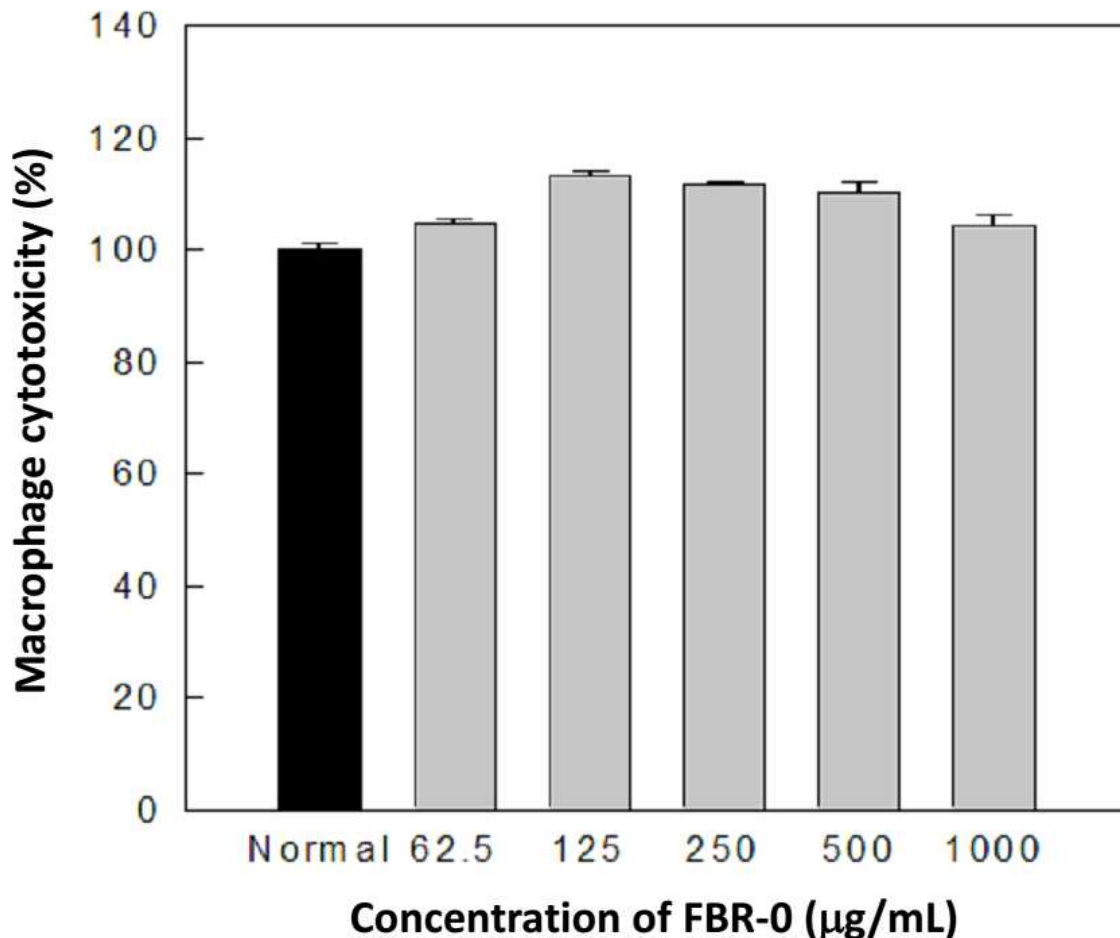


Fig. 81. Cytotoxic effect of FBR-0 prepared from the fermented brown rice on murine peritoneal macrophages from Balb/c.

(3) 현미발효물 유래 FBR-0 다당이 대식세포(macrophage)의 cytokine 생산에 미치는 영향

현미발효물 유래 다당 시료의 직접적인 자극에 의한 macrophage의 cytokine 생산을 *in vitro* 에서 측정된 결과, 신규로 조제한 FBR-0는 모두 농도 의존적으로 IL-6, IL-12 및 TNF- $\alpha$ 의 생산을 촉진하였으며 시료농도에 따른 생산자극 pattern 또한 두 시료가 유사함을 확인하였다. (Fig. 82). 그러나 본 실험에 사용한 macrophage가 Balb/c mouse의 복강에서 TG medium으로 유도된 세포이므로 mouse의 개체에 따라 활성의 변화가 있을 수 있으므로 약 한달 후 별도로 주문한 동일계열 mouse를 이용, macrophage를 분리하고 시료에 따른 cytokine 생산 경향을 재검토하고자 하였다 (Fig. 83). 종합해보면, FBR-0 는 mouse의 개체에 무관하게 복강 내 대식세포를 자극하여 농도 의존적인 IL-6 및 IL-12의 생산능을 보였으므로, FBR-0의 cytokine 생산능은 안정적이고 분명하다고 판단되었다 (Fig. 83).

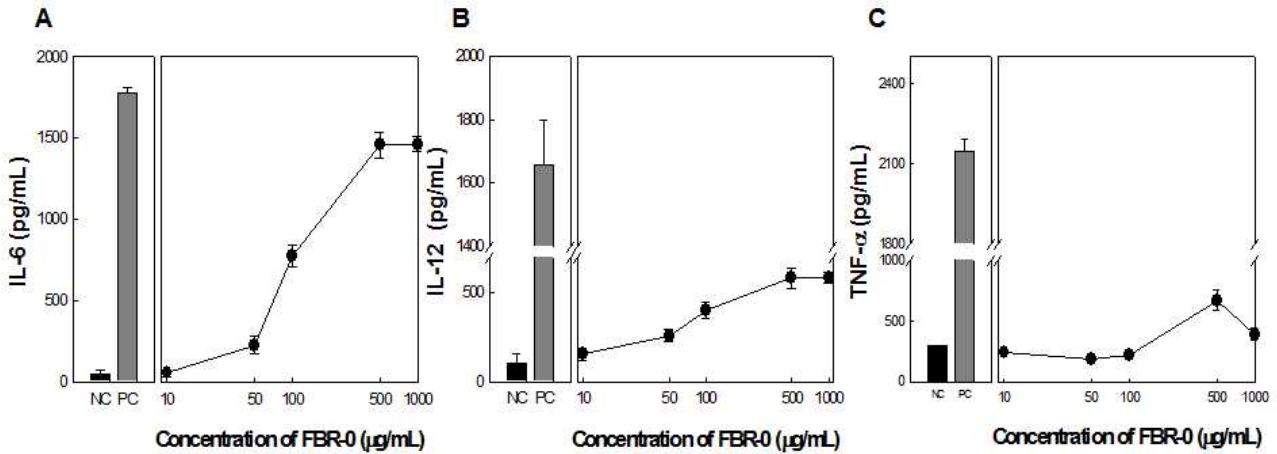


Fig. 82. Effect of FBR-0 on the cytokines production by peritoneal macrophage from Balb/c mice (I). A, interleukin-6(IL-6); B, interleukin-12(IL-12); C, Tumor necrosis factor- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ ).

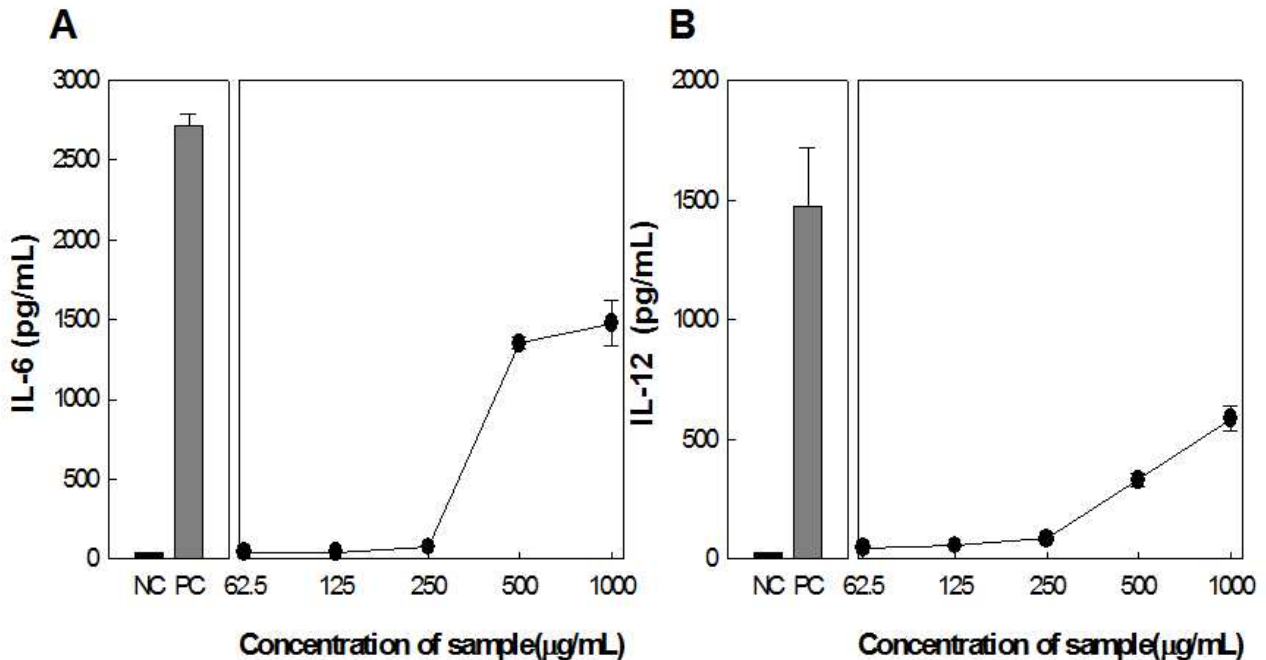


Fig. 83. Effect of FBR-0 on the cytokines production by peritoneal macrophage from Balb/c mice (II). A, interleukin-6(IL-6); B, interleukin-12(IL-12).

특히 FBR-0가 macrophage의 IL-12 생산을 자극하는 활성이 있다는 사실은 현미발효물 유래 다당체가 NK cell의 활성화 및 Th1 type의 면역 반응 유도를 통한 cytotoxic T lymphocyte(CTL)의 활성화와 같은 세포매개성 면역에 있어 활성을 갖으리라 예상되었다. IL-12는 암세포에 대한 치사작용을 하는 NK cell의 활성화에 직접 관여하는 항암 활성 유도 cytokine으로 알려져 있기 때문에, 현미발효물 유래 다당체 FBR-0는 암세포에 대해서도 높은 항암 효과를 나타낼 수 있을 것으로 기대되었다.

#### (4) 현미발효물 유래 FBR-0 다당의 장관면역 활성화에 대한 영향

대량으로 조제한 FBR-0의 장관면역 활성을 측정하기 위해 C3H/HeJ로부터 유도된 Peyer's patch 세포를 대상으로 FBR-0의 IgA 및 IL-6, GM-CSF의 생산 유도능을 조사하였다. 그 결과, C3H/HeJ 마우스에서 분리한 Peyer's patch 세포를 FBR-0와 함께 배양 시, 비교적 생산량은 높지 않았으나 IL-6 및 GM-CSF를 농도 의존적으로 생산하였으며, 특히 IgA의 경우 1,000 µg/mL의 시료농도에서 우수한 생산증가 양상을 나타내었다(Fig. 84). 따라서 현미발효물 유래 다당 FBR-0는 장관면역계에 대해 유효한 증진활성이 있다고 최종 판정하였다.

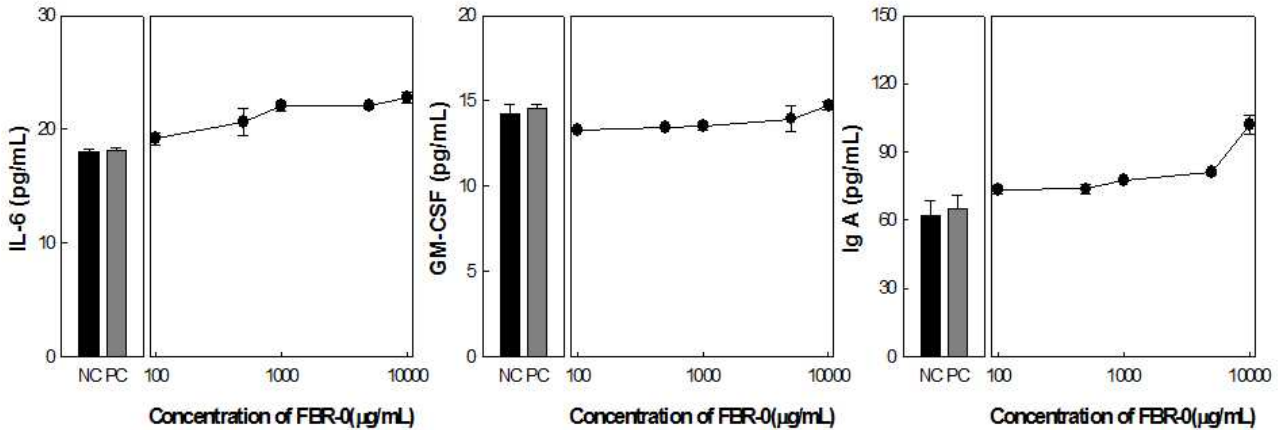
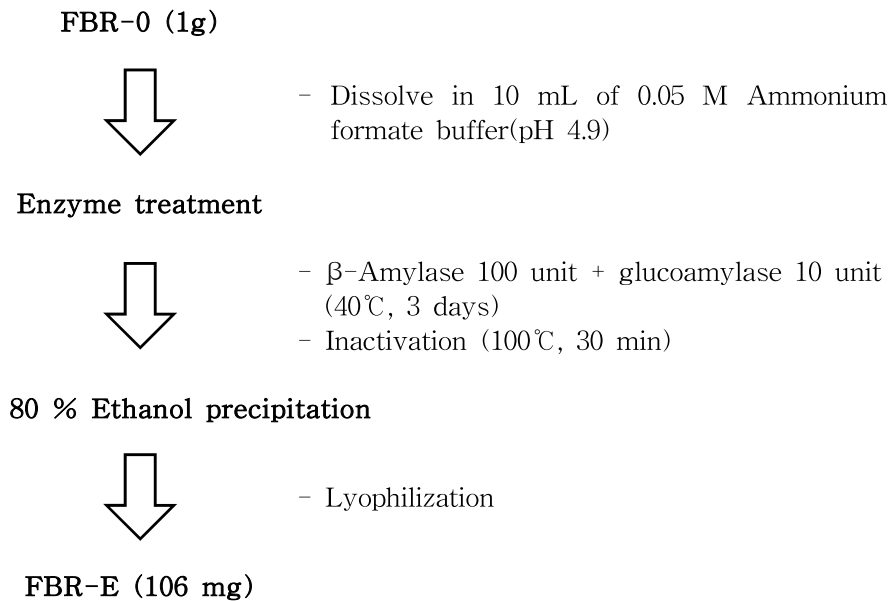


Fig. 84. Effect of FBR-0 on immunoglobulin A(IgA) and cytokine production by Peyer's patch cells from C3H/HeJ mice. A, Interleukin-6(IL-6); B, Granulocyte macrophage-colony stimulating factor(GM-CSF); C, Immunoglobulin A(IgA).

#### 다. 면역활성 증진을 위한 FBR-0의 효소처리

Table 77에서 보는 바와 같이 현미발효물 유래 조다당 FBR-0에는 발효 중 amylase에 의해 분해되지 않은 limit dextrin이 다량 함유되어 있어 이들을 제거할 경우 활성의 증가 뿐 아니라, 향후 활성 분체 규명을 위한 구조분석에도 용이하리라 판단되어 FBR-0의 효소처리를 진행하였다(Fig. 85). FBR-0는 α-amylase 생산이 우수한 균주와 glucoamylase 생산능이 우수한 균주에 의해 발효 조제한 현미발효물이지만 limit dextrin을 제거하기 위해선 α-(1,6) 결합의 side chain 제거가 용이하고, exo-type으로서 비환원 말단으로부터의 당 제거가 용이한 효소의 처리가 필수적이라고 판단되었던 바, Fig. 85와 같이 β-amylase와 glucoamylase로 효소처리 후 다당을 회수하여 구성당의 변화, 분자량 분포의 변화, 및 활성에 미치는 영향을 검토하였다.



**Fig. 85. Procedure of enzyme treatment for removing of limit dextrin in FBR-0.**

**(1) 효소처리에 의한 FBR-0 다당의 화학 특성 변화**

FBR-0를 효소처리한 결과, Table 78에 보이는 바와 같이 전체 조성이 완전히 변화하는 특성을 보였는데, 이는 limit dextrin의 제거에 의한 것으로 판단되었다. 즉, 효소처리 후 구성당 조성에는 glucose 함량의 급격한 감소를 보이고 있으며, 효소처리 전에 검출되지 않았던 rhamnose와 fucose가 검출될 뿐 아니라, 높은 비율로 arabinose, xylose, mannose, galactose로 구성되어 있음을 확인할 수 있었다(Table 78). 이러한 조성은 활성 다당으로 알려진 hemicellulose의 일종인 arabinoxylan과 pectin류에 존재하는 rhamnogalacturonan(RG)의 측쇄 구조의 당 조성파 유사한 특성이므로 주목할 필요가 있다고 판단되었다.

Arabinoxylan은 hemicellulose를 구성하는 다당류의 일원으로 항암 활성 등의 유용한 활성이 보고되고 있으나 hemicellulose의 특성상 세포벽의 강력한 cellulose 다발들과 강하게 결합(수소 결합의 중첩)되어 있어 단순 물추출로는 분리가 어려운 다당으로 알려져 있다. 또한 펙틴(pectin)을 포함한 펙틴물질(pectic substances)들은 고등식물의 1차 세포벽(primary cell wall)과 중엽(middle lamella)에 주로 존재하는 다당류로써 식물세포벽의 구성다당류 중 가장 복잡한 형태로 존재하고 있다. 펙틴물질은 과거 D-galacturonic acid(GalA)가  $\alpha$ -1,4 결합으로 연결된 고분자 물질( $\alpha$ -D-1,4-polygalacturonic acid)로, 구성 GalA의 carboxyl기가 methylester화되어 있거나 염 형태, 혹은 free acid 형태를 가지고 있다고 알려져 왔으나 실제로 자연계에 존재하는 펙틴은 이보다 훨씬 복잡한 구조를 가지고 있다고 보고되고 있다. Pectin 전체분자 중 많은 부분은 homogalacturonan(HG)으로 구성되어 있지만 여기에 다양한 oligo- 및 polysaccharide로 분지된 rhamnogalacturonan(RG)류가 공유적으로 결합되어 있는 것으로 보고되고 있다.

Table 78. Chemical properties of FBR-0 and FBR-E prepared from fermented brown rices

Sample	FBR-0 (Before enzyme treatment)	FBR-E (After enzyme treatment)
Chemical property(%) <sup>1)</sup>		
Neutral sugar	90.2 ± 0.1	62.6 ± 4.8
Uronic acid	5.1 ± 0.1	6.8 ± 0.6
KDO <sup>2)</sup> -like material	0.3 ± 0.1	6.4 ± 2.0
Protein	4.4 ± 0.3	24.2 ± 1.2
Sugar component(mole%) <sup>3)</sup>		
Rhamnose	-	2.4 ± 0.1
Fucose	-	0.5 ± 0.1
Arabinose	1.0 ± 0.1	<b>10.9 ± 0.2</b>
Xylose	1.1 ± 0.1	6.2 ± 0.2
Mannose	0.4 ± 0.1	5.9 ± 0.1
Galactose	0.7 ± 0.2	<b>23.8 ± 0.4</b>
Glucose	<b>96.8 ± 0.3</b>	12.8 ± 0.1
Total	100	100

<sup>1)</sup>Percentage (%) against of the dried material.

<sup>2)</sup>KDO means 2-*keto*-3-deoxy-D-*manno*-octulosonic acid.

<sup>3)</sup>Monosaccharides were analyzed using alditol acetate method and Mole% was calculated from the detected neutral sugar.

식물체 다당에서 보이는 각종 약리활성은 주로 pectin류에 존재하는 rhamnogalacturonan(RG)의 구조적 차이, 즉 산성당과 중성당의 종류와 양, 결합양식의 차이와 밀접한 관련이 있다고 보고되고 있으므로 현미를 발효하는 과정에서 얻어진 FBR-E 희분은 단순 물 추출물로는 분리가 힘든 arabinoxylan과 pectin 유래의 rhamnogalacturonan(RG)다당으로 구성된 화합물로 추정되었다.

## (2) 효소처리에 의한 FBR-0 다당의 분자량 분포의 변화

HPSEC를 이용하여 효소처리 전 현미발효물 유래 다당 FBR-0와 효소처리 후의 다당 FBR-E의 분자량 분포와 정제도를 측정된 결과, FBR-0은 주로 고분자 보다는 중간 분자량 영역에 broad한 peak를 형성하고 있었는데, 이는 아마도 분해가 덜된 limit dextrin의 혼합체로 추정되었다(Fig. 86A).

효소처리 후 FBR-E의 분자량 분포는 FBR-0와는 완전히 상이한 양상을 나타내었는데, Fig. 19B에 보이는 바와 같이 FBR-0의 대부분을 차지했던 limit dextrin이 효소처리에 의해 제거되면서 고분자영역의 peak가 증가한 결과로 사료되었다. 이러한 결과는 본 효소처리가 limit dextrin을 제거하기 위한 당초의 목적에 잘 부합하는 방법이었다고 판단되었다.



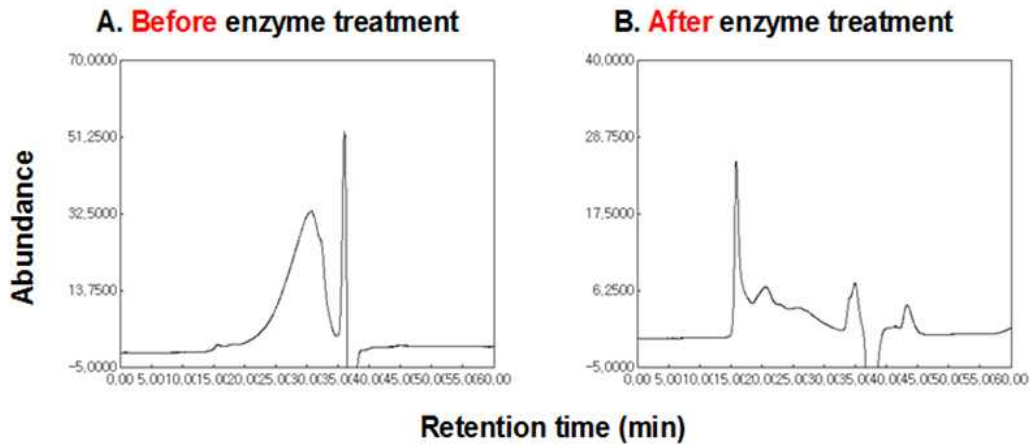


Fig. 86. Changes of elution patterns of the polysaccharides prepared from fermented brown rices before and after the enzyme treatment. HPLC equipped with Superdex 75 GL column.

(3) 효소처리에 의한 FBR-0 다당의 면역활성 변화

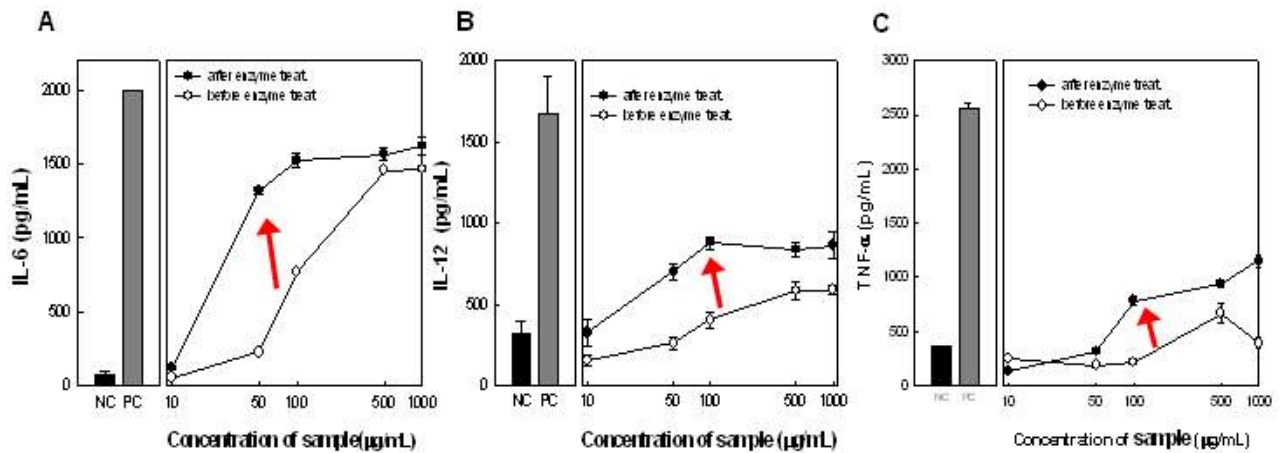


Fig. 87. Changes of macrophage-cytokine producing activity by enzyme treatment of FBR-0 by peritoneal macrophage from Balb/c mice. A, interleukin-6(IL-6); B, interleukin-12(IL-12); C, tumor necrosis factor-alpha(TNF- $\alpha$ )

효소처리 전의 FBR-0와 limit dextrin의 제거를 위한 효소처리 후 다당 FBR-E의 면역활성을 검토하기 위해, macrophage cytokine 생산능을 측정 한 결과, Fig. 86에 나타난 바와 같이 효소처리 후 다당인 FBR-E의 활성이 FBR-0에 비해 유의적으로 증가되는 양상을 나타내었다. Macrophage가 생산하는 IL-6, IL-12 및 TNF- $\alpha$ 의 생산능을 비교한 결과, 모든 결과에서 효소처리 이전 다당(FBR-0)에 비해 효소처리 이후 다당(FBR-E)은 높은 활성 증가가 관찰되었으며, 이는 효소처리에 의한 FBR-0 중의 limit dextrin을 효율적으로 제거되어 면역활성도 증가되었음을 추정케 하였다. 그러나 단일물질이 아닌 혼합물 상태인 FBR-E에서도 면역활성 성분에 대한 정확한 규명이 어렵기 때문에 추후 gel permeation chromatography를 이용한 정제를 통해 이후 실험을 진행하고자 하였다.

#### (4) 효소처리 정제다당 FBR-E로부터 면역활성 다당획분의 정제

현미발효물에서 분리 및 효소처리된 면역활성 다당인 FBR-E의 정제는 Superdex 75 GL column을 이용한 gel filtration chromatography에 의해 수행하였다. 현미발효물 유래 다당체 FBR-E는 50 mM ammonium formate buffer (pH 5.5)로 평형화시킨 Superdex 75 GL (1.0×30 cm)에 loading하고 동일 buffer를 이용하여 용출시켜 분자량이 상이한 3개 획분, 즉 FBR-E1(E-I), FBR-E2(E-II)와 FBR-E3(E-III)로 분획하였다(Fig. 88).

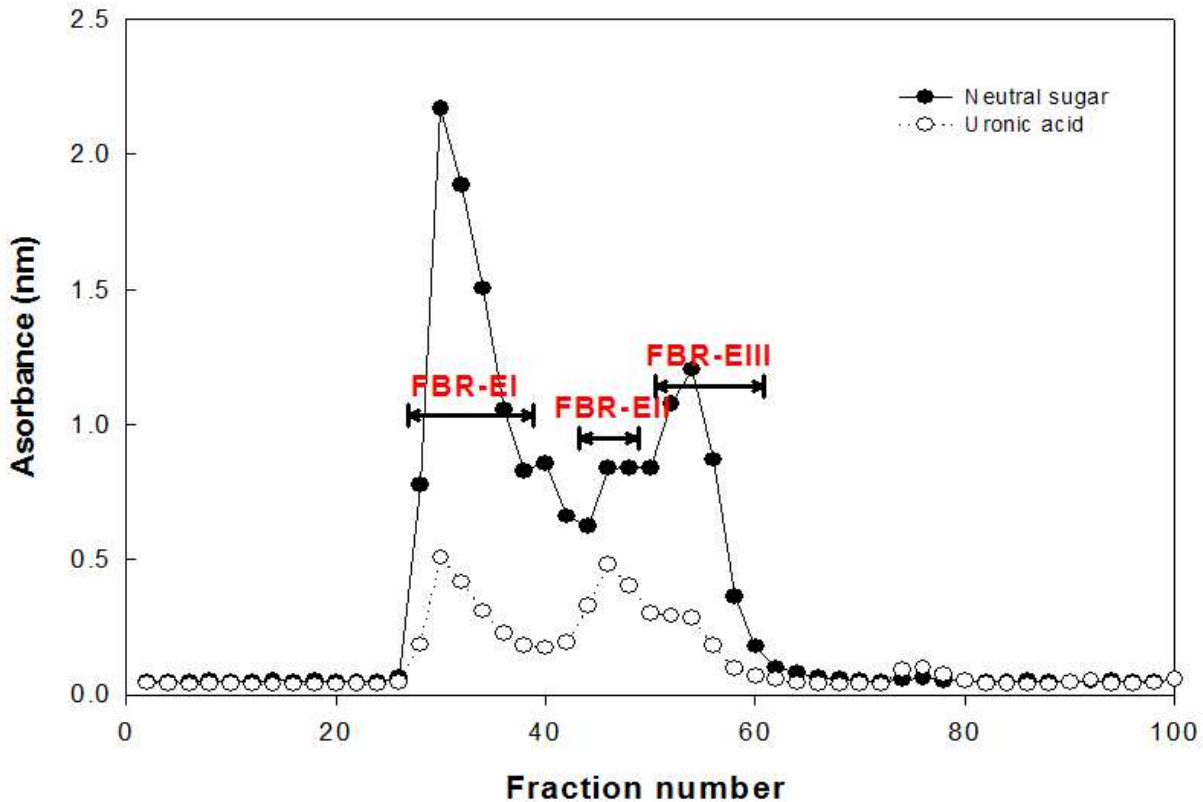
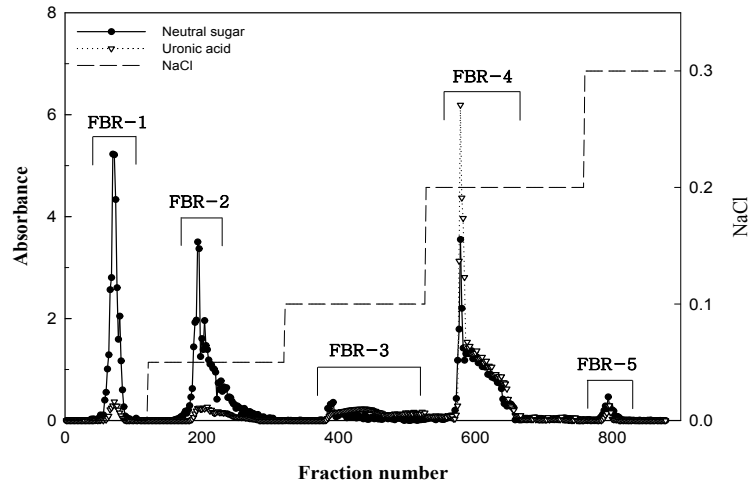


Fig. 88. Elution profile of FBR-E by gel permeation chromatography packed with Superdex 75 GL resin.

FBR-E was subjected on Superdex 75 GL column(1.0×30 cm) and eluted with 50 mM ammonium formate buffer(pH 5.5) at the flow rate of 0.5 mL/min. ●, Neutral sugar (490 nm); ■, Uronic acid (520 nm).

그러나 gel permeation chromatography를 이용해 정제된 FBR-E1, FBR-E2 및 FBR-E3는 모두 HPLC 상에서 다수의 peak를 나타내는 등 순도가 낮은 문제가 발생하였으며, 따라서 정제도가 낮은 상기방법에 의한 분획은 2, 3차년도에 실시에 부적절하다고 판단되어 Fig. 88에 나타낸 바와 같이 FBR-E의 정제는 2차례에 걸친 column chromatography에 의해 재수행되었다. 즉, FBR-E는 먼저 DEAE Sepharose FF(Cl<sup>-</sup> form)로 충전된 anion exchange chromatography를 통해 1개의 비흡착획분(FBR-1)과 6개의 흡착획분(FBR-2 ~ FBR-7)으로 분리하였다.

이온교환 수지에 흡착된 산성 조다당의 분리는 이온강도가 상이한 용매로 stepwise gradient 로 용출시켜야 분리가 용이한 특성을 나타낸다. 따라서 본 실험에서는 0.05 M, 0.1 M, 0.2 M, 0.3 M, 0.4 M, 0.5 M의 NaCl 용액을 이용하여 stepwise로 각각 용출하였는데, Fig. 89에 나타난 바와 같이 각 획분들은 모두 복잡한 peak pattern을 나타내었다.



**Fig. 89.** Elution profile of FBR-E by anion exchange chromatography packed with DEAE Sepharose FF(Cl<sup>-</sup> form) resin. The column was eluted with DW until sugar was no longer detected and then eluted with 0.05M ~ 2.0M NaCl solution by stepwise gradient. ■, Neutral sugar(490 nm); ▽, Uronic acid(520 nm).

FBR-0로부터의 얻은 획분의 수율은 Table 5에 나타난 바와 같이 0.05 M 및 0.2 M 용출획분인 FBR-2 및 FBR-4가 각각 13.7 및 23.0%로 가장 우수하였다. 한편, 정제된 각 획분을 대상으로 면역활성을 측정한 결과, macrophage 자극에 의한 IL-6 및 IL-12 생산자극 활성은 0.05 M과 5 M 용출획분인 FBR-2와 FBR-7을 제외하고는 모두 모든 농도에서 높은 자극활성을 보였다(Fig. 90). 이러한 경향은 활성다당의 정제 시 일반적으로 나타나는 현상으로, 구조와 분자량 등이 상이한 것에 의해 생리활성의 차이가 기인된다고 예상되었다.

Table 79. Yield of each subfraction of FBR-0 by DEAE sepharose FF(Cl<sup>-</sup> form) anion exchange chromatography

Fraction	Elution buffer	Recovered amount from 1 g of FBR-0	Yield(%)
FBR-1	DIW	64.8 mg	6.5%
FBR-2	0.05M NaCl	137.2 mg	13.7%
FBR-3	0.1M NaCl	65.1 mg	6.5%
<b>FBR-4</b>	<b>0.2M NaCl</b>	<b>230.4 mg</b>	<b>23.0%</b>
FBR-5	0.3M NaCl	65.8 mg	6.6%
FBR-6	0.4M NaCl	45.7 mg	4.6%
FBR-7	0.5M NaCl	13.2 mg	1.3%
FBR-8	2.0M NaCl	-	-
Total		623.1 mg	62.3%

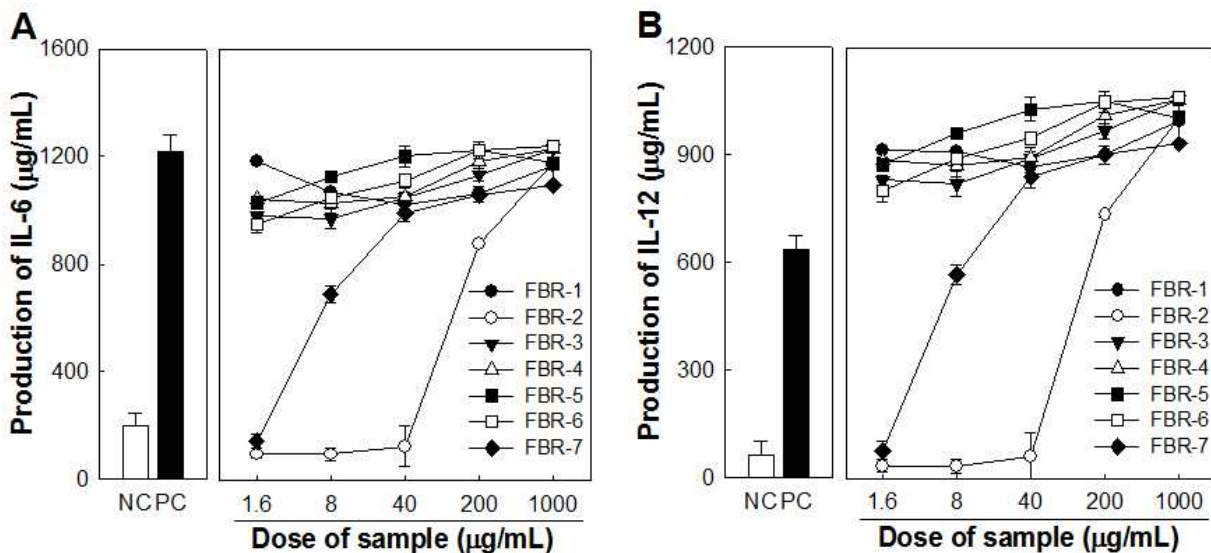
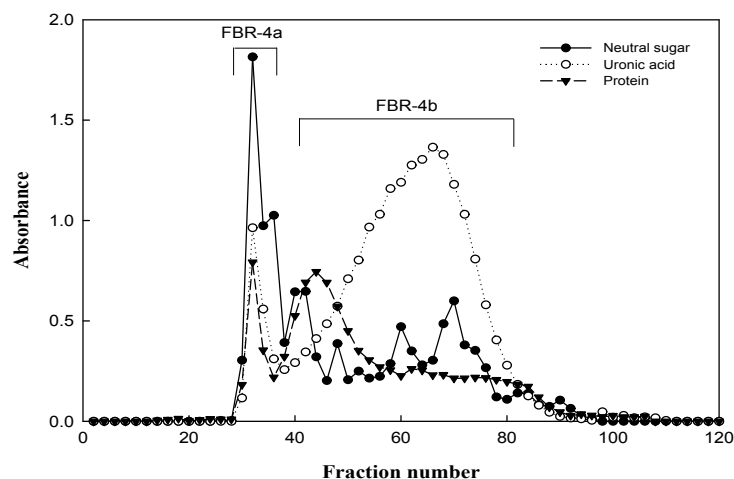


Fig. 90. IL-6(A) and IL-12(B) producing activity of subfractions of FBR-0 by DEAE sepharose FF(Cl<sup>-</sup> form) anion exchange chromatography on murine peritoneal macrophage from Balb/c mice.

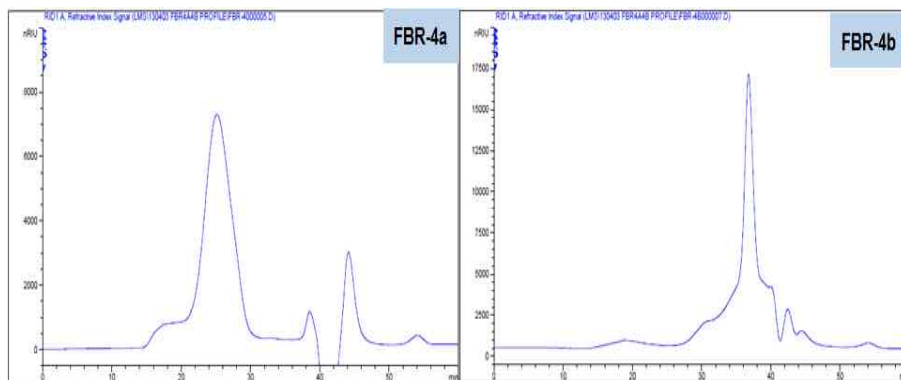
따라서 수율과 면역활성 등 종합적인 평가를 통해 이후의 정제과정을 위해서는 0.2 M 용출 획분(FBR-4)이 가장 적합할 것으로 판단되어 두 번째 정제과정인 gel filtration chromatography를 수행하였다. 면역 활성과 수율이 양호했던 FBR-4 획분은 50 mM ammonium formate buffer(pH 5.5)로 평형화된 Sephadex G-100 column(2.5×90 cm)에 loading 하고 동일 buffer를 이용하여 용출시켜 분자량이 상이한 2개 획분, FBR-4a와 FBR-4b로 분획 하였으며(Fig. 90), 이들은 현미발효물 유래 정제 다당으로 이후의 실험에 사용하였다.



**Fig. 91.** Elution profile of FBR-4 fraction by gel permeation chromatography packed with Sephadex 75-100 resin. FBR-4 was subjected on Sephadex G-100 column (2.590 cm) and eluted with 50 mM ammonium formate buffer (pH 5.5) at flow 1 mL/min. ●, Neutral sugar(490 nm); ■, Uronic acid(520 nm); ▼, Protein(280 nm).

### (5) 현미발효물 유래 정제 다당 FBR-4a 및 FBR-4b의 화학적 특성

현미발효물 유래 정제 과정에서 높은 수율과 면역활성을 보였던 FBR4의 subfraction인 FBR-4a 및 FBR-4b를 Superdex 200 GL이 장착된 HPLC를 이용하여 순도 및 분자량을 확인하였다. 두획분 모두 단일 peak를 나타내지는 않았으나 주 peak를 중심으로 분자량이 상이한 소량의 물질이 혼입된 양상의 비교적 우수한 정제도로 확인되었으며, 표준물질(pullulan series)을 standard로 계산한 결과 각각 62 kDa 및 21 kDa으로 확인되었다(Fig. 92). 또한 FBR-4a 및 FBR-4b의 일반 화학특성을 살펴본 결과, Table 80에 나타난 바와 같이 FBR-4a는 중성당(88.3%) 및 산성당(11.7%)으로 구성되어 있었으며, 일반적으로 식물추출물에서 검출되는 단백질 및 KDO물질은 함유하고 있지 않았다. FBR-4b의 경우, 47.6%의 높은 산성당 함량을 함유한 다당획분으로 약간의 KDO를 함유하고 있는 것으로 분석되었다.



**Fig. 92. Elution pattern of FBR-4a and FBR-4b purified isolated from fermented brown rice. HPLC equipped with Superdex 200 GL.**

FBR-4a 및 FBR-4b를 가수분해하여 alditol acetate 유도체로 전환하고 구성당을 분석한 결과, FBR-4a는 galactose, arabinose 및 glucose를 각각 43.2%, 21.7% 및 12.5%의 높은 비율로 함유하고 있었으며, FBR-4b의 경우 47.6%의 GalA+GlcA 외에 rhamnose, arabinose, mannose 및 galactose(각각 8.1, 8.4, 8.8 및 12.2%)를 고 비율로 함유하고 있었다 (Table 80 및 Fig. 93). 이러한 결과는 FBR-4a가 현미에 존재하는 pectin 다당의 rhamnogalacturonan I (RG-I)에서 분리된 arabinogalactan일 가능성으로 강력히 시사되었으며, FBR-4b는 현미의 발효 과정 중 생산된 다양한 glycolytic enzyme에 의해 절단된 RG-I 및 RG-II 단편으로 존재하고 있음을 추론할 수 있었다. 한편, 식물세포벽에 존재하는 pectic polysaccharide는 homogalacturonan에 rhamnogalacturonan I (RG-I) 및 rhamnogalacturonan II (RG-II)가 공유적으로 결합되어 있다고 보고되고 있는데 특히 RG-I의 경우 rhamnogalacturonan core에 arabinan, galactan, arabinogalactan 및 oligosaccharide류가 고도로 분지된 구조를 가지고 있다고 알려져 있다.

Table 80. Chemical properties of FBR-4a and FBR-4b purified from fermented brown rices

Sample	FBR-4a	FBR-4b
Chemical property(%) <sup>1)</sup>		
Neutral sugar	88.3 ± 4.1	50.8 ± 1.7
Uronic acid	11.7 ± 0.2	47.6 ± 0.6
Protein	-	-
KDO-liked material <sup>2)</sup>	-	1.6 ± 1.7
Sugar component(mole%) <sup>3)</sup>		
Rhamnose	2.8 ± 0.5	<b>8.1 ± 0.9</b>
Fucose	0.2 ± 0.0	2.0 ± 0.2
Arabinose	<b>21.7 ± 3.1</b>	<b>8.4 ± 1.1</b>
Xylose	2.4 ± 0.7	4.2 ± 1.2
Mannose	5.5 ± 1.1	<b>8.8 ± 1.8</b>
Galactose	<b>43.2 ± 2.4</b>	<b>12.2 ± 0.5</b>
Glucose	<b>12.5 ± 1.8</b>	7.1 ± 1.1
GalA+GlcA <sup>4)</sup>	11.7 ± 0.2	<b>47.6 ± 0.6</b>
Yield <sup>5)</sup>	21.8%	46.5%

<sup>1)</sup>Percentage (%) against of the dried material.

<sup>2)</sup>KDO means 2-keto-3-deoxy-D-manno-octulosonic acid.

<sup>3)</sup>Monosaccharides were analyzed using alditol acetate method and Mole% was calculated from the detected neutral sugar.

<sup>4)</sup>GalA+GlcA means amount of galacturonic acid and glucuronic acid.

<sup>5)</sup>Yield against of FBR-4 fraction.

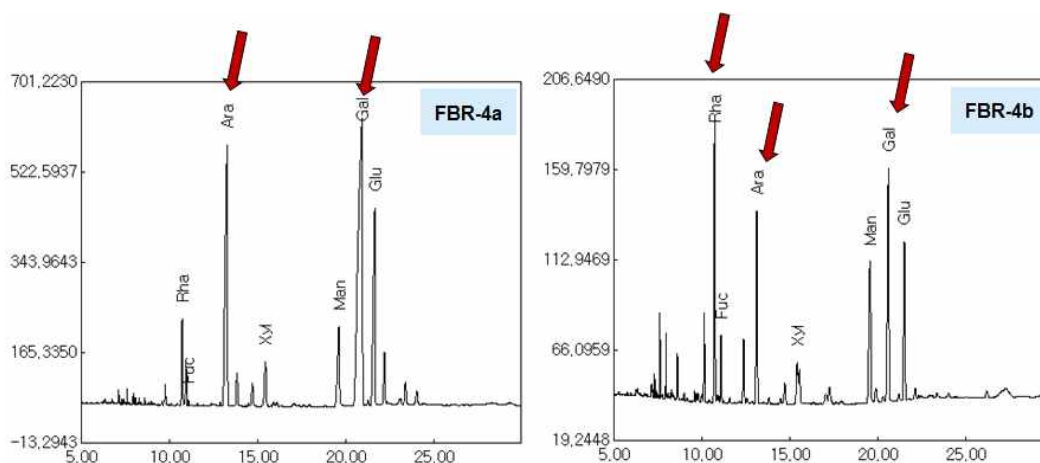


Fig. 93. GC chromatogram for the determination of sugar composition of FBR-4a and FBR-4b purified from fermented brown rice.



(6) FBR-4a 및 FBR-4b의  $\beta$ -glucosyl Yariv reagent와의 반응성 검토

FBR-4a 및 FBR-4b는 arabinose와 galactose를 높은 비율로 함유하고 있어 이들이 arabinogalactan으로 존재할 가능성이 높다고 판단되었으므로 이를 재차 확인하기 위해  $\beta$ -glucosyl Yariv reagent와의 반응성을 검토하였다.  $\beta$ -Glucosyl Yariv reagent [1,3,5-tri-(4- $\beta$ -glucopyranosyl oxyphenylazo)-2,4,6-trihydroxy-benzene]는 arabinogalactan 중 II형의 arabino- $\beta$ -3.6-galactan과 특이적으로 반응하여 적색 침전을 형성하는 것으로 알려져 있다 (Fig. 94).

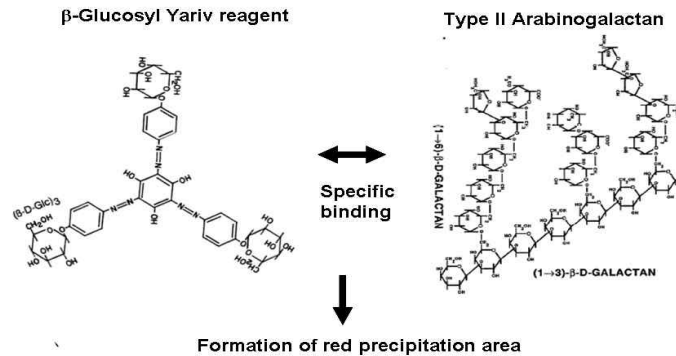


Fig. 94. Scheme of the reactivity between arabinogalactan and  $\beta$ -glucosyl Yariv reagent.

이는 다당과 특이적으로 반응하는 유일한 발색 시약으로 알려져 있으므로, 이 원리를 이용, FBR-4a 및 FBR-4b에 대한 single radial 젤 확산을 행하였다. 표준 arabino- $\beta$ -3.6-galactan인 gum arabic은 농도 의존적으로 침전환이 증가하는 양상을 보여 주었으며, FBR-4a의 경우 침전환 형성이 관찰된 반면 FBR-4b는 어떠한 농도에서도 반응환이 관찰되지 않았다(Fig. 94). 또한 침전환의 크기는 동일량의 표준물질이 형성한 침전환의 약 60-70%정도로 나타났으며 (Fig. 95), 이러한 결과는 FBR-4a의 구조 내에는 II형 arabinogalactan이 높은 비율로 함유되어 있음을 나타내고 있었다.

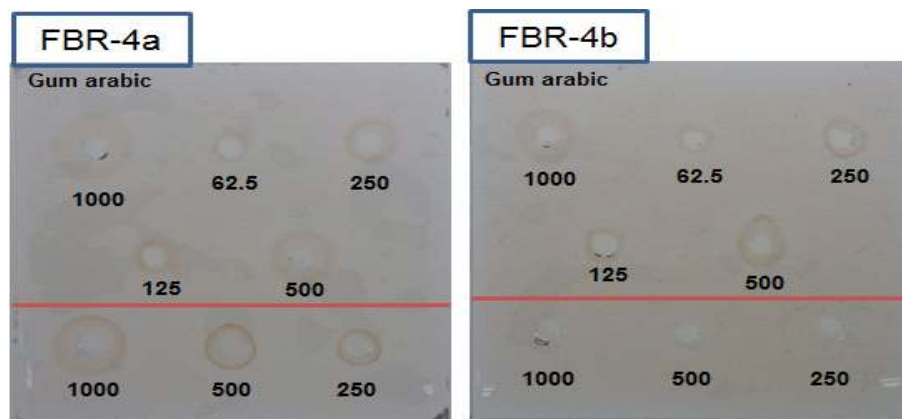


Fig. 95. Single radial gel diffusion of FBR-4a and FBR-4b purified from fermented brown rice by  $\beta$ -glucosyl Yariv reagent.  $\beta$ -Glucosyl Yariv reagent has specific binding affinity



to arabino-3,6-galactan. Gum arabic was used as a positive reference.

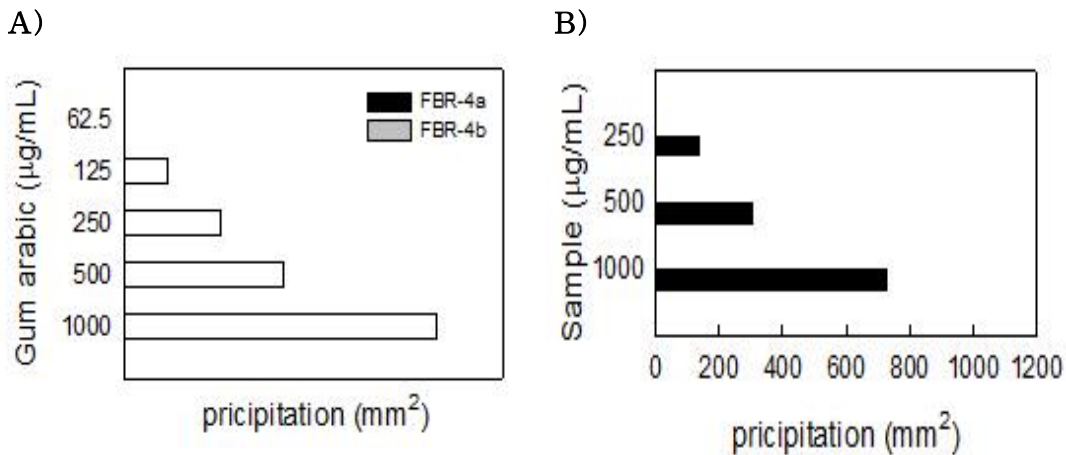


Fig. 96. Reactivity between  $\beta$ -glucosyl Yariv reagent and FBR-4a purified from fermented brown rice.  $\beta$ -Glucosyl Yariv reagent has specific binding affinity to arabino-3,6-galactan. Gum arabic was used as a positive reference.

라. 현미발효물 유래 활성 다당체의 면역 활성 특성 평가

(1) 현미발효물 유래 정제 다당의 면역세포 및 장관 상피세포에 대한 독성평가

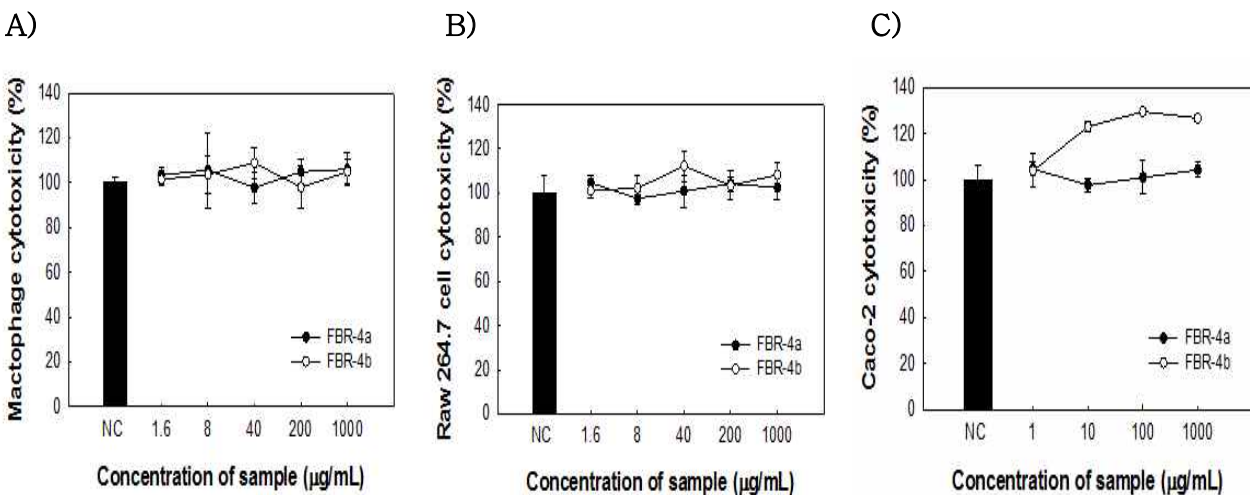


Fig. 97. Cytotoxic effect of FBR-4a and FBR-4b purified from fermented brown rice on murine peritoneal macrophage(A), RAW 264.7 cells line(B) and Caco-2 cells(C) *in vitro*. Each cell ( $2.5 \times 10^5$  cells/well) were treated with various concentrations of FBR-4a or FBR-4b in 96 well plate for 72 h. The cell cytotoxicity were determined by cell counting kit (CCK) assay. NC(medium) used as negative control.

현미발효물 유래 정제 다당 중 높은 수율과 면역활성을 보였던 FBR-4a 및 FBR-4b는 mouse의 복강으로부터 분리한 macrophage와 murine macrophage 세포주인 RAW 264.7, 장관 상피 세포주 Caco-2에 대한 직접적인 독성여부를 측정하고자 하였다.  $2.5 \times 10^6$  cells/mL로 조정된 각각의 세포주에 FBR-4a 및 FBR-4b는 1.6~1000  $\mu\text{g/mL}$ 까지의 다양한 농도로 가하여 3일간 배양한 후 세포의 생존여부를 확인하였으며, 그 결과는 Fig. 97에 나타난 바와 같이 모든 세포군에서 독성은 나타나지 않았으며, 특히 고농도에서 생육의 저해는 관찰되지 않았다. 따라서 이들의 면역세포 및 장관 상피세포에 대한 평가는 1.6~1000  $\mu\text{g/mL}$ 까지의 농도로 진행하기로 하였다.

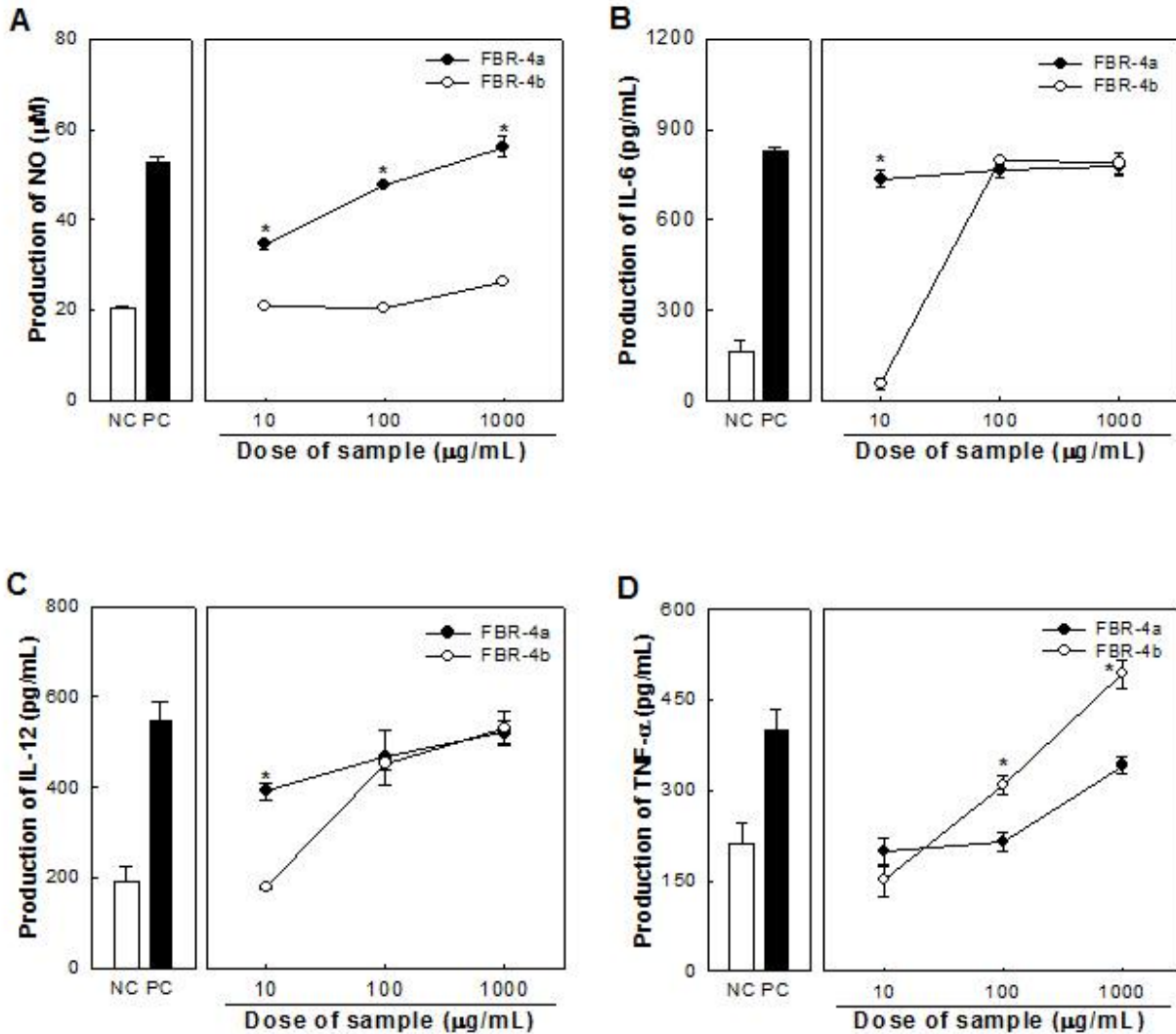
## (2) 현미발효물 유래 정제 다당의 대식세포에 대한 활성

### (가) 대식세포(Macrophage)의 NO 생산에 미치는 영향

Fig. 31A에 제시한 것처럼, 현미발효물 유래 정제 다당 FBR-4a 및 FBR-4b는 모두 농도의존적으로 대식세포를 자극하여 NO를 생성하는 경향을 보였다. 하지만 음성 대조군인 NC와 비교할 때 저분자 다당획분인 FBR-4b의 NO 생성능은 유의적 차이를 보이지 않은 반면, 고분자 다당획분인 FBR-4a는 1,000  $\mu\text{g/mL}$  농도에서 NC의 약 3배에 이르는 높은 NO 생성량을 나타냈으며 농도의존적 활성증가 양상도 뚜렷하게 나타났다.

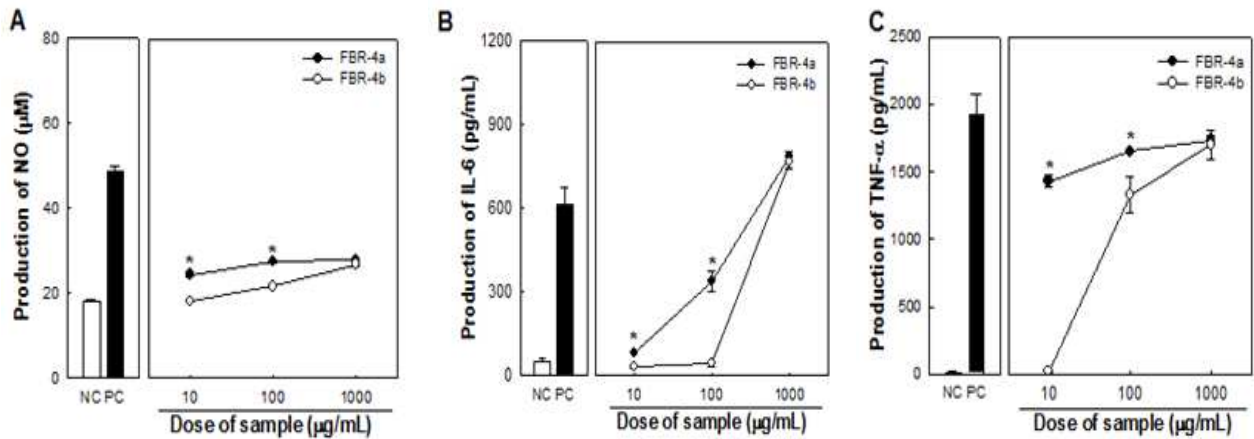
### (나) 대식세포(Macrophage)의 cytokine 생산에 미치는 영향

고분자 다당획분인 FBR-4a와 저분자 다당획분 FBR-4b는 Balb/c mouse에서 유래한 복강 대식세포를 자극하여 IL-6, IL-12 및 TNF- $\alpha$ 의 생성을 모두 농도 의존적으로 증진시키는 경향을 나타내었다(Fig. 98B, C 및 D). IL-6와 IL-12 생성능의 경우 1,000  $\mu\text{g/mL}$ 의 고농도에서는 FBR-4a와 FBR-4b가 유사한 활성을 보였지만, 10  $\mu\text{g/mL}$ 의 저농도에서 FBR-4a만이 생성능을 나타내었다(Fig. 31B 및 C). 하지만 TNF- $\alpha$  생산능에서는 IL-6 및 IL-12의 결과와는 반대인 결과를 나타내었는데, 10  $\mu\text{g/mL}$ 의 저농도를 제외하고는 FBR-4b가 FBR-4a에 비해 상대적으로 높은 활성을 나타내었다(Fig. 98D). 이 결과를 종합해 볼 때, 고분자 다당획분인 FBR-4a는 TNF- $\alpha$ 를 제외하고 NO, IL-6 및 IL-12에서 상대적으로 저분자 다당획분인 FBR-4b에 비해 우수한 생성 유도능을 나타내는 것으로 확인되었다.



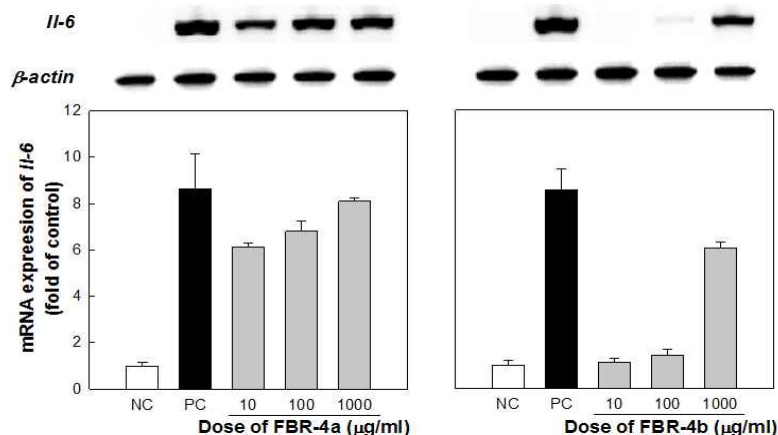
**Fig 98.** Effect of FBR-4a and FBR-4b on production of nitric oxide and cytokines (IL-6, IL-12 and TNF- $\alpha$ ) by murine peritoneal macrophage from Balb/c mice. Peritoneal macrophage( $2.0 \times 10^6$ /mL) were treated with various concentrations of FBR-4a and FBR-4b in 96 well plate for 24 h. The concentrations of NO and cytokines in the medium were determined by Griess reagent and ELISA kits. NC(medium) and PC(LPS 5  $\mu$ g/mL) used as negative and positive control, respectively. A, nitric oxide(NO); B, interleukin-6(IL-6); C, interleukin-12(IL-12); D, tumor necrosis factor- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ ).

한편, FBR-4a 및 FBR-4b는 RAW 264.7 대식세포주를 이용한 동일실험을 진행하여 활성을 비교한 결과, NO 및 IL-6, TNF- $\alpha$  생산자극효과는 마우스 복강 유래 macrophage 실험 결과와는 약간 다른 양상을 나타내었다. 하지만 고분자 다당 FBR-4a가 저분자 다당 FBR-4b에 비해 모두 우수한 생산 자극 활성을 보임으로서 FBR-4a가 대식세포에 대해 더 유효하게 작용함을 추론케 하였다(Fig. 99).



**Fig 99.** Effect of FBR-4a and FBR-4b on production of nitric oxide and cytokines (IL-6, IL-12 and TNF- $\alpha$ ) by RAW 264.7 murine macrophage cell line. RAW 264.7 cells( $2.0 \times 10^6$ /mL) were treated with various concentrations of FBR-4a and FBR-4b in 96 well plate for 24 h. The concentrations of NO and cytokines in the medium were determined by Griess reagent and ELISA kits. NC(medium) and PC(LPS 5  $\mu$ g/mL) used as negative and positive control, respectively. A, nitric oxide(NO); B, interleukin-6(IL-6); C, tumor necrosis factor- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ ).

Reverse transcription-PCR을 이용한 유전자의 발현을 확인한 실험에서도 FBR-4a는 FBR-4b보다 각 농도에서 공히 높은 IL-6 mRNA의 발현을 나타냈으며, 특히 10  $\mu$ g/mL의 저 농도에서도 FBR-4a는 무처리군에 비해 약 6배의 IL-6 mRNA의 발현을 보인 반면 FBR-4b는 거의 활성을 나타내지 않았다(Fig. 100). TNF- $\alpha$ 의 mRNA 발현의 경우에서도 FBR-4a가 FBR-4b에 비해 약간 높은 발현정도를 나타내었지만, 두 시료 모두 농도 의존적인 경향은 보여주지 않았다(Fig. 101).



**Fig. 100.** Effect of FBR-4a and FBR-4b on mRNA expression of IL-6 of RAW 264.7 murine macrophage cell line. NC(medium) and PC(LPS 5  $\mu$ g/mL) used as negative and positive control, respectively.

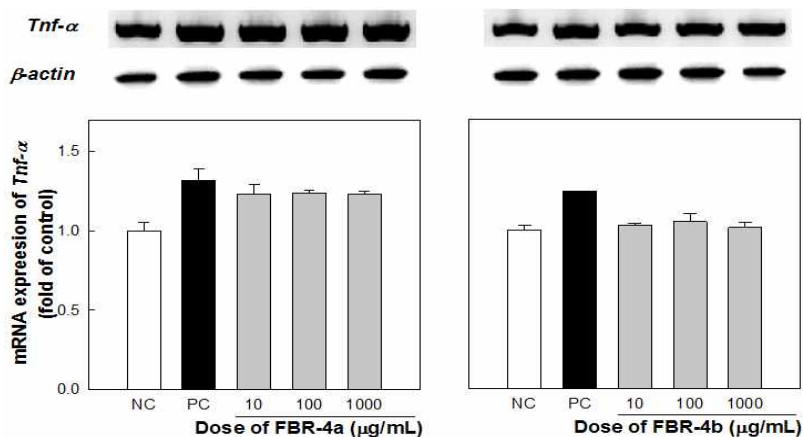


Fig. 101. Effect of FBR-4a and FBR-4b on mRNA expression of TNF- $\alpha$  of RAW 264.7 murine macrophage cell line. NC (medium) and PC (LPS 5  $\mu$ g/mL) used as negative and positive control, respectively.

결론적으로, 본 실험에서 Balb/c에서 유래된 복강 내 대식세포 및 대식세포주 RAW264.7 세포는 각각 FBR-4a 및 FBR-4b에 의해 24시간 자극되었을 때, 염증부위에 면역세포의 귀소와 직접 관련이 있는 염증성 cytokine으로 분류되는 TNF- $\alpha$  및 IL-6의 생산 및 세포성 면역능의 활성화와 직접 관련이 있는 IL-12를 유의적으로 유도하는 활성이 있음이 확인되었다. 또한, IL-6 및 TNF- $\alpha$ 는 mRNA level에서도 그 생산 증가가 확인되었다. 이들 결과로부터, 현미발효물 유래 정제 다당 FBR-4a 및 FBR-4b는 생체방어에 작용하는 선천면역계를 활성화하는 기능이 있다고 판단할 수 있다.

(3) 현미발효물 유래 정제 다당의 장관면역계에 대한 활성(*in vitro*)

(가) Peyer's patch cell에 의한 cytokine 생산 자극 활성 및 이를 통한 골수세포 증식 활성

Peyer's patch는 T 세포와 B 세포 등으로 구성되어 있고 T세포는 macrophage와 함께 작용하여 다양한 cytokine을 생산하게 되는데, 이중 골수의 증식에 관여를 하는 IL-6, GM-CSF 등과 같은 cytokine에 의해 전신면역으로 확대가 일어나게 된다. 이를 확인하기 위하여 시료에 의한 Peyer's patch cell에서의 cytokine의 생성량과 Peyer's patch cell 배양 상등액을 mouse bone marrow에 적용하여 골수세포의 proliferation에 미치는 영향을 확인하고자 하였다.

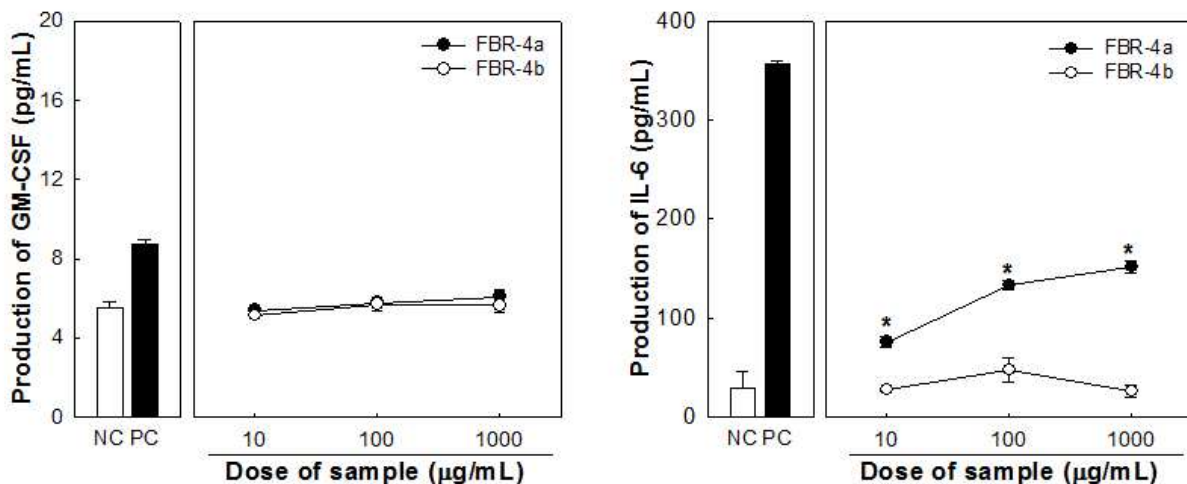


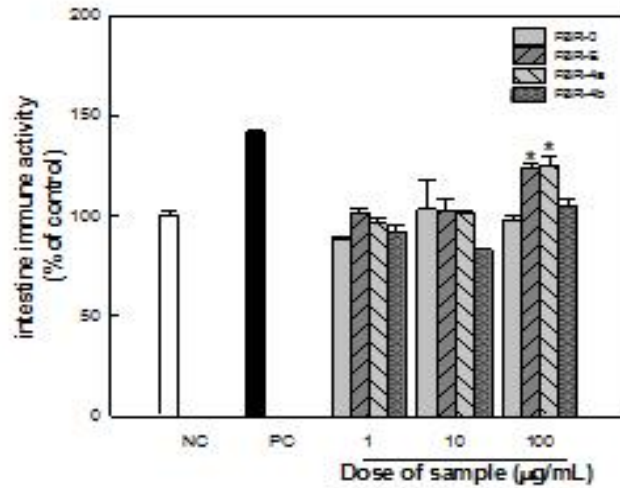
Fig. 102. Effect of FBR-4a and FBR-4b on production of GM-CSF (A) and IL-6 (B) by Peyer's patch cells. Peyer's patch cells ( $2.0 \times 10^6$ /mL) were treated with FBR-4a and FBR-4b in 96 well plate for 5 days. The concentration of cytokine in the medium was determined by ELISA kits. NC(medium) and PC(LPS 5 µg/mL) used as negative and positive control, respectively.

현미발효물로부터 분리한 면역활성 정제 다당인 FBR-4a 및 FBR-4b는 각각 C3H/HeN mouse에서 유도된 Peyer's patch cell에 처리하여 이들이 생산한 GM-CSF와 IL-6의 함량을 ELISA로 측정하였는데, 두 시료 모두 granulocyte macrophage-colony stimulating factor(GM-CSF)의 생산에는 어떠한 영향도 미치지 않는 결과를 보여주었다(Fig. 102). 하지만 IL-6 생산능의 경우 FBR-4a는 농도의존적인 증가 경향을 보였으나 FBR-4b의 경우에는 NC와 비교했을 때 생산유도 효과는 관찰되지 않았다. 따라서 장관면역세포인 Peyer's patch cell에 대한 자극 효과는 현미발효물 유래 고분자 정제 다당인 FBR-4a가 우수할 것으로 예상되었다.

한편 FBR-4a와 FBR-4b에 대한 Peyer's patch를 경유한 골수세포 증식활성을 검토한 결과, Fig. 103에 나타난 바와 같이 FBR-4a의 경우 음성대조군(NC)에 비해 약 25%로 유의적 활성 증가가 관찰된 반면, FBR-4b에서는 활성 증가를 나타내지 않았다. 하지만 이들 정제획분의 시료대조군으로 조다당 획분인 FBR-0와 FBR-E에 대한 Peyer's patch 경유 골수세포 증식능을

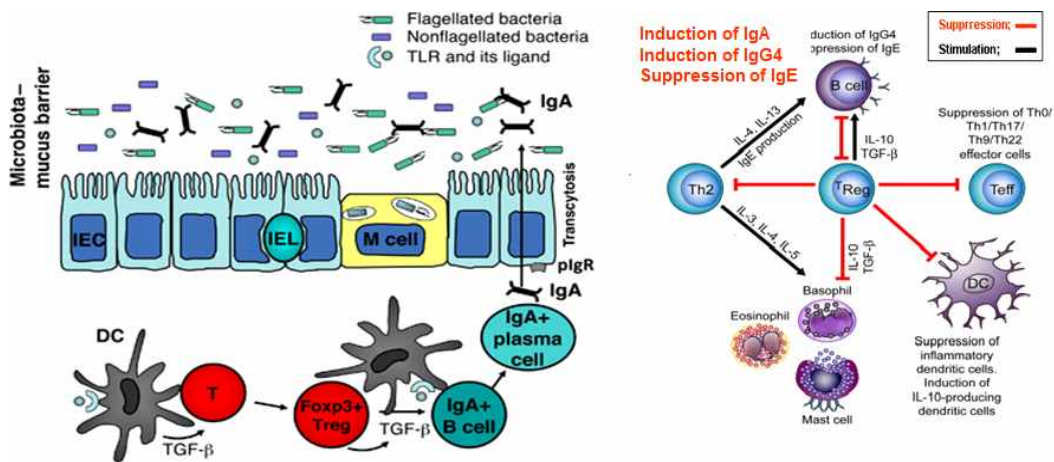


비교한 결과, FBR-0는 어떠한 농도에서도 유의적인 활성이 나타나지 않았으나 FBR-E는 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서 유의적으로 활성의 증가를 나타내었다(Fig. 103). 이러한 결과는 효소처리에 의해 조제된 FBR-E 중 장관면역 활성 성분은 거의 FBR-4a로 정제되었음을 추론하게 하였다.



**Fig 103. Bone marrow cell proliferating activity through Peyer's patch cells of FBR-4a and FBR-4b.** Peyer's patch cells( $2.0 \times 10^6/\text{mL}$ ) were treated with FBR-4a and FBR-4b in 96 well plate for 12 h. The concentration of cytokine in the medium was determined by ELISA kits. NC(medium) and PC(LPS  $10 \mu\text{g}/\text{mL}$ ) used as negative and positive control, respectively.

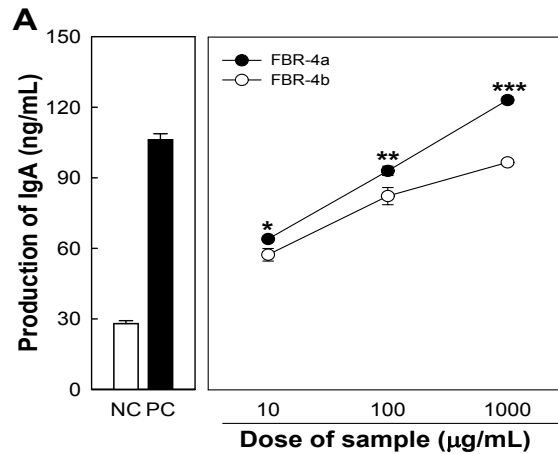
(나) FBR-4a 및 FBR-4b의 Peyer's patch cell 자극에 의한 IgA 생산자극 활성



**Fig. 104. IgA production by Peyer's patch cells and related regulatory mechanism.**

시료 자극에 의해 Peyer's patch 내 T세포 중 Treg 세포가 자극하게 되면 장관내 분비형 항체인 IgA의 생산에 중요한 역할을 담당하는 IL-10 및 transforming growth factor- $\beta$ (TGF- $\beta$ ) 등의 cytokine의 생산이 촉진되고, 점막 면역과 관련된 IgA 항체의 생성이 증가하게 된다고 알려져 있다(Fig. 104). FBR-4a 및 FBR-4b를 Peyer's patch cell에 처리하고 IgA의 생산량을 조

사한 결과, 두 시료 모두 IgA의 생산량을 농도 의존적으로 증가시켰는데, 특히 고분자 정제 다당획분인 FBR-4a의 경우 지금까지의 면역활성 실험의 결과와 마찬가지로 저분자 정제 다당획분인 FBR-4b에 비해서 유의적으로 우수한 IgA 생산능을 나타내었다(Fig. 105).



**Fig. 105. Effect of FBR-4a and FBR-4b on production of IgA by Peyer's patch cells.** Peyer's patch cells( $2.0 \times 10^6$ /mL) were treated with FBR-4a and FBR-4b in 96 well plate for 72 h. The concentration of IgA in the medium was determined by ELISA kits. NC(medium) and PC(LPS 10 µg/mL) used as negative and positive control, respectively.

IgA는 인체에서 생산되는 총 면역글로브 항체의 약 6%를 차지하는 대표적 분비형 항체로써 주로 타액, 눈물 그리고 장점막(mucosal-associated lymphoid tissues; MALT)에서 주로 분비되며 점막을 통하여 인체로 침입하는 병원균의 제거를 담당하는 생체방어의 최일선을 담당하는 항체로 인간은 1일 평균 약 3 g의 IgA를 생산하는 것으로 보고되어 있다. 따라서 현미발효물 유래 면역 활성다당은 인체의 항상성 유지에 중요 역할을 담당하는 장관면역계에 유효하게 관여함을 재차 확인할 수 있었다.

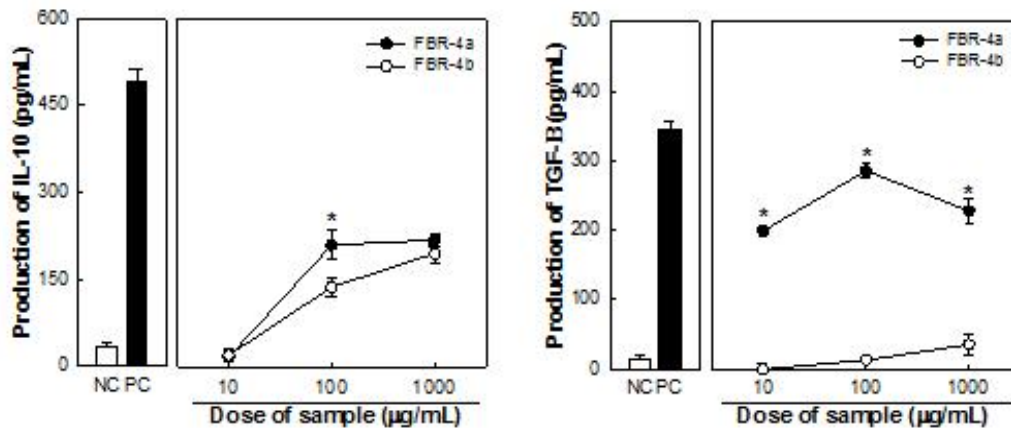
#### (다) Peyer's patch cell에 의한 IgA 생산 관련 cytokine의 생산

현미발효물로부터 유래된 정제 다당획분 FBR-4a 및 FBR-4b는 Peyer's patch cell를 자극하여 농도 의존적으로 IgA의 생산을 자극시켰다는 사실은 IgA 생산에 관련된 cytokine의 변화를 예상할 수 있었다. 따라서 FBR-4a 및 FBR-4b의 직접적인 자극에 의한 Peyer's patch cell의 cytokine 생산을 *in vitro*에서 측정하고자 하였으며, 결론적으로 활성 Peyer's patch cell은 FBR-4a 및 FBR-4b에 의해 IL-10 및 TGF-β의 생산을 촉진됨을 확인할 수 있었다(Fig. 106). IL-10의 경우, 두 시료는 모두 농도 의존적인 생산량의 증가가 관찰되었지만 상대적 활성은 FBR-4a가 우수하였고 FBR-4a는 시료농도 100 µg/mL 이상에서는 생산량의 증가가 둔화되는 경향을 보임으로서 현미발효물 유래 정제 다당획분 FBR-4a의 유효 활성 최대농도는 약 100 µg/mL일 것으로 추측되었다(Fig. 106A). 한편, Peyer's patch cell의 TGF-β 생산자극 효과는 저분자 다당인 FBR-4b의 경우 매우 낮은 것으로 관찰된 반면, 고분자 다당 FBR-4a에서는 음성대조군(NC)에 비해 최대 10배 이상의 높은 생산량을 보였다. FBR-4a는 100 µg/mL의 농도에서 TGF-β 생산을 최대로 자극하였으나 그 이상의 농도에서는 생산량이 감소되는 경향을



보였다(Fig. 106B).

이 결과를 통해 FBR-4a 및 FBR-4b는 모두 장관면역인 Peyer's patch cell의 IgA 생산을 촉진하였으며, IgA 생산과 관련된 cytokine인 IL-10 및 TGF- $\beta$ 의 생산 결과와도 일치하였다. 따라서 장관면역세포 중 regulatory T cell(Treg)이 정제 다당획분 시료에 의해 자극되어 IL-10 및 TGF- $\beta$ 를 분비하고, 이들에 의해 IgA+ B cell의 분화를 촉진하여 IgA+ plasma cell로 전환 시킴으로써 다량의 IgA를 생산하도록 유도됨이 추론될 수 있었다.



**Fig. 106. Effect of FBR-4a and FBR-4b on production of IgA by Peyer's patch cells.** Peyer's patch cells( $2.0 \times 10^6$ /mL) were treated with FBR-4a and FBR-4b in 96 well plate for 120 h. The concentration of cytokine in the medium was determined by ELISA kits. NC(medium) and PC(LPS 10  $\mu$ g/mL) used as negative and positive control, respectively.

#### (라) Caco-2 cell과 면역세포의 혼합배양계를 이용한 면역세포의 증식능(*in vitro*)

현미발효물 유래 정제 다당획분 FBR-4a 및 FBR-4b는 다당이라는 특성상, 시료의 장관내 흡수에 대한 논란이 있는 것이 사실이다. 최근 다당과 같은 거대분자의 흡수가 기존에 제시되어 왔던 장관 상피세포 사이의 tight junction을 통한 흡수, endocytosis 및 exocytosis에 의한 상피세포 통과라는 가설 외에도 Peyer's patch를 둘러싼 장관측 상피세포 중 M-cell을 경유하여 진행된다는 많은 연구가 보고되어 있다. 따라서 본 실험에서는 경구투여된 활성다당이 장관 상피세포를 통과하여 흡수된 후, 체내 면역세포들과 반응, 그들을 활성화시킬 수 있다는 가설을 증명하기 위해서, Fig. 6에서 설명한 바와 같이 Transwell® insert가 장착된 12 well plate를 이용, 실험을 실행하였다. 즉, transwell membrane 상층부에는 장 상피 모델 세포주인 Caco-2 cell을 배양하여 세포 monolayer를 형성시키고, 하층부에는 대식세포 모델세포주인 RAW 264.7를 배양하면서, transwell 상층부에 현미발효물 유래 정제다당을 첨가하여 본 시료가 Caco-2 cell을 통과하여 하층부에 존재하는 RAW 264.7 cell을 자극할 수 있는지 여부를 RAW 264.7 cell이 생산하는 IL-6 및 IL-12 함량을 측정하였다.

실험 결과, Fig. 107에 나타난 바와 같이 현미발효물 유래 활성다당 FBR-4a는 transwell 상층부의 Caco-2 cell monolayer를 통과하여 하층부의 RAW 264.7 cell을 자극하여 시료의 농도에 의존적인 IL-6의 생산을 유도할 수 있음이 확인되었다. 시료 투과에 의한 IL-6 생산 정도는

시료를 단순히 RAW 264.7 cell 배양액에 첨가했을 때 보다는 낮았으나, 농도별로 약 55~75% 정도의 투과율을 보이는 것으로 관찰되었다.

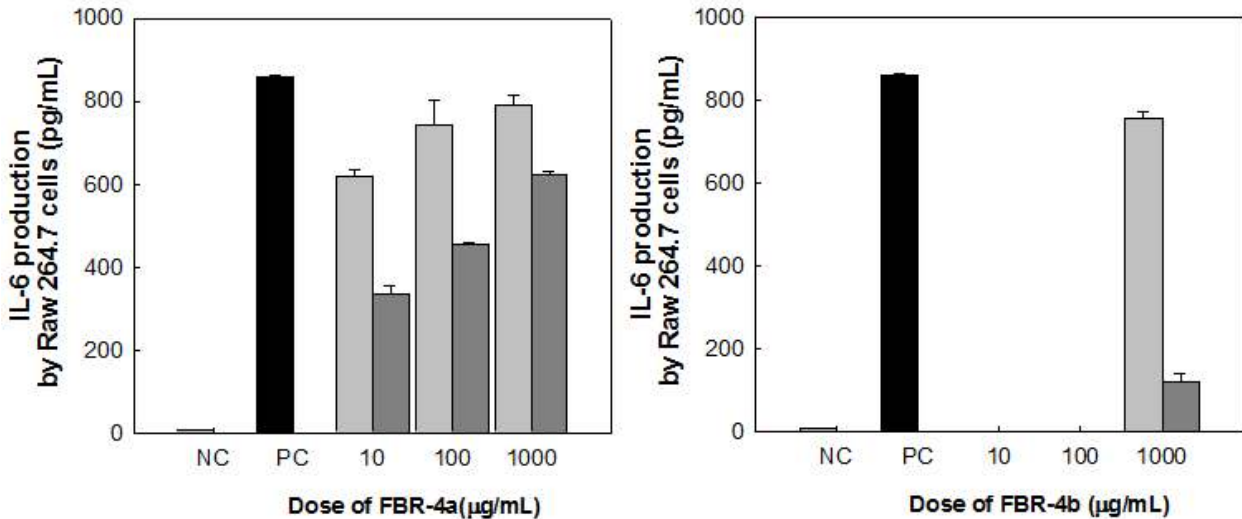


Fig. 107. Effect of FBR-4a(A) and FBR-4b(B) passing through Caco-2 cell monolayer on cytokine production by RAW 264.7 cells.

FBR-4b의 경우는 FBR-4a와는 달리 약 15% 미만의 활성이 관찰되어 상대적으로 낮은 투과율을 짐작케 하였다. 이러한 결과는 FBR-4a가 주로 arabino- $\beta$ -3,6-galactan 형태인 중성 다당획분이고, FBR-4b는 galacturonic acid(산성당) 함량이 높은 pectic polysaccharide임을 고려할 때, 전기적 성질을 갖지 않는 FBR-4a가 장관상피세포를 통과할 때의 세포막 지질층을 통과하는데 더 유리하게 작용했을 가능성이 추론되었다. 향후, 본 assay system을 이용, 상층부에는 장관상피세포인 Caco-2 cell을, 하층부에는 장관면역세포인 Peyer's patch cell을 이식하여 사용할 경우, 장관과 유사환경을 갖는 in vitro 조건에서 장관면역세포 활성화 물질을 검색하는데 있어 신속, 간편하게 응용될 수 있을 것으로 판단되었다.

마. 장관면역계 활성화에 미치는 현미발효물 유래 다당의 경구 투여 효과(*in vivo*)

(1) 현미발효물 유래 다당의 경구 투여가 Peyer's patch cell의 IgA 및 관련 cytokine 생산에 미치는 효과 Immunoglobulin A (IgA) 생산능

지금까지의 실험 (*in vitro*)을 통해 면역활성 증진이 입증된 현미발효물 유래 다당의 경구투여를 통한 장관면역 활성화 증진에 대한 가능성을 타진하고자 본 실험에서는 마우스를 이용하여 동물실험을 진행하고자 하였다. 본 과제 목적은 현미발효물을 이용한 다양한 생리활성 강화성분을 분리 및 동정함과 동시에 이를 바탕으로 산업적으로 응용할 수 있는 소재로 적용하는 것이 목적이기 때문에, 지금까지의 연구에서 강한 면역활성을 나타낸 정제 다당획분이 아닌 산업적으로 응용이 가능한 조다당체, 즉 현미발효물 유래 조다당획분인 FBR-0 및 이를 효소처리한 FBR-E를 실험에 사용하였다. FBR-0 및 FBR-E는 각각 10, 100, 1,000 µg/mouse의 농도로 1일 1회 총 20일간 경구투여 하였으며, Peyer's patch를 분리한 후  $1 \times 10^7$  cells/mL 농도로 조정하고 5일간 배양하여 상등액 중 존재하는 IgA 및 관련 cytokine인 IL-6, GM-CSF를 ELISA로 측정하여 그 영향을 분석하였다.

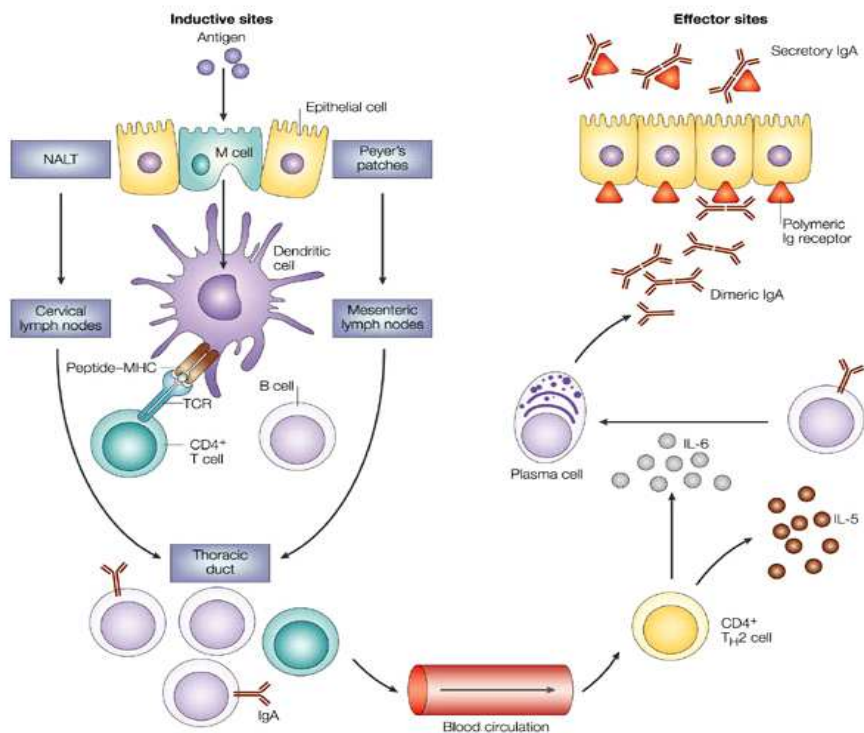


Fig. 108. Immune response in the Peyer's patch mediated mucosal immunity

우리 신체의 장관은 환경으로부터의 여러 가지 항원에 끊임없이 노출되고 장관내에는 막대한 양의 미생물이 항원으로 작용하게 되는데, 이에 대응하여 장관면역계에서는 면역응답으로 IgA 항체를 생산하게 된다. 이러한 면역반응에 있어서는 gut-associated lymphoid tissue (GALT)가 중요한 역할을 하는데, Fig. 108에서 나타난 것처럼 다양한 종류의 세포들과 cytokine이 작용하게 된다. Peyer's patch (P.P)는 가장 중요한 GALT로써 알려져 있으며, 이러

한 림프조직은 전신의 림프절이나 비장과는 독립한 면역 조직계를 형성하고 외부비 장기에 연결된 림프조직과 교류하여 immunoglobulin A (IgA)의 생산을 중심으로 하는 분비형 면역계를 형성하고 있다.

Immunoglobulin A (IgA)는 점막에서 면역을 조절하는 면역글로불린 중 하나로 미생물 유래 독소나 외부항원이 점막에 결합하지 못하게 하는 일차적 점막 방어기전(primary mucosal defense mechanism)의 중요한 기능을 하는 것으로 알려져 있다. 항체를 분비하는 B 림프구는 일반적인 경우에 IgG를 생산하지만, 장관 면역계에서는 특이적으로 IgA를 많이 생산하여 장관 내로 분비시키고, 분비된 항체는 세균이나 바이러스를 불활성화시키는 중요한 역할을 한다 (Fig. 109). 이러한 IgA는 인체에서 생산되는 총 면역글로브 항체의 약 6%를 차지하는 대표적 분비형 항체로써 주로 타액, 눈물 그리고 장점막(mucosal-associated lymphoid tissues; MALT)에서 주로 분비되며 점막을 통하여 인체로 침입하는 병원균의 제거를 담당하는 생체방어의 최일선을 담당하는 항체로 인간은 1일 평균 약 3 g의 IgA를 생산하는 것으로 보고되어 있는 장관면역에서 중추적인 역할을 하는 항체이다.

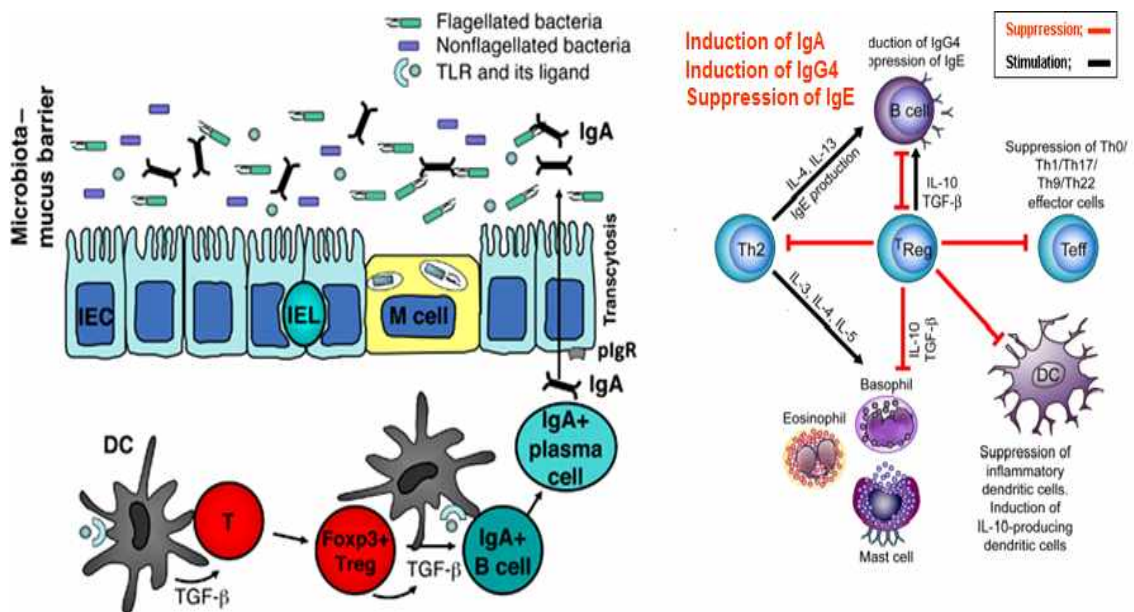
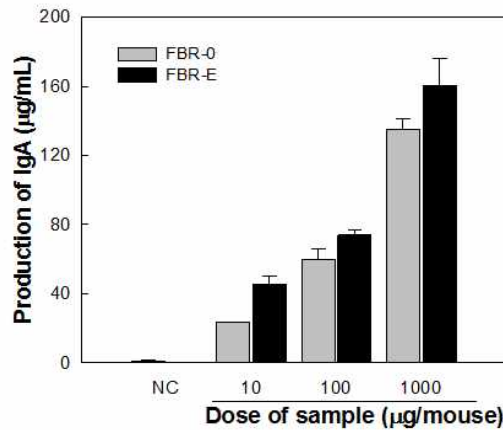


Fig. 109. IgA production by Peyer's patch cells and related regulatory mechanism.

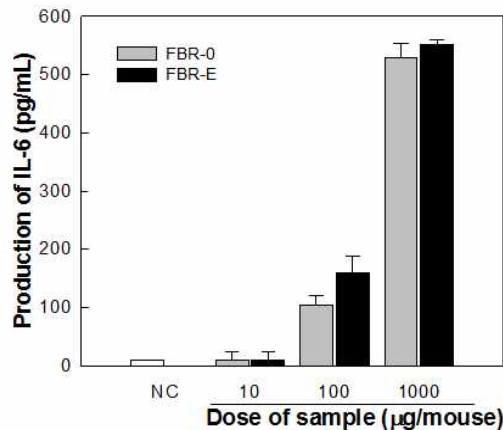
현미발효물 유래 조다당획분인 FBR-0와 효소처리물 FBR-E를 각각 10, 100 및 1,000  $\mu$ g/mouse의 농도로 20일간의 경구투여한 마우스의 소장으로부터 Peyer's patch 세포 분리하고, 배양 중 생산되는 IgA의 함량을 측정된 결과 두 종류의 시료에서 모두 농도의존적인 IgA 분비능을 나타내었다(Fig. 110). 특히, FBR-0의 효소처리물인 FBR-E의 경우, 시료농도 10  $\mu$ g/mouse에서부터 FBR-0에 비해 유의적으로 높은 IgA 분비능을 나타내었다.

IL-6의 경우에도 FBR-0 및 FBR-E를 경구투여한 군에서 모두 Peyer's patch 세포로부터 IL-6의 생산유도활성이 농도의존적으로 증가하였다(Fig. 111). 하지만 활성다당인 FBR-4a를 상대적으로 높은 비율로 함유하고 있는 FBR-E를 투여한 군이 100  $\mu$ g/mouse의 시료농도에서 FBR-0보다 높은 활성을 나타내었다. Peyer's patch는 T 세포와 B 세포 등으로 구성이 되어져 있고 T세포는 macrophage와 함께 작용하여 다양한 cytokine을 생산하게 되는데 IL-6는 이때

콜수의 증식에 관여를 하는 cytokine으로 전신면역으로 확대가 일어나게 된다고 알려져 있다.



**Fig. 110.** Effect of oral administration of FBR-0 and FBR-E on the production of IgA by Peyer's patch cells from C3H/HeJ mice. C3H/HeN mice were orally injected with FBR-0 or FBR-E(10, 100, 1000 µg/mouse) for every 20 days(n=8), and then Peyer's patch cells( $1 \times 10^7$ ) of the mice were seeded into 96 well plate. Cells were incubated for 5 days, IgA in the cultured medium was determined by ELISA kit. NC means water injected group orally as negative control.

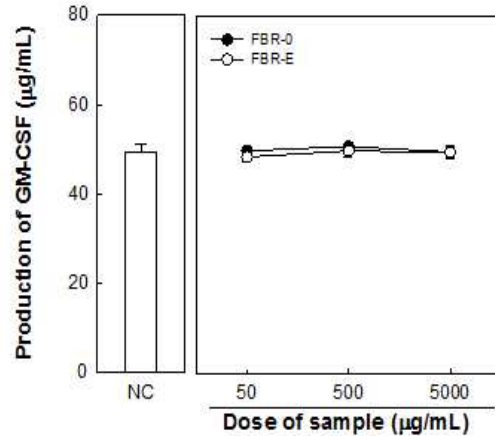


**Fig. 111.** Effect of oral administration of FBR-0 and FBR-E on the production of IL-6 by Peyer's patch cells from C3H/HeJ mice. C3H/HeN mice were orally injected with FBR-0 or FBR-E(10, 100, 1000 µg/mouse) for every 20 days(n=6), and then Peyer's patch cells( $1 \times 10^7$ ) of the mice were isolated and then seeded into 96 well plate. Cells were incubated for 5 days, IL-6 in the cultured medium was determined by ELISA kit. NC means water injected group orally as negative control.

한편, 대식세포, T 세포, 비만세포, 자연살해(natural killer, NK) 세포 등에서 발생시켜 백혈구의 성장인자로 작용하며, 줄기세포가 과립구(호중구, 호염기구, 호산구)과 단핵구를 생산하도록 자극하는 과립구 단구-군체자극인자(granulocyte macrophage-colony stimulating factor, GM-CSF)의 자극활성을 확인한 결과는 Fig. 112에 나타내었다. GM-CSF는 대식세포의 수를

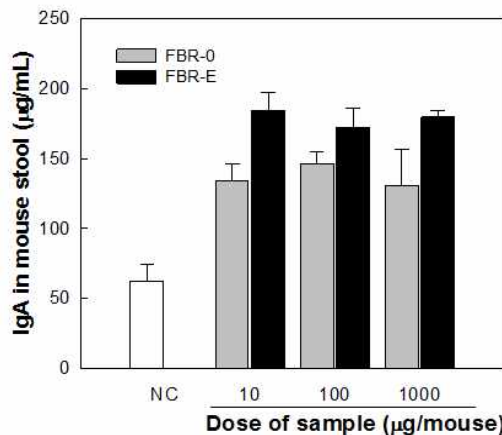


급격히 늘려 감염반응과 대항할 수 있도록 하는 면역/감염반응의 일부로, 현미발효물 유래 조다당획분인 FBR-0와 이를 효소처리한 FBR-E를 경구투여한 마우스의 Peyer's patch 세포에서 발생하는 GM-CSF는 음성대조군(NC)와 비교하여 생산능을 나타내지 못했으며, 또한 농도의존적인 변화도 보여주지 못했다. GM-CSF는 과립구의 증식과 생성뿐만 아니라 성숙 과립구의 강력한 활성인자로 작용하는 가장 중요한 사이토카인이며, 각각에 대한 특이세포 표면수용체에 결합함으로써 생리학적 효과를 나타낸다고 알려져 있다.



**Fig. 112.** Effect of oral administration of FBR-0 and FBR-E on the production of GM-CSF by Peyer's patch cells from C3H/HeJ mice. C3H/HeN mice were orally injected with FBR-0 or FBR-E(10, 100, 1000 µg/mouse) for every 20 days(n=6), and then Peyer's patch cells( $1 \times 10^7$ ) of the mice were isolated and then seeded into 96 well plate. Cells were incubated for 5 days, GM-CSF in the cultured medium was determined by ELISA kit. NC means water injected group orally as negative control. NC means water injected group orally as negative control.

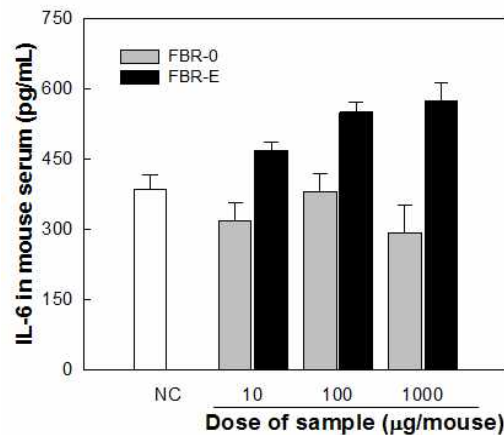
(2) 현미발효물 유래 다당의 경구 투여가 분변 중 IgA 및 혈청내 IL-6 생산에 미치는 효과



**Fig. 113.** Effect of oral administration of FBR-0 and FBR-E on the production of IgA in feces from C3H/HeJ mice. C3H/HeN mice were orally injected with FBR-0 or FBR-E(10, 100, 1000 µg/mouse) for every 20 days(n=6), and then feces were collected and

dissolved in water. IgA in the solution was determined by ELISA kit. NC means water injected group orally as negative control.

현미발효물 유래 조다당획분의 경구투여에 의해 Peyer's patch 내 면역세포가 활성화되면 IgA의 생성능이 증가된 결과로부터, 장관 내 또는 분변 중에는 장내로 분비된 IgA가 상당량이 포함되어 있을 것으로 예측되었다. 따라서 본 실험에서는 FBR-0 및 FBR-E의 경구투여 후 분변 중에 존재하는 잔여 IgA의 함량을 측정된 결과, 두 종류의 시료에서 모두 IgA의 함량이 NC에 비해 유의적으로 증가하였으며, 특히 FBR-E를 경구투여한 군에서 FBR-0에 비해 상대적으로 높은 IgA 생산량을 나타내었다(Fig. 113).



**Fig. 114. Effect of oral administration of FBR-0 and FBR-E on the production of IL-6 in serum from C3H/HeJ mice.** C3H/HeN mice were orally injected with FBR-0 or FBR-E(10, 100, 1000 µg/mouse) for every 20 days(n=6), and then serum was collected in blood. IL-6 in the serum was determined by ELISA kit. NC means water injected group orally as negative control.

현미발효물 유래 조다당획분의 경구투여에 의해 Peyer's patch 내 면역세포가 활성화되어 IgA의 생성능이 증가된 결과로부터, 혈액으로 순환하는 cytokine인 IL-6의 양을 확인하고자 하였다. 실험결과 FBR-0의 경우, 혈청 내의 IL-6는 모든 농도에서 대조군과 비교하여 유의적인 생산증가를 확인하지 못한 반면, FBR-E를 경구 투여한 군에서는 모든 농도에서 혈청 내 IL-6가 농도의존적으로 증가하였으며, 1,000 µg/mouse을 경구 투여 했을 시 가장 높은 활성을 나타내었다(Fig. 114). 이를 통해 현미발효물 유래 다당 시료의 경구 투여에 의해 활성화된 Peyer's patch 세포로부터 IgA 생성능이 증가시켜 장관 내로의 IgA 분비를 촉진시킬 수 있음이 확인되었으며 이러한 사실은 식이 등에 포함되어 장내로 유입된 각종 항원을 신속하게 제거하는데 기여할 수 있을 것으로 사료되었다. 또한 활성다당 FBR-4a를 상대적으로 높은 비율로 포함하는 효소처리 조다당 FBR-E의 경구 투여는 IgA 생산을 통한 장관면역을 활성화뿐만 아니라, IL-6 등과 같은 면역관련 cytokine의 생산 증가를 유도하여 전신면역의 활성화에도 기여할 수 있음을 추론할 수 있었다.

이상의 결과를 종합할 때, 현미발효물 유래의 다당은 우수한 면역증진활성을 소유하고 있으

며, 가공적성이 우수하고 면역활성이 배가된 기능성 소재로 개발하기 위해서는 효소처리 등의 공정을 도입하여야 하며 이를 통해 국내 쌀 소비를 증진시킬 수 있는 새로운 방법을 제시할 수 있는 기초자료로 활용할 수 있음을 알 수 있었다.

### 바. 현미발효물 유래 활성 다당체의 전체구조 규명

다당의 구조 분석에 있어서 당쇄의 결합양식은 다당체의 기본 구조를 해명한다는 점에서 가장 중요한 분석으로 알려져 있다. 핵산 및 단백질이 구성분자인 nucleotide나 amino acid의 사이에 phosphodiester 결합이나 peptide 결합이라는 동일한 결합양식으로 연결된 데 반하여, 다당은 구성당 사이에 1→2, 1→3, 1→4, 1→6 등의 결합이 가능하며 각 탄소에서 분지된 형태로 존재 할 수 있기 때문에 타 생체 분자에 비해 구조 해석이 어려우며 따라서 결합양식의 분석은 다당의 구조 특성 규명에 있어 가장 중요한 단계이다.

당쇄 결합양식 분석에 많이 사용되는 methylation analysis는 Fig. 115에 나타난 바와 같이 결합에 참여하지 않은 탄소에 붙은 hydroxyl를 methyl화하고, 가수분해하여 부분적으로 methyl화 된 구성당의 ring을 개환한 후, 남아있는 hydroxyl group을 acetylation하여 GC-MS를 이용, fragment ion을 분석하여 구조를 규명하는 복잡한 과정이다.

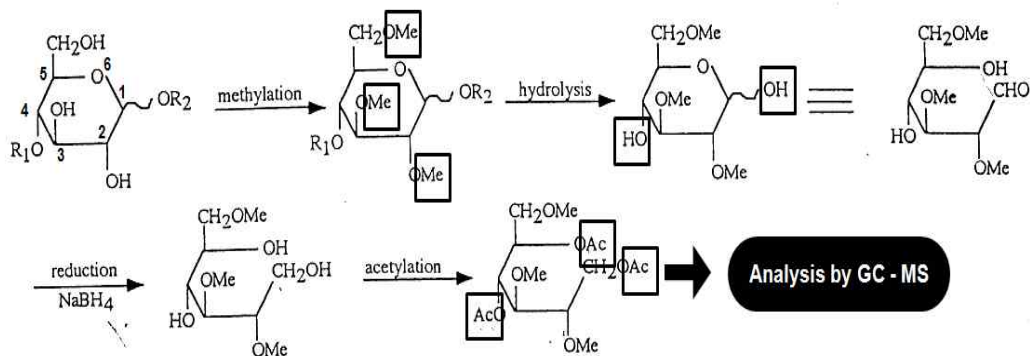


Fig. 115. Principle of methylation analysis for determination of sugar linkages of polysaccharides.

현미발효물 유래 면역활성 정제 다당인 FBR-4a를 대상으로 활성에 공헌하는 구조(active moiety)를 확인하고자 Hakomori법에 의해 methylation을 행하고, GC에 의해 당쇄 결합양식의 total ion chromatogram을 확인하였다(Fig 116). 또한, total ion chromatogram에서 관찰된 각 peak들은 GC-MS로 fragment 이온을 분석하여 결합에 참여하고 있는 각 당의 탄소 위치를 확인하였으며(Fig. 117), 이들의 결과를 종합하여 Table 81에 구성당 결합 양식의 조성을 표시하였다.



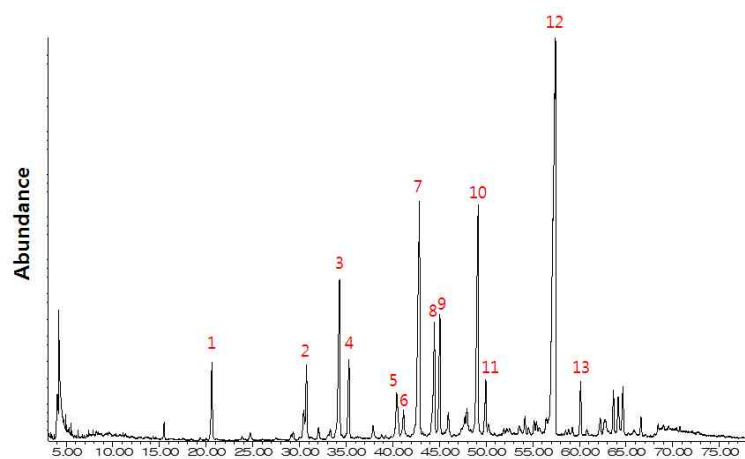


Fig. 116. Total ion chromatograms on GC-MS of partially methylated alditol acetates of derived from FBR-4a purified from fermented brown rice.

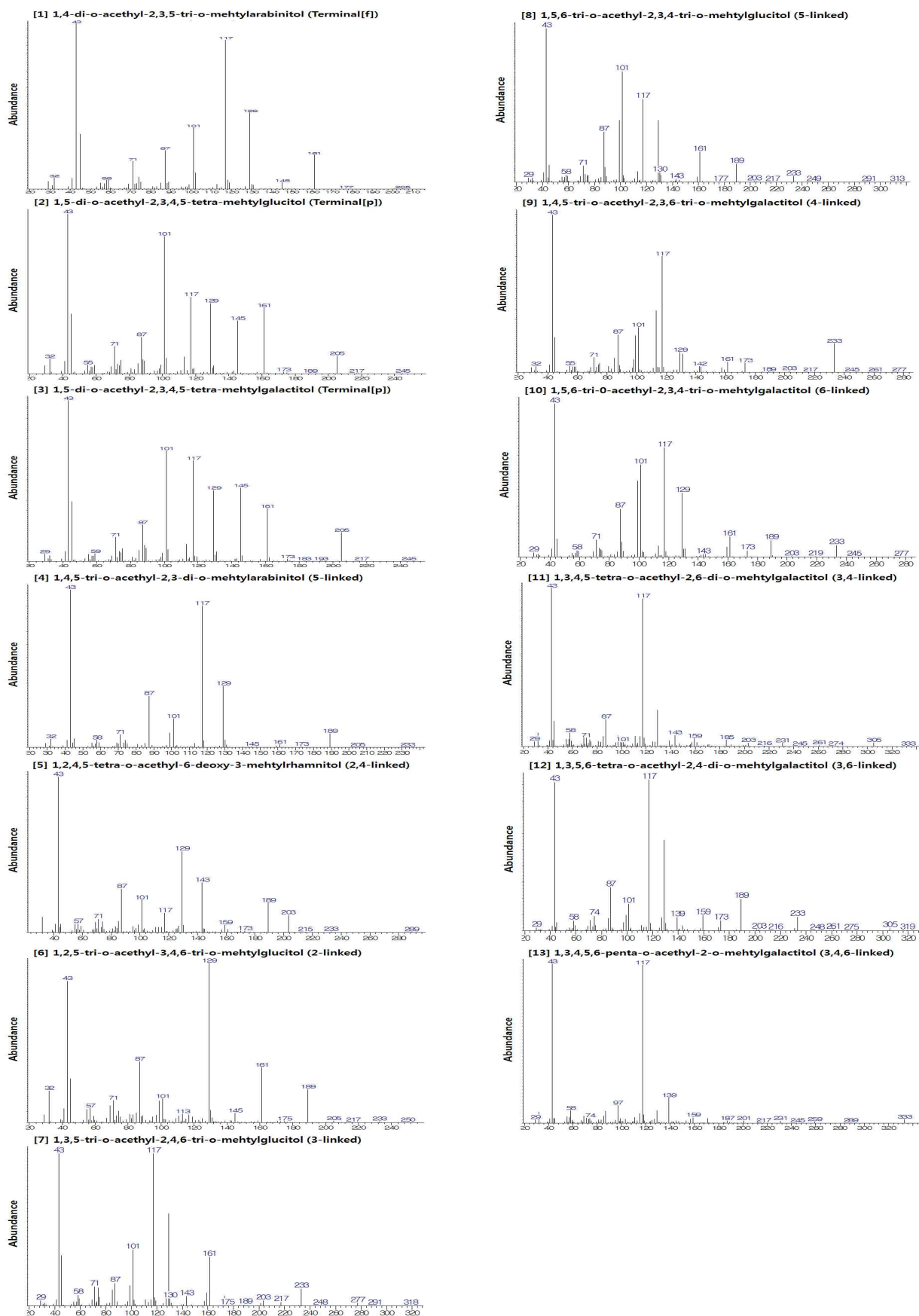


Fig. 117. GC-MS fragment ion patterns of the characteristic linkages derived from FBR-4a purified from fermented brown rice.

(1) 현미발효물 유래 면역활성 정제 다당획분의 전체구조

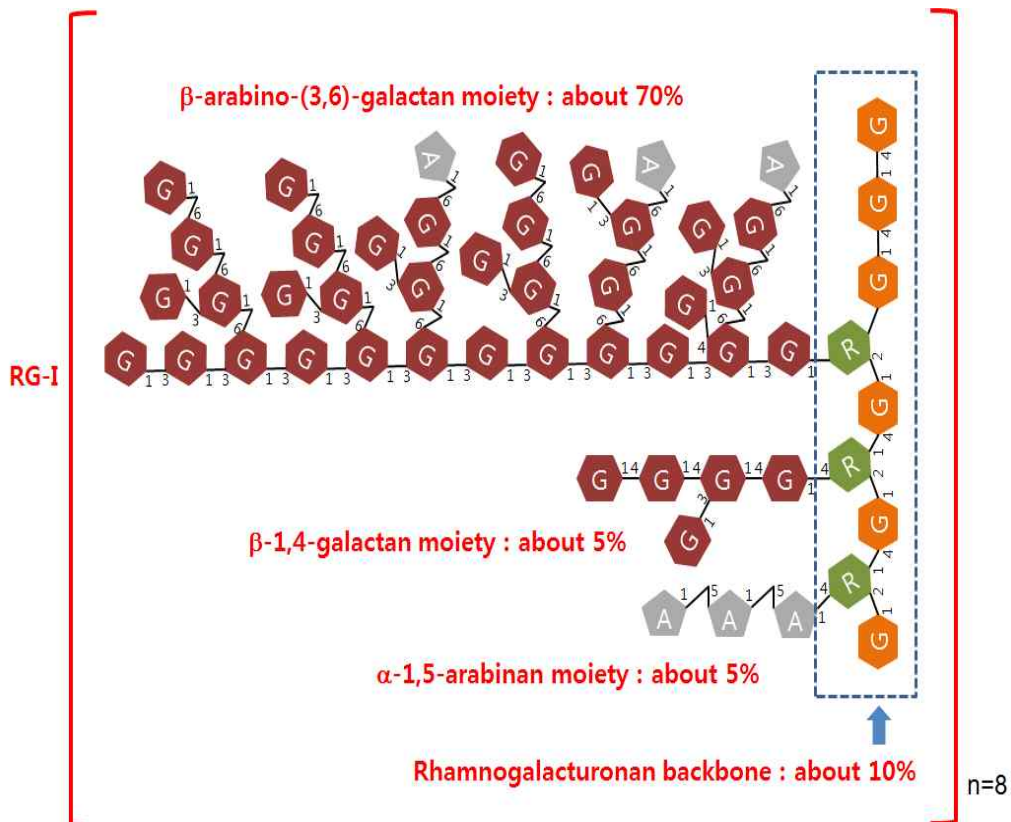
국내산 현미발효물 유래 면역활성 다당획분인 FBR-4a의 total ion chromatogram은 Fig. 116에 나타내었으며, 주요한 fragment ion spectrum은 Fig. 117에 나타내었다. FBR-4a은 총 13종의 당쇄 결합이 검출되었는데(Fig. 116), 주로 galactose(Gal) 결합 당쇄가 가장 높은 비율로 존재하고 있었으며(43.2%), 그 다음으로 arabinose(Ara) 결합 및 glucose(Glc) 결합이 주를 이루고 있었고(각각 21.7% 및 12.5%) 소량의 mannose와 rhamnose 결합 당쇄가 존재하는 것으로 나타났다. 하지만 구성당 조성 및 당쇄의 특성으로 미루어 FBR-4a은 하나의 단일 다당이 아니라 서로 다른 분자량을 갖는 2종의 다당이 서로 다른 비율로 혼합되어 존재함이 시사되었다(Table 81). FBR-4a 다당에는 첫째, 약 90% 이상의 가장 높은 비율로 존재하는  $\beta$ -arabino-(3,6)-galactan을 함유한 RG-I, 둘째로 약 10% 미만으로 존재하는  $\beta$ -1,6-glucan이 혼합되어 존재함을 추정할 수 있었다.

**Table 81. Methylation analysis of FBR-4a purified from the crude polysaccharide of fermented brown rice**

Glycosyl residue	Deduced linkage	Composition (mole%)	Polysaccharide	Organism
Arabinose	terminal[f]	3.8	RG-I	Brown rice
	5-linked	4.1	RG-I	Brown rice
Rhamnose	2,4-linked	2.9	RG-I	Brown rice
Galactose	terminal[p]	3.3	RG-I	Brown rice
	3-linked	14.7	RG-I	Brown rice
	4-linked	5.6	RG-I	Brown rice
	6-linked	13.0	RG-I	Brown rice
	3,4-linked	2.4	RG-I	Brown rice
	3,6-linked	31.5	RG-I	Brown rice
	3,4,6-linked	1.9	RG-I	Brown rice
Glucose	terminal[p]	3.3	$\beta$ -Glucan	Fermenting M/O
	2-linked	1.6	$\beta$ -Glucan	Fermenting M/O
	6-linked	6.1	$\beta$ -Glucan	Fermenting M/O

FBR-4a을 구성하는 다당 rhamnogalacturonan-I(RG-I)의 존재는 다양한 결합의 galactose, rhamnose 및 arabinose 잔기로부터 추정 가능하였다(Table 81). 본 실험에서는 galacturonic acid의 결합양식은 확인할 수 없었으나, 비교적 높은 비율로 2,4-linked rhamnose가 존재하는 사실로부터 주쇄가  $\rightarrow 2$ -Rha-(1 $\rightarrow$ 4)-GalA-(1 $\rightarrow$ 2)-의 disaccharide 반복 서열로 구성되어 있으며 rhamnose의 C4 위치에서 다양한 측쇄가 연결되어 존재함을 알 수 있었다. 한편 다양한 결합양식의 arabinose와 galactose의 잔기들은 RG-I의 측쇄가 arabinan, galactan 또는 arabinogalactan으로 뻗어나간 구조로 존재함을 확인하게 하였다(Table 81). Arabinan의 경우, 5-linked Ara가 존재하는 사실로부터 side chain에 붙어 있는 arabinan은 1 $\rightarrow$ 5결합으로 연결되어 존재함을 알 수 있었다. 하지만 그들의 비교적 낮은 함량으로부터 발효과정중 중 RG-I에

결합되어 존재하는 arabinan의 상당 부분은 원래 존재하던 당쇄 사슬에 비해 많이 절단되어 존재함을 알 수 있었다. 한편 galactan의 경우에는 4-linked Galp의 존재로부터 (1→4)-galactan으로 존재하고 있음을 추정케 하였으며 galactan 사슬의 C3위치에서 재차 측쇄로 galactose가 연결되어 있음을 추정 할 수 있었다. 또한 arabinogalactan의 경우, terminal-Araf의 존재와 함께 arabino-3,6-galactan을 지척하는 3,6-linked Galp residue 및 3-linked Galp, 6-linked Galp residue(각각 31.5 및 14.7%, 13.0%)가 높은 비율로 검출된 사실로부터 β-arabino-(3,6)-galactan의 주쇄(main chain)는 (1→3) 결합으로 연결된 galactose 사슬로 연결되어 있으며, 주쇄 galactose의 C6 위치(일부 C4)에서 측쇄가 연결되어 뻗어나가는 구조로 되어 있음을 유추할 수 있었다. 또한 3,6- 또는 6-linked-Galp 및 T-Araf(각각 31.5, 13.0 및 3.8%)가 높은 비율로 존재하는 사실로부터, β-(1→3)-galactan backbone에는 (1→6) 결합으로 연결된 galactose가 다시 사슬을 이루고 있으며 C3위치에서 재차 galactose가 연결되어 β-arabino-(3,6)-galactan의 전형적 기본구조를 형성하고 있었으며, 이들의 비환원말단에 arabinose가 연결되어 존재함을 확인할 수 있었다(Table 81). 이는 FBR-4a의 β-arabino-(3,6)-galactan과 선택적으로 반응하는 β-Glucosyl Yariv reagent에 약 60%이상의 반응성을 보였던 사실과 잘 일치하였다. 이상의 결과로부터 추정되는 FBR-4a 중 β-arabino-(3,6)-galactan를 주로 함유하고 있는 RG-I의 전체 구조는 Fig. 118에 표시한 바와 같다.



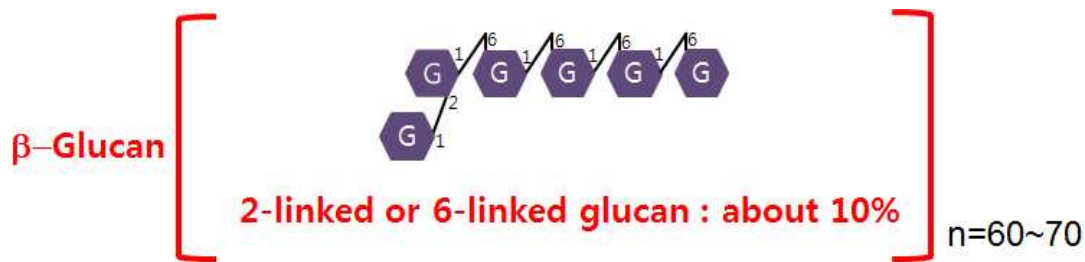


Fig. 118. A proposed structure of immunostimulating polysaccharide purified from fermented brown rice.

일반적으로 arabinogalactan은 고등식물에서 주로 발견되는 다당류의 일종으로, 구조적 특성에 따라 I형, II형 및 기타형으로 구분된다. I형 arabinogalactan은 측쇄에 arabinosyl oligosaccharide 잔기를 갖는  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4)-D-galactan 주쇄로 구성된 다당을, II형은  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 3)-D-galactan 주쇄에 galactose의 C6 위치에서  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 6)-D-galactosyl 측쇄 및 비환원 말단 arabinose 잔기를 갖는 arabino- $\beta$ -3,6-galactan을, 그리고 기타형은 arabinogalactan 측쇄를 갖는 pectic polysaccharide를 지칭한다. 따라서 FBR-4a에 존재하는 RG-I은 Type III의 arabinogalactan이며 주로 원재료인 현미에서 유래한 pectin으로부터 발효과정 중 미생물에 의해 분해되어 존재하는 것으로 추측되었다. 그러나 FBR-I 중의 RG-I은 일반적으로 보고된 RG-I에 비해 측쇄로 연결된  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 5)-arabinan (약 5%)과  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4)-galactan (약 5%)이 짧고,  $\beta$ -arabino-(3,6)-galactan이 약 70%로 RG-I 다당의 대부분을 차지하는 특징적 형태를 보여주었다. 이는 현미의 발효과정 중 미생물의 효소에 의해 pectin으로부터 RG-I이 분리되고, 분리된 RG-I 다당 중 비교적 구조가 간단한  $\alpha$ -(1 $\rightarrow$ 5)-arabinan과  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4)-galactan은 측쇄는 역시 미생물이 생산한 분해효소에 의해 상당 부분이 절단되지만,  $\beta$ -arabino-(3,6)-galactan의 경우, 고도로 분지된 당쇄 결합으로 인하여 분해효소가 작용할 수 있는 공간적 위치가 제공되지 않아 (steric hindrance) 절단되지 않고 남은 것으로 이들이 활성화에 주로 공헌함을 예측할 수 있었다. Pectin은 식물체의 세포벽과 middle lamella 층에 존재하는 수용성 다당류로 전체분자의 많은 부분은 직쇄상의 homogalacturonan(HG)으로 구성(펙틴의 smooth region)되어 있지만 여기에 다양한 oligo- 및 polysaccharide가 고도로 분지(branched)된 RG-I 및 RG-II가 공유적으로 결합(펙틴의 hairy region을 구성)되어 있는 것으로 보고되고 있다. 따라서 현미발효물 중에 존재하는 활성 다당 FBR-4a은 현미의 pectin이 발효과정 중에 HG region이 분해되어 분리된 RG-I이며, 특히 이들 RG-I의 측쇄에는  $\beta$ -arabino-(3,6)-galactan이 높은 비율로 존재하며 활성화에 공헌함을 최종 확인 할 수 있었다(Fig. 119).

한편 현미발효물 유래 FBR-4a에서 검출된  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 6)/ $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 2)-glucan은 식물체의 구성성분으로 관찰된 경우가 드물며, 특히 현미라는 곡류의 성분으로 본 당쇄가 검출되어 보고된 예는 거의 찾아볼 수 없다. 따라서 FBR-4a에서 확인된  $\beta$ -glucan의 존재는 발효 중 사용된 미생물에서 유래한 것으로 추정되었다. 현미발효물의 제조를 위해선 현미에 미생물을 배양하게 되는데, 특히 곰팡이(fungi)에 의해 주로 발효가 진행된다. 곰팡이의 세포벽은  $\beta$ -glucan과 chitin이 주성분으로 존재하며 최외각에 mannoprotein이 둘러싸여 존재하는 것으로 보고되고 있다. 따라서 발효 및 숙성과정 중 곰팡이가 자가분해되어 수용화되어 추출되었음을 추론할 수 있었다. 따라서 현미발효물에 존재하는 주요 면역활성 다당획분인 FBR-4a는 발효과정 중 분해되지 않은 현미 유래 다당계와, 발효제인 곰팡이의 세포벽 기원의 다당계 물질로 추정된다.

FBR-4a의 구성 다당 glucan은 2-linked, 6-linked GlcP 잔기의 검출되었는데 이 결과로부터  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 2)-glucan 영역이  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 6)-glucan과 연결된 기본 구조를 갖는 것으로 평가되었다(Fig. 119).  $\beta$ -glucan의 활성은 잘 알려져 있지만, 상대적으로 매우 낮은 함량으로 존재한다는 점에서 FBR-4a의 면역활성에 공헌할 가능성은 낮은 것으로 판단되었다.

이상의 결과를 요약할 때 Fig. 118에 제시한 바와 같이 현미발효물의 면역활성의 주요 다당인 FBR-4a는 원재료인 현미의 pectin이 발효과정 중에 분해되어 생성된 RG-I, 특히 rhamnogalacturonan backbone에  $\beta$ -arabino-(3,6)-galactan이 복잡하게 측쇄로 연결된 다당으로 구성되어 있음을 최종 결론지을 수 있었다.

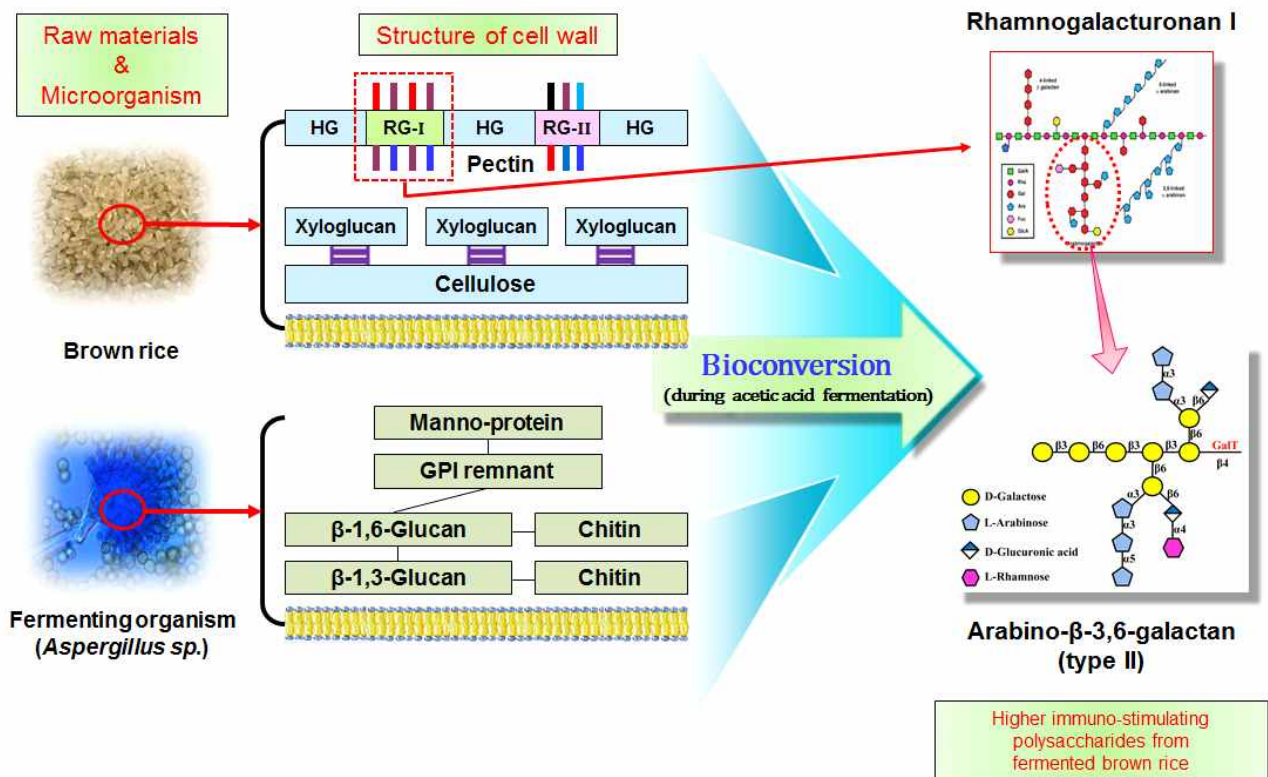


Fig. 119. A proposed bioconversion mechanism of immunostimulating polysaccharide purified from fermented brown rice.

#### 사. 장관면역 활성 다당의 지표 구성당 및 함량 설정

식품의약품안전처에서는 건강기능식품에 대한 과학적 관리원칙을 수립하여 이미 잘 알려진 건강기능식품 기능성 원료에 대하여 과학적 근거를 확보하여 그 기능성분을 밝히고 일일섭취량 (acceptable daily intake)을 정하여 고시하고 있다. 따라서 앞으로는 어떠한 기능성분이 얼마만큼 함유되어 있는 건강기능식품을 섭취하면 어떻게 건강유지 및 증진에 도움이 된다는 것을 과학적으로 설명할 수 있어야만 한다. 그러나 이런 변화는 건강기능식품 기능성 원료에 함유하고 있는 기능/지표성분(functional/marker compound)을 정확히 분석해 낼 수 있어야 한다.



본 과제의 목적은 현미발효물을 이용한 면역활성 강화 성분을 분리 및 동정함과 동시에 이를 바탕으로 산업적으로 응용할 수 있는 소재로 개발하는 것이므로, 단가 및 수율을 고려하였을 때, 산업적으로 실제 응용가능한 획분은 현미발효물 효소처리 획분 (FBR-E-1)이 적절할 것으로 판단되었다. 따라서 시료 중 원재료의 사용여부 (identity)를 확인할 수 있고 제조공정의 표준화를 위해 관리할 수 있는 지표성분을 결정하기 위해, 3차에 걸쳐 각 면역 활성 조다당체를 조제하였으며, 이들의 구성당을 분석하여 지표 구성당의 함량을 설정하고자 하였다. 지표 구성당 함량은 다당체 원물(dry material)에 존재하는 구성당 간의 mole%가 아닌 실제값 (real value)로 나타내었다.

(1) 현미발효물 유래 면역활성 조다당체의 지표 구성당 및 함량 설정

Table 82. Sugar composition of FBR-E-1 isolated from fermented brown rice

Component sugar	Sugar content in FBR-E-1 (mg/g)				Sugar composition (%)
	1st prep.	2nd prep.	3rd prep.	Mean ± SD	Mean ± SD
Rha	1.6	1.7	1.9	1.8 ± 0.2	0.2 ± 0.0
Fuc	-	-	-	-	-
Ara	19.3	18.4	21.5	19.7 ± 1.6	2.0 ± 0.2
Xyl	15.1	15.7	18.0	16.3 ± 1.5	1.6 ± 0.2
Man	10.7	10.3	13.0	11.3 ± 1.5	1.1 ± 0.2
Gal	22.9	21.2	26.9	23.7 ± 2.9	2.4 ± 0.3
Glc	274.2	282.4	329.9	295.5 ± 30.1	29.6 ± 3.0
Total	343.8	349.7	411.3	368.8 ± 37.8	36.8 ± 3.8

Table 82에 나타난 바와 같이 FBR-E-1 중 총당 함량을 측정한 결과, 36.8%로 분석되었으며, 주요한 구성당으로는 29.6%의 glucose와 2.4%의 galactose 및 2.0%의 arabinose를 함유한 것으로 나타났다. 따라서, FBR-E-1를 장관면역 활성 증진에 도움을 줄 수 있는 소재 또는 제품으로 산업화에 응용하기 위해서는 지표성분으로 galactose와 arabinose의 함량의 합이 4.0% 이상으로 설정하는 것이 적절하다고 판단되었다. 현미발효물 유래 활성다당 FBR-E-1에 존재하는 높은 glucose 함량은 원재료인 현미에서 기원한 전분유래의 α-glucan일 것으로 추정되었으며, 이들은 영양성분으로의 기능외에 어떠한 생리활성도 보고되어 있지 않으므로 지표당으로 설정하는 데는 무리가 있을 것으로 판단되었다. 또한 glucose 성분 중 일부는 활성이 알려져 있는 β-glucan일 가능성도 있으나 이들은 상대적으로 매우 낮은 함량으로 존재한다는 점에서 FBR-E-1의 면역활성에 공헌할 가능성은 낮은 것으로 판단되었다. Fig. 120에 제시한 chromatogram은 FBR-E-1의 전형적 구성당 pattern이다.

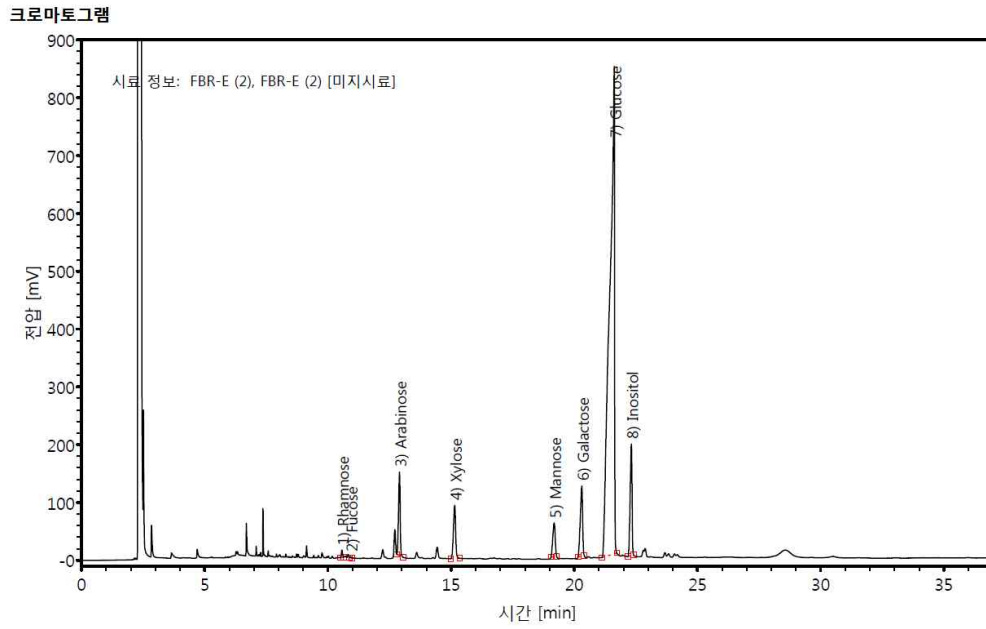
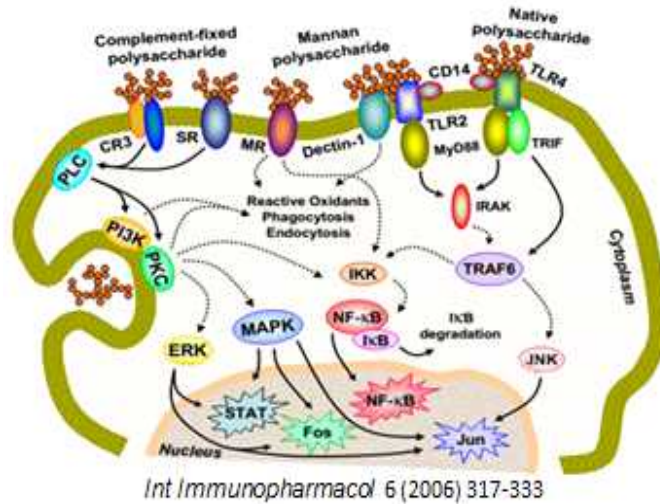


Fig. 120. GC chromatogram for the determination of sugar composition of FBR-E-1.



## 아. 현미발효물 유래 정제 다당의 대식세포 활성화 관련 분자 기작 규명

식물 기원 다당체의 면역증진활성, 항암활성 및 기타 약리활성은 면역계 중 대식세포를 시작으로 일어나는 것으로 보고되고 있으며, 결과적으로 선천 면역계의 활성화에 의해 적응면역계의 활성화를 유발하여 인체의 방어 시스템을 작동시킨다고 알려져 있다.



**Fig. 121. Signal transduction pathway through polysaccharides in mammalian cell**

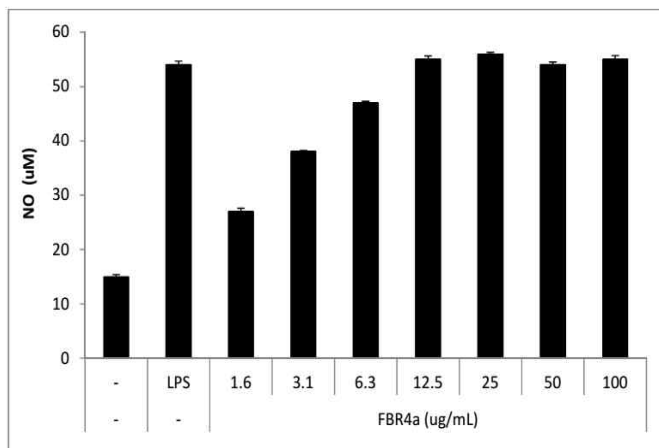
선천 면역계 세포 중 대식세포의 활성화는 식물 유래 다당을 인식(recognition) 하는 특이 수용체(specific receptor)에 의해 유도되는데, 이들을 Pattern Recognition Receptor(PRR) 분자로 알려진 세포막결합 단백질로 면역반응 초기에 외부의 ligand를 인식할 수 있는 수용체라고 보고되어 있다. 대식세포는 toll-like receptor-4(TLR-4), CD14, complement receptor 3(CR3), scavenger receptor, dectin-1 및 mannose receptor 등을 경유하여 식물 기원의 다당 또는 당 단백질과 결합이 가능하다고 보고되어 있다. 이들 수용체의 활성화는 일련의 연속된 세포내 신호전달을 유도하여 MAPK 단백질(ERK, p38, JNK) 및 NF-κB 경로를 활성화 시켜 결과적으로 핵 내에서 관련 유전자의 발현 조절 및 cytokine(IL-6, TNF-α 등)의 생산 조절을 유도 한다고 알려져 있다(Fig. 121).

이후 활성화된 대식세포는 감염 및 자극에 의해 생산되는 cytokine이나 nitric oxide 등에 의해 국소적인 감염으로부터 인체를 방어하고, 포획 섭취된 항원을 processing하여 항원제시세포로서 작용하여 적응면역계의 활성화를 유도해낸다. 또한 생산된 cytokine에 의해 NK 세포를 활성화시켜 간접적으로 항암 활성을 유도할 수 있다고 알려져 있다.

### (1) 현미발효물 정제 다당이 NO 생산에 미치는 영향

선천면역계 세포인 대식세포의 항미생물 기전 중 산화적 공격법에 해당하는 활성산소종(reactive oxygen species, ROS) 및 활성질소종(reactive nitrogen species, RNS)은 독성이 높기 때문에, 살미생물제(microbicide)로 알려져 있어 미생물 감염 시 초기 방어선으로 중요하게 역할을 한다고 알려져 있다.

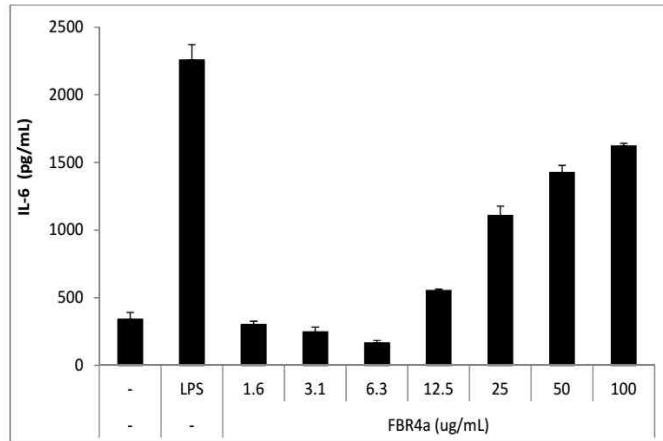
현미발효물 정제 다당 FBR-4a를 RAW 264.7세포에 24시간동안 처리한 결과, FBR-4a의 농도 의존적으로 NO를 생성하는 경향을 보였다(Fig. 122). 특히, FBR-4a 처리농도 12.5 ug/mL부터 100 ug/mL의 농도에서는 대식세포 활성화 인자인 양성 대조군 LPS와 유사한 수준의 NO 생성능이 나타났다(Fig. 122).



**Fig. 122. Effect of the FBR-4a on dose-dependent production of NO production in RAW 264.7 murine macrophage cell line.** RAW 264.7 macrophages( $1 \times 10^5$  cells/mL) were cultured in 24 well plates and stimulated with the FBR-4a. After 24 h, culture supernatants were collected and nitrite was measured using Griess reagent. Equal volumes of Griess reagent(1:1 of 0.1% N-1 naphthylethylenediamine in 5% phosphoric acid and 1% sulfanilamide in 5% phosphoric acid) and sample were incubated together at room temperature for 10 min. Absorbance at 540 nm was measured using a microplate reader. -(medium) and LPS(100 ng/mL) used as negative and positive control, respectively.

## (2) 현미발효물 정제 다당이 IL-6 생산에 미치는 영향

cytokine은 자가분비(autocrine), 주변분비(paracrine) 및 내분비(endocrine)등의 특성과 다면성(pleiotropy) 기능을 통하여 단계적인 유도 반응을 일으키므로 면역반응에 있어서 매우 중요한 인자이다. 대식세포에 의해 생산되는 cytokine 중 IL-6는 적응면역계의 B 림프구 계열의 증식과 항체 분비에 관여한다고 알려져 있다. 현미발효물 정제다당 FBR-4a는 RAW 264.7 세포에 24시간 처리한 결과, FBR-4a 농도 의존적으로 IL-6의 생산이 확인되었다(Fig. 123).



**Fig. 123. Effect of FBR-4a on dose-dependent production of IL-6 by RAW 264.7 murine macrophage cell line.** RAW 264.7 macrophages( $1 \times 10^5$  cells/mL) were cultured in 24 well plates and stimulated with the FBR-4a. After 24 h, culture supernatants were collected and IL-6 was measured using mouse IL-6 ELISA kit. -(medium) and LPS(100 ng/mL) used as negative and positive control, respectively.

### (3) 현미발효물 유래 정제 다당의 대식세포 활성화 기전 분석

선천면역에 관여하는 많은 분자들은 패턴인식 수용체(pattern recognition receptor, PRR)를 발현하고 있어 특정 분자를 인지하는 능력이 있다. 즉 일부 특정 분자들은 다른 다세포 조직에서는 발견되지 않고 미생물에서만 고유하게 있기 때문에, 즉각적으로 인지하여 침입한 병원체를 공격하는 강력한 선천면역 반응을 나타낸다고 알려져 있다. Fig. 124에 나타난 바와 같이, 대식세포에는 Toll like receptors, mannose receptor, CR3 및 Dectin-1 등 LPS (리포다당) 혹은 beta-glucan 등 특정 분자를 인식하여 결합할 수 있는 다양한 종류의 패턴인식 수용체를 발현하고 있다. 이들의 세포내 활성화 신호전달 연구방법을 이용하여 현미발효물 유래 정제 다당에 의한 선천 면역계 활성화 작용기전 연구를 진행하였다.

#### (가) 현미발효물 정제 다당에 의한 MAPK 및 NF- $\kappa$ B 활성화

대식세포에 존재하는 패턴인식수용체에 의해 활성화되는 신호전달 단백질 중 대표적으로 MAPK(mitogen-activated protein kinase) 및 NF- $\kappa$ B(nuclear factor-kappa B)에 대해 상세하게 연구되어져 있다. MAPK 신호전달 경로는 신호전달 효소들의 단계적 활성화 경로로 많은 세포 유형에서 발견되며 효모에서 인간에 걸친 진핵세포 범위에서 진화적으로 보존되어 있다. 이들은 p38, ERK, JNK의 세 종류로 구성되어 있으며, 최종적으로 핵 내로 이동하여 다양한 전사인자를 포함하는 AP-1 family를 활성화 시켜 cytokine 및 NO 등의 생산을 유도한다고 알려져 있다(Fig. 124).

NF- $\kappa$ B는 B림프구의 kappa chain enhancer protein으로 최초로 발견되었으며, 면역세포 뿐만 아니라 각종 조직에서 발현되어 염증, 면역, 세포사, 발암, 조직재생 등에 광범위하게 역할을 하는 것으로 알려져 있다.

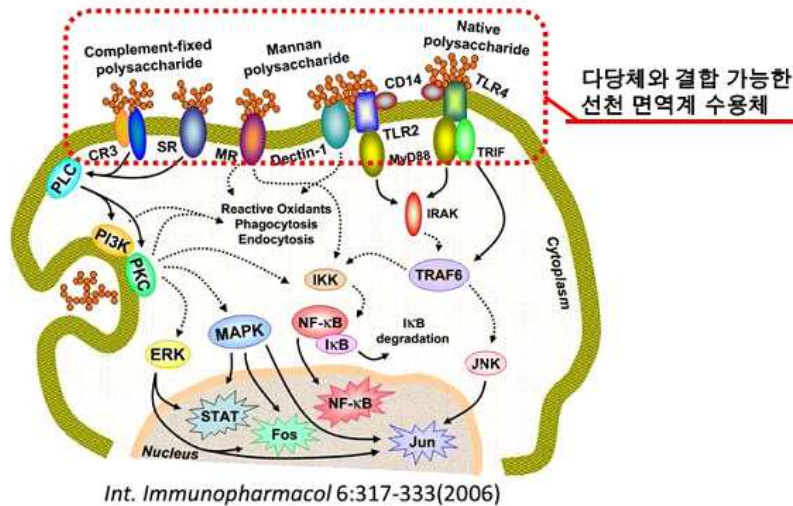
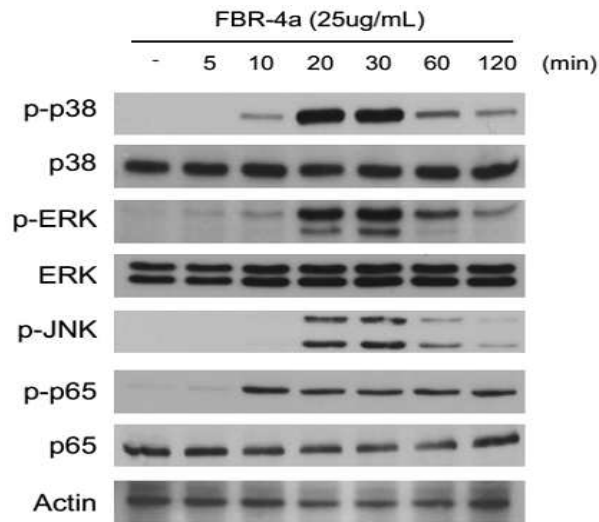


Fig 124. Membrane receptor in macrophage as innate immune cells

NF- $\kappa$ B는 강력한 전사인자로 그 활성은 세포질 내에 존재하는 비인산화된 형태의 I $\kappa$ B에 의해 억제되어 있다. NF- $\kappa$ B는 비인산화된 I $\kappa$ B에 결합하여 세포질에 고립되어 있다가, IKK가 I $\kappa$ B를 인산화시키면 NF- $\kappa$ B가 I $\kappa$ B로부터 유리되고 핵으로 이동할 수 있게 된다. 핵으로 이동한 NF- $\kappa$ B는 선천면역계의 효력을 나타내기 위해 필요한 많은 유전자들의 전사를 개시한다. 척추동물에서 NF- $\kappa$ B 의존적인 경로는 다양한 cytokine을 생산하게 하여, T 림프구와 B 림프구의 신호전달경로에서 중요한 역할을 담당하기 때문에 적응면역계에서도 매우 중요한 인자로서 알려져 있다.

현미발효물 유래 면역활성 정제 다당인 FBR-4a를 경시적인 시간변화를 주며 처리한 결과 MAPK(p38, ERK, JNK)의 인산화는 FBR-4a 처리 20분부터 강하게 유도되어 30분까지 지속되었고, 60분부터 탈인산화 되는 것으로 확인되었다(Fig. 125). 반면, NF- $\kappa$ B p65의 인산화는 FBR-4a 처리 10분부터 인산화가 시작되어 120분까지 지속되는 것으로 나타났다. 이를 통해 FBR-4a에 의해 세포내에서 MAPK의 활성화 및 NF- $\kappa$ B p65의 활성화가 일어나, AP-1 전사인자군 및 NF- $\kappa$ B를 통한 전사가 개시되어 IL-6 및 NO의 생산이 이루어진다고 예측할 수 있다(Fig. 125).



**Fig. 125. Activation of MAPK and NF- $\kappa$ B pathway by treatment of FBR-4a from RAW 264.7 murine macrophage cell line.** RAW 264.7 macrophage cells( $2.0 \times 10^6$ /6-cm well) were treated with FBR-4a(25  $\mu$ g/mL) for the indicated periods. Whole cell lysate were immunoblotted with specific antibodies indicated on the left side of each panel. Whole cell lysates were prepared with RIPA buffer(50 mM Tris-HCl pH 7.4, 150 mM NaCl, 0.25% deoxycholate, 1% NP-40, 1mM EDTA, 1mM DTT, 1mM PMSF, 1mM sodium orthovanadate, 20mM  $\beta$ -glycerophosphate, protease inhibitor cocktail). Cell lysates were resolved by 10% SDS-PAGE and transferred to an Immobilon-P nylon membrane(Millipore). The membrane was treated with 5% skim milk in TBST for 2hr and probed with primary antibodies for overnight at 4 $^{\circ}$ C. Antibodies were detected using horseradish peroxidase-conjugated anti-rabbit, anti-mouse, anti-goat IgG(Santa Cruz), and visualized with the ECL system(Amersham Biosciences). Antibody reactions were carried out in TBST. The specificity of antibody was confirmed by the molecular weight of the band detected using Precision plus protein standard(Bio-Rad, USA)

#### (나) 현미발효물 정제 다당에 의한 cytokine IL-6 및 NO 생산 경로 분석

현미발효물 정제다당 FBR-4a에 의해 유도되는 IL-6 및 NO의 생산유도 기전을 알아보기 위하여 신호전달 단백질 MAPK 및 NF- $\kappa$ B의 specific inhibitor를 사용하여, signaling pathway를 확인 하였다. SB203580는 p38의 하위 signaling을 억제하는 기능을 하며, SP600125는 JNK의 활성을 직접적으로 억제시킨다고 알려져 있다. U0126은 ERK의 상위 분자인 MEK1/2를 억제시킴으로서 ERK signaling을 억제하고, BAY11-7085는 NF- $\kappa$ B의 subunit p65 및 p50 이량체와 결합하여 이들을 비활성 상태로 존재시키는 I $\kappa$ Ba의 인산화 억제제로서 기능을 한다(Fig. 126).

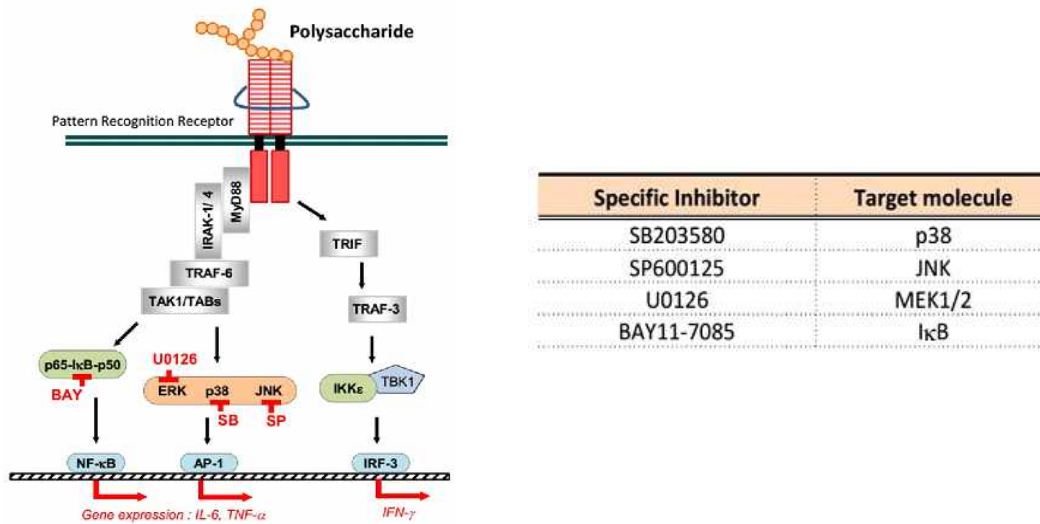


Fig. 126. Specific inhibitors of signaling pathway molecule.

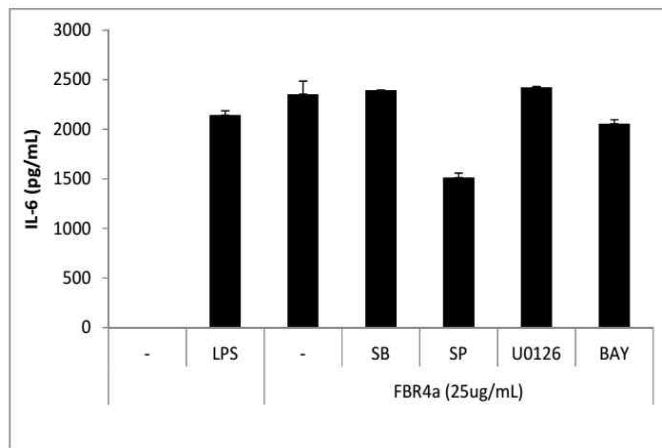
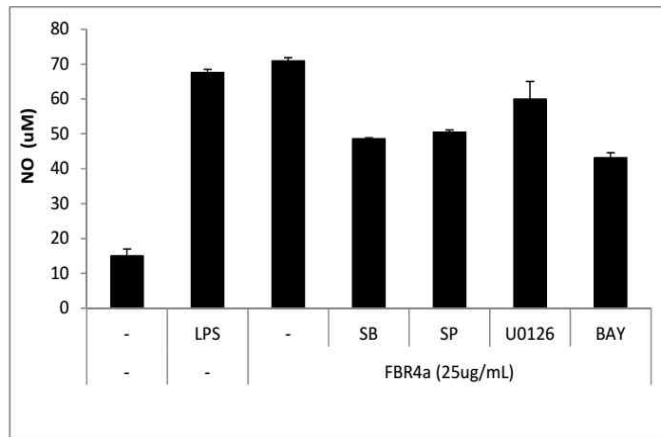


Fig 127. Effect of FBR-4a on IL-6 production by treatment of specific inhibitor from RAW 264.7 murine macrophage cell line. RAW 264.7 cells( $2.0 \times 10^5$  cells/well, 24-well plate) were pretreated with inhibitors(SB, SP and U0126, 10  $\mu$ M; BAY, 5  $\mu$ M) for 30 min and then stimulated with FBR-4a(25ug/mL) for 24 h. The concentration of IL-6 in the cultured medium was determined by mouse IL-6 ELISA kit. -(medium) and LPS(100 ng/mL) used as negative and positive control, respectively. Specific inhibitors and target molecules refer Fig. 126.

본 실험에서 MAPK (p38, ERK 및 JNK) 및 IκBa의 inhibitor를 이용하여 어떤 분자에 의해 IL-6 생산이 유도되는 지 확인하고자 하였다. RAW 264.7 세포에 각각의 specific inhibitor를 30분 동안 처리하고, FBR-4a를 24시간 동안 처리하였다. 그 결과, JNK 단백질의 inhibitor를 처리한 경우에서 FBR-4a에 의한 IL-6의 생산이 현저하게 억제됨을 확인하였다. 또한 NF-κB 신호전달의 저해제인 BAY11-7085에 의해서도 IL-6의 생산이 유의적으로 억제됨을 확인되었다(Fig. 127). 이러한 사실을 통해 JNK signal pathway의 하위에 존재하고 있는 신호전달 단백질이 주로 cytokine IL-6의 생산에 직접 혹은 간접적으로 영향을 미치는 것으로 판단되었다.

또한 NF- $\kappa$ B 경로도 FBR-4a에 의한 IL-6생산에 관여함을 알 수 있었다(Fig. 127).



**Fig 128. Effect of FBR-4a on NO production by treatment of specific inhibitor from RAW 264.7 murine macrophage cell line.** RAW 264.7 cells( $2.0 \times 10^5$  cells/well, 24-well plate) were pretreated with inhibitors(SB, SP and U0126, 10  $\mu$ M; BAY, 5  $\mu$ M) for 30 min and then stimulated with FBR-4a (25ug/mL) for 24hr. The concentration of NO in the cultured medium was determined by griess assay. -(medium) and LPS(100 ng/mL) used as negative and positive control, respectively. Specific inhibitors and target molecules refer in Fig. 126.

한편, FBR-4a에 의한 NO 생산유도의 경우는 cytokine IL-6 생산경로와 다르게 p38, JNK 및 NF- $\kappa$ B 경로에 의해 다양하게 생산이 제어되는 것을 확인하였다(Fig. 128). 따라서, 현미발효물 유래 정제 다당 FBR-4a 의한 대식세포의 NO의 생성 기전은 cytokine IL-6와 상이한 작용기전을 통해 조절되고 있는 것으로 판단되며, 향후 보다 상세한 연구가 필요하다고 사료된다.

## 제4장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

### 1절 연구개발목표 달성도

#### 1. 향미가 증진된 고기능성 현미발효물과 응용제품 개발

당초목표	달성도	당초연구목표 대비 연구결과
현미(쌀)를 주원료로 하는 탄수화물발효 중심의 미생물 발효기술 최적화/소재개발	100%	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ <b>현미(쌀) 발효에 적합한 고역가 효소 곰팡이 분리 및 개량</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Starch를 glucose로 전환시키는 효소인 amylase (α-amylase, glucoamylase) 활성이 높은 곰팡이 균주를 target 하였음.</li> <li>▪ Aflatoxin을 생성하지 않고, 전분 액화 효소인 α-amylase와 탄수화물 전분 당화 효소인 glucoamylase 효소 활성이 높은 곰팡이를 enzyme assay를 통해 2종을 최종 selection 하였음.</li> </ul> </li> <li>○ <b>현미의 발효 최적화 기술 개발</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Selection 된 곰팡이의 amylase 효소의 최대 활성을 나타내는 발효 조건 설정하였음.</li> <li>▪ 곰팡이 효소 활성 최적 발효 온도, 최적 발효 시간 설정 후 발효 수율 측정을 통해 기술을 설정하였음.</li> </ul> </li> <li>○ <b>현미발효물의 영양학적 성분 분석 및 수율 측정</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ 현미발효물의 체내 유효 영양학적 성분을 분석 장비를 통해 방법 setting 및 분석하였음.</li> <li>▪ 현미발효물의 단백질, 무기질, 구성당, arabinoxylan, 비타민 성분을 기기 분석을 통해 정량적으로 분석하여 영양학적 유용 가치를 판단하였음.</li> </ul> </li> <li>○ <b>현미발효물 소재의 scale-up</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ Cellulose, starch의 성분을 분해하는 효소 활성이 뛰어난 곰팡이를 대량 생산하는 공정 및 조건을 설정하였음.</li> <li>▪ 현미의 cellulose, starch 등의 성분을 분해하는 효소를 생산하는 곰팡이 2종을 대량 생산하고, 안정화하였음.</li> <li>▪ 대량 배양된 곰팡이를 사용하여 pilot scale로 현미 발효를 실시하여 발효 수율을 측정하였음.</li> <li>▪ 100 L 열교환 반응기를 사용하여 현미발효물을 제조하고 현미발효물의 발효수율을 측정하여 대량 생산 안정화에 기여하고자 하였음.</li> </ul> </li> </ul>
기능성 현미발효물을 활용한 고부가가치의 응용제품 개발	100%	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ <b>현미발효물 적용 제품의 최적 가공 기술 및 최적화 제조 기술 개발</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ 오리엔탈 드레싱을 기본배합비로 액상과당을 현미발효물과 말티톨로 대체하여 제조공정 중 열처리에 의한 갈변현상을 최소화하는 배합비 개발 완료</li> <li>▪ 가열 살균 온도를 90℃에서 85℃로 하향 조정하여 열처리에 의한 갈변현상을 최소화하면서도 보존성 테스트를 통한 안전성이 확인된 살균 공정 조건을 설정함.</li> <li>▪ 분말원료를 물에 용해한 후 현미발효물을 포함한 액상원료를 혼합한 후 85℃까지 가열 살균하고 양조식초를 투입하여 80℃에서 살균을 종료하여 풍미를 유지하면서도 열에 의한 갈변을 최소화하는 공정 조건을 설정함.</li> <li>▪ 가열살균이 완료된 배합물의 병 충전시 Hot filling과 Cold filling의 풍미를 비교하여 Cold filling 조건을 설정하였으며 충전시간대별 풍미 점검을 통해 Cold filling 2시간 이내 충전으로 배합물의 풍미열화와 갈변 최소화를 위한 충전 공정 조건을 설정함.</li> </ul> </li> </ul>



	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ 갈변 최소화 공정 조건을 적용한 Lab scale 현미발효물 적용 오리엔탈 드레싱의 전문패널 대상 관능검사 결과 시중 M/S 1위제품(A사) 대비 향(3.4점), 맛(3.8점), 전반적 만족도(3.7점)으로 동등 이상의 관능품질을 확인함.</li> <li>▪ 현미발효물을 적용한 머스터드 드레싱에는 액상과당 대신 현미발효물, 벌꿀, 말티톨 시럽을 사용하였으며 머스타드 풍미를 위해 사용되는 조제겨자를 현미발효물, 벌꿀, 말티톨 시럽에 혼합시에 조제겨자의 용해도가 향상됨을 확인함.</li> <li>▪ 현미발효물을 적용한 머스터드 드레싱은 분말원료와 액상원료를 정제수와 혼합하여 85℃까지 살균 후 양조식초를 첨가하여 80℃에서 살균 종료하고 배합물이 30℃이하로 냉각되면 수상부 배합물과 유상부 배합물(엑스트라버진 올리브유,카놀라유)을 각각 정량대로 병에 충전하는 공정 조건을 설정함.</li> <li>▪ 현미발효물을 적용한 머스터드 드레싱과 M/S 1위인 C사의 머스터드 드레싱의 전문패널 대상 관능검사 결과, 전반적 만족도 3.8점(Top 2, 70%), 맛 기호도 3.7점으로 경쟁사 제품 대비 유의적으로 좋은 결과를 확인함.</li> <li>▪ 현미발효물을 적용한 비비큐 소스에 점도와 결합력을 부여하기 위해 전분을 넣고 호화시키도록 하였으며 소스의 점도가 강할수록 교반이 힘들고 온도 상승이 느려지기 때문에 전분 투입 시기는 다른 분말 원료와 액상 원료의 가열이 끝난 후로 설정함.</li> <li>▪ 드레싱 제품과 달리 현미발효물을 적용한 바비큐 소스는 오일이 별도로 사용되지 않기 때문에 냉각 후 충전과정에서 2차 오염이 가능성이 있으므로 충전시 70℃를 유지하며 2시간 이내로 충전하여 냉각하는 Hot filling 공정을 적용하였으며 보존료 대신 주정을 85℃ 살균 종료 직후 투입하여 미생물 안전성을 향상시키는 공정 조건을 확정함.</li> <li>▪ 현미발효물을 적용한 바비큐 소스와 시중에 판매중인 M/S 1위 제품인 H사 히코리 바비큐 소스(수입)의 관능검사 결과, 전반적 만족도 3.9점(Top 2, 71%)로 경쟁사 제품 대비 유의적으로 좋게 평가되었음을 확인함.</li> </ul> <p>○ 현미발효물 적용 제품의 Scale-up 및 시제품 제작</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ 현미발효물을 적용한 오리엔탈 드레싱은 분말원료와 액상원료를 정제수와 혼합하여 85℃까지 살균 후 양조식초를 첨가하여 80℃에서 살균 종료하고 배합물이 30℃이하로 냉각되면 수상부 배합물과 유상부 배합물(엑스트라버진 올리브유,카놀라유)를 각각 정량대로 병에 충전하는 공정 조건을 설정하였으며 Scale up시에는 배합물을 30kg로 시생산시에는 실제 생산 배합물량인 700kg으로 제조 완료함.</li> <li>▪ 현미발효물을 적용한 오리엔탈 드레싱의 Scale up 시제품의 전문패널 대상 관능검사 결과, 전반적 만족도 3.8점(Top2, 71%)로 확인됨.</li> <li>▪ 현미발효물을 적용한 오리엔탈 드레싱의 Scale up 시제품과 시생산 제품에 대한 35℃ 향온 보관에 따른 품질 체크(Brix,염도,pH,갈변도,미생물,관능품질) 결과, 10주 보관시에도 한도건본과 유사한 품질이 확인되어 유통기간을 상온 10개월로 설정함.</li> </ul> <p>○ 기능성 현미발효물이 풍부하게 함유된 제품개발 완료</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ 현미발효물을 적용한 오리엔탈 드레싱 Scale up 시제품과 시생산 제품의 관능 검사 결과, 전반적 만족도 3.8점(Top2, 71%)로 확인되었고 향온 35℃, 10주 보관시에도 한도건본대비 관능품질이 유지되었고 미생물,갈변도 등 제품의 안전성이 확인되어 유통기간을 상온 10개월로 설정 완료함.</li> <li>▪ 현미발효물을 적용한 오리엔탈 드레싱의 품질 평가 방법과 검사 방법을 확립하여 기본규격 항목(내용량,라벨 부착상태,이물질), 관능규격(관능검사 방법, 색상, 이미와 이취, 풍미), 일반규격 검사방법(당도,염도,pH), 특별검사 식품공전 규격(보존료,대장균군,바실러스 세레우스,타르색소)를 설정하여 제품개발을 완료함.</li> <li>▪ 현미발효물을 적용한 머스터드 드레싱은 분말원료와 액상원료를 정제수와 혼합하여 85℃까지 살균 후 양조식초를 첨가하여 80℃에서 살균 종료</li> </ul>
--	---

		<p>하고 배합물이 30℃이하로 냉각되면 수상부 배합물과 유상부 배합물(엑스트라버진 올리브유,카놀라유)을 각각 정량대로 병에 충전하는 제조 공정 조건을 설정함.</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ 현미발효물을 적용한 머스터드 드레싱 관능 검사 결과, 전반적 만족도 전반적 만족도 3.8점(Top 2, 70%)로 확인되었고 항온 35℃, 10주 보관시에도 한도건본대비 관능품질이 유지되었고 미생물,갈변도 등 제품의 안전성이 확인되어 유통기간을 상온 10개월로 설정 완료함.</li> <li>▪ 현미발효물을 적용한 머스터드 드레싱의 품질 평가 방법과 검사 방법을 확립하여 기본규격 항목(내용량,라벨 부착상태,이물질), 관능규격(관능검사 방법, 색상, 이미와 이취, 풍미), 일반규격 검사방법(당도,염도,pH), 특별검사 식품공진 규격(보존료,대장균군,바실러스 세레우스,타르색소)를 설정하여 제품개발을 완료함.</li> <li>▪ 현미발효물을 적용한 바비큐 소스는 분말원료와 액상원료를 정제수와 혼합하여 교반하면서 85℃까지 가열한 후 진분과 정제수를 섞어 투입하여 85℃까지 가열하여 살균을 종료하였으며 가열 살균 종료 후 주정을 투입하여 2분간 교반하여 추가 살균하였고 규격 검사 후 70℃를 유지하면서 2시간 이내에 충전한 후 30℃까지 냉각하는 제조공정 조건을 설정함.</li> <li>▪ 현미발효물을 적용한 바비큐 소스 관능 검사 결과, 전반적 만족도 전반적 만족도 3.9점(Top 2, 70%)로 확인되었고 항온 35℃, 10주 보관시에도 한도건본대비 관능품질이 유지되었고 미생물,갈변도 등 제품의 안전성이 확인되어 유통기간을 상온 10개월로 설정 완료함.</li> <li>▪ 현미발효물을 적용한 바비큐 소스의 품질 평가 방법과 검사 방법을 확립하여 기본규격 항목(내용량,라벨 부착상태,이물질), 관능규격(관능검사 방법, 색상, 이미와 이취, 풍미), 일반규격 검사방법(당도,염도,pH), 특별검사 식품공진 규격(보존료,대장균군,바실러스 세레우스,타르색소)를 설정하여 제품개발을 완료함.</li> <li>▪ 현미발효물의 건강 기능성 컨셉적 활용 방안 검토 결과, 본 과제를 통해 개발된 오리엔탈 드레싱, 머스터드 드레싱, 바비큐 소스는 액상과당을 사용하는 시중 제품과는 차별화되게 향미가 증진된 현미발효물을 사용하여 건강하면서 맛있는 단맛이 구현 가능함을 확인하였으며 건강 기능성 컨셉을 간접적으로 활용하기 위해 제품 라벨에 “액상과당 무첨가”, 제품명으로 “현미 발효” 표시와 함께 제품 라벨 전면에 현미발효물 사용량을 표시하였고 현미의 건강한 측면을 식품 표시법 기준에 맞도록 ‘미네랄, 식이섬유가 풍부한 현미를 발효하여 더 건강하고 맛있게 만들었습니다.’ 라는 문구를 표시하였음.</li> </ul>
--	--	--

## 2. 현미발효물의 당 및 지질대사 개선 효능 평가

당초목표	달성도	당초연구목표 대비 연구결과
당 및 지질대사 조절 효능을 나타내는 현미발효물의 선별	100%	<p>○ <b>스크리닝을 통한 현미발효물의 활성검색</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ 샘플식품(주)로부터 제공받은 여러 가지 발효조건에 의해 생산된 다양한 현미발효물의 당 및 지질대사 조절 효능 스크리닝하였음.</li> <li>▪ PPAR/LXR 핵수용체 활성조절능력이 있는 고생리활성의 현미발효물 선별하였음.</li> </ul>
현미발효물로부터 분리한 생리활성 분획물의 당대사 조절 효능 평가	100%	<p>○ <b>스크리닝을 통한 현미발효 분획물의 활성탐색</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ 기 선정된 현미발효물로부터 분리한 여러 분획물의 당 대사 조절 효능 스크리닝: PPAR/LXR 핵수용체 활성조절을 통한 당대사효능 연구, 아미노산/펩타이드 및 수용성 식이섬유 분획물 대상</li> <li>▪ 고생리활성 분획물 선별</li> </ul> <p>○ <b>배양세포계에서 현미발효 분획물의 당대사 조절 효능 평가</b></p>

		<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ MTT를 통한 독성평가 및 유효 농도 선정</li> <li>▪ PPAR/LXR 타겟 유전자 발현조절을 통한 insulin sensitivity 조절 및 당신생성 억제기전(당대사) 연구</li> </ul> <p>○ <b>마우스에서 현미발효 분획물의 당대사 조절 효능 평가</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ 동물식이용 함량 설정</li> <li>▪ PPAR/LXR 타겟 유전자 발현조절을 통한 분획물의 당대사 조절효능평가</li> <li>▪ 혈액, 근육, 간 조직에서 당대사 주요 조절 유전자 및 단백질 발현 분석을 통한 기작 연구</li> </ul>
현미발효물로부터 분리한 생리활성 분획물의 지질대사 조절 효능 평가	100%	<p>○ <b>기 선정된 생리활성분획물을 이용하여 배양세포계 및 마우스에서 지질대사 조절 효능 및 기작의 심층적 연구</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ PPAR/LXR 핵수용체 활성조절을 통한 지질대사효능 연구</li> <li>▪ 아미노산/펩타이드 및 수용성 식이섬유 분획물 대상</li> </ul> <p>○ <b>배양세포계 및 마우스를 이용한 당대사 조절 효능 및 기작의 심층적 연구</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ 간, 지방조직 분석</li> <li>▪ 당 및 지질대사 바이오 마커 분석 (PCR, Westernblot)</li> </ul> <p>○ <b>PPAR/LXR 타겟 유전자 발현조절을 통한 HDL 콜레스테롤 상승기전 및 세포내 지질 합성억제/산화촉진 기전연구</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ 간, 혈액 콜레스테롤 함량분석</li> <li>▪ HDL/LDL 비율 측정</li> <li>▪ 콜레스테롤 대사조절 마커 분석 (담즙산 측정)</li> </ul>

### 3. 현미발효물로부터 장관면역계 활성화 다당체의 분리 및 특성 평가

당초목표	달성도	당초연구목표 대비 연구결과
장관면역 활성화 다당체가 풍부한 현미발효물 선별 및 활성화다당체의 분리·정제	100%	<p>○ <b>장관면역 활성화 다당체가 풍부한 현미발효물 선별</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ 현미발효물로부터 에탄올 침전법을 통한 발효물 조다당 획분[fermented brown rice(FBR-0), rice bran(RB-0) 외 다수, sample-F1, F2, F3]을 조제한.</li> <li>▪ FBR-0 획분의 경우 유일하게 IgA를 비롯하여 IL-6 및 GM-CSF의 생산량을 증가시키는 양상을 보였음.</li> <li>▪ Balb/c 유래 peritoneal macrophage를 회수하여 면역활성을 측정된 결과, FBR-0는 타 발효물 시료와는 달리 IL-6, IL-12 및 TNF-<math>\alpha</math>의 생산을 농도 의존적으로 증가시켰음.</li> <li>▪ FBR-0는 중성당(91.5%)과 소량의 산성당(7.0%) 및 단백질(1.5%)로 구성된 중성다당류였음.</li> <li>▪ FBR-0는 arabinose, xylose, mannose 및 galactose를 소량 함유한 반면, 고비율의 glucose(86.9%)로 함유하고 있었으며, RB-0에서도 비슷한 양상을 보였음.</li> <li>▪ 이러한 결과는 장관면역 활성 다당 FBR-0에 전분성 물질(발효 중 amylase에 의해 분해되지 않은 limit dextrin)이 많이 존재함을 시사하였으며, 이들을 제거될 경우 활성의 증가가 가능하리라 사료되었음.</li> </ul> <p>○ <b>현미발효물로부터 장관면역 활성화 다당체의 분리, 정제</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ FBR-0를 효소처리한 결과, 포도당 함량의 급격한 감소를 보였으며, 효소처리 전에 미검출 rhamnose와 fucose가 검출되었으며, 고비율로 arabinose, xylose, mannose, galactose로 구성되어 있음을 확인할 수 있었음.</li> </ul>

		<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ 현미발효물에서 분리 및 효소처리된 면역활성 다당인 FBR-E는 DEAE Sepharose FF(Cl<sup>-</sup> form)를 이용, 1개의 비흡착획분(FBR-1)과 6개의 흡착획분(FBR-2~7)으로 분리하였음.</li> <li>▪ 면역 활성화와 수율이 양호했던 FBR-4 획분은 Sephadex G-100 column에 의해 분자량이 상이한 2개 획분, FBR-4a와 FBR-4b로 정제하였음.</li> <li>▪ FBR-4a와 FBR-4b는 분자량 62 및 21 kDa이었으며, FBR-4a는 중성당(88.3%) 및 산성당(11.7%)을 함유하였으며, FBR-4b는 47.6%의 고분은 산성당 함량을 함유한 다당획분이었음.</li> <li>▪ FBR-4a 및 FBR-4b의 구성당을 분석한 결과, FBR-4a는 galactose, arabinose 및 glucose를 각각 43.2%, 21.7% 및 12.5% 함유하였으며 FBR-4b의 경우 47.6%의 GalA+GlcA 외에 rhamnose, arabinose, mannose 및 galactose를 8.1, 8.4, 8.8 및 12.2% 함유하고 있었음</li> <li>▪ FBR-4a의 경우 <math>\beta</math>-Glucosyl Yariv reagent와 반응, 침전환 형성한 반면, FBR-4b는 반응환이 관찰되지 않았음.</li> </ul>
<p>현미발효물 유래 활성 다당체의 장관면역 활성화 특성 평가 (<i>in vitro</i> &amp; <i>in vivo</i>)</p>	<p>100%</p>	<p>○ 현미발효물이 대식세포의 면역활성에 미치는 효과</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ FBR-4a 및 FBR-4b는 mouse의 복강 유래 macrophage와 RAW 264.7, Caco-2의 세포들에서 독성은 나타나지 않았음.</li> <li>▪ 대식세포를 자극활성은 고분자 다당획분인 FBR-4a에서 NO, IL-6 및 IL-12 생성능이 저분자 획분인 FBR-4b에 비해 우수한 효과를 보였으며, RAW 264.7 대식세포주에서도 FBR-4a가 FBR-4b에 비해 우수한 활성을 보였음.</li> <li>▪ FBR-4a는 FBR-4b보다 높은 IL-6 mRNA의 발현을 나타냈으나, TNF-<math>\alpha</math>의 mRNA 발현의 경우에는 FBR-4a가 FBR-4b에 비해 약간 높은 발현정도를 나타내었음.</li> </ul> <p>○ 현미발효물이 장관면역계 활성화에 미치는 효과</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ FBR-4a는 C3H/HeN mouse 유래 Peyer's patch cell을 자극하여 농도의존적으로 높은 IL-6 및 IgA 생산 유도능을 보였으며 FBR-4B 보다 우수하였음.</li> <li>▪ FBR-4a와 FBR-4b에 대한 Peyer's patch를 경유한 골수세포 증식활성을 검토한 결과, FBR-4a의 경우 NC에 비해 약 25%로 유의적 활성 증가가 관찰된 반면, FBR-4b 활성을 보이지 않았음.</li> <li>▪ 활성화다당이 장관 상피세포를 통과하여 흡수된 후, 체내 면역세포들과 반응 가능여부를 확인하기 위해 Transwell® insert가 장착된 well plate를 이용, 실험한 결과, FBR-4a 투과에 의한 IL-6 생산 정도는 농도별로 약 55~75% 정도의 투과율을 보이는 것으로 관찰되었음.</li> <li>▪ 이러한 결과는 FBR-4a가 주로 arabino-<math>\beta</math>-3,6-galactan 형태인 중성 다당획분으로 산성당 형태의 FBR-4b에 비해 장관상피세포의 세포막 지질층을 통과하는데 더 유리하게 작용했을 가능성이 추론되었음.</li> </ul> <p>○ 장관면역계 활성화에 미치는 현미발효물 유래 다당의 경구투여 효과(<i>in vivo</i>)</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ FBR-0와 FBR-E를 각각 10, 100 및 1,000 <math>\mu</math>g/mouse의 농도로 20일간의 경구투여한 마우스의 소장으로부터 Peyer's patch 세포 분리, 배양 중 생산되는 IgA와 IL-6의 함량을 측정된 결과, 두 시료에서 모두 농도의존적인 IgA 및 IL-6 분비능을 나타내었으며, 특히, FBR-E의 경우, 10 <math>\mu</math>g/mouse에서부터 FBR-0 대비 유의적으로 높은 IgA 분비능을 보였음.</li> <li>▪ 분변 중 IgA 및 혈중 IL-6의 함량에서도 FBR-E를 경구투여한 군에서 상대적으로 높은 생산량과 농도의존적인 증가를 나타내었음.</li> <li>▪ 이상의 결과로부터, 현미발효물 유래의 다당은 우수한 면역증진활성을 보유하고 있으며, 가공적성이 우수하고 면역활성이 배가된 기능성 소재로 개발하기 위해서는 효소처리 공정의 도입이 필수적임을 알 수 있었음.</li> </ul>
<p>현미발효물 유래</p>	<p>100%</p>	<p>○ 현미발효물 유래 다당의 구조화학적 특성 규명 및 지표성분 설정</p>

<p>장관면역 활성화 다당체의 상세 구조 규명</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ 구성당, Methyl화 분석, 분자량 분석에 의해 현미발효물 유래 활성 다당체의 전체구조를 규명하였음.</li> <li>▪ FBR-4a는 총 13종의 당쇄 결합이 검출되었는데, 약 90%의 고비율로 존재하는 <math>\beta</math>-arabino-(3,6)-galactan을 측쇄로 하는 rhamnagalacturonan-I (RG-I)과 약 10% 미만으로 존재하는 <math>\beta</math>-1,6-glucan이 혼합되어 존재함을 추정할 수 있었음.</li> <li>▪ FBR-4a를 구성하는 RG-I은 main chain이 <math>\rightarrow</math>2)-Rha-(1<math>\rightarrow</math>4)-GalA-(1<math>\rightarrow</math>2)-의 이당류가 반복되는 서열의 기본 구조에 복잡한 구조의 측쇄가 연결된 구조였으며, 타 RG-I에 비해 측쇄로 연결된 <math>\alpha</math>-(1<math>\rightarrow</math>5)-arabinan과 <math>\beta</math>-(1<math>\rightarrow</math>4)-galactan이 짧고, <math>\beta</math>-arabino-(3,6)-galactan이 약 70%로 RG-I 다당의 대부분을 차지하는 특징적 형태를 보여주었으며 <math>\beta</math>-arabino-(3,6)-galactan이 활성화에 주로 공헌함을 알 수 있었음.</li> <li>▪ FBR-4a의 구성 다당 glucan은 2-linked, 6-linked GlcP 잔기가 검출되었으며 이 결과는 <math>\beta</math>-(1<math>\rightarrow</math>2)-glucan 영역이 <math>\beta</math>-(1<math>\rightarrow</math>6)-glucan과 연결된 기본 구조를 갖는 것으로 평가되었음.</li> <li>▪ 그러나 상대적으로 매우 낮은 함량으로 존재한다는 점에서 FBR-4a의 면역활성에 공헌할 가능성은 낮은 것으로 판단되었음.</li> <li>▪ 따라서 FBR-4a는 원재료인 현미의 pectin이 발효과정 중에 분해되어 생성된 RG-I, 특히 RG backbone에 <math>\beta</math>-arabino-(3,6)-galactan이 복잡하게 측쇄로 연결된 다당으로 구성되어 있음을 최종 결론지었음.</li> <li>▪ 장관면역 활성 다당의 산업화에 필수적인 지표 구성당 및 함량 설정을 위해 3회에 걸쳐 활성 다당을 조제한 후, 절대값으로 지표다당의 함량을 측정한 결과 산업적 응용 가능획분 FBR-E-1은 arabinose와 galactose 합산 함량 4.0% 이상으로 결정하였음</li> </ul> <p>○ 현미발효물 유래 다당의 신호전달 기작 규명 (추가 성과)</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ 현미발효물 유래 면역활성 정제 다당인 FBR-4a는 RAW 264.7 세포주에 처리하였을 때, 20분 후부터 MAPK(p38, ERK, JNK) 인산화를 강하게 유도하였으며 60분 경과 후, 탈인산화 되는 것으로 확인되었음.</li> <li>▪ NF-<math>\kappa</math>B p65의 인산화는 FBR-4a 처리 10분부터 인산화가 시작되어 120분까지 지속되는 것으로 나타났음.</li> <li>▪ 이를 통해 FBR-4a에 의해 세포내에서 MAPK의 활성화 및 NF-<math>\kappa</math>B p65의 활성화가 일어나, AP-1 전사인자군 및 NF-<math>\kappa</math>B를 통한 전사가 개시되어 IL-6 및 NO의 생산이 이루어진다고 예측할 수 있었음.</li> <li>▪ 또한, MAPK(p38, ERK 및 JNK) 및 I<math>\kappa</math>B<math>\alpha</math>의 inhibitor를 이용하여 어떤 분자에 의해 IL-6 생산이 유도되는 지 확인했을 때, FBR-4a에 의한 NO 생산유도의 경우는 cytokine IL-6 생산경로와 다르게 p38, JNK 및 NF-<math>\kappa</math>B 경로에 의해 다양하게 생산이 제어되는 것을 확인하였음.</li> <li>▪ 따라서, 현미발효물 유래 정제 다당 FBR-4a 의한 대식세포의 NO의 생성 기전은 cytokine IL-6와 상이한 작용기전을 통해 조절되고 있는 것으로 판단되며, 향후 보다 상세한 연구가 필요하다고 사료됨.</li> </ul>
---------------------------------------	--

## 2절 기술발전 기여도

본 연구를 통해 향미가 증진된 고기능성 현미발효물의 당·지질대사조절 작용 및 면역활성을 확인하였으며, 다양한 제품에 적용될 수 있는 가능성을 확인하였음. 단맛을 부여하는 맛내기 소재로써의 건강하게 식품을 섭취할 수 있으며, 과다한 당 섭취로 인한 건강문제를 해결할 수 있는 소재임을 확인하였음. 당 연구결과는 국내외 학술대회 발표, 논문 게재, 전시회 참여를 통해 홍보되었으며, 추가적으로 제품 출시와 함께 당 연구결과를 활용하여 소비자들에게 건전한 건강정보를 제공할 수 있을 뿐 아니라 국내산 농산물에 대한 관심을 고취할 수 있음.

현미발효물 소재의 상용화 완료시 건강 지향적인 단맛 맛내기 소재의 산업화로 한식의 고급화 및 국민 보건 복지에 기여 가능하며, 품미가 향상된 천연지향적 소재의 실용화를 통해 수입소재에 대한 대체 효과 유발 가능함. 또한 국내산 곡물을 활용하여 제조한 고부가가치 상품의 수출을 통해 쌀 생산 농가의의 소득증대와 산업 발전에 기여가능함.

# 제5장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

## 1절 실용화·산업화 계획(기술실시 등)

본 연구는 식물성 천연원료인 현미에 미생물 발효기술을 접목하여 소재를 개발하고, 이를 응용한 제품군을 개발하며 현미발효물의 건강 기능성 평가를 통한 고부가가치를 창출하는 것을 최종목표로 하였다. 이에 탄수화물(전분) 발효에 적합한 효소 곰팡이 2종을 분리하여 확보하였으며, 당 미생물을 활용하여 소재 개발을 완료하고, 영양학적 가치와 기능성을 연구하였다. 그 결과, 부드럽고 풍부한 단맛을 지니는 소재로 현재 시판중인 당류를 대체할 수 있음을 확인하였으며, 대량 생산 공정을 확립하였다. 또한 이를 활용하여 시제품 3종\_현미 발효 오리엔탈 드레싱, 현미 발효 바비큐 소스, 현미 발효 머스타드 드레싱\_ 개발을 완료하여 대량 생산 공정을 확립하였다. 현미발효물 소재의 건강기능성 연구를 위해 고려대학교와 경기대학교에 제공하여 당 대사/지질대사 활성과 면역활성능을 연구한 결과, 당 소재에 함유되어 있는 아미노산펩타이드와 수용성 polysaccharide에 의해 기능성이 발현됨을 확인하였다.

- 탄수화물(전분) 분해 효소 활성을 가진 미생물 (곰팡이) 분리 2종 확보
- 향미가 증진된 고기능성 현미발효물 소재 개발 완료



- 현미발효물 소재를 적용한 시제품 개발 3종 완료: 현미 발효 오리엔탈 드레싱, 현미 발효 머스타드 드레싱, 현미 발효 바비큐 소스



- 현미발효물 소재의 적용범위 확대 예정 (장류, 소스류, 기호성 음료 등)
- 당 연구개발 결과를 자체 사업화를 실시하기 위해 농림수산식품기술기획평가원과 기술실시를 협의중임.

## 2절 교육·지도·홍보 등 기술확산 계획 등

### 1. 전시회 참가: 3건

- 2011 생명산업대전참가, 포스터발표 및 개발기술 관련 홍보 (11.10.13, 샘표식품(주), 생명산업대전, aT 센터)
- 2012 생명산업대전참가, 포스터발표 및 개발기술 관련 홍보 (12.09.20, 샘표식품(주), 생명산업대전, aT 센터)
- 2013 생명산업대전참가, 포스터발표 및 개발기술 관련 홍보 (13.09.26, 샘표식품(주), 생명산업대전, aT 센터)

### 2. 홍보: 1건

- <퓨처스클럽> 쌀·보리 등 가공... 기능성건강식품 개발 박차, 신문홍보 (13.07.30, 고려대학교, 헤럴드경제 뉴스 게재)

## 3절 특허, 품종, 논문 등 지식재산권 확보계획 등

### 1. 특허: 출원 4건, 등록 1건 확보

- 알파-아밀라아제 및 글루코아밀라아제고활성능을 가지는 아스퍼질러스 균주 및 그 배양방법(2011, 샘표식품(주), 대한민국, 출원번호 10-2011-012775)
- 알파-아밀라아제 및 글루코아밀라아제고활성능을 가지는 리조푸스 균주 및 그 배양방법(2011, 샘표식품(주), 대한민국, 출원번호 10-2011-0127759)
- PPAR 활성을 지닌 자생 불레기말 추출물을 함유하는 조성물(2012, 고려대학교산학협력단, 대한민국, 등록번호 10-1193730)
- 전분 분해 효소 활성을 지니는 균주의 생산 방법(2013, 샘표식품(주), 대한민국, 출원번호 10-2013-0042296)
- 혈중콜레스테롤 및 혈당강하효능을 가지는 현미발효물; 그 제조방법 및 용도(2014, 고려대학교산학협력단, 대한민국, 출원번호 10-2014-0055758)

### 2. 논문: SCI 6건, 비SCI 1건, 투고진행중 5건

#### SCI

- Iristectorigenin B isolated from *Belamcanda chinensis* is a live X receptor modulator that increases ABCA1 expression in macrophage RAW 264.7 cell (Biotechnology Letters, 34:2213-2221, 2012)



- Taurine is a liver X receptor- $\alpha$  ligand and activates transcription of key genes in the reverse cholesterol transport without inducing hepatic lipogenesis (Molecular Nutrition & Food Research, 56(6), 1613-4125)
- Fucosterol is a liver X receptor agonist that regulates the expression of key genes in cholesterol homeostasis in macrophage, hepatocytes, and intestinal epithelium (Journal of Agricultural and Food Chemistry, 60:11567-11575, 2012)
- Ombuine-3-O-beta-D-glucopyranoside from Gynostemma pentaphyllum is a dual ligand of peroxisome proliferator-activated receptor alpha and beta/delta (Biochemical and Biophysical Research Communications, 430:1322-1328, 2013)
- The dipeptide H-Trp-Glu-OH (WE) shows agonistic activity to peroxisome proliferator-activated protein- $\alpha$  and reduces hepatic lipid accumulation in lipid-loaded H4IIE cells (Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters 24, 24 : 2957-2962, 2014)
- Ethyl 2,4,6-trihydroxybenzoate is an agonistic ligand for liver X receptor that induces cholesterol efflux from macrophages without affecting lipid accumulation in HepG2 cells (Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 22(12), 4094-4099)

#### 비SCI

- Hypolipidemic and anti-inflammatory activities of fermented soybean fibers from meju in C57BL/6J mice (Phytotherapy Res, Epub, 2014)

#### 투고진행중

- The hypolipidemic and hypoglycemic activities of fermented brown rice fibers in C57BL/6J mice (Life Sciences, Accepted, 2014)
- Effect of enzyme treatment on isolation of immuno-stimulating polysaccharide from fermented brown rices (한국식품영양과학회 심사 중, 2014년 43권)
- Structural characterization of intestinal immune-modulating polysaccharide purified from fermented brown rices (Phytotherapy Research 투고 중 2014년 28권)
- Macrophage-stimulating activities and chemical properties of polysaccharides purified from fermented brown rices (한국식품과학회지 투고 예정, 작성 중)
- In vitro and in vivo of the polysaccharides purified from fermented brown rices on intestinal immune system (Carbohydrate Polymers 투고 예정, 작성 중)

#### 3. 학술발표: 총 7건

- C-FBM-1, a Natural Flavonoid, is a Ligand for Liver X Receptors (12.06.13, 고려대학교, 한국식품과학회, 대전)
- Small dipeptides, FBS-W1 and FBS-W2, are agonistic ligands for peroxisome proliferator-activated receptor- $\alpha$  (12.10.31, 고려대학교, The Korean Society of Food Science and Nutrition(KFN), 제주도)
- Fermented brown rice extracts activate liver X receptor activates in vitro (12.10.31, 고려대학교, The Korean Society of Food Science and Nutrition(KFN), 제주도)

- Isolation and characterization of immuno-stimulating polysaccharide from fermented brown rices (12.11.01, 경기대학교, 41th Anniversary 2012 International Symposium and Annual Meeting, 제주 ICC)
- Macrophage-stimulating activities and chemical properties of polysaccharides from fermented brown rices (13.08.29, 경기대학교, 2013 Annual Meeting of Korean Society of Food Science and Technology, 천안 예술의전당)
- Intestinal immune-modulating activity of polysaccharides Isolated from fermented brown rices (13.11.15, 경기대학교, 2013 International Symposium and Annual Meeting of the KFN, 광주 김대중 컨벤션센터)
- Rhamnogalacturonan, a promising immuno-active polysaccharide(14.07.02, 경기대학교, 2014 한국당과학회 하계학술대회, 대천 한화콘도)

## 4절 추가연구, 타 연구에 활용 계획

본 연구는 식물성 천연원료인 현미에 미생물 발효기술을 접목하여 “현미발효물” 소재를 개발하고, 이를 활용하여 다양한 제품에 응용가능한지 검증하여 그 가능성을 확인하였다. 당 연구결과인 “현미발효물” 소재는 현미의 영양이 풍부하여 현대인들에게 건강기능성을 제공할 뿐만 아니라, 향미가 뛰어나고, 풍미가 증진된 “단맛”을 제공하여 현미를 건강하고 맛있게 섭취할 수 있게 한다. 미생물발효기술을 기반으로 현미의 외피를 구성하는 주성분인 hemicellulose 성분을 분해하는 국균을 선별하였고, 이를 영양학적, 공정상의 최적화 된 발효를 진행하여 개발하였으므로 한식의 정서와 건강의 가치를 확립했다 말할 수 있다.

향미가 증진된 현미발효물로 기존 드레싱과 소스 제품에 사용되는 액상과당을 대체 적용이 가능함을 확인하였으며 풍미열화와 갈변을 최소화하기 위한 제조 공정 조건을 확인하였으므로 이러한 연구 결과를 활용하여 샐료식품(주)에서 서양식 정통 브랜드로 운영 중인 폰타나 브랜드 신제품으로 개발될 향후 다양한 소스와 드레싱에 액상과당을 사용하지 않고 현미발효물을 적용하는 연구를 진행할 계획이며 상품화도 검토할 예정이다.

“현미발효물” 소재를 산업용으로 다양하게 이용하기 위해서는 목적에 부합하는 다양한 제형의 개발이 필요하다. 또한 당 기술로 적용된 국균 이외에도 건강기능성을 부여하고 풍미를 증진시키는 다양한 미생물의 적용을 통한 확장 연구를 통해 고부가가치를 부여할 수 있다. 당 연구에서 적용된 소스류 뿐 아니라 기호성 음료, 장류, 가공/즉석 식품 등 무궁무진하게 영역을 넓혀서 적용가능하다.

- 현미발효물에 다양한 미생물군 (국균, 유산균, 효모 등)을 적용하여 발효에 따른 향미성분 분석 및 적용가능성 탐색
- 해외 시장을 타겟으로 한 수출용 제품류에 현미발효물 소재 적용시 가공적성 연구 및 안정성 유지 탐색
- 현미발효물 소재의 향미성분 분석을 통한 타 당류/감미료 소재와의 우위성 확인 연구
- 유아용/노인용 기호성 음료에 적용하여, 생애주기별 영양소 공급에 도움을 줄 수 있는 제품 개발 가능성 탐색 등

- 현미발효물을 이용하여 건강기능식품의 소재로 개발하기 위해서는 현미발효물에 대한  $\beta$ -amylase와  $\alpha$ -glucoamylase 효소처리 공정과 효소처리 후 활성다당체가 존재하는 것으로 확인된 활성다당획분(FBR-4a)을 정제하는 공정 도입이 필수적이므로 이에 대한 생산 공정 검토
- 산업적으로 응용이 가능한 시료 형태인 현미발효물유래 면역활성다당체 FRB-E-1의 Gal 및 Ara의 함량이 각 2.4%와 2.0% 수준인데 기능 지표 성분으로 Gal 및 Ara의 함량을 각 4.0% 이상으로 설정하고 지표성분의 함량을 증가시키기 위한 제조 공정 조건 검토
- 경기대학교와 고려대학교의 협동과제 연구 결과를 바탕으로 현미발효물이 IgA 생산을 통한 장관면역 활성화와 IL-6 등과 같은 면역관련 cytokine의 생산 증가를 유도하여 전신면역의 활성화에 효과적이며 PPAR $\alpha$ 의 발현을 조절하여 지방산 산화 및 합성, 그리고 콜레스테롤 대사를 조절하고, LXR $\alpha$ 의 발현을 조절하여 당 대사와 콜레스테롤 대사를 조절하여 대사증후군에 의한 지방축적을 저해하고 인슐린 저항성 및 혈중 지질 프로파일을 개선시키는 효능을 확인하였으며 이러한 건강기능 효능을 컨셉으로 하는 현미발효물 건강기능식품의 상품화 검토

## 제6장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

해당사항 없음.

## 제7장 연구시설·장비 현황

해당사항 없음.

## 제8장 참고문헌

1. Conigrave AD, Quinn SJ, Brown EM. L-amino acid sensing by the extracellular Ca<sup>2+</sup>-sensing receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(9):4814-4819 (2000)
2. Abbildung angelehnt an, Böhm, H-J., Klebe, G., and H. Kubinyi, *Wirkstoffdesign, Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg* (2002)
3. Baranowski M. Biological role of liver X receptors. *J Physiol Pharmacol* ;59 Suppl 7:31-55 (2008)
4. Conigrave AD, Quinn SJ, Brown EM. L-Amino acid sensing by the extracellular Ca<sup>2+</sup>-sensing receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(9):4814-4819 (2000)
5. Ye F, Zhang ZS, Luo HB, Shen JH, Chen KX, Shen X, Jiang HL: The dipeptide H-Trp-Glu-OH shows highly antagonistic activity against PPAR gamma: *Bioassay with molecular modeling simulation, Chembiochem*, 7:74-82 (2006)
6. Deng GH, Liu ZG, Ye F, Luo XM, Zhu WL, Shen X, et al. Tryptophan-containing dipeptide derivatives as potent PPAR gamma antagonists: Design, synthesis, biological evaluation, and molecular modeling. *European Journal of Medicinal Chemistry* ;43(12):2699-2716 (2008)
7. Arancibia SA, Beltrán CJ, Aguirre IM, Silva P, Peralta AL, Malinarich F, Hermoso MA. Toll-like receptors are key participants in innate immune responses. *Biol Res* 40: 97-112 (2007)
8. Artursson P, Lindmark T, Davis SS, Illum L. Effect of chitosan on the permeability of monolayers of intestinal epithelial cells (Caco-2). *Pharm Res* 11: 1358-1361 (1994)
9. Beutler B. Innate immunity: an overview. *Mol Immunol* 40: 845-859 (2004)
10. Bienenstock J, Befus AD. Review of mucosal immunology. *Immunol* 41: 249-270 (1980)
11. Blumenkrantz N, AsboeHansen G. New method for quantitative determination of uronic acid. *Anal Biochem* 54(2): 484-489 (1973)
12. Bockman DE, Cooper MD. Pinocytosis by epithelium associated with lymphoid follicles in the bursa of labricus, appendix and Peyer's patches: An electron microscopic study. *Am J Anat* 136: 455-478 (1973)
13. Booth JS, Nichani AK, Benjamin P, Dar A, Krieg AM, Babiuk LA, Mutwiri GK. Innate immune responses induced by classes of CpG oligodeoxynucleotides in ovine lymph node and blood mononuclear cells. *Vet Immunol Immunopathol* 115: 24-34 (2007)
14. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram

- quantities of protein utilizing the principle of protein dyebinding. *Anal Biochem* 72: 248-254 (1976)
15. Cao H, Urban JF, Anderson RA. Cinnamon polyphenol extract affects immune responses by regulating anti-and proinflammatory and glucose transporter gene expression in mouse macrophages. *J Nutr* 138: 833-840 (2008)
  16. Choi C, Choi KS, Lee SH, Hong SP, Lee HD, Bae DK. Characteristics and action pattern of  $\alpha$ -galactosidase from *Scopulariopsis brevicaulis* in korean traditional meju. *Agr Chem Biotechnol* 41: 489-495 (1998)
  17. Dubois M, Gilles KA, Hamilton JK, Rebers PA, Smith F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Anal Chem* 28: 350-356 (1956)
  18. Fujihara M, Muroi M, Tanamoto K, Suzuki T, Azuma H, Ikeda H. Molecular mechanisms of macrophage activation and deactivation by lipopolysaccharide: roles of the receptor complex. *Pharmacol Ther* 100: 171-194 (2003)
  19. Gross SS, Wolin MS. Nitric oxide: pathophysiological mechanisms. *Annu Rev Physiol* 57: 737-769 (1995)
  20. Gruchalla RS, Jones J. Combating high-priority biological agents: what to do with drug-allergic patients and those for whom vaccination is contraindicated?. *J Allergy Clin Immunol* 112: 675-682 (2003)
  21. Guinazu N, Carrera-Silva EA, Becerra MC, Pellegrini A, Albesa I, Gea S. Induction of NADPH oxidase activity and reactive oxygen species production by a single *Trypanosoma cruzi* antigen. *Int J Parasitol* 40: 1531-1538 (2010)
  22. Hackett CJ. Innate immune activation as a broad-spectrum biodefense strategy: prospects and research challenges. *J Allergy Clin Immunol* 112: 686-694 (2003)
  23. Hamilton TA, Adams DO. Molecular mechanism of signal transduction in macrophage. *Immunol Today* 8: 151-158 (1987)
  24. Herre J, Willment JA, Gordon S, Brown GD. The role of Dectin-1 in antifungal immunity. *Crit Rev Immunol* 24: 193-203 (2004)
  25. Heumann D, Roger T. Initial responses to endotoxins and gram-negative bacteria. *Clin Chim Acta* 323: 59-72 (2002)
  26. Holst GJ, Clarke AE. Quantification of arabinogalactan-protein in plant extracts by single radial gel diffusion. *Anal Biochem* 148: 446-450 (1985)
  27. Hong T, Matsumoto T, Kiyohara H, Yamada H. Enhanced production of hematopoietic growth factors through T cell activation in Peyer's patch by oral administration of Kampo(Japanese herbal) medicine "Juzen-Taiho-To". *Phytomedicine* 5: 353-360 (1998)
  28. Hosono A, Ozawa A, Kato R, Ohnishi Y, Nakanishi Y, Kimura T, Nakamura R. Dietary Fructooligosaccharides induce immunoregulation of intestinal IgA secretion by murine Peyer's patch cells. *Biosci Biotechnol Biochem* 67: 758-764 (2003)
  29. Hultqvist M, Backlund J, Bauer K, Gelderman KA, Holmdahl R. Lack of reactive oxygen species breaks T cell tolerance to collagen type II and allows development of arthritis in mice. *J Immunol* 179: 1431-1437 (2007)

30. James SP, Zeitz M. Human gastrointestinal mucosal T cells: In Handbook of Mucosal Immunology. *London: Academic Press*, 275–285 (1994)
31. Jiang HL, Kang ML, Quan JS, Kang, SG, Akaike T, Yoo HS, Cho CS. 2008. The potential of mannosylated chitosan microspheres to target macrophage mannose receptors in an adjuvant-delivery system for intranasal immunization. *Biomaterials* 29(12): 1931–1939 (2008)
32. Jones TM, Albersheim P. A gas chromatographic method for the determination of aldose and uronic acid constituents of plant cell wall polysaccharides. *Plant Physiol* 49: 926–936 (1972)
33. Kabat EA, Meyer MM, Charles C. Complement and complement fixation: In Experimental Immunology. *Springfield: Thomas Publisher ed.* 133–240 (1964)
34. Kang BR, Park MJ, Lee HS. Germination dependency of antioxidative activities in brown rice. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 35: 389–394 (2006)
35. Kataoka S, Liu W, Albright K, Storkson J, Pariza M. Inhibition of benzo[a]pyrene-induced mouse forestomach neoplasia and reduction of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> concentration in human polymorphonuclear leucocytes by flavour components of Japanese-style fermented soy sauce. *Food Chem Toxicol* 35: 449–457 (1997)
36. Kim MH, Shin MS. Quality characteristics of bread made with brown rice flours of different preparations. *Korean J Soc Food Cookery Sci* 19: 136–143 (2003)
37. Kim ZY. Activations of the complement system. *Allergy* 6: 61–66 (1986)
38. Kindt TJ, Osborne BA, Goldsby RA. Kuby Immunology. *6th ed. New York: WH Freeman and Co.* 43–50 (2007)
39. Kinoshita E, Yamakoshi J, Kikuchi M. Purification and identification of an angiotensin I-converting enzyme inhibitor from soy sauce. *Biosci Biotech Bioch* 57: 1107–1110 (1993)
40. Kobayashi M, Hashimoto Y, Taniuchi S, Tanabe S. Degradation of wheat allergen in Japanese soy sauce. *Int J Mol Med* 13: 821–827 (2004)
41. Kobayashi M, Matsushita H, Yoshida K, Tsukiyama R, Sugimura T, Yamamoto K. *In vitro* and *in vivo* anti-allergic activity of soy sauce. *Int J Mol Med* 14: 879–884 (2004)
42. Kobayashi M, Nagatani Y, Magishi N, Tokuriki N, Nakata Y, Tsukiyama R, Imai H, Suzuki M, Saito M, Tsuji K. Promotive effect of shoyu polysaccharides from soy sauce on iron absorption in animals and humans. *Int J Mol Med* 18: 1159–1163 (2006)
43. Kong SH, Choi YM, Lee S, Lee JS. Antioxidant compounds and antioxidant activities of the methanolic extracts from milling fractions of black rice. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 37: 815–819 (2008)
44. Kroncke KD, Fehsel K, Kolb-Bachofen V. Inducible nitric oxide synthase in human diseases. *Clin Exp Immunol* 113: 147–156 (1998)
45. Kuno T, Hirose Y, Hata K, Kato K, Qiang SH, Kitaori N. Preventive effect of



- fermented brown rice and rice bran on N-nitrosomethylbenzylamine-induced esophageal tumorigenesis in rats. *Int J Oncol* 25: 1809-1815 (2004)
46. Laere KM, Beldman G, Voragen AG. A new arabinofuranohydrolase from *Bifidobacterium adolescentis* able to remove arabinosyl residues from double-substituted xylose units in arabinoxylan. *Appl Microbiol Biotech* 47: 231-235 (1997)
47. Kim JH, Shin KS, Lee H. Characterization and action mode of anti-complementary substance prepared from *Lactobacillus plantarum*. *Korean J Food Sci Technol* 34: 290-295 (2002)
48. Choi JH and Shin KS. Characterization of Anti-Complementary Polysaccharides Isolated from Fruit Wine Using Korean Pears. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 40: 63-69 (2012)

## 주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 고부가가치식품기술개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림축산식품부에서 시행한 고부가가치식품기술개발사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니 됩니다.