

119014-  
3

국내산  
곡물  
자원을  
이용한  
고부가  
가치 곡물  
가공  
음료의  
개발 및  
상품화

2022

농림식품기술기획평가원  
농림축산식품부

보안 과제( ), 일반 과제( O ) / 공개( O ), 비공개( ) 발간등록번호( O )  
맞춤형혁신식품 및 천연안심소재 기술개발사업  
2021년도 최종보고서

발간등록번호

11-1543000-004193-01

# 국내산 곡물자원을 이용한 고부가 가치 곡물 가공 음료의 개발 및 상품화

2022.11.11.

주관연구기관 / 강원대학교 산학협력단  
협동연구기관 / (주) 이룸

농림축산식품부  
(전문기관)농림식품기술기획평가원

제출문

## 제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 "국내산 곡물 자원을 이용한 고부가 가치 곡물 가공 음료의 개발 및 상품화"(개발기간 : 2019. 05. 20 ~ 2022. 03. 31)과제의 최종보고서로 제출합니다.

2022. 11. 11.

주관연구기관명 : 강원대학교 산학협력단 (대표자) 장 철 성  
협동연구기관명 : ㈜ 이룸 (대표자) 김 동 원



주관연구책임자 : 오 덕 환  
협동연구책임자 : 홍 성 길

국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정 제18조에 따라 보고서 열람에 동의합니다.

최종보고서										보안등급		
										일반[√], 보안[ ]		
중앙행정기관명		농림축산식품부			사업명		사업명		맞춤형혁신식품 및 천연안심소재 기술개발사업			
전문기관명 (해당 시 작성)		농림식품기술기획평가원					내역사업명 (해당 시 작성)					
공고번호					총괄연구개발 식별번호 (해당 시 작성)		119014-3					
					연구개발과제번호							
기술분류	국가과학기술 표준분류	1순위 LB1704	50%	2순위 LB0706	30%	3순위 LB1803	20%					
	농림식품과학기술분류	1순위 PA1013	100%									
총괄연구개발명 (해당 시 작성)		국문										
		영문										
연구개발과제명		국문	국내산 곡물 자원을 이용한 고부가가치 곡물 가공 음료의 개발 및 상품화									
		영문	Grain based high value added functionally enriched drink development									
주관연구개발기관		기관명	강원대학교 산학협력단			사업자등록번호		221-82-10213				
		주소	(우)강원도 춘천시 강원대학길 1 강원대학교 태백관			법인등록번호		140171-0003228				
연구책임자		성명	오덕환			직위		교수				
		연락처	직장전화				휴대전화					
			전자우편				국가연구자번호					
연구개발기간	전체	2019. 05. 20 - 2022. 03. 31 (35개월)										
연구개발비 (단위: 천원)		정부지원 연구개발비	기관부담 연구개발비		그 외 기관 등의 지원금				합계		연구개발비 외 지원금	
		현금	현금	현물	현금	현물	현금	현물	현금	현물		합계
총계		483,000	16,800	151,200					499,800	151,200	651,000	
1단계	1년차	126,000	4,200	37,800					130,200	37,800	168,000	
	2년차	168,000	6,300	56,700					174,300	56,700	231,000	
	3년차	189,000	6,300	56,700					195,300	56,700	252,000	
공동연구개발기관		기관명	책임자		직위	휴대전화	전자우편		비고			
공동연구개발기관		(주) 이름	홍성길		이사				역할	기관유형		
연구개발담당자 실무담당자		성명	박채린			직위		대학원생				
		연락처	직장전화				휴대전화					
			전자우편				국가연구자번호					

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

2022 년 05 월 29 일

연구책임자: 오 덕 환 (인)

주관연구개발기관의 장: 장 철 성 (직인)

공동연구개발기관의 장: 김 동 원 (직인)

농림축산식품부장관·농림식품기술기획평가원장 귀하

## < 요약 문 >

사업명		맞춤형혁신식품 및 천연안심소재 기술개발사업				총괄연구개발 식별번호 (해당 시 작성)		
내역사업명 (해당 시 작성)						연구개발과제번호		119014-3
기술 분류	국가과학기술 표준분류	1순위 LB1704	50%	2순위 LB0706	30%	3순위 LB1803	20%	
	농림식품 과학기술분류	1순위 PA1013	100%					
총괄연구개발명 (해당 시 작성)								
연구개발과제명		국내산 곡물 자원을 이용한 고부가가치 곡물 가공 음료의 개발 및 상품화						
전체 연구개발기간		2019. 05. 20 - 2022. 03. 31 (35개월)						
총 연구개발비		총 651,000 천원 (정부지원연구개발비: 483,000 천원, 기관부담연구개발비 : 168,000 천원)						
연구개발단계		기초[ ] 응용[ ] 개발[ <input checked="" type="checkbox"/> ] 기타[ ]			기술성숙도		착수시점 기준( 1 ) 종료시점 목표( 8 )	
연구개발과제 유형 (해당 시 작성)								
연구개발과제 특성 (해당 시 작성)								
연구개발 목표 및 내용	최종 목표	국내산 곡물 자원을 이용한 고부가가치 미래 식품소재 개발 및 곡물 가공 음료 개발 및 상품화						
	전체 내용	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 국내산 곡물 자원의 생물전환 공정을 이용한 고부가가치 식품소재 개발 <ul style="list-style-type: none"> <li>- 국내산 쌀, 콩 등 곡물 자원 및 곡물 유래 단백질 원료의 생물전환 가공 적합성 평가 및 적합원료 선별</li> <li>- 국내산 곡물 자원의 생물전환 식품소재 생산조건 확립</li> <li>- 곡물 자원을 이용한 생물전환 식품소재의 대량생산 표준화</li> <li>- 곡물 자원을 이용한 생물전환 식품소재의 품목규격 확립</li> </ul> </li> <li>○ 국내산 곡물 자원을 이용한 생물전환 식품소재의 유효성 및 작용기전 규명 <ul style="list-style-type: none"> <li>- 국내산 곡물 자원을 이용한 생물전환 식품소재의 in vitro/in vivo 항고혈압(ACEI activity) 활성 규명</li> <li>- 국내산 곡물 자원을 이용한 생물전환 식품소재의 in vitro/in vivo 프리바이오틱스 기능 및 장내균총 개선 효능 평가</li> <li>- 국내산 곡물 자원을 이용한 생물전환 식품소재의 지표/기능성분 규명</li> <li>- 국내산 곡물 자원을 이용한 생물전환 식품소재의 작용기전 규명</li> </ul> </li> <li>○ 생물전환 식품소재를 적용한 두유 및 쌀음료 등 곡물 베이스의 가공 음료 개발 및 상품화 <ul style="list-style-type: none"> <li>- 국내산 쌀, 콩 등 곡물 원료에 대한 음료제형 가공 적합성 확립 및 제조 공정 표준화</li> <li>- 쌀, 콩 등 곡물 베이스의 기호도 및 관능개선 음료제품 레시피 개발</li> <li>- 생물전환 식품소재를 곡물 베이스 음료 제품에 적용하여 기능이 강화된</li> </ul> </li> </ul>						

	<p>고부가가치 곡물 베이스 가공 음료 개발</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 생물전환 식품소재 적용 곡물 가공 음료제품의 영양성분 및 기능성분 평가 및 품목규격 확립</li> <li>- 생물전환 식품소재 적용 곡물 가공 음료제품의 브랜드 개발, 상품화 및 마케팅 추진</li> </ul>
--	---

연구개발성과	SCI 논문 3편, 학술발표 5건, 특허출원 1건, 기술실시 1건, 기술료 2,562,000원, 제품화 2건, 고용 창출 4명, 인력양성 4명
--------	---

연구개발성과 활용계획 및 기대 효과	<p>○ 기술적 측면</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 유럽, 미국 등이 주도하고 있는 생물전환 기술 및 곡물 가공 음료의 제조기술에 대한 국내 원천기술 확보를 통한 국제 경쟁력 향상</li> <li>- 사업과제를 통하여 확보된 곡물 가공 원천기술을 응용하여 기타 곡류 및 견과류 등의 음료 적합성 고품질 페이스트 제조 기술의 확보</li> <li>- 국내 제조시설 기반의 곡물 생물전환 소재생산 및 가공 음료 생산 원천기술 확보</li> </ul> <p>○ 경제적·산업적 측면</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 수입 제품에 의존하고 있는 국내 음료 시장에 국내 기술과 국내 자원을 이용하여 개발된 곡물 가공 음료의 보급을 통하여 음료 업계의 새로운 방향 제시와 신규시장 창출</li> <li>- 곡류 유래 단백질의 생물전환기술을 이용한 영양성분 및 건강기능 강화 식품원료 생산 관련 제조 및 유통 산업의 활성화</li> <li>- 곡물 가공 음료 시장 활성화를 통한 농가, 음료 제조, 생산, 유통 업계의 매출 증진 및 고용인력 확대</li> </ul>
---------------------	--

연구개발성과의 비공개여부 및 사유

연구개발성과의 등록·기탁 건수	논문	특허	보고서 원문	연구 시설·장비	기술 요약 정보	소프트 웨어	표준	생명자원		화합물	신품종	
								생명 정보	생물 자원		정보	실물
	3	1							1			
연구시설·장비 종합정보시스템 등록 현황	구입 기관	연구시설·장비명	규격 (모델명)	수량	구입 연월일	구입가격 (천원)	구입처 (전화)	비고 (설치장소)	ZEUS 등록번호			
국문핵심어 (5개 이내)	곡물		생물전환		고혈압		장내균총		음료			
영문핵심어 (5개 이내)	grains		bioconversion		hypertension		microbiome		beverage			

## < 목 차 >

1. 연구개발과제의 개요
2. 연구개발과제의 수행 과정 및 수행내용
3. 연구개발과제의 수행 결과 및 목표 달성 정도
4. 목표 미달 시 원인분석
5. 연구개발성과 및 관련 분야에 대한 기여 정도
6. 연구개발성과의 관리 및 활용 계획
7. 참고 문헌

# 1. 연구개발과제의 개요

## 1-1 연구개발의 필요성

- 연구개발 개요 : 국내산 곡물자원을 이용한 고부가가치 미래 식품소재 개발과 소재를 적용한 곡물 가공 음료의 개발 및 상품화
  - 쌀, 콩 등의 국내산 곡물자원을 생물전환 공정(bioconversion)을 이용한 유효성분 및 영양성분이 강화된 고부가가치 식품원료 제조기술을 확립함
  - 생물전환 공정을 통하여 생산된 식품소재의 항고혈압 활성과 장내 미생물군총(microbiota) 개선 효과를 검증하고 작용기전을 규명함
  - 생물전환 식품소재의 대량생산 제조공정을 표준화하며 기능/지표성분을 규명함
  - 쌀, 콩 등의 곡물 베이스 음료 가공기술을 개발하며 생물전환 식품소재를 적용하여 고기능이면서도 음료로서의 안정성과 기호성을 증진시킨 곡물 가공음료를 개발함
  - 고기능/고영양인 동시에 식품적 관능이 우수한 곡물 가공음료 브랜드의 개발 및 상품화를 통하여 국내산 쌀 및 콩 등의 곡물자원의 고부가가치화 및 소비를 증진시킴



곡물 가공음료 제품 사례 : 이롬 라이스밀크 (쌀음료), 이롬 두유다운두유 (두유)

### ○ 핵심기술 :

- 생물전환(bioconversion) 기술 : 곡물 및 곡물유래 단백질 원료를 효소처리 또는 젖산균 발효 등의 생물전환기술을 통하여 항고혈압 활성 펩타이드의 생산 또는 장내 균총 개선 기능의 프리바이오틱 성분의 증대 및 아미노산 등의 영양성분을 강화 시키는 한편 음료 제품에 적합한 물성을 확보하는 생물전환 조건 확립 기술 및 양산 공정에 적용하여 대량생산 안정화 및 표준화가 확보된 공정개발 기술.
- 곡물 가공 기술 : 쌀과 콩 등의 곡물 원료의 전처리(세척, 침지, 분쇄, 증숙 등) 조건 설정과 amylase, protease 등의 효소처리 또는 고압균질화 등의 가공 공정을 통하여 음료제형에 적합한 입도, 점도, pH 등의 안정성과 색상, 향미 등의 관능을 최적화 시킨 음료의 가공기술 및 제조공정 표준화 기술.
- 음료 베이스 공정개발 기술 : 쌀액화액 또는 두유액과 식품 첨가물을 이용하여 음료로서의 안정성이 확보된 음료 베이스의 개발 기술과 멸균팩, 유리병, 파우치, PET 등의

양산 공정에 적용하여 대량생산 안정화 및 표준화가 확보된 공정개발 기술.

- 음료 레시피 개발 기술 : 쌀액화액 또는 두유액을 다양한 식품 원재료 및 부재료를 이용하여 소비자 관능평가 대하여 기호성이 우수하면서도 음료로서의 안정성이 확보된 음료제품 레시피의 개발 기술.
- 유효성 평가 기술: 곡물 생물전환 식품소재 및 제품에 대하여 in vitro와 in vivo 모델을 이용하여 항고혈압 활성기능 및 장내 마이크로바이옴에 대한 메타지놈 분석을 통한 균총의 변화를 평가할 수 있는 기초연구 기술.

### <기술개발 체계도>



## 1-2 연구개발 대상의 국내·외 현황

### 가. 국내 기술 수준 및 시장 현황

- 생물전환공정(발효)을 통한 식물성 단백질 유래 항고혈압 펩타이드 개발 관련 지식재산권 현황
  - 특허정보넷 KIPRIS에서 검색한 결과 및 결과내 검색의 결과는 다음과 같음: 키워드 “ACE” 35,976건, “ACE \* soy” 441건, “ACE \* soy \* peptide” 75건, “ACE \* soy \* peptide \* 발효” 29건, “ACE \* soy \* peptide \* 발효”(등록) 12건.
  - 검색된 특허들은 항고혈압 연관 안지오펀신전환효소(ACE) 활성 억제제와 관련되어 있으나, 사용한 시료나 생물전환공정(발효, 효소분해 등), 도출된 활성 물질 및 펩타이드 서열, 활성 분석법 등에서 차이를 가지므로 직접적 관련성이 낮고 기존 기술과의 차별성이 분명하므로, 본 과제에서 도출될 결과물들의 특허 출원 등에 제약이 되지 않으며, 또한 이를 이용한 제품 개발 및 생산에도 문제가 되지 않을 것임.



- 특히 29건 중에서 본 과제와 연관성이 가장 높은 4건의 등록 특허를 검토·분석하여 본 과제와의 차별성을 아래 간략히 기술하였음.

표. 개발대상 기술(제품, 서비스 등) 관련 지식재산권

지식재산권명	지식재산권출원인	출원국/출원번호
① 대두 발효 조성물의 제조방법 및 이 조성물로부터 유래된 펩타이드	한양대학교 산학협력단 /샘표 주식회사	한국/10-0787949
② 혈압 저하 효과가 있는 카제인 단백질 분해물 및 그 제조방법	농촌진흥청	한국/1020010039282
③ ACE 억제능이 있는 신규한 락토바실러스 지애 RMK 354 균주	한국식품연구원	한국/1008582880000
④ 인지오텐신 전환효소(ACE) 저해제의 제조 방법 및 이의 용도	카운슬 오브 사이언티픽 앤드 인더스트리얼 리서치	한국/10-2005-011366

① 대두 발효 조성물의 제조방법 및 이 조성물로부터 유래된 펩타이드(한양대, 샘표)

- 위 특허는 대두를 고온에서 단기간 발효시켜 제조하는 것으로 항산화 활성, 항균 활성, 암세포 독성 및 항고혈압 활성을 가진다. 또한, 이 대두 발효 조성물로부터 정제된 펩타이드는 높은 ACE 저해 활성을 가짐. 본 과제와의 차별점은 먼저, 간장 발효균(*Aspergillus*)를 사용하여 소재 및 생물전환 공정용 균주가 다르며, 그 발효 조성물에서 분리한 펩타이드들도 아미노산 서열이 다른 것임. 본 과제에서 도출된 대두단백 발효 공정 및 유산균과 도출된 펩타이드들은 신규로서 특허 출원 계획임.

② 혈압 저하 효과가 있는 카제인 단백질 분해물 및 그 제조방법 (농촌진흥청):

- 위 특허는 혈압저하 효과가 있는 카제인 단백질 분해물 및 그 제조방법에 관한 것으로, 본 과제는 우유단백질이 아닌 쌀 및 대두단백질을 사용하며, 단순 효소 분해 공정이 아닌 생물전환 공정으로 차별화되며, 더 나아가 이들 공정과 산물을 이용하여 항고혈압 기능성 제품(미유 및 쌀가공음료)의 개발 및 생산이 목표임.

③ ACE 억제능이 있는 신규한 락토바실러스 지애 RMK 354 균주 (한국식품연구원)

- 위 특허는 발효유 제조에 적합한 젖산 및 ACE 억제 활성능력이 있는 신규한 젖산 균인 락토바실러스 지애(*L. zae* RMK354)에 관한 것으로, 본 과제에서는 전통발효식품 된장에서 분리동정한 신규 유산균들을 이용할 것임.

④ 인지오텐신 전환효소(ACE) 저해제의 제조 방법 및 이의 용도 (카운슬 오브 사이언티픽 앤드 인더스트리얼 리서치, 인도)

- 위 특허는 대두 저장 단백질 분획인 글리시닌의 효소 가수분해물을 제조하고 ACE 저해제로서 글리시닌 폴리펩티드의 용도에 관한 것으로, 본 과제는 분획물이 아닌 쌀 및 분리대두단백을 사용하며, 효소의 가수분해물이 아닌 생물전환 공정(발효)을 사용하며, 도출된 ACE 저해 활성을 가진 펩타이드들도 아미노산 서열이 다른 신규 펩타이드들이 포함되어 있는 혼합물이며, 이들을 이용한 기능성 음료(두유)의 개발 및 생산이 목표임.

- 결론: 쌀 및 곡류 단백질의 유산균 생물전환 기술을 이용한 혈압조절 활성 펩타이드는 본 과제의 연구기관이 수행한 선행연구 결과를 비추어 볼 때 기존 관련 특허

들에 대하여 차별적이며 독창적인 기술인 것으로 분석되었으며 본 사업과제를 통한 추가 연구로서 특허기술을 충분히 확보할 수 있을 것으로 사료됨.

○ 곡물 가공 음료 개발 관련 지식재산권 현황 : 쌀 음료에 관한 NDSL 검색 결과

: 검색어 “쌀 음료” 전체 111건, 논문 26건, 특허 40건, 보고서 43건, 동향 2건.

- 검색된 보고서 43건 중 국가R&D보고서 29건 (발행일: 1998-2015년)

- 주관기관: 한국식품연구원 10건, 국립식량과학원 2건, 국립농업과학원 2건, 건양대학교 2건 및 다음 각 1건: 한국농촌경제연구원, 한국원자력연구원, 한국표준과학연구원, 산업연구원, 전북대학교, 순천향대학교, 동아대학교, 공주대학교, 대구산업정보대학, (주)북방농업연구소, (주)비케이바이오, (주)프로바이오닉

- 쌀을 이용한 다양한 연구들 중에서 쌀음료 특히 미유(rice milk) 개발 연구 보고서는 많지 않았음.

- 한국식품연구원, 농촌진흥청에서 주도적으로 쌀을 이용한 다양한 연구와 제품 개발에 대한 연구를 주도함

○ 시장현황

1) 국내 제품생산 및 시장 현황

- 국내 식품시장 중 음료 시장의 규모는 2017년 통계청 추산 약 11조 4,482억으로 예상되며 대부분은 탄산음료 드링크류 등이 차지하는 것으로 나타남. 한편, 쌀 가공 음료 시장은 매출규모가 낮은 편으로 정확한 시장은 추산하기 어려움 (통계청, IBK 투자증권)



음료제조업 시장 규모 및 전년대비 성장률 추이, 자료: 통계청, IBK투자증권 리서치센터 주1: 율하역 기준, 주2: 2015 2016년은 소매 판매액 통계자료를 참고한 IBK투자증권 추정치

- 한편 국내 쌀 소비량에 대한 통계조사결과에서 쌀가공식품 중 음료류는 주정 등의 주류 제품으로 분류되어 비주류 음료로 별도 분류는 되어 있지 않으나 쌀을 이용한 식료품 중 떡류, 과제류 등의 비음료 식품류를 제외한 기타 곡물가공품 제조업에 포함된 것으로 추정 됨 (통계청 2016년 양곡 소비량 조사결과)

- 기타 곡물가공품 제조업은 쌀 전체 소비량의 약 7.1%를 차지하며 쌀 소비량으로 연간 약 4만 7천톤으로 낮은 비중을 차지하는 것으로 추정되며, 이중 쌀음료 관련 제품은 더욱 규모가 작을 것으로 예상됨

<표. 업종별 쌀 소비량>

	2014		2015		2016		
	소비량	구성비	소비량	구성비	소비량	구성비	증감률
<b>사업체부문 쌀 소비량(계)</b>	<b>534,999</b>	<b>100.0</b>	<b>575,460</b>	<b>100.0</b>	<b>658,869</b>	<b>100.0</b>	<b>14.5</b>
식료품 제조업(10)	399,045	74.6	369,626	64.2	378,428	57.4	2.4
기타 곡물가공품 제조업(10619)	53,600	10.0	41,610	7.2	46,823	7.1	12.5
전분제품 및 당류 제조업(10620)	12,856	2.4	12,956	2.2	12,294	1.9	-5.1
떡류 제조업(10711)	188,248	35.2	170,980	29.7	169,618	25.7	-0.8
코코아제품 및 과자류 (10713)	7,074	1.3	7,194	1.3	9,033	1.4	25.6
면류·마카로니 및 유사식품 (10730)	9,859	1.8	11,115	1.9	9,938	1.5	-10.6
장류 제조업(10743)	12,197	2.3	10,858	1.9	10,530	1.6	-3.0
도시락 및 식사용 조리식품 (10798)	98,369	18.4	96,411	16.8	100,247	15.2	4.0
음료 제조업(11)	135,954	25.4	205,834	35.8	280,441	42.6	36.2
탁주 및 약주 제조업(11111)	47,259	8.8	46,403	8.1	51,592	7.8	11.2
주정 제조업(11121)	78,449	14.7	155,754	27.1	222,356	33.7	42.8
* 2011년부터 사업체부문 쌀 소비량조사를 포함하여 양곡소비량조사 실시함							

(통계청 2016년 양곡소비량 조사결과)

- 한편, 대표적인 쌀음료로 유통되고 있는 웅진식품의 ‘아침햇살’은 2015년 까지 16년 동안의 누적매출이 약 8,600억으로 추산되며 이를 연간 매출로 환산할 경우 약 530억으로 추산되고 (조선비즈 2015.07.31.) 쌀 소비량으로 연간 약 2,200톤을 소비한 것으로 예상됨
- 국내 쌀음료의 주류가 웅진식품의 식혜와 아침햇살인 것으로 추정할 경우 국내 쌀음료 시장은 위 제품 시장의 약 2배수 이내의 시장을 형성하고 있을 것으로 예상됨

○ 경쟁기관현황

- 국내 식품업계의 대표적 쌀음료인 식혜 제품과 웅진식품의 아침햇살 제품이 있음
- 대체유 제품에 대응하는 기존의 서울우유, 남양우유, 파스퇴르우유 등의 유업계와 한미, 자연과사람들, 연세우유, 삼육두유 등의 두유류 관련 업계 등이 있음
- 국내 쌀가공 음료 시장은 크게 활성화 되어 있지는 않으나 웅진식품의 아침햇살을 비롯하여 주관기관 이름의 라이스 밀크 등 다양한 관련 제품이 유통되고 있음

<국내 쌀가공 제품 현황>

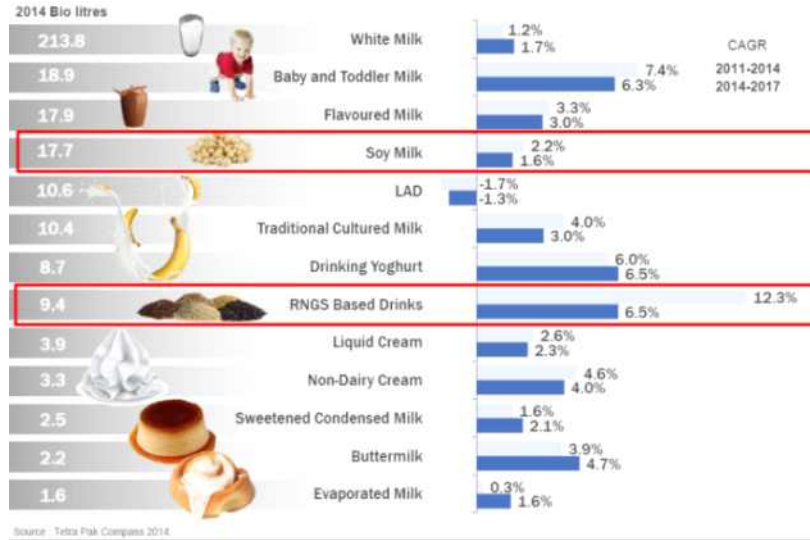
상품명	제조원	특징	사진
아침햇살	웅진식품	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 1999년 세계 최초로 출시된 쌀 음료</li> <li>- 주요성분 : 쌀추출액 35%(고형분 9% 이상, 국산), 현미추출액 33%(고형분 0.2%이상 : 볶은현미(국산) 1.6%)</li> </ul>	
파머스 라이스밀크	이룸	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 주요성분 : 쌀(국산), 알파미(국산), 쌀눈추출물분말, 탄산칼슘, 비타민A, 비타민E</li> </ul>	
라이스밸리	서강유업	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 주요성분 : 알파미분 3.37%, 현미호분추출물분말 0.42%, 현미유, 천일염, 천연바닐라향</li> </ul>	
프로바이오65 스마트 (식물성 유산균 음료)	유산균하우스	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 식물성발효음료</li> <li>- 주요성분 : 쌀추출발효액 69.5%, 혼합유산균 배양액 28.3%, 프락토올리고당, 매실농축액</li> </ul>	
쌀눈워터	자연마을	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 주요성분 : 정제수, 볶은쌀눈 추출액 30%</li> </ul>	
아기랑 쌀이랑	남양	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 주요성분 : 알파미분 2.5%, 현미추출물 2%, 곡물페이스트 2%, 오곡분말 1%, 쌀 단백질분말 0.2%, 정제수 등</li> </ul>	
식물성유산균쌀플레인	풀무원	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 쌀로 만든 요구르트</li> <li>- 순우리쌀즙, 원유, 혼합달지부유, 정제수, 나타데코코, 난소화성말토덱스트린</li> </ul>	

<국내 두유 가공 제품 현황>

상품명	제조원	특징	사진
베지밀 에이	정식품	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 대두를 직접 갈아 만든 두유 액 사용</li> <li>- 두유 본래의 좋은 영양소와 다양한 비타민, 무기질의 영양 성분을 함유</li> </ul>	
베지밀 검은콩 두유 고칼슘	정식품	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 국산 검은콩과 칼슘 함유</li> <li>- 칼슘과 인의 비율 설계 및 비타민 D3 함유로 칼슘 흡수율 높임</li> </ul>	
맛있는 두유 GT	남양유업	<ul style="list-style-type: none"> <li>- GT공법(Good Taste Technology)으로 완성한 두유</li> </ul>	
매일두유	매일유업	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 콩 본연의 부드럽고 고소한 맛을 살린 두유로 설탕 0%, 콩 그대로 두유액이 99.89% 함유</li> </ul>	
삼육 두유	삼육식품	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 국산검은콩과 검은 참깨, 검은쌀 함유</li> </ul>	
현미 참두유	롯데칠성음료	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 나트륨을 줄이고 3가지 현미 함유</li> </ul>	

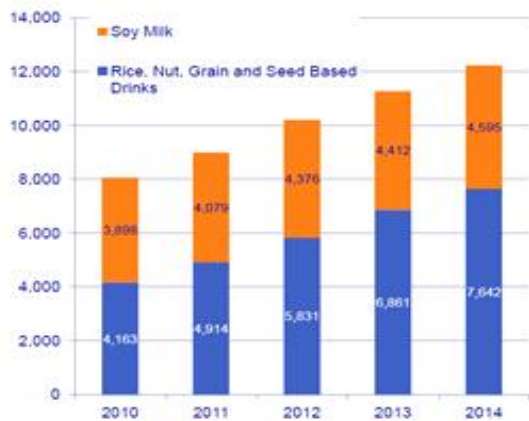
나. 국외 기술 수준 및 시장 현황

○ 시장현황



<그림. 유제품 및 Dairy Alternative 카테고리별 생산 규모>

- 테트라 2014년도 음료시장 조사 결과에 따르면 유제품 및 대체유 (diary alternative) 시장의 카테고리별 비중은 유제품을 제외하고 두유가 가장 큰 규모를 차지하고 있으며 쌀, 견과류, 기타 곡류 및 종실류를 기반으로 하는 음료 시장이 그 다음을 차지하고 있음 (Tetra Pack Compass 2014)
- 특히, 연간 두유와 쌀 및 기타 곡류 기반의 음료 (RNGS based drink)의 연간 생산량을 비교할 경우 두유 시장의 규모는 소폭 상승하는데 그쳤으나 쌀 및 기타 곡류 기반의 음료의 생산량은 해마다 큰폭으로 성장을 거듭하여 향후 글로벌 음료 시장의 주류로서 자리 매김할 것으로 예측됨







Source : Tetra Pak Compass 2014 (Still 기준, 백만리터)

<그림. 두유 및 RNGS 음료의 생산 규모>

- 곡류 별 세부 음료 시장의 규모는 북미시장의 경우 아몬드가 가장 크고, 두유와 코코넛 음료 다음으로 쌀음료가 시장의 우위를 차지하고 있으며, 유럽시장의 경우는 두유가 가장 큰 시장을 형성하고 있고 북미와 다르게 쌀음료가 2위의 시장규모를 형성하고 있는

것으로 나타나 쌀음료가 두유를 제외한 대체유 시장에서 큰 규모를 형성하고 있는 것으로 확인됨

<해외 쌀가공 제품 현황>

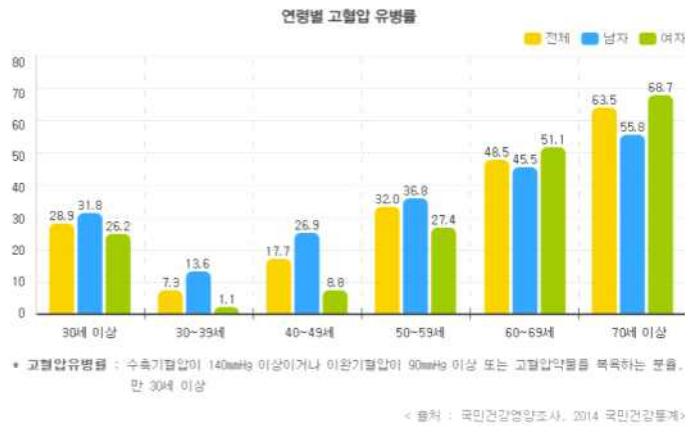
상품명	특징	사진
쌀만들기 재팬타바코	- 쌀 탄산음료	
유메베리카차 일본 철도 JR동일본 워터비지니스	- 쌀청량음료 - 여성층을 주요타겟으로 논카페인에 구수한 맛이 특징	
바이오라이스 The bridge srl *이탈리아산	- 유기농 라이스음료 - 구성성분 : 물, 유기농쌀, 해바라기유, 홍화유, 천일염	
라이스 드림 The Hain Celestial Group, Inc.	- 구성성분: Water, rice (13.8%), sunflower oil, calcium phosphate, sea salt, vitamin D2, vitamin B12. Water, rice (13.8%), sunflower oil, calcium phosphate, seasalt, vitaminD2, vitaminB12.	
Rice milk Vitasoy International Holdings Limited	- 정제수, 현미, 해바라기유, 인산칼슘, 천일염	
rice milk trader joe's	- 정제수, 현미, 홍화유, 해바라기유, 카놀라유, 인산칼슘, 천일염, vitamin A, palmitate, vitamin d2, vitamin b12	

### 1-3. 연구개발의 중요성

○ 생물전환 기술을 이용한 곡류 유래 단백질의 항고혈압 펩타이드 개발의 필요성

- 혈압 및 고혈압 합병증의 현황과 치료 및 조절

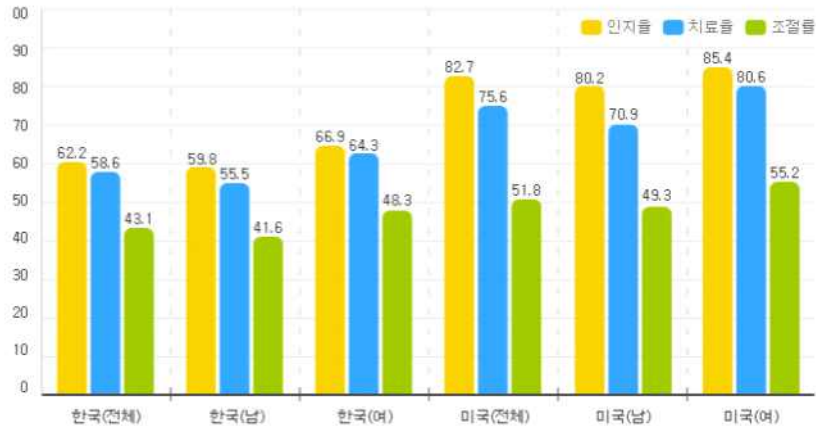
- 고혈압은 평소에 아무런 증상이 없다가 갑자기 뇌졸중, 심장마비 등의 치명적인 질환을 일으키기 때문에 “침묵의 살인자”라고 불림.
- 고혈압이란 수축기 및 이완기(확장기) 혈압이 140mmHg/90 mmHg이상인 경우를 말한다. 160 mmHg이상이면 고혈압 2기로 분류한다.
- 고혈압 원인: 고혈압의 대부분(약 90%)은 1차성, 즉 본태성이며 그 원인은 분명하지 않으나 유전적인 요인(가족력)이 가장 중요함.
- 고혈압 합병증은 장기손상으로 나타나는데, 뇌혈관, 심혈관, 신장, 망막출혈 질환 등이 대표적임. 고혈압 합병증은 우리나라 전체 사망 원인의 50% 이상을 차지하고 있고, 특히 40-50대의 한창 일할 나이에서 가장 많이 발생하여 개인과 가정의 불행은 물론 국가경제에도 큰 손실임.
- 고혈압 유병률은 우리나라 30세 이상의 성인에서 약 34%(900만 명)가 고혈압 환자이나, 고혈압 인지율은 매우 낮은데, 특히 30대 및 40대는 각각 81%, 57%가 미인지 상태임(그림 1)(국민건강영양조사 2014 국민건강통계; 통계청 2015년 통계청 보도자료)



- 고혈압 치료 환자 중 고혈압 조절률은 72.7%로 남녀 모두 고혈압 조절률이 높으나, 고혈압 유병자 기준 조절률(만30세 이상)은 2013-14년에 45.7%으로 상대적으로 낮음
- 고혈압에 대한 지속적 건강 캠페인 등으로 국민인식이 높아진 결과 주요 만성질환인 고혈압 치료율과 조절률은 98년에 비해 3배 이상 증가하고 있으나, 미국, 유럽 등 주요 선진국에 비해서는 낮은 수준임
- 해소방안: 우리나라 성인, 특히 남성의 적극적인 고혈압 치료와 조절, 예방 및 관리를 선진국 수준으로 높이기 위한 관심과 노력이 필요함



미국과 한국의 고혈압 인자율, 치료율, 조절률 비교



< 출처 : 국민건강영양조사, 2014 국민건강통계, CDC National Health and Nutrition Survey 2011-2012 >

- 고혈압 관리: 체중 조절(비만은 2~6배 발병률 증가), 운동요법(유산소 운동 4~8 mmHg SBP 감소, 체중 감소, HDL 콜레스테롤 증가), 식사조절(저염식, 칼로리 제한, 육류보다 생선), 생활습관(담배 니코틴 혈압 상승-2개피 10 mmHg 상승, 동맥경화, 항이노호르몬 분비 촉진-수분 축적, 과음-혈압 상승, 혈압약 효력 감소, 카페인-일시적 혈압 상승), 스트레스 조절 및 약물치료
- 고혈압 치료제: 이뇨제, 교감신경차단제, 안지오텐신전환효소 억제제, 칼슘길항제, 직접 혈관 확장제, 응급약물, 복합약물요법 등
- ACE 저해제/억제제(ACE (Angiotensin converting enzyme) inhibitors) : 심장이나 혈관에 직접 작용하지 않고, 레닌-안지오텐신-알도스테론(renin-angiotensin-aldosterone)이라는 인체에서 혈압을 올리고 염분과 수분을 축적시키는 시스템을 억제하여 혈압을 낮추는 약제임
- 고혈압의 원인 및 발생 기전은 인체에서 혈압을 올리는 레닌-안지오텐신-알도스테론시스템과 밀접하게 관련되고, 안지오텐신전환효소(ACE) 및 그 억제제는 이의 핵심 조절인자임(Bakris 2001, Red 2006)
- 안지오텐신- 전환 효소 (ACE)는 칼리크레인-키닌계 (KKS)에서 B2 수용체를 통해 혈관확장의 촉진, 혈소판의 흡착 및 평활근세포증식의 저해 기능을 하는 나노펩타이드인 브래디키닌으로부터 두 개의 C-말단의 디펩타이드 (Phe-Arg)를 가수 분해하여 불활성화 시킴으로써 결과적으로 혈압을 상승시킴(Dorer et al., 1974)
- 따라서, 이러한 안지오텐신- 전환 효소 (ACE)의 억제물질인 안지오텐신- 전환 효소 (ACE) 저해제는 혈압 상승원을 제거하고 혈관 확장제인 브래디키닌을 증가시키며 특이적으로 신장혈관을 확장시켜 나트륨 배설을 촉진함으로써 고혈압뿐만 아니라 만성신장병, 동맥경화, 심장발작과 그로 인한 사망률 등을 효과적으로 감소시킬 수 있음

## Renin-angiotensin-aldosterone system

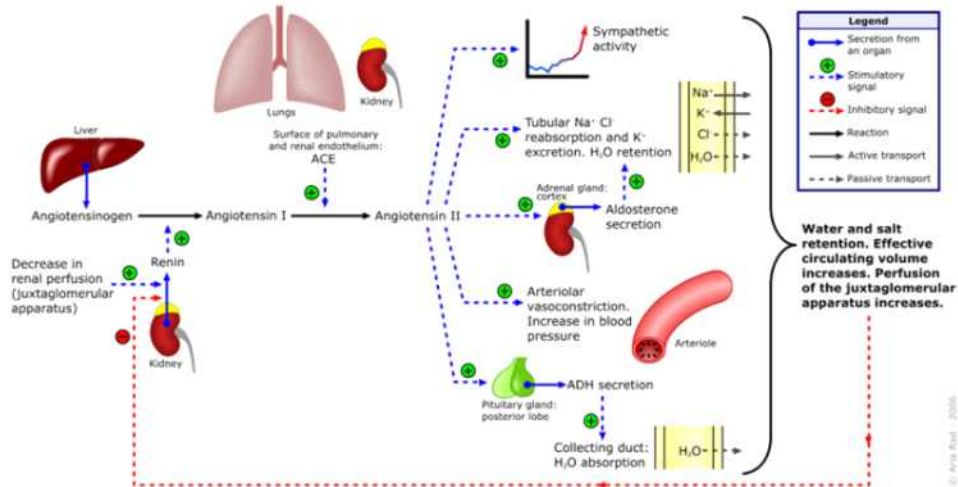


그림. 레닌-안지오텐신-알도스테론(renin-angiotensin- aldosterone) 시스템. 인체에서 혈압을 올리고 염분과 수분을 축적시키는 주요 시스템 (Aria Red , 2006 Wikipedia)

- ACE 억제제의 대표적 약물은 Sulphydryl 계열 captopril(카포텐), Carboxyl 계열 Enalapril(레니텍, 바소텍, 에나프린), Quinapril(아쿠프릴), ramipril(알테이스), lisinopril(프리니빌, 제스트릴), benzepril(로텐신, 시바센) 및 Phosphoryl 계열 Fosinopril(모노프릴) 등(표 1).
- ACE 억제 약물의 부작용: 다른 약물에 비해 거의 없으나, 약 20%의 사람에게서 마른 기침(남성보다 여성에서 흔히)을 유발하고 신부전의 원인이 되기도 하며, 임신의 경우 사생아를 유발할 수 있음. 이 밖에 미상미각, 백혈구 감소증, 혈관부종 또는 발진 등을 유발하는 것으로 알려져 있음(대한고혈압학회, 2013년 고혈압 진료지침, 고혈압 환자 가이드라인).

### - 식품 단백질 유래 항고혈압 펩타이드

- 생리활성 펩타이드(Bioactive peptides)의 장점은 안전하고, 매우 선택적이며, 효과적이고, 지속적이므로 몇 가지 화학 치료제와 비교하여 더 좋은 대체제임.
- 또한 생리활성 펩타이드들은 보다 저렴한 단백질 원료로부터 쉽게 얻을 수 있으며, 기능성 식품 및 건강 증진에 대한 소비자의 인식과 요구가 증가하고 있음(Aluko 2015).
- Cushman 등(1971)과 Cheung 등(1980)은 여러 가지 디펩타이드 (dipeptide)를 합성하여 안지오텐신- 전환 효소 저해 효과에 미치는 C말단 및 N말단 아미노산 잔기의 영향을 검토한 결과 C말단에서 방향족 아미노산 그리고 N말단에서 지방족 아미노산 잔기가 분지(branched)된 것이 안지오텐신- 전환 효소 (ACE)와 결합하는 경쟁적 저해제로서 적당하다고 보고한 이래 많은 연구가 되고 있음(Cushman et al. 1971; Cheung et al. 1980).
- 우유 단백질 유래의 생리활성 펩타이드는 식품 성분으로서의 영양 가치에 더하여 여러 생물학적 특성 및 심혈관 질환을 포함해 여러 질환들에 대한 치료 효과를 보이고 있음. 위장관에서의 소화, 식품 가공 또는 효소 및 세균 발효에 의하여 만들어지는 우유 유래 생리활성 펩타이드는 지질 저하, 항고혈압, 면역조절, 항염증,

항트롬빈 효과와 같은 다양하고 유익한 효과를 나타냄(그림 4)(Marcone et al. 2017).

- 현재 안지오텐신-1 전환 효소 (ACE) 활성 저해제는 식물 자원, 어류 및 두류와 그 발효식품 등을 비롯한 다양한 자원으로부터 탐색되고 있음(그림 5).
- 식품 내에 존재하는 안지오텐신-1 전환 효소 (ACE) 저해제는 열에 안정하며 체내에서의 흡수도 용이한 비교적 저분자 물질로서 이들의 ACE 활성 저해 효과는 기존의 혈압 강하제보다 비교적 낮은 활성을 가지고 있지만 대량으로 항상 섭취하는 식품 중에 존재하며 안정적이라는 점에서 그 유용성이 기대됨.

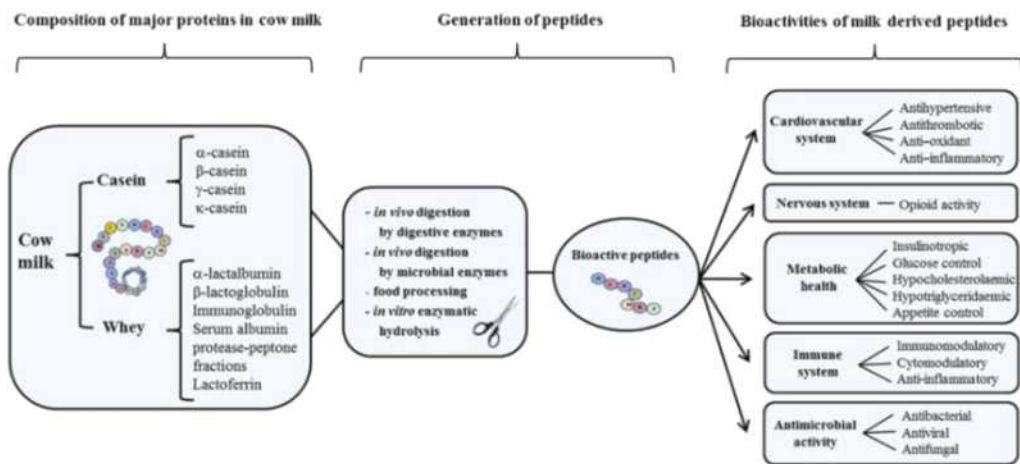


그림. 우유 유래 생리활성 펩타이드의 발생 과정과 이들의 다양한 생리적 기능 (Marcone. et al. 2017)

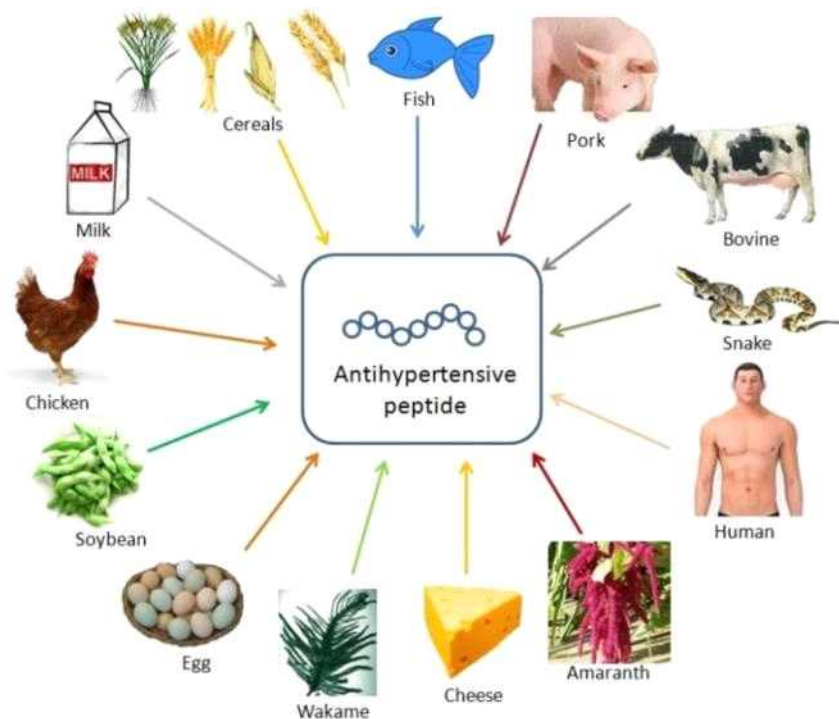


그림. 식품 단백질 유래 항고혈압 펩타이드들을 얻기 위한 천연 식품 재료들 (출처: AHTPDB, India: Kumar 등 2015)

- 항고혈압 펩타이드 데이터베이스(AHTPDB, Antihypertensive peptide database, CSIR - Institute of Microbial Technology, India) 자료에 의하면 현재 식품 유래 항고혈압 펩타이드들은 현재 약 1,700 종류가 보고되었으며, 이들 펩타이드들의 아미노산 길이는 2-5 아미노산기의 작은 펩타이드들이 대략 75%(4,445개), 6-16 잔기의 긴 펩타이드들이 약 25%(1,533개)으로 다양하였음. 이들 항고혈압 펩타이드들은 우유, 카제인, 소, 곡물, 어류, 돼지, 사람, 닭, 콩, 계란 등에서 유래하였음 (Kumar et al. 2015).
- 발효 우유가 세균성 발효에 의하여 단백질과 펩타이드를 증가시켜 혈압을 낮추는 효과를 가진다고 보고되었으며(Nakamura et al. 1995), 우유 단백질 casein에서 유래하는 lactopeptide 2 가지, Isoleucine-Proline-Proline (IPP) and Valine-Proline-Proline (VPP)가 자연적으로 효소적 분해에 의하여 존재하며, ACE 저해 활성이 있어 인체의 혈압 개선에 도움이 된다는 여러 보고가 있음(Boelsma & Kloek 2008).

- 쌀 및 곡류 단백질 그리고 곡류 단백질 유래의 항고혈압 펩타이드

- 쌀 단백질: 쌀은 단백질을 6~8% 함유, 상대적으로 낮으나, 주식으로써 가장 많은 양을 섭취하기 때문에 우리의 총단백질 섭취량의 약 24%를 차지할 만큼 영양적으로 매우 중요한 단백질 공급원임(출처: 최해춘 쌀을 알자, 1996, 신구문화사)
- 종자저장단백질을 그 용해성에 따라 물에 녹는 성질을 가진 알부민, 소금물에 녹는 글로불린, 산에 녹는 글루텔린, 알콜에 녹는 프롤라민 등으로 나눌 수 있음.
- 쌀의 저장 단백질은 글루텔린이 75~90%를 차지하고 프롤라민이 1~5% 정도이며, 소화 흡수성이 낮은 프롤라민을 주성분으로 함유하는 옥수수, 밀, 보리 등과 비교하여 그 질이 다른 양질의 고급 단백질임
- 쌀의 단백질은 주로 씨눈과 겨층이나 호분층등 바깥층에 많이 분포하고 있으며 쌀 전 분립의 주변을 둘러싸고 있음. 현미는 백미보다 단백질 함량을 1~2% 더 많이 가지며, 비타민B군을 비롯한 각종 미량원소가 많기 때문에 현미로 섭취하는 것이 영양학적으로 더욱 유리함.
- 벼 품종에 따라 쌀 단백질 함량이 차이가 있으며, 벼 품종에서 단순히 총단백질 함량만을 증가시켰다고 영양학적으로 개량되었다고 볼 수 없으며, 단백질의 질적 향상 및 필수아미노산 조성의 증대를 함께 이루어야 성공적인 성분 개량이 되었다고 할 수 있을 것임.
- 곡류단백질의 아미노산 조성에서 쌀은 밀이나 옥수수에 비해 라이신, 트립토판, 발린, 알기닌, 아스파라긴산 등이 많은 반면에 프롤린과 시스테인은 적은 경향으로 곡류 단백질 중에서 가장 아미노산 조성이 우수함.
- 쌀 미강 단백질은 현미에서 백미로 넘어가는 쌀 도정의 중간단계에서 생기는 부산물인 미강을 원료로 하는 단백질임. CJ제일제당이 2008년 저온탈지 기술과 미강 단백질 추출기술을 확보해 세계 최초로 미강단백질 대량 생산에 성공함(생산공장, 중국 하얼빈 베이다황CJ식품과기유한책임공사)
- 식품용 단백질은 과자, 케익, 아이스크림, 뉴트리션 바, 햄, 소시지 등에 다양하게 사용 되는 데, 대부분 콩을 원료로 하는 대두 단백질이 쓰이고 있음.

- 대두단백 (식약처 건강기능식품 기능성원료, 2011., 식품의약품안전처): 대두는 전통적으로 우리나라 국민이 가장 많이 섭취하는 두류로서 육류의 대체식품이나 영양공급원으로 다양하게 이용되고 있는 식품이다. 기능성분(또는 지표성분)의 함량 : 조단백질을 건고물 기준으로 600mg/g 이상 함유하고 있어야 하며, 다이드제인 및 제니스테인이 확인되어야 함.
  - 분리대두단백(isolated soy protein, soy protein isolate, SPI): 분리대두단백은 탈지대두(defatted soy protein)를 물 추출하면 약 90%의 단백질이 추출되고, 물 추출 단백질의 약 80%가 산침전하여 침전단백질은 초원심침강분석에 의하며 2, 7, 11, 15S(S는 침강계수)의 4성분으로 이루어진다. 이 중 7S(conglycinin), 11S(glycinin) 성분을 합쳐서 전체의 약 70%로 되고 대두단백질의 주성분. 식품가공상 기능적 특성이 우수하여 다양한 용도를 가지고 있지만, 주로 육제품, 두유제품, 전통적 대두식품과 유사한 식품에 사용되고 있다. 특수한 용도로서는 영양보급식품인 단백질분말제품, 소위 프로테인 다이어트에 사용되고 있음(영양학사전, 채범석, 김을상, 아카데미서적, 1998)
- 유산균 프로바이오틱스를 이용한 생물전환공정 개발 및 쌀 가공 음료의 개발
- 프로바이오틱스(probiotics)란 체내에 들어가서 건강에 좋은 효과를 주는 살아있는 균.
  - 러시아의 과학자 Elie Mechnikoff가 불가리아 사람들이 장수를 누리는 이유가 Lactobacillus로 발효된 발효유의 섭취 때문이라는 것을 밝혀내어 노벨상을 받은 이래로 유산균, 프로바이오틱스의 기능성은 오랫동안 연구되어 오고 있음(Mercenier et al. 2006).
  - 유산균을 비롯한 세균들이 프로바이오틱스로 인정받기 위해서는 위산과 담즙산에서 살아남아 소장까지 도달하여 장에서 증식하고 정착하여야 하며 장관 내에서 유용한 효과를 나타내어야 하고 독성이 없으며 비병원성이어야 함.
  - 전통적으로 프로바이오틱스 제품들은 Lactobacillus 등의 유산균을 이용하여 만들어진 발효유 제품으로 섭취되어 왔으나 최근에는 Lactobacillus 이외에 Bifidobacterium, Enterococcus 일부 균주 등을 포함한 발효유뿐 아니라 과립, 분말 등의 형태로 판매.
  - 국내 건강기능식품에 프로바이오틱스로 사용할 수 있는 균주는 Lactobacillus, Lactococcus, Enterococcus, Streptococcus, Bifidobacterium 속에 속하는 약 20여종이 있음(식약처 건강기능식품 기능성원료, 2011., 식품의약품안전처)
  - 결론: 쌀 및 곡류 특히 대두단백 유래의 생물전환(발효) 산물인 기능성 저분자 펩타이드 조성물을 첨가하여 영양성분 강화 및 항고혈압 효능을 가진 쌀 가공 음료를 제조하여 하려고 함

## 1-4. 선행연구 내용 및 결과

### ○ 생물전환 기술을 이용한 식물성 단백질의 기능성 펩타이드 제조

- 생물전환이란 미생물 발효 또는 효소 처리 등의 생물학적 방법을 통해 천연물 생리활성 물질의 구조적 변화를 유도하여 유효성분의 함량 증가, 흡수율 개선 및 새로운 기능성분의 생성을 유도하는 작업으로 본 과제에서도 Bioconversion product를 효과적으로 생성할 수 있는 Bioconversion 발효공정의 도입을 통해 곡물 단백질 등 식물자원 소재의 기능성을 강화하여 이를 활용한 건강음료 개발에 이용코자 함
- 본 연구진은 전통발효식품에서 유산균을 분리·동정하고, 선발된 우수한 유산균을 활용한 생물전환 공정으로 곡류 단백질로부터 기능성 펩타이드 성분을 제조하고 그 효능 평가를 실시한 바 있음

#### 1) 생물전환 공정을 위한 유산균 분리·동정 및 확보

- 전통발효식품 유래 유산균 확보 (1차 선별한 보유 유산균 34균주 목록): *Ped. pentosaceus* SDL1416, *Ped. acidilactici* SDL1405, *Ent. lactis* SCL1421, *L. planterum* JDFM44, *W. confusa* SCSB2320, *L. rhamnosus* JDFM6, *Ped. acidilactici* SDL1414, *Ent. faecalis* MAD13, *Strep. thermophilus* SCML300, *Ped. pentosaceus* SDL1415, *L. rhamnosus* JDFM33, *Strep. thermophilus* SCML337, *Ped. pentosaceus* SDL1409, *Ped. pentosaceus* SDL1401, *Ped. acidilactici* SDL1406, *Leu. mesenteroides* JBNU10, *Leu. citreum* SC53, *Ped. acidilactici* SKL1418, *L. pentosus* SC48, *Ent. faecium* CK5, *Ped. pentosaceus* MAC11, *Leu. paramesenteroides* SC46, *W. koreensis* JBNU2, *L. curvatus* JBNU38, *W. confusa* SCKB2318, *Ent. faecium* SC54, *L. brevis* SDL1411, *L. brevis* SDL1408, *Ped. acidilactici* SCL1420, *L. planterum* SDL1413, *W. cibaria* SCCB2306, *L. arizonensis* SC25, *Ped. acidilactici* DN9 and *Ped. acidilactici* SDL1402.
- 이들 유산균 균주는  $-80^{\circ}\text{C}$ 에서 20% Glycerol에서 보관하였으며, 균주의 배양은 MRS(de Man, Rogosa and Sharpe agar, Difco)에 도말하여  $37^{\circ}\text{C}$ 에서 24시간 배양하고, 단일 콜로니를 MRS broth에 접종하여  $37^{\circ}\text{C}$ 에서 지수기 배양하여 사용함.
- 생균수를 MRS agar에서 plate counting 법으로 측정함

#### 2) 생물전환 공정에 사용할 최적 유산균의 선정

- 단백질 시료를 보유 유산균 대상으로 반응시킨 후, 유청단백 발효조성물(WPFF)에 대하여 OPA 분석법으로 단백질 양을 정량하여 단백질 분해도를 측정하여 각 유산균의 단백질 분해 활성을 조사하였음.
- 대부분의 유산균(LAB, lactic acid bacteria)들은 50% 이상의 단백질 분해도를 보여 주었으며, 특히 LAB L11은 가장 높은 단백질 분해도를 나타냈음.

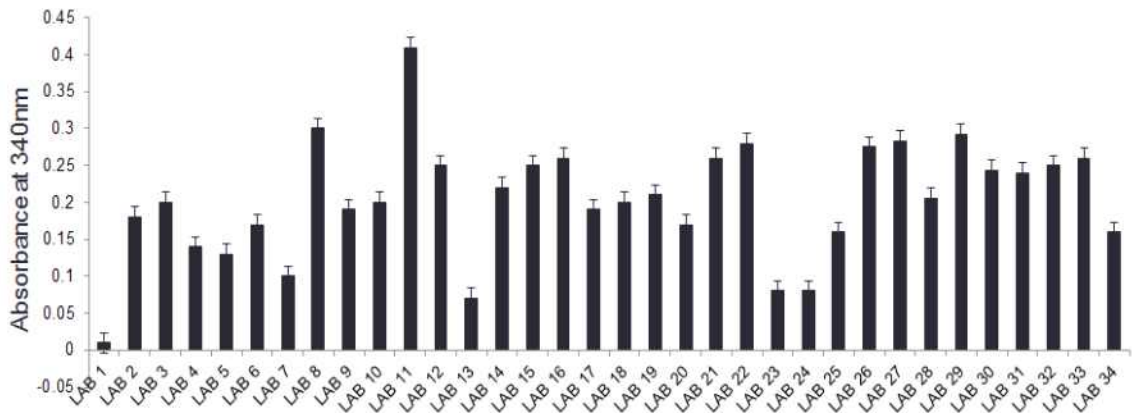


Fig. 전통발효식품에서 확보한 유산균들의 단백질 분해능. 유산균(lactic acid bacteria, LAB)는 모두 전통발효식품(된장 등)에서 분리 동정된 균주들로 본 연구팀의 보유균주들임. 대부분 유산균들은 높은 단백질 분해능을 보여주었음.

3) 생물전환 공정 후 얻은 펩타이드 조성물의 항고혈압 효능 분석 - ACE 저해 활성

- 생물전환 공정 후 얻은 저분자량 펩타이드 조성물에 대한 안지오텐신 전환효소 저해 활성(ACE inhibition activity, ACEI(%))를 측정한 결과 매우 높은 ACE 저해 활성을 나타냄
- 유산균 LAB 11 및 LAB 8은 항고혈압-ACE inhibitor인 captopril과 비교하여 거의 유사한 효능을 나타냄(84.0 &/5mg LAB 11, 84.7%/5mg LAB 8 SPFFs, 90.8%/captopril)
- WPF에 대한 ACE 저해활성 IC50를 측정한 결과를 표 4에 나타냄
- LAB 11, LAB 8, LAB 12, LAB 32, LAB 19, LAB26, LAB 1, LAB 5 및 LAB 34 균주들은 이들의 발효조성물에서 40% 이상의 ACE 저해활성을 보여 주었음
- LAB 11 및 LAB 8은 가장 높은 ACEI 활성을 나타냈음( 19.8 µg/ml LAB 11, 65.5 µg/ml LAB 8 SPFFs, 5.0 µg/ml captopril)

Table. ACE inhibitory assay of LAB fermented whey (WPF)

Bacteria	Peptide concentration (mg/ml)*	ACEI (%)
LAB 15	0.30±0.01	54.3±1.50
LAB 5	0.13±0.01	40.0±0.52
LAB 11	0.51±0.01	84.0±1.05
LAB 16	0.26±0.02	2.9±1.10
LAB 1	0.22±0.01	52.4±2.10
LAB 8	0.30±0.01	84.7±0.67
LAB 20	0.17±0.01	5.4±0.10
LAB 12	0.25±0.02	55.4±1.73
LAB 19	0.21±0.01	79.0±3.40
LAB 18	0.20±0.02	25.7±0.50
LAB 13	0.07±0.01	42.2±0.90
LAB 26	0.10±0.01	72.9±1.60
LAB 32	0.18±0.02	54.9±0.90
LAB 22	0.33±0.03	31.8±2.80
LAB 33	0.26±0.02	5.2±2.20
LAB 14	0.22±0.01	28.4±1.00
LAB 21	0.26±0.02	9.1±0.50
Captopril (control)	-	90.8±10.3

\* Peptide concentration of the permeates were determined by the OPA assay.

\*\*17 LAB fermentates showed ACE inhibitory activities after fermentation

Table. Inhibitory potency of the fermentates (WPFF) from table 2.

LAB used for fermentation	IC <sub>50</sub> of LMW peptides
LAB 11	19.8±1.73 µg/ml
LAB 8	65.5±7.99 µg/ml
LAB12	70.5±11.2 µg/ml
LAB 32	96.7±20.9 µg/ml
LAB19	1.28±0.30 mg/ml
LAB26	2.07±0.55 mg/ml
LAB1	2.13±0.70 mg/ml
LAB5	2.77±0.20 mg/ml
LAB34	2.84±0.40 mg/ml
Captopril	5.00±0.004 µg/ml

\*LMW= Low molecular weight

\*\* These peptides in table 2 which had lower ACE inhibition below 40% were not determined their IC<sub>50</sub>.

4) 생물전환 공정에서 도출된 ACE 저해 활성의 저분자량 펩타이드 프로파일 분석

- 선발된 유산균에 의한 단백 발효산물을 LC-ESI-TOF-MS/MS 분석을 통하여 표 5의 결과를 얻음
- 질량분석기 분석으로 동정된 올리고펩타이드들의 대부분 아미노산 서열은 ACE 저해 활성이 보고된 펩타이드 서열들을 공유하므로 이것은 유산균에 의한 유청단백 발효산물(WPFF)들이 높은 ACE 저해 활성을 나타냄을 보여준 본 연구의 결과들과 일치함.
- 결론: 선행 연구결과에서 생물전환 공정으로 얻은 펩타이드들은 항고혈압-ACE 저해-활성이 높으므로, 이들을 항고혈압 기능성 음료 등의 제품 개발에 적용할 수 있음.



Table. Antihypertensive peptides in LAB 11 fermented whey using LC-ESI-TOF-MS/MS

Name	Peptide sequence	Anti-ACE peptides already reported	References
β-CN	(f1-27) RELEELNVPGEIVESL	(f7-16) NVPGEIVESL (f6-14) LNVPGEIVE (f2-11) ELEELNVPGE ( f 1 9 1 - 2 0 9 ) LLYQEPVLGPVRGPFPIIV	Iwaniak & Dziuba, 2009 Hayes, et al., 2007 Hayes, et al., 2007 Yamamoto 1994
	(f1-25) RELEELNVPGEIVE		
	(f1-22) RELEELNVPGE		
	(f1-24) RELEELNVPGEIV		
	(f192-209) LYQEPVLGPVRGPFPIIV		
	(f193-209) YQEPVLGPVRGPFPIIV		
	(f193-208) YQEPVLGPVRGPFPII		
κ-CN	(f194-209) QEPVLGPVRGPFPIIV	(f64-69) VTSTAV	Weimann et al., 2009
	(f195-209) EPVLGPVRGPFPIIV		
	(f161-169) TVQVTSTAV		
	(f155-169) SPPEINTVQVTSTAV		
	(f149-169) SPEVIESPPEINTVQVTSTAV		
	(f151-169) EVIESPPEINTVQVTSTAV		
	(f159-169) INTVQVTSTAV		
	(f152-169) VIESPPEINTVQVTSTAV		
	(f150-169) PEVIESPPEINTVQVTSTAV		
	(f157-169) PEINTVQVTSTAV		
	(f151-169) EVIESPPEINTVQVTSTAV		
	(f151-165) EVIESPPEINTVQVT		
	(f151-163) EVIESPPEINTVQ		
	(f149-162) SPEVIESPPEIN		
(f151-162) EVIESPPEIN			
(f116-141) MAIPPKKNQDKTEIPTINTIASGEPT	(142-148) ALPMHIR	Nagpal et al. 2011; Mullally et al. 1997	
(f130-149) DEALEKFDKALKALPMHIRL			
(f130-146) DEALEKFDKALKALPMH			
(f130-145) DEALEKFDKALKALPM			
(f1-11) LIVTQTMKGLD			
(153-162) PTQLEEQCHI			
(147-156) IRLSFNPTQL			
(f1-11) LIVTQTMKGL	(f1-23) RPKHPIKHQGLPQEVLENLLRF (f14-23) EVLENLLRF	Moller et al. 2012	
(f10-23) GLPQEVLENLLRF			
(f10-22) GLPQEVLENLLR			
(f1-23) RPKHPIKHQGLPQEVLENLLRF			
(f14-23) EVLENLLRF			
(f10-21) GLPQEVLENLL			
(f24-34) FVAPFPEVFGK			
(f25-34) VAPFPEVFGK	(f19-36) ILNKPEDETHLEAQPTDA (f19-35) ILNKPEDETHLEAQPTD (f77-87) QPQSQNPKLPL		
(f24-38) FVAPFPEVFGKEKVNEL			
(f19-36) ILNKPEDETHLEAQPTDA			
PP3	(f19-35) ILNKPEDETHLEAQPTD		
PIGR	(f383-404) PGRPTGYSGSSKALVSTLVPLA		
UP (GP2)	(f455-473) SEGVAIDPARVLDLGPITR		

\*CN: casein, α<sub>S1</sub>-CN: Alpha-S1-casein, κ-CN: kappa-casein, β-CN: beta-casein, PP3: Proteose-peptone component 3, UP (GP2): Uncharacterized protein GP2; PIGR: Polymeric immunoglobulin receptor.

\*\* Sequences in RED are those identified in this study which are already reported in literature.

#### 5) 식물성 단백질 유래 생물전환 공정 산물의 ACE 억제 효능 분석

- 국내 유통되는 여러 대두단백 제품 중에서 품질이 가장 우수한 제품 “분리대두단백 (ISP)” 를 구입하여 유산균 발효에 적용하였음
- 본 연구에 사용한 “분리대두단백”의 기본 조성은 단백질 90% 이상, 수분 6.3%, 회분 8.0%, 지방 1%, 건조분말의 색깔(light-yellow) 등(제품 시험성적서)
- 전통발효식품들에서 분리한 유산균들은 높은 단백질 분해능을 가지며, 이들 유산균으로 발효시킨 대두단백 생물전환 산물들은 높은 항고혈압(ACE 저해) 활성을 나타냈음
- 식물성 대두단백질은 우유 등 동물성 단백질의 젖당불내성, 알레르기 유발, 채식주의 섭취불가 등의 단점을 극복하고 보다 친환경적이며 저렴하고 현대인들이 선호하는 식물성 단백질로서 두유의 주성분임. 또한, 쌀 단백질에 부족한 필수아미노산 라이신이 풍부함
- 선행 연구에서 선별된 유산균 균주를 사용하여 대두단백 발효 조성물을 수확하여 ACE 저해 활성을 분석하였으며, 그 결과 유산균 LAB 26과 LAB 11이 높은 활성을 보임

Table. ACE inhibitory activities of LMW peptides (SPFF) obtained from LAB fermented soybean proteins

Bacteria	ACE inhibition (%)	IC 50
LAB 11	45.9±1.3	1.705±0.29 mg/ml
LAB 8	0	-
LAB 12	0	-
LAB 32	0	-
LAB 19	0	-
LAB 26	65.1±0.78	123.3±15 µg/ml
LAB 1	0	-
LAB 5	28.3±0.57	n.d*
<i>Captopril</i>	90.82±10.3	5.00±0.917 µg/ml

\*n.d: Not determined

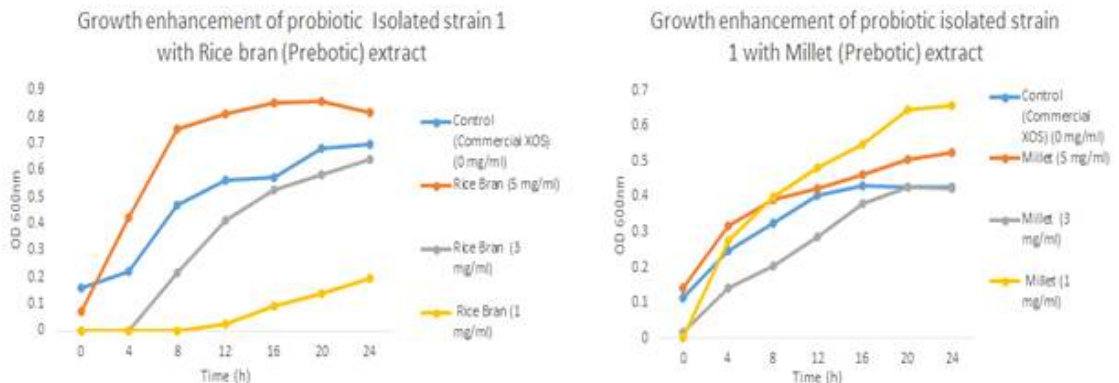
- 유산균 LAB 26 균주에 의한 대두단백 발효산물(SPFF)의 질량분석기 펩타이드 프로파일을 표에 나타냄

Table 7. Peptide profile of LAB 26 fermented SPI using LC-ESI-TOF-MS/MS

Sequence	Prec MW	Prec m/z	Theor MW	Theor m/z	Theor z
AVSGVEAVP	827.4189	414.7167	827.4389	414.7267	2
IAGILLNN	826.4307	414.2226	826.4913	414.2529	2
SADLANL	702.3453	352.1799	702.3548	352.1847	2
DNLNLENN	944.438	473.2263	944.4199	473.2173	2
EEEGLQICVE	1147.564	574.7892	1147.507	574.7606	2
DDASQHPGAGG	1010.451	506.233	1010.405	506.21	2
LAGTQQLP	826.4307	414.2226	826.4549	414.2347	2
VIEPNKITIN	1139.601	570.8078	1139.655	570.8348	2
<b>IEPPVEEP</b>	908.4294	455.222	908.4491	455.2318	2
DLDAASL	703.3797	352.6971	703.3388	352.6767	2
GAVGAADAAQLQ	1070.569	536.292	1070.536	536.2751	2
LSVPGVK	698.4011	350.2078	698.4327	350.2236	2
AGGTAPLQ	713.3735	357.694	713.3708	357.6927	2
NVLSGQNP	827.4178	414.7162	827.4138	414.7141	2
GAASITAAAP	828.4019	415.2082	828.4341	415.2243	2
NENGOAVP	827.4189	414.7167	827.3773	414.696	2
ITAEGLKP	827.4189	414.7167	827.4753	414.7449	2
CVKYLVVTVADNLLS	1635.858	546.2933	1635.891	546.3041	3

\*Conserved or peptides with similar sequences have been red-colour **boldened**.

○ 곡류(미강 및 수수) 유래 프리바이오틱스의 프로바이오틱스 생육 촉진 효능



- 효소적 소화 처리법(Enzymatic digestion method)을 이용하여 추출된 미강 샘플(3 mg/mL) 및 수수 샘플(1mg/mL)은 상업용 프리바이오틱스(XOS)와 비교하여 프로바이오틱스 strain 1에 대해 생육 촉진 효능이 높았음.
- 600nm에서 측정한 Spectrophotometer 분석에 근거하여 위의 결과는 미강과 수수의 효소적 소화 처리 추출물이 프리바이오틱스로서 기능을 나타내는 물질을 함유하고 있다는 것을 나타냄.

- 본 결과를 바탕으로 미강과 수수 추출물이 프로바이오틱스 균주의 생육을 촉진시키는 프리바이오틱스 소재로 활용될 수 있을 것으로 기대됨.

(d) Antimicrobial activity of Lactic Acid Bacteria (LAB) against cell free supernatant and < 10Kda peptide purified

S.No	List of Lactic Acid Bacteria	LAB cell free supernatant against <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (PA14)	< 10Kda peptide purified from LAB against <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (PA14)
		Zone of inhibition (mm)	Zone of inhibition (mm) (1mg/mL)
L03	<i>Enterococcus faecium</i> CK-5	15 <sup>d</sup>	16 <sup>d</sup>
<b>L05</b>	<b><i>Lactobacillus brevis</i> SDL1411</b>	25 <sup>g</sup>	28 <sup>h</sup>
L09	<i>Lactobacillus plantarum</i> JDFM44	11 <sup>a</sup>	12 <sup>b</sup>
L12	<i>Leuconostoc citreum</i> SC53	12 <sup>b</sup>	14 <sup>c</sup>
L17	<i>Pediococcus acidilatic</i> SDL1414	13 <sup>c</sup>	10 <sup>a</sup>
<b>L21</b>	<b><i>Pediococcus acidilatic</i> DM9</b>	19 <sup>e</sup>	26 <sup>g</sup>
L22	<i>Pediococcus pentosaceus</i> MAC11	15 <sup>d</sup>	14 <sup>c</sup>
L31	<i>Weissella koreensis</i> JBNU2	12 <sup>b</sup>	13 <sup>c</sup>
<b>L33</b>	<b><i>Pediococcus pentosaceus</i> SDL1409</b>	23 <sup>f</sup>	28 <sup>h</sup>

Antimicrobial activity of Lactic Acid Bacteria (LAB) against cell free supernatant and < 10Kda peptide purified from LAB against *Pseudomonas aeruginosa* (PA14) Values are expressed as the mean  $\pm$  standard deviation (n = 3). Different superscripts (a, b, c, d, e, f, g) represent significantly different values (P < 0.05)

1) LAB 균주의 항균 효능 (In vitro 분석)

- 9종의 분리 균주의 CFS와 < 10 Kda 펩타이드가 *P. aeruginosa* 다양한 수준의 항균작용을 보였음(Table 3). 3가지 유산균 균주[*L. brevis* SDL1411 (L05), *P. acidilatici* DM9 (L21) and *P. pentosaceus* SDL1409 (L33)]는 clear zone이 19 ~ 25 mm로 강력한 항균 활성을 보였음. *Enterococcus faecium* CK-5 (L03), *Lactobacillus plantarum* JDFM44 (L09), *Leuconostoc citreum* SC53 (L12), *Pediococcus acidilatic* SDL1414 (L17), *Pediococcus pentosaceus* MAC11 (L22), *Weissella koreensis* JBNU2 (L31)은 각각 최소한의 생존능력을 보였음(< 15 mm). 저분자 중량(< 10 Kda) 펩타이드는 각각 저분자 중량 펩타이드가 높아지면서 항균 활성이 강화됨.

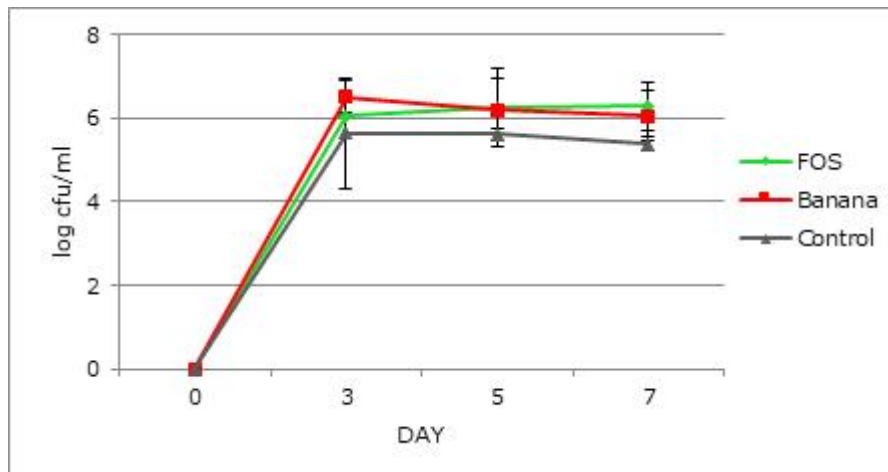


Fig. *C. elegans*를 모델로 이용하여 바나나 껍질 추출물과 FOS(프락토올리고당)의 프리바이오틱스 효능 탐색 *Lactobacillus rhamnosus* 에 대한 장내 콜로니 형성능 측정

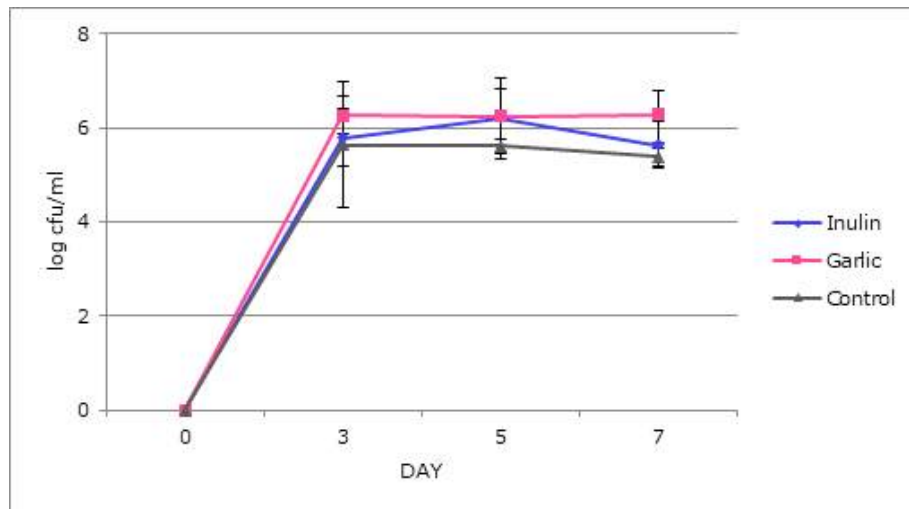


Fig. *C. elegans*를 모델로 이용하여 마늘 껍질 추출물과 Inulin(이눌린)의 프리바이오틱스 효능 탐색 *Lactobacillus rhamnosus* 에 대한 장내 콜로니 형성능 측정

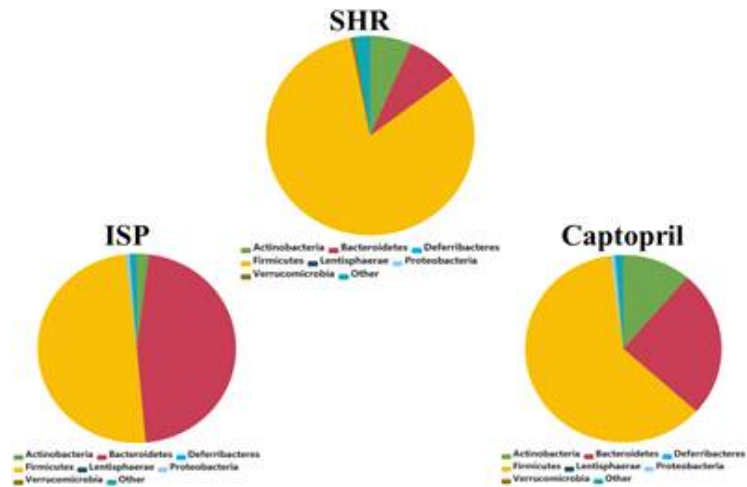
## 2) 바나나 껍질 추출물 및 FOS(프락토올리고당)의 효능 (*In vivo* 분석)

- *C. elegans*를 모델로 이용하여 장내 콜로니 형성능을 측정함. *C. elegans* 대조군은 프리바이오틱스를 섭취하지 않음. 다음 결과는 프리바이오틱스를 섭취한 *C. elegans*(처리군)는 대조군에 비해 장내 콜로니 형성능이 높은 것을 나타냄. 대조군은 3일차에 가장 높은 콜로니 수가 측정되었으며, 콜로니 수는 점차적으로 감소되었는데 비해, 처리군은 유사한 수준을 유지하였음.

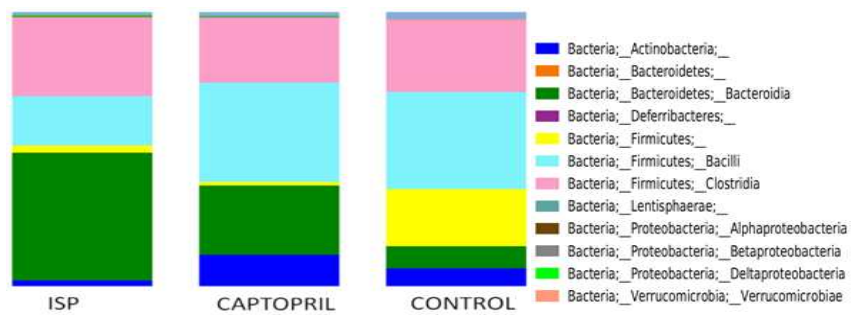
## 3) 결론 및 고찰

- 본 연구에서는 프리바이오틱스 소재 추출을 위한 식품부산물로 마늘껍질을 사용하였으며, 추출물의 프로바이오틱스 생육 증진효능과 기기분석을 통한 구조 동정 및 *C. elegans* 모델을 이용한 집락 형성능을 평가하였음. 마늘껍질 추출 소재는 표준 이눌린과 동일한 프리바이오틱스 효능을 보였으며, *C. elegans* 장내 젖산균의 군체 형성을 증대시키는 것으로 확인하였음. 본 실험은 식품부산물의 프리바이오틱스 소재로서의 활용 가능성을 입증하였고, 또한 프로바이오틱스 개발 산업에서 긍정적인 영향을 미칠 수 있을 것으로 사료됨. 식품 부산물로부터 프리바이오틱스 소재를 추출하여 활용하는 기술이 개발되면 부산물 폐기 및 설비 비용이 절감되는 등 다양한 경제적 이점을 발생시킬 것으로 사료됨. 프리바이오틱스의 섭취의 요점은 면역체계를 강화시킴으로써 급성 감염을 예방하는 것으로, 본 연구에서 개발된 프리바이오틱스 소재와 식품을 결합시켜 새로운 형태의 건강기능식품을 개발할 수 있을 것으로 판단됨.

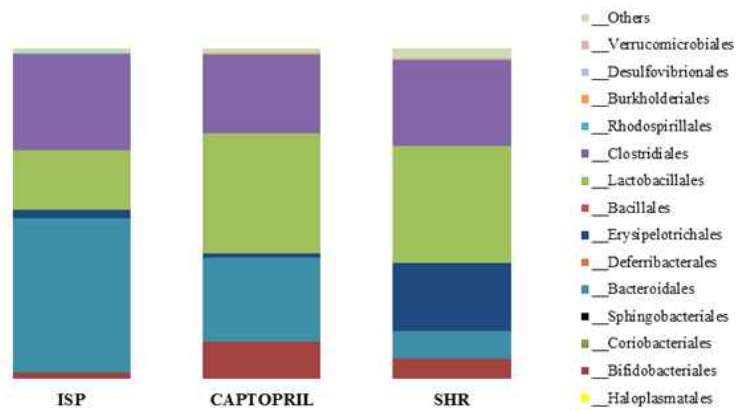
○ 생물전환 peptide의 장내 미생물군총 개선 효과 (metagenomics)



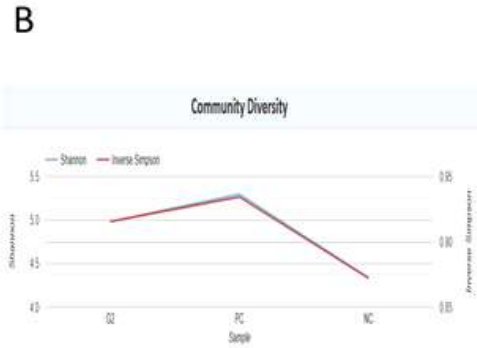
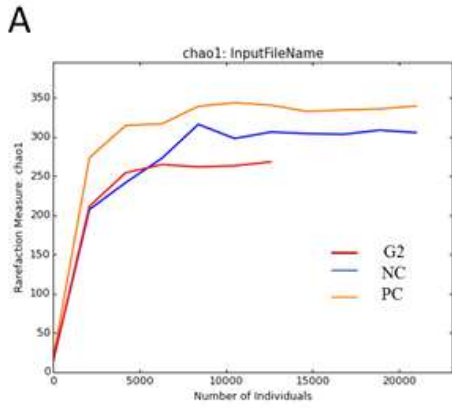
- 고혈압 쥐에게 콩 단백질을 섭취시키면, 장내 미생물군총이 변함. 콩 단백질을 섭취한 쥐(처리군)는 섭취하지 않은 쥐(대조군)에 비해 *Bacteroidetes/Firmicutes* 비율이 상당히 감소되었음.



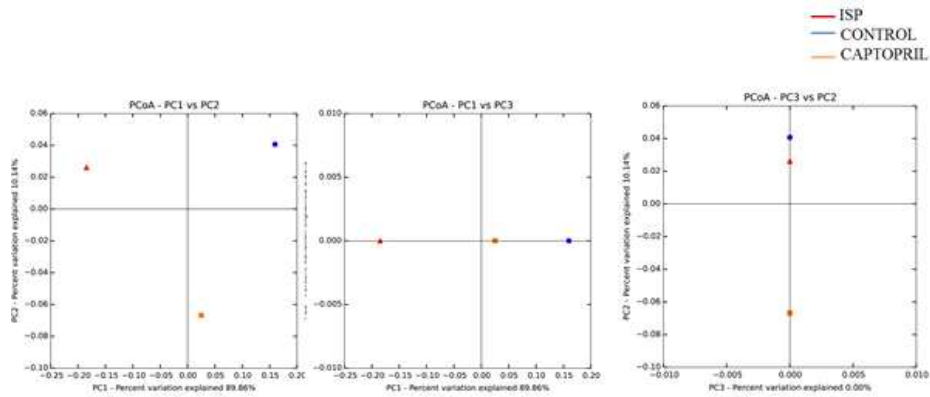
- 고혈압 쥐에게 콩 단백질을 섭취시켰을 때, 장내 미생물군총이 변함. 콩 단백질 공급량은 대조군에 비해 처리군에서 크게 증가했음.



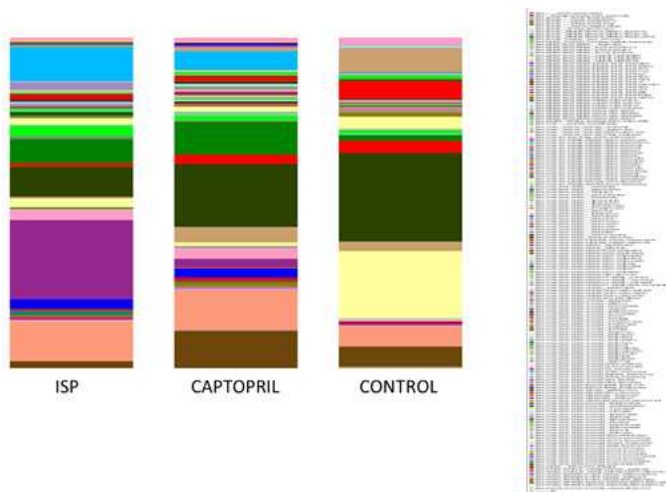
- 콩 단백질 섭취는 콜레스테롤 용해 능력을 가진 N-acylated 파생물을 생성하는 *Bacteroidales*의 수치를 증가시켰으며, 이는 *Lactobacillales*의 감소를 유발함.



- 알파 다양성. X-coordinate는 유효 sequence의 개수로, 세로좌표는 OTU의 개수로 함. 그래프의 각 곡선은 다른 색상 마크를 가진 샘플을 나타냄. Sequence depth는 OTU의 수를 증가시킴. 곡선이 평평해지면, 도출된 데이터의 양이 증가함에 따라 감지된 OTU의 수가 더 이상 증가하지 않고, sequencing 데이터를 신뢰할 수 있음.



- 베타 다양성. 2D 주성분 분석(PCoA) 그래프. 이 결과는 세 그룹의 장내 미생물균총은 3개의 그룹으로 구분됨을 보여줌.



- 다음 누적 막대 차트는 콩 단백질 섭취 그룹, captopril 그룹 및 일반 고혈압 쥐 그룹의 배설물 표본을 배열하여 얻은 박테리아 종이 상대적 풍부함을 보여줌.

## 2. 연구개발과제의 수행 과정 및 수행 내용

### 2. 연구개발의 목표 및 내용

#### 2-1. 연구개발의 목표 및 내용

##### 가. 최종목표

- 국내산 곡물 자원을 이용한 고부가가치 미래 식품소재 개발 및 곡물 가공 음료 개발 및 상품화

##### 나. 세부목표

- 국내산 곡물 자원의 생물전환 공정을 이용한 고부가가치 식품소재 개발
  - 국내산 쌀, 콩 등 곡물 자원 및 곡물 유래 단백질 원료의 생물전환 가공 적합성 평가 및 적합원료 선별
  - 국내산 곡물 자원의 생물전환 식품소재 생산조건 확립
  - 곡물 자원을 이용한 생물전환 식품소재의 대량생산 표준화
  - 곡물 자원을 이용한 생물전환 식품소재의 품목규격 확립
- 국내산 곡물 자원을 이용한 생물전환 식품소재의 유효성 및 작용기전 규명
  - 국내산 곡물 자원을 이용한 생물전환 식품소재의 in vitro/in vivo 항고혈압(ACEI activity) 활성 규명
  - 국내산 곡물 자원을 이용한 생물전환 식품소재의 in vitro/in vivo 프리바이오틱스 기능 및 장내균총 개선 효능 평가
  - 국내산 곡물 자원을 이용한 생물전환 식품소재의 지표/기능성분 규명
  - 국내산 곡물 자원을 이용한 생물전환 식품소재의 작용기전 규명
- 생물전환 식품소재를 적용한 두유 및 쌀음료 등 곡물 베이스의 가공 음료 개발 및 상품화
  - 국내산 쌀, 콩 등 곡물 원료에 대한 음료제형 가공 적합성 확립 및 제조공정 표준화
  - 쌀, 콩 등 곡물 베이스의 기호도 및 관능개선 음료제품 레시피 개발
  - 생물전환 식품소재를 곡물 베이스 음료 제품에 적용하여 기능이 강화된 고부가가치 곡물 베이스 가공 음료 개발
  - 생물전환 식품소재 적용 곡물 가공 음료제품의 영양성분 및 기능성분 평가 및 품목규격 확립
  - 생물전환 식품소재 적용 곡물 가공 음료제품의 브랜드 개발, 상품화 및 마케팅 추진



다. 연차별 개발목표 및 내용

<1차년도>

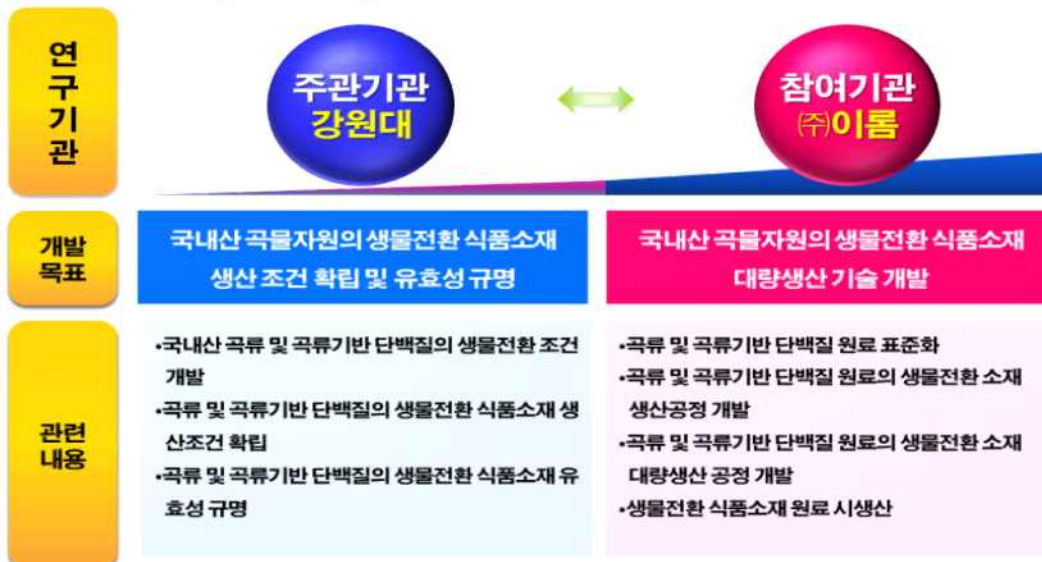
○ 연구개발 목표

- 주관연구기관(강원대학교 산학협력단) : 국내산 곡물 자원을 이용한 생물전환 식품소재 생산조건 확립 및 유효성 규명
- 협동연구기관(주식회사 이룸) : 국내산 곡물 자원을 이용한 생물전환 식품소재 대량생산 기술 개발

○ 개발 내용 및 범위 (시스템 구성도, 구조 등을 그림으로 구체적 표현)

- 주관연구기관(강원대학교 산학협력단) :
  - 국내산 쌀, 콩 등 곡류 및 곡류기반 단백질을 이용한 생물전환 식품소재 생산조건 개발
  - 쌀, 콩 등 곡류 및 곡류기반 단백질을 이용한 생물전환 식품소재 생산조건 확립
  - 쌀, 콩 등 곡류 및 곡류 기반 단백질을 이용한 생물전환 식품소재의 유효성 규명 : 생물전환 식품소재의 in vitro 향고혈압활성 평가
- 협동연구기관(주식회사 이룸) :
  - 쌀, 콩 등 곡류 및 곡류기반 단백질 원료 표준화
  - 쌀, 콩 등 곡류 및 곡류기반 단백질을 이용한 생물전환 소재 생산공정 개발
  - 쌀, 콩 등 곡류 및 곡류기반 단백질을 이용한 생물전환 소재 대량생산 공정 기술개발
  - 곡물 자원 생물전환 식품소재 원료의 pilot 시생산
  - 곡물 자원 생물전환 식품소재의 영양성분 등 품질규격 평가

● 1차년도 [2019년]





<2차년도>

○ 연구개발 목표

- 주관연구기관(강원대학교 산학협력단) : 국내산 곡물 자원을 이용한 생물전환 식품소재의 지표성분 규명 및 작용기전 규명
- 협동연구기관(주식회사 이룸) : 국내산 곡물자원을 이용한 생물전환 식품소재 대량생산 공정 확립 및 곡물 가공음료 기술 개발

○ 개발 내용 및 범위 (시스템 구성도, 구조 등을 그림으로 구체적 표현)

- 주관연구기관(강원대학교 산학협력단) :
  - 곡물 자원 생물전환 식품소재의 지표성분 규명
  - 곡물 자원 생물전환 식품소재의 지표성분 분석
  - 곡물 자원 생물전환 식품소재의 영양성분 등 식품학적 분석
  - 곡물자원 식품소재의 기능 및 작용기전 규명
    - : 생물전환 식품소재의 in vivo 항고혈압활성 평가
    - : 생물전환 식품소재의 in vivo 장내 균총변화 평가(microbiome)
    - : 생물전환 식품소재의 in vitro/in vivo 프리바이오틱스 기능 평가
- 협동연구기관(주식회사 이룸) :
  - 곡물 자원 생물전환 식품소재의 대량생산 공정 개발
  - 곡물 자원 생물전환 식품소재의 대량생산 공정 확립 및 표준화
  - 곡물 자원 생물전환 식품소재의 대량생산 시생산
  - 곡물 자원 생물전환 식품소재 원료 표준화 및 품목규격 확립
  - 국내산 쌀 및 콩 등 곡물 자원을 이용한 음료 가공 기술 개발

● 2차년도 [2020년]



### <3차년도>

#### ○ 연구개발 목표

- 주관연구기관(강원대학교 산학협력단) : 생물전환 식품소재 및 소재를 적용한 곡물 가공음료의 식품학적 분석 및 효능 규명
- 협동연구기관(주식회사 이룸) : 국내산 곡물 자원을 이용한 생물전환 식품소재 적용 곡물 가공음료 제품 개발 및 상품화

#### ○ 개발 내용 및 범위 (시스템 구성도, 구조 등을 그림으로 구체적 표현)

- 주관연구기관(강원대학교 산학협력단) :
  - 생물전환 식품소재 적용 곡물 가공음료의 지표성분 분석
  - 생물전환 식품소재 적용 곡물 가공음료의 영양성분 등 식품학적 분석
  - 생물전환 식품소재 적용 곡물 가공음료의 기능 및 작용기전 규명
    - : 생물전환 식품소재의 in vivo 항고혈압활성 평가
    - : 생물전환 식품소재의 in vivo 장내 균총변화 평가(microbiome)
    - : 생물전환 식품소재의 in vitro/in vivo 프리바이오틱스 기능 평가
- 협동연구기관(주식회사 이룸) :
  - 생물전환 식품소재 적용 곡물 가공음료 제품 레시피 개발
  - 생물전환 식품소재 적용 곡물 가공음료 대량생산 시생산 및 표준화
  - 곡물 가공음료 제품의 영양성분 등 품목규격 확립
  - 생물전환 식품소재 적용 곡물 가공음료의 브랜드 개발, 상품화 및 마케팅

### ● 3차년도 [2021년]



## <세부 연구 방법 기술>

### ○ 곡물 원재료 및 곡물 가공 음료 제품의 일반성분 및 영양성분 분석

- 곡물 원재료 및 가공 음료의 일반성분 분석을 A.O.A.C 방법(AOAC 1990)에 준하여 수분함량은 105°C 상압 가열건조법, 조단백질은 Kjeldahl 질소 정량법, 조지방은 Soxhlet's 추출법, 조회분은 550°C 직접회화법을 이용하여 분석하였다. 이때 염도는 염분농도계 (Model NS-3P, Merbabu Trading Co., Ltd., Japan)를 사용하여 측정한다.

### ○ 곡물 원재료 및 생물전환 식품소재 조성물의 아미노산 조성 분석

- 본 과제외 곡물 생물전환 식품소재의 아미노산 조성은 AccQ-Tag 법(Waters)을 이용하여 분석한다. 구체적으로, 생물전환 조성물 0.5g에 증류수를 가하여 초음파 처리한 용액을 50  $\mu$ L 취하여 붕산염 완충액 350  $\mu$ L와 AccQ-Tag 유도체 시약 100  $\mu$ L을 넣어 잘 혼합한 후 55°C 에서 10분간 유도체화한다. 유도체화된 시료를 각각 10  $\mu$ L씩 취한 후 HPLC의 자동시료주입기에 안치하여 아래와 같은 조건으로 분석한다.
- 표준물질은 40  $\mu$ L, 시료용액은 10  $\mu$ L을 HPLC에 주입하여 아미노산을 분석하였으며, 컬럼 (column)은 AccQ-Tag C18 (Millipore Co. Milford, MA, USA) 아미노산 분석 컬럼(amino acid analysis column)을 사용하였으며 이동상은 0.14 M 아세트산 나트륨 (sodium acetate) 과 10% 트리에틸아민 (triethylamine)을 1% 인산 (phosphoric acid) 으로 pH 5.02를 맞춘 용액 (eluent A)과 물과 아세토니트릴 (acetonitrile)을 4:6으로 혼합한 용액 (eluent B)을 선형 구배 (linear gradient) 시켜 용출한다.
- 곡물 생물전환 식품소재의 아미노산 성분 분석을 위한 HPLC의 조건: 장비 (Instrument) Waters 1525 Binary Pump, Waters 717 plus Autosampler, Waters474 Fluorescence detector, 컬럼 (Column) AccQ-Tag column C18, 컬럼크기 (Column size) 3.9  $\times$  150 mm, 용출용매 A (Eluent A) 0.14 M Sodium acetate, 10% triethylamine in water, pH 5.02, 용출용매 B (Eluent B) Acetonitrile : water = 6:4, 구배 (Gradient) AccQ-Tag method, 유속 (Flow rate) 1.0 mL/min, 가동시간 (Run time) 45 min, 파장(Wavelength) ex. = 250 nm, em. = 395 nm
- 그 결과를 식품성분표 (Food Composition 표, 2001)의 아미노산 조성 및 타 연구 결과들에 서의 아미노산 조성과 비교 분석한다.

### ○ 생물전환 공정을 위한 최적 조건 선정

최종 선별된 우수한 유산균 균주 및 효소의 단백질 가수분해능 분석

생육증진 : *Pediococcus acidilactici* SDL1405, *Pediococcus acidilactici* SDL1406, *Pediococcus acidilactici* SDL1402, *Streptococcus thermophilus* SCML300, *Streptococcus thermophilus* SCML337, *Weissella acibaria* SCCB2306, *Enterococcus faecium* SC54, *Lactobacillus rhamnosus* JDFM6에 대한 추출물의 생육증진 효능을 평가함. 12-well plate에 균주를 배양시키면서 12시간동안 분광 광도계를 사용하여 600nm에서 흡광도를 측정함. 미강 추출물과 일반 영양강화배지(대조구)를 배양액의 10<sup>-1</sup> 농도로 혼합하여 사용함.

단백질 가수분해도 분석 (degree of protein hydrolysis): 단백질 가수분해도는 Church 등의 방법에 따라 *O*-phthaldialdehyde(OPA)를 사용한다(Church et al. 1983). 간단히 기술하면, OPA 용액은 100 mM sodium tetraborate 25 mL, 20% (w/w) sodium dodecyl sulfate 2.5 mL, OPA 40 mg/1 mL methanol with 100 mL of mercaptoethanol을 혼합하여 증류수로 최종부피 50 mL을 만든다. 시료인 단백질발효산물-저분자량 펩타이드(5 mg/ml)를 OPA 용액(1.0 mL)에서 실온에서 2분 동안 반응시킨 후, 흡광도(파장 340 nm)를 측정한다. 시료단백질에서 수분해되어 유리된 펩타이드의 양은 디펩타이드 Phe-Gly 의 표준곡선으로부터 결정한다.

## ○ 생물전환 공정 최적 조건 확립

### 1) 효소 공정

- 곡물 추출물에 함유된 SPI(대두단백질)를 증류수에 20% (w/v)농도로 첨가하고 pH 7.0으로 조정함. 3% prozyme을 이용하여 SPI를 55℃에서 1시간 동안 가수분해 한 후, prozyme을 비활성화 시키기 위해 오토클레이브를 이용하여 121℃에서 멸균함.

### 2) 발효 공정

- 스타터 균종

- *Lactobacillus species*, *Lactobacillus acidophilus* (MTCC 447) 및 *Lactobacillus fermentum* (MTCC 903) 을 이용한 정상발효 및 이상발효 균종은 KTCC 및 ATCC(Korean and American Type Culture Collection)에서 얻음.

- 스타터 균종을 이용한 발효 공정

- 밀가루를 121℃에서 15분 동안 오토클레이브를 이용하여 멸균한 후, 슬러리를 준비하기 위해 식힘. 슬러리에 미생물 스타터 배양액(각각 1% 접종, *Lactobacillus acidophilus* MTCC 447; 6.48 log CFU mL<sup>-1</sup>, *Lactobacillus permentum* MTCC 903; 6.30 log CFU mL<sup>-1</sup>)의 혼합물을 첨가하여 37℃에서 0, 6, 12, 18, 24, 36, 48시간 동안 각각 배양함.

- 샘플 분석

- 발효 0, 6, 12, 18, 24, 36, 48시간 샘플들을 각각 60℃에서 hot-air oven을 이용하여 건조시킴. 이후 모든 샘플은 폴리에틸렌 백에 밀봉하여 추가 분석될 때까지 4℃에서 보관함. 추가 분석으로는 pH, 적정산도, 미생물 수 및 항균활성을 측정함.

### 3) 복합 공정 : 효소 및 발효 공정

- 단백질 가수분해효소 준비 및 발효

- 위에 기술한 바와 같이 효소공정을 통해 SPI를 가수분해 함. 가수분해된 SPI에 스타터 균종을 접종하여 37℃, 150rpm의 조건으로 발효시킴. 정해진 시간에 따라 발효된 샘플을 동결건조기를 이용하여 건조하여 -20℃에서 보관한 후 추가 분석함. 추가 분석으로는 pH, 적정산도, 미생물 수 및 항균활성을 측정함.

○ 생물전환 공정에 의한 기능성 펩타이드 산물의 분리 및 정제

- 생물전환 산물의 한외여과액 및 동결건조 조건 최적화: 곡류 단백 생물전환 공정 후 원심분리하여 세포와 찌꺼기 침전물을 제거하고 상등액을 한외여과(<7,000Da cut-off)하여 얻은 여과액을 동결건조하여 최종 생물전환 산물인 펩타이드 조성물을 얻는다.
- 곡물 생물전환 식품소재 조성물은 동결건조하여 -80℃에 보관한다.

○ 생물전환 식품소재 조성물의 펩타이드 프로파일링 (Mass spectrometry)

- 펩타이드 프로파일을 위한 질량분석기 분석은 LC-ESI-TOF-MS/MS를 이용하여 수행한다(예, 서울대 농생명과학공동기기원(NISEM) 질량분석실 소재).
- 액체 상태의 물질을 이온화(Electron Ionization spray, Nano Electron Ionization spray)하여, 검출기인 Mass Analyzer (Quadrupole/ FT Orbitrap)에서 질량/하전량과의 비(m/z)에 따라 분리 검출하여 얻어진 질량스펙트럼을 해석하여 분석 물질의 질량 및 그 구조를 확인 할 수 있으며, 또한 Metabolite ID software program을 이용하여 물질의 반응 경로를 추적할 수 있다.
- 저분자량 펩타이드들의 종류, 아미노산 서열과 정성 및 정량 분석이 가능하며, 축적된 곡류 단백질의 데이터베이스를 통한 생물공정 조성물의 펩타이드 프로파일을 얻을 수 있다.

○ 생물전환 식품소재 조성물의 ACE inhibitor activity 측정 (in vitro assay)

- 항고혈압 활성을 위하여 ACE 저해 활성은 Cushman & Cheung(1971) 방법에 따라 측정한다(Cushman & Cheung 1971). 구체적으로, 시료 20 μL에 0.3 M NaCl이 함유된 0.1 M 나트륨 붕산염 완충액(sodium borate buffer(pH 8.3))에 녹인 5 mM HHL (hippuryl-L-histidyl-L-leucine) 용액 50 μL를 가한 후 37℃에서 5분간 전배양한다. 여기에 안지오텐신-1 전환 효소 용액 (ACE 0.1 Unit/mL) 10 μL 를 첨가하고, 혼합액을 37℃에서 30분간 반응시킨다. 반응종결 용액으로 위 반응액에 1 N HCl 100 μL 를 가하여 반응을 멈추고, 에틸 아세테이트 1 mL를 가하여 60초간 교반한 후 원심분리(2,000×g, 5 min)하고 ethyl acetate 층 상층액 0.8 mL를 새 튜브에 옮긴다. 이 상층액은 드라이 오븐 100℃에서 40분 동안 완전히 건조시킨 다음 증류수 0.8 mL를 가하여 튜브 속의 hippuric acid(HA)를 용해시킨 후 228 nm에서 흡광도를 측정한다. 대조군은 저해제 없이 같은 반응 조건에서 Hip-His-Leu (HHL)로부터 유리된 HA의 양으로 한다. 아래 계산식에 따라 안지오텐신-1 전환 효소(ACE) 저해율(%)을 나타내었다.

$$\text{안지오텐신-1 전환 효소(ACE) 저해율(\%)} = \frac{(E_c - E_s)(E_b - E_s)}{E_b - E_s} \times 100$$

- 여기서,  $E_s$ 는 반응액에 첨가한 시료의 흡광도,  $E_c$ 는 반응액에 시료 대신 버퍼를 첨가한 흡광도,  $E_b$ 는 반응 개시 전에 반응종결용액(1 N HCl)을 첨가한 튜브의 흡광도
- 각 시료들에 대하여 5000, 500, 50, 5, 0.5, 및 0.05 μg/ml 희석을 준비한다. 시료들의  $IC_{50}$  값은 위 반응조건에서 ACE 저해 활성을 50% 저해하는데 필요한 저해제(시료)의 양으로 정의하며, 각 시료의 regression curve로부터 계산한다.

## ○ 프리바이오틱스 특성 규명

- 고성능 액체 크로마토그래피-증발 광산란 검출기(HPLC-ELSD): 당 함량은 Agilent 1260 액체 크로마토그래피 시스템(1260 RID, Agilent, USA)을 사용하여 분석하였으며 80% acetonitrile 을 이동상으로하여 1 mL min<sup>-1</sup>의 유속에서 분석함. 농도는 100g FW 당 mg 으로 표시함. XOS에 존재하는 당의 동정과 정량은 Isocratic solvent acetonitrile : 물 (75:25)을 이동체로 사용함. 30°C에서 Ashahipak NH2P-504E(250 mm x 5.0 mm, Shodex, Japan) 컬럼을 이용해 HPLC(SPD 20A, Shimadzu, Japan)로 분석하였으며 1 mL min<sup>-1</sup>의 유속으로 상을 분리함. 분석전 샘플에 존재하는 XOS 이외의 기타성분을 제거하기 위해 polytetrafluorethylene(PTFE) membrane(0.45 μm)을 사용하여 여과시킴. XOS 20 μl를 주입하여 증발 광산란 검출기(ELSD, Varian, UK) (nebulizer = 50°C 유지, 증발기 온도 = 90°C, 질소 가스 = 1.6 bar)를 사용하여 분석함. 표준 XOS와 미강 추출물, 상업용 XOS도 동일한 방법으로 분석하였으며, 농도는 mg/g으로 표시함.
- 핵 자기 공명(<sup>1</sup>H NMR & <sup>13</sup>C NMR) : HPLC를 이용하여 분리한 화합물을 0.1 M CDCl<sub>3</sub>에 용해시켜 NMR 분석을 실시함. NMR 스펙트럼은 Bruker DPX-400 FT-NMR을 이용하여, 600 MHz의 <sup>1</sup>H-NMR 및 100 MHz의 <sup>13</sup>C-NMR을 조건으로 함. 각각의 용액은 1% TMS가 포함된 1mL 원통형 메스 플라스크에 준비함. 용액의 일부(0.6mL)를 5mm NMR 튜브로 옮겨 20°C에서 스펙트럼을 측정함.
- 푸리에 변환 적외선 분광법(FTIR) : 탄수화물에 대한 FT-IR 스펙트럼은 Perkin-Elmer Frontier FT-IR spectrometer 장치에 기록함. 모든 분석 시료는 KBr pellet으로 제조하고 4000-400cm<sup>-1</sup> 범위에서 4.0cm<sup>-1</sup> 해상도로 스캔함.
- 입자 크기 및 제타 전위 : 샘플 입자의 크기 및 표면 제타 번위는 입자 분석기 SZ 100(Horiba, Japan)로 분석하였으며 입자의 희석된 수성 분산액을 측정함. 입자 크기는 Z-평균 직경으로, 입자 전하는 Z 전위로 기록함.
- X-ray 분말 회절법(XRD) : 회절 패턴은 실온에서 X-ray 회절계(XRD) (Rigaku miniflex IIC, USA)로 기록함; 타겟 : Cu (λ1.54 Å); 필터 : Kβ foil 필터; 전압 : 40 kV; 전류 : 30 mA; 시정 수 : 10 mm s<sup>-1</sup>; scanning 범위 : 10e80 rom; 전체 scale : 200.2.2.4.7.

## ○ 항고혈압 효능 분석 (in vivo assay 동물시험)

- 동물 실험은 강원대학교 동물실험윤리위원회(KIACUC, Ethics Committee for Animal Welfare' of Kangwon National University)의 승인을 받아 실험동물에 관한 법률 'Protection of Animals used for Experimental and other Scientific Purposes' 에 따라 수행한다.
- 기본적인 실험동물의 처리는 (Obernier & Baldwin, 2006)에 따라 수행한다. 구체적으로, 7/12주령의 고혈압 유발쥐(SHR, spontaneously hypertensive rats) 수컷을 분양받아 (실험동물생산, 중앙실험동물(주) 또는 (주)삼육실험동물연구소) (SHRs) 5마리를 한 군으로 하여 온도 및 밤낮 조절(23°C, 12 h light/dark cycles) 및 사료와 물을 자유급식(*ad libitum*) 하면서 1주간 적응기간을 거친다. 그 후 본 과제에서 제조된 대두단백발효산물 또는 이를 함유한 두유를 zonde로 강제 경구 투여한다. 또는 경우에 따라 물 대신 상기

대두발효산물을 함유한 물 또는 두유를 일정량 물병으로 공급 투여하는 방법을 사용한다.

- 시험군은 생물전환 식품소재 조성물(10 ml/kg body weight, n = 5)을 투여한다. 처리에 앞서, 하루밤 굶기고, 처리 후 4시간 후, 수축기혈압(SBP, systolic blood pressure) 및 심박동수(heart rate)를 다음 시간 별로 측정한다(0, 3, 6, 9h). 이때 상기 고혈압 유발쥐를 38~40 보온상자에서 5~15분 가온 후 홀더에 넣고 고정시킨 다음 비혈관식 혈압측정장치를 사용하여 테일 커프 방법(tailcuff method using computer-assisted Non-Invasive Blood Pressure equipment (LE5001 unit with LE5160R cuff & transducer, Panlab Harvard Apparatus, Cornellá, Barcelona, Spain. 또는 PowerLab 800/ADInstruments)에 따라 꼬리 동맥압을 측정한다. 이 방법은 direct intra-arterial measurements에 의하여 검증되었다(Ibrahim et al. 2006). 각 SBP 값은 쥐가 정지 상태에 있을 때 신호 편차 (disturbance)가 없는 5회 이상 연속 측정하여 평균값을 얻는다. 혈압의 변화는 처리 바로 전에 얻은 기본 측정값에 대한 차이 값(mmHg)으로 계산한다. 제조된 대두단백질 발효 산물을 각각 0, 10, 100, 1,000 mg/kg을 경구 투여하고 3시간 후 혈압을 측정한 결과를 비교한다. 투여 기간(1주, 4주간, 8주, 12주) 및 투여량에 대한 Dose-response 시험을 수행한다. 상대적 효과를 비교하기 위하여 양성 대조군으로 captopril을 사용한다.

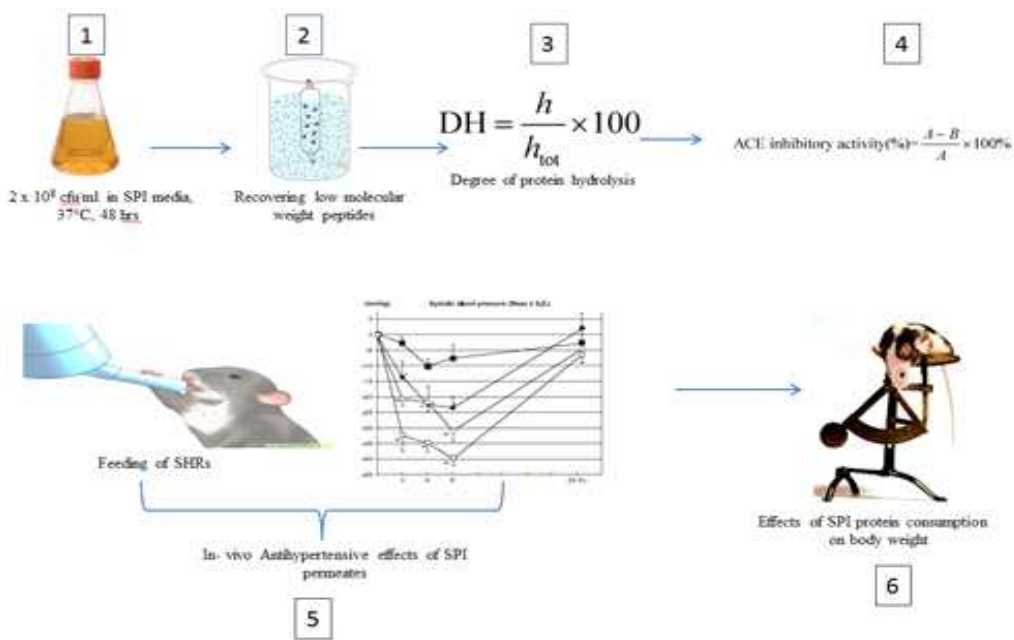


그림. 항고혈압 in vivo assay 모식도.

### ○ 항산화 효능 평가

- 항산화 활성 관련 성분 분석 및 효능평가는 DPPH 라디칼 소거능, 총 폴리페놀 함량, Reducing power 등을 이용하여 평가함.
- DPPH 라디칼 소거능은 시료 0.2 mL에 ethanol로 용해한 0.4 mM DPPH 용액 0.8 mL을 첨가하여 혼합한 후 상온에서 10분간 반응한 후 microplate reader를 사용하여 490 nm에서 흡광도 값을 측정 후 다음 식을 이용하여 결과 값을 나타냄.

$$DPPH\ radical\ scavenging\ activity(\%) = \left(1 - \frac{A_{Experiment}}{A_{Control}}\right) \times 100$$

- **총 페놀 함량**은 Folin-ciocalteu's phenol reagent가 시료의 페놀성 화합물에 의해 몰리브덴 청색으로 환원되는 원리로 측정함. 각 시료 1 mL에 2% Follin-Ciocalteu's phenol reagent 1 mL, 10% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 용액을 1 mL을 첨가하여 혼합한 후 상온에서 1시간 동안 방치함. 그리고 상등액을 microplate reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)를 이용하여 750 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준물질은 gallic acid를 이용하였으며 0, 0.00625, 0.0125, 0.025, 0.05, 0.1, 0.2 mg/mL의 농도로 제조하여 시료와 동일한 방법으로 측정하여 나타냄.
- **Reducing power**는 시료 1 mL에 pH 6.6의 200 mM 인산 완충액 및 1%의 potassium ferricyanide를 각 1 mL씩 차례로 가하여 교반한 후 50°C의 수욕상에서 20분간 반응시킴. 여기에 10% TCA 용액을 1 mL 가하여 13,500×g에서 15분간 원심분리하여 상등액 1 mL에 증류수 및 ferric chloride를 각 1 mL씩 혼합하여 700 nm에서 흡광도를 측정. 환원력은 시료 첨가군과 대조군의 흡광도 비를 %값으로 환산함.

#### ○ 장내 미생물 균총 분석 (Metagenomic analysis)

- **Microbial DNA 추출:** 배설물에서 분리된 균총은 16S rRNA 박테리아 유전형을 사용하여 측정됨. 박테리아의 DNA는 제조자의 지시에 따라 PowerLyzer®PowerSoil DNA® 분리 키트 (MoBio)를 사용하여 동물 표본에서 추출됨. 배설물의 서브 샘플은 변동성을 줄이기 위해, 표본의 외부 영역에서만 채취하여 PowerLyzer® 유리 비드 튜브(MoBio)에 무게를 측정함. FastPrep-24™ 5 G(MP 생체의학)는 각 사이클 사이에 60 second로 4회 90초 주기 동안 5.5 m/s의 속도로 샘플을 균질하는 데 사용됨.
- **1.1.2 16S rRNA 박테리아 유전자 염기서열 분석 :** 추출한 박테리아 DNA는 바코드 핵융합 프라이머를 이용한 16S rRNA 박테리아 유전자의 V3-V4 초가변성 영역의 초기 PCR 증폭용 템플릿으로 사용될 예정임.; 16SR\_V4 (5'-CAAGCAGAAGACGGCATACGAGAT-barcode-AGTCAGTCAGCCGGACTACHVGGGTWTCTAAT-3') and 16SF\_V3 (5'-AATGATACGGCGACCAACCGAGATCTACAC-barcode-TATGGTAATTGGCCTACGGGAGGCAGCAG-3'). 또한 하류 Illumina MiSeq 시퀀싱을 위한 어댑터를 포함하고 있음. 각 샘플은 바코딩 프라이머 한 쌍으로 증폭되며, 사용하는 PCR 시약은 인비트로젠 AccuPrime™Taq SuperMix(부품번호 12344-040), 10µM 16SR\_V4 프라이머(1µl), 10µM16SF\_V3 프라이머(1µl), 앰비온 뉴클리스프라이머(카탈로그 번호 AM9932)로 일반화함. PCR 조건은 다음과 같음: 95°C에서 2분간 유지한 후 20초 동안 95°C에서 30회 주기(거부), 15초 동안 55°C로, 5분 동안 72°C에서 10분간 (확장)로 마무리함. Library clean-up은 Invitrogen Sequel-Prep Normalisation Plate Kit (Thermo Fisher)를 활용함. 다량의 PCR 제품은 유출량이 12µl인 library 청소하는 데 사용됨. Library 농도를 측정하기 위해 큐비트 DNA 고감도 분석법을, Library 트기를 측정하기 위해 Bioanalyzer DNA HS assay를 사용할 예정임. Library는 같은 부피로 가득 차게 될 것이고, sequence는 Massey Genome Service(Massey University)에서 2×250 bp의 읽기 길이를 사용하는 Illumina MiSeq 기계에서 수행될 것임. Illumina MiSeq sequencing에서 얻은 데이



터는 Quantitative Insights to Microbial Ecology(QIIME)를 사용하여 분석함. DNA 염기서열을 위한 쌍방향 조립기는 최소 350 bp, 최대 500 bp의 최소 50 bp 중첩을 보장하는 연속적인 순서로 전방 및 후방 판독을 조립하는 데 사용될 것임. 키메라 필터링된 순서와 판독값은 USEARCH 6.1과 UCLUST를 사용하여 ID 임계값 97%를 기준으로 운영 분류학 단위로 클러스터링됨. Green genes core reference database (version 13\_5)를 이용한 sequencing 정렬은 PyNASt를 사용해 실시함. RDP Naïve Bayesian 분류기는 분류학 과제를 제공하는 데 사용될 것임. Library 크기(33,906 ~ 196,843)에 변화가 있을 것이고, 다양성 측정 계산에 편중될 수 있는 배열 깊이가 다를 가능성이 있기 때문에 모든 표본은 33,000까지 희박해질 것임.

- 2.1 배설물 단쇄지방산(SCFA) 분석 : SCFA는 수정된 알려진 방법을 사용하여 GC에 의해 측정될 것임(Richardson et al. 1989). 냉동된 상태에서, 동물 표본의 0.5 ~ 1.0 g을 15 ml eppendorf tube를 이용하여 무게를 측정함. 2-ethylbutyric acid (5.56 mM)을 포함하는 0.01 MPBS를 내부 표준으로 하여 동물 표본에 첨가에 5 mM 2-ethylbutyric acid을 함유한 수용액(희석계수 10)을 만듦. 그 후, 샘플을 얼음위에 보관하여 동물성 물질을 흩어지게 함. 수성 동물성 용액은 3000g에서 4°C, 10분 동안 원심분리하고 상등액 500 µl를 2 ml eppendorf tube로 옮겨 250 µl의 농축 염산으로 산성화하고 1000 µl의 diethyl ether를 첨가함. 산이 diethyl ether 단계로 전이될 수 있도록 10초 동안 VORTEX를 이용하여 혼합하여 10,000g에서 4°C, 5분 동안 원심분리함. GC vial에서 diethyl ether 100 µl는 1% butyldimethylchlorosilane (MTBSTFA + TBDMSCI, 99:1; Sigma-Aldrich)를 가지고 20 µl의 N-tert-butyldimethylsilyl-N-methyltrifluoroacetamide를 water bath에서 80°C, 20분 동안 유도함. 일단 냉각되면, 유도체화된 샘플은 200 µl vial 끼우고 옮겨짐. 완전한 유도체를 위해 샘플을 실온에서 48시간 동안 방치한 뒤 GC를 사용해 분석함. 샘플과 함께 유도체화를 위한 내부 표준으로 2-ethylbutyric acid (5 mM)을 포함한 표준을 준비함. 화염이온화 검출기와 Restek column (SH-Rtx-1, 30 m×0.25 mm ID×0.25µm) (Shimadzu)을 장착한 GC system (GC-2010 Plus)에 대한 분석을 실시함. 운송용 가스는 총 유량 21.2ml/min, 압력 131.2 kPa이며, 보충 가스는 질소를 이용함. 온도 프로그램은 70°C에서 시작하여 6°C/min에서 115°C로 증가하며, 최종 증가량은 60°C/min에서 300°C로 3분간 유지됨. 유량 제어 모드는 37.5 cm/s의 선형 속도로 설정하며, 주입기 온도는 260°C, 검출기 온도는 310°C로 함. 샘플은 분할주입(분할비율 10:1)으로 주입함. GC 장비는 Shimadzu GC Work Station Lab Solutions version 5.3을 사용하여 제어하고 데이터를 처리함. 수집된 데이터는 µmol SCFA/g 습식 동물군의 최종 샘플 결과를 제공함.

### 3. 연구개발과제의 수행 결과 및 목표 달성 정도

#### 1) 연구수행 결과

##### (1) 정성적 연구개발성과

#### ① 국내산 곡물자원의 생물전환 식품소재 생산 조건 확립 및 유효성 규명

##### ○ 곡물 및 곡류 유래 단백질 원료의 가공 특성 규명

- 다양한 종류의 곡물 및 곡류 유래 단백질 원료를 이용하여 생물전환 소재를 생산하기 위하여 원료의 물리 화학적인 가공 특성을 규명하고자 하였음
- 시험에 사용하기 위하여 선별된 원료는 양산을 위해 국내에 분말의 형태로서 공급이 원활한 원료들을 수배하였으며, 입수된 원료는 탄수화물 기반의 쌀 등의 곡물 7종과 단백질 기반의 두류 3종 및 곡류 유래 단백질 원료 2종을 선별하였음

Table 1. 곡물 원료명

No	원료명	제조판매사	공급사	원료사진
1	차조분말	중앙타프라	황성곡산(주)농업회사법인 (여주)	
2	쌀분말	중앙타프라	황성곡산(주)농업회사법인 (여주)	
3	곡류 수수분말	중앙타프라	황성곡산(주)농업회사법인 (여주)	
4	찰흑미분말	중앙타프라	황성곡산(주)농업회사법인 (여주)	

5		현미분말	중앙타프라	황성곡산(주)농업회사법인 (여주)	
6		오트밀분말	중앙타프라	황성곡산(주)농업회사법인 (여주)	
7		보리분말	중앙타프라	황성곡산(주)농업회사법인 (여주)	
8	두류	서리태분말	중앙타프라	(주)영남농산 (진주)	
9		대두분말	중앙타프라	(주)영남농산 (진주)	
10		쥐눈이콩분말	중앙타프라	(주)영남농산 (진주)	
11	곡류 유래 단백질	Profam 974 (soy ISP)	시아스	시아스	
12		쌀단백분말	빅솔	빅솔	

## ○ 원료 영양성분 분석 및 품질 분석

- 원료 수분함량 측정: 곡물 및 곡류유래 단백질 원료의 수분함량은 디지털 수분측정기 (ML-50 Moisture Analyzer, USA)를 사용하여 할로겐 건식 측정법으로 측정하였음. 즉, 곡물 분말 시료를 각 3g 씩 취하여 105℃에서 가열하여 수분 변화를 측정하였음.
- 수분함량 측정 결과 차조 분말은 통상 건조곡물 보다 수분함량이 높은 편인 9.3%로 나타났고 쌀분말도 다소 높은 6.6%로 확인되었으며 그 외의 곡물은 약 5~6% 정도의 수분함량으로 갖는 것으로 측정되었음.

Table 2. 원료 수분함량

Sample	Initial weight(g)	Final weight(g)	Moisture(%)
차조분말	3.025	2.745	9.3
쌀분말	3.015	2.815	6.6
수수분말	3.050	2.875	5.8
찰흑미분말	3.045	2.865	5.8
현미분말	3.020	2.845	5.7
오트밀분말	3.025	2.860	5.5
보리분말	3.035	2.865	5.5
서리태분말	3.030	2.870	5.3
대두분말	3.005	2.805	6.6
쥐눈이콩분말	3.030	2.870	5.3
Profam 974	3.090	2.915	5.6
쌀단백분말	3.005	2.855	5.0

- 영양성분 분석: 곡물 및 곡물유래 단백질 원료의 이화학적 특성을 규명하기 위하여 식품 공전 및 AOAC의 방법에 따라 탄수화물, 지방 및 단백질 등 원료의 영양성분 분석을 진행하였음.
- 영양성분 분석 결과는 다음과 같음.

Table 3. 차조분말 영양성분 분석

시험항목	단위	시험방법	결과
열량	kacl/100g	식품공전	382.70
탄수화물	g/100g	식품공전	73.26
단백질	g/100g	식품공전, Protein Analyzer	11.03
지방	g/100g	식품공전	5.06
당류	g/100g	식품공전, HPLC/RI	0.73
포화지방	g/100g	식품공전, GC/FID	0.86
트랜스지방	g/100g	식품공전, GC/FID	0.04
콜레스테롤	mg/100g	식품공전, GC/FID	불검출
나트륨	mg/100g	식품공전, ICP/OES	불검출
수분	g/100g	식품공전	9.56
회분	g/100g	식품공전	1.09

Table 4. 쌀 영양성분 분석

시험항목	단위	시험방법	결과
열량	kacl/100g	식품공전	355.46
탄수화물	g/100g	식품공전	80.79
단백질	g/100g	식품공전, Protein Analyzer	6.50
지방	g/100g	식품공전	0.70
당류	g/100g	식품공전, HPLC/RI	불검출
포화지방	g/100g	식품공전, GC/FID	0.44
트랜스지방	g/100g	식품공전, GC/FID	0.01
콜레스테롤	mg/100g	식품공전, GC/FID	불검출
나트륨	mg/100g	식품공전, ICP/OES	1.497
수분	g/100g	식품공전	11.94
회분	g/100g	식품공전	0.07

Table 5. 수수분말 영양성분 분석

시험항목	단위	시험방법	결과
열량	kacl/100g	식품공전	391.88
탄수화물	g/100g	식품공전	78.05
단백질	g/100g	식품공전, Protein Analyzer	11.82
지방	g/100g	식품공전	3.60
당류	g/100g	식품공전, HPLC/RI	0.29
포화지방	g/100g	식품공전, GC/FID	0.69
트랜스지방	g/100g	식품공전, GC/FID	0.03
콜레스테롤	mg/100g	식품공전, GC/FID	불검출
나트륨	mg/100g	식품공전, ICP/OES	불검출
수분	g/100g	식품공전	5.15
회분	g/100g	식품공전	1.38

Table 6. 찰흑미분말 영양성분 분석

시험항목	단위	시험방법	결과
열량	kacl/100g	식품공전	392.40
탄수화물	g/100g	식품공전	81.58
단백질	g/100g	식품공전, Protein Analyzer	8.9
지방	g/100g	식품공전	3.48
당류	g/100g	식품공전, HPLC/RI	0.34
포화지방	g/100g	식품공전, GC/FID	0.93
트랜스지방	g/100g	식품공전, GC/FID	0.02
콜레스테롤	mg/100g	식품공전, GC/FID	불검출
나트륨	mg/100g	식품공전, ICP/OES	1.229
수분	g/100g	식품공전	5.05
회분	g/100g	식품공전	1.20

Table 7. 현미분말 영양성분 분석

시험항목	단위	시험방법	결과
열량	kacl/100g	식품공전	388.85
탄수화물	g/100g	식품공전	82.56
단백질	g/100g	식품공전, Protein Analyzer	8.51
지방	g/100g	식품공전	2.73
당류	g/100g	식품공전, HPLC/RI	4.33
포화지방	g/100g	식품공전, GC/FID	1.04
트랜스지방	g/100g	식품공전, GC/FID	0.05
콜레스테롤	mg/100g	식품공전, GC/FID	불검출
나트륨	mg/100g	식품공전, ICP/OES	1.300
수분	g/100g	식품공전	4.95
회분	g/100g	식품공전	1.25

Table 8. 오토밀분말 영양성분 분석

시험항목	단위	시험방법	결과
열량	kacl/100g	식품공전	416.16
탄수화물	g/100g	식품공전	73.35
단백질	g/100g	식품공전, Protein Analyzer	12.69
지방	g/100g	식품공전	8.00
당류	g/100g	식품공전, HPLC/RI	1.00
포화지방	g/100g	식품공전, GC/FID	1.69
트랜스지방	g/100g	식품공전, GC/FID	0.04
콜레스테롤	mg/100g	식품공전, GC/FID	불검출
나트륨	mg/100g	식품공전, ICP/OES	1.708
수분	g/100g	식품공전	4.33
회분	g/100g	식품공전	1.63

Table 9. 보리분말 영양성분 분석

시험항목	단위	시험방법	결과
열량	kacl/100g	식품공전	391.91
탄수화물	g/100g	식품공전	77.66
단백질	g/100g	식품공전, Protein Analyzer	12.87
지방	g/100g	식품공전	3.31
당류	g/100g	식품공전, HPLC/RI	0.81
포화지방	g/100g	식품공전, GC/FID	0.94
트랜스지방	g/100g	식품공전, GC/FID	0.02
콜레스테롤	mg/100g	식품공전, GC/FID	불검출
나트륨	mg/100g	식품공전, ICP/OES	4.879
수분	g/100g	식품공전	4.78
회분	g/100g	식품공전	1.38

Table 10. 서리태분말 영양성분 분석

시험항목	단위	시험방법	결과
열량	kacl/100g	식품공전	444.39
탄수화물	g/100g	식품공전	35.90
단백질	g/100g	식품공전, Protein Analyzer	38.50
지방	g/100g	식품공전	16.31
당류	g/100g	식품공전, HPLC/RI	6.99
포화지방	g/100g	식품공전, GC/FID	2.53
트랜스지방	g/100g	식품공전, GC/FID	0.04
콜레스테롤	mg/100g	식품공전, GC/FID	불검출
나트륨	mg/100g	식품공전, ICP/OES	2.153
수분	g/100g	식품공전	4.67
회분	g/100g	식품공전	3.07



Table 11. 대두분말 영양성분 분석

시험항목	단위	시험방법	결과
열량	kacl/100g	식품공전	472.24
탄수화물	g/100g	식품공전	34.05
단백질	g/100g	식품공전, Protein Analyzer	35.41
지방	g/100g	식품공전	21.60
당류	g/100g	식품공전, HPLC/RI	7.29
포화지방	g/100g	식품공전, GC/FID	2.88
트랜스지방	g/100g	식품공전, GC/FID	0.03
콜레스테롤	mg/100g	식품공전, GC/FID	불검출
나트륨	mg/100g	식품공전, ICP/OES	2.473
수분	g/100g	식품공전	4.25
회분	g/100g	식품공전	4.69

Table 12. 쥐눈이콩분말 영양성분 분석

시험항목	단위	시험방법	결과
열량	kacl/100g	식품공전	458.88
탄수화물	g/100g	식품공전	33.01
단백질	g/100g	식품공전, Protein Analyzer	37.16
지방	g/100g	식품공전	19.80
당류	g/100g	식품공전, HPLC/RI	5.45
포화지방	g/100g	식품공전, GC/FID	0.29
트랜스지방	g/100g	식품공전, GC/FID	0.03
콜레스테롤	mg/100g	식품공전, GC/FID	불검출
나트륨	mg/100g	식품공전, ICP/OES	1.810
수분	g/100g	식품공전	4.89
회분	g/100g	식품공전	5.14

Table 13. 대두 단백질 분말 영양성분 분석

시험항목	단위	시험방법	결과
열량	kacl/100g	식품공전	385.92
탄수화물	g/100g	식품공전	10.23
단백질	g/100g	식품공전, Protein Analyzer	78.33
지방	g/100g	식품공전	3.52
당류	g/100g	식품공전, HPLC/RI	0.18
포화지방	g/100g	식품공전, GC/FID	1.01
트랜스지방	g/100g	식품공전, GC/FID	0.03
콜레스테롤	mg/100g	식품공전, GC/FID	불검출
나트륨	mg/100g	식품공전, ICP/OES	1150
수분	g/100g	식품공전	4.20
회분	g/100g	식품공전	3.72

Table 14. 쌀 단백질 분말 영양성분 분석

시험항목	단위	시험방법	결과
열량	kacl/100g	식품공전	392.91
탄수화물	g/100g	식품공전	14.28
단백질	g/100g	식품공전, Protein Analyzer	73.71
지방	g/100g	식품공전	4.55
당류	g/100g	식품공전, HPLC/RI	0.27
포화지방	g/100g	식품공전, GC/FID	2.13
트랜스지방	g/100g	식품공전, GC/FID	0.03
콜레스테롤	mg/100g	식품공전, GC/FID	불검출
나트륨	mg/100g	식품공전, ICP/OES	637.7
수분	g/100g	식품공전	5.39
회분	g/100g	식품공전	2.07







- 선행 연구 결과에서 항고혈압 활성을 나타나는 중요한 성분은 발효 및 생물 전환을 통한 단백질의 가수분해물로 추정되고 있었으며, 이에 따라 본 연구에서 수행하는 생물전환 또는 발효를 통한 원료 가공 방법에서는 단백질 함량이 상대적으로 높은 원료들이 상대적으로 기능성이 강화될 가능성이 높은 것으로 사료됨
- 곡류, 두류 및 곡류/두류 가공 분말의 영양성분 분석 결과에서 단백질 함량은 두류 관련 원료 및 쌀에서 상대적으로 높은 함량을 나타내었고, 따라서 본 연구에서는 쌀 및 단백질을 생물전환 또는 발효 공정을 수행하였을 때 상대적으로 높은 활성이 나타날 가능성이 높은 것으로 사료됨

## ○ 곡류 원물의 항고혈압 활성 스크리닝

- 다양한 국내산 곡류 원물의 젖산균 발효에 의한 생물전환 소재의 ACE inhibitory activity를 평가하여, 항고혈압 활성을 갖는 최적의 원물을 선별하고자 하였음. 국내 유통이 가능한 공급사를 통해 다양한 곡류 원물을 입수하여 아래와 같이 12종의 원물을 이용하여 연구에 사용함.
- 항고혈압 활성을 갖는 제품 개발을 위해 가장 적합한 곡류 원물을 선별하기 위해, 곡류 원료(10%, w/v)를 이용하여 ACE inhibitory activity를 수행하였음. 시중에 판매되고 있는 항고혈압제 captopril과 비교하였을 때, 모든 곡류 원료는 항고혈압 활성을 나타내지 않아 일반 곡류/두류를 사용한 일반 식품에서는 이러한 기능성을 기대하기 힘든 것으로 판단되며 이에 따라 이러한 곡류/두류 원료를 가공한 식품에서 기능성을 강화하기 위한 추가 공정이 필요할 것으로 판단되었음 (Figure 1A).
- 이러한 원료들의 기능성 강화 가능성을 살펴보기 위하여 원료를 기존 주관연구기관에서 기 확보하고 있던 생물 전환 공정인 *Lactobacillus rhamnosus* JDFM6 균주를 이용하여 37°C, 48시간 동안 발효하였을 경우 대부분의 생물전환 원물의 경우 ACE inhibitory activity를 증가시켰으며, 특히 captopril과 유사한 수준의 활성을 나타낸 수수와 흑미를 추후 연구에 사용함 (Figure 1B,C)
- 기능성 스크리닝을 위한 원료 발효에 사용된 발효 유산균 균주 *L. rhamnosus* JDFM6의 유전자 정보는 다음과 같음(Table 16)

Table 16. 원료 선별을 위한 발효 유산균 균주의 유전자 정보

Strain	16S rRNA sequence
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> JDMF6	1 gctsgcggcg tgcctaatac atgcaagtcg aacgagtctt gattattgaa aggtgcttgc
	61 atcttgattt aattttgaac gagtggcggg cgggtgagta acacgtgggt aacctgccct
	121 taagtggggg ataacatttg gaaacagatg ctaataccgc ataaatccaa gaaccgcatg
	181 gttcttggct gaaagatggc gtaagctatc gcttttggat ggaccgcggg cgtattagct
	241 agttggtgag gtaacggctc accaaggcaa tgatacgtag ccgaactgag aggttgatcg
	301 gccacattgg gactgagaca cggcccaaac tctacgggag gcagcagtag ggaatcttcc
	361 acaatggacg caagtctgat ggagcaacgc cgcgtgagtn aagaaggctt tccggtcgta
	421 aaactctggt gttggagaag aatggtcggc agagtaactg ttgtcggcgt gacggtatcc
	481 aaccagaaag ccacggctaa ctacgtgcca gcagccgagg taatacgtag gtggcaagcg
	541 ttatccggat ttattgggag taaagcgagc gcaggcgggt ttttaagtct gatgtgaaag
	601 ccctcggctt aaccgaggaa gtgcatcgga aactgggaaa cttgagtnca gaagaggaca
	661 gtggaactcc atgtgtagcg gtgaaatgcg tagatatatg gaagaacacc agtggcgaag
	721 cgggctgtct ggtctgtaac tgacgctgag gctcgaagc atgggtagcg aacaggatta
	781 gataccctgg tagtccatgc cgtaaacgat gaatgctagg tgttggaggg tttccgccct
	841 tcagtgccgc agctaacgca ttaagcattc cgcctgggga gtacgaccgc aaggttgaaa
	901 ctcaaaggaa ttgacggggg cccgcacaag cgggtggagca tgtggtttaa ttcgaagcaa
	961 cgcaagaac cttaccaggt cttgacatct tttgatcacc tgagagatca ggtttccctt
	1021 tcgggggcaa aatgacaggt ggtgcatggt tgtcgtcagc tcgtgtcgtg agatgttggg
	1081 ttaagtcccg caacgagcgc aacccttatg actagtggc agcatttagt tgggactctt
	1141 agtaagactg ccggtgacaa accggaggaa ggtggggatg acgtcaaac atcatgcccc
	1201 ttatgacctg ggctacacac gtgctacaat ggatggtaca acgagttgcg agaccgcgag
	1261 gtcaagctaa tctcttaaag ccattctcag ttcggactgt aggctgcaac tgcctacac
	1321 gaagtcgaa tcgctagtaa tcgcgatca gcacgcccgc gtgaatacgt tcccgggctt
	1381 tgtaacaccg cccgtcacac catgagagtt tgtaacacc gagccgggtg c

○ 쌀 및 두류 원료의 항고혈압 활성 스크리닝

- 다양한 국내산 곡류 단백질 원료의 젖산균 발효에 의한 생물전환 소재의 ACE inhibitory activity를 평가하여, 항고혈압 활성을 갖는 최적의 원물을 선별하고자 하였음. 국내 유통이 가능한 공급사를 통해 다양한 콩과 식물을 입수하여 아래와 같이 5종의 원물을 이용하여 연구에 사용함.
- 항고혈압 활성을 갖는 제품 개발을 위해 가장 적합한 곡류 단백질을 선별하기 위해, 곡류 단백질 원료(10%, w/v)를 이용하여 ACE inhibitory activity를 수행하였음. 시중에 판매되고 있는 항고혈압제 captopril과 비교하였을 때, 모든 두류 단백질 원료는 항고혈압 활성을 나타내지 않았음 (Figure 2A).
- 반면, 열처리 원물 및 *Lactobacillus rhamnosus* JDMF6 균주를 이용하여 37°C, 48시간 동안 발효한 대부분의 생물전환 원물의 경우 ACE inhibitory activity를 증가시켰으며, 특히 captopril과 유사한 수준의 활성을 나타낸 검은콩을 추후 연구에 사용함 (Figure 2B,C).

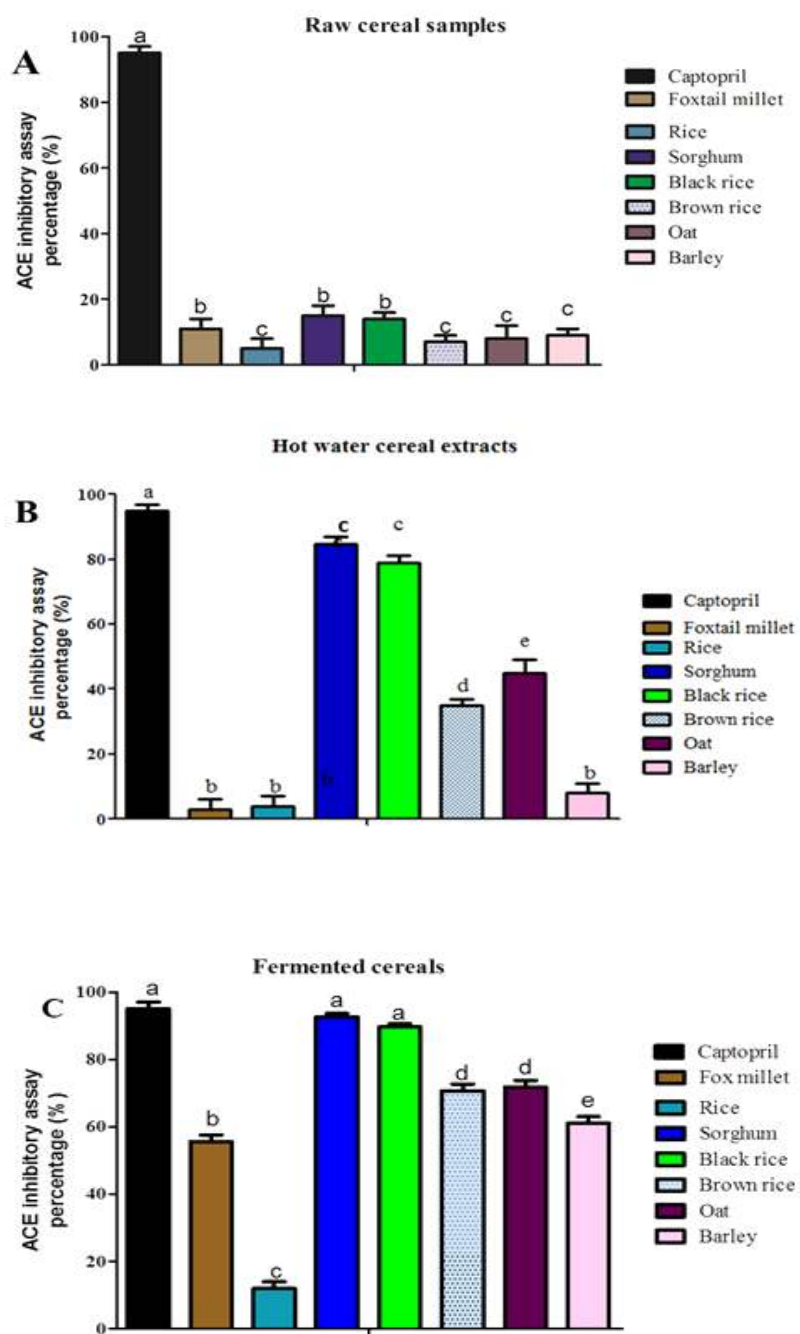


Figure 1. ACE inhibitory activity of cereals and legume samples (A) raw samples, (B) heated samples and (C) samples fermented with *Lactobacillus rhamnosus* JDFM6 at 37°C for 48 h.



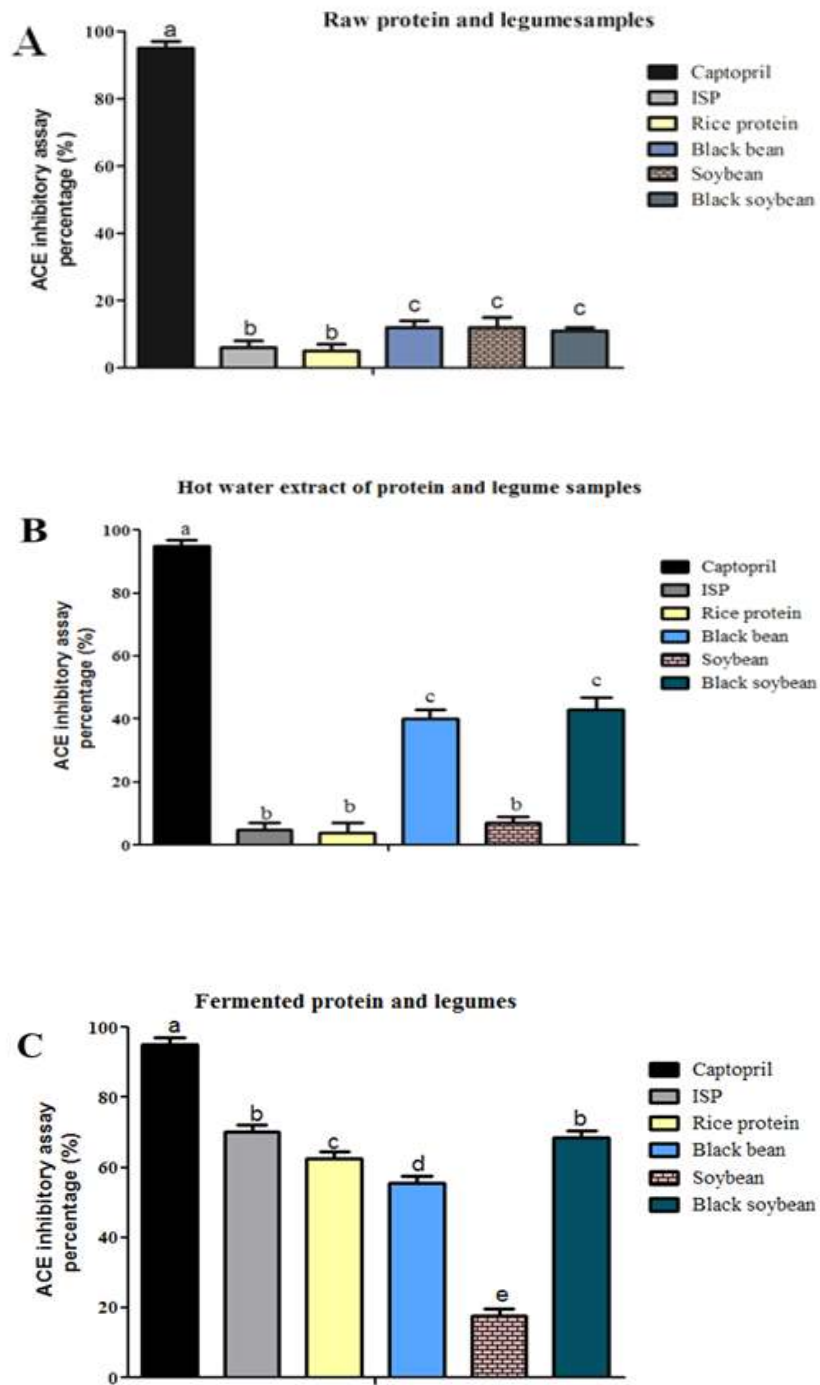


Figure 2. ACE inhibitory activity of proteins and legume samples (A) raw samples, (B) heated samples and (C) samples fermented with *Lactobacillus rhamnosus* JDFM6 at 37°C for 48 h.

## ○ 발효 공정을 위한 젖산균주 선별

- 젖산균 발효에 의해서 곡류 및 두류 원료의 항고혈압 활성이 증진되는 것을 확인하였으며, 이에 따라서 곡류 발효에 사용될 젖산균을 선별하기 위하여 상대적으로 활성이 높았던 수수 및 흑미에 대한 발효를 진행한 후 항고혈압 활성 평가를 수행하였음
- 발효에 사용된 젖산균주는 주관기관에서 기 확보하고 있는 균주들인 *L. arizonensis* SC25, *L. pentosus* SC48, *L. plantarum* SDL1413, *L. curvatus* JBNU38, *L. plantarum* JDFM44, *L. brevis* SDL1408, *L. brevis* SDL1411, *L. rhamnosus* JDFM33 및 *L. rhamnosus* JDFM6 의 총 9종의 *Lactobacillus* 균주를 사용하였으며, 각 균주들은 수수 및 흑미 원료에 대하여 37°C, 48시간 동안 발효한 후, ACE inhibitory activity를 측정하였음.
- 발효 공정 후 항고혈압 활성의 측정에서는 *L. plantarum* JDFM44 및 *L. brevis* SDL1411 균주를 이용하여 발효한 샘플이 가장 높은 항고혈압 활성을 나타내었음 (Figure 3 and 4).

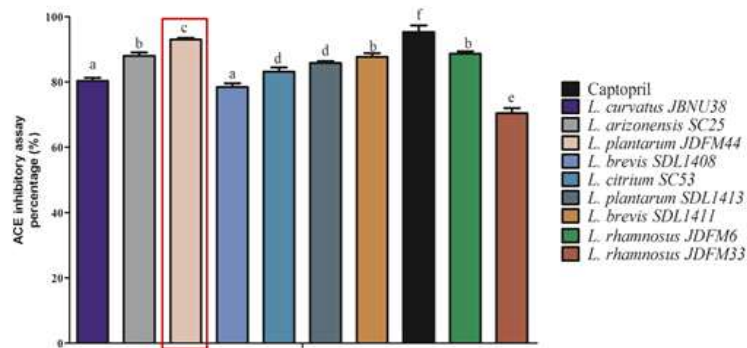


Figure 3. ACE inhibitory activity of sorghum fermented with 9 *Lactobacillus* species at 37°C for 48 h.

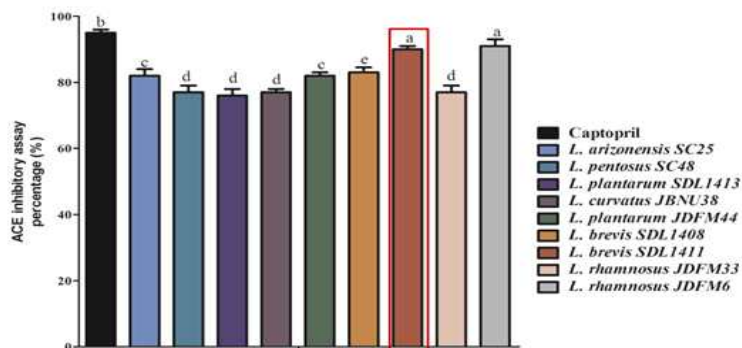


Figure 4. ACE inhibitory activity of black rice fermented with 9 *Lactobacillus* species at 37°C for 48 h.

## ○ 발효를 위한 최적 발효 온도 탐색

- 발효 공정 개발을 위하여 발효 과정에서의 최적 발효온도를 확인하기 위하여 수수 및 흑미 시료를 121°C에서 15분 동안 고압 멸균하고 *L. plantarum* JDFM44를 이용하여 각각 30°C, 37°C 및 45°C의 3가지 다른 온도에서 발효하고, 배양 48시간 후, 젖산균의 생육 불활성화 시키기 위해 샘플을 10분 동안 100°C에서 가열 처리하한 뒤 각각의 시료에 대한 ACE inhibitory activity를 진행하였음.
- 48시간 동안 30°C, 37°C, 45°C에서 샘플을 발효시켰을 때 ACE 저해 활성에 대한 유의미한 차이가 나타나지 않았음 (Table 17 및 Figure 5).
- 유산균의 최적 생육 온도는 37°C이므로, 추후의 연구 진행을 위해 복합 공정의 조건으로 37°C를 선택함.

Table 17. Effects of fermentation temperature on ACE inhibitory activity

Sample		Sorghum		
Temperature		30°C	37°C	45°C
ACE inhibition (%)		88 ± 3	93 ± 2	90 ± 2

Sample		Black rice		
Temperature		30°C	37°C	45°C
ACE inhibition (%)		86 ± 4	90 ± 2	92 ± 1.5

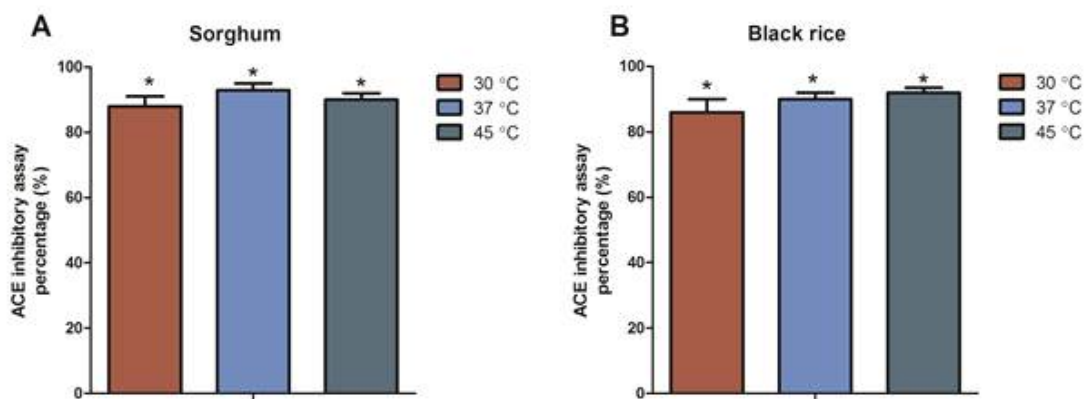


Figure 5. A) Sorghum and B) Black rice samples (without enzyme treatment) were fermented using *L. plantarum* JDFM44 at different temperatures: 30°C, 37°C and 45°C.

## ○ 최적 발효 시간 탐색

- 발효시간이 항고혈압 활성이 미치는 영향을 확인 하기 위하여 각 균주의 발효 시간 별로 항고혈압 활성을 확인하였으며, 곡류 원료를 121°C에서 15분 동안 고압 멸균하고 *L. plantarum* JDFM44를 이용하여 발효시켰음. 0, 4, 8, 12, 16, 24, 36 및 48시간 동안 서로 다른 발효 시간을 설정하여 진행한 후, 100°C에서 10분간 가열하여 균주를 불활성화 시킨 후 시험에 사용하였음.
- 서로 다른 발효시간 조건에서 수집한 샘플을 이용하여 ACE inhibitory activity를 측정한 결과, 발효시간이 증가할수록 항고혈압 활성이 증가하는 것을 확인하였으며, 항고혈압 활성은 24시간째에 상승하여 36 및 48시간에서는 큰 차이를 나타나지 않았음 (Table 18 및 Figure 6).
- 따라서, 최적의 생물전환 공정 방법으로 효소 처리 후, 37°C에서 24시간 발효를 진행하는 것으로 확인하였음

Table 18. Effects of fermentation time on ACE inhibitory activity

Sample	Sorghum							
Time	0 h	4 h	8 h	12 h	16 h	24 h	36 h	48 h
ACE inhibition (%)	80 ± 1	81 ± 2	80 ± 4	78 ± 3	80 ± 4	87 ± 5	85 ± 5	90 ± 2

Sample	Black rice							
Time	0 h	4 h	8 h	12 h	16 h	24 h	36 h	48 h
ACE inhibition (%)	78 ± 1	81 ± 0.5	78 ± 4	76 ± 4	80 ± 1	87 ± 3	90 ± 5	93 ± 2

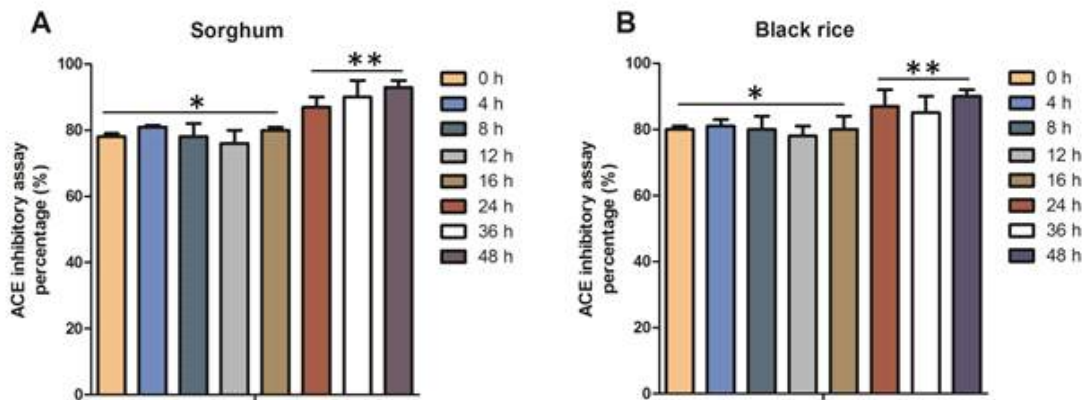


Figure 6. A) Sorghum and B) Black rice samples (without enzyme treatment) were fermented using *L. plantarum* JDFM44 at different times: 0 ~ 48 h. Bars represent means of three independent readings ± SD.

○ 발효공정에서 ACE inhibitory activity에 대한 열처리, 효소처리 및 발효 공정의 효과

- 발효 공정 중 열처리와 효소처리에 대한 영향을 확인하기 위하여 곡류 시료와 Prozyme 2000P 혼합물을 제조하고, water bath를 이용하여 50°C, pH 6.0 에서 2시간 동안 열처리 한 후, 샘플 내의 자체 효소를 불활성화시키기 위해 100°C에서 10분 동안 가열처리를 진행 하였음.
- 각각의 처리 조건에 따른 곡류 원료의 ACE inhibitory activity는 다음과 같이, 효소 및 발효 복합공정, 발효공정, 효소처리, 열처리 순으로 높은 활성은 나타냄 (Table 19 및 Figure 7).
- 따라서, 추후의 연구 진행을 위해 생물전환 공정을 위해 효소 및 발효를 이용한 복합공정을 이용하는 것으로 결정하였음

Table 19. Effects of processing methods on ACE inhibitory ability

	Raw	Heated	Enzyme treated	Fermented	Enzyme treated + Fermented
Sorghum (% ACE)	15 ± 2	79 ± 1.5	88 ± 4	92.8 ± 1.5	93 ± 1.5
Black rice (% ACE)	14 ± 2	84 ± 0.5	89 ± 1.2	90 ± 0.5	90 ± 2

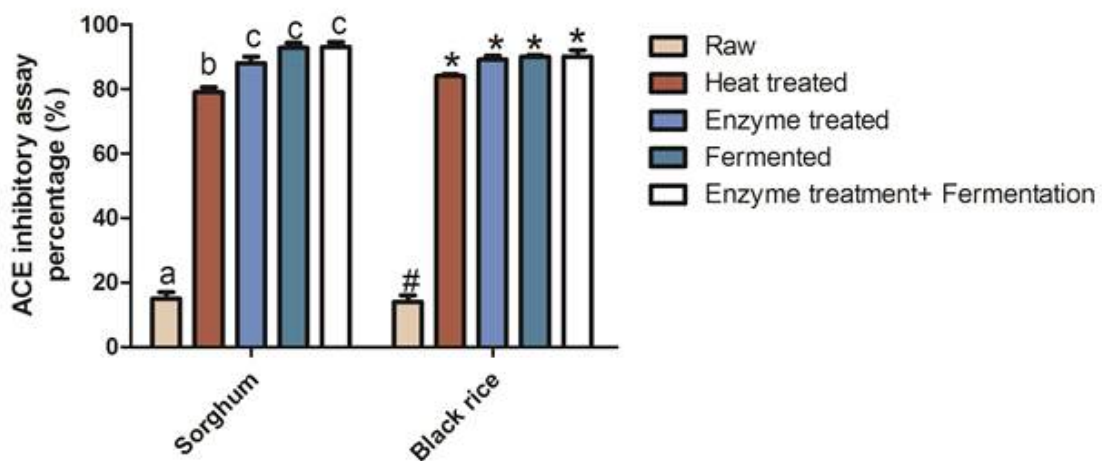


Figure 7. ACE inhibitory activity of raw, heated, enzyme treated and fermented black rice and sorghum. The ACEI activities of enzyme treated and fermented,

## ○ 최적의 생물전환 식품소재 생산조건 확립

- ACE inhibitory activity를 갖는 곡물의 생물전환을 위해 10%w/v의 농도로 곡물을 물에 희석 시키고, pH 6에서 Prozyme 2000P(E:S=0.1%:1)로 처리하여 50°C에서 2시간 동안 가열하였음.
- 샘플을 100°C에서 10분간 가열하여 효소 비활성화 시킨 후, 유산균 *L. plantarum* JDFM44 ( $2 \times 10^8$  cfu/ml)를 이용하여 37°C에서 24시간 동안 발효를 진행함.
- 발효 후 100°C에서 10분간 가열하여 박테리아를 비활성화 시킨 후, 생물전환 식품 소재로 활용함.

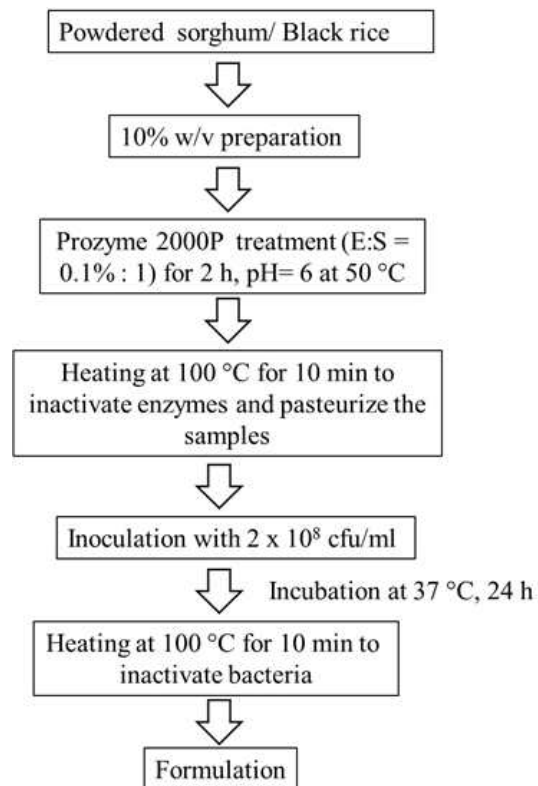


Figure 8. 쌀 및 콩 등 곡류 및 곡류기반 단백질을 이용한 생물전환 식품소재 생산조건 확립

## ② 국내산 곡물자원의 생물전환 식품소재 대량생산 기술 개발

### ○ 생물전환 소재 생산 공정 개발

- 선별된 곡물의 생물전환 공정 및 음료 제조를 위한 가공적성을 확인하기 위하여 단백질 분해효소 및 당화효소 처리에 따른 분해 활성 및 물성 변화를 관찰하였음.
- 단백질 분해효소 활성 시험을 위해 상업용 단백질 효소 6종에 대해서 기질로서는 대두 분말, 대두단백 분말(Profam974) 및 쌀단백 분말을 사용하여 원료의 혼합비에 따른 물성의 변화를 관찰하고자 하였음.

Table 20. 상업용 protease

No	종류	제품명	처리조건
1	Protease	Food Pro Alkaline protease	shaking incubation (50°C, 150rpm, 3hr)
2		Prozyme 1000L	
3		Prozyme 2000P	
4		Alcalase	
5		Flavourzyme	
6		Neutrase	

- 효소의 처리 조건은 대두 분말, 대두단백 분말 및 쌀단백 분말을 각각 정제수에 10% 및 20%의 비율로 혼합한 후에 각각의 protease를 0.15% 첨가 후에 50°C에서 150rpm으로 교반하며 3시간 동안 효소 반응을 시켰음. 점도의 측정은 디지털 점도계(Brookfield, LVDV-II+)를 이용하여 상온에서 100rpm으로 측정하였으며 측정치는 centipoise(cP)로 표시함.
- 단백질 분해효소 처리 전 대두 분말은 비교적 정제수에 현탁이 잘 되는 것으로 확인 되었으며, 효소처리 전에 비해 효소처리 후에 점도가 크게 감소하는 것으로 확인됨. 한편 정제수에 대해 10% 혼합한 경우 효소처리 후의 점도감소는 크지 않았으나 20%까지 상승시킬 경우 효소처리 전보다 50% 이상 점도가 크게 감소하는 것으로 확인됨.

Table 21. Protease 처리에 따른 대두 분말의 점도 변화

		CON	1	2	3	4	5	6
Viscosity (cP)	10% soybean	3.67 ±0.08	3.45 ±0.08	3.59 ±0.24	3.11 ±0.08	3.89 ±0.06	3.64 ±0.13	3.54 ±0.08
	20% soybean	20.7 ±0.95	10.97 ±2.27	7.61 ±0.04	6.67 ±0.04	8.14 ±0.04	9.90 ±0.04	7.00 ±0.13

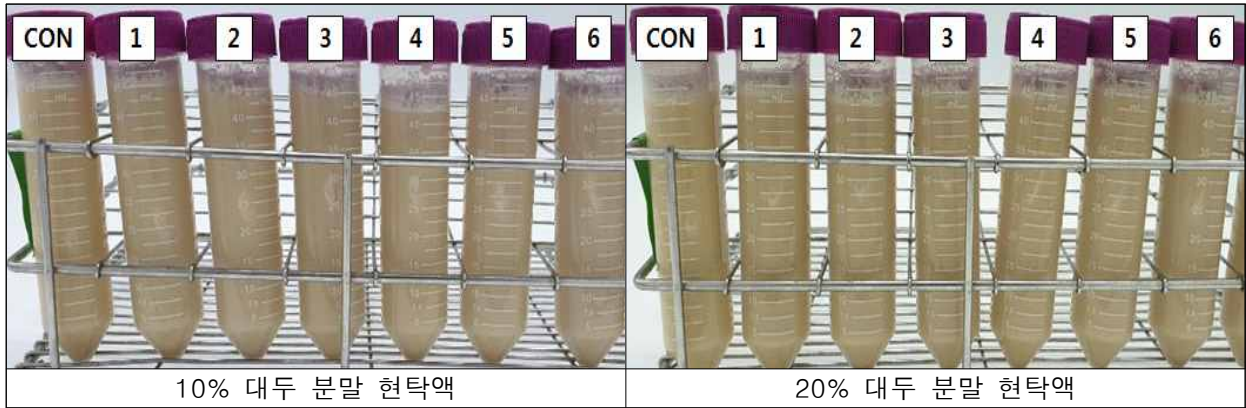


Figure 9. Protease 처리에 따른 대두 분말의 점도 변화

- 단백질 분해효소 처리 전 대두단백 분말은 정제수에 현탁이 잘 안되며 점도가 매우 높아 가공성이 매우 낮은 것으로 확인 되었으나, 효소처리 후에는 점도가 크게 감소하는 것으로 확인됨. 정제수에 대해 10% 혼합한 직후의 점도는 약 13cP로 높았으며 20%의 경우는 점성이 높아 점도측정이 불가능하였음. 효소처리 후에 10% 혼합비에서는 효소별로 차이는 있으나 약 1~3cP로 가공성은 좋은 것으로 확인되었음. 한편, 20% 혼합비에서는 Prozyme 2000P와 Alcalase가 점도감소가 매우 큰 것으로 확인 되었고 한편 Flavozyme 및 Neutrase의 활성이 가장 낮은 것으로 확인되었음

Table 22. Protease 처리에 따른 대두단백 분말의 점도 변화

		CON	1	2	3	4	5	6
Viscosity (cP)	10% soybean Protein	13.47 ±0.06	1.95 ±0.08	1.72 ±0.10	1.16 ±0.04	0.65 ±0.02	3.27 ±0.06	1.71 ±0.02
	20% soybean Protein	ND	12.73 ±0.57	12.17 ±0.12	3.20 ±0.43	3.58 ±0.08	56.00 ±1.08	26.03 ±0.06

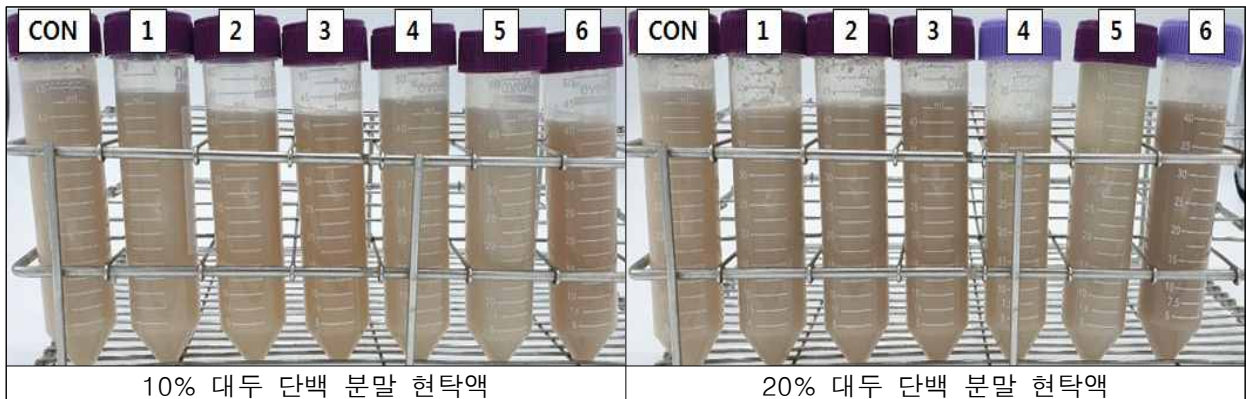


Figure 10. Protease 처리에 따른 대두단백 분말의 점도 변화



- 단백질 분해효소 처리 전 쌀단백 분말은 비교적 정제수에 현탁이 잘 되는 것으로 확인 되었으며, 한편 효소처리 전과 후에 점도의 변화가 크지 않은 것으로 확인됨. 한편 쌀단백 분말은 정제수와 혼합 시에 빠르게 침전되는 특성을 보이는데, 효소처리 후에 침전의 양이 감소된 것으로 확인할 수 있었음.

Table 4. Protease 처리에 따른 쌀단백 분말의 점도 변화

		CON	1	2	3	4	5	6
Viscosity (cP)	10% Rice Protein	0.53 ±0.01	0.64 ±0.02	0.77 ±0.03	0.93 ±0.02	0.68 ±0.01	0.62 ±0.01	0.76 ±0.01
	20% Rice Protein	0.67 ±0.04	0.45 ±0.04	0.42 ±0.02	0.90 ±0.04	0.51 ±0.06	0.68 ±0.02	0.49 ±0.04

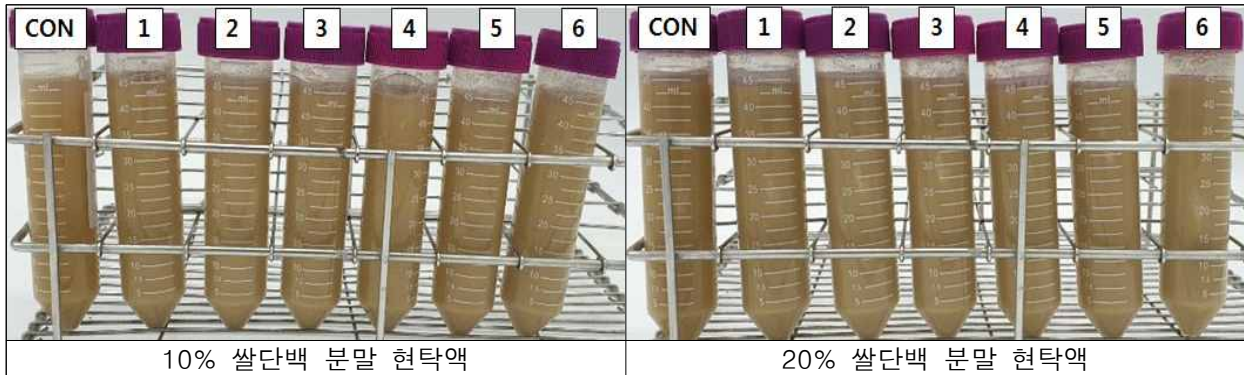


Figure 11. Protease 처리에 따른 쌀단백 분말의 점도 변화

- α-amylase 활성 시험을 위해 상업용 효소 2종에 대해서 기질로서는 쌀분말을 사용하여 원료의 혼합비에 따른 물성의 변화를 관찰하고자 하였음

Table 23. 상업용 α-amylase

No	종류	제품명	
1	α-amylase	SPEZYME® FRED	shaking incubation (60℃, 150rpm, 90min)
2		BioWin AG	1) incubation (105℃, 5min) 2) incubation (95℃, 90min)
3		BioWin AG+SPEZYME® FRED	1) shaking incubation (60℃, 150rpm, 90min) 2) incubation (105℃, 5min) 3) incubation (95℃, 90min)

- 효소의 처리 조건은 쌀분말을 정제수에 10, 20, 30, 40 및 50%의 비율로 혼합한 후에 SPEZYME® FRED는 60℃에서 150rpm으로 교반하며 90분간 반응 시키고, BioWin AG는 105℃에서 5분간 반응시킨 후에 95℃에서 다시 90분간 반응시켰으며, 2종의 효소를 혼합한 시료는 60℃에서 150rpm으로 교반하며 90분간 1차 반응 시킨 후, 105℃에서 5분간 2차 반응시키고, 다시 95℃에서 90분간 3차 반응을 시켰음.

- $\alpha$ -amylase 처리 전 쌀분말은 10~30%까지는 점도 높지 않았으나 40~50%의 혼합비에서는 점도가 크게 상승하는 것으로 확인되었으며, 비교적 정제수에 현탁이 잘 되는 것으로 확인됨. 효소처리 전과 후의 물성의 변화는 효소에 따라 크게 차이를 보였는데, SPEZYME® FRED는 효소처리 후에 점도를 감소 시켰으나 BioWin AG는 효소처리 후에 오히려 점도가 크게 상승하는 것으로 확인됨. 2종의 효소를 혼합하여 사용할 경우에는 점도가 크게 상승하지는 않는 것으로 확인됨

Table 24.  $\alpha$ -amylase 처리에 따른 쌀분말의 점도 변화

		CON	1	2	3
Viscosity (cP)	10% Rice	0.34±0.05	0.21±0.08	1.24±0.05	2.40±0.48
	20% Rice	0.36±0.02	0.24±0.03	1.75±0.13	0.68±0.11
	30% Rice	0.64±0.05	2.48±0.11	4.50±0.06	1.41±0.02
	40% Rice	2.87±0.03	2.72±0.03	52.00±0.14	3.64±0.16
	50% Rice	8.31±0.02	5.59±0.11	ND	9.25±0.08

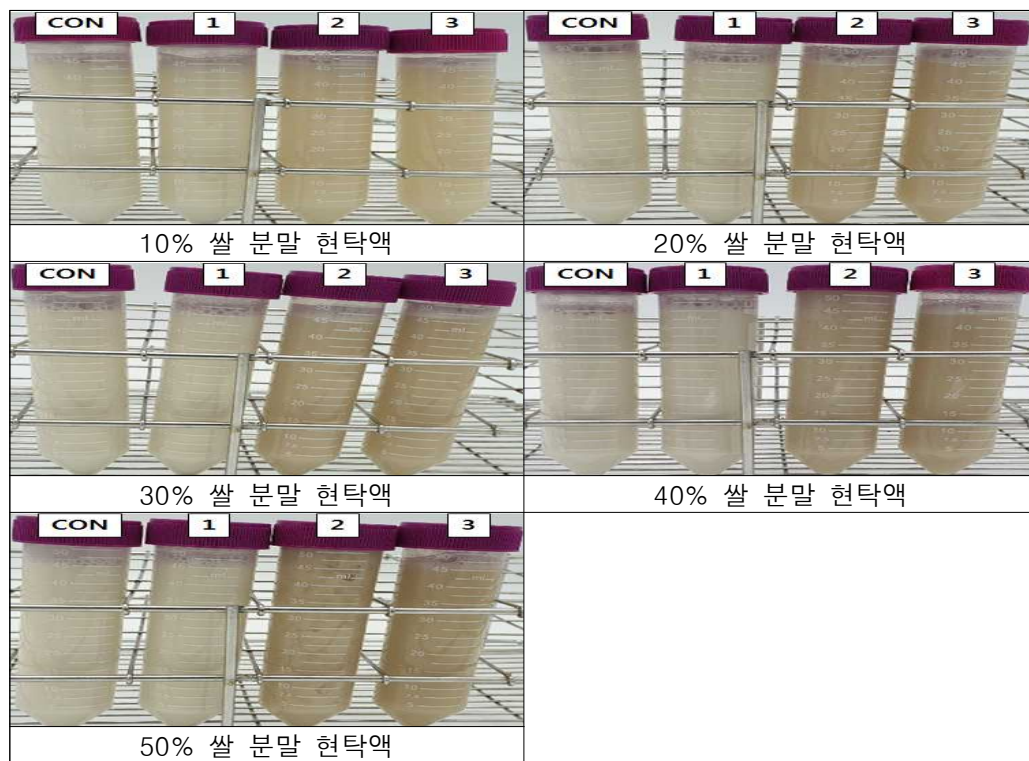


Figure 12.  $\alpha$ -amylase 처리에 따른 쌀분말의 점도 변화

○ 대두단백을 이용한 항고혈압 활성 생물전환 소재의 생산 기초 공정 설계

- 곡류 유래의 단백질 원료의 효소처리 및 발효공정을 통한 항고혈압 활성의 생물전환 활성 소재를 bioreactor 조건 내에서 대량 생산하기 위한 기초공정을 설계하고자 하였음. 원료로서는 대두단백(ISP)를 사용하였으며, 발효균주는 기존에 활성이 높았던 *L. rhamnosus* JDFM6를 사용하였음.
- 발효 전의 효소 전처리 단계는 실험실 조건에 따라 최대 혼합비인 20%를 상정하였으나 fermenter 내에서 용이하게 혼합되지 않아 생산 조건을 modify 하여 원재료 혼합 탱크에서 먼저 효소반응을 시켜 점도를 충분히 감소시킨 후에 fermenter로 이송하여 발효공정으로 진행하도록 변경하였음.
- 시험에 따른 전 공정은 다음과 같이 설계하였음.

제조공정	공정, 식품, 식품첨가물	비고
원재료 혼합	대두분리단백 (ISP)과 정제수를 1:5로 혼합	16.7% (200kg:1000kg) □
↓		
가수분해 (효소처리)	Protease 0.15% (w/w), 50 °C, 3h	1,200g □ 섞일정도, 낮은 rpm에서 교반
↓		
살균공정 후 냉각	95 °C, 20min, 37 °C	생략 (20% 액량증가)
↓		
주 발효	<i>L. rhamnosus</i> JDFM6 접종 0.5%	□ 전배양 (Flask □ 300L) 2 x 10 <sup>8</sup> cfu/ml 농도로 접종 150rpm, 37 °C, 15~24h
↓		
발효종료 및 멸균	121 °C, 20min	
↓		
동결(분무) 건조	V믹서 혼합	원료 수율에 따라 동결건조 또는 분무건조
↓		
제품분석 및 포장	수분, a.a, 아미노태질소, 관능 등	상온보관

- 대두단백의 시험 설계된 공정에 대해 소규모 pilot 생산 test를 수행하였으며, 수행 결과 양산에 가능한 수준의 생산성을 확보할 수 있을 것으로 확인되었음.

## ○ 대두단백 생물전환 소재 시제품의 유효성 평가

- 생물전환 공정으로 생산된 대두단백 소재에 대하여 혈관내피세포(HUVEC)를 이용하여 항고혈압과 관련된 지표들에 대한 영향을 평가하여 항고혈압 활성을 확인하고자 하였음.
- 세포독성 평가: HUVEC에서 발효 대두 추출물의 세포 독성을 확인하기 위해 MTS assay를 수행하였음. 96 well plate에  $1 \times 10^5$ 개의 HUVEC 세포를 seeding한 후, 24시간 동안 배양하였음. 그 후 발효 대두 추출물을 2~20  $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 처리하고 24시간 배양한 후 MTS (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)5-(3-carboxy-methoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium)용액(Promega, USA)을 각 well당 20  $\mu\text{l}$ 씩 첨가하여 37°C, 5%  $\text{CO}_2$  incubator에서 4시간 동안 반응시킨 후 580 nm에서 흡광도를 측정하였음.
- 대두단백 생물전환 소재를 2, 5, 10 및 20  $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 HUVEC 세포에 처리한 후 결과 처리 농도에 따라서 세포 사멸은 유발시키지 않는 것으로 나타남.

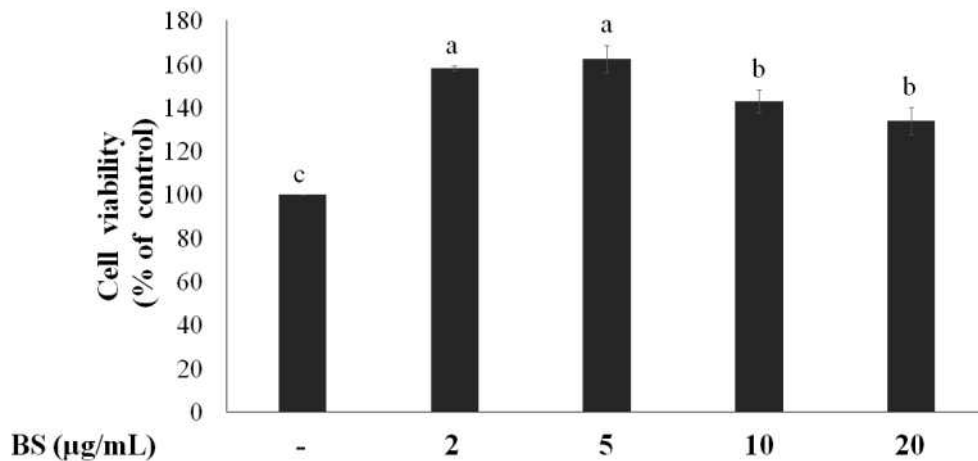


Figure 13. HUVEC에서 대두단백 생물전환 소재의 세포 독성

- Nitric oxide (NO) 생성 활성 측정: HUVEC을 96well plate에  $1 \times 10^5$  cells/well로 분주하여 24시간 동안 배양한 후 발효 대두 추출물을 2~20 $\mu\text{g/mL}$ ,  $\text{TNF-}\alpha$  20 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도로 처리하여 24시간 동안 배양하였음. 배양 후 얻은 배양액의 nitric oxide(NO) 생성 활성을 Nitric Oxide(NO) detection kit (iNtRON)를 이용하여 540nm에서 흡광도를 측정하였음.
- 대두단백 생물전환 소재를 2, 5, 10 및 20  $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 HUVEC 세포에 처리한 후 NO 생성률을 측정한 결과 시료의 처리 농도에 따라서 유의하게 NO의 생성이 증가하는 것으로 확인할 수 있었음. 따라서 대두단백 생물전환 소재는 NO 생성을 증가시킴으로서 고혈압에서 혈관의 확장을 통한 혈압조절 기능을 기대할 수 있을 것으로 평가됨.

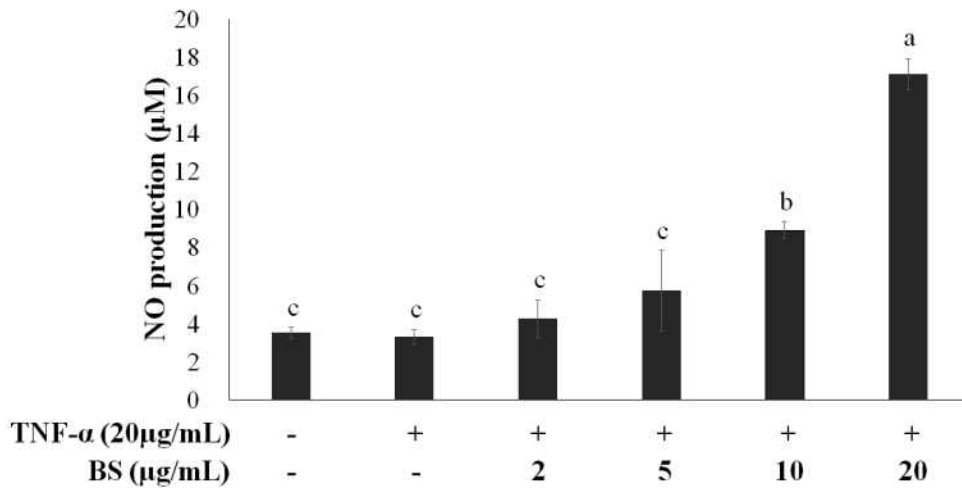


Figure 14. HUVEC에서 대두단백 생물전환 소재의 NO생성에 미치는 영향

- Hemoxygenase-1(HO-1) 활성 측정: HUVEC을 96well plate에  $1 \times 10^5$  cells/well로 분주하여 24시간 동안 배양한 후 발효 대두 추출물을 2~20 $\mu$ g/mL, TNF- $\alpha$  20 $\mu$ g/mL의 농도로 처리하여 24시간 동안 배양하였음. 배양 후 HUVEC 세포의 RNA를 추출하여 HO-1의 primer를 이용하여 RT-PCR을 수행하여 HO-1 유전자의 발현율을 평가하였음.
- 대두단백 생물전환 소재의 처치에 따라 HO-1의 발현이 유의하게 증가하는 것으로 확인할 수 있었음. HO-1은 항산화 기전에 중요하게 작용하며, 특히 고혈압에서 혈관 내피세포의 산화적 손상을 개선하고 carbon oxide의 생성을 촉진함으로써 혈관의 이완을 촉진한다. 따라서 대두단백 생물전환 소재의 처치는 고혈압에서 혈관이완을 통한 혈압조절 기능과 함께 혈관의 손상도 예방 및 개선할 수 있을 것으로 평가되었음.

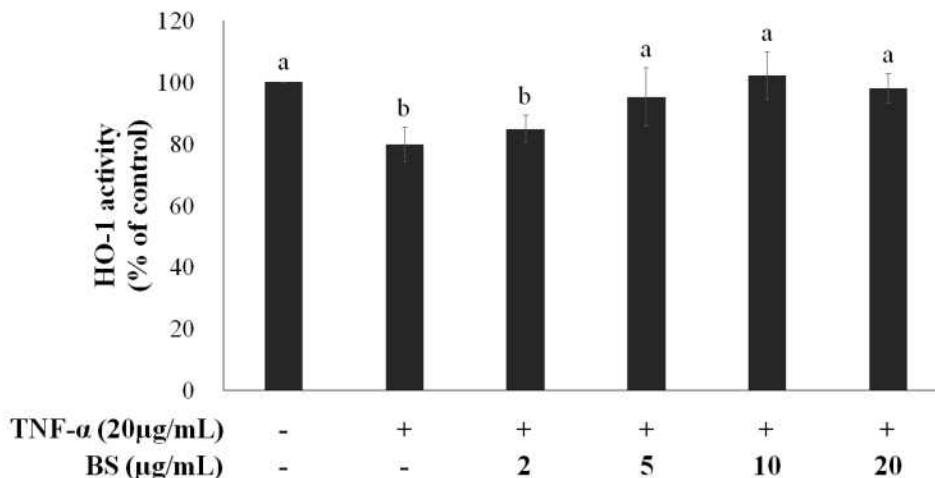


Figure 15. HUVEC에서 대두단백 생물전환 소재의 HO-1 활성에 미치는 영향

- Endothelin-1(ET-1) 생성 저해 활성 측정: HUVEC 세포를  $1.5 \times 10^5$  cells/well의 농도로 96well plate에 분주하여 24시간 후 TNF- $\alpha$  (20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )와 발효 대두 추출물을 농도별(2, 5, 10, 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )로 처리하여 18시간 배양하였음. 일정량의 상등액을 취해 Endothelin-1 Quantikine kit (R&D systems, USA)를 사용하여 ET-1 생성량을 측정하였음.
- 대두단백 생물전환 소재의 처리에 따라 ET-1의 발현이 유의하게 증가하는 것으로 확인할 수 있었음. ET-1은 혈관의 수축에 중요하게 작용하는 protein factor로서 특히 고혈압에서 혈압의 상승에 영향을 줌. 따라서 대두단백 생물전환 소재는 ET-1의 생성을 감소시킴으로서 고혈압에서 혈관의 확장을 통한 혈압조절 기능이 갖는 것으로 평가됨.

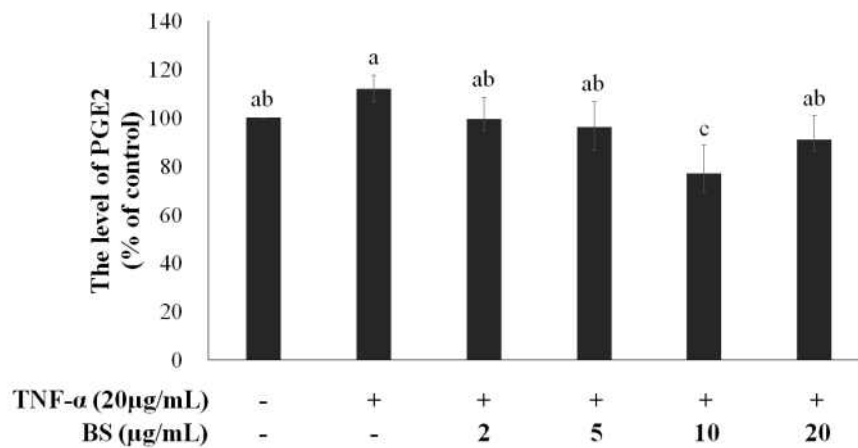


Figure 16. HUVEC에서 대두단백 생물전환 소재의 PGE2 생성에 미치는 영향

---

### ③ 국내산 곡물 자원의 생물전환 식품소재 지표 성분 규명 및 작용기전 규명

#### ○ 곡물 기반 기능성 소재 선별

- 국내산 곡물 자원을 이용한 생물전환 식품소재의 성분분석 및 항고혈압 활성 평가를 통해 우수 곡물 자원을 선별하였으며, 그 중 곡물 가공 음료에 제품화 적용을 위해 소재의 기능 성분 함량, 원료 가격 등 생산 단가 경제성을 고려하여 쌀단백분말, 대두분말을 선정하여 이후 연구를 진행하였음
- 항고혈압 및 장내균총 개선 기능의 식품소재를 개발하기 위한 생물전환 공정 중 최적의 효소 전처리 공정을 세팅하기 위하여 쌀, 대두 및 ISP 등 식품 원재료에 대한 다양한 식품용 효소제의 처리 조건에 따른 시료의 활성을 비교 평가하였음
- 쌀단백질 원료는 Prozyme 2000P를 처리한 시료에서 높은 ACE 억제 활성을 보였으며, 대두 분말의 경우는 Proalkaline protease, Prozyme 1000L이 비교적 높은 ACE 억제 활성을 보였고, Prozyme 2000P 및 flavozyme도 높은 ACE 억제 활성을 나타냈음.
- 한편, 대두분말의 생물전환공정 중 효소 전처리를 위한 최적 상용 효소제로는 처리 조건 및 경제성을 고려할 경우 Prozyme 2000P가 공정에 적합한 것으로 확인되어 생산공정에 사용하였음.

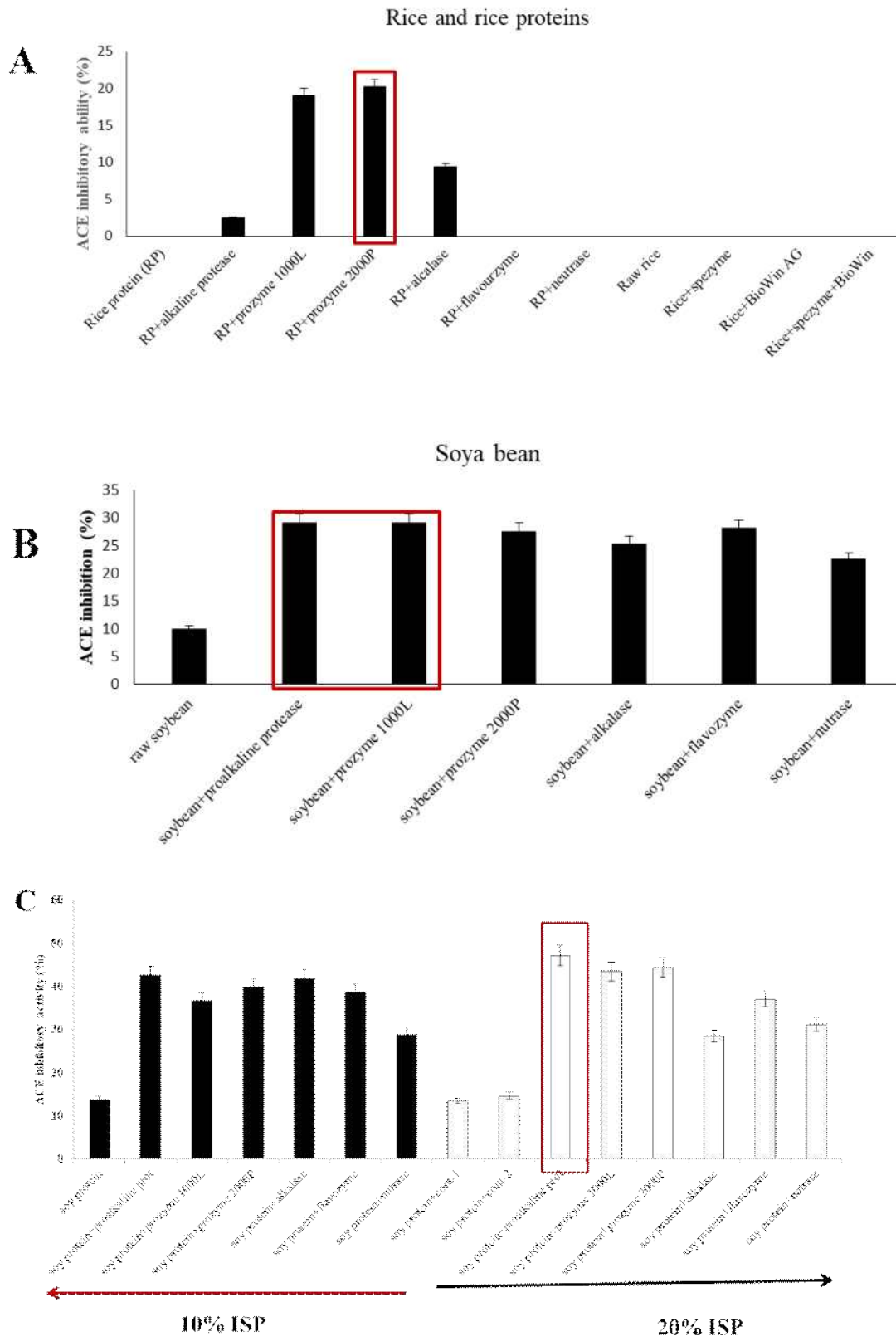


Figure 17. ACE inhibitory activity of proteins and legume samples (A) raw rice and rice peptides, (B) soya bean and (C) isolated soya bean.



○ 선별된 곡물들을 조합하여 높은 ACE 억제 활성을 가지는 유산균 스크리닝

- Prozyme 2000 처리된 쌀가루와 Prozyme 2000 처리된 콩가루를 조합하여 발효할 수 있는 최상의 유산균을 선별하기 위해 혼합된 분말 (1:1)을 12가지 유산균으로 발효하였음. 발효 후 *Pediococcus acidilactici* OHER4로 발효된 시료는 가장 강력한 ACE 억제 활성을 나타내었음.
- 이 박테리아는 KCTC (Korean Collection of Type Culture)에 등록을 위해 제출되었으며, 균주는 참조 번호 20210068로 *Pediococcus acidilactici* KCTC 21159로 기탁되었음.

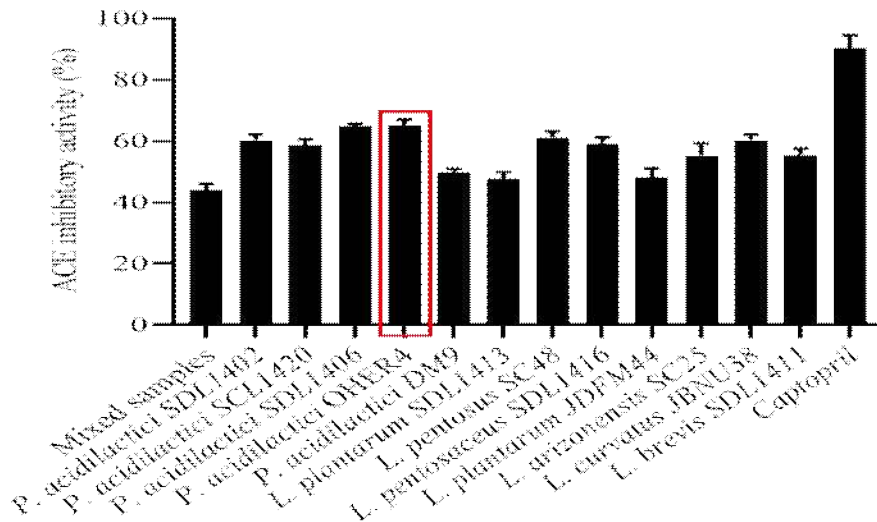


Figure 18. ACE inhibitory activities of mixed rice and soya bean samples fermented with different lactic acid bacteria.

## ○ 쌀 및 대두 혼합물의 발효 시간 및 온도 최적화

- 샘플 (쌀과 대두 혼합물)을 0시간 (미발효 샘플), 12시간, 24시간, 48시간 및 72시간 동안 발효시켰음. 발효 시간이 증가함에 따라 발효 시료의 ACE 억제 활성이 증가하는 것으로 관찰되었으나 24시간과 48시간 동안 발효된 샘플은 유의적인 차이를 나타내지 않았으며, 양산시의 경제성을 고려할 경우 24시간 및 48시간의 발효 시간이 적합한 것으로 확인되었음.

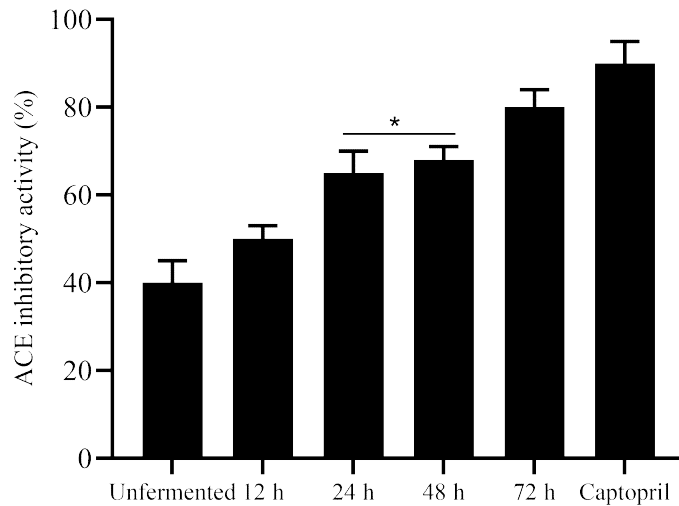


Figure 19. Effect of fermentation time on ACE inhibitory activity of mixed samples fermented with *Pediococcus acidilactici* OHER4.

- 발효 과정의 최적 온도를 확인하기 위해 혼합 쌀과 대두 샘플을 *Pediococcus acidilactici* OHER4로 발효시키고 30, 37 및 45°C에서 48시간 동안 배양한 후 ACE 활성을 비교 평가한 결과, 발효 온도가 증가함에 따라 ACE 활성억제가 유의하게 증가하였으나 큰 차이를 보이지 않아 공정의 경제성을 고려하여 37°C를 최적 공정으로 설정하였음.

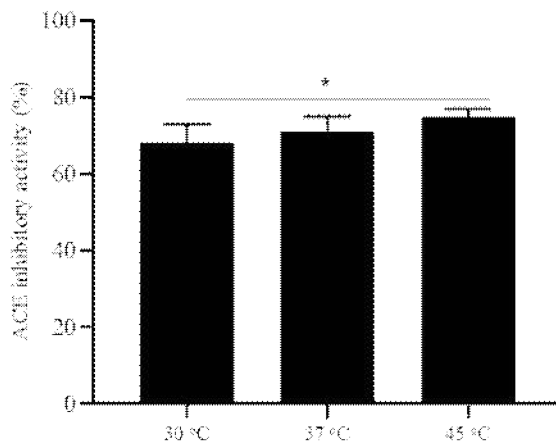


Figure 20. Effect of fermentation temperature (30, 37 and 45°C) on ACE inhibitory activity of mixed samples fermented with *Pediococcus acidilactici* OHER4 for 48h.

## ○ 쌀 및 쌀 발효 식품소재의 식품학적 분석

### - 쌀 및 쌀 발효 식품소재의 아미노산 분석

- 분석된 샘플에서 총 16개의 아미노산이 검출되었음. 본 연구에서 전분 제거된 쌀은 대부분의 아미노산이 모 단백질에 결합되어 있을 수 있기 때문에 최소한의 유리 아미노산 함량을 포함했음. 쌀 단백질을 Prozyme으로 가수 분해하면 페닐알라닌, 트레오닌, 메티오닌, 히스티딘 및 트립토판과 같은 다량의 필수 아미노산이 절단되고 방출되었음.
- 이러한 필수 아미노산의 수준은 히스티딘과 메티오닌을 제외하고 발효 후 크게 감소하였으며, 글루타민, 시스테인, 트립토판 및 피로 글루탐산은 Prozyme 처리된 샘플에 존재하지만 발효 과정에서 질소 요구 사항을 충족하기 위해 박테리아에 의해 소비되었기 때문에 발효된 샘플에서 검출되지 않았음. 한편 류신 (필수 아미노산)과 오르니틴, 아르기닌, 세린과 같은 일부 조건부 필수 아미노산의 수준은 발효 후 증가하였음(Figure 21).

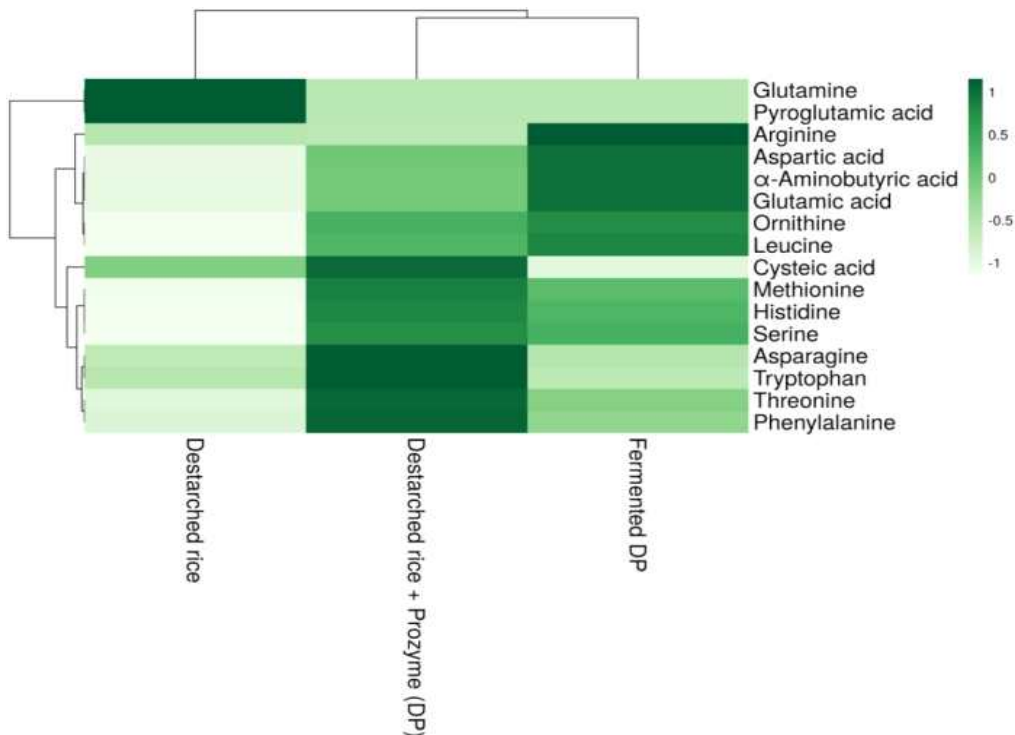


Figure 21. Relative levels of amino acids in destarched rice, Prozyme treated destarched rice (DP) and fermented DP. Heat map shows the different levels of organic acids present in the three samples. The color range from green to white represents higher to lower levels of amino acids.

- 쌀 및 쌀 발효 식품소재의 페놀 화합물 분석

- 본 연구에서 검출된 17개의 페놀 화합물 중 10개가 탈지 쌀에 존재하는 반면 9개는 Prozyme 처리 후에 검출되었음 (Figure 22). 그러나 발효된 샘플에는 16개의 페놀 화합물이 존재했으며 이는 발효 과정이  $\alpha$ -amylase 및 Prozyme 처리 후에도 쌀 매트릭스에 결합된 페놀 화합물의 유리를 효과적으로 향상시켰음을 의미함.
- 발효는 바닐산, 유제놀, 베라트르산, 에틸갈레이트, 에피갈로 카테킨, 아피게닌 및 크리소 파놀과 같은 강력한 항산화 제 및 항고혈압 페놀 화합물의 농축을 나타내었음. 본 연구는 미생물 발효가 곡물의 폴리 페놀을 증가시킨다는 것을 입증한 이전 연구와 일치함.

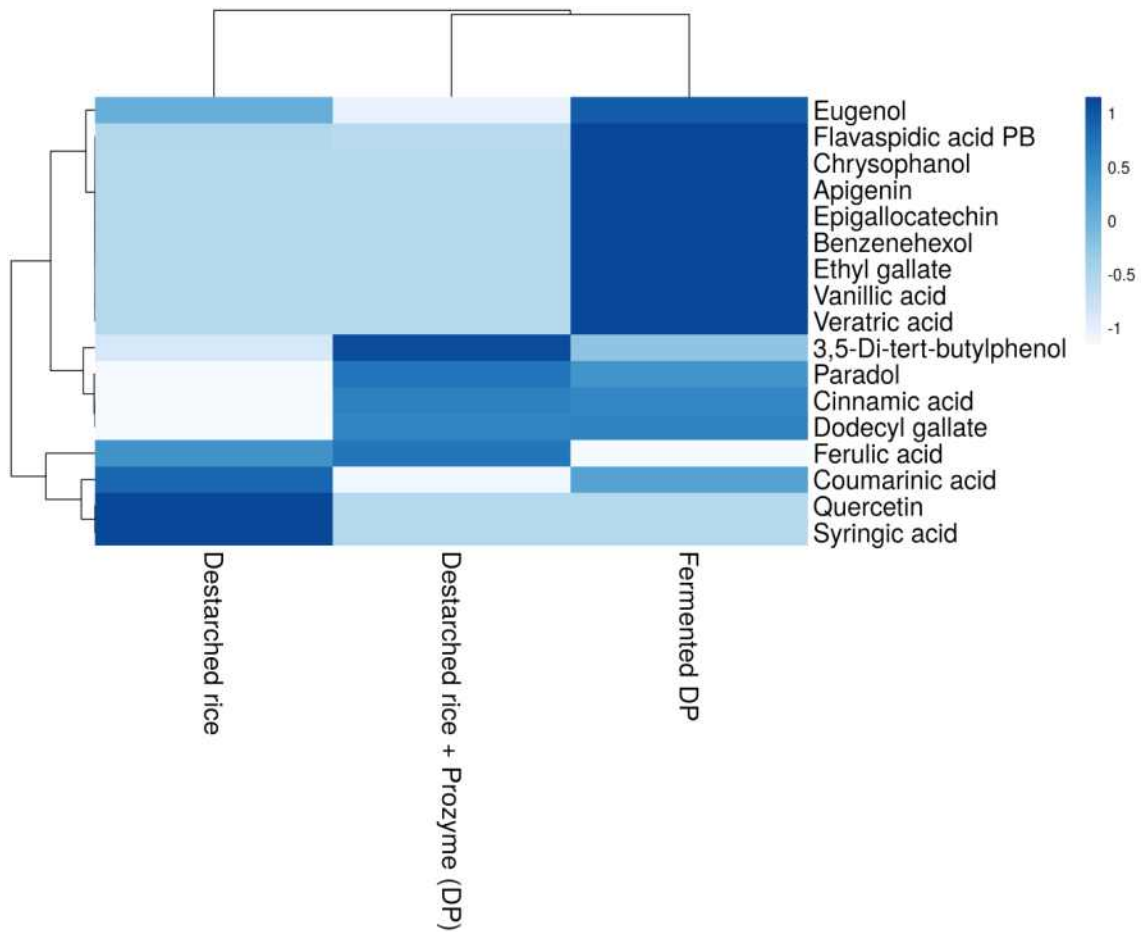


Figure 22. Relative levels of phenolic compounds in destarched rice, Prozyme treated destarched (DP) and fermented DP. Heat map shows the different levels of phenolic compounds present in the three samples. The color range from blue to white represents higher to lower levels of phenolic compounds.

- 쌀 및 쌀 발효 식품소재의 유기산 분석

- 모든 쌀 샘플에서 총 20개의 유기산이 검출되었음 (Figure 23). 10개의 유기산은 전분 제거된 쌀에서 검출되었고, 14개는 DP에서, 19개는 발효된 DP에서 검출되었음. 발효된 샘플만 호모 시트르산, 구연산, 비니코틴산, 디옥소헵탄산, 옥소부티르산 및 히드록시부탄산을 함유하였음. 한편, 부티르산, 니코틴산 및 구연산은 향고혈압 화합물로 알려져 있으므로 발효물이 풍부해져 잠재적인 향고혈압 기능성 식품임.

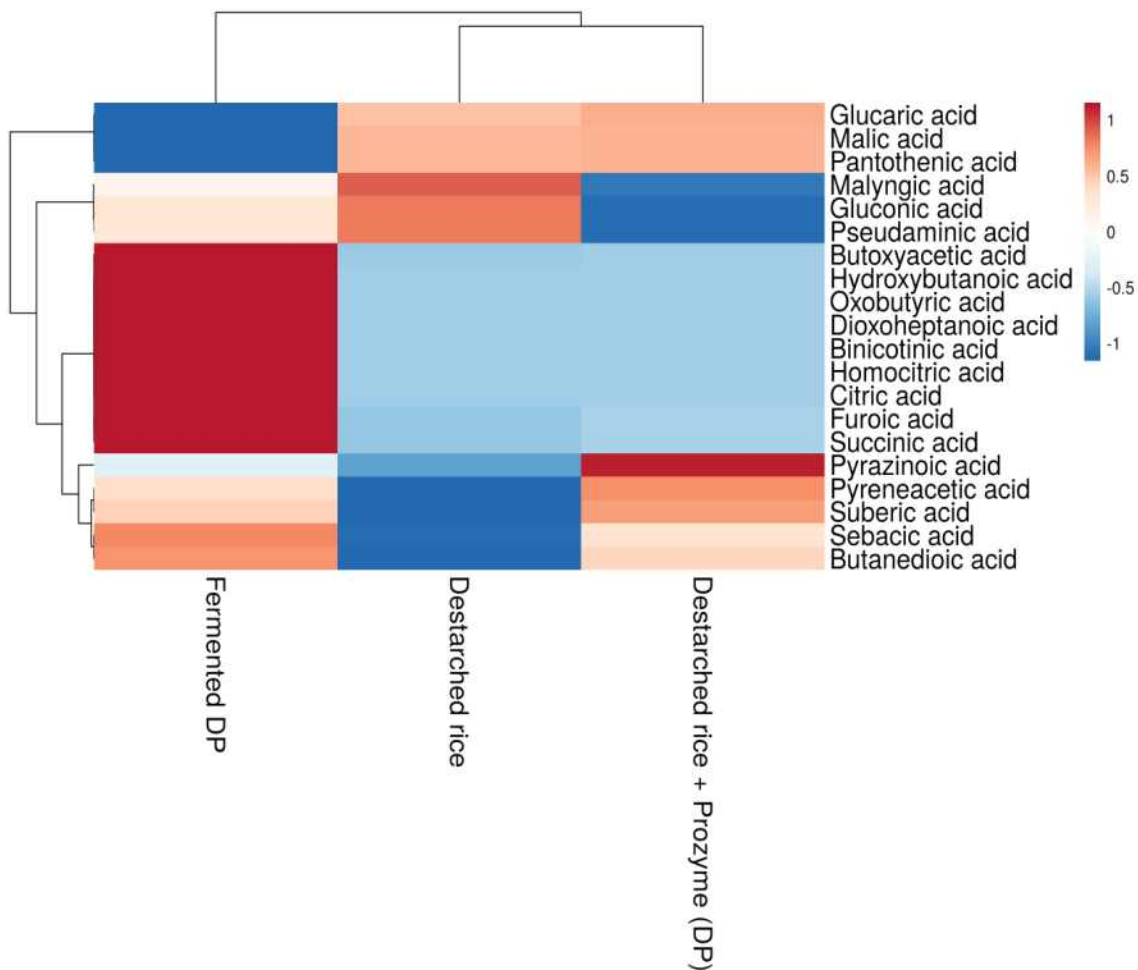


Figure 23. Relative levels of organic acids and volatile compounds in destarched rice, Prozyme treated destarched rice (DP) and fermented DP. Heat map shows the different levels of organic acids present in the three samples. The color range from red to blue represents higher to lower levels of organic acids.

- 쌀 및 쌀 발효 식품소재의 지방산 분석

- 본 연구에서는 *Pediococcus acidilactici* OHER4 발효는 쌀 샘플의 지방산 수준을 전반적으로 감소시켰음 (Figure 24). 스테아르산 (항산화 지방산)의 수치는 약간 증가된 반면 라우르산 (항고혈압 지방산)은 발효물에서 여전히 검출 가능했음.

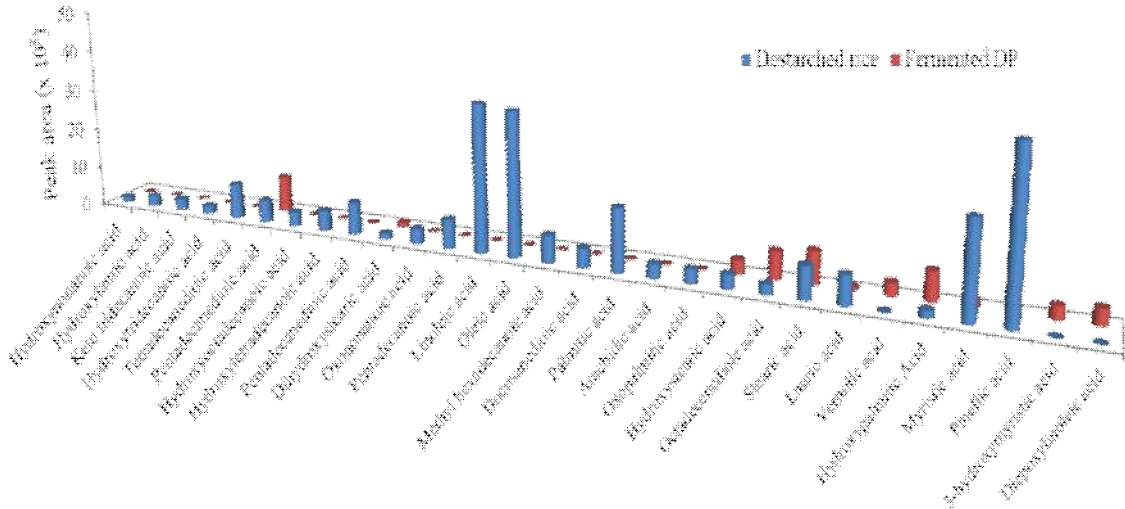


Figure 24. The relative levels of fatty acids in destarched rice and fermented DP.

## ○ 대두 및 대두 발효 식품소재의 식품학적 분석

### - 대두 및 대두 발효 식품소재의 아미노산 분석

- 샘플 분석 후 22개의 아미노산이 검출되었음 (Figure 25). 생 대두 샘플에는 유리 아미노산이 거의 없었지만 Prozyme으로 처리하면 티로신, 세린, 트레오닌, 아르기닌 및 호모티로신 수치가 증가했음. 이것은 Prozyme이 모단백질에서 결합된 아미노산을 가수분해하여 배지에서 사용할 수 있도록 하는 능력 때문일 수 있음.
- 이후 가수 분해물의 발효는 19개 아미노산의 수준을 상당히 증가시키면서 티로신, 세린, 트레오닌 및 호모티로신의 수준을 감소시켰음. 이러한 아미노산은 발효 과정에서 박테리아에 의해 소비되었을 가능성이 있음. 한편 발효는 히스티딘, 류신, 라이신, 메티오닌, 페닐알라닌 및 트립토판과 같은 필수 아미노산의 농축을 일으켰으며, 또한 높은 수준의  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA)를 가졌음을 확인함.

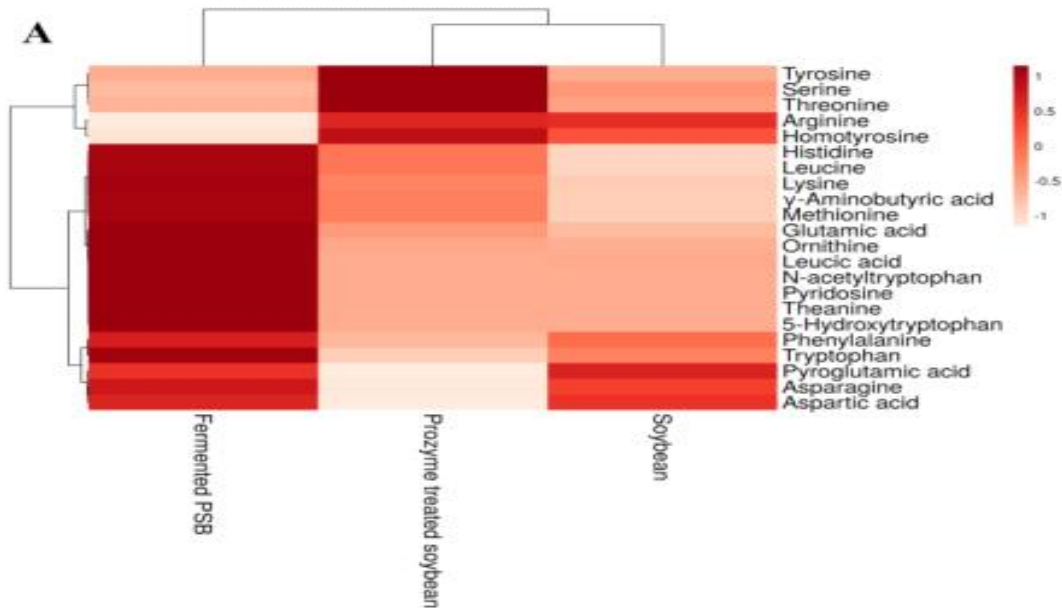


Figure 25. Relative amino acid levels in soybean, Prozyme treated soybean, and fermented PSB. The heat map shows the different amounts of amino acids in the three samples. The color range from red to white indicates high to low levels of amino acids.

- 대두 및 대두 발효 식품소재의 페놀 화합물 분석

- 본 연구에서 글루코시린산, 엔젤레틴, 글리시틴, 디히드록시-4-페닐쿠마린, 페디플라본, 가르반졸 및 포르모노네티나과 같은 페놀 화합물은 생 대두에서 검출되지 않았지만 Prozyme 처리 후에 검출되었음 (Figure 26). 이것은 페놀 화합물이 생 대두 샘플의 단백질에 결합되어 있었으나, Prozyme의 가수분해로 인해 발효물에서 함량을 향상시켰음.
- Prozyme 가수 분해물의 발효물에서는 포르모노네티나, 맥시마이소플라본 H, 아카세틴, 퀘스트린, 엠벨산, 베라틱산, 쿠마로일알 다르산 1, 노르베르게닌, 노호파긴, 아밀갈레이트, 아포시닌, 테트라히드록시스틸벤, 맥시마이소플라본 H 및 포르피라-334 모두 발견되지 않았음. 대두나 효소 처리 된 샘플에서, 흥미롭게도 제니스틴 (이소 플라본)은 발효되지 않은 샘플 (생 대두 및 PSB)에만 존재했지만 발효 후에는 존재하지 않았음. 그러나 그 유도체인 acacetin과 isogentisin은 발효 후에만 존재했음.
- 이것은 *Pediococcus acidilactici* OHER4가 genistin (isoflavone)의 acacetin (flavone)과 isogentisin (폴리 페놀 및 방향족 에스테르)으로의 생물학적 전환을 유발했을 수 있음을 나타냄 (Figure 26). 유사하게, 미발효 샘플에만 존재하는 diazein은 발효 후 daidzein 6''-O-acetate로 전환되었음. 전반적으로 우리는 발효가 대두에 존재하는 페놀 화합물의 수준을 증가시키는 것을 관찰했으며 이는 많은 이전 연구와 일치함.

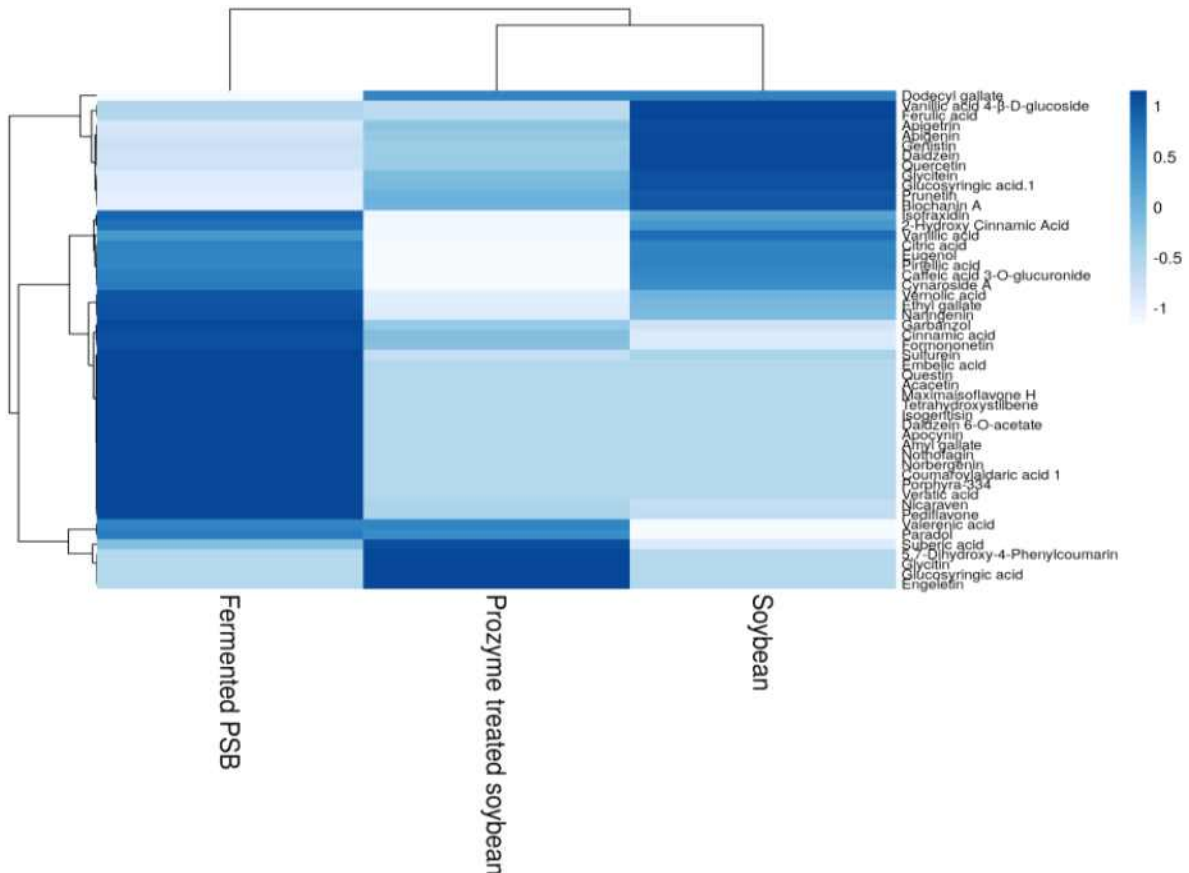


Figure 26. Relative levels of phenolic and antioxidant compounds in soybean, Prozyme treated soybean, and fermented PSB. The heat map shows the different levels of phenolic compounds and antioxidants in the three samples. The color range from blue to white indicates high to low levels of the phenolic compounds and antioxidants.



- 대두 및 대두 발효 식품소재의 지방산 분석

- 대두를 Prozyme으로 처리 시 5-하이드록시데칸산, 2-하이드록시프로필 라우레이트, 헥사데칸산, 13-메틸펜타데칸산 및 메틸 2-설포미리스테이트가 검출되었음. 이것은 지질이 생 대두에 지단백질 복합체로 존재하여 효소 가수 분해 후에 분리되었기 때문일 것이라고 추정 하였음.
- 이후 가수 분해물의 발효는 총 지질 수준을 크게 증가시켰으며 (Figure 27), 특히 라우르산 (항고혈압성 지방산)의 수준은 증가한 반면, 스테아린산 (항산화제) 의 수준은 효소 처리 및 발효 후에 크게 변하지 않았음.

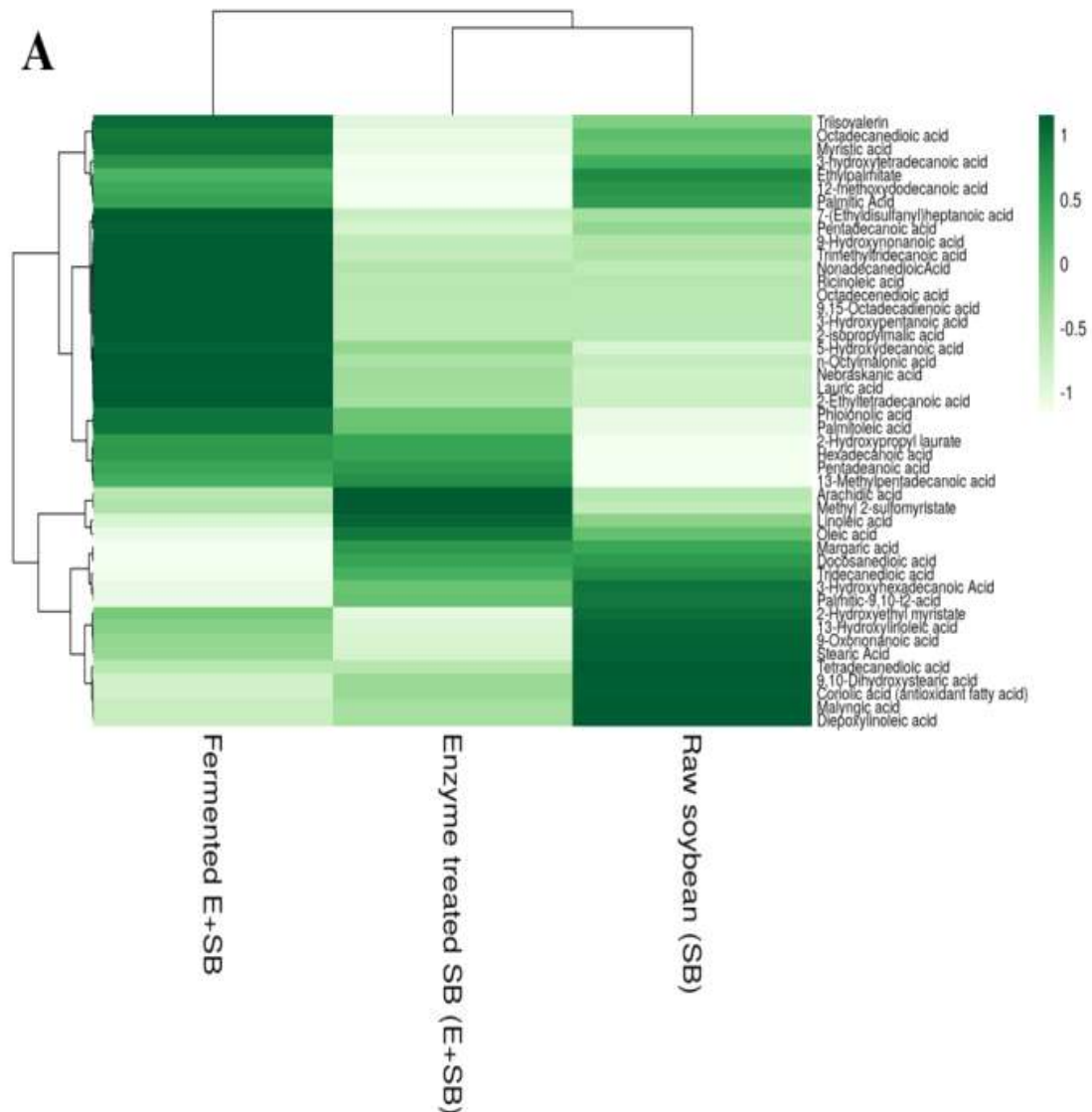


Figure 27. Relative levels of fatty acids in soybean, Prozyme treated soybean, and fermented PSB. The heat map shows the different levels of fatty acids in the three samples. The color range from green to white indicates high to low levels of the fatty acids.

## ○ 위장 효소에 대한 대두 발효 식품 소재의 안정성

- 소규모 생산된 대두발효 식품소재에 대하여 위장관내 소화효소인 pepsin 및 pancreatin을 처리한 후 활성을 측정하여 안정성을 평가하고자 하였음(Figure 28).
- Pepsin 및 pancreatin의 처리 전에 대하여 처리 후에도 대두 발효 식품소재의 ACE 억제 활성은 크게 감소하지 않아 생산된 원료가 소화관 내에서도 안정성이 유지되는 것으로 확인되어 식품소재로서 사용가치가 높은 것으로 확인할 수 있었음.

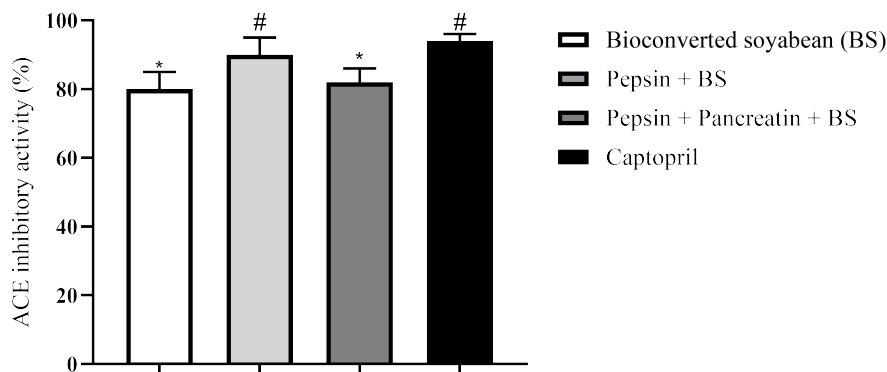


Figure 28. Stability of ACE inhibitory activity of the bioconverted soya bean samples after treatment with gastrointestinal enzymes.

## ○ 생물 전환된 대두(BSB)의 항고혈압 효능 in vivo 평가

### – 생물 전환 대두(BSB)의 항고혈압 효능

- SHR에 BSB를 섭취시켰을 시 혈압이 크게 감소시켰으며, Captopril은 BSB보다 SHR의 혈압을 더 유의하게 감소시켰음. BSB는 복용량에 따라 혈압을 낮추었으며, 3주 차에는 BSB의 500mg/kg 체중을 섭취한 SHR과 50mg/kg의 captopril을 섭취한 SHR간에 수축기 혈압에 유의한 차이가 없었음.
- BSB 섭취는 정상 (비고혈압) 쥐의 혈압에 영향을 미치지 않았으며, 500mg/kg 섭취한 쥐에 비해 50mg/kg 섭취한 쥐가 DBP를 더 잘 조절하였음 (Figure 30).
- SHR+Captopril 군은 가장 높은 혈압 감소를 보였으며, 이어 SHR+500mg/kg 군이 두 번째로 높은 혈압 감소를 보였음. 또한 SHR+50mg/kg 군은 수축기 혈압을 감소시키지 않았지만 전체적인 혈압 증가를 유의미하게 억제하였음.

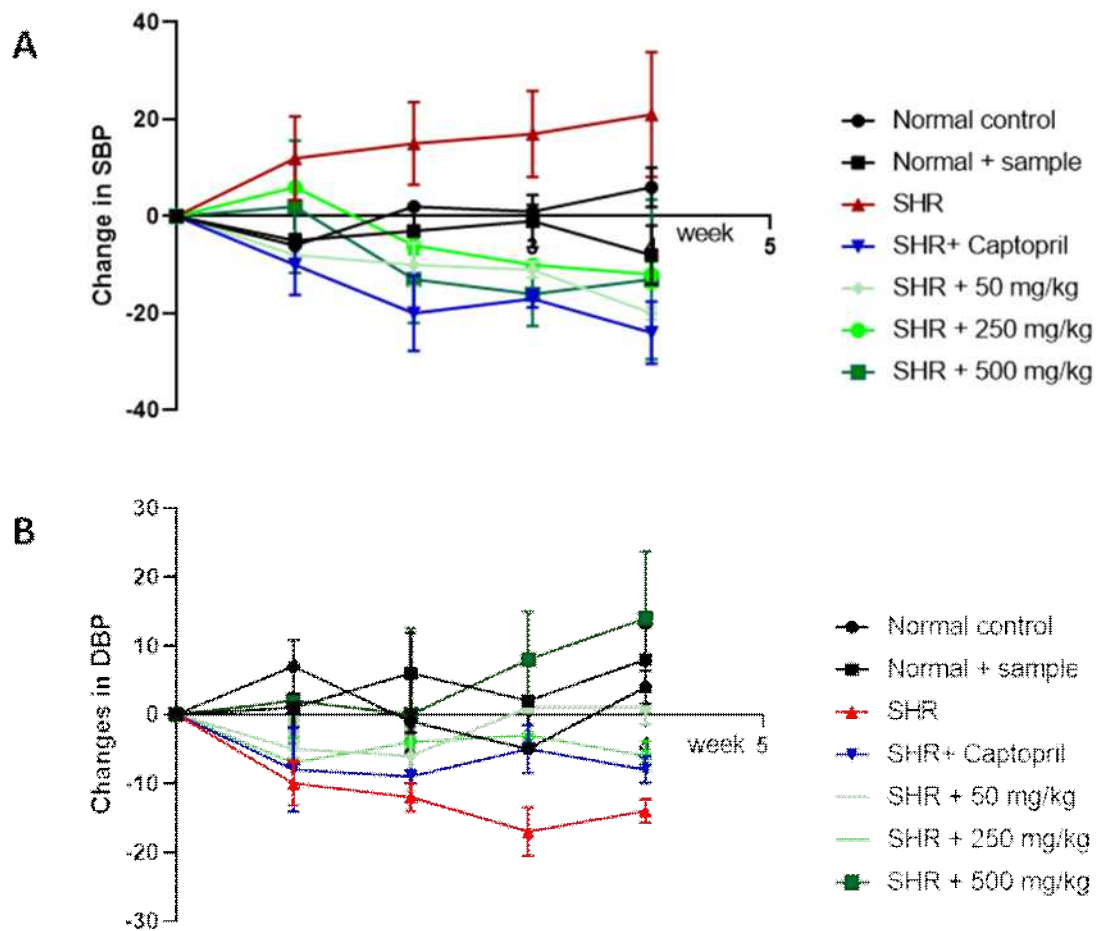


Figure 29. Antihypertensive ability of BSB. (A) Changes in systolic blood pressure and (B) changes in diastolic blood pressure in the experimental animals.

- BSB 섭취에 의한 사료 섭취량 및 체중 변화 분석

- 사료의 섭취 증가는 과도한 체중 증가를 초래하여 비만으로 이어지고 혈압상승을 유발할 수 있으므로, BSB 섭취가 사료 섭취에 미치는 영향 및 체중 증가를 분석한 결과 BSB의 섭취는 실험군이 섭취하는 사료의 양에 유의적인 영향을 미치지 않았으며, 또한 체중의 변화에도 영향을 미치지 않았음(Figure 30, 31).
- 따라서 SHR군에 대하여 BSB의 섭취는 식이를 억제하지 않으면서, 항고혈압 효능을 가지는 것을 시사함.

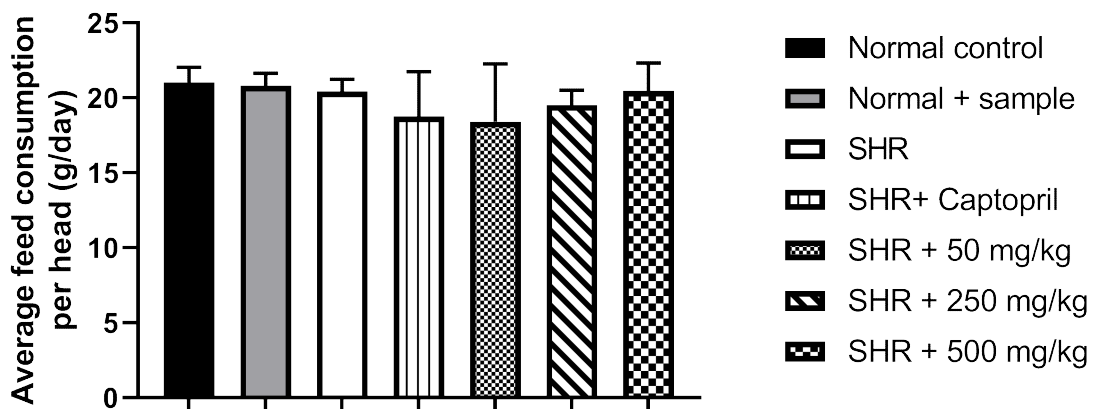


Figure 30. Effect of BSB consumption on feed consumption in experimental animals. The animals in each group were provided with equal amounts of feed per day. Each bar represents the mean of feed consumed by each rat ( $n = 5$ )  $\pm$  SEM in each group per day ( $p > 0.05$ ).

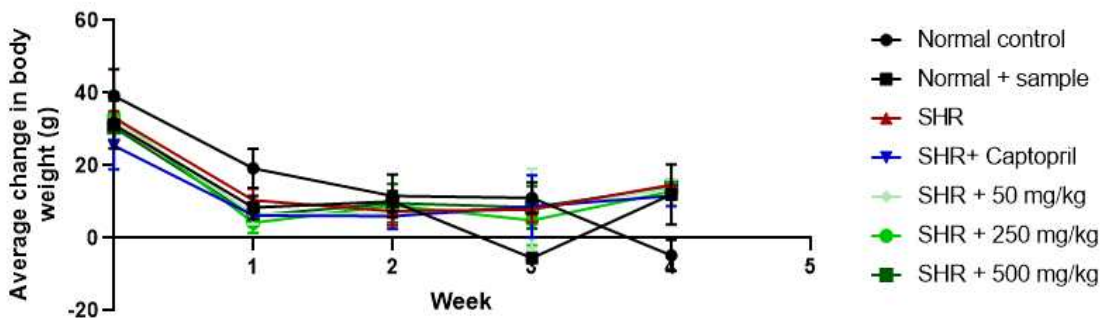


Figure 31. Effect of BSB consumption on the body weights of experimental animals. The animals in each group were provided with equal amounts of feed per day. Each data point represents the mean of the weight of each rat ( $n = 5$ )  $\pm$  SEM in each group per week ( $p > 0.05$ ).

○ BSB 섭취에 의한 혈중 지질 분석

- 고혈압과 고콜레스테롤 혈증은 상관관계가 있고, 혈관 벽의 콜레스테롤 플라크에 의해 혈관이 좁아지고 혈압이 증가시킬수 있으므로 BSB 섭취가 HDL-c, LDL-c 및 중성지방에 미치는 영향을 평가하였음
- BSB 섭취에 의해 모든 실험군에서 HDL-c의 수준을 증가시켰으며, SHR+500 mg/kg 군의 HDL-c의 수준은 음성대조군과 유사하였음
- BSB의 섭취량에 따라 LDL-c/VLDL-c를 감소시켰으며, SHR+500 mg/kg 군의 LDL-c의 수준은 음성대조군과 유사하였으나, 총 트리글리세라이드에는 영향을 미치지 않았음

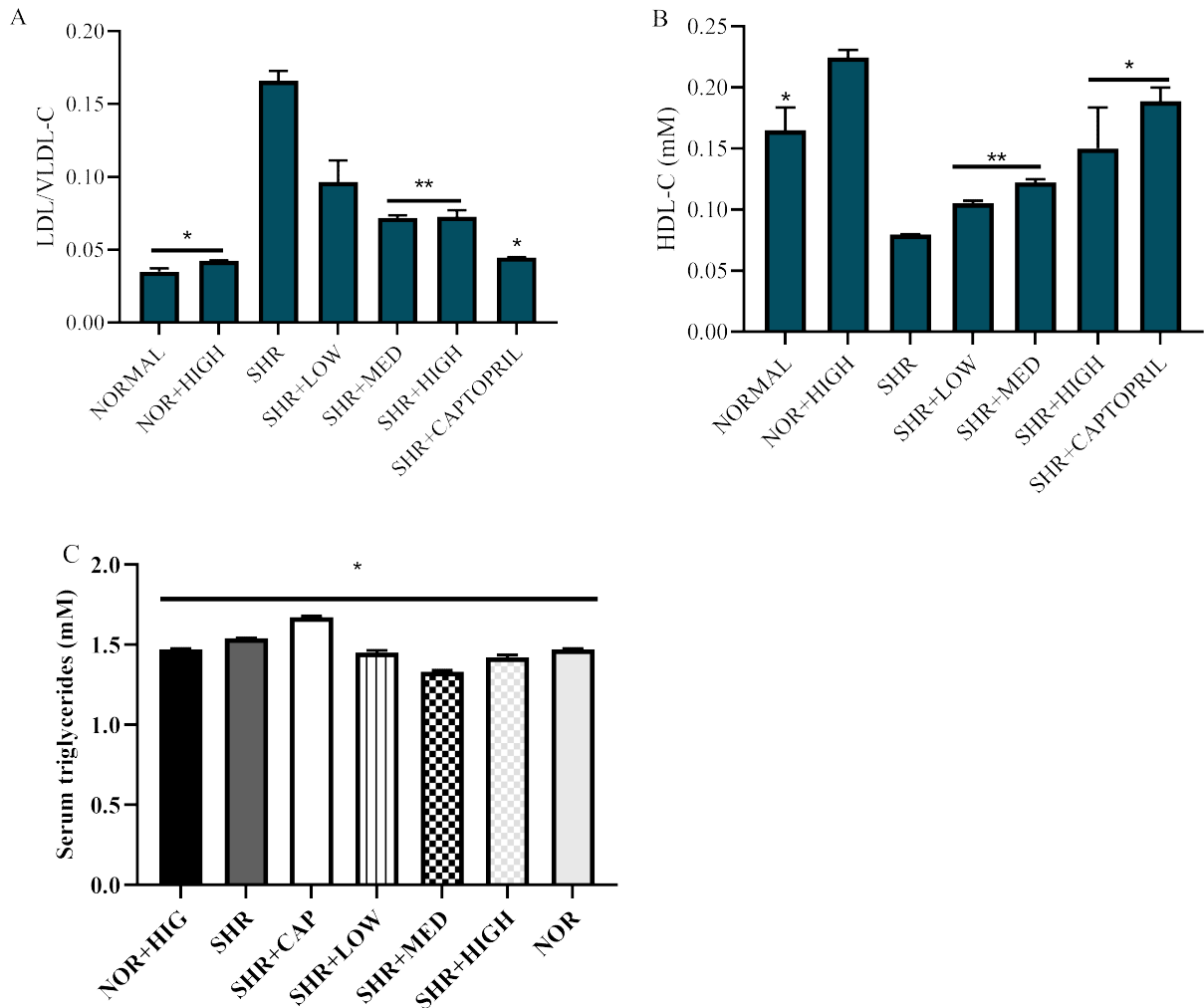


Figure 32. Effects of BSB consumption on A. serum low density lipoprotein cholesterol (LDL-c/vLDL-c), B. High density lipoprotein cholesterol (HDL-c) and C. Total serum triglycerides. Bars with (\*) are not significantly different. Bars represent means of three readings  $\pm$  SD. NOR= Wistar Kyoto rats, CAP= captopril, LOW= 50mgKg BSB, MID= 250mgKg BSB, HIGH = 500mgKg BSB.

## ○ BSB 섭취에 의한 SHR의 장내 균총 조절 효능

### – Alpha diversity

- SHR의 장내 미생물 균총은 풍부함(Chao1)을 나타내었지만 가장 낮은 다양성(Shannon index)과 가장 얇은 균일도(Simpson's index)를 나타내어 장내 균총의 불균형을 확인하였음.
- 한편, BSB를 섭취한 SHR의 장내 미생물 균총에서는 풍부함과 균일도가 개선되었음을 확인하였음

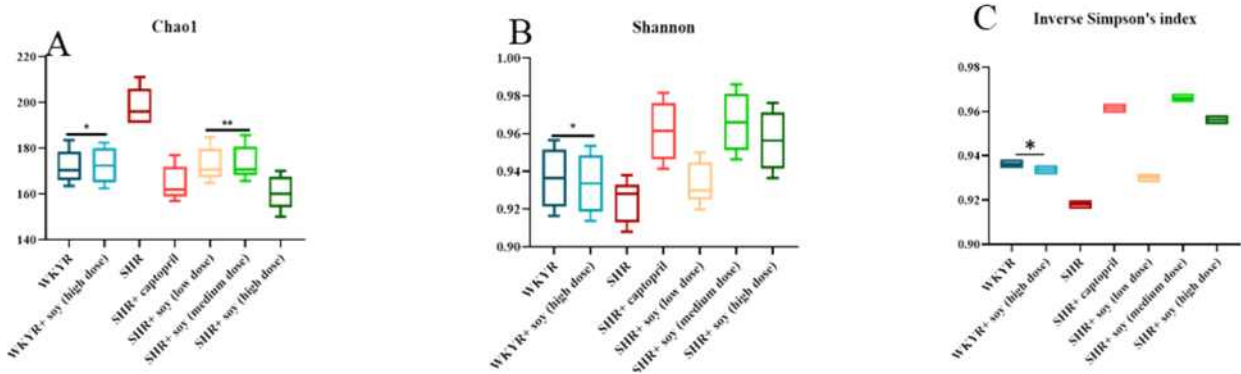


Figure 33. The comparison of gut microbiota alpha diversity between each group, including species richness (represented by Chao1) and evenness (represented by Shannon and inverse Simpson index). Box plots with (\*) were not significantly different ( $p > 0.05$ ).

### – Beta diversity

- 16S rDNA 시퀀싱을 통해 고혈압의 처리군 쥐와 정상군 쥐의 장에서 장내 균총 분석을 진행함.
- 시퀀싱 결과를 바탕으로 2D 차트에 표시된대로 주요 구성요소에 대해 분석되었으며, SHR 그룹과 처리군에서 현저한 분리가 관찰됨(Figure 34).
- BSB를 섭취한 SHR군과 정상군 사이에 유의한 구분은 나타나지 않았으며, BSB 섭취가 SHR의 장내 균총을 정상군 쥐와 유사하게 형성되는 영향 주는 것을 나타냄.

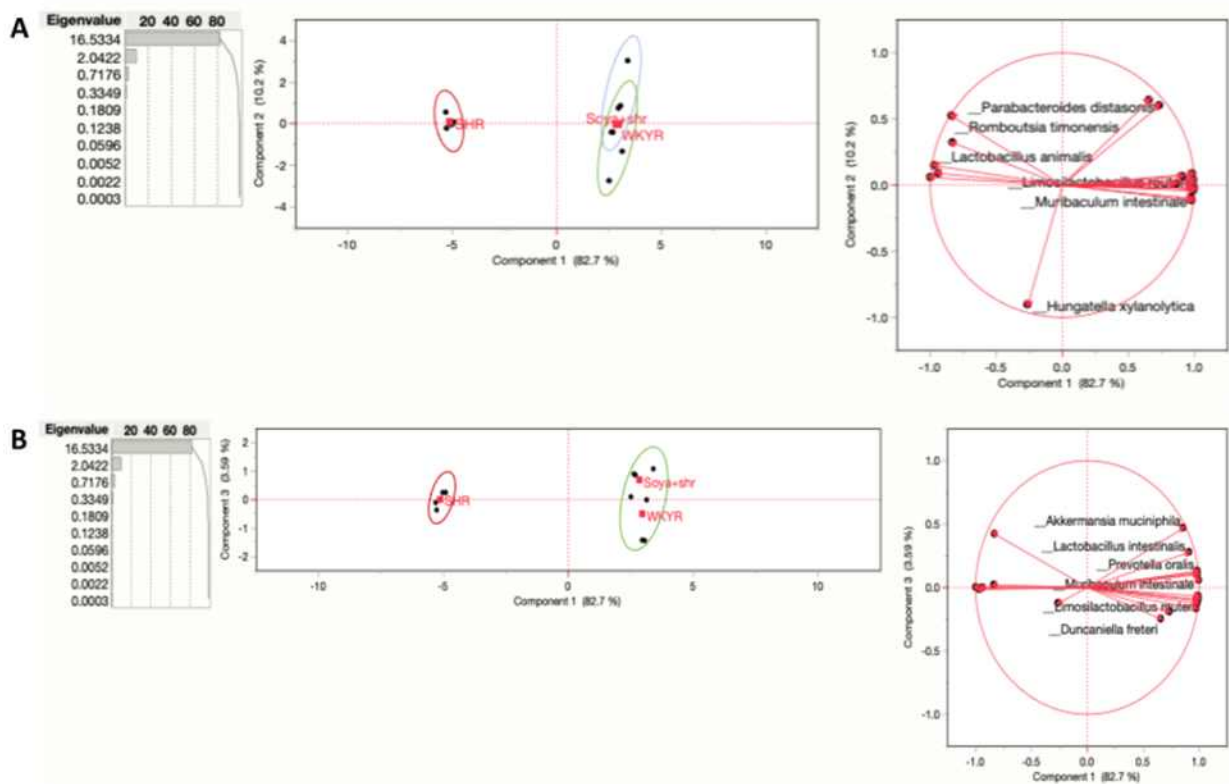


Figure 34. Distinct features of the gut microbiota composition in the rat groups. A and B) PCoA analysis of the 16S rRNA sequencing showing in 2D view. Each of the dots represents data from one rat and each eclipse represents the rat group they belonged to.

- BSB 섭취에 의한 장내 균총 변화 분석

- BSB 섭취에 의한 장내 균총 변화는 각 실험군의 분변 샘플로부터 미생물군 유전체 분석을 통해 확인하였으며, SHR군의 장내 균총 내 주요 문의 변화를 확인하였음
- SHR은 정상혈압군에 비해 높은 Firmicutes/Bacteroidetes의 비율을 보였으나, BSB를 섭취한 SHR군에서 Firmicutes/Bacteroidetes의 비율이 크게 감소하였음.

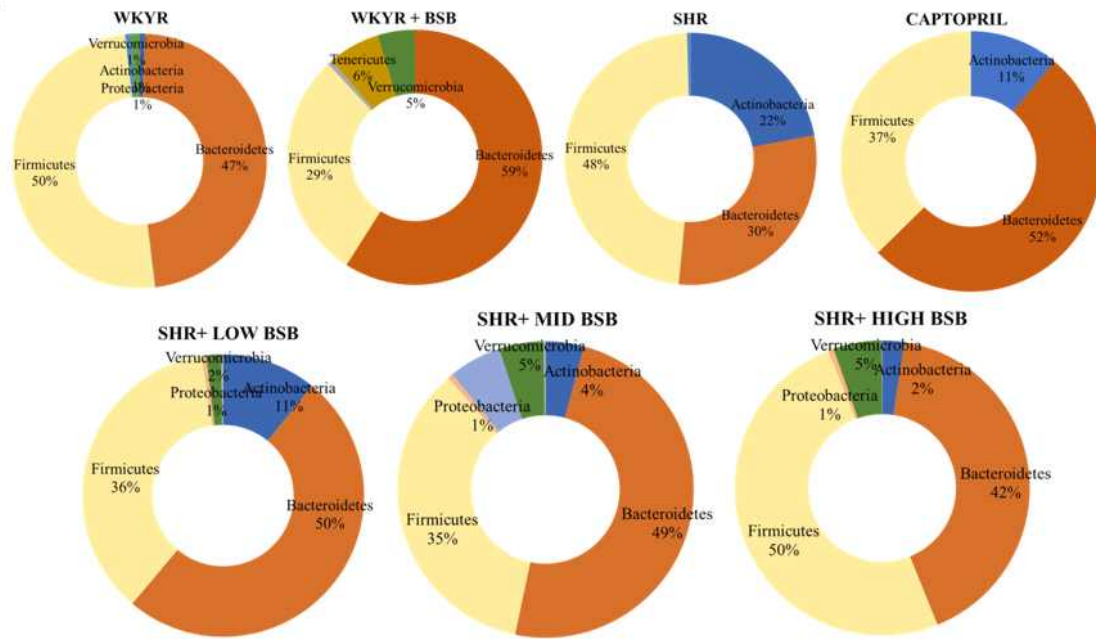


Figure 35. The effect of BSB and Captopril administration on the gut microbiota of Wistar Kyoto rats and spontaneous hypertensive rats. The yellow sections represent Firmicutes populations and brown indicate Bacteroidetes. Fecal samples were collected from spontaneous hypertensive rats (n=5), the BSB group (n=5), Captopril group (n=5) and Wistar Kyoto rats (n=5).



## ○ 생물전환 식품 소재의 프리바이오틱스 기능

- 음성 대조군의 분변에서 검출된 *Akkermansia muciniphila*는 전체 분변 미생물군의 1.1%를 형성한 반면, *Bifidobacterium animalis*는 0.67%를 형성하였음.
- BSB를 섭취한 음성 대조군의 경우 *A.muciniphila* 개체군을 5%로 증가시켰지만, *B. animalis*는 검출되지 않았음. 한편, SHR에서 *B.animalis*는 검출된 미생물 개체군의 21.97%를 형성했으며, *A.muciniphila*는 검출되지 않았음
- BSB를 섭취한 SHR은 *A.muciniphila*의 개체군이 증가하였으며, *B.animalis*는 BSB의 섭취량에 따라 감소하였음

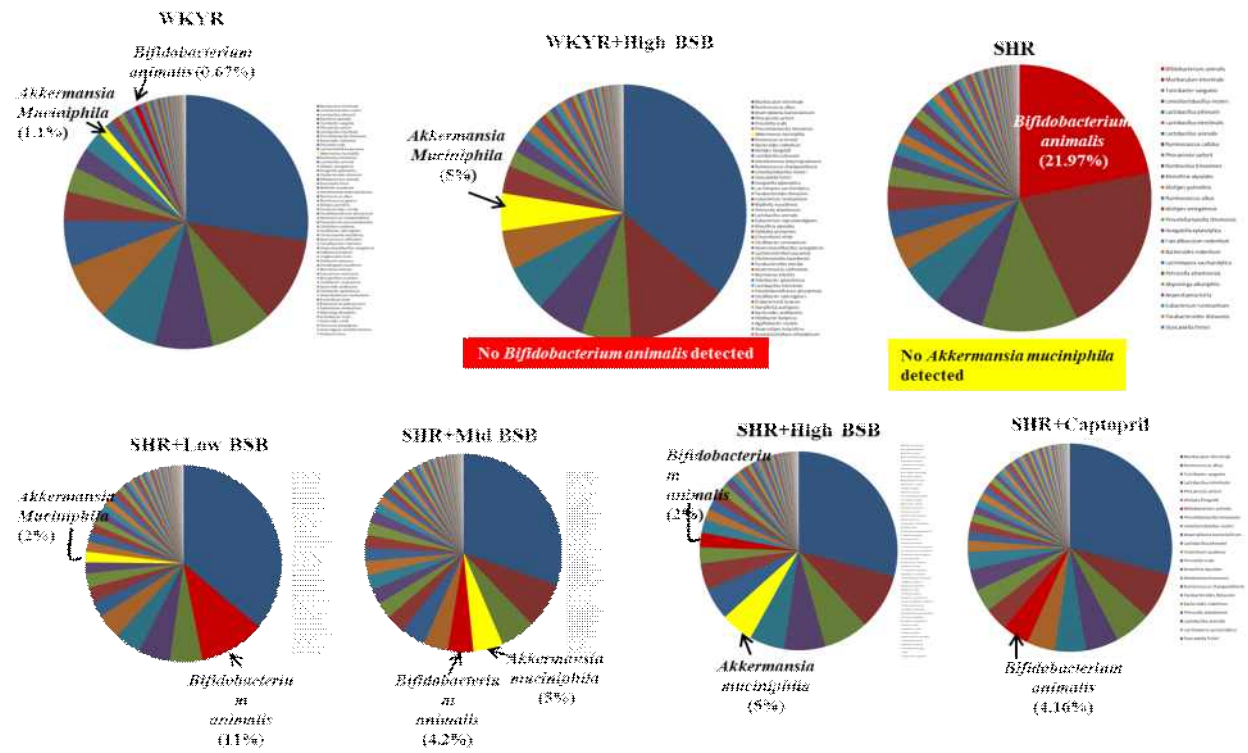


Figure 36. Effects of BSB consumption on *Bifidobacterium animalis* but increases *Akkermansia muciniphilla*. . The different colors of the pie chart represent the proportions of the different bacteria groups detected in the fecal samples.

○ BSB 섭취에 의한 SHR의 장내 주요 미생물 함량 변화 분석

- *Akkermansia muciniphila*와 *Rumminococcus ablus*의 수준은 SHR에서 유의하게 감소된 반면, *Bifidobacterium animalis*의 수준은 매우 높게 나타났음.
- BSB를 섭취한 SHR의 장에서 *Akkermansia muciniphila*와 *Rumminococcus ablus*의 수준을 유의적으로 증가시켰으며, *Bifidobacterium animalis*의 수준은 감소시켰음 (Table 25).
- *Akkermansia muciniphila*는 대사 및 위장장애에 중요 역할을 하며, *Rumminococcus ablus*는 주요 단쇄 지방산의 생산 균주로 알려져있음.

Table 25. Top 15 most abundant bacteria in the gut microbiome of experimental animals. HIGH: 500mg/kg BW of BSB, MID: 250mg/kg BW of BSB and LOW: 50 mg/kg BW of BSB.

Wistar Kyoto rats		SHR		CAPTOPRIL + SHR	
<i>Muribaculum intestinale</i>		<i>Bifidobacterium animalis</i>	11.97%	<i>Muribaculum intestinale</i>	29.20%
<i>Limosilactobacillus reuteri</i>	10.86%	<i>Muribaculum intestinale</i>	10.45%	<i>Ruminococcus albus</i>	7.25%
<i>Lactobacillus johnsonii</i>	8.15%	<i>Turicibacter sanguinis</i>	11.78%	<i>Turicibacter sanguinis</i>	5.78%
<i>Kineothrix alysoidea</i>	7.75%	<i>Limosilactobacillus reuteri</i>	6.24%	<i>Lactobacillus intestinalis</i>	5.22%
<i>Turicibacter sanguinis</i>	7.75%	<i>Lactobacillus johnsonii</i>	5.21%	<i>Phocaeicola sartorii</i>	4.89%
<i>Phocaeicola sartorii</i>	7.38%	<i>Lactobacillus intestinalis</i>	4.06%	<i>Alistipes finegoldii</i>	4.48%
<i>Lactobacillus intestinalis</i>	5.85%	<i>Lactobacillus animalis</i>	3.30%	<i>Bifidobacterium animalis</i>	4.16%
<i>Prevotellamassilia timonensis</i>	3.72%	<i>Ruminococcus callidus</i>	3.03%	<i>Prevotellamassilia timonensis</i>	3.73%
<i>Bacteroides rodentium</i>	3.17%	<i>Phocaeicola sartorii</i>	2.38%	<i>Limosilactobacillus reuteri</i>	3.50%
<i>Prevotella oralis</i>	2.70%	<i>Romboutsia timonensis</i>	1.50%	<i>Anaeroplasmata bactoclasticum</i>	3.35%
<i>Lachnospirillum pacaense</i>	2.66%	<i>Kineothrix alysoidea</i>	1.45%	<i>Lactobacillus johnsonii</i>	2.81%
<i>Akkermansia muciniphila</i>	1.11%	<i>Alistipes putredinis</i>	1.22%	<i>Clostridium saudiense</i>	1.73%
<i>Romboutsia timonensis</i>	1.07%	<i>Ruminococcus albus</i>	1.22%	<i>Prevotella oralis</i>	1.49%
<i>Lactobacillus animalis</i>	0.95%	<i>Alistipes senegalensis</i>	1.21%	<i>Kineothrix alysoidea</i>	1.42%
<i>Alistipes senegalensis</i>	0.88%	<i>Prevotellamassilia timonensis</i>	1.16%	<i>Romboutsia timonensis</i>	1.34%
LOW BSB + SHR		MID SBS + SHR		HIGH BSB + SHR	
<i>Muribaculum intestinale</i>	36.08%	<i>Muribaculum intestinale</i>	30.31%	<i>Muribaculum intestinale</i>	29.19%
<i>Bifidobacterium animalis</i>	10.84%	<i>Ruminococcus albus</i>	7.49%	<i>Lactobacillus intestinalis</i>	9.16%
<i>Lactobacillus intestinalis</i>	5.35%	<i>Anaeroplasmata bactoclasticum</i>	5.75%	<i>Ruminococcus albus</i>	7.30%
<i>Phocaeicola sartorii</i>	5.27%	<i>Akkermansia muciniphila</i>	4.88%	<i>Limosilactobacillus reuteri</i>	6.76%
<i>Turicibacter sanguinis</i>	4.38%	<i>Bifidobacterium animalis</i>	4.21%	<i>Lactobacillus johnsonii</i>	5.72%
<i>Limosilactobacillus reuteri</i>	4.13%	<i>Alistipes finegoldii</i>	4.04%	<i>Akkermansia muciniphila</i>	5.30%
<i>Lactobacillus johnsonii</i>	2.61%	<i>Phocaeicola sartorii</i>	3.99%	<i>Phocaeicola sartorii</i>	5.20%
<i>Prevotellamassilia timonensis</i>	2.40%	<i>Prevotellamassilia timonensis</i>	3.14%	<i>Lacrimispora saccharolytica</i>	4.33%
<i>Kineothrix alysoidea</i>	2.34%	<i>Lactobacillus intestinalis</i>	2.68%	<i>Turicibacter sanguinis</i>	2.64%
<i>Alistipes finegoldii</i>	1.84%	<i>Bacteroides rodentium</i>	2.49%	<i>Bifidobacterium animalis</i>	2.40%
<i>Akkermansia muciniphila</i>	1.71%	<i>Kineothrix alysoidea</i>	2.41%	<i>Ruminococcus callidus</i>	2.22%
<i>Ruminococcus albus</i>	1.65%	<i>Turicibacter sanguinis</i>	2.32%	<i>Alistipes finegoldii</i>	1.70%
<i>Prevotella oralis</i>	1.64%	<i>Limosilactobacillus reuteri</i>	2.17%	<i>Kineothrix alysoidea</i>	1.67%
<i>Hungatella xylanolytica</i>	1.35%	<i>Anaerotaenia torta</i>	2.09%	<i>Prevotellamassilia timonensis</i>	1.58%
<i>Intestinimonas butyriciproducens</i>	1.31%	<i>Lactobacillus johnsonii</i>	2.04%	<i>Lactobacillus animalis</i>	1.57%
Wistar Kyoto rats + HIGH BSB					
<i>Muribaculum intestinale</i>					
<i>Ruminococcus albus</i>			13.23%		
<i>Anaeroplasmata bactoclasticum</i>			6.57%		
<i>Phocaeicola sartorii</i>			6.30%		
<i>Prevotella oralis</i>			5.86%		
<i>Prevotellamassilia timonensis</i>			4.99%		
<i>Akkermansia muciniphila</i>			4.72%		
<i>Ruminococcus bromii</i>			3.49%		
<i>Bacteroides rodentium</i>			2.01%		
<i>Alistipes finegoldii</i>			1.92%		
<i>Lactobacillus johnsonii</i>			1.14%		
<i>Intestinimonas butyriciproducens</i>			1.07%		
<i>Ruminococcus champanellensis</i>			0.96%		
<i>Limosilactobacillus reuteri</i>			0.89%		
<i>Duncaniella freteri</i>			0.80%		

○ *Akkermansia muciniphila* / *Bifidobacterium animalis* 비율과 혈압의 연관성 분석

- 상기 연구 결과에서부터 *Akkermansia muciniphila*의 현저한 감소는 혈압의 상승, *A. muciniphila* / *B. animalis*의 높은 비율은 혈압의 감소와 연관을 확인하였음.
- SHR은 *A. muciniphila* / *B. animalis*의 비율이 낮게 나타났으며, 비율이 높아짐에 따라 혈압이 감소하였음. BSB의 섭취는 *A. muciniphila* / *B. animalis*의 비율을 증가시켰으며, 이는 BSB가 항고혈압 소재로 작용했음을 의미함

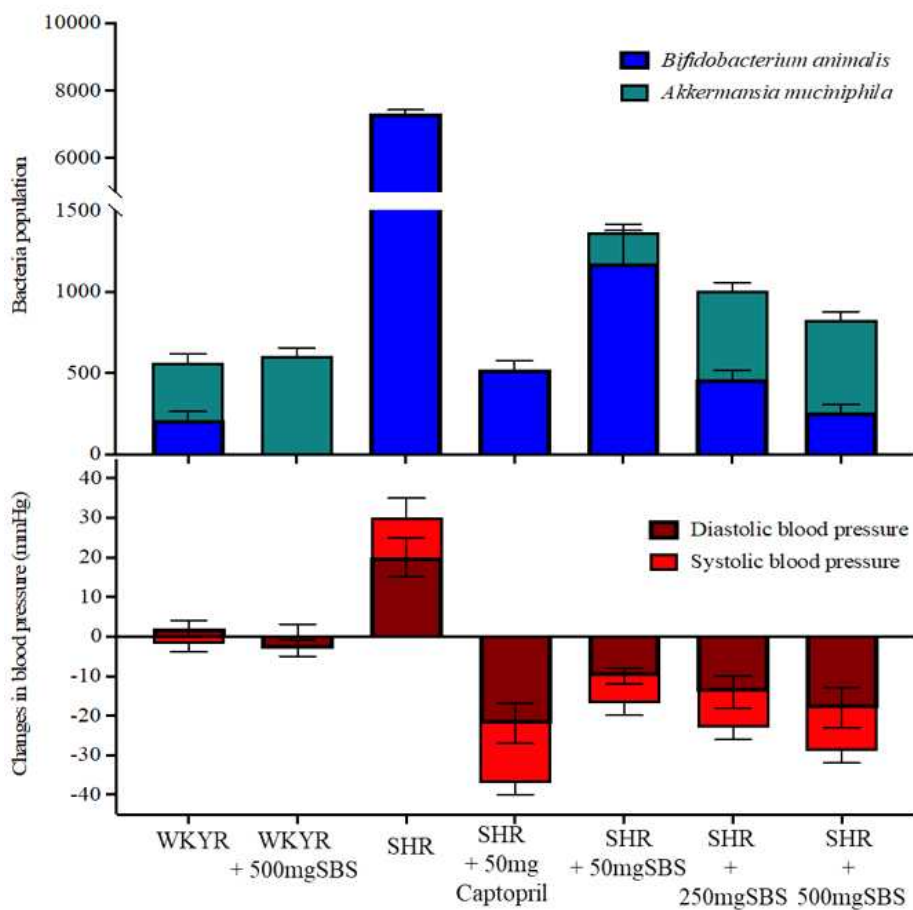


Figure 37. Association between *A. muciniphila*/*B. animalis* ratio and blood pressure. Each bar represent the ratios of *B. animalis* and *A. muciniphila* in each experimental group with their corresponding blood pressures (systolic and diastolic).

○ BSB 섭취에 의한 SHR의 장내 균총 네트워크 분석

- 실험 동물의 분변 샘플에서 확인된 상위 20개의 박테리아를 기반으로 JMP 소프트웨어 (SAS institute Inc.) 및 cytoscape를 사용하여 상관관계 분석 진행하였으며, BSB 섭취군의 박테리아 네트워크가 SHR 및 정상 혈압군의 박테리아 네트워크와 다른 것으로 나타났음
- 정상혈압군인 Wistar Rat에서 나타나듯이 균총 간 상호작용이 균형 잡혀있지만, SHR군에서는 상위 20종의 박테리아 사이에 부정적 상호작용이 더 많았고 긍정적 상호작용은 거의 없음을 확인하였음
- BSB를 섭취한 SHR군에서는 장내 상위 20종의 박테리아 사이에 부정적 상호작용보다 긍정적 상호작용이 우세하였음. 따라서 BSB의 섭취는 SHR의 장내 미생물 균총과 상호 작용에 영향을 줄 수 있음

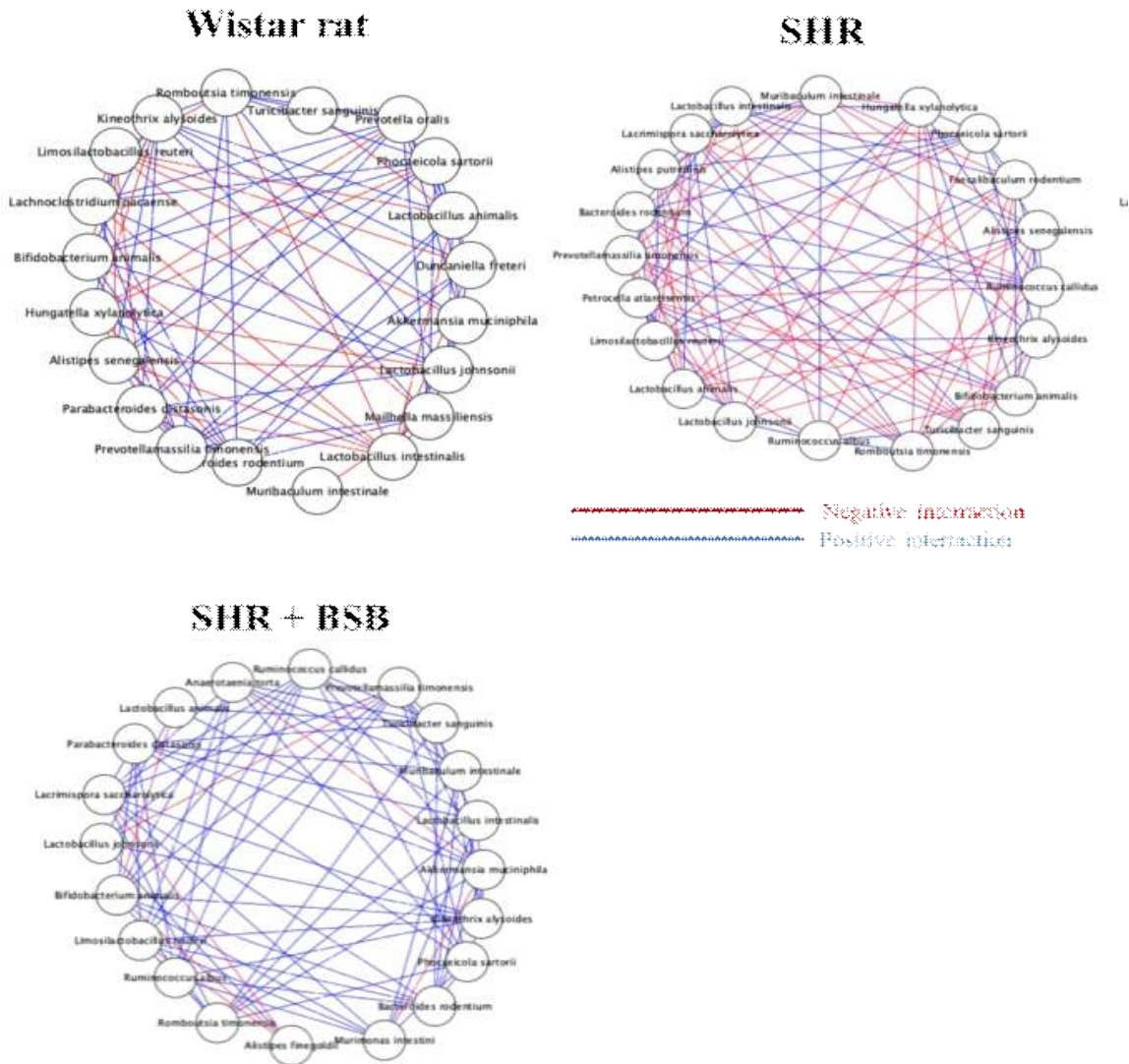


Figure 38. The effect of BSB and Captopril administration on the major phyla of gut bacteria of rats. Fecal samples were collected from spontaneous hypertensive rats (n=5), the BSB group (n=5), Captopril group (n=5) and Wistar Kyoto rats.

## ○ BSB 섭취에 의한 SHR의 장내 미생물 대사 산물 분석

### - BSB 섭취에 의한 SHR 혈청 내 BCAA 수준 분석

- 많은 연구에서 혈액 내 증가된 BCAA가 고혈압과 강한 상관관계가 있는 것으로 보고되었음
- 보고된 연구 결과와 동일하게 SHR군의 혈청에서 BCAA 수준이 증가함을 확인하였으며, BSB의 섭취 후 SHR 혈청의 발린 수준을 감소시키는 것으로 나타났음.

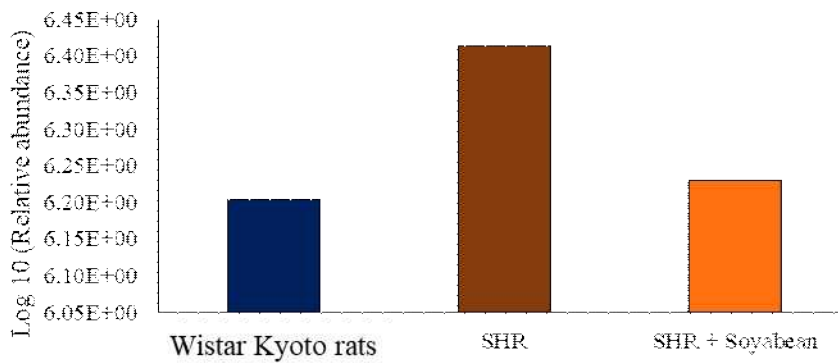


Figure 39. The effect of BSB administration on the levels of serum branched chain amino acids. Normotensive = Wistar Kyoto rats. Each bar represents the peak area of the amino acid in the serum sample.

### - BSB 섭취에 의한 SHR 단쇄 지방산 및 트립토판 수준 분석

- 장내 미생물이 생성하는 대사 산물에 의해 체내 영향을 분석하기 위해 정상 혈압군, SHR군 및 BSB 섭취 SHR군의 분변 샘플에서 단쇄 지방산 및 트립토판 대사 산물을 분석하였음.
- SHR의 단쇄 지방산은 정상 혈압군에 비해 낮은 수준의 hydroxyvaleric acid, lactate 및 succinic acid를 나타내었으나, BSB를 섭취한 SHR에서는 단쇄 지방산 수준이 개선되었음.
- 트립토판 대사 산물인 2-oxindole-3-acetate는 SHR에서 유의적으로 감소하였으며, 이는 아릴탄화수소 수용체 리간드 역할을 하여 막의 무결성을 촉진함.
- BSB 섭취는 SHR의 장내 미생물에 의해 대사 증후군을 완화하는 기능이 있는 2-oxindole-3-acetate 생산을 증가시켰음.



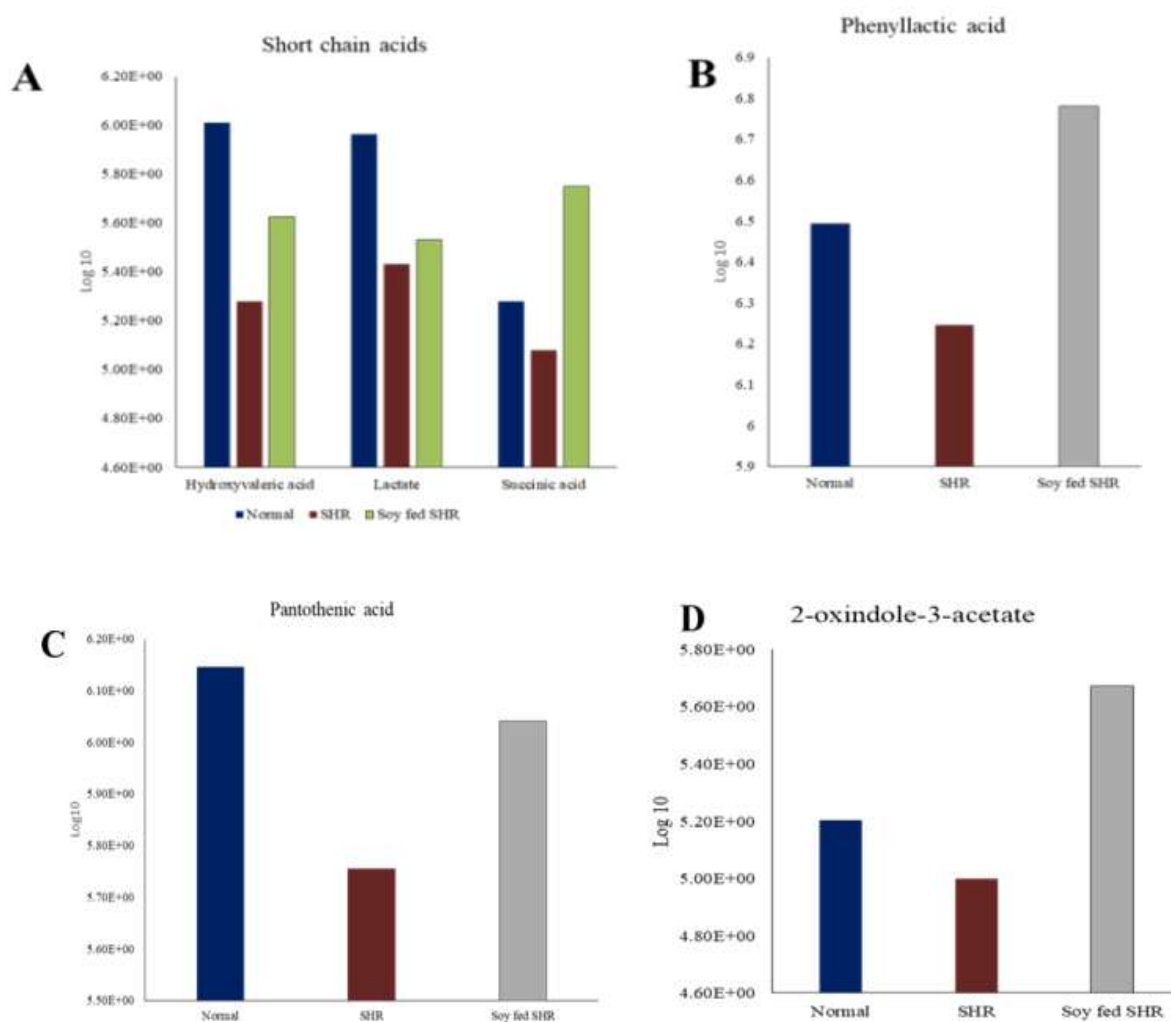


Figure 40. The effect of BSB administration on the levels of fecal short chain fatty acids, vitamins and tryptophan metabolites in feces of SHR, WKYR and SHR fed with BSB. Normal= Wistar Kyoto rats. Each bar represents the peak area of the levels of microbial metabolites in the fecal samples of the experimental in each group (n = 5). SHR = Spontaneous hypertensive rats.

○ 생물전환 식품소재의 지표 성분 분석

- 총 9266개의 펩타이드가 확인되었으며, ACE inhibitory activity에 대해 시험관 내에서 개별적으로 합성/용출 및 테스트함은 어려움이 있어 펩타이드 서열은 잠재적인 ACE 억제 펩타이드를 예측하기 위해 in silico 플랫폼(<http://crdd.osdd.net/raghava/ahtpin/index.php>)을 사용하여 스크리닝 하였음.
- 펩타이드 EGEQPRPFPPF, EITPEKNPQ, EITPEKNPQLR, FEITPEKNPQ, PFSFLVPPQESQRR, NNPFSLVPPQESQRR, AIPVNKP 및 PPNPHIGIN이 가장 풍부하고 항고혈압 활성을 가질 것으로 예측되었음.
- 따라서, 위의 펩타이드를 합성하여 ACE inhibitory activity를 테스트하였으며 EGEQPRPFPPF가 가장 높은 ACE inhibitory activity를 보였고 AIPVNKP이 두 번째로 높은 ACE inhibitory activity를 나타냈음. 다른 펩타이드는 30% 미만의 억제능을 보였음

Table 26. ACE inhibitory ability of potential ACE peptides predicted by AHTpin.

Peptides	ACE inhibition (%)
NNPFSLVPPQESQRR	10.6±4
AIPVNKP	70.4±5
PPNPHIGIN	0
EITPEKNPQ	12±5
PFSFLVPPQESQRR	15.8±7
FEITPEKNPQ	11.5±5
EITPEKNPQLR	24.4±6
EGEQPRPFPPF	90.4±5
Captopril	94 ± 5

## ○ BSB 섭취에 의한 SHR 장내 미생물 기능 조절

- 장내 균총 불균형은 장내 미생물 기능의 변화와 밀접한 연관이 있음. 정상 혈압군, SHR군, SHR+500mg/kg 군의 장내 미생물의 대사 활성을 in silico 플랫폼(<https://piphillin.secondgenome.com/>)을 사용하여 예측하였음
- SHR의 장내 미생물 균총은 정상 혈압군에 비해 과도한 에너지 대사를 나타내었으나, BSB를 섭취한 SHR에서는 대사율이 크게 감소하였음
- 이는 장내 균총 불균형이 신체의 에너지 균형을 붕괴시키고, 질병을 유발할 수 있다는 연구와 일치함(Cavallari and Schertzer 2017).
- 장내 균총 불균형을 개선하고 장내 미생물의 기능을 회복하면, 에너지 균형을 이뤄 고혈압과 같은 질병의 완화에 영향을 줄 수 있음.

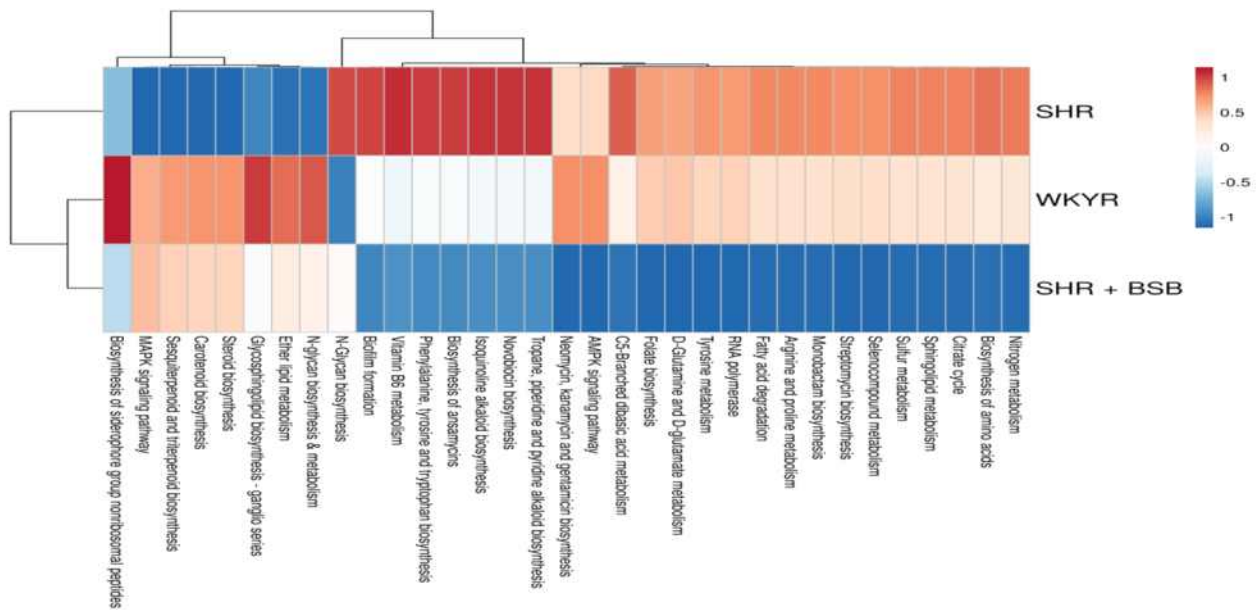


Figure 41. Energy metabolism of gut microbiota in SHR, WKYR and SHR fed with BSB (high dose). The color range from red to blue represents higher to lower degrees of metabolism. Values for drawing the heat map were generated from 16S rRNA data fed into an in-silico platform (<https://piphillin.secondgenome.com/>).



## ○ BSB 섭취에 의한 항고혈압 메커니즘

- 위 연구 결과를 바탕으로 BSB가 혈청 내 LDL-c를 감소시키고, HDL-c를 증가시키며 혈청 ACE 활성을 감소시키는 것을 확인하였음.
- 대장에서 BSB는 장내 ACE 활성을 감소시켜 고혈압과 관련된 장내 균총 불균형을 개선하였으며, *Ruminococcus albus* 및 *Muribaculum*의 장내 성장을 촉진하고, *Bifidobacterium animalis*/*Akkermansia muciniphila*의 비율을 감소시켰음.
- 이러한 장내 균총 개선은 혈압 감소에 중요 기능을 하는 대사산물인 2-oxindole-3-acetate, 단쇄지방산 및 판토텐산을 증가시켰음.

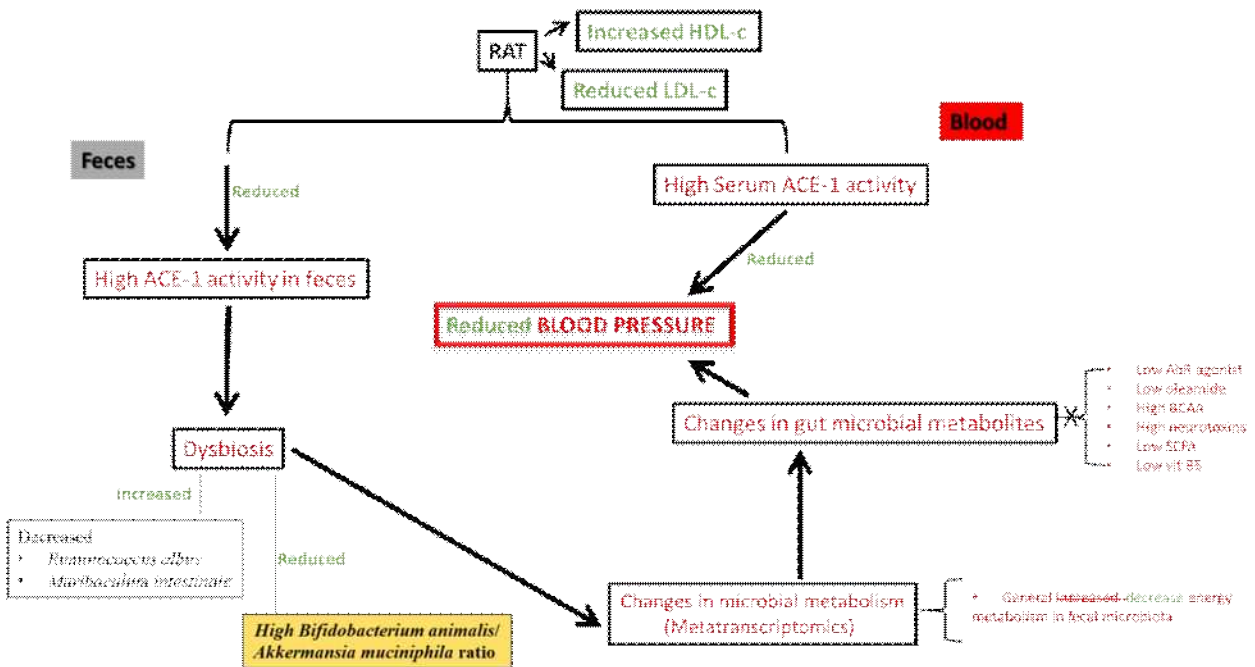


Figure 42. Mechanism by which BSB reduces blood pressure.

#### ④ 식품소재 대량생산 공정 확립 및 곡물 가공음료 기술 개발

##### ○ 대두의 발효공정 Scale-up test (5L)

- 대두는 국내산을 입수하여 건조 및 정선한 후에 분말로 제조하여 공정에 사용하였음.
- 대두분말의 생물전환 공정은 실험실 규모의 생산조건 연구에 따라 효소는 Prozyme 2000P를 사용하였으며, 발효균주는 *Pediococcus acidilactici* OHER4(KCTC 21159)를 사용하였음
- 곡물 가공 음료 개발을 위한 최적의 조건을 선별하기 위해 20% w/v의 대두 분말액을 제조한 후, 선별된 효소인 Prozyme 2000p을 처리(50°C, 150rpm, 3시간)하여 대두분말 효소처리액을 제조하였음.
- Start culture 한 *Pediococcus acidilactici* OHER4을 원심분리하여 pellet을 분리하고 증류수에 2회 세척하고, 회수된 cell pellet은  $2 \times 10^8$  CFU/ml의 농도로 멸균 증류수에 재현탁 시킨 후 10 mL의 곡물 배지에 접종하였으며, 선행된 연구의 조건에서 37°C에서 72시간 동안 교반 배양하였음.
- 발효를 중단시키기 위해 샘플을 95°C에서 15분 동안 가열한 뒤 동결건조 하였음
- 각 단계의 공정을 총 3회 (3 #Lot.)를 수행하여 공정의 안정성을 비교 평가하였음
- 각 단위공정 및 조건은 다음과 같았음:

제조공정	공정, 식품, 식품첨가물	비고 (kg)
원재료	대두분말, 20% (w/v)	대두분말: 600g 증류수: 2.4L
↓		
가수분해 (효소처리)	Prozyme 2000P (E:S=0.15%:1) 50 °C, 150rpm, 3시간	효소: 0.9g
↓		
효소 실활	100°C 15분	효소 불활성화
↓		
유산균 발효	유산균 접종, 발효 : 37°C, 48시간	<i>Pediococcus acidilactici</i> OHER4 $2 \times 10^8$ cfu/mL
↓		
살균	95°C, 15분	
↓		
동결건조		

- 대두분말의 발효 과정 중 pH는 첫 24시간 동안 5.8에서 3.9로 감소했으며 그 이상 변하지 않았음. 박테리아의 성장은 0시간에서 50시간으로 증가했고 72시간까지 감소하기 시작했다.

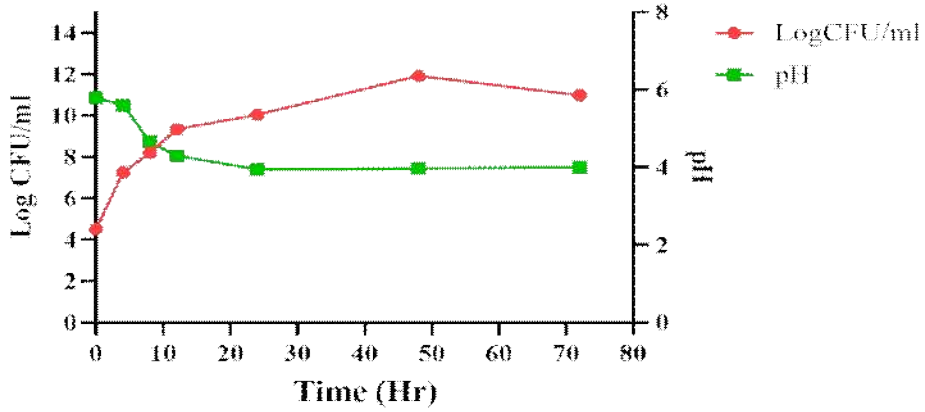


Figure 43.1 Soybean fermentation for 72 hr (Cell growth and pH) LOT 1

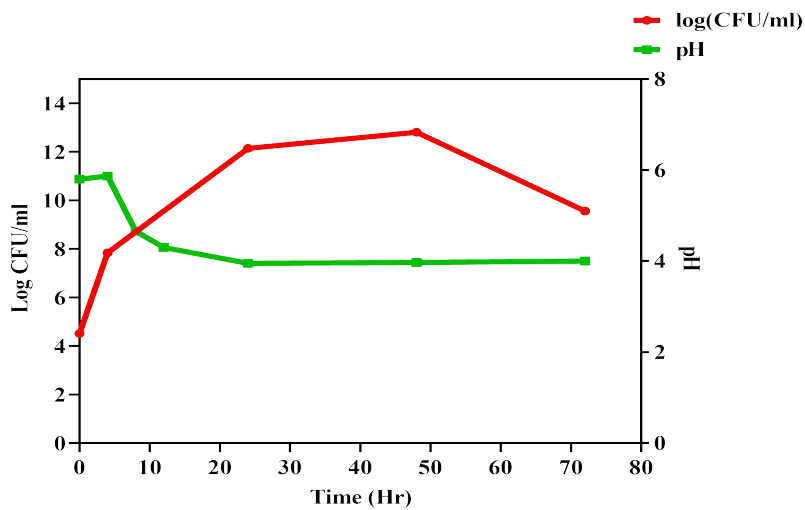


Figure 43.2. Soybean fermentation 72 hr (cell growth and pH) LOT 2

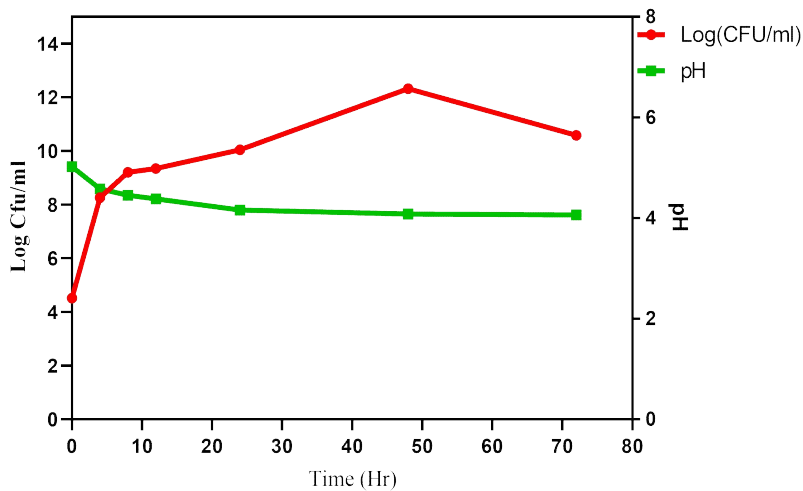


Figure 43.3. Soybean fermentation 72 hr (cell growth and pH) LOT 3

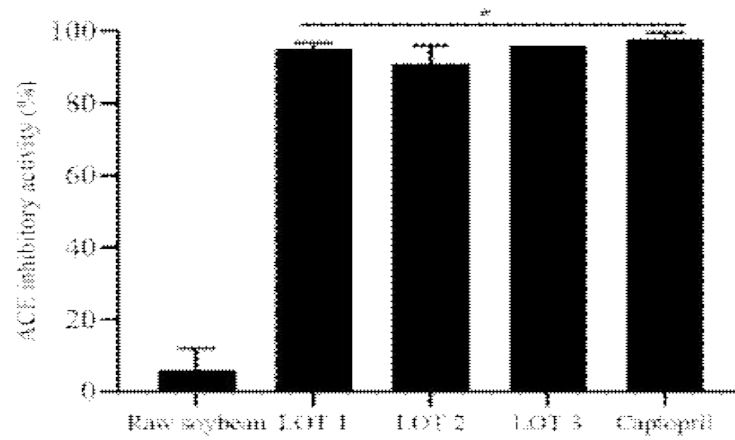


Figure 44. Comparison of ACE inhibitory activities of samples 5L fermentation.

- 대두분말의 발효 과정 후 ACE 활성을 측정한 결과 대두분말과의 ACE 활성 비교 시 크게 증가하였고, 발효가 종료된 대두분말의 경우 Captopril과 유사한 결과 값을 보였으며 각 Lot 간의 유의미한 차이를 나타내지 않았음.

○ 대두의 발효공정 Scale-up test (70L)

- 대두 효소처리 발효분말 대량 공정 조건 확립

- 5L 급 fermenter를 이용하여 확인된 대두분말의 최적 생산조건과 안정성을 확인할 수 있었으며, 각 조건은 원료 전처리를 위한 효소로는 Prozyme 2000P와 발효 균주로서 *Pediococcus acidilatici* OHER4(KCTC 21159)를 이용 하였으며, 발효조건 및 시간은 경제성을 고려하여 37°C에서 48시간으로 설정하였음.
- 대량생산 조건을 확립하기 위한 scale-up의 증량 조건으로는 70L 급의 fermenter를 이용하여 시생산 테스트를 3회 반복시행한 후에 원료의 안정성을 확인하여 최종 양산 조건을 확정하고자 하였음.
- 70L 급 fermenter를 이용한 scale-up test의 각 단위공정 및 조건은 다음과 같았음.

제조공정	공정, 식품, 식품첨가물	비고 (kg)
원재료	대두분말, 20% (w/v)	대두분말: 5kg 증류수: 25L
↓		
가수분해 (효소처리)	Prozyme 2000P (E:S=0.15%:1) 50°C, 150rpm, 3시간	효소: 7.5g
↓		
효소 실활	95°C 15분	효소 불활성화
↓		
유산균 발효	유산균 접종 : 37°C, 48시간	<i>Pediococcus acidilatici</i> OHER4 2 x 10 <sup>8</sup> cfu/mL 농도로 접종
↓		
살균	95°C, 60분	
↓		
탈수(원심분리)	관상 원심분리기	원심분리
↓		
동결건조		

## - 대두 효소처리 발효분말 건조 조건 설정

- 대두 발효 식품소재의 생산 조건에 대한 선행된 연구에서 원료의 열안정성을 확인하였으나, 경제성 및 생산의 용이성, 개발 소재의 품질적 차이를 규명하여 최종 건조 방법을 설정하고자 하였음.
- 분무건조인 SD 건조방법은 비교적 저렴한 가격으로 대량의 원료를 안정적으로 건조하는 방법으로 널리 사용되고 있으나, 방식의 특성상 필터링을 거쳐야 하는데, 본 소재의 발효 과정에서 대두 단백질의 침전 또는 대두 지방 성분 등의 뭉침 현상으로 인하여 필터시 loss가 증가하는 것으로 조사되었으며, 본 연구에서도 SD 건조 방식을 사용하기 위하여 소량의 필드 테스트를 진행하였을 때 필터의 막힘 증상으로 인하여 생산성이 극도로 저하됨을 확인하여 SD 건조 방법이 아닌 다른 건조방법을 활용하고자 하였음.
- 진공 건조를 사용하는 VD(Vacuum Drying) 또는 FD(Freezing Drying)은 저온 또는 산소가 제거된 상태에서 건조를 수행하는 방법으로 원료의 관능 변화를 억제하고, 열에 약한 기능성분들을 보호하는데 최적의 공정으로 사용되고 있으나 건조 시간의 장기화와 상대적으로 높은 제조가격을 가지고 있다는 단점이 있음.
- 따라서 전통적 대두 건조 방법으로 SD를 사용하기 어렵다는 판단 아래 대두 발효 식품소재에 최적화된 건조 방법을 설정하고자, VD 건조방식과 FD 건조 방식을 비교하고자 하였음.



Figure 45. 건조 방법에 따른 원료의 외관 특성

- 발효 산물에 대해서 VD와 FD 두가지 방법으로 건조를 수행하였을 때 상기의 Fig 45.와 같이 VD로 건조를 진행하였을 때 색상을 포함한 관능의 변화가 발생한 것으로 나타났으며, FD의 경우 lab-scale상의 결과와 유사한 결과를 얻을 수 있었음.
- 본 연구에서 얻어진 소재의 생리활성이 열에 비교적 안정한 것으로 선행연구결과에서 확인되었으나 건조온도를 영하로 낮추어 시행하는 FD에 비하여 상온에서 산소를 제거하여 시행하는 VD의 관능적 변화가 있을 것으로 예상되어 실제 대량 생산을 위해서는 FD 공정을 사용하는 것으로 최종 결정하였음.
- 70L 급 fermenter를 이용한 scale-up test를 다음의 과정을 통해 수행하였으며, 각 단위 공정에 대한 작업안정성 및 최종 원료에 대한 안정성을 확인할 수 있었음.
- 70L 급 fermenter를 이용한 scale-up test 시생산의 결과 동결건조를 통해 최종 미갈색의 고유 향미를 갖는 대두발효 식품소재의 원료를 생산할 수 있었으며 식품으로서의 품질을 확인할 수 있었음



Figure 46. 70L fermenter 발효 생산 공정



Figure 47. 대두발효 식품소재 원료

- 70L 급 fermenter를 이용한 scale-up test에서도 5L 급 fermenter와 유사한 경향을 보이는지를 확인하기 위해서 ACE 활성평가를 진행하였고 5L 급 fermenter로 진행한 발효물의 결과값과 유사한 값을 보이는 것을 확인하였음.

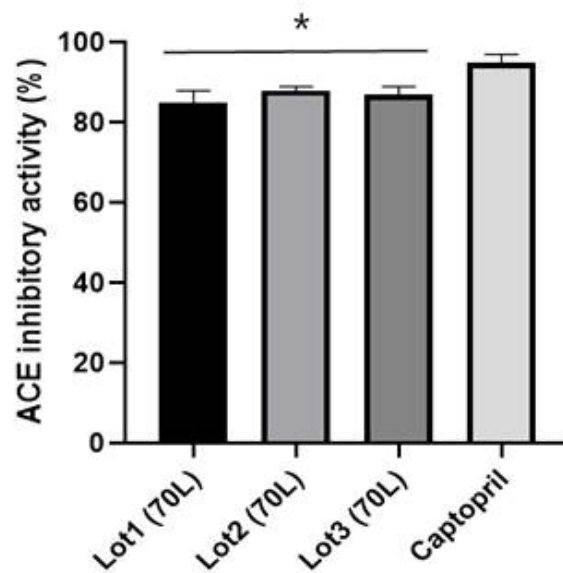


Figure 48. Comparison of ACE inhibitory activities of samples 70L fermentation.



○ 대량 생산 공정 확립 (3000L)

- 대두분말과 *Pediococcus acidilatici* OHER4 균주를 이용한 대두 발효 식품소재의 대량생산 조건 확립을 위한 scale-up test의 결과를 바탕으로 대량생산을 위한 양산조건 셋팅 및 원료의 시생산을 통한 식품첨가물 제품의 제조공정을 확립하고자 하였음.
- 70L scale-up test의 조건을 기반으로 하여 3000L 급 fermenter에 대한 대량생산 조건을 설정하여 아래와 같이 대량생산 제조공정도를 설계하였음.

<대두발효 식품소재 대량생산 제조공정도>

제조공정	공정, 식품, 식품첨가물	비고 (kg)
원재료	대두분말 20% (w/w)	대두분말: 200kg 증류수: 1000L
↓		
가수분해 (효소처리)	<i>Prozyme 2000P</i> (E:S=0.15%:1) 50°C, 150rpm, 3시간	효소: 300g
↓		
효소 실활	95°C 30분	효소 불활성화
↓		
유산균 발효	유산균 접종 37°C, 48시간	<i>Pediococcus acidilatici</i> OHER4 2 x 10 <sup>8</sup> cfu/mL
↓		
살균	90°C, 60분	
↓		
대형 분무건조	대형 분무건조기	SD
↓		
포장	10kg 포장	지대포장
↓		
QC	이물, 수분, 대장균군, 일반세균	

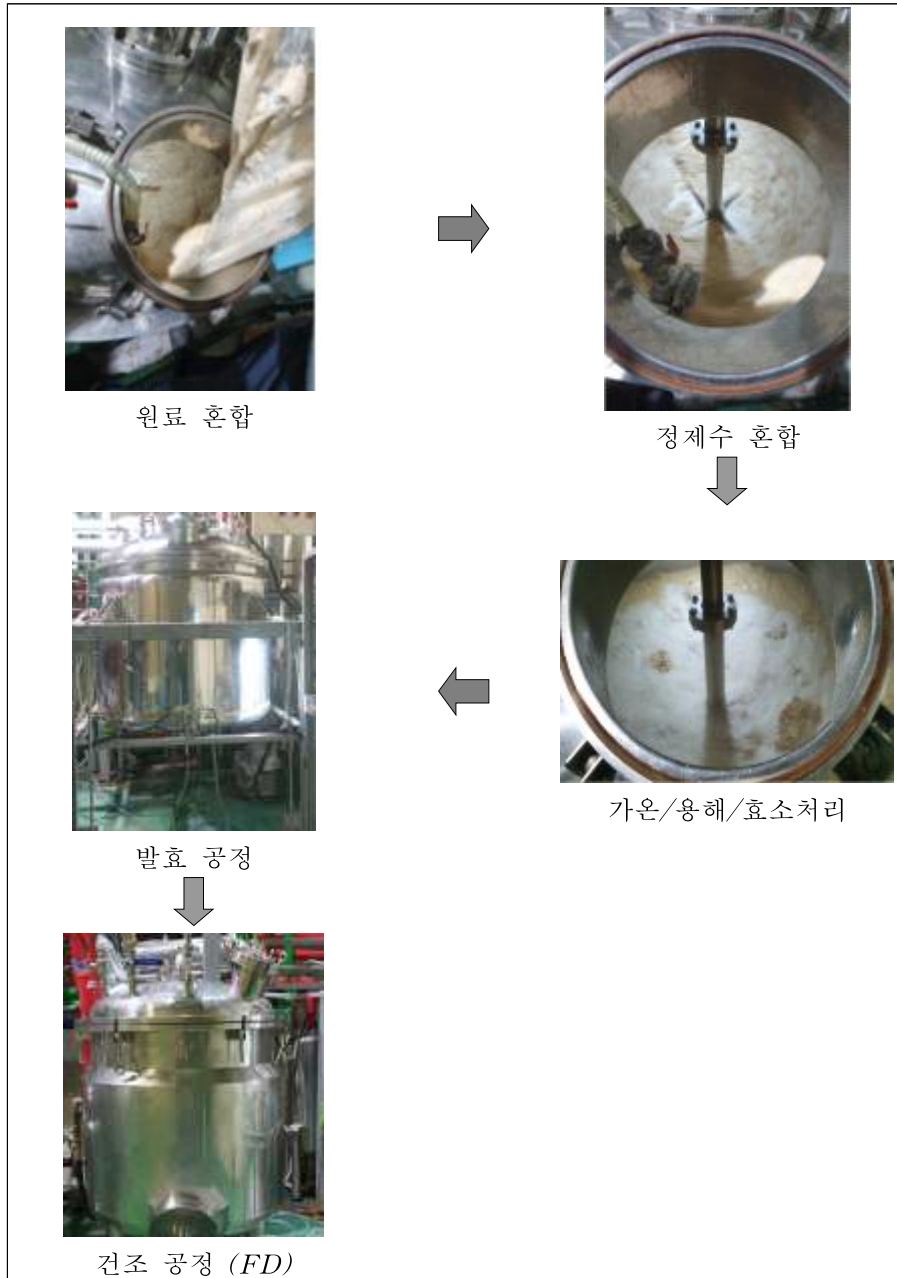


Figure 49. 대량생산 발효 생산 공정

- 각각의 공정에 대하여 춘천 소재의 발효 전문 업체 (메디언스)의 기기를 임대하여 대두 발효 식품소재의 총 3회(#3Lot.)의 반복 시생산을 수행하여 생산 안정성을 확인하였음.
- 시생산된 원료에 대하여 상품으로서 판매하기 위하여 ‘효소처리대두발효분말’로서 명명하여 품목제조보고를 진행하였음.

발급번호 : MAMB-AKBM-CXMN-NMEX-ICFO

### 식품·식품첨가물 품목제조보고서


보고인	성명	생년월일		
	직장	1965년 1월 28일		
주소	경기도 용인시 수지구 양현로 25, 107동 1702호 ( )	전화번호		
		033-2590258		
제조업소	명칭(상호)	영양등록번호		
	(주)에디앤스	20110308845		
소재지	주소			
	강원도 춘천시 신북읍 신북로 61-201강원테크노파크춘천벤처공장 102, 104-2호			
제품정보	식품의 유형	기타가공품	품목제조보고번호	20110308845142
	제품명	효소처리대두발효분말		
	유통기한	제조일로부터36개월		
	분류유지기간			
	원재료명 또는 성분명 및 첨가물명	원장에 기재		
	용도 용법	원장에 기재		
	보관방법 및 포장재료	원장에 기재		
	포장방법 및 포장단위	원장에 기재		
	성상	고유한 색채와 향미가 있고, 이미 이취가 없는 완결적의 분말		
	품목의 특성			
■ 조영양·기능성 식품 해당 여부 [ ]예 [ ]아니오 [ ]확인 안됨 ■ 알·유아용 식품(영양성분 표시) 표시 대상인 식품 해당 여부 [ ]예 [ ]아니오 ■ 알코올·알코올 대체물 해당 여부 [ ]예 [ ]아니오				
기타 <small>* 식품위생법, 제57조 제5항 및 같은 법 시행규칙 제45조 제1항에 따라 식품(식품첨가물) 품목제조 사항을 보고합니다.</small>				

2021년 03월 26일  
보고인 박승태

강원도 춘천시청 기하

품목보고번호 : 20110308845142

차관부서	보관소	식품첨가물과	차관자명	신영규	차관일자	2021년 03월 26일
------	-----	--------	------	-----	------	---------------



### 효소처리대두발효분말의 품목제조보고서

- 현재 생산된 원료에 대하여 영양성분 및 일반성분, 미생물, 잔류농약 및 중금속 등의 지표에 대하여 공인시험분석기관에 분석을 의뢰를 진행하였고, 모든 항목에 대하여 품질이 적합한 것으로 확인되었음.
- 공인시험 분석 결과는 다음과 같음.

Table 27. 시생산 원료 영양성분 분석

시험항목	단위	시험방법	결과
열량	kacl/100g	식품공전	446.30
탄수화물	g/100g	식품공전	28.3
단백질	g/100g	식품공전, Protein Analyzer	39.91
지방	g/100g	식품공전	19.26
당류	g/100g	식품공전, HPLC/RI	2.06
포화지방	g/100g	식품공전, GC/FID	2.67
트랜스지방	g/100g	식품공전, GC/FID	0.03
콜레스테롤	mg/100g	식품공전, GC/FID	불검출
나트륨	mg/100g	식품공전, ICP/OES	34.32
수분	g/100g	식품공전	7.09
회분	g/100g	식품공전	5.41

Table 28. 시생산 원료 미생물 분석

시험항목	단위	시험방법	결과
대장균	cfu/g(mL)	식품공전	0,0,0,0,0
대장균군	cfu/g(mL)	식품공전	0,0,0,0,0
일반세균수	cfu/g(mL)	식품공전	0,0,0,0,0

Table 29. 시생산 원료 중금속분석

시험항목	단위	시험방법	결과
수은	ug/kg	식품공전, DMA	불검출
납	mg/kg	식품공전, ICP/MS	불검출
카드뮴	mg/kg	식품공전, ICP/MS	불검출
비소	mg/kg	식품공전, ICP/MS	불검출

**Table 30. 시생산 원료 잔류농약 분석**

- 시험결과: 잔류농약 245종 불검출
- 비고: 불검출 = 정량한계(0.01mg/kg) 이하

잔류농약 245종
Acetamiprid, Acrinathrin, Alachlor, Aldicarb, Aldrin, Amisulbrom, Anilofos, Azinphos-methyl, Azoxystrobin, Bendiocarb, Benthiavalicarb-isopropyl, Benzoximate, BHC, Bifenox, Bifenthrin, Biteranol, Boscalid, Bromobutide, Bromopropylate, Buprofezin, Butachlor, Cadusafos, Captan, Carbaryl(NAC), Carbendazim, Carbofuran, Carbophenothion, chinomethionat(Oxythioquinox), Chlorantraniliprole, Chlordane, Chlorfenapyr, Chlorfenvinphos, Chlorfluzuron, Chlorobenzilate, Chlorothalonil, Chlorpropham, Chlorpyrifos, Chlorpyrifos-methyl, Chromafenozide, Clofentezine, Clothianidin, Cyazofamid, Cyflufenamid, Cyfluthrin(beta), Cyhalofop-butyl, Cyhalothrin-lambda, Cymoxanil, Cypermethrin, Cyproconazole, Cyprodinil, DDT, Deltamethrin, Diazinon, Dichlofluanid, Dichlorvos/DDVP, Diclofop-methyl, Diclolan, Dicofol, Diethofencarb, Difenoconazole, Diflubenzuron, Dimepiperate, Dimethenamid, Dimethoate, Dimethomorph(E,Z), Dimethylvinphos(Z), Diniconazole, Diphenamid, Diphenylamine, Disulfoton, Dithiopyr, Diuron, Edifenphos, Endosulfan(alpha, beta, sulfate), Endrin(dieldrin), EPN, Esprocarb, Ethaboxam, Ethalfuralin, Ethiofencarb, Ethion, Ethoprophos, Ethoxazole, Etofenprox, Etridiazole, Etrimfos, Fenamidone, Fenamiphos, Fenarimol, Fenazaquin, Fenbuconazole, Fenitrothion:MEP, Fenobucarb, Fenothiocarb, Fenoxanil, Fenprophthrin, Fenpyroximate, Fenthion:MPP, Fenvalerate, Ferimzone, Fipronil, Fluacrypyrim, Flubendiamide, Flucythrinate, Fludioxonil, Flufenoxuron, Flumioxazine, Fluopicolide, Fluquinconazole, Flusilazole, Flutolanil, Folpet, Forchlorfenuron, Fosthiazate, Fthalide, Furathiocarb, Halfenprox, Heptachlor, Heptachlor epoxide, Hexaconazole, hezaflumuron, Hexythiazox, Imazalil, Imibenconazole, Imidacloprid, Indanofan, Indoxacarb, Iprobenfos/IBP, Iprodione, Iprovalicarb, Isofenphos, Isoprocarb:MIPC, Isoprothiolane, Kresoxim-methyl, Lufenuron, Malathion, Mandipropamid, Mecarbam, Mefenacet, Mepanipyrim, Mepronil, Metalaxyl, Metamitop, Metconazole, Methabenzthiazuron, Methidathion, Methiocarb, Methomyl, Methoxychlor, Methoxyfenozone, Metobromuron, Metolachlor, Metolcarb, Metribuzin, Mevinphos, Molinate, Myclobutanil, Napropamide, Novaluron, Nuarimol, Ofurace, Oxadiazone, Oxamyl, Oxaziclomefon, Oxyfluorfen, Paclobutrazole, Parathion, Parathion-methyl, Penconazole, Pencycuron, Pendimethalin, Pentoxazone, Permethrin, Phenthoate:PAP, Phorate, Phosalone, Phosalone, Phosphamidone, Piperophos, Pirimicarb, Pirimiphos-ethyl, Pirimiphos-methyl, Probenazole, Prochloraz, Procymidone, Profenofos, Prometryn, Propanil, Propiconazole, Propoxur, Prothiofos, Pyraclofos, Pyraclostrobin, Pyrazophos, Pyribenzoxim, Pyributicarb, Pyridaben, Pyridalyl, Pyridaphenthion, Pyrimethanil, Pyrimodifen, Pyriminobac-methyl(E,Z), Pyriproxyfen, Pyroquilon, Quinoclamine, Quintozene(pentachloroaniline, Methyl pentachlorophenyl sulfide), silafluofen, Simazine, Simeconazole, Simetryn, Spirodiclofen, Spiromesifen, Tebuconazole, Tebufenozone, Tebufenpyrad, Tecyprifos, Teflubenzuron, Tefluthrin, Terbufos, Terbutylazine, Terbutryn, Tetraconazole, Tetradifon, Thiabendazole, Thiacloprid, Thiamethoxam, Thiazopyr, Thifluzamide, Thiobencarb, Thiodicarb, Thiophanate-methyl, Tiadinil, Tolclofos-methyl, Tolyfluanid, Tralomethrin, Triadimefon, Triadimenol, Triazophos, Tricyclazole, Trifloxystrobin, Triflumizole, Triflumuron, Trifluralin, Uniconazole, Vinclozolin, Zoxamid



- 최종 원료인 효소처리 대두 발효분말에서도 동일한 ACE 활성이 나오는지를 파악하기 위해서 ACE 활성 테스트를 진행하였고, 결과값이 5, 70L 급 fermenter의 결과값과 유사한 값을 얻을 수 있었다. 따라서 Scale-up에 따른 효능에 변화는 없다는 것을 확인 할 수 있었음.

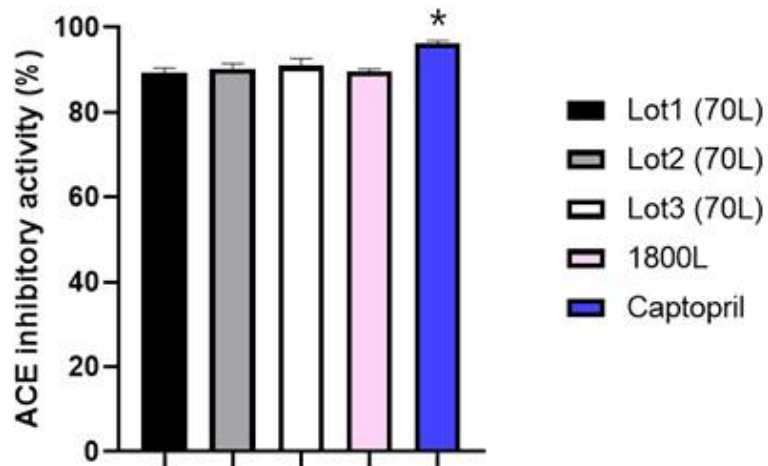


Figure 50. Comparison of ACE inhibitory activities of samples final product

---

## ⑤ 생물전환 식품소재 적용 곡물 가공 음료 개발 및 상품화 마케팅

### ○ 대두 발효 식품소재를 이용한 제품 상품화

- 우유 및 유제품은 영양보급에 중요한 역할을 하지만, 한편으로 최근 알레르기 문제와 포화지방 과다 섭취 우려 등으로 인한 건강 문제가 제기되고 있고, 건강에 민감한 소비자들이 점차 대체 우유 제품에 대한 관심이 증가하고 있음.
- 건강에 대한 관심 증가로, 각종 질병에 대한 예방도 관심이 높아지는데 특히 고혈압은 가장 빈번하게 발생하는 질병 중 하나로 고혈압 예방과 이를 위한 영양관리의 필요성이 높아짐.
- 식품 내에 존재하는 안지오펜신-1 전환효소(ACE) 저해제는 열에 안정하고 체내 흡수도 잘되는 비교적 저분자 물질로 기존 ACE 억제제보다 비교적 낮은 활성을 갖고 있으나 일상적으로 식품 중에 존재하므로 안정적이며 유용성이 기대됨.
- 두유는 가장 대표적인 대체유 제품으로서 건강 식사대용, 간식용으로 섭취하는 경향이 높고, 식물성단백질이 풍부하여 근육강화에 도움이 되고, 소화가 잘 된다는 장점이 있음.
- 선행연구 결과들로부터 생물전환 기능성 펩타이드는 안전하고, 매우 선택적이며, 효과적이고 지속적이므로 화학 치료제와 비교하여 더 좋은 대체제임을 확인하였음.
- 따라서 일반적으로 식이조절로 사후 혈압 조절 관리를 진행하는 고혈압에 특성에 맞춰서 식사대용 및 간식 등으로 장기 섭취가 가능하고, 항고혈압성 소재인 대두 발효 식품소재를 더하여 프리미엄 파우치 두유제품으로 개발함.

### - 관능평가를 통한 제품의 소재 함량 및 배합비 설정

- 본 연구에서 개발된 대두 발효 식품 소재는 일반적인 탈지 대두분을 사용하지 않고 대두 전체를 유산균 발효한 것으로, 발효 과정에서 대두 고유의 유지 성분의 산패 및 젖산 축적으로 인해서 산미 등이 일부 관찰되고 있으며, 이러한 변화는 전반적으로 두유 제품의 기호도를 저하시키는 원인이 될 수 있음.
- 따라서, 대두 발효 식품 소재를 두유의 기호도를 낮추지 않는 범위 내에서 최대한 적용시키기 위해, 대두 발효 식품 소재가 0.1~1.0%로 함유되도록 두유 시료를 제조한 뒤, 관능평가를 실시하였으며, 기존 두유와의 관능, 기호도의 차이를 평가하여 배합 가능한 한계점을 확인하고자 하였음.
- 시료는 난수표를 이용하여 4자리 숫자를 표기하여 구분하였고, 각각의 시료를 시음한 후에는 입을 헹굴 수 있도록 상온의 물을 제공하였으며, 각각의 시료에 대하여 9점 척도(1: 전혀 나지 않는다, 9: 이상한 맛이 매우 강하다)로 평가하여 기존 두유의 관능에 영향을 주는 정도를 평가하였고, 두유의 기호도 검사 결과에 대하여 시료 간의 유의적 차이를 검증하기 위해 분산분석(analysis of variance, ANOVA)을 수행하였으며, 그 결과에 따라 Duncan's multiple range test를 수행한 후에 SPSS statics 17.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA)를 이용하여 통계분석을 수행함.



- 대두 발효 식품소재를 첨가한 두유의 관능평가 결과, 대두 발효 식품 소재가 포함되지 않은 두유액과 1.0%까지의 비율로 첨가한 두유의 관능 및 기호도 항목에서 기존 두유 제품과의 유의적인 차이가 없었지만, 소재를 첨가할수록 기호도값이 낮아지는 경향이 보였음. 이러한 경향은 대두 발효 식품 소재에서 나타나는 이취 및 산미 등이 제품 관능에 영향을 주는 것으로 평가 되었음.
- 대두 발효 식품소재를 제조할 때 발효가 진행됨에 따라 발효 특유의 냄새를 갖는 것으로 확인 되었음. 그래서 소재를 두유에 첨가하여 이미 인지정도를 측정한 결과, 대두 발효 식품 소재를 0.5% 첨가시 대조군과 비교하여 이미의 유의적인 차이가 없었으며, 피검자의 변별력이 떨어지는 것을 확인할 수 있었음.
- 따라서 대두 발효 식품 소재를 두유 제품에 적용할 경우, 소재의 이미가 마스킹 될 수 있는 배합비는 0~0.5% 비율로 확인되었음.

Table 32. 대두 발효 식품소재를 첨가한 두유액의 관능평가 인지도<sup>1)</sup>

	대두 발효 식품소재 함량(%)			
	0	0.1	0.5	1
색깔	6.43 <sup>a</sup>	7.14 <sup>a</sup>	6.57 <sup>a</sup>	5.86 <sup>a</sup>
향	5.43 <sup>a</sup>	6.14 <sup>a</sup>	5.86 <sup>a</sup>	5.57 <sup>a</sup>
맛	5.85 <sup>a</sup>	6.29 <sup>a</sup>	5.57 <sup>a</sup>	5.00 <sup>a</sup>
이취	2.57 <sup>a</sup>	2.86 <sup>a</sup>	2.43 <sup>a</sup>	3.43 <sup>a</sup>
이미	2.57 <sup>a</sup>	2.86 <sup>a</sup>	2.43 <sup>a</sup>	3.43 <sup>a</sup>
기호도	6.0 <sup>a2)</sup>	6.0 <sup>a</sup>	6.14 <sup>a</sup>	5.14 <sup>a</sup>

1) 이미 인지 평균, 9점 척도

2) 동일한 문자는 시료 간 차이가 뚜렷하지 않음을 의미한 (95% 신뢰수준)

- 이룸 두유의 전두유 원액을 베이스로 하여 대두 발효 식품 소재를 이용한 제품 컨셉과 관능 개선을 위한 기타 식품 부원료를 배합하여 두유 신제품 배합비를 개발하고자 하였음.
- 대두 발효 식품소재는 앞서 이미와 맛에 대한 관능평가 실험의 결과를 바탕으로 이미가 거의 느껴지지 않는 0.5%의 배합비로 결정하였음.
- 본 두유 배합비 중의 대두 발효 식품소재의 배합비는 동물실험의 결과에서 실험동물의 경구투여 용량인 100mg/kg과 250mg/kg과 500mg/kg을 인체등가비로서 환산할 경우 두유 한팩(200mL)에 대하여 일일 섭취기준은 각각 0.1%, 0.25%, 0.5%이며, 동물실험에서는 500mg/kg에서도 충분한 혈압조절 기능을 확인할 수 있었으므로 0.5%의 본 배합비는 소재의 기능을 기대하기에 충분한 섭취량으로 결정할 수 있었음.

- 두유 제품의 배합비는 전두유 원액을 바탕으로 한 대두 발효 식품소재의 관능에 적합한 부원료들을 선별하여 기초 배합비 실험을 통해 아래와 같은 배합비를 선별하였음.

Table 33. 두유 배합비표

시료명	원료 및 함량 (%)	컨셉
배합 A	백태 70, 유기농 설탕 3, 현미유 0.75, 동결건조흑미분말 0.3, 약콩 분말 0.3, 천일염, 0.16, 해조분말 0.15, 미강발효분말 0.02, 건조효모아연 0.03, 유산균추출물분말 0.03, 젤란검 0.02, 겨우살이추출분말 0.01, 파라다이스넛추출분말 0.009, 비타민 E 0.004, 후코이단분말 0.005, 정제수 24.71, PA 대두 발효분말 0.5	대두 발효 식품 소재 및 발효 소재를 이용한 발효 컨셉의 두유
배합 B	원액두유 70, 정제수 25, 블랙푸드7곡혼합분말 2, 비타프로BSH 1.3, 니코틴산아미드 0.7, 산화이연 0.5, 비타민B6염산염 0.3, 천일염 0.2	설탕 및 당 첨가를 최소화하여 건강 컨셉의 두유
배합 C	원액두유 70, 정제수 21, 이소말토올리고당 3, 발아약콩혼합분말 2.3, 현미유 0.75, 해조칼슘 0.45, 천일염 0.1, 견과혼합페이스트 1.0, 파이토뉴트리5종분말 1.0, 동결건조시금치분말 0.2, 동결건조브로콜리분말 0.2	몸에 좋은 약콩을 컨셉으로 한 두유

- 선별된 두유 3종의 배합비를 제조한 후, 관능평가를 실시하여 상품화에 적합한 최종 배합비를 선정하고자 하였음.
- 시료는 난수표를 이용하여 4자리 숫자를 표기하여 구분하였고, 각각의 시료를 사용한 후에는 입을 헹굴 수 있도록 상온의 물을 제공하였음.
- 평가는 7가지 평가항목(색깔, 향, 맛, 목넘김, 외관, 종합적인 기호도)으로 진행하였고, 평가 척도는 9점 척도(1: 대단히 싫다, 9: 대단히 좋다)를 사용하였음.
- 두유 3종의 기호도 검사 결과에 대해 시료 간의 유의적 차이를 검증하기 위해 분산분석 (analysis of variance, ANOVA)을 수행하였으며, 그 결과에 따라 Duncan's multiple range test를 수행함. 통계분석에는 SPSS statics 17.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA)을 사용함.

- 두유 3종의 종합적인 기호도 분석 결과는 아래 표와 같았음. 종합적인 기호도 항목에서는 배합비 A가 B와 C보다 높은 것으로 확인되었음.

Table 34. 두유 3종의 종합적인 기호도

	종합적인 기호도
배합A	5.83 <sup>b</sup>
배합B	4.17 <sup>ab</sup>
배합C	3.17 <sup>a</sup>

- 1) 종합적인 기호도, 9점 척도
- 2) 동일한 문자는 시료간 차이가 뚜렷하지 않음을 의미함 (95% 신뢰수준)

- 세부 기호도 결과는 아래의 표와 같았음. 향, 맛, 목넘김에서는 시료간의 유의적인 차이를 보이지 않았음. 하지만 맛에 대해서 배합 A가 B와C에 비해 기호도가 높은 것으로 확인되었음.

Table 35. 두유 3종의 세부 기호도

	색 <sup>1)</sup>	향	맛	목넘김	외관
배합A	7.0 <sup>b</sup>	5.17 <sup>a</sup>	5.67 <sup>a</sup>	6.83 <sup>a</sup>	6.33 <sup>b</sup>
배합B	5.0 <sup>ab</sup>	6.17 <sup>a</sup>	4.0 <sup>a</sup>	6.83 <sup>a</sup>	4.83 <sup>ab</sup>
배합C	3.83 <sup>a</sup>	4.67 <sup>a</sup>	3.5 <sup>a</sup>	5.17 <sup>a</sup>	3.67 <sup>a</sup>

- 1) 세부기호 평균, 7점 척도
- 2) 동일한 문자는 시료간 차이가 뚜렷하지 않음을 의미함 (95% 신뢰수준)

#### 제품 컨셉

##### 주원료

- 백태(국산) 70%
- PA 대두발효분말 0.5%
- 미강 발효 분말 0.03%

##### 컨셉

- 100% 국산콩으로 만든 국내산 전두유
- 향료, 유화제, 소포제 無
- PA 대두발효분말 0.5% (1g/day 정도(제품으로 약 2포) 섭취시 항고혈압 효과가 클 것으로 기대됨.)

## Specification

No.	원재료명	배합비(%)	원산지
1	백태	70.0	국산
2	정제수	24.7	
3	유기농 설탕	3.0	
4	PA 대두발효분말	0.5	국산
5	약콩 분말	0.3	
6	현미유, 동결건조 흑미분말, 천일염, 해조분말, 미강발효분말, 건조효모아연, 유산균추출물분말, 젤란검, 겨우살이추출분말, 파라다이스넛추출분말, 비타민 E, 후코이단분말	1.5	
	합계	100.0	

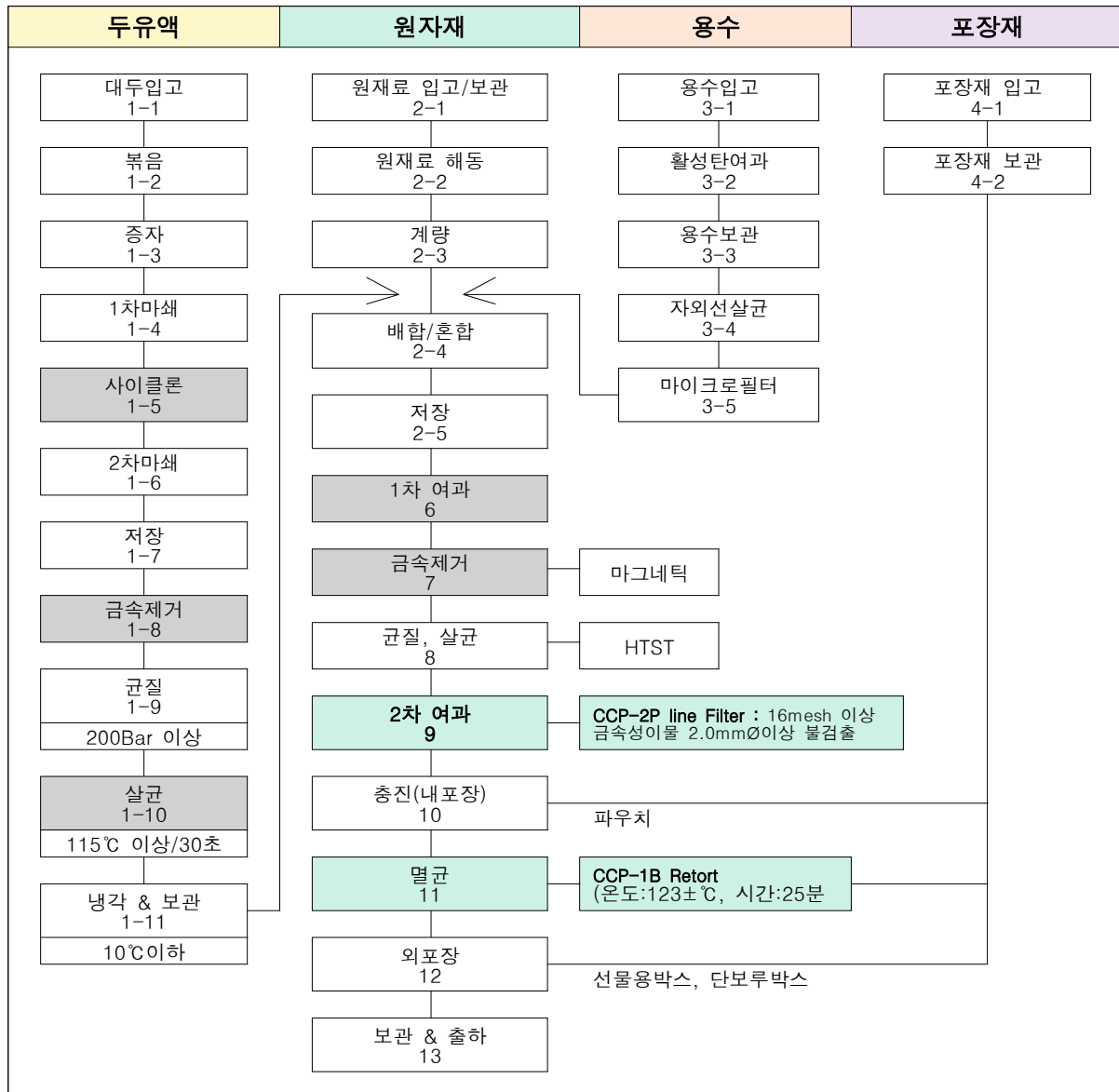
- 표시사항

항목		표시내용																																							
주 표 시 면	제품명(10P 이상)	• 황성주 국산콩 두유 발효 플러스																																							
	내용량(열량) (12P 이상)	• 날팩:180mL(kcal)																																							
	제품명에 포함된 원재료명 (14P 이상)	• 백태 70%, PA 대두발효분말 0.5%																																							
정 보 표 시 면	식품의 유형 (10P 이상)	• 가공두유, 멸균제품(레토르트식품)																																							
	원재료명	• 백태 70%, 유기농설탕, 현미유, 동결건조흑미분말, 약콩 분말, 천일염, 해조분말, 미강발효분말, 건조효모아연, 유산균추출물분말, 젤란검, 겨우살이추출분말, 파라다이스넛추출분말, 비타민 E, 후코이단분말, 정제수, PA 대두발효분말																																							
	내포장재질 (10P 이상)	• 폴리프로필렌(PP)																																							
	유통기한/품질유지기한 (12P 이상)	• 품목보고번호: • 유통기한: 상단부 표기일까지(8개월까지)																																							
기 타 표 시 면	업소명 및 소재지 (10P 이상)	• 유통전문판매원: (주)이롬/서울특별시 강남구 역삼로 552 • 제조원: (주)연두/전북 익산시 함열읍 익산대로 78길 145-28																																							
	섭취 시 주의사항 (10P 이상)	• 용기가 변형, 팽창, 손상되었거나 내용물에 이상이 있을 경우 섭취하지 마십시오. • 개봉 후에는 바로 섭취하시기 바랍니다. • 원료성분이 뜨거나 가라앉을 수 있으니 잘 흔들어서 드십시오. • 전자레인지 직접 가열하지 마십시오. • 파우치 특성상 취급 시 용기에 손을 베일 염려가 있으니 개봉 시 손이 다치지 않도록 주의하시기 바랍니다. • 본 제품은 우유, 땅콩, 호두, 복숭아, 토마토, 잣을 사용한 제품과 같은 제조시설에서 제조하고 있습니다.																																							
	보관방법 (10P 이상)	• 직사광선을 피해 서늘한 곳에 보관하십시오.																																							
	기타표시사항 (10P 이상)	• 이롬고객센터: 080-345-1111(수신자부담) • 반품 및 교환장소: 구입처 및 판매원 • 본 제품은 공정거래위원회 고시 소비자분쟁해결기준에 의거 교환 또는 보상 받을 수 있습니다. • 부정·불량식품 신고는 국번없이 1399																																							
	영양성분 (10P 이상)	<table border="1"> <thead> <tr> <th colspan="2">영양정보</th> <th colspan="2">총 내용량 180mL 84 kcal</th> </tr> <tr> <th>총 내용량 당</th> <th colspan="3">% 영양성분기준치</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td><b>나트륨</b></td> <td>59 mg</td> <td></td> <td>3 %</td> </tr> <tr> <td><b>탄수화물</b></td> <td>7 g</td> <td></td> <td>2 %</td> </tr> <tr> <td><b>당류</b></td> <td>3 g</td> <td></td> <td>3 %</td> </tr> <tr> <td><b>지방</b></td> <td>3 g</td> <td></td> <td>6 %</td> </tr> <tr> <td><b>트랜스지방</b></td> <td>0 g</td> <td></td> <td></td> </tr> <tr> <td><b>포화지방</b></td> <td>0.4 g</td> <td></td> <td>2 %</td> </tr> <tr> <td><b>콜레스테롤</b></td> <td>0 mg</td> <td></td> <td>0 %</td> </tr> <tr> <td><b>단백질</b></td> <td>5 g</td> <td></td> <td>9 %</td> </tr> </tbody> </table> <p>1일 영양성분 기준치에 대한 비율(%)은 2,000kcal 기준이므로 개인의 필요 열량에 따라 다를 수 있습니다.</p>	영양정보		총 내용량 180mL 84 kcal		총 내용량 당	% 영양성분기준치			<b>나트륨</b>	59 mg		3 %	<b>탄수화물</b>	7 g		2 %	<b>당류</b>	3 g		3 %	<b>지방</b>	3 g		6 %	<b>트랜스지방</b>	0 g			<b>포화지방</b>	0.4 g		2 %	<b>콜레스테롤</b>	0 mg		0 %	<b>단백질</b>	5 g	
영양정보		총 내용량 180mL 84 kcal																																							
총 내용량 당	% 영양성분기준치																																								
<b>나트륨</b>	59 mg		3 %																																						
<b>탄수화물</b>	7 g		2 %																																						
<b>당류</b>	3 g		3 %																																						
<b>지방</b>	3 g		6 %																																						
<b>트랜스지방</b>	0 g																																								
<b>포화지방</b>	0.4 g		2 %																																						
<b>콜레스테롤</b>	0 mg		0 %																																						
<b>단백질</b>	5 g		9 %																																						

- 기준 및 규격

항목		규격	비고
식품의 유형		가공두유, 멸균제품(레토르트 식품)	내부 관리규격
고형분(%)	두유액	7.0 ± 0.2	
	완제품	8.4 ± 0.5	
pH		6.8 ± 0.2	
당도(Brix)		5.3 ± 0.5	
비중		1.02 ± 0.002	
세균수		n=5, c=0, m=0	법적 관리규격
세균발육		음성	
타르색소		불검출	
내용량 허용 오차		180mL ± 43.5% (8.1mL)	

- 제품 제조 공정도



- 제품 시생산

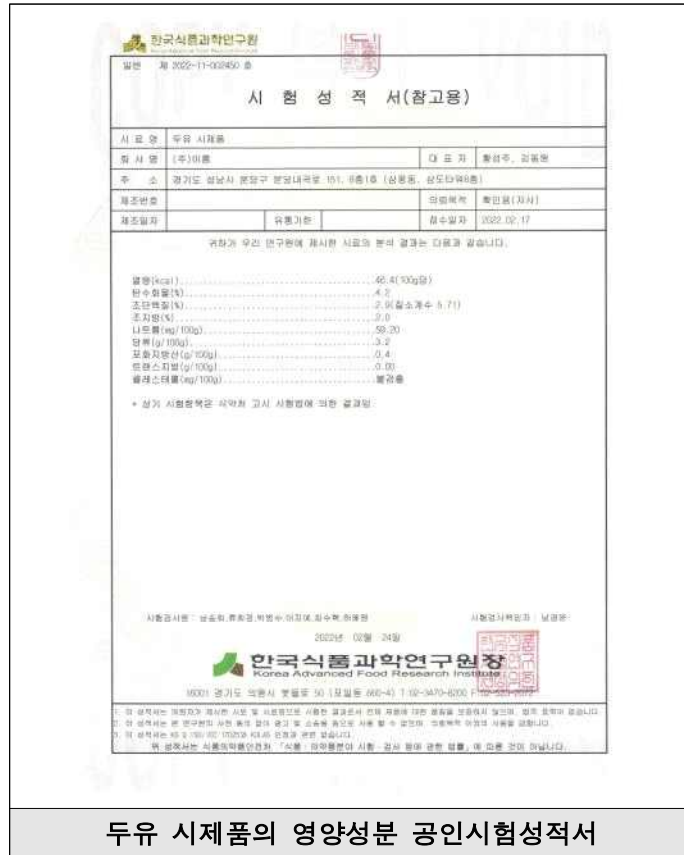
- 확립된 최종 두유 제품의 제조 공정을 적용하여 파우치 타입의 시제품을 시험 생산하였음

	
<p>① 원료 roasting</p>	<p>② 대두 증숙</p>
	
<p>③ 대두 1차 분쇄</p>	<p>④ 대두 2차 분쇄</p>
	
<p>⑤ 살균 및 냉각</p>	<p>⑥ 두유액 저장</p>
	
<p>⑦ 파우치 충전</p>	

Figure 51. 두유 제품 시생산 공정







– 시제품 품질규격 분석

- 두유 시제품으로 두유 품질 규격에 대한 성분을 분석한 결과는 다음과 같으며 식품위생법상의 가공두유의 규격 및 내부 품질규격에 적합한 결과를 확인하였음.

항목		규격	결과	비고
고형분(%)	두유액	7.0 ± 0.2	6.9%	내부 관리규격
	완제품	8.4 ± 0.5	8.1%	
pH		6.8 ± 0.2	6.7	
당도(Brix)		5.3 ± 0.5	5.4	
비중		1.02 ± 0.002	1.02	법적 관리규격
세균수		n=5, c=0, m=0	0,0,0,0,0	
세균발육		음성	음성	
내용량 허용 오차		180mL ± 43.5% (8.1mL)	적합	

---

- 상품 디자인 개발

- 상기와 같이 개발된 제품에 대해 발효 컨셉을 부각시킬 수 디자인을 개발하였음



## ○ 대두 발효 식품 소재의 활성 물질 규명

- LC-ESI-TOF-MS / MS 분석 및 in-silico platform을 이용하여 대두발효 식품소재 중의 활성을 나타내는 활성(지표)성분을 규명하고자 하였음.
- 대두 발효 식품소재의 LC-ESI-TOF-MS / MS 분석 후, 주요 피크 (P1 및 P2) (Figure 52)가 확인되었고 선택된 생물 전환된 대두 샘플에서 사용 가능한 가장 풍부한 펩타이드가 확인되었음.
- 분석으로부터 확인된 주요 펩타이드 서열은 in-silico platform (<http://crdd.osdd.net/raghava/ahtpdb/>)을 사용하여 ACE 억제 활성에 대응되는 서열의 스크리닝에 사용되었음.
- In-silico platform을 이용한 스크리닝에 따라 잠재적으로 ACE 억제활성의 가능성이 있는 것으로 밝혀진 펩타이드로 AIPVNKP, DEGEQPRPFPPF, DEGEQPRPFPPRP, DEGRQFPFPPPHQ, LEPGDMIHIP 및 PPNPHIGIN의 총 6종의 펩타이드 서열을 선별할 수 있었으며 (Table 37), 각각의 펩타이드를 합성하여 실험에 사용하였음(GL Biochem (Shanghai) Ltd.).

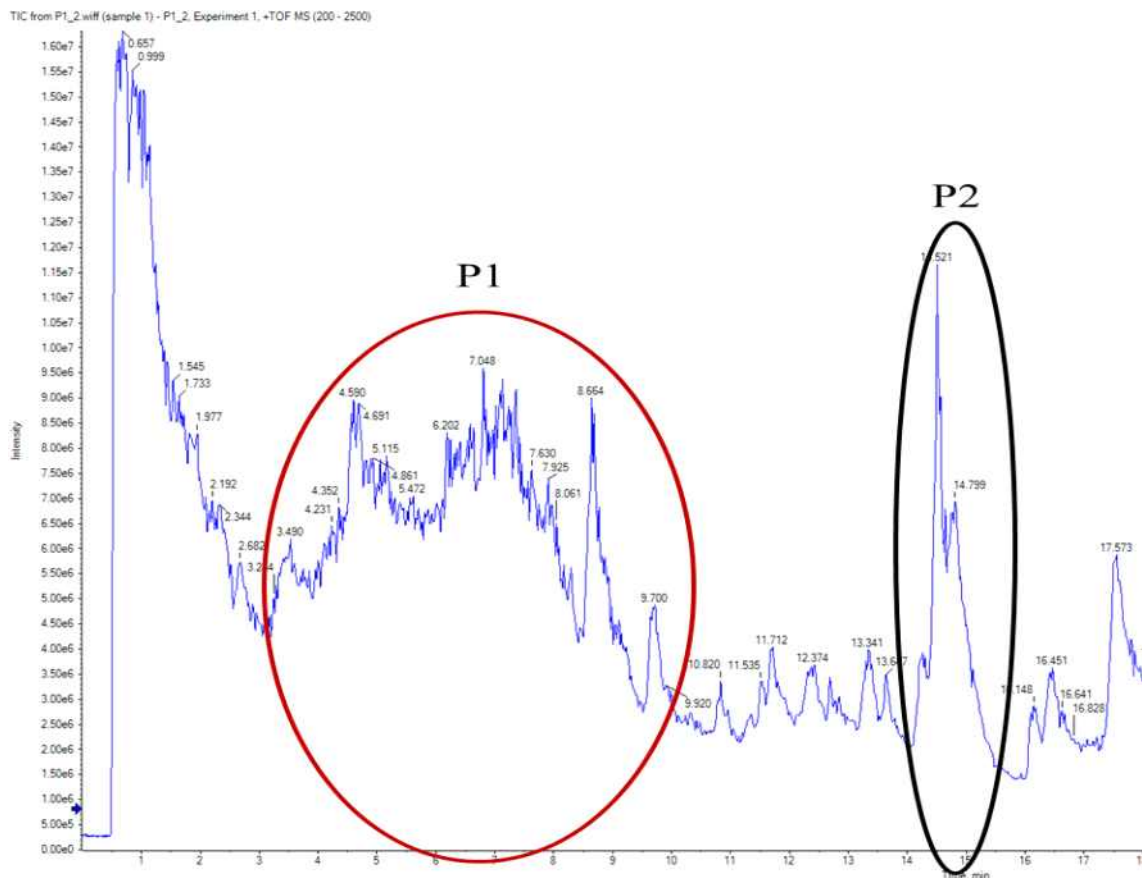


Figure 52. Chromatograph of the bioconverted soya bean samples obtained from LC-ESI-TOF-MS/MS analysis.

Table 37. LC-ESI-TOF-MS/MS analysis of peptides ( $\leq 3$  kDa) in the bioconverted soya bean samples.

Fraction	Prec MW	Prec m/z	Theor MW	Theor m/z	Theor z	Identified sequence
P1	548.2577515	549.265	548.2594604	549.2667236	1	<b>AIPVNKP</b>
	907.437439	908.4447	907.4399414	908.4472046	1	EITPEKNP
	737.4405518	738.4478	737.4436035	738.4508667	1	TTQVPPHS
	1167.612305	584.8134	1167.613525	584.8140259	2	ANIELVGIK
	1906.940186	477.7423	1906.943848	477.7432251	4	DEDEQPRPIP
	2201.091064	551.28	2201.097656	551.2817383	4	DEDEQPRPIPPF
	1557.838623	520.2868	1557.841553	520.2877808	3	DEDEQPRPIPPFRP
	1672.867676	837.4411	1672.86853	837.4415283	2	DEDEQPRPIPPFRPQP
	1447.757935	724.8862	1447.757202	724.8858643	2	DEGEQPRPFP
	1489.736816	745.8757	1489.746582	745.8806152	2	<b>DEGEQPRPFPFP</b>
	1323.639038	662.8268	1323.645874	662.8302612	2	<b>DEGEQPRPFPFPFP</b>
	1194.599121	598.3068	1194.603271	598.30896	2	DEQPRPIPPF
	1104.549683	553.2821	1104.550537	553.2825317	2	DERQFPFP
	923.432251	462.7234	923.4348755	462.7247009	2	DERQFPFPRPPH
	1095.51709	548.7658	1095.519653	548.7670898	2	<b>DERQFPFPRPPHQ</b>
	957.4856567	479.7501	957.4879761	479.7512512	2	DERQFPFPRPPHQKE
	1170.527832	586.2712	1170.530518	586.272522	2	DKGIGTIISP
	1299.626099	650.8203	1299.624756	650.8196411	2	EDEQPRPIPPFRPQP
	1223.583496	612.799	1223.585571	612.8001099	2	EGEQPRPFPFP
	924.4880981	463.2513	924.4916382	463.2531128	2	EITPEKNPQL
	1199.674438	600.8445	1199.676147	600.8453369	2	EQPRPIPPFRPQP
	1446.717896	724.3662	1446.717651	724.3661499	2	ERQFPFPRPPHQ
	1042.491089	522.2528	1042.490601	522.2525635	2	FEITPEKNP
	993.5288696	497.7717	993.5283813	497.7714539	2	<b>LEPGDMIHIP</b>
993.5288696	497.7717	993.5283813	497.7714539	2	LEPGDMIHIP	
1194.546875	598.2807	1194.551636	598.2831421	2	<b>PPNPHIGIN</b>	
1906.940186	477.7423	1906.943848	477.7432251	4	QFPFPRPPHQ	
1649.805176	550.9423	1649.806274	550.942688	3	SGDALRVP	
958.4696655	959.4769	955.5702515	956.5775146	1	SGDALRVPAG	
P2	6055.18457	866.0336	6055.22168	866.0389404	7	TPMIGTLAGANSLLNALPEEVIOHTFNLKSQQ
						ARQIKNNNPFKFLVPPQESQKR

○ 대두 발효 식품소재의 활성 물질 함량 분석

- HPLC을 이용한 활성 물질 분석

- 대두 발효 식품소재의 활성물질 함량 분석을 위해서 HPLC을 이용하여 분석을 진행하였음.
- 분석을 위한 대두 발효 식품소재의 활성물질은 강원대에서 선행연구로 설정한 펩타이드 활성물질을 이용하여 분석을 진행하였고, 활성물질은 총 6가지로 1차적으로 ACE 억제 활성 평가를 토대로 활성물질을 선별하였음.
- ACE 억제 활성 평가로 선별된 1개의 활성물질을 이용하여 HPLC 분석 조건을 토대로 분석을 진행하였고, 최종적으로 대두 발효 식품소재 및 소재를 적용한 두유 제품의 분석 조건으로 채택하였음.

Table 38. 활성성분 HPLC 분석 조건

Column	Kinetex 5u EVO C18 100A (4.6 × 250mm, 5 $\mu$ m)		
	Time(min)	0.1% TFA in Acetonitrile A(%)	0.1% TFA in Water B(%)
Mobile phase	0.01	30	70
	25	55	45
	25.01	100	0
	30	30	70
	35	30	70
Column temp.	40 $^{\circ}$ C		
Flow rate	1.0 mL/min		
Injection volume	20 $\mu$ L		
Autosampler temp.	Room temperature		
Run time	35min (EGEQRPFPFP: 2.3min)		
Wavelength	220 nm		

- 물질 분석 결과를 토대로 정량선을 그렸고, 정량선을 토대로 대두 발효 식품 소재 및 소재를 적용한 두유에서 활성물질이 얼마나 들어있는지 분석을 하였음

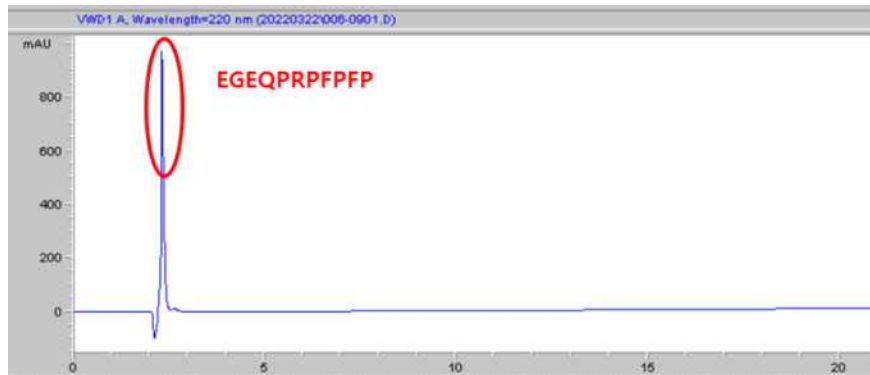


Figure 53. HPLC 활성물질(EGEQPRPFPPF) 분석결과

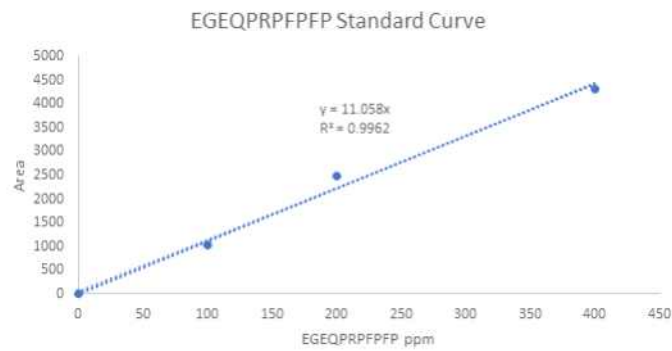


Figure 54. 활성성분 (EGEQPRPFPPF) 검량선



Figure 55. 원료의 지표성분 HPLC 분석결과

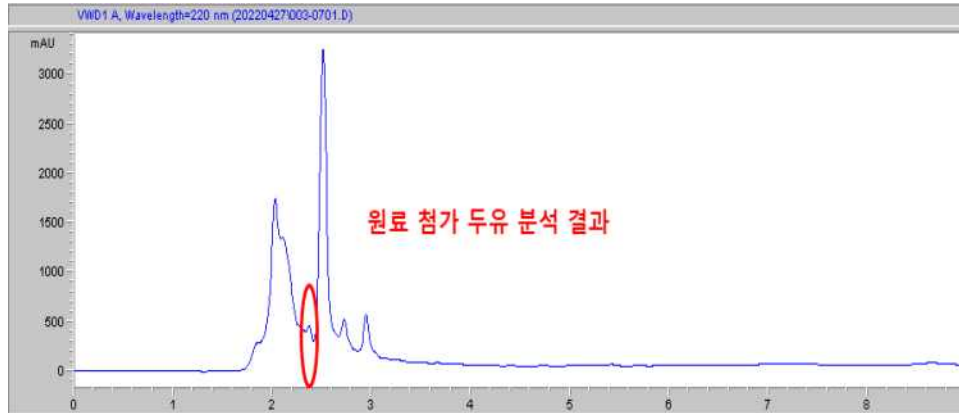


Figure 56. 원료를 적용한 두유 제품의 지표성분 HPLC 분석결과

- 분석한 결과를 보게 되면 원료와 원료를 첨가한 두유의 활성물질 함량은 다음과 같다. 원료의 경우 661~665 ppm의 범위에서 측정되었고, 두유의 경우 20~32 ppm 범위에서 측정된 것을 확인 할 수 있었음.
- 최종 생산된 원료와 두유에서 선별된 1종의 표준물질 peptide의 peak를 확인할 수 있었고, 원료와 두유 모든 샘플에서 검출되는 것을 확인할 수 있었음. 또한 추후에 생산될 원료와 두유에서의 품질관리를 위한 함량 또한 확인할 수 있었음.

Table 39. 원료 및 원료를 적용한 두유 제품의 활성성분 HPLC 분석 결과

Sample Name	EGEQPRPFPPF	
	Area	ppm
Fermented soybean	7362	665.76
	7280.7	658.41
	7314.4	661.46
Fermented soybean soymilk	222.5	20.12
	284.3	25.71
	357.2	32.30

⑥ 생물전환 식품소재 적용 곡물 가공 음료의 효능 규명

○ 생물전환 식품소재 적용 곡물 가공 음료의 항고혈압 효능 in vivo 평가

- 생물전환 식품소재 적용 곡물 가공 음료의 항고혈압 효능

- 생물전환 식품소재 적용 곡물 가공 음료 시제품을 BSB의 용량이 50, 250, 500mg/kg이 투여되도록 시제품을 조제하였으며, SHR에 섭취시켰을 시 혈압을 크게 감소되었고 시제품의 복용량에 따라 효능이 달라졌음.
- 4주 차에서 시제품을 섭취한 SHR+50mg/kg, SHR+250mg/kg, SHR+550mg/kg, SHR+captopril 군의 SBP은 각각 30.85, 39.3, 42.25 및 40.75mmHg 감소하였으며, 고혈압 치료제로 쓰이는 captopril과 유사한 효능을 나타냄을 확인하였음.

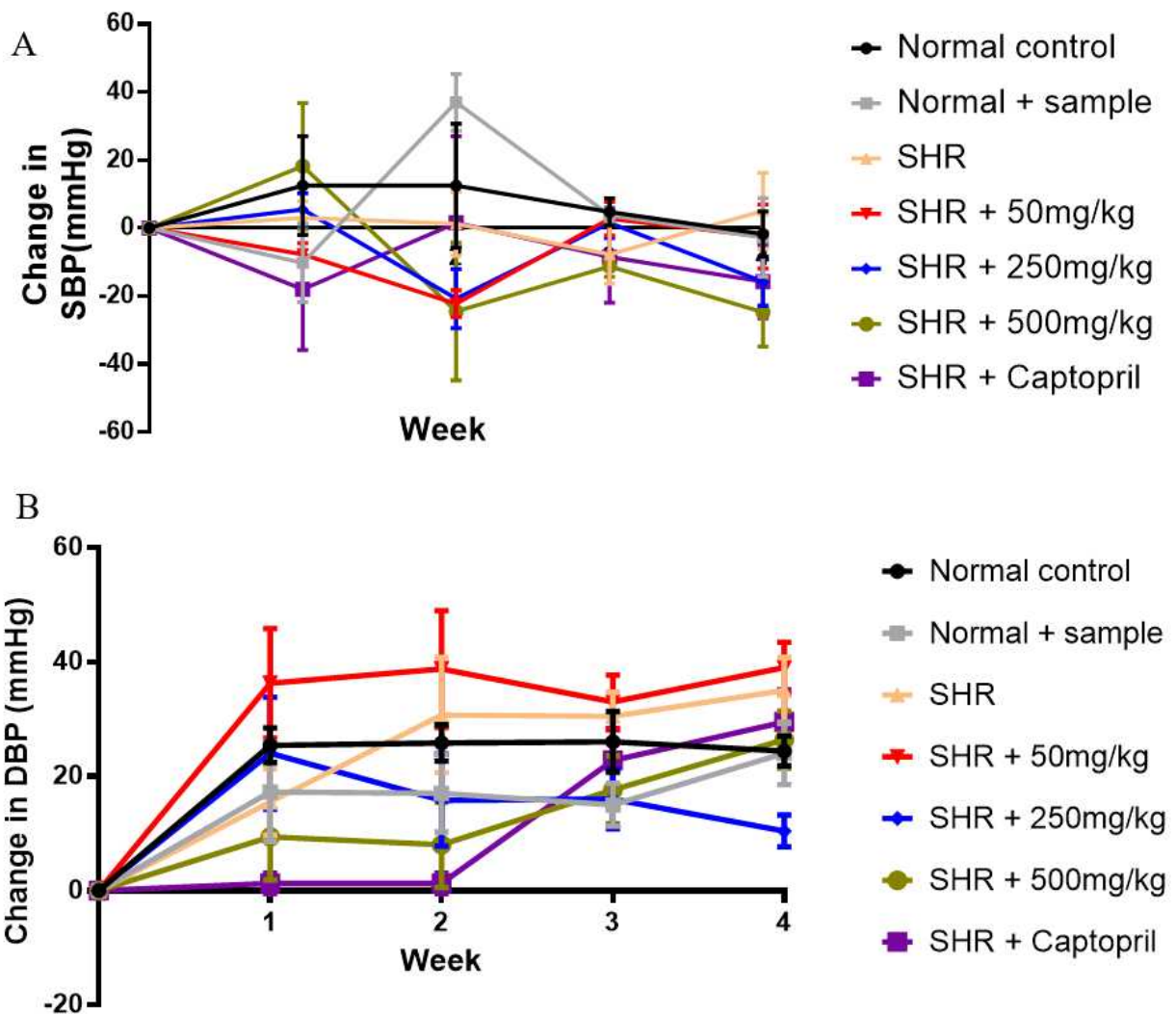


Figure 57. Effect of the newly developed product on blood pressure in rat. Normal Control, Normal 500: Normal rat treated with 500 mg/Kg; SHR 50, 250, and 500: Spontaneous hypertension rat with treatment 50, 250, 500, respectively. SHR-Captopril. SHR-NC = SHR rat without treatment. SBP= systolic blood pressure



- 생물전환 식품소재 적용 곡물 가공 음료 섭취에 의한 사료 섭취량 분석

- 생물전환 식품소재 적용 곡물 가공 음료 시제품은 실험군이 섭취하는 사료의 양에 큰 영향을 미치지 않았음

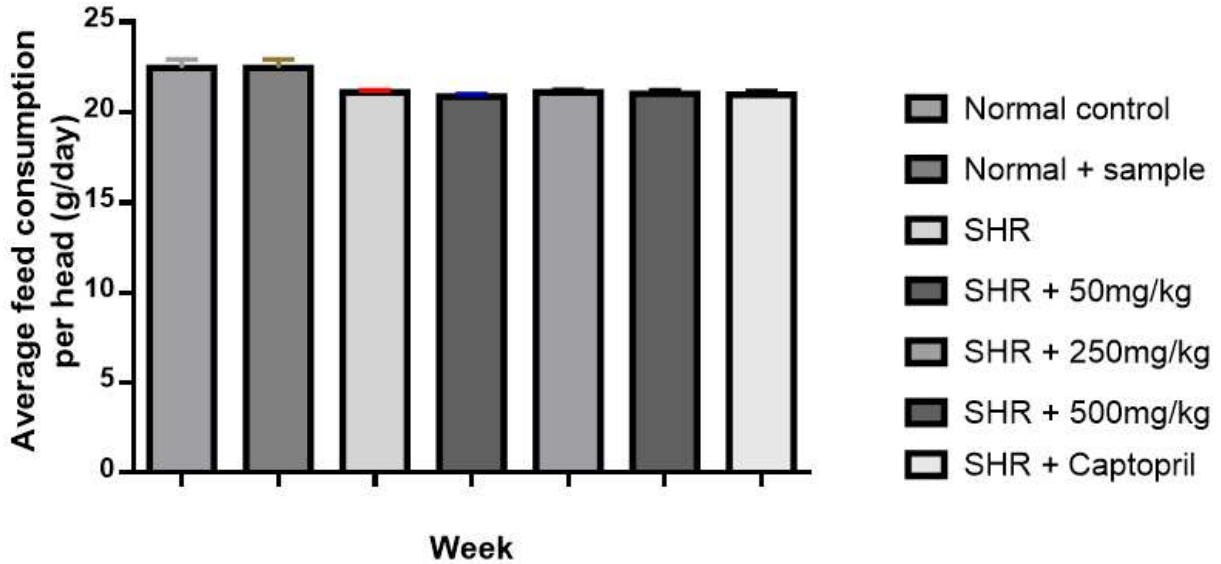


Figure 58. Effect of the pilot product on the feed consumption by rat

- 생물전환 식품소재 적용 곡물 가공 음료 섭취에 의한 체중 변화 분석

- 생물전환 식품소재 적용 곡물 가공 음료 시제품은 실험군의 체중에 영향을 미치지 않았음

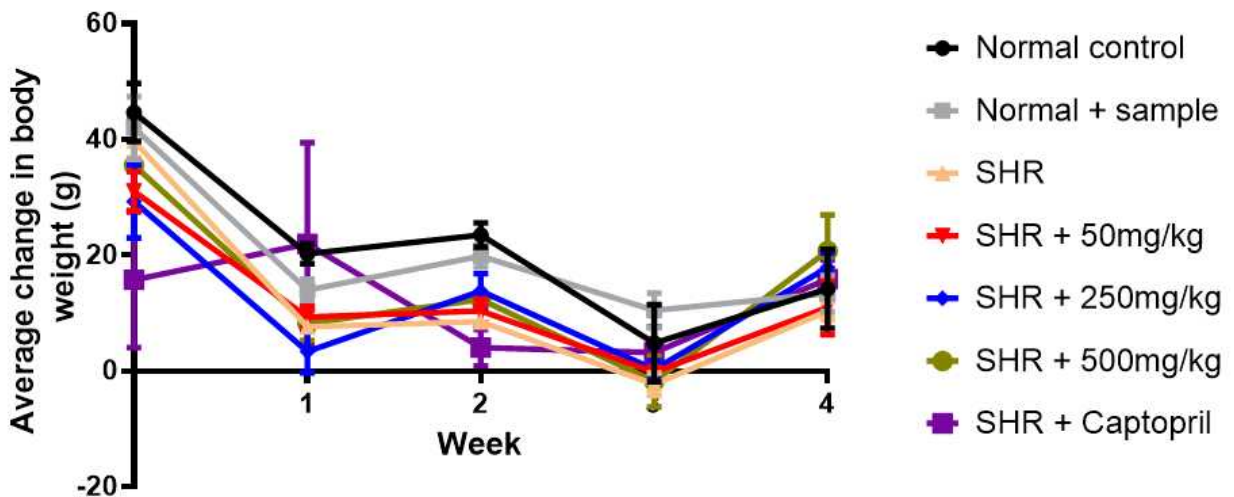


Figure 59. Effect on the body weight of the rat after treatment with PP. Normal Control, Normal 500: Normal rat treated with 500 mg/Kg; SHR 50, 250, and 500: Spontaneous hypertension rat with treatment 50, 250, 500, respectively. SHR-Captopril. SHR-NC = SHR rat without treatment.

○ 생물전환 식품소재 적용 시제품 섭취에 의한 장내 균총 변화 분석

- SHR은 정상혈압군에 비해 높은 Firmicutes/Bacteroidetes의 비율을 보였으나, 시제품을 섭취한 SHR군에서 Firmicutes/Bacteroidetes의 비율이 크게 감소하였음.

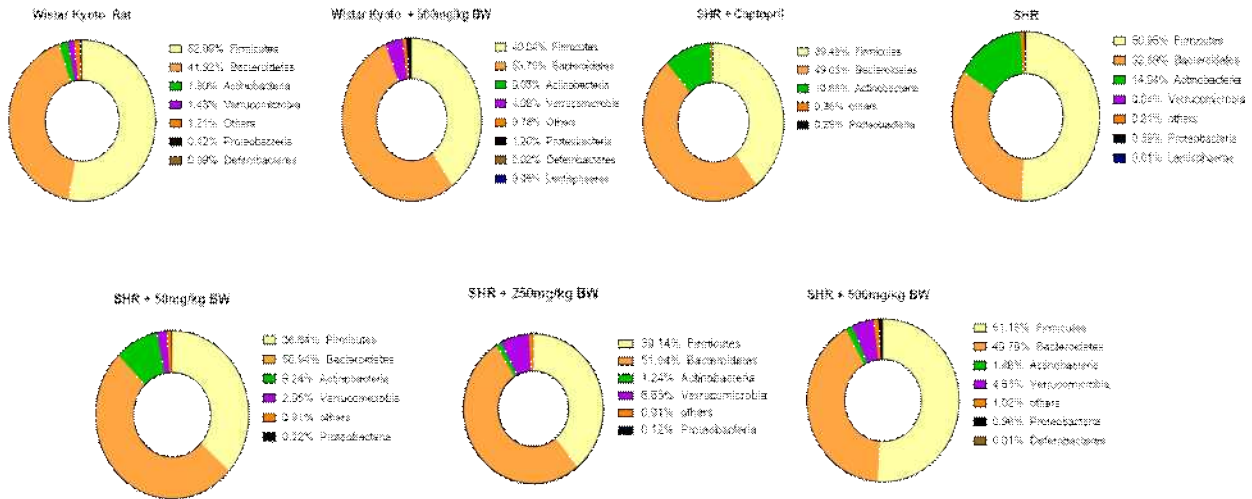
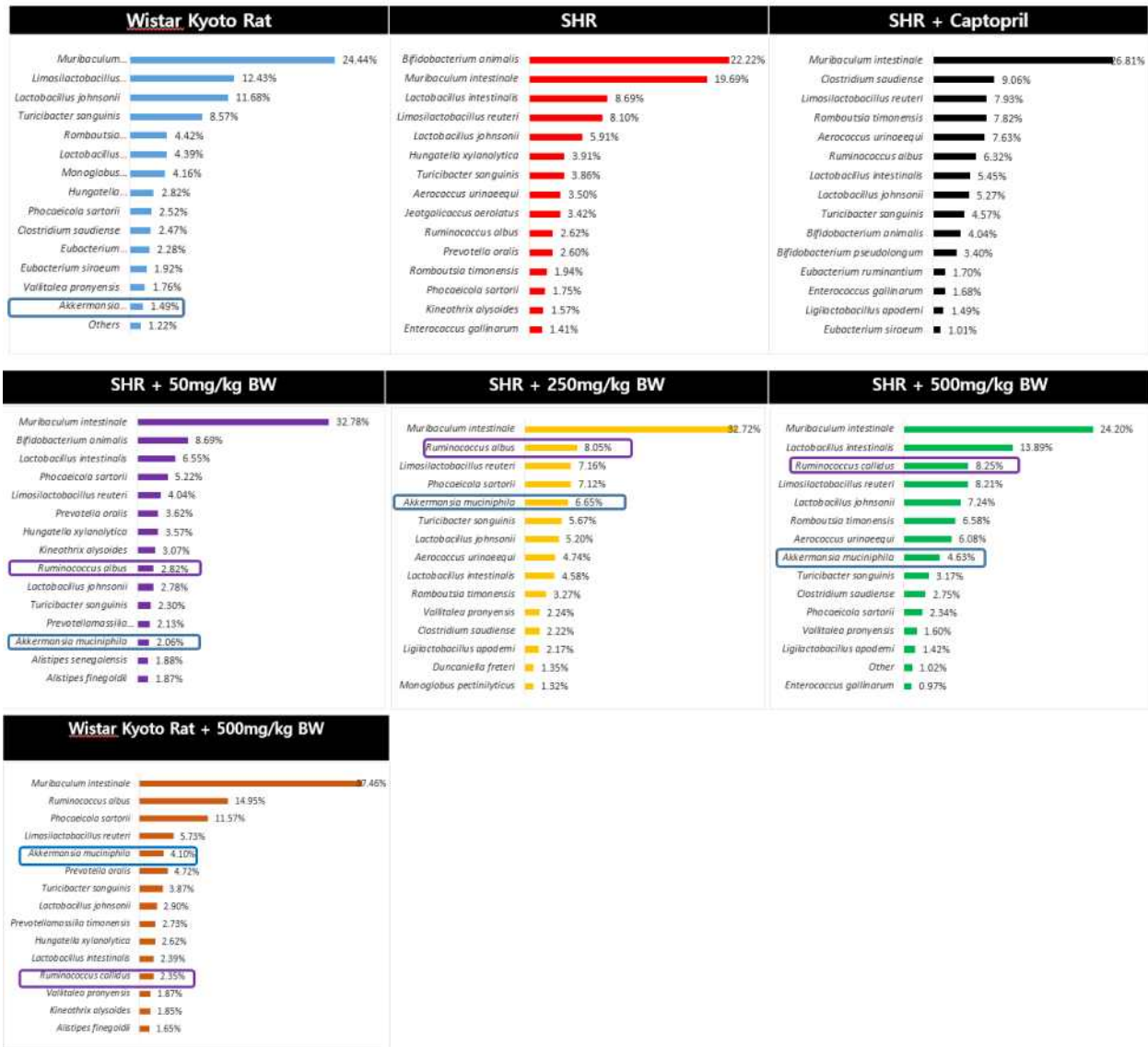


Figure 60. The effect of new administration on the gut microbiota of WistarKyoto rats and spontaneous hypertensive rats. The yellow sections represent Firmicutespopulations and brown indicate Bacteroidetes. Fecal samples were collected from spontaneous hypertensive rats The pie chart represents the entire gut microbiome and each sector represents a major phylum identified

○ 생물전환 식품소재 적용 시제품의 프리바이오틱스 기능에 의한 장내 주요 미생물 함량 변화 분석

- 시제품을 섭취한 SHR의 장내 균총의 변화는 앞선 BSB 소재 섭취시 장내 균총 변화 결과와 유사하게 관찰되었음
- *Akkermansia muciniphila*와 *Rumminococcus ablus*의 수준은 SHR에서 유의하게 감소된 반면, *Bifidobacterium animalis*의 수준은 매우 높게 나타났음
- 시제품 섭취한 SHR의 장에서 *Akkermansia muciniphila*와 *Rumminococcus ablus*의 수준을 유의적으로 증가시켰으며, *Bifidobacterium animalis*의 수준은 감소시켰음
- *Akkermansia muciniphila*는 대사 및 위장장애에 중요 역할을 하며, *Rumminococcus ablus*는 주요 단쇄 지방산의 생산 균주로 알려져있음
- BSB 소재의 장내 균총 개선의 결과와 마찬가지로 소재 적용 시제품을 섭취할 경우 항고혈압 효능과 더불어 장내 균총을 개선할 수 있음

Table 40. Top 15 most abundant bacteria in the gut microbiome of experimental animals. HIGH: 500mg/kg BW of BSB, MID: 250mg/kg BW of BSB and LOW: 50 mg/kg BW of product.



(2) 정량적 연구개발성과

성과 목표	사업화지표										연구기반지표									
	지식 재산권			기술 실시 (이전)		사업화					기술 인증	학술성과				교육 지도	인력 양성	정책 활용·홍보		기 타 (타 연 구 활 용 등)
	특 허 출 원	특 허 등 록	품 종 등 록	건 수	기 술 료	제 품 화	매 출 액	수 출 액	고 용 창 출	투 자 유 치		논 문		학 술 발 표	정 책 활 용			홍 보 전 시		
												SC I	비 SC I						논 문 평 균 IF	
단위	건	건	건	건	백 만 원	백 만 원	백 만 원	백 만 원	명	백 만 원	건	건	건	건	명	건	건			
가중치	4	2		2	25	40	10		10				2	2	2		1			
최종목표	2	1		1	1	2	200		2			3	2	3	6	2		1		
1 차 년 도	목 표														2		1			
	실 적														3		1			
2 차 년 도	목 표	1				1			1			2	1	1.5	2		1			
	실 적	1		1		1			3			3		10	1		2			
3 차 년 도	목 표	1	1		1	1	200		1			1	1	1.5	2				1	
	실 적				1	232	1		1						1		1			
소 계	목 표	2	1		1	1	200		2			3	2	1.5	6		2		1	
	실 적	1		1	1	232	2		4			3		10	5		4			
종료 1차년도							300													
종료 2차년도		1					300													
종료 3차년도							500													
종료 4차년도							500													
종료 5차년도							100													
소 계		1					200													
합 계	2	2	1	1	1	2	200		2			3	2	3	6		2		1	

(3) 세부 정량적 연구개발성과  
[과학적 성과]

□ 논문(국내외 전문 학술지) 게재

번호	논문명	학술지명	주저자명	호	국명	발행기관	SCIE 여부 (SCIE/비SCIE)	게재일	등록번호 (ISSN)	기여율
1	Influence of fermented soy protein consumption on hypertension and gut microbial modulation in spontaneous hypertensive rats	BIOSCIENCE OF MICROBIOTA FOOD AND HEALTH	에릭 달리리, 오덕환	4	일본	BMFH PRESS	SCIE	2020.05.14	2186-6953	100
2	Untargeted Metabolomics of Fermented Rice Using UHPLC Q-TOF MS/MS Reveals an Abundance of Potential Antihypertensive Compounds	Foods	에릭 달리리, 오덕환	8	스위스	MDPI AG	SCIE	2020.07.27	2304-8158	100
3	A discovery-based metabolomic approach using UHPLC Q-TOF MS/MS unveils a plethora of prospective antihypertensive compounds in Korean fermented soybeans	LWT-Food science and technology	에릭 달리리, 오덕환	-	네덜란드	ELSEVIER SCIENCE BV	SCIE	2020.10.14	0023-6438	100

국내 및 국제 학술회의 발표

번호	회의 명칭	발표자	발표 일시	장소	국명
1	한국식품영양과학회	에릭 달리리, 오덕환	2019.10.23	제주국제컨벤션센터	대한민국
2	한국식품영양과학회	에릭 달리리, 라마찬드란 켈리아, 오덕환	2019.10.23	제주국제컨벤션센터	대한민국
3	한국식품영양과학회	강주진, 오현택, 김중학, 박미현, 에릭 달리리, 오덕환	2019.10.23	제주국제컨벤션센터	대한민국
4	2020 KFN International Symposium and Annual Meeting	에릭 달리리	2020.10.22	제주국제컨벤션센터	대한민국
5	2021 KoSFoST	에릭달리리, 오덕환	2021.07.08	대전컨벤션센터	대한민국

생명자원(생물자원, 생명정보)/화합물

번호	생명자원(생물자원, 생명정보)/화합물 명	등록/기탁 번호	등록/기탁 기관	발생 연도
1	<i>Pediococcus acidilactici</i> OHER4	KCTC 21159	한국생명공학연구원 생물자원센터	2021

[기술적 성과]

지식재산권(특허, 실용신안, 의장, 디자인, 상표, 규격, 신제품, 프로그램)

번호	지식재산권 등 명칭 (건별 각각 기재)	국명	출원			등록			기여율	활용 여부
			출원인	출원일	출원 번호	등록인	등록일	등록 번호		
1	신규한 페디오코커스 약시딜락티시 균주 및 상기 균주를 이용하여 발효시킨 대두 발효물의 다양한 용도	대한민국	강원대학교 산학협력단, (주) 이룸	2021.03.22	10-2021-0036549				100	0

○ 지식재산권 활용 유형

※ 활용의 경우 현재 활용 유형에 √ 표시, 미활용의 경우 향후 활용 예정 유형에 √ 표시합니다(최대 3개 중복선택 가능).

번호	제품화	방어	전용실시	통상실시	무상실시	매매/양도	상호실시	담보대출	투자	기타
1	√									

[경제적 성과]

시제품 제작

번호	시제품명	출시/제작일	제작 업체명	설치 장소	이용 분야	사업화 소요 기간	인증기관 (해당 시)	인증일 (해당 시)
1	효소처리대두 발효분말	2021.03	(주)메디언스	-	식품	-	-	-
2	황성주 국산콩 발표 플러스	2022.05	(주)연두	-	식품	-	-	-

기술 실시(이전)

번호	기술 이전 유형	기술 실시 계약명	기술 실시 대상 기관	기술 실시 발생일	기술료 (해당 연도 발생액)	누적 징수 현황
1	기술 이전	대두 발효 식품소재를 이용한 두유 신제품 개발	(주) 이룸	2022. 05	2,562,000	-

□ 사업화 현황

번호	사업화 방식 <sup>1)</sup>	사업화 형태 <sup>2)</sup>	지역 <sup>3)</sup>	사업화명	내용	업체명	매출액		매출 발생 연도	기술 수명
							국내 (천원)	국외 (달러)		
1	자기 실시	신제품 개발	국내	국내산 곡물자원을 이용한 고부가가치 곡물 가공음료의 개발 및 상품화	신제품 개발 및 출시	(주)이룸	0	0	22	성숙기

□ 매출 실적(누적)

사업화명	발생 연도	매출액		합계	산정 방법
		국내(천원)	국외(달러)		
국내산 곡물자원을 이용한 고부가가치 곡물 가공 음료의 개발 및 상품화		0	0	0	
합계		0	0	0	

□ 사업화 계획 및 무역 수지 개선 효과

성과		과제를 통한 발효 타입의 원료 개발을 통한 두유 신제품			
사업화 계획	사업화 소요기간(년)	-			
	소요예산(천원)	-			
	예상 매출규모(천원)	현재까지	3년 후	5년 후	
		0	500,000	1,500,000	
	시장 점유율	단위(%)	현재까지	3년 후	5년 후
		국내	0	0.1	0.3
국외		0	0	0	
향후 관련기술, 제품을 응용한 타 모델, 제품 개발계획		발효 타입의 원료를 이용한 생식 개발 및 상품화			
무역 수지 개선 효과(천원)	수입대체(내수)	현재	3년 후	5년 후	
		0	0	0	
	수출	0	0	0	

□ 고용 창출

순번	사업화명	사업화 업체	고용창출 인원(명)		합계
			2020년	2021년	
1	국내산 곡물자원을 이용한 고부가가치 곡물 가공음료의 개발 및 상품화	(주)이룸	2	1	3
합계			2	1	3

□ 고용 효과

구분			고용 효과(명)
고용 효과	개발 전	연구인력	0
		생산인력	0
	개발 후	연구인력	1
		생산인력	5

[사회적 성과]

□ 전문 연구 인력 양성

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

2) 목표 달성 수준

추진 목표	달성 내용	달성도(%)
○ 지식 재산권: 특허출원 2건, 등록 1건	○ 특허출원 1건	33%
○ 기술실시 1건, 기술료 1백만원	○ 기술실시 1건, 기술료: 2.562 백만원	100%
○ 사업화: 제품화 2건, 매출액 200 백만원, 고용창출 2명	○ 제품화 2건, 고용창출 4명	66%
○ 학술성과: SCI논문 3건, 비 SCI 논문 2건, 논문 평균 IF 1.5, 학술발표 6건	○ SCI 논문 3건, 논문 평균 IF 4.01, 학술발표 5건	92%
○ 인력양성 2명, 홍보 전시 1건	○ 인력양성 4명	50%



## 4. 목표 미달 시 원인분석

### 1) 목표 미달 원인(사유) 자체분석 내용

---

- 지식재산권: 고혈압의 예방 및 개선의 효능을 지닌 신규한 균주 특허 1건, 균주를 이용하여 발효시킨 대두발효물을 포함하는 고혈압 예방, 개선 및 장내 균총 개선용 조성물 특허 1건으로 계획하였으나, 출원 및 등록 특허의 품질의 향상을 위해 하나의 특허로 구성하게 되었음.
  - 사업화: 본 사업 과제로부터 제품화 및 고용 창출은 목표달성 했으나, 협동연구기관의 내부적 사정으로 인해 개발된 시제품이 과제 기간 내 상품화가 어려워 매출액이 발생하지 못하였음.
- 

### 2) 자체 보완활동

---

- 현재 출원된 1건의 특허의 등록을 위해 심사에 적극적인 대응을 진행하고 있음.
  - 사업 과제 기간 내 매출액이 발생하지 못하였지만 협동연구기관에서 사업화 과정 중에 있으며 과제 종료 후 계속해서 상품화를 진행할 것이며, 이에 발생하는 매출액에 대하여 지속적으로 보고할 계획임.
- 

### 3) 연구개발 과정의 성실성

---

사업 기간 동안 예상치 못한 코로나 19 사태와 겹쳐 주관연구기관 및 협동연구기관의 연구 수행, 제품 개발, 생산을 위한 작업에 심각한 제한이 있었음에 불구하고, 계획된 연차별 목표를 달성하기 위해 성실히 과제를 수행하였음. 비록 설정된 모든 목표를 달성하지 못하였지만 과제 종료 후 목표된 연구 성과를 달성하기 위해 연구 및 상품화를 진행할 예정임.

---

## 5. 연구개발성과의 관련 분야에 대한 기여 정도

---

### <기대성과>

#### ○ 기술적 측면

- 유럽, 미국 등이 주도하고 있는 생물전환 기술 및 곡물 가공 음료의 제조기술에 대한 국내 원천기술 확보를 통한 국제 경쟁력 향상
- 사업과제를 통하여 확보된 곡물 가공 원천기술을 응용하여 기타 곡류 및 견과류 등의 음료 적합성 고품질 페이스트 제조 기술의 확보
- 국내 제조시설 기반의 곡물 생물전환 소재생산 및 가공 음료 생산 원천기술 확보
- 곡류 및 기타 곡류 기반 단백질의 생물전환기술 (bioconversion)을 이용한 영양성분 강화 및 항고혈압 등 건강기능 강화 식품원료 제조 원천기술 확보
- 곡류 단백질 기반의 항고혈압 활성 등 건강기능 강화 펩타이드 성분 규명 및 대량생산 기술 확보
- 인체 마이크로바이옴 관련 식품소재 개발 기술의 확보로 미래가치의 신 패러다임 식품 소재의 개발 방향 제시

#### ○ 경제적 · 산업적 측면

- 수입 제품에 의존하고 있는 국내 음료 시장에 국내 기술과 국내 자원을 이용하여 개발된 곡물 가공 음료의 보급을 통하여 음료 업계의 새로운 방향 제시와 신규시장 창출
- 유제품, 탄산음료, 청량음료 등이 주도하여 장기적으로 고착되고 정착되어 있는 국내 음료 시장에 기능소재 접목을 통한 두유 시장의 재성장 견인과 쌀 등 기타 곡류 가공 음료 제품의 보급과 마케팅을 통하여 신규시장 창출 및 식음료 시장의 활성화
- 유럽, 미국 및 일본이 선도하고 있는 곡물 음료 관련시장의 국내 원천기술을 통한 시장 공략으로 해외 수출 판로 개척
- 곡류 유래 단백질의 생물전환기술을 이용한 영양성분 및 건강기능 강화 식품원료 생산 관련 제조 및 유통 산업의 활성화
- 곡물 가공 음료 시장 활성화를 통한 농가, 음료 제조, 생산, 유통 업계의 매출 증진 및 고용인력 확대

### <파급효과>

#### ○ 기술적 측면

- 곡류단백질을 이용하여 영양성분 및 건강기능을 강화시키는 생물전환공정의 국내 기술 선진화
- 곡물의 음료적합 액화액 가공과 관련한 원천기술 확보를 통하여 곡류를 이용한 음료적합 식품원료 제조에 대한 기존 기술의 발전
- 국내산 곡류를 이용한 생물전환 소재 생산 및 음료 안정화 국내 원천 기술 확보

---

○ 경제 산업적 측면

- 국내 곡물 가공 음료 관련 산업의 활성화 및 신산업 창출
- 국내 곡물 가공 음료 관련 산업 활성화에 따른 국내 농산자원의 소비 촉진
- 국내 곡물 자원을 이용한 우수한 곡물 가공 음료의 개발과 해외 시장 공략을 통하여 국내 농산자원의 우수성에 대한 해외 홍보 및 국내 곡물의 국제 경쟁력 향상과 소비 수출 판로 개척
- 곡물 가공 음료 생산을 위한 국내 제조업 기반시설에 대한 재고를 통한 생산설비 및 기술의 선진화 동기 부여
- 곡물 가공 음료 관련시장 활성화를 통한 기타 가공식품 업계의 활성화 및 국내 농산물을 이용한 식품개발 촉진
- 국내 곡물 관련 산업의 활성화를 통한 국내 농산자원의 소비 촉진과 이를 통한 국내 식량자원의 생산 증대

○ 사회적 측면

- 곡물 가공 음료만이 아니라 곡물 제조 1차 산업 및 관련 2차 산업 및 유통과 판촉과 관련한 3차 산업 등 총괄적 산업계의 활성화를 통하여 국내의 위축된 고용시장에 새로운 동력과 활력을 창출
- 곡류기반 단백질의 생물전환기술을 이용한 영양성분 및 건강기능이 강화된 소재를 적용한 쌀 음료의 보급을 통하여 국민건강보건 향상에 기여
- 노령화의 가속화에 따른 노령인구 증가와 1인 가구 증가 등의 사회 풍토에 따라 결식율 증가와 패스트 푸드 등 편리식품 소비 증가 풍토에 식사 대용 및 단백질 등 영양이 풍부하며 고기능으로 건강증진의 곡물 가공 음료의 보급을 통하여 국민건강 증진에 기여 및 건강 백세사회 구현

## 6. 연구개발성과의 관리 및 활용 계획

---

### <활용방안>

- 본 사업기술과정을 통한 소재 및 제품개발을 위한 곡물음료 가공기술과 생물전환 기술을 이용한 활성 펩타이드 제조 기술 등은 식품음료와 관련된 사업 뿐 만이 아니라 기초화학, 생명공학 및 약학 등 폭 넓게 응용할 수 있는 기반기술로서 국내 관련산업의 기술향상에 기여할 수 있음
- 생물전환기술은 쌀단백질 및 기타 곡류 단백질 이외에도 다양한 원료에 응용하여 항고혈압 및 항산화, 면역증진 활성 물질의 탐색 및 확보에 응용이 가능함
- 본 연구에서 곡물 생물전환 식품소재 및 음료에 대한 장내균총(microbiome)에 개선 기능은 최근 주목받고 있는 인체 마이크로바이옴 관련 연구분야로 향후 미래가치가 큰 기반기술로 관련 소재의 개발에 기여할 수 있음
- 곡물 가공 음료의 안정성 확보 기술은 곡류 기반의 가공음료를 제조하기 위한 기반기술로서 시장 제품들의 품질 향상에 기여할 수 있음
- 현재 유럽, 미국, 일본 등 해외 제품의 의존하고 있는 곡물 가공 음료에 대하여 국내 개발 기술을 통한 음료로서 안정성과 관능이 확보된 우수한 품질의 음료제품의 상품화로 위촉된 국내 식음료 시장에 신규시장 창출로 식품산업계의 재활성화를 꾀할 수 있음
- 두유 및 쌀음료 등 곡물 가공 음료 신시장의 창출을 통하여 기업의 매출 및 사업 저변확대로 고용창출이 가능하며 농가의 소득증대에도 크게 기여할 수 있음
- 국내 쌀 등 곡물 자원으로 인하여 연간 재고비용으로 수천억씩 국고에서 지출되고 있는 불용 식량자원들을 관련 업계를 활성화 시킴으로서 소비를 촉진하여 국고 낭비의 절감 효과와 관련 비용의 농업 및 관련 업계 재투자에 이용할 수 있으므로 농업과 식품산업을 보다 촉진할 수 있는 배가의 효과를 이룰 수 있음
- 국내 곡물 자원의 고부가가치화와 원천기술을 확보하여 해외 시장에 잠식되지 않고 오히려 해외 시장을 공략하여 국내 농산 자원의 해외 수출판로를 개척할 수 있음

### <사업화 계획>

- 상품화 계획
  - 현재 사회적으로 고령화 가속에 따라서 노령으로 인한 소화·흡수·장기능 저하 및 고혈압 유병율 증가 문제가 심화되어 관련 시장이 급성장 하고 있음
  - 최근 건강에 대한 관심으로 곡물가공음료 시장은 증가추세며 특히 고령친화 식품시장이 급성장할 것으로 전망되며 40대 이상 시니어층이 선호하는 것으로 확인됨
  - 곡물가공음료 중 두유시장은 국산콩, 검은콩, 고칼슘 등 원재료에 대한 차별화를 통한 제품의 세그멘테이션이 이루어져 있으나 원료적 차별의 한계로 경쟁력이 약화된 문제점이 있음
  - 기능성 원료 함유 시장은 성장 중이지만 고혈압과 장관기능에 대해서는 항고혈압 소재나 유산균 소재의 단일 기능성 제품만 출시되어 있고 고가의 제품들로 시장 경쟁력이 낮은 한계가 있음

- 따라서, 본 사업과제로부터 개발된 항고혈압 및 장내균총 개선의 복합기능 소재를 곡물 음료에 적용하여 소화흡수가 용이하고 관능이 우수하면서도 항고혈압과 장내균총 개선의 복합 기능을 갖는 고기능의 프리미엄 두유 제품 상품화할 계획임
- 또한 본 프리미엄 두유는 일반식품으로 건강기능식품 보다 저가로서 소비자 접근성이 용이하고 향후 고령자의 식사를 대신할 수 있는 HMR 식품으로 자리잡을 경우 수요가 크게 향상될 것으로 기대되며, 관련 마케팅을 추진할 계획임
- 기존 프리미엄 두유 제품은 검은콩과 칼슘 등 단순 원료 차별 및 보강을 한 제품들로 대표적인 두유 메이저 브랜드인 정식품과 삼육에서 각각 팩당 850원과 600원으로 판매되고 있으며 (주)이룸도 유사 컨셉의 제품이 팩당 600원에 판매되고 있어, 본 사업으로부터 개발 예정인 제품의 경우 팩당 800원 이상까지 시장 접근성이 허용될 것으로 예상됨

기업명	제품명	제품 주요 핵심기술 및 성능	개발 제품의 자사 기존 제품 및 경쟁 제품 대비 기술적 우위	단위당 판매가격 (원)	단위당 생산원가 (원)
(주)이룸	이룸 황성주 국산콩 발효 플러스	항고혈압, 장내균총 개선 및 소화흡수가 잘 되는 단백질 성분 함유로 고기능 시니어 컨셉		800원/팩	350원/팩
자사 기존 제품	이룸 황성주 검은콩 고칼슘	검은콩과 칼슘 강화 및 전두유를 특징으로 국산콩의 차별성 외에 타사 제품과 유사한 컨셉	국립 단백질 기반 항고혈압기능 및 장내균총개선 기능강화와 아미노산 등 영양성분을 강화하여 기능적 차별성 확보 및 특히, 고령 친화적 제품 컨셉	600원/팩	260원/팩
정식품	베지밀 시니어두유	당사 기존 제품과 유사한 컨셉, 시장 선도 제품	국내 두유가공 1위 기업으로 제품 우점적 지위 확보	850원/팩	
삼육	검은콩칼슘두유	당사 기존 제품과 유사 컨셉이며 하 더 저가	국내 두유가공 2위 기업	600원/팩	

○ 원료 수급 계획

- 제품의 생산을 위한 주원료인 콩과 쌀은 (주)이룸이 연단위 계약체결을 하고 있는 국내 농산물 수매상과 단위 농협을 통하여 안정적 공급량을 확보함
- 소재 생산을 위한 대두 원료는 (주)이룸이 거래하고 있는 원료업체들을 통하여 국내 및 해외 상용원료의 안정적 공급량을 확보함

구 분	원료 수급 방안	주요 생산자단체	기 타
콩	콩 : 지역단위 농협 및 농산물 수매상	콩 : 국내 농산물 수매상(아흥)	전년도 4/4분기 중 사전 연간 계약체결을 통한 지속 공급
쌀	쌀 : 국내 지역단위 농협 및 농산물 수매상	쌀 : 국내 쌀 생산 농가	국내산 쌀 100% 사용
대두단백질	대두단백질 : 국내 원료상 및 해외 수입	대두단백질 : 해외수입	소재 생산용 원료로만 공급

○ 판매 계획

- 본 사업의 제품은 (주)이룸이 거래하고 있는 주요 음료제품 생산업체들을 통하여 위탁 (OEM) 방식으로 생산할 계획이며, 제품에 따라 팩 또는 파우치 등 시장의 선호도와 공급 물량을 고려하여 적절한 포장재로 생산하여 공급할 계획임
- 본 사업이 기간 중 상품화된 제품은 (주)이룸이 유통하고 있는 시판유통(대형마트, SSM), 홈쇼핑, 온라인과 네트워크마케팅을 통하여 출시할 계획임

구 분		( 2022 )년 (개발종료 후 1년)	( 2023 )년 (개발종료 후 2년)	( 2024 )년 (개발종료 후 3년)
사업화 제품		두유제품	두유제품	두유제품
생산계획		위탁(OEM) 생산	위탁(OEM) 생산	위탁(OEM) 생산
판매 계획	수요처 (유통채널)	B2C : 대형마트, 온라인	좌 등	좌 등
	추진체계	개발 : 연구소 생산 : OEM 생산 판매 : 영업부, 마케팅	좌 등	좌 등
	마케팅전략	관련 기술의 특허, 논문 등 홍보자료 활용한 마케팅 관측 특허 확보 후 제품에 특허번호 명기로 차별화	쌀가공 음료 개발로 식물성 대체유 시장 및 식사 대용식 시장 공략 홈쇼핑 채널을 이용한 홍보 마케팅으로 제품 포지셔닝 및 관측증대	시판유통 및 홈쇼핑 외에 온라인 바이럴 마케팅 등을 통한 유통 저변 확대 해외 현지법인을 통한 제품 수출 도모

○ 수출 사업화 계획

- 본 사업으로부터 개발된 프리미엄 두유 및 쌀음료 제품을 이룸이 보유한 중국 및 미국 지사와 인도네시아 총판 등 해외 판매대리점을 통하여 제안하여 현지판로를 모색할 계획임
- 또한 본 사업으로부터 개발된 대두단백질 등을 이용한 항고혈압 및 장내미생물 개선 기능의 식품소재를 해외 수출형 생식 및 기능식품의 원료로 적용하여 기능적으로 차별화된 제품으로 현지 시장 공략 및 차별화 마케팅을 추진할 계획임

## 7. 참고문헌

---

- Daliri, E. B.-M., Lee, B. H., & Oh, D. H. (2017). Current perspectives on antihypertensive probiotics. *Probiotics and antimicrobial proteins*, 9(2), 91–101.
- Daliri, E. B.-M., Lee, B. H., Park, M. H., Kim, J.-H., & Oh, D.-H. (2018). Novel angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides from soybean protein isolates fermented by *Pediococcus pentosaceus* SDL1409. *LWT*, 93, 88–93.
- Manzanares, P., Salom, J. B., Garcia-Tejedor, A., Fernandez-Musoles, R., Ruiz-Gimenez, P., & Gimeno-Alcaniz, J. V. (2015). Unraveling the mechanisms of action of lactoferrin-derived antihypertensive peptides: ACE inhibition and beyond. *Food Funct*, 6(8), 2440–2452. doi: 10.1039/c5fo00580a
- Marco, M. L., Heeney, D., Binda, S., Cifelli, C. J., Cotter, P. D., Foligne, B., . . . Pihlanto, A. (2017). Health benefits of fermented foods: microbiota and beyond. *Current opinion in biotechnology*, 44, 94–102.
- Martinez-Maqueda, D., Miralles, B., Recio, I., & Hernandez-Ledesma, B. (2012). Antihypertensive peptides from food proteins: a review. *Food Funct*, 3(4), 350–361. doi: 10.1039/c2fo10192k
- Robertson, C.E., et al., Explicet: graphical user interface software for metadata-driven management, analysis and visualization of microbiome data. *Bioinformatics*, 2013. 29(23): p. 3100–3101.
- Pinkard, B.R., et al., Raman spectroscopic data from formic acid decomposition in subcritical and supercritical water. *Data in brief*, 2020. 29: p. 105312.
- Dey, T.B. and R.C. Kuhad, Enhanced production and extraction of phenolic compounds from wheat by solid-state fermentation with *Rhizopus oryzae* RCK2012. *Biotechnology Reports*, 2014. 4: p. 120–127.
- Daliri, E.B.-M., et al., Untargeted metabolomics of fermented rice using UHPLC Q-TOF MS/MS reveals an abundance of potential antihypertensive compounds. *Foods*, 2020. 9(8): p. 1007.
- Alves, N.F.B., et al., Acute treatment with lauric acid reduces blood pressure and oxidative stress in spontaneously hypertensive rats. *Basic & clinical pharmacology & toxicology*, 2017. 120(4): p. 348–353.
- Wang, Z.J., et al., Stearic acid protects primary cultured cortical neurons against oxidative stress 4. *Acta Pharmacologica Sinica*, 2007. 28(3): p. 315–326.

[뒷면지]

주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 맞춤형혁신식품 및 천연안심소재기술개발 연구개발사업의 최종보고서이다.
2. 이 연구개발내용을 대외적으로 발표할 때에는 반드시 농림축산식품부에서 시행한 맞춤형혁신식품 및 천연안심소재기술개발 연구개발사업의 결과임을 밝혀야 한다.
3. 국가과학기술 기밀 유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 안 된다.