

918005-4

기능성 김치 유산균을 활용한  
미강발효제품 개발 및 사업화

2021

농림축산식품부  
농림식품기술기획평가원

보안 과제( ), 일반 과제( O ) / 공개( O ), 비공개( ) 발간등록번호( O )  
포스트게놈다부처유전체사업 2021년도 최종보고서

발간등록번호

11-1543000-004022-01

# 기능성 김치 유산균을 활용한 미강발효제품 개발 및 사업화

2022.04.07

주관연구기관 / 조선대학교 산학협력단  
협동연구기관 / 경희대학교 산학협력단  
경상대학교 산학협력단  
CJ제일제당(주)

농림축산식품부  
(전문기관)농림식품기술기획평가원





발간등록번호

11-1543000-004022-01

# 기능성 김치 유산균을 활용한 미강발효제품 개발 및 사업화

2022.04.07

주관연구기관 / 조선대학교 산학협력단  
협동연구기관 / 경희대학교 산학협력단  
경상대학교 산학협력단  
CJ제일제당(주)

농림축산식품부  
(전문기관)농림식품기술기획평가원

## 제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “기능성 김치 유산균을 활용한 미강발효제품 개발 및 사업화”(개발기간 : 2018. 04. 25 ~ 2021. 12. 31)과제의 최종보고서로 제출합니다.

2022.04.07

주관연구기관명 : 조선대학교 산학협력단 (대표자) 최 한 철

협동연구기관명 : 조선대학교 산학협력단 (대표자) 최 한 철

경희대학교 산학협력단 (대표자) 김 윤 혁

경상대학교 산학협력단 (대표자) 정 재 우

CJ제일제당(주) (대표자) 신 현 재

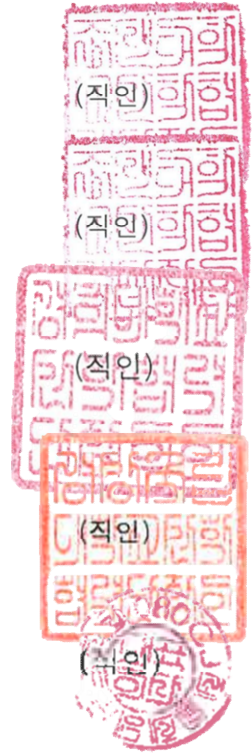
주관연구책임자 : 최 지 영

협동연구책임자 : 이 재 준

김 해 영

김 정 환

김 아 진



국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정 제18조에 따라 보고서 열람에 동의 합니다.

## < 요약 문 >

사업명		포스트게놈다부처유전체사업		총괄연구개발 식별번호 (해당 시 작성)		-	
내역사업명		산업화지원미생물유전체전략연구 (조기성과창출)		연구개발과제번호		918005-4	
기술 분류	국가과학기술 표준분류	LB1703	30%	LA0906	25%	LB1702	20%
	농림식품 과학기술분류	PA0102	30%	PA0201	25%	PA0204	25%
총괄연구개발명		농림축산식품 미생물유전체전략연구사업단					
연구개발과제명		기능성 김치 유산균을 활용한 미강발효제품 개발 및 사업화					
전체 연구개발기간		2018. 04. 25 - 2021. 12. 31(3년 9개월)					
총 연구개발비		총 1,320,000 천원 (정부지원연구개발비: 660,000 천원, 기관부담연구개발비 : 660,000 천원)					
연구개발단계		기초[ ] 응용[○] 개발[ ] 기타(위 3가지에 해당되지 않는 경우)[ ]		기술성숙도		착수시점기준(1단계) 종료시점 목표(9단계)	
연구개발과제 유형		지정공모					
연구개발과제 특성		조기성과창출					
연구개발 목표 및 내용	최종 목표	기능성 김치 유산균을 활용한 미강발효제품 개발 및 산업화					
	전체 내용	<p>○ 세부기관별 연구개발 내용</p> <p>1) 제 1세부</p> <p>① 개발 균주의 기능성 평가 및 안전성 평가</p> <p>② 개발 균주의 안정성 평가 및 미강발효 조건 확립</p> <p>③ 미강에서의 유산균 증식 및 최적 발효 조건 확립</p> <p>④ 기능성 미강발효제품 개발 및 생산(Lab scale)</p> <p>2) 제 2세부</p> <p>① 항콜레스테롤 및 항비만 관련 기능성 평가체계 구축 및 기능성 평가 : 동물 실험</p> <p>② 미강 발효 개발제품의 콜레스테롤 저하효과 및 항비만 효과 평가</p> <p>3) 제 1협동</p> <p>① 항콜레스테롤 효과가 있는 <i>L. plantarum</i> 및 항비만 효과가 있는 <i>W. koreensis</i>의 생명 현상 및 기작에 대해 이해하기 위해 각 균주의 전체 미생물 염기서열을 해독하기 위함.</p> <p>② 저온성 김치 유산균 염기서열 해독 및 유전체 특성 분석</p> <p>③ 유전체 비교 분석 및 기능성 유전자 분석</p> <p>④ 유용유전자 발굴 및 확인</p> <p>4) 제 2협동</p> <p>① 김치 유산균 미강발효물 대사체 변화 및 영향 연구</p> <p>② 김치 유산균 미강발효물의 대사경로 도출</p> <p>5) 제 3협동</p> <p>① 발효를 위한 부산물 소재 확보, Scale-up 발효공정 검토, 발효 후 가공공정 개발</p> <p>② 최적의 Scale-up 발효공정 확립 및 발효 건강 원료 pilot 생산 기반 구축</p> <p>③ 발효공정 최적화 및 표준화</p> <p>④ 미강발효제품의 제품화 및 사업화</p>					

연구개발성과	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 유용 균주의 특성 분석, 유용성, 안전성, 안정성 실험을 통한 기능성 균주 개발 2건</li> <li>○ 미강발효제품 개발 관련 특허 등록 1건</li> <li>○ 동물 실험을 통한 개발 제품의 기능성 평가 2건</li> <li>○ 전략미생물 유전체 해독 2건</li> <li>○ 유용유전자 확보 9건</li> <li>○ 대사체 분석 11건</li> <li>○ 제품 실용화 1건</li> <li>○ SCI급 논문 13편</li> </ul>
--------	--

연구개발성과 활용계획 및 기대 효과	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 활용계획 <ul style="list-style-type: none"> <li>- 기능성 미강발효제품의 산업화: 'HOPE 시니어 팻다운(건강기능식품)'</li> <li>- 미강발효제품의 열풍건조 분말 제형화로 선식, 이유식, 노인식, 환자식 등 특수식 개발</li> <li>- 미강발효제품의 열풍건조 플레이크로 씨리얼 제품 개발</li> <li>- 개발기능성유산균을 발효식품 종균으로 활용</li> <li>- 개발기능성유산균을 임상실험을 통하여 건강기능식품(개별 인정형) 개발</li> </ul> </li> <li>○ 기대효과 <ul style="list-style-type: none"> <li>- 전략형 미생물(산업형 미생물) 자원의 확보</li> <li>- 유용 미생물 유전 자원의 확보 및 유전 정보의 보유 : 우리나라 고유 바이오 소재 자원 확보 및 보존·관리</li> <li>- 쌀 부산물 미강의 고부가가치화: 농가 수익증대</li> <li>- 균주 배양 기술: 한국형 맞춤 유산균 배양 기술(원천 기반 기술)</li> <li>- 국민 건강 증진 기여</li> <li>- 발효식품 관련 대사체 기술을 통해 발효식품의 기능성을 설명할 수 있는 지표물질들을 확보: 김치 유산균을 이용한 미강 발효식품(소재) 개발에 대한 과학적인 정보 제공을 통해 발효식품 산업의 경쟁력 제고</li> <li>- 국내 발효 건강원료의 기능성 증대와 원천기술 확립: K-food의 글로벌 경쟁력 강화</li> </ul> </li> </ul>
---------------------------	---

연구개발성과의 비공개여부 및 사유	해당사항 없음
-----------------------	---------

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
18	4	1	-	-	-	-	-	25	-	-	-	-

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)	김치 유산균	미강	고기능성 미강발효제품	건강기능	항콜레스테롤능
------------------	--------	----	----------------	------	---------

영문핵심어 (5개 이내)	Kimchi lactic acid bacteria	Rice-bran	High valued fermented rice bran	Healthy functionality	Cholesterol -lowering activity
------------------	--------------------------------	-----------	---------------------------------------	--------------------------	--------------------------------------

## < 목 차 >

1. 연구개발과제의 개요 .....	1
1-1. 연구개발의 총괄적 개요 .....	1
1-2. 본 연구개발의 차별성 .....	1
2. 연구개발과제의 수행 과정 및 수행 내용 .....	3
2-1. 연구개발의 목표 및 내용 .....	3
2-2. 연구개발 결과 .....	20
3. 연구개발과제의 수행 결과 및 목표 달성 정도 .....	158
4. 연구개발성과 및 관련 분야에 대한 기여 정도 .....	172
5. 연구개발성과의 관리 및 활용 계획 .....	173

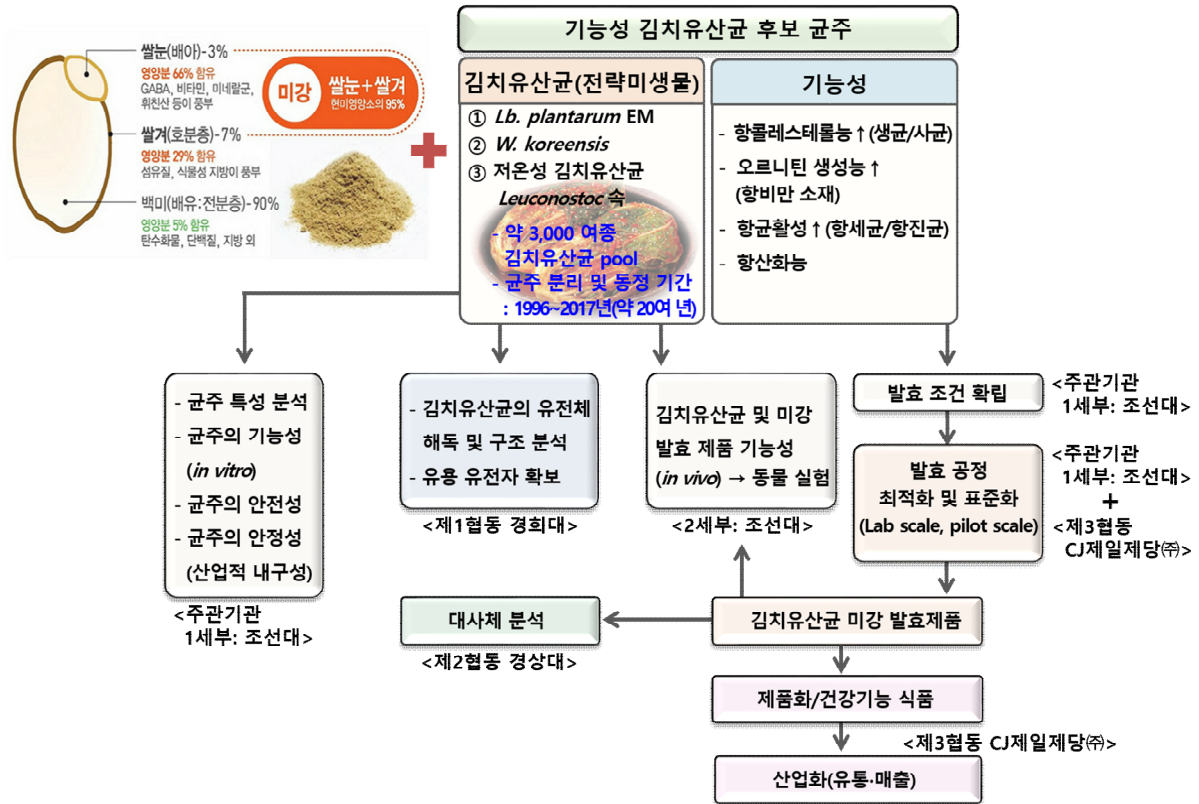
### [ 별첨 자료 ]

1. 자체평가의견서
2. 연구성과활용계획서
3. 참고문헌



# 1. 연구개발과제의 개요

## 1-1. 연구개발의 총괄적 개요



## 1-2. 본 연구개발의 차별성

### 1) 균주 screening 시 김치시료의 다양성

- 일반적으로 국내 연구진들의 김치 등 발효식품으로부터 유용미생물 분리 및 동정 시 sampling의 수월성과 단기간 내 많은 시료확보 때문에 대부분 국내 시판시료를 사용함.
- 그러나 본 연구진은 1996년부터 현재까지 20년이 넘는 기간 동안 지속적으로 민간, 사찰, 종가, 식당 등의 맛있는 발효식품(김치)로부터 유용균주분리용 시료를 확보함. 시료 sampling 시 반드시 관능적 test를 실시하여 맛있는 발효식품을 sampling함으로써 분리균주가 발효식품의 평균으로 이어질 때 최종 평균화된 발효식품의 관능적 우수성을 기본으로 함.
- 오랜 기간 다양한 곳에서 시료 sampling을 수행함으로써 분리균주의 다양성을 확보함.  
→ 현재 약 3,000여종의 신규한 김치 유산균 보유

### 2) 유용한 기능성 균주의 보유

- 최근 NGS기반 유전체 기술을 활용하여 유용미생물을 개발하고 그 기능성 등을 규명하는 연구가 활발히 수행되고 있음. 이 기술들은 짧은 시간 내 수많은 균주를 대상으로 유용균주를 찾아내는 우수한 기술임. 그러나 유용유전자를 균주가 지니고 있다고 하더라도 유전자의 발현여부 그 발현정도는 유전체 분석만으로는 정확히 규명하기 어려워 대사체 분석 등의 기술이 요구됨.
- 본 연구진은 이미 장기간 동안 균주를 수집하고 균주 분리 시 균주 동정과 더불어 기초적·기능적 특성 규명 연구를 병행하여 기존의 보고와는 차별화된 전략 미생물을 기보유함. 본 연구를 통하여 기보유된 균주의 안전성, 안정성, 기능성 평가와 더불어 유전체 분석과 대사체

분석에 따른 정보를 얻는다면 본 연구진이 기구명한 균주특성에 더하여 더 많은 광범위한 정보를 구축할 것으로 기대함.

### 3) 농식품 산업의 근간인 농산자원 쌀, 그 가공부산물(미강)의 활용제고 및 부가가치 제고

- 쌀 도정 시 부산물로 생산되는 미강은 현재 70~80% 사료나 퇴비로 사용되어 그 활용도가 낮고 부가가치도 아주 낮음.
- 현재까지 국내·외에서 개발한 미강 활용제품은 미강을 그대로 또는 미강에 유산균을 혼합한 제품, 기타 빵·과자류 등에 미강을 그대로 첨가한 제품 등이 있음.
- 본 연구에서는 미강의 단순첨가나 미강추출물의 이용이 아닌 미강을 기능성 유산균으로 발효시켜 고기능성 미강발효제품으로 개발함으로써 그 기능성 및 부가가치 향상에 기여할 것임.

### 4) 균주배양 기술: 한국형 김치 유산균 맞춤형 배양배지 및 배양 기술

- 김치 유산균은 식물성 유산균으로써 유제품 기원 유산균과는 대사적·생리학적 특성이 다소 다름. 기존의 유산균 배양 기술은 서양의 유제품 기원 유산균에 맞추어진 기술을 그대로 적용해왔음. 현재 시판되는 미강발효제품에서도 미강 주원료에 유산균만을 가하여 발효한 제품은 거의 없으며 미강에 우유(탈지분유)를 첨가하여 발효시키는 기술을 적용함.
- 우리나라 전통 발효식품인 김치발효를 주도하는 김치 유산균은 영양원이 한국형 식품 원료(배추, 소금, 향신채소 등)이며 이러한 환경 하에서 생육이 우수( $10^9$  CFU/mL)하였음은 이들 식물성 식품원료를 활용한 배양배지에서 생육이 최적화 된다는 것을 시사함. 본 연구진은 식물성 식품원료에서 김치 유산균을 잘 생육( $10^{8\sim 9}$  CFU/mL)시킬 수 있는 기술을 보유함.

### 5) 관련분야 국내 최고 전문 산업체의 제품생산 및 산업화

- 국내 건강식품(영양보충제 포함)시장에서 소비자의 needs는 기존의 프로바이오틱 또는 특정기능성 식품(인삼 등)에서 유용 기능성 균주를 특정 기능성 식품 원료에 접목하여 발효된 발효제품으로 옮겨가는 추세임.
- 이에 본 연구진은 해당분야 국내 최고 기업이 참여하여 기존의 건강기능 제품을 한 단계 upgrade시키는 제품 또는 새로운 건강기능 제품을 공동 개발하여 이를 산업화 할 것임.
- 이미 해당분야 제품출시·유통·산업화 등에 있어서 노하우를 지닌 전문 업체가 참여함으로써 국내·외 시장에서 제품 시장 점유에 의한 조기성과 창출이 가능함.



## 2. 연구개발과제의 수행 과정 및 수행 내용

### 2-1. 연구개발의 목표 및 내용

#### 가. 최종목표

- 기능성 김치 유산균을 활용한 미강발효제품 개발 및 산업화

#### 나. 세부목표

- 1) 전략 미생물 : 기능성 김치 유산균의 개발 - 2건 이상  
(기능성: 항콜레스테롤능, 항비만능, 항균능 등)
- 2) 기능성 김치 유산균을 활용한 미강발효
  - ① 미강발효 후  $10^9$  CFU/mL 생육도 달성
  - ② 미강발효물의 기능성 평가(동물 실험)  
: 미강발효물 섭취 쥐가 대조구 대비 유의적 기능성 판정
- 3) 전략 미생물 유전자 해독 - 2건 이상
- 4) 전략 미생물로부터 유용 유전자원 확보 - 6건 이상
- 5) 미강발효물의 대사체 분석 - 5건 이상
- 6) 기능성 김치 유산균을 활용한 미강발효제품의 산업화·실용화 - 1건
- 7) 특허 등록 2건 이상, SCI급 논문 5편 이상

#### 다. 연차별 개발목표 및 내용

##### < 1차년도 >

##### ○ 연구개발 목표

- 제 1세부(조선대학교) : 개발 균주의 기능성평가 및 안전성 평가
- 제 1협동(경희대학교) : 항콜레스테롤 효과가 있는 *L. plantarum* 및 항비만 효과가 있는 *W. koreensis*의 생명 현상 및 기작에 대해 이해하기 위해 각 균주의 전체 미생물 염기서열을 해독하기 위함
- 제 3협동(CJ제일제당㈜) : 발효를 위한 부산물 소재 확보, Scale-up 발효공정 검토, 발효 후 가공공정 개발

##### ○ 개발 내용 및 범위

##### - 제 1세부(조선대학교)

##### 1) 기능성 균주의 선정

- 가) *Lactobacillus plantarum* EM(기보유)  
: 김치 분리, 항콜레스테롤 기능성 균주
- 나) *Weissella koreensis*(기보유)  
: 김치 분리, 오르니틴 생성능에 기인한 항비만 기능성 균주
- 다) 기타(5종 보유, 추가 보유 예정)  
: 저온성 생육 김치 분리 유산균(*Leuconostoc* 속)

##### 2) 오르니틴 생성 *W. koreensis*와 저온성 생육 유산균의 배양학적 특성

- 가) 배양 온도에 따른 생육
  - 측정항목: 생균수, pH, 산도 등
- 나) 배양 초기 pH에 따른 생육
  - 측정항목: 생균수, pH, 산도 등
- 다) 생화학적 특성: API 50 CHL kit(BioMerieux)을 이용한 당대사능 조사

### 3) 균주의 기능성 평가

#### 가) 항콜레스테롤능

- ① BSH(Bile Salt Hydrolase) 활성  
: BSH screening medium에 spotting하여 배양 후 침전 정도를 확인
- ② Cholesterol assimilation  
: Rudel과 Morris 방법, 550nm에서 흡광도 측정하여 콜레스테롤 양 계산

#### 나) Ornithine 생성능

- ① 생성 최적조건: 배양 시간, 온도, pH 및 영양원
- ② 측정방법: TLC(Thin Layer Chromatography),  
HPLC(High Performance Liquid Chromatography)

#### 다) 항산화능

- ① DPPH: DPPH와 시료를 반응시켜 Spectrophotometer로 흡광도(517nm) 측정  
일정농도의 DPPH와 sample 혼합 → 실온 방치 → 흡광도(517nm) 측정
- ② SOD: SOD assay kit(Dojindo)을 이용하여 ELISA로 흡광도(450nm) 측정  
sample, WST working solution, Enzyme(Xanthine Oxidase) working solution 혼합 → 37°C에서 반응 → 흡광도(450nm) 측정

### 4) 균주의 안전성 평가 (*in vitro*)

#### 가) 용혈성 (hemolysis)

- ① 측정방법: 용혈성배지(horse blood agar)에 획선 도말하여 hemolysis 음성/양성 판정

#### 나) 항생제 내성

- ① 판정기준: European food safety authority (EFSA, 2012 기준 적용)
- ② 항생제: 9종(ampicillin, vancomycin, chloramphenicol, kanamycin, clindamycin, tetracycline, streptomycin, gentamicin, erythromycin)
- ③ 측정방법: 최소 저해 농도 (minimum inhibitory concentration)  
(EFSA, 2012 기준 적용)

균주별 항생제 최소 저해농도(mg/L)	<i>Lactobacillus plantarum</i>	<i>Weissella</i>
Ampicillin	4	2
Vancomycin	n.r.*	2
Gentamicin	16	4
Kanamycin	64	16
Streptomycin	64	8
Erythromycin	1	0.5
Clindamycin	1	0.25
Tetracycline	8	2
Chloramphenicol	4	2

\* n.r.: not required

#### 다) Biogenic amine 생성능

- ① 측정방법(HPLC를 이용한 검출)  
: ornithine, lysine을 첨가한 broth → 균주 접종 → 배양 → 원심분리 →  
배양상징액 → biogenic amine의 추출 및 유도체화 → HPLC 분석

#### 라) 유해효소 활성능(Zym kit, BioMérieux)

- ① 측정방법: cupule에 균주 접종 → 배양 → ZYM A/ZYM B 시약 loading → 결과 판독

- 제 1협동(경희대학교)

1) *W. koreensis*, *L. plantarum* EM 염기서열 해독

- 가) DNA 추출
  - ① 균주 배양
  - ② Kit를 이용하여 genomic DNA 추출
- 나) Whole genome sequencing
  - ① Library 제작 및 정량
  - ② Whole genome sequencing

2) 유전자 조립 및 유전자 주석 처리

- 가) 유전자 조립
  - ① Reference sequence 다운로드 (*W. koreensis*, *L. plantarum*)
  - ② Reference based assembly
- 나) 유전자 주석 처리
  - ① RAST annotation

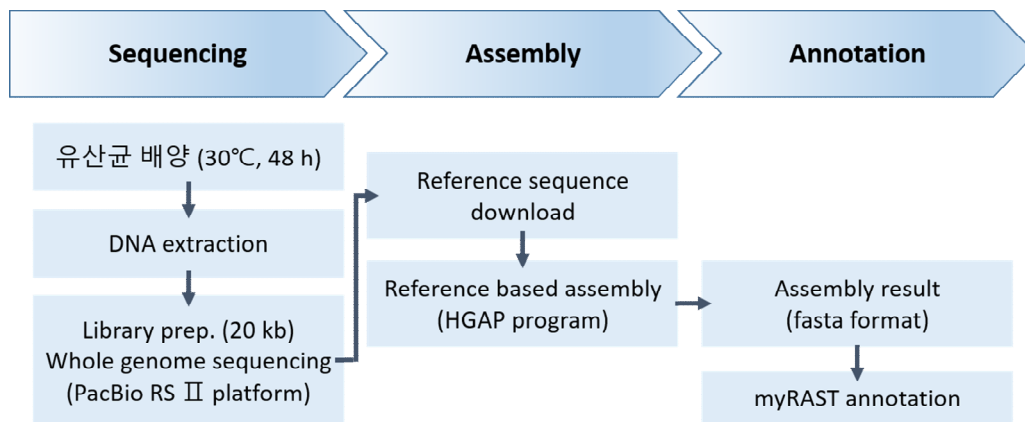


Figure 1. 1차년도 균주 염기서열 해독, 조립 및 주석 방법

- 제 3협동(CJ제일제당㈜)

1) 발효를 위한 부산물 소재 확보

- 가) 발효에 활용가능한 CJ제일제당㈜ 제품의 부산물 검토
  - 미강
    - 햇반 도정시 발생하는 쌀눈, 쌀겨
- 나) 부산물 수급가능성 검토
  - 각 부산물의 수급처, 수급량, 필요량 등 검토
- 다) 부산물 전처리 공정 확립
  - 세척, 보관, 운반 등의 공정 검토

2) Scale-up 발효공정 검토

- 가) 부산물 발효가 가능한 scale-up 업체 검토
  - 가능한 업체 리스트업
  - 비용 및 활용가능성 검토

3) 발효 후 가공공정 개발

- 가) 발효 후 가공공정 예상
  - 건조, 분말 가능 업체 리스트업
  - 가공공정 비용 및 공정 흐름도 등 검토

## < 2차년도 >

### ○ 연구개발 목표

- 제 1세부(조선대학교) : 개발 균주의 안정성 평가 및 미강발효 조건 확립
- 제 2세부(조선대학교) : 항콜레스테롤 및 항비만 관련 기능성 평가체계 구축 및 기능성 평가 (동물 실험)
- 제 1협동(경희대학교) : 김치 유산균 군집 확인 및 저온성 김치 유산균 염기서열 해독, 조립, 주석처리
- 제 3협동(CJ제일제당㈜) : 최적의 scale-up 발효공정 확립 및 발효 건강 원료 pilot 생산 기반 구축

### ○ 개발 내용 및 범위

#### - 제 1세부(조선대학교)

##### 1) 균주의 안정성 평가

가) 균주: 1차년도 연구결과 선정된 2종(*L. plantarum* EM, *W. koreensis* DB1)

나) 산업적 내구성

① 평가대상: 개발 기능성 균주

② 평가항목

○ 내산성 (pH 안정성)

- pH 범위: pH 2.0~pH 7.0
- 시간: 24 or 48 시간
- 측정 항목: 생균수/항균 활성

○ 내열성 (온도 안정성)

- 온도 범위: -2~100℃
- 시간: 수 초~수 시간
- 측정 항목: 생균수/항균 활성

○ 내염성 (염 안정성)

- NaCl 농도: 0~15%(w/v)
- 시간: 24 or 48 시간
- 측정 항목: 생균수/항균 활성

다) 생균 유지를 위한 안정화 최적 조건 확립

① 조건

○ 배지: MRS(실험실용 유산균 전용배지)

식용배지(실험실 개발 배지)

○ 안정제: 당(glucose, sucrose, lactose), 식품 원료(skim milk, corn steep liquor), 기타(tween 80, glycerol, 미네랄 등)

○ 온도: 4℃

○ 기간: 4주

② 평가항목

○ 생균수 측정: 1주 간격으로 생균수 측정(plate count)

##### 2) 미강의 특성 분석

가) 시료: 쌀 도정 후 생산된 미강

나) 미강의 이화학적 특성

① pH (54X02630, Fisher Science Education)

② 산도 (AOAC 법)

③ 당도 (ES-421, ATAGO)

④ 염도 (Pal- $\alpha$ , ATAGO)

다) 미강의 일반성분 분석

① 수분 (상압가열건조법)

② 조단백 (kjeldahl법)

③ 조지방 (에테르추출법)

④ 조회분 (회분 시험법)

⑤ 기타성분 (조섬유 등)

라) 미강의 영양성분 분석

① 유리당 (HPLC)

② 유기산 (HPLC)

③ 유리아미노산 (HPLC)

④ 기타성분 (지방산 등)

### 3) 미강의 발효 조건 확립 (전처리)

가) 전처리 조건

① 미강 첨가량: 1~20%

② 가열 처리: 121 °C, 15분

③ 용량(Lab scale):

- small scale: 100 ml/250 ml flask

- big scale: 800 ml/1,000 ml flask

나) 평가항목

① 육안검사(색, 탁도, 고형물의 분리 등)

② 이화학적 특성

- pH (54X02630, Fisher Science Education)

- 산도 (AOAC 법)

- 당도 (ES-421, ATAGO)

- 점도 (LVDV-II+PRO, BROOKFIELD)

### 4) 발효공정의 최적화(미강에서 유산균 증식)

※ 조기성과 창출을 위해 연구개발계획서 3차년도 연구내용 일부를 2차년도에 수행.

가) 균주: *W. koreensis* DB1 (1차년도 최종 선정 균주 2종 중 1종)

나) 균주 특성 조사(평가 결과에 따른 추가 실험)

- Phytase 활성: PSM(Phytase specific media) plate법

나) 영양원의 최적화

① 탄소원: glucose, sucrose 등

② 질소원: soy 추출물 등

③ 기타 성분: 비타민류, 무기질류 등

④ 영양원 최적화에 따른 특성

- 미생물학적 특성: 생균수

- 이화학적 특성: pH, 산도

- 기능성 평가: Ornithine 생성량

다) 발효 초기 pH의 최적화

① 발효 초기 pH: pH 5.0~pH 6.5

② 발효 초기 pH에 따른 특성

- 미생물학적 특성: 생균수

- 이화학적 특성: pH, 산도

- 기능성 평가: Ornithine 생성량
- 라) 발효 온도의 최적화
- ① 발효 온도: 25~30℃
  - ② 발효 온도에 따른 균주 특성
    - 미생물학적 특성: 생균수
    - 이화학적 특성: pH, 산도
    - 기능성 평가: Ornithine 생성량

### 5) 최적 발효 공정 조건에서 미강 발효

가) 균주: *W. koreensis* DB1 (Ornithine 생성 균주)

나) 최적화 조건

- ① 미강 첨가량 및 호화조건
- ② 종균 접종량
- ③ 발효 시간

다) 미강 발효 제품-①

- ① 발효 제품: 시니어 다이어트제품
- ② 지표성분: Ornithine(최종 생산량 목표치: 40,000\* mg/kg)  
\* 국내 기존 기술 대비 약 1.3배 높은 생산량

라) 미강 발효 전후 기능성 물질 비교

- ① Ornithine 생성량
- ② 소화율(제 2세부: 동물 실험 수행)
- ③ 기타 미강내 기능성 물질 1종

### - 제 2세부(조선대학교)

1) *W. koreensis* DB1 균주, 미강 및 미강발효제품의 지방세포 분화에 미치는 영향 및 그에 따른 유전자 발현 변화 확인

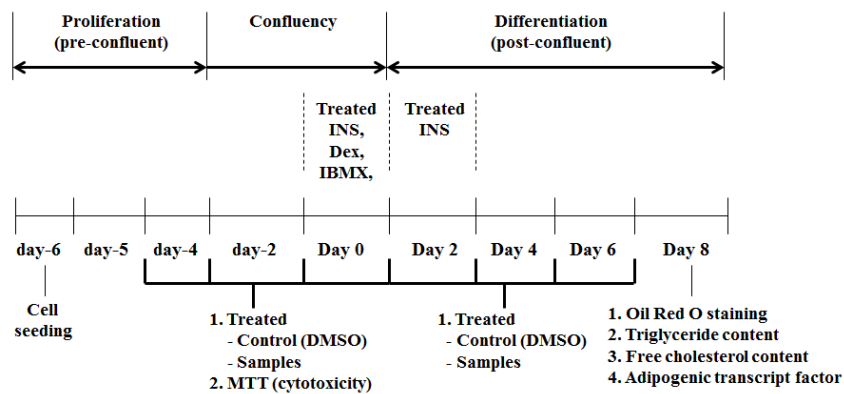


Figure 2. 3T3-L1 세포의 세포배양과 분화과정

가) 시료 및 시료준비

- ① 시료:
  - i) 균주(*W. koreensis* DB1)
  - ii) 미강
  - iii) *W. koreensis* DB1로 발효한 미강발효제품
- ② 시료준비
  - i) 균주: *W. koreensis* 균주 cell 부위만 냉동 건조한 후 멸균증류수로 희석 후 sonication한 다음 원심분리하여 suspension을 모아 시료로 사용

- ii) 미강 및 미강발효제품: 에탄올 추출하여 시료로 사용
- 나) 3T3-L1 세포배양과 분화유도
- 다) 균주의 농도에 따른 지방전구세포에 대한 독성평가
  - ① Cell viability assay: MTT assay
- 라) 균주가 3T3-L1 세포의 분화에 미치는 영향평가
  - ① Oil-Red O 염색
  - ② 중성지방 함량
  - ③ 지방축적량 측정
  - ④ 총콜레스테롤 함량
- 마) 균주에 의한 3T3-L1 지방세포 분화 억제효과 측정
  - ① RNA extraction과 RT-PCR
  - ② Western blot analysis
    - SREBP-1c(Sterol regulatory element-binding protein-1c), PPAR- $\gamma$  (Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma), FAS(Fatty acid synthase), ACC (Acetyl CoA carboxylase), aP2(Adipocyte protein 2 or Fatty acid binding protein 4),  $\beta$ -actin mRNA level

## 2) 동물 실험을 통한 균주, 미강 및 미강발효제품의 콜레스테롤 저하효과 및 항비만 효과 평가

- 가) 시료:
  - i) 균주 (*W. koreensis* DB1)
  - ii) 미강
  - iii) *W. koreensis* DB1로 발효한 미강발효제품
- 나) 실험군과 실험식이
  - ① 실험군
    - i) 정상식이군
    - ii) 고지방-고콜레스테롤식이
    - iii) 고지방-고콜레스테롤식이 +균주 경구투여군
    - iv) 고지방-고콜레스테롤식이 +미강 5% 첨가군
    - v) 고지방-고콜레스테롤식이 +발효미강제품 5% 첨가군
  - ② 실험식이
    - i) AIN-93 식이 변형하여 제조
    - ii) 균주는 경구 투여( $1 \times 10^9$  CFU *W. koreensis*)하고, 미강 및 미강발효제품은 사료에 5% 첨가하여 급여
- 다) 실험동물 및 실험기간
  - ① 실험동물
    - 수컷 C57BL/6N 마우스, 각 군당 10마리씩 총 50마리
  - ② 실험기간
    - 8주간 실시
- 라) 사양시험
  - 조선대학교 실험동물센터에서 동물 실험승인(IRB)을 받은 후 사양시험 실시
- 마) 항콜레스테롤 및 항비만효능 검증 biomarker 분석
  - ① 체중 증가량, 식이섭취량 및 식이효율
  - ② 간과 지방조직 부위별 (부고환지방, 장간막지방, 등지방 및 신장주변 지방, 총 지방조직) 무게 측정
  - ③ 혈청 중 효소 활성 및 지질 함량 분석
    - 혈청 중 간기능 지표인자: alanine aminotransferase(ALT), asparatate amino-

transferase (AST), alkaline phosphatase(ALP) 및 lactate dehydrogenase(LDH) 활성 측정

- 혈청 중 지질 성상: 중성지질, 총콜레스테롤, LDL-콜레스테롤, HDL-콜레스테롤 함량
- 동맥경화지수 및 심혈관위험지수 측정
- ④ 혈청 중 렙틴 및 인슐린 함량 분석
- ⑤ 간 조직 중 지질성상
  - 총 지질, 중성지방 및 총콜레스테롤 함량
- ⑥ 간조직의 과산화지질 함량 분석
- ⑦ 콜레스테롤대사 및 지방대사 관련 효소의 유전자발현
  - 간조직 중 콜레스테롤대사 관련 mRNA 발현: HMG-CoA reductase, LDL-receptor 및 cholesterol 7 $\alpha$ -hydroxylase(CYP7A1) mRNA 함량
  - 간조직 중 지방대사 관련 mRNA 발현: acetyl CoA carboxylase(ACC), fatty acid synthetase(FAS) 및 glucose-6-phosphate dehydrogenase(G6PDH) mRNA 함량
  - 부고환 지방조직: lipoprotein lipase(LPL) 및 hormone-sensitive lipase(HSL) mRNA 함량
- ⑧ 간 조직의 병리조직학적 검사
  - Oil-Red O 염색 및 간 지방변증 비율 (hepatic steatosis ratio)
- ⑨ 지방세포의 크기
  - Hematoxylin & eosin 염색 후 Image analyzer로 지방세포 크기 측정
- ⑩ 분변 중 지질성상 분석
  - 총지질, 중성지방 및 총콜레스테롤 함량
- ⑪ 통계처리

## - 제 1협동(경희대학교)

### 1) 저온성 김치의 메타지놈 분석

가) 메타지놈 sequencing

- ① 김치의 total DNA 추출
- ② 16S rRNA 부분 증폭
- ③ Sequencing

나) 유전체 분석

- ① Qiime software로 alpha, beta diversity 분석을 통해 김치 샘플 간 미생물 군집 차이 확인

### 2) 저온성 김치 유산균과 표준 미생물 염기서열 해독, 조립 및 주석처리

가) Whole genome sequencing

- ① 저온성 김치 유산균 DNA 추출
- ② Library 제작
- ③ Whole genome sequencing

나) 유전자 조립 및 주석처리

- ① Reference based assembly
- ② RAST annotation

### 3) COG 카테고리에 따라 유전체 분류

가) COG 데이터베이스 다운로드

- ① NCBI에서 COG 데이터베이스 다운로드

나) 유전자 COG 카테고리에 따라 분류

- ① Annotation한 균주 유전자 파일과 COG 데이터베이스 alignment



② 유전체를 COG 카테고리에 따라 분류

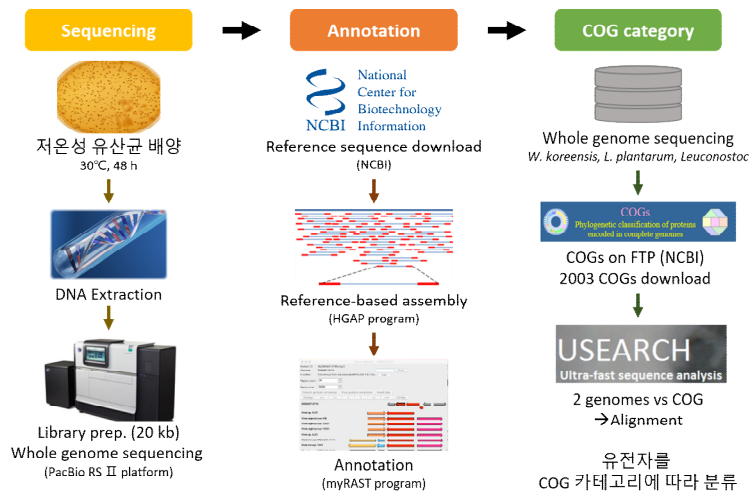


Figure 3. 2차년도 저온성 유산균 염기서열 분석 및 유전체 분석

- 제 3협동(CJ제일제당㈜)

1) Scale-up 발효공정 확립

가) Lab-test를 통해 확립된 발효공정의 scale-up 생산

- ① 반복생산을 통한 재현성 확인
- ② Mass-balance 추정을 통한 생산성 확인

2) Pilot 발효 소재 생산 시스템 구축

가) 가공공정 확립

- ① 건조 및 사균/생균 소재화: spray drying, freeze drying 등  
(생균 유지 필요시 동결건조 방법 고려할 수 있으나, 균수 유지가 필요하지 않는 경우는 단가 고려하여 열풍건조, 분무건조 및 진공건조 방법으로 진행할 예정)
- ② 분말화: 분쇄, 과립 등

나) 지표성분 및 영양소 분석

- ① 아미노산, 유기산, 비타민, 미네랄 등 분석
- ② 지표성분 분석

다) 안정성 분석

- ① 온도별, 시간별 타겟 지표성분 변화 분석을 통한 유통기한 산정
- ② 이미, 이취, 색 등 확인

라) 안전성 분석

① CJ제일제당㈜ 안전게이트 검증 (건강식품 기준 및 규격)

- 미생물 검증
- 화학 검증: 중금속, 농약 등
- 안전게이트 통과 후 CJ제일제당㈜ 신규 건강식품 원료 등록

※ 시니어 다이어트 제품 컨셉 (가안)

- 40대 이후 “Healthy aging“을 위한 건강기능식품
- 노화에 의한 비만 및 관련 대사성질환 (이상지질혈증, 혈당, 혈압 등) 예방을 위한 제품
- 과립, 정제 등의 제형
- 컨셉 원료로 “미강발효물” 적용 예정

## < 3차년도 >

### ○ 연구개발 목표

- 제 1세부(조선대학교) : 미강에서의 유산균 증식 및 최적 발효 조건 확립
- 제 2세부(조선대학교) : *L. plantarum* EM 및 *L. plantarum* EM 미강 발효 개발제품의 콜레스테롤 저하효과 및 항비만 효과평가 (동물 실험)
- 제 1협동(경희대학교) : 유전체 비교 분석 및 기능성 유전자 분석
- 제 2협동(경상대학교) : 김치 유산균 미강발효물 대사체 변화 및 영향 연구
- 제 3협동(CJ제일제당㈜) : 발효공정 최적화 및 표준화

### ○ 개발 내용 및 범위

#### - 제 1세부(조선대학교)

##### 1) 발효공정의 최적화(미강에서 유산균 증식)

가) 균주: 개발된 기능성 김치 유산균(*L. plantarum* EM)

- ※ 기능성 김치 유산균 2종 중 항비만능(오르니틴 생성)을 지닌 *W. koreensis* DB1 미강 발효 공정 최적화는 조기성과 창출을 위해 2차년도 (2019년)에 수행

나) 영양원의 최적화

- ① 탄소원: glucose, sucrose, maltose, fructose 등
- ② 질소원: 젓갈, soy추출물 등
- ③ 기타 성분: 비타민류, 무기질류 등
- ④ 영양원 최적화에 따른 균주 특성
  - 미생물학적 특성: 생균수
  - 이화학적 특성: pH, 산도
  - 기능성 평가: 항콜레스테롤능(Cholesterol assimilation), 항균활성

다) 발효 초기 pH의 최적화

- ① 발효 초기 pH: pH 5.0~pH 6.5
- ② 발효 초기 pH 최적화에 따른 균주 특성
  - 미생물학적 특성: 생균수
  - 이화학적 특성: pH, 산도
  - 기능성 평가: 항콜레스테롤능(Cholesterol assimilation), 항균활성

라) 발효 온도의 최적화

- ① 발효 온도: 25~30℃
- ② 발효 온도 최적화에 따른 균주 특성
  - 미생물학적 특성: 생균수
  - 이화학적 특성: pH, 산도
  - 기능성 평가: 항콜레스테롤능(Cholesterol assimilation), 항균활성

##### 2) 최적 발효 공정 조건에서 미강 발효

가) 균주: 개발된 기능성 김치 유산균

- *W. koreensis* DB1: 오르니틴 생성균주
- *L. plantarum* EM: 콜레스테롤 제거능

나) 최적화 조건(영양원, pH, 온도)에서 미강 발효

: *L. plantarum* EM 전용 최적화 조건

- ① 미강 첨가량 및 호화조건
- ② 종균 접종량
- ③ 발효 시간

다) 발효 미강 제품의 특성 분석

- *W. koreensis* DB1: 오르니틴 생성균주(2차년도)
- *L. plantarum* EM: 콜레스테롤 제거능(3차년도)
- ① 저장기간: 0~12개월
- ② 저장온도: 4℃, 상온
- ③ 생균수: plate count(발효 균주 및 유해 균주)
- ④ 기능성
  - *W. koreensis* DB1: 오르니틴 함량
  - *L. plantarum* EM: 항균활성, 콜레스테롤 제거능
- ⑤ 관능적 특성: 산패여부 등

- 제 2세부(조선대학교)

1) 개발제품 추출물이 지방세포 분화에 미치는 영향 및 그에 따른 유전자 발현 변화 확인

가) 시료 및 시료준비

- ① 시료:
  - i) 균주(*L. plantarum* EM)
  - ii) 미강
  - iii) *L. plantarum* EM로 발효한 발효미강제품
- ② 시료준비
  - i) 균주: *L. plantarum* EM 균주 cell 부위만 냉동 건조한 후 멸균증류수로 희석 후 sonication한 다음 원심분리하여 suspension을 모아 시료로 사용
  - ii) 미강 및 미강발효제품: 에탄올 추출하여 시료로 사용
  - iii) 대조구: DMSO

나) 3T3-L1 세포배양과 분화유도

다) 3T3-L1 지방전구세포에 대한 독성평가

- ① Cell viability assay : MTT assay

라) 3T3-L1 세포의 분화에 미치는 영향평가

- ① Oil-Red O 염색
- ② 중성지방 함량
- ③ 지방축적량 측정
- ④ 총 콜레스테롤 함량

마) 시료에 의한 3T3-L1 지방세포 분화관련 유전자 발현 측정

- ① RT-PCR
  - SREBP-1c(Sterol regulatory element-binding protein-1c), PPAR- $\gamma$  (Peroxisome proliferator -activated receptor-gamma), FAS(Fatty acid synthase), ACC(Acetyl CoA carboxylase),  $\beta$ -actin mRNA level

2) 동물실험을 통한 개발제품이 콜레스테롤 저하효과와 항비만 효과 평가

가) 시료:

- i) 균주 (*L. plantarum* EM)
- ii) 미강
- iii) *L. plantarum* EM로 발효한 발효미강제품

나) 실험군과 실험식이

- ※ 개발제품: ① *L. plantarum* EM 발효미강제품
- ② *L. plantarum* EM 발효미강제품 + *W. koreensis* DB1 발효미강제품

- ① 실험군

- i) 정상식이군
- ii) 고지방-고콜레스테롤식이군
- iii) 고지방-고콜레스테롤식이 + 균주(*L. plantarum* EM) 첨가군
- iii) 고지방-고콜레스테롤식이 + 미강 5% 첨가군
- v) 고지방-고콜레스테롤식이 + 개발제품 ① 5% 첨가군
- iv) 고지방-고콜레스테롤식이 + 개발제품 ② 5% 첨가군

② 실험식이

- AIN-93 식이 변형하여 제조
- 균주는 냉동건조하여 분말 형태로 급여
- 미강 및 발효미강개발제품 5%를 식이에 첨가하여 급여

다) 실험동물 및 실험기간

① 실험동물

- 수컷 C57BL/6J 마우스, 각 군당 10마리씩

② 실험기간

- 10주간 실시

라) 사양시험

- 조선대학교 실험동물센터에서 동물 실험승인(IRB)을 받은 후 사양시험 실시

마) 항콜레스테롤 및 항비만효능 검증 biomarker 분석

① 체중 증가량, 식이섭취량 및 식이효율

② 간과 지방조직(부고환지방, 장간막지방, 등지방 및 신장주변 지방, 총 지방조직)무게

③ 혈청 중 효소 활성 및 지질 함량 분석

- 혈청 중 간기능 지표인자: alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), alkaline phosphatase (ALP) 및 lactate dehydrogenase (LDH) 활성

- 혈청 중 지질 성상: 중성지질, 총콜레스테롤, Non HDL-콜레스테롤, HDL-콜레스테롤 함량

- 동맥경화지수 및 심혈관위험지수

④ 혈청 중 인슐린, 포도당, 렙틴 및 인슐린 함량 분석

⑤ 간 조직 중 지질 성상

- 총 지질, 중성지방 및 총 콜레스테롤 함량

⑥ 콜레스테롤대사 및 지방대사 관련 효소의 유전자발현

- 간 조직 중 콜레스테롤대사 관련 mRNA 발현: HMG-CoA reductase, LDL-receptor, cholesterol 7 $\alpha$ -hydroxylase (CYP7A1)

- 간 조직 중 지방대사 관련 mRNA 발현: acetyl CoA carboxylase (ACC) 및 fatty acid synthetase (FAS) mRNA 함량

⑦ 간 조직의 병리조직학적 검사

- Oil-Red O 염색 및 간 지방병증 비율(hepatic steatosis ratio)

⑧ 지방세포의 크기

- Hematoxylin & eosin 염색 후 Image analyzer로 지방세포 크기 측정

⑨ 분변 중 지질성상 분석

- 총 지질, 중성지방 및 총 콜레스테롤 함량

⑩ 통계처리

- 제 1협동(경희대학교)

1) Pan, core, unique, accessory genome 분석

- 가) 유전체 수집 및 annotation

- ① NCBI에 공개된 *W. koreensis*, *L. plantarum* 전체 염기서열 다운
- ② 항비만 및 항콜레스테롤 효과가 있는 다른 유산균 전체 염기서열 다운
- ③ RAST annotation
- 나) Pan, core, unique, accessory genome 분석
  - ① 모든 균주의 염기서열 InParanoid blast
  - ② Core, unique, accessory gene 추출

## 2) 유전자 기능 비교

- 가) Core, unique, accessory gene 기능성 분류
  - ① COG 카테고리에 따라 분류
  - ② KEGG 카테고리에 따라 분류
- 나) 프로바이오틱 관련 유전자 보유 유무 비교
  - ① 모든 균주의 염기서열에서 프로바이오틱 관련 유전자 추출
  - ② Heat map을 이용하여 균주 별 유전자 보유 유무 비교

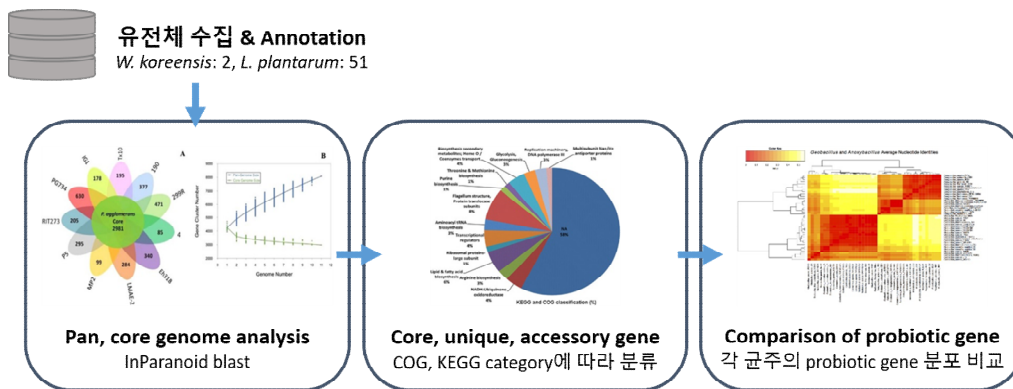


Figure 4. 3차년도 비교 유전체 분석 방법

(Ghobakhlou et al. BMC Genomics (2015), Vahid SJ et al. Scientific Report (2017), Bezuidt OK et al. Front Microbiol (2016))

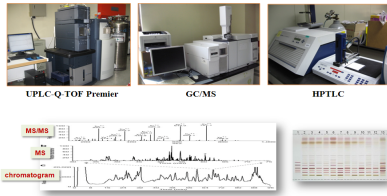
## 3) 항균력 관련 유전자 조사

- 가) *Lactobacillus plantarum* EM의 항균력 관련 유전자 조사
  - ① Bacteriocin gene cluster 확인
  - ② 항균력 관련 물질에 대한 합성 유전자 확인
- 나) 다른 *L. plantarum*의 항균력 관련 유전자 비교 및 확인
  - ① 다른 *L. plantarum*의 항균력 관련 유전자 추출
  - ② *L. plantarum* EM과 항균력 관련 유전자 비교

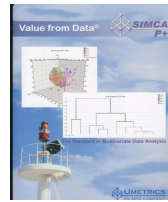
## - 제 2협동(경상대학교)

### 1) 대사체 분석 기술을 이용한 김치 유산균 미강발효물 대사체 및 상관관계 분석

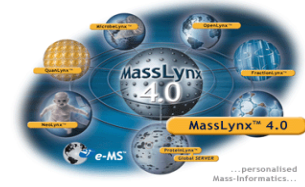
- 가) LC/MS와 GC/MS를 이용한 대사체 분석
  - ① 김치 유산균 미강발효물 대사체 및 상관관계 분석
    - LC/MS
    - GC/MS
    - 다변량 통계분석 (Multivariate statistical analysis)
    - PCA (Principal Component Analysis)
    - PLS-DA (Partial Least Squares-Discriminant Analysis)
    - 미강 발효물 대사체 분석 5건



<분석장비>



<통계프로그램>



<대사체 분석 프로그램>

- 제 3협동(CJ제일제당㈜)

1) 발효 건강 원료 개발 완료

- ① 생산처 품목제조신고
- ② 기술이전서 작성
- ③ 안정성 분석 \* 유통기한 실측 테스트 실시(계속)

2) 제품화 연구 및 출시 완료(2차년도 조기 달성)

- ① 제형테스트
  - 흐름성, 활택성, 결합성 등 타정 테스트
  - 포뮬라 개발
- ② 시생산
- ③ 지표성분 및 영양소 분석
- ④ 안전성 검증

3) 원가 절감 검토

- ① 생산성 향상을 위한 개선 가능 공정 검토
- ② 지표 성분의 생산량 증대를 위한 발효 공정 최적화

4) 제형 다양화 검토

- ① 정제 (tablet), 과립 (granule) 등 제형 다양화
- ② 다양한 제형에서의 안정성 검토
  - 지표성분, 영양소, 흐름성, 용해도 등

## < 4차년도 >

### ○ 연구개발 목표

- 제 1세부(조선대학교) : 기능성 미강발효제품 개발 및 생산(Lab scale)
- 제 1협동(경희대학교) : 유용유전자 발굴 및 확보
- 제 2협동(경상대학교) : 김치 유산균 미강발효물의 대사경로 도출
- 제 3협동(CJ제일제당㈜) : 미강발효제품의 제품화 및 사업화

### ○ 개발 내용 및 범위

#### - 제 1세부(조선대학교)

##### 1) 기능성 미강발효제품 개발

###### 가) 최적 제조 조건 설정

###### ① 동결건조 조건

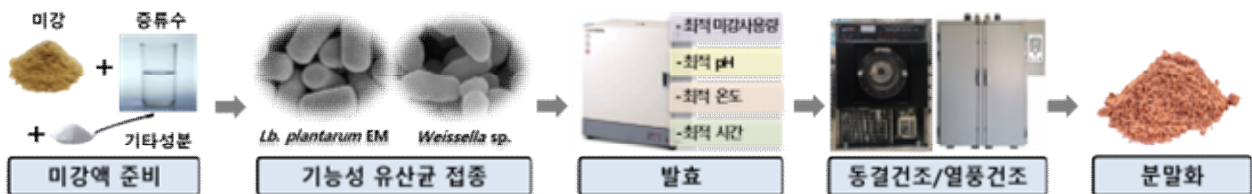
- 초저온 저장(-70℃, 12시간) → 진공동결건조(SFDSM12, Samwon)
- 기간 설정: 0~3일

###### ② 열풍건조 조건

- 향온향습기(LPC-281SK, Whisen)
- 온도 설정: 40~80℃
- 습도 설정: 10~30%
- 기간 설정: 0~7일

###### 나) 건조 조건에 따른 생균수 측정(plate count)

##### 2) 기능성 미강발효제품의 특성 조사



###### 가) 이화학적 특성

- ① pH (54X02630, Fisher Science Education)
- ② 산도 (AOAC 법)
- ③ 당도 (ES-421, ATAGO)

###### 나) 미생물학적 특성: 유산균 수 등

다) 관능적 특성: 향과 맛, 신맛, 이미/이취, 전체적인 기호도 등

라) 기능성 평가: 항콜레스테롤, ornithine 함량 등

마) 향기성분 분석(GC/MS)

##### 3) 기능성 미강발효제품의 성분 분석

###### 가) 일반 성분:

- 수분(상압가열건조법)
- 조회분(회분 시험법)
- 조지방(에테르추출법)

###### 나) 영양 성분:

- 유리당(HPLC): glucose, maltose, sucrose 등
- 유기산(HPLC): lactic acid, acetic acid 등
- 지방산(HPLC): butanoic acid, decanoic acid 등

다) 미강 발효 전과 발효 후 성분 분석 비교

#### 4) 기능성 미강발효제품의 저장 안정성 평가

- 가) 저장기간: 0~12개월
- 나) 저장온도: 4℃, 상온
- 다) 생균수: plate count
- 라) 기능성: 콜레스테롤 제거능, 오르니틴 함량, 항산화능, 항균활성
- 마) 관능적 특성: 산패여부 등

#### - 제 1협동(경희대학교)

##### 1) 항비만 효과에 관여하는 유용유전자 발굴

- 가) 유전체 비교 분석
  - ① 항비만 효과가 알려진 균주의 전체 유전자 다운로드
  - ② *W. koreensis* 균주와 유전체 비교
- 나) 항비만 관련 유용유전자 발굴
  - ① 비교 유전체 결과를 바탕으로 core gene 추출 (후보 유전자)
  - ② Ornithine 생성으로 인해 항비만 효과에 관여하는 최종 유용유전자 선별

##### 2) 항콜레스테롤 효과에 관여하는 유용유전자 발굴

- 가) 유전체 비교 분석
  - ① 항콜레스테롤 효과가 알려진 균주의 전체 유전자 다운로드
  - ② *L. plantarum* 균주와 유전체 비교
- 나) 항콜레스테롤 관련 유용유전자 발굴
  - ① 비교 유전체 결과를 바탕으로 core gene 추출 (후보 유전자)
  - ② 항콜레스테롤 효과에 관여하는 최종 유용유전자 선별

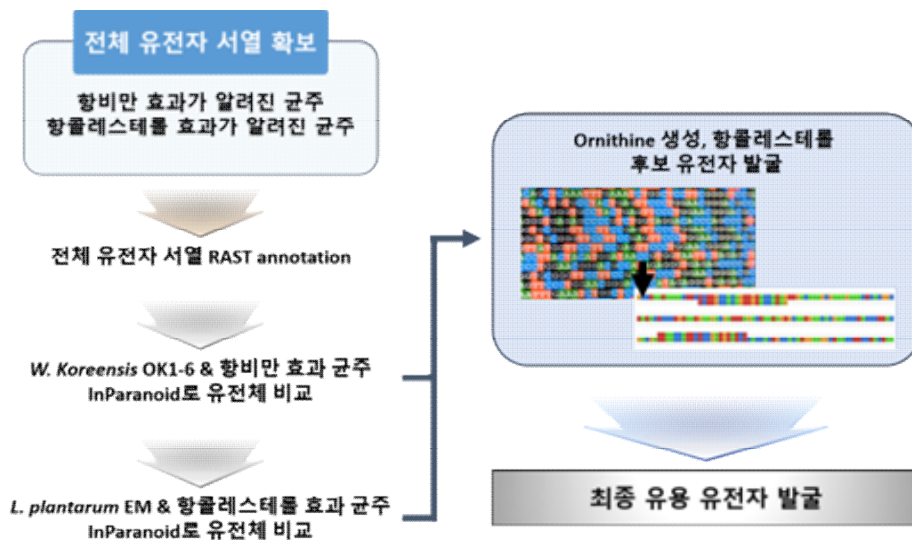


Figure 5. 4차년도 유용유전자 발굴 방법

#### - 제 2협동(경상대학교)

##### 1) 대사체 분석 기술을 이용한 김치 유산균 미강발효물의 대사경로 도출

- 가) LC/MS와 GC/MS를 이용한 대사체 분석 및 대사경로 도출
  - ① 김치 유산균 미강발효물의 대사경로 도출
    - 미강발효물의 대사물질 profile 확인 및 동정
    - Database를 이용한 지표물질 선정
    - 상관성 규명을 통한 잠재적 metabolic pathway 도출
    - 기능성 바이오마커 프로파일링



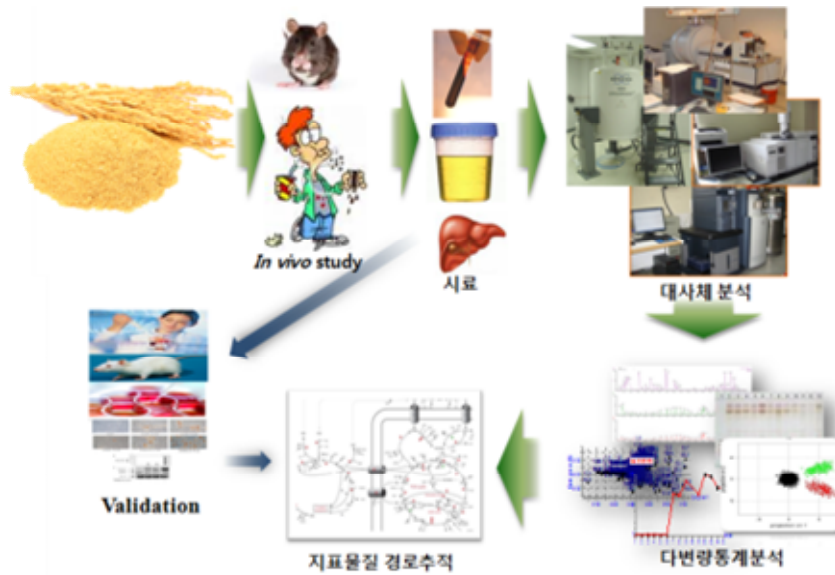


Figure 6. 대사체 분석 기술의 연구도식

- 제 3협동(CJ제일제당㈜)

1) 발효 컨텐츠 개발 및 홍보

- 한식발효 토대로 한 건강기능 강조
- K-food의 우수성 홍보
- CJ만의 발효 건강원료 컨텐츠 개발

2) 제형 다양화 연구 및 제품적용 확대

① 제형 다양화

- 안전성 결과를 토대로 다양한 제형으로의 확대 적용

② 제품 적용 확대

- Returnup 브랜드 카테고리내 다양한 제품에 적용될 수 있는 베이스 포뮬라 개발

③ 글로벌 제품 적용 가능성 검토

- 일본, 중국, 동남아 등 글로벌 제품 적용 검토
- 발효 건강 원료 컨텐츠 홍보

3) 기능성 주원료 활용성 검토

- Returnup만의 베이스 원료로의 활용성 외 주원료로의 제품화 검토

## 2-2. 연구개발 결과

### < 1차년도 >

#### ○ 제 1세부(조선대학교)

##### 1) 기능성 균주의 선정

###### 가) *Lactobacillus plantarum* EM(기보유)

- 김치로부터 분리
- 항콜레스테롤 활성

(Ref: Cholesterol-lowering effects of a putative probiotic strain *Lactobacillus plantarum* EM isolated from kimchi(2015) LWT-Food Sci & Tech, 62, 210-217)

- 항균활성: 항세균 / 항진균 활성

→ 원인물질: 3-hydroxy-5-dodecenoic acid

(Ref: Purification and characterization of an antimicrobial compound produced by *Lactobacillus plantarum* EM showing both antifungal and antibacterial activities(2019) LWT-Food Sci & Tech, 114, 108403)

###### 나) *Weissella koreensis*(기보유)

- 김치 분리, 오르니틴 생성능에 기인한 항비만 기능성 균주
- 서울·경기, 강원, 충청, 영남, 호남 5개 지역권에서 김치 시료 수집, 총 36개의 김치로부터 40종의 *Weissella koreensis* 분리

i) 각 지역권에서 2종씩 → 총 10종 1차 선정

ii) 16S rRNA sequence

: Table 1과 같이 10종의 분리균주 모두 *W. koreensis* S-5623<sup>T</sup>와 가장 높은 상동성을 나타냄. 분리균주 10종간의 상동성은 HJ를 제외하고는 100%로 나타남.

Table 1. 분리균주의 16S rRNA sequence 동정

Isolates	b.p	BLASTn result(ident.)
H65	1,442	<i>W. koreensis</i> S-5623 <sup>T</sup> (98.89%)
GH	1,504	<i>W. koreensis</i> S-5623 <sup>T</sup> (99.06%)
GL	1,345	<i>W. koreensis</i> S-5623 <sup>T</sup> (99.13%)
DB1	1,460	<i>W. koreensis</i> S-5623 <sup>T</sup> (99.86%)
YA	1,369	<i>W. koreensis</i> S-5623 <sup>T</sup> (99.92%)
CM	1,519	<i>W. koreensis</i> S-5623 <sup>T</sup> (99.13%)
IS	1,515	<i>W. koreensis</i> S-5623 <sup>T</sup> (99.13%)
NS	1,512	<i>W. koreensis</i> S-5623 <sup>T</sup> (99.13%)
CGM1	1,453	<i>W. koreensis</i> S-5623 <sup>T</sup> (99.11%)
HJ	1,517	<i>W. koreensis</i> S-5623 <sup>T</sup> (98.80%)

iii) RAPD-PCR

: 지역별 2종씩 1차 선정된 10종의 RAPD-PCR 분석 결과, 각 온도에서 지역별 균주간의 밴드의 차이를 나타낸 *W. koreensis* GL, DB1, CM, GH, IS7, CGM1, HJ를 선정함(Figure 1).

→ 16S rRNA 서열이 동일하게 나타남에 따라 RAPD-PCR을 통하여 서로 다른 균주 총 7종 2차 선정

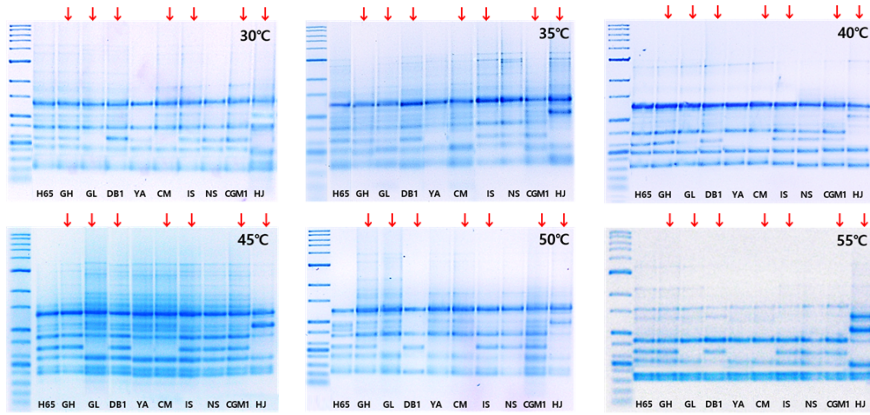


Figure 1. *W. koreensis* 10종의 RAPD-PCR

iv) 오르니틴 생성능(TLC, HPLC)

: 2차 선정된 7종의 오르니틴 생성량을 정성, 정량적으로 분석하여 가장 오르니틴 생성능이 우수한 2종의 균주를 최종 선정함(data: 연구개발 수행내용 중 균주의 기능성 평가)

→ 오르니틴 생성능이 가장 뛰어난 균주 총 2종 최종 선정 (보고서 page 9 참조)  
(*W. koreensis* DB1, *W. koreensis* HJ)

다) 저온성 생육 김치 분리 유산균(*Leuconostoc* 속)

: 30°C 이하에서만 생육

• 경기, 영남, 호남 3개 지역권에서 김치 시료 수집, 총 14개의 김치로부터 21종의 저온성 유산균 분리

i) 각 지역권에서 2종~3종씩 → 총 7종 1차 선정

ii) 16S rRNA sequence

: Table 2와 같이 PG7, HT1, JW1을 제외한 4종은 모두 *Leu. gelidum* ssp. *gasicomitatum*으로 동정되었으며 이들 간의 상동성이 동일하게 나타남.

Table 2. 분리균주의 16S rRNA sequence 동정

Isolates	b.p	BLASTn result (ident.)
CH3	1,509	<i>Leu. gelidum</i> ssp. <i>gasicomitatum</i> TB 1-10 <sup>T</sup> (100%)
GH3	1,506	<i>Leu. gelidum</i> ssp. <i>gasicomitatum</i> TB 1-10 <sup>T</sup> (100%)
PG7	1,501	<i>Leu. inhae</i> IH003 <sup>T</sup> (99.66%)
HT1	1,507	<i>Leu. carnosum</i> NRIC 1722 <sup>T</sup> (99.86%)
SG4	1,492	<i>Leu. gelidum</i> ssp. <i>gasicomitatum</i> TB 1-10 <sup>T</sup> (100%)
JW1	1,506	<i>Leu. gelidum</i> ssp. <i>aenigmaticum</i> POUF4d <sup>T</sup> (100%)
JW2	1,514	<i>Leu. gelidum</i> ssp. <i>gasicomitatum</i> TB 1-10 <sup>T</sup> (100%)

ii) RAPD-PCR

: 16S rRNA 서열이 동일하게 나타난 4종 (CH3, GH3, JW2, SG4)의 RAPD-PCR 결과 CH3의 경우 30°C, 35°C, 40°C, 45°C, 50°C, 55°C에서 3종(GH3, JW2, SG4)과는 다른 패턴을 나타냄(Figure 2).

→ 이에 *Leu. inhae* PG7, *Leu. carnosum* HT1, *Leu. gelidum* ssp. *aenigmaticum* JW1, *Leu. gelidum* ssp. *gasicomitatum* CH3로 총 4종 최종 선정

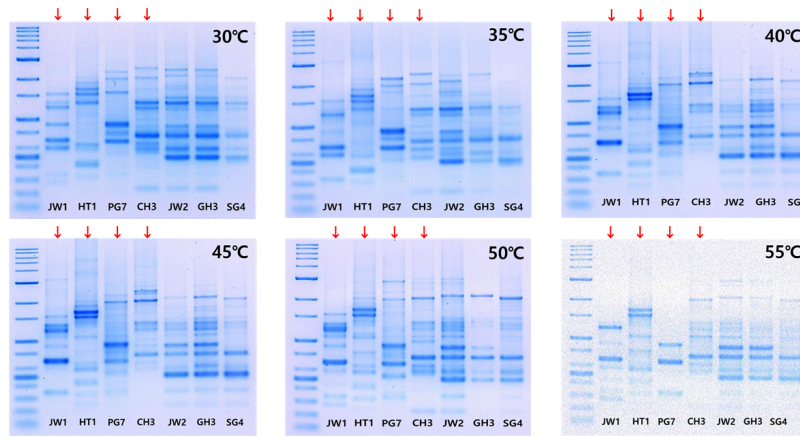


Figure 2. 저온성 생육 김치 유산균의 RAPD-PCR

## 2) 오르니틴 생성 *W. koreensis*와 저온성 생육 유산균의 배양학적 특성

가) 배양 온도에 따른 생육

: -1°C, 5°C, 10°C, 15°C, 25°C, 30°C 생육측정

※ ← : 최적 생육 온도

### ① 오르니틴 생성 *W. koreensis*

#### - *W. koreensis* DB1

- -1°C: 4주, 최대  $9.19 \pm 0.34$  log CFU/mL
- 5°C: 11일, 최대  $A_{600} 1.787 \pm 0.012$
- 10°C: 4일, 최대  $A_{600} 2.535 \pm 0.021$
- 15°C: 4일, 최대  $A_{600} 2.955 \pm 0.133$
- 25°C: 20시간, 최대  $A_{600} 3.162 \pm 0.157$
- 30°C: 16시간, 최대  $A_{600} 3.035 \pm 0.174$  ←

#### - *W. koreensis* HJ

- -1°C: 4주, 최대  $8.95 \pm 0.02$  log CFU/mL
- 5°C: 10일, 최대  $A_{600} 1.850 \pm 0.028$
- 10°C: 4일, 최대  $A_{600} 2.490 \pm 0.057$
- 15°C: 4일, 최대  $A_{600} 2.783 \pm 0.095$
- 25°C: 24시간, 최대  $A_{600} 3.088 \pm 0.168$
- 30°C: 20시간, 최대  $A_{600} 3.125 \pm 0.021$  ←

### ② 저온성 생육 김치 유산균

#### - *Leu. aenigmaticum* JW1

- -1°C: 4주, 최대  $8.754 \pm 0.129$  log CFU/mL
- 5°C: 10일, 최대  $A_{600} 1.030 \pm 0.014$
- 10°C: 3.3일, 최대  $A_{600} 1.910 \pm 0.014$
- 15°C: 3.3일, 최대  $A_{600} 2.045 \pm 0.092$
- 25°C: 20시간, 최대  $A_{600} 1.907 \pm 0.045$  ←
- 30°C: 20시간, 최대  $A_{600} 1.220 \pm 0.014$

#### - *Leu. gasicomitatum* CH3

- -1°C: 4주, 최대  $8.366 \pm 0.092$  log CFU/mL
- 5°C: 9일, 최대  $A_{600} 1.110 \pm 0.042$
- 10°C: 3.6일, 최대  $A_{600} 1.935 \pm 0.021$
- 15°C: 3일, 최대  $A_{600} 1.980 \pm 0.028$
- 25°C: 20시간, 최대  $A_{600} 2.028 \pm 0.105$  ←
- 30°C: 20시간, 최대  $A_{600} 1.600 \pm 0.071$

- *Leu. carnosum* HT1
  - 1℃: 4주, 최대  $8.153 \pm 0.032$  log CFU/mL
  - 5℃: 11일, 최대  $A_{600} 0.895 \pm 0.064$
  - 10℃: 4일, 최대  $A_{600} 2.250 \pm 0.014$
  - 15℃: 3.3일, 최대  $A_{600} 2.555 \pm 0.106$
  - 25℃: 20시간, 최대  $A_{600} 3.015 \pm 0.103$  ←
  - 30℃: 16시간, 최대  $A_{600} 2.207 \pm 0.051$
- *Leu. inhae* PG7
  - 1℃: 4주, 최대  $8.263 \pm 0.057$  log CFU/mL
  - 5℃: 10일, 최대  $A_{600} 1.505 \pm 0.064$
  - 10℃: 3.3일, 최대  $A_{600} 2.370 \pm 0.014$
  - 15℃: 3.3일, 최대  $A_{600} 2.573 \pm 0.088$
  - 25℃: 20시간, 최대  $A_{600} 2.422 \pm 0.033$  ←
  - 30℃: 24시간, 최대  $A_{600} 0.199 \pm 0.016$

나) 배양 초기 pH에 따른 생육

: 배지 초기 pH 4, 5, 6, 7, 8 생육측정 (생균수)

① 오르니틴 생성 *W. koreensis*

- *W. koreensis* DB1: pH 6, 7, 8 최대 생육  
(약  $8.32 \sim 8.84$  log CFU/mL)
- *W. koreensis* HJ: pH 6, 7, 8 최대 생육  
(약  $8.81 \sim 8.86$  log CFU/mL)

② 저온성 생육 김치 유산균

- *Leu. aenigmaticum* JW1: pH 6, 7, 8 최대 생육  
(약  $9.25 \sim 9.40$  log CFU/mL)
- *Leu. gasicomitatum* CH3: pH 6, 7, 8 최대 생육  
(약  $9.25 \sim 9.40$  log CFU/mL)
- *Leu. carnosum* HT1: pH 6, 7, 8 최대 생육  
(약  $9.35 \sim 9.49$  log CFU/mL)
- *Leu. inhae* PG7: pH 8 최대 생육  
(약  $9.11$  log CFU/mL)

다) 생화학적 특성

: API 50 CHL kit(BioMerieux)을 이용한 당대사능 조사

- 분리 유산균 6종의 당대사능 측정 결과, Table 3과 같이 나타남.

Table 3. 분리균주의 당대사능

Sugar	DB1	HJ	JW1	PG7	HT1	CH3	Sugar	DB1	HJ	JW1	PG7	HT1	CH3
Glycerol	-	-	-	-	-	-	Salicine	-	-	-	Δ	-	-
Erythritol	-	-	-	-	-	-	Cellobiose	-	-	+	+	+	+
D-Arabinose	-	-	-	-	-	-	Maltose	-	-	+	+	+	+
L-Arabinose	+	+	+	+	-	+	Lactose	-	-	-	-	-	-
Ribose	+	+	+	+	+	+	Melibiose	-	-	+	-	-	+
D-Xylose	+	-	+	Δ	-	+	Sucrose	-	-	+	+	+	+
L-Xylose	-	-	-	-	-	-	Trehalose	-	-	+	+	-	+
Adonitol	-	-	-	-	-	-	Inuline	-	-	-	-	-	-
Methyl-BD-xylopyranosicle	-	-	-	-	-	-	Melezitose	-	-	-	-	-	-
D-Galactose	-	-	-	-	-	-	Raffinose	-	-	+	-	-	+
D-Glucose	+	+	+	+	+	+	Starch	-	-	-	-	-	-
D-Fructose	+	-	+	+	+	+	Glycogen	-	-	-	-	-	-
D-Mannose	+	+	+	+	+	+	Xylitol	-	-	-	-	-	-
L-Sorbose	-	-	-	-	-	-	β-Gentiobiose	-	-	+	+	+	+
Rhamnose	-	-	-	-	-	-	D-Turanose	-	-	+	+	+	+
Dulcitol	-	-	-	-	-	-	D-Lyxose	-	-	-	-	-	-
Inositol	-	-	-	-	-	-	D-Tagatose	-	-	-	-	-	-
Mannitol	-	-	-	Δ	-	-	D-Fucose	-	-	-	-	-	-
Sorbitol	-	-	-	-	-	-	L-Fucose	-	-	-	-	-	-
α-Methyl-D-mannoside	-	-	-	-	-	-	D-Arabitol	-	-	-	-	-	-
α-Methyl-D-glucoside	-	-	+	+	+	+	L-Arabitol	-	-	-	-	-	-
N-Acetyl glucosamine	+	+	+	+	+	+	Gluconate	Δ	Δ	+	+	+	-
Amygdaline	-	-	-	-	-	-	2-Keto-gluconate	-	-	+	+	-	-
Arbutin	-	-	-	-	-	-	5-Keto-gluconate	-	-	+	+	-	-
Esculine	-	-	+	+	+	+							

### 3) 균주의 기능성 평가

- 사용균주: 개발균주 7종

EM: *L. plantarum* EM, DB1: *W. koreensis* DB1, HJ: *W. koreensis* HJ,  
 JW1: *Leu. aenigmaticum* JW1, CH3: *Leu. gasicomitatum* CH3,  
 HT1: *Leu. carnosum* HT1, PG7: *Leu. inhae* PG7

#### 가) 향콜레스테롤능

##### ① BSH(Bile Salt Hydrolase) 활성

- BSH screening medium에 기능성 유산균 후보 7종을 spotting하여 배양한 후 침전 정도를 확인
- *L. plantarum* EM을 제외한 다른 6종의 유산균에서는 BSH 활성이 나타나지 않음(Figure 3).

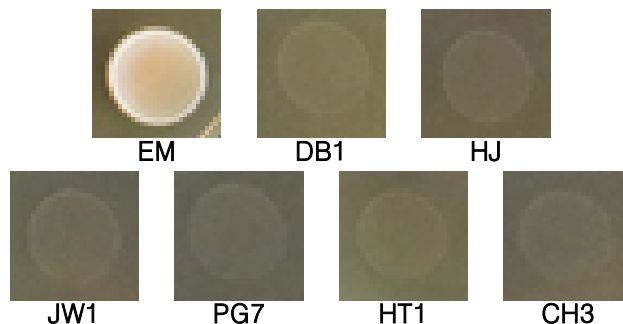


Figure 3. 분리균주의 BSH 활성 screening

② Cholesterol assimilation

- BSH. 활성을 나타낸 *L. plantarum* EM의 경우, 생균(growing cell) 뿐만 아니라 휴식기 상태(resting cell) 혹은 사균(dead cell) 상태에서도 높은 콜레스테롤 제거능을 보임(Table 4).

Table 4. *L. plantarum* EM의 콜레스테롤 제거능

Unit: %

Cell state \ Media	0.5% Oxgall	0.5% TDCA
Growing cell	88.12±2.80	47.66±0.00
Resting cell	60.59±0.83	38.20±0.00
Dead cell	39.02±0.00	33.33±0.00

나) Ornithine 생성능

① Ornithine 생성능 우수 균주 선정

i) TLC 분석

: 1% arginine이 첨가된 MRS 배지에서 48시간 배양 후 오르니틴 생성능을 TLC를 이용하여 확인하였음(Figure 4).

그 결과 *L. plantarum* EM과 저온성 생육 김치 유산균 4종(JW1, CH3, PG7, HT1)은 오르니틴 생성능이 거의 없는 것으로 나타남. *W. koreensis* 7종은 모두 오르니틴 생성능을 가지며 그 차이가 TLC 상으로는 구분하기 어려움. 이에 HPLC를 통해 정량 분석을 진행하였음.

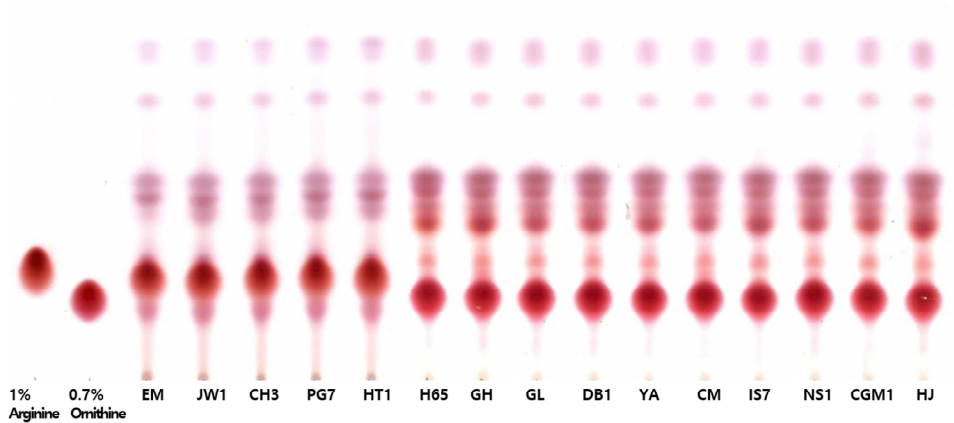


Figure 4. 분리 균주의 오르니틴 생성능(TLC)

ii) HPLC 분석

: HPLC 분석 결과 *W. koreensis* DB1(8,373.59 mg/L)과 *W. koreensis* HJ (7,602.42 mg/L)가 가장 높은 오르니틴 생성능을 나타냄.



Table 5. *W. koreensis* 7종의 오르니틴 생성능 확인 (HPLC)

Unit: mg/L

No.	Amino acid	CM	IS7	CGM1	HJ ✓	GH	GL	DB1 ✓
1	Aspartic acid	411.84	353.26	340.69	389.53	375.65	413.54	348.42
2	Glutamic acid	739.43	734.33	697.14	753.66	739.34	754.81	713.83
3	Asparagine	11.05	71.44	62.33	33.03	38.75	7.43	40.46
4	Serine	274.87	284.05	270.57	277.26	270.67	277.34	264.19
5	Glutamine	28.69	29.80	26.84	N.D	29.13	32.36	N.D
6	Histidine	106.19	86.07	78.84	65.53	111.70	104.37	73.72
7	Glycine	151.77	154.41	118.81	140.02	140.78	138.64	134.05
8	Threonine	306.79	303.84	254.59	294.48	302.98	280.58	289.69
9	Arginine	230.50	89.08	97.92	68.26	267.46	90.08	65.54
10	Alanine	942.31	1068.04	99.67	1,046.76	912.87	1,077.51	1,024.63
11	Taurine	13.46	12.36	12.29	13.50	12.97	12.45	13.51
12	GABA	26.06	25.17	25.99	31.20	26.31	28.16	30.15
13	Tyrosine	194.50	214.71	210.03	194.98	198.34	191.81	191.22
14	Valine	402.31	410.92	400.80	411.66	398.09	410.90	404.32
15	Methionine	69.70	58.16	54.45	64.54	65.57	60.13	57.86
16	Tryptophane	147.11	150.99	141.93	149.78	138.94	148.51	145.87
17	Penylalanine	209.67	210.23	206.76	194.44	228.34	185.69	176.75
18	Isoleucine	306.79	328.81	321.19	325.73	307.11	315.18	319.43
19	Ornithine	6,293.43	6,520.55	5,928.54	7,602.42	5,059.53	6,335.13	8,373.59
20	Leucine	369.52	376.17	363.47	372.39	408.88	347.89	349.44
21	Lysine	271.17	307.58	265.94	303.87	254.03	260.74	289.15
22	Proline	106.81	95.50	152.95	98.83	93.56	151.96	121.00
Total		11,613.97	11,885.46	11,027.74	12,831.85	10,380.99	11,626.23	13,426.81

② Ornithine 생성 최적 조건

- 배양온도

· *W. koreensis* DB1

: 1% arginine이 첨가된 MRS에서 24시간 배양한 결과, 25°C와 30°C에서 배양하였을 때 ornithine 생성능이 가장 높은 것으로 확인됨.

· *W. koreensis* HJ

: 1% arginine이 첨가된 MRS에서 24시간 배양한 결과, 30°C에서 배양하였을 때 ornithine 생성능이 가장 높은 것으로 확인됨.

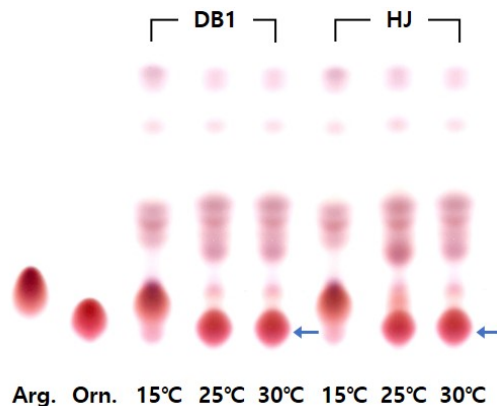


Figure 5. *W. koreensis* 균주 2종의 배양온도에 따른 오르니틴 생성능 확인 (TLC)

- 영양원: Arginine(Ornithine 전구체)

· *W. koreensis* DB1

: Arginine이 농도별로 첨가된 MRS에서 24시간 배양한 결과, 1% 첨가구의



ornithine 생성능이 가장 높은 것으로 확인됨.

· *W. koreensis* HJ

: Arginine이 농도별로 첨가된 MRS에서 24시간 배양한 결과, 1% 첨가구의 ornithine 생성능이 가장 높은 것으로 확인됨.

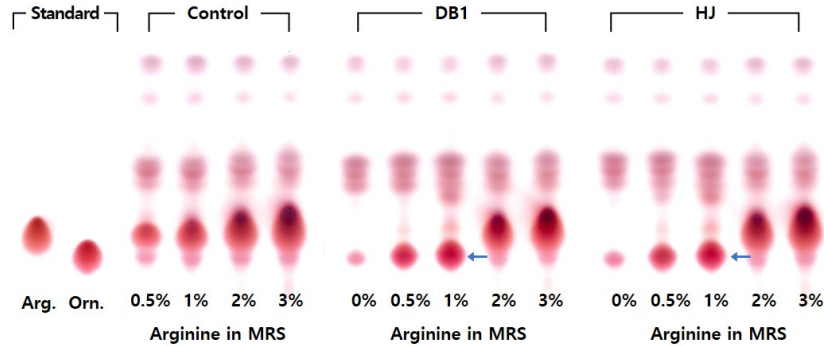


Figure 6. *W. koreensis* 균주 2종의 영양원 농도에 따른 오르니틴 생성능 확인 (TLC)

- pH

i) TLC 분석

· *W. koreensis* DB1

: 1% arginine 첨가 후 pH가 조정된 MRS에서 24시간 배양하여 TLC 분석. pH 조정에 따른 오르니틴 생성능 차이를 확인하기 어려움.

· *W. koreensis* HJ

: 1% arginine 첨가 후 pH가 조정된 MRS에서 24시간 배양하여 TLC 분석. pH 조정에 따른 오르니틴 생성능 차이를 확인하기 어려움.

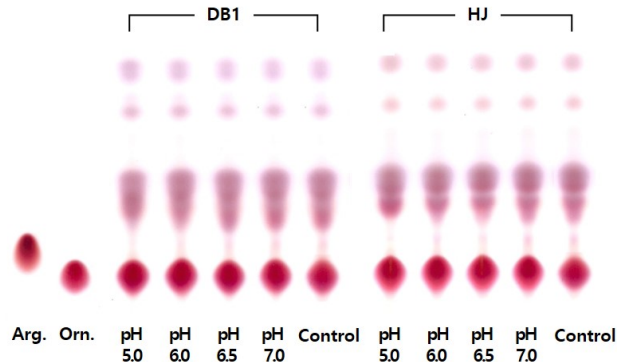


Figure 7. *W. koreensis* 균주 2종의 초기 pH에 따른 오르니틴 생성능 확인(TLC)

ii) 생육도 측정

· *W. koreensis* DB1

: 1% arginine이 첨가된 MRS에서 24시간 배양한 결과, pH 5.0에서 최대 생육 나타냄( $A_{600} 5.08 \pm 0.11$ ).

· *W. koreensis* HJ

: 1% arginine이 첨가된 MRS에서 24시간 배양한 결과, pH 6.0~7.0에서 최대 생육을 나타냄( $A_{600} 3.35 \pm 0.07 \sim 3.45 \pm 0.05$ ).

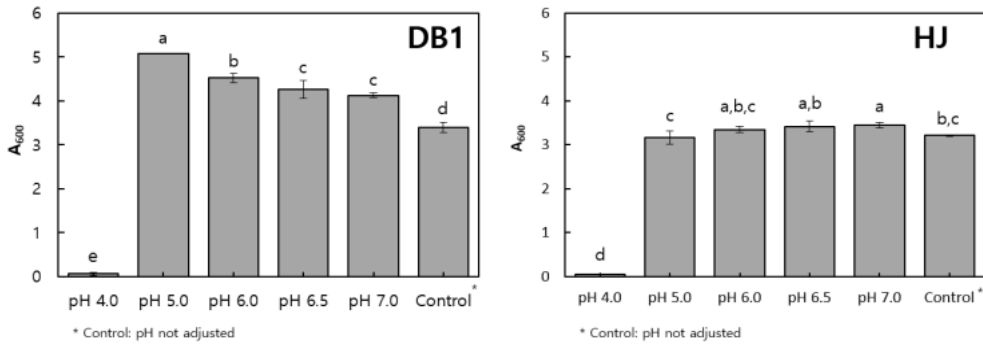


Figure 8. *W. koreensis* 균주 2종의 초기 pH에 따른 생육도

- 배양시간

i) TLC 분석

· *W. koreensis* DB1

: 최대 생육을 나타낸 pH 5.0로 조정된 1% arginine 첨가 MRS에 균주를 접종 후 30°C에서 24시간, 48시간 배양하여 TLC 분석. 배양시간에 따른 오르니틴 생성능 차이를 확인하기 어려움.

· *W. koreensis* HJ

: 최대 생육을 나타낸 pH 6.5로 조정된 1% arginine 첨가 MRS에 균주를 접종 후 30°C에서 24시간, 48시간 배양하여 TLC 분석. 배양시간에 따른 오르니틴 생성능 차이를 확인하기 어려움.



Figure 9. *W. koreensis* 균주 2종의 배양 시간에 따른 오르니틴 생성능 확인(TLC)

ii) HPLC 분석

· *W. koreensis* DB1

: 최대 생육을 나타낸 pH 5.0로 조정된 1% arginine 첨가 MRS에 균주를 접종 후 30°C에서 24시간, 48시간 배양하여 HPLC 분석. 48시간에서 가장 높은 함량을 나타냄(11,270.73 mg/L) → 최적 생산

Table 6. *W. koreensis* DB1의 배양시간에 따른 오르니틴 생성능 확인 (HPLC)

Unit: mg/L

No.	Amino acid	24h	48h
1	Aspartic acid	336.75	341.82
2	Glutamic acid	698.68	708.53
3	Asparagine	62.21	61.72
4	Serine	287.27	288.73
5	Glutamine	N.D*	N.D
6	Histidine	86.65	88.49
7	Glycine	167.00	171.82
8	Threonine	311.71	309.38
9	Arginine	18.52	15.52
10	Alanine	1,245.06	1,325.62
11	Taurine	11.34	11.87
12	GABA	18.50	20.26
13	Tyrosine	209.01	199.45
14	Valine	407.57	403.79
15	Methionine	94.55	87.20
16	Tryptophane	198.03	201.25
17	Penylalanine	226.83	199.88
18	Isoleucine	318.93	316.36
19	Ornithine	11,066.14	11,270.73
20	Leucine	426.99	379.17
21	Lysine	443.90	458.04
22	Proline	160.86	155.04
<b>Total</b>		16,796.48	17,014.67

\* N.D: Not detected

· *W. koreensis* HJ

: 최대 생육을 나타낸 pH 6.5로 조정된 1% arginine 첨가 MRS에 균주를 접종 후 30°C에서 24시간, 48시간 배양하여 HPLC 분석. 48시간에서 가장 높은 함량을 나타냄(11,144.55 mg/L) → 최적 생산

Table 7. *W. koreensis* HJ의 배양시간에 따른 오르니틴 생성능 확인 (HPLC)

Unit: mg/L

No.	Amino acid	24h	48h
1	Aspartic acid	392.41	407.93
2	Glutamic acid	753.95	764.06
3	Asparagine	40.40	39.38
4	Serine	293.40	298.57
5	Glutamine	N.D*	N.D
6	Histidine	93.79	99.29
7	Glycine	187.70	190.38
8	Threonine	298.99	307.40
9	Arginine	17.61	18.88
10	Alanine	1,095.24	1,184.32
11	Taurine	12.81	13.32
12	GABA	19.95	19.12
13	Tyrosine	210.36	208.71
14	Valine	413.61	424.71
15	Methionine	108.35	102.39
16	Tryptophane	206.70	217.51
17	Penylalanine	217.91	195.48
18	Isoleucine	326.55	332.31
19	Ornithine	11,046.74	11,144.55
20	Leucine	401.90	370.40
21	Lysine	484.69	464.25
22	Proline	139.20	163.03
<b>Total</b>		16,762.27	16,965.99

\* N.D: Not detected

다) 항산화능

① DPPH radical 소거능(배양상징액)

- 유산균 7종의 DPPH radical 소거능은 대조구의 약 10% 활성을 지님.

Table 8. 분리균주의 DPPH 항산화능

	Sample	Inhibition (%)
Control (1,000 ppm)	Ascorbic acid	93.07 ± 0.21
	BHT	92.64 ± 0.29
	BHA	92.37 ± 0.33
Culture supernatant (100 µL)	EM	9.25 ± 0.51
	DB1	8.26 ± 0.22
	HJ	8.34 ± 0.26
	JW1	8.74 ± 0.40
	CH3	8.20 ± 0.36
	HT1	8.21 ± 0.67
	PG7	7.92 ± 0.88

② SOD assay(세포내추출물)

- SOD 활성능

: EM > HJ, HT1, JW1, DB1, CH3 > PG7로 Vit C의 1~100 ppm의 활성에 준함.

Table 9. 분리균주의 SOD 항산화능

	Sample	Inhibition (%)
Control	Ascorbic acid 100 ppm	27.53 ± 0.58
	Ascorbic acid 10 ppm	6.83 ± 0.70
	Ascorbic acid 1 ppm	0.44 ± 0.31
Intracellular cell-free extract	EM( $7.30 \times 10^7$ CFU)	22.10 ± 1.89
	DB1( $1.79 \times 10^7$ CFU)	6.25 ± 0.73
	HJ( $1.83 \times 10^7$ CFU)	10.24 ± 0.96
	JW1( $4.26 \times 10^7$ CFU)	6.68 ± 0.33
	CH3( $4.54 \times 10^7$ CFU)	4.11 ± 0.59
	HT1( $4.34 \times 10^7$ CFU)	8.29 ± 1.69
	PG7( $1.81 \times 10^7$ CFU)	0.90 ± 0.65

4) 균주의 안전성 평가 (*in vitro*)

- 사용균주: 개발균주 7종

EM: *L. plantarum* EM, DB1: *W. koreensis* DB1, HJ: *W. koreensis* HJ,  
 JW1: *Leu. aenigmaticum* JW1, CH3: *Leu. gasicomitatum* CH3,  
 HT1: *Leu. carnosum* HT1, PG7: *Leu. inhae* PG7

가) 용혈성 (hemolysis)

- 용혈성 배지(horse blood agar)에 획선 도말하여 α or β-hemolysis 음성/양성을 판정함.
- *L. plantarum* EM 외 6종의 유산균 모두 α,β형 용혈성을 나타내지 않음(Figure 10).

☞ 용혈성(α,β형) : 음성 판정

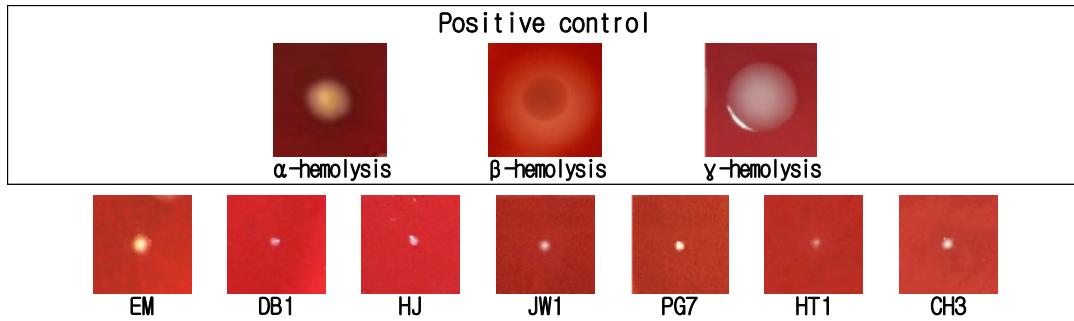


Figure 10. 분리균주의 용혈성 검사

나) 항생제 내성

- *L. plantarum* EM과 저온성 유산균 4종의 경우, EFSA(2012)의 breakpoint 보다 낮거나 동일한 농도의 항생제 감수성을 나타냄.
- *W. koreensis*의 경우, EFSA breakpoint가 없기 때문에 타 연구를 참고하여 비교한 결과, 타 연구에서 분리·동정된 *W. koreensis* 보다 낮은 항생제 감수성을 나타냄(Table 10).

☞ 항생제 내성: 안전 판정

Table 10. 기능성 유산균 후보 7종의 항생제 감수성

Unit: MIC (µg/mL)

Strains	Amp	Van	Gen	Kana	Strep	Ery	Tetra	Chlo
B.P for <i>L. plantarum</i> **	2	n.r	16	64	n.r	1	32	8
<i>L. plantarum</i> EM	2	>512	0.5	16	4	0.125	16	4
Ref. for <i>Weissella</i> spp.***	>10	1024	32	512	128	>15	1	>30
<i>W. koreensis</i> DB1	0.5	512	2	8	8	0.06	0.5	4
<i>W. koreensis</i> HJ	1	512	4	8	4	0.25	0.5	4
B.P for <i>Leuconostoc</i> spp.**	2	n.r	16	16	64	1	8	4
<i>Leu. aenigmaticum</i> JW1	1	512	0.06	1	2	0.06	1	4
<i>Leu. gasicomitatum</i> CH3	1	512	0.125	2	2	0.03	1	4
<i>Leu. carnosum</i> HT1	2	256	0.06	1	1	0.25	4	4
<i>Leu. inhae</i> PG7	1	512	0.06	1	2	0.06	2	2

\* Amp: Ampicillin, Van: Vancomycin, Gen: Gentamycin, Kana: kanamycin, Strep: Streptomycin, Ery: Erythromycin, Tetra: Tetracycline, Chlo: Chloramphenicol

\*\* B.P: Break point were according to the guidelines of EFSA(2012)

\*\*\* Ref: Determining the probiotic potential of cholesterol-reducing *Lactobacillus* and *Weissella* strains isolated from gherkins (fermented cucumber) and south Indian fermented koozh(2015) Res Microbiol, 166, 428-439. Antagonistic activities and probiotic potential of lactic acid bacteria derived from plant-based fermented food(2018) Front Microbiol, 9, 1-12.

다) Biogenic amine 생성능

① Decarboxylase plate method

- Bover-Cid(1999) method

- *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 : 보라색(양성대조구)
- 분리 유산균 7종 : 음성(Figure 11)

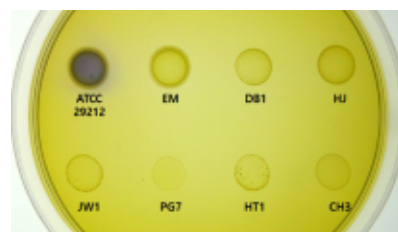


Figure 11. plate 법을 통한 biogenic amine 검출

② HPLC 분석법

- HPLC 분석을 통해 정량적으로 biogenic amine 생성을 확인한 결과, 모든 유산균주 7종에서 biogenic amine이 생성되지 않음을 확인함(Figure 12).

☞ BA 생성능: 음성 판정

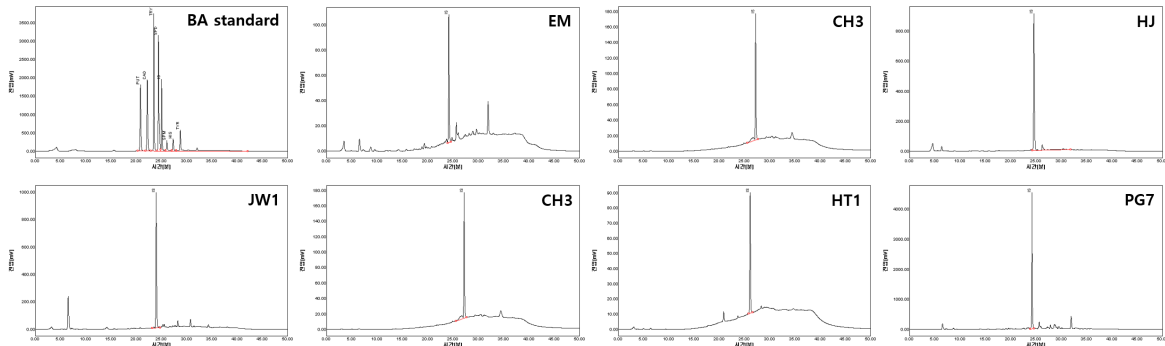


Figure 12. HPLC 법을 통한 biogenic amine 검출

라) 유해효소 활성능(Zym kit, BioMérieux)

- API zym kit(BioMérieux Co., France)를 통하여 유산균주 7종의 효소 활성을 측정함.

- EM: Leucine arylamidase, Valine arylamidase,  $\beta$ -Galactosidase,  $\beta$ -Glucosidase 양성
- DB1:  $\beta$ -Galactosidase 양성
- HJ: 모두 음성
- JW1:  $\beta$ -Galactosidase 양성
- CH3: Acid phosphatase 양성
- HT1:  $\beta$ -Galactosidase 양성
- PG7: 모두 음성

☞ 유해효소 활성: 없음

※ 분리균주 7종 모두 용혈성, 항생제 내성, biogenic amine 생성, 유해효소 활성 분석 결과, 안전한 것으로 판단됨.

☞ 이상과 같은 개발균주 7종의 연구결과(배양학적 특성 규명, 기능성 및 안전성 평가)로부터 2종의 유산균을 기능성 미생물로 최종 선정

① 항콜레스테롤능, 항균능(항세균/항진균) 김치유산균: *L. plantarum* EM

② 항비만능(오르니틴생성능 ↑) 김치유산균: *W. koreensis* DB1

→ 이 2종의 유산균을 각각 미강발효에 종균으로 적용하여 미강발효제품 개발 등 향후 실험 수행

5) 미강에서 유산균 *W. koreensis* DB1의 발효

※ 개발 균주의 미강발효 조건 확립(2차년도 연구개발 목표 중 우선 수행 부분)

미강에서의 유산균 증식(3차년도 연구개발 목표 중 우선 수행 부분)

조기 성과 창출 목표에 따라 2-3차년도 내용 우선 수행(선정된 기능성 미생물 2종 중 1종 우선 수행)

① Ornithine의 생산

(HPLC를 이용한 검출: 정량 분석)

No.	Peak name	유리아미노산 함량 (mg/L)				
		20% 미강 (control)	20% 미강 + DB1* (48 h)	20% 미강 + 1% Arg** + DB1 (48 h)	MRS + 1% Arg + DB1 (48 h)	
					최적화 전	최적화 후
1	Aspartic acid	206.79	209.32	204.36	348.42	341.82
2	Glutamic acid	274.04	219.64	445.54	713.83	708.53
3	Asparagine	142.36	146.38	128.08	40.46	61.72
4	Serine	44.72	49.51	44.40	264.19	288.73
5	Histidine	27.17	28.58	25.48	73.72	88.49
6	Glycine	25.98	37.65	44.35	134.05	171.82
7	Threonine	22.24	24.51	20.53	289.69	309.38
8	<b>Arginine</b>	<b>102.10</b>	<b>76.22</b>	<b>8,181.14</b>	<b>65.54</b>	<b>15.52</b>
9	Alanine	77.16	80.41	105.35	1,024.63	1,325.62
10	GABA	165.62	255.82	107.79	30.15	20.26
11	Tyrosine	15.70	17.36	14.36	191.22	199.45
12	Valine	20.49	22.66	17.41	404.32	403.79
13	Methionine	5.95	6.11	2.09	57.86	87.20
14	Tryptophan	19.78	23.36	116.44	145.87	201.25
15	Phenylalanine	8.82	8.46	4.79	176.75	199.88
16	Isoleucine	8.53	9.25	6.18	319.43	316.36
17	<b>Ornithine</b>	<b>-</b>	<b>32.59</b>	<b>2,307.07</b>	<b>8,373.59</b>	<b>11,270.73</b>
18	Leucine	13.84	13.05	6.71	349.44	379.17
19	Lysine	24.80	28.24	21.56	289.15	458.04
20	Proline	38.64	46.01	48.96	121.00	155.04
Total		1,037.95	1,335.06	11,852.56	13,413.33	17,014.67

\* DB1: *W. koreensis* DB1, \*\* Arg: Arginine

- 기존의 보고에서의 ornithine 생산

: 김치로부터 분리된 오르니틴 생성균인 *Weissella* 속의 MRS+1% arginine 배지에서 오르니틴 생성량은 27~31 mg/L/h임(48시간 배양).

- 본 연구의 시간당 ornithine 생산수준

i) 20% 미강: ornithine 0 mg/L/h

ii) 20% 미강 + 1% DB1: ornithine 0.68 mg/L/h

iii) 20% 미강 + 1% arginine + 1% DB1

: ornithine 48 mg/L/h

iv) MRS + 1% arginine + 1% DB1

- 최적화 전 : ornithine 174 mg/L/h

- 최적화 후 : ornithine 235 mg/L/h

→ 본 연구의 ornithine 생산 균주의 생산 수준은 동일한 조건(MRS + 1% arginine)에서 기존 보고와 비교하였을 때 최적화 전은 5.6~6.4배, 최적화 후는 약 7.6~8.7배 높은 수치임.

(기존 보고: Ref. 김치로부터 오르니틴 생성능을 갖는 *Weissella* 속 균주의 분리, 동정 및 특성(2009) 한국미생물학회지, 45(4), 339-345)

- ② 미강의 열풍·동결 건조
- 건조기 및 시료 건조 상태



- 관능 평가
  - 생미강: 식감이 거칠고 도정 전 곡류에서 느낄 수 있는 특유의 지푸라기 같은 맛과 향이 남. 입에 넣었을 때 입안에 잔여물이 많이 남음.
  - 미강발효 동결건조물: 식감이 미숫가루 혹은 콩가루와 같이 부드럽고 입안에서 녹는 듯한 느낌. 입안에 잔여물의 거의 없음. 적절한 신맛과 고소한 맛이 어우러짐.
  - 미강발효 열풍건조물: 동결건조보다는 좀 더 거친 느낌으로 씹히는 맛이 있음. 부드럽고 적절한 신맛과 고소한 맛이 느껴짐.

## ○ 제 1협동(경희대학교)

### 1) *W. koreensis*, *L. plantarum* EM 염기서열 해독

- ① *L. plantarum* EM 염기서열 해독
  - Sequencing 결과 total reads 수는 3,189,332, low-quality reads 수는 11로 filtered reads 수는 3,189,321로 분석됨.
- ② *W. koreensis* HJ 염기서열 해독
  - Total reads 수는 3,577,172, low-quality reads는 11로 filtered reads는 3,577,161로 분석됨.
- ③ *W. koreensis* DB1 염기서열 해독
  - Total reads는 3,512,760, low-quality reads는 12로 filtered reads는 3,512,748로 분석됨.

### 2) 유전자 조립 및 유전자 주석 처리

- ① *L. plantarum* EM 유전자 조립 및 주석처리 결과
  - Assembly 결과 총 50개의 contig가 나왔으며 contig의 평균 길이는 69,055 bp로 가장 긴 contig는 372,573 bp, 가장 짧은 contig는 6,361 bp로 측정됨.
  - Annotation은 myRAST program을 이용하였고, annotation 결과 균주의 길이는 3,452,787 bp로 GC content는 44.2%, 유전자는 3474개, protein은 3403개로 분석됨.
- ② *W. koreensis* HJ 유전자 조립 및 주석처리 결과
  - Assembly 결과 총 15개의 contig가 나왔으며 contig의 평균 길이는 95,171 bp로 측정됨.
  - Annotation 결과 균주의 길이는 1,427,517 bp로 GC content는 35.5%, 유전자는 1453개, protein은 1400개로 분석됨.
- ③ *W. koreensis* DB1 유전자 조립 및 주석처리 결과
  - Assembly 결과 총 14개의 contig가 나왔으며 contig의 평균 길이는 103,280 bp로 측정됨.



- Annotation 결과 길이는 1,445,923 bp로 GC content는 35.4%, 유전자는 1404개, protein은 1404개로 분석됨.

### 3) *L. plantarum* EM 항콜레스테롤 유전자 분석

#### ① *L. plantarum* EM 균주의 항콜레스테롤 관여 유전자 조사

- 혈중 콜레스테롤을 저하 시키는데 관여하는 bile salt hydrolase (bsh) 유전자가 있는지 PCR을 통해 확인함.
- PCR을 통해 bsh 유전자가 있는지 확인하기 위해 NCBI에 등록되어 있는 *L. plantarum* whole genome sequence를 모두 얻었고, 각 균주에 들어있는 *L. plantarum* bsh gene을 추출함. 추출 후 bsh gene alignment 한 결과 크게 4가지 group으로 나뉘는 것을 확인함 (그림 1).
- Grouping 결과를 토대로 bsh 유전자 primer를 4쌍 디자인 하였고 (그림 2), 디자인한 primer를 이용하여 *L. plantarum* EM 균주의 bsh gene 보유 유무를 확인한 결과 4개의 bsh gene 모두 보유하고 있는 것을 확인함 (그림 3).
- *L. plantarum* EM 균주의 bsh gene 정보를 genome sequence에서 얻었고, NCBI에 등록된 다른 *L. plantarum*과 sequence를 비교해 본 결과 *L. plantarum*에 비해 많은 수의 bile salt hydrolase 유전자가 존재함을 알 수 있었음 (그림 4).

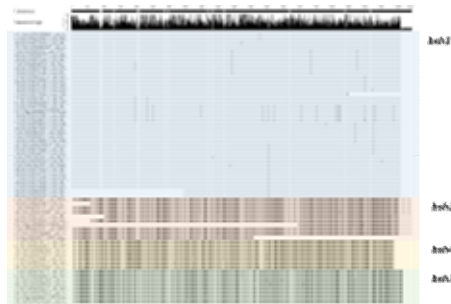


그림 1. *L. plantarum*의 bsh 유전자 alignment

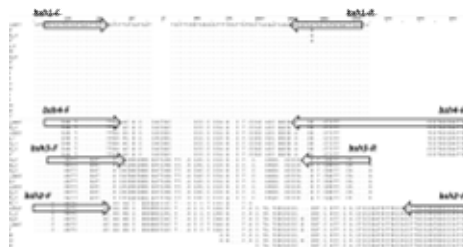


그림 2. bsh 유전자 primer design

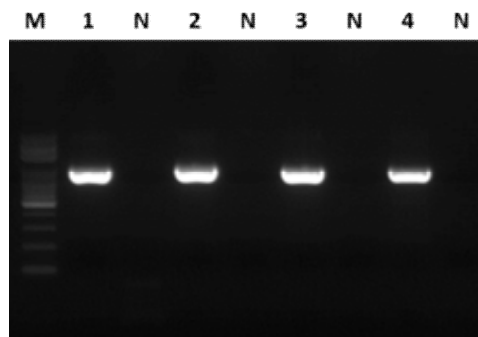


그림 3. *L. plantarum* EM 균주의 bsh 유전자 PCR 결과

Lane M: 100 bp DNA ladder, lane 1: bsh1 gene, lane 2: bsh2 gene, lane 3: bsh3 gene, lane 4: bsh4 gene

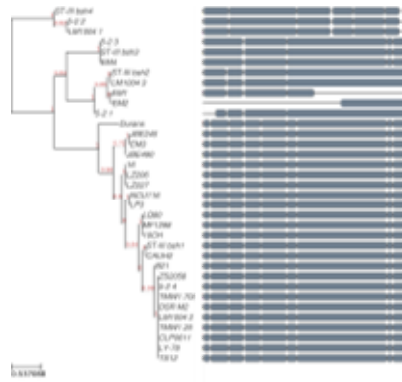


그림 4. *L. plantarum*의 bsh 유전자 서열 비교

#### 4) 저온성 김치의 메타유전체 분석

##### ① 메타유전체 분석

- 오르니틴 생성 능력이 있는 *W. koreensis*를 분리한 한성김치의 메타유전체 분석을 수행함. 그 결과 한성김치의 우점종은 *Weissella* (82.4%)로 확인 되었고, *Weissella* 중에서도 *W. kandleri* group (79.5%)이 가장 많은 비율을 차지하는 것을 확인함.
- 저온성 생육 유산균인 *Leuconostoc* species를 분리한 팔공산 김치의 메타 유전체 분석을 수행함. 그 결과 팔공산김치의 우점종은 *Lactobacillus* (78.9%)로 확인 되었고, *Leuconostoc*은 1.1%로 존재하는 것을 확인함.

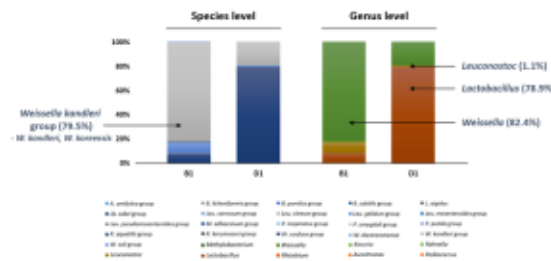


그림 5. 한성김치와 팔공산김치의 메타유전체 분석 결과

#### ○ 제 3협동(CJ제일제당㈜)

- 미강
  - CJ자체 내부 생산 부산물 검토하여 미강 확보
  - 원물 공급처: CJ제일제당에서 도정 시 발생하는 쌀눈 및 쌀겨
  - 발생량: 2017년 1월~12월 기준 연간 3,497톤 (표 1)

표 1. CJ제일제당㈜ 2017년 기준 연간 미강 발생량

구분	1월	2월	3월	4월	5월	6월	7월	8월	9월	10월	11월	12월	누계
미강	282	273	252	283	257	309	320	326	351	250	284	310	3,497

단위: 톤

- 미강 발생 프로세스 (표 2)
  - 투입→선별→집진→도정→집진→저장

표 2. 미강 발생 프로세스

설비	기능	비고
투입	현미가 타이콘 백으로 입고되면 현미를 현미 저장 탱크로 투입하기 위해 거침	
선별	부로아에서 발생하는 풍속과 풍량을 이용하여 비중차에 의해 쌀보다 가벼운 이물질을 날려 선별	
집진	선별에서 발생된 미강을 집진하여 회수함	집진기에서 미강룸으로 미강배출
도정	현미의 표면을 스크류 회전방식으로 깎아 백미로 가공	
집진	도정기에서 발생된 미강을 집진하여 회수함	집진기에서 미강룸으로 미강배출
저장	발생된 미강을 저장	

- 집진기에서 미강룸으로 미강 배출 (그림 1)



그림 1. 배출된 미강룸의 미강

2) Scale-up 발효공정 검토

- 부산물 발효가 가능한 scale-up 업체 (표 3)
  - 해○○ : HOPE 발효효소 원료 및 제품
  - 건○○○○ : 건강기능성 소재 생산, GMP, HACCP 인증 업체
  - S○○○○○○ : 건강기능성 발효소재 전문업체, GMP 인증 업체
  - K○○○○ : 건강기능성 소재 업체, GMP 인증 업체

표 3. 부산물 발효가 가능한 scale-up 업체 검토 및 리스트업

	업체명	주요 생산품	소재지	비고
1	해○○	발효효소 원료 및 제품	경기도	CJ 발효효소 슈퍼곡물 고체발효, HACCP
2	건○○○○	건강기능성 소재	충북	GMP, HACCP
3	우○○○○	건강기능성 소재 개발	경기도	미생물유전체사업단 참여기업, B-GMP
4	S○○○○ ○○	건강기능성 발효소재 개발	경기도	GMP
5	K○○○○	인홍삼 농축액 및 천연물 추출	충북	한국인삼공사 (KGC) 자회사, GMP, HACCP

3) 발효 후 가공공정 개발

- 건조
  - 동결건조, 분무건조, 열풍건조 등
- 분쇄, 과립
  - 분말로의 균질화를 위한 분쇄 혹은 과립 공정 등 검토

< 2차년도 >

○ 제 1세부(조선대학교)

1) 균주의 안정성 평가

가) 균주

- 1차년도 연구결과 선정된 2종: *L. plantarum* EM, *W. koreensis* DB1

나) 산업적 내구성

① 내산성(pH 안정성)

- 실험구: pH 2.0~10.0

- 대조구: 무처리구(약 pH 6.5±0.2)

- 초기균수: DB1(≈ 8.8 log CFU/mL), EM(≈ 9.0 log CFU/mL)

• *W. koreensis* DB1

: 72시간 기준 pH 10.0에서 가장 높은 생균수(6.1 log CFU/mL)를 유지하였으며 pH 6.0 pH 6.5(control)에서 약 4.0~5.0 log CFU/mL 이상 생균수 유지함. pH 2.0에서는 처리 직후 모두 사멸하는 것을 확인함(Fig. 1-A).

• *L. plantarum* EM

: 72시간 기준 pH 4.0, pH 6.0과 pH 6.5(control)에서 약 7.8~8.0 log CFU/mL로 가장 높은 생균수를 유지함. 또한 pH 8.0과 pH 10.0에서는 약 7.2~7.3 log CFU/mL를 유지함. pH 2.0에서는 24시간 만에 모두 사멸함(Fig. 1-B).

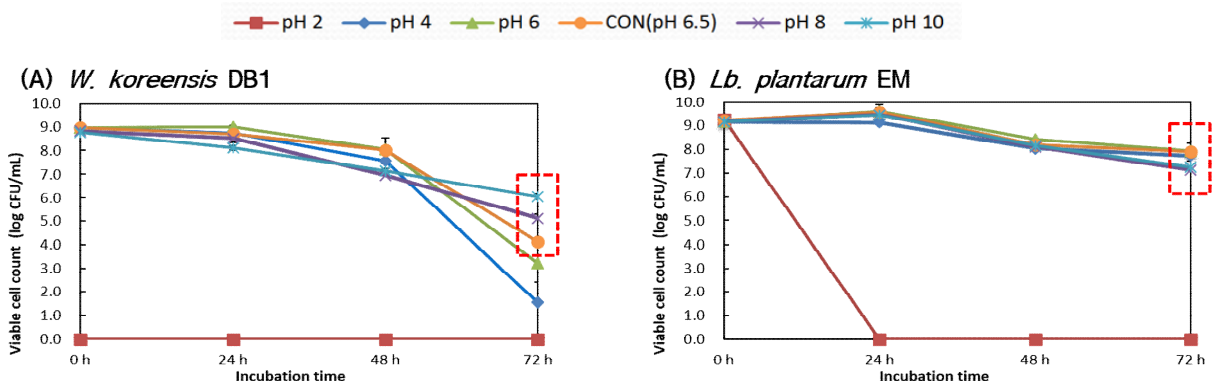


Figure 1. MRS배지에서 유산균 2종의 pH 안정성

② 내열성(온도 안정성)

- 처리 조건:

i) -2°C, 0°C, 4°C, 30°C, 50°C, 70°C/24, 48, 72 시간

ii) 100°C/30, 60분

iii) 121°C/15, 30분

• *W. koreensis* DB1

: 72시간 기준 -2~4°C구간에서 가장 높은 생균수(약 9.0 log CFU/mL 이상)를 유지함. 한편 30°C구간에서는 24시간 이후 점차 감소하여 72시간에는 4.3 log CFU/mL의 생균수가 유지됨(Fig. 2-A). 50°C 이상의 온도에서는 24시간 만에 모두 사멸함.

• *L. plantarum* EM

: 72시간 기준 -2~30°C구간에서 가장 높은 생균수(약 8.7 log CFU/mL 이상)를 유지함 (Fig. 2-B). 50°C~121°C구간에서는 24시간 만에 모두 사멸함.

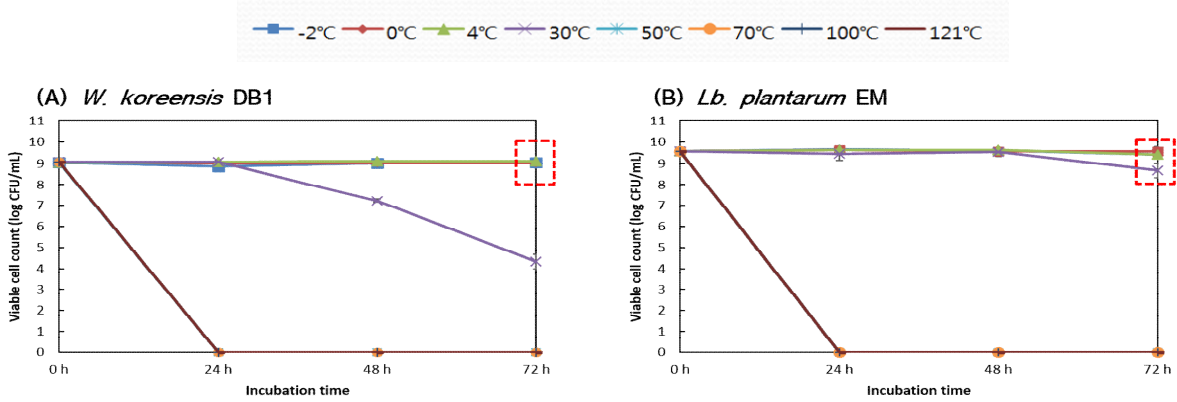


Figure 2. MRS배지에서 유산균 2종의 온도 안정성

③ 내염성(염 안정성)

- 실험구: 1~15%(w/v) NaCl 첨가구
- 대조구: 무첨가구

• *W. koreensis* DB1

: 72시간 기준 NaCl 5%와 7% 구간(약 6.2~6.3 log CFU/mL)에서 가장 높은 생균수를 나타냄. 반면 NaCl을 첨가하지 않은 대조구(1.9 log CFU/mL)에서 가장 낮은 생균수를 나타냄. 그 외 NaCl 1%, 3%, 9%, 12%, 15% 구간에서는 약 4.5 log CFU/mL 이상의 생균수를 유지함(Fig. 3-A).

• *L. plantarum* EM

: 72시간 기준 전구간 (NaCl 0~12%)에서 약 7.3~8.4 log CFU/mL의 생균수를 유지함. 이 중 NaCl 9%와 12%구간에서 약 8.2~8.4 log CFU/mL로 가장 높은 생균수가 유지되었으며 NaCl 3%구간에서 7.3 log CFU/mL로 가장 낮은 생균수가 유지됨(Fig. 3-B).

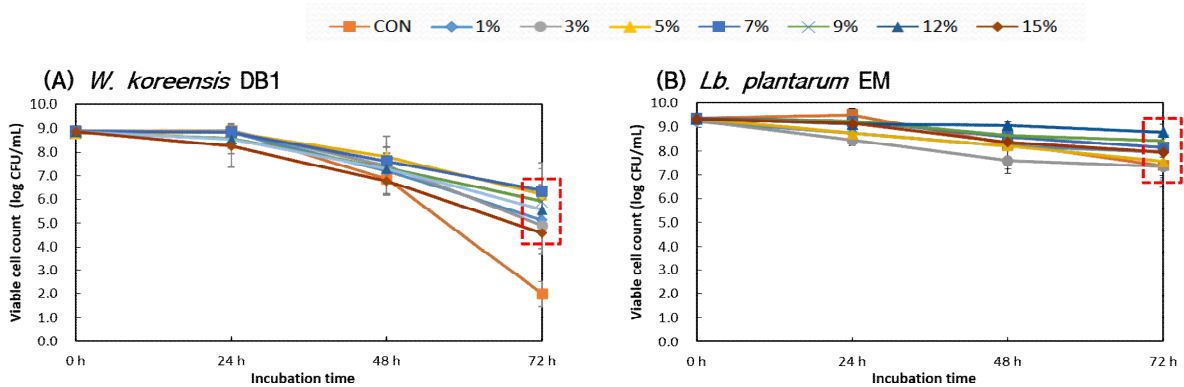


Figure 3. MRS배지에서 유산균 2종의 염 안정성

다) 생균 유지를 위한 안정화 최적 조건 확립

- 안정제 종류: MRS(실험실용 배지), 식용배추즙배지(CBJ), 20% 미강호화물, 20% 미강+1% arginine 호화물, skim milk, glycerol, glucose, lactose, tween80 각 2.5%, 5%
- 대조구: 무처리(none), 3차 증류수(3DDW)
- 보관 온도: 4°C, 보관 기간: 4주

• *W. koreensis* DB1

: 4주 기준 20% 미강 호화물과 20% 미강+1% arginine 호화물에서 가장 높은 생균수 (약 8.1 log CFU/mL 이상)가 유지되었으며 그다음으로는 MRS(7.5 log CFU/mL), 식용배추즙 배지 (2.8 log CFU/mL)가 높은 생균수를 나타냄(Fig. 4-A). 그 외 glycerol를 포함한 안정제 4종 과 대조구인 무처리구와 3차 증류수에서는 1~2주 이후 모두 사멸되었음.

• *L. plantarum* EM

: 4주 기준 무처리구와 3차 증류수를 제외한 대부분의 안정제에서 약 9 log CFU/mL 이상의 생균수를 유지함. 이 중 20% 미강 호화물과 20% 미강+1% arginine 호화물 에서 가장 높은 생균수(약 9.2 log CFU/mL 이상)를 나타냄(Fig. 4-B).

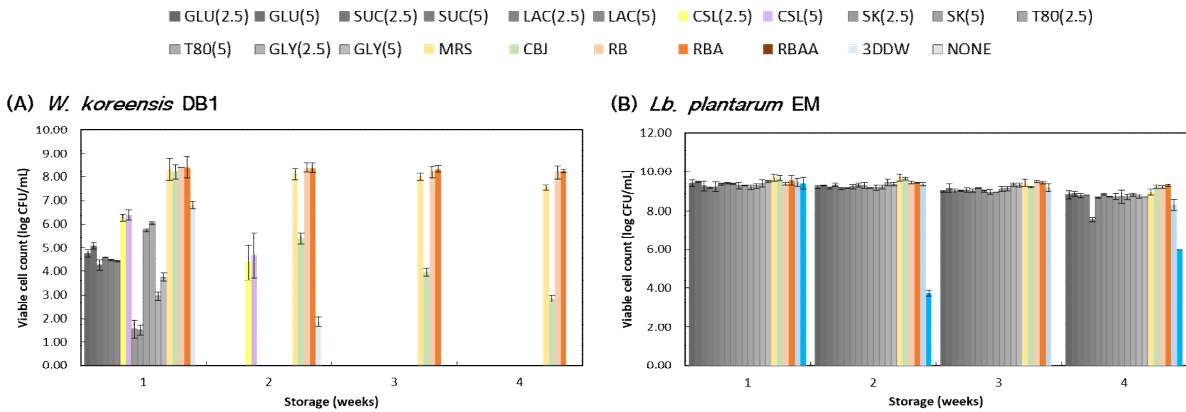


Figure 4. 안정제 종류에 따른 유산균 2종의 생균수 유지 확인

2) 미강의 특성 분석

가) 이화학적 특성(pH, 산도, 염도, 당도)

- 시료: 미강

※ 전처리: 미강의 이화학적 특성을 분석하기 위하여 미강을 3차 증류수에 20%(w/v) 농도로 희석한 후 멸균가아제에 여과한 여과액을 사용함.

① pH, 산도

- 미강의 pH는  $6.37 \pm 0.20$ , 산도는  $0.38 \pm 0.05$ 로 나타남.

② 염도, 당도

- 미강의 염도는  $0.78 \pm 0.02$ , 당도는  $9.68 \pm 0.17$ 로 나타남.

나) 일반성분 분석

- 시료: 미강

※ 전처리: 미강 가루 상태 그대로 일반성분 분석을 진행함.

① 수분: 상압가열건조법

- 미강의 수분 함량은 약 10%로 나타남(Table 1).

② 조회분: 직접회화법

③ 조섬유: 효소-중량법

④ 조단백: 킬달법(micro-Kjeldahl법)

⑤ 조지방: ether 추출법

- 미강의 조회분 함량은 약 8%, 조섬유 함량은 약 12%, 조단백 함량은 약 14%, 조지방 함량은 약 20%로 나타남(Table 1).

Table 1. 미강의 일반성분 분석

unit: %(w/v)

Moisture	Crude ash	Crude fiber
10.84±0.04	8.96±0.09	12.34±0.62
Crude protein		Crude fat
14.06±0.09		20.28±0.40

다) 영양성분 분석

- 시료: 미강

※ 전처리: 생미강 가루 상태 그대로 일반성분 분석을 진행함.

① 유리당

- 전처리: 초음파 추출

- 분석법: HPLC

- Column: Sugar-pak (300×6.5 mm, Waters, USA)

- 결과: 총 11종(glucose 외 10종)의 표준물질을 사용하여 유리당 검출 여부를 확인한 결과, 미강에서는 sucrose(99,216 mg/kg) 1종만 검출됨(Table 2).

Table 2. 미강의 유리당 함량

Content	mg/kg
Sucrose	99,216.13±3,153.12
Glucose	n.d
Fructose	n.d
Mannitol	n.d
Sorbitol	n.d
<b>Total</b>	<b>99,216.13±3,153.12</b>

n.d: not detected

② 유기산

- 전처리: 초음파 추출

- 분석법: HPLC

- Column: Aminex 87H (300×10 mm, Agilent, USA)

- 결과: 총 6종(lactic acid 외 5종)의 표준물질을 사용하여 유기산 검출 여부를 확인한 결과, 미강에서는 어떠한 유기산도 검출되지 않았음(Table 3).

Table 3. 미강의 유기산 함량

Content	mg/kg
Lactic acid	n.d
Acetic acid	n.d
Citric acid	n.d
Fumaric acid	n.d
Phenyllactic acid	n.d
<b>Total</b>	<b>n.d</b>

n.d: not detected

③ 지방산

- 전처리: Garcés & Mancha법

- 분석법: HPLC

- Column: DB-23 (60 mm×0.25 mm×0.25 μm, Agilent, USA)

- 결과: 총 36종(myristic acid 외 35종)의 표준물질을 사용하여 지방산 검출 여부를 확인한 결과, 미강에서는 oleic acid(69.898 mg/g)와 linoleic acid(66.493 mg/g) 함량이 가장 높게 나타남(Table 4).

Table 4. 미강의 지방산 함량

Content	mg/g
Myristic acid	0.54±0.02
Palmitic acid	29.92±3.32
Stearic acid	2.83±0.24
Oleic acid	69.90±0.66
Linoleic acid	66.49±4.47
α-Linolenic acid	2.42±0.36
Arachidic acid	1.07±0.02
Eicosenoic acid	1.04±0.01
Behenic acid	0.91±0.06
Lignoceric acid	1.86±0.08
<b>Total</b>	<b>176.98±8.42</b>

④ 유리아미노산

- 전처리: 초음파 추출 후 OPA-FMOC 유도체화
- 분석법: HPLC
- Column: Inno C18 (4.6 mm×150 mm×5 μm, Youngjin, Korea)
- 결과: 총 25종(aspartic acid 외 16종)의 표준물질을 사용하여 유리아미노산 검출 여부를 확인한 결과, 미강에서는 22종의 유리아미노산이 검출됨. 이 중 glutamic acid(1,629 mg/kg)이 가장 높게 나타났으며 그 다음 aspartic acid(864 mg/kg)가 높게 검출됨 (Table 5).

Table 5. 미강의 유리아미노산 함량

Content	mg/kg
Aspartic acid	864.51±80.44
Glutamic acid	1,629.00±251.05
Asparagine	551.39±73.18
Serine	150.70±32.43
Glutamine	57.87±19.70
Histidine	93.03±44.67
Glycine	80.80±18.99
Threonine	75.54±25.04
Citrulline	17.01±19.90
Arginine	257.46±71.27
Alanine	325.02±38.13
GABA	190.32±120.92
Tyrosine	59.39±20.93
Valine	66.51±25.96
Methionine	15.86±11.48
Tryptophane	95.45±12.80
Phenylalanine	21.83±24.16
Isoleucine	29.98±14.28
Ornithine	7.19±5.40
Leucine	36.26±27.25
Lysine	69.29±22.01
Proline	304.27±109.79
<b>Total</b>	<b>4,981.67±755.28</b>



### 3) 미강의 발효조건 확립 (전처리)

#### 가) 전처리 조건

- 미강호화물 제조: 미강+ 3차 증류수 → 5, 10, 15, 20, 25, 30% (w/v) 농도 희석 → Autoclave

① 점도 측정: Viscosimeter(LVDV-II+PRO, Brookfield, USA), spindle no. 4, 20 rpm

• 미강 첨가량에 따른 점도

- 각 농도에 따른 미강호화물의 상태는 Fig. 5와 같음. 25%(w/v) 이상의 미강 농도에서는 점도 측정이 불가함. 5, 10% 미강호화물의 경우 100~200 cp를 나타냈으며 15%의 경우 2,200~2,800 cp를 20%의 경우 15,000~16,000 cp를 나타냄.

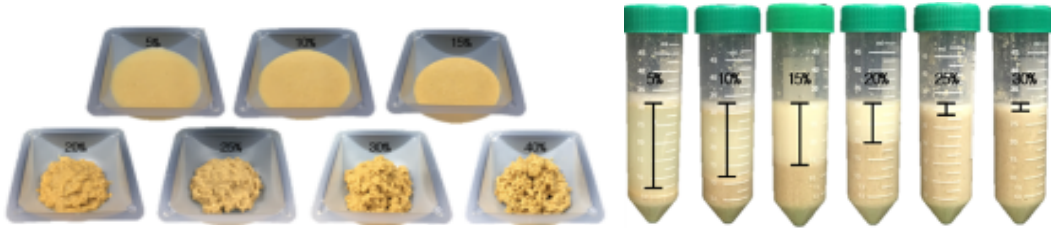


Figure 5. 미강 함량에 따른 미강의 호화상태

② 생균수 측정: 미강+ 3차 증류수 → 5, 10, 15, 20, 25, 30%(w/v) 농도 희석 → Autoclave → 기능성 유산균 2종(DB1, EM) 배양 → 생균수 측정

• 미강 첨가량에 따른 생균수

- *W. koreensis* DB1: 24시간 기준 모든 구간에서 약 7.0 log CFU/mL의 생균수를 나타냄.

- *L. plantarum* EM: 24시간 기준 모든 구간에서 약 8.0 log CFU/mL로 나타나 유의차가 없음.

☞ 실험의 용이성 등을 고려하여 미강 농도 20%(w/v)를 선정하여 추후 실험을 진행함.

③ 가열 처리

i) 농도: 20%(w/v) 미강

ii) 실험구: 10, 20, 30, 40분/100℃ 가열

iii) 대조구: Autoclave (121℃, 15분)

- 점도 측정: Viscosimeter(LVDV-II+PRO, Brookfield, USA), spindle no. 4, 20 rpm

• 가열 처리에 따른 점도

- 사업화 적용을 위해 다양한 가열 처리 조건에 따른 미강호화물 특성을 분석함. 점도 측정 결과, 대조구인 autoclave의 점도와(15,000~16,000 cp) 30분, 40분 가열한 점도 (13,000~13,800 cp)가 유사하게 나타남.

• 가열 처리에 따른 생균수

- *W. koreensis* DB1: 24시간 기준 모든 구간에서 약 7.0 log CFU/mL의 생균수를 나타냄.

- *L. plantarum* EM: 24시간 기준 모든 구간에서 약 8.0 log CFU/mL의 생균수를 나타냄.

☞ 실험실 조건인 autoclave와 가열 30~40분 호화 조건이 미강호화물 제조에 적합함.

④ 용량

i) 농도: 20%(w/v) 미강

ii) 용량: 30, 100, 800 mL

• 용량에 따른 생균수

- *W. koreensis* DB1: 24시간 기준 모든 용량의 미강 호화물에서 약 7.0 log CFU/mL의 생균수를 나타냄.

- *L. plantarum* EM: 24시간 기준 모든 용량의 미강 호화물에서 약 8.0 log CFU/mL의 생균수를 나타냄.

☞ 용량에 따른 생균수 차이를 나타내지 않음.

#### 4) 발효공정의 최적화 (미강에서 유산균 증식)

※ 조기성과 창출을 위해 3차년도 연구 내용 중 일부를 2차년도에 우선 수행함.

##### 가) 균주 특성 조사

- Phytase 활성(phytase specific media)
- 사용균주: *L. acidophilus* KFRI 150, *Leu. mesenteroides* KCTC 1628, *L. plantarum* KFRI 236, *L. debruekii* KFRI 347, *L. plantarum* KFRI 464
- 균주: *W. koreensis* DB1, *Lb plantarum* EM
- *L. plantarum* EM(18.14 mm)이 가장 강한 phytase 활성을 나타냄. 그 다음으로는 *Lactobacillus* sp.에 속하는 KFRI 464(14.44 mm)와 KFRI 347(11.54 mm)이 높은 phytase 활성을 나타냄. *W. koreensis* DB1 (9.01 mm)은 약하지만 phytase 활성을 나타냄.(Fig. 6).

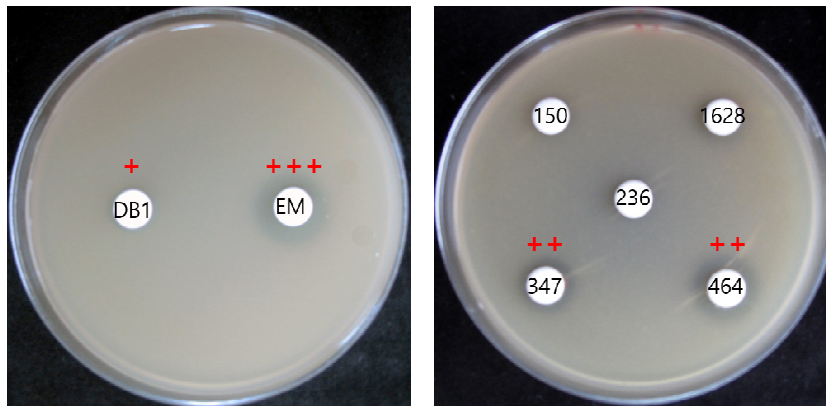


Figure 6. 유산균의 phytase 활성

##### 나) 발효공정의 최적화 적용 균주

(3차년도 미강 발효 공정 최적화 중 개발된 기능성 균주 1종에 대해 우선 시행)

- 선정 균주: 항비만능 기능성 유산균

(오르니틴 생성균주인 *W. koreensis* DB1) → 1차년도 연구결과 선정된 기능성 미생물

##### 다) 영양원의 최적화

###### ① 탄소원

i) 종류: glucose, sucrose, maltose, fructose

ii) 농도: 1, 2, 3%(w/v)

- 조건: 20%(w/v) 미강 + 1% arginine + 탄소원 4종 각 1, 2, 3%(w/v)

- 결과: 24시간 발효 기준 glucose 1% 첨가 구간에서 8.1 log CFU/mL로 가장 높은 생균수를 나타내었으며 이는 첨가전보다 약 1.0 log CFU/mL 증가한 결과임(Fig. 7).

☞ 최적 탄소원: Glucose 1% 선정

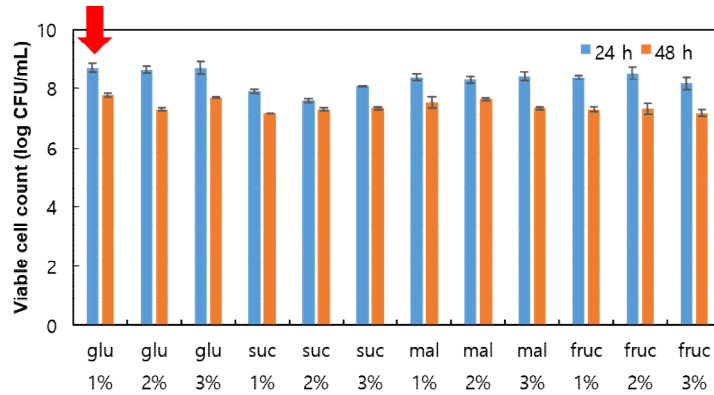


Figure 7. 탄소원 농도에 따른 *W. koreensis* DB1의 생육

② 질소원

i) 종류: soytone, beef extract, yeast extract, peptone

ii) 농도: 1, 2, 3%(w/v)

- 조건: 20%(w/v) 미강 + 1% arginine + 1% glucose + 질소원 4종 각 1, 2, 3%(w/v)

- 결과: 24시간 발효 기준 질소원 4종 모두 약 8.0 log CFU/mL 생균수를 나타냄(Fig. 8). 이는 질소원 첨가 전과 첨가 후의 생균수 값이 유의적인 차이를 나타내지 않으므로 질소원은 첨가하지 않기로 함.

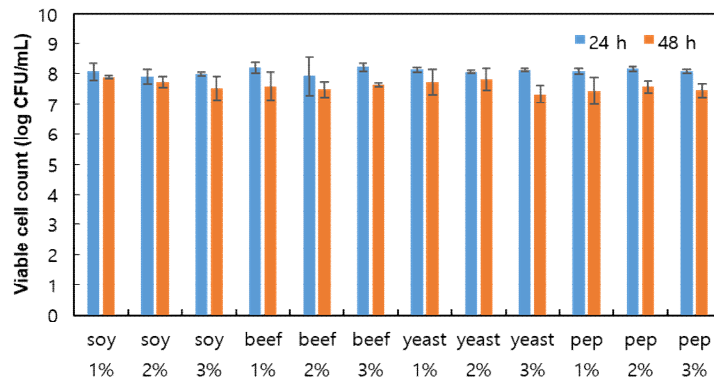


Figure 8. 질소원 농도에 따른 *W. koreensis* DB1의 생육

① 기타 성분

i) 종류: 식용이 가능한 무기질 및 비타민 10종을 단독 혹은 혼합하여 첨가

※ 기술산업화의 정보 보호를 위하여 상세한 무기질 및 비타민 종류 및 농도 비공개

- a: 무기질ⓐ 0.02~0.05%, b: 무기질ⓑ 0.02~0.05%, c: 무기질ⓒ 0.02~0.05%, d:

무기질ⓓ 0.5~2%, e: 무기질ⓔ 0.5~2%, f: 무기질ⓕ 0.005~0.2%, g: 무기질ⓖ

0.1~0.5%, h: 무기질ⓗ 0.1~0.5%, j: 비타민⓲ 0.1~0.2%, j: 비타민⓳ 0.2~0.3%, k:

비타민⓴ 0.1~0.2%, l: 비타민⓵ 0.2~0.3%, A: 무기질 a+c, B: 무기질 a+d, C: 무기질 c+f

- 조건: 20%(w/v) 미강 + 1% arginine + 1% glucose + 무기질 및 비타민 약 7종 단용 또는 혼용물 (농도범위: 0.005~2%)

- 결과: 24시간 발효 기준 B mixture 첨가 시 8.8~9.0 log CFU/mL를 나타냄(Fig. 9). 이는 유산균 전용 실험실용 배지인 MRS와 동일한 수치임.

☞ 최적 무기질 및 비타민: B mixture

※ 추후 4차년도 효율성과 생산성을 높이기 위해 식용성분/영양성분 최적화를 재진행함.

→ 식용성분 A 3% + glucose 2%로 최종 확정됨.

(식용성분 A는 기술산업화 정보 보호를 위해 비공개함)

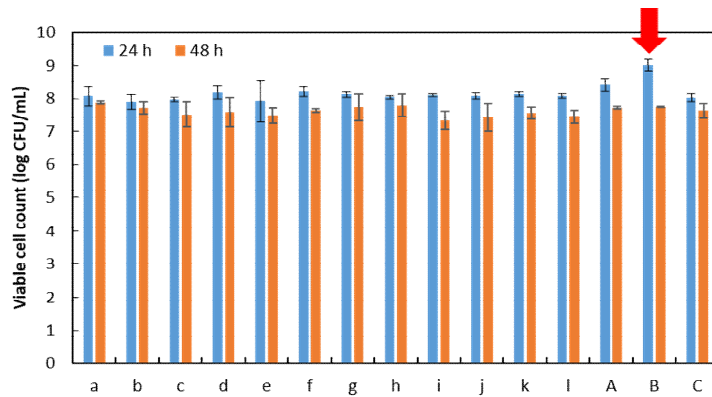


Figure 9. 비타민 및 무기질에 따른 *W. koreensis* DB1의 생육

라) 발효 초기 pH의 최적화

: 초기 pH 4.0~7.0 (대조구: 무처리구, 약 pH 6.5±0.2)

• 생균수

- 조건: 20%(w/v) 미강 + 1% arginine + 1% glucose + 무기질 및 비타민 B mixture → pH 조정 (pH4.0~7.0)
- 24시간 발효 기준 pH 6.0과 pH 6.5에서 가장 높은 생균수 (9.0 log CFU/mL)를 나타냄 (Fig. 10).

☞ 최적 발효 초기 pH: pH 6.0~6.5 선정

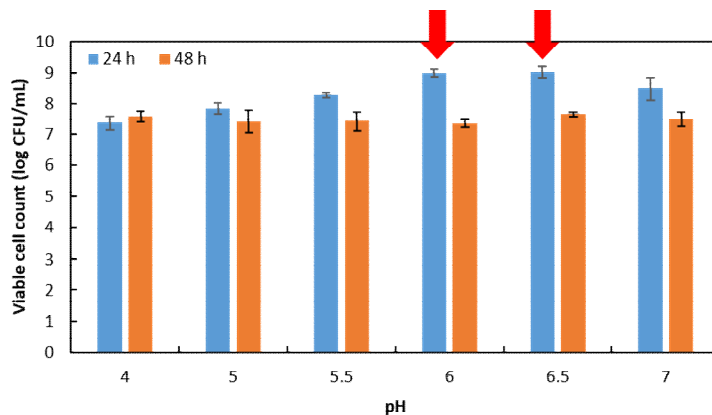


Figure 10. 미강의 초기 pH에 따른 *W. koreensis* DB1의 생육

마) 발효 온도의 최적화

: 25°C, 30°C, 37°C

• 생균수

- 조건: 20%(w/v) 미강 + 1% arginine + 1% glucose + 무기질 및 비타민 B mixture/pH 6.0~6.5 → 발효 온도(25°C, 30°C, 37°C)
- 24시간 발효 기준 발효온도 25~30°C에서 최대 생균수 (9.0 log CFU/mL)를 나타냈으며 37°C에서는 약 1.0 log CFU/mL 낮은 생균수(8.2 log CFU/mL)를 나타냄 (Fig. 11).

☞ 최적 발효 온도: 25~30°C 선정

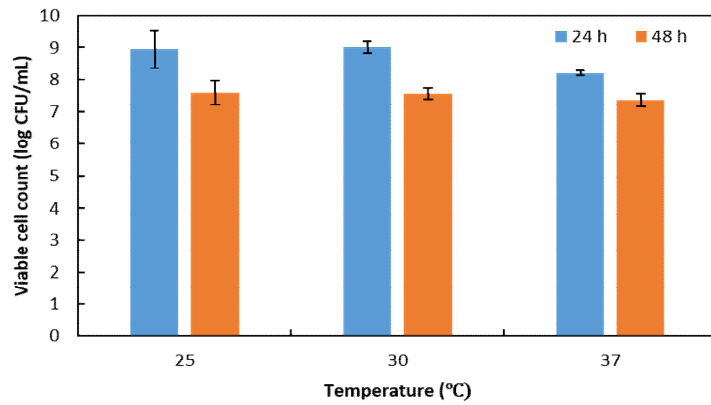


Figure 11. 발효 온도에 따른 *W. koreensis* DB1의 생육

5) 최적 발효 공정 조건에서 미강 발효(DB1 발효미강)

가) 최적화 조건

- 미강 첨가량: 20%(w/v)
- 호화 조건: Autoclave(121°C, 15분)
- 영양원 조건: 1% Glucose + 1% Arginine + 무기질 및 비타민 B mixture
- 종균 접종량: *W. koreensis* DB1 1%(w/v)
- 발효 시간: 48시간
- 발효 온도: 25~30°C
- 발효 초기 pH: pH 6.0~6.5



<최종 발효미강>

나) 미강 발효 제품 ① (항비만능 DB1 발효미강)

- 개발 제품: 시니어 다이어트 제품
  - 제품 개발을 위해 발효미강의 건조조건을 설정하기로 함.
- DB1 발효미강 건조 조건 설정
  - 미강 발효 제품 개발을 위한 열풍건조 후 관능평가를 실시함.
  - 건조 조건
    - ① 온도: 40~80°C
    - ② 시간: 약 6~16시간 이상
 (시간 조절은 원재료 미강 무게를 기준으로 수율 약 105±5%으로 하여 건조를 종료함)
  - 건조 발효미강의 특성
    - pH: 모든 미강 건조물의 pH 측정 결과 약 7.39±0.24로 나타났으며 시료 간 큰 차이가 없음.
    - 생균수: 미강 건조물의 생균수 측정 결과, 모든 시료에서 미강 발효 유산균인 *W. koreensis* DB1을 포함한 미생물이 검출되지 않음.

· 관능평가

- ① 생미강: 식감이 거침. 도정 전 곡류 특유의 지푸라기 같은 맛과 향이 남. 삼킨 후 잔여물이 많이 남음.
- ② 열풍미강: 식감이 미숫가루 혹은 콩가루와 같이 부드러움. 적절한 신맛과 고소한 맛이 어우러지며 잔여물이 남지 않음.

☞ 열풍 건조 조건: 55℃, 12~14시간 선정

- 지표 성분: ornithine, citrulline 두 가지 항목을 지표 성분으로 설정하여 미강 발효 전후 함량 분석을 실시함.

다) 미강 발효 전후 기능성 물질 비교

• 시료 제작:

- 발효전 미강 건조물

: 20% 미강 + 1% arginine + 1% glucose + 무기질 및 비타민 B mixture → 초기 pH 6.0~6.5 조정 → Autoclave (121℃, 15분) → 열풍건조(55℃, 12시간) → 분쇄

- 발효후 미강 건조물

: 20% 미강 + 1% arginine + 1% glucose + 무기질 및 비타민 B mixture → 초기 pH 6.0~6.5 조정 → Autoclave (121℃, 15분) → *W. koreensis* DB1 1% 접종 → 30℃, 48시간 배양 → 열풍건조 (55℃, 12시간) → 분쇄

• 분석 항목:

① 일반성분(수분, 회분, 조섬유, 조단백, 조지방)

i) 수분: 상압가열건조법

- 발효후 미강 건조물의 수분 함량은 약 7%로 나타남(Table 6).

ii) 조회분: 직접회화법

- 발효후 미강 건조물의 회분 함량은 약 9%로 나타남(Table 6).

iv) 조단백: 킬달법 (micro-Kjeldahl법)

- 발효후 미강 건조물의 조단백 함량은 약 22%로 나타남(Table 6).

v) 조지방: ether 추출법

- 발효후 미강 건조물의 조지방 함량은 약 18%로 나타남(Table 6).

Table 6. DB1 발효미강의 일반성분 분석

unit: %(w/v)

Moisture	Crude ash	Crude fiber
7.06±0.02	9.91±0.02	14.37±0.39
Crude protein		Crude fat
22.73±0.11		18.73±0.14

② 영양성분(유리당, 유기산, 지방산, 유리아미노산)

i) 유리당

- 전처리: 초음파 추출

- 분석법: HPLC

- Column: Sugar-pak(300×6.5 mm, Waters, USA)

- 결과: 총 10종(glucose 외 9종)의 유리당 종류에 대한 분석 결과, sucrose 1종(약 97,082mg/kg)이 검출됨(Table 7). 이는 영양원 최적화를 통해 첨가한 glucose가 모두 소진되었음을 알 수 있음.

Table 7. DB1 발효미강의 유리당 함량

Content	mg/kg
Sucrose	97,082.31±3,004.57
Glucose	n.d
Fructose	n.d
Mannitol	n.d
Sorbitol	n.d
<b>Total</b>	<b>97,082.31±3,004.57</b>

n.d: not detected

ii) 유기산

- 전처리: 초음파 추출
- 분석법: HPLC
- Column: Aminex 87H(300×10 mm, Agilent, USA)
- 결과: 총 6종(lactic acid 외 5종)의 유기산 종류에 대한 분석 결과, 발효후 미강건조물 에서는 lactic acid(약 22,918 mg/kg)와 acetic acid(약 25,773 mg/kg)이 검출됨 (Table 8). 미강 발효 균주인 *W. koreensis* DB1은 이상발효 (heterofermentative type) 유산균으로 영양원 최적화를 통해 첨가한 glucose가 대사되어 lactic acid와 acetic acid로 생산됨을 알 수 있음.

Table 8. DB1 발효미강의 유기산 함량

Content	mg/kg
Lactic acid	22,918.65±1,054.67
Acetic acid	25,773.54±929.88
<b>Total</b>	<b>48,692.19±1,976.36</b>

iii) 지방산

- 전처리: Garcés & Mancha법
- 분석법: HPLC
- Column: DB-23 (60 mm×0.25 mm×0.25 μm, Agilent, USA)
- 결과: 총 36종(myristic acid 외 35종) 지방산 종류에 대한 분석 결과, 발효후 미강건조물에서는 약 총 10종의 지방산이 검출되었으며 이 중 가장 많이 검출된 지방산은 oleic acid(약 65.92 mg/g)와 linoleic acid(약 63.21 mg/g) 으로 나타났으며 이는 미강과 비슷한 결과임 (Table 9).

Table 9. DB1 발효미강의 지방산 함량

Content	mg/g
Myristic acid	0.51±0.03
Palmitic acid	29.43±0.43
Stearic acid	2.75±0.07
Oleic acid	65.92±1.02
Linoleic acid	63.21±1.60
α-Linolenic acid	2.40±0.11
Arachidic acid	1.02±0.02
Eicosenoic acid	1.01±0.03
Behenic acid	0.87±0.05
Lignoceric acid	1.75±0.08
<b>Total</b>	<b>168.87±2.77</b>

iv) 유리아미노산

- 전처리: 초음파 추출 후 OPA-FMOC 유도체화
- 분석법: HPLC
- Column: Inno C18(4.6 mm×150 mm×5 μm, Youngjin, Korea)
- 결과: 총 25종(aspartic acid 외 16종) 유리아미노산 종류에 대한 분석 결과, 발효전 미강 건조물에는 첨가한 arginine(약 39,394 mg/kg)의 함량이 가장 높게 나타남. 발효후 미강 건조물에서는 ornithine(약 40,433 mg/kg)의 함량 변화가 가장 크게 나타났으며 이는 ornithine의 전구체인 arginine이 미강 발효균주인 *W. koreensis* DB1에 의해 대사되어 ornithine으로 전환되었음을 나타냄. 또한 arginine과 ornithine 대사체로의 중간체인 citrulline(약 4,646.47 mg/kg)도 발효전보다 약 26배 증가함(Table 10).

👁️ 조기성과 창출을 위한 2차년도 연구개발 목표

: 지표성분인 ornithine 생산 목표치 40,000 mg/kg 이상 달성

Table 10. DB1 발효미강의 유리아미노산 함량

unit: mg/kg

Con.	Before fermentation of Rice-bran	After fermentation of rice-bran
Asp	780.11 ± 485.02	1,343.17 ± 125.36
Glu	1,919.15 ± 369.60	1,669.96 ± 116.55
Apn	792.74 ± 3.21	214.35 ± 28.67
Ser	471.52 ± 11.95	357.61 ± 43.24
His	316.41 ± 32.15	254.92 ± 34.79
Gly	267.99 ± 33.96	285.90 ± 34.78
Thr	366.02 ± 28.25	256.69 ± 35.48
Cit	177.04 ± 56.73	4,646.47 ± 1,234.85
Arg	39,394.44 ± 1,296.04	196.00 ± 72.88
Ala	1,154.87 ± 43.63	2,300.67 ± 444.64
GABA	540.37 ± 139.36	529.71 ± 80.34
Tyr	404.99 ± 8.59	205.07 ± 51.52
Val	523.68 ± 5.61	418.07 ± 44.11
Met	169.01 ± 4.20	20.06 ± 9.96
Try	259.84 ± 38.8	195.49 ± 58.76
Phe	389.17 ± 0.25	43.67 ± 18.75
Ile	384.64 ± 120.44	192.14 ± 28.90
Orn	1,923.81 ± 948.30	40,433.61 ± 4,453.76
Leu	713.01 ± 392.93	49.40 ± 8.49
Lys	347.17 ± 55.94	215.30 ± 51.52
Pro	817.88 ± 456.05	772.16 ± 179.09
Total	52,113.85 ± 2,949.35	54,600.41 ± 3,542.88

※ *W. koreensis* 유산균들은 arginine에서 citrulline으로 분해되는 arginine deiminase와 citrulline에서 ornithine으로 전환되는 ornithine carbamoyl-transferase가 존재함을 유전체 분석을 통해 규명된 바 있음.

※ **Ornithine**은 성장호르몬 분비 촉진, 항비만, 근육합성의 기능을 가지며 (Morphological changes in adult males from resistance exercise and amino acid supplementation(1988) J Sports Med Phys Fit, 28(1), 35-39; Arginine and ornithine supplementation increases growth hormone and insulin-like growth factor-1 serum levels after heavy-resistance exercise in strength-trained athletes(2010) J Strength Cond Res, 24(4), 1082-1090), **간기능 개선** (Long-term effectiveness of high-dosed ornithine-aspartate on urea synthesis



rate and portal hypertension in human liver cirrhosis(1992) Amino acids, 3(2), 147-153), **피부미용**(Effect of supplemental ornithine on wound healing(2002) J Surg Res, 106(2), 299-302)에 도움을 주는 것으로 알려짐.

- ※ **Citrulline**은 **항비만**(Evaluation of the effects and mechanism of citrulline on anti-obesity by appetite suppression in obese/diabetic kk-ay mice and high-fat diet fed sd rats(2017) Biol Pharm Bull, 40(4), 524-530), **근육합성** (Citrulline modulates muscle protein metabolism in old malnourished rats(2006) Am J Physiol - Endocrinol Metab, 291(3), 582-586), **이노작용**(Distribution of Free Sugars in the Various Portions of Watermelon (*Citrullus vulgaris* L.) and Muskmelon (*Cucumis melo* var . *reticulatus* Naud.)(1996) Agric Chem Biol Technol, 39(3), 200-205), **혈행 개선**(Oral supplementation with a combination of L-citrulline and L-arginine rapidly increases plasma L-arginine concentration and enhances NO bioavailability(2014) Biochem Biophys Res Commun, 454(1), 53-57) 등의 생리활성을 가짐.

→ 이에 ornithine과 citrulline을 포함한 발효미강은 미강의 단순 첨가가 아닌 기능성 유산균으로 발효시킨 ornithine과 citrulline이 함유된 미강발효 제품임. 또한 이 발효물은 추출이나 여과 없이 발효물 전체를 건조하여 사용할 수 있는 강점을 지님.

### ③ Phytic acid(피틴산)

- ※ 1차년도 평가에서 심사위원의 comment에 따라 phytic acid 함량 분석을 시행함.

- 시료: i) 미강(무처리)

ii) DB1 발효미강

- 미강의 피틴산 함량은 약 8,500 mg/100 g으로 나타 났으며 DB1 발효미강에서는 약 5,000 mg/100 g으로 약 41% 감소함(Fig. 12). 이는 발효균주 *W. koreensis* DB1의 phytase 활성 (보고서 page 29쪽 참조) 및 유기산(젖산, 아세트산) 생성에 따른 결과로 사료됨.

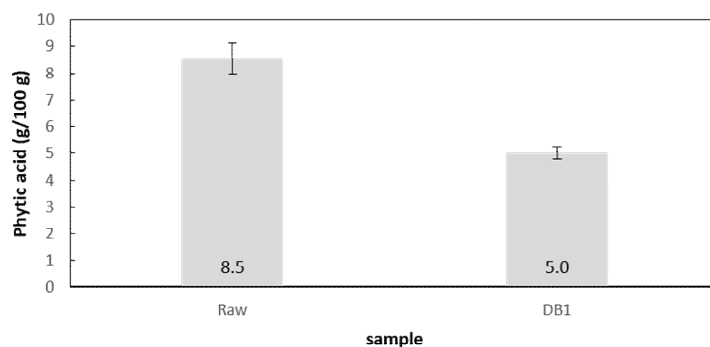


Figure 12. 미강 및 DB1 발효미강의 phytic acid 함량

- 피틴산은 식물의 종자나 껍질 등에 함유되어 있는 유기성분으로 강력한 항산화 작용과 항암 작용 등 기능성 물질로도 알려져 있음(Phytate in foods and significance for humans: Food sources, intake, processing, bioavailability, protective role and analysis(2009) Mol Nutr Food Res, 53, S330-S375). 동시에 무기질 흡수를 방해하여 어린이나 노약자와 같이 칼슘 흡수가 중요한 시기에 과다 섭취가 체내 무기질 이용에 영향을 미칠 수 있다는 보고가 있음(Phytic acid content in milled cereal products and breads(1999) Food Res Int, 32, 217-221).
- 피틴산의 하루 섭취량 기준은 100~400 mg(인체 무해), 1,000~2,000 mg(영양소 결핍과

무관)으로 알려져 있음(Phytate in foods and significance for humans: Food sources, intake, processing, bioavailability, protective role and analysis(2009) Mol Nutr Food Res, 53, S330-S375; A review phytic acid: As antinutrient or nutraceutical(2017) J Pharmacogn Phytochem, 6(6), 1554-1560). 즉, 본 발효미강을 하루에 1~10 g 섭취시 약 피틴산 5~50 mg 정도를 섭취하는 양으로 인체에 무해한 수준임을 알 수 있음.

※ 참고

- 아몬드의 피틴산 함량: 1,200~1,400 mg/100 g
- 하루견과 섭취시 섭취하게 되는 피틴산 함량: 300~350 mg/25 g(시판 하루 견과 중량 기준)

○ 제 2세부(조선대학교)

1) *W. koreensis* DB1 균주, 미강 및 미강발효제품의 지방세포 분화에 미치는 영향 및 그에 따른 유전자 발현 변화 확인

가) 시료 및 처리

① 실험 1

- 시료: *Weissella koreensis* DB1
- 제1세부과제로부터 제공받음.
- *W. koreensis* DB1 cytoplasmic fractions  
: *W. koreensis* 균주 cell 부위만 동결건조한 후 멸균 증류수로 희석하여 sonication한 다음 원심분리하여 suspension을 모아 시료로 사용.
- DMSO로 희석하여 처리.

② 실험 2

- 시료: 미강원물 및 DB1 발효미강제품
- 제1세부과제로부터 제공받음.
- 미강 및 DB1 발효미강제품 추출물  
: 미강 및 DB1 발효미강제품은 에탄올 추출하여 동결건조하여 분말로 만들어 시료로 사용.
- DMSO로 희석하여 처리.

나) 3T3-L1 세포배양과 분화유도

- 세포: mouse fibroblast 3T3-L1 cell

• 세포배양 및 지방세포 분화유도

- *in vitro* 연구를 위해 마우스 3T3-L1 세포주를 Fig. 1과 같은 실험 스케줄에 따라 3T3-L1 preadipocytes 세포 배양과 분화를 유도하였음.

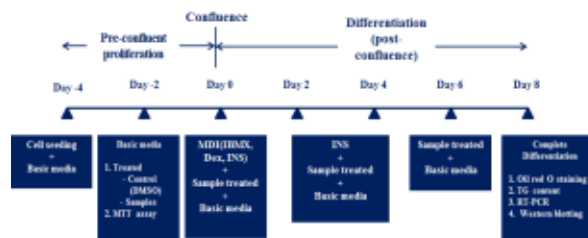


Figure 1. Process of adipocytes differentiation in 3T3-L1 cells.

다) 세포생존 및 독성평가

① 세포생존률 측정 MTT assay

② 처리군과 처리시간

- 실험처리 시간: 24시간 혹은 48시간

- 실험 1: 처리군

i) 대조군: 무첨가군

ii) 시료군: 균주(0, 0.25, 0.75, 1.0 µg/mL)

- 실험 2: 처리군

i) 대조군: 무첨가군

ii) 시료군: 미강 혹은 DB1 발효미강 추출물(0, 50, 100, 500, 1000, 2000 µg/mL)

• 실험 1: 균주 cytoplasmic fractions 독성평가(Fig. 2)

- 균주 cytoplasmic fractions를 24시간 혹은 48시간 0-1.0 µg/mL 농도로 전처리하였을 경우 0.75 µg/mL 농도까지는 90% 이상 세포 생존율이 확인되었으며, 1.0 µg/mL 농도에서는 미처리군과 유의성 있는 차이를 보여 세포 독성이 나타남.

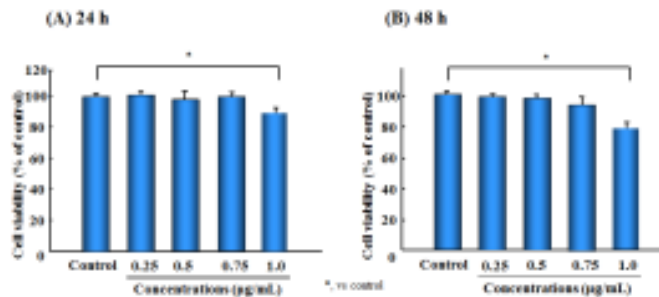


Figure 2. Cytotoxic effects of *W. koreensis* DB1 cytoplasmic fraction on 3T3-L1 cells.

• 실험 2: 미강과 DB1 발효미강 추출물의 독성평가(Fig. 3)

- 처리군

- 미강과 DB1 발효미강 추출물 24시간 혹은 48시간 0-2,000 µg/mL 농도로 처리하였을 때 2,000 µg/mL 농도에서는 미처리군과 유의성 있는 차이를 보여 세포 독성이 나타남.

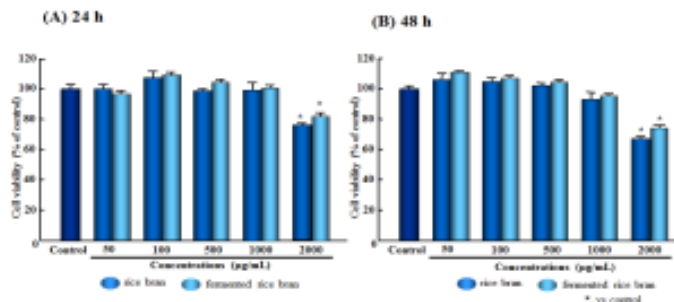


Figure 3. Cytotoxic effects of rice bran and fermented rice bran on 3T3-L1 cells.

☞ 균주 cytoplasmic fractions 혹은 미강 및 DB1 발효미강 추출물은 독성이 나타나지 않은 농도에서 추후 지방세포 분화 실험을 진행하였음.

라) 지방축적량 측정

- Oil-Red O 염색

- 중성지방 함량 분석
- 실험 1: 균주 cytoplasmic fractions(Fig. 4)
  - Oil-Red O 염색에 의한 지방구 형성
    - : 독성이 나타나지 않은 농도 (0-0.75  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )에서 Oil-Red O 염색에 의한 균주 cytoplasmic fractions 세포내 지방구 생성을 농도 의존적으로 감소하는 것을 육안으로 확인함.
  - 세포 내 중성지방 함량
    - : 균주의 처리로 인하여 중성지방 함량도 농도 의존적으로 감소되었음.

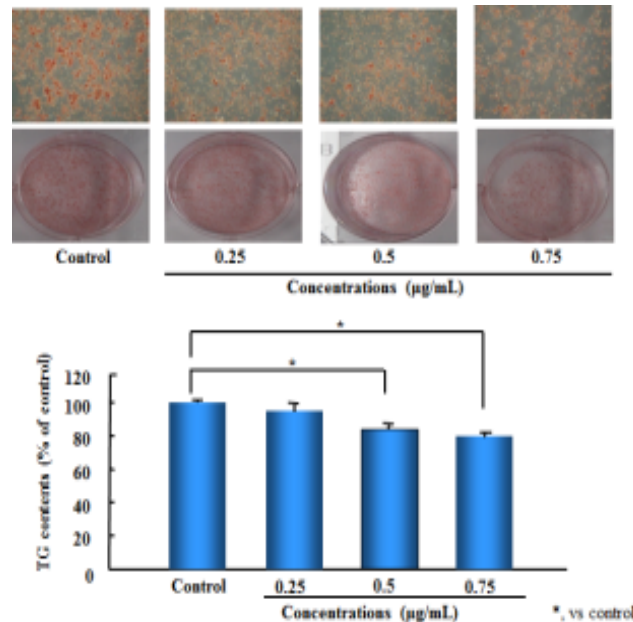


Figure 4. Inhibitory effects of *W. koreensis* DB1 cytoplasmic fraction on lipid accumulation in 3T3-L1 cells.

- 실험 2: 미강과 DB1 발효미강 추출물(Fig. 5)
  - Oil-Red O 염색에 의한 지방구 형성
    - : 미강 혹은 DB1 발효미강 추출물 모두 독성이 나타나지 않은 농도(100 혹은 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) 범위에서 Oil-Red O 염색에 의한 지방구 생성이 농도 의존적으로 감소하는 것을 육안으로 확인하였으며, DB1 발효미강 추출물이 미강 추출물에 비하여 더 많은 감소를 보임.
  - 세포 내 중성지방 함량
    - : 미강 및 DB1 발효미강 추출물의 중성지방 함량이 모두 미처리군에 비하여 농도 의존적으로 감소하였으며, 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  농도에서는 DB1 발효미강 추출물이 미강 추출물에 비하여 유의하게 중성지방 농도가 저하되었음.

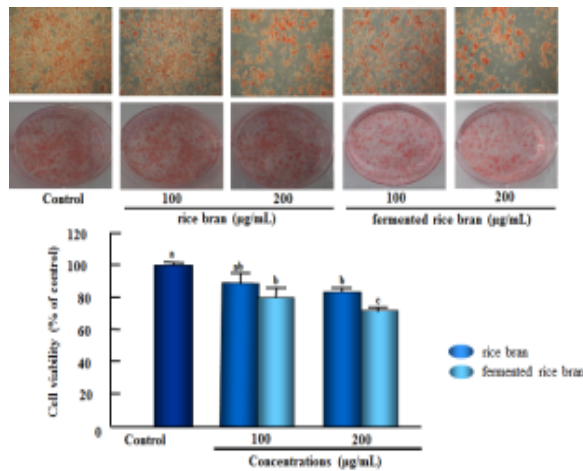


Figure 5. Inhibitory effects of rice bran and fermented rice bran on lipid accumulation in 3T3-L1 cells.

- ☞ 균주 cytoplasmic fractions 혹은 미강 및 DB1 발효미강 추출물은 지방세포의 지방구 형성과 중성지방 함량을 모두 저하시킴.
- ☞ DB1 발효미강 추출물은 미강 추출물에 비하여 지방축적 억제효과가 더 우수하게 나타남.

마) 지방분화 관련 유전자 발현

- ① Total RNA 추출
- ② RT-PCR
- ③ Adipogenic transcription factors
  - C/EBP $\gamma$ 와 SREBP-1c 유전자 발현
- ④ Lipogenic gene
  - FAS와 ACC 유전자 발현

• 실험 1: 균주 cytoplasmic fractions(Fig. 6-7)

- 지방세포 분화에 관련된 전사인자에 미치는 영향(Fig. 6)

: C/EBP $\gamma$ 와 SREBP-1c와 같은 adipogenic transcription factor 유전자 발현은 균주 cytoplasmic fractions을 전처리하였을 때 감소되어지는 경향을 보였으며, 특히 고농도로 처리하였을 경우 유의하게 감소하였음.

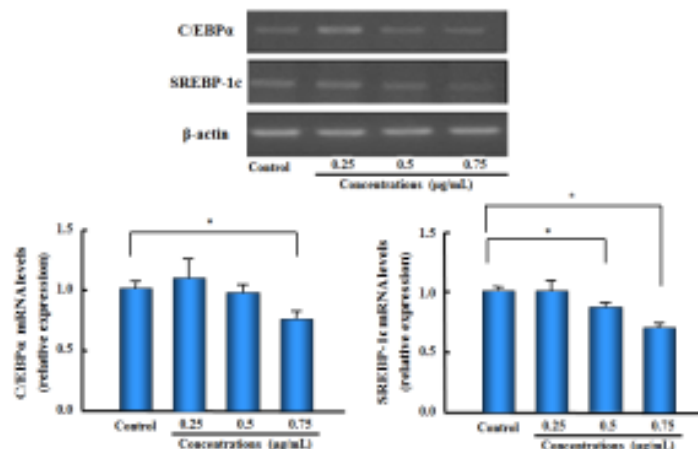


Figure 6. Effects of *W. koreensis* DB1 cytoplasmic fraction on mRNA expression of adipogenic transcription factors in 3T3-L1 cells.

- 지방세포 분화 시 lipogenic gene의 발현 변화(Fig. 7)
- : 지방조직 내 지방합성관련 주요 조절효소인 FAS와 ACC 유전자 발현도 균주 cytoplasmic fractions을 고농도 처리 시 대조군에 비하여 유의하게 감소하였음.

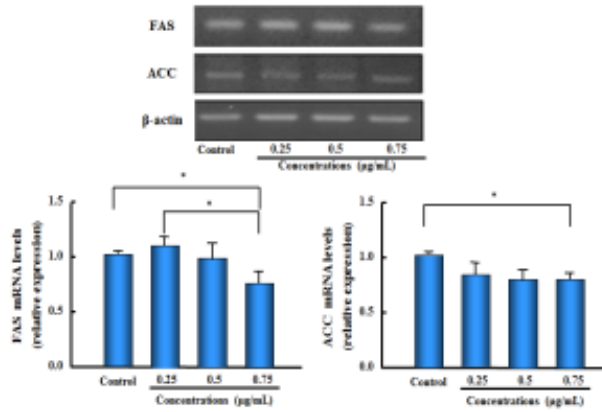


Figure 7. Effects of *W. koreensis* DB1 cytoplasmic fraction on mRNA expression of lipogenic enzymes in 3T3-L1 cells.

- 실험 2: 미강과 DB1 발효미강 추출물(Fig. 8-9)
- 지방세포 분화에 관련된 전사인자에 미치는 영향(Fig. 8)
- : C/EBP $\alpha$ 와 SREBP-1c 유전자 발현이 미강 및 DB1 발효미강 추출물 처리로 모두 저하되었으며, DB1 발효미강 추출물은 농도 의존적으로 저하되었으며, 미강 추출물에 비하여 유전자 발현 억제효과가 크게 나타남.

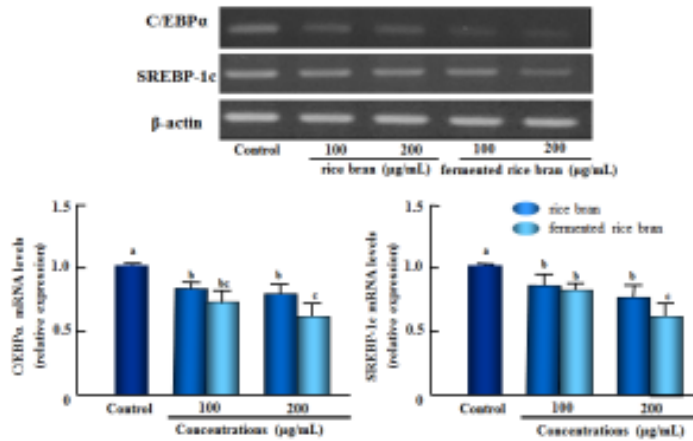


Figure 8. Effects of rice bran and fermented rice bran on mRNA expression of adipogenic transcription factors in 3T3-L1 cells.

- 지방세포 분화 시 lipogenic gene의 발현 변화(Fig. 9)
- : FAS와 ACC mRNA 발현이 미강 및 DB1 발효미강 추출물 처리로 모두 저하되었으며, FAS mRNA 수준은 DB1 발효미강 추출물이 미강 추출물에 비하여 고농도에서 유의하게 저하됨.

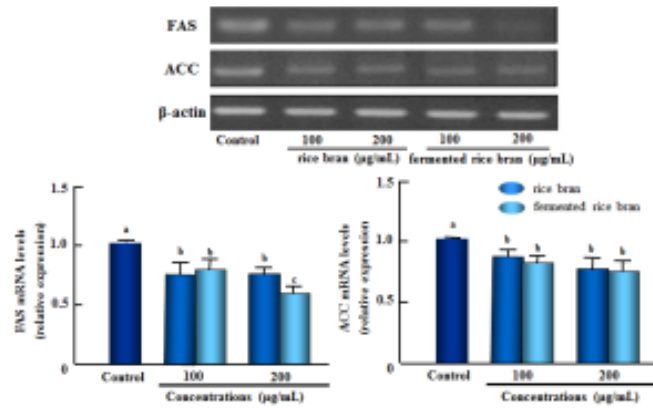


Figure 9. Effects of ice bran and fermented rice bran on mRNA expression of lipogenic enzymes in 3T3-L1 cells.

- ☞ 균주 cytoplasmic fractions 혹은 미강 및 DB1 발효미강 추출물은 지방세포 분화 전사인자 및 지방합성관련 효소의 유전자 발현을 억제시킴.
- ☞ DB1 발효미강 추출물은 미강 추출물에 비하여 지방세포 분화 억제효과가 더 우수한 것으로 나타남.

## 2) 동물 실험을 통한 균주, 미강 및 미강발효제품의 콜레스테롤 저하효과 및 항비만 효과 평가

가) 시료, 실험동물, 실험설계 및 동물사육

### ① 시료(4종류)

- 균주: *W. koreensis* DB1
- 미강 분말
- DB1 발효미강(열풍건조물)
- 키토산(양성 대조군)

### ② 실험동물

- C57BL/6J 마우스
- 수컷 70마리

### ③ 실험기간

- 적응기간: 1주일
- 본실험 기간: 10주

### ④ 실험군: 7군

- 정상식이군: 1군
- 고지방고콜레스테롤 식이군: 6군

### • 실험동물 사육 및 실험설계

- 실험동물은 생후 6주령 C57BL/6J 마우스 70마리를 구입하여 조선대학교 실험동물센터에서 1주간 고형 사료로 적응시킨 후 난괴법에 따라 각 처리군 당 10마리씩 분리하여 사육.
- 사양조건: 물과 식이는 제한없이 공급하였고, 조명은 12시간 주기(08:00-20:00)로 조절하였고, 사육실 내 온도는  $18 \pm 2^\circ\text{C}$  유지하였음.
- 실험설계는 Fig. 10과 같이 실시하였음.

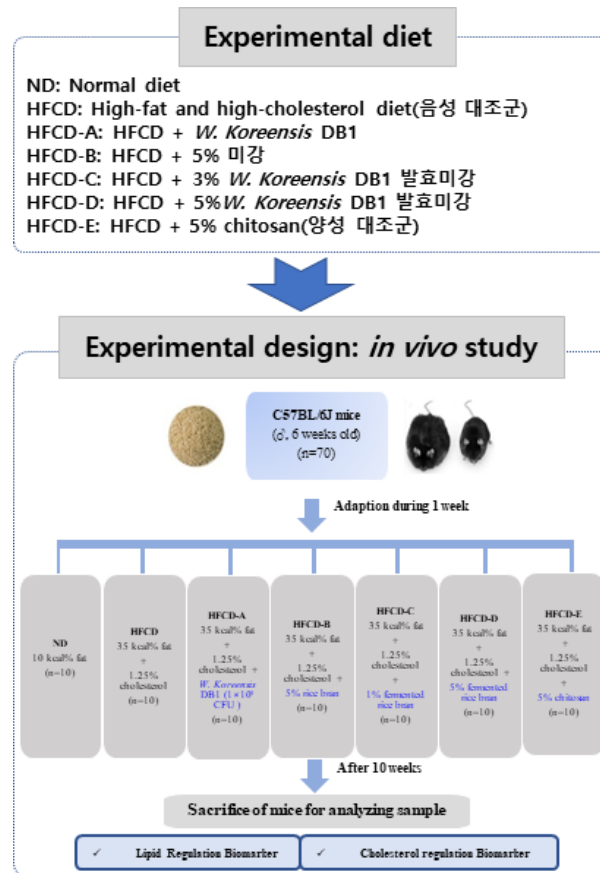


Figure 10. Experimental design.

• 실험군

- 정상식이군(ND): 1군
- 고지방고콜레스테롤군(HFCD): 6군  
 고지방고콜레스테롤식이군(음성 대조군)  
 고지방고콜레스테롤 + 균주 첨가군(HFCD-A)  
 고지방고콜레스테롤 + 5% 미강분말 첨가군(HFCD-B)  
 고지방고콜레스테롤 + 1% DB1 발효미강분말 첨가군(HFCD-C)  
 고지방고콜레스테롤 + 5% DB1 발효미강분말 첨가군(HFCD-D)  
 고지방고콜레스테롤 + 5% 키토산분말 첨가군(HFCD-E)

※ *W. koreensis* DB1 발효미강은 농도 차이에 의한 변화를 보기 위해서 두 농도에서 실시.

※ 양성대조군: 키토산은 항비만효과가 우수한 것으로 연구 보고되어 선택하였음.

나) 식이조성

- AIN-93 식이 변형하여 제조



Table 1. Composition of the experimental diets.

Ingredient (g)	ND	HFD	HFD-A	HFD-B	HFD-C	HFD-D	HFD-E
Casein	200	200	200	200	197.7	198.6	199
Corn oil	5	5	3	3	3	3	3
Corn starch	297.000	281.900	274.900	268.200	260.800	248.900	247.000
Maltodextrin	150	150	150	150	150	150	150
Sucrose	100	100	100	100	100	100	100
Celulose	50	50	50	45.6	45.6	45.6	4
Lard	0	100	100	100	100	100	100
Selenium (g)	70	70	70	59.9	60.1	60.6	59.9
Cholesterol	0	12.5	12.5	12.5	12.0	12.5	12.5
Minerals	30	30	30	30	30	30	30
Vitamins	10	10	10	10	10	10	10
Choline bitartrate	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5
1-Butyl-3-(3-dimethylammoniumpropyl) carbodiimide	0.014	0.014	0.014	0.010	0.010	0.010	0.010
W. Jensen DB1	-	-	10	-	-	-	-
Resin	-	-	-	10	-	-	-
Tetrasodium borate	-	-	-	-	10	10	-
Chitosan	-	-	-	-	-	-	1.00

• 실험식이(Table 1)

- 정상식이와 고지방고콜레스테롤식이군은 AIN-93 식이조성을 변형하여 제조하였으며, 정상식이는 열량 대비 10 kcal% 지방을 공급하였고, 고지방고콜레스테롤 식이는 열량대비 35 kcal% 지방과 1.25% 콜레스테롤을 급여함.

다) 분석방법

① 동물 희생, 혈액 및 장기채취

- 10주간 사육한 실험동물은 물만 주고 12시간 절식 후 ether 마취하에 복대동맥에서 혈액을 채취한 후 원심분리하여 혈청을 분리하여 냉동 보관
- 간과 백색지방조직인 부고환, 장간막, 등 및 신장주변 백색지방을 적출하여 무게를 측정 후 지질 성상 분석을 위해 냉동 보관

② 미강 및 DB1 발효미강의 소화흡수율

• 분변 채취 및 소화흡수율 측정(전분채취법)

- 실험 9주차에 실험동물의 체중과 식이섭취량 측정 후 마지막 주 7일간 실험동물의 사료섭취량과 분변량을 측정.

③ *in vivo* 비만 억제효과 효능 검증을 위한 biomarker 분석

• 혈청 간 손상 지표 효소의 활성

- 혈청 중 ALT, AST, ALP 및 LDH 활성 측정  
: 혈액생화학 검사 자동분석기를 사용.

• 혈청 지질 성상 분석

- 중성지방, 총 콜레스테롤 및 HDL-콜레스테롤 함량  
: 혈액생화학 검사 자동분석기를 사용.
- Non HDL-콜레스테롤 함량: = (총 콜레스테롤 함량 - HDL-콜레스테롤 함량)

• 혈청 포도당, insulin, leptin 및 adiponectin 함량 분석

- 혈청 포도당 함량: 혈액생화학 검사 자동분석기를 사용.
- 혈청 insulin, leptin 및 adiponectin 함량:

i) insulin radioimmuno assay kit → Microplate reader로 분석

ii) leptin mouse/rat enzyme immuno assay kit → Microplate reader로 분석

iii) adiponectin rat EIA를 이용하여 sandwich type enzyme linked immunosorbent assay → Microplate reader로 분석

• 간, 지방조직 및 분변 중 지질 성상 분석

- 지질 추출: Folch 방법(1957)
- 중성지방 함량: Biggs 등(1975)의 방법
- 총 콜레스테롤 함량: Zlatkis와 Zak(1969)의 방법

- 간 조직의 병리조직학적 검사
    - Oil-Red O 염색 후 light microscope에서 조직 상태 관찰 후, Image Analyzer 지방 축적 정도를 측정.
  - 간 조직의 유전자 발현 분석
    - 간 조직 total RNA 추출하고 RT-PCR을 이용하여 지방합성 관련 유전자 발현을 측정.
  - 지방세포의 크기 측정
    - 부고환 지방조직을 Hematoxylin & Eosin 염색 후 광학 현미경으로 지방세포 찍은 후 Image analyzer program을 통하여 실험군 간의 지방세포의 크기를 비교함.
- ④ 통계처리

라) 분석결과

① 체중 증가량 및 식이섭취량

i) 일반증상 및 사망률

- 일반증상 및 사망률
  - 실험 전 기간 동안 모든 실험군에서 폐사한 동물은 관찰되지 않았으며, 실험물질로 기인된 변화로 인정되는 어떠한 임상증상도 관찰되지 않음.
- 고지방고콜레스테롤식이로 인한 비만 유도
  - 10주 동안 과체중을 유도하기 위한 고지방고콜레스테롤 식이를 급여한 후 희생한 실험동물의 체중증가량, 간 및 지방조직 부위별 무게는 고지방고콜레스테롤식이군(HFCD)이 정상식이군(ND)에 비하여 유의적으로 높아 비만이 유도된 것을 확인함.

ii) 체중증가량(g/day): 매주 동일시간 측정

- 체중증가량(g/day)(Fig. 11)
  - 고지방고콜레스테롤식이군(HFCD)에 비하여 고지방고콜레스테롤식에 균주, 미강, DB1 발효미강 및 키토산을 첨가한 군(HFCD-A, HFCD-B, HFCD-C, HFCD-D, HFCD-E) 체중이 저하되었음. 특히 5% DB1 발효미강 첨가군(HFCD-D)과 5% 키토산 첨가군(HFCD-E)은 체중이 유의하게 저하되었음.

iii) 식이섭취량(g/day): 매주 동일시간 측정

- 식이섭취량(g/day)(Fig. 11)
  - 식이섭취량은 실험군 간에 유의차가 나타나지 않음.

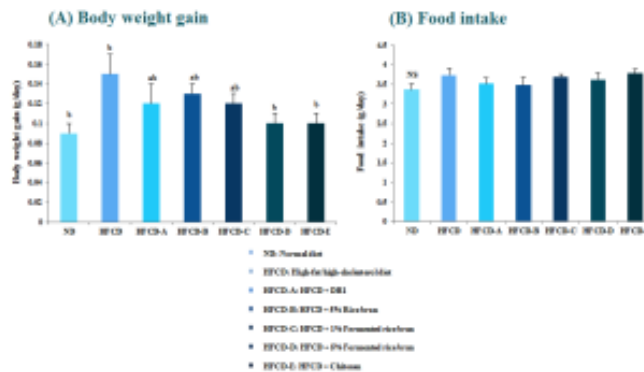


Figure 11. Changes in body weight and food.

② 간 조직 및 백색지방조직의 무게(체중 100 g에 대한 상대 증량으로 계산)

i) 간 조직

- 간 조직 무게 변화(Fig. 12-A)

- 간조직의 무게는 고지방고콜레스테롤식이군(HFCD)이 정상식이군(ND)에 비하여 유의하게 증가하였으며, 고지방고콜레스테롤식이에 시료를 첨가하여 급여한 군(HFCD-A, HFCD-B, HFCD-C, HFCD-D, HFCD-E)들이 고지방고콜레스테롤식이군(HFCD)에 비하여 저하되었으나 5% 키토산 첨가군(HFCD-E) 만이 유의하게 저하됨.
- ii) 백색 지방조직의 무게
  - 부고환지방조직 무게
  - 장간막지방조직 무게
  - 등 지방조직 무게
  - 신장주변 지방조직 무게
  - 총 백색지방조직 무게
- 지방조직 부위별 무게 및 총 백색 지방조직의 무게(Fig. 12-B-F)
  - 모든 부위의 지방조직의 무게는 고지방고콜레스테롤 식이군(HFCD)이 정상식이군(ND)에 비하여 유의하게 증가하였음.
  - 모든 부위의 지방조직의 무게는 고지방고콜레스테롤 식이군(HFCD)에 비하여 고지방고콜레스테롤식이에 시료를 첨가하여 급여한 군(HFCD-A, HFCD-B, HFCD-C, HFCD-D, HFCD-E)들이 감소하는 경향을 보임.
  - 부고환지방조직 및 총 백색지방조직의 무게는 고지방고콜레스테롤식이군(HFCD)에 비하여 5% 미강 첨가군 (HFCD-D)과 5% 키토산 첨가군(HFCD-E) 만이 유의하게 저하됨.
  - 5% DB1 발효미강 첨가군(HFCD-D)은 5% 미강 첨가군 (HFCD-B)에 비하여 모든 부위의 지방조직의 무게가 저하되는 경향을 보임.

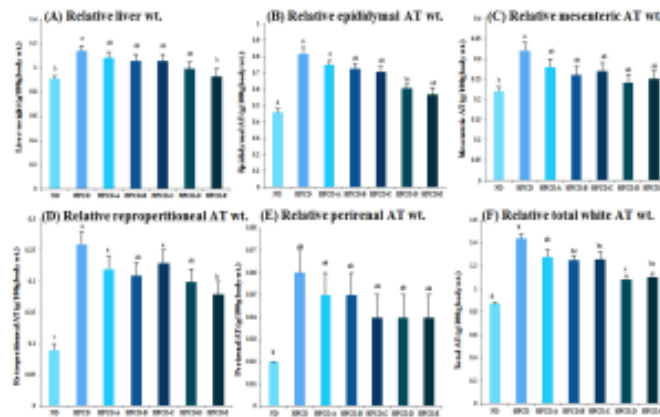


Figure 12. Relative liver(A) and white fat pads(B-F) weights of mice.

③ 혈청 중 간 기능 손상지표 효소 활성

- ALT 활성
  - AST 활성
  - ALP 활성
  - LDH 활성
- 혈청 중 간 기능 손상지표 효소 활성
    - 혈청 중 간 기능 손상지표 효소의 활성을 측정한 결과, 혈청 중 ALT, AST, ALP 및 LDH 활성은 고지방고콜레스테롤식이군(HFCD)이 정상식이군(ND)에 비하여 유의하게 증가하였으며, 고지방고콜레스테롤 식이군(HFCD)에 비하여 시료를 첨가하여 급여한 군 (HFCD-A, HFCD-B, HFCD-C, HFCD-D, HFCD-E)들이 감소하는 경향을 보임.

- 5% 미강 첨가군(HFCD-D)과 5% 키토산 첨가군 (HFCD-E)은 고지방고콜레스테롤식이군(HFCD)에 비하여 혈청 중 ALT, ALP 및 LDH 활성은 유의하게 저하되었음.
- 시료를 급여한 모든 군들의 혈청 중 ALT, AST, ALP 및 LDH 활성 수치는 모두 정상 범위로 시료를 급여로 인한 간 조직에 독성이 발생하지 않았으며, 고지방고콜레스테롤식이로 증가되어진 효소의 활성을 감소시킴으로써 간 조직을 보호하는 것으로 보여짐.

Table 2. Activities of ALT, AST, ALP and LDH in serum of mice.

Groups	ALT	AST	ALP	LDH
ND	156.13±8.40 <sup>c</sup>	25.31±2.36 <sup>b</sup>	426.89±25.36 <sup>c</sup>	50.13±2.88 <sup>c</sup>
HFCD	230.13±13.22 <sup>a</sup>	59.36±3.78 <sup>a</sup>	741.36±30.26 <sup>a</sup>	119.63±10.37 <sup>a</sup>
HFCD-A	193.10±10.21 <sup>ab</sup>	50.36±3.19 <sup>b</sup>	628.36±49.63 <sup>ab</sup>	88.23±10.22 <sup>ab</sup>
HFCD-B	164.23±13.89 <sup>b</sup>	47.97±5.12 <sup>a</sup>	550.23±50.13 <sup>b</sup>	85.64±6.98 <sup>b</sup>
HFCD-C	180.12±15.11 <sup>ab</sup>	48.22±4.29 <sup>a</sup>	599.69±44.23 <sup>b</sup>	83.63±9.36 <sup>b</sup>
HFCD-D	162.70±10.36 <sup>b</sup>	45.13±4.11 <sup>a</sup>	570.36±25.04 <sup>b</sup>	72.69±6.39 <sup>b</sup>
HFCD-E	155.20±12.88 <sup>b</sup>	48.26±2.90 <sup>a</sup>	569.33±40.22 <sup>b</sup>	69.33±6.78 <sup>b</sup>

④ 혈청 지질성상 분석

- 중성지방 함량
  - 총 콜레스테롤 함량
  - HDL-콜레스테롤 함량
  - Non HDL-콜레스테롤 함량
  - 동맥경화지수(AI)
  - 심혈관위험지수(CRF)
- 혈청 중 지질성상(Fig. 13-A-D)
    - 혈청 중 중성지방, Non HDL-콜레스테롤 함량은 고지방고콜레스테롤식이군(HFCD)이 정상식이군(ND)에 비하여 유의하게 증가하였음.
    - 혈청 중 중성지방과 Non HDL-콜레스테롤 함량은 고지방고콜레스테롤식이군(HFCD)에 비하여 고지방 고콜레스테롤식이에 시료를 첨가하여 급여한 군(HFCD-A, HFCD-B, HFCD-C, HFCD-D, HFCD-E) 들이 감소하는 경향을 보임.
    - 특히 5% 미강 첨가군(HFCD-D)과 5% 키토산 첨가군 (HFCD-E)은 고지방고콜레스테롤식이군(HFCD)에 비하여 혈청 중 중성지방과 Non HDL-콜레스테롤 함량이 유의하게 저하됨.
    - 혈청 중 총 콜레스테롤 함량은 실험군 간에 차이가 없었음.
    - 혈청 중 HDL-콜레스테롤 함량은 고지방고콜레스테롤 식이군(HFCD)이 정상식이군(ND)에 비하여 유의하게 저하되었으나, 5% 미강 첨가군(HFCD-D)과 5% 키토산 첨가군(HFCD-E)은 고지방고콜레스테롤식이군(HFCD)에 비하여 혈청 중 HDL-콜레스테롤함량이 유의하게 증가되어짐.
  - 동맥경화지수 및 심혈관위험지수(Fig. 13-E-F)
    - 동맥경화지수와 심혈관계지수는 고지방고콜레스테롤 식이군(HFCD)이 정상식이군(ND)에 비하여 유의하게 증가하였음.
    - 동맥경화지수는 고지방고콜레스테롤식이군(HFCD)에 비하여 5% 미강 첨가군(HFCD-D)과 5% 키토산 첨가군(HFCD-E)은 유의하게 저하됨.
    - 심혈관위험지수는 지방고콜레스테롤식이군(HFCD)에 비하여 고지방고콜레스테롤

식이에 시료를 첨가하여 급여한 군(HFCD-A, HFCD-B, HFCD-C, HFCD-D, HFCD-E)들이 유의하게 저하되었음.

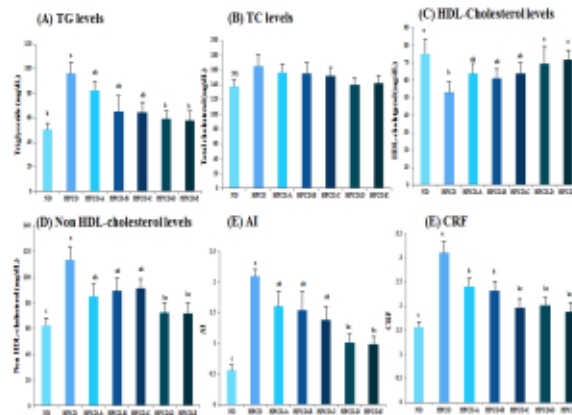


Figure 13. Serum lipid profiles, AI and CRF of mice.

⑤ 혈청 중 비만관련 biomarker 분석

- insulin 함량, 포도당 함량, leptin 함량, adiponectin 함량

- 혈청 중 insulin 및 포도당 함량(Fig. 14-A-B)
  - 혈청 중 insulin과 포도당 함량은 고지방고콜레스테롤 식이군(HFCD)이 정상식이군(ND)에 비하여 유의하게 증가하였음.
  - 고지방고콜레스테롤식이군(HFCD)에 비하여 시료를 첨가하여 급여한 군(HFCD-A, HFCD-B, HFCD-C, HFCD-D, HFCD-E)들의 혈청 중 insulin 함량이 모두 유의하게 감소하였으며, 포도당 함량은 1% 혹은 5% DB1 발효미강 첨가군(HFCD-C, HFCD-D)과 5% 키토산 첨가군(HFCD-E)만이 유의하게 저하됨.
- 혈청 중 leptin 및 adiponectin 함량(Fig. 14-C-D)
  - 혈청 중 leptin 함량은 고지방고콜레스테롤식이군(HFCD)이 정상식이군(ND)에 비하여 유의하게 증가 하였으나, 혈청 중 adiponectin 함량은 유의하게 감소함.
  - 고지방고콜레스테롤식이군(HFCD)에 비하여 시료를 첨가하여 급여한 군(HFCD-A, HFCD-B, HFCD-C, HFCD-D, HFCD-E)들의 혈청 중 insulin 함량이 모두 유의하게 감소하였으며, 혈청 중 adiponectin 함량은 5% DB1 발효미강 첨가군(HFCD-C, HFCD-D)과 5% 키토산 첨가군(HFCD-E)만이 유의하게 저하됨.

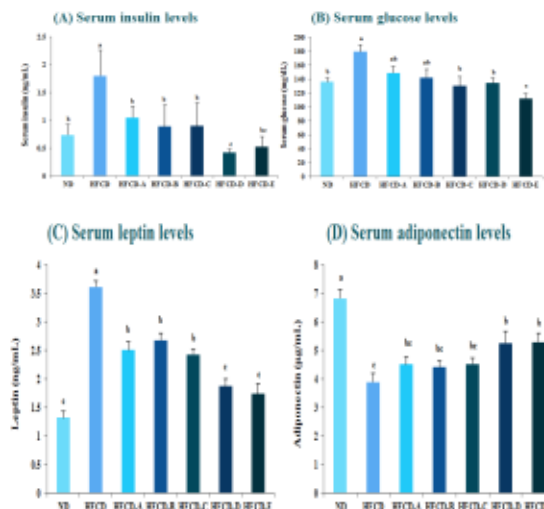


Figure 14. Serum insulin, glucose, leptin and adiponectin levels.

⑥ 분변 지질 성상

- 총 지질 함량
- 중성지방 함량
- 총 콜레스테롤 함량

• 분변 지질 성상(Fig. 15)

- 분변 중 총 지질, 중성지방 및 총 콜레스테롤 함량은 정상식이군(ND)에 비하여 고지방고콜레스테롤식이군 (HFCD, HFCD-A, HFCD-B, HFCD-C, HFCD-D, HFCD-E) 들이 유의하게 증가함.
- 분변 중 총 지질과 중성지방 함량은 고지방고콜레스테롤 식이군(HFCD)에 비하여 시료를 첨가하여 급여한 군 (HFCD-A, HFCD-B, HFCD-C, HFCD-D, HFCD-E) 들이 유의하게 증가하였으나 총 콜레스테롤 함량은 5% 미강 첨가군(HFCD-B)은 고지방고콜레스테롤식이군 (HFCD)간에 비하여 유의하게 저하됨.

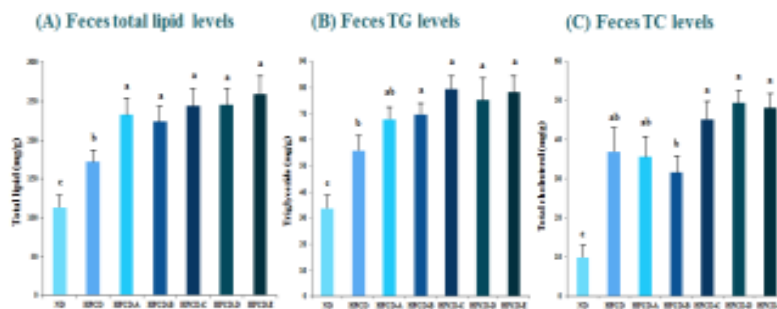


Figure 15. Feces lipid profiles.

⑦ 간 조직 중 비만관련 biomarker 분석

i) 간조직의 지질 성상

- 총 지질 함량
- 중성지방 함량
- 총 콜레스테롤 함량

• 간 조직의 지질 성상(Fig. 16)

- 간조직의 총 지질, 중성지방 및 총 콜레스테롤 함량은 고지방콜레스테롤식이군 (HFCD)이 정상식이군(ND)에 비하여 유의하게 증가하였음.
- 고지방고콜레스테롤식이군(HFCD)에 비하여 시료를 첨가하여 급여한 군(HFCD-A, HFCD-B, HFCD-C, HFCD-D, HFCD-E)들의 간 조직의 지질 성상이 개선되었음.

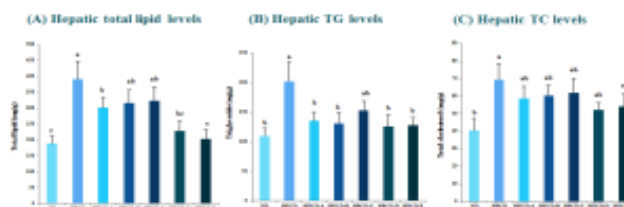


Figure 16. Hepatic lipid profiles.

ii) 간 조직의 외관 상태 관찰

• 간 조직의 외관 상태(Fig. 17)

- 실험동물을 희생직후 해부하여 간과 내장 백색지방의 크기와 함께 간의 형태를 촬영한 결과, 간과 지방조직의 크기는 고지방고콜레스테롤식이군 (HFCD)이

정상식이군 (ND)에 비하여 간 조직의 크기가 증가하였으며, 정상식이군(ND)의 간 조직은 선홍빛을 띄며, 고지방 고콜레스테롤식이군(HFCD)은 황색의 지방들이 침착되어 옅은 분홍색을 나타냄.

- 고지방고콜레스테롤식에 시료를 첨가한 군(HFCD-A, HFCD-B, HFCD-C, HFCD-D, HFCD-E)들은 지질 침착이 적은 것으로 보여짐.

iii) 간 조직의 병리조직학적 관찰: Oil-Red-O 염색

- 간 조직의 병리조직학적 변화(Fig. 17)

- Oil-Red-O로 염색한 간 조직을 광학현미경으로 관찰한 결과, 고지방고콜레스테롤식이군(HFCD)은 간세포 내 붉은색으로 염색되어진 지방구가 많아 지방축적이 뚜렷이 관찰되었으며, 고지방고콜레스테롤식에 시료를 첨가한 군(HFCD-A, HFCD-B, HFCD-C, HFCD-D, HFCD-E)들은 붉은색으로 염색된 부분이 감소하여 지방축적이 억제됨.

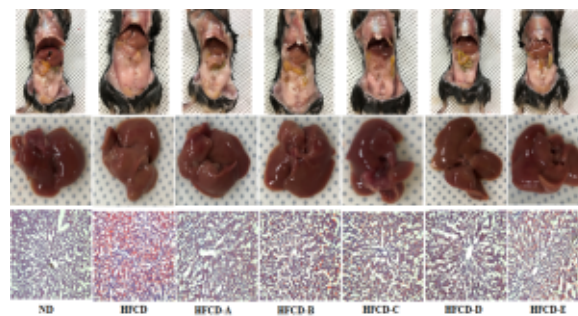


Figure 17. Hepatic representative anatomical views and histopathological analysis.

⑧ 간 조직 중 지방합성관련 유전자 발현

i) Transcription factors

- C/EBP $\alpha$  gene expression
- SREBP-1c gene expression

- 간 조직의 지방합성관련 유전자 발현(Fig. 18-19)

- 지방합성관련 transcription factors인 C/EBP $\alpha$ 과 SREBP-1c 유전자 발현은 고지방고콜레스테롤식이군 (HFCD)이 정상식이군(ND)에 비하여 유의하게 증가하였으며, 고지방고콜레스테롤식에 시료를 첨가한 군 (HFCD-A, HFCD-B, HFCD-C, HFCD-D, HFCD-E) 들은 고지방고콜레스테롤식이군 (HFCD)에 비하여 저하되었음. 특히 5% DB1 발효미강 첨가군 (HFCD-D)과 5% 키토산 첨가군 (HFCD-E)은 다른 시료군들에 비하여 유의하게 저하되었음.

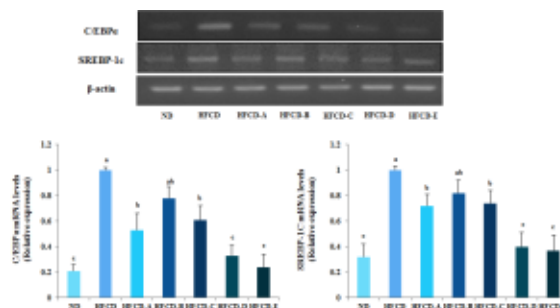


Figure 18. mRNA expression of adipogenic transcription factors in mice.

ii) 지방산합성관련 유전자

- FAS gene expression

- ACC gene expression
- 간 조직의 지방합성관련 주된 효소인 FAS와 ACC 유전자 발현은 고지방 고콜레스테롤식이군(HFCD)이 정상식이군 (ND)에 비하여 유의하게 증가하였음.
- 고지방고콜레스테롤식이에 시료를 첨가한 군(HFCD-A, HFCD-B, HFCD-C, HFCD-D, HFCD-E)들의 FAS와 ACC 유전자 발현은 고지방고콜레스테롤식이군(HFCD)에 비하여 저하되었으나, 5% 키토산 첨가군(HFCD-E)의 유전자 발현이 가장 많이 저하되었으며, 그 다음으로는 5% DB1 발효미강 첨가군 (HFCD-D)으로 나타남.

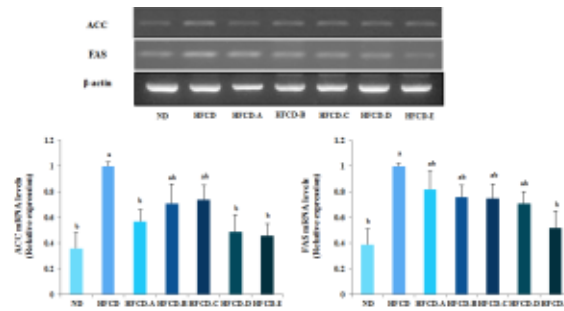


Figure 19. mRNA expression of lipogenic enzymes in mice.

⑨ 지방조직의 지질성상 및 지방세포 크기

i) 지방조직의 지질성상

- 부고환 및 장간막 지방조직의 비교, 총 지질 함량, 중성지방 함량
- 부고환 및 장간막지방조직의 지질성상(Fig. 20)
  - 부고환지방조직이 장간막지방조직에 비하여 총 지질 및 중성지방 함량이 많음.
  - 고지방고콜레스테롤식이군 (HFCD)이 정상식이군(ND)에 비하여 부고환 혹은 장간막 지방조직의 총 지질 및 중성지방 함량이 유의하게 증가하였음.
  - 부고환지방조직 중 총 지질 및 중성지방 함량은 고지방고콜레스테롤식이에 시료를 첨가한 군(HFCD-A, HFCD-B, HFCD-C, HFCD-D, HFCD-E)들은 고지방 고콜레스테롤식이군(HFCD)에 비하여 모두 유의적 저하되었음.
  - 장간막지방조직 중 총 지질 및 중성지방 함량은 고지방고콜레스테롤식이군 (HFCD)에 비하여 총 지질은 5% DB1 발효미강 첨가군(HFCD-D)과 5% 키토산 첨가군 (HFCD-E)은 유의하게 저하되었으며, 중성지방 함량은 5% DB1 발효미강 첨가군(HFCD-D)만이 유의하게 저하됨.

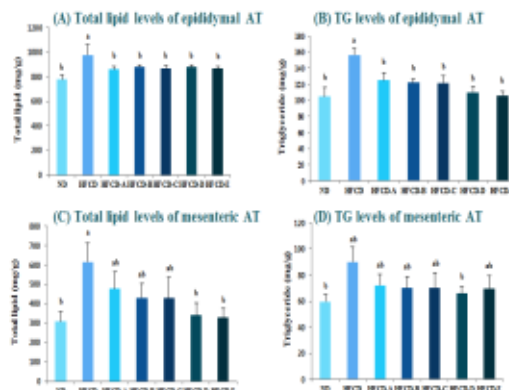


Figure 20. Adipose tissue lipid profiles.



ii) 지방세포 크기

- 부고환 지방세포 크기
- Hematoxylin & Eosin 염색

• 부고환 지방세포의 크기(Fig. 21)

- 마우스의 지방세포의 크기를 측정하기 위하여 현미경으로 관찰한 결과와 이미지 분석기로 측정한 결과, 고지방고콜레스테롤식이군(HFCD)이 정상식이군 (ND)에 비하여 부고환지방세포의 hypertrophy가 관찰되었으며, 지방세포의 크기도 유의하게 증가하였음.
- 고지방고콜레스테롤식에 시료를 첨가한 군(HFCD-A, HFCD-B, HFCD-C, HFCD-D, HFCD-E)들은 고지방 고콜레스테롤식이군 (HFCD)에 비하여 지방세포의 크기가 유의하게 저하되었음.

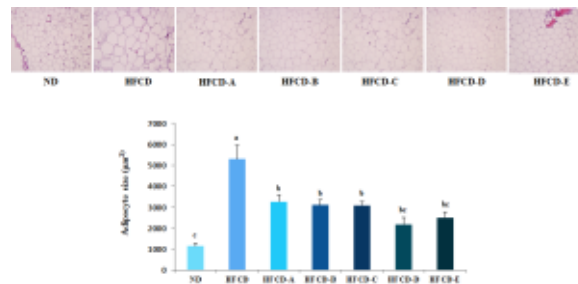


Figure 21. Representative findings and fat cell size of epididymal adipose tissue.

⑩ 미강 및 DB1 발효미강 소화흡수율

i) 실험군(4군)

- 정상식이군
- 고지방고콜레스테롤 식이군
- 고지방고콜레스테롤 식이+5% 미강 첨가군
- 고지방고콜레스테롤 식이+ 5% DB1 발효미강 첨가군

ii) 소화흡수율

- 조단백질 소화율
- 조지방 소화율
- 조섬유소 소화율
- 유기물 소화율
- 무기물 소화율

• 미강 및 DB1 발효미강 소화흡수율(Fig. 22)

- 모든 영양소의 소화흡수율은 고지방고콜레스테롤식이군(HFCD)이 정상식이군(ND)에 비하여 낮았음.
- DB1 발효미강 첨가군은 미강 첨가군에 비하여 모든 영양소의 소화흡수율이 유의하게 증가하였음.

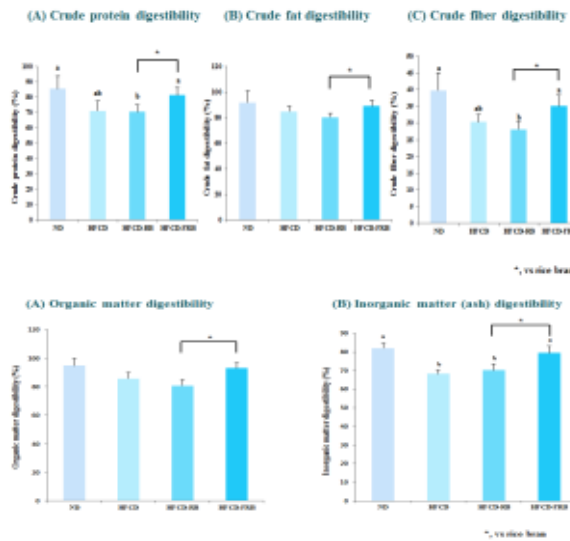


Figure 22. Apparent digestibility of crude protein, crude fat, crude fiber, organic matter and inorganic matter in mice.

마) 요약

① *in vitro* 연구

• *in vitro* 연구 결과

- 본 연구에 사용된 균주인 *W. koreensis* DB1 cytoplasmic fractions은 지방세포의 분화를 억제하는 것으로 보여짐.
- DB1 발효미강 추출물은 미강추출물에 비하여 3T3-L1 세포의 지방구 형성을 억제하고 지방합성관련 유전자 발현을 억제하여 비만 억제에 기여할 것으로 사료됨.

② *in vivo* 연구

• *in vivo* 연구 결과

- DB1 발효미강 분말은 고지방고콜레스테롤식으로 유도된 비만 모델 마우스의 체중을 감소시키고, 간 및 백색지방조직의 무게를 감소시킴으로써 비만치료에 긍정적인 영향을 미칠 것으로 보여짐.
- DB1 발효미강은 미강에 비하여 혈청, 간 및 지방 조직의 중성지방 과 총 콜레스테롤 함량은 저하시키고, 분변으로의 중성지방과 총 콜레스테롤의 배설을 촉진시켜 지질대사 개선효과가 있는 것으로 보여짐.
- DB1 발효미강은 혈청 중 insulin, 포도당 및 leptin 함량은 저하시키고 adiponectin 함량을 증가시켜 비만예방효과가 있는 것으로 나타남.
- DB1 발효미강은 간 조직의 지질축적을 억제하고 지방합성 관련 유전자 발현을 억제시키며, 지방세포의 크기를 저하시켰음.
- **항비만효과:**
  - i) 5% DB1 발효미강 첨가군과 5% 키토산 첨가군이 가장 우수한 효과가 나타남.
  - ii) 1% DB1 발효미강 첨가군, 미강 첨가군 및 균주 첨가군도 효과가 있었음.
  - iii) 5% DB1 발효미강 첨가군이 1% DB1 발효미강 첨가군에 비하여 항비만효과가 우수함.
  - iv) DB1 발효미강 첨가군이 미강 첨가군에 비하여 항비만 효과가 우수하게 나타남.
- **소화흡수율**
  - : DB1 발효미강 첨가군이 미강 첨가군에 비하여 영양성분의 소화흡수율이 높은 것으로 나타남.

○ 제 1협동(경희대학교)

1) 저온성 김치의 메타지놈 분석

가) 메타지놈 sequencing

① 김치 샘플링

- 담금 직후 -1℃에서 5일 동안 보관한 김치
- 담금 직후 25℃에서 5일 동안 보관한 김치

② 메타지놈 분석

- 분석 지역: 16S rRNA V3~V4
- 분석 장비: Illumina사의 MiSeq 장비
- 군집 분석: ChunLab pipeline의 PKSSU4.0 DB

• 속 수준 군집 비교 결과

- 2개의 시료에서 모두 *Lactobacillus* 속이 각각 -1℃에서 74.83%, 25℃에서 71.58%로 가장 높은 비율을 차지하였고, 그 다음은 *Weissella*, *Leuconostoc*이 높은 비율로 존재하였고 이 3가지 속이 전체 91% 이상을 차지함.

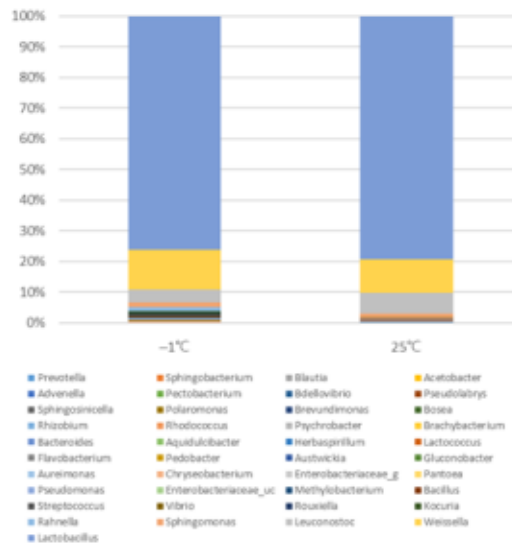


그림 1. 두 샘플의 속 수준 군집 비교 결과

• 종 수준 군집 비교 결과

- 2개의 시료에서 모두 *Lactobacillus sakei* group이 -1℃에서 74.64%, 25℃에서 57.53%로 가장 높은 비율을 차지하였고, *Weissella confusa* group은 각각 10.82%, 8.4%를 차지함. 25℃ 시료에서는 -1℃ 시료와 다르게 *L. plantarum* group, *L. brevis* group이 각각 7.4%, 6.0%으로 높게 나타남.
- 저온성 김치 유산균인 *Leuconostoc gelidum* group의 경우 -1℃ 김치에서는 0.31%, 25℃ 김치에서는 0.009%로 나타남.

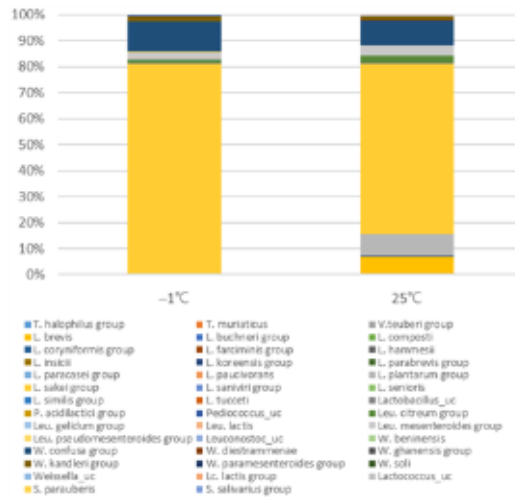


그림 2. 두 샘플의 종 수준 군집 비교 결과

## 2) 저온성 김치 유산균과 표준 미생물 염기서열 해독, 조립 및 주석처리

### 가) 분석방법

- ① Genome sequencing
  - 분석 장비: PacbioRS II
- ② 분석
  - Assembly 및 annotation: HGAP, prokka
  - Annotation 후 CGView를 이용하여 circular map 분석

### 나) *Leuconostoc inhae* PG7, *Leu. gelidum* CH3의 genome sequencing 및 분석

- *Leuconostoc inhae* PG7의 genome sequencing 결과
  - *Leu. inhae* PG7 genome sequencing은 Pacbio RS II 장비로 수행함. Sequencing 결과 filtering 후 total read수는 103,212개로 확인됨.
  - Assembly, annotation 결과 총 4개의 contig가 나왔고 1개의 chromosome과 3개의 plasmid DNA가 확인됨. Chromosome의 size는 1,965,201 bp, plasmid의 size는 37,916 bp, 23,621 bp, 22,490 bp로 각각 확인되었고, chromosome의 coding-gene 수는 1,933개, plasmid는 46개, 27개, 28개로 각각 확인됨.

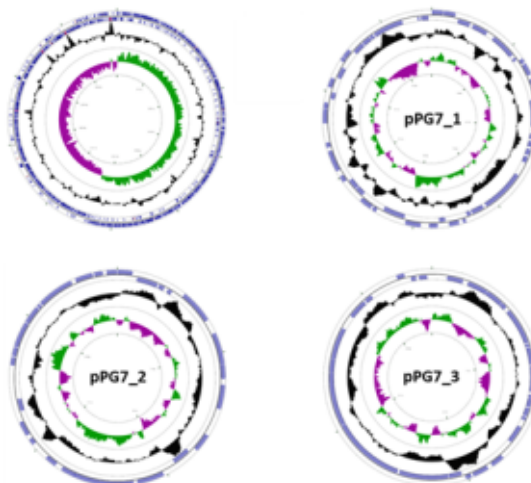


그림 3. *Leu. inhae* PG7의 genome map

- *Leu. gelidum* CH3의 genome sequencing 결과
  - *Leu. gelidum* CH의 genome sequencing은 Pacbio RSII 장비를 이용하여 수행함. Sequencing 결과 total read수 (filtering 후)는 174,991개로 확인됨.
  - Assembly 및 annotation 결과 총 3개의 contig가 나왔고, 1개의 chromosome과 2개의 plasmid DNA가 확인됨. Chromosome의 size는 1,798,911 bp, plasmid의 size는 35,056 bp, 29,973 bp로 각 확인되었고, chromosome의 coding-gene 수는 1,742개, plasmid는 43개, 37개로 각 확인됨.

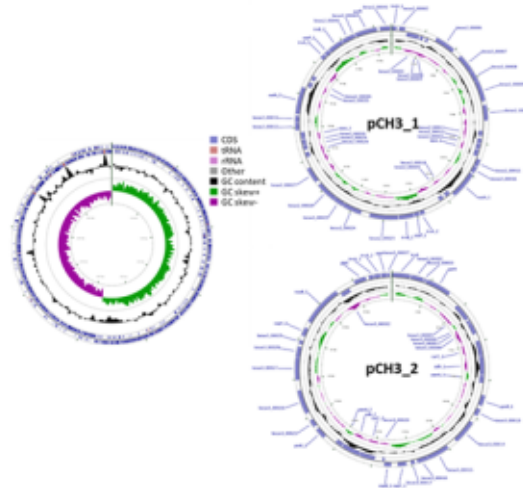


그림 4. *Leu. gelidum* CH3의 genome map

### 3) COG 카테고리에 따라 유전체 분류

#### 가) 분석방법

##### ① COG 분석

- Annotation 후 *Leu. inhae* PG7, *Leu. gelidum* CH3의 protein fasta file을 이용해 유전자를 기능별로 분류

##### ② RAST subsystem 분석

- RAST annotation 후 subsystem에 따라 유전자 분류

#### 나) 저온성 김치 유산균 유전체 COG 카테고리에 따라 분류

- *Leu. inhae* PG7, *Leu. gelidum* CH3의 유전체 COG 카테고리에 따른 분류 결과
  - General function prediction only에 속하는 유전자 비율이 가장 높았고, 다음은 amino acid transport and metabolism 관련 유전자가 가장 높았음.
- *Leu. inhae* PG7, *Leu. gelidum* CH3의 RAST subsystem에 따른 유전자 분류 결과
  - *Leu. inhae* PG7의 경우 amino acids and derivatives에 관련하는 유전자 비율이 가장 높았고, 다음은 protein metabolism 유전자 비율이 높았음.
  - *Leu. gelidum* CH3의 경우 protein metabolism에 관련하는 유전자 비율이 가장 높았고, 다음 carbohydrate와 amino acids and derivatives에 관련하는 유전자 비율이 높았음.

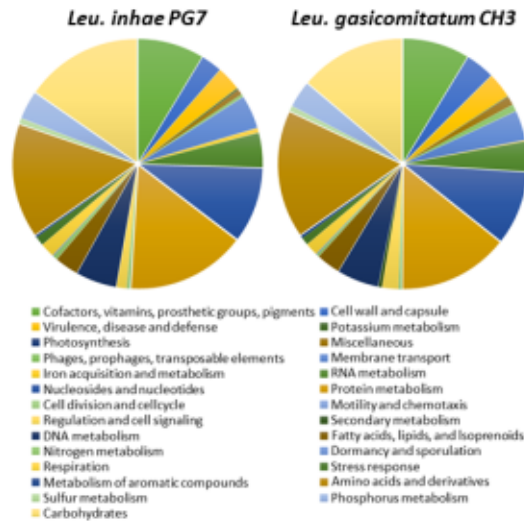


그림 5. RAST subsystem에 따른 유전자 분류 결과

#### 4) 항콜레스테롤능에 관여하는 유전자원 확보(추가실험)

가) *L. plantarum* EM의 항콜레스테롤 관여 유전자원 확보

① bile salt hydrolase 유전자

- 다른 *L. plantarum*과 bsh 유전자 비교
- *L. plantarum* EM의 bsh 유전자 발현

• *L. plantarum* EM의 항콜레스테롤 관여 유전자 분석 결과

- *L. plantarum* EM의 genome상에 bsh 유전자 5개가 존재하는 것을 확인함. 기존의 문헌 자료를 통해 이들 bsh 유전자가 항콜레스테롤능에 관여한다는 것을 확인함.
- *L. plantarum*들의 bsh 유전자를 분석한 결과 크게 4가지 형태의 bsh 유전자가 존재하는 것을 확인함. 특히 bsh 2번 유전자의 경우 *L. plantarum* EM의 genome에서 2개 조각의 단편으로 존재하는 것을 확인함.

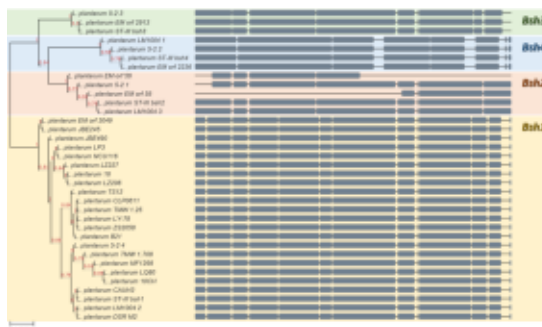


그림 6. *L. plantarum* EM의 항콜레스테롤 관련 유전자 분석 결과

- 2개 조각으로 존재하는 bsh 2번 유전자를 확인한 결과 EM 균주의 bsh 2번 유전자 사이에 stop codon이 존재하여 2개 조각으로 나뉘는 것을 확인함.
- EM 균주에 존재하는 서열을 바탕으로 단백질 사이즈를 예측한 결과 10~36 kDa으로 예상되었고, 이를 확인하기 위해 각 유전자 별로 cloning 진행하여 단백질을 발현함. 그 결과 1, 3, 4번 유전자는 예상하는 크기인 36 kDa에서 발현양이 증가되는 것을 확인하였고, 2번 유전자의 경우 나뉜 유전자가 20 kDa에서 발현되는 것을 확인함.

② EPS 합성 유전자

- *L. plantarum* EM의 genome상에 존재하는 EPS 합성 경로 확인

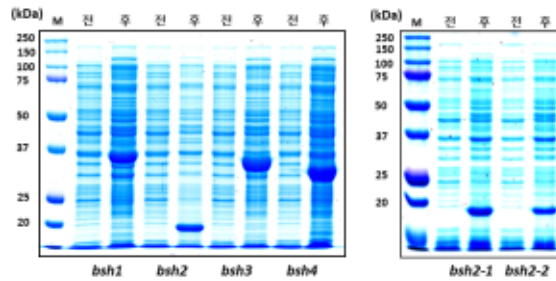


그림 7. 항콜레스테롤 관련 유전자 발현 결과

• *L. plantarum* EM의 exopolysaccharide 유전자 확인

- 사균에서 콜레스테롤 저해능을 나타내는 EM의 균주가 EPS 생성 능력이 있을 것으로 예측하고 EPS 생성 관련 유전자를 확인함.
- 그 결과 EM의 genome상에는 EPS를 생성하는 경로가 존재하는 것을 확인함.

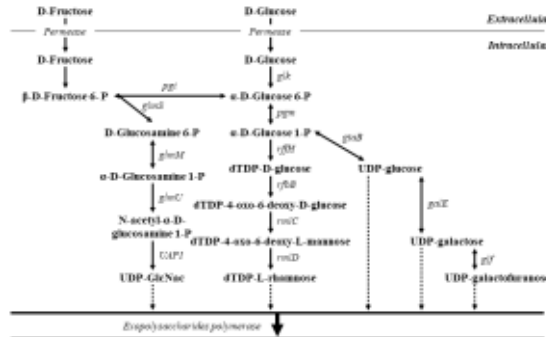


그림 8. *L. plantarum* EM에 존재하는 EPS 생성 경로

○ 제 3협동(CJ제일제당㈜)

1) 미강의 원료 검증

- 미강
  - 영양 성분 및 유해 인자(중금속 및 곰팡이독소) 검증
- 기질(Arginine) : CJ제일제당㈜, 교○, 미○○○○○○, 나○○○

2) 발효공정의 Scale-up 생산

- Scale-up 생산 테스트
- ① 아르기닌별 품질 특성 비교 (표 1)
  - 아르기닌별 발효 품질 차이가 있음.
  - 발효 속도: 교○>CJ제일제당㈜>미○○○○○○>나○○○
  - 아르기닌(나○○○ 제외) 국내 수급 이슈 없음
  - 발효 속도, 관능 평가, 가격, 수급 이슈 등 고려하여 전구체 기질로 CJ제일제당㈜ 아르기닌 선정.

표 1. 아르기닌별 품질 특성 비교

	교○	미○○○○○	CJ제일제당(주)	나○○○
함량(%)	99.36	99.13	99.26	99.36
pH	10.72	10.83	10.64	10.65
성상	연노란-흰색	밝은흰색	연노란-흰색	밝은흰색
원산지	미국	중국	인도네시아	미국
가격(원/kg)	40,000	16,000	15,500	23,000
오르니틴(g/L)	2.48	11.50	12.40	15.57
pH (발효건조물)	7.01	7.03	6.42	<6.0
발효속도	△	○	○	◎
관능평가 (전반 선호도)	◎	○	◎	△

② 발효시간 : 21, 25, 30 hr (표 2)

- CJ제일제당(주) 아르기닌 적용하여 25시간 발효 기준, 오르니틴 전환율 75% 확보

표 2. 발효시간에 따른 DB1 발효미강의 성분 분석

단위: g/L

분석 항목	미강	21 hr	25 hr	30 hr
Arginine	0.69	7.77	5.36	n.d
Ornithine	n.d	14.99	17.08	19.67
Citric acid	2.29	-	-	-
Malic acid	0.04	0.20	0.14	0.10
Succinic acid	0.18	1.01	1.48	1.61
Lactic acid	0.41	11.69	25.90	23.81
Formic acid	1.55	0.35	0.09	0.22
Acetic acid	0.39	4.88	7.33	5.27
Total	4.86	18.12	34.93	31.01

③ 가수량 : 50%, 60%, 65%, 70%, 80% (표 3)

- 현장 적용시, 고가수량으로인해 부피가 높아지고 멸균시간 및 건조시간이 오래 걸림.  
→ 가수 60%(w/w) 이상 첨가시, 오르니틴 전환율 75% 이상 확보

표 3. 가수량에 따른 DB1 발효미강의 아르기닌 및 오르니틴 함량

단위: g/L

분석 항목	가수량				
	50%	60%	65%	70%	80%
Arginine	15.74	4.90	-	-	-
Ornithine	3.10	14.70	19.50	20.18	20.99

### 3) Pilot 발효 소재 생산 시스템 구축

#### 가) 가공공정 확립

- 반복생산
  - 2 kg, 10회
  - 10 kg, 3회
  - 50 kg, 5회
- 가공 공정 확립



- 건조 및 사균/생균 소재화
  - ① 목적: 수분 감량
  - ② 설비: 열풍건조기
  - ③ 지표: 건조 후 수분 10% 미만
  - ④ 주의점: 온도/시간 조건에 따라 과열시 탄맛  
건조시간에 따른 오르니틴 생성량 확인
- 분말화
  - ① 목적: 입도 조정
  - ② 설비: 분쇄기
  - ③ 지표: 입도
- 생산 공정도(그림 1)
  - Mass balance 기반 수율 89.6% 확보

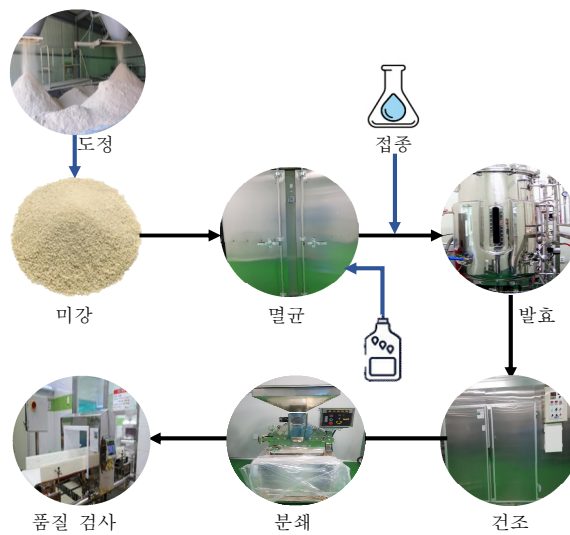


그림 1. 발효미강의 생산 공정도



그림 2. Scale-up 양산 테스트



그림 3. 미강과 DB1 발효미강의 사진

나) 지표성분 및 영양소 분석

• 품질 검증

- 미강과 DB1균주를 이용하여 발효한 발효미강의 지표 성분 및 영양소 분석 (표 4, 5, 6)

표 4. 미강과 DB1 발효미강의 품질 분석

영양 성분(%)		
항목	미강	DB1 발효미강
탄수화물	46.0	44.8
조단백질	13.9	23.7
조지방	20.6	22.0
식이섬유	27.4	31.9
수분	11.4	2.0
회분	7.9	8.6
관능 평가	부드럽고 고소하나 떫은 맛이 느껴짐	후미에 약간의 씹싸름한 맛. 전반적으로 맛이 부드럽고 고소함.

표 5. 미강과 DB1 발효미강의 유리아미노산 분석 결과 (지표성분)

유리아미노산 함량(mg/L)		
항목	미강	DB1 발효미강
Arginine	691.3	5,360
Ornithine	4.8	17,080

표 6. 미강과 DB1 발효미강의 유기산 분석 결과

유기산 함량(g/L)		
항목	미강	DB1 발효미강
Total*	4.9	34.9

\* Total : Citric Acid, Malic Acid, Succinic Acid, Lactic Acid, Formic Acid, Acetic Acid

다) 안정성 분석

- 온도별, 시간별 타겟 지표 성분 변화 분석을 통한 유통기한 산정.
  - 유통 기한이 설정된 기존 유통 제품과 유형, 성상, 포장 형태, 유통온도, 멸균 방법이 유사하여 유통기한 설정 테스트 대체함.
  - CJ미강발효제품의 법적 기준 및 자가 관리기준을 바탕으로 이화학적(수분),

미생물학적(대장균, 대장균군), 관능학적(성상) 평가 지표 설정하여 실측 테스트 진행 중.

라) 안전성 분석(품질 검증)

- 품질 검증
  - 안전성 분석: 법적 규격 미생물 및 화학(중금속, 농약 등)
  - CJ제일제당(주) 내부 신규 원료 등록을 위한 안전 Gate(자가 및 법적 규격) 검증 완료

마) 원료 양산화

※ 조기 성과 창출

- 원료 소재화
  - 품목제조보고서 등록(2019.07.26)(그림 4)
  - 제품명: CJ유산균발효미강분말
  - 유통기한: 2년



그림 4. CJ제일제당(주) 유산균발효미강분말의 품목제조보고서

바) 제품 출시

※ 조기 성과 창출

- 제품 출시(그림 5)
  - 발효효소 베이직 제품 적용화(2019년 10월)



그림 5. CJ제일제당(주) 유산균발효미강분말의 적용화 제품

## < 3차년도 >

### ○ 제 1세부(조선대학교)

#### • 발효공정의 최적화(미강에서 유산균 증식)

##### 1) 균주

- 개발된 기능성 김치 유산균 *L. plantarum* EM(콜레스테롤 저하능)

##### 2) 영양원

###### ① 식용성분

- 종류: A, B
- 농도: 1-5%
- 조건: 20%(w/v) 미강 + 식용성분 2종 (각 1, 2, 3, 4, 5%)  
※ 기술산업화의 정보 보호를 위해 성분명 비공개
- 결과: 24시간 생균수 측정 결과, 식용성분 A 3% 첨가구간에서 가장 높은 생균수(약 9.7 log CFU/ml)를 나타냄. 48시간 생균수 측정 결과, 식용성분 A 2%와 3% 첨가구간에서 가장 높은 생균수(약 9.5 log CFU/ml)를 나타냄(Fig. 1). 이때 향세균 활성은 200 AU/ml로 실험실용 배지인 MRS와 동일한 활성을 나타냄. 향진균 활성은 100AU/ml로 MRS(800) 대비 1/8 낮은 활성을 나타냄.

☞ 최적 식용성분: 식용성분A 3% 선정

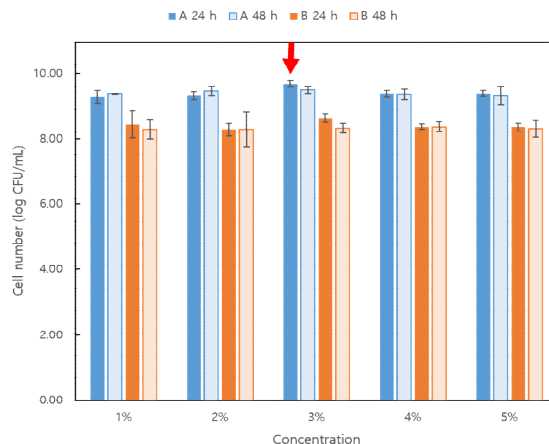


Figure 1. 식용성분 농도에 따른 *L. plantarum* EM의 생육

###### ② 탄소원

- 종류: glucose, maltose, sucrose, fructose
- 농도: 1-5%
- 조건: 20%(w/v) 미강 + 식용성분 A 3% + 탄소원 4종 (각 1, 3, 5%)
- 결과: 24시간 생균수 측정 결과, glucose 1%를 첨가한 구간에서 가장 높은 생균수(약 9.8 log CFU/ml)를 나타냄(Fig. 2). 이때 향세균 활성은 200 AU/ml를 나타내었으며 향진균 활성은 첨기전보다 2배 높은 200 AU/ml를 나타냄.

☞ 최적 탄소원: Glucose 1% 선정

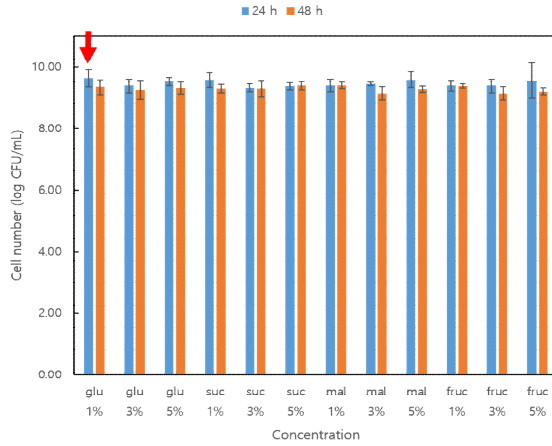


Figure 2. 탄소원에 따른 *L. plantarum* EM의 생육

③ 질소원

- 종류: soytone, yeast extract, beef extract, tryptone, peptone
- 농도: 1~3%
- 조건: 20%(w/v) 미강 + 식용성분 A 3% + Glucose 1% + 질소원 5종 각 1, 2, 3%
- 결과: 24시간 생균수 측정 결과, 질소원 5종 모두 약 9.3~9.6 log CFU/ml를 나타냄(Fig. 3). 이는 질소원 첨가 전과 후의 생균수 값이 유의적으로 차이를 나타내지 않으므로 질소원은 첨가하지 않기로 함. 항세균과 항진균 활성 측정 결과, 첨가 전과 첨가 후에 동일한 활성을 나타냄.

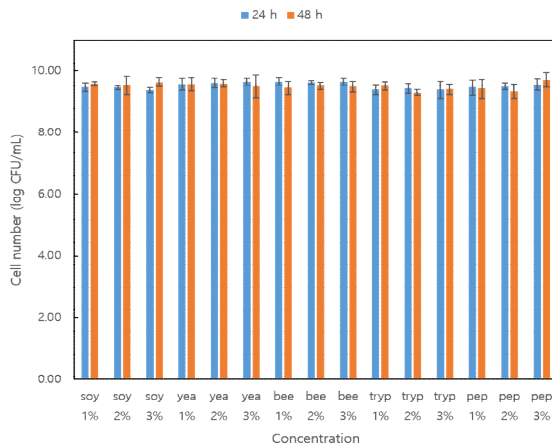


Figure 3. 질소원에 따른 *L. plantarum* EM의 생육

④ 기타 성분

- 종류: 식용 가능한 무기질 및 비타민 12종 단독 혹은 혼합 첨가
- a: 성분 ㉠ 0.02~0.05%, b: 성분㉡ 0.02~0.05%, c: 성분㉢ 0.02~0.05%, d: 성분㉣ 0.5~2%, e: 성분㉤ 0.5~2%, f: 성분 a+b, g: 성분 a+c, h: 성분 a+d, i: 성분 a+e, j: 성분 b+c, k: 성분 b+d, l: 성분 b+e, m: 성분 c+d, n: 성분 c+e, o: 성분 d+e
- 조건: 20%(w/v) 미강 + 식용성분 A 3% + Glucose 1% + 기타 성분
- ※ 기술산업화의 정보 보호를 위해 성분명 비공개
- 결과: 24시간 생균수 측정 결과, 무기질 및 비타민 각 첨가구 모두 약 9.2~9.6 log CFU/ml로 첨가 전과 후의 생균수 값에는 차이가 없음(Fig. 4). 항세균 활성 및 항진균 활성 측정 결과 h 구간 에서 MRS와 동일한 항세균 최대활성(200 AU/ml)와 항진균 최대활성(800 AU/ml)을 나타냄.

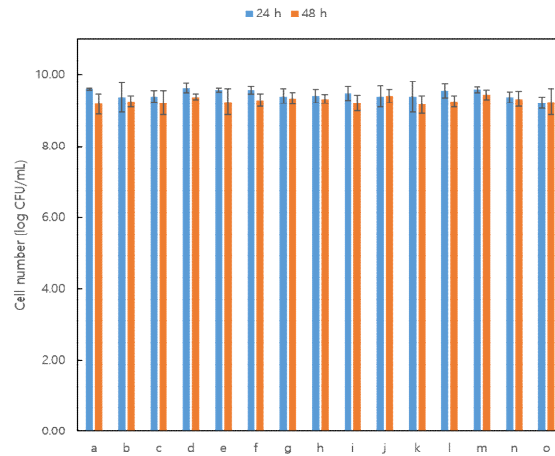


Figure 4. 기타성분에 따른 *L. plantarum* EM의 생육

### 3) 발효 초기 pH의 최적화

- 조건: 20%(w/v) 미강 + 식용성분 A 3% + Glucose 1% → pH 조정(pH 4.0-7.0)
- 결과: 24시간 발효 기준 초기 pH 6.0, 6.5, 7.0 구간에서 가장 높은 생균수(약 9.8 log CFU/ml) 를 나타내었으며 48시간에서 가장 높은 생균수 (약 9.5-9.6 log CFU/ml)를 유지함(Fig. 5).

☞ 최적 발효 초기 pH: pH 6.0-7.0 선정

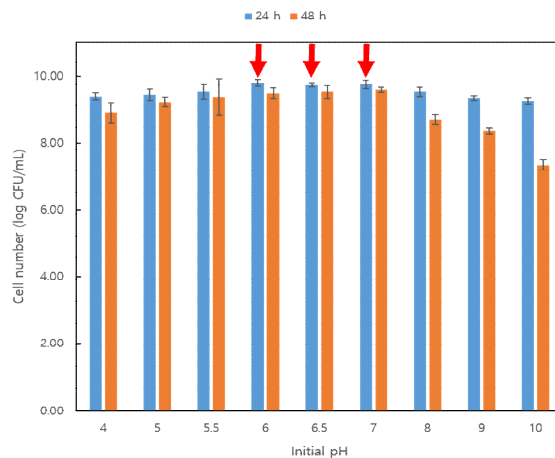


Figure 5. 미강의 발효 초기 pH에 따른 *L. plantarum* EM의 생육

### 4) 발효 온도의 최적화

- 조건: 20%(w/v) 미강 + 식용성분 A 3% + Glucose 1% → pH 6.0-7.0 → 25°C, 30°C, 37°C
- 결과: 24시간 발효 기준 30°C에서 9.7 log CFU/ml로 가장 높은 생균수를 나타냄(Fig. 6).

☞ 최적 발효 온도: 30°C 선정

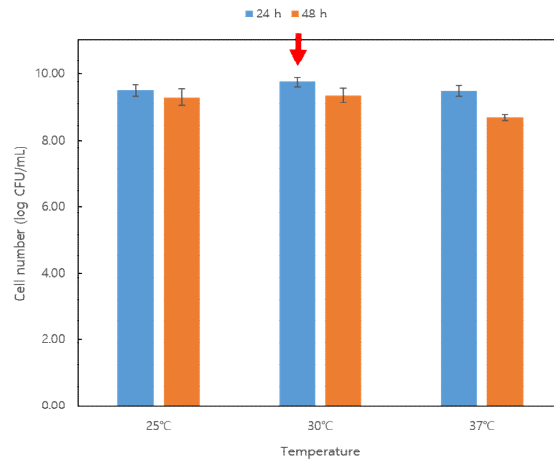


Figure 6. 미강의 발효 온도에 따른 *L. plantarum* EM의 생육

• 최적 발효 공정 조건에서 미강 발효

1) 균주

- *L. plantarum* EM: 콜레스테롤 제거능

2) 최적화 조건에서 미강 발효

- 미강 첨가량: 20%(w/v)
- 호화 조건: Autoclave(121 °C, 15분)
- 영양원 조건: 식용성분A 3% + Glucose 1%
- 종균 접종량: *L. plantarum* EM 1%(w/v)
- 발효 초기 pH: pH 6.0-7.0
- 발효 시간 및 온도: 48시간, 30°C

3) 발효 미강 제품의 특성 분석

- 저장기간: 0-12개월
- 저장온도: 4°C, 20°C
- 미강 발효물
  - W. koreensis* DB1(오르니틴 생성균주)
  - L. plantarum* EM(콜레스테롤 저하능)

① 미생물학적 특성

- 저장기간에 따른 미생물 변화

- 발효 균주

: *W. koreensis* DB1 미강 발효물의 경우, 제조 직후(열풍 건조 직후) *W. koreensis* DB1이 검출되지 않았으며 저장 기간 동안에도 검출되지 않음. *L. plantarum* EM 미강 발효물의 경우, 제조 직후에는 약 100 CFU/g의 *L. plantarum* EM이 검출되었으나 이후 저장시료에서는 검출되지 않음.

- 유해 균주 및 일반 세균

: *W. koreensis* DB1 미강발효물과 *L. plantarum* EM 미강발효물 모두 유해 균주 및 일반세균(곰팡이, 효모 포함)이 검출되지 않음(Fig. 7).

※ 식품 공전 “식품별 기준 및 규격”에 따라 기타 농산가공품류 기준은 아래와 같음.

15-7. 기타 농산가공품류 규격

- (1) 색상: 적합하여야 한다.
- (2) 이물: 적합하여야 한다.
- (3) 산가: 4.0이하(참깨분, 대두분에 한한다)  
5.0이하(유탕·유처리식품에 한한다)
- (4) 과산화물가: 60이하(유탕·유처리식품에 한한다)
- (5) 타르색소: 검출되어서는 아니된다.
- (6) 대장균군: n=5, c=1, m=0, M=10 (살균제품에 한한다)
- (7) 세균: n=5, c=0, m=0(멸균제품에 한한다)
- (8) 대장균: n=5, c=1, m=0, M=10(비살균 과채 가공품과 더 이상 가공, 가열조리를 하지 않고 그대로 섭취하는 비살균 제품에 한한다)
- (9) 총 아플라톡신( $\mu\text{g}/\text{kg}$ ): 15.0이하(팝콘용옥수수 가공품에 한한다)

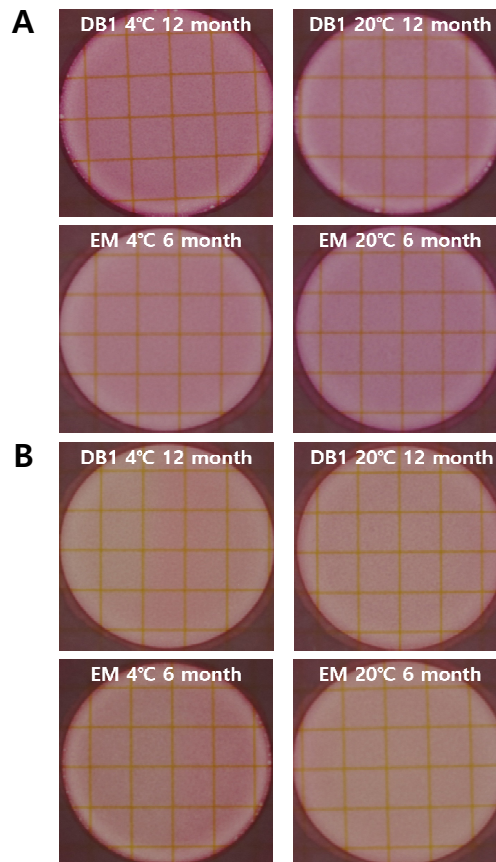


Figure 7. *W. koreensis* DB1 미강발효물(DB1)과 *L. plantarum* EM 미강발효물(EM)의 대장균(A), 대장균군(B) 검출 결과

② 산패 여부

- 저장기간에 따른 산패 여부

– 과산화물가

: *W. koreensis* DB1 미강발효물의 경우, 제조 직후 약 2.0 meq/kg으로 나타남. 저장 12개월 동안 4°C에서는 약 2.4-3.3 meq/kg를 유지 하였고 20°C에서는 약 2.9-5.7



meq/kg를 유지함. *L. plantarum* EM 미강발효물의 경우, 제조 직후 약 2.1meq/kg으로 나타남. 저장 6개월 동안 4℃에서는 약 2.0–2.7 meq/kg 정도를 유지하였고 20℃에서는 약 3.1–4.5 meq/kg을 유지함(Fig. 8). He(2020)에 따르면 생미강의 과산화물가는 초기 1.72 meq/kg이며 저장 8주 만에 4℃에서는 19.06 meq/kg으로 37℃에서는 58.19 meq/kg으로 증가함(Ref. 1). 또한, Mujahid(2005) 보고에서도 생미강의 초기 과산화물가는 약 2.3 meq/kg이며 상온에서 저장 345일에는 약 32.8 meq/kg으로 증가함(Ref. 2). 이에 비해 본 연구에서의 미강발효물(DB1, EM)은 저장 후 과산화물 증가가 현저히 낮게 나타남을 알 수 있음.

(Ref. 1. Storage characteristics of infrared radiation stabilized rice bran and its shelf-life evaluation by prediction modeling(2020) J Sci Food Agric, 100:2638–2647;  
 Ref. 2. Effect of various processing techniques and different levels of antioxidant on stability of rice bran during storage(2005) J Sci Food Agric, 85: 847–852)

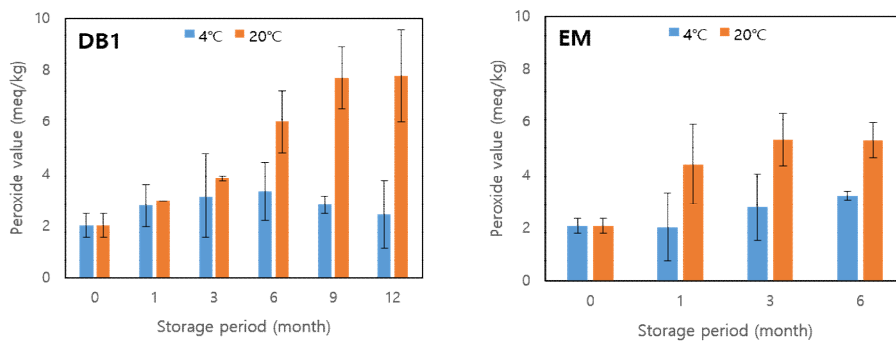


Figure 8. 저장기간에 따른 미강발효물의 과산화물가

– 산가

: *W. koreensis* DB1 미강발효물의 경우, 제조 직후 시료는 약 2.8로 나타남. 4℃에서 12개월 저장기간 동안 약 2.9–3.6 정도를 비슷한 수준을 유지함. 20℃, 12개월 저장기간 동안에는 약 3.4–4.4 정도로 소폭 증가함. *L. plantarum* EM 미강발효물의 경우, 제조 직후 시료는 약 3.1로 나타남. 4℃에서 6개월 저장기간 동안 약 3.2–3.6 정도를 유지하였고 20℃에서는 약 3.3–3.9 정도를 유지함(Fig. 9). Yan(2004)에 따르면 현미를 상온에 저장시 초기 산가는 약 1.93으로 나타났으며 상온 저장(100일)기간 동안 최대 2.98까지 증가하였다가 소폭 감소함(Ref. 3).

(Ref. 3. Development of an automatic packer using vacuum packaging and its effects on the rice quality(2004) J Bio Eng, 29(20): 131–140)

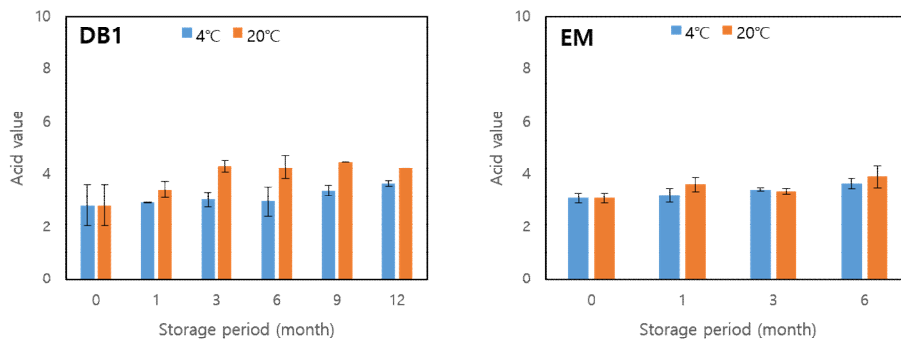


Figure 9. 저장기간에 따른 미강발효물의 산가

☞ 미강발효물의 과산화물가, 산가 모두 4℃ 저장 12개월까지 안정하게 유지됨.

### ③ 기능성 평가

#### •저장기간에 따른 기능성

##### - *W. koreensis* DB1

: 4°C와 25°C에서 저장한 시료의 오르니틴 함량을 TLC 분석을 통해 확인 결과(Fig. 10), 각 온도 및 기간별 시료의 오르니틴 함량은 12개월 동안 유지되는 것을 확인함.

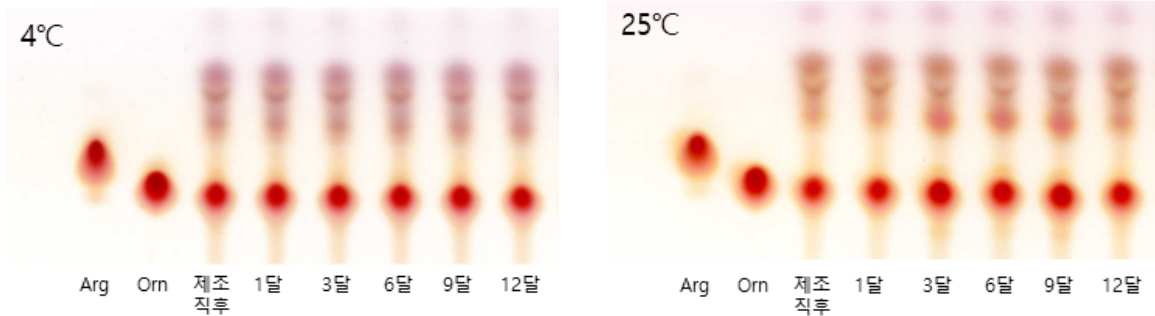


Figure 10. 저장기간에 따른 오르니틴 TLC 결과

##### - *L. plantarum* EM

- 생균: 0.5% oxgall 실험 결과, EM 생균과 EM 미강발효물의 콜레스테롤 저하능은 각각 82.9%, 81.1%로 유사하게 나타남. 반면 미강의 경우 1.2%로 낮은 콜레스테롤 저하능을 나타냄. 0.5% TDCA 실험 결과도 마찬가지로 EM 생균과 EM 미강발효물에서는 높은 콜레스테롤 저하능을 나타냄(Fig. 11).
- 사균: 0.5% oxgall 실험 결과, EM 사균은 32.6%의 콜레스테롤 저하능을 나타내었으며 EM 미강발효물은 67.1%의 콜레스테롤 저하능을 나타냄으로서 약 2.1배 더 높은 효과를 나타냄(Fig. 12).
- (열풍)미강발효물의 저장기간 중 콜레스테롤 저하능을 살펴본 결과, Figure 13과 같이 6개월 저장 시료에서도 제조 직후의 시료와 동일한 콜레스테롤 저하능을 지님을 확인함.

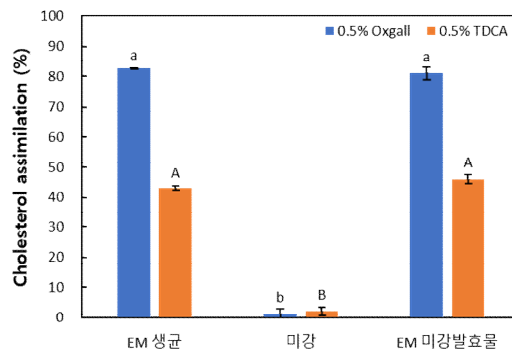


Figure 11. 생균 조건에서의 콜레스테롤 저하능

Values with different superscripts within columns are significantly different by Duncan's multiple range test at  $p < 0.05$

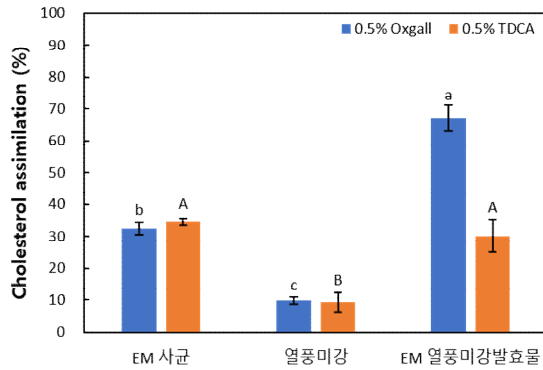


Figure 12. 사균 조건에서의 콜레스테롤 저하능

Values with different superscripts within columns are significantly different by Duncan's multiple range test at  $p < 0.05$

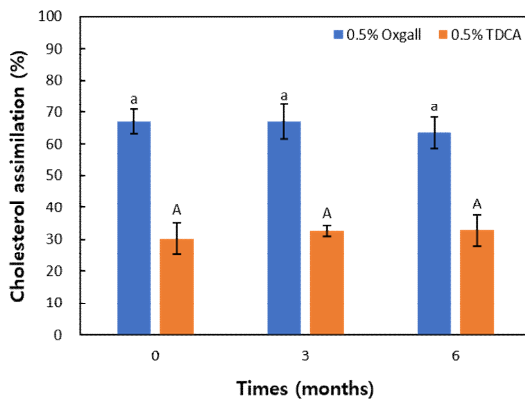


Figure 13. 저장기간에 따른 EM 미강발효물(열풍건조)의 콜레스테롤 저하능

Values with different superscripts within rows are significantly different by Duncan's multiple range test at  $p < 0.05$

• 저장기간에 따른 관능적 특성

– *W. koreensis* DB1

: 제조직후, 4°C 저장 6개월, 12개월 시료의 관능검사 결과, 저장기간에 따른 맛이나 향의 변화는 거의 관찰되지 않았으며, 다만 색이 짙어짐을 확인함(Table 1).

Table 1. 저장기간에 따른 *W. koreensis* DB1의 미강발효물 관능검사

	제조직후	저장 6개월	저장 12개월
신맛	3.0±0.0 <sup>a</sup>	3.0±0.0 <sup>a</sup>	3.0±0.0 <sup>a</sup>
쓴맛	1.7±0.5 <sup>a</sup>	1.7±0.5 <sup>a</sup>	1.7±0.5 <sup>a</sup>
짠맛	2.2±0.4 <sup>a</sup>	2.2±0.4 <sup>a</sup>	2.2±0.4 <sup>a</sup>
고소한맛	4.5±0.5 <sup>a</sup>	4.5±0.5 <sup>a</sup>	4.5±0.5 <sup>a</sup>
불쾌취	1.3±0.5 <sup>a</sup>	1.3±0.5 <sup>a</sup>	1.3±0.5 <sup>a</sup>
조식감	3.8±0.4 <sup>a</sup>	3.8±0.4 <sup>a</sup>	3.8±0.4 <sup>a</sup>
산패취	5.0±0.0 <sup>a</sup>	5.0±0.0 <sup>a</sup>	5.0±0.0 <sup>a</sup>
밝기	3.3±0.5 <sup>a</sup>	2.7±0.8 <sup>ab</sup>	1.8±1.0 <sup>b</sup>
기호도	4.5±0.5 <sup>a</sup>	4.5±0.5 <sup>a</sup>	4.5±0.5 <sup>a</sup>

Values with different superscripts within columns are significantly different by Duncan's multiple range test at  $p < 0.05$

○ 제 2세부(조선대학교)

1) 개발제품 추출물이 지방세포 분화에 미치는 영향 및 그에 따른 유전자 발현 변화 확인

가) 시료 및 처리

① 실험 1

- 시료: *L. plantarum* EM
- 제1세부과제로부터 제공받음
- *L. plantarum* EM cytoplasmic fractions  
: *L. plantarum* EM의 cell 부위만 동결 건조한 후 멸균 증류수로 희석하여 sonication한 다음 원심 분리하여 suspension을 모아 시료로 사용
- 시료 농도별 DMSO로 희석하여 사용

② 실험 2

- 시료: 미강원물 및 *L. plantarum* EM으로 발효한 발효미강제품
- 제1세부과제로부터 제공받음
- 미강 및 발효미강제품 추출물  
: 미강 및 발효미강 제품은 에탄올 추출하여 동결 건조하여 분말로 만들어 시료로 사용
- 시료 농도별 DMSO로 희석하여 사용

나) 3T3-L1 세포주의 세포배양과 분화유도

① 세포

- mouse fibroblast 3T3-L1 cells

② 세포배양

③ 지방세포 분화유도

• 세포배양

- *in vitro* 연구를 위해 마우스 3T3-L1 세포주를 Fig. 1과 같은 실험 스케줄에 따라 3T3-L1 preadipocytes 세포배양과 분화 유도를 확립하여 실험을 실시

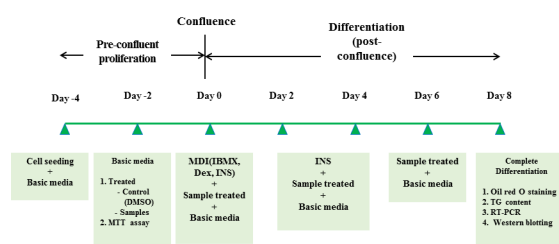


Figure 1. Process of adipocytes differentiation in 3T3-L1 cells.

다) 세포생존 및 독성평가

① 세포생존률 측정

- MTT assay

② 처리군과 처리시간

- 실험처리시간: 24시간 혹은 48시간
- 실험 1: 처리군
  - i) 대조군: 무첨가군
  - ii) 시료군: 균주(0-80 µg/mL)
- 실험 2: 처리군
  - i) 대조군: 무첨가군

ii) 시료군: 미강 혹은 발효미강 추출물(0,-2000 µg/mL)

- 실험 1: *L. plantarum* EM 균주 cytoplasmic fractions 독성 평가(Fig. 2)
  - 균주 cytoplasmic fractions을 24시간 혹은 48시간 0-80 µg/mL 농도로 전처리하였을 경우 40 µg/mL 농도까지는 98% 이상 세포 생존율이 확인되었으며, 80 µg/mL 농도에서는 24시간 혹은 48시간 모두 미처리군에 비하여 유의성 있게 세포 생존율이 저하되어 세포 독성이 나타남

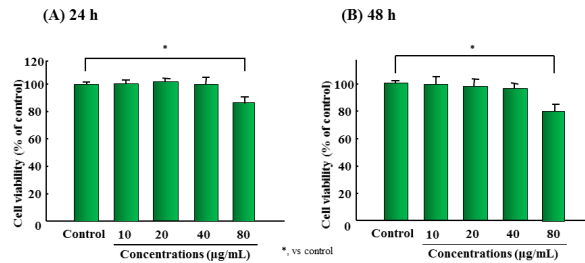


Figure 2. Cytotoxic effects of *L. plantarum* EM cytoplasmic fraction on 3T3-L1 cells.

- 실험 2: 미강과 발효미강 추출물의 독성평가(Fig. 3)
  - 미강과 발효미강 추출물을 24시간 혹은 48시간 0-2,000 µg/mL 농도로 전처리하였을 때 2,000 µg/mL 농도에서는 24시간 혹은 48시간 모두 미처리군에 비하여 유의성 있게 세포 생존율이 저하되어 세포 독성이 나타남

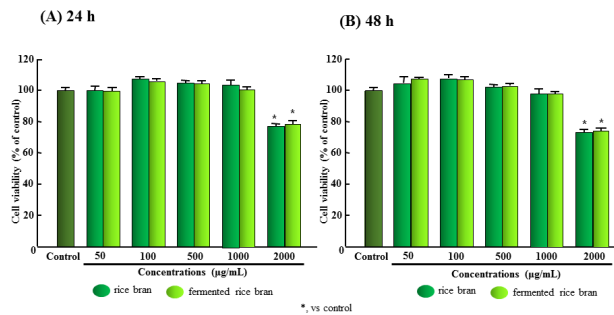


Figure 3. Cytotoxic effects of rice bran and fermented rice bran on 3T3-L1 cells.

☞ 추후 *L. plantarum* EM 균주 cytoplasmic fractions 혹은 미강 및 *L. plantarum* EM 균주로 발효한 발효 미강 추출물은 독성이 나타나지 않은 농도에서 지방세포 분화 실험을 진행하였음

라) 지방축적량 측정

- ① Oil-Red O 염색
- ② 중성지방 함량 분석

- 실험 1: *L. plantarum* EM 균주 cytoplasmic fractions의 지방축적량(Fig. 4)
  - Oil-Red O 염색에 의한 지방구 형성: EM 균주 cytoplasmic fractions을 독성이 나타나지 않은 농도(0, 10, 20, 40 µg/mL)에서 전처리한 후, Oil-Red O 염색을 실시하여 살펴본 결과 균주 cytoplasmic fractions이 세포내 지방구 생성을 농도 의존적으로 감소시키는 것을 육안으로 확인함
  - 세포 내 중성지방 함량: EM 균주의 전처리로 인하여 중성지방 함량도 농도 의존적으로 감소 되었으며, 20 µg/mL 농도 이상에서는 유의적인 차이가 나타남

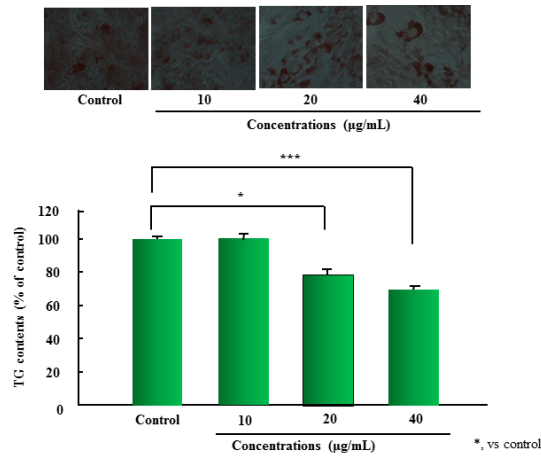


Figure 4. Inhibitory effects of *L. plantarum* EM cytoplasmic fraction on lipid accumulation in 3T3-L1 cells.

- 실험 2: 미강과 발효미강 추출물의 지방축적량(Fig. 5)
  - Oil-Red O 염색에 의한 지방구 형성: 미강 혹은 발효 미강 추출물 모두 독성이 나타나지 않은 농도(100 혹은 200 µg/mL) 범위에서 전처리한 후 Oil-Red O 염색에 의한 지방구 생성을 살펴본 결과, 농도 의존적으로 감소하는 것을 육안으로 확인하였으며, 발효미강 추출물 이 미강추출물에 비하여 지방구 생성이 억제 되었음
  - 세포 내 중성지방 함량: 미강 및 발효미강 추출물의 중성지방 함량이 모두 미처리 군에 비하여 농도 의존적으로 감소하였으며, 50 혹은 100 µg/mL 농도 모두에서 발효미강 추출물이 미강 추출물에 비하여 유의하게 중성지방 농도가 저하되었음

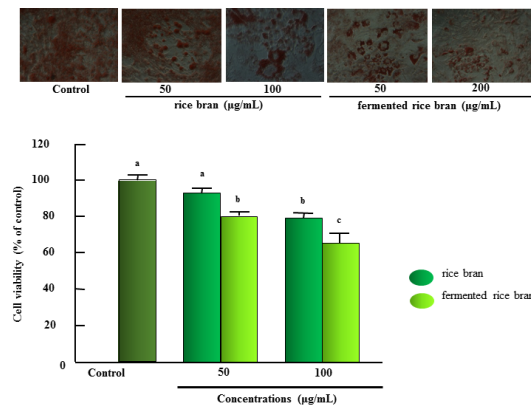


Figure 5. Inhibitory effects of rice bran and fermented rice bran on lipid accumulation in 3T3-L1 cells.

- ☞ *L. plantarum* EM 균주 cytoplasmic fractions 혹은 미강 및 발효미강 추출물 모두 독성이 나타나지 않은 농도에서 전처리하였을 경우 지방세포의 지방구 형성과 중성 지방 함량을 모두 저하시킴
- ☞ 발효미강 추출물은 미강 추출물에 비하여 지방축적 억제효과가 우수하게 나타남

마) 지방분화 관련 유전자 발현

- ① Total RNA 추출
- ② RT-PCR
- ③ Adipogenic transcription factors
  - C/EBP $\gamma$  gene expression
  - SREBP-1c gene expression

- 실험 1: *L. plantarum* EM 균주 cytoplasmic fractions(Fig. 6-7)
  - 지방세포 분화에 관련된 전사인자에 미치는 영향(Fig. 6)
    - : C/EBP $\gamma$ 와 SREBP-1c와 같은 adipogenic transcription factor 유전자 발현은 균주 cytoplasmic fractions을 10, 20, 40  $\mu\text{g}/\text{mL}$  농도로 전처리하였을 때 농도 의존적으로 감소 하는 경향을 보여 C/EBP $\gamma$  mRNA는 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  농도로 처리 하였을 경우부터 유의하게 감소 하였으며, SREBP-1c mRNA는 40  $\mu\text{g}/\text{mL}$  농도에서 만 유의하게 저하되었음

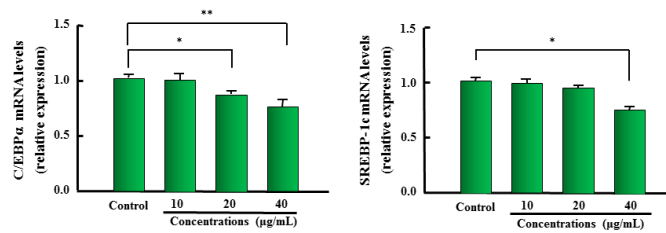


Figure 6. Effects of *L. plantarum* EM cytoplasmic fraction on mRNA expression of adipogenic transcription factors in 3T3-L1 cells.

- 지방세포 분화 시 lipogenic gene의 발현 변화(Fig. 7)
  - : 지방조직 내 지방합성관련 주요 조절 효소인 FAS와 ACC 유전자 발현도 *L. plantarum* EM 균주 cytoplasmic fractions을 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  농도로 처리 하였을 경우부터 유의하게 감소하였음

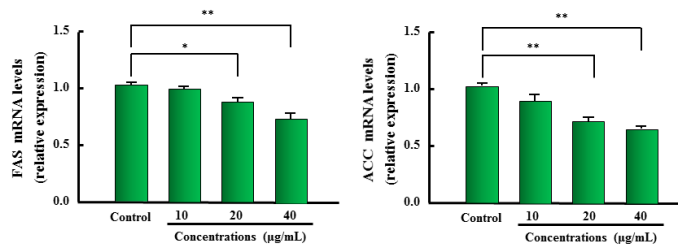


Figure 7. Effects of *L. plantarum* EM cytoplasmic fraction on mRNA expression of lipogenic enzymes in 3T3-L1 cells.

- 실험 2: 미강과 발효미강 추출물(Fig. 8-9)
  - 지방세포 분화에 관련된 전사인자에 미치는 영향(Fig. 8)
    - : C/EBP $\gamma$ 와 SREBP-1c 유전자 발현이 미강 및 발효미강 추출물 처리로 모두 농도 의존적으로 저하되었으며, 발효미강 추출물이 미강 추출물에 비하여 유전자 발현 억제 효과가 크게 나타남

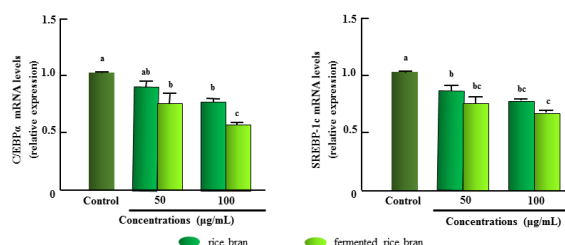


Figure 8. Effects of rice bran and fermented rice bran on mRNA expression of adipogenic transcription factors in 3T3-L1 cells.

- 지방세포 분화 시 lipogenic gene의 발현 변화 (Fig. 9)
  - : FAS와 ACC mRNA 발현이 미강 및 발효미강 추출물 전처치로 모두 농도 의존적으로 저하되었으며, FAS와 ACC mRNA 수준 모두 발효미강 추출물이 미강 추출물에 비하여 유의하게 저하됨

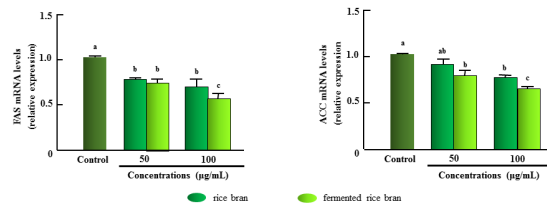


Figure 9. Effects of ice bran and fermented rice bran on mRNA expression of lipogenic enzymes in 3T3-L1 cells.

- ☞ *L. plantarum* EM 균주 cytoplasmic fractions 혹은 미강 및 발효미강 추출물은 지방세포 분화 전사인자 및 지방합성관련 효소의 유전자 발현을 억제시킴.
- ☞ 발효미강 추출물은 미강 추출물에 비하여 지방 세포 분화 억제효과가 더 우수한 것으로 나타남

## 2) 동물실험을 통한 개발제품이 콜레스테롤 저하효과와 항비만 효과 평가

가) 시료, 실험동물, 실험 설계 및 동물사육

### ① 시료

- 균주: *L. plantarum* EM
- 생 미강
- 발효 미강(2종): *L. plantarum* EM 발효 미강, *W. koreensis* DB1 발효 미강
- 발효미강 혼합물

### ② 실험동물

- C57BL/6J 마우스
- 수컷 70마리

### ③ 실험기간

- 적응기간: 1주일
- 본실험 기간: 12주

### ④ 실험군: 7군

- 정상식이군: 1군
- 고지방고콜레스테롤 식이군: 6군

### • 실험동물 사육 및 실험설계

- 실험동물은 생후 6주령 웅성 C57BL/6J 마우스 70마리를 구입하여 조선대학교 실험동물센터에서 1주간 고행사료로 적응시킨 후 난괴법에 따라 각 처리군 당 10마리씩 분리하여 사육
- 사양조건: 물은 제한 없이 공급하였고, 식이는 동일 에너지 섭취를 위하여 Pair-feeding으로 급여하였으며, 조명은 12시간 주기(08:00-20:00)로 조절하였고, 사육실 내 온도는  $18 \pm 2^\circ\text{C}$  유지하였음

### • 체중과 식이섭취량

- 체중은 매주 일정한 시간에 측정하였으며, 실험 식이는 고지방고콜레스테롤식이에 준한 제한 식이를(Pair-feeding) 급여하였음.
- 실험설계는 Fig. 10과 같이 실시하였음



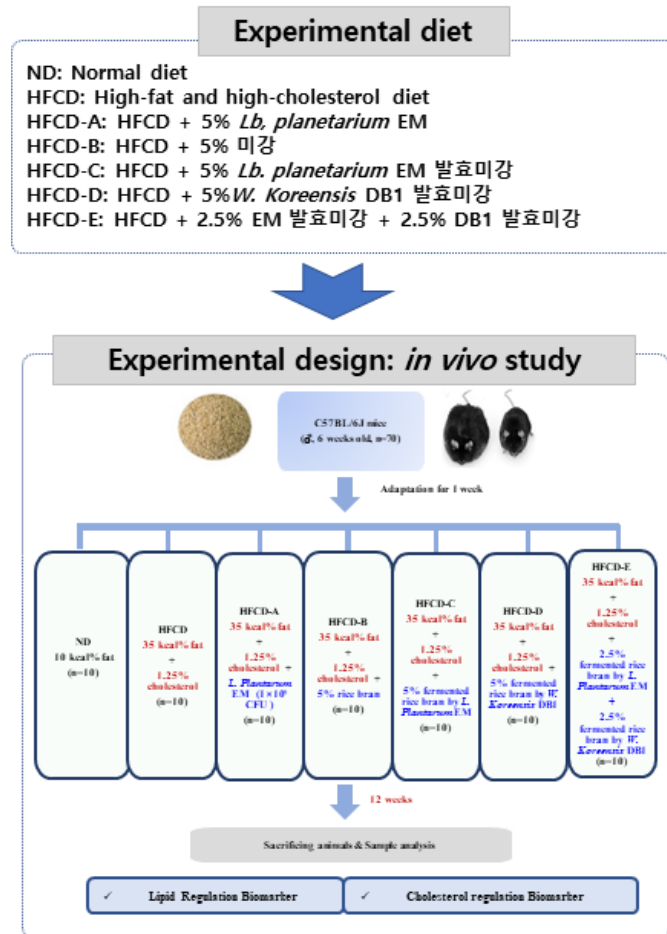


Figure 10. Experimental design

- 실험군: 7군
    - 정상식이군(ND): 1군
    - 고지방고콜레스테롤(HFCD)군: 6군
- HFCD군
- HFCD-A군(HFCD + EM 균주 첨가)
  - HFCD-B군(HFCD + 5% 미강 첨가)
  - HFCD-C군(HFCD + 5% EM 발효 미강 첨가)
  - HFCD-D군(HFCD + 5% DB1 발효 미강첨가)
  - HFCD-E군(HFCD + 5% 발효 미강 혼합물첨가: 2.5% EM 발효 미강 + 2.5% DB1 발효 미강)

나) 식이조성

- AIN-93 식이 조성을 변형하여 pellet 사료 조제

• 실험식이(Table 1)

- 정상식이와 고지방고콜레스테롤식이군은 AIN-93 식이조성을 변형하여 제조하였으며, 정상식이군은 열량대비 10 kcal% 지방을 공급하였고, 고지방고콜레스테롤식은 열량대비 35 kcal% 지방과 1.25% 콜레스테롤을 급여함
- 모든 사료는 pellet 형태로 제조하여 급여
- *L. plantarum* EM 균주는 실험동물의 유산균 급여 시 항비만효과가 있다고 알려진 농도인  $1 \times 10^9$ /day으로 사료에 섞어 조제
- 미강, EM 발효 미강, DB1 발효 미강은 각각 사료 내 5% 첨가하였으며, 발효 미강

혼합물은 *L. plantarum* EM 발효 미강과 *W. koreensis* DB1 발효 미강을 각각 2.5%로 반반 섞어서 제조하였음

Table 1. Composition of the eperimental diets

Ingredients (g)	ND	HFGD	HFGD-A	HFGD-B	HFGD-C	HFGD-D	HFGD-E
Casein	200	200	200	193	197.7	188.6	193
Cystine	3	3	3	3	3	3	3
Corn starch	397.486	284.966	284.966	234.966	234.966	234.966	234.966
Maltodextrin	132	132	132	132	132	132	132
Sucrose	100	100	100	100	100	100	100
Cellulose	50	50	50	50.0	50.0	50.0	50.0
Lard	0	100	100	100	100	100	100
Soybean oil	70	70	70	70	70	70	70
Cholesterol	0	12.5	12.5	12.5	12.5	12.5	12.5
Mineral mix	35	35	35	35	35	35	35
Vitamin mix	10	10	10	10	10	10	10
Choline bitartrate	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5
t-Butylhydroquinone	0.014	0.034	0.034	0.034	0.034	0.034	0.034
<i>L. Plantarum</i> EM	-	-	1 X 10 <sup>9</sup>	-	-	-	-
Rice bran	-	-	-	50	-	-	-
EM Fermented rice bran	-	-	-	-	50	-	25
DB Fermented rice bran	-	-	-	-	-	50	25

#### 다) 분석방법

##### ① 동물 희생, 혈액 및 장기채취

- 12주간 사육한 실험동물은 물만 주고 12시간 절식 후 ether 마취하에 cardiac puncture에 의해 혈액을 채취한 후 원심 분리하여 혈청을 분리하여 보관
- 간과 백색지방조직인 부고환, 장간막, 등 및 신장 주변 백색 지방을 적출하여 무게를 측정 후 지질 성상 분석을 위해 보관

##### ② 분변 채취

###### • 분변 채취

- 실험 11주차에 실험동물의 체중을 측정 후 마지막 주 7일간 실험동물의 사료 섭취량과 분변량을 측정

##### ③ *in vivo* 효능 검증을 위한 biomarker 분석

###### • 혈청 간 손상 지표 효소의 활성

- 혈청 중 ALT, AST, ALP 및 LDH 활성 측정
- : 혈액생화학 검사 자동분석기를 사용.

###### • 혈청 지질 성상 분석

- 중성지방, 총 콜레스테롤 및 HDL-콜레스테롤 함량
- : 혈액생화학 검사 자동분석기를 사용.
- Non HDL-콜레스테롤 함량: = (총 콜레스테롤 함량 - HDL-콜레스테롤 함량)

###### • 혈청 포도당, insulin, leptin 및 adiponectin 함량 분석

- 혈청 포도당 함량: 혈액생화학 검사 자동분석기를 사용.
- 혈청 insulin, leptin 및 adiponectin 함량:
  - i) insulin radioimmunoassay kit → Microplate reader로 분석
  - ii) leptin mouse/rat enzyme immuno assay kit → Microplate reader로 분석
  - iii) adiponectin rat EIA를 이용하여 sandwich type enzyme linked immunosorbent assay → Microplate reader로 분석

###### • 간, 지방조직 및 분변 중 지질 성상 분석

- 지질 추출: Folch 방법(1957)으로 분석
- 중성지방 함량: Biggs 등(1975)의 방법으로 분석
- 총 콜레스테롤 함량: Zlatkis와 Zak(1969)의 방법으로 분석

- 간조직의 병리조직학적 검사
  - Oil-Red O 염색 후 light microscope에서 조직상태 관찰 후, Image Analyzer 지방 축적 정도를 측정
- 간 조직의 유전자 발현 분석
  - 간 조직 total RNA 추출하고 RT-PCR을 이용하여 지방대사 및 콜레스테롤 대사 관련 유전자 발현 측정

Table 2. RT-PCR primer sequence(5' to 3')

Transcript	Forward	Reverse
Acc	CAACGCCTTCACACCACCTT	AGCCCATTACTTCATCAAAGATCCT
Fas	GGAAGTGAACGGCATTACTCG	CATGCCGTTATCAACTTGTCC
G6pdh	GTTTGGCAGCGCAACTAA	GGCATCACCCCTGGTACAACCTC
Cyp7a1	GCCGTCCAAGAAATCAAGCAGT	TGTGGGCAGCGAGAACAAGT
Hmgcr	GTGATTACCCTGAGCTTAGC	TGGGATGTGCTTAGCATTGA
Ldlr	ATTTTGGAGGATGAGAAGCAG	CAGGGCGGGGAGGTGTGAGAA
$\beta$ -actin	GTGGGGCGCCCCAGGCACCAGGGC	CTCCTTAATGTCACGCACGATTTTC

- 지방세포의 크기 측정
  - 부고한 지방조직을 Hematoxylin & Eosin 염색 후 광학현미경으로 지방세포 찍은 후 Image analyzer program을 통하여 실험군 간의 지방 세포의 크기를 비교함
- ④ 통계처리
  - 통계처리: 결과는 평균과 표준오차로 표시하였고, 각 실험군과의 비교는 one-way ANOVA를 이용하여 분석한 후 Duncan's multiple range test에 의해 처리구간의 유의성 검증

라) 분석결과

① 체중 증가량 및 식이섭취량

i) 일반증상 및 사망률

• 일반증상 및 사망률

- 실험 전 기간 동안 모든 실험군에서 폐사한 동물은 관찰되지 않았으며, 실험물질로 기인된 변화로 인정되는 어떠한 임상증상도 관찰되지 않음

• 고지방고콜레스테롤식이로 인한 비만 및 고지혈 유도

- 12주 동안 과체중 및 고지혈증을 유도하기 위하여 고지방고콜레스테롤식을 급여한 후 희생한 실험동물의 체중 증가량, 간 및 지방조직 부위별 무게 및 혈청, 간 및 지방조직의 지질 성상이 고지방고콜레스테롤식에 의해 체중 및 조직 무게가 증가되었으며, 고지혈증이 유발 되어진 것을 확인함

ii) 체중증가량(g/day): 매주 동일 시간 측정

• 체중변화(Fig. 11)

- 고지방고콜레스테롤식이군(HFCD)에 비하여 고지방고콜레스테롤식에 EM 균주, 발효 미강 및 발효 미강 혼합물을 첨가한 군(HFCD-A, HFCD-C, HFC, D-D, HFCD-E)의 체중이 식이급여 후 7주부터 저하되기 시작하였음. 특히 EM 균주를 급여한 군(HFCD-A)의 체중이 가장 많이 저하되었으며, 정상식이군(ND)과 유사한 경향을 보였음. 미강 첨가는 체중 변화에 영향을 미치지 않았음. 두 발효 미강 간에도 차이가 나타나지 않음

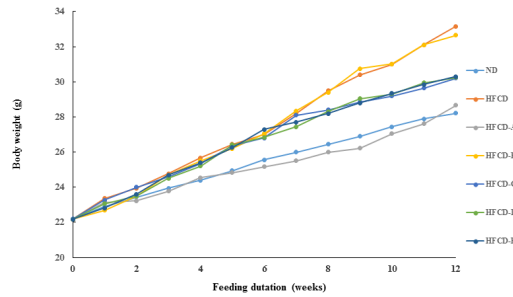


Figure 11. Body weights changes in mice

② 간 조직 및 백색지방조직의 무게(체중 100 g에 대한 상대 중량으로 계산)

i) 간 조직

• 간 조직 무게 변화(Table 3)

- 간조직의 무게는 고지방고콜레스테롤식이군(HFCD)이 정상식이군(ND)에 비하여 유의하게 증가하였으며, 고지방고콜레스테롤식이에 EM 균주를 첨가한 HFCD-A군만이 고지방고콜레스테롤 식이군(HFCD)에 비하여 유의하게 저하되었음

ii) 백색 지방조직의 무게

- 부고환지방조직
- 장간막지방조직
- 등 지방조직
- 신장주변 지방조직
- 총 백색지방조직

• 간 조직 무게 변화(Table 3)

- 간조직의 무게는 고지방고콜레스테롤식이군(HFCD)이 정상식이군(ND)에 비하여 유의하게 증가하였으며, 고지방고콜레스테롤식이에 EM 균주를 첨가한 HFCD-A군만이 고지방고콜레스테롤 식이군(HFCD)에 비하여 유의하게 저하되었음

• 지방조직 각 부위별 무게 및 총 백색 지방조직의 무게(Table 3)

- 모든 지방조직의 무게와 총 백색 지방조직의 무게는 고지방고콜레스테롤식이군(HFCD)이 정상식이군(ND)에 비하여 유의하게 증가하였음
- 장간막 지방조직 및 총 백색 지방조직의 무게는 지방고콜레스테롤식이군(HFCD)에 비하여 EM 균주 첨가군(HFCD-A)과 EM 발효 미강 첨가군(HFCD-C)만이 유의하게 저하됨
- 발효미강 간에는 지방조직의 무게에 영향을 미치지 않았음

Table 3. Relative liver(A) and white fat pads(B-F) weights of mice

	Liver wt.	Epididymal AT	Mesenteric AT	Reperitoneal AT	Perirenal AT	Total White fat pad
ND	3.47±0.15b	2.81±0.82b	1.03±0.33b	0.87±0.29b	0.28±0.10a	4.99±1.45b
HFCD	4.81±0.51a	4.11±1.20ab	1.47±0.35ab	1.14±0.21ab	0.30±0.11a	7.03±1.76ab
HFCD-A	3.52±0.22b	1.32±0.35c	0.57±0.09c	0.27±0.11c	0.09±0.05b	2.25±0.57c
HFCD-B	5.16±1.00a	4.42±1.76ab	1.60±0.52a	1.13±0.43ab	0.39±0.21a	7.54±2.82ab
HFCD-C	4.90±0.58a	3.53±1.33ab	1.35±0.42ab	1.05±0.37ab	0.33±0.13a	6.27±2.13ab
HFCD-D	5.15±0.98a	4.36±1.61ab	1.50±0.48ab	1.18±0.39ab	0.38±0.19a	7.42±2.53ab
HFCD-E	5.34±0.54a	4.88±1.08a	1.67±0.38a	1.33±0.19a	0.43±0.08a	8.30±1.58a

③ 혈청 중 간 기능 손상지표 효소 활성

- ALT 활성
- AST 활성

- ALP 활성
- LDH 활성
- 혈청 중 간 기능 손상지표 효소 활성 (Fig. 12 A-D)
  - 혈청 중 간 기능 손상지표 효소의 활성을 측정한 결과, 혈청 중 ALT, AST, ALP 및 LDH 활성은 고지방고콜레스테롤식이군(HFCD)이 정상식이군(ND)에 비하여 유의하게 증가하였음.
  - ALT 활성(Fig. 12-A): 고지방고콜레스테롤 식이군(HFCD)에 비하여 EM 균주 첨가군 (HFCD-A) 만이 ALT활성이 유의하게 저하 되었으며, 정상식이군(ND)과 비슷한 수치를 나타냄
  - AST 활성(Fig. 12-B): 고지방고콜레스테롤 식이군(HFCD)에 비하여 EM 균주, EM 발효 미강 및 발효 미강 혼합물 첨가군(HFCD-A, HFCD-C, HFCD-E)만이 AST 활성을 유의 하게 감소하는 경향을 보임
  - ALP 활성(Fig. 12-C): 미강 첨가군(HFCD-B) 을 제외하고 EM 균주, 발효 미강을 첨가한 군 (HFCD-A, FCD-C, HFCD-E)들의 ALP 활성이 고지방콜레스테롤 식이군(HFCD)에 비하여 유의하게 저하되었음.
  - LDH 활성(Fig. 12-D): 고지방고콜레스테롤 식이군(HFCD)에 비하여 시료를 첨가한 모든 군 (HFCD-A, HFCD-B, HFCD-C, HFCD-E)들의 LDH 활성이 유의하게 저하되었음
  - 미강보다는 발효 미강이 혈청 중 간 기능 손상지표 효소 활성을 더 많이 억제하는 것으로 나타났으며, 발효 미강 간에는 차이가 없는 것으로 보여짐
  - 시료를 급여한 모든 군들의 혈청 중 ALT, AST, ALP 및 LDH 활성 수치는 모두 정상 범위로 시료를 급여로 인한 간 조직에 독성이 발생하지 않았으며, 고지방 고콜레스테롤식이로 증가되어진 효소의 활성을 감소시킴으로써 간 조직을 보호하는 것으로 보여짐

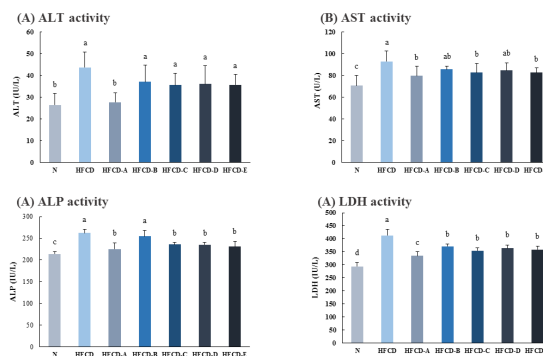


Figure 12. Activities of ALT, AST, ALP and LDH in serum of mice

④ 혈청 지질성상 분석

- 중성지방 함량
- 총 콜레스테롤 함량
- HDL-콜레스테롤 함량
- Non HDL-콜레스테롤 함량
- 동맥경화지수((AI)
- 심혈관위험지수(CRF)
- 혈청 중 지질성상(Fig. 13-A-D)
  - 혈청 중 중성지방, 총 콜레스테롤 및 Non HDL-콜레스테롤 함량은 고지방고콜레스테롤

식이군(HFCD)이 정상식이군(ND)에 비하여 유의하게 증가하였으나 HDL-콜레스테롤 함량은 유의하게 저하되었음

- 혈청 중 중성지방, 총 콜레스테롤 및 Non HDL-콜레스테롤 함량은 고지방고콜레스테롤 식이군(HFCD)에 비하여 고지방고콜레스테롤식이 에 시료를 첨가하여 급여한 군(HFCD-A, HFCD-B, HFCD-C, HFCD-D, HFCD-E)들이 유의하게 감소하는 경향을 보임
- 특히 EM 균주 첨가군(HFCD-A)은 다른 시료 첨가한 군에 비하여 혈청 지질대사 개선효과가 가장 우수한 것으로 나타남
- 혈청 중 HDL-콜레스테롤 함량은 시료 첨가 군 중 미강 첨가군(HFCD-B)을 제외하고는 모든 첨가군(HFCD-C, HFCD-D, HFCD-E)이 고지방고콜레스테롤식이군(HFCD)에 비하여 유의하게 증가되었음

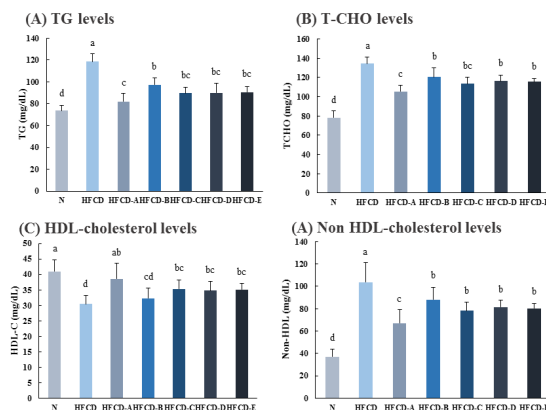


Figure 13. Serum lipid profiles

- 동맥경화지수 및 심혈관위험지수(Fig. 14 A-B)
  - 동맥경화지수와 심혈관계지수는 고지방고콜레스테롤 식이군(HFCD)이 정상식이군(ND)에 비하여 유의하게 증가하였음
  - 동맥경화지수와 심혈관계지수 모두 고지방 고콜레스테롤 식이에 시료를 첨가한 군 (HFCD-A, HFCD-B, HFCD-C, HFCD-D, HFCD-E)이 고지방고콜레스테롤 식이군(HFCD) 비하여 유의하게 저하됨

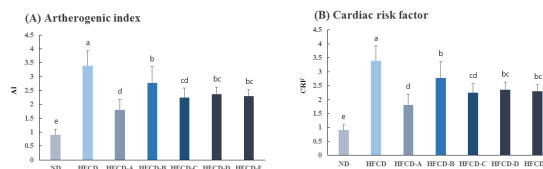


Figure 14. AI and CRF of mice.

⑤ 혈청 중 비만관련 biomarker 분석

- insulin 함량
- 포도당 함량
- leptin 함량
- adiponectin 함량
- 혈청 중 insulin 및 포도당 함량(Fig. 15 A-B)
  - 혈청 중 insulin과 포도당 함량은 고지방고콜레스테롤 식이군(HFCD)이 정상식이군(ND)에 비하여 유의하게 증가하였음
  - linsulin 함량은 고지방고콜레스테롤식이군(HFCD) 에 비하여 EM 균주와 EM 발효

미강 첨가군 (HFCD-A, HFCD-C)만이 유의하게 저하되었으며, 포도당 함량은 고지방고콜레스테롤식이에 시료를 첨가한 모든 군(HFCD-A, HFCD-B, HFCD-C, HFCD-D, HFCD-E)들이 유의하게 저하되었음

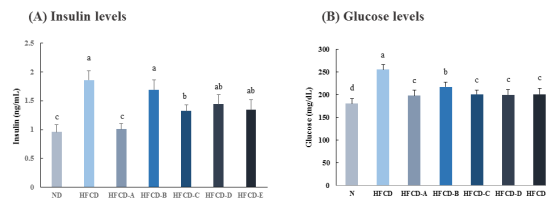


Figure 15. Serum insulin and levels.

- 혈청 중 leptin 및 adiponectin 함량(Fig. 16 A-B)
  - 혈청 중 leptin 함량은 고지방고콜레스테롤식이군 (HFCD)이 정상식이군(ND)에 비하여 유의하게 증가하였으나, 혈청 중 adiponectin 함량은 유의하게 감소하였음
  - 고지방고콜레스테롤식이군(HFCD)에 비하여 미강을 첨가한 경우를 제외하고는 시료를 첨가하여 급여한 군(HFCD-A, HFCD-B, HFCD-C, HFCD-D, HFCD-E)들의 혈청 중 leptin 함량이 모두 감소하였음
  - 혈청 중 adiponectin 함량은 EM 군주만을 첨가한 군(HFCD-A)만이 고지방 고콜레스테롤식이군 (HFCD)에 비하여 유의하게 증가되었음

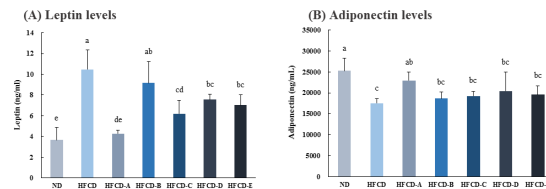


Figure 16. Serum leptin and adiponectin levels.

- ⑥ 분변 지질 성상
- 총 지질 함량
  - 중성지방 함량
  - 총 콜레스테롤 함량
- 분변 지질 성상(Fig. 17 A-C)
    - 분변 중 총 지질, 중성지방 및 총 콜레스테롤 함량은 고콜레스테롤식이군(HFCD, HFCD-A, HFCD-B, HFCD-C, HFCD-D, HFCD-E)들이 정상식이군(ND)에 비하여 유의하게 증가함
    - 분변 중 총 지질과 중성지방 함량은 고지방 고콜레스테롤식이군(HFCD, HFCD-A, HFCD-B, HFCD-C, HFCD-D, HFCD-E)들 간에는 차이가 없었으나, 분변 중 총콜레스테롤 함량은 고지방 고콜레스테롤식이에 EM 군주, EM 발효 미강, 미강 발효 혼합물 급여로 유의하게 증가됨

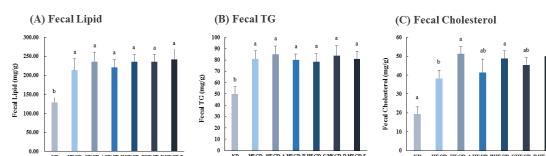


Figure 17. Feces lipid profiles.

⑦ 간 조직 중 비만관련 biomarker 분석

i) 간조직의 지질 성상

- 중성지방 함량
- 총 콜레스테롤 함량

• 간 조직의 지질 성상(Fig. 18 A-B)

- 간조직의 중성지방 및 총 콜레스테롤 함량은 고지방콜레스테롤식이군(HFCD)이 정상식이군 (ND)에 비하여 유의하게 증가하였음
- 고지방고콜레스테롤식이군(HFCD)에 비하여 시료를 첨가하여 급여한 군(HFCD-A, HFCD-B, HFCD-C, HFCD-D, HFCD-E)들의 간 조직의 중성지방 및 총 콜레스테롤 함량이 저하하는 경향을 보였으나, 중성지방의 경우는 EM 균주를 첨가 한 군(HFCD-A군)만이 유의하게 저하 되어 정상식이군(ND) 함량과 유사하였으며, 총 콜레스테롤 함량은 균주, DB1 발효 미강 및 발효 미강 혼합물을 급여한 군(HFCD-A, HFCD-D, HFCD-E) 만이 유의하게 저하되었음

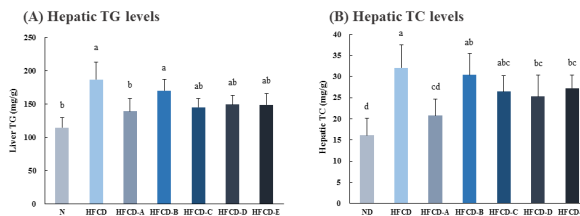


Figure 18. Hepatic lipid profiles.

ii) 간 조직의 외관 상태 관찰

• 간 조직의 외관 상태(Fig. 19)

- 실험동물을 희생직후 해부하여 간의 형태를 사진으로 촬영한 결과, 간조직의 크기는 고지방 고콜레스테롤식이군(HFCD)이 정상식이군(ND)에 비하여 크기가 증가하였으며, 정상식이군 (ND)의 간 조직의 색은 선홍빛이었으나 고지방 고콜레스테롤식이군(HFCD)은 황색의 지방들이 침착되어 옅은 분홍색을 나타냄
- 미강을 첨가한 군(HFCD-B)을 제외하고 고지방고콜레스테롤식이군에 EM 균주, 발효 미강 및 발효 미강 혼합물을 첨가한 군(HFCD-A, HFCD-C, HFCD-D, HFCD-E)들은 지질 침착이 감소되어 약간의 선홍색을 나타냄

iii) 간 조직의 병리조직학적 관찰: Oil-Red-O 염색

- Oil-Red-O 염색

• 간 조직의 병리조직학적 변화(Fig. 187)

- Oil-Red-O로 염색한 간 조직을 광학현미경으로 관찰한 결과, 고지방고콜레스테롤식이군(HFCD)은 간세포 내 붉은색으로 염색되어진 지방구가 많아 지방축적이 뚜렷이 관찰되었으며, 고지방 고콜레스테롤식이군에 균주, 발효 미강 및 발효 미강 혼합물을 첨가한 군(HFCD-A, HFCD-C, HFCD-D, HFCD-E)들은 붉은색으로 염색된 부분이 감소하여 지방축적이 억제됨.



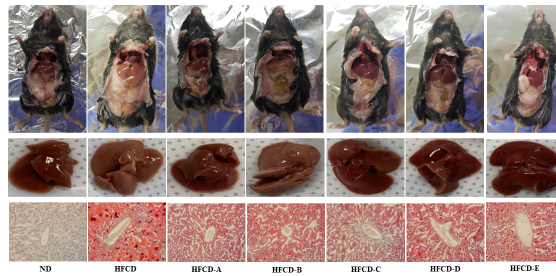


Figure 19. Hepatic representative anatomical views and histopathological analysis.

⑧ 간 조직 중 지방 합성 및 콜레스테롤 대사 관련 유전자 발현

i) transcription factors

- C/EBP $\alpha$  gene expression
- SREBP-1c gene expression

• 간 조직의 지방합성관련 transcription factors 유전자 발현(Fig. 20-22)

- 지방합성관련 transcription factors인 C/EBP $\alpha$ 과 SREBP-1c 유전자 발현은 고지방고콜레스테롤 식이군(HFCD)이 정상식이군(ND)에 비하여 유의하게 증가하였으며, 고지방고콜레스테롤식이 에 EM 균주, DB1 발효 미강 및 발효 미강 혼합물을 시료에 첨가한 군(HFCD-A, HFCD-D, HFCD-E)들은 고지방고콜레스테롤식이군 (HFCD)에 비하여 저하되었음. 특히 EM 균주 첨가군 (HFCD-A)은 정상식이군(ND)과 비슷한 수치를 나타냄

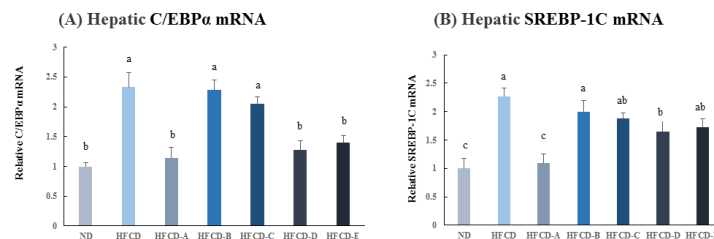


Figure 20. mRNA expression of adipogenic transcription factors in mice.

ii) 지방산합성관련 유전자

- FAS gene expression
- ACC gene expression

- 간 조직의 지방합성 관련 주된 효소인 FAS와 ACC 유전자 발현은 고지방고콜레스테롤식이군 (HFCD)이 정상식이군 (ND)에 비하여 유의하게 증가하였음. FAS 유전자 발현은 고지방고콜레스테롤 식이에 시료를 첨가로 저하되었으나 EM 균주 첨가군 (HFCD-A)만이 고지방고콜레스테롤식이군 (HFCD)에 비하여 유의하게 저하되었음. ACC 유전자 발현은 고지방고콜레스테롤식이에 EM 균주, DB1 발효 미강 및 발효 미강 혼합물을 시료에 첨가한 군(HFCD-A, HFCD-D, HFCD-E)들은 고지방고콜레스테롤식이군(HFCD)에 비하여 유의하게 저하되었음.

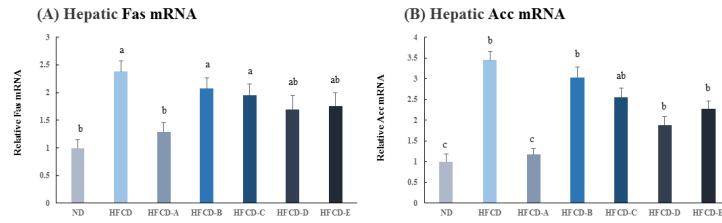


Figure 21. mRNA expression of lipogenic enzymes in mice.

⑨ 콜레스테롤 대사 관련 유전자

- HMGCR gene expression
- LDLR gene expression
- CYP7a1 gene expression

• 간조직의 콜레스테롤대사 관련 유전자 발현(Fig. 21)

- 간 조직 중 콜레스테롤 합성, 제거 및 운반에 관여하는 효소인 HMGCR, LDLR 및 CYP7a1의 유전자 발현을 살펴본 결과 HMGCR 유전자 발현은 고지방고콜레스테롤식이군(HFCD)이 정상식이군(ND)에 비하여 유의하게 증가하였으나, LDLR과 CYP7a1 유전자 발현은 유의하게 감소하였음
- HMGCR 유전자 발현은 고지방고콜레스테롤 식이에 EM 균주 및 EM 발효 미강을 첨가한 군(HFCD-A, HFCD-C)이 고지방고콜레스테롤 식이군(HFCD)에 비하여 유의하게 감소되었음
- LDLR 및 CYP7a1 유전자 발현은 미강을 첨가 한 군(HFCD-B) 제외하고는 모든 시료 첨가군 (HFCD-A, HFCD-C, HFCD-D, HFCD-E)은 고지방고콜레스테롤 식이군(HFCD)에 비하여 유의하게 증가되었음

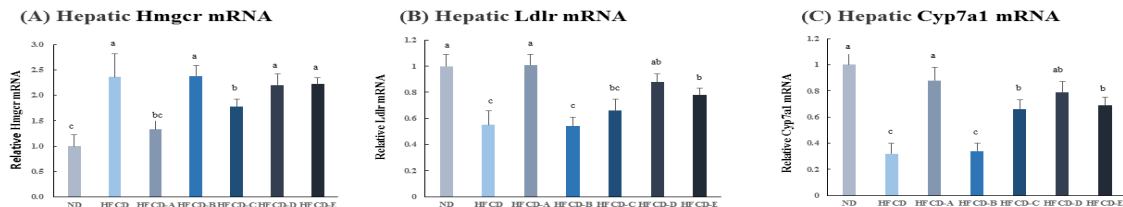


Figure 22. mRNA expression of cholesterol metabolism-related enzymes in mice.

⑩ 지방조직의 중성지방 함량 및 지방세포 크기

i) 지방조직의 중성지방 함량

• 지방조직의 중성지방 함량(Fig. 23 A-B)

- 부고환 혹은 장간막 지방조직의 중성지방 함량은 고지방고콜레스테롤식이군(HFCD)이 정상 식이군(ND)에 비하여 유의하게 증가하였음
- 부고환지방조직 및 장간막 지방조직 모두 중성지방 함량(Fig. 22 A)은 미강을 첨가한 군(HFCD-B)을 제외하고는 고지방고콜레스테롤 식이에 EM 균주, 발효미강, 발효미강 혼합물을 첨가한 군(HFCD-A, HFCD-C, HFCD-D, HFCD-E)들 모두 고지방고콜레스테롤식이군 (HFCD)에 비하여 모두 유의적 저하되었음
- 미강에 비하여 발효미강 및 발효미강 혼합물의 첨가하였을 경우 지방조직의 중성지방 함량 저하효과가 큰 것으로 나타났으며, EM 균주를 첨가하였을 경우 효과가 가장 좋았음

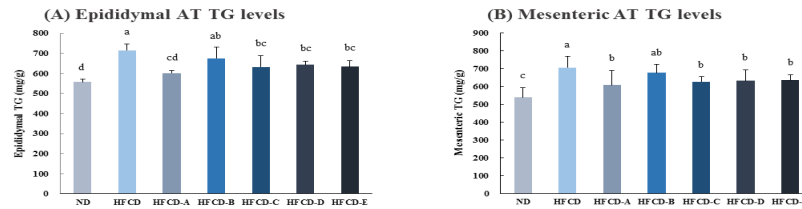


Figure 23. Adipose tissue TG levels.

ii) 지방세포 크기

- 부고환 지방세포
- Hematoxylin & Eosin 염색

• 부고환 지방세포의 크기(Fig. 24)

- 마우스의 지방세포의 크기를 측정하기 위하여 현미경으로 관찰한 결과와 이미지 분석기로 측정한 결과, 고지방고콜레스테롤식이군(HFCD)이 정상식이군(ND)에 비하여 부고환지방세포의 hypertrophy가 관찰되었으며, 지방세포의 크기도 유의하게 증가하였음
- 고지방고콜레스테롤식이에 시료를 첨가한 군 (HFCD-A, HFCD-B, HFCD-C, HFCD-D, HFCD-E)들은 고지방고콜레스테롤식이군 (HFCD)에 비하여 지방세포의 크기가 저하되는 경향을 보였음

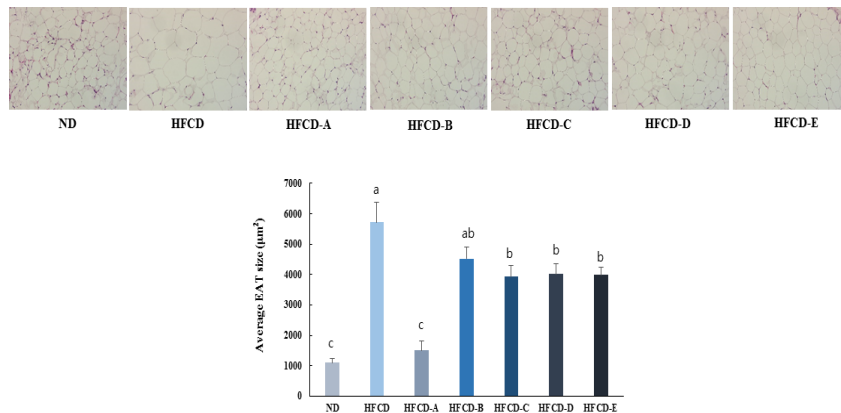


Figure 24. Representative findings and fat cell size of epididymal adipose tissue.

마) 요약

① *in vitro* 연구

• *in vitro* 연구 결과

- 본 연구에 사용된 균주인 *L. plantarum* EM의 cytoplasmic fractions은 지방세포의 분화를 억제하는 것으로 보여짐
- 발효미강 추출물은 미강추출물에 비하여 지방구 형성을 억제하고, 지방합성관련 유전자 발현을 억제하여 비만억제에 기여할 것으로 사료됨

② *in vivo* 연구

• *in vivo* 연구 결과

- *L. plantarum* EM 균주, EM 혹은 DB1 발효 미강, 발효 미강 혼합물을 고지방고콜레스테롤 식이와 같이 급여하였을 경우 고지방 고콜레스테롤식으로 유도된 비만과 고지혈증을 개선하는 것으로 나타남
- EM 균주, 발효 미강, 발효 미강 혼합물은 미강에 비하여 혈청, 간 및 지방조직의 중성지방과 총 콜레스테롤 함량은 저하시키고, 분변으로의 총 콜레스테롤의

- 배설을 촉진시켜 지질대사 개선 효과가 있는 것으로 보여짐
- EM 균주, 발효 미강, 발효 미강 혼합물은 혈청 중 insulin, 포도당 및 leptin 함량은 저하시키고, adiponectin 함량을 증가시 비만 예방효과 및 지질대사 개선효과가 있는 것으로 나타남
  - EM 균주, 발효 미강, 발효 미강 혼합물은 간조직의 지질축적을 억제하고, 콜레스테롤 대사를 개선하여 지방합성관련 유전자와 콜레스테롤 항상성 유지에 관여하는 유전자 발현에 영향을 미치며, 지방조직의 크기도 억제하는 것으로 나타남
- **항비만효과:**
- i) *L. plantarum* EM 균주가 항비만 효과가 가장 우수함
  - ii) 미강 첨가군에 비하여 EM 혹은 DB1 발효 미강 및 발효미강 혼합물의 효과가 더 우수하였음
  - iii) 균주를 달리하여 발효한 발효미강 첨가군 간에는 차이가 없었으며, 발효미강 혼합물 과다 차이가 나타나지 않았음
- **콜레스테롤 저하능 효과:**
- i) *L. plantarum* EM 균주가 지질대사 개선 효과가 가장 우수함
  - ii) 미강 첨가군에 비하여 EM 혹은 DB1 발효 미강 및 발효 미강 혼합물의 효과가 더 우수하였음
  - iii) 발효 미강 첨가군 중에는 *L. plantarum* EM 발효 미강이 *W. koreensis* DB1 발효 미강에 비하여 약간 우수한 것으로 나타남

## ○ 제 1협동(경희대학교)

### 1) Pan, core, unique, accessory genome 분석

가) 유전체 수집 및 annotation

- *L. plantarum* 유전체 수집
  - NCBI에 등록된 *L. plantarum* 유전체 수집함.
  - *L. plantarum* EM을 포함한 51개의 유전체에 대한 비교유전체 분석 수행함.

나) 비교유전체 분석

- *L. plantarum* 비교유전체 분석 결과
  - 51개 genome의 pan-genome은 6,132, core-genome은 1,576, accessory-genome은 3,146, unique-genome은 1,410개로 확인됨.
  - Unique-genome 중 *L. plantarum* EM만의 unique gene은 83개로 확인됨.

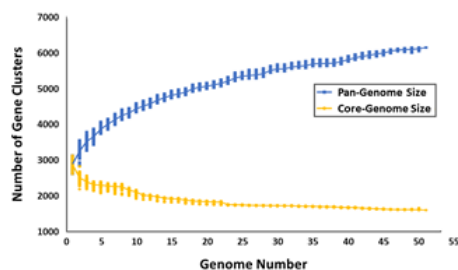


그림 1. 51개 *L. plantarum*에 대한 pan, core-genome plot

## 2) 유전자 기능 비교

### 가) COG category

- 기능에 따른 유전자 분류

- Core-, accessory-, unique-genome을 COG 카테고리에 따라 분류한 결과 core-genome과 accessory-genome은 general function prediction only 비율이 각각 13%, 14%로 가장 높았음.
- Unique-genome은 cell wall/ membrane/ envelope biogenesis가 16%로 가장 높은 비율로 존재함.

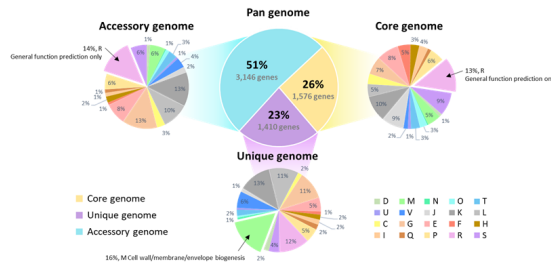


그림 2. 51개 *L. plantarum*의 core, accessory, unique-genome의 COG 카테고리 분류 결과

### 나) 프로바이오틱 관련 유전자 보유 유무 비교

- 프로바이오틱 관련 유전자 보유유무

- *L. plantarum* EM에 존재하는 프로바이오틱 관련 유전자에 대해 조사한 결과 내산성, 내담즙성, 항산화능에 관련된 유전자가 존재함.

## 3) 항균력 관련 유전자 조사

- 항균력 관련 유전자 보유유무

- 다른 *L. plantarum*의 경우 대부분 plantaricin gene cluster를 보유함.
- *L. plantarum* EM에는 항균력과 관련된 plantaricin, bovicin gene cluster를 보유하고 있다는 것이 확인됨.
- Plantaricin F는 문헌을 통해 *Micrococcus*, *Listeria*, *Staphylococcus*등에 대해 항균력을 가진다고 보고됨.

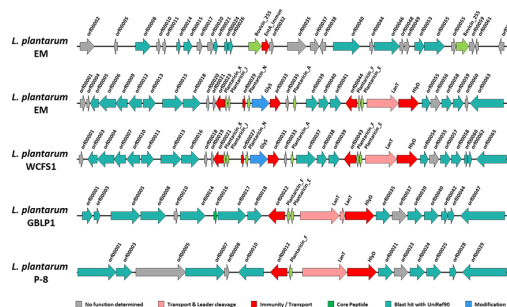


그림 3. *L. plantarum* genome에 존재하는 bacteriocin gene cluster

## 4) 메타유전체 분석

### 가) 발효김치의 메타유전체 분석

- -1℃에서 발효한 김치의 메타유전체

- -1℃에서 10일 동안 발효한 김치의 메타유전체 분석한 결과 *Latilactobacillus sakei* group species (87.8%)가 가장 많은 비율을 차지하였고, 다음으로는 *W. confusa* group (7.7%)이 가장 많은 비율을 차지함.

- 4°C에서 발효한 김치의 메타유전체
  - 4°C에서 10일 동안 발효한 김치의 메타유전체 분석 결과에서도 -1°C와 유사하게 *Lat. sakei* group species (94.3%)가 가장 높은 비율을 차지하였고, 다음으로는 *W. confusa* group (3.9%)이 많이 존재함.

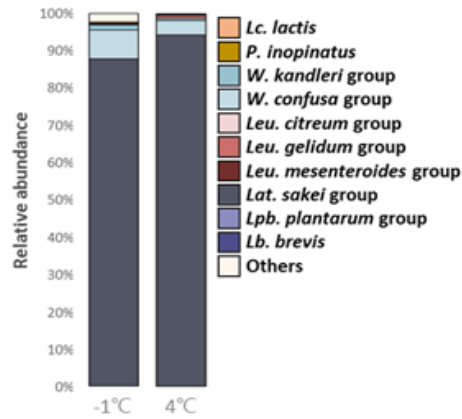


그림 4. -1°C와 4°C에서 10일간 발효한 김치 균총 분석 결과

### ○ 제 2협동(경상대학교)

- ※ 조선대와 CJ 시료 공히 발효전과 발효 후 대사체 프로파일이 구별됨.  
조선대 시료들 발효 1일차와 2일차도 구별됨.

#### 1) 조선대 제공 시료 대사체 분석

##### 가) 조선대 미강 발효물

- 발효시간 : 0, 24, 48시간 시료 LC/MS 분석
- 대사체들의 통계분석:
  - 다변량 통계분석 (Multivariate statistical analysis)
  - PCA (Principal Component Analysis)
  - PLS-DA (Partial Least Squares-Discriminant Analysis)

##### 나) LC/MS 분석

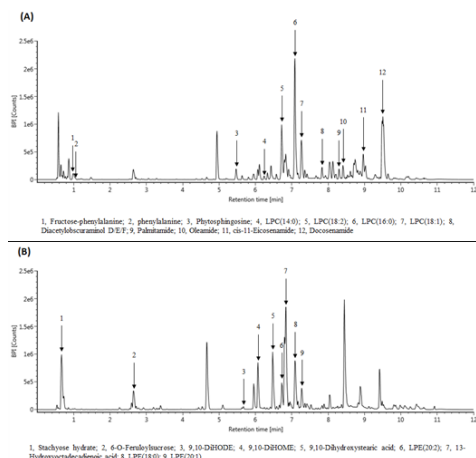


Fig. 1. Typical LC chromatogram of fermented rice bran.  
(A) positive mode, (B) negative mode.

- 534개 대사물질들중 253개 유의적 차이 보임. 21개 물질 동정됨: LPC(14:0), LPC(18:2), LPC(16:0), LPC(18:1), LPE(20:2), LPE(18:0), LPE(20:1), palmitamide,

oleamide, cis-11-eicosenamide, docosenamide, 9,10-dihydroxyoctadecadienoic acid (DiHODE), 9,10-dihydroxyoctadecenoic acid (DiHOME), 9,10-dihydroxystearic acid (DHSA), 13-hydroxyoctadecadienoic acid (HODE), diacetylobscuraminol, phenylalanine, stachyose hydrate, fructose-phenylalanine, 6-O-feruloylsucrose, phytosphingosine.

- 동정된 모든 물질들의 variable importance in projection (VIP, 사용된 PLS-DA 모델에 사용된 변수들 중 주요변수들을 찾기 위해서 사용되며 보통 그 값이 1.0 이상인 경우 주요변수로 판단함) 값이 1.0 이상으로 매우 높아서 동정된 모든 물질이 PLS-DA score plot 상에서 시료들간의 차이에 관여하는 것으로 확인됨.

다) GC/MS 분석

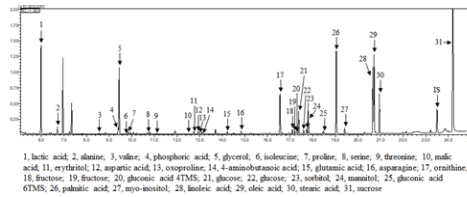


Fig. 2. Typical GC chromatogram of fermented rice bran.

- 32개 유의적 차이 물질 확인, 28개 동정: lactic acid, phosphoric acid, malic acid, palmitic acid, stearic acid, oleic acid, linoleic acid, alanine, valine, isoleucine, serine, threonine, aspartic acid, proline, oxoproline, glutamic acid, asparagine, ornithine, 4-aminobutanoic acid (GABA), sucrose, glucose, fructose, erythritol, gluconic acid, sorbitol, glucitol, myo-inositol, glycerol.
- VIP>1.0인 lactic acid, ornithine, gluconic acid, glucitol, oleic acid, sucrose가 GC/MS 기반 PLS-DA score plot 상에서 시료들간의 차이에 관여하는 것으로 확인됨.

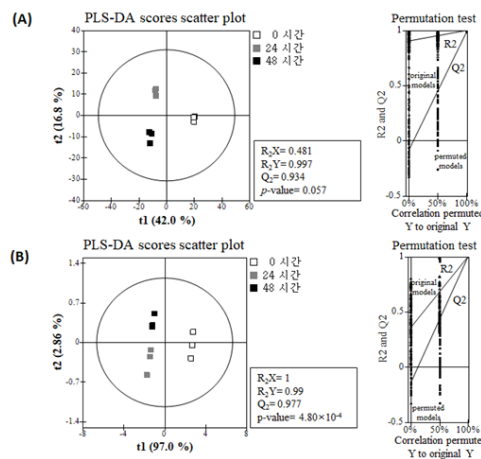


Fig. 3. PLS-DA score plots and quality parameters for LC/MS (A) and GC/MS (B) results for fermented rice bran.

라) 조선대 시료들 대사물질들 함량변화

: 발효에 따른 미강대사물질들의 함량 변화

• Heat map 분석

- 함량변화는 heat map과 chromatogram intensity를 비교 분석함.

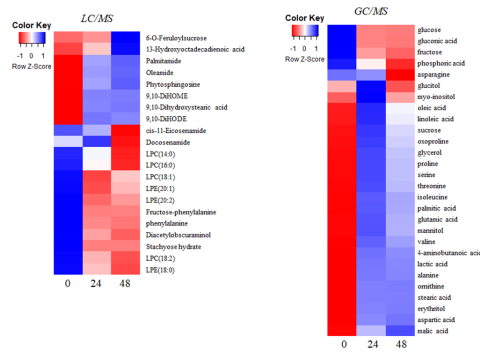


Fig. 4. Heat map of LC/MS (left) and GC/MS (right) analyzed metabolites.

① 당류

- Glucose, fructose, stachyose hydrate, gluconic acid, fructose phenylalanine 함량은 발효에 의해 감소됨. Gluconic acid를 제외한 당들은 미강 발효물에서는 거의 관찰되지 않음.
- 이들 당들은 발효 미생물의 에너지원으로 사용되거나 또는 당알코올로 전환된 것으로 추정됨.
- 미생물에 의해 전환된 당알코올인 erythritol, glucitol, mannitol, myo-inositol 함량은 24 시간 발효에 의해 증가하나 erythritol를 제외한 당알코올들은 발효가 더 진행되면서 다시 감소하는 경향을 보임. Glucitol과 myo-inositol은 48시간 발효 후 발효 전 수준으로 감소함,
- 48시간 발효 후 erythritol와 mannitol 함량은 발효전 시료보다 2배, 4배 증가함.
- 당들중 가장 높은 함량을 갖는 sucrose는 발효 24시간에 증가하나 48시간에 감소함.

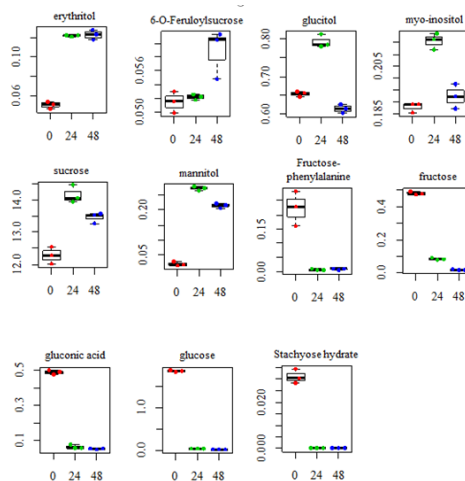


Fig. 5. Changes of relative amounts of sugars and related metabolites.

② 아미노산 및 관련 물질

- Asparagine과 phenylalanine를 제외한 모든 아미노산들의 함량은 발효에 의해서 약 2 배 이상 증가함.
- 24 시간과 48 시간 발효의 차이는 거의 관찰되지 않음.
- 항비만, 숙취해소, 피로감 감소, 간기능 회복 등 효능이 알려진 ornithine 함량이 미강발효물에 가장 많은 것으로 확인됨.
- 이들 아미노산들은 발효에 사용된 미생물이 에너지를 생성하기 위해서 미강 단백질을 분해하는 과정에서 생성된 것으로 추정됨.



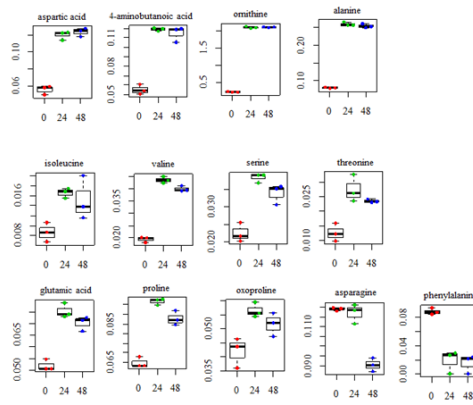


Fig. 6. Changes of relative amounts of amino acids and related metabolites.

③ 유기산 및 관련 물질

- Lactic acid와 malic acid는 증가하고 Phosphoric acid는 감소함.
- lactic acid는 발효에 의해 3배 이상 증가하였으나 발효시간에 따른 차이는 없음.

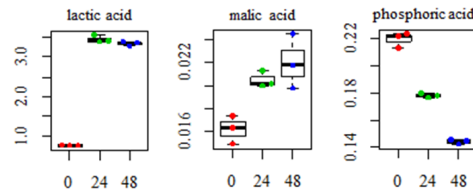


Fig. 7. Changes of relative amounts of organic acids.

④ 지방산 및 관련 물질

- 인지질계열인 LPCs (14:0, 16:0, 18:1, 18:2)와 LPEs (18:0, 20:1, 20:2) 그리고 cis-11-eicosenamide, diacetyl obscuraminol 함량은 발효가 진행될수록 감소되는 경향을 보임.
- diacetyl obscuraminol은 발효에 의해 약 3.5 배 감소함.
- stearic acid, 9,10-DHSA, palmitamide, oleamide, 9,10-DiHODE, 9,10-DiHOME, 13-HODE, phytosphingosine들은 발효 시간 증가에 따라 증가하는 경향을 보임.
- 9,10-DHSA, palmitamide, oleamide, 9,10-DiHODE, 9,10-DiHOME들은 발효 전보다 약 2 배 이상의 증가함.
- Palmitic acid, oleic acid, linoleic acid, docosenamide, glycerol들은 24 시간 발효시 증가하나 48 시간 발효에서는 감소됨.

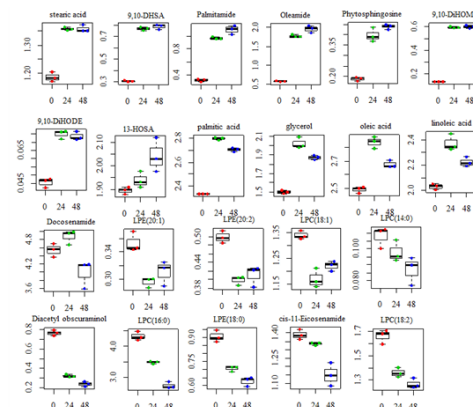


Fig. 8. Changes of relative amounts of fatty acids and related metabolites.

## 2) CJ 제공 미강발효물의 대사체 분석

- 대사체들의 통계분석:
  - 다변량 통계분석 (Multivariate statistical analysis)
  - PCA (Principal Component Analysis)
  - PLS-DA (Partial Least Squares-Discriminant Analysis)

### 가) LC 및 GC 분석

- 미강과 미강발효물을 80% 메탄올로 추출한 후 positive mode와 negative mode로 UPLC-Q-TOF MS와 GC/MS로 분석함.
- 미강발효물 대사물질 프로파일이 미강 프로파일보다 매우 다양하여 발효에 의해 다양한 물질들이 새롭게 형성된 것을 보여줌.
- 다변량통계분석 방법으로 분석하여 PLS-DA score plot으로 시각화한 결과 두 그룹이 유의 적으로 분리됨을 확인.
- LC/MS와 GC/MS 기반 PLS-DA score plot 상에서 미강과 미강발효물은 각각 t(1) (84.8%) 와 t(1) (71.3%)을 기준으로 서로 유의적으로 분리됨.

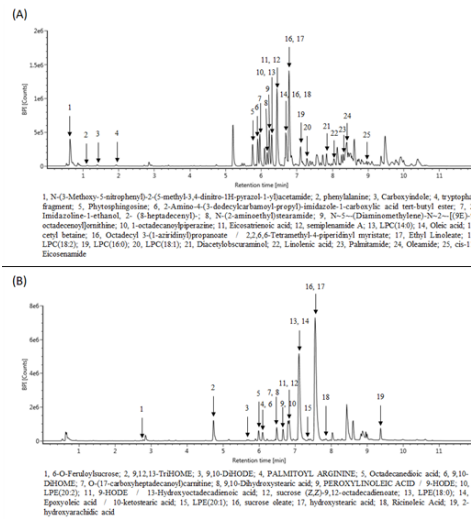


Fig. 9. Typical LC chromatogram of fermented rice bran from CJ. (A) positive mode, (B) negative mode.

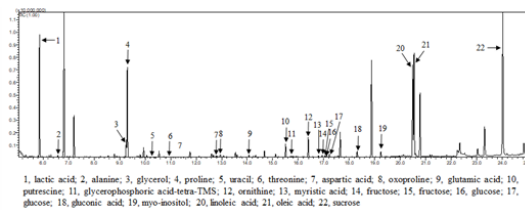


Fig. 10. Typical GC chromatogram of fermented rice bran from CJ

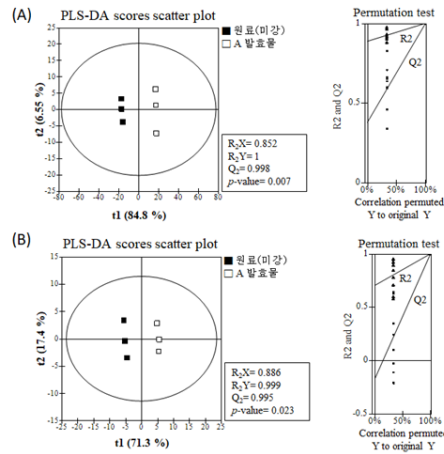


Fig. 11. PLS-DA score plots and quality parameters for LC/MS (A) and GC/MS results for fermented rice bran from CJ.

## 나) 주요 대사물질의 동정

### ① LC/MS 동정

- LC/MS 기반 PLS-DA score plot 상에서 시료들 간에 유의적 차이에 관여하는 물질들을 확인한 결과 positive mode와 negative mode로 분석된 435개 대사물질들(fragment 포함)중 323개들이 유의적으로 차이가 있었음. 45개 물질 동정: 9-HODE, 9,12,13-TriHOME, 9,10-DiHODE, 9,10-DiHOME, 9,10-DHSA, octadecanedioic acid, semiplenamamide A, cetyl betaine, ethyl inoleate, diacetyl obscuraminol, cis-11-eicosenamamide, peroxylinoleic acid, hydroxystearic acid, ricinoleic acid, 2-hydroxyarachidic acid, sucrose-octadecadienoate, sucrose oleate, phytosphingosine, LPC(14:0), LPC(18:2), LPC(16:0), LPC(18:1), LPE(20:2), LPE(18:0), LPE(20:1), oleic acid, linolenic acid, myristic acid, palmitamide, oleamide, eicosatrienoic acid, palmitoyl arginine, phenylalanine, carboxyindole, tryptophan, 6-O-feruloylsucrose, N-(3-Methoxy-5-nitrophenyl)-2-(5-methyl-3,4-dinitro-1H-pyrazol-1-yl)acetamide, 2-Amino-4-(3-dodecylcarbamoyl-propyl)-imidazole-1-carboxylic acid tert-butyl ester, 2-Imidazoline-1-ethanol, 2-(8-heptadecenyl)-, N-(2-aminoethyl) stearamide, N-5-(Diaminomethylene)-N-2-[(9E)-9-octadecenyl]ornithine, 1-octadecanoylpiperazine, Octadecyl 3-(1-aziridiny)propanoate / 2,2,6,6-Tetramethyl-4-piperidiny myristate, O-(17-carboxyheptadecanoyl)carnitine, epoxyoleic acid /10-ketostearic acid.
- 9-HODE, 9,10-DiHODE, LPE(20:1)을 제외한 동정된 물질들의 VIP 값이 1.0 이상으로 매우 높아서 이들이 PLS-DA score plot 상에서 시료들간의 차이에 관여하는 것으로 확인됨.

### ② GC/MS 동정

- GC/MS 기반 PLS-DA score plot 상에서 시료들 간 차이에 관여하는 물질들을 확인한 결과 45 개 대사물질들 중 28 개가 유의적 차이가 있었음. 20 개 물질 동정: lactic acid, alanine, glycerol, proline, uracil, threonine, aspartic acid, oxoproline, glutamic acid, putrescine, glycerophosphoric acid-tetra, ornithine, myristic acid, fructose, glucose, gluconic acid, myo-inositol, linoleic acid, oleic acid, sucrose.
- 이들 물질들의 VIP 값을 분석한 결과 동정된 모든 물질들이 VIP>1.0인 것으로 확인되어 GC/MS 기반 PLS-DA score plot 상에서 시료들간의 차이에 관여하는

것으로 확인됨.

다) 발효에 따른 미강대사물질들의 함량 변화

• Heat map 분석

- 발효에 따른 대사물질의 함량변화는 heat map과 chromatogram intensity를 비교분석함.

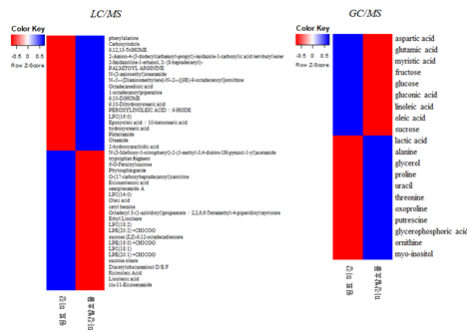


Fig. 12. Heat map of metabolites by LC/MS (left) and GC/MS (right).

① 당 및 관련 물질

- Glucose, fructose, sucrose, gluconic acid, 6-O-feruloylsucrose, sucrose oleate, sucrose-9,12-octadecadienoate 들은 발효 후 감소되어 거의 관찰되지 않음.
- 당알코올인 myo-inositol의 함량은 발효 후 증가함.

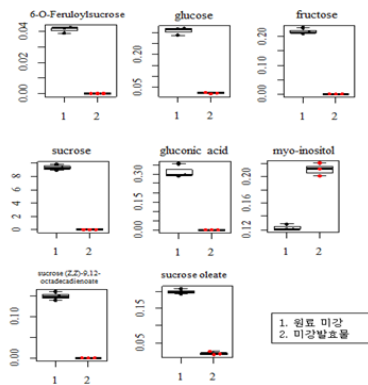


Fig. 13. Changes of relative amounts of sugars and sugar alcohols.

② 아미노산 및 관련 물질

- Phenylalanine, alanine, proline, theronine, oxoproline, ornithine, palmitoyl arginine들은 발효에 의해 증가함.
- aspartic acid, glutamic acid, tryptophan은 2배 이상 감소함.
- ornithine의 함량이 가장 높았고 약 5배 이상 증가함.

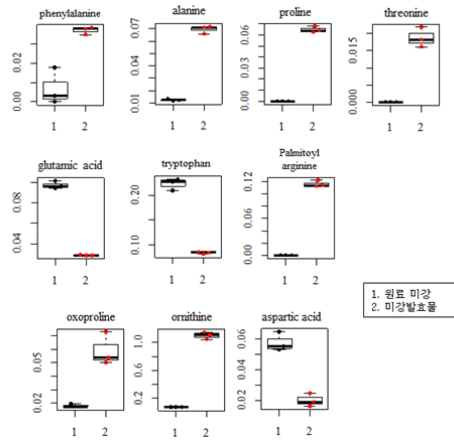


Fig. 14. Changes of relative amounts of amino acids and related metabolites.

③ 지방산 및 관련 물질

- LPC(16:0)을 제외한 인지질계열의 대사물질인 LPCs(14:0, 18:1, 18:2)와 LPEs(18:0, 20:1, 20:2) 뿐만 아니라 지방산 계열 (oleic acid, linoleic acid, myristic acid, linolenic acid, ethyl linoleate, eicosatrienoic acid), semiplenamide A, cis-11-eicosenamide, diacetyl obscuraminol, Octadecyl 3-(1-aziridinyl)propanoate/2,2,6,6-Tetramethyl-4-piperidinyl myristate, O-(17-carboxyheptadecanoyl)carnitine, phytosphingosine들은 발효후 감소.
- 지방산에 hydroxy가 결합한 형태인 9,12,13-TriHOME, 9,10-DiHOME, 9,10-DiHOME, 9,10-DHSA, hydroxystearic acid, 2-hydroxyarachidic acid 뿐만 아니라 LPC(16:0), octadecanedioic acid, peroxylinoleic acid/9-HOPE, glycerol, epoxyoleic acid/10-ketostearic acid, glycerophosphoric acid 및 amide 계열인 oleamide, N-(2-aminoethyl)-stearamide, palmitamide들은 발효 후 증가함.
- 지방계열 물질들 중 미강발효물에는 hydroxystearic acid, epoxyoleic acid/10-ketostearic acid가 가장 높은 함량을 보였고 다음으로 oleamide, palmitamide 순으로 함량이 높았음.

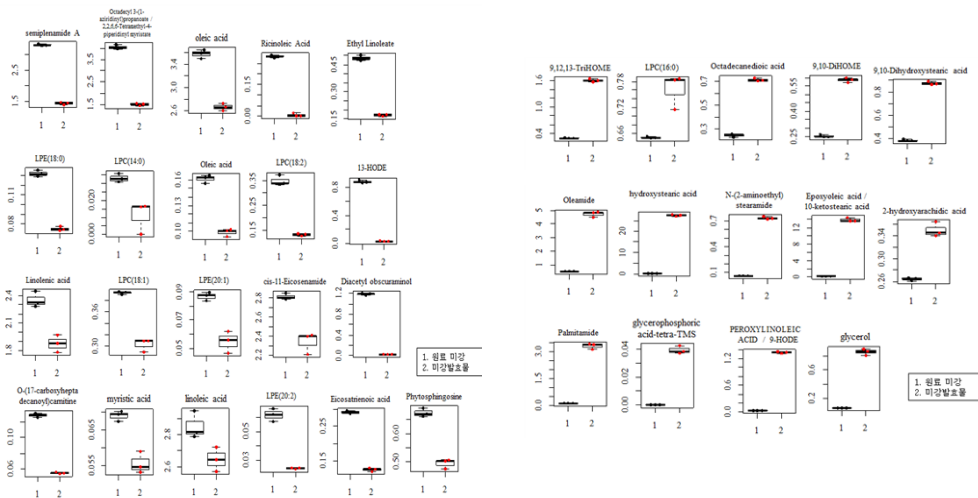


Fig. 15. Changes of relative amounts of fatty acids and related metabolites.

④ 기타 물질

- 미강에서 관찰되지 않았던 lactic acid를 비롯하여 N~5~-(Diaminomethylene)-N~2~-[ (9E)-9-octadecenoyl]ornithine, 2-Amino-4-(3-dodecylcarbamoyl-propyl)-imidazole-1-carboxylic acid tert-butyl ester, 2-Imidazoline-1-ethanol, 2-(8-heptadecenyl)-, N-(2-aminoethyl)stearamide, carboxyindole, 1-octadecanoyl piperazine들은 발효에 의해 크게 증가함.
- N-(3-Methoxy-5-nitrophenyl)-2-(5-methyl-3,4-dinitro-1H-pyrazol-1-yl)acetamide과 cetyl betaine의 함량은 감소함.

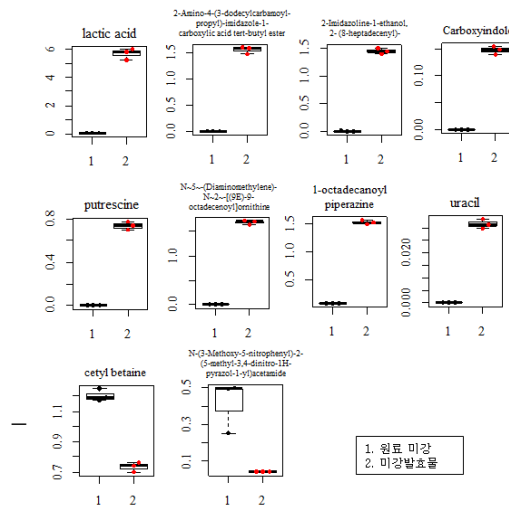


Fig. 16. Changes of relative amounts of various metabolites.

○ 제 3협동(CJ제일제당주)

1) Pilot scale 공정 최적화

① 50L scale-up 공정 최적화 (표 1)

- Scale-up 결과, 35도 48시간 발효 시 오르니틴 함량이 가장 높은 것으로 확인

표 1. 50L scale-up 공정 최적화

조건		Lab 조건	scale-up 1번	scale-up 2번
발효온도		30도	35도	30도
발효시간		48시간	48시간	48시간
건조온도		40도	65도	65도
건조시간		16시간	5일	5일
분석결과	오르니틴 (mg/L)	7,767	11,002	5,477

② 관능 품질 개선을 위한 공정 검토 (표2)

- 발효에 따른 오르니틴 함량과 관능 품질 상관 관계 확인
- 결과: 발효가 진행될수록 발효취에 의한 관능 저하 확인

표 2. 발효에 따른 오르니틴 함량과 관능 품질

항목	A	B	C
색상	옅은노란색	노란색	짙은노란색
건조물 pH	6.92	6.78	6.24
관능	고소한 풍미	전반맛 고소하나 후미 쓴맛	쓴맛 강하며 이미/이취 있음
오르니틴 (mg/kg)	976	551	12,176
아르기닌 (mg/kg)	28,908	28,323	n.d

2) 유통기한 가속테스트 진행

- 50L scale-up 생산 제품으로 유통기한 가속 테스트 진행 [유통기한 설정 사유서]
  - 식품유형: 기타가공품
  - 유통기한 24개월 확보: 오르니틴 함량 유지 확인

항목	0개월	3개월		
		25도	35도	45도
오르니틴(mg/L)	11,002	10,880	11,595	11,300

- [유통기한 설정 사유서]

1. 제품의 특성

- 1) 제품의 유형 : 기타가공품
- 2) 색상 : 옅은 갈색의 분말
- 3) 제조·가공과정 : 원료입고시 원료별 자가품질검사를 통한 품질관리를 실시하며, 칭량·발효·건조·분쇄·포장 등의 제조공정을 거치는 동안 당해 제품에 미치는 위해요소를 충분히 검토하여 설정한 공정관리 절차에 따라 자가품질 검사가 이루어지고 있음.
- 4) 포장재질 : 고밀도폴리에틸렌(HDPE), 저밀도폴리에틸렌(LDPE), 폴리에틸렌(PE)
- 5) 포장단위 : 10kg·5kg·1kg 등
- 6) 보존 및 유통온도 : 고온 다습한 곳을 피하고 실온에서 공기의 노출을 최대한 차단하여 보관 유통

2. 실험방법

- 1) 유통조건 및 안정성시험 검토  
제품의 유통조건은 일상의 기후조건에서 유통되고, 보관·진열·소비자 보관 등은 고온다습한 곳과 직사광선을 받지 아니하는 실온에 보관 유통
- 2) 검체채취 및 취급방법은 자사 「검체채취 및 보관에 관한 규정」에 따름.
- 3) 실험항목 및 실험방법

항목	설정규격	시험방법
성상	이미, 이취가 없는 옅은 갈색의 분말	육안검사, 관능검사
수분	표시량 (100mg/1.5g)의 80.0~150.0%	식품공전 제8.일반시험법 2.식품성분시험법 2.1.1 수분
대장균	음성	식품공전 제8.일반시험법 4.미생물시험법 4.8 대장균

- 4) 제품의 유통기간 설정을 위한 안정성 검토는 가속조건과 실온조건 시험결과에 따라 유통기한 내 품질변화를 예측하는 방법에 따라 검토하였음.

시험조건	가속시험		
	온도 : 45℃±2 상대습도 : 85%RH±2	온도 : 35℃±2 상대습도 : 85%RH±2	온도 : 25℃±2 상대습도 : 85%RH±2
	시험기간 : 3개월 측정시기 : 초기, 1개월, 2개월, 3개월		

\*\* 시험기간 : 2020. 7. ~ 2020. 9

### 3. 실험결과

#### 1) 실온조건 및 가속조건 시험결과

##### ○ 일반항목 시험결과

시험항목	기준	초기
성상	이미, 이취가 없는 열은 갈색의 분말	적합
수분	10% 이하	7.1%
대장균	음성	음성

##### ○ 시험결과

#### (1) 성상(이미/이취)

		실측값 평균		
저장기간(일)	저장온도	25℃	35℃	45℃
	0 (초기)		5	5
30 (1개월)		5	5	5
60 (2개월)		5	4.5	4
90 (3개월)		4.5	4	3

#### (2) 수분

		실측값 평균		
저장기간(일)	저장온도	25℃	35℃	45℃
	0 (초기)		7.1%	7.1%
30 (1개월)		6.8%	6.7%	7.0%
60 (2개월)		6.9%	6.6%	6.6%
90 (3개월)		6.7%	6.8%	6.5%

#### (3) 대장균

		실측값 평균		
저장기간(일)	저장온도	25℃	35℃	45℃
	0 (초기)		음성	음성
30 (1개월)		음성	음성	음성
60 (2개월)		음성	음성	음성
90 (3개월)		음성	음성	음성



2) 유통기간 산출

① 품질지표별 반응속도상수(K)의 산출

품질지표	온도(°C)	회귀방정식 <sup>1)</sup>
성상(관능)	25	$Y = -0.0054x + 5.1$
	35	$Y = -0.0125x + 5.15$
	45	$Y = -0.025x + 5.3$

<sup>1)</sup>  $Y = KX + B$  (X: 저장기간, Y:  $\ln A$ , B:  $\ln A_0$ , K: 반응속도상수) (A: 저장기간 X중의 시험항목의  $\ln$ 값,  $A_0$ : 저장전 제품중의 시험항목의  $\ln$ 값)

② 온도에 대한 품질지표의 활성화에너지(Ea) 산출

온도(°C)	온도(K)	1/T	K	lnK	
저장 온도	25	298	0.003355	0.005400	-5.221356
	35	308	0.003246	0.012500	-4.382027
	45	318	0.003144	0.025000	-3.688879

$\ln k = -(E_a/R)(1/T) + \ln A$
<b>가속 3온도 (25, 35, 45°C)</b>
$\ln K = -7266.1X + 19.177$ ( $R^2 = 0.9987$ ) $E_a(\text{Kcal/mole}) = -14437.7407$

③ 제품의 유통기한 산출

온도	온도(K)	1/T	K	lnK
0	273	0.0036663004	0.000588	-7.438750916
10	283	0.003533569	0.001506	-6.498265018
15	288	0.003472222	0.002352	-6.052513889
20	293	0.003412969	0.003617	-5.621976109
25	298	0.003355705	0.005484	-5.205885906
30	303	0.003300330	0.008201	-4.803528053

○ 국내 주요지역 월별 기온(기상청 자료)

- 그 결과 1월, 2월, 3월, 12월(4개월;121일)의 평균 기온은 10°C이하였으며, 4월과 10월, 11월(3개월;91일) 10~15°C, 5월(1개월;31일)은 16.4°C, 6월과 7월, 8월, 9월(4개월;122일)은 20~25°C인 것으로 나타났다. 이에 따라 실온 유통 시 1년간 온도별 예상 유통일수는 10°C(121일), 15°C(91일), 20°C(31일), 25°C(122일)로 하여 유통기간 산출의 근거로 사용하였다.

Unit : °C

	1월	2월	3월	4월	5월	6월	7월	8월	9월	10월	11월	12월
서울	-7.2	1.2	3.6	10.7	17.9	22.0	24.6	25.8	21.8	14.2	10.7	-0.9
인천	-5.6	1.4	4.2	10.0	16.8	20.0	23.9	25.0	21.7	14.8	11.4	0.4
대전	-5.7	1.8	4.5	11.6	18.1	22.7	25.7	25.8	21.2	13.5	11.2	0.4
대구	-2.5	4.2	7.0	13.7	18.8	24.3	26.8	26.2	23.0	15.7	11.9	2.3
광주	-3.4	3.1	5.3	12.2	19.0	23.3	26.5	25.9	22.7	15.4	12.6	2.2
울산	-1.9	4.3	6.7	12.6	17.2	22.0	25.2	25.3	21.8	15.8	12.3	3.2
부산	-0.7	6.1	7.4	13.1	17.3	21.3	25.1	25.8	23.3	17.6	14.1	4.4
강릉	-2.8	2.5	5.5	11.7	16.0	22.0	23.4	25.3	20.2	14.8	11.2	1.5
제주	2.3	7.0	7.8	13.2	18.2	21.7	27.3	26.0	23.1	17.9	15.7	7.1
평균	-2.7	3.4	5.5	11.3	16.4	20.5	23.6	23.2	20.8	15.0	12.2	3.3

④ 1차 반응식을 이용한 연간변화 반응속도상수(K')

유통온도(°C)	국내 연간온도별 예상 유통일수(A)	반응속도상수(B)	연간변화량 (A×B)%
10	121일(4개월)	0.001506	0.092
15	91일(3개월)	0.002352	0.071
20	31일(1개월)	0.003617	0.224
25	122일(4개월)	0.005484	0.329
누계	365(12개월)	-	1.278

⑤ 1차 반응식을 이용한 제품의 유통기간 산출

최초함량 (A)	규격 하한선 (B)	A-B	연간 변화량 (C)	$[(A-B)/C]*12$ $[(A-B)/C]*365$
5	2	3	1.278	28.6개월

4. 결 론

- 제품의 기준 규격 항목 중 품질지표로 설정한 성상, 수분, 대장균에 대한 가속 및 실온조건하에서의 안정성 시험결과 설정된 기준에 적합하였고, 제품의 품질지표에 대한 안정성 검토 결과 제품화 상태에서 인습이 방지되고 기밀성이 유지되는 포장방법으로 포장하여 유통될 제품으로서 직사광선을 받지 아니하는 실온에서 보관 유통시 제조일로부터 24개월은 안정할 것으로 판단되어짐.

3) 제품화 연구 및 출시 완료(2차년도 조기 달성)

- CJ 건강 제품 소재 적용
- 유산균발효미강분말 소재화 및 CJ 건강 제품 소재 적용
  - 발효효소 베이직 제품 적용(2019년 10월)
  - 매출액: 약 5억원(2019년 11월-2020년 5월 누계)

#### 4) 원가 절감 검토

① 생산성 향상을 위한 개선 가능 공정 검토

- 건조공정에 따른 공정 최적화 및 원가 산출(표 3)
  - 발효 후 건조 방법 별 원가 비교하여 기존 열풍건조 比 효율적인 건조 방법 도출
  - 결과: 원심분리를 통해 상등액과 잔사를 분리한 후 상등액은 농축 후 열풍건조, 잔사는 열풍건조하였을 때 가장 원가경쟁력 有

표 3. 건조방법에 따른 원가 비교[100kg 기준]



건조방법		원가 (원/kg)
동결건조		38,000원/kg
열풍건조		27,000원/kg
원심분리 (Sup./Res.분리)	S: Spray dey, R: 열풍	29,000원/kg
	S: 농축 후 동결건조, R: 열풍	26,000원/kg
	S: 농축 후 열풍건조, R: 열풍	24,500원/kg

② 지표 성분의 생산량 증대를 위한 발효 공정 최적화

#### 5) 제형 다양화 검토 : 과립, 정제

- 과립/정제 제조가공방법(표 4)

표 4. 과립, 정제 제조가공방법

제조 순서	과립	정제
1	원료 계량	
2	과립	과립   혼합/과립/건조
3		타정
4	정립	코팅
5	혼합	선별
6	포장	
제품		

• 정제 공정 조건 (표 5)

- 유산균발효미강분말 함유량에 따른 정제 조건 확인: 0, 10, 20, 30, 40%
- 기준중량: 583 ± 10mg(최종중량 600mg)
- 경도: 12kg/cm<sup>2</sup> 이상
- 붕해도: 40분 이하
- 마손도: 0.3 이하

표 5. 유산균발효미강분말 함유량에 따른 정제 조건

유산균 발효 미강분말 함유량	결정 셀룰로오스	경도 (kg/cm <sup>3</sup> )	사진
0	100	17	
10	90	15	
20	80	12	
30	70	8	
40	60	5	

-> 최대 유산균발효미강분말 20% 함유 가능

< 4차년도 >

○ 제 1세부(조선대학교)

1) 기능성 미강발효제품 개발

가) 최적 제조 조건 설정

: 미강발효물의 저장성을 높이고 유통시 용이성과 관능적으로 우수한 식감과 풍미를 내고자 열풍건조와 동결건조로 나누어 각각의 최적의 건조 조건을 설정하고자 함.

① 열풍건조 조건

- 건조 용량: 미강발효물 약 50~80 g을 약 A4 용지 크기의 트레이에 넓게 펴 바름.
- 건조 온도 및 기간: 열풍건조기(항온항습기)에서 55℃에서 12~16시간 건조함.  
(건조 완료 기준은 건조 전 미강 첨가 무게 대비 수율 100±5% 범위로 함.)

※ 이때 60℃ 이상의 열풍건조 조건에서는 특유의 탄 듯한 쓴맛이 나타남과 동시에 색이 어두워짐.

☞ 이에 열풍건조의 건조 조건은 55℃에서 12~16시간으로 최종 선정함.



Figure 1. 미강발효물의 열풍건조 공정

② 동결건조 조건

- 건조 용량: 미강발효물 약 10~15 g을 50 ml 멸균 용기에 나눠 담음.  
이후 24시간 -70℃에서 냉각함.

- 건조 온도 및 기간: 동결건조기에서 -70℃, 3~4일 건조함.

(건조 완료 기준은 건조 전 미강 첨가 무게 대비 수율 100±5% 범위로 함.)

※ 3일 이전까지는 미강발효물의 겉은 완전히 마른 듯 보이나 속까지 완전히 건조되지 않아 분쇄시 문제가 발생함. 4일 이후로는 더 이상의 건조가 이루어지지 않고 동일한 수율이 유지됨에 따라 3~4일의 건조 기간이 적합함.

☞ 이에 동결건조의 건조 조건은 -70℃에서 3~4일로 최종 선정함.



Figure 2. 미강발효물의 동결건조 공정

나) 건조 조건에 따른 생균수 측정(plate count)

- W. koreensis DB1: 열풍건조 직후 미생물이 검출되지 않음. 동결건조 직후 약 100 CFU/g 이하의 DB1이 검출됨.
- L. plantarum EM: 열풍건조 직후 약 100 CFU/g의 EM이 검출되었으며 동결건조 직후 약 1,000 CFU/g 이하의 EM이 검출됨.

## 2) 기능성 미강발효제품의 특성 조사

가) 이화학적 특성

- W. koreensis DB1
  - pH: 발효 전에는 약 pH 6.02±0.07로 나타났으며, 발효 후에는 약 pH 5.70±0.08로 나타남.
  - 산도: 발효 전에는 약 0.23±0.05%로 나타났으며, 발효 후에는 약 0.29±0.05%로 나타남.
  - 당도: 발효 전에는 약 16.40±0.47 brix로 나타났으며, 발효 후에는 약 15.84±0.34 brix를 나타냄.
- L. plantarum EM
  - pH: 발효 전에는 약 pH 5.96±0.18로 나타났으며, 발효 후에는 약 pH 3.78±0.21로 나타남.
  - 산도: 발효 전에는 약 0.76±0.11%로 나타났으며, 발효 후에는 약 2.62±0.35%로 나타남.
  - 당도: 발효 전에는 13.96±0.39 brix로 나타났으며, 발효 후에는 약 12.45±0.32 brix로 나타남.

나) 미생물학적 특성

- W. koreensis DB1: 발효 후 24시간에 최대 생균수에 도달하여 약 8.41±0.32 log CFU/g을 나타냈으며 이후 48시간에는 약 7.21±0.30 log CFU/g로 감소함.
- L. plantarum EM: 발효 후 24시간에 최대 생균수에 도달하여 약 9.70±0.15 log CFU/g을 나타냈으며 48시간까지 유지됨.

다) 관능적 특성

• *W. koreensis* DB1

- 신맛의 경우, 생미강에서는 신맛이 전혀 느껴지지 않았으며 발효 후 미강에서 약간의 신맛이 느껴짐.
- 쓴맛의 경우, 생미강에서 특유의 쓴맛이 끝에 남았으며 발효 전 미강에서는 첨가한 아르기닌에 의해 약간의 쓴맛이 느껴짐. 발효 후 미강에서는 쓴맛이 전혀 느껴지지 않음.
- 발효 후 미강에서 부드럽고 고소한 맛이 강하게 느껴지는 반면 생미강에서는 지푸라기와 같은 냄새와 거친 조직감이 느껴짐.
- 발효 전 미강보다 발효 후 미강에서 부드러운 조직감이나 고소한 맛이 증가하여 기호도가 더 높게 나타남. 그 중 동결건조 발효 후 미강에서 가장 높은 기호도를 나타냄.

☞ 생미강(1.0점) 대비 발효 후 열풍건조(4.0점), 동결건조(5.0점)가 더 높은 기호도를 나타냄.

Table 1. *W. koreensis* DB1의 미강발효물 관능검사

	생미강	발효 전		발효 후	
		열풍	동결	열풍	동결
신맛	1.1±0.4 <sup>b</sup>	2.9±0.6 <sup>a</sup>	2.8±0.7 <sup>a</sup>	3.0±0.8 <sup>a</sup>	3.0±0.8 <sup>a</sup>
쓴맛	4.8±0.5 <sup>a</sup>	2.5±0.9 <sup>b</sup>	2.4±0.9 <sup>b</sup>	1.9±0.6 <sup>b</sup>	1.9±0.6 <sup>b</sup>
짠맛	2.1±0.8 <sup>a</sup>	2.8±0.5 <sup>a</sup>	2.8±0.5 <sup>a</sup>	2.8±0.5 <sup>a</sup>	2.8±0.5 <sup>a</sup>
고소한 맛	1.3±0.5 <sup>c</sup>	2.6±0.5 <sup>b</sup>	2.6±0.5 <sup>b</sup>	4.4±0.5 <sup>a</sup>	4.4±0.5 <sup>a</sup>
냄새	4.8±0.5 <sup>a</sup>	2.4±0.7 <sup>b</sup>	2.4±0.7 <sup>b</sup>	1.5±0.5 <sup>c</sup>	1.5±0.5 <sup>c</sup>
조직감	2.4±1.6 <sup>b</sup>	2.5±0.9 <sup>b</sup>	4.9±0.4 <sup>a</sup>	2.5±0.9 <sup>b</sup>	4.9±0.4 <sup>a</sup>
산패취	4.4±0.7 <sup>a</sup>	4.4±0.7 <sup>a</sup>	4.4±0.7 <sup>a</sup>	4.4±0.7 <sup>a</sup>	4.4±0.7 <sup>a</sup>
밝기	4.9±0.4 <sup>a</sup>	2.6±0.7 <sup>c</sup>	3.9±0.4 <sup>b</sup>	2.4±0.7 <sup>c</sup>	3.9±0.4 <sup>b</sup>
기호도	1.0±0.0 <sup>d</sup>	2.9±0.6 <sup>c</sup>	3.0±0.8 <sup>c</sup>	4.0±0.0 <sup>b</sup>	5.0±0.0 <sup>a</sup>

\* Values in same column with different letters indicate significant difference (p<0.05)

• *L. plantarum* EM

- 신맛의 경우, 발효 후 미강에서 강한 신맛이 느껴짐. 이는 homo형의 젖산균인 *L. plantarum* EM의 산 생성능에 의한 것으로 사료됨.
- 발효 후 미강에서 조직감이 부드러워지며 지푸라기와 같은 불쾌취가 느껴지지 않음. 그러나 강한 신맛으로 인해 기호도가 낮게 평가됨에 따라 식품첨가물인 스테비아를 소량(0.1%) 첨가하여 관능을 실시함. 스테비아를 첨가한 발효 후 미강에서 신맛이 줄어들고 약간의 단맛과 함께 고소한 맛이 느껴져 기호도가 증가하는 것을 확인할 수 있음.

☞ 생미강(1.0점) 대비 발효 후 열풍건조(4.0점), 동결건조(5.0점)가 더 높은 기호도를 나타냄. 특히, 스테비아 첨가 후 약 1.2~2.4점 높은 기호도를 나타냄.

Table 2. *L. plantarum* EM의 미강발효물 관능검사

	생미강	발효 전		발효 후		발효 후 + 스테비아	
		열풍	동결	열풍	동결	열풍	동결
신맛	1.1±0.4 <sup>d</sup>	1.9±0.4 <sup>c</sup>	1.9±0.4 <sup>c</sup>	5.0±0.0 <sup>a</sup>	5.0±0.0 <sup>a</sup>	4.1±0.4 <sup>b</sup>	4.1±0.4 <sup>b</sup>
쓴맛	4.8±0.5 <sup>a</sup>	1.5±0.5 <sup>b</sup>	1.5±0.5 <sup>b</sup>	1.5±0.5 <sup>b</sup>	1.5±0.5 <sup>b</sup>	-	-
짠맛	2.3±0.7 <sup>a</sup>	2.6±0.5 <sup>a</sup>	2.6±0.5 <sup>a</sup>	2.6±0.5 <sup>a</sup>	2.6±0.5 <sup>a</sup>	-	-
고소한 맛	1.1±0.4 <sup>b</sup>	2.1±0.4 <sup>a</sup>	2.1±0.4 <sup>a</sup>	2.1±0.4 <sup>a</sup>	2.1±0.4 <sup>a</sup>	-	-
냄새	4.8±0.5 <sup>a</sup>	1.4±0.5 <sup>b</sup>	1.4±0.5 <sup>b</sup>	1.1±0.4 <sup>b</sup>	1.1±0.4 <sup>b</sup>	-	-
조직감	2.3±1.5 <sup>c</sup>	4.0±0.0 <sup>b</sup>	5.0±0.0 <sup>a</sup>	4.0±0.0 <sup>b</sup>	5.0±0.0 <sup>a</sup>	-	-
산패취	4.4±0.7 <sup>a</sup>	4.4±0.7 <sup>a</sup>	4.4±0.7 <sup>a</sup>	4.4±0.7 <sup>a</sup>	4.4±0.7 <sup>a</sup>	-	-
밝기	4.9±0.4 <sup>a</sup>	2.5±0.5 <sup>c</sup>	3.6±0.5 <sup>b</sup>	1.9±0.8 <sup>d</sup>	3.6±0.5 <sup>b</sup>	-	-
기호도	1.0±0.0 <sup>d</sup>	3.0±0.0 <sup>b</sup>	3.0±0.0 <sup>b</sup>	1.9±0.4 <sup>c</sup>	1.9±0.4 <sup>c</sup>	3.1±0.6 <sup>b</sup>	4.3±0.4 <sup>a</sup>

\* Values in same column with different letters indicate significant difference (p<0.05)

라) 기능성 평가

① 항콜레스테롤능

• *W. koreensis* DB1

: DB1의 경우, 발효 전/후 미강의 콜레스테롤 제거능에 차이를 나타내지 않음. 1차년도 연구 결과에서도 나타난 바와 같이 DB1은 콜레스테롤 제거능을 가지고 있지 않음. 이에 동결/열풍건조를 거친 발효 전/후 미강 모두 약 9~10%의 콜레스테롤 제거능을 나타냄.

Table 3. *W. koreensis* DB1의 미강발효물 콜레스테롤 제거능

Unit : %

	0.5% Oxgall	0.5% TDCA
발효 전 열풍	9.9±0.4	10.2±0.0
발효 후 열풍	9.8±0.4	10.0±0.3
발효 전 동결	9.8±0.2	10.2±0.3
발효 후 동결	10.3±0.2	9.7±0.6

• *L. plantarum* EM

: EM의 경우, 발효 전 미강의 콜레스테롤 제거능이 약 9%인 반면에 발효 후 미강의 콜레스테롤 제거능은 oxgall 기준 약 60~69%, TDCA 기준 약 23~30%로 크게 증가한 것을 볼 수 있음. 이는 *L. plantarum* EM 사균의 콜레스테롤 흡착능을 통해 제거되는 것으로 사료됨(Ref: Cholesterol-lowering effects of a putative probiotic strain *Lactobacillus plantarum* EM isolated from kimchi(2015) LWT-Food Sci & Tech, 62, 210-217).

Table 4. *L. plantarum* EM의 미강발효물 콜레스테롤 제거능

Unit : %

	0.5% Oxgall	0.5% TDCA
발효 전 열풍	9.7±1.1	9.3±3.1
발효 후 열풍	69.4±0.3	30.0±4.5
발효 전 동결	9.5±1.2	8.4±0.8
발효 후 동결	60.5±2.5	23.8±3.8

② 오르니틴 함량

- *W. koreensis* DB1: DB1의 경우, 발효 후 열풍건조물과 동결건조물 모두에서 오르니틴으로 완전히 전환되는 것을 확인할 수 있음.
- *L. plantarum* EM: EM의 경우, 아르기닌에서 오르니틴으로 전환되지 않음.

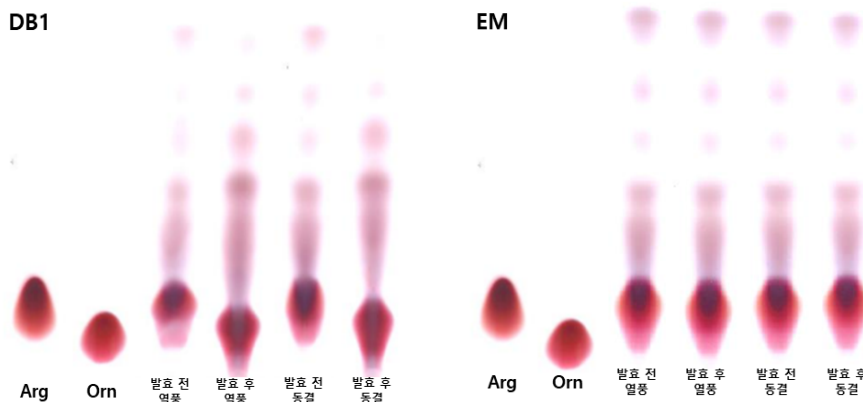


Figure 3. *W. koreensis* DB1과 *L. plantarum* EM 미강발효물의 오르니틴 TLC 결과



마) 향기성분 분석(GC/MS)

• 생미강

: 생미강의 향기성분 분석 결과, 총 53종의 성분이 검출됨. 이 중 acetic acid(22.14%)가 가장 많은 양 검출되었고 그 다음으로는 5-hydroxymethyl furfural (16.35%), fufural(15.59%), benzaldehyde(6.16%), 2-furanmethanol (3.24%) 등이 검출되었으며 이들은 미강에서 검출된바 있음(Ref: Analysis of the key aroma volatile compounds in rice bran during storage and processing via HS-SPME GC/MS(2021) J Cereal Sci, 99, 103178). 또한, green, hay와 같이 지푸라기 풀 냄새를 내는 성분으로 heptanal, octanal, 2-nonenal, 2-decenal, nerol oxide는 생미강에서만 검출되었으며 그 외 2-octenal, 2-methyl propanal 등 총 14종의 green, hay, fresh 등의 관능적 특성을 내는 성분이 검출되었음(Ref: Determination of flavor components of rice bran by GC-MS and chemometrics(2012) Analytical Methods, 4, 539).

☞ 생미강 주요 향기성분은 heptanal, octanal, 2-nonenal, 2-decenal, nerol oxide, 2-octenal, 2-methyl propanal 등 green, hay, fresh한 관능적 특성을 가진 성분이 다량 검출됨.

Table 5. 생미강의 향기성분

Unit : Relative peak area (%)

No.	Compounds	생미강
1	Acetone	1.75
2	n,n-Dimethyl methylamine	0.16
3	Formic acid	0.96
4	2-Methyl propanal	0.43
5	Acetic acid	22.14
6	2-Methyl butanal	0.43
7	1-Hydroxy-2-propanone	0.16
8	Propanoic acid	0.42
9	Pentanal	0.97
10	Pyrrole	0.12
11	1-Pentanol	0.40
12	Furan, 2,3-dihydro-4-methyl	0.23
13	Hexanal	1.67
14	3(2H)-Furanone, dihydro-2-methyl	0.17
15	Methyl pyrazine	0.14
16	Furfural	15.59
17	2-Furanmethanol	3.24
18	Acetoxyacetone	0.31
19	4-Cyclopentene-1,3-dione	1.45
20	Heptanal	0.27
21	2(5H)-Furanone	1.01
22	Butyrolactone	0.17
23	2,5-Furandione, 3-methyl	0.13
24	2-Heptenal, (E)	0.41
25	5-Methyl, 2-furancarboxaldehyde	2.63
26	Bezaldehyde	6.16
27	2,4-Dihydroxy-2,5-dimethyl-3(2H)-furan-3-one	0.34
28	2-Pentyl furan	1.35
29	Octanal	0.40
30	1H-Pyrrole-2-carboxaldehyde	0.76
31	3(2H)-Furanone, 4-hydroxy-5-methyl	0.18
32	Pantolactone	0.87
33	2-Octenal	0.15

34	2,5-Furandicarboxyaldehyde	0.88
35	3-Pyridinol or 4-Pyridinone	1.66
36	Nonanal	1.57
37	3-Methyl pentanal	0.52
38	4H-Pyran-4-one, 2,3-dihydro-3,5-dihydroxy-6-methyl	2.01
39	2-Nonenal, (E)	0.33
40	Decane	0.20
41	2,3-Dihydro benzofuran	0.43
42	5-Hydroxymethyl furfural	16.35
43	4-Oxononanal	0.11
44	2-Decenal, (E)	0.31
45	5-Acetoxymethyl-2-furaldehyde	0.81
46	2-Methoxy-4-vinylphenol	1.07
47	2,4-Decadienal, (E,E)	0.56
48	Nerol oxide	0.15
49	Vanillin	0.72
50	n-Hexadecanoic acid	2.93
51	9,12-Octadecadienoic acid	0.51
52	Oleic acid	3.01
53	Stearic acid	0.30
	SUM	100.00

• W. koreensis DB1

: 발효 전 미강의 경우, 열풍과 동결건조 미강제품에서 각각 51종, 44종의 향기성분이 분석되었으며 그 중 acetic acid(28.63~35.09 %)의 함량이 가장 높게 나타남. 그다음으로는 4H-pyran-4-one, 2,3-dihydro-3,5-dihydroxy-6-methyl(4.59~11.54%), 3-methyl butanal(4.52~10.17%), fufural (3.76~7.78%) 등이 높게 검출됨. 발효 전 미강에서는 green, hay 등 풀 냄새를 나타내는 2-methyl propanal, 1-hydroxy-2-propanone 등과 nutty, malty 등 견과류의 고소한 향을 내는 2-methyl butanal, fufural, 2-acetyl pyrrole 등이 동시에 검출되었음(Ref: A comprehensive analysis of aroma compounds and microstructure changes in brown rice during roasting process(2018) LWT Food Sci & Tech, 98, 613-621).

발효 후 미강의 경우, 열풍건조에서 총 63개의 향기성분이 검출되었으며 동결건조에서는 73개로 가장 많은 수의 향기성분이 검출되었음. 발효 후 미강 열풍/동결 건조시 acetic acid(14.24~15.15%), lactic acid(16.64~29.16%)로 가장 많이 검출되었으며 그 외 oleic acid(3.89~11.22%) 등이 검출됨. 검출된 향기성분 중 sweet한 향을 내는 것으로 알려진 propylene, glycerin,  $\alpha$ -hydroxisocaproic acid와 커피향, 다크초콜렛이나 와인과 같은 발효취를 나타내는 것으로 알려진 hexanoic acid, pyrazine, 2-ethyl-3,5-dimethyl, dl-Mevalonic acid lactone, tryptophol, hexadecanoic acid, ethyl ester 등은 발효 후 미강에서만 검출됨. 특히 고소한 향과 특유의 향긋한 향을 냈던 발효 후 동결건조에서는 2-vinyl furan, 3-methyl butanoic acid, 2-hexanol, phenol, trimethyl pyrazine, 1H-pyrrole-2-carboxaldehyde-1-methyl, 2-butoxyethyl acetate, 2-furoic acid, benzoic acid, 1-(2-furanylmethyl)-1H-pyrrole, 1-furfuryl pyrrole이 유일하게 검출되며 발효취와 과일향, 와인향과 발사믹 향 등이 어우러진 것으로 사료됨(Ref: Comparison of volatile and nonvolatile compounds in rice fermented by different lactic acid bacteria(2019) Molecules, 24, 1183).

☞ W. koreensis DB1의 미강발효물의 주요 성분은 propylene, glycerin 등 sweet한

향을 내는 성분과 hexanoic acid, pyrazine, 2-ethyl-3,5-dimethyl, dl-Mevalonic acid lactone, tryptophol, hexadecanoic acid, ethyl ester 등 고소한 향, 커피향, 와인향, 다크초콜릿향을 내는 성분이 검출됨. 특히, 발효 후 동결건조물에서만 검출된 성분들은 2-vinyl furan, 3-methyl butanoic acid, 2-hexanol, trimethyl pyrazine, 2-butoxyethyl acetate, 1-(2-furanylmethyl)-1H-pyrrole 등으로 고소하고 향긋한 발효취를 내는 성분임.

Table 6. *W. koreensis* DB1 미강발효물의 향기성분

Unit : Relative peak area (%)

No.	Compounds	발효 전		발효 후	
		열풍	동결	열풍	동결
1	Ethanol	-	-	-	6.31
2	Acetone	0.89	1.76	0.55	-
3	n,n-Dimethyl methylamine	0.23	-	-	2.01
4	Formic acid	-	-	0.12	0.36
5	2-Methyl propanal	4.39	2.34	1.61	1.76
6	Acetic acid	28.63	35.09	15.16	14.24
7	Imidazole	-	-	4.34	-
8	3-Methyl butanal	10.17	4.52	1.04	1.35
9	2-Methyl butanal	4.20	4.14	1.39	1.47
10	1-Hydroxy-2-propanone	2.29	-	-	-
11	Propanoic acid	0.66	0.70	-	0.47
12	Pentanal	-	0.50	-	0.84
13	2-Vinyl furan	-	-	-	0.26
14	2-Heptanol or 2-Butanol, 3-methyl	0.26	-	-	-
15	Isopropyl alcohol	0.12	-	0.23	0.79
16	Propylene glycol	-	-	0.39	0.53
17	Pyrrole	0.26	0.38	0.27	0.83
18	Acetamide	-	-	-	2.11
19	2,3-Butanediol	0.13	-	0.23	0.19
20	Hexanal	0.30	0.78	0.31	0.86
21	3(2H)-Furanone, dihydro-2-methyl	0.10	0.23	1.45	0.42
22	Methyl pyrazine	0.47	0.30	0.35	0.61
23	Furfural	3.76	7.78	0.95	3.69
24	1H-Pyrrole, 2-methyl	0.17	-	0.15	0.15
25	3-Methyl butanoic acid	-	-	-	0.15
26	2-Furanmethanol	1.57	2.41	0.15	0.51
27	Acetoxyacetone	-	0.16	-	-
28	Lactic acid	-	-	29.16	16.64
29	4-Cyclopentene-1,3-dione	1.01	1.93	-	2.75
30	2-Hexanol	-	-	-	4.76
31	2(5H)-Furanone	1.09	1.22	-	0.41
32	Butyrolactone	-	0.94	-	0.61
33	2,5-Dimethyl pyrazine	1.15	-	-	0.91
34	3-Ethyl-1-methyl-1,2,4-triazole	-	-	0.21	-
35	5-Methyl, 2-furanmethanol	0.60	0.46	0.25	-
36	2-Heptenal, (E)	-	0.22	-	0.24
37	5-Methyl, 2-furancarboxaldehyde	1.58	3.15	0.41	1.63
38	Benzaldehyde	0.23	0.49	0.15	0.51
39	Phenol	-	-	-	0.27
40	Hexanoic acid	-	-	0.14	0.36
41	2,4-Dihydroxy-3,5-dimethyl-3(2H)-furan-3-one	0.91	0.72	0.12	-
42	2-Pentyl furan	-	0.67	0.19	1.04
43	Glycerin	-	-	0.91	0.24
44	2-Ethyl-6-methyl pyrazine	0.27	-	0.16	0.38
45	Propanamide, 2-hydroxy	-	-	0.66	-

46	Trimethyl pyrazine	-	-	-	0.75
47	1H-Pyrrole-2-carboxaldehyde-1-methyl	-	-	-	0.29
48	1,2-Cyclopentanedione, 3-methyl	0.23	-	-	-
49	1H-Pyrrole-2-carboxaldehyde	0.26	0.66	1.97	6.26
50	3(2H)-Furanone, 4-hydroxy-5-methyl	0.29	-	-	-
51	1-(2-Pyridinyl) ethanone	-	-	-	0.16
52	Pantolactone	0.65	0.50	0.46	0.73
53	Benzeneacetaldehyde	0.91	0.60	0.18	0.18
54	Furaneol	1.15	0.25	0.53	-
55	2-Butoxyethyl acetate	-	-	-	0.48
56	2-Octenal	-	-	-	0.47
57	2-Acetyl pyrrole	1.89	1.22	0.34	0.23
58	2-Furoic acid	-	-	-	1.85
59	Pyrazine, 2-ethyl-3,5-dimethyl	-	-	1.62	0.54
60	2,5-Furandicaroxaldehyde	-	0.31	-	-
61	2(3H)-Furanone, 5-butyldihydro-4-methyl, cis	0.22	-	0.30	0.73
62	3-Pyridinol or 4-Pyridinone	-	0.93	-	1.99
63	Nonanal	0.25	0.72	0.18	-
64	2(1H)-Pyridinone, 3-methyl or Phenol, 4-amino	0.35	-	-	-
65	Maltol	0.71	0.53	0.27	0.63
66	$\alpha$ -Hydroxyisocaproic acid	-	-	2.08	0.51
67	1-(6-Methyl-2-pyrazinyl)-1-ethanone	-	-	0.15	0.16
68	3-Methyl pentanal	-	0.45	-	-
69	Succinimide	-	-	0.98	0.50
70	4H-Pyran-4-one, 2,3-dihydro-3,5-dihydroxy-6-methyl	11.54	4.59	2.72	0.32
71	2(3H)-Furanone, dihydro-4-hydroxy	0.10	-	0.53	-
72	Benzoic acid	-	-	-	0.15
73	Dehydromevalonic acid	-	-	0.26	0.48
74	1-(2-Furanlymethyl)-1H-pyrrole	-	-	-	0.23
75	4H-Pyran-4-one, 3,5-dihydroxy-2-methyl	0.50	0.42	0.54	-
76	2(3H)-Furanone, 5-butyldihydro	0.35	0.57	3.47	0.57
77	2-Butyl pyridine	-	-	0.23	0.47
78	1H-Indole, 2,3-dihydro-1-methyl	-	-	0.22	-
79	2,3-Dihydro benzofuran	0.74	0.47	0.66	0.45
80	5-Hydroxymethyl furfural	1.76	5.92	-	-
81	dl-Mevalonic acid lactone	-	-	0.25	0.41
82	5-Thiazoleethanol, 4-methyl	0.21	-	0.08	0.21
83	2-Methoxy-4-vinylphenol	0.94	0.83	0.74	1.10
84	2,4-Decadienal, (E,E)	-	-	-	0.18
85	Tryptophol	-	-	0.24	0.30
86	1,5-Naphthalenediol	-	-	0.18	0.40
87	Pyrrole, 1-methyl-2-(2-pyrrolidinyl)	-	-	0.05	-
88	Vanillin	0.23	0.35	-	0.15
89	1-Furfuryl pyrrole	-	-	-	0.28
90	Benzaldehyde, 4-ethoxy	-	-	0.03	-
91	Phenol, 4-ethenyl-2,5-dimethoxy	-	-	0.05	-
92	1H-Indole-5-carboxaldehyde, 2,3-dihydro-1-methyl	-	-	0.05	-
93	Tetradecanoic acid	-	-	0.11	-
94	$\rho$ -Formophenetidide	0.13	-	-	-
95	n-Hexadecanoic acid	2.79	2.33	4.46	1.94
96	Hexadecanoic acid, ethyl ester	-	-	0.07	0.09
97	9,12-Octadecadienoic acid	1.20	0.10	3.45	0.70
98	Oleic acid	5.91	6.18	11.22	3.89
99	Stearic acid	1.25	1.18	0.28	0.56
	SUM	100.00	100.00	100.00	100.00

• *L. plantarum* EM

: 발효 전 미강의 경우, oleic acid(10.72~22.32%)이 가장 많은 양 검출되었으며

그 다음으로는 4H-pyran-4-one, 2,3-dihydro-3,5-dihydroxy-6-methyl (6.99~19.19%), 9,12-octadecanoic acid(2.13~12.20%) 등이 검출됨. green, hay와 같은 풀 냄새를 내는 2-methyl propanal(2.56~1.65%)과 5-hydroxymethyl furfural이 검출됨(Ref: A comprehensive analysis of aroma compounds and microstructure changes in brown rice during roasting process(2018) LWT Food Sci & Tech, 98, 613-621).

발효 후 미강의 경우, lactic acid 함량이 약 33.95~49.01%로 가장 높게 검출되었고 이 외에도 acetic acid(4.47~4.79%), n-hexadecanoic acid(7.58~15.98%), 9,12-octadecanoic acid(4.84~7.16%), oleic acid(13.09~14.98%) 등 sour, fatty, vinegar-like 향을 내는 물질이 다량 검출됨. 그 외 sweet한 향과 과일향을 내는 것으로 알려진 2-butanone, 2-butoxyethyl acetate, benzeneacetic acid, hexadecanoic acid, ethyl ester 등이 검출되어 신 향과 함께 향긋한 발효취를 갖는 것으로 나타남(Ref: Volatile compounds produced by *Lactobacillus paracasei* during oat fermentation(2016) J Food Sci, 81(12), C2915-C2922).

☞ *L. plantarum* EM의 미강발효물의 주요 성분은 lactic acid로 관능적으로 신맛과 신향이 낮던 원인 물질로 사료되며 그 외 acetic acid, n-hexadecanoic acid 등은 sour, fatty, vinegar-like 향을 내는 물질들이 다량 검출됨.

Table 7. *L. plantarum* EM 미강발효물의 향기성분

Unit : Relative peak area (%)

No.	Compounds	발효 전		발효 후	
		열풍	동결	열풍	동결
1	Acetone	0.37	0.74	0.31	0.44
2	Formic acid	0.15	-	-	-
3	2-Methyl propanal	1.65	2.55	0.81	0.89
4	Acetic acid	5.79	14.63	4.47	4.80
5	3-Methyl butanal	4.02	5.12	1.54	1.42
6	2-Methyl butanal	1.85	3.55	0.65	0.75
7	Propanoic acid	-	-	-	0.13
8	2-Butanone	-	-	0.03	-
9	3-Hexanone	0.12	-	0.11	0.14
10	Propylene glycol	-	-	0.13	0.13
11	Dimethyl disulfide	0.06	-	-	-
12	Pyrrole	-	-	0.03	0.04
13	1-Pentanol	-	-	0.04	0.03
14	2,3-Butanediol	-	-	-	0.10
15	Hexanal	0.17	0.45	0.12	0.17
16	Cyclotrisiloxane, hexamethyl	-	-	0.04	-
17	3(2H)-Furanone, dihydro-2-methyl	-	-	-	0.06
18	Methyl pyrazine	-	-	0.05	-
19	Furfural	2.42	5.22	1.20	1.95
20	2-Furanmethanol	0.56	1.41	0.15	0.30
21	Lactic acid	1.41	3.14	33.95	49.01
22	4-Cyclopentene-1,3-dione	1.26	1.66	-	-
23	2(5H)-Furanone	0.45	0.84	-	-
24	Butyrolactone	0.18	0.68	-	-
25	2,5-Furandione, 3-methyl	0.07	-	-	0.14
26	5-Methyl, 2-furanmethanol	0.19	0.53	-	-
27	2-Heptenal, (E)	-	-	-	0.03
28	5-Methyl, 2-furancarboxaldehyde	0.86	1.26	0.62	0.93
29	Benzaldehyde	0.11	0.23	0.13	0.10
30	Dimethyl trisulfide	-	-	0.04	-
31	Cyclotetrasiloxane, octamethyl	-	-	0.06	-

32	2,4-Dihydroxy-3,5-dimethyl-3(2H)-furan-3-one	0.60	1.27	0.15	0.37
33	Boronic acid, ethyl diethyl ester	-	-	0.06	-
34	2-Pentyl furan	-	0.54	0.06	-
35	2H-Pyran-2,6(3H)-dione	-	-	0.05	-
36	Glycerin	6.75	1.71	6.97	2.67
37	1H-Pyrrole-2-carboxaldehyde	-	-	-	0.31
38	Pantolactone	0.28	0.52	-	0.39
39	Benzeneacetaldehyde	0.53	0.84	0.21	-
40	Furaneol	0.22	0.47	-	0.18
41	2-Butoxyethyl acetate	-	-	0.13	0.21
42	2-Acetyl pyrrole	0.21	0.45	0.14	0.16
43	Pyrazine, 2-ethyl-3,5-dimethyl	0.08	-	0.20	0.26
44	2,5-Furandicarboxaldehyde	0.10	-	0.07	0.09
45	1,2,3-Propanetriol, 1-acetate	0.18	-	0.29	0.07
46	3-Pyridinol or 4-Pyridinone	0.16	-	-	0.11
47	Nonanal	0.17	0.31	0.15	0.15
48	Maltol	0.43	0.85	0.21	0.36
49	3-Methyl pentanal	0.21	0.82	1.02	1.60
50	Succinimide	0.23	-	0.28	-
51	4H-Pyran-4-one, 2,3-dihydro-3,5-dihydroxy-6-methyl	6.99	19.19	1.25	2.44
52	2(3H)-Furanone, dihydro-4-hydroxy	0.14	0.68	-	-
53	Benzoic acid	-	-	0.25	0.32
54	Phenol, 4-ethyl	-	-	0.14	0.23
55	1-(2-Furanlymethyl)-1H-pyrrole	-	-	0.11	-
56	4H-Pyran-4-one, 3,5-dihydroxy-2-methyl	0.67	1.10	0.39	0.47
57	2(3H)-Furanone, 5-butyldihydro	0.17	0.49	0.12	0.14
58	2,3-Dihydro benzofuran	0.34	0.86	0.20	0.16
59	5-Hydroxymethyl furfural	2.75	10.12	0.09	0.35
60	Benzeneacetic acid	-	-	0.03	0.02
61	5-Thiazoleethanol, 4-methyl	-	-	0.03	0.04
62	Salicylic acid	-	-	0.04	-
63	2-Methoxy-4-vinylphenol	0.34	0.52	0.30	0.29
64	Tryptophol	-	-	-	0.05
65	Vanillin	0.11	-	0.05	0.06
66	1-Furfuryl pyrrole	-	-	0.02	-
67	Phenol, 4-ethenyl-2,5-dimethoxy	-	-	0.01	0.03
68	Carbamic acid, methylphenyl, ethyl ester	0.15	0.25	-	-
69	Tetradecanoic acid	0.09	-	0.12	0.09
70	Palmitoleic acid	-	-	0.03	-
71	n-Hexadecanoic acid	18.17	4.15	15.98	7.58
72	Hexadecanoic acid, ethyl ester	-	-	0.39	-
73	9,12-Octadecadienoic acid	12.20	2.13	7.16	4.84
74	Oleic acid	22.32	10.72	14.98	13.09
75	Stearic acid	3.72	-	3.84	1.31
	SUM	100.00	100.00	100.00	100.00

☞ 향기성분 분석 결과 EM의 경우 52~57개의 향기성분이 검출되었고, DB1의 경우 63~73개로 훨씬 다양한 향기성분이 검출됨. 특히, 2-vinyl furan, 3-methyl butanoic acid, 2-hexanol, trimethyl pyrazine, 1H-pyrrole-2-carboxaldehyde-1-methyl, 1-(6-methyl-2-pyrazinyl)-1-ethanone, 1H-indole-2,3-dihydro-1-methyl, dl-mevalonic acid lactone, benzaldehyde-4-ethoxy 등 너트류의 고소한 향과 와인의 발효취, 향긋한 커피향, 달콤한 과일향을 내는 성분들이 DB1에서 다량 검출됨.

→ 이는 관능검사 결과와 일치하는 결과로 W.koreensis DB1의 미강발효물은 특유의 고소한 향과 더불어 향긋한 향으로 높은 기호도를 나타냄.  
(발효 후 동결건조 기준: DB1(5.0점) > EM(1.9점/스테비아 첨가 후 4.3점)

### 3) 기능성 미강발효제품의 성분 분석

#### 가) 일반성분

- *W. koreensis* DB1

: 수분 함량은 약 1~5%로 나타났으며 조회분은 약 8~9%, 조지방은 약 15~18%로 나타남. 열풍건조물의 수분이 함량이 약 3.99~5.41%로 동결건조물 (1.41~1.87%)보다 조금 높은 수분 함량을 나타냄.

Table 8. *W. koreensis* DB1의 미강발효제품 일반성분 분석

Unit : %(w/v)

Content		Moisture	Crude ash	Crude fat
열풍건조	발효 전	5.41±0.54	8.30±0.18	15.89±0.46
	발효 후	3.99±0.43	8.72±0.12	16.48±1.21
동결건조	발효 전	1.87±1.06	8.57±0.08	17.82±0.86
	발효 후	1.41±0.80	9.22±0.56	18.38±0.67

- *L. plantarum* EM

: 수분 함량은 약 1~4%로 나타났으며 조회분은 약 9%, 조지방은 약 16~18%로 나타남. DB1과 마찬가지로 열풍건조물(4.86~4.94%)이 동결건조물(1.86~2.01%)보다 높은 수분 함량을 나타냈으며 이는 건조방식에 따른 차이로 사료됨.

Table 9. *L. plantarum* EM의 미강발효제품 일반성분 분석

Unit : %(w/v)

Content		Moisture	Crude ash	Crude fat
열풍건조	발효 전	4.86±0.93	9.13±0.24	16.84±0.23
	발효 후	4.94±0.76	9.67±0.30	16.82±0.54
동결건조	발효 전	2.01±1.18	9.61±0.91	17.88±1.50
	발효 후	1.86±0.58	9.74±0.74	18.25±1.43

#### 나) 영양 성분

- 유리당

- *W. koreensis* DB1

: 발효 전 미강에서는 sucrose(61,269~75,557 mg/kg)와 glucose (56,605~80,531 mg/kg) 함량이 가장 높게 나타남. sucrose는 원료에 함유된 당이며 (2차년도 생미강의 유리당 분석 결과) glucose는 유산균 발효 최적화를 위해 첨가한 유리당임. 발효 후 미강에서는 *W. koreensis* DB1의 당대사능에 의해 glucose와 fructose가 모두 소진됨을 확인할 수 있음(1차년도 당대사능 결과).

Table 10. *W. koreensis* DB1의 미강발효물 유리당 함량

Unit : mg/kg

Content		발효 전	발효 후
열풍건조	Sucrose	75,557±28,323	62,224±1,141
	Glucose	56,605±8,703	-
	Fructose	3,067±210	-
	Mannitol	7,587±1,084	14,296±3,337
	Sorbitol	2,817±3,630	5,348±163
	<b>Total</b>	<b>145,632±50,949<sup>a</sup></b>	<b>81,869±4,642<sup>a</sup></b>
동결건조	Sucrose	61,269±355	62,362±778
	Glucose	80,531±696	-
	Fructose	4,270±41	-
	Mannitol	8,773±140	14,642±3,731
	Sorbitol	2,658±119	5,473±415
	<b>Total</b>	<b>158,201±1,351<sup>a</sup></b>	<b>82,477±4,926<sup>a</sup></b>

\* Values in same column with different letters indicate significant difference ( $p < 0.05$ )

- *L. plantarum* EM

: 발효 전 미강에서 sucrose(56,266~60,073 mg/kg)와 glucose(48,569~59,150 mg/kg) 함량이 가장 높게 나타났으며 이는 DB1과 동일한 이유로 사료됨. 발효 후 미강에서는 *L. plantarum* EM의 당대사능에 의해 glucose와 fructose가 모두 소진됨을 확인할 수 있음(Ref: 비가열 식품의 식중독 제어를 위한 미생물 유래 천연항균제 개발(2016) 고부가가치식품기술개발사업, 농림축산식품부).

Table 11. *L. plantarum* EM의 미강발효물 유리당 함량

Unit : mg/kg

Content		발효 전	발효 후
열풍건조	Sucrose	56,266±9,557	42,998±9,616
	Glucose	48,569±11,346	-
	Fructose	8,112±2,468	-
	Mannitol	8,306±405	6,608±3,703
	Sorbitol	4,648±153	3,449±1,750
	<b>Total</b>	<b>125,903±23,625<sup>a</sup></b>	<b>53,056±6,614<sup>a</sup></b>
동결건조	Sucrose	60,073±11,419	47,954±6,960
	Glucose	59,150±4,318	-
	Fructose	12,322±4,699	-
	Mannitol	5,983±4,329	6,555±3,056
	Sorbitol	3,225±2,637	2,900±616
	<b>Total</b>	<b>140,754±14,653<sup>a</sup></b>	<b>57,410±7,144<sup>a</sup></b>

\* Values in same column with different letters indicate significant difference ( $p < 0.05$ )

• 유기산

- *W. koreensis* DB1

: 발효 전 미강에서는 lactic acid가 약 17,980~17,986 mg/kg으로 가장 높게 검출되었으며 이는 미강과 함께 첨가된 corn steep liquor 내 함유된 유기산임을 확인하였음(data not shown). 발효 후 미강에서는 lactic acid(55,663~56,845 mg/kg)와 acetic acid (2,265~2,591 mg/kg)의 유기산 함량이 크게 증가하였으며 이는 hetero-fermentative type의 *W. koreensis* DB1 발효에 의한 것임(Ref: Characterization of high-ornithine-producing *Weissella koreensis* DB1 isolated from kimchi and its application in rice bran fermentation as a starter culture(2020) Foods, 9, 1545).

Table 12. *W. koreensis* DB1의 미강발효물 유기산 함량

Unit : mg/kg

Content		발효 전	발효 후
열풍건조	Citric acid	4,167.72±276.04	4,677.25±463.12
	Fumaric acid	149.08±0.85	161.28±0.23
	Lactic acid	17,980.78±127.40	56,845.35±566.35
	Acetic acid	888.56±89.45	2,591.87±322.71
	<b>Total</b>	<b>23,186±493.74<sup>a</sup></b>	<b>64,275.75±1,352.41<sup>a</sup></b>
동결건조	Citric acid	4,112.31±268.17	5,036.64±884.29
	Fumaric acid	165.50±3.57	150.27±1.35
	Lactic acid	17,986.51±405.21	55,663.99±1,585.98
	Acetic acid	905.20±41.85	2,265.39±840.68
	<b>Total</b>	<b>23,169.52±718.80<sup>a</sup></b>	<b>63,116.29±3,312.30<sup>a</sup></b>

\* Values in same column with different letters indicate significant difference ( $p < 0.05$ )



- *L. plantarum* EM

: DB1과 마찬가지로 발효 전 미강에서는 lactic acid(17,199~17,745 mg/kg) 함량이 가장 높게 나타남. 발효 후 미강에서 lactic acid(91,979~ 93,918 mg/kg) 함량이 매우 크게 증가하는 것을 볼 수 있음. 이는 homofermentative type인 *L. plantarum* EM 발효에 의한 것으로 사료됨(Ref: Rice bran fermentation using *Lactiplantibacillus plantarum* EM as a starter and the potential of fermented rice bran as a functional food(2021) Foods, 10, 978).

Table 13. *L. plantarum* EM의 미강발효물 유기산 함량

Unit : mg/kg

Content		발효 전	발효 후
열풍건조	Citric acid	1,332±2,119	-
	Fumaric acid	41±67	35±57
	Lactic acid	17,199±1,044	91,944±3,065
	Acetic acid	n.d	n.d
	<b>Total</b>	<b>18,573±2,325<sup>a</sup></b>	<b>91,979±3,008<sup>a</sup></b>
동결건조	Citric acid	1,470±2,369	1,284±1,119
	Fumaric acid	43±71	57±95
	Lactic acid	17,745±2,136	93,918±8,015
	Acetic acid	n.d	n.d
	<b>Total</b>	<b>19,258±3,793<sup>a</sup></b>	<b>95,259±9,028<sup>a</sup></b>

\* Values in same column with different letters indicate significant difference (p<0.05)

• 지방산

- *W. koreensis* DB1

: 발효 전 미강과 발효 후 미강에서 myristic acid, palmitic acid, palmitoleic acid, stearic acid 등 총 11종의 지방산이 검출됨. 검출된 지방산 중 oleic acid(52~54 mg/g), linoleic acid(45~47 mg/g)가 가장 높게 검출되었으며 그 다음 순으로 palmitic acid(23~24 mg/g)가 높게 검출됨. 발효 전/후와 건조방법(열풍/동결)에 따른 차이점을 나타나지 않음.

Table 14. *W. koreensis* DB1의 미강발효물 지방산 함량

Unit : mg/g

Content		발효 전	발효 후
열풍건조	Myristic acid	0.43±0.01	0.73±0.05
	Palmitic acid	23.46±0.70	24.74±0.58
	Palmitoleic acid	0.22±0.01	0.23±0.01
	Stearic acid	1.93±0.19	2.04±0.09
	Oleic acid	52.46±4.94	54.58±2.51
	Linoleic acid	45.85±3.88	47.74±2.45
	Alpha-linolenic acid	1.64±0.09	1.72±0.07
	Arachidic acid	0.69±0.11	0.72±0.04
	Eicosenoic acid	0.69±0.10	0.71±0.04
	Behenic acid	0.53±0.07	0.61±0.10
	Lignoceric acid	1.24±0.18	1.30±0.09
	<b>Total</b>	<b>129.18±10.28<sup>a</sup></b>	<b>135.18±6.03<sup>a</sup></b>
	동결건조	Myristic acid	0.42±0.02
Palmitic acid		24.18±1.65	24.69±1.31
Palmitoleic acid		0.22±0.02	0.23±0.00
Stearic acid		1.96±0.21	2.03±0.15
Oleic acid		53.44±5.28	54.39±4.54
Linoleic acid		46.94±4.81	47.64±4.18

	Alpha-linolenic acid	1.69±0.15	1.72±0.13
	Arachidic acid	0.69±0.08	0.71±0.07
	Eicosenoic acid	0.69±0.08	0.71±0.07
	Behenic acid	0.59±0.11	0.61±0.13
	Lignoceric acid	1.24±0.16	1.29±0.15
	<b>Total</b>	<b>132.11±12.57<sup>a</sup></b>	<b>134.85±10.78<sup>a</sup></b>

\* Values in same column with different letters indicate significant difference (p<0.05)

- *L. plantarum* EM

: DB1과 마찬가지로 총 11종의 지방산이 검출되었으며 이 중 oleic acid(60~63 mg/g)와 linoleic acid(50~54 mg/g)가 가장 높게 나타남. 발효 전과 후, 건조방법(열풍/동결)에 따른 차이점은 나타나지 않음.

Table 15. *L. plantarum* EM의 미강발효물 지방산 함량

Unit : mg/g

Content		발효 전	발효 후
열풍건조	Myristic acid	0.44±0.02	0.46±0.03
	Palmitic acid	26.93±1.88	26.20±1.44
	Palmitoleic acid	0.25±0.01	0.24±0.01
	Stearic acid	2.25±0.24	2.27±0.24
	Oleic acid	60.91±6.37	60.41±6.72
	Linoleic acid	53.53±5.72	50.96±5.39
	Alpha-linolenic acid	1.92±0.18	1.81±0.14
	Arachidic acid	0.81±0.11	0.85±0.15
	Eicosenoic acid	0.80±0.10	0.84±0.14
	Behenic acid	0.66±0.07	0.66±0.09
	Lignoceric acid	1.49±0.20	1.50±0.23
	<b>Total</b>	<b>149.97±14.86<sup>a</sup></b>	<b>146.20±13.75<sup>a</sup></b>
동결건조	Myristic acid	0.48±0.05	0.55±0.18
	Palmitic acid	26.58±1.50	26.56±2.05
	Palmitoleic acid	0.26±0.01	0.25±0.02
	Stearic acid	2.34±0.19	2.30±0.33
	Oleic acid	63.43±4.93	61.70±8.18
	Linoleic acid	54.69±3.55	51.82±5.37
	Alpha-linolenic acid	1.90±0.11	1.81±0.12
	Arachidic acid	0.89±0.15	0.87±0.19
	Eicosenoic acid	0.87±0.11	0.86±0.17
	Behenic acid	0.67±0.08	0.69±0.11
	Lignoceric acid	1.54±0.19	1.57±0.29
	<b>Total</b>	<b>153.65±8.98<sup>a</sup></b>	<b>148.98±16.19<sup>a</sup></b>

\* Values in same column with different letters indicate significant difference (p<0.05)

• 유리아미노산

- *W. koreensis* DB1

: 발효 전과 발효 후 미강에서는 총 21종의 유리아미노산이 검출됨. 이 중 ornithine 생성을 위한 첨가한 arginine의 경우 발효 전에는 약 23,000~35,000 mg/kg으로 나타났으며 발효 후에는 167~413 mg/kg으로 감소됨을 확인하였고 반면에 ornithine의 경우 발효 전에는 검출되지 않았으나 발효 후에는 약 19,000~22,000 mg/kg까지 증가됨을 확인하였음. 이는 *W. koreensis* DB1의 아미노산 대사를 통해 arginine이 ornithine으로 전환되었음을 알 수 있음(Ref: Rice bran fermentation using *Lactiplantibacillus plantarum* EM as a starter and the potential of fermented rice bran as a functional food(2021) Foods, 10, 978).

Table 16. *W. koreensis* DB1의 미강발효물 유리아미노산 함량

Unit : mg/kg

Content		발효 전	발효 후
열풍건조	Aspartic acid	929.76±19.82	1,407.62±86.06
	Glutamic acid	1,543.38±700.40	1,498.29±449.35
	Asparagine	1,423.42±639.41	1,344.63±459.22
	Serine	679.12±102.04	917.13±122.66
	Glutamine	-	-
	Histidine	253.16±50.91	353.88±66.36
	Glycine	501.11±271.07	647.90±316.83
	Threonine	519.84±16.20	562.90±42.87
	Citrulline	117.40±10.71	7,955.49±645.38
	Arginine	33,409.77±502.30	413.47±29.97
	Alanine	1,922.46±307.24	4,487.18±647.49
	GABA	579.35±46.67	1,036.69±121.91
	Tyrosine	656.81±28.36	745.54±27.18
	Valine	865.79±409.81	1,458.30±660.30
	Methionine	304.26±142.86	257.36±108.80
	Tryptophane	235.59±115.76	1,716.43±1,060.59
	Phenylalanine	660.61±91.53	615.42±468.62
	Isoleucine	477.47±217.83	731.99±338.27
	Ornithine	-	19,911.77±242.35
	Leucine	1,434.69±67.83	651.03±80.99
Lysine	570.08±349.16	849.97±374.47	
Proline	1,570.06±714.95	1,964.02±689.60	
<b>Total</b>	<b>48,654.13±4,804.86<sup>a</sup></b>	<b>49,527.01±7,039.27<sup>a</sup></b>	
동결건조	Aspartic acid	1,079.93±32.54	1,488.06±25.18
	Glutamic acid	1,941.98±693.51	1,604.87±463.55
	Asparagine	1,958.14±713.87	1,302.43±542.63
	Serine	898.31±75.30	929.87±123.51
	Glutamine	-	56.61±4.37
	Histidine	420.94±15.24	383.52±43.97
	Glycine	587.62±247.35	672.36±342.44
	Threonine	634.44±18.98	614.09±14.00
	Citrulline	115.71±1.01	7,090.05±617.06
	Arginine	35,170.40±59.04	167.37±92.72
	Alanine	2,294.93±232.18	4,573.38±543.14
	GABA	977.98±14.66	1,008.09±103.03
	Tyrosine	878.75±17.02	762.63±14.92
	Valine	1,385.84±573.28	1,503.97±679.35
	Methionine	612.86±267.17	315.12±162.91
	Tryptophane	253.28±155.54	1,729.41±995.85
	Phenylalanine	771.94±372.51	318.18±53.41
	Isoleucine	772.86±329.64	755.75±354.41
	Ornithine	-	22,309.02±298.16
	Leucine	2,215.14±34.15	578.88±44.67
Lysine	1,018.86±475.47	888.62±440.87	
Proline	1,482.98±416.66	2,160.33±88.99	
<b>Total</b>	<b>55,472.89±4,745.12<sup>a</sup></b>	<b>51,212.61±6,049.14<sup>a</sup></b>	

\* Values in same column with different letters indicate significant difference ( $p < 0.05$ )

- *L. plantarum* EM

: 발효 전과 발효 후 미강에서는 총 21종의 유리아미노산이 검출됨. 발효 전과 후, 건조방법(열풍/동결)에 따른 유리아미노산 함량의 차이점은 나타나지 않았음.

Table 17. *L. plantarum* EM의 미강발효물 유리아미노산 함량

Unit : mg/kg

Content		발효 전	발효 후
열풍건조	Aspartic acid	952±52	893±119
	Glutamic acid	1,080±64	788±246
	Asparagine	1,335±170	1,235±105
	Serine	760±150	41±8
	Glutamine	10±17	10±18
	Histidine	279±68	359±73
	Glycine	373±69	577±103
	Threonine	616±145	501±116
	Citrulline	33±29	34±30
	Arginine	146±129	1,584±106
	Alanine	2,241±691	2,250±807
	GABA	779±210	1,089±192
	Tyrosine	656±53	475±87
	Valine	795±143	1,105±170
	Methionine	267±41	313±36
	Tryptophane	231±172	169±160
	Phenylalanine	719±57	584±90
	Isoleucine	444±81	538±105
	Ornithine	185±186	96±106
	Leucine	1,741±214	1,955±151
Lysine	542±194	603±237	
Proline	1,828±135	1,934±190	
<b>Total</b>	<b>16,951±2,842<sup>a</sup></b>	<b>17,143±2,142<sup>a</sup></b>	
동결건조	Aspartic acid	1,158±40	1,137±317
	Glutamic acid	1,019±372	862±241
	Asparagine	1,640±74	1,201±257
	Serine	952±135	328±488
	Glutamine	11±19	24±41
	Histidine	424±57	419±17
	Glycine	470±69	616±111
	Threonine	723±110	585±101
	Citrulline	38±33	38±33
	Arginine	1,722±29	1,648±92
	Alanine	2,586±590	2,082±1,031
	GABA	1,315±363	1,237±56
	Tyrosine	855±66	591±185
	Valine	1,142±122	1,196±146
	Methionine	504±46	304±87
	Tryptophane	259±157	129±50
	Phenylalanine	999±77	509±235
	Isoleucine	624±92	611±77
	Ornithine	83±84	94±106
	Leucine	2,393±102	1,642±967
Lysine	848±274	680±229	
Proline	1,975±169	2,057±148	
<b>Total</b>	<b>21,751±1,339<sup>a</sup></b>	<b>18,000±2,202<sup>a</sup></b>	

\* Values in same column with different letters indicate significant difference ( $p < 0.05$ )

※ 건조 방식에 따른 차이

- ① 일반성분: 열풍건조(약 3~5 %) 수분함량이 동결건조(약 1%)보다 높게 나타남. 이 외 조회분과 조지방의 함량에서는 유의적 차이를 나타내지 않음.
- ② 유리당: 열풍건조의 총 유리당 함량이 동결건조보다 높게 나타났으나 유의적 차이는 없음.
- ③ 유기산: 열풍건조와 동결건조에 따른 총 유기산 함량에는 차이를 나타내지 않음.
- ④ 지방산: 열풍건조와 동결건조에 따른 총 지방산 함량에는 차이를 나타내지 않음.
- ⑤ 유리아미노산: 열풍건조와 동결건조에 따른 총 유리아미노산 함량에는 차이를 나타내지 않음.

※ 균주에 따른 차이

- ① 일반성분: 수분과 조회분, 조지방의 함량은 유의차를 나타내지 않음.
- ② 유리당: 발효 전 DB1의 glucose 함량(약 56,000~81,000 mg/kg)이 EM(약 48,000~59,000 mg/kg)으로 다소 높게 나타남. 이는 DB1의 발효 최적화를 위해 첨가한 glucose 함량이 2%로 EM(1%)보다 높기 때문으로 사료됨. 또한, 발효 후 DB1의 mannitol 함량(약 14,000 mg/kg)이 EM(약 6,000 mg/kg)보다 높게 나타남에 따라 총 유리당 함량이 DB1이 유의적으로 높게 나타남.
- ③ 유기산: 발효 후 EM의 총 유기산 함량은 약 92,000~95,000 mg/kg으로 DB1의 총 유기산 함량(63,000~64,000 mg/kg)보다 높게 나타남. 이는 DB1의 경우, heterofermentative형 유산균이고 EM의 경우, homofermentative형 유산균으로 당으로부터 산을 대사하는 차이로 여겨짐.
- ④ 지방산: 균주에 따른 총 지방산 함량에는 차이를 나타내지 않음.
- ⑤ 유리아미노산: 발효 전 DB1의 아르기닌 함량이 약 33,000~35,000 mg/kg으로 EM(약 100~1,000 mg/kg)보다 높게 나타난 이유는 오르니틴 생성을 위해 아르기닌을 추가하였기 때문임. 발효 후 DB1의 시트룰린과 오르니틴 함량이 높은 이유는 아르기닌을 대사하여 시트룰린과 오르니틴을 생성하는 DB1의 기능적 특성 때문임.

다) 미강 발효 전과 발효 후 성분 분석 비교

- 일반성분: 발효 전과 후에 따른 일반성분 분석 결과에는 차이를 나타내지 않음.
- 유리당: DB1과 EM 모두 발효 후 glucose가 모두 대사되어 소진됨을 확인함.
- 유기산: DB1의 경우, heterofermentative형 젖산균으로 lactic acid와 함께 acetic acid 함량이 증가하였고 EM의 경우, homofermentative형 젖산균으로 lactic acid 함량이 크게 증가함.
- 지방산: 발효 전과 후에 따른 지방산 분석 결과에는 차이를 나타내지 않음.
- 유리아미노산: DB1의 경우, arginine을 ornithine으로 전환하여 발효 후 ornithine 함량이 크게 증가함.

4) 기능성 미강발효제품의 저장 안정성 평가

가) 저장기간: 0~12개월

나) 저장온도: 4℃, 상온

다) 생균수: plate count

- W. koreensis DB1

: 제조 직후 열풍건조에서는 미생물이 검출되지 않았으며 동결건조에서 약 100 CFU/g 이하의 DB1이 검출되었으나 이는 저장 1개월 이후 모두 사멸되어 검출되지 않음.

- *L. plantarum* EM

: 제조 직후 열풍건조와 동결건조에서 각각 100 CFU/g, 1,000 CFU/g 이하로 나타났으나 저장 1개월 이후에는 모두 사멸되어 검출되지 않음. 저장 12개월까지 4°C와 상온 저장 모두 일반세균, 대장균군 등이 검출되지 않음.

라) 기능성

① 콜레스테롤 제거능

- *L. plantarum* EM

: 그림 1과 같이 열풍건조와 동결건조 시료 모두 냉장보관과 상온보관 12개월까지 높은 콜레스테롤 제거능을 나타냄(oxgall 기준 약 60.0~67.1%, TDCA 기준 약 22.8~32.6%). 저장 안정성 평가에서 생균수 측정시 건조 직후 100~1,000 CFU/g의 EM이 검출되었지만 이내 저장 1달만에 모두 사멸하는 것을 확인한 바 있음. 그럼에도 불구하고 높은 콜레스테롤 저하능을 나타내는 이유는 사균상태에서도 콜레스테롤 흡착할 수 있는 *L. plantarum* EM의 특성인 것으로 사료됨(Ref: Cholesterol-lowering effects of a putative probiotic strain *Lactobacillus plantarum* EM isolated from kimchi(2015) LWT-Food Sci & Tech, 62, 210-217).

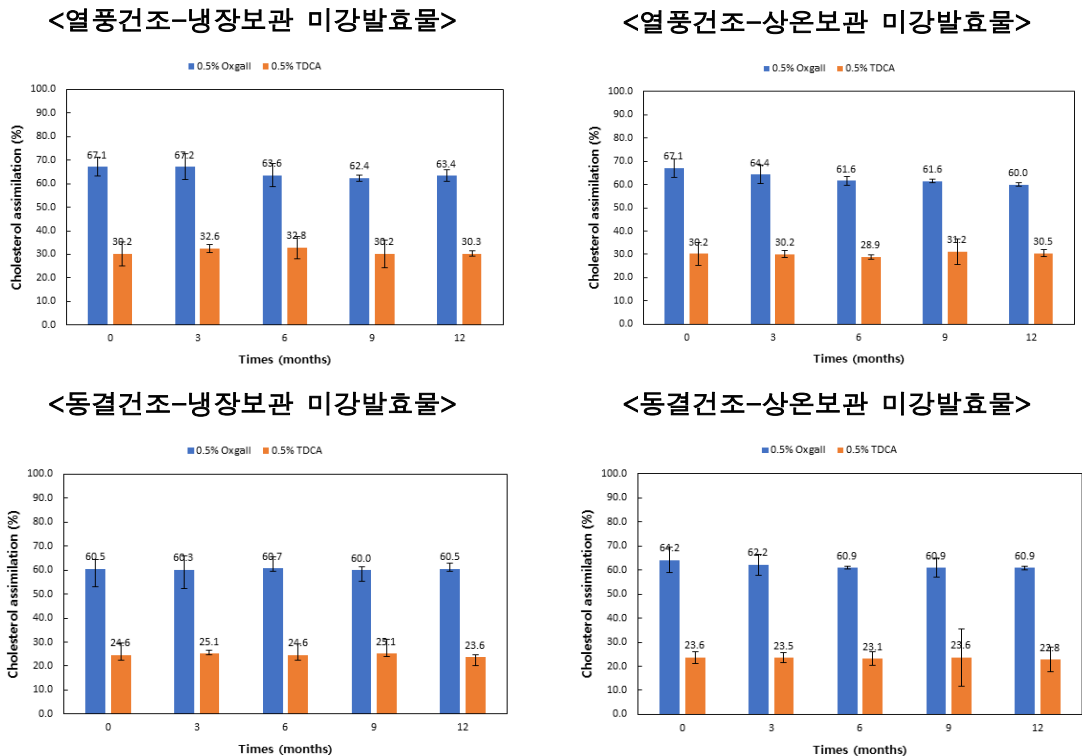


Figure 4. 미강발효물의 저장기간에 따른 콜레스테롤 저하능

② 오르니틴 함량

- *W. koreensis* DB1

: 열풍건조와 동결건조 시료 모두 냉장보관과 상온보관 12개월까지 ornithine 함량에는 변화가 없는 것으로 나타남.

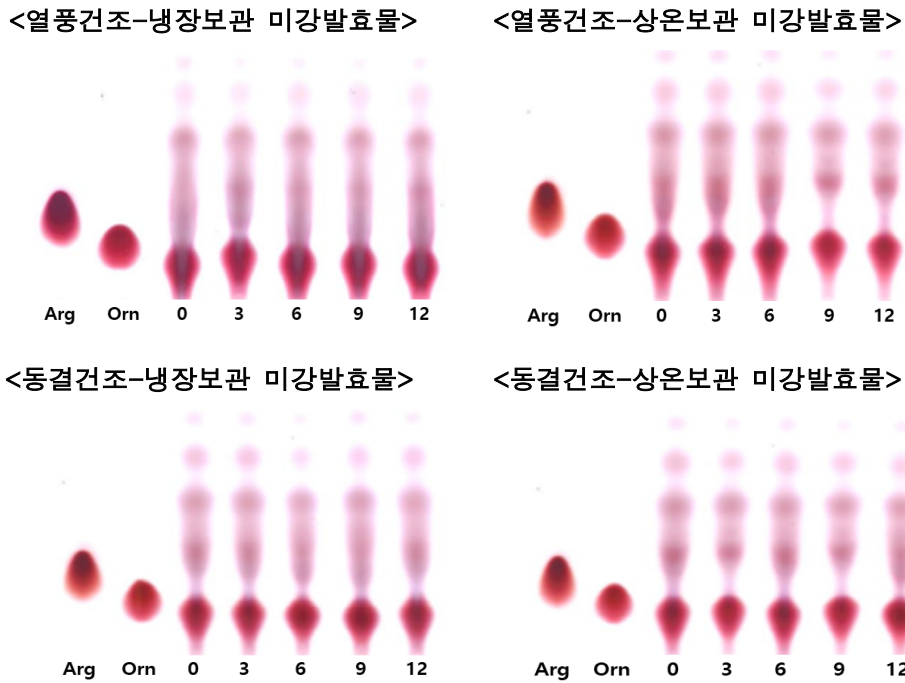


Figure 5. 미강발효물의 저장온도 및 저장기간에 따른 오르니틴 TLC 결과

③ 항산화능

• DPPH

- *W. koreensis* DB1

: 발효 전 열풍/동결건조의 DPPH 항산화능은 약 88.97~89.72%, 발효 후 열풍/동결건조는 약 90.23~90.42%로 나타났으며 이는 생미강(70.93%)보다 높은 수준임. 또한, 대표적인 항산화 물질로 알려진 BHT 1,000 ppm과 유사한 수준임.

- *L. plantarum* EM

: 발효 전 열풍/동결건조의 DPPH 항산화능은 약 92.13~ 93.58%로 나타났으며 발효 후 열풍/동결건조는 약 93.77~93.84%로 약간 높게 나타났지만 유의차는 나타나지 않음. 이는 ascorbic acid, BHA의 1,000 ppm과 유사한 수준임.

Table 18. 미강발효물의 DPPH 항산화능

	Sample		inhibition(%)
Control (1,000 ppm)	Ascorbic acid		95.62±0.54
	BHT		89.77±0.68
	BHA		93.64±0.52
DB1	생미강		70.93±0.75
	발효 전	열풍	89.72±1.08
		동결	88.97±0.76
	발효 후	열풍	90.42±0.59
동결		90.23±1.10	
EM	발효 전	열풍	93.58±0.45
		동결	92.13±0.85
	발효 후	열풍	93.84±0.39
		동결	93.77±0.35

• SOD assay

- *W. koreensis* DB1

: 발효 전 열풍/동결건조의 SOD 결과는 약 93.36~97.79%로 나타났으며 발효 후 열풍/동결건조는 96.90~99.09%로 나타남. 이는 항산화제로 알려진 ascorbic acid 100 ppm보다 높은 수치로 생미강 자체의 항산화력이 강한 것으로 사료됨.

- *L. plantarum* EM

: 발효 전 열풍/동결건조의 SOD 결과는 약 95.68~98.03%로 나타났으며 발효 후 열풍/동결건조는 101.74~106.65%로 나타남.

Table 19. 미강발효물의 SOD assay

	Sample		inhibition(%)
Control (100 ppm)	Ascorbic acid		28.37
DB1	생미강		93.25±2.49
	발효 전	열풍	97.79±1.65
		동결	93.36±1.04
	발효 후	열풍	99.09±1.61
동결		96.90±3.80	
EM	발효 전	열풍	95.68±0.74
		동결	98.03±3.30
	발효 후	열풍	101.74±10.54
		동결	106.65±9.21

④ 항균활성

- *W. koreensis* DB1

: 생미강과 발효 전 열풍/동결건조, 발효 후 열풍/동결건조 모두 항세균과 항곰팡이 활성을 나타내지 않음.

Table 20. *W. koreensis* DB1 미강발효물의 항균활성

Unit : AU/mL

	생미강	발효 전		발효 후		MRS (1X)
		열풍	동결	열풍	동결	
<i>Aspergillus fumigatus</i> ATCC 96918	0	0	0	0	0	0
<i>Aspergillus flavus</i> ATCC 22546	0	0	0	0	0	0
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 14579	0	0	0	0	0	0
<i>E. coli</i> 0157:H7 ATCC 43895	0	0	0	0	0	0

- *L. plantarum* EM

: 생미강과 발효 전 열풍/동결건조 미강에서는 항세균과 항곰팡이 활성을 나타내지 않은 반면, 발효 후 열풍/동결건조 미강에서는 원액에서 200~400 AU/mL의 항곰팡이 활성을 나타냈으며 200 AU/mL의 항세균 활성을 나타냄. 이는 MRS(실험실용 배지)와 유사한 결과로 *L. plantarum* EM의 항균 활성 생성에 의한 것으로 여겨짐(Ref: Purification and characterization of an antimicrobial compound produced by *Lactobacillus plantarum* EM showing both antifungal and antibacterial activities (2019) LWT-Food Sci & Tech, 114, 108403).



Table 21. *L. plantarum* EM 미강발효물의 항균활성

Unit : AU/mL

	생미강	발효 전		발효 후		MRS (1X)
		열풍	동결	열풍	동결	
<i>Aspergillus fumigatus</i> ATCC 96918	0	0	0	400	400	600
<i>Aspergillus falvus</i> ATCC 22546	0	0	0	200	200	200
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 14579	0	0	0	200	200	300
<i>E. coli</i> O157:H7 ATCC 43895	0	0	0	200	200	200

마) 관능적 특성

① *W. koreensis* DB1

• [저장온도 4℃]

: 냉장보관 시 신맛, 쓴맛, 짠맛, 고소한 맛, 냄새(지푸라기 등 불쾌취), 조직감, 밝기에는 큰 변화가 없었으나 열풍건조 시료의 경우, 약 6개월부터 약간의 산패취가 느껴졌으며 동결건조 시료의 경우에는 저장 12개월까지 산패취가 느껴지지 않음.

Table 22. 4℃에 저장한 미강발효물의 저장기간에 따른 관능검사

		0개월	3개월	6개월	9개월	12개월
열풍건조	신맛	2.1±0.7 <sup>a</sup>	2.3±0.8 <sup>a</sup>	2.3±0.8 <sup>a</sup>	2.3±0.8 <sup>a</sup>	2.3±0.8 <sup>a</sup>
	쓴맛	2.6±1.1 <sup>a</sup>	2.7±1.3 <sup>a</sup>	2.9±1.2 <sup>a</sup>	3.0±1.3 <sup>a</sup>	3.0±1.3 <sup>a</sup>
	짠맛	2.1±0.7 <sup>a</sup>	2.1±0.7 <sup>a</sup>	2.1±0.7 <sup>a</sup>	2.1±0.7 <sup>a</sup>	2.1±0.7 <sup>a</sup>
	고소한맛	4.0±1.0 <sup>a</sup>	4.0±1.0 <sup>a</sup>	4.0±1.0 <sup>a</sup>	4.0±1.0 <sup>a</sup>	4.0±1.0 <sup>a</sup>
	냄새	1.6±0.8 <sup>a</sup>	1.6±0.8 <sup>a</sup>	1.6±0.8 <sup>a</sup>	1.6±0.8 <sup>a</sup>	1.6±0.8 <sup>a</sup>
	조직감	3.4±0.5 <sup>a</sup>	3.4±0.5 <sup>a</sup>	3.4±0.5 <sup>a</sup>	3.4±0.5 <sup>a</sup>	3.4±0.5 <sup>a</sup>
	산패취	3.9±0.9 <sup>a</sup>	3.7±1.0 <sup>a</sup>	3.0±0.6 <sup>ab</sup>	2.7±0.8 <sup>b</sup>	2.7±0.8 <sup>b</sup>
	밝기	2.7±0.5 <sup>a</sup>	2.7±0.5 <sup>a</sup>	2.7±0.5 <sup>a</sup>	2.7±0.5 <sup>a</sup>	2.7±0.5 <sup>a</sup>
기호도	3.6±0.8 <sup>a</sup>	3.6±0.8 <sup>a</sup>	3.0±0.6 <sup>a</sup>	2.7±0.8 <sup>a</sup>	2.7±0.8 <sup>a</sup>	
동결건조	신맛	1.9±0.4 <sup>a</sup>	1.9±0.4 <sup>a</sup>	1.9±0.4 <sup>a</sup>	1.9±0.4 <sup>a</sup>	1.9±0.4 <sup>a</sup>
	쓴맛	1.7±0.5 <sup>a</sup>	1.7±0.5 <sup>a</sup>	1.7±0.5 <sup>a</sup>	1.7±0.5 <sup>a</sup>	2.0±0.8 <sup>a</sup>
	짠맛	1.9±0.4 <sup>a</sup>	1.9±0.4 <sup>a</sup>	1.9±0.4 <sup>a</sup>	1.9±0.4 <sup>a</sup>	1.9±0.4 <sup>a</sup>
	고소한맛	4.3±0.8 <sup>a</sup>	4.3±0.8 <sup>a</sup>	4.3±0.8 <sup>a</sup>	4.3±0.8 <sup>a</sup>	4.3±0.8 <sup>a</sup>
	냄새	1.6±0.8 <sup>a</sup>	1.6±0.8 <sup>a</sup>	1.6±0.8 <sup>a</sup>	1.6±0.8 <sup>a</sup>	1.6±0.8 <sup>a</sup>
	조직감	4.1±0.9 <sup>a</sup>	4.1±0.9 <sup>a</sup>	4.1±0.9 <sup>a</sup>	4.1±0.9 <sup>a</sup>	4.1±0.9 <sup>a</sup>
	산패취	4.3±0.5 <sup>a</sup>	4.3±0.5 <sup>a</sup>	4.3±0.5 <sup>a</sup>	4.3±0.5 <sup>a</sup>	4.1±0.7 <sup>a</sup>
	밝기	3.3±0.5 <sup>a</sup>	3.3±0.5 <sup>a</sup>	3.3±0.5 <sup>a</sup>	3.3±0.5 <sup>a</sup>	3.3±0.5 <sup>a</sup>
기호도	4.4±0.5 <sup>a</sup>	4.4±0.5 <sup>a</sup>	4.4±0.5 <sup>a</sup>	4.4±0.5 <sup>a</sup>	4.0±1.2 <sup>a</sup>	

\* Values in same row with different letters indicate significant difference ( $p < 0.05$ )

• [저장온도 상온]

: 상온보관 시 신맛, 쓴맛, 짠맛, 고소한 맛, 냄새(지푸라기 등 불쾌취), 조직감, 밝기에는 큰 변화가 없었으나 열풍건조 시료의 경우, 약 9개월부터 약간의 산패취가 느껴져 기호도가 낮아졌으며 동결건조 시료의 경우에는 저장 12개월까지 산패취가 느껴지지 않음.

Table 23. 상온에 저장한 미강발효물의 저장기간에 따른 관능검사

		0개월	3개월	6개월	9개월	12개월
열풍건조	신맛	2.3±1.0 <sup>a</sup>	2.3±1.0 <sup>a</sup>	2.6±1.2 <sup>a</sup>	2.4±1.0 <sup>a</sup>	2.4±1.0 <sup>a</sup>
	쓴맛	2.0±0.8 <sup>a</sup>	2.0±0.8 <sup>a</sup>	2.0±0.8 <sup>a</sup>	2.4±1.0 <sup>a</sup>	2.6±1.1 <sup>a</sup>
	짠맛	2.1±0.7 <sup>a</sup>	2.1±0.7 <sup>a</sup>	2.1±0.7 <sup>a</sup>	2.1±0.7 <sup>a</sup>	2.1±0.7 <sup>a</sup>
	고소한맛	4.0±1.0 <sup>a</sup>	4.0±1.2 <sup>a</sup>	3.7±1.3 <sup>a</sup>	3.6±1.4 <sup>a</sup>	3.6±1.4 <sup>a</sup>
	냄새	1.6±0.8 <sup>a</sup>	1.6±0.8 <sup>a</sup>	1.6±0.8 <sup>a</sup>	1.6±0.8 <sup>a</sup>	1.6±0.8 <sup>a</sup>
	조직감	3.3±0.8 <sup>a</sup>	3.3±0.8 <sup>a</sup>	3.3±0.8 <sup>a</sup>	3.3±0.8 <sup>a</sup>	3.3±0.8 <sup>a</sup>
	산패취	4.3±0.5 <sup>a</sup>	4.3±0.5 <sup>a</sup>	3.7±0.8 <sup>a</sup>	2.5±0.8 <sup>b</sup>	2.6±0.8 <sup>b</sup>
	밝기	2.7±0.5 <sup>a</sup>	2.7±0.5 <sup>a</sup>	2.7±0.5 <sup>a</sup>	2.7±0.5 <sup>a</sup>	2.7±0.5 <sup>a</sup>
동결건조	기호도	3.6±0.8 <sup>a</sup>	3.6±0.8 <sup>a</sup>	3.0±0.8 <sup>a</sup>	2.4±0.8 <sup>b</sup>	2.3±1.0 <sup>b</sup>
	신맛	1.7±0.5 <sup>a</sup>	1.7±0.5 <sup>a</sup>	2.0±1.0 <sup>a</sup>	1.9±0.7 <sup>a</sup>	1.9±0.7 <sup>a</sup>
	쓴맛	1.6±0.5 <sup>a</sup>	1.6±0.5 <sup>a</sup>	1.9±1.1 <sup>a</sup>	1.7±0.8 <sup>a</sup>	1.7±0.8 <sup>a</sup>
	짠맛	1.9±0.7 <sup>a</sup>	1.9±0.7 <sup>a</sup>	2.0±1.0 <sup>a</sup>	1.9±0.7 <sup>a</sup>	1.9±0.7 <sup>a</sup>
	고소한맛	4.4±0.5 <sup>a</sup>	4.4±0.5 <sup>a</sup>	3.7±1.3 <sup>a</sup>	3.7±1.3 <sup>a</sup>	3.7±1.3 <sup>a</sup>
	냄새	1.4±0.8 <sup>a</sup>	1.4±0.8 <sup>a</sup>	1.7±1.3 <sup>a</sup>	1.7±1.3 <sup>a</sup>	1.7±1.3 <sup>a</sup>
	조직감	4.4±0.8 <sup>a</sup>	4.4±0.8 <sup>a</sup>	4.4±0.8 <sup>a</sup>	4.4±0.8 <sup>a</sup>	4.4±0.8 <sup>a</sup>
	산패취	4.4±0.5 <sup>a</sup>	4.4±0.5 <sup>a</sup>	3.4±1.3 <sup>a</sup>	3.6±1.1 <sup>a</sup>	3.6±1.1 <sup>a</sup>
밝기	3.1±0.4 <sup>a</sup>	3.1±0.4 <sup>a</sup>	3.1±0.4 <sup>a</sup>	3.1±0.4 <sup>a</sup>	3.1±0.4 <sup>a</sup>	
기호도	4.4±0.5 <sup>a</sup>	4.4±0.5 <sup>a</sup>	3.4±1.5 <sup>a</sup>	3.6±1.4 <sup>a</sup>	3.6±1.4 <sup>a</sup>	

\* Values in same row with different letters indicate significant difference ( $p<0.05$ )

② *L. plantarum* EM

• [저장온도 4℃]

: 냉장보관 시 신맛, 쓴맛, 짠맛, 고소한 맛, 냄새(지푸라기 등 불쾌취), 조직감, 밝기에는 큰 변화가 없었으나 EM 발효 열풍/동결건조 시료의 경우, 강한 신맛에 의해 오히려 산패취가 저장 12개월까지 전혀 느껴지지 않음.

Table 24. 4℃에 저장한 미강발효물의 저장기간에 따른 관능검사

		0개월	3개월	6개월	9개월	12개월
열풍건조	신맛	5.0±0.0 <sup>a</sup>	5.0±0.0 <sup>a</sup>	5.0±0.0 <sup>a</sup>	5.0±0.0 <sup>a</sup>	5.0±0.0 <sup>a</sup>
	쓴맛	1.2±0.4 <sup>a</sup>	1.2±0.4 <sup>a</sup>	1.2±0.4 <sup>a</sup>	1.2±0.4 <sup>a</sup>	1.2±0.4 <sup>a</sup>
	짠맛	2.2±0.4 <sup>a</sup>	2.2±0.4 <sup>a</sup>	2.2±0.4 <sup>a</sup>	2.2±0.4 <sup>a</sup>	2.2±0.4 <sup>a</sup>
	고소한맛	2.2±0.4 <sup>a</sup>	2.2±0.4 <sup>a</sup>	2.2±0.4 <sup>a</sup>	2.2±0.4 <sup>a</sup>	2.2±0.4 <sup>a</sup>
	불쾌취	1.0±0.0 <sup>a</sup>	1.0±0.0 <sup>a</sup>	1.0±0.0 <sup>a</sup>	1.0±0.0 <sup>a</sup>	1.0±0.0 <sup>a</sup>
	조직감	4.2±0.4 <sup>a</sup>	4.4±0.5 <sup>a</sup>	4.4±0.5 <sup>a</sup>	4.4±0.5 <sup>a</sup>	4.4±0.5 <sup>a</sup>
	산패취	4.6±0.5 <sup>a</sup>	4.6±0.5 <sup>a</sup>	4.6±0.5 <sup>a</sup>	4.2±0.4 <sup>a</sup>	4.0±0.7 <sup>a</sup>
	밝기	2.0±0.7 <sup>a</sup>	2.2±0.8 <sup>a</sup>	2.2±0.8 <sup>a</sup>	2.2±0.8 <sup>a</sup>	2.2±0.8 <sup>a</sup>
동결건조	기호도	3.0±1.0 <sup>a</sup>	3.0±0.7 <sup>a</sup>	3.0±0.7 <sup>a</sup>	3.0±0.7 <sup>a</sup>	3.0±0.7 <sup>a</sup>
	신맛	5.0±0.0 <sup>a</sup>	5.0±0.0 <sup>a</sup>	5.0±0.0 <sup>a</sup>	5.0±0.0 <sup>a</sup>	5.0±0.0 <sup>a</sup>
	쓴맛	1.2±0.4 <sup>a</sup>	1.2±0.4 <sup>a</sup>	1.2±0.4 <sup>a</sup>	1.2±0.4 <sup>a</sup>	1.2±0.4 <sup>a</sup>
	짠맛	2.2±0.4 <sup>a</sup>	2.2±0.4 <sup>a</sup>	2.2±0.4 <sup>a</sup>	2.2±0.4 <sup>a</sup>	2.2±0.4 <sup>a</sup>
	고소한맛	2.2±0.4 <sup>a</sup>	2.2±0.4 <sup>a</sup>	2.2±0.4 <sup>a</sup>	2.2±0.4 <sup>a</sup>	2.2±0.4 <sup>a</sup>
	불쾌취	1.0±0.0 <sup>a</sup>	1.0±0.0 <sup>a</sup>	1.0±0.0 <sup>a</sup>	1.0±0.0 <sup>a</sup>	1.0±0.0 <sup>a</sup>
	조직감	4.6±0.5 <sup>a</sup>	4.6±0.5 <sup>a</sup>	4.6±0.5 <sup>a</sup>	4.6±0.5 <sup>a</sup>	4.6±0.5 <sup>a</sup>
	산패취	4.6±0.5 <sup>a</sup>	4.6±0.5 <sup>a</sup>	4.4±0.5 <sup>a</sup>	4.2±0.4 <sup>a</sup>	4.2±0.4 <sup>a</sup>
밝기	3.6±0.5 <sup>a</sup>	3.4±0.9 <sup>a</sup>	3.4±0.9 <sup>a</sup>	3.4±0.9 <sup>a</sup>	3.4±0.9 <sup>a</sup>	
기호도	3.4±0.9 <sup>a</sup>	3.4±0.9 <sup>a</sup>	3.4±0.9 <sup>a</sup>	3.4±0.9 <sup>a</sup>	3.2±0.8 <sup>a</sup>	

\* Values in same row with different letters indicate significant difference ( $p<0.05$ )

• [저장온도 상온]

: 상온보관 시 신맛, 쓴맛, 짠맛, 고소한 맛, 냄새(지푸라기 등 불쾌취), 조직감, 밝기에는 큰 변화가 없었으나 EM 발효 열풍/동결건조 시료의 경우, 신맛이 강하여 저장 12개월까지 산패취가 느껴지지 않음.

Table 25. 상온에 저장한 미강발효물의 저장기간에 따른 관능검사

		0개월	3개월	6개월	9개월	12개월
열풍 건조	신맛	5.0±0.0 <sup>a</sup>	5.0±0.0 <sup>a</sup>	5.0±0.0 <sup>a</sup>	5.0±0.0 <sup>a</sup>	5.0±0.0 <sup>a</sup>
	쓴맛	1.2±0.4 <sup>a</sup>	1.2±0.4 <sup>a</sup>	1.2±0.4 <sup>a</sup>	1.2±0.4 <sup>a</sup>	1.2±0.4 <sup>a</sup>
	짠맛	2.2±0.4 <sup>a</sup>	2.2±0.4 <sup>a</sup>	2.2±0.4 <sup>a</sup>	2.2±0.4 <sup>a</sup>	2.2±0.4 <sup>a</sup>
	고소한맛	2.2±0.4 <sup>a</sup>	2.2±0.4 <sup>a</sup>	2.2±0.4 <sup>a</sup>	2.2±0.4 <sup>a</sup>	2.2±0.4 <sup>a</sup>
	불쾌취	1.0±0.0 <sup>a</sup>	1.0±0.0 <sup>a</sup>	1.0±0.0 <sup>a</sup>	1.0±0.0 <sup>a</sup>	1.0±0.0 <sup>a</sup>
	조직감	4.2±0.4 <sup>a</sup>	4.2±0.4 <sup>a</sup>	4.2±0.4 <sup>a</sup>	4.2±0.4 <sup>a</sup>	4.2±0.4 <sup>a</sup>
	산패취	4.6±0.5 <sup>a</sup>	4.6±0.5 <sup>a</sup>	4.4±0.5 <sup>a</sup>	4.0±0.7 <sup>a</sup>	3.8±0.8 <sup>a</sup>
	밝기	2.2±0.8 <sup>a</sup>	2.2±0.8 <sup>a</sup>	2.0±1.0 <sup>a</sup>	2.2±0.8 <sup>a</sup>	2.2±0.8 <sup>a</sup>
기호도	3.0±1.0 <sup>a</sup>	3.0±1.0 <sup>a</sup>	3.0±1.0 <sup>a</sup>	3.0±1.0 <sup>a</sup>	3.0±1.0 <sup>a</sup>	
동결 건조	신맛	5.0±0.0 <sup>a</sup>	5.0±0.0 <sup>a</sup>	5.0±0.0 <sup>a</sup>	5.0±0.0 <sup>a</sup>	5.0±0.0 <sup>a</sup>
	쓴맛	1.2±0.4 <sup>a</sup>	1.2±0.4 <sup>a</sup>	1.2±0.4 <sup>a</sup>	1.2±0.4 <sup>a</sup>	1.2±0.4 <sup>a</sup>
	짠맛	2.2±0.4 <sup>a</sup>	2.2±0.4 <sup>a</sup>	2.2±0.4 <sup>a</sup>	2.2±0.4 <sup>a</sup>	2.2±0.4 <sup>a</sup>
	고소한맛	2.2±0.4 <sup>a</sup>	2.2±0.4 <sup>a</sup>	2.2±0.4 <sup>a</sup>	2.2±0.4 <sup>a</sup>	2.2±0.4 <sup>a</sup>
	불쾌취	1.0±0.0 <sup>a</sup>	1.0±0.0 <sup>a</sup>	1.0±0.0 <sup>a</sup>	1.0±0.0 <sup>a</sup>	1.0±0.0 <sup>a</sup>
	조직감	4.2±0.4 <sup>a</sup>	4.2±0.4 <sup>a</sup>	4.2±0.4 <sup>a</sup>	4.2±0.4 <sup>a</sup>	4.2±0.4 <sup>a</sup>
	산패취	4.6±0.5 <sup>a</sup>	4.2±0.8 <sup>a</sup>	4.2±0.8 <sup>a</sup>	3.8±0.8 <sup>a</sup>	3.6±0.5 <sup>a</sup>
	밝기	3.4±0.9 <sup>a</sup>	3.4±0.9 <sup>a</sup>	3.4±0.9 <sup>a</sup>	3.4±0.9 <sup>a</sup>	3.4±0.9 <sup>a</sup>
기호도	3.4±0.9 <sup>a</sup>	3.4±0.9 <sup>a</sup>	3.4±0.9 <sup>a</sup>	3.4±0.9 <sup>a</sup>	3.4±0.9 <sup>a</sup>	

\* Values in same row with different letters indicate significant difference ( $p < 0.05$ )

☞ 전체적 기호도

- *W. koreensis* DB1: 열풍건조물(평균 3.00점) < 동결건조물(평균 3.95점)
- *L. plantarum* EM: 열풍건조물(평균 3.00점) < 동결건조물(평균 3.38점)  
→ 두 균주 모두 열풍건조물보다는 동결건조물에서 고소한 향, 부드러운 조직감으로 인해 높은 기호도를 나타냄.

☞ 저장에 따른 산패취

- *W. koreensis* DB1: 열풍건조물의 경우, 상온 보관시 6개월부터 냉장(4℃) 보관시 9개월부터 산패취가 느껴짐.  
동결건조물의 경우, 상온 or 냉장(4℃) 보관 12개월까지 산패취가 느껴지지 않음.
- *L. plantarum* EM: 열풍건조물과 동결건조물 모두 상온 or 냉장(4℃) 보관 12개월까지 산패취가 느껴지지 않음.  
→ *W. koreensis* DB1의 경우, 약 6~9개월부터 산패취가 느껴졌으며 *L. plantarum* EM의 경우, 약 12개월까지 산패취가 느껴지지 않음.

○ 제 1협동(경희대학교)

1) 항비만 효과에 관여하는 유용유전자 발굴

가) 유전체 비교 분석

- 항비만 효과가 확인된 *W. koreensis* HJ의 전장유전체 해독
  - 항비만 효과가 확인된 *W. koreensis* HJ의 전장유전체 해독을 수행함
  - *W. koreensis* HJ는 15개의 contig로 구성되어 있으며, 게놈 사이즈는 1,427,157 bp, GC content는 35.6%, protein 수는 1400개로 확인됨
- 항비만 효과가 확인된 *W. koreensis* DB1의 전장유전체 해독
  - 항비만 효과가 확인 DB1은 1개의 chromosome과 1개의 plasmid로 구성되어 있으며, 게놈 사이즈는 1,502,799 bp, GC content는 35.6%, protein 수는 1417개로 확인됨

표 1. *W. koreensis* HJ 및 DB1의 게놈 특성

	<i>W. koreensis</i> HJ	<i>W. koreensis</i> DB1
Size(bp)	1,427,571	1,502,799
GC content	35.5	35.6
Contigs	16	2
Coding sequences	1418	1417
RNAs	55	72

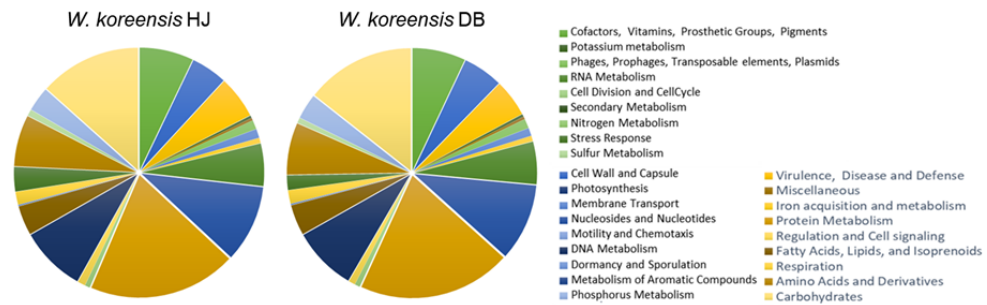


그림 1. *W. koreensis* HJ 및 DB1의 annotation 결과

나) 항비만 관련 유용유전자 발굴

- 항비만 관련 유용유전자 정보 확보

- 문헌을 통해 항비만 관련 유용유전자 정보를 확보함. Arginine deiminase pathway에 관여하는 유전자인 ornithine transcarboxylase 유전자를 유용유전자원으로 결정함
- KEGG pathway에서 ornithine transcarboxylase(OTC, EC 2.1.3.3) 유전자서열을 얻음

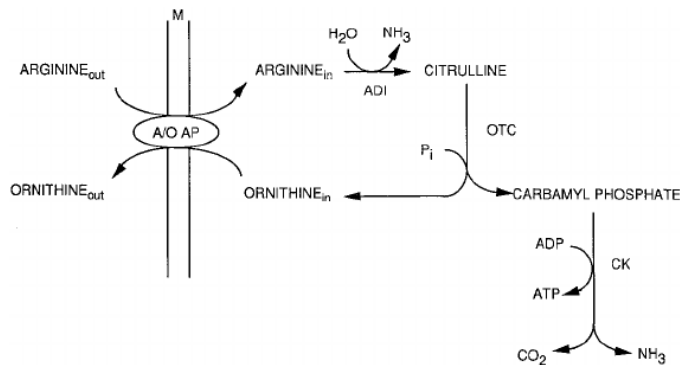


그림 2. Arginine deiminase pathway

2) 항비만 효과에 관여하는 유용유전자 발굴

가) 유전체 비교 분석

- *W. koreensis* DB1 및 HJ 균주의 비교유전체 분석
  - 미국 국립생물공학정보센터에 등록된 다른 *W. koreensis*와 함께 비교유전체 분석결과 1556 pangenome, 1146 core-genome, 246 accessory-genome, 164 unique-genome이 확인되었음
  - *W. koreensis* DB1의 unique gene은 8개, *W. koreensis* HJ의 unique gene은 93개로 확인됨. 이들 유전자는 NAD(P)H-binding protein, low temperature

requirement protein A, LicD family protein 등과 다수의 hypothetical proteins로 구성됨

- *W. koreensis* HJ 및 DB1의 게놈에는 FOF1 ATP synthases, chologlycine hydrolase, NADPH-quinone oxidoreductase gene 등 프로바이오틱 관련 유전자가 존재함

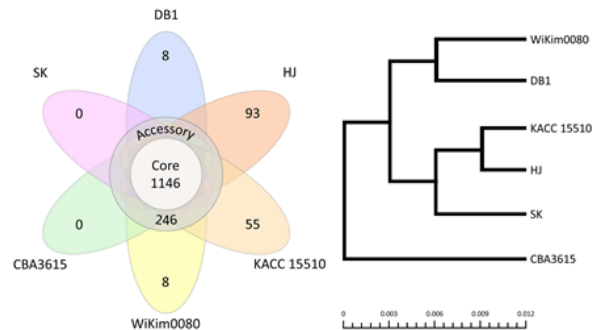


그림 3. 6개의 *W. koreensis* 게놈의 비교유전체 분석

나) 항비만 관련 유용유전자 발현

- *W. koreensis* DB1 및 HJ 균주 내 arginine deminase 유전자 확인
  - *W. koreensis* DB1 및 HJ 균주의 전장유전체 내에 arginine deminase 유전자가 존재하는지 확인함
  - *W. koreensis* HJ 균주의 게놈 15,424 bp ~ 16,500 bp에 arginine deminase 유전자가 존재하였고, *W. koreensis* DB1 균주의 게놈 35,486 bp ~ 36,562 bp에 arginine deminase 유전자가 존재함
  - *W. koreensis* DB1 및 HJ 균주에 존재하는 서열을 바탕으로 단백질 사이즈를 예측한 결과 대략 39~45 kDa으로 예상되었고, 이를 확인하기 위해 cloning을 진행하여 단백질을 발현함
  - 그 결과 DB1 및 HJ 균주에서 40 kDa에서 발현양이 증가되는 것을 확인함

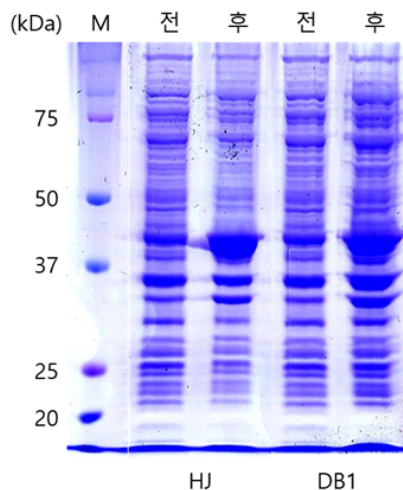


그림 4. 항비만 관련 유전자 발현 결과

### 3) 메타유전체 분석

#### 가) 발효김치의 메타유전체 분석

- -1°C, 4°C, 10°C에서 15일간, 25°C에서 3일간 발효한 김치의 메타유전체 분석
  - -1°C 및 10°C에서 15일간 발효한 김치 및 25°C에서 3일간 발효한 김치의 메타유전체 분석 결과 *Lat. sakei* group species가 가장 높은 비율을 차지하였고 그 다음으로는 *W. confusa* group이 많이 존재함
  - 4°C에서 15일간 발효한 김치의 메타유전체 분석 결과 *Lat. sakei* group과 *W. kandleri* group이 가장 높은 비율로 존재함

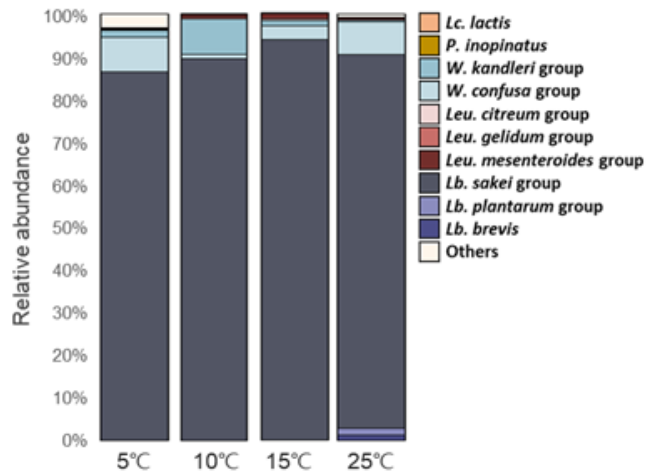


그림 5. 메타유전체 분석 결과

#### ○ 제 2협동(경상대학교)

##### 1) 3차년도 조선대 제공 시료 (*Weissella koreensis* DB1 미강 발효물) 대사체 분석

###### 가) *W. koreensis* DB1 접종 미강발효물의 대사경로 도출

- 발효에 의해서 대부분의 아미노산 대사, 당알코올 대사, 지방산 관련 대사, 유기산 생성 대사가 활성화된 반면 LPC와 LPE를 포함하는 인지질 계열 대사, 일부 당 대사는 감소되는 경향을 확인함.
- 발효 초기에 고분자 물질들은 발효에 사용된 균의 에너지원으로 사용되기 위해서 분해되면서 그들의 함량은 감소된 반면 고분자물질 (인지질과 일부 당 등)의 분해과정에 의해 생성된 부산물들 (아미노산 대사산물, 당알코올 대사산물, 지방산 관련 대사산물, 유기산등)의 함량은 증가한 것으로 사료됨.

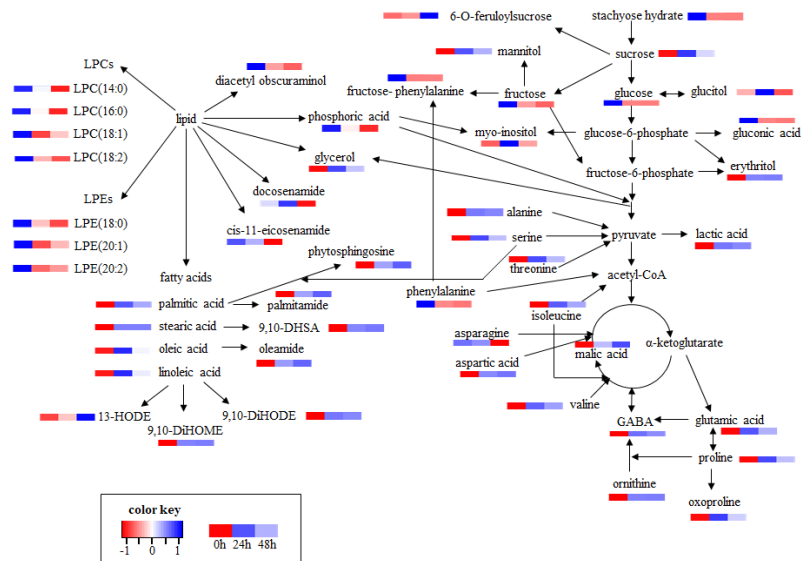


Fig. 1. Schematic representation of the major metabolic pathways of rice bran fermented with *W. koreensis* DB1.

## 2) 4차년도 *Lactiplantibacillus plantarum* (이전 이름 *Lactobacillus plantarum*) EM 미강발효물 (조선대 제공) 대사체 분석

### 가) *L. plantarum* EM 접종한 미강 발효물

- 발효시간: 0, 24, 48 시간 시료 LC/MS 분석
- 대사체들의 통계분석:
  - 다변량 통계분석 (Multivariate statistical analysis)
  - PLS-DA (Partial Least Squares-Discriminant Analysis)

### 나) LC/MS 분석

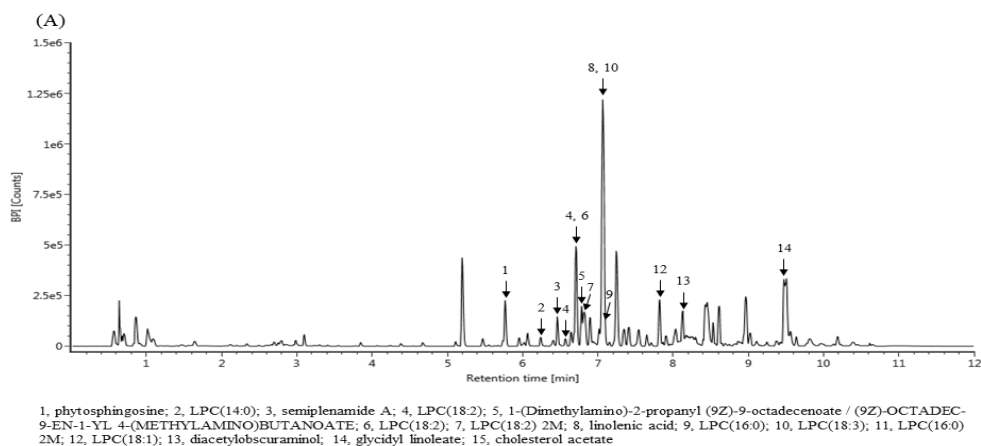


Fig 2. Typical LC chromatogram of fermented rice bran fermented with *L. plantarum* EM.

- 미강을 0 시간 (control), 24 시간, 48 시간 발효한 미강발효물에 들어있는 대사물질들을 분석하기 위하여 80% 메탄올로 추출한 대사물질들을 UPLC-Q-TOF MS를 이용한 LC/MS로 분석함.
- LC/MS로 분석한 미강발효물의 분석에 사용된 PLS-DA score plot의 quality parameter인 R2X, R2Y, Q2 값들이 각각 0.669, 0.986, 0.861로 매우 높으며

permutation test를 이용하여 교차검증한 결과 R2의 y축 값이 <0.4와 <-0.1로 매우 낮고 p-value도 0.026으로 낮아 본 실험을 통해 얻어진 LC/MS 기반 PLS-DA model은 통계적으로 전혀 문제가 없는 것으로 확인됨.

- 발효 전 미강시료 (0 시간)와 미강발효시료 (24시간, 48시간)는 t(1) (52.2%)을 기준으로 서로 유의적으로 분리되었으며 24시간 미강발효물과 48시간 미강발효물도 t(2)(14.8%)를 기준으로 분리되는 것이 관찰됨.

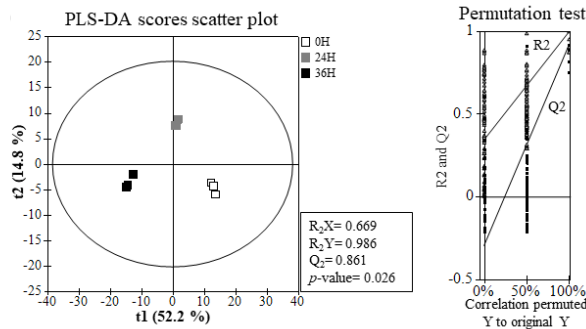


Fig. 3. PLS-DA score plots and quality parameters for LC/MS results for fermented rice bran with *L. plantarum* EM.

#### 다) GC/MS 분석

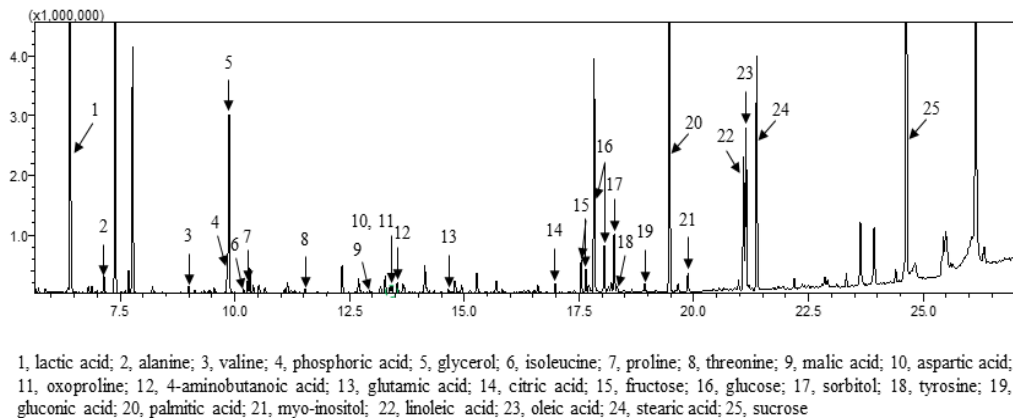


Fig. 4. Typical GC chromatogram of fermented rice bran with *L. plantarum* EM.

- GC/MS로 분석한 미강발효물의 분석에 사용된 PLS-DA score plot의 quality parameter인 R2X, R2Y, Q2 값들이 각각 0.885, 0.987, 0.904로 매우 높음.
- permutation test를 이용하여 교차검증한 결과 R2와 Q2의 y축 값이 <0.8로 다소 높아서 overfitting이 의심되며 p-value도 0.267로 통계적 유의성이 없는 것처럼 보이지만 Q2의 y축 값이 <-0.1로 낮은 것으로 봐서 분석시료 개수가 충분하지 않아서 오는 문제인 것으로 판단됨.
- 추가실험을 통해 보완할 예정임.
- 발효 전 미강시료 (0 시간)와 미강발효시료 (24 시간, 48 시간)는 t(1) (52.2%)을 기준으로 서로 유의적으로 분리되었으며 24 시간 미강발효물과 48 시간 미강발효물도 t(2)(14.8%)를 기준으로 분리됨.
- 발효 전 미강시료 (0 시간)와 미강발효시료 (24 시간, 48 시간)는 t(1) (51.5%)을 기준으로 서로 분리되었으며 24시간 미강발효물과 48시간 미강발효물은 t(2)(17.6%)를 기준으로 분리됨.



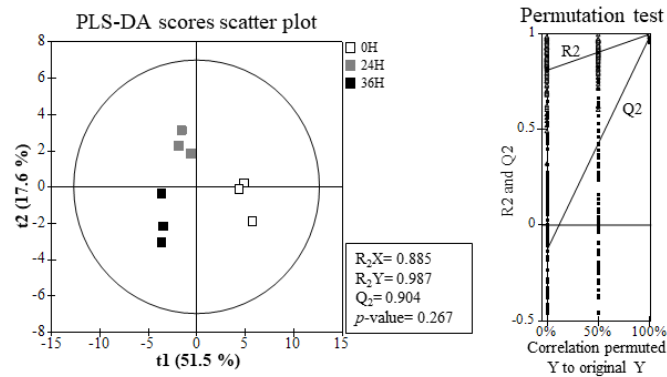


Fig. 5. PLS-DA score plots and quality parameters for GC/MS results for fermented rice bran with *L. plantatum* EM.

라) 주요 대사물질의 동정

① LC/MS 동정

- LC/MS 기반 PLS-DA score plot 상에서 시료들 간에 유의적 차이에 관여하는 물질들을 확인한 결과 positive mode에서 261개의 대사물질들(fragment 포함)이 분석되었으며 이들 중 151개의 대사물질들(fragment 포함)이 유의적으로 차이가 있었으며 10개 물질 [LPC(14:0), LPC(18:2), LPC(18:3), LPC(16:0), LPE(18:1), semiplenamamide A, oleoyl-valinolamide, 1-(Dimethylamino)-2-propanyl(9Z)-9-octadecenoate, diacetylobscuraminol]이 동정됨.
- 동정된 모든 물질들의 variable importance in projection (VIP, 사용된 PLS-DA 모델에 사용된 변수들 중 주요변수들을 찾기 위해서 사용되며 보통 그 값이 1.0 이상인 경우 주요변수로 판단함) 값이 약 1.0 이상으로 매우 높아서 동정된 모든 물질이 PLS-DA score plot 상에서 시료들간의 차이에 관여하는 것으로 확인함.

Table 1. Metabolites different among rice bran samples based on PLS-DA score plot from LC/MS.

No.	RT (min)	Compound	Exact mass (M+H)	MS Fragments	VIP	p-value
1	5.60	phytosphingosine	318.2991	270, 282, 300	0.94	0.299
2	6.24	LPC(14:0)	468.3053	104, 184, 450	1.02	1.42E-03
3	6.27	semiplenamamide A	366.3364	109, 95, 81	1.40	3.82E-04
4	6.57/6.71	LPC(18:2)	520.3387	184, 104	0.98	2.94E-06
5	6.59	oleoyl-L valinolamide	368.3515	95, 309	1.39	9.10E-04
6	6.71	LPC(18:2) 2M	1039.6697	520, 184, 104	0.93	1.48E-03
7	6.84	linolenic acid	279.2311	95	0.88	0.074
8	7.07	LPC(16:0)	496.3408	184, 104	1.35	0.094
9	7.08	LPC(18:3)	518.3208	184, 104	1.51	2.36E-05
10	7.08	LPC(16:0) 2M	991.6680	496, 184, 104	0.97	1.05E-03
11	7.25	LPC(18:1)	522.3563	184, 104	1.24	4.00E-06
12	7.86	diacetylobscuraminol	340.2835	95, 280, 298	1.10	2.06E-05
13	8.17	glycidyl linoleate	337.2734	67, 95, 263	0.24	0.898
14	9.47	cholesterol acetate	429.3727	165, 205	0.90	0.108

② GC/MS 동정

- GC/MS 기반 PLS-DA score plot 상에서 시료들 간에 유의적 차이에 관여하는 물질들을 확인한 결과 30개의 대사물질들 중 15개의 대사물질들이 유의적으로 차이가 있었으며 이들 중 14개 물질 [lactic acid, alanine, threonine, malic acid, glutamic acid, citric acid, fructose, glucose, sorbitol, tyrosine, gluconic acid, sucrose]이 발효에 의한 차이에 관여하는 물질들이므로 동정됨.
- 이들 물질들의 VIP 값을 분석한 결과 VIP>1.0인 lactic acid, citric acid, sorbitol, gluconic acid, sucrose가 GC/MS 기반 PLS-DA score plot 상에서 시료들간의 차이에 관여하는 것으로 확인됨.

Table 2. Metabolites different among rice bran samples based on PLS-DA score plot from GC/MS.

No.	RT (min)	Compound	RI <sup>(a)</sup>	VIP	p-value
1	6.42	lactic acid	1052	1.02	4.37E-09
2	7.15	alanine	1096	0.95	0.011
3	9.00	valine	1209	0.72	0.176
4	9.84	phosphoric acid	1264	0.69	0.973
5	9.88	glycerol	1266	1.27	0.149
6	10.20	isoleucine	1287	1.04	0.364
7	10.29	proline	1293	1.18	0.122
8	11.53	threonine	1375	0.95	0.007
9	12.94	malic acid	1478	0.93	0.011
10	13.39	aspartic acid	1512	0.79	0.283
11	13.43	oxoproline	1516	0.78	0.934
12	13.55	4-aminobutanoic acid	1525	0.96	0.338
13	14.66	glutamic acid	1612	0.96	1.97E-04
14	16.99	citric acid	1808	1.09	5.24E-09
15	17.56/17.66	fructose	1859	1.00	4.32E-09
16	17.84/18.06	glucose	1884	0.99	6.79E-09
17	18.27	sorbitol	1925	1.24	1.13E-05
18	18.34	tyrosine	1932	0.94	0.003
19	18.94	gluconic acid	1989	1.01	4.78E-08
20	19.48	palmitic acid	2042	0.61	0.832
21	19.88	myo-inositol	2082	0.65	0.491
22	21.10	linoleic acid	2209	1.22	0.122
23	21.15	oleic acid	2214	1.21	0.160
24	21.38	stearic acid	2240	0.58	0.800
25	24.65	sucrose	2622	1.19	3.07E-05

(a) Retention index

마) 발효에 따른 미강대사물질들의 함량변화

• Heat map 분석

- 발효에 따른 미강발효물에 들어있는 대사물질의 함량변화는 heat map과 chromatogram intensity를 비교분석함.

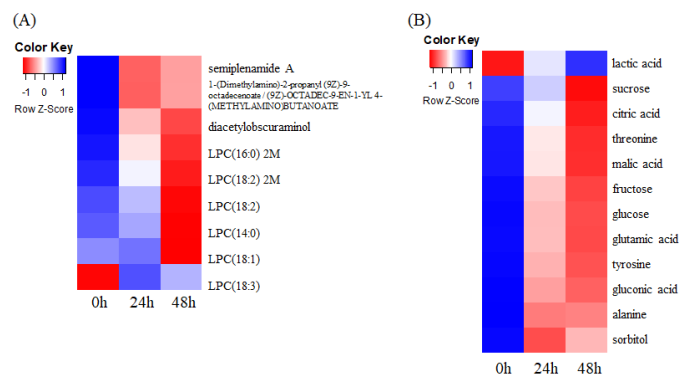


Fig. 6. Heat map of LC/MS(A) and GC/MS(B) analyzed metabolites.

① 당과 아미노산 관련물질

- Glucose, fructose, sucrose, gluconic acid의 함량은 발효에 의해 감소되었으며 glucose와 fructose인 경우 발효 48 시간에는 거의 관찰되지 않는 것으로 보아 이들 당이 주요 에너지원인 것으로 사료됨.
- 아미노산인 경우 alanine, threonine, glutamic acid의 함량 또한 발효에 의해 감소됨.

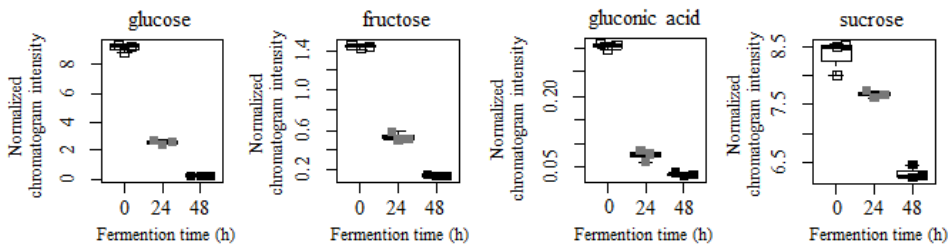


Fig. 7. Changes of relative amounts of sugars and related metabolites.

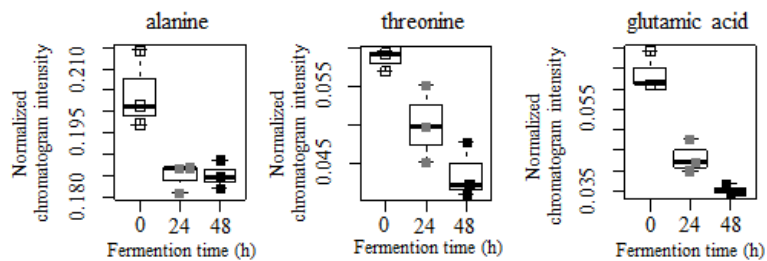


Fig. 8. Changes of relative amounts of amino acids.

② 유기산 및 관련 물질

- Lactic acid, malic acid, citric acid의 함량이 발효에 의해 영향을 받을 것으로 확인됨.
- Malic acid와 citric acid는 발효시간의 증가에 따라 감소되는 경향을 보인 반면 lactic acid 함량은 증가하는 경향을 보임. 특히 lactic acid인 경우 발효시간의 증가에 따라 함량이 증가하여 발효 48 시간에는 control에 비해 4 배 이상 증가함.
- 발효시간 증가에 따른 malic acid와 citric acid 함량의 감소는 이들 물질이 에너지 생성에 활용되어 그 함량이 줄어드는 것으로 추정되며 발효 48 시간에는 거의 관찰되지 않음.

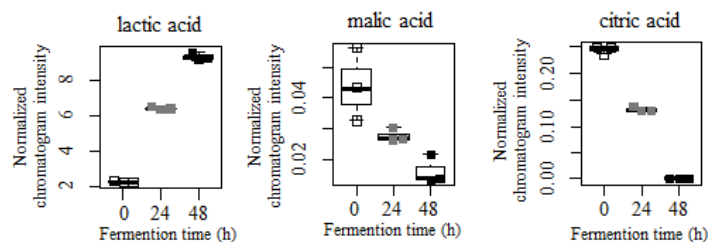


Fig. 9. Changes of relative amounts of organic acids.

③ 지방산 및 관련 물질

- 인지질계열의 대사물질인 LPCs(14:0, 16:0, 18:1, 18:2) 뿐만 아니라 oleoyl-valinolamide, diacetyl obscuraminol의 함량은 발효가 진행될수록 감소되는 경향을 보였으며 특히, LPC(16:0)의 함량은 발효에 의해 약 5배 감소함 (Fig. 26).
- LPC(18:3) 함량은 발효시간의 증가에 따라 증가하는 경향을 보임.

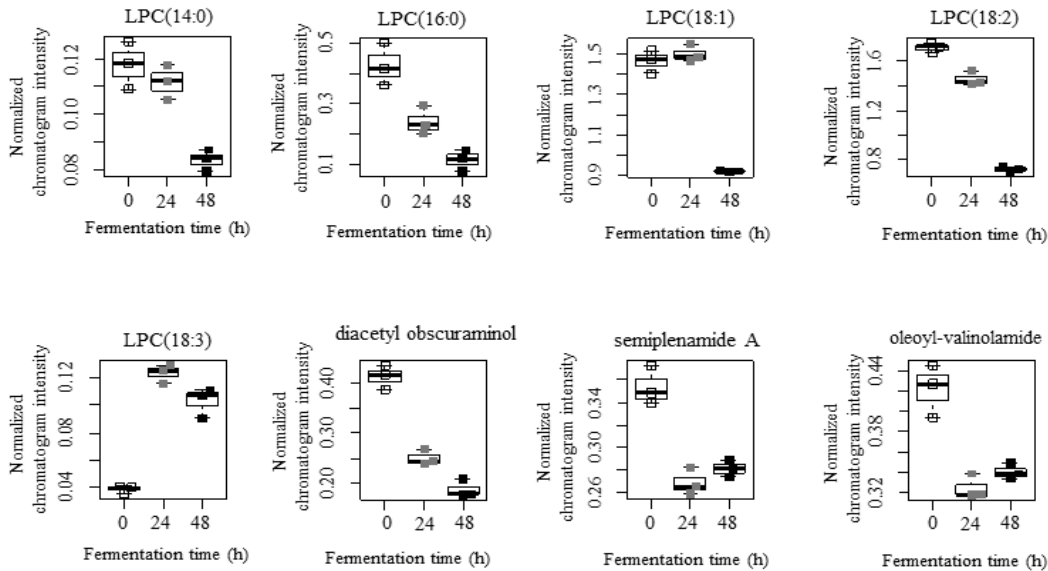


Fig. 10. Changes of relative amounts of fatty acids and related metabolites.

바) 미강발효 대사경로

- LC/MS와 GC/MS로 분석을 통해 동정된 미강발효물의 대사물질들을 기반으로 발효시간에 따른 미강발효 대사경로를 도출하였으며 대사물질들의 함량을 heat map으로 비교하였다. 미강발효물인 경우 2차대사산물들은 거의 분석되지 않았으며 주로 1차대사산물인 지방, 단백질, 탄수화물의 분해산물들이 주로 검출됨. 특히 지방 분해산물들과 아미노산들이 발효에 의해 크게 영향을 받은 것으로 확인됨.

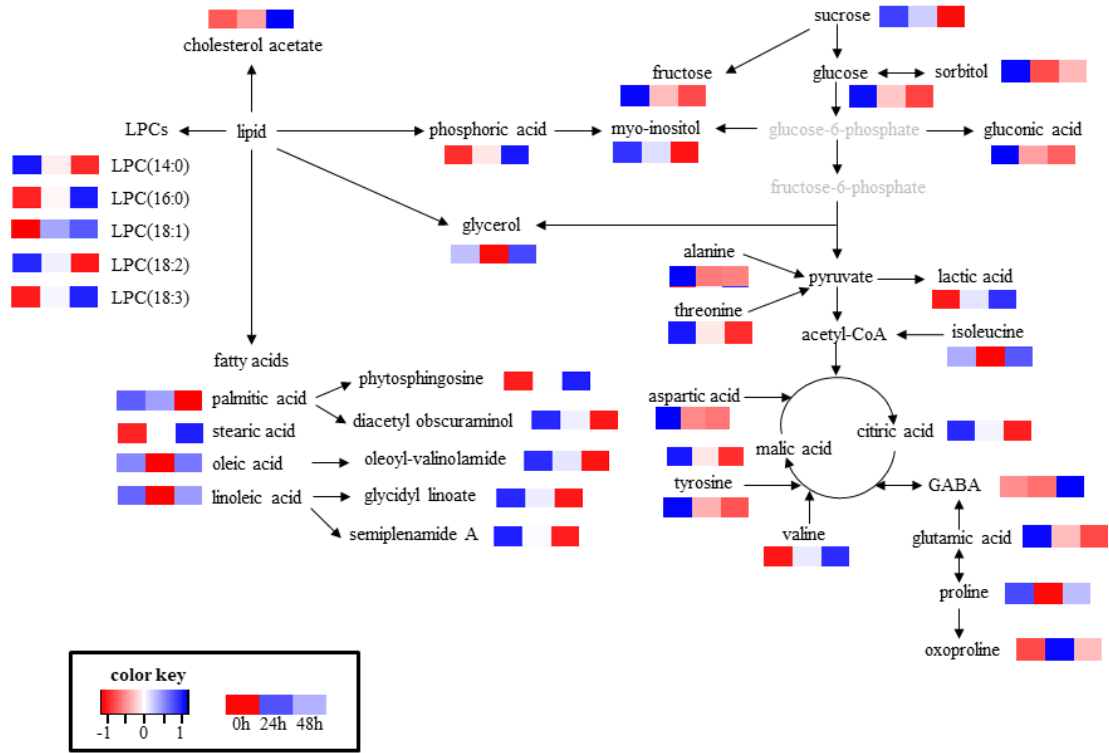


Fig. 11. Metabolic pathways constructed from metabolite analyses

### 3) *Latilactobacillus curvatus* (이전 이름, *Lactobacillus curvatus*) K285 (GABA 생성균) 미강발효물 (경상대 시료) 대사체 분석

가) *L. curvatus* K285 접종 미강 발효물

- 발효시간 : 0, 24, 48 시간대별 발효시료들 GC/MS 분석
- 대사체들의 통계분석:
  - 다변량 통계분석 (Multivariate statistical analysis)
  - PLS-DA (Partial Least Squares-Discriminant Analysis)

나) GC/MS 분석

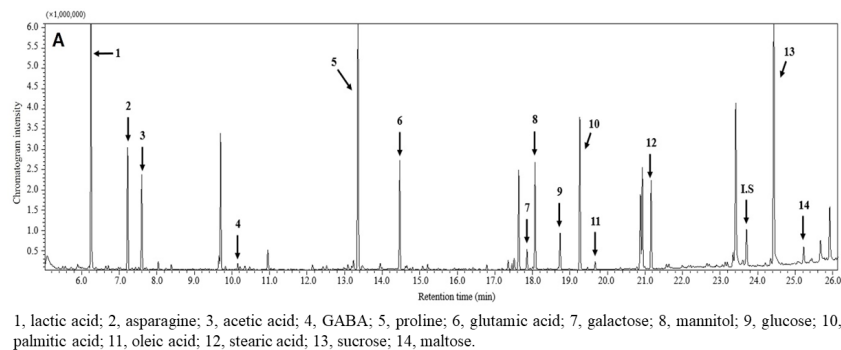


Fig. 12. Typical GC chromatogram of fermented rice bran with *L. curvatus* K285.

- 유의적으로 차이나는 14개 물질 동정: lactic acid, asparagine, acetic acid,  $\gamma$ -aminobutanoic acid, proline, glutamic acid, glucose, galactose, palmitic acid, mannitol, oleic acid, stearic acid, sucrose, maltose.

다) 발효시간 : 0, 24, 48 시간 시료 LC/MS 분석

- 대사체들의 통계분석:

- 다변량 통계분석 (Multivariate statistical analysis)
- PLS-DA (Partial Least Squares-Discriminant Analysis)

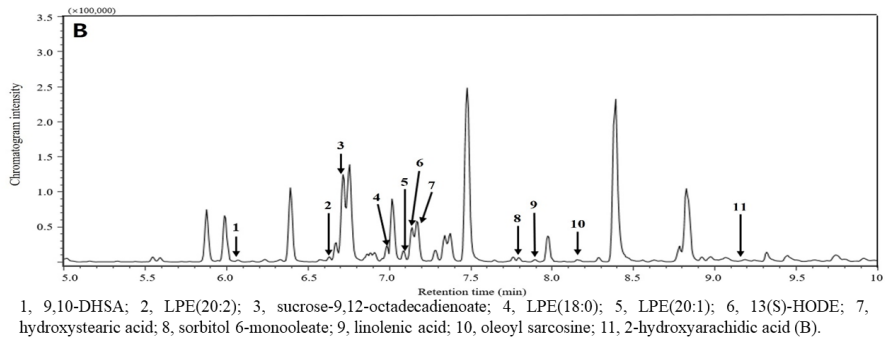


Fig. 13. Typical LC chromatogram of fermented rice bran with *L. curvatus* K285.

- 11개 물질 동정됨: 9,10-DHSA, LPE(20:2), sucrose-9,12-octadecadienoate, LPE(18:0), LPE(20:1), 13(S)-HODE, hydroxystearic acid, sorbitol 6-monooleate, linolenic acid, oleoyl sarcosine, 2-hydroxyarachidic acid.
- 동정된 모든 물질들의 variable importance in projection (VIP)이 0.7 이상으로 동정된 모든 물질들이 PLS-DA score plot 상에서 시료들간의 차이에 관여하는 것으로 확인됨.
- GC/MS와 LC/MS로 분석한 미강발효물의 분석에 사용된 PLS-DA score plot의 quality parameter인 R2X, R2Y, Q2 값들이 각각 0.783, 0.976, 0.767로 분석됨.

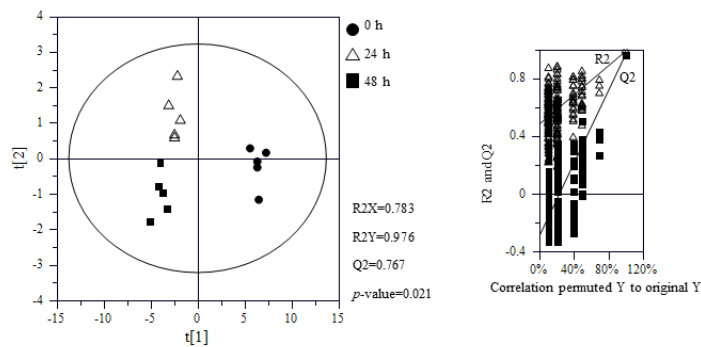


Fig. 14. PLS-DA score plots and quality parameters for GC/MS and LC/MS results for fermented rice bran with *L. curvatus* K285.

라) 발효시간에 따른 미강 대사물질들의 함량 변화

- Heat map 분석

- 함량변화는 heat map과 chromatogram intensity를 비교 분석함.

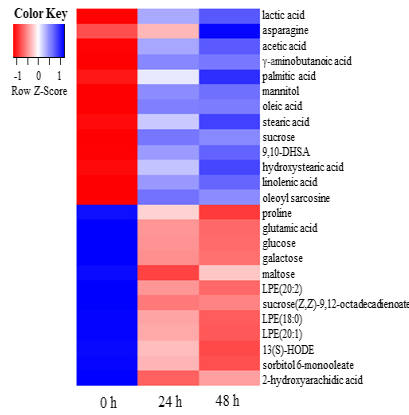


Fig. 15. Heat map of LC/MS and GC/MS analyzed metabolites.

① 당류

- Glucose, galactose, sucrose, maltose, mannitol이 분석됨.
- Glucose는 발효 미생물의 에너지원으로 사용되어 감소된 것으로 추정됨.
- Glucose외에 galactose 함량도 발효 후 크게 감소함. Maltose 함량은 발효 후 약간 감소함.
- 반면, sucrose와 mannitol 함량은 증가함.

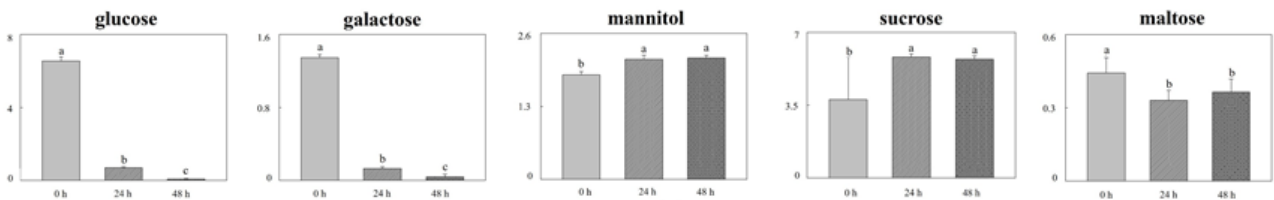


Fig. 16. Changes of relative amounts of sugars and related metabolites.

② 아미노산 및 관련 물질

- Asparagine과 GABA, proline, glutamic acid가 분석되었음.
- GABA는 발효 후 1.8 배 증가함.
- Glutamic acid는 대부분 *L. curvatus* K285에 의해 GABA로 전환된 것으로 추정됨.
- Glutamic acid와 proline은 발효 후 감소함.
- 이들 아미노산들은 발효에 사용된 미생물이 에너지를 생성하기 위해서 미강 단백질을 분해하는 과정에서 생성된 것으로 추정됨.

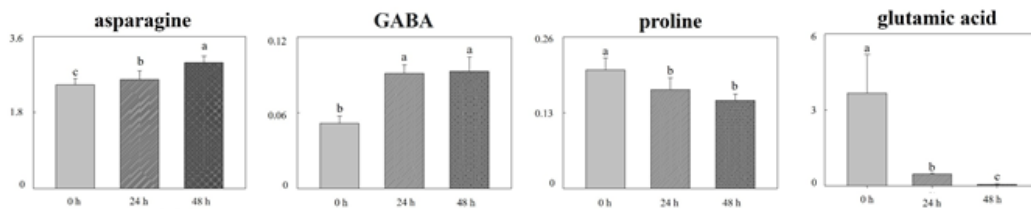


Fig. 17. Changes of relative amounts of amino acids and related metabolites.

③ 유기산 및 관련 물질

- Lactic acid와 acetic acid가 발효 미생물로 인해 발효 과정중에 증가함.
- 최종 발효시에 lactic acid는 73 배로 가장 크게 증가하나 acetic acid는 약간만 증가함.

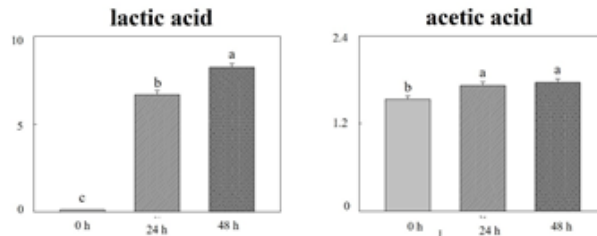


Fig. 18. Changes of relative amounts of organic acids and related metabolites.

④ 지방산 및 관련 물질

- 지방산 및 관련 물질에는 palmitic acid, oleic acid, stearic acid, 9,10-DHSA, LPEs(20:0, 18:0, 20:1), sucrose 9,12-octadecadienoate, 13(S)-HODE, hydroxystearic acid, sorbitol 6-monooleate, linolenic acid, oleoyl sarcosine, 2-hydroxy arachidic acid 등이 분석됨.
- palmitic acid, oleic acid, stearic acid, 9,10-DHSA, linolenic acid는 발효 후 1.16~1.97 배 증가함.
- Hydroxystearic acid는 발효 후 119.39 배 증가함.
- 9,12-octadecadienoate, 13(S)-HODE, sorbitol 6-monooleate, 2-hydroxy arachidic acid는 발효가 진행됨에 따라 감소하였다.
- 인지질 계열의 대사물질인 LPEs(20:2, 18:0,20:1)의 함량은 발효에 의해 감소하여 19.72~36.44%만 잔여함.

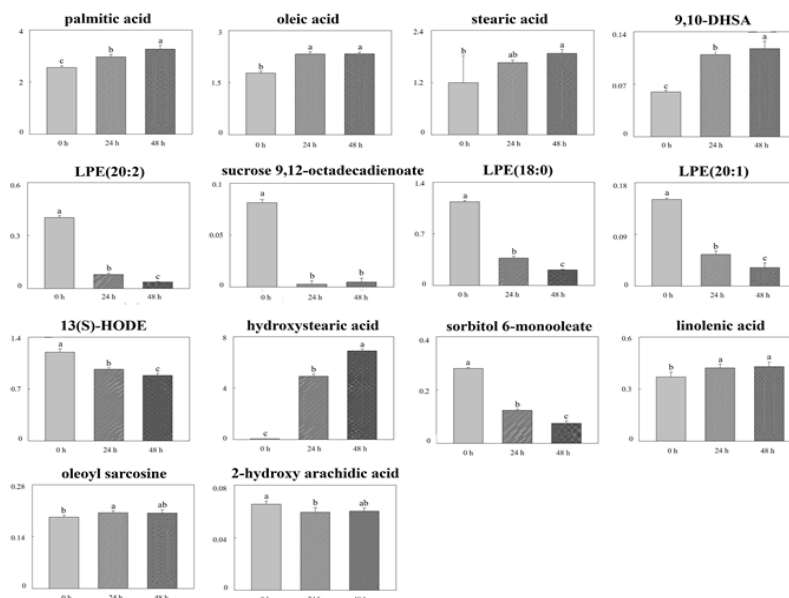


Fig. 19. Changes of relative amounts of fatty acids and related metabolites.



마) 김치 유산균 *L. curvatus* K285 미강발효 대사 경로

- 미강 발효의 대사 경로는 동정된 대사물질들을 이용하여 그려졌으며, 각 대사물질들의 상대적 함량 비교는 heat map을 이용하여 비교 분석한 결과를 보여줌.
- 발효가 진행됨에 따라 일부 아미노산과 지방산 관련 물질, 유기산 생성 대사가 활성화됨.
- LPE를 포함하는 인지질계열, 일부 아미노산 대사, 일부 당 대사는 감소하는 경향을 보임.

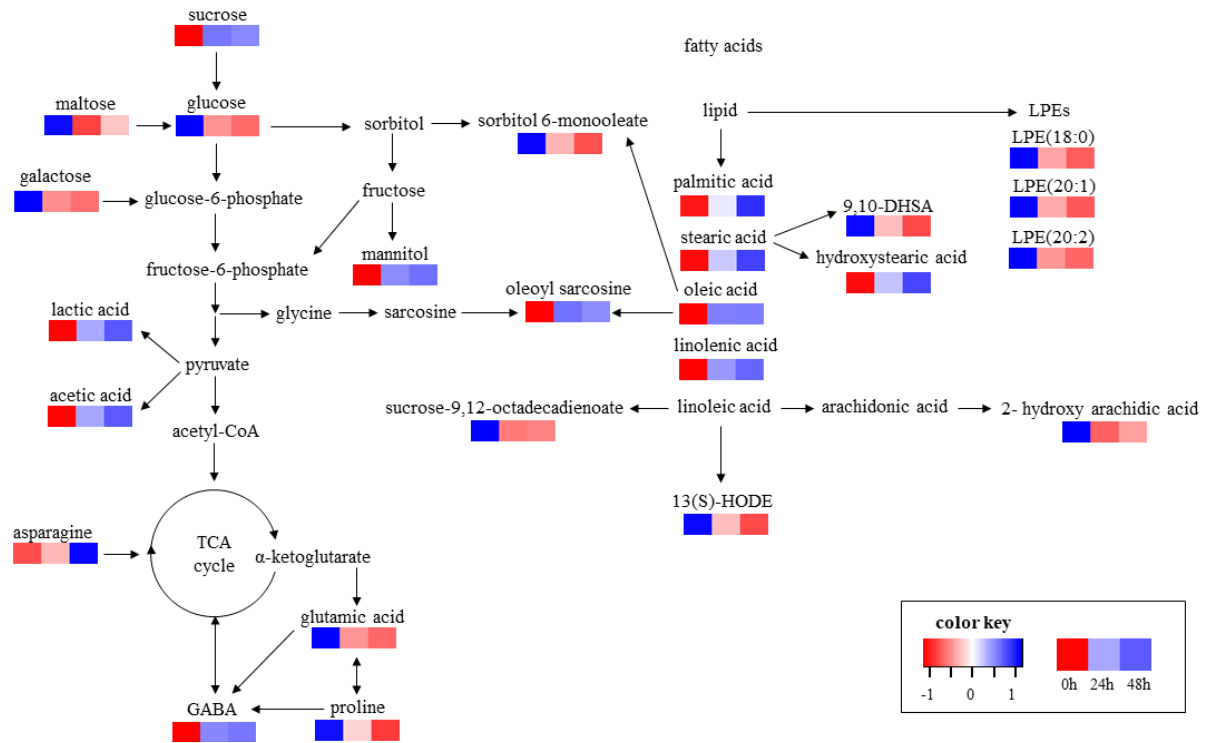
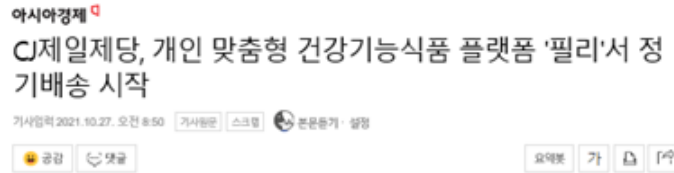


Fig. 20. Schematic representation of the major metabolic pathways of rice bran fermented with *L. curvatus* K285.

○ 제 3협동(CJ제일제당주)

1) 발효 콘텐츠 개발 및 홍보

- 미강발효물의 우수성 및 산업화 관련 언론 기사 홍보  
: 2021. 10. 27 (아시아경제)



CJ제일제당이 헬스케어 서비스를 제공하는 스타트업 케어위드와 손잡고 개인 맞춤형 건강기능식품(이하 건강식) 시장 공략에 본격 나섰다.

CJ제일제당은 케어위드가 운영하는 개인 맞춤형 영양제 추천 플랫폼인 '필리'에서 건강식 제품 정기배송 서비스를 시작한다고 27일 밝혔다. 이는 지난 2월 CJ제일제당이 케어위드와 '개인별 맞춤형 건강식' 비즈니스 모델 구축을 위한 업무협약(MOU) 체결 후 첫 행보다.

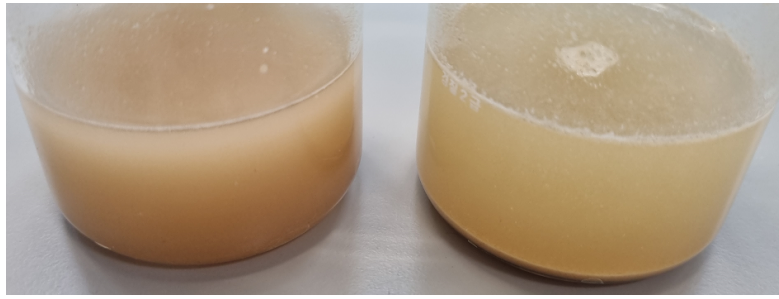
이번에 '필리'를 통해 선보이는 제품은 소화를 돕는 영양제 제품인 '리턴업 발효효소'다. CJ제일제당의 특허 균주로 6가지 건강 곡물(밀, 귀노미, 현미, 귀리, 쉐럴콩, 콩보리)을 발효시켜 만들었으며, '길치 유래 기능성 유산균'으로 발표시킨 살균 성분은 넣어 항비만 및 항콜레스테롤 효능도 갖췄다. 이는 CJ제일제당과 조선대가 함께 '길치 유래 기능성 유산균을 활용한 미강발효제품 개발 및 상용화'라는 구상 계획을 통해 이뤄진 바 있다.

2) 제형 다양화 연구 및 제품 적용 확대

- 다양한 제형의 확대 적용을 위한 제형 연구
  - 액상 제품의 적용성 증대를 위한 초미세분말화를 통한 물 분산성 향상 조건 테스트 진행(ACM, 기류분쇄기)
- 입도분석
  - 입도분석기 : Beckman Coulter, LS 13 320 XR
  - Carrier fluid : EtOH

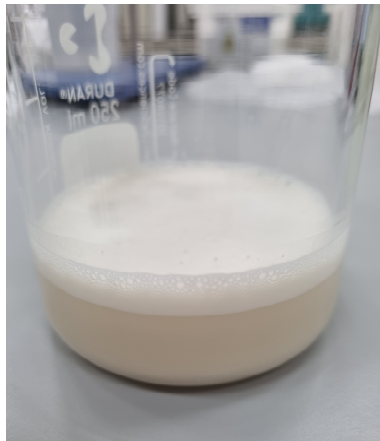
	기존(Hammer mill)	초미세분말(ACM)
평균 입도(μm)	375	85

- 물 분산성 테스트
  - 초미세분말, 기존 분말 각 3g을 물 100ml에 넣고 약 1분간 stirring한 후 침전되는 정도를 확인

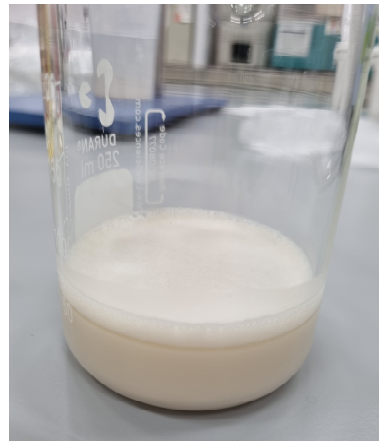


• 단백질 음료 적용성 테스트

- 단백질 5%, 초미세미강발효물 5%, 유지 2%, 레시틴 0.1%
- 유향 homogenizer 5min 후 물분산성 측정을 위해 한시간 방치



[균질 후 0 min]



[균질 후 60 min]

-> 물분산성 매우 우수하여 음료 제형에 적합함을 확인

3) 기능성 주원료 활용성 검토

- Returnup만의 베이스 원료로의 활용성 외 주원료로의 제품화 검토
  - 2022년: 팻다운 신제품 부원료로 적용(체지방 개선 실험 내용 기반 부원료 선정)
  - 2023년: 리턴업 신제품 부원료로 적용(콜레스테롤 개선 실험 내용 기반 콜레스테롤 케어 제품 부원료 선정)

### 3. 연구개발과제의 수행 결과 및 목표 달성 정도

#### 1) 연구수행 결과

##### (1) 정성적 연구개발성과

- 전략 미생물 기능성 김치 유산균의 개발 (목표 2건 → 달성 2건)
  - 기능성 김치 유래 유산균 2종: *W. koreensis* DB1(우수한 오르니틴 생성능)  
*L. plantarum* EM(강력한 콜레스테롤 저하능)
- 기능성 김치 유산균을 이용한 미강발효
  - 미강 발효 후  $10^9$  CFU/mL 생육도 달성
    - MRS(실험실용 배지) 대비 100% 생육 달성 → *W. koreensis* DB1( $2.6 \times 10^8$  CFU/mL)  
*L. plantarum* EM( $5.1 \times 10^9$  CFU/mL)
  - 미강발효물의 기능성 평가(동물 실험): 미강발효물 섭취 쥐가 대조구 대비 유의적 기능성 판정
    - *W. koreensis* DB1: 생미강 대비 지방세포의 지방축적과 지방분화 15~20% 억제  
→ 항비만 효과 20~40% 우수
    - *L. plantarum* EM: 생미강 대비 지방세포의 지방축적과 지방분화 10~15% 억제  
→ 항콜레스테롤 효과 15~40% 우수
- 전략 미생물 유전자 해독 (목표 2건 → 달성 2건)
  - *W. koreensis* DB1(iGEM0000-175), *W. koreensis* HJ(iGEM0000-176) 해독 완료
- 전략 미생물로부터 유용 유전자원 확보 (목표 6건 → 달성 9건)
  - *L. plantarum* EM 항콜레스테롤 유전자 5건, 항균력 유전자 2건, 이차대사산물 유전자 2건 확보
- 미강발효물의 대사체 분석 (목표 5건 → 달성 11건)
  - 미강발효물(조선대/CJ제일제당(주) 제공) 총 11건 분석 완료
- 기능성 김치 유산균을 활용한 미강발효제품의 산업화·실용화 (목표 1건 → 달성 1건)
  - 연구수행 1차년도 기술이전(조기 달성) 이후 연구수행 2차년도 제품화(조기 달성) 완료  
연구수행 중 매출액 발생(목표 3억원 → 달성 11.3억원)

##### (2) 정량적 연구개발성과

###### ○ 가. 미생물 유전체사업의 성과목표

성과목표		전략 미생물 해독	유용 유전자원 확보	표준 유전체 해독	메타 유전체 분석	유전체 분석 기술 개발	NABIC 등록	병원성 미생물 진단마커 개발	병원성 미생물 정보 완성	미생물 병발생 기작 규명
최종목표		2	6	4	8					
1차 년도	목표	-	-	2	2					
	실적	2	-	2	2					
2차 년도	목표	1	2	2	2					
	실적	0*	5	2	2					
3차 년도	목표	1	2	-	2					
	실적	0*	2	-	2					
4차 년도	목표	-	2	-	2					
	실적	-	2	-	4					
계	목표	2	6	4	8					
	실적	2	9	4	10					

\* 비고: 전략 미생물 해독은 1차년도에 성과 조기 달성(2건)을 완료함.

○ 나. 기타 성과목표

성과 목표	사업화지표										연구기반지표									
	지식 재산권			기술 실시 (이전)		사업화					기술 인증	학술성과			교육 지도	인 력 양 성	정책 활용 홍 보		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		논문		학 술 발 표			정 책 활 용	홍 보 전 시		
												SCI	비 SCI							논 문 평 균 IF
단위	건	건	건	건	백 만 원	백 만 원	백 만 원	명	백 만 원	건	건	건	명	건	건					
가중치	15	15		10		30	10						5	10	5					
최종목표	2	2		1		2	11,800						6	7	1.2	13	2	5		1
1차년도				0	0								1		1	0				0
실적				1	1								1		3	1				1
2차년도						0							0	1	1.2	3		2		
실적	1					1							3	1	3.4	6		4		
3차년도							0						2	1	1.2	5	1	1		
실적	1	0					513						5	1	4.3	7	2	2		
4차년도						1	300						3	3	1.2	3	1	2		0
실적		2		1		1	622						5	2	4.6	4	1	3		1
0*		0*		0*																
소계	2	2		1	0	1	300						5	6	1.2	12	2	5		0
실적	3	1		1	1	1	1,135						13	5	4.1	20	4	9		2
종료 1차년도							500						1	1	1.2	1				
종료 2차년도							1,000													
종료 3차년도						1	2,000													1
종료 4차년도							3,000													
종료 5차년도							5,000													
소계						1	11,500						1	1	1.2	1				1
합계	2	2		1		2	11,800						6	7	1.2	13	2	5		1

\* 비고: 특허등록은 3차년도에 조기 달성(1건) 완료, 특허등록 예정(1건)  
 기술이전은 1차년도에 조기 달성(1건) 완료  
 제품화는 2차년도에 조기 달성(1건) 완료  
 (논문 Impact factor의 경우, 2021년 기준으로 작성)

(3) 세부 정량적 연구개발성과

[미생물유전체사업 성과]

전략미생물 해독

번호	분석대상 (유전체, 유전자원 명칭)	분석내용	등록일자	등록번호	생산량 (GB)
1	<i>Weissella koreensis</i> DB	Genome sequencing, assembly, annotation	18.10.31	iGEM0000-175	0.0013
2	<i>Weissella koreensis</i> HJ	Genome sequencing, assembly, annotation	18.10.31	iGEM0000-176	0.0013

유용 유전자원 확보

번호	분석대상 (유전체, 유전자원 명칭)	분석내용	등록일자	등록번호	생산량 (GB)
1	<i>Lactobacillus plantarum</i> EM bile salt hydrolase 1	항콜레스테롤 관련 유전자	19.06.28	iGEM0000-393	0.000001
2	<i>Lactobacillus plantarum</i> EM bile salt hydrolase 2-1	항콜레스테롤 관련 유전자	19.06.28	iGEM0000-394	0.000000395
3	<i>Lactobacillus plantarum</i> EM bile salt hydrolase 2-2	항콜레스테롤 관련 유전자	19.07.03	iGEM0000-395	0.000000584
4	<i>Lactobacillus plantarum</i> EM bile salt hydrolase 3	항콜레스테롤 관련 유전자	19.07.03	iGEM0000-396	0.000001
5	<i>Lactobacillus plantarum</i> EM bile salt hydrolase 4	항콜레스테롤 관련 유전자	19.07.04	iGEM0000-397	0.000001
6	<i>Lactobacillus plantarum</i> EM Plantaricin gene cluster	항균력 관련 유전자	20.06.21	iGEM0000-1473	0.000028
7	<i>Lactobacillus plantarum</i> EM Bovicin gene cluster	항균력 관련 유전자	20.06.21	iGEM0000-1474	0.000019
8	<i>Lactobacillus plantarum</i> EM Terpene gene cluster	이차대사산물 합성 유전자	21.07.12	iGEM0000-2145	0.000015
9	<i>Lactobacillus plantarum</i> EM Cyclic lactone autoinducer gene cluster	이차대사산물 합성 유전자	21.07.12	iGEM0000-2146	0.000015

표준유전체 해독

번호	분석대상 (유전체, 유전자원 명칭)	분석내용	등록일자	등록번호	생산량 (GB)
1	<i>Lactobacillus plantarum</i> EM	Sequencing, assembly, annotation	18.10.31	iGEM0000-174	0.0032
2	<i>Leuconostoc inhae</i> PG7	Sequencing, assembly, annotation	19.06.28	iGEM0000-391	0.002
3	<i>Leuconostoc gelidum</i> CH3	Sequencing, assembly, annotation	19.06.28	iGEM0000-392	0.0018
4	<i>Weissella koreensis</i> DB1	Sequencing, assembly, annotation	18.10.25	iGEM0000-785	0.0046

메타유전체 분석

번호	분석대상 (유전체, 유전자원 명칭)	분석내용	등록일자	등록번호	생산량 (GB)
1	오르니틴 생성 유산균 분리된 한성김치	김치메타유전체 분석	18.11.23	iGEM0000-252	0.0138
2	저온성 생육 유산균 분리된 팔공산김치	김치메타유전체 분석	18.11.23	iGEM0000-271	0.0130
3	저온에서 발효한 김치의 메타유전체 분석	김치메타유전체 분석	19.10.21	iGEM0000-637	0.024
4	상온에서 발효한 김치의 메타유전체 분석	김치메타유전체 분석	19.10.21	iGEM0000-638	0.019
5	-1℃에서 발효한 김치 메타유전체 분석	김치메타유전체 분석	20.10.14	iGEM0000-1579	0.0850
6	4℃에서 발효한 김치 메타유전체 분석	김치메타유전체 분석	20.10.14	iGEM0000-1580	0.0789
7	-1℃에서 15일 발효한 김치 메타유전체 분석	김치메타유전체 분석	21.12.22	iGEM0000-2538	0.10352
8	4℃에서 15일 발효한 김치 메타유전체 분석	김치메타유전체 분석	21.12.22	iGEM0000-2539	0.08083
9	10℃에서 15일 발효한 김치 메타유전체 분석	김치메타유전체 분석	21.12.22	iGEM0000-2540	0.07741
10	25℃에서 3일 발효한 김치 메타유전체 분석	김치메타유전체 분석	21.12.22	iGEM0000-2541	0.06391

[과학적 성과]

논문(국내외 전문 학술지) 게재

번호	논문명	학술지명	주저자명	호	국명	발행기관	SCIE 여부 (SCIE/ 비SCIE)	게재일	등록번호 (ISSN)	기여율
----	-----	------	------	---	----	------	-----------------------------	-----	----------------	-----

1	Rice Bran Fermentation Using <i>Lactiplantibacillus plantarum</i> EM as a Starter and the Potential of the Fermented Rice Bran as a Functional Food	Foods	Song Hee Moon	10 (5)	Switzer-land	MDPI	SCIE (IF : 4.350)	2021. 04.29	2304 -8158	100%
2	Rice Bran Fermented with Kimchi-Derived Lactic Acid Bacteria Prevents Metabolic Complications in Mice on a High-Fat and -Cholesterol Diet	Foods	Si hoon Park	10 (7)	Switzer-land	MDPI	SCIE (IF : 4.350)	2021. 06.28	2304 -8158	100%
3	Analysis of Cultivable Microbial Community during Kimchi Fermentation Using MALDI-TOF MS	Foods	Ei Seul Kim	10 (5)	Switzer-land	MDPI	SCIE (IF : 4.350)	2021. 05.12	2304 -8158	100%
4	Novel approaches for the identification of microbial communities in kimchi: MALDI-TOF MS analysis and high-throughput sequencing	Food Microbiology	Ei Seul Kim	94 :103 641	USA	ELSEVIER SCIENCE LTD	SCIE (IF : 5.516)	2021. 04.01	0740 -0020	100%
5	Some Important Metabolites Produced by Lactic Acid Bacteria Originated from Kimchi	Foods	Se-Jin Lee	10 (9)	Switzer-land	MDPI	SCIE (IF : 4.350)	2021. 09.10	2304 -8158	100%
6	3T3-L1 세포에서 김치유산균 <i>Weissella koreensis</i> DB1 추출물의 지방분화 억제효과	한국지역사회 생활과학회지	Si hoon Park	32 (3)	Korea	한국지역사회 생활과학회	비SCIE/ KCI	2021. 08.18	1229 -8565	100%
7	Characterization of the Recombinant Glutamate Decarboxylase of <i>Lactobacillus brevis</i> G144 Isolated from Galchi Jeotgal, a Korean Salted and Fermented Seafood	Microbiology and Biotechnology Letters	Jeong A Kim	49 (1)	Korea	한국미생물 생명공학회	비SCIE (KCI/ Scopus)	2021. 03.28	1598 -642X	100%
8	Characterization of high ornithine-producing <i>Weissella koreensis</i> DB1 isolated from kimchi and its application in rice-bran fermentation as a starter culture	Foods	So Yeong Moon	9 (11)	Switzer-land	MDPI	SCIE (IF: 4.350)	2020. 10.26	2304 -8158	100%
9	Effects of Cabbage-Apple Juice Fermented by <i>Lactobacillus plantarum</i> EM on Lipid Profile Improvement and Obesity Amelioration in Rats	Nutrients	Si hoon Park, Hee-Kyoung Son	12 (4)	Switzer-land	MDPI	SCIE (IF: 5.719)	2020. 04.18	2072 -6643	100%
10	Novel real-time PCR assay for <i>Lactobacillus casei</i> group species using comparative genomics	Food Microbiology	Ei Seul Kim	90 :103 485	USA	ELSEVIER SCIENCE LTD	SCIE (IF: 5.516)	2020. 09.01	0740 -0020	100%
11	Design of PCR assays to specifically detect and identify 37 <i>Lactobacillus</i> species in a single 96 well plate	BMC Microbiology	Ei Seul Kim	20 :96	England	BMC	SCIE (IF: 3.605)	2020. 04.15	1471 -2180	100%
12	Complete Genome Sequence of <i>Lactobacillus plantarum</i> EM, A Putative Probiotic Strain with the Cholesterol-Lowering Effect and Antimicrobial Activity	Current Microbiology	Ei Seul Kim	77 (8)	USA	SPRINGER	SCIE (IF: 2.188)	2020. 08.01	0343 -8651	100%
13	Properties of $\beta$ -Galactosidase from <i>Lactobacillus zymae</i> GU240, an Isolate from <i>Kimchi</i> , and Its Gene Cloning	Microbiology and Biotechnology Letters	Huong Giang Le	48 (3)	Korea	한국미생물 생명공학회	비SCIE (KCI/ Scopus)	2020. 09.28	1598 -642X	100%
14	Purification and characterization of an antimicrobial compound produced by <i>Lactobacillus plantarum</i> EM showing both antifungal and antibacterial activities	LWT- Food Science and Technology	So Yeong Mun	114 :108 403	England	Elsevier	SCIE (IF: 4.952)	2019. 11.01	0023 -6438	100%
15	Characterization of juice fermented with <i>Lactobacillus plantarum</i> EM and its cholesterol-lowering effects on rats fed a high-fat and high-cholesterol diet	Food Science and Nutrition	Yu Bin Jeon	7 (11)	USA	Wiley	SCIE (IF: 2.863)	2019. 11.11	2048 -7177	100%

16	Rapid identification of <i>Staphylococcus</i> species isolated from food samples by matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry	Journal of Microbiology and Biotechnology	Ei Seul Kim	29 (4)	Korea	KMB (The Korean Society for Microbiology and Biotechnology)	SCIE (IF: 2.351)	2019. 04.28	1017 -7825	100%
17	김치 유산균 <i>Weissella koreensis</i> DB1을 활용한 미강발효물의 특성 규명	한국지역사회 생활과학회지	문승희	30 (4)	Korea	한국지역사회 생활과학회	비SCIE/KCI	2019. 11.20	1229 -8565	100%
18	Healthy and safe Korean traditional fermented foods: kimchi and chongkukjang	Journal of Ethnic Foods	Hae Choon Chang	5 (3)	Korea	한국식품 연구원	비SCIE/(KCI/Scopus)	2018. 09.01	2352 -6181	100%

□ 국내 및 국제 학술회의 발표

번호	회의 명칭	발표자	발표 일시	장소	국명
1	2021년도 한국식품영양과학회 2021 KFN International Symposium and Annual Meeting	Si hoon Park, Hae-Choon Chang, Jae-Joon Lee	2021.10.29	부산 BEXCO	Korea
2	2021년도 한국미생물·생명공학회 48th Annual Meeting & International Symposium	Song Hee Moon, Hae Choon Chang	2021.06.23	부산 BEXCO	Korea
3	2021년도 한국미생물·생명공학회 48th Annual Meeting & International Symposium	Ei Seul Kim, Hae Choon Chang, Hae Yeong Kim	2021.06.24	부산 BEXCO	Korea
4	2021년도 한국미생물·생명공학회 48th Annual Meeting & International Symposium	Hye Sung Jeon, Jeong Hwan Kim	2021.06.24	부산 BEXCO	Korea
5	2020년도 한국식품과학회 국제 학술대회 및 정기총회	Hye Sung Jeon, Hyun-Jin Kim, Jeong Hwan Kim	2020.07.02	광주 김대중컨벤션 센터	Korea
6	2020년도 한국식품과학회 국제 학술대회 및 정기총회	Song Hee Moon, Eun Jung Kim, Hae Choon Chang	2020.07.02	광주 김대중컨벤션 센터	Korea
7	2020년도 한국식품과학회 국제 학술대회 및 정기총회	Su Yeong Lee, Min Kyeong Jo, Hae Choon Chang	2020.07.02	광주 김대중컨벤션 센터	Korea
8	2020년도 한국식품영양과학회 2020 KFN International Symposium and Annual Meeting	Si Hoon Park, Hae Choon Chang, Jae Joon Lee	2020.10.22	제주국제컨벤션센터	Korea
9	2020년도 한국식품영양과학회 2020 KFN International Symposium and Annual Meeting	Si Hoon Park, Hae Choon Chang, Jae Joon Lee	2020.10.22	제주국제컨벤션센터	Korea
10	2020년도 한국미생물·생명공학회 47th Annual Meeting & International Symposium	Ei Seul Kim, Hae Young Kim et al	2020.09.23	e-Conference	Korea
11	ASM Microbe	Ei Seul Kim, Hae Young Kim	2020.06.22	e-Conference	USA
12	2019년도 한국미생물·생명공학회 46th Annual Meeting & International Symposium	Hae Choon Chang	2019.06.24	제주 ICC 국제컨벤션센터	Korea
13	2019년도 한국미생물·생명공학회 46th Annual Meeting & International Symposium	Song Hee Moon, Hae Choon Chang	2019.06.24	제주 ICC 국제컨벤션센터	Korea
14	2019년도 한국미생물·생명공학회 46th Annual Meeting & International Symposium	Song Hee Moon, Hae Choon Chang	2019.06.24	제주 ICC 국제컨벤션센터	Korea
15	2019년도 한국영양학회 2019 The Korean Nutrition Society International Conference and Annual Meeting	Si Hoon Park, Hae Choon Chang, Jae Joon Lee	2019.10.11	서울 드래곤 시티 호텔	Korea
16	2019년도 한국식품영양과학회 2019 KFN International Symposium and Annual Meeting	Si Hoon Park, Hae Choon Chang, Jae Joon Lee	2019.10.23	제주 ICC 국제컨벤션센터	Korea
17	2019년도 한국미생물·생명공학회 46th Annual Meeting & International Symposium	Ei Seul Kim, Hae Choon Chang, Hae Yeong Kim	2019.06.24	제주 ICC 국제컨벤션센터	Korea
18	2018년도 한국미생물·생명공학회 45th Annual Meeting & International Symposium	Hae Choon Chang	2018.06.27.	여수 EXPO	Korea
19	2018년도 한국식품영양과학회 2018 KFN International Symposium and Annual Meeting	Jae Joon Lee, Hae Choon Chang	2018.11.01.	부산 BEXCO	Korea
20	2018년도 한국미생물·생명공학회 45th Annual Meeting & International Symposium	Ei Seul Kim, Seung Min Yang, Hae Yeong Kim	2018.06.27.	여수 EXPO	Korea



[기술적 성과]

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

번호	지식재산권 등 명칭 (건별 각각 기재)	국명	출원				등록			기여율	활용 여부
			출원인	출원일	출원 번호	등록 번호	등록인	등록일	등록 번호		
1	락토비실러스 균주 검출용 멀티플렉스 PCR 프라이머 및 이의 용도	한국	경희대학교 산학협력단	2019.02.27	10-2019-0023395	-	경희대학교 산학협력단	2020.04.03	10-2099344	100%	
2	김치로부터 분리된 유산균을 이용한 미강 발효물 제조방법 및 그로부터 제조된 미강 발효물	한국	조선대학교 산학협력단	2020.09.03	10-2020-0112510	-	-	-	-	100%	
3	김치로부터 분리된 유산균을 이용한 미강 발효물 제조방법 및 그로부터 제조된 미강 발효물	한국	조선대학교 산학협력단	2019.10.23	10-2019-0131979	-	-	-	-	100%	

[경제적 성과]

□ 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	노하우	균주를 이용해 미강을 발효시키는 기술 (노하우)	CJ제일제당(주)	2018.10.08.	1,000,000원	1,000,000원

\* 내부 자금, 신용 대출, 담보 대출, 투자 유치, 기타 등

□ 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	기술이전	기존제품개선	국내	미강발효 제품 산업화	김치유래기능성유산균을 활용한 미강발효제품의 개발 및 제품화	CJ 제일제당(주)	622 백만원	-	2021	-
2	기술이전	기존제품개선	국내	미강발효 제품 산업화	김치유래기능성유산균을 활용한 미강발효제품의 개발 및 제품화	CJ 제일제당(주)	513 백만원	-	2020	-
3	기술이전	제품개발	국내 국외	미강발효 제품 산업화	김치유래 기능성 유산균을 활용한 미강발효제품의 개발 및 제품화	CJ 제일제당(주)	-	-	2019	-

□ 매출 실적(누적)

사업화명	발생 연도	매출액		합계	산정 방법
		국내(천원)	국외(달러)		
리턴업 발효효소 베이직	2019-2021	1,135,740	-	1,135,740	2019.11. 출시 2021.10. 까지
합계		1,135,740	-	1,135,740	-

[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	전혜성	2022		○				○						
2	이수영	2021		○				○				○		
3	조은지	2021		○				○						
4	서예진	2020		○				○						
5	김이슬	2020	○					○						
6	김다은	2019		○				○						
7	박시훈	2019		○			○							
8	채소정	2019		○				○						
9	최진영	2019		○				○		○				

□ 홍보 실적

번호	홍보 유형	매체명	제목	홍보일
1	중앙일간지	아시아경제	CJ제일제당, 개인 맞춤형 건강기능식품 플랫폼 '필리'서 정기배송 시작	2021.10.27
2	중앙전문지	농수축산식품	한국 전통발효식품, 생물자원으로서의 가치 및 발전 방안	2018.06.04

[그 밖의 성과]

□ 교육지도 성과

번호	성과 유형	교육명	교육 대상자	교육일	교육내용
1	교육지도	연구수행 관련 교육지도	경상대학교	2021.04.22	4차년도 연구수행을 위한 시료 전달 및 특성 교육
2	교육지도	연구 수행 관련 기술 협의 및 교육	CJ제일제당(주)	2020.02.20	최적화 전 열풍건조물 및 미강 2종의 발효 테스트 특성 분석 결과
3	교육지도	연구 수행 관련 기술 협의 및 교육	CJ제일제당(주)	2020.03.02. ~2020.04.27	미강 2종의 발효미강열풍건조물 샘플 전달 및 발효 특성
4	교육지도	연구 수행 관련 교육지도	경희대 양승민 박사과정	2018.12.20	유전체 분석을 위한 기능성 미생물 선별 및 분리 방법 확립 (BSH activity test & Cholesterol removal activity test)

## 2) 목표 달성 수준

추진 목표	달성 내용	달성도(%)
<p>&lt; 1차년도 &gt;</p> <p>○ 제 1세부(조선대학교) : 개발 균주의 기능성평가 및 안전성 평가</p>	<p>○ 기능성 균주의 선정 - 콜레스테롤 저하능 기능성 유산균 1종 : <i>L. plantarum</i> EM (기보유) - 오르니틴 생성에 기인한 항비만 기능성 균주 : <i>W. koreensis</i> DB1, HJ → 오르니틴 생성능이 우수한 균주 2종 선정 - 저온성 생육 김치 유산균 : 4종 선정</p> <p>○ 오르니틴 생성 <i>W. koreensis</i>와 저온성 생육 유산균의 배양학적 특성 : 선정 균주 7종에 대하여 배양 온도에 따른 생육, 배양 초기 pH에 따른 생육, 생화학적 특성 분석 완료</p> <p>○ 균주의 기능성 평가 - 항콜레스테롤능 : <i>L. plantarum</i> EM에서 높은 BSH 활성 및 콜레스테롤 제거능을 보임 - 오르니틴 생성능 : 오르니틴 생성능이 우수한 균주 <i>W. koreensis</i> DB1, HJ의 오르니틴 생성 최적화 조건 분석 완료 - 항산화능 : DPPH, SOD assay 완료</p> <p>○ 균주의 안전성 평가 : 선정 균주 7종에 대하여 용혈성, 항생제 내성, Biogenic amine 생성능, 유해효소 활성능 분석 결과, 안전한 것으로 확인됨</p>	<p>○ 100</p> <p>○ 100</p> <p>○ 100</p> <p>○ 100</p>
<p>○ 제 1협동(경희대학교) : 항콜레스테롤 효과가 있는 <i>L. plantarum</i> 및 항비만 효과가 있는 <i>W. koreensis</i>의 생명 현상 및 기작에 대해 이해하기 위해 각 균주의 전체 미생물 염기 서열을 해독하기 위함</p>	<p>○ <i>W. koreensis</i>, <i>L. plantarum</i> EM 염기서열 해독 - 1세부에서 기보유 및 분리한 유산균 3종 : 항콜레스테롤능이 있는 <i>L. plantarum</i> EM : 항비만능이 있는 <i>W. koreensis</i> DB : 항비만능이 있는 <i>W. koreensis</i> HJ → 3종의 유산균에 대한 유전체 염기서열 해독을 수행함</p> <p>○ 유전자 조립 및 유전자 주석 처리 - 3종의 유산균에 대한 유전자 조립 및 주석처리 : <i>L. plantarum</i> EM을 complete 수준으로 조립 : <i>W. koreensis</i> DB, HJ 균주를 contig 수준으로 조립 : 3종의 유산균을 RAST annotation함</p> <p>○ 항콜레스테롤 관련 유전자 분석 - <i>L. plantarum</i> EM 계놈의 항콜레스테롤 관련 유전자 분석 : <i>bsh</i> gene이 EM 균주에 있는지 PCR을 통해 확인 : 보고된 다른 균주의 <i>bsh</i> gene과 비교유전체 분석 수행 : EM 계놈 내 존재하는 <i>bsh</i> gene의 패턴 확인</p>	<p>○ 100</p> <p>○ 100</p> <p>○ 100</p>
<p>○ 제 3협동(CJ제일제당주) : 발효를 위한 부산물 소재 확보, Scale-up 발효공정 검토, 발효 후 가공공정 개발</p>	<p>○ 발효를 위한 부산물 소재 확보 - 미강 원료 검증을 통한 소재 확보 : 영양 성분 및 유해 인자 (중금속 및 곰팡이독소) 검증</p> <p>○ Scale-up 발효공정 검토 - 아르기닌별 품질 특성 비교 : 발효 속도, 관능 평가, 가격, 수급 이슈 등 고려하여 전구체 기질로 CJ제일제당주 아르기닌 선정</p> <p>○ 발효 후 가공공정 개발 - 가공 공정 확립 : 건조 및 사균/생균 소재화 : 분말화</p>	<p>○ 100</p> <p>○ 100</p> <p>○ 100</p>

< 2차년도 >

<p>○ 제 1세부(조선대학교) : 개발 균주의 안정성 평가 및 미강발효 조건 확립</p>	<p>○ 균주의 안정성 평가 - 내산성(pH 2.0~10.0) : DB1(pH 4.0~10.0/24시간 기준 생존율 90% 이상 유지) : EM(pH 4.0~10.0/72시간 기준 생존율 90% 이상 유지) - 내열성(-2℃~70℃) : DB1(-2℃~4℃/72시간 기준 생존율 90% 이상 유지) : EM(-2℃~30℃/72시간 기준 생존율 90% 이상 유지) - 내염성(0~15% NaCl) : DB1(NaCl 1~15%/72시간 기준 생존율 50% 이상 유지) : EM(NaCl 0~15%/72시간 기준 생존율 80% 이상 유지)</p> <p>○ 미강의 특성 분석 - 이화학적 특성(pH, 산도, 염도, 당도) 분석 완료 - 일반성분(수분, 조회분, 조섬유, 조단백, 조지방) 분석 완료 - 영양성분(유리당, 유기산, 유리아미노산, 지방산) 분석 완료</p> <p>○ 미강의 발효 조건 확립 (전처리) - 미강 농도: 20% - 가열 조건: autoclave(121℃, 15분)</p> <p>○ 발효공정의 최적화(미강에서 유산균 증식): <i>W. koreensis</i> DB1 * 조기성과 창출을 위해 연구개발계획서 3차년도 연구내용 일부를 2차년도에 수행 - 균주 특성 조사(phytase 활성): DB1과 EM 모두 phytase 양성 - DB1의 영양성분(탄소원/질소원/기타성분) 최적화 완료 - DB1의 발효조건(초기 pH/발효 온도) 최적화 완료</p> <p>○ 최적 발효 공정 조건에서 미강 발효 - 미강 첨가량: 20%(w/v) - 호화 조건: autoclave(121℃, 15분) - 영양원 조건: glucose 1%+arginine 1%+무기질/비타민 - 발효조건: 48시간/25~30℃/pH 6.0~6.5</p>	<p>○ 100</p> <p>○ 100</p> <p>○ 100</p> <p>○ 100</p> <p>○ 100</p>
<p>○ 제 2세부(조선대학교) : 항콜레스테롤 및 항비만 관련 기능성 평가체계 구축 및 기능성 평가 (동물 실험)</p>	<p>○ <i>W. koreensis</i> DB1 균주, 미강 및 균주 발효미강제품의 지방세포 분화에 미치는 영향 및 그에 따른 유전자 발현 변화 확인 - 시료준비 : <i>W. koreensis</i> DB1 균주 cytoplasmic fractions, 미강 및 균주 발효미강 에탄올 추출물 → 3종 선정 - 3T3-L1 세포주의 세포배양과 분화유도 : Mouse fibroblast 3T3-L1 cells을 사용하여 실험1은 균주, 실험2는 미강제품 추출물 분석을 위해 사용 - 시료의 세포독성 측정 : MTT assay 완료 → 독성이 없는 범위에서 지방세포 분화억제효과 효능 검증 완료 - 지방축적량 측정 : Oil-Red O 염색과 중성지방 함량 측정 → 모든 시료가 농도 의존적으로 세포내 지방축적 억제효과 나타났으며, 균주 발효미강제품이 미강제품에 비하여 효과가 큰 것으로 확인함 - 지방분화 관련 유전자 발현 측정 완료 : Adipogenic transcription factors과 lipogenic gene 유전자 발현 측정 → 모든 시료가 농도 의존적으로 지방분화 관련 유전자 발현을 억제하였으며, 균주 발효미강제품이 미강제품에 비하여 효과가 큰 것으로 확인함</p> <p>○ 동물 실험을 통한 <i>W. koreensis</i> DB1 균주, 미강 및 균주 발효미강제품의 콜레스테롤 저하효과 및 항비만 효과 평가 - 동물실험을 위한 IBR 승인완료(CIACUC2019-S0004) - 시료, 실험동물 선정 및 동물사육 완료 : 정상식이(1종), 고지방-고콜레스테롤식이(6종) → 7군 실험동물 → C57BL/6J 마우스 수컷 처리군당 10마리 식이섭취방법 → Ad libitum</p>	<p>○ 100</p> <p>○ 100</p>

	<p>실험기간 → 적응 1주간, 본 실험 10주간  실험식이 → AIN-93 식이조성을 변형하여 제조하였으며, 이때 양성대조군으로 비만효과가 입증된 키토산과 비교</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 매주 체중 및 사료섭취량 측정 완료</li> <li>- 혈청, 간, 백색 지방조직 부위별, 변 채취 완료하여 지질 성상 분석 완료</li> <li>- 혈청 중 간기능 손상지표 효소 활성 측정 완료</li> <li>- 비만억제효과 효능 검증을 위한 biomarker 분석 완료</li> <li>- 콜레스테롤 저하효과 효능 검증을 위한 biomarker 분석 완료</li> <li>- 미강 및 발효미강제품의 소화흡수율 측정완료</li> <li>- 통계처리 분석 완료</li> <li>- 항비만 및 콜레스테롤 저하효과 <ul style="list-style-type: none"> <li>: 항비만효과 및 콜레스테롤 저하효과는 실험군 중 발효 미강제품과 키토산 첨가군 준 가장 우수하였으며, 발효 미강제품은 미강제품과 균주보다 항비만효과 및 콜레스테롤 저하효과가 우수하였음</li> </ul> </li> <li>- 난소화성 미강의 소화흡수율 <ul style="list-style-type: none"> <li>: 소화흡수율은 발효미강제품이 미강제품에 비하여 우수함</li> </ul> </li> </ul>																																					
<p>○ 제 1협동(경희대학교)  : 김치 유산균 균집 확인 및 저온성 김치 유산균 염기서열 해독, 조립, 주석처리</p>	<p>○ 저온성 김치의 메타지놈 분석 <ul style="list-style-type: none"> <li>- -1℃, 25℃에서 5일동안 발효한 김치의 메타유전체 분석 <ul style="list-style-type: none"> <li>: 16S rRNA 유전자의 V3~V4 지역의 염기서열 해독</li> <li>: 저온에서 발효한 김치와 상온 발효 김치의 차이를 확인함</li> </ul> </li> </ul> </p> <p>○ 저온성 김치 유산균과 표준 미생물 염기서열 해독, 조립 및 주석처리 <ul style="list-style-type: none"> <li>- <i>Leuconostoc</i> 2종에 대한 전장유전체 분석 <ul style="list-style-type: none"> <li>: <i>Leu. inhae</i> PG7에 대한 유전체 염기서열 해독 수행</li> <li>: <i>Leu. gasicomitatum</i> CH3의 염기서열 해독 수행</li> <li>: 2종의 저온성 김치 유산균의 염기서열 조립 완료</li> <li>: 2종의 저온성 김치 유산균의 주석처리 완료</li> </ul> </li> </ul> </p> <p>○ COG 카테고리에 따라 유전체 분류 <ul style="list-style-type: none"> <li>- <i>Leuconostoc</i> 2종의 전장유전체의 기능적 분류 <ul style="list-style-type: none"> <li>: <i>Leu. inhae</i> PG7 계놈을 COG 카테고리에 따라 분류함</li> <li>: <i>Leu. gasicomitatum</i> CH3를 기능에 따라 분류함</li> <li>: RAST subsystem에 따라 기능적으로 분류함</li> </ul> </li> </ul> </p>	<p>○ 100</p> <p>○ 100</p> <p>○ 100</p>																																				
<p>○ 제 3협동(CJ제일제당주)  : 최적의 scale-up 발효공정 확립 및 발효 건강 원료 pilot 생산 기반 구축</p>	<p>○ Scale-up 발효공정 확립 <ul style="list-style-type: none"> <li>- Mass balance 기반 수율 89.6% 확보</li> </ul> </p> <div style="text-align: center;"> <table border="1" style="display: inline-table; margin-right: 20px;"> <thead> <tr> <th>미강</th> <th>%</th> <th>kg</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>수분</td> <td>11.4</td> <td>6.0</td> </tr> <tr> <td>조단백</td> <td>13.9</td> <td>7.3</td> </tr> <tr> <td>지방</td> <td>20.6</td> <td>10.8</td> </tr> <tr> <td>고형분</td> <td>54.3</td> <td>28.6</td> </tr> <tr> <td><b>Total</b></td> <td><b>100.0</b></td> <td><b>52.7</b></td> </tr> </tbody> </table> <div style="display: inline-block; vertical-align: middle; text-align: center;"> <p>발효</p> <p>↓</p> <p>가수 →</p> <p>← 배양액</p> <p>← 아르기닌</p> <p>↓</p> <p><b>Loss: 5.5 kg</b></p> <p>생산수율: 89.6%</p> </div> <table border="1" style="display: inline-table; margin-left: 20px;"> <thead> <tr> <th>미강발효분말</th> <th>%</th> <th>kg</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>수분</td> <td>2.1</td> <td>1.0</td> </tr> <tr> <td>조단백</td> <td>22.5</td> <td>10.6</td> </tr> <tr> <td>지방</td> <td>19.0</td> <td>9.0</td> </tr> <tr> <td>고형분</td> <td>56.4</td> <td>26.6</td> </tr> <tr> <td><b>Total</b></td> <td><b>100.0</b></td> <td><b>47.2</b></td> </tr> </tbody> </table> </div> <p>○ 지표 성분 및 영양소 분석 <ul style="list-style-type: none"> <li>- 미강과 DB1균주를 이용하여 발효한 미강 발효물의 지표 성분 및 영양소 분석</li> <li>- 품질 검증 : 법적 규격 <ul style="list-style-type: none"> <li>미생물 및 화학(중금속, 농약 등)</li> <li>: CJ제일제당주 내부 신규 원료 등록을 위한 안전 Gate(자가 및 법적 규격) 검증 완료</li> </ul> </li> </ul> </p>	미강	%	kg	수분	11.4	6.0	조단백	13.9	7.3	지방	20.6	10.8	고형분	54.3	28.6	<b>Total</b>	<b>100.0</b>	<b>52.7</b>	미강발효분말	%	kg	수분	2.1	1.0	조단백	22.5	10.6	지방	19.0	9.0	고형분	56.4	26.6	<b>Total</b>	<b>100.0</b>	<b>47.2</b>	<p>○ 100</p> <p>○ 100</p>
미강	%	kg																																				
수분	11.4	6.0																																				
조단백	13.9	7.3																																				
지방	20.6	10.8																																				
고형분	54.3	28.6																																				
<b>Total</b>	<b>100.0</b>	<b>52.7</b>																																				
미강발효분말	%	kg																																				
수분	2.1	1.0																																				
조단백	22.5	10.6																																				
지방	19.0	9.0																																				
고형분	56.4	26.6																																				
<b>Total</b>	<b>100.0</b>	<b>47.2</b>																																				

	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 원료 소재화 <ul style="list-style-type: none"> <li>- 품목제조보고서 등록(2019.07.26)</li> <li>- 제품명: CJ유산균 발효미강분말</li> <li>- 유통기한: 2년</li> </ul> </li> <li>○ 제품 출시 <ul style="list-style-type: none"> <li>- 발효효소 베이직 제품 적용화(2019년 10월)</li> </ul> </li> </ul> <div style="text-align: center; margin-top: 20px;">  </div>	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 100</li> <li>○ 100</li> </ul>
--	--	--

< 3차년도 >

<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 제 1세부(조선대학교) <ul style="list-style-type: none"> <li>: 미강에서의 유산균 증식 및 최적 발효 조건 확립</li> </ul> </li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 발효공정의 최적화(미강에서 유산균 증식) <ul style="list-style-type: none"> <li>- 균주: 개발된 기능성 김치 유산균 <i>L. plantarum</i> EM</li> <li>- 식용성분/영양성분(탄소원, 질소원, 기타성분)최적화 완료</li> <li>- 발효조건: 발효 초기 pH, 온도 최적화 완료</li> </ul> </li> <li>○ 최적 발효 공정 조건에서 미강 발효 <ul style="list-style-type: none"> <li>- 미강 첨가량: 20%(w/v)</li> <li>- 호화 조건: autoclave(121°C, 15분)</li> <li>- 영양원 조건: 식용성분 3% + glucose 1%</li> <li>- 발효조건: 48시간/25~30°C/pH 6.0~7.0</li> <li>• 발효 미강 제품의 특성 분석 <ul style="list-style-type: none"> <li>- 미생물 분석: 저장 12개월동안 부패/병원성 미생물 검출 X</li> <li>- 산패: 과산화물가 4°C 저장 12개월까지 안정 산가 4~20°C 저장 12개월까지 안정</li> <li>- 기능성: DB1(오르니틴 4~20°C 저장 12개월 유지) EM(콜레스테롤 저하능 4~20°C 저장 12개월 유지)</li> </ul> </li> </ul> </li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 100</li> <li>○ 100</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 제 2세부(조선대학교) <ul style="list-style-type: none"> <li>: <i>L. plantarum</i> EM 및 <i>L. plantarum</i> EM 미강 발효 개발제품의 콜레스테롤 저하 효과 및 항비만 효과평가 (동물 실험)</li> </ul> </li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 개발제품 추출물이 지방세포 분화에 미치는 영향 및 그에 따른 유전자 발현 변화 확인 <ul style="list-style-type: none"> <li>- 시료준비 <ul style="list-style-type: none"> <li>: <i>L. plantarum</i> EM 균주 cytoplasmic fractions, 미강 및 균주 발효미강 에탄올 추출물 → 3중 선정</li> </ul> </li> <li>- 3T3-L1 세포주의 세포배양과 분화유도 <ul style="list-style-type: none"> <li>: Mouse fibroblast 3T3-L1 cells을 사용</li> </ul> </li> <li>- 시료의 세포독성 측정 <ul style="list-style-type: none"> <li>: MTT assay 완료 → 독성이 없는 범위에서 지방세포 분화억제효과 효능 검증 완료</li> </ul> </li> <li>- 지방축적량 측정 <ul style="list-style-type: none"> <li>: Oil-Red O 염색과 중성지방 함량 측정 → 모든 시료가 농도 의존적으로 세포내 지방축적 억제효과 나타났으며, 균주 발효미강제품이 미강제품에 비하여 효과가 큼</li> </ul> </li> <li>- 지방분화 관련 유전자 발현 측정 완료 <ul style="list-style-type: none"> <li>: Total RNA 추출, RT-PCR</li> <li>Adipogenic transcription factors 유전자 발현 측정</li> <li>Lipogenic gene 유전자 발현 측정</li> <li>→ 모든 시료가 농도 의존적으로 지방분화 관련 유전자</li> </ul> </li> </ul> </li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 100</li> </ul>

	<p>발현을 억제하였으며, 균주 발효미강제품이 미강제품에 비하여 효과가 큼</p> <p>○ 동물실험을 통한 개발제품이 콜레스테롤 저하효과와 항비만 효과 평가</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 동물실험을 위한 IBR 승인완료(CIACUC2020-S0004)</li> <li>- 시료 및 실험식이 <ul style="list-style-type: none"> <li>: 시료 → 균주(<i>L. plantarum</i> EM), 생미강, 발효미강(3종, <i>L. plantarum</i> EM, <i>W. koreensis</i> DB1, 발효미강혼합물) 총 4종 정상식이(1종), 고지방-고콜레스테롤식이(6종) → 7군 실험식이 → AIN-93 식이조성을 변형하여 제조하였으며, 이때 양성대조군으로 비만효과가 입증된 키토산과 비교</li> </ul> </li> <li>- 실험동물 선정 및 동물사육 완료 <ul style="list-style-type: none"> <li>: 실험동물 → C57BL/6J 마우스 수컷 처리군당 10마리</li> <li>식이섭취방법 → Pair-feeding으로 급여</li> <li>실험기간 → 적응 1주간, 본 실험 12주간</li> </ul> </li> <li>- 매주 체중 및 사료섭취량 측정 완료</li> <li>- 혈청, 간, 백색 지방조직 부위별, 번 채취 완료하여 지질 성상 분석 완료</li> <li>- 혈청 중 간기능 손상지표 효소 활성 측정 완료</li> <li>- 비만억제효과 효능 검증을 위한 biomarker 분석 완료</li> <li>- 콜레스테롤 저하효과 효능 검증을 위한 biomarker 분석 완료</li> <li>- 미강 및 발효미강제품의 소화흡수율 측정완료</li> <li>- 통계처리 분석 완료</li> <li>- 항비만효과 및 콜레스테롤 저하효과 <ul style="list-style-type: none"> <li>: <i>L. plantarum</i> EM 균주 및 균주 발효미강제품 간의 비교 → <i>L. plantarum</i> EM 균주 &gt; 균주 발효미강제품 &gt; 미강제품 순으로 나타남</li> <li>: <i>L. plantarum</i> EM 및 <i>W. koreensis</i> DB1균주 발효 미강제품간의 비교 → 항비만효과(<i>W. koreensis</i> DB1균주 발효미강 &gt; <i>L. plantarum</i> EM 발효미강), 콜레스테롤 저하효과(<i>L. plantarum</i> EM 발효미강 &gt; <i>L. plantarum</i> EM 발효미강)가 나타남</li> </ul> </li> </ul>	○ 100
○ 제 1협동(경희대학교) : 유전체 비교 분석 및 기능성 유전자 분석	<p>○ Pan, core, unique, accessory genome 분석</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 51개의 <i>L. plantarum</i>의 비교유전체 분석 <ul style="list-style-type: none"> <li>: NCBI에서 <i>L. plantarum</i>의 유전체 수집</li> <li>: 51개의 <i>L. plantarum</i>에 대한 pangenome 분석</li> <li>: <i>L. plantarum</i> EM의 unique gene 추출</li> </ul> </li> <li>○ 유전자 기능 비교 <ul style="list-style-type: none"> <li>- 51개의 <i>L. plantarum</i>의 비교유전체 분석</li> <li>: Pangenome을 COG 카테고리에 따라 분류함</li> <li>: EM 게놈에 존재하는 프로바이오틱 관련 유전자 확인</li> </ul> </li> <li>○ 항균력 관련 유전자 조사 <ul style="list-style-type: none"> <li>- 51개의 <i>L. plantarum</i>의 항균력 관련 유전자 추출</li> <li>: <i>L. plantarum</i>에 존재하는 항균력 관련 유전자 조사</li> <li>: EM 게놈에만 특이적으로 존재하는 항균력 관련 유전자 확인</li> </ul> </li> </ul>	○ 100  ○ 100  ○ 100
○ 제 2협동(경상대학교) : 김치 유산균 미강발효물 대사체 변화 및 영향 연구	<p>○ 대사체 분석 기술을 이용한 김치 유산균 미강발효물 대사체 및 상관관계 분석</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- GC/MS를 이용한 대사체 분석 및 물질 동정</li> <li>- LC/MS를 이용한 대사체 분석 및 물질 동정</li> <li>- 다변량통계분석을 이용한 발효시간별 대사체 차이 확인</li> <li>- 발효중 증감이 현저한 대사물질 확인</li> </ul>	○ 100
○ 제 3협동(CJ제일제당주) : 발효공정 최적화 및 표준화	<p>○ 발효 건강 원료 개발 완료</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Pilot scale 공정 최적화 <ul style="list-style-type: none"> <li>: Scale-up 결과, 35도 48시간 발효시 오르니틴 함량이 가장 높은 것으로 확인</li> </ul> </li> <li>- 관능 품질 개선을 위한 공정 검토 <ul style="list-style-type: none"> <li>: 발효에 따른 오르니틴 함량과 관능 품질 상관 관계 확인</li> </ul> </li> </ul>	○ 100

	<p>결과 : 발효가 진행될수록 발효취에 의한 관능 저하 확인</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 50L scale-up 생산 제품으로 유통기한 가속 테스트 진행 [유통기한설정사유서]</li> <li>: 식품유형: 기타가공품</li> <li>: 유통기한 24개월 확보</li> <li>: 오르니틴 함량 유지 확인</li> </ul> <p>○ 원가 절감 검토</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 건조 공정에 따른 공정 최적화 및 원가 산출</li> <li>: 발효 후 건조 방법 별 원가 비교하여 기존 열풍건조 比 효율적인 건조 방법 도출</li> <li>: 원심분리를 통해 상등액과 잔사를 분리한 후 상등액은 농축 후 열풍건조, 잔사는 열풍건조하였을 때 가장 원가경쟁력 有</li> </ul> <p>○ 제형 다양화</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 정제 조건 확립</li> <li>: 유산균발효미강분말 함유량에 따른 조건 확인</li> <li>0, 10, 20, 30, 40%</li> <li>: 기준중량: 583 ± 10mg(최종중량 600mg)</li> <li>: 경도 12kg/cm<sup>2</sup> 이상</li> <li>: 붕해도 40분 이하</li> <li>: 마손도 0.3 이하</li> <li>- 과립, 액상 적용 테스트 진행</li> </ul>	<p>○ 100</p> <p>○ 100</p>
--	--	---------------------------

< 4차년도 >

<p>○ 제 1세부(조선대학교) : 기능성 미강발효제품 개발 및 생산(Lab scale)</p>	<p>○ 기능성 미강발효제품 개발</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 최적 제조 조건 설정(건조)</li> <li>: 열풍건조 → 55℃, 12~16시간</li> <li>: 동결건조 → -70℃, 3~4일</li> </ul> <p>○ 기능성 미강발효제품의 특성 조사</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• 이화학적 특성(발효 전/후) <ul style="list-style-type: none"> <li>- pH: DB1(pH 6.02±0.07/pH 5.70±0.08)</li> <li>EM(pH 5.96±0.18/pH 3.78±0.21)</li> <li>- 산도: DB1(0.23±0.05%/0.29±0.05%)</li> <li>EM(0.76±0.11%/2.62±0.35%)</li> <li>- 당도: DB1(16.40±0.47 brix/15.84±0.34 brix)</li> <li>EM(13.96±0.39 brix/12.45±0.32 brix)</li> </ul> </li> <li>• 미생물학적 특성 <ul style="list-style-type: none"> <li>- DB1(24시간에 최대 생균수 도달 후 48시간에 감소)</li> <li>- EM(24시간 최대 생균수 도달 후 48시간까지 유지)</li> </ul> </li> <li>• 관능적 특성 <ul style="list-style-type: none"> <li>- DB1: 발효 후 동결건조미강에서 고소한 맛과 단맛, 부드러운 질감으로 가장 높은 기호도를 나타냄.</li> <li>- EM: 발효 후 동결건조미강+스테비아에서 적당히 신맛과 단맛, 부드러운 질감으로 가장 높은 기호도를 나타냄.</li> </ul> </li> <li>• 기능성 평가 <ul style="list-style-type: none"> <li>- DB1: 발효 후 아르기닌이 모두 오르니틴으로 전환(TLC) 확인</li> <li>- EM: 발효 후 콜레스테롤 제거능 확인(oxgall 기준 60~69%)</li> </ul> </li> <li>• 향기성분 분석(GC/MS) <ul style="list-style-type: none"> <li>- 생미강에서는 heptanal, octanal 등 지푸라기 특유의 풀 냄새를 내는 성분이 다량 검출된 반면, 발효 후 미강에서는 DB1의 경우, propylene, glycerin 등 커피향, 다크초콜릿향, 와인향을 나타내는 성분 다량 검출. EM의 경우, lactic acid가 가장 많이 검출되었으며 그 외 n-hexadecanoic acid, oleic acid 등 검출.</li> </ul> </li> </ul> <p>○ 기능성 미강발효제품의 성분 분석</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• 시료: <i>W. koreensis</i> DB1/<i>L. plantarum</i> EM 각각의 발효 전/후 열풍건조/동결건조 미강</li> <li>- 일반성분: 수분, 조회분, 조지방 분석 완료</li> </ul>	<p>○ 100</p> <p>○ 100</p> <p>○ 100</p>
---	---	--





## 4. 연구개발성과의 관련 분야에 대한 기여 정도

### ○ 기술적 측면

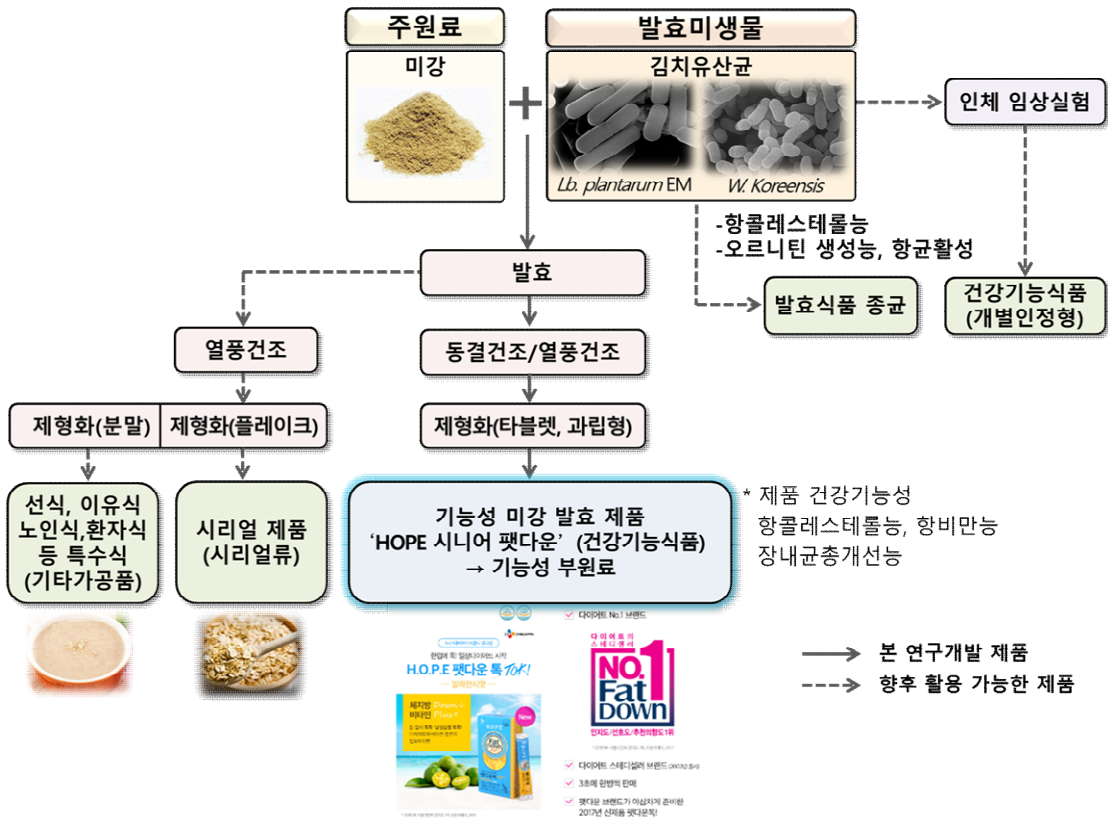
- 농산부산물인 미강의 활용 및 기능성 김치 유래 유산균의 발효 종균 개발은 고부가가치화를 이룬 구체적인 사례를 제시함으로써 농산부산물 재활용 관련 분야 연구 촉진에 기여하였음. 또한, 고부가가치화를 위한 기능성 물질들의 선정과 발효를 통해 이들의 생산 증대에 관한 구체적인 자료들을 도출함.
- 오르니틴 고생산성 혹은 콜레스테롤 저하능을 지닌 김치 유래 기능성 유산균을 사용한 소재 개발은 소비자의 욕구에 부합하는 안전하고 기능성이 입증된 식품 개발을 촉진하여 국민 건강에 기여할 것임. 특히, L-오르니틴의 경우, 2021년 식약처 등재되어 식품, 식품첨가물, 건강기능식품에 사용이 허가됨에 따라 오르니틴 고생산성 균주를 이용한 개발 제품이 다양한 산업적 활용이 가능해짐.
- 오르니틴 생성균주와 콜레스테롤 저하능 균주의 세포 및 동물실험을 통하여 고지혈조절, 간기능 개선 및 항비만 효과 효능이 입증된 과학적 근거 자료를 도출하여 기능성을 입증함.
- 김치에서 분리된 항콜레스테롤, 항비만, 저온생육 유산균에 대한 전장유전체 분석을 수행하였고 전장유전체 분석을 통해 김치유래 미생물의 유전적 정보를 확보하고 이해하는 중요한 연구가 됨. 본 연구에서 수행한 비교유전체 분석 결과는 기존에 보고된 다른 유산균들과 본 연구에서 분리된 유산균의 유전적 차이를 분명히 보여주었음. 이러한 결과는 이후 우리나라 전통 발효식품으로부터 항콜레스테롤 및 항비만 효과가 있는 유용유산균 발굴 연구에 활용될 수 있을 것으로 보임.
- 기존 연구는 단백질 및 유전자 연구만으로 전통식품의 기능성 및 호르몬과의 상관관계를 이해하는데 많은 한계가 있었지만 metabolomics(대사체 연구)을 이용하여 지표물질 및 관련 대사경로를 새롭게 확인하고 기존 연구와의 상관성 규명 연구를 통해 발효식품의 기능성 연구의 새로운 틀을 형성함. 특히 김치 유산균 발효 대사체가 어떻게 조절되는지 이해할 수 있으며 조절되는 대사체의 변화가 기능성과 어떤 관계인지를 규명함으로써 기능성 연구에 새로운 접근 방법을 제시함. 도출된 발효식품 유래 기능성 물질 확인은 새로운 건강기능식품의 제조 및 기능성 물질 대량 생산의 특화된 기술 개발에 활용됨으로써 질병 모델, 신약 개발, 기타 기능성 식품 연구 등에 응용이 가능함.
- 과학적 근거를 확보한 발효건강 원료 개발과 발효를 통한 기능성 물질 생산은 건강지향적인 사회적 경향에 부합하는 국가 성장 기반 구축에 기여할 것임.

### ○ 경제적·산업적 측면

- 본 연구개발의 성과인 유용 김치 유래 유산균 및 그 유전자는 기존 유산균들과는 차별화된 특성을 지니므로 국내·외 시장에서 경쟁력을 가짐. 토종 미생물 및 그 유전자 전략자원 확보와 산업화 전략을 제시하고 제품 개발에 따라 실용화를 이루어냄. 이는 타 식품 산업분야(예: 발효식품 종균, 선식, 이유식, 환자식, 노인식, 건강기능식품 등)에 적용될 수 있는 가능성을 열어줌으로써 경제·산업적 파급 효과를 가져올 것으로 사료됨.
- 본 연구개발에서 주원료로 사용되는 미강은 국내·외 연간 7억 6,800만톤 생산되며 이 중 10%만이 미강유 등 식품으로 이용되고 나머지 90%는 사료 등으로 처리되는 실정임. 현재까지의 미강 제품은 대부분 단순혼합 제품이거나 유산균 발효 후 미강을 혼합하는 수준에 달함. 본 연구에서는 미강을 주원료로 하여 유산균 발효 제품을 개발함으로써 기존 미강을 활용한 제품들과는 차별화된 기술이 적용된 새로운 형태의 건강기능제품임. 본 연구를 통하여 미강의 부가가치를 높여 궁극적으로 쌀 재배 농가 수익과 더불어 우리나라 쌀 산업 발전에 기여할 수 있음.
- 건강 후보물질 개발은 고부가 가치의 차세대 BT 전략사업으로, 안전성이 확보된 균주와 균주로 발효하여 개발한 개발제품을 이용한 특효성이 있는 동맥경화 예방효과와 더불어 비만 예방효과 건강소재가 기능성 식품 개발로 연결하여 독점력 있는 시장 확보가 기대됨. 또한 의약품개발의 경쟁력이 취약한 국내 상황에서 기능식품분야의 연구력 강화는 Bio 분야의 국가 경쟁력강화에 호재로 작용할 수 있음.

## 5. 연구개발성과의 관리 및 활용 계획

### <연구개발 결과의 활용 방안>



- 전략형 미생물(산업형 미생물) 자원의 확보 → 김치유산균의 우수성 입증
- 유용 미생물 유전 자원의 확보 및 유전 정보의 보유  
→ 우리나라 고유 바이오 소재 자원 확보 및 보존·관리
- 쌀 부산물 미강의 고부가가치화 → 농가 수익 증대
- 균주 배양 기술: 한국형 김치유산균 맞춤형 배양 기술(원천 기반 기술 발전)
- 개발제품의 기능성에 대한 과학적 근거 제시(동물실험, 유전체, 대사체 분석)  
→ 국제학술지 게재
- 한식발효기술을 이용한 건강기능식품 시장 활성화 → 국내·외 시장
- 소비자 욕구에 부합하는 안전하고 기능성이 입증된 식품의 개발 → 국민 건강 증진 기여

### <연구개발 결과의 활용 계획>

- 연구 기간 내 곡물 발효 제품인 리턴업 발효효소 제품에 적용하여 일반 식품의 발효 대사물로서 미강발효물의 우수성을 소구하였음
- 향후 리턴업 발효효소 제품 외 콜레스테롤 개선, 비만 개선 동물실험 내용을 바탕으로 항비만, 항노화 제품군에 기능성 부원료로 적용 예정임.
- 연구 결과를 바탕으로 시장 규모 및 사업적의사결정에 따라 항비만 또는 항콜레스테롤 관련 개별 인정 획득을 위한 추가 연구 진행 여부 및 시기를 정할 예정임.
- 추가 연구 결과에 따라 기능성 개별인정원료로 신규 또는 복합 기능성 시장을 창출할 수 있으며 제품 매출에 기여할 것으로 기대함.

성과 목표	사업화지표										연구기반지표									
	지식 재산권			기술 실시 (이전)		사업화					기술 인증	학술성과				교육 지도	인력 양성	정책 활용 홍 보		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		논문		논 문 평 균 IF	학 술 발 표			정 책 활 용	홍 보 전 시	
												SCI	비 SCI							
단위	건	건	건	건	백 만 원	건	백 만 원	백 만 원	명	백 만 원	건	건	건	건	명	건	건			
종료 1차년도							500					1	1	1.2	1					
종료 2차년도							1,000													
종료 3차년도						1	2,000											1		
종료 4차년도							3,000													
종료 5차년도							5,000													
소 계						1	11,500					1	1	1.2	1				1	

## 참 고 문 헌

1. Elam, R. P. (1988). Morphological changes in adult males from resistance exercise and amino acid supplementation. *The Journal of Sports Medicine and Physical Fitness*, 28(1), 35–39.
2. Muting, D., Kalk, J. F., & Klein, C. P. (1992). Long-term effectiveness of high-dosed ornithine–aspartate on urea synthesis rate and portal hypertension in human liver cirrhosis. *Amino Acids*, 3(2), 147–153.
3. Sohn, J. Y., Ban, S. C., Hong, S. H., & Shin, J. S. (1996). Distribution of free sugars in the various portions of watermelon (*Citrullus vuigaris L.*) and Muskmelon (*Cucumis meio var. reticulatus Naud.*). *Applied Biological Chemistry*, 39(3), 200–205.
4. Garcia-Esteva, R. M., Guerra-Hernandez, E., & Garcia-Villanova, B. (1999). Phytic acid content in milled cereal products and breads. *Food Research International*, 32(3), 217–221.
5. Christensen, J. E., Dudley, E. G., Pederson, J. A., & Steele, J. L. (1999). Peptidases and amino acid catabolism in lactic acid bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 76(1–4), 217–246.
6. Shi, H. P., Fishel, R. S., Efron, D. T., Williams, J. Z., Fishel, M. H., & Barbul, A. (2002). Effect of supplemental ornithine on wound healing. *Journal of Surgical Research*, 106(2), 299–302.
7. Yan, T. Y., Chung, J. H., & Rhee, C. O. (2004). Development of an automatic packer using vacuum packaging and its effects on the rice quality. *Journal of Biosystems Engineering*, 29(2), 131–140.
8. Mujahid, A., Haq, I. Ul., Asif, M., & Gilani, A. H. (2004). Effect of various processing techniques and different levels of antioxidant on stability of rice bran during storage. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 85(5), 847–852.
9. Osowska, S., Duchemann, T., Walrand, S., Paillard, A., Boirie, Y., Cynober, L., & Moinard, C. (2006). Citrulline modulates muscle protein metabolism in old malnourished rats. *American Journal of Physiology–Endocrinology and Metabolism*, 291(3), 582–586.
10. Schlemmer, U., Frølich, W., Prieto, R. M., & Grases, F. (2009). Phytate in foods and significance for humans: Food sources, intake, processing, bioavailability, protective role and analysis. *Molecular Nutrition and Food Research*, 53(S2), S330–S375.
11. Yu, J. J., Park, H. J., Kim, S. G., & Oh, S. H. (2009). Isolation, identification, and characterization of *Weissella* strains with high ornithine producing capacity from kimchi. *Korean Journal of Microbiology*, 45(4), 339–345.
12. Zajac, A., Poprzecki, S., Zebrowska, A., Chalimoniuk, M., & Langfort, J. (2010). Arginine and ornithine supplementation increases growth hormone and insulin-like growth factor-1 serum levels after heavy-resistance exercise in strength-trained athletes. *Journal of Strength and Conditioning Research*, 24(4), 1082–1090.
13. EFSA(European Food Safety Authority). (2012). Guidance on the assessment of bacterial susceptibility to antimicrobials of human and veterinary importance. *EFSA Journal*, 10(6), 2740.
14. Zeng, M., Zhang, L., He, Z., Qin, F., Tang, X., Huang, X., Qu, H., Chen, J. (2012). Determination of flavor components of rice bran by GC–MS and chemometrics. *Analytical Methods*, 4(2), 539–545.
15. Gallego, P., Planell, R., Benach, J., Querol, E., Perez-Pons, J. A., & Reverter, D. (2012). Structural characterization of the enzymes composing the arginine deiminase pathway in *Mycoplasma penetrans*. *PLoS One*, 7(10), e47886.

16. Morita, M., Hayashi, T., Ochiai, M., Maeda, M., Yamaguchi, T., Ina, K., & Kuzuya, M. (2014). Oral supplementation with a combination of L-citrulline and L-arginine rapidly increases plasma L-arginine concentration and enhances NO bioavailability. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 454(1), 53–57.
17. Anandharaj, M., Sivasankari, B., Santhanakaruppu, R., Manimaran, M., Rani, R. P., & Sivakumar, S. (2015). Determining the probiotic potential of cholesterol-reducing *Lactobacillus* and *Weissella* strains isolated from gherkins (fermented cucumber) and south Indian fermented koozh. *Research in Microbiology*, 166(5), 428–439.
18. Choi, E. A., & Chang, H. C. (2015). Cholesterol-lowering effects of a putative probiotic strain *Lactobacillus plantarum* EM isolated from kimchi. *LWT-Food Science and Technology*, 62(1), 210–217.
19. Lee, S. M., Oh, J., Hurh, B. S., Jeong, G. H., Shin, Y. K., & Kim, Y. S. (2016). Volatile compounds produced by *Lactobacillus paracasei* during oat fermentation. *Journal of Food Science*, 81(12), C2915–C2922.
20. Alauddin, M., Shirakawa, H., Koseki, T., Kiiima, N., Ardiansyah, Budijanto, S., Islam, J., Goto, T. & Komai, M. (2016). Fermented rice bran supplementation mitigates metabolic syndrome in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 16(1), 442.
21. Kudo, M., Yoshitomi, H., Momoo, M., Suguro, S., Yamagishi, Y., & Gao, M. (2017). Evaluation of the effects and mechanism of L-citrulline on anti-obesity by appetite suppression in obese/diabetic KK-Ay mice and high-fat diet fed SD rats. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*, 40(4), 524–530.
22. Gu, E. J., Kim, D. W., Jang, G. J., Song, S. H., Lee, J. I., Lee, S. B., ... Kim, H. J. (2017). Mass-based metabolomic analysis of soybean sprouts during germination. *Food Chemistry*, 217, 311–319.
23. Kim, D. W., Kim, B. M., Lee, H. J., Jang, G. J., Song, S. H., Lee, J. I., ... Kim, H. J. (2017). Effects of different salt treatments on the fermentation metabolites and bacterial profiles of kimchi. *Journal of Food Science*, 82(5), 1124–1131.
24. 장해춘, 고상범, 류병희. (2017). 비가열 식품의 식중독 제어를 위한 미생물 유래 천연항균제 개발. 세종: 농림축산식품부.
25. Nissar, J., Ahad, T., Naik, HR., & Hussain, SZ. (2017). A review phytic acid: As antinutrient or nutraceutical. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 6(6), 1554–1560.
26. Choi, A. R., Patra, J. K., Kim, W. J., & Kang, S. S. (2018). Antagonistic activities and probiotic potential of lactic acid bacteria derived from a plant-based fermented food. *Frontiers in Microbiology*, 9, 1963.
27. Shi, Y., Wang, L., Fang, Y., Wang, H., Tao, H., Pei, F., ... Hu, Q. (2018). A comprehensive analysis of aroma compounds and microstructure changes in brown rice during roasting process. *LWT-Food Science and Technology*, 98, 613–621.
28. Lee, S. M., Hwang, Y. R., Kim, M. S., Chung, M. S., & Kim, Y. S. (2019). Comparison of volatile and nonvolatile compounds in rice fermented by different lactic acid bacteria. *Molecules*, 24(6), 1183.
29. Shibayama, J., Goto, M., Kuda, T., Fukunaga, M., Takahashi, H., & Kimura, B. (2019). Effect of rice bran fermented with *Saccharomyces cerevisiae* and *Lactobacillus plantarum* on gut microbiome of mice fed high-sucrose diet. *Beneficial Microbes*. 10(7), 811–821.
30. Mun, S. Y., Kim, S. K., Woo, E. R., & Chang, H. C. (2019). Purification and characterization of an antimicrobial compound produced by *Lactobacillus plantarum* EM showing both antifungal and antibacterial activities. *LWT-Food Science and Technology*,

114, 108403.

31. Son, Y., Lee, K. Y., Gu, S., Park, J. Y., Choi, S. G., & Kim, H. J. (2020). Quality changes in perilla seed powder related to storage duration and temperature. *Journal of Food Science and Technology*, 57(1), 263–273.
32. He, R., Wang, Y., Zou, Y., Wang, Z., Ding, C., Wu, Y., & Ju, X. (2020). Storage characteristics of infrared radiation stabilized rice bran and its shelf-life evaluation by prediction modeling. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 100(6), 2638–2647.
33. Rusbana, T. B., Agista, A. Z., Saputra, W. D., Ohsaki, Y., Watanabe, K., Ardiansyah, A., Budijanto, S., Koseki, T., Aso, H., Komai, M., & Shirakawa, H. (2020). Supplementation with fermented rice bran attenuates muscle atrophy in a diabetic rat model. *Nutrients*, 12(8), 2409.
34. Mun, S. Y., Moon, S. H., & Chang, H. C. (2020). Characterization of high-ornithine-producing *Weissella koreensis* DB1 isolated from kimchi and its application in rice bran fermentation as a starter culture. *Foods*, 9(11), 1545.
35. Ardiansyah. (2021). A short review: Bioactivity of fermented rice bran. *Journal of Oleo Science*, 70(11), 1565–1574.
36. Moon, S. H., & Chang, H. C. (2021). Rice bran fermentation using *Lactiplantibacillus plantarum* EM as a starter and the potential of the fermented rice bran as a functional food. *Foods*, 10(5), 978.
37. Gao, C., Li, Y., Pan, Q., Fan, M., Wang, L., & Qian, H. (2021). Analysis of the key aroma volatile compounds in rice bran during storage and processing via HS-SPME GC/MS. *Journal of Cereal Science*, 99, 103178.

## 주 의

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