

발간등록번호
11-1543000-003057-01

맛 바이오
촉형 오

발생물
효선전
식환
및공
정음
을

음료
통
한
개
발
당
노
병
환
자
최
종
보
고
서

2020

농기
림획
축평
산식
산가
식품원
품기술
부

바이오 생물전환공정을 통한 당뇨병환자 맞춤형 발효선식 및 음료 개발

최종보고서

2020.03.27.

주관연구기관 / (주)비에치앤바이오
협동연구기관 / 한스바이오
(재)경북바이오산업연구원

농림축산식품부

(전문기관) 농림식품기술기획평가원

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “바이오 생물전환공정을 통한 당뇨병환자 맞춤형 발효선식 및 음료개발”(개발기간 : 2017.12.21. ~ 2019.12.20.)과제의 최종보고서로 제출합니다.

주관연구기관명 : ㈜비에이치앤바이오 (대표자) 이근갑 (인)

협동연구기관명 : 한스바이오 (대표자) 조종일 (인)

(재)경북바이오산업연구원 (대표자) 이택관 (인)

주관연구책임자 : 이중복

제1협동연구책임자 : 조종일

제2협동연구책임자 : 조규형

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

보고서 요약서

과제고유번호	117104-2	해 당 단 계 연 구 기 간	2017.12.21.~ 2019.12.20.	단 계 구 분	2년/ 2년
연구사업명	단 위 사 업	농식품기술개발사업			
	사 업 명	2017년도 고부가가치식품기술개발사업			
연구과제명	대 과 제 명	(해당 없음)			
	세 부 과 제 명	바이오 생물전환공정을 통한 당뇨병환자 맞춤형 발효선식 및 음료개발			
연구책임자	이중복	해당단계 참여연구원 수	총: 12명 내부: 12명 외부: 명	해당단계 연구개발비	정부: 160,000천원 민간: 57,200천원 계: 217,000천원
		총 연구기간 참여연구원 수	총: 24명 내부: 24명 외부: 명	총 연구개발비	정부: 320,000천원 민간: 114,400천원 계: 434,400천원
연구기관명 및 소속부서명	(주)비에이치앤바이오 생물산업소재개발연구소			참여기업명 한스바이오 (재)경북바이오산업연구원	
국제공동연구	상대국명:				상대국 연구기관명:
위탁연구	연구기관명:				연구책임자:

※ 국내외의 기술개발 현황은 연구개발계획서에 기재한 내용으로 같음

연구개발성과의 보안등급 및 사유	
-------------------------	--

9대 성과 등록·기탁번호

구분	논문	특허	보고서 원문	연구시설 ·장비	기술요약 정보	소프트 웨어	화합물	생명자원		신품종	
								생명 정보	생물 자원	정보	실물
등록·기탁 번호	2	2	1						3		

국가과학기술종합정보시스템에 등록된 연구시설·장비 현황

구입기관	연구시설· 장비명	규격 (모델명)	수량	구입연월일	구입가격 (천원)	구입처 (전화)	비고 (설치장소)	NTIS 등록번호

요약

연구개발 계획에 따라 비만억제 및 체지방감소를 통해 당뇨병을 예방하고자 연구를 진행하였으며, 홍국균을 이용한 홍국쌀의 고부가 기능성식품 개발을 위해 유산균과 홍국쌀의 2단 발효를 실시하여 Monacolin-K, GABA 기능물질 함량을 증대 시킴으로써 *in vitro*, *in vivo* 실험을 통해 과학적으로 항당뇨, 항비만 효능을 규명 하였음.

산업화를 위해 소재 생산의 대량생산공정 및 운전기술을 확보하였으며, 발효 홍국쌀이 함유된 양산품 3종을 개발 품목신고 하였으며, 홍국쌀과 유산균의 2단 발효 공정과 효능평가 통해 '바이오 생물공정을 이용한 당뇨병환자 맞춤형 발효 선식 및 음료 개발'을 완료함.

연구개발을 통해 특허출원 2건, 상표출원 3건, 매출 31백만원, 고용창출 16명, 논문 비SCI2건, 학술발표 12건, 인력양성 1명, 홍보전시 6건을 진행 완료 함.

보고서 면수

183

<요약문>

<p align="center">연구의 목적 및 내용</p>	<ul style="list-style-type: none"> - 바이오 생물공정을 이용한 당뇨병환자 맞춤형 발효선식 및 음료 개발 - 발효미생물 스크린, 2단 발효 원천기술 및 자원 확보 - 대량생산공정 및 운전조건 개발 - 당뇨병 맞춤형 발효선식, 음료 최적 배합비 개발 - 개발제품의 항당뇨 기능성 입증 - 기업 매출증대 및 고용창출 - 항당뇨 고부가가치식품 해외수출 - 기능성 쌀가공 제품 개발을 통한 쌀소비 촉진 				
<p align="center">연구개발성과</p>	<ul style="list-style-type: none"> - 항당뇨 발효선식 및 발효음료 제품화 3건 - 특허출원 2건, 균주기탁 1건, 상표출원 3건 - SCI 건, 비SCI 2건 - 제품판매 매출 31백만원 - 인력양성 3명 - 고용창출 16명 				
<p align="center">연구개발성과의 활용계획 (기대효과)</p>	<ul style="list-style-type: none"> - 활용계획 <ul style="list-style-type: none"> · 기능성 발효쌀 소재를 이용한 제품의 다양화 · 항당뇨 기능성 식품 해외시장 판로개척 및 수출 · 유산균 중균 확보 및 프로바이오틱스 연계 활용제품 개발 · 발효공정을 이용한 천연소재 발효제품 개발 · 바이오 인력양성 및 발효기술 이전 - 기대효과 <ul style="list-style-type: none"> · 수입건강식품 및 치료제 대체에 따른 내수경제 기여 · 산학연 인프라를 통한 기술개발로 인적, 물적자원 활용 및 개발비용절감 효과 · 제품개발에 따른 국내산 농산물 소비증대 · 쌀농가 계약재배를 통한 쌀소비 촉진 · 생산 및 연구인력 신규채용 				
<p>국문핵심어 (5개 이내)</p>	항당뇨	발효선식	발효 음료	홍국	유산균

< 목 차 >

제 1 장. 연구개발과제의 개요	6
1. 연구개발의 목적 및 필요성	6
1-1. 연구개발의 목적	6
1-2. 연구개발의 필요성	6
1-3. 연구개발의 배경	10
1-4. 연구개발의 범위	14
제 2 장. 연구수행 내용 및 결과	17
1. 1차년도 연구수행 내용	17
2. 2차년도 연구수행 내용	29
3. 1차년도 연구결과	36
4. 2차년도 연구결과	91
5. 연구개발성과	158
제 3 장 목표 달성도 및 관련 분야 기여도	164
1. 목표 및 목표달성여부	164
2. 관련분야 기여도	166
제 4 장 연구결과의 활용 계획 등	167
1. 사업화 추진전략	167
2. 마케팅 전략	170
붙임. 참고 문헌	173

<별첨> 주관연구기관의 자체평가의견서

제 1 장 연구개발과제의 개요

1. 연구개발의 목적 및 필요성

1-1. 연구개발 목적

- 바이오 생물공정을 이용한 당뇨병환자 맞춤형 발효선식 및 음료 개발
- 발효미생물 스크린, 2단 발효 원천기술 및 자원 확보
- 대량생산공정 및 운전조건 개발
- 당뇨병 맞춤형 발효선식, 음료 최적 배합비 개발
- 개발제품의 항당뇨 기능성 입증
- 기업 매출증대 및 고용창출
- 항당뇨 고부가가치식품 해외수출
- 기능성 쌀가공 제품 개발을 통한 쌀소비 촉진

1-2. 연구개발의 필요성

가. 연구개발의 배경

- 당뇨병은 전 세계적으로 성인부터 어린이까지 많이 겪고 있는 만성질환으로 세계적으로 1억 5,000만명이 앓고 있으며, 심장병, 신장질환과 시력저하 등 심각한 합병증을 유발함으로써 사회경제적 비용 발생이 매우 높아 심각성이 대두 되고 있음.
- 당뇨병 관련 치료제 세계시장 규모는 2017년 417억달러이며 향후 2022년에는 661억달러 예상되며 당뇨병환자가 지속적으로 증가함으로써 당뇨병관련 시장이 확대 될 것으로 예상하고 있음.
- 당뇨병은 만성 대사질환이기 때문에 치료 목적이 완치가 아니라 관리이므로 생활 식생활에 대한 관심과 중요성이 높으나 아직 당뇨환자를 위한 맞춤형 **식의약 제품이 부족한** 실정이며 이에 대한 소비욕구가 매우 높아 향후 발전 가능성이 큰 분야 임.
- 2016년 1인당 연간 양곡(쌀+기타양곡) 소비량은 71.2kg으로 전년대비 0.7% 감소하였으며 그중 쌀 소비량(61.9kg)은 매년 감소하고, 기타 양곡 소비량(9.3kg)은 4년 연속 증가 중에 있으며, 1인당 연간 양곡 소비량은 1981년 이후 지속적으로 감소하는 추세로 30년 전인 '86년 소비량(142.4kg)에 비해 절반수준으로 감소하였음.
- 2017년 정부 양곡 재고 233만톤, 민간 재고 118만 톤으로 1970년의 32만톤 이후 사상 최대 규모로 쌀 재고가 발생하였으며 공급과잉, 쌀 소비 감소로 인한 복합적인 요인으로 현지 쌀 가격이 폭락하여 **쌀 생산 농가의 소득보장, 쌀 농업 보호 등의 사회적으로 문제로 대두** 됨.

- 정부에서는 쌀 소비 촉진을 위해 다양한 육성 정책을 실시하고 있으며 2015년 쌀 가공산업 활성화 방안을 발표 하는 등 쌀 소비 촉진을 위한 가공산업의 중요성이 인식 됨.
- 쌀은 영양적으로 우수하며, 균형을 이루고 있고, 콜레스테롤 저하, 체지방 감소에 의한 다이어트 효과 등 생활습관병 예방효과를 보유하고 있음. 또한, 중금속의 체내 흡수 억제, 항암, 항균 활성 등 건강에 기여하는 효과가 우수하여 단순한 주식으로의 역할에서, 각종 질환을 예방할 수 있는 건강기능 식품의 하나로 최근 연구가 강화되고 있음. 최근 쌀의 기본적인 영양 및 건강 기능성에 성인병의 예방 및 치료를 위한 각종 기능성 성분을 코팅하거나 첨가해서 새로운 형태의 건강기능성 쌀의 개발 연구가 추진되고 있음.
- 현재 환경의 변화와 서구화된 식습관으로 비만, 당뇨, 혈압 등 대사성 질환 및 **생활습관병이 증가**하고 있어 전 사회적문제로 대두 되고 있으며 이에 대한 예방과 관리가 중요시되고 있어 건강기능성 식품이나 **천연소재를 활용한 고부가 식품의 소비가 증가**하고 있음.
- 당뇨병 환자의 식품 선택 시 고려 될 사항은 보통정도의 탄수화물과 GI(당지수)가 낮은 식이섬유 식품을 섭취하는 것이 바람직하나 바쁜 현대인의 생활 때문에 식품에 대한 정보 없이 섭취를 하고 있으며, 식단을 통한 관리는 많은 시간과 부대비용이 발생하여 장기적인 관리가 힘든 실정 임. 홍국은 붉은 누룩을 의미하며, 중국 한나라 때부터 혈행을 개선하는 음식으로 사용되었고, 우리나라에서는 조선 중기에 전래되어 한방에서 산후 어혈 해소제로 사용되고 있었음.
- 홍국쌀은 쌀에 홍국균(*Monascus* sp.)을 접종하여 고체 발효시킨 것으로 식품관련 법에는 색소용 홍국(식품첨가물공전 등록)과 기능성 홍국(건강기능성식품공전 등록)으로 구분되어 사용되고 있음.
- 홍국의 기능은 본초강목에 [소화를 돕고 피를 소생케 하며(消食活血), 비장을 강하게 하고 위를 조절하며(建脾燥胃), 여인의 피를 소생케하여 부인병을 고친다(治女人血氣痛)]라고 기술되어 있으며, 허준의 동의보감에는 [홍국은 피를 잘 돌게 하고 음식이 소화되게 하며 이질을 멎게 하는 신국(神麴, 약누룩)]이라고 기록되어있음.
- 현재 식품첨가물로 사용되는 홍국은 인체 안전성에 근거하여 생리활성 구멍과 발효 특성을 구명한다면 기능성 사료, 건강 기능성 식품 소재 등의 가능성 보유하고 있음.
- 홍국은 콜레스테롤 개선과 LDL수치 저하 기능성 원료로 식약처공전에 등록된 성분이며, *Monascus*속 균류가 쌀이나 콩에 기생하여 발효하여 생성된 선휘색의 누룩으로, 최근 동물 연구에서 홍국이 혈당을 감소시키고 인슐린을 증가 시키는 것이 밝혀 짐.
- 유산균은 인간 체내에서 서식하며 장 기능 개선, 면역력 증가, 피부미용 효과 등에 직간접적으로 영향을 끼치며 몸속 미생물중 유익균으로서 최근 전통식품 김치에서 분리된 균주가 최근 많이 활용 되고 있으며, 유산균 관련 시장이 폭발적으로 성장하고 있고, 소비자의 기호성이 매우 높은 건강식품 중 하나 임.

- 따라서, 본 연구팀은 쌀을 주원료 이용하여 홍국균과 유산균을 2단 생물전환공정을 통해 향당뇨에 대한 기능성이 증가 된 소재를 개발 하여 발효선식, 발효음료 개발을 통한 향당뇨 효능 검증함으로써 **새로운 개념의 기능성 제품, 향당뇨 맞춤형 식의약 제품을 개발하여** 국내 및 해외수출을 통한 기업매출 증대와 2단 생물전환공정 원천기술 확보, 발효균주 특허등록을 통한 유전자원 확보, 국내쌀 소비 확대 및 국내산 농산물 상생방안 협력을 통해 기업성장, 국내 농산업 육성과 더불어 고부가가치 향당뇨 기능성 제품을 통한 국민건강 증진과 국가 경제에 이바지 하고자 함.

나. 연구개발의 필요성

- 당뇨병은 발병 원인, 진행 경로 및 합병증의 다양성 때문에 인슐린 제제를 포함한 약물 치료의 한계가 존재하여 다양한 표적형 약물이 있음에도 불구하고 여전히 부작용이 적고 상용화 가능성이 큰 새로운 치료제 개발이 요구됨.
- 당뇨병은 고혈당이 만성으로 지속되면서 당 대사 뿐만 아니라 지질 및 단백질 대사 장애도 수반되어 망막, 신장, 신경, 심혈관계 관련 질병이 합병증으로 나타나며, 합병증으로 인한 위험성이 높기 때문에 당뇨병 치료에 있어 혈당 조절과 함께 합병증의 유발 및 진행 억제에 매우 중요 함.
- 성인 10명 중 1명이 당뇨병환자 (당뇨병 유병률 10.1%)이며, 성인 10명 중 2명이 당뇨병 전단계(공복혈당장애 유병률 19.9%)로 2010년 기준 성인 10명 중 3명이 당뇨병환자 및 잠재적 당뇨병으로 2050년도 우리나라 당뇨병환자 수는 약 600만 명으로 추정되며 이는 2010년 기준 183% 증가한 수치로 향후 40년간 약 2배 증가 예상됨.
- 당뇨병환자 10명 중 3명은 본인이 당뇨병이 있다는 사실을 모르고 있으며 (당뇨병 인지율 73.4%), 특히 30~44세의 젊은 연령층에서 본인이 당뇨병임을 모르고 있는 경우가 45.6%로 약 절반에 해당됨.
- 당뇨병과 그로 인한 합병증이 개인의 의료비 부담은 물론 의료시스템과 국가 경제에 미치는 영향이 매우 크며 최근의 관련 문헌고찰을 통해 경제적 비용부담 규모를 추계한 결과, 전세계적으로 당뇨병으로 인한 연간 비용부담이 약 8,270억 달러를 넘을 것으로 나타남.
- 국제당뇨병연맹(IDF)의 추산에 따르면 2003년부터 2013년 사이에 당뇨병으로 인한 총 의료비 지출이 세배 정도 증가 되었으며 전 세계적으로 당뇨병으로 인한 의료비 지출 증가세는 지속 될 것이며 , 특히 중간소득과 저소득 국가에서는 선진국에 비해서 이런 비용부담이 훨씬 더 클 것으로 예상되어 당뇨병과 그로 인한 합병증은 환자와 그 가족에게 상당한 경제적 손실을 가져오고, 사회적으로도 직접 의료비용과 소득 상실 등을 모두 감안하면 의료시스템과 국가경제에도 큰 영향을 미칠 것으로 분석 됨.
- 따라서 새로운 관점의 당뇨병 및 당뇨합병증 치료제의 개발이 절실하며, 특히 부작용이 적은 천연물을 이용한 치료제 및 건강식품 개발의 중요성이 더욱 증가하고 있는 실정임.
- 당뇨병은 만성 대사질환으로 치료제의 목적이 완치가 아니라 관리이며, 따라서 생활습관을 통한 예방 및 관리가 매우 중요 함.

다. 연구개발의 차별성

- 천연물을 이용한 식사대용의 당뇨병환자 맞춤형 기능성 식품을 개발하는 것이 목적이며, 천연물은부작용이 신약에 비해 적으며 평소 일상생활 식습관을 통해 당뇨의 예방과 관리가 가능 함.
- 따라서 천연소재인 쌀에 홍국균과 유산균을 이용하여 2단발효 생물전환공정 기술을 이용하여 기능성 검증을 통해 발효 최적화가 가능하며, 본 연구팀은 발효미생물에 대한 선별 및 유효성분 증대가 가능한 2단발효 시스템이 구축 되어 있으며 우수한 연구원 인력도 확보 되어 2단발효 생물전환공정을 통해 항당뇨 기능이 증가된 소재를 개발 제품화함으로써 그 차별성을 가지고 있음.

라. 연구의 중요성

- 기술적 측면
 - 미생물을 이용한 생물공정기술은 인체 친화적이며 환경오염 발생이 없는 신개념의 가공 기술로 각광 받고 있음.
 - 세계 바이오산업 시장규모는 2010년 2,500억 달러로 2004년부터 연평균 11.8% ('04~'08) 성장하였으며, 2015년 까지는 3,980억 달러의 시장형성 전망 됨.
 - 2010년 세계 기능성 바이오 소재산업 시장 점유율은 바이오 의약품이 46.66%, 바이오 식품이 31.54%, 바이오화학 9.29%, 바이오공정 및 기기 3.82% 순이며 바이오를 이용한 산업 전반이 고성장 중 임.
 - 최근들어 미생물을 이용한 산업화가 다양해지고 있으며, 환경가치를 중요시 하는 사회적 분위기가 조성되어 관련 산업 매출이 증대 되고 있음.
 - 발효공정을 통해 항당뇨 기능성 발효선식, 음료 제품을 제공함으로써 소비자의 건강증진과 새로운 항당뇨 식품 시장의 트렌드 형성이 가능 함.
- 경제산업적 측면
 - 국내쌀을 주원료로 사용하는 제품 개발로 과잉생산되는 쌀의 소비 촉진이 가능하며, 부재료도 국내산 원료와 토종균주를 사용함으로써, 나고야의정서에 규제를 받지 않으며 국내 유전자원을 활용도를 통한 국내생물자원 육성산업이 가능 함.
 - (주)비에이치앤바이오는 해외수출을 위해 활발한 영업활동을 하고 있으며, 해외 유통망 구축에 따라 본 연구팀에서 개발 될 항당뇨 기능성 발효선식, 음료 제품의 해외수출이 용이 할 것으로 사료되며, 수출을 통한 해외획득이 가능 함.
- 사회문화적 측면
 - 식생활을 통한 당뇨의 관리가 가능하여 당뇨로 인한 사회적 비용 및 문제점과 당뇨환자의 음식섭취의 어려움이 해결 가능하므로 항당뇨 기능성 제품을 통한 국민 건강증진이 가능 함.

1-3. 연구개발의 배경

가. 국내 기술 수준 및 시장 현황

(1) 기술현황

- 당뇨병은 췌장 호르몬인 인슐린의 분비 또는 작용의 이상으로 발생하는 고혈당을 특징으로 하는 대사장애 증후군이며, 만성퇴행성질환 중의 하나로서 제 1형 및 제 2형 당뇨병으로 구분됨.
- 당뇨병은 고혈당이 만성으로 지속되면서 당 대사 뿐만 아니라 지질 및 단백질 대사 장애도 수반되어 망막, 신장, 신경, 심혈관계 관련 질병이 합병증으로 나타나며, 합병증으로 인한 위험성이 높기 때문에 당뇨병 치료에 있어 혈당 조절과 함께 합병증의 유발 및 진행 억제가 매우 중요함.
- 인슐린 제제는 생체 인슐린과 동일한 생리작용을 나타내나 주사제로 밖에 사용할 수 없고 내성이 문제가 될 수 있으며, sulfonylurea계는 경구 제제로 저렴하나 인슐린 분비 증강에 한계가 있고, metformin 및 thiazolidinedione계 일부 약물이 인슐린 내성을 부분적으로 극복하였으나 효과가 미미한 단점이 있음.
- 비인슐린 제제로써 임상에서 사용되는 당뇨병 치료제는 크게 1) sulfonylurea계 등 인슐린 분비를 촉진시키는 약물, 2) glytazone계 등 인슐린 수용체의 감수성을 증가시키는 약물, 3) 그 외 당분해를 억제하여 흡수를 억제하거나 간에서 저장된 포도당을 서서히 유리시키는 약물로 구분됨.
- 당뇨병은 발병 원인, 진행 경로 및 합병증의 다양성 때문에 다양한 관점에서 치료제가 개발되고 있으나 아직까지 약물 치료의 한계가 존재하고 있으며, 새롭게 개발되는 약물의 부작용 역시 상당하여 임상 단계에서 개발이 중단 되는 경우가 빈번함.

(2) 시장현황

- 국내 당뇨병 환자는 2010년 201만9000명에서 2015년 251만5000명으로 5년 사이 25% 증가하였으며 당뇨병은 40대부터 급속히 늘어 남자는 50대(40만여 명, 전체의 30%), 여자는 60대(32만 여 명, 28%)에 가장 많고 중년부터 당뇨병이 급격히 늘어나는 현재 추세라면 2020년 정도에는 30 대 이상 10명 중 1명이 당뇨병 환자가 될 것 예상 됨.
- 국내 당뇨병 치료제 시장은 2008년 3,400억 원에서 연평균 12% 성장하여 2014년 7,176억 원으로 증가 하였으며, 2014년 이후 연평균 13% 성장하여 2020년 14,939억 원으로 전망 됨.

(3) 경쟁기관현황

- 국내기업으로는 LG생명과학의 제미글로정, 종근당의 듀비에정이 당뇨병 신약으로 개발되어 판매 되고 있음.
- 혈당 조절 건강기능식품은 모두 개별인정형 건강기능식품으로써 난소화성 말토덱스트린, 바나바 주정 추출물, 피니톨, 구아바잎, 솔잎증류농축액 참밀알부민, 동결건조 누에분말이 있음.

(4) 지식재산권현황

- 당뇨병 및 당뇨합병증 치료제에 관련된 특허는 1970년대 후반부터 출원되기 시작하여 1980년대 후반부터 본격적으로 특허활동이 증가하기 시작하여 유효분석 구간인 2009년까지 전반적인 증가 추세에 있음에 있으며 한국은 169건으로 나타 남.
- 미국이 해당 기술 분야의 특허를 387건 출원, 등록하였으며, 전체 특허수의 52%로 당뇨병 또는 당뇨 합병증 치료제 기술 분야를 주도하고 있는 것으로 나타나며 한국이 뒤를 이어 169건, 23%를 차지하고 있음.

(5) 표준화현황

- 제1형 당뇨병은 면역시스템에서 면역세포가 췌장에 인슐린을 생성하는 베타세포를 집중적으로 공격하여 베타세포가 사라져 자체적으로 인슐린 생산이 불가능한 자가면역질환이며, 제2형 당뇨병은 췌장에서 인슐린이 분비되지만 인슐린 저항성으로 인하여 체내에 포도당이 과잉상태로 유지되는 대사질환이임.
- 당뇨병은 당화혈색소 6.5%이상, 8시간 공복상태에서 혈장포도당농도 126mg/Dl 이상인 경우를 기준으로 진단을 내리게 됨.

(6) 기타현황

- 질병관리본부에서 국가적인 당뇨병관리 사업을 진행하고 있으며 전국 시·군·구에서 실시하며 19개 등록교육센터를 설치 운영하고 있음.
- 의원, 병원에서 진료 후 등록교육센터에 등록, 센터에서 개별·집단교육, 콜 센터 운영하며 보건소에서 총괄관리를 하고 있음.

나. 국외 기술 수준 및 시장 현황

(1)기술현황

- 당뇨병 치료방식은 주사제와 경구제로 나누어지며 대표적인 주사제는 인슐린 유사체와 GLP-1 유사체가 있음.
- 인슐린은 가장 대표적인 당뇨치료제로서 체내에 있는 혈당을 조절해주는 인슐린호르몬은 직접적으로 투여하기 때문에 시장에 나와있는 당뇨치료제 중에서는 가장 효과적인 혈당강하치료제 이며, GLP-1 작용제는 인슐린분비를 촉진하여 간접적으로 혈당조절 함.
- 이를 제외한 대부분의 당뇨치료제는 경구치료제이며, 대표적으로 처방되는 경구처방제는 메트포르민(metformin), 설폰닐(Sulphonylureas), 티아졸리딘디온(Thiazolidinediones)이 있음.
- 대부분의 당뇨치료제는 2형 당뇨환자의 혈당저하효과를 타겟하며 효과적인혈당강하, 저혈당·심장질환안전성·예방효과, 복용용이성, 지속기간, 체중감소효과, 낮은 가격을 기준으로 개발하고 있음.

(2) 시장현황

- 전 세계 당뇨병 환자 수는 2012년 3억 7100만 명에서 2035년 5억 9200만 명으로 60% 증가

- 할것으로 전망되며, 이에 따라 당뇨병 치료제의 수요는 지속적으로 증가할 것으로 보여 짐.
- 세계 당뇨병 치료제 시장은 2008년 250억 달러에서 연평균 10% 성장하여 2014년 530억 달러로 증가하였으며, 2014년 이후 연평균 13% 성장하여 2020년 1,120억 달러로 전망 됨.
 - 당뇨병으로 인해 전 세계 각국에서 부담하는 경제적 비용을 모두 합하면 약 1천조원에 달할 것으로 추정되며, 당뇨병 치료제와 당뇨병 관련 건강식품 개발이 활발하게 진행되고 있음.

(3) 경쟁기관현황

- 글로벌 대표 당뇨업체는 일라이릴리(Eli Lilly), 노보노디스크(Novo Nordisk), 머크(Merck), 사 노피(Sanofi), 베링거인겔하임(Boehringer Ingelheim)을 꼽을수 있음.

(4) 지식재산권현황

- 미국이 해당 기술분야의 특허를 387건 출원, 등록하였으며, 전체 특허수의 52%로 당뇨병 또는 당뇨 합병증 치료제 기술 분야를 주도하고 있으며, 일본과 유럽은 각각 105건, 79건이 특허등록됨.

(5) 표준화현황

- 당뇨병은 당화혈색소 6.5%이상, 8시간 공복상태에서 혈장 포도당농도 126mg/Dl 이상인 경우를 기준으로 진단을 내리게 됨.

(6) 기타현황

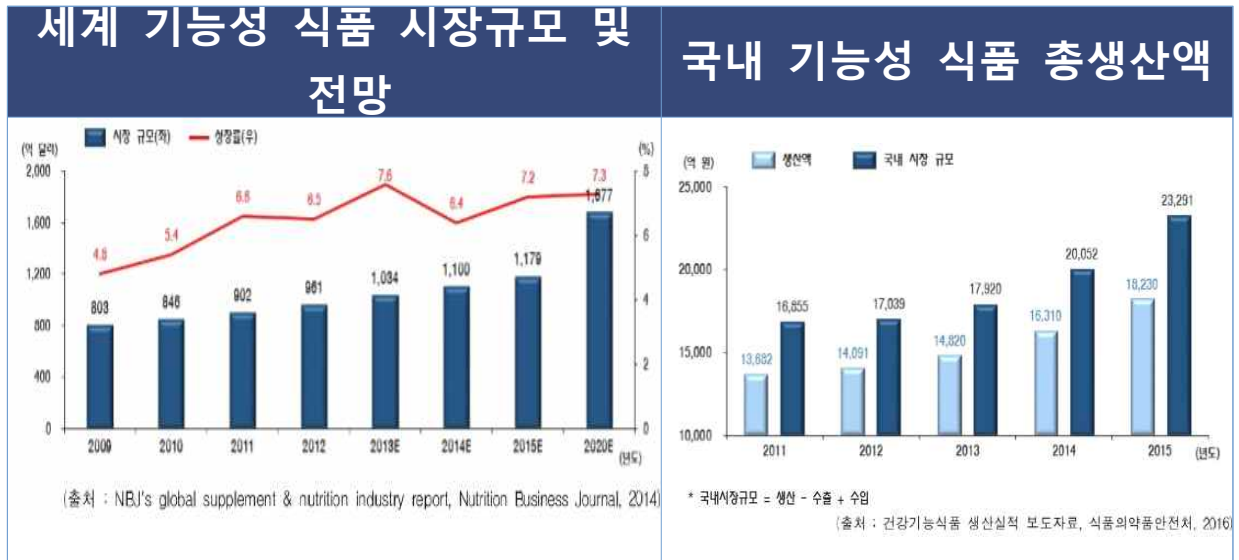
- 유엔의 ‘2015년 세계인구전망(World Population Prospects: the 2015 Revision)’에 따르면 향후 수십 년간 전 세계적으로 60세 이상 노년층이 급격히 늘어날 것이며, 증가 속도도 지속적으로 가속화 될 것으로 전망하고 있으며 2015년 9억 100만 명이었던 60세 이상 인구는 2030년 약 14억명(56% 증가)으로 증가할 것이며, 2050년엔 2015년의 2배 수준인 21억 명에 이를 것으로 추정되고 80세 이상의 “초고령” 노년층은 더 빠르게 불어나 2050년에 그 수가 4억 3,400만명(60세 이상 노년층의 20%)에 달해 오늘날 수준 (1억 2,500만 명, 60세 이상 노년층의 14%)의 세 배로 늘어날 전망 임
- 인구 고령화가 불러오는 또 하나의 심각한 문제는 만성질환의 증가이며, 만성질환은 현재 사망 원인의 60%를 차지하고 장애와 사망으로 인한 손실 수명의 절반이 만성질환에 기인 하며 부국, 빈국, 노년층, 생산가능인구 가릴 것 없이 만성질환은 압도적인 수준의 장애 및 사망 원인이 되고 있음.

다. 국내외 기능성 식품 시장

- 세계적인 웰빙트렌드 확산과 고령화사회로의 변화에 의한 건강지향적 소비자의 지속적 증가 추세에 있음.
- 식의약품 및 화장품 기능성 소재 관련 세계 바이오산업 시장규모는 2,234억달러('11)→ 3,208억달러('15)로 예상되며, 연 평균 성장률이 10%의 고성장세를 보이고 있음.
- 바이오소재 활용 건강기능식품의 경우 분류기준에 따라 세계시장규모의 추정에는 차이가 있으

- 며, Nutrition Business Journal(2014)의 자료에 따르면 세계시장 규모는 2015년 1,179억 달러 이
 며, 2020년 약 1,677억 달러 규모로 추정되어 전체적으로 연 평균 7.3%의 성장을 기록하고 있음.
- 국내 건강기능식품 시장 총생산액이 2011년 13,682억원, 2014년 16,310억원, 2015년 18,230
 억원으로 2014년에 비해 11.8% 증가하였으며, 건강기능식품 생산은 2011년 이후 연평균 성
 장률 7.4%를 기록하며 지속적으로 성장하고 있음.

▼ 국내외 기능성 식품 시장 규모



<그림 1. 국내외 기능성 식품 시장 규모>

1-4. 연구개발 범위

가. 1차년도

(1) 개발 목표

(가) 주관연구기관 ((주)비에이치앤바이오)

- 발효 미생물 선별/ 2단발효 최적 조건 확립
- *in vitro*, *in vivo* 실험을 통한 항당뇨 검증
- 지표성분 정량 분석
- 발효선식, 음료 시제품 개발

(나) 제 1협동연구기관(한스바이오)

- 발효선식, 음료 첨가 홍국쌀 개발

(다) 제 2협동연구기관(경북바이오산업연구원)

- 발효선식, 발효음료 제형화 및 배합비 개발
- 시제품 생산을 위한 공정개발

(2) 개발 내용 및 범위

(가) 주관연구기관 ((주)비에이치앤바이오)

- 발효 미생물 유산균 2종 이상 선별 및 최적화
- 변수별 실험을 통한 2단발효 조건 설정
- 조건별 항당뇨 효능 실험
 - : α -glucosidase 및 α -amylase 활성 저해능 검증
 - : 세포기반 및 동물기반 항당뇨 효능 검증
- 지표성분 분석 및 분석법 개발
- 시제품 발효선식, 발효음료 생산
- 특허출원 1건 논문발표 1건 이상

(나) 제 1협동연구기관(한스바이오)

- 홍국균 발효 최적화
- 홍국쌀 첨가를 위한 제형 개발
- 제형별 테스트 생산공정 개발
- 홍국쌀 시제품 생산

(다) 제 2협동연구기관(경북바이오산업연구원)

- 제형개발 및 공정에 따른 배합비 개발(주관연구기관 공동연계)
- 시제품 생산을 위한 테스트 생산공정 개발

나. 2차년도

(1) 개발 목표

(가) 주관연구기관 ((주)비에이치앤바이오)

- 2단발효 대량생산공정 및 운전조건 개발
- 시제품 *in vivo* 실험을 통한 항당뇨 검증
- 소비자 관능 평가
- 발효선식, 발효음료 양산품 개발
- 양산품 1회분 제공량에 따른 영양소 함량 분석

(나) 제 1협동연구기관(한스바이오)

- 홍국쌀 대량생산 공정 및 운전조건 개발

(다) 제 2협동연구기관(경북바이오산업연구원)

- 양산품 대량생산을 위한 공정 및 운전조건 개발

(2) 개발 내용 및 범위

(가) 주관연구기관 ((주)비에이치앤바이오)

- 2단발효 대량생산공정 및 운전조건 개발
- 시제품 항당뇨 효능 실험
 - : α -glucosidase 및 α -amylase 활성 저해능 검증
 - : 세포기반 및 동물기반 항당뇨 효능 검증
 - : 양산품 항당뇨 효능 검증
- 지표성분 분석 및 분석법 개발
- 양산품 발효선식, 발효음료 개발
- 특허출원 1건 논문발표 1건 이상

(나) 제 1협동연구기관(한스바이오)

- 제형별 대량생산공정 및 운전조건 개발
- 홍국쌀 양산품 개발

(다) 제 2협동연구기관(경북바이오산업연구원)

- 제형개발 및 공정에 따른 배합비 개발(주관연구기관 관능평가 공동연계)
- 양산품 생산을 위한 발효선식, 발효음료 대량생산공정 및 운전조건 개발
- 유통기한 산정 실험
- 양산품 위해성 평가법 개발
- 식약처 기준 생산가이드라인 작성
- 품목제조 신고

제 2장 연구수행 내용 및 결과

1. 1차년도 연구수행 내용

1-1. 주관기관 : (주)비에이치앤바이오

가. 주관기관 연구수행 내용

(1) 발효 미생물 선별/ 2단발효 최적 조건 확립

- 발효 미생물 분리

- 김치, 전통장류에서 *Lactobacillus* sp 의 전통미생물을 분리

: 시료 1g으로부터 다단희석법을 통해 BCP plate에 37°C에서 2일간 배양 후 노란색 콜로니를 선별하여 MRS plate에 계대하여 유산균을 확보하였음.

(2) 발효 미생물 선별

- 분리된 전통미생물을 홍국쌀에 1차 접종하여 24hr, 48hr, 72hr 시간별 생존균수를 측정 하여 1차 선별하여 증식유무 조사

(3) 위액 및 장액에서의 생존 여부 시험

- 산에 대한 발효균의 저항성은 영양배지의 pH를 2, 3, 5, 6, 7로 맞추고 발효균을 접종한 후 37°C에서 16시간 24시간 배양후 균수를 측정하여 균의 증식 정도를 조사

(4) 담즙에 대한 저항성 시험

- 영양배지에 0.3, 0.6 1.0%가 되게 담즙을 가하고 발효균을 접종한 후 37°C에서 16, 24시간 배양후 균수를 측정하여 균의 증식 정도를 조사

(5) 장액에 대한 저항성 시험

- 발효균을 위산장액(pH1.2)와 소화기장액(pH6.8)을 이용하여 3, 6시간동안 배양하고 균주의 증식 유무를 조사

(6) 소화효소에 대한 저항성 시험

- 영양배지에 protease, lipase, amylase를 1unit/ml, 판크레아틴을 1mg/ml이 되도록 가하고 발효균을 접종 한 후 3, 6시간 동안 배양하고 균주의 증식 유무를 조사 변수별 실험을 통한 2단발효 조건 설정

(7) 2단 발효 조건 설정(예시)

- 원료제형 : 고상, 액상

- 온도 : 30°C, 32°C, 34°C, 35°C, 37°C

- 습도 : 60%, 70% 80%

- 시간 : 1일, 2일, 3일, 4일, 5일

- 최적 발효균주 접종비율, 에너지원 배합비, pH 설정

- GABA HPLC 분석조건

: GABA분석 조건으로는 검체 약 0.5g을 5ml URIPREP에 현탁 후 10분간 방치한후 13,000rpm에서 10분간 원심분리 후 0.2 μ m의 나이론막여과지로 여과하여 분석

: 사용기기

HPLC : Agilent, 110 Series

Reactor : Pickering, PININACLE PCX

: 분석조건

Flow rate : 0.3mL/min

Column Temp : 40 $^{\circ}$ C

Reactor Temp : 130 $^{\circ}$ C

Mobile phase

	Lithium eluent pH 2.75	Lithium eluent pH 7.50	Lithium column Regenerant	비 고
0	100	0	0	
17	100	0	0	
65	35	65	0	
128	0	100	0	
145	0	100	0	
185	0	94	6	
189	0	90	10	
189.01	100	0	0	
190	100	0	0	

(8) 조건별 향당노 효능 실험

(가) α -glucosidase 및 α -amylase 활성 저해능 검증

- 2단발효 조건별 발효질의 향당노 효능 예측 α -glucosidase 및 α -amylase 활성 저해능 검증
- α -amylase 저해 활성 측정은 agar diffusion 방법을 이용하여 측정. Plate는 5 g 의 agar 와 5 g의 soluble starch를 500 ml 증류수에 녹인 후 121 $^{\circ}$ C 15분간 감압 살균하고 15ml씩 분주하여 제조하고, 대조군의 경우 8 μ l의 증류수 0.2 μ l의 효소 (1,000 unit/ml) 를 섞고 반응군은 증류수대신 추출물을 효소와 섞어 plate에 놓인 disc paper 위에 각각 분주하고 37 $^{\circ}$ C에서 3일간 배양한 후 I2/KI (5 mM I2 in 3% KI) 5 ml를 가하여 15분 간 발색 후 효소 저해율을 측정
- α -glucosidase 저해 활성을 측정하기 위하여 Tibbot 등의 방법에 따라 반응 혼합액은 50mM sodium succinate buffer (pH 4.2)에 p-nitrophenol- α - D-glucopyranoside (pNPG)를 용해시켜 1mg/ml의 농도로 기질을 만듦. 기질 1ml와 효소액 0.1ml를 혼합하

고 대조구에는 증류수 0.1ml, 반응구에는 시료 0.1ml을 넣어 37°C에서 30분간 반응시킨 후 1N-NaOH 0.1ml를 첨가하여 발색. 이때 생성된 p-nitrophenol(PNP)은 400nm에서 spectro-photometer를 이용하여 측정, 그 양은 표준물질 p-nitrophenol로 부터 작성한 표준곡선으로부터 구하여 저해율을 측정

(9) 세포기반 항당뇨 효능 검증

(가) 3T3-L1 전지방세포를 활용한 glucose consumption 억제 활성 평가

- 전지방세포인 3T3-L1을 분화유도물질인 0.25M Dexamethasone, 0.5mM 1-methyl-3-isobutylxanthine, insulin(1µg/ml)이 함유된 배지로 3일 동안 배양. 여기에 insulin(1µg/ml)만 포함된 배지를 넣어 2일 동안 배양 후, 2일에 한번씩 DMEM을 새로 바꾸어 주어 지방세포로 완전히 전환된 10~15일 사이에 포도당 흡수 실험을 진행. 포도당 흡수 실험을 하기 위하여 분화된 지방세포를 serum free DMEM media로 씻은 후 연구개발 대상 소재를 첨가하거나 첨가하지 않고 24시간 동안 starvation 시킨 후 Krebs-Ringer-Hepes (KRP) 용액으로 3번 washing. 여기에 KRP용액을 넣고 37°C에서 30분간 배양하고 시료와 insulin을 처리하여 15분간 반응. 포도당 흡수는 0.1µCi/ml의 [3H]2-deoxyglucose와 1mM 포도당을 첨가하여 15분간 37°C에서 반응시킨후 Ca²⁺와 Mg⁺이 포함되어있지 않은 PBS용액으로 3회 세척하여 반응을 중지시키고 포도당의 세포 내로의 흡수 정도를 3H의 세포 내로 이동한 양으로 측정. 세포 내 3H의 함량은 0.5ml의 lysis용액(1% SDS in 0.5N NaOH)을 넣고 세포를 완전히 분해시킨 후 β-counter로 측정

(나) Oil red O 염색

- 지방세포로의 분화 후, 세포 내 지방구 생성 확인은 Oil red O 염색을 통해 실시하였다. 세포를 배양한 배지를 완전히 제거하고 phosphate-buffered saline (PBS)로 세척한 후 4% formalin으로 10분간 세포를 고정하였다. 고정 후, deionized water로 세척하고 Oil red O 를 넣어 실온에서 30분간 염색한 후 염색액을 제거하고 deionized water로 3회 세척하여 염색된 지방구를 microscopic image (Olympus, Tokyo, Japan)로 관찰하였다. 그 후, isopropyl alcohol를 가하여 지방을 추출하고 microplate reader (TECAN, Mannedorf, Swizerland)를 이용하여 510 nm에서 흡광도를 측정하여 정량 분석하였다.

(나) western blot

- 지방분화유도 단백질의 활성을 확인하기 위하여 cold PBS로 세척 후 수거한 세포에 protease inhibitor cocktail (Roche, Basel, Swizerland)과 phosphatase inhibitor cocktail (Roche)을 첨가한 RIPA buffer (150mM Sodium chloride, 1% Triton X-100, 1% sodium deoxycholate, 0.1% SDS, 50mM Tris-HCl, pH 7.5, and 2mM EDTA.) (Bioseang, Seongnam-si, Korea)를 넣고 5분 간격으로 vortex하여 얼음에 30분 간 방치하였다. 그 후 12,000 rpm, 4°C 에서 30분 동안 원심분리하고 상등액을 취하여 SMARTTM bicinchoninic assay (BCA) protein assay kit (iNtRON Biotechnology,

Seongnam-si, Korea) 를 사용하여 단백질 양을 정량 하였다. 정량한 각 단백질 lysate 100 ug을 취하여 SDS loading buffer와 섞고 95°C 에서 3분 간 반응시킨 후, 얼음에 넣고 10분 간 방치하였다. 각 단백질은 10% sodium dodecyl sulfate (SDS) -polyacrylamide gel에 loading을 하고 80 V에서 30분, 120 V에서 1시간 30분 동안 전기 영동을 통해 단백질을 분리시켰고, PVDF(polyvinylidenedifluoride) membrane (Amersham, Little Chalfont, UK)에 1 시간 동안 전이 시킨 후, 5% skim milk를 처리하여 상온에서 1 시간 동안 반응시켜 비 특이적인 단백질을 blocking하였다. 그리고 각각의 1차 항체를 4°C 에서 12 시간 이상 반응시키고 PBS-T로 세척한 후, 1차 항체에 따른 2차 항체를 처리하여 상온에서 2시간 동안 반응시켰다. 그 후, Enhanced Chemiluminescence (ECL) solution 을 처리하고, Chemidoc을 이용하여 특정 단백질의 발현 양을 분석하였다.

(10) 동물기반 항당뇨 효능 검증

(가) 고지방식이 유발 비만형 제2형 당뇨병 동물 모델의 제작 및 유전자 변형마우스 사용
 사료 섭취 실험군은 C57BL/6N종 수컷 mice 5주령을 (주)오리엔트바이오에서 구입하여 7일간 순화시킨 뒤 실험에 사용하였다. 동물은 온도 23±3°C, 상대 습도 55±15% 및 12시간 명암주기로 조절되는 환경에서 사육하였으며 실험동물은 케이지당 1마리로 배치하여 사육하였다. 물과 식이는 자유롭게 섭취하도록 하였고, 그 후 두엘바이오텍사 (DooYeol Biotech, Seoul, Korea)에서 구매한 고지방식이사료(HFD, 45% AIN-76 diet 45% fat calorie)를 8주간 섭취시켜 비만형 제2형 당뇨병을 유발했으며 정상군에는 표준식이 (ND, AIN-76 diet 10% fat calorie)(표 4).를 섭취하였다. 고지방식이(HFD)를 섭취한 군을 표준식이(ND)에 비교하여 체중은 30% 이상, 혈당은 공복혈당이 126 mg/dL 이상만을 선별하였다.

실험물질 경구투여 실험군은 C57BL/6J ob/ob mice 5주령을 (주)오리엔트바이오에서 구입하여 7일간 순화시킨 뒤 C57BL/6J 정상마우스에 비해 체중이 30% 이상, 공복 시 혈당이 200 mg/dL 이상인 것을 확인 후 실험에 사용하였다.

(나) 실험군 배정

사료 섭취 실험군은 C57BL/6N mouse는 각 군당 8마리씩 정상군(ND), 대조군 (HFD), 실험군인 일반쌀 5% 첨가한 사료, 발효한 홍국쌀 2.5% 첨가한 사료, 발효한 홍국쌀 5% 첨가한 사료, 양성대조군인 1% 가르시니아추출물을 첨가한 사료 (PG)와 1% 상백피 에탄올 추출물을 첨가한 사료(PM)으로 나누어 시험을 진행하였으며 홍국쌀 섭취군과 양성대조물질 섭취군은 High fat diet(HFD, 45% AIN-76 diet 45% fat calorie)에 시험물질을 용량 별로 섞어 8주간 섭취하도록 하였다. 홍국쌀이 첨가된 사료의 농도 설정은 14일 반복예비독성시험을 수행하여 최대내성용량(MTD, Maximum Tolerated Dose)을 구하여 독성이 나타나지 않는 농도를 최고농도로 설정하여 사료를 주문 제작하였다. 실험물질 경구투여 실험군은 C57BL/6J ob/ob mouse를 각 군당 5마

리씩 C57BL/6J 일반 mice(G1), C57BL/6J ob/ob mice(G2) 대조군, 실험군인 홍국쌀 주정 추출물 1000mg/kg 투여군(G3), metformin 300mg/kg 투여군(G4)으로 군분리한 후 4주간 경구투여하였다. 일반마우스(G1) 군, 대조군 C57BL/6J ob/ob mouse(G2) 군에는 각각 멸균주사용수를 경구투여하였다.

모든 동물 실험 과정은 안동대학교 동물실험윤리 위원회의 승인을 받았다
(No. 2018-3-0501-01-01).

(다) 체중, 식이 섭취량, 식이섭취효율 측정

체중은 실험시작일에 최초로 측정한 다음 매주 1회 실험 종료일까지 8주에 걸쳐 측정하였고 식이 섭취량은 투여기간 동안 매주 1회 측정하였다. 식이섭취량은 이전 사료 공급량에서 잔량을 감하여 계산하였으며 식이섭취효율은 실험 전 기간 동안 체중증가량을 같은 기간 동안에 섭취한 식이 섭취량으로 나누어 계산하였다.

(라) 부고환 지방조직 및 간 무게 측정

사료 섭취실험군은 실험 시작 8주째 mouse를 희생 시킨 후 부검하여 부고환 지방조직(epididymal fat pad) 및 간 무게를 측정하였다. 경구투여 실험군은 실험시작 4주째 부고환 지방조직 및 간 무게를 측정하였다.

(마) 경구당부하검사(oral glucose tolerance test, OGTT)

경구 당부하 검사는 사료섭취군은 실험 7주째, 경구투여 실험군은 실험 3주째 12시간 이상 금식 시킨 후 공복 시 혈당을 측정한 다음 glucose(2g/kg body weight)를 멸균주사용에 녹여 경구 투여한 다음 30, 60, 90, 120, 150, 180 분 후 mouse의 꼬리정맥에서 혈액을 채취하고 혈당측정기(g doctor, (주) 올메디쿠스, Korea)를 이용하여 혈당을 측정하였다.

(바) 실험동물의 시료채취

실험 종료 전 12시간 동안 mouse를 절식시키고 체중과 공복 혈당을 측정한 다음, ethyl ether로 마취하여 심장에서 채혈하고, 채혈된 혈액은 실온에서 1시간 두었다가 4,000 rpm에서 20분간 원심분리한 혈청을 분석시료로 사용하였다.

(사) 인슐린 저항성 및 혈중 인슐린 농도 측정

인슐린 저항성은 HOMA-IR을 이용하여 측정하였다. 사료 섭취 실험군은 실험 시작 8주째에 경구투여 실험군은 실험시작 4주째 12시간 이상 금식시킨 후 공복 시 혈당 및 insulin을 측정하였고 HOMA-IR은 다음의 공식을 이용하여 계산한다. 인슐린 농도는 Mouse Insulin Elisa kit(SHIBAYAGI, Co., Gunma, Japan)를 사용하여 ELISA로 측정하였고, 인슐린 항상성의 지표로 $\text{glucose(mg/dL)} \times \text{insulin}(\mu\text{IU/mL}) / 405$ 의 식을 이용하여 HOMA-IR(homeostasis model assessment)를 구하였다.

(아) Total cholesterol, Glucose 함량 측정

혈청 중 glucose 및 Total cholesterol 함량은 효소법에 따라 조제된 시약 kit (아산제약)를 사용하여 측정하였다. 혈청 0.02 ml에 효소 시액 3 ml를 넣고 37°C에서 5분간

방치하여 시약블랭크를 대조로 파장 500 nm에서 흡광도를 측정하였다.

(자) Triglyceride 함량 측정

혈청의 triglyceride 함량은 효소법에 따라 조제된 시약 kit(아산제약)를 사용하여 측정하였다. 혈청 0.02 ml에 효소 시액 3 ml를 넣고 37°C에서 5분간 방치하여 시약블랭크를 대조로 파장 550 nm에서 흡광도를 측정하였다.

(차) HDL cholesterol 함량 측정

혈청의 HDL cholesterol 함량은 효소법에 따라 조제된 시약 kit(아산제약)를 사용하여 측정하였다. 혈청 0.02 ml에 분리 시액 0.02 ml를 넣고 잘 섞어 후 실온에서 10분간 방치하고 3,000 rpm에서 10분간 원심분리 하였다. 상층액 0.1 ml에 효소시액 3.0 ml를 넣어 잘 섞어준 후 37°C에서 5분간 방치하여 파장 500 nm에서 시약블랭크를 대조로 흡광도를 측정하였다.

(카) 통계 처리

실험 성적의 분석은 각 실험군 간의 평균치와 평균오차로 표시하고 각 실험군 간의 유의성 검정은 student's t-test를 이용하여 통계 처리하였다.

(11) Western blot

단백질의 활성을 확인하기 위하여 실험동물을 ether로 마취시킨 다음 복부 정중선을 따라 개복하고 심장 채혈 후 간을 채취하여 cold PBS로 세척 후 수거한 조직에 protease inhibitor cocktail (Roche, Basel, Swizerland)과 phosphatase inhibitor cocktail (Roche)을 첨가한 RIPA buffer (150mM Sodium chloride, 1% Triton X-100, 1% sodium deoxycholate, 0.1% SDS, 50mM Tris-HCl, pH 7.5, and 2mM EDTA.) (Bioseang, Seongnam-si, Korea)를 넣고 5분 간격으로 voltex하여 얼음에 30분 간 방치하였다. 그 후 12,000 rpm, 4°C 에서 30분 동안 원심분리하고 상등액을 취하여 SMART™ bicinchoninic assay (BCA) protein assay kit (iNtRON Biotechnology, Seongnam-si, Korea) 를 사용하여 단백질 양을 정량 하였다. 정량한 각 단백질 lysate 100 ug을 취하여 SDS loading buffer와 섞고 95°C 에서 3분 간 반응시킨 후, 얼음에 넣고 10분 간 방치하였다. 각 단백질은 10% sodium dodecyl sulfate (SDS)-polyacrylamide gel에 loading을 하고 80 V에서 30분, 120 V에서 1시간 30분 동안 전기 영동을 통해 단백질을 분리시켰고 PVDF (polyvinylidene difluoride) membrane (Amersham, Little Chalfont, UK)에 1 시간 동안 전이 시킨 후, 5% skim milk를 처리하여 상온에서 1 시간 동안 반응시켜 비특이적인 단백질을 blocking하였다. 그리고 각각의 1차 항체를 4°C 에서 12 시간 이상 반응시키고 PBS-T로 세척한 후, 1차 항체에 따른 2차 항체를 처리하여 상온에서 2시간 동안 반응시켰다. 그 후, Enhanced Chemiluminescence (ECL) solution 을 처리하고, Chemidoc을 이용하여 특정 단백질의 발현 양을 분석하였다.

(12) 지표성분 분석 및 분석법 개발

(가) Monacolin K

Monacolin K의 추출은 시료 1 g에 75% 에탄올 20 ml을 첨가하여 30℃, 150 rpm으로 3시간 동안 교반하고 정치시킨 후 6,000 × g 에서 10분간 원심 분리하여 얻은 상등액을 membrane filter (0.45 μm, Millipore)로 여과하여 시료로 사용, HPLC 분석조건은 Monacolin K의 정량은 Luna 5 μ Phenyl-Hexyl column (250 × 4.6 mm, Phenomenex Inc., USA)이 장착된 HPLC (Sykam, Germany) 를 이용하여 flow rate : 1.0 ml/min, UV 237 nm에서 검출하면서 injection volume 20 μl로 하여 acetonitrile : 0.1% Phosphoric acid = 55 : 45의 비율로 용출 시킨 후 표준 monacolin K (Sigma) 를 이용하여 peak의 면적비로써 비교 정량 분석 하였다.

(나) GABA 정량분석

GABA 정량분석은 시료 1 g에 75% 에탄올 20 ml을 첨가하여 30℃, 150 rpm으로 3시간 동안 교반하고 정치시킨 후 6,000 × g 에서 10분간 원심 분리하여 얻은 상등액을 membrane filter (0.45 μm, Millipore)로 여과하여 시료로 사용, 시료와 0.2 Sodium bicarbonate solution (pH 9.8)을 1:9로 희석한 후, 유도체화 시약인 dansyl chloride로 시료에 8.0g/L가 되게 혼합한 후 빛을 차단하여 30℃, 1시간 반응시킨 후 분석하며 분석 조건은 이동상 tetrahydrofuran-methanol-50mM pH 6.2 sodium acetate (5:75:420, V:V:V)가 혼합된 용매와 Methanol을 사용하여 gradient 조건 100:0 (0분), 60:40 (10분), 0:100(40분)으로 유속 1ml/min, 컬럼 C18 (4.6x250cm)를 사용하며, 오븐온도는 40℃, UV-detector 280nm에서 분리하고, GABA표준용액을 제조하여 표준곡선으로 사용하여 정량 분석 하였다.

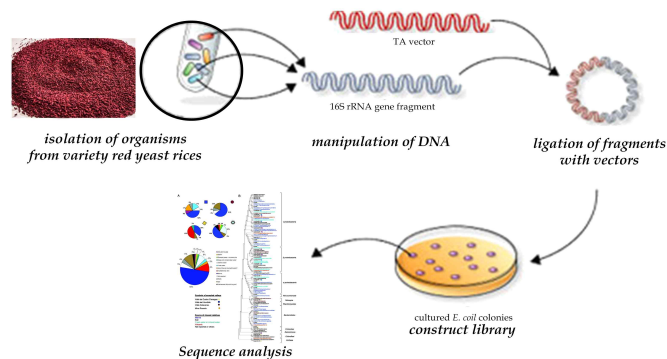
(13) 대량생산 공정개선을 위한 균주 및 배양방법 탐색

(가) *Monascus* sp. 동정

미생물 동정은 18S rRNA gene, 26S rRNA gene, ITS rRNA gene분석을 통해 수행하였다. 미생물 배양액 1.5 mL로부터 원심분리하여 cell을 회수하였다. 회수된 cell은 Fast DNA Spin kit for Soil (MP bio, USA)을 이용하여 total DNA를 추출하였다. 추출된 total DNA의 농도와 순도는 Spark® Multimode Microplate Reader (Tecan, Switzerland)을 이용하여 결정하였으며, 시료의 농도는 50 ng/μl 이상, 순도는 1.8~2.0을 갖는 것을 확인하였다. 18S rRNA gene 증폭은 18SF (5' -CCT GGT TGA TCC TGC CAG-3')와 18SR (5' -AG CCG CGG TAA TTC CAG CT-3')를 이용하였으며, 26S rRNA gene 증폭은 SR-4F (5' -GCA TAT CAA TAA GCG GAG GAA AAG-3')와 SR-7R (5' -TCC TTG GGC AAA TGC TTT CGC-3')를 사용하였고, ITS rRNA gene 증폭은 ITS1 (5' -TCC GTA GGT GAA CCT GCG G-3')와 ITS4 (5' -TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC-3')를 사용하였다. PCR mixture는 총50 μl 안에 1× PCR buffer, 20 mM MgCl₂, 40 mM dNTP mixture, 각 primer (1 μ

M), template DNA와 0.5 U Taq polymerase를 첨가하여 PCR을 수행하였다. PCR 반응조건은 94°C에서 5 min동안 DNA를 pre-denaturation시켜, 94°C에서 1 min denaturation, 65°C에서 1 min annealing, 72°C에서 1 min 30 sec extension하고 72°C에서 5 min동안 final extension을 수행하였다. PCR 증폭산물은 1.2% agarose gel에 loading하였으며, 각 band를 잘라 HiGene™Gel & PCR Purification Solution Kit (Biofact, Korea)를 이용하여 정제하여 cloning을 수행하였다. Cloning은 All-in-one PCR cloning kit (Biofact, Korea)를 이용하였고, manufacturer's protocol을 따라 수행하여 rRNA gene의 염기서열을 결정하였다. 결정된 염기서열은 CAP3 sequence assembly program (<http://doua.prabi.fr/software/cap3>)을 통해 assemble하여 rRNA gene 염기서열을 확인하였으며, NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov)의 GenBank database를 이용하여 BLAST search를 통해 분석하였다. 또한, Phylogenetic tree는 ClusterX를 이용하여 분석된 미생물간의 유전적 상동성을 분석하고, MEGA 7.0의 neighbor-joining method를 이용하여 유전적 계통분류를 수행하였다.

Identification of ITS region



<그림7. 미생물 동정 방법>

(나) Citrinin 생합성 관련 유전자 *ctnA* gene 검출

Monascus sp.의 citrinin 생합성 관련 유전자 검출을 위해 *ctnA* F (5' -ATC GTC GGA GTG AAG AAG AA-3')과 *ctnA* R (5' -GTG TTG TTG ATG CCA GTG T-3') 등의 probe를 이용하여 PCR을 수행하였다(표). PCR mixture는 총 50 µl 안에 1× PCR buffer, 20 mM MgCl₂, 40 mM dNTP mixture, 각 primer (1 µM), template DNA와 0.5 U Taq polymerase를 첨가하여 PCR을 수행하였다. PCR 반응조건은 94°C에서 5 min동안 DNA를 pre-denaturation시켜, 94°C에서 1 min denaturation, 65°C에서 1 min annealing, 72°C에서 1 min 30 sec extension하고 72°C에서 5 min동안 final extension을 수행하였다. PCR 증폭산물은 1.2% agarose gel에 loading하였으며, 각 band를 잘라 HiGene™Gel & PCR Purification Solution Kit (Biofact, Korea)를 이용하여 정제하여 cloning을 수행하였다.

<표1. citrinin-related genes fragments 탐색을 위한 primer>

number	primer	sequence	position
	ctnA F	ATCGTCGGAGTGAAGAAGAA	6-532
	ctnA R	GTGTTGTTGATGCCAGTGT	
	ctnR F	ACTTCACCAGCGTCGTTAT	7446-7925
	ctnR R	CATCGGAGCCTTACCACAT	
	ctnE F	TGGTAGACCTCGCCTCCTTGT	2522-3464
	ctnE R	CTCCTTCCGAGCCATCAAC	
	pksCT F	TGATGCGACGAAGATGTTAC	13837-1426
	pksCT R	TCTCTATGCTGCGACTGAC	

(다) 색소 생산 및 대량 배양을 위한 배지조성 탐색

색소 생성을 위한 최적배양조건을 알아보기 위해 YPD를 대조구로 사용하였으며, 색소 생산을 위한 배지는 1.5% peptone, 0.1% MgSO₄·7H₂O, 0.25%·KH₂PO₄에 8% carbon sources (rice flour, glucose, sucrose, glycerol)을 포함하는 배지를 사용하여 32°C, 180 rpm 진탕배양하여 10일간 배양하였다. 세포외 색소의 양은 배양액을 filter paper (Whatman No. 4)로 여과한 다음 여과액을 12,000 rpm으로 10분간 원심분리한 상등액의 흡광도로 측정하였으며, 색소의 정량은 추출한 색소를 적정배수로 희석한 후, 황색 색소 생성능은 410 nm에서, 오렌지색소 생성능은 470 nm에서, 적색 색소 생성능은 510 nm에서 흡광도(OD)를 측정하였다.

(14) 발효선식, 음료 시제품 개발

(가) 제품개발을 위한 선식 및 음료 테스트용 시제품 개발 및 관능평가 실시

(15) 특허출원

(가) 연구개발중에 취득한 정보 및 연구결과를 활용한 특허출원

1-2. 제1협동기관 : 한스바이오

가. 제1협동기관 연구수행 내용

(1) 발효선식, 음료 첨가 홍국쌀 개발

(가) 균주 배양 방법

- Lin 배지를 기본으로 하여 쌀 분말 1%, 3%, 5%와 glucose 3%, 5%, 10% 함량에 따른 종균 배양 최적화를 조사하였다.

(나) 홍국쌀 배양 온도를 최적화기를 위해 고상 발효기를 이용하여 25~30℃에서 홍국배양을 실시하였다.

(다) 홍국쌀 배양

- 시료의 호화에 따라 발효 조건 최적화를 위해 121℃ 15분 30분, 1시간 증자를 실시 후 3 ~ 12 일간 배양을 실시 하여 배양 조건을 조사 하였다.
- 수분 함량에 따른 배양 조건을 확립하기 위해 10%, 30%, 50%로 수분조절하여 배양 조건을 조사하였다.
- 배양 시간 최적화를 위하여 고상발효기 28℃에서 3~12일간 배양을 실시 하였다.
- 대량생산공정 개발을 위하여 종균배양 Lin배지 에 쌀분말 3%, glucose 5%를 첨가하여 120rpm 에 5일간 배양을 실시후 침지시킨 쌀을 121℃에 30분 멸균(호화) 후, 쌀 1kg, 5kg, 10kg에 수분을 30%로 접종 후 28℃에서 1~ 10일간 배양을 실시하였다.

1-3. 제2협동기관 : (재)경북바이오산업연구원

가. 제2협동기관 연구수행 내용

(1) 발효선식, 발효음료 제형화 및 배합비 개발

(가) 발효선식 및 발효음료 재료

- 홍국쌀 분말, 찹쌀현미 분말, 백태분말, 메밀분말, 귀리분말, 보리분말, 흑미분말, 울무분말, 감초분말, 옥수수분말, 혼합탈지분유, 폴리텍스트로즈, 소화성말토텍스트린, 비타민미네랄혼합분말, 프락토올리고당, 자일리톨, 효소처리스테비오사이드, 야채추출물분말, 요거트향, 카놀라오일분말, 코코넛크림파우더, 트레할로스, 수크랄로스, 곡물믹스, 아로니아, 오디, 꾸지뽕, 뽕잎, 바닐라맛 향, 딸기맛 향, Wheat protein concentrate(WPC), Isolated soy protein(ISP)
- 본 실험은 항당뇨 성분이 있는 발효 홍국쌀을 이용하여 식품 안전성이 확보되고 적절한 포만감을 가지면서 영양학적으로 균형이 잡힌 선식을 개발하고 기타 다양한 곡물과 지역에서 생산되는 특용작물, 제품 공급이 원활한 오디, 뽕잎 등을 첨가하여 항당뇨 및 혈중 지질 농도를 개선할 수 있는 원료를 선정 첨가하였음.
- 홍국균을 이용한 발효를 통하여 얻은 홍국쌀을 기본 베이스로 하여 시중에 유통되고 있는 다양한 곡류와 미네랄성분 그리고 단백질 보충재를 활용하였고 기타 소재는 논문 및 특허를 조사하여 적용하였다.

(나) 발효 홍국쌀의 건조

- 발효 후 홍국쌀의 건조는 삼보기계사의 열풍건조기와 일신바이오베이스사의 동결건조 사용하였다.

(다) 홍국쌀 분쇄

- 경북바이오벤처프라자에 구축되어져 있는 삼보기계사(2012년 구축) 제품으로 분쇄기 속도별, 장착하여 사용하는 메쉬망의 사이즈별 테스트를 통한 최적의 분말화 조건을 탐색하였다.

(라) 발효선식 혼합

- 경북바이오벤처프라자에 구축되어져 있는 혼합기로는 드럼믹서, 주걱형 혼합기, 리본형혼합기, 하이스피드 믹서기 등이 있으나 본 실험에서는 주걱형 혼합기를 활용하여 (소량형과 대량형) 실험을 수행하였다.

(마) 발효음료

- 경북바이오벤처프라자에 구축되어져 있는 혼합기로는 드럼믹서, 주걱형 혼합기, 리본형 혼합기, 하이스피드 믹서기 등이 있으나 본 실험에서는 주걱형 혼합기를 활용하여 (소량형과 대량형) 실험을 수행하였음.

(2) 제형화에 따른 관능평가

(가) 관능평가

- 관능평가는 경북바이오산업연구원 임직원 10명과 BHN 바이오 안동공장 임직원 10명을 대상으로 수행하였고 5점 척도법을 이용한 평가결과를 도출함. 매우나쁨 1점, 나쁨 2점, 보통 3점, 좋음 4점, 매우 좋음 5점으로 평가하였으며, 평가항목은 맛, 향, 색, 현탁도 등 전체적인 선호도를 평가하였음.

2. 2차년도 연구수행 내용

2-1. 주관기관 : (주)비에이치앤바이오

가. 주관기관 연구수행 내용

(1) 2단발효 대량생산공정 및 운전조건 개발

홍국균을 이용한 홍국쌀을 대량배양하기 위하여 온도, 습도, 배합비율 등을 1차년도 연구결과를 활용하여 대량생산공정 및 운전조건을 개발하였다.

(2) *in vitro* 검증

(가) Nitric Oxide radical (NO) 검증

Nitric oxide radical 저해활성은 Marcci 등의 방법을 변형해 진행하였다. 먼저 10mM sodium nitroprusside을 20mM phosphate buffer(pH 7.4)에 녹여 Sodium nitroprusside solution으로 사용하였다. 각 시험물질 50ul에 Sodium nitroprusside solution 50ul를 첨가하여 25°C에서 150분간 반응 시켰다. 반응액과 20mM phosphate buffer(pH 7.4)에 녹인 Griess 시약을 1:1로 반응시켜 540nm 파장의 흡광도를 측정하여 시험 물질을 첨가한 실험군과 첨가하지 않은 군의 흡광도 차이를 백분율로 나타내었다.

(나) 홍국보리 효능 검증

홍국균으로 발효한 보리의 효능 평가를 위해 3T3-L1 세포를 이용하여 항비만효능을 검증하였다.

(3) 동물기반 시제품 항당뇨 효능 검증

(가) 실험동물 제작

실험동물은 C57BL/6N종 수컷 mice 5주령을 (주)오리엔트바이오에서 구입하여 7일간 순화 시킨 뒤 실험에 사용하였다. 동물은 온도 23±3°C, 상대 습도 55±15% 및 12시간 명암주기로 조절되는 환경에서 사육하였으며 실험동물은 케이지당 1마리로 배치하여 사육 하였다. 물과 식이는 자유롭게 섭취하도록 하였고, 그 후 두얼바이오텍사(DooYeol Biotech, Seoul, Korea)에서 구매한 고지방식이사료(HFD, 45% AIN-76 diet 45% fat calorie, 31% sucrose)를 8주간 섭취시켜 비만형 제2형 당뇨병을 유발했으며 정상군에는 표준식이(ND, AIN-76 diet 10% fat calorie) <표 3>를 섭취하였다. 고지방식이(HFD)를 섭취한 군을 표준식이(ND)에 비교하여 체중은 30% 이상, 혈당은 공복혈당이 126 mg/dL 이상의 mice 만을 선별하여 각 군의 평균 체중 및 혈당값이 균등하게 군 분리를 하였다.

(나) 실험군 배정

홍국 음료실험군은 C57BL/6N mice를 각 군당 6마리씩 정상군(ND), 대조군(HFD), 실험군인 홍국음료 동결건조물 500 mg/kg(RRB 500), 홍국음료 동결건조물 1000

mg/kg(RRB 1000), 양성대조군은 Metformin 300 mg/kg(PM 300)으로 나누어 정상군을 제외한 군에 매일 고지방식이 사료(HFD, 45% AIN-76 diet 45% fat calorie, 31% sucrose)를 자율섭취 하면서 정상군(ND), 대조군(HFD)군은 멸균주사용수를 시험물질군은 각각의 시험물질을 10 ml/kg body weight 비율로 6주간 매일 경구투여하였다. 모든 군에서 100%의 생존율을 보임으로써 독성은 나타나지 않았다.

홍국선식 실험군은 C57BL/6N mouse 각 군당 8마리씩 사육하였으며, 식이사료는 정상군(ND), 대조군 (HFD), 실험군인 홍국선식 제품 2.5% 첨가한 사료군(2.5% RRS), 홍국선식 제품 5% 첨가한 사료군(5% RRS), 양성대조군인 1% 가르시니아 추출물을 첨가한 사료군(1% PG), 상백피 추출물을 첨가한 사료군(1% PM)으로 나누어 연구를 수행하였다. 또한, 홍국선식 제품 섭취군과 양성대조물질 섭취군은 High fat diet (HFD, 45% AIN-76 diet 45% fat calorie, 31% sucrose)에 시험물질을 용량별로 섞어 8주간 섭취하도록 하였다.

<표2. 홍국선식/음료 조성표>

재료명	홍국선식	홍국음료
현미찹쌀	25%	6.25g
보리	19%	4.75g
흑미찹쌀	16.5%	4.125g
검은콩	15%	3.75g
귀리	6.5%	1.625g
자이리톨	4%	1g
홍국쌀	3%	0.75g
메밀	3%	0.75g
프락토올리고당	3%	0.75g
돼지감자분말	2.9%	0.725g
야채분말	1%	0.25g
코코넛밀크파우더	1%	0.25g
유산균혼합분말	0.1%	0.025g
정제수		200ml

<표3. 홍국선식 사료군 식이조성표>

	ND ¹⁾	HFD ²⁾
Casein, lactic	200	200
DL-methionine	3	3
Corn Starch	350	80
Sucrose	250	375
Cellulose	100	50
Corn Oil	50	50
AIN 76A Mineral Mix	35	35
AIN 76A Vitamin Mix	10	10
Cholesterol	-	5
Lard	-	190
Choline Bitartrate	2	2
Total (g)	1,000	1,000

¹⁾ND: normal diet group

²⁾HFD: high fat diet group

<표4. 홍국선식 사료군 식이조성표>

	ND ¹⁾	HFD ²⁾	2.5% RRS ³⁾	5% RRS ⁴⁾	1% PG ⁵⁾	1% PM ⁶⁾
Casein, lactic	200	200	200	200	200	200
DL-methionine	3	3	3	3	3	3
Corn Starch	350	80	55	30	70	70
Sucrose	250	375	375	375	375	375
Cellulose	100	50	50	50	50	50
Corn Oil	50	50	50	50	50	50
AIN 76A Mineral Mix	35	35	35	35	35	35
AIN 76A Vitamin Mix	10	10	10	10	10	10
Cholesterol	-	5	5	5	5	5
Lard	-	190	190	190	190	190
Choline Bitartrate	2	2	2	2	2	2
Red yeast rice sunsikproduct	-	-	25	50	-	-
Garcinia cambogia extract					10	
Mull berry root extract						10
Total (g)	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000	1,000

¹⁾ ND: normal diet group

²⁾ HFD: high fat diet group

³⁾ 2.5% RRS: high fat diet group with 2.5 % Red yeast rice sunsik product powder

⁴⁾ 5% RRS: high fat diet group with 5% Red yeast rice sunsik product powder

⁵⁾ PG: high fat diet group with 1% *Garcinia cambogia* extracts

⁶⁾ PM: high fat diet group with 1% Mulberry (*Morus alba*L.) root bark extracts

(다) 체중, 식이 섭취량, 식이섭취효율 측정

홍국음료 동결건조 투여군의 체중은 실험 시작일 최초로 측정된 다음 매일 1회 측정된 후 체중 용량에 맞게 경구투여하였고 식이섭취량은 매주 1회 측정하였다. 홍국선식 제품 섭취군의 체중은 실험 시작일에 최초로 측정된 다음 매주 1회 측정하였으며, 실험 종료일까지 8주에 걸쳐 측정하였다. 식이 섭취량은 매주 1회 측정하였다. 식이 섭취량은 이전 사료 공급량에서 잔량을 감하여 계산하였으며, 식이섭취효율은 실험 기간 중의 체중증가량을 식이섭취량으로 나누어 계산하였다.

(라) 부고환 지방조직 및 간 무게 측정

부고환 지방조직(epididymal fat pad) 및 간 무게 측정은 실험 시작 8주째 mouse를 희생 시킨 후 부검하여 측정하였다.

(마) 경구당부하검사(oral glucose tolerance test, OGTT)

경구당부하검사는 홍국음료 투여군은 실험 5주 째 홍국선식 제품 사료 섭취군은 실험 7주째 12시간 이상 금식시킨 후, 공복 시 혈당을 측정된 다음 glucose (2g/kg body weight)를 생리식염수에 녹여 경구 투여한 다음 0, 30, 60, 90, 120, 150, 180 분 후 mouse의 꼬리정맥에서 혈액을 채취하고 혈당측정기(g doctor, Allmedicus, Korea)를 이용하여 혈당을 측정하였다.

(사) 실험동물의 혈청 제조

분석에 이용한 혈청(serum)은 실험 종료 전 12시간 동안 mouse를 절식시키고 체중과 공복 혈당을 측정된 다음, 채혈된 혈액은 실온에서 1시간 방치하고 4,000 rpm에서 20 분간 원심분리하여 제조하였다.

(아) 인슐린 저항성 및 혈중 인슐린 농도 측정

인슐린 저항성은 HOMA-IR 계산법을 이용하여 산출하였다. 혈당 및 insulin은 실험 시작 8 주째에 12시간 이상 금식시킨 후 공복 시에 측정하였고, 인슐린 농도는 Mouse Insulin Elisa kit (SHIBAYAGI, Co., Gunma, Japan)를 사용하여 ELISA로 측정하였다. 인슐린 저항성의 지표로 사용되는 HOMA-IR(homeostasis model assessment)은 다음의 공식을 이용하여 계산하였다.

$$\text{HOMA-IR} = \text{공복 시 혈당 blood glucose(mg/dL)} \times \text{insulin}(\mu\text{IU/mL}) / 405$$

(자) Glucose 함량 측정

혈청 중 glucose 함량은 효소법에 따라 조제된 시약 kit (Asanpharm, Korea)를 이용하였으며, kit에서 제공하는 protocol에 따라 측정하였다.

(차) Total cholesterol, Triglyceride 함량 측정

혈청의 Total cholesterol 및 간 효소액의 Triglyceride 함량은 효소법에 따라 조제된 시약 kit (Asanpharm, Korea)를 이용하였으며, kit에서 제공하는 protocol에 따라 측정하였다.

(카) Western blot

20 mM Tris HCl (pH 7.5), 1% Triton X-100, 137 mM sodium chloride, 10% glycerol, 2mM EDTA, 1 mM sodium orthovanadate, 25 mM b-glycerophosphate, 2 mM sodium pyrophosphate, 1 mM phenylmethylsulfonylfluoride과 1 mg/mL leupeptin을 함유하는 buffer를 사용하여 cell을 lysis시켰다. Cell lysates를 15,000×g 로 4℃에서 30분간 원심분리하여 debris를 제거하였다. 정량한 단백질 15 µg을 취하여 10% SDS-PAGE에 기동시킨 후 NC membrane으로 gel의 단백질을 blot시켰다. Blocking 후 1차 antibody와 반응시킨 후 2차 antibody인 horseradish peroxidase-conjugated anti-rabbit IgG를 반응시키고 ECL detection reagents (Amersham Biosciences Corp., Piscataway, NJ, USA)를 사용하여 단백질의 발현 정도를 확인하였다. Densitometric analysis를 해 ChemiDoc imaging systems (BIO-RAD, USA)을 사용하였다.

(과) 통계 처리

모든 통계분석은 SPSS version 25을 이용하였으며, 모든 실험 결과는 평균(mean)±표준(SD)로 나타냈다. ND과 HFD은 independent t-test를 이용하여 검증하였고, HFD과 고지방식이에 시험물질을 첨가한 군은 one-way ANOVA를 실시 한 후, 사후 검증 방법으로 Duncan's multiple range test를 이용하여 유의성을 검증하였다. 모든 경우의 유의적 수준은 P<0.05를 적용하였다.

(하) 동물실험

모든 동물실험 과정은 안동대학교 동물실험윤리 위원회의 승인을 받았다 (No. 2019-2-0430-02).

(4) 양산품 Monacolin-K 정량분석

신규균주를 배양한 홍국쌀 지표물질 Monacolin-K 정량분석 실시

(5) 홍국쌀을 이용한 발효선식/음료 양산품 개발

(가) 시제품 제작을 위한 비교 분석 실시

- 경쟁업체 주요제품 분석
- 발효쌀의 배합률에 따른 제품 분석 및 레시피 경북바이오산업연구원 공동개발
- 항당뇨 기능성 발효선식, 항당뇨 기능성 발효음료 양산품 생산

(나) 상표출원을 위한 네이밍 선정

- 명품 브랜드 네이밍 선정
- 발효쌀의 항당뇨 기능성 이미지를 부각한 브랜드 네임
- 해외수출 대비 일어표기가 용이한 전략적 브랜드 네임
- 명품 브랜드 네이밍 상표출원 및 등록

(나) 명품 브랜드 디자인 개발 실시

- Identity Design : 브랜드 네임, 디자인 개발
- Package Design : 용기, 레이블, 포장 등 사용별 패키지 디자인 개발
- Brochure Design : 상품 홍보를 위한 브로슈어 디자인 개발

(5) 시제품 관능평가 실시

(가) 9점 척도법을 활용한 소비자 기호 및 관능평가 실시

- 컨셉평가(만족도/독창성/구매의지)
- 블라인드 맛 평가(기호도/선호선택/주요특성 기호/구매의지)
- 관능특성 강도 평가(인지 강도 및 희망 강도)
- 디자인(만족도/표기 정보 영향) 및 가격 저항 평

(6) 제품 상용화를 위한 영양성분 및 안전성 평가

(가) 9대영양소 검사 실시

(나) 안전성 평가 실시

(7) 특허출원 및 논문게재

연구성과를 활용한 특허 및 논문투고

2-2. 제1협동기관 : 한스바이오

가. 제1협동기관 연구수행 내용

- (1) 홍국쌀 대량생산 공정 및 운전조건 개발
 - pH, 온도별, 시간별 배양 최적화
 - 수분함량에 따른 배양 조건
 - 증자 시간에 따른 배양 조건
 - 배양 시간에 따른 활성물질 변화
 - 쌀, 보리 첨가량 1Kg~10Kg 에 따른 배양 조건
- (2) 홍국쌀 양산품 개발
 - 분말, 추출물 제형에 따른 최적 생산공정 개발

2-3. 제2협동기관 : (재)경북바이오산업연구원

가. 제1협동기관 연구수행 내용

- (1) 제형개발 및 공정에 따른 배합비 개발(주관연구기관 관능평가 공동연계)
- (2) 양산품 생산을 위한 발효선식, 발효음료 대량생산공정 및 운전조건 개발
- (3) 유통기한설정 사유서 작성
- (4) 양산품 위해성 평가법 개발
- (5) 식약처 기준 생산가이드라인 작성
- (6) 품목제조 신고 컨설팅

3. 1차년도 연구결과

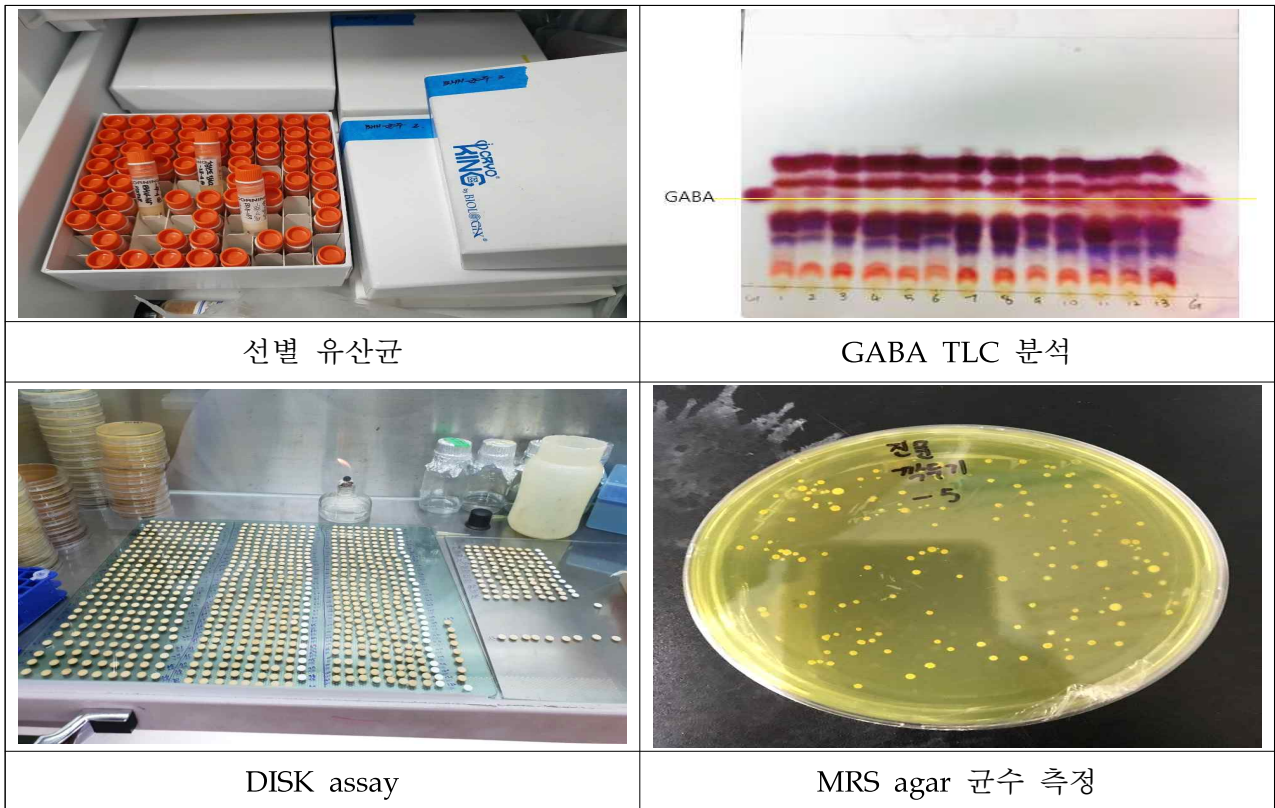
3-1. 주관기관 : (주)비에이치앤바이오

가. 주관기관 연구결과

(1) 발효 미생물 선별

발효 식품으로부터 400여종의 유산균을 분리하여 TLC를 통해 GABA 생성을 하는 유산균을 분리하였다. 분리된 균주는 모두 skim milk 콜로니를 따서 넣고 -40℃에 보관하였다.

분리된 유산균을 홍국추출물을 디스크에 loading 하여 항균활향균력에 저해능을 보이는 유산균을 선택 분리 하였다.



<그림 8. 발효미생물 선별방법>

(2) 장액 및 소화효소에 대한 저항성 시험

(가) 위액(pH) 실험결과

분리 유산균의 내산성을 알아보기 위하여 pH2로 조정하여 안정성과 생존성을 확인하였다. pH2에서는 6시간, 9시간 경과 후의 결과는 Control의 생균수와 10^1 의 차이를 보이거나 많은 차이를 보이지 않아 pH 2에서는 내산성을 지녔다고 확인할 수 있었다. 하지만 음식과 함께 곤죽의 형태로 변할 경우 pH의 변화가 다소 높아져 균주의 생육에 보다 높은 환경으로 변화되어 균주가 더 증가 할 것으로 사료된다.

단위 : CFU/ml

pH 2.0	0hr	6hr	9hr
#59	5.0×10^9	3.7×10^9	8.7×10^8
#33	5.1×10^9	3.8×10^9	6.4×10^9
#2-1	8.8×10^9	6.0×10^8	7.8×10^8
#40017	3.7×10^9	7.6×10^8	4.4×10^6
#11	7.5×10^9	1.4×10^9	6.9×10^8

(나) 담즙(oxgall) 실험결과

분리 유산균의 담즙에 대한 저항성을 조사하기 위해, 담즙을 처리하여 1시간 경과 후의 담즙에 대한 저항성을 확인한 결과, 담즙을 처리하지 않은 Control과 유사한 생균수를 유지하는 것으로 조사되었다. 분리균주가 담즙에 생존율을 나타내므로 담즙에 대한 저항성에 대해 긍정적인 결과로 판단된다.

단위 : CFU/ml

oxgall 0.3%	0hr	1hr
#59	5.0×10^9	4.2×10^9
#33	5.1×10^9	4.8×10^9
#2-1	8.8×10^9	6.7×10^9
#40017	3.7×10^9	4.0×10^8
#11	7.5×10^9	4.6×10^9

(다) 장액(펩신) 실험결과

분리 유산균에 장액을 처리하여 3시간, 6시간 경과 후 결과를 확인하였다. 시간에 관계없이 약 90%이상의 생존률을 나타내었으며 이에 소화효소인 장액에 대해 저항성을 보이는 것으로 조사되었다.

단위 : CFU/ml

pH2.0+펩신 1%	0hr	3hr	6hr
#59	5.0*10 ⁹	6.1*10 ⁹	3.8*10 ⁹
#33	5.1*10 ⁹	6.6*10 ⁹	4.8*10 ⁹
#2-1	8.8*10 ⁹	6.6*10 ⁹	4.9*10 ⁹
#40017	3.7*10 ⁹	5.5*10 ⁹	1.9*10 ⁹
#11	7.5*10 ⁹	5.7*10 ⁹	7.8*10 ⁹

(라) 소화효소 실험결과

분리 유산균에 protease, lipase, amylase와 pancreatase를 섞은 소화효소를 처리하여 3시간, 6시간 경과 후 생존율을 조사하였다. 그 결과 분리 유산균은 시간에 관계없이 소화효소에 대해 저항성을 보이며 약 90%이상의 생존률을 나타내었으며 이에 저항성이 있다고 판단한다. 몇몇 균주들의 경우 6시간이 경과하자 소화효소들의 저항을 받아 균수가 감소하기보다는 오히려 처리시간동안 생존수가 증가됨을 확인 할 수 있었다.

단위 : CFU/ml

protease+lipase+ amylase 1unit/ml + pancreatase 1mg/ml	0hr	3hr	6hr
#59	5.0*10 ⁹	2.9*10 ⁹	7.0*10 ⁹
#33	5.1*10 ⁹	5.0*10 ⁹	8.3*10 ⁹
#2-1	8.8*10 ⁹	4.1*10 ⁹	3.0*10 ⁹
#40017	3.7*10 ⁹	5.0*10 ⁹	3.5*10 ⁹
#11	7.5*10 ⁹	2.9*10 ⁹	7.8*10 ⁹

(3) 2단 발효 결과

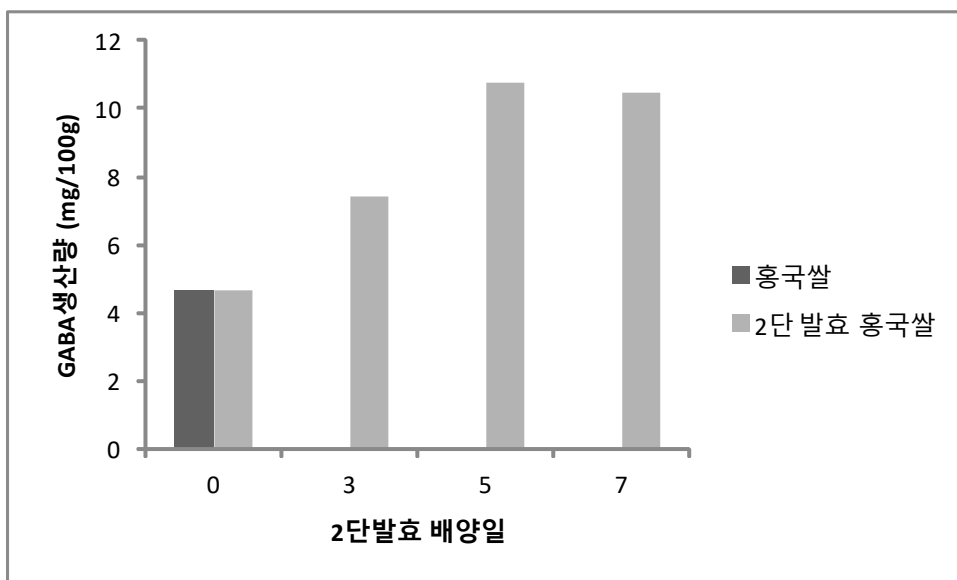
- (가) 2단 발효 준비를 위해 20g의 홍국 쌀을 각각의 습도를 조정하여 37°C로 진행하였다. 계획서 상의 온도 범위를 30°C, 32°C, 34°C, 35°C, 37°C를 정하였지만, 유산균 배양 온도인 37°C를 기준으로 하여 2단 발효의 배양 시간별로 조사를 실시하였다. 2단 발효된 홍국쌀을 먼저 항당노화성을 효소를 이용하여 측정하였다.



<그림9. 2단 발효 배양 모습>

원재료인 쌀은 고상제형을 가지고 있어, 발효조건을 액상에서 고상 배양만 실시하여 2단 발효를 조사하였다.

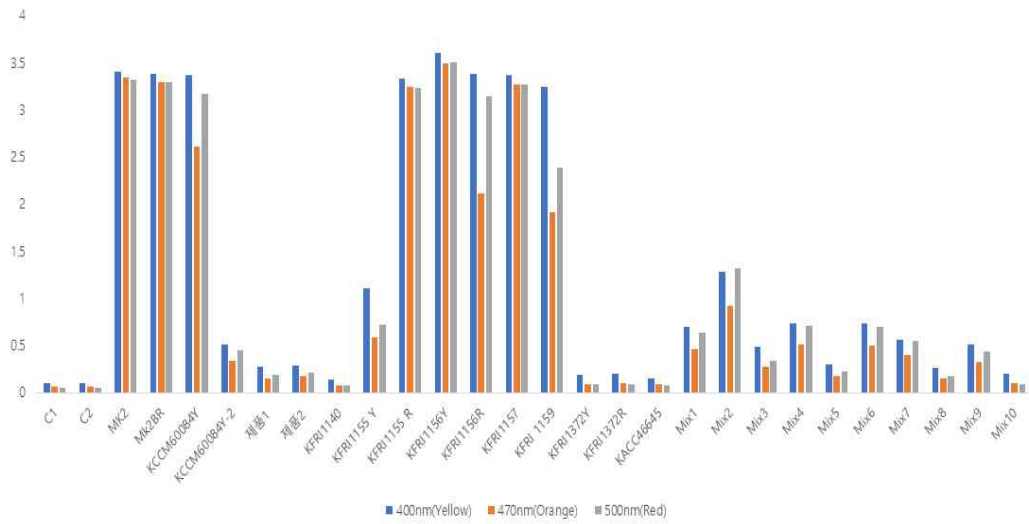
- (나) 분석 결과 배양시간일 지날수록 기능성 물질인 GABA 생산량이 그림에서와 같이 초기 홍국쌀에서 분석된 GABA 농도는 4.67 mg/100g 으로 조사되었으며, 유산균 배양액을 첨가한 2단 발효 시 3일 뒤 7.43 mg/100g으로 59.1%가 증가되었으며, 5일 뒤에는 10.74 mg/100g 2배이상 GABA함량이 증가된뒤 7일차에 감소 되는 것으로 조사되어, 기능성 물질이 5일 까지 최대로 생성되는 것으로 조사 되었다.



<그림10. 유산균을 이용한 홍국 2단 발효 GABA 생산량>

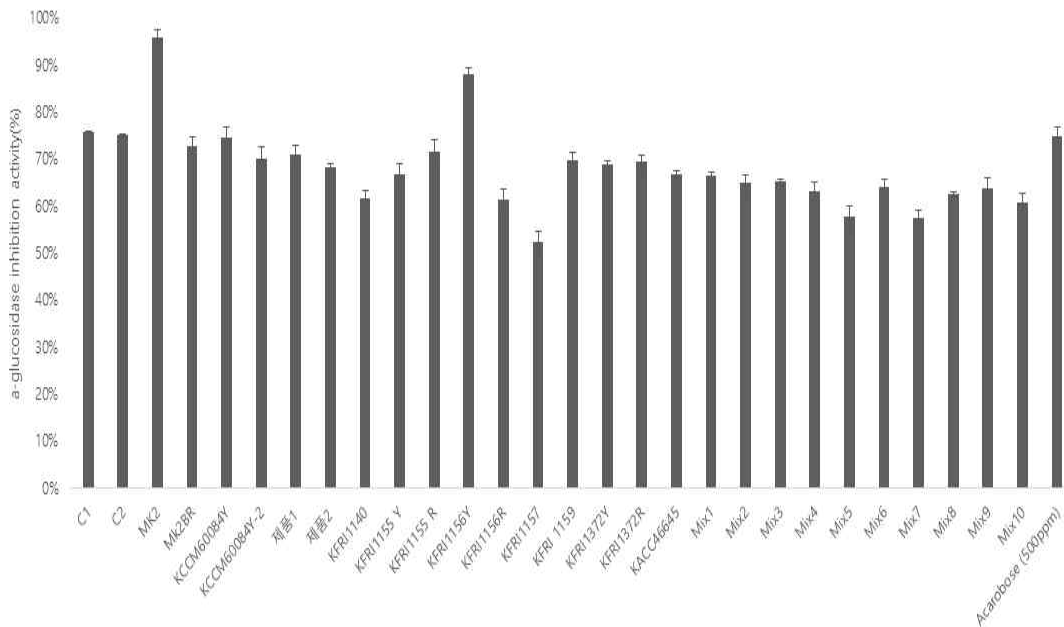
(4) 홍국쌀의 색소 측정

(가) 홍국쌀의 색소 빨강, 노랑, 오렌지색의 흡광도를 측정한 결과 흡광도 값 0.1을 1 units로 하였을 때 분리 균주 중 MK2가 전반적으로 35units로 조사 되었다.



<그림11. 홍국쌀 추출물 흡광도 변화>

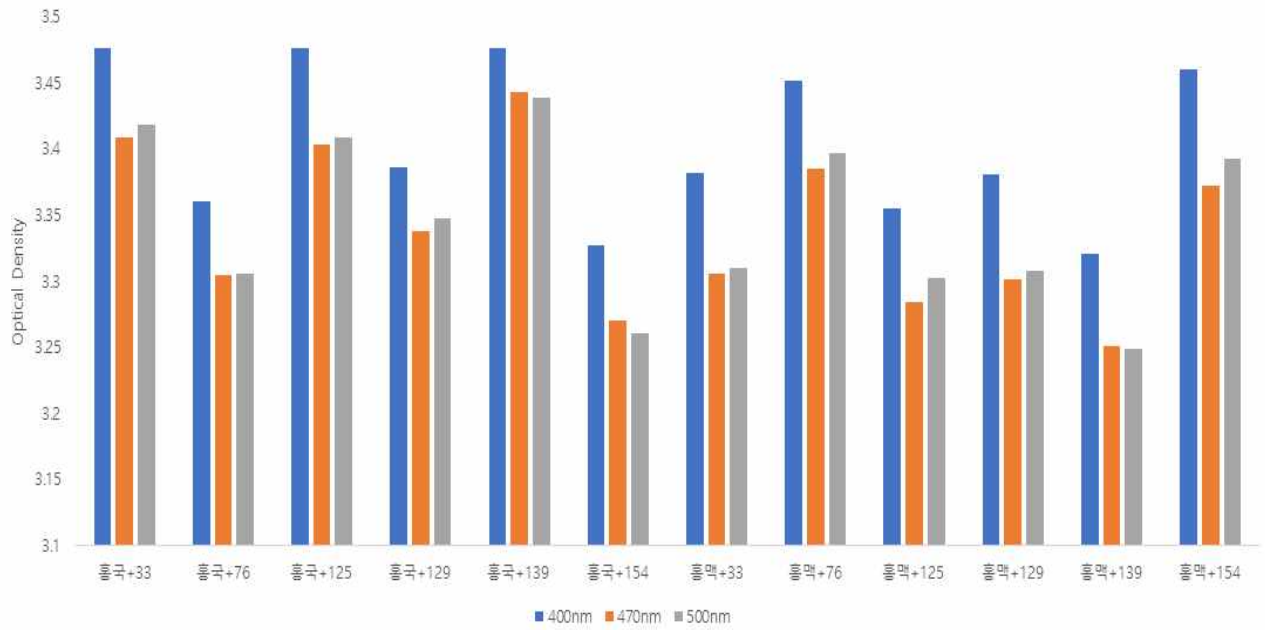
(나) 항당뇨활성의 경우 모나스커스 MK2가 활성을 가장 높은 것으로 조사되었으며, 색소와 상관없이 항당뇨활성의 차이를 보이는 것으로 조사 되어, 향후 추출물에 의한 활성 조사를 통해 2차년도에는 물질분석으로 확인이 필요할 것으로 사료된다.



<그림12. 홍국쌀의 색소와 α -glucosidase 관계>

(다) 유산균 발효 홍국쌀의 색소 변화를 조사

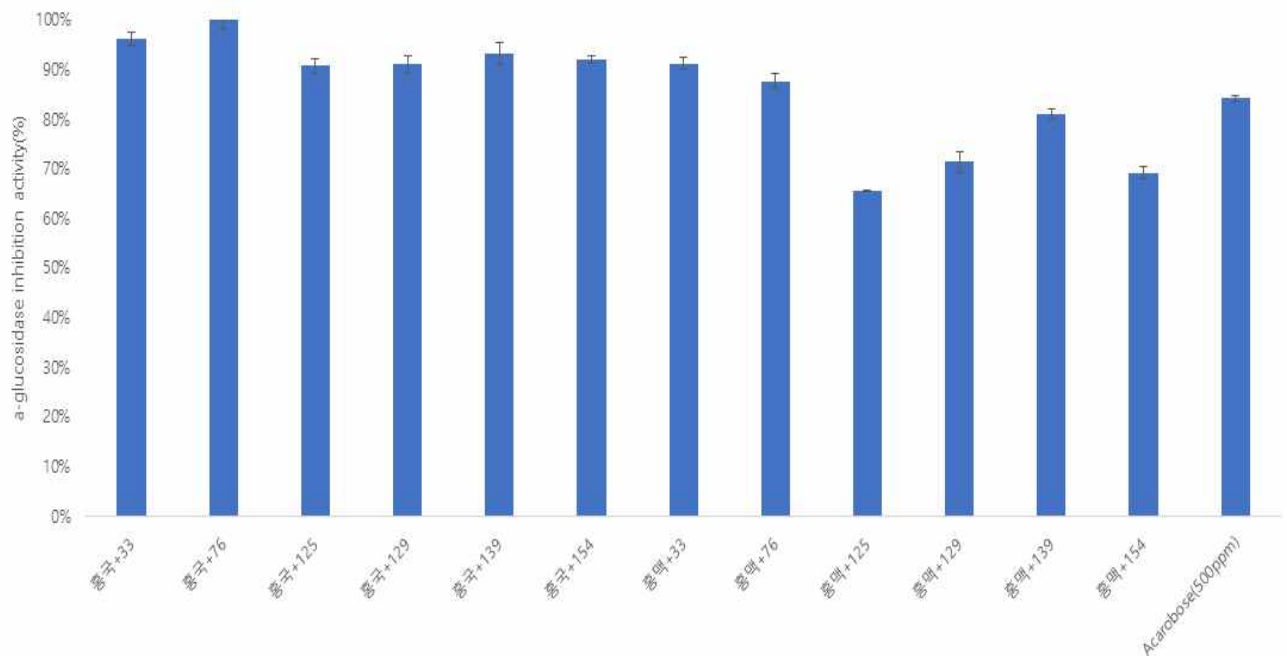
발효 후 색소흡광도의 경우 유산발효 후 흡광도 units가 높아지는 경우도 있는데 이는 유산균발효 시 산도의 변화로 인해 천연색소의 색이 변화되는 것으로 사료된다.



<그림13. 홍국쌀의 색소 유산균발효 α-glucosidase 함량 관계>

(다) 홍국쌀과 유산균 발효 후 항당뇨활성의 조사

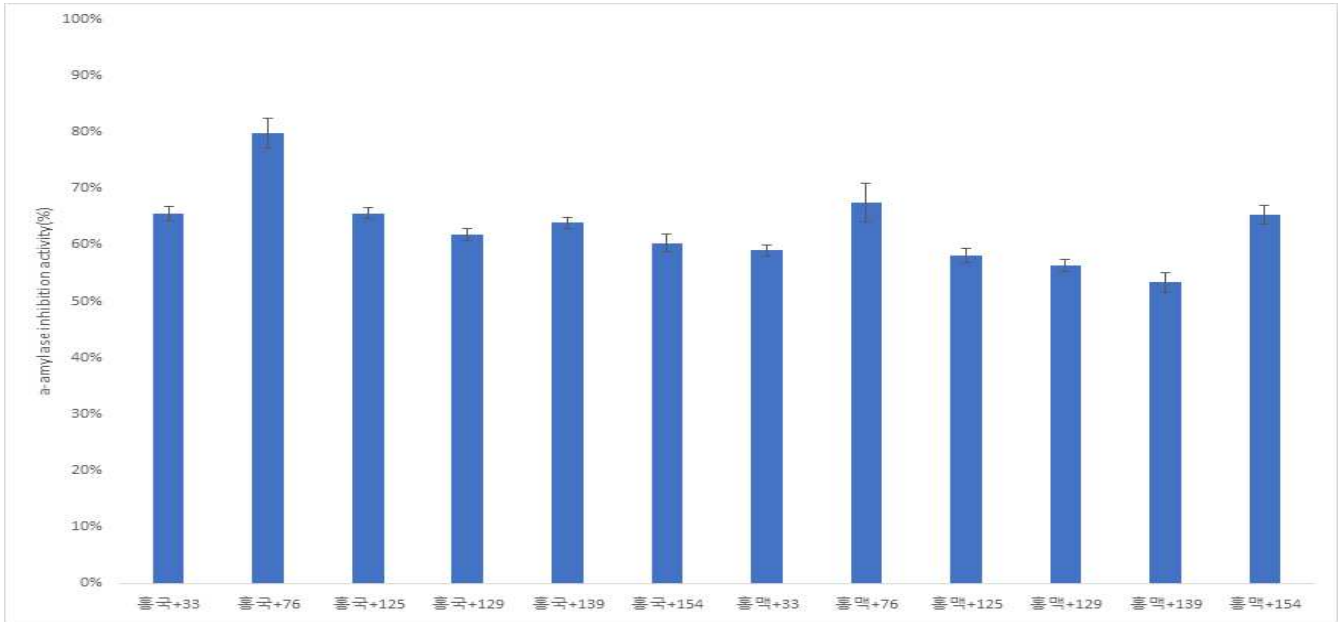
유산균 발효 후 유산균 홍국쌀에서 모두 대조구인 acarbose 보다 높은 활성을 확인하였으며, 향후 유산균발효 홍국이 기능성 소재로 활용 가능성이 매우 높은 것을 확인하였다.



<그림14. 홍국쌀의 색소 2단발효 α-glucosidase 함량 관계>

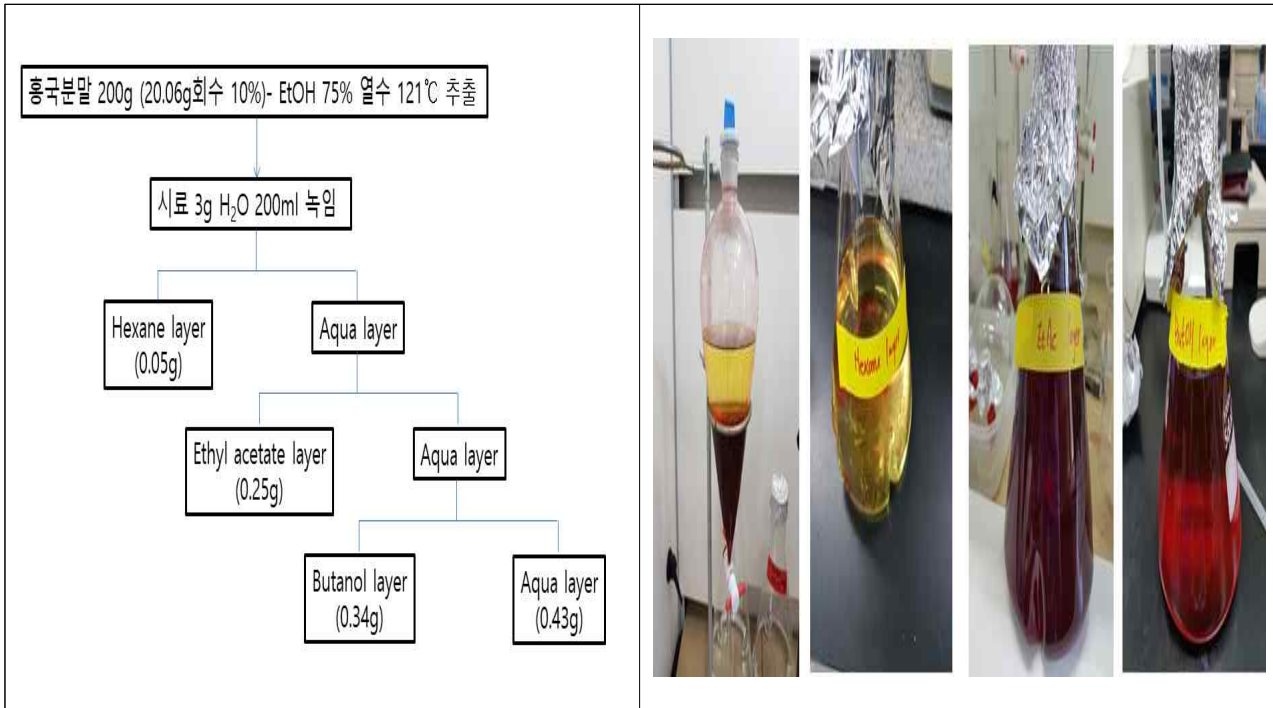
(5) α -amylase 활성 조사결과

유산균 발효 홍국쌀 추출물의 α -amylase 활성 저해율을 측정한 결과 홍국 유산균 발효 시 76번 유산균으로 발효한 유산균발효 홍국에서 80%의 α -amylase 저해 활성을 보이는 것으로 조사 되었다. 전반적으로 유산균 발효 홍국은 60%이상의 α -amylase 저해 활성을 보이는 것을 나타냈다.



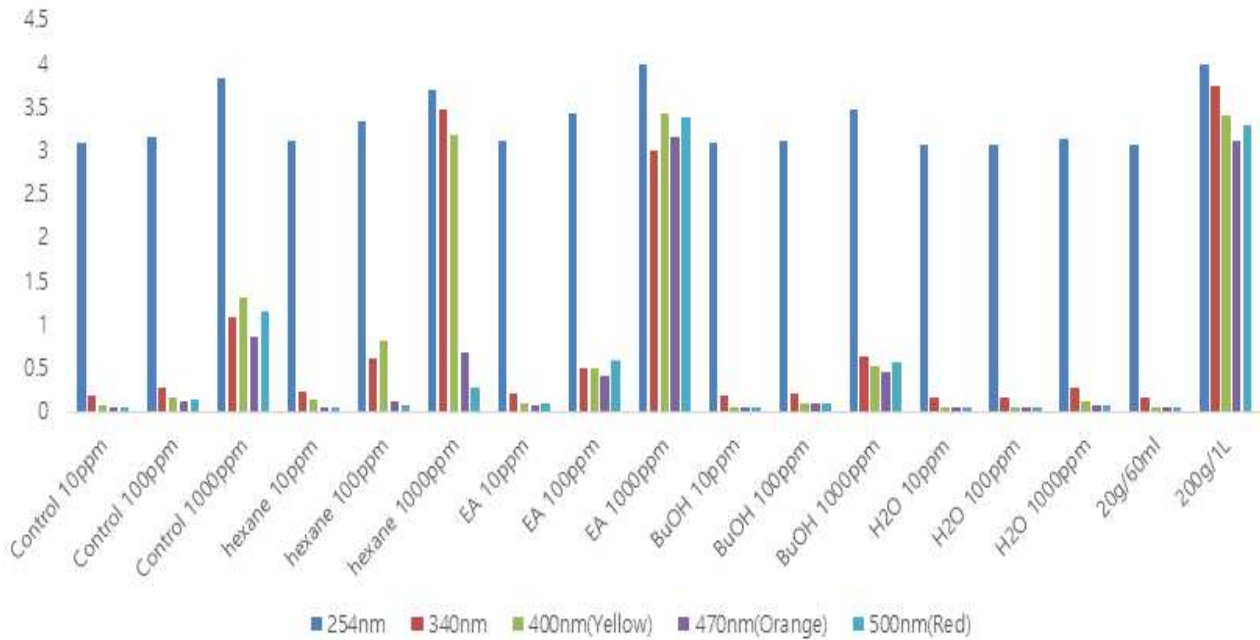
<그림15. 홍국쌀의 α -amylase 활성 조사결과>

(6) 홍국쌀의 추출용매에 따른 항당뇨활성을 조사한 결과



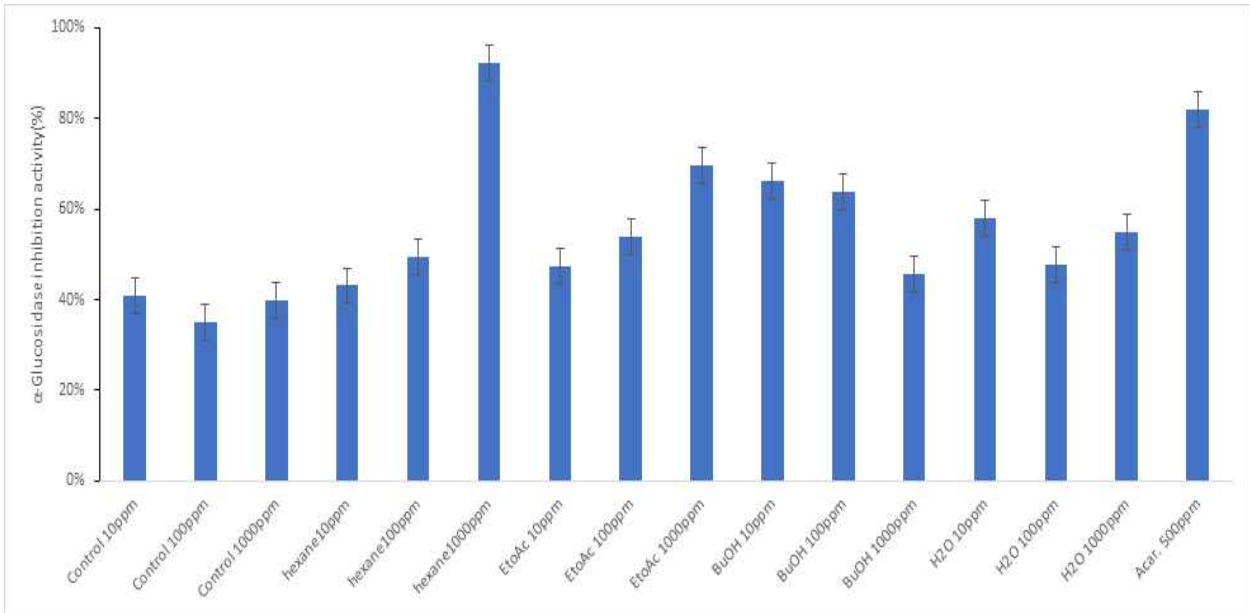
<그림16. 홍국쌀의 추출용매 방법>

hexane추출물과 에틸아세테이트 추출물에서 red, orange색이 높은 것을 조사 되었다.



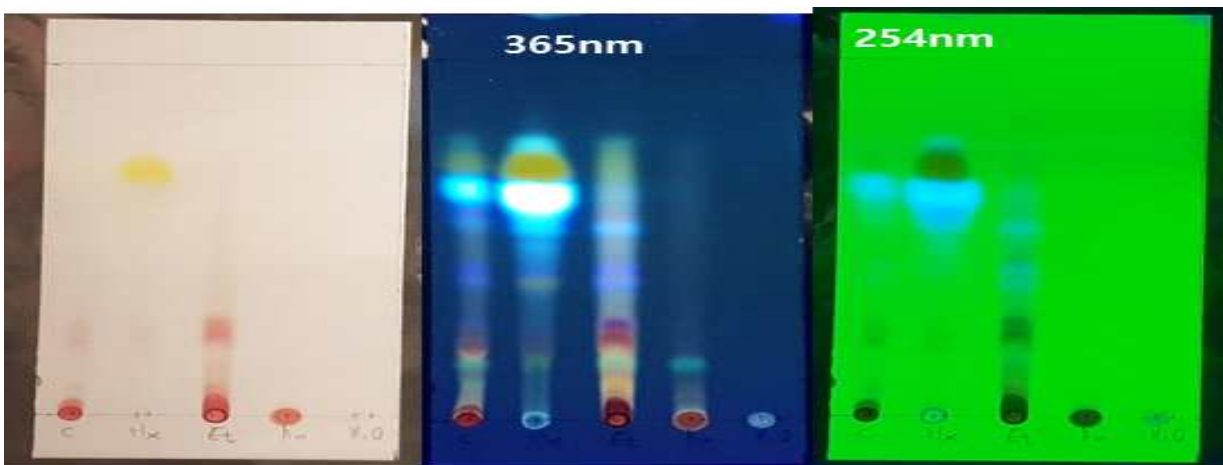
<그림17. 홍국쌀 추출물의 흡광도>

홍국에탄올 추출물을 이용하여 용매에 따른 추출물의 항당뇨활성을 조사한 결과 hexane 1,000ppm에서 92%의 α -glucosidase 저해활성을 보이는 것으로 조사 되었다.



<그림18. 홍국쌀 추출물의 α -glucosidase 결과>

분획별 추출물의 TLC 분석결과는 다음 그림과 같이 조사 되었다. TLC 상에서 다양한 물질을 함유하고 있는 것으로 조사 되었으며, 향후 물질 분석을 통해 더 진행을 하여야 할 것으로 사료된다.

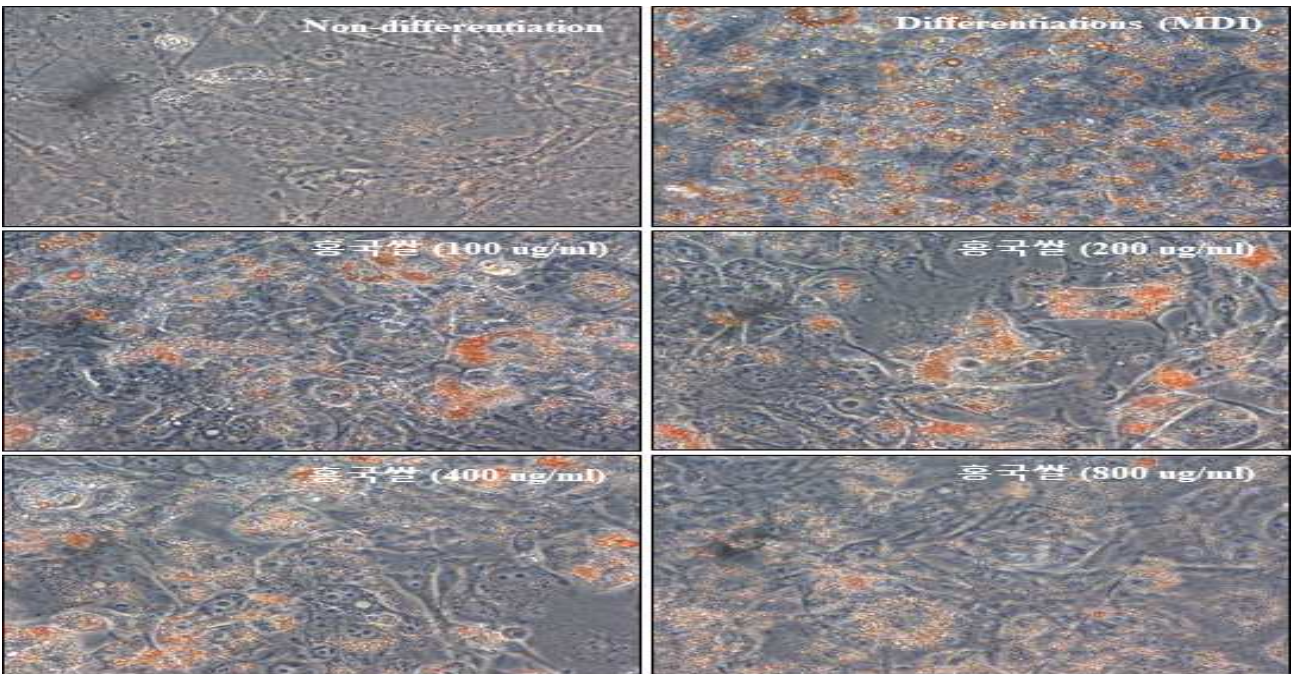


1: MeOH, 2:Hexane, 3: EtAC, 4: BuOH 5: Aqua

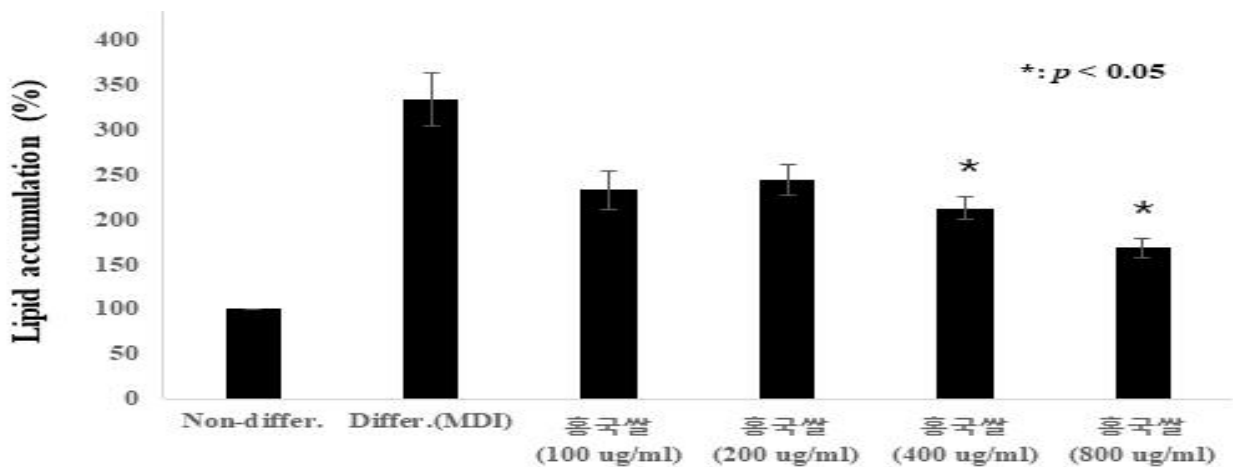
<그림19. 홍국추출물 분획별 TLC 결과>

(7) 3T3-L1 전지방세포를 활용한 glucose consumption 억제 활성 평가

홍국균으로 발효한 쌀의 70% 주정 추출물이 지방세포로의 분화 과정에 작용하여 지방구의 생성을 억제여부를 확인하기 위해 Oil Red O 염색액을 이용하여 지방구가 형성된 3T3-L1 세포를 염색한 후 현미경으로 관찰하였다. 그 결과, 분화 유도 배지 (MDI) 만 처리한 군에 비해 홍국균으로 발효된 쌀의 70% 주정 추출물을 처리한 군에서 염색된 지방구의 수가 농도 의존적으로 감소하는 것을 확인할 수 있었으며, 특히 800 ug/ml의 농도로 처리한 군에서는 MDI 처리 군 대비 약 60% 정도의 지방구 생성 억제를 확인할 수 있었다.



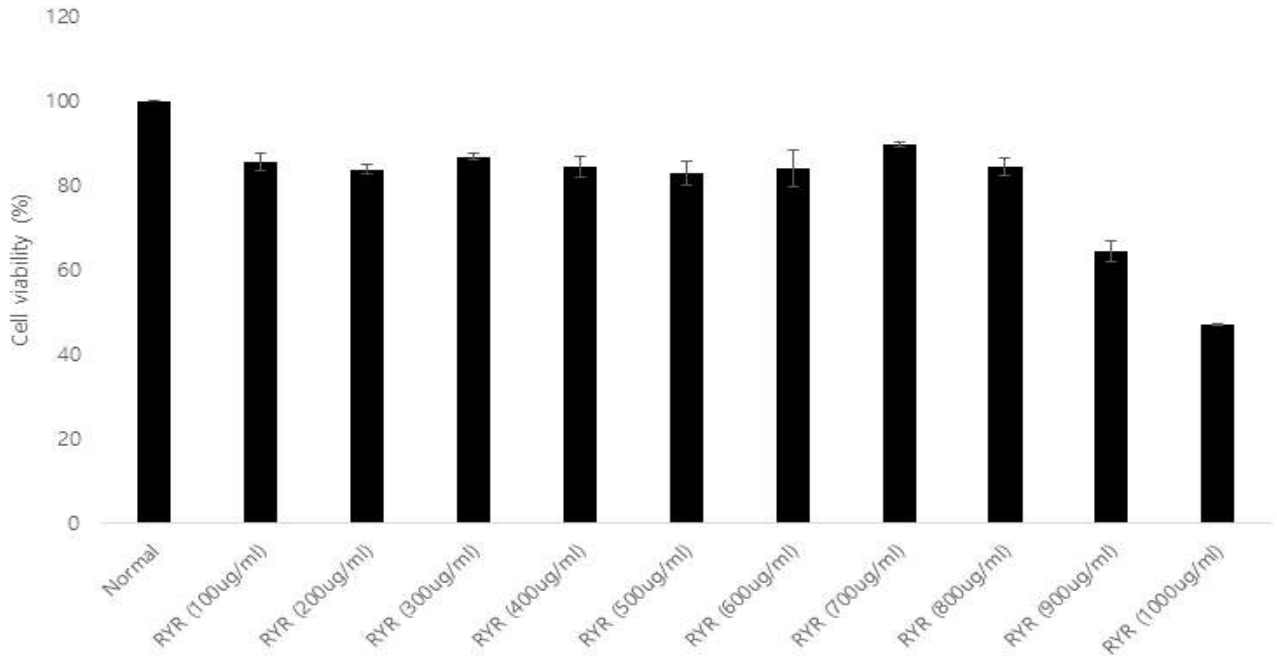
<그림20. 홍국추출물 3T3-L1 현미경 관찰사진>



<그림21. 홍국추출물 3T3-L1 활성 억제 효과>

(8) 홍국균으로 발효한 쌀의 세포 독성 평가

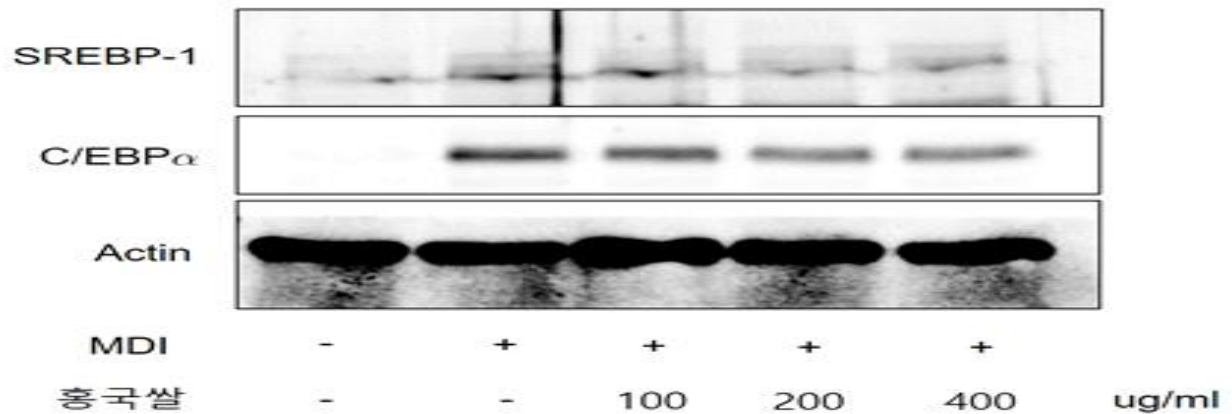
홍국균으로 발효한 쌀의 70% 주정 추출물이 세포 생존율에 미치는 영향을 조사하기 위하여 MTT assay를 통해 세포 독성을 확인하였다. 시료를 24시간 동안 3T3-L1 전지방 세포 처리한 결과, 추출물을 처리하지 않은 대조군의 세포 생존율과 비교하여 홍국균으로 발효한 쌀의 70% 주정 추출물을 100 ug/ml 부터 800 ug/ml 까지의 농도로 처리한 군에서는 세포 독성이 나타나지 않음을 확인하였다.



<그림22. 홍국쌀 세포 독성평가 결과>

(9) western blot 결과

지방전구세포에서 지방세포로 분화되는 adipogenesis 과정은 많은 종류의 adipogenic transcription factor들의 단계적인 조절에 의하여 유발되는 것으로 알려져 있으며 이러한 분화과정에서 가장 중추적인 역할을 하는 것이 SREBP-1과 C/EBP α 이다. 이러한 전사인자들은 호르몬과 같은 분화유도물질에 의해 촉진되어 지방전구세포를 성숙지방세포로 분화시킨다. SREBP-1와 C/EBP α 의 발현은 상호작용을 통하여 세포내 lipid droplet 생성 및 세포의 크기 증가 등과 같은 형태적 특징과 더불어 leptin 및 adiponectin과 aP2 및 FAS 등과 같은 adipocytokine과 adipogenic protein 발현에 중요한 역할을 한다. 본 연구에서 홍국쌀 추출물의 농도에 따라 SREBP-1, C/EBP α 가 감소됨을 확인하였다.



<그림23. 홍국쌀 western blot 결과>

(10) 고지방식이로 고혈당 비만이 유도된 마우스의 홍국쌀 8주 섭취 후 동물 실험 결과



<표 5. 홍국쌀 사료군 식이조성표>

	ND ¹⁾	HFD	5% 쌀	2.5% 홍국쌀	5% 홍국쌀	1% PG (가르 시니아)	1% PM (상백 피)
Choline bitartrate	10	10	7	7	7	7	7
Methionine	15	15	10.5	10.5	10.5	10.5	10.5
Cholesterol	-	25	17.5	17.5	17.5	17.5	17.5
Vitamin	50	50	35	35	35	35	35
Mineral	175	175	122.5	122.5	122.5	122.5	122.5
Casein	1000	1000	700	700	700	700	700
Cellulose	250	250	175	175	175	175	175
Corn oil	250	250	175	175	175	175	175
Lard	0	1000	700	700	700	700	700
Corn starch	1750	725	332.5	420	332.5	472.5	472.5
Sucrose	1500	1500	1050	1050	1050	1050	1050
Rice.			175				
Red yeast rice (<i>Monascus purpureus</i>).				87.5	175		
Garcinia cambogia extract						35	
Mullberry root extract							35
Total (g)	5,000	5,000	3,500	3,500	3,500	3,500	3,500

(가) 고지방식이로 고혈당 비만이 유도된 마우스의 홍국쌀 8주 섭취 후 체중, 식이섭취량, 식이효율성 계산

홍국쌀을 고지방식이와 같이 급여 8주 후 고지방식이군(HFD)에 비해 모든 실험물질을 섭취한 실험군에서 체중 감소를 보였으며 일반쌀을 섭취한 군보다 홍국쌀을 섭취한 군에서 더 큰 체중 감소($p<0.01$)를 보였다. 식이 섭취량은 모든 군에서 유의성 있는 차이는 없었고 식이섭취효율은 HFD에 비해 모든 실험군에서 유의한 차이($p<0.01$)를 보였다. 위의 결과로 보아 홍국쌀은 체중감소에 효과가 있는 것으로 사료 되어진다.

<표6. Effect of red yeast rice sunsik product powder on final body weight, food intake and food efficiency ratio>

	Initial body weight (g)	Final body weight (g)	Food intake (g/8 weeks)	Food intake (g/day)	Food efficiency ratio (%)
ND ¹⁾	31.29±2.47	33.13±2.51	177.01±6.33	3.16±0.11	1.04±0.75
HFD	40.86±2.46	47.43±1.43 ²⁾	171.11±11.00	3.06±0.20	3.79±1.04
5% 쌀	41.31±2.19	45.53±1.36 ³⁾	172.21±14.67	3.08±0.26	1.61±0.77**
2.5% 홍국쌀	42.05±3.23	43.80±2.04 ^{**4)}	172.99±4.43	3.09±0.08	1.71±0.89**
5% 홍국쌀	41.40±2.74	43.96±2.05**	166.81±9.76	2.97±0.09	1.95±0.58**
1% 가르시니아	42.23±2.74	41.34±1.62**	173.03±13.95	3.09±0.25	0.60±1.62**
1% 상백피	39.99±4.48	41.19±3.48**	174.11±22.77	3.11±0.41	0.60±0.92**

¹⁾Groups are the same as in 표 5.

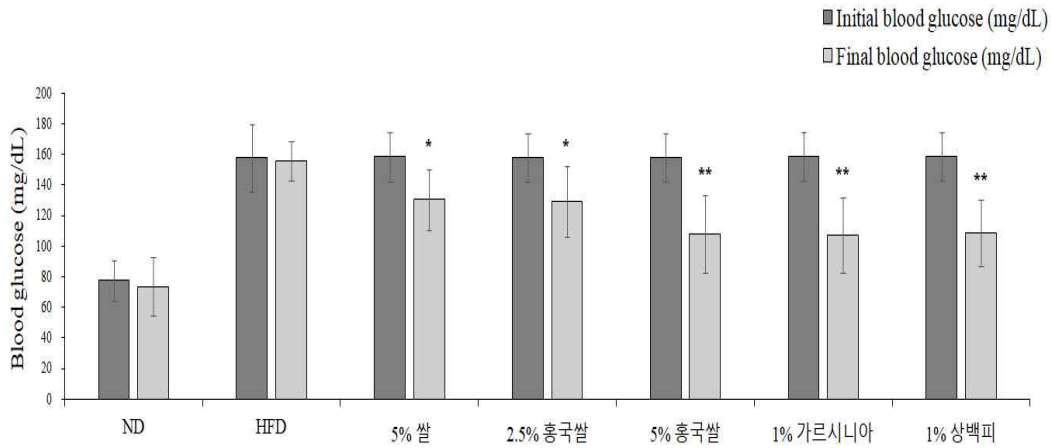
²⁾All values are mean±SD.

^{3)**}Significantly different between the ND and the HFD by t-test($p<0.01$)

^{4)***}Significantly different between the ND and the HFD by t-test($p<0.001$)

(나) 홍국쌀 식이 섭취 시 8 주후 혈당 농도 변화

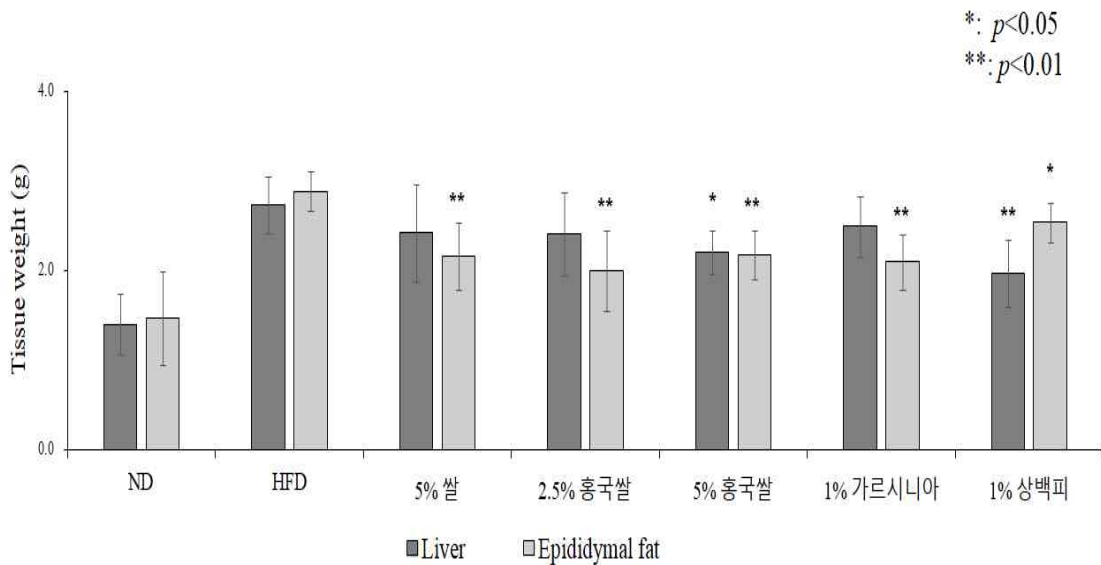
고지방식이 섭취로 고혈당을 유발 시킨 마우스 ND 음성대조군을 제외한 모든 실험군을 약 평균 150 mg/dL로 군분리 한 후 홍국쌀 등을 고지방식과 같이 급여한 뒤 8주 후 결과 <그림 24.>과 같이 2.5%, 5% 홍국쌀에서 HFD에 비교하여 농도의존적으로 유의성 ($p<0.05$, $p<0.01$) 있게 혈당 낮아지는 것을 관찰 할 수 있었다. 양성대조군인 1% 가르시니아, 1% 상백피 역시 HFD 에 비해서 유의하게 ($p<0.01$) 낮아졌다. 위 결과로 보아 홍국쌀이 농도 의존적으로 공복시 혈당에 영향을 주는 것을 사료되어진다.



<그림24. Blood glucose change in mice fed experimental diets supplemented with red yeast rice of diets for 8 weeks>

(다) 홍국쌀 식이 섭취 시 부고환 지방조직 및 간 무게 측정

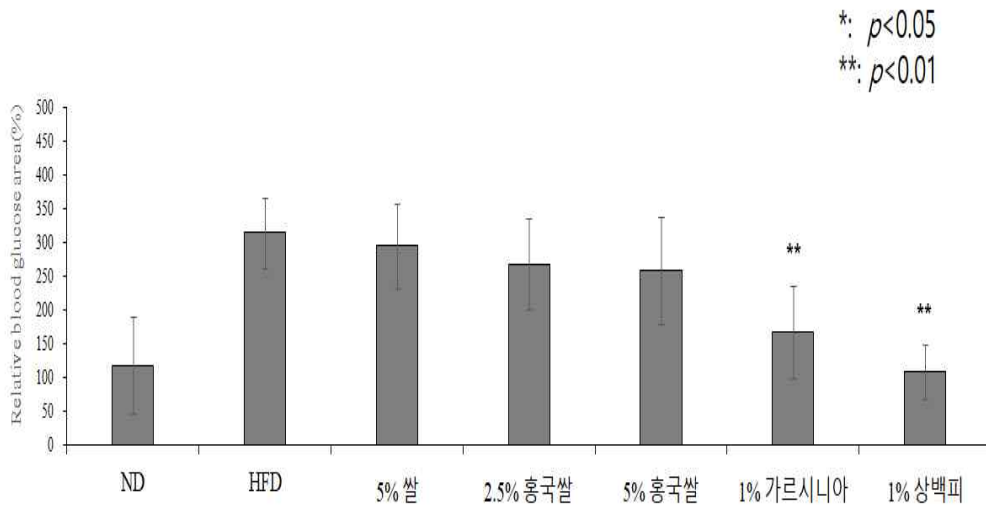
홍국쌀을 고지방식이사료에 섭취한 실험군에서 섭취 시작 8주 째 mice를 희생 시킨 후 부고환지방(epididymal fat pad) 및 간(liver) 무게를 측정하였다. <그림 25.>과 같이 부고환지방의 무게는 HFD에 비해서 모든 실험군에서 유의성($p<0.01$) 있게 낮아졌다. 간의 무게는 HFD에 비해서 5% 홍국쌀에서 유의성($p<0.05$) 있는 감소를 보였다. 위 결과로 보아 홍국쌀이 유의하게 부고환지방과 지방간을 감소시키는 것으로 사료되어진다.



<그림25. Liver and epididymal fat weight of mice fed experimental diets supplemented with red yeast rice of diets for 8 weeks>

(라) 홍국쌀 식이 섭취 시 경구당부하검사(oral glucose tolerance test, OGTT)

홍국쌀을 고지방식이사료에 섭취한 실험군에서 실험 7주 째 12시간 이상 금식 시킨 뒤 공복시 혈당을 측정 한 후 glucose(2g/kg body weight)를 멸균주사용액에 녹여 경구 투여한 다음 0, 30, 60, 90, 120, 150, 180분 후 mice의 꼬리정맥에서 혈액을 채취하고 혈당측정기(gdoctor, (주)올메디쿠스, Korea)를 이용하여 혈당을 측정하였다. 이러한 혈당 농도 반응을 혈당 반응 면적으로 산출한 결과 <그림 26.> 양성대조군을 제외한 모든 군에서 유의한 결과를 나타내지는 못하였다.



<그림26. AUC (Area under the curve) calculation after glucose treatment in mice fed experimental diets supplemented with red yeast rice for 7 weeks>

(마) 홍국쌀 식이 섭취 시 Total cholesterol, Triglyceride 함량 측정

혈중의 지질 농도는 동맥경화, 심장병, 고지혈증, 고혈압 등의 심혈관계 질환의 진단 지표로 사용되고 있다. Wat 등(2009)과 Park 등(2005)은 고지방 식이 섭취가 일반 식이군과 비교하여 혈중 총 콜레스테롤 함량과 중성지방 함량을 증가한다는 보고와 일치하였다. 비만이나 당뇨병 또는 유전적 요인으로 인해 체내 지질의 균형이 깨지면 혈장 내 lipoprotein인 HDL-cholesterol과 LDL-cholesterol의 비가 깨어지며, 이로 인한 심혈관계 질환의 발병률이 높아진다고 보고되고 있다(Park 등, 2013).

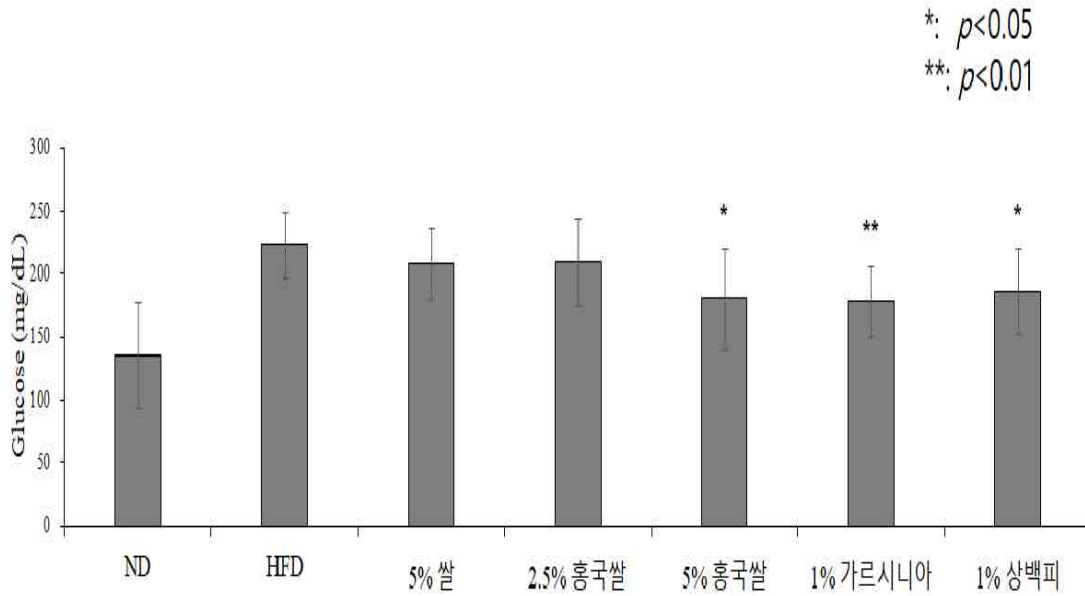
홍국쌀을 고지방식이사료에 섭취한 실험군에서 혈청을 분리한 후 총콜레스테롤 및 중성 지방 함량을 측정한 결과 <표 7.> 와 같이 HFD에 비해서 홍국쌀을 고농도에서 섭취한 군에서 농도의존적인 감소를 보였지만 유의성을 나타내지는 못하였다. 중성지방의 경우 모든 실험군에서 유의성($p<0.01$)을 보였다. 위 결과로 보아 홍국쌀이 혈중 내 지질농도를 낮추는데 효과가 있는 것으로 판단되어진다.

<표7. The lipid profiles of red yeast rice experimental group after 8 weeks>

	ND	HFD	5% 쌀	2.5% 홍국쌀	5% 홍국쌀	1% 가르시니아	1% 상백피
Total cholesterol (mg/dL)	143.34±23.17	243.26±36.50	215.22±19.32	210.56±19.95	193.55±44.85	187.40±44.29*	192.93±46.03*
Triglyceride (mg/dL)	65.16±13.92	97.88±10.97	56.94±7.14**	59.82±6.47*	58.33±16.34**	43.69±12.51**	44.46±13.67**

(바) 홍국쌀 식이 섭취 시 Glucose 함량 측정

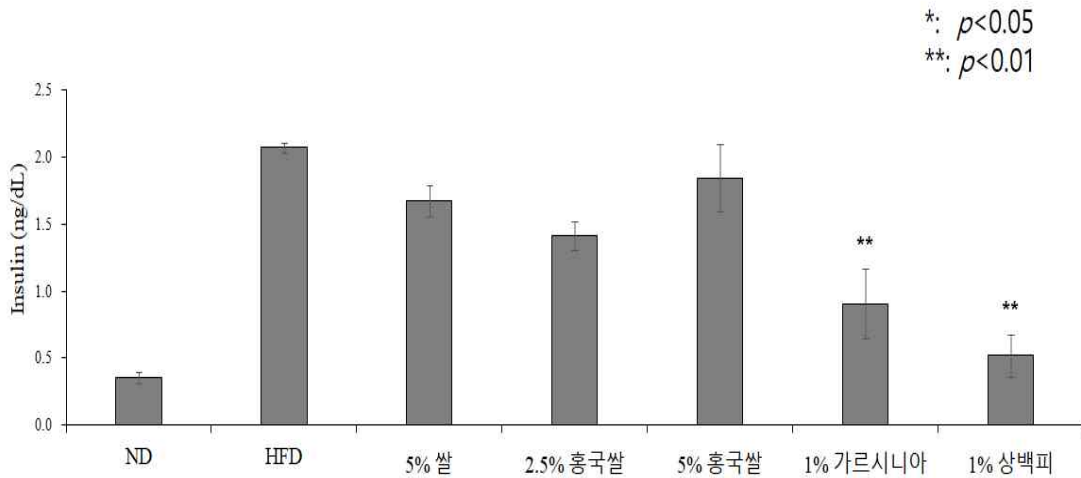
홍국쌀을 고지방식이사료에 섭취한 실험군에서 혈청을 분리한 후 혈청 글루코스 지수를 측정된 결과 <그림 27.> 와 같이 HFD에 비교하여 5% 홍국쌀에서 유의한 결과 ($p < 0.05$) 나타내었다. 양성대조군 역시 유의하게 낮아졌다. 위 결과로 보아 홍국쌀은 혈중 내 포도당 농도를 낮추어 주는데 효과가 있을 것이라고 사료되어진다.



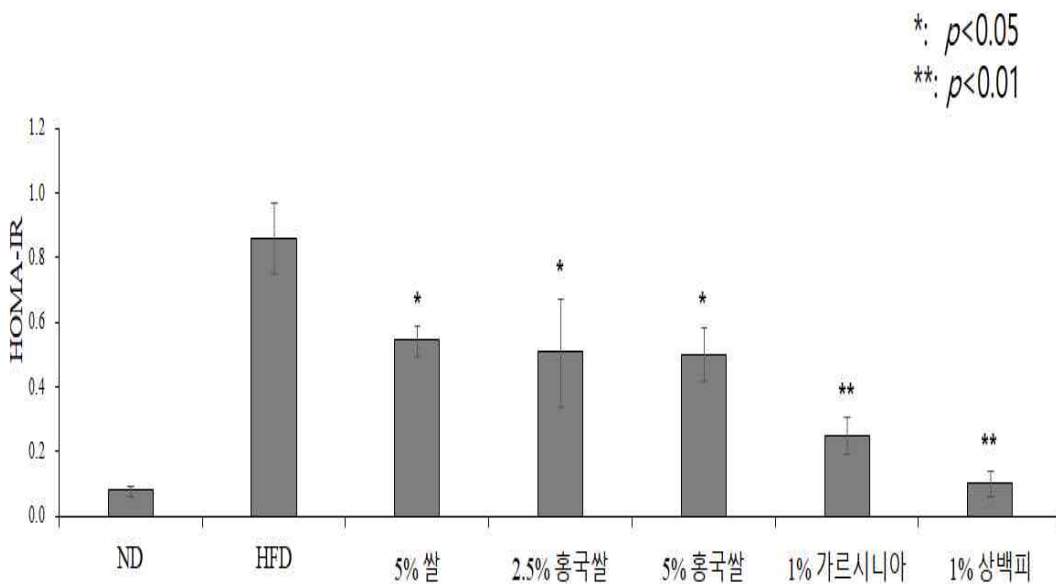
<그림27. Effects of the Red yeast rice beverage on serum glucose>

(사) 인슐린 저항성 및 혈중 인슐린 농도 측정

홍국쌀을 고지방식이사료에 섭취한 실험군의 인슐린 저항성을 측정하기 위해 실험 시작 8 주째 12시간 이상 공복 후 꼬리혈당을 측정하고 부검 후 혈청을 분리하여 인슐린 농도를 측정하였다. <그림 28.> 와 같이 HFD와 비교하였을 때 홍국쌀의 인슐린 농도는 유의한 차이가 없었다. 양성대조군인 1% 가르시니아 및 1% 상백피는 유의한($p<0.01$) 차이를 보였다. 인슐린저항성 지표를 나타내는 HOMA-IR 값은 희생 전 혈당 농도에 인슐린 농도 값을 곱하여 계산하는데 $HOMA-IR = \text{공복 시 혈당 blood glucose(mg/dL)} \times \text{insulin}(\mu\text{IU/mL}) / 405$ <그림 29.> 와 같이 HFD 군에 비해 모든 실험군에서 유의한($p<0.05$) 결과를 얻었다. 결과로 보아 홍국쌀은 각종 당뇨병 등 성인병과 관련이 있는 인슐린저항성 값을 약하게 낮추는 것을 사료되어진다.



<그림28. Effects of the red yeast rice on serum insulin levels>

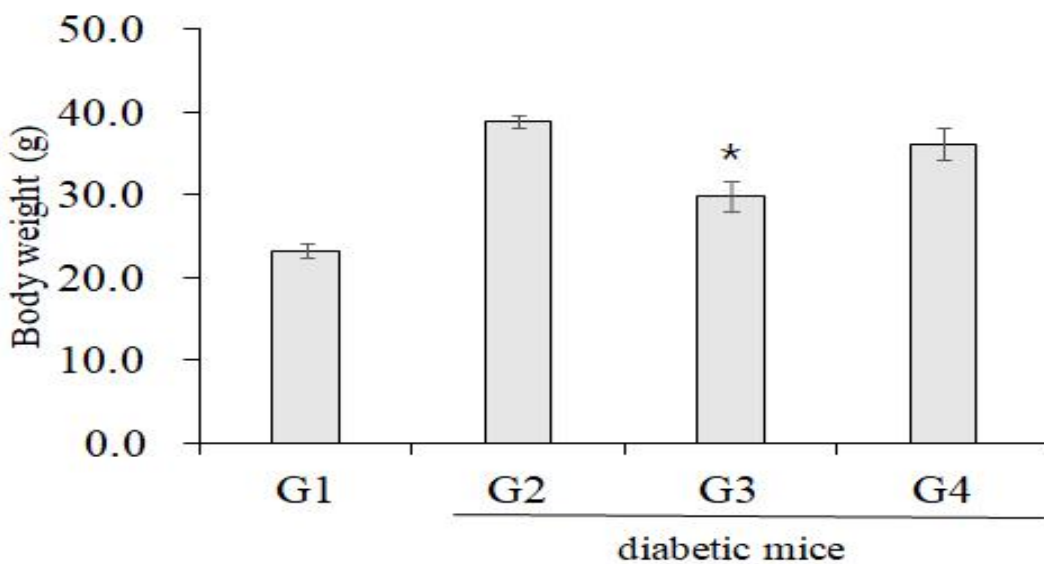


<그림29. Effects of the red yeast rice calculated HOMA-IR in mouse>

(11) 유전자 변형 마우스를 4 주간 홍국쌀 주정추출물을 경구투여한 동물실험결과

(가) 유전자 변형 마우스에 홍국쌀 주정추출물을 4주간 경구투여 후 체중변화

C57BL/6J ob/ob 유전자 변형 마우스에 홍국쌀 주정추출물을 4주간 경구투여한 결과 <그림 30.>와 같이 C57BL/6J ob/ob mice에 멸균주사용수를 경구투여한 군(G2)에 비하여 C57BL/6J ob/ob mice에 홍국쌀 주정추출물 1000 mg/kg 을 경구투여한 군(G3)에서 유의성($p<0.05$) 있게 체중이 감소되었다. 양성대조군인 C57BL/6J ob/ob mice에 metformin 300 mg/kg을 경구투여한 군(G4)에서는 G2 군에 비해 유의하게 체중이 감소되지 않았다. 위 결과로 보아 홍국쌀 주정추출물에서의 유효물질이 체중 감소에 큰 효과가 있는 것으로 판단되어진다.



G1; Normal diet.

G2; C57BL/6J ob/ob mice.

G3; Oral administration of 1000 mg/kg of red rice on C57BL/6J ob/ob mice,

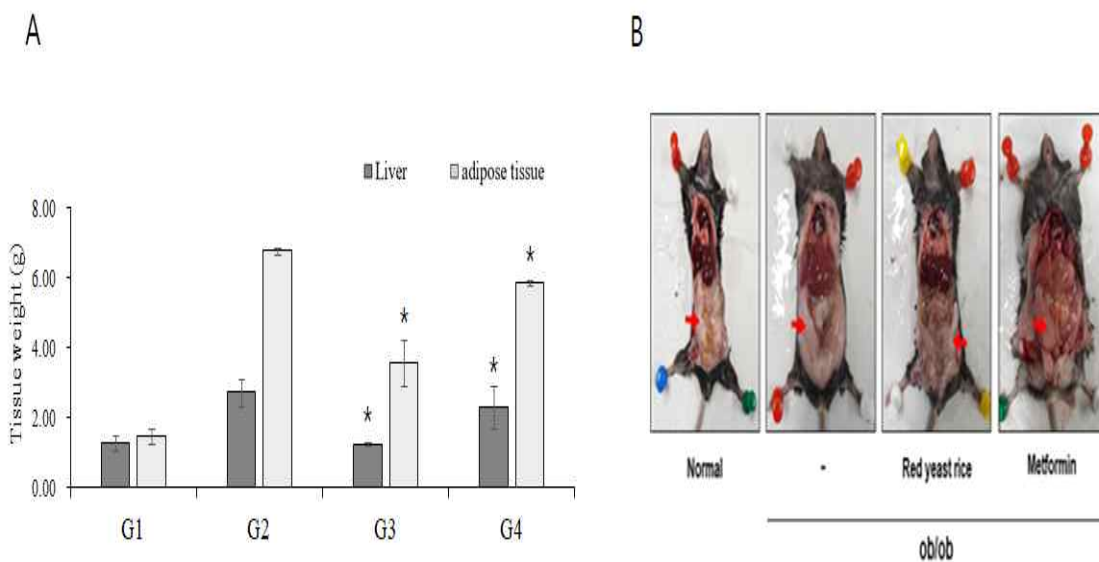
G4; Oral administration of 300 mg/kg of metformin on C57BL/6J ob/ob mice.

Significantly different from C57BL/6J ob/ob mice group (* $P<0.05$).

<그림30. C57BL/6J ob/ob mice were orally administered with Red yeast rice ethanol extract 1000 mg/kg for 4 weeks, and body weights were compared>

(나) 유전자 변형 마우스에 홍국쌀 주정추출물을 4주 간 경구투여 후 부고환지방 및 간 무게 측정

C57BL/6J ob/ob 유전자 변형 마우스에 홍국쌀 주정 추출물을 4주간 경구투여 후 부검 뒤 부고환지방 및 간의 무게를 측정한 결과 <그림 31.>와 같이 멸균주사용수 만을 경구투여한 G2군에 비해 홍국쌀 주정추출물을 경구투여한 G3군에서 부고환지방 및 간의 무게를 크게 감소($p < 0.05$) 시켰다. 양성대조군인 G4 군도 G2군에 비해 유의성 있게 감소시켰지만 G2군은 음성대조군인 일반마우스에 멸균주사용수를 경구투여한 군(G1)군과 비교하더라 간 무게가 비슷할 만큼 감소시켰다. 위 결과로 보아 홍국쌀 주정추출물의 유효물질이 비만에 큰 효과가 있는 것으로 판단되어진다.



G1; Normal diet.

G2; C57BL/6J ob/ob mice.

G3; Oral administration of 1000 mg/kg of red rice on C57BL/6J ob/ob mice.

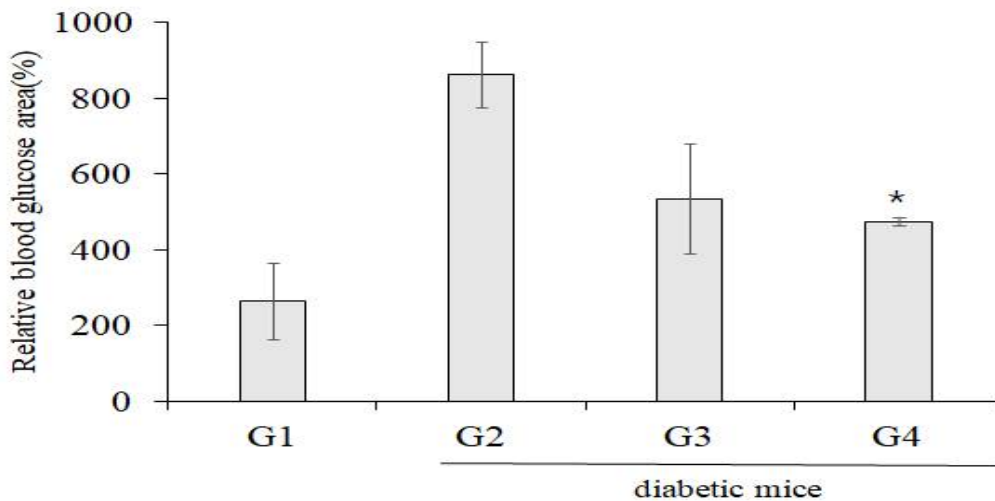
G4; Oral administration of 300 mg/kg of metformin on C57BL/6J ob/ob mice.

Significantly different from C57BL/6J ob/ob mice group (* $P < 0.05$).

<그림31. C57BL/6J ob/ob mice were orally administered with Red yeast rice ethanol extract 1000 mg/kg for 4 weeks, and liver, adipose tissue weights were compared>

(다) 유전자 변형 마우스에 홍국쌀 주정추출물을 3주간 경구투여 후 경구당부하검사(oral glucose tolerance test, OGTT)

C57BL/6J ob/ob 유전자 변형 마우스에 홍국쌀 주정 추출물을 경구투여 실험군에서 실험 3주 째 12시간 이상 금식시킨 후 공복시 혈당을 측정 한 후 glucose(2g/kg body weight)를 멸균 주사용액에 녹여 경구 투여한 다음 0, 30, 60, 90, 120, 150, 180분 후 mice의 꼬리정맥에서 혈액을 채취하고 혈당측정기(g doctor, (주)올메디쿠스, Korea)를 이용하여 혈당을 측정하였다. 이러한 혈당 농도 반응을 혈당 반응 면적으로 산출한 결과 <그림 32.>와 같이 G2 군과 비교하였을 때 G3군은 감소되었지만 유의성을 보이지는 못하였다. 당뇨병 치료제로 알려져 있는 metformin(G4)군의 경우 G2군에 비해 유의한 결과($p<0.05$)를 얻었다.



G1; Normal diet.

G2; C57BL/6J ob/ob mice.

G3; Oral administration of 1000 mg/kg of red rice on C57BL/6J ob/ob mice.

G4; Oral administration of 300 mg/kg of metformin on C57BL/6J ob/ob mice.

Significantly different from C57BL/6J ob/ob mice group (* $P<0.05$).

<그림32. The AUC (Area under curve) was calculated after C57BL/6J ob/ob mice were orally administered red yeast rice ethanol extract for 3 weeks and then treated with 2g/kg glucose>

(라) 유전자 변형 마우스에 홍국쌀 주정추출물을 4주 간 경구투여 후 Total cholesterol, HDL cholesterol 함량 측정

C57BL/6J ob/ob 유전자 변형 마우스에 홍국쌀 주정 추출물을 경구투여 실험군은 <표 8.>와 같이 혈청에서 혈액 내 총콜레스테롤 함량과 HDL 함량을 측정한 결과 G2군에 비해서 홍국쌀 주정 추출물을 경구투여한 G3군에서 총콜레스테롤 함량이 유의하게 ($p<0.01$) 크게 감소하는 것을 알 수가 있었으며 일반마우스에 멸균주사용수를 경구투여한 G1군과 비슷하게 측정되었다. 좋은 지질이라고 알려져 있는 HDL cholesterol은 G2군에 비해 G3군에서 유의성($p<0.01$) 있게 크게 증가한 것을 알 수가 있었다. 위 결과로 보아 홍국쌀 주정 추출물의 유효물질이 혈중내 콜레스테롤에 강하게 효과를 보이는 것으로 판단된다.

<표8. The Lipid Profiles of Each Experimental Group after 4 Weeks>

	G1	G2	G3	G4
Total cholesterol (mg/dL)	91.45±3.25	194.95±4.89	97.76±3.23**	119.18±6.13**
HDL cholesterol (mg/dL)	52.68±1.13	11.91±0.99	63.08±1.50**	26.84±3.55**

G1: Normal diet.

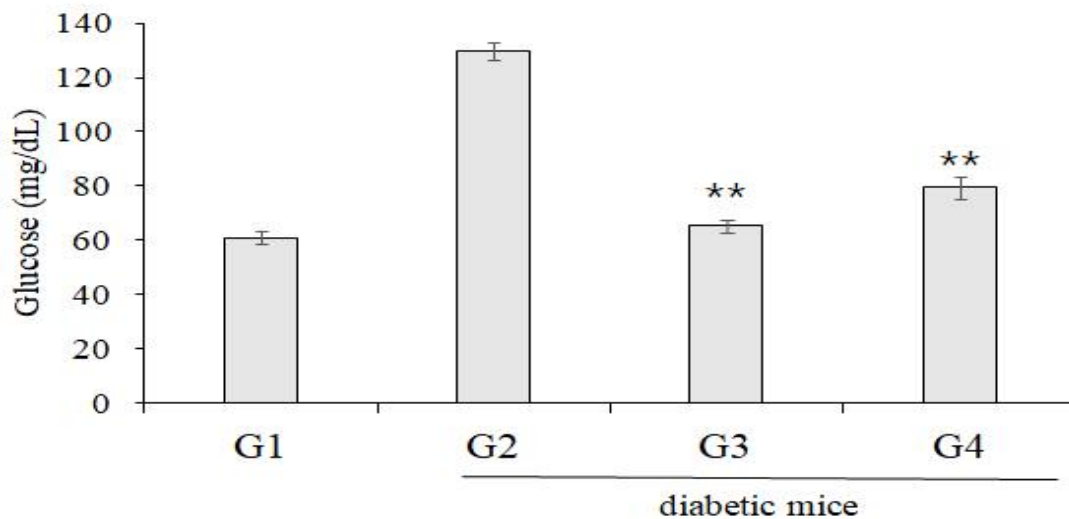
G2: C57BL/6J ob/ob mice.

G3: Oral administration of 1000 mg/kg of red yeast rice on C57BL/6J ob/ob mice.

G4: Oral administration of 300 mg/kg of metformin on C57BL/6J ob/ob mice.

Significantly different from C57BL/6J ob/ob mice group (** $P<0.01$)

(마) 유전자 변형 마우스에 홍국쌀 주정추출물을 4주 간 경구투여 후 Glucose 함량 측정
 C57BL/6J ob/ob 유전자 변형 마우스에 홍국쌀 주정추출물을 경구투여 실험군은 <그림 33.>와 같이 혈청 내 글루코스 함량을 측정한 결과 G2군과 비교하여 G3 군은 유의성 ($p<0.01$)있게 감소하는 것을 알 수가 있었다. 양성대조군인 G4군도 유의한 ($p<0.01$) 차이를 보였다. 위 결과로 보아 홍국쌀 주정 추출물이 혈중내 글루코스를 감소시켜 당뇨병 등의 성인병에 효과가 있을 것으로 사료되어진다.



G1; Normal diet.

G2; C57BL/6J ob/ob mice.

G3; Oral administration of 1000 mg/kg of red rice on C57BL/6J ob/ob mice.

G4; Oral administration of 300 mg/kg of metformin on C57BL/6J ob/ob mice.

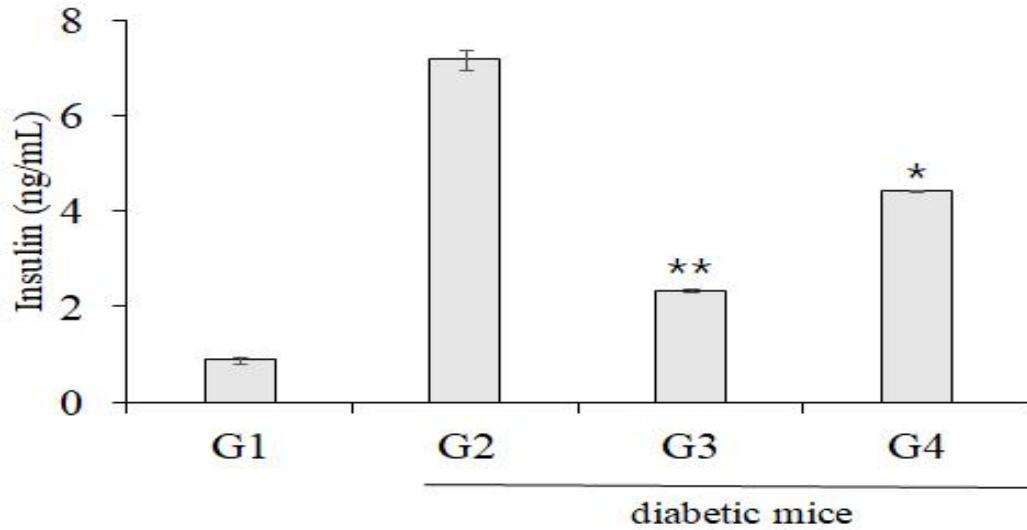
Significantly different from C57BL/6J ob/ob mice group (* $P<0.05$).

Data are presented as mean \pm SEM.

<그림33. Effect of Red yeast rice ethanol extract on serum levels of glucose>

(바) 유전자 변형 마우스에 홍국쌀 주정추출물을 4주 간 경구투여 후 인슐린 저항성 및 혈중 인슐린 농도 측정

C57BL/6J ob/ob 유전자 변형 마우스에 홍국쌀 주정 추출물을 경구투여 실험군의 인슐린 저항성을 측정하기 위해 실험 시작 4주 째 12시간 이상 공복 후 꼬리혈당을 측정하고 부검 후 혈청을 분리하여 인슐린 농도를 측정하였다. <그림 34.> 와 같이 G2과 비교하였을 때 홍국쌀 주정추출물의 인슐린 농도($p<0.01$)를 유의성 있게 크게 감소하는 것을 알 수가 있었다. 양성대조군인 G4군도 유의한($p<0.01$) 차이를 보였다. 인슐린저항성 지표를 나타내는 HOMA-IR 값은 희생 전 혈당 농도에 인슐린 농도 값을 곱하여 계산하는데 $HOMA-IR = \text{공복 시 혈당 blood glucose(mg/dL)} \times \text{insulin}(\mu\text{IU/mL}) / 405$ HOMA-IR 값은 <그림 35.> 와 같이 G2군에 비해 유의한 결과를 얻지는 못하였다. 위에결과로 보아 홍국쌀은 각종 당뇨병 등 성인병과 관련이 있는 인슐린과 관련된 질병을 완화시킬 수 있을 것이라고 사료되어진다.



G1; Normal diet.

G2; C57BL/6J ob/ob mice.

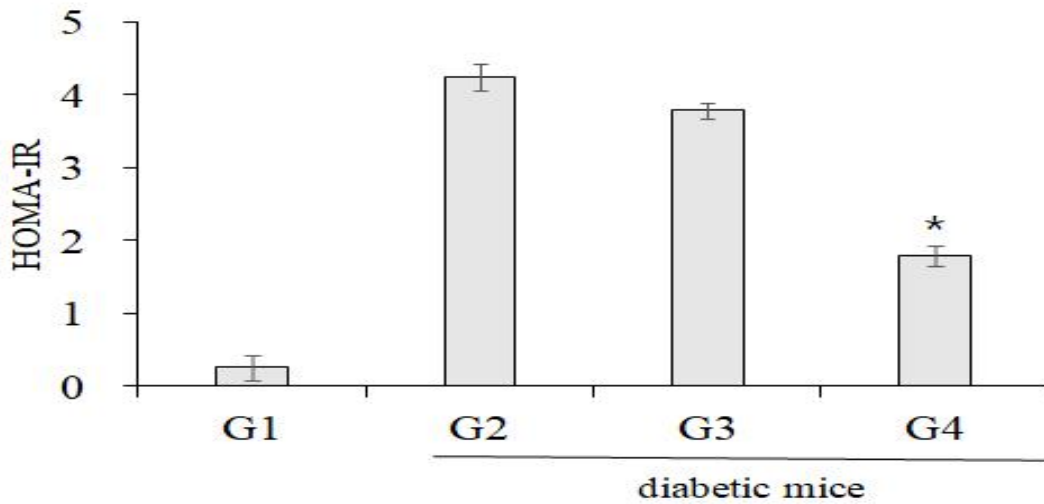
G3; Oral administration of 1000 mg/kg of red rice on C57BL/6J ob/ob mice.

G4; Oral administration of 300 mg/kg of metformin on C57BL/6J ob/ob mice.

Significantly different from C57BL/6J ob/ob mice group (* P <0.05).

Data are presented as mean±SEM.

<그림34. Effects of the red yeast rice ethanol extract on serum insulin levels>



G1; Normal diet.

G2; C57BL/6J ob/ob mice.

G3; Oral administration of 1000 mg/kg of red rice on C57BL/6J ob/ob mice.

G4; Oral administration of 300 mg/kg of metformin on C57BL/6J ob/ob mice.

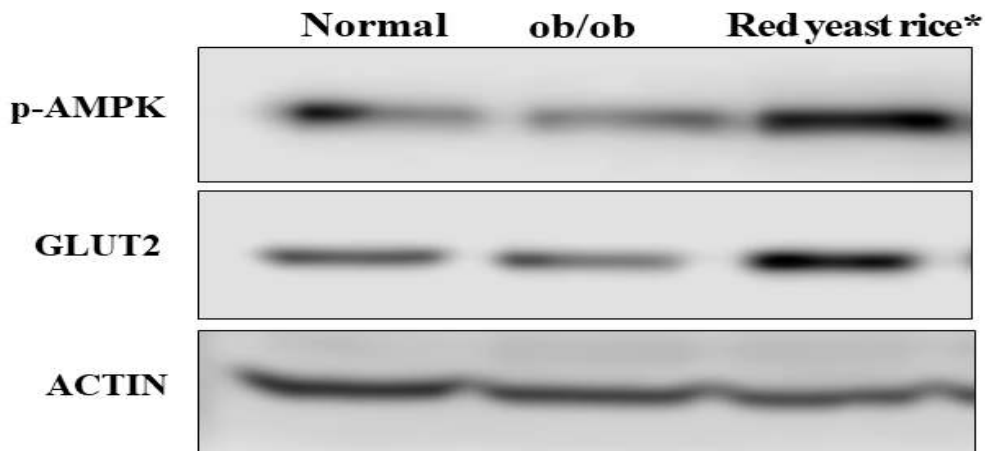
Significantly different from C57BL/6J ob/ob mice group (* P <0.05).

Data are presented as mean±SEM.

<그림35. Effects of the red yeast rice ethanol extract on serum calculated HOMA-IR>

(사) 유전자 변형 마우스에 홍국쌀 주정추출물을 4주 간 경구투여 후 간에서의 western blot 결과

C57BL/6J ob/ob 유전자 변형 마우스에 홍국쌀 주정 추출물을 경구투여 실험군의 간조직을 lysis 시킨 후 Western blot 실험한 결과 <그림 36.> 와 같이 비만 및 당뇨병 등 성인병과 관련된 P-AMPK 단백질량이 유전자형질변환마우스(C57BL/6J ob/ob)의 간에서 보다 크게 증가한 것을 볼 수가 있었으며 당뇨병과 관련된 간조직의 당 수용체인 GLUT2의 단백질량이 유전자형질변환마우스(C57BL/6J ob/ob)보다 크게 증가한 것을 볼 수가 있었다. 위 결과로 보아 홍국쌀 주정 추출물 내 유효물질은 체 내 혈당에 관련된 기전을 회복하는데 효과가 있을 것으로 생각되어지며 비만, 당뇨병 등 인슐린과 관련된 질병에 유효성분으로 사료되어진다.

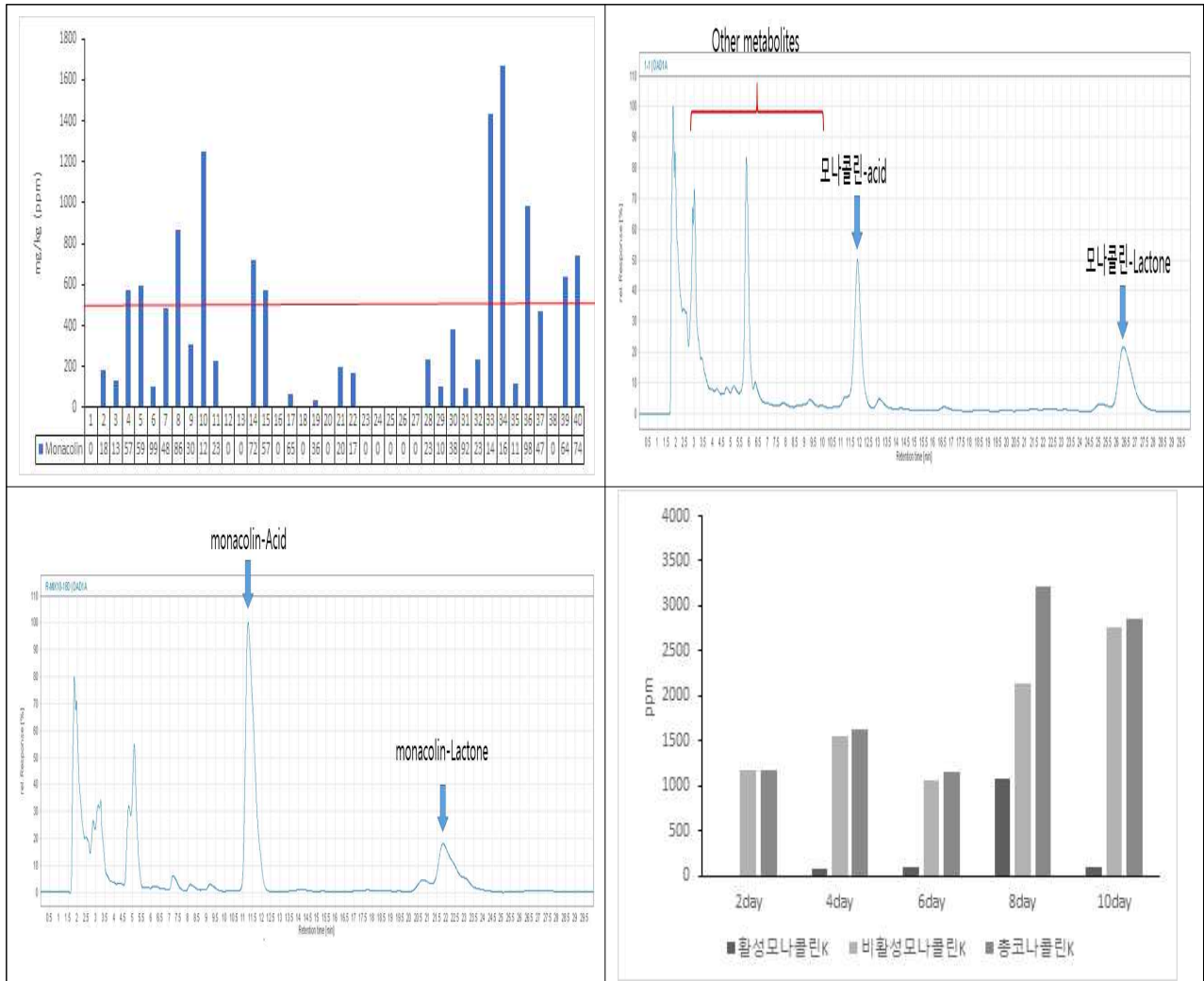


<그림36. Effects of red yeast rice beverage on P-AMPK, GLUT2 protein expressions in mouse liver>

(11) 모나콜린-K 함량의 조사결과

분리 홍국균의 monacolin-K 함량을 조사하여 시트린 negative 균주를 선별 MK01 균주를 선별 조사 하였다.

배양시기에 따른 모나콜린 K의 함량변화는 2일차에는 활성모나콜린 0 ppm, 비활성모나콜린은 1169 ppm으로 조사 되었으며, 10일 배양시 활성모나콜린 98.68 ppm, 비활성모나콜린은 2761.50 ppm 총모나콜린함량은 2860,187 ppm으로 조사되었다.

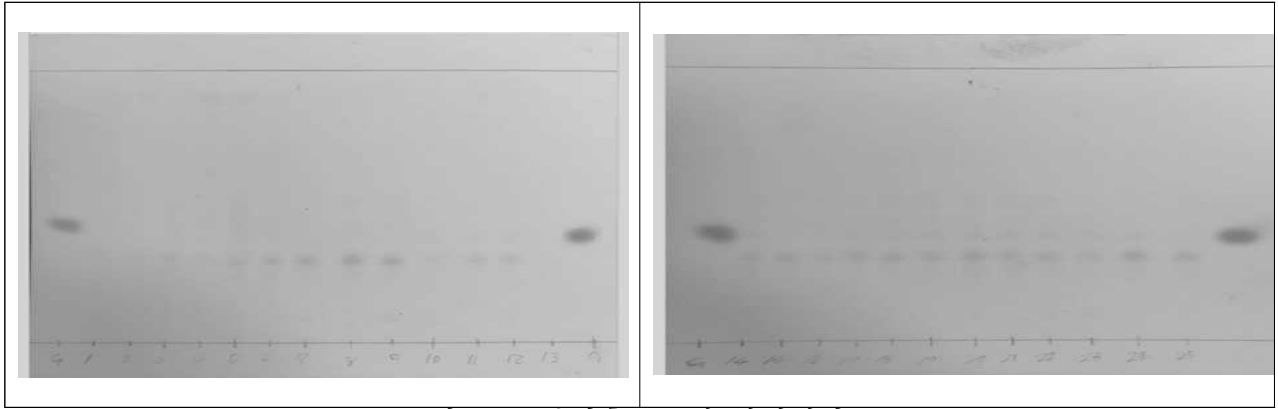


<그림37 . 분리홍국균의 monacolin-K 정량평가>

(12) GABA 함량 분석

(가) 정성평가

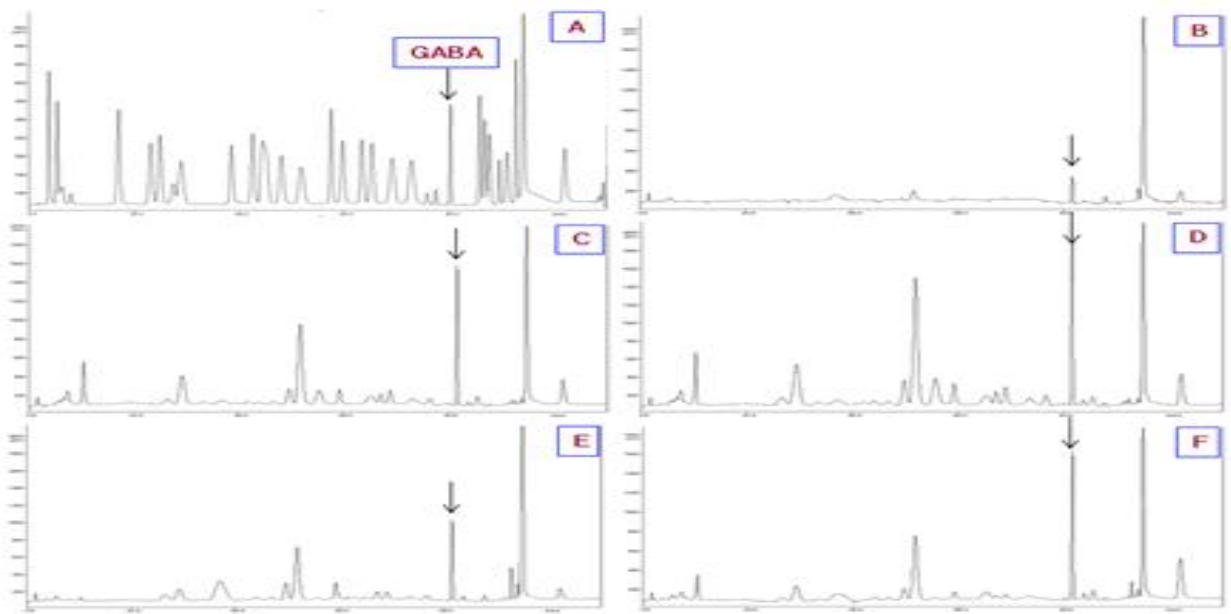
GABA 분석을 위해 먼저 정성적 분석방법으로 TLC 분석 결과를 통해 GABA의 정성적으로 확인 하였다.



<그림38 . 분리홍국균의 활성평가>

(나) 정량평가

GABA 함량이 2단발효시 발효전보다 120mg/kg이 더 증가된 945mg/kg 으로 조사되었다.



<그림39 . 분리홍국균의 활성평가>

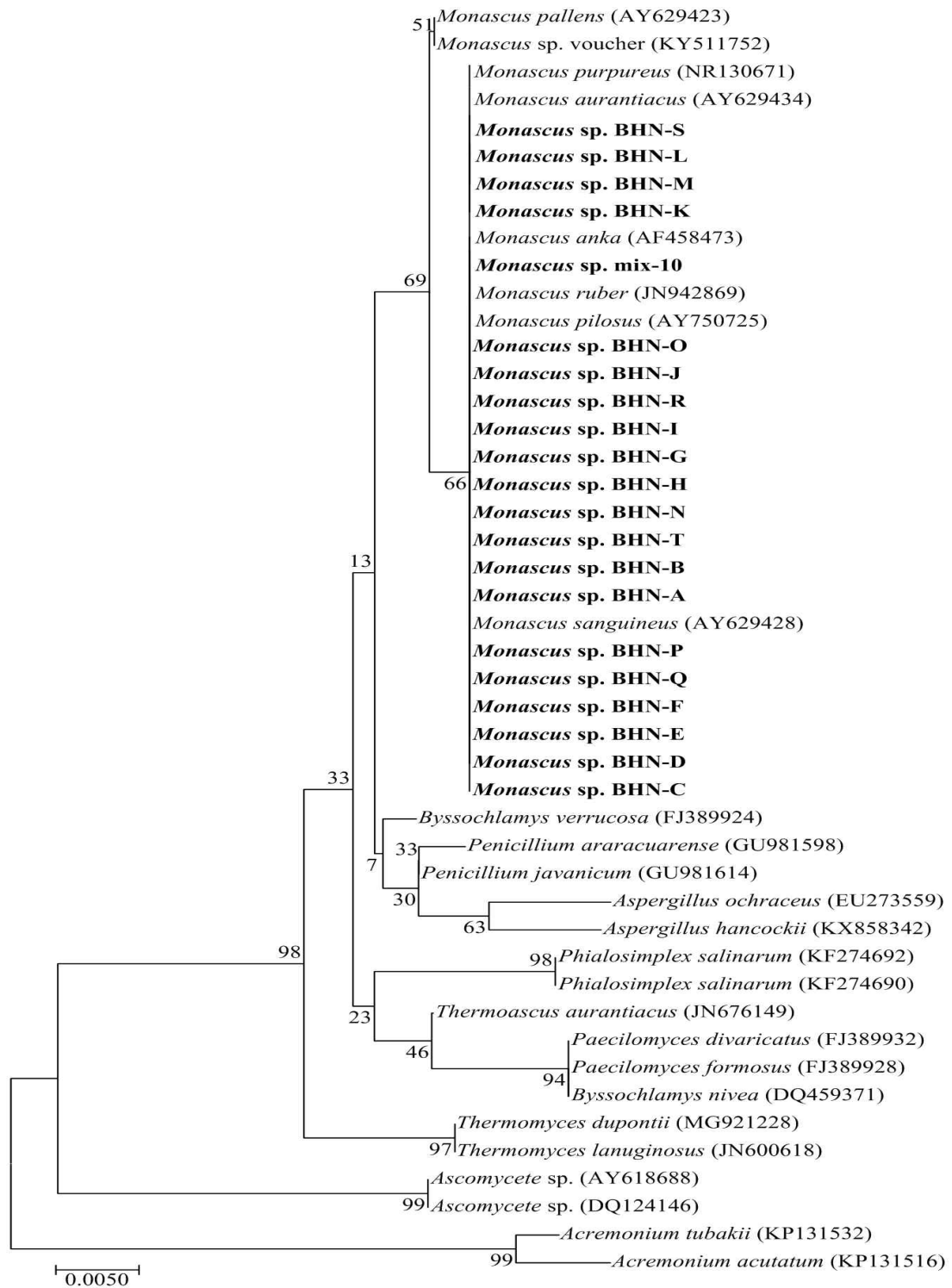
(13) 대량생산 공정개선을 위한 균주 및 배양방법 탐색

(가) *Monascus* sp. 동정

본 연구팀이 확보한 홍국균 21종의 ITS rRNA gene, 18S rRNA gene, 26S rRNA gene 의 염기서열을 분석하였다. 21종의 홍국 발효균의 ITS rRNA gene을 분석한 결과 모두 *Monascus* sp.와 유사도 99%를 갖는 것으로 분석되었다. 또한, 분석된 ITS rRNA gene 를 이용하여 유전적 계통도를 분석한 결과, *Monascus* sp.에 속하고, *M. purpureus*, *M. aurantiacus*, *M. ruber*, *M. pilosus*, *M. sanguineus*등과 같은 species 수준에서 함께 포함되는 것을 확인하였다<(표 9., 그림 40.>.

<표9. 홍국발효균의 ITS rRNA gene의 BLAST 결과>

	Accession no.	Description	Similarity
A	HM188439	<i>Monascus purpureus</i> isolate M11 ITS 1, 5.8S rRNA gene	100%
B	HM188439	<i>Monascus purpureus</i> isolate M11 ITS 1, 5.8S rRNA gene	100%
C	HM188440	<i>Monascus purpureus</i> isolate M4 ITS 1, 5.8S rRNA gene	100%
D	HM188440	<i>Monascus purpureus</i> isolate M4 ITS 1, 5.8S rRNA gene	100%
E	HM188440	<i>Monascus purpureus</i> isolate M4 ITS 1, 5.8S rRNA gene	100%
F	HM188440	<i>Monascus purpureus</i> isolate M4 ITS 1, 5.8S rRNA gene	100%
G	HM188439	<i>Monascus purpureus</i> isolate M11 ITS 1, 5.8S rRNA gene	100%
H	HM188439	<i>Monascus purpureus</i> isolate M11 ITS 1, 5.8S rRNA gene	99%
I	HM188439	<i>Monascus purpureus</i> isolate M11 ITS 1, 5.8S rRNA gene	99%
J	HM188439	<i>Monascus purpureus</i> isolate M11 ITS 1, 5.8S rRNA gene	99%
K	HM188439	<i>Monascus purpureus</i> isolate M11 ITS 1, 5.8S rRNA gene	99%
L	HM188439	<i>Monascus purpureus</i> isolate M11 ITS 1, 5.8S rRNA gene	99%
M	HM188439	<i>Monascus purpureus</i> isolate M11 ITS 1, 5.8S rRNA gene	99%
N	HM188440	<i>Monascus purpureus</i> isolate M4 ITS 1, 5.8S rRNA gene	99%
O	HM188439	<i>Monascus purpureus</i> isolate M11 ITS 1, 5.8S rRNA gene	99%
P	HM188439	<i>Monascus purpureus</i> isolate M11 ITS 1, 5.8S rRNA gene	99%
Q	HM188439	<i>Monascus purpureus</i> isolate M11 ITS 1, 5.8S rRNA gene	99%
R	HM188440	<i>Monascus purpureus</i> isolate M4 ITS 1, 5.8S rRNA gene	99%
S	HM188439	<i>Monascus purpureus</i> isolate M11 ITS 1, 5.8S rRNA gene	99%
mix-10	HM188440	<i>Monascus purpureus</i> isolate M4 ITS 1, 5.8S rRNA gene	99%

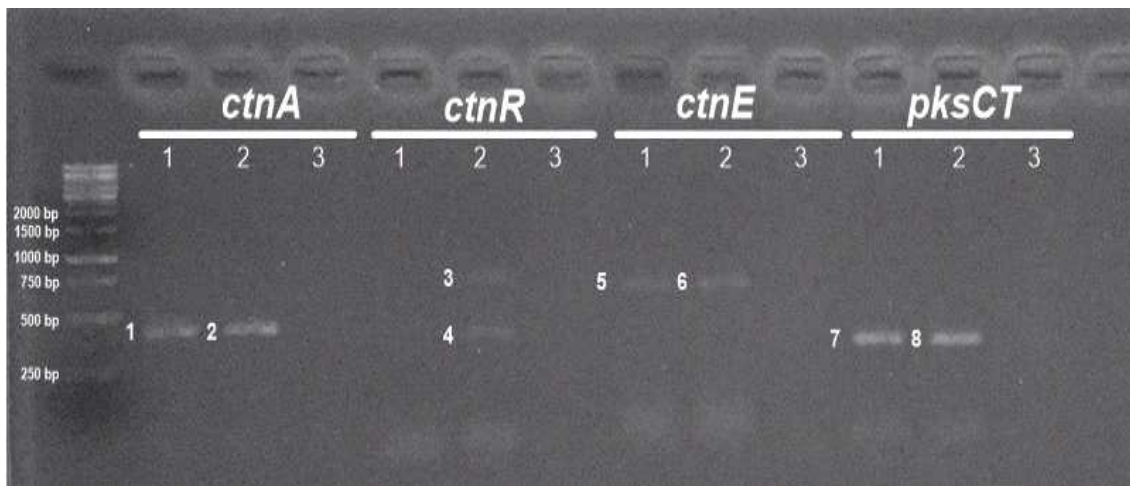


<그림40. 홍콩발효균의 유전적 계통도>

(나) Citrinin 생합성 관련 유전자 *ctnA* gene 검출

홍국균이 생산하는 가장 대표적인 생리활성물질로서 monacolinK (lovastatin)가 잘 알려져 있으며 이 물질은 cholesterol 합성에 관여하는 효소인 HMG-CoA (3-Hydroxy-3-Methyl Glutaryl CoA) reductase의 활성을 저해하여 혈중 cholesterol 저하작용을 갖는 것으로 알려져 있다. Citrinin은 홍국배양 시 색소와 함께 생성되는 mycotoxin 의 일종으로 항균 효과가 있으나 여러 동물에서 신장독성을 유발한다고 알려져 있어, 식약처에서는 홍국제품의 citrinin 함량을 0.05 mg/kg 이하로 제한하고 있다. 이에 따라 발효과정 중 citrinin 생성량을 감소시킬 수 있는 균주를 선별하는 매우 중요하다. 이는 citrinin을 생성하지 않고 고농도의 monacolin K를 생성하는 유용한 균주를 선별하여 건강기능식품 및 소재 개발에 보다 적극적으로 활용이 가능할 것으로 판단된다. 이를 위해, citrinin 생성하지 않는 *Monascus* sp. 선별하기 위해 배양과 분석을 통해 이루어지고 있지만, 본 연구팀에서는 citrinin 생성 관여유전자 탐색을 통해 유용균주 선별을 위한 분자마커를 활용하여 citrinin을 생성하지 않는 균주를 선별하고자 하였다. 현재까지 보고된 *Monascus* sp.의 key citrinin biosynthesis related gene은 *pksCT* (polyketide synthase), *ctnA* (transcriptional regulator), *orfB* (oxygenase)로 보고되어, 본 연구에서는 *ctnA* gene과 *pksCT* gene을 선택적으로 선별이 가능한 PCR primer를 제작하였다.

citrinin 생합성 관련 유전자 탐색을 위한 PCR primer 4 set를 확인한 결과 *ctnA* F/R, *ctnE* F/R, *pksCT* F/R은 단일 PCR 증폭 산물을 생성하였으며, *ctnR* F/R은 두 개의 밴드를 생성하는 것을 확인하였다.



<그림41. citrinin-related genes fragments 탐색을 위한 PCR>

증폭된 PCR 산물이 citrinin 생합성관련 유전자인지 확인하기 위해 8개의 밴드를 회수하여 염기서열을 결정하였다. 결정된 염기서열을 BLAST로 분석한 결과, 모든 밴드가 *Monascus* sp. citrinin biosynthesis gene cluster로 분석되었으며, PCR을 통해 citrinin 관련 유전자를 탐색할 수 있을 것으로 판단하였다.

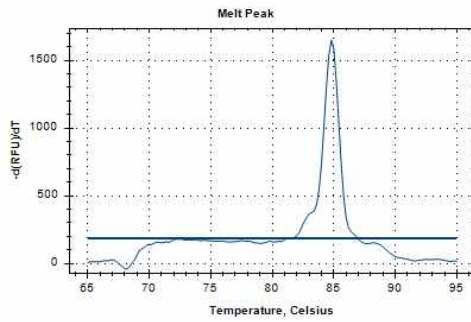
<표10. citrinin-related genes PCR fragments 증폭산물 BLAST search 결과>

Band	Accession no.	Descript	Similarity
1	EU309474	<i>Monascus aurantiacus</i> citrinin biosynthesis gene cluster	99.81%
	KT781075	<i>Monascus ruber</i> isolate M7 citrinin biosynthesis gene cluster	100.00%
2	EU309474	<i>Monascus aurantiacus</i> citrinin biosynthesis gene cluster	100.00%
	KT781075	<i>Monascus ruber</i> isolate M7 citrinin biosynthesis gene cluster	100.00%
3	KT781075	<i>Monascus ruber</i> isolate M7 citrinin biosynthesis gene cluster	100.00%
	HQ123043	<i>Monascus ruber</i> strain M7 citrinin biosynthesis transcriptional activator (<i>ctnA</i>) gene	100.00%
4	KT781075	<i>Monascus ruber</i> isolate M7 citrinin biosynthesis gene cluster	100.00%
	HQ123043	<i>Monascus ruber</i> strain M7 citrinin biosynthesis transcriptional activator (<i>ctnA</i>) gene	100.00%
5	EU309474	<i>Monascus aurantiacus</i> citrinin biosynthesis gene cluster	99.54%
	KT781075	<i>Monascus ruber</i> isolate M7 citrinin biosynthesis gene cluster	99.43%
6	EU309474	<i>Monascus aurantiacus</i> citrinin biosynthesis gene cluster	99.77%
	KT781075	<i>Monascus ruber</i> isolate M7 citrinin biosynthesis gene cluster	99.66%
7	AY954027	<i>Monascus purpureus</i> citrinin polyketide synthase (<i>pksCT</i>) gene	99.97%
	EU309474	<i>Monascus aurantiacus</i> citrinin biosynthesis gene cluster	100.00%
8	AY954027	<i>Monascus purpureus</i> citrinin polyketide synthase (<i>pksCT</i>) gene	99.97%
	EU309474	<i>Monascus aurantiacus</i> citrinin biosynthesis gene cluster	100.00%

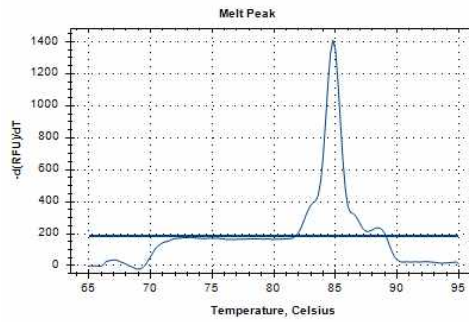
또한, 염기서열 결정을 위해 cloning된 plasmid는 Real-time PCR을 이용한 probe로 활용이 가능한지 melting curve분석을 수행하였다. Real time PCR의 melting curve 분석을 통해, citrinin 생합성관련 유전자가 포함된 plasmid를 정량분석에 활용할 수 있는지 검토한 결과 *ctnA* plasmid와 *ctnR* plasmid는 annealing temp. 65.7°C에서, *ctnE* plasmid와 *pksCT* plasmid는 annealing temp. 68.5°C에서 1 peak를 확인하였다. 향후 citrinin 생합성 유전자의 발현을 상대 및 절대 정량할 때 위 조건을 이용하여 분석할 수 있을 것으로 판단된다.

ctnA gene clone: ctnA F/R

65.7°C

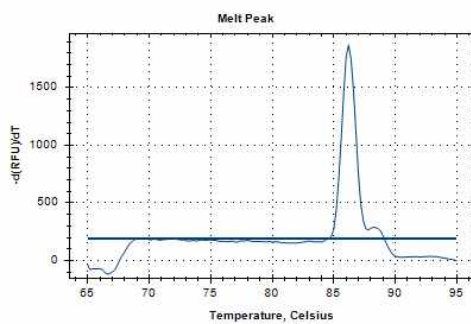


67.5°C

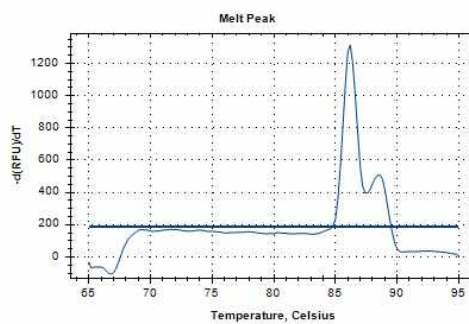


ctnR gene clone: ctnR F/R

65.7°C

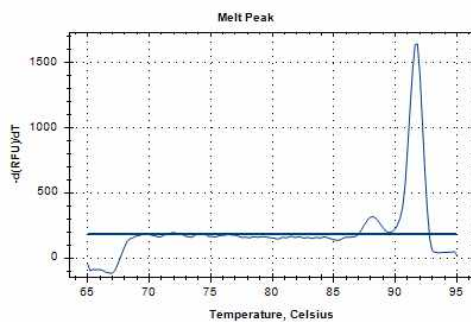


67.5°C

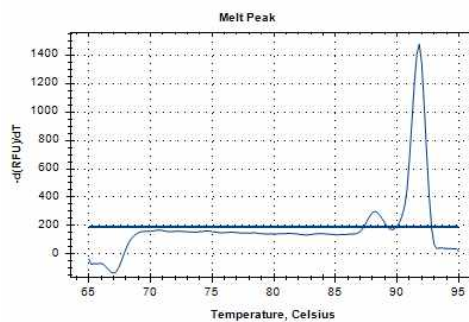


ctnE gene clone: ctnE F/R

68.5°C

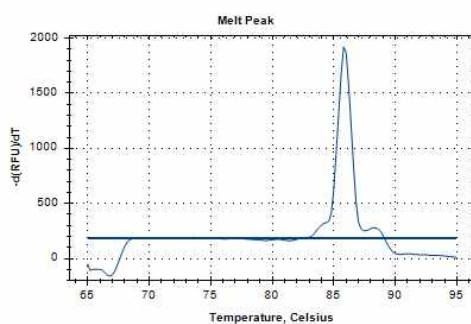


69.0°C

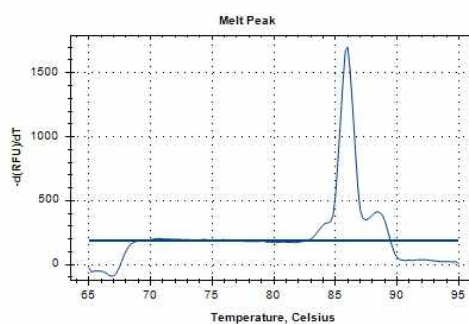


pksCT gene clone: pksCT F/R

68.5°C



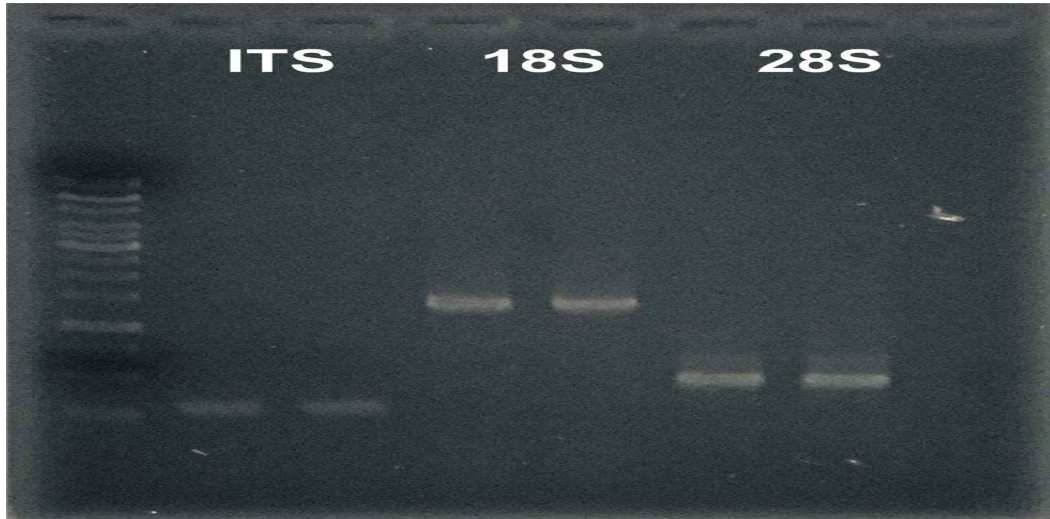
69.0°C



<그림42. citrinin-related genes clone melting curve 분석>

(다) *Monascus* sp. BHN-mix 10

본 연구팀에서 citrinin을 생성하지 않은 홍국균을 선별하여, 미생물동정을 수행하여 각각 500 bp, 1300 bp, 500 bp의 PCR 증폭산물을 확인하였다(그림). PCR 증폭산물을 아가로스겔에서 분리·정제하여 cloning 한 후, 염기서열을 결정하였다.

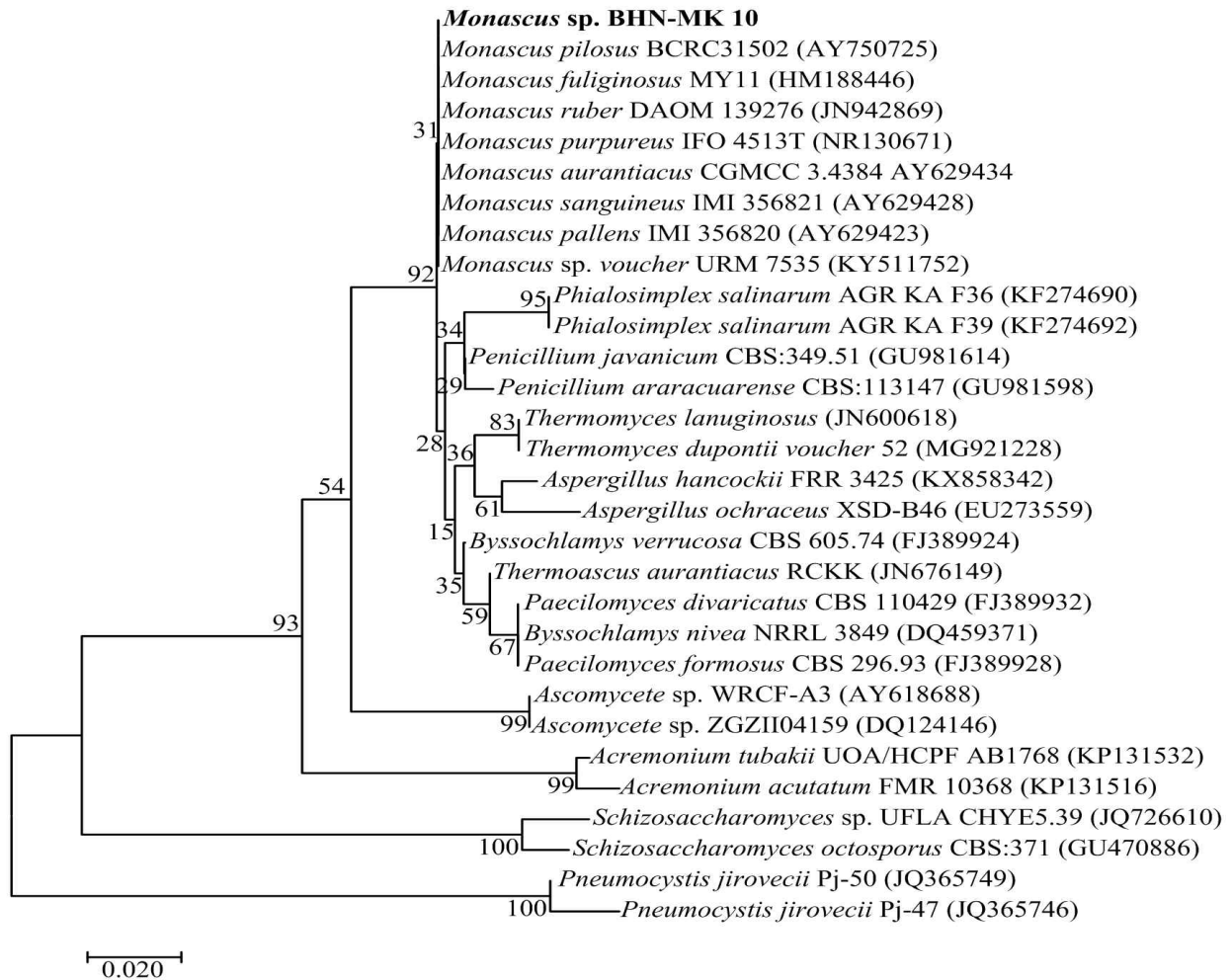


<그림43. *Monascus* sp. BHN-mix 10의 rRNA gene PCR product>

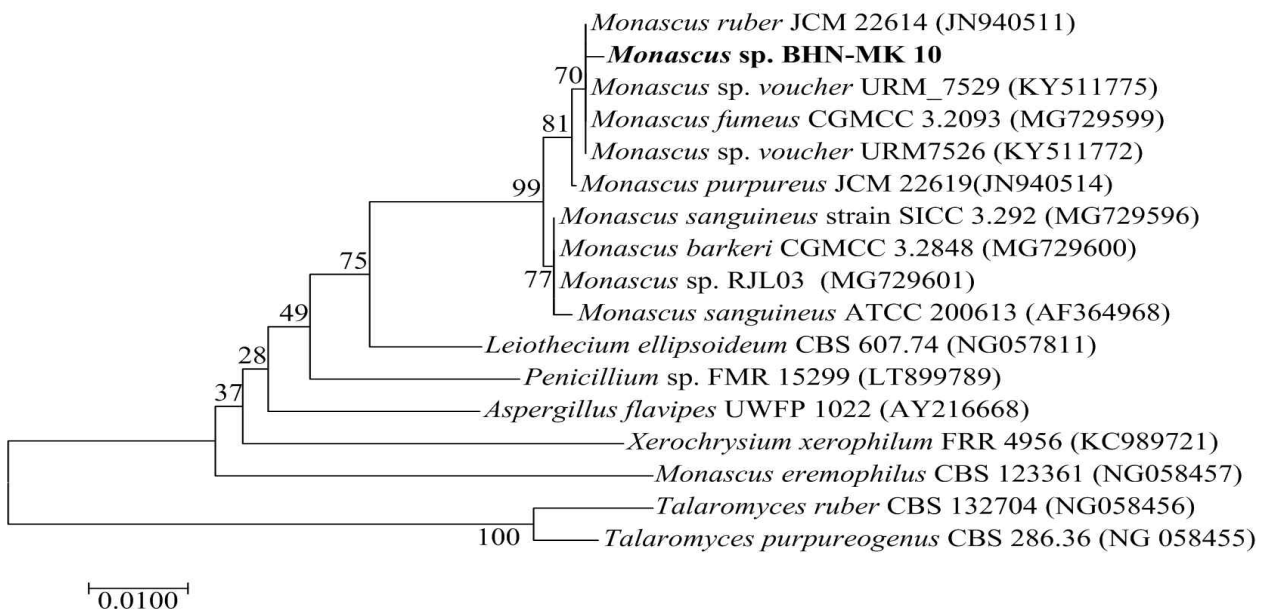
염기서열결정을 통해 분석된 *Monascus* sp. BHN-MK 10은 *Monascus ruber*와 가장 높은 상동성을 갖는 것으로 확인되었다(표). 또한, 유전적 상관도를 분석한 결과 *Monascus* sp.에 위치한 것을 확인하였다(그림).

<표11. *Monascus* sp. BHN-MK 10의 rRNA gene 염기서열 BLAST search 결과>

	Accession	Description	Similarity
28S	MH876218	<i>Monascus ruber</i> CBS 127970 28S rRNA gene	99.84%
	JN940511	<i>Monascus ruber</i> JCM 22614 28S ribosomal RNA	99.84%
18S	KX999557	<i>Monascus ruber</i> SDCP1 18S rRNA gene	99.48%
	JN940456	<i>Monascus pilosus</i> JCM 22613 18S rRNA gene	99.48%
ITS	MH864780	<i>Monascus ruber</i> CBS 127970 ITS1	100.00%
	MG654472	<i>Monascus albidulus</i> CGMCC 3.568 ITS1	100.00%

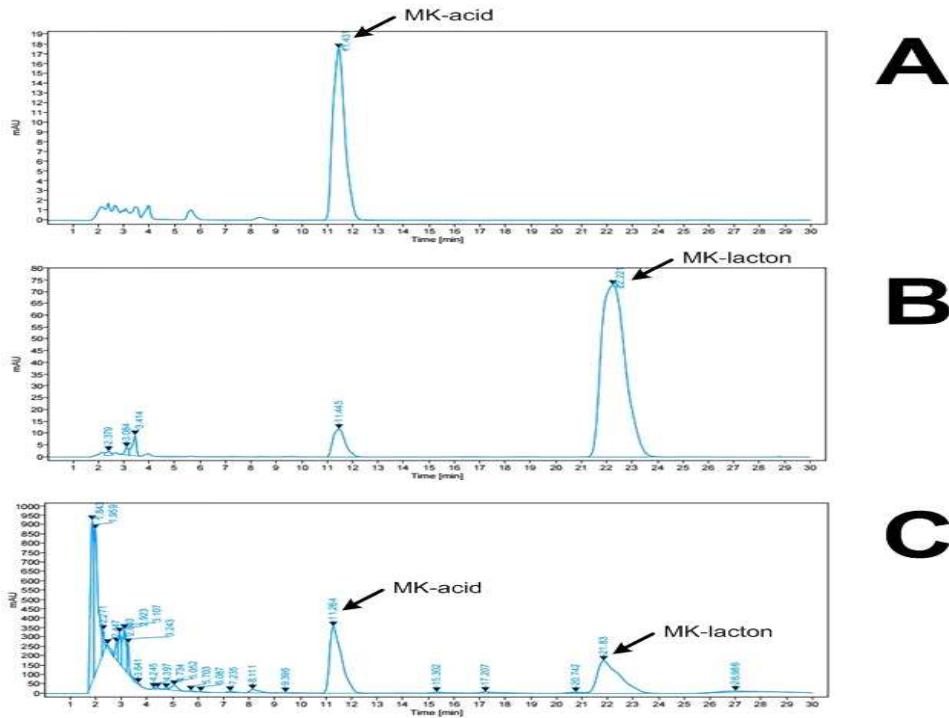


<그림44. *Monascus* sp. BHN-MK 10 ITS rRNA gene을 통한 유전적 계통도>

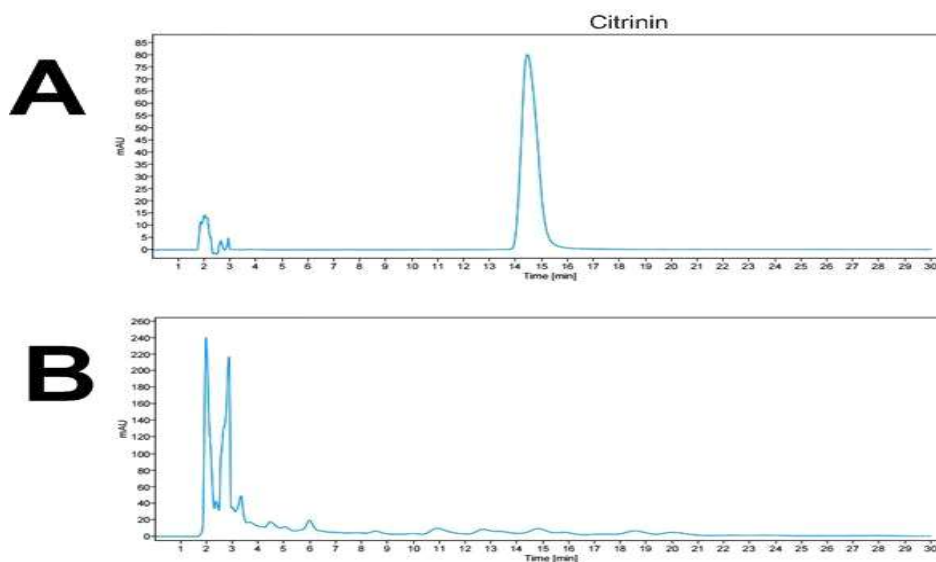


<그림45. *Monascus* sp. BHN-MK 10 26 rRNA gene을 통한 유전적 계통도>

Monascus sp. BHN-MK 10은 쌀을 기질로 하여 홍국을 생산하며, monacolin-K를 생산하는 것을 확인하였다. Monacolin-K는 acid form과 lacton form의 두가지 구조를 가지고 있으며, HPLC 분석을 통해 각각 분석할 수 있다. *Monascus* sp. BHN-MK 10로 생산된 홍국을 추출하여 분석한 결과, acid form과 lacton form을 모두 생산하는 것을 확인할 수 있었다. 또한, 매우 특이적인 것은 *Monascus* sp. BHN-MK 10으로 생산된 홍국 추출물에서는 citrinin이 검출되지 않음을 HPLC 분석을 통해 확인하였다.



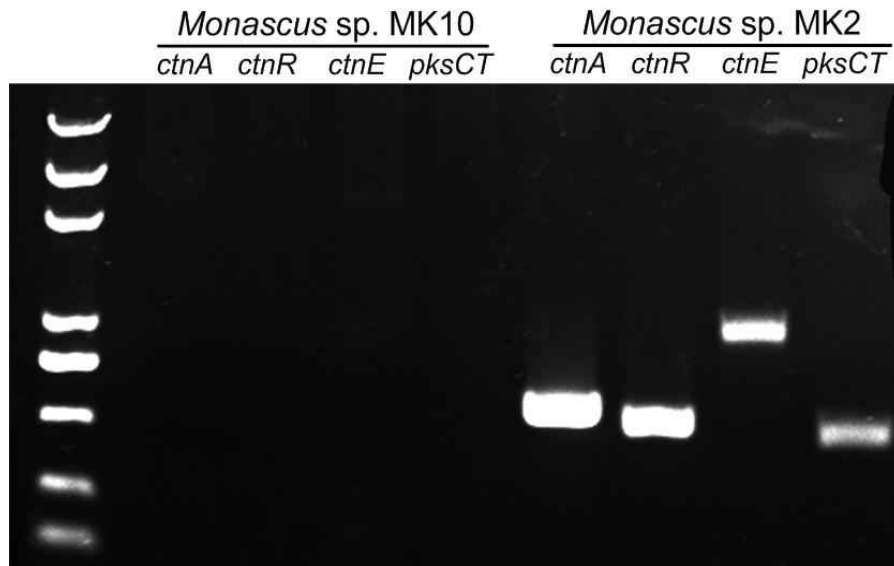
<그림46. Monacolin-K standard (A; acid form & B; lacton form)과 *Monascus* sp. BHN-MK 10으로 발효된 홍국추출물의 HPLC 분석>



<그림47. Citrinin standard (A: 500 ppm)과 *Monascus* sp. BHN-MK 10으로 발효된 홍국추출물의 HPLC 분석>

(라) *Monascus* sp. BHN-MK 10의 citrinin 생합성관련 유전자 탐색

HPLC 분석을 통해 *Monascus* sp. BHN-MK10이 citrinin을 생성하지 않은 것을 확인하였다. 추가적으로 citrinin 생합성관련 유전자를 검출할 수 있는 probe를 제작하였으며, citrinin 합성 균주인 *Monascus* sp. MK2와 유전적 차이를 확인하고자 PCR을 수행하였다. Citrinin 합성균주인 *Monascus* sp. MK2는 *ctnA*, *ctnR*, *ctnE*, *pksCT* gene을 모두 확인할 수 있었으나, *Monascus* sp. BHN-MK 10은 *ctnA*, *ctnR*, *ctnE*, *pksCT* gene이 증폭되지 않았다. 이를 통해 *Monascus* sp. BHN-MK 10은 citrinin 합성유전자의 부재로 인해 citrinin이 생성되지 않음을 확인할 수 있었다. 이를 통해 *Monascus* sp. BHN-MK 10을 활용한 홍국의 대량생산을 통해 보다 안전한 건강기능식품 및 소재를 생산할 수 있을 것으로 판단된다.

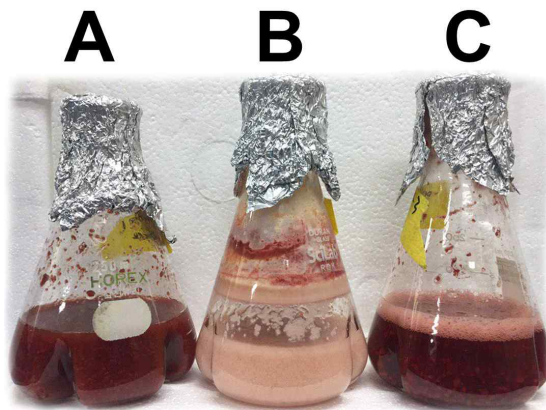


<그림50. PCR amplification result of citrinin-related genes of citrinin non-producing *Monascus* sp. MK10 & citrinin producing *Monascus* sp. MK2>

(마) *Monascus* sp. BHN-MK 10의 색소 생산 및 대량 배양을 위한 배지조성 탐색

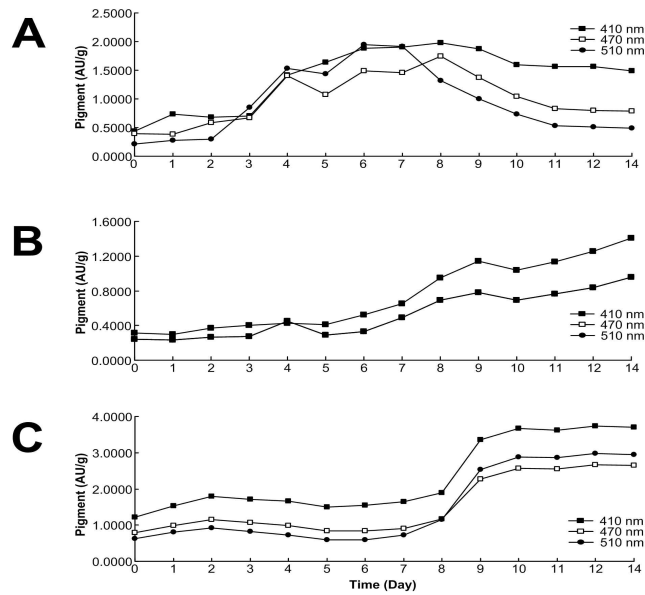
색소는 식품, 의약품, 화장품 그리고 의류염색 등 매우 다양한 용도로 이용되어져 왔으며, 그 중에서도 특히 식품에 있어서 색소는 관능성을 높여 제품의 가치를 높이고, 소비자의 충동과 식용을 돋우어 주는 중요한 역할을 한다. 홍국은 적색, 황색, 오렌지색의 색소가 알려져 있다. 적색의 색소는 N-glucosylrubropunctamine과 N-glucosylmonascorubramine이, 오렌지 색소는 rubropunctatin과 monascorubrin이 규명되었다. 또한 황색의 색소는 monasin과 ankaflavin이 규명되어 보고되었다. 또한, *Monascus* 색소는 항암, 항돌변, 항염, 항균, 콜레스테롤 저해등의 기능들이 보고되었다. *Monascus* sp.를 이용한 천연색소 및 그 밖의 이차대사산물 생산은 현재 쌀을 이용한 고체배양이 일반화되어 있으며, 액체배양에 의해 생산된 색소는 용혈반응에서 음성으로 나타나 유해성이 없음이 확인되었으며, 홍국색소생산과 균사체 생산성에 관한 연구는 아직 미진한 상태에 있다. 사상균을 대량 배양할 때 일반적으로 포자접종법을 사용하는 것이 일반적이지만 홍국균은 포자형성능력이 약하여 포자접종방법으로 홍국균을 대량 배양하는 것은 매우 어려우므로 홍국균을 액체배지에 배양하여 홍국균의 균사체를 직접 접종하는 균사체 접종법이 유리하다.

색소 생산을 위한 배지는 1.5% peptone, 0.1% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.25% KH_2PO_4 에 8% carbon sources (glucose, corn starch, rice flour)를 이용하였으며, *Monascus* sp. BHN-MK 10을 14일간 배양하여 색소 생산능을 확인하였다. 배양 14일 후 corn starch를 제외하고 rice flour와 glucose에서 높은 적색의 색소를 확인할 수 있었다.



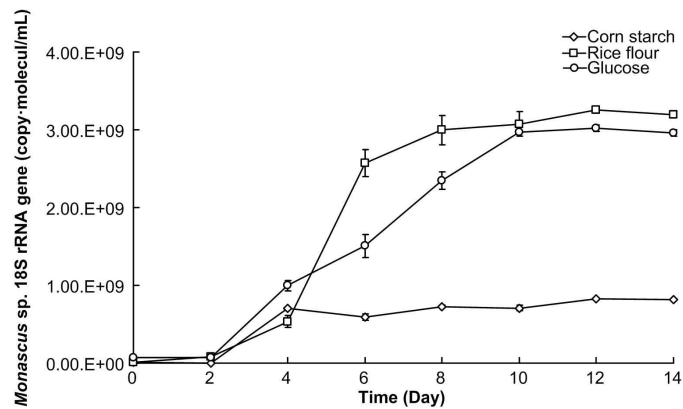
<그림51. 탄소원에 따른 배양플라스크 (A; glucose, B; corn starch, C; rice flour)>

분광광도계를 이용한 색소를 측정 한 결과, glucose 배양액에서 색소가 빠르게 증가되었으나 배양 7일이후부터 감소되는 경향이 관찰되었다. 또한, rice flour 을 이용한 배양액에서는 배양 8일부터 색소의 생산이 증대되었으며, 배양 10 일 이후에는 농도가 유지되었다. 그러나, corn starch 배양액에서는 매우 낮은 색소량과 증가량을 확인 할 수 있었다(그림).



<그림52. 탄소원에 따른 색소 생산량 (A; glucose, B; corn starch, C; rice flour). Yellow; 410 nm, orange; 470 nm, red; 510 nm>

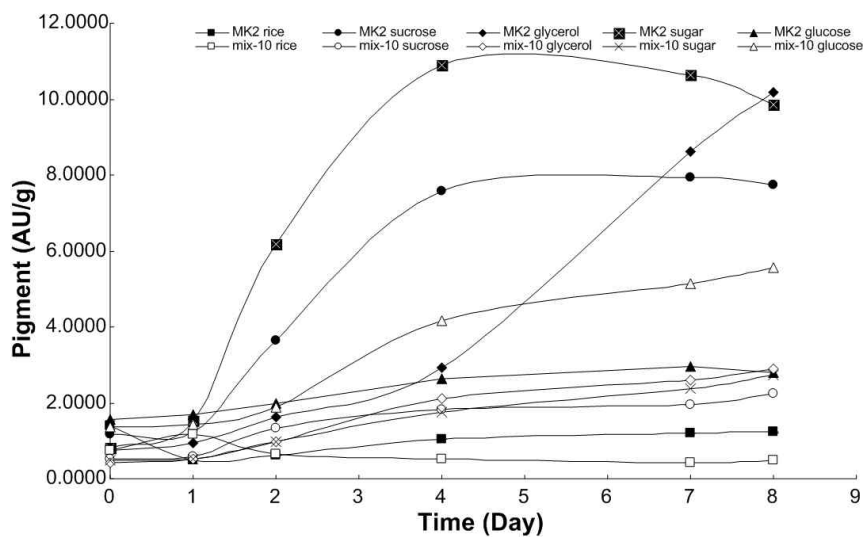
QRT-PCR을 통해 배양 기간동안의 *Monascus* sp. BHN-MK 10의 생장을 확인하였다. *Monascus* sp. BHN-MK 10의 18S rRNA gene을 정량에 이용하였으며, 절대정량 분석법을 이용하여 배양 기간동안의 홍국균의 성장곡선을 확인하였다(그림). 배양 초기 접종량은 2.67 ± 10^6 copy·molecules/ul였으며, corn starch의 경우 배양 4일 후부터 배양 종료시점까지 10^8 copy·molecules/ul로 유지되는 것을 확인하였다. 그러나, rice flour를 포함한 배양액은 배양 4일부터 대수증식기를 거치며 배양 8일이후로는 10^9 copy·molecules/ul가 유지되는 것을 확인할 수 있다. 또한, glucose 배양액은 배양 2일부터 지속적으로 증가되어 배양 10일까지 지속적으로 생장이 일어났으며, 10일 이후 유지되는 것을 확인할 수 있다.



<그림53. *Moanscus* sp. BHN-MK 10 18S rRNA gene의 Real time-PCR>

(바) *Monascus* sp. BHN-MK 10과 *Monascus* sp. MK2의 색소 생산능 비교

Citrinin의 용해도는 ethanol 2 mg/ml, DMSO와 DMF에 약 20 mg/ml로 보고되었으며, 물에는 녹해되지 않는다. 이에, *Monascus* sp. 배양액내에 citrinin은 존재하지 않고, 미생물 생체내에 존재한다. 이에, 색소생산을 위해서는 색소성장이 우수한 균주를 선별하고자 *Monascus* sp. BHN-MK 10과 *Monascus* sp. MK2의 색소 생산과 탄소원에 따른 색소 생산을 확인하였다. 탄소원은 rie flour, sucrose, glycerol, 설탕, glucose로 총 5종의 탄소원을 수행하였다. *Monascus* sp. MK2가 BHN-MK 10보다 매우 높은 색소생산량을 확인하였다. 색소 생산에 있어 *Monascus* sp. BHN-MK 10은 MK2에 비해 매우 낮은 생산량을 보여, citrinin이 없이 monacolin K를 생산할 수 있는 우수성외에 색소 생산에서는 우수성은 확인할 수 없었다. *Monascus* sp. MK2의 색소 생산에 있어 glucose와 rice flour는 우수한 기질이 되지 못하며, sucrose, glycerol, 설탕이 우수함을 확인하였다. 이중, 설탕을 이용할 경우 배양 2일부터 급격하게 색소의 양이 증가하였으며, 다른 기질보다 월등함을 확인하였다. 또한, glycerol은 배양 초기에는 낮은 색소 생산량을 보이지만 배양 시간이 길어질수록 지속적으로 증가하는 것을 확인하였다. 대량배양의 경우 배양시간에 따라 경제성이 감소됨으로 설탕이 가장 우수한 기질임을 확인하였으며, glycerol을 이용할 경우 장기배양시에 색소의 생산량의 변화를 향후 분석할 필요성이 있을 것으로 판단된다.



<그림54. *Monascus* sp. BHN-MK 10과 MK2의 탄소원에 따른 색소 생산량>

(14) 발효선식/음료 시제품 개발

제2협동기고나 (재)경북바이오산업연구원 주관하에 발효선식 및 음료에 들어 가는 원료 및 기본 배합비를 설정 하였다.

(15) 균주등록

선별된 BHN-LAB MK01 은 바이오팩트(대전)에 의뢰하여 18S rRNA gene 동정 결과 모나스커스 퍼푸레우스(*Monascus purpureus*) BHN-LAB MK01 로 확인 되었으며 2018년 9월 18일자로 한국생명공학연구원 생물자원센터에 기탁 하였다(기탁번호 KCTC13646BP),

BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL RECOGNITION OF THE DEPOSIT
OF MICROORGANISMS FOR THE PURPOSES OF PATENT PROCEDURE

INTERNATIONAL FORM

RECEIPT IN THE CASE OF AN ORIGINAL DEPOSIT


issued pursuant to Rule 7.1

TO: BHN BIO Inc.

BHNEO Inc.

52, Sincheoksan-dan 1-ro, Deoksan-myeon, Jimcheon-gun, Chungcheongbuk-do

Republic of Korea

I. IDENTIFICATION OF THE MICROORGANISM	
Identification reference given by the DEPOSITOR: <i>Monascus purpureus</i> BHN-MK 01	Accession number given by the INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY: KCTC 13646BP
II. SCIENTIFIC DESCRIPTION AND/OR PROPOSED TAXONOMIC DESIGNATION	
The microorganism identified under I above was accompanied by: <input type="checkbox"/> a scientific description <input type="checkbox"/> a proposed taxonomic designation (Mark with a cross where applicable)	
III. RECEIPT AND ACCEPTANCE	
This International Depositary Authority accepts the microorganism identified under I above, which was received by it on September 18, 2018 .	
IV. RECEIPT OF REQUEST FOR CONVERSION	
The microorganism identified under I above was received by this International Depositary Authority on and a request to convert the original deposit to a deposit under the Budapest Treaty was received by it on	
V. INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY	
Name: Korean Collection for Type Cultures Address: Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology (KRIBB) 181, Ipsin-gil, Jeongeup-si, Jeollabuk-do 56212 Republic of Korea	Signature(s) of person(s) having the power to represent the International Depositary Authority or of authorized official(s):  KIM, Cha Young, Director Date: September 18, 2018

Form BF/4 (KCTC Form 17)

no. page

(16) 특허출원

특허균주 모나스커스 퍼퓨레우스(*Monascus purpureus*) BHN-LAB MK01을 이용하여 홍국쌀의 연구에 결과에 따른 발명명칭 ‘신규 균주 홍국균 BHN-MK01의 발효산물과 이를 유효성분으로 함유하는 당뇨병 또는 지방간 개선 및 이용 식품 조성물 및 그 제조방법’을 2018.10.30. 출원번호 10-2018-0131008로 접수 완료 하였다.

출원번호통지서

출원일자	2018.10.30
특기사항	심사청구(무) 공개신청(무)
출원번호	10-2018-0131008 (접수번호 1-1-2018-1073847-92)
출원인명칭	주식회사 비에이치앤바이오(1-2016-006434-7)
대리인성명	이덕복(9-1998-000461-7)
발명자성명	이중복 김병혁 윤여초 김종규 이준형 박예은 정수진 권기석
발명의명칭	신규 균주 홍국균 BHN-MK01의 발효산물과 이를 유효성분으로 함유하는 당뇨병 또는 지방간 개선 및 예방용 식품 조성물 및 그 제조방법

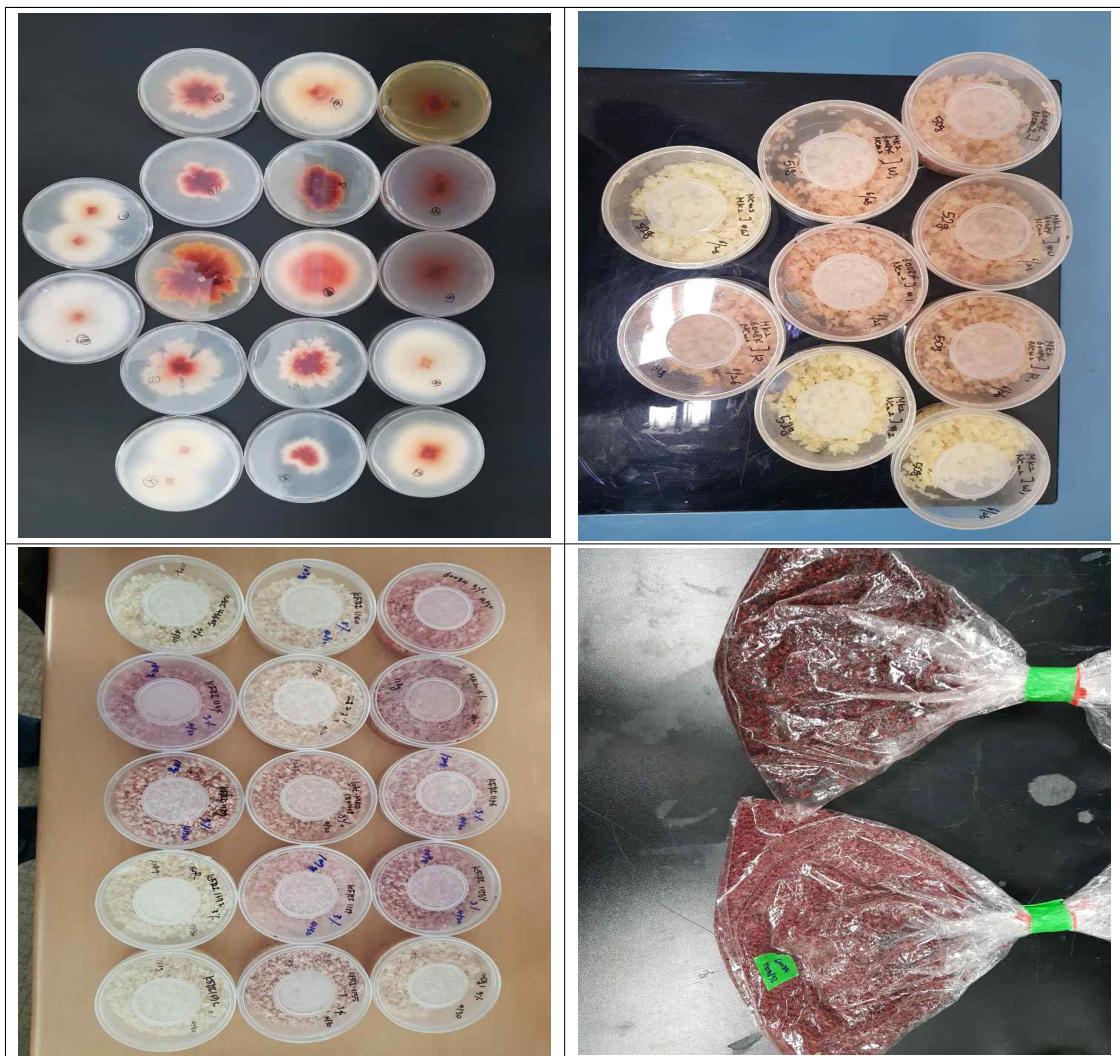
특 허 청 장

3-2. 제1협동기관 : 한스바이오

가. 제1협동기관 연구결과

(1) 배지조성 결과

홍국쌀 개발을 위한 종균 배양 조건을 위해 쌀 분말과 glucose 함량에 따른 변화를 조사 결과 lin 배지에 쌀분말 3% glucose 5% 첨가시 가장 좋은 균사 성장 활성을 확인하였다.



<그림55 . 홍국균 배지조성에 따른 성장 비교>

(2) 홍국쌀 배양 최적화

배양 온도를 실험한 결과 배양 시 28℃ 시보다 30℃에서 성장이 더 좋은 것으로 조사되어 최적온도를 30℃로 설정하여 배양하였다.



<그림56 . 홍국쌀 배양온도 설정>

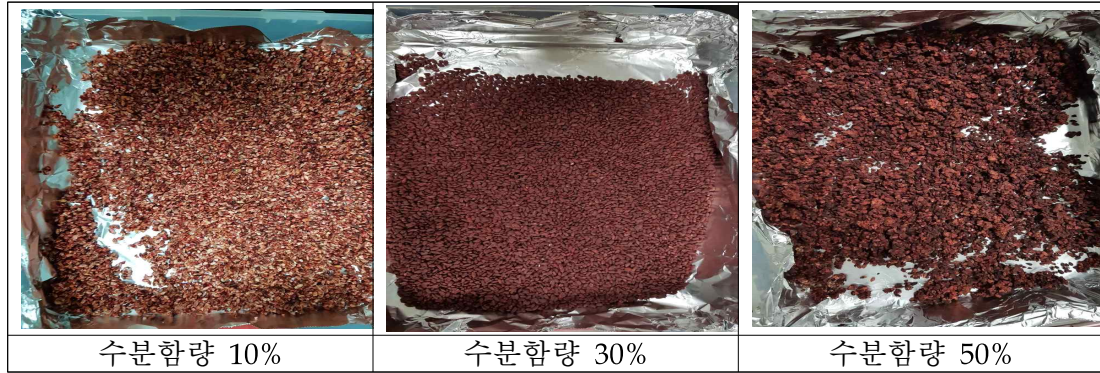
호화시간, 배양시간을 조사한 결과 호화시간은 침지시간 20분 물빼기 20분으로 121℃에서 30분가 증자하여 배양한. 배양시간은 10일 배양이 가장 최적함으로 조사되었다.



<그림57 . 홍국쌀 호화시간/배양시간에 따른 성장 비교>

(다) 수분함량에 따른 성장 비교

수분 함량에 따른 배양 조건을 확인한 결과 30% 함유시 가장 좋은 결과를 보였다. 10% 수분조건에서는 균 성장이 느리게 나타났으며, 수분 30%일 때 균 성장이 알맞게 골고루 나타났고 수분 50%일때 균 성장과 더불어 쌀끼리 붙는 경향이 높게 나타났다.



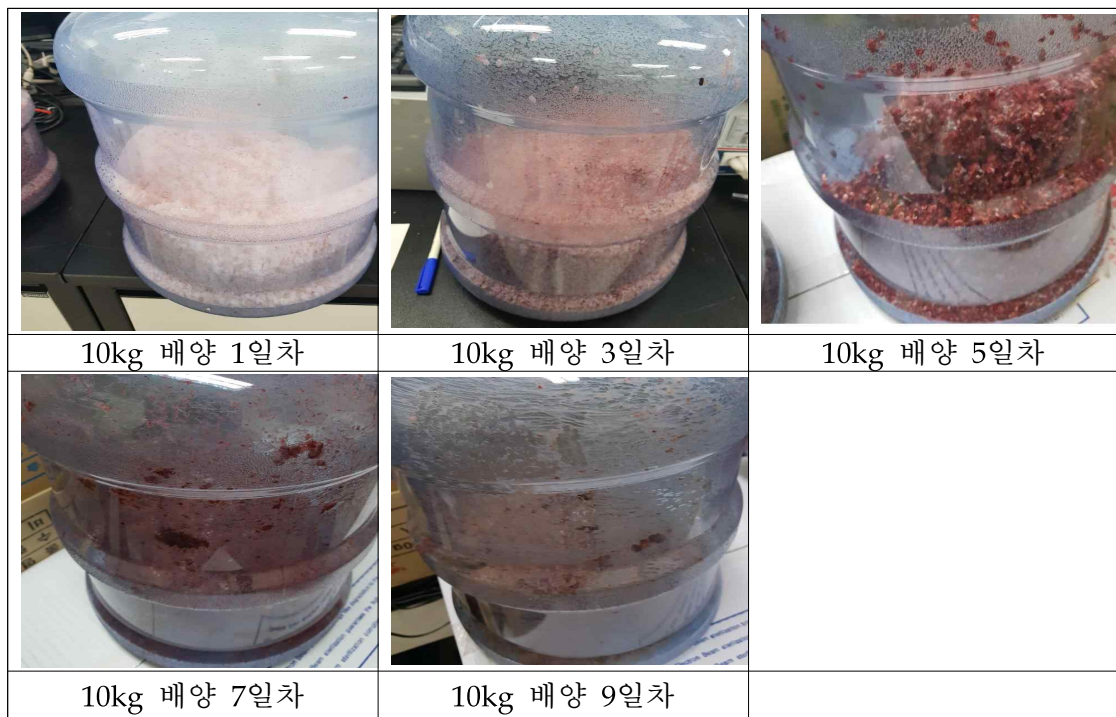
<그림58 . 홍국쌀 수분함량에 따른 성장 비교>

(라) 홍국쌀 배양 최적화

홍국쌀 배양 최적화를 위하여 배양 시간을 실험한 결과 28℃에서 7~8일간 배양 할때가 가장 좋은 성장 모습을 보였으며, 배양 시간이 짧을수록 홍국균의 성장이 느렸으며, 배양시간이 길수록 홍국균의 성장이 활발하였다.

(마) 홍국쌀 대량배양

1~5kg 배양시에는 균주활성이 좋고 오염도가 적었으나 10kg 배양시 균주활성이 무분별하게 나타났으며, 오염도가 높게 나타나 추후 대량생산에 대한 추가적인 연구가 더 필요할 것으로 판단되었다.



<그림59 . 홍국쌀 수분함량에 따른 성장 비교>

3-3. 제2협동기관 : (재)경북바이오산업연구원

가. 제2협동기관 연구결과

(1) 홍국쌀 분쇄 조건 탐색

열풍 건조가 완료된 홍국쌀을 이용하여 핀밀을 이용한 분쇄 조건 탐색을 수하였으며, 분쇄기는 본 연구원에 구축하여 보유하고 있는 핀밀을 이용 속도 별, 메쉬망별 분말 형태를 비교 분석하였다.



<그림60. 홍국쌀 수분함량에 따른 성장 비교>

그 결과 홍국쌀을 핀밀 원료 공급모터 3이상 속도로 가동하였을 경우 다량의 홍국쌀이 공급되어 체 내에 다량이 체류하게 되어 분쇄 작업의 속도가 나지 않고 내부에 열이 발생하여 분말제품에 영향을 주며, 따라서 원료 공급 모터를 2이하로 유지하여 적절한 공급을 유지하는 것이 가장 좋았다.

분쇄기의 망은 80mesh, 100mesh, 120mesh를 활용하여 분말도 등 전반적인 사항을 검토 한 결과 체망의 체류와 원료의 망 끼임 발생이 적은 80mesh가 가장 좋았고, 100mesh 이상에서는 망에 원료 분쇄물이 끼거나 열에 의한 덩어리가 생기는 현상이 발생하여 여러번 작업을 해야 했으며, 이로 인한 수율이 급격히 떨어짐을 확인되었으며 최종 본 선식 레시피 실험에는 핀밀 80mesh 망을 이용한 홍국분말을 이용하였다.





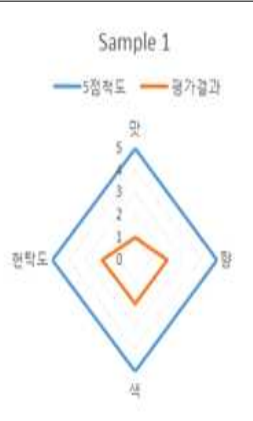
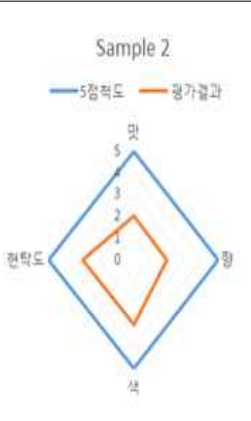
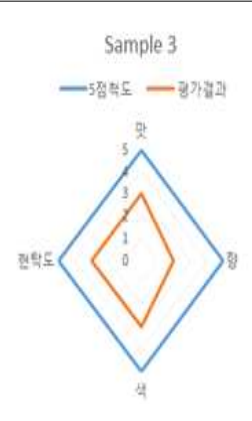
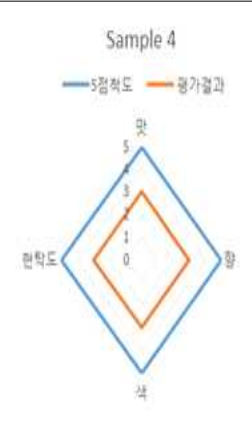
(2) 맞춤형 선식 제형 실험

(가) 선식 원료

Test 1.(sample 1)	Test 1.(sample 1)
<p>홍국쌀 분말 3%, 곡류분말(28%, 찹쌀현미 분말, 보리분말, 흑미분말, 울무분말), 옥수수분말 7%, 혼합탈지분유 10%, 난소화성말토덱스트린 15%, 비타민미네랄 혼합분말 5%, 프락토올리고당 10%, 자일리톨 8%, 효소처리스테비오사이드 1%, 오디, 꾸지뽕, 뽕잎.</p>	<p>홍국쌀 분말 3%, 곡류분말(38%, 찹쌀현미 분말, 메밀분말, 보리분말, 흑미분말, 울무분말), 감초분말 5%, 옥수수분말 5%, 혼합탈지분유 10%, 난소화성말토덱스트린 13%, 비타민미네랄 혼합분말 0.5%, 프락토올리고당 10%, 자일리톨 6%, 수크랄로스 0.5%, 오디, 꾸지뽕, 뽕잎.</p>
Test 3.(sample 3)	Test 4.(sample 4)
<p>홍국쌀 분말 3%, 곡류분말(47.8%, 찹쌀현미 분말, 메밀분말, 보리분말, 흑미분말, 울무분말), 감초분말 5%, 옥수수분말 5%, 혼합탈지분유 10%, 난소화성말토덱스트린 13%, 비타민미네랄 혼합분말 0.5%, 프락토올리고당 10%, 수크랄로스 0.5%, 오디, 꾸지뽕, 뽕잎.</p>	<p>홍국쌀 분말 3%, 곡류분말(49%, 찹쌀현미 분말, 메밀분말, 보리분말, 흑미분말, 울무분말), 감초분말 5%, 옥수수분말 5%, 혼합탈지분유 10%, 난소화성말토덱스트린 15%, 비타민미네랄 혼합분말 0.1%, 프락토올리고당 5%, 수크랄로스 0.1%, 오디, 꾸지뽕, 뽕잎.</p>
Test 5.(sample 5)	
<p>홍국쌀 분말 3%, 곡류분말(45%, 찹쌀현미 분말, 메밀분말, 보리분말, 흑미분말, 울무분말), 감초분말 1%, 옥수수분말 7%, 혼합탈지분유 10%, 난소화성말토덱스트린 15%, 비타민미네랄 혼합분말 0.1%, 프락토올리고당 5%, 자일리톨 2%, 오디, 꾸지뽕, 뽕잎.</p>	

(나) 관능평가

- 각각의 원료를 지퍼백에 넣어 5min이상~10min이하 일정한 시간 흔들어 완전하게 mixing이 되도록
- Sample 1번과 2번의 경우 올리고당과 자일리톨, 천연감미료가 복합적으로 과량이 사용이 되어 맛에 있어 단맛이 과하게 느껴지고 비타민미네랄의 과량 사용에 따른 쓴맛이 강하게 나타났다.
- 강한 단맛을 일정부분 조정하고 천연물 중 단맛을 낼 수 있는 감초분말을 넣어 단맛을 보충할 수 있도록 실험을 수행하였다.
- 현재 실험 부형제로 사용중인 곡류의 경우 전부 roasting이 되지 않은 재료인 분말제품으로 맛과 향을 개선하기에는 한계가 있고 또한 환자가 섭취하였을 경우 소화에 어려움을 겪게될 소지가 있으며, 따라서 추후 곡류의 경우 roasting 된 혼합곡류나 개별 곡류를 구입하여 맛과 향이 개선된 제품을 개발할 예정
- 본 연구원에서 보유하고 있는 주걱형 혼합장비는 분말혼합 공급장치가 부착되어 있지 않은 단순 회전체의 혼합기로 혼합기를 가동하기 위해서는 각 원료 분말을 미리 소정의 비율로 정량하여 둔 후 혼합 비율에 맞게 투입하여 사용하여야 하며, 또한 원료중 덩어리 짐이 있는 분말의 경우 미리 체로 쳐서 혼합을 원활하게 해 주어야 한다.
주걱형 혼합기의 경우 바닥면과 주걱 임펠러간의 약간의 간격이 생겨 주기적, 인위적으로 작업자가 교반을 해 주어서 최상의 혼합분말을 얻어야 하며 교반 시간은 최소 20min이상을 유지시켜 주는 것이 좋게 판단된다.

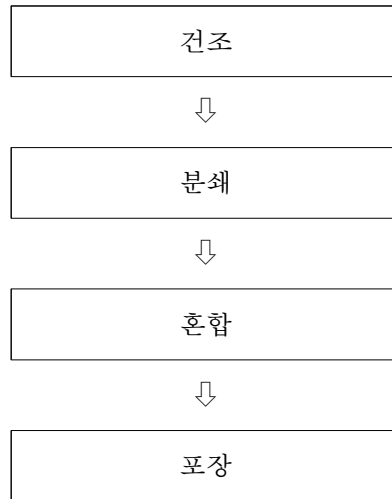
sample 1	sample 2	sample 3	sample 4
			
sample 1	sample 2	sample 3	sample 4
<p>Sample 1</p> <p>— 5점 척도 — 평가결과</p> 	<p>Sample 2</p> <p>— 5점 척도 — 평가결과</p> 	<p>Sample 3</p> <p>— 5점 척도 — 평가결과</p> 	<p>Sample 4</p> <p>— 5점 척도 — 평가결과</p> 

<그림61. 홍국선식 관능평가>

(다) 당뇨병 환자식 맞춤형 선식 시제품 공정개발

가. 분말 타입 선식 시제품 공정 개발

시제품 생산공정 개발에 따른 공정도는 홍국쌀 및 곡류의 건조→분쇄→혼합
→포장으로 원료의 분말화, 혼합도, 포장 방법 등을 바탕으로 시제품 공정을
구성하였다.

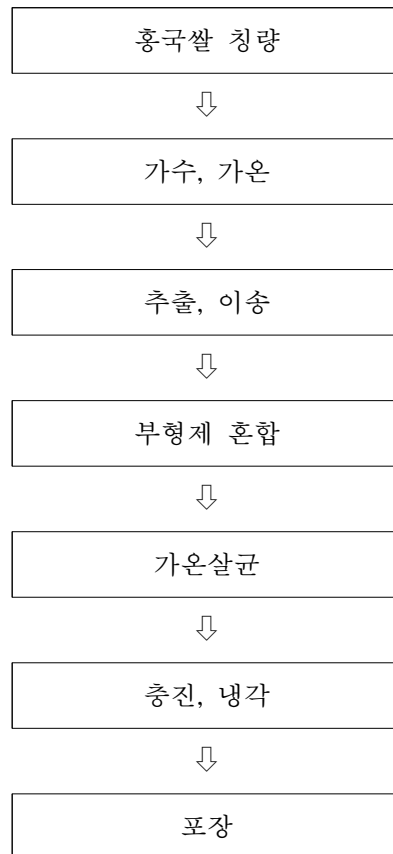


< 시제품 공정 모식도 >

(라) 음료 제조를 위한 레시피 개발

가. 음료 시제품 공정 개발

발효 홍국쌀을 가로×세로, 50×70cm 크기의 추출 부직포 망에 넣어 추출 온도 60°C, 24hr over night 시켜 추출 시킨 후 팽화 및 호화된 발효 홍국쌀 추출물을 고액 분리를 위해 1mm filter와 0.45 μ m filter를 이용하여 여과하였고 이를 이용한 최적의 음료 제조테스트를 수행하였다.



< 음료 공정 모식도 >

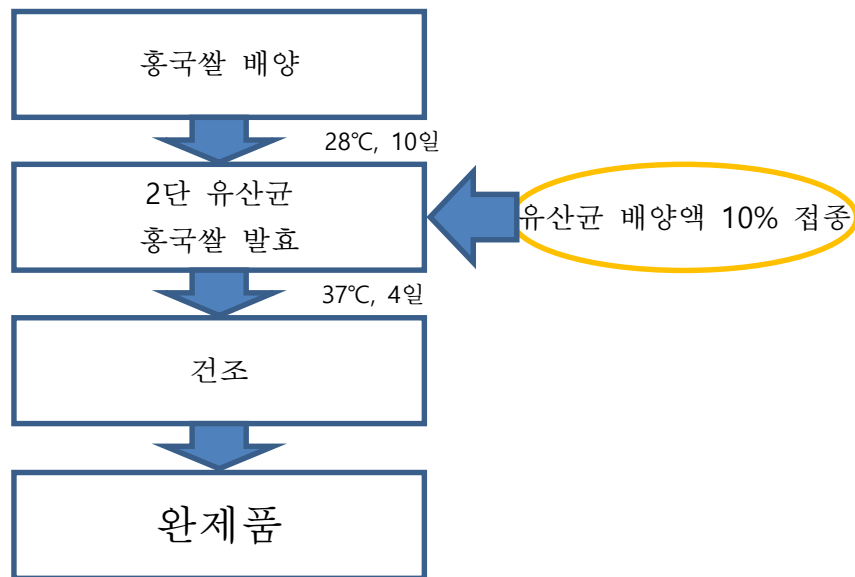


4. 2차년도 연구결과

4-1. 주관기관 : (주)비에이치엔바이오

가. 2단발효 대량생산공정 개발

(1) 국쌀의 GABA 증진을 위해 2단 발효를 진행하였다. 먼저 홍국쌀을 28℃에 10일간 전 배양을 한 후 제품화를 위해 건조를 거쳐 제품화를 완성하지만, 2단 발효를 위해 발효가 완료된 홍국쌀에 유산균 배양액 10%를 접종하여 37℃에서 4일간 발효를 진행한다. 건조된 홍국쌀을 이용하여 발효시 수분 함량 조절이 어려워 발효가 완료된 홍국쌀을 바로 이용하여, 4일간 유산균 발효를 진행하여 GABA 함량이 증가된 2단 발효 홍국쌀을 완성하였다. 2단 발효가 완성된 홍국쌀을 건조한 후 시제품으로 개발 완료하였다. 발효 시 수분 함량을 30%이므로 계속 조절을 하여야 홍국균주가 균일하게 증식할 수 있으므로, 온도 조절보다 수분 조절이 본 배양의 가장 큰 관건으로 나타났다. 균질 배양을 위해선 고체발효기를 이용하여 자세한 연구를 더 진행하여야 할 것으로 사료된다.



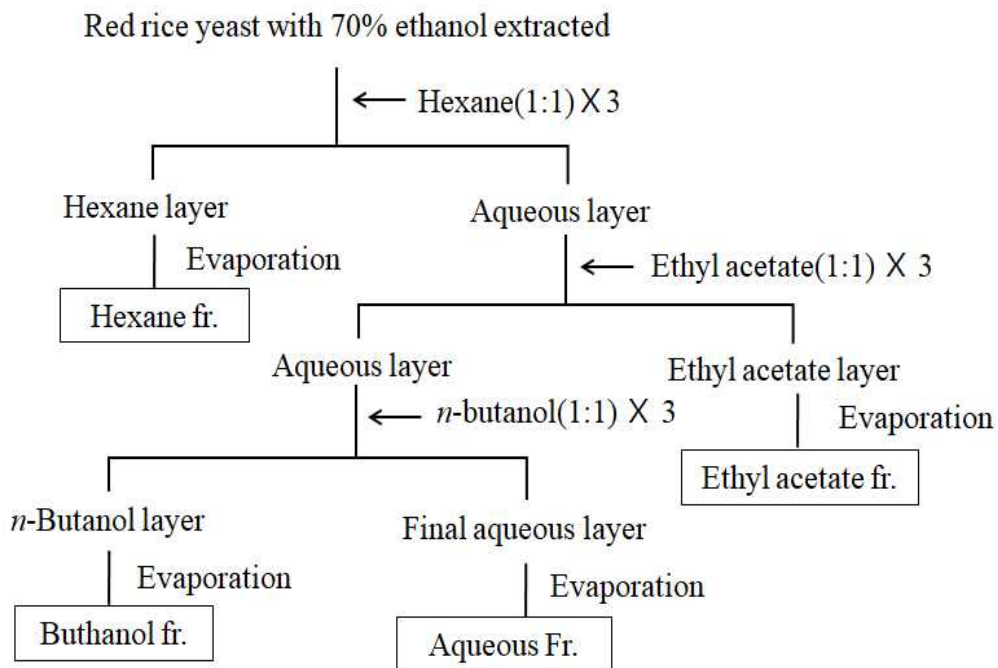
<2단발효 홍국쌀 생산과정의 표준화 공정 모식도>

나. *in vitro* 효능 연구결과

(1) 홍국 용매분획물 제조

홍국 에탄올추출분말을 제조하기 위해 먼저 실온에 보관되어진 홍국쌀을 일정량을 취하여 마쇄하였다. 마쇄된 홍국에 5배에 해당하는 70%에탄올 더해 섞고 80℃에서 60분 동안 추출하였다. 추출물은 여과(No. 2, Whatman) 후 감압 농축하여 용매를 없애고 동결 건조하여 분말로 만들었다.

홍국70%에탄올 추출물분말을 순차 용매 분획하기 위해 추출물에 증류수를 넣어 분액 여두에 넣은 다음 hexane을 증류수와 같은 부피로 넣어 각각 3회씩 추출하여 얻은 hexane 층을 농축하여 Hexane 분획물로 하였다. Hexane 분획 후 남은 하층부를 ethyl acetate로 3회 추출하고 농축하여 ethyl acetate 분획물로 하였다. Buthanol을 사용하여 동일한 방법으로 buthanol 분획물을 얻었으며 최종적으로 남은 하층부를 수층 분획물로 하였다. 각 순차 용매 분획물은 건물량 기준으로 수율을 확인하고 제조된 추출분말은 밀봉하여 -20℃ 냉동에 보관하면서 시험시료로 사용하였다.

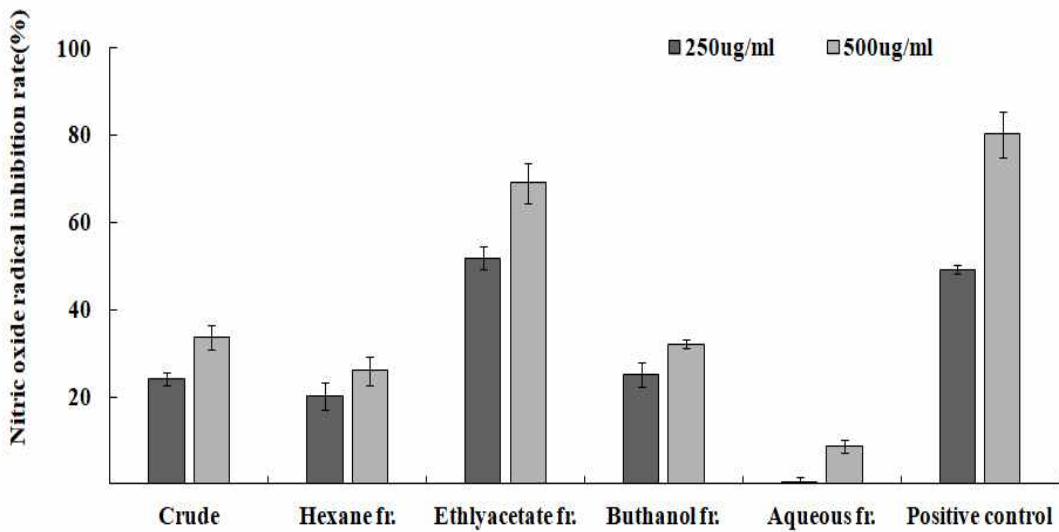


<그림62. 홍국추출물과 용매분획도>

(2) 홍국 용매분획물 Nitric Oxide radical (NO) 활성평가

홍국 70%에탄올 추출물(Crude)과 추출물의 용매분획물을 250ug/ml, 500ug/ml의 농도로 Nitric Oxide radical 저해능 측정 결과 에탄올추출물에서 각 24.02±1.51%, 33.78±2.79%로 확인되었고, 용매분획물 Hexane fr., Ethylacetate

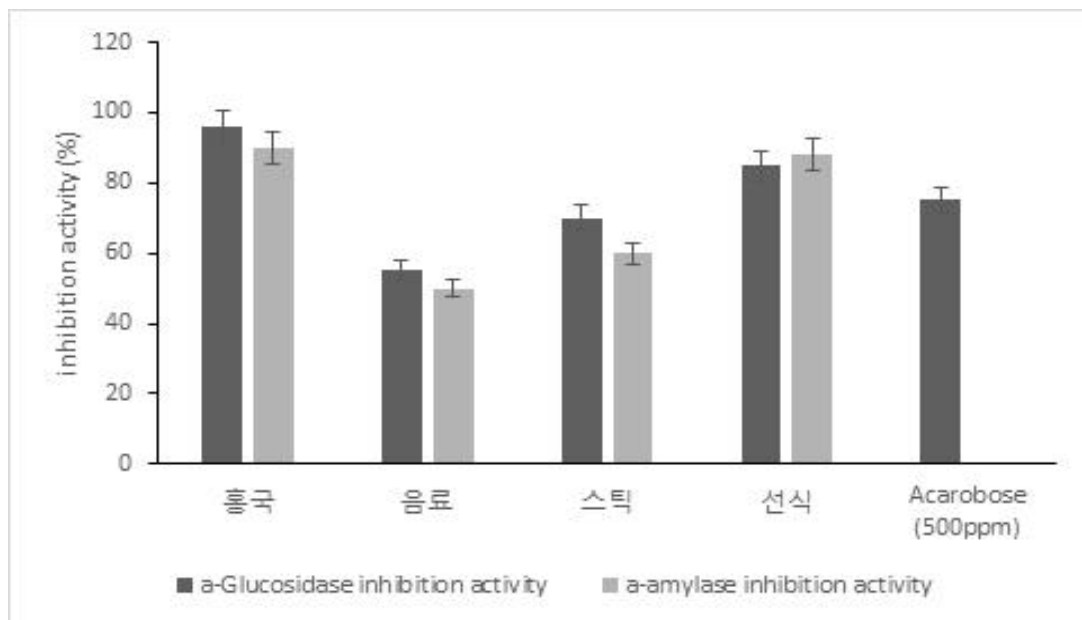
fr., Buthanol fr. 및 Aqueous fr.은 250ug/ml에서 각각 20.16±3.1%, 51.89±2.71%, 25.11±2.82%, 0.58±0.98%으로, 500ug/ml에서 각각 25.96±3.26, 69.05±4.73%, 32.07±0.99%, 8.73±1.45%으로 측정되었다. 홍국 70%에탄올 추출물 보다 ethly acetate과 buthanol로 용매분획한 Ethly acetate fr., Buthanol fr.의 활성이 높은 것으로 확인되었으며 Ethly acetate fr.이 실험실시한 시험군중 가장 높은 활성을 보였다(그림 2). 따라서 홍국 70%에탄올 추출물과 용매분획물 중 Ethly acetate fr., Buthanol fr.은 생체 내에서 아질산염과 아민반응에 의한 nitrosamine 생성을 억제하는데 효과가 있는 것으로 사료된다.



<그림63. 홍국 70%에탄올 추출물과 용매분획된 추출물의 nitric oxide radical inhibition rate>

(3) 시제품 α -glucosidase 및 α -amylase 활성평가

시제품의 α -glucosidase 및 α -amylase 활성 저해능조사 결과 음료는 α -glucosidase 및 α -amylase 활성 저해능이 53.1%, 50%로, 스틱제품은 α -glucosidase 및 α -amylase 활성 저해능이 82.84%, 77.5%와 시제품인 선식은 α -glucosidase 및 α -amylase 활성 저해능이 85%와 88%로 각각 조사되었으며, 선식의 경우 대조구인 Acarbose 500ppm 보다 10%이상 더 높은 것으로 조사되었다, 이러한 결과는 본 시제품을 섭취하였을 때 효소학적 결과로 항당뇨활성을 예방할 수 있을 것으로 사료된다. 이 등(2014)이 보고한 잠곡당화음료를 이용한 항당뇨활성 평가에서는 21%의 활성억제율을 보인다고 보고 하였으나, 본 홍국을 이용한 음료는 55%의 저해활성으로 보다 높게 나타났다.

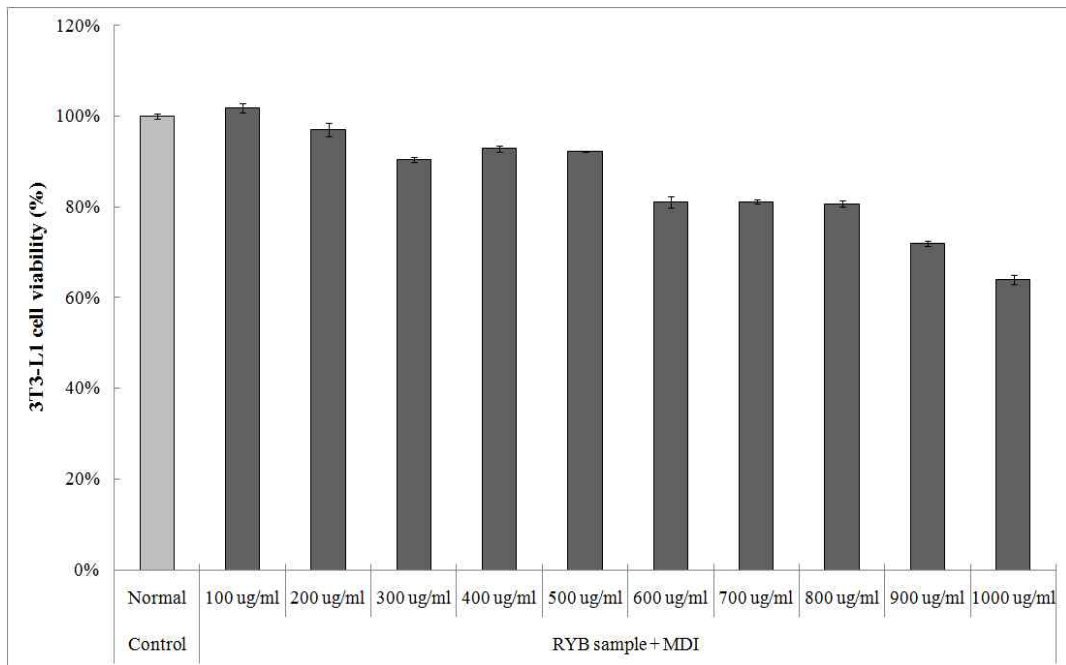


<그림64. 시제품 α -glucosidase 및 α -amylase 활성평가결과>

(4) 홍국보리 3T3-L1 항비만 효능평가

(가) 홍국균으로 발효한 보리의 세포 독성 평가

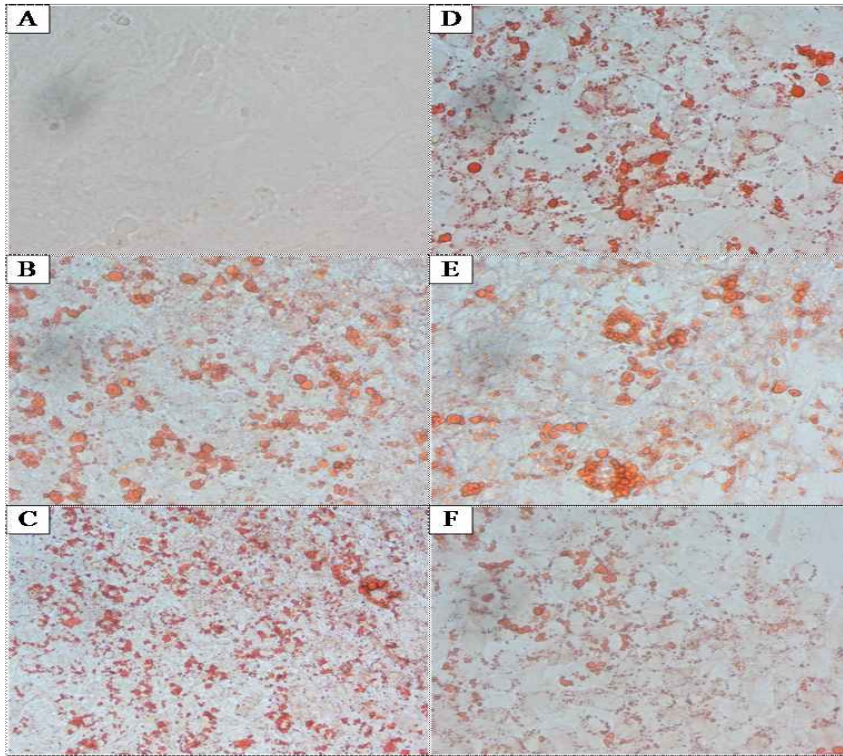
홍국균으로 발효한 보리의 70% 주정 추출물이 세포 생존율에 미치는 영향을 조사하기 위해 MTT assay를 통해 세포 독성을 확인하였다. 세포 배양 배지와 지방분화유도 물질인 insulin, dexamethasone 그리고 IBMX (이하 MDI), 그리고 각 농도별 시료를 48시간 동안 3T3-L1 전지방세포에 처리하였다. 그 결과 추출물을 처리하지 않은 대조군(Control)의 세포 생존율과 비교하여 홍국균으로 발효한 보리의 70% 주정 추출물을 100 ug/ml 부터 800 ug/ml 까지의 농도로 처리한 군에서는 세포 독성이 나타나지 않음을 확인하였다.



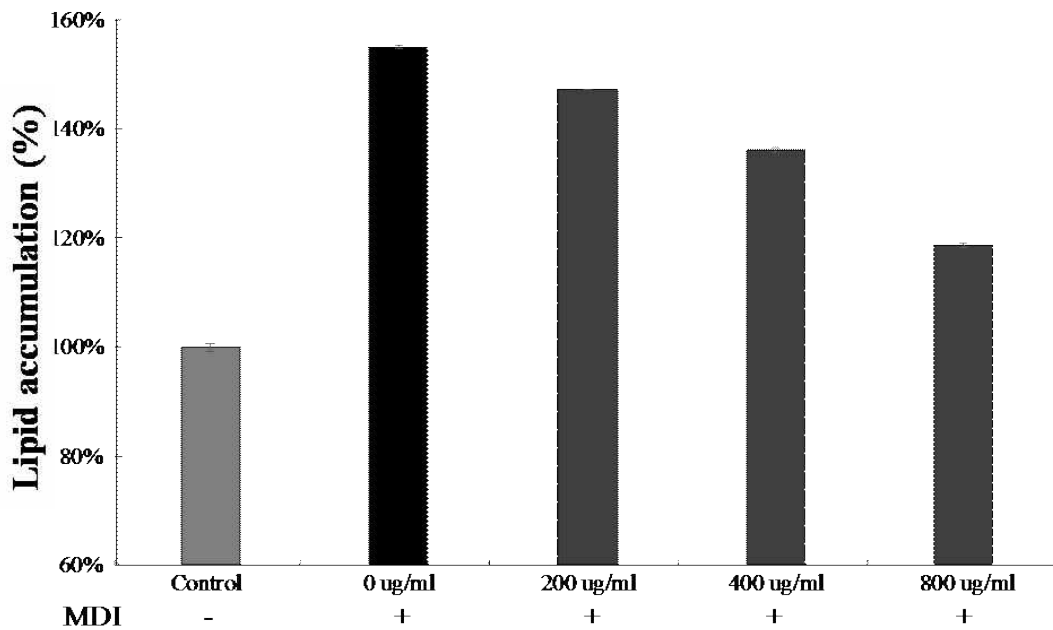
<그림65. 홍국보리 70% ethanol 추출물의 세포 독성 평가 결과>

(나) 3T3-L1 전지방세포를 활용한 glucose consumption 억제 활성 평가

홍국균으로 보리를 발효하고 70% 주정을 이용해 추출하여 홍국보리 추출물이 지방세포의 분화 과정에 간섭하여 지방구 생성 억제에 영향을 주는지 여부를 확인하기 위해 Oil Red O 염색 및 염색 시약의 용출을 이용하여 지방구가 형성된 3T3-L1 세포를 관찰하였다. 그 결과, 지방 분화 유도 물질(MDI) 만 처리한 군에 비해 홍국균으로 발효된 보리의 70% 주정 추출물을 처리한 실험군에서 염색된 지방구의 수가 농도 의존적으로 감소하는 것을 확인할 수 있었으며, 특히 800 ug/ml의 농도로 처리한 군에서는 MDI 처리군 대비 약 77% 정도의 지방구 생성 억제를 확인 할 수 있었다.



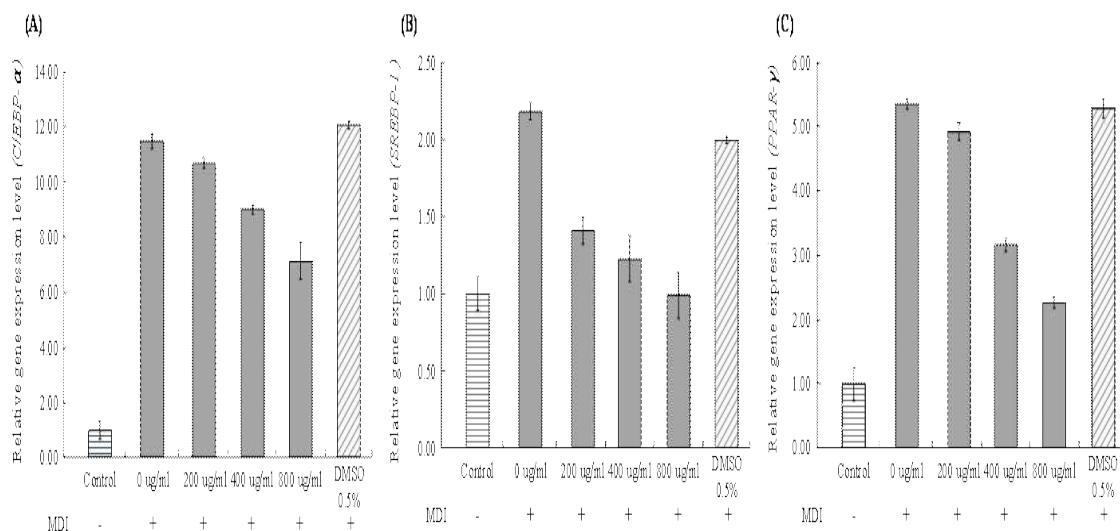
<그림66. 홍국보리 70% ethanol 추출물이 처리된 3T3-L1 지방 세포의 ORO 염색 사진. A: control. B: MDI treated without sample, C: DMSO treated (negative control), D-F: 200, 400, 800 ug/ml samples treated with MDI solution)>



<그림67. 홍국보리 70% ethanol 추출물의 3T3-L1 지방분화 억제 효과>

(다) Reverse Transcription-Real time-PCR

홍국보리 추출물의 지방분화 억제능을 평가하기 위해 실험 및 분화 된 3T3-L1 지방세포의 RNA를 추출하여 RT-PCR을 통해 유전자 발현을 확인 하였다. 지방분화유도 물질 MDI를 처리 하여 지방 분화를 유도하였을 경우 C/EBP- α , SREBP-1, PPAR- γ 의 발현이 증가하게 된다. 아래 그림의 결과에 따라 홍맥 추출물의 농도가 높아질수록 지방 분화 전사 인자의 발현량이 유의적으로 감소하는 것을 확인하였다. C/EBP- α 의 경우 200 ug/ml 농도에서 MDI 처리군 대비 약 6.87% 감소하였고, 800 ug/ml 농도에서 약 37.77%의 발현 억제 활성을 확인하였다. SREBP-1의 발현은 세포 내 처리된 홍맥 추출물의 농도가 높아짐에 따라 각각 MDI 처리군 값 대비 35.32%, 43.58%, 54.58%의 저해가 확인되었다. PPAR- γ 의 발현은 200, 400, 800 ug/ml 농도일 때 MDI 처리군 발현량 대비 각각 8.03%, 41.12%, 57.57%의 발현량 저해를 확인하였다.



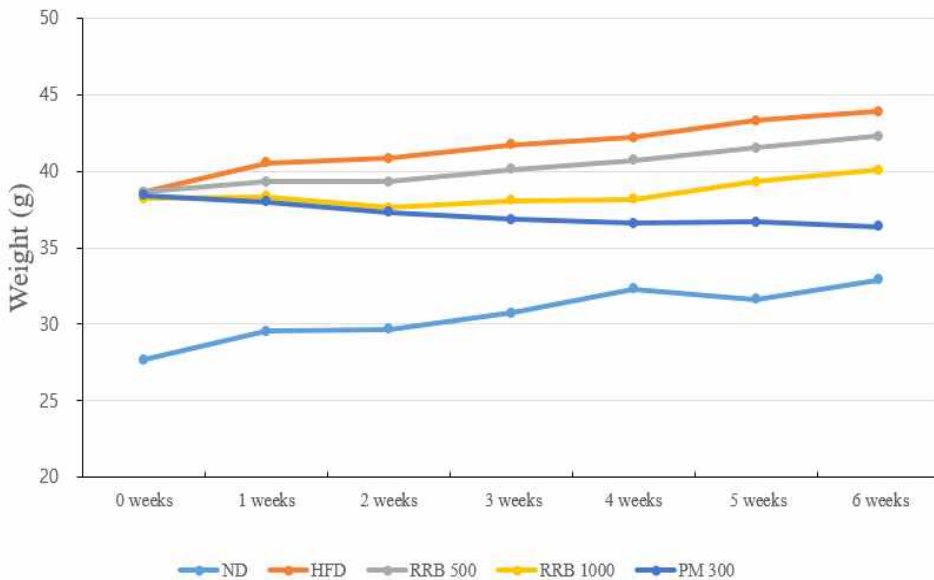
<그림68. 홍국보리 70% ethanol 추출물의 3T3-L1 지방분화 유전자 발현 억제>

나. 동물실험 연구결과

(1) 체중, 식이 섭취량, 식이섭취효율 측정

홍국음료 동결건조 투여군의 경구투여 6 주후, 일반식이 섭취 mice와 고지방 식이사료를 섭취한 mice에서 각 실험군의 최종 체중, 식이섭취량 및 식이섭취 효율을 조사하였다.

고지방식이사료와 시험물질을 경구투여한 마우스의 시험 초기의 평균 체중은 약 38g 으로 모든 실험 군 사이에 유의한 차이가 없었으나, 경구투여 6주 후 RRB 500군은 HFD군에 비해 3.7% 감소하며 유의적인 감소를 보이지는 않았지만 감소하는 경향을 보였고 RRB 1000군과 양성대조군 PM 300군은 각각 8.8%, 17.2% 감소하며 유의적으로 낮아졌다($p<0.05$). 식이섭취량은 5개 실험군 모두에서 유의성이 없는 것으로 보아 고지방식이 섭취량에 따른 체중 감소는 아닌 것으로 보인다. 식이섭취효율은 RRB 1000 군은 HFD 군에 비해 약 62.2% 감소하며 유의성 있게 감소($p<0.05$)하는 것으로 보아 고농도의 홍국음료가 체지방 감소에 효과가 있는 것으로 보인다. 홍국음료 동결건조물을 경구투여 시 농도의존적으로 체중증가량이 감소되는 것으로 보아 홍국음료를 섭취에 체중감소에 효과가 있는 것으로 판단된다<그림 69., 표 12>.



<그림69 . 홍국음료 경구투여시 체중 변화량>

<표 12 . Effect of red yeast rice beverage on final body weight, food intake and food efficiency ratio>

	Initial body weight (g)	Final body weight (g)	Food intake (g/6 weeks)	Food intake (g/day)	Food efficiency ratio (%) ⁵⁾
ND ¹⁾	27.66±2.69 ^{***} ₃₎	32.91±1.93 ^{***}	128.05±7.21	2.29±0.13	4.05±1.32 ²⁾
HFD	38.66±3.62	43.93±2.41 ^{a4)}	121.45±21.92 _a	2.17±0.39 ^a	4.47±1.80 ^a
RRB 500	38.63±2.69	42.31±2.96 ^{ab}	110.27±4.93 ^a	1.97±0.09 ^a	3.28±1.51 ^{ab}
RRB 1000	38.21±2.41	40.08±3.19 ^b	121.93±22.07 _a	2.18±0.39 ^a	1.68±1.39 ^b
PM 300	38.44±2.47	36.37±1.36 ^c	107.14±10.78 _a	1.91±0.19 ^a	-2.06±1.9 ^c

¹⁾Groups are the same as in table 1.

²⁾All values are mean±SD.

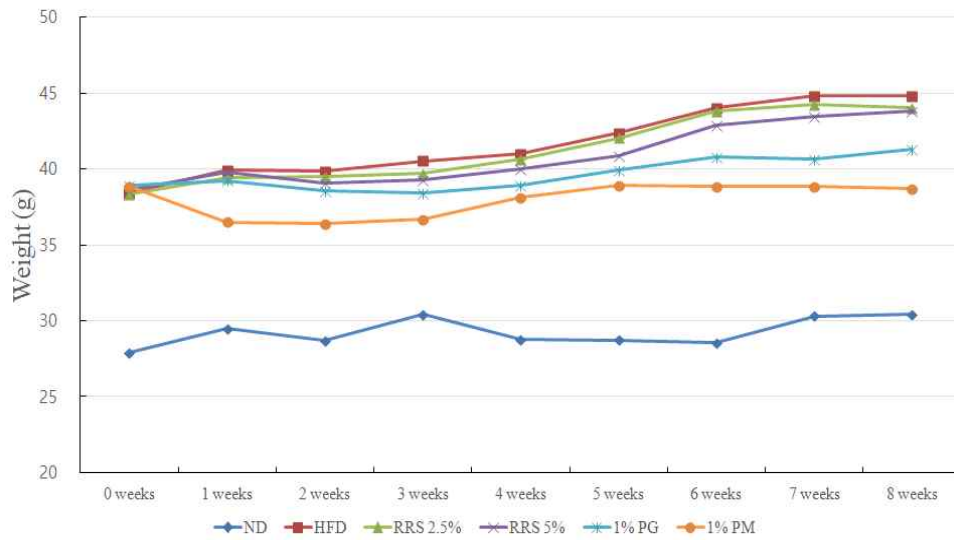
^{3)***}Significantly different between the ND and the HFD by t-test($p<0.001$)

⁴⁾Values with different superscripts are significantly different among high fat diet groups by ANOVA with Duncan's multiple range test at $p<0.05$.

⁵⁾FER(food efficiency ratio = body weight gain/food intake)×100

홍국선식 제품 섭취군의 실험식이 급여 8주 후, 일반식이 섭취 mice와 고지방식이사료를 섭취한 mice에서 각 실험 군의 최종 체중, 식이섭취량 및 식이섭취 효율을 조사하였다. 고지방식을 섭취하여 비만 유도 시 ND에 비해 HFD가 유의적($p<0.001$)으로 높은 약 27.4%의 체중 증가율을 보여 고지방식으로 비만이 유도되었음을 확인하였다<그림 70., 표 13>. 실험 전 모든 mice의 평균 체중은 약 38 g으로 실험군 사이에 유의한 차이가 없었다. 실험식이 급여 8주 후 2.5% RRS, 5% RRS는 HFD에 비해 각각 1.7%, 2.2% 감소되었지만 유의성 있는 결과를 보지는 못했다. 양성대조군인 1% PG는 HFD에 비해서 7.9% 감소하였지만 유의성을 보이지는 못하였으며 또 다른 양성대조군인 1% PM은 13.6% 평균 체중이 감소되어 유의적으로 낮아졌다($p<0.05$), 식이 섭취량은 ND, HFD 유의한 차이는 없었고 실험군인 2.5% RRS 및 5% RRS 또한 HFD와 실험군의 식이 섭취량을 비교했을 때 유의한 차이가 없었다. 다만 양성대조군인 1% PG, 1% PM은 HFD보다 유의적으로 더 적은 사료를 섭취하였다($p<0.05$). 식이섭취 효율은 HFD가 ND에 비해 유의하게 높았으며($p<0.01$), HFD과 실험군의 식이 섭취효율 비교 시 2.5% RRS와 5% RRS는 각각 HFD에 비해서 14.7%, 19.4% 식이섭취효율이 감소하였으나 유의성 있는 결과를 보이지는 못하였다. 양성대

조군은 모두 HFD보다 유의하게 낮은 결과를 보였다($p<0.05$). 위 체중결과로 보아 홍국선식제품은 비록 유의성 있는 결과를 보이지는 못하였지만 약하게 체중 감소에 효과가 있는 것으로 판단된다.



<그림70 . 홍국선식 제품 섭취 시 체중 변화량>

<표13 . Effect of red yeast rice sunsik product powder on final body weight, food intake and food efficiency ratio>

	Initial body weight (g)	Final body weight (g)	Food intake (g/8 weeks)	Food intake (g/day)	Food efficiency ratio (%) ⁶⁾
ND ¹⁾	27.89±3.03 ^{***4)}	30.43±3.20 ^{***}	128.12±4.80	2.29±0.09	1.99±1.34 ^{**2)3)}
HFD	38.43±3.51	44.82±2.85 ⁵⁾	127.53±6.95 ^a	2.28±0.12 ^a	5.01±1.82 ^a
2.5% RRS	38.37±3.33	44.05±3.36 ^b	131.22±10.45 ^a	2.34±0.19 ^a	4.27±1.92 ^b
5% RRS	38.61±3.19	43.84±3.74 ^c	129.32±5.71 ^a	2.31±0.10 ^a	4.04±1.74 ^{ab}
1% PG	38.94±3.31	41.28±3.66 ^c	110.20±8.54 ^b	1.97±0.15 ^b	2.06±1.86 ^b
1% PM	38.82±3.32	38.72±4.82 ^c	99.53±5.18 ^c	1.78±0.09 ^c	-0.10±2.71 ^c

¹⁾Groups are the same as in table 1.

²⁾All values are mean±SD.

^{3)**}Significantly different between the ND and the HFD by t-test($p<0.01$)

^{4)***}Significantly different between the ND and the HFD by t-test($p<0.001$)

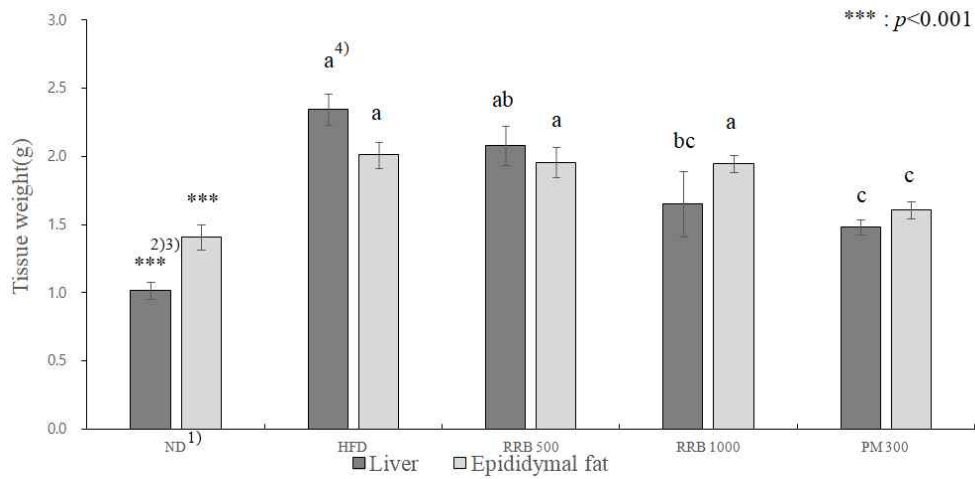
⁵⁾Values with different superscripts are significantly different among high fat diet groups by ANOVA with Duncan's multiple range test at $p<0.05$.

⁶⁾FER(food efficiency ratio = body weight gain/food intake)×100

(2) 부고환 지방조직 및 간 무게 측정

홍국음료 동결건조물 투여 실험 시작 6주째 mice를 희생 시킨 후 부검하여 부고환 지방조직(epididymal fat pad) 및 간 무게를 측정하였다. 그 결과 부고환 지방 무게는 <그림 71.>과 같이 RRB 500, RRB 1000은 HFD에 비하여 각각 2.8%, 3.2% 감소하며 유의한 차이가 없었다. 양성대조군 PM 300은 HFD에 비해 20.1% 감소($p<0.05$)하며 유의성 있는 감소를 보였다. 하지만 간의 무게는 RRB 500은 HFD에 비해 유의성은 없었지만 11.3% 감소하였으며 RRB 1000은 HFD에 비해 29.61% 감소($p<0.05$)하며 유의성을 보인 것으로 보아 시험물질이 농도의존적으로 간의 무게를 감소하는데 효과가 있는 것으로 보인다. 양성대조군인 PM 300은 HFD에 비해 36.8% 감소($p<0.05$)하며 유의성을 보였다. 위 결과로 보아 홍국음료가 농도의존적으로 지방간을 감소하여 체중감소에 효과가 있는 것으로 판단된다.

홍국선식 제품 섭취 실험 시작 8주째 mice를 희생 시킨 후 부검하여 부고환 지방조직(epididymal fat pad) 및 간 무게를 측정하였다. 간과 부고환지방 무게 모두 HFD가 ND에 비해 유의하게 증가하였으며($p<0.001$), HFD와 실험섭취군과 비교에서 부고환지방무게는 2.5% RRS, 5% RRS는 HFD에 비하여 각각 10.9%, 17.5% 감소하였으나 유의성을 보이지는 못하였다. 양성대조군인 1% PG, 1% PM 경우 각각 23.6%, 27.5%($p<0.05$) 감소하며 모두 유의성있는 감소를 보였다. 간 무게는 부고환 지방 무게는 <그림 72.>와 같이 2.5% RRS, 5% RRS는 HFD에 비하여 각각 4.7%, 6.4% 감소하며 유의한 차이가 없었다. 양성대조군인 1% PG 군은 HFD에 비해 18.9% 감소하였지만 유의한 결과를 보이지는 못하였다. 하지만 또 다른 양성대조군 1% PM군은 38.4%($p<0.05$) 감소하며 유의하게 감소하였다.



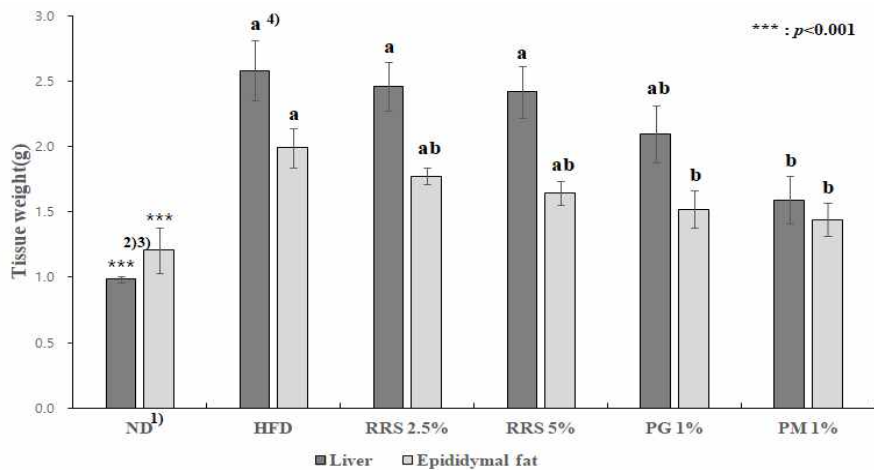
¹⁾ Groups are the same as in Table 2.

²⁾ All values are mean±SD.

^{3)***} Significantly different between the ND and the HFD by t-test(p<0.001),

⁴⁾ Values with different superscripts are significantly different among high fat diet groups by ANOVA with Duncan's multiple range test at p<0.05.

<그림71. Liver and epididymal fat weight of mice fed experimental diets supplemented with red yeast rice beverage of oral administration for 6 weeks>



¹⁾ Groups are the same as in Table 2.

²⁾ All values are mean±SD.

^{3)***} Significantly different between the ND and the HFD by t-test(p<0.001),

⁴⁾ Values with different superscripts are significantly different among high fat diet groups by ANOVA with Duncan's multiple range test at p<0.05.

<그림72. Liver and epididymal fat weight of mice fed experimental diets supplemented with red yeast rice sunsik product powder of diets for 8 weeks>

(3) 경구당부하검사(oral glucose tolerance test, OGTT)

홍국음료 실험군의 경구당부하 검사는 실험 5주째 12시간 이상 금식 시킨 후 공복 시 혈당을 측정 한 후 glucose(2g/kg body weight)를 멸균주사용수에 녹여 경구 투여한 다음 0, 30, 60, 90, 120, 150, 180분 후 mice 의 꼬리정맥에서 혈액을 채취하고 혈당측정기(g doctor, (주)올메디쿠스, Korea)를 이용하여 혈당을 측정하였다. 그 결과 홍국음료 투여군은 <표 14.>와 같이 RRB 1000의 경우 경구당 부하 120분에서 HFD에 비해서 혈당 농도가 유의하게 낮았다 ($p<0.05$). 양성대조군 PM 300은 HFD에 비해서 120, 180분에서 유의하게 낮았다 ($p<0.05$). 이러한 혈당 농도 반응을 혈당 반응 면적으로 산출한 결과 <그림 73.>와 같이 ND는 HFD에 비해서 유의하게 혈당 반응 면적이 낮았으며 ($p<0.05$) 홍국음료 투여군인 RRB 500, RRB 1000 모두 HFD에 비해 혈당 반응 면적이 감소되었지만 유의성 있는 감소를 보이지는 못하였다. 양성대조군 PM 300은 HFD에 비해서 유의적으로 낮았다 ($p<0.05$). 홍국선식 제품 실험군의 경구당부하검사는 실험 7주 째 12시간 이상 금식 시킨 후 홍국음료 실험 방법과 동일하게 실험을 진행하였다. 그 결과 <표 15.>와 같이 5% RRS는 경구 부하 120, 150, 180 분에서 HFD에 비해서 혈당 농도가 유의하게 낮았다 ($p<0.05$).

양성대조군 1% PG는 HFD에 비해서 경구 부하 0, 90, 120, 150, 180 분에서 혈당농도가 유의하게 낮았으며 ($p<0.05$) 또 다른 양성대조군 1% PM 은 HFD에 비해서 모든 시간대에서 혈당농도가 유의하게 낮게 나타났다 ($p<0.05$). 이러한 혈당 농도 반응을 혈당 반응 면적으로 산출한 결과 <그림 74.>와 같이 ND는 HFD에 비해서 유의하게 혈당면적이 낮았으며 ($p<0.05$) 홍국선식 섭취군인 RRS 5% 경우 HFD에 비해서 혈당 반응 면적이 유의적인 감소 ($p<0.05$)를 보였다. 양성대조군인 1% PG, 1% PM역시 HFD에 비해서 유의적인 감소 ($p<0.05$)를 나타냈다. 위 결과로 보아 홍국선식 제품이 혈액 속 혈당의 농도를 낮추는데 효과가 있는 것으로 판단되어진다.

<표14. 홍국음료 실험 5주차 경구당부하검사(Oral glucose tolerance test, OGTT)>

	ND ¹⁾	HFD	RRB 500	RRB 1000	PM 300
0 min	102.17±32.46 ^{*2)3)}	145.17±29.01 ⁴⁾	122.33±9.27 ^a	131.33±19.00 ^a	118.83±20.85 ^a
30 min	244.83±10.91 [*]	280.00±11.24 ^a	265.33±37.95 ^a	280.50±17.18 ^a	233.83±19.22 ^b
60 min	218.50±23.42	192.33±21.25 ^a	202.17±15.92 ^a	194.00±29.08 ^a	193.33±23.79 ^a
90 min	154.20±24.57	180.67±36.05 ^a	158.83±14.69 ^a	169.17±7.86 ^a	170.17±18.64 ^a
120 min	130.67±18.81 [*]	173.83±29.32 ^a	149.17±12.40 ^{ab}	136.33±18.26 ^b	135.67±26.21 ^b
150 min	113.17±22.54	142.17±28.63 ^a	133.00±12.12 ^a	123.50±11.76 ^a	127.33±14.87 ^a
180 min	104.33±12.55 [*]	139.17±29.62 ^a	127.50±8.29 ^{ab}	116.83±13.86 ^{ab}	113.00±11.14 ^b

¹⁾Groups are the same as in Table 2.

²⁾All values are mean±SD.

^{3)*} Significantly different between the ND and the HFD by t-test(p<0.05),

⁴⁾Values with different superscripts are significantly different among high fat diet groups by ANOVA with Duncan's multiple range test at p<0.05.

<표15. 홍국선식 실험 7주차 경구당부하검사(Oral glucose tolerance test, OGTT)>

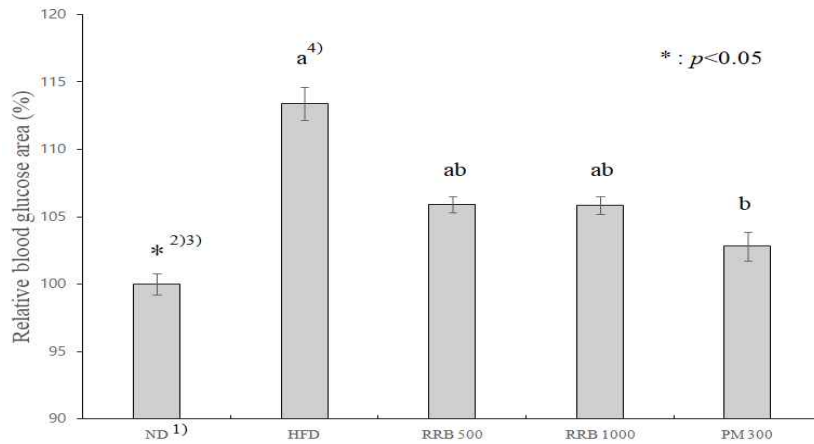
	ND ¹⁾	HFD	2.5% RRS	5% RRS	1% PG	1% PM
0 min	109.29±12.2 _{8^{*2)3)}}	154.25±14.2 _{2⁴⁾}	147.00±26.2 _{6^a}	150.50±16.4 _{1^a}	117.50±18.1 _{1^b}	92.25±28.57 ^c
30 min	257.43±104.06 ^{**3)}	361.38±84.2 _{3^a}	325.75±32.5 _{2^{ab}}	290.63±45.7 _{3^{ab}}	303.63±123.82 ^{ab}	267.75±47.57 ^b
60 min	189.43±78.5 ₀	202.75±43.6 _{8^{ab}}	219.50±26.1 _{4^a}	175.50±35.6 _{0^{ab}}	176.25±48.6 _{4^{ab}}	167.75±42.0 _{7^b}
90 min	139.14±35.3 ₈	177.88±41.1 _{1^a}	163.00±32.9 _{3^{ab}}	140.13±16.4 _{3^{bc}}	136.50±22.5 _{9^c}	144.25±31.2 ^b _c
120 min	108.14±15.9 _{2[*]}	162.13±38.2 _{9^a}	151.25±29.1 _{5^{ab}}	126.88±14.3 _{7^b}	117.00±22.0 _{1^b}	131.88±28.9 _{8^b}
150 min	99.43±16.65	142.75±38.4 _{3^a}	135.88±28.3 _{4^{ab}}	113.25±12.7 _{6^{bc}}	98.25±16.59 ^c	123.13±21.0 _{9^{bc}}
180 min	94.14±15.55 [*]	134.50±32.5 _{8^a}	122.50±24.2 _{1^{ab}}	108.25±14.9 _{8^{bc}}	94.25±15.45 ^c	110.00±19.1 _{1^{bc}}

¹⁾Groups are the same as in Table 2.

²⁾All values are mean±SD.

^{3)*} Significantly different between the ND and the HFD by t-test(p<0.05),

⁴⁾Values with different superscripts are significantly different among high fat diet groups by ANOVA with Duncan's multiple range test at p<0.05.



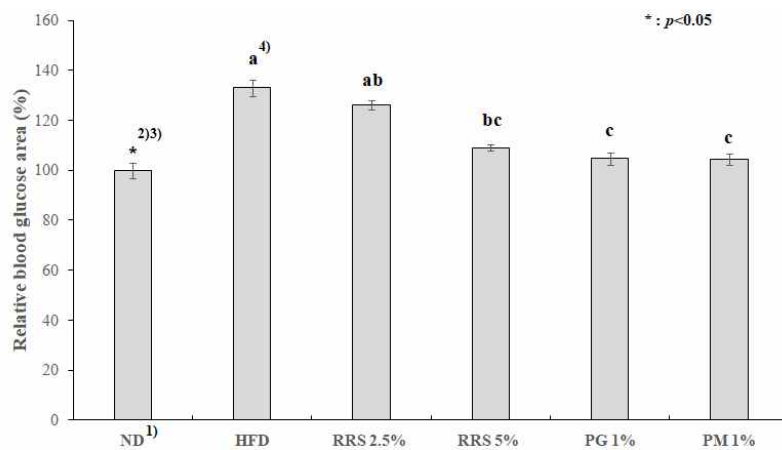
1) Groups are the same as in Table 2.

2) All values are mean±SD.

3) * Significantly different between the ND and the HFD by t-test($p < 0.05$)

4) Values with different superscripts are significantly different among high fat diet groups by ANOVA with Duncan's multiple range test at $p < 0.05$

<그림74. AUC (Area under the curve) calculation after glucose treatment in mice fed experimental diets supplemented with red yeast rice beverage of oral administration for 5 weeks>



1) Groups are the same as in Table 2.

2) All values are mean±SD.

3) * Significantly different between the ND and the HFD by t-test($p < 0.05$)

4) Values with different superscripts are significantly different among high fat diet groups by ANOVA with Duncan's multiple range test at $p < 0.05$

<그림75. AUC (Area under the curve) calculation after glucose treatment in mice fed experimental diets supplemented with red yeast sunsik product of diets for 7 weeks>

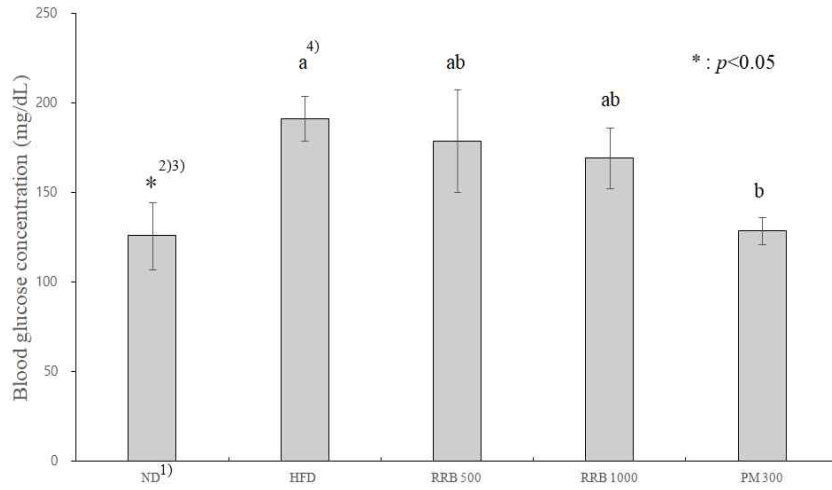
(4) 실험동물의 시료채취

실험 종료 전 12시간 동안 mice 를 절식시키고 체중과 공복 혈당을 측정한다음, avertin으로 마취하여 심장에서 채혈하고, 채혈 된 혈액은 실온에서 1시간 두었다가 4,000 rpm에서 20분간 원심분리한 혈청을 분석시료로 사용하였다.

(5) Glucose 함량 측정

혈청 중 glucose 함량은 효소법에 따라 조제된 시약 kit (아산제약)를 사용하여 측정하였다. 혈청 0.02 ml에 효소 시액 3 ml를 넣고 37°C에서 5분간 방치하여 시약블랭크를 대조로 파장 500 nm에서 흡광도를 측정하였다.

그 결과 홍국음료 투여 실험군은 <그림 75.> 과 같이 실험식이에 따른 혈중 글루코스 지수는 ND는 HFD에 비해서 유의하게 낮았으며 ($p<0.05$) 실험군인 RRB 500, RRB 1000군은 HFD군과 비교하였을 때 각각 6.6%, 11.6% 감소하였지만 유의성 있는 감소를 보지 못하였다. 양성대조군 PM 300군은 HFD 군에 비해 32.7% 감소하며 유의하게 낮았다($p<0.05$). 홍국선식 제품 섭취 실험군은 <그림 76.> 과 같이 실험식이에 따른 혈중 글루코스 지수는 ND는 HFD에 비해서 유의하게 낮았으며 ($p<0.001$) 실험군인 2.5% RRS는 HFD에 비교 했을 때 13.1% 감소하였지만 유의성 있는 감소를 보이지는 못하였다. 5% RRS는 HFD에 비해서 25.6% 감소하여 유의성 있는 감소($p<0.05$)를 보였다. 양성대조군인 1% PG, 1% PM은 35.5%, 43.3% 감소하며 유의성 있는 감소($p<0.05$)를 보였다. 위 결과로 보아 비록 2.5% RRS 에서 유의적인 감소를 보이지는 못하였지만 HFD에 크게 감소하였고 5% RRS에서 유의적인 감소를 보이는 것으로 보아 홍국선식이 농도의존적으로 혈중 내 글루코스 농도를 낮추어 주는 것으로 생각되어지며 이것은 혈 중내 포도당 농도를 낮추어 당뇨병에도 효과가 있을 것으로 예상되어진다.



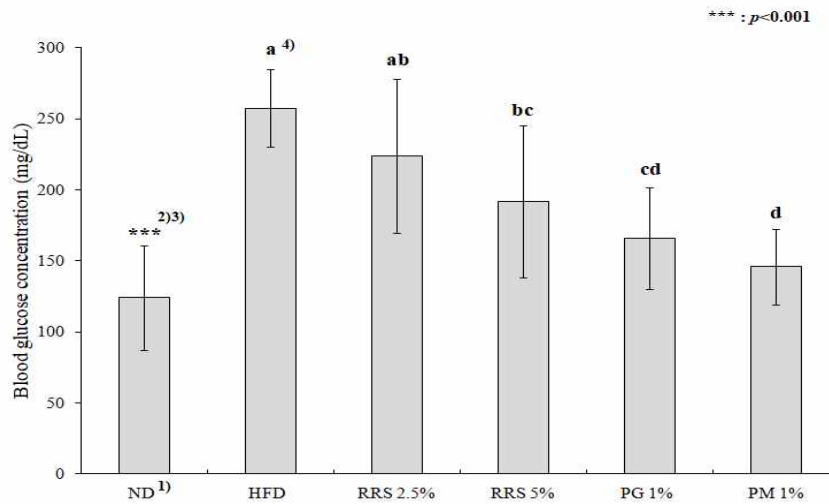
1)Groups are the same as in Table 2.

2)All values are mean±SD.

3)*Significantly different between the ND and the HFD by t-test(p<0.05)

4)Values with different superscripts are significantly different among high fat diet groups by ANOVA with Duncan's multiple range test at p<0.05

<그림 75. Effects of the Red yeast rice beverage on serum glucose>



1)Groups are the same as in Table 2.

2)All values are mean±SD.

3)***Significantly different between the ND and the HFD by t-test(p<0.001)

4)Values with different superscripts are significantly different among high fat diet groups by ANOVA with Duncan's multiple range test at p<0.05

<그림 76. Effects of the Red yeast rice sunsik product on serum glucose>

(6) Total cholesterol, Triglyceride 함량 측정

혈청 중 Total cholesterol 함량은 효소법에 따라 조제된 시약 kit (아산제약)를 사용하여 측정하였다. 혈청 0.02 ml에 효소 시액 3 ml를 넣고 37°C에서 5분간 방치하여 시약블랭크를 대조로 파장 500 nm에서 흡광도를 측정하였다.

혈청의 triglyceride 함량은 효소법에 따라 조제된 시약 kit(아산제약)를 사용하여 측정하였다. 혈청 0.02 ml에 효소 시액 3 ml를 넣고 37°C에서 5분간 방치하여 시약블랭크를 대조로 파장 550 nm에서 흡광도를 측정하였다.

그 결과 홍국음료 투여실험에서 <표 16.>와 같이 실험경구투여에 따른 혈청 중 총콜레스테롤 함량은 ND는 HFD에 비해서 유의하게 낮았으며 ($p<0.001$) 실험군인 RRB 500에서는 HFD와 비교하였을 때 19.9% 감소하였으나 유의성을 보이지는 못하였다. 하지만 RRB 1000에서는 HFD가 비교하였을 때 28.5% 감소하며 유의하게 낮았다($p<0.05$). 양성대조군인 PM 300은 HFD와 비교하였을 때 29.5% 감소하며 유의하게 낮았다($p<0.05$). 중성지방 경우 ND는 HFD에 비해서 유의하게 낮았으며 ($p<0.05$) RRB 500, RRB 1000 모두 HFD와 비교하였을 때 각각 12.8%, 16.1% 감소하였지만 유의성 있는 감소를 보이지는 못하였다. 양성대조군 PM 300은 22.0% 감소하며 유의하게 낮았다($p<0.05$). 위 결과로 보아 홍국음료가 혈액의 총콜레스테롤 함량을 농도의존적으로 억제하는데 효과가 있다고 사료된다.

홍국선식 제품 섭취군은 <표 17.>과 같이 실험식이에 따른 혈청 중 총콜레스테롤 함량은 ND는 HFD에 비해서 유의하게 낮았으며 ($p<0.001$) 실험군에서는 HFD에 비해 2.5% RRS, 5% RRS, 1% PG, 1% PM은 각각 2.8%, 3.1%, 20.2%, 30.3% 감소하였지만 모두 유의성 있는 결과를 보이지는 못하였다. 중성지방 함량은 ND는 HFD에 비해서 유의하게 낮았으며 ($p<0.001$) 실험군인 2.5% RRS, 5% RRS는 HFD에 비해서 각각 4.5%, 12.9% 감소하면 농도의존적인 결과를 보였지만 유의성 있는 결과를 보이지 못하였다. 양성대조군인 1% PG는 HFD에 비해서 25.1% 감소하며 유의성이 있는 감소($p<0.05$)를 보였다. 또 다른 양성대조군인 1% PM은 HFD에 비해서 19.7% 감소하였지만 유의성 있는 감소를 보이지는 못하였다.

<표16. The lipid profiles of red yeast rice beverage experimental group after 6 weeks>

	ND ¹⁾	HFD	RRB 500	RRB 1000	PM 300
Total cholesterol (mg/dL)	106.04±15.2 1 ^{2)3)***}	193.47±29.99 ^{a5)}	154.93±29.95 ^{ab}	138.37±34.86 ^b	136.32±27.89 ^b
Triglyceride (mg/dL)	55.27±9.05 ^{4)*}	68.59±8.31 ^a	59.81±12.12 ^{ab}	57.52±11.81 ^{ab}	53.48±7.17 ^b

¹⁾Groups are the same as in Table 2.

²⁾All values are mean±SD.

^{3)*} Significantly different between the ND and the HFD by t-test(p<0.05),

^{4)***} Significantly different between the ND and the HFD by t-test(p<0.001),

⁵⁾Values with different superscripts are significantly different among high fat diet groups by ANOVA with Duncan's multiple range test at p<0.05.

<표17. The lipid profiles of red yeast rice sunsik product experimental group after 8 weeks>

	ND ¹⁾	HFD	2.5% RRS	5% RRS	1% PG	1% PM
Total cholesterol (mg/dL)	106.73±36.7 1 ^{2)3)***}	219.70±39.9 7 ^{a5)}	213.45±118. 13 ^a	212.96±88.9 7 ^a	175.35±34.8 6 ^a	153.09±50.0 1 ^a
Triglyceride (mg/dL)	49.79±8.91 ⁴⁾ ***	64.829±10.0 7 ^a	61.90±14.36 ^a	56.49±8.92 ^{ab}	52.52±12.85 ^b	53.45±6.47 ^{ab}

¹⁾Groups are the same as in Table 2.

²⁾All values are mean±SD.

^{3)***} Significantly different between the ND and the HFD by t-test(p<0.001)

⁴⁾Values with different superscripts are significantly different among high fat diet groups by ANOVA with Duncan's multiple range test at p<0.05.

(7) 인슐린 저항성 및 혈중 인슐린 농도 측정

인슐린 저항성 HOMA-IR 계산법을 이용하여 산출하였다. 혈중 및 insulin은 실험 시작 6주 쯤 12시간 이상 금식 시킨 후 공복 시에 측정하였고, 인슐린 농도는 Mouse Insulin Elisa kit(SHIBAYAGI, Co., Gunma, Japan)를 사용하여 ELISA로 측정하였다. 인슐린 저항성의 지표로 사용되는 HOMA-IR(homeostasis model assessment)은 다음의 공식을 이용하여 계산하였다.

$$\text{HOMA-IR} = \text{공복 시 혈당 (mg/dL)} \times \text{insulin} (\mu\text{IU/mL}) / 405$$

그 결과 홍국음료 경구투여에 따른 혈중 인슐린 농도의 차이를 <표 18.>에 제시하였다. <표 18.>에서 볼 수 있는 것과 같이 혈중 인슐린 지수는 ND는 HFD에 비해 유의적($p < 0.001$)으로 낮게 나타났으며 고지방식이를 섭취할수록 인슐린 과다분비가 나타난다는 것을 알 수 있었다. 실험물질 경구투여에 따른 혈중 인슐린 지수는 RRB 500는 HFD에 비해서 21.1% 감소하였지만 유의성을 보이지는 못하였다. 하지만 RRB 1000, PM 300 모두 각각 52.1%, 59.1% 감소하며 유의성 있는 감소($p < 0.05$)를 보였다. 인슐린 저항성 지표로 사용되는 HOMA-IR은 <표 18.>에 제시하였다. <표 18.>에서 볼 수 있는 것과 같이 HOMA-IR 지수는 RRB 500은 HFD에 비해서 19.5% 감소하였지만 유의성을 보이지는 못하였다. 하지만 RRB 1000, PM 300 은 HFD와 비교하였을 때 각각 53.9%, 64.2% 감소하며 유의성 있는 감소($p < 0.05$)를 보였다. 위 결과로 보아 본 연구에 사용되어진 홍국음료는 농도의존적으로 인슐린저항성을 낮추어지는 것으로 사료되어진다.

홍국 선식제품 사료 섭취에 따른 혈중 인슐린 농도의 차이를 <표 19.>에 제시하였다. <표 19.>에서 볼 수 있는 것과 같이 혈중 인슐린 지수는 ND는 HFD에 비해 유의적($p < 0.001$)으로 낮게 나타났으며 실험물질 섭취에 따른 인슐린 지수는 HFD에 비해서 2.5% RRS, 5% RRS, 1% PG, 1% PM에서 각각 31.1%, 47.9%, 61.6%, 77.4% 감소하며 모든 실험물질에서 유의적인 감소($p < 0.05$)를 나타냈다. HOMA-IR 지수는 2.5% RRS는 HFD에 비해 32.5% 감소하였지만 유의성 있는 감소를 나타내지는 못하였다. 5% RRS, 1% PG, 1% PM은 HFD에 비해 각각 48.5%, 61.4%, 79.3% 감소하며 유의성 있는 감소($p < 0.05$)를 나타냈다. 위 결과로 보아 홍국 선식제품사료은 농도의존적으로 인슐린저항성을 낮추며 효과가 뛰어난 것으로 판단되어진다.

<표 18. Effects of the red yeast rice beverage on serum insulin levels and calculated HOMA-IR in mouse>

	ND	HFD	RRS 500	RRS 1000	PM 300
Insulin level (ng/mL)	0.88±0.20 ^{***2)}	3.89±1.71 ^{a3)}	1.56±0.60 ^b	1.20±0.38 ^b	0.89±0.33 ^b
HOMA-IR ⁴⁾	0.35±0.11 ^{*1)}	0.84±0.47 ^a	0.67±0.31 ^{ab}	0.39±0.11 ^b	0.48±0.12 ^b

¹⁾*Significantly different between the ND and the HFD by t-test (p<0.05),

²⁾***Significantly different between the ND and the HFD by t-test (p<0.001),

³⁾ Values with different superscripts are significantly different among high fat diet groups by ANOVA with Duncan's multiple range test at p<0.05.

⁴⁾ HOMA-IR: homestasis model assessment blood glucose (mg/dL)×insulin (μIU/mL)/405.

<표 19. Effects of the red yeast rice sunsik product on serum insulin levels and calculated HOMA-IR in mouse>

	ND	HFD	2.5% RRS	5% RRS	1% PG	1% PM
Insulin level (ng/mL)	0.66±0.46 ^{***2)}	2.02±0.91 ^{a3)}	1.39±0.42 ^b	1.05±0.53 ^{bc}	0.78±0.32 ^c	0.46±0.16 ^c
HOMA-IR ⁴⁾	0.20±0.13 ^{*1)}	0.63±0.33 ^a	0.43±0.16 ^{ab}	0.33±0.17 ^{bc}	0.24±0.12 ^{bc}	0.13±0.06 ^c

¹⁾*Significantly different between the ND and the HFD by t-test (p<0.05),

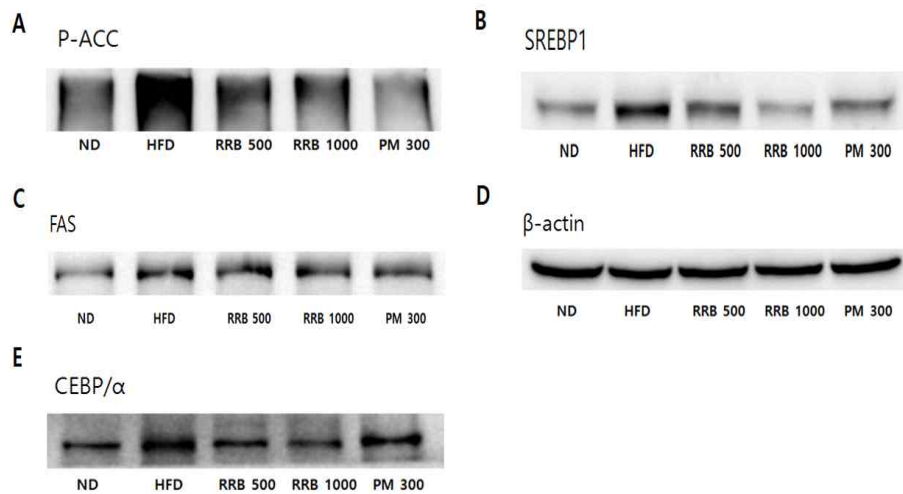
²⁾***Significantly different between the ND and the HFD by t-test (p<0.001),

³⁾ Values with different superscripts are significantly different among high fat diet groups by ANOVA with Duncan's multiple range test at p<0.05.

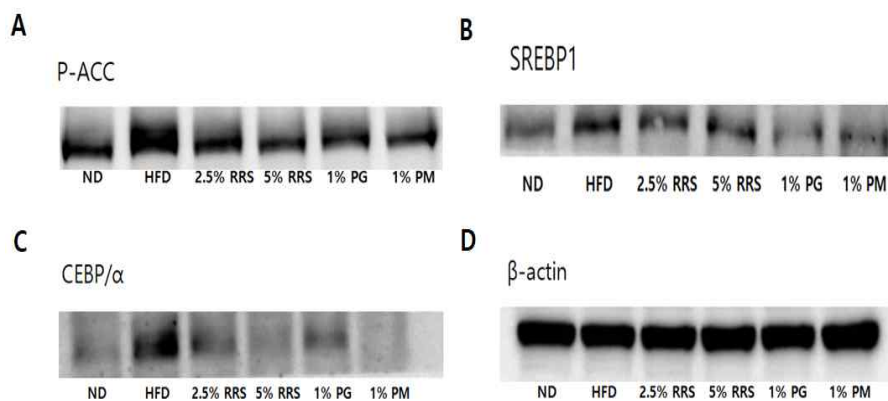
⁴⁾ HOMA-IR: homestasis model assessment blood glucose (mg/dL)×insulin (μIU/mL)/405.

(8) Western blot

동물을 부검하여 간을 채취한 후 단백질을 분리하여 BCA protein assay 방식을 이용하여 단백질을 정량한 후 Western blot 방식을 이용하여 홍국음료가 동물의 간의 비만활성을 억제하는지를 확인하였다. <그림 77.>에서 볼 수 있듯이 비만, 고지혈증과 관련된 P-ACC, SREBP1, FAS, CEBP/α 단백질을 HFD 에 비하여 농도의 존적으로 억제하는 것을 알 수 있었다. 위 결과로 보아 홍국음료가 동물의 in vivo의 비만유전자를 억제하는 것으로 판단되어진다. 홍국선식 제품 사료도 <그림 78.>에서와 같이역시 P-ACC, SREBP1, FAS, CEBP/α 단백질을 HFD 에 비하여 농도의존적으로 억제하는 것을 볼 수가 있었다. 위 결과로 보아 홍국음료, 홍국선식 제품 모두 비만에 효과가 있는 것으로 사료되어진다.



<그림77. Effects of red yeast rice beverage on P-ACC, SREBP1, FAS, C/EBPa protein expressions in mouse liver>



<그림78. Effects of red yeast rice sunsik product on P-ACC, SREBP1, C/EBPa protein expressions in mouse liver>

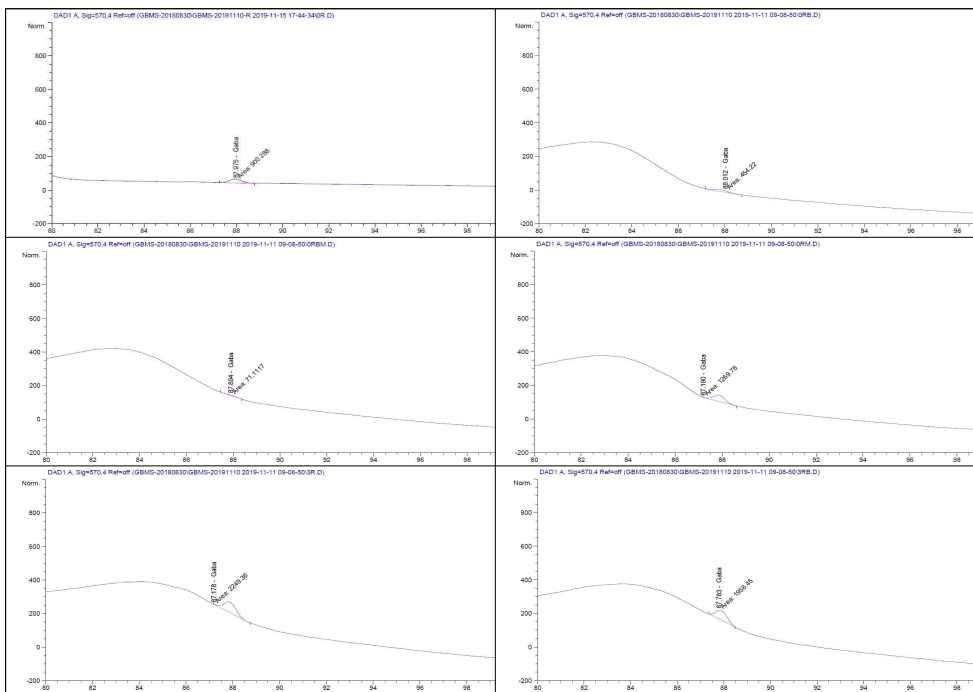
(9) Monacolin-K 정량분석

실험에 사용된 대량배양한 제품의 모나콜린 K 조사결과 활성형 모나콜린 K 3,104.575 mg/kg, 비활성형 모나콜린 K 156.054 mg/kg으로 총 모나콜린 K 함량이 3260.62mg/kg으로 조사되었다.

활성모나콜린 K	비활성모나콜린 K	총모나콜린 K
3,104.58	156.05	3,260.62

(10) GABA 정량분석

발효된 홍국쌀에 대한 GABA함량 분석



<그림79. GABA HPLC 패턴 분석>

<표20. 홍국쌀 유산균 2단발효 GABA 정량분석>

(단위 : mg/100g)

	시료명		결과값
1	쌀MK	OR	3.33
2	쌀보리60084Y	ORB	1.71
3	쌀보리MK	ORBM	0.26
4	쌀Mix10	ORM	4.67
5	쌀MK 3day	3R	8.46
6	쌀보리60084Y 3day	3RB	6.98
7	쌀보리MiNo 3day	3RBM	8.99
8	쌀Mix10 3day	3RM	7.43
9	쌀MK 5day	5R	12.71
10	쌀보리60084Y 5day	5RB	29.84
11	쌀보리MK 5day	5RBM	29.51
12	쌀Mix10 5day	5RM	10.74
13	쌀MK 7day	10R	10.71
14	쌀보리60084Y 7day	10RB	24.98
15	쌀보리MK7day	10RBM	19.01
16	쌀Mix10 7day	10RM	10.44

(다) 홍국쌀추출물을 이용한 스틱 개발

최근 이슈되는 바이러스관련 질병 및 미세먼지 예방효과를 위한 면역력증강 및 항당뇨 제품으로 홍국 특유의 쓴맛을 살려내고, 기관지 및 폐에 좋은 배, 도라지, 생강, 대추, 꿀, 홍삼이 함유되어 있으며 무방부제, 무정제수, 무화학 첨가제 등 국내산 원료가 함유되어 있는 제품으로 개발하였다.

① 당당한하루 레드스틱케이 외박스

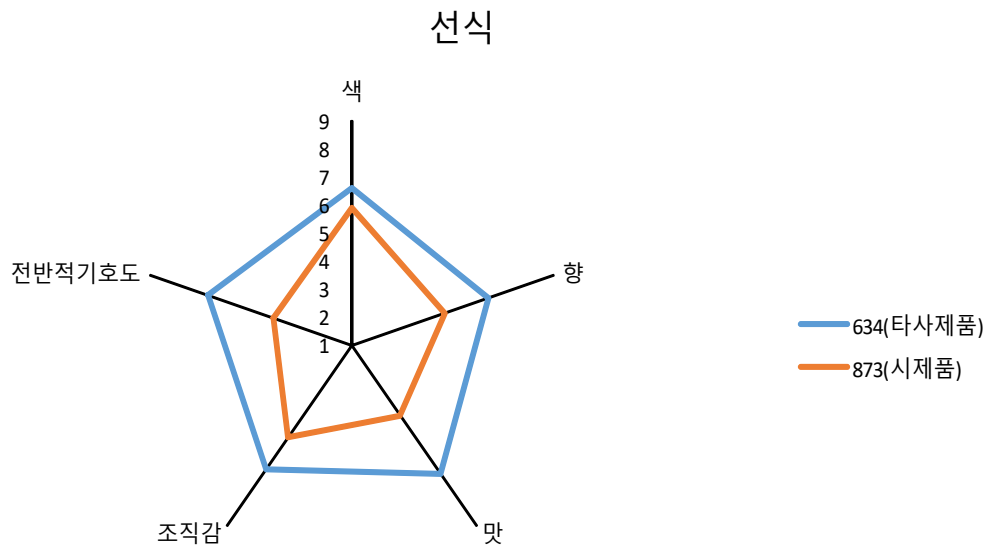


(2) 관능평가

9점척도법을 응용하여 색, 향, 맛, 조직감, 전반적기호도에 관하여 평가하였다.

(가) 당당한하루 레드밀(홍국선식)

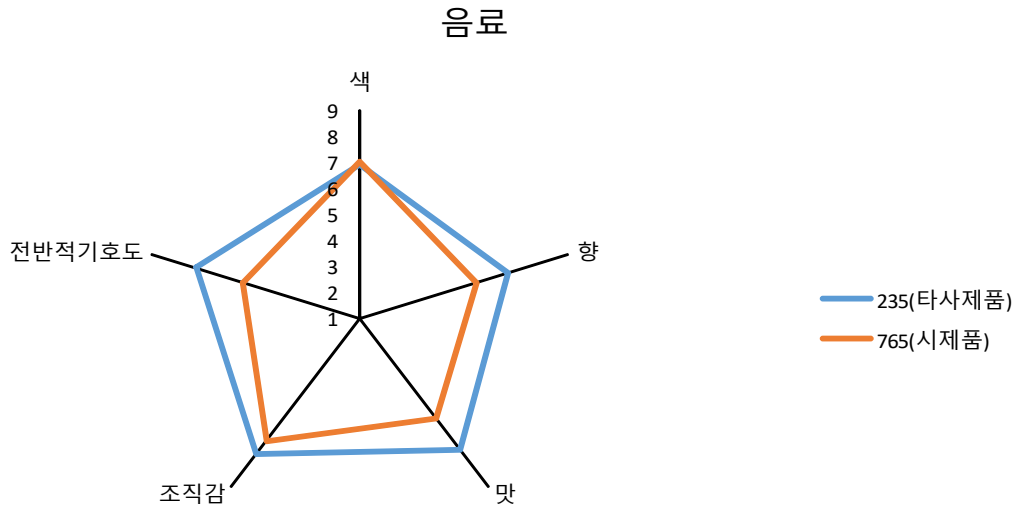
대조구로 대형마트 및 온라인 판매량이 높은 ‘육망뉴트리밀’ 제품을 선정하여 비교 한 결과, 양산품의 경우 당이 함유되지 않아 전반적인 기호도에 서 많이 떨어짐을 나타냈으며, 관능평가 결과를 토대로 건강한 이미지로 마케팅에 활용하고자 하였다.



<그림80. 당당한하루 레드밀 관능평가>

(나) 당당한하루 레드미(홍국음료)

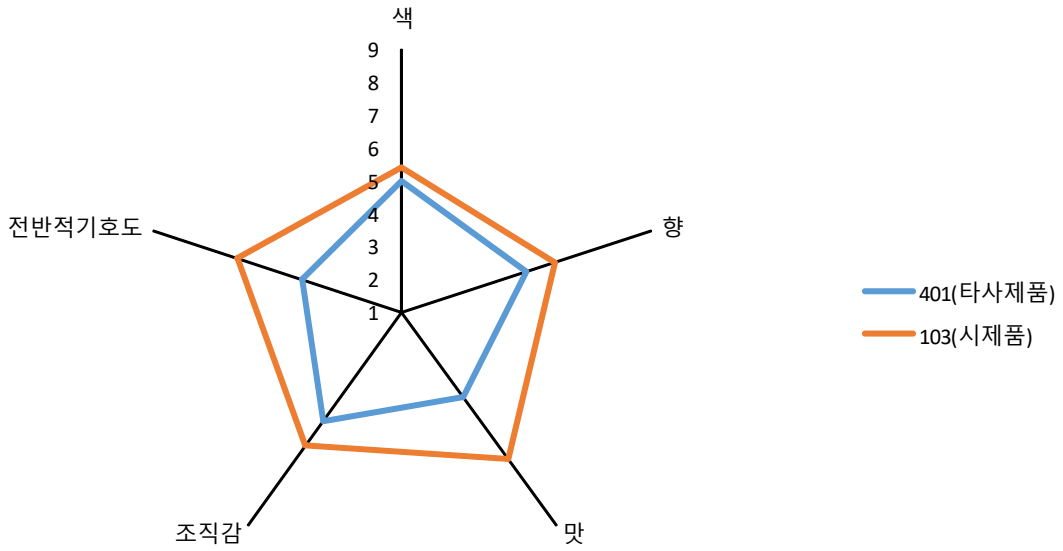
대조구로 대표적인 식이음료인 ‘미에로화이바’제품을 선정하여 비교 한 결과, 미에로화이바는 전반적인 모든면에서 높은 점수를 받았으며, 홍국음료의 경우 핑크색의 색감에서는 높은 점수를 받았으나 향, 맛, 조직감, 전반적 기호도가 낮게 나타났다.



<그림81. 당당한하루 레드미 관능평가>

(다) 당당한하루 레드케이스틱(홍국스틱)

대조구로 대표적인 홍삼제품 ‘정관장 매실스틱’ 제품을 선정하여 비교 한 결과, 홍국스틱제품이 모든면에서 높은 점수를 받았으며, 제품판매시 높은 호응 및 매출이 발생할것으로 판단 되었다.



<그림82. 당당한하루 레드케이스틱 관능평가>



(라) 관능평가 설문지

남자 : 성별 : 나이 :

시료 두 가지를 맛보고, 아래의 척도를 사용하여 각 시료의 기호도를 평가하여 해당란에 체크하여 주십시오.
각각의 시료를 검사할 때는 물론 입을 헹구고, 다음 시료 평가는 30초 후에 실시하여 주십시오.

<척도>

점수	1	2	3	4	5	6	7	8	9
기호도	매우 싫음	←			보통			→	매우 좋음

[634]

	1	2	3	4	5	6	7	8	9
색 (Color)									
향 (Odor)									
맛 (Taste)									
조직감 (Texture)									
전반적인 기호도 (Overall acceptability)									

● 해당 시료에 대한 종합적 평가 또는 기타 의견이 있으시면 작성하여 주십시오.

--

[873]

	1	2	3	4	5	6	7	8	9
색 (Color)									
향 (Odor)									
맛 (Taste)									
조직감 (Texture)									
전반적인 기호도 (Overall acceptability)									

● 해당 시료에 대한 종합적 평가 또는 기타 의견이 있으시면 작성하여 주십시오.

--

(3) 영양소 함량 분석

소비자에게 제품관련 영양정보를 제공하기 위하여 9대영양소 나트륨, 조단백질, 트랜스지방, 콜레스테롤, 탄수화물, 포화지방, 당류, 열량, 조지방 검사를 의뢰하여 제품에 대한 영양소 분석을 완료하였다.

(가) 당당한하루 레드밀



문서확인번호 : CVQM-NAEO-NGS1-MLFP

시험 · 검사성적서

발행번호	R20191126-0004		접수번호	190101432-003	
검사완료일	2019-11-26		접수연월일	2019-11-05	
제품명	레드밀				
(품목)제조번호		품목제조신고번호			
유형 · 재질 · 품목명	기타기준규격외				
제조(수입)일		유통(품질유지)기한			
의뢰자	성명				
	소재지				
제조원	업체명		제조국		
	소재지				
시험 · 검사목적	식품 기타(참고용)				
시험 · 검사 항목 및 결과					
시험 · 검사 항목	시험 · 검사 기준	시험 · 검사 결과	판정	비고	
나트륨(mg/100g)	기준없음	3.29	상기시험확인함		
조단백질(g/100g)	기준없음	14.11	상기시험확인함		
트랜스지방(g/100g)	기준없음	0.00	상기시험확인함		
콜레스테롤(mg/100g)	기준없음	0.00	상기시험확인함		
탄수화물(g/100g)	기준없음	76.82	상기시험확인함		
포화지방(g/100g)	기준없음	0.72	상기시험확인함		
당류(g/100g)	기준없음	1.29	상기시험확인함		
열량(kcal/100g)	기준없음	405.75	상기시험확인함		
조지방(g/100g)	기준없음	4.67	상기시험확인함		

(나) 당당한하루 레드미



문서확인번호 : TEUN-SP6X-EVQG-DJE8

시험 · 검사성적서

발행번호	R20191126-0002		접수번호	190101432-001	
검사완료일	2019-11-26		접수연월일	2019-11-05	
제품명	RED ME				
(품목)제조번호			품목제조신고번호		
유형 · 재질 · 품목명	기타기준규격외				
제조(수입)일			유통(품질유지)기한		
의뢰자	성명				
	소재지				
제조원	업체명			제조국	
	소재지				
시험 · 검사목적	식품 기타(참고용)				
시험 · 검사 항목 및 결과					
시험 · 검사 항목	시험 · 검사 기준	시험 · 검사 결과	판정	비고	
나트륨(mg/100g)	기준없음	4.47	상기실험확인함		
조단백질(g/100g)	기준없음	0.00	상기실험확인함		
트랜스지방(g/100g)	기준없음	0.00	상기실험확인함		
콜레스테롤(mg/100g)	기준없음	0.00	상기실험확인함		
탄수화물(g/100g)	기준없음	6.37	상기실험확인함		
포화지방(g/100g)	기준없음	0.00	상기실험확인함		
당류(g/100g)	기준없음	4.99	상기실험확인함		
열량(kcal/100g)	기준없음	25.75	상기실험확인함		
조지방(g/100g)	기준없음	0.03	상기실험확인함		

(다) 당당한하루 레드케이 스틱



문서확인번호 : 80QD-JOAT-T2SM-IAT7

시험 · 검사성적서

발행번호	R20191126-0003		접수번호	190101432-002	
검사완료일	2019-11-26		접수연월일	2019-11-05	
제품명	레드K스틱				
(품목)제조번호			품목제조신고번호		
유형 · 재질 · 품목명	기타기준규격외				
제조(수입)일			유통(품질유지)기한		
의뢰자	성명				
	소재지				
제조사	업체명			제조국	
	소재지				
시험 · 검사목적	식품 기타(참고용)				
시험 · 검사 항목 및 결과					
시험 · 검사 항목	시험 · 검사 기준	시험 · 검사 결과	판정	비고	
나트륨(mg/100g)	기준없음	3.79	상기시험확인함		
조단백질(g/100g)	기준없음	0.42	상기시험확인함		
트랜스지방(g/100g)	기준없음	0.00	상기시험확인함		
콜레스테롤(mg/100g)	기준없음	0.00	상기시험확인함		
탄수화물(g/100g)	기준없음	36.70	상기시험확인함		
포화지방(g/100g)	기준없음	0.00	상기시험확인함		
당류(g/100g)	기준없음	20.53	상기시험확인함		
열량(kcal/100g)	기준없음	149.83	상기시험확인함		
조지방(g/100g)	기준없음	0.15	상기시험확인함		

라. 연구성과

(1) 특허출원 및 논문게재

(가) 특허출원

홍국추출물을 포함하는 항당뇨 및 항비만 효능을 갖는 조성물을 이용한 기능성 음료와 그 제조방법에 관한 것으로 특히, 본발명은 홍국추출물의 제조공정을 통해 항당뇨 효능 증진과 지방축적 억제 효능을 통해 당뇨병 및 비만 치료 예방에 효과적으로 이용될 수 있는 신규한 기능성 음료 및 소재로의 활용이 기대되는 것으로 이에따른 특허출원을 완료하였다.

출원번호통지서

출원일자 2019.12.09

특기사항 심사청구(유) 공개신청(무)

출원번호 10-2019-0162721 (접수번호 1-1-2019-1269480-60)

출원인명칭 주식회사 비에이치앤바이오(1-2016-006434-7)

대리인성명

발명자성명

발명의명칭 홍국추출물을 포함하는 당뇨 및 비만 예방 조성물 함유 음료 및 그 제조방법

특 허 청 장

(나) 상표출원

홍국이 첨가된 제품인 선식, 음료, 스틱을 매일매일 섭취함으로써 ‘건강하고
힘찬 일상’을 즐기자는 뜻으로 ‘당당한 하루’를 상표 출원함

① ‘당당한하루’ 상품류 5류

출원 번호 통지서

출원 일자 2019.12.12
특기사항 참조번호(0001)
출원 번호 40-2019-0193103 (접수번호 1-1-2019-1287408-15)
출원인 명칭 주식회사 비에이치앤바이오(1-2016-006434-7)
대리인 성명 윤의섭(9-1998-000376-8)

특 허 청 장

② ‘당당한하루’ 상품류 30류

출원 번호 통지서

출원 일자 2019.12.12
특기사항 참조번호(0003)
출원 번호 40-2019-0193115 (접수번호 1-1-2019-1287478-90)
출원인 명칭 주식회사 비에이치앤바이오(1-2016-006434-7)
대리인 성명 윤의섭(9-1998-000376-8)

특 허 청 장

③ ‘당당한하루’ 상품류 32류

출원번호통지서

출원일자 2019.12.12
특기사항 참조번호(0002)
출원번호 40-2019-0193107 (접수번호 1-1-2019-1287444-48)
출원인명칭 주식회사 비에이치앤바이오(1-2016-006434-7)
대리인성명 윤의섭(9-1998-000376-8)

특허청장

(다) 논문게재

① 한국식품영양과학회지 제48권 제10호 2019 논문게재

J Korean Soc Food Sci Nutr
48(10), 1053-1060(2019)

한국식품영양과학회지
<http://doi.org/10.3746/jkfn.2019.48.10.1053>

Lactobacillus plantarum BHN-LAB 33에 의한 천궁 발효 추출물의 항산화 활성 증대 효과 평가

Increased Antioxidant Activity of the Fermented *Cnidium officinale* Extract by *Lactobacillus plantarum* BHN-LAB 33

Su Jin Jeong¹, Byung-Hyuk Kim¹, Jun-Hyeong Lee^{1,2}, YeEun Park¹,
Jung-Gyu Kim^{1,2}, Gi-Seok Kwon², and Jung-Bok Lee¹

¹Institute for Development of Bio-industrial Materials, BHN-BIO Co., LTD.

²Division of Horticulture & Medicinal Plant, Andong National University

ABSTRACT *Cnidium officinale* Makino (Umbelliferae) is an endemic species in China that has been cultivated in Korea, China, and Japan. *C. officinale* is used as traditional medicine in Asia because of its effects on pain, inflammation, menstrual disturbance, blood pressure depressant, and anti-vitamin deficiency disease. This study compared the antioxidant activity, total polyphenol, and total flavonoid content of fermented *C. officinale* with lactic acid bacteria and non-fermented *C. officinale*. The activity of the fermented *C. officinale* was increased, as illustrated by the 1.7 fold increase in 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical scavenging activity. In addition, 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) radical scavenging activity, and superoxide dismutase, total polyphenol, and total flavonoid contents were increased slightly. These results provide the basic data needed to understand the biological activities of fermented *C. officinale* for the development of functional foods and biological materials.

Key words: antioxidant, bioconversion, fermentation, lactic acid bacteria, *Cnidium officinale* Makino

② 한국식품영양과학회지 제49권 제2호 논문 게재 예정

게재 (예정) 증명서

47209 부산시 부산진구 중앙대로 993, 1010호 (양정동)
#1010, 993, Jungang-daero, Busanjin-gu, Busan 47209, Korea
TEL: 051-866-3694 FAX: 051-866-3695

2020. 1. 29

접수번호 : K19-11-04

논문제목 : 혐기성 조건에서 유산균에 의한 Daidzin의 생물전환

저 자 :

위 논문은 본 학회지에 투고하여 게재를 위한 모든 심사과정을 거쳤으므로
한국식품영양과학회지 제49권 제2호(2020년 2호, 2020년 2월말 발간 예정)에
게재될 것임을 증명합니다.

한국식품영양과학회



(라) 학술발표

순번	발표자	발표제목	발표일시	발표일시
1		biological activitiy and anti-diabetic effect of fermented red rice by monascus	KMB 2018 45th Annual meeting & International Symposium	2018.06.27.
2		Biological Activity and Anti-Diabetic Effect of Fermentation Red-rice by isolated fungi Monascus sp. BHN-321	21st International conference on Food & Nutriotion	2018.07.25.
3		Anti-Diabetic Effect and Antioxidative Activity of Rice Fermented by Monascus purpureus BHN-MK 01	2018 한국미생물학회연합 국제학술대회	2018.10.12.
4		Antioxidative Activity and α -glucosidase inhibition Activity of Solvent Fraction from Red-Yeast-Rice	2018 한국미생물학회연합 국제학술대회	2018.10.12.
5		Antioxidative Activity and α -glucosidase inhibition Activity of Solvent Fraction from Fermented Barley with Monascus perpures BHN-MK01	2018 한국미생물학회연합 국제학술대회	2018.10.12.
6		change in antioxodant activity of Monascus spp.BHN fermented riceculture time	2019 한국미생물생명공학회 영남지부 학술대회	2019.02.14.
7		Antioxidant activities and inhibit lipopolysaccharide- induced COX-2 and iNOS expression in RAW 264.7 Macrophages of fermented Red yeast rice with Mon	Power of microbes in ihdustry and environment 2019	2019.05.17.
8		Anti-obesity effect of red yeast rice (Monascus purpureus) extract in 3T3-L1 adipocytes	46th annual meeting&internatio nal symposium	2019.06.24.
9		Anti-oxidative activity of red rice and red barley extracrts anf their fractions	46th annual meeting&internatio nal symposium	2019.06.24.
10		Evaluation of thr anti oxidant activitrs and inhibition of COX2 expression for red rice yeast ethanol extracts with RAW264.7 macrophages	46th annual meeting&internatio nal symposium	2019.06.24.
11		Isolation and identification of Monascus sp. MK10 that does not produce citrinin	46th annual meeting&internatio nal symposium	2019.06.24.
12		comparison of Monascus purpureus growth and natural pigment production on different media	KOSFOP 2019 40th International Symposium and Annual Meeting	2019.08.21.

- (2) 균주기탁
 (가) 홍국균 *Monascus purpureus* BHN-M10(KCTC13913BP)

BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL RECOGNITION OF THE DEPOSIT
 OF MICROORGANISMS FOR THE PURPOSE OF PATENT PROCEDURE

INTERNATIONAL FORM

RECEIPT IN THE CASE OF AN ORIGINAL DEPOSIT


issued pursuant to Rule 7.1

TO: BHNBIOLINC.

BHNBIOLINC.

52 Shincheoksan-dan 1-ro, Deoksan-myeon, Incheon-gun, Chungcheongbuk-do

Republic of Korea

I. IDENTIFICATION OF THE MICROORGANISM	
Identification reference given by the DEPOSITOR: <i>Monascus purpureus</i> BHN-M10	Accession number given by the INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY: KCTC 13913BP
II. SCIENTIFIC DESCRIPTION AND/OR PROPOSED TAXONOMIC DESIGNATION	
The microorganism identified under I above was accompanied by: <input type="checkbox"/> a scientific description <input type="checkbox"/> a proposed taxonomic designation (Mark with a cross where applicable)	
III. RECEIPT AND ACCEPTANCE	
This International Depositary Authority accepts the microorganism identified under I above, which was received by it on August 9, 2019 .	
IV. RECEIPT OF REQUEST FOR CONVERSION	
The microorganism identified under I above was received by this International Depositary Authority on and a request to convert the original deposit to a deposit under the Budapest Treaty was received by it on	
V. INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY	
Name: Korean Collection for Type Cultures Address: Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology (KRIBB) 181, Ipsin-gil, Jeongeup-si, Jeollabuk-do 56212 Republic of Korea	Signature(s) of person(s) having the power to represent the International Depositary Authority or of authorized official(s):  KIM, Song-Gun, Director Date: August 9, 2019

Form BP/4 (KCTC Form 17)

total page

(나) 유산균 *Lactobacillus brevis* BHN-LAB127(KCTC13441BP)

BUDAPEST TREATY ON THE INTERNATIONAL RECOGNITION OF THE DEPOSIT
OF MICROORGANISMS FOR THE PURPOSE OF PATENT PROCEDURE

INTERNATIONAL FORM

RECEIPT IN THE CASE OF AN ORIGINAL DEPOSIT


issued pursuant to Rule 7.1

TO: BHNBIO Inc.

BHNBIO Inc.

14, Dongbu-daero 436beon-gil, Osan-si, Gyeonggi-do 18150

Republic of Korea

I. IDENTIFICATION OF THE MICROORGANISM	
Identification reference given by the DEPOSITOR: <i>Lactobacillus brevis</i> BHN-LAB127	Accession number given by the INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY: KCTC 13441BP
II. SCIENTIFIC DESCRIPTION AND/OR PROPOSED TAXONOMIC DESIGNATION	
The microorganism identified under I above was accompanied by: <input type="checkbox"/> a scientific description <input type="checkbox"/> a proposed taxonomic designation (Mark with a cross where applicable)	
III. RECEIPT AND ACCEPTANCE	
This International Depositary Authority accepts the microorganism identified under I above, which was received by it on December 20, 2017 .	
IV. RECEIPT OF REQUEST FOR CONVERSION	
The microorganism identified under I above was received by this International Depositary Authority on and a request to convert the original deposit to a deposit under the Budapest Treaty was received by it on	
V. INTERNATIONAL DEPOSITARY AUTHORITY	
Name: Korean Collection for Type Cultures Address: Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology (KRIBB) 181, Ipsin-gil, Jeongeup-si, Jeollabuk-do 56212 Republic of Korea	Signature(s) of person(s) having the power to represent the International Depositary Authority or of authorized official(s):  KIM, Cha Young, Director Date: December 20, 2017

Form EP/4 (KCTC Form 17)

sole page

(3) 안전성 검사

시제품에 대한 안정성 검사를 진행 완료함

(가) 당당한하루 레드밀



문서확인번호 : KJLW-M68B-BQCG-3TWZ

시험 · 검사성적서

발행번호	R20191212-0023		접수번호	190101597-002	
검사완료일	2019-12-12		접수연월일	2019-11-29	
제품명	당당한하루 레드미				
(품목)제조번호			품목제조신고번호		
유형 · 재질 · 품목명	기타기준규격외				
제조(수입)일			유통(품질유지)기한		
의뢰자	성명				
	소재지				
제조원	업체명				
	소재지				
시험 · 검사목적	식품 기타(참고용)				
시험 · 검사 항목 및 결과					
시험 · 검사 항목	시험 · 검사 기준	시험 · 검사 결과	판정	비고	
세균수(CFU/g)	기준없음	3500000	상기실험확인함		
대장균(CFU/ml)	기준없음	0	상기실험확인함		

종합판정 : 상기실험확인함

시험검사원 : 서유미, 오민석

시험검사책임자 : 권순열

비고 :

※ 위 판정은 의뢰된 시험 · 검사 항목만을 대상으로 한 것입니다.

※ 지면이 부족한 경우 시험 · 검사 항목 및 결과란은 별지로 작성 가능합니다.

※ 검사결과를 광고하거나 용기 · 포장 등에 표시할 때에는 시험 · 검사성적서 전체 내용을 모두 표시하여야 합니다.

2019년12월12일

재단법인 경북바이오산업연구원

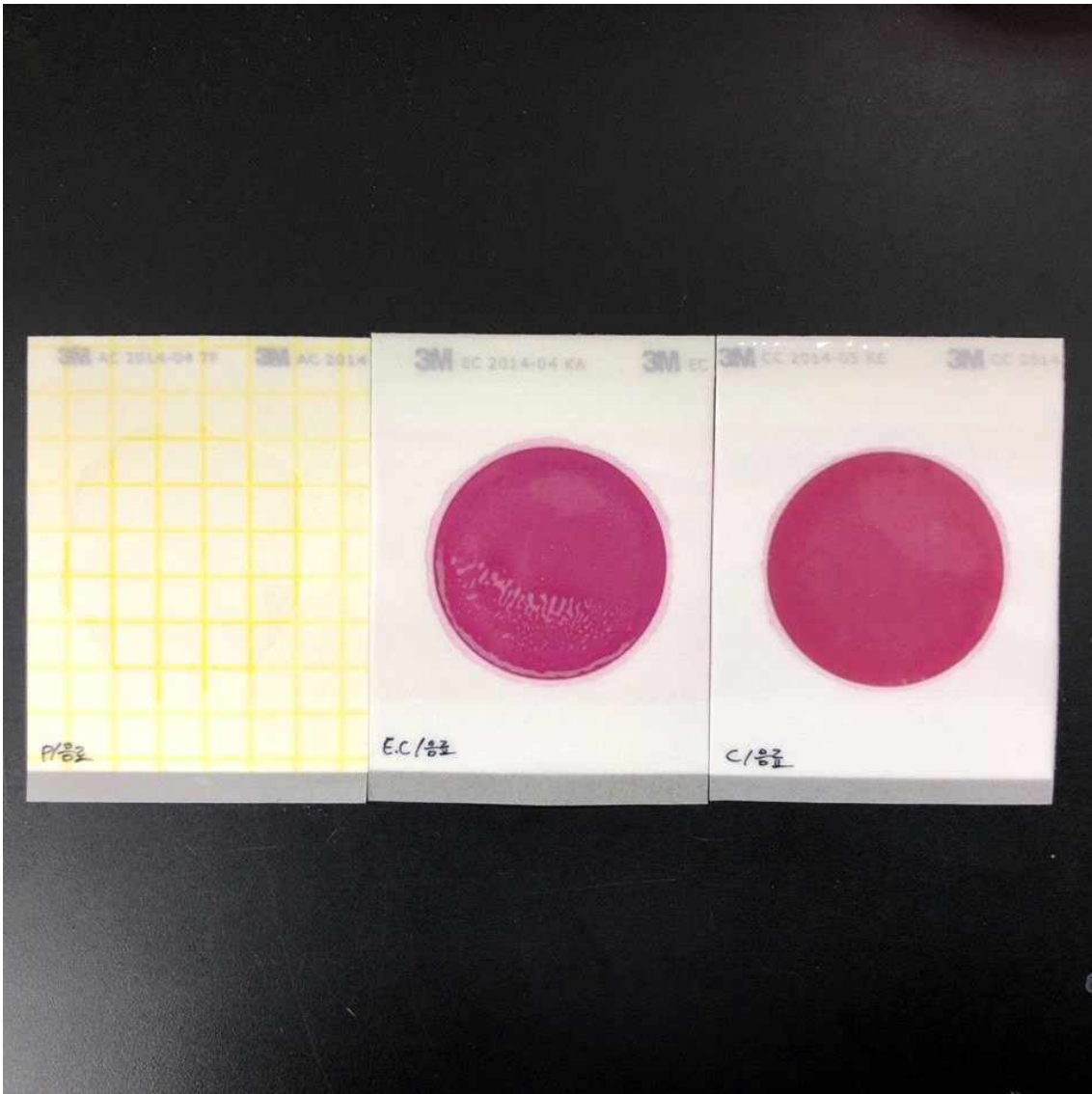


36618 경상북도 안동시 풍산읍 산업단지2길 5

T:054-850-6914

F:054-850-6999

자체 당당한하루 레드미 일반세균, 대장균, 포도상구균 검사 실시



(나) 당당한하루 레드미

문서확인번호 : DCMV-RZV9-9TWA-INB2



시험 · 검사성적서

발행번호	R20191212-0022		접수번호	190101597-001	
검사완료일	2019-12-12		접수연월일	2019-11-29	
제품명	당당한하루 레드미				
(품목)제조번호			품목제조신고번호		
유형 · 재질 · 품목명	기타기준규격외				
제조(수입)일			유통(품질유지)기한		
의뢰자	성명				
	소재지				
제조원	업체명				
	소재지				
시험 · 검사목적	식품 기타(참고용)				
시험 · 검사 항목 및 결과					
시험 · 검사 항목	시험 · 검사 기준	시험 · 검사 결과	판정	비고	
세균수(CFU/g)	기준없음	0	상기실험확인함		
대장균(CFU/g)	기준없음	0	상기실험확인함		
금속성이물(mg/kg)	기준없음	0.4	상기실험확인함		

종합판정 : 상기실험확인함

시험검사원 : 서유미, 오민석, 이진목

시험검사책임자 : 권순열

비고 :

※ 위 판정은 의뢰된 시험 · 검사 항목만을 대상으로 한 것입니다.

※ 지면이 부족한 경우 시험 · 검사 항목 및 결과란은 별지로 작성 가능합니다.

※ 검사결과를 광고하거나 용기 · 포장 등에 표시할 때에는 시험 · 검사성적서 전체 내용을 모두 표시하여야 합니다.

2019년12월12일

재단법인 경북바이오산업연구원



36618 경상북도 안동시 풍산읍 산업단지2길 5

T:054-850-6914

F:054-850-6999

(다) 당당한하루 레드케이 스틱

문서확인번호 : GNU8-CA6B-QXCK-ES00



시험 · 검사성적서

발행번호	R20191212-0024		접수번호	190101597-003	
검사완료일	2019-12-12		접수연월일	2019-11-29	
제품명	당당한하루 레드케이스틱				
(품목)제조번호			품목제조신고번호		
유형 · 재질 · 품목명	기타기준규격외				
제조(수입)일			유통(품질유지)기한		
의뢰자	성명				
	소재지				
제조사	업체명				
	소재지				
시험 · 검사목적	식품 기타(참고용)				
시험 · 검사 항목 및 결과					
시험 · 검사 항목	시험 · 검사 기준	시험 · 검사 결과	판정	비고	
세균수(CFU/g)	기준없음	0	상기실험확인함		
대장균(CFU/g)	기준없음	0	상기실험확인함		

종합판정 : 상기실험확인함

시험검사원 : 서유미, 오민석

시험검사책임자 : 권순열

비고 :

※ 위 판정은 의뢰된 시험 · 검사 항목만을 대상으로 한 것입니다.

※ 지면이 부족한 경우 시험 · 검사 항목 및 결과란은 별지로 작성 가능합니다.

※ 검사결과를 광고하거나 용기 · 포장 등에 표시할 때에는 시험 · 검사성적서 전체 내용을 모두 표시하여야 합니다.

2019년12월12일

재단법인 경북바이오산업연구원



36618 경상북도 인동시 풍산읍 산업단지2길 5

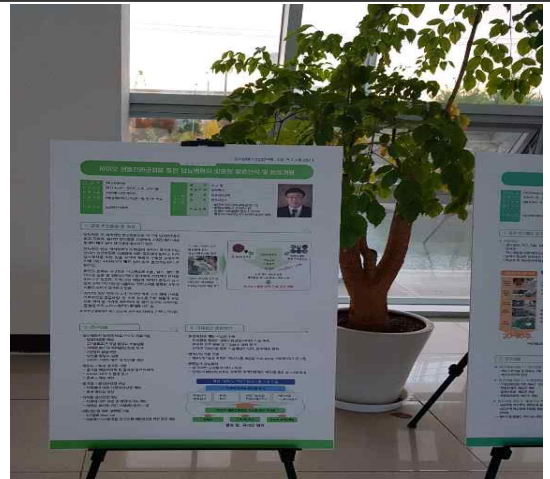
T:054-850-6914

F:054-850-6999

(4) 전시회 참가



안동국제탈춤페스티벌



(재)경북바이오벤처프라자



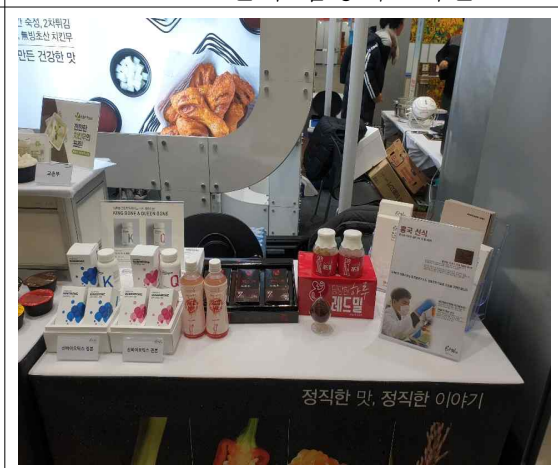
2019 교촌허니레이디오픈골프대회



2019 오크밸리 캠핑페스티벌



2019 교촌레드산악자전거축제



2019 대구국제식품산업전

(5) 최종제품

(가) 당당한하루 레드밀



(나) 당당한하루 레드미



(다) 당당한하루 레드케이 스틱



4-2. 제1협동기관 : 한스바이오

가. 제1협동기관 연구결과

(1) 홍국쌀 대량생산 공정 및 운전조건 개발

- 홍국쌀 대량생산 공정 개발을 위해 기존 내열봉투 봉지배양방식에서 20L통과 사각 트레이를 활용한 방식을 이용하여 배양하였다.
- 배양 조건은 기존 배양방법과 동일하게 수분함량을 조정하여 전배양한 홍국균을 종균으로 하여 접종하였다.
- 종균배양은 PDA고체 평판배이를 이용하여 홍국 균주를 30℃에서 7일간 배양하였다. 배양된 고체배지로부터 PDB에 홍국 균주를 절편으로 잘라 넣어 180rpm 30℃배양을 실시하였다.



<그림83. 홍국쌀 배양에 필요한 기구>

- 1차적으로 멸균봉투 배양을 통해 배양량을 설정하고 20L 통배양과 트레이 배양을 비교하여 대량배양을 설정하였다. 배양 운전 조건은 대량생산을 위한 배양실에 최적 배양온도 28℃ 설정하여 배양을 실시하였다. 배양 봉투에는 약 1.5kg까지의 배양이 가능하며 물통의 경우 약 10Kg까지 배양이 가능하였다.
- 쌀을 흐르는 물에 깨끗이 씻고 20분 침지 후 20분 물빼기를 해준 후 최종함수율을 조절을 한 다음 121℃ 30분간 고압멸균기를 이용하여 증자를 하여 쌀 시료를 준비한다. 멸균이 끝난 증자 쌀을 식힌 후 종균을 일정량 접종하여 흔들어 종균과 잘 섞이도록 한다(수분함량과 접종량은 기업의 요청으로 표기하지 않음). 대량 배양은 종균을 접종 후 1일이 지난 뒤 매일 2회 흔들어 주어 홍국균이 균질하게 증식 할 수 있도록 하여 10일간 배양을 한다. 소

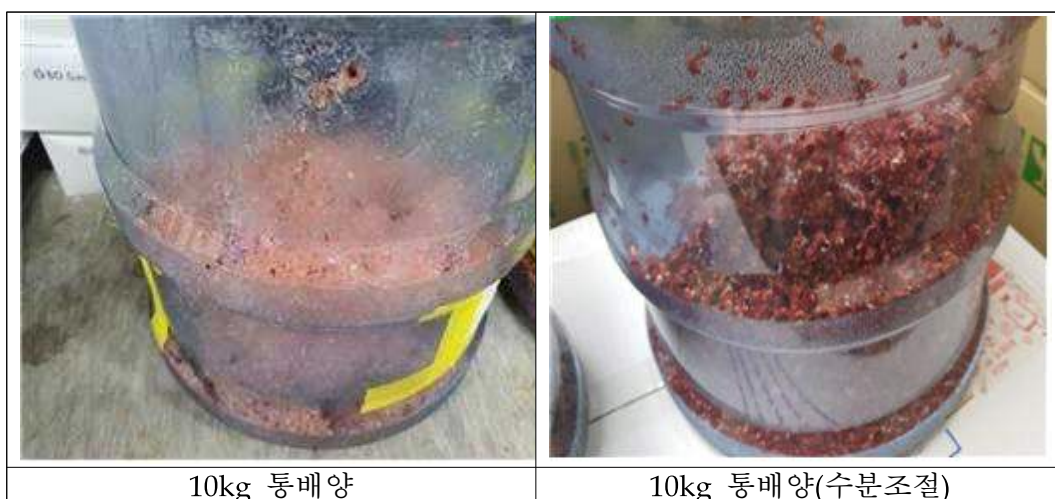
량의 경우 15일배양을 하였으나 대량배양의 조건은 기존 배양에서 10-100배 까지 증가하여 대량배양을 실시하였다.

- 홍국쌀 대량생산을 위한 방법으로 기존배양조건에서 10-101배까지 증가시켜 배양 경향을 조사하여 대량배양의 가능성을 확인하였다. 기존 200g의 봉투 배양에서는 2kg까지의 배양이 가능한 것으로 조사 되었다. 하지만 수분조정의 문제에 따라 오염이 되는 경우와 홍국균이 증식되지 않는 경우가 종종 나타났다.



<그림84. 홍국쌀 2kg 배양 과정>

- 생수통배양은 10kg 이상 배양이 가능한 것으로 조사 되었으며, 10kg을 증가 후 홍국균을 접종하여 배양한 결과 4일 정도까지는 골고루 잘 증식을 하다 5일 차부터 수분 함량이 증가하여 뭉쳐서 배양이 진행이 되어 상품성이 없는 것으로 조사되었다. 이러한 현상을 없애기 위해 통에 구멍을 뚫어 원활한 공기 흐름을 주어 자연적 수분 조절을 위해 배양을 하였으나, 통배양에서는 수분조절의 문제로 통을 이용한 대량 생산은 어려울 것으로 조사되었다.



<그림85. 홍국쌀 2kg 배양 과정>

- 홍국배양에 있어서 수분 조절이 가장 중요하므로 대량 생산 방법은 사각 트레이를 활용하여 표면적을 넓혀 수분조절을 통한 대량 배양을 실시하였다.
- 막걸리 종국을 배양하는 방법을 변형하여 홍국쌀 대량생산을 위해 트레이에 증자된 쌀 10kg을 넣고 종균을 접종하여 배양실에서 배양을 진행하여 대량 배양을 성공하였다. 이러한 방식은 향후 홍국 전용 배양 실로 사용한다면 전통방식인 국실을 활용하면 가능성이 있을 것으로 사료된다.



<그림86. 트레이 배양 및 배양실>

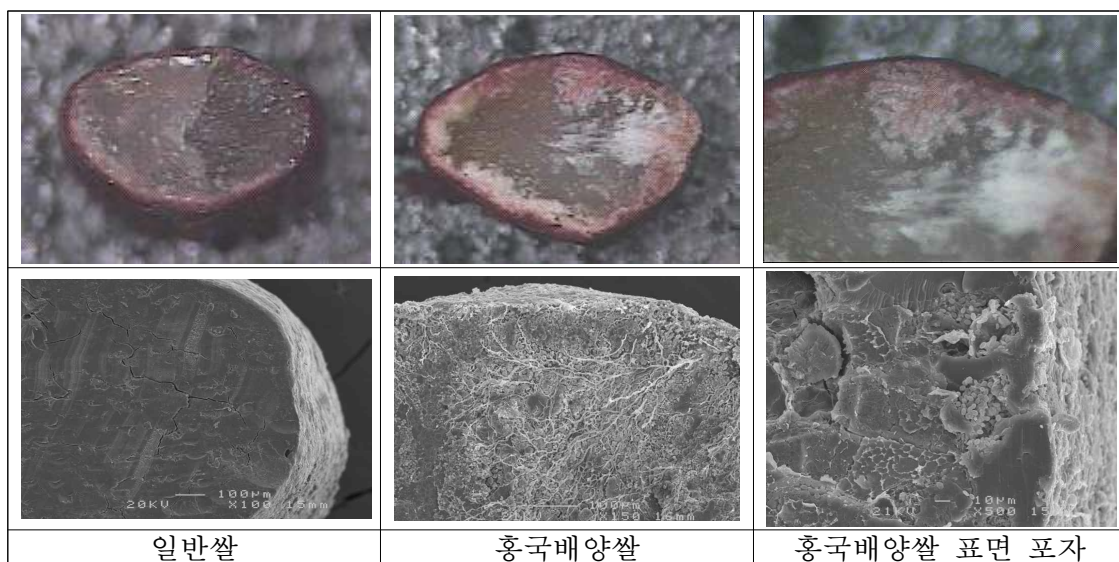
(2) 홍국쌀 양산품 개발

- 홍국쌀의 대량배양을 통한 양산품 생산을 위해 최종적으로 배양실을 활용하여 트레이에 배양을 실시하였다. 양산방법은 대량배양 방법 중 트레이를 이용한 배양실 배양방법을 이용하여 실시하였다.
- 백미10Kg을 세척, 침지, 물빼기 과정을 거쳐 121℃ 30분간 증자를 한 후 증자된 쌀을 식힌다음 종균을 일정량 접종한 후 하루가 지난뒤 골고루 섞어 홍국균이 잘 퍼지도록 하였으며, 배양온도는 기존 온도 보다 1-2℃를 낮추어 배양을 10일 진행하였다. 배양기간 동안 오염이 되지 않도록 공기 순환을 최소로 하였다.

이렇게 배양한 쌀을 건조기를 통해 건조 후 통 홍국쌀 또는 홍국 분말로 제품을 만들어 사용하였다.



<그림87. 트레이 배양 과정>



<그림88. 홍국쌀 전자현미경 확대 사진>

4-3. 제2협동기관 : (재)경북바이오산업연구원

가. 제1협동기관 연구결과

(1) 발효 홍국선식 양산품 개발

(가) 발효 홍국선식용 원료 선정

구 분	원 료 명	현 황	비고
1	홍국쌀 분말	구 입	
2	참쌀현미 분말	구 입	
3	백태분말	구 입	
4	메밀분말	구 입	
5	귀리분말	구 입	
6	보리분말	구 입	
7	흑미분말	구 입	
8	율무분말	구 입	
9	감초분말	구 입	
10	옥수수분말	보 유	
11	혼합탈지분유	보 유	
12	폴리텍스트로즈	보 유	
13	난소화성말토덱스트린	보 유	
14	비타민미네랄혼합분말	보 유	
15	프락토올리고당	보 유	
16	자일리톨	구 입	
17	효소처리스테비오사이드	구 입	
18	야채추출물분말	구 입	
19	요거트향	구 입	
20	카놀라오일분말	구 입	
21	코코넛크림파우더	구 입	
22	트레할로스	구 입	
23	수크랄로스	구 입	
24	곡물믹스	구 입	
25	아로니아	보 유	
26	오디	보 유	
27	꾸지뽕	보 유	
28	뽕잎	보 유	
29	바닐라	구 입	
30	WPC(식첨_유청단백)	구 입	
31	ISP(식첨_분리대두단백)	구 입	



<그림89. 홍국쌀 분쇄에 따른 물성변화>

(나) 발효 홍국선식용 배합비 선정

1차 레시피				2차 레시피			
품명	원료 투입량	배합비율(%)		품명	원료 투입량	배합비율(%)	
1	홍국쌀 분말	30.0	3.00%	1	현미참쌀가루	350.0	35.00%
2	보리가루분말	270.0	27.00%	2	보리쌀가루	255.0	25.50%
3	검은콩가루	190.0	19.00%	3	검정콩가루	120.0	12.00%
4	백태가루	150.0	15.00%	4	백태가루	110.0	11.00%
5	귀리가루	140.0	14.00%	5	귀리가루	105.0	10.50%
6	현미참쌀가루	70.0	7.00%	6	흑미참쌀가루	30.0	3.00%
7	흑미참쌀가루	70.0	7.00%	7	홍국쌀분말	25.0	2.50%
8	메밀가루	30.0	3.00%	8	야채가루	5.0	0.50%
9	돼지감자가루	20.0	2.00%		소계	1,000	100.00%
10	팽잎가루	15.0	1.50%				
11	감초가루	10.0	1.00%				
12	야채가루	5.0	0.50%				
	소계	1,000	100.00%				

3차 레시피				4차 레시피			
품명	원료 투입량	배합비율(%)		품명	원료 투입량	배합비율(%)	
1	검정콩가루	270.0	27.00%	1	현미참쌀	290.0	29.00%
2	흑미참쌀가루	160.0	16.00%	2	보리가루	200.0	20.00%
3	현미참쌀가루	130.0	13.00%	3	흑미참쌀가루	195.0	19.50%
4	보리가루	115.0	11.50%	4	검은콩가루	170.0	17.00%
5	백태가루	90.0	9.00%	5	귀리가루	70.0	7.00%
6	귀리가루	70.0	7.00%	6	메밀가루	30.0	3.00%
7	오디가루	50.0	5.00%	7	홍국쌀분말	35.0	3.50%
8	분리대두단백	45.0	4.50%	8	야채가루	10.0	1.00%
9	무수결정포도당	30.0	3.00%		소계	1,000	100.00%
10	야채가루	25.0	2.50%				
11	홍국쌀분말	15.0	1.50%				
	소계	1,000	100.00%				

품 명		원 료 투입양	배 합 비율(%)
1	현미참쌀가루	200.0	20.00%
2	흑미참쌀가루	200.0	20.00%
3	귀리가루	140.0	14.00%
4	보리가루	120.0	12.00%
5	백태가루	120.0	12.00%
6	검은콩가루	120.0	12.00%
7	야채가루	50.0	5.00%
8	돼지감자가루	30.0	3.00%
9	홍국쌀분말	20.0	2.00%
소 계		1,000	100.00%

품 명		원 료 투입양	배 합 비율(%)
1	홍국쌀 분말	300.0	30.00%
2	보리가루	240.0	24.00%
3	현미참쌀가루	120.0	12.00%
4	흑미참쌀가루	100.0	10.00%
5	귀리가루	100.0	10.00%
6	검은콩가루	70.0	7.00%
7	백태가루	50.0	5.00%
8	야채가루	20.0	2.00%
소 계		1,000	100.00%

5차 레시피				6차 레시피			
--------	--	--	--	--------	--	--	--

품 명		원 료 투입양	배 합 비율(%)
1	보리가루	100.0	20.00%
2	귀리가루	100.0	20.00%
3	흑미참쌀가루	100.0	20.00%
4	검은콩가루	100.0	20.00%
5	오디가루	25.0	5.00%
6	홍국쌀분말	50.0	10.00%
7	탈지분유	10.0	2.00%
8	자일리톨	15.0	3.00%
소 계		500	100.00%

품 명		원 료 투입양	배 합 비율(%)
1	현미참쌀가루	125.0	25.00%
2	보리가루	110.0	22.00%
3	백태가루	60.0	12.00%
4	검은콩가루	55.0	11.00%
5	귀리가루	45.0	9.00%
6	뽕잎가루	15.0	3.00%
7	야채가루	15.0	3.00%
8	홍국쌀분말	75.0	15.00%
소 계		500	100.00%

7차 레시피				8차 레시피			
--------	--	--	--	--------	--	--	--

9차 레시피			10차 레시피				
품명	원료 투입량	배합비율(%)	품명	원료 투입량	배합비율(%)		
1	현미찹쌀가루	333.0	33.30%	1	현미찹쌀	260.0	26.00%
2	흑미찹쌀가루	140.0	14.00%	2	보리가루	190.0	19.00%
3	검정콩가루	120.0	12.00%	3	흑미찹쌀가루	185.0	18.50%
4	백태가루	120.0	12.00%	4	검은콩가루	170.0	17.00%
5	귀리가루	100.0	10.00%	5	귀리가루	65.0	6.50%
6	보리가루	100.0	10.00%	6	메밀가루	30.0	3.00%
7	탈지분유	50.0	5.00%	7	홍국쌀분말	30.0	3.00%
8	홍국쌀분말	30.0	3.00%	8	야채가루	10.0	1.00%
9	야채가루	7.0	0.70%	9	돼지감자분말	30.0	3.00%
소계		1,000	100.00%	10	프락토올리고당	30.0	3.00%
소계		1,000	100.00%	소계		1,000	100.00%

품명	원료 투입량	배합비율(%)	
1	현미찹쌀	250.0	25%
2	보리가루	190.0	19%
3	흑미찹쌀가루	165.0	16.5%
4	검은콩가루	150.0	15%
5	귀리가루	65.0	6.5%
6	자일리톨	40.0	4%
7	홍국쌀분말	30.0	3%
8	메밀가루	30.	3%
9	프락토올리고당	30.0	3%
10	돼지감자분말	29.0	2.9%
11	야채가루	10.0	1%
12	코코넛밀크파우더	10.0	1%
13	유산균혼합분말	1.0	0.1%
소계		1,000	100.00%
최종 레시피			

(다) 발효 홍국선식 제조공정 개발

공정명	제조방법 설명	
칭량	각 원료를 칭량한다.	
▼ 혼합	적당하게 혼합한다.	
▼ 세척	상수를 이용하여 1차, 2차 세척한다.	
▼ 건조	열풍건조기를 이용하여 50℃, 6시간 건조한다.	
▼ 로스팅	330℃, 10분간 로스팅한다.	
▼ 분쇄	분쇄기를 이용하여 분쇄한다.	
▼ 포장	소포장한다.	
		
원료준비	측량	혼합
		
세척	건조	분쇄

<그림90. 발효 홍국선식 제조공정>

(2) 발효 홍국음료 양산품 개발

(가) 발효 홍국음료 배합비 개발

	색	향	맛	특징	종합 결론
T1	색이 혼탁하며, 정제하여도 좋은 색을 나타내지 않을 것만 같음	플랜세의 신선함이 느껴짐	단맛이 매우 약해, 싱거운 느낌이 나기는 하나, 무설탕음료에 비해서는 단맛이 강함. 그러나, 무설탕 음료와 비교해 큰 특징이 없음	치킨과 함께 섭취시 싱거운 맛이 더욱 증가되고, 느끼함을 잡을 수 없음	향이 Best
	약간 노란색이 좋다 2% 음료가 생각남	약간 달달한 향이 난다	2% 음료 맛, 토레타 음료로 비슷하고 이온음료와 같다. 끝맛이 약간 텁음	치킨과 함께 먹을 때, 가장 어울림 (탄산없이 그대로)	
	2%음료느낌이 나며, 레몬(과즙)음료처럼 보임 물같은 느낌이 남	무취의 비슷한 연한냄새	레몬과즙음료처럼 상큼한 맛이 나며, 뒷맛이 다소 개운함	식사후 가글 느낌이 들 치킨섭취시 가글 느낌이 강함	
	너무 연한색 연한 노란색	사이다 향	2% 부족하며, 연함 약한 소주맛이 남	밍밍한 맛 치킨과 함께 섭취시 어울리지 않음	
	물에 뛰탄 느낌 밋밋함	달콤함 꽃향	2% 부족한 맛 끝맛이 시원함(민트향?) 치킨과 함께 먹으면 맛도 밋밋함	색을 보고 맛이 가능할 수있음 (예상하던 맛)	손이 안감
	비타민워터 맛	달달한 냄새 레몬주스 냄새가 남	달달함과 탄산빠진 맛이 남	치킨과 먹었을 때 느끼한 맛이 없어지지 않아 아쉬움	
T2	홍국의 이미지와는 어울리지 못하며, 분홍색이 약해 어린이 음료와 같은 느낌을 받음	건강음료, 이온음료, 박카스와 유사한 향이 남	민트맛이 끝맛을 잡아주고, 시원함 민트맛이 지속되어 개운함이 지속됨. 치킨이 아닌 음료수에 충실하여 평소에 마셔되 될 것 같으며, 단맛을 약간 줄여도 괜찮을 듯함	치킨콤보와 함께 섭취시 단맛이 더욱 배가되고, 민트맛으로 끝맛이 정리됨. 치킨과 먹을시 민트맛이 조금 더 강해도 좋을 듯함	맛 Best
	약간 분홍 빛	달달한 향이 T1보다 강함	달달한 맛이 조금 강함 아이들도 좋아할 맛 어린이 음료와 비슷함	치킨과 함께 먹을 때 좋기는 하나 탄산이 들어가면 더 어울릴 듯	
	시원스런 느낌의 핑크빛	복숭아향이 다소 묻어남	개운하고, 신맛이 먼저 느껴지며 섭취 후 박하느낌이 올라옴	향긋하면서 시큼하였고, 시원함. 치킨과 함께 섭취시 상큼함과 다소 단맛이 느껴짐	
	연한 핑크색	꽃향기	박카스 맛 (탄산 많이 없음)	탄산이 약함. 치킨과 먹을 때 가장 좋은 맛이 남. 향후 탄산을 첨가되면 좋을 것 같음	
	여리여리한 색 벗꽃색	T1에 비해 진한 향 꽃향+복숭아향	T1에 비해 진한 맛 입에 남는 끝맛이 시원함. 치킨과 먹으면 단맛이 강함	탄산이 첨가되면 청량감이 증가될 듯. 신맛이 가미되어도 깔끔할 듯 함	맛, 향 Best
	물빠진 핑크색	T1보다 더 달달하며, 복숭아 냄새가 남	시원한 맛이 강함 달달함	치킨과 어울리나 탄산이 없어 아쉬움(청량감 부족)	
T3	홍국의 이미지에 맞는 적당한 색임	향은 한약재 향이 강해 old 한 느낌이 강함. 생각, 계피등의 한약재 향이 강함. 개인적으로 계피향이 NG	단맛이 너무 강함. 계피맛이 너무 오래가서 청량감이 떨어짐	치킨과 먹었을 때 정리되는 느낌을 주기는 하나, 한약재의 불쾌감이 역시 지속됨	색 Best
	좀 더 강한 분홍색	건강음료 향(오미자? 계피)	떴은 맛이 좀 강함. 첫 맛이 부담스럽다	다른 음료보다 건강한 맛이 강하기는 하나, 치킨과 어울리지 않음. 탄산 첨가시 달라질 수도 있을 듯함	
	색감은 매우 좋으나, 다소 부담스러운 느낌이 남	연한 계피향이 남	계피맛이 먼저 나타나서 기호도에 대한 호불호가 나올 것 같음	계피향이 강함. 치킨과 함께 섭취시 시원한 느낌이 남	
	핑크색이 다른것에 비해 진함	상쾌한 향	쓰고 텁텁함	화학물질 맛이 진함. 치킨과 함께 먹었을 때, 화학물질 맛이 증가됨	
	여자여자한 색이 눈길을 사로잡음	복숭아향+약초향(계피등) 향으로 마냥 달콤하지는 않은 듯함. 치킨과 먹으면 향이 별로 느껴지지 않음	퐁미는 T2와 비슷한 듯 하지만, 끝맛, 입에 남는 맛이 어스러운 느낌 (젊은층 기호에는 별로). 치킨과 먹으니 시원함이 중화되어 적절한 많이 먹으면 화~한 느낌이 강해짐	치킨과 함께 하는 음료보다는 개별적으로 음용하는 건강음료가 좋을 듯함	색 Best 그러나, 치킨과 어울어지는 색을 아닌듯함
	보기 좋음	계피향이 남	시원함과 칼칼함이 느껴짐		



(나) 발효 홍국음료 최종 배합비

원료명	배합비율(%)	비고
정제수	82.094	
홍국추출액	10	
프락토올리고당	3.5	
과당	3.4	
에리스리톨	0.3	
함수구연산	0.15	
화이버슬	0.1	
생강농축액	0.1	
레몬농축액	0.1	
비타민C	0.05	
계피향	0.05	
구연산나트륨	0.03	
재제소금	0.03	
민트향	0.025	
레몬향	0.025	
생강향	0.02	
L-카르니틴	0.01	
베지추출물	0.010	
수크랄로스	0.006	
소 계	100	

(3) 발효 홍국스틱 양산품 개발

(가) 발효 홍국스틱 배합비 개발

원료명	500		4500
홍국 추출물	440.7	88.14	396630
유청단백	10	2.269117	10211.03
분리대두단백	5	50	225000
말토텍스트린	20	400	1800000
프락토올리고당	20	100	450000
결정과당	2	10	45000
곤약	2	10	45000
바나나향	0.3	15	67500
꽃소금		0.001333	6

1차 레시피

원료명	1	2	3	500ml		
홍국쌀 추출물	44.9	34.9	24.9	224.5	174.5	124.5
홍삼농축액	0.1	0.1	0.1	0.5	0.5	0.5
꿀	5	5	5	25	25	25
배농축액	15	15	15	75	75	75
도라지농축액	10	10	10	50	50	50
생강농축액	10	10	10	50	50	50
대추농축액	5	5	5	25	25	25
프락토올리고당	10	20	30	50	100	150
	100	100	100	500		

2차 레시피

원료명	배합비율(%)	비고
홍국 추출물	44.9	
배농축액	15	
도라지농축액	10	
생강농축액	10	
프락토올리고당	10	
꿀	5	
대추농축액	5	
홍삼농축액	0.1	
합계	100	

최종레시피

(나) 발효 홍국스틱 제조공정 개발

공정명	제조방법 설명
추출	홍국쌀에 물 15배수를 넣고 75℃에서 15시간 이상 추출한다.
혼합	홍국쌀 추출물, 배농축액, 도라지농축액, 생강농축액, 대추농축액, 홍삼농축액, 꿀, 프락토올리고당을 넣어 혼합한다.
살균	혼합 후 원료를 살균기로 이송하여 98℃이상에서 순간살균을 수행한다.
충진	5열 액상스틱포장기를 이용하여 10g씩 충진한다.
포장	제품 용량에 맞게 정해진 포장단위로 포장한다.

		
<p>추출</p>	<p>혼합</p>	<p>살균</p>
		
<p>충진</p>	<p>포장</p>	<p>제품</p>

<그림91. 발효 홍국스틱 제조공정>

5. 연구개발성과

2-5-1. 연구개발 성과목표 대비 실적

성과 목표	사업화지표										연구기반지표									
	지식 재산권			기술 실시 (이전)		사업화					기술 인증	학술성과				교육 지도	인력 양성	정책 활용· 홍보		기타 (타 연구 활용 등)
	특허 출원	특허 등록	품 종 등록	건 수	기술 료	제 품 화	매 출 액	수 출 액	고 용 창 출	투 자 유 치		SCI	비 SCI	논 문 평 균 IF	학 술 발 표			정 책 활 용	홍 보 전 시	
단위	건	건	건	건	백 만 원	백 만 원	백 만 원	백 만 원	명	백 만 원	건	건	건	건	명	건	건			
가중치	10				20	20		20					10	5	5		10			
최종목 표	2				2	20		8			2	2	2.0	4	2		3			
1차 연도	목 표	1						6			1	1	1.0	2	1					
	실 적	1						10						5			2			
2차 연도	목 표	1				2	20	2			1	1	1.0	2	1		3			
	실 적	4				3	31	6				2		7	1		4			
소 계	목 표	2				2	20	8			2	2	2.0	4	2		3			
	실 적	5				3	31	16				2		12	1		6			
종료 1차연도							40	40	1								1	1	1	
종료 2차연도		1					50	50	1								1			
종료 3차연도		1				1	62 5	65	1								1	1		
종료 4차연도							79 0	85	1							1	1			
종료 5차연도							99 0	11 0	1										1	
소 계		2				1	33 05	35 0	5							2	5	3		
합 계	2	2				3	33 25	35 0	13				2.0	4		2	8	3		

5-2. 연구성과

가. 국내외 논문 게재

No	논문명	학술지명	주저자명	호	국명	발행기관	SCI여부 (SCI/비SCI)	게재일
1.	<i>Lactobacillus plantarum</i> BHN-LAB 330에 의한 천궁 발효 추출물의 항산화 활성 증대 효과 평가	Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition		48	대한민국	한국식품영양과학회지	비SCI	2019.10
2	혐기성 조건에서 유산균에 의한 Daidzin의 생물전환	Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition		게재 예정	대한민국	한국식품영양과학회지	비SCI	2020.02

* SCI 논문 게재 준비중으로 2020년 투고 예정 임.

나. 국내 및 국제학술회의 발표

순번	발표자	발표제목	발표일시	발표일시
1		biological activity and anti-diabetic effect of fermented red rice by monascus	KMB 2018 45th Annual meeting & International Symposium	2018.06.27.
2		Biological Activity and Anti-Diabetic Effect of Fermentation Red-rice by isolated fungi Monascus sp. BHN-321	21st International conference on Food & Nutriotion	2018.07.25.
3		Anti-Diabetic Effect and Antioxidative Activity of Rice Fermented by Monascus purpureus BHN-MK 01	2018 한국미생물학회연합 국제학술대회	2018.10.12.
4		Antioxidative Activity and α -glucosidase inhibition Activity of Solvent Fraction from Red-Yeast-Rice	2018 한국미생물학회연합 국제학술대회	2018.10.12.
5		Antioxidative Activity and α -glucosidase inhibition Activity of Solvent Fraction from Fermented Barley with Monascus perpureus BHN-MK01	2018 한국미생물학회연합 국제학술대회	2018.10.12.
6		change in antioxodant activity of Monascus spp.BHN fermented riceculture time	2019한국미생물생명공학회 영남지부 학술대회	2019.02.14.
7		Antioxidant activities and inhibit lipopolysaccharide- induced COX-2 and iNOS expression in RAW 264.7 Macrophages of fermented Red yeast rice with Mon	Power of microbes in ihdustry and environment 2019	2019.05.17.
8		Anti-obesity effect of red yeast rice (Monascus purpureus) extract in 3T3-L1 adipocytes	46th annual meeting&international symposium	2019.06.24.
9		Anti-oxidative activity of red rice and red barley extractrs anf their fractions	46th annual meeting&international symposium	2019.06.24.
10		Evaluation of thr anti oxidant activitrs and inhibition of COX2 expression for red rice yeast ethanol extracts with RAW264.7 macrophages	46th annual meeting&international symposium	2019.06.24.
11		Isolation and identification of Monascus sp. MK10 that does not produce citrinin	46th annual meeting&international symposium	2019.06.24.
12		comparison of Monascus purpureus growth and natural pigment production on different media	KOSFOP 2019 40th International Symposium and Annual Meeting	2019.08.21.

다. 생명자원(생물자원)/화합물

No	생명자원(생물자원)/화합물명	등록/기탁번호	등록/기탁기관	발생년도
1	<i>Monascus purpureus</i> BHN-MK01	KCTC 13646BP	한국생명공학 연구원	2018.09.18
2	<i>Lactobacillus brevis</i> BHN-LAB33	KCTC 13645BP	한국생명공학 연구원	2018.09.18
3	<i>Monascus purpureus</i> BHN-M10	KCTC 13913BP	한국생명공 연구원	2019.08.09

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

No	지식재산권 등 명칭 (건별 각각 기재)	국명	출원			등록			기여율
			출원인	출원일	출원번호	등록인	등록일	등록번호	
1	신규 균주 홍국균 BHN-ML01의 발효산물과 이를 유효성분으로 함유하는 당뇨병 또는 지방간 개선 및 예방용 식품 조성물 및 그 제조방법	대한민국	8	2018.10.30	10-2018-0131008				100
2	홍국추출물을 포함하는 당뇨 및 비만 예방 조성물 함유 음료 및 그 제조방법	대한민국	7	2019.12.09	10-2019-0162721				100
3	당당한하루	대한민국	-	2019.12.12	40-2019-0193103				100
4	당당한하루	대한민국	-	2019.12.12	40-2019-0193115				100
5	당당한하루	대한민국	-	2019.12.12	40-2019-0193107				100

마. 인력양성

No	분류	기준 년도	현황											
			학위별				성별		지역별					
			박사	석사	학사	기타	남	여	수도권	충청권	영남권	호남권	기타	
1		2019		1			1				1			

바. 고용창출

No	분류	기준 년도	현 황					
			생산	품질	연구	경영/ 마케팅	남	여
	신규채용	2020.02	5	1	8	2	12	4

사. 사업화

No	사업화 방식	사업화 형태	지역	사업 화명	내용	업체 명	매출액		매출 발생년도	기술 수명
							국내	국외		
1	자기실시	신제품개발	국내 국외	당당하 하루레 드밀	기능식 품개발 판매	비에 이치 앤바 이오	-	-		
2	자기실시	신제품개발	국내 국외	당당한 하루레 드미	기능식 품개발 판매	비에 이치 앤바 이오	-	-		
3	자기실시	신제품개발	국내 국외	당당한 하루레 드스틱 케이	기능식 품개발 판매	비에 이치 앤바 이오	-	-		
4	자기실시	기존제품 개선 및 신공정개발	국내	홍국쌀	홍굴쌀 판매		3,097 만원		2019	

아. 홍보실적

No	홍보유형	홍보내용	홍보장소	홍보일자
1	판넬	연구현황 소개	(재)경북바이오벤처프 라자 (재)경북바이오산업 연구원	2018.03 ~ 계속
2	부스홍보	제품 및 연구현황소개	2018국제탈춤 페스티벌 행사장	2018.09.28.~ 10.07
3	부스홍보	제품 및 연구현황소개	2019 교촌허니레이디오픈 골프대회	2019.05.03.~ 05.05
4	부스홍보	제품 및 연구현황소개	2019년 오크밸리 캠핑페스티벌	2019.05.31.~ 06.02
5	부스홍보	제품 및 연구현황소개	2019년 교촌레드산악 자전거축제	2019.08.31.~ 09.01
6	부스홍보	제품 및 연구현황소개	2019년 대구국제식품산업전	2019.11.21.~ 11.24

자. 사업화성과

항목	세부항목			성 과	
사업화 성과	매출액	개발제품	개발후 현재까지	0.31억원	
			향후 3년간 매출	억원	
		관련제품	개발후 현재까지	억원	
			향후 3년간 매출	억원	
	시장 점유율	개발제품	개발후 현재까지	국내 : % 국외 : %	
			향후 3년간 매출	국내 : % 국외 : %	
		관련제품	개발후 현재까지	국내 : % 국외 : %	
			향후 3년간 매출	국내 : % 국외 : %	
	세계시장 경쟁력 순위	현재 제품 세계시장 경쟁력 순위			위
		3년 후 제품 세계 시장경쟁력 순위			위



(1 / 1)

발급번호		부가가치세과세표준증명 (과·면세점영사업자 포함)			처리기간	
2931-519-8138-049					속 시	
성 명(대표자)	조종일					
상 호(법인명)	한스바이오					
업 태	제조업					
사 업 장						
(단위: 원)						
과 세 기 간		매출과세표준(수입금액)			납부할 세액 (환급받을 세액)	
부터	까지	계	과세분	면세분		
2019/01/01	2019/06/30	15,370,000	6,095,000	9,275,000	130,478	
2019/07/01	2019/12/31	15,600,000	6,160,000	9,440,000	-68,470	
		이 하	여 백			
위의 같이 증명합니다.						
※ 위 내용은 발급일 현재 상황으로서 추후 변경될 수 있습니다.						
접 수 번 호	501732511956				2020년 2월 4일	
담 당 부 서	민원봉사실				안동세무서장 (인)	
담 당 자						
연 락 처						



* 본 증명의 위·변조 여부는 발급일로부터 90일 이내 「국세청 홈택스(www.hometax.go.kr) 또는 모바일 홈택스 > 민원증명(증명발급) > 민원증명 원본확인」에서 발급번호로 확인, 또는 문서 하단의 바코드로 확인이 가능합니다.
(공문서를 위·변조하거나 행사한 자는 10년 이하의 징역에 처할 수 있습니다.)
* 본 증명은 홈택스(www.hometax.go.kr)에서 대인 온라인 서비스를 통해 발급된 증명서입니다.

자. 쌀 생산농가 구매계약 체결

2020년산 쌀(일반계) 구매계약서

한스바이오(이하 “갑” 이라 칭함)과 박종모(이하 “을” 이라 칭함)은(는) 영양읍에서 생산된 2020년산 쌀(품종:일반계)의 생산 및 구매에 관하여 아래와 같이 계약을 체결한다.

제1조(총칙) 본 계약은 “갑” 과 “을” 이 계약하는 2020년산 쌀의 출하 및 구매에 관한 제반 사항을 규정한다.

제2조(수량) “갑” 과 “을” 이 계약하는 쌀은 영양읍에서 생산된 2020년산 쌀(20kg포장 기준)로 하고, 구매 물량에 대해서는 상호 협의하여 결정한다.

제3조(검사기준) 정부양곡 구매기준을 적용하여 “갑” 이 시행 한다.

제4조(구매가격) “갑” 이 “을” 로부터 매입하는 2020년산 쌀의 구매가격은 구매 시점에서의 영양농협마트의 판매가격을 기준으로 한다.

제5조(대금지급) “갑” 이 “을” 로부터 매입하는 2020년산 쌀의 대금은 구매종료 후 20일 이내에 지급한다.

제6조(성실이행의무) “갑” 과 “을” 은 상호 협의한 물량에 대하여 책임 공급 및 인수하기로 한다.

제7조(계약기간) 본 계약서 유효기간은 2020년 12 월 31 일까지로 한다.

제8조(기타사항) 본 계약서에 정하지 않은 사항은 상호 협의하여 결정한다.

2020년 2 월 1일

“갑” 상 호 :
성 명 :
주 소 :
연 락 처 :

“을” 성 명 :
주 소 :
연 락 처 :

제 3장. 목표 달성도 및 관련 분야 기여도

1. 목표 및 목표달성여부

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	연구개발수행내용	달성도	가중치
1차년도	발효선식/ 음료 시제품 개발	발효미생물 선별/ 2단발효 최적조건 확립	- 홍국균, 유산균 선별을 통한 400여종 유산균 선별 및 신규 균주 <i>Monascus</i> sp. BHN-MK 10등록 완료 - 유산균 2단발효 공정개발 및 GABA 정량 평가를 통한 2단 발효시 120mg/Kg → 945mg/Kg 증가확인	100%	5
		항당뇨 효능 검증	- 홍국쌀 분말/추출물 소재를 이용하여 <i>in vitro</i> , <i>in vivo</i> 를 수행하였으며, 효능평가를 통해 항염증, 항비만, 항당뇨 효능을 확인함	100%	20
		지표성분 정량분석	- 원료 홍국쌀의 지표물질 선별 및 실험 방법 개발을 통한 정량분석 실시 완료함 - Monacolon-K - GABA	100%	5
		발효선식/ 음료 시제품 개발	- 홍국쌀의 제형 테스트와 부원료 선정을 통해 시제품 관능 평가를 실시하여 시제품 생산을 완료함	100%	5
	홍국쌀 개발	홍국쌀 개발	- 신규균주를 활용한 배지조성, 배양조건을 통해 최적의 홍국쌀 제조 조건을 완료함	100%	5
	홍국쌀 함유 발효선식 및 음료 제형	발효선식/음료 제형화 및 배합비 개발	- 홍국쌀 분말제조를 위한 공정개발 및 부원료 혼합 테스트를	100%	5

			통해 부원료 선정을 통해 제형 및 배합비를 선정함		
	개발	시제품 생산공정개발	- 선식시제품 공정은 홍국쌀 및 곡류의 건조 → 분쇄 → 혼합 → 포장으로 원료의 분말화, 혼합도, 포장 방법 등을 바탕으로 시제품 공정 개발 - 음료시제품 공정은 HACCP 기준으로 개발 완료 함	100%	5
2차년도	발효선식/ 음료 양산품 개발 및 효능 검증	대량생산공정 및 운전조건 개발	- 밀폐용기를 이용한 트레이공법과 발효기를 응용하여 대량생산공정 개발 완료	100%	5
		시제품 향당뇨 검증	- 양산품 발효선식을 물과 혼합한 시료와 발효선식 시료를 직접 사용하여 <i>in vivo</i> 수행을 완료함	100%	20
		소비자 관능평가	- 9점척도법을 응용 시장에서 판매가 많이 되는 제품을 대조구로 사용 실시함	100%	5
		발효선식/음료 양산품 개발	- 발효선식, 음료, 스틱파우치 3종을 개발 완료 함	100%	5
		영양소 함량 분석	- 식품9대영양성분을 공인기관에 의뢰하여 분석 완료함	100%	5
	홍국쌀 대량 생산공정 개발	홍국쌀 대량생산 공정 및 운전조건 개발	- 기존 비닐공정에서 트레이공정으로 전환하여 대량생산공정 개발을 완료함	100%	5
	양산품 대량 생산공정 개발	양산품 대량생산을 위한 공정 및 운전조건 개발	- (재)경북바이오벤처 프라자의 보유중인 설비를 기준으로 대량생산을 위한 레잉아웃과 제조공정 및 운전조건을 개발 완료 함	100%	5

2. 관련분야 기여도

가. 발효제품개발 시스템 구축

- (1) 고부가가치 제품 개발을 위한 생물전환공정인 발효개발 시스템을 구축하여 차후 개발되는 응용발효제품 개발에 활용기대
- (2) 식품, 화장품, 농산물 소재 개발등 다양한 분야에 활용기대

나. 항당뇨 기능성 식품 시장 개척

- (1) 당뇨병 환자를 위한 맞춤형 기능성 발효선식 음료를 개발함으로써 식생활을 통한 당뇨병 예방 및 관리가 가능한 새로운 트렌드를 제시
- (2) 국민건강증진과 해외수출을 통한 국가 이미지 제고와 기업 매출 증대 기여

다. 프로바이오틱스 시장 진출

- (1) 유산균 우수균주 확보
- (2) 최근 각광받고 있는 기능성 건강식품 프로바이오틱스 유산균 시장 진출 모색
- (3) 전통 유산균을 이용한 아토피, 면역증강과 장 기능개선 제품 개발

라. 생리활성, 기능검증 연구 시스템 구축

- (1) 과학적이며 체계적인 연구를 통해 효율적, 고부가가치 제품 개발
- (2) 발효, 기능성식품 개발 전문연구원 확보

마. 건강기능식품 소재 개발

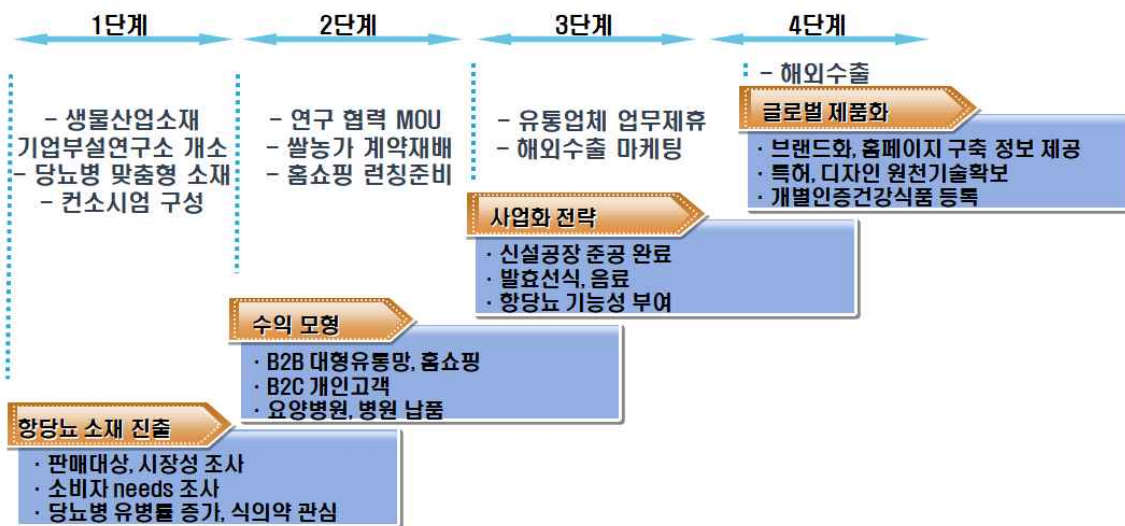
- (1) 혈당관리 개별인정형 건강기능식품 개발
- (2) 체지방감소 개별인정형 건강기능식품 개발

제 4 장. 연구결과의 활용 계획 등

1. 사업화 추진전략

가. 단계별 추진전략

사업화의 단계별 추진전략을 통해 연구개발에서부터 판로개척까지 프로세스를 수립하여 성공적인 사업을 전개



나. SWOT 분석

기업의 환경분석을 통해 강점(strength)과 약점(weakness), 기회(opportunity)와 위협(threat) 요인을 규정하고 이를 토대로 마케팅 전략을 수립



다. 경쟁력 확보 방안

식사대용 선식의 편리성과 원료의 기능성을 접목하여 건강한 먹거리를 찾는 소비자의 Needs를 충족할 수 있는 새로운 먹거리 개발로 판매



경쟁력 분석을 통한 제품 판매

시중 다이어트 선식제품 대비 **저당류, 저나트륨** 제품개발

영양성분	합량	영양성분	합량
나트륨(mg/100g)	3.29	나트륨(mg/100g)	200
조단백질(g/100g)	14.11	조단백질(g/100g)	22.5
트랜스지방(g/100g)	0	트랜스지방(g/100g)	0
콜레스테롤(mg/100g)	0	콜레스테롤(mg/100g)	0
탄수화물(g/100g)	76.82	탄수화물(g/100g)	65
포화지방(g/100g)	0.72	포화지방(g/100g)	1.75
당류(g/100g)	1.29	당류(g/100g)	15
조지방(g/100g)	4.67	조지방(g/100g)	9.2
열량(Kcal/100g)	405.75	열량(Kcal/100g)	407.5

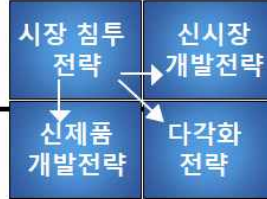


라. 시장진입 전략

시장분석을 바탕으로 홍국쌀이 첨가된 기능성 선식 시장진입 전략

- **당뇨환자 증가**
 - 당뇨유병률 증가
 - 전연령층 환자 증가
 - 맞춤형 제품화
- **원가절감 경쟁력 확보**
 - 기능물질 증대
 - 생물공정기술 효율증대

- **세계적 당뇨병 문제**
 - 천문학적 사회적 비용 발생
 - 당뇨합병증 유발
- 식생활을 통한 예방 및 관리
 - 식사대용, 간편편의식
- **K-FOOD**
 - 쌀기반 **한식** 제품화



- **항당뇨** 기능성 소재
 - 발효 선식
 - 발효 음료
- 당뇨 식의약 소재 Needs
 - 간편편의식
 - 영양식
- 2단 생물공정전환 기술
 - 홍국균, 유산균 발효

- 국내산 소재화
 - 쌀 소비 촉진
 - **나고야의정서 대응**
- 식의약 소재
 - **개별인증 건강기능식품**
 - 기능식품 첨가제

2. 마케팅 전략

가. B2B 시장

환자의 건강회복에 도움을 줄 수 있는 제품으로 수요가 많은 요양시설, 병원, 복지센터, 약국 등에 납품



양로원, 요양시설



종합병원, 개인병원



복지센터/관공서



약국

나. B2B/해외시장

모바일 쇼핑과 대형유통체인점을 최우선적으로 공략 후 정부 프로그램이나 각종 박람회 및 수출상담을 통한 해외시장 진출



개인고객, 대형유통망, 자체영업망 활용



국내/해외식품 박람회 참가



홈페이지/블로그/SNS 적극활용



중소기업청 수출 상담/컨설팅

다. 해외시장 판로개척

	수출전략수립	수출준비	해외마케팅	수출/진출	성과관리
수출 진입	1. 해외시장조사 - 국가별, 제품별 시장조사	1. 지적재산권 지원 - 해외특허 출원 - 디자인/상표 등록	1. 마케팅 인력지원 - 신규 채용인력 인건비 보조	1. 계약관련 컨설팅 - 계약서 검토 및 통·번역	1. 사후관리 - 지원기업 DB구축 - 추가 연계지원
수출 초보	2. 컨설팅 - 현지 법률/회계 자문 등	2. 홍보물 제작 - 다국어 홈페이지 - 제품홍보브로셔	2. 전시회 참가지원 - 전문전시회 참가 - 통역 및 물류 등	2. 제품 개선 - 성능, 디자인, 기능 등 개선	2. 모니터링 - 프로그램성과 - 만족도 조사
수출 유망	3. 교육훈련 - 타겟국가 FTA, 세무 등	3. 온라인 마케팅 - 전문사이트 이용 경비 등	3. 밴더 등록지원 - 현지 자문, 심사, 경비 등	3. 해외규격 인증 - 해외규격인증 취득비 등	3. 프로그램 개선 - 성과, 만족도결과 반영 조정

라. 6차산업 연계 체험 홍보

지자체 및 농민 작목반과 연계한 컨소시엄을 통해 지역축제 참여 홍보

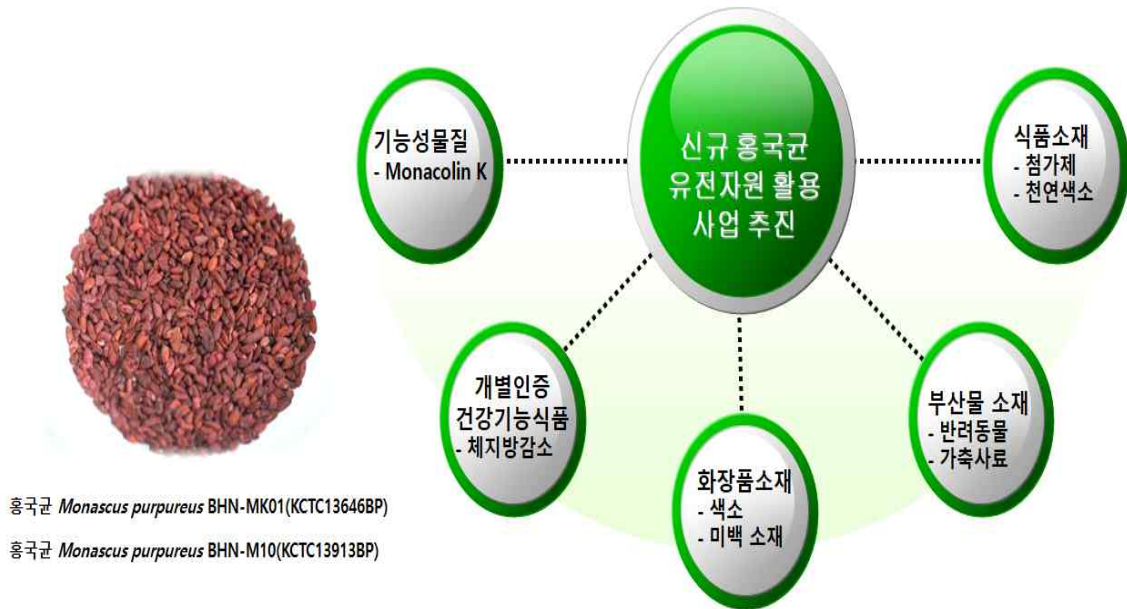


이천, 경주, 부안, 청원, 진천 쌀 축제 참여
쌀 관련 한방김치축제, 광주세계김치축제, 서울김치축제

아빠와 엄마랑 한국음식 만들기
흥국쌀로 밥짓기
세계인의 입맛 김치만들기
K-Food 알림이 해외관광객 안내
제품 시식회/홍보

마. 신규 홍국균 유전자원 활용 사업추진

신규 홍국균주를 활용한 소재산업 연계 제품 개발 및 판매



붙임. 참고문헌

- An, B. J., Bae, M. J., Choi, H. J., Zhang, Y. B., Sung, T. S. and Choi, C. 2002. Natural products, organic chemistry: Isolation of polyphenol compounds from the leaves of Korean persimmon (*Diospyros kaki* L. Folium). *J. Kor. Soc. Agric. Chem. Biotechnol.* 45, 212-217.
- Avula B, Cohen PA, Wang YH, Sagi S, Feng W, Wang M, Zweigenbaum J, Shuangcheng M, Khan IA. 2014. Chemical profiling and quantification of monacolins and citrinin in red yeast rice commercial raw materials and dietary supplements using liquid chromatography-accurate QToF mass spectrometry: Chemometrics application. *J Pharm Biomed Anal* 100: 243-253.
- Akihisa T, Tokuda H, Yasukawa K, Ukiya M, Kiyota A, Sakamoto N, Suzuki T, Tanabe N, Nishino H. 2005. Azaphilones, furanoisophthalides, and amino acids from the extracts of *Monascus pilosus*-fermented rice (red-mold rice) and their chemopreventive effects. *J Agric Food Chem* 53: 562- 565.
- Bang BH, Jeong EJ, Kim KP 2013 Quality characteristic of cookies added with Hongkuk powder. *Korean J Food Nutr* 26(2):177-183.
- Babitha S, Soccol CR, Pandey A. 2007. Solid-state fermentation for the production of *Monascus* pigments from jackfruit seed. *Bioresour Technol* 98: 1554-1560.
- Blois, M. S. 1958. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature* 181, 1199-1200.
- Burchi, F.; Fanzo, J.; Frison, E. The role of food and nutrition system approaches in tackling hidden hunger. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 2011, 8, 358 - 373. [CrossRef] [PubMed]
- Cheng C-f, Pan T-M. (2011) Protective effect of *Monascus*-fermented red mold rice against alcoholic liver disease by attenuating oxidative stress and inflammatory response. *J. Agric. Food Chem.* 59: 9950-9957.
- Cheng, C.F. and T.M. Pan (2011) Protective effect of *Monascus* fermented red mold rice against alcoholic liver disease by attenuating oxidativestress and inflammatory response. *J. Agric. Food Chem.* 59:9950-9957.
- Dewanto V, Wu X, Liu RH. 2002. Processed sweet corn has higher antioxidant activity. *J Agric Food Chem* 50: 4959- 4964.
- Duque GA, Descoteaux A. (2014) Macrophage cytokines: Involvement in

- immunity and infectious diseases. *Front. Immunol.* 5: 491
- Emrich LJ, Dennison D, Dennison KF. (1989) Distributionshape of nutrition data. *J Am Diet Assoc* 89: 665-670.
- Endo,A.(1979) Monacolin-K, a new hypocholesterolemic agent produced by a *Monascus* species. *J. Anti biot.* 32: 852-854.
- Franco, C. M. and Fente, C. A. (1996) Simple and sensitive high-performance liquid chromatography-Fluorescence method for the determination of citrinin application to the analysis of fungal cultural and cheese extracts. *J. Chromatogr. A.* 723, 69-75.
- Fargues. J., N. Smits, C. Vidal, A. Vey, F. Vega, G. Mercadier, and P. Quimby (2002) Effect of liquid culture media on morphology, growth, propagule production, and pathogenic activity of the Hyphomycete, *Metarhizium flavoviride*. *Myco pathologia* 154:127-138.
- Fengling Lu, Yaolin Huang, Xuehong Zhang, Zhilong Wang (2017) Biocatalytic activity of *Monascus* mycelia depending on physiology and high sensitivity to product concentration. *AMB Express.* 7: 88-97.
- Heber D, Yip I, Ashley JM, Elashoff DA, Elashoff RM, Go VL. 1999. Cholesterol-lowering effects of a proprietary Chinese red-yeast-rice dietary supplement. *Am J Clin Nutr* 69: 231-236.
- Hwang JH, Ma JN, Park JH, Jung HW, Park Yk. (2019) Anti-inflammatory and antioxidant effects of MOK, a polyherbal extract, on lipopolysaccharide stimulated RAW 264.7 macrophages. *Int. J. Molecul. Med.* 43: 26-36
- Hwang YK, Kim TY 2000 Characteristics of colored rice bread using the extruded Heugjinju rice. *Korean J Food Cook Sci* 16(2):167-172.
- Hsu, W.H., B.H. Lee, T.H. Liao, Y.W. Hsu, T.M. Pan (2012) *Monascus*-fermented metabolite monascin suppresses inflammation via PPAR-cregulation and JNK inactivation in THP-1 monocytes. *Food Chem. Toxicol.* 50:1178-1186.
- Ho, B.Y. and T.M. Pan (2009)The *Monascus* metabolite monacolin K reduces tumor progression and metastasis of Lewis lung carcinoma cells. *J. Agric. Food Chem.* 57: 8258-8265.
- Johns MR, Stuart DM. 1991. Production of pigments by *Monascus purpureus* in

- solid culture. *J Ind Microbiol* 8: 23–28.
- Jeun, J., Jung, H., Kim, J.H., Kim, Y.O., Youn, S.H., Shin, C.S. (2008) Effect of the *Monascus* pigment threonine derivative on regulation of the cholesterol level in mice. *Food Chem.* , 107, 1078 - 1085.
- Jia, Z., Tang, M. and Wu, J. (1999) The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chem* 64, 555–559.
- Jin M, Suh S-J, Yang JH, Lu Y, Kim SJ, Kwon S, Jo TH, Kim JW, Park YI, Ahn GW, Lee C-K, Kim C-H, Son J-K, Son KH, Chang HW. (2010) Anti-inflammatory activity of bark of *Dioscorea batatas* DECNE through the inhibition of iNOS and COX-2 expressions in RAW264.7 cells via NF- κ B and ERK1/2 inactivation. *Food Chem. Toxicol.* 48: 3073–3079
- Júzlová P, Martínková L, Křen V. (1996) Secondary metabolites of the fungus *Monascus*: a review. *J. Ind. Microbiol.* 16: 163–170.
- Kim HJ, Park JY, Lee SK, Park HY, Cho DH, Choi HS, Oh SK. 2017. Quality characteristics of rice cultivars suitable for rice beer. *Korean J Crop Sci* 62: 113–117.
- Kim KY, Kim HG, Song BC, Cha CJ. (2006) Screening for fermentative microorganisms that grow on brown rice with high amylase and protease activities. *Korean J Microbiol* 42: 160–163.
- Kim MJ. 1995. Analysis of the factors enhancing *Monascus* pigment production in mixed culture. PhD Dissertation. Yonsei University, Seoul, Korea.
- KFDA (2015) Health Functional Food Code. Korea Food and Drug Administration, Seoul, Korea.
- Kim, H.J., G.E. Ji, and I. Lee (2007) Natural occurring level of citrinin and monacolin K in Korean *Monascus* fermentation products. *Food Sci. Biotechnol.* 16:142–145.
- Kim SH, Park BW, Kim JH. 2015. Quality characteristics of Tarakjuk (milk porridge) prepared with red yeast-rice. *Korean J Food Nutr* 2: 313–319.
- Kwon CS. (2012) Antioxidant properties of red yeast rice (*Monascus purpureus*) extracts. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 41: 437–442.
- Kim MY, Lee SH, Jang GY, Park HJ, Li M, Kim S, Lee YR, Lee J, Jeong HS. 2013. Effects of high pressure treatment on antioxidant compounds and

- activity of germinated rough rice (*Oryza sativa* L.). *J Korean Soc Food Sci Nutr* 42: 1783–1791.
- Kim, S.J., J.W. Rhim, S.G. Kang, and S.T. Jung (1997) Characteristics and stability of pigments produced by *Monascus anka* in a jarfermenter. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 26:60–66.
- Kim HM. 2001. Optimization for the production of lovastatin by a mutant of *Monascus purpureus* KCCM 11832. Dept. of Biotechnology The Graduate School Yonsei University, The degree of master paper
- Koh TJ, DiPietro LA. (2013) Inflammation and wound healing: The role of the macrophage. *Expert Rev. Mol. Med.* 13: e23.
- Kwak, E.J., S.K. Cha, and S.I. Lim (2003) The optimal condition for the production and extraction of monacolin K from red koji. *Korean J. Food Sci. Technol.* 35:830–8334.
- Laskin DL, Pendino KJ. (1995) Macrophages and inflammatory mediators in tissue injury. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 35: 655–677.
- Lawrence RM. (1979) Autoimmune therapy for herpes zoster. *West. J. Med.* 130: 271
- Lee, J S et al., (2014) Exploration of optimum conditions for production of saccharogenic mixed grain beverages and assessment of anti-diabetic activity. *J. Nutr. Health.* 47(1): 12–22.
- Lee CL, Wang JJ, Kuo SL, Pan TM. 2006. *Monascus* fermentation of dioscorea for increasing the production of cholesterol- lowering agent- monacolin K and antiinflammation agent- monascin. *Appl Microbiol Biotechnol* 72: 1254–1262.
- Lee SH, Jang GY, Kim MY, Kim S, Lee YR, Lee J, Jeong HS. (2015) Effect of *Monascus* fermentation on content of monacolin K and antioxidant activities of germinated brown rice. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 44: 1186–1193.
- Lee SM, Kim HS, Yu TS. (2003) The optimal condition for production of red pigment by *Monascus anka* on solid culture. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 32: 155–160.
- Lee YR, Kim JY, Woo KS, Hwang IG, Kim KH, Kim KJ, Kim JH, Jeong HS. (2007) Changes in the chemical and functional components of Korean rough rice before and after germination. *Food Sci Biotechnol* 16: 1006–1010.

- Li CL, Zhu Y, Wang Y, Zhu JS, Chang J, Kritchevsky D. (1998) *Monascus purpureus*-fermented rice (red yeast rice): A natural food product that lowers blood cholesterol in animal models of hypercholesterolemia. *Nutr Res* 18: 71-81.
- Lee, B.H. and T.M. Pan (2012) Benefit of *Monascus*-fermented products for hypertension prevention. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 94:1151-1161.
- Lee, S.M., H.S. Kim, and T.S. Yu (2003) The optimal condition for production of red pigment by *Monascus anka* on solid culture. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 32:155-160.
- Lee C-L, Wang J-J, Pan T-M. (2008) Red mold rice extract represses amyloid beta peptide-induced neurotoxicity via potent synergism of anti-inflammatory and antioxidative effect. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 79: 829-841.
- Lee, C.L., H.K. Hung, J.J. Wang, and T.M. PAN (2007) Improving the ratio of monacolin K to citrinin production of *Monascus purpureus* NTU 568 under *Dioscorea* medium through the mediation of pH value and ethanol addition. *J. Agric. Food Chem.*55: 6493-6502.
- Littman DR, Pamer EG. (2011) Role of the commensal microbiota in normal and pathogenic host immune responses. *Cell Host Microbe.* 10: 311-323
- Lowenstein CJ, Snyder SH. (1992) Nitric oxide, a novel bio logic messenger. *Cell* 70: 705-707.
- Lee, C.L. and T.M. Pan (2012) Development of *Monascus* fermentation technology for high hypolipidemic effect. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 94:1449-1459.
- Martinkova L, Patakova-Juzlova P, Krent V, Kucerova Z, Havlicek V, Olsovsky P, Hovorka O, Rihova B, Vesely D, Vesela D, Ulrichova J, Prikrylova V. 1999. Biological activities of oligoketide pigments of *Monascus purpureus*. *Food Addit Contam* 16: 15-24.
- Ma J, Li Y, Ye Q, Li J, Hua Y, Ju D, Zhang D, Cooper R, Chang M. (2000) Constituents of red yeast rice, a traditional chinese food and medicine. *J. Agric. Food Chem.* 48: 5220-5225
- MaCartney-Francis N, Allen JB, Mizel DE, Albina JI, Xie QW, Nathan CF, Wahl SM. (1993) Suppression of arthritis by an inhibitor of nitric oxide synthase. *J Exp Med* 178: 749-754.

- Meng F, Lowell CA. (1997) Lipopolysaccharide (LPS)-induced macrophage activation and signal transduction in the absence of Src-family kinases Hck, Fgr, and Lyn. *J. Exp. Med.* 185: 1661-1670
- Martinkova, L., P. Pataková-Juzlova, V. Kren, Z. Kucerova, V. Havlicek, P. Olsovsky, O. Hovorka, B. Rihova, D. Vesely, D. Vesela, J. Ulrichova, and V. Prikrylova (1999) Biological activities of oligoketide pigments of *Monascus purpureus*. *Food Addit. Contam.* 16:15-24.
- Mittal M, Siddiqui MR, Tran K, Reddy SP, Malik AB. (2014) Reactive oxygen species in inflammation and tissue injury. *Antioxid. Redox Signal.* 20: 1126-1167
- Mohamed el Logy. (1983) Dietary variability and its impact on nutritional epidemiology. *J Chro* 36: 237-249.
- Moncada S, Higgs EA. (2006) The discovery of nitric oxide and its role in vascular biology. *Br. J. Pharmacol.* 147: 193-201
- Moncada S, Palmer RM, Higgs EA. (1991) Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev* 43: 109-142.
- Montague PR, Gancayco CD, Winn MJ, Marchase RB, Friedlander MJ. (1994) Role of NO production in NMDA receptor-mediated neurotransmitter release in cerebral cortex. *Science* 263: 973-977
- Nathan C, Xie QW. (1994) Nitric oxide synthase: roles, tolls, and controls. *Cell* 78: 915-918.
- Oh, H. G. et al., (2014) Ameliorative Effects of *Monascus pilosus*-Fermented Black Soybean (*Glycine max* L. Merrill) on High-Fat Diet-Induced Obesity. *J Med Food.* 17(9): 972 - 978.
- Park, C.D., H.J. Hang, H.W. Lee, H.S. Kim, and T.S. Yu (2005) Antioxidant activity of Monascus pigment of *Monascus purpureus* P-57 mutant. *Korean J. Microbiol.* 41:135-139.
- Park JY, Han SI, Seo WD, Ra JE, Sim EY, Nam MH. 2014. Study on *Monascus* strains and characteristic for manufacturing red yeast rice with high production of monacolin K. *Korean J Crop Sci* 59: 167-173.
- Park Y-J, Ahn JB, Kim CS, Kim KS. (2012) Characteristics of growth, monacolin K and pigment production by *Monascus* strains on plate culture. *Food Eng. Prog.* 16: 347-354.

- Patakova P. (2013) *Monascus* secondary metabolites: Production and biological activity. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 40: 169–181
- Selim Silbir, Yekta Goksungur (2019) Natural Red Pigment Production by *Monascus Purpureus* in Submerged Fermentation Systems Using a Food Industry Waste: Brewer's Spent Grain. *Foods* 8(5): 161–175
- Seo, J.W., C.S. Kim, E.J. Seo, C.O. Jeon, H.K. Choi, and Y.J. Park (2012) Characteristics of growth, pigment and monacolin K production by *Monascus* strains in liquidculture. *Korean Soc. Biotechnol. Bioeng. J.* 27:301–307.
- Su, N.W., Y.L. Lin, M.H. Lee, and C.Y. Ho (2005) Ankaflavin from *Monascus* fermented redrice exhibits selective cytotoxic effect and induces cell death on HepG2 cells. *J. Agric. Food Chem.* 53:1949–1954.
- Taira J, Miyagi C, Aniya Y. (2002) Dimerumic acid as an antioxidant from the mold, *Monascus anka*: the inhibition mechanisms against lipid peroxidation and hemeprotein-mediated oxidation. *Biochem Pharmacol* 63: 1019–1026.
- Tsukahara, M., N. Shinzato, Y. Tamaki, T. Namihira, and T. Matsui (2009) Red yeast rice fermentation by selected *Monascus* sp. with deep-red color, lovastatin production but no citrinin, and effect of temperature-shift cultivation on lovastatin production. *Appl. Biochem. Biotechnol.*158:476–482.
- Wang J, Lu Z, Chi J, Wang W, Su M, Kou W, Yu P, Yu L, Chen L, Zhu JS, Chang J. (1997) Multicenter clinical trial of the serum lipid-lowering effects of a *Monascus purpureus* (red yeast) rice preparation from traditional Chinese medicine. *Curr Ther Res* 58: 964–978.
- Zahra Ajdari, Maaruf Abd Ghani, Mohd Khan Ayob, Saadi Bayat, Mazlin Mokhtar, Sahar Abbasiliasi, Anahita Khoramnia, Heshu Sulaiman Rahman, Parvaneh Mehrbod, Daniel Ajdari, Arbakariya B. Ariff. (2014) Hypocholesterolemic Activity of *Monascus* Fermented Product in the Absence of Monacolins with Partial Purification for Functional Food Applications. *ScientificWorldJournal*. Published online 2014 Feb 20. doi: 10.1155/2014/252647.

[별첨]

자체평가의견서

1. 과제현황

		과제번호		117104-2	
사업구분	농식품기술개발사업				
연구분야				과제구분	단위
사업명	고부가가치식품기술개발사업				주관
총괄과제	기재하지 않음			총괄책임자	기재하지 않음
과제명	바이오 생물전환공정을 통한 당뇨병환자 맞춤형 발효선식 및 음료개발			과제유형	개발
연구기관				연구책임자	
연구기간 연구비 (천원)	연차	기간	정부	민간	계
	1차연도	2017.12~ 2018.12	160,000	57,200	217,200
	2차연도	2018.12~ 2019.12	160,000	57,200	217,200
	계		320,000	114,400	434,400
참여기업	한스바이오, (재)경북바이오산업연구원				
상대국			상대국연구기관		

※ 총 연구기간이 5차연도 이상인 경우 셀을 추가하여 작성 요망

2. 평가일 : 2020.03.10.

3. 평가자(연구책임자) :

소속	직위	성명
(주)비에이치앤바이오	생물산업소재개발연구소	이중복

4. 평가자(연구책임자) 확인 :

본인은 평가대상 과제에 대한 연구결과에 대하여 객관적으로 기술하였으며, 공정하게 평가하였음을 확약하며, 본 자료가 전문가 및 전문가관 평가 시에 기초자료로 활용되기를 바랍니다.

확약	이중복
----	-----

I. 연구개발실적

1. 연구개발결과의 우수성/창의성

■ 등급 : (아주우수, 우수, 보통, 미흡, 불량)

- 국내 유일 홍국쌀 생산관련 업체로서 신규 균주 자원을 확보하여 독자적으로 생산중에 있음
- 신규균주 홍국쌀에 대한 *in vivo* 효능평가를 실시하여 홍국쌀의 기능성을 확인하고 신규균주를 배양한 홍국쌀의 우수성을 확보함

2. 연구개발결과의 파급효과

■ 등급 : (아주우수, 우수, 보통, 미흡, 불량)

- 수입에 의존하던 홍국쌀 및 홍국쌀의 지표물질 Monacolin-K 의 국산화가 가능하여 수입대체에 관련산업의 시너지 효과 기대

3. 연구개발결과에 대한 활용가능성

■ 등급 : (아주우수, 우수, 보통, 미흡, 불량)

- 양산품 3종 홍국쌀 선식, 음료, 스틱파우치를 생산하여 판매 할 예정
- 국내산 홍국쌀 원료소재 판매로 기업매출 증대

4. 연구개발 수행노력의 성실도

■ 등급 : (아주우수, 우수, 보통, 미흡, 불량)

- 효능평가를 위한 동물실험을 계획에 따라 올바르게 수행 완료함으로써 홍국쌀의 효능평가 결과를 얻을수 있었음

5. 공개발표된 연구개발성과(논문, 지적소유권, 발표회 개최 등)

■ 등급 : (아주우수, 우수, 보통, 미흡, 불량)

- 국내학술지 논문 게재2건, 학술발표 12건, 특허출원 2건, 상표출원 3건, 신규균주 등록 2건, 전시회 6건을 수행 완료 함

II . 연구목표 달성도

세부연구목표 (연구계획서상의 목표)	비중 (%)	달성도 (%)	자체평가
발효미생물 선별/ 2단발효 최적조건 확립	20	100%	- 유산균 400종 확보 - 신규균주 3종 등록 완료 - 유산균 2단발효 조건 확립
발효선식/음료 제형화 및 배합비 개발	15	100%	- 홍국쌀의 가공법 개발 완료 - 홍국쌀을 첨가한 선식,음료, 스틱 최적 배합비 개발
대량생산 공정 및 운전조건 개발	15	100%	- 홍국쌀 대량생산공정 확립 - 대량생산공정 및 운전기술개발 완료
항당뇨 효능 검증	25	100%	- <i>in vivo</i> 효능평가를 통한 효능검증 완료
양산품 개발	25	100%	- 홍국쌀 함유 양산품 3건 식품품목제조보고 완료
합계	100점		

III. 종합의견

1. 연구개발결과에 대한 종합의견

- 중국산 홍국쌀의 난립으로 국내 홍국쌀 생산업체는 현재 한스바이오 업체가 유일하며 국내산 홍국쌀의 명맥유지와 상품화 개발을 통한 소비촉진으로 국내산 홍국쌀의 산업보존을 위해 쌀의 가장 많이 소비되는 선식제품류와 그에 따른 응용제품을 개발하였으며, 동물실험을 통해 국내산 홍국쌀의 우수성을 입증하고자 본 컨소시엄에서 많은 협력을 통해 연구개발에 열정적으로 노력 하였으며, 홍국쌀의 이용한 제품의 판매를 통해 국내 홍국산업에 이바지 하고자 함

2. 평가시 고려할 사항 또는 요구사항

- 영세기업 한스바이오 현황 및 중소기업 연구소 단기경력을 고려한 연구평가가 필요할 것으로 사료 됨
- 국내산 홍국균 자원확보를 위해 많은 노력을 기울였으며, 홍국쌀의 위해요소인 Citrinin 생합성 유전자가 없는 자원확보에 많은 시간을 투자 함

3. 연구결과의 활용방안 및 향후조치에 대한 의견

- 양산품 3종을 (주)비에이치앤바이오에서 2019년 하반기부터 순차적으로 출시 할 예정임

주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 고부가가치식품기술개발사업의 연구 보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표하는 때에는 반드시 농림축산식품부에서 시행한 고부가가치식품기술개발사업의 연구 결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니됩니다.