

발간등록번호

11-1543000-001699-01

**천연소재 유래 고감미 건강기능성  
감미료 및 설탕보완재 개발  
최종보고서**

2017. 4. 4.

주관연구기관 / 세종대학교  
협동연구기관 / 대한제당 주식회사  
국민대학교  
이화여자대학교

**농림축산식품부**

# 제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “천연소재 유래 고감미 건강기능성 감미료 및 설탕보완재 개발”(개발기간 : 2013. 11. 20.~ 2016. 11. 19.)과제의 최종보고서로 제출합니다.

2017. 4. 4.

주관연구기관명 : 세종대학교 산학협력단 (대표자) 김 선 재



협동연구기관명 : 대한제당 주식회사 (대표자) 김 영 권



협동연구기관명 : 국민대학교 산학협력단 (대표자) 임 흥 재



협동연구기관명 : 이화여자대학교 산학협력단 (대표자) 박 석 순



주관연구책임자 : 세종대학교 이수용

공동연구책임자 : 세종대학교 유상호

협동연구책임자 : 대한제당 정상원

국민대학교 홍재희

이화여자대학교 김유리

국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정 제18조에 따라 보고서 열람에 동의합니다.

## 보고서 요약서

과제고유번호	313024-3	해 당 단 계 연구 기 간	2013.11.20 -2016.11.19	단 계 구 분	(최종) / (3단계)
연구사업명	중사업명				
	세부사업명	고부가가치식품기술개발사업			
연구과제명	대과제명	천연소재 유래 고감미 건강기능성 감미료 및 설탕보완재 개발			
	세부과제명	제1세부 : 수국 phylloidalin의 효율적 생산 공정 개발 및 특성 규명 제1협동 : 설탕보완재 xylobiose 생합성 기술 개발 제2협동 : 종합적 감미 특성 및 식품 적용시의 안정성 분석 제3협동 : Xylobiose 및 phylloidalin의 항당뇨 기능성 및 항비만 효능 분석			
연구책임자	이수용	해당단계 참여 연구원 수	총: 60 명 내부: 12 명 외부: 48 명	해당단계 연구개발비	정부:900,000천원 민간:180,000천원 계:1,080,000천원
		총연구기간 참여 연구원 수	총: 60 명 내부: 12 명 외부: 48 명	총연구개발비	정부:900,000천원 민간:180,000천원 계:1,080,000천원
연구기관명 및 소속부서명	세종대학교 산학협력단			참여기업명: 대한제당	
위탁연구	해당사항 없음.			해당사항 없음.	
요약				보고서 면수	
<p>본 연구 사업에서는 설탕 보완재로써 xylobiose 당류의 생촉매적 합성과 함께 천연고감미소재인 phylloidalin의 추출, 분리를 통한 산업규모의 생산 가능성을 타진하여 새로운 식품소재로써의 활용성을 타진한 연구로 연구개발결과가 매우 우수하며, 후속연구를 통한 식품, 화장품 분야의 핵심소재로써의 가능성이 매우 높음. 연구수행이 성실도가 매우 높으며, 국내기반 핵심소재개발기술의 배타적 권리 확보 역시 잘 진행된 것으로 판단됨.</p>				305 쪽	

## < 요약문 >

		코드번호	D-01
연구의 목적 및 내용	<p>○ 연구개발의 최종 목표</p> <p>생축매 시스템을 이용하여 프리바이오틱스로서 건강기능성이 알려진 xylobiose의 효율적 생산 공정을 확립하고, 정제 및 결정화 기술을 적용하여 xylobiose 함유 설탕보완재를 개발함. 또한, 천연소재인 수국 잎으로부터 고감미 감미료인 phyllodulcin의 효율적 추출 및 정제 기술을 개발하고, 특성 분석 및 물성 개선을 통해 제품화를 위한 기반을 마련하여, 이를 통해 항당뇨 및 항비만 효능의 건강기능성이 입증된 신규 고감미 감미료를 성공적으로 개발하여 제품화 함.</p> <p>○ 세부 내용</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• 생합성 효소 시스템을 이용한 xylobiose의 생산 공정 개발</li> <li>• Xylobiose의 정제 및 결정화 기술 개발</li> <li>• Xylobiose의 혈당상승억제 효과 및 정장효과 규명</li> </ul>		
연구개발성과	<p>○ 수국 phyllodulcin의 효율적 생산 공정 개발 및 특성 규명</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• 수국 잎 추출액으로부터 phyllodulcin과 hydrangenol의 구조를 HPLC-MS를 통해 동정 함.</li> <li>• 간편하고, 빠르고, 경제적인 방법으로 phyllodulcin의 최적의 전처리 공정과 추출 공정을 확립 함.</li> <li>• 이온교환수지를 통해 색소체 및 불순물을 효과적으로 제거하였고, 수국 잎 추출액으로부터 90% 이상의 회수율을 나타냄.</li> <li>• Preparative HPLC를 통해 98.3%의 고순도 phyllodulcin을 2% 수율로 정제할 수 있고, 결정화 공정을 통해 97.3%의 고순도로 phyllodulcin을 수율 약 1.6%로 정제 함.</li> <li>• 결정화 공정은 용매 사용량을 최소화할 수 있는 정제 방법으로, 이를 통해 경제적이고 친환경적인 phyllodulcin 정제 방법을 확립함.</li> <li>• 베타사이클로 텍스트린과 phyllodulcin 간의 복합체를 성공적으로 형성하였고, 이를 UV absorption studies, FT-IR, DSC, <sup>1</sup>H-NMR등 다양한 분석방법을 통해 증명함.</li> <li>• 베타사이클로 텍스트린과 복합체를 형성한 phyllodulcin은 용해도와 항산화능이 모두 향상되어 앞으로 식품 산업에서의 활용도를 높임.</li> </ul>		

연구개발성과	<p>○ 설탕보완재 xylobiose 생합성 기술 개발</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Wild-type 균주 중에서 xylobiose 생합성 효율이 우수한 <math>\beta</math>-xylosidase 후보균을 3종 선정하고, 그 중 xylobiose 생합성 능력이 가장 우수한 <i>B.pumilus</i> 유래의 <math>\beta</math>-xylosidase (XynB)를 GRAS 발현 시스템 2종 (Yeast, Bacillus)에 도입함.</li> <li>• GRAS 균주 2종 (Y01, B01)의 배양 특성연구를 통해서 <math>\beta</math>-xylosidase 생산성이 우수한 재조합 효모 (Y01)를 선정하고, flask test에서 확보한 배양 최적화 조건을 30 L 발효기에 적용하여 대량 생산 기술을 개발함 (8.4 g DCW/L 이상).</li> <li>• Y01 균주에서 발현된 <math>\beta</math>-xylosidase의 정제 공정 최적화 연구를 수행한 결과 정제수율은 80% 이상을 달성함.</li> <li>• Y01 균주에서 발현된 <math>\beta</math>-xylosidase를 이용하여 xylobiose 생합성 공정 최적화 연구를 수행한 결과 xylose 95%(w/v), 효소 10 U/mL, 온도 50°C 조건에서 반응시킬 경우 최대 17.6%의 xylobiose 전환율을 나타냄.</li> <li>• Simulated Moving Bed (SMB)를 적용하여 생합성 xylobiose 대용량 정제 공정을 구축하였으며, 생합성 xylobiose의 최종순도는 98.5%로 확인됨.</li> <li>• Xylobiose의 기능성을 규명하기 위하여 rat sucrase inhibition activity 효과를 확인하였고, 장내 유익균 및 유해균의 xylobiose 이용성을 평가를 통해서 prebiotic effect를 규명하였으며, XylobioSugar&lt;가칭&gt;는 혈당지수 산출을 통해서 혈당상승 억제효과가 있는 저GI 식품인 것으로 확인됨.</li> <li>• 설탕보완재 xylobiose를 설탕에 적용하여 설탕과의 혼합 적합성, 재분리 안정성, 물성 및 caking 특성을 파악하여 XylobioSugar&lt;가칭&gt;를 개발하였고, 이를 스틱슈가 및 커피믹스 형태로 적용한 시제품을 제작함.</li> </ul> <p>○ Xylobiose 및 phyllo dulcin의 종합적 감미 특성 및 식품 적용시의 안정성 분석</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• 라한과 추출물, 리바우디오사이드, 자일로올리고당 등 천연 대체 감미료를 모델 시스템으로 활용하여 상대 당도, 감미질, 감미 출현/지속 속도 등을 평가할 수 있는 방법을 확립하였음.</li> <li>• 수용액 형태에서 2-AFC 검사를 활용하여 phyllo dulcin의 3% 설탕 수용액 대비 상대당도와 Xylobiose의 5% 설탕 수용액 대비 상대당도를 규명하였음. Phyllo dulcin은 주정 1% 수용액 형태로 50°C에서 평가하였을 때 설탕 대비 434배의 단맛 강도를 가짐. Xylobiose는 설탕의 0.34배 단맛을 가짐.</li> </ul>
--------	--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

연구개발성과

- 정량적 묘사분석 방법을 활용하여 phyllodulcin과 xylobiose 수용액의 감미질 및 감미 출현/지속 정도를 기타 감미료, 설탕의 감미질과 비교 분석한 결과 phyllodulcin은 쓴맛, 알코올 향미, 화한 감각, 뚝은 후미의 특성이 강하게 나타났으며, 감미 출현/지속 정도에는 설탕과 유의적인 차이가 없었음. Xylobiose는 노란색, 옥수수향, 옥수수 향미, 누룽지 사탕 향미, 바디감이 강했음. 감미 출현/지속 정도에 대해서 xylobiose는 설탕과 유의적인 차이를 보이지 않았으나, xylobiose가 설탕보다 단맛이 다소 늦게 출현하는 경향을 보였음. 섭취 허용량을 고려하여 xylobiose와 설탕을 7:93으로 혼합한 경우 설탕과 감미 특성에 유의적 차이가 없었음.
- Phyllodulcin과 xylobiose를 함유한 식품으로 플레인 쿠키를 설정하여, 감미료 대체에 따른 혼합 조건 및 제조 조건을 확립하여 비교용 대체 감미료를 적용할 수 있는 쿠키 시스템을 확립하였음.
- 2-AFC를 활용하여 phyllodulcin이 적용된 쿠키의 설탕 쿠키 대비 상대당도를 규명한 결과 쿠키 시스템에서 설탕의 333.3배의 단맛을 나타내었음.
- 정량적 묘사분석 방법을 활용하여 phyllodulcin과 xylobiose를 적용한 쿠키의 감미질을 분석하였음. Phyllodulcin의 대체 혼합 비율을 다르게 한 쿠키와, xylobiose를 설탕과 7 : 93으로 혼합한 xylobiose-sugar 함유 쿠키의 감미질을 설탕 쿠키 및 기타 감미료 적용 쿠키와 비교하여 분석하였음.
- 설탕을 phyllodulcin으로 100% 대체한 시료의 경우 설탕 쿠키에 비해 단맛이 유의적으로 약하고 우마미, 우마미 후미, 아린 느낌 후미, 쓴맛 후미, 경도, 파쇄성, 조각의 경도와 같은 특성이 강했음. 설탕 대체율을 50%로 낮추어 설탕과 혼합하여 대체한 phyllodulcin 함유 쿠키 시료의 경우 단맛에서 설탕과 유의적인 차이를 보이지 않았으며 phyllodulcin 100% 대체 시료에서 나타나는 아린 느낌, 우마미, 쓴맛과 같은 특성들이 거의 나타나지 않았음. Xylobiose-sugar 쿠키 시료는 황토색, 붉은 콩가루 향과 향미, 입자의 불균일성 등의 특성이 강했음.
- 대체 감미료를 함유한 쿠키에 대하여 일반 소비자 기호도 검사를 실시하였으며, 감미료에 대한 정보를 제공하여 기호도와 구매의사에 정보가 미치는 영향을 평가하였음. 전반적인 기호도는 정보를 제공하였을 때 조금 상승하는 경향을 보였으나, blind 상태에서 가장 기호도가 낮은 phyllodulcin 쿠키의 기호도가 정보에 의해 크게 상승하지 않았음. blind와 informed 상태 모두 설탕 쿠키가 가장 선호되었으며, phyllodulcin을 설탕과 혼합한 혼합 시료 및 xylobiose-sugar 쿠키 역시 선호도에서 설탕 쿠키와 유의적으로 차이가 없었음.

연구개발성과	<p>○ Xylobiose 및 phylloducin의 항당뇨 기능성과 항비만 효능 규명</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• D-Xylose와 stevioside를 이용하여 항당뇨, 항비만 기능평가를 위한 in vitro, in vivo 시스템을 확립하였음.</li> <li>• Xylobiose 항당뇨의 in vitro 세포실험에서 효능 평가 결과에서 미디어 중의 glucose를 xylobiose로 5%, 10% 대체하였을 때, 근육세포에서의 포도당 흡수율을 증가시키고 췌장세포인 <math>\beta</math>-cell에서의 인슐린 분비량 증가함.</li> <li>• Xylobiose 항당뇨의 in vivo db/db mouse 동물실험에서 식이 중 sugar의 함량 중에서 xylobiose로 대체하였을 때, 공복혈당 강하 효과, 내당능장애 개선효과가 있었으며, 혈중 지질마커인 TG, TC, LDL이 감소함.</li> <li>• Xylobiose 항비만의 in vivo 동물실험에서 평가 결과, 60% 고지방 식이를 먹인 쥐에 비하여 식이 중의 sugar를 xylobiose 10%와 15%로 대체한 군에서 혈당 및 혈중 지질마커인 TG, TC, LDL이 감소함.</li> <li>• 피하지방 및 내장지방 감소효과를 나타냄. 간에서 lipid droplet의 크기와 사이즈가 줄어들었으며, lipogenesis marker인 C/EBP<math>\alpha</math>, PPAR<math>\gamma</math>, SREBP-1c가 xylobiose 대체군에서 유의적으로 감소함.</li> <li>• Phylloducin 항당뇨의 in vitro 세포실험에서 효능 평가 결과 phylloducin을 1, 3, 10 <math>\mu</math>M을 추가로 미디어에 treat 하였을 때, 근육세포에서의 포도당 흡수율을 증가시킴. 또한 췌장세포 <math>\beta</math>-cell에서의 인슐린 분비량 증가함.</li> <li>• Phylloducin 항당뇨의 in vivo db/db mouse 동물실험에서 phylloducin을 10, 20mg/kg b.w.을 가바지로 공급하였을 때, 혈당강하효과, 내당능장애 개선효과 및 간에서의 gluconeogenesis marker인 PEPCK가 감소함.</li> <li>• Phylloducin 항비만의 in vitro 세포실험에서 효능 평가 결과, 지방세포에서 지방구 생성이 감소하였으며, lipogenesis와 inflammation의 mRNA level이 유의적으로 감소함. 그리고 지방세포 분화에 영향을 미치는 c-Raf signaling인 c-Raf, p-Akt, p-mTOR의 protein level이 유의적으로 감소함.</li> <li>• Phylloducin 항당뇨의 in vivo 동물실험에서 phylloducin을 20, 40mg/kg b.w.을 가바지로 공급하였을 때, 60% 고지방 식이를 공급한 그룹에 비하여 공복혈당 및 혈중 지질마커인 TG 감소, 피하지방 무게의 감소효과를 나타냄. 또한 피하지방에서 lipogenesis marker인 C/EBP<math>\alpha</math>, PPAR<math>\gamma</math>, SREBP-1c가 유의적으로 감소함.</li> </ul>
--------	----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

<p>연구개발성과의 활용계획 (기대효과)</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 연구성과 <ul style="list-style-type: none"> <li>• 논문 (SCI 5편, 비SCI 5편)</li> <li>• 학술발표 15건</li> <li>• 인력양성 10명</li> <li>• 지식재산권 (특허 출원 4건, 등록 1건)</li> <li>• 제품화 3건</li> </ul> </li> <li>○ 성과활용 계획 <ul style="list-style-type: none"> <li>• 2017년 상반기 내 ‘결정화 방법을 이용한 필로둘신의 대량 정제’ 관련 특허 출원 1건 예정</li> <li>• 2017년 상반기 내 ‘베타싸이클로 텍스트린과 복합체 형성을 통한 필로둘신의 품질향상’ 관련 특허 출원 1건 예정</li> <li>• 국내 유래의 천연 고감미 소재인 phyllodulcin 대량 생산 공정을 확립하여, 추후 산업화의 가능성을 타진할 수 있음.</li> <li>• 2017년 상반기 내 ‘Xylobiose 적용 설탕의 변비개선 효과’ 관련 논문 1건 게재 예정</li> <li>• 2017년 4월 ‘Relative Sweetness and Sweetness Quality of Xylose’ 논문 1건 게재 예정</li> <li>• ‘수국 phyllodulcin의 생산 공정 기술’ 및 ‘생합성 xylobiose 생산 기술’ 등 기술이전 검토</li> <li>• 쓴맛이나 신맛 등 이미가 강한 천연 대체 감미료의 상대 당도, 감미질, 감미 출현/지속 정도등을 보다 정확하게 평가할 수 있는 기법을 구축하였으며, 수용성이 낮은 phyllodulcin의 수용액 모델 시스템 및 쿠키 적용 시스템을 개발하여 향후 관련 연구에 기여함.</li> <li>• 천연 대체 감미료인 phyllodulcin과 xylobiose의 수용액 및 쿠키 시스템에서의 종합적 감미 특성을 규명하여 식품 적용을 위한 가이드라인을 확보하였음.</li> <li>• 천연 대체 감미료인 phyllodulcin과 xylobiose를 쿠키 시스템에 적용하였을 때 소비자의 기호도 성향 및 주요 기호 유발 인자를 규명, 감미료 개선 방향을 제시하였음.</li> <li>• 천연 대체 감미료인 phyllodulcin과 xylobiose의 기호도 및 구매 의사가 해당 감미료의 기능성 정보에 의해 변화하는지 규명하여 향후 천연 대체 감미료 상용화시 마케팅 전략에 활용할 수 있는 기초 자료를 제공하였음.</li> <li>• 대체감미료와 고감미료의 항당뇨, 항비만의 in vitro, in vivo 실험방법을 개발하여 향후 연구에 기여함.</li> <li>• Xylobiose 및 phyllodulcin 항당뇨와 항비만 및 항바이러스 기능성을 규명함으로써 SCI 논문 게재를 통한 학술 활용으로 과학적 기초 자료를 제시함.</li> </ul> </li> </ul>
------------------------------------	-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------



<p>연구개발성과의 활용계획 (기대효과)</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 식품 산업을 이끌 수 있는 기술 개발과 전문가 인력 양성으로 다양한 R&amp;D 기반을 구축</li> <li>• 전문 지식인력 양성으로 향후 관련 산업계에 기여함.</li> <li>• 고감미 감미료의 해외 수출 및 수입대체 효과를 기대할 수 있음.</li> </ul>				
<p>중심어 (5개 이내)</p>	<p>수국</p>	<p>고감미 감미료</p>	<p>설탕 보완재</p>	<p>자일로바이오 스</p>	<p>필로둘신</p>

## < SUMMARY >

		코드번호	D-02
Purpose& Contents	<p>○ Objective and Necessity of Research and Development</p> <p>To establish an efficient production process of xylobiose by biocatalyst system, and to apply an purification and crystallization technology for development xylobiose containing sugar complementary material. In addition, we developed efficient biocatalytic pretreatment, extraction and purification of phyllodulcin which is a high intensity sweetener from hydrangea leaves. As a result, we developed a new sweetener with proven healthy functionality of anti-diabetic and anti-obesity by quality improvement of phyllodulcin.</p> <p>○ Content and Scope of Research and Development</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Development of biosynthetic xylobiose for sugar supplement</li> <li>• Development technology of purification and crystallization on xylobiose</li> <li>• Elucidation of inhibitory effect of blood glucose and prebiotic effect by xylobiose</li> <li>• Development for efficient extraction and purification of phyllodulcin from hydrangea leaves</li> <li>• Development of fermentation technology for increasing phyllodulcin content from hydrangea leaves</li> <li>• Improvement solubility and sweetness of phyllodulcin by catalytic and excipient technology</li> <li>• The anti-diabetic and anti-obesity effects of xylobiose, and the anti-diabetic and anti-obesity effects of phyllodulcin</li> <li>• Comprehensive sweetness characteristics of phyllodulcin and xylobiose and their sweetness stability in a food system</li> </ul>		
Results	<p>○ Optimized production of phyllodulcin from hydrangea leaves and elucidation of its properties</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Phyllodulcin and hydrangenol were identified from the extract of hydrangea leaves using HPLC-MS.</li> <li>• Optimum one-pot massive bioconversion and extraction could be utilized industrially for phyllodulcin production in an easy, quick and cost-effective way.</li> <li>• Mixed-bed ion exchangers removed impurities and colorants efficiently, and the resulting solution displayed over 90% of very high recovery from the phyllodulcin extract.</li> </ul>		

Results

- By utilizing preparative HPLC, highly pure phyllodulcin was finally produced with 98.3% of purity and 2% yield of which the productivity can be obtained from scale-up process.
  - By utilizing crystallization process, highly pure phyllodulcin was finally produced with 97.3% of purity and 1.6% yield of which the productivity can be obtained from scale-up process.
  - Crystallization process of phyllodulcin production was cost-effective more than purification of preparative HPLC.
  - The inclusion complexation of phyllodulcin with  $\beta$ -cyclodextrin was successfully achieved, which was confirmed by various instrumental analyses such as UV/Vis spectrophotometer, DSC, FT-IR and  $^1\text{H-NMR}$ .
  - The solubility and antioxidant activity of inclusion complex between phyllodulcin and  $\beta$ -CD was remarkably higher than that of phyllodulcin.
- Development of biosynthetic xylobiose for sugar supplement
- Recombinant GRAS strains (Yeast, Bacillus) were constructed by  $\beta$ -xylosidase (XynB) from *B.pumilus* which had high biosynthesis efficiency.
  - To optimize the large scale culture process of  $\beta$ -xylosidase production, the cultivation was successfully carried out in 30 L reactor system (cell mass > 8.4 g DCW/L).
  - According to the result of optimization of purification process, purification yield of  $\beta$ -xylosidase was more than 80%.
  - $\beta$ -xylosidase from Y01 strain was used to optimize the xylobiose biosynthesis process. As a result, the maximum xylobiose conversion ratio was 17.6% when the reaction was conducted at 95% (w / v) xylose, 10 U / mL, temperature 50°C.
  - Simulated Moving Bed (SMB) was applied to establish large scale purification system and final purity of biosynthetic xylobiose was 98.5%.
  - Xylobiose showed rat sucrase inhibition potency and prebiotic effects. XylobioSugar<provisional name> reduced blood glucose response and it is a low-GI food.

<p>Results</p>	<p>○ Comprehensive sweetness characteristics of phyllodulcin and xylobiose and their sweetness stability in a food system</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Sucrose complement, Xylobiose was added to sugar and xylobiose-sugar mixture was evaluated for mixing suitability with sugar, separation stability, and caking characteristics. XylobioSugar&lt;provisional name&gt; was developed and used it to make stick sugar and coffeemix prototype.</li> <li>• The methodology to elucidate comprehensive sensory profiles of potential natural alternative sweeteners was developed using xylooligosaccharide(XOS) and luohan guo extract(LHGE) as model sweeteners.</li> <li>• The sweetness potency of phyllodulcin and XB, relative to that of sucrose, was investigated using 2-alternative forced choice (AFC) test. Phyllodulcin solution was prepared by dissolving it in 1% ethanol (v/v) at 50°C. For phyllodulcin, relative sweetness(RS) to that of 3% sucrose in 1% ethanol solution was determined. XB was prepared as aqueous solution and RS to 5% sucrose was determined. RS of phyllodulcin and XB was 434.8, and 0.34, respectively.</li> <li>• The sensory profile of phyllodulcin and XB was elucidated based on descriptive analysis (DA) using 10 trained panelists. Phyllodulcin was characterized by its bitterness, alcohol flavor, cooling sensation, and astringent aftertaste, but the persistence and onset of the sweetness of phyllodulcin were similar to those of sucrose. XB was distinguished from other sweeteners by its yellowness, corn aroma, corn flavor, and <i>nurungji</i> candy flavor. Persistence of sweetness of XB seems to be similar to that of sucrose, but its onset of sweetness was slower than that of sucrose. When XB was mixed with sucrose at the ratio of 7:93, the mixture exhibited similar sensory quality as that of sucrose, making it a useful sucrose complement.</li> <li>• RS of phyllodulcin to that of 15.3% sucrose was identified in a cookie system using 2-AFC. Cookie model samples were formulated by replacing sucrose with phyllodulcin. Because intense bitterness of phyllodulcin suppressed sweetness at high concentration ranges, phyllodulcin could not produce equi-intense sweetness to 15.3% sucrose. When phyllodulcin was mixed with sucrose at the ratio of 1:1, its RS to 7.7% sucrose was identified as 333.3.</li> </ul>
----------------	-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

Results

- Sensory characteristics of cookies containing phylloidalin and xylobiose were analyzed using QDA. Phylloidalin replaced 50% and 100% of sugar in the cookie formulation, respectively. Xylobiose mixed with sugar at the ratio of 7:93 was added to the cookie in place of sugar. 100% phylloidalin cookie (PHY100) was significantly less sweet, and had stronger umami, hardness, hardness of fragments, fracturability, and lingering sensations of umami, acridness, and bitterness compared to 100% sugar cookie(SUC). Sweetness of 50% phylloidalin cookie (PHY50) was not significantly different from that of SUC, and also PHY50 exhibited very weak umami, bitterness, and acridness. Xylobiose-sugar cookie (XOBS) was characterized by brown color, aroma and flavor of roasted soy flour, and heterogeneity of particles.
- Consumer liking of cookies containing alternative sweeteners was assessed both in blind and informed condition to understand the effect of information on consumer liking. Overall liking scores of all cookies were increased by increased by information provided, but information had only limited effect on liking of PHY100 that was least liked in blind condition, because its liking did not become significantly greater than those of other cookies. Consumers liked SUC most, but there was not significant difference in liking between SUC and PHY50 and XOBS.
- The anti-diabetic and anti-obesity effects of xylobiose, and the anti-diabetic and anti-obesity effects of phylloidalin.
- In vitro and in vivo methodology system to examine the anti-diabetic and anti-obesity effect of xylobiose and phylloidalin was established using D-xylose and stevioside.
- Xylobiose replaced by glucose in media increased glucose uptake in skeletal muscle cell and insulin secretion in pancreatic  $\beta$ -cells.
- Xylobiose supplementation decreased the level of fasting blood glucose, glucose tolerance and regulated plasma lipid profiles such as TG, TC, and LDL compared to diabetic control in db/db mouse, respectively.
- Xylobiose supplementation decreased fasting blood glucose, plasma lipid profiles such as TG, TC, and LDL, and also the weight of subcutaneous fat and mesenteric fat.

<p style="text-align: center;">Results</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• The size and number of hepatic lipid droplet were decreased by xylobiose supplementation. Hepatic lipogenesis markers such as C/EBP<math>\alpha</math>, PPAR<math>\gamma</math>, SREBP-1c were down-regulated in xylobiose supplemented group compared to obesity control.</li> <li>• Glucose uptake in skeletal muscle cell and insulin secretion in pancreatic <math>\beta</math>-cell were increased by 1, 3, or 10 <math>\mu</math>M phyllodulcin treatment, respectively.</li> <li>• Phyllodulcin supplementation decreased water and food intake, fasting blood glucose and glucose tolerance in db/db mouse.</li> <li>• Phyllodulcin supplementation decreased the size of lipid droplet in the liver tissues and decreased gluconeogenesis marker such as PEPCK expression in the liver and increased glucose uptake marker, GLUT4 expression in the muscle of db/db mice.</li> <li>• Phyllodulcin treatment decreased lipid accumulation in differentiated 3T3 L1 cells and down-regulated mRNA levels of lipogenesis and inflammation markers compared to glucose 20mM. The protein expressions of c-Raf signaling, including c-Raf, p-Akt, p-mTOR were decreased in phyllodulcin treatment, respectively.</li> <li>• Phyllodulcin supplementation decreased fasting blood glucose, plasma lipid profile such as TG, and the weight of subcutaneous fat. In addition, lipogenesis markers, including C/EBP<math>\alpha</math>, PPAR<math>\gamma</math>, SREBP-1c in subcutaneous fat were lower in phyllodulcin supplementation groups compared to obesity control group.</li> </ul>
<p style="text-align: center;">Expected Contribution</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ Research achievements <ul style="list-style-type: none"> <li>• Paper publication 10 (SCI 5)</li> <li>• Academic achievements (proceeding, poster etc.) 15</li> <li>• Graduate students education 10</li> <li>• Patents (application 4, registration 1)</li> <li>• Prototype 3</li> </ul> </li> <li>○ Application of research achievements <ul style="list-style-type: none"> <li>• Patent application for ‘Scale-up production of phyllodulcin, a potential high intensity sweetener, from hydrangea leaves by crystallization method’ is planned for the first half of 2017.</li> <li>• Patent application for ‘Phyllodulcin quality improvement of inclusion complexation between phyllodulcin and beta-cyclodextrin’ is planned for the first half of 2017.</li> </ul> </li> </ul>

<p style="text-align: center;">Expected Contribution</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Paper publication for ‘Effects of xylobiose–sugar mixture on defecation frequency and symptoms’ is planned for the first half of 2017.</li> <li>• Paper publication of ‘Relative sweetness and sweetness quality of Xylobiose’ is planned in April 2017.</li> <li>• Review of technology transfer for ‘Production process technology of phyllodulcin’ or ‘Production process technology of biosynthetic xylobiose for sugar complement’</li> <li>• This study has established the methodologies to evaluate relative sweetness, sweetness quality, and temporal sweetness profile of natural alternative sweeteners that were characterized by strong bitter off-flavor. Also this study has developed the method to solubilize phyllodulcin in a model solution using alcohol and heat, and the plain sugar cookie system that can be used as a food model system. The methods and model systems developed in this study can contribute to future research of natural alternative sweeteners with low solubility.</li> <li>• This study has identified relative sweetness, sweetness quality, and temporal sweetness profiles of phyllodulcin and xylobiose that had not been much studied. The outcomes of this study can provide academia and industry with a useful guideline for application of the natural alterantive sweeteners to foods and beverages.</li> <li>• By investigating consumer liking and perception of the cookie model system which phyllodulcin and xylobiose are applied to, consumer liking and major drivers of liking have been identified. This result will contribute to future studies to improve sensory quality and functionality of natural alternative sweeteners.</li> <li>• This study investigated the potential effect of information about functionality and health–promoting effect of alternative sweeteners on consumer liking and purchase intent. The outcomes of this study can help food industries to establish a marketing strategy for commercialization of alternative natural sweeteners.</li> <li>• The methodology for evaluating in vitro and in vivo anti-diabetic and anti-obesity effect of high intensity sweetener and a sugar complement was established and would be contributed for the researches in this area.</li> <li>• Suggest the scientific evidence for effects of xylobiose and</li> </ul>
--------------------------------------------------------------	--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

Expected Contribution	<p>phyllodulcin on anti-diabetic and anti-obesity.</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Establish the various R&amp;D foundation through technical development and professional manpower training.</li> <li>• Expect strengthen overseas export and import substitution effect of high-sweetness sweeteners.</li> </ul>				
Keywords	Hydrangea macrophylla	Sweetener	Sugar complement	Xylobiose	Phyllodulcin



## < CONTENTS >

1. Introduction of Research and Development Project .....	19
2. Current Status of Domestic and Global Technical Development ..	31
3. Content and Result of Research and Development .....	35
4. Level of Achievement and Contribution .....	278
5. Outcome of Research and Development and the Plan for Practical Use .....	288
6. Scientific and Technical Information Collected Internationally during Research and Development .....	289
7. Security level of Outcome of Research and Development .....	293
8. Status of Facility · Equipment .....	294
9. Results of Laboratory Safety Management .....	295
10. Research Achievements .....	297
11. Other Matters .....	298
12. References .....	299

<Attachment> Self Evaluation Report

## 〈 목 차 〉

1장 연구개발과제의개요 .....	19
2장 국내외 기술개발 현황 .....	31
3장 연구수행 내용 및 결과 .....	35
4장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도 .....	278
5장 연구결과의 활용계획 등 .....	288
6장 연구과정에서 수집한 해외과학기술정보 .....	289
7장 연구개발성과의 보안등급 .....	293
8장 국가과학기술종합정보시스템에 등록된 연구시설·장비현황 .....	294
9장 연구개발과제 수행에 따른 연구실 등의 안전조치 이행실적 .....	295
10장 연구개발과제의 대표적 연구실적 .....	297
11장 기타사항 .....	298
12장 참고문헌 .....	299

<별첨> 자체평가의견서

# 1장 연구개발과제의 개요

코드번호	D-03
------	------

## 제 1 절 연구개발의 목적

### 1. 연구개발 최종 목적

생축매 시스템을 이용하여 프리바이오틱스로서 건강기능성이 알려진 xylobiose의 효율적 생산 공정을 확립하고, 정제 및 결정화 기술을 적용하여 xylobiose 함유 설탕보완재를 개발함. 또한, 천연소재인 수국 잎으로부터 고감미 감미료인 phylodulcin)의 효율적 추출 및 정제 기술을 개발하고, 특성 분석 및 물성 개선을 통해 제품화를 위한 기반을 마련하여, 이를 통해 항당뇨 및 항비만 효능의 건강기능성이 입증된 신규 고감미 감미료를 성공적으로 개발하여 제품화 함.

### 2. 세부 목표

- 생합성 효소 시스템을 이용한 xylobiose의 생산 공정 개발
- Xylobiose의 정제 및 결정화 기술 개발
- Xylobiose의 혈당상승억제 효과 및 정장효과 규명
- 수국 잎으로부터 phylodulcin의 고수율 추출 및 정제 기술 개발
- 수국 잎 phylodulcin 함량 증진을 위한 발효 기술 개발
- 축매나 부형제를 이용한 phylodulcin의 감미도 및 용해도 개선
- Phylodulcin의 항당뇨 및 항비만 효능의 건강 기능성 규명
- Xylobiose 함유 설탕과 수국 추출 phylodulcin의 감미 특성 분석
- Xylobiose 함유 기능성 설탕 및 phylodulcin 활용 제품 개발

### 3. 주요연구내용

[제 1세부과제] 수국 phylodulcin의 효율적 생산 공정 개발 및 특성 규명

- 수국(감차)잎으로부터 phylodulcin의 고수율 추출 및 정제공정 개발
- Phylodulcin의 함량 증진을 위한 수국 잎 발효 기술 개발
- Phylodulcin의 이화학적 특성 및 안정성 규명
- 축매 또는 부형제를 이용한 phylodulcin의 물성 및 감미도 개선

[제 1협동과제] 설탕보완재 xylobiose 생합성 기술 개발

- Xylobiose 생합성 효소 탐색 및 발현 시스템 구축
- Xylobiose의 정제 및 결정화기술 개발
- Xylobiose의 혈당상승억제 효과 및 정장효과 규명
- Xylobiose 함유 기능성 설탕 및 phylodulcin 활용 항당뇨 및 항비만 제품 개발

[제 2협동과제] Xylobiose 및 phyllodulcin의 종합적 감미 특성 및 식품 적용시의 안정성 분석

- Xylobiose와 phyllodulcin의 감미 특성 분석을 위한 종합적 감미 특성 평가 시스템 개발
- Xylobiose와 phyllodulcin의 감미 특성 분석
- Xylobiose 설탕 및 phyllodulcin을 적용한 식품 시스템에서의 감미 특성 및 안정성 규명

[제 3협동과제] Xylobiose 및 phyllodulcin의 항당뇨 기능성과 항비만 효능 규명

- Xylose, 천연물 유래 고감미 감미료 stevioside 및 설탕을 이용한 건강 기능성 평가 in vitro, in vivo 모델 및 평가 시스템 개발
- Xylobiose 및 phyllodulcin의 in vitro 및 in vivo 항당뇨 기능성 평가
- Xylobiose 및 phyllodulcin의 in vitro 및 in vivo 항비만 효능 평가

## 제 2 절 연구개발의 배경 및 필요성

### 1. 식생활 및 생활 습관의 변화에 의한 국내 당뇨 및 비만 인구의 증가

- 세계보건기구에 의하면 비만 인구는 앞으로 10년간 50% 이상 증가할 것으로 예측되어 이에 따른 사회, 경제적 비용이 증가할 것으로 예상된다.

- 우리나라의 경우도 경제 향상에 따라 식생활의 서구화 및 교통수단 발달에 의한 생활습관의 변화로 비만 인구가 꾸준히 증가하여 2009년에는 성인의 약 30%가 비만으로 나타났다.

- 인제대학교 서울백병원 강재현 교수팀의 조사에 따르면 국내에서 성인 비만으로 인해 발생하는 사회적 비용이 연간 3조 4000억원에 달함.

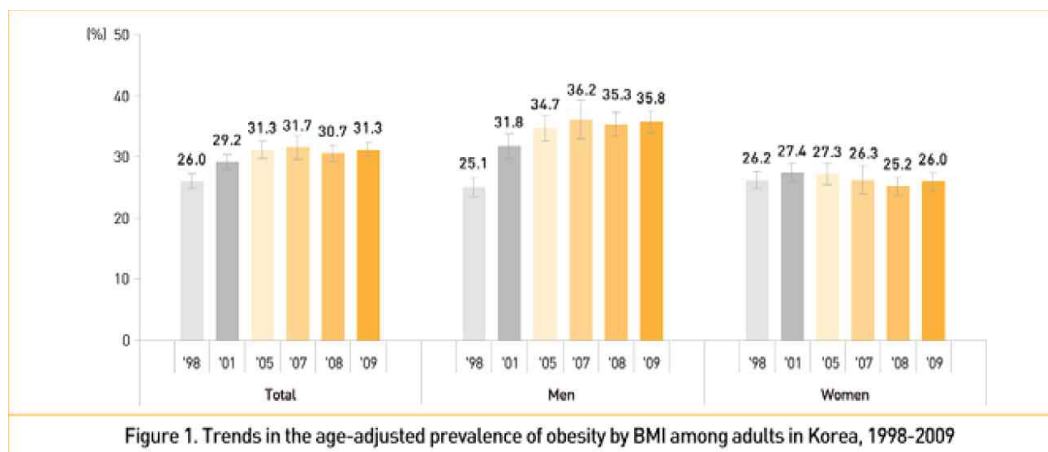
- 비만 인구의 당뇨 유병률은 정상인에 비해 2배에 달하며 건강보험심사평가원에 따르면 국내 당뇨 인구는 2012년 기준 240 만명 수준으로 전체 성인 인구의 5% 정도이나, 2015년에는 553만 명, 2030년에는 772 만 명으로 급증할 것으로 예측됨.

- 비만이나 당뇨 인구는 감미료의 섭취에 제한이 있으므로, 체중의 증가 또는 혈당에 영향이 없는 감미료 혹은 감미료 보완제의 개발이 절실함.

### 2. 대사증후군과 감미료

- 만성적인 대사 장애로 인해 비만, 당뇨, 고지혈증 및 고혈압 등 대표적인 성인병이 동시에 나타나는 것을 일컫는 대사증후군은 일반적으로 식생활의 변화 및 생활 습관 등이 복합적으로 작용하여 발생하는 것으로 알려짐.

- 식품 산업에서 널리 사용되는 감미료는 대사 증후군을 유발하는 원인 가운데 하나로 지목 받고 있으며 이러한 이유로 설탕 및 감미료의 섭취를 줄이기 위한 노력이 시급함.



<1998-2009년도 우리나라 비만 유병률과 추이, 질병관리본부>

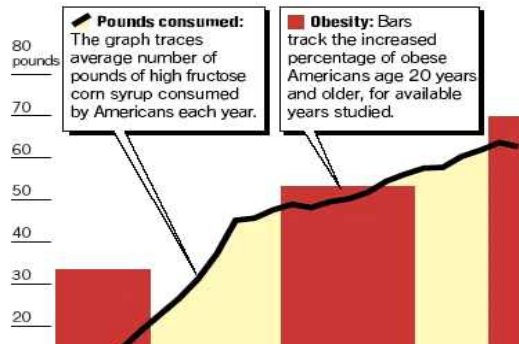
- 설탕은 섭취 시 소장 내 sucrase에 의해 분해되어 분해된 포도당과 과당이 혈액 내로 흡수되어 혈당을 높이는 반면, 설탕 대체제로 가장 널리 사용되는 고과당의 경우 포도당과 과당이 1:1의 비율로 혼합되어 있는 형태로 섭취 시 효소에 의한 분해 작용을 거치지 않고 바로 혈중으로 흡수됨.

- 설탕의 경우 sucrase의 반응을 억제하면 혈액 내로 흡수되는 포도당 및 과당을 감소시킬 수 있으나 고과당의 경우는 이와 같은 흡수 억제 기작을 적용할 수 없어 더욱 문제가 됨.

- 미국 비만 연합에 따르면 미국 내 비만 인구의 증가는 고과당 사용량의 증가와 밀접한 연관이 있으며 이러한 이유로 미국 내에서는 2006년 이후 고과당이 사용된 음료 및 가공식품에서 고과당을 설탕으로 대체하는 현상이 발생하였음.

### Obesity and high fructose corn syrup

The number of Americans who are obese has quadrupled in recent years, a study shows. At the same time, high fructose corn syrup consumption has risen at parallel rates.



<고과당 사용량과 비만 인구의 증가>

- 고과당과 비만의 관계는 'High fructose corn syrup causes characteristics of obesity in rats : Increases body weight, body fat and triglyceride levels (Pharmacol Biochem Behav 2010 Vol. 97(1) 101-106)'의 논문에서 명확히 나타남.

- 위의 논문에 의하면 고과당 섭취군은 설탕 섭취군에 비해 몸무게, 체지방 및 혈중 중성지방 (triglyceride)이 유의적으로 증가하였으며, 혈중 중성지방의 증가는 고지혈증이 발생 확률 및 인슐린 저항성을 높여 제 2형 당뇨병을 유발할 가능성이 높음.

- 또한, 고과당은 액상으로 주로 음료 등에 사용되며, 분말 형태의 제품에는 적용할 수 없어 보관, 운송 및 제품 적용에 한계가 있음.

### 3. 설탕의 생산, 소비량 및 설탕 산업

- 설탕은 인류가 보편적으로 사용해 온 감미료로 맛과 가공성이 다른 감미료에 비해 우수하며, 2013년 전 세계 생산량이 1억 7500만 톤으로 다른 감미료의 생산량에 비해 월등히 많음.
- 2012년 기준으로 전 세계 설탕 시장은 약 82조원 수준으로 전체 감미료 시장의 85% 내외를 차지하고 있음. 또한 설탕 소비량은 약 4%라는 연평균 복합 성장률 (CAGR)로 증가하고 있음.
- 국외의 전문 시장조사기관의 예측치에 따르면 세계 설탕 및 감미료 시장은 2017년에는 그 규모가 약 100조원 이상으로 예측됨.
- 국내의 경우 설탕의 생산액은 약 1조 3000억원 (2011, 보건산업진흥원)으로 국내 전체 식품 시장의 약 2%를 차지하고 있음. 반면, 설탕 대체가 가능한 포도당, 올리고당류 및 당시럽류의 생산액은 각각 약 550억, 약 430억 및 12억 원에 그쳐 국내 감미료 시장에서 설탕이 차지하는 비중은 약 90% 수준임.
- 따라서 현실적으로 설탕을 완전히 대체하는 것은 어려움이 있으며 설탕으로 인해 야기될 수 있는 문제를 해결하기 위해서는 설탕 보완재의 개발이 절실함.

### 4. 설탕 보완재 시장

- 설탕은 섭취 후 소장 내 sucrase에 의해 분해되어 혈당의 급격한 상승을 유발하여 문제가 됨. 이러한 문제를 보완하기 위해 sucrase의 활성을 억제하는 천연 감미료인 xylose를 설탕과 혼합하여 혈당의 상승을 지연시키는 기능성 감미료인 자일로슈가 (Xylosugar)가 세계 최초로 대한제당에서 개발됨.
- 대한제당에서 개발한 자일로슈가 및 동일한 제품군인 CJ(주)의 자일로스설탕의 시장 매출액은 매년 약 200억원 수준임.



<Xylosugar 이마트 PB상품, 대한제당>



<자일로스설탕, CJ>

- 설탕의 잠재적인 문제점을 해결할 수 있는 제품의 출시로 설탕 보완재 시장은 지속적 발전이 가능할 것으로 판단되며 이에 따라 프리미엄급의 기능성 감미료 제품의 개발이 감미료 시장에서 중요한 요소로 대두될 것으로 보임.

#### 5. 대체 감미료의 사용 현황 및 문제점

- 설탕의 과잉 섭취로 인한 치아 우식, 당뇨, 비만이나 과체중의 부작용을 줄이기 위한 노력의 일환으로 대체 감미료가 주목받고 있음.

- 세계 대체 감미료 시장은 2011년 93억 달러 규모를 기록하고 있으며, 매년 복합연간성장률 1.1%에 달하여 2016년에는 99억 달러 규모가 될 것으로 예측됨.

- 북미 및 유럽 시장은 각각 2011년 59억 및 19억 달러 규모를 기록하였으며, 이후 복합연간성장률 0.4 및 1.5%로 2016년 20억 달러에 도달할 것으로 예측되고 있음. 그 외의 지역은 2011년 15억 달러에서 매년 3.3% 성장률을 보여 2016년에는 18억 달러 시장을 형성할 것으로 예측됨.

- 국내 대체 감미료 시장은 2008년 2759톤에서 2011년 4427톤으로 60.5% 성장률을 보이며 크게 증가함. 이는 설탕 판매량 9만 9424톤의 약 7.2% 수준이나 같은 기간 설탕 판매량은 15.1% 줄어든 점에 비하면 비약적인 성장률임.

- 대표적인 대체 감미료로 솔비톨, 말티톨, 자일리톨 등의 당알콜과 수크랄로스, 사카린, 아스파탐, 아세설팜 칼륨 등의 고감미 인공감미료가 개발되었으나, 당알콜계 감미료의 경우 소화 장애 유발, 아스파탐의 경우 페닐케톤뇨증 환자의 섭취 제한 등 한계점이 있음. 특히 사카린의 경우 부작용에 대한 우려로 유럽과 미국에서 사용금지 물질로 지정되기도 했으며, 현재 우리나라에서는 빵, 과자, 캔디, 빙과 아이스크림 등에는 사용이 금지되어 있음.

- 천연 고감미 감미료인 stevioside는 인공감미료에 비해 소비자의 거부감이 적어 음료 등에 사용되고 있으나, 알코올과 화학 반응하여 유독성 물질인 steviol로 변화한다는 보고가 있어 유해성 논란이 있음.

#### 6. 국내 신규 대체 고감미 기능성 감미료 개발의 필요성

- 국내 고감미 설탕 대체 감미료 시장은 2004년 약 130억 원이었으며, 매년 15%의 급격한 성장률을 보이고 소비자의 건강에 대한 욕구가 커질수록 수요는 더욱 폭발적으로 증가할 것으로 예상됨.

- 설탕 대체재인 타가토스는 시판되고 있으나 유당을 효소 반응으로 가수분해 및 이성화시켜 생산하기 때문에 원료 수급의 불안정, 높은 원가 및 설탕과 유사한 감미도로 설탕 소비를 줄이기 위한 목적으로는 부적절함. 또한 설탕과 상이한 감미질과 6g의 낮은 일일



권장섭취량 으로 설탕대체제로서 부족함.

- 반면, 고감미 감미료는 단맛의 강도가 설탕의 수십 배에서 수백 배에 달하여 소량 사용만으로도 원하는 수준의 단맛을 낼 수 있어 설탕 대체제로서 성공가능성이 큰 것으로 평가됨. 이로 인해 전 세계적으로 steviol glucoside, isocoumarin glucoside, phylodulcin 등 신규 고감미 감미료에 대한 연구 성과들이 활발히 보고되는 반면, 국내에서 이에 대한 연구는 미진한 실정임.

#### 7. 기능성 감미료로서 Xylo-oligosaccharide의 활용 가능성 및 문제점

- Xylo-oligosaccharide (XOS)는 올리고당의 일종으로 xylose가  $\beta$ -(1,4)-linkage에 의해 결합된 형태로 인체의 소화효소에 의해 분해되지 않음.

- XOS는 장 내 유익미생물인 *Bifidobacteria*에 의해 분해되어 선택적으로 *Bifidobacteria*의 증식을 유도하는 것으로 알려져 있으며, anti-cancerous activity, bacteriostatic activity 등의 건강 기능성을 나타내는 한편 보습 효과가 뛰어나 이를 화장품에도 적용하려는 시도가 지속됨.

- XOS는 상업적으로 옥수수수심에서 물리화학적인 전처리 과정을 거친 후 endo-xylanase와  $\beta$ -xylosidase에 의한 xylan의 분해를 통해 생산됨. 그러나 XOS 생산 과정 중 전처리 과정은 많은 양의 화학물질을 사용하기 때문에 폐수 등 공정에서 다량의 오염물질이 발생하는 것이 문제로 지적됨.

- 또한 XOS는 syrup의 형태로 생산되며, 분말화 후에도 흡습성이 높아 뛰어난 기능성에도 불구하고 식품 가공 전반에 사용하기에는 무리가 있음.

- 시판되는 XOS는 xylobiose의 함량이 30% 이상이나 XOS에서 xylobiose를 분리, 정제하여 고순도의 xylobiose를 얻기에는 상업적으로 어려움이 있어 시판 고순도 xylobiose 제품은 없음. 따라서, 국제적으로 xylan으로부터 효소 처리를 통해 고농도 xylobiose 시럽을 생산하려는 다양한 시도가 있음.

- XOS의 주성분인 xylobiose는 XOS가 갖는 모든 생리활성의 주요인으로 알려져 있으며, sucrase 억제 효과 및 분말화 시 설탕과 유사한 물성을 나타낼 것으로 예측됨. 따라서 앞서가고 있는 국외 연구진과 경쟁하여 고부가가치 신규 기능성 감미소재 개발 기술을 선점하기 위해서는 효과적인 xylobiose 생산 공정의 개발이 시급함.

#### 8. 고감미 감미료로서 phylodulcin에 대한 국내외 연구 현황 및 활용 가능성

- 감로차의 감미 성분으로 알려진 phylodulcin은 산수국에 많이 함유되어 있으며, 감미도는 설탕의 600-800 배이고, 물에 대한 용해성이 떨어져 단맛의 발현이 늦고 오래 지속되는 것으로 알려짐. 또한 산수국 추출물에 포함된 다른 성분들과 함께 항알레르기능, 항궤양능, 항당뇨능 등 다양한 건강 기능성이 보고됨.

- 일본에서는 산수국의 건조 잎을 감차의 원료로 이용하는데, 구강청량제 및 민간약 등으로도 이용됨. 또한 설탕 보급 이전에는 감미료로 사용되었을 것으로 추정되어, 그 안전성이 이미 확보됨.
- Phylloidalin을 생산하는데 원료가 되는 수국의 국내 유통 규모는 2011년 한 해 연간 100만본 이상으로 50억 이상의 시장이 형성되어 있으며, 특히 수국 잎은 수국 꽃을 장식용으로 사용하고 남은 부산물로서 경제적인 원료 확보가 가능함.
- Phylloidalin을 비롯한 수국 추출물에 대한 연구는 1970년대부터 주로 일본을 위주로 활발히 이루어져 왔으며, 최근의 연구들은 phylloidalin의 항당뇨, 항알레르기 등 건강 기능성을 밝히는데 주로 초점이 맞춰져 있음.
- Phylloidalin의 강한 단맛, 다양한 건강 기능성 및 확보된 안전성은 이를 고감미 기능성 감미료로서 활용하는데 있어 매우 큰 장점이나, 그 동안의 연구들이 학문적 가치에 치우쳐져 있어 상업화 및 산업화를 위해서는 최적화된 추출 및 정제 공정의 확립에 대한 연구가 시급함.

### 제 3 절 연구개발의 범위

#### 1. 수국 phyllodulcin의 효율적 생산 공정 개발 및 특성 규명

##### 가. 연구개발 목표

: 국내 재배된 수국 잎으로부터 phyllodulcin의 고효율 추출 기술 및 이의 함량 증진을 위한 발효 기술을 개발하고, 촉매 및 부형제를 이용한 물성 개선을 통하여 천연물 유래 phyllodulcin의 고감미 감미료로서의 개발을 목표로 함.

##### 나. 연구개발 내용

###### [1차년도]

- 수국 잎으로부터 phyllodulcin의 추출 기술 개발
  - 유기용매를 이용한 추출 공정 개발
  - 열수추출 공정 개발
- Phyllodulcin의 정제 기술 개발
  - 분별결정법을 이용한 정제 조건 탐색
  - 크로마토그래피법을 이용한 정제 기술 개발
  - 고순도 phyllodulcin 분말 확보

###### [2차년도]

- Phyllodulcin의 생성 및 추출 효율을 높이기 위한 수국 잎 전처리 공정 개발
  - 수국 잎의 열풍건조, 동결건조 및 분말화 등의 전처리 공정에 따른 효과 분석
  - 발효에 의한 수국 잎의 phyllodulcin 함량 및 추출 효율 평가
- Phyllodulcin 생산 공정 최적화
  - 대량의 수국 잎을 이용한 추출 scale-up 및 정제 공정 최적화
  - 추출 시 사용한 유기용매의 회수 및 재사용을 위한 공정 개발

###### [3차년도]

- Phyllodulcin의 이화학적 특성 및 안정성 규명
  - 흡습성, 용해도, 결정성, 산·염기 반응성 등 물리적, 화학적 특성 규명
  - 산·염기 및 열 등의 조건에 대한 구조적 안정성을 평가
- 촉매 및 부형제를 이용한 phyllodulcin의 물성 개선
  - 당전이 효소를 이용하여 phyllodulcin glycosides를 합성하여 용해도 증가
  - 생성된 phyllodulcin glycosides의 특성 평가
  - 설탕, 이소말토올리고당, 유당, glycerides, cyclodextrin 등을 부형제로 이용하여 phyllodulcin과 혼합 제재를 만든 후 감미도 및 용해도 평가

## 2. 설탕보완재 xylobiose 생합성 기술 개발

### 가. 연구개발 목표

: 건강기능성 당류인 xylobiose의 효과적인 생산을 위한 생합성 시스템의 개발과 정제 및 결정화 기술을 개발하여 신규 설탕 보완재를 확보하고, 이를 설탕에 접목하여 고부가가치 기능성 설탕의 제품화를 목표로 함.

### 나. 연구개발 내용

#### [1차년도]

- Xylobiose 생합성 시스템 개발
  - Xylobiose 생합성을 위한  $\beta$ -xylosidase 탐색
  - GRAS 균주를 이용한 재조합  $\beta$ -xylosidase 발현 시스템 구축
  - Xylobiose 생산을 위한  $\beta$ -xylosidase 반응 조건 탐색
- Xylobiose 정제
  - One-step 정제 가능한 chromatographic resin 탐색 및 정제 조건 탐색
  - Xylobiose의 결정화 특성 파악
- Xylobiose의 특성 확인
  - Xylobiose의 감미도 및 감미 특성, 내산성 및 물리화학적 안정성 확인

#### [2차년도]

- $\beta$ -xylosidase 대량 생산 기술 개발
  - 재조합  $\beta$ -xylosidase를 발현하는 미생물의 배양 공정 최적화
  - 재조합  $\beta$ -xylosidase의 효율적 정제 공정 확보 및 공정 최적화
- Xylobiose 생합성 공정 최적화
  - Xylobiose 생산을 위한 최적 효소 반응 조건 확보
  - 효소고정화 기술 확보 및 최적화
  - 고정화된 효소를 이용한 packed bed system 확보
- Xylobiose 정제 기술 최적화
  - Binding, elution 용매 조건 및 elution 조건 최적화
  - Lab-scale continuous separation 공정 확보
- Xylobiose 결정화 기술 개발
  - 농축 방법 및 농축 조건 최적화
  - 결정화 효율 증대를 위한 seed 농도, 결정화 온도 및 시간, 회수 방법 최적화

[3차년도]

- Xylobiose의 기능성 규명
  - *In vitro* rat sucrase inhibition activity 측정
  - *In vitro Bifidobacteria* 증식 효과 확인
- Xylobiose 적용 제품 (자일로바이오슈가, Xylobiosugar <가칭>) 개발
  - Xylobiosugar의 혼합 특성, 재분리 특성, 물성 및 caking 특성 확인
  - Proto-type 제작
- Xylobiose 적용 제품 (자일로바이오슈가, Xylobiosugar <가칭>)의 기능성 확인
  - GI test를 통한 *in vivo* 혈당상승억제 효과 확인

3. Xylobiose 및 phylloolulcin 감미 특성 분석을 위한 종합적 평가 시스템 개발

가. 연구개발 목표

: 종합적 감미 특성 평가 시스템 개발을 통해 xylobiose 및 phylloolulcin의 감미 특성을 분석하고 식품 시스템에서 감미 특성 변화 조사를 통해 식품 적용 시 안정성을 규명하는 것을 목표로 함.

나. 연구개발 내용

[1차년도]

- Xylobiose 및 phylloolulcin 감미 특성 분석을 위한 종합적 평가 시스템 개발
  - 시판 천연유래 대체 감미료를 모델 시스템으로 활용하여 감미 특성 분석 평가 시스템 개발
  - 감미 특성을 종합적이며 총괄적으로 규명하기 위하여 상대 당도, 감미질, 감미 발현 및 지속 속도 측정 방법 확립

[2차년도]

- Xylobiose 및 phylloolulcin의 감미 특성 분석
  - 1차년도에서 도출된 최적화된 관능검사법을 통한 xylobiose의 감미 특성 분석
  - 최적화된 관능검사법을 통한 phylloolulcin의 감미 특성 분석

[3차년도]

- Xylobiose 및 phylloolulcin의 식품 적용에 따른 감미 안정성 규명
  - 묘사 분석을 통한 감미료 대체시의 식품의 관능적 특성 변화 규명
  - 감미료를 대체한 식품의 소비자 기호도 및 수용 가능한 감미질 변화 정도 측정

4. Xylobiose 및 phylloolulcin의 항당뇨 기능성과 항비만 효능 규명

가. 연구개발 목표

: 천연물 유래 고감미 감미료 및 설탕을 이용한 건강기능성 평가시스템 개발하고, xylobiose 및 phylloolulcin의 *in vitro* 및 *in vivo* 환경에서의 항당뇨 및 항비만 등 건강기능성 규명을 목표로 함.

나. 연구개발 내용

[1차년도]

- 천연물 유래 감미료 stevioside 및 설탕을 이용한 항당뇨 *in vitro*, *in vivo* 모델 및 시스템 개발
  - *In vitro* 항당뇨 효과 측정을 위한 모델개발
  - *In vivo* 항당뇨 효과 측정을 위한 모델개발
- 천연물 유래 감미료 stevioside 및 설탕을 이용한 항비만 기능성 평가 시스템 개발
  - *In vitro* 항비만 기능성 평가 모델 개발
  - *In vivo* 항비만 기능성 평가 모델 개발

[2차년도]

- Xylobiose 및 phylloidalin의 항당뇨 기능성 평가
  - *In vitro* 항당뇨 기능성 평가
  - *In vivo* rat 모델을 이용한 항당뇨 기능성 평가

[3차년도]

- Xylobiose 및 phylloidalin의 *in vitro* 및 *in vivo* 항비만 효능 분석
  - *In vitro* 세포실험을 통한 항비만 효과와 분자적 기전 규명
  - 비만을 유도한 *in vivo* 마우스모델에서 xylobiose 및 phylloidalin의 항비만 효과와 분자적 기전 규명

## 2장 국내외 기술개발 현황

코드번호

D-04

### 제 1 절 국내외 기술개발 현황

#### 1. 최근 당류/비당류 기반의 기능성 감미료 개발 현황

가. 고감미료, 당알코올은 국내 생산기반이 부족하여 90% 이상을 수입에 의존하고 있음

나. CJ 제일제당은 설탕 감미도의 92% 정도에 고감미료 특유의 쓴 맛이 완화된 ‘타가토스’를 개발하여 2011년 하반기부터 출시한 바 있고, 최근 알룰로스라는 희소당을 제품을 출시하여 시장 반응을 예의 주시 중임

다. 삼양사 및 대상에서도 추격형 기술력 확보로 자체 균주개발에 성공함으로써 알룰로스 출시를 앞두고 있음

라. ㈜대평은 중소기업으로서 스테비아 재배 및 육종과 함께 스테비올 배당체 생산, 연구 개발을 수행해 오고 있으나, 주로 중국에서 생산된 스테비오사이드 조추출액을 수입하여 추가적인 가공, 정제를 진행하는 방식으로 생산, 공급하는 수준임

#### 2. 고감미 소재 원료로써 수국 추출물의 연구 현황 및 활용 가능성

가. 감로차의 감미 성분은 산수국에 많이 함유되어 있으며, 감미도는 설탕의 600-800 배이고, 물에 대한 용해성이 떨어져 단맛 발현이 늦고 오래 지속되는 것으로 알려짐

나. 일본에서는 산수국의 건조 잎을 감차의 원료로 이용하는데, 구강청량제 및 민간약 등으로도 이용됨. 또한 설탕 보급 이전에는 감미료로 사용되었을 것으로 추정되어, 그 안전성이 이미 확보됨

다. 수국 원료의 국내 유통 규모는 2011년 한 해 연간 100만불 이상으로 50억 이상의 시장이 형성되어 있으며, 특히 수국 잎은 수국 꽃을 장식용으로 사용하고 남은 부산물로서 경제적인 원료 확보가 가능함.

라. 수국 추출물에 대한 연구는 1970년대부터 주로 일본을 위주로 활발히 이루어져 왔으며, 최근의 연구들은 항당뇨, 항알레르기 등 건강 기능성을 밝히는데 주로 초점이 맞춰져 있음.

3. 고감미 소재 원료로써 수국 추출물의 연구 현황 및 활용 가능성

가. 현재까지 보고된 천연 유래 대체 감미료는 설탕과는 다른 감미 특성, 즉 단맛의 출현 시점, 지속성, 쓰거나 뚹은 등의 후미를 가지는 것으로 보고됨 (Table 1).

나. 최근에 개발된 합성 감미료로 영국의 테잇&라일(Tate & Lyle)의 수크랄로스(sucralose): 설탕 분자 내 세 군데의 수산기를 염소기로 선택적으로 치환시켜 제조하였으며, 설탕의 약 600~700배 정도의 단맛을 제공한다. 수크랄로스는 '91년 캐나다에서 최초로 식품첨가물로 사용 허가, 미국은 '99년, 유럽연합은 '00년, 개발국인 영국은 '02년에 사용허가

Table 1. 일부 천연 유래 감미료의 감미 특성 및 가공 안정성

구분	감미료	상대당도	감미 특성	가공 안정성
Bulk sweetener	Erythritol	0.6-0.7	쓴맛 cooling effect	열과 산에 안정
	Xylo-oligosaccharides	0.3	이미지 없음	pH 2.5-8범위 안정 100°C에서 안정
	Tagatose	0.85-0.92	설탕과 가까운 감미 및 물리적 특성 (외관, 갈변 정도, bulking effect)	
Intensive sweetener	Stevia 추출물	10-15	쓴 뒷맛	열에 안정
	Rebaudioside A (Stevia 유래)	200-300	Stevia 추출 성분 중 가장 향미가 우수 쓴맛, 감초와 같은 후미 단맛 지속성	산과 고온에 안정
	Thaumatococin	100,000 (몰농도 기준)	감미 발현 속도 늦음 감초와 같은 후미 타 성분의 향미 증진	pH5.5 미만에서 100°C 가열시 안정
	Monellin	2000-3000		산, 열에 불안정
	Phyllodulcin	300-400	감미 발현 속도 늦음 anise/감초와 같은 후미 cooling effect	용해도 낮음

다. 그러나 역시 인체에 20~30% 흡수되는 염소성분 때문에 수크랄로스는 장기 섭취 시 장기나 생식력에 문제가 있다는 설이 제기돼 많은 안전성 연구가 필요한 것으로 알려짐



#### 4. 고감미 소재 원료로써 나한과 추출물에 대한 국내의 연구 현황 및 활용 가능성

가. Luo han guo의 단 맛 성분으로 알려진 mogroside의 감미도는 설탕 대비 150 배이고, 전통적으로 약재 및 설탕대체재로써 중국남부에서 사용되어옴. 물에 대한 용해도가 높고 낮은 열량으로 비만환자 및 당뇨병 환자에게 사용할 수 있음.

나. 중국에서는 luo han guo을 건조한 후 분말화하여 민간약 등으로도 이용됨. 또한 설탕 보 급 이전에는 감미료로 사용되었을 것으로 추정되어, 그 안전성이 이미 확보됨.

다. Luo han guo의 설탕과 유사한 감미질과 확보된 안전성은 이를 고감미 기능성 감미료로서 활용하는데 있어 매우 큰 장점이나, 그 동안의 연구들이 학문적 가치에 치우쳐져 있어 상업화 및 산업화를 위해서는 최적화된 추출 및 정제 공정의 확립에 대한 연구가 시급함.

#### 5. 고감미 소재 원료로써 감귤껍질 추출물의 연구 현황 및 활용 가능성

가. 감귤 껍질에 존재하는 것으로 알려진 neohesperidin에 potassium hydroxide을 처리하여 생산된 neohesperidin dihydrochalcone(NHDC)는 1960년대에 감귤주스에 쓴맛을 최소화하는 방법을 연구하다가 발견함.

나. 설탕대비 1,800배의 단맛을 지니고 있는 것으로 알려져 있으며, 스테비오사이드와 유사하게 단맛의 발현이 늦음.

다. EU에서는 NHDC를 1994년에 감미료로 승인하였으나, 아직 미국에서는 감미료로서 인정받지 못함. 또한 NHDC는 the Flavour and Extract Manufacturer's Association에 의해 GRAS로 인정하였지만, FDA에서는 GRAS로 고려하지 않음

라. Neohesperidin dihydrochalcone는 설탕을 대체하는 잠재적인 고감미 소재로서 그 가치가 충분하지만, 상업화 산업화를 위한 연구보다는 학문적 가치에 치우쳐져 있어서 이를 위한 연구가 필요함.

## 제 2 절 연구결과의 기대효과 및 위상

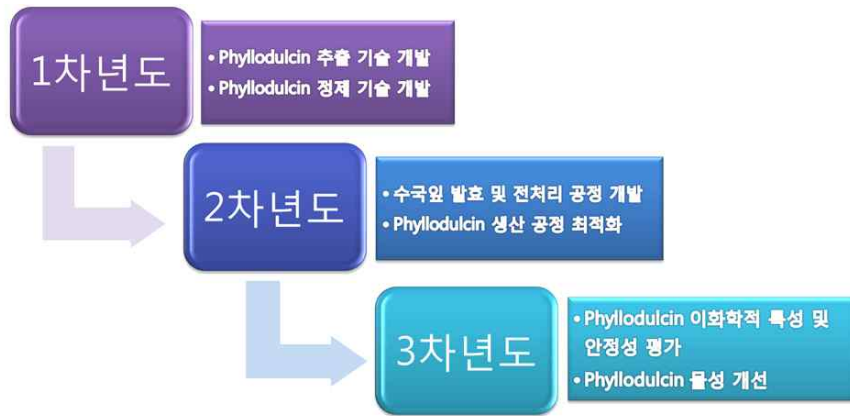
- Xylobiose 생합성 기술은 국내외에서 연구되지 않은 새로운 기술로 본 기술을 확보하면 세계 최고 수준의 기술을 확보할 수 있으므로 식품 소재 분야에서 국제 경쟁력을 갖출 수 있음
- 본 연구에서 도출한 결과로 8편의 논문 및 지적재산권을 3편 출원 및 최소 2편을 등록하여 국내외 시장에서 기술력을 확보할 수 있음
- 식품 산업을 이끌 수 있는 기술 개발과 전문가 인력 양성으로 다양한 R&D 기반을 구축함
- 기존 개발한 설탕 보완재로는 혈당 저감 효과가 있는 자일로슈가 및 장 건강에 좋은 자일로올리고슈가가 있음.
- 자일로바이오슈가(Xylobiosugar)<sup><가칭></sup>는 결정형 xylobiose를 생산하여 혼합공정으로 설탕 보완재를 생산할 수 있어 생산비의 절감효과를 기대할 수 있으며, 설탕의 감미도를 거의 유지하고 장기간 저장 안정성이 우수할 것으로 기대함.
- 또한, 장건강과 더불어 혈당상승억제, 항당뇨 및 항비만 기능을 갖춘 우수한 기능성 제품으로 기여할 가능성이 높으므로, 대사증후군과 같은 만성질환을 예방하여 사회적 비용절감 효과가 있을 것으로 판단됨.
- Sucrose 대비 xylobiose와 phyllodulcin의 감미 특성에 대한 중요한 기초 자료를 확보함
- Xylobiose와 phyllodulcin의 적용 사례 구축을 통하여 관련 식품 개발을 위한 기초 자료를 확보함
- 전문 지식인력 양성으로 향후 관련 산업계에 기여함.
- Xylobiose 및 phyllodulcin을 이용한 고감미 기능성 감미료 상품을 개발하여 기존의 대체감미료 수입 감소 및 수출 증대 효과를 기대할 수 있음.
  - 수입감소 효과: 현재 xylobiose 단독으로는 유통되지 않고 xylo-oligosaccharide (XOS)의 형태로 수입되고 있으며 XOS의 수입액은 약 3억원 수준임. 또한 국내 대체감미료 중 천연 소재 유래의 대체감미료는 스테비오사이드가 주류를 이루고 있고 주로 수입에 의존하고 있다. 2012년 스테비오사이드의 수입액은 약 27억 원(약 250 만불)으로 두 소재의 국내 총 수입액은 30억 원 수준으로 과제 종료 후 두 소재의 약 50%정도를 대체하여 15억 원, 과제 종료 5년 후 전체를 대체하여 30억 원 정도의 수입감소를 기대하고 있음.
  - 수출증대 효과: 새로운 기능성을 갖는 식품 소재인 xylobiose와 phyllodulcin을 중심으로 수출이 될 것으로 예상되며, 과제 종료 후 10억 원, 과제 종료 5년 후 50억 원 정도의 수출증대를 기대하고 있음
- 혈당 상승억제 효과를 갖는 xylobiose를 함유하는 고부가가치 설탕 및 다양한 생리활성을 갖는 천연 유래의 고감미 감미료인 phyllodulcin을 함유하는 기능성 감미료 개발, 제조하여 판매하고자 하며 그에 따른 기대효과는 아래의 표와 같음
- 과제 종료 후 상업화를 위한 기반 준비를 위한 기간으로서 1차년도는 경제적 기대효과는 발생하지 않으며, 종료 후 2차년도부터 매출 증가가 기대됨.

### 3장 연구수행 내용 및 결과

코드번호	D-05
------	------

#### 제 1 절 수국 phyllodulcin의 효율적 생산 공정 개발 및 특성 규명

##### 1. [제 1 세부] 연구개발 추진 전략 및 추진 체계



##### [1차년도]

- 수국 잎으로부터 phyllodulcin의 추출 기술 개발 : 열수 및 유기용매 추출법의 추출 효율 비교
  - 유기용매추출 : 수국 잎으로부터 methanol, acetone, acetonitrile, tetrahydrofuran, ethanol 등의 유기 용매의 농도에 따라 추출된 phyllodulcin의 양을 HPLC를 이용하여 정량.
  - 열수추출 : 0°C ~ 100°C의 온도 범위에서 온도에 따른 phyllodulcin의 추출 효율을 HPLC를 이용하여 정량.
  - 추출 과정 중 sonication 등의 공정 동반 시 추출 효율에 미치는 영향 조사.
  - 최적 시료-용매 비율 확립 및 phyllodulcin의 분석을 위한 HPLC system 분석 조건 확립.
- Phyllodulcin의 정제 기술 개발 : 수국 잎 추출물로부터 phyllodulcin 순수 분리, 정제 공정을 확립
  - 추출물의 불용성 성분을 원심분리 및 여과를 이용하여 제거한 후 여과액을 NH2 column, C18 column, silica column 등의 다양한 분석용 column을 이용하여 분석하여 최적 column을 찾고, acetonitrile, trifluoroacetic acid, water 등을 조합한 solvent system을 탐색하여 HPLC 분석 조건을 확립함.
  - 분별결정법 등의 정제 기술을 활용하여 대량 정제 공정 구축 조건 탐색.
  - 최적화된 정제 기술을 바탕으로 생산한 phyllodulcin은 추후 분석을 위한 표준물질로 사용하며, 99%이상의 고순도 phyllodulcin을 준비하여 3협동 과제의 관능검사 및 4협동과제의 항당뇨 기능성 모델 개발을 위해 공급.

## [2차년도]

- Phyllodulcin의 함량 및 추출 효율을 높이기 위한 수국 잎 전처리 공정 개발
  - 생잎, 고온 열풍건조, 상온 건조, 저온건조, 동결건조의 건조 조건에 따른 phyllodulcin 추출 효율을 높이기 위한 전처리 조건 탐색.
  - 분말화 후 수국 잎 가루의 보관 조건에 따른 추출 효율 평가.
  - 생잎으로부터 phyllodulcin의 glycoside를 분리한 후  $\beta$ -glucosidase를 이용하여 감미도 증진을 위한 glycoside 제거 공정의 수율 및 경제적 효율성 평가.
- Phyllodulcin의 함량 증대 및 추출효율 향상을 위한 발효 기술 개발
  - 수국 잎 전처리 공정으로 발효의 영향 평가. *Saccharomices cerevisiae*, *Bacillus subtilis*, *Aspergillus niger* 등의 발효 미생물 이용 조건에 따른 phyllodulcin의 함량 변화 및 추출 효율 평가를 통해 phyllodulcin 추출 효율 극대화 기술을 확보.
- Phyllodulcin 정제 기술 최적화 : 상용화를 위한 대량 생산 공정 확립
  - 1회 추출시 사용하는 수국잎 시료를 5 kg 수준으로 증량하여 소량 정제 과정의 공정을 scale up하여 수정, 보완하여 정제 조건 최적화.
  - 대용량 ion-exchange chromatography 또는 size exclusion chromatography를 이용한 정제 공정 단순화를 통해 시간 및 비용 최소화 공정 개발.
  - 이화학적 특성 규명, 관능평가 및 기능성 평가를 위한 충분한 양의 phyllodulcin을 확보.

## [3차년도]

- Phyllodulcin의 이화학적 특성 및 안정성 규명
  - Dynamic vapor sorption을 이용하여 건조된 phyllodulcin 흡습 및 탈습 특성을 상대습도 10~90% 범위에서 조사하여 moisture isotherm curve 작성하고, 흡습, 탈습 곡선 및 두 곡선의 차이에 의해 나타나는 hysteresis를 조사함.
  - 내산성, 내염기성, 내열성 및 구조적 안정성 평가 : 산성, 중성 및 염기성 buffer에 phyllodulcin을 용해시킨 후 온도 및 시간 별로 다양한 균을 선별하여 각 균에서의 구조적 안정성을 HPLC 또는 thin layer liquid chromatography를 이용하여 조사.
  - 용해도, 결정성 등의 물리화학적 특성 평가 : 증류수에 소량의 phyllodulcin을 vortexing 하면서 지속적으로 첨가하여, 물에 녹을 수 있는 phyllodulcin의 최대 g수로 용해도 측정. phyllodulcin의 순도에 따른 결정 형성 능력 조사.
  - Rheometer(AR1500ex, TA Instruments)를 이용하여  $5\sim 100\text{ s}^{-1}$ 의 shear-rate의 범위에서 진행하여 다양한 농도의 phyllodulcin 용액에 대해 25°C, 35°C, 45°C에서 점성 조사.
- 촉매 또는 부형제를 이용한 phyllodulcin의 물성 개선
  - Phyllodulcin의 용해도를 높이기 위해 생촉매인 amylosucrase, glucosyltransferase 등의 당전이 효소를 이용하여, 수국 내에 존재하는 phyllodulcin glycosides와는 다른 결합 구조를 가지는 glycosides를 합성.
  - 생성된 phyllodulcin glycosides의 용해도, 흡습성, 결정성 및 산, 염기, 열에 대한 안정성 평가
  - 설탕, 이소말토올리고당, 유당, glycerides, cyclodextrin 등을 부형제로 이용하여 phyllodulcin 과 혼합 제재를 만든 후 용해도, 감미도, 결정성, 흡탈습 특성, 물성 등 특성 변화 조사

## 2. 수국 잎으로부터 phyllodulcin의 추출 기술 개발

### 가. 실험재료 및 방법

#### (1) 실험재료

수국 잎은 대구 달성군 수국의 미소 부부다원에서 유기농으로 재배한 것을 2013년 10월 및 2014년 7월에 수확하여 사용하였고, 수국 차는 수국의 미소(부부다원) 차를 구입하여 사용하였음.

#### (2) 다양한 방법과 용매를 이용한 phyllodulcin 추출

##### ▪ Conventional soaking extraction (CSE)

동결건조 후 분쇄한 수국잎 분말 1g에 30, 70, 100%(v/v)의 다양한 추출용매(methanol, ethanol, water) 50mL을 첨가한 후 이를 상온에서 12시간 방치함.

##### ▪ Ultrasonic extraction (UE)

동결건조 후 분쇄한 수국잎 분말 1g에 30, 70, 100%(v/v)의 다양한 추출용매(methanol, ethanol, water) 50mL을 첨가한 후 이를 35±1°C 에서 1시간 방치. 이렇게 추출된 추출물은 Whatman No. 1 filter paper를 사용하여 여과함.

##### ▪ Accelerated solvent extraction (ASE)

동결건조 후 분쇄한 수국잎 1g을 filter paper가 장치된 스테인리스 추출 cell (5mL)에 충전하여 accelerated solvent extractor (Dionex ASE 350, Sunnyvale, CA, USA)를 이용하여 추출함. 추출은 다섯 수준의 추출 온도(40, 50, 60, 70, 80°C), 다섯 수준의 추출 cycle(1, 2, 3, 4, 5 cycle) 및 다양한 추출용매를 사용하여 실시하였음 (30, 70, 100% methanol, ethanol, water)

##### ▪ 추출물의 phyllodulcin 함량 분석

추출물을 0.45µm syringe filter을 이용하여 여과한 후 HPLC system(Ultimate-3000, Dionex Co., CA, USA)을 이용하여 분석함. Phyllodulcin 함량 분석을 위해서는 Capcell pak C18 column(4.6 mm I.D. × 250 mm, 5µm, Shiseido Co., Tokyo, Japan) 및 acetonitrile 0.1% TFA와 water with 0.1% TFA를 이동상으로 사용하여 gradient mode를 적용함(30:70 v/v at 0 min 에서 50:50 v/v at 20 min). Flow rate은 1.0mL/min, 오븐온도는 40°C, detection은 254nm의 조건하에서 실험이 진행됨.

#### (3) Phyllodulcin 함량을 높이기 위한 수국 잎의 전처리 공정

##### ▪ Hand-rolling 및 건조 공정

신선한 수국 잎을 1분간 hand rolling하여 drying oven(70°C\*10min)에서 25°C에서 12시간 혹은 70°C에서 4시간 건조하였음. 건조잎을 분쇄하여 50mesh sieve를 사용하여 수국 잎 분말을 균질화하였음.

##### ▪ 분쇄 공정

해동된 수국 잎 50g을 100mL의 water와 함께 blender(HR2096, Philips, Amsterdam, Netherlands)를 사용하여 20초간 분쇄함. 이를 실온에서 0, 0.5, 3, 24시간 각각 방치시킨 후, 이를 freeze dryer(CoolSafe 110-4, Labogene™, Lynge, Denmark)를 사용하여 동결건조하였음. 동결건조한 샘플은 분쇄하여 50mesh sieve를 통과시켜 균질화함.

■ 전처리 공정에 의한 가공 수국 잎의 phyllodulcin 추출 및 함량 조사

100% methanol을 용매로 하여 ASE를 이용한 최적 추출조건으로 전처리 공정에 의해 가공된 수국 잎으로부터 phyllodulcin을 추출하였음. 즉, 동결건조된 분말 1g을 스테인리스 추출 cell(10mL)에 넣고 70°C에서 5분간 3cycle로 추출함. 이를 syringe filter로 여과한 후 위에 기술한 HPLC system으로 추출액 내의 함량을 조사함.

나. 실험결과

(1) 다양한 방법과 용매를 이용한 phyllodulcin 추출

(가) ASE(Accelerated solvent extraction)의 최적추출조건

40-80°C 사이에서 추출온도가 증가함에 따라 추출된 phyllodulcin의 농도도 증가하는 경향이 나타났으며, 온도에 따른 추출액의 phyllodulcin 함량은 18.00~20.66 mg/g로 나타남. 특히, 70°C에서 최대값을 나타내어 이를 최적 추출온도로 선정하였음(Fig. 1). Fig. 2는 70°C에서의 cycle에 따른 추출액의 phyllodulcin 함량을 나타냄. 5min, 5cycle에서 최대 함량인 21.30 mg/g의 최대값을 나타내었으나 추출시간 및 용매 사용의 저감화를 위해 최종적으로 70°C, 5min, 3cycle을 ASE 추출 최적 조건으로 확립하였음.

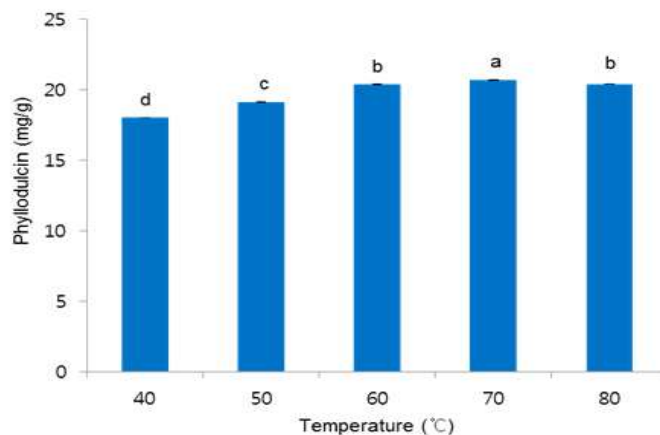


Fig 1. Phyllodulcin contents in methanol extract of hydrangea leaves using accelerated solvent extraction with variation of temperature at 1,500 psi.

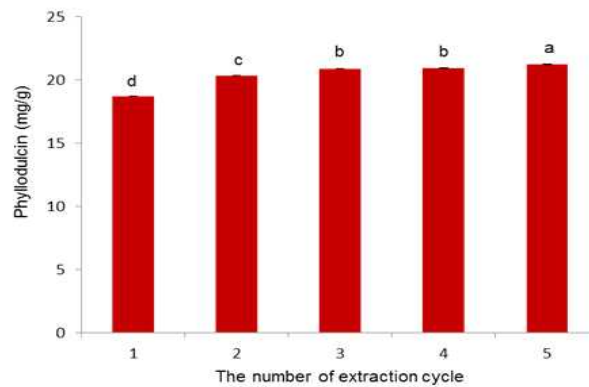


Fig 2. Phyllodulcin contents in methanol extract of hydrangea leaves using accelerated solvent extraction with variation of cycle at 70°C, 1,500 psi.

(나) 다양한 추출 방법과 용매의 효과

다양한 추출용매 및 추출방법에 따른 효과는 Table.1 과 같음. 추출액 중의 phyllodulcin 함량은 추출방법에 따라 유의적인 차이를 나타냄 ( $p < 0.05$ ). ASE를 이용한 추출은 70%와 100% methanol, 그리고 70% ethanol을 용매로 사용하였을 때 가장 높은 phyllodulcin 함량을 보였으며, ultrasonication의 경우는 100% methanol을 사용하였을 때 ASE와 유사한 추출 효율을 나타냄. Conventional soaking은 추출용매에 상관없이 ultrasonic extraction 및 ASE에 비해 현저하게 낮은 추출효율을 나타냄.

추출액 중의 phyllodulcin 함량은 추출용매에 따라서도 유의적인 차이를 나타냄. Phyllodulcin은 물에 의해서는 거의 추출되지 않았으며, methanol 사용 시에는 그 함량이 증가함에 따라 phyllodulcin 함량도 증가하여 100% methanol에서 phyllodulcin의 최대 함량을 나타내었음. Ethanol의 경우는 70%에서 최대의 phyllodulcin 함량을 나타냄. 따라서 100% methanol을 용매로 하여 ASE를 통한 phyllodulcin 함량의 최대값은 21.3mg/g으로 이를 추출최적조건으로 확립하였음.

Table. 1 Effect of extraction methods and solvent variability on phyllodulcin content in the extracts of hydrangea tea<sup>1</sup>

Solvent (%)	Phyllodulcin (mg/g)			F	
	CSE	UE	ASE		
MeOH	0	0.02 ± 0.00 <sup>eE</sup>	0.15 ± 0.09 <sup>eE</sup>	0.06 ± 0.06 <sup>dE</sup>	465.93 <sup>***</sup>
	30	6.72 ± 0.23 <sup>dD</sup>	9.81 ± 0.49 <sup>dC</sup>	4.44 ± 1.95 <sup>cdD</sup>	
	70	18.65 ± 0.04 <sup>bB</sup>	18.47 ± 0.22 <sup>bB</sup>	21.33 ± 0.03 <sup>aA</sup>	
	100	19.33 ± 0.17 <sup>abAB</sup>	21.20 ± 0.33 <sup>aA</sup>	21.28 ± 0.10 <sup>aA</sup>	
EtOH	0	0.02 ± 0.00 <sup>eC</sup>	0.15 ± 0.09 <sup>eC</sup>	0.06 ± 0.06 <sup>dC</sup>	66.13 <sup>***</sup>
	30	9.80 ± 0.56 <sup>cB</sup>	11.84 ± 1.47 <sup>cB</sup>	11.23 ± 4.51 <sup>bcB</sup>	
	70	19.82 ± 0.11 <sup>aA</sup>	19.54 ± 0.29 <sup>abA</sup>	21.11 ± 0.27 <sup>aA</sup>	
	100	18.78 ± 0.08 <sup>bA</sup>	11.73 ± 0.20 <sup>cB</sup>	17.69 ± 0.63 <sup>abA</sup>	
F		2068.72 <sup>***</sup>	280.40 <sup>***</sup>	43.954 <sup>***</sup>	

<sup>1</sup>Means of duplicate. a, b, c, d and e : Means within a column followed by different letters are significantly different at  $P < 0.05$  by Tukey's HSD. A, B, C, D and E : Means within methanol or ethanol followed by a different letter are significantly different at  $P < 0.05$  by Tukey's HSD.

## (2) Phyllodulcin 함량 증진을 위한 수국 잎의 전처리 공정

### (가) Hand-rolling 및 건조온도의 효과

동결 건조된 수국 잎과 비교하였을 때, 모든 처리조건에서 phyllodulcin 함량이 증가하였으며, hand-rolling 및 70°C에서 고온 건조하였을 때 유의적으로 가장 높은 phyllodulcin 함량은 나타냄( $p < 0.05$ , Fig. 3). 건조온도에 상관없이 hand-rolling 에 의해 phyllodulcin 함량이 유의적으로 증가하였으며( $p < 0.05$ ), 70°C 건조가 25°C에서 건조된 수국잎보다 높은 phyllodulcin 함량을 나타내었으며( $p < 0.05$ ), 따라서 전통적인 수국차 제조 방법인 hand-rolling 및 고온건조는 수국잎의 phyllodulcin 함량 증가에 모두 유효하였음(Fig. 3).

### (나) 분쇄공정의 효과

Blender를 이용한 분쇄공정은 순간적으로 phyllodulcin의 함량을 증가시키고 24시간 동안 방치하여도 phyllodulcin의 함량은 더 이상 증가하지 않는 것으로 나타남(Fig. 4). 이는 blending의 공정을 통하여 수국잎의 세포벽이 파괴되고 따라서 전구체인 phyllodulcin glucoside가  $\beta$ -glucosidase에 의해 가수분해되는 것으로 여겨짐. Blending은 hand-rolling 및 고온건조보다 phyllodulcin 함량의 증가에 우월한 효과를 나타내었으며, 따라서 blending은 수국잎 속 phyllodulcin의 함량을 극대화시키는 효과적인 전처리 공정으로 확인됨.



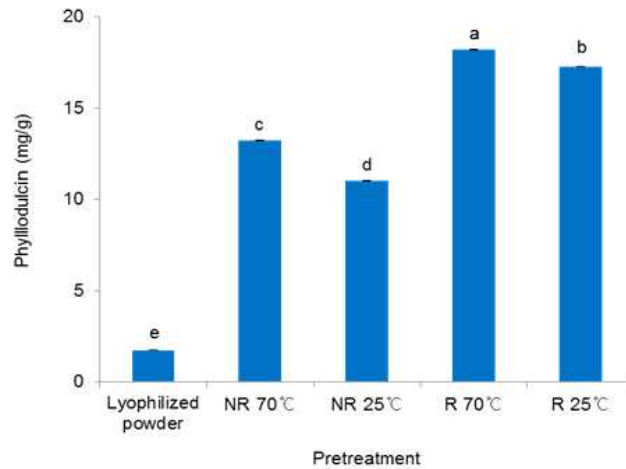


Fig. 3. Phyllodulcin contents in methanol extracts of hydrangea leaves differing hand-rolling and drying temperature. R and NR: hand-rolling and non-rolling, respectively; a, b, c, d and e: means followed by different letters are significantly different at  $P < 0.05$  by Tukey's HSD.

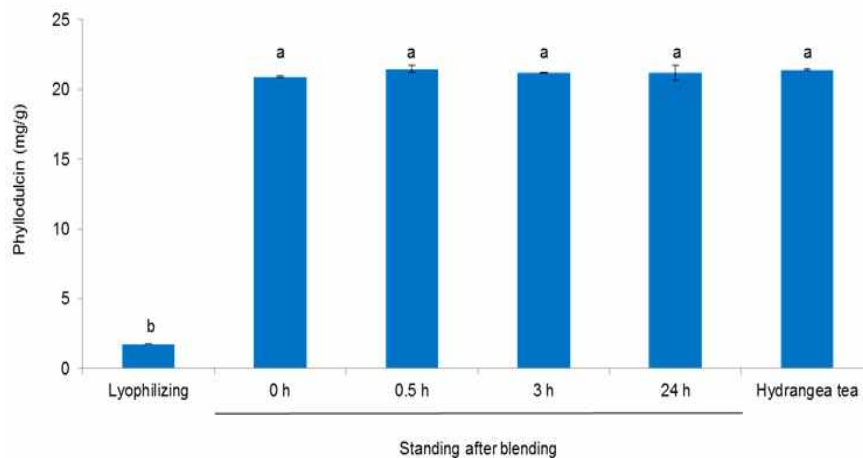


Fig. 4. Effect of blending and standing time on the content of phyllodulcin in the extracts of hydrangea leaves.

### 3. Phyllodulcin 정제 기술 개발

#### 가. 실험방법

(1) Preparative recycling HPLC를 이용한 수국잎 추출액의 phyllodulcin 분리

고순도의 phyllodulcin을 얻기 위해서, 수국 추출물을 preparative recycling HPLC (LC-9104, JAI, Japan)를 이용하여 정제함. Column은 Jaigel W-251 preparative column (20 × 500 mm, Jai, Japan)을 사용하였고 이동상으로는 methanol을 flow rate 3.0mL/min으로 사용하여 정제함. Column을 통해 분리된 시료를 분획하여 LC/MS로 분석하여 phyllodulcin을 동정하였음.

(2) LC/MS를 이용하여 수국잎 추출물로부터 phyllodulcin 동정

PDA-UV detector가 장착된 Thermo-Finnigan surveyor HPLC(Thermo Scientific, Sunnyvale, CA, USA) 및 Thermo-Finnigan LCQ Deca XP plus ion trap mass spectrometer를 사용하여 prep recycling HPLC의 분획으로부터 phyllodulcin의 동정을 수행함. HPLC system에는 Synergi™ 4  $\mu$ m Fusion-RP 80 Å LC column(100 × 3 mm, Phenomenex Inc., CA, USA)을 사용하였고, 이동상으로는 0.1% formic acid와 acetonitrile이 70:30의 비율로 구성하여 250 $\mu$ L/min의 flow rate으로 분리함. 주입량은 10 $\mu$ L였으며, 총 30분동안 수행하였고, electrospray ionization(ESI)의 capillary 온도는 275°C, capillary voltage는 45V로 유지하였음.

(3) Phyllodulcin powder 생산

Preparative recycling HPLC를 이용하여 phyllodulcin peak의 분획을 회수하여 이를 speed vacuum concentrator(Scanspeed40, Labogene™, Lynge, Denmark)로 농축하였음. 이동상으로 사용한 methanol을 물로 바꾸기 위하여 농축 과정 중 80mL의 water를 첨가하고, 최종 농축된 샘플을 동결건조하여 고순도 phyllodulcin 분말을 생산하였음.

(4) Phyllodulcin 표준검량선 확립

Phyllodulcin powder를 methanol에 용해하여 1% phyllodulcin solution을 만들고, 여러 수준의 injection volume을 HPLC system에 주입하여 peak면적과 phyllodulcin양의 표준검량 회귀식을 얻음.

## 나. 실험결과

(1) Preparative recycling HPLC 및 LC/MS를 이용한 phyllodulcin 동정 및 정제

고순도의 phyllodulcin을 얻기 위해서 methanol로 추출한 수국차 추출물을 preparative recycling HPLC를 이용하여 Fig. 5와 같은 크로마토그램을 얻었으며 각 peak별로 분획을 얻어 LC/MS를 이용하여 분자량 및 그 fragmentation pattern을 바탕으로 phyllodulcin 및 수국잎에 특이적으로 존재하는 hydrangeic acid 및 hydrangenol을 동정하였음 (Fig. 6).

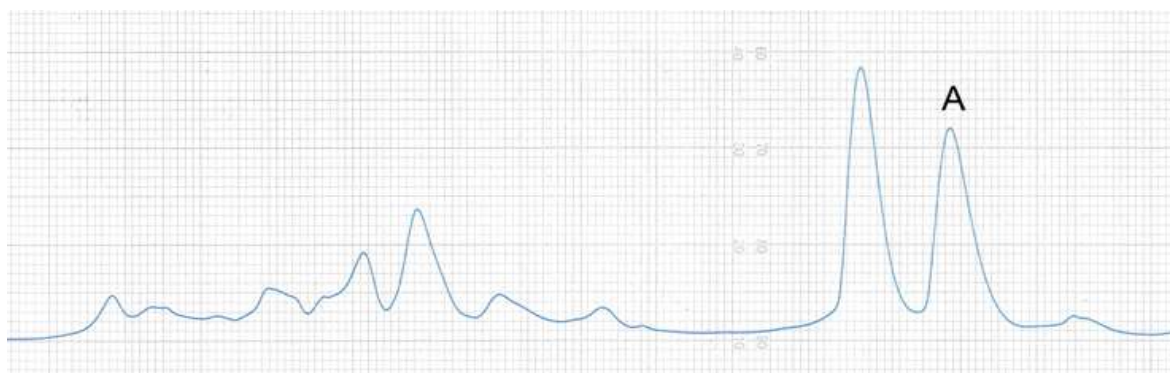


Fig. 5 Preparative recycling HPLC chromatogram of the hydrangea tea extract. A, phyllodulcin

Hydrangenol와 hydrangeic acid, 그리고 phyllodulcin의 ESI-MS spectra는 각각 Fig. 6A, 6B, 및 6C와 같음. Hydrangeic acid의 mass spectrum은  $m/z$  257.3  $[M+H]^+$ 의 base ion peak,  $m/z$  537.3  $[2M+Na]^+$ , 278.9 $[M+Na]^+$ , 239.4 $[M-OH]^+$  및 210.7 $[M-COOH]^+$  peak을 나타냄. Hydrangenol은  $m/z$  257.2  $[M+H]^+$ 의 base ion peak 및  $m/z$  537.2  $[2M+Na]^+$ , 279.0 $[M+Na]^+$  그리고 239.3 $[M-OH]^+$ 등이 감지됨. Hydrangenol(Fig. 6A)과 hydrangeic acid(Fig. 6B)은 210.7  $[M-COOH]^+$ 을 통하여 구분 가능함. Phyllodulcin은  $m/z$  287.2  $[M+H]^+$ 의 base ion peak 및  $m/z$  597.2  $[2M+Na]^+$ , 269.1 $[M-OH]^+$ 을 나타냄(Fig. 6C).

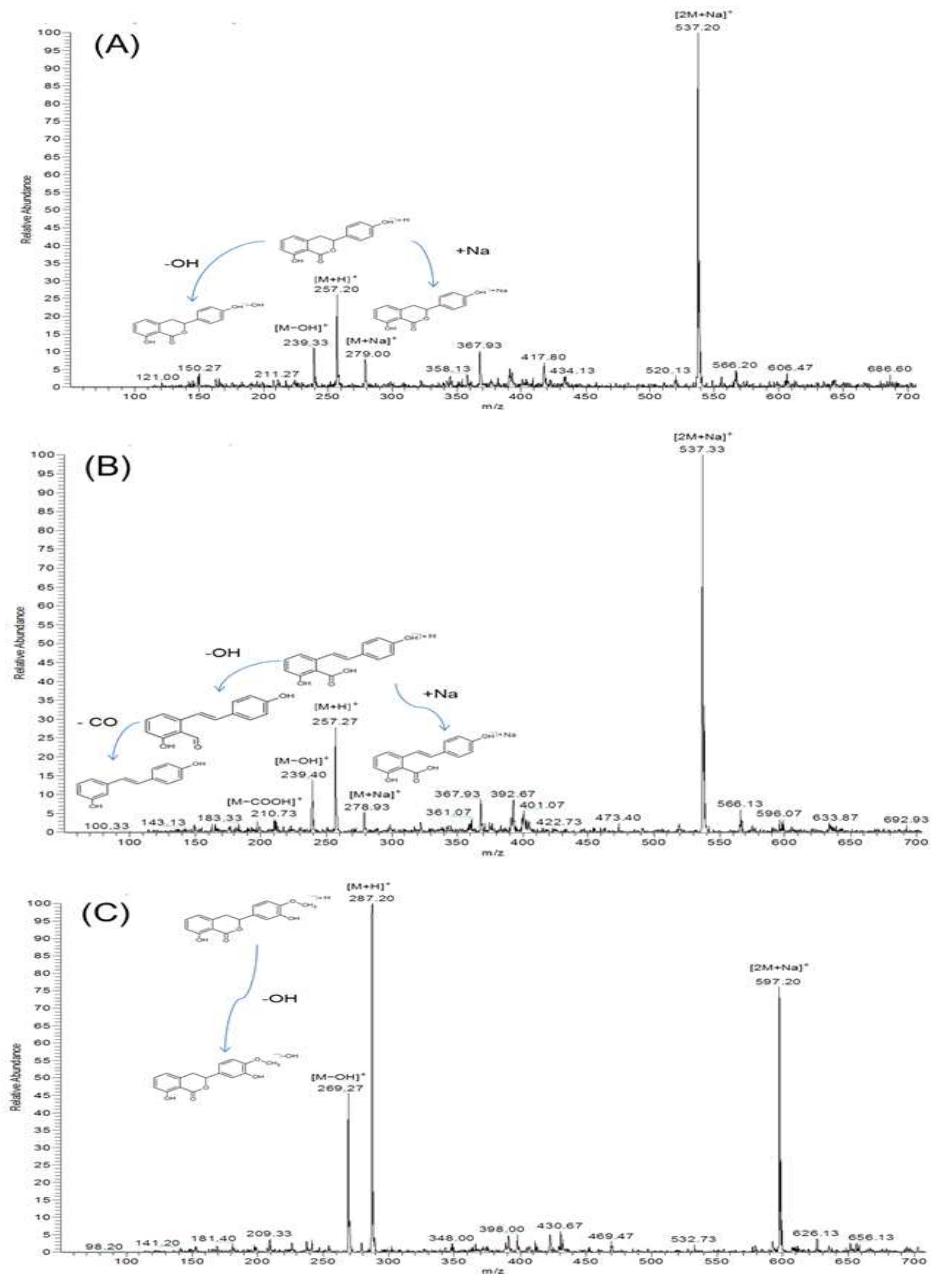


Fig. 6. LC/MS spectra of phyllodulcin, hydrangenol and hydrangeic acid. (A)hydrangenol (B)hydrangeic acid (C) phyllodulcin.

수국잎 메탄올 추출물을 HPLC/UV system을 이용하여 분석한 크로마토그램은 Fig. 7과 같으며, peak a, b, c는 각각 hydrangenol, hydrangeic acid 및 phyllodulcin에 해당하는 것을 확인함. LC/MS 결과로부터 preparative recycling LC 크로마토그램(Fig. 5)의 peak A가 phyllodulcin으로 확인되어 이를 회수하여 동결건조하여 HPLC로 분석하였으며 순도는 3회 반복 평균 96.8%를 나타냄(Fig. 7).

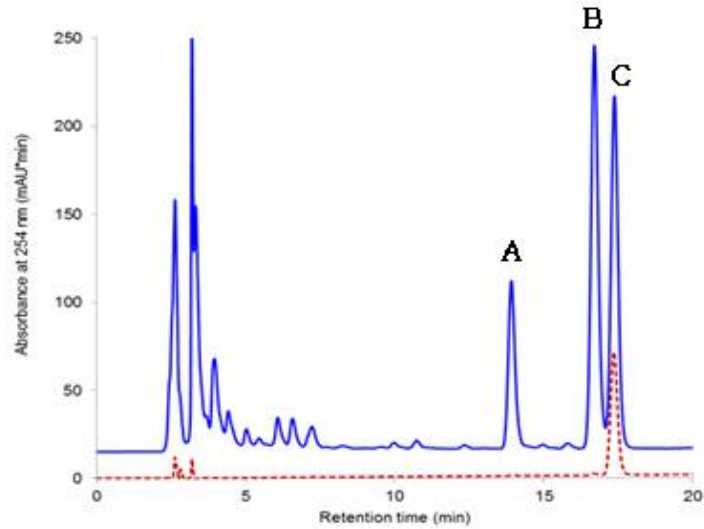


Fig. 7 HPLC chromatogram of hydrangea leaf extract(solid line) and purified fraction of phyllodulcin from preparative recycling HPLC(dashed line).

## (2) Phyllodulcin 표준검량선

HPLC의 peak 면적으로부터 얻어진 phyllodulcin의 표준검량회귀식은 0-0.25%의 농도범위에서  $y = 1872.8x + 1.2957$ 로 나타났으며,  $r^2 = 1.00$ 의 직선을 나타내었음(Fig. 8). 이 표준검량선을 이용하여 계산된 phyllodulcin 분말의 수율은 수국잎 건물기준  $2.116 \pm 0.023\%$ 로 확인됨.

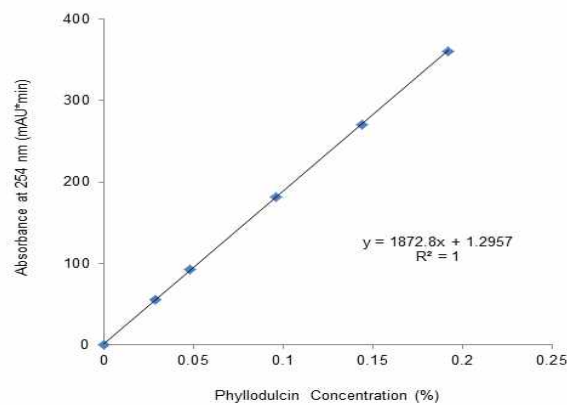


Fig. 8. Standard curve for phyllodulcin quantification.

#### 4. Phyllodulcin 전구체 추출을 통한 phyllodulcin 생산 기술 개발

##### 가. 실험방법

Phyllodulcin 전구체로부터 효소적인 반응에 의해 phyllodulcin이 생성되는 것을 확인하기 위한 실험의 계획은 Fig. 9와 같음. 개략적으로 데치기를 통해 효소를 불활성화한 수국잎으로 부터는 phyllodulcin이 생성되지 않으며, 이에  $\beta$ -glucosidase를 처리하여 phyllodulcin의 생성을 확인함. 또한, 효소불활성화를 거치지 않은 동결건조 수국잎을 물과 함께 방치하여 효소 반응을 유도하여 phyllodulcin이 생성됨을 확인함.

##### (1) 동결건조 수국잎으로부터 phyllodulcin의 효소적 생합성

동결건조된 1.5g 수국 잎 분말에 30mL의 물을 첨가하여 상온에서 각각 0, 0.5, 1, 3, 12, 24시간 방치하여 수국잎 자체에 내재하는 효소의 반응을 유도하고, 반응 후 10분간 끓여 효소를 불활성화함.

##### (2) 효소 불활성화 수국 잎의 제조

해동된 수국잎을 끓는 물에서 10분간 데쳐 수국잎에 내재하는 효소를 불활성화 시킴. 이를 동결건조 후 블렌더를 이용하여 분쇄하여 50mesh sieve를 이용하여 균질화함. 이 시료 1.5g에 30mL의 물을 가하여 상온에서 각각 0, 0.5, 1, 3, 12, 24시간 방치한 후 10분간 끓임.

##### (3) $\beta$ -Glucosidase를 이용하여 효소 불활성화 수국 잎으로부터 phyllodulcin 생합성

위에서 제조된 효소 불활성화 수국잎 1.5g에 30mL의 물과 5unit의  $\beta$ -glucosidase(G4511, Sigma-Aldrich Chemical Co., St. Louis, Mo, U.S.A.)를 첨가한 뒤 37°C에서 각각 0, 0.5, 1, 3, 12, 24시간 방치시킴. 반응 후 10분간 끓여 효소를 불활성화함.

##### (4) Phyllodulcin의 추출 및 함량 분석

위에서 준비된 각 시료는 동결건조, 분쇄 및 100mesh sieve로 체치기하고, 각 분말 1g을 ASE를 사용하여 methanol을 용매로 70°C에서 5분간 3cycle로 추출함. HPLC를 이용하여 각 추출액 내의 phyllodulcin 함량을 측정함.

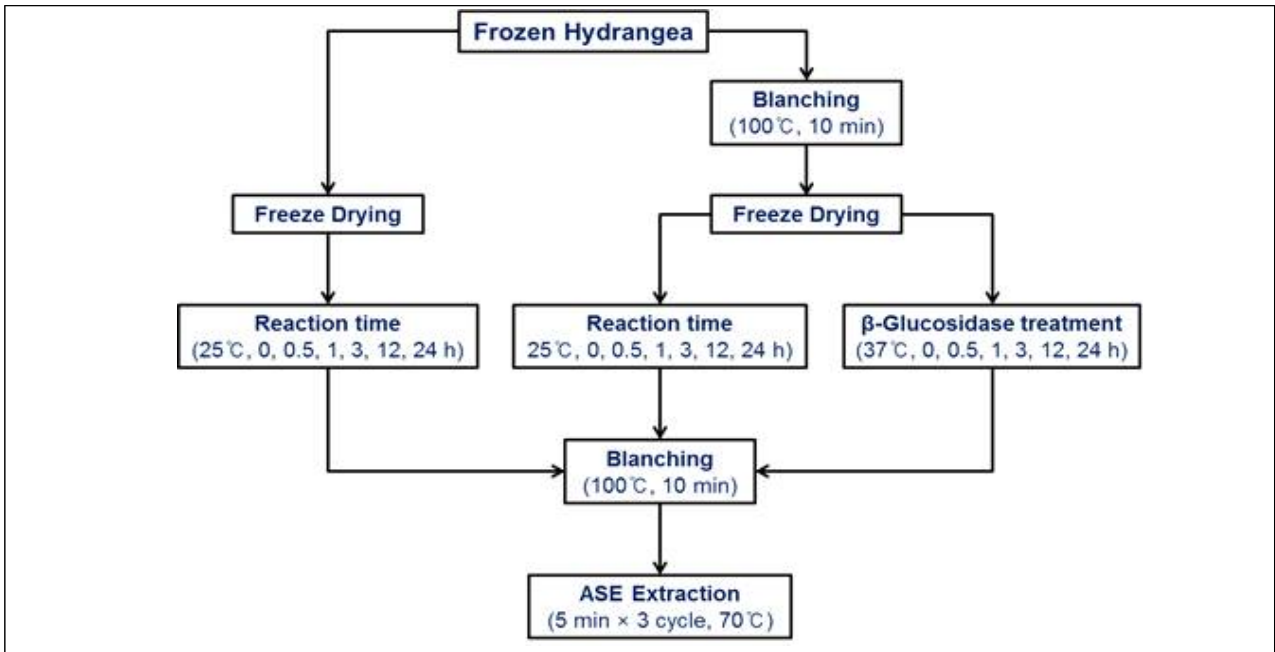


Fig. 9. Experimental design for elucidation of phyllodulcin biosynthesis from phyllodulcin glucoside via  $\beta$ -glucosidase reaction.

(5) 수국잎 추출물로부터 phyllodulcin glucoside 동정

Phyllodulcin 전구체가 존재하고 있는 동결건조 수국잎 분말 및 30, 50, 70, 100% ethanol 과 methanol을 용매로 ASE를 활용하여 추출함. 각 추출액으로부터 LC/MS를 이용하여 phyllodulcin 전구체를 동정함. LC/MS system은 PDA-UV detector가 장착된 Thermo-Finnigan surveyor HPLC(Thermo Scientific, Sunnyvale, CA, USA) 및 Thermo-Finnigan LCQ Deca XP plus ion trap mass spectrometer를 사용하였음. Synergi™ 4  $\mu$ m Fusion-RP 80 Å LC column(100 × 3 mm, Phenomenex Inc., CA, USA)을 사용하였고, 이동상으로는 0.1% formic acid와 acetonitrile이 70:30의 비율로 구성하여 250 $\mu$ L/min의 flow rate으로 분리하였음. 주입량은 10 $\mu$ L였으며, 총 30분 동안 수행하였고, electrospray ionization(ESI)의 capillary 온도는 275°C, capillary voltage는 30V 및 45V로 유지하였음.

나. 실험결과

(1) 동결건조 수국잎으로부터 phyllodulcin의 효소적 생합성

동결건조한 수국잎 속 phyllodulcin은 내재된 효소의 반응에 의해 생합성되어 12시간까지 지속적으로 증가하였으며, 12시간에서 20.67±0.56 mg/g 의 phyllodulcin 함량 최대값을 보임(Fig. 10). 12시간 이후로는 24시간까지 방치하여도 유의적인 함량의 변화를 나타내지 않음.

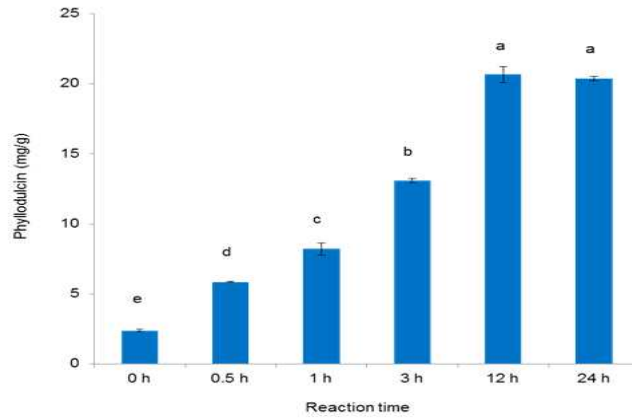


Fig. 10. Phyllodulcin contents in methanol extracts of non-blanching and lyophilized hydrangea leaves with water addition for 24 h reaction at 25°C.

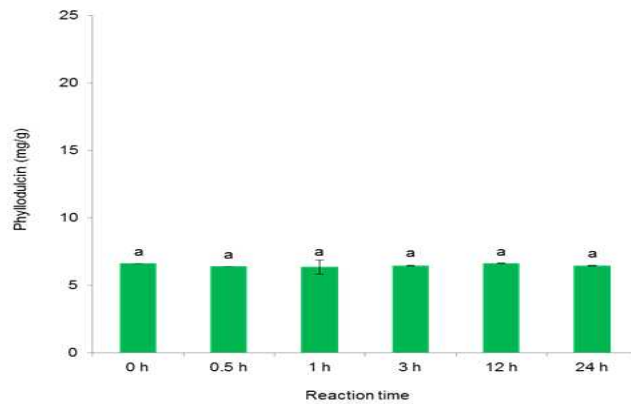


Fig. 11. Phyllodulcin contents in methanol extracts of blanching and lyophilized hydrangea leaves with water addition stood for 24 h at 25°C.

(2) 효소 불활성화 수국 잎의 phyllodulcin 함량

데치기를 통하여 내재한 효소를 불활성화시킨 수국잎은 수용액 상태로 24시간 동안 방치하여도 phyllodulcin 함량에 유의적인 변화가 나타나지 않았음(Fig. 11).

(3)  $\beta$ -Glucosidase를 이용하여 효소 불활성화 수국 잎으로부터 phyllodulcin 생합성

데치기를 통하여 효소를 불활성화시킨 수국잎에  $\beta$ -glucosidase를 첨가시킨 경우,  $\beta$ -glucosidase반응에 의해 phyllodulcin의 함량이 반응시간에 따라 증가함(Fig. 12). 그러나, 5unit의  $\beta$ -glucosidase 처리로는 수국잎 자체 효소로 생합성 가능한 phyllodulcin 양의 약 60%에 해당하는  $12.58 \pm 0.18$  mg/g 수준으로만 생합성 가능한 것이 확인됨.

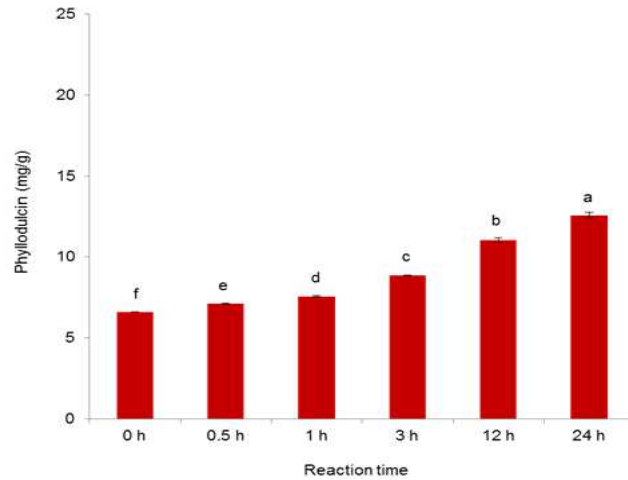


Fig. 12 Phyllodulcin contents in methanol extracts of blanching and lyophilized hydrangea leaves with  $\beta$ -glucosidase treatment at 37°C for 24 h.

(4) 수국잎 추출물로부터 phyllodulcin glucoside 동정

동결건조 수국잎의 물, 메탄올 및 에탄올 추출액에 대해 LC-MS분석을 통하여 분자량 및 fragmentation pattern을 바탕으로 메탄올 및 에탄올 추출물 중 phyllodulcin의 전구체인 phyllodulcin glucoside의 존재를 확인하였음(Fig. 13). Fig. 14는 냉동수국잎을 물과 함께 분쇄하여 70% ethanol로 추출하여 HPLC로 분석한 크로마토그램임. 분쇄 후 바로 추출한 추출액의 크로마토그램과 12시간동안 반응시킨 후 추출한 추출액의 크로마토그램을 비교하면 17분에 나타나는 phyllodulcin peak은 12시간 반응 후 현저히 증가하고, 4분 5초에 나타나는 phyllodulcin 전구체의 peak은 감소하는 것을 볼 수 있음. 따라서, 동정된 phyllodulcin 전구체를 preparative recycling HPLC를 이용하여 회수하여,  $\beta$ -glucosidase 반응을 통해 phyllodulcin을 생합성하는 기술을 확립함.

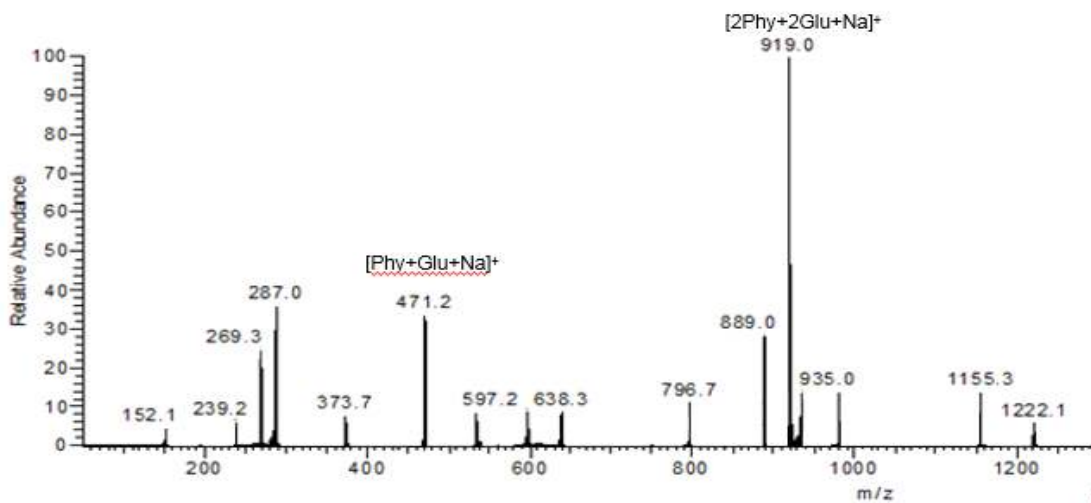


Fig. 13. LC/MS spectra of phyllodulcin glucoside.



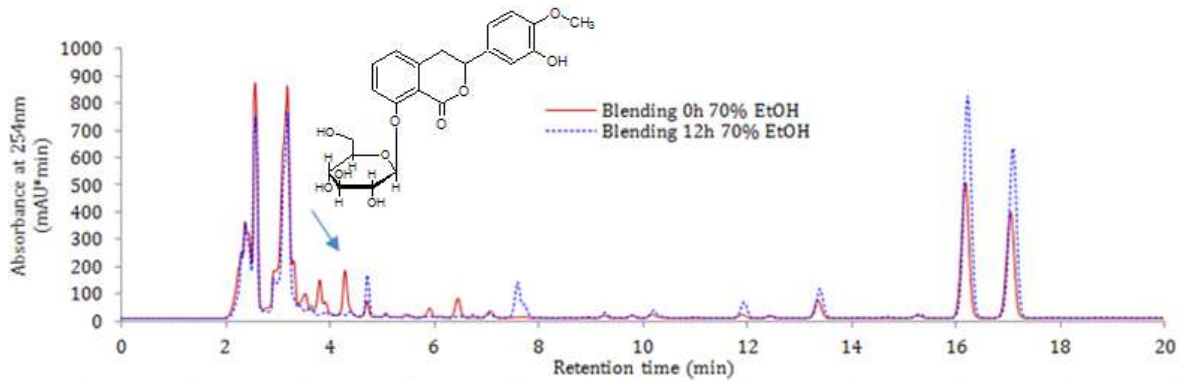


Fig. 14. HPLC chromatograms of extracts of hydrangea leaves blended with water and stood for 0 and 12 h.

## 5. Phyllodulcin 함량 및 추출 효율을 높이기 위한 수국 잎 전처리 공정 개발

### 가. 실험방법

#### (1) 건조 온도 조건이 추출 효율에 미치는 영향

다양한 침지 온도(4, 30, 55°C)에서 동결건조 된 수국 잎 분말 1 g을 증류수 5 mL에 침지 후 15시간 방치함. 이후 두 수준의 건조 온도(25, 70°C)를 설정하여 24-36 시간 동안 건조를 실시 함. 건조된 수국 잎 분말을 ASE 최적 추출 조건인 methanol용매로, 70°C에서 5분간 3회 추출하고, 50 mL 메스플라스크로 정용하여 HPLC 분석을 통해 phyllodulcin 생성량을 평가 함. 이를 통하여 수국 잎 내의 phyllodulcin 전구체로부터 phyllodulcin을 합성하는 효소 반응을 위한 최적의 건조의 온도 조건을 설정하였음.

#### (2) 동결건조 수국 잎으로부터 phyllodulcin 함량 증진을 위한 발효 방법 개발

수국 잎에 있는 phyllodulcin 전구체로부터 발효를 통해 phyllodulcin이 생성되는 것을 확인하기 위한 실험의 계획은 Fig. 1과 같음. 해동된 수국 잎을 끓는 물에 10분간 데쳐 수국 잎을 살균 함. 이를 동결 건조 후, 블렌더를 이용하여 분쇄하고 100 mesh 체로 쳐 균질화 함. 살균한 수국 잎 분말 및 동결 건조 수국 잎 분말을 각각 1.5 g씩 칭량하여 삼각플라스크에 넣은 뒤, 30 mL MRS broth 및 전 배양과 본 배양 공정을 거친 *Lactobacillus paracasei*( $3.83 \times 10^9$  cfu/mL)를 접종 한 후 배양기(Jeiotech, Korea)에서 37°C, 140 rpm으로 각각 0, 1, 3, 12 및 24 시간동안 발효를 진행 함. 발효 후 10분 간 끓여 발효를 종료함. 이렇게 준비된 각 시료는 동결건조 후 분쇄 및 100 mesh 체로 균질화 함. 이렇게 얻은 각 분말 1 g을 ASE를 사용하여 methanol을 용매로 70°C에서 5분간 3 cycles로 추출하고, 50 mL 메스플라스크로 정용함. 이 후 HPLC system을 이용하여 각 추출액의 phyllodulcin 함량을 측정함.

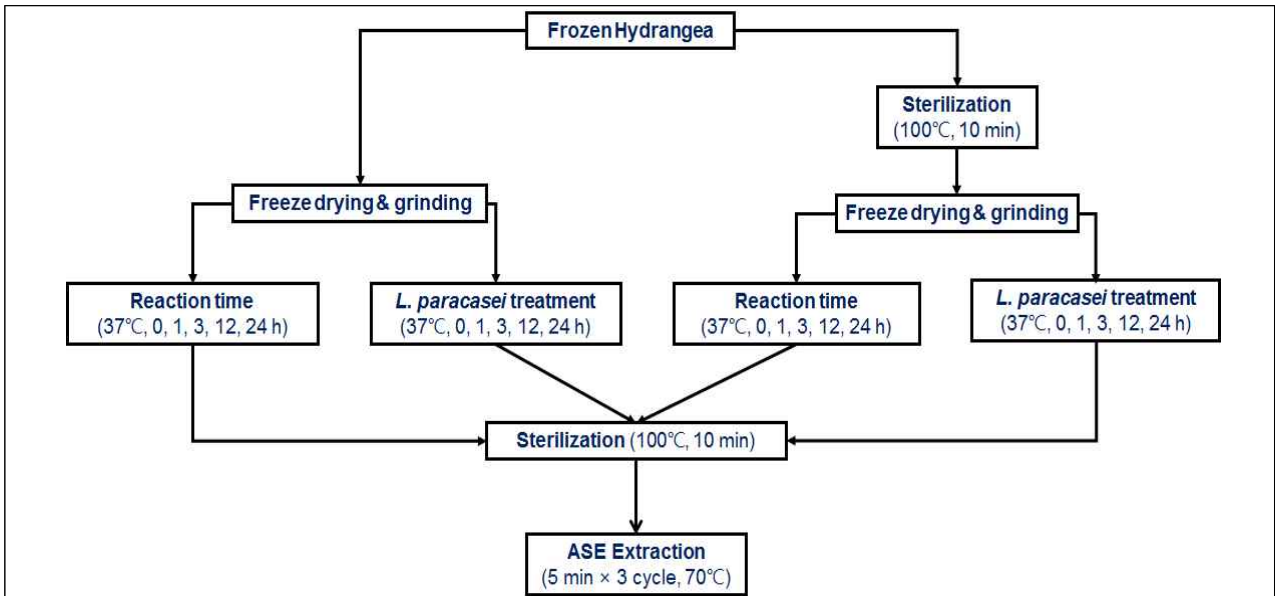


Fig. 1. Fermentation process using lactic acid bacteria for producing phyllodulcin.

(3) 수국 잎 추출액을 이용한 발효법의 개발

Phyllodulcin 전구체로부터 효소적인 반응에 의해 phyllodulcin의 생성을 확인하기 위한 실험의 계획은 Fig. 2와 같음. 1차년도에 시도하였던 식물체 유래인 almond  $\beta$ -glucosidase 처리에 의해 생성된 phyllodulcin의 양은 수국 잎 자체 효소로 생합성 가능한 양의 약 60% 수준에 그쳐, 미생물 유래의 다양한  $\beta$ -glucosidase를 처리하여 phyllodulcin의 생성을 확인함. 또한, 효소 불활성화를 거치지 않은 동결건조 수국 잎을 물과 함께 방치하여 효소 반응을 유도하여 phyllodulcin이 생성됨을 확인함.

- 동결건조 수국 잎으로부터 phyllodulcin 효소적 생합성

동결 건조된 수국 잎 분말 1.5 g 에 30 mL의 물을 첨가하여 상온에서 각각 0, 0.5, 1, 3, 12 및 24시간 방치하여 수국 잎에 내재하는 효소의 반응을 유도하고, 반응 후 10분간 끓여 효소를 불활성화함.

- 효소 불활성화 수국 잎의 제조

해동된 수국 잎을 끓는 물에서 10분간 데쳐 수국 잎에 내재하는 효소를 불활성화 함. 이를 동결건조 후 분쇄하여 100 mesh sieve를 이용하여 균질화 함. 이 시료 1.5 g에 30 mL의 buffer를 가하여 상온에서 각각 0, 0.5, 1, 3, 12 및 24시간 방치한 후 10분간 끓임.

- $\beta$ -Glucosidase를 이용하여 효소 불활성화 수국 잎으로부터 phyllodulcin 생합성

위에서 제조된 효소 불활성화 수국잎 1 g에 25 mL의 buffer와 almond 유래의  $\beta$ -glucosidase(Sigma-Aldrich Chemical Co., U.S.A.) 20 unit 또는 *Aspergillus niger*, *Agrobacterium sp.*, *Phanerochaete chrysosporium*, *Theromotoga maritima*(Megazyme, USA)와 같은 다양한 미생물 유래의  $\beta$ -glucosidase 10 unit 을 첨가한 뒤 37°C에서 각각 0, 0.5, 1, 3, 12, 24시간 방치시킴. 반응 후 10분간 끓여 효소를 불활성화하고 사용하여 70%

ethanol을 용매로 ultrasonic extraction을 실시 함. HPLC system을 이용하여 각 추출액 내의 phyllodulcin 함량을 측정함.

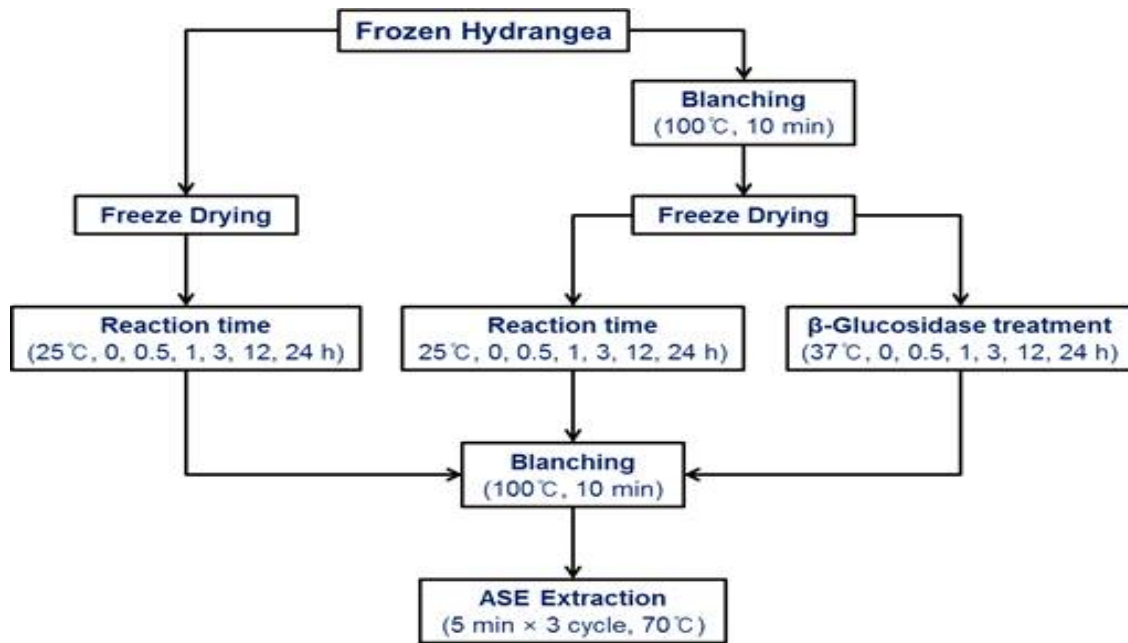


Fig. 2. Experimental design for phyllodulcin biosynthesis from phyllodulcin glucoside via  $\beta$ - glucosidase reaction.

#### 나. 실험결과

(1) 건조 온도 조건이 추출 효율에 미치는 영향 파악

동결건조분말의 phyllodulcin 함량은 2 mg/g으로 물 침지 및 건조한 시료들보다 현저히 낮은 phyllodulcin 함량을 나타냄. 4°C에서 침지한 동결건조 분말의 경우는 30 및 55°C에서 침지한 것보다 phyllodulcin 함량이 유의적으로 낮은 것으로 나타남( $p < 0.05$ ). 4°C 침지의 경우 높은 건조 온도에서 phyllodulcin 생성이 유의적으로 증가하였으나( $p < 0.05$ ) 다른 침지 온도에서는 건조온도에 따른 효과는 나타나지 않았음. 그러나, phyllodulcin 생성 증진 및 건조 시간을 고려하여, 침지온도 30°C 및 건조온도 70°C로 전체 공정 확립함.

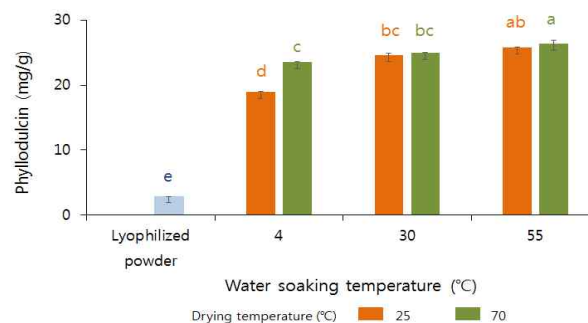


Fig. 3. Effect of soaking and drying temperature on phyllodulcin biosynthesis from hydrangea powder.

(2) 동결건조 수국 잎으로부터 phyllostulcin 함량 증진을 위한 발효 방법 개발

살균공정을 거치지 않은 건조된 수국 잎 추출액의 phyllostulcin 함량은 유산균 발효 및 발효하지 않은 군 모두 24시간까지 지속적으로 증가하였음( $p < 0.05$ ). 24시간의 유산균 발효 및 비발효시 각각  $21.65 \pm 0.20$  mg/g 및  $20.74 \pm 0.15$  mg/g의 phyllostulcin 함량이 나타남 (Fig.4).

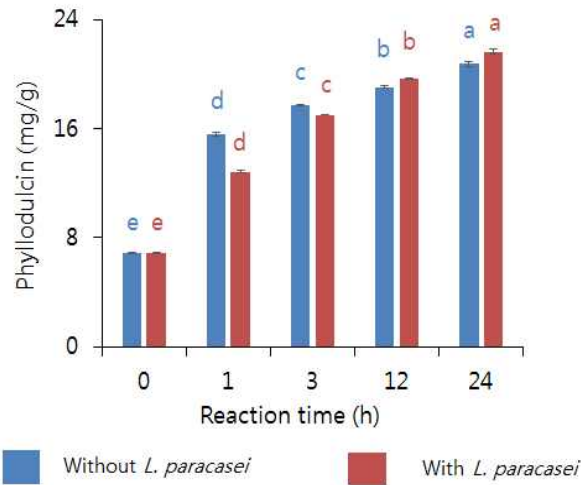


Fig. 4. Phyllostulcin content in the non-sterilized hydrangea leaf extracts fermented with or without *Lactobacillus paracasei*.

살균공정을 거친 건조된 수국 잎 속 phyllostulcin 함량은 유산균 발효 및 발효하지 않은 군 모두 시간에 따라 유의적인 차이가 없음( $p < 0.05$ , Fig. 5). 살균 공정을 거친 수국 잎에서 *Lactobacillus paracasei*를 통한 유산균 발효는 phyllostulcin 함량 증진에 긍정적인 영향을 주지 못함을 확인 함.

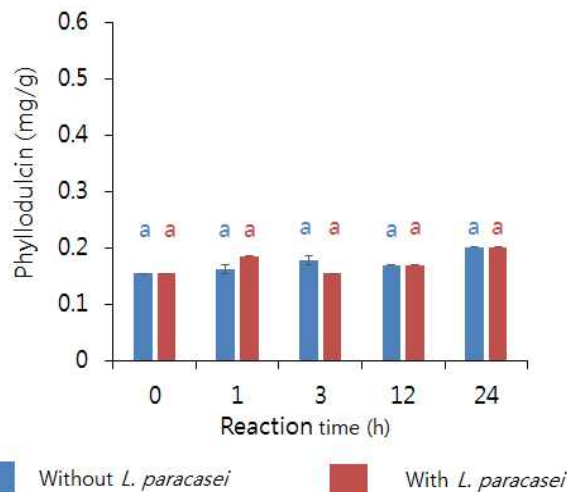


Fig. 5. Phyllostulcin content in the sterilized hydrangea leaf extracts fermented with or without *Lactobacillus paracasei* with sterilization.

(3) 수국 잎 추출액을 이용한 발효법의 개발

열처리를 통하여 내재 효소를 불활성화한 수국 잎 반응액에 다양한 미생물 및 식물체(almond) 유래의  $\beta$ -glucosidase를 첨가시킨 경우, 효소 반응에 의해 수국 잎 반응액 내의 phyllodulcin의 함량이 반응시간에 따라 점차 증가하는 경향을 보임( $p < 0.05$ ; Table 1). 특히 *Phanerochaete cryso sporium* 및 *Thermotoga maritima* 유래의  $\beta$ -glucosidase는 반응 3시간 이내에 phyllodulcin 전구체로부터 phyllodulcin의 최대량을 생성함. 미생물 유래의  $\beta$ -glucosidase는 24 시간 반응 시, 수국 잎에 내재하는 효소에 의해 생합성 가능한 phyllodulcin 양과 유사한 양의 phyllodulcin을 생성하는 반면 almond 유래의  $\beta$ -glucosidase는 수국 잎 자체 효소로 생합성 가능한 phyllodulcin 양의 약 21%에 해당하는  $5.18 \pm 0.03$  mg/g의 phyllodulcin만을 합성함. 이는 almond 유래의  $\beta$ -glucosidase의 기질 특이적 반응으로 인해 수국 잎 내의 phyllodulcin 전구체에 잘 작용하지 못하는 것으로 사료됨.

Table. 1. Amount of phyllodulcin biosynthesized with  $\beta$ -glucosidase from various source

Time (h)	Phyllodulcin (mg/g db)						
	Blanched powder	Lyophilized powder	<i>Aspergillus niger</i>	<i>Agrobacterim Sp.</i>	<i>Phanerochaete cryso sporium</i>	<i>Thermotoga maritima</i>	Almond
0	3.01±0.01	3.71±0.41	2.51±0.36	3.00±0.16	1.83±1.13	1.09±1.64	0.08±0.00
1	2.47±0.00	2.10±0.11	16.10±0.59	13.77±0.48	22.72±1.36	8.92±0.65	1.46±0.00
3	2.72±0.01	10.18±2.70	20.18±2.70	21.94±0.89	26.01±0.17	24.75±0.18	1.90±0.00
9	2.56±0.01	24.69±1.61	23.71±0.61	21.33±0.71	24.96±1.03	25.47±0.05	3.79±0.00
24	1.74±0.04	26.73±0.36	24.41±0.01	22.85±0.36	24.58±0.37	25.74±0.10	5.18±0.00

6. Phyllodulcin 대량 생산을 위한 공정 최적화

가. 실험방법

(1) 동결 건조된 수국 잎 분말로부터 phyllodulcin 생성 및 추출 scale-up 공정 확립

동결 건조된 수국 잎 분말 100g (생물기준 약 1 kg)을 500 mL 증류수(30°C)에 침지 후 15 시간 방치. 이 후 ethanol 1500 mL을 첨가하여 ultrasonic extraction을 실시함. Phyllodulcin 추출 효율을 시간별로(30, 60, 90 min) 조사하기 위하여 시간별로 추출한 추출액을 0.45  $\mu$ m syringe filter를 사용하여 여과 후, 이를 HPLC system (Ultimate-3000, Dionex Co., USA)을 이용하여 분석함.

(2) 다양한 색소체 제거 방법에 의한 phyllodulcin 회수율 평가

• Ion exchange resin

Amberlite<sup>®</sup> 200C Na<sup>+</sup>(양이온, Dow, USA), Amberlite<sup>®</sup> IRA-67(음이온, Dow, USA)을 각각 3 mL 씩 메스실린더로 측정하고 1:1로 비율로 교반 후, 20 × 45 mm의 open column에 충전 후 packing하고 column의 용매를 ethanol로 교환함. Ultrasonic extraction 추출액 5 mL을 45  $\mu$ m syringe filter(Pall, USA)를 사용하여 여과 한 뒤 resin이 충전 되어 있는 open column에 space velocity 1.5로 loading 함. 추출액 loading이 끝나고 나서 ethanol 10 mL로 washing하여 이온교환수지 내에 잔존하는 phyllodulcin을 회수 함. 이를 HPLC system을 이용하여 이온교환수지 통과 전, 후의 phyllodulcin 함량을 분석함.

- Sunfire C<sub>18</sub> prep column

Recycling preparative HPLC(LC-9104, Jai, Japan)에 Sunfire C<sub>18</sub> OBD prep column(20 × 300 mm, Waters, USA)을 연결하여 정제 효율을 평가함. 수국 잎 추출액을 45 μm syringe filter를 사용하여 여과하여 5 mL주입하여 정제하였으며, 이동상은 70% ethanol을 5.0 mL/min 속도로 사용하여 phylloidalin peak를 분획함. Column을 통해 분획한 시료를 HPLC로 분석하여 phylloidalin 회수율 및 불순물 제거 능력을 평가함.

- Sep-pak cartridge

100% ethanol 5 mL을 Sep-pak cartridge(35 cc, 10 g, Waters, USA)에 흘려 활성 시킨 후, 수국 잎 100% ethanol 추출액을 45 μm syringe filter를 사용하여 여과하여 5 mL을 cartridge에 부하함. 100% ethanol 50 mL을 cartridge에 흘려 잔류하는 phylloidalin을 회수함. 통과하기 전, 후의 phylloidalin 함량을 HPLC system을 이용하여 측정하여 phylloidalin 회수율 및 불순물 제거 능력을 평가 함.

- HLB cartridge

100% ethanol 10 mL을 흘려 활성화한 HLB cartridge(20 cc, 1 g, Waters, USA)에 45 μm syringe filter를 사용하여 여과한 수국 잎 추출액 5 mL을 cartridge에 loading함. 100% ethanol 20 mL을 통과시켜 cartridge 내에 잔류하는 phylloidalin을 회수함. HLB cartridge 통과하기 전, 후의 phylloidalin 함량을 HPLC system을 이용하여 분석하여 회수율 및 불순물 제거능력을 평가함.

### (3) Scale-up 이온교환수지 공정

Amberlite<sup>®</sup> 200C Na<sup>+</sup>(양이온), Amberlite<sup>®</sup> IRA-67(음이온)을 각각 500 mL 씩 메스실린더로 측량한 뒤, 교반하고, 55 × 700 mm의 open column에 충전하여 column 내의 용매를 ethanol로 교환함. Ultrasonic extraction scale-up 추출을 통해 얻은 추출액 1,860 mL을 1.5 space velocity의 유속으로 loading함. Ethanol 3,000 mL를 이용하여 column 내에 잔류하는 phylloidalin을 회수 함. HPLC system을 이용하여 이온교환수지 통과 전, 후의 phylloidalin 함량을 비교 분석하여 회수율을 평가함.

### (4) 용매의 회수 및 재사용을 위한 공정 개발

이온교환수지 및 HLB cartridge에 사용하는 ethanol을 40°C, 120 rpm 조건으로 Rotary vacuum evaporator(Eyela, USA)를 이용하여 농축함. 이렇게 농축한 용매를 HPLC system으로 분석하여 phylloidalin의 잔류 확인 및 용매 회수율을 평가함.

(5) Preparative recycling HPLC 이용한 phylloidalin 고순도 정제

고순도의 phylloidalin을 얻기 위하여 scale-up 공정을 거친 시료를 20  $\mu$ m syringe filter로 여과 후, recycling preparative HPLC(LC-9104, Jai, Japan) 및 JAIGEL-ODS-AP preparative column (20  $\times$  500 mm, Jai, Japan) 두 개를 연결하여 정제함. 이동상은 50% acetonitrile을 6.0 mL/min 유속으로 하여 사용하였고 265 nm에서 검출하였음. 고순도 정제를 위해 91분부터 180분까지 1회 recycle하여 phylloidalin peak을 분획 후, HPLC system을 이용하여 phylloidalin standard와 비교 후 동정하였음.

나. 실험결과

(1) 동결 건조 수국 잎 분말로부터 phylloidalin의 scale-up 추출

수국 잎 분말 100 g을 ultrasonic extraction을 이용하여 추출한 추출액의 phylloidalin 함량은 Fig.5에 나타내었음. 추출시간에 따라서 phylloidalin 함량에는 유의적인 차이가 나타나지 않음( $p < 0.05$ ). 추출액의 phylloidalin 함량은 약 25 mg으로 수국 잎 분말 1 g을 accelerated solvent extraction(ASE)의 최적 추출 조건인 70 $^{\circ}$ C, 5 min  $\times$  3 cycles을 이용하여 추출한 추출액의 phylloidalin의 함량과 유의적인 차이가 나타나지 않았음. 또한 30분이라는 짧은 시간 내에 추출이 완료되어 ASE에 비하여 추출 시간 단축이 가능하여 효율적인 대량 생산 방법으로 사료됨.

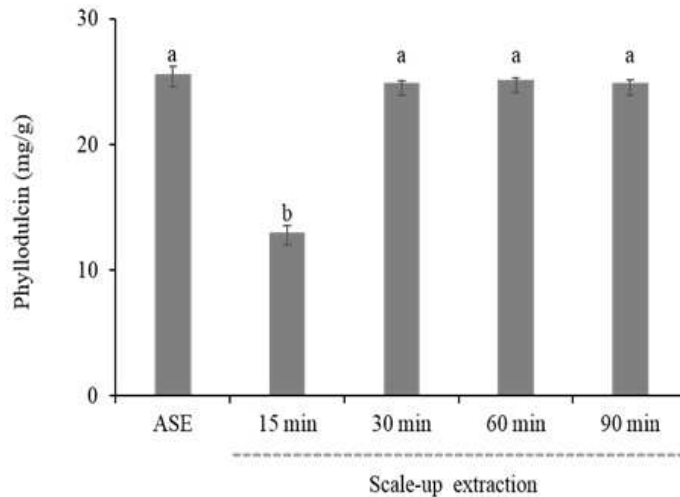







Fig. 6. Extraction yield of phylloidalin contents in the scale-up process at different times. ASE, accelerated solvent extraction.

(2) 다양한 색소체 제거 방법의 효율 및 phylloidalin 회수율 평가

다양한 색소체 제거 방법의 효율 및 phylloidalin 회수율 분석 결과는 Table 2 와 같음. 색소체 제거 방법에 따른 phylloidalin 회수율은 Sunfire C<sub>18</sub> prep column 및 다른 세 방법 간에 유의적인 차이가 나타남( $p < 0.05$ ). HLB cartridge, Sep-pak cartridge 및 ion exchange process 간에는 phylloidalin 회수율에 유의적인 차이가 나타나지 않음. Ion exchange process를 통해서 녹색의 색소체가 많이 제거 되어 황색의 액체를 얻을 수 있었으며 용매의 사용량도 가장 낮음. 한편 HLB cartridge는 용매의 사용량과 phylloidalin 회수율이

비교적 높고, 용매의 재사용이 가능하기 때문에 ion exchange process 및 HLB cartridge 두 가지를 병행하는 것으로 색소체 제거 공정을 확립함.

Table 2. Appearance of hydrangea extracts treated with various methods and phyllodulcin contents after the treatments

Process	ASE	Ion exchange	Sunfire C <sub>18</sub> prep column	Sep-pak cartridge	HLB cartridge
Picture					
Recovery (%)	-	91.03 ± 1.07 <sup>a</sup>	49.42 ± 0.68 <sup>b</sup>	92.20 ± 2.30 <sup>a</sup>	94.02 ± 1.22 <sup>a</sup>

### (3) 이온교환수지 공정 scale-up

이온교환수지 공정의 scale-up은 sample volume을 Table 3과 같이 높이면서 진행하였으며 phyllodulcin 회수율은 평균 90.7%로 공정의 scale-up 과정 중 꾸준히 유지되었음. Scale-up 이온교환수지 통과 전, 후를 HPLC/UV system을 이용하여 분석한 chromatogram은 Fig. 6과 같으며, phyllodulcin과 hydrangeic acid를 제외한 나머지 불순물 peak들이 효과적으로 제거되었음. 회석배수를 고려한 phyllodulcin의 회수율은 2회 반복 평균 93.21%를 나타냄. 이를 통하여 phyllodulcin의 대량 정제 가능성을 확인 함.

Table 3. Phyllodulcin recovery after mixed ion exchange resin processes with different scale

Column size (cm <sup>2</sup> )	Injection (mL)	Resin (mL)	Washing ethanol (mL)	Final volume (mL)	Recovery (%)
2 × 45	60	60	180	255	88.48
5 × 50	300	200	1,000	1,520	88.56
5 × 50	750	400	1,500	2,400	92.58
5.5 × 75	1,860	800	3,000	5,320	93.21



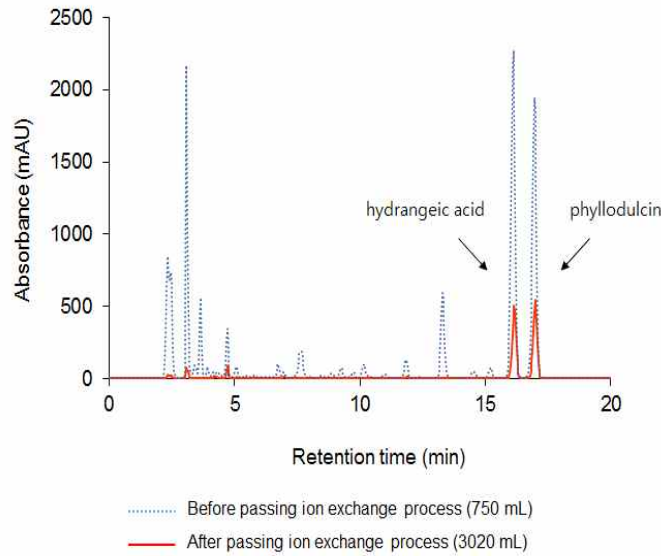


Fig. 7. HPLC chromatograms of hydrangea extracts before and after ion exchange process.

(4) 정제 공정 중 사용한 용매의 회수 및 재사용을 위한 공정 개발

색소체 제거 공정(ion exchange resin 및 HLB cartridge)을 거친 시료를 10 배 농축하여 ethanol 분획을 회수 함. 재사용 가능 여부를 판단하기 위하여 HPLC system으로 분석한 회수 용매의 chromatogram은 Fig.7과 같으며, 매우 소량의 기타 물질만을 포함하는 것을 standard와의 비교하여 확인하였음. 회수된 ethanol을 이온교환수지 및 HLB cartridge에 재사용하는 공정을 포함한 phyllodulcin 정제 최적화 공정은 Fig. 8과 같이 확립되었음. Phyllodulcin의 정제 및 회수율은 재사용한 용매를 사용한 공정에서는 2회 평균 89.75%, 순수한 용매를 사용한 공정에서는 90.35%으로 유의적인 차이를 나타내지 않음 ( $p < 0.05$ ; data not shown).

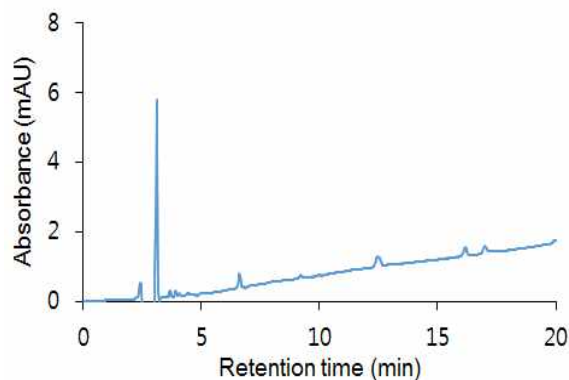


Fig. 8. HPLC chromatogram of recycled ethanol.

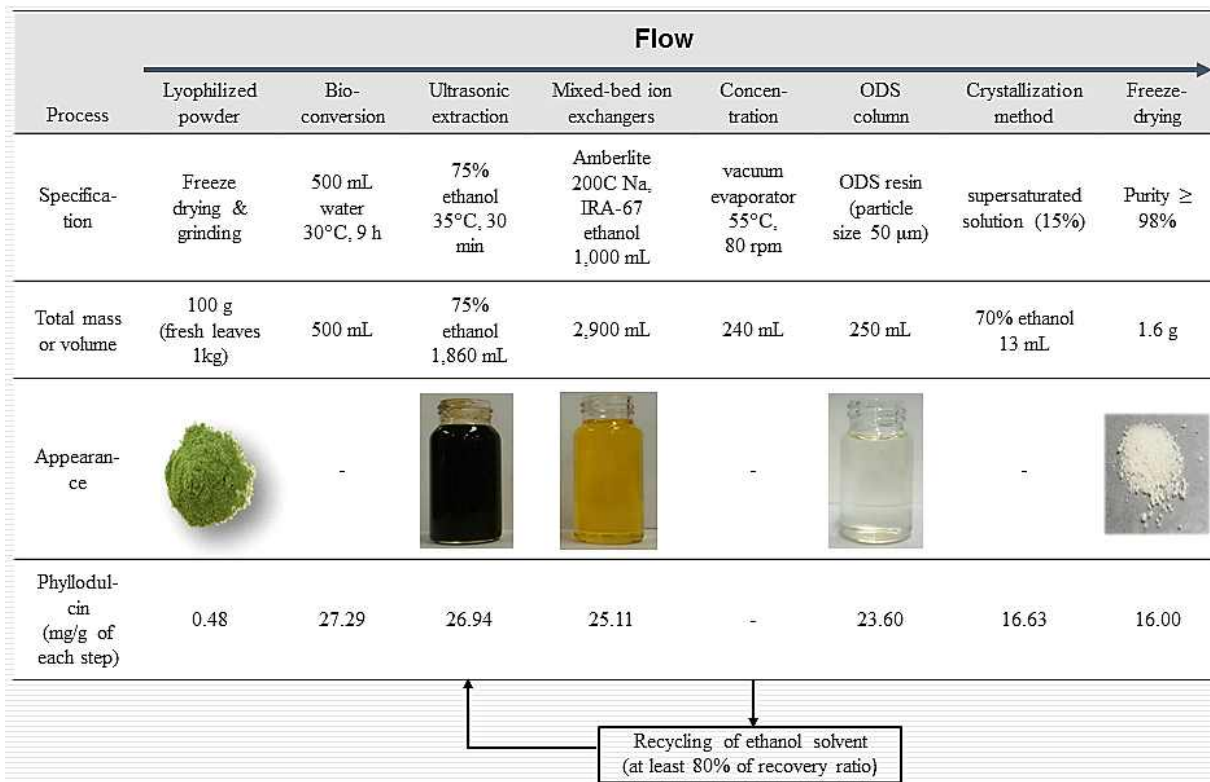


Fig. 9. Process of high purity phyllodulcin production

(5) Preparative recycling HPLC 이용한 phyllodulcin 고순도 정제

고순도의 phyllodulcin을 얻기 위해서 preparative recycling HPLC(LC-9104, Jai, Japan)을 이용하여 아래와 같은 chromatogram을 얻었으며, 이를 HPLC/UV system을 이용해 phyllodulcin standard와 비교하여 phyllodulcin을 확인함. Preparative recycling HPLC chromatogram(Fig. 9)의 110분부터 나오는 peak가 phyllodulcin으로 확인되어, 이를 분획, 농축 및 동결 건조하여 미황색의 phyllodulcin 분말을 얻었으며 순도는 3회 반복 평균 99% 이상으로 확인됨(Fig 10).

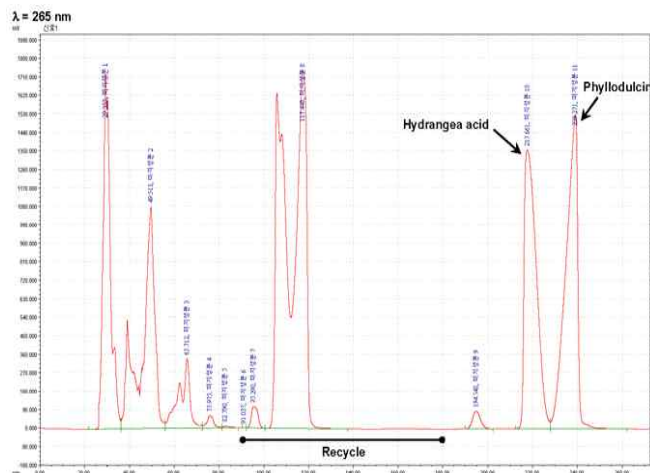


Fig. 10. Preparative recycling HPLC chromatogram for phyllodulcin purification.

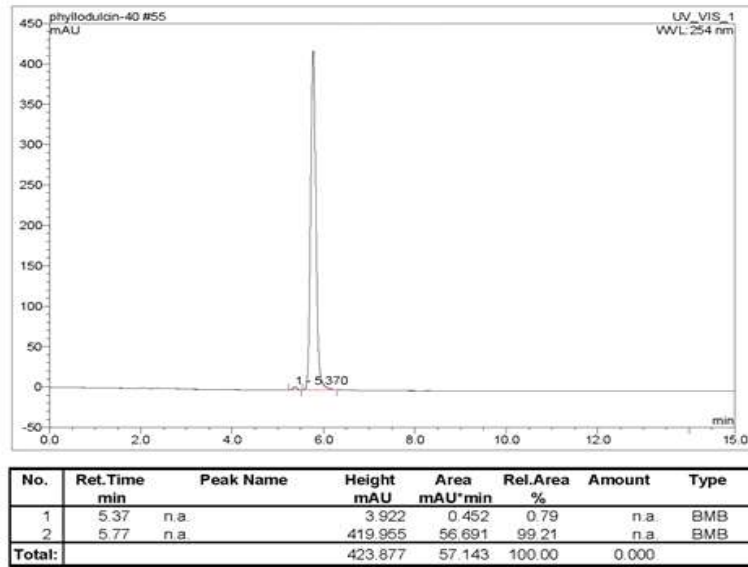


Fig. 11. HPLC chromatogram of purified phyllodulcin (purity = 99.21%)

## 7. 효율적인 필로둘신 정제 방법 개발

### 가. 실험방법

#### (1) Multiple preparative HPLC 정제

고순도의 phyllodulcin을 얻기 위하여 ODS 컬럼 정제를 거친 시료를 22  $\mu\text{m}$  syringe filter로 여과 후, Multiple preparative HPLC (LC-Forte, YMC Inc., Japan) 및 YMC-Actus C<sub>18</sub> column (20  $\times$  500 mm, YMC Inc., Japan)를 연결하여 정제함. 이동상은 47% acetonitrile을 gradient모드로 하여 15분 이후 80% acetonitrile이 되도록 함. 유속은 18.9 mL/min으로 하여 사용하였고 254 nm에서 검출하였음. 고순도 phyllodulcin peak를 20분 안에 분획 후, HPLC system을 이용하여 phyllodulcin standard와 비교 후 동정하였음.

#### (2) 결정화 정제

(가) ODS 정제 후 얻은 250 mL를 55°C에서 진공농축한 후 탈색시료에 포함된 필로둘신 150 mg 당 60%~100% 에탄올 1 mL의 비율로 첨가하여 가온(90°C)하면서 녹임.

(나) (가)의 시료의 필로둘신 농도에 0.1% 해당하는 만큼 미세분말 필로둘신을 첨가하여 결정화를 유도한 후, 50°C에서 1시간 이상 방치.

(다) (나)의 샘플을 상온에서 24시간 이상 방치시켜 결정화를 유도.

(라) (다)의 시료를 4000rpm에서 5분 간 원심분리하여 상등액을 제거한 후 결정을 얻음.

(마) (가)에서 첨가한 부피의 25%에 해당하는 35% 에탄올을 (다)의 결정에 첨가하여 격렬하게 흔들어 잘 혼합한 후 4)의 방법과 동일하게 원심분리하여 상등액을 제거하고 침전을 얻음.

(바) (마)의 과정을 2회 반복함.

(사) (바)의 결정을 동결건조한 후 분말화하여 1차 정제시료로 함.

(아) HPLC로 1차 정제시료를 분석하여 필로둘신의 총량을 계산함.

(자) 1차 정제시료에 포함된 필로둘신 150 mg 당 60%~100% 에탄올 1 mL을 첨가하여 가온(55~100℃)하면서 녹임.

(차) (나)~(자)의 과정과 동일하게 반복하여 2차, 3차 정제시료를 만듦

## 나. 실험결과

### (1) Multiple preparative HPLC를 이용한 고순도 정제

고순도의 phyllodulcin을 얻기 위해서 multiple preparative HPLC (LC-Forte, YMC Inc., Japan)을 이용하여 아래와 같은 chromatogram을 얻었으며, 이를 HPLC/UV system을 이용해 phyllodulcin standard와 비교하여 phyllodulcin을 확인함. Preparative HPLC chromatogram (Fig. 1)의 20분부터 나오는 peak가 phyllodulcin으로 확인되어, 이를 분획, 농축 및 동결 건조하여 미황색의 phyllodulcin 분말을 얻었으며 순도는 3회 반복 평균 99% 이상으로 확인됨.

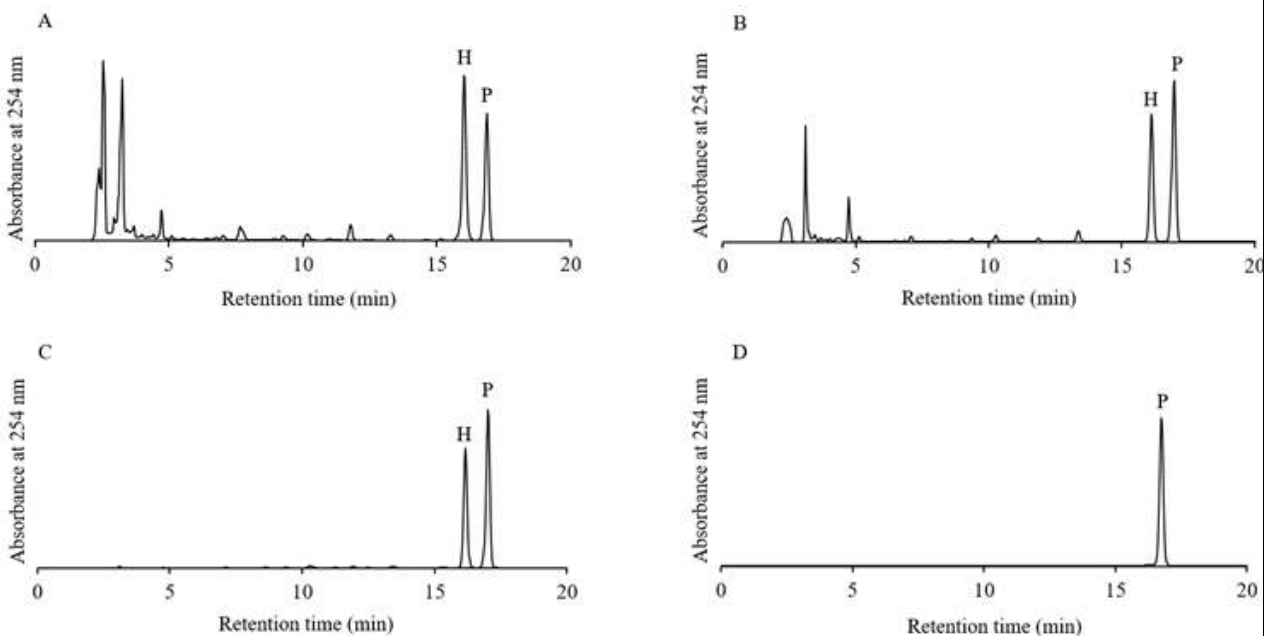


Figure 1. Analytical HPLC chromatogram of 75% ethanol extract of hydrangea leaves (A), effluent from mixed bed ion exchangers (B), effluent from ODS column (C), purified phyllodulcin by preparative HPLC (D).

Peak H, Hydrangenol; peak P, Phyllodulcin

(2) 결정화 방법을 이용하여 고순도 정제

Table 1.을 통해 에탄올 농도에 따른 필로둘신의 회수율과 순도를 확인할 수 있음. 모든 실험은 두 번 반복을 실시함. 60% 에탄올로 재결정화 한 것을 제외한 나머지 에탄올 농도에서는 모두 순도가 95% 이상을 나타냄. 그 중에서 70% 에탄올로 재결정화 할 때 67.5 ± 3.7%로 가장 높은 회수율을 보임. 따라서 70% 에탄올로 재결정화 하는 것이 가장 효율적임.

Table 1. Phyllodulcin recovery ratio after crystallization method

Ethanol	After passing ODS column	Crystallization method			Recovery
		1 <sup>st</sup>	2 <sup>nd</sup>	3 <sup>rd</sup>	
		(%)			
60		78.9 ± 2.1	80.1 ± 1.7	81.2 ± 1.0	57.5 ± 0.4
70		83.9 ± 0.9	95.5 ± 1.1	96.2 ± 0.4	67.5 ± 3.7
80	57.8 ± 0.4	86.0 ± 0.3	95.6 ± 1.3	96.5 ± 0.7	51.0 ± 3.1
90		86.5 ± 0.8	94.0 ± 0.6	96.3 ± 0.3	58.3 ± 2.7
100		81.4 ± 1.7	96.9 ± 1.3	97.3 ± 0.1	48.5 ± 3.3

(3) 두 정제의 비교

Preparative HPLC를 이용한 필로둘신 정제는 한 번에 인젝션 할 수 있는 샘플의 양이 5 mL임. ODS 컬럼 정제 후 얻은 250 mL을 모두 처리하기 위해서는 총 50 번 인젝션을 해야하고, 이 때 소요되는 용매 사용량은 38 L임. 하지만 재결정화 방법을 이용한다면 한 번에 모든 샘플을 처리할 수 있고, 용매 사용량도 20 mL로 1,900배 절약할 수 있다. 또한, figure 2.를 보면 preparative HPLC을 이용한 정제한 필로둘신은 아직 색소를 포함하고 있는 것을 확인할 수 있고, 결정화 방법으로 정제한 필로둘신은 색소체가 완벽하게 제거되어 하얀색 큰 분말 형태라는 것을 확인 할 수 있음. 결정화 방법으로 필로둘신을 고순도로 정제하게 되면 회수율이 67.5%로 낮은 편이지만, 용매 사용량을 최소화할 수 있을 뿐만 아니라 회수되지 않은 필로둘신 용액을 다시 결정화할 때 사용할 수 있는 장점이 있음. 이를 통해 경제적이고 친환경적인 결정화 방법으로 필로둘신을 고순도로 정제함.

Table 2. Purification loads of preparative HPLC and crystallization processes

1 kg batch basis	Final purification step	
	Preparative HPLC	Crystallization
Sample volume to be handled	5 mL x 50 times	250 mL
Operation solvent volume	760 mL x 50 times	20 mL

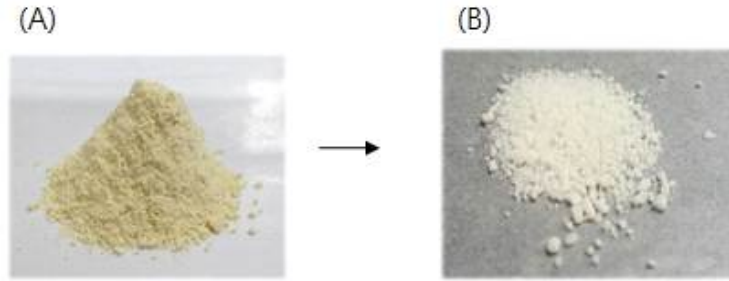


Figure 2. Images of purified phyllodulcin; preparative HPLC (A) and crystallization (B) processes.

### 8. 베타싸이클로덱스트린-필로둘신 복합체 형성을 통한 품질 향상

목적: 베타싸이클로덱스트린과 복합체를 형성하여 필로둘신의 용해도 및 항산화능을 향상시킴. 이를 통해 식품 산업에서의 필로둘신의 활용성을 높임.

#### 가. 실험방법

베타싸이클로덱스트린과 필로둘신의 복합체를 형성한 것을 다양한 기계적인 방법을 통해 확인하고, 이 복합체에 대한 특성을 평가함. 실험계획은 Figure 1.과 같음.

### Experimental design of inclusion complex of phyllodulcin with $\beta$ -CD

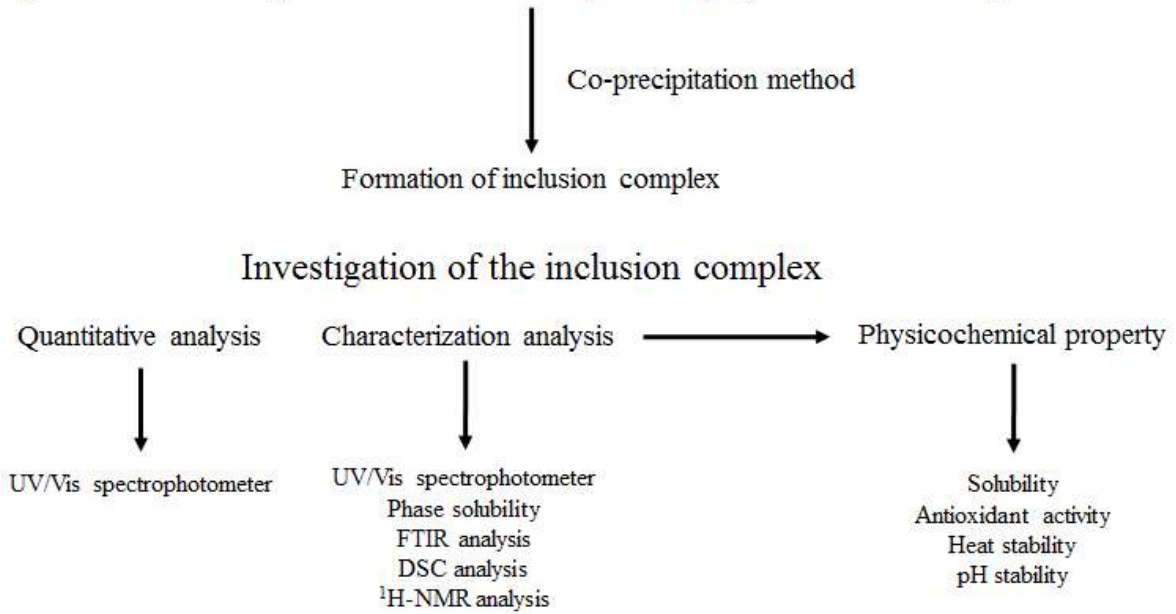


Figure 1. Flow diagram for formation of inclusion complex of phyllodulcin with  $\beta$ -CD and analysis of the physicochemical property.

(1) 베타싸이클로 텍스트린 필로둘신 복합체 형성

복합체 준비는 Co-precipitation 방법으로 준비함 [17-20]. 2 mM 베타싸이클로텍스트린 (Sigma Aldrich Co., USA) 10 mL을 증류수에 용해하여 준비한 후에, 70% 에탄올에 용해된 2 mM 정제된 필로둘신 용액을 5분 안에 천천히 첨가 함. 필로둘신 용액을 모두 첨가한 뒤에, sonication bath에서 40분 동안 초음파 처리 함. 그리고 24시간 동안 상온에서 120 rpm으로 교반한 뒤에, 0.45  $\mu\text{m}$ 의 필터를 통과시키고 감압 건조하여 베타싸이클로 텍스트린과 필로둘신의 복합체를 얻음.

(2) 베타싸이클로 텍스트린과 필로둘신의 physical mixture 제조

2 mM 베타싸이클로텍스트린(Sigma Aldrich Co., USA)과 2 mM 정제된 필로둘신을 정확하게 칭량한 뒤에 막자사발에 넣고 잘 혼합이 되도록 섞어 줌. 이후 100 mesh로 균질화하여 샘플을 제조 함.

(3) 복합체의 정량분석

필로둘신과 베타싸이클로 텍스트린의 복합체를 0.1% 필로둘신 stock solution에 해당하는 양만큼 준비함. 베타싸이클로 텍스트린과 필로둘신은 몰 비율로 4:1 임을 고려하여 필로둘신 샘플을 준비 함. 이 샘플을 농도별로 희석시켜 spectrometer를 이용하여 UV 254 nm에서 복합체의 standard curve를 만들어 정량 분석함. 이 때, 베타싸이클로 텍스트린은 254 nm에서 어떠한 흡광도 값을 나타내지 않아, 필로둘신 정량 분석에 영향을 주지 않음.

(4) 기계적 방법과 다양한 분석 방법을 통한 복합체 형성을 증명

(가) UV absorption studies

다양한 베타싸이클로 텍스트린 농도 (0, 1, 2, 3, 4 and 5 mM)에서 2 mM의 필로둘신을 각각 co-precipitation 방법을 통해 복합체를 형성 함. 이 후 베타싸이클로 텍스트린, 필로둘신 그리고 그들의 복합체 샘플을 증류수에 용해한 후에 UV/vis spectrophotometer (Du 730, USA)를 이용하여 UV 파장 200-400 nm에서 스펙트럼을 확인 함.

(나) Phase solubility studies

필로둘신의 용해도를 초과하여 증류수에 용해한 후에, 다양한 베타싸이클로 텍스트린 농도 (0, 1, 2, 3, 4 and 5 mM)를 첨가하여 co-precipitation 방법을 통해 복합체를 형성 함. 이 후, UV/vis spectrophotometer (Du 730, USA)를 이용하여 UV 254 nm에서 복합체에 포함된 필로둘신의 양을 정량분석 함.

(다) FT-IR

베타싸이클로 텍스트린, 필로둘신, physical mixture (1:1 molar ratio), 베타싸이클로텍스트린과 필로둘신의 복합체 샘플을 준비한 뒤에, Nicolet FT-IR spectrometer (Nicolet, USA)의 potassium bromide disk 방법을 통해 분석을 실시함. 스펙트럼은 500-4000  $\text{cm}^{-1}$ 에서 64 스캔을 실시함.

(라) DSC

Netzch DSC-200 F3 thermal analyzer (Netzch Co., Germany)를 이용하여 베타싸이클로덱스트린, 필로둘신, physical mixture (1:1 molar ratio), 베타싸이클로덱스트린과 필로둘신의 복합체 샘플의 열적 특성 변화를 파악 함. 각 각의 샘플을 3 mg을 정확하게 칭량한 뒤에, 알루미늄 팬을 통해 sealing 함. 이 후, 질소가스를 통해 10°C/min으로 온도를 높여가며 50°C에서 230°C사이의 샘플 특성을 관찰 함.

(마) <sup>1</sup>H-NMR spectroscopy

정제된 필로둘신과 베타싸이클로덱스트린 그리고 그들의 복합체를 다양한 농도로 준비한다. 농도가 달라짐에 따라 베타싸이클로덱스트린과 필로둘신의 결합력이 어떻게 달라지는 파악하기 위해 베타싸이클로덱스트린의 농도와 필로둘신의 농도를 1:1, 2:1, 3:1로 하여 복합체를 형성한 샘플을 준비 함. 각 각의 샘플을 중화된 50% DMSO 용매에 녹인 후, Cryo-NMR (Bruker Co., USA)를 통해 분석을 실시 함. 스탠다드 물질로는 TMS를 사용하여 비교 분석 함.

나. 실험결과

(가) UV absorption studies를 통한 복합체 형성 파악

베타싸이클로덱스트린의 농도 증가에 따른 필로둘신의 UV 파장 변화 값은 Figure 1과 같음. 베타싸이클로덱스트린의 경우 200-400 nm 구간에서 어떠한 피크도 나타나지 않음. 베타싸이클로덱스트린이 존재하지 않고, 물에 용해된 필로둘신은 200-400 nm의 파장에서 254 nm 흡광도 값이 가장 높지만 0.3 이하의 낮은 흡광도 값을 나타남. 반면, 베타싸이클로덱스트린의 농도가 증가할 경우 필로둘신의 용해도를 초과하여 흡광도 값이 커지는 것을 Figure 1.을 통해 알 수 있음. 또한, 복합체를 형성한 샘플에서 최대 흡광도 값이 254 nm에서 257 nm로 변화하는 것으로 보아 베타싸이클로덱스트린과 필로둘신간의 수소 결합이 있음을 추측할 수 있음.

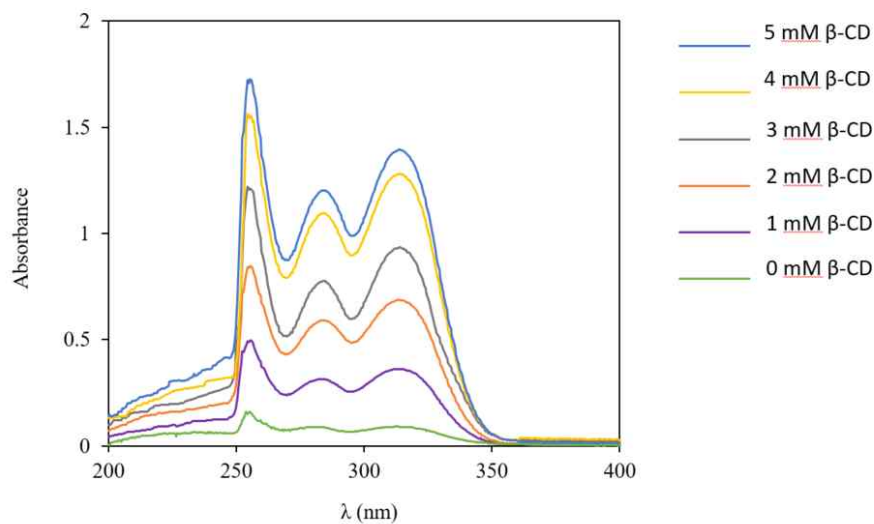


Figure 1. UV absorption spectra of phyllodulcin ( $2.0 \times 10^{-3}$  M) in the presence of increasing concentration of  $\beta$ -CD ( $0.0$ – $5.0 \times 10^{-3}$  M).



(나) Phase solubility studies를 통한 복합체의 안정성 평가

베타싸이클로 텍스트린의 농도 증가에 따른 물에 용해된 필로둘신의 함량 변화는 Figure 2와 같음. 베타싸이클로 텍스트린의 농도가 증가하면 물에 용해되는 필로둘신의 양은 비례적으로 증가하고, 이 때  $R^2$  값은 0.982이다. 베타싸이클로 텍스트린이 존재하지 않을 때, 필로둘신의 용해도는 0.01 mM이며 이를 가지고 복합체의 안정성을 평가하는  $K_c$  값은 다음의 식을 통해 구할 수 있다.

$$K_c = \text{Slope} / S_0(1-\text{Slope})$$

$K_c$  : Stability of constants,  $S_0$  : Solubility of phyllodulcin in water

위의 식을 통해 구한  $K_c$  값은 1767.6으로 다른 플라보노이드-베타씨디 복합체가 500-2000의 값을 나타내는데, 이와 유사한 안정도를 가지는 것을 확인할 수 있다.

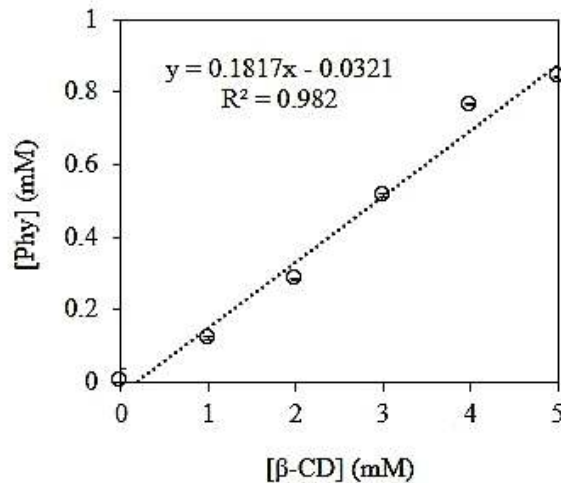


Figure 10. Phase solubility diagram of phyllodulcin ( $2.0 \times 10^{-3}$  M) with  $\beta$ -CD ( $0.0$ - $5.0 \times 10^{-3}$  M) in distilled water.

(다) 베타싸이클로 텍스트린과 필로둘신 복합체의 FT-IR spectrum

베타싸이클로 텍스트린, 필로둘신, physical mixture (1:1 molar)와 베타싸이클로 텍스트린과 필로둘신의 복합체의 FT-IR 스펙트럼은 Figure 3과 같다. Table 1을 통해서도 FT-IR의 peak들을 모두 assignments 했음. 베타싸이클로 텍스트린과 필로둘신의 복합체에서는  $3250\text{cm}^{-1}$ 과  $2927\text{cm}^{-1}$  같이 베타싸이클로 텍스트린에 해당하는 피크들이 각각  $3269\text{cm}^{-1}$ 과  $2,925\text{cm}^{-1}$ 로 변화한 것을 확인할 수 있음. 반면에, 필로둘신의 aromatic peak인  $1516\text{cm}^{-1}$ ,  $1203\text{cm}^{-1}$ ,  $1130\text{cm}^{-1}$  그리고  $1123\text{cm}^{-1}$ 는 베타싸이클로 텍스트린과 필로둘신의 복합체에서 나타나지 않음. 이를 통해서 복합체에서는 필로둘신의 aromatic peak들이 베타싸이클로 텍스트린에 포접되었다고 추측할 수 있음. Physical mixture에서는 필로둘신의 aromatic peak들이 모두 나타났기 때문에 확실한 비교설명이 가능함. 이를 통해 베타싸이클로 텍스트린과 필로둘신의 복합체가 형성되었다는 것을 파악할 수 있음.

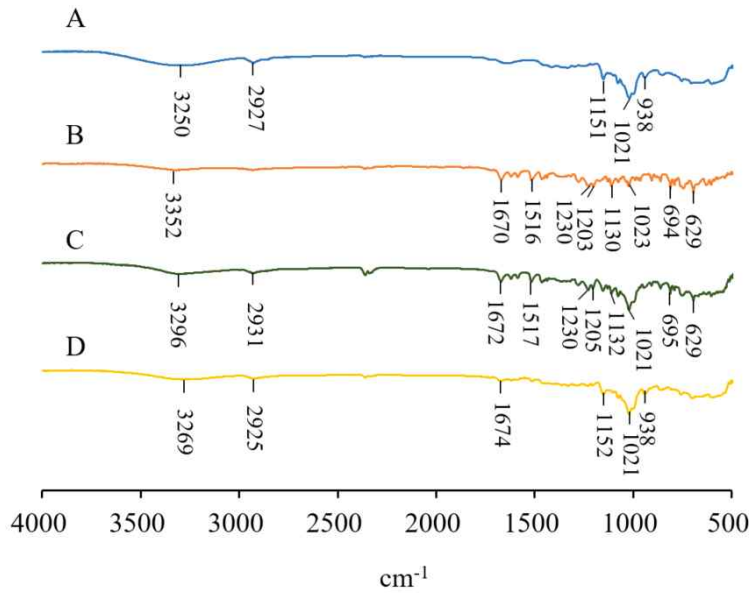


Figure 3. FT-IR spectra of  $\beta$ -CD (A), phyllo dulcin (B), physical mixture (1:1 molar ratio of phyllo dulcin and  $\beta$ -cyclodextrin) (C), their inclusion complex (D).

Table 1. FT-IR peak assignments of  $\beta$ -CD, phyllo dulcin and their inclusion complex

Infra bands ( $\text{cm}^{-1}$ ) and assignments		
$\beta$ -CD	Phyllo dulcin	Inclusion complex
3250: $\nu^*$ (O-H)	3352: $\nu$ (O-H)	3269: $\nu$ (O-H)
2927: $\nu_{\text{sym}}^{**}$ (C-H)	1670: $\nu$ (C=O)	2925: $\nu_{\text{sym}}$ (C-H)
1151: $\nu$ (C-C)	1516: $\nu$ (C=C) from aromatic	2360: $\nu$ (C-O)
1021: $\nu_{\text{sym}}$ (C-O-C)	1230: $\nu$ (C-O)	1674: $\nu$ (C=O)
938: skeletal vibration involving $\alpha$ -1,4 linkage	1203, 1130 and 1123: $\nu_{\text{asym}}^{***}$ (C-O) from aromatic	1152: $\nu$ (C-C)
	694 and 629: Aromatic (C-H) out of plane bend	1021: $\nu_{\text{sym}}$ (C-O-C)
		938: skeletal vibration involving $\alpha$ -1,4 linkage

$\nu^*$ : stretching,  $\text{sym}^{**}$ :symmetric,  $\text{asym}^{***}$ :asymmetric

(라) DSC 분석을 통한 복합체의 열 특성 변화 파악

베타사이클로 덱스트린, 필로둘신, physical mixture (1:1 molar ratio) 그리고 베타사이클로 덱스트린과 필로둘신의 복합체의 thermogram은 Figure 4에 나타남. Table 2을 통해서도 DSC의 endothermic peak에 대해 표시 함. 베타사이클로 덱스트린은 183°C에서 물이 제거됨에 따라 endothermic peak가 나타남 것을 확인 할 수 있음. 필로둘신은 110°C 부근에서 endothermic peak가 나타남. 그리고 physical mixture의 경우는 베타사이클로 덱스트린과 필로둘신의 고유 피크가 모두 나타나는 것을 확인 함. 반면에, 베타사이클로 덱스트린과 필로둘신 복합체의 경우는 필로둘신의 피크는 존재하지 않음. 또한, 약 198°C에서 베타사이클로 덱스트린과 다른 새로운 모양의 피크가 나타남.

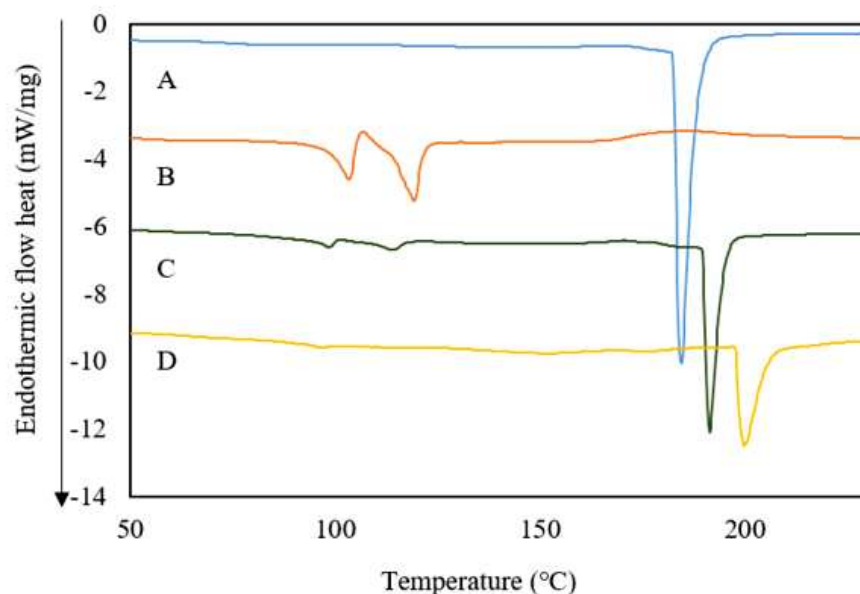


Figure 4. Thermograms of  $\beta$ -CD (A), phyllodulcin (B), physical mixture (1:1 molar ratio of phyllodulcin and  $\beta$ -cyclodextrin) (C), their inclusion complex (D).

Table 2. Thermo behavior of  $\beta$ -CD, phyllodulcin, physical mixture (1:1 molar ratio of phyllodulcin and  $\beta$ -CD) (C), their inclusion complex (D)

	$T_O$	$T_P$ ( $^{\circ}C$ )	$T_E$	$\Delta H$ (J/g)
$\beta$ -CD	$182.7 \pm 0.3$	$184.3 \pm 0.4$	$188.0 \pm 0.8$	$218.2 \pm 16.5$
phyllodulcin	-	-	-	-
physical mixture (1:1)	$189.9 \pm 0.3$	$191.2 \pm 0.4$	$194.5 \pm 0.6$	$105.2 \pm 15.9$
Inclusion complex	$197.8 \pm 0.1$	$199.8 \pm 0.1$	$205.6 \pm 0.2$	$86.9 \pm 2.7$

The data presented are means  $\pm$  SD of triplicate experiments and superscripts are significantly different at  $P < 0.05$

(마)  $^1H$ -NMR spectroscopy를 통한 베타싸이클로 텍스트린과 필로둘신의 chemical shift 변화

$^1H$ -NMR spectroscopy은 타싸이클로 텍스트린의 cavity안에 guest가 들어가서 복합체를 형성하는지 파악하는 가장 명확한 분석 방법임. 또한, guest가 어떤 방향으로 베타싸이클로 텍스트린과 결합했는지도 알려줄 수 있는 유용한 분석 방법임. 베타싸이클로 텍스트린과 필로둘신 사이의 몰 비율 차이에 따른 필로둘신의 chemical shift 변화 값은 Table 3을 통해 나타내었고, 다음의 식을 따름.

$$\Delta\delta = \delta_{\text{complex}} - \delta_{\text{free}}$$

베타싸이클로 텍스트린이 존재할 때는 필로둘신의 chemical shift 값이 upfield와 downfield로 나뉜다. Upfield shift의 경우는 필로둘신의 해당 proton이 베타싸이클로 텍스트린의 cavity 안으로 들어간 것을 의미하고, downfield는 베타싸이클로 텍스트린의 산소 원자에 필로둘신의 proton이 위치하고 있는 것임. 둘 다 복합체를 형성했을 경우에 나타나는데, 이를 통해 베타싸이클로 텍스트린과 필로둘신 사이에 결합이 있음을 파악함. 구체적으로, 필로둘신의 H-5가 upfield를 나타내며 베타싸이클로 텍스트린의 cavity 안으로 들어간 것을 확인할 수 있음. 그리고 필로둘신의 H-3과 H-7은 베타싸이클로 텍스트린 주변의 산소원자에 위치하는 것을 파악할 수 있음. 이를 통해 베타싸이클로 텍스트린과 필로둘신의 복합체 형성을 증명함.

Table 3. Chemical shift (ppm) change value relating to the signals of phyllodulcin on different  $\beta$ -CD concentration

Phyllodulcin	$\delta_{\text{free}}$	Inclusion complex of phyllodulcin with $\beta$ -CD (molar ratio)					
		1:1 molar ratio		1:2 molar ratio		1:3 molar ratio	
		$\delta_{\text{complex}}$	$\Delta\delta$	$\delta_{\text{complex}}$	$\Delta\delta$	$\delta_{\text{complex}}$	$\Delta\delta$
H-3	5.485	5.498	0.013	5.510	0.025	5.505	0.020
H-4	3.222	3.227	0.005	3.237	0.015	3.224	0.002
H-5	6.895	6.894	-0.001	6.890	-0.005	6.872	-0.023
H-7	7.431	7.438	0.007	7.445	0.014	7.450	0.019
H-5'	3.697	3.700	0.003	3.703	0.006	3.700	0.003

## 9. 베타싸이클로 텍스트린과 복합체 형성을 통한 필로둘신의 품질 향상

### 가. 실험방법

#### (가) Solubility test

Co-precipitation 방법을 이용하여 필로둘신과 다양한 농도에서의 베타싸이클로 텍스트린 (0, 1, 2, 3, 4 and 5)과의 복합체를 형성함. 각 각의 샘플을 증류수에 용해되지 않을 만큼 초과하여 넣고, 상온에서 10분간 vortexing 함. 이후, UV/vis spectrophotometer (Du 730, USA)를 이용하여 UV 254 nm에서 복합체에 포함된 필로둘신의 양을 정량분석하여 용해도를 평가함.

#### (나) Antioxidant activity

베타싸이클로 텍스트린 0.005%, 필로둘신 0.005%, 필로둘신 글리코사이드 0.005%, 그리고 베타싸이클로 텍스트린과 필로둘신의 복합체 0.025%를 20% 에탄올에 용해하여 제조함. 이후, 0.1 mM의 DPPH 용액에 첨가하여 30분간 상온에서 반응시킴. 30분 뒤에 UV/vis spectrophotometer를 이용하여 517 nm에서 흡광도 값을 측정 측정하고, 다음의 식을 사용하여 항산화능을 계산함.

$$AU = 1 - A_s/A_0 \times 100$$

(다) Heat stability

0.2%의 필로둘신, 필로둘신 글리코사이드 그리고 베타싸이클로 텍스트린과 필로둘신의 복합체를 물에 용해하여 제조한 뒤에, 각 각의 샘플을 60°C와 80°C에서 각 각의 샘플을 0, 0.5, 3, 9, 24, 48, 그리고 72시간 동안 보관한 뒤에 UV/vis spectrophotometer를 이용하여 254 nm에서 정량분석을 실시 함. 그리고 boiling water에서는 샘플을 0, 0.5, 1, 2, 3, 4, 5, 그리고 6시간 동안 보관한 뒤에 UV/vis spectrophotometer를 이용하여 254 nm에서 정량 분석을 실시 함.

(라) pH stability

0.2%의 필로둘신, 필로둘신 글리코사이드 그리고 베타싸이클로 텍스트린과 필로둘신의 복합체를 각 각 phosphate buffer solution (pH 3.0), sodium phosphate buffer (pH 7.0), Glycine-NaOH buffer (pH 10.0)에 용해하여 함. 각 각의 샘플을 상온에서 10분간 vortexing한 뒤, 원심분리를 통해 상등액을 얻음. 필로둘신이나 복합체에 포함된 필로둘신 은 glycine-NaOH (pH 10.0)에서 지속적으로 용해되기 때문에 원심분리를 함. 그리고 각 각의 샘플을 0, 0.5, 3, 9, 24, 48, 그리고 72시간 동안 보관한 뒤에 UV/vis spectrophotometer를 이용하여 254 nm에서 정량분석을 실시 함.

나. 실험결과

(가) 복합체 형성을 통한 용해도 향상

Table 1을 통해서 베타싸이클로 텍스트린의 농도가 높아질수록 물에 용해되는 필로둘신의 양이 많아지는 것을 확인할 수 있음. 최초 순수한 필로둘신의 물에 대한 용해도가 0.00006 mg/mL였지만, 1:5 비율로 베타싸이클로 텍스트린과 복합체를 형성했을 경우에는 약 4,000배가 향상된 0.2411 mg/mL을 나타내었다. 이를 통해서 필로둘신의 낮은 용해도를 극복할 수 있고, 식품 산업에서 응용 범위를 넓힐 수 있음.

Table 1. Solubility of phyllocludin on different β-CD concentration

[β-CD] (mM)	Solubility in water (mg/mL)	Ratio
0	0.00006 ± 0.000003	1
1	0.0341 ± 0.0043	568.3
2	0.0812 ± 0.0016	1353.3
3	0.1470 ± 0.0043	2450.0
4	0.2191 ± 0.0020	3651.7
5	0.2411 ± 0.0026	4018.3

The data presented are means ± SD of double experiments and superscripts are significantly different at  $P < 0.05$

(나) 복합체 형성을 통한 항산화능 향상

필로둘신, 필로둘신 글리코사이드 그리고 베타싸이클로 텍스트린과 필로둘신의 복합체의 DPPH radical scavenging activities는 Figure 1에 나타남. DPPH scavenging reaction은 517 nm에서 absorbance 값이 감소하는 것을 관찰하여 나타냄. Figure 1에서는 DPPH 소비량은 베타싸이클로 텍스트린과 필로둘신의 복합체가 87.06% VCE를 나타냄으로써 정제된 필로둘신만 존재했을 때 (45.81% VCE)보다 항산화능이 향상된 것을 파악할 수 있음. 이는 필로둘신 글리코사이드의 90.24% VCE와 유사한 수준임. 이렇게 항산화능이 향상된 이유는 필로둘신의 용해도가 향상되었기 때문이고, 이 결과를 통해 복합체 형성이 필로둘신의 항산화능을 유지해 준다는 것을 알 수 있음.

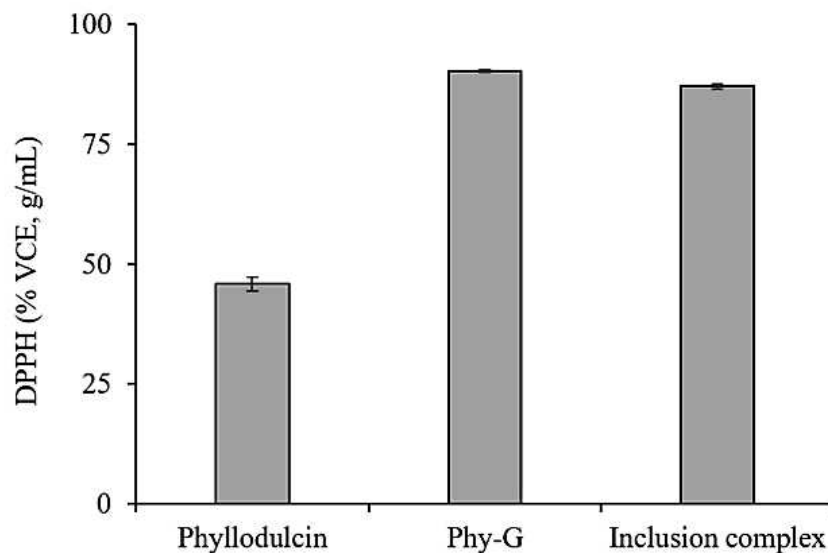


Figure 1. The consume percentage of DPPH in presence of phyllodulcin, phyllodulcin glycoside and inclusion complex between phyllodulcin and  $\beta$ -CD.

(다) Heat stability

필로둘신, 필로둘신 글리코사이드 그리고 베타싸이클로 텍스트린과 필로둘신 복합체의 온도에 대한 stability는 Figure 2에 나타남. 60°C와 80°C에서는 반응 시간을 72시간까지 하더라도 잔존하는 필로둘신, 필로둘신 글리코사이드, 복합체의 양이 유의적인 차이가 나지 않음. Boiling water의 경우에는 유의적으로 필로둘신, 필로둘신 글리코사이드, 복합체의 양이 줄어드나, 6시간 동안 방치하더라도 90% 이상의 함량이 보존되는 것을 파악함. 이를 통해, 필로둘신, 필로둘신 글리코사이드 그리고 베타싸이클로 텍스트린과 필로둘신의 복합체의 열 안정성이 매우 높은 것을 확인할 수 있음. 이러한 결과를 통해 식품 산업의 가공이나 살균공정 후에도 안전하게 물질이 보존된다는 것을 알 수 있으므로, 앞으로 식품 산업에서 활용도를 높일 수 있음.

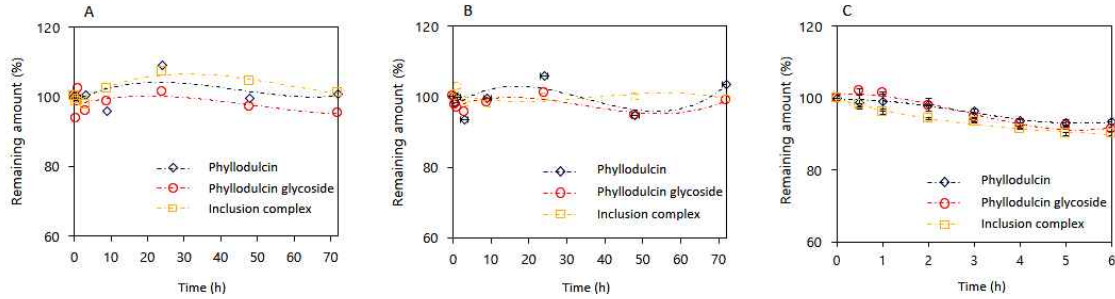


Figure 2. Heat stability of phyllodulcin, phyllodulcin glycoside and inclusion complex between phyllodulcin and  $\beta$ -CD at 60°C (A), 80°C (B) and boiling water (C).

#### (라) pH stability

필로둘신, 필로둘신 글리코사이드 그리고 베타사이클로 텍스트린과 필로둘신 복합체의 pH stability는 Figure 3에 나타남. phosphate buffer (pH 3.0), sodium phosphate buffer (pH 7.0) 그리고 Glycine-NaOH buffer (pH 10.0)에서는 반응 시간을 48시간까지 하더라도 잔존하는 필로둘신, 필로둘신 글리코사이드, 복합체의 양이 유의적인 차이가 나지 않음. 이를 통해 필로둘신이 내산·내염기성을 가지고 있는 것을 확인할 수 있고, 이는 복합체 형성을 하거나 배당체 형태로 존재할 때에도 유지된다는 것을 파악함.

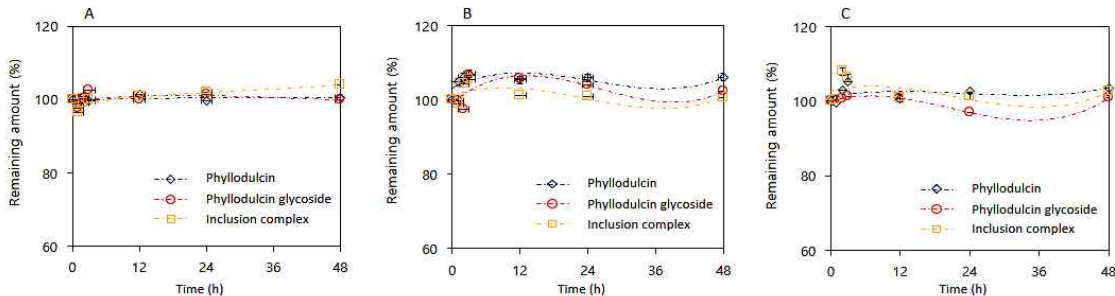


Figure 3. pH stability of phyllodulcin, phyllodulcin glycoside and inclusion complex between phyllodulcin and  $\beta$ -CD in the phosphate buffer pH 3.0 (A), sodium phosphate buffer pH 7.0 (B) and Glycine-NaOH buffer pH 10.0 (C).

## 10. 당전이 반응을 통한 phyllodulcin의 물성개선

### 가. 실험방법

#### (1) 필로둘신의 당전이 반응

필로둘신은 buffer에 용해되지 않기 때문에 효소 반응을 유도하기 어려움. 따라서 필로둘신을 buffer에 용해하는 것이 우선시 되어야 한다. 이를 위해서 ethanol 농도에 따라 효소 반응이 어떻게 일어나는지 평가하였고, 그 결과 20% 에탄올 농도에 용해가 가능한 0.004%와 0.008% 필로둘신을 pH 6.0의 sodium acetate buffer에 용해시킴. 그리고 이 용액에 1%  $\alpha$ -cyclodextrin (기질)과 CGTase (Novozyme, USA) 0.000138 U를 넣고 50°C에서 한 시간 동안 반응을 유도함. 반응 후, 100°C에서 10분 동안 효소 불활성화를 유도한 뒤에 HPLC-UV system으로 필로둘신 당전이 산물을 분석 함.

(2) 필로둘신 글리코사이드의 당전이 반응

2 mM 필로둘신 글리코사이드를 pH 6.0의 sodium acetate buffer에 용해시킨 후, 1%  $\alpha$ -cyclodextrin (기질)을 추가해 줌. 그리고 CGTase (Novozyme, USA) 0.000138 U를 넣고 50°C에서 한 시간 동안 반응을 유도함. 반응 후, 100°C에서 10분 동안 효소 불활성화를 유도한 뒤에 HPLC-UV system으로 필로둘신 글리코사이드의 당전이 산물을 분석 함.

(3) 당전이 산물의 HPLC-UV 분석

당전이 산물을 0.45 $\mu$ m syringe filter을 이용하여 여과한 후 HPLC system(Ultimate-3000, Dionex Co., CA, USA)을 이용하여 분석함. 필로둘신 및 당전이 함량 분석을 위해서는 Capcell pak C18 column(4.6 mm I.D.  $\times$  250 mm, 5 $\mu$ m, Shiseido Co., Tokyo, Japan) 및 acetonitrile with 0.1% formic acid와 water with 0.1% formic acid를 이동상으로 사용하여 gradient mode를 적용함 (10::90 v/v at 0 min 에서 30:70 v/v at 20 min). Flow rate은 1.0mL/min, 오븐온도는 40°C, detection은 254nm의 조건하에서 실험이 진행됨.

나. 실험결과

(1) 필로둘신의 당전이 반응

필로둘신 당전이 반응의 크로마토그램은 Figure 1과 같음. 1시간 동안 당전이 반응을 유도하였지만, 필로둘신의 피크가 줄어들지 않고 그대로 나타남. 그리고 retention time 3분대에 나오는 피크는 분석 용매의 피크와 효소의 색소 피크가 혼재되는 것으로 사료됨. 이 결과를 통해, 에탄올 20% 농도에서 필로둘신의 당전이 반응을 유도하지 못함. 20%에서 CGTase의 활성은 있었기 때문에, 효소의 활성 문제가 아니라 필로둘신의 구조적 문제라고 추측되고 다른 당전이 효소를 이용하여 지속적으로 실험할 필요성을 느낌.

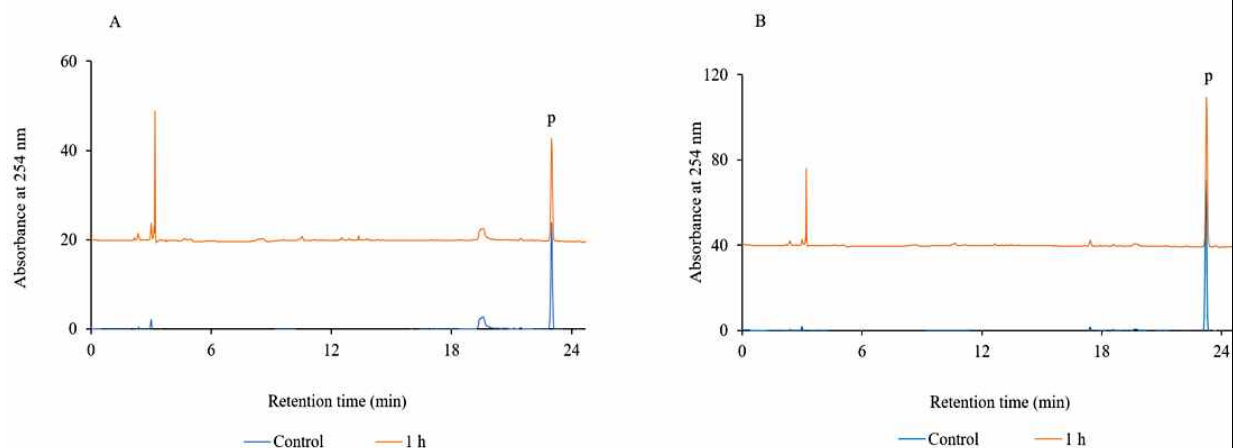


Figure 1. Analytical HPLC chromatogram of transglycosylation of phyllodulcin 0.004% (A) and phyllodulcin 0.0008% (B).



## (2) 필로둘신 글리코사이드의 당전이 반응

필로둘신 글리코사이드 당전이 반응의 크로마토그램은 Figure 2와 같음. 최초 필로둘신 글리코사이드의 피크가 효소 반응 시간에 따라 유의적으로 감소하였고, 24시간 후에는 약 50%이상의 필로둘신 글리코사이드가 피크가 없어지고 앞 쪽으로 많은 피크가 형성된 것을 확인할 수 있음. 필로둘신 글리코사이드 당전이 피크가 크로마토그램에서 앞쪽으로 나오는 이유는 당전이 산물이 용해도가 높아 필로둘신 글리코사이드보다 높기 때문임. 이를 통해, 필로둘신 글리코사이드의 당전이 반응이 나타났다는 것을 파악할 수 있음. 필로둘신 글리코사이드에서 당전이 반응이 나타나는 것은 글루코오스의 OH group에서 추가적으로 당이 붙는 것으로 추측 됨. 반면에 필로둘신은 이러한 OH group이 없기 때문에 당전이 반응이 유도가 않되는 것으로 사료 됨.

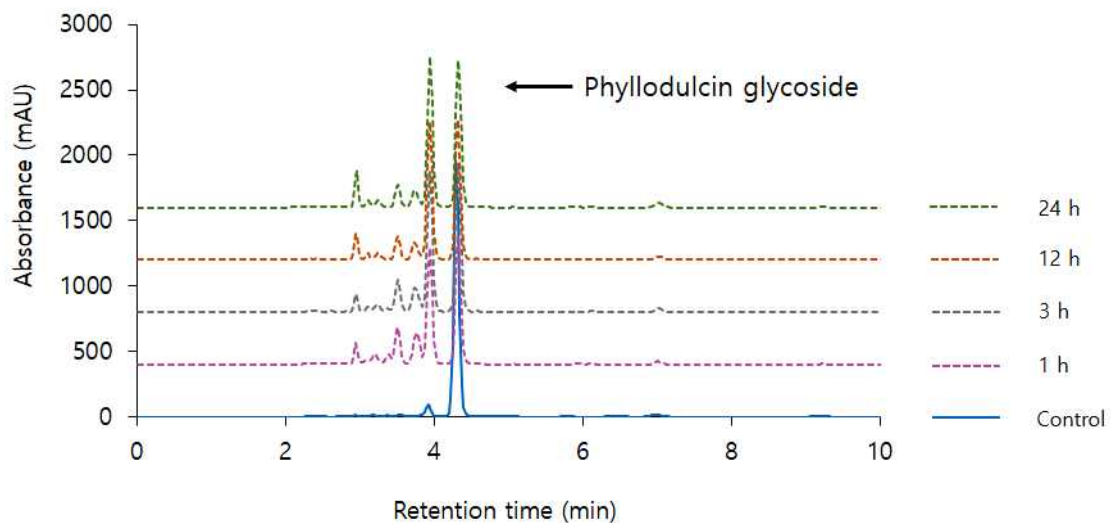


Figure 2. Analytical HPLC chromatogram of transglycosylation of phyllodulcin glycoside.

## 11. 제형화를 통한 시제품 개발

### 가. 필로둘신을 함유한 시제품 컨셉

#### (1) Half calories 컨셉

설탕, 에리스리톨 그리고 필로둘신의 과립형성 여부를 파악한 후에 설탕의 반을 에리스리톨과 필로둘신으로 대체하여 half calories 컨셉으로 설탕과 유사한 감미도를 가지는 시제품을 개발 함.

#### (2) Zero calories 컨셉

에리스리톨과 필로둘신의 과립형성 여부를 파악한 후에 설탕 모두를 에리스리톨과 필로둘신으로 대체하여 zero calories 컨셉으로 설탕과 유사한 감미도를 가지는 시제품을 개발 함.

## 나. 실험방법

### (1) 과립제조법

(가) [혼합] Table 1의 비율대로 미분원료를 넣고 균일하게 혼합함. 아래 비율은 상대당도를 고려하여 설탕과 유사한 감미도를 나타낼 수 있도록 구성 비율을 준비 함. (상대당도: 설탕 1, 필로둘신 435, 에리스리톨 0.7)

(나) [반죽] 혼합된 고형분을 기준으로 5%에 해당하는 양만큼 50% 주정을 넣고 반죽함

예) 혼합원료 100 g에 50% 주정 5 g을 투입하여 반죽

(다) [성형] 반죽된 원료를 과립기 (Rotary granulator, 금강 ENG)에 넣고 과립망 (Sieve size: 1.0 mm)을 통과시켜 과립으 성형함.

(라) [건조] 성형된 과립을 회수하여 50°C 건조기에서 12 시간 이상 건조함.

(마) [체별] 14 mesh (425 um), 40 mesh (1,400 um) sieve를 사용하여 체별하고, 14-40 mesh 사이의 과립을 회수함.

### (2) 분석방법

(가) [시료채취] 시료 1 g을 취하여 50% 에탄올에 녹이고, 최종 부피가 5 mL 또는 10 mL가 되도록 시료를 준비함.

(나) [표준물질] 필로둘신을 50% 에탄올에 녹이고, 32.25, 62.5, 125, 250, 500 ppm이 되도록 희석하여 표준곡선을 구함.

(다) [HPLC 분석] 용매 : A (0.1% acetic acid), B (0.1% acetic acid in ACN)

Gradient : 0-10 min, 용매 B 50% → 80% linear gradient

유속 : 0.5 mL/min, 검출 : UV 245 nm

Table 1. 필로둘신 과립 구성 비율

구분	단위: %			
	설탕	에리스리톨	필로둘신	합계
Half calories	50.00	49.96	0.04	100.00
Zero calories	0.00	99.93	0.07	100.00

## 다. 실험결과

### (1) Half calories 과립 형성

저칼로리 과립은 Table 2와 같은 비율로 혼합이 됨. 필로둘신의 최적 혼합비율은 0.04%였으나, 실제로 혼합 후 시료에서 평균 0.048%로 혼합되어 필로둘신의 양이 목표보다 많이 들어감. 과립 형성 이후에는 0.038%의 필로둘신이 회수되었음. 이는 약 80%정도 필로둘신이 과립형성 이후에도 잔재하고 있어, 목표 혼합비율에 최적화 됨.

Table 2. 저칼로리 컨셉 과립

Sample	Contents(%)	Average (%)	stdev	CV (%)
혼합 후 시료 1	0.053	0.048	0.008	16.91
혼합 후 시료 2	0.042			
과립제조 후 시료 1	0.036	0.038	0.003	8.36
과립제조 후 시료 2	0.041			

(2) Zero calories 과립 형성

저칼로리 과립은 Table 3와 같은 비율로 혼합이 됨. 필로둘신의 최적 혼합비율은 0.07%였으나, 실제로 혼합 후 시료에서 평균 0.075%로 혼합되어 필로둘신의 양이 목표보다 많이 들어감. 과립 형성 이후에는 0.066%의 필로둘신이 회수되었음. 이는 약 88%정도 필로둘신이 과립형성 이후에도 잔재하고 있어 half calories의 시제품보다 많은 양이 회수됨을 확인 함.

Table 3. 제로칼로리 컨셉 과립

Sample	Contents(%)	Average (%)	stdev	CV (%)
혼합 후 시료 1	0.077	0.075	0.003	3.50
혼합 후 시료 2	0.073			
과립제조 후 시료 1	0.067	0.066	0.001	2.16
과립제조 후 시료 2	0.065			

(3) 과립의 모양과 시제품

과립의 모양 (A)과 시제품(B)은 Figure 1에 나타남. 제형화 기술을 통해 필로둘신이 함유한 half calories와 zero calories 컨셉의 시제품을 개발할 수 있었음. 이러한 시제품을 통해 필로둘신을 다른 감미료와 혼합으로써 감미질의 향상에 기여할 수 있는 것을 파악하였고, 필로둘신의 상품화 가능성을 파악함.



Figure 1. Tablet formation including phyllo dulcin of pellet (A) and prototype product (B).

## 12. Phyllodulcin의 생산 경제성 분석(예상원가 산출)

### 가. 가정

- (1) 현재 산업화가 진행되지 않았으므로 예상원가를 산출하였음.
- (2) 원료의 필로둘신 함량 3%
- (3) 정제수율 85%
- (4) 최종순도 98%

### 나. 분석결과

Table 4. Phyllodulcin의 생산 경제성 분석(예상원가 산출)

공정	원가요소	단위 및 규격	금액 (원)	비고
원료	동결건조 수국잎	1000 kg	2,500,000	2,500 원/kg
수국잎 발효	가공비		100,000	
추출/농축	주정	500 L	750,000	75% 주정 1,500 원/kg
분획	가공비		1,230,000	
결정화	주정	50 L	70,000	70% 주정 1,400 원/kg
건조	가공비		150,000	
간접비			400,000	
제품 판매가	Phyllodulcin	26 kg	5,200,000	

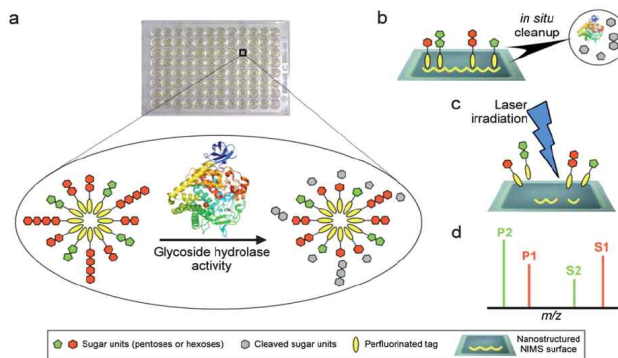
## 제 2 절 설탕보완재 xylobiose 생합성 기술 개발

### 1. [제 1 협동] 연구개발 추진 전략 및 추진 체계



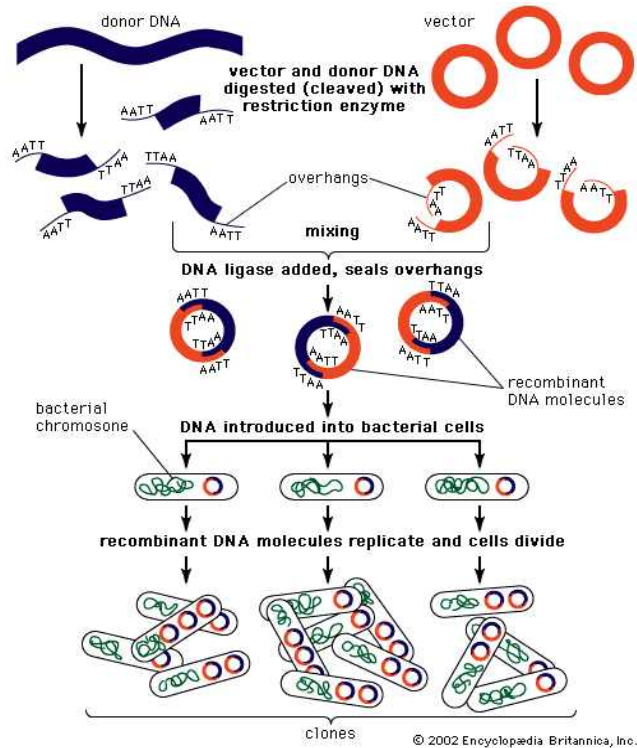
#### [1차년도]

- Xylobiose 생합성 시스템 개발을 위한  $\beta$ -xylosidase 탐색
  - $\beta$ -xylosidase의 origin에 관계없이 고농도 xylose 조건에서 xylose condensation 반응을 매개하므로  $\beta$ -xylosidase를 발현하는 것으로 알려진 미생물에서  $\beta$ -xylosidase를 스크리닝하여 고효율로 xylobiose를 생합성 할 수 있는 새로운 효소를 확보하고자 함
  - Brenda 및 NCBI 등의 생물학정보 site를 활용하여  $\beta$ -xylosidase를 발현하는 미생물의 list 제작
  - KCTC, KCCM, ATCC 등의 기관을 통해 미생물 분양
  - 분양받은 미생물에서  $\beta$ -xylosidase 추출 후 high-throughput screening 방법을 이용하여 고효율의  $\beta$ -xylosidase 확보
  - 선정된  $\beta$ -xylosidase의 xylobiose 생합성 활성 측정



#### <High-through screening 방법을 이용한 glycoside hydrolase 활성 확인 방법>

- GRAS 균주를 이용한 재조합  $\beta$ -xylosidase 발현 시스템 구축
  - 재조합 단백질 제조 기술을 이용하여 GRAS 균주 (*Bacillus*, *Saccharomyces*, *Phicia*)에서  $\beta$ -xylosidase를 효율적으로 생산할 수 있도록 발현 vector를 제조하고자 함



<재조합 단백질 생산기술 모식도>

- Xylobiose 생산을 위한  $\beta$ -xylosidase 반응 조건 탐색
  - 상기에서 제조된  $\beta$ -xylosidase의 특성을 분석하고 xylose condensation 반응을 수행하여 제조된  $\beta$ -xylosidase의 활성에 필요한 기초적인 정보 및 조건을 얻고자 함
  - Enzyme kinetics을 제조된  $\beta$ -xylosidase의  $K_m$ ,  $V_{max}$  값 확인
  - Xylobiose 합성에 필요한 기질 농도, 반응 온도, 시간, pH 조건 확보

## [2차년도]

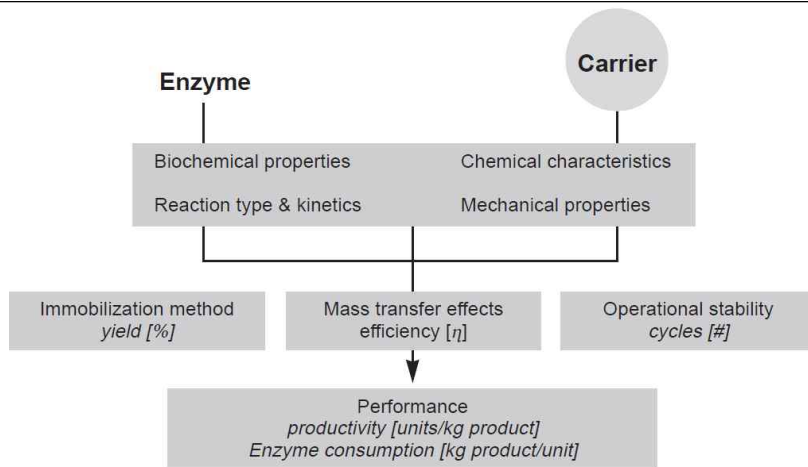
### ■ $\beta$ -xylosidase 대량 생산 기술 개발

- 재조합 미생물 배양공정의 최적화
  - Flask level에서  $\beta$ -xylosidase의 발현이 최대가 될 수 있는 배양 조건을 확인한 후 5L Jar fermenter를 이용해 미생물 배양 시스템을 scale-up하여 재조합  $\beta$ -xylosidase를 대량으로 획득할 수 있는 배양 조건을 확보하고자 함
  - Flask level에서 배지 최적화 : 탄소원, 질소원 선정 및 농도 결정
  - 배양 방식 설정 : 회분식 배양, 유가식 배양
  - 최적화된 배양공정 parameter 확보
- 재조합  $\beta$ -xylosidase의 효율적 정제 공정 확보 및 공정 최적화

- 미생물 배양을 통해 확보된  $\beta$ -xylosidase를 효율적으로 정제할 수 있는 단백질 정제 공정을 확보하고자 함
- Capture step : Tagged sequence를 이용하여 one-step으로 90% 이상의 단백질 순도 확보
- Intermediate step: Ion-exchange resin을 이용하여 major impurities 제거, 단백질 순도 95% 이상
- Polishing step : HIC 및 RPC 등의 방법을 이용하여 최종 순도 98%이상의  $\beta$ -xylosidase 확보

### ■ Xylobiose 생합성 공정 최적화

- Xylobiose 생산을 위한 효소 반응 조건 최적화
  - 1차년도에 확보한 xylobiose 생산에 필요한 기질 농도, 반응 온도, 시간, pH 조건 등을 바탕으로 통계학적 방법을 이용하여 최적 반응 조건을 설정한 후 반응 system을 최적화하고자 함
  - 실험계획법 및 반응표면분석법 등의 통계학적 방법을 바탕으로 최적의 반응 조건 탐색
  - 생합성 효소의 반응 공정 확인 : Repeatability, Robustness
- 효소고정화 기술 확보 및 최적화
  - Xylobiose 생합성에 사용되는  $\beta$ -xylosidase의 재사용 및 반응 안정성을 확보하기 위하여 carrier를 이용해 효소를 고정화할 수 있는 방법을 확보하고 고정화된 효소를 이용하여 xylobiose를 생합성 할 수 있는 공정을 개발하고자 함.
  - 고정화 담체의 탐색 : Alginate, Carrageenan, PEG 등
  - 고정화 방법 확보 : 흡착, 이온결합, 공유결합, 가교결합, Encapsulation 등
  - 고정화 효소의 반응 인자 확인 및 반응공정 최적화 :  $K_m$ ,  $V_{max}$ , pH 등
- 고정화된 효소를 이용한 packed bed system 확보
  - 고정화 효소를 실험실 수준에서 open column에 충전하여 고정화 효소의 생합성 반응의 공정을 design하고 공정 parameter를 확보하여 상업화 공정으로 scale-up이 용이한 효소 반응 공정을 확보하고자 함.
  - 적합한 효소 반응기 모델의 선택 : 충전형, 유동층형, 한외여과형 등
  - 반응 공정 설계 : 기질의 feeding rate 및 recycle 여부 검토
  - 효소 반응기의 유지 관리 : 오염 방지 및 Cleaning 방법 확보



### <고정화 효소의 특성>

#### ■ Xylobiose 정제기술 최적화 및 결정화 기술 개발

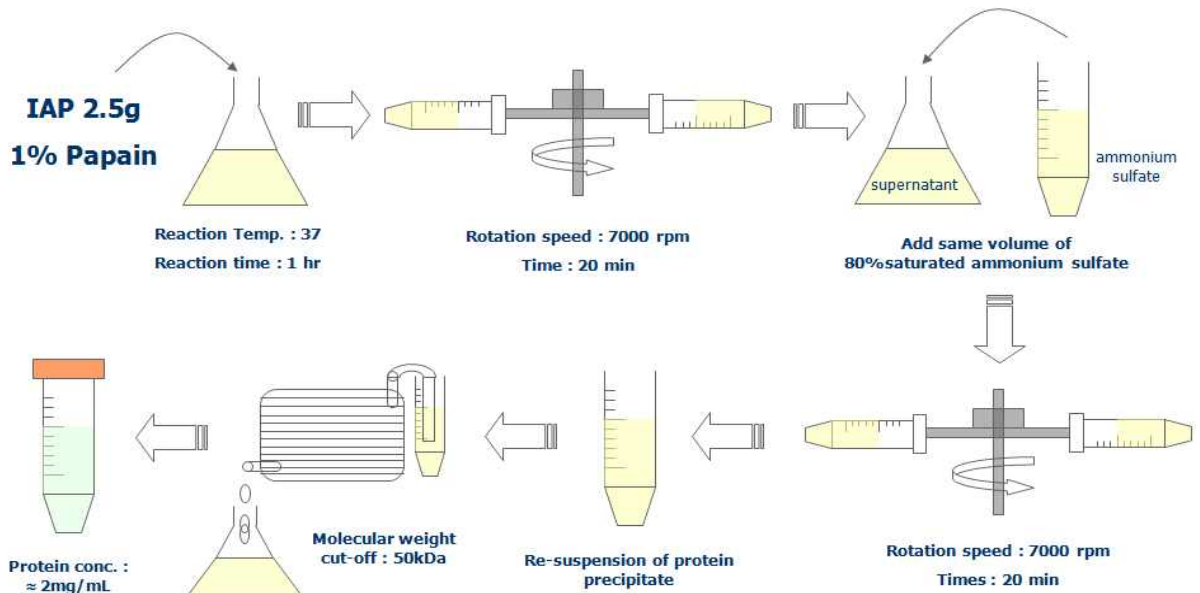
- Binding, elution 용매 및 elution 조건 최적화
  - 1차년도에 확보한 xylobiose 정제 공정 변수를 바탕으로 상업화가 용이한 정제 공정을 설계하고 실제 정제 공정을 통해 결정화 공정으로의 진행이 가능한 고순도의 xylobiose 용액을 확보하는 것을 목표로 함.
  - 정제 공정 최적화 : 용매 조건 및 binding, elution 조건 최적화
  - 정제 공정 안정성 확보 : Repeatability, Robustness
  - Scale-up을 위한 공정 변수 확보
- 결정화 공정의 개발
  - 정제 공정을 통해 확보된 고순도의 xylobiose 용액을 이용하여 xylobiose를 결정화 할 수 있는 조건을 탐색하고 이 조건을 바탕으로 99.9% 순도의 xylobiose 결정을 확보하는 것을 목표로 함
  - 결정화 공정 최적화 : Seed 농도, 결정화 온도, 결정화 시간 등의 공정 변수를 실험계획법 및 반응표면분석법 등의 통계학적 방법을 바탕으로 최적의 결정 형성 조건 확보
  - 고순도 (99.9%)의 xylobiose 결정 확보

#### [3차년도]

#### ■ Xylobiose의 기능성 규명

- *In vitro* rat-sucrase inhibition 활성 측정
  - 본 연구팀에 확립되어 있는 *in vitro* rat-sucrase inhibition test method를 활용하여 확보된 xylobiose의 sucrase 활성 억제 효과를 실험실적으로 확인하여 xylobiose의 체내 기능성을 유추하고자 함





<본 연구팀에서 확립한 Rat-sucrase isolation method의 모식도>

- *In vitro Bifidobacteria* 증식 효과 확인
  - *Bifidobacteria* 배양에서 xylobiose가 *Bifidobacteria*의 증식에 미치는 영향을 확인하여 prebiotics로서의 xylobiose의 기능성을 확인하고자 함
  
- Xylobiosugar의 *in vivo* 혈당상승 억제 효과 확인
  - 본 연구팀은 Xylosugar 및 Xylooligosugar를 상품화 하면서 본 제품의 기능성을 과학적으로 증명하기 위해 외부의 GI test 전문 기관에 용역을 의뢰하여 본 제품이 통계학적으로 유의한 기능성이 있음을 확인하였고, 이 결과를 논문으로 발표한 경험을 보유하고 있으므로 이러한 경험을 바탕으로 제품화 된 Xylobiosugar (가칭)의 혈당상승억제 효능을 과학적으로 증명하고자 함
  - GI test를 통한 *in vivo* 혈당 상승억제 효과 확인
  
- **Xylobiose가 포함된 고부가가치 설탕 제품 (Xylobiosugar, 가칭)의 개발**
  - 본 연구팀은 xylose가 설탕에 혼합된 형태인 Xylosugar를 최초로 개발하여 출시한 연구팀으로 설탕 관련 제품을 개발하고 상업화하는데 필요한 경험을 보유하고 있으므로 이러한 경험을 바탕으로 xylobiose가 함유된 고기능성 설탕 제품 (가칭 Xylobiosugar)을 개발하고자 함
    - 감미도 및 감미특성, xylobiose의 이화학적 특성을 바탕으로 적절한 함유량 결정
    - 제품의 균질화 및 재분리 현상을 최소화하는 혼합 방식 설정
    - 제품의 물성 확인 및 caking test
    - 제품의 Proto-type 제작 및 field test

## 2. Xylobiose 생합성 시스템 개발

### 가. 실험방법

#### (1) Xylobiose 생합성을 위한 $\beta$ -xylosidase 보유 균주 배양 및 선별

균주별 배지 및 배양 조건은 Table 1과 같으며, 400 mL의 working volume으로 배양하였다. 혐기 배양의 경우 jar chamber에 gas pack을 넣고 혐기적 조건을 유지하였다. Induction이 필요한 경우 접종 후 4 hr이 경과한 시점에서 induction 원료의 최종 농도가 0.5%가 되도록 첨가하고, 배양 후 초음파 세포파쇄기를 이용하여 세포벽을 파쇄하고 cell extract를 얻어 효소를 평가하였다.

Table 1. Media and cultivation condition

Strains	Medium	Culture conditions	Induction
<i>Bacillus pumilus</i>	LB	30°C, 200 rpm, 16 hr	xylose
<i>Thermoanaerobacter saccharolyticum</i>	TSC7	60°C, 72 hr	-
<i>Latobacillus brevis</i>	MRS	37°C, 200 rpm, 16 hr	Xylooligosaccharide
<i>Paenibacillus sp.</i>	LB	30°C, 200 rpm, 16 hr	xylose
<i>Geobacillus thermoleovorans</i>	LB	60°C, 200 rpm, 16 hr	xylan
<i>Enterobacter sp.</i>	LB	30°C, 200 rpm, 16 hr	-
<i>Talaromyces emersonii</i>	PDB	40°C, 120 rpm, 48-60 hr	Xylooligosaccharide
<i>Aspergillus fumigatus</i>	PDB	30°C, 120 rpm, 48-60 hr	Xylooligosaccharide
<i>Aspergillus sp.</i>	PDB	30°C, 200 rpm, 48-60 hr	Xylooligosaccharide
<i>Selenomonas ruminantium</i>	LB	30°C, 24 hr	-

#### (2) $\beta$ -xylosidase assay

1 mM p-nitrophenyl- $\beta$ -D-xylopyranoside 200 uL와  $\beta$ -xylosidase 200 uL를 넣고, 37°C에서 10분 동안 반응시킨 후 400mM sodium bicarbonate 400 uL를 넣어 반응을 정지한다. p-nitrophenol을 표준물질로 하여 0~200 uM 농도에 따른 흡광도를 405 nm에서 측정하고 표준곡선을 작성한다.  $\beta$ -xylosidase가 생성하는 p-nitrophenol을 정량 분석하여 효소의 활성을 측정한다. 1 Unit은 1 min에 p-nitrophenyl- $\beta$ -D-xylopyranoside로부터 1 uM의 p-nitrophenol을 생성하는데 필요한  $\beta$ -xylosidase의 양으로 정의하였다.

#### (3) Xylobiose 생합성 평가

60% xylose 용액에 strain별로 얻은  $\beta$ -xylosidase를 0.001 U이 되도록 첨가하여 50°C에서 24 hr동안 반응시킨 후 HPLC 분석을 통해 생합성된 xylobiose를 정량 분석하였다.

(4)  $\beta$ -xylosidase 발현 *E.coli* 재조합 균주 제조

NCBI(national center for biotechnology information)로부터 확인된 *B.pumilus* IPO xynB의 DNA(2,207 bp)를 합성한 후 제한효소 자리가 첨가된 primer를 제작하여 PCR을 통해 목적 유전자를 확보하였다. *S.ruminantium* 및 *L.brevis*의 genomic DNA 추출 후 제한효소 자리가 첨가된 primer를 제작하여 PCR을 통해 목적 유전자를 확보하고, PCR을 통해 확보된 3 종의 목적 유전자를 각각 pET21a에 삽입하여 *E.coli* BL21(DE3) 균주에 형질전환하여 재조합 균주 TS01(origin: *B.pumilus*), TS02(origin: *S.ruminantium*), TS03(origin: *L.brevis*)을 구축하였다.

(5)  $\beta$ -xylosidase 발현 GRAS 재조합 균주 제조

*B.pumilus* 및 *S.ruminantium* 유래의  $\beta$ -xylosidase(xynB)를 p424GPD에 도입 후 *S.cerevisiae* SK1에 형질 전환시킨 재조합 균주 2 종을 구축하고, *B.pumilus* 유래  $\beta$ -xylosidase(xynB)를 pHT08에 도입 후 *B.subtilis* RIK1285(DE3)에 형질 전환시킨 재조합 균주 1 종을 구축하였다.

(6)  $\beta$ -xylosidase 발현 재조합 균주 배양 및 정제

재조합 *E.coli* 내  $\beta$ -xylosidase 발현을 위하여 100 ug/mL의 ampicillin이 포함된 LB 배지에서 호기배양 후 배양액의 OD<sub>600</sub>가 0.8 정도일 때 0.5 mM IPTG를 첨가한 후 20°C, 100 rpm에서 16 hr 동안 배양을 진행한다. 재조합 *S.cerevisiae* 내  $\beta$ -xylosidase 발현을 위하여 YNB tryg(-) 배지에서 중배양 후 YPD 배지에 5% 접종하여 30°C, 200 rpm에서 24 hr 동안 배양을 진행하였다. 재조합 *B.subtilis* 내  $\beta$ -xylosidase 발현을 위하여 5 ug/mL의 chloramphenicol이 포함된 LB 배지에서 호기배양 후 배양액의 OD<sub>600</sub>가 1 정도일 때 1 mM IPTG를 첨가한 후 37°C, 200 rpm에서 8 hr 동안 배양을 진행한다. 배양 후 cell을 회수하여 50 mM Tri-HCl buffer(pH 7)를 넣고 cell을 균질화 한 후 초음파 세포파쇄기를 이용하여 세포벽을 파쇄하고 cell extract를 얻어 Ni-NTA column을 이용하여 효소를 정제한 후 50 mM sodium phosphate buffer(pH 7)를 사용하여 투석한 후 농축하여 사용하였다.

(7)  $\beta$ -xylosidase의 xylobiose 생합성 조건 최적화

TS01 균주로부터 정제된  $\beta$ -xylosidase는 최종 농도가 0.1 및 0.2 U이 되도록 첨가하였고, TS02 균주로부터 정제된  $\beta$ -xylosidase는 최종 농도가 0.1, 0.2 및 2 U이 되도록 첨가하여 24 hr 동안 반응한 후 99°C, 10 분 동안 효소를 불활성화 시킨 후 HPLC로 정량 분석한다. Xylose 농도에 따른 xylobiose 생합성 조건 최적화는 xylose 40~90%(w/v), 온도 50°C, 50 mM sodium phosphate buffer(pH 7) 조건에서 24 hr 동안 반응하여 확인한다. 온도 조건에 따른 xylobiose 생합성 조건 최적화는 온도 30~70°C, xylose 60%, 50 mM sodium phosphate buffer(pH 7) 조건에서 24 hr 동안 반응하여 확인한다. pH 조건에 따른 xylobiose 생합성 조건 최적화는 pH 4~8, xylose 60%, 50 mM sodium phosphate buffer(pH 7) 조건에서 24 hr 동안 반응하여 확인하였다.

## 나. 실험 결과

### (1) Xylobiose 생합성을 위한 $\beta$ -xylosidase 보유 균주 배양 및 선별

문헌을 통해 확인된  $\beta$ -xylosidase 보유 균주 10 종을 확보하여 실험방법에 따라 배양 후 얻은  $\beta$ -xylosidase와 시약급으로 판매되고 있는 2 종의 효소에 대한 활성을 평가하였다. Table 2 에서와 같이 배양액 1 L당 얻은  $\beta$ -xylosidase의 활성이 높으면서 생합성 된 xylobiose가 높은 *B.pumilus* 및 *L.brevis* 2 종을 선정함. 본 실험에서 wild type 균주로  $\beta$ -xylosidase의 활성이 확인되지 않았으나, 시약급 효소 중 활성이 우수한 *S.ruminantium* 유래의 균주를 1 종 추가로 선정하였다.

Table 2.  $\beta$ -xylosidase activity from wild-type and xylobiose biosynthesis

구 분	Strain No. (or Cat No.)	Strain (or origin)	U/L <sup>1)</sup>	Xylobiose (%) <sup>3)</sup>	선정
Wild-type (10 종)	KCCM 12146	<i>Bacillus pumilus</i>	2.5	0.011	○
	ATCC 49915	<i>Thermoanaerobacter saccharolyticum</i>	2.4	×	
	ATCC 14869	<i>Latobacillus brevis</i>	2.1	0.022	○
	KCTC 3893	<i>Paenibacillus sp.</i>	0.7	0.013	
	KCTC 3570	<i>Geobacillus thermoleovorans</i>	0.1	×	
	KCTC 2625	<i>Enterobacter sp.</i>	0.02	×	
	ATCC 66241	<i>Talaromyces emersonii</i>	0.008	×	
	ATCC MYA-4609	<i>Aspergillus fumigatus</i>	0.008	0.039	
	KCTC 16780	<i>Aspergillus sp.</i>	0.002	0.013	
	ATCC12561	<i>Selenomonas ruminantium</i>	- <sup>2)</sup>	-	○
시약급 (2 종)	Megazyme E-BXSEBP	<i>Bacillus pumilus</i>	-	0.012	
	Megazyme E-BXSR	<i>Selenomonas ruminantium</i>	-	0.018	

<sup>1)</sup> 배양액 1 L에서 얻은  $\beta$ -xylosidase의 활성을 나타냄.

<sup>2)</sup> Wild type에서 활성을 확인하지 못하였으나, *E.coli* 재조합 균주에서 활성이 우수한 것으로 확인됨.

<sup>3)</sup>  $\beta$ -xylosidase의 최종 농도는 0.001 U 기준이며, 24 hr 반응 후 생성된 xylobiose 함량을 나타냄.

Table 3.  $\beta$ -xylosidase expression system

Strains		Recombinant vector	Origin
<i>E.coli</i> BL21 (DE3)	TS01	pET21a xynB	<i>B.pumilus</i>
	TS02	pET21a Xsa	<i>S.ruminantium</i>
	TS03	pET21a xynB1	<i>L.brevis</i>
<i>S.cerevisiae</i> SK1 (GRAS)	Y01	p424GPD xynB	<i>B.pumilus</i>
	Y02	p424GPD Xsa	<i>S.ruminantium</i>
<i>B.subtilis</i> RIK1285 (GRAS)	B01	pHT08 xynB1	<i>B.pumilus</i>

(2)  $\beta$ -xylosidase 발현을 위한 *E.coli* 및 GRAS 균주 벡터 제작

Table 3 과 같이  $\beta$ -xylosidase 발현 시스템을 구축하기 위하여 총 6 종의 발현 벡터를 제작하였으며, 그 중 GRAS 균주 발현 벡터는 총 3 종을 확보하였다.

(3)  $\beta$ -xylosidase 발현 *E.coli* 재조합 균주 및 GRAS 재조합 균주의 활성 평가

*E.coli* 재조합 균주의 경우  $\beta$ -xylosidase의 발현량은 TS02 균주가 가장 높았으나 xylobiose 생합성은 TS01 균주가 가장 우수한 것으로 나타났다(Table 4). TS03 균주는  $\beta$ -xylosidase의 발현량도 낮고 xylobiose를 생합성하지 못하는 것으로 확인되었다. 본 연구를 통해 *E.coli* 재조합 균주 중 TS01 및 TS02를 선정하여 GRAS 재조합 균주를 제작하였으며, Table 4 에서와 같이 총 3 종의 GRAS 균주를 제작하였다. GRAS 균주로부터 발현된  $\beta$ -xylosidase를 이용하여 xylobiose를 합성한 결과 3 종 모두 유사한 것으로 확인되었으나, 시약급 효소보다는 생합성되는 양이 높게 나타났다.

Table 4.  $\beta$ -xylosidase activity from recombinant microorganisms and xylobiose biosynthesis

Strain		Origin	U/L <sup>1)</sup>	Xylobiose (%) <sup>2)</sup>
<i>E.coli</i> BL21(DE3)	TS01	<i>B.pumilus</i>	10.7	0.69
	TS02	<i>S.ruminantium</i>	66.4	0.021
	TS03	<i>L.brevis</i>	0.004	×
<i>S.cerevisiae</i> (GRAS)	Y01	<i>B.pumilus</i>	4.2	0.025
	Y02	<i>S.ruminantium</i>	16.0	0.024
<i>B.subtilis</i> (GRAS)	B01	<i>B.pumilus</i>	1.8	0.022
Megazyme E-BXSEBP	시약급	<i>B.pumilus</i>	-	0.012
Megazyme E-BXSR		<i>S.ruminantium</i>	-	0.018

<sup>1)</sup> 배양액 1 L에서 얻은  $\beta$ -xylosidase의 활성을 나타냄.

<sup>2)</sup>  $\beta$ -xylosidase의 최종 농도는 0.001 U 기준이며, 24 hr 반응 후 생성된 xylobiose 함량.

(4) GRAS 균주의  $\beta$ -xylosidase 발현 최적화

온도에 따른 Y01 균주와 B01 균주의  $\beta$ -xylosidase 발현 최적화 조건을 확인한 결과 Fig.1 에서와 같이 Y01 균주는 30°C, B01 균주는 42°C인 것으로 나타났다. pH에 따른 Y01 균주와 B01 균주의  $\beta$ -xylosidase 발현 최적화 조건을 확인한 결과 Fig.2 에서와 같이 Y01 균주와 B01 균주 모두 초기 pH 8이 최적 조건으로 확인되었다. 본배양 4 hr 시점에서 기본 배지에 1%의 C-source를 추가하여 Y01 균주와 B01 균주의  $\beta$ -xylosidase 발현 최적화 조건을 확인한 결과 Fig.3 에서와 같이 Y01 균주는 glucose 이며, B01 균주는 xylose 인 것으로 나타났다. 특히, B01 균주의 경우 C-source 중 xylose를 첨가하였을 때  $\beta$ -xylosidase가 최대 25 U/L까지 증가하는 것을 확인되었다.

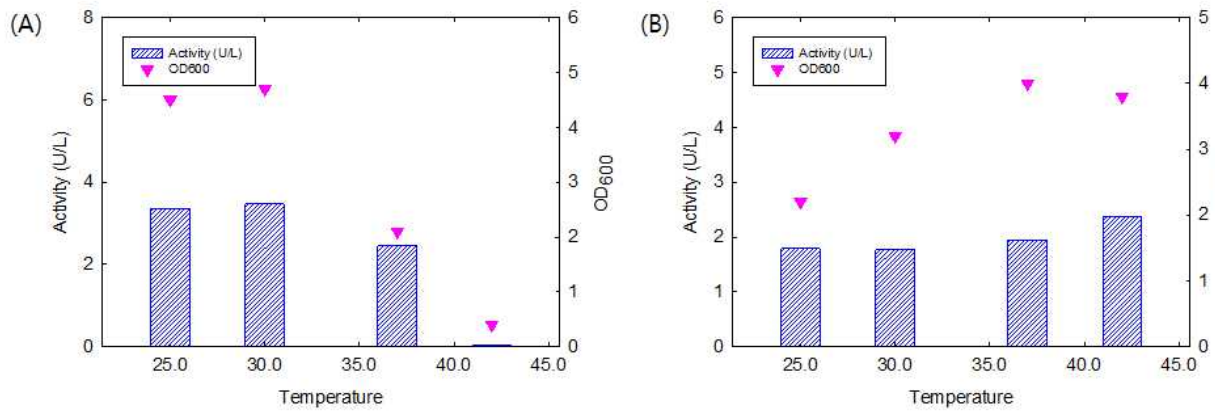


Fig.1 Optimum temperature of Y01(A) and B01(B) on  $\beta$ -xylosidase expression.

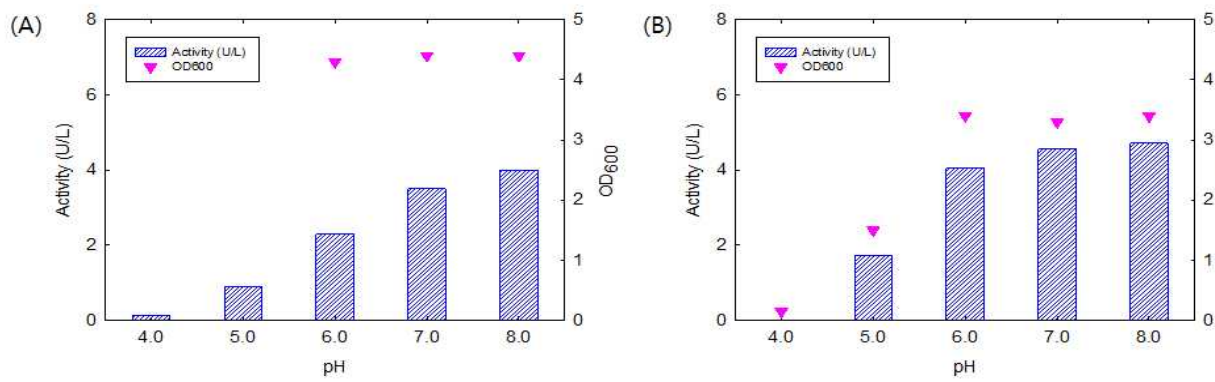


Fig.2 Optimum pH of Y01(A) and B01(B) on  $\beta$ -xylosidase expression.

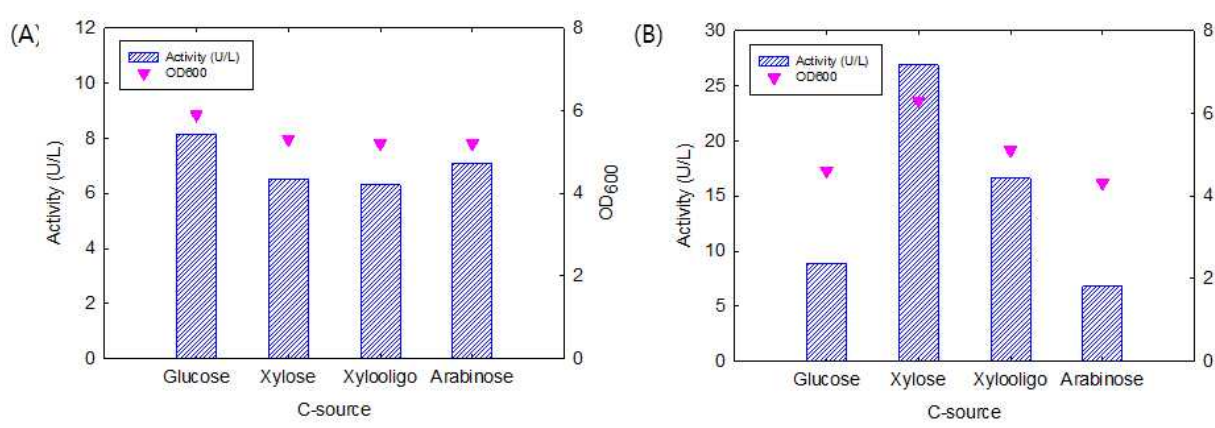


Fig.3 Optimum C-source of Y01(A) and B01(B) on  $\beta$ -xylosidase expression.

(5)  $\beta$ -xylosidase의 xylobiose 생합성 조건 최적화

온도, pH, 기질농도에 따른 xylobiose 생합성 최적 조건을 확인하기 위하여 TS01 균주(BP\_TS)와 TS02 균주(SR\_TS)에서 발현된  $\beta$ -xylosidase와 origin이 동일한 시약급 효소인 BP\_M과 SR\_M을 각각 사용하여 비교 평가를 실시하였다. Fig.4 에서와 같이 최적 온도는 TS01 균주(BP\_TS)에서 발현된  $\beta$ -xylosidase의 경우 40 $^{\circ}$ C, TS02 균주(SR\_TS)에서 발현된  $\beta$ -xylosidase의 경우 60 $^{\circ}$ C로 확인되었다. Fig.5 에서와 같이 최적 pH 는 TS01 균주(BP\_TS)에서 발현된  $\beta$ -xylosidase의 경우 pH 6, TS02 균주(SR\_TS)에서 발현된  $\beta$ -xylosidase의 경우 pH 5 로 나타났다. Fig.6 에서와 같이 최적 기질 농도는 TS01 균주(BP\_TS)에서 발현된  $\beta$ -xylosidase의 경우 xylose 90%, TS02 균주(SR\_TS)에서 발현된  $\beta$ -xylosidase의 경우 0.1에서는 xylose 50%, 0.2 U에서는 xylose 60%, 2 U에서는 xylose 80%로 확인되었다. TS01 균주(BP\_TS)에서 발현된  $\beta$ -xylosidase는 0.1 U 과 0.2 U에 따라 xylobiose의 생합성 전환율의 차이를 나타내지 않으며, 시약급 효소(BP\_M) 보다 우수한 것으로 나타났다. TS02 균주(SR\_TS)에서 발현된  $\beta$ -xylosidase는 효소의 양이 많아짐에 따라 xylobiose의 생합성 전환율이 높아졌으며, 시약급 효소(SR\_M)도 유사한 결과를 나타냈다.

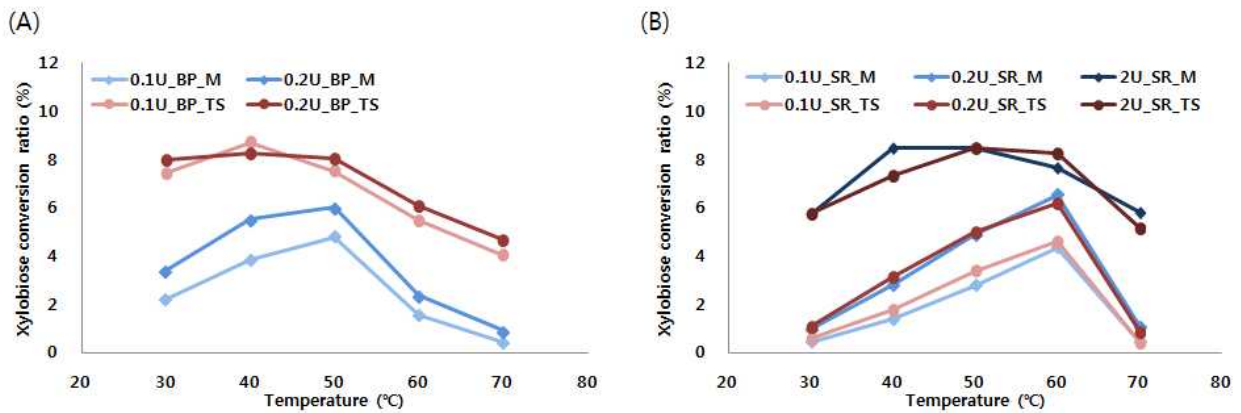


Fig.4 Optimum temperature of BP\_TS(A) and SR\_TS(B) on xylobiose biosynthesis.

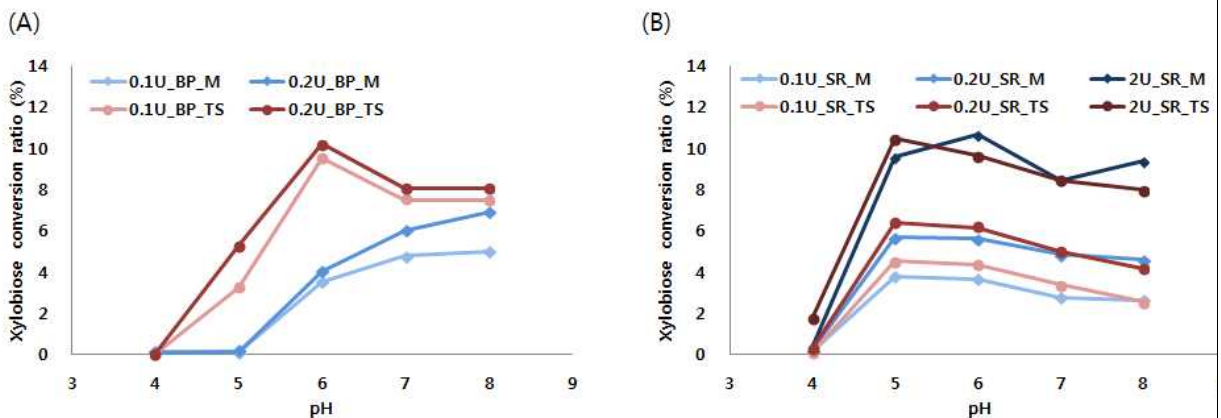


Fig.5 Optimum pH of BP\_TS (A) and SR\_TS (B) on xylobiose biosynthesis.



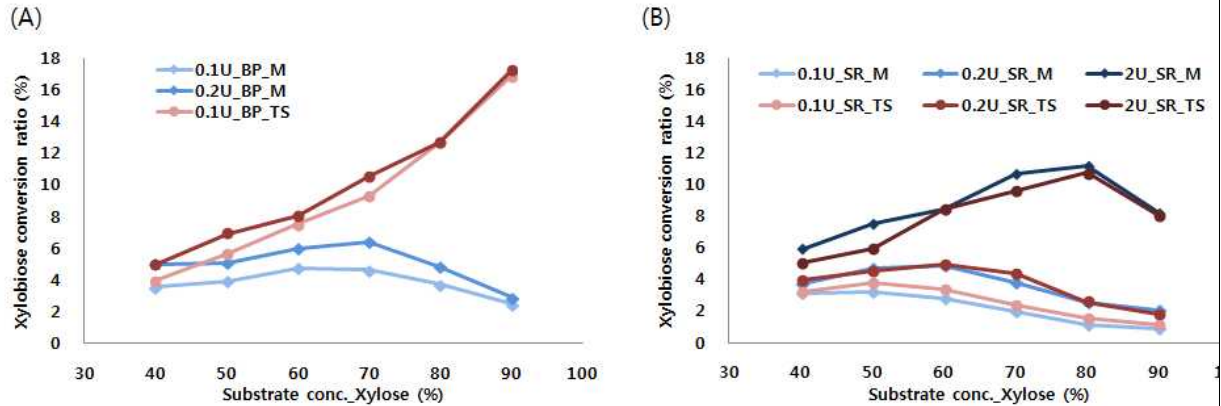


Fig.6 Optimum substrate concentration of BP\_TS(A) and SR\_T(B) on xylobiose biosynthesis.

(6) *E.coli* 및 GRAS 재조합 균주의  $\beta$ -xylosidase 정제

*E.coli* 및 GRAS 재조합 균주로부터 발현된  $\beta$ -xylosidase를 Ni-NTA resin을 사용하여 정제하고, SDS-PAGE 분석을 통해 분자량을 확인하였다. Fig.7 과 같이 시약급  $\beta$ -xylosidase와 동일하게 분자량은 62 kDa이며, 비교적 순도가 높게 정제가 가능한 것으로 나타났다.

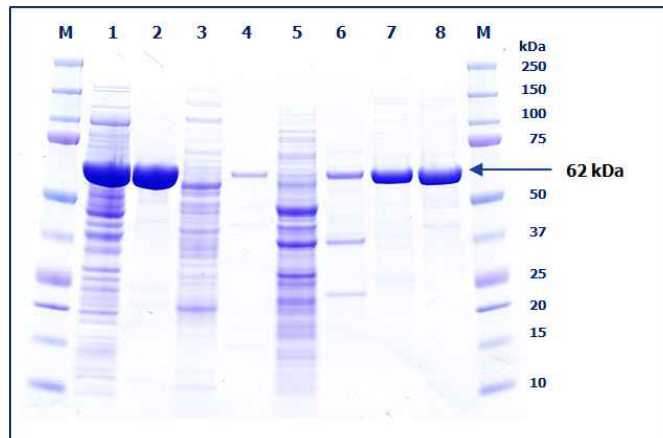


Fig.7 SDS-PAGE of  $\beta$ -xylosidase from recombinant cells, size marker(M), cell extract of TS01 (lane 1), purified  $\beta$ -xylosidase from TS01 (lane 2), cell extract of B01 (lane 3), purified  $\beta$ -xylosidase from B01 (lane 4), cell extract of Y01 (lane 5), purified  $\beta$ -xylosidase from Y01 (lane 6),  $\beta$ -xylosidase from Megazyme E-BXSEBP (lane 7),  $\beta$ -xylosidase from Megazyme E-BXSR (lane 8).



### 3. Xylobiose 정제

#### 가. 실험 방법

(1) Xylobiose 정제를 위한 chromatographic resin 탐색

Xylobiose 정제를 위해 사용가능한 대용량 정제 장비 및 chromatographic resin을 탐색하고, Xylobiose 정제를 위한 resin의 후보군을 선정한다.

(2) Xylobiose 정제를 위한 분석용 column을 이용한 분리패턴 확인

Agilent 1100 series HPLC 장비에 작용기가 다른 Waters 사의 Sugar-pakI column 과 Shodex사의 Sugar KS-801 column을 각각 적용하여 xylose, xylobiose, xylotriose를 분석하였다. 이동상은 물을 사용하며, 온도 80℃, 유속 0.5 ml/min, RID를 이용하여 분석을 실시하였다.

(3) Xylobiose 결정화 특성 파악을 위한 유사 당류의 결정화 조건 확인

Xylobiose 결정화 특성을 파악하기 위하여 xylobiose와 특징이 유사한 단당류 3종(xylose, psicose, glucose) 및 이당류 3종(cellobiose, maltose, sucrose)에 대하여 결정화 조건을 확인하였다. 결정화를 위하여 Evaporator 장비를 이용하여 100 torr 압력에서 목적당의 종류에 따른 농도와 온도로 과포화 용액을 만들고 flask의 압력을 600 torr로 맞춘 후 곱게 간 seed를 ethanol에 부유 시켜 0.05~0.1%정도 과포화 농축용액에 투입하였다. 과포화 농축 온도에서 시간당 1~5℃씩 낮춰가며 각각의 당의 종료온도까지 overnight하여 결정을 성장시킨다. 결정 종료 시 water bath의 온도와 같거나 5~10℃ 높은 온도로 ethanol 온도를 맞춘 후 투입하여 시럽을 제거하고 2~3회 washing 후 sieve에 넓게 펴서 50℃ dry oven에서 건조한다.

Table 5. List of chromatographic resin for xylobiose purification

Product	Particle size	Ionic form	Manufacturer
Purolite-PCR145K	260~300 um	K <sup>+</sup>	Purolite
Purolite-PCR450	360~400 um	Na <sup>+</sup>	Purolite
Purolite-PCR631Ca	210~230 um	Ca <sup>++</sup>	Purolite
Purolite-PCR632Ca	210~250 um	Ca <sup>++</sup>	Purolite
Purolite-PCR633	210~250 um	Na <sup>+</sup>	Purolite
Purolite-PCR651	330~360 um	Na <sup>+</sup>	Purolite
Purolite-PCR732Ca	210~250 um	Ca <sup>++</sup>	Purolite
Purolite-PCR833	225~275 um	Na <sup>+</sup>	Purolite
Purolite-PCR833Ca	225~275 um	Ca <sup>++</sup>	Purolite
Dowex 50wx4	120~65 um	H <sup>+</sup>	Dowex

## 나. 실험 결과

### (1) Xylobiose 정제를 위한 chromatographic resin 탐색 및 정제 조건 확인

Xylobiose 정제를 위한 chromatographic resin 탐색 결과 당 분취용으로 적용되고 있는 resin의 종류는 Table 5 와 같으며, particle size는 65~400 um 수준으로 분포하고 있다. Particle size가 작을수록 압력이 높아지게 되므로 chromatographic resin의 수명이 짧은 단점이 있으나 분리가 잘 되는 장점이 있음. 일반적으로  $Ca^{++}$  form과  $Na^{+}$  form이 범용적으로 사용되고 있으며, particle size에 따라 선택의 폭이 다양하므로 본 연구에서는  $Ca^{++}$  form과  $Na^{+}$  form의 분석용 컬럼을 이용하여 xylobiose의 분리 패턴 조건을 확인하였다.

### (2) Xylobiose 정제를 위한 분석용 column을 이용한 분리패턴 확인

작용기가 다른 두 분석용 컬럼을 이용하여 xylose, xylobiose xylotriose를 분석한 결과  $Ca^{++}$  form인 Waters Sugar-pakI(A) 보다  $Na^{+}$  form인 Shodex Sugar KS-801(B)에서 peak width 및 symmetry가 적은 것으로 나타남. Fig.8 과 같이 작용기가  $Na^{+}$  form인 Shodex Sugar KS-801(B)에서 X2(xylobiose)와 X1(xylose)의 분리가 잘되는 것을 확인하였고, 본 연구에서 xylobiose를 정제하기 위한 resin으로  $Na^{+}$  form이 더 우수한 것으로 판단되었다.

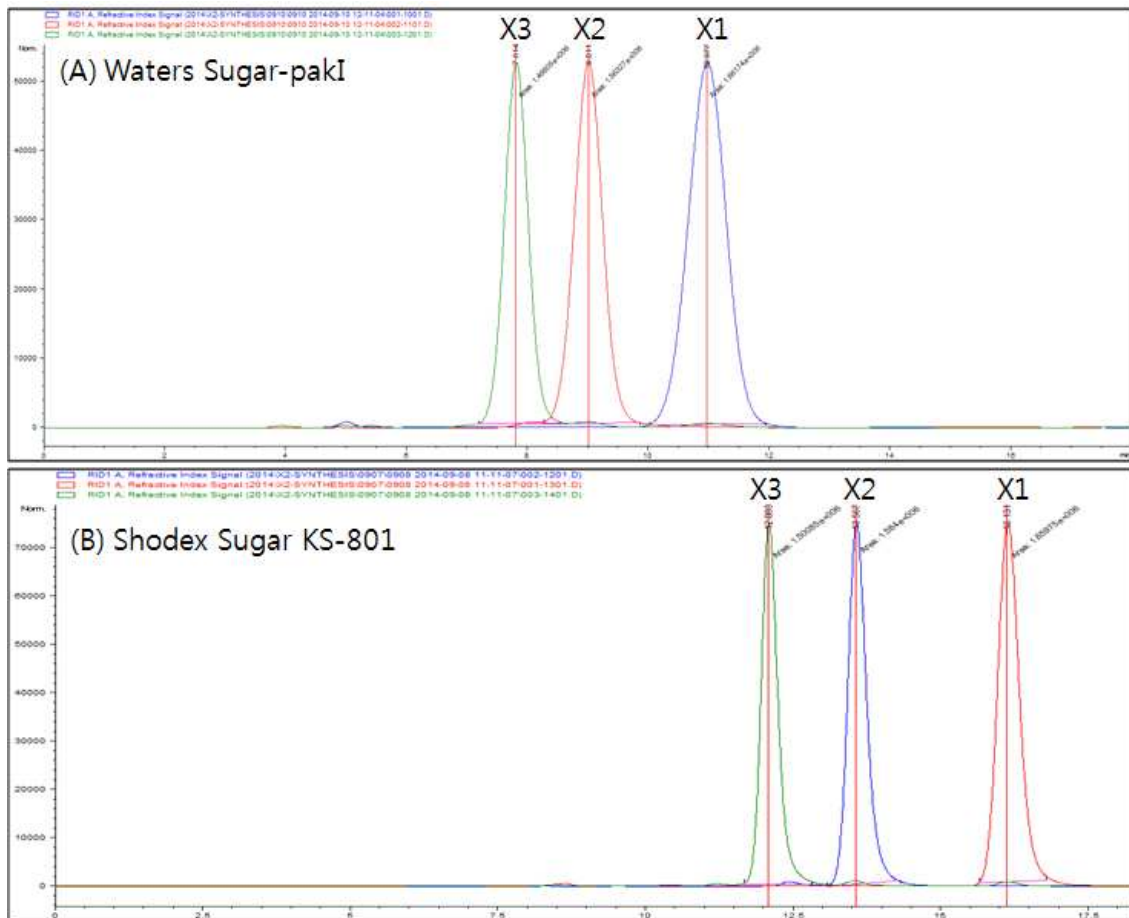


Fig.8 HPLC chromatogram of Waters Sugar-pakI(A) and Shodex Sugar KS-801(B), xylose(X1), xylobiose(X2), xylotriose(X3).

(3) Xylobiose 결정화 특성 파악을 위한 유사 당류의 결정화 조건 확인

Table 6 과 같이 단당류 3 종과 이당류 3 종의 결정을 형성하는 조건이 확인되었으며, cellobiose를 제외한 나머지 당류들은 90% 이상의 과포화 용액 상태에서 결정화 시작이 가능하다. 결정화 시작 온도는 60~70℃이며 결정화 종료 온도는 35~55℃로 확인되었으며, Fig. 9 와 같이 USB digital microscope로 200 배 확대하여 관찰한 결과 6 종의 당류 모두 결정화가 되었다.

Table 6. Critical point of crystallization on monosaccharide and disaccharide

Material	Initial concentration (% , w/v)	Supersaturated solution (% , w/v)	Initial crystallization temperature (°C)	Final crystallization temperature (°C)
Xylose	80	100	60	35
Psicose	50	90	75	50
Glucose	80	100	60	40
Cellobiose	30	50	75	35
Maltose	70	90	70	55
Sucrose	75	90	70	50

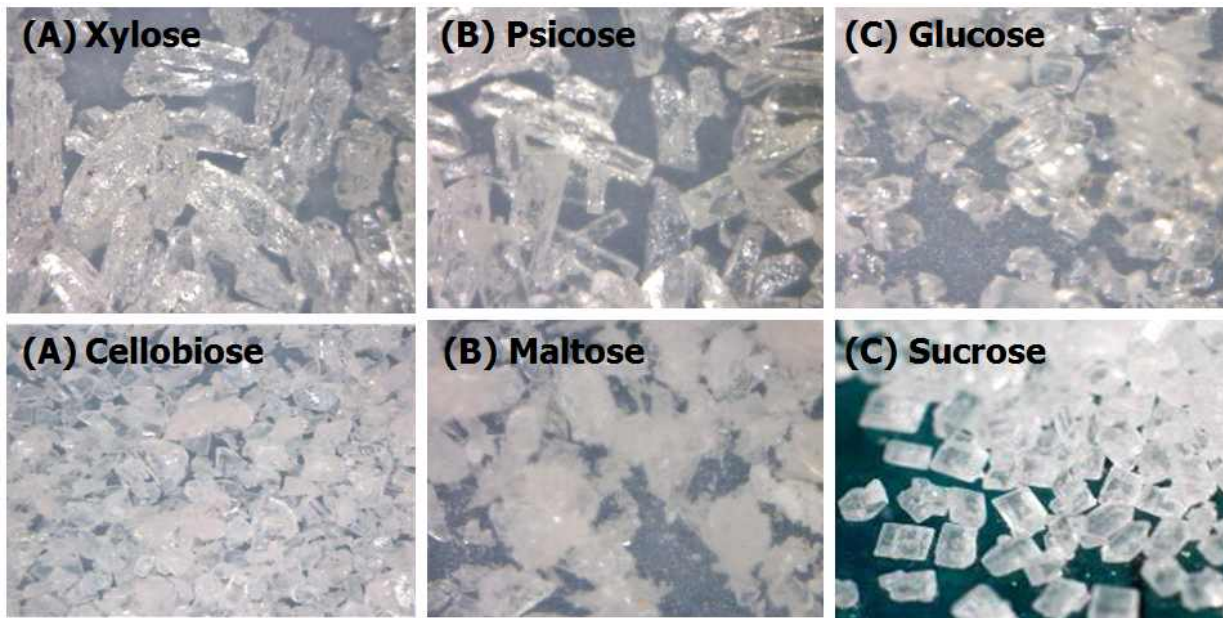


Fig. 9 Image of crystal monosaccharide and disaccharide.

## 4. Xylobiose의 특성 확인

### 가. 실험방법

#### (1) Xylobiose의 감미 특성 확인

Xylobiose는 xylose가 2개 결합된 당류로 xylose 보다 감미도가 낮다는 가정 하에 xylobiose가 30% 이상 함유된 분말 자일로올리고당 및 이를 설탕과 혼합하여 설탕보완재로서의 적합한 당도를 가지고 있는지 확인하기 위하여 식품공전의 기타설탕 규격인 당도 86% 이상을 충족시킬 수 있는지 판단하고자 선풍도 측정법을 실시하였다.

#### (2) Xylobiose의 내산성 확인

0.2 N HCl과 0.2 N NaOH를 사용하여 pH 1~5까지 제조한 후 1% xylobiose 용액과 1:1의 비율로 혼합한 후 25℃에서 3일 동안 보관하고, HPLC 분석을 통해 잔존하는 xylobiose 함량을 산출하였다.

#### (3) Xylobiose의 물리화학적 안정성 확인

0.2 N HCl과 0.2 N NaOH를 사용하여 pH 2, pH 6, pH 10 용액을 제조한 후 0.5% xylobiose 용액과 1:1로 혼합한 후 100℃에서 보관하면서 시간에 따라 샘플링한 시료를 HPLC로 분석하여 잔존하는 xylobiose 함량을 산출하였다.

### 나. 실험결과

#### (1) Xylobiose의 감미 특성 확인

식품공전 규격에 따라 선풍도를 측정한 결과 설탕의 당도는 100%이며, xylobiose가 30% 이상 함유된 분말 자일로올리고당의 당도는 47%로 확인되었으며, 설탕 80%와 분말 자일로올리고당을 20% 혼합하였을 경우 당도는 89%로 기타설탕 규격의 당도를 충족시킨다. 분말 자일로올리고당은 xylobiose 보다 분자량이 크고 감미도가 낮은 xylose unit의 올리고당이 존재하므로 실제로 xylobiose의 당도는 이 보다 높을 것으로 판단되며, xylobiose를 10% 이내로 설탕과 혼합한다면 설탕의 감미도를 90% 이상 유지하면서 기능성을 나타내는 설탕보완재로서 역할이 가능할 것으로 판단된다.

#### (2) Xylobiose의 내산성 확인

Fig. 10 에서와 같이 xylose, xylobiose, xylooligosaccharide 모두 pH 1~5 범위 내에서 3일 동안 보관했을 때 분해되지 않고 초기 상태를 유지하는 것으로 확인되었다. 산성 조건에서 쉽게 분해되지 않고 내산성이 있는 것으로 확인되었다.

#### (3) Xylobiose의 물리화학적 안정성 확인

Xylobiose 용액을 100℃에서 pH 2, 6, 10 조건으로 보관하면서 잔존하는 xylobiose의 양을 분석한 결과 control(물에 녹임)은 큰 변화를 나타내지 않았으나, Fig. 11 에서와 같이 pH 2, 6, 10 조건에서는 시간이 경과됨에 따라 xylobiose가 분해되는 것으로 나타났다.

초기 반응시간인 10분 동안에는 모든 조건에서 xylobiose가 분해되지 않았으나, pH 6, 10은 3시간 동안 약 10% 정도가 분해되었고, pH 2 조건에서는 같은 시간 동안 24%가 분해되는 것으로 나타났다. 식품의 열처리 조건은 시간이 길지 않으므로 큰 영향을 주지 않을 것으로 판단되나, 제과나 제빵과 같이 고온에서 조리되는 경우에는 분해량이 더 증가할 것으로 판단된다.

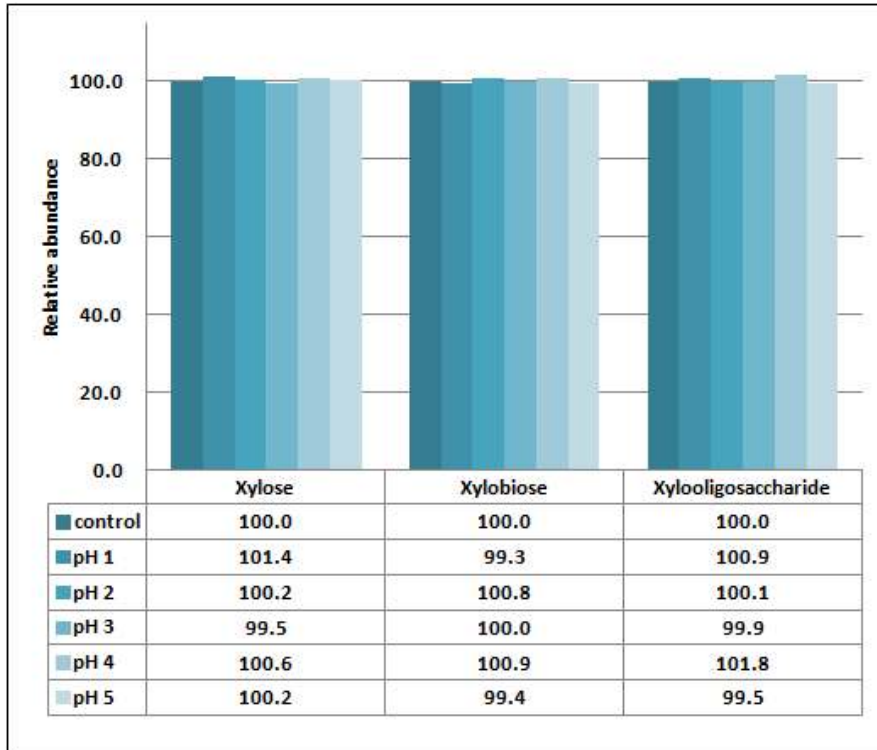


Fig. 10 Relative abundance of xylose, xylobiose, xylooligosaccharide in acidic conditions.

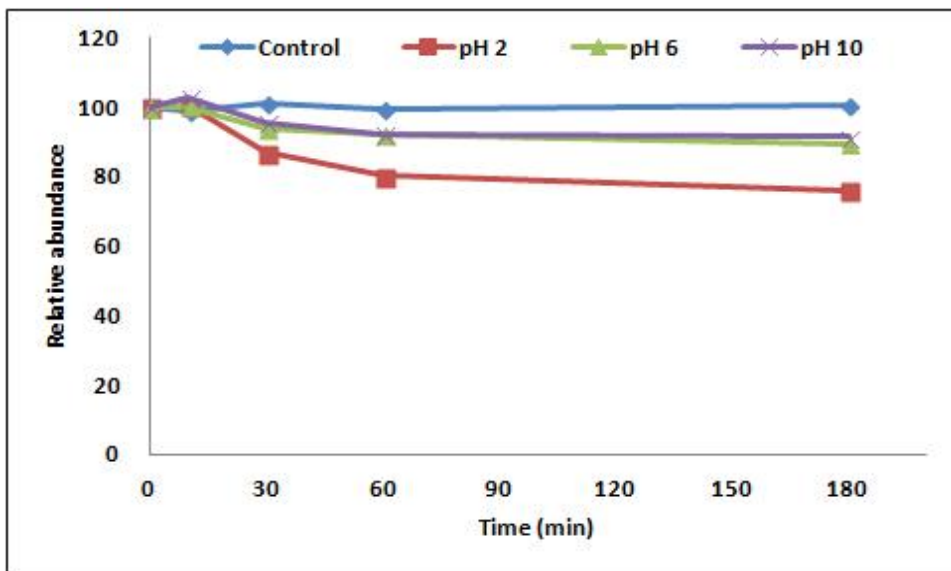


Fig. 11 Relative abundance of xylobiose in pH 2, pH 6 and pH 10 conditions.

## 5. Xylobiose가 함유된 자일로올리고슈가의 정장효능 평가

### 가. 실험방법

#### (1) 연구대상자 모집 및 변비 진단

변비 증세를 나타내는 20대 대학생 80명을 모집하여 기능성 변비의 로마 진단기준에 따라 연구 대상자를 모집하였다.

#### (2) Xylobiose가 함유된 자일로올리고슈가 커피믹스 섭취

피험자를 무작위로 3군으로 나누어 6주 동안 1일 2회 섭취를 통해 배변 개선효과에 대한 설문 평가를 실시하며, 시험군은 대조군(블랙커피 + 일반 설탕 10g)과 시험 1군(블랙커피 + 자일로올리고슈가 10g) 및 시험 2군(자일로올리고슈가 커피믹스)으로 나누어 실시하였다.

#### (3) 설문지 조사 및 통계 분석

설문조사는 1주일에 1회씩 실시하며, 배변횟수 및 배변상태 등을 조사하며, 그룹별로 평균 및 표준편차를 구하고, t-test나 Mann-Whitney test에 의해 비교하며 유의수준 5% 수준 내에서 검증하였다.

### 나. 실험결과

#### (1) Xylobiose가 함유된 자일로올리고슈가 섭취에 따른 배변개선 효과

6주간의 섭취 평가 결과 대조군과 시험 1군은 각각 19명, 시험 2군은 18명이 최종적으로 평가를 완료하였다. 대조군과 시험 1군의 섭취기간에 따른 배변횟수를 평가한 결과 섭취 2주차부터 섭취하는 기간 동안 시험 1군의 배변횟수가 유의적으로 증가하였다( $p < 0.05$ ). 시험 2군의 경우 피험자들의 섭취 전 평균 배변횟수는 주당 2.5회였으나, xylobiose가 함유된 자일로올리고슈가 커피믹스를 섭취한 1주차부터 6주차까지 섭취전과 비교하여 모두 유의적인 차이를 나타냈으며( $p < 0.05$ ), 특히 6주차에는 주당 배변횟수가 5.5회 이상으로 초기보다 2배 이상 증가한 것으로 나타났다.

본 연구를 통해 xylobiose가 함유된 자일로올리고슈가를 하루에 10g 이상 꾸준히 섭취하면 변비개선 효과가 나타나는 것으로 확인되었으며, 자일로올리고당 중 가장 기능성이 우수한 xylobiose를 설탕보완제로 사용할 경우 장건강 증진에 도움을 줄 수 있다고 판단된다.

## 6. $\beta$ -Xylosidase 대량 생산 기술 개발

### 가. 실험방법

#### (1) GRAS 균주 2종의 배지 최적화

재조합 *B. subtilis* B01의 배지 최적화는 Tryptone 10 g/L과 NaCl 10 g/L를 고정한 상태에서 yeast extract를 1, 5, 10 g/L로 첨가하였을 때  $\beta$ -xylosidase 생산 최적 조건을 확인하였다. Yeast extract 5 g/L와 NaCl 10 g/L를 고정한 상태에서 tryptone을 5, 10, 15, 20 g/L로 첨가하였을 때  $\beta$ -xylosidase 생산 최적 조건을 확인하였다.

재조합 *S. cerevisiae* Y01의 배지 최적화는 Peptone 20 g/L, glucose를 20 g/L를 고정한 상태에서 yeast extract를 5, 10, 15, 25 g/L로 첨가하였을 때  $\beta$ -xylosidase 생산 최적 조건을 확인하였다. Yeast extract 5 g/L, glucose를 20 g/L를 고정한 상태에서 peptone을 10, 20, 30, 40, 50 g/L로 첨가하였을 때  $\beta$ -xylosidase 생산 최적 조건을 확인하였다.

Table 1. Culture condition

	<i>B. subtilis</i> B01	<i>S. cerevisiae</i> Y01
Working volume (mL)	100	100
Temp. (°C)	37	30
RPM	150	250
Time (hr)	8 (after induction)	24
Initial pH	8.0	8.0
IPTG Con. (mM)	0.2	-

#### (2) GRAS 균주의 30 L fermenter 적용 배양

Flask culture는 배지 최적화 평가 후  $\beta$ -xylosidase의 생산이 우수한 *S. cerevisiae* Y01 균주를 선정하였으며, scale-up 평가를 비교하기 위하여 2 L 플라스크에 working volume을 500 mL로 하여 flask 배양을 실시하였다. 배양 조건은 Table 1과 동일하며, 배지 조성은 선행 연구를 통해 선정된 yeast extract 10 g/L, tryptone 20 g/L, glucose를 20 g/L로 사용하였다. 30 L fermenter culture는 1차 seed culture는 YNB tryp(-) 배지에서 30°C, 200 rpm, working volume 20 mL 조건으로 배양을 실시하였다. 2차 seed culture는 YPD 배지에서 30°C, 200 rpm, working volume 500 mL 조건으로 배양을 실시하였다. 본 배양은 30 L 발효조(Kobio Tech Co. Ltd. KOREA)에 선행 연구를 통해 선정된 yeast extract 10 g/L, tryptone 20 g/L, glucose를 20 g/L를 배지로 사용하였으며, working volume을 20 L 조건으로 working volume의 2%(v/v)를 2차 seed 배양액을 사용하여 접종하였다. 공기유속 1 vvm, 30°C, 200 rpm에서 44 hr 동안 배양을 진행하였으며, 배양 시간 동안 채취한 샘플은 DCW,  $\beta$ -xylosidase activity, glucose 및 ethanol 농도를 분석하고 용존 산소 농도와 pH 변화를 관찰하였다.

#### (3) Glucose & Ethanol 함량 분석

배양시간 별 glucose와 ethanol을 분석하기 위해 HPLC(Agilent Technologies 1100 series, USA) 장비를 사용하였으며, 컬럼은 Waters Sugar Pak I(Waters, USA), 이동상은 물, 유속은 0.5 mL/min, 온도는 80°C, 검출기는 Refractive Index Detector(RID)를 이용하였다.

#### (4) $\beta$ -xylosidase activity assay

Activity 측정 방법은 1 mM p-nitrophenyl- $\beta$ -D-xylopyranoside 200  $\mu$ L와  $\beta$ -xylosidase 200  $\mu$ L를 넣고, 37°C에서 10분 동안 반응시킨 후 400mM sodium bicarbonate 400  $\mu$ L를 넣어 반응을 정지하였다. p-nitrophenol을 표준물질로 하여 0~200  $\mu$ M 농도에 따른 흡광도를 405 nm에서 측정하고 표준곡선을 작성하였다.  $\beta$ -xylosidase가 생성하는 p-nitrophenol을 정량 분석하여 효소의 활성을 측정하였다. Unit 정의는 1 분에 p-nitrophenyl- $\beta$ -D-xylopyranoside로부터 1  $\mu$ M의 p-nitrophenol을 생성하는데 필요한  $\beta$ -xylosidase의 양으로 정의하였다.

#### (5) $\beta$ -xylosidase 정제

균체를 회수한 후 lysis buffer(50 mM Tris-HCl 300 mM NaCl, 10 mM imidazole, pH 8.0)에 균질화 시켜 Ultrasonic processor(ColepParmer)를 사용하여 세포벽을 파쇄하였다. Cell extract는 8,000 rpm에서 20분 동안 원심 분리하여 상등액을 회수하고, 0.45  $\mu$ m filter에 여과시킨 후 Ni-NTA컬럼(Ni-NTA agarose, Qiagen)을 이용하여 정제하였다. Washing buffer는 50 mM Tris\_HCl, 300 mM NaCl, 20 mM imidazol, pH 8.0을 사용하고, elution buffer는 50 mM Tris\_HCl, 300 mM NaCl, 250 mM imidazol, pH 8.0을 사용하여  $\beta$ -xylosidase를 정제하였다. Cell extract Loading volume, impurity washing volume, Elution volume을 확인하여  $\beta$ -xylosidase 정제 조건을 최적화 하였다.

### 나. 실험결과

#### (1) GRAS 균주 2종의 배지 최적화

Fig. 1은 재조합 B. subtilis B01 균주의 배지 최적화 실험 결과이며, (A)는 yeast extract 첨가량에 따른  $\beta$ -xylosidase의 발현량 변화를 관찰한 것으로 yeast extract 10 g/L 조건에서 효소의 발현량이 3.4 U/L 수준으로 가장 우수한 것으로 나타났으며, yeast extract 1 g/L 조건 보다 3.2배 높은 것으로 확인되었다. Fig. 1은 재조합 B. subtilis B01 균주의 배지 최적화 실험 결과이며, (B)는 tryptone 첨가량에 따른  $\beta$ -xylosidase의 발현량 변화를 관찰한 것으로 tryptone 20 g/L 조건에서 2.5 U/L로 효소의 발현량이 우수한 것으로 나타났으며, tryptone 5 g/L 조건 보다 2.3배 높은 것으로 확인되었다. B. subtilis B01 균주의  $\beta$ -xylosidase 발현량 향상을 위한 배지 최적화 조건은 yeast extract 10 g/L, tryptone 10 g/L, NaCl 10 g/L로 선정하였다.



Fig. 1. Comparison of  $\beta$ -xylosidase expression levels from *B. subtilis* B01 by yeast extract concentration(A) and tryptone concentration(B).

Fig. 2는 재조합 *S. cerevisiae* Y01 균주의 배지 최적화 실험 결과이며, (A)는 yeast extract 첨가량에 따른  $\beta$ -xylosidase의 발현량의 차이를 관찰한 것으로 yeast extract 25 g/L 조건에서 효소의 발현량이 16.6 U/L 수준으로 가장 우수한 것으로 나타났으며, yeast extract 5 g/L 조건 보다 2.7 배 높은 것으로 확인되었다. Fig. 2는 재조합 *S. cerevisiae* Y01 균주의 배지 최적화 실험 결과이며, (B)는 peptone 첨가량에 따른  $\beta$ -xylosidase의 발현량의 차이를 관찰한 것으로 peptone 40 g/L 조건에서 효소의 발현량이 17.07 U/L 수준으로 가장 우수한 것으로 나타났으며, peptone 10 g/L 조건 보다 2배 높은 것으로 확인되었다. *S. cerevisiae* Y01 균주의  $\beta$ -xylosidase 발현량 향상을 위한 배지 최적화 조건은 yeast extract 10 g/L, tryptone 40 g/L, glucose를 20 g/L가 가장 우수한 것으로 확인되었으나, 상업화를 고려할 경우 yeast extract 10 g/L, tryptone 20 g/L, glucose를 20 g/L가 적합하다고 사료되며  $\beta$ -xylosidase의 발현량에도 큰 차이가 없다고 판단된다.

Fig. 3은 재조합 *S. cerevisiae* Y01의  $\beta$ -xylosidase 발현량과 glucose 첨가량의 관계를 관찰한 것으로 기준 배지 조건에서 glucose를 더 첨가할 경우 균체량은 증가하지만  $\beta$ -xylosidase 발현량은 현저히 감소하는 것으로 나타났으므로 glucose의 최적화 조건은 20 g/L로 판단된다.

Fig. 2. Comparison of  $\beta$ -xylosidase expression levels from *S. cerevisiae* Y01 yeast extract concentration(A) and peptone concentration(B).

Fig. 3. Comparison of  $\beta$ -xylosidase expression levels from *S. cerevisiae* Y01 by glucose concentration.

(2) GRAS 균주의 30 L fermenter 적용 배양

Flask 배양의 경우 Fig. 4의 (A)와 같이  $\beta$ -xylosidase의 발현량은 13.8 U/L로 선행 연구와 유사한 수준으로 확인되었으며, 부산물인 에탄올이 8.1 g/L로 비교적 많이 생성된 것으로 나타났다. 12 h 이후 초기에 투입된 glucose는 모두 소모하였으며, cell growth 및  $\beta$ -xylosidase 발현량은 더 이상 증가하지 않는 것으로 나타났다. 30 L fermenter 배양의 경우 Fig. 4의 (B)와 같이 flask 배양과 달리 glucose를 모두 소모한 12 hr 이후에도 에탄올과 같은 대사산물 이용하여 지속적으로 균체량이 증가하는 것으로 판단되며,  $\beta$ -xylosidase 발현량 또한 증가하는 것으로 나타났다. 에탄올을 모두 소모한 36 hr에 DCW는 8.4 g/L로 가장 높았으며,  $\beta$ -xylosidase의 발현량도 23.7 U/L으로 높게 나타났다.

Fig. 4.  $\beta$ -xylosidase expression from *S. cerevisiae* Y01 for scale-up production, flask test(A) and 30 L fermenter test(B).

30 L fermenter의 경우 미생물에게 원활한 산소 공급을 통해 플라스크 배양보다 균체량 및  $\beta$ -xylosidase 발현량이 각각 1.9 배, 1.7 배 증가하였으며, 부산물인 에탄올은 1.7 g/L 적게 생산하는 것으로 확인되었다. *S. cerevisiae* Y01 균주를 이용한  $\beta$ -xylosidase 대량 생산을 위한 배지는 yeast extract 10 g/L, tryptone 20 g/L, glucose를 20 g/L이며, 배양 조건은 공기유속 1 vvm, 30°C, 200 rpm이며, 36 hr 동안 배양을 진행할 경우 flask 배양보다 약 2배 높은 23.7 U/L의  $\beta$ -xylosidase를 대량 확보할 수 있다.

(3)  $\beta$ -xylosidase 정제 공정 최적화

Loading capacity 최적화는 *S. cerevisiae* Y01 균주로부터 생산된  $\beta$ -xylosidase cell extract의 loading capacity를 확인하기 위하여 0.5 mL Ni-NTA resin을 이용한 정제 공정 최적화를 실시한 결과이며, 2 반복 실험을 실시하였다(Fig. 5). Cell extract를 12 mL (total loading activity 2.4 U) 이상 loading 할 경우 1차 실험(A)과 2차 실험(B)에서 동일하게 activity loss가 10% 이상으로 증가하는 경향을 나타내었으나, cell extract를 20 mL (total loading activity 3.9 U)까지 loading 할 경우 activity loss가 최대 10.5%로 확인되어 상기 조건을 loading capacity로 선정하였다.

Fig. 5. Loading capacity test of  $\beta$ -xylosidase, 1st test(A) and 2nd test(B).

Washing step 최적화는 loading capacity로 선정된 cell extract를 20 mL (total loading activity 3.9 U)을 0.5 mL Ni-NTA resin에 loading 하고, impurity 제거를 위한 washing volume 결정을 위한 평가를 실시한 결과 Table 2와 같이 6 CV(column volume) washing 을 실시할 경우 activity loss가 1% 이하인 것으로 확인되었다.

Table 2.  $\beta$ -xylosidase activity loss by washing step

Washing volume	2 CV <sup>1)</sup>	4 CV	6 CV	8 CV	10 CV
1st test-activity loss (%)	0.4	0.7	0.9	1.1	1.2
2nd test-activity loss (%)	0.4	0.7	1.0	1.2	1.4

<sup>1)</sup> CV : colume volume.

Elution step 최적화는 washing step에서 선정된 6 CV(column volume) washing을 실시한 후  $\beta$ -xylosidase 회수를 위한 elution step 실험을 실시한 결과 Table 3과 같이 4 CV elution을 실시할 경우 효소를 85% 이상을 회수할 수 있는 것으로 확인되었다.

Table 3.  $\beta$ -xylosidase activity yield

Elution volume	2 CV <sup>1)</sup>	4 CV	6 CV
1st test-activity yield (%)	81.5	85.2	85.2
2nd test-activity yield (%)	81.2	85.6	85.6

<sup>1)</sup> CV : colume volume.

#### (4) $\beta$ -xylosidase 정제 공정 scale-up

Loading capacity 최적화는 *S. cerevisiae* Y01 균주로부터 생산된  $\beta$ -xylosidase cell extract의 loading capacity를 확인하기 위하여 선행 연구의 최적화 조건을 바탕으로 5 mL Ni-NTA resin을 이용한 정제 공정 최적화 및 재현성 확인을 위하여 2 반복 실험을 실시하였다(Fig. 6). Cell extract를 132 mL(total loading activity 35 U)을 loading한 결과 small scale 실험과 유사한 결과를 나타냈으며, 1차 실험(A)과 2차 실험(B)에서 각각 9.9%, 9.8%의 activity loss가 나타났으며, 이는 small scale 결과와 유사한 것으로 확인되었다. 상기 결과로부터  $\beta$ -xylosidase의 loading capacity는 7 U/Ni-NTA resin(mL)으로 확인되었다. Washing step 최적화는 impurity 제거를 위한 washing volume 확인 실험은 small scale 결과를 바탕으로 실시하였으며, Table 4와 같이 6 CV(column volume) washing을 실시한 결과 1차 실험과 2차 실험에서 모두 0.5% 이하의 activity loss를 나타내었다.

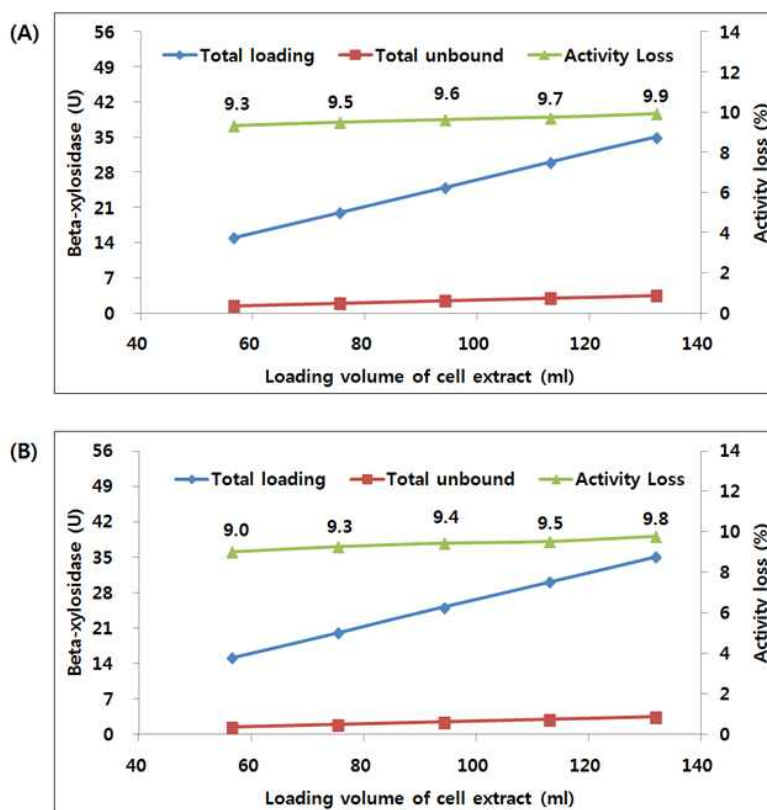


Fig. 6. Loading capacity test of  $\beta$ -xylosidase, 1st test(A) and 2nd test(B).

Elution step 최적화는 sashing step에서 선정된 6 CV(column volume) washing을 실시한 후  $\beta$ -xylosidase 회수를 위한 elution step 실험을 실시한 결과 Table 5와 같이 4 CV elution을 실시할 경우 효소를 81.5% 이상을 회수할 수 있는 것으로 확인되었다.

Table 4.  $\beta$ -xylosidase activity loss by washing step

Washing volume	2 CV <sup>1)</sup>	4 CV	6 CV
1st test-activity loss (%)	0.4	0.4	0.5
2nd test-activity loss (%)	0.4	0.4	0.5

<sup>1)</sup> CV : colome volume.

Table 5.  $\beta$ -xylosidase activity yield

Elution volume	2 CV <sup>1)</sup>	4 CV	6 CV
1st test-activity yield (%)	78.3	81.5	81.5
2nd test-activity yield (%)	81.3	81.8	81.8

<sup>1)</sup> CV : colome volume

## 7. Xylobiose 생합성 공정 최적화

### 가. 실험방법

#### (1) GRAS 발현 효소 2종의 생합성 xylobiose 반응

기질은 xylose의 최종 농도가 60%(w/v), 90%(w/v)이 되도록 준비하고, 효소는 *B. subtilis* B01 균주와 *S. cerevisiae* Y01 균주로부터 생산된  $\beta$ -xylosidase를 각각 정제하여 0.1, 1, 5 U/mL 이 되도록 반응액에 첨가하였다. Xylobiose 생합성 반응 온도는 50°C, 반응 시간은 24 hr으로 진행하며, 0, 3, 6, 12, 24 hr에 100  $\mu$ L씩 샘플링하여 100°C, 15min 동안 처리하여 효소를 불활성화 시킨다. Xylobiose(X2)의 생합성 전환율 평가는 HPLC(Agilent Technologies 1100 series, USA)를 사용하였으며, 컬럼은 Waters Sugar Pak I(Waters, USA), 이동상은 물, 유속은 0.5 mL/min, 온도는 80°C, 검출기는 Refractive Index Detector(RID)를 이용하였다.

#### (2) 효소 고정화 기술 확보

Alginate를 이용한 고정화 기술 확보(Adsorption)는 3% sodium alginate 용액을 제조하여 50°C에서 용해시키고, 1 U의  $\beta$ -xylosidase와 잘 섞은 후 30, 50, 70, 90, 100, 200 mM calcium chloride 용액에 각각 bead를 제조하였다. Chitosan을 이용한 고정화 기술 확보(Cross-linking)는 low molecular chitosan과 High molecular chitosan 2종을 각각 4g 씩 취하여 2% acetic acid 용액 200mL에 넣고 용해시킨 후 3M NaOH 용액을 이용하여 pH 8로 맞춰 chitosan 침전물을 생기면 원심분리기(6000 rpm, 10 min)를 사용하여 회수하였다. Chitosan 침전물에 1% acetic acid 용액을 넣고 용해 시킨 3M NaOH 용액을 이용하여 pH 4로 맞추고, 최종 농도가 2.5%가 되도록 glutaraldehyde 용액을 첨가하여 30°C, 12 hr 동안 activation 시킨다. 활성화된 chitosan은 50 mM phosphate buffer (pH 8)를 이용하여 washing하고, 효소와 혼합하여 4 hr 동안 교반하여 고정화를 실시한다.

#### (3) Xylobiose 생합성 공정 최적화

*S. cerevisiae* Y01 균주로부터 생산된  $\beta$ -xylosidase를 이용하여 고농도 xylose 조건인 90, 95, 100 %(w/v)에서 xylobiose 생합성이 가능한 반응 최적화를 실시한다. 반응 온도는 50°C로 선행 연구 결과를 바탕으로 선정하였고, pH는 5 정도로 생합성 반응액 정제공정을 고려하여 완충용액을 사용하지 않고 xylobiose를 생합성 할 수 있는 공정 최적화 조건 탐색을 실시하였다. *S. cerevisiae* Y01 균주로부터 생산된  $\beta$ -xylosidase를 이용하여 고농도 xylose 조건인 90 %(w/v)에서  $\beta$ -xylosidase 첨가량을 1, 2, 3, 4, 5 U/mL 처리하여 xylobiose 생합성 최적 반응 공정을 탐색하였다. Xylobiose(X2)의 생합성 전환율 평가는 HPLC(Agilent Technologies 1100 series, USA)를 사용하였으며, 컬럼은 Waters Sugar Pak I(Waters, USA), 이동상은 물, 유속은 0.5 mL/min, 온도는 80°C, 검출기는 Refractive Index Detector(RID)를 이용하였다.

## 나. 실험결과

### (1) GRAS 발현 효소 2종의 생합성 xylobiose 반응

*B. subtilis* B01 균주로부터 생산된  $\beta$ -xylosidase의 xylobiose(X2) 전환율은 Fig. 7은 *B. subtilis* B01 균주로부터 생산된  $\beta$ -xylosidase의 xylobiose(X2) 전환율을 나타낸 것으로 (A)에서와 같이 60%(w/v) xylose 조건에서 24 hr 동안 반응시킨 경우 최대 8%까지 X2 생합성이 가능한 것으로 확인되었으며,  $\beta$ -xylosidase 1 U/mL과 5 U/mL에서 동일한 것으로 나타났다. (B)의 90%(w/v) xylose 조건에서 24 hr 동안 반응시킨 결과로  $\beta$ -xylosidase 5 U/mL 처리 조건에서 X2 전환율이 최대 13.4%로 나타났고, 효소의 첨가량이 많으면 X2 생합성 전환율이 증가하나, 60%(w/v) xylose 조건에서 1 U/mL과 5 U/mL은 유사한 것으로 확인되었다.

Fig. 7. Time course of xylobiose(X2) conversion ratio by  $\beta$ -xylosidase from *B. subtilis* B01, 60%(w/v) xylose(A) and 90%(w/v) xylose(B).

*S. cerevisiae* Y01 균주로부터 생산된  $\beta$ -xylosidase의 xylobiose(X2) 전환율은 *S. cerevisiae* Y01 균주로부터 생산된  $\beta$ -xylosidase의 xylobiose(X2) 전환율을 평가한 결과 Fig. 8의 (A)에서와 같이 60%(w/v) xylose 조건에서 24 hr 동안 반응시킨 경우  $\beta$ -xylosidase 5 U/mL은 최대 8.5%의 X2 전환율을 나타내었고, *B. subtilis* B01 균주로부터 생산된  $\beta$ -xylosidase와 유사한 반응 특성을 지닌 것으로 확인되었다. 90%(w/v) xylose 조건에서 24 hr 동안 반응시킨 결과로  $\beta$ -xylosidase 5 U/mL 처리 조건에서 X2 전환율이 최대 15.7%로 가장 높은 것으로 나타났으며, *B. subtilis* B01 균주로부터 생산된  $\beta$ -xylosidase 보다 X2 생합성이 우수한 것으로 판단된다.



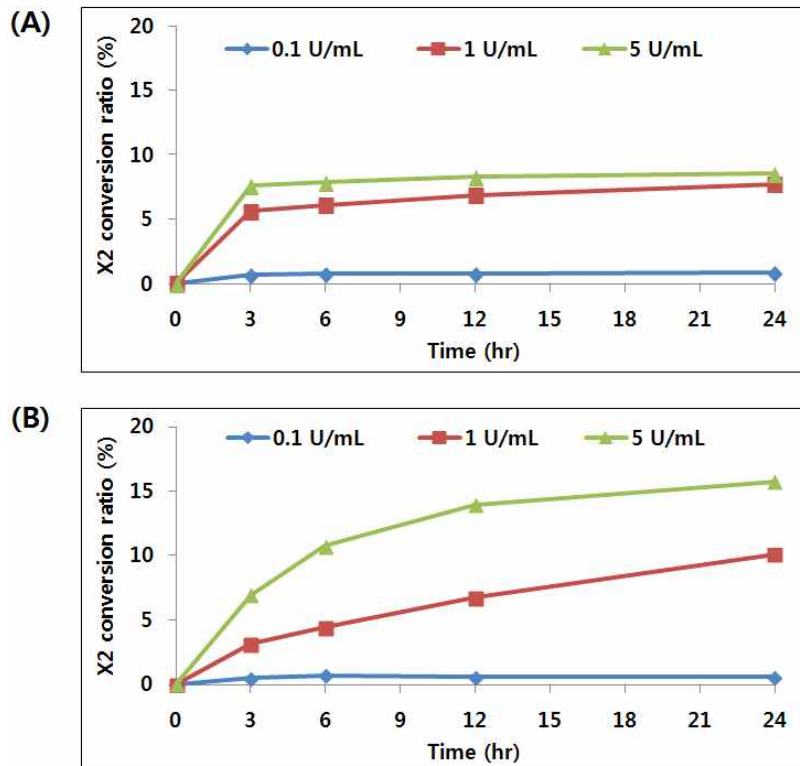


Fig. 8. Time course of xylobiose(X2) conversion ratio by  $\beta$ -xylosidase from *S. cerevisiae* Y01, 60%(w/v) xylose(A) and 90%(w/v) xylose(B).

(2) 효소 고정화 기술 확보

3% sodium alginate 용액을 이용하여 1 U의  $\beta$ -xylosidase와 잘 섞은 후 30, 50, 70, 90, 100, 200 mM calcium chloride 용액에 각각 bead를 제조한 결과 Fig. 9에서와 같이 고정화 수율은 30 mM calcium chloride 용액에서 89.3%였으며, 50 mM calcium chloride 이상 조건에서는 모두 90% 이상으로 우수한 것으로 나타났다.

Fig. 9. Sodium alginate immobilization yield of  $\beta$ -xylosidase from *E.coli*.

Low molecular chitosan 담체와 high molecular chitosan 담체 3 g에  $\beta$ -xylosidase를 각각 1, 3 U을 넣고, incubation 시켜서 효소와 결합 할 수 있도록 한 결과 고정화 수율이 모두 90% 이상으로 나타났다(Table 7). 고정화 효소를 이용하여 xylose 60% 조건에서 xylobiose 생합성 평가를 실시한 결과 alginate를 이용한 고정화 방법과 chitosan을 이용한 고정화 방법 모두 xylobiose가 생합성 되는 것으로 확인되었으며, xylobiose 생합성 활성을 나타내는 것으로 확인되었다. Alginate를 이용한 고정화 방법과 chitosan을 이용한 고정화 방법은 immobilization yield가 90% 정도로 우수한 것으로 나타났으며, activity yield는 10% 정도로 확인었다. 고정화 효소를 상업적으로 사용하기 위해서 효소의 고정화 수율, 효소 활성의 장기 안정성, 고정화 비용, 생산량과 수급 예측, 균의 오염방지, 안전성 등을 중심으로 검토한 결과 상기  $\beta$ -xylosidase는 유리 효소로 사용하는 것이 생합성 xylobiose 생합성에 적합하다고 판단된다. 따라서, xylobiose 생합성 공정의 최적화 조건 검토는  $\beta$ -xylosidase 유리효소를 이용한 batch 반응을 기준으로 연구를 실시하였다.

Table 7. Chitosan immobilization yield of  $\beta$ -xylosidase from E.coli

	$\beta$ -xylosidase	immobilization yield (%)
Low molecular chitosan	1 U	92.4
	3 U	91.2
High molecular chitosan	1 U	94.2
	3 U	92.5

### (3) Xylobiose 생합성 공정 최적화

고농도 기질 농도에 따른 xylobiose 생합성 공정 최적 조건을 탐색하기 위하여 S. cerevisiae Y01 균주로부터 생산된  $\beta$ -xylosidase를 과량 사용하여 각 기질 농도별로 xylobiose conversion 평형값을 확인하였다. Fig. 10의 (A), (B), (C) 조건 모두 24 hr 이후 평형에 도달한 것으로 판단되며, 72 hr 까지 반응을 시킨 결과 소량 증가하는 양상을 나타낸다. Fig. 10의 (A)는 xylose 90%(w/v) 조건에서  $\beta$ -xylosidase를 5 U/mL, 10 U/mL로 첨가한 것으로 두 조건 모두 72 hr에 xylobiose 생합성 전환율이 가장 높았으며, 이때 xylobiose 생합성 전환율은  $\beta$ -xylosidase 5 U/mL을 첨가한 경우 16.2%, 10 U/mL을 첨가한 경우 16.4%로 나타났다. Fig. 10의 (B)는 xylose 95%(w/v) 조건에서  $\beta$ -xylosidase를 5 U/mL, 10 U/mL로 첨가한 것으로 두 조건 모두 72 hr에 xylobiose 생합성 전환율이 가장 높았으며, 이때 xylobiose 생합성 전환율은  $\beta$ -xylosidase 5 U/mL을 첨가한 경우 16.3%, 10 U/mL을 첨가한 경우 17.6%로 나타났다. Fig. 10의 (C)는 xylose 100%(w/v) 조건에서  $\beta$ -xylosidase를 5 U/mL, 10 U/mL로 첨가한 것으로 두 조건 모두 72 hr에 xylobiose 생합성 전환율이 가장 높았으며, 이때 xylobiose 생합성 전환율은  $\beta$ -xylosidase 5 U/mL을 첨가한 경우 15.9%, 10 U/mL을 첨가한 경우 17.2%로 나타났다.

Fig. 10. Time course of xylobiose(X2) conversion ratio by  $\beta$ -xylosidase from *S. cerevisiae* Y01, 90%(w/v) xylose(A), 95%(w/v) xylose and 100%(w/v) xylose(C).

고농도 xylose에서  $\beta$ -xylosidase를 과량 첨가하여 X2 생합성의 평형값을 확인한 결과 각 기질 농도에 따라 차이가 있으나, xylose 90%(w/v) 이상에서  $\beta$ -xylosidase 5 U/mL 정도 첨가할 경우 16% 이상의 xylobiose 생합성 전환율을 나타냈으며,  $\beta$ -xylosidase를 10 U/mL까지 첨가할 경우 xylobiose 생합성 전환율은 최대 18% 정도로 확인되었다.

상기 조건은 과량의 효소를 사용한 것으로 상업적으로 생합성 xylobiose를 생산하기 위해서는 최소의 효소 처리량 조건 확보가 필요하며, 효소의 처리량을 낮추기 위해서 Fig. 11과 같이 효소 처리량에 따른 xylobiose 생합성 전환율을 평가하였다. Fig. 11은 xylose 90%(w/v) 조건에서  $\beta$ -xylosidase 1, 2, 3, 4, 5 U/mL로 첨가한 후 24, 48 hr에서 X2 생합성 전환율을 평가한 것으로  $\beta$ -xylosidase 2 U/mL을 처리한 후 48 hr이 경과하면 X2 생합성 전환율이 약 16% 까지 도달할 수 있는 것으로 나타났다. X2 생합성 반응 최적 조건은 xylose 90%(w/v),  $\beta$ -xylosidase 2 U/mL을 첨가하여 48 hr 동안 반응시키는 것으로 확인되었다.

Fig. 11. Evaluation of xylobiose (X2) conversion ratio.

## 8. Xylobiose 정제기술 최적화

### 가. 실험방법

(1) Simulated Moving Bed(SMB)를 이용한 자일로올리고당 유래의 xylobiose 대량 정제  
Dowex 50WX4 hydrogen(Sigma 217484) resin을 500 mM NaCl에 activation된 작용기를 Na<sup>+</sup>로 치환시키고, 217 ×35 mm 규격 column에 resin을 충전하여 5 column-3 zone으로 SMB 장치를 구성하였다. Column 온도는 65°C, desorbent, feed, raffinate, extract의 flow는 설계된 프로그램 값에 맞추어 정제를 실시하였으며 정제 목적물질은 raffinate port에서 회수하였다. Ring1 정제에서 xylobiose(X2)가 30% 함유된 자일로올리고당을 이용하였으며, feed의 농도는 total solute 기준 300 g/L가 되도록 맞추고, raffinate port를 통해 xylotriose(X3) ~xylohexaose (X6)를 제거하며, Ring1에서 정제된 extract solution을 300 g/L로 농축시킨 후 Ring2 정제를 실시하였다. Ring2 정제는 extract port를 통해 xylose(X1)가 제거되며, raffinate port를 통해 정제된 xylobiose를 회수한다.

(2) SMB 정제 시스템을 이용한 생합성 xylobiose 정제 조건 최적화

Resin은 상기와 동일하며, 217 ×25 mm 규격 column에 resin을 충전하여 3 column - 3 zone으로 SMB 장치를 구성하였다. Column 온도는 65°C, desorbent, feed, raffinate, extract의 flow는 설계된 프로그램 값에 맞추어 정제를 실시하였으며 정제 목적물질은 raffinate port에서 회수한다. Ring1 정제에서 사용한 생합성 X2 반응물은 X1, X2, X3가 각각 145.01, 31.54, 2.47 g/L로 구성되어 있으며, raffinate port를 통해 X1을 제거하며, Ring1에서 정제된 extract solution을 농축시킨 후 Ring2 정제를 실시하였다. Ring2 정제는 extract port를 통해 X3가 제거되며, raffinate port를 통해 정제된 xylobiose를 회수한다.

### 나. 실험결과

(1) Simulated Moving Bed(SMB)를 이용한 자일로올리고당 유래의 xylobiose 대량 정제  
Feed의 농도는 total Solute 농도가 300 g/L가 되도록 맞추었으며, 그 중 X2의 함량은 88.9 g/L로 약 30%를 차지하는 것으로 확인되었다(Fig. 12).

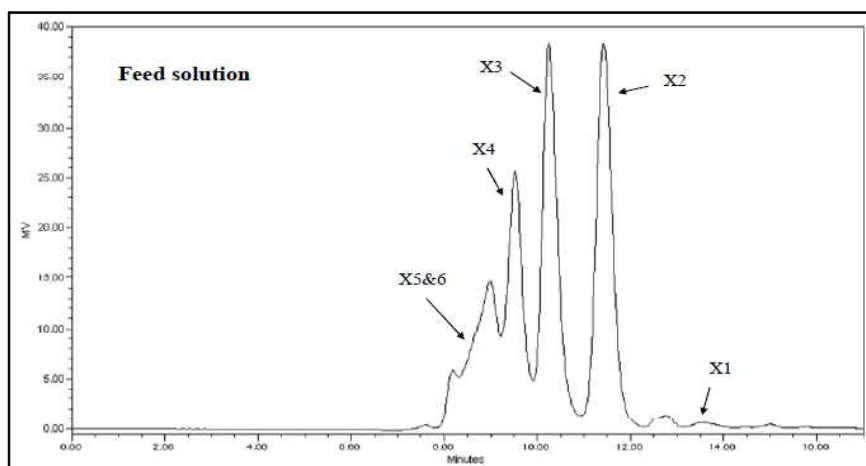


Fig. 12. HPLC chromatogram of xylooligosaccharides.

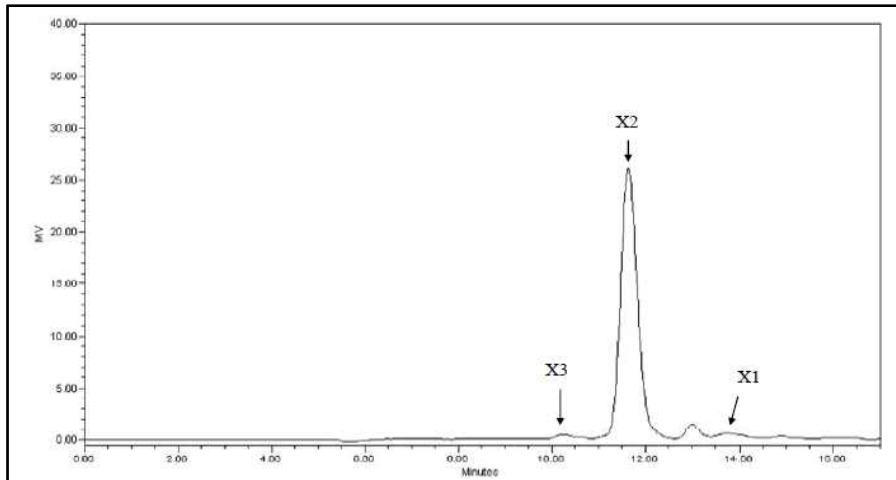


Fig. 13. HPLC chromatogram of Ring1 extract solution.

Ring1 정제에서 raffinate port를 통해 X3~X6가 제거되었으며, extract port 를 통해 1차 정제된 product를 회수하여 분석한 결과 X1, X2, X3의 농도가 각각 1.76, 76.70, 1.20 g/L로 나타났다. 1차 정제된 product의 분석결과는 Fig. 13에서와 같이 X2의 순도가 30%에서 96%로 현저히 높아진 것으로 확인되었다. Ring2 정제에서는 extract port를 통해 X1이 제거되었으며, raffinate port를 통해 X2를 회수함. Raffinate port를 통해 정제된 solution을 분석한 결과 X2와 X3의 농도가 각각 90.6, 1.53 g/L로 확인되었으며, 순도 98% 이상의 X2를 얻는데 성공하였다(Fig. 14). 상기 조건으로 순도 98% 이상의 X2를 총 3.8 kg 정제하였다.

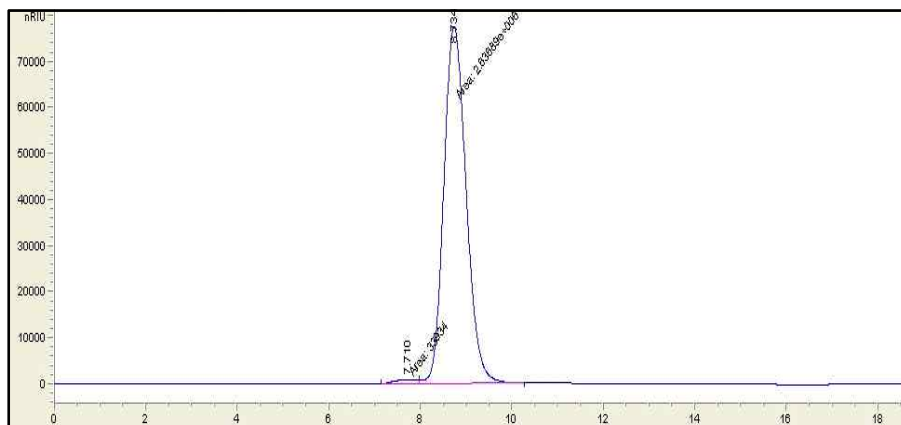


Fig. 14. HPLC chromatogram of Ring2 raffinate solution (X2 98%).

## (2) SMB 정제 시스템을 이용한 생합성 xylobiose 정제 조건 최적화

생합성 xylobiose 반응물은 재조합 E.coli 에서 발현된  $\beta$ -xylosidase를 이용하여 xylose 95% (w/v), 50°C, 24 hr 조건에서 제조하였으며, X1, X2, X3의 농도가 각각 145.01, 31.54, 2.47 g/L로 구성되었다(Fig. 15).

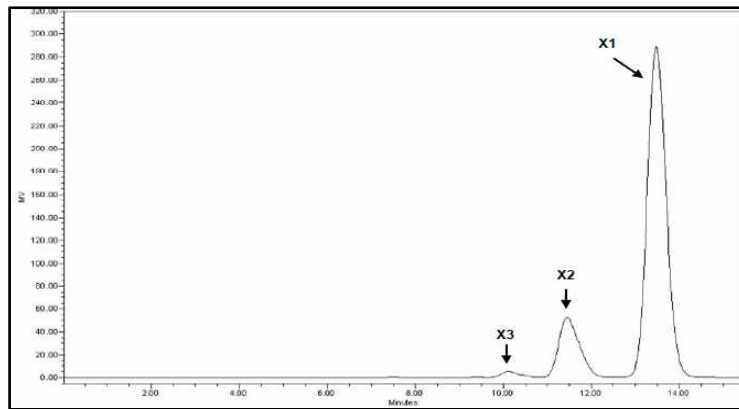


Fig. 15. HPLC chromatogram of biosynthetic xylobiose reaction mixture.

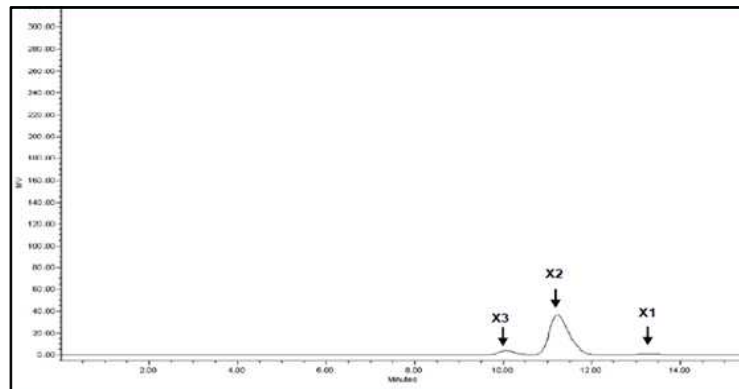


Fig. 16. HPLC chromatogram of biosynthetic xylobiose reaction mixture after Ring1 purification.

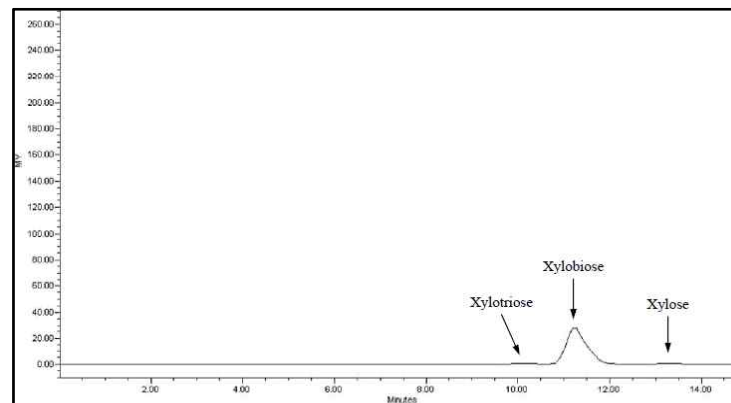


Fig. 17. HPLC chromatogram of biosynthetic xylobiose after Ring2 purification.

Ring1 정제 결과 제거 대상 물질인 X1이 145.01 g/L에서 0.29 g/L로 99% 이상 제거되었고, X2의 순도는 17.6%에서 90.9% 높아진 것으로 확인됨. Ring1에서 정제된 raffinate 용액의 분석결과는 Fig. 16과 같으며, Ring1의 raffinate 용액을 농축하여 Ring2의 Feed로 사용하였다. Ring2 정제 결과 X2의 순도는 98.5%로 목표 순도인 98% 이상의 xylobiose 확보에 성공하였다(Fig. 17).

## 9. Xylobiose 결정화 기술개발

### 가. 실험방법

#### (1) 온도에 따른 xylobiose 용해도 특성 평가는

30~70°C 조건에서 5°C 간격으로 일정하게 유지시킨 3차 증류수에 xylobiose 분말을 조금씩 투입하여 xylobiose 분말이 더 이상 녹지 않는 상태의 투입량과 용액의 부피를 산출하여 xylobiose의 포화농도곡선을 작성하였다.

#### (2) Xylobiose 결정화 공정 최적화

Evaporator를 이용하여 100 torr, 70°C 조건에서 90%(w/v) xylobiose 과포화 용액을 제조하고, 온도를 60°C로 낮춘 후 1 hr 동안 incubation 시킨 뒤 과포화 용액의 xylobiose 중량의 0.01~0.05%가 되도록 seed를 투입하고, 압력을 500 torr로 맞춘 후 1 hr 동안 교반하여 결정 생성 조건을 확인되었다. 미세 결정이 생성되면 1 °C/hr 씩 온도를 낮추며 결정 성장의 최적 조건을 확보하고, 50°C로 가열된 에탄올로 2~3회 washing하여 시럽을 제거한 후 xylobiose를 60°C dry oven에서 건조하였다.

### 나. 실험결과

#### (1) 온도에 따른 xylobiose 용해도 특성 평가

30~70°C 조건에서 xylobiose의 용해도 특성을 평가한 결과 Fig. 18과 같으며, 35°C에서 xylobiose의 용해도는 600 g/L이며, 60°C에서 xylobiose의 용해도는 750 g/L로 확인되었다.

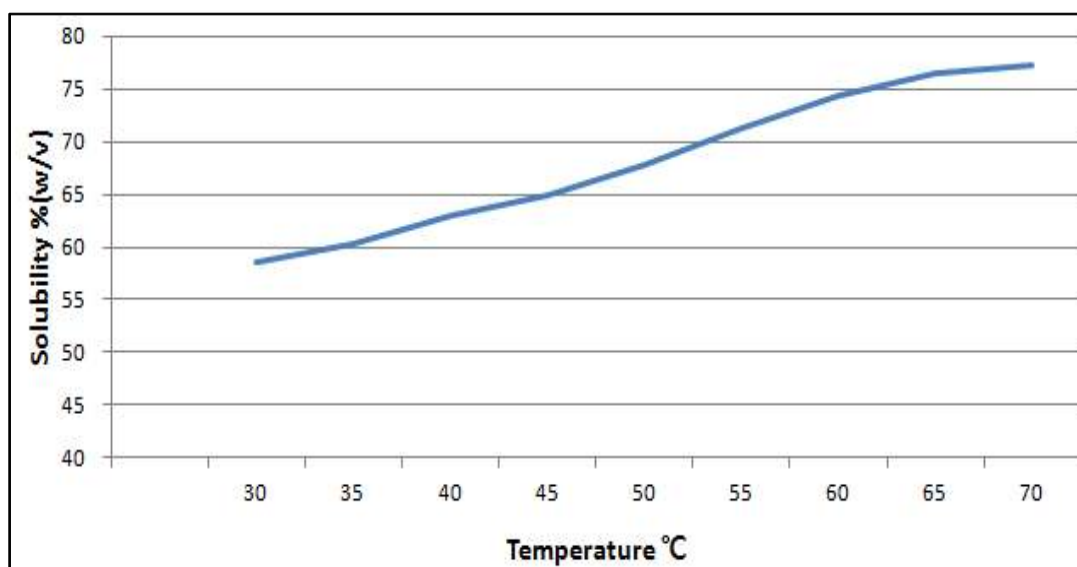


Fig. 18. Solubility curve of xylobiose with temperature.



## (2) Xylobiose 결정화 공정 최적화

Evaporator를 이용하여 100 torr, 70°C 조건에서 90% (w/v) xylobiose 과포화 용액을 제조하고, 온도를 60°C로 낮춘 후 1 hr 동안 incubation 시킨 뒤 과포화 용액의 xylobiose 중량의 0.01~0.05%가 되도록 seed를 투입하고, 압력을 500 torr로 맞춘 후 1 hr 동안 교반하여 결정 생성이 확인되었다. 미세 결정이 생성이 육안으로 확인된 이후 1°C/hr 씩 온도를 낮추며 결정 성장의 최적 조건을 관찰한 결과 45°C로 나타났으며, 50°C로 가열된 에탄올로 2~3회 washing하여 시럽을 제거한 후 xylobiose를 60°C dry oven에서 건조하여 Fig. 19와 같은 xylobiose 결정을 세계 최초로 확보하였다.



Fig. 19. Xylobiose crystal.

### (3) Xylobiose 결정화 공정 최적화

Evaporator를 이용하여 100 torr, 70°C 조건에서 90% (w/v) xylobiose 과포화 용액을 제조하고, 온도를 60°C로 낮춘 후 1 hr 동안 incubation 시킨 뒤 과포화 용액의 xylobiose 중량의 0.01~0.05%가 되도록 seed를 투입하고, 압력을 500 torr로 맞춘 후 1 hr 동안 교반하여 결정 생성이 확인되었다. 미세 결정이 생성이 육안으로 확인된 이후 1°C/hr 씩 온도를 낮추며 결정 성장의 최적 조건을 관찰한 결과 45°C로 나타났으며, 50°C로 가열된 에탄올로 2~3회 washing하여 시럽을 제거한 후 xylobiose를 60°C dry oven에서 건조하여 Fig. 19와 같은 xylobiose 결정을 세계 최초로 확보하였다.



Fig. 19. Xylobiose crystal.

## 10. Xylobiose의 기능성 규명 (in vitro)

### 가. 실험방법

#### (1) Rat-sucrase preparation

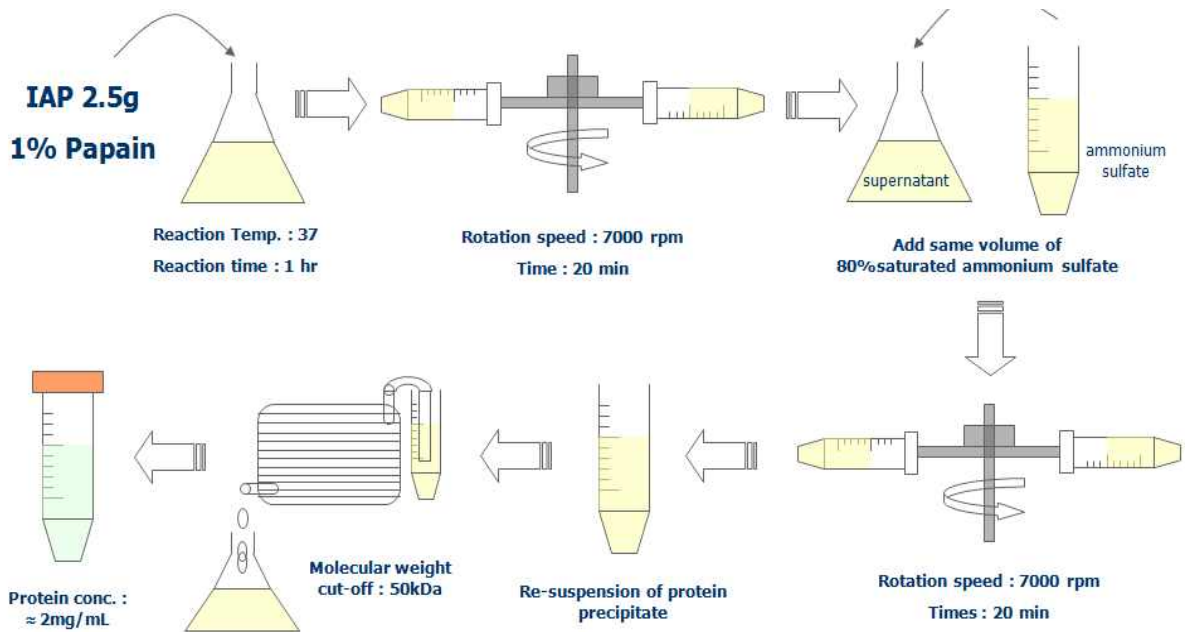


Fig. 1. Rat-sucrase preparation method.

#### (2) Xylobiose의 rat-sucrase 활성억제 반응

Sucrose(대조군), XBS 7(sucrose with 7% xylobiose), XBS 10(sucrose with 10% xylobiose), XBS 14(sucrose with 14% xylobiose) 농도는 최종 반응액의 5%가 되도록 준비하고, rat-sucrase 추출액은 단백질을 기준으로 반응액 최종농도의 50 ug/mL가 되도록 첨가하여 37°C에서 6시간 동안 반응을 시킨 후 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6 시간에 100 uL씩 샘플링을 하고, 99°C에서 15분 동안 열처리하여 효소를 불활성화 시킨다. 설탕분해 저해율 (%) = 100-(실험군의 포도당 생성량/설탕의 포도당 생성량 × 100)

#### (3) Glucose 분석

Rat-sucrase 반응을 통해 생성된 glucose 분석은 HPLC(Agilent Technologies 1100 series, USA)를 이용하였으며, 컬럼은 Waters Sugar Pak I(Waters, USA), 이동상은 물, 유속은 0.5 mL/min, 온도는 80°C, 검출기는 Refractive Index Detector(RID)를 이용하였다.

(4) 장내세균은 *Bifidobacterium* 3종(*B.adolescentis*, *B.lactis-bb12*, *B.longum*) *Lactobacillus* 3종(*L.acidophilus*, *L.paracasei*, *L.rhamnosus*), 유해균 2종(*E.coli*, *C.pergrigens*)으로 선정하였다. 전배양은 BL(lactic acid bacteria Bifidobacterium) 배지 5 mL에 균주를 접종하여 37°C에서 18 hr 동안 혐기조건으로 배양하고, 흡광도(OD 600 nm)를 측정하여 1.5가 넘으면 본배양을 실시하였다. 본배양은 glucose(G), xylose(X1), xylobiose(X2), xylooligosaccharides(X3~X7)으로 탄소원을 2%로 제한한 BL 배지 25 mL에 전배양액 0.5 mL를 접종하여 24 hr 동안 혐기조건에서 본배양을 실시하였다. 장내세균 배양실험은 2반복으로 실시한 후 평균값을 나타낸다.

(5) 장내세균의 생육도 평가

장내세균의 생육도 평가는 본배양을 진행하면서 0, 3, 6, 9, 12, 15, 24 h에 2 mL씩 샘플링 하여 흡광도(OD 600 nm)를 측정하여 비교하였다.

(6) 장내세균의 탄소원 이용 평가

탄소원 이용 평가는 0, 6, 12, 24 h에 샘플링한 반응액을 적절히 희석하여 Bio-LC를 이용하여 정량분석을 실시하였다.

나. 실험결과

(1) Xylobiose의 rat-sucrase 활성억제 평가

Fig. 2는 rat-sucrase 활성이 xylobiose 첨가량 증가에 따라 설탕분해 반응이 효과적으로 저해되는 것을 나타낸 것으로 xylobiose가 첨가된 경우 반응 초기부터 효과적으로 포도당 생성량을 감소시키는 것으로 확인되었다. XBS 7과 XBS 10은 rat-sucrase 활성억제 효과가 유사한 것으로 나타났고, XBS 14의 rat-sucrase 활성억제 효과가 가장 우수한 것으로 확인되었다. Rat-sucrase 반응이 종료되는 시점(6 hr)에 설탕분해 저해율을 산출한 결과 XBS 7과 XBS 10은 각각 34.7, 33.2%로 나타났고, XBS 14는 44.7%로 가장 우수한 것으로 나타났다.

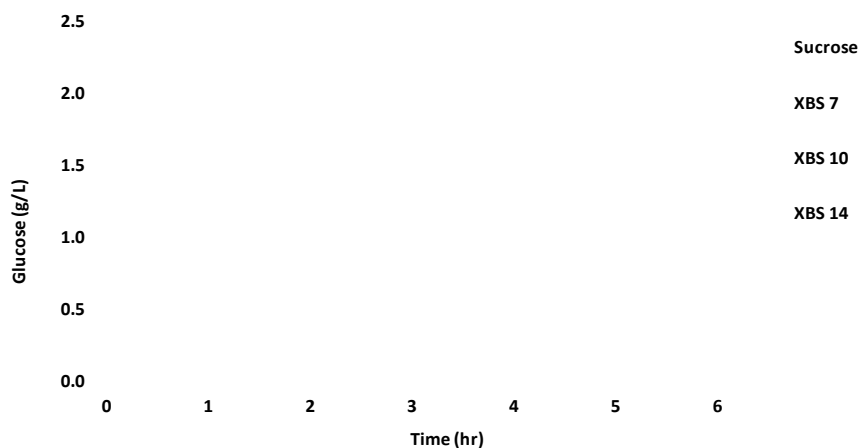


Fig. 2. Time course of sucrose inhibition by the various xylobiose concentration.

Table 1. Inhibition ratio of sucrose hydrolysis

Substrate	Inhiition ratio at 6 hr
Sucrose	0
XBS 7	34.7
XBS 10	33.2
XBS 14	44.7

(2) 장내세균의 생육도 평가

선행된 연구들에서 xylobiose는 *Lactobacillus*의 생육을 선택적으로 증가시키지 않는 것으로 보고되고 있으며, 본 연구도 선행연구와 유사하게 *Lactobacillus* 3종(*L.acidophilus*, *L.paracasei*, *L.rhamnosus*)의 생장은 glucose >> xylooligosaccharides(X3~X7) > xylobiose(X2) ≥ xylose(X1) 순으로 확인되었다. *B.adolescentis*의 생장은 Fig. 3과 같이 xylooligosaccharides(X3~X7) ≥ xylobiose(X2) >> xylose(X1) 순으로 나타나 X3~X7와 X2가 *Bifidobacterium* 생장에 도움을 주는 탄소원으로 확인되었으며, 특히 생육 6 hr 이후에 생장이 높아지는 것으로 나타났다.

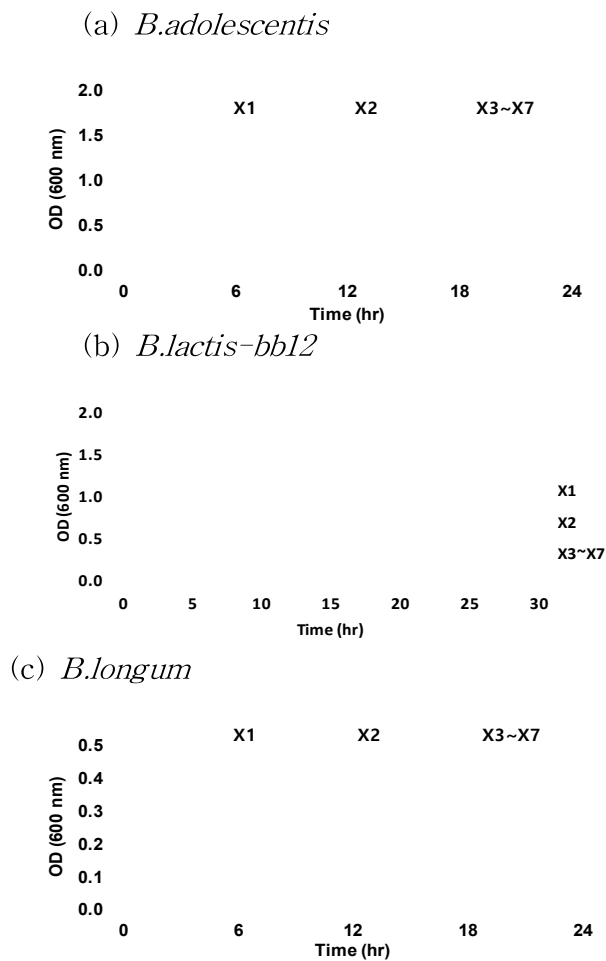


Fig. 3. Growth curve of *Bifidobacterium*.

*B.lactis-bb12*의 생장은 xylooligosaccharides(X3~X7) ≥ xylobiose(X2) > xylose(X1) 순으로 나타나 X3~X7와 X2가 *Bifidobacterium* 생장에 도움을 주는 탄소원으로 확인되었으며, 특히 생육 3 hr 이후에 생장이 높아지는 것으로 나타났다. *B.longum*의 생장은 xylobiose(X2) ≥ xylooligosaccharides(X3~X7) > xylose(X1) 순으로 나타났으며, 특히 생육 6~12 시간 사이에 생장이 빠르게 증가하여 선행문헌과 같이 *Bifidobacterium*의 생장을 선택적으로 증가시키는 것으로 확인되었다. 유해균인 *E.coli*의 경우 생육 0~9 hr까지 xylobiose(X2)를 탄소원으로 공급한 경우에 생장이 느린 것으로 나타나 초기에 유해균 증식을 억제하는 효과가 확인되었으며, *C.pergrigens*는 탄소원에 따른 생장의 차이가 나타나지 않았다.

(3) 장내세균의 탄소원 이용 평가

*Lactobacillus* 3종(*L.acidophilus*, *L.paracasei*, *L.rhamnosus*)와 유해균 2종(*E.coli*, *C.pergrigens*)는 배양 시간에 따른 탄소원의 감소경향이 유사한 것으로 확인되었다. *B.adolescentis*의 탄소원 소모량은 Fig. 4와 같이 glucose(G) >> xylooligosaccharides(X3~X7) ≥ xylobiose(X2) >> xylose(X1) 순으로 나타나 성장속도와 유사한 것으로 확인되었다.

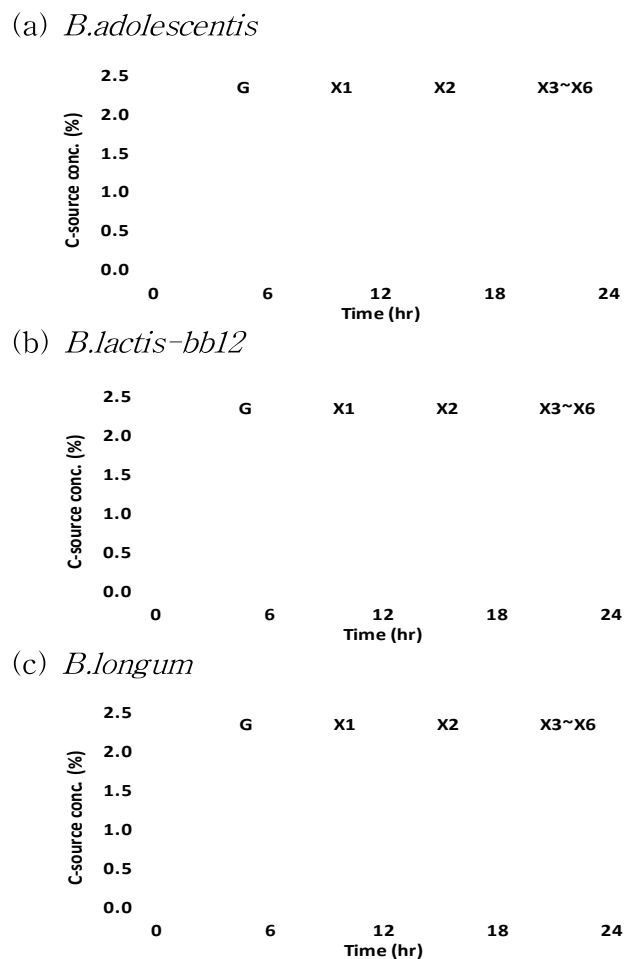


Fig. 4. C-source utilization of *Bifidobacterium*.

*B.lactis-bb12*의 탄소원 소모량은 xylooligosaccharides(X3~X7)  $\geq$  xylobiose(X2)  $\geq$  glucose(G)  $\gg$  xylose(X1) 순으로 나타나 G, X3~X7, X2가 *Bifidobacterium* 성장에서 쉽게 이용할 수 있는 탄소원으로 나타났다. *B.longum*의 탄소원 소모량은 xylobiose(X2)  $>$  glucose(G)  $\gg$  xylooligosaccharides(X3~X7)  $\geq$  xylose(X1) 순으로 나타났으며, 생육이 빠르게 증가한 시점과 동일하게 xylobiose(X2) 소모량이 많은 것으로 확인됨. *B.longum*은 상기 탄소원 중에서 xylobiose를 선택적으로 잘 활용하고, 생장이 빠르게 증가할 수 있도록 도움을 주는 것으로 판단된다.

## 11. Xylobiose 적용 제품개발

### 가. 실험방법

#### (1) 설탕과 xylobiose의 혼합 적합성 평가

설탕과 xylobiose의 혼합비는 *in vitro*와 *in vivo* 평가 및 Xylobiosugar의 이론상 감미도 (0.95)를 기준으로 설탕 93%와 xylobiose 7%로 선정함. 설탕 93%와 xylobiose 7%를 Rotary mixer에 교차되게 넣고 10분간 교반한 교반 후 4곳에서 각각 10 g씩 샘플을 채취한다. 샘플은 증류수를 넣고 용해하여 HPLC를 이용하여 xylobiose 함량을 분석하고, 평균 값과 CV값을 산출한다. Test는 2회 진행하며 혼합한 Xylobiosugar의 xylobiose 함량 평균 값과 기준 혼합비와의 차이가  $\pm 10\%$  이내이며, CV값이 15% 미만인 경우 혼합이 적합한 것으로 판단한다.

#### (2) 설탕과 xylobiose 혼합물의 재분리 안정성 평가

가로 × 세로 × 높이 (130 × 130 × 80 mm) 규격 용기에 Xylobiosugar 800 g을 담고, 교반기에 고정시킨 후 270 rpm으로 10 min 동안 충격을 가한다. 샘플이 담긴 용기를 꺼낸 후 상단부 4 곳에서 10 g씩 샘플을 채취한 뒤 혼합샘플을 400 g 덜어낸 후 하단부 4 곳에서 10 g씩 샘플을 채취하여 HPLC를 이용하여 xylobiose 함량을 분석한다.

#### (3) 재분리 안정성 평가기준 설정

재분리 안정성은 우수(평가기준 90~110%, 샘플 수 5개 이상), 양호(평가기준 80~120%, 샘플 수 5개 이상), 불량(우수, 양호 조건을 충족시키지 못할 경우 또는 우수, 양호 조건을 충족시키더라도 70 %미만 130 %초과 샘플이 1개라도 나올 경우) 3개의 등급으로 분류한다. Test는 2회 진행하며 각각 판정을 실시한 후 다른 등급이 나올 경우 낮은 등급의 판정을 채택한다.

#### (4) 설탕과 xylobiose 혼합물의 caking degree 특성규명

시료는 50 g씩 정량하여 용기에 담아 온도 37℃, 상대습도 80% 조건에서 24시간 동안 샘플을 보관하면서 증가하는 수분량을 측정하여 흡습률을 산출한다. 흡습률(%) = (흡습한 시료 무게-초기 시료 무게)/초기 시료 무게 × 100

#### (5) 시제품 제작 (2종)

자일로바이오슈가 스틱 디자인 및 시제품 제작과 자일로바이오슈가 커피믹스 디자인 및 시제품 제작하였다.



나. 실험결과

(1) 설탕 xylobiose의 혼합 적합성 평가

Xylobiosugar의 이론상 감미도(0.95) 및 *in vitro*와 *in vivo* 평가를 기준으로 선정된 혼합비 (설탕 93%, xylobiose 7%)를 기준으로 Rotary mixer에 원료를 넣고 혼합한 결과 Table 2와 같이 xylobiose 평균 함량은 6.8 %, 표준편차는 0.1, CV 는 1.2 %로 나타나 혼합적합성 판단 기준인 ‘기준 혼합비와의 차이가 ±10% 이내이며, CV값이 15% 미만’ 조건을 충족하였다.

Table 2. The mixability of Xylobiosugar

sample No.	Xylobiose (%)
1	6.8
2	6.6
3	6.9
4	6.7
Average	6.8
STDEV	0.1
CV	1.2

(2) 설탕과 xylobiose 혼합물의 재분리 안정성 평가

재분리 안정성 평가를 2회 반복 실시한 결과 우수(평가기준 90~110%, 샘플 수 6개), 양호(평가기준 80~120%, 샘플 수 8개), 불량(70% 미만, 130%초과, 샘플 수 0개)로 나타났으므로 최종 판정은 ‘우수’로 확인됨. 설탕 93%와 xylobiose 7%를 혼합하여 만든 Xylobiosugar는 혼합 적합성 판단기준을 충족하였고, 제품의 재분리 안정성도 ‘우수’로 평가되었다.

(3) 설탕과 xylobiose 혼합물의 caking degree 특성규명

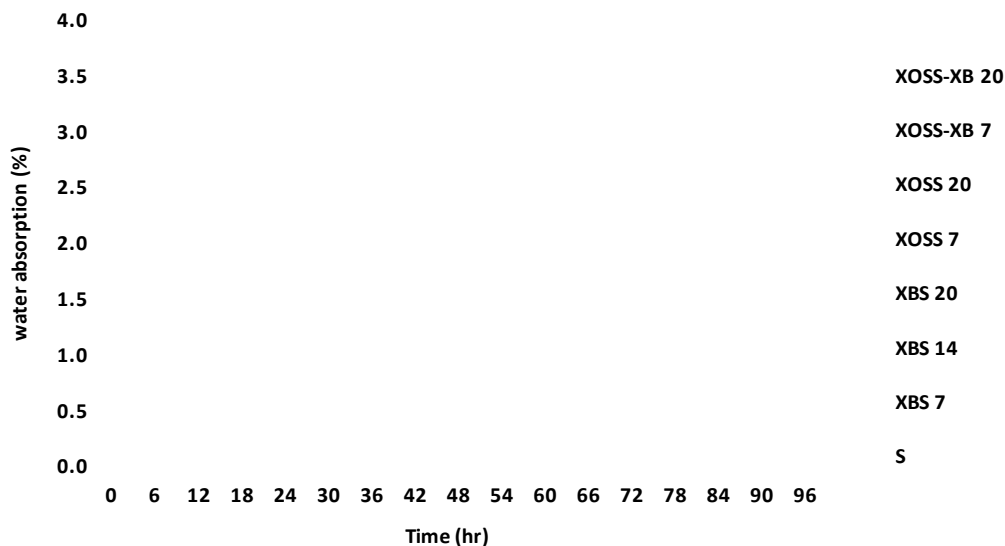


Fig. 5. Time course of moisture absorption test.

시료는 S(sucrose), XBS 7(sucrose with 7% xylobiose), XBS 14(sucrose with 14% xylobiose), XBS 20(sucrose with 20% xylobiose), XOSS 7(sucrose with 7% xylooligosaccharides), XOSS 20(sucrose with 20% xylooligosaccharides), XOSS-XB 7(sucrose with 7% xylooligosaccharides(without xylobiose)), XOSS-XB 20(sucrose with 20% xylooligosaccharides(without xylobiose))로 총 8개로 구성하였다. Fig. 5와 같이 S의 경우 수분 흡습률이 매우 낮은 것으로 확인되었으며, xylobiose가 함유된 XBS 7, XBS 14, XBS 20의 경우도 1% 이내로 낮았고 96 hr 후에도 Fig. 6와 같이 caking이 발생하지 않은 것으로 나타났다.

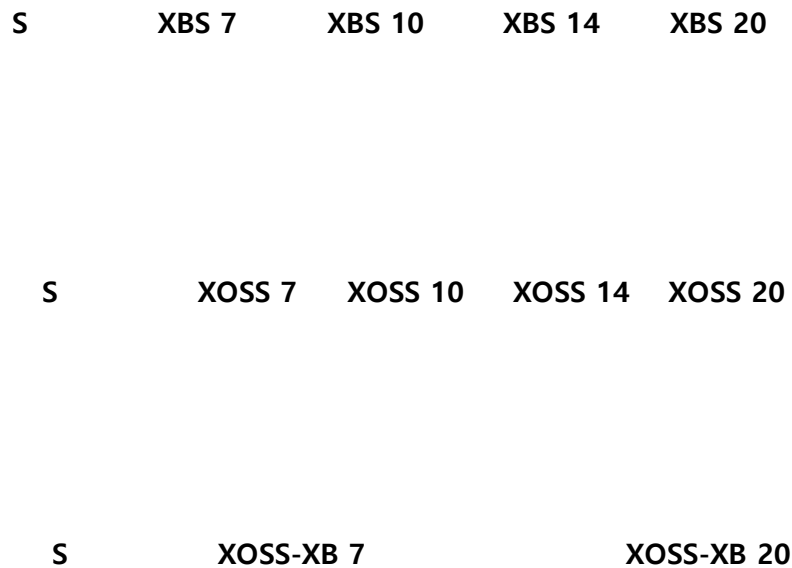


Fig. 6. Comparing sugar mixtures after moisture absorption test.

Xylooligosaccharides가 함유된 XOSS 7, XOSS 20은 흡습성 시험 96 hr 후 흡습률이 각각 2.1%, 2.7%로 높게 나타났으며, Fig. 6와 같이 caking이 발생한 것으로 확인됨. Xylooligosaccharides without xylobiose가 XOSS-XB 7과 XOSS-XB 20은 흡습성 시험 96 hr 후 흡습률이 각각 2.3%, 3.5%로 매우 높게 나타났으며, Fig. 6와 같이 caking이 형성된 것으로 확인되었다.

상기 결과와 같이 xylobiose가 첨가된 설탕은 흡습률이 낮아 caking이 형성되지 않았으나, xylobiose가 제거된 xylooligosaccharides는 흡습률이 매우 높아지는 것으로 확인되어 xylobiose는 xylooligosaccharides의 단점을 보완한 설탕보완제로 판단된다.

(4) 시제품 제작

자일로바이오스 7%와 설탕 93%를 혼합하여 table top sugar로 활용할 수 있는 신개념 기능성 설탕을 1회에 간편하게 사용할 수 있도록 5g 스틱슈가 형태로 디자인하여 Fig. 7과 같이 시제품을 제작하였다.



Fig. 7. Image of Xylobiosugar.

자일로바이오스 7%와 설탕 93%를 혼합한 xylobiosugar와 커피, 크림어를 첨가하여 대중성이 높고 커피믹스 제품을 디자인 하였으며, Fig. 8과 같이 Xylobiosugar coffee mix는 기능성 원료인 xylobiose의 효과와 함께 간편하게 커피를 즐길 수 있는 신개념 기능성 커피믹스 제품을 컨셉으로 시제품을 제작하였다.



Fig. 8. Image of Xylobiosugar coffee mix.

## 12. Xylobiose 적용제품의 기능성 확인 (in vivo)

### 가. 실험방법

#### (1) Xylobiosugar의 체내 혈당상승 억제 효능 평가

포도당(Daesang, Korea), 설탕(TS Corporation, Korea)과 자일로바이오스는 순도 98% 이상으로 자일로올리고당에서 정제하여 사용하였고, 혈당측정기와 혈당측정시험지는 Lifescan, Milpitas, CA, USA 제품을 사용하였다. 국제 임상시험기준에 준하여 임상시험 실시 기관인 국민대학교 IRB 심의절차를 거쳐 승인을 받은 후 참여의사를 밝힌 사람을 대상으로 면담을 통해 동의를 얻은 후 수행하였다(kmu-201601-hr-096). 만 19~29세의 건강한 성인 남녀로 혈액 화학적 검사인 AST, ALT, 총콜레스테롤, 혈당과 Inbody 측정기를 통해 체중과 체지방이 정상범위에 해당하는 사람을 선정한 후 혈압, BMI, 참여자 본인과 직계 부모, 조부모의 각종 병력(당뇨, 심혈관계 질환, 고혈압, 갑상선 질환 여부), 복용하는 약물, 여성 참여자의 경우 임신 또는 실험 기간 동안 임신가능성이 있는지의 여부 등의 제외 기준을 통과한 대상자 15명을 최종 선정하였다. 본 연구는 무작위 배정, 공개, 2회 섭취시험으로 포도당, XB 7(자일로바이오스 7% 함유 설탕), XB 10(자일로바이오스 10% 함유 설탕), XB 14(자일로바이오스 14% 함유 설탕)을 1주일에 한 가지씩 섭취하였으며, 2번 반복하여 총 8 주간 수행하였다. 12 hr 금식 및 금주, 보충제 복용 금지 상태로 참여하였으며, 피험자의 혈당 안정도는 시료 섭취 전 30 min과 0 min에 혈당을 측정하여 차이가 5 mg/dL 미만인 경우 시험식품을 섭취하고, 섭취 시작 0 min을 시작으로 15, 30, 45, 60, 90, 120 min에 혈당을 2번 반복 측정하였다. GI 계산은 Food and Agriculture Organization에서 권유하는 방법인 Incremental Area Under the Curve(IAUC)를 사용하였다.

#### (2) Xylobiose의 일일 섭취 허용량 설정

Xylobiose에 대한 기준을 식품의약품안전처에 질의를 통해 유권해석 답변을 확보하였다.

### 나. 실험결과

#### (1) Xylobiosugar의 체내 혈당상승 억제 효능 평가

식품의 섭취순서는 1군[포도당(A)-XB 7(B)-XB 10(C)-XB 14(D)] 또는 2군[XB 7(B)-XB 10(C)-XB 14(D)-포도당(A)], 3군[XB 10(C)-XB 14(D)-포도당(A)-XB 7(B)], 4군[XB 14(D)-포도당(A)-XB 7(B)-XB 10(C)]로 유용성 탄수화물 50 g을 정제수 250 mL에 녹여서 섭취하였다. 총 14명의 종료자 중에서 분석의 신뢰도를 높이기 위해 시료별로 1차 혈당반응값 (IAUC)의 분포와 GI값의 분포를 적용하여 이상점 (outlier)에 이상점에 해당하는 대상자 3명을 제외한 11명 (남 6명, 여 5명)을 최종 평가의 대상자로 선정하였다. Fig. 8과 같이 xylobiose가 함유된 test food의 경우 섭취 후 15, 30, 45, 60, 90, 120 min 모두 혈당이 낮게 올라가는 것으로 확인되었으며, 특히 섭취 60 min에는 초기 혈당수준으로 돌아가는 것으로 확인되어 혈당상승을 억제하는 효과가 확인되었다.

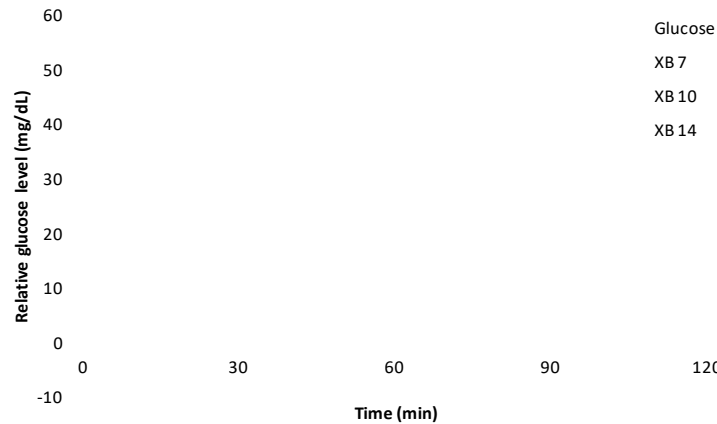


Fig. 8. Blood glucose responses after administration of control food(glucose) and test food(XB 7, XB 10 and XB 14).

상기 결과를 바탕으로 GI를 산출한 결과 Table 3과 같이 XB 7은 57로 medium GI에 속했으며, XB 10과 XB 14는 각각 53.6, 49.7로 low GI에 해당하는 것으로 확인되었다. 선행 연구 결과에서 설탕의 GI는 68로 GI가 높은 편에 속하는 medium GI로 분류되나, xylobiose를 설탕보완재로 첨가하여 섭취할 경우 설탕의 단맛은 유지하면서 혈당상승 억제 효과가 우수한 것으로 확인되었다. 설탕의 GI를 기준으로 GI 저감효과를 산출한 결과 XB 7, XB 10, XB 14는 각각 16, 21, 27% 낮은 것으로 나타났다. Xylobiose는 설탕에 첨가하는 설탕보완재로 혈당상승을 효과적으로 억제시키는 기능성 원료로 판단되고, 특히 XB 10와 XB 14는 GI 55 미만의 low GI 제품으로 혈당상승 억제 효과가 우수한 것으로 판단된다.

Table 3. Glycemic indices of Xylobiosugar (n=11)

Variables	XB 7	XB 10	XB 14
GI	57.0 ± 18.6	53.6 ± 14.9	49.7 ± 9.7
CV	32.57	27.77	19.56

## (2) Xylobiose의 일일 섭취 허용량 설정

자일로올리고당은 식품공전 및 건강기능식품 개별인정형 원료로 등재되어 있는 감미료로 널리 사용되고 있는 감미료로 구분된다. 자일로올리고당은 식품공전 규격에서 섭취 제한이 없는 안전한 물질로 알려져 있으며, 건강기능식품 공전에서는 장내 유익균 증식, 유해균 억제, 배변활동에 도움을 줄 수 있는 원료로 유효 섭취량은 0.7~7.5 g/day로 설정되어 있다. Xylobiose는 자일로올리고당에 해당한다는 유권해석을 식품의약품안전처를 통해서신으로 답변을 확보하였다(처리기관 접수번호 2AA-1407-328284). 상기 결과를 바탕으로 xylobiose는 자일로올리고당과 같이 섭취 허용량에 제한이 없는 것으로 판단된다.

### 13. Xylobiose 생산 경제성 분석

#### 가. 가정

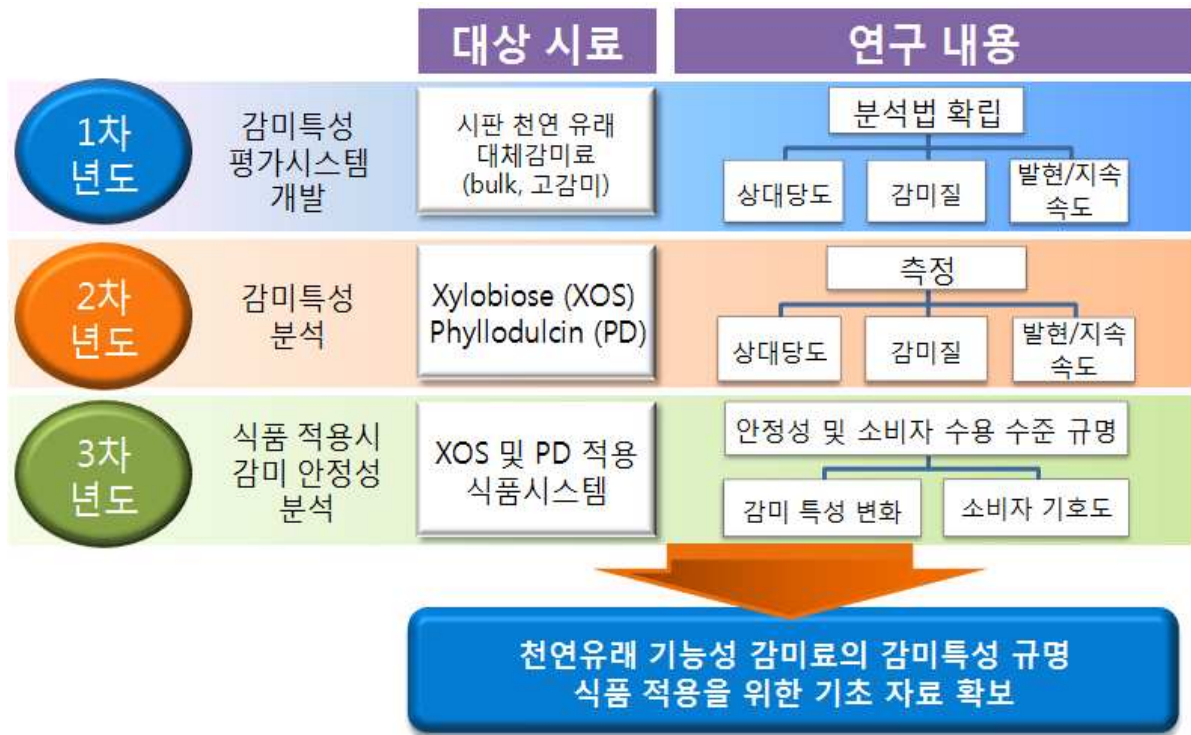
- (5) 제품 : Xylobiose (X2)
- (6) 제품 가격 : 20,000 원/kg
- (7) 생산 용량 : 1,000 톤/년
- (8) X2 생합성 전환율 : 30%
- (9) X2 수율 : 90%
- (10) 공장 가동일 : 330 일/년

#### 나. 분석결과

- (1) 상기 조건을 충족시키는 공장 설립 투자비는 290 억원으로 추산됨.
- (2) 상기 조건으로 공장을 가동시킬 경우 연간 1,000 톤의 xylobiose를 생산할 수 있으며, 연매출 200 억원의 수익을 올릴 수 있는 것으로 예상됨.
- (3) 예상 순이익률은 29%로 연간 58 억원의 순수익을 올릴 수 있으며, 투자비 회수기간은 3.3년이 소요되는 것으로 산출됨.

### 제 3 절. 종합적 감미 특성 및 식품 적용시의 안정성 분석

#### 1. [제 2 협동] 연구개발 추진 전략 및 추진 체계



#### 2. 종합적 감미 특성 평가 시스템 개발

##### 가. 2-alternative forced choice method (2-AFC)

본 실험은 5% 설탕 수용액과 동일한 상대당도를 확립하기 위해 실시함.

##### (1) 실험방법

##### (가) 시료

##### ① 시료

- 총 6종류의 시료를 평가에 사용함(Table 1).
- 자일리톨, 자일로오스, 자일로올리고당, 라한과, 수크랄로오스, 스테비오사이드의 농도를 5수준으로 제조하여 각 시료마다 5% 설탕 수용액과 비교함 (Table 2).
- 예비 실험 결과 자일로올리고당은 농도가 증가할수록 특유의 신 향미가 증가하여 단맛을 masking하기 때문에 고농도 범위에서도 설탕 5%보다 단맛이 약한 것으로 나타났음. 따라서 자일로올리고당은 2% 설탕 수용액에 3% 수준으로 첨가하여 상대 당도를 결정하도록 하였음.
- 총 30쌍의 시료 평가를 진행함.

Table 1. Sample information.

Sample	Product name	Manufacturer	Purity (%)
Xylitol	Xylisorb 700	ROQUETTE	99.7
Xylose	D-Xylose	SAMIN	99.6
Xylo-oligosaccharide	Xylo-oligosaccharide	Sangdong Longlive	53.34
Luo han guo	Luo Han Guo P.E	NEOCREMAR	mogrosides 80.22
Sucralose	sucralose PWD	-	95
Stevioside	Rebaudioside-A98	Ingredion	98.8

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

Sample	Concentration
Xylitol	3%, 4%, 5%, 6%, 7%
Xylose	6%, 7%, 8%, 9%, 10%
Xylo-oligosaccharide	sucrose 2% + XOS 8%, 10%, 12%, 14%, 16%
Luo han guo	0.02%, 0.04%, 0.06%, 0.08%, 0.1%
Sucralose	0.004%, 0.006%, 0.008%, 0.01%, 0.012%
Stevioside	0.01%, 0.02%, 0.03%, 0.05%, 0.07%

## ② 시료의 준비

- 시료는 분량의 감미료를 실온의 생수(Bongpyeong mineral water, E-Mart, Seoul, Korea)에 magnetic stirrer로 10분간 교반하여 완전히 용해시켜 제조함.
- 일주일의 냉장 저장기간 동안 관능적 특성 및 품질에 변화가 없는 것으로 확인되어 농도별로 제조한 시료를 냉장 보관하여 일주일동안 사용함.
- 시료의 온도 차이가 시료 평가에 미치는 영향을 최소화하기 위하여 평가가 있기 최소 3시간 전에 실온(22±2℃)에서 방냉함. 평가 30분 전에 흰색 일회용 종이컵에 30mL씩 소분하여 실온으로 제시함.
- 검사요원들이 입을 헹글 수 있는 실온의 생수를 제공함.
- 시료는 난수표에서 추출한 세 자리 숫자로 표기함.

## ③ 검사요원

- 국민대학교 감각과학 연구실의 소비자 검사 요원 pool을 대상으로 한 전화 모집과 국민대학교 각 건물 및 인근 기숙사 및 식당의 게시판에 참가자 모집문을 공지하여 자발적인 참여 지원자 60명을 선발함(20대 25명, 30-40대 35명, 남 19명, 여 41명).



#### ④ 평가 절차

- 6 session으로 구성되어 있으며, 3 session씩 2일에 걸쳐 진행함.
- 1 session당 한 종류의 감미료 시료를 평가함. 5 농도 수준으로 제조된 시료를 각각 5% 설탕 수용액과 비교하여 단맛이 더 강한 시료를 선택하도록 함.
- 제시된 시료의 1/3가량을 5초 동안 머금고 제시된 타구 컵에 뱉은 후 5초 동안 맛을 평가하도록 함.
- 한 쌍의 시료를 평가한 후 다음 시료 쌍의 평가 전 1분간의 휴식과 함께 제시된 물로 충분히 입을 행구도록 함.
- Session 사이에는 5분간 휴식을 취하여 검사 시 피로감을 최소화함.
- 각 session에 제시되는 시료의 종류 및 session내에서 제시되는 시료의 농도의 제시 순서는 Williams Latin square design에 따라 결정되었음.
- 5% 설탕 수용액과 감미료 시료 제시 순서는 counter-balanced, randomized 되었음.
- 검사는 국민대학교 감각과학 연구실 내 관능검사실 booth에서 개별적으로 실시함.
- 시료의 색에 따른 오류를 최소화하기 위하여 적색 조명아래에서 검사를 실시함.

#### ⑤ 결과 분석

- 시료를 5% 설탕 용액보다 더 달다고 평가한 응답수를 세어 농도-반응곡선을 구하고 회귀식을 구하여 응답율이 50%일 때의 감미료 농도를 구함.
- 상대 당도 = 설탕 농도 (5%)/응답율 50%일때의 감미료 농도

#### (2) 실험결과

- 각 감미료의 농도-반응 곡선 (Fig. 1)에서 구해진 상대 당도는 Table 1과 같음. 대부분 문헌에서 보고된 바와 유사한 값을 나타내어 본 연구에서 사용된 방법이 효율적으로 상대 당도를 측정하는 것으로 나타남.
- 라한과 추출물에서의 주요 감미 성분은 mogrosides라 불리는 terpene glycosides이며 그 중 주요 배당체는 mogroside V 로, 가공 방법에 따라 mogroside V 함유량이 20-80%까지 달라짐. 또한, mogroside혼합물의 경우 설탕의 300배 정도의 감미도를 가지며, mogroside 혼합물을 80%함유한 추출물의 경우 250배의 감미도를 가짐. 순수 mogroside IV 와 V는 설탕의 400배 정도의 단맛을 나타낸다고 보고됨. 본 연구에 사용된 라한과 추출물은 mogroside 혼합물 함유량이 80% 이상이었으나, 약 75배의 상대당도만을 나타내었음. 이러한 결과는 라한과 추출물의 색과 기타 향미가 단맛 평가에 영향을 주었으며, 또한 단맛의 출현 정도가 늦어 검사원들이 초기 단맛을 위주로 평가하였기 때문이라고 판단되므로, 향후 유사한 감미질을 가진 소재의 상대당도 평가시 이러한 부분을 보정해야 할 것이라 사료됨.

Table 3. Relative sweetness of 6 sweeteners calculated from dose-response curves

Samples	Relative sweetness	
	From previous literature	Determined in this study
Sucralose	600	<b>561.80</b>
Xylose	0.6	<b>0.61</b>
Xylitol	1	<b>0.98</b>
Xylooligosaccharide (in 2% sugar solution)	0.25	<b>0.25</b>
Stevioside	150-400	<b>144.93</b>
Luo Han Guo extract	250	<b>75.76</b>

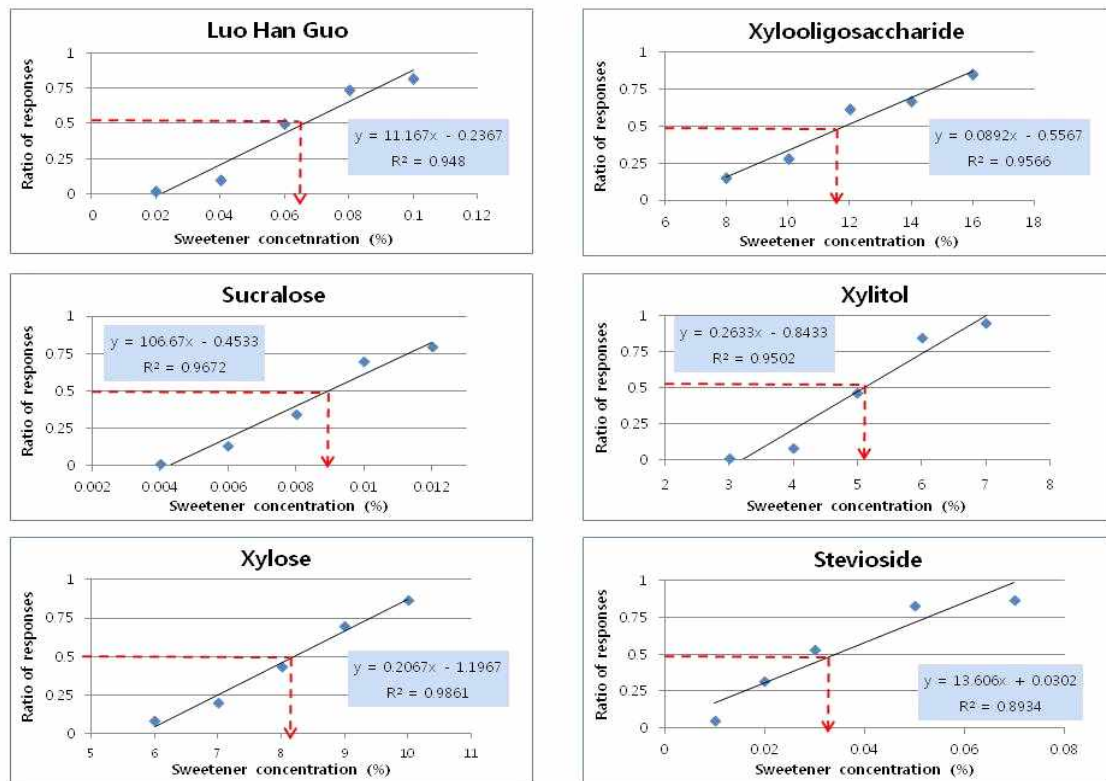


Fig. 1. Dose-response curves of 6 sweeteners. Xylooligosaccharide solution was prepared by adding xylooligosaccharide to 2% sugar solution.

#### 나. 묘사분석

본 실험은 정량적 묘사분석을 이용하여 감미 특성을 규명하기 위해 실시함.

##### (1) 실험방법

##### (가) 시료

- 2-AFC를 통해 확립된 5% 설탕 수용액과 동일한 감미도를 갖는 농도를 이용함(Table 4).
- 2-AFC를 통해 확립된 스테비오사이드의 감미도가 상대적으로 높게 측정되어, 묘사분석 요원들의 토의에 의해 농도를 재 조정한 stevioside 시료를 추가로 측정, 총 8종류의 시료로 묘사분석을 진행함.

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

Sample	Concentration
Sucrose	5.0000 %
Xylitol	5.1018 %
Xylose	8.2085 %
Xylo-oligosaccharide(XOS)	11.8464 % (in 2% sucrose solution)
Luo han guo	0.0660 %
Sucralose	0.0089 %
Stevioside-1	0.0345 %
Stevioside-2	0.0259 %

(나) 시료의 준비

- 시료는 당일 제조하였으며, 사용 시까지 상온보관함.
- 향미 평가용 시료는 시료의 온도 차이가 시료 평가에 미치는 영향을 최소화하기 위하여 평가 30분 전에 흰색 일회용 종이컵에 40mL씩 소분하여 실온(22±2℃)으로 제시함.
- 패널들이 입을 행굴 수 있는 실온의 생수를 제공함.
- 시료는 난수표에서 추출한 세 자리 숫자로 표기함.
- 외관 시료는 50mL 투명 vial에 담아 제시하였으며, 향미 평가용 시료와 다른 세 자리 숫자로 표기함.

(다) 패널 선발 및 훈련

① 패널 선발

- 검사요원은 국민대학교 각 건물 및 인근 기숙사 및 식당의 게시판에 참가자 모집문을 공지하여 자발적인 참여 지원자를 대상으로 패널 선발 test를 실시함.
  - 패널 선발 test는 기본 맛 검사, 향 묘사검사, 오렌지 주스의 신맛 및 단맛 강도 순위 검사, 감미료 시료 특성 묘사검사로 구성되어 있음.
- 단맛 민감도 및 구분능력, 특성 표현 능력이 우수한 상위 고득점자 10명을 선발함(20대 남자 2명, 여자 8명).

② 패널 훈련

- 패널 훈련은 주 3회, 4개월간 진행되었으며, 회당 1-1.5hr 소요됨
- 용어 및 표준 시료 개발(19 hr)
  - Orientation(1hr) ; 검사 목적, 관능검사 및 묘사분석의 소개
  - 특성 용어 도출(6hr) ; 시료간의 차이를 잘 설명하는 특성을 개별적으로 도출한 후 패널 들 간의 토의를 거쳐 용어 목록을 개발함 (Table 5).
  - 정의 및 표준시료 확립(12hr) ; 특성 용어에 대한 정의 및 표준시료, 평가 방법을 확립 하였으며 (Table 5, 6), 15점 선척도(1.25cm; 매우 약하다, 13.75cm; 매우 강하다) 사용법을 훈련함.

- 패널들의 수행 능력 평가(6hr)
- 확립된 방법에 의하여 3회 모의 평가 후 통계분석을 통해 패널들 간의 consensus와 각 패널 요원의 재현성을 평가함.
- 재현성이 낮거나 평가 경향이 다른 패널 요원은 재훈련을 실시함.

(라) 평가 절차

- 본 실험은 4회 진행됨.
- 하나의 시료를 평가한 후 다음 시료를 평가하는 monadic 방법을 사용함.
- 시료사이에 30초 휴식과 함께 제시된 물로 충분히 입을 헹구도록 함.
- 4개의 시료 평가 후 5분의 휴식을 취하여 검사 시의 피로감을 최소화함.
- 시료의 색에 따른 오류를 최소화하기 위하여 향, 향미, 맛의 경우 적색 조명 아래에서 검사를 실시하였으며, 외관 평가는 자연광 조명(MULTI LIGHT BOOTH, Super Light VI, BOWOO ENG Co., Ltd., Gunpo, Kyungi-do, Korea)에서 향미 평가가 끝난 후 별도로 진행함.
- 시료는 first sample effect를 막기 위해 Williams Latin square design에 따라 제시됨.
- 검사는 국민대학교 감각과학 연구실 내 관능검사실에서 실시하였으며, 본 실험은 booth에서 개별적으로 진행함.

Table 5. Definitions of descriptive attributes of sweetener samples

Attributes		Definition
Appearance	Yellow	Yellow color
Odor	Honey	The smell associated with honey
	sourish	The smell associated with sourdough and spoiled barley tea
	sweet	The smell associated with sugars
	corn silk	The smell associated with corn silk
Taste	sweet	Fundamental taste sensation of which sucrose is typical
	bitter	Fundamental taste sensation of which caffeine and quinine is typical
Flavor	licorice	Aromatics associated with licorice
	sourish	Aromatics associated with sourdough or spoiled barley tea
	honey	Aromatics associated with honey
	sweet rice malt drink (sikhye)	Aromatics associated with sweet rice malt drink (sikhye)
Trigeminal senses	acridness	Sharp, irritating, or biting sensation on the tongue

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

Attributes		Reference materials
Appearance	Yellow	NCSS1015-Y10R (NCS color index, Scandinavian Colour Institute AB, Stockholm, Sweden)
Odor	honey	3%(w/v) honey (Dong suh honey, Dong suh Co., Jinchun-gun, Chungcheongbuk-do, Korea) in water (Bongpyeong mineral water, E-Mart, Seoul, Korea) and 5% honey in water.
	sourish	Abstraction and generalization using experience with sourdough and spoiled barley tea
	sweet	Abstraction and generalization using experience with caramel, maltitol, and vanilla
	corn silk	Mixture of corn silk tea (Kwang dong corn silk tea, Kwang dong pharmaceutical Co., Pyeongtaek, Gyeonggi-do, Korea) and water in the ratio of 1 to 3.
Taste	sweet	2%(w/v) sucrose (Foodream refined hite sugar, TS Co., Incheon, Korea) , 5% and 10% sucrose in water
	bitter	0.03% caffeine (sigma-Aldrich, st.Lous, MO, USA) in water.
Flavor	licorice	10g licorice root (licorice, Geumkwang Co., Gwangju-si, Gyeonggi-do, Korea) and 1L water boiled using high heat about 10 minutes, then boiled using low heat about 20 minutes.
	sour	Abstraction and generalization using experience with sourdough and spoiled barley tea
	honey	10%(w/v) honey (Dong suh honey, Dong suh Co., Jinchun, Chungcheongbuk-do, Korea) in water.
	sweet rice malt drink (sikhye)	Birak sikhye(Birak sikhye, Paldo Co., Jinchun, Chungcheongbuk-do, Korea)
Trigeminal senses	acridness	Abstraction and generalization using experience with oral irritation, biting, and sharpness

(마) 통계 분석

■ 분산분석

- 분산분석 모형에는 시료, 패널, 반복이 주 효과로 포함되었으며, 이들의 2차 상호작용이 포함되었음.
- 시료를 고정 변인, 패널을 랜덤 변인으로 하는 혼합 모형을 적용하였음.
- 사후 분석으로는 Duncan's multiple range test를 실시하였음.
- SPSS 18.0 통계 패키지를 이용하여 분석

■ 주성분 분석

- 각 특성별 데이터는 패널에 따라 center되었으며, rotation은 선택되지 않음.
- Bootstrapping technique을 이용하여 (iteration = 500) 시료의 confidence ellipses를 구하였으며, Hotelling's T test를 통해 시료간의 global difference를 검증함.
- SensoMineR 통계 패키지를 이용하여 분석

- 모든 분석의 유의 확률은  $p < 0.05$ 임.

(2) 실험 결과

- 각 감미료에서 도출된 감미 특성과 시료간의 관계를 주성분분석으로 요약한 결과는 Fig. 2-3과 같음. 시료의 관능특성을 보다 종합적이며 다각적으로 관찰하기 위하여 감미 출현 및 지속 속도 역시 분석에 포함되었음.

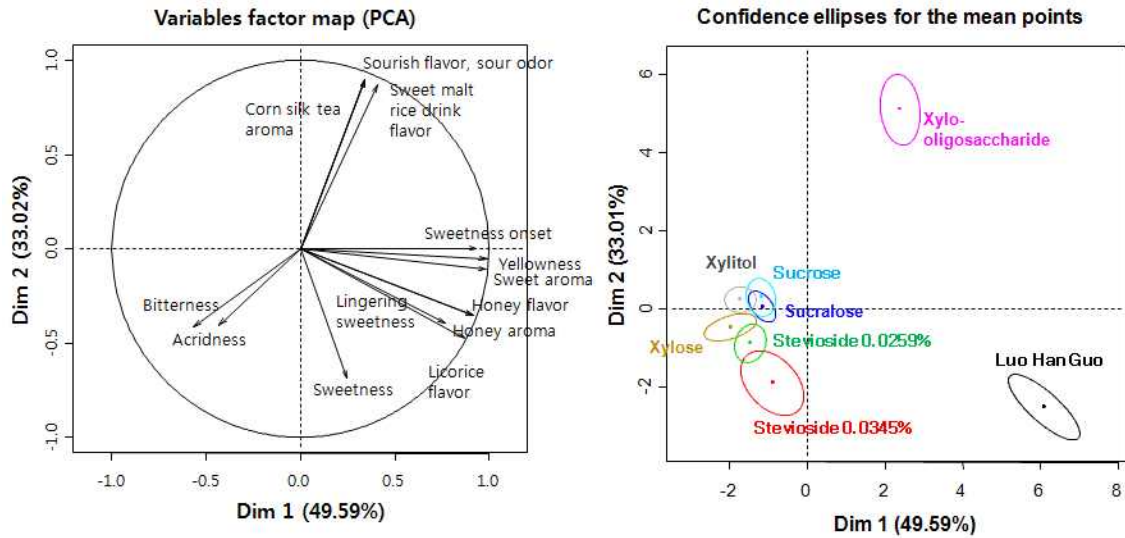


Fig 2. Loadings of the sensory attributes (A) and principal component (PC) scores (B) of the 8 sweetener samples on PC1 and PC2.

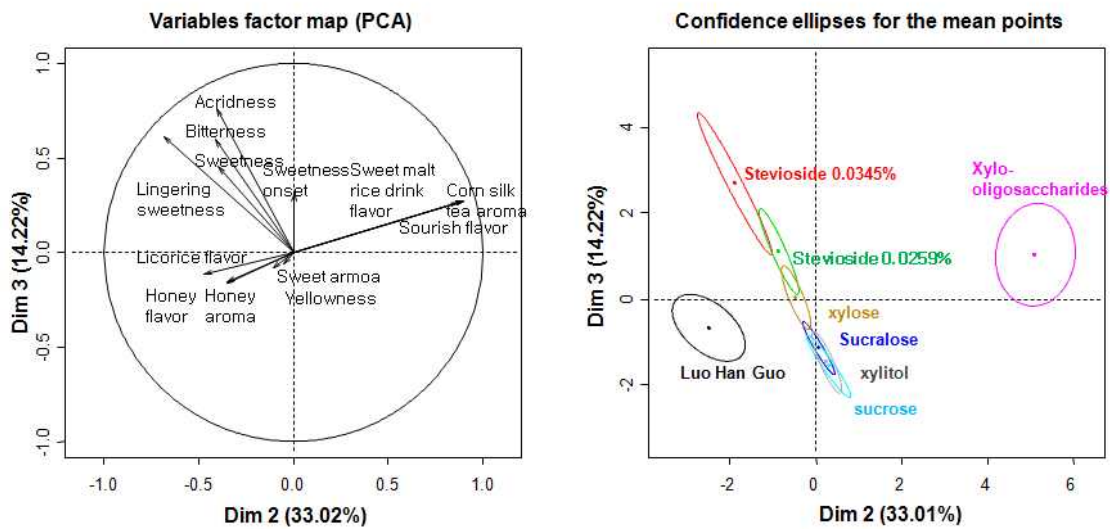


Fig. 3. Loadings of the sensory attributes (A) and principal component (PC) scores (B) of the 8 sweetener samples on PC2 and PC3.

- 단맛의 경우 동일한 상대 당도를 나타내도록 시료가 준비되었음에도 불구하고, 라한과 추출물과 스테비오사이드 0.0345%는 설탕보다 단맛이 유의적으로 강하게 평가되었음 (Table 7). 라한과 추출물과 스테비오사이드의 경우 단맛 외 특징적인 향미와 맛이 강하며 단맛의 시간적인 출현 속도와 지속 속도가 설탕과 달라 단맛의 평가에 영향을 주기 때문이라 판단됨.

- 반면, 재 조정된 stevioside 농도인 0.0259%에서는 단맛이 설탕과 유의적으로 차이가 없었음. 농도-반응 곡선에 1linear regression equation (Fig 1) 대신 log equation ( $y = 0.4487\ln(x) + 2.1064$ )를 적합시킬 경우  $R^2$  값이 0.98로 증가하며, 이때 구해지는 상대 당도인 0.0279% 와 재 조정된 stevioside 농도가 매우 유사하게 나타남. 따라서 stevioside의 경우 상대 당도 계산 시 log equation을 적합시키는 것이 더 정확한 농도를 구할 수 있으리라 사료됨.
- Fig. 2-3에 나타난 confidence ellipses가 서로 겹치는 경우 시료간의 유의차를 표명할 수 없음. 따라서, 차이를 종합적으로 판단할 경우 설탕과 유사한 감미질을 가지는 시료는 xylose와 sucralose이며, 이는 여러 기존 문헌에서도 보고된 바 있음.

Table 7. Mean intensities<sup>1</sup> of descriptive sensory attributes elicited from the 8 sweetener samples

	Sucrose	Luo Han Guo	Xylitol	Xylose	Xylo-oligoaccharide	Stevioside 0.0345 %	Stevioside 0.259 %	Sucralose
Yellowness	0 <sup>a</sup>	6.59 <sup>c</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	2.83 <sup>b</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>
	0	(1.60) <sup>2</sup>	0	0	(1.07)	0	0	0
Honey aroma	0.05 <sup>a</sup>	5.87 <sup>c</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0.585 <sup>b</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>
	(0.31)	(1.13)	0	0	(1.30)	0	0	0
Sour odor	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	5.83 <sup>b</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>
	0	0	0	0	(2.96)	0	0	0
Sweet aroma	0 <sup>a</sup>	6.08 <sup>c</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	2.23 <sup>b</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>
	0	(2.76)	0	0	(1.11)	0	0	0
Corn silk tea aroma	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	3.73 <sup>b</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>
	0	0	0	0	(1.25)	0	0	0
Sweet taste	5.05 <sup>ab</sup>	5.59 <sup>c</sup>	5.01 <sup>ab</sup>	5.20 <sup>ab</sup>	4.98 <sup>a</sup>	5.95 <sup>d</sup>	5.27 <sup>b</sup>	5.13 <sup>ab</sup>
	(0.40)	(0.58)	(0.54)	(0.64)	(0.46)	(0.92)	(0.89)	(0.61)
Bitter taste	0.17 <sup>a</sup>	0.06 <sup>a</sup>	0.27 <sup>a</sup>	0.86 <sup>b</sup>	0.11 <sup>a</sup>	1.80 <sup>c</sup>	1.82 <sup>c</sup>	0.22 <sup>a</sup>
	(0.76)	(0.28)	(0.74)	(1.23)	(0.50)	(1.80)	(1.76)	(0.84)
Licorice flavor	0 <sup>a</sup>	4.53 <sup>c</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0.42 <sup>b</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>
	0	(2.93)	0	0	0	(1.29)	0	0
Sourish flavor	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	5.69 <sup>b</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>
	0	0	0	0	(3.17)	0	0	0
Honey flavor	0 <sup>a</sup>	3.84 <sup>c</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0.40 <sup>b</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>
	0	(1.52)	0	0	(0.97)	0	0	0
Sweet malt rice drink flavor	0 <sup>a</sup>	0.27 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	3.69 <sup>b</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>
	0	(1.24)	0	0	(1.64)	0	0	0
Acridness	0.07 <sup>a</sup>	0 <sup>a</sup>	0.64 <sup>b</sup>	1.70 <sup>cd</sup>	0 <sup>a</sup>	1.76 <sup>d</sup>	1.23 <sup>c</sup>	0.33 <sup>ab</sup>
	(0.43)	0	(1.50)	(2.12)	0	(2.48)	(2.06)	(1.01)

<sup>1</sup>Different alphabet letters indicate a significant difference among different samples ( $p < 0.05$ , Duncan's multiple range test)

<sup>2</sup>Standard deviation

#### 다. 감미 출현 및 지속 정도

본 실험은 단맛의 지속정도와 출현정도를 규명하기 위해 실시됨.

##### (1) 실험방법

##### (가) 시료

- 묘사분석과 동일한 시료로 평가함(Table 3).



(나) 시료의 준비

- 묘사분석과 동일한 방법으로 시료 준비를 실시함.

(다) 패널 선발 및 훈련

① 패널 선발

- 검사요원은 국민대학교 각 건물 및 인근 기숙사 및 식당의 게시판에 참가자 모집문을 공지하여 자발적인 참여 지원자를 대상으로 패널 선발 test를 실시함.
  - 패널 선발 test는 기본 맛 검사, 향 묘사검사, 오렌지 주스의 신맛 및 단맛 강도 순위 검사, 감미료 시료 특성 묘사검사로 구성되어 있음.
- 패널 선발 test를 통하여 단맛 민감도 및 구분능력이 우수한 상위 고득점자 10명을 선발함(20대 남자 2명, 여자 8명).

② 패널 훈련

- 패널 훈련은 주 3회, 회당 1-1.5hr 소요됨.
- 출현 정도 및 지속 정도의 정의 및 평가 방법 개발(15hr)
  - Orientation(1hr) ; 검사의 목적, 관능검사 및 출현 및 지속 평가 소개
  - 출현 정도의 정의(Table 7) 및 평가 방법 확립(7hr) ; 패널간의 토의를 거쳐 출현 정도를 가장 잘 측정하는 평가 방법 이용하여 15점 선척도(1.25cm; 매우 약하다, 13.75cm; 매우 강하다) 사용법을 훈련함.
  - 지속 정도의 정의(Table 7) 및 평가 방법 확립(7hr) ; 단맛외의 쓴맛, 아린맛 등이 토의되었으나, 그 지속정도가 미미하여 단맛을 위주로 평가를 진행함. 확립된 평가 방법을 이용하여 시료의 단맛 지속 정도를 타이머를 이용하여 측정하는 훈련을 진행함.
- 패널들의 수행 능력 평가(5hr)
  - 확립된 방법에 의하여 5회 모의 평가 후 통계분석을 통해 패널들 간의 consensus와 각 패널 요원의 재현성을 평가함.
  - 재현성이 낮거나 평가 경향이 다른 패널 요원은 재훈련을 실시함.

(라) 평가 절차

- 평가는 4회 진행됨.
- 출현 정도 및 지속정도를 평가하는 방법은 다음과 같음.
  - 출현 정도 ; 시료를 5초 동안 입에 머금은 후 삼키고 5초 동안 단맛을 평가하도록 하여 단맛의 최고점이 삼키고 1-2초 전후에 출현되는 시료는 척도의 "매우 약하다", 삼키고 5-6초 전후에 출현되는 시료는 "매우 강하다"쪽에 위치하도록 함.
  - 지속 정도 ; 시료를 5초 동안 입에 머금은 후 삼키는 동시에 타이머의 시작 버튼을 눌러 단맛이 지속되는 시간을 측정해 소수점 둘째 자리에서 반올림하여 첫째 자리까지 작성하도록 함.
- 그 외의 평가 절차는 묘사분석과 동일함.

(마) 통계 분석

- 통계 분석은 묘사 분석과 동일함.

Table 7. Definitions of descriptive attributes of sweetener samples.

Attributes	Definition
Onset of sweetness	The time when maximum sweetness was first perceived.
Persistence of sweetness	The persistence of sweet taste after swallowing

(2) 실험결과

- 설탕, xylitol, xylose의 감미 출현 속도와 지속 정도는 유의적인 차이가 없는 것으로 나타났으나, xylitol의 경우 평가된 8종의 시료 중 가장 감미가 빨리 출현하고 빨리 사라지는 것으로 평가되었음 (Fig. 4).
- Sucralose의 경우 감미 출현 속도는 설탕과 유사하나, 감미 지속 정도는 설탕보다 유의적으로 더 오래 지속됨 ( $\Delta$  1 sec).
- Xylose나 같은 xylose derivatives인 xylitol과 달리 xylooligosaccharide는 설탕에 비해 감미가 늦게 출현하며 더 오래 지속되었음.
- 천연 감미료인 라한과와 stevioside는 설탕보다 늦은 감미 출현 속도와 오랜 지속 정도를 나타내며, stevioside의 경우 농도가 높을수록 감미가 더 늦게 출현하며 더 오래 지속되는 것으로 나타남.
- 묘사 분석에서 평가된 단맛은 출현 정도와는 약한 양의 상관관계를 ( $r=0.441$ ), 지속 정도와는 강한 양의 상관관계 ( $r=0.743$ )를 나타내어, 단맛 지속 정도가 전체적인 단맛 인지에 영향을 주는 것으로 판단됨.

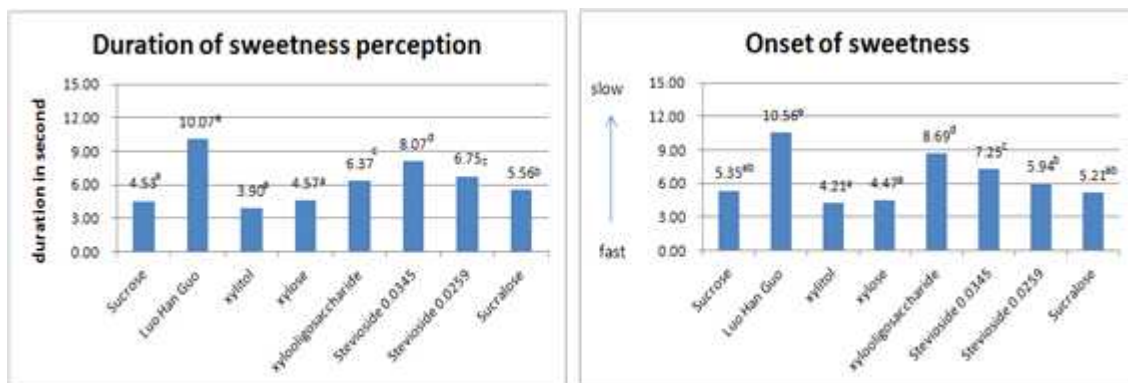


Fig. 4. Mean duration and onset of sweetness perceived from the 8 sweeteners.

(2) 실험결과

용해 방법	결과
수용액	<ul style="list-style-type: none"><li>70°C에서 최대 0.002% 용해, 실온에서 침전</li></ul>
Hydro-alcoholic 용액	<ul style="list-style-type: none"><li>1% ethanol 용액에 70°C에서 용해시 0.012% 까지 용해 가능하며 온도 유지시 2시간 동안 안정</li><li>2% ethanol 용액과 80°C 온도조건은 각각 지나치게 강한 알코올 향미 및 평가시 지나치게 뜨거운 온도 때문에 제외됨</li></ul>
Natural 유화 시스템	<ul style="list-style-type: none"><li>유지방 38% 생크림 - 혼합시 fat이 응고되어 분리되며, 생크림 향미가 강하여 단맛 masking</li><li>유지방 10% light 생크림 - 혼합시 fat 이 응고되어 분리되며, 시각적으로 용해 판단이 어려움</li><li>두유 - 용해 여부의 시각적 판별이 어려우며 단맛이 masking됨</li></ul>
Oil-in-water 유화 시스템	<ul style="list-style-type: none"><li>완전한 유화가 일어나지 않으며, 안정성이 떨어지고, 기름 산패취가 강함</li></ul>

: 1% hydro-ethnaol solution system으로 결정함.

나. Phyllodulcin과 고감미 감미료(intense sweeteners)의 상대당도 및 감미질 분석

본 실험에서는 2-alternative forced choice method (2-AFC) 를 이용하여 3% 설탕 수용액과 동일한 상대당도를 확립하였음.

(1) 실험방법

(가) 시료

- 총 6종류의 시료를 평가하였음 (Table 1).
- Rebaudioside A, aspartame, sucralose, luo han guo extract (LHGE), enzymatically modified stevia (EMST), phyllodulcin 수용액의 농도를 5수준으로 제조하여 각 시료마다 3% 설탕 수용액과 비교하였음 (Table 2).
- Phyllodulcin은 물에 대한 용해도가 낮아 주정 (95%, Ethyl alcohol; Daehan Ethanol Life, Korea) 1% 수용액 형태로 시료를 제조하였음. 동일한 조건에서 평가하기 위해 모든 시료에 주정 1%를 첨가하였음.
- 총 30쌍의 시료를 평가하였음.

Table 1. Sample information

Sample	Product name	Manufacturer	Purity (%)
Sucrose	White sugar	TS Corporation	100.00
Rebaudioside A	Rebaudioside-A98	Ingredion	98.80
Aspartame	Aspartame	AJOU Food Additive	98.50
Sucralose	sucralose PWD	Tate & Lyle	95.00
Luo Han Guo Extract	Luo Han Guo P.E	Neocremar	mogrosides 80.22
Enzymatically Modified Stevia	Enzymatically Modified Stevia	Daepyung	steviol glycosides 83.00
Phyllodulcin	Phyllodulcin	Sejong University	99.18

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

Sample	Concentration (%)
Rebaudioside A	0.005, 0.01, 0.02, 0.03, 0.04
Aspartame	0.005, 0.01, 0.02, 0.03, 0.04
Sucralose	0.001, 0.002, 0.004, 0.006, 0.008
LHGE	0.02, 0.03, 0.04, 0.05, 0.06
EMST	0.02, 0.03, 0.04, 0.05, 0.06
Phyllodulcin	0.0024, 0.0048, 0.0072, 0.0096, 0.012

## (나) 시료의 준비

① Phyllodulcin 시료 제조방법

㉔ 평가가 있기 1시간 전에, phyllodulcin을 주정에 용해하여 최종 농도의 100배에 해당하는 stock solution을 제조하였음.

㉕ Phyllodulcin stock solution을 70℃ 물에 최종 etOH 농도가 1%가 되도록 5분 간격으로 소량씩 첨가, 교반하여 (Magnetic stirrer, GLHPS-G; Global lab, Siheung, Korea) 총 1시간 내에 용해하여 수용액을 제조하였음.

㉖ 시료를 제조한 즉시 50℃로 조정된 water bath (345×710mm, NTT-2200, Tokyo Rikakikai. Co., Ltd., Japan) 에 옮겨 phyllodulcin 시료의 온도를 50℃로 조정하였음.

② Phylloidalcin 이외의 시료 제조방법

- ㉓ 분량의 감미료와 실온의 정수, 주정 1%를 함께 magnetic stirrer로 30분간 교반하여 각각의 시료를 제조하였음.
- ㉔ 시료는 평가가 있기 3일 전에 제조하여 평가가 있기 전까지 냉장 ( $2\pm 1^{\circ}\text{C}$ ) 보관하였음 (냉장 저장기간 동안 관능적 특성 및 품질에 변화가 없는 것으로 확인되었음).
- ㉕ 평가 2시간 전에 실온 ( $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ ) 에서 방냉한 뒤, 평가 1시간 전에  $50^{\circ}\text{C}$ 로 조정된 water bath에서 보관하여 phylloidalcin과 동일한 온도 조건에서 제시되도록 하였음.
- ㉖ 모든 시료가  $50^{\circ}\text{C}$ 로 조정되었음.

(2) 시료의 제시

- 시료는 난수표에서 추출한 세 자리 숫자로 표기하였음.
- 시료의 온도 변화를 최소화하기 위하여 검사 직전까지 hot water bath에서  $50^{\circ}\text{C}$ 로 유지되었으며, 평가 바로 직전에 일회용 종이컵에 10mL씩 소분하여 제시하였음.
- 입가심 물은 보온병 (1.5L, THS-1500, Thermos L.L.C, Japan) 에서  $40\pm 1^{\circ}\text{C}$ 로 유지하여 제시하였음. 입가심 물의 온도는 예비실험을 통하여 구강 내 온도 변화를 최소화함과 동시에 지나치게 뜨겁지 않은 온도로 설정되었음.

③ 검사요원

- 국민대학교 감각과학 연구실의 소비자 검사 요원 pool을 대상으로 한 전화 모집과 국민대학교 각 건물 및 인근 기숙사, 식당 게시판에 참여자 모집문을 공지하여 지원자 45명을 선발하였음 (20대 32명, 30-40대 13명, 남 17명, 여 28명).

④ 평가 절차

- Phylloidalcin은 하루에 1쌍의 시료를 평가하여 5일에 걸쳐 5수준의 농도를 평가하였음.
- Phylloidalcin을 제외한 나머지 5종류의 감미료 시료는 하루에 1 종류의 감미료 시료를 평가하였음. 감미료 종류 당 5개의 농도를 평가하여 총 5개의 session이 진행되었음.
- Session 별 제공되는 농도의 제시순서는 William Latin square design에 의해 결정되었음.
- 한 session내에서는 3% 설탕 수용액과 감미료 시료 1쌍이 평가되었음.
- 시료는 monadic sequence 방법으로 제시되었으며, 1쌍 (3% 설탕 수용액과 감미료 시료) 내에서의 시료 평가 순서는 counter-balanced, randomized 되었음.
- 평가 방법 - 시료 전체를 5초 동안 머금고 제시된 타구 컵에 빨은 후 5초 동안 맛을 느껴 총 10초 동안 느껴지는 총체적인 단맛을 평가하여 단맛이 더 강한 시료를 선택함.
- 한 쌍의 시료를 평가한 후 다음 시료 쌍의 평가 전에 3분간의 휴식과 함께 제시된 입가심 물( $40\pm 1^{\circ}\text{C}$ ) 로 입을 충분히 헹구도록 하였음.
- 검사는 국민대학교 감각과학 연구실 내 관능검사실 booth에서 개별적으로 실시하였음.
- 시료의 색에 따른 오류를 최소화하기 위하여 적색 조명아래에서 검사를 실시하였음.

### ⑤ 결과 분석

- 시료를 3% 설탕 수용액 보다 더 달다고 평가한 응답수를 세어 concentration-response (C-R curve) 를 이용하여 회귀식을 구하였음.
- C-R curve의 회귀식 ( $\% \text{ response} = a \times \text{concentration}(\%) + b$ ) 을 구하여 응답률이 50%일 때의 감미료 농도를 계산하였음.
- 상대 당도 = 설탕수용액 농도 (3%) /응답률 50%일 때의 감미료 농도

### (2) 실험결과

- 각 감미료의 C-R curve (Fig. 1) 에서 구해진 회귀식, R2, 상대당도는 Table 3과 같음.
- 각 시료의 회귀식에 대한 R2값은 0.84-0.98로, 회귀선이 결과값에 잘 적합됨. R2값이 비교적 낮은 rebaudioside A, aspartame, sucralose의 경우에는 가장 높은 농도를 제외하고 4수준의 농도로 회귀식을 구하였을 때, 각각의 R2값은 0.90, 0.94, 0.95으로 well-fitted되며, 상대당도는 200.67, 171.43, 750가 나타남.
- Mogroside 혼합물을 80%정도 함유한 LHGE의 경우 250배의 감미도를 나타낸다고 보고됨. 본 실험에서 사용된 LHGE의 mogroside 혼합물 함량이 80.22%이었으나, 약 87배의 상대당도를 나타냄. 이러한 결과는 LHGE의 기타 향미가 평가 시 영향을 주었으며, 또한 단맛의 출현정도가 늦어 상대당도가 보다 낮게 평가된 것으로 판단됨.
- Rebaudioside A는 stevia의 잎에 속해 있는 감미성분으로, stevia에서 별도의 분리조작을 통해 생산되며 감미성분 중 감미도가 가장 높고 감미질이 우수함. EMST는 stevia extract에  $\alpha$ -glucosyltransferase를 처리하여 glucose를 부가시켜 얻어지는 감미료로, 주 감미 성분은 stevioside 라고 알려짐. 본 실험에서 사용된 EMST는 steviol glycoside가 약 80% 포함되어있어, rebaudioside A (98.80%) 보다 순도 및 감미질이 낮음. 본 실험에서 rebaudioside A의 상대당도가 189.87로 EMST보다 2배 이상 높게 측정됨. EMST의 경우에는 농도가 높아짐에 따라 쓴맛도 함께 증가하며, 단맛 이외의 기타 특유 향미의 발현으로 인해 단맛이 masking되어 보다 낮은 상대당도가 도출된 것으로 판단됨. Rebaudioside A에서도 약간의 쓴맛이 나타나지만, 단맛 평가에 영향을 미칠 정도로 강하지 않아, 상대당도를 평가할 때 큰 문제가 되지 않았음.
- Phyllodulcin은 수국잎에 함유된 고 감미 물질로 상대당도가 500라고 알려져 있음. 본 실험에서 도출된 상대당도는 434.78로 약간 낮게 평가되었음. 이는 phyllodulcin의 농도가 높아짐에 따라 쓴맛도 함께 증가하며, 단맛이 약간 늦게 출현되는 경향이 있어 검사요원들이 초기 단맛을 위주로 평가하였기 때문이라고 판단됨. 향후 추가적인 처리공정을 도입하여 phyllodulcin의 쓴맛이 저감된다면 상대당도 평가 시 더 정확한 결과를 도출할 수 있을 것으로 사료됨.

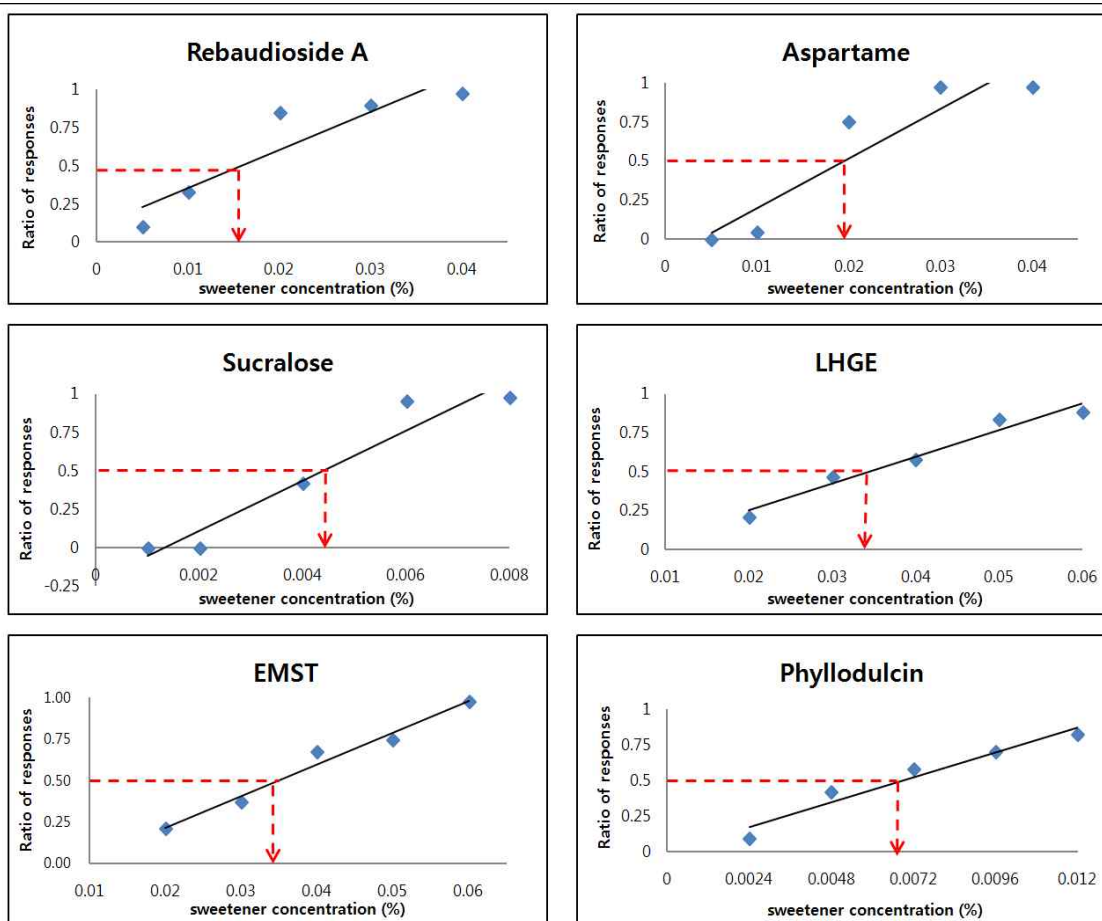


Fig. 1. C-R curves of 6 sweeteners.

Table 3. Relative sweetness of 6 sweeteners calculated from the C-R curves.

Sample	Regression equation	R <sup>2</sup>	Relative sweetness obtained by 2-AFC (comparing to 3% sucrose)	Relative sweetness from literature data
Rebaudioside A	$y=25.122x+0.1024$	0.8425	189.87	200-300
Aspartame	$y=31.87x-0.1182$	0.8619	154.64	200
Sucralose	$y=162.93x-0.2145$	0.9313	681.82	500-750
LHGE	$y=17.209x-0.093$	0.9621	86.96	150-500
EMST	$y=19.07x-0.1674$	0.9756	85.71	100-300
Phyllodulcin	$y=72.491x+0.0011$	0.9457	434.78	500

#### 다. 감미질 분석

본 실험에서는 정량적 묘사분석 (Quantitative Descriptive Analysis) 을 이용하여 감미 특성을 규명하였음.

##### (1) 실험방법

###### (가) 시료

- 2-AFC 검사를 통해 확립된 3% 설탕 수용액과 동일한 감미도를 갖는 농도를 이용하였음 (Table 4).
- Rebaudioside A는 2-AFC 검사에서 5 농도 수준으로 회귀식을 구하였을 때, 3% 설탕 수용액과 동일한 감미도를 갖는 농도는 0.01583%가 나타남. 그러나 농도를 낮추어야 한다는 패널들의 의견을 수렴하여, 4 농도 수준으로 회귀식을 구하였을 때의 3% 설탕 수용액과 동일한 감미도를 갖는 농도 0.01495%로 재조정되었음.
- EMST는 2-AFC 검사에서 확립된 3% 설탕 수용액과 동일한 감미도를 갖는 농도가 0.035%이지만, 검사 요원들의 평가 결과 단맛이 3% 설탕 수용액에 비해 유의적으로 낮은 것으로 나타나 최종적으로 0.045%로 재조정되었음.
- Phyllodulcin은 2-AFC 검사에서 확립된 3% 설탕 수용액과 동일한 감미도를 갖는 농도가 0.00688%이지만 0.006%로 재조정되었음.

Table 4. Concentration of samples used in descriptive analysis.

Sample	Concentration
Sucrose	3.0000 %
Rebaudioside A1)	0.01495 %
Aspartame	0.01939 %
Sucralose	0.00439 %
LHGE	0.03446 %
EMST2)	0.04500 %
Phyllodulcin2)	0.00600 %

<sup>1)</sup> Concentration of rebaudioside A was re-adjusted, calculated from regression equation of the C-R curve using only 4 concentration levels.

<sup>2)</sup> Concentrations of EMST and phyllodulcin were re-adjusted through panel discussion.

###### (나) 시료의 준비

① 시료는 2-AFC 검사에서 이용한 제조방법과 동일한 방법으로 제조되었음.

###### ② 시료의 제시

- 시료는 2-AFC 검사에서 사용한 방법과 동일하게 제시되었음.
- 하나의 시료를 평가한 후 다음 시료를 평가하는 monadic sequence 방법을 사용하였음.
- 외관 시료는 50mL 투명 vial에 담아 평가하였으며, 시료의 색에 따른 오류를 방지하기 위해 향미 평가용 시료와 다른 세 자리 숫자로 표기하였음.



(다) 검사요원

① 패널 선발

국민대학교 감각과학 연구실의 소비자 검사 요원 pool을 대상으로 이전에 관능검사에 참여한 경험이 있으며 특성 표현 능력이 우수한 10명을 선발하였음 (30-40대 여자 10명).

② 패널 훈련

- 패널 훈련은 주 3회, 3개월간 진행되었으며, 회당 1-1.5hr 소요되었음.
- 용어 및 표준 시료 개발 (17hr)
  - 오리엔테이션 (1hr) : 검사 목적, 관능검사 및 묘사분석의 소개,
  - 특성 용어 도출 (3hr) : 시료간의 차이를 잘 설명하는 특성을 개별적으로 도출한 후 패널들 간의 토의를 거쳐 용어 목록을 개발하였음 (Table 5).
  - 정의 및 표준시료 확립 (13hr) : 특성 용어에 대한 정의 및 표준시료, 평가방법을 확립하였으며 (Table 6), 15cm 선척도 (1.25cm:매우 약하다/매우 일찍 느껴진다, 13.75cm:매우 강하다, 매우 늦게 느껴진다) 사용법을 훈련하였음.
- 패널들의 수행 능력 평가 (5hr)
  - 확립된 평가 방법에 의하여 4회 모의 평가 후 통계분석을 통해 패널들 간의 consensus와 각 패널 요원의 재현성을 확인하였음.
  - 재현성이 낮거나 평가 경향이 다른 패널 요원들은 재훈련을 실시하였음.
- 본 실험 (4hr)
  - 본 실험은 4회 진행하였음.

③ 평가 절차

- 시료는 William Latin square design에 따라 제시되었음.
- 시료사이에 3분 간 휴식과 함께 제시된 입가심 물 ( $40\pm 1^{\circ}\text{C}$ ) 로 입을 충분히 행구도록 하였음.
- 시료의 색에 따른 오류를 최소화하기 위하여 향, 향미, 맛, 삼차감각의 경우 적색 조명 아래에서 검사를 실시하였으며, 외관은 자연광 조명 (North sky day light, CIE-F7, 6500K, Multi Light Booth, Super Light VI; Bowoo engineering Co., Ltd., Gunpo, Korea) 에서 평가를 별도로 진행하였음.
- 검사는 국민대학교 감각과학 연구실 내 관능검사실 booth에서 개별적으로 실시하였음.

④ 결과 분석

㉞ 분산 분석 (ANOVA)

- 분산분석 모형에는 sample, panel, repetition과 이들의 2차 상호작용이 포함되었음.
- 시료를 고정변인, 패널을 랜덤변인으로 하는 혼합 모형을 적용하였음.
- 사후분석은 Duncan's multiple range test ( $p < 0.05$ ) 를 실시하였음.
- SPSS (ver 18.0, SPSS inc., Chicago, IL, USA)를 이용하여 분석하였음.

㉟ 주성분 분석 (PCA)

- 각 특성별 데이터는 패널에 따라 center되었으며, rotation은 선택되지 않았음.
- SensoMineR (ver 3.1.1, Husson and Lê) 을 이용하여 분석하였음.

Table 5. Definitions of descriptive attributes of sweetener samples.

Attributes		Definition
Appearance	Yellow	Yellow color
Odor	Honey	The smell associated with honey
Taste	Sweet	Fundamental taste sensation of which sucrose is typical
	Bitter	Fundamental taste sensation of which caffeine and quinine is typical
Flavor	Alcohol	Aromatics associated with alcohol flavor
	Nurungji candy	Aromatics associated with nurungji candy
	Artificial	Aromatics associated with artificial sweetener such as saccharin and plastic flavor
Trigeminal senses	Cooling	Cooling sensation associated with mentol
Aftertaste	Astringent	The feeling which shrivels the tongue associated with aluminium potassium sulfate after expectorate
Persistence	Sweet	The persistence of sweet taste after expectorate
Onset	Sweet	The time when maximum sweetness was first perceived

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

Attributes		Reference materials	Scale value (0 to 15)
Appearance	Yellow	NCSS1015-Y10R (NCS color index, Scandinavian Colour Institute AB, Stockholm, Sweden)	7.5
Odor	Honey	3% (w/v) honey (Dong suh honey, Dong suh Co., Jinchun-gun, Chungcheongbuk-do, Korea) and 1% (v/v) ethyl alcohol in water.	6.9
Taste	Sweet	3%, 5% (w/v) sucrose (Foodream refined hite sugar, TS Co., Incheon, Korea) and 1% (v/v) ethyl alcohol in water.	5.6 and 11
	Bitter	0.05%(w/v) caffeine (sigma-Aldrich, st.Lous, MO, USA) and 1% (v/v) ethyl alcohol in water.	10.4
Flavor	Alcohol	3% (w/v) sucrose (Foodream refined hite sugar, TS Co., Incheon, Korea) and 1% (v/v) ethyl alcohol in water.	7.5
	Nurungji candy	Nurungji candy (nurungji on iron pot, HAITAI Co., Gwangju, Korea)	11.5
	Artificial	Abstraction and generalization using experience with artificial sweetener such as saccharin.	N/A <sup>1)</sup>
Trigeminal senses	Cooling	0.3% (w/v) peppermint (peppermint powder, ESfood, Gyeonggi-do, Korea) and 1% (v/v) ethyl alcohol in water.	13.75
Aftertaste	Astringent	0.3% (w/v) aluminium potassium sulfate(aluminium potassium sulfate, Daejung chemicals & metals Co., Gyeonggi-do, Korea) and 1% (v/v) ethyl alcohol in water.	11.25

<sup>1)</sup> N/A means that reference standard of a sensory attribute does not have a specific scale value because the reference sample was only used for assessors' concept alignment.

Table 7. Tasting method for the persistence and onset of sweetness.

Attributes	Tasting method
Persistence of sweetness	Sample was swirled around in the oral cavity for 5 s, and its sweetness was perceived over 10 s after expectoration. The time when maximum sweetness was first perceived
Onset of sweetness	with holding in the oral cavity. very fast (scale value : 1.25) - within 1-2 s very slow (scale value : 13.75) - within 5-6 s

(2) 실험결과

- 각 감미료에서 도출된 감미 특성과 시료간의 관계를 주성분 분석한 결과 Fig 2, 3와 같은 결과를 도출하였음. 시료의 관능적인 특성을 보다 종합적, 다각적으로 분석하기 위하여 감미 출현 및 지속정도를 분석에 포함하였음.
- 2-AFC 검사를 통해 설탕 3%와 동일한 감미도를 갖는 농도를 이용하여 묘사분석을 진행하기 전에 묘사분석 패널들의 충분한 논의를 통하여 rebaudiosie A, phyllo dulcin, EMST의 시료의 농도가 조정되어 Table 4에 작성된 농도를 이용하여 실험을 진행하였음. 그 결과 시료들 간의 단맛이 유의적으로 차이가 없었음 (Table 8).
- Fig. 2에서 dim 1과 dim 2는 각각 전체 변동의 43.93%, 27.15%을 설명함. Dim 1에서는 주로 LHGE와 phyllo dulcin이 뚜렷이 구분됨. Fig 2A에서 dim 1의 양의 방향으로 노란색, 꿀향, 누룽지 사탕 향미가 강하게 부하되며 LHGE에서 이러한 특성이 강하게 나타남. Fig 2에서 dim 1의 음의 방향으로 쓴맛, 알코올 향미, 화한 느낌, 짧은 후미가 강하게 부하되었으며, phyllo dulcin이 다른 시료에 비해 유의적으로 강하게 나타남 (Table 8). Dim 2에서는 LHGE와 phyllo dulcin이 상대적으로 향과 향미 특성이 없는 나머지 시료들과 구분되었음.

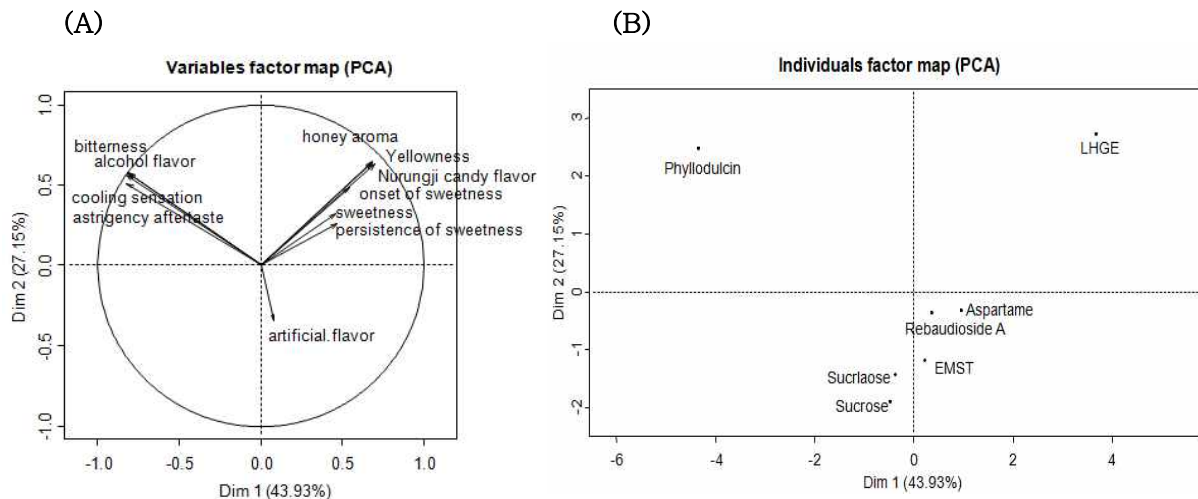


Fig. 2. Principal component loading of the sensory attributes (A) and scores of the samples (B) from 7 sweeteners on dim 1 and dim 2.

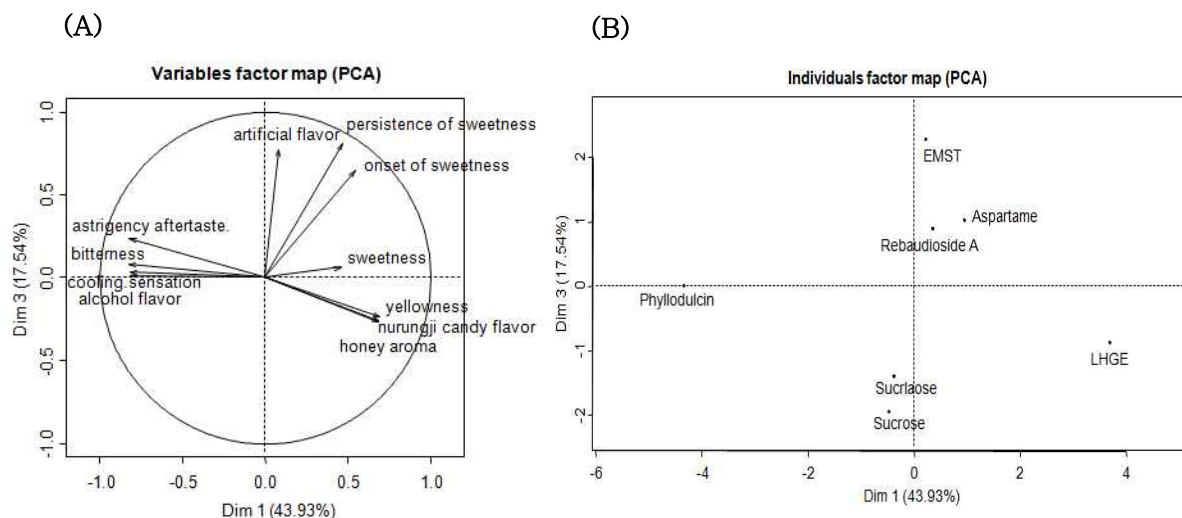


Fig. 3. Principal component loading of the sensory attributes (A) and scores of the samples (B) from 7 sweeteners on dim 1 and dim 3.

Table 8. Mean intensities of descriptive sensory attributes elicited by 7 sweeteners.

	Sucrose	Sucralose	Aspartame	EMST	Rebaudioside A	LHGE	Phyllo dulcin
Yellowness	0a1) (0.00)2)	0a (0.00)	0a (0.00)	0a (0.00)	0a (0.00)	4.49b (0.96)	0a (0.00)
Honey aroma	0.05a (0.24)	0a (0.00)	0a (0.00)	0a (0.00)	0a (0.00)	3.80b (0.68)	0a (0.00)
Sweetness	5.44 (0.76)	5.55 (0.56)	5.72 (0.56)	5.42 (0.71)	5.59 (0.53)	5.63 (0.54)	5.50 (0.79)
Bitterness	0.09a (0.33)	0.34ab (0.67)	0.28ab (0.53)	0.43b (0.59)	0.44b (0.70)	0.14a (0.40)	3.60c (0.93)
Alcohol flavor	1.11a (0.37)	1.16a (0.43)	1.11a (0.37)	1.14a (0.32)	1.20a (0.49)	1.11a (0.37)	3.46b (0.71)
Nurungji candy flavor	0.05a (0.24)	0.05a (0.24)	0.05a (0.24)	0.18a (0.94)	0a (0.00)	3.76b (0.73)	0a (0.00)
Artificial flavor	0.15a (0.77)	0.23ab (0.49)	0.56bc (1.12)	3.82d (1.16)	0.74c (1.25)	0a (0.00)	0a (0.00)
Cooling sensation	0.18a (0.37)	0.18a (0.41)	0.23a (0.46)	0.25a (0.50)	0.33a (0.52)	0.14a (0.35)	3.56b (1.02)
Astringent aftertaste	0.21a (0.60)	0.60bc (0.85)	0.63c (0.71)	0.96d (0.76)	1.01d (0.74)	0.31ab (0.53)	3.31e (0.77)

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

2) Standard deviation

- 향과 향미 특성이 거의 없는 sucrose, sucralose, rebaudioside A, EMST, aspartame은 dim 3에 의해서 주로 설명됨 (Fig. 3). Dim 3은 전체 변동의 17.54%를 설명하며, 양의 방향으로 인공적인 향미, 단맛의 지속정도, 단맛의 출현정도가 강하게 부하됨 (Fig. 3A). Dim 3의 방향으로는 EMST, aspartame, rebaudioside A가 높게 부하되어, sucrose와 sucralose에 비해 이러한 특성이 강하게 나타남 (Fig 3B). 인공적인 향미는 EMST가 가장 강하며, rebaudioside A, aspartame이
- 다른 시료에 비해 유의적으로 강하게 평가되었음 (Table 8).
- Sucrose 와 sucralose를 비교하였을 때, 짧은 후미가 sucralose가 유의적으로 높게 평가되었으며 (Table 8), 짧은 후미의 평균 차는 0.39로 미세한 차이를 보임. 짧은 후미 이외의 모든 특성들이 유의적으로 차이를 나타내지 않아, Fig 2B, 3B에서 두 시료가 매우 밀접하게 위치한 것을 확인할 수 있음. 다른 연구에서 보고된 바와 같이 두 시료간의 감미질이 매우 유사한 것으로 판단됨.
- Rebaudioside A와 EMST는 같은 stevia에서 추출된 천연 감미료이지만 감미질에서 약간의 차이를 보이며, 이는 각각의 주 감미 성분의 차이에 인한 것으로 보임. 천연소재 감미료임에도 불구하고 플라스틱과 같은 인공적인 향미에서 유의적으로 EMST가 높게 평가됨. 또한, 유의적인 차이는 없지만 EMST의 단맛이 더 오래 지속됨 (Table 9).

Table 9. Mean intensities of persistence and onset of sweetness elicited by 7 sweeteners

	Sucrose	Sucralose	Aspartame	EMST	Rebaudioside A	LHGE	Phyllodulcin
Persistence of sweetness	1.89 <sup>a1)</sup> (1.21) <sup>2)</sup>	2.21 <sup>ab</sup> (1.49)	3.83 <sup>d</sup> (1.90)	3.57 <sup>cd</sup> (1.87)	3.28 <sup>c</sup> (1.94)	3.36 <sup>cd</sup> (1.52)	2.60 <sup>b</sup> (1.61)
Onset of sweetness	2.36 <sup>a</sup> (2.58)	2.51 <sup>a</sup> (2.57)	4.63 <sup>bc</sup> (4.24)	4.98 <sup>bc</sup> (4.57)	5.24 <sup>bc</sup> (4.47)	5.70 <sup>c</sup> (4.77)	3.67 <sup>ab</sup> (3.62)

<sup>1)</sup> Different alphabet letters indicate a significant difference among the samples ( $p < 0.05$ ).

<sup>2)</sup> Standard deviation

- Phyllodulcin는 쓴맛, 알코올 향미, 화한 느낌, 짧은 후미가 강하게 나타남 (Fig. 2, 3). 그러나 Table 8 에서의 각 특성에 대한 평균값을 살펴보면 15cm 선척도 (1.25cm:매우 약하다, 13.75cm:매우 강하다) 를 기준으로 대략 3cm 정도에 위치하여, 이러한 특성들이 ‘매우 약하다’ 부근에 평가되었음을 확인할 수 있음. Phyllodulcin의 인공적인 향미는 전혀 나타나지 않음. Rebaudioside A와 EMST의 경우와 같이 동일한 stevia 유래 감미료 일지라도 순도 및 감미질에서 우수한 rebaudioside A의 인공적인 향미가 유의적으로 낮게 평가된 것처럼, phyllodulcin도 마찬가지로 후속연구를 통하여 쓴맛, 짧은 후미와 같은 관능적 특성이 저감된다면 더 우수한 감미질을 나타낼 수 있으리라 사료됨.
- Sucrose의 경우 평가된 7종류의 시료들 중 단맛이 가장 일찍 출현하고 빨리 사라지는 것으로 나타남 (Table 9). Sucrose, sucralose, phyllodulcin의 단맛 출현 정도는 유의적으로 차이가 없었음. Sucrose와 sucralose, sucralose와 phyllodulcin간의 단맛 지속정도가 유의적으로 차이가 없었음. 세 시료간의 단맛 profile이 매우 유사한 것으로 판단됨.

- Phyllodulcin는 sucrose와 비교하여 특정한 특성에서 약간의 차이를 보이지만, 단맛의 출현정도 및 지속정도가 매우 유사한 것으로 나타남. 후속 연구를 통해 쓴맛과 짧은 후미와 같은 특성이 저감된다면, sucrose와 유사한 감미질과 단맛 profile을 나타내며 sucrose의 약 500배의 단맛을 가진 우수한 감미료로 발전 할 수 있을 것으로 사료됨.
- Aspartame, EMST, rebaudioside A, LHGE는 단맛이 유의적으로 늦게 출현하였으며 또한 오래 지속되었음. 4개의 시료간의 유의적인 차이는 없지만 LHGE의 단맛 출현이 가장 늦었으며, aspartame의 단맛이 가장 오래 지속되었음.

#### 4. Xylobiose 및 기능성 감미소재의 상대당도 및 감미질 분석

Xylobiose의 상대당도를 측정하고, 같은 bulk sweetener인 xylitol, xylose, xylo-oligosaccharide (powder), erythritol과 비교 평가하였음. 설탕은 감미질 기준 시료로써 포함되었음.

##### 가. 상대당도 분석

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

##### (1) 실험방법

###### (가) 시료

- 1차년도에서 상대당도가 구해진 xylitol, xylose를 제외한 xylo-oligosaccharide powder (XOSP), xylobiose (XB), erythritol 3종류의 시료를 평가하였음 (Table 10).
- 감미료 수용액 농도를 5 수준으로 제조하여 각 시료 마다 5% 설탕 수용액과 비교하였음 (Table 11).
- 총 15쌍의 시료를 평가하였음.

Table 10. Sample information

Sample	Product name	Manufacturer	Purity (%)
Sucrose	White sugar	TS Corporation	100.00
Xylo-oligosaccharide Powder	Xylo-oligosaccharide	Shandong Longlive	XOS2-7 contents 96.86
		Bio-Technology	XOS2-4 contents 78.56
Xylobiose	Xylobiose	TS Corporation	98.00
Erythritol	Erythritol	Cargil Polyols	100.00

Table 11. Concentration of samples used in 2-AFC

Sample	Concentration (%)
XOSP	12, 15, 18, 21, 24
XB	8.5, 10.5, 12.5, 14.5, 16.5
Erythritol	6, 7, 8, 9, 10

(나) 시료의 준비

- 시료는 분량의 감미료와 실온의 정수를 magnetic stirrer로 30분간 교반하여 각각의 시료를 제조하였음.
- 시료는 평가가 있기 3일 전에 제조하여 평가가 있기 전까지 냉장 ( $2\pm 1^{\circ}\text{C}$ ) 보관하였음 (냉장 저장기간 동안 관능적 특성 및 품질에 변화가 없는 것으로 확인되었음).
- 평가 3시간 전에 실온 ( $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ ) 에서 방냉한 뒤, 평가 30분 전에 일회용 종이컵에 10mL씩 소분하였음.
- 시료는 난수표에서 추출한 세 자리 숫자로 표기하였음.
- 실온의 입가심 물을 제공하였음.

(다) 검사 요원

- 국민대학교 감각과학 연구실의 소비자 검사 요원 pool을 대상으로 한 전화 모집과 국민대학교 각 건물 및 인근 기숙사, 식당 게시판에 참여자 모집문을 공지하여 지원자 43명을 선발하였음 (20대 - 남 13명, 여 21명, 30-40대 - 남 1명, 여 8명).

(다) 평가 절차

- 총 3 session으로 구성되었으며, 2일에 걸쳐 진행하였음.
- 1 session당 한 종류의 감미료 시료를 평가하였으며, 5 농도 수준으로 제조된 시료를 각각 설탕 5% 수용액과 비교하였음.
- 각 session에 제시되는 시료의 종류 및 session내에서 제시되는 시료의 농도 제시 순서는 William Latin square design에 의해 결정되었음.
- 시료는 monadic sequence 방법으로 제시되었으며, 1쌍 (5% 설탕 수용액과 감미료 시료)내에서의 시료 평가 순서는 counter-balanced, randomized 되었음.
- 평가 방법 - 시료 전체를 5초 동안 머금고 제시된 타구 컵에 빨은 후 5초 동안 맛을 느껴 총 10초 동안 느껴지는 단맛을 평가하여 단맛이 더 강한 시료를 선택함.
- 한 쌍의 시료를 평가한 후 다음 시료 쌍의 평가 전에 3분간의 휴식과 함께 제시된 실온의 입가심 물로 입을 충분히 헹구도록 하였음.
- 검사는 국민대학교 감각과학 연구실 내 관능검사실 booth에서 개별적으로 실시하였음.
- 시료의 색에 따른 오류를 최소화하기 위하여 적색 조명아래에서 검사를 실시하였음.

(라) 결과 분석

- 고감미 감미료 2-AFC 검사에서 이용한 방법과 동일하게 분석되었음.
- 상대당도 = 설탕 수용액 농도 (5%) / 응답률 50%일 때의 감미료 농도



(2) 실험결과

- 각 감미료의 C-R curve (Fig. 4) 에서 구해진 회귀식, R2, 상대당도는 Table 12와 같음.
- 각 회귀식에 대한 R2값이 0.95-0.99로 나타났으며, 특히 XOSP의 R2이 0.99로 회귀선이 결과값에 잘 적합되었음.
- XOSP와 XB는 옥수수심으로부터 얻은 xylan을 원료로 이용함. XOSP는 XOS2-7 96.86%를 함유하고 있으며, 78.56%가 XOS2-4로 구성되어 있음. XB는 xylose 2개가  $\beta$ -1,4 결합된 물질로 XOS에 30% 이상 존재함. XOSP와 XB의 상대당도가 약 0.5로 알려져 있지만, 본 실험에서 도출된 상대당도는 각각 0.2588, 0.3425가 나타남. 이러한 결과는 두 시료의 농도가 높아짐에 따라 단맛 이외의 옥수수 향미와 같은 기타 특유 향과 향미가 함께 증가하여 평가 시 영향을 미쳤으며, 또한 단맛이 늦게 출현하고 오래 지속되는 경향이 있어 검사요원들이 초기 단맛을 위주로 평가하였기 때문이라고 판단됨.
- Erythritol은 0.6-0.8배의 상대당도를 나타낸다고 보고되었으나, 본 실험에서 도출된 상대당도는 0.5650으로 약간 낮게 평가되었음. 이는 erythritol의 농도가 높아짐에 따라 쓴맛도 함께 증가하여 단맛이 masking되어 보다 낮은 상대당도가 도출된 것으로 판단됨.

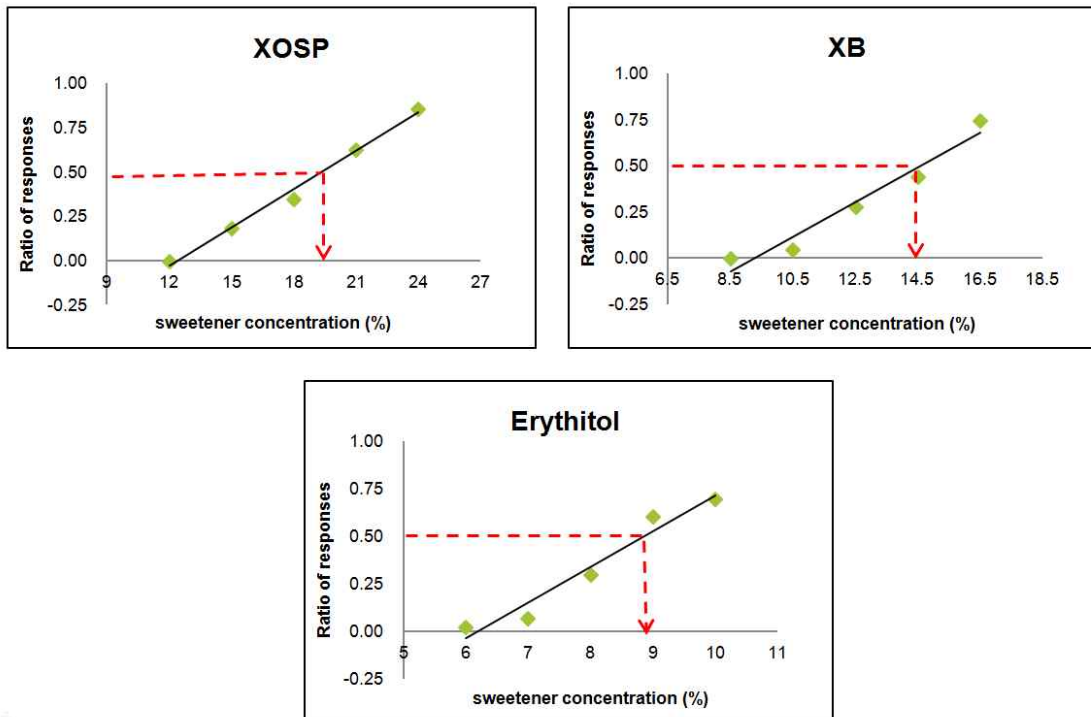


Fig. 4. C-R curves of 3 sweeteners.

Table 12. Relative sweetness of 3 sweeteners calculated from the C-R curves

Sample	Regression equation	R2	Relative sweetness obtained by 2-AFC (comparing to 5% sucrose)	Relative sweetness from literature data
XOSP	$y=0.0721x-0.893$	0.9905	0.2588	0.5
XB	$y=0.0942x-0.875$	0.9536	0.3425	0.5
Erythritol	$y=0.1884x-1.1674$	0.9520	0.5650	0.6

나. 감미질 분석

본 실험에서는 정량적 묘사분석 (Quantitative Descriptive Analysis) 을 이용하여 감미 특성을 규명하였음.

(1). 실험방법

(가) 시료

- 2-AFC 검사를 통해 확립된 5% 설탕 수용액과 동일한 감미도를 갖는 농도를 이용하였음 (Table 13).
- Xylitol 과 xylose는 이전에 진행된 감미료의 평가 시스템 개발 연구에서 도출된 상대 당도가 이용되었음.
- XB는 2-AFC 검사에서 확립된 5% 설탕 수용액과 동일한 감미도를 갖는 농도가 14.60%로 나타
- 남. XB 1일 섭취 허용 기준량 0.7 ~ 7.5g을 고려하여 XB의 생리활성 기능성을 나타내면서 설탕 감미도의 90%이상을 나타낼 수 있도록 XB를 sucrose에 7 : 93의 비율로 xylobiosugar (XBSU) 를 제조하여 이용되었음.
- Erythritol은 2-AFC 검사에서 확립된 5% 설탕 수용액과 동일한 감미도를 갖는 농도가 8.85%이지만, 검사 요원들의 평가 결과 단맛이 5% 설탕 수용액에 비해 유의적으로 높은 것으로 나타나 최종적으로 7.80%로 재조정되었음.

Table 13. Concentration of samples used in descriptive analysis.

Sample	Concentration
Sucrose	5.00 %
Xylitol1)	5.10 %
Xylose1)	8.21 %
XOSP	19.32 %
XB	14.60 %
XBSU2)	XB 0.35% + Sucrose 4.65%
Erythritol3)	7.80 %

<sup>1)</sup> Concentration of xylitol and xylose were defined from previous study.

<sup>2)</sup> Level of showed biotically active and higher sweetness than sucrose 90%,XBSU was added to the sample list.

<sup>3)</sup> Concentration of erythritol was re-adjusted through panel discussion.

#### (나) 시료의 준비

- 시료는 2-AFC 검사에서 이용한 제조방법과 동일하게 제조되었음.
- 평가 2시간 전에 실온 (22±2℃) 에서 방냉한 뒤, 평가 30분 전에 일회용 종이컵에 40mL씩 소분하여 제시하였음.
- 하나의 시료를 평가한 후 다음 시료를 평가하는 monadic sequence 방법을 사용하였음.
- 외관 시료는 50mL 투명 vial에 담아 평가하였으며, 시료의 색에 따른 오류를 방지하기 위해 향미 평가용 시료와 다른 세 자리 숫자로 표기하였음.
- 실온의 입가심 물을 제공하였음.

#### (다) 검사요원

##### ① 패널 선발

- 국민대학교 감각과학 연구실의 소비자 검사 요원 pool을 대상으로 이전에 관능검사에 참여한 경험이 있으며 특성 표현 능력이 우수한 3명과, 이전 고감미 감미료 묘사분석에 참여한 7명을 선발하였음 (30-40대 여자 10명).

##### ② 패널 훈련

- 패널 훈련은 주 4회, 2개월간 진행되었으며, 회당 1hr 소요되었음.
- 용어 및 표준 시료 개발 (10hr)
  - 오리엔테이션 (1hr) : 검사 목적, 관능검사 및 묘사분석의 소개,
  - 특성 용어 도출 (2hr) : 시료간의 차이를 잘 설명하는 특성을 개별적으로 도출한 후 패널들 간의 토의를 거쳐 용어 목록을 개발하였음 (Table 14).
- 패널들의 수행 능력 평가 (4hr)
  - 확립된 평가 방법에 의하여 4회 모의 평가 후 통계분석을 통해 패널들 간의 consensus 와 각 패널 요원의 재현성을 확인하였음.
  - 재현성이 낮거나 평가 경향이 다른 패널 요원들은 재훈련을 실시하였음.
- 본 실험 (3hr)
  - 본 실험은 3회 진행하였음.

③ 평가 절차

- 시료는 William Latin square design에 따라 제시되었음.
- 시료사이에 3분 간 휴식과 함께 제시된 입가심 물로 입을 충분히 헹구도록 하였음.
- 시료의 색에 따른 오류를 최소화하기 위하여 향, 향미, 맛, 삼차감각의 경우 적색 조명 아래에서 검사를 실시하였으며, 외관은 자연광 조명 (North sky day light, CIE-F7, 6500K, Multi Light Booth, Super Light VI; Bowoo engineering Co., Ltd., Gunpo, Korea) 에서 평가를 별도로 진행하였음.
- 검사는 국민대학교 감각과학 연구실 내 관능검사실 booth에서 개별적으로 실시하였음.

④ 결과 분석

㉞ 분산 분석 (ANOVA)

- 분산분석 모형에는 sample, panel, repetition과 이들의 2차 상호작용이 포함되었음.
- 시료를 고정변인, 패널을 랜덤변인으로 하는 혼합 모형을 적용하였음.
- 사후분석은 Tukey's multiple range test ( $p < 0.05$ ) 를 실시하였음.
- SPSS (ver 18.0, SPSS inc., Chicago, IL, USA)를 이용하여 분석하였음.

㉟ 주성분 분석 (PCA)

- 각 특성별 데이터는 패널에 따라 center되었으며, rotation은 선택되지 않았음.
- Bootstrapping technique을 이용하여 (iteration = 500) 시료의 confidence ellipses를 구하였으며, Hotellins's T test를 통해 시료간의 global difference를 검증하였음.
- SensoMineR (ver 3.1.1, Husson and Lê) 을 이용하여 분석하였음.

Table 14. Definitions of descriptive attributes of sweetener samples

Attributes		Definition
Appearance	Yellow	Yellow color
Odor	Corn	The smell associated with corn
Taste	Sweet	Fundamental taste sensation of which sucrose is typical
	Bitter	Fundamental taste sensation of which caffeine and quinine is typical
Flavor	Corn	Aromatics associated with corn
	Nurungji candy	Aromatics associated with nurungji candy
Trigeminal senses	Acridness	Sharp, irritating, or biting sensation on the tongue
Texture	Body	Rate of sample flows on the tongue
Aftertaste	Bitter	Bitter taste after expectorate
Persistence	Sweet	The persistence of sweet taste after expectorate
Onset	Sweet	The time when maximum sweetness was first perceived

Table 15. Reference materials for the descriptive attributes of sweetener samples

Attributes		Reference materials	Scale value (0 to 15)
Appearance	Yellow	NCSS1040-Y (NCS color index, Scandinavian Colour Institute AB, Stockholm, Sweden)	9.5
Odor	Corn	Mixture of corn silk tea (Kwang dong corn silk tea, Kwang dong pharmaceutical Co., Pyeongtaek, Gyeonggi-do, Korea) and water in the ratio of 1 to 5.	7.5
Taste	Sweet	3% (w/v) sucrose (Foodream refined hite sugar, TS Co., Incheon, Korea) , 4% and 5% sucrose in water	4, 5 and 6
	Bitter	0.05% (w/v) caffeine (sigma-Aldrich, st.Lous, MO, USA) in water.	7.5
Flavor	Corn	Mixture of corn silk tea (Kwang dong corn silk tea, Kwang dong pharmaceutical Co., Pyeongtaek, Gyeonggi-do, Korea) and water in the ratio of 1 to 5.	7.5
	Nurungji candy	Nurungji candy (nurungji on iron pot, HAITAI Co., Gwangju, Korea)	11.25
Trigeminal senses	Acridness	21g Radish sprout (radish sprout, Neulpureun farm, Gyeonggi-do, Korea) extract on 200mL water.	7.5
Texture	Body	1.5g potato starch (potato starch, Ttureban, Gyeonggi-do, Korea) and 500mL water boiled using low heat with stir about 5 minutes.	9.4
Aftertaste	Bitter	Abstraction and generalization using experience with bitter taste such as caffeine and quinine.	N/A <sup>1)</sup>

<sup>1)</sup> N/A means that reference standard of a sensory attribute does not have a specific scale value because the reference sample was only used for assessors' concept alignment.

Table 16. Tasting method for the persistence and onset of sweetness.

Attributes	Tasting method
Persistence of sweetness	Sample was swirled around in the oral cavity for 5 s, and its sweetness was perceived over 10 s after expectoration.
Onset of sweetness	The time when maximum sweetness was first perceived with holding in the oral cavity. very slow (scale value : 13.75) - LHGE 0.0576% (w/v)

## (2) 실험결과

- 각 감미료에서 도출된 감미 특성과 시료간의 관계를 주성분 분석한 결과는 Fig. 5에 나타났으며, 시료간의 유의적인 차이를 보기 위하여 분산 분석한 결과 Table 17이 도출되었음. 시료의 관능적인 특성을 보다 종합적, 다각적으로 분석하기 위하여 감미 출현 및 지속정도를 묘사분석에 포함하였음.
- 2-AFC 검사를 통해 설탕 5%와 동일한 감미도를 갖는 농도를 이용하여 묘사분석을 진행하기 전 패널들의 충분한 논의를 통하여 erythritol의 농도가 조정되었음. Xylitol과 xylose는 이전에 진행된 감미료 평가 시스템 개발 연구에서 도출된 5% 설탕 수용액과 동일한 감미도를 갖는 농도를 이용하였으며, XBSU는 XB와 sucrose를 일정 비율로 혼합하여 제조되었음.
- Table 13에 작성된 농도를 이용하여 실험을 진행한 결과, sucrose와 다른 시료간의 단맛이 유의

적으로 차이가 없었으나, XOSP가 xylitol보다 단맛이 유의적으로 강하게 평가됨 (Table 17). 이는 총 10초 동안 느껴지는 단맛을 평가하는 방법으로 진행하여, XOSP가 xylitol에 비해 유의적으로 단맛이 늦게 출현하고 오래 지속되어 단맛이 더 강하게 평가 되었을 것으로 사료됨.

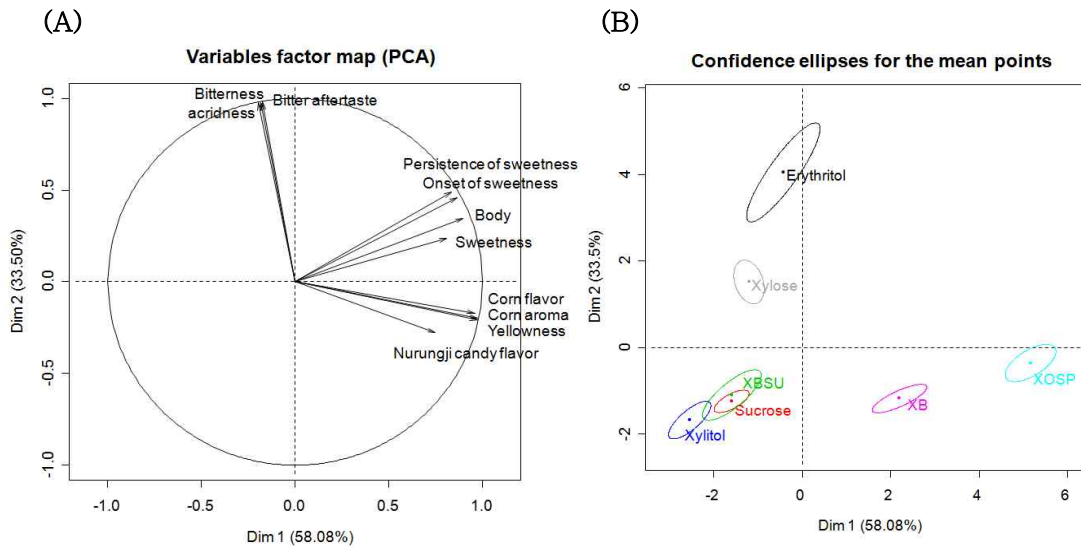


Fig. 5. Principal component loading of the sensory attributes (A) and scores of the samples (B) from 7 sweeteners on dim 1 and dim 2.

- Fig. 5에서 dim 1과 dim 2는 각각 전체 변동의 58.08%, 33.5%를 설명하여, 총 91.58%를 설명함. Dim 1에서는 주로 XB와 XOSP가 상대적으로 향과 향미 특성이 거의 없는 나머지 시료들과 구분됨. Fig 5A에서 dim 1의 양의 방향으로 노란색, 옥수수향, 옥수수 향미, 누룽지 사탕 향미, 바디감, 단맛의 출현 및 지속정도가 강하게 부하되며, 이러한 특성들이 XOSP와 XB에서 강하게 나타남. 특히 노란색, 옥수수향, 옥수수 향미, 누룽지 사탕 향미는 XB와 XOSP에서만 두각을 보이며, 나머지 시료에서는 전혀 나타나지 않았음. XOSP가 XB보다 노란색, 옥수수향, 옥수수향미, 바디감이 유의적으로 강하며, 누룽지 사탕 향미에서만 XB가 XOSP보다 유의적으로 강하게 나타남 (Table 17).
- Dim 2에서는 erythritol과 xylose가 쓴맛, 쓴맛 후미, 아린 느낌이 없는 나머지 시료들과 구분됨. Dim 2의 양의 방향으로 쓴맛, 쓴맛 후미, 아린 느낌이 강하게 부하됨. 이러한 특성들이 erythritol에서 가장 강하게 나타나며, xylose가 다른 시료에 비해 유의적으로 강하게 평가됨 (Table 17). Erythritol의 바디감이 sucrose, XBSU, XB, xylitol, xylose에 비해 유의적으로 강하게 나타남.
- Fig 5B에서 dim 1, 2의 음의 방향에 향, 향미 특성이 거의 없는 sucrose, XBSU, xylitol이 위치함. Table 17에서 XBSU와 sucrose를 비교하였을 때, 단맛을 포함한 모든 특성에서 매우 유사하게 평가되어, Fig 5B에서 XBSU와 sucrose의 confidence ellipses가 겹쳐있는 것을 확인 할 수 있음. Xylitol과 sucrose 비교 시 유의적인 차이는 없지만 xylitol의 단맛이 약간 낮게 평가되었으며, xylitol이 sucrose보다 단맛이 일찍 출현하고 짧게 지속됨 (Table 18). Fig 5B에서 두 시료의 confidence ellipses가 겹치지 않고 독립적으로 위치하여, 감미질이 매우 유사하지만 구별될 수 있는 것으로 나타남.

- 요약하면, XB는 XOSP보다 약하지만 노란색, 옥수수향, 옥수수 향미, 바디감 등의 특징이 강하나, 섭취 허용 범위를 만족할 수준으로 설탕과 혼합시 설탕과 감미질 및 단맛 강도에서 유의적으로 차이를 보이지 않음.

Table 17. Mean intensities of descriptive sensory attributes elicited by 7 sweeteners

	Sucrose	XBSU	Xylitol	Xylose	Erythritol	XOSP	XB
Yellowness	0.00 <sup>a1)</sup>	0.00 <sup>a</sup>	0.00 <sup>a</sup>	0.00 <sup>a</sup>	0.00 <sup>a</sup>	5.85 <sup>c</sup>	3.42 <sup>b</sup>
s	(0.00) <sup>2)</sup>	(0.00)	(0.00)	(0.00)	(0.00)	(1.20)	(0.65)
Corn aroma	0.00 <sup>a</sup>	0.00 <sup>a</sup>	0.00 <sup>a</sup>	0.00 <sup>a</sup>	0.00 <sup>a</sup>	4.72 <sup>c</sup>	1.80 <sup>b</sup>
s	(0.00)	(0.00)	(0.00)	(0.00)	(0.00)	(0.94)	(1.22)
Sweetness	5.04 <sup>abc</sup>	4.96 <sup>ab</sup>	4.73 <sup>a</sup>	5.13 <sup>bc</sup>	5.02 <sup>abc</sup>	5.33 <sup>c</sup>	5.08 <sup>bc</sup>
s	(0.46)	(0.59)	(0.48)	(0.45)	(0.58)	(0.27)	(0.41)
Bitterness	0.07 <sup>a</sup>	0.18 <sup>a</sup>	0.15 <sup>a</sup>	2.48 <sup>b</sup>	4.51 <sup>c</sup>	0.00 <sup>a</sup>	0.00 <sup>a</sup>
s	(0.28)	(0.55)	(0.40)	(1.16)	(1.36)	(0.00)	(0.00)
Corn flavor	0.00 <sup>a</sup>	0.00 <sup>a</sup>	0.00 <sup>a</sup>	0.00 <sup>a</sup>	0.00 <sup>a</sup>	5.06 <sup>c</sup>	2.63 <sup>b</sup>
s	(0.00)	(0.00)	(0.00)	(0.00)	(0.00)	(0.60)	(0.51)
Nurungji candy flavor	0.00 <sup>a</sup>	0.00 <sup>a</sup>	0.00 <sup>a</sup>	0.00 <sup>a</sup>	0.00 <sup>a</sup>	3.13 <sup>b</sup>	6.12 <sup>c</sup>
s	(0.00)	(0.00)	(0.00)	(0.00)	(0.00)	(0.69)	(1.56)
Acridness	0.00 <sup>a</sup>	0.11 <sup>a</sup>	0.08 <sup>a</sup>	2.59 <sup>b</sup>	4.14 <sup>c</sup>	0.04 <sup>a</sup>	0.02 <sup>a</sup>
s	(0.00)	(0.42)	(0.32)	(1.54)	(1.32)	(0.17)	(0.11)
Body texture	1.07 <sup>a</sup>	1.43 <sup>a</sup>	1.15 <sup>a</sup>	1.47 <sup>a</sup>	4.20 <sup>c</sup>	5.85 <sup>d</sup>	3.55 <sup>b</sup>
s	(1.33)	(1.51)	(1.21)	(1.70)	(2.55)	(1.66)	(1.43)
Bitter aftertaste	0.02 <sup>a</sup>	0.08 <sup>a</sup>	0.04 <sup>a</sup>	1.71 <sup>b</sup>	3.37 <sup>c</sup>	0.00 <sup>a</sup>	0.00 <sup>a</sup>
s	(0.09)	(0.32)	(0.18)	(0.98)	(1.13)	(0.00)	(0.00)

<sup>1)</sup> Different alphabet letters indicate a significant difference among the samples ( $p < 0.05$ ).

<sup>2)</sup> Standard deviation

- Xylitol은 7종류의 시료들 중 단맛이 가장 일찍 출현하여 빨리 사라지는 것으로 나타남 (Table 18). sucrose와 비교하여 XBSU, Xylitol의 출현정도 및 지속정도가 유의적으로 차이가 없었음. 세 시료의 감미질 뿐만 아니라, 단맛 profile도 매우 유사한 것으로 판단됨.
- XOSP와 erythritol은 단맛이 다른 시료에 비해 단맛이 늦게 출현하고 오래 지속됨.
- XB와 xylose는 sucrose에 비해 유의적으로 단맛 출현이 늦었으며, XB와 erythritol은 단맛의 출현 정도가 유의적으로 차이가 없었음. 반면에 단맛 지속정도에서는 XB와 xylose가 sucrose와 유의적으로 차이가 없었음.
- XB 자체의 단맛은 sucrose에 비해 단맛이 유의적으로 늦게 출현하였으나, XBSU는 sucrose와 단맛 profile이 매우 유사하게 나타남. XBSU는 XB가 지닌 생리활성 기능을 포함하며, sucrose와 매우 유사한 감미질과 단맛 profile을 나타내어 우수한 설탕 보완제가 될 것으로 사료됨.

Table 18. Mean intensities of persistence and onset of sweetness elicited by 7 sweeteners

	Sucrose	XBSU	Xylitol	Xylose	Erythitol	XOSP	XB
Persistence of sweetness	2.59ab <sup>1)</sup> (1.07) <sup>2)</sup>	2.74b (1.20)	2.11a (0.93)	3.02bc (1.09)	3.40cd (1.13)	3.95d (0.87)	3.01bc (1.18)
Onset of sweetness	1.77a (1.14)	1.78a (1.35)	1.45a (0.64)	2.66b (1.79)	4.56cd (2.08)	5.29d (1.88)	4.28c (2.15)

<sup>1)</sup> Different alphabet letters indicate a significant difference among the samples ( $p < 0.05$ ).

<sup>2)</sup> Standard deviation

## 5. Phyllodulcin과 Xylobiose 식품 적용시의 안정성 규명

### 가. 쿠키 시스템 제조 레시피 확립

본 실험에서는 가장 적합한 쿠키 제조 배합 조건, 설탕 대체 쿠키의 부피 복원성, phyllodulcin의 반죽에서의 용해성에 대한 예비 실험을 통하여 감미료 적용 쿠키 레시피를 확립하였음.

#### (1) 쿠키 제조 조건 설정

- 쿠키 제조 방법은 기존 고감미 감미료를 함유한 쿠키의 제조 레시피(Kim et al. 2006)를 참고하여 방법을 일부 수정한 크림법(creaming method)에 의하여 제조하였음.
- 예비 실험 조건을 다르게 한 증량제, 유지, 감미료의 종류를 제외하고 나머지 재료는 박력분, 계란 노른자, 소금으로 동일함.

#### (가) 설탕 대체로 인한 부피 감소를 보완하기 위한 증량제 비교

- 설탕은 제과·제빵류에 사용될 경우 단맛뿐만 아니라 향미, 외관 등의 특성에 영향을 미침. 특히 퍼짐성, 부서짐성 및 경도 등과 같은 식품의 구조와 텍스처에도 많은 영향을 미치는 것으로 보고되고 있음. 따라서 설탕을 다른 감미료로 대체할 경우 제품 부피의 감소나 호화에 영향을 미치기 때문에 이를 보완할 수 있는 증량제가 필요함.
- 본 실험에서는 Maltodextrin, Polydextrose, Maltitol(분말형), Maltitol(결정형)의 네 종류의 증량제를 사용하여 설탕을 고감미 감미료로 대체한 쿠키를 제조한 후 이에 따른 반죽의 물성, 최종 제품의 조직감, 단맛의 정도를 같은 당도의 설탕 쿠키와 비교하였음.
- Phyllodulcin의 제한적인 생산량을 고려하여, 증량제의 종류를 선정하는 본 실험은 phyllodulcin과 같이 intense sweetener의 한 종류인 sucralose로 설탕을 대체하여 실험을 진행하였음.
- 증량제는 감소된 설탕의 양과 동일하게 첨가하였음.

#### (나) 유지의 종류에 따른 반죽의 용이성 비교

- 쿠키의 제조에 필수 성분인 식용유지의 종류에 따른 반죽의 물성과 최종 쿠키 제품의 품질 특성을 비교하여, 감미료를 적용한 반죽 제조가 용이하고, 최종 제품이 일정하게 나올 수 있는 기본 유지를 선택하고자 함.
- 본 실험에서는 쿠키 제조에 가장 기본적으로 사용되는 버터, 쇼트닝의 두 종류의 유지를 사용하여 비교 실험을 진행하였음.



(다) 반죽에서 phyllodulcin의 용해도 실험

- 지용성인 phyllodulcin을 용해시켜 반죽에 고르게 섞이도록 하기 위해서 포도씨유, 알코올에 필로둘신을 용해시킨 후 반죽에 넣는 방법과, 반죽 과정에서 계란 노른자에 필로둘신을 바로 용해시키는 방법을 비교하였음.

(2) 실험결과

조건	결과
(1) 증량제의 종류	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Polydextrose를 첨가한 쿠키가 다른 쿠키들에 비해서 가장 퍼짐성이 좋았으나, 쿠키를 구웠을 때 가장 기름기가 많고, 가장 바삭거리는 질감을 가짐.</li> <li>• Maltitol 분말과 Maltitol 결정을 첨가한 쿠키는 거의 동일한 형태로 구워짐. 두 쿠키의 단맛의 정도는 설탕 쿠키와 가장 비슷하게 났으나, 질감이 계란 과자의 질감이 나타나 조직감에서의 차이를 보임.</li> <li>• Maltodextrin을 사용하였을 경우 반죽 과정에서 분말에 의해 반죽이 조금 뭉쳐지는 경향을 보였으며, 쿠키를 구웠을 때 단맛 정도나 두께, 모양은 기존 설탕 쿠키와 비슷하게 나타남.</li> </ul>
(2) 유지의 종류	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 쇼트닝을 사용하였을 경우가 버터를 사용했을 경우보다 크림화가 굉장히 빨리 되었지만, 쿠키 반죽을 2시간 동안 휴지 시킨 후 꺼냈을 때 버터 반죽보다 훨씬 질었음.</li> <li>• 쿠키의 크기 및 모양, 두께를 맞추기 위하여 쿠키커터를 사용하였으나, 쇼트닝을 사용한 반죽은 너무 질어서 커터에 달라붙어서 사이즈 컨트롤이 불가능하였음.</li> </ul>
(3) phyllodulcin 용해 조건	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 1mL의 포도씨유에 phyllodulcin 0.4g이 용해된다는 가정하에 포도씨유 0.4mL에 phyllodulcin 0.08g을 용해시켰으나 필로둘신의 알갱이가 계속 남아있어서, 양을 추가하여 포도씨유 2mL에 0.08g을 용해시켰지만 완전히 용해되지 않았음. 또한 phyllodulcin을 용해시킨 포도씨유의 색이 노랗게 변함.</li> <li>• Phyllodulcin 0.4g에 알코올 1mL을 넣으니 phyllodulcin이 알코올을 흡수해서 딱딱하게 굳음.</li> <li>• 계란 노른자에 바로 용해시킨 경우에는 계란 노른자 25g을 크림화한 유지와 합쳐 반죽하기 전에 계량한 노른자에 필로둘신을 3분동안 용해함.</li> <li>• Phyllodulcin을 포도씨유에 용해시킨 뒤에 버터를 계량하여 크림화한 oil phyllodulcin cookie와 계란 노른자에 용해시킨 phyllodulcin cookie의 경우 단맛이나 조직감의 차이는 거의 존재하지 않았음.</li> <li>• 예비 기호도 결과로는 포도씨유에 용해시킨 쿠키보다 노른자에 용해시킨 쿠키가 선호도가 높았음.</li> </ul>

: (1)설탕의 부피감소를 보완하기 위한 증량제로는 maltodextrin을, (2)유지는 버터를 사용하기로 결정하였으며, (3)phyllodulcin을 포함한 intense sweetener는 반죽 과정에서 계란 노른자에 3분 동안 용해시키는 방법으로 결정하였음.

(3) 확립 레시피

Table 1. Basic formulation for the preparation of sugar cookie

Ingredients	Weight (g)	Flour weight basis (%)	Source
Cookie flour	260	100	Soft wheat flour, Qone Co.
Butter	130	50	Unsalted butter, Seoulmilk Co.
Sugar	80	30.7	White sugar, TS Corporation
Salt	2	0.8	Pure salt, Hanju Co.
Egg yolk	50	19.2	Fertile chicken eggs, Heungsaeng poultry farming

Table 2. Dough preparation procedure for the preparation of cookie

**Mixing steps**

1. Cream butter for 1min with speed setting 3<sup>1)</sup>
2. Add salt and half of sugar, and continue creaming for 1min with speed setting 3
3. Add the rest of sugar and continue creaming for 1min with speed setting 3
4. Add the dough to egg yolk
5. Continue creaming for 1min with speed setting 3
6. Continue creaming for 2mins with speed setting 4
7. Add sifted flour
8. Mix with silicone spatula for 10mins

<sup>1)</sup>Food Mixer (HB-125, SANSHUI HOP SHING METAL & PLASTIC MANUFACTORY LTD., Japan)

- 설탕 쿠키를 제조하는 배합비는 Table 1과 같으며, 설탕 쿠키 반죽 혼합 과정은 Table 2와 같음.
- Intense sweetener로 설탕을 대체하는 경우에는 대체되는 설탕량과 동량의 maltodextrin(ES food, Korea)을 버터의 크림링 과정(과정 2와 3)에서 첨가하였으며, intense sweetener는 과정 4에서 계란 노른자에 반죽을 혼합하기 전에 계란 노른자에 3분 동안 용해시켜 첨가하였음(Table 2).
- Bulk sweetener로 대체하는 경우에는 별도로 maltodextrin을 첨가하지 않았으며, 노른자 용해 과정을 거치지 않고, 크림링 과정(과정 2와 3)에서 설탕과 마찬가지로 반씩 나누어 첨가하였음(Table 2).

- 혼합과정을 끝낸 쿠키 반죽은 4등분 하여 랩으로 감싼 뒤 냉장( $2\pm 1.5^{\circ}\text{C}$ ) 보관하여 2시간 동안 휴지시켰음.
- 휴지가 끝난 쿠키 반죽은 두께가 균일하도록 나무로 만든 guide bar 사이에 놓고 밀대로 밀어 두께 0.6cm로 성형하였음. 이후 직경 2cm의 원형 쿠키 성형틀로 찍어내어 유산지를 깬 쿠키 팬 (사이즈)위에 배열하였음.
- 준비된 쿠키 반죽은 천장온도  $170^{\circ}\text{C}$ , 바닥온도  $150^{\circ}\text{C}$ 로 예열된 전기 오븐(FDO-7102, 대영공업사)에 넣어 15분 동안 굽고, 구운 쿠키는 실온에서 30분 간 식힌 후 폴리비닐 백에 실리카겔과 함께 넣어서 냉동( $-16\pm 2^{\circ}\text{C}$ ) 보관함.
- 위의 배합량과 제조 방법으로 약 220개의 쿠키 시료를 제조할 수 있으며, 냉동 보관한 쿠키 시료는 예비 실험을 통해 최대 1개월까지 품질에 차이가 없음을 확인하였음.

## 6. Phylloolulcin과 Xylobiose의 쿠키 시스템에서 상대당도 및 감미질 분석

### 가. 상대당도 분석

본 실험에서는 2-alternative forced choice method(2-AFC)를 이용하여 15.33% 설탕 쿠키와 동일한 상대당도를 확립하였음

#### (1) 실험 방법

##### (가) 시료

- 총 5종류의 감미료를 평가하였음(Table 3).
- 대조군인 15.33% 설탕 쿠키 외에, phylloolulcin을 포함하여 4종류의 감미료를 단일 적용 혹은 혼합하여 설탕을 대체한 4종류의 쿠키 시료를 평가하였음.
- 예비 실험 결과 phylloolulcin은 농도가 증가할수록 특유의 쓴맛이 강하게 나타나 감미를 억제시켜 회귀선 작성이 불가능하였음. 따라서 설탕 대체 비율을 100%에서 50%로 낮추어 제조하였음.
- Phylloolulcin을 설탕과 혼합할 경우 고감미료에서 기대되는 칼로리 저감화 효과가 낮아 지므로, 저열량 감미료의 한 종류인 xylitol과 혼합한 쿠키를 제조하였음. Xylitol의 칼로리는 설탕의 60%정도로 알려져 있으며, 수용액 system을 사용한 이전 실험 및 관련 문헌 조사에서 설탕과 동일한 감미도를 가지는 것으로 나타남. 시료의 설탕 대체 비율을 phylloolulcin 50%, xylitol 50%로 조정하여 혼합하여 제조하였음.
- 후미에 쓴맛을 강하게 가지는 Rebaudioside-A 시료 역시 고농도에 따른 쓴맛 증가 때문에 설탕과 혼합하여 전체 설탕의 50%를 대체하는 쿠키 시료를 제조하였음.
- Sucralose 쿠키, phylloolulcin(50%)+설탕(50%) 쿠키, phylloolulcin(50%)+xylitol(50%) 쿠키, rebaudioside-A(50%)+설탕(50%) 쿠키는 예비 실험을 거쳐 농도를 5수준으로 제조하여 각 시료마다 15.3%의 설탕 쿠키와 비교하였음(Table 4).
- 총 20쌍의 시료를 평가하였음.

Table 3. Sweetener information.

Sample	Product name	Manufacturer	Purity (%)
Sucrose	White sugar	TS Corporation	100.00
Rebaudiosde A	Rebaudioside-A98	Ingredion	98.80
Xylitol	Xylitol	ROQUETTE	100.00
Phyllodulcin	Phyllodulcin	Sejong University	99.18
Sucralose	sucralose PWD	Tate & Lyle	95.00

Table 4. Concentration of cookie samples used in 2-AFC test.

Sample	Concentration (%)
Sucralose	0.0161, 0.0191, 0.0236, 0.0306, 0.0438
Phyllodulcin + Sucrose (PHS50)	0.0045, 0.0085, 0.017, 0.034, 0.051
Phyllodulcin + Xylitol (PHX50)	0.0043, 0.0085, 0.017, 0.034, 0.051
Rebaudioside-A + Sucrose (RBAS50)	0.0038, 0.0077, 0.0153, 0.1530, 0.3056

(나) 시료의 준비 및 제시

- 쿠키 시료는 실험을 통해 확립한 레시피에 따라 각 감미료의 농도를 5수준으로 제조하였음.
- 시료는 평가가 있기 일주일 전 제조하였으며 각 평가 시 필요한 시료의 개수만큼 소분하여서 냉동(-16±2°C) 보관하였음(냉동 저장기간 동안 쿠키 시료의 관능적 특성 및 품질에 변화가 없는 것을 확인하였으며, 해동 횟수에 따른 품질의 저하를 막기 위하여 소분함).
- 평가 한 회 분량의 시료를 검사가 있기 최소 2시간 전에 실온(22±2°C)에서 해동하였음.
- 평가 1시간 전에 검정색 일회용 용기에 2개씩 소분하여 실온에서 제시하였음.
- 패널들이 입을 헹굴 수 있는 실온(22±2°C)의 입가심 물을 제공하였음.
- 패널들이 평가 시에 입 안에 남는 쿠키 잔여물을 제거할 수 있도록 입가심 시료로 오이를 제공하였음. 오이의 온도 차이가 시료 평가에 미치는 영향을 최소화하기 위하여 평가가 있기 최소 2시간 전에 실온(22±2°C)에서 세척 후 방냉하였으며, 평가 1시간 전에 한 입에 먹을 수 있는 크기로 잘라 10개씩 소분하여 실온에서 제시하였음.
- 시료는 난수표에서 추출한 세 자리 숫자로 표기하였음.
- 쿠키 시료의 색상 차이가 시료 평가에 미치는 영향을 최소화하기 위하여 시료 용기는 검정색 일회용 용기를 사용하였음.

(다) 검사요원

- 국민대학교 각 건물 및 인근 기숙사, 식당 게시판 공고문 및 SNS 모집문을 통하여 자발적인 지원자 32명을 선발하였음 (20대 32명, 남 14명, 여 18명).

(라) 평가 절차

- 감미료 쿠키 시료는 하루에 2종류의 시료를 평가하였으며, 총 4 종류의 시료를 2일에 걸쳐 평가하였음. 감미료 종류 당 5개의 농도를 평가하여, 1 종류의 시료 당 총 5개의 session이 진행되었음.
- Session 별 제공되는 농도의 제시 순서는 William Latin square design에 의해 결정되었음.
- 한 session 내에서는 15.33% 설탕 쿠키 시료와 감미료 쿠키 시료 한 쌍이 평가되었음.
- 시료는 한 쌍씩 순차적으로 제시되었으며, 한 쌍(15.33% 설탕 쿠키 시료와 감미료 쿠키 시료) 내에서의 시료 평가 순서는 counter-balanced, randomized 되었음.
- 평가 방법 - 쿠키 시료 전체가 입안 전체에 잘 풀리도록 20회 이상 씹으며 맛을 느낀 뒤, 제시된 타구 컵에 빨은 후에도 느껴지는 단맛까지 총체적으로 평가하여 단맛이 더 강한 시료를 선택함.
- 한 쌍의 시료를 평가한 후 다음 시료 쌍의 평가 전에 2분간의 휴식과 함께 제시된 입가심용 오이와 입가심 물로 입을 충분히 헹구도록 하였음.
- 1 종류의 5session의 시료에 대한 평가가 끝나면 5분 동안의 전체 휴식 시간을 가진 뒤에, 다른 1 종류의 5 session의 감미료 시료에 대한 평가를 진행하였음.
- 검사는 국민대학교 감각과학 연구실 내 관능검사 booth에서 개별적으로 실시하였음.
- 쿠키 시료의 색에 따른 오류를 최소화하기 위하여 적색 조명 아래에서 검사를 실시하였음.

(마) 결과 분석

- 감미료 시료를 15.33% 설탕 쿠키보다 더 달다고 평가한 응답수를 세어 concentration-response (C-R) curve를 이용하여 회귀식을 구하였음.
- C-R curve의 회귀식 ( $\% \text{ response} = a \times \text{concentration}(\%) + b$ ) 을 구하여 응답률이 50%일 때의 감미료 농도를 계산하였음.
- 상대 당도 = 설탕 쿠키 농도 (15.33%) / 응답률 50%일 때의 감미료 쿠키 농도

(2) 실험결과

- 각 감미료 시료의 C-R curve (Fig. 1) 에서 구해진 회귀식,  $R^2$ , 상대당도는 Table 5과 같음.
- 각 시료의 회귀식에 대한  $R^2$ 값은 0.74-0.95로, sucralose와 PHS50 시료는  $R^2$ 값이 각 0.94, 0.95로 선형 회귀선이 결과값에 잘 적합됨(1에 근접한 값일수록 회귀식이 데이터를 잘 설명한다고 평가함).
- 본 실험에서 sucralose는 설탕의 농도 15.33%를 기준으로 하였을 때 동일량 설탕 대비 507.61배의 단맛을 가지는 것으로 나타났으며, 수용액 시스템에서의 상대당도인 561.8에 비해 약간 낮게 평가되었음.
- Phyllodulcin과 rebaudioside-A 농도가 높아짐에 따라 특유의 쓴맛이 함께 증가하여, 설탕을 100% 대체하여 단맛을 평가하기에 어려움이 있었음. 설탕의 대체율을 50%로 낮추어 평가를 진행하였기 때문에, phyllodulcin과 rebaudioside-A는 설탕 농도 7.66% 대비 상대당도를 도출하였음.
- Phyllodulcin을 설탕과 혼합하여 전체 설탕 양의 50%를 대체한 PHS50의 경우, phyllodulcin은 동일량 설탕 대비 333.33배의 단맛을 나타내었음.
- Phyllodulcin을 xylitol과 혼합하여 설탕의 50%를 대체한 PHX50의 경우 회귀식을 구하였을 때 동일량 설탕 대비 183.32배의 단맛을 가지는 것으로 계산되었다. 그러나 쿠키 시료의 최고 농도에서의 단맛이 설탕 쿠키와 유의적인 차이를 나타내지 않았으므로, 도출된 상대 당도를 사용하는 것은 보류하였음.
- xylitol이 수용액 시스템에서는 설탕과 유사한 당도를 나타내었지만, 식품 시스템에서는 xylitol의 흡습 성질에 의하여 무른 조직감이 단맛에 영향을 미쳤을 것이라 예상됨.
- Rebaudioside-A를 설탕과 혼합하여 전체 설탕 양의 50%를 대체한 RABS50의 경우 선형 회귀식의  $R^2$ 값은 0.75로 낮게 나타났기 때문에 로그 회귀식을 적용하여 상대당도 값을 규명하였음. 50%로 대체율을 낮추었음에도 불구하고 높은 농도에서 여전히 쓴맛의 단맛 억제 효과가 나타난 것으로 보임. rebaudioside-A는 동일량 설탕 대비 119.26배의 단맛을 나타내었음.
- 감미료 시료의 쿠키 시스템에서의 상대당도는 수용액 시스템에서의 상대당도보다 낮게 나타났음. 이는 감미료를 식품에 적용하였을 시 다른 식재료 및 식품의 향미에 영향을 받아 감미료 자체의 상대당도가 감소하는 것으로 판단됨.
- 향후 추가적인 처리공정을 도입하여 phyllodulcin의 쓴맛이 저감된다면 설탕을 100% 대체한 phyllodulcin의 상대당도에 대하여 더 정확한 결과를 도출할 수 있을 것이라 사료됨.

Table 5. Relative sweetness of 4 sweetener cookies calculated from the C-R curves

Sample	Regression equation	R <sup>2</sup>	Relative sweetness obtained by 2-AFC (comparing to 15.3% sucrose)	Relative sweetness in solution system
Sucralose	$y=20.941x-0.1329$	0.9382	507.61	561.8
PHS50	$y=11.837x+0.228$	0.9549	333.33 <sup>1)</sup>	NA <sup>2)</sup>
PHX50	$y=10.594x+0.0568$	0.7941	183.32 <sup>3)</sup>	NA
RBAS50	$y=0.1486\ln x+1.0694$	0.9466	119.26 <sup>1)</sup>	NA

<sup>1)</sup>In HS50 and RBAS50, 50% of sugar was substituted with alternative sweeteners, thus relative sweetness value indicates sweetness intensity relative to 20g of sugar.

<sup>2)</sup>Not available.

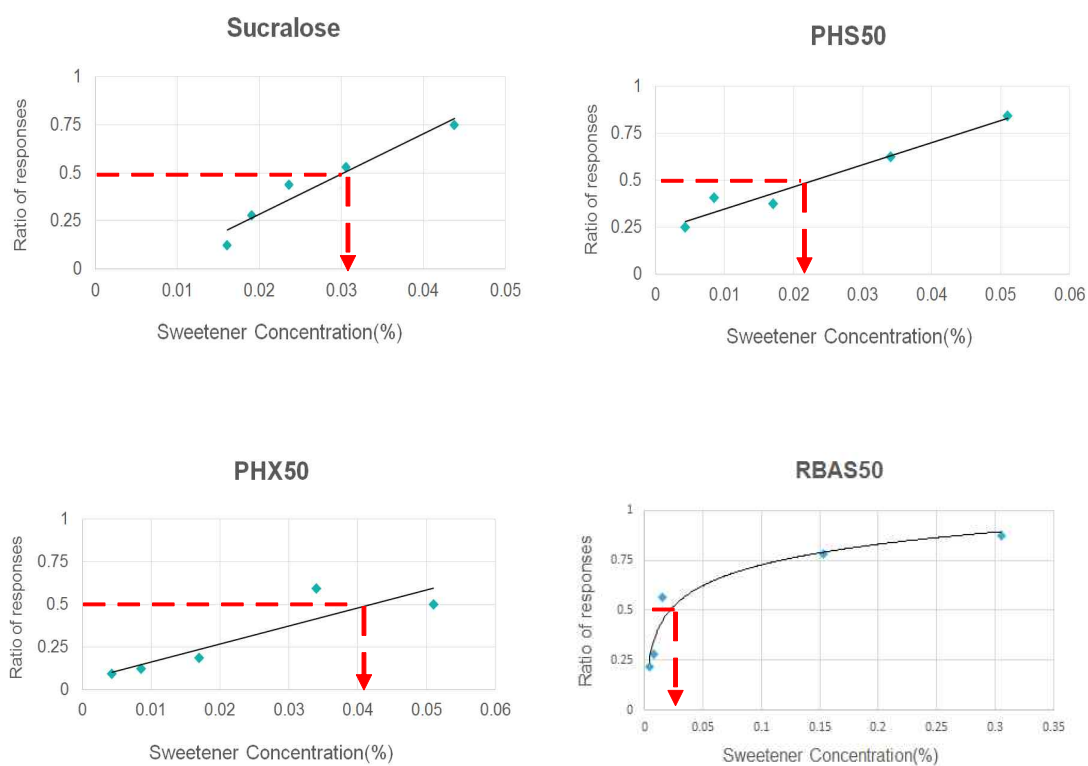


Figure 1. C-R curves of 4 sweetener cookies

나. 감미질 분석

본 실험에서는 정량적 묘사분석 (Quantitative Descriptive Analysis; QDA) 을 이용하여 감미 특성을 규명하였음.

(1) 실험방법

(가) 시료

- 2-AFC 검사를 통해 확립된 15.3% 설탕 쿠키와 동일한 감미도를 갖는 농도를 이용하였음 (Table 6).
- Xylobiose(XB)는 1일 섭취 허용 기준량이 0.7 - 7.5g으로 알려져 있으므로, XB의 생리활성 효과를 나타내면서 설탕 감미도의 90% 이상을 나타낼 수 있도록 XB를 설탕에 7 : 93 의 비율로 혼합하여 자일로바이오설탕(xylobiosugar) 쿠키를 제조하였음.
- Phyllodulcin과 rebaudioside-A는 후미에서 나타나는 특유의 쓴맛 때문에 2-AFC 검사에서 각 감미료로 설탕을 100% 대체한 쿠키의 상대당도를 구하지 못하였음. 따라서 50% 설탕 대체 쿠키에서 구한 7.66% 상대당도를 나타내는 감미료 농도의 2배를 넣어 설탕을 100% 대체한 감미료 쿠키를 제조하였음. 설탕 50% 대체 쿠키에서 phyllodulcin은 0.0230%, rebaudioside-A는 0.0217%의 농도가 7.66%의 설탕 쿠키와 동일한 감미도를 갖는다고 나타났으며, 이에 따라 15.33%의 설탕을 phyllodulcin으로 100% 대체한 쿠키는 0.0460%, rebaudioside-A로 100% 대체한 쿠키는 0.0434%의 농도로 조정하여 쿠키 시료를 제조하였음.
- Phyllodulcin과 xylitol을 혼합하여 설탕을 대체한 쿠키는 2-AFC에서 유의적인 상대당도 값을 구하지 못하였음. 따라서 phyllodulcin과 설탕을 혼합하여 설탕을 대체한 쿠키에서 phyllodulcin이 7.66%의 설탕과 동일한 감미도를 갖는 감미료 농도인 0.0230%과 동일한 농도로 재조정하여 쿠키 시료를 제조하였음. Xylitol은 설탕의 50% 농도인 7.66%를 포함하도록 하였음.

Table 6. Concentration of cookie samples used in 2-AFC

Sample	Concentration
Sucrose	15.3 %
Sucralose	0.0302 %
XBS <sup>1)</sup>	XB 1.0728 % + Sucrose 14.25 %
Phyllodulcin 100 <sup>2)</sup>	Phyllodulcin 0.0460 %
PHS50	Phyllodulcin 0.0230 % + Sucrose 7.66%
PHX50 <sup>3)</sup>	Phyllodulcin 0.0230 % + Xylitol 7.66%
Rebaudioside-A 100 <sup>2)</sup>	0.0434 %
RBAS50	Rebaudioside-A 0.0217 % + Sucrose 7.66%

<sup>1)</sup>XB was mixed with sucrose at the ratio of 7 : 93 to meet allowance of daily intake (0.7-7.5g/day).

<sup>2)</sup>Concentration of phyllodulcin and rebaudioside-A substitute 100% of sucrose was adjusted by concentration from sweetener substitute 50% of sucrose.

<sup>3)</sup>Concentration of phyllodulcin of PHX50 was adjusted concentration of PHS50.



(나) 시료의 준비 및 제시

- 쿠키 시료는 2-AFC 검사에서 이용한 제조방법과 동일하게 제조되었음.
- 평가 2시간 전에 실온 (22±2℃) 에서 방냉한 뒤, 평가 30분 전에 검정색 일회용 용기에 6개씩 소분하여 제시하였음.
- 하나의 시료를 평가한 후 다음 시료를 평가하는 monadic sequence 방법을 사용하였음.
- 외관 시료는 지름 10cm의 하얀색 일회용 접시에 담아 평가하였으며, 시료의 색에 따른 오류를 방지하기 위해 향미 평가용 시료와 다른 세 자리 숫자로 표기하였음.
- 입가심 시료로는 냉장 보관 후 실온에서 2시간 이상 방냉한 오이를 한 입 크기로 잘라 제공하였으며, 실온의 입가심 물을 제공하였음.

(다) 검사요원

① 패널 선발

- 국민대학교 각 건물 및 인근 기숙사 및 식당의 게시판에 참가자 모집문을 공지하여 자발적인 참여 지원자를 대상으로 패널 선발 검사를 실시하였음.
- 패널 선발 검사는 기본 맛 검사, 향 묘사 검사, 단맛 농도를 다르게 한 쿠키의 단맛 강도 순위 검사, 특성 표현 능력으로 구성되었음.
- 선발 검사 성적 및 묘사분석 기간 동안 지속적으로 참여할 수 있는지를 고려하여 검사요원 10명을 선발하였음. (20대, 남자 3명, 여자 7명)

② 패널 훈련

- 패널 훈련은 주 3-4회, 2개월간 진행되었으며, 회당 1hr 소요되었음.
- 용어 및 표준 시료 개발 (17hr)
  - 오리엔테이션 (1hr) : 검사 목적, 관능검사 및 묘사분석의 소개.
  - 특성 용어 도출 (5hr) : 시료간의 차이를 잘 설명하는 특성을 개별적으로 도출한 후 패널들 간의 토의를 거쳐 용어 목록을 개발하였음 (Table 7).
  - 정의 및 표준시료 확립 (11hr) : 특성 용어에 대한 정의(Table 7) 및 표준시료(Table 8), 평가방법(Table 9)을 확립하였으며, 초기에는 15 cm 선척도 (1.25 cm : 매우 약하다, 13.75cm : 매우 강하다)를 사용하여 훈련을 진행하였으나, 중간에 패널들과 의견을 조율하여 16점 항목척도(0점 : 없다, 1점 : 약하다 - 15점 : 매우 강하다)를 사용하는 검사 방법으로 바꿔 훈련을 진행하였음.
- 패널들의 수행 능력 평가 (4hr)
  - 확립된 평가 방법에 의하여 4회 모의 평가 후 통계분석을 통해 패널들 간의 consensus 와 각 검사 요원의 재현성을 확인하였음.
  - 재현성이 낮거나 평가 경향이 다른 패널 요원들은 재훈련을 실시하였음.
- 본 실험 (4hr)
  - 본 실험은 4회 진행하였음.

### ③ 평가 절차

- 시료는 William Latin square design에 따라 제시되었음.
- 시료사이에 함께 제시된 입가심 오이로 입안을 정리하고, 입가심 물로 입을 충분히 헹구도록 하였음. 4개의 시료에 대한 평가가 끝나면 5분 휴식 후 다음 4개의 시료를 평가하도록 하였음.
- 시료의 색에 따른 오류를 최소화하기 위하여 향, 향미, 맛, 삼차감각, 조직감의 경우 적색 조명 아래에서 검은색 용기에 담아 검사를 실시하였으며, 외관은 자연광 조명 (North sky day light, CIE-F7, 6500K, Multi Light Booth, Super Light VI; Bowoo engineering Co., Ltd., Gunpo, Korea) 에서 흰색 용기에 담아 평가를 별도로 진행하였음.
- 검사는 국민대학교 감각과학 연구실 내 관능검사실 booth에서 개별적으로 실시하였음.
- 시료사이에 함께 제시된 입가심 오이로 입안을 정리하고, 입가심 물로 입을 충분히 헹구도록 하였음. 4개의 시료에 대한 평가가 끝나면 5분 휴식 후 다음 4개의 시료를 평가하도록 하였음.
- 시료의 색에 따른 오류를 최소화하기 위하여 향, 향미, 맛, 삼차감각, 조직감의 경우 적색 조명 아래에서 검은색 용기에 담아 검사를 실시하였으며, 외관은 자연광 조명 (North sky day light, CIE-F7, 6500K, Multi Light Booth, Super Light VI; Bowoo engineering Co., Ltd., Gunpo, Korea) 에서 흰색 용기에 담아 평가를 별도로 진행하였음.
- 검사는 국민대학교 감각과학 연구실 내 관능검사실 booth에서 개별적으로 실시하였음.

Table 7. Definitions of descriptive attributes of sweetener cookie samples

Attributes		Definition
Appearance	Brown color	Intensity of brown color
	Spot	The overall amount of small and large spots appeared on the surface
Odor	Roasted bean	The smell associated with roasted bean flour
Taste	Sweetness	Fundamental taste sensation of which sucrose is typical
	Saltiness	Fundamental taste sensation of which salt is typical
	Umami	Fundamental taste sensation of which monosodium glutamate is typical
Flavor	Roasted bean	Aromatics associated with roasted bean flour
Aftertaste	Sweetness	Fundamental taste sensation of which sucrose is typical after swallowing
	Umami	Fundamental taste sensation of which monosodium glutamate is typical after swallowing
	Roasted bean	Aromatics associated with roasted bean flour after swallowing
	Acridness	The feeling of sting the tip of tongue after swallowing
	Bitterness	Fundamental taste sensation of which caffeine and quinine is typical after swallowing
Texture	Hardness	Force required to bite through using molars at the first 1-2 biting
	Fracturability	The force with which the sample breaks when chewing 3-4 times between molars
	Hardness of fragment	Hardness of cookie fragments perceived after chewing 5-6 times
	Heterogeneity of particle size	Heterogeneity of particles of cookie samples perceived in the mouth after chewing 10-20 times

Table 8. Reference materials for the descriptive attributes of sweetener cookie samples

Attributes		Reference materials	Scale value (0 to 15)
Appearance	Brown	NCSS2040-Y30R (NCS color index, Scandinavian Colour Institute AB, Stockholm, Sweden)	10
Taste	Sweetness	3% sucrose solution (Foodream refined hite sugar, TS Co., Korea)	7.5
	Saltiness	0.2% salt solution (Pure salt, Hanju Co., Korea)	8.5
	Umami	0.03% monosodium solution (Monosodium glutamate, Daesang Co., Korea)	N/A <sup>1)</sup>
Texture	Hardness	Butterwaffles cookie (Crown Co., Korea)	8
	Fracturability	Rusk (Honey Rusk, Samlip Co., Korea)	3.5
	Hardness of fragment	Whole grain wheat cookie (Diget, Orion Co., Korea)	5
	Heterogeneity of particle size	1 part of perilla seeds powder (Tureban Co., Korea) in 2 part of water (g/g)	6

<sup>1)</sup> N/A means that reference standard of a sensory attribute does not have a specific scale value because the reference sample was only used for assessors' concept alignment.

Table 9. Tasting method for the persistence and onset of sweetness

Attributes	Tasting method
Sweetness	To evaluate sweetness of samples after chewing 10 times
Saltiness	To evaluate maximum saltiness while chewing samples 20 times
Hardness	To evaluate force required to bite through using molars when biting 1-2 times
Fracturability	To evaluate the force with which the sample breaks when chewing 3-4 times between molars
Hardness of fragment	To evaluate hardness of cookie fragments perceived after chewing 5-6 times
Heterogeneity of particle size	to evaluate Heterogeneity of particles of cookie samples perceived in the mouth after chewing 10-20 times

#### ④ 결과 분석

##### ㉠ 분산 분석 (ANOVA)

- 분산분석 모형에는 sample, panel, repetition과 이들의 2차 상호작용이 포함되었음.
- 시료를 고정변인, 패널을 랜덤변인으로 하는 혼합 모형을 적용하였음.
- 사후분석은 Tukey's Honestly Significant Difference test( $p < 0.05$ )를 실시하였음.
- SPSS (ver 18.0, SPSS inc., Chicago, IL, USA)를 이용하여 분석하였음.

㉞ 주성분 분석 (PCA)

- 각 특성별 데이터는 패널에 따라 center되었으며, rotation은 선택되지 않았음.
- SensoMineR (ver 3.1.1, Husson and Lê) 을 이용하여 분석하였음.

(2) 실험결과

- 각 감미료에서 도출된 감미 특성과 시료간의 관계를 주성분 분석한 결과 Fig 2와 같은 결과를 도출하였음.
- 2-AFC 검사를 통해 설탕 15.33%와 동일한 감미도를 갖는 농도로 쿠키를 제조하여 묘사분석을 진행하였음. phyllodulcin과 rebaudioside-A로 설탕을 100% 대체하는 시료를 만들기 위해 감미료의 농도를 조절한 과정에서 각 감미료의 설탕 혼합 시료에서 구해진 상대 농도를 두 배하여 시료를 제조하였는데, 설탕 혼합 시료에 비해서 감미료 단독 대체 시료에서 단맛이 감소하는 영향이 나타나 단맛간의 유의적인 차이는 나타났음 (Table 10).

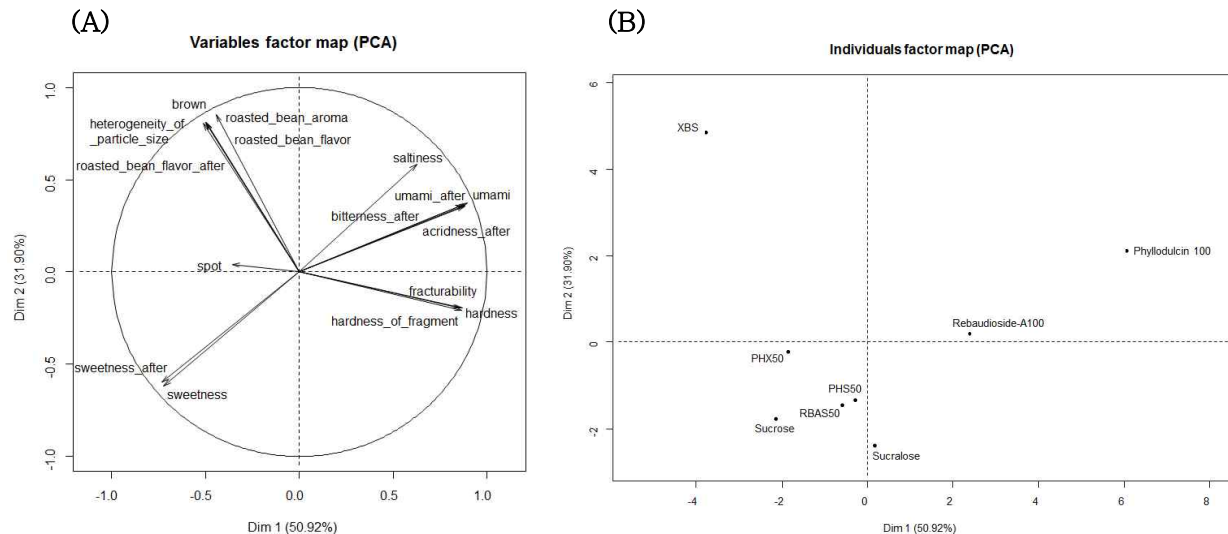


Fig. 2. Principal component loading of the sensory attributes (A) and scores of the samples (B) from 8 sweetener cookies on dim 1 and dim 2.

- Fig. 2에서 dim 1과 dim 2는 각각 전체 변동의 50.92%, 31.90%를 설명함.
- 단맛 및 단맛 후미는 dim 1의 음의 방향에, 우마미, 우마미 후미, 아린 느낌 후미, 쓴맛 후미, 경도, 파쇄성, 조각의 경도 등은 양에 방향에 높게 부하되었으며, 이런 차이들에 의해 phyllodulcin 100과 rebaudioside-A 100과 다른 시료들이 구분되는 것으로 나타남.
- Dim 2는 양의 방향에 높게 부하된 황토색, 볶은 콩가루 향과 향미, 입자의 불균일성등에 의한 차이를 주로 설명하며, 이러한 특성이 강한 XBS가 다른 시료들과 뚜렷이 구분되었음.

- 설탕을 phyllo dulcin과 rebaudioside-A로 100% 대체한 시료의 경우 설탕의 단맛에 비해 유의적으로 덜 달게 평가되었음(Table 10). 설탕을 100% 대체한 시료에 들어가는 감미료의 양이 설탕을 50% 대체하여 평가한 감미료에서 구한 상대당도에 맞춘 감미료 양을 2배로 하여 넣었기 때문에, 단독으로 사용했을 경우에 유의적으로 덜 달게 평가되었으므로 판단됨. 반면 설탕의 대체율을 50%로 하여 설탕과 혼합하여 대체한 PHS50의 경우 단맛에서 설탕과 유의적인 차이를 보이지 않았음(Table 10). Rebaudioside-A를 설탕과 혼합한 시료는 유의적인 차이는 보였지만 큰 차이는 나타나지 않았음. 즉 설탕의 50%를 대체할 경우 단맛의 강도를 설탕과 거의 유사하게 유지시킬 수 있음.
- Phyllo dulcin으로 100% 대체하였을 때 후미에서 강하게 나타나는 아린 느낌, 우마미, 쓴맛과 같은 특성들이 PHS50에서는 거의 나타나지 않고 설탕과 유의적인 차이를 보이지 않았으며(Table 10), Fig 2 (B)에서 PHS50은 설탕과 매우 밀접하게 위치한 것을 확인할 수 있음. 이는 phyllo dulcin을 설탕과 혼합하여 대체할 경우 쓴맛, 아린 느낌 등 부정적 특성이 masking 되어 쿠키의 설탕 함량은 낮추면서 관능적 품질은 매우 유사하게 구현할 수 있을 것으로 판단됨.

Table 9. Mean intensities of descriptive sensory attributes elicited by 8 sweetener cookies

	Sucrose	Sucralose	XBS	Phyllodulcin 100	PHS50	PHX50	Rebaudio- side A100	RBAS50
Brown	2.95 <sup>a1)</sup> (1.39) <sup>2)</sup>	1.2 <sup>b</sup> (0.69)	12.24 <sup>c</sup> (0.97)	4.4 <sup>d</sup> (1.67)	3.54 <sup>e</sup> (1.54)	7.53 <sup>f</sup> (1.62)	4.34 <sup>d</sup> (1.46)	4 <sup>de</sup> (1.50)
Spot	1.23 <sup>a</sup> (1.21)	0.45 <sup>b</sup> (0.60)	2.84 <sup>c</sup> (2.07)	1.51 <sup>a</sup> (1.39)	3.49 <sup>d</sup> (1.95)	9.38 <sup>e</sup> (1.56)	1.11 <sup>a</sup> (1.20)	3.58 <sup>d</sup> (1.81)
Roasted bean aroma	0 <sup>a</sup> (0)	0 <sup>a</sup> (0)	9.1 <sup>b</sup> (1.00)	0 <sup>a</sup> (0)	0 <sup>a</sup> (0)	0 <sup>a</sup> (0)	0 <sup>a</sup> (0)	0 <sup>a</sup> (0)
Sweetness	9.06 <sup>a</sup> (1.77)	8.96 <sup>ab</sup> (1.97)	5.66 <sup>c</sup> (1.41)	0.58 <sup>d</sup> (0.98)	8.06 <sup>ab</sup> (1.75)	6.11 <sup>c</sup> (2.43)	3.14 <sup>e</sup> (2.02)	7.9 <sup>b</sup> (1.74)
Saltiness	5 <sup>a</sup> (3.39)	5.73 <sup>ab</sup> (3.22)	7.18 <sup>b</sup> (2.63)	8.29 <sup>d</sup> (3.68)	7 <sup>bc</sup> (2.83)	6.64 <sup>bc</sup> (3.33)	8.25 <sup>cd</sup> (2.71)	6.49 <sup>ab</sup> (3.46)
Umami	0 <sup>a</sup> (0)	0.1 <sup>a</sup> (0.30)	0.2 <sup>a</sup> (0.60)	7.45 <sup>b</sup> (2.39)	0.23 <sup>a</sup> (0.62)	0 <sup>a</sup> (0)	2.2 <sup>ac</sup> (1.73)	0.1 <sup>a</sup> (0.38)
Roasted bean flavor	0.75 <sup>a</sup> (0.35)	0 <sup>b</sup> (0)	9.23 <sup>c</sup> (0.10)	0 <sup>b</sup> (0)	0 <sup>b</sup> (0)	0 <sup>b</sup> (0)	0 <sup>b</sup> (0)	0 <sup>b</sup> (0)
Sweetness aftertaste	7.85 <sup>a</sup> (2.67)	7.71 <sup>a</sup> (2.65)	5.09 <sup>b</sup> (1.94)	0.43 <sup>c</sup> (0.98)	7 <sup>a</sup> (2.40)	5.18 <sup>b</sup> (2.52)	2.48 <sup>d</sup> (2.06)	7.15 <sup>a</sup> (2.30)
Roasted bean flavor aftertaste	0.25 <sup>a</sup> (0.16)	0 <sup>b</sup> (0)	8.45 <sup>c</sup> (1.81)	0 <sup>b</sup> (0)	0 <sup>b</sup> (0)	0 <sup>b</sup> (0)	0 <sup>b</sup> (0)	0 <sup>b</sup> (0)
Umami aftertaste	0 <sup>a</sup> (0)	0.08 <sup>a</sup> (0.27)	0.1 <sup>a</sup> (0.30)	6.38 <sup>b</sup> (2.76)	0.23 <sup>a</sup> (0.62)	0 <sup>a</sup> (0)	1.45 <sup>c</sup> (1.58)	0.08 <sup>a</sup> (0.35)
Bitterness aftertaste	0 <sup>a</sup> (0)	0.03 <sup>a</sup> (0.16)	0.1 <sup>a</sup> (0.30)	5.56 <sup>b</sup> (3.60)	0.28 <sup>a</sup> (0.64)	0.03 <sup>a</sup> (0.16)	1.11 <sup>c</sup> (1.65)	0.03 <sup>a</sup> (0.16)
Acridness aftertaste	0 <sup>a</sup> (0)	0.03 <sup>a</sup> (0.16)	0 <sup>a</sup> (0)	7.48 <sup>b</sup> (1.78)	0.18 <sup>a</sup> (0.55)	0 <sup>a</sup> (0)	1.65 <sup>c</sup> (1.97)	0.03 <sup>a</sup> (0.16)
Hardness	2.3 <sup>a</sup> (8.8)	7.06 <sup>b</sup> (1.57)	2.1 <sup>a</sup> (1.0)	7.84 <sup>c</sup> (1.57)	5.49 <sup>d</sup> (1.62)	2.44 <sup>a</sup> (1.38)	6.85 <sup>b</sup> (1.75)	5.18 <sup>d</sup> (1.68)
Fracturability	2.14 <sup>a</sup> (0.90)	6.14 <sup>bc</sup> (1.25)	1.98 <sup>a</sup> (0.82)	6.78 <sup>c</sup> (1.17)	4.61 <sup>d</sup> (1.61)	2.14 <sup>a</sup> (1.10)	6 <sup>b</sup> (1.63)	4.5 <sup>d</sup> (1.24)
Hardness of fragment	2.28 <sup>a</sup> (0.85)	6.86 <sup>b</sup> (1.28)	2.13 <sup>a</sup> (0.89)	7.51 <sup>c</sup> (0.98)	5.15 <sup>d</sup> (1.52)	2.16 <sup>a</sup> (0.99)	6.91 <sup>bc</sup> (1.22)	5.06 <sup>d</sup> (1.42)
Heterogeneity of particle size	0.13 <sup>a</sup> (0.46)	0 <sup>a</sup> (0)	5.29 <sup>b</sup> (1.36)	0 <sup>a</sup> (0)	0.03 <sup>a</sup> (0.16)	0.1 <sup>a</sup> (0.63)	0 <sup>a</sup> (0)	0 <sup>a</sup> (0)

<sup>1)</sup> Different alphabet letters indicate a significant difference among the samples (p<0.05)

<sup>2)</sup> Standard deviation

- XBS는 다른 시료에서는 전혀 나타나지 않은 볶은 콩가루 향, 볶은 콩가루 향미, 입자의 불균일성의 특성을 가지며, 외관의 색 또한 황토색이 진하게 나타남. 이는 xylobiose가 환원성 이당류 이므로 구울 때 비효소적 갈변반응(maillard reaction)이 일어났기 때문이라고 판단됨.

- 고감미 감미료를 사용하여 설탕 쿠키를 100% 대체한 시료는 경도, 과쇄성, 조각의 정도가 설탕 쿠키에 비해 유의적으로 매우 강하게 나타났으며 혼합 시료인 PHX50과 RBAS50 역시 설탕의 조직감과 유의적인 차이를 나타냄 (Table 10). 이는 조직감 보안을 위한 증량제 maltodextrin이 쿠키의 조직감에 영향을 미쳐, 설탕 쿠키보다 조직감이 딱딱해졌기 때문임. 하지만 고감미 감미료와 bulk sweetener인 xylitol을 혼합한 PHX50 시료와 xylobiose를 설탕 총량의 7%를 대체한 XBS는 설탕 쿠키와 조직감에서 유의적으로 차이를 보이지 않았음. 이는 PHX50에 함유된 xylitol의 보습성 때문에 무른 조직감을 갖게 되었으며, XBS는 xylobiose의 설탕 대체 비율 자체가 낮기 때문에 설탕의 조직감과 비슷하게 구현되었기 때문임.
- Phyllo dulcin은 후미에서 특유의 아린 느낌, 우마미, 쓴맛이 강하게 나타남. 후속 연구를 통해 이러한 특성을 저감시킨다면 더 우수한 감미질을 나타낼 수 있으리라 사료됨. 또한 본 실험에서 phyllo dulcin을 설탕과 혼합하여 사용하였을 때 설탕 쿠키와 매우 유사한 감미 특성을 보이고, xylitol과 혼합하여 사용하였을 경우 조직감을 매우 유사하게 구현하였음. Fig 2 (B)에서도 phyllo dulcin 대체 시료들이 설탕과 매우 밀접하게 위치하여 감각 특성이 매우 유사한 것으로 나타났음. 이는 설탕 대체제로서 phyllo dulcin의 활용에 긍정적인 방향성을 제시할 수 있음.

#### 다. Phyllo dulcin과 Xylobiose를 적용한 쿠키 소비자 기호도 검사

본 실험에서는 phyllo dulcin과 xylobiose를 적용한 감미료 쿠키의 소비자 기호도 검사를 실시하여 감미료 대체 시 식품에 대한 기호도의 변화와, 감미료에 대한 정보가 소비자 인식에 미치는 영향을 규명하였음.

##### (1) 실험방법

###### (가) 시료

- 묘사분석과 동일하게 8종류의 쿠키 시료를 제공하였으며, 정보 제공 시와 정보 비 제공 시 제시된 쿠키 종류는 동일하였음(Table 5).

###### (나) 시료의 준비 및 제시

- 쿠키 시료는 묘사분석 검사에서 이용한 제조방법과 동일하게 제조되었음.
- 평가 2시간 전에 실온( $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ )에서 방냉한 뒤, 평가 30분 전에 흰 색 일회용 용기에 5개씩 소분하여 제시하였음.
- 하나의 시료를 평가한 후 다음 시료를 평가하는 monadic sequence 방법을 사용하였음.
- 정보 비제공 실험인 1차에서는 3자리의 난수로 표기하여 시료를 제시하였으며, 정보를 제공하는 2차 실험에서는 시료의 이름을 표기하여 제시하였음.
- 정보 제공 시에는 쿠키와 함께 쿠키 시료에 들어간 감미료에 대한 정보카드를 함께 제공하였음(Figure 3).
- 입가심 시료로는 냉장 보관 후 실온에서 2시간 이상 방냉한 오이를 한 입 크기로 잘라 제공하였으며, 실온( $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ )의 입가심 물을 제공하였음.



<p><b>무설탕 쿠키 (필로둘신 100%)</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• 설탕이 들어가지 않은 무설탕 쿠키이며, 필로둘신으로 단맛을 보충하였습니다.</li> <li>• 필로둘신은 감차 수국의 잎에서 추출한 천연 감미료입니다.</li> <li>• 설탕 대비 350-800배의 단맛을 가집니다.</li> <li>• 고감미 감미료로 극소량 사용되기 때문에 칼로리가 거의 없습니다.</li> </ul>	<p><b>무설탕 쿠키 (수크랄로오스 100%)</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• 설탕이 들어가지 않은 무설탕 쿠키이며, 수크랄로오스로 단맛을 보충하였습니다.</li> <li>• 수크랄로오스는 설탕을 원료로 하여 제조된 합성 감미료입니다.</li> <li>• 설탕에 비해 600배의 단맛을 가지는 고감미 감미료입니다.</li> <li>• 체내에서 소화되지 않는 무칼로리 감미료입니다.</li> <li>• 대체 감미료 중 설탕과 가장 유사한 단맛을 가지고 있습니다.</li> <li>• 다른 감미료와 혼합하여 사용할 경우, 다른 감미료의 단점을 보완하고 단맛을 증가시킵니다.</li> </ul>
<p><b>설탕 함유 쿠키 (설탕)</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• 설탕은 가장 자연스러운 단맛을 내며 일상생활과 식품산업에서 가장 많이 사용되고 있습니다.</li> </ul>	<p><b>기능성 설탕 쿠키 (자일로바이오스 슈가)</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• 설탕과 가장 유사한 단맛을 내면서 자일로바이오스의 기능성을 발휘할 수 있도록 두 감미료를 적절히 배합한 제형 감미료입니다 [설탕 : 자일로바이오스 = 93 : 7].</li> <li>• 자일로바이오스는 식물성 원료에서 추출한 기능성 감미료로, 장내에서 거의 흡수되지 않는 저칼로리 감미료입니다.</li> <li>• 자일로바이오스는 비피더스균을 증식시켜 면역력을 높이며 배변활동을 도와줍니다.</li> </ul>
<p><b>설탕 저감 쿠키 (설탕 50%+필로둘신)</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• 설탕은 ½로 줄이고, 필로둘신으로 단맛을 보충하였습니다.</li> <li>• 필로둘신은 감차 수국의 잎에서 추출한 천연 감미료입니다.</li> <li>• 필로둘신은 설탕 대비 350-800배의 단맛을 가집니다.</li> <li>• 필로둘신은 고감미 감미료로 극소량 사용되기 때문에 칼로리가 거의 없습니다.</li> </ul>	<p><b>무설탕 쿠키 (자일리톨+필로둘신)</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• 설탕이 들어가지 않은 무설탕 쿠키이며, 필로둘신과 자일리톨로 단맛을 보충하였습니다.</li> <li>• 필로둘신은 감차 수국의 잎에서 추출한 천연 감미료입니다.</li> <li>• 필로둘신은 설탕 대비 350-800배의 단맛을 가집니다.</li> <li>• 필로둘신은 고감미 감미료로 극소량 사용되기 때문에 칼로리가 거의 없습니다.</li> <li>• 자일리톨은 설탕과 같은 당도의 단맛을 내지만, 칼로리는 설탕의 60% 정도입니다.</li> <li>• 자일리톨은 치아를 보호하거나 손상된 치아 표면을 복원하는 효과가 있습니다.</li> </ul>
<p><b>무설탕 쿠키 (리바우디오사이드 100%)</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• 설탕이 들어가지 않은 무설탕 쿠키이며, 리바우디오사이드로 단맛을 보충하였습니다.</li> <li>• 국화와 식물인 스테비아(stevia rebaudiana)에서 추출한 천연 감미료입니다.</li> <li>• 설탕에 비해 200-300배의 단맛을 가집니다.</li> <li>• 고감미 감미료로 극소량 사용되기 때문에 칼로리가 거의 없습니다.</li> </ul>	<p><b>설탕 저감 쿠키 (설탕 50%+리바우디오사이드)</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• 설탕은 ½로 줄이고, 리바우디오사이드로 단맛을 보충하였습니다.</li> <li>• 리바우디오사이드는 국화와 식물인 스테비아(stevia rebaudiana)에서 추출한 천연 감미료입니다.</li> <li>• 리바우디오사이드는 설탕에 비해 200-300배의 단맛을 가진다고 알려져 있습니다.</li> <li>• 리바우디오사이드는 고감미 감미료로 극소량 사용되기 때문에 칼로리가 거의 없습니다.</li> </ul>

Fig. 3. Information cards presented for informed condition test.

(다) 검사요원

- 국민대학교 감각과학 연구실의 소비자 검사 요원 pool을 대상으로 한 전화 모집과 국민대학교 각 건물 및 인근 기숙사, 식당 게시판에 참여자 모집문을 공지하여 지원자 96명을 선발하였음.
- (1점 : 전혀 그렇지 않다, 7점 : 매우 그렇다)를 사용하여 평가하였음.

- 단맛, 경도(딱딱한 정도), 수분감 특성의 강도는 7점 척도(1점 : 매우 약하다, 7점 매우 강하다)를 사용하여 평가하였으며, 세 특성의 적합도는 5점의 Just-about-right(JAR) 척도(1점 : 너무 약하다, 3점 : 적당하다, 5점 : 너무 강하다)를 사용하여 평가하였음. JAR 척도는 강도와 기호도를 합친 형태의 척도이며, 평가시 시료에서 느껴지는 특성의 강도를 7점 척도로 평가한 뒤, 패널 본인이 생각하는 주관적인 기준에 따른 적합도를 평가하도록 하였음.
- 모든 시료에 대한 평가가 끝난 후 인구통계학적인 질문(성별, 나이, 직업, 가계소득)과 당류 저감화 식품 관련 경험 및 구매의향에 대하여 질문하였음.
- (20대 50명, 남 25명, 여 25명 / 30대 46명, 남 12명, 여 34명).

#### (라) 평가 절차

- 한 패널은 실험에 2회 참여하였음. 1회차 실험에서는 정보를 제공하지 않은 상태(blind condition)로 실험을 하고, 2회차 실험에서는 시료에 대한 정보를 제공(informed condition)하여 같은 방법을 이용하여 실험을 진행하였음.
- 1차와 2차 실험은 1주일의 간격을 두고 실시되었으며, 예비 실험을 통해 1주일의 검사 간격이 주어질 경우 1차 검사에 의한 학습효과가 나타나지 않는 것을 확인하였음.
- 우선 쿠키 시료를 맛본 후에 전반적인 기호도와 쿠키 구매의사, 외관의 기호도, 향미의 기호도, 조직감의 기호도를 평가한 뒤 쿠키에서 느껴지는 특성(단맛, 경도, 수분감)의 강도와 적합도를 평가하였음. 이후 시료를 좋아하는 이유와 싫어하는 이유를 자유롭게 적도록 하였음.
- 기호도는 9점 척도(1점 : 매우 싫다, 9점 : 매우 좋다)를 사용하여 평가하였으며 구매의사는 7점 척도(1점 : 전혀 그렇지 않다, 7점 : 매우 그렇다)를 사용하여 평가하였음

#### (마) 결과 분석

##### ① 분산 분석 (ANOVA)

- 쿠키 시료 간 기호도 및 특성 강도의 차이는 paired-sample T test 또는 분산분석 (ANOVA) 및 사후 검정으로 Tukey's Honestly Significant Difference test로 검증하였음 ( $p < 0.05$ ).
- ANOVA model : liking or perceived intensity of an attribute = sample + age + information + sample \* age + sample \* information + age \* information + sample \* age \* information
- 시료를 고정변인, 패널을 랜덤변인으로 하는 혼합 모형을 적용하였음.
- 사후분석은 Tukey HSD test ( $p < 0.05$ )를 실시하였음.
- SPSS (ver 18.0, SPSS inc., Chicago, IL, USA)를 이용하여 분석하였음.

##### ② Penalty analysis

- 쿠키 시료의 단맛, 경도, 수분감에 대한 적합도 평가는 penalty analysis를 이용하여 분석하였음.

- 8개의 쿠키 시료 별로 JAR 척도와 함께 시료에 대한 기호도 점수를 적용하여, JAR(적당하다)로 표시한 패널들의 기호도 평균 점수와, JAR를 선택하지 않은 패널들(non-JAR)의 기호도 평균 점수의 차이를 나타내는 mean drop을 산출하였으며, 각 특성이 시료의 기호도에 유의적 영향을 주는지 검증하였음.
- XLSTAT 통계 소프트웨어(Trial version 2013, Addinsoft®, Paris, France)를 이용하여 분석하였음.

### ③ 소비자 군집 분석

- 쿠키 기호도에 따른 소비자 군집을 알아보기 위하여 군집 분석을 실시하였으며, 각 군집별 시료간 기호도 및 인지되는 특성의 강도, 시료별 군집 간 기호도 및 인지되는 특성의 강도의 유의적 차이를 알아보기 위하여 independent-sample T test 또는 ANOVA와 Tukey's HSD test를 실시하였음( $p < 0.05$ ).
- SPSS (ver 18.0, SPSS inc., Chicago, IL, USA)를 이용하여 분석하였음.

### ④ 기호도 유발 인자 규명

- 비정보와 정보 조건 각각에서 각 군집별 소비자 기호도를 유발하는 감각 특성을 규명하기 위하여 묘사 분석 결과와 기호도 검사 결과간의 다변량 상관관계를 주성분분석으로 규명하였음.

## (2) 실험결과

### (가) 소비자 특성

- 96명의 전체 소비자에 대한 정보는 Table 10와 같음.
- 소비자 중 남성은 38.5%, 여성 61.5%이었으며, 20대는 52.1%, 30-40대는 47.9%이었음.
- 참여한 소비자 중 학생이 52.1%로 가장 높게 나타났음.
- 연 가계 소득은 4000만원 이상인 사람은 40.6%, 1000만원 미만인 사람은 10.4%로 나타났으며, 가계 소득을 1000만원 미만으로 선택한 사람 일부는 자취 또는 기숙사에 사는 학생들로 판단됨.
- 음식 구매 시 가장 중요하게 생각하는 기준에 대해서 77.1%는 맛이라고 응답하였으며, 그 다음으로 성분, 가격이 중요한 기준으로 나타남. 기타 중요한 기준에 대해서는 2%의 소비자가 가격 대비 양의 '가성비'를 중요시 한다고 응답하였음.
- 쿠키 섭취 빈도는 한 달에 한 번 이상 먹는 사람이 55.2%로 가장 높게 나타났으며, 일주일에 한 번 이상 먹는 사람은 19.8%로 나타났음.
- 다이어트 경험에 대해서는 다이어트 경험은 있으나 현재는 하고 있지 않다는 사람이 58.3%로 가장 높게 나타났으며, 소비자의 25%는 다이어트를 경험해 보지 않았고 16.7%는 현재도 다이어트를 진행 중이라고 응답하였음.
- 당 관련 질병에 관한 질문에 대해서 소비자의 93.8%는 고혈압, 당뇨, 고지혈증에 대한 질병이 없다고 응답하였으며, 고혈압이 있다고 응답한 소비자는 4.2%로 나타남.

- 당류 저감화 식품에 대해서 소비자의 62.5%는 들어본 적이 있다고 응답하였으며, 직접 당류 저감화 식품을 구매한 경험이 있는 사람은 전체의 40.6%이었음. 구매 경험이 있는 소비자 중 당을 줄인 제품임을 인지하고 구매한 사람은 94.9%였으며, 모르고 구매한 사람은 5.1%였음. 당류 저감화 식품에 대한 정보는 상품 자체의 정보를 통해 알게 되었다고 한 사람이 56.8%였으며, 대중 매체 및 인터넷 미디어를 통하여 정보를 얻는 사람은 29.7%로 나타남.
- 당류 저감화 식품 구매 경험자 중 건강을 이유로 구매한 사람이 51.3%로 가장 많았으며, 체중 조절을 이유로 구매하는 사람은 17.9%이었음. 주변 사람의 추천이나 일반 당류 식품에 대한 거부감, 호기심 등이 또 다른 구매 동기로 나타났음.
- 향후 당류 저감화 식품에 대한 구매 의향에 대해서는 구매할 의향이 있다고 대답한 소비자는 91.7%이었으며, 이 중 구매의향이 크다고 응답한 사람은 전체의 34.4%로 나타남. 8.3%의 소비자는 ‘맛이 없기 때문에’, ‘딱히 몸에 더 좋을 것 같지 않기 때문에’ 등의 이유로 당류 저감화 식품에 대한 구매 의향이 없다고 응답하였음.
- 구매 의향이 있는 소비자들 중 당류 저감화 식품 구매 시 가장 중요시 생각하는 기준으로는 ‘맛’이 50%로 가장 많았으며, 그 다음으로는 ‘성분’, ‘기능성’으로 나타났음. 또한 구매 의향이 있다고 응답한 소비자들 중, 당류 저감화 식품 중 특정 식품인 쿠키에 대해서 구매할 의향이 있다고 응답한 소비자는 85.2%이었음.
- 현재 시판되고 있는 당류 저감화 쿠키의 가격 1000원을 기준으로, 가격이 더 비싸면 쿠키를 구매할 것인지에 대해서는 소비자의 72.9%는 비싸도 구매할 것이라고 응답하였으며, 추가적으로 지불 가능한 금액에 대해서는 53.1%가 500원 이하의 금액까지 지불할 의향이 있다고 응답하였음. 가장 높은 금액을 지불할 의향이 있다고 응답한 소비자의 제시 금액은 4000원이었음.

Table 10. Consumer demographic profile and food habits related low-sugar food (n=96)

Classification		Percent (%)
Gender	Male	38.5
	Female	61.5
Age	19-29	52.1
	30-39	27.1
	40-49	20.8
Occupation	Student	53.1
	Housewife	16.7
	Office worker	17.7
	Part-timer	5.2
	Others	7.3
Household income	Under 10 million won	10.4
	10-20 million won	8.3
	20-30 million won	13.5
	30-40 million won	27.1
	Over 40 million won	40.6
Criteria of food purchase	Flavor	77.1
	Ingredient	10.4
	Price	9.4
	Functionality	1.0
	Others	2.1
Cookie intake frequency	Every day	2.1
	More than once a week	19.8
	More than once a month - less than once a week	55.2
	More than 2-3 times a year - less than once a month	16.7
	Rarely	6.3
Previous experience in weight control	No	25.0
	Experienced	58.3
	Ongoing	16.7
Disease	Hypertension	4.2
	Diabetes	1.0
	Hyperlipidemia	1.0
	None	93.8
Previous exposures to low-sugar foods	Yes	62.5
	No	37.5

Table 10. Consumer demographic profile and food habits related low-sugar food (n=96)

Classification			Percent (%)
Yes			40.6
-----			
Purchase experience of low-sugar foods	Recognition of sugar reduction	Yes	94.9
		No	5.1
	Recognition path	Product information	56.8
		Media	29.7
		Recommendation of acquaintance	5.4
		Others	8.1
	Purchase motivation of low sugar food	Health	51.3
		Losing weight	17.9
		Resistance to general sweet food	7.7
		Recommendation of acquaintance	5.1
Others	17.9		
-----			
No			59.4
-----			
Likely to buy			36.5
-----			
Maybe			55.2
-----			
Purchase intention of low-sugar food	Criteria for purchase of low-sugar food	Flavor	50
		Ingredient	29.5
		Price	8
		Functionality	10.2
		Others	2.3
	Criteria for purchase of low-sugar cookie	Yes	85.2
	No	14.8	
-----			
Never			8.3
-----			
Yes			72.9
Purchase intention of low sugar cookie at higher price	Extra cost that can be willingly paid	under 500 won	72.9
		500-1000 won	11.4
		1000-1500 won	7.1
		1500-2000 won	7.1
		over 2000 won	1.4
-----			
No			27.1

(나) 기호도, 구매의사, 적합도

- 기호도, 구매의사, 적합도에 대한 분산분석 수행 결과는 Table 11과 같음.
- 쿠키 시료의 종류에 따라 모든 특성이 유의적( $p < 0.05$ )인 차이가 나타났음. 연령(20대/3,40대)은 외관, 향미, 조직감 기호도와 단맛, 수분감 적합도에 유의적인 영향을 미쳤으며, 정보의 제공은 쿠키 구매 의사와 단맛, 수분감 적합도에 유의적인 영향을 나타내었음. 그러나 시료와 연령, 정보의 각 상호작용은 대부분의 특성에서 관찰되지 않았음.
- 시료의 종류와 연령의 상호작용 효과는 외관 기호도에 대해서 유의적으로 나타났음. 또한 연령과 정보의 상호작용 효과는 수분감 적합도에서 유의적으로 관찰되었으며, 시료의 종류와 정보의 상호작용 효과는 관찰되지 않았음.

(다) 기호도 결과

- 쿠키 시료에 대한 정보 제공의 유무에 따른 기호도와 구매의사에 대한 결과는 Table 12과 같음.
- 쿠키에 사용된 감미료에 대한 정보를 제공하였을 때, 전반적인 기호도는 정보를 제공하지 않았을 때에 비교하여 약간이지만 상승하는 경향을 나타내었음. 하지만 고감미 인공 대체 감미료인 sucralose의 경우, 정보를 제공하였을 때 전반적인 기호도가 유의적으로 더 낮게 평가되었음.
- 쿠키에 대한 구매 의향은 감미료에 대한 정보를 제공하였을 때 모든 시료에 대하여 정보를 제공하지 않았을 때보다 구매 의향이 상승하는 경향을 보였으며, 특히 phyllodulcin만을 사용한 쿠키는 구매 의향이 유의적으로 증가하였음.
- 전체 시료 중 설탕 쿠키가 모든 기호도 항목에서 가장 선호되었으며, sucralose 쿠키, 설탕과 phyllodulcin 또는 rebaudioside-A를 혼합한 설탕+감미료 혼합 시료 역시 선호되었으며 모든 기호도 항목에서 설탕 쿠키와 유의적으로 차이가 없었음.
- 고감미 천연 대체 감미료인 phyllodulcin을 100% 대체한 쿠키 시료는 외관 기호도를 제외한 전반적인 기호도, 향미 기호도, 조직감 기호도, 구매 의향에서 설탕 쿠키 시료에 비하여 유의적으로 낮았음. 하지만 향미 기호도, 조직감 기호도, 구매 의향은 정보를 제공 받았을 때 유의적으로 상승하였음을 보아 정보의 제공이 소비자들의 쿠키에 대한 인식에 영향을 주었음을 알 수 있음.
- Phyllodulcin과 xylitol을 혼합한 쿠키(PHX50)는 PHS50보다 설탕 쿠키의 기호도나 구매 의사에 더 가까울 것이라 예상되었으나, 실제 결과는 설탕 쿠키보다 기호도, 구매 의사가 더 낮은 것으로 나타났다.
- 정보 제공시 시료간 기호도의 차이가 더 뚜렷하게 구분되는 것으로 나타남. 정보 제공이 기호도 점수의 상승/저하에 미치는 영향은 적으나, 기호도 결정 판단 기준을 제공함으로써 시료간의 차이를 더 잘 구분할 수 있도록 돕는 것으로 사료됨.
- 정보 제공의 효과는 설탕 쿠키와 유사한 수준 혹은 그 이상으로 기호도를 높이지는 않아, 정보의 영향이 제한적인 것으로 나타남.

Table 11. F-Values and P-values associated with effects of samples, information, age and two-way interactions between three factors on consumer acceptability and JAR ratings of 8 cookie samples

		Sample		Age		Information	
		F-value	P-value	F-value	P-value	F-value	P-value
Liking	Overall liking	30.007	<b>&lt;0.001<sup>1</sup></b>	0.755	0.385	3.075	0.08
	Appearance liking	11.502	<b>&lt;0.001</b>	4.665	<b>0.031</b>	0.471	0.493
	Flavor liking	23.586	<b>&lt;0.001</b>	23.853	<b>&lt;0.001</b>	1.583	0.208
	Texture liking	11.633	<b>&lt;0.001</b>	7.055	<b>0.008</b>	0.042	0.838
	Purchase intention	26.065	<b>&lt;0.001</b>	0.009	0.923	13.819	<b>&lt;0.001</b>
JAR	Sweetness	41.289	<b>&lt;0.001</b>	9.836	<b>0.002</b>	17.470	<b>&lt;0.001</b>
	Hardness	74.081	<b>&lt;0.001</b>	3.521	0.061	1.290	0.256
	Moisture	43.759	<b>&lt;0.001</b>	22.814	<b>&lt;0.001</b>	4.214	<b>0.040</b>
		Sample × Information		Sample × Age		Age × Information	
		F-value	P-value	F-value	P-value	F-value	P-value
Liking	Overall liking	0.289	0.959	1.723	0.099	2.110	0.147
	Appearance liking	0.715	0.660	4.912	<b>&lt;0.001</b>	0.000	0.983
	Flavor liking	0.592	0.763	0.839	0.555	0.038	0.846
	Texture liking	0.465	0.860	1.173	0.315	0.031	0.860
	Purchase intention	0.471	0.856	0.857	0.540	3.089	0.079
JAR	Sweetness	0.319	0.946	1.140	0.335	0.590	0.442
	Hardness	0.374	0.918	1.870	0.071	5.661	<b>0.017</b>
	Moisture	0.659	0.707	1.094	0.364	2.559	0.110

<sup>1)</sup> p-values smaller than 0.05 were highlighted in bold letters.



Table 12. Mean Score of consumer liking and purchase intention of 8 cookie samples by 96 panelist under different information condition

Sample	Overall liking <sup>1)</sup>		Appearance liking		Flavor liking		Texture liking		Purchase intention	
	Blind	Info	Blind	Info	Blind	Info	Blind	Info	Blind	Info
Sucrose	<b>5.9<sup>a2)</sup></b>	<b>6.1<sup>a</sup></b>	<b>5.7<sup>a</sup></b>	<b>5.9<sup>a</sup></b>	<b>5.9<sup>a</sup></b>	<b>6.1<sup>a</sup></b>	5.8 <sup>a</sup>	5.8 <sup>a</sup>	4.3 <sup>a</sup>	4.3 <sup>a</sup>
Sucralose	<b>5.5<sup>ab</sup></b>	<b>5.4<sup>bc</sup></b>	5.5 <sup>ab</sup>	5.7 <sup>a</sup>	5.7 <sup>a</sup>	5.5 <sup>abc</sup>	<b>5.5<sup>ab</sup></b>	<b>5.3<sup>abc</sup></b>	3.9 <sup>ab</sup>	4.1 <sup>ab</sup>
XBS	5.0 <sup>bc</sup>	5.2 <sup>cd</sup>	4.8 <sup>b</sup>	4.7 <sup>b</sup>	5.1 <sup>ab</sup>	5.4 <sup>bc</sup>	5.4 <sup>ab</sup>	5.3 <sup>abc</sup>	3.6 <sup>bc</sup>	4.1 <sup>ab</sup>
Phyllodulcin	3.8 <sup>d</sup>	4.1 <sup>e</sup>	5.3 <sup>ab</sup>	5.5 <sup>a</sup>	<b>3.9<sup>c</sup></b>	<b>4.3<sup>d</sup></b>	<b>4.5<sup>c</sup></b>	<b>4.8<sup>c</sup></b>	<b>2.5<sup>d</sup></b>	<b>3.2<sup>c</sup></b>
PHS50	5.4 <sup>ab</sup>	5.5 <sup>abc</sup>	5.5 <sup>ab</sup>	5.4 <sup>a</sup>	5.4 <sup>ab</sup>	5.5 <sup>abc</sup>	5.7 <sup>ab</sup>	5.6 <sup>ab</sup>	3.9 <sup>ab</sup>	4.1 <sup>ab</sup>
PHX50	<b>5.0<sup>bc</sup></b>	<b>5.2<sup>cd</sup></b>	4.8 <sup>b</sup>	4.6 <sup>b</sup>	5.3 <sup>ab</sup>	5.2 <sup>bc</sup>	5.2 <sup>abc</sup>	5.3 <sup>abc</sup>	3.7 <sup>abc</sup>	3.9 <sup>ab</sup>
Rebaudioside -A	<b>4.5<sup>cd</sup></b>	<b>4.6<sup>de</sup></b>	5.3 <sup>ab</sup>	5.6 <sup>a</sup>	4.8 <sup>b</sup>	4.9 <sup>cd</sup>	4.9 <sup>bc</sup>	5.1 <sup>bc</sup>	3.2 <sup>c</sup>	3.2 <sup>c</sup>
RBAS50	<b>5.6<sup>ab</sup></b>	<b>5.9<sup>ab</sup></b>	5.5 <sup>ab</sup>	5.6 <sup>a</sup>	5.8 <sup>a</sup>	5.9 <sup>ab</sup>	5.9 <sup>a</sup>	5.9 <sup>a</sup>	4.2 <sup>ab</sup>	4.2 <sup>ab</sup>

<sup>1)</sup> Means within a row not sharing a superscript letter are significantly different (p<0.05, Tukey's HSD test)

<sup>2)</sup> Bold letters indicate a significant different between blind and informed condition (independent t-test, p<0.05)

(라) Just-about-Right (적합도) 검사

- 각 시료 별로 단맛, 경도, 수분감에 대한 penalty analysis를 수행하여 얻은 mean drop의 그래프는 Figures 4-11와 같음.
- Mean drop은 각 특성에 대해 non-JAR 소비자들의 시료에 대한 기호도 평균 점수와 JAR를 선택한 소비자들의 시료에 대한 기호도 평균 점수의 차이이며, 감소한 정도를 나타냄. 시료 별로 JAR를 선택한 JAR 소비자그룹, 특성의 정도가 부족함(below level)을 선택한 non-JAR 소비자그룹, 특성의 정도가 지나침(over level)을 선택한 non-JAR 소비자그룹으로 총 세 level로 나누어 두 level의 non-JAR 그룹의 mean drop을 y축으로, non-JAR 그룹의 비율을 x축으로 하여 그래프에 나타내었음.
- 설탕 쿠키에 대해서는 정보가 제공되지 않았을 때 전체 소비자의 37.5%가 설탕 쿠키의 경도가 무르기 때문에 적당하지 않다고 평가하였고, 이와 같이 평가한 소비자들의 mean drop은 1.23점으로 유의적인 값을 나타내었음(Figure 4). 반면 정보가 제공되었을 시에는 전체 소비자의 29.17%가 경도가 무르기 때문에 적당하지 않다고 평가하였으나, 이 소비자들의 mean drop은 0.43으로, 기호도에 대한 유의적인 차이는 없었음. 설탕 쿠키의 정보 제공 여부에 상관없이 단맛과 수분감에 대해서는 non-JAR 패널들의 수가 유의적이지 않았기 때문에 대부분의 소비자들이 설탕 쿠키의 단맛과 수분감은 적당한 수준이라고 느끼고 있음으로 판단됨.

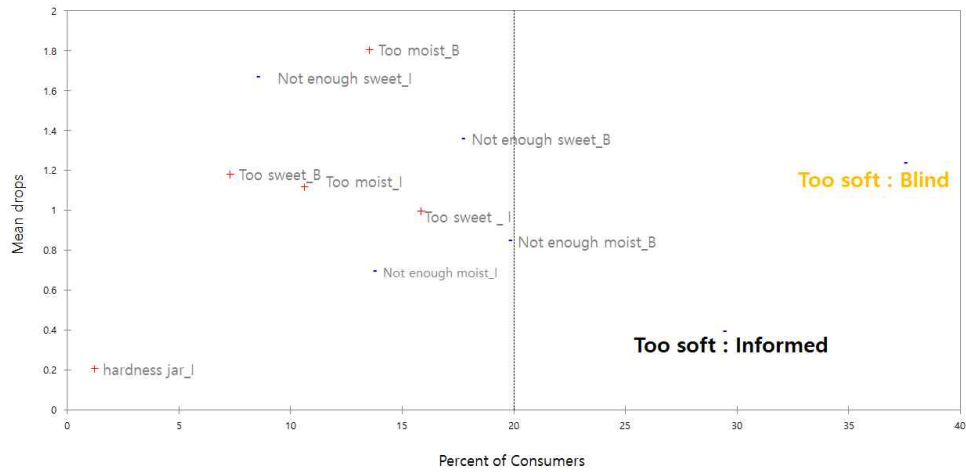


Figure 4. Percentage of consumers–Mean drops of sucrose cookie.

- Sucralose 쿠키에 대해서는 정보를 제공하지 않았을 때와 정보를 제공했을 때 모두 경도와 수분감에 대해 적당하지 않다고 판단하였으며, 시료의 경도가 너무 딱딱하고, 수분감이 부족하다는 평가를 하였음(Figure 5). 특히 정보를 제공하였을 때 시료의 수분감이 부족하기 때문에 non-JAR로 평가한 소비자는 전체 소비자의 50%로, 전체 패널 중 수분감이 적당하다고 평가한 소비자의 수보다 높게 나타남. 기호도에 대한 mean drop은 정보를 제공하지 않았을 때 더 높게 나타났음. 이를 통해 소비자들은 시료의 정보를 알고 있을 때보다 시료의 정보에 대해 알지 못하고 쿠키 시료를 먹을 때, 시료의 특성이 자신의 기준에 적합하지 않다고 생각하면 기호도 점수를 더 낮게 줄을 알 수 있었음.

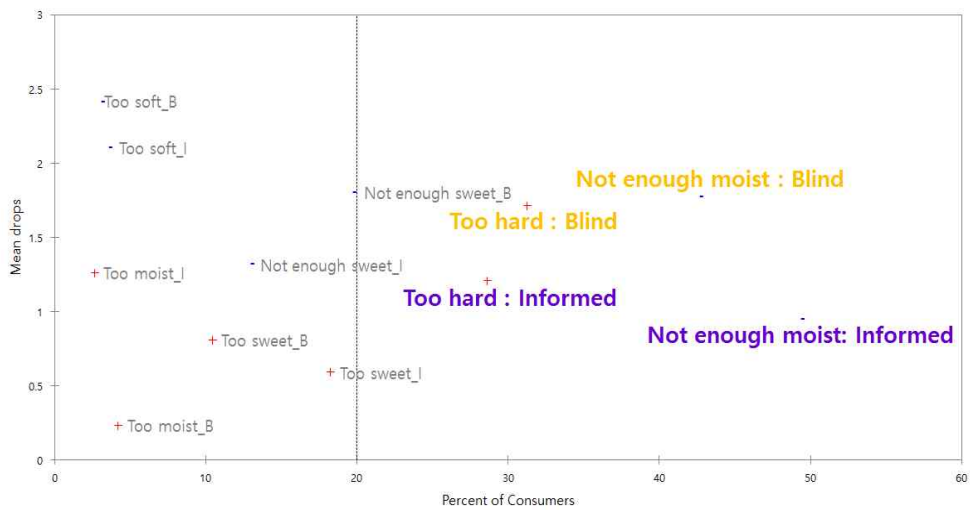


Figure 5. Percentage of consumers–Mean drops of sucralose cookie

- XBS 쿠키에 대해서는 정보를 제공하지 않았을 때와 정보를 제공했을 때, 두 경우 모두 단맛이 약하고 경도가 너무 무르기 때문에 적당하지 않다고 소비자들은 판단하였음 (Figure 6). 단맛에 관하여 정보 비 제공 시에는 전체 소비자의 31.25%이 단맛이 부족하다고 평가하였으며, 정보를 제공한 후에는 단맛이 부족하다고 평가한 소비자의 전체의 21.88%로 감소하였음. 이에 대한 mean drop은 정보 제공에 따라 0.83에서 1.57로 상승하였음. 경도에 대해서 각 35.42%(비정보), 37.50%(정보)의 소비자들은 너무 무르기 때문에 non-JAR로 평가하였으며, 이에 대한 mean drop은 1.48에서 1.28로 정보 제공 시 약간 감소하였음. 즉, 정보가 제공될 때 감미 적합성 평가 기준이 완화되었으나, 반면 정보에 의해 감미 적합성 평가 기준이 영향받지 않은 소비자들의 경우 정보가 주어졌을 때 감미 적합성 기준이 강화되었음. 반면 경도 적합성 평가 기준은 정보 제공 시 다소 완화된 것으로 보임.

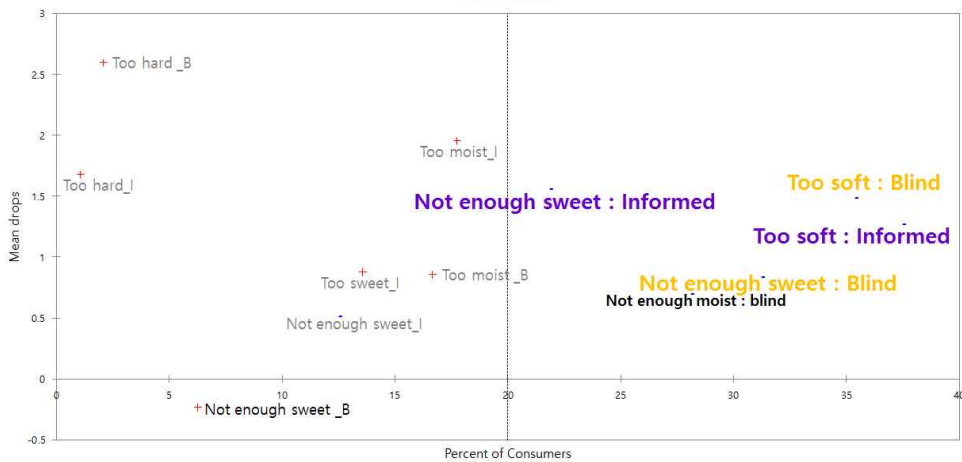


Figure 6. Percentage of consumers–Mean drops of XBS cookie.

- PhylloDulcin 100% 대체 쿠키에 대해서는 정보를 주지 않았을 때 다수의 소비자들이 단맛, 경도, 수분감 모든 특성에서 시료에 대해 적당하지 않다고 평가함(Figure 7). 시료의 단맛에 대해서는 정보를 제공하지 않았을 때 66.67%, 정보를 제공하였을 때 62.5%의 사람들이 단맛이 부족하기 때문에 non-JAR로 평가하였으며, 정보를 제공받았을 때 단맛이 부족한 non-JAR 그룹의 mean drop이 증가함. 이는 설탕 감소에 대한 긍정적 평가보다 단맛이 부족하다는 점에 대한 penalty가 더 컸기 때문이라고 사료됨. 경도에 대해서는 정보의 제공 여부에 따라 각 41.67%, 40.63%의 소비자들이 너무 딱딱하기 때문에 적합하지 않다고 평가하였음. 정보를 제공받았을 때 그룹의 mean drop은 감소함. 정보 비제공/제공 시 소비자의 63.54%가 시료의 수분감이 부족하기 때문에 적당하지 않다고 평가하였음. 경도와 수분감의 경우 정보를 제공받았을 때는 mean drop이 감소하였으며 시료의 기호도를 유의적으로 낮게 평가하지 않았음.

- Phyllodulcin과 설탕을 혼합하여 대체한 쿠키인 PHS50 쿠키에 대해서 약 34%의 소비자들은 수분감이 부족하기 때문에 non-JAR라고 평가하였음(Figure 8). 시료에 대한 정보를 제공하였을 때, 수분감 부족하다고 평가하는 소비자의 수는 약 30%로 감소하였고, mean drop 역시 1.42에서 1.12로 감소하였음. 정보가 제공되지 않았을 때 PHS50의 단맛이 부족하여 non-JAR로 평가하는 소비자는 30.21%였으며 그룹의 mean drop은 1.61이었으나, 정보가 제공 되었을 때는 단맛이 부족하기 때문에 non-JAR로 평가하는 소비자의 수가 전체 16.67%로 감소하였음.

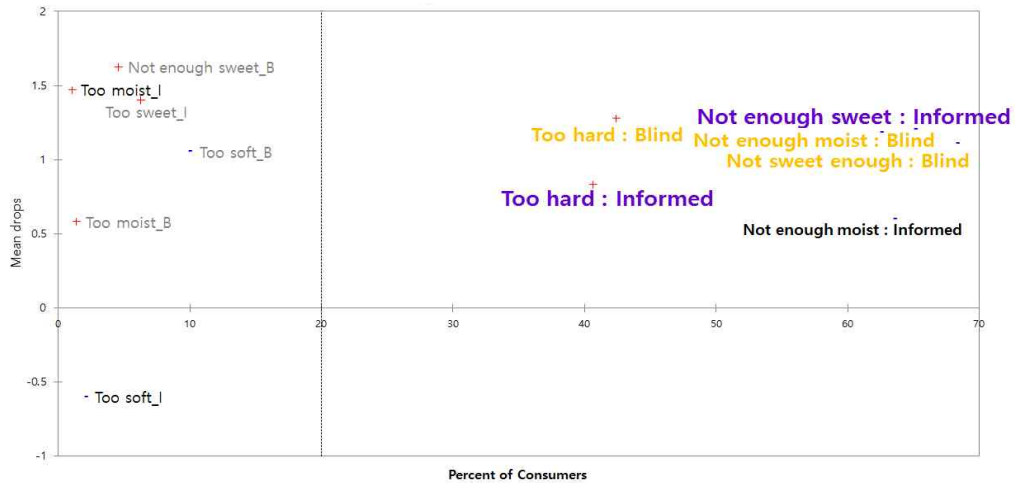


Figure 8. Percentage of consumers–Mean drops of PHS50 cookie

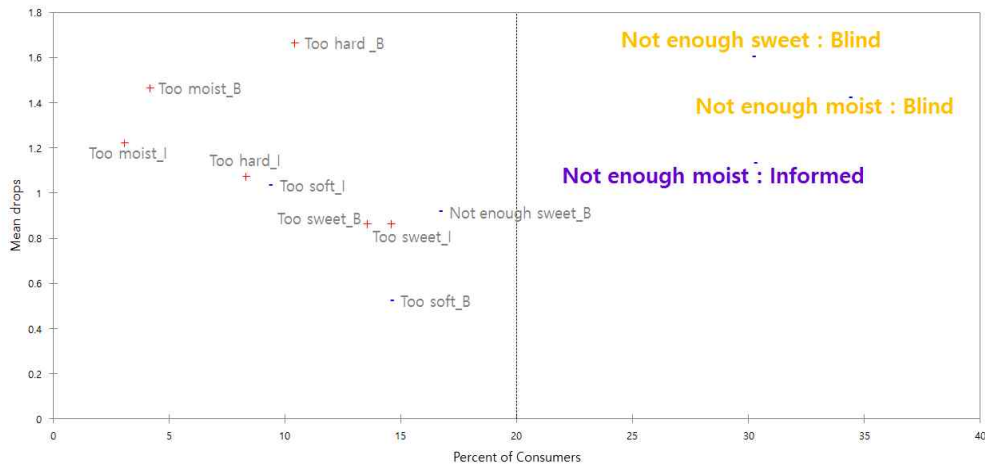


Figure 7. Percentage of consumers–Mean drops of Phyllodulcin 100% cookie.

- Phyllo dulcin과 xylitol을 혼합하여 설탕을 대체한 PHX50 쿠키에 대해서는 정보를 제공하지 않았을 때와 정보를 제공했을 때 모두 단맛, 경도, 수분감의 세 가지 특성 모두에 대해서 소비자들은 적당하지 않다고 평가하였음(Figure 9). 특히 PHX50의 경도에 대해서는 정보 비제공/제공 시 각 46.88%, 48.96%가 너무 무르다고 평가하였으며, 정보를 제공 받았을 때 그룹의 mean drop이 1.72에서 0.94로 감소하였지만, 여전히 유의적으로 기호도를 낮게 평가하였음. 또한 시료의 단맛이 충분하지 않기 때문에 non-JAR로 평가한 소비자그룹은 정보 비제공/제공 시 각 36.46%, 32.29%였으며, 정보를 제공 받은 후에 non-JAR 그룹의 mean drop은 1.56에서 1.66으로 다소 상승하였음. 수분감에 대해서는 전체 소비자의 약 21%가 적당한 수준보다 지나치다고 평가하였음. PHX50의 시료는 xylitol의 보습성이 수분감과 무른 조직감에 영향을 주어 소비자들에게 이와 같은 평가를 받았음으로 판단됨.

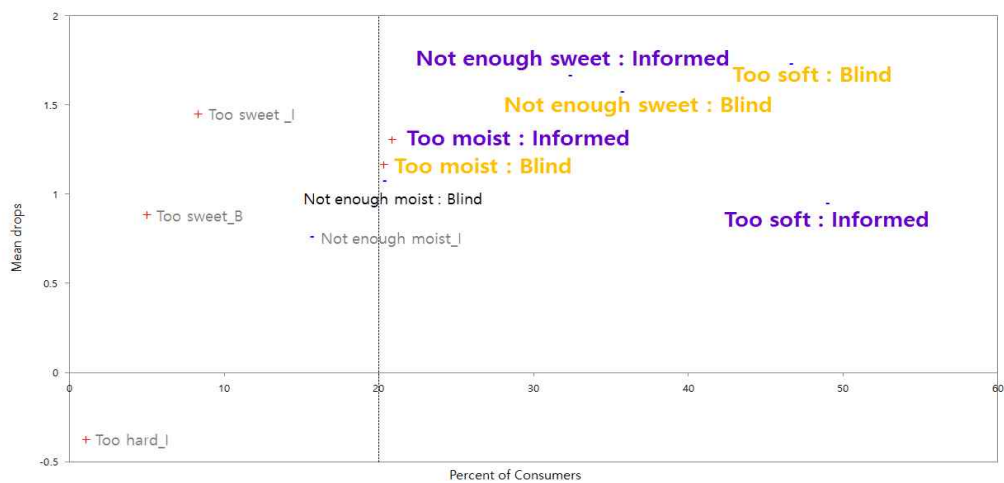


Figure 9. Percentage of consumers–Mean drops of PHX50 cookie.

- Rebaudioside-A 100% 대체 쿠키에 대해서는 phyllo dulcin 100% 대체 쿠키와 마찬가지로 단맛, 경도, 수분감 모든 특성에서 다수의 소비자들이 시료에 대해 적당하지 않다고 평가하였으며, 이와 같은 non-JAR 소비자그룹의 수는 정보를 제공하지 않았을 때와 정보를 제공했을 때 모두 유의적으로 나타났음(Figure 10). 특히 경도와 수분감에 관련하여 적당하지 않다고 생각하는 소비자들은 전체 평가 인원의 60% 이상으로, 설탕을 rebaudioside-A로 100% 대체한 쿠키 시료의 조직감 특성에 대한 보완이 필요함으로 사료됨.

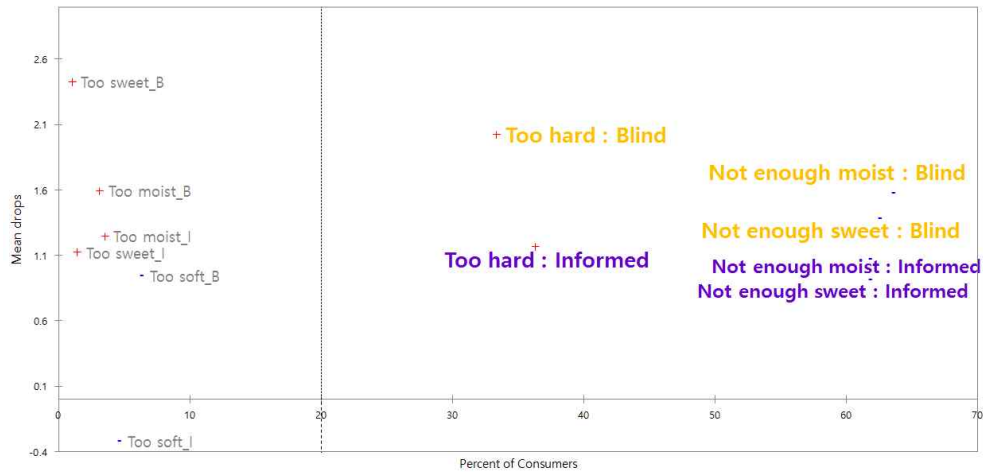


Figure 10. Percentage of consumers–Mean drops of Rebaudioside-A 100% cookie.

- Rebaudioside-A와 설탕을 혼합하여 대체한 RBAS50 쿠키에 대해서는 정보를 제공하지 않았을 때 수분감과 단맛이 부족하다고 평가하였으나, 정보를 제공받은 후에는 두 특성에 대하여 non-JAR로 평가한 소비자의 수가 유의적으로 차이하지 않았음(Figure 4H). 정보를 제공받은 후에 RBAS50시료의 세 가지 특성에 대한 JAR로 평가한 소비자그룹은 전체의 75%이상으로, 시료의 특성들이 소비자를 만족시킬 수준으로 적당함으로 판단됨.

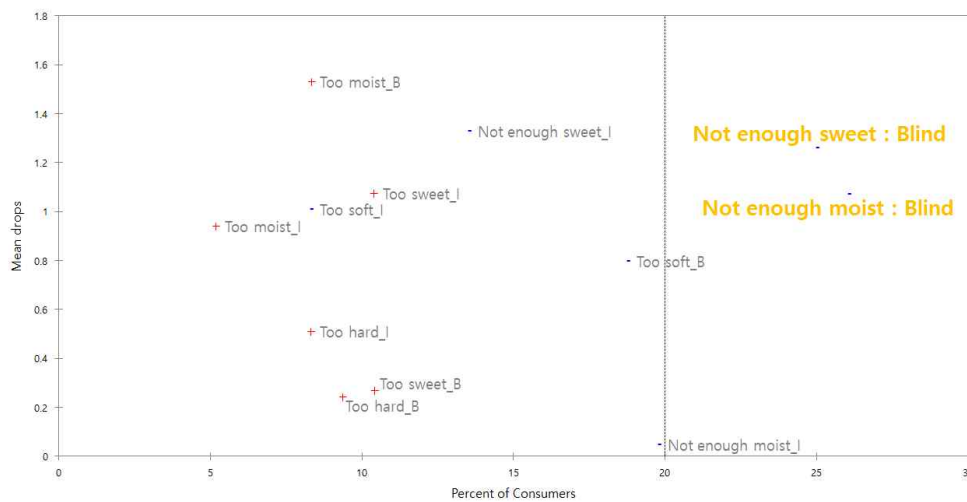


Figure 11. Percentage of consumers–Mean drops of RBAS50 cookie

- 각 시료에 대하여 세 가지 특성에 대한 non-JAR 소비자그룹의 penalty 점수는 Figure 12와 같음.
- Penalty는 시료의 특성이 non-JAR 일 때, 시료의 기호도에 대하여 감소하는 점수의 크기를 나타냄(Figure 12). 이는 non-JAR의 below level과 over level이 주는 mean drop의 평균 점수로 도출해 낸 값이며, 특성이 적합하지 않을 때 소비자들이 시료의 기호도에 얼마나 낮게 점수를 주는지를 나타냄. Non-JAR 그룹의 응답 수가 충분하지 않을 경우 penalty의 유의성은 검증되지 않았음.

- 전체 시료 중 가장 큰 penalty 값을 나타낸 것은 rebaudioside-A로 100% 대체한 쿠키의 경도 특성이었으며, 특히 정보가 제공되지 않았을 때 시료에 대한 경도가 non-JAR로 판단될 경우 소비자들이 기호도에 대하여 1.86의 penalty를 부여하는 것으로 나타남. 또한 sucralose 쿠키와 PHX50 쿠키의 경도의 적합 여부에 대해서도 각 1.78, 1.72의 큰 penalty를 부여하였음.
- 정보가 제공될 경우 패널들의 평가 기준에 영향을 미쳐 penalty가 감소할 것으로 추측하였으나 시료 및 특성 별로 penalty에 정보가 미치는 영향은 일정하지 않았음. 기능성 및 저칼로리 대체 감미료의 경우 정보가 제공되면 설탕보다 penalty를 더 감소시킬 것으로 예측되었으나 실제 설탕이나 sucralose의 penalty를 더 감소시키는 것으로 나타났음.
- 즉 소비자들은 각각의 감미료 정보에 대해 다른 기대감과 연관성을 형성하므로, 이들이 penalty에 영향을 미치는 방향과 정도 역시 다른 것으로 사료됨.



Figure 12. Penalty scores of sweetness, hardness, moisture of 8 cookie samples  
 1) \* means that penalty is significantly different from 0 (p < 0.05)



(마) 군집 분석

- 시료에 대한 평가 경향이 뚜렷하게 다른 여러 소비자 집단이 존재하는지 알아보기 위하여 시료에 대한 전반적인 기호도를 기준으로 군집 분석을 실시하였음. 각 군집 별로 시료에 대한 기호도 평균 점수는 Table 15와 같음.
- 정보를 제공하였을 때와 정보를 제공 하지 않았을 때 두 경우 모두 좋아하는 시료를 기준으로 3 집단으로 나누어졌으며, 각 3 집단의 선호 시료 경향은 거의 유사하였음.

Table 15. Overall liking scores of 8 samples by each cluster

(A) Blind condition								
	Sucrose	Sucralose	XBS	Phyllodulin 100	PHS50	PHX50	Rebaudioside-A 100	RBAS50
cluster 1 (n=30) <sup>1)</sup>	4.9 <sup>bcd2)B3)</sup>	6.8 <sup>aA</sup>	3.8 <sup>cdB</sup>	4.7 <sup>cdA</sup>	6.0 <sup>abA</sup>	4.7 <sup>cdA</sup>	4.6 <sup>cd</sup>	5.3 <sup>bc</sup>
cluster 2 (n=19)	7.0 <sup>aA</sup>	5.1 <sup>bcB</sup>	5.7 <sup>abA</sup>	4.4 <sup>bcA</sup>	4.1 <sup>bcB</sup>	3.4 <sup>cB</sup>	3.7 <sup>c</sup>	5.1 <sup>bc</sup>
cluster 3 (n=47)	6.0 <sup>aA</sup>	4.8 <sup>bbB</sup>	5.5 <sup>abA</sup>	3.0 <sup>cB</sup>	5.6 <sup>abA</sup>	5.8 <sup>abA</sup>	4.9 <sup>b</sup>	6.1 <sup>a</sup>
(B) Informed condition								
	Sucrose	Sucralose	XBS	Phyllodulin 100	PHS50	PHX50	Rebaudioside-A 100	RBAS50
cluster 1 (n=22)	5.2 <sup>abB</sup>	5.1 <sup>a</sup>	3.6 <sup>bbB</sup>	5.2 <sup>aA</sup>	5.1 <sup>a</sup>	3.8 <sup>bbB</sup>	6.0 <sup>aA</sup>	5.1 <sup>a</sup>
cluster 2 (n=60)	6.7 <sup>aA</sup>	5.4 <sup>b</sup>	6.1 <sup>abA</sup>	3.8 <sup>cB</sup>	5.6 <sup>b</sup>	5.4 <sup>baA</sup>	3.9 <sup>cB</sup>	5.9 <sup>b</sup>
cluster 3 (n=14)	5.0 <sup>bcB</sup>	5.9 <sup>ab</sup>	4.0 <sup>cB</sup>	3.7 <sup>cB</sup>	5.7 <sup>ab</sup>	6.4 <sup>abA</sup>	5.1 <sup>bcA</sup>	7.0 <sup>a</sup>

<sup>1)</sup> Number of consumers in a cluster

<sup>2)</sup> Means within a row not sharing a small alphabet letter are significantly different( $p < 0.05$ , Tukey's HSD test)

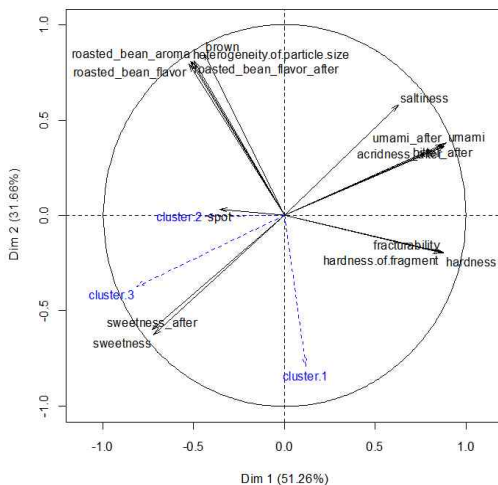
<sup>3)</sup> Means within a row column not sharing a capital alphabet letter are significantly different( $p < 0.05$ , Tukey's HSD test)

- 정보를 제공하지 않았을 때 (Table 15A) 시료에 대한 각 cluster간의 기호도 점수는 유의적으로 차이가 있었으며( $p < 0.05$ ) rebaudioside-A 쿠키 시료에 대해서만 유의적인 차이를 보이지 않았음.
- Cluster 1의 소비자들은 sucralose 대체 쿠키와 PHS50 쿠키를 가장 선호하였음. 특히 sucralose에 대한 기호도는 다른 두 cluster에 비하여 유의적으로 높았음. 그 외 쿠키들의 기호도에는 유의적인 차이가 없었음. 그러나 다른 두 클러스터에 비하여 XBS와 sucrose 쿠키에 대해 유의적으로 낮은 기호도 점수를 주었음.
- Cluster 2의 소비자들은 설탕 쿠키를 가장 선호하였으며, XBS쿠키의 기호도 역시 설탕 쿠키와 유의적인 차이를 나타내지 않았음. Cluster 2는 다른 두 클러스터에 비해 PHX50과 PHS50을 유의적으로 낮게 평가하였음.
- Cluster 3의 소비자들은 RBAS50 쿠키와 설탕 쿠키를 가장 선호하였으며, phyllo dulcin 100쿠키를 특히 싫어하였음. Cluster 3은 전체 cluster 들 중 phyllo dulcin 100 쿠키의 기호도를 유의적으로 가장 낮게 평가하였음.
- 정보를 제공하였을 때(Table 15B) 기호도 점수는 sucralose, PHS50, RBAS50 시료를 제외한 모든 시료에서 cluster간 유의적인 차이가 있었음. 반면 정보가 제공되지 않았을 때와 비교하면 클러스터 간 rebaudioside-A 평가 성향에 유의적인 차이가 나타났음.
- Cluster 1는 XBS에 유의적으로 낮은 기호도 점수를 주었으며, sucrose쿠키의 기호도를 다른 클러스터에 비교하여 낮게 평가하였다는 면에서 정보 비 제공시의 Cluster 1과 유사한 성향을 보였음. 그러나 정보 제공시의 Cluster 1 소비자들은 고감미 대체 감미료를 적용한 쿠키들을 유사한 정도로 선호하였으며, xylobiose가 이용된 쿠키들을 유의적으로 덜 선호하였음.
- Cluster 2의 소비자들은 설탕과 XBS 쿠키 등을 가장 선호하였으며, sucralose, PHS50, PHX50, RBAS50등 설탕이나 xylose가 혼합된 고감미 쿠키를 phyllo dulcin 100% 쿠키와 rebaudioside-A 100% 쿠키보다 유의적으로 선호하여 고감미료가 단독으로 사용된 쿠키를 기피하는 경향을 보임. 전반적인 평가 경향은 정보 비 제공시의 cluster 2와 유사하였으나, 고감미료 단독 사용 쿠키에 대해 더 뚜렷하게 낮은 기호도 점수를 주었음.
- Cluster 3의 소비자들은 RBAS50 쿠키, PHS50, PHX50, sucralose 쿠키등에 유의적으로 높은 기호도 점수를 준 반면 phyllo dulcin 100% 쿠키와 XBS쿠키에 대해서는 가장 낮은 기호도를 보임. Cluster 3의 소비자들은 설탕의 50%를 대체한 쿠키와 sucralose 쿠키에 대해 긍정적으로 평가하여, 설탕 함량을 줄이면서도 설탕 쿠키와 비교적 유사한 특성을 나타내는 쿠키들을 선호하는 것으로 파악됨.
- 시료에 대한 소비자 기호도를 기준으로 나눈 cluster의 경향은 정보 비제공 시와 제공 시 유사하게 나타났으나, 군집 안의 소비자 개인의 경향의 변화 또한 다소 나타났음. 전체 소비자 중 정보의 제공에 상관 없이 cluster 경향을 유지한 소비자는 38.5%로, 정보에 상관없이 선호하는 시료의 경향이 동일하였음. 61.5%의 소비자는 정보의 제공에 따라 선호하는 시료에 따른 cluster가 변화하였음.

3) 군집별 기호 유발 인자(drivers of liking) 분석

- 정보를 제공하였을 때와 정보를 제공했을 때 각각 각 군집의 기호도에 가장 크게 영향을 미치는 감각 특성 요인들을 규명하였음.
- 정보를 제공하지 않았을 때 (Fig 6A)
  - Cluster 1의 기호도는 볶은 콩 향미, 갈색, 입자 크기 등 xylobiose 함유 쿠키에서 나타나는 특성들과 음의 상관관계를 나타내어, 이들이 drivers of disliking으로 작용하는 것으로 보임. 단맛, 경도, 부서짐성 등의 특성과 약한 양의 상관관계를 나타내었음.
  - Cluster 2의 기호도는 Dim 3의 양의 방향과( $\text{Cos}^2 = 0.20$ ) Dim 4의 음의 방향( $\text{Cos}^2 = 0.55$ )에 높게 부하되어 Fig 6A에서는 잘 나타나지 않았음. Dim 3은 음의 방향에 표면 반점 특성이 높게 부하된 반면, Dim 4는 양의 방향에 짠맛이 높게 부하되어, 이러한 특성들이 drivers of disliking인 것으로 보임. 그러나 Cluster 1과 3에 비하여 특정한 감각 특성과 기호도간의 상관성이 낮았음.
  - Cluster 3에서는 단맛이 drivers of liking인 반면, 짠맛, 우마미, 쓴맛, 아린 느낌 등의 특성들이 drivers of disliking인 것으로 나타남.
- 정보를 제공하였을 때 (Fig 6B)
  - Cluster 1의 기호도는 정보 제공시와 마찬가지로 볶은 콩 향미, 갈색, 입자 크기 등 xylobiose 함유 쿠키에서 나타나는 특성들과 음의 상관관계를 나타내었음. 반면, 경도, 부서짐성 등과 더 큰 양의 상관관계를 나타내어, 이들이 주 drivers of liking으로 사료됨.
  - Cluster 2와 3 모두 단맛이 주요 drivers of liking인 반면, 짠맛, 우마미, 쓴맛, 아린 느낌 등의 특성들이 drivers of disliking이었음.
  - 정보를 제공하지 않았을 때와 비교하여 감각 특성과 기호도간의 양의 상관관계가 더욱 뚜렷하게 드러나, 제품 정보와 같은 비감각적 요인들이 기호도 판정 시 특정한 감각 특성을 좀 더 고려하도록 영향을 미치는 것으로 사료됨.

(A) Blind condition



(B) Informed condition

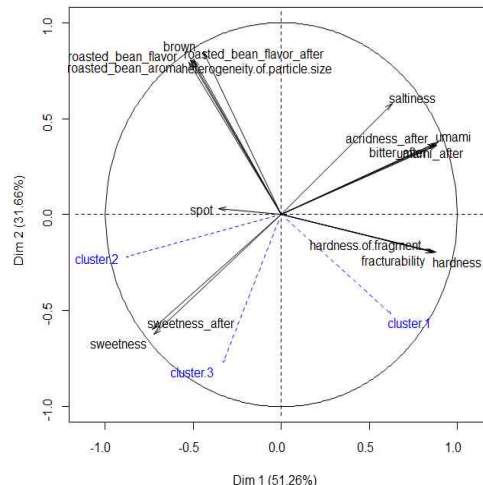
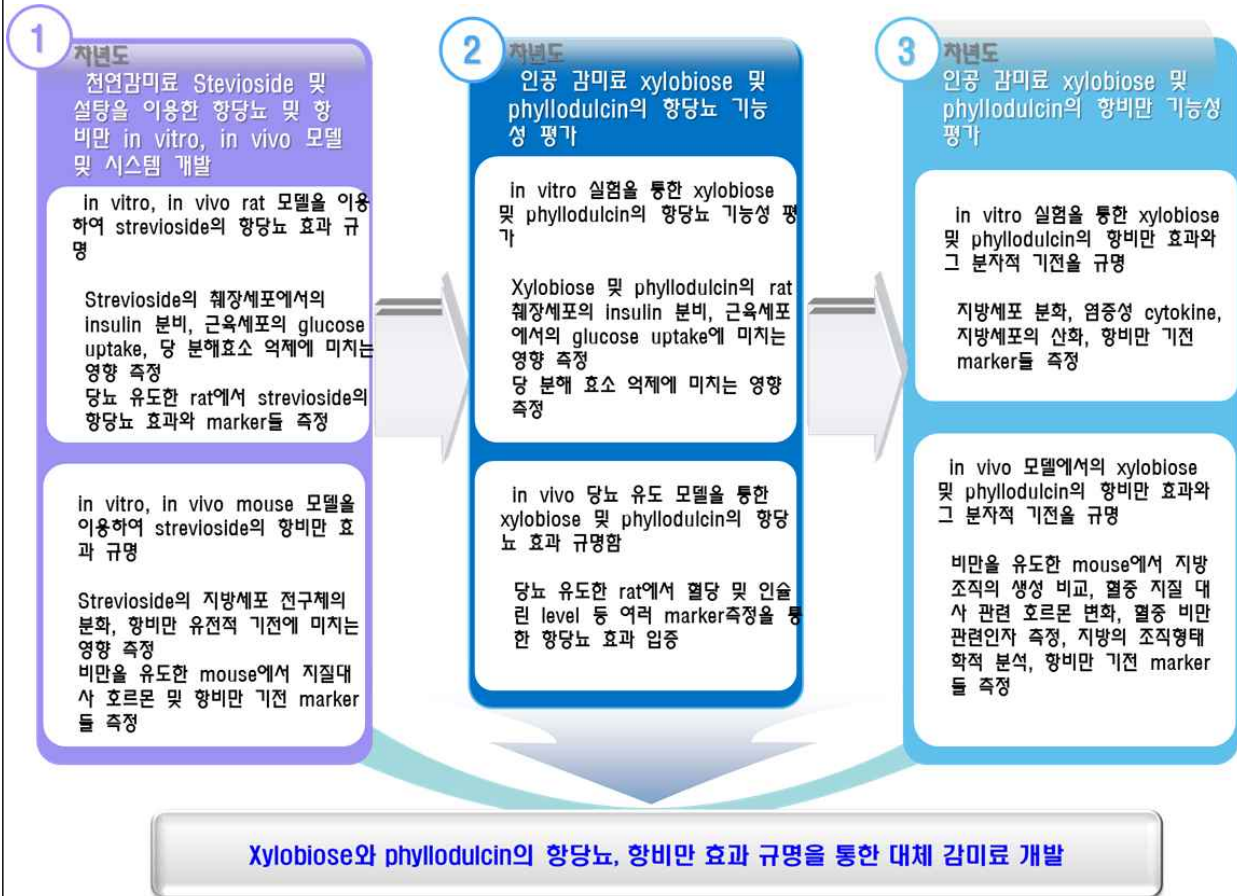


Figure 6. Supplementary variables factor map(PCA) of clusters and sensory attributes.

## 제 4 절 Xylobiose 및 phylodulcin의 항당뇨 기능성과 항비만 효능 규명

### 1. [제 2 협동] 연구개발 추진 전략 및 추진 체계



[1차년도] 천연감미료 (stevioside) 및 설탕을 이용한 건강 기능성 *in vitro* 및 *in vivo* 모델의 시스템 개발 및 실험조건 확립 : 항당뇨와 항비만 효과와 기전을 *in vitro* 및 *in vivo* 실험을 이용해 확인하기 위하여 현재 통용되고 있는 천연감미료인 stevioside 와 설탕을 이용하여 건강기능성 평가모델 및 시스템을 개발하고 실험조건 확립

#### 가. 천연감미료 (stevioside) 및 설탕을 이용한 항당뇨 *in vitro*, *in vivo* 모델 및 시스템 개발

- *In vitro* 항당뇨 효과측정을 위한 모델개발
  - 췌장세포에서의 시료 독성실험 및 stevioside의 insulin 분비 촉진 정도 측정: INS-1 rat insulinoma pancreatic  $\beta$  cell을 준비하여 skeletal muscle인 C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> cell을 culture하여 시료의 독성실험은 MTT assay를 이용하여 측정하고, INS-1 rat insulinoma pancreatic  $\beta$  cell 세포에서 ELISA를 통하여 streptozotocin(STZ)에 의해 감소된 insulin level을 여러 농도의 stevioside treat시에 얼마나 회복되는지 측정하고 인슐린 분비 촉진이 제일 잘되는 농도를 실험을 통해 확인함.
  - 근육세포 분화와 glucose uptake 측정: 먼저 C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> skeletal muscle cell을 분화시킨 뒤, 2-NBDG uptake를 fluorometer로 측정.

- $\alpha$ -amylase activity 측정:  $\alpha$ -amylase는 다당류인 전분이나 글리코젠을 분해하는 소화효소로 췌장과 침샘에서 분비됨.  $\alpha$ -amylase의 활성이 높은 경우, 탄수화물의 소화, 흡수가 촉진되어 혈당상승 및 비만에 영향을 준다고 알려져 있음. 따라서 stevioside의  $\alpha$ -amylase 활성억제 정도를  $\alpha$ -amylase activity assay kit (Sigma-Aldrich)를 이용하여 측정함.
- $\alpha$ -glucosidase activity의 저해정도 측정:  $\alpha$ -glucosidase는 다당류인 전분이나 글리코젠이 1,4-linked- $\alpha$ -D-glucose에서 포도당을 분해하는 효소로 당뇨병과 비만에 영향을 준다고 알려져 있음, 따라서, stevioside의 효능을 알아보기 위해 glucosidase assay kit (Bioassay system)을 이용하여 활성 억제 효능을 측정함.
- *In vivo* 항당뇨 효과측정을 위한 모델개발
  - Rat모델에서의 식이, 당뇨 유도 및 treatment: male Wistar rat을 이용하여 nicotinamide (NIC) 와 streptozotocin (STZ)을 injection하여 당뇨 유도함. 당뇨 유도 후 72시간 후 혈당으로 당뇨 유도를 확인함. 14일 후 쥐의 혈당이 200mg/dL인 쥐들을 실험에 이용함. STZ, NIC 투여 후 0, 7, 14, 21, 28일에는 blood를 꼬리 정맥으로 뽑아서 glucose analyzer로 glucose를 측정함. 당뇨 유도하지 않은 쥐와, 당뇨가 유도된 쥐를 sucrose군과 stevioside 군으로 나누어 실험.
  - 체중, 식이 섭취량 측정: 매주 일정한 시간에 체중과, 식이 섭취량 및 수분 섭취량을 급여량과 잔여량의 차이로 측정함.
  - Oral glucose tolerance test(OGTT) 와 insulin 분비 측정: glucose를 경구 투여 후 0, 30, 60, 90, 120분 뒤 혈액을 뽑아 glucose level을 측정함. Area under the glucose-time curve (AUC)를 계산함. 혈액 sample은 모두 원심분리 하여 -20도에 보관 후 ELISA kit를 이용하여 insulin level을 측정함으로써 stevioside의 항당뇨 효과를 입증함.
  - Insulin tolerance 정도 측정: 2시간 동안 굶긴 후, human insulin 피하 투여 후 0, 30, 60, 120분 후의 혈액을 꼬리정맥에서 채취 후, glucose level을 측정하고 AUC 면적을 구함.
  - 당뇨 유도한 쥐에서의 Hb, HbA1c, TP 변화 정도 측정: 당뇨가 유도된 쥐에서 늘어난 Hb, 증가된 HbA1c와 TP level을 측정 확인하고 대체 감미료인 stevioside 경구 투여한 그룹에서의 감소된 Hb, 늘어난 HbA1c, TP level을 측정함으로써 비교함으로써 stevioside의 항당뇨 효과를 입증함.
  - 혈액 채취 및 TC, HDL, LDL, TG level 측정: TC, HDL, LDL, TG level을 enzymatic colorimetric kit로 측정함으로써 serum에서의 lipid에는 어떤 영향을 미치는지 측정함.
  - 간, 췌장의 histopathology: 췌장과 간을 추출하여 4% paraformaldehyde에 fix한 후, 파라핀 블록을 만들어서 H&E staining을 실시하여 간과 췌장의 조직을 관찰함.
  - 간과 근육에서 GLUT 4, PEPCK 측정: 쥐의 간과 근육조직에서 western blot을 이용하여 GLUT 4와 PEPCK의 발현을 측정함.
  - Liver glycogen 함량 측정: 간 조직을 추출한 후, KOH와 ethanol을 첨가하여 incubation한 후, anthrone을 첨가한 후, 620 nm에서 흡광도를 측정하여 glycogen함량을 측정함.

#### 나. 인공감미료 (stevioside) 및 설탕을 이용한 항비만 기능성 평가 시스템 개발

- *In vitro* 항비만 기능성평가 모델 개발
  - 지방세포전구체(preadipocyte)인 3T3-L1 세포가 지방세포(adipocyte)인 3T3-F442A 로 분화하는데 있어 대체감미료인 Stevioside와 sucrose의 영향을 비교함. Dexamethasone, isobutylmethylxanthine, insulin을 첨가하여 preadipocyte 세포를 maintain함으로써 분화를 유도하고 각각의 preadipocyte에 sucrose와 Stevioside가 분화에 미친 영향을 측정하기 위해 Oil Red O staining 방법을 통해 축적된 지방세포의 크기와 개수를 비교함.
  - Cell viability: Stevioside 와 sucrose 처리의 유무가 3T3-L1 세포의 cell viability에 영향을 주는지를 trypan blue 또는 MTT assay를 이용해 세포 독성을 측정함
  - 면역사이토카인 측정: 지방세포가 분화를 함으로써 변화하게 되는 염증성 인자 (pro-inflammatory cytokines, anti-inflammatory cytokines)인 TNF- $\alpha$ , IL-1을 대체감미료인 stevioside와 sucrose 처리유무에 따른 비교분석
  - 항비만 유전적 기전 분석: 대체감미료인 stevioside의 항비만 유전적 기전을 일반 sucrose와 비교, 규명하기 위해 stevioside와 sucrose를 처리한 3T3 세포에서 RNA를 분리함. 지방세포 분화에 결정적인 역할을 하는 PPAR $\gamma$ 와 C/EBP $\alpha$ 의 변화를 RT-PCR (또는 qPCR) 통해 확인함. 또한 PPAR  $\gamma$  와 C/EBP $\alpha$ 의 타겟 유전자인 aP2와 FAS, ACC1, 그리고 SCD1의 유전적 발현을 RT-PCR (또는 qPCR)을 통해 확인함. 또한 지방세포분화를 촉진하는 signaling pathway를 stevioside와 sucrose가 어떻게 타겟하는지 보기 위하여 ERK, Akt와 그들의 down-stream 마커인 mTOR, p90RSK, c-Raf, p-70s6k의 발현 변화를 western blot 통해 규명
- *In vivo* 항비만 기능성평가 모델 개발
  - 비만유도 및 식이섭취량, 체중 측정: 적응기간을 거쳐 5주령이 된 C57BL/6 마우스를 stevioside군과 sucrose군으로 나눈 후, 비만을 유도하지 않은 군, 비만을 유도한 군으로 다시 나누어 실험을 진행 함. 매주 2회 씩 마우스의 식이섭취량과 체중을 측정하여 식이효율 (Food efficiency ratio, FER = Bodyweight gain (g)/Food intake (g) x 100)을 산출하고 비만이 유도된 정도를 그룹 간 비교함.
  - 지질대사 관련 호르몬 혈장 adiponectin, leptin 측정: Stevioside와 sucrose 섭취 유무에 따라 마우스 각 부위의 지방조직 (subcutaneous, visceral, perigonadal adipose tissue), 간 조직을 분리하여 무게를 측정하고, 지방 조직이 총 체중에서 차지하는 비율을 %로 환산하여 stevioside 및 sucrose의 지방조직 생성 억제 효능을 측정함.
  - 지방조직의 histopathology: 마우스 희생당시 분리한 부고환지방을 4% 포르말린에 고정시킨 후, 파라핀 embedding으로 슬라이드를 만들어 H&E staining 염색함. 염색된 지방세포의 크기와 개수를 stevioside군과 sucrose군에서 비교
  - 항비만 기전 규명: 마우스 모델에서 분리한 지방 또는 간조직에서 단백질과 RNA를 분리하여 PPAR $\gamma$ , aP2, SREBP-1c, CPT-1의 유전적 발현 변화를 RT-PCR (또는 qPCR) 과 western blot을 통해 확인함. 또한 ERK와 mTOR의 수준 변화도 RT-PCR (또는 qPCR)과 western blot을 통해 측정하여, stevioside 및 sucrose이 타겟하는 signaling pathway차이를 규명함

[2차년도] Xylobiose 및 phyllodulcin의 항당뇨 기능성 평가: 1차년도에 확립된 *in vitro*, *in vivo* 항당뇨 모델과 기전 시스템을 이용하여 xylobiose 및 phyllodulcin의 항당뇨 효과와 기능성을 규명함

#### 가. Xylobiose 및 phyllodulcin의 항당뇨 기능성 평가

- *In vitro* 항당뇨 기능평가

- Cell culture: INS-1 rat insulinoma pancreatic  $\beta$  cell과 mouse skeletal muscle인 C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> cell을 배양하여 실험에 이용함.
- 세포 독성: 시료의 독성시험은 MTT assay를 이용하여 조사함. 96 well에 3-5\*10<sup>3</sup> 세포들/well의 세포를 분주한 후, 4시간 preincubation함. 4시간 후 시료를 농도별로 처리한 후, 72시간 배양시키고 MTT assay를 실시함. 배양이 끝난 후 50ul의 MTT 용액을 넣은 후 4시간 배양하여 formazan이 형성되면 상등액을 제거하고 150ul의 DMSO를 넣음. ELISA reader을 이용하여 540nm에서 흡광도를 측정함.
- 근육세포 분화와 glucose uptake 측정: 먼저 C<sub>2</sub>C<sub>12</sub> skeletal muscle cell을 분화시킨 뒤, 2-NBDG uptake를 fluorometer로 측정.
- $\alpha$ -amylase activity 측정: xylobiose 및 phyllodulcin의  $\alpha$ -amylase 활성 억제 정도를 amylase activity assay kit (Sigma-aldrich)를 이용해 측정함.
- $\alpha$ -glucosidase activity의 저해 정도 측정: xylobiose 및 phyllodulcin의 효능을 알아보기 위해 glucosidase assay kit (Bioassay system)을 이용하여 활성 억제 효능을 측정함.
- 세포의 과산화물 제거율과 NO생성 측정: INS-1 rat insulinoma pancreatic  $\beta$  cell에 20uM의 DCF-DA를 넣어 PBS를 넣은 후 ROS에 의해 생성된 fluorescence를 fluorescence plate reader을 이용하여 잼다. 살아 있는 세포에서의 NO 생성을 측정하며, western blot을 통해 iNOS 발생 측정함.
- 세포의 insulin 생성 level을 측정: INS-1 rat cell에서 xylobiose 및 phyllodulcin이 insulin 생성에 미치는 영향을 ELISA를 통하여 측정함.
- Pro-inflammatory cytokine의 발현 억제를 통한 인슐린 분비 회복 측정: INS-1 rat insulinoma pancreatic  $\beta$  cell의 pro-inflammatory cytokine 인 IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$ 의 발현 정도를 RT-PCR 또는 qPCR로 측정함.

- *In vivo* rat 모델을 이용한 항당뇨기능 평가

- Rat모델에서의 식이, 당뇨 유도 및 treatment: male Wistar rat을 이용하여 nicotimide (NIC) 와 streptozotocin (STZ)을 injection하여 당뇨 유도함. 당뇨 유도 후 72시간 후 혈당으로 당뇨 유도를 확인함. 14일 후 쥐의 혈당이 200mg/dL인 쥐들을 실험에 이용함. STZ, NIC 투여 후 0, 7, 14, 21, 28일에는 blood를 꼬리정맥으로 뽑아서 glucose analyzer로 glucose를 측정함. 당뇨 유도하지 않은 쥐와, 당뇨가 유도된 쥐를 sucrose군과 xylobiose 군으로 나누어 실험. Phyllodulcin군도 위와 같은 방법으로 실험을 진행함.

- 체중, 식이 섭취량 및 수분 섭취량 측정: 일주일에 두 번, 일정한 시간에 체중과 식이섭취량 및 수분 섭취량을 급여량과 잔여량의 차이로 정함
- Oral glucose tolerance test(OGTT) 와 insulin분비 측정: STZ(Sigma, USA)-NA 투여 후 29일 후 모든 그룹은 2.5g/kg의 glucose를 경구 투여 후 0, 30, 60, 90, 120분 뒤 혈액을 뽑아 20ul의 혈액 sample로 glucose level을 측정함. Area under the glucose-time curve (AUC)를 계산함. 혈액 sample은 모두 원심분리 하여 -20도에 보관 후 ELISA kit를 이용하여 insulin level을 측정함.
- Insulin tolerance 정도 측정: 2시간 동안 쥐를 굶긴 후, human insulin(0.5U/kg) 피하 투여 후 0, 30, 60, 120분 후의 혈액을 꼬리정맥에서 채취 후, glucose level을 측정함. AUC 면적을 구함.
- 장기무게 측정: 최종 실험동물 희생 후, 간, 신장, 비장, 이자 장기를 적출하여 각각의 무게를 측정함.
- 당뇨 유도한 rat에서의 Hb, HbA1c, TP 변화 정도 측정: 당뇨가 유도 된 쥐에서 늘어난 Hb, 증가된 HbA1c와 TP level을 측정 확인하고, xylobiose 및 phylloolulcin 경구 투여한 그룹에서의 감소된 Hb, 늘어난 HbA1c, TP level을 측정함으로써 비교함.
- 혈액 채취 및 TC, HDL, LDL, TG, insulin level 측정: HDL, LDL, TG, TC, insulin level을 enzymatic colorimetric kit로 측정함으로써 serum에서의 lipid에는 어떤 영향을 미치는지 측정함.
- rat에서 췌장 islet을 분리 후 인슐린 분비능 분석: 쥐에게서 췌장을 collagen digestion 방법에 의해 분리한 후 cytokine을 처리하고, 분비된 인슐린의 양을 ELISA kit를 이용하여 측정함.
- 간, 췌장의 histopathology: 췌장과 간을 추출하여 4% paraformaldehyde에 fix한 후, 파라핀 블록을 만들어서 H&E staining을 실시하여 간과 췌장의 조직을 관찰함. 췌장 islet의 apoptosis를 관찰하기 위하여 TUNEL staining을 통해 확인하며, insulin antibody와 FITC-labelled secondary antibody를 사용하여 염색하여 인슐린을 확인함.
- 간과 근육에서 GLUT 4, PEPCK 측정: 쥐의 간과 근육조직에서 western blot을 이용하여 GLUT 4와 PEPCK의 발현을 측정함.
- liver glycogen 함량 측정: 간 조직을 추출한 후, KOH와 ethanol을 첨가하여 incubation 한 후, anthrone을 첨가한 후, 620 nm에서 흡광도를 측정하여 glycogen함량을 측정함.

**[3차년도]** Xylobiose 및 phylloolulcin의 *in vitro* 및 *in vivo* 항비만 기능성 평가: 1차년도에 확립된 *in vitro*, *in vivo* 항당뇨 모델과 기전 시스템을 이용하여, xylobiose 및 phylloolulcin의 항비만 효과와 기능성을 규명하여 과학적 근거를 제시함.

**가. Xylobiose 및 phylloolulcin의 *in vitro* 및 *in vivo* 항비만 효능 분석**

- *In vitro* 세포실험을 통한 항비만 효과와 그 분자적 기전을 규명
- 지방세포분화(adipogenesis)측정: Xylobiose 및 phylloolulcin이 3T3-L1 세포의 cell viability에는 영향을 주지 않으면서, 3T3-L1 세포의 분화를 억제시킴을 보임으로써 그 기능성을 검증함.



- Toxicity 검사: Xylobiose 및 phylloolulcin의 처리 유무가 3T3-L1 세포의 cell viability에 영향을 주는지를 trypan blue을 이용해 확인함. 또한 xylobiose 및 phylloolulcin의 처리 유무가 3T3-L1 세포의 분화에 어떠한 영향을 미쳤는지를 알아보기 위하여 Oil Red O staining 방법을 통해 축적된 지방세포의 크기와 개수를 비교함.
- 지방세포분화에 따른 염증성 cytokine 측정: 지방세포가 분화를 함으로써 변화하게 되는 염증성 인자 (pro-inflammatory cytokines, anti-inflammatory cytokines)인 TNF- $\alpha$ , IL-1, adiponectin 가 xylobiose 및 phylloolulcin의 처리에 의해 변화하는가를 측정함.
- 지방세포의 산화 측정: Xylobiose 및 phylloolulcin의 처리 유무가 3T3-L1 세포의 산화에 영향을 주는지 증명하기 위하여, 3T3-L1 세포의 palmitic acid 산화 정도를 측정.
- 항비만 기전 측정: Xylobiose 및 phylloolulcin 가 지방세포분화에 미치는 기전을 규명하기 위하여 지방세포분화 유전자 마커를 측정함. 지방세포분화에 결정적인 역할을 하는 PPAR $\gamma$ 와 C/EBP $\alpha$ 의 변화를 RT-PCR (또는 qPCR)을 통해 확인함. 또한 PPAR $\gamma$ 와 C/EBP $\alpha$ 의 타겟 유전자인 aP2와 FAS, ACC1, 그리고 SCD1의 유전적 발현을 RT-PCR (또는 qPCR)을 통해 확인함. 또한, 지방 세포분화를 촉진하는 signaling pathway를 타겟하는데 xylobiose 및 phylloolulcin의 기능성을 확인함. 이는 지방세포분화를 촉진하는 signaling pathway에서 세포의 proliferation에서 중요한 역할을 하는 ERK, Akt와 그들의 down-stream 마커인 mTOR, p90RSK, c-Raf, p-70S6k의 발현 수준 변화를 Western blot을 통해 증명함.
- 비만을 유도한 *in vivo* 마우스모델에서 xylobiose 및 phylloolulcin의 항비만 효과와 그 분자적 기전을 규명
  - 비만유도 및, 식이섭취량, 체중 측정: 적응기간을 거쳐 5주령이 된 C57BL/6 마우스를 xylobiose 및 phylloolulcin군으로 나눈 후, 비만을 유도하지 않은 군, 비만을 유도한 군으로 다시 나누어 실험을 진행 함. 매주 2회 씩 마우스 식이섭취량과 체중을 측정하여 식이효율 (Food efficiency ratio , FER = Bodyweight gain (g)/Food intake (g) x 100)을 산출하고 비만이 유도된 정도를 그룹 간 비교함.
  - 지방조직의 생성 비교: Xylobiose 및 phylloolulcin 섭취 유무에 따라 마우스 각 부위의 지방조직 (subcutaneous, visceral, perigonadal adipose tissue)을 분리하여 무게를 측정하고, 총 체중에서 차지하는 비율을 %로 환산하여 xylobiose 및 phylloolulcin의 지방조직 생성 억제 효능을 측정함.
  - 혈중 지질대사 관련 호르몬 변화 측정: 마우스 희생 당시 채혈한 전혈을 항응고 튜브에 보관 후 plasma을 분리함. 혈중 plasma에서 지질대사 관련 호르몬인 leptin 및 adiponectin 함량의 변화를 ELISA를 이용해 관찰함.
  - 혈중 비만 관련인자 측정: 마우스 희생 당시 채혈한 전혈을 항응고 튜브에 보관 후 plasma을 분리함. 혈중 plasma에서 비만을 예측할 수 있는 여러 지표; glucose, triglycerol, total cholesterol, 수준이 xylobiose 및 phylloolulcin 섭취 유무에 따른 증감을 측정함. 또한 비만이 유도됨에 따라 변화하는 염증성 인자인 TNF- $\alpha$ 의 변화를 비교함.

- 지방세포의 조직형태학적 분석: 마우스에서 분리한 부고환지방을 4% 포르말린에 고정시킨 후, 파라핀 embedding으로 슬라이드를 만들어 H&E staining 염색함. 염색된 지방세포의 크기와 개수를 xylobiose 및 phylloolucin 섭취 유무에 따라 비교분석함.
- 항비만 기전 측정: 마우스 모델에서 분리한 지방 또는 간조직에서 단백질과 RNA를 분리하여 PPAR $\gamma$ , aP2, SREBP-1c, CPT-1의 유전적 발현 변화를 RT-PCR (또는 qPCR)과 western blot을 통해 확인함. 또한 ERK와 mTOR의 수준 변화도 RT-PCR (또는 qPCR)과 western blot을 통해 측정하여, xylobiose 및 phylloolucin 이 타겟하는 signaling pathway차이를 규명함.

## 2. 천연감미료 및 설탕을 이용한 in vitro, in vivo 항당뇨 효과측정 위한 모델 개발 가. 실험방법

### In vitro

**In vitro study**에서, 먼저 glucose 농도에 따른 insulin secretion과 glucose uptake를 관찰하기 위하여 glucose 5mM, 10mM, 20mM dose를 설정하여 실험진행.

- D-xylose는 glucose와 함께 treat하는 보완제로서의 물질로서 in vitro 세포 성장에 필요한 medium의 농도인 glucose 20mM 기준으로 하여 glucose를 D-xylose로 5%, 10%, 20%를 대체했을 때의 효과를 평가함.
- Stevioside의 경우는 glucose를 대체할 수 있는 단독 물질로서 stevioside는 단독으로 1uM, 3uM, 10uM treat 하였을 때의 효과를 평가함.

### (1) 췌장세포(INS-1)에서의 D-xylose, stevioside의 insulin 분비촉진 정도 측정

INS-1 rat insulinoma pancreatic  $\beta$  cell에서 insulin level을 여러 농도의 D-xylose, stevioside treat시에 얼마나 증가하는지 ELISA kit를 이용하여 측정하고 인슐린 분비 촉진이 제일 잘 되는 농도를 확인함.

### (2) 췌장세포(INS-1)에서의 D-xylose, stevioside cell viability에 미치는 영향

INS-1 rat insulinoma pancreatic  $\beta$  cell에서 insulin level을 여러 농도의 D-xylose, stevioside treat시에 viability를 MTT를 이용하여 측정하고 시료독성을 평가함.

### (3) 근육세포(C2C12) 분화 후, D-xylose, stevioside가 glucose uptake에 미치는 영향 측정

C2C12 skeletal muscle cell을 100% confluence에서 horse serum 4%가 첨가된 분화 media로 change 후 4일 동안 분화시킴. 2-NBDG 20uM을 treat하여 glucose uptake를 fluorometer를 이용하여 측정하고, insulin 100nM을 기준으로 glucose uptake의 증감을 관찰함.

(4) 근육세포(C2C12) 분화 후, D-xylose, stevioside가 cell viability에 미치는 영향  
C2C12 skeletal muscle cell을 100% confluence에서 horse serum 4%가 첨가된 분화 media로 change 후 4일 동안 분화시킴. 여러 농도의 D-xylose, stevioside treat시에 viability를 MTT를 이용하여 측정하고 시료독성을 평가함.

### In vivo

**In vivo study**에서는 Wistar rat model로 93G diet를 control 식이로 사용함  
Diabetes rat의 경우 Nicotinamide (NA) 150 mg/kg b.w.와 Streptozotocin (STZ) 65mg/kg b.w.를 injection하여 제 2형 당뇨를 유도시키고, 그 이후로 2주간 D-xylose와 stevioside를 공급함

D-xylose model에서 93G의 sucrose 함량에서 각각 5%, 10%를 대체한 식이를 각각의 group III인 X5과 group IV인 X10에 사용하였으며, Stevioside model에서는 93G control 식이에 stevioside 20mg/kg b.w.을 gavage로 투여함.

#### **\* D-xylose groups**

Group I : normal (93G control diet for 2 weeks)

Group II : Diabetes control (93G control diet for 2 weeks)

Group III : X 5 (xylose replaced by 5% of total sucrose in the diet for 2 weeks)

Group IV : X 10 (xylose replaced by 10% of total sucrose in the diet for 2 weeks)

#### **\* Stevioside groups**

Group I : normal (93G control diet for 2 weeks)

Group II : Diabetes control (93G control diet for 2 weeks)

Group III : SVS 20 (93G control diet and stevioside 20mg/kg b.w. by gavage for 2 weeks)

#### **(1) 제 2형 당뇨가 유도 된 Rat 모델에서의 체중변화와 식이섭취량 변화**

당뇨가 유도된 시점으로부터 실험 종료 시점인 2주후 까지 체중변화와 식이섭취량 변화를 측정하여 Feeding efficiency ratio [FER = Bodyweight gain (g)/Food intake (g) x 100]를 계산함.

#### **(2) Fasting blood glucose**

공복혈당은 rat을 9시간 절식시킨 후 꼬리정맥에서 혈액을 채혈한 후 혈당측정기 (Accucheck, Germany)를 이용하여 측정함.

#### **(3) Oral glucose tolerance test (OGTT)**

D-xylose와 stevioside 섭취가 당뇨유도된 쥐의 내당능에 미치는 영향을 알아보기 위하여 rat에 glucose를 1g/kg b.w.을 경구투여 후 0, 30, 60, 90, 120분 후 혈액을 뽑아 glucose level을 측정함.

#### **(4) Insulin 분비에 미치는 영향과 HOMA-IR 평가**

D-xylose와 stevioside 섭취가 당뇨쥐의 insulin 분비에 미치는 영향을 살펴보고자 혈액 sample을 원심 분리하여 serum을 얻은 후 insulin ELISA kit로 insulin secretion을 측정함. Insulin 분비 감소는 골격근의 포도당 섭취의 감소와 더불어 골격근의 주 에너지원이 지방으로 전환되는 등 당대사에 많은 변화를 초래하며, HOMA-IR은 인슐린 저항성을 살펴볼 수 있는 지표로 대체적으로 diabetes control에서 높게 나타남.

#### **(5) Organ weight**

Rat 해부 시 liver, pancreas, spleen, kidney의 무게를 측정. D-xylose, stevioside를 섭취한 rat에서 diabetes control과 비교하였음.

#### **(6) Blood analysis (red blood cell, white blood cell, hematocrit, HbA1c, hemoglobin, platlet)**

D-xylose와 stevioside를 섭취한 후, diabetes control과 blood marker들을 비교함.

#### **(7) Total protein, total cholesterol, triglyceride**

Total protein은 biuret protein determination방법을 이용하여 측정하였고, total cholesterol은 standard method of clinical chemistry 방법을, Triglyceride는 아산제약의 TG-S kit를 사용하여 instruction대로 수행함.

#### **(8) Liver glycogen**

간 조직 10mg을 추출한 후 glycogen assay kit를 이용하여 liver에 있는 glycogen의 함량을 측정함.

Liver glycogen의 함량이 높다는 것은 혈중에 있는 glucose가 glycogen으로 전환되어 liver에 저장된다는 것으로, 이는 혈중 glucose의 농도 조절이 보다 효과적으로 이루어진다고 판단할 수 있음.

#### **(9) Western blot (PEPCK, GLUT4)**

Western blot을 통하여 시트르산회로에서 당신생으로의 중요한 단계를 촉매하는 효소인 PEPCK (phosphoenol pyruvate carboxykinase)와, glucose transporter type4인 GLUT4의 발현을 살펴봄.

#### **(10) Histopathological change in Pancreas**

장기별 병리조직학적 변화를 H&E staining으로 관찰함. 당뇨가 유도되지 않은 정상군에서는 췌장조직에서 많은 수의 선세포 (acini cell)가 모여 하나의 공 형태를 이루는 랑게르한스섬 (islet of Langerhans)의 모양이 뚜렷하게 잘 나타나 있는 것을 확인할 수 있음.

#### **(11) Histopathological change in Liver**

장기별 병리조직학적 변화를 H&E staining으로 관찰함. 정상군의 경우 비교적 크기가 크고 하나 또는 두 개의 소포형태를 띠는 핵을 가진 다각형 (polygonal)의 간세포가 잘 관찰되고 간 조직이 치밀한 것을 볼 수 있음.

## 나. 실험결과

### In vitro

#### (1) 췌장세포(INS-1)에서의 D-xylose, stevioside의 insulin 분비촉진 정도 측정.

- Glucose는 5mM에서는 insuline 분비가 증가하지 않았으나, 10mM treatment 부터는 glucose를 처리하지 않은 control에 비해 insulin 분비가 유의적으로 증가함. glucose 20mM가 가장 많이 증가한 경향을 보였으나, 10mM와는 차이를 보이지 않음.
- D-xylose을 glucose의 5%, 20% 대체한 경우, insulin secretion이 유의적으로 증가하는 것을 확인함. 이는 D-xylose를 glucose의 보완제로 treat하였을 때 insulin이 잘 분비되어 항당뇨에 기능성이 있다고 보여짐.
- Stevioside의 경우 insulin secretion이 증가하는 경향이 나타나지 않음.

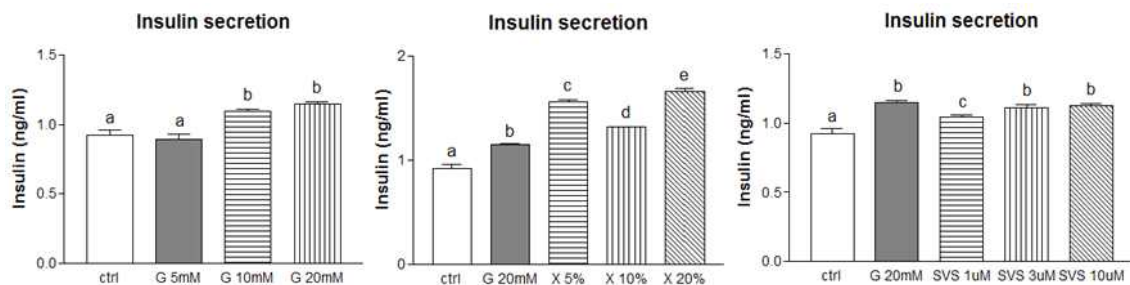


Fig. 1. Insulin secretion of INS-1 cells by treating glucose, D-xylose, stevioisde

The cells were treated with glucose, D-xylose, or stevioside for 2 h. Values shown are the mean  $\pm$  SEM. Different letters for given bars indicate that those values are significantly different from each other ( $P < 0.05$ ). ctrl : control , G : glucose, X : D-xylose, SVS : Stevioside.

#### (2) 췌장세포 (INS-1)에서의 D-xylose, stevioside cell viability에 미치는 영향

- Glucose, D-xylose는 dose에 따라 viability가 증가하는 경향을 보였으며, D-xylose의 이 연구에 사용된 dose에서는 독성이 없음을 보여줌.
- stevioside에서는 dose가 증가하더라도 cell viability가 control과 크게 다르지 않았으며, 이 연구에 사용된 dose에서는 stevioside의 독성은 없었음.

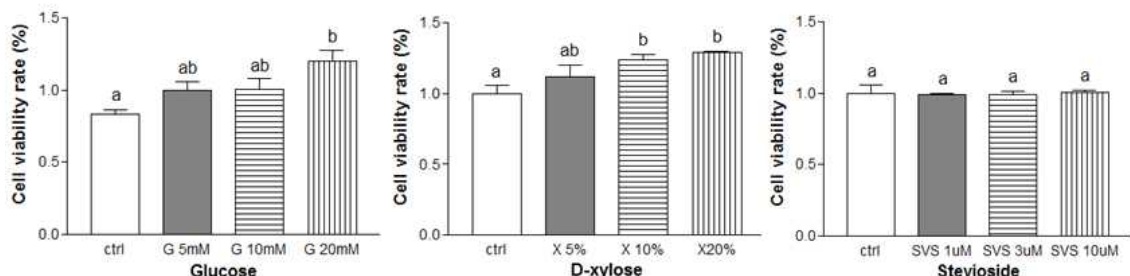


Fig. 2. Effect of glucose, D-xylose and stevioside on INS-1 cells' viability

Values shown are the mean  $\pm$  SEM. Different letters for given bars indicate that those values are significantly different from each other ( $P < 0.05$ ). ctrl : control , G : glucose, X : D-xylose, SVS : Stevioside.

(3) 근육세포(C2C12) 분화 후, D-xylose, stevioside가 glucose uptake에 미치는 영향 측정

- Insulin 100nM positive control을 기준으로 glucose 20mM, D-xylose 20%에서 유의적으로 증가하는 결과가 도출됨
- Insulin 100nM positive control을 기준으로 stevioside 3uM, 10uM에서 glucose uptake가 유의적으로 증가하는 결과가 도출됨

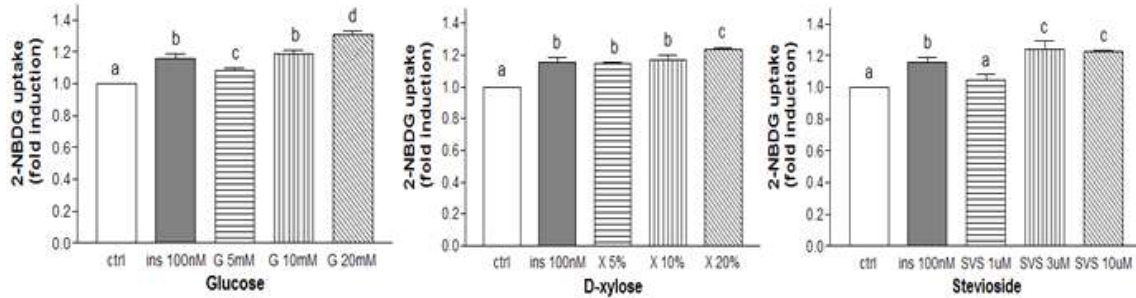


Fig. 3. Effect of Glucose, D-xylose, and stevioside on glucose uptake in C2C12 skeletal muscle cell

Differentiated C2C12 cells were treated with 2-[N(nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl) amino]-2-deoxy-D-glucose (2-NBDG) for 2 h. Values shown are the mean  $\pm$  SEM. Different letters for given bars indicate that those values are significantly different from each other ( $P < 0.05$ ). ctrl : control, ins : insulin, G : glucose, X : D-xylose, SVS : Stevioside.

(4) 근육세포(C2C12) 분화 후, D-xylose, stevioside가 cell viability에 미치는 영향

- Glucose, D-xylose 시료 독성실험 결과 C2C12 viability가 control에 비하여 더 증가하는 효과를 보였으며, 독성은 나타나지 않음
- Stevioside 시료 독성실험 결과 C2C12 viability가 control에 비하여 더 증가하는 효과를 보였으며, 독성은 나타나지 않음

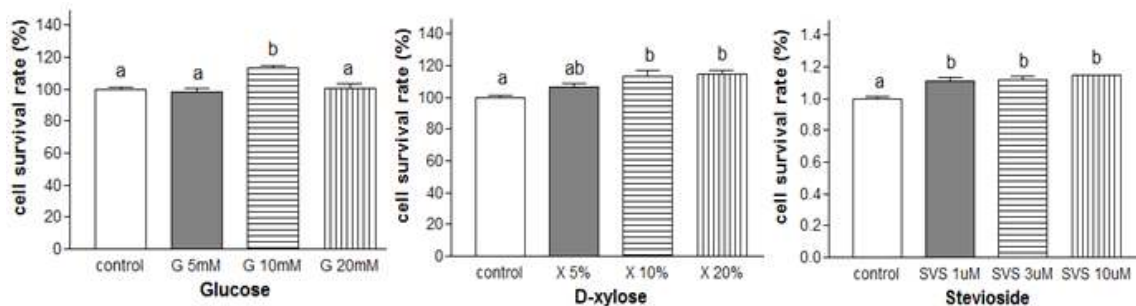


Fig. 4. Effect of glucose, D-xylose and stevioside on C2C12 cells viability

Values shown are the mean  $\pm$  SEM. Different letters for given bars indicate that those values are significantly different from each other ( $P < 0.05$ ). ins : insulin, G : glucose, X : D-xylose, SVS : Stevioside.

## In vivo

### (1) 제 2형 당뇨병이 유도된 Rat 모델에서의 체중변화와 식이섭취량 변화

- Normal control에 비하여 diabetes이 유도된 rat에서 무게와 feeding efficiency ratio가 유의적으로 감소하였으나, D-xylose 10%를 섭취한 군에서 diabetes control 그룹과 비교하여 몸무게가 증가하고 feeding efficiency ratio가 증가하는 경향을 보였으나, 통계적으로 유의하지 않았음.
- Normal control에 비하여 diabetes이 유도된 rat에서 무게와 feeding efficiency ratio가 유의적으로 감소하였으나, stevioside 섭취군에서 diabetes control 그룹과 비교하여 유의적인 몸무게 변화와 feeding efficiency ratio가 보이지 않았음.

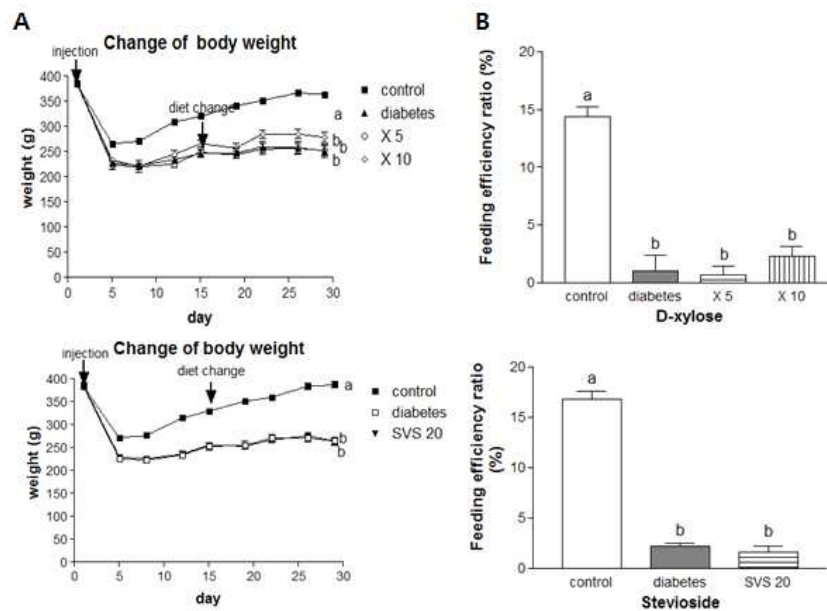


Fig. 5. Effect of D-xylose, Stevioside on body weight (A) and feeding efficiency ratio (B) in control and NA-STZ induced diabetic rats

Values shown are the mean  $\pm$  SEM. Different letters for given bars indicate that those values are significantly different from each other ( $P < 0.05$ ). X, D-xylose; SVS, Stevioside.

### (2) Fasting blood glucose

- Diabetes이 유도된 rat에서 혈당이 normal control에 비하여 유의적 증가하는 것을 볼 수 있었으며, D-xylose에서는 dose에 따라 혈당이 감소하는 경향이 나타났으며, 특히 D-xylose 10% 섭취 군에서 혈당이 유의적으로 감소함.
- Diabetes이 유도된 rat에서 혈당이 normal control에 비하여 크게 증가하는 것을 볼 수 있었으며, stevioside 20mg/kg b.w.을 섭취한 그룹에서 diabetes control에 비하여 혈당이 유의적으로 감소함

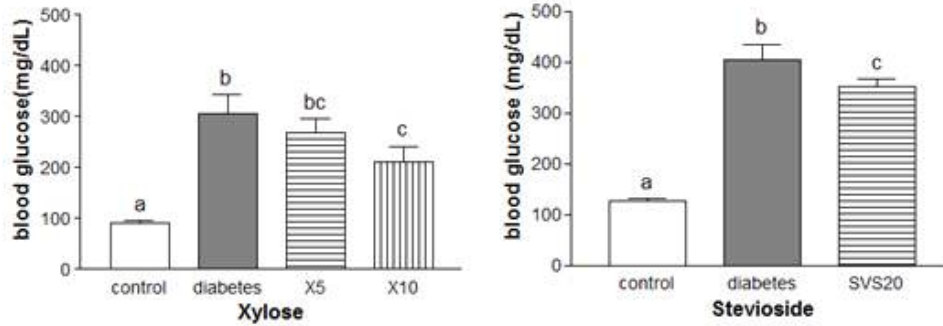


Fig. 6. Effect of D-xylose and stevioside on blood glucose levels of the rats

Values shown are the mean  $\pm$  SEM. Different letters for given bars indicate that those values are significantly different from each other ( $P < 0.05$ ). X, D-xylose; SVS, Stevioside.

### (3) Oral glucose tolerance test (OGTT)

- Diabetes control군과 D-xylose를 섭취한 군 간의 시간에 따른 혈당 변화와 OGTT AUC (area under the curve) 모두 유의적인 차이는 보이지 않음. D-xylose와 stevioside를 섭취하였을 때에는 혈당에서는 유의적으로 감소하는 효과를 보였으나, 당뇨쥐의 내당능 지표인 OGTT에서는 효과를 보이지 않았음.

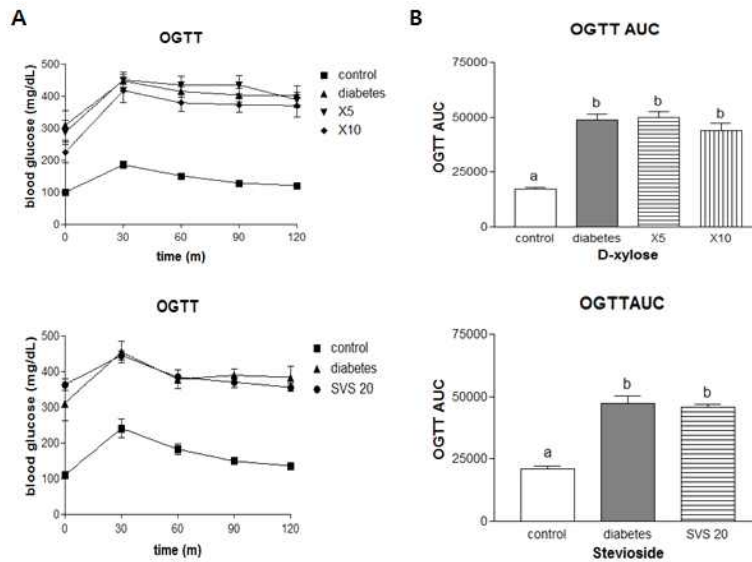


Fig. 7. Oral glucose tolerance test of the rats

Time course of changes in blood glucose level (A) and blood glucose AUC (B). Values shown are the mean  $\pm$  SEM. Different letters for given bars indicate that those values are significantly different from each other ( $P < 0.05$ ). X, D-xylose; SVS, Stevioside.

### (4) Insulin 분비에 미치는 영향과 HOMA-IR

- Normal control군에 비하여 diabetes군에서 insulin secretion이 저하 되었으나, D-xylose 10%를 섭취한 군에서 insulin 분비가 증가하는 경향을 나타내었음. 그러나, HOMA-IR에서는 효과가 관찰되지 않았음
- Normal control군에 비하여 diabetes군에서 insulin secretion이 저하가 된 것을 살핌. Stevioside에서는 insulin 분비가 유의적인 차이를 보이지 않으며, HOMA-IR에서도 효과가 나타나지 않았음



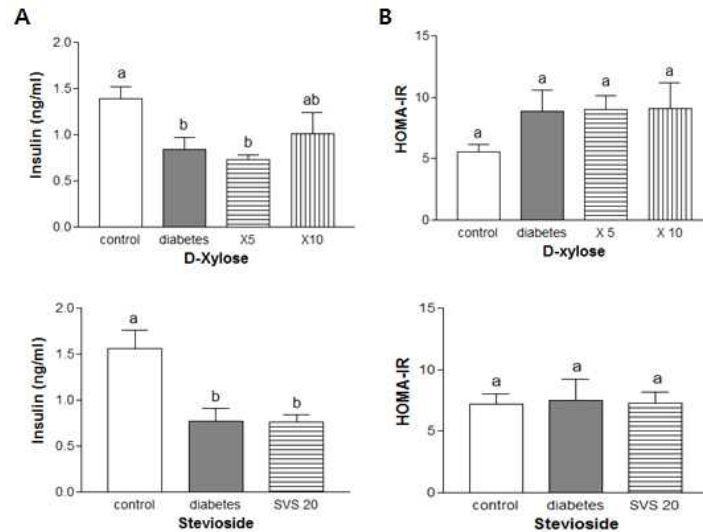


Fig. 8. Insulin secretion of the rats

Insulin secretion (A), HOMA-IR = fasting plasma insulin(ug/L) \* fasting blood glucose (mg/dl)/ 22.5 (B). Values shown are the mean  $\pm$  SEM. Different letters for given bars indicate that those values are significantly different from each other ( $P < 0.05$ ). X, D-xylose; SVS, Stevioside.

### (5) Organ weight

- D-xylose 5% 10%를 섭취한 군 모두, 모든 organ weight 유의적인 차이가 없었음.
- stevioside 20mg/kg b.w.를 섭취한 군의 pancreas의 무게가 유의적으로 증가한 것을 제외하고, 다른 organ에서 유의적인 차이가 없었음.

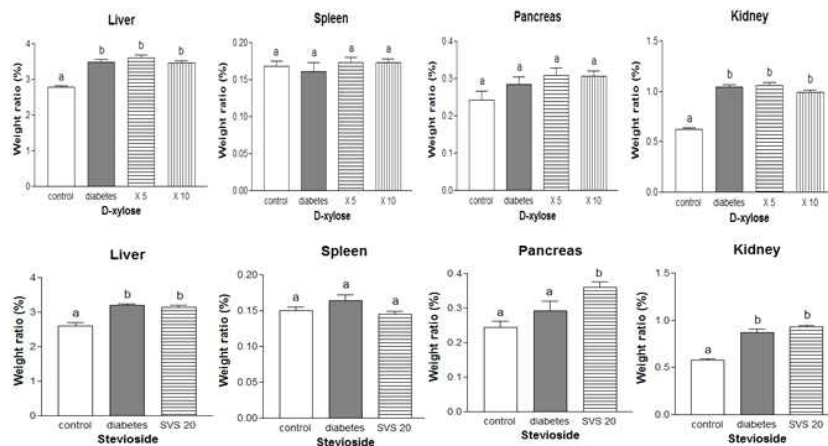


Fig. 9. Effect of D-xylose, stevioside on organ weight

Values shown are the mean  $\pm$  SEM. Different letters for given bars indicate that those values are significantly different from each other ( $P < 0.05$ ). X, D-xylose; SVS, Stevioside.

### (6) Blood analysis (red blood cell, white blood cell, hematocrit, HbA1c, hemoglobin, platelet)

- D-xylose 10%를 섭취한 군에서 red blood cell, hematocrit, hemoglobin level이 diabetes control 그룹에 비해 유의적으로 증가하였고, platelet은 dose에 따라 증가하는 경향을 보였음.

- Stevioside에서는 20mg/kg b.w.을 섭취한 군에서 당화혈색소인 HbA1c level이 diabetes control 그룹에 비해 유의적으로 감소하였으나, 다른 blood marker에서는 diabetes control과 차이를 보이지 않음.

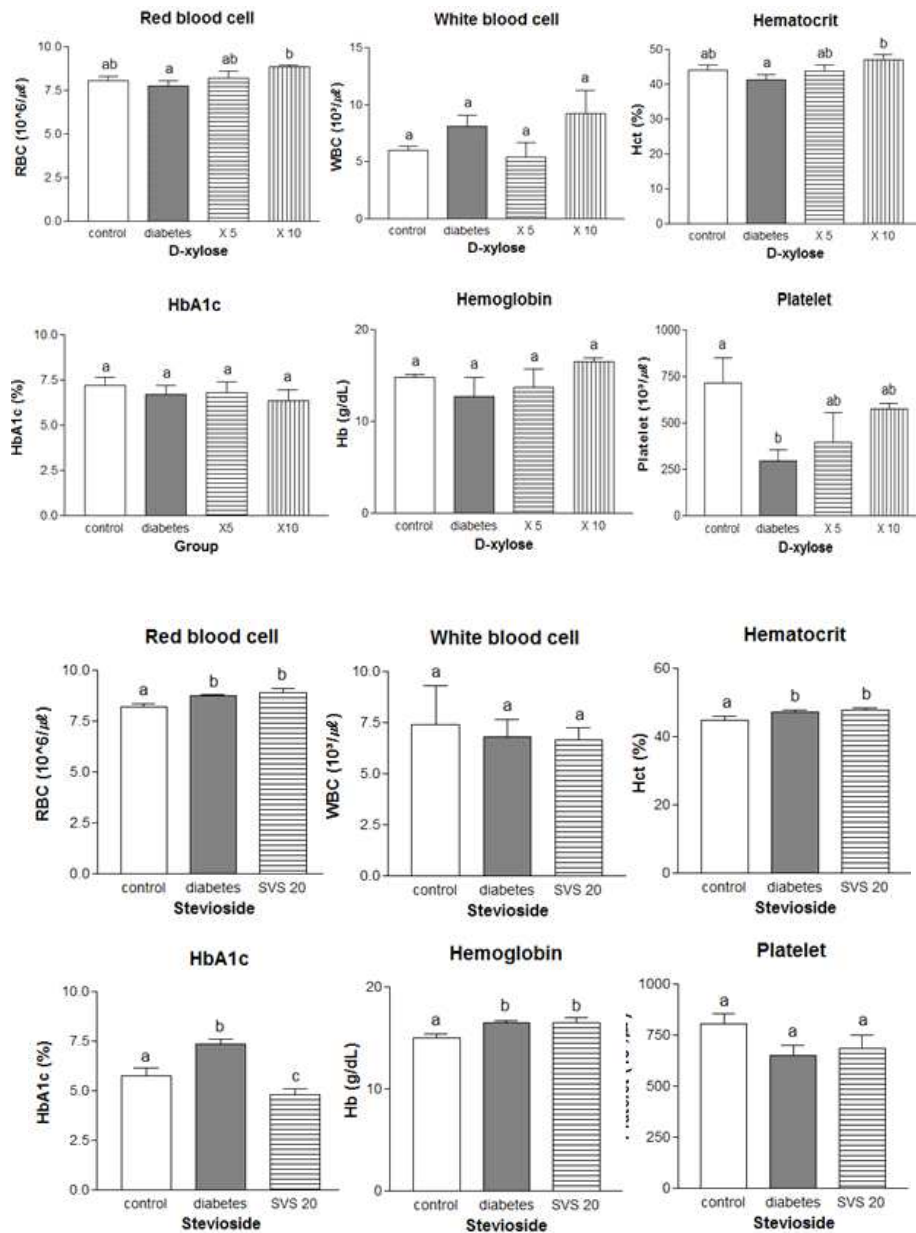


Fig. 10. Effect of D-xylose and steviode on concentration of red blood cell, white blood cell, hematocrit, HbA1c, hemoglobin, and platelet levels

Values shown are the mean  $\pm$  SEM. Different letters for given bars indicate that those values are significantly different from each other ( $P < 0.05$ ). X, D-xylose; SVS, Stevioside.

### (7) Total protein, total cholesterol, triglyceride level

- D-xylose의 경우 dose에 따라서 total protein이 증가하는 경향을 보였으며, triglyceride에서는 D-xylose 10%를 섭취한 군에서 증가하는 경향의 결과가 도출됨
- stevioside의 경우 stevioside 20mg/kg b.w.을 섭취한 군에서 total protein이 약간 증가하는 경향을 보였으나, total cholesterol, triglyceride level에는 차이를 보이지 않음.

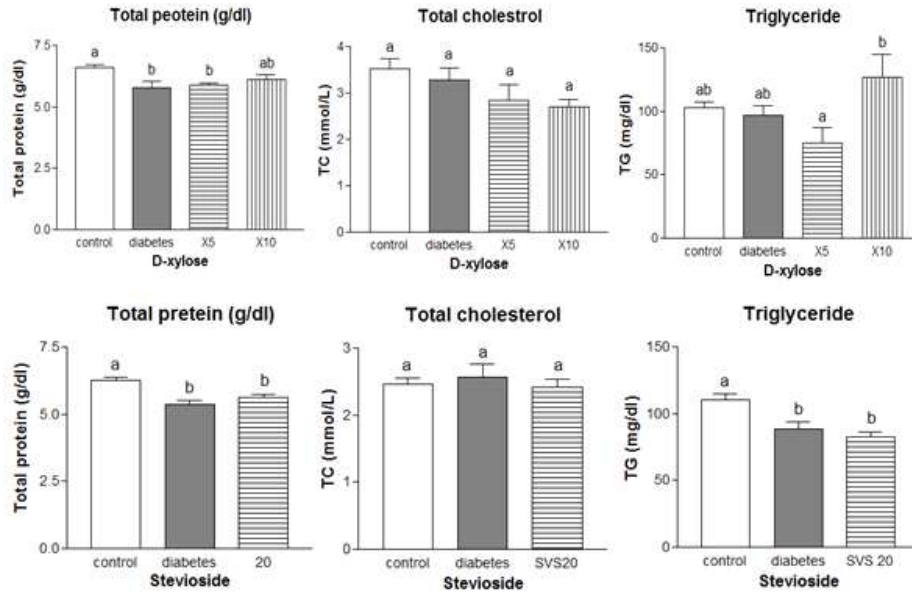


Fig. 11. Effect of D-xylose and stevioside on total protein, total cholesterol, and triglyceride

Values shown are the mean  $\pm$  SEM. Different letters for given bars indicate that those values are significantly different from each other ( $P < 0.05$ ). X, D-xylose; SVS, Stevioside.

### (8) Liver glycogen

- Diabetes을 유도한 군에서 liver glycogen의 함량이 떨어 질 것으로 기대했으나, D-xylose의 diabetes control 모두 유의적으로 감소하지 않았고, D-xylose 5%, 10%를 섭취한 군에서 모두 liver glycogen의 함량이 증가하는 경향을 보임
- Diabetes을 유도한 군에서 liver glycogen의 함량이 떨어 질 것으로 기대했으나, stevioside의 diabetes control 모두 유의적으로 감소하지 않았고, stevioside를 섭취한 군에서는 그룹간 차이가 없었음.

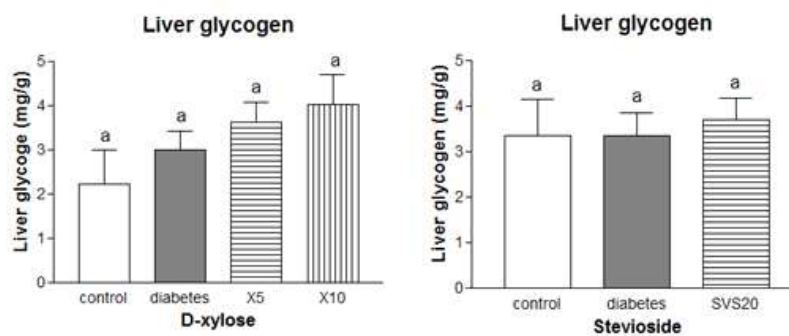


Fig. 12. Effect of D-xylose and stevioside on liver glycogen level

Values shown are the mean  $\pm$  SEM. Different letters for given bars indicate that those values are significantly different from each other ( $P < 0.05$ ). X, D-xylose; SVS, Stevioside.

### (9) PEPCK, GLUT4 levels

#### (가) PEPCK

- Diabetes이 유도된 rat에서 발현이 normal control에 비하여 유의적으로 증가한 것을 볼 수 있음. D-xylose 10%의 경우 diabetes control에 비하여 PEPCK의 발현이 감소한 경향을 보였으나 통계적으로는 유의하지 않았음.

- Diabetes이 유도된 rat에서 발현이 normal control에 비하여 유의적으로 증가한 것을 볼 수 있었으나, Stevioside 섭취는 영향을 미치지 않았음.

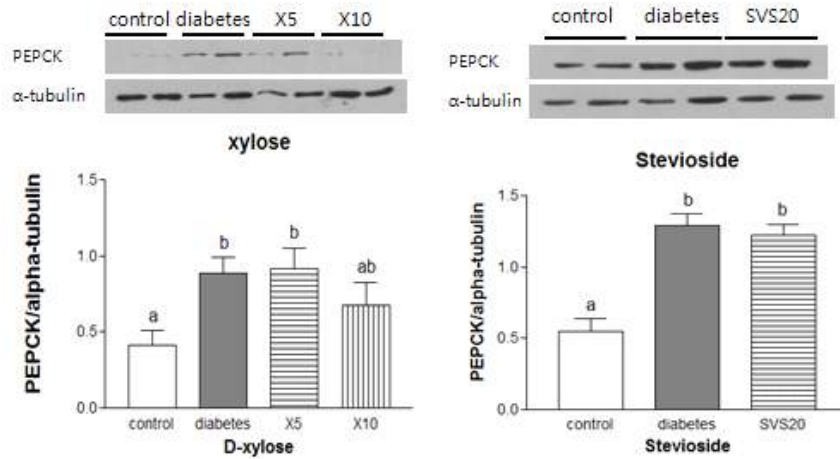


Fig. 13. The relative PEPCK expression in liver

Values shown are the mean  $\pm$  SEM. Different letters for given bars indicate that those values are significantly different from each other ( $P < 0.05$ ). X, D-xylose; SVS, Stevioside.

#### (나) GLUT4

diabetes control이 normal control에 비하여 발현이 연하게 나타날 것을 기대하였으나, diabetes에서 GLUT4의 단백질 발현이 더 증가하였고 D-xylose, stevioside에 의한 효과는 없었음.

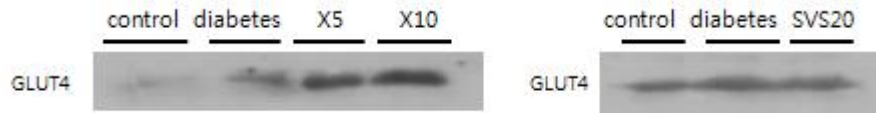


Fig. 14. The relative GLUT4 expression in muscle

Values shown are the mean  $\pm$  SEM. Different letters for given bars indicate that those values are significantly different from each other ( $P < 0.05$ ). X, D-xylose; SVS, Stevioside.

#### (10) Histopathological change in Pancreas

- Diabetes이 유도된 rat의 pancreas에서는 랑게르한스섬이 뚜렷하게 보이지 않고 파괴가 된 것을 관찰되었으나, D-xylose 를 섭취한 군에서 diabetes control과 비교하였을 때, 랑게르한스섬이 더 뚜렷하게 보이는 것을 볼 수 있음.
- Stevioside 20mg/kg b.w.을 투여한 군에서 diabetes control과 비교하였을 때, 랑게르한스섬이 더 뚜렷하게 보이는 것을 볼 수 있음.

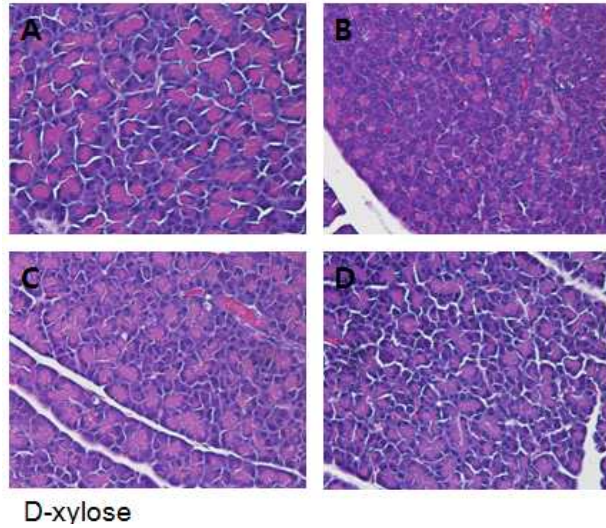


Fig. 15. Histopathological changes in pancreas (H&E staining, ×400)  
 (A) Normal control (B) Diabetes control (C) D-xylose 5 (D) D-xylose 10

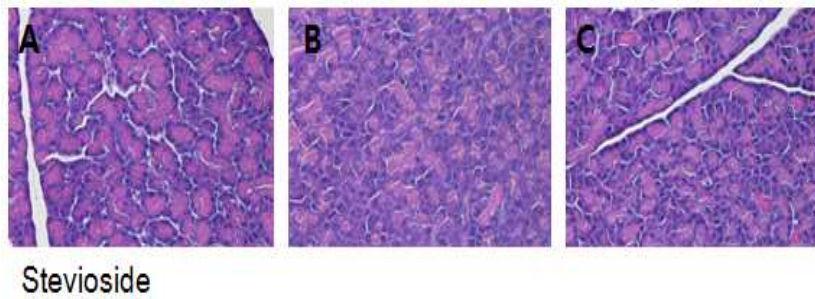


Fig. 16. Histopathological changes in pancreas (H&E staining, ×400)  
 (A) Normal control (B) Diabetes control (C) Stevioside 20

#### (11) Histopathological change in Liver

- Diabetes이 유도된 군에서 liver의 조직이 치밀하지 못하고 간세포가 조밀하지 않는 것을 확인하였으며, D-xylose 5%와 10%를 섭취한 군에서 diabetes control과 비교하였을 때, 간 조직이 치밀한 것을 볼 수 있으며 간세포가 잘 관찰됨.
- Stevioside 20mg/kg b.w.을 투여한 군에서 diabetes control과 비교하였을 때, 간 조직이 치밀한 것을 볼 수 있으며 간세포가 잘 관찰됨.



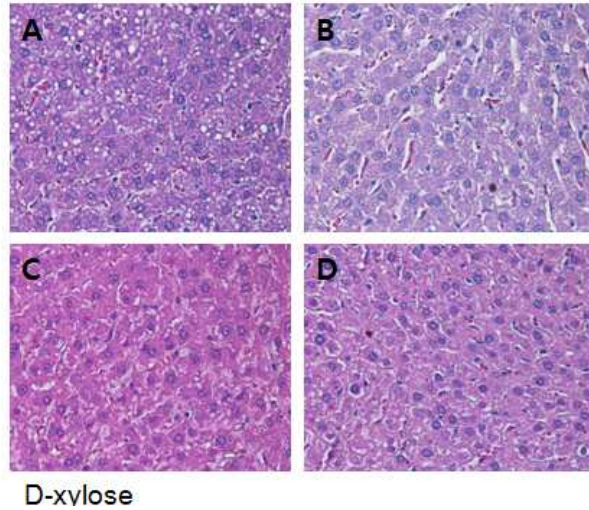


Fig. 17. Histopathological changes in liver (H&E staining, ×400)  
 (A) Normal control (B) Diabetes control (C) D-xylose 5 (D) D-xylose 10

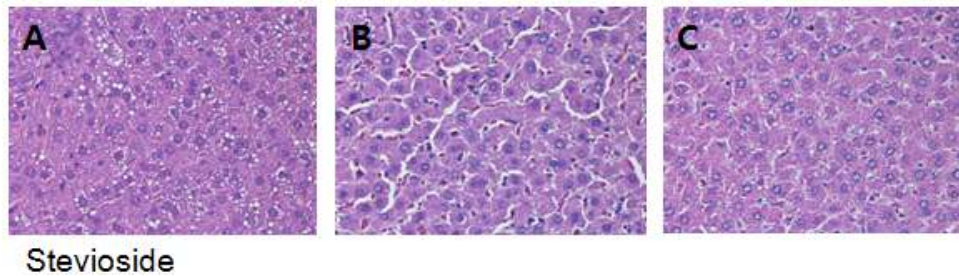


Fig. 18. Histopathological changes in liver (H&E staining, ×400)  
 (A) Normal control (B) Diabetes control (C) Stevioside 20

### 3. 천연감미료 및 설탕을 이용한 *in vitro*, *in vivo* 항비만 효과측정 위한 모델 개발 가. 실험방법

#### In vitro

##### (1) Oil red O staining 및 Lipid accumulation 측정

지방세포 전구체(Preadipocyte)인 3T3-L1 cell을 maintain하여 confluence 상태가 되면, Dexamethasone, isobutylmethylxanthine, insulin을 첨가하여 분화를 유도시킴. 8일간의 분화 maintain 후, 분화에 미치는 영향을 측정하기 위해 Oil Red O staining 후 microscopy로 측정된 지방세포의 크기와 개수를 비교하고, 염색된 지방을 isopropyl alcohol로 녹인 후 505nm에서 흡광도를 재서 lipid accumulation을 측정함.

##### (2) MTT assay

3T3-L1 세포에서 분화를 유도시킴과 동시에 Glucose 20mM의 5, 10, 20%를 D-xylose로 대체하여 처리함. 분화 2, 4, 6, 8일째 되는 날에 MTT assay를 통해 562nm에서 cell viability를 측정함.

### (3) ELISA (Enzyme-Linked Immunospecific Assay)를 통한 염증성 인자 측정

3T3-L1 세포를 분화 유도 후에 8일 동안의 maintain 기간을 거친 후 media에서 Immunospecific Assay(ELISA) kit를 이용하여 TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ 를 각각 측정함.

### (4) RT-PCR을 통한 mRNA 발현 측정

3T3-L1 세포에서 분화를 유도시킴과 동시에 D-xylose group 에서는 Glucose 20mM의 5, 10, 20%를 D-xylose로 처리하고, Stevioside group에서는 Glucose 20mM 대신 1, 3, 10 $\mu$ M을 처리함. 분화 maintain 8일 후 RNA를 분리하여 지방세포 분화에 결정적인 역할을 하는 PPAR $\gamma$ , SREBP-1C, C/EBP $\alpha$ 의 변화와 PPAR $\gamma$ , C/EBP $\alpha$ 의 타겟 유전자인 FAS, ACC1의 유전자 발현을 RT-PCR을 통해 측정함. GAPDH를 loading control로 사용함.

### (5) Western blotting을 통한 protein 발현 측정

3T3-L1 세포에서 분화를 유도시킴과 동시에 D-Xylose group 에서는 Glucose 20mM의 5, 10, 20%를 D-xlose로 처리하고, Stevioside group에서는 Glucose 20mM 대신 1, 3, 10 $\mu$ M을 처리함. 분화 maintain 8일 후 Lysate를 만들어 지방세포분화를 촉진하는 Akt, mTOR, c-Raf signaling pathway가 D-xlose와 Stevioside가 어떻게 타겟하는지 보기 위하여 Akt, mTOR, c-Raf의 발현변화를 Western blotting으로 측정함.

## In vivo

### (1) 비만유도 및 실험그룹

5주령이 된 C57BL/6 마우스를 60% 고지방 식이를 먹여 비만을 유도하고, 12주간의 실험 기간 동안 D-xylose group은 HFD (High Fat Diet)에서 총 sugar 양의 5%, 10%의 D-Xylose를 대체하여 공급하고 stevioside group은 각각 stevioside를 10, 20mg/kg b.w을 gavage를 통해 공급함.

#### \* D-xylose groups

Group I : normal (93G control diet)

Group II : high fat diet (HFD, 60% high fat)

Group III : X 5 (xylose replaced by 5% of total sucrose in HFD)

Group IV : X 10 (xylose replaced by 10% of total sucrose in HFD)

#### \* Stevioside groups

Group I : normal (93G control diet)

Group II : high fat diet (HFD, 60% high fat)

Group III : SVS 20 (HFD with stevioside 20mg/kg b.w. by gavage)

### (2) 체중 측정 식이효율 계산 및 혈당 측정

12주의 실험기간을 거친 뒤 최종 몸무게와 총 식이 섭취량을 측정하여 식이 효율(FER; Food Efficiency Ratio, Body weight gain(g)/Food intake(g) \* 100)을 산출하고, overnight fasting 후 혈당을 측정함.

### (3) 마우스의 지방조직 및 간 조직 무게 측정

D-xylose 또는 Stevioside를 공급한 마우스에서 부고환지방(epididymal adipose tissue), 피하지방(subcutaneous adipose tissue), 내장지방(visceral adipose tissue) 및 간 조직을 분리하여 무게를 측정함.

### (4) serum Leptin 측정

D-xylose, Stevioside group을 해부 시 혈액을 채취하여, 4°C, 3000rpm에서 15분간 원심분리하여 - serum을 분리한 후, ELISA(Enzyme-Linked Immunospecific Assay)를 통해 leptin을 측정함.

### (5) 마우스 간의 histopathology 관찰

마우스 희생 시 분리한 간 조직을 4% 포르말린에 고정시킨 후, 파라핀 embedding으로 슬라이드를 만들어 H&E staining을 함.

### (6) RT-PCR을 통한 지방조직의 mRNA 발현 측정

D-xylose group 마우스의 내장지방과 피하지방 및 Stevioside group마우스의 피하지방 조직에서 RNA를 분리하여 SREBP-1C, C/EBP $\alpha$ , PPAR $\gamma$  mRNA의 발현을 RT-PCR을 통해 측정함.

## 나. 실험결과

### In vitro

#### (1) D-xylose 또는 Stevioside가 지방세포 전구체(preadipocyte)의 분화에 미치는 영향

- Glucose 20mM 처리시 3T3 L1 지방 전구세포의 분화가 유의적으로 증가하였으며, Glucose 20mM의 5% 를 D-xylose로 대체하였을 때, lipid accumulation 감소의 경향은 보이나 유의적이지 않았음. 그러나, D-xylose를 10%, 20% 대체했을 때에는 유의적인 감소를 보임 (Fig. 21A,  $p < 0.001$ ).
- Stevioside가 분화에 미치는 영향을 관찰하기 위하여 분화 유도과 동시에 Glucose 20mM 대신 1, 3, 10 $\mu$ M을 처리한 후, 8일 후 Oil red O staining을 하여 지방세포의 크기와 개수를 비교한 결과, stevioside를 1, 3, 10 $\mu$ M 처리했을 때 Glucose 20mM에서보다 Lipid accumulation이 유의적으로 감소함을 관찰할 수 있었음 (Fig. 21B,  $p < 0.001$ ).



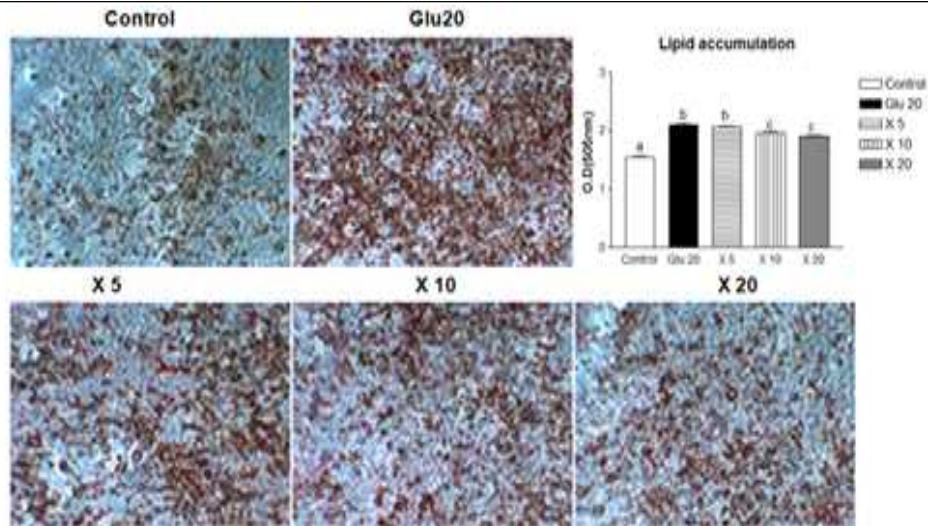
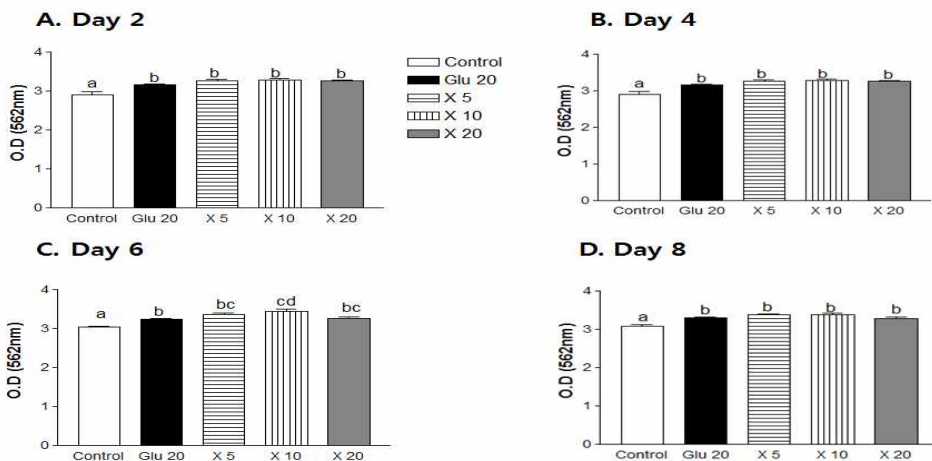


Fig. 21. D-xylose and Stevioside reduced lipid accumulation on 3T3-L1 cells during differentiation

(A) 3T3-L1 cells were cultured in 6-well plates and treated with D-Xylose 5%, 10%, 20% of Glucose 20mM. (B) 3T3-L1 cells were cultured in 6-well plates and treated with stevioside 1, 3, 10 $\mu$ M. Differentiated cells were stained and imaged using microscopy. Lipid accumulation was measured at 505 nm. *P*-value was less than 0.01 performed by One-way ANOVA. X, D-xylose; SVS, Stevioside.

(2) D-xylose와 treat함으로써 지방세포 전구체(preadipocyte)의 분화과정의 viability에 미치는 영향

- Glucose 20mM의 5, 10, 20%를 D-xylose로 대체하여 처리했을 때, 분화 2, 4, 6, 8일째에서 D-Xylose를 대체하여 처리한 농도에서는 Control과 Glucose 20mM과 비교하였을 때 Day 2, Day 6에서는 cell viability가 유의적으로 증가하였으나(Fig. 2A, 2C), Day 4, Day 8에서는 비슷한 수준의 cell viability를 보임(Fig. 22B, 2D). 따라서 본 실험에 이용된 dose에서는 독성이 없음을 알 수 있었음.



(A) 3T3-L1 cells were cultured in 6-well plates and treated with D-Xylose 5%, 10%, 20% of Glucose 20mM. (B) 3T3-L1 cells were cultured in 6-well plates and treated with stevioside 1, 3, 10 $\mu$ M. Differentiated cells were stained and imaged using microscopy.

Lipid accumulation was measured at 505 nm. *P*-value was less than 0.01 performed by One-way ANOVA. X : D-xylose, SVS : Stevioside.

**(3) D-xylose 또는 Stevioside가 지방세포가 분화를 함으로써 염증성 인자인 TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  변화에 미치는 영향**

- 3T3-L1 세포를 분화 유도 후에 8일 동안의 maintain 기간을 거친 다음 media에서 TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ 를 각각 측정하였으나 D-xylose, stevioside group의 모든 dose에서 TNF- $\alpha$ , IL-1이 나타나지 않아 차이를 볼 수 없었음 (data not shown).

**(4) D-xylose 또는 Stevioside가 항비만 유전적 기전에 미치는 영향**

- D-xylose group과 Stevioside group 모두 PPAR $\gamma$ , SREBP-1C, C/EBP $\alpha$ , FAS, ACC1 유전자 발현의 변화에 영향이 없었음 (Fig. 23).

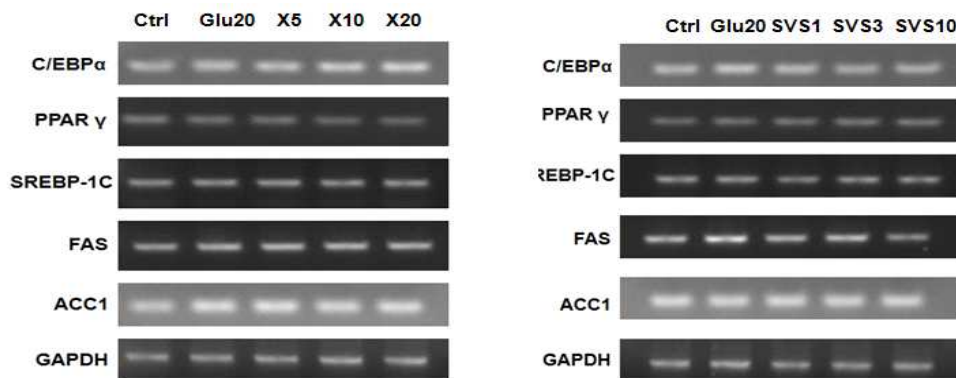
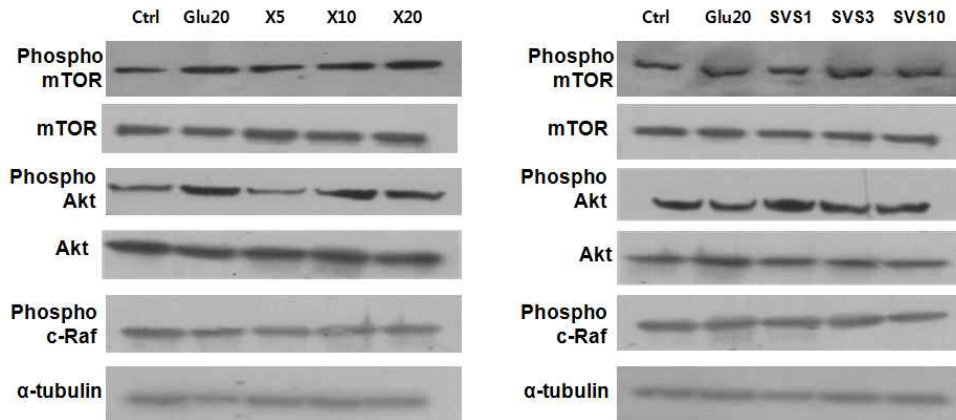


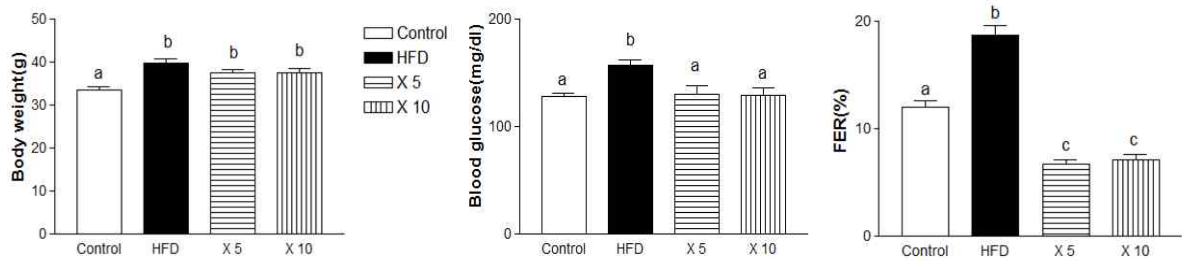
Fig. 23. Effect of D-xylose and stevioside on mRNA expressions of C/EBP $\alpha$ , PPAR $\gamma$ , SREBP-1C, FAS and ACC1 in 3T3-L1.

mRNA levels of C/EBP $\alpha$ , PPAR $\gamma$ , SREBP-1C, FAS and ACC1 were measured by RT-PCR using GAPDH as a loading control .Ctrl, Control; Glu 20, Glucose 20mM; X, D-xylose; SVS, Stevioside.

- D-xylose group과 stevioside group 모두에서 Akt, Phospho-Akt, mTOR, Phospho-mTOR, Phospho-c-Raf 각각 단백질 발현에 차이가 없었음 (Fig. 24).



### A. D-Xylose



### B. Stevioside

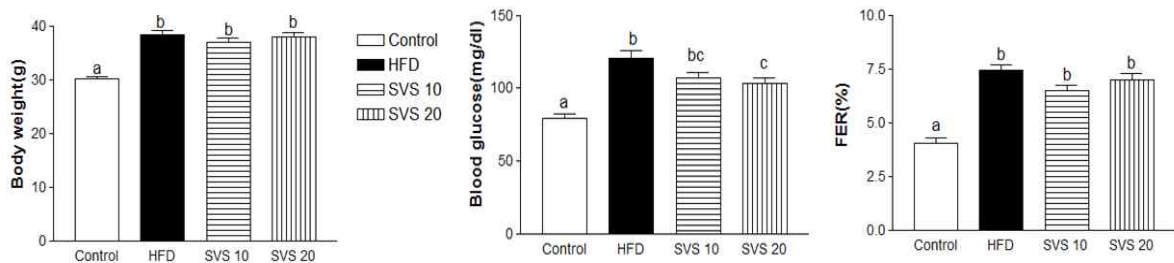


Fig. 25. Effect of D-xylose and stevioside on the changes of body weight, blood glucose, and FER (Food Efficiency Ratio) in high-fat induced obese mice

Values shown are the mean  $\pm$  SEM. Different letters for given bars indicate that those values are significantly different from each other ( $P < 0.05$ ). HFD, High Fat Diet; X, D-xylose; SVS, Stevioside.

### (5) D-xylose 또는 Stevioside가 비만유도가 된 마우스의 지방조직 및 간조직의 무게에 미치는 영향

- D-xylose를 공급한 마우스에서는 부고환지방의 무게에서는 고지방식이를 공급한 마우스에 비해 감소를 보이지 않았으나 피하지방과 내장지방의 무게에서는 유의적인 감소 효과를 보임 (Fig. 26A).

- Stevioside를 공급한 마우스에서는 부고환지방, 내장지방의 무게에서는 고지방식이를 공급한 마우스에 비해 감소를 보이지 않았으나, 피하지방 무게에서는 stevioside를 10mg/kg b.w를 공급한 마우스에서 유의적으로 감소를 보였으나( $p < 0.001$ ), stevioside를 20mg/kg b.w를 공급한 마우스에서는 경향은 보이나 유의적으로 감소를 보이지 않음(Fig. 26B). 간 조직 무게는 D-xylose, stevioside group 모두에서 차이가 없었음(Fig. 26C, 26D).

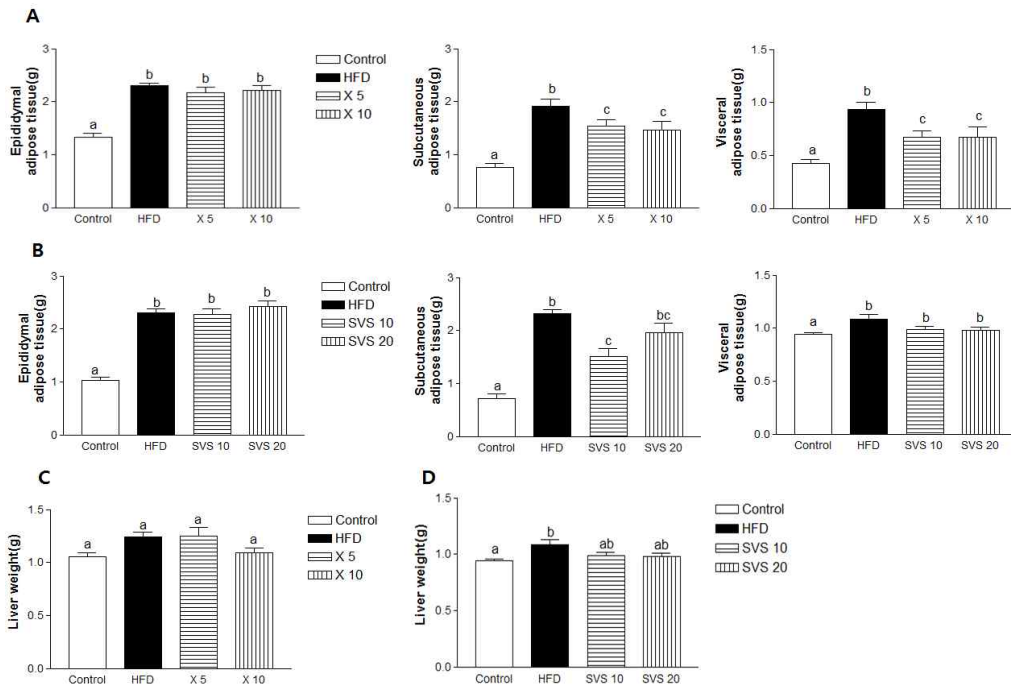


Fig. 26. Effects of D-xylose and Stevioside on adipose tissue mass and liver weight.

(A) Changes of adipose tissue weight in the mice fed high fat diet with D-xylose 5%, 10%. (B) Changes of adipose tissue mass in the mice gavaged SVS 10, 20mg/kg b.w. (C, D) Changes of liver weight in the mice in both D-xylose and stevioside group. HFD, High Fat Diet; X, D-xylose; SVS, Stevioside. B.

Values shown are the mean  $\pm$  SEM. Different letters for given bars indicate that those values are significantly different from each other ( $P < 0.05$ ).

### (6) D-xylose 또는 Stevioside가 비만유도가 된 마우스의 혈장 Leptin에 미치는 영향

- D-xylose, Stevioside group의 마우스 혈청에서 leptin 수준을 측정된 결과, D-xylose group, stevioside group에서 HFD를 공급한 마우스에서는 Control에 비해 leptin 수준이 유의적으로 증가하였으나( $p < 0.001$ ), D-Xylose 또는 stevioside를 공급한 모두 leptin 수준에 차이를 보이지 않음 (Fig. 27A, B).

Fig. 27. Effects of D-xylose and Stevioside on plasma leptin levels.

Values shown are the mean  $\pm$  SEM. Different letters for given bars indicate that those values are significantly different from each other ( $P < 0.05$ ). HFD, High Fat Diet; X, D-xylose; SVS, Stevioside.

### (7) D-xylose 또는 stevioside가 마우스 간조직의 histopathology에 미치는 영향

- D-xylose와 stevioside를 공급한 마우스의 간 조직에서는 고지방식이에 비해 간 조직에 있는 지방이 감소하였으며, D-Xylose를 공급한 마우스에서는 용량의존적인 감소를 보임 (Fig. 28, 29).

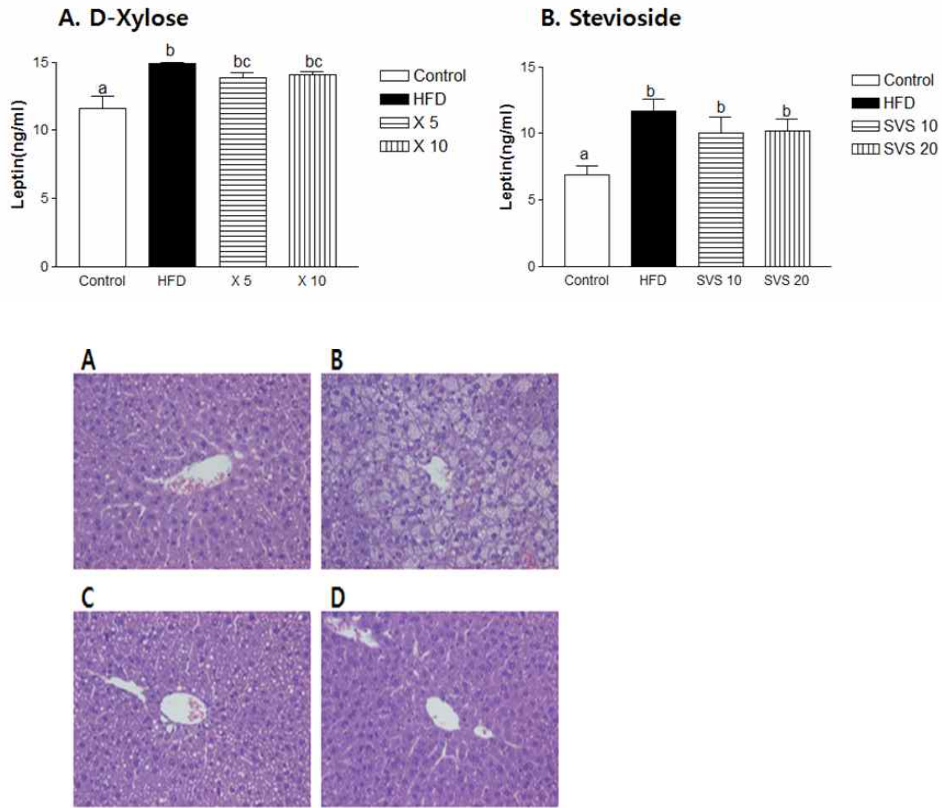


Fig. 28. Effect of D-xylose on histopathology in mouse livers.

(A) Control diet, (B) High-fat diet (HFD), (C) HFD + D-xylose (5%), (D) HFD + D-xylose (10%). H&E staining (400x).

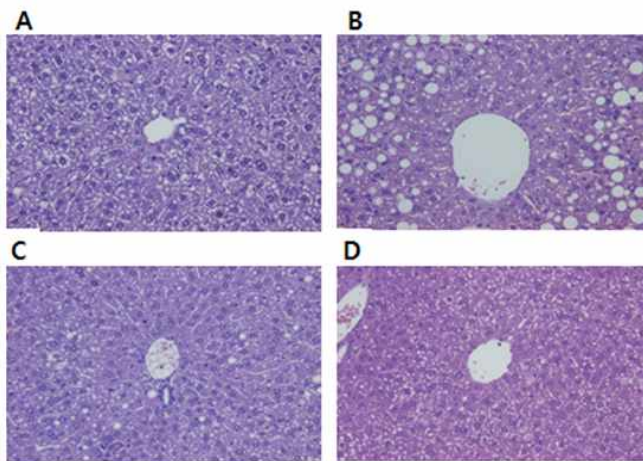


Fig. 29. Histopathologically changed feature by stevioside in mouse livers

(A) Control diet, (B) High-fat diet (HFD), (C) HFD + stevioside (10 mg), (D) HFD + stevioside (20 mg). H&E staining (400x).



(8) D-xylose 또는 stevioside가 비만유도가 된 마우스의 지방조직의 유전적 발현에 미치는 영향

- D-xylose group에서는 피하지방과 내장지방에서 RNA를 분리하여 mRNA의 발현을 측정 한 결과, D-xylose를 공급한 마우스의 내장지방에서 SREBP-1C, C/EBP $\alpha$ , FAS의 mRNA의 발현이 고지방식을 공급한 마우스의 내장지방에서의 mRNA 발현보다 유의적으로 감소(Fig. 30B-D)하였으나, 피하지방에서는 SREBP-1C, C/EBP $\alpha$ , PPAR $\gamma$  mRNA의 발현에서는 감소효과를 보이지 않음 (Fig 31A).
- Stevioside group에서는 마우스의 피하지방에서 RNA를 분리하여 mRNA의 발현을 측정하였으나, stevioside에 의한 PPAR $\gamma$ , SREBP-1C, C/EBP $\alpha$  mRNA 발현의 차이가 없었음 (Fig 31B).

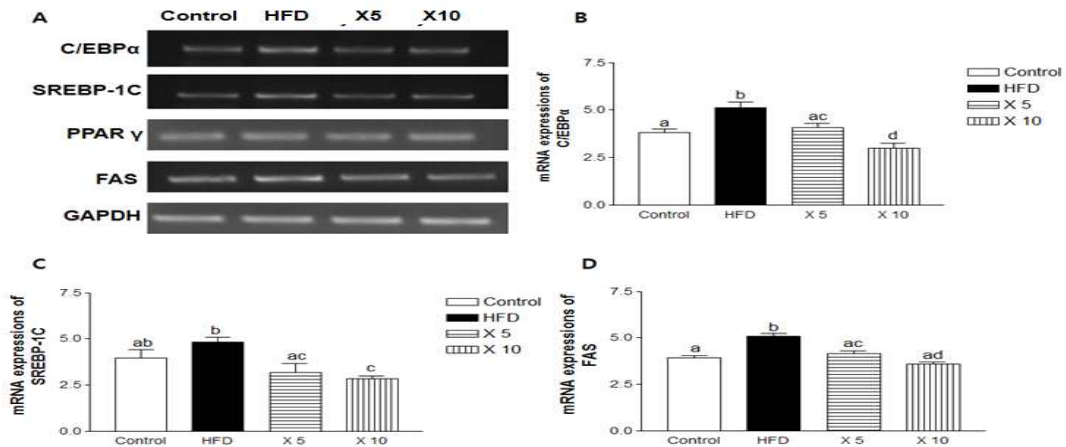


Fig. 30. D-xylose down-regulates mRNA expression of C/EBP $\alpha$ , SREBP-1C, PPAR $\gamma$ , and FAS in high fat-induced obese mice.

(A) Representative blots of C/EBP $\alpha$ , SREBP-1C, PPAR $\gamma$ , and FAS expression. (B, C, D) Each figure shows mRNA expressions of C/EBP $\alpha$ , SREBP-1C, FAS detected by RT-PCR. GAPDH was used as a loading control. Values shown are the mean  $\pm$  SEM. Different letters for given bars indicate that those values are significantly different from each other ( $P < 0.05$ ). HFD, High Fat Diet; X, D-xylose; SVS, Stevioside.

4. 천연감미료 및 설탕을 이용한 in vitro 항바이러스 효과측정 위한 모델 개발  
가. 실험방법

(1) CVB3에서의 glucoes, D-xylose, stevioside가 cell viability에 미치는 영향

실험물질의 세포독성 측정을 위해 vero cell의 세포 단층에 바이러스 (coxackievirus B3, CVB3)를 접종시킨 다음 다양한 농도의 glucose, D-xylose, stevioside를 well에 분주하여 배양하고 MTT assay로 cell viability을 측정함.

(2) 항바이러스 활성을 sulforhodamine B (SRB) 염색방법으로 측정

Vero cell의 세포 단층에 바이러스 (coxackievirus B3, CVB3)를 접종시킨 다음 glucose, D-xylose, stevioside 을 첨가하여 바이러스의 세포 독성 변화를 sulforhodamine B (SRB) 염색방법으로 측정함.

나. 실험결과

(1) CVB3에서의 glucose, D-xylose, stevioside가 cell viability에 미치는 영향

- Glucose의 처리에 의한 차이가 없었고 D-xylose 처리 시 가장 낮은 dose에서 cell viability가 증가하는 경향을 보여, 독성이 없음을 확인함.
- Stevioside 처리 시 가장 낮은 dose에서 cell viability가 증가하는 경향을 보여 독성이 없음을 확인함

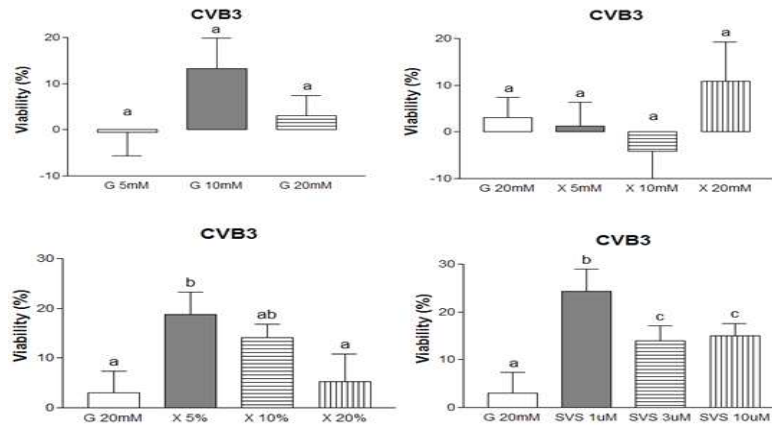


Fig. 19. Effect of glucose, D-xylose and stevioside on viability of vero cells

Values shown are the mean  $\pm$  SEM. Different letters for given bars indicate that those values are significantly different from each other ( $P < 0.05$ ). ctrl : control , G : glucose, X : D-xylose, SVS : Stevioside.

(2) 항바이러스 활성을 sulforhodamine B (SRB) 염색방법으로 측정

- D-xylose는 항바이러스 활성에 대한 효과를 나타내지 않았음
- Stevioside의 처리에 따른 세포 독성 변화가 통계적으로 유의미한 수준으로 나타나지 않았음

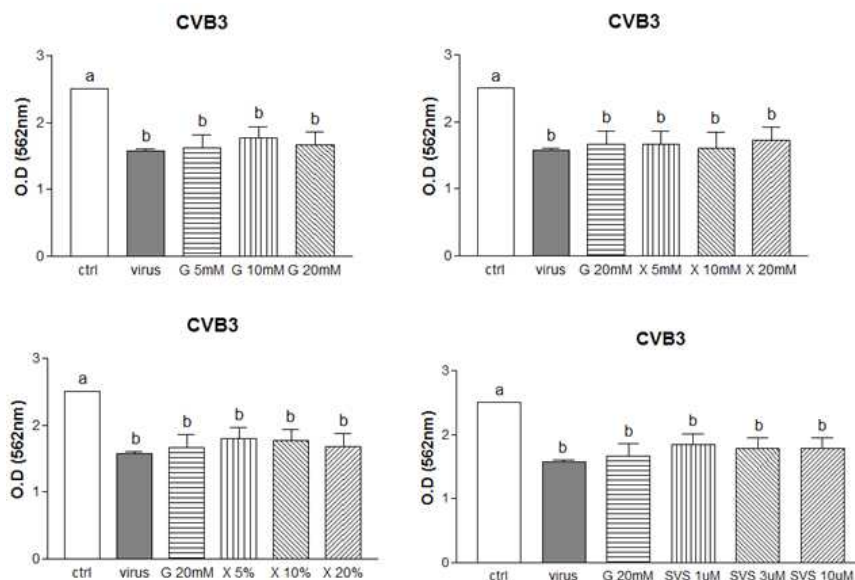


Fig. 20. An antiviral effect of D-xylose and stevioside on CVB3 cells was measured using SRB

Values shown are the mean  $\pm$  SEM. Different letters for given bars indicate that those values are significantly different from each other ( $P < 0.05$ ). ctrl : control, G : glucose, X : D-xylose, SVS : Stevioside.

#### 4. Xylobiose와 phyllodulcin의 in vitro, in vivo 항당뇨 기능성 평가

##### 가. 실험방법

###### In vitro

- Xylobiose는 glucose와 함께 treat하는 보완제로서의 in vitro 세포 성장에 필요한 medium의 농도인 glucose 20mM 기준으로 하여 glucose를 xylobiose로 5%, 10%를 대체했을 때의 효과를 평가함.
- Phyllodulcin의 경우는 glucose를 대체할 수 있는 단독 물질로서 Phyllodulcin은 단독으로 1uM, 3uM, 10uM treat 하였을 때의 효과를 평가함.

##### (1) MTT를 이용한 cell viability 측정 및 비교

C2C12 skeletal muscle cell과 INS-1 rat insulinoma pancreatic  $\beta$  cell에서 여러 농도의 xylobiose 또는 phyllodulcin treat함. treat 후에 cell viability를 MTT를 이용하여 측정하고 시료독성을 평가함.

##### (2) 근육세포(C2C12) 분화 후, glucose uptake 측정 및 비교

C2C12 skeletal muscle cell을 100% confluence에서 horse serum 4%가 첨가된 분화 media로 change 후 6일 동안 분화시킴. 2-NBDG 20uM을 treat하여 glucose uptake를 fluorometer를 이용하여 측정하고, insulin 100nM을 기준으로 xylobiose를 glucose 20mM의 각각 5%, 10% 대체하여 treat 그리고 phyllodulcin을 glucose 20mM 대신 1, 3, 10 uM로 treat 했을 때의 glucose uptake의 증감을 관찰함.

##### (3) 췌장세포(INS-1)에서의 insulin 분비 측정 및 비교

INS-1 rat insulinoma pancreatic  $\beta$  cell에서 insulin level을 여러 농도의 xylobiose를 glucose 20mM의 각각 5%, 10% 대체하여 treat 그리고 phyllodulcin을 glucose 20mM 대신 1, 3, 10 uM로 treat시에 얼마나 증가하는지 ELISA kit를 이용하여 측정하고 인슐린 분비 측진이 제일 잘 되는 농도를 확인함.

##### (4) macrophage cell(Raw 264.7)에서 NO 생성 측정

Raw 264.7 murine macrophage cell에서 macrophage의 중요한 기능중의 하나인 phagocytosis와 관련된 활성측정의 한 방법으로 Raw 264.7에 xylobiose를 glucose 20mM의 각각 5%, 10% 대체하여 treat 그리고 phyllodulcin을 glucose 20mM 대신 1, 3, 10 uM로 treat함. 그리고 그 media를 100ul 따서 Griess reagent 100ul를 넣어준 다음 5분 뒤 560nm의 흡광도로 값을 읽어줌.



(5) RT-PCR을 이용하여 대식세포(Raw 264.7)에서 pro-inflammatory cytokine의 발현 측정 및 비교

Raw 264.7 macrophage cell에서 Glucose 20mM에서 5, 10%를 xylobiose로 대체하고, phyllodulcin group에서는 Glucose 20mM 대신 1, 3, 10 $\mu$ M을 처리함. RNA를 분리하여 pro-inflammatory cytokine인 IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ 의 발현을 RT-PCR을 통해 측정함. Loading control로는 GAPDH가 사용됨

***In vivo***

- C57BL/6J (normal control)와 C57BL6KS/J-db/db mouse model을 이용하고, AIN 93G diet를 control 식이로 하여 실험을 실시함. 1차년도에 당뇨의 효과가 있음이 검증된 D-xylose와 stevioside를 xylobiose와 phyllodulcin group 내에서 각각 positive control로 하였음. 그리고 실험 기간인 6주 동안 D-xylose, xylobiose 그리고 4주 동안 stevioside와 phyllodulcin을 공급함.
- **Xylobiose group**에는 AIN 93G 식이의 성분 중 D-xylose를 사용하여 sucrose 함량에서 10%를 대체한 식이를 group III인 Xylo 그룹에 공급하였으며, xylobiose를 사용하여 AIN 93G 식이의 성분인 sucrose 함량에서 각각 5%, 10%를 대체한 식이를 각각의 group IV인 XB 5그룹과 group V인 XB 10그룹에 공급하였음.
- **Phyllodulcin group**에서는 AIN 93G 식이를 공급하고 group III인 SVS 20에는 stevioside 20mg/kg b.w., group IV인 P 10, group V인 P 20에는 각각 phyllodulcin 10, 20mg/kg b.w.을 gavage로 투여함

▷ **Xylobiose groups (treated for 6 weeks)**

Group I : Normal control (AIN 93G diet)

Group II : db/db mouse - Diabetes control (AIN 93G diet)

Group III : db/db mouse - Xylo (D-xylose replaced by 10% of total sucrose in the diet)

Group IV : db/db mouse - XB 5 (xylobiose replaced by 5% of total sucrose in the diet)

Group V : db/db mouse - XB 10 (xylobiose replaced by 10% of total sucrose in the diet)

▷ **Phyllodulcin groups (treated for 4 weeks)**

Group I : Normal control (AIN 93G diet)

Group II : db/db mouse - Diabetes control (AIN 93G diet)

Group III : db/db mouse - SVS 20 (AIN 93G diet and stevioside 20mg/kg b.w. by gavage)

Group IV : db/db mouse - P 10 (AIN 93G diet and phyllodulcin 10mg/kg b.w. by gavage)

Group V : db/db mouse - P 20 (AIN 93G diet and phyllodulcin 20mg/kg b.w. by gavage)

**(1) 제 2형 당뇨 모델인 db/db mouse의 체중변화와 식이 및 수분 섭취량 변화**

db/db mouse의 적응 기간이 끝나고 실험 시작부터 실험 종료 시점인 4~6주 .후까지 1주에 2회씩 체중변화와 식이 및 수분 섭취량 변화를 측정하여 각 그룹 간의 차이를 비교함.

**(2) Organ weight**

db/db mouse 희생 시 liver, pancreas, spleen, kidney을 적출하여 PBS로 혈액을 제거한 후, 무게를 측정함. xylobiose, phyllodulcin를 섭취한 그룹들과 diabetes control과의 장기 무게 차이를 비교함.

**(3) Fasting blood glucose**

공복혈당은 db/db mouse를 12시간 절식시킨 후, 꼬리정맥에서 혈액을 채혈한 다음 혈당 측정기(Accucheck, Germany)를 이용하여 측정함.

**(4) Oral Glucose Tolerance Test (OGTT)**

Xylobiose와 phyllodulcin 섭취가 db/db mouse model의 내당능에 미치는 영향을 알아보기, glucose 1g/kg b.w.을 경구투여 후 0, 30, 60, 90, 120분 후 꼬리정맥에서 혈액을 채혈 후 glucose level을 측정함. 측정된 glucose level을 이용하여 그래프 면적의 값인 AUC (Area under the curve)를 각 그룹 간에 비교함.

**(5) Insulin 측정 및 HOMA-IR 평가**

Xylobiose와 phyllodulcin의 섭취가 db/db mouse의 insulin 분비에 미치는 영향을 살피고자 혈액 sample을 원심 분리하여 plasma를 얻은 후 ELISA kit를 이용하여 insulin 양을 측정함. Insulin은 골격근의 포도당 섭취 뿐 아니라 당과 관련된 에너지 대사에 중요한 역할을 하는 호르몬임. HOMA-IR은 인슐린 저항성을 살펴볼 수 있는 지표로 계산식은 아래와 같으며,

$$\text{HOMA-IR} = [\text{Fasting plasma insulin } (\mu\text{g/L}) \times \text{Fasting blood glucose (mg/dL)}] / 22$$

#### **(6) Whole blood analysis (HbA1c, Hemoglobin A1c)**

Xylobiose와 phylloidalin을 섭취한 후, 나타나는 HbA1c 변화를 측정함. HbA1c는 당화혈색소로 혈액 속에서 산소 운반의 역할을 하는 적혈구 속 혈색소가 얼마나 당화되었는지 확인하는 지표임. 마우스에서 적출한 혈액을 EDTA tube 옮긴 후, 그 중 일부를 따서 -80°C에 보관함. HbA1c는 Mouse Hemoglobin A1c Assay Kit (Crystal Chem, IL, USA)를 이용하여 측정하였음.

#### **(7) Plasma GOT and GPT**

Xylobiose와 phylloidalin을 섭취한 후, 나타나는 GOT와 GPT의 변화를 측정함. 아산제약의 GOT, GPT kit (Asan Pharmaceutical, Seoul, Korea)를 사용하여 GOT와 GPT는 간의 손상이 증가했을 때 배출이 증가되어 혈액 중의 수치가 증가하며, 간의 독성을 평가할 수 있는 지표임.

#### **(8) Plasma total protein and lipid analysis (total protein, TG, TC, LDL-C, HDL-C)**

Triglyceride, total cholesterol, HDL-cholesterol은 아산제약의 kit를 사용하여 instruction 대로 수행함. LDL-cholesterol은 'Friedewald formula' (Clin chem, 18(6):499-502, 1972)를 이용하여 값을 산출함. 계산식은 아래와 같음. Total protein은 buret protein determination방법을 이용하여 plasma에서의 level을 측정하였음.

$$\text{LDL-C} = \text{TC} - \text{HDL-C} - \text{TG}/5$$

#### **(9) Liver glycogen 분석**

간 조직 10mg을 추출한 후 glycogen assay kit (Abcam, Cambridge, UK)를 이용하여 liver에 있는 glycogen의 함량을 측정함. Liver glycogen의 함량이 높다는 것은 혈중에 있는 glucose가 glycogen으로 전환되어 liver에 저장된다는 것으로, 이는 혈중 glucose의 농도 조절이 보다 효과적으로 이루어진다고 판단할 수 있음.

#### **(10) 췌장조직에서의 Histopathological change와 insulin 발현 분석**

Mouse 희생 시 췌장을 PBS로 씻어 혈액을 제거한 후, 10% 포르말린 용액에 담가 보관함. 파라핀블록을 제작한 후 H&E staining을 하여 장기별 병리조직학적 변화를 현미경을 통하여 관찰함. db/db model에서는 췌장조직에서 많은 수의 선세포 (acini cell)가 모여 하나의 공 형태를 이루는 랑게르한스섬 (islet of Langerhans)의 개수가 많이 관찰되며,  $\beta$ -cell의 개수도 많이 관찰되는 것을 볼 수 있음. 췌장 조직으로 empty slide를 만든 후, insulin antibody를 이용하여 췌장  $\beta$  cell의 insulin만 염색함. 염색된 부분이 진하면 insulin 단백질의 발현이 췌장조직에서 많이 나타난 것임.

### (11) 간조직에서의 Histopathological change

장기별 병리조직학적 변화를 H&E staining으로 관찰함. 정상군의 경우 비교적 크기가 크고 하나 또는 두 개의 소포형태를 띠는 핵을 가진 다각형 (polygonal)의 간세포가 잘 관찰되고 간 조직이 치밀한 것을 볼 수 있음.

### (12) 간조직에서 PEPCK와 근육조직에서 GLUT4의 단백질 발현분석

Western blotting을 통하여 시트르산회로에서 당신생의 중요한 단계를 촉매하는 효소인 phosphoenol pyruvate carboxykinase (PEPCK)의 발현을 간 조직에서 관찰하였음. 또한 주로 insulin에 의해서 조절되며 혈당조절 인자인 glucose transporter type4 (GLUT4)의 발현을 근육 조직에서 관찰함.

## 나. 실험결과

### *In vitro*

#### (1) C2C12 skeletal muscle cell과 INS-1 rat insulinoma pancreatic $\beta$ cell에서의 xylobiose와 phyllodulcin이 cell viability에 미치는 영향

##### (가) C2C12 skeletal muscle cell

- C2C12 skeletal muscle cell에서 xylobiose와 phyllodulcin의 시료 독성실험 결과 control에 비하여 cell viability가 감소하지 않았으며, 이로 인한 독성도 나타나지 않음 (Fig. 1A, Fig 1B).

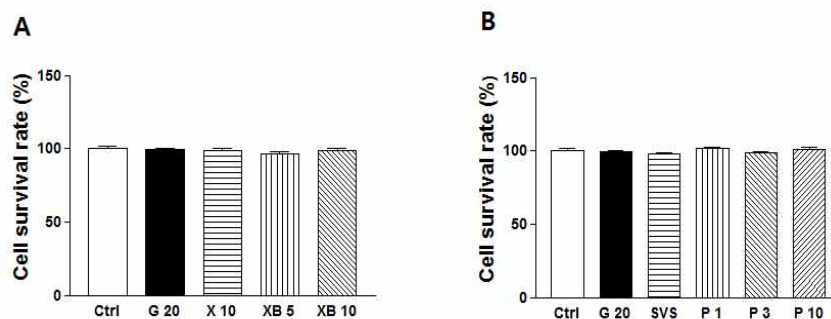


Fig. 1. Effect of xylobiose and phyllodulcin on C2C12 skeletal muscle cells viability.

A. Xylobiose treatment. B. Phyllodulcin treatment. Values shown are the mean  $\pm$  SEM. Different letters for given bars indicate that those values are significantly different from each other ( $P < 0.05$ ). Ctrl, control; G 20, glucose 20mM; X 10, D-xylose replaced by 10% of total glucose in the media; XB 5, xylobiose replaced by 5% of total glucose in the media; XB 10, xylobiose replaced by 10% of total glucose in the media; SVS, stevioside 10 uM; P 1, phyllodulcin 1 uM; P 3, phyllodulcin 3 uM; P 10, phyllodulcin 10 uM.

##### (나) INS-1 rat insulinoma pancreatic $\beta$ cell

- INS-1 rat insulinoma pancreatic  $\beta$  cell에서 xylobiose와 phylloculcin의 시료 독성실험 결과 control에 비하여 cell viability가 감소하지 않았으며, 이로 인한 독성도 나타나지 않음 (Fig. 2A, Fig. 2B).

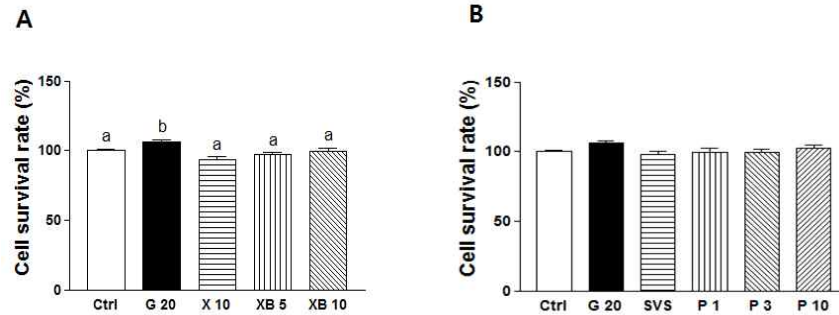


Fig. 2. Effect of xylobiose and phyllodulcin on INS-1 rat insulinoma pancreatic  $\beta$  cells viability.

A. Xylobiose treatment. B. Phyllodulcin treatment. Values shown are the mean  $\pm$  SEM. Different letters for given bars indicate that those values are significantly different from each other ( $P < 0.05$ ). Ctrl, control; G 20, glucose 20mM; X 10, D-xylose replaced by 10% of total glucose in the media; XB 5, xylobiose replaced by 5% of total glucose in the media; XB 10, xylobiose replaced by 10% of total glucose in the media; SVS, stevioside 10uM; P 1, phyllodulcin 1uM; P 3, phyllodulcin 3uM; P 10, phyllodulcin 10uM.

## (2) 근육세포 (C2C12) 분화 후, glucose uptake 측정 및 비교

- Insulin 100nM positive control을 기준으로 D-xylose 10%, xylobiose 5%, 그리고 xylobiose 10%에서 유의적으로 증가하는 결과가 도출됨. (Fig. 3A, D-xylose 10%, xylobiose 5% and 10%  $p < 0.001$ )
- Insulin 100nM positive control을 기준으로 phyllodulcin 1uM, 3uM, 그리고 10uM에서 glucose uptake가 유의적으로 증가하는 결과가 도출됨. (Fig. 3B, phyllodulcin 1uM, 3uM, and 10uM  $p < 0.001$ )
- 이는, xylobiose와 phyllodulcin이 insulin 100nM과 glucose 20mM에 비하여 유의적으로 glucose uptake를 증가시켜 혈당저하 조절기전에 도움을 주는 것으로 볼 수 있음.

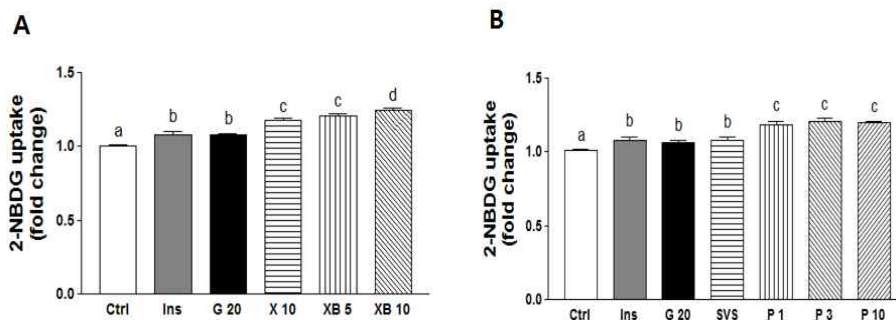


Fig. 3. Effect of Glucose, D-xylose, and stevioside on glucose uptake in C2C12 skeletal muscle cell.

A. Xylobiose treatment. B. Phyllodulcin treatment. Differentiated C2C12 cells were treated with 2-[N(nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl) amino]-2-deoxy-D-glucose (2-NBDG) for 2 h. Values shown are the mean  $\pm$  SEM. Different letters for given bars indicate that those values are significantly different from each other ( $P < 0.05$ ). Ctrl, control; Ins, insulin 100nM; G 20, glucose 20mM; X 10, D-xylose replaced by 10% of total glucose in the media; XB 5, xylobiose replaced by 5% of total glucose in the media; XB 10, xylobiose replaced by 10% of total glucose in the media; SVS, stevioside 10uM; P 1, phyllodulcin 1uM; P 3, phyllodulcin 3uM; P 10, phyllodulcin 10uM.

### (3) 췌장세포 (INS-1)에서의 insulin 분비 측정 및 비교

- Glucose 20mM을 treat하였을 때 보다, D-xylose 10%, xylobiose 5%, 그리고 xylobiose 10%가 유의적으로 insulin 분비가 증가하는 것을 확인. (Fig 4A,  $p < 0.001$  for D-xylose 10%, xylobiose 5%, 10%)
- 특히 xylobiose 5%, 10%의 경우 D-xylose 10%에 비하여 insulin 분비가 더 증가하는 것을 확인. (Fig 4A,  $p < 0.05$  for xylobiose 5%,  $p < 0.001$  for xylobiose 10%)
- Glucose 20mM에 비하여 phyllodulcin 3uM과 10uM을 treat하였을 때, 보다 더 insulin 분비가 유의적으로 증가하는 것을 확인. (Fig. 4B,  $p < 0.001$  for P 3 and P 10)
- 위의 결과는 xylobiose와 phyllodulcin이 insulin을 효과적으로 분비하게 하여 항당뇨에 가능성이 있다고 보여짐.

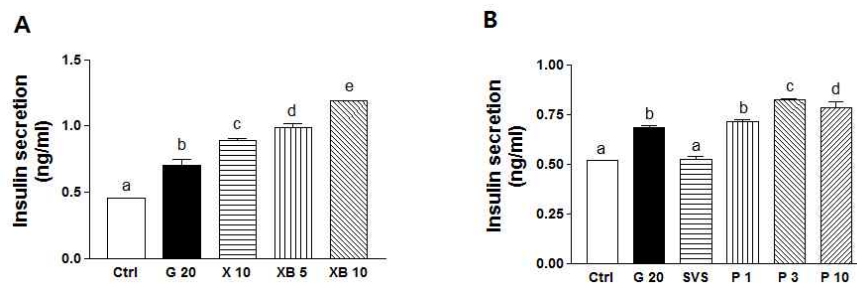


Fig. 4. Insulin secretion of INS-1 rat insulinoma pancreatic  $\beta$  cells by treating xylobiose and phyllodulcin.

A. Xylobiose treatment. B. Phyllodulcin treatment. The cells were treated with glucose, xylobiose or phyllodulcin for 2 h. Values shown are the mean  $\pm$  SEM. Different letters for given bars indicate that those values are significantly different from each other ( $P < 0.05$ ). Ctrl, control; G 20, glucose 20mM; X 10, D-xylose replaced by 10% of total glucose in the media; XB 5, xylobiose replaced by 5% of total glucose in the media; XB 10, xylobiose replaced by 10% of total glucose in the media; SVS, stevioside 10uM; P 1, phyllodulcin 1uM; P 3, phyllodulcin 3uM; P 10, phyllodulcin 10uM.

### (4) Macrophage cell (Raw 264.7)에서 NO 생성 측정

- LPS를 기준으로 glucose 20mM에서 NO의 생성이 유의적으로 증가하는 것을 확인 (Fig. 5A  $p < 0.001$ , Fig 5B,  $p < 0.001$ )
- Glucose 20mM을 기준으로 D-xylose 10%와 xylobiose 5%와 10%에서 유의적으로 NO 생성이 감소하는 것을 확인 (Fig. 5A,  $p < 0.001$  for D-xylose and xylobiose 10%,  $p < 0.05$  for xylobiose 5%)
- Glucose 20mM을 기준으로 stevioside 10uM, phyllodulcin 1uM, 3uM, 그리고 10uM에서 각각 유의적으로 NO 생성이 감소하는 것을 확인. (Fig. 5B,  $p < 0.001$  for stevioside 10uM, phyllodulcin 1uM, 3uM and 10uM)
- Raw cell 264.7에서 NO 생성능이 xylobiose와 phyllodulcin에서 유의적으로 감소한 것은 염증매개인자가 감소되어 inflammation에 효과를 줄 수 있다고 할 수 있음.

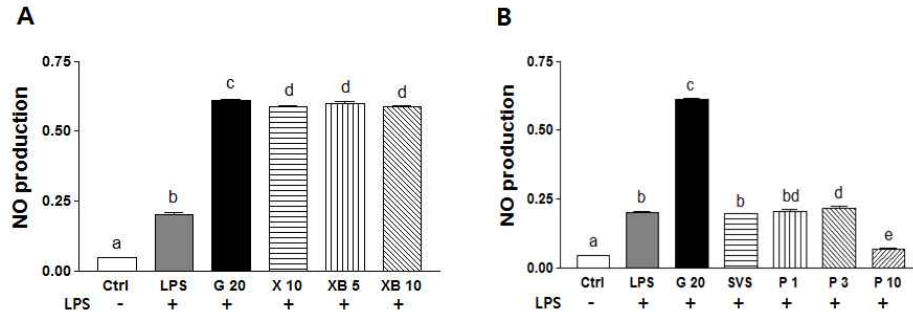


Fig. 5. Effect of xylobiose and phyllodulcin on NO production in Raw cell 264.7.

A. Xylobiose treatment. B. Phyllodulcin treatment. The cells were treated with 1 $\mu$ g/ml LPS for 24 h. Values shown are the mean  $\pm$  SEM. Different letters for given bars indicate that those values are significantly different from each other ( $P < 0.05$ ). Ctrl, control; LPS, lipopolysaccharide; G 20, glucose 20mM; X 10, D-xylose replaced by 10% of total glucose in the media; XB 5, xylobiose replaced by 5% of total glucose in the media; XB 10, xylobiose replaced by 10% of total glucose in the media; SVS, stevioside 10 $\mu$ M; P 1, phyllodulcin 1 $\mu$ M; P 3, phyllodulcin 3 $\mu$ M; P 10, phyllodulcin 10 $\mu$ M.

#### (5) RT-PCR을 이용하여 대식세포 (Raw 264.7)에서 pro-inflammatory cytokine의 발현 측정 및 비교

- LPS를 기준으로 glucose 20mM에서 IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ 가 증가하는 것을 확인.
- Glucose 20mM을 기준으로 xylobiose 5%와 10%에서 유의적으로 IL-1 $\beta$  발현이 감소하는 것을 확인 (Fig. 6A,  $p < 0.001$  for xylobiose 5% and 10%)
- Glucose 20mM을 기준으로 xylobiose 10%에서 TNF- $\alpha$  발현이 감소하는 경향을 확인 (Fig. 6A)
- Glucose 20mM을 기준으로 stevioside 10 $\mu$ M, phyllodulcin 1 $\mu$ M, 3 $\mu$ M, 그리고 10 $\mu$ M에서 각각 유의적으로 IL-1 $\beta$  발현이 감소하는 것을 확인. (Fig. 6B,  $p < 0.001$  for stevioside 10 $\mu$ M, phyllodulcin 1 $\mu$ M, 3 $\mu$ M and 10 $\mu$ M)
- Glucose 20mM을 기준으로 phyllodulcin 1 $\mu$ M과 3 $\mu$ M에서 각각 유의적으로 TNF- $\alpha$  발현이 감소하는 것을 확인. (Fig. 6B,  $p < 0.01$  for phyllodulcin 1 $\mu$ M,  $p < 0.05$  for phyllodulcin 3 $\mu$ M)

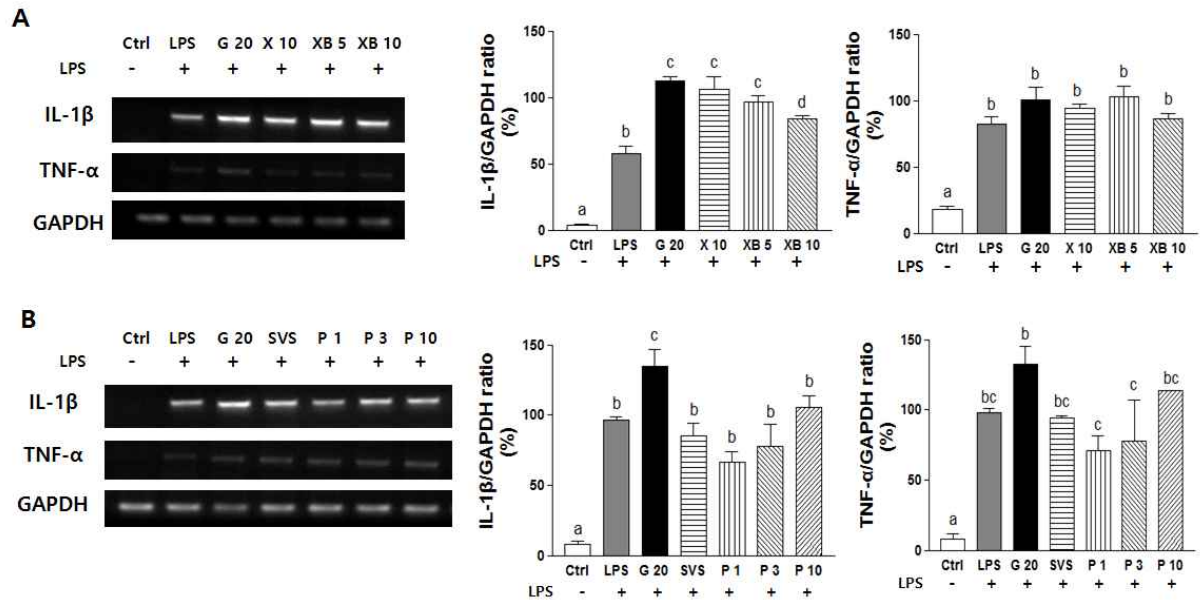


Fig. 6. Effect of xylobiose and phyllodulcin on pro-inflammatory cytokine in Raw cell 264.7.

A. Xylobiose treatment. B. Phyllodulcin treatment. The cells were treated with 1 $\mu$ g/ml LPS for 24 h. Values shown are the mean  $\pm$  SEM. Different letters for given bars indicate that those values are significantly different from each other ( $P < 0.05$ ). Ctrl, control; LPS, lipopolysaccharide; G 20, glucose 20mM; X 10, D-xylose replaced by 10% of total glucose in the media; XB 5, xylobiose replaced by 5% of total glucose in the media; XB 10, xylobiose replaced by 10% of total glucose in the media; SVS, stevioside 10 $\mu$ M; P 1, phyllodulcin 1 $\mu$ M; P 3, phyllodulcin 3 $\mu$ M; P 10, phyllodulcin 10 $\mu$ M.

### *In vivo*

#### Xylobiose의 효과

##### (1) Xylobiose가 db/db 마우스의 체중과 식이 및 수분 섭취량에 미치는 영향

- 실험 기간 동안 db/db 마우스의 체중 변화를 관찰하였으나, xylobiose에 의한 체중 변화는 나타나지 않았음 (Fig. 1).
- 총 식이 및 총 수분 섭취량을 실험 기간인 6주(42일)로 나누어, 하루 평균 식이 및 수분 섭취량을 산출함. 그 결과 Ctrl군에 비하여 db/db mouse group에서 유의적으로 높은 식이 및 수분 섭취량을 보임.
- Xylo 10과 XB 10에서는 DB에 비하여 식이 및 수분 섭취량에 대한 감소 효과는 나타나지 않았음. 하지만 XB 5은 DB에 비하여 유의적으로 낮은 식이 및 수분 섭취량을 보였음 (Fig. 1A, 1B,  $p < 0.001$ ).



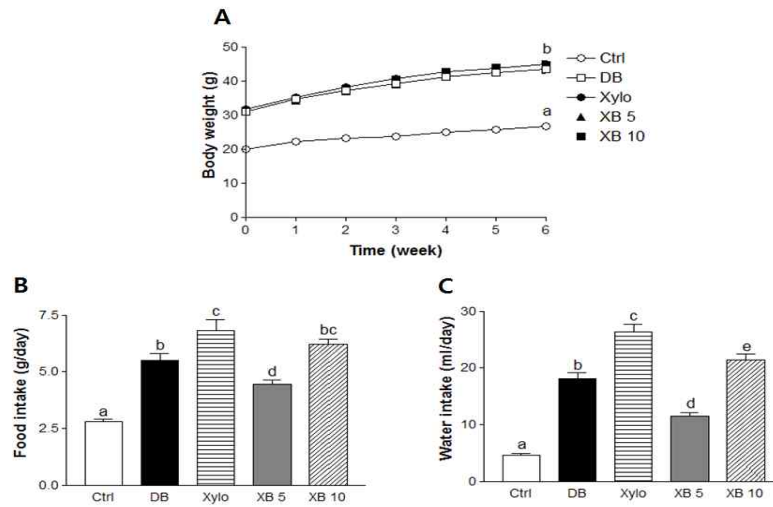


Fig. 7. Effect of xylobiose on the changes of body weight, food intake and water intake in db/db mice.

Body weight (A), water intake (B), and water intake (C) were measured in db/db mice. Values shown are the mean  $\pm$  SEM. Different letters for given bars indicate that those values are significantly different from each other ( $p < 0.05$ ). Ctrl, normal control; DB, diabetes control; Xylo, D-xylose replaced by 10% of total sucrose in the diet; XB 5, xylobiose replaced by 5% of total sucrose in the diet; XB 10, xylobiose replaced by 10% of total sucrose in the diet.

**(2) Xylobiose가 db/db 마우스의 간, 신장, 췌장 그리고 비장의 무게에 미치는 영향**

- 실험 기간인 6주 후에 마우스의 간, 신장, 췌장 및 비장을 적출하여 각각의 무게를 측정하여 그룹 간에 비교함.
- xylobiose에 의한 간, 신장, 췌장 및 비장 무게 변화에 대한 영향은 나타나지 않았음 (Fig. 2).

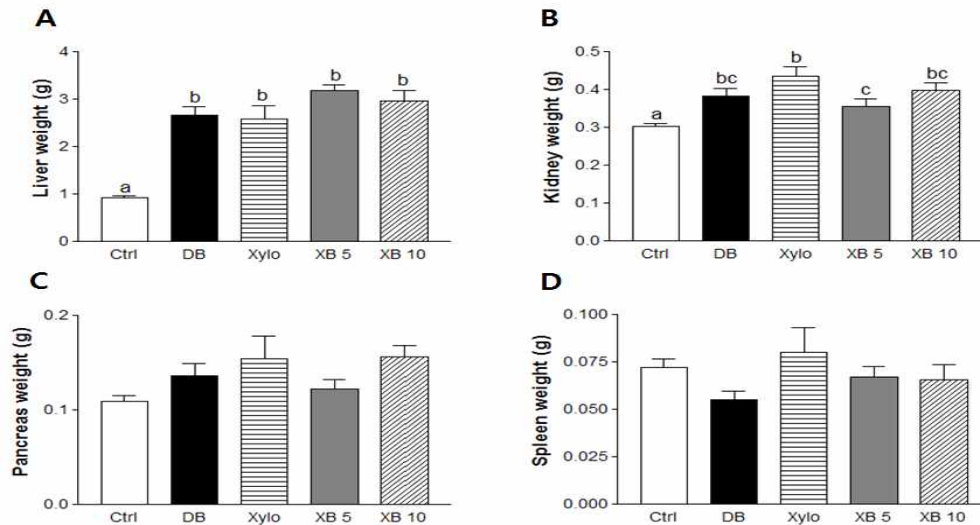


Fig. 8. Effect of xylobiose on organ weight in db/db mice.

Organ weight of liver, kidney, pancreas and spleen was measured. Data were analyzing using one-way ANOVA with Newman-Keuls post hoc test ( $p < 0.05$ ,  $n = 10$  mice per group). Letter subscripts are used to indicate significant differences. Ctrl, normal control; DB, diabetes control; Xylo, D-xylose replaced by 10% of total sucrose in the diet; XB 5, xylobiose replaced by 5% of total sucrose in the diet; XB 10, xylobiose replaced by 10% of total sucrose in the diet.

### (3) Xylobiose가 db/db 마우스의 내당능(glucose tolerance), 공복혈당(fasting blood glucose) 및 HbA1c에 미치는 영향

- 실험 4주차에, db/db mouse의 내당능을 측정하기 위하여 OGTT를 실시함. 그 결과 DB에 비하여 Xylo와 XB 10에서는 시간에 따른 혈당 변화와 AUC (Area Under the Curve) 모두 유의적인 차이는 보이지 않음. 하지만 XB 5에서는 DB에 비하여 OGTT에 의한 AUC에서 유의적인 차이를 보임 (Fig. 3A-3B,  $p < 0.05$ ).
- Fasting blood glucose는 마우스 희생 전, 12시간 공복 후 측정되었음. Normal control 마우스에 비하여 db/db 마우스에서 유의적으로 높은 혈당을 보였음(Fig. 3C). XB 5에서는 DB에 비하여 유의적으로 공복혈당이 감소하였음( $p < 0.01$ ). 하지만 Xylo와 XB 10에서는 공복혈당 감소 효과가 나타나지 않았음.
- Normal control 마우스에 비하여 db/db 마우스에서 현저히 높은 HbA1c를 보였음. 또한 DB에 비하여 xlyo에서는 기대했던 HbA1c 감소효과를 보이지 않았으나, XB 5, XB 10에서는 HbA1c가 유의적으로 감소함 ( $p < 0.05$ ,  $p < 0.001$ ).

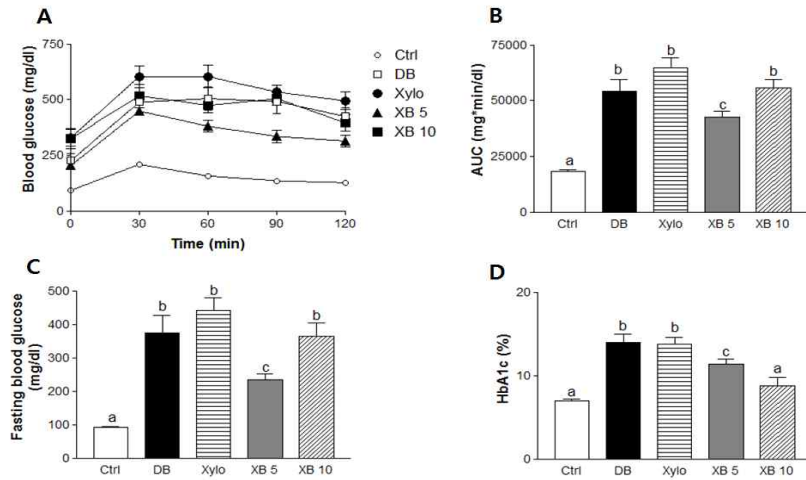


Fig. 9. Effect of xylobiose on glucose tolerance, fasting blood glucose and HbA1c in db/db mice.

(A) Oral glucose tolerance test by the measure of blood glucose. (B) AUC was calculated from blood glucose in each time. (C) Fasting blood glucose was measured before sacrifice. (D) HbA1c was measured in whole blood. Values shown are the mean  $\pm$  SEM. Different letters for given bars indicate that those values are significantly different from each other ( $p < 0.05$ ). AUC, Area Under the Curve; HbA1c, Hemoglobin A1c; Ctrl, normal control; DB, diabetes control; Xylo, D-xylose replaced by 10% of total sucrose in the diet; XB 5, xylobiose replaced by 5% of total sucrose in the diet; XB 10, xylobiose replaced by 10% of total sucrose in the diet.

#### (4) Xylobiose가 db/db 마우스의 혈장 insulin 및 HOMA-IR에 미치는 영향

- Normal control 마우스에 비하여 db/db 마우스에서 plasma insulin이 유의적으로 증가하였음 (Fig. 4A,  $p < 0.001$ ). 하지만 D-xylose와 xylobiose를 섭취한 마우스의 plasma insulin은 유의적으로 감소하였음 ( $p < 0.001$  for Xylo,  $p < 0.01$  for XB 5 and XB 10).
- 인슐린 저항성을 측정할 수 있는 지표인 HOMA-IR 지수에서는 normal control 마우스에 비하여 db/db 마우스에서 유의적으로 증가하였음 (Fig. 4B). 하지만 D-xylose와 xylobiose를 섭취한 마우스의 HOMA-IR이 유의적으로 감소하였음 ( $p < 0.01$ ).

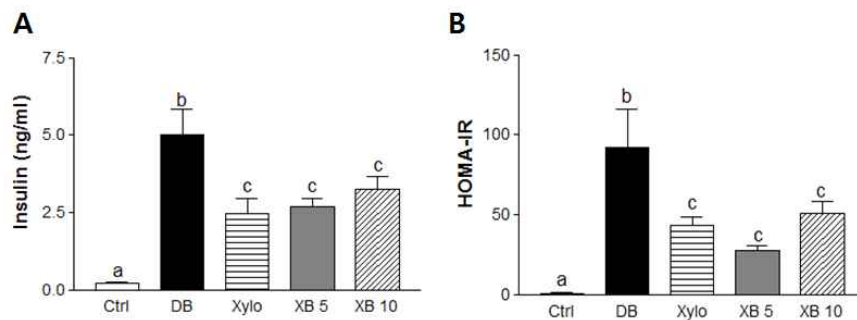


Fig. 10. Effect of xylobiose on glucose tolerance, fasting blood glucose and HbA1c in db/db mice.

(A) Insulin was measured in plasma after sacrifice. (B) HOMA-IR = fasting plasma insulin(ug/L) \* fasting blood glucose (mg/dl)/ 22.5. Data were analyzing using one-way ANOVA with Newman-Keuls post hoc test ( $p < 0.05$ ,  $n = 10$  mice per group). Letter subscripts are used to indicate significant differences. Ctrl, normal control; DB, diabetes control; Xylo, D-xylose replaced by 10% of total sucrose in the diet; XB 5, xylobiose replaced by 5% of total sucrose in the diet; XB 10, xylobiose replaced by 10% of total sucrose in the diet.

(5) Xylobiose가 db/db 마우스의 혈장 total protein에 미치는 영향

- Normal control 마우스에 비하여 db/db 마우스에서 혈장 total protein이 유의적으로 증가하였음 (Fig. 5,  $p < 0.001$ ). 또한 D-xylose와 xylobiose에 의한 혈장 total protein의 변화는 나타나지 않았음.

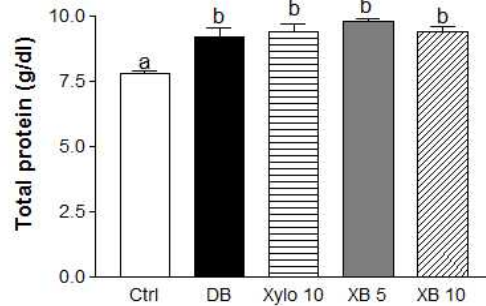


Fig. 11. Effect of xylobiose on total protein in plasma in db/db mice.

Total protein was measured in plasma. Values shown are the mean  $\pm$  SEM. Different letters for given bars indicate that those values are significantly different from each other ( $p < 0.05$ ). Ctrl, normal control; DB, diabetes control; Xylo, D-xylose replaced by 10% of total sucrose in the diet; XB 5, xylobiose replaced by 5% of total sucrose in the diet; XB 10, xylobiose replaced by 10% of total sucrose in the diet.

(6) Xylobiose가 db/db 마우스의 liver glycogen에 미치는 영향

- Normal control 마우스에 비하여 db/db 마우스에서 liver glycogen이 유의적으로 감소하였음 (Fig. 6,  $p < 0.001$ ). 또한 기대했던 D-xylose와 xylobiose의 섭취에 의한 liver glycogen의 증가효과는 나타나지 않았음.

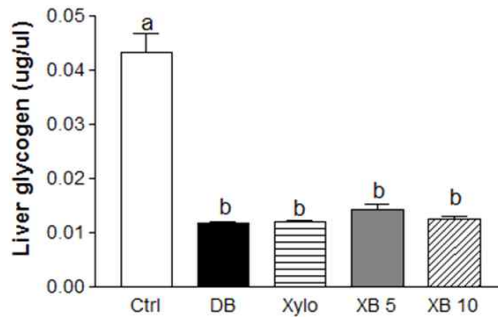


Fig. 12. Effect of xylobiose on liver glycogen in db/db mice.

Liver glycogen was analyzed in liver tissue in db/db mice. Values shown are the mean  $\pm$  SEM. Data were analyzing using one-way ANOVA with Newman-Keuls post hoc test ( $p < 0.05$ ,  $n = 10$  mice per group). Ctrl, normal control; DB, diabetes control; Xylo, D-xylose replaced by 10% of total sucrose in the diet; XB 5, xylobiose replaced by 5% of total sucrose in the diet; XB 10, xylobiose replaced by 10% of total sucrose in the diet.

### (7) Xylobiose가 db/db 마우스의 GOT, GPT에 미치는 영향

- Normal control 마우스에 비하여 db/db 마우스에서 GOT와 GPT가 유의적으로 증가하였음 (Fig. 7,  $p < 0.001$ ). 또한 D-xylose와 xylobiose의 섭취에 의한 GOT와 GPT의 변화는 나타나지 않았음.

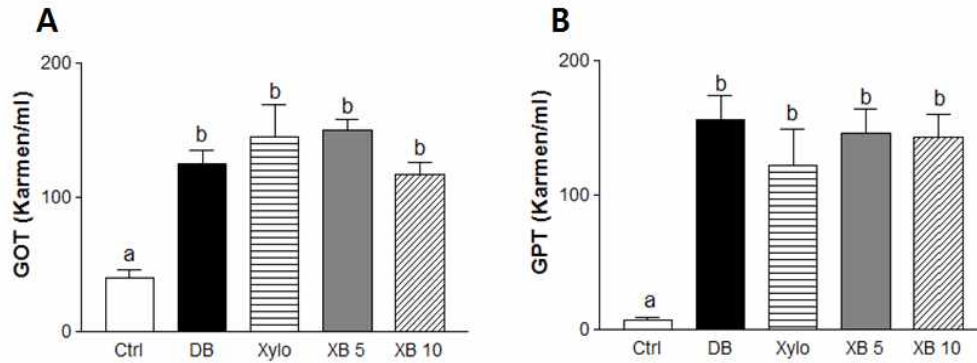


Fig. 13. Effect of xylobiose on GOT and GPT in plasma in db/db mice.

GOT (A) and GPT (B) were measured in plasma in db/db mice. Values shown are the mean  $\pm$  SEM. Different letters for given bars indicate that those values are significantly different from each other ( $p < 0.05$ ). GOT, glutamic oxaloacetic transaminase; GPT, glutamic pyruvic transaminase; Ctrl, normal control; DB, diabetes control; Xylo, D-xylose replaced by 10% of total sucrose in the diet; XB 5, xylobiose replaced by 5% of total sucrose in the diet; XB 10, xylobiose replaced by 10% of total sucrose in the diet.

### (8) Xylobiose가 db/db 마우스의 plasma lipid profile에 미치는 영향

- Normal controll과 DB에서의 혈장 TG의 양을 비교하였을 때, 약간 증가하는 경향을 보이나 유의적이지 않음. 또한 D-xylose 섭취에 의한 TG의 변화는 나타나지 않음. 하지만 xylobiose를 섭취한 XB 5와 XB 10에서는 혈장 TG가 유의적으로 감소함 (Fig. 8A,  $p < 0.001$ ).
- 혈장 TC와 LDL-C는 normal control 마우스에서보다 db/db 마우스에서 유의적으로 증가함 (Fig. 8B, 8C). DB에 비하여 Xylo 및 XB 10에서는 TC와 LDL-C는 유의적으로 감소하였으나 ( $p < 0.001$ ,  $p < 0.01$ ), XB 5에서는 감소하는 경향만 보임.
- 혈장 HDL-C는 normal control 마우스에서보다 db/db 마우스에서 유의적으로 증가함 (Fig. 8D). 또한 DB에 비하여 Xylo에서 HDL-C가 유의적으로 감소하였으며 ( $p < 0.01$ ), xylobiose의 섭취에 의한 HDL-C의 영향은 없었음.

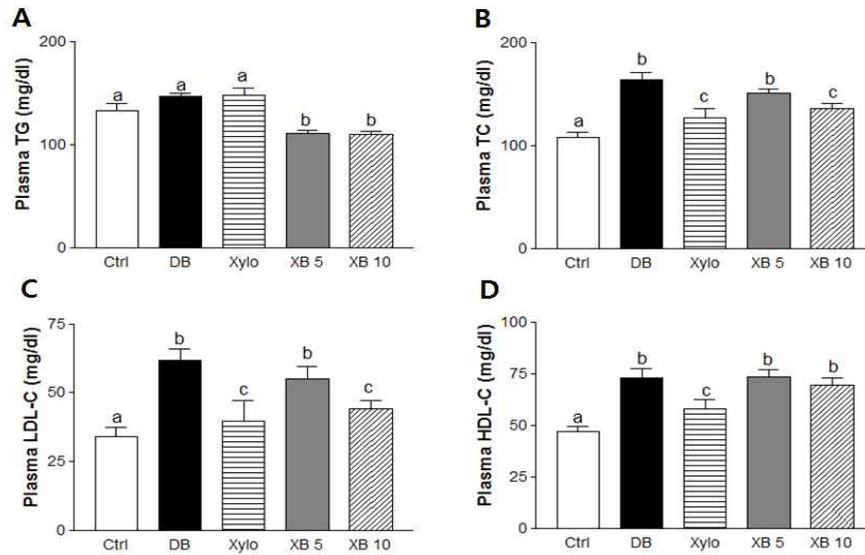


Fig. 14. Effect of xylobiose on lipid profile in plasma in db/db mice.

(A) Triglycerider (TG), (B) total cholesterol (TC), (C) low density lipoprotein (LDL-C) and (D) high density lipoprotein (HDL-C) were measured in plasma. Data were analyzing using one-way ANOVA with Newman-Keuls post hoc test ( $p < 0.05$ ,  $n = 10$  mice per group). Letter subscripts are used to indicate significant differences. Ctrl, normal control; DB, diabetes control; Xylo, D-xylose replaced by 10% of total sucrose in the diet; XB 5, xylobiose replaced by 5% of total sucrose in the diet; XB 10, xylobiose replaced by 10% of total sucrose in the diet.

### (9) Xylobiose가 db/db 마우스 간 조직의 histopathology에 미치는 영향

- Normal control 마우스에 비하여 diabetes control 마우스에서의 간 조직의 지방구가 현저히 증가하였으며, 간 조직이 치밀하지 못하고 간세포가 조밀하지 않은 것을 확인 되었음. 하지만 D-xylose 및 xylobiose 섭취에 의한 간 조직의 지방구 감소가 관찰되었으으며, 간 세포가 조밀한 것이 관찰됨.

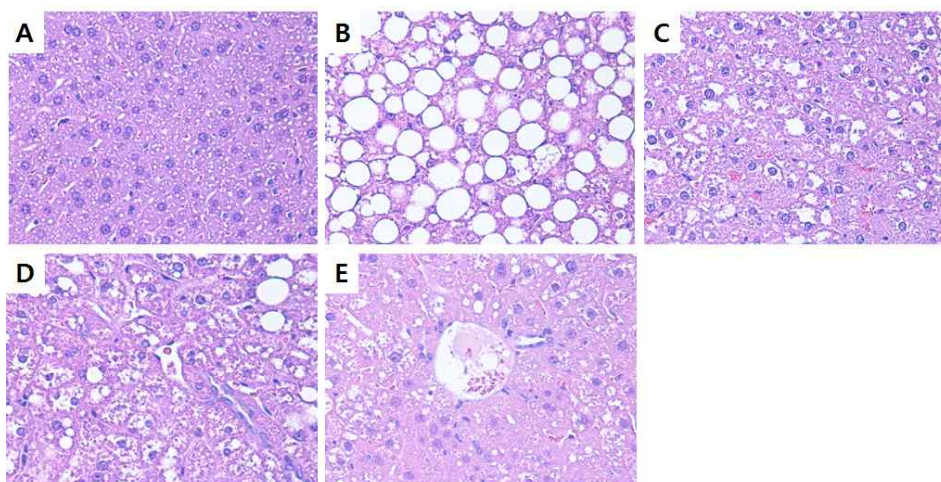


Fig. 15. Effect of xylobiose on histopathology in mouse liver tissue.

Hepatic histopathological features were observed in db/db mice. (A) Ctrl, (B) DB, (C) Xylo, (D) XB 5 and (E) XB 10. Tissues were stained with H&E (400 x). Ctrl, normal control; DB, diabetes control; Xylo, D-xylose replaced by 10% of total sucrose in the diet; XB 5, xylobiose replaced by 5% of total sucrose in the diet; XB 10, xylobiose replaced by 10% of total sucrose in the diet.



**(10) Xylobiose가 db/db 마우스 췌장 조직의 histopathology에 미치는 영향**

- Diabetes control 마우스의 췌장에서는 normal control 마우스의 췌장에 비해 랑게르한스섬이 뚜렷하게 보이는 것이 관찰됨. 하지만 D-xylose 및 xylobiose를 섭취한 군에서는 normal control 마우스와 유사한 췌장 조직의 모습이 관찰됨.

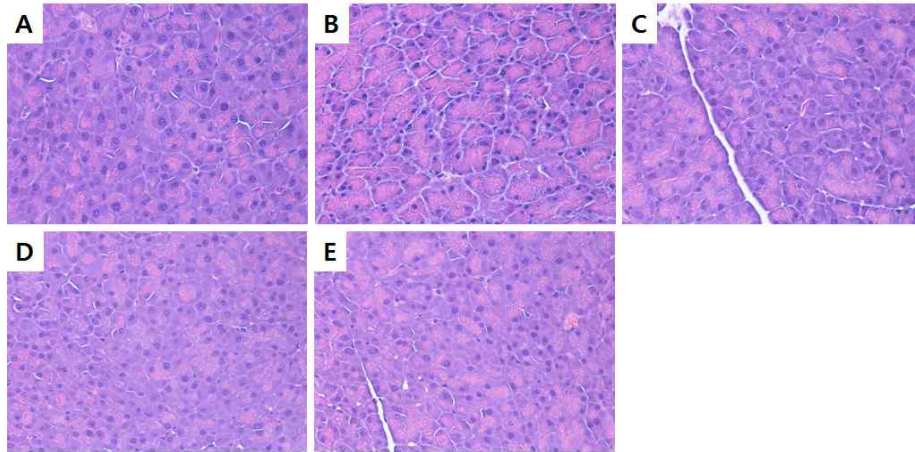


Fig. 16. Effect of xylobiose on histopathology in mouse pancreas tissue.

Pancreatic histopathological features were observed in db/db mice. (A) Ctrl, (B) DB, (C) Xylo, (D) XB 5 and (E) XB 10. Tissues were stained with H&E (400 x). Ctrl, normal control; DB, diabetes control; Xylo, D-xylose replaced by 10% of total sucrose in the diet; XB 5, xylobiose replaced by 5% of total sucrose in the diet; XB 10, xylobiose replaced by 10% of total sucrose in the diet.

**(11) Xylobiose가 db/db 마우스 췌장 조직의 insulin histopathology에 미치는 영향**

- Diabetes control 마우스의 췌장에서는 normal control 마우스에 비하여 인슐린 면역염색된 부분이 크고 진하게 관찰됨. 하지만 D-xylose 및 xylobiose를 섭취한 마우스의 췌장에서는 diabetes control 마우스에 비하여 인슐린 면역염색된 부분이 더 작고 연하게 관찰됨.

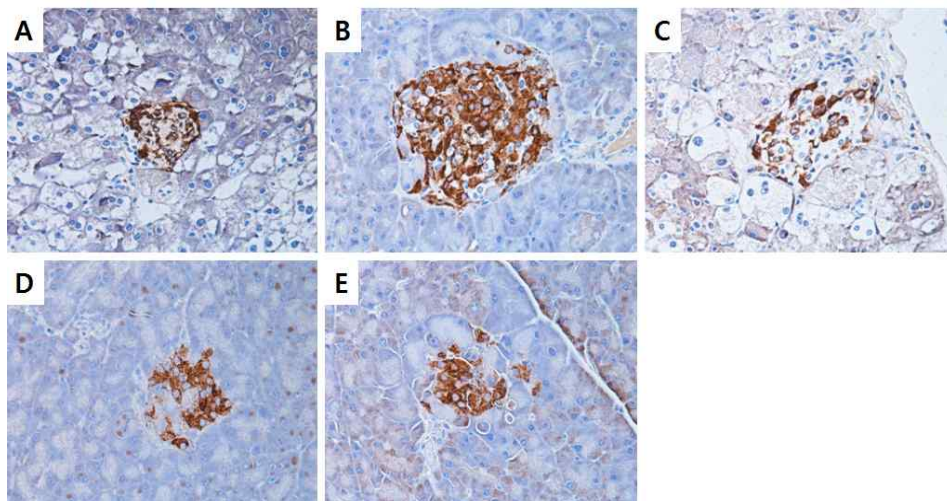


Fig. 17. Effect of xylobiose on immunohistochemical change in mouse pancreas tissue.

Insulin immunostaining in pancreas in db/db mice (400 x). (A) Ctrl, (B) DB, (C) Xylo, (D) XB 5 and (E) XB 10. Tissues were stained with H&E. Ctrl, normal control; DB, diabetes control; Xylo, D-xylose replaced by 10% of total sucrose in the diet; XB 5, xylobiose replaced by 5% of total sucrose in the diet; XB 10, xylobiose replaced by 10% of total sucrose in the diet.

(12) Xylobiose가 db/db 마우스의 PEPCK (간) 및 GLUT4 (근육)의 단백질 발현에 미치는 영향

- normal ctrl과 diabetes control에서 PEPCK의 단백질 발현에서는 유의적인 차이가 발견되지 않음. 또한 D-xylose의 섭취에 의한 PEPCK 발현의 유의적인 차이도 발견되지 않음. 하지만 xylobiose를 섭취한 XB 5와 XB 10에서는 PEPCK의 발현이 유의적으로 감소함 (Fig. 12A,  $p < 0.001$ ).
- GLUT4의 단백질 발현은 normal control 마우스에서보다 db/db 마우스에서 유의적으로 증가함 (Fig. 12B). 또한 diabetes control 마우스와 Xylo 및 XB 5를 비교하였을 때, GLUT4의 발현에 유의적인 차이가 발견되지 않음. 하지만, XB 10에서는 GLUT4의 발현이 유의적으로 증가한 것이 관찰됨 ( $p$

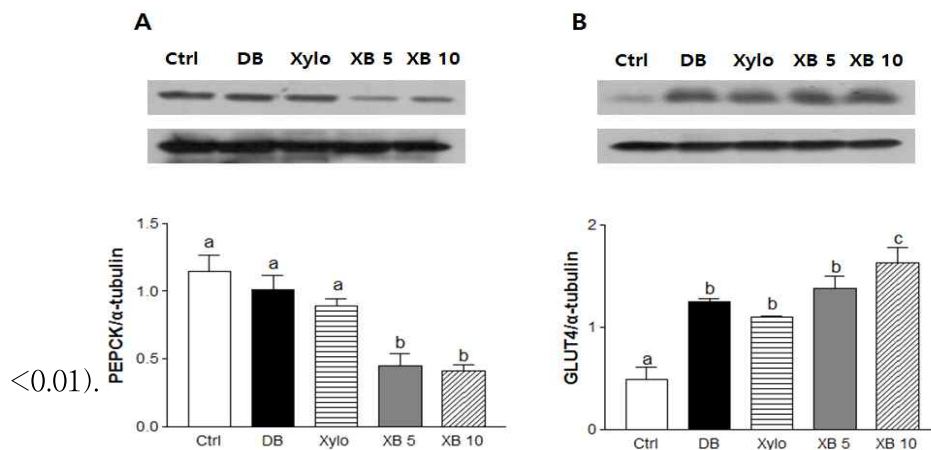


Fig. 18. Effect of xylobiose on expression of PEPCK and GLUT4 in db/db mice.

(A) Protein expressions of PEPCK in liver and (B) GLUT4 in muscle were measured by western blotting analysis. Band intensities were quantified by densitometry and were analyzed using one-way ANOVA with Newman-Keuls post hoc test ( $p < 0.05$ ,  $n = 10$  mice per group).  $\alpha$ -tubulin was used as a loading control. Letter subscripts are used to indicate significant differences. PEPCK, phosphoenolpyruvate carboxykinase; GLUT4, glucose transporter type 4; Ctrl, normal control; DB, diabetes control; Xylo, D-xylose replaced by 10% of total sucrose in the diet; XB 5, xylobiose replaced by 5% of total sucrose in the diet; XB 10, xylobiose replaced by 10% of total sucrose in the diet.

**Phyllodulcin group**

(1) Phyllodulcin이 db/db 마우스의 체중과 식이 및 수분 섭취량에 미치는 영향

- 실험 기간 동안 일주일에 2번씩 마우스의 체중 변화를 관찰하였으나, 실험 종료까지 phyllodulcin에 의한 체중변화는 관찰되지 않았음 (Fig. 1A).
- 하루 동안의 수분섭취량과 식이섭취량은 DB 그룹에서 normal control그룹에 비하여 유의적으로 높게 나타남 (Fig. 1B,  $p < 0.001$ , Fig. 1C,  $p < 0.001$ ).
- 식수섭취량의 경우 DB그룹에 비하여 SVS 20, P 10, 그리고 P 20그룹에서 모두 유의적으로 감소하였음 (Fig. 1B,  $p < 0.05$  for SVS20,  $p < 0.01$  for P 10,  $p < 0.001$  for P 20).
- 식이섭취량의 경우 DB그룹에 비하여 SVS 20, P 10, 그리고 P 20그룹에서 모두 유의적으로 감소하였음 (Fig. 1C,  $p < 0.05$  for SVS20 and P 10,  $p < 0.001$  for P 20).
- Phyllodulcin이 dose에 따라서 당뇨의 증상인 다갈, 다식을 완화시키는 것으로 볼 수 있음.



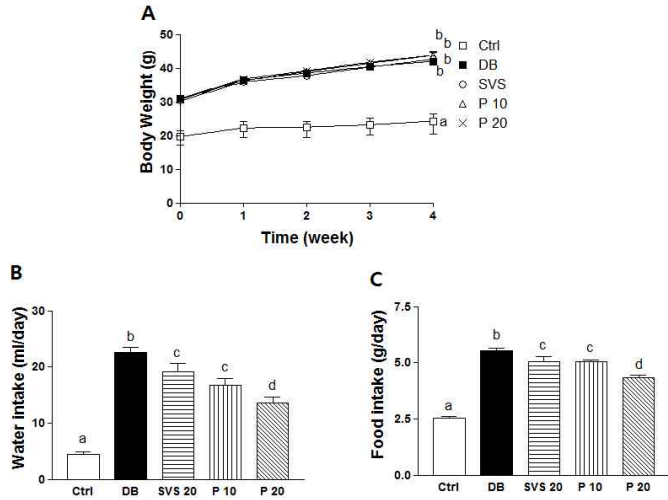


Fig. 19. Effect of phyllodulcin on the changes of body weight, food intake and water intake in db/db mice.

Body weight (A), water intake (B), and water intake (C) were measured in db/db mice. Values shown are the mean  $\pm$  SEM. Different letters for given bars indicate that those values are significantly different from each other ( $p < 0.05$ ). Ctrl, normal control; DB, diabetes control; SVS 20, stevioside 20 mg/kg b.w.; P 10, phyllodulcin 10 mg/kg b.w.; P 20, phyllodulcin 20 mg/kg b.w.

(2) Phyllodulcin이 db/db 마우스의 간, 신장, 비장 그리고 췌장의 무게에 미치는 영향

- 희생 후 간, 신장, 비장 그리고 췌장을 적출하여 각각의 무게를 잰 후 몸무게 대비 %로 나타냄.
- 간의 무게는 normal control에 비하여 DB그룹에서 무게 ratio가 유의적으로 증가하였음 (Fig. 2A,  $p < 0.001$ ).
- 신장, 비장 그리고 췌장의 무게는 DB 그룹에서 무게 ratio가 유의적으로 감소하였음 (Fig. 2B,  $p < 0.001$ , Fig. 2C,  $p < 0.001$ , Fig. 2D,  $p < 0.001$ ).
  - 간, 신장, 비장 그리고 췌장 모두 DB그룹과 treat그룹간의 유의적인 차이는

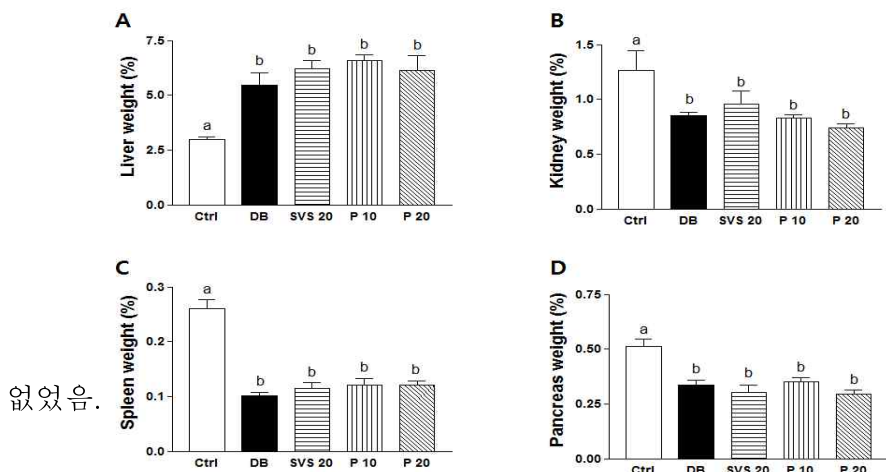


Fig. 20. Effect of phyllodulcin on organ weight ratio in db/db mice.

Organ weight/body weight (b.w.) ratio of liver (A), kidney (B), pancreas (C) and spleen (D) was shown. Data were analyzing using one-way ANOVA with Newman-Keuls post hoc test ( $p < 0.05$ ,  $n = 10$  mice per group). Letter subscripts are used to indicate significant differences. Ctrl, normal control; DB, diabetes control; SVS 20, stevioside 20 mg/kg b.w.; P 10, phyllodulcin 10 mg/kg b.w.; P 20, phyllodulcin 20 mg/kg b.w.

(3) Phyllodulcin이 db/db 마우스의 내당능(glucose tolerance), 공복혈당(fasting blood glucose) 및 HbA1c에 미치는 영향

- Treat 시작으로부터 3주차에 내당능을 측정하기 위하여 OGTT (oral glucose tolerance test)를 실시함. 그 결과 normal control그룹에 비하여 DB그룹에서 유의적으로 OGTT AUC가 증가하는 것을 볼 수 있었음 (Fig. 3B,  $p < 0.001$ ). DB그룹에 비하여 SVS 20, P 10 그리고 P 20그룹에서는 OGTT AUC가 감소하는 경향을 볼 수 있음.
- 실험 4주차에 12시간을 절식시킨 후, 공복혈당을 측정함. DB그룹에 비하여 P 10과 P 20그룹에서 모두 dose에 따라 유의적으로 감소함 (Fig. 3C,  $p < 0.05$  for P 10 and P 20).
- Whole blood에서 당화혈색소인 HbA1c를 측정함. DB그룹에 비하여 P 10에서 감소하는 경향을 보였으며, 유의적이지는 않았음. DB그룹에 비하여 SVS 20과 P 20에서 당화혈색소 수치가 유의적으로 감소하는 것을 보임 (Fig. 3D,  $p < 0.05$  for SVS 20,  $p < 0.01$  for P 20).
- 위의 결과로 phyllodulcin이 dose에 따라 혈당 조절기전에 효과적인 것으로 보임.

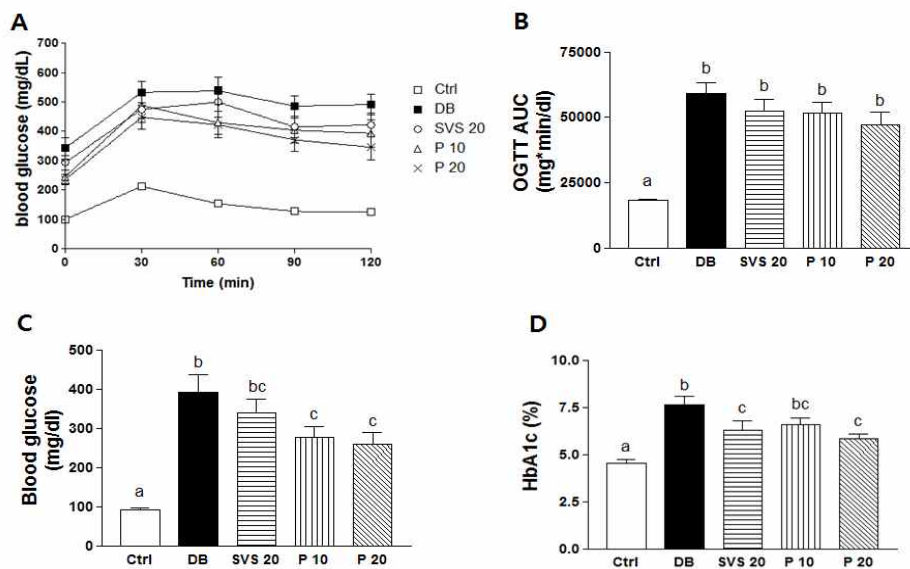


Fig. 21. Effect of phyllodulcin on glucose tolerance, fasting blood glucose and HbA1c in db/db mice.

(A) Oral glucose tolerance test by measuring of blood glucose. (B) AUC was calculated from blood glucose in each time. (C) Fasting blood glucose was measured before sacrifice. (D) HbA1c was measured in whole blood. Values shown are the mean  $\pm$  SEM. Different letters for given bars indicate that those values are significantly different from each other ( $p < 0.05$ ). OGTT, oral glucose tolerance test; AUC, Area Under the Curve; HbA1c, Hemoglobin A1c; Ctrl, normal control; DB, diabetes control; SVS 20, stevioside 20 mg/kg b.w.; P 10, phyllodulcin 10 mg/kg b.w.; P 20, phyllodulcin 20 mg/kg b.w.

**(4) Phylloidalcin이 db/db 마우스의 혈장 insulin 및 HOMA-IR에 미치는 영향**

- Normal control 마우스에 비하여 DB그룹에서 plasma insulin이 유의적으로 증가하였음 (Fig. 4A,  $p < 0.001$ ). SVS 20, P 10 그리고 P 20에서는 DB그룹과 비교하였을 때, 유의적인 변화가 없었음.
- 인슐린 저항성을 측정할 수 있는 지표인 HOMA-IR에서는 normal control 마우스에 비하여 DB그룹에서 유의적으로 증가하였음 (Fig. 4B,  $p < 0.01$ ). SVS 20, P 10 그리고 P 20에서는 DB그룹과 비교하였을 때, 유의적인 변화는 없었음.

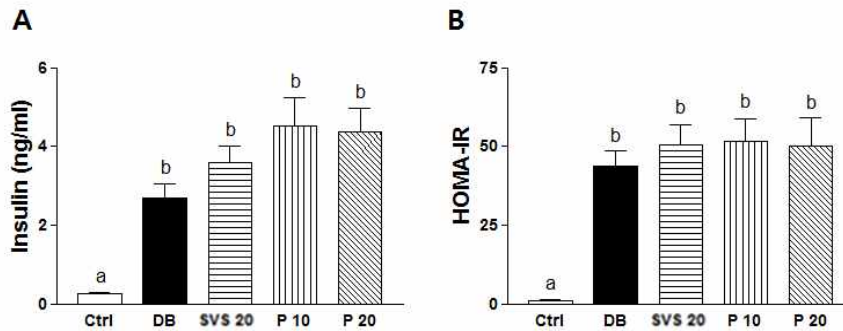


Fig. 22. Effect of phylloidalcin on insulin and HOMA-IR in db/db mice.

(A) Plasma insulin (B) HOMA-IR Data were analyzing using one-way ANOVA with Newman-Keuls post hoc test ( $p < 0.05$ ,  $n = 10$  mice per group). Letter subscripts are used to indicate significant differences. Ctrl, normal control; DB, diabetes control; SVS 20, stevioside 20 mg/kg b.w.; P 10, phylloidalcin 10 mg/kg b.w.; P 20, phylloidalcin 20 mg/kg b.w.

**(5) Phylloidalcin이 db/db 마우스의 혈장 total protein에 미치는 영향**

- Normal control 마우스에 비하여 DB그룹에서 혈장 total protein이 유의적으로 증가하였음 (Fig. 5,  $p < 0.001$ ). DB그룹에 비하여 SVS 20, P 10 그리고 P 20에서는 total protein이 유의적이진 않으나 감소하는 경향을 보였음.

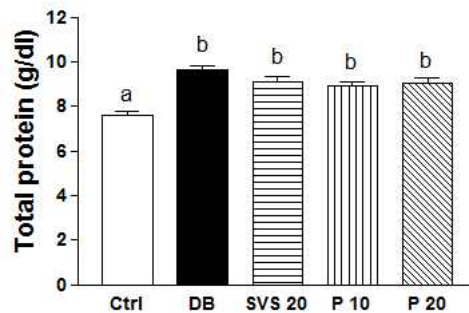


Fig. 23. Effect of phylloidalcin on total protein in plasma in db/db mice.

Total protein was measured in plasma. Values shown are the mean  $\pm$  SEM. Different letters for given bars indicate that those values are significantly different from each other ( $p < 0.05$ ). Ctrl, normal control; DB, diabetes control; SVS 20, stevioside 20 mg/kg b.w.; P 10, phylloidalcin 10 mg/kg b.w.; P 20, phylloidalcin 20 mg/kg b.w..

(6) Phyllodulcin이 db/db 마우스의 liver glycogen에 미치는 영향

- Normal control 마우스에 비하여 DB그룹에서 liver glycogen이 유의적으로 감소하였음 (Fig. 6,  $p < 0.001$ ). DB그룹에 비하여 SVS 20, P 10 그리고 P 20그룹에서 유의적이진 않으나 liver glycogen이 약간 증가하는 경향을 보임.

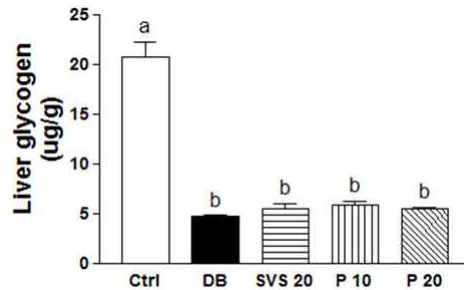


Fig. 24. Effect of phyllodulcin on liver glycogen in db/db mice.

Liver glycogen was analyzed in liver tissue in db/db mice. Values shown are the mean  $\pm$  SEM. Different letters for given bars indicate that those values are significantly different from each other ( $p < 0.05$ ). Ctrl, normal control; DB, diabetes control; SVS 20, stevioside 20 mg/kg b.w.; P 10, phyllodulcin 10 mg/kg b.w.; P 20, phyllodulcin 20 mg/kg b.w.

(7) Phyllodulcin이 db/db 마우스의 GOT, GPT에 미치는 영향

- 시료의 간독성을 보기위하여 plasma에서 GOT, GPT를 측정함. Normal control 그룹에 비하여 DB그룹에서 GOT, GPT가 모두 유의적으로 증가하였음 (Fig. 7A,  $p < 0.001$ , Fig. 7B,  $p < 0.001$ )
- DB그룹에 비하여 SVS 20, P 10 그리고 P 20그룹에서는 GOT, GPT가 모두 유의적으로 차이가 나지 않음.

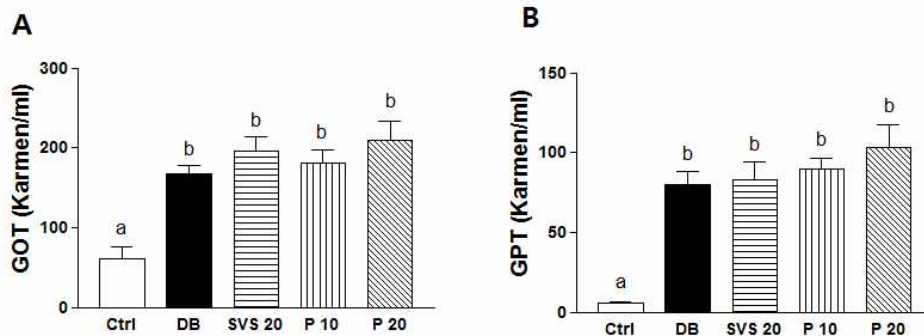


Fig. 25. Effect of phyllodulcin on GOT and GPT in plasma in db/db mice.

(A-B) GOT and GPT were measured in plasma in db/db mice. Values shown are the mean  $\pm$  SEM. Different letters for given bars indicate that those values are significantly different from each other ( $p < 0.05$ ). GOT, glutamic oxaloacetic transaminase; GPT, glutamic pyruvic transaminase; Ctrl, normal control; DB, diabetes control; SVS 20, stevioside 20 mg/kg b.w.; P 10, phyllodulcin 10 mg/kg b.w.; P 20, phyllodulcin 20 mg/kg b.w.

(8) Phyllodulcin이 db/db 마우스의 plasma lipid profile에 미치는 영향

- Plasma TG 레벨이 normal control 그룹에 비하여 DB 그룹이 유의적으로 증가함 (Fig. 8A,  $p < 0.01$ ). DB 그룹에 비하여 SVS 20, P 10 그리고 P 20에서 normal control의 수치와 비슷하게 유의적으로 감소한 것을 볼 수 있음 (Fig 8A,  $p < 0.01$  for SVS 20, P 10 and P 20).
- Plasma TC 레벨이 normal control 그룹에 비하여 DB 그룹이 유의적으로 증가함 (Fig 8B,  $p < 0.001$ ). DB 그룹에 비하여 SVS 20, P 10 그리고 P 20에서는 유의적인 변화가 관찰되지 않음.
- Plasma LDL-C 레벨이 normal control 그룹에 비하여 DB 그룹이 유의적으로 증가함 (Fig 8C,  $p < 0.001$ ). DB 그룹에 비하여 SVS 20, P 10 그리고 P 20에서는 유의적으로 증가함 (Fig 8C,  $p < 0.01$  for SVS 20 and P 20,  $p < 0.001$  for P 10).
- Plasma HDL-C 레벨이 normal control 그룹에 비하여 DB 그룹이 유의적으로 증가함 (Fig. 8D,  $p < 0.001$ ). DB 그룹에 비하여 SVS 20, P 10 그리고 P 20에서는 유의적인 변화가 관찰되지 않음.

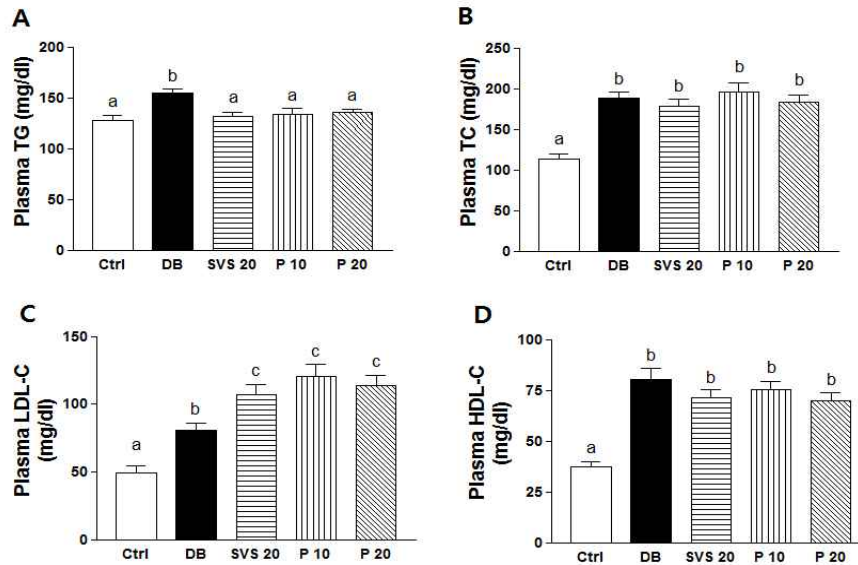


Fig. 26. Effect of phyllodulcin on lipid profile in plasma in db/db mice.

(A) Triglyceride (TG), (B) total cholesterol (TC), (C) low density lipoprotein (LDL-C) and (D) high density lipoprotein (HDL-C) were measured in plasma. Values shown are the mean  $\pm$  SEM. Different letters for given bars indicate that those values are significantly different from each other ( $p < 0.05$ ). Ctrl, normal control; DB, diabetes control; SVS 20, stevioside 20 mg/kg b.w.; P 10, phyllodulcin 10 mg/kg b.w.; P 20, phyllodulcin 20 mg/kg b.w.



**(9) Phyllodulcin이 db/db 마우스 간 조직의 histopathology에 미치는 영향**

- Normal control그룹에 비하여 DB그룹에서의 간 조직의 지방구가 현저히 증가하였으며, 간 조직이 치밀하지 못하고 간세포가 조밀하지 않은 것을 확인되었음. SVS 20, P 10 그리고 P 20 그룹에서 간 조직의 지방구 감소가 관찰됨.
- 이는 phyllodulcin이 지방간에 효과를 보일 수 있다는 것을 의미함.

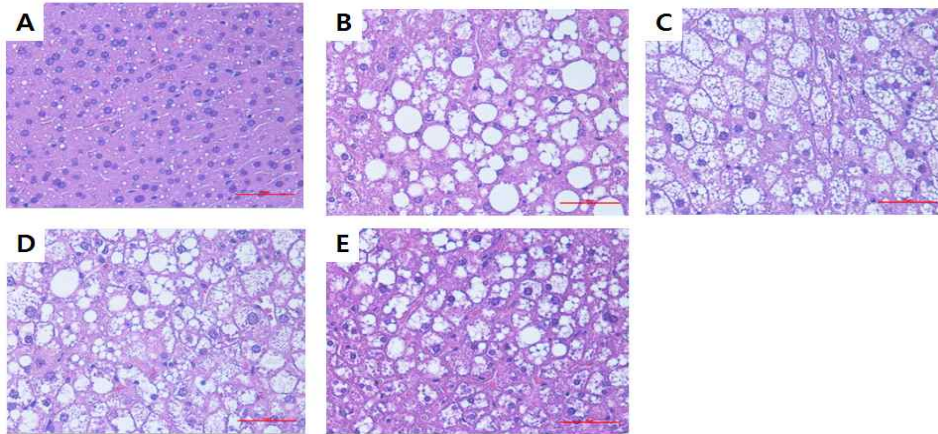


Fig. 27. Effect of phyllodulcin on histopathology in mouse liver tissue.

Hepatic histopathological features were observed in db/db mice. Bars indicate 50um. (A) Ctrl, (B) DB, (C) SVS 20, (D) P 10 and (E) P 20. Tissues were stained with H&E (400 x). Ctrl, normal control; DB, diabetes control; SVS 20, stevioside 20 mg/kg b.w.; P 10, phyllodulcin 10 mg/kg b.w.; P 20, phyllodulcin 20 mg/kg b.w.

**(10) Phyllodulcin이 db/db 마우스 췌장 조직의 histopathology에 미치는 영향**

- Normal control그룹에 비하여 DB그룹이  $\beta$ -cell의 핵이 보다 더 많고 진하게 관찰되는 것을 볼 수 있음. 이는 DB그룹에서 insulin의 양이 많이 증가하는 것으로 이야기 할 수 있으며, SVS 20, P 10 그리고 P 20그룹에서는 DB그룹과 큰 차이를 보이지 않음.

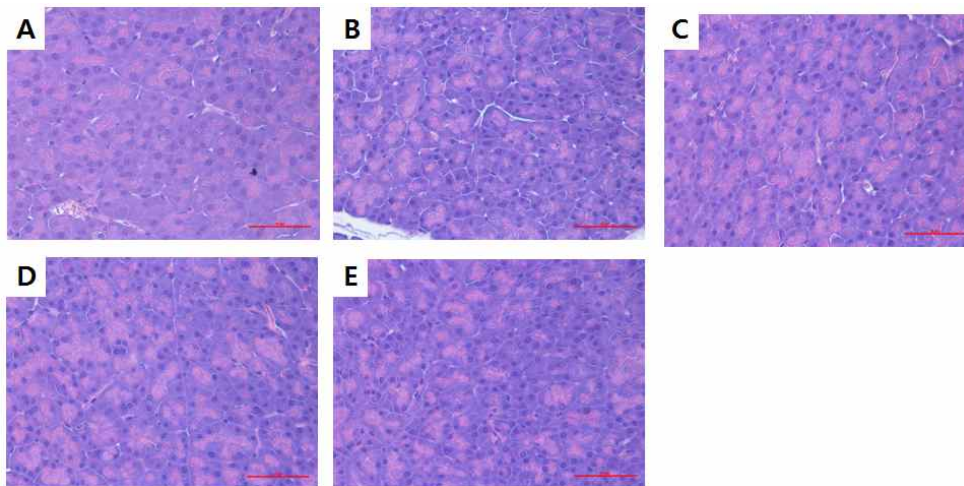


Fig. 28. Effect of phyllodulcin on histopathology in mouse pancreas tissue.

Pancreatic histopathological features were observed in db/db mice. Bars indicate 50 um. (A) Ctrl, (B) DB, (C) SVS 20, (D) P 10 and (E) P 20. Tissues were stained with H&E (400 x). Ctrl, normal control; DB, diabetes control; SVS 20, stevioside 20 mg/kg b.w.; P 10, phyllodulcin 10 mg/kg b.w.; P 20, phyllodulcin 20 mg/kg b.w.

(11) Phylloidalcin이 db/db 마우스 췌장 조직의 insulin histopathology에 미치는 영향

- Normal control 그룹에 비하여 DB 그룹에서 insulin으로 면역염색 된 부분이 광범위하여 진하게 나타난 것을 볼 수 있으며, SVS 20, P 10 그리고 P 20 그룹에서 DB 그룹에 비하여 insulin으로 면역염색 된 부분이 연하게 나타나는 것을 볼 수 있음.

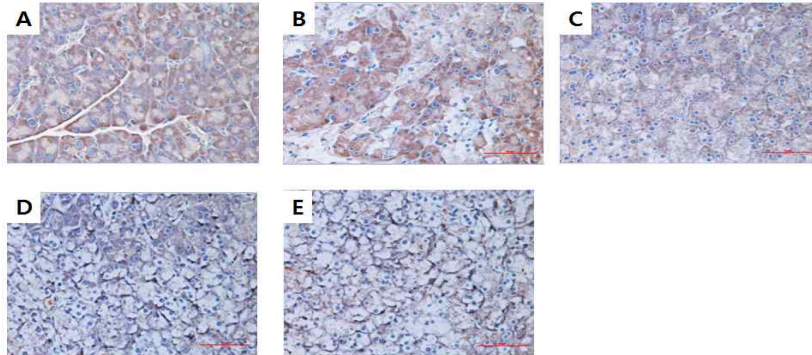


Fig. 29. Effect of phylloidalcin on immunohistochemical change in mouse pancreas tissue (400X).

Insulin immunostaining in pancreas in db/db mice. Bars indicate 50  $\mu$ m. (A) Ctrl, (B) DB, (C) SVS 20, (D) P 10 and (E) P 20. Tissues were stained with H&E. Ctrl, normal control; DB, diabetes control; SVS 20, stevioside 20 mg/kg b.w.; P 10, phylloidalcin 10 mg/kg b.w.; P 20, phylloidalcin 20 mg/kg b.w.

(12) Phylloidalcin이 db/db 마우스의 PEPCK (간) 및 GLUT4 (근육)의 단백질 발현에 미치는 영향

- 당신생과정에서 증가하는 PEPCK의 발현이 DB 그룹에 비하여 SVS 20, P 10 그리고 P 20 그룹에서 유의적으로 감소함 (Fig 12A.  $p < 0.05$  for SVS 20, P 10 and P 20)
- Glucose를 근육으로의 저장을 용이하게 하는 GLUT4의 발현이 DB 그룹에 비하여 SVS 20, P 20에서 증가하는 경향을 보였으며, 특히, P 10에서는 유의적으로 증가함 (Fig. 12B,  $p < 0.01$ ).

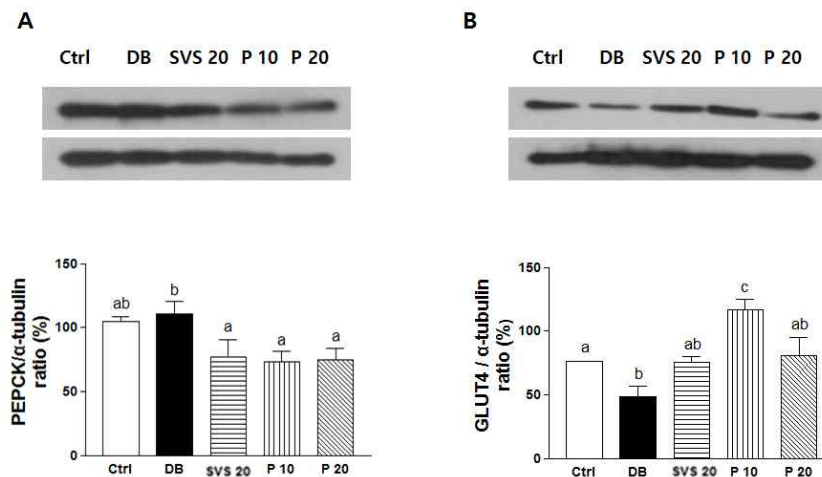


Fig. 30. Effect of phylloidalcin on expression of PEPCK and GLUT4 in db/db mice.

(A) Protein expressions of PEPCK in liver and (B) GLUT4 in muscle were measured by western blotting analysis. Band intensities were quantified by densitometry. Values shown are the mean  $\pm$  SEM. Different letters for given bars indicate that those values are significantly different from each other ( $p < 0.05$ ).  $\alpha$ -tubulin was used as a loading control. PEPCK, phosphoenolpyruvate carboxykinase; GLUT4, glucose transporter type 4; Ctrl, normal control; DB, diabetes control; SVS 20, stevioside 20 mg/kg b.w.; P 10, phylloidalcin 10 mg/kg b.w.; P 20, phylloidalcin 20 mg/kg b.w.

## 5. Xylobiose와 phyllodulcin의 in vitro, in vivo 항비만 기능성 평가

### 가. 실험방법

#### In vitro

- Xylobiose는 glucose와 함께 treat하는 보완제로서의 in vitro 세포 성장에 필요한 medium의 농도인 glucose 20mM 기준으로 하여 glucose를 xylobiose로 10%, 15%를 대체했을 때의 효과를 평가함.
- Phyllodulcin의 경우는 glucose를 대체할 수 있는 단독 물질로서 Phyllodulcin은 단독으로 1uM, 3uM, 10uM treat 하였을 때의 효과를 평가함.

#### (1) MTT 또는 Trypan blue를 이용한 cell viability 측정 및 비교

3T3-L1 preadipocyte 상대의 cell에서 여러 농도의 phyllodulcin을 treat함. Treat 후에 cell viability를 MTT를 이용하여 측정하고 시료독성을 평가함. 또는 3T3-L1을 여러 농도의 xylobiose로 treat하여 분화시킨 후 trypan blue를 이용하여 cell viability를 측정하고 시료독성을 평가함.

#### (2) 지방세포(3T3-L1) 분화 후, Oil red O staining을 통한 지방구 생성능력 비교

3T3-L1 cell을 100% confluence에서 분화 media로 change 후 8일 동안 분화시킴. 지방구를 빨간색으로 염색시키는 oil red O staining 시약을 이용하여 cell의 지방구를 염색함. xylobiose를 glucose 20mM의 각각 10%, 15% 대체하여 treat하고 phyllodulcin을 glucose 20mM 대신 1, 3, 10 uM로 treat 했을 때의 지방세포에서의 지방구 분화능력을 관찰함.

#### (3) RT-PCR을 이용하여 지방세포(3T3-L1)에서 pro-inflammatory cytokine 및 lipogenesis marker의 발현 측정 및 비교

3T3-L1에서 Glucose 20mM에서 10%, 15%를 xylobiose로 대체하고, phyllodulcin group에서는 Glucose 20mM 대신 1, 3, 10 $\mu$ M을 처리함. mRNA를 분리하여 cDNA로 합성시키고, pro-inflammatory cytokine인 IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  등과 lipogenesis marker인 PPAR $\gamma$ , FAS, C/EBP $\alpha$  등의 발현을 RT-PCR을 통해 측정함. Loading control로는 GAPDH가 사용됨.

#### (4) Western blot을 이용하여 지방세포(3T3-L1)에서 지방구 분화 marker의 발현 측정 및 비교

3T3-L1에서 Glucose 20mM에서 10%, 15%를 xylobiose로 대체하고, phyllodulcin group에서는 Glucose 20mM 대신 1, 3, 10 $\mu$ M을 처리함. Cell에서 단백질을 분리하고 지방구 분화 마커인 cRaf 및 PI3K-Akt-TOR signaling의 발현을 측정함. Loading control로는  $\alpha$ -tubulin이 사용됨.



### In vivo

- C57BL/6 (normal control)을 이용하고, AIN 93G diet를 control 식이로, 비만유도 그룹에게는 60% high fat diet를 공급 하여 실험을 실시함. 1차 년도에 비만의 효과가 있음이 검증된 D-xylose와 stevioside를 xylobiose와 phyllodulcin group 내에서 각각 positive control로 하였음. 그리고 실험 기간인 10주 동안 D-xylose, xylobiose 그리고 7주 동안 stevioside와 phyllodulcin을 공급함.
- Xylobiose group에는 60% high fat 식이의 성분 중 D-xylose를 사용하여 sucrose 함량에서 15%를 대체한 식이를 group III인 Xylo 그룹에 공급하였으며, xylobiose를 사용하여 60% high fat 식이의 성분인 sucrose 함량에서 각각 10%, 15%를 대체한 식이를 각각의 group IV인 XB 10그룹과 group V인 XB 15그룹에 공급하였음.
- Phyllodulcin group에서는 우선적으로 모든 비만유도 쥐에게 4주 동안 60% high fat 식이를 공급하고, normal control 그룹과 몸무게가 유의적으로 벌어진 4주차에 randomization 진행함. Group III인 SVS에는 stevioside 40mg/kg b.w., group IV인 P 20, group V인 P 40에는 각각 phyllodulcin 20, 40mg/kg b.w.을 gavage로 투여함

#### ▷ Xylobiose groups (treated for 6 weeks)

Group I : Normal control (AIN 93G diet)

Group II : Obesity control (60% high fat diet)

Group III : Xylo 15 (D-xylose replaced by 15% of total sucrose in the 60% high fat diet)

Group IV : XB 10 (xylobiose replaced by 10% of total sucrose in the 60% high fat diet)

Group V : XB 15 (xylobiose replaced by 15% of total sucrose in the 60% high fat diet)

#### ▷ Phyllodulcin groups (treated for 4 weeks)

Group I : Normal control (AIN 93G diet)

Group II : Obesity control (60% high fat diet)

Group III : SVS 40 (60% high fat diet and stevioside 40mg/kg b.w. by gavage)

Group IV : P 20 (60% high fat diet and phyllodulcin 20mg/kg b.w. by gavage)

Group V : P 40 (60% high fat diet and phyllodulcin 40mg/kg b.w. by gavage)

#### (1) 실험동물의 체중변화와 식이 섭취량 측정

실험동물의 적응 기간이 끝나고 실험 시작부터 실험 종료 시점까지 1주에 2회씩 체중변화와 식이 섭취량 변화를 측정하여 각 그룹 간의 차이를 비교함.

#### (2) Organ weight

실험동물 희생 시 liver, pancreas, spleen, kidney 등을 적출하여 PBS로 혈액을 제거한 후, 무게를 측정함. xylobiose, phyllodulcin를 섭취한 그룹들과 obesity control과의 장기 무게 차이를 비교함.

(3) Final fasting blood glucose

공복혈당은 해부당일로 부터 실험동물을 12시간 절식시킨 후, 꼬리정맥에서 혈액을 채혈한 다음 혈당측정기(Accucheck, Germany)를 이용하여 측정함.

(4) Leptin 및 adiponectin level 측정

Xylobiose와 phyllo dulcin의 섭취가 식이섭취 호르몬인 leptin과 adiponectin에 미치는 영향을 살펴보고자 혈액 sample을 원심 분리하여 plasma를 얻은 후 ELISA kit (Crystal Chem, IL, USA)를 이용하여 leptin 및 adiponectin의 양을 측정함.

(5) Plasma lipid analysis (TG, TC, LDL-C, HDL-C)

Triglyceride, total cholestrol, HDL-cholesterol은 아산제약의 kit를 사용하여 instruction 대로 수행함. LDL-cholesterol은 'Friedewald formula' (Clin chem, 18(6):499-502, 1972)를 이용하여 값을 산출함. 계산식은 아래와 같음.

$$\text{LDL-C} = \text{TC} - \text{HDL-C} - \text{TG}/5$$

(6) 간조직에서의 Histopathological change

장기별 병리조직학적 변화를 4% 포르말린에 고정시킨 후, 파라핀 embedding으로 슬라이드를 만들어 H&E staining 염색함. 지방간의 경우 lipid droplet이 동그랗게 관찰되며, 간조직이 치밀하지 못함.

(7) 간조직에서 lipogenesis 및 inflammation 단백질 발현분석

Western blotting을 통하여 지방간에서 증가하는 lipogenesis 및 inflammation의 발현을 측정하여 treatment 그룹과 비교함.

(8) 간 또는 지방조직에서 lipogenesis 및 inflammation mRNA 발현분석

Real time PCR을 통하여 lipogenesis 및 inflammation의 발현을 측정하여 항비만 기전을 밝힘.

**나. 실험결과**

**In vitro (3T3-L1 preadipocytes)**

**(1) Xylobiose**

**(가) Oil Red O Staining 지방세포분화(adipogenesis)측정 결과**

- 지방세포 전구체(Preadipocyte)인 3T3-L1 cell을 maintain하여 confluence 상태가 되면, Dexamethasone, isobutylmethylxanthine, insulin을 첨가하여 분화를 유도시킴. 8일간의 분화 maintain 후, 분화에 미치는 영향을 측정하기 위해 Oil Red O staining 후 microscopy로 축적된 지방세포의 크기와 개수를 비교하고, 염색된 지방을 isopropyl alcohol로 녹인 후 505nm에서 흡광도를 재서 lipid accumulation을 측정함.

- Xylobiose 및 xylose를 treat한 3T3-L1 세포로 oil red o staining을 한 결과 glucose 20mM을 treat한 세포에 비해 모든 treat 그룹들(Xylo 15, XB 10, XB15)의 지방세포 분화가 유의적으로 낮아짐 (Fig 1.  $p < 0.001$  for Xylo 15, XB 10, XB 15).
- Xylo 15와 XB 10간에 차이는 없으며 (Fig 1.  $p > 0.05$  for XB 10) XB15는 G에 비해 Ctrl과 비슷한 수준으로 유의적으로 낮아짐 (Fig 1.  $p < 0.001$  for XB 15).

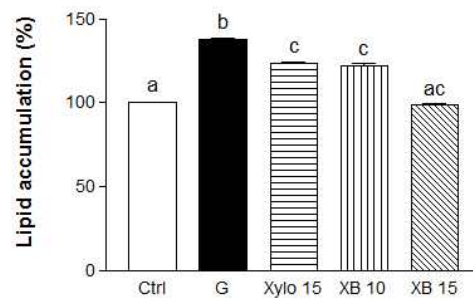


Fig. 1. Effect of xylobiose and xylose on 3T3-L1 cell lipid accumulation

Values shown are the mean  $\pm$  SEM. Different letters for given bars indicate that those values are significantly different from each other ( $P < 0.05$ ). Ctrl, control; G, glucose 20mM; Xylo 15, D-xylose replaced by 15% of total glucose in the media; XB 10, xylobiose replaced by 10% of total glucose in the media; XB 15, xylobiose replaced by 15% of total glucose in the media.

#### (나) Trypan blue를 이용한 cell viability 측정 및 비교

- Cell viability 측정 결과 Glucose 20mM, Xylose 15%, Xylobiose 10%, 15% 모두 Ctrl과 유의적인 차이가 없었음. (Fig 2.  $p > 0.05$  for all) 즉, xylose, xylobiose는 해당 dose에서 toxicity가 없음을 알 수 있었음.

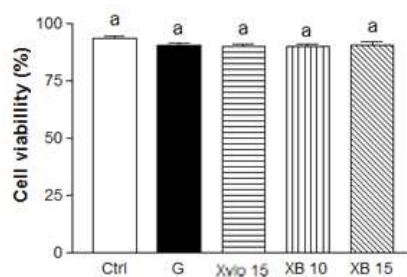


Fig. 2. Effect of xylobiose and xylose on 3T3-L1 cell viability

Values shown are the mean  $\pm$  SEM. Different letters for given bars indicate that those values are significantly different from each other ( $P < 0.05$ ). Ctrl, control; G, glucose 20mM; Xylo 15, D-xylose replaced by 15% of total glucose in the media; XB 10, xylobiose replaced by 10% of total glucose in the media; XB 15, xylobiose replaced by 15% of total glucose in the media.

(다) 지방세포분화에 따른 염증성 cytokine 측정

- 염증성 cytokine TNF $\alpha$  (A), IL1- $\beta$  (B) mRNA expressions 측정 결과 그룹 간 발현 차이를 보이지 않았음.

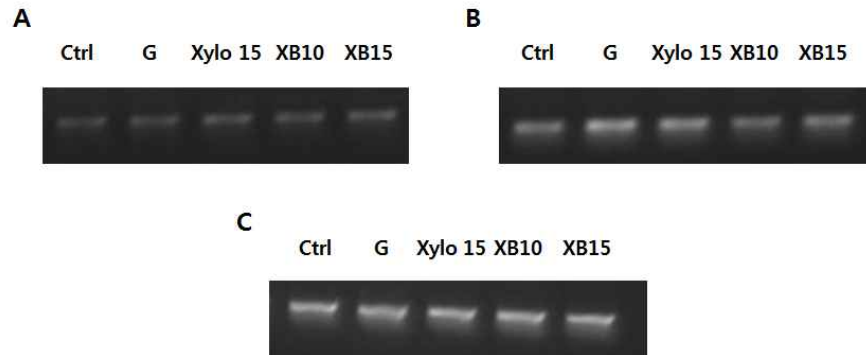


Fig. 3. Effect of xylobiose and xylose on mRNA levels of inflammatory cytokines in 3T3-L1 cell

(A) mRNA expressions of TNF $\alpha$  in 3T3-L1 cell. (B) mRNA expressions of IL1- $\beta$  in 3T3-L1 cell. (C) mRNA expressions of GAPDH (loading control). Ctrl, control; G, glucose 20mM; Xylo 15, D-xylose replaced by 15% of total glucose in the media; XB 10, xylobiose replaced by 10% of total glucose in the media; XB 15, xylobiose replaced by 15% of total glucose in the media.

(라) 항비만 기전 측정

- Lipogenesis marker PPAR $\gamma$  (A), C/EBP $\alpha$  (B), SREBP-1c (C) expression 측정 결과 그룹 간 발현 정도의 차이를 보이지 않았음.

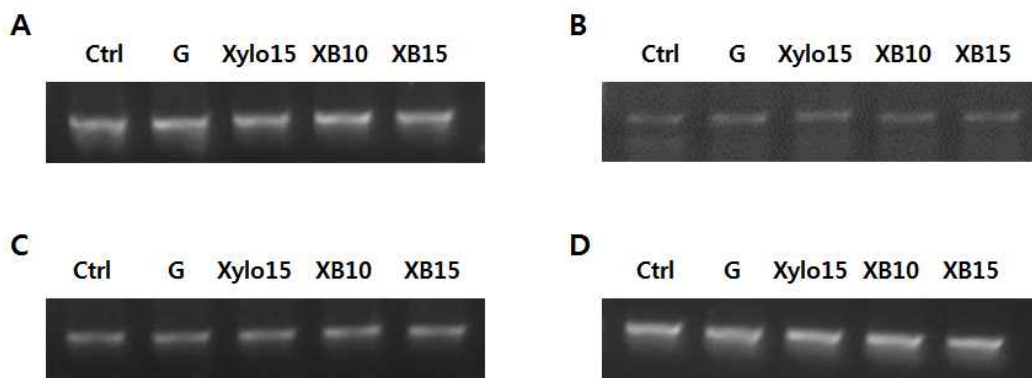


Fig. 4. Effect of xylobiose and xylose on mRNA levels of lipogenesis markers in 3T3-L1 cell

(A) mRNA expressions of PPAR $\gamma$  in 3T3-L1 cell. (B) mRNA expressions of C/EBP $\alpha$  in 3T3-L1 cell. (C) mRNA expressions of SREBP-1c in 3T3-L1 cell. (D) mRNA expressions of GAPDH (loading control). Ctrl, control; G, glucose 20mM; Xylo 15, D-xylose replaced by 15% of total glucose in the media; XB 10, xylobiose replaced by 10% of total glucose in the media; XB 15, xylobiose replaced by 15% of total glucose in the media.

## (2) Phyllodulcin

### (가) Oil Red O Staining 지방세포분화(adipogenesis)측정 결과

- Phyllodulcin을 treat한 분화시킨 3T3-L1 cell로 oil red o staining을 한 결과 glucose 20mM을 treat한 세포에 비해 모든 treat 그룹들 (SVS, P 1, P3, P 10) 의 지방세포 분화가 유의적으로 낮아짐. ( $p < 0.001$  for SVS, P 1, P 3 and P 10)
- 이는 phyllodulcin이 glucose에 비하여 지방세포의 분화를 줄여준다고 해석 할 수 있음.

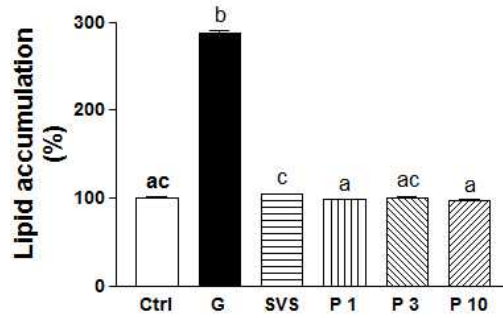


Fig. 5. Effect of phyllodulcin on 3T3-L1 cell lipid accumulation

Values shown are the mean  $\pm$  SEM. Different letters for given bars indicate that those values are significantly different from each other ( $P < 0.05$ ). Ctrl, control; G, glucose 20mM; SVS, stevioside 10  $\mu$ M; P 1, phyllodulcin 1  $\mu$ M; P 3, phyllodulcin 3  $\mu$ M; P 10, phyllodulcin 10  $\mu$ M.

### (나) MTT를 이용한 cell viability 측정 및 비교

- Phyllodulcin을 treat한 preadipocyte의 3T3-L1 cell로 24h 또는 48h MTT assay를 한 결과 모든 treat 그룹들 (SVS, P 1, P3, P 10) 의 cell viability가 유의적인 차이가 없었음 ( $p > 0.05$  for all).
- 이는 phyllodulcin이 cell의 toxicity를 유도하지 않아 cell viability에 영향을 주지 않는 것으로 해석할 수 있음.

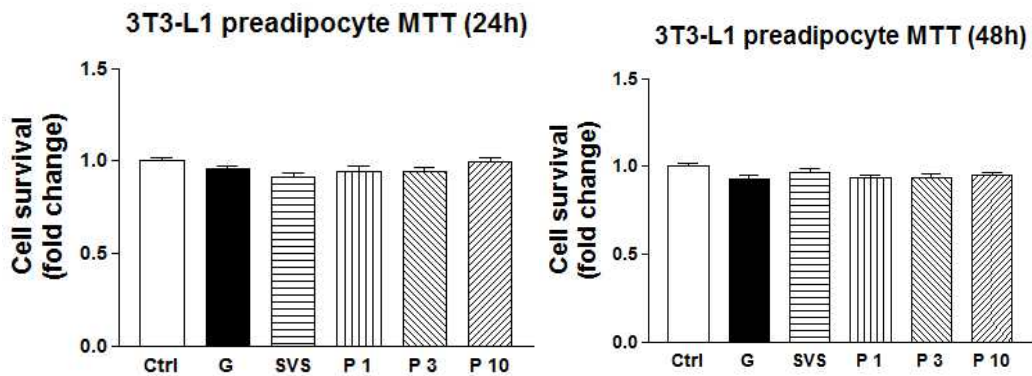


Fig. 6. Effect of phyllodulcin on preadipocyte 3T3-L1 cell viability

Values shown are the mean  $\pm$  SEM. Different letters for given bars indicate that those values are significantly different from each other ( $P < 0.05$ ). Ctrl, control; G, glucose 20mM; SVS, stevioside 10  $\mu$ M; P 1, phyllodulcin 1  $\mu$ M; P 3, phyllodulcin 3  $\mu$ M; P 10, phyllodulcin 10  $\mu$ M.

(다) 지방세포분화에 따른 염증성 cytokine 측정

- 염증성 cytokine IL1-β, IFN-γ, TNFα mRNA expressions 측정 결과 phyllooludcin에 비하여 유의적으로 낮아진 것을 관찰 할 수 있었음 (p<0.01 for all).
- 특히, IFN-γ, TNFα에서는 phyllooludcin의 dose에 따라 염증성 cytokine이 glucose 20mM에 비하여 유의적으로 낮아짐을 보임.
- 이는 phyllooludcin을 glucose대신 treat하였을 때, 염증반응을 감소시킨다는 것을 보여 줌.

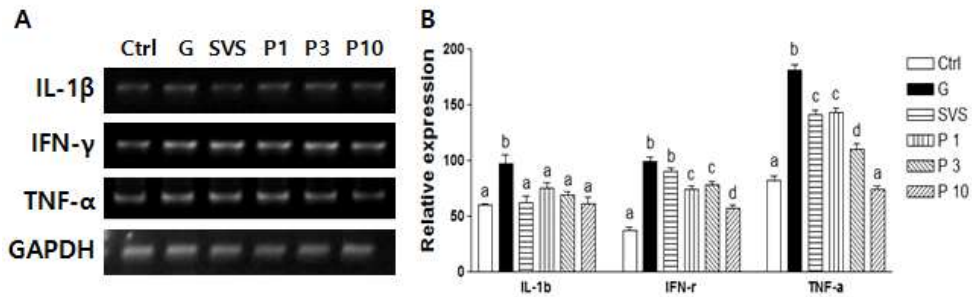


Fig. 7. Effect of phyllooludcin on mRNA levels of inflammatory cytokines in 3T3-L1 cell. (A) Representative blots of IL1-β, IFN-γ and TNFα expression. (B) Each figure shows mRNA expressions of IL1-β, IFN-γ and TNFα detected by RT-PCR. GAPDH was used as a loading control. Values shown are the mean ± SEM. Different letters for given bars indicate that those values are significantly different from each other ( $P < 0.05$ ). Ctrl, control; G, glucose 20mM; SVS, stevioside 10 uM; P 1, phyllooludcin 1 uM; P 3, phyllooludcin 3 uM; P 10, phyllooludcin 10 uM.

(라) 항비만 기전 측정

- Lipogenesis marker C/EBPα, PPARγ, SREBP-1c expression을 RT-PCR로 측정 결과 phyllooludcin에 의해서 glucose 20mM에 비해 유의적으로 항비만 기전이 감소되는 것을 보임 (p<0.01 for all)
- 이는 phyllooludcin이 glucose에 비해 유의적으로 lipogenesis를 억제시켜 준다고 할 수 있음.

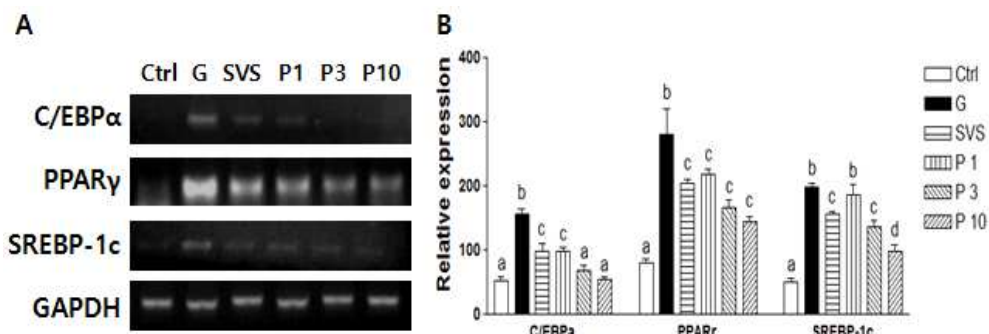


Fig. 8. Effect of phyllooludcin on lipogenesis mRNA levels of C/EBPα, PPARγ, and SREBP-1c in 3T3-L1 cell. (A) Representative blots of C/EBPα, PPARγ, and SREBP-1c expression. (B) Each figure shows mRNA expressions of C/EBPα, PPARγ, and SREBP-1c detected by RT-PCR. GAPDH was used as a loading control. Values shown are the mean ± SEM. Different letters for given bars indicate that those values are significantly different from each other ( $P < 0.05$ ). Ctrl, control; G, glucose 20mM; SVS, stevioside 10 uM; P 1, phyllooludcin 1 uM; P 3, phyllooludcin 3 uM; P 10, phyllooludcin 10 uM.

- 지방구의 분화에 따라 증가하는 c-Raf signaling을 western blot으로 측정된 결과, glucose 20mM에 비하여 phylloduclin treatment 그룹에서 모두 유의적으로 감소함 ( $p < 0.05$  for SVS,  $p < 0.01$  for P1, P3, and P10 in c-Raf,  $p < 0.05$  for SVS, P1, and P3,  $p < 0.01$  for P10 in p-Akt,  $p < 0.05$  for all in p-mTOR).
- 이는 위의 lipogenesis RT-PCR 결과와 더불어 phylloduclin이 지방구의 분화를 억제시켜 지방구 생성을 억제하는 신호전달체계에 영향을 준다는 것을 보여줌.

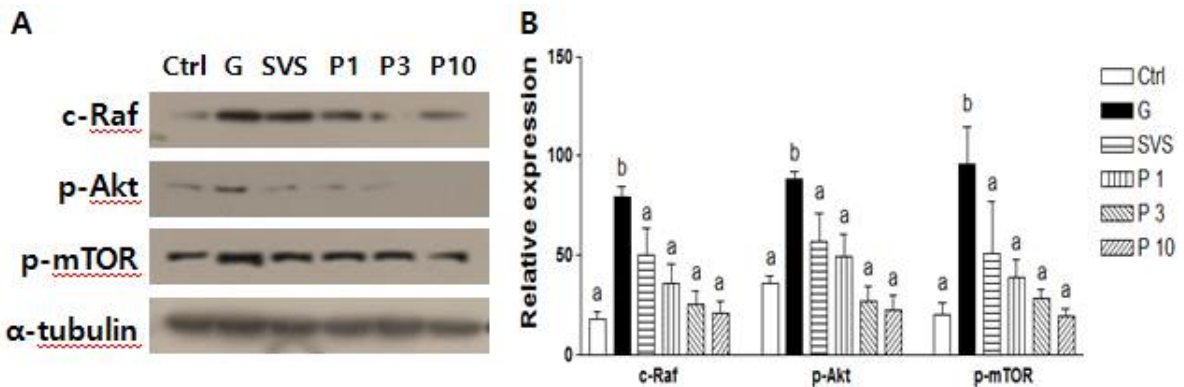


Fig. 9. Effect of phylloduclin on c-Raf signaling protein levels of c-Raf, p-Akt, p-mTOR in 3T3-L1 cell

(A) Representative blots of c-Raf signaling expression. (B) Each figure shows mRNA expressions of c-Raf signaling detected by western.  $\alpha$ -tubulin was used as a loading control. Values shown are the mean  $\pm$  SEM. Different letters for given bars indicate that those values are significantly different from each other ( $P < 0.05$ ). Ctrl, control; G, glucose 20mM; SVS, stevioside 10 uM; P 1, phylloduclin 1 uM; P 3, phylloduclin 3 uM; P 10, phylloduclin 10 uM.

### *In vivo*

#### (1) Xylobiose

##### (가) Xylobiose 및 xylose가 C57BL/6 마우스의 체중과 식이 섭취량에 미치는 영향

##### (a) 체중, 식이 섭취량

- 10주의 실험 기간 동안 해당 식이를 급여한 결과 Ctrl에 비해 HF과 모든 treat그룹 (Xylo 15, XB 10, XB 15)의 체중이 유의적으로 높아짐 (Fig 10 (A).  $p < 0.001$  for all).
- XB 15의 체중은 다른 비만 유도 그룹들(HF, Xylo 15, XB 10)에 비해 유의적으로 낮아짐 (Fig 10 (A).  $p < 0.01$  for Xylo 15,  $p < 0.001$  for HF, XB 10).
- 총 식이 섭취량을 실험 기간인 10 주(70 일)로 나누어, 하루 평균 식이 섭취량을 산출함. 그 결과 Ctrl군에 비하여 비만 유도 그룹(HF, Xylo 15, XB 10, XB 15)이 유의적으로 낮아짐(Fig 10 (B).  $p < 0.01$  for all).



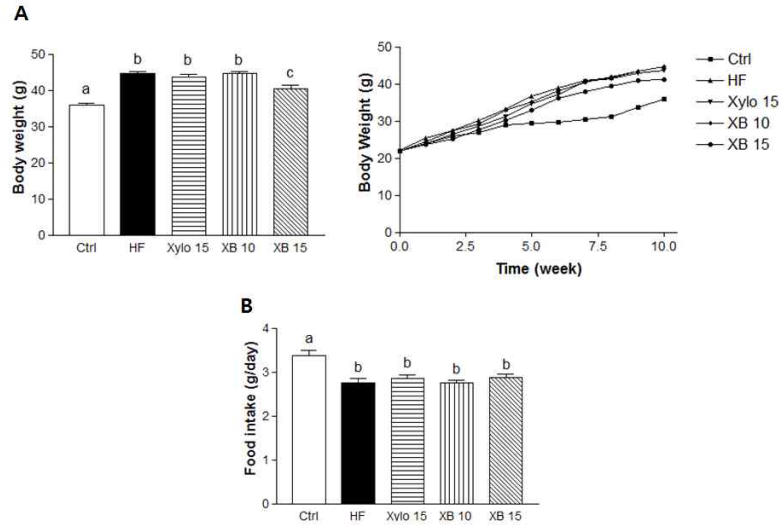


Fig. 10. Effect of xylobiose on the changes of body weight, food intake in high fat-induced obese mice

Body weight (A), food intake (B) were measured in C57BL/6 mice. Values shown are the mean  $\pm$  SEM. Different letters for given bars indicate that those values are significantly different from each other ( $p < 0.05$ ). Ctrl, normal control; HF, high fat(60%) diet control; Xylo 15, D-xylose replaced by 15% of total sucrose in the high fat diet; XB 10, xylobiose replaced by 10% of total sucrose in the diet; XB 15, xylobiose replaced by 15% of total sucrose in the high fat diet.

### (b) 식이효율

- 식이효율(Food efficiency ratio , FER)은 식이 섭취량 대비 체중 증가량(Bodyweight gain (g)/Food intake (g) x 100)으로 산출하였고 그 결과 Ctrl에 비해 비만 유도 그룹들이 유의적으로 높아짐 (Fig 11.  $p < 0.01$  for all).
- XB 15 그룹은 다른 비만 유도 그룹에 비해 낮지만 유의적이지 않음 (Fig 11.  $p > 0.05$  for XB 15).

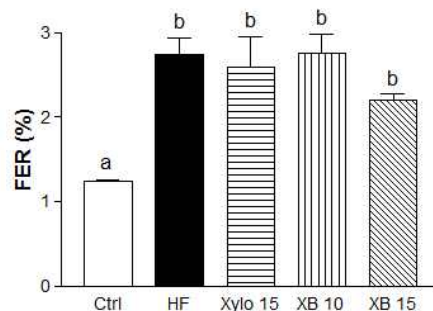


Fig. 11. Effect of xylobiose on the food efficiency ratio of high fat-induced obese mice. Bodyweight gain, food intake were measured in C57BL/6 mice. Values shown are the mean  $\pm$  SEM. FER, Food efficiency ratio= Bodyweight gain (g)/Food intake (g) x 100. Different letters for given bars indicate that those values are significantly different from each other ( $p < 0.05$ ). Ctrl, normal control; HF, high fat(60%) diet control; Xylo 15, D-xylose replaced by 15% of total sucrose in the high fat diet; XB 10, xylobiose replaced by 10% of total sucrose in the diet; XB 15, xylobiose replaced by 15% of total sucrose in the high fat diet.



## (나) C57BL/6 mice 조직 무게 비교

### (a) 간 조직 무게

- 간 조직의 무게는 Ctrl과 XB 15 간에 차이를 보이지 않았으며 나머지 비만 유도 그룹들은 Ctrl에 비해 유의적으로 무게가 증가함 (Fig 12.  $p < 0.001$  for HF,  $p < 0.01$  for Xylo 15, XB 10,  $p > 0.05$  for XB 15).
- HF 그룹에 비해 모든 treat 그룹들의 무게가 유의적으로 낮았음 (Fig 12.  $p < 0.05$  for Xylo 15, XB 10,  $p < 0.001$  for XB 15).

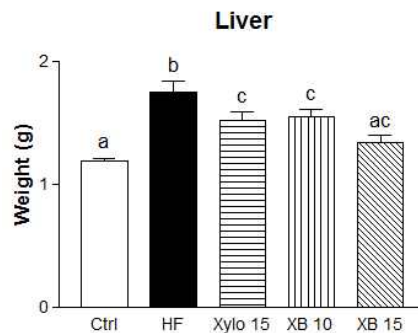


Fig. 12. Effect of xylobiose on liver weight in high fat-induced obese mice.

Organ weight of liver was measured. Data were analyzing using one-way ANOVA with Newman-Keuls post hoc test ( $p < 0.05$ ). Letter subscripts are used to indicate significant differences. Ctrl, normal control; HF, high fat(60%) diet control; Xylo 15, D-xylose replaced by 15% of total sucrose in the high fat diet; XB 10, xylobiose replaced by 10% of total sucrose in the diet; XB 15, xylobiose replaced by 15% of total sucrose in the high fat diet.

### (b) 지방조직 무게

- 마우스 지방조직(subcutaneous, mesenteric, epididymal, perirenal adipose tissue)들을 분리하여 무게를 측정한 결과 모든 조직에서 비만 유도 그룹들이 Ctrl에 비하여 유의적으로 조직 무게가 높았음 (Fig 13 (A,B,C,D).  $p < 0.001$  for all).
- Perirenal 지방조직에서는 XB 15 그룹 무게가 HF, Xylo 15, XB 10 그룹에 비해 낮았음 (Fig 13 (A).  $p < 0.05$  for HF, XB 10,  $p < 0.01$  for Xylo 15).
- Subcutaneous 지방조직에서 Xylo 15는 HF과 차이가 없으며 (Fig 13 (B).  $p > 0.05$  for Xylo 15) XB 10, XB 15 두 그룹 모두 HF 그룹에 비해 유의적으로 낮았음 (Fig 13 (B).  $p < 0.05$  for XB 10, XB 15).
- Epididymal 지방조직에서는 HF과 treatment 그룹 간 차이가 없음 (Fig 13 (C).  $p > 0.05$  for all).
- Mesenteric 지방조직에서는 XB 15 그룹 무게가 HF, Xylo 15, XB 10 그룹에 비해 유의적으로 낮았음 (Fig 13 (D).  $p < 0.01$  for HF, Xylo 15,  $p < 0.001$  for XB 10).

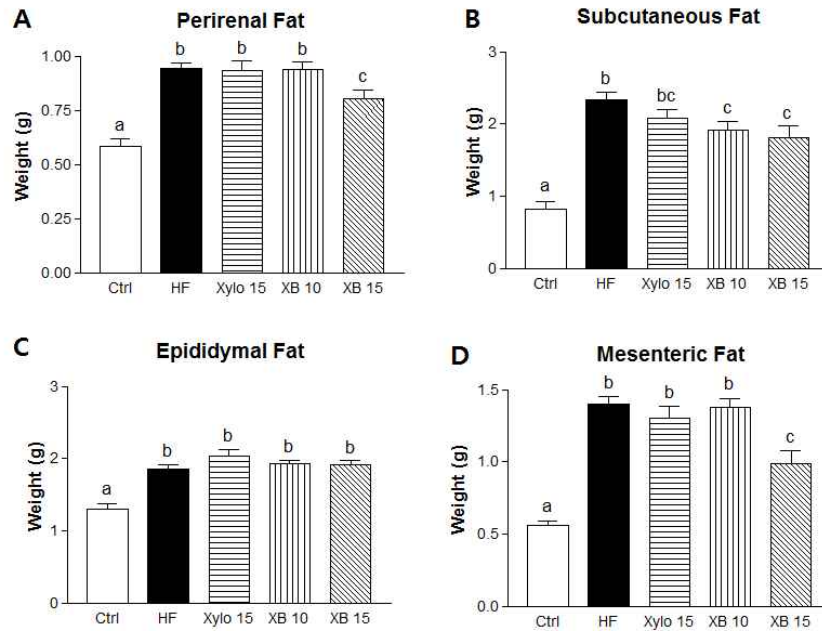


Fig. 13. Effect of xylobiose, xylose on fat tissue weights in high fat-induced obese mice.

Weight of (A) perirenal, (B) subcutaneous, (C) epididymal, (D) mesenteric adipose tissue were measured. Data were analyzing using one-way ANOVA with Newman-Keuls post hoc test ( $p < 0.05$ ). Letter subscripts are used to indicate significant differences. Ctrl, normal control; HF, high fat(60%) diet control; Xylo 15, D-xylose replaced by 15% of total sucrose in the high fat diet; XB 10, xylobiose replaced by 10% of total sucrose in the diet; XB 15, xylobiose replaced by 15% of total sucrose in the high fat diet.

#### (다) 혈중 지질대사 관련 호르몬 변화 측정

- Elisa를 통해 혈중 leptin, adiponectin 호르몬 측정 결과 모든 비만유도 그룹이 Ctrl과 유의적인 차이를 보임(Fig 14 (A,B).  $p < 0.001$  for HF, Xylo 15, XB 10, XB 15). Leptin은 Ctrl에 비해 수치가 높아졌으며 adiponectin은 낮아짐.
- Leptin 측정 결과 HF에 비해 XB 15의 수치가 낮아짐 (Fig 14 (A).  $p < 0.01$  for XB 15).
- Adiponectin 측정 결과 HF에 비해 Xylo 15, XB 15에서 수치가 유의적으로 높아짐(Fig 14 (B).  $p < 0.001$  for Xylo 15,  $p < 0.01$  for XB 15).
- 높은 수치의 leptin과 낮은 수치의 adiponectin은 비만의 지표로 xylobiose 15% 대체그룹은 leptin, adiponectin을 수준을 조절하여 비만 예방에 효과가 있는 것으로 볼 수 있음.

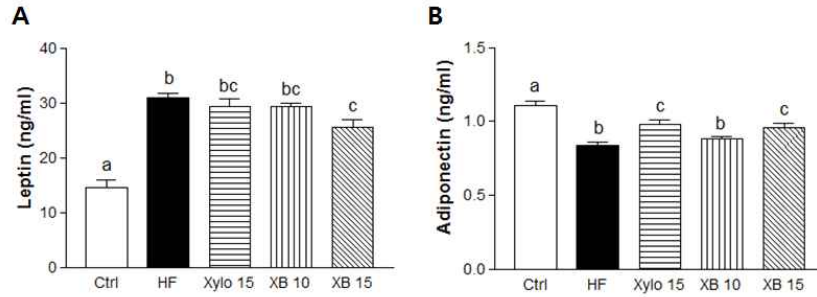


Fig. 14. Effect of xylobiose, xylose on plasma leptin, adiponectin levels in high fat-induced obese mice.

(A) leptin, (B) adiponectin were measured in plasma. Data were analyzing using one-way ANOVA with Newman-Keuls post hoc test ( $p < 0.05$ ). Letter subscripts are used to indicate significant differences. Ctrl, normal control; HF, high fat(60%) diet control; Xylo 15, D-xylose replaced by 15% of total sucrose in the high fat diet; XB 10, xylobiose replaced by 10% of total sucrose in the diet; XB 15, xylobiose replaced by 15% of total sucrose in the high fat diet.

### (라) 혈중 혈당 및 비만 관련인자 측정

#### (a) Final blood glucose

- 최종 혈당 수치가 Ctrl에 비해 모든 비만 유도 그룹이 유의적으로 높아짐(Fig 15.  $p < 0.001$  for HF, Xylo 15, XB 10, XB 15).
- HF에 비해 Xylo 15와 XB 15에서 유의적으로 혈당이 낮아짐 (Fig 15.  $p < 0.001$  for Xylo 15, XB 15). 반면에 XB 10은 HF과 차이가 없어 (Fig 15.  $P > 0.05$  for XB 10) xylobiose 10%는 경향은 보이나 유의적이지 않았으며 15%의 대체는 혈당조절 효과를 보이는 것으로 볼 수 있음 (Fig 15.  $p < 0.001$  for XB 15)

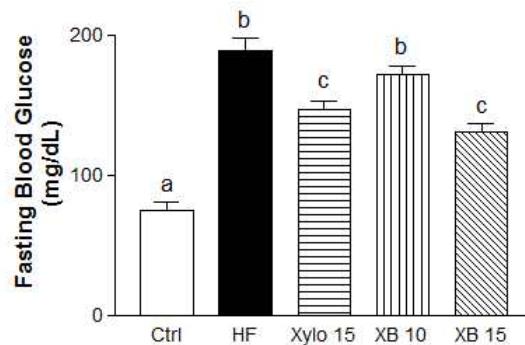


Fig. 15. Effect of xylobiose, xylose on final blood glucose in high fat-induced obese mice

Data were analyzing using one-way ANOVA with Newman-Keuls post hoc test ( $p < 0.05$ ). Letter subscripts are used to indicate significant differences. Ctrl, normal control; HF, high fat(60%) diet control; Xylo 15, D-xylose replaced by 15% of total sucrose in the high fat diet; XB 10, xylobiose replaced by 10% of total sucrose in the diet; XB 15, xylobiose replaced by 15% of total sucrose in the high fat diet.

**(b) Triglyceride, total cholesterol, HDL-cholesterol, LDL-cholesterol**

- Triglyceride(TG), total cholesterol(TC)에서 HF 그룹에 비해 Ctrl과 treat 그룹의 수치가 낮아짐 (Fig 16 (A,B).  $p < 0.001$  for Ctrl, Xylo 15, XB 10, XB 15).
- LDL cholesterol(LDL-C)은 HF 그룹에 비해 Ctrl과 treat 그룹의 수치가 낮아짐 (Fig 16 (D).  $p < 0.001$  for Ctrl, XB 10, XB 15,  $p < 0.05$  for Xylo 15).
- TG 측정 결과 HF 그룹은 Ctrl에 비해 유의적으로 높아졌으며 (Fig 16 (A).  $p < 0.001$  for HF), xylose, xylobiose 섭취그룹은 모두 HF 보다 유의적으로 낮았음 (Fig 16 (A).  $p > 0.05$  for Xylo 15, XB 10, XB 15).
- TC 측정 결과 HF 그룹은 유의적으로 Ctrl 보다 높았으며 (Fig 16 (B).  $p < 0.001$  for HF) xylose, xylobiose 그룹은 유의적으로 HF 보다 낮았음. 특히, XB15 그룹은 Ctrl 그룹 수준으로 TC 레벨이 낮아졌음 (Fig 16 (B).  $p < 0.05$  for Xylo 15,  $p < 0.01$  for XB 10,  $p < 0.001$  for XB 15)
- HDL cholesterol은 XB 10이 HF에 비하여 유의적으로 높아짐 (Fig 16 (C).  $p < 0.01$  for XB 10). Xylo 15, XB 15 그룹은 높아지는 경향은 보이나 유의적이지 않았음 (Fig 16 (C).  $p > 0.05$  for Xylo 15, XB 15).
- LDL-C는  $TG/5-(TC+HDL)$  식을 통해 산출하였고 HF 그룹은 Ctrl 그룹에 비해 유의적으로 높아졌으며 (Fig 16 (D).  $p < 0.001$  for HF), Xylo 15, XB 10, XB 15 모든 그룹은 HF에 비해 유의적으로 낮아졌고, 특히 xylobiose 그룹들은 Ctrl 수준으로 LDL-C 레벨이 떨어졌음(Fig 16 (D).  $p < 0.05$  for Xylo 15,  $p < 0.001$  for XB 10, XB 15).

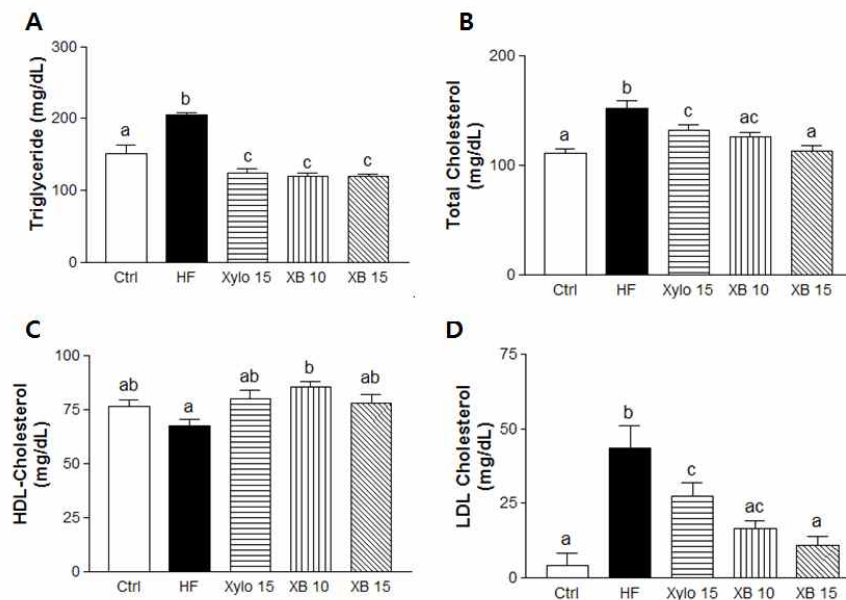


Fig. 16. Effect of xylobiose, xylose on lipid profile in plasma of high fat-induced obese mice

(A) Triglyceride (TG), (B) total cholesterol (TC), (C) high density lipoprotein (HDL-C) and (D) low density lipoprotein (LDL-C) were measured in plasma. Data were analyzing using one-way ANOVA with Newman-Keuls post hoc test ( $p < 0.05$ ). Letter subscripts are used to indicate significant differences. Ctrl, normal control; HF, high fat(60%) diet control; Xylo 15, D-xylose replaced by 15% of total sucrose in the high fat diet; XB 10, xylobiose replaced by 10% of total sucrose in the diet; XB 15, xylobiose replaced by 15% of total sucrose in the diet.

### (c) 동맥경화지수

- 동맥경화지수(atherogenic index)는  $\text{Log}(\text{TG}/\text{HDL-C})$ 으로 계산됨.
- 동맥경화지수를 산출한 결과, HF은 Ctrl에 비해 유의적으로 높으며 (Fig 17.  $p < 0.001$  for HF) 모든 treat 그룹은 HF에 비해 유의적으로 낮았음(Fig 17.  $p < 0.05$  for Xylo 15, XB 15.  $p < 0.01$  for XB 10).

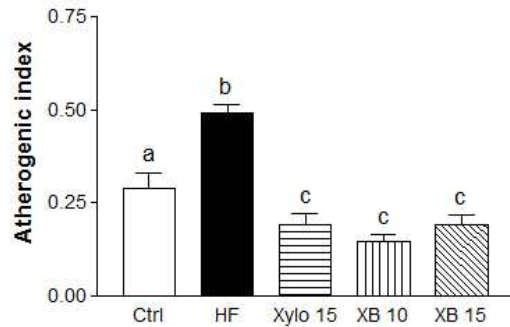


Fig. 17. Effect of xylobiose, xylose on atherogenic index in plasma in high fat-induced obese mice

Atherogenic index =  $\text{Log}(\text{TG}/\text{HDL-C})$ . Triglyceride(TG), high density lipoprotein (HDL-C) were measured in plasma. Data were analyzing using one-way ANOVA with Newman-Keuls post hoc test ( $p < 0.05$ ). Letter subscripts are used to indicate significant differences. Ctrl, normal control; HF, high fat(60%) diet control; Xylo 15, D-xylose replaced by 15% of total sucrose in the high fat diet; XB 10, xylobiose replaced by 10% of total sucrose in the diet; XB 15, xylobiose replaced by 15% of total sucrose in the high fat diet.

### (마) 간조직에서의 Histopathological change

- 간조직의 병리조직학적 변화를 H&E staining으로 관찰한 결과 lipid droplet(white color)이 HF군(Fig 18. A-b, B-b)과 비교하여 나머지 그룹들에서 수와 크기가 줄어든 것을 확인 할 수 있음.
- 즉, HF에서는 광범위한 steatosis(Fig 18. A-b, B-b arrow head)를 볼 수 있었으며 xylose와 xylobiose는 고지방 식이로 인한 지방간을 예방한다고 볼 수 있음.



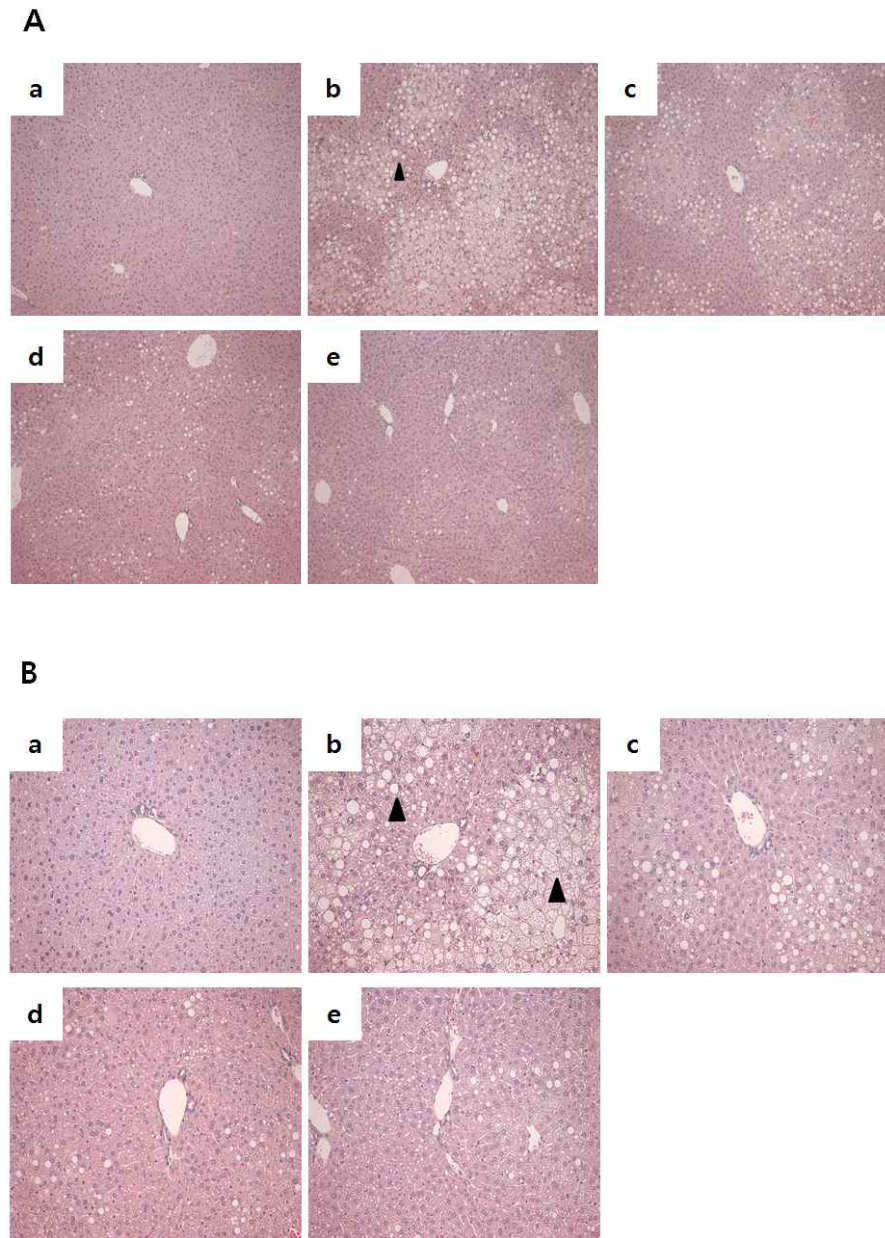


Fig. 18. Effect of xylobiose, xylose on histopathological features of mouse in high fat-induced obese mice

(A) HE staining, magnification  $\times 100$ . (B) HE staining, magnification  $\times 200$ . (a) Ctrl, (b) HF, (c) Xylo 15, (d) XB 10, (e) XB 15 for both (A),(B). Arrow head points at extensive steatosis. Ctrl, normal control; HF, high fat(60%) diet control; Xylo 15, D-xylose replaced by 15% of total sucrose in the high fat diet; XB 10, xylobiose replaced by 10% of total sucrose in the diet; XB 15, xylobiose replaced by 15% of total sucrose in the high fat diet.

#### (바) 간조직에서 lipogenesis 및 inflammation mRNA 발현분석

- Real time PCR 을 통하여 mRNA 발현을 측정 한 결과 lipogenesis marker PPAR $\gamma$  (Fig A)에서 Ctrl에 비해 HF가 유의적으로 높아졌으나, xylose, xylobiose supplementation에 의해 Ctrl 수준으로 낮아졌음(Fig 19 (A).  $p < 0.05$  for all)
- SREBP-1c (Fig. B)에서도 Ctrl에 비해 HF가 유의적으로 높아졌으나( $p < 0.05$ ), xylose, xylobiose supplementation에 의해 Ctrl 수준으로 낮아졌음(Fig 19 (B).  $p < 0.01$  for all).

- C/EBPα (Fig. C)에서도 Ctrl에 비해 HF가 유의적으로 높아졌으나( $p < 0.05$ ), xylose, xylobiose supplementation에 의해 Ctrl 수준으로 낮아졌음(Fig 19 (C).  $p < 0.05$  for Xylo 15, XB 10,  $p < 0.01$  for XB 15)

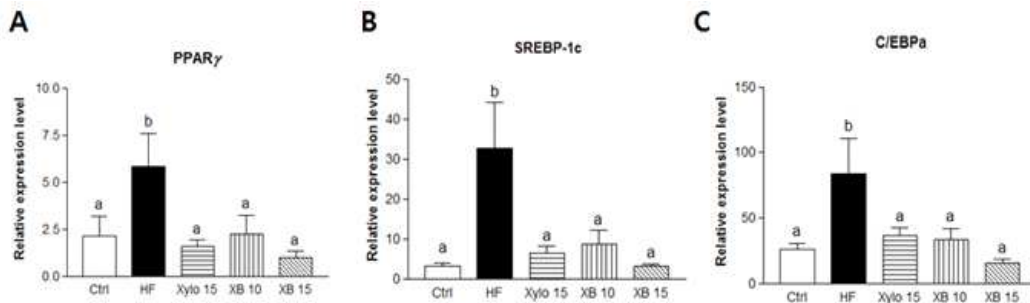


Fig. 19. Effect of xylobiose, xylose on lipogenesis marker mRNA expressions of liver in fat-induced obese mice

(A)PPAR $\gamma$ , (B) SREBP-1c, (C)C/EBP $\alpha$  mRNA expression in liver. Data were analyzing using one-way ANOVA with Newman-Keuls post hoc test ( $p < 0.05$ ). Letter subscripts are used to indicate significant differences. Ctrl, normal control; HF, high fat(60%) diet control; Xylo 15, D-xylose replaced by 15% of total sucrose in the high fat diet; XB 10, xylobiose replaced by 10% of total sucrose in the diet; XB 15, xylobiose replaced by 15% of total sucrose in the high fat diet.

## (2) Phyllodulcin

### (가) Phyllodulcin의 비만유도 마우스에서의 체중과 식이 섭취량에 미치는 영향

#### (a) 체중, 식이 섭취량

- 7주의 실험 기간 동안 phyllodulcin 및 stevioside를 가바지로 공급한 결과 Ctrl에 비해 HF과 모든 treat그룹 (SVS, P 20, P 40)의 체중이 유의적으로 높아짐( $p < 0.001$ ). HF에 비하여 phyllodulcin treat 그룹 간의 유의적인 체중 변화는 없었음( $p > 0.05$ ).
- 총 식이 섭취량을 실험 기간인 7 주(49 일)로 나누어, 하루 평균 식이 섭취량을 산출함. 그 결과 Ctrl군에 비하여 비만 유도 그룹(HF, SVS, P 20, P 40)이 유의적으로 낮아짐( $p < 0.001$ ). 또한, SVS의 경우 HF에 비하여 식이섭취량이 유의적으로 낮아짐( $p < 0.05$ ).

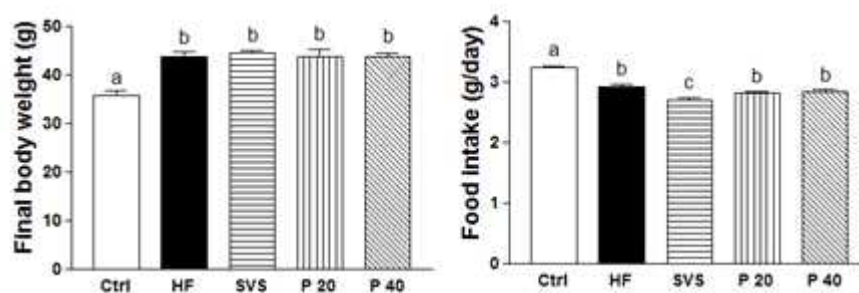


Fig. 20. Effect of phyllodulcin on the changes of body weight, food intake in high fat-induced obese mice

Body weight (A), food intake (B) were measured in C57BL/6 mice. Values shown are the mean  $\pm$  SEM. Different letters for given bars indicate that those values are significantly different from each other ( $p < 0.05$ ). Ctrl, normal control; HF, high fat(60%) diet control; SVS 20, stevioside 20 mg/kg b.w.; P 20, phyllodulcin 20 mg/kg b.w.; P 40, phyllodulcin 40 mg/kg b.w.

**(b) 식이효율**

- 식이효율(Food efficiency ratio , FER)은 식이 섭취량 대비 체중 증가량(Bodyweight gain (g)/Food intake (g) x 100)으로 산출하였고 그 결과 Ctrl에 비해 비만 유도 그룹들이 유의적으로 높아짐. (p<0.05 for HF, p<0.01 for P20 and P40, p<0.01 for p SVS)
- HF에 비하여 phyllodulcin treat 그룹에서는 유의적인 차이는 관찰되지 않음.

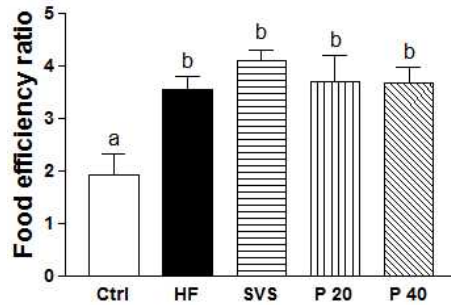


Fig. 21. Effect of phyllodulcin on the food efficiency ratio in high fat-induced obese mice

Bodyweight gain, food intake were measured in C57BL/6 mice. Values shown are the mean ± SEM. FER, Food efficiency ratio= Bodyweight gain (g)/Food intake (g) x 100. Different letters for given bars indicate that those values are significantly different from each other ( $p < 0.05$ ). Ctrl, normal control; HF, high fat(60%) diet control; SVS 20, stevioside 20 mg/kg b.w.; P 20, phyllodulcin 20 mg/kg b.w.; P 40, phyllodulcin 40 mg/kg b.w.

**(나) C57BL/6 mice 조직 무게 비교**

**(a) 장기 무게**

- 일반적으로 비만에 의해서 뇌 수축 작용으로 뇌무게가 줄어듦. Ctrl에 비해서 HF가 유의적으로 뇌 무게가 줄어들었으며 (p<0.05), P 40에서 HF와 유의하게 무게가 증가하였고 이는 Ctrl과 유사한 수치만큼 증가함 (p<0.05).
- 비만에 의해 간에 지방간이 유도되면 간 무게가 증가하는 것이 일반적임. Ctrl에 비해서 HF에서 유의적으로 증가하였으며 (p<0.05), P 40에서는 유의적이진 않으나 HF에 비해서 간 무게가 감소된 경향을 관찰함.
- 이는 phylloduclin 40mg/kg b.w.이 비만으로 인한 뇌의 수축과 지방간 개선에 도움을 준다는 것을 간접적으로 알 수 있음.

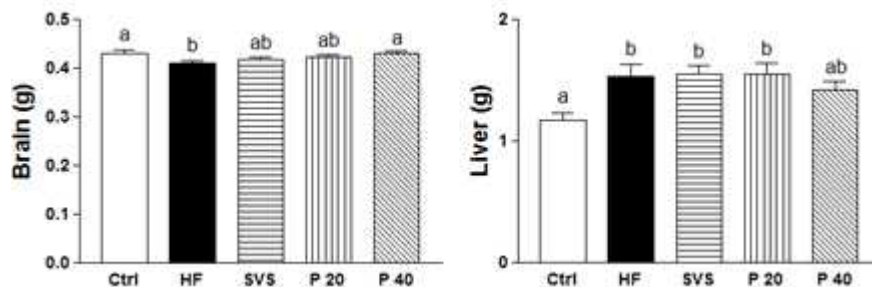


Fig. 22. Effect of xylobiose, xylose on organ weight in high fat-induced obese mice

Organ weight of liver was measured. Data were analyzing using one-way ANOVA with Tukey post hoc test ( $p < 0.05$ ). Letter subscripts are used to indicate significant differences. Ctrl, normal control; HF, high fat(60%) diet control; SVS 20, stevioside 20 mg/kg b.w.; P 20, phyllodulcin 20 mg/kg b.w.; P 40, phyllodulcin 40 mg/kg b.w.



**(b) 지방조직 무게**

- 마우스 지방조직(subcutaneous, mesenteric, epididymal, perirenal adipose tissue)들을 분리하여 무게를 측정한 결과 epididymal을 제외한 모든 조직에서 비만 유도 그룹들이 Ctrl에 비하여 유의적으로 조직 무게가 증가함 (All  $p < 0.01$ ). 특히, subcutaneous 지방에서는 P 40에서 HF에 비하여 유의적으로 fat의 무게가 감소함 ( $p < 0.05$ )

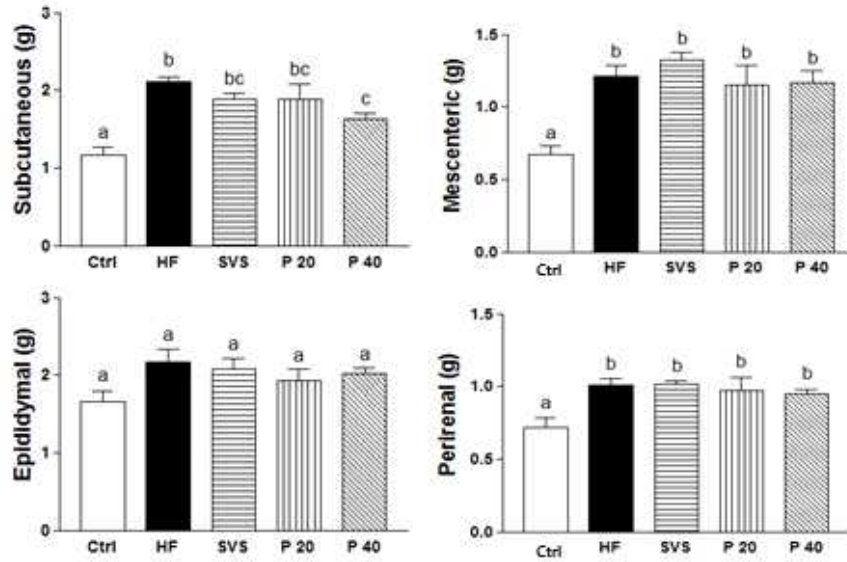


Fig. 23. Effect of phylloidalcin on fat tissue weight in high fat-induced obese mice

Weight of (A) subcutaneous, (B) mesenteric, (C) epididymal, (D) perirenal adipose tissue were measured. Data were analyzing using one-way ANOVA with Tukey post hoc test ( $p < 0.05$ ). Letter subscripts are used to indicate significant differences. Ctrl, normal control; HF, high fat(60%) diet control; SVS 20, stevioside 20 mg/kg b.w.; P 20, phylloidalcin 20 mg/kg b.w.; P 40, phylloidalcin 40 mg/kg b.w.

**(다) 혈중 지질대사 관련 호르몬 변화 측정**

- Elisa kit를 통해 혈중 leptin, adiponectin 호르몬 측정 결과 모든 비만유도 그룹이 Ctrl 과 유의적인 차이를 보임. Leptin은 HF 그룹에서 Ctrl에 비해 수치가 높아졌으며 adiponectin은 낮아짐 (All  $p < 0.001$ ).
- Leptin 측정 결과 HF과 비교하여 SVS, P 20 그룹에서는 낮아지는 경향을 보였으며, 특히 P 40그룹에서 수치가 유의적으로 낮아짐 ( $p < 0.01$ ).
- Adiponectin 측정 결과 HF에 비해 P 20과 P 40에서 수치가 유의적으로 높아짐 ( $p < 0.05$  for P 20,  $p < 0.01$  for P 40).
- 높은 수치의 leptin과 낮은 수치의 adiponectin은 비만의 지표로, phylloidalcin 섭취로 인하여 leptin, adiponectin과 관련지표가 개선된 것으로 해석 됨. 이로 인해, 식이섭취 조절이 보다 효과적으로 이루어 질 수 있음.

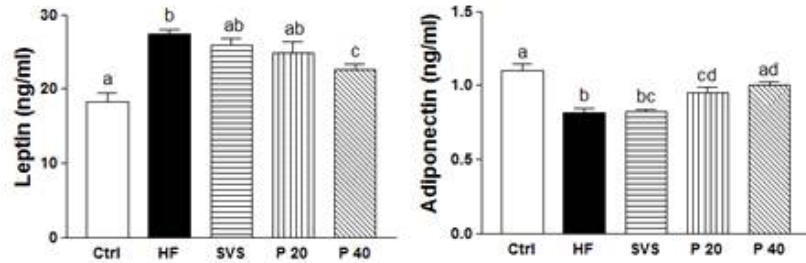


Fig. 24. Effect of xylobiose, xylose on plasma leptin, adiponectin levels in high fat-induced obese mice

(A) leptin, (B) adiponectin were measured in plasma. Data were analyzing using one-way ANOVA with Newman-Keuls post hoc test ( $p < 0.05$ ). Letter subscripts are used to indicate significant differences. Ctrl, normal control; HF, high fat(60%) diet control; SVS 20, stevioside 20 mg/kg b.w.; P 20, phyllodulcin 20 mg/kg b.w.; P 40, phyllodulcin 40 mg/kg b.w.

#### (라) 혈중 혈당 및 비만 관련인자 측정

##### (a) Final blood glucose

- 최종 혈당 수치가 HF 그룹이 Ctrl에 비해 유의적으로 높아짐 ( $p < 0.001$ ). 이는, high fat diet 섭취로 인한 비만유도로 인하여 혈당이 높아진 것으로 볼 수 있음.
- Phyllodulcin에 의해서 HF에 비해 유의적으로 혈당이 낮아져 phyllodulcin이 glucose homeostasis를 조절하여 혈당조절 효과를 보이는 것으로 볼 수 있음 ( $p < 0.001$ ).

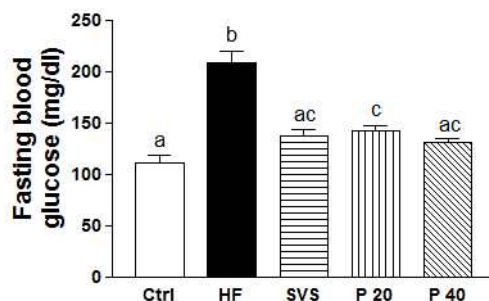


Fig. 25. Effect of phyllodulcin on final blood glucose in high fat-induced obese mice

Data were analyzing using one-way ANOVA with Newman-Keuls post hoc test ( $p < 0.05$ ). Letter subscripts are used to indicate significant differences. Ctrl, normal control; HF, high fat(60%) diet control; SVS 20, stevioside 20 mg/kg b.w.; P 20, phyllodulcin 20 mg/kg b.w.; P 40, phyllodulcin 40 mg/kg b.w.

##### (b) Triglyceride, total cholesterol, HDL-cholesterol, LDL-cholesterol level

- Triglyceride (TG), total cholesterol (TC), LDL cholesterol (LDL-C) 모두 HF 그룹이 Ctrl에 비해 유의적으로 높아짐.
- TG 측정 결과 phyllodulcin treat 그룹 모두에서 유의적으로 HF에 비하여 감소함 ( $p < 0.05$  for P 20,  $p < 0.01$  for P 40)
- TC 측정 결과 SVS, P 20, P 40에서 모두 유의적으로 HF에 비해서 감소함 (all  $p < 0.01$ ).
- LDL-C는  $TG/5 - (TC + HDL)$  식을 통해 산출하였고 SVS, P 20, P 40에서 모두 HF에 비하여 유의적으로 감소함 (all  $p < 0.05$ )

- 이는 phyllodulcin이 혈중 지질 마커를 개선하여 항비만 효과를 보이는 것으로 볼 수 있음.

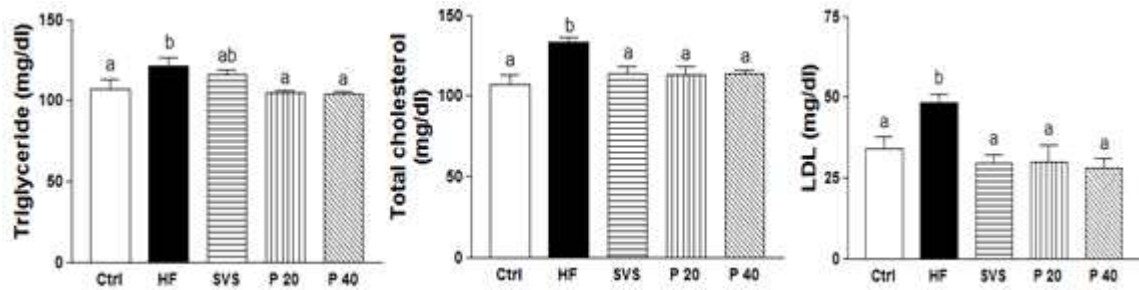


Fig. 26. Effect of phyllodulcin on lipid profile in plasma in high fat-induced obese mice (A) Triglyceride (TG), (B) total cholesterol (TC), (C) low density lipoprotein (LDL-C) were measured in plasma. Data were analyzing using one-way ANOVA with Newman-Keuls post hoc test ( $p < 0.05$ ). Letter subscripts are used to indicate significant differences. Ctrl, normal control; HF, high fat(60%) diet control; SVS 20, stevioside 20 mg/kg b.w.; P 20, phyllodulcin 20 mg/kg b.w.; P 40, phyllodulcin 40 mg/kg b.w.

#### (마) 간에서의 지방세포의 조직형태학적 분석

- High fat diet를 섭취한 마우스는 간 조직에서 지방구의 크기가 크고 숫자도 더 많이 관찰됨.
- 육안으로는 HF에 비해서 phyllodulcin treat 그룹에서의 지방구 감소 효과는 잘 관찰되지 않음.

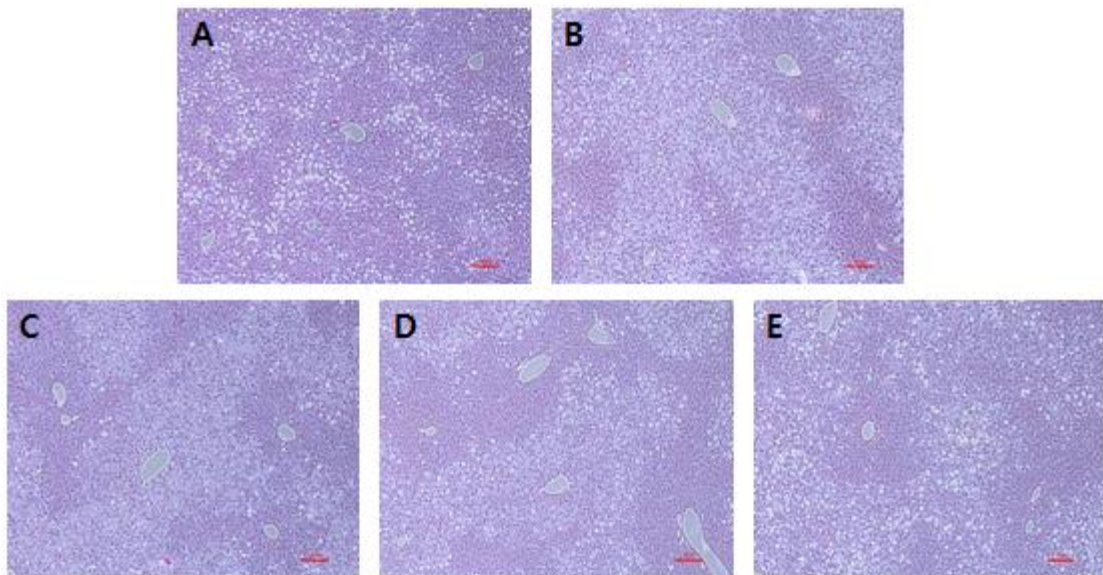


Fig. 27. Effect of phyllodulcin on histopathology in mouse liver tissue

Hepatic histopathological features were observed in high fat induced obese mice. Bars indicate 50um. (A) Ctrl, (B) HF, (C) SVS 20, (D) P 10 and (E) P 20. Tissues were stained with H&E (100 x). Ctrl, normal control; HF, high fat(60%) diet control; SVS 20, stevioside 20 mg/kg b.w.; P 20, phyllodulcin 20 mg/kg b.w.; P 40, phyllodulcin 40 mg/kg b.w.

**(바) 항비만 기전 측정**

- 유의적으로 감소된 지방인 피하지방을 선택하여 q-PCR을 진행함.
- Lipogenesis 마커인 C/EBPα, PPARγ, SREBP-1c의 발현이 HF 그룹에 비하여 유의적으로 낮아짐을 관찰 할 수 있음 (p<0.05 for SVS, p<0.01 for P20 and p40 in C/EBPα, p<0.01 for all in PPARγ, p<0.01 for all in SREBP-1c).
- 지방에 존재하는 protein양이 매우 작고 추출이 어려워 western은 진행 하지 못함. 추후에 q-PCR을 이용하여 lipogenesis marker 외의 다른 inflammation marker 등을 확인 할 예정임.

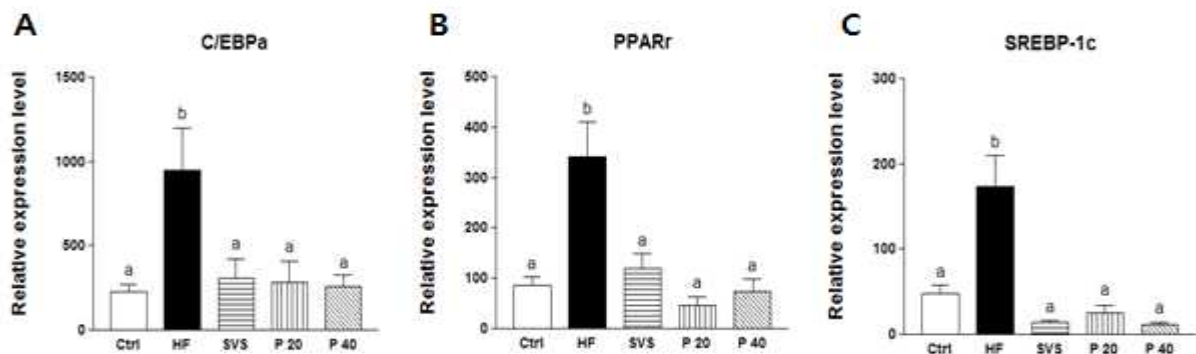


Fig. 28. Effect of phylloidalcin on lipogenesis in subcutaneous fat in high fat-induced obese mice

Representative expression of C/EBPα, PPARγ, and SREBP-1c expression. Each figure shows mRNA expressions of C/EBPα, PPARγ, and SREBP-1c detected by q-PCR. GAPDH was used as a loading control. Data were analyzing using one-way ANOVA with Newman-Keuls post hoc test ( $p < 0.05$ ). Letter subscripts are used to indicate significant differences. Ctrl, normal control; HF, high fat(60%) diet control; SVS 20, stevioside 20 mg/kg b.w.; P 20, phylloidalcin 20 mg/kg b.w.; P 40, phylloidalcin 40 mg/kg b.w.

○ <3차년도> Xylobiose, phylloidalcin을 이용한 in vitro 항바이러스 효과측정

1. 실험방법

(1) CVB3에서의 glucoes, D-xylose, stevioside가 cell viability에 미치는 영향

실험물질의 세포독성 측정을 위해 vero cell의 세포 단층에 바이러스 (coxackievirus B3, CVB3)를 접종시킨 다음 다양한 농도의 glucose, xylobiose, phylloidalcin을 well에 분주하여 배양하고 cell viability를 측정함.

2. 실험결과

(1) CVB3에서의 glucoes, xylobiose, phylloidalcin가 cell viability에 미치는 영향

- Virus 처리에 의해서 Ctrl에 비해 유의적으로 감소한 것을 확인함 (p<0.001)
- Glucose 20mM에 비해 xylobiose, phylloidalcin 모두 cell viability에 유의적인 효과를 보이지 않았음 (p>0.05).

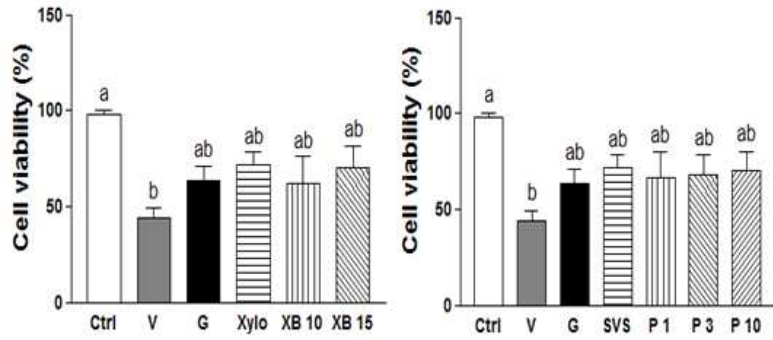


Fig. 29. Effect of glucose, D-xylose and stevioside on viability of vero cells

Values shown are the mean  $\pm$  SEM. Different letters for given bars indicate that those values are significantly different from each other ( $P < 0.05$ ). Ctrl : control , V: virus infection control, G : glucose 20mM, Xylo, D-xylose replaced by 15% of total glucose in the media; XB 10, xylobiose replaced by 10% of total glucose in the media; XB 15, xylobiose replaced by 15% of total glucose in the media; SVS, stevioside 10  $\mu$ M; P 1, phylodulcin 1  $\mu$ M; P 3, phylodulcin 3  $\mu$ M; P 10, phylodulcin 10  $\mu$ M.

### 제 5 절 연구개발 성과

(단위 : 건수)

구분		특허		논문		제품개발	기타
		출원	등록	SCI	비SCI	시제품	
1차 년도	목표				1		
	달성				2		3(학술발표) 5(인력양성)
2차 년도	목표	1		2	1		
	달성	1		2	2		4(학술발표) 1(인력양성)
3차 년도	목표	2	1	3		2	
	달성	3	1	3	1	3	8(학술발표) 5(인력양성)
계	목표	3	1	5	2	2	
	달성	4	1	5	5	3	15(학술발표) 11(인력양성)

#### 가. 논문 및 특허 목록

번호	구분 (논문/ 특허/ 기타)	논문명/특허명/ 기타	소속 기관명	역할	논문계 재지/ 특허등 록국가	Impa ct Facto r	논문계재일 /특허등록 일	사사여부 (단독사 사 또는 중복사사 )	특기사항 (SCI여부/ 인용횟수 등)
1	논문	Relative sweetness, sweetness quality, and temporal profile of xylooligosacchar ides and luo han guo (Siraitia grosvenorri)	국민대, 세종대	주저자 (국민대), 참여저자 (세종대)	Food Science and Biotech nology	0.699	2016.06.01	단독사 사	SCI(E)

		extract							
2	논문	Relative sweetness and sweetness quality of xylobiose	국민대, 세종대	주저자 (국민대), 참여저자 (세종대)	Food Science and Biotechnology	0.699	2017년 게재 예정	단독사사	SCI(E)
3	논문	Effects of short-term supplementation of erythritol-salt on urinary electrolyte excretion in rats	대한제당 이화여자대학교	제1저자, 교신저자	Journal of nutrition and health	-	2014.04.10	단독사사	-
4	논문	Effects of xylooligosaccharide-sugar mixture on glycemic index(GI) and blood glucose response in healthy adults	대한제당 이화여자대학교	제1저자, 교신저자	Journal of nutrition and health	-	2014.08.01	단독사사	-
5	논문	Effect of xylooligosaccharide-sugar mixture on defecation frequency and symptoms in young women with constipation: a randomized, double-blind,	대한제당	참여저자	Journal of nutrition and health	-	2015.01.26	단독사사	-

		placebo-controlled trial							
6	논문	D-Xylose suppresses adipogenesis and regulates lipid metabolism genes in high-fat diet - induced obese mice	이화여자대학교	주저자	Nutrition Research	2.68	2015.07.01	중복사사	SCI
7	논문	D-Xylose as a sugar complement regulates blood glucose levels by suppressing phosphoenolpyruvate carboxylase (PEPCK) in streptozotocin-nicotinamide-induced diabetic rats and by enhancing glucose uptake <i>in vitro</i>	이화여자대학교	주저자	Nutrition Research and Practice	1.416	2016.02.01	중복사사	SCI(E)
8	논문	The establishment of efficient bioconversion, extraction, and isolation processes for the production of phyllodulcin,	세종대학교	제1저자, 교신저자	Phytochemical Analysis	2.497	2016.03/04	단독사사	SCI



		a potential high intensity sweetener, from sweet hydrangea leaves ( <i>Hydrangea macrophylla Thunbergii</i> )							
9	특허	자일로바이오스 함유 감미료 조성물	대한 제당	발명자	대한민국	-	-	단독사사	출원
10	특허	필로둘신 또는 이의 염을 포함하는 당뇨병 예방, 개선 및 치료용 조성물	이화 여자 대학교	발명자	대한민국	-	2016.07.27	단독사사	출원
11	특허	수국차 잎으로부터 천연 고감미료인 필로둘신을 수득하는 방법	세종 대학교	발명자	대한민국	-	2015.11.24.	단독사사	출원
12	특허	수국차 잎으로부터 천연 고감미료인 필로둘신을 수득하는 방법	세종 대학교	발명자	대한민국	-	2016.10.05	단독사사	등록

다. 학회 발표 목록

- (1) Anti-diabetic effects of stevioside in streptozotocin-nicotinamide-induced diabetic rats. 2014. 한국영양학회 추계학술대회 (대한민국).
- (2) Stevioside attenuates insulin resistance and fatty liver in high-fat diet-induced obese mice. 2014. 한국영양학회 추계학술대회 (대한민국).
- (3) Potential high-intensity sweetener, phyllodulcin: Optimization of processing and extraction conditions from hydrangea leaves. 2014. IUFost (캐나다).
- (4) Extraction Process Optimization of Phyllodulcin as a Glycoside from Sweet Hydrangea marcophylla. 2015. 한국식품과학회 (대한민국).
- (5) Elucidation of a Mechanism of Phyllodulcin Biosynthesis in Hydrangea Leaves and Establishment of an Effective Phyllodulcin Manufacturing Process From, 2015. IFT (미국).
- (6) D-Xylose as a sugar complement exerts antidiabetic effects in

streptozotocin–nicotinamide–induced diabetic rats. 2015. Experimental Biology (미국).

(7) D-Xylose suppresses adipogenesis and lipid abnormalities in high-fat induced obese mice. 2015. Experimental Biology (미국).

(8) Phyllodulcin as a sugar complement exerts anti-diabetic effects in db/db mouse. 2016. Experimental Biology (미국).

(9) Xylobiose ameliorates hyperglycemia and dyslipidemia via regulating hepatic lipogenic genes in db/db mice. 2016. Experimental Biology (미국).

(10) Effective mass production process of natural sweet compound phyllodulcin from sweet hydrangea leaves (*Hydrangea macrophylla thubergii* Makino). 2016. IFT (미국).

(11) Large Scale Production and Solubility Improvement of Phyllodulcin, a Potential High Intensity Sweetener, from Leaves of Hydrangea. 2016. 한국식품과학회 (대한민국).

(12) Relative sweetness of phyllodulcin in a cookie system. SPISE 2016 : Taste and try before you fry (베트남).

(13) Effect of "functional sweetener" context on consumers' sensory and hedonic perception of sweetened soymilk. SPISE 2016 : Taste and try before you fry (베트남).

(14) 자일로바이오스(Xylobiose)의 상대당도 및 감미특성. 2016. 한국식품과학회 (대한민국)

(15) Effect of phyllodulcin, a natural functional sweetener, on hepatic lipogenesis, inflammation, oxidative stress, fibrosis, and gluconeogenesis in db/db mice. 2016. 한국영양학회 추계학술대회 (대한민국).

라. 인력양성 목록

인력 양성명	인력양성년도	성과발생년도	인력양성내용	전공	학위	성별
석사학위 인력 양성	2014	2014	석사학위 취득 (정창환)	공학계열	석사	남
석사학위 인력 양성	2014	2014	석사학위 취득 (김유선)	의 약 보 건 학계열	석사	여
석사학위 인력 양성	2014	2014	석사학위 취득 (김혜진)	공학계열	석사	여
석사학위 인력 양성	2014	2014	석사학위 취득 (이지혜)	공학계열	석사	여
석사학위 인력 양성	2016	2016	석사학위 취득 (고정민)	공학계열	석사	남
석사학위 인력 양성	2016	2016	석사학위 취득 (김민지)	공학계열	석사	여
석사학위 인력 양성	2016	2016	석사학위 취득 (임은진)	의 약 보 건 학계열	석사	여
취업성과	2015	2015	취업 (정창환)	공학계열	석사	남
취업성과	2015	2015	취업 (김혜진)	공학계열	석사	여

취업성과	2016	2016	취업 (김민지)	공학계열	석사	여
취업성과	2016	2016	취업 (고정민)	공학계열	석사	남

마. 수상실적

- (1) 우수포스터상. 2015. 한국식품과학회. 김민수
- (2) Outstanding research paper award. 2016. Korea American Food Technologists Association (KAFTA). 김민수
- (3) 우수포스터상. 2016. 한국식품과학회. 최서윤
- (4) 대학원생 우수논문 선발대회 장려. 2016. 한국식품과학회 김민수
- (5) Best Poster Award. 2016. symposium of Summer Program in Sensory Evaluation (SPISE). 최서윤

## 제 6 절 사업화 성과

항목	세부항목			성 과	
사업화 성과	매출액	개발제품	개발후 현재까지	-- 억원	
			향후 3년간 매출	2 억원	
		관련제품	개발후 현재까지	-- 억원	
			향후 3년간 매출	20 억원	
	시장 점유율	개발제품	개발후 현재까지	국내 : -- % 국외 : -- %	
			향후 3년간 매출	국내 : 5 % 국외 : -- %	
		관련제품	개발후 현재까지	국내 : -- % 국외 : -- %	
			향후 3년간 매출	국내 : 10 % 국외 : -- %	
	세계시장 경쟁력 순위	현재 제품 세계시장 경쟁력 순위			-- 위
		3년 후 제품 세계 시장경쟁력 순위			-- 위

## 제 7 절 사업화계획 및 계획실적

항 목	세부 항목	성 과			
사업화 계획	사업화 소요기간(년)	3~10년			
	소요예산(백만원)	30,000			
	예상 매출규모 (억원)	현재까지	3년후	5년후	
		--	20	200	
	시장 점유율	단위(%)	현재까지	3년후	5년후
		국내	--	5	40
국외		--	--	10	
	향후 관련기술, 제품을 응용한 타 모델, 제품 개발계획	건강기능식품 개별인정형 원료 등록 검토			
무역 수지 개선 효과	(단위: 억원)	현재	3년후	5년후	
	수입대체(내수)	--	--	20	
	수 출	--	--	100	

## 제 8 절 연구개발결과에 대한 평가

본 연구사업에서는 설탕 보완제로써 xylobiose 당류의 생촉매적 합성과 함께 천연고감미 소재인 phylodulcin의 추출, 분리를 통한 산업규모의 생산 가능성을 타진하여 새로운 식품소재로써의 활용성을 타진한 연구로 연구개발결과가 매우 우수하며, 후속연구를 통한 식품, 화장품 분야의 핵심소재로써의 가능성이 매우 높음. 연구수행이 성실도가 매우 높으며, 국내기반 핵심소재개발기술의 배타적 권리 확보 역시 잘 진행된 것으로 자체평가함.

## 4장 목표달성도 및 관련분야 기여도

				코드번호	D-06
제 1 절 연구목표의 달성도					
1. 제 1세부					
구분 (연도)	세부연구개발 목표	세부연구목표	달성도 (%)	연구개발 수행내용	
1차 년도 (2014)	수국 phyllodulcin의 효율적 생산 공정 개발 및 특성 규명	수국 잎으로부터 phyllodulcin의 추출 기 술 개발	100%	- 용매 특성을 활용한 추출 공 정 탐색 - 추출공정의 효율성 증대를 위한 다양한 물리적 처리 방 법 적용	
		Phyllodulcin 정제 기술 개발	100%	- 크로마토그래피법을 이용한 정제 기술 개발 - 고순도 phyllodulcin 대량 생 산 및 확보	
		Phyllodulcin glycoside 등 phyllodulcin 수용성 전구체 추출을 통한 phyllodulcin 생산 기술 개발	100%	- 수용성 phyllodulcin 전구체 추출법 및 분석기술 개발	
2차 년도 (2015)		Phyllodulcin 함량 및 추출 효율을 높이기 위한 수국 잎 전처리 공정 개발	100	-수국 잎의 열풍건조, 동결건조 등의 전처리 공정이 추출효율에 미치는 영향 파악. -수국 잎 내의 phyllodulcin 함량 증진을 위한 발효법의 개발	
		Phyllodulcin의 대량 생산을 위한 공정 최적화	100	-추출 scale-up 및 정제 공정 최적화	
		정제 공정 확립	100	-Sep-pak, sunfire c18 prep column 등을 사용하여 phyllodulcin 이외의 성분 및 색소체 제거를 위한 공정 확립.	
3차 년도 (2016)	Phyllodulcin의 이화학적 특성 파악 및 안정성 규명	100	- 흡습성, 용해도, 산·염기 반응성 등 물리적, 화학적 특성 및 안정성 규명 - 용해도, 결정성 등의 물리화학적 특성 평가		
	Phyllodulcin의 제형화 기술 개발	100	- Spray dryer, freeze dryer 등의 기기를 이용하여 온도 및		

			시료 조건에 따른 분말화 가능성 탐색
			- 설탕, 글루코스 등의 당류를 부형제로 이용한 제형화 기술 탐색
	생촉매 및 부형제를 이용한 phyllodulcin의 물성 개선	100	- 당전이 효소류를 활용하여 phyllodulcin 배당체의 합성 공정 개발
			- 설탕, 올리고당, cyclodextrin 등을 부형제로 이용하여 phyllodulcin과 혼합 제재를 만든 후 용해도 등 특성 변화 조사

2. 제 1협동

구분 (연도)	세부연구개발 목표	달성도 (%)	평가의 착안점 및 기준
1차 년도 (2014)	Xylobiose 생합성 시스템 개발	100	- Xylobiose 생합성을 위한 $\beta$ -xylosidase 12종 평가 - Xylobiose의 생합성 효율이 높은 $\beta$ -xylosidase 3종 선정 - 재조합 균주 제조를 위한 자체 vector 2종 확보 - GRAS 균주를 이용한 재조합 $\beta$ -xylosidase 발현 시스템 2종 구축(yeast, bacillus) - Xylobiose 생합성 효소 발현 균주 2종 확보 - Xylobiose 생산을 위한 $\beta$ -xylosidase 반응 조건 탐색
	Xylobiose 정제	100	- One-step 정제 가능한 chromatographic resin 10종 탐색 및 정제 조건 탐색 - Xylobiose의 결정화 특성파악(6종 감미료 조건확보)
	Xylobiose의 특성 확인	100	- Xylobiose의 감미 특성 및 물리화학적 안정성 확인
	Xylobiose가 함유된 자일로올리고슈가의 정장효능 평가	100	- 자일로올리고슈가 섭취에 따른 변비개선 효능 평가
2차 년도 (2015)	$\beta$ -xylosidase 대량 생산 기술 개발	100	- $\beta$ -xylosidase 발현 미생물 2종의 배양 최적화 - 생합성 효소 발현 균주 배양 최적화(5 g DCW/L 이상) - GRAS 균주를 이용한 재조합 $\beta$ -xylosidase의

			30 L Fermentation 적용 대량생산((8.4 g DCW/L 이상) -β-xylosidase 정제 공정 최적화(정제수율 80% 이상)
	Xylobiose 생합성 공정 최적화	100	-Xylobiose 생산을 위한 최적 효소 반응 조건 확보 -Xylobiose 생합성 공정 개발(고정화 수율 90%이상)
	Xylobiose 정제 기술 최적화	100	-Xylobiose 정제 시스템 구축(SMB 구축) -생합성 xylobiose 반응액 분리 조건 최적화
	Xylobiose 결정화 기술 개발	100	-순도 97%이상의 xylobiose 결정 확보(98%이상 확보) -Xylobiose 용해도 곡선 확보 -Xylobiose 결정화 공정 최적화
3차 년도 (2016)	Xylobiose의 기능성 규명	100	- <i>In vitro</i> rat sucrase inhibition activity 평가 - <i>In vitro</i> xylobiose의 prebiotic effect 규명
	Xylobiose 적용 제품 개발	100	-XylobioSugar 제품 caking degree 특성 규명 -Xylobiosugar <가칭>의 혼합 적합성, 재분리 안정성, 물성 및 caking 특성 확인 -Xylobiose가 적용된 고부가가치 설탕 제품 2종 개발
	Xylobiose 적용 제품의 기능성 확인	100	-Xylobiose 적용 설탕보완제의 혈당 상승 억제 효능 확인(기준 GI 55이하)
최종평가	설탕보완재 xylobiose 생합성 기술개발	100	설탕보완재 xylobiose 생합성 기술개발 및 기능성 시제품 제작(제품화 2종)

### 3. 제 2협동

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	달성도 (%)	연구개발 수행내용
1차 년도 (2014)	종합적 감미 특성 및 식품 적용시의 안정성 분석	상대 당도 평가법 확립	100	- 7종 시판 감미료의 수용액 모델 시스템을 활용, 상대당도 평가법 확립: 2-alternative forced choice (AFC) method을 최적 검사법으로 선택함 (설탕은 기준시료로 활용)
		감미질 평가법 확립	100	- 감미질 평가법 확립: 정량적 묘사분석법을 활용. 검사 요원의 선정 기준 및 훈련, 시료 제시 방법, 평가 절차 최적화
		감미 출현 및 지속 속도	100	- 감미 출현 및 지속 속도



		평가법 확립		평가법 확립: 정량적 묘사분석법을 활용. 검사 요원의 선정 기준 및 훈련, 시료 제시 방법, 평가 절차 최적화
2차 년도 (2015)		phyllodulcin 및 xylobiose 수용액 시료 제조를 위한 예비실험	100	- phyllodulcin과 xylobiose 용해도 확인 및 수용액 모델 시스템 제조법 확립
		phyllodulcin 상대당도 분석	100	-1차년도에서 확립한 상대당도 측정 방법 (2-AFC)를 활용하여 3% 설탕 수용액 대비 상대당도 규명
		phyllodulcin 감미질 및 감미 출현/지속 정도 분석	100	-1차년도에서 확립한 감미질 측정 방법 (QDA)를 활용하여 3% phyllodulcin 수용액 감미질 및 감미 출현/지속 정도를 기타 고감미 감미료 5종, 설탕의 감미질과 비교 분석함
		phyllodulcin 감미 출현/지속 정도 분석	100	-1차년도에서 확립한 감미 출현/지속 정도 분석법 (QDA)을 활용하여 3% phyllodulcin 수용액의 출현/지속 정도를 기타 고감미 감미료 5종, 설탕의 감미질과 비교 분석함
		Xylobiose 상대당도 분석	100	-1차년도에서 확립한 상대당도 측정 방법 (2-AFC)를 활용하여 5% 설탕 수용액 대비 상대당도 규명
		Xylobiose 감미질 및 감미 출현/지속 정도 분석	100	-1차년도에서 확립한 감미질 측정 방법 (QDA)를 활용하여 5% xylobiose 수용액 감미질 및 감미 출현/지속 정도를 기타 기능성 감미소재 6종, 설탕의 감미질과 비교 분석함
3차 년도 (2016)	종합적 감미 특성 및 식품 적용시의 안정성 분석	xylobiose 설탕 및 phyllodulcin 함유 식품 시스템 제조	100	- phyllodulcin의 용해도를 고려하여 플레인 쿠키 시스템으로 확정 -감미료 대체에 따른 부형제 종류 결정, phyllodulcin 혼합 조건 등 제조 조건 확립 -비교용 대체감미료 적용

				조건(혼합물, 제조조건 등) 확립
		xylobiose 설탕 및 phyllodulcin 함유 쿠키시스템의 상대당도 규명	100	- 1차년도에서 확립된 검사 방법(2-AFC)를 활용하여 대체감미료 적용 쿠키의 설탕 쿠키 대비 상대당도 규명
		xylobiose 설탕 및 phyllodulcin 함유 식품 시스템 묘사분석	100	- 1차년도에서 확립된 검사 방법(2-AFC)를 활용하여 대체 감미료 적용 쿠키 및 설탕 쿠키의 감미질 및 감각 특성 규명
		감미료 적용에 따른 소비자 기호도 측정	100	- 대체 감미료 혼합 비율 및 종류에 따른 소비자 기호도 변화 규명 - 대체 감미료의 기능성 정보 제공이 소비자 기호도에 미치는 영향 규명
		소비자 허용 감미질 변화 수준 규명	100	- 군집분석을 활용, 소비자 군집별 기호 성향 파악 - 주성분분석을 활용, 소비자 군집별 주요 기호 유발 인자 규명 - 적합강도(Just-about-right; JAR) 측정을 통한 감미질 변화 허용 수준 규명

4. 제 3협동

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	달성도 (%)	연구개발 수행내용
1차 년도 (2014)	D-Xylose 및 stevioside의 항당뇨, 항비만 및 항바이러스 기능성 평가 모델 개발 및 조건 확립	D-Xylose 및 stevioside의 <i>in vitro</i> , <i>in vivo</i> 항당뇨 기능성 평가 모델 개발	100	- 췌장세포에서의 시료 독성 측정 - Oral glucose tolerance test(OGTT) 와 insulin 분비 측정 - stevioside가 positive control 로 작용하는 농도, 시간 설정
		D-Xylose 및 stevioside의 <i>in vitro</i> , <i>in vivo</i> 항비만 기능성평가 모델 개발	100	- 지방세포전구체 (preadipocyte)인 3T3-L1 세포의 분화 측정 - 동물 모델에서 혈중 지질대사 관련 호르몬 및 항비만 기전 측정 - stevioside가 positive control 로 작용하는 농도, 시간설정
		D-Xylose 및 stevioside의	100	- 세포 독성시험 - 항바이러스 효능을 plaque reduction assay로 측정

		항바이러스 기능성평가 모델 개발 및 조건 확립		<ul style="list-style-type: none"> <li>- 항바이러스 활성을 sulforhodamine B (SRP) 염색방법으로 측정</li> <li>- stevioside가 positive control로 작용하는 농도설정</li> </ul>
2차 년도 (2015)	Xylobiose 및 phyllodulcin의 항당뇨 기능성 평가	Xylobiose 및 phyllodulcin의 in vitro 항당뇨 기능성 평가	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>-근육세포 분화와 glucose uptake 측정</li> <li>-Pro-inflammatory cytokine의 발현 측정</li> <li>-세포의 insulin level을 측정</li> </ul>
		Xylobiose 및 phyllodulcin의 in vivo 항당뇨 기능성 평가	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Oral glucose tolerance test(OGTT) 와 insulin분비 측정</li> <li>-Plasma lipid profile 측정</li> <li>-Liver glycogen 함량 측정</li> <li>간과 췌장의 장기 조직학적 변화 관찰</li> </ul>
3차 년도 (2016)	Xylobiose 및 phyllodulcin의 항비만 및 항 바이러스 기능성 평가	Xylobiose 및 phyllodulcin의 in vitro 항비만 기능성 평가	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 지방세포 분화와 adipogenesis 측정</li> <li>- Pro-inflammatory cytokine의 발현 측정</li> <li>- Lipogenesis marker 측정</li> </ul>
		Xylobiose 및 phyllodulcin의 in vivo 항비만 기능성 평가	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 지방 및 조직무게 비교</li> <li>- Leptin, adiponectin 호르몬 변화 측정</li> <li>- Plasma lipid profile 측정</li> </ul>
		Xylobiose 및 phyllodulcin의 항바이러스 기능성 평가	100	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 세포 독성시험</li> <li>- 항바이러스 효능을 plaque reduction assay로 측정</li> <li>- 항바이러스 활성을 sulforhodamine B (SRP) 염색방법으로 측정</li> </ul>

## 제 2 절 평가 착안점 및 기준에 관한 수행성과

세부연구목표 (연구계획서상의 목표)	비중 (%)	달성도 (%)	자체평가
생합성 효소 시스템을 이용한 xylobiose의 생산 공정 개발	10	10	xylobiose 생합성 능력이 가장 우수한 B.pumilus 유래의 $\beta$ -xylosidase (XynB)를 GRAS 발현 시스템 2종을 도입하여 효율적인 생합성 효소 시스템을 확립함.
Xylobiose의 정제 및 결정화 기술 개발	10	10	Simulated Moving Bed (SMB)를 적용하여 생합성 xylobiose 대용량 정제 공정을 구축하였으며, 결정화된 xylobiose의 최종순도는 98.5%로 대량생산 최적화 공정을 확립함.
Xylobiose의 혈당상승억제 효과 및 정장효과 규명	10	10	자일로올리고당 함유 감미료 조성물을 개발하여 향후 프리바이오틱스 또는 GI저감을 목적으로 식품산업에서 다양한 활용에 기여함.
수국잎으로부터 phyllodulcin의 고수율 추출 및 정제 기술 개발	10	10	대량 추출 기술 및 결정화를 통한 phyllodulcin의 효율적인 정제 공정을 확립하여 목표 달성함.
축매나 부형제를 이용한 phyllodulcin의 감미도 및 용해도 개선	10	10	Phyllodulcin의 용해도를 향상시켜 식품산업에서 다양한 활용으로 사용이 가능함. 또한, 앞으로 이 기술과 관련된 특허 출원 1건이 예정되어 있어 초과 목표 달성함.
Xylobiose 함유 기능성 설탕 및 phyllodulcin 활용 제품 개발	10	10	천연 설탕보완제 및 대체재로써 xylobiose와 phyllodulcin 포함한 시제품을 3건 제작함. 각 감미료의 특성에 따라 스틱슈가, 커피믹스 그리고 펠렛 형태의 제품 등 다양한 제품군으로 시제품을 성공적으로 개발함.
Phyllodulcin의 항당뇨 및 항비만 효능의 건강 기능성 규명	20	20	대체감미료와 고감미료의 항당뇨, 항비만의 in vitro, in vivo 실험방법을 성공적으로 개발하여 향후 연구에 기여함.
Xylobiose 함유 설탕과 수국 추출 phyllodulcin의 감미 특성	20	20	쓴맛이나 신맛 등 이미가 강한 천연 대체 감미료의 상대 당도,

분석			감미질, 감미 출현/지속 정도등을 보다 정확하게 평가할 수 있는 기법을 구축하였으며, 수용성이 낮은 phylodulcin의 수용액 모델 시스템 및 쿠키 적용 시스템을 개발하여 향후 관련 연구에 기여함.
합계	100	100	

### 제 3 절 관련분야에의 기여도

- 수국 잎으로부터 고순도 phyllodulcin 대량 생산 기술을 확립하여 천연 유래의 고감미 소재의 기술적 진보에 기여함.
- Phyllodulcin 용해도를 향상시켜 식품 산업에서의 활용도를 높이는데 기여함.
- Phyllodulcin과 erythritol를 혼합한 무열량 설탕 대체재를 개발하여 경제성과 새로운 시장 가능성을 확보함.
- 생합성 xylobiose 생산 기술을 확립하여 설탕보완재 관련분야의 기술적 진보에 기여함.
- 일반 설탕에 설탕보완재 xylobiose를 첨가한 기능성 설탕을 개발하여 국내시장뿐만 아니라 국제시장에 경쟁력을 갖출 것으로 기대됨.
- 일반 당류와 비교하여 혈당상승 억제효능 및 변비개선 효과가 우수한 기능성 설탕을 커피믹스 등과 같은 기능성 가공제품 개발에 적용하여 새로운 시장 창출과 식품산업 발전에 기여함.
- 2-AFC법을 통한 천연 유래 대체 감미료의 감미 특성 평가법을 수립하였고, 쓴맛이나 신맛 등 이미가 강한 천연 감미료의 경우 2-AFC를 사용한 문제점을 보완하기 위해 묘사분석 요원을 활용하여 값을 보정함.
- 천연 유래 신규 대체 감미료인 phyllodulcin과 xylobiose의 감미 특성을 규명하고, 수용성 시스템에 잘 용해되지 않는 phyllodulcin을 용해할 수 있는 모델 시스템 및 검사 조건을 확보함으로써 향후 phyllodulcin 연구에 기여함.
- Xylobiose와 phyllodulcin의 식품에서의 감미 안정성과 식품의 기타 관능적 특성에 미치는 영향은 본 연구에서 처음으로 연구되었음. 특히, 본 연구에서는 용해도가 낮은 phyllodulcin을 적용하기 위한 쿠키 레시피를 개발 확립하였음.
- 본 연구에서는 쿠키의 감각 특성 분석을 통한 감미 안정성을 규명하였을 뿐 아니라, 소비자 기호 성향 및 주요 기호 유발 인자를 규명하여 향후 감미질 개발의 방향성을 제시하였음.
- 천연 대체 감미료의 정보가 소비자의 기호도에 미치는 영향을 규명하여, 천연 대체 감미료의 감각 특성을 긍정적인 인지적 정보가 보완할 수 있는지를 파악하여 향후 제품 포지셔닝 등 마케팅 등에 활용할 수 있는 기초 정보를 제공하였음.
- Sucrose 대비 xylobiose와 phyllodulcin의 감미 특성에 대한 중요한 기초 자료를 확보함.

- 고감미료, 설탕대체제의 항비만, 항당뇨 모델시스템을 구축하고 관련 연구에 활용될 수 있도록 기여함.
- Xylobiose와 phyllodulcin의 항당뇨, 항비만 기능성을 분석하고, 규명하여 향후 기능성 감미료 개발을 위한 기초자료를 제시하고, 관련 감미료 개발에 기여함.
- Xylobiose와 phyllodulcin의 적용 사례 구축을 통하여 관련 식품 개발을 위한 기초 자료를 확보함.
- 천연 유래 기능성 감미료 개발로 관련 산업의 발전 및 국민 건강 증진에 기여함.
- 당뇨 및 비만 환자의 식이 조절에 기여하는 감미료 및 활용 식품 개발로 의료비 절감 효과를 기대할 수 있음.
- 식품산업을 이끌 수 있는 기술 개발 전문가 인력 양성으로 다양한 R&D 기반을 구축함.
- 기능성 감미료의 해외 수출 및 수입대체 효과를 기대할 수 있음.
- 국내 소재를 사용한 천연 유래 감미료 개발에 따른 신규 소재 수요량 증가로 재배 농가 수익에 기여함.

## 5장 연구결과의 활용계획

코드번호	D-07
<p>1. 국내외 사업화 방안</p> <p>(1) 국내 마케팅 및 판매 전략</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• 수국잎에서 추출한 천연 고감미료 phyllodulcin은 동물실험에서 항당뇨 및 항비만 효능이 입증된 고부가가치 신소재로 다양한 식품군에 대체감미료로 활용이 가능함.</li> <li>• 설당보완재 xylobiose가 적용된 혈상상승 저감효과 및 변비개선 효과가 우수한 기능성 설당으로 일반 설당과 동일하게 적용이 가능함.</li> <li>• 수국잎에서 추출한 천연 고감미료 phyllodulcin과 설당보완재 xylobiose가 적용된 XylobioSugar는 건강에 관심이 많은 소비자 계층을 대상으로 마케팅 전략을 수립할 계획임.</li> <li>• 합성감미료 및 일반 설당을 사용하고 있는 국내 가공식품 업체를 대상으로 천연 고감미료 phyllodulcin과 기능성 설당 XylobioSugar의 장점을 효과적으로 전달할 수 있는 B2B 영업전략을 수립할 계획임.</li> </ul> <p>(2) 글로벌(수출) 마케팅 및 판매 전략</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• 수국잎에서 추출한 천연 고감미료 phyllodulcin은 단일 소재로 제품화가 된 것이 없는 새로운 소재로 해외시장에 기술이전 및 진출이 가능함.</li> <li>• 생합성 xylobiose는 세계 최초로 개발된 설당보완재 생산 기술로 기능성 설당의 수요가 증가할 경우 해외시장에 기술이전 및 진출이 가능함.</li> <li>• 천연 고감미료 phyllodulcin 및 설당보완재가 첨가된 XylobioSugar는 기능성이 부여된 프리미엄 감미료로 다양한 식품군에 적용이 가능하기 때문에 이를 적용한 가공식품을 해외에 수출하여 이익창출을 기대할 수 있음.</li> </ul>	



## 6장 연구과정에서 수집한 해외과학기술정보

코드번호	D-08
<p><b>제 1 절 천연 유래 대체 감미료의 용해도 증진의 필요성</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 천연 유래 대체 감미소재의 이화학적 특성은 물질별로 다르지만, 대부분 물에 대한 용해도가 섭취 시 입 안에서 감미도를 빠른 시간 내에 발현하는 것에 제한을 받음</li> <li>- 천연 유래 대체 감미소재 자체의 용해도는 분산상에서의 농도, 물질의 표면전하 및 계면특성, 물리적인 상태 등에 영향을 받으며, 최종적으로 구강 내에서의 감미도 및 감미 부여 속도에 영향을 줌</li> <li>- 난용성 천연 유래 대체 감미소재의 초미세화(또는 나노화)를 통하여 용해도를 증진시킬 수 있는데, 입자의 크기가 작아지면 벌크한 소재에 비하여 비표면적이 증가되었기 때문에 용해도(solubility) 및 분산성(dispersibility)을 향상시킬 수 있을 것으로 기대됨</li> <li>- 압력을 이용한 균질화(초고압균질) 또는 초음파기술을 적용하여 난용성 천연 유래 대체 감미소재의 입자 크기를 작고 균일하게 제조할 수 있다고 판단되며, 이러한 감미소재 가용화 기술을 표준화하는 것이 필요함</li> <li>- 이러한 기술을 바탕으로 천연 유래 대체 감미소재의 구강 내 감미능을 극대화함으로써 감미소재를 최소량만을 사용하여 구강 내에서 감미를 나타낼 수 있는 제품으로 개발하여 가격 경쟁력을 높일 수 있는 기술 개발이 절실히 요구됨</li> </ul>	

## 제 2 절 국내 농생물자원 유래 천연물질로써의 고감미 소재

- 소비자의 건강에 대한 인식이 높아짐에 따라 “천연”에 대한 요구가 지속적으로 증가되고 있으며, 이에 따라 기존 범용적으로 사용하던 소재를 대체할 수 있는 천연 소재에 많은 관심이 증가되고 있고 그 구매력도 날로 증가하고 있음
- 현재의 소비자는 “천연”이란 value에 추가적인 비용을 감수할 수 있는 수준까지 발전한 상황임
- 한국과 일본을 중심으로 “건강기능성식품소재” 및 이를 활용한 건강식품의 시장이 날로 확대되고 있는 추세이며, 이는 일반 식품 소재의 부가가치를 벗어난 “건강 기능성” 소재 시장의 탄생을 의미함
- 기존 시장에서 범용적으로 사용되는 소재가 인공/합성인 경우, 혹은 기존 범용 소재가 건강기능성에 반하는 경우는 새로운 소재의 개발 및 발굴이 사업적 가치 및 국가 산업 경쟁력 증진에 도움이 될 수 있을 뿐 아니라, 그 산업화 가능성도 높은 카테고리 정의가 가능함
- 식품은 그 특성상 사람이 의도적이거나 비의도적으로 섭취하였던 “식경험 유무”가 가장 중요한 선결 요건이며, 기존에 알려진 자연계에 존재하는 물질이어야 함
- 현재까지의 대부분의 “천연” 혹은 “건강기능성” 식품소재의 개발은 효능 평가 중심의 연구를 통하여 선별된 단순 고순도 추출/정제 제품의 개발이 대부분을 차지하나 그 한계점이 분명함
- 대규모 경작을 통하여 원료를 수급하기에는 대부분의 기능성 소재 원료 (자생식물 등)의 수급 물량 및 가격 한계가 큼
- 식품 소재 사업화는 그 특성상, 높은 초기 투자비를 요구하고 대량 생산을 통한 원가 절감이 선결 요건임. 이러한 요구 조건을 충족하기 위해서는 대부분의 소재는 국내 내수가 아닌 글로벌 소재로서의 사업성(원가, 독점성, 인허가)을 갖추어야 함
- 천연 고감미소재의 경우 주로 쓴맛으로 나타나는 고감미소재의 후미(뒷맛)에 대한 개선 필요성이 대두됨
- 스테비아의 경우 8가지의 알려진 배당체 형태의 화학구조 중 RebA 만이 바람직한 감미도와 감미질을 갖추고 있어, 이를 고순도로 분리하는 과정이 필요하며, 따라서 가격 상승 부담이 있음
- 대안으로는 다른 감미료와의 혼합제제 조성, 분자구조의 변형 등을 들 수 있겠으나 매우 제한적인 가능성을 보임. 따라서 쓴맛 매스킹 기술력의 축적 또한 고감미 소재를 중심으로 한 sweetener 개발에는 가장 중요하게 해결되어야 할 당면 과제임
- 전세계 공급량의 약 75%에 이르는 스테비아 재배는 중국, 나한과 재배의 거의 대부분은 역시 중국과 뉴질랜드에 분포되어 있어 식물체 원료 공급에 상당한 제한이 있음
- 따라서 국내 자생/재배되는 식물체를 중심으로 고감미 성분을 함유한 원료를 찾아내는 것은 매우 중요하며, 이를 통해 국내의 독자적인 원천기술을 통한 천연고감미 소재의 개발은 큰 의미를 갖고 있음

- 국내의 제한적인 재배면적을 통해 소량의 생산으로 고부가가치를 창출할 수 있는 식품 소재로써 활용도가 높은 천연고감미소재는 국내의 식품소재 산업의 바로미터가 될 수 있는 적합한 개발 소재임
- 고감미 감미료는 단맛의 강도가 설탕의 수십 배에서 수백 배에 달하여 소량 사용만으로도 원하는 수준의 단맛을 낼 수 있어 설탕 대체재로서 성공가능성이 큰 것으로 평가됨. 이로 인해 전 세계적으로 steviol glucoside, isocoumarine glucoside, phylloolulcin 등 신규 고감미 감미료에 대한 연구 성과들이 활발히 보고되는 반면, 국내에서 이에 대한 연구는 미진한 실정임.
- 신규 소재의 경우 대부분 유사 혹은 동일 제품 개발을 통한 신제품 개발 추진, 기업에서는 추격형 기술 복제 수준의 제품개발에 치중함
- 산업화 보다는 소규모 연구개발 과제 수준으로 지원하고 있는 실정임

### 제 3 절 대체 감미료의 사용 현황 및 문제점

- 설탕의 과잉 섭취로 인한 치아 우식, 당뇨, 비만이나 과체중의 부작용을 줄이기 위한 노력의 일환으로 대체 감미료가 주목받고 있음
- 세계 대체 감미료 시장은 2011년 93억 달러 규모를 기록하고 있으며, 매년 복합연간성장률 1.1%에 달하여 2016년에는 99억 달러 규모가 될 것으로 예측됨
- 북미 및 유럽 시장은 각각 2011년 59억 및 19억 달러 규모를 기록하였으며, 이후 복합연간성장률 0.4 및 1.5%로 2016년 20억 달러에 도달할 것으로 예측되고 있음. 그 외의 지역은 2011년 15억 달러에서 매년 3.3% 성장률을 보여 2016년에는 18억 달러 시장을 형성할 것으로 예측됨
- 국내 대체 감미료 시장은 2008년 2759톤에서 2011년 4427톤으로 60.5% 성장률을 보이며 크게 증가함. 이는 설탕 판매량 9만 9424톤의 약 7.2% 수준이나 같은 기간 설탕 판매량은 15.1% 줄어든 점에 비하면 비약적인 성장률임
- 대표적인 대체 감미료로 솔비톨, 말티톨, 자일리톨 등의 당알콜과 수크랄로스, 사카린, 아스파탐, 아세설팜 칼륨 등의 고감미 인공감미료가 개발되었으나, 당알콜계 감미료의 경우 소화 장애 유발, 아스파탐의 경우 페닐케톤뇨증 환자의 섭취 제한 등 한계점이 있음. 특히 사카린의 경우 부작용에 대한 우려로 유럽과 미국에서 사용금지 물질로 지정되기도 했으며, 현재 우리나라에서는 빵, 과자, 캔디, 빙과 아이스크림 등에는 사용이 금지되어 있음
- 천연 고감미 감미료인 stevioside는 인공감미료에 비해 소비자의 거부감이 적어 음료 등에 사용되고 있으나, 알코올과 화학 반응하여 유독성 물질인 steviol로 변화한다는 보고가 있어 유해성 논란이 있음
- 인공감미료 (사카린, 아스파탐)등이 포도당 과민증을 유발하여 장내 세균 균총에 영향을 준다는 연구가 발표되어, 소비자들의 인공감미료에 대한 거부감이 더욱 커짐
- 또한 clean label의 중요성을 인식하면서 국내를 비롯한 다국적 기업에서 천연 유래의 고감미 소재에 대한 관심도가 증가함

## 7장 연구개발결과의 보안등급

코드번호	D-09
○ 해당사항 없음.	

## 8장 국가과학기술종합정보시스템에 등록된 연구시설·장비 현황

코드번호	D-10
○ 해당사항 없음.	

## 9장 연구개발과제 수행에 따른 연구실 등의 안전조치 이행실적

코드번호	D-11
<p><b>제 1절 실험실 안전 점검 체계</b></p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. 위험등급별로 환경안전점검을 단계별로 체계화하여 관리</li> <li>2. 관리위험등급의 지정               <ol style="list-style-type: none"> <li>가. A등급: 가연성 가스, 인화성 시약, 유해화학물질, 다량의 폐액 배출, 독극물, 생물 및 동물, 방사성 동위원소, 위험성이 높은 기계장비가 설치된 실험실</li> <li>나. B등급: 일반 시약, 소규모 인화성 시약, 불연성 가스, 소량의 폐수발생 실험실</li> <li>다. C등급: 이화학실험을 수행하지 않는 전기, 설계, 컴퓨터 관련 실험실</li> </ol> </li> </ol> <p>(1) 실험실 정밀안전진단 실시</p> <p>(가) 대상 : 연구실 안전환경 조성에 관한 법률 제15조(미래창조과학부), 연구개발활동에 유해화학물질 관리법 제2조 7호에 따른 유해화학물질을 취급하는 연구실, 산업안전보건법 제39조에 따른 유해인자를 취급하는 연구실, 과학기술부령이 정하는 독성가스를 취급하는 연구실</p> <p>(나) 실험실 정밀안전진단 실시 : 2년마다 1회 실시하여 미래창조과학부에 보고</p> <p>(2) 실험실 정기점검 실시</p> <p>(나) 실험실 정기점검 실시 : 1년마다 1회 실시하여 미래창조과학부에 보고</p> <p><b>제 2절 안전 교육 훈련</b></p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1. 개요 : 실험실의 안전을 확보하고 종사자의 건강을 보호하여 실험 및 연구활동에 기여하고, 또한 연구실 안전환경조성에 관한 법률에 의거하여 실험실의 환경안전교육이 의무화됨에 따라 이공계열 대학원생 및 연구원 등 관련자 전원은 연구실 안전교육을 의무적으로 수강</li> <li>2. 교육대상 : 교수, 대학원생, 실험조교, 전문직원, 소속연구원, 실험참여 학부생 및 업체직원 등</li> <li>3. 단계별 교육 이수과정 :               <ol style="list-style-type: none"> <li>가. 1단계 : 공통이수과목(등록실험실전체)</li> <li>나. 2단계 : 특수실험실</li> </ol> </li> <li>4. 교육구분               <ol style="list-style-type: none"> <li>가. 정기교육 : 온라인 안전교육 또는 집체 안전교육 (6시간) 실시, 신규 등록 시(8시간)</li> <li>나. 비정기 임시교육 :                   <ol style="list-style-type: none"> <li>(1) 대상 : 새로운 실험과정의 신설시, 연구소의 신설시, 교육 미 이수자(신입 대학원생, 전담직원, 연구원, 업체직원, 유해물질 취급자 등)</li> <li>(2) 방법 : 사이버 교육 환경안전교육 등(홈페이지 개설 동영상교육), 자료/유인물, 외부 온라인상, 외부강사, 전문교육기관의뢰 등</li> </ol> </li> </ol> </li> </ol>	

(3) 특별교육: 해당기관에서 자체 또는 외부의 전문기관에 의뢰하여 위탁교육 실시  
제 3절 보험 가입 현황

보 험 명	보 상 내 용	대 상	주관부서
재산종합보험 (종합패키지 보험)	재산종합위험담보 :2조 5천 6백억원 (신체배상책임보험 특별약관포함)	피보험자	관리처 (건설개발과)
	대인대물일괄 : 20억원-사고당	전체	“
	제3자 치료비 보상:1천만원/인당, 8천만원/사 고당	제3자 보상	“
	학생교내외치료비:1천5백만원/인당, 8천만원/사 고당	학생	“
학생단체 상해보험 (경영자배상책임보 험)	상해사망, 후유장해 : 2억원 의사상자 상해위험 : 1억원 상해, 후유정도에 따른 보상 : 약관보상 연구활동종사자보험 포함(특별약관)	학부생, 대학원생	학생지원처 (학생과)
교직원 단체안심보험	사망, 후유장해, 질병사망 : 1억원/인 의료비지원 - 암치료비 : 1천만원/인당 - 입원의료비지원 : 3천만원/인당 - 상해의료실비 : 2백만원/인당	교직원	총무처 (총무과)
상해보험	사망, 후유장해(1급시) : 1억원/인 상해 : 1천만원/인	연구활동 종사자	연구실 안전관리센 터

제 4절 추가 이행 계획

가) 실험종사자 건강검진 및 보험 추가가입	1. 건강검진(특수실험실) 2. 상해보험추가가입검토(특수실험실)
나) 실험실 공기질 관리, 환기	유해물질농도 측정관리, 환기대책수립
다) 실험실 환경개선공사	노후 실험실 개선공사 시행
라) 특수위험 실험실에 별도의 소화설비 설 치	위험성이 큰 실험실에 별도의 특수소화 설비 설치하여 사고 확산을 예방
마) 유기용매 보관시설 설치 및 액체질소 통합관리	1. 보관창고를 설치하여 통합관리 2. 액체질소를 시약센터에서 통합관리
바) 실험실 환경안전지침 작성	보완작성
사) 고압가스 안전관리	안전시설 설치
아) 안전보호장비 시설 보완	안전보호장비와 안전표지 설치



## 10장 연구개발과제의 대표적 연구실적

번호	구분 (논문/ 특허/ 기타)	논문명/특허명/기타	소속 기관명	역할	논문게재 지/ 특허등록 국가	코드번호		D-12	
						Impact Factor	논문게재일 /특허등록 일	사사여부 (단독사사 또는 중복사사)	특기사항 (SCI여부/ 인용횟수 등)
1	논문	The establishment of efficient bioconversion, extraction, and isolation processes for the production of phyllodulcin, a potential high intensity sweetener, from sweet hydrangea leaves ( <i>Hydrangea macrophylla Thunbergii</i> )	세종대학교	제1저자/ 교신저 자	Phytoch -emical Analysis	2.497	2016.03.04	단독사사	SCI
2	논문	Relative sweetness and sweetness quality of xylobiose	국민대 학교, 세종대 학교	주저자 (국민대) / 참여저 자 (세종대)	Food Science and Biotechn ology	0.699	2017년 게재 예정	단독사사	SCI(E)
3	특허	자일로비오스 생산을 위한 $\beta$ -자일로시다아제 발현 시스템	대한 제당	발명자	대한한국	-	2015.05.14	단독사사	출원
4	특허	필로둘신 또는 이의 염을 포함하는 당뇨병 예방, 개선 및 치료용 조성물	이화 여자 대학교	발명자	대한민국	-	2016.07.27	단독사사	출원
5	특허	수국차 잎으로부터 천연 고감미료인 필로둘신을 수득하는 방법	세종 대학교	발명자	대한민국	-	2016.10.05	단독사사	등록

## 11장 기타사항

코드번호	D-13
○ 해당사항 없음.	

## 12장 참고문헌

코드번호	D-14
제 1 절 제 1세부연구과제	
1. R. Zehnter, H. Gerlach, Enantiodifferentiation in taste perception of the phyllodulcins. <i>Tetrahedron</i> , <b>6</b> (11), 2779-2786. (1995).	
2. A. Ramacciotti, R. Fiaschi, E. Napolitano, Highly enantioselective synthesis of natural phyllodulcin. <i>J. Org. Chem.</i> , <b>61</b> (16), 5371-5374 (1996)	
3. Gunes, M. Speicher, A. Efficient syntheses of (+/-)-hydrangenol, (+/-)-phyllodulcin and (+/-)-macrophyllol. <i>Tetrahedron</i> , <b>59</b> (44), 8799-8802 (2003)	
4. Yang, C. J. Wang, Z. B. Zhu, D. L. Yu, Y. Lei, Y. T. Liu, Y. Two new cyanogenic glucosides from the Leaves of <i>Hydrangea macrophylla</i> . <i>Molecules</i> , <b>17</b> (5), 5396-5403 (2012)	
5. Yamahara, J. Matsuda, H. Shimoda, H. Ishikawa, H. Kawamori, S. Wariishi, N. Harada, E. Murakami, N. Yoshikawa, M. Development of bioactive functions in <i>Hydrangeae-Dulcis-Folium</i> - antiulcer, antiallergy, and cholagoic effects of the extract from <i>Hydrangeae-Dulcis-Folium</i> . <i>Yakugaku Zasshi</i> , <b>114</b> (6), 401-413 (1994)	
6. Nozawa, K.; Yamada, M.; Tsuda, Y.; Kawai, K. I.; Nakajima, S. Antifungal activity of oosponol, oospolactone, phyllodulcin, hydrangenol, and some other related-compounds. <i>Chem. Pharm. Bull. Tokyo</i> , <b>29</b> (9), 2689-2691 (1981)	
7. Zhang, H. L. Matsuda, H. Yamashita, C. Nakamura, S. Yoshikawa, M. Hydrangeic acid from the processed leaves of <i>Hydrangea macrophylla</i> var. <i>thunbergii</i> as a new type of anti-diabetic compound. <i>Eur. J. Pharmacol.</i> , <b>606</b> (1-3), 255-261 (2009)	
8. Yoshikawa, M. Ueda, T. Shimoda, H. Murakami, T. Yamahara, J. Matsuda, H. Dihydroisocoumarin constituents from the leaves of <i>Hydrangea macrophylla</i> var. <i>thunbergii</i> (2). Absolute stereostructures of hydrangenol, thunberginol I, and phyllodulcin glycosides and isomerization reaction at the 3-positions of phyllodulcin and its glycosides. <i>Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)</i> , <b>47</b> (3), 383-387 (1999)	
9. Ujihara, M.; Shinozaki, M.; Kato, M. Accumulation of phyllodulcin in sweet-leaf plants of <i>Hydrangea serrata</i> and its neutrality in the defence against a specialist leafmining herbivore. <i>Res. Popul. Ecol. Kyoto</i> , <b>37</b> (2), 249-257 (1995)	
10. Akiyama, T. Shibuya, M. Liu, H. M. Ebizuka, Y. p-Coumaroyltri-acetic acid synthase, a new homologue of chalcone synthase, from <i>Hydrangea macrophylla</i> var. <i>thunbergii</i> . <i>Eur. J. Biochem.</i> , <b>263</b> (3), 834-839 (1999)	

11. Suzuki, H. Ikeda, T. Matsumoto, T. Noguchi, M. Isolation and identification of phyllo dulcin and skimmin from cultured-cells of Amacha (*Hydrangea-Macrophylla* Seringe Var *Thunbergii* Makino). *Agric. Biol. Chem.*, **41**(4), 719-720 (1977)
12. Yoshikawa, M. Harada, E. Naitoh, Y. Inoue, K. Matsuda, H.; Shimoda, H. Yamahara, J. Murakami, N. Development of bioactive functions in *Hydrangeae-Dulcis* Folium .3. on the anti allergic and antimicrobial principles of *Hydrangeae-Dulcis* Folium .1. Thunberginol-a, Thunberginol-B, and Thunberginol-F. *Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)*, **42**(11), 2225-2230 (1994)
13. Sugai, E. Morimitsu, Y. Iwasaki, Y. Morita, A. Watanabe, T. Kubota, K. Pungent qualities of sanshool-related compounds evaluated by a sensory test and activation of rat TRPV1. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **69**(10), 1951-1957 (2005)
14. Yang, E. J. Chang, H. C. Purification of a new antifungal compound produced by *Lactobacillus plantarum* AF1 isolated from kimchi. *Int. J. Food Microbiol*, 139(1-2), 56-63 (2010)
15. Yasuda, T. Kayaba, S. Takahashi, K. Nakazawa, T. Ohsawa, K. Metabolic fate of orally administered phyllo dulcin in rats. *J. Nat. Prod.*, **67**(9), 1604-1607 (2004)
16. Dominique, D. Gilles P. Denis W. Cyclodextrins in targeting application to nanoparticles. *Advanced Drug Delivery Review*, **36**, 29-40 (1999)
17. Szejtli J. Introduction and general overview of cyclodextrin chemistry. *Chem. Rev.*, **98**, 1743-1753 (1998)
18. Krishna Mohan P. R. Sreelakshmi G. Muraleedharan C. V. Muraleedharan, Roy Joseph. Water soluble complexes of curcumin with cyclodextrins: Characterization by FT-Raman spectroscopy. *Vibrational Spectroscopy*, **62**, 77-84 (2012)
18. Tayade P. Kale R. Study of freeze-dried quercetin-cyclodextrin binary system by DSC, FT-IR, X-ray diffraction and SEM analysis. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, **34**, 333-339 (2004)
19. Qin Y. Z. Anqi Z. David T. Yu H. Zhen Y. C. Stability of Green Tea Catechins. *J. Agric. Food. Chem.*, **45**, 4624-4628 (1997)
20. Seung W. J. Kim M. S. Kim J. S. Park H. J. Lee S. Woo J. S. Hwang S. J. Preparation and characterization of simvastatin/hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin inclusion complex using supercritical antisolvent (SAS) process, *Euro. J. Pharm. Biopharm.*, **66**, 413-421 (2007)

## 제 2 절 제 1협동연구과제

1. W. Panbangred, T. Kondo, S. Negoro, A. Shinmyo, H. Okada, Molecular cloning of the genes for xylan degradation of *Bacillus-pumilus* and their expression in *Escherichia coli*. *Mol. Gen. Genet.* **192**, 335-341 (1983).
2. H. Moriyama, E. Fukusaki, J. C. Crespo, A. Shinmyo, H. Okada, Structure and expression of genes coding for xylan-degrading enzymes of *Bacillus pumilus*. *Eur. J. Biochem.* **166**, 539-545 (1987).
3. M. Okazaki, S. Fujikawa, N. Matsumoto, Effect of xylooligosaccharide on growth of *Bifidobacterium*. *J. Jpn. Soc. Nutr. Food Sci.* **43**, 395-401 (1990).
4. W. Z. Xu, Y. Shima, S. Negoro, I. Urabe, Sequence and properties of *b*-xylosidase from *Bacillus pumilus* IPO contradiction of the previous nucleotide sequence. *Eur. J. Biochem.* **202**, 1197-203 (1991)
5. K. J. Jeong, P. C. Lee, I. Y. Park, M. S. Kim, S. C. Kim, Molecular cloning and characterization of an endoxylanase gene of *Bacillus sp.* in *Escherichia coli*. *Enzyme Microb. Technol.* **22**, 599-605 (1998).
6. Y. Suwa, K. Koga, S. Fujikawa, M. Okazaki, T. Irie, T. Nakada, "Bifidobacterium bifidum proliferation promoting composition containing xylooligosaccharide" (U.S. Patent 5939309, 1999).
7. M. J. Vazquez, J. L. Alonso, H. Dominguez, J. C. Parajo, Xylooligosaccharides: manufacture and applications. *Trends Food Sci. Technol.* **11**, 387-393 (2000).
8. Z. Zhang, K. Hidajat, A. K. Ray, M. Morbidelli, Multiobjective optimization of SMB and Varicol process for chiral separation. *AIChE J.* **48**, 2800-2816 (2002).
9. Q. P. Yuan, H. Zhang, Z. M. Qian, X. J. Yang, Pilot-plant production of xylo-oligosaccharides from corncob by steaming enzymatic hydrolysis and nanofiltration. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **79**, 1073-1079 (2004).
10. P. Katapodis, W. Nerinckx, M. Claeysens, P. Christakopoulos, Purification and characterization of a thermostable intracellular *b*-xylosidase from the thermophilic fungus *Sporotrichum thermophile*. *Process Biochem.* **41**, 2402-2409 (2006).
11. K. Terpe, Overview of bacterial expression systems for heterologous protein production: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **72**, 211-222 (2006).
12. Y. Kawajiri, L. T. Biegler, Nonlinear programming superstructure for optimal dynamic operations of simulated moving bed processes. *Ind. Eng. Chem. Res.* **45**, 8503-8513 (2006).

13. P. Moura, R. Barata, F. Carvalheiro, F. Girio, M. C. Loureiro-Dias, M. P. Esteves, *In vitro* fermentation of xylo-oligosaccharides from corn cobs autohydrolysis by *Bifidobacterium* and *Lactobacillus* strains. *Lebensm.-Wiss. Technol.***40**, 963-972 (2007).
14. M. Guerfali, A. Gargouri, H. Belghith, *Talaromyces thermophilus* b-D-xylosiase: purification, characterization and xylobiose synthesis. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **150**, 267-279 (2008).
15. J. Nowak, D. Antos, A. Seidel-Morgenstern, Theoretical study of using simulated moving bed chromatography to separate intermediately eluting target compounds. *J. Chromatogr. A* **1253**, 58-70 (2012).
16. S. M. Song, I. H. Kim, A three-zone simulated moving-bed for separation of immunoglobulin Y. *Korean J. Chem. Eng.* **30**, 1527-1532 (2013).

### 제 3 절 제 2협동연구과제

1. R. Deliza, H. J. MacFie, The generation of sensory expectation by external cues and its effect on sensory perception and hedonic ratings: a review. *Journal of Sensory Studies*, **11**(2), 103-128 (1996).
2. J. A. Bower, R. Boyd, Effect of health concern and consumption patterns on measures of sweetness by hedonic and Just-About-Right scales, *Journal of Sensory Studies*, **18**(3), 235-248 (2003).
3. J. A. Bower, M. A. Saadat, C. Whitten, Effect of liking, information and consumer characteristics on purchase intention and willingness to pay more for a fat spread with a proven health benefit. *Food Quality and Preference*, **14**(1), 65-74 (2003).
4. M. Y. Kim, Y. M. Lee, Y. Kim, D. S. Suh, S. J. Chung, K. O. Kim, Relative sweetness of sucralose in a cookie system and physicochemical and sensory properties of low calorie cookies containing sucralose. *Korean Journal of Food Science and Technology*, **38**(4), 501-505 (2006).
5. M. Gacula, S. Rutenbeck, L. Pollack, A.V. Resurreccion, H. R. Moskowitz, The Just About Right intensity scale: functional analyses and relation to hedonics. *Journal of sensory studies*, **22**(2), 194-211 (2007).
6. H. Kim, H. S. Lee, J. Y. Shin, K. O. Kim, Sensory properties and consumer acceptability of coffee drinks contained sucralose and acesulfame-K. *Korean Journal of Food Science and Technology*, **39**(5), 527-533 (2007).
7. S. J. Yoon, N. J. Jo, Y. H. Jeong, Development of a Carbohydrate-based Fat Replacement for Use in Bread Making. *Journal of the East Asian Society of Dietary Life*, **18**(6), 1032-1038 (2008).
8. Y. S. Chung, Y. H. Kwak, M. N. Lee, D. J. Kim, Quality characteristics of sponge cake with erythritol. *Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition*, **38**(11), 1606-1611 (2009).
9. S. B. Johansen, T. Næs, J. Øyaas, M. Hersleth, Acceptance of calorie-reduced yoghurt: Effects of sensory characteristics and product information. *Food Quality and Preference*, **21**(1), 13-21 (2010).
10. S. S. Yoo, H. C. Jeong, Quality Characteristics of Cookies Different with Various Fat. *Journal of the East Asian Society of Dietary Life*, **21**(6), 905-910 (2011).
11. D. Ryu, D. B. Kim, K. H. Lee, D. S. Son, J. Surh, Influences of sugar substitutes on the physicochemical and sensory properties and hardness of Baksulgi during storage. *Korean Journal of Food Science and Technology*, **44**(5), 568-576 (2012).

12. Y. S. Choi, H. W. Kim, K. E. Hwang, C. J. Kim, H. M. Lee, O. K. Kim, H. J. Chung, Effects of Replacing Sugar with Xylitol and Sorbitol on the Textural Properties and Sensory Characteristics of injeolmi. *Korean journal of food and cookery science*, **29**(6), 825-831 (2013).
13. S. M. Song, I. H. Kim, A three-zone simulated moving-bed for separation of immunoglobulin Y. *Korean J. Chem. Eng.* **30**, 1527-1532 (2013).
14. M. J. Kim, S. H. Yoo, S. Jung, M. K. Park, J. H. Hong, Relative sweetness, sweetness quality, and temporal profile of xylooligosaccharides and luohan guo (*Siraitia grosvenorii*) extract. *Food Science and Biotechnology*, **24**(3), 965-973 (2015).



#### 제 4 절 제 3협동연구과제

1. P. S. Lechner, C. M. Croniger, P. Hakimi, C. Millward, C. Fekter, J. S. Yun, and R. W. Hanson. The Use of Transgenic Mice to Analyze the Role of Accessory Factor Two in the Regulation of Phosphoenolpyruvate Carboxykinase (GTP) Gene Transcription during Diabetes. *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY*. **276**, 22675 - 22679 (2001).
2. S. Gregersen, P. B. Jeppesen, J. J. Holst, K. Hermansen. Antihyperglycemic Effects of Stevioside in Type 2 Diabetic Subjects. *Metabolism*, **53**, 73-76 (2004)
3. T. Yasuda, S. Kayaba, K. Takahashi, T. Nakazawa, K. Ohsawa. Metabolic Fate of Orally Administered Phyllostulcin in Rats. *J. Nat. Prod.* **67**, 1604-1607 (2004).
4. S. D. Anton, C. K. Martin, H. Han, S. Coulon, W. T. Cefalu, P. Geiselman, D. A. Williamson. Effects of stevia, aspartame, and sucrose on food intake, satiety, and postprandial glucose and insulin levels. *Appetite*, **55**, 37 - 43 (2010).
5. S. Jeong, M. Kang, H. Choi, J. Kim, J. Kim. Quercetin ameliorates hyperglycemia and dyslipidemia and improves antioxidant status in type 2 diabetic db/db mice. *Nutr Res Pract.* **6**(3), 201-207 (2012).
6. O. T. Hardy, M. P. Czech, S. Corvera. What causes the insulin resistance underlying obesity, *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes.* **19**(2): 81 - 87 (2012).
7. J. Ann, H. Eo, Y. Lim, Mulberry leaves (*Morus alba* L.) ameliorate obesity-induced hepatic lipogenesis, fibrosis, and oxidative stress in high-fat diet-fed mice. *Genes Nutr.* **10**, 46 (2015).
8. L. C. Bertot, L. A. Adams. The Natural Course of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease. *Int. J. Mol. Sci.* **17**, 774 (2016).

주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 고부가가치식품기술개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표하는 때에는 반드시 농림축산식품부에서 시행한 고부가가치식품기술개발사업의 연구 결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니됩니다.