

발간등록번호

11-1543000-001275-01

발아곡류의 유산균 발효를 통한  
바이오 식품 신소재 개발

(Development of new bio food materials via lactic acid  
bacteria fermentation of germinated grains)

(주) 세포활성연구소

농림축산식품부

# 제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “발아곡류의 유산균 발효를 통한 바이오 식품 신소재 개발” 과제의 보고서로 제출합니다.

2016년 03월 22일

주관연구기관명 : (주) 세포활성연구소

주관연구책임자 : 박 동 기

세부연구책임자 : 박 동 기

# 요 약 문

## I. 제 목

발아곡류의 유산균 발효를 통한 바이오 식품 신소재 개발

## II. 연구성과 목표 대비 실적

1. 발아현미의 유산균 발효를 통해 기존의 발아곡류보다 향산화 활성과 풍미가 향상된 식품소재개발
2. 유산균 발효 발아현미의 신규(특이)지표물질 설정 및 품질 기준 확립
3. 발아현미의 유산균 발효를 통한 향산화 효능이 뛰어난 과립형 제품개발

## III. 연구개발의 목적 및 필요성

### 1. 연구개발 목적, 연구 필요성

- (1) 지금까지 식품의 신소재 개발은 기존의 곡류 및 천연물로부터 탐색하거나 화학적인 처리를 통해서 또는 유전자 조작을 통해서 이루어져 왔으며, 소비자의 다양한 요구에 따라 독창적이며 기능성이 뛰어난 바이오식품소재의 개발이 필요함.
- (2) 기존의 기능성 곡류, 유산균의 생리활성을 높이고 시장에서의 상용범위가 넓은 바이오 식품 신소재 개발이 요구됨
- (3) 식품 신소재 개발은 식품을 이용한 고부가가치 창출을 위한 중요한 과제이며 이는 식품산업뿐 아니라 생명기술 발전에도 큰 도움이 됨
- (4) 그러나 종래의 방식은 안전성 문제, 생산 단가 상승, 대량생산의 어려움 등의 한계가 있음. 안전성뿐 아니라 가격 경쟁력이 높고 기능성까지 뛰어난 식품 신소재의 개발은 식품 산업을 선도하는데 있어 매우 중요한 과제임
- (5) 기존의 기능성 곡류가 낮은 체내흡수율 및 생체이용률을 극복하기 위해 유산균 발효기술을 통해 발아곡류에서 기능성이 향상되고 체내흡수율이 좋은 새로운 바이오 식품 소재의 개발이 필요함

## IV. 연구개발 내용

### 1. 발아현미의 유산균 발효를 통해 기존의 발아곡류보다 향산화 활성이 향상된 식품소재개발

- (1) 다양한 분리원으로부터 발효용 유산균의 탐색 및 균주 library 구축
- (2) 발아현미에 대한 발효 적성과 기능성이 우수한 유산균주 선정
- (3) 분리 균주를 이용한 발아현미의 발효 최적화 연구
- (4) 발아현미 대량생산을 위한 발효공정의 개발
- (5) 발아현미에 효모를 접종하여 발효 여부 확인

### 2. 유산균 발효 발아현미의 신규(특이)지표물질 탐색 및 품질 기준 확립

- (1) 유산균 발효 발아현미 중의 지표물질 탐색 및 품질기준 확립
- (2) 발아현미의 기지지표물질 확보 및 분석법 설정

- (3) 발아현미의 유산균 발효에 따른 발효 전/후의 성분 패턴 분석
  - (4) 활성추적분획법(activity-guided fractionation)을 이용한 지표 물질 및 유효 활성성분 분리 확인
  - (5) 유산균 발효 발아현미의 신규 지표물질 설정
  - (6) 유산균 발효 발아현미의 지표성분 분석법 확립 및 밸리데이션
  - (7) 유산균 발효 발아현미의 이용 신규 식품의 품질관리기준 확립
3. 발아현미의 유산균 발효를 통한 항산화 효능이 뛰어난 과립형 제품개발
- (1) 발아현미의 유산균 발효를 통한 바이오 식품신소재 개발 및 조건 확립
  - (2) 개발신규 식품소재에 대한 활용도 방안모색(제형 및 시제품 개발)
  - (3) 신규식품소재의 대량생산 조건 확립 및 이를 이용한 시제품 개발

## V. 연구개발결과

### 1. 발아현미에 적합한 다양한 분리원으로 부터의 유산균주 선정 및 발효 공정 개발

다양한 분리원에서 동정한 55개의 유산균주로부터 발아현미에 적용할 우수한 균주 8개를 1차적으로 선정하여 최종적으로 *P. pentosaceus* SP-024 균주를 선택하였다. 선택한 균주를 이용하여 발효 최적화를 진행하기위하여 온도, 산도, pH, 환원당, 당도 등을 측정하였다.

발아현미의 유산균 발효의 액상 발효와 고상발효의 조건을 확립하였고, 그 결과 발아현미의 액상발효의 경우 15% 농도, 온도 30 °C, 24 시간 발효에서 최적 조건으로 나타났다. 그리고 고상발효의 경우 발아현미를 침지 후, 멸균 시켜 수분 함량 37.5%(v/w), 배양액 5%(v/w), 발효온도 30 °C, 24 시간 발효에서 최적조건을 나타났다.

발아현미를 발효시키기 위해 발효 공정을 진행하였다. 먼저 발아현미를 깨끗이 세척하여 물기를 제거한 후 100g에 물 30mL을 넣고, 121°C의 고압증기멸균기에서 15분간 멸균처리 하였다. 멸균 된 발아현미에 액체 배양된 유산균을 5mL (5%) 첨가하여 30°C에서 24시간 동안 고상발효를 진행하였다. 발효 후 발아 현미를 40°C에서 24시간 동안 냉풍건조기 수분이 10% 미만이 되도록 저온 건조 한 후 미세 분말화 하기 위해 조분쇄기와 롤밀 분쇄기에 넣어 분쇄 하여 과립 공정을 통해 발효된 발아현미를 과립화 하였다.

### 2. 유산균 발효 발아현미의 신규(특이)지표물질 탐색 및 품질 기준 확립

유산균 발효 발아현미의 액상발효의 경우, 발효 성분 변화를 HPLC로 검토한 결과, 발효 전 존재한 6'-o-feruloyl sucrose가 발효 후 없어지고 protocatechuic acid가 많이 생성되었다. 반면, 고상발효의 경우에는 발효 전 6'-O-feruloyl sucrose가 발효 후 없어지는 형태는 같았지만 반면 protocatechuic acid가 생성되지 않았다. 액상 및 고상 발효 추출물을 NMR로 분석한 결과 액상 발효의 경우에는 trans-ferulic acid와 protocatechuic acid를 지표 물질로 선정 할 수 있었고, 반면 고상발효의 경우에는 trans-ferulic acid를 지표물질로서 선정 할 수 있었다.

### 3. 발아현미의 유산균 발효를 통한 과립형 제품개발

유산균 발아 발효현미를 과립화하여 과립형 시제품 생산 하였으며, 개발된 원료를 이용하여 향후 유동식 제품 생산예정이다.

## VI. 연구성과 및 성과활용 계획

### 1. 연구성과

- (1) 풍미와 기능성이 뛰어난 유산균주가 선발되었으며, 유산균 발효 발아현미를 활용하여 장 개선 및 면역력 조절 등 다양한 제품을 개발할 수 있는 식품 소재가 개발되었다.
- (2) 액상발효, 고상발효 조건을 확립하여, 발효 영양 곡류를 이용한 환자식, 노약자식, 유아식 등을 개발 할 수 있는 기반을 마련하였다.
- (3) 유산균 발효 발아현미생산의 표준화를 구축할 수 있는 지표 물질이 선정되었다.

### 2. 연구 성과활용 계획

본 개발한 유산균발효 발아현미를 이용하여 추후, 장개선 및 면역력 조절제품을 생산하여 소비자들에게 다가가고자 한다. 본 연구결과를 활용하여 개별인증을 받을 수 있도록 향후 진행 할 것이다. 또한 (주)생명나무 및 강산농원에 기술이전을 통하여 유산균발효 발아현미를 두유형태로 생산하여 전 연령층을 대상으로 식사대용 및 유동식 식품으로 개발하고자 한다.

# SUMMARY

## (영문 요약문)

### I. Title

Bio-Materials developed by the lactic fermentation of food grains germinated

### II. Research Aims

1. To investigate the best fermentation condition for germinated brown rice by lactic acid bacteria with enhanced antioxidant activity
2. To establish a index substance in germinated brown rice fermented by lactic acid bacteria for quality control
3. To develop novel food materials and products using germinated brown rice fermented by selected lactic acid bacteria with the prospect of its application as functional food or pharmaceutical preparation.

### III. Background for research

1. Currently novel food materials came through genetic manipulation or through chemical processing on existing Natural Products.
2. Accordance with the diverse needs of customers, it is required for the development of bio- food material with unique and exceptional biological functional activities.
3. The market demands development of new materials and products using conventional functional grains or probiotics with enhanced physiological activities
4. Developing novel food materials is an important task for the high valued products in the food industry.
5. therefore, there is a limitation in the conventional method due to safety issues, high production costs rise, and difficulty in the mass production.
6. Ccurrent functional cereals is hard to digest and absorb nutrients. Therefore, lactic acid fermentation technology is used to develop new food bio materials. This will overcome these problems as well as improve bioavailability and biological function of grains.

### IV. Studies

1. We focused on the development of germinated brown rice by lactic acid fermentation with improved antioxidant activity.
  - (1) We have developed the library of lactic acid bacteria strains from a variety of sources.
  - (2) We set the optimal fermentation condition for germinated brown rice by lactic acid bacteria and selected the lactic acid bacteria with anti-oxidant activity
  - (3) We optimized fermentation conditions on germinated brown rice

- (4) We developed Germinated brown rice fermentation process for mass production.
  - (5) Germinated brown rice inoculated yeast fermentation confirmation.
2. We focused on navigation of a novel (specific) index substance and established quality control standard for germinated brown rice fermented by lactic acid bacteria.
    - (1) We found index substance in germinated brown rice fermented by lactic acid bacteria
    - (2) We set up the analysis methods for known index substance in germinated brown rice
    - (3) We determined the index substance and bioactive substance in germinated brown rice fermented by lactic acid bacteria, using activity-guided fractionation analysis.
    - (4) We established a novel index substance in germinated brown rice fermented by lactic acid bacteria.
    - (5) We established analysis methods for a novel index substance in germinated brown rice fermented by lactic acid bacteria.
    - (6) We established quality control standard for germinated brown rice fermented by lactic acid bacteria.
  3. We focused on the development of granule type products of germinated brown rice with enhanced antioxidant activity through the lactic acid fermentation
    - (1) We developed novel food materials by fermenting germinated brown rice with lactic acid bacteria
    - (2) Explore ways to develop a new food material utilization (formulation and prototyping)
    - (3) We developed mass production methods for novel food materials and trial manufactured goods

## VI. Results

1. We focused on the development of germinated brown rice by lactic acid fermentation with improved antioxidant activity.

We selected eight out of 55 lactic acid bacteria strains. Among eight lactic acid bacteria strains, *P. pentosaceus* SP-024 was finally selected

We established condition of liquid- and solid-state fermentation of lactic acid fermentation in germinated brown rice. As a result, the optimum condition of liquid-state fermentation was exhibited in 10%(w/v) germinated brown rice and 30°C for 24hr. In solid-state fermentation, the optimum condition was exhibited in 37.5%(w/v) water content and 5%(v/w) culture medium, 30°C for 24hr, which was sterilized after soaking.

We processed solid fermentation on germinated brown rice. First, germinated brown rice was cleansed and added 30ml water per 100g germinated brown rice. And then, the mixture was autoclaved at 121°C for 15 min. Sterilized germinated brown rice was fermented with 5% lactic acid bacteria, which was cultured in liquid culture media, in 30°C for 24 hr. After fermentation, germinated brown rice was dehydrated to become less than 10% water content in 40°C for 24hr and pulverized into powder. Finally, the germinated brown rice powder was formed via granulation processing.

2. We focused on navigation of a novel (specific) index substance and established quality control standard for

In liquid fermentation of germinated brown rice fermented by lactic acid bacteria instance, we confirmed fermentation component change using HPLC method. As a results, 6'-o-feruloyl sucrose that is detected before fermentation is not detected and protocatechuic acid is generated after fermentation. However, In solid fermentation instance, protocatechuic acid is not generated. As a results of analysis using NMR method, In liquid fermentation, trans-ferulic acid and protocatechuic acid was index substances and in solid fermentation, trans-ferulic acid was index substance.

3. We developed granulation products through lactic acid bacteria fermentation of germinated brown rice.

We produced granulation trial manufactured goods by granulating germinated brown rice fermented by lactic acid bacteria. Using the this, we will develop liquid food.

## VI. Achievement of research and the future plan for the commercial application plan

1. Achievement of the research

In the research, we selected lactic acid bacteria with excellent flavor and functionality and produced food materials that is able to develop various products, which regulated immunity and improved intestine activity, using the germinated brown rice fermented by lactic acid bacteria.

We established condition of liquid and solid fermentation and prepared base that is able to develop foods for patients and senior citizens, infants by using fermented nutrition grains.

In the research, we selected index substance that constructed standardization of the germinated brown rice fermented by lactic acid bacteria.

2. The future plan for the commercial application plan

In the future, we want to approach to customers by producing products that regulate immunity and improve intestine activity using the germinated brown rice fermented by lactic acid bacteria. Also, we plan to develop soymilk form for the germinated brown rice fermented by lactic acid bacteria through technology transfer to Life tree and Gangsan farm for total age group.



# CONTENTS

## (영 문 목 차)

### **Chapter 1 Overview and outcome aim of the research**

- Paragraph 1 Aim of the research
- Paragraph 2 Necessity and scope of the research
- Paragraph 3 Achievement of research
- Paragraph 4 Theoretical and experimental approach

### **Chapter 2 Current state of the art in domestic and abroad**

- Paragraph 1 Background of research and current position of market in domestic and abroad
- Paragraph 2 Current state of the research in domestic and abroad

### **Chapter 3 Results**

- Paragraph 1 Development of antioxidant activity outstanding food materials than existing sprung grains through lactobacillus fermentation of germinated brown rice.
- Paragraph 2 Establishment of quality standards and investigation of new (specific) index substance of lactobacillus fermentation of germinated brown rice
- Paragraph 3 Development of antioxidant activity outstanding granular products through lactobacillus fermentation of germinated brown rice

### **Chapter 4 Contributions to industrial fields**

### **Chapter 5 Achievement of research and the future plan for the commercial application plan**

- paragraph 1 The commercializaion and industalization plan

### **Chapter 6 The obtained informations during the project progress**

### **Chapter 7 Laboratory safety management implementation performance**

### **Chapter 8 Reference**

# 목 차

## 제 1 장 연구개발과제의 개요 및 성과목표

- 제 1 절 연구개발 목적
- 제 2 절 연구개발의 필요성 및 범위
- 제 3 절 연구 성과 및 목표 대비 실적
- 제 4 절 이론적, 실험적 접근방법

## 제 2 장 국내외 기술개발 현황

- 제 1 절 연구 개발 배경 및 국내외 시장 현황
- 제 2 절 국내외 연구개발 현황

## 제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

- 제 1 절 발아현미의 유산균 발효를 통해 기존의 발아곡류보다 항산화 활성이 향상된 식품소재 개발
- 제 2 절 유산균 발효 발아현미의 신규(특이)지표물질 탐색 및 품질 기준 확립
- 제 3 절 발아현미의 유산균 발효를 통한 항산화 효능이 뛰어난 과립형 제품개발

## 제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

## 제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

- 제 1 절 실용화 · 산업화 계획

## 제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

## 제 7 장 연구실 안전관리 이행실적

## 제 8 장 참고문헌

# 제 1 장 연구개발과제의 개요 및 성과목표

## 제 1 절 연구개발 목적

1. 발아현미의 유산균 발효를 통해 기존의 발아곡류보다 항산화 활성이 향상된 식품소재 개발
2. 유산균 발효 발아현미 중의 신규(특이)지표물질 탐색 및 품질기준 확립
3. 발아현미의 유산균 발효를 통한 항산화 효능이 뛰어난 과립형 제품개발

## 제 2 절 연구개발의 필요성 및 범위

1. 지금까지 식품의 신소재 개발은 기존의 곡류 및 천연물로부터 탐색하거나 화학적인 처리를 통해서 또는 유전자 조작을 통해서 이루어져 왔음
2. 소비자의 다양한 요구에 따라 독창적이며 기능성이 뛰어난 바이오식품소재의 개발이 필요함.
3. 기존의 기능성 곡류, 유산균의 생리활성을 높이고 시장에서의 상용범위가 넓은 바이오 식품 신소재 개발이 요구됨
4. 식품 신소재 개발은 식품을 이용한 고부가가치 창출을 위한 중요한 과제이며 이는 식품산업뿐 아니라 생명기술 발전에도 큰 도움이 됨
5. 그러나 종래의 방식은 안전성 문제, 생산 단가 상승, 대량생산의 어려움 등의 한계가 있음
6. 안전성뿐 아니라 가격 경쟁력이 높고 기능성까지 뛰어난 식품 신소재의 개발은 식품 산업을 선도하는데 있어 매우 중요한 과제임
7. 기존의 기능성 곡류가 낮은 체내흡수율 및 생체이용률을 극복하기 위해 유산균 발효기술을 통해 발아곡류에서 기능성이 향상되고 체내흡수율이 좋은 새로운 바이오 식품 소재의 개발이 필요함



<그림 1> 유산균발효를 통한 새로운 소재도출

8. 이와 같은 배경으로 본 연구진은 국내외적으로 소개되지 않은 식품 신소재를 개발하고자 함.

## 제 3 절 연구 성과 및 목표 대비 실적

### 1. 연구성과

- (1) 풍미와 기능성이 뛰어난 유산균주가 선발되었다.
- (2) 유산균 발효 발아현미를 활용하여 장 개선 및 면역력 조절등 다양한 제품을 개발할 수 있는 식품 소재가 개발되었다.
- (3) 발효 영양 곡류를 이용한 환자식, 노약자식, 유아식 등을 개발 할 수 있는 기반을 마련하였다.
- (4) 유산균 발효 발아현미생산의 표준화를 구축할 수 있는 지표 물질이 선정되었다.

### 2. 목표 대비 실적

- (1) 발아현미의 유산균 발효를 통해 기존의 발아곡류보다 향산화 활성과 풍미가 향상된 식품소재개발
- (2) 유산균 발효 발아현미의 신규(특이)지표물질 설정 및 품질 기준 확립
- (3) 발아현미의 유산균 발효를 통한 향산화 효능이 뛰어난 과립형 제품개발

## 제 4 절 이론적, 실험적 접근방법

### 1. 유산균의 탐색

발효 균주의 선정을 위한 유산균주를 선발하기 위하여 다양한 발효식품(김치, 젓갈 등)과 과채류를 수집하여 연구를 진행하였다. 시료 1 g을 멸균생리식염수(3M, MN, USA) 9 mL에 현탁한 후,  $10^{-1}$ - $10^{-5}$ 까지 십진희석하여 BCP plate count agar 배지(Eiken chemical Co., LTD., Tokyo, Japan)에 50  $\mu$ L씩 도말하였다. 37°C에서 24시간 배양한 후 단일 집락 주변 노란색 환이 생성된 집락을 1차 선별하였다. 선별된 집락은 Lactobacilli MRS broth(Difco, NJ, USA)에 접종하여 멸균된 20%의 글리세린을 첨가하여 -80°C에서 동결보존하여 사용하였다.

### 2. 발아 조건 확립

5% 적양과 추출물이 함유된 향산화수소수에 24시간 25~27°C에서 침지 후 채반으로 옮겨 향산화수소수를 분무하면서 습도는 60%, 온도는 25-27°C를 유지하여 발아하였다. 이 조건에서 발아율을 측정한 결과 3일 만에 95% 이상의 발아율을 보임을 확인하였다.

### 3. 발아곡류에서 성장 확인

발아검정콩 및 발아곡류에서 성장할 수 있는 균주의 분리를 위하여 2%(w/v)의 발아곡류와 1.5%의 agar를 첨가하여 121°C에서 15분간 멸균하여 petri dish에 25 mL 정도 분주하여 고체화를 시킨 뒤, 멸균한 이쑤시개를 이용하여 탐색 및 분리 균주를 고체배지에 접종하여 균주가 집락을 생성하는지에 대한 유무로 성장을 확인하였다.

### 4. DPPH radical 소거능 측정

생리활성이 높은 유산균주를 선정하기 위하여 DPPH radical 소거능을 측정하였다. 5%의 발아곡류를 121°C에서 15분간 멸균하여 분리된 유산균주를 접종하여 24시간 배양한 후, 13,200 rpm에서 1분간 원심분리하여 상등액을 유산균주 발효액으로 사용하였다. 에탄올에 용해한 333 µM DPPH(2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl)(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) 용액을 사용하였고, DPPH와 동량의 유산균주 발효액(100 µL)을 암소에서 30분간 반응시켜 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이 때 양성 대조군으로는 1 mM의 아스코르브산(Sigma-Aldrich, USA)을 사용하였고, 아래의 계산식에 적용하여 DPPH radical 제거율(%)을 산출하였다.

$$\text{DPPH radical scavenging activity (\%)} = 100 - (B - A) * 100 / C$$

$$A = A_{450 \text{ nm}}$$

$$B = \text{Blank (sample + MeOH)}$$

$$C = \text{Control (DPPH + DW)}$$

## 5. 분리균주의 주사전자현미경 촬영

주사전자현미경(scanning electron microscope, SEM)을 이용하여 최종선발균주를 관찰하였다. 주사전자현미경의 사용은 서울대학교 농생명과학공동기기원(NICEM, Korea)의 협조로 이루어졌다. Lactobacilli MRS broth에 배양된 유산균주의 균체를 회수하여 단백질 고정액(Kamovsky's fixation)을 사용하여 4°C에서 2시간동안 고정한 뒤, 0.05 M sodium cacodylate buffer로 4°C에서 10분간 3번 세척하였다. 지질 고정액(2% osmium tetroxide in 0.1 M sodium cacodylate buffer)으로 4°C에서 2시간 후고정을 실시하고, 다시 증류수로 2회 세척하였다. 탈수 용매제 에탄올 30, 50, 70, 80, 90%를 이용하여 4°C에서 각각 10분간 탈수시킨 후, 마지막으로 100% 에탄올로 4°C에서 10분 3번 탈수한 뒤, 100% hexamethyldisilazane으로 10분간 2번 건조하여 SEM(JSM-5410LV, JEOL, Japan)으로 세포를 관찰하였다.

## 6. 최종선발균주의 계통학적 분류 및 생화학적 분석

Lactobacilli MRS 액체배지(Difco, MI, USA)에 단일 집락을 접종하여 37°C에서 16시간 정지배양하였다. 배양액 3 mL을 13,200 rpm에서 1분간 원심분리하여 균체를 수확하고, 상등액을 제거하였다. 이후 AccuPrep Genomic DNA Extraction kit(Bioneer, Daejeon, Korea)를 이용하여 균주의 genomic DNA를 분리하였고 균체에 1 mL의 TEN 완충용액(10 mM Tris-HCl, pH 7.6, 1 mM EDTA, 10 mM NaCl)을 첨가하여 현탁하고, 원심분리하여 배지성분을 제거하였다. SET 완충용액(20% sucrose, 50 mM Tris-HCl, pH 7.6, 50 mM EDTA) 500 µL를 첨가하여 현탁하고, 50 µL의 lysozyme(60 mg/mL in TEN buffer, w/v)과 3 µL의 RNase A용액을 첨가하여 37°C에서 1시간동안 반응시켰다. 이 반응 용액에 25 µL의 SDS(25%, w/v)와 20 µL의 proteinase K를 첨가하여 조심스럽게 혼합하고, 37°C에서 30분간 반응시켰다. 반응 종료 후, GC binding buffer 400 µL를 첨가하여 60°C에서 10분간 반응시키고, 200 µL의 iso-propanol(Sigma-Aldrich, MO, USA)을 첨가하여 조심스럽게

혼합하였다. 반응액을 column tube에 옮겨서 원심분리를 통하여 DNA를 column에 부착시키고, 500  $\mu$ L의 washing buffer 1과 washing buffer 2를 순차적으로 첨가하여 순수하게 DNA를 부착시킨 후, 50  $\mu$ L의 멸균 3차 증류수로 DNA를 용출시켰다.

분리된 유산균 균주의 16S ribosomal DNA sequencing은 다음과 같은 방법으로 수행하였다. 균주의 genomic DNA을 Wizard genomic DNA purification kit(Promega, USA)를 이용해 분리한 후 16S rRNA 유전자의 염기서열 결정에 사용하는 universal primer인 27F(5'-AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG-3')와 1492R(5'-TAC GGY TAC CTT GTT ACG ACTT-3') primer를 사용하여 polymerase chain reaction(PCR)을 수행하였다. 증폭된 PCR 산물은 Wizard SV Gel and PCR clean-up system(Promega, USA)을 이용하여 정제하였다. 정제된 PCR 산물은 마크로젠(Korea)에 의뢰하여 ABI PRISM 3700 DNA Analyzer로 염기서열을 분석하였다. 그 결과는 BLASTN 프로그램을 이용하여 GenBank의 ribosomal DNA 염기서열과 비교하였으며, 염기서열의 상동성은 Clustal X 와 Mega 5 program을 이용하여 비교분석하였다. 최종 선정된 protease 활성 유산균의 특성은 최종선발균주의 colony를 취하여 Gram-stain, 3% KOH test, 운동성, catalase test, 당 분해로 인한 gas 생성 유무를 확인하였다. 생화학적 특성은 API CHL 50 kit를 사용하여 분석하였고, 최종 선발된 균주의 colony를 API medium에 현탁하여 이를 kit의 strip에 접종한 후 37°C에서 24시간, 48시간 배양한 후 medium의 색상 변화를 비교분석하여 당 분해 유무에 따른 생화학적 성질을 확인하였다.

## 7. 적정산도

선발된 유산균의 single colony를 121°C, 15분간 멸균한 발아곡류를 배지로 사용하여 현탁하여 37°C에서 24시간 배양하였다. 증류수 10 mL에 배양액을 9 mL 취하여 희석한 후, 0.1% phenolphthalein 용액 500  $\mu$ L를 첨가하고, 30초 동안 미홍색이 없어지지 않을 때까지 0.1 N NaOH로 적정하여 그 소비량을 % 적정 산도로 나타내었다. 산도는 유산(0.1 N NaOH 1 mL = 유산 0.009 g)으로 표시하였으며 아래 식을 이용하여 계산하였다. 또한 동시에 남은 배양액을 pH meter(FE-20K, METTLER TOREDO, USA)를 이용하여 pH를 측정하였다.

$$\text{Titratable acidity (\%)} = \frac{0.1 \text{ N NaOH (mL)} \times \text{factor} \times 0.009 \times 100}{\text{Sample weight (g)}}$$

## 8. 환원당

환원당 함량은 Somogyi와 Nelson의 방법을 수정하여 사용하였고, 정량곡선은 glucose를 0-1.0  $\mu$ mol의 농도로 작성하였다. 시료 0.5 mL과 alkaline copper reagent 0.4 mL을 혼합한 후 끓는 물에서 10분간 중탕하였다. 10분간 방냉하여 nelson's reagent를 0.4 mL 첨가한 후 증류수 2.6 mL로 희석하고 520nm에서 흡광도를 측정하였다.

## 9. HPLC chromatogram

### 실험 조건

- 검액제조 : 1 mg/mL의 농도로 추출물을 MeOH로 희석

b. 컬럼 : Hydrosphere C18 column (250 × 4.6 mm, 5 μm; YMC)

c. 컬럼 온도 : 30 °C

d. 검출 조건 : UV detection, 280 nm

e. Flow rate : 0.8 mL/min

f. Gradient condition

min	A (Acetonitrile)	B (water + 0.1% formic acid)
0	5	95
5	9	91
15	9	91
22	11	89
38	18	72
88	80	20

## 제 2 장 국내외 기술개발 현황

### 제 1 절 연구 개발 배경 및 국내외 시장 현황

#### 1. 기능성 곡류와 유산균 소재의 국내외 시장 및 연구 개발 현황

##### (1) 기능성 곡류의 국내외 시장 및 연구개발 현황

###### 서론

① 예로부터 인류는 곡류 위주로 식생활을 하여왔고, 이를 열량원으로 삼아왔음. 특히 쌀은 우리나라를 비롯한 동남아시아권에서 주식이 되어왔고, 현대사회에 들어서는 쌀시장의 개방 및 식생활의 변화로 쌀 소비량 감소와 건강지향적 식품에 대한 국민적 관심의 증가로 인해 기능성 쌀 시장이 점차 넓어지고 있음

#### 2. 국내외 시장 현황

(1) 외식 빈도의 증가로 인한 일반 쌀의 소비량이 줄어드는 것과 대조적으로 특별한 효능이 첨가된 ‘기능성 쌀’이 각광받고 있음

(2) 기능성 쌀 시장은 초기 단계여서 정확한 통계가 집계되지 않았지만 최근 2년 새 50% 이상 성장했으며, 2010년 기능성 쌀 시장은 8조 원 규모의 일반 쌀 시장의 약 6%인 4800억 원으로 추정됨

### 제 2 절 국내외 연구개발 현황

#### 1. 과학적으로 입증된 기능성 곡류의 효능에 대한 선행 연구 결과

이름	효능	내용요약	참고문헌
거대배아미쌀	항콜레스테롤	당뇨를 유발한 쥐에 거대배아미 식이 후 효능을 알아본 결과, 간 조직중의 산화적 손상을 억제하였음	Youn Ri Lee et al. Effect of Giant embryonic rice supplementation on the lipid peroxide levels and antioxidative enzyme activities in the plasma and liver of streptozotocin-induced diabetic rats. J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem. 48(4): 358-363 (2005)
흑미	항암	유방암 세포주를 이용한 in vivo, in vitro 실험을 통해 항암효과를 알아본 결과, 혈관신생의 억제 및 세포사를 유도함으로써 암세포의 발현을 억제	Hui C et al. Anticancer activities of an anthocyanin-rich extract from black rice against breast cancer cells in vitro and in vivo. Nutr. Cancer 62(8): 1128-36 (2010)
발아현미	항암	급성백혈구세포와 자궁경부암 세포주를 이용한 in vivo 실험 결과 발아현미는 백혈구 세포주의 분화를 억제하였고, 자궁경부암 세포의 세포사를 유도하여 억제하였음	Oh CH et al. Effects of germinated brown rice extracts with enhanced levels of GABA on cancer cell proliferation and apoptosis. J. Med. Food. 7(1): 19-23 (2004)



## 2. 본 연구진에 의해 개발된 발아곡류

- (1) 본 연구진이 개발한 발아현미는 (그림 2) 신 개념의 식품소재로 타 연구기관이 보유하지 못한 국내외 유일한 소재로서 기존의 기능성 곡류보다 풍미나 향이 개선 되었을 뿐 아니라 다양한 약리효능을 가지며 연구개발 가치가 매우 큰 식품소재임.
- (2) 발아현미의 생산공정은 <그림 2>과 같음.



<그림 2> 발아현미 생산 공정

## 3. 유산균의 국내외 시장 및 연구개발 현황

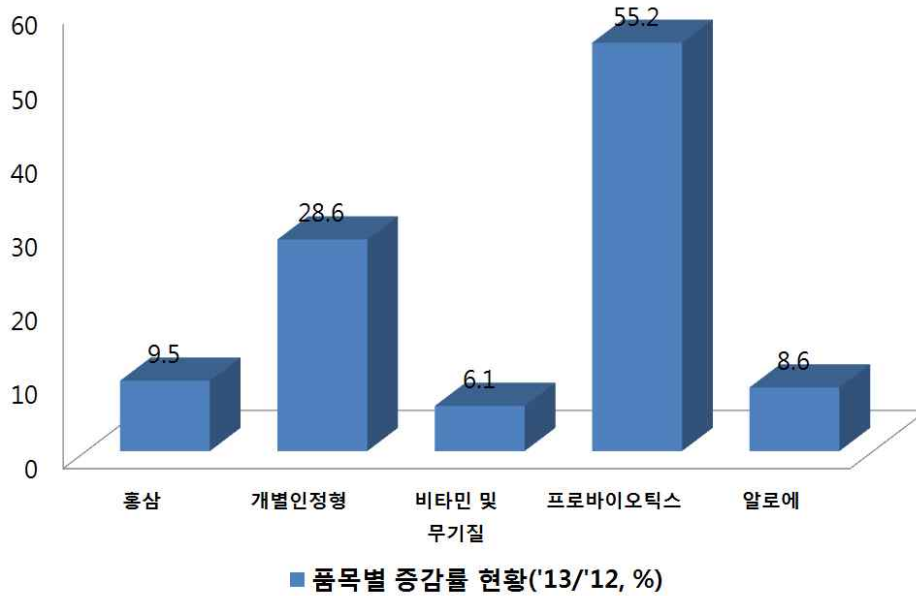
### (1) 서론

- ① 오래 전부터 인류는 식품을 보존하기 위한 해결책으로 유산균을 이용해왔음. 그 예로 김치, 간장 등 전통발효식품과 yoghurt, cheese 등 발효유제품 등이 있으며, 이와 같은 발효기술은 식품산업에 있어서 중요한 역할을 담당해 왔음
- ② Lactobacillus, Lactococcus, Leuconostoc, Pediococcus, Bifidobacterium 등의 균속들이 대표적인 유산균에 속함
- ③ 식품이 유산균에 의해 발효되면, 보존성이 향상될 뿐 아니라, 발효 대사산물에 의해 풍미가 증진되며, 길항물질 등의 생성으로 인체에 유해한 미생물을 억제시킬 수 있음
- ④ 뿐만 아니라 가축의 사료 첨가제로서 장내 세균 개선, 설사 방지 등의 효능을 나타내고, 최근 음식물 처리에 대한 사료화의 관심이 높아지면서 음식 잔반의 액화 사료 제조 시에도 Lactobacillus acidophilus를 첨가하여 발효한 연구가 성공적으로 이루어지고 있음
- ⑤ 특히 유산균은 발효과정을 통해 장내 유해균을 억제하고, 혈중 콜레스테롤 감소 및 면역 증강 작용을 하는 것으로 나타났으며, 비타민과 같은 인체 유용 물질이 생성되어 영양 및 건강 증진에 매우 이로운 역할을 함

### (2) 유산균의 국내외 시장현황

- ① 식품의약품안전처의 건강기능식품 생산실적을 분석한 결과, 2013년 성장은 새로운 기능성 원료를 사

용한 ‘개별인정형’ 제품(전년대비 29% 증가)과 프로바이오틱스(probiotics) 제품(2012년대비 518억 원에서 804억 원으로 55% 증가)이 주도한 것으로 나타남 <그림 3>



<그림 3> 기능성 식품 품목별 생산 증가율

② 발효유 외에도 건강식품, 정장제, 화장품 등 그 사용 용도가 폭 넓게 발전하고 있어 유산균을 이용한 산업은 향후 전망이 밝은 분야임

③ 특히, 최근 유산균과 기능성 원료를 혼합한 고기능성 제품이 출시되고 있음

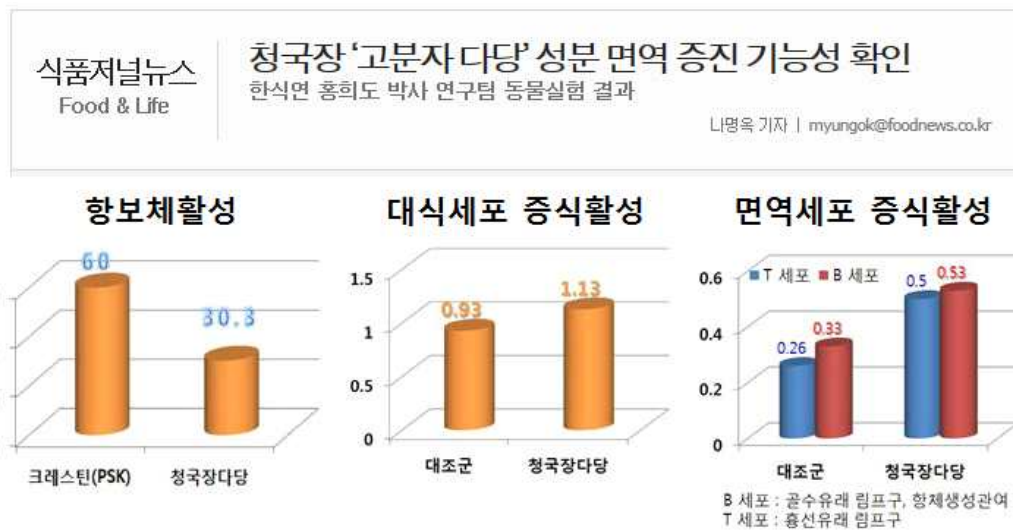
(3). 국내외 연구개발 현황

- 과학적으로 입증된 유산균의 효능에 대한 선행 연구 결과

효능	내용요약	참고문헌
면역 증강	유산균(Lactobacillus pentosus b240)은 TLR2 조절된 수지상세포를 활성화를 통해 장 내 IgA의 생산을 증진시키는 기전으로 면역증강 작용에 도움을 줌.	Kotani Y et al. Role of Lactobacillus pentosus Strain b240 and the Toll-Like Receptor 2 Axis in Peyer's Patch Dendritic Cell-Mediated Immunoglobulin A Enhancement. PLOS One 9(3): 91857 (2014)
	유산균은 숙주의 선천성면역(innate immunity)과 후천성면역(adaptive immunity) 활성을 증가 또는 조절하여 건강에 도움을 줌.	Tsai YT et al. The immunomodulatory effects of lactic acid bacteria for improving immune functions and benefits. Appl. Microbiol. Biotechnol 96(4): 853-62 (2012)
항암	유산균은 대장암세포의 자가사멸을 유도하여 항암효과를 나타낼 수 있음이 밝혀짐.	Wang SM et al. Induction of HT-29 cells apoptosis by lactobacilli isolated from fermented products. Res. Microbiol. 165(3):

## 4. 기능성 곡류, 발효식품으로부터 유래된 천연 다당체 → 기능성 천연 고분자소재

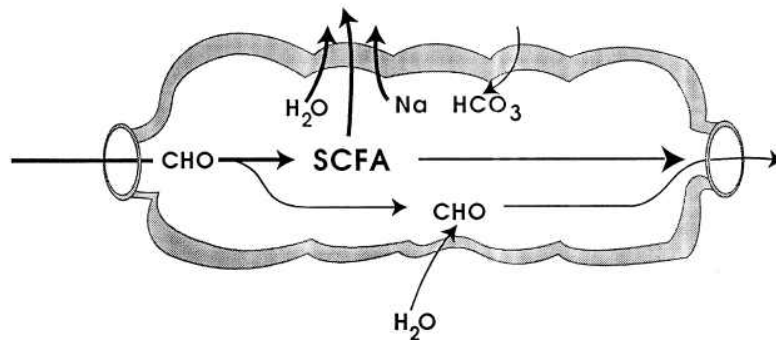
- (1) 탄수화물은 동식물 세포의 구조물 또는 에너지원으로 알려져 왔으나, 최근 단백질과의 특이적인 상호 작용(carbohydrate-protein interaction)을 통한 인식(recognition)을 매개하는 등 생명 현상에 있어서도 중요한 역할을 하는 것으로 알려지고 있으며, glycobiology, glycomics 등 신종 학문의 연구 대상임
- (2) 다당체(polysaccharide)는 단일 구성당의 중합체로 이루어진 천연 생중합 소재로 starch, cellulose, chitin, inulin, pectin류 등이 있음
- (3) Pectic polysaccharide(pectin)은 carboxylic group(-COOH)로 치환된 monosaccharide 형태의 uronic acid의 함량이 높은 산성 다당류로서 구조 다당류일 뿐만 아니라, 여러 가지 생리 활성 및 기능성을 가지는 것으로 보고됨
- (4) Pectic polysaccharide는 구조적으로 매우 복잡하며, 주당쇄(backbone structure)와 부당쇄(hairy region)으로 구성되며, 이 중 hairy region은 생리 활성을 가지는 기능성 당쇄로 알려져 있음
- (5) 특히, 곡류 발효식품의 경우 기능성 다당체 성분의 함유량이 높으며, 최근 면역 증진 기능을 가진 청국장의 다당체 성분이 보도되기도 하였음 <그림 4>
- (6) 또한, 인삼 다당체 성분 조형물인 '진산'은 암치료 보조제로서 판매되고 있으며, 앞으로 기능성 다당체 성분을 이용한 다양한 연구 사례 및 제품이 개발될 것으로 예상됨



<그림4> 청국장 고분자 다당체의 면역 증진 기능 (식품저널뉴스)

## 5. 다당체 구성성분의 유산균 대사체 short chain fatty acid (SCFA)

- (1) 천연 다당체 성분의 일종인 prebiotics는 유산균과 같은 장내 미생물의 발육/증식 등에 도움을 주며, 식이섬유, inulin, oligofructose, galacto-oligosaccharide 등의 다당체 성분이 알려져 있음
- (2) 유산균은 이러한 다당체 성분을 대사시켜 acetate, propionate, butyrate와 같은 SCFA류의 대사산물을 생산하며, 장내 환경 개선, 질병 예방뿐만 아니라 인체의 건강에 다양한 기능을 하는 것으로 알려져 있음
- (3) Acetate는 전신에 흡수되어 cholesterol의 합성을 촉진하며, propionate는 cholesterol의 합성을 억제하는 기능이 보고됨
- (4) Butyrate는 장막의 보호, 대장암 예방 등의 건강 증진 기능이 보고되고 있음
- (5) SCFA의 생산 속도, 개개 대사체의 양은 다당체(substrate)와 균주에 의존적인 것으로 알려지고 있으며, 특정 유산균과 같은 균주에 맞는 적절한 다당체 prebiotics 성분을 발굴하기 위한 다양한 연구가 진행되고 있음
- (6) SCFA는 휘발성 저분자 성분이므로 GC-MS 등의 분석 기법을 이용한 함량 분석법이 개발되어 활용되고 있음
- (7) 유산균 발효에 의한 SCFA의 함유량 분석(acetate/propionate 비율 확인, butyrate 함량 변화)은 최적 유산균의 선택 등의 발효 공정의 최적화에 기여할 수 있을 것으로 사료됨



<그림 5> 소화되지 않는 다당체의 발효 대사에 의한 SCFA의 생성 (Cook SI and Sellin, 1998)

## 제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

### 제 1절 발아현미의 유산균 발효를 통해 기존의 발아곡류보다 항산화 활성이 향상된 식품소재 개발

#### 1. 곡류의 발아

- (1) 현미는 (주)미농에서 도정 된 현미와 약콩을 공급 받아 5% 적양과 추출물이 함유된 항산화 수소수에 24시간 25~27℃에서 침지 후 채반으로 옮겨 항산화수소수를 분무하면서 습도는 60%, 온도는 25-27℃를 유지하여 발아하였다. 이 조건에서 3일간 발아 시킨 결과, 다음 그림과 같이 고르게 발아하여 95% 이상의 발아율을 보였으며 이취도 발생하지 않았다.



그림 6. 발아된 현미

#### 2. 다양한 분리원으로부터 발효용 유산균의 탐색 및 균주 library 구축

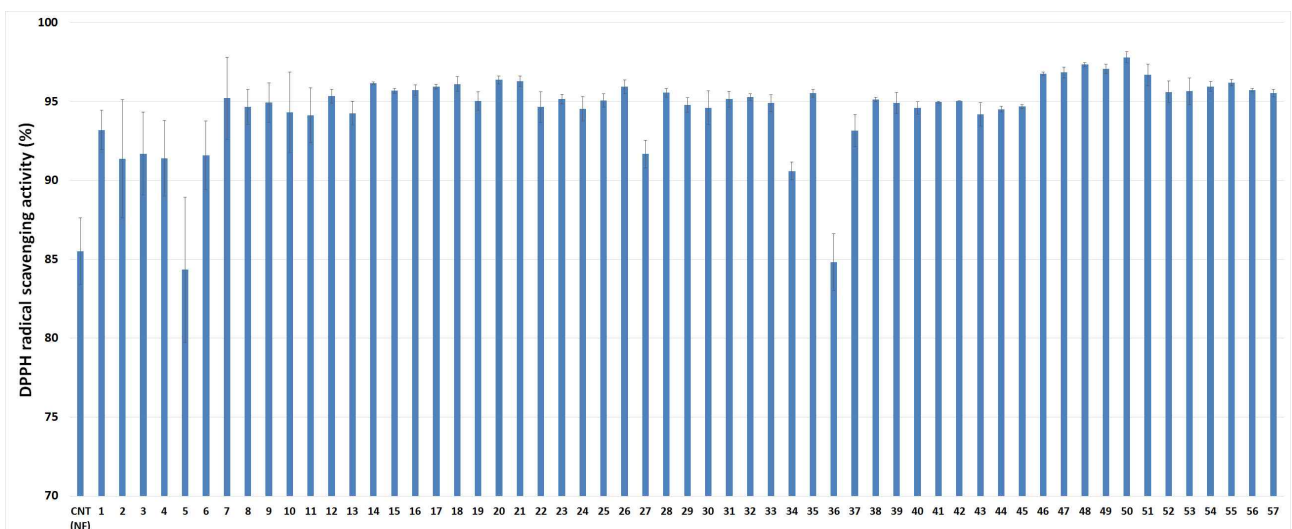
- (1) 젓갈, 김치 등 전통발효식품 및 단호박, 양파 등 식품 내에서 유산균주를 탐색하였다. 분리한 균주 중 313균주는 식품의약품안전처에서 인정한 식품 원재료로 사용 가능한 유산균이었고, 각 2% 발아검정콩 및 발아현미 고체 배지에서 생육이 가능한 균주를 선정하였다. 그림 7은 본 연구에서 분리한 균주의 library 일부이다.
- (2) 발아검정콩 고체 배지에서 생육활성이 높은 균주는 낙지젓갈에서 14균주, 감장아찌에서 1균주, 우영장아찌에서 3균주, 더덕장아찌에서 6균주, 브로콜리에서 1균주, 단호박에서 5균주, 김치에서 1균주, 조개젓갈에서 4균주, 배에서 1균주, 양파에서 15균주, 파에서 1균주, 고구마에서 5균주로 총 57균주가 발아검정콩에서 성장함을 확인할 수 있었다. 이에 해당하는 균주로는 *Pediococcus pentosaceus*, *Lactobacillus paraplatarum*, *Leuconostoc lactis* 등으로 동정되었다.
- (3) 발아현미 고체 배지에서 생육활성이 높은 균주는 감에서 1균주, 낙지젓갈에서 13균주, 우영장아찌에서 6균주, 더덕장아찌에서 2균주, 브로콜리에서 3균주, 단호박에서 4균주, 김치에서 1균주, 양파에서 17균주, 무에서 1균주, 파에서 1균주, 고구마에서 6균주로 총 55균주가 발아현미에서 성장함을 확인할 수 있었다. 이에 해당하는 균주로는 *P. pentosaceus*, *Weissella kimchii*, *Leu. mesenteroides* 등으로 동정되었다.

Box	Well	Old No.	KCCP No.	ID	Strain	Source	DPPH(AA%)
LAB Isolate 01	1	11001	11001	Leuconostoc citreum	S.Pum19	단호박	-
LAB Isolate 01	2	11002	11002	Lactobacillus sakei	Y-KC4	김치(윤경)	-
LAB Isolate 01	3	11004	11003	Lactobacillus sakei	Y-KC9	김치(윤경)	-
LAB Isolate 01	4	11005	11004	Leuconostoc lactis subsp.	S-Per.s12	감쪽지(소현)	64.0
LAB Isolate 01	5	11006	11005	Lactobacillus dextrinicus	sal.cla3	조개젓	6.00
LAB Isolate 01	6	11007	11006	Lactobacillus sakei	blue.Be13	서리태콩	-
LAB Isolate 01	7	11009	11007	Pediococcus pentosaceus	SC1	낙지젓갈	93.2
LAB Isolate 01	8	11010	11008	Pediococcus pentosaceus	SC2	낙지젓갈	91.4
LAB Isolate 01	9	11011	11009	Pediococcus pentosaceus	SC3	낙지젓갈	91.7
LAB Isolate 01	10	11012	11010	Pediococcus pentosaceus	SC4	낙지젓갈	91.4
LAB Isolate 01	11	11013	11011	Pediococcus pentosaceus	SC5	낙지젓갈	84.3
LAB Isolate 01	12	11014	11012	Pediococcus pentosaceus	SC6	낙지젓갈	91.6
LAB Isolate 01	13	11015	11013	Pediococcus pentosaceus	SC7	낙지젓갈	95.2
LAB Isolate 01	14	11016	11014	Pediococcus pentosaceus	SC8	낙지젓갈	59.6
LAB Isolate 01	15	11017	11015	Pediococcus pentosaceus	SC9	낙지젓갈	97.2
LAB Isolate 01	16	11018	11016	Pediococcus pentosaceus	SC10	낙지젓갈	97.1

<그림 7> 본 연구에서 분리된 균주들의 library(일부).

### 3. 발아곡류에 대한 발효적성과 기능성이 우수한 유산균주 선정

- (1) 발아곡류를 분리된 유산균주로 발효가 진행되었을 때, 생리활성이 우수한 유산균주를 DPPH radical scavenging activity를 측정하여 높은 활성을 지니는 균주를 발아곡류 발효 균주로 선정하였다.
- (2) 그림 8은 발아검정콩을 분리된 유산균주로 발효한 뒤 DPPH radical scavenging activity를 측정한 결과이다. 총 57균주로 발아검정콩을 발효하였을 때, 14, 18, 20, 28, 31, 32, 35, 37, 50, 55번 총 10균주를 선정할 수 있었다.
- (3) 가장 높은 활성을 보인 균주는 양파에서 분리된 유산균 50번 *P. pentosaceus* ON-81A으로 97.8%로 측정되었고, 우영장아찌에서 분리된 20번 *L. pentosus* SC65 균주가 96.4%로 높은 활성을 나타내었다(표 1).



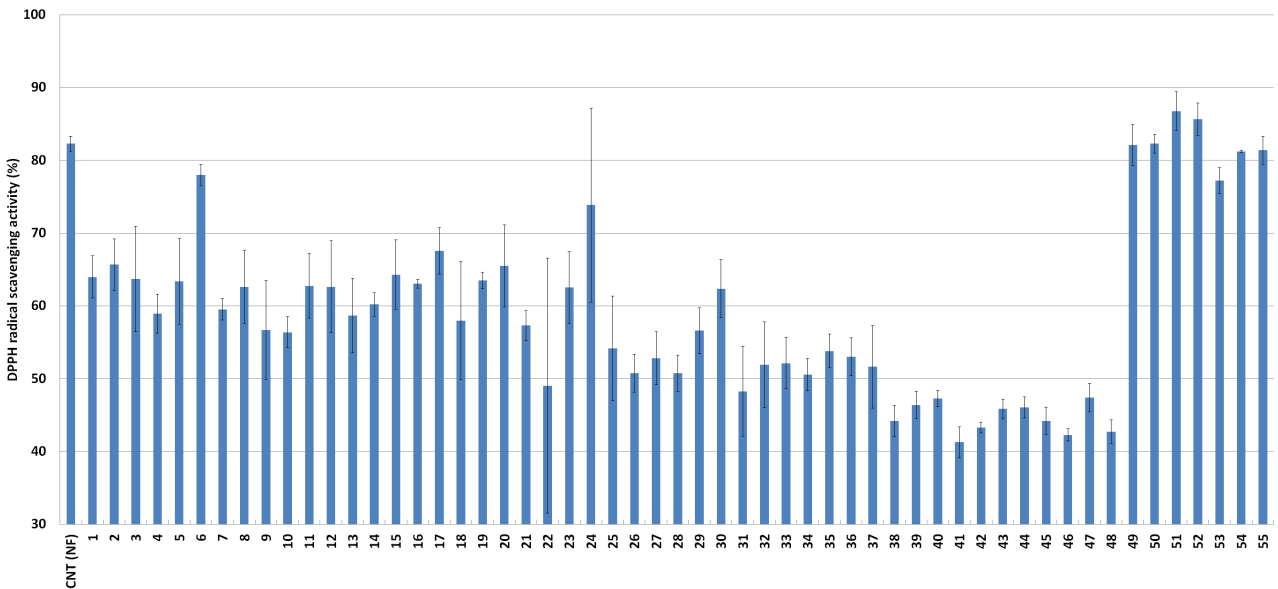
<그림 8> 발아검정콩을 분리된 유산균주로 발효하여 DPPH radical scavenging activity 측정.

표 1. 선정된 발아검정콩 발효 균주

No.	Strain	Source	DPPH activity (%)
14	<i>Pediococcus pentosaceus</i> SC30	낙지젓갈	96.2±0.1
18	<i>Lactobacillus paraplantarum</i> SC63	우영장아찌	96.1±0.5
20	<i>Lactobacillus pentosus</i> SC65	우영장아찌	96.4±0.3
28	<i>Weisella cibaria</i> S.Pum8	단호박	95.6±0.3
31	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> Y-KC6	김치	95.2±0.5
32	<i>Lactobacillus sakei</i> sal.cla9	조개젓갈	95.3±0.2
35	<i>Leuconostoc lactis</i> S.Pum21	단호박	95.5±0.2
37	<i>Pediococcus pentosaceus</i> ON-184	양파	93.2±1.0
50	<i>Pediococcus pentosaceus</i> ON-81A	양파	97.8±0.3
55	<i>Pediococcus pentosaceus</i> SP-038	고구마	96.2±0.2

(4) 그림 9는 발아현미를 분리된 유산균주로 발효한 뒤 DPPH radical scavenging activity를 측정된 결과이다. 총 55균주로 발아현미를 발효하였을 때, 11, 6, 17, 24, 30, 35, 49, 51번 총 8균주를 선정할 수 있었다.

(5) 가장 높은 활성을 보인 균주는 고구마에서 분리된 유산균 51번 *P. pentosaceus* SP-024로 86.7%로 측정되었고, 파에서 분리된 49번 *P. pentosaceus* GO-008 균주가 82.12%로 높은 활성을 나타내었다(표 2).



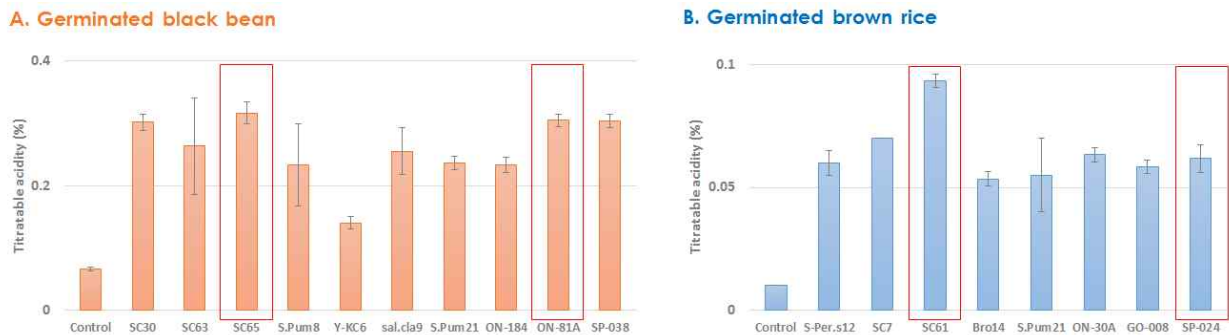
<그림 9.> 발아현미를 분리된 유산균주로 발효하여 DPPH radical scavenging activity 측정.

표 2. 선정된 발아현미 발효 균주

No.	Strain	Source	DPPH activity (%)
1	<i>Leuconostoc lacis</i> S-Per.s12	감	64.0±2.9
6	<i>Pediococcus pentosaceu</i> SC7	낙지젓갈	78.0±1.5
17	<i>Lactobacillus paraplantarum</i> SC61	우영장아찌	67.6±3.2
24	<i>Weisella kimchii</i> Bro14	브로콜리	73.9±13.3
30	<i>Leuconostoc lactis</i> S.Pum21	단호박	62.4±4.0

35	<i>Pediococcus pentosaceus</i> ON-30A	양파	53.8±2.3
49	<i>Pediococcus pentosaceus</i> GO-008	파	82.1±2.8
51	<i>Pediococcus pentosaceus</i> SP-024	고구마	86.7±2.7

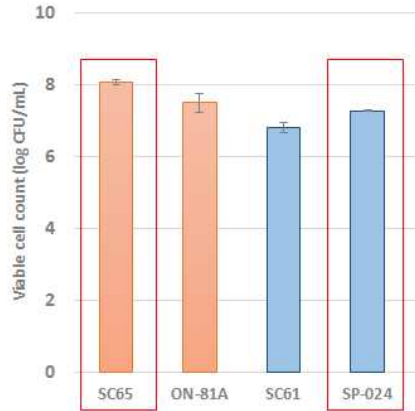
- (6) 상기 선정된 발효균주를 이용하여 각 발아곡류를 발효하였을 때, 발효하지 않은 control과 비교하여 높아짐을 확인하였다(그림 10). 발아검정콩에서 가장 높은 산도를 보인 균주는 *L. pentosus* SC65와 *P. pentosaceus* ON-81A로 확인되었는데, 그 값은 각각 0.32, 0.31%로 측정되었다. 이 두 균주는 DPPH radical scavenging activity도 가장 높은 활성을 지닌 균주인 것으로 확인되었다.
- (7) 발아현미의 경우 유산균이 발효시키기에 여러 요소가 부족하여 발효가 잘 안되었기 때문에 먼저 Lactobacilli MRS 액체배지에서 최대로 배양한 후, 발아현미에 2%(v/v)으로 접종하여 발효를 진행하였다. 발아현미에서 가장 높은 산도를 지니고 있는 균주는 *L. paraplantarum* SC61와 *P. pentosaceus* SP-024로 확인되었고, 그 값은 각각 0.09, 0.06%로 발아검정콩을 발효시킨 결과보다 낮게 측정되었다.
- (8) 발아검정콩을 발효하였을 때, 총 10균주 중 높은 적정산도를 나타낸 *L. pentosus* SC65와 *P. pentosaceus* ON-81A 2균주와 발아현미를 발효하였을 때, 총 8균주 중 높은 적정산도를 나타낸 *L. paraplantarum* SC61와 *P. pentosaceus* SP-024 2균주를 선정하여 생균수를 통하여 발아곡류에 가장 적합한 균주를 선정하였다.



<그림 10> 발아곡류를 분리된 유산균주로 발효하여 적정산도 측정.

- (9) 발아검정콩을 *L. pentosus* SC65와 *P. pentosaceus* ON-81A로 각각 발효하였을 때, 두 균주의 생균수는 각각 8.08, 7.50 log CFU/mL로 측정되었다. 또한 발아현미를 *L. paraplantarum* SC61와 *P. pentosaceus* SP-024로 각각 발효하였을 때 생균수는 각각 6.82, 7.28 log CFU/mL로 확인되었다(그림 11).



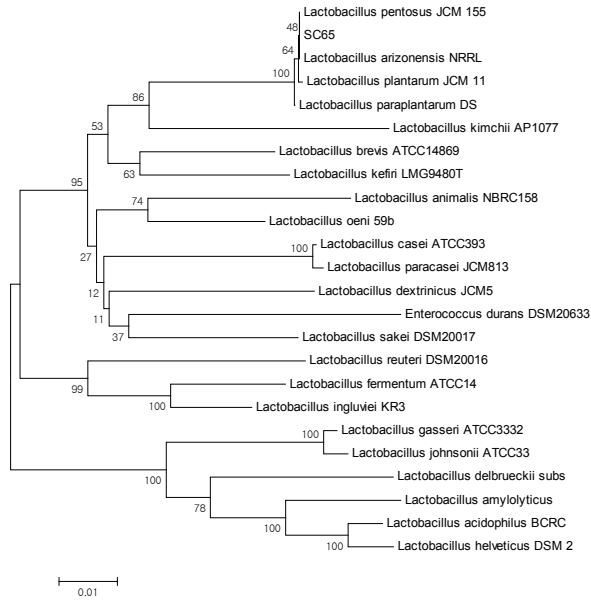


<그림 11> 발아곡류를 분리된 유산균주로 발효하여 생균수 측정.

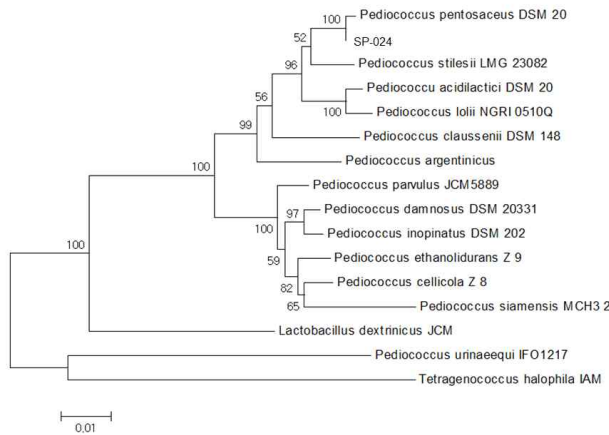
- (10) DPPH radical scavenging activity, 적정산도, 생균수를 측정하여 최종적으로 발아검정콩은 *L. pentosus* SC65, 발아현미는 *P. pentosaceus* SP-024를 이용하여 발효하는 것이 가장 적합하다고 판단되어 이 두 균주를 선정하였다.

#### 4. 선정 유산균의 형태학적, 생리학적, 분자생물학적 특성분석에 의한 균주 동정

- (1) 최종 선정된 발아검정콩 및 발아현미에서 발효능이 높은 두 균주에 대한 16S rRNA 유전자 염기서열 분석결과는 그림 12과 13에 나타내었고, 염기서열은 그림 14과 15에 나타내었다. 이들 염기서열을 NCBI에서 BLASTN 프로그램을 이용하여 GenBank의 16S rRNA 염기서열과 비교한 결과 발아검정콩 발효균주는 *Lactobacillus* 속, 발아현미 발효균주는 *Pediococcus* 속과 높은 상동성을 나타내었고, Clustal X와 Mega 5 프로그램을 이용하여 각 *Lactobacillus* 및 *Pediococcus* 유전자에 속하는 다양한 종들과 염기서열의 상동성을 비교분석하여 phylogenetic tree를 작성하였다.
- (2) 발아검정콩 발효균주인 SC65는 *L. pentosus* 및 *L. arizonensis*와 높은 유사성을 갖고, 이 중 *L. pentosus* JCM155와 가장 높은 상동성을 나타내어 최종 선발된 균주는 *Lactobacillus pentosus* SC65로 명명하였다. 또한 발아현미 발효균주인 SP-024는 *P. pentosaceus*와 높은 유사성을 갖고, 가장 높은 상동성을 나타내어 최종 선발된 균주는 *Pediococcus pentosaceus* SP-024로 명명하였다.



<그림 12> 발아검정콩 발효 균주인 SC65의 phylogenetic tree.



<그림 13> 발아현미 발효 균주인 SP-024의 phylogenetic tree.

CACCTGGAAACAGATGCTAATACCGCATAACAACCTTGGACCGCATGGTCCGAGTTTGAAGATGGCTTCGGCTATCACTT  
 TTGGATGGTCCCGCGGCGTATTAGCTAGATGGTGGGGTAACGGCTACCATGGCAATGATACGTAGCCGACCTGAGAGGG  
 TAATCGGCCACATTTGGACTGAGACACGGCCAAACCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGACGAA  
 GTCTGATGGAGCAACGCGCGTGAAGTGAAGAAGGGTTTCGGCTCGTAAAACTCTGTGTGTTAAAGAAGAACAATATCTGAG  
 AGTAACGTTCAGGTATTGACGGTATTTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGT  
 GGCAAGCGTTGTCGGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTTTTAAGTCTGATGTGAAAGCCTTCGGCTCAA  
 CCGAAGAAGTGCATCGGAAACTGGGAAACTTGGTGCAGAAAGAGGACAGTGGAACTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGT  
 AGATATATGGAAGAACCACAGTGGCGAAGGCGGCTGTCTGTTAACTGACGCTGAGGCTCGAAAGTATGGGTAGCA  
 AACAGGATTAGATACCTGGTAGTCCATACCGTAAACGATGAATGCTAAGTGTGGAGGTTTTCCGCCCTTCAGTGTCTGC  
 AGCTAACGCATTAAGCATTCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAAG  
 CGGTGGAGCATGTGTTTTAATTCGAAGTACGCGAAGAACCTTACCAGGCTCTGACATACTATGCAAATCTAAGAGATT  
 AGACGTTCCCTTCGGGGACATGGATACAGTGGTGCATGGTTGTCTGAGTCTGAGATGTGTTGGGTTAAGTCCC  
 GCAACGAGCGCAACCCCTAATTATCAGTTGCCAGCATTAAAGTTGGGCACTCTGGTGTGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGA  
 AGGTGGGGATGACGTCAAATCATATGCCCTTATGACCTGGGCTACACAGTGTACAATGGATGGTACAACGAGTTGC  
 GAACTCGCGAGAGTAAGCTAATCTCTTAAAGCCATTTCTCAGTTTCGGATTGTAGGCTGCAACTCGCCTACATGAAGTCGGA  
 ATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTAATACGTTCCCGGGCCTGTGACACACCGG

<그림 14> 발아검정콩의 발효 균주인 SC65의 염기서열.

GCAGTGAACGAACCTTCCGTTAATTGATTATGACGFACTTGTACTGATTGAGATTTTAAACGAAGTGAAGTGGCGAACG  
 GGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCAGAAAGTAGGGGATAACACCTGGAAACAGATGCTAATACCGTATAACAGAGAA  
 AACCGCATGGTTTTCTTTTAAAGATGGCTCTGCTATCACTTCTGGATGGACCCGCGGCGTATTAGCTAGTTGGTGAGGT  
 AAAGGCTCACCAGGCAAGTGAACGTAGCCGACCTGAGAGGGTAAATCGGCCACATTTGGGACTGAGACACGGCCAGACTC  
 CTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGACGCAAGCTGATGGAGCAACGCGCGTGAAGTGAAGAAGGGTTT  
 CGGCTCGTAAAGCTCTGTTGTTAAAGAAGAAGCTGGGTAAGAGTAACTGTTTACCCAGTGACGGTATTTAACCAGAAAG  
 CCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGC

GCAGGCGGTCTTTTAAGTCTAATGTGAAAGCCTTCGGCTCAACCGAAGAAGTGCATTGGAAACTGGGAGACTTGAGTGC  
 AGAAGAGGACAGTGGAACTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAAGAACACCACTGGCGAAGCGGTGT  
 CTGGTCTGCAACTGACGCTGAGGCTCGAAAGCATGGGTAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCATGCCGTAAACG  
 ATGATTACTAAGTGTGGAGGGTTCCGCCCTTCAGTGTGCTGACGCTAACGCATTAAGTAATCCGCCCTGGGGAGTACGACC  
 GCAAGTTGAAACTCAAAGAATTGACGGGGGCCGACAAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAAATTCGAAGCTACGCGAAG  
 AACCTTACCAGGTTGACATCTTCTGACAGTCTAAGAGATTAGAGGTTCCCTTCGGGGACAGAATGACAGGTGGTGCA  
 TGGTTGTCGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTTATTACTAGTTGCCAGCATT  
 AAGTTGGGCACTCTAGTGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGA  
 CCTGGGTACACACGCTGCTACAATGGATGGTACAACGAGTCGCGAGACCCGAGGTTAAGCTAATCTCTTAAAACCATTC  
 TCAGTTCGACTGTAGGCTGCAACTCGCCTACACGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAAT  
 ACGTTCCCGGCTTGTACACACCGCCGTCACACCATGAGAGTTTGTAAACCCAAAGCCGGTGGGGTAACTTTTAGG  
 AG

<그림 15> 발아현미의 발효 균주인 SP-024의 염기서열.

(3) 최종 선정된 *L. pentosus* SC65와 *P. pentosaceus* SP-024의 일반적인 특성을 분석한 결과 Gram 양성의 무포자형성균이고, 운동성은 없으며, catalase 활성과 gas 생성은 하지 않는 것으로 나타났다(표 3).

표 3. *L. pentosus* SC65와 *P. pentosaceus* SP-024의 특성

Characteristics	<i>L. pentosus</i> SC65	<i>P. pentosaceus</i> SP-024
Gram-stain	+	+
3% KOH test	+	+
Motility	-	-
Catalase test	Anaerobic	Anaerobic
Saccharolytic test	-	-

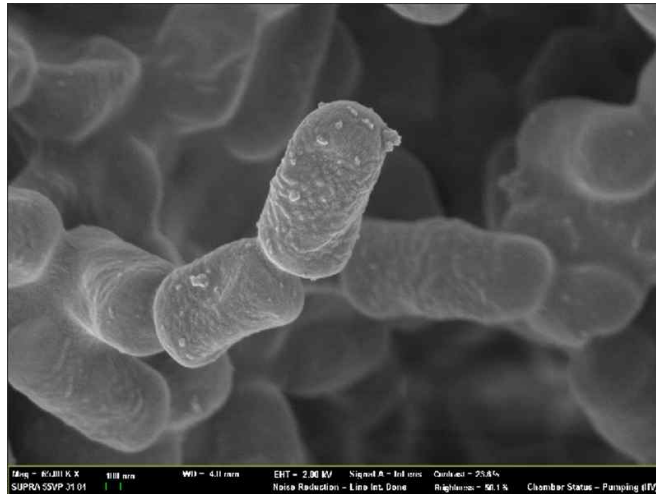
(4) *L. pentosus* SC65와 *P. pentosaceus* SP-024의 생화학적 특징을 API kit로 분석한 결과를 표 4에 나타내었고, 이에 따라 본 균주의 당 이용성을 확인한 결과 단당류인 glucose, fructose, ribose, manose 등과 이당류인 saccharose, trehalose 등을 이용하고, 다당류인 inulin과 melezitose 등은 이용하지 못하였다. Cyan 배당체인 amygdalin, arbutin과 raffinose 배당체인 N-acetyl glucosamin, esculin ferric citrate를 이용하는 것을 확인할 수 있었다.

표 4. API kit를 이용한 *L. pentosus* SC65와 *P. pentosaceus* SP-024의 생화학적 특성

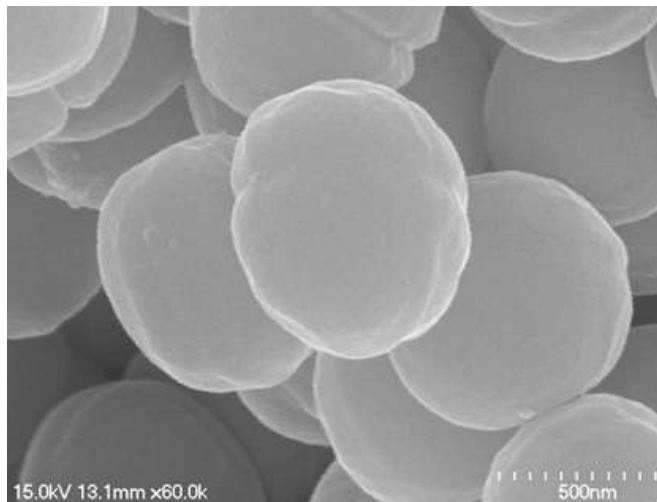
Characteristics	<i>L. pentosus</i> SC65	<i>P. pentosaceus</i> SP-024	Characteristics	<i>L. pentosus</i> SC65	<i>P. pentosaceus</i> SP-024
Glycerol	-	-	Salicin	+	+
Erythritol	-	-	D-Cellobiose	+	+
D-Arabinose	-	-	D-Maltose	+	+
L-Arabinose	+	+	D-Lactose (bovine origin)	+	+
D-Ribose	+	+	D-Melibiose	+	+
D-Xylose	-	-	D-Saccharose (sucrose)	+	+
L-Xylose	-	-	D-Trehalose	+	+
D-Adonitol	-	-	Inulin	-	-
Methyl-β-D-xylopyranoside	-	-	D-Melezitose	-	-
D-Galactose	+	-	D-Raffinose	+	+
D-Glucose	+	+	Amidon (starch)	-	-
D-Fructose	+	+	Glycogen	-	-
D-Mannose	+	+	Xylitol	-	-
L-Sorbose	-	-	Gentiobiose	+	+
L-Rhamnose	-	+	D-Turanose	+	-
Dulcitol	-	-	D-Lyxose	-	-
Inositol	-	-	D-Tagatose	-	+
D-Mannitol	+	-	D-Fucose	-	-

D-Sorbitol	+	-	L-Fucose	-	-
Methyl- $\alpha$ -D-mannopyranoside	-	-	D-Arabitol	-	-
Methyl- $\alpha$ -D-glucopyranoside	-	-	L-Arabitol	-	-
N-Acetyl glucosamine	+	+	Potassium Gluconate	+	+
Amygdalin	+	+	Potassium 2-ketogluconate	-	-
Arbutin	+	+	Potassium 5-ketogluconate	-	-
Esculin ferric citrate	+	+			

(5) 주사전자현미경(scanning electron microscope, SEM)을 이용하여 최종선발균주의 형태를 관찰한 결과, 발아검정콩 발효균주인 *L. pentosus* SC65는 간균으로 균체의 길이는 약  $0.7 \times 1.3-1.5 \mu\text{m}$ 로 측정되었다. 또한 발아현미의 발효균주인 *P. pentosaceus* SP-024는 구균으로서 균체의 지름은  $0.6 \mu\text{m}$ 로 측정되었다(그림 16, 17).



<그림 16> 발아검정콩 발효균주로 선정된 *L. pentosus* SC65의 SEM 사진( $\times 65,000$ ).



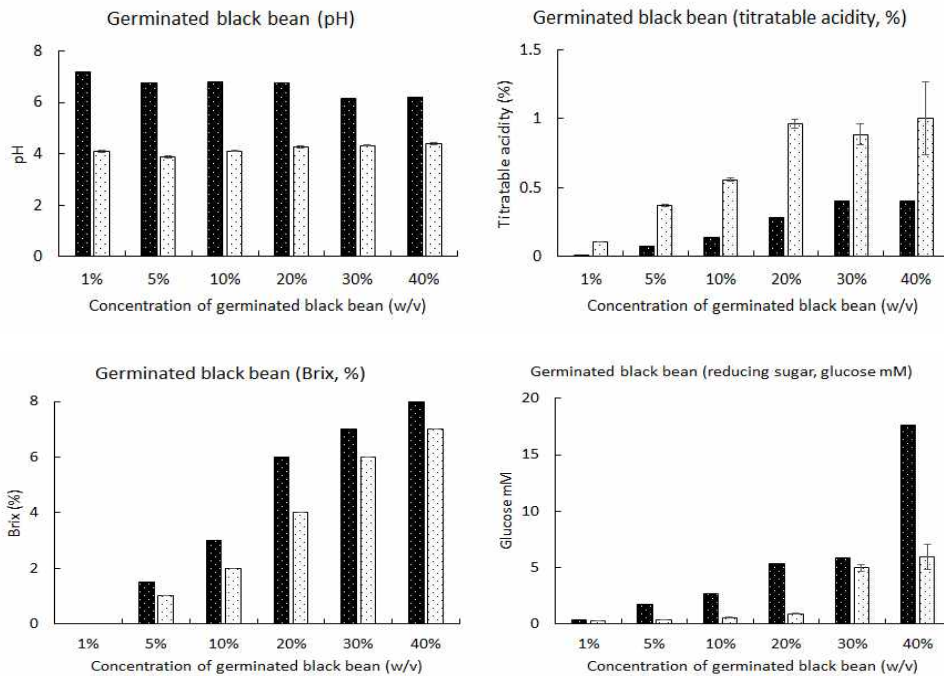
<그림 17> 발아현미 발효균주로 선정된 *P. pentosaceus* SP-024의 SEM 사진( $\times 60,000$ ).

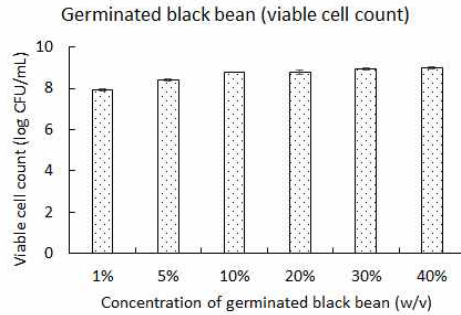
## 5. 분리 균주를 이용한 발아 곡류의 발효 최적화 연구

### (1) 발아곡류의 액상발효

① 분리 균주를 이용하여 발아 곡류의 발효 최적화 연구를 위하여 먼저 액상발효를 통하여 발아 곡류 원물의 농도, 발효온도, 발효시간에 대한 최적화 연구를 진행하였다.

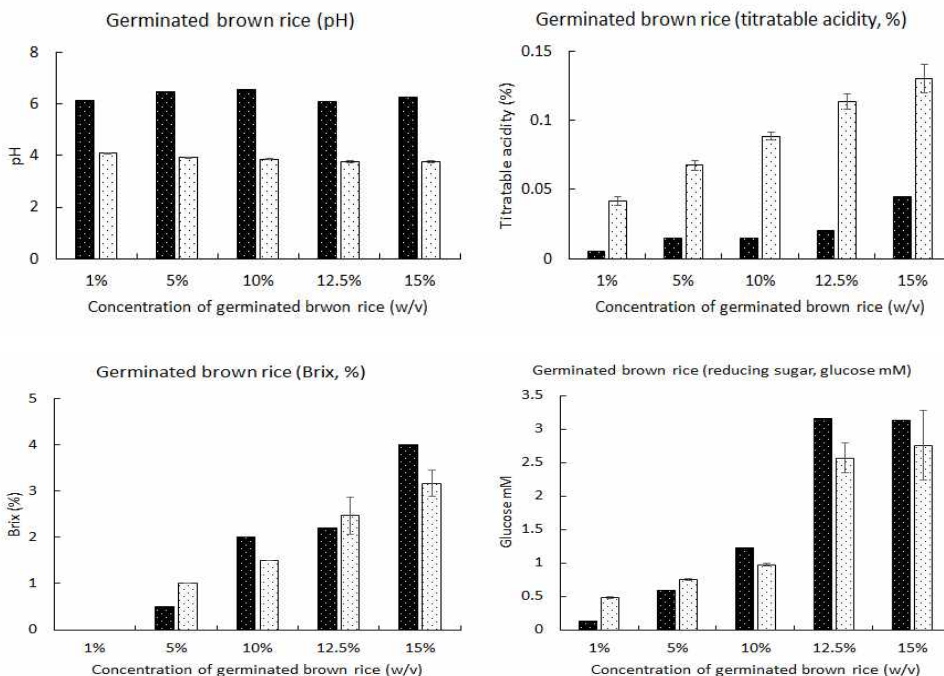
- ② 액상발효를 진행하기 위하여 발아검정콩 원물의 농도를 1, 5, 10, 20, 30, 40%로 조정하여 열수추출을 진행하여 액상발효에 사용하였고(그림 18), 발아현미 원물의 농도를 1, 5, 10, 12.5, 15%로 조정하고, 각각 *L. pentosus* SC65, *P. pentosaceus* SP-024의 배양액을 2%(v/v)으로 발효를 진행하였다(그림 19).
- ③ 발아검정콩을 발효하기 전과 후 pH는 평균적으로 각각 6.6, 4.2로 측정되었고, 원물의 농도를 증가하여 발효 시킬 경우 pH의 변화를 보이지 않았다. 발효한 후 발아검정콩은 20%(w/v)의 농도에서 0.96%의 최대 산도를 확인할 수 있었다. 또한 원물의 농도가 높아질수록 열수 추출물의 당도는 높아지는 것을 확인할 수 있었고, 발효 전보다 발효 후가 당도가 1 Brix 감소한 것을 확인할 수 있었는데, 이는 유산균주가 원물의 당을 사용하여 발효를 하는 것과 연관이 있다고 판단되었다. 더불어 발효 전 발아검정콩 원물의 농도가 40%(w/v)일 때, 발효 전보다 발효 후에 각각 17.58, 5.91 mM glucose equivalent로 환원당이 12 mM glucose equivalent 정도 감소한 것으로 관찰되었다. 발아검정콩의 발효 후 유산균의 생균수를 측정하였을 때, 원물의 농도가 1%(w/v)일 때 보다 40%(w/v)일 때 생균수가 7.92 log CFU/mL에서 9.00 log CFU/mL로 약 1 log CFU/mL가 증가한 것을 확인할 수 있었다. 즉 원물의 농도가 증가 할수록 유산균의 생균수가 증가함을 알 수 있었다. 본 결과를 통하여 발효 전 원물의 농도에 따른 pH와 생균수는 큰 차이가 없었고, 원물의 농도가 각각 20, 30, 40%(w/v)일 때 적정 산도의 값이 유사하였으므로 액상발효에 가장 적합한 원물의 농도는 20%(w/v)로 선정할 수 있었다.

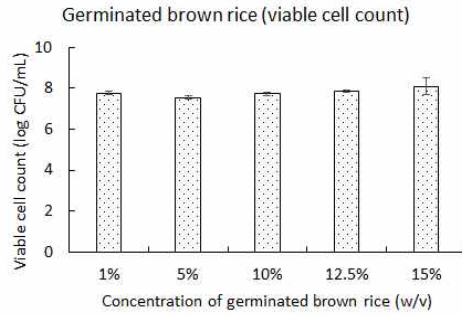




<그림 18> 발아검정콩의 농도에 따른 발효특성 분석(검정색 바: 발효 전; 흰색 바: 발효 후).

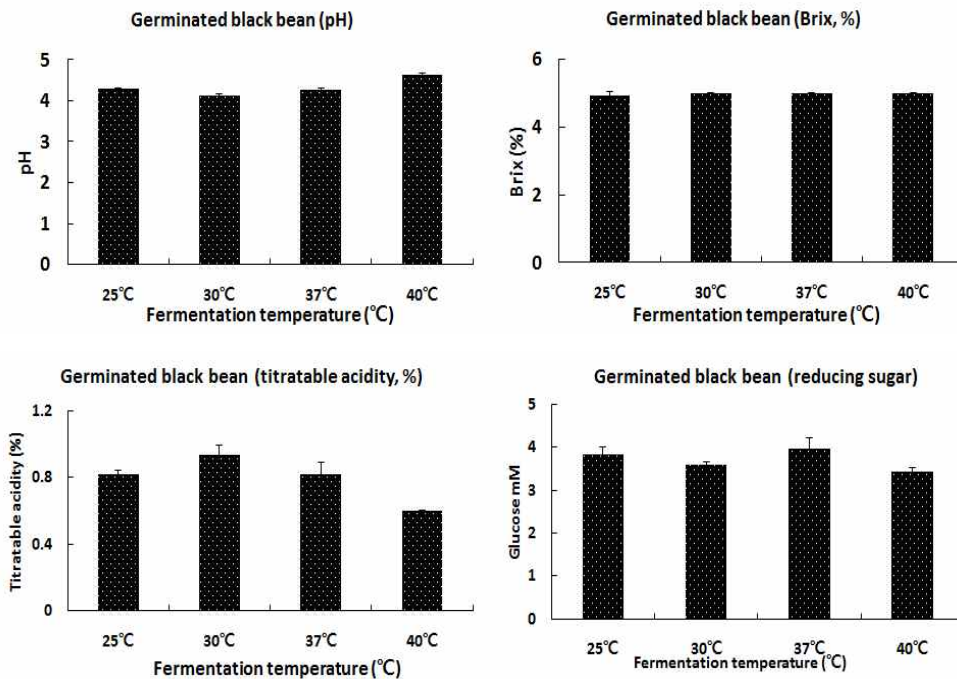
④ 발아현미를 발효하기 전과 후 pH는 평균적으로 각각 6.3, 3.9로 측정되어 발아검정콩 발효보다 낮은 pH 결과를 얻을 수 있었고, 원물의 농도를 증가하여 발효 시킬 경우 pH의 변화를 보이지 않았다. 발효한 후 발아현미는 농도의존적으로 산도가 증가함을 확인하였으나, 원물의 농도가 가장 높았던 15%(w/v)에서도 산도가 0.13% 밖에 검출되지 않아 발아검정콩에 비하여 발효가 적게 되는 것이 관찰되었다. 환원당의 경우, 원물의 농도가 1, 5%(w/v)일 때는 발효 후가 발효 전보다 높은 환원당량을 보였는데, 10, 12.5, 15%(w/v)일 때는 발아검정콩의 발효와 유사하게 발효 전보다 발효 후가 낮은 환원당량을 나타내었다. 또한 생균수의 경우 원물의 농도가 15%(w/v)일 때 8.09 log CFU/mL로 가장 높은 생균수를 나타내었으나, 모두 발아검정콩의 발효보다 약 1 log CFU/mL이 낮은 것이 확인되었다. 본 결과를 통하여 pH와 생균수는 큰 차이가 없었고, 적정 산도가 농도 의존적으로 상승하는 것으로 보아 원물의 농도를 15%(w/v) 이상으로 증가시킬 수 있었으나, 12.5%부터는 열수 추출 후 얻어지는 추출물의 양이 상당히 적은 것으로 확인되어 발아현미의 액상발효에서 가장 적합한 원물의 농도는 10%(w/v)로 선정할 수 있었다.

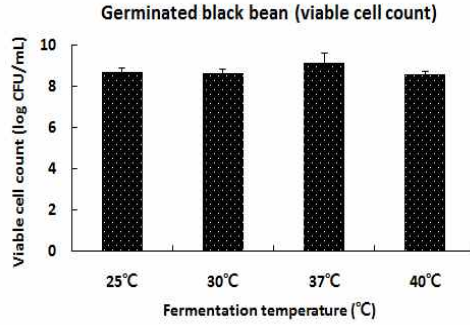




<그림 19> 발아현미의 농도에 따른 발효특성 분석(검정색 바: 발효 전; 흰색 바: 발효 후).

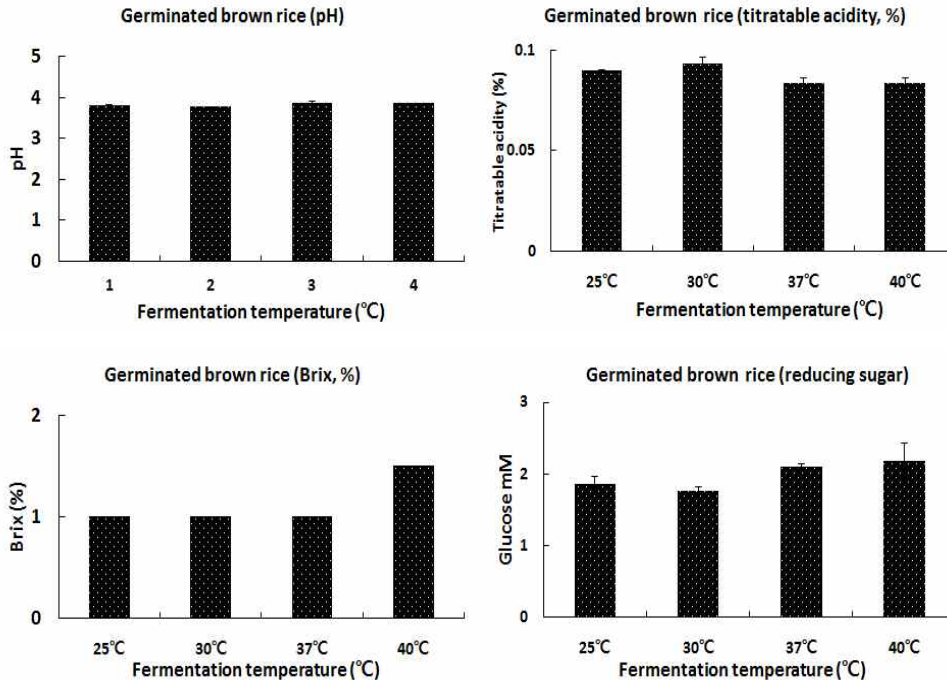
- ⑤ 발아 곡류의 발효를 위한 발효 온도 최적화를 위하여 발아검정콩과 발아현미를 각각 20, 10%(w/v)의 농도로 열수 추출한 후, 배양액 2%(v/v)를 접종하여 25, 30, 37, 40°C에서 발효를 진행하였다.
- ⑥ 발아검정콩 열수 추출물에 유산균 발효하였을 때의 결과의 경우 pH, 당도, 환원당의 경우, 온도에 따른 변화가 거의 없었고, 산도의 경우 30°C에서 발효를 하였을 때 0.93%로 가장 높은 산도를 나타내었고, 40°C에서 발효하였을 때 0.60%로 가장 낮은 산도를 보였다(그림 20). 반면에 생균수의 경우 37°C에서 발효하였을 때 9.14 log CFU/mL로 가장 높은 생균수를 보였고, 30°C가 8.65 log CFU/mL로 나타났다. 상기의 결과를 종합적으로 살펴 보았을 시, 온도에 따른 생균수의 경우 큰 차이가 없음을 확인하였고, 발효시 온도에 따라 적정산도가 가장 중요하다고 판단되어, 발아검정콩의 가장 적합한 발효온도는 30°C로 선정할 수 있었다.



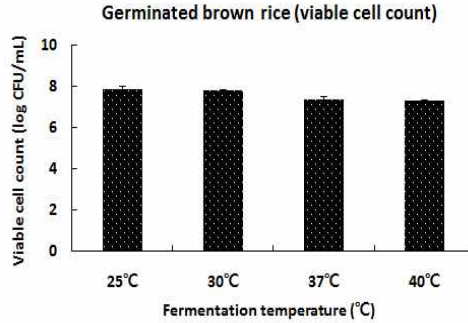


<그림 20> 발효 발아검정콩의 발효온도 최적화.

- ⑦ 발아현미의 열수 추출물에 유산균 발효를 하였을 때의 결과의 경우, 발아현미를 발효하였을 때 pH는 평균 3.83으로 측정되었고, 온도에 따른 차이는 없었다. 또한 발아검정콩을 발효한 뒤 산도의 차이가 있었으나, 발아현미의 경우 pH가 아래의 데이터와 같이 별다른 차이는 없는 것으로 확인되었다(그림21). 30°C에서 발효할 때, 1.76 mM glucose equivalent로 가장 낮은 수치를 기록하였고, 40°C에서 발효할 때 2.19 mM glucose equivalent로 환원당이 높았다. 발효 온도에 따른 생균수의 경우 평균 7.59 log CFU/mL로 온도에 따른 차이는 없는 것으로 나타났다. 상기결과에 의거하여 당을 많이 소모한 것으로 확인된 발효온도 30°C에서 최적 발효가 이루어지는 것으로 판단되었다.

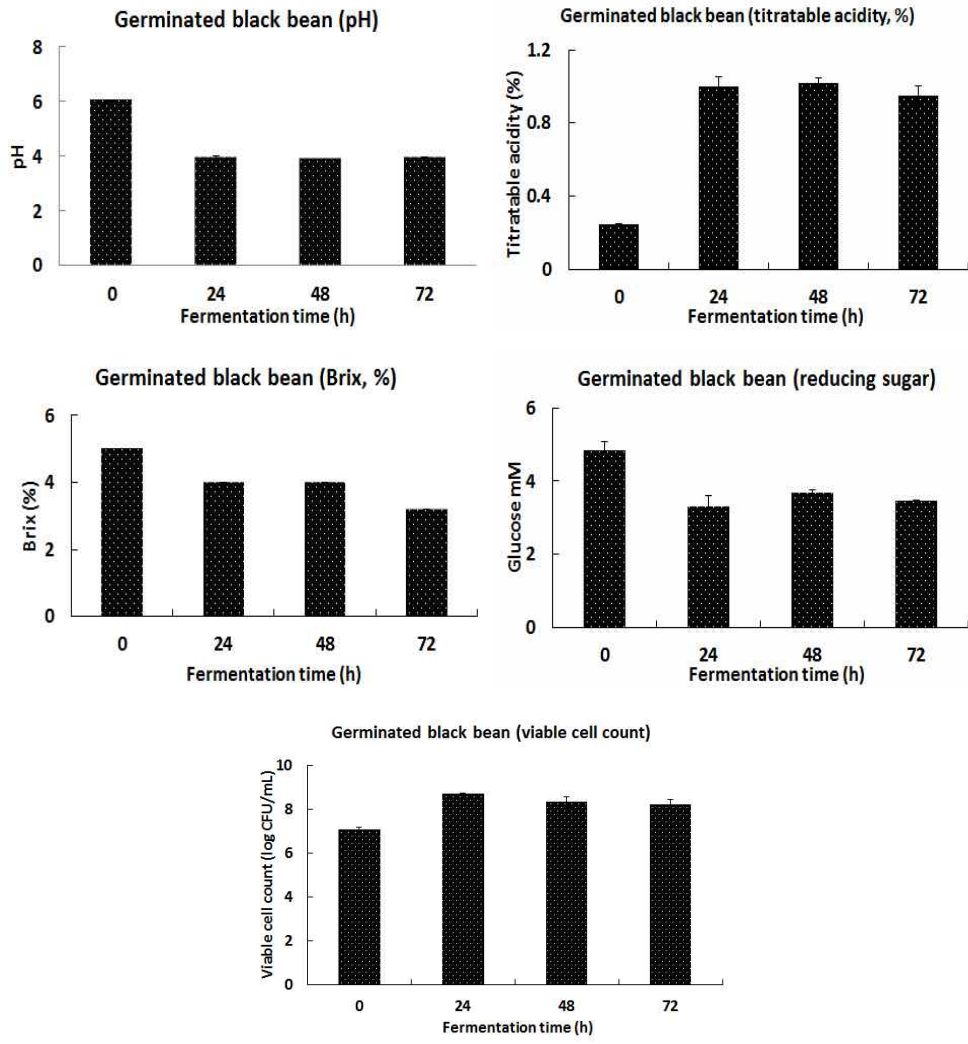




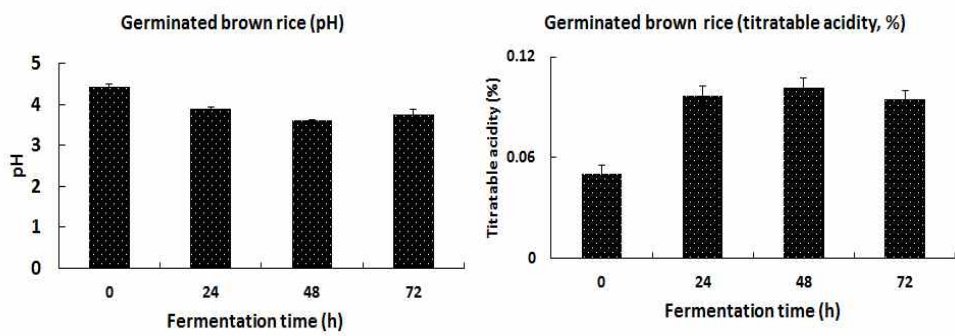


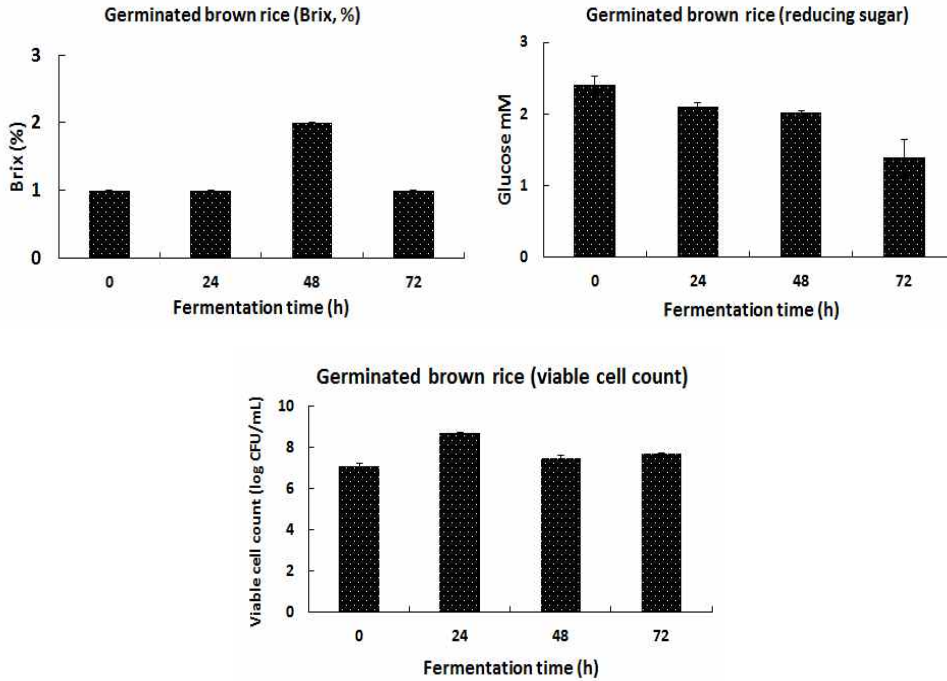
<그림 21> 발효 발아현미의 발효온도 최적화.

- ⑧ 액상발효에 있어서 원물의 양을 발아검정콩과 발아현미 각각 20, 10%(w/v)로 결정하고, 발효온도를 30°C로 최적화하여, 발효 최적 시간을 결정하기 위하여 0, 24, 48, 72시간 동안 pH, 적정산도, 환원당, 생균수를 측정하였다.
- ⑨ 그림 22에 발아검정콩의 액상발효시 발효시간에 따른 여러 항목을 분석한 결과, pH는 발효 24시간 이후 변화가 없는 것으로 확인되었고, 적정산도 또한 24시간에 1.0%로서 그 이후에는 변화가 없었다. 24, 48시간 발효까지는 당도가 4%로 같았으나, 24시간이 지난 72시간째에 3.2%로 조금 더 감소한 것으로 확인되었다. 반면에 환원당과 생균수의 경우 24시간 이후 발효 시간에 따른 변화는 없는 것으로 확인되었다. 상기 결과를 고려하여 발아검정콩의 발효는 24시간 이후 분석결과에 큰 변화가 없고, 공정상으로 효율을 높이기 위하여 최적 발효 시간은 24시간으로 결정하였다.
- ⑩ 발아현미의 액상발효시 발효시간에 따른 분석결과는 그림 23에 나타내었다. 발아현미를 발효하기 전 pH는 4.42로 측정되었는데, 이는 발아검정콩보다 초기 pH가 낮은 것을 확인할 수 있었다. 발효 24시간 이후 pH 3.90으로 감소되어, 발효 48시간에 pH 3.60으로 감소되었으나, 발효 72시간에 pH 3.75로 약간 증가하였다. 이는 적정산도의 결과와 유사하였는데, 발효 24시간에 0.097%에서, 발효 48시간에 0.102%, 발효 72시간에 조금 감소한 0.095%를 기록하였다. 적정산도와 pH의 관계가 어느정도 일치한다고 판단된다. 환원당은 발효 24, 48시간에 약간 감소한 것으로 관찰되었으나(각각 2.11, 2.02 mM glucose equivalent), 발효 72시간에 1.39 mM glucose equivalent로 감소한 것을 확인할 수 있었다. 발효시간에 따른 생균수는 초기 7.10 log CFU/mL에서 발효 24시간에 8.70 log CFU/mL로 가장 높은 생균수를 보였고, 발효 48, 72시간에는 유사한 값을 나타내었다. 상기 결과에 의거하여 생균수가 가장 높았던 발효 24시간을 최적 발효 시간으로 결정하였다.



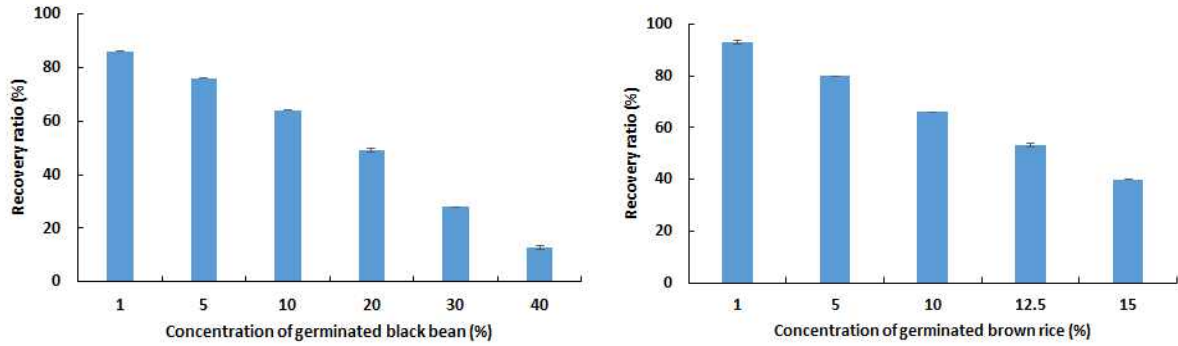
<그림 22> 발효 발아검정콩의 발효시간 최적화.





<그림 23> 발효 발아현미의 발효시간 최적화.

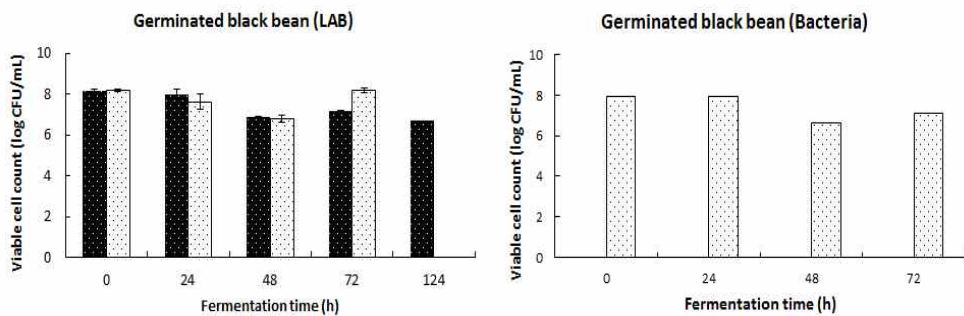
- ⑪ 발아검정콩과 발아현미의 발효 방법에 따른 발효 효율을 연구하기 위하여 먼저 액상발효에 대한 연구를 진행하였다(그림 24). 발아검정콩과 물의 양을 총 50 mL로 원물의 농도를 1, 5, 10, 20, 30, 40%(w/v)로 조정하여 121°C에서 15분간 열수 추출을 진행하였다. 그 결과는 그림 12에 나타내었는데, 원물의 농도가 1%(w/v)일 때도 86% 밖에 회수가 되지 않는 것으로 나타났고, 40%(w/v)일 때는 13%가 회수되어 액상발효는 발효 효율이 좋지 않은 것으로 확인되었다.
- ⑫ 발아현미의 액상발효의 경우, 발아검정콩과 동일한 양으로 진행하였고, 원물의 농도는 1, 5, 10, 12.5, 15, 20%(w/v)로 조정하여 121°C에서 15분간 열수 추출을 진행하였다. 그러나 20%(w/v)의 원물로 열수 추출을 하였을 때, 고체화되어서 열수 추출을 할 수 없었다. 원물의 농도가 1%(w/v)일 때 회수율은 발아검정콩보다 높은 93%가 회수되었고, 15%(w/v)을 원물의 농도로 하였을 때 40%가 회수되어 사용할 수 있었다.
- ⑬ 액상발효와 고상발효를 비교하였을 때, 고상발효는 원물을 그대로 사용할 수 있는 장점이 있었다. 그러나 액상발효의 경우 추출 후 손실되는 양이 50% 미만으로 감소하는 것이 관찰되어 효율적이지 않다고 판단되어 고상발효를 진행하였다.



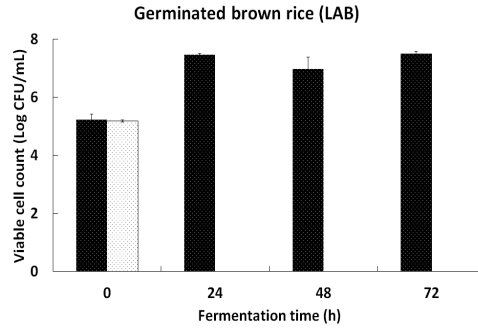
<그림 24> 발아검정콩 및 발아현미의 원물 농도에 따른 액상발효 회수율.

(2) 발아곡류의 고상발효

- ① 고상발효를 진행하기 위하여 멸균공정 및 발아곡류의 불림 등의 전처리 방법에 대한 연구를 진행하였다.
- ② 발아검정콩의 경우 *Bacillus* 속이 많이 존재하기 때문에 발효 균주인 유산균이 우점종이 되기에는 한계가 있는 것으로 확인되었다. 멸균공정 없이 진행한 발효의 경우 이취 및 곰팡이가 자라기도 하는 것으로 관찰되어 멸균공정이 필수적이라고 판단되었다. 또한 멸균공정을 도입한 고상발효의 경우 액상발효보다 발효시간이 경과할수록 생균수가 감소하는 현상을 관찰할 수 있었다(그림 25).
- ③ 발아현미 또한 같은 방법으로 멸균유무에 따른 생균수를 그림 21에 나타내었다. 초기 유산균은 멸균유무에 따른 차이가 거의 없었으나, 발효 24시간부터 멸균공정을 도입하지 않은 실험군에서 곰팡이가 오염이 되어 다른 분석이 불가능하였다. 발효 24시간 이후 유산균의 생균수는 발효시간이 경과함과 관계없이 일정하게 유지되는 것을 확인하였다.
- ④ 이를 통하여 멸균공정은 필수적으로 도입되어야 한다고 판단되어 발아검정콩 및 발아현미의 멸균공정 도입 후 연구를 진행하였다.

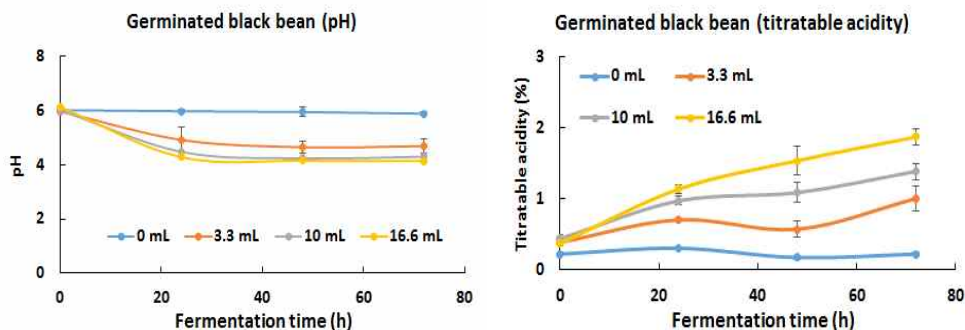


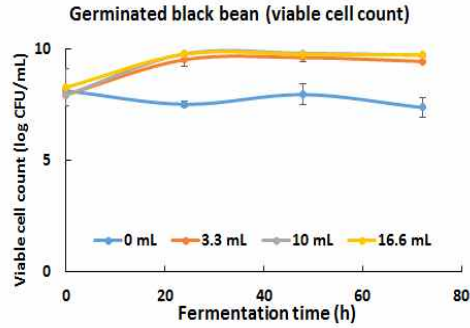
<그림 25> 발아검정콩의 멸균유무에 따른 생균수(검은 바: 멸균공정; 흰 바: 멸균안함).



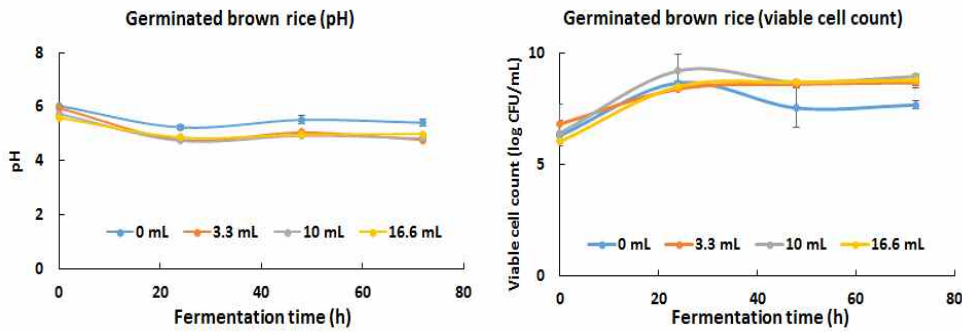
<그림 26> 발아현미의 멸균유무에 따른 생균수(검은 바: 멸균공정; 흰 바: 멸균안함).

- ⑤ 발아곡류를 발효시킬 때 가장 중요한 요인 중 하나인 수분을 고려해 주기 위하여, 고상발효 전 물의 양을 결정하기 위하여 성상을 확인하였다. 먼저 발아검정콩의 경우 10 g당 물의 양을 0, 3.3, 10, 16.6 mL을 분주하였고, 발아현미의 경우 16.6 g당 물의 양을 0, 3.3, 10, 16.6 mL을 분주하여 멸균하여, 배양액 2 mL을 접종하여 발효를 진행하였다.
- ⑥ 물의 양을 달리하여 발효를 진행하였을 때, 발아검정콩의 경우, 물을 넣지 않고 발효하였을 때, 발효시간의 경과에 따른 pH, 적정산도, 생균수의 차이가 없는 것으로 확인되었다(그림 22). 물의 양이 가장 많을 때(16.6 mL), pH가 가장 낮게 측정되었고, 적정산도의 경우 발효 72시간째에는 1.9% 정도의 높은 적정산도를 보였다. 시간이 경과할수록 직선적으로 적정산도가 상승함을 관찰할 수 있었다. 그러나 생균수는 물을 넣지 않고 발효시킨 균을 제외하고, 24시간에 약 9 log CFU/mL 이상으로 측정된 것을 확인할 수 있었다. 여러 조건과 멸균 후 발아검정콩의 성상을 고려하여 본 연구에서 사용될 물의 양은 1 mL/g(물로써 50%(v/w))으로 결정하였다.
- ⑦ 발아현미의 경우 그림 28에 나타낸 바와 같이 물을 넣지 않고 발효한 균을 제외하고, 발효 24시간 이후 pH가 유사한 것을 관찰할 수 있었고, 적정산도는 없는 것으로 확인되었다 (data not shown). 생균수의 경우 10 mL의 물을 넣고 발효하였을 때, 발효 24시간 후 9.2 log CFU/mL로 측정되어 가장 높은 생균수를 보였다. 이러한 결과를 통하여 본 연구에 사용될 발아현미의 발효에 10 mL/16.6 g(물로써 37.5%(v/w))으로 선정할 수 있었다.



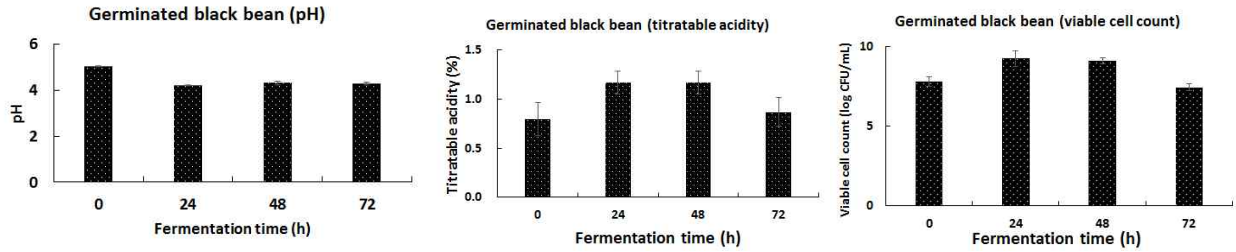


<그림 27> 물에 양에 따른 발아검정콩의 발효 특성 분석.

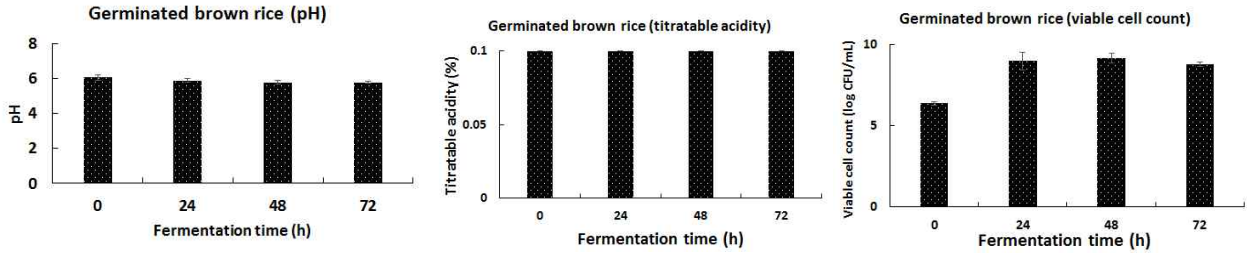


<그림 28> 물에 양에 따른 발아현미의 발효 특성 분석.

- ⑧ 멸균공정 전에 발아검정콩 50 g을 증류수 100 mL, 발아현미 50 g을 증류수 180 mL에 18 시간 불려놓은 뒤, 상기 결과에서 도출된 물의 양을 각각 50, 37.5%(v/w)를 넣고, 멸균공정을 진행하여 발효하였다.
- ⑨ 그림 29에 나타낸 바와 같이 불린 발아검정콩을 발효하였을 때, 시간이 경과할수록 변화하는 것을 관찰할 수 있었다. pH의 경우 발효 24시간이 경과 후, 4.18로 감소하였고, 발효시간이 경과함에 따른 변화는 관찰하지 못했다. 또한 적정산도의 경우 초기 0.8%에서 발효 24, 48시간에 1.17%로 동일한 값을 나타내었고, 72시간이 경과하였을 때 다시 0.87%로 초기 수준정도로 적정산도가 감소함을 확인할 수 있었다. 생균수도 적정산도의 결과와 유사하게 초기 7.82 log CFU/mL에서 24시간 경과 후 9.27 log CFU/mL로 가장 높은 생균수를 확인하였다.
- ⑩ 발아현미를 불린 후, 발효를 진행하였을 때, pH 및 적정산도는 발효시간이 경과함에 따른 큰 변화는 없는 것으로 나타났으나, 생균수가 초기 6.38 log CFU/mL에서 48시간 경과 후 9.17 log CFU/mL로 가장 높은 생균수를 지니고 있음을 확인할 수 있었다(그림 30).
- ⑪ 상기 결과와 불리지 않고 진행하였던 발효특성이 유사한 것으로 판단되어, 불림 공정을 포함하는 공정으로 진행하고자 하였다.

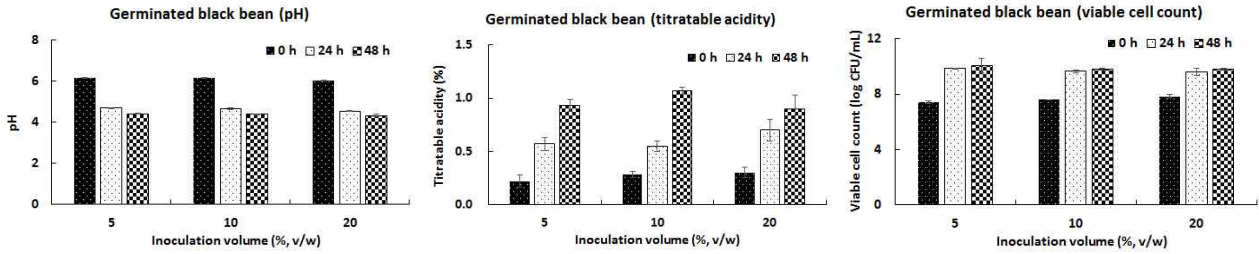


<그림 29> 불린 발아검정콩에 대한 유산균 발효특성분석.

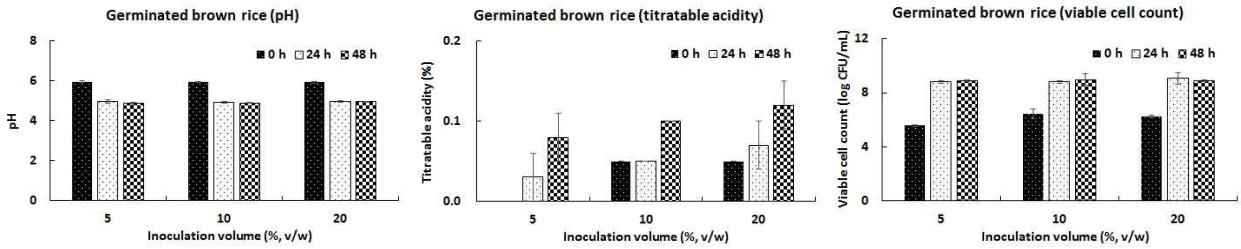


<그림 30> 불린 발아현미에 대한 유산균 발효특성분석.

- ⑫ 상기 결과를 바탕으로 고상발효에 적합한 배양액의 접종량을 최적화하기 위하여 멸균공정 까지 완료된 발아검정콩과 발아현미에 각각 5, 10, 20%(v/w)으로 선정된 유산균주의 배양액을 접종하였다.
- ⑬ 접종량을 달리한 발아검정콩의 발효특성분석에 대한 결과는 그림 31에 나타내었다. pH는 발효 24시간이 경과한 후, pH가 4 부근으로 감소하여 발효시간에 따른 차이가 없는 것으로 확인되었고, 배양액의 접종량에 따라 pH도 큰 차이를 관찰할 수 없었다. 적정산도의 경우 발효시간이 경과할수록 적정산도가 상승하였고, 20%(v/w)를 접종하였을 때, 발효 24시간에 적정산도가 0.7%에서 가장 높았으나, 발효 48시간에 0.9%로 가장 낮은 수치를 기록하였다. 접종량에 따른 생균수의 변화 또한 24시간 이후, 각 접종량에 따라서 변화가 거의 없는 것을 확인할 수 있었다. 배양액의 접종량에 따른 차이는 없는 것으로 확인되었으므로 가장 적은 접종량인 5%(v/w)가 최적 접종량인 것으로 판단할 수 있었다.
- ⑭ 그림 32에 나타낸 바와 같이 접종량에 따른 발아현미의 발효특성을 발아검정콩과 같은 항목으로 분석한 결과이다. 발아검정콩과 유사한 결과를 얻을 수 있었는데, 초기 pH에서 발효 24시간이 경과하게 되면 pH가 일정 수준 이하로 감소하지 않는 것을 확인할 수 있었다. 발아현미를 발효한 후, 적정산도는 매우 낮은 수준으로 검출이 되었는데, 발효시간에 의존적으로 상승하는 경향을 볼 수 있었다. 생균수는 발효 초기 5-6 log CFU/mL에서 발효 24시간이 경과한 후 8 log CFU/mL로 상승하는 것으로 확인되었고, 접종량에 따른 차이는 없었다. 발아검정콩의 결과와 같이 발아현미에 접종하는 배양액의 접종량에 따른 차이는 없었으므로, 가장 적은 접종량인 5%(v/w)가 최적 접종량으로 판단하였다.



<그림 31> 접종량에 따른 발아검정콩 발효특성분석.

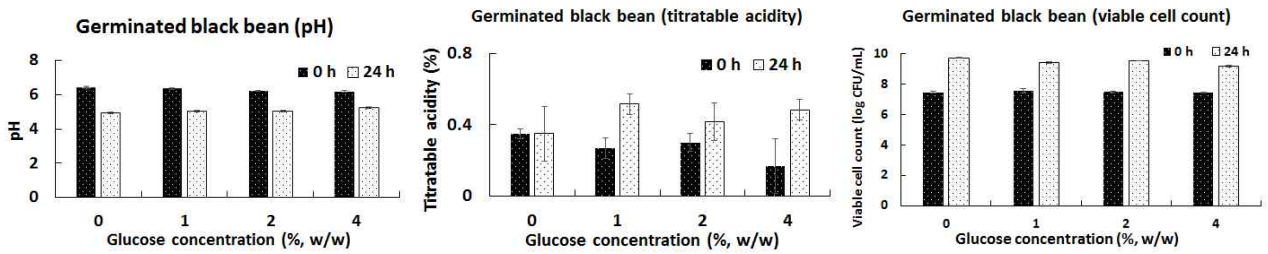


<그림 32> 접종량에 따른 발아현미 발효특성분석.

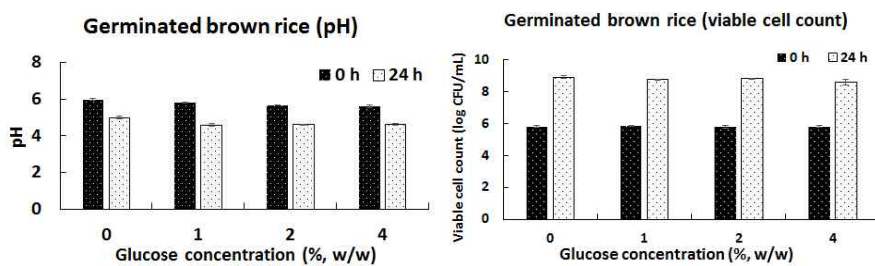
- ⑮ 상기 결과와 더불어 탄소원의 첨가여부에 관한 최적화 연구를 진행하기 위하여, 가장 단순하고 유산균주가 이용하기 쉬운 glucose를 선정하여 농도에 따른 발효적성을 확인하였다. Glucose의 농도는 0, 1, 2, 4%(w/w)을 발아검정콩과 발아현미에 각각 첨가하여 탄소원 이용성을 관찰할 수 있었다.
- ⑯ 탄소원 첨가여부를 결정하기 위하여 발아검정콩을 발효시키기 전에 glucose를 농도별로 처리하여 발효특성을 분석하였다(그림 33). 발효 후 24시간일 때, 발아검정콩의 pH는 유산균이 발효를 진행하면서 유산을 생성하여 pH가 감소하는 경향을 볼 수 있었으나 glucose 농도에 따른 차이는 관찰할 수 없었다. 적정산도의 경우 발효 초기에 glucose의 첨가 농도가 높을수록 적정산도가 낮아지는 것으로 측정되었고, glucose를 첨가하여 발효를 진행했을 때 첨가를 하지 않고 발효를 했을 때 보다 높은 산도가 확인되었다. 발효 유산균주가 glucose를 이용하여 발효능이 약간 상승한 것으로 보였다. 그러나 유산균수에는 glucose가 영향을 주지 않은 것으로 확인되었는데, glucose의 농도에 상관없이 발효 후에는 9 log CFU/mL 이상으로 검출되었다. 이러한 결과에 의거하여 탄소원을 첨가하지 않는 것이 제품이 개발되었을 때의 원료의 비용을 낮출 수 있고, 소비자의 인식에 있어서 당의 무첨가라는 이미지를 심어줄 수 있다고 판단되어 발아검정콩 발효에는 탄소원을 첨가하지 않는 것으로 결정하였다.
- ⑰ 그림 34에는 발아현미에 탄소원을 첨가하여 발효특성을 분석한 결과이다. 발아현미를 발효시켰을 때, 발아검정콩과 같이 glucose 농도에 따른 변화는 볼 수 없었다. 발아현미의 경우 초기 pH가 낮기 때문에 발효 후 감소하는 폭이 크지 않았고, 적정산도가 전혀 검출되지 않은 것으로 확인되어, glucose를 첨가하여도 유산균주가 현미에 대한 발효능이 낮은 것으로 판단할 수 있었다(data not shown). 또한 생균수는 발효 전 6 log CFU/mL로 측정되었고, 발효 24시간이 지난 뒤 glucose를 첨가하지 않은 균의 생균수가 8.89 log CFU/mL로 가장



높은 생균수가 측정되었다. 이는 glucose 첨가 여부에 관계없이 유산균주의 성장과 발효능이 차이가 없다고 판단하였다.

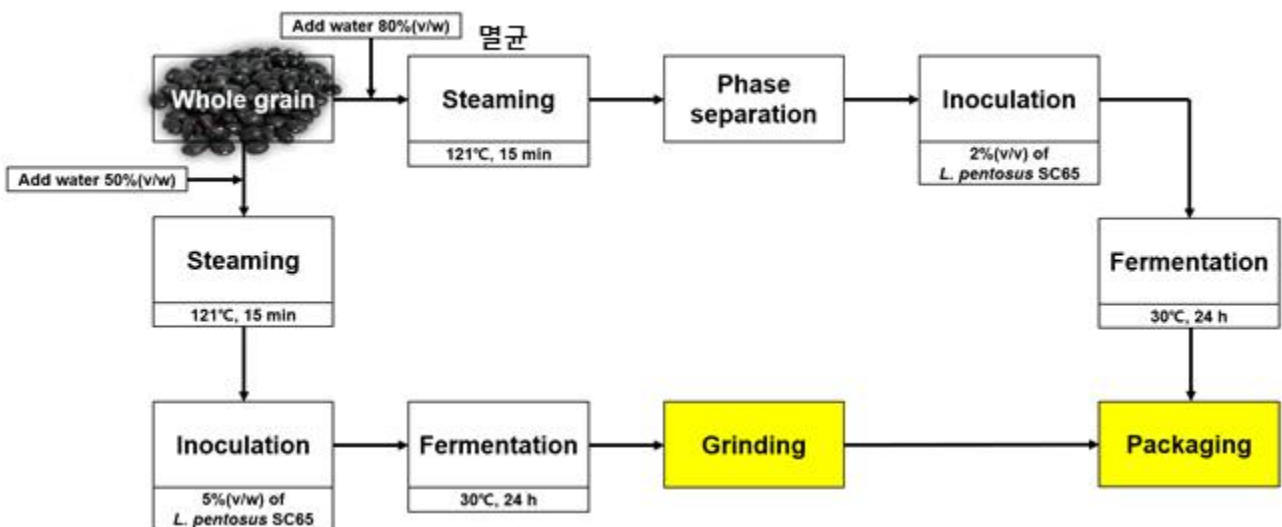


<그림 33> 탄소원 첨가에 따른 발아검정콩 발효특성분석.

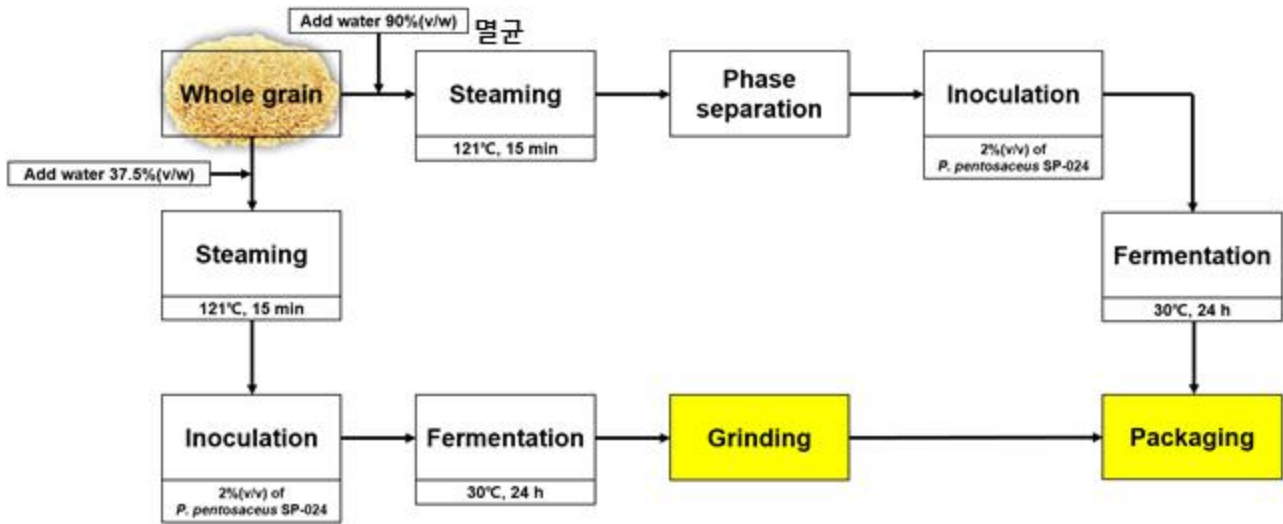


<그림 34> 탄소원 첨가에 따른 발아검정콩 발효특성분석.

- ⑱ 상기 결과들에 의거하여 본 연구에서는 발아검정콩 발효에 대한 최적의 균주는 *Lactobacillus pentosus* SC65, 발아현미 발효에 대한 최적의 균주는 *Pediococcus pentosaceus* SP-024가 발효능이 높았고, 액상발효보다는 고상발효의 발효효율이 높은 것으로 판단되었다. 발아곡류는 잡균의 오염을 방지하기 위하여 멸균공정이 꼭 투입되어야 하고, 발아검정콩의 경우 발효에 적합한 상태로 만들어주기 위하여 수분을 50%(v/w), 발아현미는 37.5%(v/w)가 요구되었다. 최적 발효시간은 24시간, 최적 발효온도는 30℃로 측정되었고, 최적 배양액 접종량은 5%(v/w)으로 결정할 수 있었고, glucose는 따로 첨가하지 않는 것으로 최적화가 되었다(그림 35, 36).

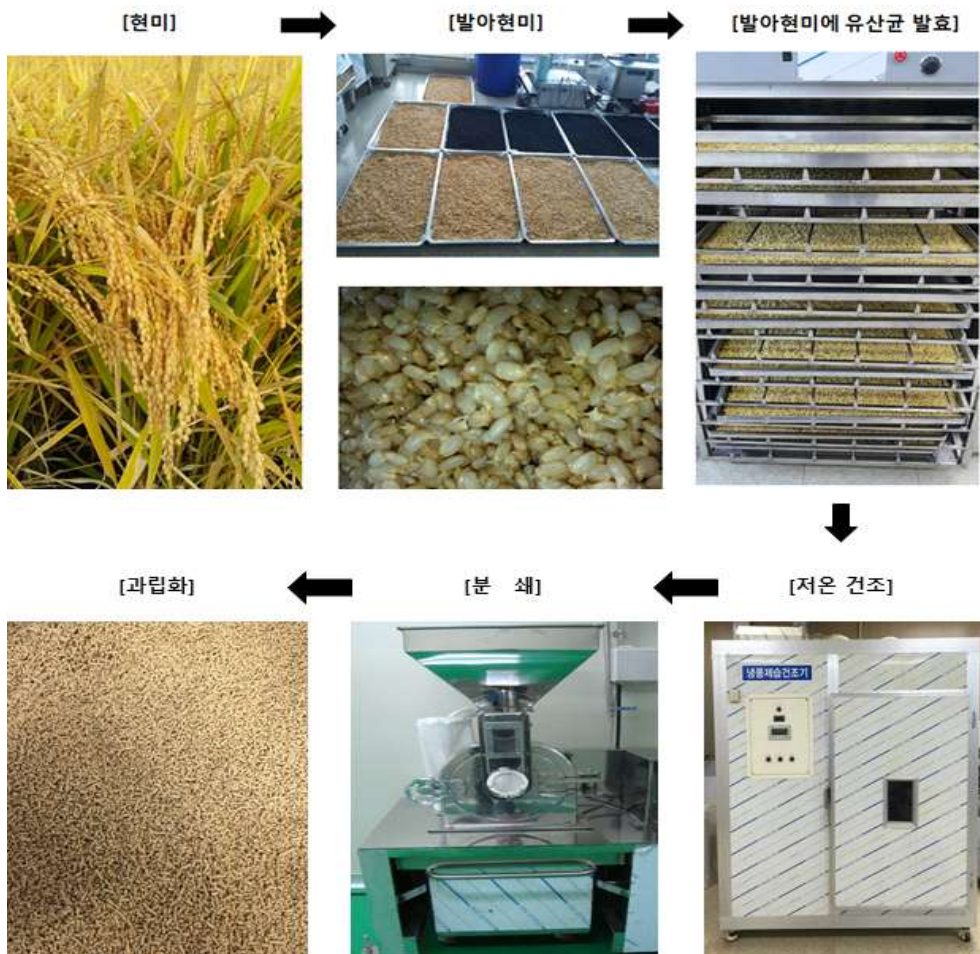


<그림 35> 발아검정콩 발효 공정도.



<그림 36> 발아현미 발효 공정도.

6. 대량생산을 위한 발효공정의 개발



<그림 37> 대량생산에서의 발효 공정

(1) 발아현미 전처리 공정의 최적화(수분함량, 분말 입도 등)

① 원물인 발아현미를 깨끗이 세척하여 물기를 제거한 후 100g에 물 30mL을 넣어주었다.

(2) 발아현미의 살균공정, 종균배양, 원료 혼합. 발효공정, 제형화 등 제품 생산을 위한 단위공정의 최적화

② 121°C의 고압증기멸균기에서 물과 혼합된 발아현미를 15분간 멸균처리 하였다. 멸균 후 발아현미에 액체배양된 유산균을 5mL (5%) 첨가하여 30°C에서 24시간 동안 고상발효를 진행하였다.

(3). 건조 공정

① 유산균 발효된 발아현미를 수분이 10% 미만이 되도록 건조 하였다.

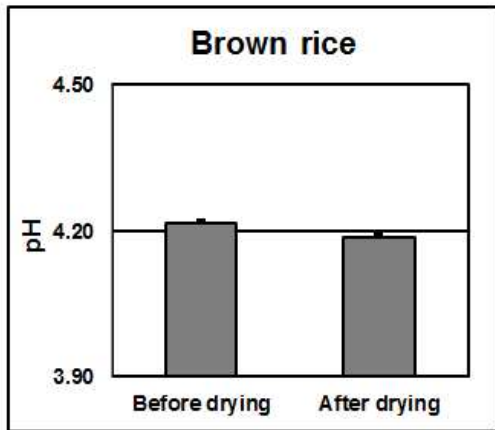
② 온도에 의한 유산균 손실을 줄이기 위해 40°C에서 24시간 동안 냉풍건조기에서 저온건조 하였다.

③ 건조 전과 비교하기 위해 건조 전 시료와 건조 후 시료를 사용하여 pH와, 생균 수를 측정하였다.

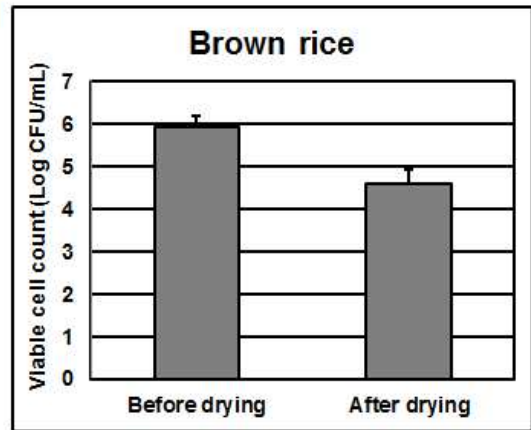
④ pH를 측정하기 위해 발효된 발아현미 1g에 생리식염수 10ml을 넣어 섞은 후 pH meter기로 측정하였다. 건조 전/후 발효발아현미의 pH 결과는 아래 그림의 (가)로 나타내었다. 그래프를 보면 발아현미 건조 전 pH는 4.22, 건조 후 pH는 4.19로 건조 전/후의 pH 차이가 거의 없었음을 확인 할 수 있다.

⑤ 생균 수를 측정하기 위해 유산균 수 측정 배지인 BCP배지에 발효발아현미 1g과 생리식염수 10ml을 섞은 용액을 일정 농도로 serial dilution 한 후 도말 하여 24h 후에 측정하였다. 건조 전/후 발효 발아현미의 생균 수 결과는 아래 그림의 (나)로 나타내었다. 그래프를 보면 건조 전 발아현미의 생균 수는 5.90 log CFU/mL이고, 건조 후 생균 수는 4.57 log CFU/mL이 측정되었다. 건조 전에 비해 건조 후의 생균 수가 감소하였지만 이 것은 건조공정을 통해 온도의 변화와 수분 함량의 변화로 인해 균 사멸이 일어난 것으로 추측된다.

(가)



(나)



<그림 38> 발효된 발아현미의 건조 전/후 pH와 생균 수.

(4). 분쇄 공정

① 건조된 발아현미를 제형화 하기 위해 분쇄 공정을 진행하였다.

② 분말 형태로 제형화하기 위하여 발효 후 건조된 발아현미를 조분쇄기에 넣어 분쇄 하였다.

③ 미세 분말화 하기 위하여 상기 원료를 롤밀 분쇄기에 넣어 미분쇄 하였다.

(5). 추출 공정

① 추출 공정 중에 환경의 변화로 인한 유산균의 사멸 및 변질과 유산균이 발효하면서 생성한 여

러 대사체들과 유효성분들의 변화가 우려되어 추출 공정은 실시하지 않았다.

(6) 과립화 공정 중의 가공적성 검토

- ① 분쇄 공정이 끝난 분말화 된 발아현미를 과립 공정을 실시하여 아래 그림과 같이 과립화 하였다.



<그림 39> 과립화 된 발효 발아현미

## 제 2 절 유산균 발효 발아현미의 신규(특이)지표물질 탐색 및 품질 기준 확립

### 1. 발아현미의 기지 지표물질 확보 및 분석법 설정 (참고논문 1-2)

#### (1) 가. 발아현미 기지 지표물질 확보

① 발아현미 추출물의 HPLC 분석을 통해 추출물내 성분 분포를 확인함으로써 지표물질을 설정하여 확인할 수 있었음.

② 반복 실험을 통하여 *trans*-ferulic acid를 지표물질로 확인 할 수 있었으며, 분석법은 아래와 같음.

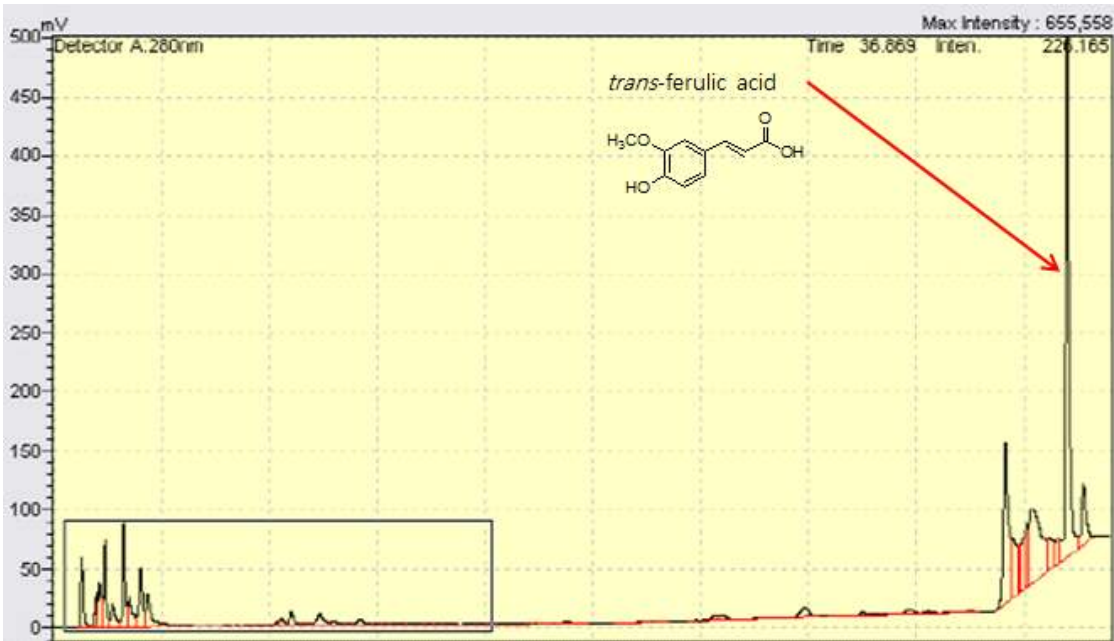
#### ③ 실험 조건

- a. 검액제조 : 1 mg/mL의 농도로 추출물을 MeOH로 희석
- b. 컬럼 : Hydrosphere C18 column (250 × 4.6 mm, 5 μm; YMC)
- c. 컬럼 온도 : 30 °C
- d. 검출 조건 : UV detection, 280 nm
- e. Flow rate : 0.8 mL/min
- f. Gradient condition

min	A (Acetonitrile)	B (water + 0.1% formic acid)
0	5	95

5	9	91
15	9	91
22	11	89
38	18	72
88	80	20

④ HPLC chromatogram



(2). 발아현미 (고체배양) 기지 지표물질 확보

① 발아현미 (고체배양)을 80% MeOH로 추출하여 그 추출물의 HPLC 분석을 통해 추출물내 성분 분포를 확인함으로써 지표물질을 설정하여 확인 할 수 있었음.

② 반복 실험을 통하여 *trans-ferulic acid*를 지표물질로 확인 할 수 있었으며, 분석법은 아래와 같음.

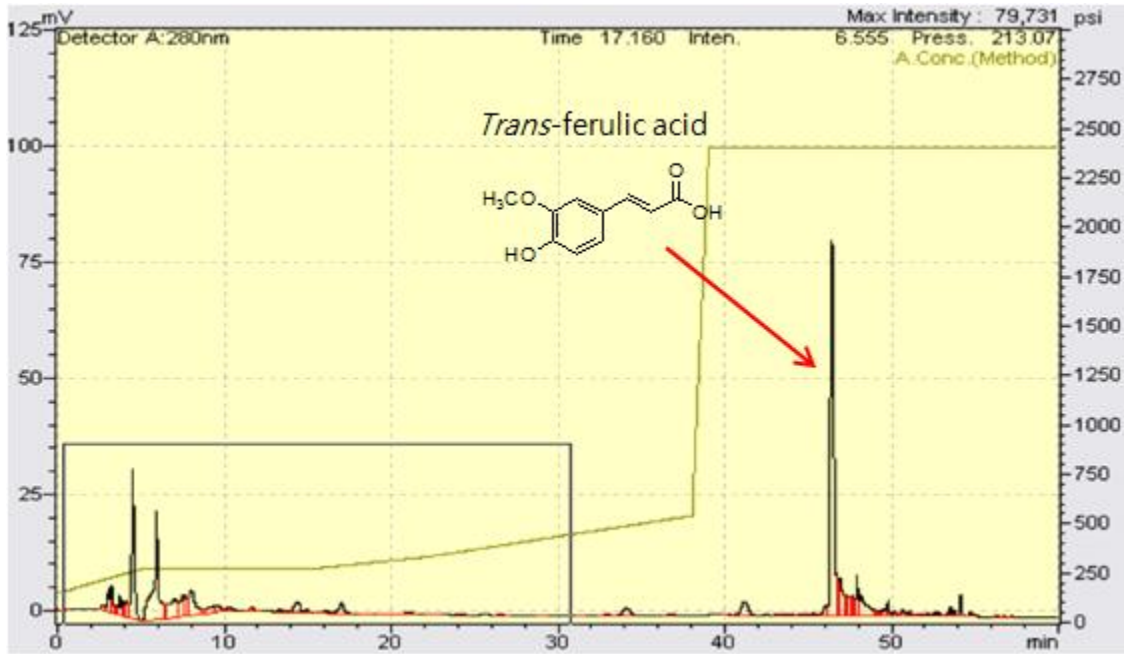
③ 실험 조건

- a. 검액제조 : 1 mg/mL의 농도로 추출물을 MeOH로 희석
- b. 컬럼 : Hydrosphere C18 column (250 × 4.6 mm, 5 μm; YMC)
- c. 컬럼 온도 : 30 °C
- d. 검출 조건 : UV detection, 280 nm
- e. Flow rate : 0.8 mL/min
- f. Gradient condition

min	A (Acetonitrile)	B (water + 0.1% formic acid)
0	5	95
5	9	91
15	9	91

22	11	89
38	18	72
88	80	20

④ HPLC chromatogram



## 2. 발아현미의 유산균 발효에 따른 발효 전/후의 성분 패턴 분석

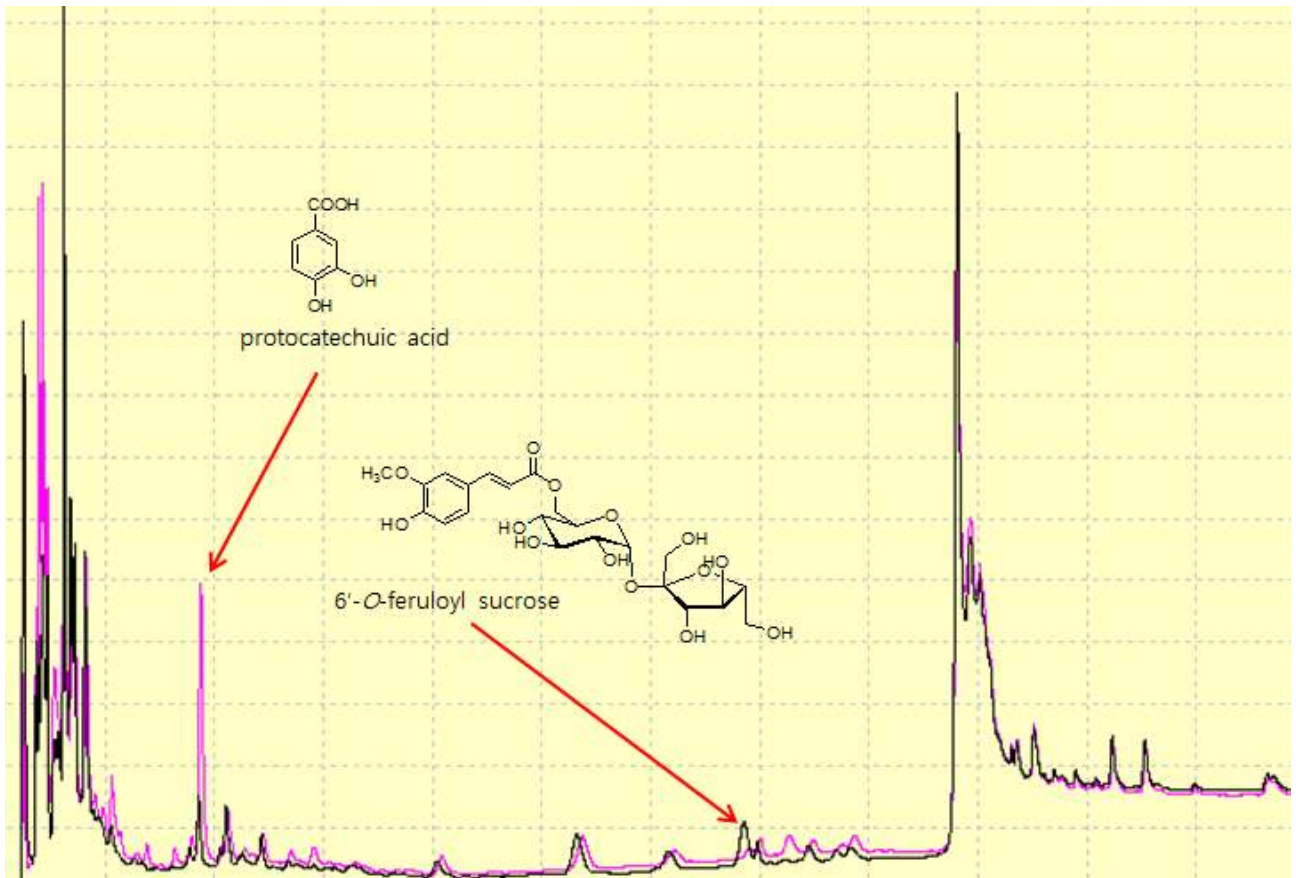
### (1) 유산균 (*P. peutosaoceus*) 발효 발아현미의 성분 패턴 분석

- ① 유산균 (*P. peutosaoceus*) 발효 발아현미 추출물의 HPLC 분석을 통해 추출물내 성분 분포를 확인함으로써 발효 전/후의 성분 패턴 분석을 할 수 있었음.
- ② 반복 실험을 통하여 확인한 결과, 발효 전에 존재 하였던 6'-*O*-feruloyl sucrose 성분이 발효 후에 사라지며, 발효 후에는 protocatechuic acid 성분이 발효 전과 비교해서 많이 검출되는 변화를 관찰 할 수 있었음.
- ③ 실험 조건

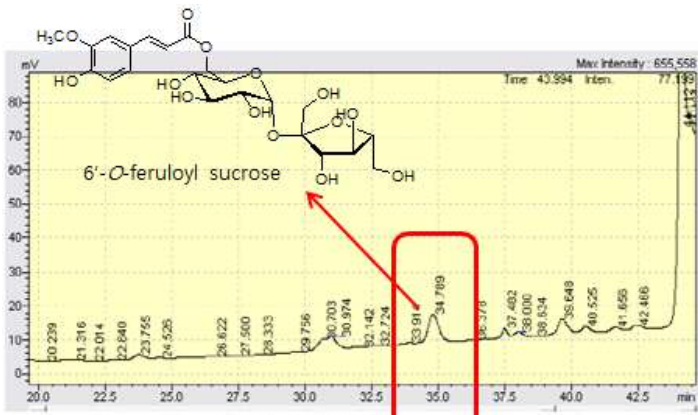
- a. 검액제조 : 1 mg/mL의 농도로 추출물을 MeOH로 희석
- b. 컬럼 : Hydrosphere C18 column (250 × 4.6 mm, 5 μm; YMC)
- c. 컬럼 온도 : 30 °C
- d. 검출 조건 : UV detection, 280 nm
- e. Flow rate : 0.8 mL/min
- f. Gradient condition

min	A (Acetonitrile)	B (water + 0.1% formic acid)
0	5	95
5	9	91
15	9	91
22	11	89
38	18	72
88	80	20

### ④ HPLC chromatogram



Black line: 발아현미 발효전  
 Pink line: 발아현미 유산균 (*P. peutosaeus*) 발효 후



발아현미 발효전



발아현미 유산균 (*P. peutosaeus*) 발효 후



(2). 유산균 (*P. peutosaoceus*) 발효 발아현미 (고체배양)의 성분 패턴 분석

① 유산균 (*P. peutosaoceus*) 발효 발아현미 (고체배양)를 80% MeOH로 추출하여 그 추출물의 HPLC 분석을 통해 추출물내 성분 분포를 확인함으로써 발효 전/후의 성분 패턴 분석을 할 수 있었음.

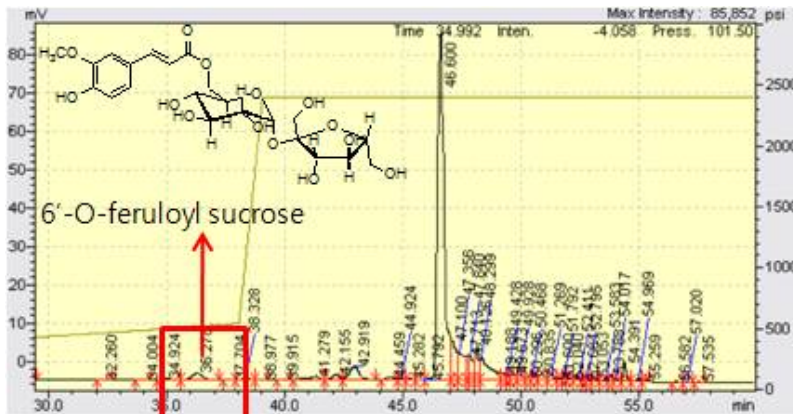
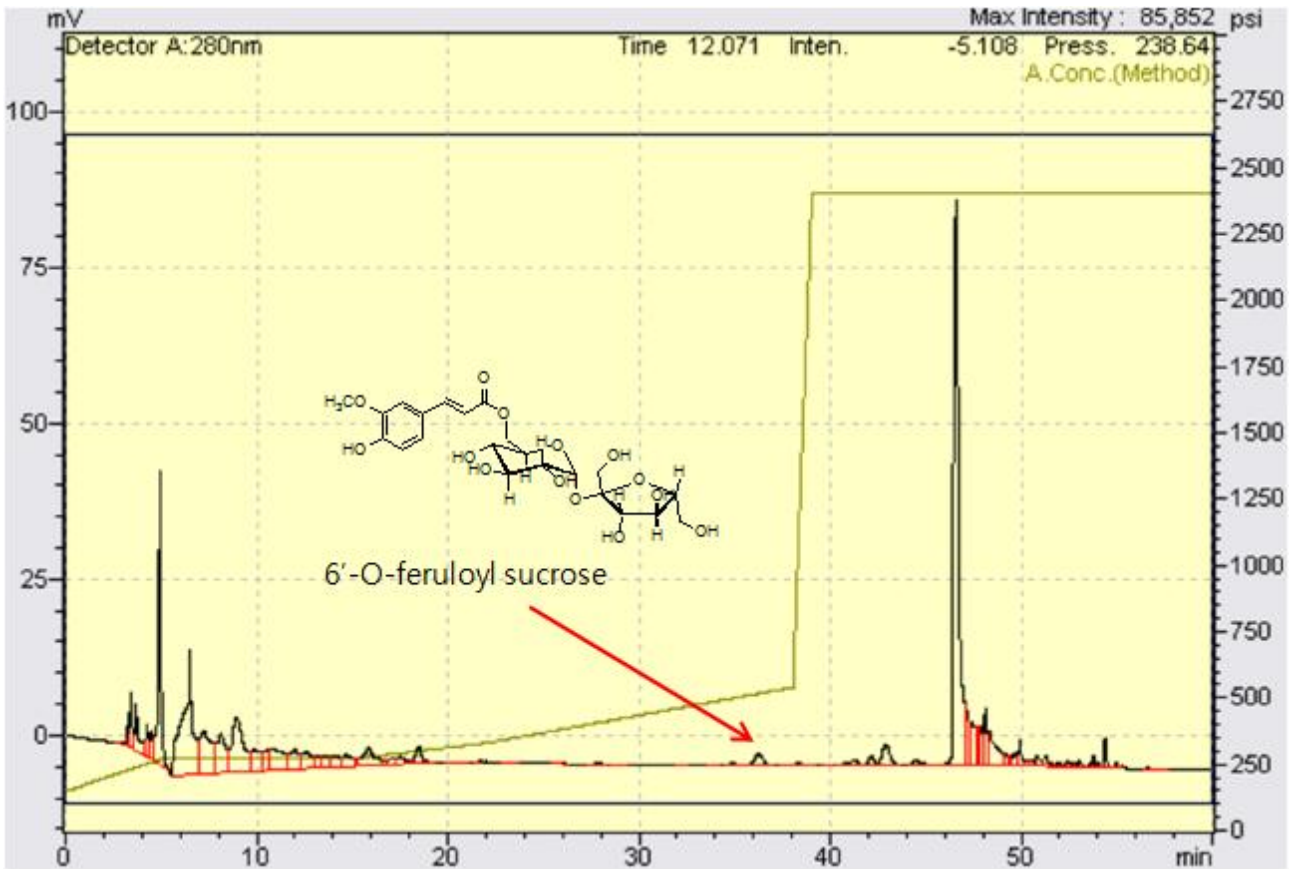
② 반복 실험을 통하여 확인한 결과, 발효 전에 존재 하였던 6'-*O*-feruloyl sucrose 성분이 발효 후에 사라지는 것을 확인할 수 있었음. 하지만 액체배양 발아 현미에서 관찰되었던, 발효 후 검출된 protocatechuic acid 성분은 고체배양에서는 관찰할 수 없었음.

③ 실험 조건

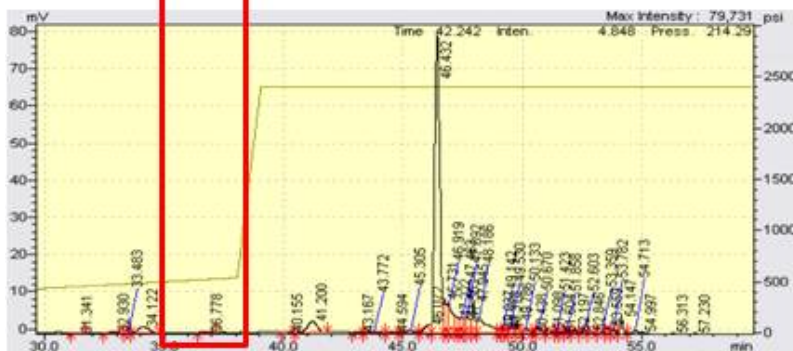
- a. 검액제조 : 1 mg/mL의 농도로 추출물을 MeOH로 희석
- b. 컬럼 : Hydrosphere C18 column (250 × 4.6 mm, 5 μm; YMC)
- c. 컬럼 온도 : 30 °C
- d. 검출 조건 : UV detection, 280 nm
- e. Flow rate : 0.8 mL/min
- f. Gradient condition

min	A (Acetonitrile)	B (water + 0.1% formic acid)
0	5	95
5	9	91
15	9	91
22	11	89
38	18	72
88	80	20

④ HPLC chromatogram



발아현미발효 전



발아현미 유산균 (*P. putosaceus*) 발효 후

3. 활성 추적 분획법(activity-guided fractionation)을 이용한 지표 물질 및 유효 활성성분 분리 확인

(1). 유산균 (*P. peutosaoceus*) 발효 발아현미의 지표 물질 및 성분 분리

① 유산균 (*P. peutosaoceus*) 발효 발아현미 추출물을 농축하여 semi-HPLC를 이용하여 성분을 분리하여 NMR 분석을 통해 구조를 확인하였음. 그 결과, 예상대로 *trans*-ferulic acid와 protocatechuic acid를 확인 할 수 있었음.

② *trans*-ferulic acid 분리 조건

a. 컬럼 : Econosil RP-C18 column (10  $\mu$ m column; 250  $\times$  10 mm)

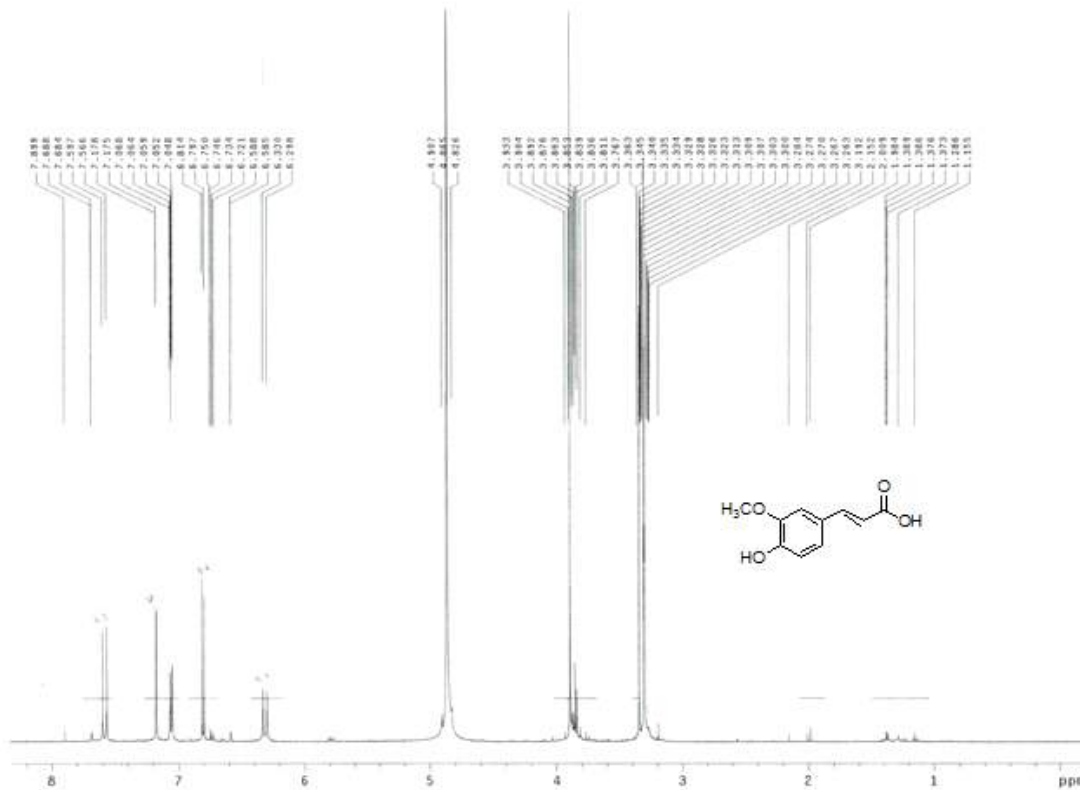
b. 컬럼 온도 : 30  $^{\circ}$ C

c. 검출 조건 : UV detection, 220 nm

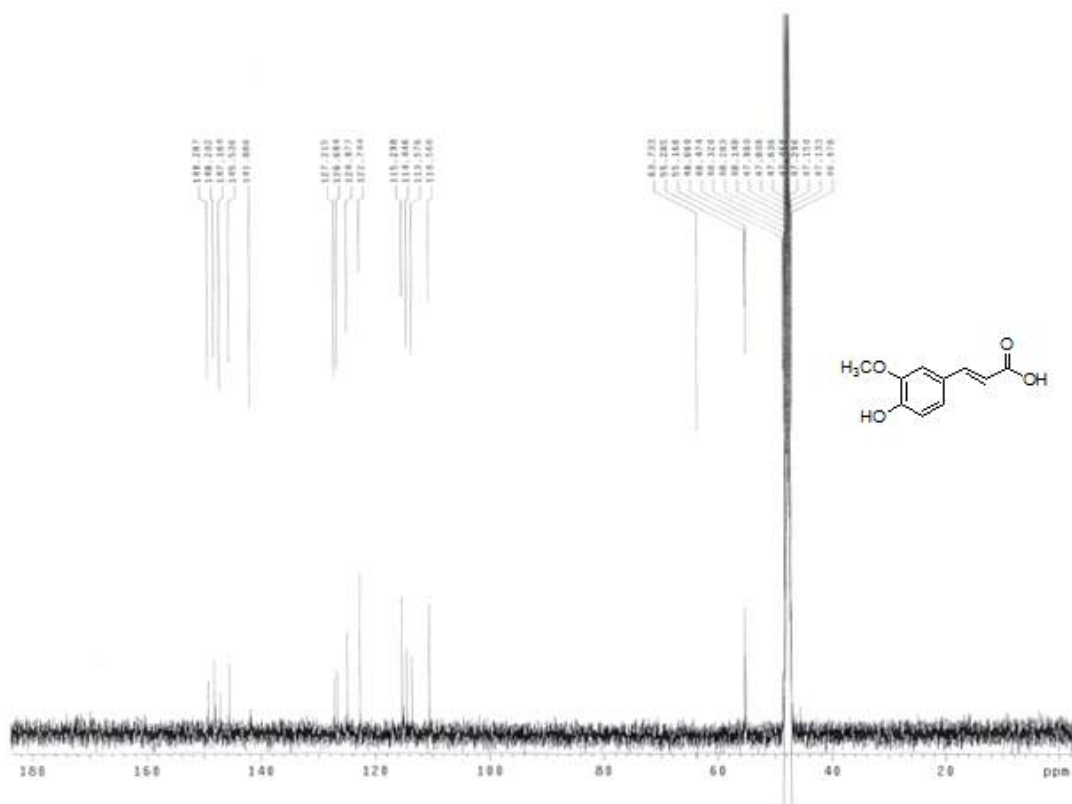
d. Flow rate : 1.5 mL/min

e. Condition : isocratic elution of 20% MeOH

③ NMR data of *trans*-ferulic acid



$^1\text{H}$  NMR of *trans*-ferulic acid



<sup>13</sup>C NMR of *trans*-ferulic acid

***trans*-ferulic acid**

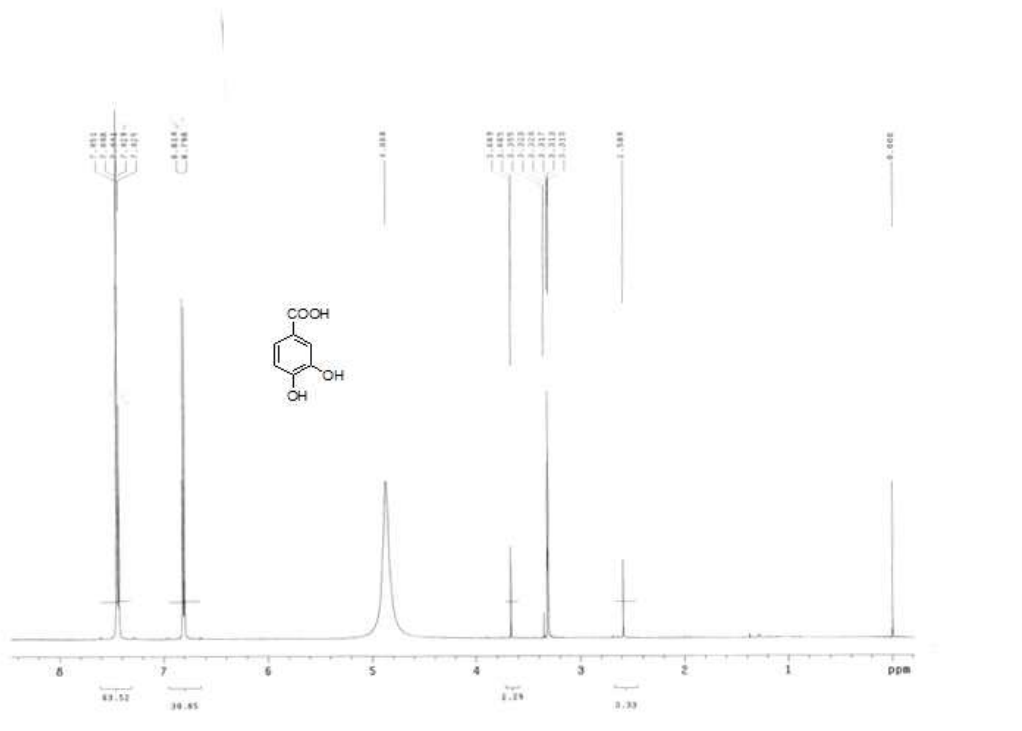
<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD): δ 7.58 (1H, d, *J* = 15.5 Hz, H-7), 7.18 (1H, d, *J* = 1.5 Hz, H-3), 7.06 (1H, dd, *J* = 8.5, 1.5 Hz, H-5) 6.80 (1H, d, *J* = 8.5 Hz, H-6) 6.31 (1H, d, *J* = 15.5 Hz, H-8) 3.88 (3H, s, OCH<sub>3</sub>); <sup>13</sup>C NMR (125 MHz, CD<sub>3</sub>OD): δ 169.0 (C-9), 149.2 (C-2), 148.2 (C-1), 145.5 (C-7), 127.0 (C-4), 125.0 (C-5), 122.7 (C-6). 115.3 (C-8) 110.6 (C-3).

- 위의 NMR data를 분석하고, 기존에 보고된 문헌 치와 비교하여 화합물을 *trans*-ferulic acid로 확인 동정 하였음.<sup>1)</sup>

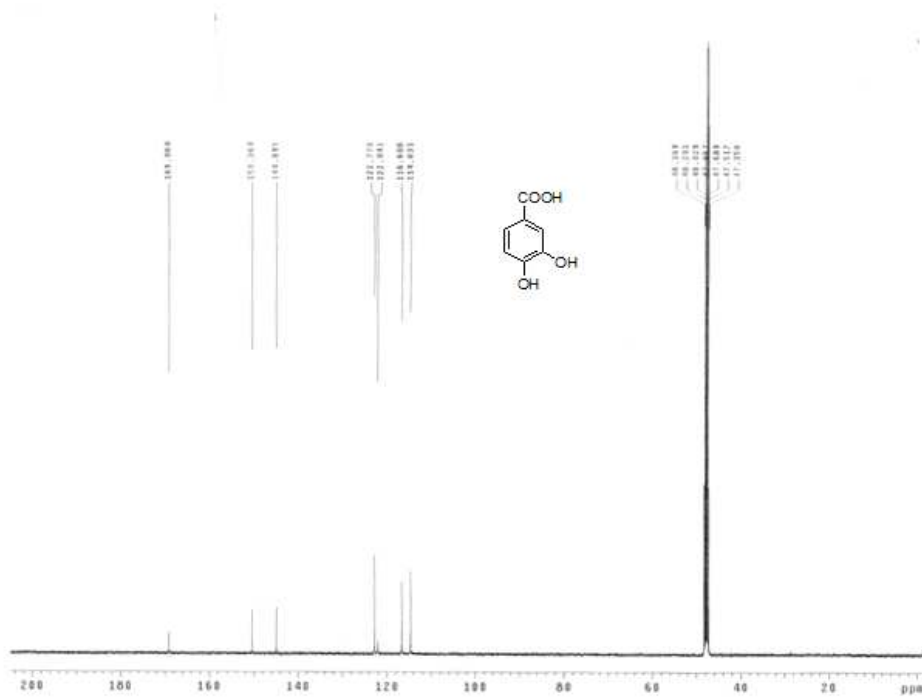
④ protocatechuic acid 분리 조건

- a. 컬럼 : Econosil RP-C18 column (10  $\mu$ m column; 250  $\times$  10 mm)
- b. 컬럼 온도 : 30  $^{\circ}$ C
- c. 검출 조건 : UV detection, 220 nm
- d. Flow rate : 1.5 mL/min
- e. Condition : isocratic elution of 15% MeOH

⑤ NMR data of protocatechuic acid



$^1\text{H}$  NMR of protocatechuic acid



$^{13}\text{C}$  NMR of protocatechuic acid

### Protocatechuic acid

$^1\text{H}$  NMR (500 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta$  7.44 (1H, d,  $J = 2.0$  Hz, H-3), 7.42 (1H, d,  $J = 8.0$  Hz, H-5), 6.80 (1H, d,  $J = 8.0$  Hz, H-6);  $^{13}\text{C}$  NMR (125 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ):  $\delta$  169.0 (C-7), 150.4 (C-1), 144.9 (C-2), 122.8 (C-5), 122.0 (C-4), 116.6 (C-3), 114.6 (C-6).

- 위의 NMR data를 분석하고, 기존에 보고된 문헌 치와 비교하여 화합물을 protocatechuic acid로 확인 동정 하였음.<sup>2)</sup>

## 4. 유산균 발효 발아현미의 신규 지표물질 설정

### (1). 유산균 (*P. peutosaoceus*) 발효 발아현미의 신규 지표물질 확보

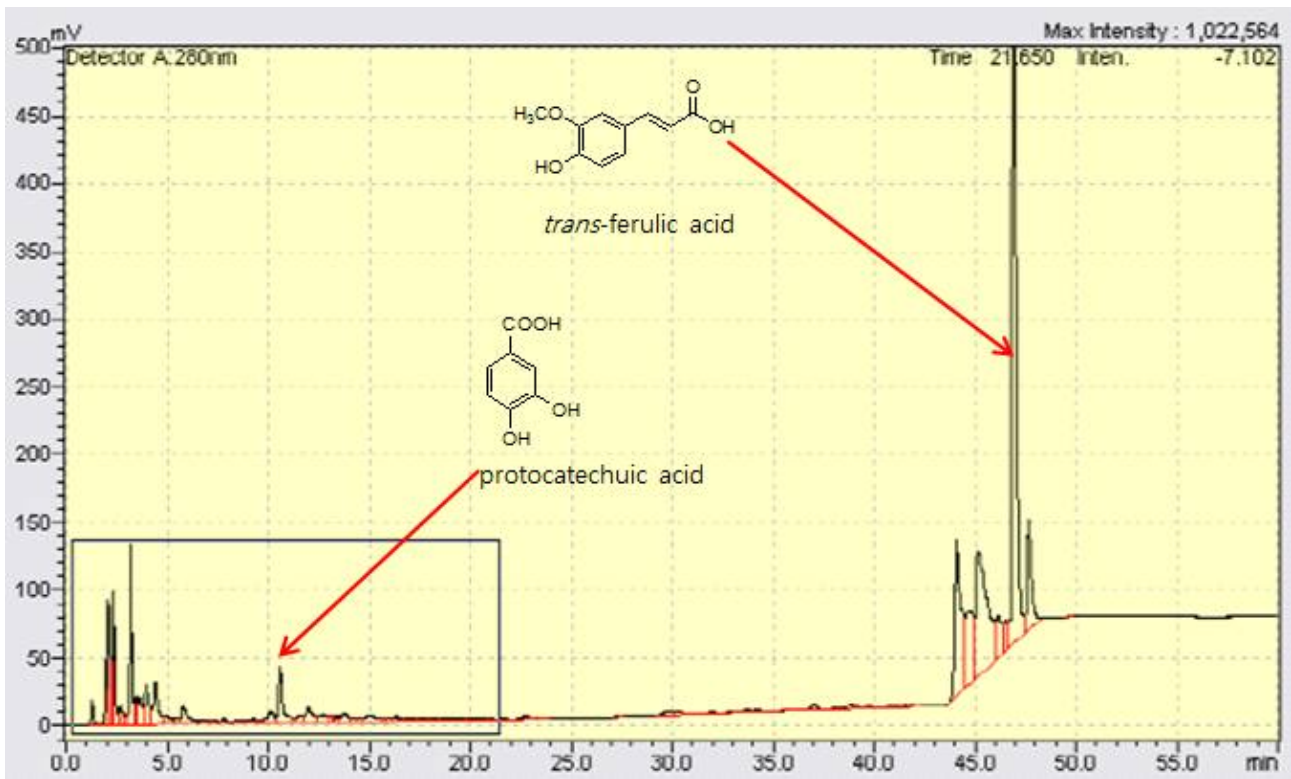
- ① 유산균 (*P. peutosaoceus*) 발효 발아현미의 HPLC 분석을 통해 추출물내 성분 분포를 확인함으로써 발효 전 발아 현미의 지표물질과는 다른 신규 지표물질을 확인 할 수 있었음.
- ② 반복 실험을 통하여 발효 후 성분 함량이 증가됨을 확인 한 protocatechuic acid를 신규 지표물질로 설정 할 수 있었으며, 분석법은 아래와 같음.

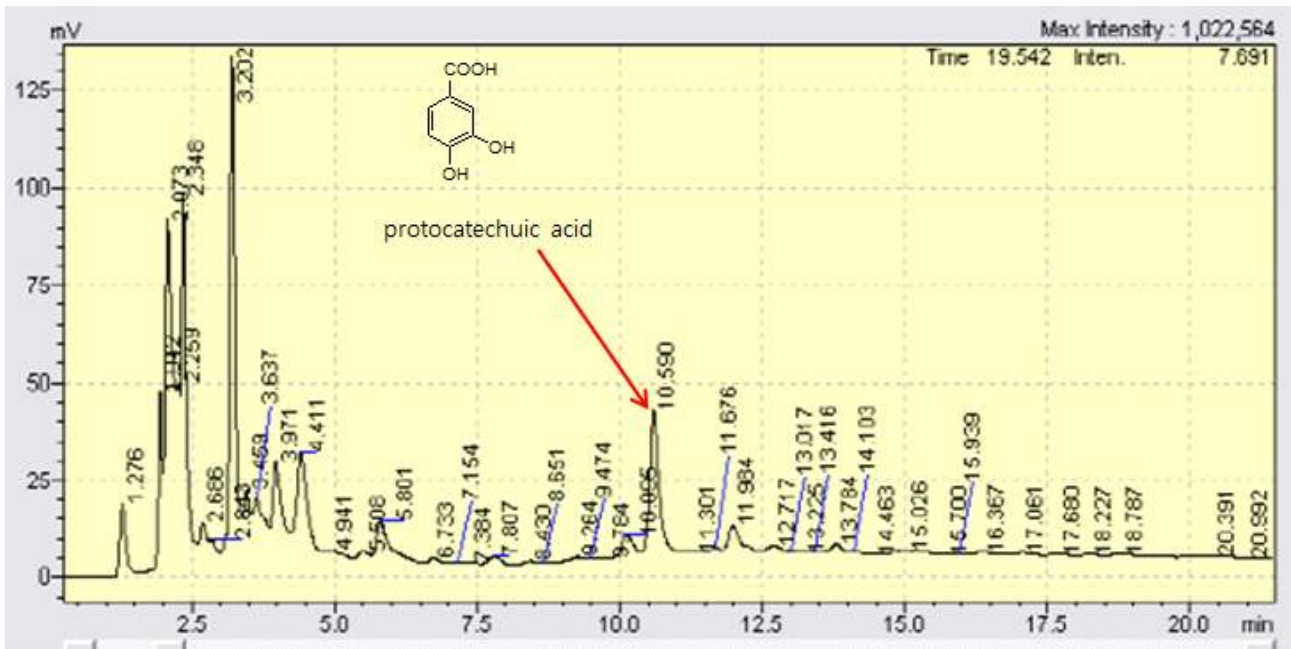
③ 실험 조건

- a. 검액제조 : 1 mg/mL의 농도로 추출물을 MeOH로 희석
- b. 컬럼 : Hydrosphere C18 column (250 × 4.6 mm, 5 μm; YMC)
- c. 컬럼 온도 : 30 °C
- d. 검출 조건 : UV detection, 280 nm
- e. Flow rate : 0.8 mL/min
- f. Gradient condition

min	A (Acetonitrile)	B (water + 0.1% formic acid)
0	5	95
5	9	91
15	9	91
22	11	89
38	18	72
88	80	20

④ HPLC chromatogram





⑤ 신규 지표물질로 설정 된 protocatechuic acid는 분리/정제 실험을 통해 NMR을 통한 구조 확인이 되었고 지표성분으로써 물질 확보가 됨.

#### 5. 유산균 발효 발아현미의 지표성분 분석법 확립 및 밸리데이션

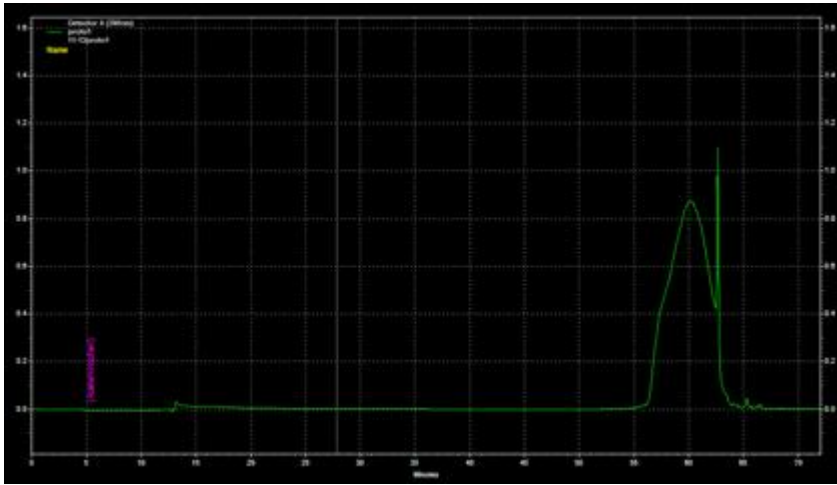
(1). 분석 조건에 따른 지표성분 protocatechuic acid의 분석법 연구

- 검액제조 : 1 mg/mL의 농도로 추출물을 MeOH로 희석
- 컬럼 : Hydrosphere C18 column (250 × 4.6 mm, 5 μm; YMC)
- 컬럼 온도 : 30 °C
- 검출 조건 : UV detection, 280 nm
- Flow rate : 0.5 mL/min

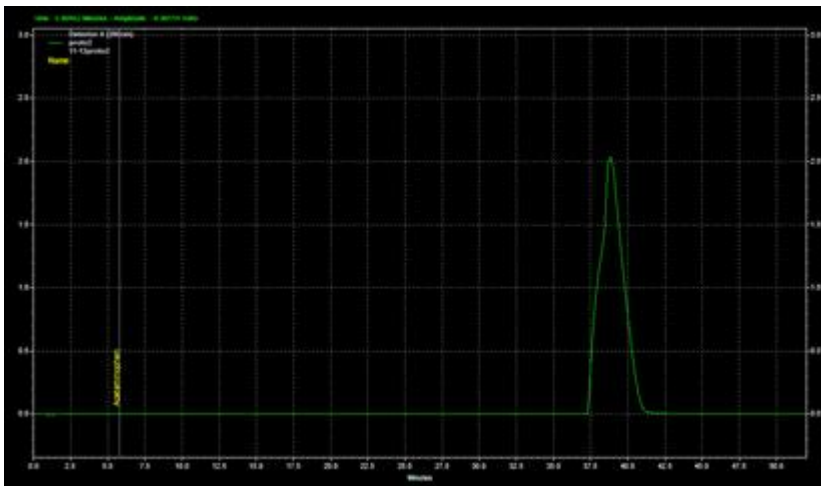
분석 조건	A (Acetonitrile)	B (water + 0.1% formic acid)
A		0-70 min; 5% A
B		0-70 min; 10% A
C		0-70 min; 15% A
D		0-70 min; 20% A
E		0-70 min; 25% A



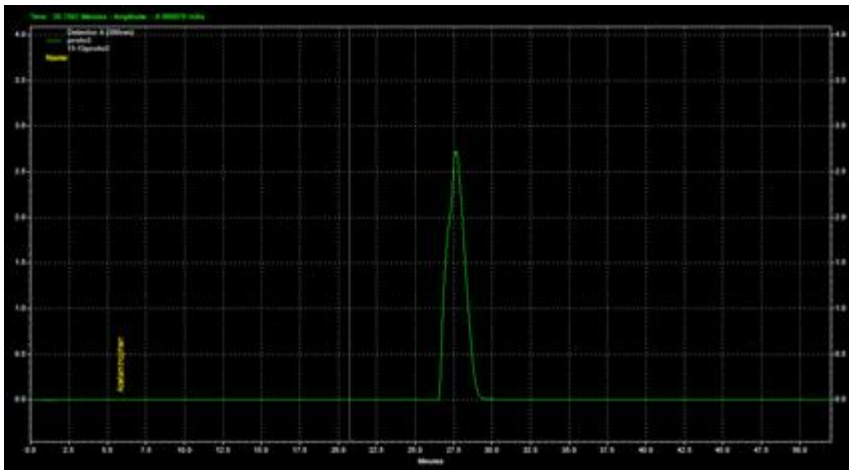
①



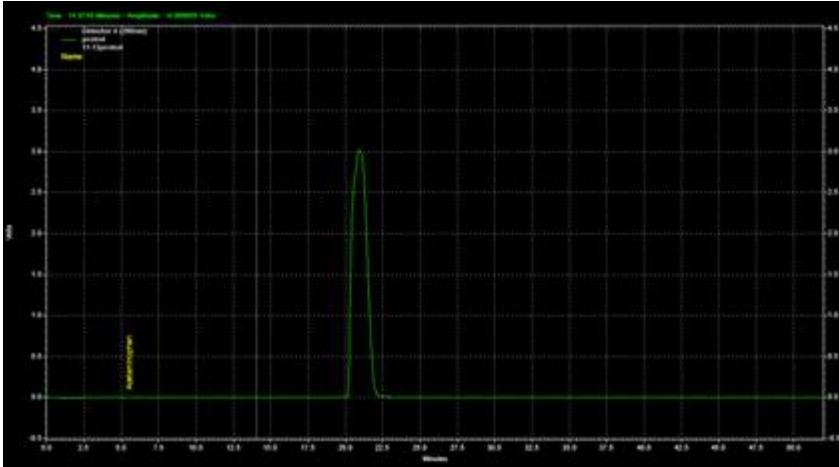
②



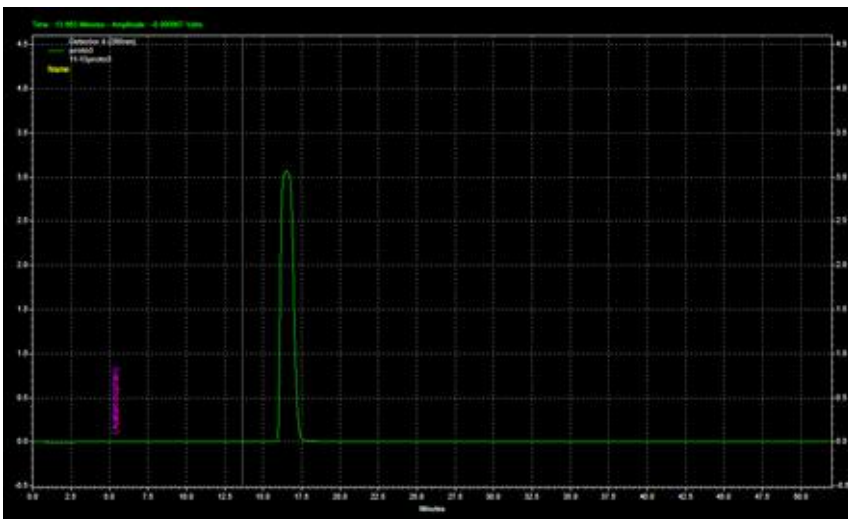
③



④



⑤



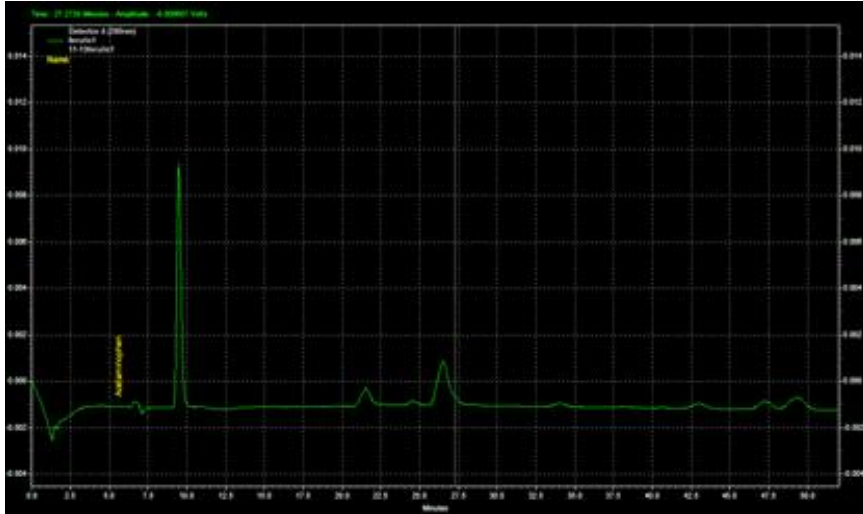
# 위의 데이터 결과를 종합해 볼 때, protocatechuic acid는 retention time이 21.2 min에서 확인되는 20% MeOH 조건이 가장 적절한 분석 조건으로 생각됨.

(2). 분석 조건에 따른 지표성분 *trans*-ferulic acid의 분석법 연구

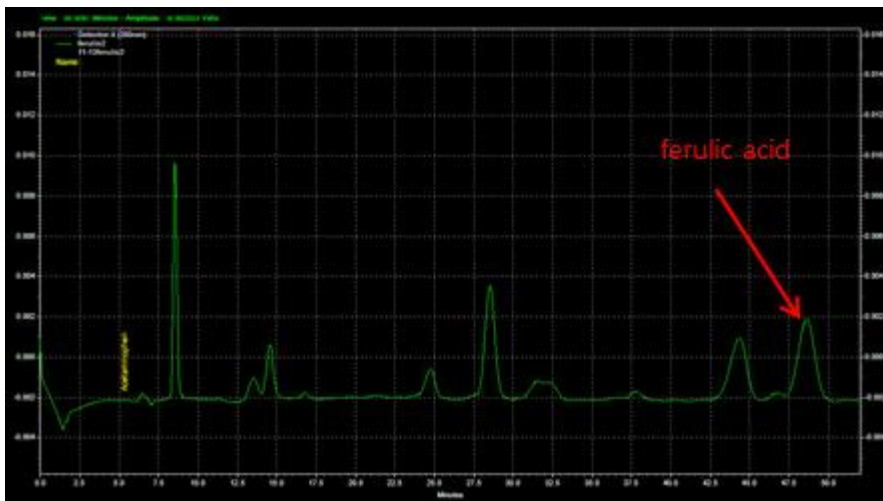
- a. 검액제조 : 1 mg/mL의 농도로 추출물을 MeOH로 희석
- b. 컬럼 : Hydrosphere C18 column (250 × 4.6 mm, 5 μm; YMC)
- c. 컬럼 온도 : 30 °C
- d. 검출 조건 : UV detection, 280 nm
- e. Flow rate : 0.5 mL/min

분석 조건	A (Acetonitrile)	B (water + 0.1% formic acid)
A	0-60 min; 20% A	
B	0-60 min; 30% A	
C	0-60 min; 40% A	

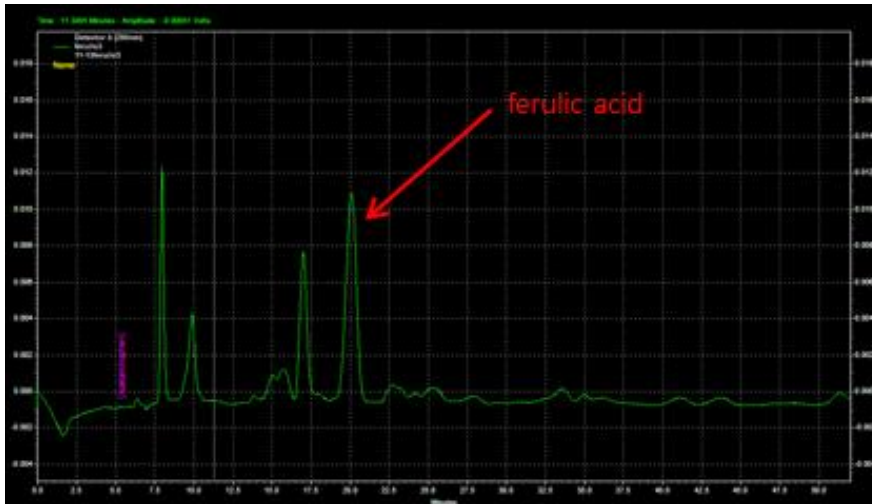
①



②



③

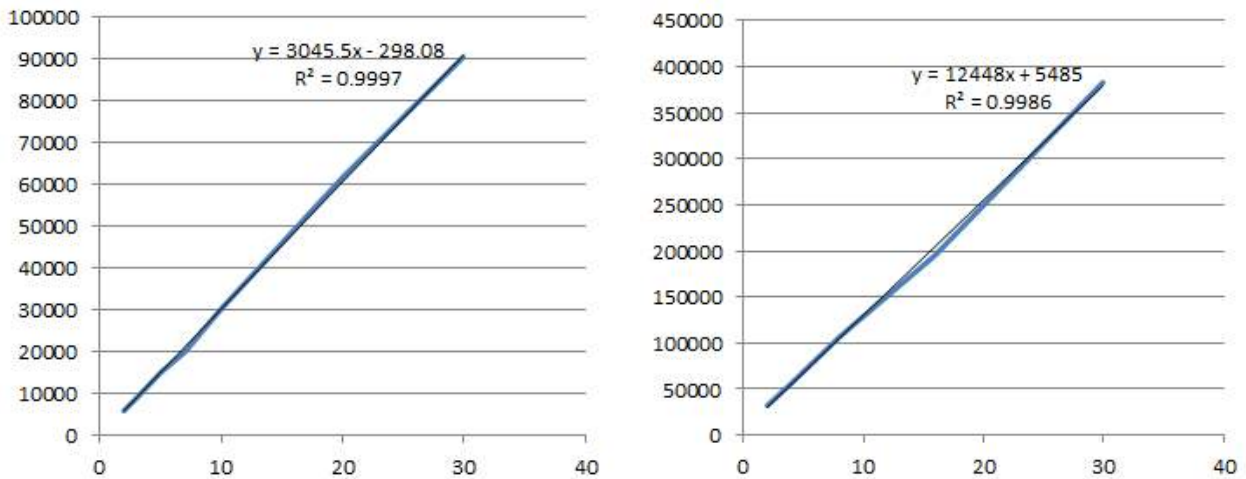


# 위의 데이터 결과를 종합해 볼 때, *trans*-ferulic acid는 retention time이 20.1 min에서 확인되는 40% MeOH 조건이 가장 적절한 분석 조건으로 생각됨.

(3). 직선성, 정확성, 정밀성 등의 적절한 항목에 대하여 밸리데이션을 수행

①. 직선성 (Linearity)

지표물질로 확인된 2가지 성분에 대하여 protocatechuic acid은 0.1~30  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , *trans*-ferulic acid는 0.2~30  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도 범위에서 검량선을 작성함. 두 성분에 대하여 검량선의 상관계수 ( $R^2$ )가 0.99 이상의 양호한 직선성을 나타냄.



Calibration curves of protocatechuic acid and *trans*-ferulic acid

②. 검출한계 및 정량한계 (LOD and LOQ)

2가지 성분을 적정 농도로 희석하면서 분석하였을 때 protocatechuic acid은 0.004  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , *trans*-ferulic acid는 0.026  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 검출한계를 설정함. 또한 protocatechuic acid은 0.05  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , *trans*-ferulic acid는 0.87  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 로 정량한계를 설정함).

Regression equation, Linear range, LOD, LOQ of compounds

Compound	Regression equation	Linear range ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	$R^2$	LOD ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	LOQ ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )
protocatechuic acid	$y=3045.5x - 298.08$	0.1 ~ 30	0.9997	0.004	0.05
<i>trans</i> -ferulic acid	$y=12448x + 5485$	0.2 ~ 30	0.9986	0.026	0.87

③. 정밀성 및 정확성 (Precision and Accuracy)

일내 및 일간 정밀성은 피크 면적을 이용하여 얻어진 검량선에 의하여 검량한 농도의 표준편차를 정량한 농도의 평균값으로 나눈 비의 백분율 (%)로서 구하였으며, 그 값은 0.2~2.9% 이었음. 일내 및 일간 정확성은 검량선에 의하여 정량한 농도의 평균값을 기지의 농도로 나눈 비의 백분율 (%)로서 구하였으며, 그 값은 98.3~100.8% 으로 본 분석법의 정밀성과 정확성을 확인하였음.

Precision, accuracy data for the HPLC-UV method (n=5)

Compound	Conc. ( $\mu\text{g/mL}$ )	Precision (C.V., %)		Accuracy (%)	
		Intra-day (n=5)	Inter-day (n=5)	Intra-day (n=5)	Inter-day (n=5)
protocatechuic acid	20	2.2	0.9	98.4	99.6
	50	2.5	1.2	100.2	99.4
	100	0.2	2.9	99.6	100.1
<i>trans</i> -ferulic acid	20	0.8	1.8	99.1	100.8
	50	2.6	1.1	99.9	100.1
	100	2.7	2.3	100.6	100.5

6. 유산균 발효 발아현미 이용 신규 식품의 품질 관리 기준 확립

(1). 설정된 지표물질 (protocatechuic acid, *trans*-ferulic acid)에 대한 정량 분석

①. 설정된 두가지 지표물질에 대해서, 표준물질의 피크와 지표물질 피크의 머무름 시간 (retention time)을 비교하여 정성 분석을 실시하였으며, 지표물질에 일정 농도의 표준물질을 첨가하여 피크의 면적이 증가하는 경향을 보고 지표물질의 정성 분석을 실시함. 정량 분석은 각 지표물질별 HPLC를 이용하여 얻은 Calibration curve를 통해 시료 중의 protocatechuic acid, *trans*-ferulic acid 함량을 구함. 각각의 시료는 3회 반복하여 실험을 실시하였으며, 확립된 분석 조건에 따라 각각의 시료를 전처리 한 후에, HPLC에 주입하여 각 시료가 함유하고 있는 protocatechuic acid, *trans*-ferulic acid의 양을 정량 분석함.

각 조건별 발아현미의 지표물질의 함량 분석<sup>a</sup> (mg/100 g of samples)

Compound	유산균 발효 전 발아현미	유산균 발효 후 발아현미	유산균 발효 전 고체배양 발아현미	유산균 발효 후 고체배양 발아현미
protocatechuic acid	0.07 ± 0.00	0.25 ± 0.01	not detectable	not detectable
<i>trans</i> -ferulic acid	23.18 ± 0.71	28.75 ± 0.82	20.44 ± 0.68	22.97 ± 0.21

<sup>a</sup> Mean value ± SD (n = 3).

(2). 분석된 지표 성분에 대한 신규 식품에 대한 품질 관리 기준 설정

① 위의 분석 결과에 따라, 유산균 발효 발아현미와 비발효 발아현미의 지표성분 함량을 비교하면, 유산균 발효했을 때 protocatechuic acid가 3.5배 정도, *trans*-ferulic acid가 1.2배 정도로 더 높은 양을 함유하고 있음. 그리고 액체배양 발아현미가 고체배양 발아현미에 비해 *trans*-ferulic acid를 1.2배 정도로 더 높은 양을 함유하고 있고 고체배양 발아현미에서는 protocatechuic acid가 관찰되지 않았음. 그리고 고체배양 발아현미에서도 비슷하게 유산균 발효를 시키면 *trans*-ferulic acid가 1.1배 정도로 늘어남을 확인할 수 있었음.

② 따라서 유산균 발효 발아현미로 신규 식품을 출시한다면 지표물질로 *trans*-ferulic acid가 20 - 28 mg/100 g of samples 정도가 함유되어야 함을 품질 관리 기준으로 설정하여야 할 것으로 생각됨.

## 제 3 절 발아현미의 유산균 발효를 통한 항산화 효능이 뛰어난 과립형 제품개발

1. 발아현미에 유산균 발효를 통한 바이오 식품 신소재 개발 및 조건 확립
  - (1) 유산균발효에 이용되는 발아현미를 생산하기 위한 조건 확립
  - (2) Master/working cell bank 구축
  - (3) 배양조건의 생산 공정의 최적화 방안 모색: 온도, 습도, pH, 첨가물의 농도 등 최적 배양 조건 확립
  
2. 개발 신규 식품소재에 대한 활용도 방안 모색(제형 및 시제품 개발)
  - (1) 유산균 발효시킨 발아현미 생산의 QA, QC 기준 확립 및 밸리데이션
  - (2) 1차년도 및 2차년도에서 연구 개발된 배양조건 공정 확립 및 표준화된 유래물질과 지표물질의 생산 공정 확립
  - (3) 개발된 신규 식품소재의 원물, 추출물, 유래물질을 이용한 시제품 및 제형 개발
  - (4) 신규소재의 물성, 맛, 향 등을 고려하여 제품의 제형 결정 → 과립형, 환, 타블렛, 음료 등 제형 결정
  - (5) 추출 조건 확립 → 수율과 유효성분의 소실 등을 고려하여 추출 용매, 추출 온도 등을 탐색 최적 조건 확립, 추출물의 건조 방식을 spray dry(SD) 혹은 freeze dry(FD) 등 결정
  - (6) 개발 소재에 대해 관능검사 실시(식감,퍼짐성 등)
  
3. 신규 식품 소재의 대량생산 조건 확립 및 이를 이용한 시제품개발
  - (1) 선정된 식품 신소재 (예, 원물, 추출물, 유래물질)의 대량 생산을 위한 공정 최적화
  - (2) 개발 신규 식품소재로부터 판매확보계획에 맞추어 시제품개발
  - (3) 포장 디자인 선택
  - (4) 판매전략 수립
  - (5) Field trial

## 제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

구분	세부연구개발 목표	가중치	평가의 착안점 및 기준	연구성과 유무
1세부	◎발아현미의 유산균 발효를 통해 기존의 발아곡류보다 항산화 활성이 향상된 식품소재개발	30%	<ul style="list-style-type: none"> <li>유산균 발효 시 발아현미의 이용성 (유산균 생균수 <math>-10^8</math> CFU/g)</li> <li>발아현미의 유산균 발효에 의한 항산화 활성 증가</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>식품 공전에 의거하여 유산균 발효 식품의 경우 유산균 생균수는 <math>10^6</math> CFU/g) 이상이면 적합하다고 명시되어 있음. 이에 만족함.</li> <li>발아현미의 유산균 발효에 의해 항산화 활성이 약 10% 이상 증가하였음.</li> </ul>
	◎유산균 발효 발아현미의 신규(특이)지표물질 탐색 및 품질 기준 확립	30%	<ul style="list-style-type: none"> <li>지표물질 확인 여부</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>발아현미 유산균 발효시 지표 물질을 protocatechui c acid 와 <i>trans</i>-ferulic acid으로 확인 하였다.</li> </ul>
	◎개발 신소재를 이용한 시제품 개발	40%	<ul style="list-style-type: none"> <li>시제품 개발 여부</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>발아현미를 유산균 발효(고상발효)를 통해 생산한 원료를 이용하여 생식 제품 시제품 완성</li> </ul>





체인 (주)강산농원에서 기술전수를 해움에 따라 발효기술을 확산할 것이다. 생산된 원료에 대한 기능성 및 효능을 더욱 검증하여 판매 홍보 자료로 적극적으로 활용할 계획에 있다.

3. 지식재산권 확보계획 (특허)

출원 번호 : 10-2016-4325 (출원 일자 : 2016. 1. 13)

제목 : 발아 곡류의 유산균 발효를 통한 바이오 식품조성물.

4. 추가연구, 타연구에 활용 계획 등

- (1) 현재 개발된 소재인 발아현미에 유산균 발효한 소재에 대한 기능성 평가의 경우, 시험관 실험인 항산화실험을 통해 입증하였다. 하지만 개발된 소재에 대한 더 심도 있는 기능성 평가가 필요되어 짐을 본 연구과제를 진행하면서 알게 되었다. 그러므로 추 후, 가천대학교 박혜진 교수팀과 협력하여 본 개발 소재를 이용하여, 항알러지, 면역증진, 항암 등의 실험을 추가적으로 진행하여 개발한 시제품의 효능을 입증하여 소비자들에게 과학적 효능을 더욱 제시하고자 한다.
- (2) 또한 본 개발은 발아곡류를 이용하여 유산균 발효를 진행 하였지만, 추가 연구로서 (주)세포활성연구소는 본사만의 특화 된 소재인 버섯배양 발아곡류에 유산균 발효를 접목시켜 더욱 다양한 식품 신소재 개발을 진행하고자 하며, 이는 가천대학교 박영서, 박혜진 교수팀과 현재 진행하고 있는 실정이다.
- (3) 평가 위원님의 제안에 따라 완제품 생산 판매보다 원료의 대량 생산에 역점을 두어 국내외 가공업체에 원료를 공급 판매하는데 사업화 역점을 두겠습니다.

5. 연구개발결과의 성과 및 활용목표

[연구성과]

- (1) 풍미와 기능성이 뛰어난 유산균주가 선발되었으며, 유산균 발효 발아현미를 활용하여 장 개선 및 면역력 조절등 다양한 제품을 개발할 수 있는 식품 소재가 개발되었다.
- (2) 액상발효, 고상발효 조건을 확립하여, 발효 영양 곡류를 이용한 환자식, 노약자식, 유아식 등을 개발할 수 있는 기반을 마련하였다.
- (3) 유산균 발효 발아현미생산의 표준화를 구축할 수 있는 지표 물질이 선정되었다.

(단위 : 건수)

성과목표	지식재산권		논문		학술 발표	기술 거래	교육 지도	사업 화	기술 인증	인력 양성	정책 활용	홍보 전시	기 타
	출원	등록	SCI	비 SCI									
최종목표													
1차년도 (계획)	1				1	1	1				1	1	
1차년도 (달성)	1				2	1	1				0	2	2
소 계	1				2	1	1				0	2	2
합 계	1				2	1	1				0	2	2

기타: 타연구활용(신진연구지원사업(여성과학자), 2015공동연구실지원사업)

**[학술 발표 및 박람회 참가]**

(1) 학술발표 : 2 건

포스터발표	
발표일	2015.06.04
발표제목	Screening and characterization of beneficial probiotics fermenting germinated grains.
발표자	Sulhee Lee.
학술회의명	2015 한국식품과학회 국제학술대회 및 정기총회
국내외	국내
개최장소	부산, 벡스코

포스터발표	
발표일	2015.06.30
발표제목	Fermentation of beneficial mushroom grown on germinated grains by lactic acid bacteria.
발표자	Sulhee Lee and Young-Seo Park.
학술회의명	The UK Probiotics Conference 2015: Microbes and Microbiomes: the gut feeling.
국내외	국외
개최장소	Royal Holloway, University of London, Egham, England.

(2) 박람회 참석 : 2 건

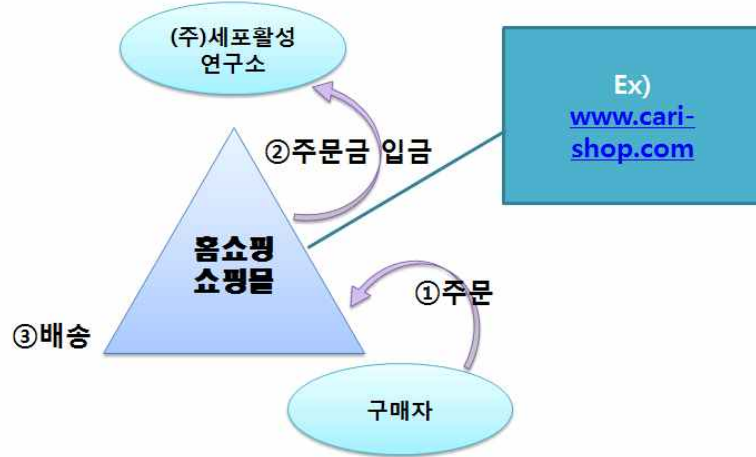
박람회 참가	
박람회 기간	2015.05.20. ~ 2015.05.22.
행사명칭	제20회 일본국제식품소재 박람회
참가자	박동기
참여품목	발아현미 유산균 발효액
국내외	국외
주관기관	EJK Japan, Ltd / Food Chemical Newspaper Inc.

박람회 참가	
박람회 기간	2015.11.18. ~ 2015.11.21.
행사명칭	강소농 대전
참가자	박동기
참여품목	발아현미 유산균 발효액
국내외	국내
주관기관	서울 코엑스

## 6. 사업화계획

### (1) 온라인 판매를 통한 수익 창출안

- 판매법인 설립과 동시에 온라인쇼핑몰과 홈쇼핑 개설하여 상품정보를 공유함으로써 온/오프라인 동시판매
- 오프라인 매장에서의 판매 부진으로 인한 재고 리스크 최소화 가능



### (2) 마케팅 전략

- (주)세포활성연구소의 경우 KOTRA와 중소기업진흥공단이 같이 진행하는 중소기업을 위한 수출지원사업의 일환인 ‘글로벌 유통망 진출사업’에 선정되었고, 또한, 온라인 쇼핑몰(B2C)지원사업에 선정되어 현재 국내외 유명 판매사이트인 아마존닷컴에 입점대상자로 선정되었음. 이처럼 본사의 경우 해외 수출에 관심을 가지고 있어 수출관련 국내지원사업에 적극적으로 참여하고 있음. 이러한 온라인 유통지원사업과 세포활성연구소와 거래처로 두고 있는 홍콩, 대만, 일본, 말레이시아 등의 해외 수출 유통망을 적극 활용하여 온라인 및 오프라인 시장을 통해 제품 판매를 계획을 실행하고자 함.



<Gobiz korea 글로벌 유통망 진출사업 선정: 중소기업 진흥공단 및 KOTRA>



<글로벌홍보마케팅 선정: 아마존닷컴 입점>

- 국내외 박람회를 통한 국내외 바이어들과의 접촉 및 계약 : (주)세포활성연구소의 경우 매년 개최하는 국내외 식품 박람회를 적극적으로 참석하고 있음. 최근의 경우 Japan 에서 열린

ifia Japan 2015에도 참관하였으며, 이를 일본에서 본사의 제품을 판매하는 대행업체인 ‘사쿠 라인터네셜’ 회사의 Facebook에 관련사진 및 동영상을 올렸음. 이 박람회의 경우 역시 산업 통상자원부의 내수기업 수출기업화 지원 사업에 선정되어, 지원을 받아 진행되었으며, 2015 년도의 경우 해외 시장을 더욱 파고들기 위해 본사는 더욱 정진할 것임.



<내수기업 수출기업화 지원 사업 선정: ifia Japan 참관, 산업통상자원부>

## 제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

1. Cartman ST, La Ragione RM, Woodward MJ (2008) *Bacillus subtilis* spores germinate in the chicken gastrointestinal tract. *Appl Environ Microbiol* 74: 5254-5258.
2. Fukuda M, Kanauchi O, Araki Y, Andoh A, Mitsuyama K, et al. (2002) Prebiotic treatment of experimental colitis with germinated barley foodstuff: a comparison with probiotic or antibiotic treatment. *Int J Mol Med* 9: 65-70.
3. Herrera-Ponce A, Nevarez-Morillon G, Ortega-Rivas E, Perez-Vega S, Salmeron I (2014) Fermentation adaptability of three probiotic *Lactobacillus* strains to oat, germinated oat and malted oat substrates. *Lett Appl Microbiol* 59: 449-456.
4. Hoa TT, Duc LH, Isticato R, Baccigalupi L, Ricca E, et al. (2001) Fate and dissemination of *Bacillus subtilis* spores in a murine model. *Appl Environ Microbiol* 67: 3819-3823.
5. Jadamus A, Vahjen W, Simon O (2001) Growth behaviour of a spore forming probiotic strain in the gastrointestinal tract of broiler chicken and piglets. *Arch Tierernahr* 54: 1-17.
6. Jeon TI, Hwang SG, Lim BO, Park DK (2003) Extracts of *Phellinus linteus* grown on germinated brown rice suppress liver damage induced by carbon tetrachloride in rats. *Biotechnol Lett* 25: 2093-2096.
7. Jung JH, Lee MY, Chang HC (2012) Evaluation of the probiotic potential of *Bacillus polyfermenticus* CJ6 isolated from Meju, a Korean soybean fermentation starter. *J Microbiol Biotechnol* 22: 1510-1517.
8. Kanauchi O, Fujiyama Y, Mitsuyama K, Araki Y, Ishii T, et al. (1999) Increased growth of *Bifidobacterium* and *Eubacterium* by germinated barley foodstuff, accompanied by enhanced butyrate production in healthy volunteers. *Int J Mol Med* 3: 175-179.
9. Kanauchi O, Matsumoto Y, Matsumura M, Fukuoka M, Bamba T (2005) The beneficial effects of microflora, especially obligate anaerobes, and their products on the colonic environment in inflammatory bowel disease. *Curr Pharm Des* 11: 1047-1053.
10. Kanauchi O, Mitsuyama K, Andoh A, Iwanaga T (2008) Modulation of intestinal environment by prebiotic germinated barley foodstuff prevents chemo-induced colonic carcinogenesis in rats. *Oncol Rep* 20: 793-801.
11. Kanauchi O, Mitsuyama K, Araki Y, Andoh A (2003) Modification of intestinal flora in the treatment of inflammatory bowel disease. *Curr Pharm Des* 9: 333-346.
12. Kanauchi O, Oshima T, Andoh A, Shioya M, Mitsuyama K (2008) Germinated barley foodstuff ameliorates inflammation in mice with colitis through modulation of mucosal immune system. *Scand J Gastroenterol* 43: 1346-1352.
13. Maathuis AJ, Keller D, Farmer S (2010) Survival and metabolic activity of the GanedenBC30 strain of *Bacillus coagulans* in a dynamic in vitro model of the stomach and small intestine. *Benef Microbes* 1: 31-36.
14. Orel R, Kamhi Trop T (2014) Intestinal microbiota, probiotics and prebiotics in inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol* 20: 11505-11524.

15. Prieto ML, O'Sullivan L, Tan SP, McLoughlin P, Hughes H, et al. (2014) In vitro assessment of marine *Bacillus* for use as livestock probiotics. *Mar Drugs* 12: 2422–2445.
16. Worametrachanon S, Apichartsrangkoon A, Chaikham P, Van den Abbeele P, Van de Wiele T, et al. (2014) Effect of encapsulated *Lactobacillus casei* 01 along with pressurized-purple-rice drinks on colonizing the colon in the digestive model. *Appl Microbiol Biotechnol* 98: 5241–5250.
17. Tian, Su; Nakamura, Kozo; Cui, Tong; Kayahara, Hiroshi et al. (2005) High-performance liquid chromatographic determination of phenolic compounds in rice. *Journal of Chromatography A*, 1063(1-2), 121–128.
18. Tian, Su; Nakamura, Kozo; Kayahara, Hiroshi. (2004) Analysis of Phenolic Compounds in White Rice, Brown Rice, and Germinated Brown Rice. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(15), 4808–4813.

## 제 7 장 연구실 안전관리 이행실적

### 1. 연구실 안전 점검 체계 및 실시

#### (1) 실험실 안전 점검 체계

##### ① 1단계 : A등급, B등급, C등급

각 실험.실습실별 안전관리책임자를 지정하여 일일점검표 작성

##### ② 2단계 : A등급, B등급, C등급

각 실험.실습실별 연구실안전관리자 및 위원회에서 분기별 정기점검 실시

##### ③ 3단계 : A등급, B등급,

2년 1회 외부기관에 의뢰하여 정밀점검 실시 후 미비점 보완

※ 위험등급별로 환경안전점검을 단계별로 체계화하여 관리

※ 관리위험등급의 지정

A등급 : 가연성가스, 인화성 시약, 유해화학물질, 다량의 폐액배출, 독극물, 생물 및 동물, 방사성 동위원소, 위험성이 높은 기계장비가 설치된 실험실

B 등급 : 일반시약, 소규모 인화성 시약, 불연성가스, 소량의 폐수발생실험실

C 등급 : 이화학실험을 수행하지 않는 전기, 설계, 컴퓨터 관련 실험실

#### (2) 실험실 정밀안전진단

##### ① 대상 : 연구개발활동에 유해화학물질 관리법 제2조 7호에 따른 유해화학물질을 취급하는

연구실, 산업안전보건법 제39조에 따른 유해인자를 취급하는 연구실, 과학기술부령이 정하는 독성가스를 취급하는 연구실

##### ① 실시 : 년 2회 외부전문기간에 의뢰하여 정밀점검 실시 후 교육과학기술부에 보고

### 2. 교육 훈련

(1) 개요 : 실험실의 안전을 확보하고 종사자의 건강을 보호하여 실험 및 연구활동에 기여하고, 또한 연구실 안전환경조성에 관한 법률에 의거하여 실험실의 환경안전교육이 의무화됨에 따라 이공계열 대학원생 및 관련자 전원은 환경안전교육을 의무적으로 수강

(2) 교육대상 : 소속연구원 및 업체직원 등

### 3. 보험 가입 현황



보 험 명	보 상 내 용	대 상
연구활동종사자 상해보험	상해사망, 후유장해 : 1억원이상 상해, 후유정도에 따른 보상 : 1천만원 이상	연구활동종사자

## 제 8 장   참고문헌

1. Kisiel W., Zielinska K., *Fitoterapia*, 71, 86-87 (2000).
2. Zhang W.J., Li X.C., Liu Y.Q., Yao R.C., Nonaka G.I., Yang C.R., *Acta Bot. Yunnanica*, 16, 354-356 (1994).

<첨부>

〈 특허, 논문 및 시장분석 〉

1. 본 연구와 관련된 기술의 국내의 수준 비교

기술명	관련기술 최고보유국	현재 기술수준		기술개발 목표수준	비고
		우리나라 관련기술수준	연구사업단 보유기술수준		
(기술 1) 발아곡류에 유산균 발효를 하는 기술 - 세부기술1-1 발아현미에 유산균 발효 기술	없음	없음	50	85	
(기술 2)유산균 발효 기술	일본	60	70	85	
(기술 3)곡류를 발아하는 기술	우리나라	60	70	85	

2. 특허조사분석

가. 특허조사분석 범위

대상국가	국내, 국외(미국, 일본, 유럽)
특허DB	특허정보원(www.kipris.or.k)
검색기간	19880101 ~ 20160311
검색범위	제목 및 초록

나. 특허 조사분석에 따른 본 연구과제와의 관련성

기술명	발아곡류에 유산균 발효를 하는 기술	유산균 발효 기술	곡류를 발아하는 기술
Keyword	발아곡류 유산균 발효	유산균 발효	발아곡류
검색건수	151	18,751	1,905
유효특허건수	59	3,003	749
핵심특허 및 관련성	특허명	발아대두를 이용한 청국장 제조방법	유산균을 이용한 혼합곡물 발효물의 제조방법
	보유국	대한민국	대한민국
	등록년도	2007	2013
	관련성(%)	70	60
	유사점	발아곡류인 발아대두를 사용하였으며 발효시켜	유산균 활용

		기능성 향상		
	차이점	현미가 아닌 대두를 사용, 일반 정제수를 공급하여 발아함, 유산균이 아닌 혼합균주 사용	발아곡류가 아닌 혼합곡물의 분말을 사용	유산균이 아닌 효모 사용하여 발효
핵심특허 및 관련성	특허명	곡류발효 효소를 포함한 식품 보조제	유산균 발효에 의한 쌀 발효물	곡류 추출물 및 곡류발아 상황버섯 추출물을 함유하는 화장료 조성물 및 그를 함유하는 화장품
	보유국	대한민국	대한민국	대한민국
	등록년도	2013	2013	2005
	관련성(%)	70	60	80
	유사점	여러 곡류를 미생물균을 이용하여 발효	유산균 활용해 기능성 및 풍미 개선	발아곡류를 배지로 이용, 항산화효능 입증
	차이점	특정 곡류, 미생물균을 지정한 것이 아닌 혼합물 사용	발아곡류가 아닌 쌀로 만든 음식으로 발효(밥, 죽, 떡)	유산균이 아닌 버섯균사체 사용, 화장품원료로 활용
핵심특허 및 관련성	특허명	유용미생물을 이용한 항산화 발효쌀의 제조방법 및 상기방법에 의해 제조된 항산화 발효쌀	곡물에서 분리된 신규한 유산균을 이용한 혼합곡의 발효 방법 및 이의 대량 생산 방법	인진쑥 추출물에서 발아된 발아곡류를 천연배지로 이용한 버섯균사체 발효물의 제조방법 및 이용한 기능성식품
	보유국	대한민국	대한민국	대한민국
	등록년도	2008	2014	2011
	관련성(%)	70	80	80
	유사점	곡물에 유산균을 포함한 유용미생물균을 이용해 발효, 항산화 효능 입증	곡류와 유산균 활용해 기능성 개선	발아곡류를 배지로 이용
	차이점	발아곡류가 아닌 일반 쌀 사용	혼합곡물 사용	유산균이 아닌 버섯균사체 사용

### 3. 논문분석

#### 가. 논문분석 범위

대상국가	한국, 미국, 일본, 유럽
논문 DB	Pubmed(www.pubmed.gov)등 논문DB
검색기간	전년도
검색범위	제목, 초록 및 키워드

#### 나. 논문분석에 따른 본 연구과제와의 관련성

기술명	발아곡류에 유산균 발효를 하는 기술	유산균 발효 기술	곡류를 발아하는 공정 기술	
Keyword	germinated grains, lactic acid bacteria	<i>Lactic acid fermentation technology</i>	<i>germinated grains</i>	
검색건수	1	1873	147	
유효논문건수	없음	없음	1	
핵심논문 및 관련성	논문명	-	-	A quantitative shotgun proteomics analysis of germinated rice embryos and coleoptiles under low-temperature conditions.
	학술지명	-	-	Proteome Science2015
	저자	-	-	Joo Hyun Lee, Wondo Lee and Soon-Wook Kwon
	게재년도	-	-	2015
	관련성(%)	-	-	80
	유사점	-	-	곡류를 발아시켰다는 점
	차이점	-	-	벼에 대해서 발아를 시켰고 본사는 콩에도 발아를 시키는 기술을 확보.

#### 4. 제품 및 시장 분석

##### 가. 생산 및 시장현황

###### 1) 국내외 관련(유사)제품의 생산 및 시장 현황

- 국내곡류시장을 살펴보면 쌀 생산량은 증가되는데 비하여 1인당 소비량은 감소되고 있고 이러한 문제로 인해 정부에서는 매년 자급쌀변동직불금이 늘어나고 있는 실정이다 (2014. 통계청. 농림축산 식품부). 해결방안으로 쌀 소비를 증대시키기 위해서는, 한정되어 있는 쌀 소재의 다양성으로 차별화된 제품 개발이 필요하다. 본사는 이에 일반 곡류가 아닌 비타민 및 무기질 함량이 더욱 증가되어있는 발아곡류에 유산균 발효를 함으로써 새로운 식품 신소재 개발에 힘썼으며, 본 기술 개발 및 제품은 국내외 전무한 실정이다.

- 국내 및 국외 발아곡류를 이용한 제품의 경우, 쌀의 형태로서 판매가 주를 이루어져 있고, 즉 제품의 형태가 한정적으로 되어져 있다. 그리고 또한 본사가 개발한 발아곡류에 유산균을 발효한 제품은 없으며, 곡류를 이용한 소재의 건강 기능적 가치를 증대시킨 제품 개발에 본사는 노력하고자 하며, 이에 본 개발 원료에 대한 효능 평가를 실시하여 제품에 대한 효능적 가치를 더욱 부각시키고자 한다.

##### 나. 연구사업단 보유(활용)기술의 산업화 계획 및 기대효과

###### 1) 산업화·제품화 계획(제품의 특징, 대상 등)

○ 본 기술 개발로 한정적으로 이용되어졌던 발아곡류를 유산균 발효를 통해 새로운 식품 신소재 개발을 완료하였다. 본사는 모든 연령층을 대상으로 고상 발효한 발아현미를 통하여 국수 형태의 제품 개발 및 발아현미를 유동식 식품으로 개발하여 소비자에게 다양한 제품의 형태로 접근 하고자한다.

○ 현재 본 기술을 이용하여 개발한 원료에 대해, 항알러지, 항염증 등 과민면역반응에 대한 효능 평가를

이용하여 특수용도 식품을 생산하고자한다. 특수용도의 식품의 경우 영유아를 대상으로 면역 식품개발을 진행 할 것이다.

2) 산업화를 통한 기대효과

(단위 : 백만원)

항 목 \ 산업화 기준	1차년도	2차년도	3차년도	4차년도	5차년도	계
직접 경제효과	100	500	1000	2000	5000	8,600
경제적 파급효과	50	300	700	1000	2000	4,050
부가가치 창출액	200	700	2000	5000	15000	22,900
합계	350	1,500	3,700	8,000	22,000	35,550

5. 3P(특허,논문,제품)분석결과 및 연구사업단 사업내에서의 활용

가. 특허분석 및 향후 활용(연계 및 추가연구 등)

○ 기존 특허들은 혼합한 곡류에 균을 접종하여 발효물을 제조하는 방법이나, 발아한 곡류를 이용하여 청국장 등 전통 식품 개발에 관한 방법에 초점을 맞추어 특허 출원 및 등록이 진행 되어져 있다. 하지만 본 연구 개발처럼 발아곡류에 국내 식품에서 분리한 유산균 주를 이용하여 식품 소재 개발에 대한 특허는 전무하다. 즉, 이 개발은 국내외 전무한 기술이며, 이미 본사는 국내 특허 출원은 진행 한 상태이고, 추후 국외에 특허 출원할 계획이다.

나. 논문분석 및 향후 활용(연계 및 추가연구 등)

○ 기존의 논문을 분석 하면 발아곡류에 유산균 발효를 접목시킨 형태의 개발기술 및 효능 평가에 대해서는 전무하다. 추후, 본 개발 원료 및 제품에 대한 효능평가를 가천대학교 박혜진 교수팀과 협력하여 항알러지 및 항염증 효능에 대해 세포 및 동물실험을 통해 효능 평가를 완료하여, SCI급 논문에 게재할 계획이다.

다. 제품·시장분석 및 향후 활용(연계 및 추가연구 등)

○ 국내 및 국외시장 분석결과 발아곡류를 이용한 제품의 경우 쌀의 형태로 판매가 주로 이루어져 있고, 이외의 다른 제품으로서의 생산 및 판매는 부족하다. 그리고 발아곡류에 유산균을 발효한 제품의 경우에는 국내외 전무하다. 본사는 개발한 기술을 이용하여 획득한 원료인, 발아현미에 유산균 발효한 액상 및 고상발효 원료를 이용하여 한끼 대용 식품이나 영유아식 (유동식 등)의 제품을 생산하여 국내 및 국외에 판매할 계획이다.

## 주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 고부가가치 식품기술개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림축산식품부에서 시행한 고부가가치 식품기술개발사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니 됩니다.