

발간등록번호

11-1541000-001519-01

과제번호(110117-02)

기능성 제과소재 개발용 한국토종효모자원 발굴과  
이를 이용한 제과사업화  
(Discovering Yeast native to Korea for functional  
confectionery Material and Commercializing)

매일유업(주) 중앙연구소

농림수산식품부



# 제 출 문

농림수산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “기능성 제과소재 개발용 한국토종효모자원 발굴과 이를 이용한 제과사업화” 과제의 보고서로 제출합니다.

2012년 06월 30일

주관연구기관명 : 매일유업(주) 중앙연구소

주관연구책임자 : 권 순 일

세부연구책임자 : 김 희 경

연 구 원 : 김 재 홍

연 구 원 : 김 성 진

연 구 원 : 신 호 재

연 구 원 : 전 민 선

연 구 원 : 박 해 미



# 요 약 문

## I. 제 목

기능성 제과소재 개발용 한국토종효모자원 발굴과 이를 이용한 제과사업화

## II. 연구개발 목표 및 내용

### 1. 연구개발 목표

- 가) 제과용 한국토종효모자원 선발(과제번호 : 농기평 109115-2 연계) 및 대량생산 시스템 구축에 따른 효모 자원 활용 극대화(제과 원료화)
- 나) 제과용 기능성 소재(세포벽 소재, 추출물 소재) 탐구·선발 및 개발기법 정립
- 다) 선발 기능성소재별 임상실험(표준세포주 및 동물)을 통한 안전성 및 효과검정(면역, 독성 및 영양성분)
- 라) 최종개발 기능성 소재의 제품화(제과 레시피 확보) 및 사업화(관련기업 기술이전)

### 2. 연구개발 목적

현재 낙농업(유업계)과 제과·제빵업계의 단편적인 연구개발 부분을 산업화에 관련되게 통합 연구개발에 대한 방안 및 시스템 구축이 필요하다 할 수 있다.

밀가루 등 농업자원(다국적 기업에 종속)과 균일화된 상업효모(프랑스 르샤프사의 세계 몇 개 회사에서 독점생산)의 장기적 사용과 이에 따른 소비자 입맛의 종속으로부터 야기되는 국내외 제과/제빵 산업의 발전저해요소를 효모자원의 확보와 대체를 통한 해결방안이 필요하다.

현재 한국 낙농산업의 최대 고민거리인 잉여 원유의 수급불균형 해소기여와 더불어, 낙농, 농업 및 제빵산업 전반의 기반보호와 육성이라는 종합대안과 관련 연구개발 또한 요구받고 있다.

이에 따라 국내 미이용 자원의 활용을 통한 현장애로기술 해결과 소비자 기호성에 충실한 고부가 가치화 제품창출을 위한 종합적 연구개발(낙농, 제빵, 농업 및 미생물)에 관한 연구개발의 필요성이 절실하다 할 수 있다.

본 연구는 낙농업(유업계)과 제과·제빵 업계의 단편적인 연구개발 부분을 산업화에 관련되게 통합 연구차원에서 한국 토착형 효모자원의 개발과 한발자국 더 나아가 기능성 소재의 활용이 핵심기술임을 주목하고 이의 응용성을 주요항목으로 선택하였다.

목적으로, 농업자원(국산 유기농 농산물 확보)과 잉여 국내산 원유소재(우유, 버터 및 생크림 등)를 이용한 기술우위의 고부가 가치 소재 및 상품으로 개발하되, 세계 몇 개 회사에서 독점 생산하여 사용되는 균일화된 상업효모로 인한 국내외 제과 및 제빵

산업을 포함한 식품발전저해요소를 토착 효모균 및 기능성 소재로 해결코 저, 소비자 기호성에 충실한 제품개발을 종합적으로 연계 실시하였다.

방법으로서, 유기농 농산물에서 분리한 제과·제빵 적용성이 우수한 한국토종효모 자원의 대량생산방법 및 그를 통해 제조된 효모 및 기능성 소재 제품을 제공함으로써, 종래 상업효모와 다른 향미를 가지면서도 식감 등이 우수한 특화성을 갖는 제빵 및 기능성 소재가 함유토록 제조가 가능하게 레시피를 정립하고, 국내 제과·제빵 산업의 활성화와 낙농업계의 잉여 원유수급 불균형 문제를 해소할 수 있는 방안을 제시하고 저 하였다.

궁극적으로는 낙농산업의 발전의 고민거리인 잉여 원유의 수급불균형 해소가 가능하게 될 것이고, 이는 결국 가격경쟁력 강화와 낙농, 농업 및 제과·제빵사업 전반의 기반 보호와 육성이라는 종합 대안으로 제시함에 목적이 있다.

### 3. 연구개발 필요성

본 과제와 관련하여 지속적인 제과·제빵 분야의 국제적 연구개발방향 및 사업화(상용화)에 대한 정보과약 및 자료 확보를 위한 현지방문 조사를 지속적(2009년~2012년)으로 실시한 결과, 큰 특징으로서 국내외 관계없이 식품분야 적용소재가 개발 시 가장 먼저 제과·제빵 분야에 적용되고 있는데 이는 대량소모와 신속한 적용제품의 소비가 뒤따르는 점이 업계특성 때문이라 할 수 있었다.

이에 따라 과제관련 효모의 이용성 및 이의 개발 중요성은 충분히 인식 하고 있으나, 현재, 국내외적으로 체계화된 연구 부재로 자가배양(비정형화방법에 의한 효모제조) 및 소량제품 생산과 소비(동일 일반제품 대비 2~5배)패턴을 보이고 있는 경향이였다.

최근 효모자체의 이용성(단순 제빵용)을 넘어 효모가 보유하고 있는 기능성 소재 이용성 관련 연구개발 및 산업화(최우선적 제과·제빵 소재 적용)가 급속히 진행되고 있는 것으로 조사되었다[근거(조사대상국 및 업소) : 한국(2009~2012 식품박람회 참관 및 6개업소), 일본(2009~2011 식품박람회 참관, 10개업체), 유럽 3개국[2011 유럽빵 박람회 참관 및 프랑스(10개업소), 스위스(12개업소), 독일내(5개업소)].

본 연구개발은 국내 제과 및 제빵분야에서 경쟁력의 우선을 확보하기 위한 중요한 수단이 될 것으로 판단되었다. 따라서, 제빵분야에서 상업효모를 대체할 수 있는 한국형 토종효모자원의 확보와 이를 고부가가치 창출을 위한 기능성 소재 개발 및 제과분야까지 일관되게 연계하는 본 연구결과는 국가적인 산업보호 차원에서도 중요하다 할 수 있다.

현재, 효모를 자원으로 하는 제과용 소재로서, 액기스 분말과 글루코 만난으로 대변 할 수 있으며, 이중 글루코 만난의 경우 소비자가는 125만원/Kg, 그리고 효모 추출물(액기스 분말)의 경우는 50,000원~60,000원/Kg으로 형성되어 있으며 국내외적으로 관련산업에서 상업화 초기 단계에 있다고 판단되었다. 또한, 연구결과를 산업화로 연계시 주요경쟁 대상 국가는 일본 그리고 프랑스가 예상되었다.

본 연구과제에서 확보하고 저 한 차별성은 다음과 같다. 즉, 현재 상업효모의 경우

는 제빵 제조시, 효모의 CO<sub>2</sub>의 발생효과를 이용하여 빵의 부푼현상을 단순히 이용하는 것이며, 본 과제에서는 한국 유기농 농산물에 존재하는 수종의 유용 효모를 국내유 전자원화 함과 더불어 이들이 보유하고 있는 특화성(천연 및 풍미성 등)과 기능성 소재 개발과 이들이 어울어진 특화 제과·제빵 사업 및 관련산업에 까지 철저히 연계시킬 수 있음이 큰 차이점이라 할 수 있다.

### III. 연구결과

#### 1. 제빵용 한국토종효모자원 개발 및 제과·제빵적용(선행연구결과)

한국토종효모 발굴 및 이의 산업화 관련 선행연구(과제번호 : 109115-02, 농기평) 결과에서 확보된 KNOW-HOW를 연계하여 전체연구를 진행하였는데, 선행연구를 통한 확보기술은 다음과 같이 요약할 수 있다.

유기농업현장(과일 및 과실)내 제빵용 한국토종효모 선발 및 유전자 확보를 완료하였다[특허출원번호(10-2009-0134773) : 신규효모 및 그를 이용한 빵의 제조방법(2009년), 확보균주(특허): *Saccharomyces cerevisiae* JKK091002(특허수탁번호 : KCCM 11056P)]. 선발효모의 대량생산형 배지조성 및 배양조건 정립(동결분말형 효모 기준 : 생산수율 5%) 및 대량생산 시스템(압착효모 : 7,000톤/년, 동결분말형 효모 기준 : 생산효율 5%) 정립 및 산업화 관련 ROADMAP을 완료 하였다. 그리고, 개발 천연효모적용 특화 제빵 제조기법(레시피) 정립 및 이의 사업화 시점에 있다.

#### 2. 한국토종효모자원 추가 선발 및 유전자원 확보

선행연구결과와 연계하여 한국토종효모자원 추가선발 및 유전자원 확보를 위하여, 62장소의 유기농 현장에서 140종의 유기농 시료(과일류, 과채류, 채소류, 버섯류 등)를 채취한 후 효모류 및 유산균류를 분리 및 동정하였다. 결과로서, 유산균류는 효모류 중 4종의 *S.cereviase*, 13종 *Candida spp* 및 유산균류는 14종(*Lactococcus spp*, *Leuconostoc spp*, *Lactobacillus spp*류)이 분리 동정되었다.

한국토착형 효모선발을 위하여, 5% sucrose 배지내 과일표피를 분취 및 분쇄하여 접종하고 3일동안 배양(30℃, 습도:50%)을 실시함으로서, 효모 분리를 위한 배지 및 배양조건으로 하였다. 효모 분리를 위하여, 일정별 분취배양액을 TSA(총균수 확인), PDA(효모선발) 및 BCP(유산균) 고체영양배지에 배양후 Colony의 형태를 육안 및 현미경으로 검경을 통하여 효모분리균 1차 분리한후 이를 계대순수분리(3세대, PDA)하여 동정하였다. 순수분리 후 효모균의 동정은, 1단계(API Kit, Model :C-AUX), 2단계 Vitek 분석시스템(BioMeriex VITEK사, 프랑스) 및 Kit(Model : YST), 그리고 3단계는 Diversilab시스템(BioMeriex VITEK사, 프랑스) 및 Kit(Model : Saccharomyces Kit)를 사용하여 동정을 완료하였다.

분리 및 동정이 완료된 효모는 (주)마크로젠사(한국)에 의뢰하여 Gene cloning 동정을 실시하였으며, Chromatogram과 Sequencing 결과비교(Blast, NCBI)를 통하여

99%이상의 유전자 상동성을 확인하였다.

결과로서, 62장소의 유기농 현장에서 140종의 유기농 시료(과일류, 과채류, 채소류, 버섯류 등)를 채취한 후 효모류 및 유산균류를 분리 동정 결과, 유산균류는 효모류중 4종의 *S.cereviase*, 13종 *Candida spp* 및 유산균류는 14종(*Lactococcus spp*, *Leuconostoc spp*, *Lactobacillus spp*류)이 분리 동정되었다. 이중 4종 효모에 대하여 *S.cereviase* JKK091006 *S.cereviase* JKK091002, *S.cereviase* CKK110426 그리고 *S.cereviase* OKK110427로 명명하였다.

### 3. 선발 한국토종효모에 대한 대량생산시스템 정립(선행연구)

천연 유래 선발효모(Wild Type)의 경제적 생산을 위한 필수조건인 대량생산용 배지선발 및 배양조건 정립과 투입되는 원료대비 고효율의 효모 생산성(성장성 향상) 및 수익성을 극대화 할 수 있는 생산시스템 확립을 완료하였다. 필수정립항목으로서, 염 및 알코올 내성균주의 선발, 선발배지 원료의 전처리 공정설계, 고농도 배양방법 설계, 배양법 최적화(농도 fed-batch배양, 발효종료시 후처리 방법 정립), 압착효모 생산방법 정립 및 규모별 생산시스템 구축계획으로 구분 일관되게 정립하였다.

제빵효모 생산 발효기술 및 제품화 기술개발결과는 다음과 같다.

#### 가. 염 내성 및 알코올 내성 균주의 선발

NaCl 1~10%가 포함된 PDB broth에 미리 배양한 종배양액(*Saccharomyces cerevisiae* JKK091006)을 넣어 1~2일간 30℃, 200 rpm에서 배양하여 한계 성장점을 확인하고, 이로부터 단계별로 염 농도를 높여가며 염 내성을 부여하였으며, 동시에 알코올 내성을 부여하였다. 선발된 균주는 당밀 전처리, 배지 최적화 및 발효 공정설계를 위해 최종 glycerol 15% 용액이 되도록 -70℃에서 동결 보존하였다.

#### 나. 배지 원료의 전처리 공정 설계

당밀 (필리핀, 해바라기 유기농)을 적당히 희석하여 암모니아(Junsei chemical Co., Ltd., minimum 28%), 인산(85%), 기타 미네랄을 첨가하여 발효조에서 효모의 성장 패턴을 분석하였으며, 성장 속도 및 성장율이 가장 좋은 패턴의 조건을 설정하였다. 또한 당밀 내의 미네랄 성분을 ICP분석기를 이용하여 제빵효모가 필요한 영양성분이 함유될 수 있도록 추가적인 미네랄을 첨가하였다.

#### 다. 고농도 배양 방법 설계 및 최적화

당밀의 전처리 최적화와 함께 천연 유래 효모의 최적화 생산을 위해 intermittent feeding strategy, constant feeding strategy을 이용한 fed-batch 최적화, 기타 효모 성장에 따라 feeding 속도를 증대하는 방법 등을 통하여 효모의 성장성과 생균수 증대를 높이기 위해 가장 적합한 생산 방법을 개발하였다.



라. 고수율 압착효모 생산 및 제품화(제형화) 정립

산업적인 생산에서 일반적으로 사용하는 압착효모 생산 방법과 이로부터 발생할 수 있는 장단점에 대하여 고찰하며, 실험실 수준에서 수행 할 수 있는 방법으로 시제품 생산 및 시제품을 제빵 적용특성을 확인하였다.

고농도 효모 배양결과로서, 배양액당  $2.5 \times 10^9$ CFU/ml 이상 그리고 압착효모(수분 70~74% 함유)는  $1.15 \times 10^{10}$ CFU/g의 고농도 균수를 나타내었다.

생산수율 검정결과, 동결건조형은 5.4%(w/w), 압착효모는 18%(수분함유량 : 70~74%, w/w)의 높은 생산효율을 보였다.

생산효모의 제품화(제형화) 검토결과, 건조형(수분: 5%, w/w)과 압착형(수분함유량 : 70~74%, w/w)으로 구분하여 정립 완료하였다.

마. 수익성 확보형 생산시스템 구축

생산규모는 1,800톤/년(건조형 효모기준), 생산규모(3단계)는 5톤, 50톤 및 500톤으로 구분하여 경제성 평가를 완료하였다.

#### 4. 제과용 선발효모 및 기능성 소재 대량생산시스템 정립(4단계)

본 연구는 선행연구결과를 적용하여 효모균 및 유산균류 배양시설과 관련 전문지식을 보유하고 있는 아미코젠(주)에 위탁하여 선발효모 및 기능성 소재 대량생산시스템 정립과 더불어 시제품 및 시작품을 4단계를 구분하여 제조하였다.

가. 선발효모(Wild-Type) 생산수율 증대형 배지 및 배양조건 정립(1단계)

선발효모 4종류와 표준효모(선행연구)를 대상으로 선행 정립된 배양배지조건(당밀 배지)에서 발효(5L jar fermenter)를 수행함으로써, 목표 생산수율(동결건조분말효모 기준 : 5%)을 나타내는 최적의 효모선발과 배지 및 배양조건을 확인하고 저 하였다. 결과는 다음과 같다.

발효액 대비 개발효모별 압착효모(수분 70% 기준) 생산수율과 효모균수를 조사하여 보았더니, *S.cereviase* JKK091002는 20.8%, *S.cereviase* OKK110422 19.4%, *S.cereviase* CKK111111는 16.8% 그리고 *C.utilis*의 경우는 35%로 가장 높은 생산수율을 보였다. 이때 효모균수를 비교하여 보았더니, 대조 상업효모의 경우는  $1.8 \times 10^{10}$  cfu/g, 개발효모인 *S.cereviase* JKK091002는  $3.4 \times 10^{11}$  cfu/g, *S.cereviase* OKK110422는  $1.7 \times 10^{12}$  cfu/g, *S.cereviase* CKK111111는  $6.8 \times 10^{12}$  cfu/g 그리고 *C.utilis*의 경우는  $8.9 \times 10^{13}$  cfu/g의 균수를 보유하고 있었다.

발효액 기준으로 선발효모별 동결건조후 생산효율을 비교하여 보았다. 전체시험구에서 4%~5% 범위의 생산수율(동결효모분말 기준)을 보였으며, 정립된 배지 및 배양조건에서 동일한 적합성을 나타내었다( $P < 0.05$ ).

나. 최종선발 효모의 대량생산시스템 정립(2단계)

1단계 검정결과를 토대로, 5% 이상의 생산수율을 보였던 *C.utilis*와 제빵적용성 평가에서 가장 우수한 발효력을 보였던 *S.cereviase* CKK110426를 선발하고, 대량생산시스템 적용전에 중형 pilot scale(50L fermentaer)에서 상업적 생산성을 검정하였다. 결과로서, 동일배지 및 배양조건에서 5%이상(동결건조 기준)이 생산성을 나타내어 선발 효모류에 대한 대량생산이 가능함을 확인하였다.

다. 선발효모내 기능성소재 분리기법 예비 정립(3단계)

1~2단계에서 검정한 결과를 토대로 실제 10톤 규모의 대형 발효생산시스템 적용하여 생산한 효모를 대상으로, 세포파쇄기를 이용하여 파쇄한 효모와 비파쇄한 효모를 autolysis(단백 분해효소 투입)하여 최대 수율을 나타내는 효모추출물 및 세포벽 분획물 생산성을 확인하였다. 결과로서, 비파쇄 효모를 적용 시 효모추출물 및 세포벽 분획물의 생산효율이 더 좋은 것으로 확인 되었다.

라. 선발효모내 기능성 소재(세포벽 및 추출물) 대량생산시스템 정립(4단계)

1~3단계를 결과를 토대로, 효모추출물 분말 및 세포벽 분획물에 대한 대량생산시스템을 정립하였다.

## 5. 개발효모 제품화 특성조사

가. 개발효모 TYPE(압착형 및 분말형 구분)별 장단기 보관성 평가

개발효모에 대한 개발효모제형별(압착형 및 동결분말형)로 구분하여 장단기(0일, 30일, 1년) 및 보관온도별(상온 및 냉장)보관성 평가결과는 다음과 같다.

유효보관기간 평가결과, 냉장조건하에서 압착효모형은 1개월, 분말형은 1년이내였다. 이는 상업효모 대비 동등성을 보유하고 있었다( $P<0,05$ ). 또한, 시간이 경과시, 효모균수 변화를 확인하여 보았더니, 1개월 이상 장기보관시, 제형 및 보관온도에 상관없이 최대 20%까지 효모균수는 감소하는 결과를 보였다( $P<0.01$ ).

성상변화는, 시간이 경과 시 곰팡이, 갈변화 및 이취가 심하게 발생하였다( $P<0.01$ , 건조 효모 제외).

나. 개발효모별 기능성 물질 함유량 조사

아미노산 조성은 상업효모 대비 5종 개발효모류(*S.cereviase*JKK091002, *S.cereviase*CKK110426, *S.cereviase*OKK110427 그리고 *C.utilis*)의 아미노산 구성(필수아미노산 18항목기준)을 비교하였다. 결과로서 총아미노산의 함유량을 상업효모(14.1%) 대비 비교한 결과, 개발효모류중 *S.cereviase*의 경우는 약 11%, *C.utilis*는 7.68%로 차이를 나타내었다( $P<0.05$ )

기초영양성분조사(총단백질, 조지방, 탄수화물, 회분 및 미네랄 함유량 등)는 상업효

모 대비 총단백질, 조지방, 탄수화물 및 회분의 수치차이는 인정되지 않았지만 미네랄(8항목 : Ca, P, Mg, Fe, Zn, S, Se, Mn) 분석을 실시한 결과, *C.utilis*(1기준)가 *S.cereviase*보다 전체적으로 미네랄의 함유량이 높게 나타났다(칼슘:26배, P: 3.3배, Mg : 3.2배, Fe:6.4배, Zn : 4.2배, S : 1.3배, Se:불검출, Mn:불검출). *S.cereviase* 시료내 비교에서 상업효모 대비 전반적으로 개발효모의 미네랄 수치가 높게 나타났는데, 야생에서 분리 효모균의 특성으로 생각되었다( $P<0.05$ ). 즉, 칼슘기준으로 상업효모(칼슘함유량 : 47ppm), *S.cereviase* JKK091002는 170ppm *S.cereviase* CKK110426은 497ppm 그리고 *S.cereviase*OKK110427의 경우는 812ppm 으로 함유량 차이가 인정되었는데, 전체 미네랄에서 유사한 패턴을 보였다.

## 6. 대량생산 기능성 소재별 특성 및 제품적용성 사전평가

### 가. 핵산함유량 비교조사

선발효모에서 추출한 효모추출액을 RNAase처리시 효모추출물이외 기능성 소재인 핵산류는 4종(GMP, CMP, AMP, UMP)이 대표적으로 함유 되어 있었는데, 전체는 20%~25% 범위 그리고 핵산별로는 약 5%범위의 함유량을 나타내었다.

### 나. 효모추출물 분자량 범위 조사

선발효모(*S.cereviase* CKK110426)에서 대량생산한 기능성 소재중 수용성인 효모추출물을 상용효모추출물(대조)과 분자량(FPLC analysis System)을 비교함으로써 순도 및 특성을 평가하였다. 결과로서, 대조 대비 90%이상 동일 분자량 범위를 보유한 물성을 보유하고 있었으며, 수용성 성분임. 10%이내의 분자량 차이를 보이는 이유는 추출 효모종의 차이로 인한 것과 추출방법의 차이로 인한 것으로 판단되었다.

### 다. 기초영양성분조사(총단백질, 조지방, 탄수화물, 회분 등)

*S.cereviase*OKK110427 대비 기능성 소재류( $\beta$ -Glucan, 효모추출물)의 총단백질, 조지방, 탄수화물 및 회분의 수치차이는 인정되지 않았다. 그러나, 미네랄류(12항목 : Ca, Fe, Zn, Cu, Se, P, Mn, Mg, Pb, Cd, As, Cr)를 비교 분석하였다. 칼슘함유량을 기준으로 효모에서 분리한 세포벽( $\beta$ -Glucan)의 전체 미네랄 함유량은 미미한 것으로 나타났으나 전체 효모추출물내 미네랄 수치는 *S.cereviase*OKK110427(1,136ppm, 1 기준) 대비 1.08~1.27배로 유사하게 나타났다. 그러나 기타 미네랄의 함유량은 전체적으로 감소하였다( $P<0.01$ )

### 라. 열안전성 평가(액상 및 분말형 구분)

#### 1) 효모추출물

유기농 현장선발 효모(*S.cereviase* CKK110426) 대비 분리 기능성 소재(세포벽:  $\beta$

-Glucan, 핵산 함유 추출물)별, 액상(2%, w/w)과 분말형으로 구분한 후 열안정성 검정 결과를 토대로 제과·제빵용 적용시 안전(정)성을 미리 예측코져 하였다. 결과로서, 분말형의 경우는  $\beta$ -Glucan이외 효모추출물의 경우는 90℃이상 고온처리시 정상 변화(갈변화)가 유발되었으며, 온도처리에 비례하였다. 그러나, 액상형의 경우는 정상변화(갈변화) 및 분자량 변화는 없었다. 따라서, 적용성에 있어 고상형보다는 액상형 처리가 효과적이라고 판단되었다.

## 2) 핵산류

선발효모에서 추출한 효모추출액을 RNAase처리시 효모추출물 이외 기능성 소재인 핵산류는 4종(GMP, CMP, AMP, UMP)이 대표적으로 함유 되어 있었다. 따라서, 기능성 소재인 핵산류를 제과·제빵적용성 및 용도용법 확대를 위하여, 고상형 및 액상(2%, w/w)상태에서 열안정성 검정을 실시하였다. 결과로서, 고상 및 액상형 공히 70℃이상의 고열에서 핵산류 고유분자구조가 파괴되면서 정상(갈변화)변화가 나타났는데, 온도에 비례하여 증가하였다.

## 3) 효모추출 핵산류(복합핵산류) 장단기 보관 안전성 평가(32일, 상온보관, 액상)

선발효모 및 상용효모 추출물내 핵산류는 크게 4종(CMP, UMP, GMP, AMP)이 함유 되어 있었다. 따라서, 표준체를 기준으로 상기 5종의 핵산류 Mixer 용액을 장기보관(32일, 상온, 핵산류별 1% 혼합용액 조성)시, 안정성 평가(FPLC)를 토대로 제품적용시 효능의 안전(정)성을 미리 예측코져 하였다. 결과로서, 액상조건에서서 장기보관에 따라 저분자화 되는 방향으로 분자량 변화가 관찰됨으로서, 분말상 보관을 원칙으로 하고, 액상 적용시는 단시간에 사용하여야 할 것으로 판단되었다.

## 4) 효모분리 단일 및 복합핵산류에 대한 미네랄 간섭효과(킬레이팅) 평가

선발효모 및 상용효모의 추출물내 핵산류는 크게 4종(CMP, UMP, GMP, AMP)이 함유되어 있었는데, 이들 핵산류의 화학구조는 리보오스 1분자와 특정 아미노산 및 P를 보유하고 있는 공통구조를 보유하고 있다. 이 중 P의 경우는 미네랄류와의 킬레이팅 능력을 보유하고 있을 것으로 예측되어, 칼슘(CaCl<sub>2</sub>)만을 대상으로 IMP를 추가한 5종 복합핵산류 조성액(2%, w/w)과 단일 핵산조성액(2%, w/w)으로 구분하여 각각 조성하고 이를 비열처리 및 열처리조건에서 각각 비교 검정하였다. 결과는 다음과 같다.

## 5) 혼합 핵산류

칼슘 킬레이팅 반응종료 후 생산수율(불용화 침전물 동결건조)은 5% 이내로 매우 낮았으며, 열처리후 상등액내 핵산류와 칼슘 혹은 이온반응으로 인하여 겔화반응이 유발되었다.

## 6) 복합핵산류의 결과를 확인하기 위한 차원에서 단일 핵산류만을 대상으로 각각 검정

(불용성화 핵산류에 대한 ICP분석 결과)한 결과에서 AMP (81.5%) > GMP(74%) > IMP(70%) > 혼합(3.6%) > CMP(1.2%)순으로 칼슘에 대한 킬레이팅 능력 차이를 보였다. 추후, 핵산류의 각각에 대한 미네랄별 킬레이팅 반응성을 세세하게 검정할 필요가 있다고 판단되었다.

## 7. 개발 기능성소재의 사전 안전성(Cell-line) 평가

선발효모 유래 기능성 소재별, 농도별로 광역 안전성 스펙트럼을 사전확인하기 위한 표준체로서 Sialic acid는 매일유업(주) 중앙연구소에서 기증 받아 사용(순도 : 98%)하여 안전성 평가기법 사전정립을 완료하였다. 이에, 선발효모 유래 기능성 소재로서 효모추출물 및 효모추출물내 함유된 5종 핵산류를 주유대상으로 하여 RAW264.7 (macrophage cell) cell를 이용하여 MTT, NO 검정을 거쳐 최적농도범위를 선정하기 위한 사전안전성을 평가하였다.

이를 위하여, 효모추출물내 함유량과 동일한 핵산류(5종 : GMP, UMP, CMP, AMP, IMP)에 대하여, 단일(AMP, IMP) 및 복합핵산류(GMP+UMP+CMP)처리구로 조성하고, 이를 농도별 처리(무처리, 0.5%~1.0%, w/w)로 처리시 항염증지표(NO) 및 독성지표(MTT)조사 결과를 연계하여 기초효능평가를 예측코져 하였다. 결과는 다음과 같다.

가. 핵산류중 IMP는 0.5% 이상처리시 세포의 성장 촉진(MTT)과 더불어 항염증 효과(NO)가 동시에 인정되었으며, APM은 0.5% 이상의 농도에서 항염증 효과 보다는 세포생장에 유의한 효과가 있는 것으로 평가되었다( $P < 0.01$ ).

나. 기능성소재류의 표준세포주에 대하여 독성유발(MTT) 관련 농도범위가 0.5%~2% 이고 항염증(NO)효능을 보이는 농도는 0.5%~10% 범위를 보였다.

1) 세포독성(MTT) 유발 소재와 농도는 UMP와 CMP는 0.5%로 가장 높았으며, 다음으로는 효모추출물, AMP와 IMP처리구의 경우이며, 공통적으로 0.75% 다. 5종 혼합핵산류 처리구는 1%이고 GMP 처리구는 2% 이상의 농도를 첨가시 독성이 있는 것으로 평가되었다( $P < 0.05$ )

2) 항염증(NO)효능은 효모추출물의 경우 0.5%, 5종 핵산혼합처리구와 GMP처리구는 2% 그리고 CMP처리구의 경우는 10% 이상의 농도처리시 유의성이 인정되었으며, 기타 소재에서는 인정되지 않았다( $P < 0.05$ ).

다. 종합적으로, 효모추출물의 경우가 가장 우수한 소재로 평가 되었으며 첨가농도는 0.5%~1%범위 였고, 5종혼합핵산처리구로서 1~2%, GMP는 2%이상 그리고 CMP의 경우는 10%이상의 농도일 때 안전성이 확보 되면서 항염증 저하등의 복합기능성을 나타내는 것으로 최종 평가 되었다.

상기 결과를 토대로, 동물임상시험과 제과·제빵 적용성 평가시 목표로 하는 효능(안전성)을 검정하기 위한 최적 농도로서 0.5%~1%를 설정하였다.

## 8. 동물임상 평가(안전성 및 기초효능 평가)

#### 가. MIC설정근거 동물임상용 사료제조

1) 기능성소재 동물임상평가를 통한 안전성 평가를 위한 전체적인 구성은 사료 레시피는 AIN-76A를 기본식으로 하는 대조구, 비교구 2군(5종 핵산혼합, Yeast NT) 및 실험구 2군( $\beta$ -Glucan, Aromild)으로 하였고, 각 농도는 1%(L;low), 5%(M;Medium) 및 10%(H;High)로 혼합 조성하였다( $\beta$ -Glucan는 0.1%, 0.5% 및 1% 조성).

2) 전체시험구의 사료 레시피는 AIN-76A를 기본식으로 하여 비교구 2군(5종 핵산혼합, Yeast NT) 및 실험구 2군( $\beta$ -Glucan, Aromild)으로 하였고, 각 농도는 1%(L;low), 5%(M;Medium) 및 10%(H;High)로 혼합 조성하였다( $\beta$ -Glucan는 0.1%, 0.5% 및 1% 조성). 비교구는 *C. utilis* 분리 추출물인 Aromild(상품명, 일본 KOHJIN사)의 핵산 함량을 분석(CMP 7.1%, UMP 8.9%, GMP 5.3%, IMP 3%, AMP 0.7%)하여 핵산을 기본식이에 첨가하였으며, *C. utilis* 분리 추출물인 Yeast NT(상품명, KOHJIN, 일본)를 기본식이에 조성 조정하였다. 실험구는 *S. cerevisiae*에서 분리한 세포벽  $\beta$ -Glucan (오리엔탈사, 일본)과 *C. utilis* 분리 추출물인 Aromild (상품명, 일본 KOHJIN사)를 기본식이에 조성 조정하였다.

#### 나. 장단기 섭이를 통한 동물 안전성 평가(총 8주)

시험동물에 조성 사료를 자유섭이토록 한 후 4주, 8주에 각각 성장관련 및 도살조건하에서 안전성평가 항목별로 조사하였다. 주요 평가항목으로 사료효율(성장), 무게(총무게 및 기관별), 기관별 조직병리, 혈액지표 및 염색체이상 조사 및 장내미생물총 변화로 하여 총 8개 항목으로 대별하였다.

##### 1) 일정별 성장률 및 섭취율 조사

일정별로 구분하여 사료섭취량과 관련한 일일성장률(24시간 단위로 8주 동안 측정)을 대조구(AIN-76A섭취 마우스) 대비 비교구 2군(5종 핵산혼합, Yeast NT) 및 실험구 2군( $\beta$ -Glucan, Aromild)와 비교하여 보았더니, 차이가 인정되지 않았다( $P < 0.05$ ).

##### 2) 총무게 및 기관별 무게 변화

생체중 및 기관별 무게변화에 미치는 결과를 역시 기간별로 구분하여 대조 대비 비교구 2군(5종 핵산혼합, Yeast NT) 및 실험구 2군( $\beta$ -Glucan, Aromild) 비교하여 보았다.

결과로서 생체중 및 근조직(5개기관 : Liver, Kidney, Spleen)과 골조직(1개 : femur) 전체시험구에서 기간별 농도별 상관없이 비장의 크기가 대조구(체중 1기준, 0.009) 대비 비교구 및 실험구(0.003~0.006) 차이가 인정되었으며, 간, 신장 및 대퇴골의 무게 차이는 인정되지 않았다( $P < 0.05$ ).

### 3) 혈액이상 및 이화학적 지표 조사

기능성소재의 성장관련 안전성 결과를 기초로, 추가적으로 혈액조성과 지표안전성 및 염색체 이상 조사를 통하여 생체내 안전성 결과를 조사하여 보았더니, 혈액학적 지표를 통해 4주차에서는 백혈구 및 림프구의 저하로 감염위험이 있는 것으로 판단되었으나, 8주차에 재측정 결과 마우스의 면역 항상성 유지에 이상이 없는 것을 확인하였으며, 혈액생리학적 지표를 통해 YeastNT와 핵산에서 간세포가 손상되었으나 재생 회복되는 정도의 독성을 나타내었다. 그 외 다른 중요장기 및 질병에도 이상이 없음을 확인하였다. 또한 MN분석을 통해 기능성소재를 섭취한 마우스의 염색체에 이상이 없음을 재차 확인하였다( $P < 0.05$ ).

### 4) 장내 미생물총 변화 평가

개발 기능성소재를 농도별 및 섭이기간(4주, 8주 및 13주)에 따라 장내미생물총 변화를 유발하는지를 총균수(TSA배지) 대비 대장균구(MacConkey배지) 및 유산균(BCP 배지)으로 구분하여 호기조건하에서 확인하였다.

결과로서, 마우스가 성장함에 따라 대조구 및 비교구와 실험구의 장내 미생물의 분포를 볼 때 대장균 및 유산균의 수가 증가하지만 기능성소재의 지속적인 섭취시 대조구 대비 마우스 장내의 미생물 분포의 증가 양상이 대장균에 비해 유산균의 증가 폭이 큰 경향이 있지만, 통계적으로 유의한 수준은 아니다.

따라서, 기능성 소재별 및 농도별 안전성 및 기초효능 평가를 기준으로 동물 전임상을 통한 미생물 분포 분석결과 제빵/제과 제품 적용시 1%이상의 농도에서도 기능성소재의 섭취는 대조구와 큰 차이가 없음을 확인하였다.

### 5) 핵산섭취마우스의 성적난폭성 이상조사.

동물전임상 평가중 핵산류 섭이후 2일이 경과시, 성적 난폭성이 나타남에 따라, 표준주의 결과와는 다른 차이를 보일 수 있을 것으로 예측할 수 있었다. 따라서, 핵산류의 농도별 섭이에 따른 긍정적 혹은 부정적 생체반응결과를 확인하므로서, 이 결과를 기초로 제빵/제과 제품적용성 평가와 관련 제품화 연구방향을 설정코져 하였다.

가) 기본사료만을 섭이시킨 대조구와 처리구(Low, medium, high dosage)의 고환을 적출하여 조직학적 검증을 실시하였더니, 대조구의 경우에는 곱슬정세관에서 정자형성과정과 관계되는 정원세포부터 정자세포까지 모두 관찰되었으나, 실험구의 정세관에서 정자형성과정은 정자방출과정이 우선함으로서 정세관의 내강이 비어있는 것처럼 관찰되었다.

나) 이러한 결과는 핵산섭이에 따라 정상적인 생식활동보다는 정자방출이 우선함으로서 생식행동의 변화를 초래했을 것으로 판단된다. 이러한 결과를 정밀하게 확인하기 위하여는 추가적으로 시간적인 부분과 관련 호르몬 조사를 병행하면서 성적 관련 호르몬 변화 패턴을 세세하게 조사할 필요성이 대두 되었다.

## 9. 개발효모 및 기능성 소재 제과·제빵 적용성 평가 결과

개발 기능성 소재별 사전안전성 및 기능성(항염증 증대효과, 세포독성 및 성장 관련 평가) 결과를 토대로 기능성 소재(4종 Mix 핵산류, 제과·제빵 적용성 평가를 실시하였는데, 상용 제조레시피가 알려진 제과분야 24항목 그리고 제빵분야 24항목에 대한 예비 적용성 평가를 실시한 후 ‘프랑스빵’을 최적시료로 선발하여 이를 기준으로 제과·제빵 적용성을 평가하였다. 제과·제빵 제조 레시피 설정은 단일 개발효모적용 및 단일 기능성 소재 첨가조건과 동시 첨가에 따른 최종 제과·제빵제조 레시피 및 이를 적용에 따른 결과는 다음과 같다(기준 : 프랑스빵).

가. 개발효모 적용 일반 레시피 절차는 재료정량[강력분 1,000g+물 600g+개발 압착효모 50g+소금 : 18g]→반죽제조(최종 전단계)→1차 발효(30℃, 수분: 80%, 30분)→분할(270g)→중간발효(30분, 상온)→정형(로드형 및 원형) 및 패닝→2차발효(30℃, 수분: 80%, 40분)→굽기 : 200℃/180℃(25℃) 순으로 진행하였다.

개발효모 및 기능성 소재 동시 적용레시피 절차는 재료정량[강력분 1,000g+ 물 600g, 압착효모 50g(분말형 효모 25g)+소금 18g+각 소재별 50g(5%, w/w)]→반죽제조(최종 전단계)→1차 발효(30℃, 수분: 80%, 30분)→분할(270g)→중간발효(30분, 상온)→정형 및 패닝→2차발효(30℃, 수분: 80%, 40분)→굽기 : 200℃/180℃(25℃)순으로 진행하였다.

결과로서, 4종 시제품 개발효모에 대한 제빵적용성 평가(식빵 기준)에서, 상용효모 대비 *C. utilis*와 3종 *S.cereviase*류는 제빵 적용성(발효율 및 상품성)에 있어 적합한 것으로 평가되었다( $P<0.01$ ).

나. 개발효모 및 기능성 소재 첨가에 따른 발효특성비교(발효단계별 발효율 비교)

개발효모는 개발효모에 대한 제과/제빵 적용성 평가결과, 제과·제빵 제조용 및 기능성 소재 제조용으로 동시적용이 가능한 효모는 3종효모(*S.cereviase* JKK091002, *S.cereviase* CKK110426, *S.cereviase* OKK110427)였으며 그리고 *C.utilis*는 기능성 소재 제조용으로 적합하였다( $P<0.01$ ). 제과 및 제빵적용성 평가를 거쳐 최종 선정된 4종의 효모류에 대하여 특허(유전자) 확보 절차가 진행 중이다.

기능성 소재는 효모 세포벽 분리시료 첨가시, 제빵발효율은 대조 대비 80%수준이었다. 효모 추출물 소재의 첨가시, *S.cereviase*발효율은 대조대비 110%이상이었으며, *C.utilis*은 98%수준으로 나타나, *S.cereviase*의 경우가 *C.utilis*보다 효모발효율을 증대시키는 것으로 조사되었다( $P<0.01$ ).

효모추출물의 경우, 굽기후 관능평가지 1% 이상 첨가시 우마미 및 짠맛이 다소 높게 나타났다으며, 이때 첨가농도가 높을수록 빵 표면색의 증대(황갈색)에 기여하였다( $P<0.01$ ).

다. 제형별 구분 상업효모 대비 풍미발현 효과 및 인자를 조사하여 보았다.

순수효모는 기본적으로 풍미(특화성)에 미치는 효과는 없었으며, 특화성(풍미 : 카



라멜향)에 관여하는 인자는 유기산(Tartaric acid), Glucose 및 과일발효(유기산 및 Glucose 함유)였다. 압착효모는 최초(상업효모 : 1,986, 개발효모 : 1,689 기준) 대비 3시간 경과시 상업효모는 1.8배, 6시간이 경과시는 1.7배로 나타났으나, 개발효모는 1.7배에서 3.4배로 증가수치를 보였다. 건조효모는 최초(상업효모 : 1,615, 개발효모 : 910 기준) 대비 3시간 경과시 상업효모는 1.6배 1.78배, 6시간이 경과시는 3.5배로 나타났으며, 개발효모 또한 1.71배에서 2.4배로 유의한 증가수치를 보였다. 전체 향기 성분 중 알콜류 점유비율 조사결과, 압착형은 71~약 90%범위를 분말형은 59~82% 범위를 보여 제형에 관계없이 높은 점유율을 보였다. 효모균수 증감 및 시간별 먹이원 이용성과 연계성 평가에서는 동일 연계성을 갖는 것으로 판단되었다.

## 10. 사업성

최종 소비자 기호 충족형 제과제품을 구비하고 국내시장(기능성 제과제품 분야) 런칭 및 산업화 확대와 더불어 개발기술 KNOW-HOW 및 개발 소재의 이용성 다각화(타 식품, 의약품, 가축사양 등)를 통한 점진적 고부가가치 사업화 방향을 점진적으로 설정코져 하였다.

가. 중장기 전략적 사업화 진행 로드맵 설정

- 1단계 : 지적소유권 확보(특허 출원 및 등록)후 학술발표
- 2단계 : 관련기관(식약청, 수과원) 기술컨설팅 실시
- 3단계 : GLP검정(천연물신약 분야 : 천연항균제)
- 4단계 : 선발효모 및 기능성소재 대량생산시스템 및 사업화 로드맵 설정
- 5단계 : 시제품 생산 및 시장 진출 본격화

나. 생산시설 구축 : 연간 효모 및 기능성소재 생산량, 연간예상판매액, 생산시설구축 예산, 소요대지

다. 시설디자인 : 예정(주관기관 승인후)

라. 홍보 및 마케팅실시(종료후 3년 소요예산)

## 11. 결론

가. 제과·제빵용 한국토종효모자원의 개발과 지적소유권은 확보되었다.

나. 선발효모에 대한 대량발효생산기술 정립이 완료되었다.

다. 선발효모에서 기능성 소재의 대량생산시스템 정립은 완료되었다.

라. 개발효모 및 기능성 소재에 대한 사전안전성 및 동물임상 실험을 통한 안전성 및 기초효능 평가는 완료되었다.

마. 개발효모 및 기능성 소재의 제과·제빵 적용성 평가결과 확보 및 이를 토대로 한 제조레시피는 정립되었다.

사. 중장기 전략적 사업화 진행 로드맵(5단계) 설정이 완료되었다.

#### IV. 연구목표 대비 세부 항목별 연구개발성과

##### 1. 연구성과

연구목표	연구성과
<p>1. 제과·제빵용 한국토종효모자원 선발 및 유전자원 확보</p>	<p>1. 유기농 현장(64장소)내 140종의 유기농 시료(과일류, 과채류, 채소류, 버섯류 등)내 효모류 및 유산균류 분리 동정(완료)                      - <i>S.cereviase</i> 효모류 4종, <i>Candida spp</i> 13종, 유산균류는 14종 (<i>Lactococcus spp</i>, <i>Leuconostoc spp</i>, <i>Lactobacillus spp</i>류)                      2. 5종 한국토종효모자원 개발 및 유전자원 확보(완료)                      가. 추가확보 효모 : <i>S.cereviase</i> JKK091006, <i>S.cereviase</i> JKK091002, <i>S.cereviase</i> CKK110426 및 <i>S.cereviase</i> OKK110427, <i>C.utilis</i>                      나. 특허출원 진행중(특허수탁 포함).                      - 동물안전성 평가 종료후 최종출원완료예정(13주중 7주 진행중)                      3. 선행 특허출원진행중(1건, 계속진행중)                      가. 선발완료 효모 : <i>Saccharomyces cerevisiae</i> JKK091006                      나. 유전자 자원 확보 : 특허수탁완료(취득번호 : KCCM11056P)                      다. 지적재산권 확보(특허출원)                      - 발명명칭(출원번호) : 신규 효모 및 그를 이용한 빵의 제조방법 (제10-2009-0134773)</p>
<p>2. 제과용 선발효모 대량배양 및 생산 기법 정립</p>	<p>1. 선발효모류 대량생산형기법 정립(완료)                      가. 대량생산형 배지 및 배양조건 정립                      나. 저가배지 및 배양조건 정립 : 당밀배지                      2. 선발효모 대량배양시스템 정립(완료)                      가. 효모제형별 생산수율 정립                      1) 동결건조분말형(목표 : 5%) : 4~5%(w/w)이상                      2) 압착형 : 16.8~20.8%(수분함유량 : 70~74%, w/w)                      나. 장단기 보관성 및 제빵적용성 평가                      다. 생산시스템 구축계획(스케일별)정립완료                      1) 생산규모 : 1,800톤 /년(건조형 효모기준)                      2) 규모(3단계) : 5톤, 50톤 및 500톤                      3) 생산규모별 경제성 평가 완료                      3. 지적재산권 확보(특허출원, 진행중)                      - 발명명칭(출원번호):제빵용 효모의 대량생산방법 (제10-2011-0029589호. 2011.03.31)</p>
<p>3. 선발효모내 기능성 소재 대량생산 시스템 정립(4단계, 시제 및 시제품 제조실시)</p>	<p>1. 선발효모(Wild-Type) 공통 생산수율 증대형 배지 및 배양조건 정립(완료)                      - 상업효모 대비 개발효모 4종 검정(5L-Jar Fermenter)                      2. 최종 선발효모의 대량생산시스템 정립(완료)                      가. 선발효모(<i>S.cereviase</i> CKK110426) 적용(50L Pilot Test)                      나. 개발효모별 기능성 소재 함유량 조사(완료)                      - 아미노산 조성 및 기초영양성분(총단백질, 조지방, 탄수화물, 회분 및 미네랄 함유량 차이조사)                      3. 선발효모내 기능성 소재 분리기법 예비정립 시험(완료)                      - 10톤 발효조 적용 효모 배양 및 기능성 소재 분리효율 사전 검정                      4. 선발효모내 기능성 소재(세포벽: <math>\beta</math>-Glucan, 효모추출물)대량생산시스템 정립(완료)</p>

	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 10톤 규모 기준 기능성 소재 대량생산시스템 정립</li> <li>5. 제과제빵용 및 기능성 소재 개발용 효모 구분선발(완료) <ul style="list-style-type: none"> <li>- <i>S.cereviase</i> JKK091006, <i>S.cereviase</i> JKK091002, <i>S.cereviase</i> CKK110426 및 <i>S.cereviase</i> OKK110427</li> </ul> </li> <li>6. 기능성 소재 제조용 효모 선발(완료) <ul style="list-style-type: none"> <li>- <i>S.cereviase</i> JKK091006, <i>S.cereviase</i> JKK091002, <i>S.cereviase</i> CKK110426 및 <i>S.cereviase</i> OKK110427, <i>C.utilis</i></li> </ul> </li> </ul>
<p>4. 개발효모 제형화 별 제과·제빵 발 효성 필수조건 정 립</p>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. 건조형 개발효모(선행연구, 완료) <ul style="list-style-type: none"> <li>가. 적용 레시피 : Starter로 적용</li> <li>나. 기본균수 : <math>1.5 \times 10^{10}</math> cfu/g 이상</li> <li>다. 보관성 : 1년(냉장조건 기준)</li> </ul> </li> <li>2. 압착효모 개발효모(선행연구, 완료) <ul style="list-style-type: none"> <li>가. 적용 레시피 : 제빵제조용</li> <li>나. 발효율 확보형 효모균수 정립 : <math>1.5 \times 10^{10}</math> cfu/g 이상</li> <li>다. 보관성 : 1개월(냉장조건기준)</li> </ul> </li> <li>3. 효모제형별 레시피 정립(선행연구, 완료) <ul style="list-style-type: none"> <li>가. 안정성(유화제) 및 적용편리성(부형제) 부여</li> <li>나. 보관온도(상온 및 냉장) 및 장단기(0일, 30일, 1년)안정성 평가</li> </ul> </li> </ol>
<p>5. 대량생산 기능성 소재별 물리/이화 학적 특성평가(제 품적용성 사전평 가</p>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. 개발효모별 기능성 소재내 기초영양성분 함유량 조사(완료) <ul style="list-style-type: none"> <li>- 아미노산 조성 및 기초영양성분(총단백질, 조지방, 탄수화물, 회분 및 미네랄 함유량 차이조사)</li> </ul> </li> <li>2. 효모추출물내 기능성소재 함유량 조사(완료) <ul style="list-style-type: none"> <li>- 핵산류 조사 : UPM, GMP, AMP, CMP 4종 함유(총함유량: 25%)</li> </ul> </li> <li>3. 효모추출물 분자량(FPLC, 대조 : 상용 효모추출물) 조사(완료) <ul style="list-style-type: none"> <li>- 90%이상 분자량 동등성 확보</li> </ul> </li> <li>4. 개발 기능성 소재의 열안전성(고형상 및 액상구분) 평가(완료) <ul style="list-style-type: none"> <li>가. 효모추출물 : 90℃이상에서 열변성 발생</li> <li>나. 효모세포벽 : 열안전성 확보</li> <li>다. 핵산류 : 70℃이상에서 분자량 변화 발생</li> </ul> </li> <li>5. 효모추출 핵산류(복합핵산류)의 장단기 보관안전(정)성 평가(완료) <ul style="list-style-type: none"> <li>가. 상온보관조건에서 시간경과시 분자량 변화 발생</li> <li>나. 제품보관조건 : 고형상 보관 및 액상화시 즉시 사용원칙 준수</li> </ul> </li> <li>6. 효모분리 단일 및 복합핵산류에 대한 미네랄 간섭효과(킬레이팅) 평가 <ul style="list-style-type: none"> <li>가. 핵산류는 미네랄과 킬레이팅 능력보유(불용성화)</li> <li>나. 핵산류별 킬레이팅(칼슘) 효과 평가 결과 <ul style="list-style-type: none"> <li>-AMP(81.5%)&gt;GMP(74%)&gt;IMP(70%)&gt;혼합(3.6%)&gt;CMP(1.2%)순</li> </ul> </li> </ul> </li> </ol>
<p>6. 개발 기능성 소재 별 제과·제빵 적 용성 평가</p>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. 기능성 소재별 제과·제빵 제조 레시피내 첨가농도 정립(완료) <ul style="list-style-type: none"> <li>가.(세포벽) <math>\beta</math>-Glucan : 5% 이내</li> <li>나. 효모추출물 및 핵산류 : 1% 이내</li> </ul> </li> <li>2. 기능성 소재 첨가형 제과·제빵 제조레시피 구분 정립(완료) <ul style="list-style-type: none"> <li>가. 기본레시피(프랑스빵 기준) : 재료정량[강력분 1,000g+물 600g+압착효모 50g(분말효모 25g)+소금 : 18g+기능성소재(세포벽 : 10g, 효모추출물: 5g, 핵산 1g ]-&gt;반죽제조(최종 전단계)-&gt; 1차 발효(30℃, 수분: 80%, 30분)-&gt;분할( 270g)-&gt; 중간발효(30분, 상온)-&gt;정형(로드형 및 원형) 및 패닝-&gt; 2차발효(30℃, 수분: 80%, 40분)-&gt; 굽기 : 200℃/180℃(25℃)</li> <li>나. 제조레시피 구분 정립 <ul style="list-style-type: none"> <li>1) 단일 기능성소재 첨가형(밀가루 대비) : 0.1%~1%(w/w)</li> </ul> </li> </ul> </li> </ol>

	<p>2) 개발효모 및 기능성 소재 동시 첨가형</p> <p>3. 기능성 소재 첨가에 따른 물리/이화학적 특성 평가(완료)  가. 단계별 발효율: 초기, 1차, 중간, 2차 및 굽기후  나. 관능평가(굽기후) : 색상, 식감, 짠맛, 효모취, 미원취</p>
7. 개발효모 제형별 제빵제조 레시피 정립	<p>1. 상업효모 대비 개발효모류별 발효특성비교(완료)  - 제빵류 :24종, 제과류 24종 적용후 최종 프랑스빵 선발</p> <p>2. 상업효모 대비 장단기 보관(상온 및 냉장)시 제형별 개발효모(분말형, 압착형)의 발효특성평가  가. 보관일수 : 압착형(30일 이내), 분말형(1년 이내)  나. 적용성 평가 : 제빵제과용(압착효모), 분말형(Starter)</p> <p>3. 제형별(압착형, 분말형) 제빵제조 레시피 구분 정립(완료)  - 기본레시피(프랑스빵 기준) : 재료정량[강력분 1,000g+물 600g+압착효모 50g(분말효모 25g)+소금 : 18g]-&gt;반죽제조(최종 전단계)-&gt; 1차 발효(30℃, 수분: 80%, 30분)-&gt;분할( 270g)-&gt; 중간발효(30분, 상온)-&gt;정형(로드형 및 원형) 및 패닝-&gt; 2차발효(30℃, 수분: 80%, 40분)-&gt; 굽기 : 200℃/180℃(25℃)</p> <p>4. 상업효모 대비 개발효모 동일 적용레시피 정립(완료)</p> <p>5. 제형별 제빵제조 관련 물리/이화학/생물학적 메카니즘 구명(완료)</p>
8. 특화성(풍미)부여 제빵제조레시피 정립	<p>1. 상업효모 대비 개발효모별 발효특성 및 특화성(풍미) 평가(완료)</p> <p>2. 효모기원성 풍미인자 구명완료(선행연구, 완료)  -풍미발현인자 : 유기산,</p> <p>3. 풍미발현 물리/이화학/생물학적 메카니즘 구명(완료)</p> <p>4. 풍미발현형 제빵제조 레시피 정립(완료)</p>
9. 개발 기능성 소재의 사전안전성 및 동물임상 평가	<p>1. 개발기능성 소재 사전안전성 (<i>in vitro</i>) 평가(완료)  가. 표준세포주(RAW 264.7 cell)  나. 검증법 정립 : NO, MTT assay  다. 동물검정시 기능성소재 첨가농도 평가 : 0.1%~10%</p> <p>2. 동물임상 평가(완료)  가. 동물검정용 기능성 소재 함유 사료레시피 설정 및 제조  나) 장단기(4주, 8주, 13주) 섭이시 안전성 평가(완료)  1) 일정별 사료섭취량 및 일일성장 결과 측정  2) 병리/혈액 조성, 생체중 및 기관별(간,신장,지라,심장,허파,척추,대퇴골)무게변화 및 조직병리 검사(완료)  3)혈액안전성 지표 조사(혈액조성 : 4종, 지표 : 14종)완료  4)적출기관별 및 분변내 미네랄(Ca, Fe, Zn, Cu, Mn, Mg, P, S)배설량 조사 및 대퇴골내 염색체 이상 조사</p> <p>3.장내 미생물 우점변화(총균수, 대장균구, 유산균구로 구분)비교조사(완료)</p>
10. 사업화	<p>1. 사업화 진행 로드맵 설정  가. 1단계 : 지적소유권 확보(특허 출원 및 등록)후 학술발표  나. 2단계 : 관련기관(식약청, 수과원) 기술컨설팅 실시  다. 3단계 : GLP검정(천연물신약 분야 : 천연항균제)  라. 4단계:선발효모 및 기능성소재 대량생산시스템 사업화 로드맵 설정  1) 연간 효모 및 기능성 소재 생산량, 연간예상판매액, 생산시설구축 예정예산, 소요대지  2) 시설디자인 예정(주관기관 승인후)</p> <p>2. 홍보 및 마케팅실시(종료후 3년 소요예상)</p>

## 2. 연구성과 활용실적 및 계획

핵심연구결과	연구성과활용계획
1. 한국토종자원 효모확보 결과	가. 토종효모 확보와 자원화를 통한 제빵/제과 사업화에서 국제 우위성 확보기대 나. 효모균의 탐구 기초기술 확보와 지속적인 유용균 선발에 활용가능하다. 종속된 다국적사 효모균에 의한 국내제빵산업 기술발전 저해요인 해소
2. 개발효모 대 량생산기법 정 립결과	가. 친환경 유기농 제빵제과 원료의 국내조달로서, 관련산업 수익창출 기여 나. 국내 효모자원의 대량생산 및 경쟁력 확보를 통한 수입효모 대체기대
3. 기능성소재 대량생산시스템 정립기술	가. 개발가능성 소재 자사이용->시장성 평가->레시피의 관련산업 공여(소재+레시피 병용 매출극대화 나. 기능성 소재 함유 제과/제빵 사업화 및 응용성 극대화(용도용법 창출) - 제과/제빵 사업->관련식품사업 확대->고부가 기능성 식품개발
4. 개발효모 제형 화별 적용레시 피 정립 결과	가. 기존 제빵제과업계의 제빵제과 기술의 진보에 기여 가능 나. 미잉여 유기농 농업현장 유익균의 산업응용성 확대 방안 제시 다. 제빵 특화성(풍미 및 식감 등) 신규부여 KNOW-HOW 국내 제빵산업 특성화 방향
5. 용도용법 확 대	개발 및 시제품 생산과 배합비율 등의 제조기법 KNOW-HOW를 응용하여 용도용법 확대형 제품개발에 적극 활용
6. 동물임상결과 활용	소재의 동물 및 인체임상실험결과(GLP기관 기준, MSDS자료 확보: 2건이상 예정)를 활용하여, 마케팅 능력지원과 응용제품 개발시 사전 메카니즘 파악에 적극 활용
7. 사업화(매출 극대화)	국가 과제의 수행이라는 장점을 살려 국내외 영업에서 기술 및 품질 우위성을 무기로 하여 이를 최대로 활용



# SUMMARY

## I. Title

Discovering Yeast native to Korea for functional confectionery Material and Commercializing

## II. Objective and Significance

### 1. The object of research and development

The object of research and development of this project is written as follows.

- A. Selecting Korean native yeast resource for baking(Project No. IPET 109115-2 related) and maximizing application of yeast resource according to establishing the mass production system(making as baking material)
- B. Founding the method of researching functional material for baking(cell-wall material, extract material) · selecting and developing
- C. Check for safety and effect(immunity, toxicity, nutritional contents) through clinical experiment by selected functional material(standard cell strain and animal)
- D. Manufacturing and commercializing(transferring the technology of related company) of final developed functional material(securing baking recipe)

### 2. The object of research and development

It is needed to establish the way and system about the combined research and development which are relating the fragmentary research and development part of the current dairy industry and baking industry to industrialization. And a solution is needed to solve the growth hindering element of domestic and foreign baking industry which is derived from agricultural resource(subordinated to international company), long-term use of uniformized commercialized yeast(exclusively produced by a few company including Lesaffre in France) and following customers' taste. The overall alternative and the development of related research that are the base protecting and promoting of dairy, agriculture and baking industry as well as contribution to solving the supply imbalance of surplus milk which is the current Korean dairy industry's prominent problem are required. Therefore, the research development about the comprehensive research development(dairy, baking, agriculture and microbe) for creating a high valued product that is devoted to the field error solving through application of

domestic unused resources and consumer's palability is urgent. This research chose the applicability of the fragmentary research and development part of dairy and baking industry as an important part because when it is related to industrialization, the development of Korean native yeast resource in a research sense and moreover the application of functional material is the core technology. As an object, develop agricultural resource(securing domestic organic agriculture product) and surplus domestic milk resource(milk, butter and cream etc) into technological superior valued material and product, solving domestic and foreign baking industry's food development hindering elements including the uniformized commercial yeast monopolized by a few companies in the world using native yeast fungus and functional material. As a method, offering a mass production method of Korean native yeast source which has the organic farm-product derived baking applying excellence and the yeast and functional material products produced through that, we founded recipe for making breads which is different from existing commercial yeast in flavor and taste containing functional material, and planned to suggest the method to activate the domestic baking industry and solve the imbalance problem of surplus milk supplement of dairy and agricultural industry. Ultimately, It is possible to solve the supply imbalance of surplus crude oil which is the source of trouble of dairy and farming industry, and it aims to suggest the reinforcement of price competitiveness and the overall root protecting and postering the dairy, agriculture and baking industry as a comprehensive alternative.

### **3. Necessity of research and development**

As a result of constant field visiting research for grasping information and securing data about constant international research and development direction(2009~2012) of baking related to this project, the major characteristic is that the food part application material is firstly applied to baking part when developed regardless of country. This is because of the characteristic of business world to which consumption of rapid application product follows. Following above, the importance of usability and the development of the project related yeast is perceived enough, currently, it tends to show the self-culturing(yeast making by atypical method) and small quantity product producing and consuming(2~5 times as much as same general products) as the systematized research subtitle in domestic and foreign. It is investigated that the research, development and



commercialization(Application to the baking material as the top priority) that is related to the functional material usability which yeast retains is rapidly progressed over just usability of yeast itself(for simple baking).

-Basis(research subject nations and companies) : Korea(visited 2009~1012 food exposition and 6 companies). Japan(visited 2009~2011 food exposition, 10 companies), 3 from Europe[2011 visited Europe bread exposition, France(10 companies), Switzerland(12 companies), 5 companies in Germany]

This research and development is judged as an important means for securing the priority of competitive in domestic baking field. Thus, this research can be said important on national industry protection because of the consistent relation from the securing Korean native yeast resource that can replace the commercial yeast in baking field to using it to development of functional material development and baking field for creating high value. Currently, as a baking material using yeast as resource, extract powder and Gluco-Mannan can be used, and in the case of double Gluco-Mannan, retail price is 1.25 million won/kg, and yeast extract(extract powder) is settled as 50,000won~60,000 won/kg and it is considered as at the beginning stage of commercialization in the related industry in domestic and foreign. Also, when relating the result of research to industry, Japan and France is expected as main competition target country. The difference that this research theme tried to secure was same as follows. That is, for baking, the current commercial yeast simply use the swelling phenomenon of bread using the generation of the yeast's CO<sub>2</sub>. The difference of this project from the current yeast is that this project can make the dropsical useful yeast existing in Korean organic agricultural products as domestic gene resources and relate the yeast to the development of the speciality(natural and flavor etc.) they retain and functional resource. Moreover, the yeast can be thoroughly mingled and related to the baking and related industry.

### **III. The Results of Research and Development**

#### **1. Development of Korean native yeast resource for baking and application to baking(Result of preceding research)**

The whole research was conducted connecting the KNOW-HOW secured through the result of discovering Korean native yeast and the industrialization related preceding research of the yeast(Project No :

109115-02, IPET), and the technology secured by preceding research can be summarized as follows.

A. Finished the selecting Korean native yeast for baking in the organic farming spot(fruit type) and securing genes

- Patent application No.(10-2009-0134773) : A baking preparation method for using Korean native yeast. (2009), Secure cell line(patent): *Saccharomyces cerevisiae* JKK091002(patent consignment No. : KCCM 11056P)

B. Finished the culture medium construction and culturing condition for mass production of selected yeast(based on frozen powder type yeast : production yield 5%), founding a mass production system(compressed yeast : 7,000 ton/year, based on frozen powder type yeast : production efficiency 5%) and industrialization related ROADMAP

C. Now on the point of founding the making technique(recipe) of the development natural yeast applied specialized bread and commercialization of it

## **2. Replace commercial yeast with obtain Korean native Baker's yeast. (Obtain of genetic resources)**

For additional selecting Korean native yeast resource and securing gene resource related to the result of preceding research, we separated and froze the yeast type and lactobacillus type after gathering 140 kinds of organic samples(fruit type, fruit-vegetable type, vegetable type, mushroom type etc.) from 62 organic spots. For the Korean native Baker's yeast selection, we established on culture medium and culture condition for yeast isolation. it was used 5% sucrose solution and than inoculation of the organic agricultural product outer layer of skin and tried culture(temperature : 30°C, humidity : 50 %) for three days. For yeast isolation, we tried culture of different time point culture medium with TSA, PDA and BCP nutrient agar medium. afterward confirmation colony of morphology to naked eye and microscope and than tried 3 times yeast isolation. Identification of yeast isolation was finished to use 1st API systeme, 2ed Vitek analysis systeme and 3rd Diversilab systeme. The finished whole process after commit to Macrogen

company(Korea). MacroGen was tried to Identification of Gene cloning and confirmed genetic homology 99% through Chromatogram and Sequencing results comparison. As a result, The yeast which separated under organic agricultural product. we give a name to *S.cereviase* JKK091006 *S.cereviase* JKK091002, *S.cereviase* CKK110426 and *S.cereviase* OKK110427.

### 3. Established of production technique large development yeast.

We established on culture medium and culture condition and to be able to production system of maximize yeast productivity(growth and development elevation) and profitability for essential condition for economic production of natural derivation selection yeast. The established on essential items, the salt and alcohol tolerance strain selection, pre-treatment process design of selection culture medium raw materials, method design of high density culture , established optimization of compression yeast cultivation method and productive system construction by scale. Baker's yeast Productive fermentation technology and Product technology development results are as follows.

#### A. The selection of salt and alcohol tolerance strain

We confirm limit growing point as we culture it at 30 degrees, 200 rpm for one or two days as inoculation the *Saccharomyces cerevisiae* JKK091006 which cultured previously it to the PDB broth which NaCl 1~10% was included culture medium and we would raise salt density by steps, and we gave salt tolerance from this time. also we gave alcohol tolerance in ways to be similar too. and than stock of selection strain

#### B. Pre-treatment process design of culture medium raw materials.

We analyzed growing pattern of yeast at fermentation tanks as we diluted suitably syrup(The Philippines, a sunflower organic farming) as we added ammonia(28%), phosphoric acid(85%), other mineral. also, we added the mineral which was additional so that I used an ICP analyzer, and the nutritious component which Baker's yeast needed can be contained a syrup underwear mineral component.

#### C. Designs and optimization of High density culture method

We used intermediate feeding strategy, constant feeding strategy for optimization production of pre-treatment optimization of syrup and natural

derivation yeast and we developed a productive method to be most suitable in order to raise growing pattern expansion of yeast through method to increase a feeding speed etc. according to fed-batch optimization, other yeast growing.

D. Production and manufactures established of High-yield compression yeast

Generally, we consider it about the merits and demerits that can occur from commercialization yeast, and then we tried to method to be able to accomplish in laboratory levels. thereafter we confirmation can applicability made bread. Showed to high density total cell count. such as culture medium was  $2.5 \times 10^9$ CFU/ml and compression yeast was  $1.15 \times 10^{10}$ CFU/g.

The productive yield certification results of develop culture medium a product, showed high productive efficiency such as 5.4% of freeze-dried yeast and 18% of compression yeast. We was established on develop a product of productive yeast classified it to dry and compression type.

E. Profitability obtain of productive construction system

We finished economy evaluation As constructions of productive system a profitability obtain and then classified it to 1,800 ton of Annual productive scale and Productive scale step was 5, 50, and 500ton.

**4. Founding the mass production system of selected yeast for baking and functional material(4 phases)**

This research utilized the advanced research result and consigned to Amicogen, Inc. which retains the culture facility and the related expertise of lactobacillus type and yeast germs. Then, this project made the trial and start product as well as establish the mass production system of selected yeast and functional material by dividing them into 4 phases.

A. Founding the selected yeast(Wild-Type) production yield increasing type

culture medium and culturing condition(phase 1). By fulfilling the fermentation(5L jar fermenter) in the condition of culture medium and culturing(syrup culture medium) settled in advance targeting the 4 types of selected yeast and standard yeast(advance research), this project planned to confirm the optimized yeast selection and the condition for culture medium and culturing indicating the target production yield(based on freeze dried

powder yeast : 5%). The result is as same as follows. As the result of the investigation of the compressed yeast (based on the 70% of moisture) production yield and the number of yeast germs per development yeast compared to fermented liquid, *S.cereviase* JKK091002 showed 20.8%, *S.cereviase* OKK110422 showed 19.4%, *S.cereviase* CKK111111 showed 16.8% and in the case of *C.utilis*, it showed the highest production yield as 35%. Compared the production efficiency after the freeze dry per selected yeast based on the fermented liquid. In the whold experiment area, it showed the production yield in 4%~5% range(based on the freeze yeast powder), and it showed the same suitability in the corrected condition of the culture medium and culturing( $P<0.05$ ).

#### B. Founding the mass production system of final selected yeast(phase 2)

Based on the result of the first certification, we selected *C.utilis* which showed more than 5% of production yield and *S.cereviase* CKK110426 which showed the best fermentation ability in baking applicability assessment, and certificated the commercial productivity in the middle-sized pilot scale(50L fermentaer) before the mass production system application. As a result, we confirmed the possibility of the mass production of selected yeast type showing more than 5% (based on the freeze dry)of the productivity in the same culture medium and the culturing condition.

#### C. Reserve founding the division technique of functional material in selected yeast(phase 3)

Based on the certification result in phase 1~2, targeting the yeast produced by the application of actual 10 tons of large fermentation production system, we certificated the productivity of yeast extract and cell-wall graduated material showing the maximum transference by autolysis(insert of protein decomposing yeast) of the smashed yeast and unsmashed yeast by cell smashing machine. As a result, it is confirmed that the production efficiency of yeast extract and cell graduation material is better when applying unsmashed yeast.

#### D. Founding the mass production system of functional material(cell-wall and extract) in selected yeast(phase 4)

Based on the result of phase 1~3, this project founded the mass production system of yeast extract powder and cell-wall graduation material.

## 5. Characteristic investigation of the development yeast manufacturing

- A. The Different type of development yeast(dry or compression type) storage evaluation results by different period and temperature are as follows.
- B. The Effective storage validity evaluation results showed that dry and compression yeast was under cold storage condition in 1 year or 1 month.
- C. Numerical change of yeast: keep it on 1 month was showed the decrease of total cell number results until the maximum 20% without reference to storage temperature or type.
- D. Change of state : As time passed and than occurred mold, browning reaction and a nasty smell(excepte of dry yeast).
- E Investigation of the containing amount of functional material per development yeast

### 1) Amino acid making

We compared the amino acid composition(based on the 18 items of essential amino acid ) of the 5 types of development yeast(*S.cereviase* JKK091002, *S.cereviase*CKK110426, *S.cereviase*OKK110427 and *C.utilis*) compared to commercial yeast. As a result of comparison the whold amino acid content to commercial yeast(14.1%), it showed the difference that about 11% in the case of *S.cereviase* in the development yeast type, and 7.68% in *C.utilis*( $P < 0.05$ ).

### 2) Investigation of the fundamental nutrient(total protein, crude fat, carbohydrate, ash and mineral content etc.)

Though the numerical difference of total protein, crude fat, carbohydrate and ash compared to commercial yeast was not accepted, as a result of the analysis of mineral(8 items : Ca, P, Mg, Fe, Zn, S, Se, Mn), generally *C.utilis*(based on 1) showed higher content of Mineral than *S.cereviase*.(Calcium : 26 times, P : 3.3 times, Mg : 3.2 times, Fe : 6.4 times, Zn : 4.2 times, S : 1.3 times, Se : undetected, Mn : undetected).

Generally, the mineral numerica value of development yeast showed higher than commercial yeast in the comparison in *S.cereviase* sample, it is considered as the trait of the division yeast germs in wildlife( $P < 0.05$ ).

That is, based on the calcium, the content difference is accepted as in the case of commercial yeast(Calcium content : 47ppm), *S.cereviase*JKK091002

showed 170ppm, *S.cereviase*CKK110426 showed 497ppm, and *S.cereviase*OKK110427 showed 812ppm, it showed similar pattern in total mineral.

## 6. Advanced assessment of the characteristic and product applicability of each mass production functional material

### A. Comparison investigation of the nucleic acid content

After the RNAase process of the yeast extract liquid that extracted from selected yeast, the nucleic acid type that is the functional material except for yeast extract contained 4 types(GMP, CMP, AMP, UMP), total nucleic acid showed the 20%~25% ranged content and the content ranged about 5% per the type of nucleic acid.

### B. Investigation of the yeast extract molecular weight range

We tested the purity and the characteristic by comparing the water-soluble yeast extract among the mass production possible functional material in selected yeast(*S.cereviase* CKK110426) to the common yeast extract(contrast) and molecular weight(FPLC analysis System).

As a result, it retained the property of matter having more than 90% of same molecular weight range in contrast and comparison, and it was water-soluble ingredient. The reason why it showed the difference of molecular weight within 10% is judged as the difference of the type of extract yeast and the extract method.

### C. Fundamental nutrient investigation(total protein, crude fat, carbohydrate, ash etc.)

The numerical difference of the total protein, crude fat, carbohydrate, ash of the functional material type( $\beta$ -Glucan, yeast extract) compared to *S.cereviase*OKK110427 was not accepted. However, we compared and analyzed the mineral type(12 items : Ca, Fe, Zn, Cu, Se, P, Mn, Mg, Pb, Cd, As, Cr). Based on the calcium content, the total mineral content of the cell-wall( $\beta$ -Glucan) separated from yeast seemed slight. However, the total mineral figure in yeast extract showed similar figure as 1.08~1.27 times as *S.cereviase*OKK110427(1,136ppm, based on 1). But the extra mineral content generally decreased(P<0.01).

#### D. Heat-safety assessment (dividing liquid and powder type)

##### 1) Yeast extract

We planned to forecast the safety and stability during application for cookie/breadbaking according to the heat safety certification result after separating the liquid(2%, w/w) and powder type per dividing functional material(cell-wall :  $\beta$ -Glucan, extract containing nucleic acid) compared to organic farm field selecting yeast(*S.cerevisiae* CKK110426). As a result, in the case of powder type, yeast extract except for  $\beta$ -Glucan induced the property change(maillard browning) after the high temperature. it is proportional to the temperature processing. However, liquid type showed no property change(maillard browning) and molecular weight change. Therefore, the liquid type process is accepted as more effective method for application than solid type.

##### 2) Nucleic-acid type

When did the RNAase processing of the yeast extract from selected yeast, the nucleic type that is the functional material except for yeast extract contained the 4 types(GMP, CMP, AMP, UMP). Therefore, for the amplifying the baking application and the use of the functional material, we implemented the heat-safety certification in solid and liquid(2%, w/w) state. As a result, the solid and liquid type showed the property change(maillard browning) as the nucleic acid type original molecular structure is destroyed in more than 70°C of high fever, it increased proportionally to temperature.

#### E. The safety assessment of the yeast extract nucleic acid type(complex nucleic acid type) for long-and short-term storage(32 days, store in room temperature, liquid type)

The nucleic acid type in selected yeast and common yeast extract contains about types(CMP, UMP, GMP, AMP). Therefore, when storing the 5 types of nucleic acid type Mixer liquid written above based on the standard screen for long term(32 days, in room temperature, making 1% complex liquid per the type of nucleic acid), we planned to predict the safety and stability of effect based on the safety assessment(FPLC) when applied to product. As a result, the change of molecular weight was observed as change to low molecule according to long term storage in liquid type condition, it is judged that the nucleic type should be stored as the powder type, and be used as soon as possible when applied as



liquid type.

#### F. Assessment of mineral interfering effect(chelating) in yeast separating sole and complex nucleic acid type

The selected yeast and common yeast nucleic acid in extract contained about 4 types(CMP, UMP, CMP, AMP), these nucleic acid type chemical structure contains the common structure which has the ribose 1 molecule and specific amino acid and P. And P of these is predicted to contain the chelating ability with mineral type, therefore we made each 5 types of complex nucleic acid type making liquid(2%, w/w) and sole nucleic acid type making liquid(2%, w/w) that the IMP is added just targeting Calcium( $\text{CaCl}_2$ ), and then compared and certificated each of these in the heat-processed condition and un heated condition. The result is same as follows.

1) Complex nucleic acid type : After finishing the reaction to calcium chelating, the production yield(insolubilized precipitate freeze drying) was very low as within 5%, the gelation reaction was evoked because of the nucleic acid type and calcium or ion reaction in the same grade liquid after the heat processing.

2) In the result of the each certification(the result of the ICP analysis of insoluble nucleic acid type) of only sole nucleic acid type to confirm the result of the complex nucleic acid type, it showed the difference of the chelating ability to calcium in the order of AMP (81.5%) > GMP(74%) > IMP(70%) > 혼합(3.6%) > CMP(1.2%). Later, the careful certification of chelating reaction per mineral to each nucleic acid type is judged as necessary.

### 7. Advanced safety test of the development functional material

We finished the advanced founding of the safety test technique using Sialic acid which was donated by the Co. Maeil dairy industry central laboratory (purity : 98%), as the barometer for the advanced test of the wide safety spectrum per the selected yeast origin functional material, concentration. Moreover, we tested the advanced safety for selecting the optimum concentration range through the MTT, NO examination using the RAW264.7 (macrophage cell) cell mainly for the 5 types of nucleic acid which are contained in the yeast extract and inside of it as the selected yeast originated functional material. For this, Set the nucleic acid

type (5 types : GMP, UMP, CMP, AMP, IMP) with same amount of the content in yeast extract as the sole (AMP, IMP) and complex nucleic acid type (GMP+UMP+CMP) handling category, and planned to predict the basic function assessment relating the anti-inflammation index (NO) and toxicity index (MTT) investigation result when processing per concentration (No treated, 0.5%~1.0%, w/w) The result is same as follows.

- A. The growth acceleration of the cell (MTT) along with the antiinflammatory effect (NO) of IMP of the nucleic acid type after the process of more than 0.5% was accepted simultaneously, and APM was confirmed that it is effective to cell growth than antiinflammatory effect in the concentration of more than 0.5% ( $P < 0.01$ ).
- B. When it comes to the barometer cell strain of the functional material type, the toxicity induce (MTT) related concentration range was 0.5%~2% and the concentration which showed the antiinflammatory (NO) effect was 0.5%~10%.
  - 1) Among the cell toxicity (MTT) inducing material and concentration, UMP and CMP was the highest as 0.5%, the second is yeast extraction, AMP and IMP process group, and commonly 0.75%. The 5 types of the mixed nucleic acid type processed group was 1% and GMP processed group showed the toxicity when added the concentration of more than 2%.
  - 2) The significance of the antiinflammatory (NO) effect was accepted after the concentration process of 0.5% in the case of the yeast extract, 2% in GMP process group and more than 10% in CMP process group, and extra material was not accepted ( $P < 0.05$ ).
- C. Overall, the case of the yeast extract was confirmed as the best material and it was finally confirmed that the safety was secured the complex functionality such as the decline of the antiinflammation when the additional concentration was ranged from 0.5% to 1%, 1~2% as the 5 types of mixed nucleic acid processed group, more than 2% in GMP and more than 10% of concentration in CMP .

Based on the result written above, we set the optimum concentration as 0.5%~1% to certificate the aimed effect (security) during the assessment of animal clinical experiment and baking applicability.

## **8. Animal clinic test (Safety and basic functional test)**

- A. Making feed for animal clinic based on the MIC set

- 1) The overall composition for safety test through the functional material animal clinic test : the control group using AIN-76A as basic feed, 2 comparison groups(5 types of mixed nucleic acid, Yeast NT) and 2 experiment groups( $\beta$ -Glucan, Aromild), each concentration was mixed and constructed as 1%(L;low), 5%(M;Medium) and 10%(H;High)( $\beta$ -Glucan was constructed as 0.1%,0.5% and 1%)
- 2) The feed recipe of overall experiment group composed with 2 comparison groups(5 types of mixed nucleic acid, Yeast NT) and 2 experiment groups( $\beta$ -Glucan, Aromild), and each concentration was mixed and constructed as 1%(L;low), 5%(M;Medium) and 10%(H;High)( $\beta$ -Glucan was constructed as 0.1%,0.5% and 1%), using AIN-76A as the basic feed. Comparison group was added the nucleic acid to the basic feed, analyzing the nucleic acid content of the Aromild(trade name, KOHJIN company in Japan)(CMP 7.1%, UMP 8.9%, GMP 5.3%, IMP 3%, AMP 0.7%) which is the separated and extracted material of *C. utilis*. And we applied Yeast NT(trade name, KOHJIN, Japan) which is the separated and extracted material from *C. utilis* to base feed. Experiment group applied  $\beta$ -Glucan (Co. Oriental, Japan) which is the *S. cerevisiae* separated cell wall and the Aromild(trade name, Japan KOHJIN company) which is separated and extracted from *C. utilis* to the base feed.

B. Animal safety assessment through the long-and short-term eating(totally 8 weeks)

We investigated by the safety test item under the condition of growth and butchery after each 4 weeks, 8 weeks of the experiment animal's free intake of constructed feed. The main test was constructed by 8 items which are feed efficiency(Growth), weight(whole weight and per organs), histopathologic per organs, investigation of blood index and chromosome disorder and whole microbes in intestine by organs and fecal.

1) Investigation of growth rate and intake rate by schedule

There was no difference, when compared the daily growth rate(measured for 8 weeks by 24 hours) to 2 comparison groups(5 types of mixed nucleic acid, Yeast NT) compared to control group(mouse which ate AIN-76A) and 2 experiment groups( $\beta$ -Glucan, Aromild)( $P < 0.01$ ).

2) The change of the total weight and weight per organ

We divided the influence on the weight change of body weight and organs by the term, and compared the 2 control, comparison groups(5 types of mixed nucleic acid, Yeast NT) and 2 experiment groups( $\beta$ -Glucan, Aromild).

As a result, in the whole experiment groups of the body weight and muscular tissue(5 organs : Liver, Kidney, Spleen) and osseous tissue(1 : femur), the difference of the size of spleen in control group(based on the weight 1, 0.009) compared to the comparison and experiment group(0.003~0.006) was accepted regardless of the term and concentration, the weight difference of liver, kidney and thigh bone was not accepted( $P < 0.05$ ).

### 3) Investigation of blood abnormality and the physiochemical index

Based on the safety result related to growth of the functional material, we did additional investigation of the safety result in body through the test of blood forming and chromosome disorder, the risk of infection was judged as possible after 4 weeks through the hematological index because of the decline of the white blood and lymphocyte, however, as a result of the re-measurement after 8 weeks, there was no disorder in immunity homeostasis maintain of the mouse, and the toxicity which has the amount that recover the damaged liver cell in the Yeast NT and nucleic acid was confirmed through the blood physiological index. And we confirmed no abnormality in other main organs and diseases. Also, we reconfirmed that there was no disorder in the chromosome of mouse which ate the functional material through the MN analysis( $P < 0.05$ ).

### 4) Assessment of the whole change of microbes in intestine

We confirmed whether the development functional material induces the whole change of microbes in intestine according to concentration and intake period(4 weeks and 8 weeks) under the aerotropic condition dividing whole numbers of germs(TSA culture medium) and colon bacillus plot(MacConkey culture medium) and lactobacillus(BCP culture medium). As a result, As the mouse grows, observing the distribution of microbes in intestine of the contrasting comparison group and experiment group, though the number of colon bacillus and lactobacillus increases the increase of the distribution of the microbes in intestine of the compare and contrast mouse shows that lactobacillus tends to be more sizable than

the colon bacillus when continuously intaking the functional material, the level is not the matter when it comes to statistics.

Therefore, as a result of the analysis of the distribution of the microbes through the animal clinic test based on the test by functional material, safety per concentration and basic function, we confirmed that the intaking the functional material showed no difference from the compare group even in the concentration of more than 1% when applying to baking product.

#### **5) After intaking the nucleic acid during the animal clinic test**

When 2 days passes after intaking the nucleic acid during the animal clinic test, the sexual violence was shown, therefore it can be predicted that the result would be shown as different from the barometer result. Thus, as confirming the positive or negative body reaction result which follows the intake of nucleic acid type per concentration, we planned to settle the direction of the test of baking applicability to product and related manufacture research based on the result of the experience above.

- A) Started the histological verification extracting the testicles of the compare group and process group(Low, medium, high dosage) which ate just base feed, the spermatgonal which is related to the sperm forming in curly seminiferous tubule and even the sperm cell were all observed in case of the compare group, the sperm forming process in the seminiferous tubule of the experiment group was observed as the interior of the seminiferous tubule seems hollow because the process of the sperm release was superior.
- B) Following the intake of the nucleic acid, this result is judged as the sperm release was put first than the normal feeding activity and the priority would lead to the change of the reproductive behavior. To confirm those result more accurately, the necessity for investigating the sexual-related hormone change pattern more accurately with the additional investigation of time and related hormone came to the fore.

#### **9. The result of the assessment of the baking applicability of development yeast and functional material**

We carried out the baking applicability of the functional material(4 types of Mix necleic acid type) based on the result of the advanced security and functionality by the development functionality material(anti-inflammation

increasing effect, cell toxicity and growth related assessment), and we evaluated the baking applicability by selecting "French bread" as a optimum sample after the reserve applicability assessment of the 24 items of cookiebaking field that the common recipe is well-known and the 24 items of breadbaking.

#### A. Set the cookie/bread making recipe

The result of the final cookie/bread making recipe according to the addition condition and simultaneous addition of the sole development yeast and sole functional material is same as follows(criteria : French bread). Development yeast applied general recipe : required amount of material[strong flour 1,000g + water 600g + compressed yeast 50g(powder yeast 25g) + salt : 18g] → dough making(advanced stage of the final) → the first fermentation(30°C, moisture : 80%, 30 minutes) → division(270g) → intermediate fermentation(30 minutes, room temperature) → patterning(rod-type and circular type) and panning → the second fermentation(30°C, moisture : 80%, 40 minutes) → baking : 200°C/180°C(25°C). Development yeast and functional material simultaneous applied recipe : required amount of material[strong flour 1,000g + water 600g, compressed yeast 50g(powder yeast 25g) + salt : 18g+ each material 50g(5%, w/w)] → dough making(advanced stage of the final) → the first fermentation(30°C, moisture : 80%, 30 minutes) → division(270g) → intermediate fermentation(30 minutes, room temperature) → patterning and panning → the second fermentation(30°C, moisture : 80%, 40 minutes) → baking : 200°C/180°C(25°C). In the baking applicability assessment about the 4 types of trial development yeast(based on plain bread), the 3 types of *S.cereviase* including *C. utilis* are evaluated as suitable to bread application(fermentation percentage and commercializing ability) compared to common yeast(P<0.01).

#### B. Fermentation characteristic comparison according to the addition of development yeast and functional material(Comparison of fermentation percentage by each fermentation phase)

##### 1) Development yeast part

As a result of the baking applicability assessment, the yeasts that can be simultaneously used for making cookie/bread and functional material are 3 types of yeast(*S.cereviase* JKK091002, *S.cereviase* CKK110426, *S.cereviase*

OKK110427) and *C.utilis* is suitable to make functional material ( $P < 0.01$ ). The 4 types of yeast that is finally selected through the baking applicability assessment is on the process of securing patent (gene).

## 2) Functional material part

When added yeast cell-wall separating sample, the fermentation percentage is about 80% of the contrast and comparison. When added the yeast extract material, the fermentation percentage of *S.cereviase* is more than 110% of contrast and comparison, *C.utilis* showed the level of about 98%, therefore the case of *S.cereviase* increases the yeast fermentation percentage than *C.utilis* ( $P < 0.01$ ). In case of yeast extract, umami taste and salty taste was higher when adding more than 1% of extract during the organic assessment after baking, and then the higher the addition concentration the more contributed to increasing of the surface color of bread (light brown ( $P < 0.01$ )).

## D. We tried to investigate other flavor revelation effect for commercial yeast

There wasn't effect that pure yeast was cause to flavors (specialization). Organic acid (Tartaric acid), Glucose and fruit fermentation a factor to participate in to specialization (flavor: caramel). The first (Commercial yeast 1,986, development yeast 1,689) Compression yeast in case of 3 hours process of time. Commercial yeast was appeared with 1.8 fold of 3 hours after and 1.7 fold of 6 hours, but development yeast was showed the increase numerical value rose with 1.7 to 3.4 fold. The first (Commercial yeast 1,615, development yeast 910) Compression yeast in case of 3 hours process of time. Commercial yeast was appeared with 1.6 or 1.78 fold of 3 hours after and 3.5 fold of 6 hours, and development yeast was showed the increase numerical value rose with 1.71 to 2.4 fold. It was the type of alcohol occupation ratio investigation results during total fragrance components. such as dry yeast showed 59–82% range, and compression yeast was 71~ 90% range. It was showed high position regardless of type. Connectivity result of bread fermentation rate, increase or decrease numerical yeast and yeast consumed : It was confirmed same connection.

## 10. Commercialization

Planned to set the gradual high value commercialization direction through purchasing final consumer palability satisfying baking product, launching in

domestic market(functional baking product field) and usability diversification of development technology KNOW-HOW as well as magnifying(other food, medicine and nutrition supplies, stock keeping etc.)

A. Set the strategic commercialization progress road map for mid-and long-term

- phase 1 : Conference after securing patent ownership right(patent application and registration)

- phase 2 : Conduct the technology consulting with related institutions(KFDA, QIA)

- phase 3 : GLP certification(natural new drug field : natural bactericides)

- phase 4 : Set a road map for the mass production of selected yeast and functional material and commercialization

- phase 5 : Producing trial and fully-scaling the market entering

B. Constructing production facility : An output of yeast and functional material per year, expected sales per year, expected budget for production facilities, consumed land

C. Facility design : expected(after the approval of supervising institution)

D. Conducting advertising and marketing(Expecting consuming 3 years after finish)

## 11. Conclusion

A. Development of Korean native Baker's yeast resources Korean substitute commercial yeast and Intellectual Property Right were ensured.

B. Technical fermentation for Baker's yeast production technology development was finished.

C. Finished founding mass production system of functional material from selected yeast

D. Finished assessment of preceding security, security assessment through animal clinical experiment and basic effect assessment about development



yeast and functional material

E. The baking applicability assessment result of development yeast and functional material is secured and the making recipe based on the result.

F. Setting of a middle- and long term strategic commercialization progress roadmap(the 5th stage) is finished.

#### IV. Achievements and contribution to the related fields

##### 1. Achievements

Object of research	Achievement of research
<p>1. Selecting Korean native yeast resource for baking and securing gene resource</p>	<p>1. Separating freezing of yeast type and lactobacillus type in 140 kinds of organic samples (fruit, fruit-vegetable, vegetable, mushroom type) in organic farming field (64 fields)</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- <i>S.cereviase</i> 4 types of yeast, 13 types of <i>Candida spp</i>, 14 types of lactobacillus (<i>Lactococcus spp</i>, <i>Leuconostoc spp</i>, <i>Lactobacillus spp</i> type)</li> </ul> <p>2. Developing 5 types of Korean native yeast resources and Securing gene resource (Finished)</p> <p>A. Additional yeast : <i>S.cereviase</i> JKK091006, <i>S.cereviase</i> JKK091002, <i>S.cereviase</i> CKK110426 및 <i>S.cereviase</i> OKK110427, <i>C.utilis</i></p> <p>B. Patent application in progress (including consignment of patent).</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- Plan for finishing final application after animal safety assessment (in 7th week out of 13 weeks)</li> </ul> <p>3. Advanced patent application is in progress (1, keep progressing)</p> <p>A. selecting finished yeast : <i>Saccharomyces cerevisiae</i> JKK091006</p> <p>B. Securing gene resource : Finished patent consignment (acquisition number : KCCM11056P)</p> <p>C. Securing intellectual property right (patent application)</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- invention name (application number) : New yeast and making recipe for baking using the yeast (NO.10-2009-0134773)</li> </ul>
<p>2. Founding a method for mass culturing producing selected yeast</p>	<p>1. Founding a mass production technique of selected yeast type (Finished)</p> <p>A. Founding mass production type culture medium and culturing condition</p> <p>B. Founding low price culture medium and culturing condition</p> <p>2. Founding selected yeast mass culturing system (finished)</p> <p>A. Founding production yield per yeast dosage form type</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1) frozen and dried powder type (object : 5%) : more than 4~5% (w/w)</li> <li>2) compressed type : 16.8~20.8% (moisture retaining amount : 70~74%, w/w)</li> </ol> <p>B. Assessment of long- and short- term storing ability and baking applicability</p> <p>C. Finished founding production system constructing plan (per scale)</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>1) production scale : 1,800 ton/year (based on dried type yeast)</li> <li>2) scale (3 phase) : 5 ton, 50 ton and 500 ton</li> </ol>

	<p>3) Finished economic assessment per production scale</p> <p>3. Securing intellectual property right(patent application is in progress)</p> <p>– invention name(application number) : Method for mass production of baking yeast(NO. 제10-2011-0029589호. 2011.03.31)</p>
3. Founding mass production system of functional material in selected yeast(4 phases, starting the production of trial manufactured material)	<p>1. Founding selected yeast(Wild-Type) common production yield increasing culture medium and culturing condition(Finished)</p> <p>2. Founding(50L Pilot Test) a mass production system of final selected yeast(<i>S.cereviase</i> CKK110426)</p> <p>3. Test the previous founding of functional material separating technique from selected yeast(finished)</p> <p>4. Founding a mass production system of functional material in selected yeast(cell-wall : <math>\beta</math>-Glucan, yeast extract)</p> <p>5. Dividing and selecting yeast for baking and functional material developing(finished)</p> <p>– <i>S.cereviase</i> JKK091006, <i>S.cereviase</i> JKK091002, <i>S.cereviase</i> CKK110426 and <i>S.cereviase</i> OKK110427</p> <p>6. Selecting yeast for functional material making(finished)</p> <p>– <i>S.cereviase</i> JKK091006, <i>S.cereviase</i> JKK091002, <i>S.cereviase</i> CKK110426 and <i>S.cereviase</i> OKK110427, <i>C.utilis</i></p>
4. Founding the required baking fermentation condition by dosage form )	<p>1. Dried type development yeast(advanced research, finished)</p> <p>A. Applied recipe : applied as Starter</p> <p>B. Basic number of germ : more than <math>1.5 \times 10^{10}</math> cfu/g</p> <p>C. store ability : 1 year(based on refrigerating condition)</p> <p>2. Compressed yeast development yeast(advanced research, finished)</p> <p>A. Application recipe : for baking</p> <p>B. Founding number of yeast germ for fermentation percentage securing type : more than <math>1.5 \times 10^{10}</math> cfu/g</p> <p>C. Store ability : 1 month(based on refrigerating condition)</p> <p>3. Founding recipe per yeast dosage form (advanced research, finished)</p> <p>A. Stability(emulsifier) and application convenient trait(diluting agent) grant</p> <p>B. Assessment storage temperature(room temperature and refrigeration) and long-and short-term(0day, 30 days, 1 year) stability</p>
5. Assessment of physical/physiochemical characteristic per mass producing functional material(Advanced	<p>1. Investigating content of basic nutrient in functional material per development yeast(finished)</p> <p>– Making amino-acid and basic nurient(Difference investigation of the whole protein, crude fat, carbohydrate, ash and mineral content)</p> <p>2. Investigating content of functional material in yeast extract(finished)</p> <p>– Investigating nucleic acid type : UPM, GMP, AMP, CMP 4</p>

<p>assessment of product-applicability)</p>	<p>types containe(whole content : 25%)</p> <ol style="list-style-type: none"> <li>3. yeast extract molecule amount(FPLC, contrast : common yeast extract) investigation(finished) <ul style="list-style-type: none"> <li>- securing parity of more then 90 % of molecule amount</li> </ul> </li> <li>4. Assessment of heat-safety of development functional material(separating solid and liquid)(finished) <ol style="list-style-type: none"> <li>A. yeast extract : thermal denaturalization happened in more than 90°C</li> <li>B. yeast cell-wall : securing heat safety</li> <li>C. nucleic acid type : molecule amount change happened in more than 70°C</li> </ol> </li> <li>5. Assessment of long-and short term storing safety and stability of yeast extracted nucleic acid type(complex nucleic acid type) <ol style="list-style-type: none"> <li>A. As time passed in room temperature, molecule amount changed</li> <li>B. Condition for product storage : immediately obey use principle when storing as solid and liquid type</li> </ol> </li> <li>6. Assessment of mineral intervention effect(chelating) on yeast separated sole and complex nucleic acid <ol style="list-style-type: none"> <li>A. Nucleic acid type retains mineral and chelating ability (insolubilization)</li> <li>B. Result of assessment of chelating(calcium) per nucleic type <ul style="list-style-type: none"> <li>- in the order of AMP (81.5%)&gt;GMP(74%)&gt; IMP(70%)&gt;혼합(3.6%)&gt; CMP(1.2%)</li> </ul> </li> </ol> </li> </ol>
<p>6. Assessment of baking ability per development functional material</p>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Finished founding of addition concentration in baking recipe per the functional material <ol style="list-style-type: none"> <li>A. <math>\beta</math>-Glucan(cell-wall) : within 5%</li> <li>B. Yeast extract and nucleic acid type : within 1%</li> </ol> </li> <li>2. Founding and separating the functional material added type baking recipe(finished) <ol style="list-style-type: none"> <li>A. Fundamental recipe(based on French bread) : material required amount[strong flour 1,000g+water 600g+compressed yeast 50g(powder yeast 25g)+salt : 18g+functional material(cell-wall : 10g, yeast extract : 5g, nucleic 1g] -&gt; dough making(advance stage of final) -&gt; the 1st fermentation(30°C,moisture : 80%,30minutes) -&gt;division(270g) -&gt; intermediate fermentation(30 minutes, room temperature) -&gt; patterning(rod-type and circular type) and panning -&gt; the second fermentation(30°C, moisture : 80%, 40 minutes) -&gt; baking : 200°C/180°C (25°C)</li> <li>B. Separating and founding making recipe <ol style="list-style-type: none"> <li>1) Sole functional material added type(compared to flour) : 0.1%~1~(w/w)</li> <li>2) Development yeast and functional material simultaneously added type</li> </ol> </li> </ol> </li> <li>3. Assessment of physical, physiochemical trait according to</li> </ol>

	<p>functional material addition(finished)</p> <p>A. Phased fermentation percentage : beginning, first, intermediate, second and after baking</p> <p>B. organic assessment(after baking) : color, taste, salty taste, yeast flavor, umami taste.</p>
<p>7. Founding baking recipe per development yeast dosage form type</p>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Comparing fermentation trait per development yeast type compared to commercial yeast(finished) <ul style="list-style-type: none"> <li>- after an application of breadmaking type : 24v and cookiemaking type : 24, selected final French bread</li> </ul> </li> <li>2. Assessment of fermentation trait of development yeast(powder type, compressed type) per dosage form type when storing for long-and short term(room temperature and refrigeration) compared to commercial yeast <ul style="list-style-type: none"> <li>A. Number of storage days : compressed type(within 30 days), powder type (within 1 year)</li> <li>B. Applicability assessment : for baking(compressed yeast), powder type(Starter)</li> </ul> </li> <li>3. Separating and founding baking recipe per dosage form type(compressed type, powder type) (finished) <ul style="list-style-type: none"> <li>- Fundamental recipe(based on French bread) : required amount of material[strong flour 1,000g + water 600g + compressed yeast 50g(powder yeast 25g) + salt : 18g] -&gt; dough making(advanced stage of the final) -&gt; the first fermentation(30°C, moisture : 80%, 30 minutes) -&gt; division(270g) -&gt; intermediate fermentation(30 minutes, room temperature) -&gt; patterning(rod-type and circular type) and panning -&gt; the second fermentation(30°C, moisture : 80%, 40 minutes) -&gt; baking : 200°C/180°C (25°C)</li> </ul> </li> <li>4. Founding same development yeast applied recipe compared to commercial yeast (finished)</li> <li>5. Clearing up the physical/physiochemical/biological mechanism related to baking per dosage form type(finished)</li> </ol>
<p>8. Founding specialization(flavor) given baking recipe</p>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Assessment(finished) of the fermentation trait and specailization(flavor) per development yeast compared to commercial yeast</li> <li>2. Finished clearing up the flavor factor originated from yeast(Advanced research, finished) <ul style="list-style-type: none"> <li>- Flavor revelation factor : organic acid,</li> </ul> </li> <li>3. Clearing up the flavor manifesting physical/physiochemical/biological mechanism(finished)</li> <li>4. Founding flavor revealing type baking recipe(finished)</li> </ol>

<p>9. Assessment of advanced security of development functionality material and animal clinical demonstration</p>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Assessment(finished) of advanced security of development functional material(<i>in vitro</i>) <ol style="list-style-type: none"> <li>A. Standard Cell-line(RAW 264.7 cell)</li> <li>B. Establishing verification law : NO, MTT assay</li> <li>C. Assessment of addition concentration of the functional material during animal qualification : 0.1% ~ 10%</li> </ol> </li> <li>2. Animal clinical demonstration assessment(finished) <ol style="list-style-type: none"> <li>A. Set and making feed recipe containing functional material for animal verification</li> <li>B. Assessment(finished) of feeding security for long-and short term(4 weeks, 8 weeks, 13 weeks) <ol style="list-style-type: none"> <li>1) Measured the amount of feed intake by schedule and result of growth a day</li> <li>2) Making the pathology/blood, body weight and weight change by organ(liver, kidney, spleen, heart, lungs, spine, femur) and histopathological examination(finished)</li> <li>3) Blood security index investigation(blood making : 4 types, index : 14 types) finished</li> <li>4) Chromosome aberrations analyzed with the micronucleus (MN) test</li> <li>5) Confirming(testes) the positive or negative body reaction result which follows the intake of nucleic acid</li> </ol> </li> </ol> </li> <li>3. Comparing investigation(finished) of dominance change(divide into whole number of germs, colon bacillus riding, and lactobacillus riding) of microbes in intestine</li> </ol>
<p>10. commercialization</p>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. Set the road map for commercialization progress <ol style="list-style-type: none"> <li>A. phase 1 : conference after securing intellectual ownership right(patent application and registration)</li> <li>B. phase 2 : Starting the technical consulting of the related institution(KFDA, QIA)</li> <li>C. phase 3 : GLP certification(natural new drug field : natural bactericides)</li> <li>D. phase 4 : Set the mass production system of selected yeast and functional material and a commercialization road map <ol style="list-style-type: none"> <li>1) An output of yeast and functional material per year, expected sales per year, expected budget for production facilities, consumed land</li> <li>2) facility design expectation(after the approval of supervising institution)</li> </ol> </li> </ol> </li> <li>2. Starting advertisement and marketing(Expecting consuming 3 years after finish)</li> </ol>

## 2. Contribution of Achievement and development

The key result of research	Plan for utilizing research achievement
1. The result of securing Korean native yeast resource	<p>A. Expectation of securing the international superiority in baking commercialization through securing native yeast and transforming it into resource</p> <p>B. Possibility of utilizing in securing the yeast fungus researching basic technology and selecting continuous useful fungus</p> <p>C. Solving the obstacle growth to technical developing of the domestic baking industry by subordinate multinational company yeast fungus</p>
2. The result of founding a method for development yeast mass production	<p>A. Contribution to profit creating of related industry, as domestic preparing of eco-friendly organic baking material</p> <p>B. Expecting the replacement effect of imported yeast through securing the mass production of domestic yeast resource and competitiveness</p>
3. The technique of founding a method for functional material	<p>A. Own use of development functional material -&gt;Assessment of marketability -&gt; Giving to related industry of recipe(Maximizing of profit of material+recipe for bottle)</p> <p>B. Commercialization of the baking including functional material and maximizing applicability(creating use)- baking business -&gt; increasing the related food business -&gt; Development of a higher value-added functional food</p>
4. The result of founding the development yeast applied recipe by dosage form	<p>A. Possibility to contribute to progress of the baking skill of the established baking industry</p> <p>B. Suggesting the expanding method of industrial applicability of beneficial fungus in non-surplus organic farming spot</p> <p>C. Way of the baking specializing(taste and favor etc.) newly granted KNOW-HOW domestic baking industry characterization</p>
5. Increasing the way of usage	Active application to use amplifying type product development using making technique KNOW-HOW such as development, production of trial manufactured goods and mixing ratio
6. Application of the animal clinic result	Using the animal and human body clinical experiment result(based on GLP institution, securing MSDS material : expecting more than 2) of material ,actively apply to grasping the advanced mechanism when supporting marketing ability and developing applied products
7. Commercialization	Maximization of the advantage that is the conduct of national project using technique and the superiority of quality in Korean business and foreign business





# CONTENTS

<b>Chapter 1. Introduction</b>	-- 51
<b>Chapter 2. International and domestic trends of the technical development</b>	-- 53
<b>Chapter 3. Results and discussion</b>	-- 56
Section 1. Developing Korean native yeast for baking and application to baking(The result of preceding research)	-- 56
Section 2. Founding the separating method of the yeast germ existing in organic farm product	-- 84
Section 3. Separating and freezing the yeast germ in organig farm product and Securing the gene resource	-- 107
Section 4 Founding the mass production system of development yeast	-- 140
Section 5. Advanced test of the development functional material type product applicability	-- 217
Section 6. Product applicability assessment per development yeast and functional material	-- 239
Section 7. Founding the natural specialized baking recipe	-- 258
Section 8. Advanced safety assessment of the development functional material	-- 342
Section 9. Animal clinic test(functional material)	-- 363
<b>Chapter 4. Achievements and contribution to the related fields</b>	-- 422
Section 1. Achievement of research and development	-- 422
Section 2. Contribution of research and development	-- 425
<b>Chapter 5. Application</b>	-- 426
Section 1. Results of study	-- 426
Section 2. Plans for application	-- 428
<b>Chapter 6. International techniques</b>	-- 430
<b>Chapter 7. References</b>	-- 436



# 목 차

<b>제 1 장 연구개발과제의 개요</b>	-- 51
<b>제 2 장 국내외 기술개발 현황</b>	-- 53
<b>제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과</b>	-- 56
제 1 절. 제빵용 한국토종효모자원 개발 및 제빵제과적용(선행연구결과)	-- 56
제 2 절. 유기농 농산물내 존재하는 효모균 분리법 정립	-- 84
제 3 절. 유기농 농산물내 효모균 분리·동정 및 유전자원확보	-- 107
제 4 절. 개발효모 대향생산시스템 정립	-- 140
제 5 절. 개발 기능성 소재류 제품 적용성 사전 평가	-- 217
제 6 절. 개발효모 및 기능성 소재별 제품 적용성 평가	-- 239
제 7 절. 천연 특화 제과·제빵 레시피 적립	-- 258
제 8 절. 개발 기능성소재의 사전안전성 평가	-- 342
제 9 절. 동물전임상 평가(기능성소재)	-- 363
<b>제 4 장 목표 달성도 및 관련분야에 기여도</b>	-- 422
제 1 절 목표달성도	-- 422
제 2 절 관련분야의 기여도	-- 425
<b>제 5 장 연구개발성과 및 활용계획</b>	-- 426
제 1 절 연구결과 성과	-- 426
제 2 절 연구결과 활용계획	-- 428
<b>제 6 장 연구개발 과정에서 수집한 해외과학 기술정보</b>	-- 430
<b>제 7 장 참고문헌</b>	-- 436



## 제 1 장 연구개발과제의 개요

본 연구는 현재 낙농업(유업계)과 제빵·제과업계의 단편적인 연구개발 부분을 산업화에 관련되게 통합 연구개발에 대한 방안 및 시스템 구축이 필요하다 할 수 있다.

밀가루 등 농업자원(다국적 기업에 종속)과 균일화된 상업효모(프랑스 르샤프사의 세계 몇 개 회사에서 독점생산)의 장기적 사용과 이에 따른 소비자 입맛의 종속으로부터 야기되는 국내외 제빵·제과산업의 발전저해요소를 효모자원의 확보와 대체를 통하여 해결방안 필요하다.

현재 한국 낙농산업의 최대 고민거리인 잉여 원유의 수급불균형 해소기여와 더불어, 낙농, 농업 및 제빵산업 전반의 기반보호와 육성이라는 종합대안과 관련 연구개발 또한 요구받고 있다.

이에 따라 국내 미이용 자원의 활용을 통한 현장애로기술 해결과 소비자 기호성에 충실한 고부가 가치화 제품창출을 위한 종합적 연구개발(낙농, 제빵, 농업 및 미생물)에 관한 연구개발의 필요성이 절실하다 할 수 있다.

본 연구는 낙농업(유업계)과 제빵·제과업계의 단편적인 연구개발 부분을 산업화에 관련되게 통합 연구개발하는 차원에서 한국토착형 효모자원의 개발을 핵심기술로서 주목하고 이의 응용성을 주요항목으로 선택하였다.

목적으로, 농업자원(국산 유기농 농산물 확보)과 잉여 국내산 원유소재(우유, 버터 및 생크림 등)를 이용한 기술우위의 고부가 가치 소재 및 상품으로 개발하되, 세계 몇 개 회사에서 독점 생산하여 사용되는 균일화된 상업효모로 인한 국내외 제빵산업을 포함한 식품발전저해요소를 토착 효모균으로 해결코져, 소비자 기호성에 충실한 제품개발을 종합적으로 연계 실시하였다.

방법으로서, 유기농 농산물에서 분리한 제빵적용성이 우수한 한국토종효모 자원의 대량생산방법 및 기능성 소재 개발과 그를 통해 제조된 효모제품을 제공함으로써, 종래 상업효모와 다른 향미를 가지면서도 식감 등이 우수한 특화성을 갖는 제과 및 제빵의 제조가 가능하게 레시피를 정립하고, 국내 제과 및 제빵산업의 활성화와 낙농업계의 잉여 원유수급 불균형 문제를 해소할 수 있는 방안을 제시하고 저 하였다.

궁극적으로는 낙농산업의 발전의 고민거리인 잉여 원유의 수급불균형 해소가 가능하게 될 것이고, 이는 결국 가격경쟁력 강화와 낙농, 농업 및 제빵·제과사업 전반의 기반보호와 육성이라는 종합 대안으로 제시함에 목적이 있다.

현재 국내외의 제과인은 20만명(4조원 시장)을 넘고 있는데 “제과 및 제빵 연구개발 현황”을 분석하면, 전문 연구개발 인력 및 기관부족에 따라 단순제조 테크닉 단계에 머물러 있다.

이는 가장 필요한 핵심원료인 상업효모(특허등록)가 세계 몇개 회사에서 독점적으로 공급되고 있는 바(건조이스트, 5,000~10,000원/Kg), 이를 사용함에 따라 제조사 및 소비자가 장기적인 적응됨으로서 연구개발의 제한요인이 되어왔음이 주요 이유일 수 있다. 따라서, 유전자원이 확보된 효모균의 선발은 제과제빵 발전의 중요한 연구개발

항목임을 전체적으로 깊이 공감하고 있으나, 특화된 효모균이 개발되었다 하더라도 이를 제빵분야에서 별다른 조치없이 즉시 활용할 수 있는 제품레시피 및 사용방법이 정립되지 않으면 이 역시 사장될 수 있다.

또한, 가장 기본원료인 밀가루(900원/Kg, 원료별 특성보유), 낙농업소재[우유(1,000원/Kg), 버터(8,000원/Kg), 생크림(5,000원/Kg) 등], 낙농미생물(첨가되는 낙농제품) 및 제빵제도시 종합적인 특성까지 고려된 효모균들의 안정된 생산과 장기적 공급에 대한 선행 준비가 필요하다(서, 2000).

선진 낙농국의 원유 및 관련 유제품의 국내 가격경쟁력은 약 1/2~1/3수준임에 따라 농축산물 FTA와 시장개방에 속도에 따라 국내 낙농산업은 비례하여 피해(낙농분야 : 416~594억원)가 증가될 것으로 판단되고, 또한 낙농제품 수출입 현황으로는 '07년 무역적자는 약 2억\$[수출 : 13천톤(42,241천\$), 총수입량 : 72천톤(233,951천\$)]에 달하고 있다.

현재 국내 낙농업 현황으로서, 낙농산업 총생산액('07)은 1조 6천억원이고, 젖소사육두수는 점차 감소하고 있으나 규모화 및 젖소두당 산유량 증가로 원유와 더불어 분유류의 재고량이 동시에 급격히 증가되고 있다.

국내 낙농산업의 주요이슈는, 총체적인 고민거리인 잉여원유('07 기말재고량 : 141천톤)의 안정적인 소비방법을 확보하는 것인데, 생산자는 정부에 전적으로 대책을 의존하고 있으며, 정부 또한 뚜렷한 대안(공급 및 가격관리, 유통 및 품질관리, 소비촉진과 신규 유제품개발)이 없어 결국 국내 낙농산업의 총체적인 피해로 연결되고 있다.

본 연구에서는 상기분석결과를 토대로 현장애로문제를 연계 해결수단으로서 국산효모자원 이용성과 연계되는 선행연구(유기농 농업현장내 과실 및 과일표면 효모분리, 제빵적용평가)를 토대로 국내외 소비자 기호성이 충족되는 “고급브랜드화 천연효모 적용형 특화제빵 개발”이 가능(풍미, 맛, 색깔 등)하다는 결론에 도달하였다.

따라서, 본 연구에서는 이를 위하여 한국 토착형 효모에 대한 유전자원확보, 상업효모대체가 가능할 수 있는 개발 효모의 대량생산시스템 정립 및 기능성 원료별로 구분 제조한 후, 이의 제품화(제형화)와 잉여 농축산물 적용형 천연특화 제빵제조 레시피 확립까지 일련의 시스템을 정립코 저 하였다.

## 제 2 장 국내외 기술개발 현황

과제와 관련하여 지속적인 제과·제빵분야의 국제적 연구개발방향 및 사업화(상용화)에 대한 정보 파악 및 자료확보를 위한 현지방문 조사를 지속적(2009~2012)으로 실시한 결과, 큰 특징으로서 국내외 관계없이 식품분야 적용소재가 개발 시 가장 먼저 제과·제빵 분야에 적용되고 있는데 이는 대량소모와 신속한 적용제품의 소비가 뒤따르는 점이 업계특성 때문이라 할 수 있었다.

이에 따라 과제관련 효모의 이용성 및 이의 개발 중요성은 충분히 인식 하고 있으나, 현재, 국내외 적으로 체계화된 연구 부재로 자가배양(비정형화방법에 의한 효모제조) 및 소량제품 생산과 소비(동일 일반제품 대비 2~5배) 패턴을 보이고 있는 경향이였다. 최근 효모자체의 이용성(단순 제빵용)을 넘어 효모가 보유하고 있는 기능성 소재 이용성 관련 연구개발 및 산업화(최우선적 제과/제빵 소재 적용)가 급속히 진행되고 있는 것으로 조사되었다.

- 근거(조사대상국 및 업소) : 한국(2009~2012 식품박람회 참관 및 6개업소), 일본(2009~2011 식품박람회 참관, 10개업체), 유럽 3개국[2011 유럽빵 박람회 참관 및 프랑스(10개업소), 스위스(12개업소), 독일내(5개업소)]

본 연구개발은 국내 제과 및 제빵분야에서 경쟁력의 우선을 확보하기 위한 중요한 수단이 될 것으로 판단되었다. 따라서, 제빵분야에서 상업효모를 대체할 수 있는 한국형 토종효모자원의 확보와 이를 고부가가치 창출을 위한 기능성 소재 개발 및 제과분야까지 일관되게 연계하는 본 연구결과는 국가적인 산업보호 차원에서도 중요하다 할 수 있다.

현재, 효모를 자원으로 하는 제과용 소재로서, 액기스 분말과 글루코 만난으로 대변 할 수 있으며, 이중 글루코 만난의 경우 소비자가는 125만원/Kg, 그리고 효모 추출물(액기스 분말)의 경우는 50,000원~60,000원/Kg으로 형성되어 있으며 국내외적으로 관련산업에서 상업화 초기 단계에 있다고 판단되었다. 또한, 연구결과를 산업화로 연계시 주요경쟁 대상 국가는 일본 그리고 프랑스가 예상 되었다.

본 연구과제에서 확보하고 저 한 차별성은 다음과 같다. 즉, 현재 상업효모의 경우는 제빵제조시, 효모의 CO<sub>2</sub>의 발생효과를 이용하여 빵의 부푼현상을 단순히 이용하는 것이며, 본 과제에서는 한국 유기농 농산물에 존재하는 수종의 유용 효모를 국내유전자원화 함과 더불어 이들이 보유하고 있는 특화성(천연 및 풍미성 등)과 기능성 소재 개발과 이들이 어울어진 특화 제과/제빵사업 및 관련산업에 까지 철저히 연계시킬 수 있음이 큰 차이점이라 할 수 있다.

### 1. 국외 천연특화제빵 연구개발 및 제품화 현황

본 과제와 관련하여 지속적인 제과·제빵분야의 국제적 연구개발방향 및 사업화(상용화)에 대한 정보파악 및 자료확보를 위한 현지방문 조사를 실시한 바 결과는 다음과 같다.

가. 조사대상국 : 한국, 일본, 유럽( 프랑스, 스위스, 독일)

나. 조사결과

- 1) 효모는 자가배양(비정형화 효모제조)후 제빵에 적용, 생산 및 소비 패턴을 보였다.
- 2) 제빵 및 제과제품 및 원료의 세분화로 다양한 제품컨셉 사용되고 있으며, 한정된 유기농

인증원료를 활용하고 있었다.

3) 천연효모 개발에 대한 필요성은 공감하고 있으며, 체계화 연구는 초기단계에 있으나, 근시안에 정립될 것으로 예측되었다. 큰 특징으로서, 국내외 관계없이 식품분야 적용소재가 개발시, 가장 먼저 제과·제빵분야에 적용되고 있는데 이는 대량소모와 신속한 적용제품의 소비가 뒤따르는 점이 업계특성 때문인 것으로 판단되었다.

4) 과제관련 효모의 이용성 및 이의 개발 중요성은 충분히 인식 하고 있으나, 현재, 국내외적으로 체계화된 연구 부재로 자가배양(비정형화 효모제조) 및 소량제품 생산과 소비(동일 일반제품 대비 2~5배) 패턴을 보이고 있었다.

5) 최근 효모자체의 이용성(단순 제빵용)을 넘어 효모가 보유하고 있는 기능성 소재 이용성 관련 연구개발 및 산업화(최우선적 제과제빵 소재 적용)가 급속히 진행되고 있는 것으로 조사되었다.

\* 조사대상국 및 업소 : 한국(2009~2010 식품박람회 참관 및 6개업소), 일본(2009 식품박람회 참관, 10개업체), 유럽 3개국[2010 유럽빵 박람회 참관 및 프랑스(10개업소), 스위스(10개업소), 독일내(5개업소)]

## 2. 국내 제과·제빵분야 시장 현황 및 요구성

가. 시장성 : 약 4조원(해외시장 평가 불가)

나. 조사대상 : 국내 유명 햄버거 및 샌드위치 전문점(6개업소)

다. 조사결과

1) 제품컨셉이나 인테리어 판매방식의 차이외에 제품의 특화성은 결여되어 있는 것으로 조사되었다.

2) 일반효모에 대한 적응으로 인하여 특화시키기에는 현재 한계성이 있어 보였다.

3) 천연효모 개발 필요성 공감과 체계화 연구에 대한 요구성은 매우 높으나, 전문연구진이 없는 것으로 판단 되었다.

4) 제빵·제과 품목은 성장추세를 보이고 있으며, 기본 제빵(식빵)품목은 기존상업효모 유래의 한계성으로 인한 특화성의 결여로 하락세를 보이는 것으로 판단되었다.

5) 국내외 관련연구의 현황으로서, 다국적 기업에 의한 효모,상용효모를 이용한 정형화 제빵/제과 제조, 생산 및 소비패턴에 종속되어 있으며, 핵심소재 및 기술에 주안점을 둔 단편적 연구가 학교(학회)주관으로 소규모적으로 수행되고 있었다.

## 3. 국내외 낙농산업(핵심 원료) 현황

선진 낙농국가의 원유 및 관련 유제품의 국내 가격경쟁력은 약 1/2~1/3수준임에 따라 농축산물 FTA와 시장개방에 속도에 따라 국내 낙농산업은 비례하여 피해(낙농분야 : 416~594억원)가 증가될 것으로 판단되었다.

낙농제품 수출입 현황으로, '07년 무역적자는 약 2억\$[수출 :13천톤(42,241천\$), 총수입량 : 72천톤(233,951천\$)]에 달한 것으로 보고 되고 있다.



현재 국내 낙농업 현황으로서, 낙농산업 총생산액( '07)은 1조 6천억원이고, 젖소사육두수는 점차 감소하고 있으나 규모화 및 젖소두당 산유량 증가로 원유와 더불어 분유류의 재고량이 동시에 급격히 증가되고 있다.

현재 국내 낙농산업의 주요 이슈는, 총체적인 고민거리인 잉여 원유( '07 기말재고량 : 141천톤)의 안정적인 소비방법을 확보하는 것인데, 생산자는 정부에 전적으로 대책을 의존하고 있으며, 정부 또한 뚜렷한 대안(공급 및 가격관리, 유통 및 품질관리, 소비촉진과 신규 유제품개발)이 없어 결국 국내 낙농산업의 총체적인 피해로 연결되고 있다.

시장전망에 대한 불확실성으로 극소수 연구자만의 산업화가 배제된 단편적 연구 활동에 치중하고 있으며, 또한, 인력공급의 핵심인, 낙농 관련 대학/학과 등 관련분야의 축소 및 폐지 등으로 연구인력 인프라는 점차적으로 축소되고 있다. 또한, 조업체의 가격경쟁력 저하로 수입원료 대체 등으로 전반적인 취약성이 증가 일로에 있다.

기존의 단편적인 연구개발과정을 통합연구개발시스템을 통한 첨단화 소재개발로 가격 경쟁력 확보 및 소비시장의 확대, 고부가가치 제품으로서 응용 및 용도/용법 확대에 필요성에 대하여는 절실히 공감하고 있으며, 본 연구와 관련된 전문연구원, 연구센터 설립 및 검토 부분은 현재까지 없다[근거 : 국가과학기술정보서비스(NTIS), 범부처 국가 R&D현황, 2001~2008].

#### 4. 연구개발 당위성

- 가. 국내 및 국외시장은 과제관련 효모의 미이용성 및 이의 개발 중요성은 충분히 인식하고 있으나, 현재 국내외적으로 체계화된 연구가 부족한 실정이다.
- 나. 단순히 자가배양(비정형화 효모제조) 및 제품의 적용을 위한 생산과 소비 패턴을 보이며, 이는 인해 기존 상용효모유래 제과·제빵시장은 증가하고 있는 반면 질적인 측면보다는 소비자의 기호성(풍미위주)에 순응하고 있다.
- 다. 본 연구과제에서는 이들의 문제점(단점)을 장점으로 전환 할 수 있는 연구·개발함으로서, 점차적으로 예측되는 다국적 기업으로부터의 제빵 및 제과관련 산업에의 공격에 제한 기술적 방어 및 대항할 수 있는 기술확보를 실시코져 하였다.

## 제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

### 제 1 절 과제수행을 위한 필수 분석법 정립

#### 1. 연구목적

유기농 농산물내 존재하는 목적 효모류 및 유산균류 분리 및 메카니즘 정립을 위한 영양성분 변화등의 확인을 위한 필수 분석방법 확립이 필요하다.

이를 위하여 본 연구간 정립하고 저 하는 분석법은, 영양성분 분석(당류, 단백질 및 아미노산류, 지방류, 유기산류, 미네랄류 등), 개발 기능성 소재의 분자량 변화량 확인 분석(FPLC), 효모내 존재하는 미네랄 조사(ICP분석)과 효모내 검출되는 미네랄의 효노단백질간의 유기태화 반응여부 조사(X-RD) 및 주요한 관련 기능기 및 물성변화 조사(FT-IR 분석), 필요시 이온 분석을 위한 분석법(IC분석) 및 개발 기능성소재의 제과(제빵)적용성 평가시 풍미분석(GC-mass)등 연계된 일련의 분석법을 전체적으로 정립하고 저 하였다,

#### 2. 연구방법

##### 가. 영양성분 분석법 정립(당류분석 : HPLC-RID시스템)

###### 1) 분석방법

당류분석을 위한 HPLC시스템 및 조건은 표 1과 같으며, 기본적으로는 식품공전(제10 일반시험법, 5)탄수화물, 2009)에 준하여 실시하였다.

최저 검출한계검정은 1%(w/v) 당류(5종, Lactose, Galactose, Glucose, Fructose, Sucrose)를 표준체로 하였는데, 측정간 농도는 당류별 5,000ppm, 10,000ppm, 100ppm, 10ppm, 1ppm 및 0.1ppm회석하여 사용하였다.

검출효율검정은 멸균유내 표준체별 100ppm을 첨가한 후 역시 식품공전법에 준하여 실시하였다.

###### 2) 결과

당류별 최저 검출한계는 10ppm이상이었으며(표 2, 그림 1), 당류별 검출효율은 92~108%범위로 조사되어 유의성이 인정되었다(표 2, Fig 2.). 결과로서, 본 연구 개발간 필수적으로 필요한 당류분석방법은 정립되었다(표2. ).

##### 나. 영양성분 분석법 정립(유기산 분석 : HPLC-UV시스템)

###### 1) 분석방법

유기산류 분석 또한 HPLC분석법을 적용하여 실시하였다. 표 3. 과 같으며 시료로 유기산 대표 표준체 9종을 선별하여, 측정 간 1,000ppm의 Stock solution을 준비하여 회석하여 사용하였다. 표준체 내역은 표 4.와 같다.

## 2) 결과

유기산 분석을 위한 HPLC(Aminex 컬럼)분석법이 정립되었고, 분석대상 유기산 9종을 대상으로 실시한 검출한계는 1ppm이상이었다.(그림 3.). 또한, 유기산 검출 효율은 81~114%범위로 조사되어 유의성이 인정되었다(그림 4.).

## 다. 영양성분 분석법 정립(미네랄 분석: ICP 시스템)

### 1) 분석방법

영양성분 분석법중 미네랄류는 ICP분석법을 적용(ICP-OES시스템, 모델 : Optima 5300DV, Perkin Elmer사, USA)실시하였으며, 기본분석법은 식품공전(제10 일반시험법, 10)칼슘, 2009)에 준하여 실시하였다. 연구간 사용할 ICP분석기기의 최저검출효율 및 검출한계는 기본적으로 사용하는 ICP분석용 표준용액을 사용하였다. 최저검출효율 및 검출한계를 검정하기 위하여 ICP표준 용액 중 Ca, Fe 및 Mg3종을 선별하여 이들 용액을 0.01ppm, 0.1ppm, 1.0ppm 그리고 10ppm 까지 농도별로 조성한 후 이를 시료로 사용하였다(표 5.).

시료별 전처리로 마이크로웨이브 시스템 병행 적용하였다. 분석샘플에서 분취(0.5g)를 하여 가수분해용액 첨가 (70% HNO<sub>3</sub> 7ml+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1ml)하고 유기물제거(마이크로웨이브 시스템,190℃ 20min)과정을 거치고 Mass-up( 2% HNO<sub>3</sub> 용액 첨가, 최종50ml로 조절)통해 ICP 샘플별 3반복 측정하여 결과도출(평균±표준편차)을 하였다.

### 2) 결과확인

검정방법으로는 우선 조성된 검정용액으로 ICP시스템의 표준검량선을 작성한 후, 이를 시료로 재측정 하므로써 분석시스템의 최저검출한계(ppm) 및 측정효율(%)을 비교하였다.

### 3) 연구결과

대표적인 3종의 미네랄의 표준시료(Ca, Fe, Mg)에 대하여 측정시, 최저검출한계는 0.10ppm이상였으며, 검출효율은 전체 표준시료에서 97~109%범위를 보여 유의성이 인정되었다. 미네랄별 검출농도는 다른 것으로 나타나 미량인 경우는 표준용액 범위를 조절하여 측정함으로써 검출오차를 줄여야 한다고 판단되었다. 결과로서, 본 연구개발간 필수적으로 필요한 미네랄 분석방법은 정립 되었다.

## 라. 영양성분 분석법정립(물성 및 분자량 변화 분석: FPLC-Peptide, GPC시스템)

### 1) 분석방법

영양성분의 물성(분자량등) 변화 검정을 위한 FPLC분석시스템 및 분석조건은 Table 6과 같다. 또한, 시험간 표준체로서는 저분자부터 고분자까지 분자량을 보유하고 있는 FPLC Calibration kit를 시험간 사용하였다(Table 7).

표준체 시료는 가장 낮은 분자량인 Mw 209인 NAG(N-acetyl glucosamine. 1

당체), 분자량이 1,355인 Vitamine B12, Aprotinin(Mw 6,500) Chtochromec(Mw 12,384), Ribonuclease-A(Mw 13,700), Ovalbumin(Mw 43,000), Conalbumin(Mw 75,000), Aldolase(Mw 158,000) 그리고 가장 높은 분자량 수치를 보유한 Myosin(Mw 212,000)까지 9종을 대상으로 검량선을 작성하였다(그림 5.).

## 2) 결과확인

표준체 단백질의 분자량 변화 검정은 저분자부터 고분자까지 분자량별 표준체별로 FPLC 측정을 통하여 분자량별 검출시간을 측정하였으며, 이를 기준으로 검출식을 분자량 대비 시간으로 각각 작성하였다. 이를 기준으로 최종 칼슘 유기태화 제제 개발간 분자량변화가 예상되는 시료를 검출식에 대입하여 결과를 확인하였다. 또한, 검량식 대비 동일 분자량의 표준체를 재측정하여 검출효율 측정을 통하여 검량식의 측정효율을 재확인하였다.

## 3) 연구결과

표준체를 이용한 FPLC(Peptide, GPC)를 통해 분자량을 기준으로 작성한 검량식은  $y=5616.7x^2-31422x+37263$ , 검출시간을 기준으로 작성한 검정식으로는  $y=5616.7x^2-31422x+37263$ 을 정립 완료하였다. 또한, 정립된 검량식 대비 동일 분자량의 표준체를 재측정하여 분자량을 확인시 검출효율은 95~112%의 범위로 나타나 검량식은 정립되었음을 확인하였다.

## 마. 영양성분의 물성(기능기 및 성분분석) 검정(FT-IR 분석시스템)

### 1) 분석방법

본 분석법 정립은 미네랄 킬레이팅 관련 기능기 정량법을 활용한 기능성 미네랄 소재 개발을 위하여 정립하였다, 이를 위하여 내열성 보유 유단백질인 WPI를 기준으로 미네랄 킬레이팅에 관련한 기능기 확인이 필요하여 FT-IR분석을 통한 킬레이팅 기능기 분석법을 정립하고자 하였다. 분석간 사용기기는 Bruker Optics IFS66/S기종, 4,000~600Cm<sup>-1</sup>/Resol.이었으며, 분석 샘플은 KBr-Pellet Disc법에 의해 준비되었으며 실험구 내역 및 분석방법은 표 8.과 같다.

### 2) 연구결과

정립 분석법은 FT-IR분석법에 의하여 정립되었으며, 정립된 분석법에 의한 분석결과 Ca의 경우는 이온화 후 유단백질내 치환 가능 기능기중(-NH<sub>2</sub>, -COOH)-COOH기와 결합하는 것으로 확인되었다.(그림 6.). 제법에 따라 유단백질 보유 기능기중 Ca이온과 결합되는 기능기 극대화 방법(처리구-1)정립을 완료하였다.(그림 6.). 그리고, 정립된 FT-IR분석법을 통하여 내열성 보유 유단백질인 유청분말(아산공장, 유효기간 : 2010.02.03)를 기준으로 미네랄 킬레이팅 도입량별 기능기 확인을 완료하였으며, 분리한 기능성 소재 및 미네랄류의 효모내 단백질과의 킬레이팅 기능기 검출확인 기법이 정립하였다.

결과로서, 본 연구개발간 효모내 유기태화 미네랄 소재관련 기능기 확인을

FT-IR분석을 통한 킬레이팅 기능기 분석법이 정립되었다.

바) 영양성분의 물성(기능기 및 성분분석) 검정(XRD 분석시스템)

1) 분석방법

대조 WPS 분말과 함께 인위적으로 제조한 유기태화 칼슘제제의 칼슘의 결합 형태와 킬레이팅 구조를 분석을 위해 X-선회절분석방법(XRD분석)시스템이 사용되었다. 분석조건을 정립하기 위한 시료는 다음과 같이 준비하였다. 대조구(WPS)로서는, 유청분말(매일유업) 50g을 정제수 300ml에 용해한 후 상온조건에서 30분동안 교반(150rpm)하였다. 그리고, 원심분리(10,000rpm,15℃,15분)후 동결건조 처리하였다. 처리구(Ca-WPS)로서는 유청분말 50g 대비  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  30g을 혼합한 후 정제수 300ml에 용해한 후 89℃조건하에서 30분동안 교반(150rpm)처리하였다. 그리고, 이를 원심분리(10,000rpm,15℃,15분)하고 침전물만을 대상으로 다시 멸균수 200ml를 첨가하여 현탁한 후 5회 반복 세척처리 과정을 거쳐 동결건조 처리하였다.

2) 결과 확인

동결처리된 시험구별(WPS, Ca-WPS) 시료는 XRD 분석을 통하여 기질단백질과 칼슘의 킬레이팅 반응에 따른 구조분석을 실시하였다. 분석은 Powder XRD 분석시스템(모델: D8-FOCUS, BURKER사, USA)을 이용하였으며, 기기 권장방법에 의하여 결과를 확인하였다.

3) 연구결과

유기태 칼슘제제의 결합형태는 칼슘 포타슘 포스페이트 하이드레이트(Calcium Potassium Phosphate Hydrate [ $\text{Ca}_2\text{K}_2(\text{P}_6\text{O}_{18})6(\text{H}_2\text{O})$ ]), 칼슘 하이드로젠 포스페이트 하이드레이트(Calcium Hydrogen Phosphate Hydrate [ $\text{Ca}_8\text{H}_2(\text{PO}_4)6\text{H}_2\text{O}$ ]), 아나파이트 (Anapaite [ $\text{Ca}_2\text{Fe}+2(\text{PO}_4)2\text{H}_2\text{O}$ ]), 포타슘 칼슘 하이드로젠 포스페이트(Potassium Calcium Hydrogen Phosphate [ $\text{CaK}_3\text{H}(\text{PO}_4)_2$ ]), 브루샤이트(Brushite [ $\text{CaPO}_3(\text{OH})\text{H}_2\text{O}$ ]), 칼슘 설파이드 포스페이트(Calcium Sulfide Phosphate [ $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{S}$ ])인 것을 X-선 회절분석을 통해 확인 할 수 있었다.(Table 9, Fig 7.).

사) 개발 기능성소재의 제과특화성 평가(풍미성분분석: 관능평가 및 GC-MS시스템)

1) 분석방법

개발 기능성 소재를 적용한 제과(제빵) 적용성 평가와 관련 특화성(풍미)와 관련 풍미 성분분석은 GC-MS시스템을 이용하여 분석하였다(Table 8).

본 연구간 대조효모로서는 상업효모(Jenico사, 한국)을 구입 사용하였으며, 시험구는 포도(거봉)발효배지를 준비(48시간 발효 진행배지)하여 이를 시험간 사용하였다. 과일발효배지 제조용 거봉포도(하초 거봉, *Vitis labruscana* cv. "Kyoho")

는 유기농 농산물 생산단체인 한들영농법인(한국)에서 구입하여 사용하였다.

발효배지 조성은 다음과 같다. 즉, 멸균수 300g에 설탕 35g(백설탕, 흰설탕, 삼양사)를 우선 용해시킨 후 여기에 준비된 분쇄 거봉 400g첨가(첨가전 분쇄공정 실시)하였는데, 이때 당도 13~14 Brix를 유지되도록 하였다. 발효숙성조건으로서 30°C(습도 85~90%)조건에서 48시간동안 진행하였다(Fig 1).

과일 발효배지가 발효과정이 완료된 시점인 48시간이 경과 시, 효모균수 검정을 통하여  $1 \times 10^7 \sim 1 \times 10^{10}$  cfu/ml 범위를 나타낼 때 제빵제조에 적용하였다. 시험간 적용제빵은 유럽빵 종류중 “르방”을 제조하였는데, 상업효모를 적용 제조 레시피에 준하여 실시하였다(Fig 9~10, Table 9). 과일발효배지 첨가에 따른 제빵의 특화성 결과는 전문 교육을 이수한 관능평가 패널(n=12명) 검정을 통하여 비교하였다(Table 10). 이를 위한 관능평가 주요항목은 냄새[ 1)냄새의 이미이취 정도, 2)냄새의 선호도 구분], 조직감[1) 표면의 바삭한 느낌정도, 2) 안의 부드러움정도, 3) 조직감의 선호도로 구분] 및 맛[1) 신맛의 정도, 2) 이미,이취.정도, 3) 전체적인 선호도로 구분]으로 3항 및 8세부항목으로 구분하여 실시하였다.

특화성(풍미 등)과 관련하여 과일발효배지 조성 후 배양일정별(0일, 24시간, 48시간 및 72시간)으로 구분 분취한 배양액내 5종 당류분석(Fructose, Sucrose, Glucose, Galactose 및 Lactose) 및 8종 유기산(Tartaric acid, Malic acid, Lactic acid, Oxalic acid, Citric acid, Succinic acid, Formic acid 및 Acetic acid) 변화를 비교 하였다. 최종 배양단계별 먹이원의 증감변화 양상과 이화학적 분석결과를 기준으로 제빵 제조후 분취시료에서 풍미분석 일련되게 실시하였는데, 이는 이들의 연계성 판단을 위함이었다. 풍미분석을 위하여는 GC-MS시스템으로 분석하였다(Table 8)

## 2) 연구결과

특화성관련 주요향기 성분은 Furfural(35%)과 알콜류(18%)로 대별되었으며, 특화빵과 관련한 주요향기(Maillard반응)는 카라멜향, 캔디향 및 아몬드향으로 이를 발현하는 물질은 Furfural였다(Fig 11, Table 11).

상업효모 대비(100기준) 주분포 성분인 Furfural과 알콜류의 증감결과를 비교하여 보았더니, Furfural성분은 약 28배가 증가 되었는데, ethanol류는 오히려 약 48%가 감소하는 것으로 조사되었다(Table 11).

조직감과 관련 하며 표면의 바삭한 정도는 약5%, 안의 부드러움은 약 17% 그리고 조직감의 선호도는 전반적으로 증가하는 경향을 보였는데, 이는 천연특화빵의 특성이 조직을 질기고 딱딱하게 하는 특성이 있음을 시사한다 할 수 있었다. 또한, 상업효모를 적용 제조한 르방빵의 내부조직(성상)은 고르게 나타났으나, 과일발효배지 적용 르방빵의 내부조직은 기공이 크고 불균형성을 보이는 특징을 보이는 것으로 조사되었는데, 아마도 사전발효과정에서 활성이 극대화 된 효모의 먹이원 이용성의 증대와 이로 인한 CO<sub>2</sub>가스발생량도 증가함에 따른 이유인 것으로 판단되었다. 결론적으로 연구수행간 필수적인 제과특화성 평가관련 분석법은 정립되었다.

Table 1. 영양성분중 당류분석을 위한 HPLC 분석시스템 및 분석조건

분석시스템 구성 (Agilent HPLC)	분석조건
. Degasser : Model G1322A	.Column : Carbohydrate (5um,4.6 x 150mm)
. QuatPump : Model G1311A	. Mobile Phase :ACN(75):ddH <sub>2</sub> O(25)
Autosampler:Model G1313A	.Flow Rate:1.0ml/min.
. Detector(RI):Model G1365B	.Column Temp. : 35℃
. Detector(RI):Model G1365B	.Injection Vol.: 20ul

Table 2. 영양성분중 당류분석을 위한 HPLC 분석조건 정립결과

표준체별 조성내역	최저검출한계 (ppm)	검출효율 (%)
Lactose	10	108
Galactose	10	97.9
Glucose	10	92.5
Fructose	10	105
Sucrose	10	92.2



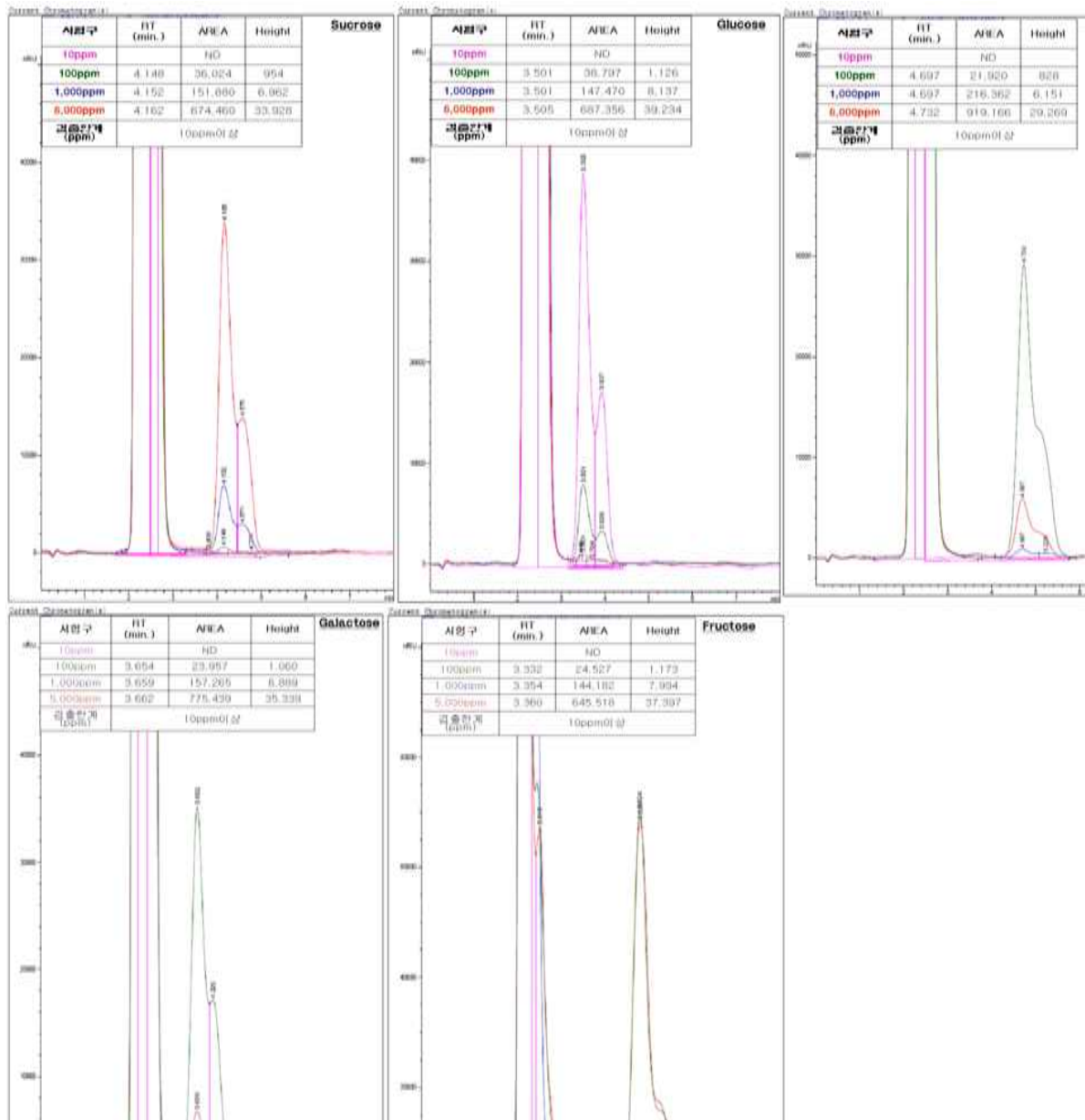


Fig 1 . 당류 분석법 정립을 위한 당류별 최저검출한계 검정 (Peak analysis) 결과

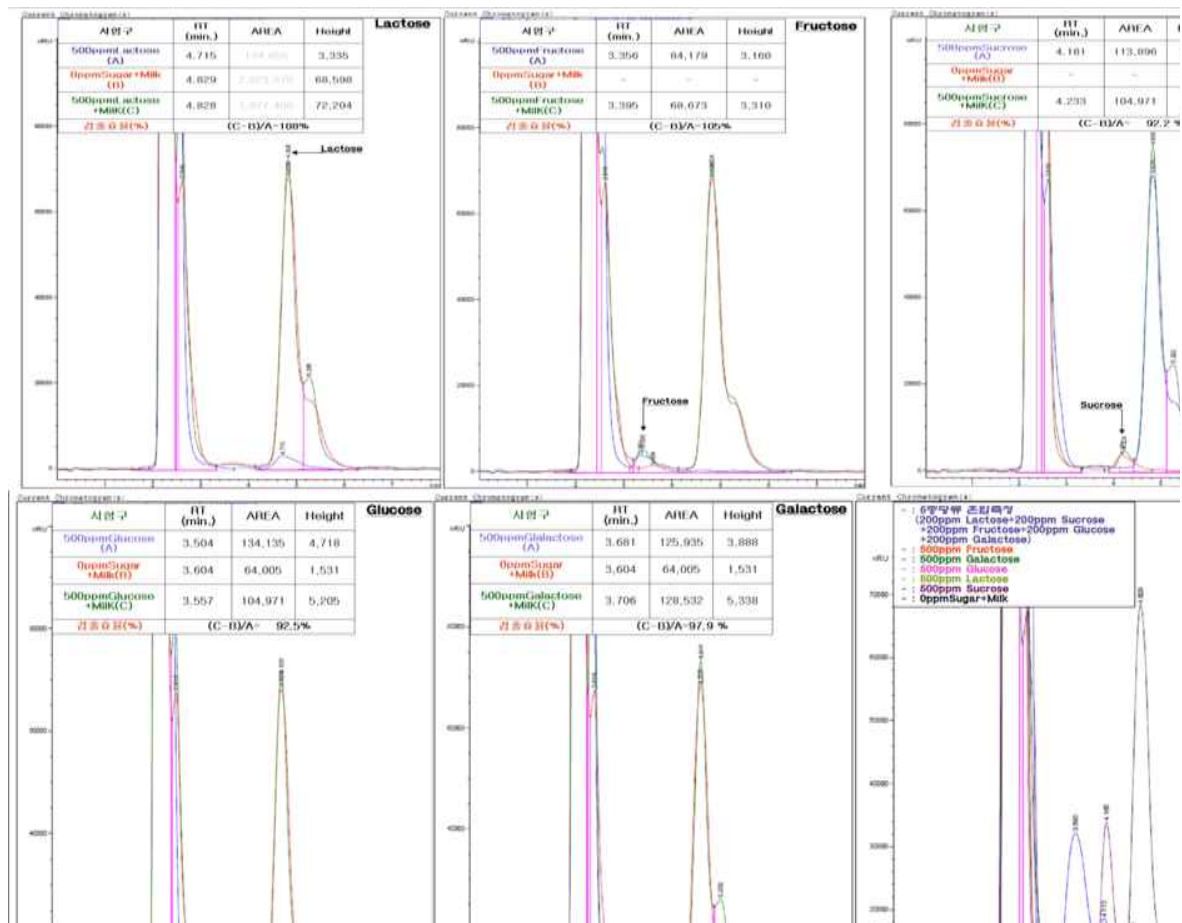


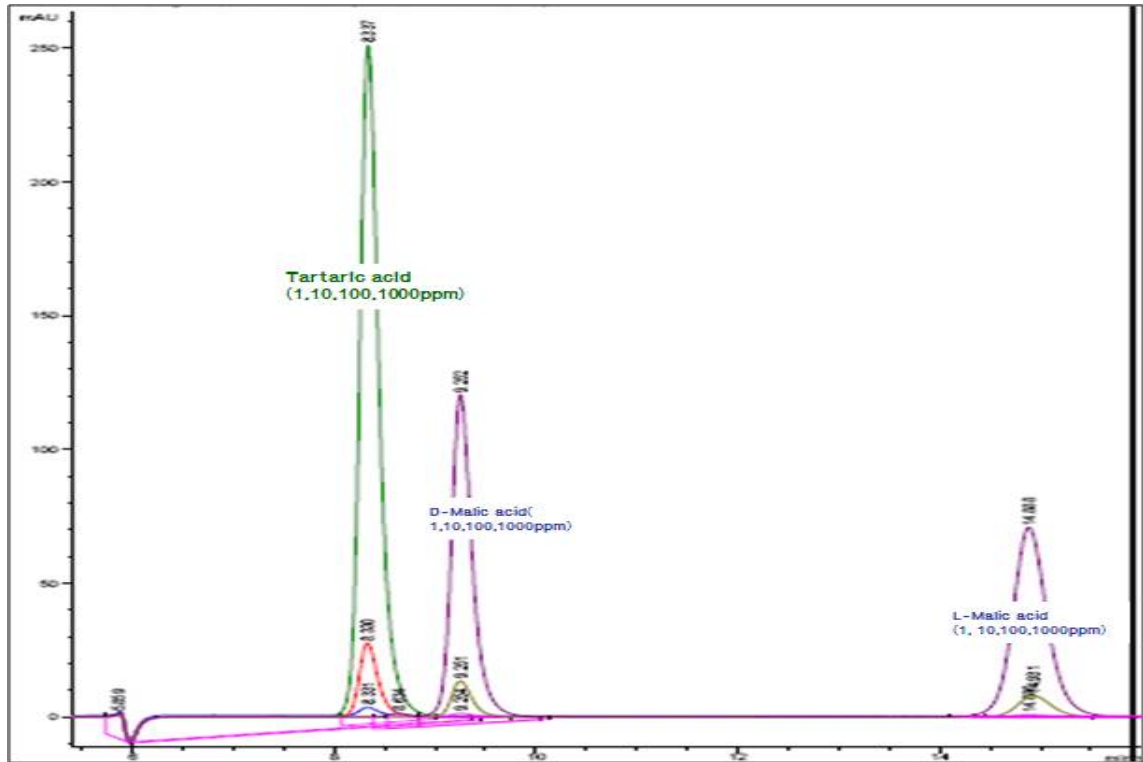
Fig 2 . 당류 분석법 정립을 위한 당류별 최저검출효율 검정(Peak analysis)결과

Table 3. 영양성분중 유기산 분석을 위한 HPLC 분석시스템 및 분석조건

분석시스템 구성 (Agilent HPLC)	분석조건
. Degasser : Model G1322A	.Column : AMINEX HPX-87 (300mm x 7.8mm)
. QuatPump : Model G1311A	. Mobile Phase :10mM H2SO4
Autosampler:Model G1313A	.Flow Rate:1.0ml/min.
. Detector(RI):Model G1365B	.Column Temp. : 35℃
. Detector(RI):Model G1365B	.Injection Vol.: 20ul
	.Detection(UV): 210nm

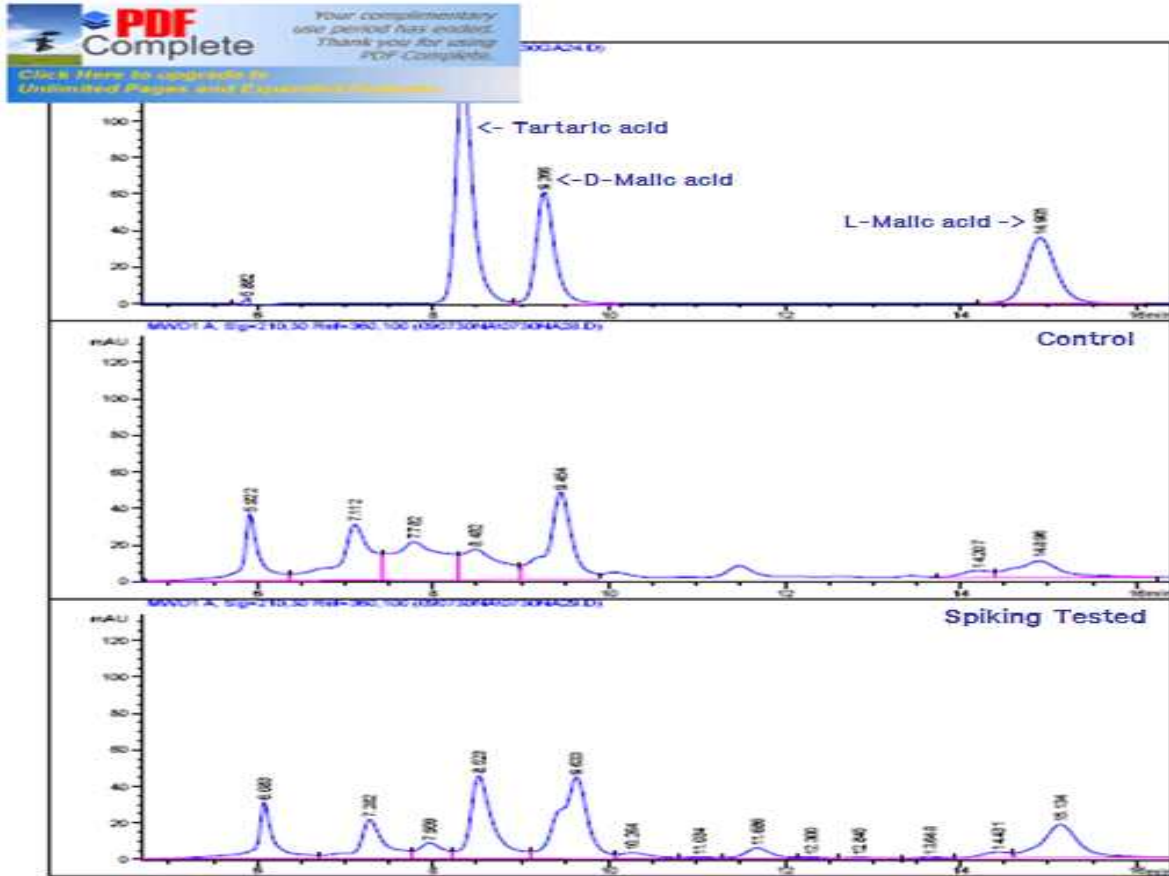
Table 4. 유기산 분석을 위해 사용된 표준체내역

표준체명 (9종, 함유량)	제조사명
1. Sodium Oxalate (0.8umol)	Organic Acid Standard (Bio-RAD (USA))
2. Sodium Citrate (4.0umol)	
3. Sodium Malate (8.0umol)	
4. Sodium Succinate (20.0umol)	
5. Sodium Formate (20.0umol)	
6. Sodium Acetate (40.0umol)	
7. Tartaric acid (C <sub>4</sub> H <sub>6</sub> O <sub>6</sub> ·H <sub>2</sub> O)	SAMCHUN (KOREA)
8. D-Lactic acid	GmBH (Germany)
9. L-Lactic Acid	GmBH (Germany)



표준체 유기산 (측정결과)	측정농도 (ppm)	유기산 분석법 정립을 위한 최저측정농도 정립결과			
		RT(min.)	Area	Height	Area%
Tartaric acid (최저검출한계 : 1ppm)	1	8.340	5.7	0.38	100
	10	8.331	39.9	3	100
	100	8.328	376.3	27.7	100
	1000	8.336	3398	251.8	100
Malic acid (최저검출한계 : 1ppm)	1	9.264(D-form)	2.5	0.16	100
		10(L-form)	-	-	-
	10	9.254	20.8	1.4	50.1
		100	20.7	0.85	49.9
	100	9.250	193.8	13.5	49.6
		14.931	196.9	8	50.4
	1000	9.251	1751	121	50.1
		14.888	1744	71.2	49.9

Fig 3-1. 유기산 분석법 정립을 위한 대표적 유기산(Malic 및 Tartaric acid)의 최저검출한계 측정결과(HPLC, Peak analysis)



시험구	시험구별조성내역	RT(min.)	Area	Height	검출효율(%)	
	Tartaric acid 100ppm	8.323	376.3	27.7(A)	-	-
	Malic acid 100ppm	9.250	193.8	13.5(B)	-	-
		14.931	196.9	8(C)	-	-
대조구	[(2%(w/w)sucrose+1%Fructose+0.39%PDA)+효모접종 발효 4일 후](80ul)+3rd ddH2O(20ul)	8.599	-	9(D)	-	-
		9.577	-	41.4(E)	-	-
		14.978	-	8.9(F)	-	-
시험구 (Spiking Test)	[(2%(w/w)sucrose+1%Fructose+0.39%PDA)+효모접종 발효 4일 후](80ul)+Malic acid(10ppm)+Tartaric acid(10ppm)	8.523	-	42.2(G)	<b>114.2</b>	G/(A+D)
		9.633	-	44.6(H)	<b>81.2</b>	H/(B+E)
		15.134	-	18.2(I)	<b>107.6</b>	I/(C+F)

Fig 3-2. 유기산 분석법 정립을 위해 선발 유기산(Malic 및 Tataric acid)을 첨가시험 (Spiking Test)을 통한 검출효율측정 및 정립결과(HPLC, Peak analysis)

Table 5. 선발효모 및 분리 기능성 소재 개발을 위한 영양성분 분석(미네랄류)을 위한 ICP분석법 정립결과

ICP분석법정립용 표준용액(ppm)	Ca		Fe		Mg	
	최저검출한계 (ppm)	검출효율 (%)	최저검출한계 (ppm)	검출효율 (%)	최저검출한계 (ppm)	검출효율 (%)
0.01	ND	-	ND	-	ND	-
0.10	0.097	79	0.109	109	0.108	108
1.0	1.049	105	1.010	101	1.096	109
10.0	10.66	106	10.44	104	10.55	105

Table 6. 선발효모 및 분리 기능성 소재 개발을 위한 영양성분의 물성(분자량)변화  
검정을 위해 정립한 FPLC분석시스템 및 분석조건

---

FPLC 분석시스템 및 분석조건

---

1. 시스템(AKTA, 스웨덴) : UPC900 +D920+CU950
  2. 운용조건
    - 가. column(Temp.) : Superdex Pep 10/300GL(35' C)
    - 나. Mobile Phase : Phosphate buffer (50mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>+150mM NaCl+ddH<sub>2</sub>O 1L)
    - 다. Flow rate : 0.5ml/min.
    - 라. Press : 0.84PSI
    - 마. injection volumn: 100ul(시료 1%용액)
  3. 표준체 : FPLC Calibration kit
-



Table 7. 선발효모 및 분리 기능성 소재 개발을 위한 물성(분자량)변화 검정을 위해 정립한 FPLC분석에 사용된 표준체 내역

표준체명	분자량	비고
NAG	209	N-acetyl glucosamine
Vitamine B12	1,355	Sigma
Aprotinin	6,500	
Cytochrome c	12,384	FPLC Calibration kit
Ribonuclease-A	13,700	"
Ovalbumin	43,000	"
Conalbumin	75,000	"
Aldolase	158,000	"
Myosin	212,000	"

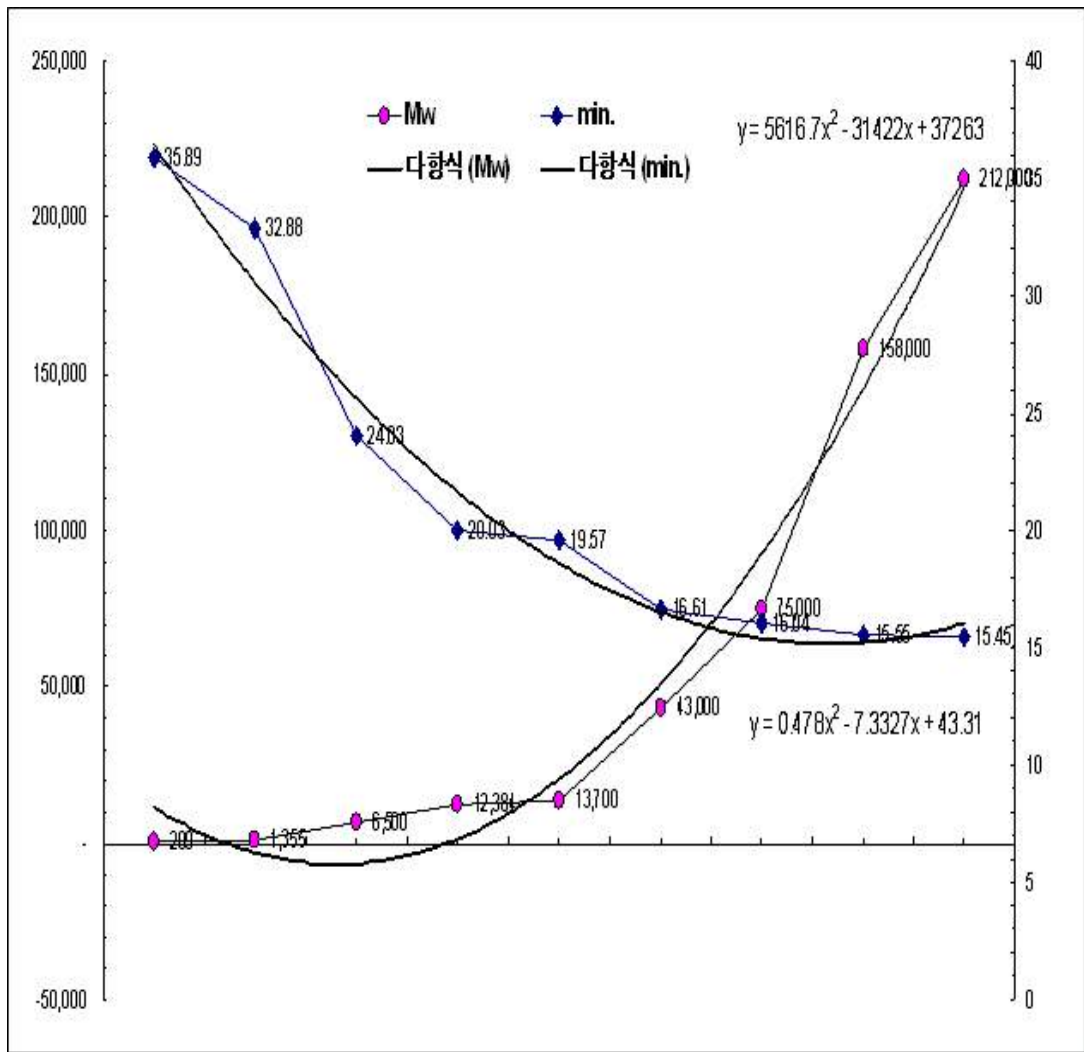


Fig 5. 선발효모유래 기능성 소재 및 영양성분의 물성(분자량)변화 검정법 정립을 위한 FPLC분석결과(FPLC Calibration 작성결과(단백질 기준) 및 검정식 정립결과)

Table 8. 효모내 단백질과 미네랄류의 킬레이팅 관련 기능기 검정(미네랄- 유기태화 소재 개발)을 위한 FT-IR분석 시스템 조성내역(칼슘-유청단백질 킬레이팅소재 적용 정립)

실험구	내역	비 고
대조구	20%CaCl <sub>2</sub> (정제수 180g+CaCl <sub>2</sub> 70g)제조 후 20%CaCl <sub>2</sub> 100g분취하여 동결건조 후 FT-IR분석(KBr-Pellet Disc법)	CaCl <sub>2</sub>
비교구	정제수 90dp WPI(Arla Co.,) 10g만을 첨가하여 동결건조 후 FT-IR분석(KBr-Pellet Disc법)	WPI
처리구-1	WPI(Arla Co., Lot No.: S090213) 10g과 CaCl <sub>2</sub> 13.23g을 먼저 혼합후 정제수 90g을 추가첨가하여 용해후 동결건조 시켜 FT-IR분석(KBr-Pellet Disc법)	CaWPI+DW
처리구-2	정제수 90g에 CaCl <sub>2</sub> 1.32g을 녹인 후 WPI(Arla Co., Lot No.: S090213)10g을 첨가하여 반응 시킨 후 동결건조 시켜FT-IR분석(KBr-Pellet Disc법)	DWCa+WPI

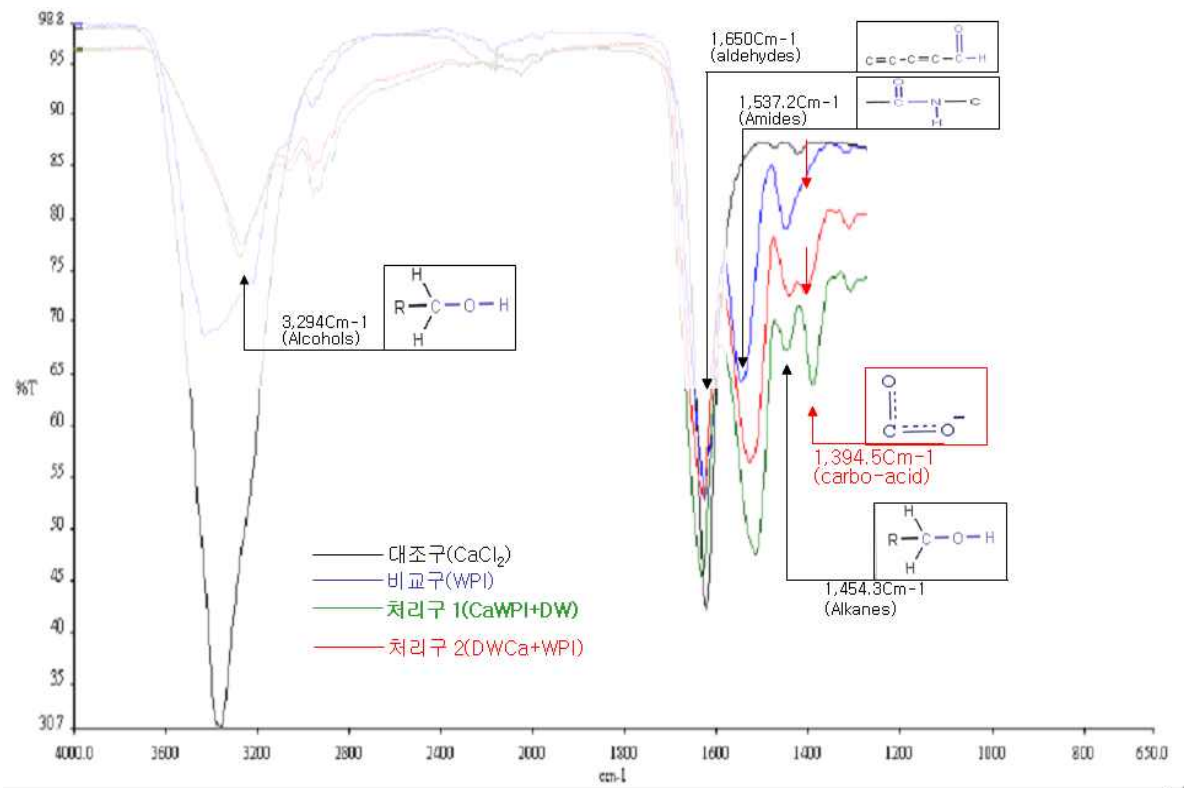


Fig 6. 유단백질 보유 기능기중 미네랄(Ca이온)과 결합되는 활성 기능기 판단(↓)을 위한 FT-IR Peak analysis결과

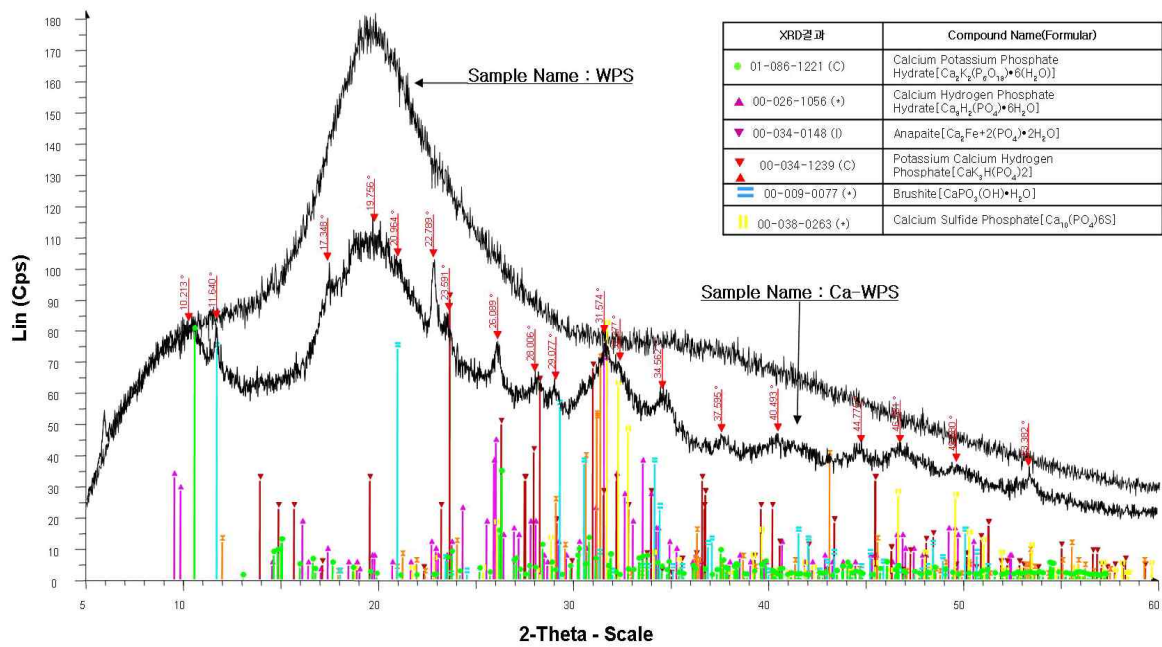


Fig 7. 미네랄(칼슘) 킬레이팅전(유청분말: WPS) 및 킬레이팅 유도체(Ca-WPS)의 킬레이팅후의 화학구조 변화를 검정하기 위한 결정구조분석(XRD anayls)결과

Table 9. 미네랄(칼슘) 킬레이팅전(유청분말: WPS) 및 킬레이팅 유도체(Ca-WPS)의 킬레이팅후의 화학구조 변화를 검정하기 위한 결정구조분석(XRD anayls)결과표

XRD결과	Compound Name(Formular)	Y-Scale	d x by	Wavelength	System	a	b	c	alpha	beta	gamma	Bravais L	Space Group
01-086-1221 (C)	Calcium Potassium Phosphate Hydrate [Ca <sub>2</sub> K <sub>2</sub> (P <sub>6</sub> O <sub>18</sub> )(H <sub>2</sub> O) <sub>6</sub> ]	43.56	1	1.5406	Monoclinic	7.266	11.833	12.3	90	103.17	90	Primitive	P21/n (14)
00-026-1056 (*)	Calcium Hydrogen Phosphate Hydrate [Ca <sub>8</sub> H <sub>2</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> •6H <sub>2</sub> O]	119.95	1	1.5406	Triclinic	9.529	18.994	6.855	92.33	90.13	79.93		
00-034-0148 (I)	Anapaite [Ca <sub>2</sub> Fe+2(PO <sub>4</sub> )•2H <sub>2</sub> O]	49.53	1	1.5406	Triclinic	6.4508	6.8187	5.9017	101.65	104.26	70.76	Primitive	P-1 (2)
00-034-1239 (C)	Potassium Calcium Hydrogen Phosphate [CaK <sub>3</sub> H(PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> ]	38.57	1	1.5406	Monoclinic	9.88	5.733	7.432	90	94.1	90	Base-centered	C2/m (12)
00-009-0077 (*)	Brushite, syn [CaPO <sub>3</sub> (OH)•H <sub>2</sub> O]	40.58	1	1.5406	Monoclinic	6.363	15.19	5.815	90	118.5	90	Base-centered	Cc (9)
00-038-0263 (*)	Calcium Sulfide Phosphate [Ca <sub>10</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> S]	44.59	1	1.5406	Hexagonal	9.4554	9.4554	6.8405	90	90	120	Primitive	P63 (173)

Table 8. 개발효모 및 기능성 소재 제과(빵) 적용성 평가를 통한 특화성(풍미)관련 분석을 위한 GC-mass분석시스템 및 분석방법 정립결과

분석시스템	분석 시스템 운영조건
GC/MS analysis	<ul style="list-style-type: none"> <li>• G/C Model name: Agilent 5975C(Agilent Technologies, Palo Alto, California, U.S.A)</li> <li>• Inlet temperature: 260° C</li> <li>• Column:DB-WAX(30mx250 <math>\mu</math> mx0.25 <math>\mu</math> m, Agilent Technologies, Palo Alto, California, U.S.A)</li> <li>• Carrier gas: helium</li> <li>• Flow rate: 1ml/min</li> <li>• Oven temperature program : from 40° C(5 min)-&gt;4° C/min-&gt; 250° C(5min)</li> <li>• M/S detector : Agilent 5975C MSD (EI mode)               <ul style="list-style-type: none"> <li>- Detector voltage was 70eV</li> <li>- The mass spectral data acquisition scan interval time 2.86 sec and data were collected over a mass range of m/z 40~550 amu.</li> </ul> </li> </ul>
SPME analysis	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Phase: Triple</li> <li>• Fiber size: 50/30 <math>\mu</math> m divinylbenzoene-&gt;50<math>\mu</math>m carboxen /polydimethylsiloxane -&gt;30<math>\mu</math>m 혼합 코팅 DVB/ Carboxen / PDMS(divinylbenzene /carboxen / polydimethylsiloxane) purchased from Supelco Co.(bellefonte, PA, USA)</li> <li>• Sampler : GERSTEL MPS2 Auto sampler</li> <li>• Sample equilibration time               <ul style="list-style-type: none"> <li>-incubation temp. 60° C</li> <li>-incubation time 40min</li> <li>-extraction time 10min</li> <li>-desorption time 10min</li> </ul> </li> </ul>



(A) (B) (C) (D) (E)  
Fig 9. 수거 유기농 농산물(A)내 목적균 우점화 유도(B~D)를 위한 발효배양 및 발효메카니즘 확인(E, 이화학 분석시료) 과정



Table 9. 선발효모 및 개발 기능성 소재 개발을 위한 제과(빵)제조 레시피.

- 유럽빵(르방) 제조 레시피(상: 상업효모, 하 : 과일발효배지)

1. 중중			2. 본반죽		
재료	중량(g)	배합률(%)	재료	중량(g)	배합률(%)
강력분	650	100	강력분	800	100
<b>상업효모</b>	26	4(강력분대비)	중력분	200	25
물	780	127	물	440	55
감자가루	50	7.69	소금	35	4.38
설탕	22	3.38	설탕	35	4.38
<제조공정> 1. 전재료를 가볍게 혼합하여 약 2시간 정도 발효 시킨다 2. 반죽온도 : 30℃ 3. 냉장실로 이동시켜 약 15시간 정도 저온 숙성 시킨다			감자가루	50	6.25
			무화과 , 햄(각각)	200	25
			<제조공정> 1. 중중반죽과 본반죽의 원료를 함께 넣고 약 90%정도 믹싱한다 2. 반죽온도 : 26℃ 3.1차발효 : 약1시간(중간 편치) 4. 분할 : 大370g, 小100g 5. 휴지 : 20~30分 6. 성형 : 봉상형에 반죽을 역어서 올림 7. 2차발효 : 30℃/ 80%/ 50분 8. 굽기 : 上220℃/ 下230℃/ 스팀주입 후 약 30분, 10분 후 下210℃ 로 맞춰서 굽기한다		

1. 중중			2. 본반죽		
재료	중량(g)	배합률(%)	재료	중량(g)	배합률(%)
강력분	650	100	강력분	800	100
<b>거봉발효액</b>	580	89.23	중력분	200	25
물	200	30.77	거봉배양액	440	55
감자가루	50	7.69	소금	35	4.38
설탕	22	3.38	설탕	35	4.38
<제조공정> 1. 전재료를 가볍게 혼합하여 약 2시간 정도 발효 시킨다 2. 반죽온도 : 30℃ 3. 냉장실로 이동시켜 약 15시간 정도 저온 숙성 시킨다			감자가루	50	6.25
			무화과 , 햄(각각)	200	25
			<제조공정> 1. 중중반죽과 본반죽의 원료를 함께 넣고 약 90%정도 믹싱한다 2. 반죽온도 : 26℃ 3.1차발효 : 약1시간(중간 편치) 4. 분할 : 大370g, 小100g 5. 휴지 : 20~30分 6. 성형 : 봉상형에 반죽을 역어서 올림 7. 2차발효 : 30℃/ 80%/ 50분 8. 굽기 : 上220℃/ 下230℃/ 스팀주입 후 약 30분, 10분 후 下210℃ 로 맞춰서 굽기한다		

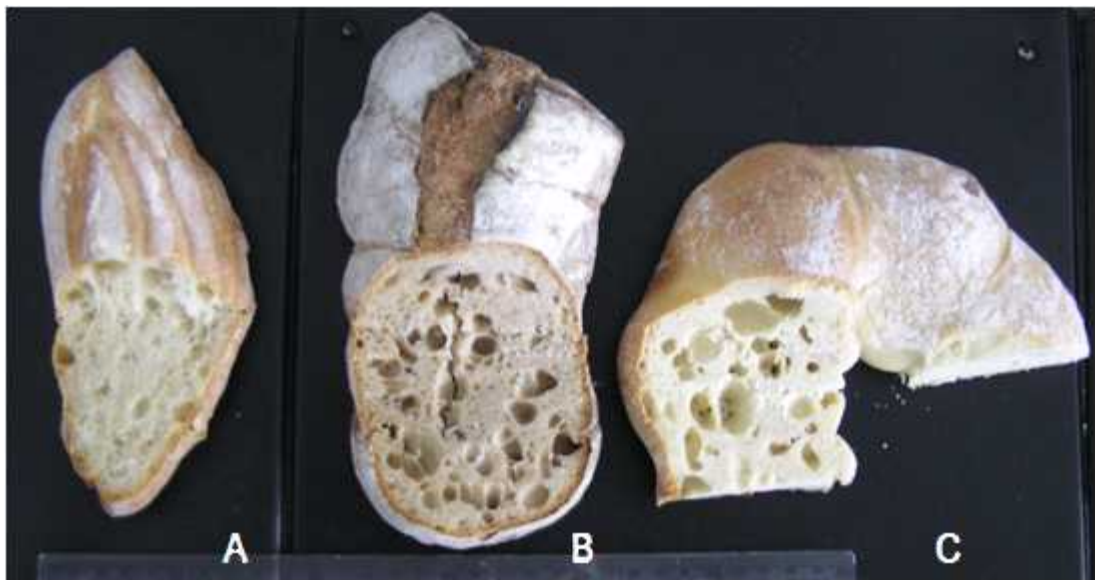


Fig 10. 선발효모 및 개발 기능성 소재 적용을 위한 제과(빵)제조 레시피 정립과 이의 특화성 평가를 위한 표준제빵(유럽빵) 제조결과.  
 A: 상업효모(*S. cerevisiae*, Janico 사), B : 개발효모(*S. cerevisiae*), C: 개발효모(*Can.utilis*), 효모배양 및 제빵제조 기준: 발효배지법 적용(48시간 배양후 제빵제조, 제빵 기준 : 유럽빵)

Table 10. 선발효모 및 개발 기능성 소재 적용을 위한 제과(빵)제조 레시피 정립과 이의 특화성 평가를 위한 표준제빵(유럽빵) 제조(유럽빵 ; 르방)후 관능평가 결과

적용 효모	1. 냄새		2. 조직감			3. 맛		
	1) 냄새 이미 이취 정도	2)냄새 선호도	1) 표면의 바삭한 느낌정도	2) 안의 부드러움 정도	3)조직감 선호도	1)신맛의 정도	2) 이미, 이취 .정도	3) 전체적인 선호도
상업 효모	5.00 ±2.30	4.25 ±1.22	4.83 ±1.27	5.75 ±1.06	5.42 ±1.08	3.50 ±1.45	3.75 ±1.29	5.67 ±1.07
과일 발효 배지	4.92 ±2.19	4.25 ±2.05	5.08 ±1.78	4.92 ±1.16	5.50 ±1.45	4.67 ±2.02	4.42 ±1.98	5.00 ±1.41

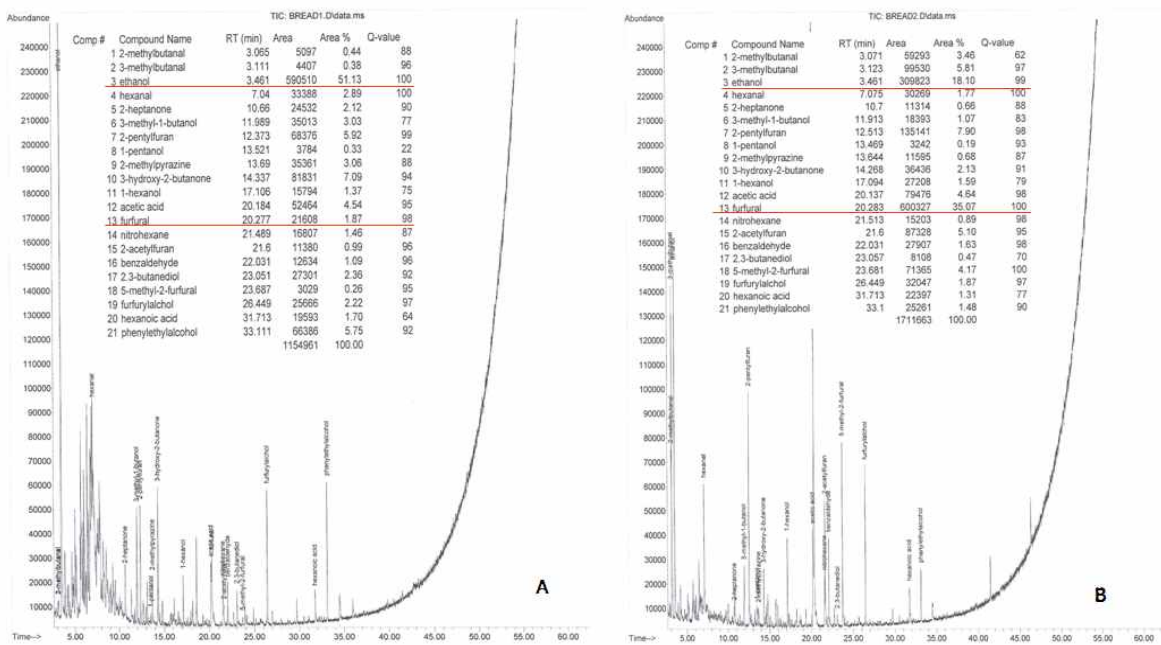


Fig 11. 상업효모(*S. cerevisiae*, Janico사) 대비 과일발효배지(우점효모 : *S. cerevisiae*)적용 제조한 제빵(유럽빵 : 르방) 풍미 비교분석결과.  
 A : 상업효모(압착형), B: 과일발효배지(48시간 배양)

Table 11. 천연특화제빵 제조법 정립(과일발효배지 첨가형)연구에 적용된 표준 제빵(유럽빵 ; 르방)에 대한 풍미성분 분석결과(( 빵굽기온도 180℃이상)

No.	Compound Name	향기특성	상업효모빵		천연효모빵1		천연효모빵2	
			Area	Area %	Area	Area %	Area	Area %
1	2-methylbutanal		5,097	0	59,293	3	42,767	7.04
2	3-methylbutanal		4,407	0	99,530	6	41,276	6.80
3	ethanol	- CH <sub>3</sub> COCH(OH)CH <sub>3</sub> 기인 - C 5이하 :채소,과일,형주 - 불포화 결합알콜:어린잎(뽕내) - 방향족알콜:꽃향기	590,510	51	309,823	18	6,075	14.18
4	hexanal		33,388	3	30,269	2	31,236	5.14
5	2-heptanone		24,532	2	11,314	1	15,812	2.60
6	3-methyl-1-butanol		35,013	3	18,393	1	8,950	1.47
7	2-pentylfuran		68,376	6	135,141	8	136,849	22.54
8	1-pentanol		3,784	0	3,242	0	1,956	0.32
9	2-methylpyrazine		35,361	3	11,595	1	16,917	2.79
10	3-hydroxy-2-butanone		81,831	7	36,436	2	3,663	0.60
11	1-hexanol		15,794	1	27,208	2	47,965	7.90
12	acetic acid	식초향	52,464	5	79,476	5	6,003	0.99
13	furfural	- Glucose : 탄 캔디향 - Tartaric acid : 탄 캔디향 - Fructose : 육즙냄새 - Sucrose : 육즙냄새	21,608	2	600,327	35	20,348	3.35
14	nitrohexane		16,807	1	15,203	1	36,944	6.08
15	2-acetyl-furan		11,360	1	87,328	5	24,942	4.11
16	benzaldehyde	캔디향	12,634	1	27,907	2	10,651	1.75
17	2,3-butanediol		27,301	2	8,108	0	473	0.08
18	5-methyl-2-furfural		3,029	0	71,365	4	3,253	0.54
19	furfurylalcohol	타는 향((Glucose등 당류기인)	25,666	2	32,047	2	11,926	1.96
20	hexanoic acid		19,593	2	22,397	1	19,300	3.18
21	phenylethylalcohol	장미향	66,386	6	25,261	1	39,830	6.56
합계(%)				100.00		100.00		100.00

## 제 2 절 한국토종효모균 분리법 정립

### 1. 연구 목적

유기농 농산물 내 존재하는 효모균을 분리를 통하여 한국토착효모균을 최종선발하고, 발효모균의 배양특성을 확인함으로써 연구시행착오 최소화의 목적을 두었다. 이에 본 연구에서는 목적 효모와 유산균 분리법 정립하고 최적 선택배지 선발하여 발효배지 내 효모와 유산균 형성관련 메카니즘 검정 및 수거농산물 내 효모 및 유산균 분리 동정을 위한 조건을 정립코져 하였다.

### 2. 연구수행방법

#### 가. 목적 효모와 유산균 분리법 정립

본 연구에서는 효모와 유산균 최적 분리를 위하여 분리법 1과 분리법 2에 대해 실험을 진행하였으며 분리법은 하기와 같은 방법을 통해 진행하였다.

#### 1) 분리법 1

분리시료인 유기농 과실의 껍질을 벗겨내어 잘게(0.5cm x 0.5cm) 자른 후 1g을 취하여 증류수를 10ml 첨가하여 stomacher를 이용하여 blending(2min)한다. 이 sample을 1ml 취하여  $10^{-1}$ ~ $10^{-5}$ 까지 peptone수에 십진 희석한 후 YPD배지에 도말하여 균의 형태를 확인하고, 효모를 분리하였다

#### 2) 분리법 2

효모 및 유산균 분리를 위한 배양액 조성조건으로서, 유기농 과실(수거 유기농 농산물)을 대상으로 한국토착형 효모선발을 위하여, 5% sucrose 배지내 과일표피를 분취 및 분쇄하여 접종하고 3일동안 배양(30℃, 습도 : 50 %)을 실시함으로써, 효모분리를 위한 배지 및 배양조건으로 하여 효모를 분리하였다.

#### 나. 효모 및 유산균 분리를 위한 최적 선택배지의 선발

정립된 분리법을 적용하여 16종 수거샘플에서 목적균(효모, 유산균) 분리를 위한 선택배지 선정예비실험으로 배양과정별 일정별로 일정액을 분취한 배양액을 TSA(총균수 확인), PDA(효모선발, 10% 주석산 혼입배지, Tataric acid+PDA) 및 BCP(유산균) 고체영양배지에 배양하였다. 이어서, 형성되는 효모형 콜로니만을 선별 1차 분리한 후 이를 계대순수분리(3세대, PDA)하여 분리과정을 완료하였다. 선택배지별로 일정별 분리된 Colony의 형태는 육안 및 현미경으로 검경하여 분리균의 형태를 확인과정을 필요시 병행하였다.

#### 다. 목적균 (효모 및 유산균) 우점화유도형 발효메카니즘 정립.

본 연구에서는 효모 및 유산균이 생성 됨에 따른 발효메카니즘을 확인하고 효모 및 유산균

우점화유도형 발효법을 확인 하고자 효모 및 유산균의 먹이 이용성을 이용한 당류 및 유기산 분석을 통하여 정립코 저 하였다.

#### 1) 당류 분석방법 (HPLC)

당류분석 위한 HPLC시스템 및 조건은 Table 1~2. 과 같으며, 기본적으로는 식품공전(제10 일반시험법, 5, 탄수화물, 2009)에 준하여 실시하였다. 최저검출한계검정은 1%(w/v) 당류(5종, Lactose, Galactose, Glucose, Fructose 및 Sucrose)를 표준체로 하였는데, 측정간 농도는 당류별 5,000ppm, 10,000ppm, 100ppm, 10ppm, 1ppm 및 0.1ppm희석하여 사용하였다. 검출효율검정은 멸균유내 표준체별 100ppm을 첨가한 후 역시 식품공전법에 준하여 실시하였다.

#### 2) 유기산류 분석방법 (HPLC)

유기산류 분석 또한 HPLC분석법을 적용하여 실시하였다. 표 3. 과 같으며 시료로 유기산 대표 표준체 9종을 선별하여, 측정 간 1,000ppm의 Stock solution을 준비하여 희석하여 사용하였다. 분석법 정립 시 적용 유기산은 Tartaric acid(Sigma, USA), DL-Malic acid(Junsei, Japan)을 사용하였으며, 표준체는 Table 3~4.와 같다.

#### 라. 유기산 변화에 따른 효모균 우점화 요인 분석

L(+)-Tartaric acid (Yakuri pure chemical Co. LTD., Japan) 및 DL-Malic acid (Junsei chemical Co. LTD., Japan)를 1%, 0.5%, 0.25%, 0.1%, 0.05% 및 0.01%로 조성하고 PDA agar배지에 25℃, 48-72시간, 호기배양조건으로 하여 pH측정 후 효모를 접종하여 효모균 성장 능력에 대한 평가를 실시하였다

### 3. 연구결과

#### 가. 목적 효모 및 유산균 우점화 배양법 정립 및 분리용 선택배지 선정결과

본 연구에서는 추후 수거 농산물내 효모 및 유산균 우점화 배양방법정립과 효과적인 목적균 분리를 위한 선택배지 선별에 목적을 두었다.

우선 농산물내 효모 및 유산균 우점화 배양방법정립 결과는 다음과 같다. 즉, 유기농 농산물(16종)내 존재하는 효모균 및 유산균을 분리를 위하여 최적 조건을 확립하고자 분리법-1과 분리법-2의 방법으로 정하고 연구를 실시하였는데(Table 5), 분리법-1(Swap 법)과 분리법-2(발효배지법)으로 하여 5종에 선택배지를 적용하여 예비실험이 진행되었다.

결과로서, 분리법-1의 경우는 여러 잡균의 의해 효모 및 유산균 분리가 어려웠는데, 분리법-2(발효배지법)은 발효과정에 따라 효모 및 유산균의 우점화가 이루어지는 결과를 보였다(Fig 1, Table 6). 즉, 분리법-2(발효배지법)는 효모 및 유산균 분리를 위한 발효기법이 적용된 배양조건으로서, 유기농 과실(16종)을 대상으로, 5% sucrose 배지내 과일 표피를 분취 및 분쇄하여 접종하고 이를 3일 동안 배양(30℃, 습도 : 50 %)을 실시

함으로서, 시간별 발효액을 분취하여 5종의 선택배지에 도말하여 목적균 분리 효과를 검정하여 보았더니, 효모와 유산균 분리가 우수함을 확인할 수 있었다. 결과로서, 분리법-2(발효배지법)를 추후 수거 농산물내 효모 및 유산균 분리 방법으로 최종 확정하였다.

다음으로, 농산물내 효모 및 유산균 우점화 배양방법과 목적균 분리를 위한 선택배지 선발결과는 다음과 같다. 결과로서, 선발을 의한 5종배지로서 총균수 검정은 TSA배지, 효모는 일반 PDA배지와 10% Tartaric acid가 포함된 PDA배지(이하, PDA-T) 그리고 유산균은 BCP, MRS를 준비하고 분리법-2에 따라 일정별 균수변화와 배지선택성을 고려한 결과를 토대로 총균수 검정은 TSA배지, 효모는 10% Tartaric acid 그리고 유산균은 BCP배지를 전체시험간 선택배지로 최종선정하였다.

#### 나. 수거 농산물내 효모 및 유산균 분리결과

상기 분리법-2(발효배양법)과 선발된 선택배지를 사용하여 16종 수거 농산물(Table 5)내 실지 효모 및 유산균 분리 결과는 다음과 같다. 그 결과로 시간 경과에 따라 총균수가 증가하는 패턴을 보였으며 선택배지별 효모균 및 유산균을 선별하였다(Table 7). 그러나 효모균은 단일 PDA 및 BCP 에서 복합적으로 검출되었으며 추후 시험 간 PDA 및 BCP를 교차 확인근거를 확보하였다.

결과로서 Fig 2-(I)은 시간 경과별 선택 배지에서 효모와 유산균 분리된 케이스이고, Fig 2-(II)는 단일 효모만 분리된 케이스 그리고 Fig 2-(III)은 유산균만 분리된 케이스로 구분되었는데, 이 결과를 통해서 배양시간이 경과하면 배지내 우점화 인자가 변화되면서 당초 존재하였던 총균내 일반균은 소멸되면서 점차적으로 효모와 유산균만 생존 및 우점화 k는 특성을 보임을 확인할 수 있었다, 이 결과를 토대로 효모선발은PDA의 주석산과 BCP에서 단일 복합적 분석을 하였고, 유산균은 BCP기준으로 분리하였다.

이에 확립된 발효법과 선택 배지를 적용하여 본 연구에서는 예비실험에서 효모와 유산균 각각 6종씩을 분리하였다(Fig 2). 이 결과에 대해 본 연구에서는 선택배지의 적절성을 확인하였으며 발효배지법 및 선택배지 적용실험에서 시간에 따른 균수 증가와 초기 균수에 비해 시간이 지나면서 총균수가 효모와 유산균만 생존하는 특성(Table 7.)을 확인하고자 본 연구에서는 발효액에 대한 이화학적 분석을 실시하였다.

#### 다. 목적균 (효모 및 유산균) 우점화유도형 발효메카니즘 정립 결과

발효법으로 정립된 결과에 따라 시간경과별 총 균수에서 효모와 유산균만 생존하는 특성을 확인하였으며 이에 따라 목적균 (효모 및 유산균)확보 및 우점화유도형 발효메카니즘 정립.이 필요하다 사료되어 발효배지대하여 배양일정별 발효 배지액의 pH, 당류 및 유기산 변화를 측정하였다.

##### 1) 균류 우점화 Type별 pH 조사결과



수거 농산물내 존재하는 효모 및 유산균류만을 선택적으로 우점화를 유도하고 분리과정의 편리성 확보를 위하여, 선발된 분리법-2(발효배양법)기법 적용후 배양일정별 균의 우점화 패턴을 확인하여 보았더니, 일반균, 효모 및 유산균별 우점화 패턴이 역시 다르게 나타났다. 따라서, 목적균 우점화 관련 메카니즘 구명을 위하여 우선 pH변화를 조사하여 보았다.

결과로서, 배양 72시간이 경과시를 기준으로 pH의 변화를 살펴보았더니, 당초 pH가 6.7이었음을 기준으로 일반균 우점형의 pH 변화를 살펴보았는데, 3~4로 낮게 나타났다. 그리고, 유산균 및 효모 우점형의 경우는 pH가 2~3 그리고 효모와 유산균이 동시 출현하는 형태에서도 pH도 2~3의 범위를 보이는 것으로 조사되었다. 결국, 이는 일반균이 사멸하면서 효모와 유산균만이 우점균으로 생존하는 pH조건은 3이 기준점임을 알 수 있었으며, 농산물 시료별 존재하는 세균종류는 다름을 알 수 있었다(Table 8).

## 2) 균류 우점화 Type별 먹이 이용성 및 유기산 형성 변화 정립결과

수거 농산물내 존재하는 효모 및 유산균류만을 선택적으로 우점화 관련 메카니즘 구명을 위하여 먼저 pH변화를 살펴본 결과에서 효모와 유산균 우점화시 pH조건이 3이하로 낮아짐을 알 수 있었다. 따라서, 이는 pH가 낮게 나타나는 인자로서 당류의 먹이이용 메카니즘과 깊은 연관성이 있을 것으로 판단되어 역시 당류 및 유기산 증감결과를 확인(HPLC 분석법)하여 보았다.

결과로서, 배양일정결과에 따른 당류의 증감결과를 토대로 관련성을 평가하여 보았다(Table 8, Fig 3). 우선 전체적으로 5종당류 기준 먹이이용성 결과를 비교하여 보았더니 Sucrose가 주요 먹이원으로 사용되었으며, 균의 성장에 따라 Glucose와 galactose로 분해되고 이용되는 공통패턴을 보였다. 이를 기준으로 우점화 형태별 먹이이용성을 비교하여 보았더니, 이는 당류 이용성에 있어 차이가 인정되었다. 효모와 유산균이 동시우점형의 경우, Sucrose는 24시간 이내 90% 이상이 소모되었으며 최종 72시간이 경과하면 100%감소하는 결과를 보였다. 이를 기준으로 효모균 우점화 및 유산균 우점화Type의 경우를 살펴보았는데, 1일 경과(24시간)시 공히 20% 감소되었으며, 72시간이 경과시는 효모균 80% 그리고 유산균은 40%로 조사되어 시간이 경과하면 할수록 증가하였다. 일반균 우점형은 이와는 전혀 다르게 당류의 이용성이 배양일정이 경과되더라도 크게 인정되지 않았다. 그에 반하여 일반균만 형성된 배지는 당류(Sucrose 기준)의 사용량이 효모 및 유산균 생성에 비해 당류(Sucrose 기준)를 소비하지 않는 결과를 얻어 이를 토대로 유기산 변화량을 연계하여 측정 하였다(Table 8, Fig 3).

유기산 분석 결과 일반균, 효모 및 유산균 단독 생성, 동시생성 발효배지의 유기산 패턴은 당류 패턴과 유의성을 보였으며 일반균 생성 유기산 분석결과를 보면 효모 및 유산균 생성 배지에 비해 유기산 생성 종류 및 유기산 함유량이 낮음을 확인 할 수 있었으며 이 결과는 pH 의한 균성장 결과와 일치함을 알 수 있었다. pH 및 당류이용성과 연계하여 유기산 생성 및 증감결과를 비교하므로써 목적균 우점화 관련 메카니즘을 검정하여 보았다.

전체 시험구에서 배양후 24시간이 경과하는 초기단계 부터 Malic acid, Lactic acid, 및 Acetic acid 순으로 유기산 농도가 높게 나타는 패턴을 보였다. 세부적으로 Malic acid의 경

우, 배양일정이 경과하면 농도가 증가하는 경향을 보였는데, 이는 균의 증식과 관련하여 먹이 이용성도 증가할 것이고 이에 따라 유기농 농산물 고유의 Malic acid가 용출되어 농도가 높아진 것으로 판단되었다. 또한, Lactic acid, 및 Acetic acid의 경우는 당을 소비하면서 균의 증식 메카니즘으로 인한 이유로 판단되었는데, 당류의 먹이용으로 인한 감소와 유기산 증감 변화패턴은 전체적으로 일치함을 알 수 있었다,

우점형별 유기산 증감패턴을 배양후 72시간 경과시를 기준으로 비교하여 보았더니, 일반균 우점형은 Malic acid는 검출되지 않았으며, Lactic acid(0.5~1.1%)과 Acetic acid(0.9~1.5%)가 낮은 농도로 검출되는 경향을 보였다. 이를 기준으로 유산균 및 효모균이 단일 및 복합적으로 우점화형의 경우는 Malic acid는 0.5~5.5% 범위, Lactic acid는 0.6~11.7% 범위를 그리고 Acetic acid는 0.1~2.3%범위의 범위를 나타내었는데 이는 당류의 감소패턴과 유사하였다.

우점화 관련하여 따라 일반균(잡균)의 소멸과 관련한 pH감소결과와 유기산의 증감수치를 비교하여 보았더니, 일반균(1.4~2.6%기준) 대비 효모 또는 유산균 우점형의 경우는 발효초기에는 1.2%에서 72시간 경과시는 19.5%로 나타나 7.5배 증가 수치를 보였다, 따라서, 우점화에 관련한 최종인자는 유기산이며 유기산중 Malic 및 Tataric acid가 주요유기산 인자였음이 확인되었다(Table 9, Fig 4).

### 3) 유기산함량 변화가 효모균의 성장에 미치는 효과 조사(MIC)

발효배지방법 적용시 목적균 우점화와 관련하여 일반균(잡균)의 소멸은 당류 이용에 따른 pH감소와 연계하여 유기산의 농도가 19.5%까지 높게 증가되는 것으로 인하여 우점화를 유도하는 것으로 확인되었는데, 이를 검정하기 위하여 Fruit acid의 대표적인 유기산인 Tartaric acid, Malic acid를 농도별로 조절하고 효모를 대상으로 항균성을 검정하여 보았다(Table 10). 즉, Tartaric acid, Malic acid를 농도별(0.01%~5%)첨가에 따른 효모균의 사멸효과를 확인하여 본 결과, 각각의 함유량이1%이상의 고농도의 경우에서, 효모균은 사멸하는 것으로 조사되었는데 이때 pH는 2.45였다. 이를 분리법-2(발효배지법)의 우점화 관련 결과와 비교하여 보았더니, pH 3이하 일때, 3종 유기산의 총량은 19.5%였는데 이중 Malic acid 5.5% 범위를 보일 때 유산균과 효모균은 우점종으로 형성됨을 알수 있었으며, 효모 및 유산균 분리를 위한 선택배지 선발시, 일반균 및 효모가 동시에 증식하였던 PDA 대비 PDA-T배지(0.4%Tataric acid 함유)는 일반균의 증식을 억제하였던 결과와 비교하면, 1% 이상의 Malic 또는 Tataric acid가 단일 또는 복합적으로 생성될 때 효모 및 유산균의 우점화 결과가 나타나는 것으로 확인되었다.

이 결과로 토대로 관련 유기산의 생성 및 변화(먹이원 이용성) 비교결과에서 유의성이 인정되었으며 효모와 유산균이 생성되는 발효 배지는 초기 시간부터 일반균의 성장을 억제하여 효모와 유산균이 생성되는 우점화 유도 메카니즘을 도출하였으며 본 연구팀의 정립방법이 효모와 유산균 분리에 효율적 방법이라는 결과를 도출하였다. 이에 따라 추후 연구에서는 목적균 우점화 유도 메카니즘을 적용한 발효배지법을 연구간 사용하였다.

#### 4. 연구결론

예비실험간, 수거시료 내 효모균 및 유산균 효율적 분리를 위하여, SWAB Test(분리법1) 및 발효배지(분리법 2) 조성을 통한 검정결과 발효배지 조성법이 우수하였다. 따라서 본 연구에서는 분리법 2를 적용하고 선택 배지별 균수조사 및 선택 배지별 균을 확인하여 3종 선택 배지(TSA, PDA+Tartaric acid 및 BCP)를 최종분리 동정기본 선택배지 선발하였으며, 효모 전용 선택배지는 PDA+Tartaric acid로 최종 결론을 도출하였다. 분리법 확립을 위한 예비실험간 효모 및 유산균 각6종씩 분리(Table 10.)하여 분리법을 확립하였고 발효배지 내 효모와 유산균 형성관련 메카니즘을 HPLC 분석을 통한 당류변화량, 유기산 생성 및 변화를 측정하여 메카니즘 검정을 완료하였다. 이에 본 연구에서는 확립된 배양법과 선택 영양배지를 적용하여 본 과제를 수행하였다.

Table 1. HPLC(당류) 분석시스템 및 분석조건

분석시스템 구성 (Agilent HPLC)	분석조건
. Degasser : Model G1322A	.Column : Carbohydrate (5um,4.6 x 150mm)
. QuatPump : Model G1311A	. Mobile Phase :ACN(75):ddH <sub>2</sub> O(25)
Autosampler:Model G1313A	.Flow Rate:1.0ml/min.
. Detector (RI):Model G1365B	.Column Temp. : 35℃
. Detector (RI):Model G1365B	.Injection Vol.: 20ul

Table 2. 검출한계 및 검출효율 검정결과

표준체별 조성내역	최저검출한계 (ppm)	검출효율 (%)
Lactose	10	108
Galactose	10	97.9
Glucose	10	92.5
Fructose	10	105
Sucrose	10	92.2

Table 3. HPLC(유기산) 분석시스템 및 분석조건

분석시스템 구성 (Agilent HPLC)	분석조건
. Degasser : Model G1322A	.Column : AMINEX HPX-87 (300mm x 7.8mm)
. QuatPump : Model G1311A	. Mobile Phase : 10mM H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
Autosampler: Model G1313A	.Flow Rate: 1.0ml/min.
. Detector (RI): Model G1365B	.Column Temp. : 35℃
. Detector (RI): Model G1365B	.Injection Vol.: 20ul
	.Detection (UV): 210nm

Table 4. 유기산 대표표준체 함유량 및 제조사

표준체명 (9종, 함유량)	제조사명
1. Sodium Oxalate (0.8umol)	Organic Acid Standard (Bio-RAD, USA)
2. Sodium Citrate (4.0umol)	
3. Sodium Malate (8.0umol)	
4. Sodium Succinate (20.0umol)	
5. Sodium Formate (20.0umol)	
6. Sodium Acetate (40.0umol)	
7. Tartaric acid (C <sub>4</sub> H <sub>6</sub> O <sub>6</sub> .H <sub>2</sub> O)	SAMCHUN (KOREA)
8. D-Lactic acid	GmbH (Germany)
9. L-Lactic Acid	GmbH (Germany)

Table 5. 효모선발을 위한 유기농 농산물 수거 내역

번호	종류	주소	비고
1	미니느타리버섯	한울타리 영농조합(경기도 용인시 포곡면 영문리66)	
2	새송이	한울타리 영농조합(경기도 용인시 포곡면 영문리66)	
3	참미나리	롯데마트 유기농코너	
4	참맛느타리버섯	경북 구미시 허평면 낙산리 387-9	
5	오이맛 고추	(주)성농 짝이네(경기 용인)	
6	바나나	필리핀 만다나오	
7	키위	뉴질랜드(제스프리)	
8	청경채	대동바이오 영농 조합(경기도 광주시 초월읍 자월리8)	
9	배	산청배 영농조합(경남 산청시 신일면 잠죽리)	
10	팽이버섯	호남버섯 영농조합(전남 나주시 노안면 오정리 473)	
11	애호박	경남 진주시 문산읍 옥산리 1267	
12	꽃감	운주농협(전남 완주군 운주면 장선리)	
13	감	창원시 북면 농협	
14	참외	롯데마트 유기농코너	
15	쌈채소(상추)	(주)성농 짝이네(경기 용인)	
16	오이	경북 구미시 허평면 낙산리 387-9	



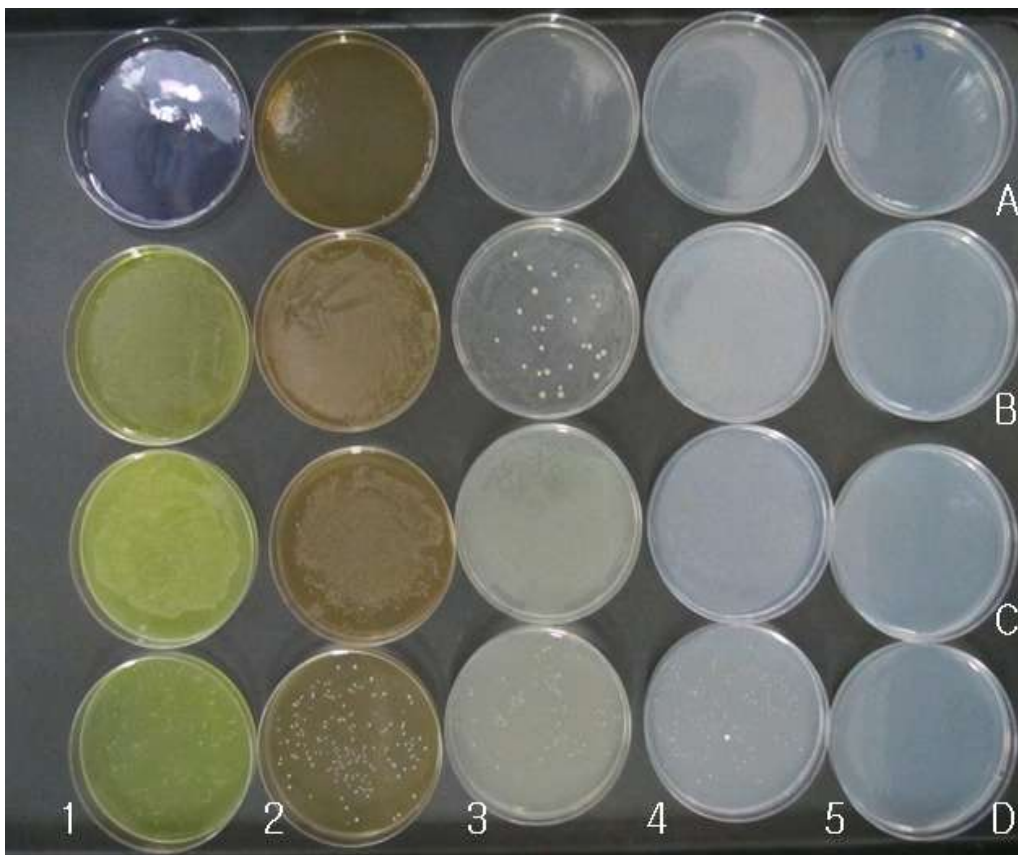


Fig 1. 시료수거 발효법이용 배양 시간별 및 선택배지 배양 결과  
 1: BCP, 2: MRS, 3: TSA, 4: PDA, 5: PDA+Tartaric acid., A: 0시간(발효배지 조성후 배양경과시간), B: 24시간, C: 48시간, D: 72시간

Table 6. 수거시료내 효모균 및 유산균 효율적 분리를 위한 선택배지 선발시험결과

종류		결과확인(cfu/ml)															비고
		TSA			PDA			PDA+주석산			MRS			BCP			
		24h	48h	72h	24h	48h	72h	24h	48h	72h	24h	48h	72h	24h	48h	72h	
1	미니느타리버섯	-	++	+++	-	++	+++	-	-	-	-	++	+++	-	+++	+++	
2	새송이	-	++	+++	-	++	+++	-	-	-	-	++	+++	-	+++	+++	
3	참미나리	-	++	+++	-	++	+++	-	-	-	-	++	+++	-	+++	+++	
4	참맛느타리버섯	-	++	+++	-	++	++	-	+	++	-	++	+++	-	+++	+++	
5	오이맛 고추	-	+++	+++	-	++	+++	-	+	++	-	+++	+++	-	+++	+++	
6	바나나	-	+++	+++	-	++	+++	-	+	++	-	+++	+++	-	+++	+++	
7	키위	-	+++	+++	-	+++	+++	-	+	++	-	+++	+++	-	+++	+++	
8	청경채	-	++	+++	-	++	+++	-	-	-	-	++	+++	-	+++	+++	
9	배	-	+++	+++	-	+++	++	-	-	-	-	+++	+++	-	+++	+++	
10	팽이버섯	-	++	+++	-	++	+++	-	-	-	-	++	+++	-	+++	+++	
11	애호박	-	+++	+++	-	+++	++	-	-	-	-	+++	+++	-	+++	+++	
12	꽃감	-	+++	+++	-	+++	+++	-	+	++	-	+++	+++	-	+++	+++	
13	감	-	++	+++	-	++	++	-	+	++	-	++	+++	-	+++	+++	
14	참외	-	++	++	-	++	++	-	-	-	-	++	++	-	+++	++	
15	쌈채소(상추)	-	+++	+++	-	++	+++	-	-	-	-	+++	+++	-	+++	+++	
16	오이	-	++	+++	-	++	++	-	-	-	-	++	+++	-	+++	+++	

- : 균 없음, + : 아주적음, ++ : 보통, +++ : 아주 많음

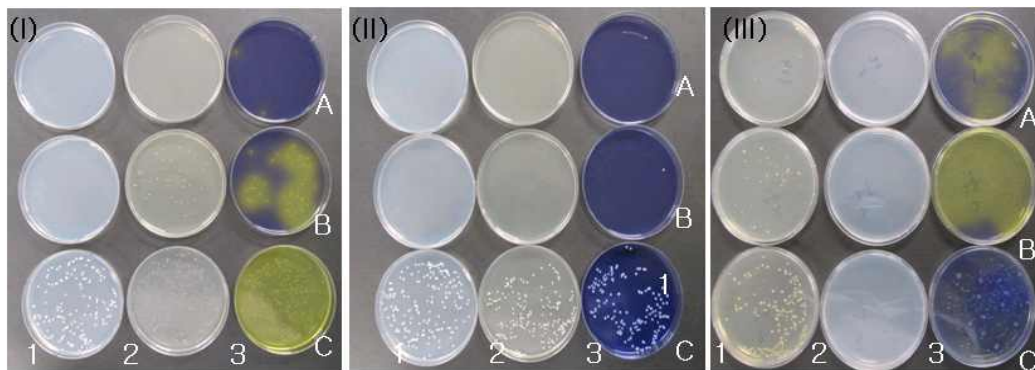


Fig2. 시료수거 배양 시간별 및 선택배지 배양에 대한 효모와 유산균 분리된 케이스 결과.  
 I : 효모와 유산균 분리된 케이스, II : 단일 효모만 분리된 케이스, III : 유산균만 분리된 케이스, 1: PDA+Tartaric acid, 2 : TSA, 3 : BCP , A : 24시간(발효배지 조성후 배양 경과시간), B : 48시간, C : 72시간

Table 7. 효모균 선발을 위한 16종 수거농산물에 효모균 및 유산균 효율적 분리를 위한 최종 정립 선택배지 선발시험결과(영양배지에 따른 균수 비교(총균수, 효모 및 유산균))

종류		결과확인(cfu/ml)									비고
		TSA			PDA(T)			BCP			
		24h	48h	72h	24h	48h	72h	24h	48h	72h	
1	미니느타리버섯	9.5x10 <sup>7</sup>	1.2x10 <sup>10</sup>	2.2x10 <sup>10</sup>	ND	ND	ND	ND	ND	ND	
2	새송이	4.7x10 <sup>9</sup>	1.1x10 <sup>10</sup>	1.6x10 <sup>9</sup>	ND	ND	ND	ND	ND	ND	
3	참미나리	4.0x10 <sup>7</sup>	4.0x10 <sup>7</sup>	1.0x10 <sup>8</sup>	ND	ND	ND	ND	2.0x10 <sup>7</sup>	2.0x10 <sup>7</sup>	
4	참맛느타리버섯	2.2x10 <sup>7</sup>	9.8x10 <sup>8</sup>	1.6x10 <sup>8</sup>	ND	ND	ND	ND	ND	ND	
5	오이맛 고추	1.4x10 <sup>7</sup>	9.8x10 <sup>8</sup>	1.6x10 <sup>8</sup>	ND	ND	1.2x10 <sup>10</sup>	ND	ND	ND	
6	바나나	9.5x10 <sup>7</sup>	1.2x10 <sup>10</sup>	2.2x10 <sup>10</sup>	ND	ND	2.2x10 <sup>7</sup>	ND	ND	ND	
7	키위	6.0x10 <sup>7</sup>	6.0x10 <sup>8</sup>	2.2x10 <sup>8</sup>	ND	ND	1.6x10 <sup>8</sup>	ND	ND	ND	
8	청경채	8.0x10 <sup>7</sup>	8.0x10 <sup>7</sup>	2.6x10 <sup>8</sup>	ND	ND	ND	7.8x10 <sup>9</sup>	9.1x10 <sup>9</sup>	1.3x10 <sup>9</sup>	
9	배	6.0x10 <sup>7</sup>	2.4x10 <sup>8</sup>	3.0x10 <sup>8</sup>	ND	ND	ND	ND	ND	2.0x10 <sup>7</sup>	
10	팽이버섯	4.0x10 <sup>7</sup>	4.0x10 <sup>7</sup>	1.0x10 <sup>8</sup>	ND	ND	ND	ND	2.0x10 <sup>7</sup>	2.0x10 <sup>7</sup>	
11	애호박	ND	ND	4.4x10 <sup>10</sup>	ND	ND	ND	ND	8.0x10 <sup>8</sup>	3.1x10 <sup>10</sup>	
12	꽃감	3.6x10 <sup>9</sup>	9.4x0 <sup>9</sup>	1.0x10 <sup>10</sup>	ND	ND	4.0x10 <sup>7</sup>	ND	ND	1.1x10 <sup>9</sup> #	
13	감	4.0x10 <sup>7</sup>	4.0x10 <sup>7</sup>	1.0x10 <sup>8</sup>	ND	ND	3.6x10 <sup>9</sup>	2.0x10 <sup>7</sup>	2.0x10 <sup>7</sup>	5.0x10 <sup>8</sup>	
14	참외	4.7x10 <sup>9</sup>	1.1x10 <sup>10</sup>	1.6x10 <sup>9</sup>	ND	ND	ND	ND	ND	ND	
15	쌈채소(상추)	1.0x10 <sup>9</sup>	1.1x10 <sup>9</sup>	2.0x10 <sup>9</sup>	ND	ND	ND	1.0x10 <sup>9</sup>	9.8x10 <sup>9</sup>	1.1x10 <sup>9</sup>	
16	오이	3.2x10 <sup>8</sup>	6.6x10 <sup>8</sup>	1.2x10 <sup>9</sup>	ND	ND	ND	ND	ND	ND	

- ND : Not Detecting, # 96시간 배양결과

Table 8. 효모균 선발용 농산물(16종)에 대한 발효배지 조성 및 일정경과시 균류 우점형에 따른 발효배지내 당류이용성 평가 결과

샘플종류	선별균의 먹이용원에 대한 당변화 조사결과(ppm)												산도 (pH)	생성균	
	Sucrose			Glucose			Galactose			Fructose					
	24h	48h	72h	24h	48h	72h	24h	48h	72h	24h	48h	72h			
기본배지 <sup>a</sup>	49,318			NT			NT			NT			6.7		
1	미니스타 리버섯	50,234	47,307	45,117	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	3.88	일반균
2	새송이	49,688	49,115	46,013	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	4.13	
3	참미나리	46,576	42,958	41,223	ND	ND	ND	ND	ND	478	ND	68	95	3.6	
4	참맛스타 리버섯	50,234	47,307	45,306	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	2.99	효모
5	오이맛 고추	47,237	42,939	32,003	ND	ND	ND	ND	ND	3,709	ND	63	216	2.78	
6	바나나	41,536	28,548	594	ND	ND	ND	2,715	8,851	13,260	125	347	504	3.90	
7	키위	40,873	35,985	33,002	ND	ND	ND	3,384	6,113	9,338	153	270	360	2.82	
8	청경채	46,485	44,415	43,422	ND	ND	ND	ND	386	759	37	50	50	3.63	유산균
9	배	44,282	41,314	38,551	ND	ND	ND	1,515	3,228	4,373	107	172	218	2.98	
10	팽이버섯	38,175	33,788	32,778	ND	ND	ND	3,262	6,359	5,295	173	266	266	2.61	
11	애호박	42,484	39,773	3,7766	ND	ND	ND	2,697	2,092	2,697	65	113	153	2.71	
12	꽃감	ND	ND	ND	ND	ND	ND	45,002	47,897	43,139	1,276	1,187	1,016	2.99	효모, 유산균
13	감	1,035	1,022	74	ND	ND	ND	23,156	32,167	31,969	758	375	1,021	3.07	

-ND : Not Detecting, NT : Not Test, 기본배지 조성 : 3차 멸균수 100g+Sucrose 5g

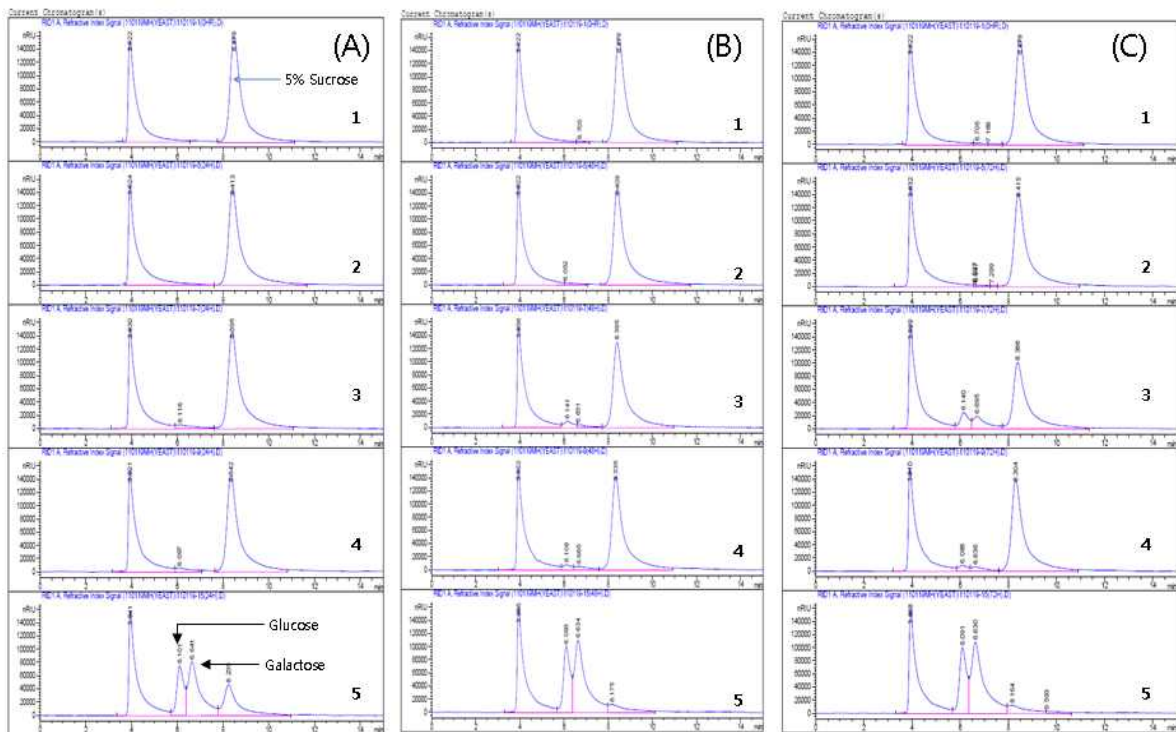


Fig 3. 발효에 따른 균우점화 형태별(일반균 우점화, 효모균 우점화, 유산균 우점화 및 효모 및 유산균 동시 우점화) 당이용성 분석 결과.

1 : 조성배지 (5% Sucrose 용액), 2 : 참미나리(일반균 우점형), 3 : 바나나(효모균 우점형), 4 : 배(유산균 우점형), 5 : 감(효모균 및 유산균동시우점형), A : 발효배지 24시간 배양후, B; 48시간, C : 72시간

Table 9. 효모균 선발용 농산물(16종)에 대한 발효배지 조성 및 일정경과시 균류 우점형에 따른 발효배지내 유기산 변화량 결과

샘플 종류	배양 시간	선별균의 먹이이용원에 대한 유기산변화 조사결과(ppm)							생성 균
		Oxal acid	Tartaric acid	D-Malic acid1	Lactic acid	Formic acid	Acetic acid	L-Malic acid2	
기본 배지 <sup>a</sup>	24h	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	
	48h	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	
	72h	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT	
1 미니스리버	24h	ND	2,508	ND	ND	ND	ND	ND	일반균
	48h	5,385	ND	ND	6,045	510	9,949	ND	
	72h	18,896	ND	ND	11,418	722	15,816	ND	
2 새송이	24h	ND	ND	ND	1,940	ND	1,020	ND	
	48h	ND	9,833	ND	5,000	ND	2,296	ND	
	72h	ND	10,167	ND	13,134	ND	5,969	ND	
3 참나리	24h	ND	1,486	ND	11,605	ND	ND	ND	
	48h	ND	1,868	ND	12,107	ND	6,327	ND	
	72h	ND	1,914	ND	14,247	ND	6,327	ND	
4 참느리버	24h	2,174	9,599	ND	6,272	488	1,633	ND	효모
	48h	ND	ND	ND	37,079	764	2,653	ND	
	72h	ND	ND	ND	48,466	1,167	4,030	ND	
5 오이추	24h	ND	ND	2,996	48,208	ND	6,327	ND	
	48h	ND	13,512	12,024	24,760	ND	6,327	ND	
	72h	ND	14,849	13,901	27,496	ND	5,561	ND	
6 바나나	24h	9,298	14,247	21,438	12,313	2,640	ND	1,122	
	48h	7,124	19,732	45,184	18,358	4,206	531	4,031	
	72h	8,462	2,140	40,679	24,104	4,437	955	1,990	
7 키위	24h	ND	13,880	8,815	5,522	ND	106	ND	
	48h	ND	15,318	12,743	10,402	ND	616	ND	
	72h	ND	15,518	15,725	11,721	ND	1,836	ND	
8 청채	24h	ND	9,197	3,315	6,962	169	1,989	ND	유산균
	48h	ND	11,605	9,565	33,555	192	1,146	20,867	
	72h	ND	12,107	10,936	37,239	224	1,274	26,071	
9 배	24h	ND	6,125	35,127	2,081	2,038	3,827	ND	
	48h	ND	9,228	55,900	2,864	1,953	3,571	ND	
	72h	ND	19,297	10,972	56,376	2,887	4,846	2371	
10 팽이버섯	24h	ND	8,284	5,149	13,433	ND	255	ND	
	48h	ND	9,933	13,478	8,366	ND	5,153	ND	
	72h	ND	10,033	8,268	9,461	297	17,959	ND	
11 애박	24h	ND	8,294	10,736	65,746	403	1,486	ND	
	48h	ND	9,298	13,344	88,195	515	1,868	ND	
	72h	ND	10,795	15,230	98,748	573	5,561	ND	
12 풋감	24h	7,993	18,127	44,301	117,540	738	4,013	ND	효모, 유산균
	48h	7,291	19,465	44,088	90,209	1,186	11,253	8,571	
	72h	23,615	18,294	40,679	50,298	743	23,571	4,154	
13 감	24h	ND	10,903	27,403	4,186	ND	191	ND	
	48h	ND	14,682	37,217	6,229	ND	807	1,122	
	72h	ND	17,324	35,432	7,736	ND	2,295	362	

-ND: Not Detecting, NT : Not Test, 기본배지 : 3차 멸균수 100g + Scurose 5g

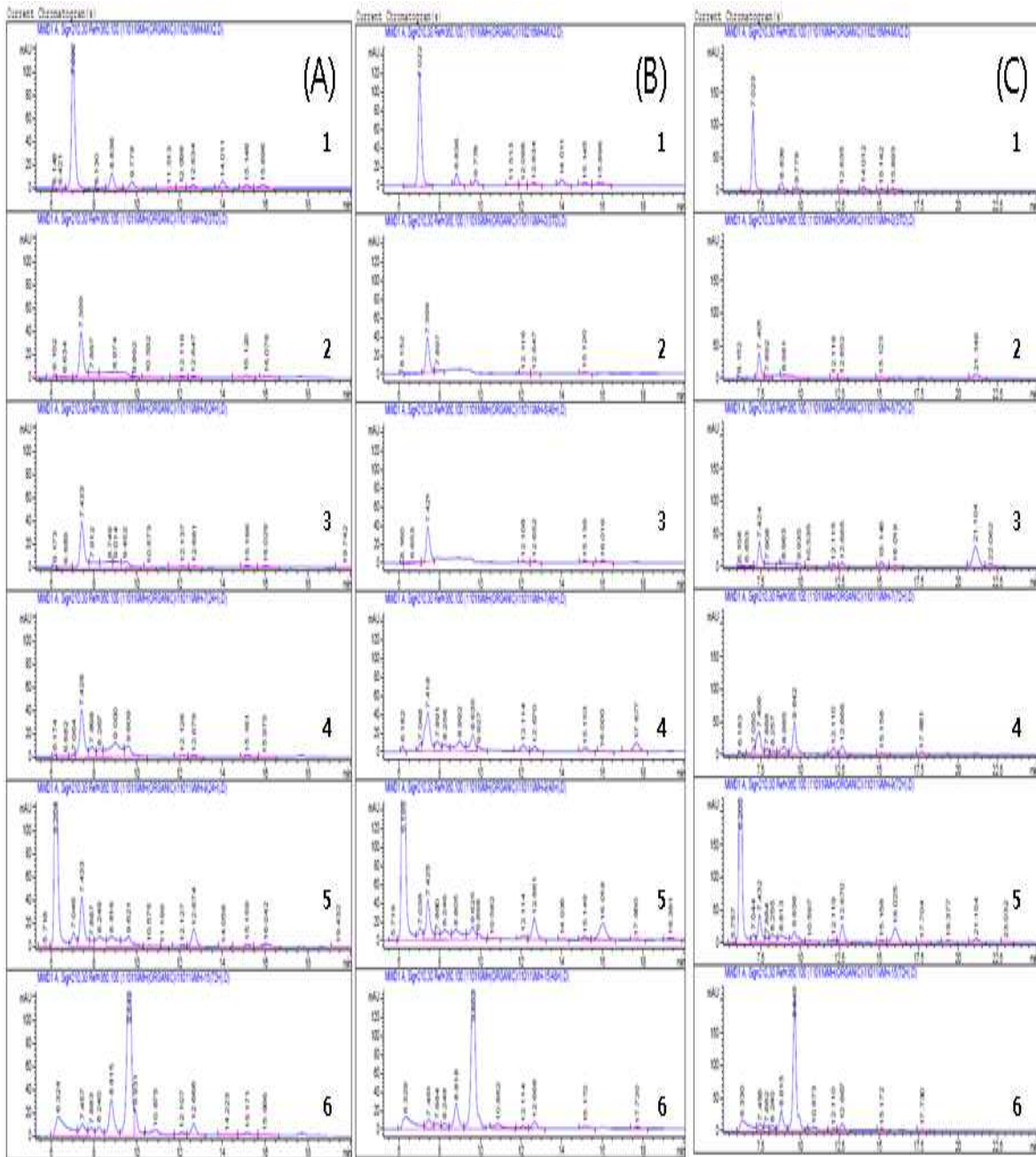


Fig 4.효모균 선발용 농산물(16종)에 대한 발효배지 조성과 일정경과시 균류 우점형에 따른 발효 배지내 유기산 변화량 분석 결과

1 : 조성배지 (5% Sucrose 용액), 2 : 참미나리(일반균 우점형), 3 : 바나나(효모균 우점형), 4 : 배(유산균 우점형), 5 : 감(효모균 및 유산균 동시우점형), A : 24시간(발효배지 조성후 경과 시간), B ; 48시간, C : 72시간



Table 10. 국내 농산물(과일 및 과채류)내 유기산 함유량 조사결과(참고)

작물	유기산 함량(%)	주요구성성분	비고
사과	0.2~0.8	malic acid, citric acid, tartaric acid	
배	<0.2	malic acid, citric acid	
포도	0.31~0.95	malic acid, tartaric acid(40~60%)	
복숭아	0.5	malic acid, citric acid	
복숭아(황도)	1	malic acid, citric acid	
단감	0.1~0.15	malic acid(주성분), citric acid, tartaric acid	
감귤(온주밀감)	1.04~1.20	citric acid(75.5~96.2%)	
매실	4~5	malic acid, citric acid	
레몬	6~7	citric acid	
자두	1~2	malic acid	
석류	1.5	citric acid	
딸기	0.6~1.5	malic acid, citric acid	
완숙토마토	0.7	citric acid(0.3~1%)	
유자	과육:6.6,과피:4.6	citric acid(과육 :56.4%, 과피:62.3%)	
파인애플	0.5~3	malic acid, citric acid	

Souci, SW. et al.(1994). Food Composition and Nutrition Tables(5th revised and completed edition, 1994)

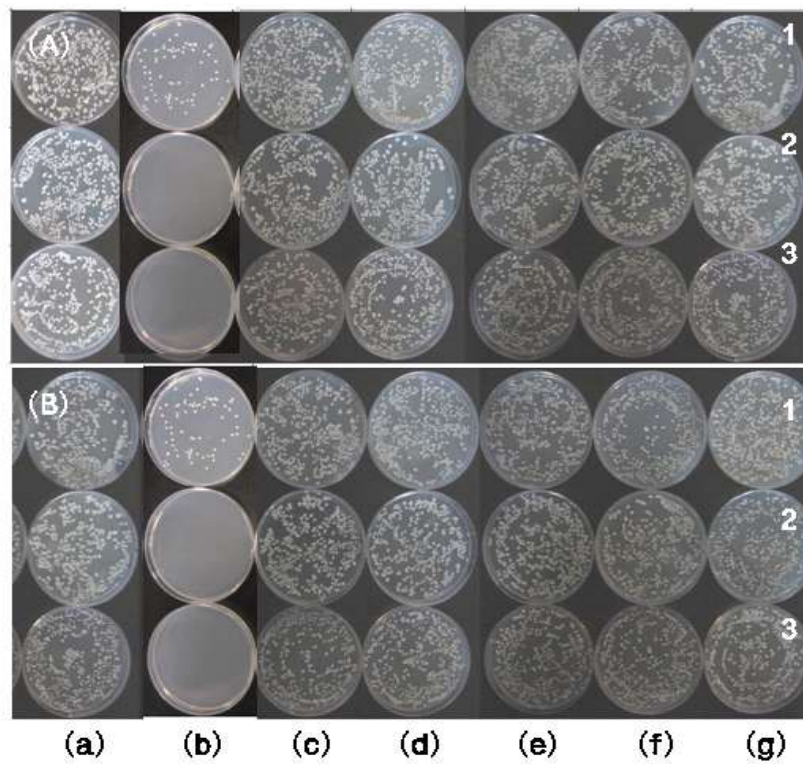


Fig 5. 유기산 농도 및 경과시간에 따른 효모균 증감에 미치는 효과 조사결과

A: Tartaric acid, B : Malic acid,, a(대조), b(5%), c(1%), d(0.5%), e(0.25%), f(0.1%), g(0.05%),, 1 : 0시간(유기산 접촉후 경과시간), 2: 12시간 경과후, 3: 24시간 경과후

Table 10. 유기산 농도변화가 pH 및 효모균 증감에 미치는 연관성 조사결과

pH 및 경과시간	Tartaric acid 조성농도별 효모균 증감에 미치는 효과(cfu/ml)							
	대조 (생리 식염수)	5%	1%	0.5%	0.25%	0.1%	0.05%	0.01%
pH	6.20 (22.4℃)	2.06 (23.2℃)	2.45 (22.5℃)	2.56 (22.5℃)	2.72 (22.5℃)	2.93 (22.5℃)	3.13 (22.5℃)	3.61 (22.5℃)
0h	1.4X10 <sup>4</sup>	1.6X10 <sup>3</sup>	1.9X10 <sup>4</sup>	1.3X10 <sup>4</sup>	1.2X10 <sup>4</sup>	1.8X10 <sup>4</sup>	1.0X10 <sup>4</sup>	1.4X10 <sup>4</sup>
12h	1.4X10 <sup>4</sup>	0	4X10 <sup>3</sup>	1.0X10 <sup>4</sup>	1.2X10 <sup>4</sup>	1.0X10 <sup>4</sup>	1.3X10 <sup>4</sup>	1.4X10 <sup>4</sup>
24h	1.4X10 <sup>4</sup>	0	2.1X10 <sup>3</sup>	1.0X10 <sup>4</sup>	1.0 X 10 <sup>4</sup>	1.5 X 10 <sup>4</sup>	1.5X10 <sup>4</sup>	1.6X10 <sup>4</sup>

pH 및 경과시간	Malic acid 조성농도별 효모균 증감에 미치는 효과(cfu/ml)							
	대조 (생리 식염수)	5%	1%	0.5%	0.25%	0.1%	0.05%	0.01%
pH	6.20 (22.4℃)	2.24 (23.2℃)	2.60 (22.5℃)	2.72 (22.5℃)	2.88 (22.5℃)	3.07 (22.5℃)	3.27 (22.5℃)	3.74 (22.5℃)
0h	1.4X10 <sup>4</sup>	8.6X10 <sup>2</sup>	1.4X10 <sup>4</sup>	1.3X10 <sup>4</sup>	1.3X10 <sup>4</sup>	1.9X10 <sup>4</sup>	1.9X10 <sup>4</sup>	1.8X10 <sup>4</sup>
12h	1.4X10 <sup>4</sup>	0	2.5X10 <sup>3</sup>	1.2X10 <sup>4</sup>	1.1X10 <sup>4</sup>	1.4X10 <sup>4</sup>	1.0X10 <sup>4</sup>	1.5X10 <sup>4</sup>
24h	1.4X10 <sup>4</sup>	0	3.1X10 <sup>3</sup>	1.2X10 <sup>4</sup>	1.3X10 <sup>4</sup>	1.5X10 <sup>4</sup>	1.6X10 <sup>4</sup>	1.3X10 <sup>4</sup>

선발 유기농 시료명	선발균 분리 결과		ID%	비고
	효모	유산균		
참맛 느타리버섯	<i>C. magnoliae</i>	ND	88	API, Vitek 및 Diversilab 시스템 적용 동정
오이맛 고추	<i>C. guilliermondii</i>	ND	76	
바나나	<i>C. famate</i>	ND	95	
꽃감	<i>C. famate</i>	<i>Lactococcus lactis spp lactis1</i>		
거봉포도	<i>C. utilis</i>	ND		
감	<i>C. guilliermondii</i>	<i>Lactobacillus brevis1</i>	95	
팽이버섯	ND	<i>Lactococcus lactis spp lactis1</i>	99	유산균API 적용
애호박	ND	<i>Leuconostoc citreum</i>	96	
청경채	ND	<i>Lactobacillus brevis1</i>	94	
배	ND	<i>Lactobacillus fermenturn</i>	99	

\* ND : Not Detecting

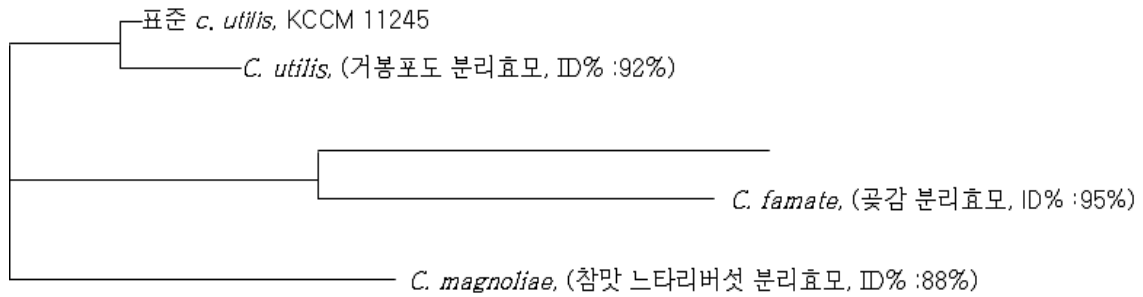


Fig 6. 예비 선발 효모균 및 유산균분리 결과 및 효모균 Diversilab시스템 적용 표준균주 (*C. utilis* KCCM11245)대비 상동성 결과

## 제 3 절 유기농 농산물내 효모균 분리, 동정 및 유전자 확보

### 3-1. 유기농 농산물내 효모균 분리, 동정 및 유전자 확보(1차)

#### 1. 연구목적

선행과제(제빵용 한국토종효모 개발)연계하여 지속적인 한국형 효모자원 및 유산균을 선발(유기농 친환경 농업현장내)과 분리동정 및 유전자원 확보를 통한 제과(빵)용 효모 확보 및 기능성물질 개발에 목적을 두었다

#### 2. 연구수행방법

##### 가. 미생물 분리원

미생물 분리는 국내에서 시판되는 유기농 농산물을 수거하여 미생물 분리원으로 사용하였으며, 곡류, 과실류, 야채류 및 버섯류 등 총 44종에서 유산균을 분리하였다(Table 1).

##### 나. 당이용성 및 유기산 생성패턴 평가

한국토착형 효모 및 유산균분리를 위한 배양액 조성조건으로서, 유기농 과실(44종)을 대상으로 각각 10g씩 분취 및 분쇄한 후 이를 5%(w/v) sucrose 300ml 배지내 접종하고 4일동안 배양(30℃, 습도 : 50 %)을 실시함으로써, 효모 및 유산균 분리를 위한 배지 및 배양조건으로 하였다(Table 1).

효모 및 유산균분리는 배양과정별 일정별로 50ml씩 분취한 배양액을 시료로 하여 배양일정별 우점균의 생성패턴(Table 2~3)과 더불어 배양일정간 형성되는 우점종 패턴에 따른 당이용성(Table 4, Fig 2) 및 유기산 생성 및 소모패턴(Table 5, Fig 3)을 조사하였다.

당이용성 및 유기산 형성패턴조사를 위하여, 예비시험을 거쳐 배양 4일후 일반균 우점형(수거시료 4 : 적상추), 유산균 우점형(수거시료 28 : 풋고추), 효모균 우점형(수거시료 37 : 딸기) 그리고 효모 및 유산균 동시 우점형(수거시료 43 : 야생오이)을 선발하여 대표적으로 변화를 조사하였다(Table 4~5, Fig 2~3).

당이용성 평가를 위한 당류는 Sucrose, Glucose, Galactose 및 Fructose를 대상으로, 유기산의 경우는 Citric acid, Tartaric acid, D-Malic acid,

Lactic acid, Formic acid, Acetic acid 및 L-Malic acid으로 7종을 대상으로 일정별 변화를 확인하였다(Table 4~5, Fig 2~3).

#### 다. 유기농 농산물내 효모균 및 유산균 분리

한국토착형 효모 및 유산균분리를 위한 배양액 조성조건으로서, 유기농 과일(44종)을 대상으로 각각 10g씩 분취 및 분쇄한 후 이를 5%(w/v) sucrose 300ml배지내 접종하고 최종 4일동안 배양(30°C, 습도 : 50%)을 실시함으로써, 효모 및 유산균 분리를 위한 배지 및 배양조건으로 하였다. 효모 및 유산균분리는 배양과정에서 일정별로 일정액을 분취한 배양액을 TSA(총균수 확인), PDA(효모선발, 10% 주석산 혼입배지) 및 BCP(유산균) 고체영양배지에 배양하였으며, 4일이 경과시 종료시점으로 하였다(Table 1, Fig 1).

효모는 배양일정별 형성되는 효모형 콜로니만을 선별 1차 분리한 후 이를 계대순수분리(3세대, PDA)하여 순수분리과정을 완료하였다(Table 2~3).

유산균의 경우, 1차 분리는 선택배지로서 BCP agar(Eiken, Japan)를 사용하였으며, 선택배지에서 생성된 유산균 생육 시 특징하는 유산균형 콜로니를 1차 선별한 후 이를 3세대까지 반복적으로 순수분리 과정을 MRS agar(Difco, USA)를 사용하여 실시하였다(Table 2~3, Fig 1).

선택배지별로 일정별 분리된 Colony의 형태는 육안 및 현미경으로 검경하여 분리균의 형태를 확인과정을 필요시 병행하였으며, 최종 순수분리과정이 종료되면 이를 저온(-80°C)보존하면서 동정 및 유전자 상동성 평가과정을 연계하여 수행하였다(Fig 1).

#### 라. 분리 효모 및 유산균 동정

신규수거 유기농산물 44종에서 발효배지법을 적용하여 분리된 효모 및 유산균에 대한 동정은 순수분리과정이 완료된 이후에 3단계로(API System, Vitek System 및 Diversilab 시스템) 구분하여 실시되었다.

분리가 완료된 효모 및 유산균의 순수분리과정은 다음과 같이 실시하였다. 즉, 효모는 PDA배지(30°C, 24시간 배양)에서, 유산균은 MRS배지에서(37°C, 24시간) 배양하였고, 이중 확실시 되는 균에 대한 분취 후 배지별 도말과 배양과정을 3회 이상 실시함으로써 순수분리과정을 완료하였다.

순수분리가 완료된 균들에 대하여 동정은 균종별 당이용성 평가를 통한 API 시스템(API Kit, Model : 20C-AUX)을 이용하여 실시하였는데, 효모는 API 20AUX(당류 : 10종) 그리고 유산균은 API CHL(당류 : 40종)의

분석 키트를 사용하여 24시간 및 48시간배양에 따른 당이용성(색깔 및 성장변화)을 비교 평가하였다.

API분석결과의 추가적인 신뢰성을 확인하기 위하여, Vitek System (Vitek Kit, Model : YST card 당이용성 평가: 46종)를 사용하였으며, API와 동일조건으로 효모균을 배양 뒤 Vitek2 Compack 권장방법에 따라 실험을 실시하였으며, API분석결과와 동일성을 비교 확인하였다(Table 4).

API 및 Vitek 결과를 최종 확인은 Diversilab 시스템을 이용하여 검정하였는데 분석간 신뢰성을 확인하기 위한 표준효모균주로서 *S. cerevisiae* JKK091002와 *C. utilis*와 비교균주로서 상용효모(J사, *S. cerevisiae*)를 신규분리 효모의 상동성 평가를 실시하였다(Fig 5.).

#### 마. 유전자원(상동성 분석 및 비교) 확보

본 연구에서는 유기농산물에서 분리한 효모 및 유산균의 신규성을 확인하기 위하여 PCR분석과 18S-RNA(효모) 및 16S-RNA(유산균)염기서열 분석을 공인 분석업체인 Macrogen사(한국)에서 위탁하여 분석하였으며 관련 실험법은 다음과 같다.

##### 1) 효모 유전자 상동성 평가

공시균은 유기농 과일 과실에서 분리된 *S. cerevisiae* JKK091006(선행 확보균주)와 표준균주 *C. utilis* 및 상업효모(J사, *S. cerevisiae*)를 대상으로 실시하였다. DNA 염기서열 분석을 위하여 200U Lyticase(Sigma, L4025) 처리하고 Dneasy Blood & Tissue kit (QIAGEN, 69504)를 이용하여 효모의 genomic DNA를 순수분리 한 후, 18S rRNA and 28S rRNA spacer region 분석하기 위하여 forward primer로 ITS1 (5'-TCC GTA GGT GAA CCT GCG G-3')를 reverse primer로 ITS4 (5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT G-3')를 이용하여 First denature(95°C, 2min.), Denaturation(95°C, 45sec), Annealing(55°C, 45sec), Extension(72°C, 45sec, 2 to 4 33 cycles) 그리고 Final extension(72°C,10min)의 조건으로 PCR을 실시하여 밴드패턴을 확인하고, 제한효소 절단법을 이용하여 분리효모의 DNA를 표준표모균주와 비교하였다(Sujaya, 2004). 또, 18s RNA의 염기서열을 CLUSTAL 2.0.11을 이용하여 Multiple sequence alignment를 실시하여 비교하였다.

##### 2) 유산균 유전자 상동성 평가

동정이 완료된 유산균에 신규성을 확보하기 위한 16S-RNA 염기서열 분석은 전문분석기관인 Macrogen사(한국)에서 다음과 같이 진행하였다.

DNA 염기서열 분석을 위하여 균주에 200U Lyticase(Sigma, L4025)를 처리하고, 이어서 Dneasy Blood & Tissue kit(QIAGEN, 69504)를 이용하여 유산균의 genomic DNA를 순수분리과정을 연계 수행하였다. 이때 forward primer로 ITS1(5'-TCC GTA GGT GAA CCT GCG G-3')를 reverse primer로는 ITS4(5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT G-3')를 이용하였다.

그리고 PCR 실시를 통한 밴드패턴을 비교하고 저 First denature(95°C, 2min.), Denaturation(95°C, 45sec), Annealing(55°C, 45sec), Extension(72°C, 45sec, 2 to 4 33 cycles) 그리고 Final extension(72°C, 10min)의 순으로 16S-ribosomal RNA sequencing과정을 실시하였다.

#### 바. 선발 효모 및 유산균에 대한 신규성 판정

선발 효모 및 유산균에 대한 신규성 검토는 유전자 상동성 평가가 완료된 18S(효모) 및 16S-ribosomal RNA sequencing결과를 토대로 다음과 같이 3단계로 신규성을 확인하였다.

1 단계는, 동일종내 유전자 상동성 평가결과와 동일종내 당이용성 평가차이를 세분화 비교함으로써 우선 신규성을 확인하였다.

2 단계는, 1단계 과정에서 확정된 균종별 차이를 연계하여 16S 및 18S-ribosomal RNA sequencing 결과 각각을 세계유전자 은행 NCBI와 비교하여 상동성 차이(ID, %) 비교 확인하였다.

3 단계는, 분리 효모 및 유산균별 당이용성 평가 및 MSP Dendrogram결과와 유전자 상동성 결과를 연계하여 신규성에 대한 일괄성을 추가 검정하였다.

### 3. 연구결과

#### 가. 당류 이용성 평가

유기농산물 접종후 배양과정중 4일동안 일정별 우점균의 생성패턴(Table 2~3)과 이에 따른 당이용성(Table 4, Fig 2) 및 유기산 생성 및 소모패턴(Table 5, Fig 3)을 연계하여 조사하여 보았다.

당이용성에 있어 Sucrose와 Galactose순으로 이용성 변화가 있었으며,



Glucose 및 Fructose는 변화가 없었다.

효모 및 유산균이 동시우점형(야생오이: 수거시료 43)가 가장 대표적인 경우였는데, 최초 49,318ppm이었던 Sucrose는 배양시간이 경과하면서 급격히 이용되어 1일 경과시 약 16%, 2일 경과시는 약 51%, 3일경과시 약 66% 그리고 최종 4일이 경과시 100%가 사용되는 것으로 조사되었다.

또한, Sucrose의 감소와 더불어 Glucose 및 Galactose의 증감 패턴 및 산도의 변화를 연계하여 조사하여 보았더니, Glucose는 전체시험구에서 검출이 되지 않는 반면에 Galactose는 배양시간이 경과 급격히 증가하여 최종 배양 4일이 경과시는 29,536ppm의 높은 수치를 보였고, 이때 pH는 2.99를 나타내었다.

이러한 결과는 균류가 Sucrose를 먹이원으로 사용함에 있어 우선적으로 사용하고, 이용과정에서 Glucose와 Galactose로 1차 분해한 후 이중 우선 먹이원으로 Glucose를 이어서 Galactose를 이용하는 패턴과 이때 유기산과 CO<sub>2</sub>를 생성하는 메카니즘을 가지고 있다고 보고 되어 있는데, 결과는 효모와 유산균이 동시에 증가되는 미생물의 우점화 경향과 더불어 Sucrose를 먹이원으로 활발히 사용하는 일련의 메카니즘과 동일 패턴을 보였다.

그리고, Fructose는 전체 시험구에서 불검출 되었는데, 이는 미생물의 생성에 따른 변화보다는 시료에서 용출되지 않은 이유로 판단되었다.

일정별 당이용성 차이를 우점형별로 구분하여 보았더니, 효모 및 유산균 우점형이 가장 이용성이 높은 것으로 나타났으며, 다음으로 유산균 우점형, 효모 우점형 그리고 일반균우점형 순으로 나타났다(Table 4).

즉, 배양 4일을 기준을 효모 및 유산균 우점형(수거시료 43:야생오이)의 Sucrose는 0ppm, Galactose는 29,536ppm 그리고 pH는 2.99였다.

유산균 우점형(수거시료 28: 풋고추)의 경우는, Sucrose는 29,112ppm, Galactose는 25,401ppm 그리고 이때 pH는 2.63이었다.

효모우점형(수거시료 37: 딸기)의 경우는, Sucrose는 33,357ppm, Galactose는 9,807ppm 그리고 이때 pH는 2.91이었는데, 일반균 우점형(수거시료 4 : 적상추)은 Sucrose는 41,545ppm, Galactose는 0ppm 그리고 이때 pH는 3.88로 가장 낮게 나타났다(Table 4).

이는 단일우점균을 기준으로 본다면 유산균이 당이용성이 가장 높고 다음으로 효모균의 순이고, 일반균의 경우는 당이용성이 떨어진다는 것을 알 수 있었는데, 효모와 유산균 동시에 우점화 되는 경우에는 당이용성은 가속화됨을 확인 할 수 있었다(Fig 2).

## 나. 유기산 생성 패턴

균류는 Sucrose를 먹이원으로 하여 Glucose와 Galactose로 1차 분해한 후 우선 먹이원으로 Glucose를 소모하고 이어서 Galactose를 이용하는 패턴을 유지하면서 유기산과 CO<sub>2</sub>를 생성하는 메카니즘을 가지고 있다고 보고되고 있다. 본 연구결과에서도 전체적으로 미생물의 우점화 경향과 더불어 Sucrose를 먹이원으로 활발히 사용하는 일련의 메카니즘이 동일 패턴을 보였다(Fig 1~2, Table 1~4).

배양일정간 일반균 우점형(수거시료 4 : 적상추), 유산균 우점형(수거시료 28 : 풋고추), 효모균 우점형(수거시료 37 : 딸기) 그리고 효모 및 유산균 동시 우점형(수거시료 43 : 야생오이)을 선발하여 당이용성과 관련한 유기산의 생성패턴을 조사하여 보았다(Table 5).

이를 위하여 Citric acid, Tartaric acid, D-Malic acid, Lactic acid, Formic acid, Acetic acid 및 L-Malic acid으로 7종을 대상으로 일정별 변화를 확인하였다(Table 4~5, Fig 2~3).

결과로서, 배양 일정별 당이용성이 가장 높았던 효모 및 유산균 우점형에서 타 우점형에 비하여 분석대상 유기산류 전체에서 가장 높은 수치를 보였다(Table 5, Fig 3).

유기산중 D-Malic acid이 배양 24시간 경과시 65,746ppm에서 48시간 경과하면서 최대 148,540ppm으로 증가한 후 점차 감소하여 최종 92시간 경과시는 90,298ppm의 감소 경향을 보였다. 이러한 결과는 유기농산물 시료내 함유되어 있던 유기산이 발효과정에서 세포조직의 이완과 더불어 지속적으로 용출되면서, 미생물이 점차적으로 이용하는 것으로 판단되었다.

또한, 동일하게 농산물 기원성인 Tataric acid 역시도 24시간 경과시 9,605ppm이었던 수치가 점차 감소되어 최종 92시간 경과시 6,228ppm으로 조사되어 Malic acid와 동일 경향을 보였다.

그리고, Sucrose 기원성 Lactic acid와 Acetic acid의 변화를 확인하여 보았더니, 효모 및 유산균 우점형은 두종류 유산균을 동시에 생성하는 것으로 조사되었는데, Lactic acid은 24시간 경과시 65,746ppm에서 92시간 경과후는 50,298ppm의 수치를 보여 다소 감소하는 경향을 보였는데, Acetic acid의 경향은 10,827ppm 및 14,294ppm로 증가하는 경향을 나타냈다.

또한, 농산물 기원성 Citric acid는 일반균 우점형에서 24시간에서 96시간 배양시 약 2,700ppm에서 2,400ppm의 범위의 수치를 보였는데, 효모 및 유산균 동시우점형의 경우에는 24시간 배양시 2,174ppm이었던 수치가 48시간 이후 경과시 불검출됨에 따라 먹이로 이용되는 것으로 판단되었다.

이를 효모균 우점형과 유산균 우점형과 비교하여 Citric acid의 증감경향을 비교하여 보았더니, 효모우점형의 24시간후 Citric acid는 28,426ppm이 검출되었었는데, 48시간 경과이후는 불검출로 나타났는데, 유산균 우점형은 46,013ppm에서 점차 감소하다가 92시간이 경과시 17,003ppm으로 나타났다. 이는 유산균보다는 효모에 의하여 Citric acid를 적극적인 먹이원으로 이용하고 있음을 확인 할 수 있었다.

일반균우점형을 기준으로 단일효모균 우점형 및 유산균 우점형의 유기산 생성 패턴을 조사하여 보았다.

일반균 우점형은 Lactic acid(24시간 경과시 : 5,614ppm, 92시간 경과시 : 5,368ppm) 및 Acetic acid(24시간 경과시 : 674ppm, 92시간 경과시 : 3,320ppm)를 균일하게 생성시키는 것으로 조사되었는데, 유산균 우점형에서는 Lactic acid는 9,081ppm~11,746ppm, Acetic acid는 4,106ppm~4,955ppm으로 조사되었다. 그러나, 효모균우점형의 경우는 Lactic acid는 24시간 배양시 16,376ppm에서 92시간 배양후는 19,461ppm으로 점차 증가하였는데, Acetic acid는 1,000~1,900ppm의 범위를 보여 유산균 보다는 효모균에 의하여 Lactic acid가 높게 형성되는 것을 확인 할 수 있었다.

따라서, 효모 및 유산균 우점형의 경우에서 높은 수치의 유기산의 증가는 효모와 유기산의 복합적인 활성으로 인한 것으로 확인할 수 있었다.

#### 다. 신규효모 및 유산균 분리 및 동정

신규수거 유기농산물 44종에서 효모 및 유산균의 분리 및 동정결과는 다음과 같다. 한국 토착형 효모 및 유산균은 총 15종(엽채류: 3종, 과실: 7종, 과일 5종)의 수거 유기농산물에서 분리되었는데, 이중 유산균이 존재하는 농산물은 11종(엽채류: 5종, 과실: 3종, 과일 3종)이었다.

4일 배양이 완료되는 시점에서 우점화되는 패턴은 효모 및 유산균의 패턴은 효모류만 존재하는 케이스, 효모류와 유산균이 존재하는 케이스 및 유산균만 분리되는 케이스로 구분되었다.

결론적으로 최종 효모 및 유산균은 총 15종이 동정되었는데, 이중 효모는 7종(*S.cerevaise* 2종, *Candida spp.* 5종) 그리고 유산균류는 4종류(*Lactococcus lactis spp lactis1*, *Leuconostoc citreum*, *Lactobacillus brevis1*, *Lactobacillus fermenturn*)였다(Table 6~7, Fig 4~6).

#### 다. 유전자원(당이용성 및 상동성 비교)확보결과

신규로 분리된 효모는 야생오이(시료 No.37)와 귤(시료 No. 42)에서 분리

되었는데, 당 이용성 등의 동정결과는 2종 공히 *S.cerevisiae* 로 판정되었다 (Table 8).

당이용성을 분석한 결과에서 분리효모의 신규성이 예상됨에 따라 *S.cerevaise* 2종의 유전자 상동성을 비교한 결과, 전체적으로는 *S. cerevisiae* strain ZP 541 (NCBI) 과의 상동성 96%~99%의 결과를 보였는데, 야생오이에서 분리한 *S. cerevisiae*는 99% 그리고 꿀에서 분리한 *S. cerevisiae*는 96%의 상동성 차이를 보였다.

또한, 선행 분리효모 *S.cerevisiae*JKK091002(대조구)는 99%(ID)의 수치를 보였는데, 상업효모의 경우(비교구)는 *S. cerevisiae* strain M01614 internal transcribed spacer 1 과의 99% 상동성을 보였으나, 선행확보균주인 *S.cerevisiae*와는 88%의 상동성을 나타냄을 확인하였다(Fig 5~6).

신규확보된 2종의 효모는 동일속 *S. cerevisiae* 이라 하더라도 비교구인 상업효모는 *S. cerevisiae* strain M01614 internal transcribed spacer 1과 99% 상동성을 보였으나, 유기농 농산물에서 분리한 3종 *S.cerevaise* 효모류는 상업효모와는 다른 *S. cerevisiae* strain ZP 541과 96~99%의 상동성 수치를 보임으로서 유기농산물에서 분리한 *S.cerevaise*는 상용효모와는 다른 패턴의 중임을 확인할 수 있었다.

## 라. 결론

본 연구목표인 유익균 분리를 위한 효율적인 방법으로 발효배양법을 정립하였으며, 배양간 미생물의 성장패턴을 일반균우점형, 유산균우점형, 효모우점형 그리고 효모 및 유산균 동시 우점형으로 구분하여 먹이이용성 및 유기산 생성패턴과 더불어 최종 미생물 생육결과를 연계하여 메커니즘을 구명하였다.

최종 이용성이 가능한 효모 2종 유산균 1종의 유전자원을 확보하였으며, 기농 농산물에서 분리한 효모류 야생오이에서 분리한 효모는 *S. cerevisiae* CKK 110426(NCBI ID : 99%), 그리고 꿀에서 분리한 효모는 *S. cerevisiae* OKK110427(NCBI ID: 96%)로 신규 명명하였다.

또한, 유산균의 경우는 본과제와 관련하여 이용성이 높다고 판단되는 *Lactobacillus fermentum* 1종이 확보되었는데 지속적인 시료수거와 분리, 동정 및 유전자 상동성 분석을 통하여 유전자원을 확보할 예정이다.

Table 1. 효모선발용 유기농농산물 (44종)수거 내역

번호	종류	주소	비고
1	오이맛 고추	경남 진주시 금산면 장사리	
2	애호박	경북 안동시 안동바이오	
3	적치콘	전남 담양군 대전면 강의리 59-8	
4	적상추	전남 담양군 대전면 강의리 59-8	
5	아욱	전남 담양군 대전면 강의리 59-8	
6	생채	전남 담양군 대전면 강의리 59-8	
7	뉴그린	전남 담양군 대전면 강의리 59-8	
8	쌈추	전남 담양군 대전면 강의리 59-8	
9	썩갓	전남 담양군 대전면 강의리 59-8	
10	오크립(청)	전남 담양군 대전면 강의리 59-8	
11	적겨자	전남 담양군 대전면 강의리 59-8	
12	시금치	전남 담양군 대전면 강의리 59-8	
13	적치커리	전남 담양군 대전면 강의리 59-8	
14	고추	경남 밀양시 부북면 운전리	
15	청포도	텔몬트 미국	
16	참다래	제주 서귀포시 도순동	
17	금귤	롯데마트 유기농 코너	
18	방울토마토	전남 담양군 대전면 갈항리	
19	토마토	전남 담양군 대전면 강의리 59-8	
20	마늘	경북 영천시 화산면 용평리	
21	꽃감	상명농산	
22	배	산청배 영농조합(경남 산청시 신일면 잠죽리)	
23	청포도	텔몬트 미국	
24	적근대	전남 담양군 대전면 강의리 59-8	
25	청경자	전남 담양군 대전면 강의리 59-8	
26	청피망	경남진주 대곡면 덕곡리	
27	치커리	전남 담양군 대전면 강의리 59-8	
28	풋고추	경남 밀양시 단장면 단장리	
29	사과	경북 영주 풍기읍 서부리	
30	시금치	전남 담양군 대전면 강의리 59-8	
31	배추 알배기	전남 영암	
32	오크립(적)	전남 담양군 대전면 강의리 59-8	
33	다대기 오이	경기 평택시 진위면 하북리 249-3	
34	금귤	롯데마트 유기농 코너	
35	참외	월항 농협	
36	대추	상명농산	
37	딸기	전남 담양군 대전면 강의리 59-8	
38	방울토마토	전남 담양군 수특면 황금리	
39	양파	경남 창녕시 유미면 부곡리	
40	매운고추	경남 밀양시 부북면 운전리	
41	파프리카	경남 창녕시 길곡면 증산리	
42	감	창원시 북면 농협	
43	야생오이	전남 순천시 낙안면 교촌리, 최성은 농장	
44	귤	제주도 중문 농협	

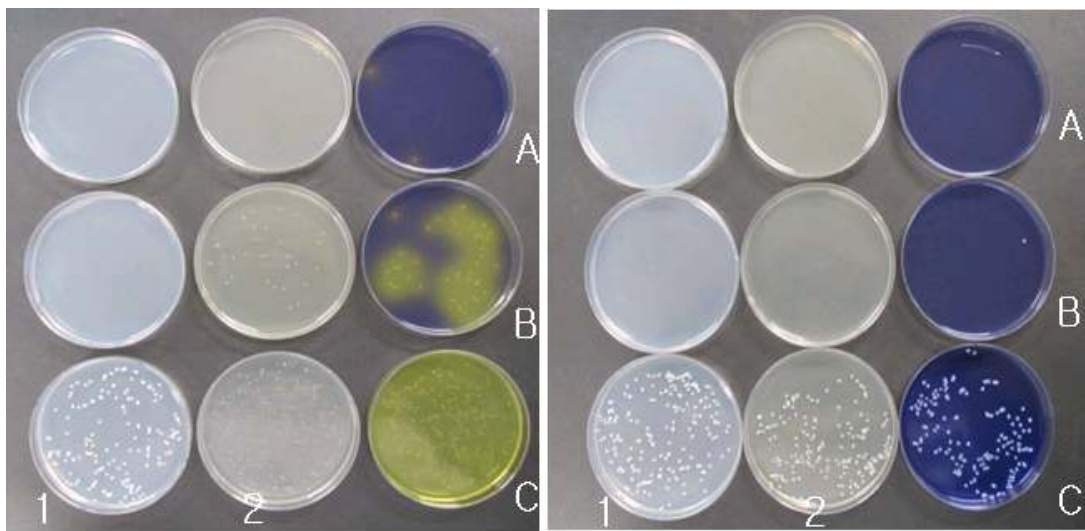


Fig 1. 발효배지 배양법 적용에 따른 일정별 균류 우점화 패턴변화 조사 결과  
 1 : PDA(T), 2 : TSA, 3 : BCP , A : 24시간, B : 48시간, C : 72시간, (좌)  
 효모 및 유산균 분리, (우) 효모균 분리, TSA : Tryptic Soy Agar  
 PDA(T): PDA+0.4% Tataric acid, BCP : BCP Plate Count Agar

Table 2. 수거농산물별 목적균 분리를 위한 발효배지 조성후 발효일정별 균수 우점화 패턴 조사

종류	결과확인												비고	
	TSA				PDA(T)				BCP					
	24h	48h	72h	92h	24h	48h	72h	92h	24h	48h	72h	92h		
1	오이맛 고추	+++	+++	+++	+++	-	-	-	-	+++	+++	+++	+++	
2	애호박	+++	+++	+++	+++	-	-	-	-	+++	+++	+++	+++	
3	적치콘	+++	+++	+++	+++	-	-	-	-	+++	+++	+++	+++	
4	적상추	+++	+++	+++	+++	-	-	-	-	+++	+++	+++	+++	
5	청상추	+++	+++	+++	+++	-	-	-	-	+++	+++	+++	+++	
6	아욱	+++	+++	+++	+++	-	-	-	-	+++	+++	+++	+++	
7	생채	+++	+++	+++	+++	-	-	-	-	+++	+++	+++	+++	
8	뉴그린	+++	+++	+++	+++	-	-	-	-	+++	+++	+++	+++	
9	쌈추	+++	+++	+++	+++	-	-	-	-	+++	+++	+++	+++	
10	썩갓	+++	+++	+++	+++	-	-	-	-	+++	+++	+++	+++	
11	오크립(청)	+++	+++	+++	+++	-	-	-	-	+++	+++	+++	+++	
12	적겨자	+++	+++	+++	+++	-	-	-	-	+++	+++	+++	+++	
13	적치커리	+++	+++	+++	+++	-	-	-	-	+++	+++	+++	+++	
14	고추	+++	+++	+++	+++	-	-	-	-	+++	+++	+++	+++	
15	청포도	+++	+++	+++	+++	-	-	-	-	+++	+++	+++	+++	
16	참다래	+++	+++	+++	+++	-	-	-	-	+++	+++	+++	+++	
17	금굴	+++	+++	+++	+++	-	-	-	-	+++	+++	+++	+++	
18	방울토마토	+++	+++	+++	+++	-	-	-	-	+++	+++	+++	+++	
19	토마토	+++	+++	+++	+++	-	-	-	-	+++	+++	+++	+++	
20	마늘	+++	+++	+++	+++	-	-	-	-	+++	+++	+++	+++	
21	꽃감	+++	+++	+++	+++	-	-	-	-	+++	+++	+++	+++	
22	배	+++	+++	+++	+++	-	-	-	-	+++	+++	+++	+++	
23	청포도	+++	+++	+++	+++	-	-	-	-	+++	+++	+++	+++	
24	적근대	+++	+++	+++	+++	-	-	-	-	+++	+++	+++	+++	
25	청경자	+++	+++	+++	+++	-	-	-	+	+++	+++	+++	+++	
26	청피망	+++	+++	+++	+++	-	-	-	-	+++	+++	+++	+++	
27	치커리	+++	+++	+++	+++	-	-	-	-	+++	+++	+++	+++	
28	풋고추	+++	+++	+++	+++	-	-	++	+++	+++	+++	+++	+++	
29	사과	+++	+++	+++	+++	-	-	+	-	+++	+++	+++	+++	
30	시금치	++	++	+++	+++	-	-	++	+++	++	++	+++	+++	
31	배추 알배기	+++	+++	+++	+++	-	-	++	+++	+++	+++	+++	+++	
32	오크립(적)	+++	+++	+++	+++	-	-	-	+	+++	+++	+++	+++	
33	다대기 오이	+++	+++	+++	+++	-	-	++	+++	+++	+++	+++	+++	
34	금굴	+++	+++	+++	+++	-	-	-	++	+++	+++	+++	+++	
35	참외	+++	+++	+++	+++	-	-	-	+	+++	+++	+++	+++	
36	대추	+++	+++	+++	+++	-	-	-	++	+++	+++	+++	+++	
37	딸기	+++	+++	+++	+++	-	-	+++	+++	+++	+++	+++	+++	
38	방울토마토	+++	+++	+++	+++	-	-	+++	+++	+++	+++	+++	+++	
39	양파	+++	+++	+++	+++	-	-	-	+++	+++	+++	+++	+++	
40	매운고추	+++	+++	+++	+++	-	-	-	+	+++	+++	+++	+++	
41	파프리카	+++	+++	+++	+++	-	-	-	+	+++	+++	+++	+++	
42	감	+++	+++	+++	+++	-	-	-	++	+++	+++	+++	+++	
43	야생오이	+++	+++	+++	+++	-	-	-	+	+++	+++	+++	+++	
44	굴	+++	+++	+++	+++	-	++	+++	-	+++	+++	+++	+++	

- : 불검출, + : 배양, ++ : 보통, +++ : 아주높음

Table 3. 유기농 농산물별 목적균 분리를 위한 발효일정별 균수 우점화 유도결과(선택배지 적용)

종류	결과확인												비고	
	TSA				PDA(T)				BCP					
	24h	48h	72h	92h	24h	48h	72h	92h	24h	48h	72h	92h		
1	오이맛 고추	1.6x10 <sup>8</sup>	2.4x10 <sup>8</sup>	4.0x10 <sup>7</sup>	4.0x10 <sup>9</sup>	ND	ND	ND	ND	3.2x10 <sup>8</sup>	1.6x10 <sup>8</sup>	4.0x10 <sup>7</sup>	1.0x10 <sup>10</sup>	일반균
2	애호박	1.2x10 <sup>8</sup>	4.0x10 <sup>8</sup>	8.0x10 <sup>7</sup>	2.0x10 <sup>9</sup>	ND	ND	ND	ND	8.0x10 <sup>7</sup>	2.8x10 <sup>8</sup>	3.6x10 <sup>8</sup>	1.8x10 <sup>10</sup>	
3	적치콘	1.4x10 <sup>8</sup>	2.8x10 <sup>8</sup>	3.6x10 <sup>8</sup>	6.0x10 <sup>9</sup>	ND	ND	ND	ND	1.8x10 <sup>10</sup>	7.0x10 <sup>9</sup>	1.2x10 <sup>10</sup>	5.0x10 <sup>9</sup>	
4	적상추	6.0x10 <sup>7</sup>	2.4x10 <sup>8</sup>	2.2x10 <sup>8</sup>	2.0x10 <sup>9</sup>	ND	ND	ND	ND	1.8x10 <sup>10</sup>	2.8x10 <sup>9</sup>	1.1x10 <sup>9</sup>	1.1x10 <sup>10</sup>	
5	청상추	1.0x10 <sup>8</sup>	2.8x10 <sup>8</sup>	4.2x10 <sup>8</sup>	1.8x10 <sup>10</sup>	ND	ND	ND	ND	1.1x10 <sup>10</sup>	2.2x10 <sup>10</sup>	2.5x10 <sup>9</sup>	9.0x10 <sup>8</sup>	
6	아욱	3.2x10 <sup>8</sup>	1.6x10 <sup>8</sup>	4.0x10 <sup>7</sup>	1.0x10 <sup>10</sup>	ND	ND	ND	ND	7.2x10 <sup>10</sup>	2.9x10 <sup>8</sup>	3.4x10 <sup>8</sup>	1.3x10 <sup>9</sup>	
7	생채	8.0x10 <sup>7</sup>	2.8x10 <sup>8</sup>	3.6x10 <sup>8</sup>	1.8x10 <sup>10</sup>	ND	ND	ND	ND	5.0x10 <sup>8</sup>	5.6x10 <sup>8</sup>	5.6x10 <sup>8</sup>	1.6x10 <sup>10</sup>	
8	뉴그린	9.5x10 <sup>7</sup>	4.0x10 <sup>7</sup>	2.2x10 <sup>8</sup>	6.0x10 <sup>9</sup>	ND	ND	ND	ND	1.4x10 <sup>8</sup>	5.6x10 <sup>8</sup>	5.6x10 <sup>8</sup>	1.6x10 <sup>9</sup>	
9	쌈추	1.8x10 <sup>10</sup>	7.0x10 <sup>9</sup>	1.2x10 <sup>10</sup>	5.0x10 <sup>9</sup>	ND	ND	ND	ND	1.6x10 <sup>8</sup>	2.4x10 <sup>8</sup>	4.0x10 <sup>7</sup>	4.0x10 <sup>9</sup>	
10	숙갓	1.8x10 <sup>10</sup>	2.8x10 <sup>9</sup>	1.1x10 <sup>9</sup>	1.1x10 <sup>10</sup>	ND	ND	ND	ND	1.2x10 <sup>8</sup>	4.0x10 <sup>8</sup>	8.0x10 <sup>7</sup>	2.0x10 <sup>9</sup>	
11	오크립(청)	1.1x10 <sup>10</sup>	5.7x10 <sup>9</sup>	9.6x10 <sup>9</sup>	1.1x10 <sup>9</sup>	ND	ND	ND	ND	1.0x10 <sup>8</sup>	2.8x10 <sup>8</sup>	4.2x10 <sup>8</sup>	1.8x10 <sup>10</sup>	
12	적겨자	1.1x10 <sup>10</sup>	2.2x10 <sup>10</sup>	2.5x10 <sup>9</sup>	9.0x10 <sup>8</sup>	ND	ND	ND	ND	1.4x10 <sup>8</sup>	2.8x10 <sup>8</sup>	3.6x10 <sup>8</sup>	6.0x10 <sup>9</sup>	
13	적치커리	2.1x10 <sup>10</sup>	7.0x10 <sup>8</sup>	3.8x10 <sup>9</sup>	4.0x10 <sup>7</sup>	ND	ND	ND	ND	2.4x10 <sup>7</sup>	4.0x10 <sup>7</sup>	4.0x10 <sup>7</sup>	1.8x10 <sup>10</sup>	
14	고추	2.0x10 <sup>10</sup>	1.2x10 <sup>10</sup>	1.3x10 <sup>9</sup>	1.4x10 <sup>9</sup>	ND	ND	ND	ND	7.2x10 <sup>10</sup>	2.9x10 <sup>8</sup>	3.4x10 <sup>8</sup>	1.3x10 <sup>9</sup>	
15	청포도	1.4x10 <sup>10</sup>	2.7x10 <sup>9</sup>	5.1x10 <sup>9</sup>	3.6x10 <sup>9</sup>	ND	ND	ND	ND	2.1x10 <sup>10</sup>	7.0x10 <sup>8</sup>	3.8x10 <sup>9</sup>	4.0x10 <sup>7</sup>	
16	참다래	1.8x10 <sup>10</sup>	7.0x10 <sup>9</sup>	1.2x10 <sup>10</sup>	5.0x10 <sup>9</sup>	ND	ND	ND	ND	2.8x10 <sup>10</sup>	1.5x10 <sup>9</sup>	4.7x10 <sup>9</sup>	5.2x10 <sup>9</sup>	
17	금굴	3.6x10 <sup>9</sup>	9.4x0 <sup>9</sup>	1.0x10 <sup>10</sup>	4.0x10 <sup>7</sup>	ND	ND	ND	ND	2.0x10 <sup>10</sup>	1.2x10 <sup>10</sup>	1.3x10 <sup>9</sup>	1.4x10 <sup>9</sup>	
18	방울토마토	6.0x10 <sup>7</sup>	6.0x10 <sup>8</sup>	2.2x10 <sup>8</sup>	9.1x10 <sup>9</sup>	ND	ND	2.0x10 <sup>7</sup>	ND	1.4x10 <sup>10</sup>	2.7x10 <sup>9</sup>	5.1x10 <sup>9</sup>	3.6x10 <sup>9</sup>	
19	토마토	6.0x10 <sup>7</sup>	2.4x10 <sup>8</sup>	3.0x10 <sup>8</sup>	5.2x10 <sup>9</sup>	ND	ND	ND	ND	2.7x10 <sup>10</sup>	2.9x10 <sup>9</sup>	1.5x10 <sup>10</sup>	2.5x10 <sup>9</sup>	
20	마늘	1.8x10 <sup>10</sup>	7.0x10 <sup>8</sup>	1.2x10 <sup>10</sup>	5.0x10 <sup>9</sup>	ND	ND	ND	ND	3.6x10 <sup>9</sup>	9.4x0 <sup>9</sup>	1.5x10 <sup>10</sup>	2.5x10 <sup>9</sup>	
21	꽃감	1.1x10 <sup>10</sup>	2.2x10 <sup>10</sup>	2.5x10 <sup>9</sup>	9.0x10 <sup>8</sup>	ND	ND	ND	ND	1.8x10 <sup>10</sup>	2.8x10 <sup>9</sup>	1.3x10 <sup>9</sup>	1.4x10 <sup>9</sup>	
22	배	5.0x10 <sup>8</sup>	5.6x10 <sup>8</sup>	5.6x10 <sup>8</sup>	1.6x10 <sup>10</sup>	ND	ND	ND	ND	5.7x10 <sup>9</sup>	9.6x10 <sup>9</sup>	5.6x10 <sup>8</sup>	5.6x10 <sup>8</sup>	
23	청포도	2.8x10 <sup>10</sup>	1.5x10 <sup>9</sup>	4.7x10 <sup>9</sup>	5.2x10 <sup>9</sup>	ND	ND	ND	ND	2.2x10 <sup>10</sup>	2.5x10 <sup>9</sup>	1.5x10 <sup>9</sup>	4.7x10 <sup>9</sup>	
24	적근대	5.0x10 <sup>8</sup>	5.6x10 <sup>8</sup>	5.6x10 <sup>8</sup>	1.6x10 <sup>10</sup>	ND	ND	ND	ND	2.4x10 <sup>7</sup>	4.0x10 <sup>7</sup>	4.0x10 <sup>7</sup>	1.8x10 <sup>10</sup>	
25	청경자	1.4x10 <sup>8</sup>	5.6x10 <sup>8</sup>	5.6x10 <sup>8</sup>	1.6x10 <sup>9</sup>	ND	ND	ND	ND	1.0x10 <sup>8</sup>	2.8x10 <sup>8</sup>	4.2x10 <sup>8</sup>	1.8x10 <sup>10</sup>	
26	청피망	1.0x10 <sup>8</sup>	2.8x10 <sup>8</sup>	4.2x10 <sup>8</sup>	1.8x10 <sup>10</sup>	ND	ND	ND	ND	9.5x10 <sup>7</sup>	4.0x10 <sup>7</sup>	2.2x10 <sup>8</sup>	6.0x10 <sup>9</sup>	
27	치커리	2.4x10 <sup>7</sup>	4.0x10 <sup>7</sup>	4.0x10 <sup>7</sup>	1.8x10 <sup>10</sup>	ND	ND	ND	ND	1.1x10 <sup>10</sup>	5.7x10 <sup>9</sup>	9.6x10 <sup>8</sup>	1.1x10 <sup>9</sup>	
28	꽃고추	1.8x10 <sup>10</sup>	2.8x10 <sup>8</sup>	1.1x10 <sup>9</sup>	1.1x10 <sup>10</sup>	ND	ND	ND	ND	1.8x10 <sup>10</sup>	7.0x10 <sup>9</sup>	1.2x10 <sup>10</sup>	5.0x10 <sup>9</sup>	
29	사과	2.2x10 <sup>10</sup>	1.8x10 <sup>8</sup>	4.1x10 <sup>9</sup>	4.5x10 <sup>9</sup>	ND	ND	ND	ND	7.0x10 <sup>8</sup>	3.8x10 <sup>9</sup>	1.8x10 <sup>9</sup>	4.1x10 <sup>9</sup>	
30	시금치	7.2x10 <sup>10</sup>	2.9x10 <sup>8</sup>	3.4x10 <sup>8</sup>	1.3x10 <sup>9</sup>	ND	ND	4.4x10 <sup>9</sup>	ND	6.0x10 <sup>7</sup>	2.4x10 <sup>8</sup>	2.2x10 <sup>8</sup>	2.0x10 <sup>9</sup>	
31	배추 알배기	2.8x10 <sup>10</sup>	1.5x10 <sup>9</sup>	4.7x10 <sup>9</sup>	5.2x10 <sup>9</sup>	ND	ND	ND	2.0x10 <sup>7</sup>	3.2x10 <sup>8</sup>	1.6x10 <sup>8</sup>	4.0x10 <sup>7</sup>	1.0x10 <sup>10</sup>	
32	오크립(적)	2.4x10 <sup>10</sup>	1.8x10 <sup>9</sup>	6.6x10 <sup>9</sup>	9.1x10 <sup>9</sup>	ND	ND	ND	ND	1.0x10 <sup>8</sup>	2.8x10 <sup>8</sup>	4.2x10 <sup>8</sup>	1.8x10 <sup>10</sup>	
33	다대기 오이	1.8x10 <sup>10</sup>	7.0x10 <sup>9</sup>	1.2x10 <sup>10</sup>	5.0x10 <sup>9</sup>	ND	ND	ND	2.0x10 <sup>7</sup>	1.1x10 <sup>10</sup>	5.7x10 <sup>9</sup>	9.6x10 <sup>9</sup>	1.1x10 <sup>9</sup>	
34	금굴	2.7x10 <sup>10</sup>	2.9x10 <sup>9</sup>	1.5x10 <sup>10</sup>	2.5x10 <sup>9</sup>	ND	ND	ND	2.0x10 <sup>7</sup>	2.4x10 <sup>10</sup>	1.8x10 <sup>9</sup>	6.6x10 <sup>9</sup>	9.1x10 <sup>9</sup>	
35	참외	1.1x10 <sup>10</sup>	5.7x10 <sup>9</sup>	2.5x10 <sup>9</sup>	9.0x10 <sup>8</sup>	ND	3.6x10 <sup>9</sup>	4.3x10 <sup>9</sup>	ND	1.8x10 <sup>9</sup>	6.6x10 <sup>9</sup>	1.2x10 <sup>10</sup>	5.0x10 <sup>9</sup>	
36	대추	1.1x10 <sup>10</sup>	2.2x10 <sup>10</sup>	2.5x10 <sup>9</sup>	9.0x10 <sup>8</sup>	ND	ND	3.4x10 <sup>9</sup>	1.2x10 <sup>9</sup>	4.7x10 <sup>9</sup>	1.1x10 <sup>10</sup>	4.7x10 <sup>9</sup>	5.2x10 <sup>9</sup>	
37	딸기	1.1x10 <sup>10</sup>	5.7x10 <sup>9</sup>	9.6x10 <sup>9</sup>	1.1x10 <sup>9</sup>	ND	ND	1.8x10 <sup>9</sup>	1.4x10 <sup>9</sup>	2.2x10 <sup>10</sup>	1.8x10 <sup>9</sup>	4.1x10 <sup>9</sup>	4.5x10 <sup>9</sup>	
38	방울토마토	6.0x10 <sup>7</sup>	6.0x10 <sup>8</sup>	2.2x10 <sup>8</sup>	9.1x10 <sup>9</sup>	ND	ND	2.0x10 <sup>7</sup>	ND	1.4x10 <sup>10</sup>	2.7x10 <sup>9</sup>	5.1x10 <sup>9</sup>	3.6x10 <sup>9</sup>	
39	양파	4.7x10 <sup>9</sup>	1.1x10 <sup>10</sup>	1.6x10 <sup>9</sup>	5.0x10 <sup>9</sup>	ND	ND	ND	4.0x10 <sup>7</sup>	1.8x10 <sup>10</sup>	7.0x10 <sup>9</sup>	1.2x10 <sup>10</sup>	5.0x10 <sup>9</sup>	
40	매운고추	1.8x10 <sup>10</sup>	2.8x10 <sup>9</sup>	1.1x10 <sup>9</sup>	1.1x10 <sup>10</sup>	ND	ND	ND	8.0x10 <sup>7</sup>	6.0x10 <sup>7</sup>	6.0x10 <sup>8</sup>	1.2x10 <sup>10</sup>	5.0x10 <sup>9</sup>	
41	파프리카	9.5x10 <sup>7</sup>	4.0x10 <sup>7</sup>	2.2x10 <sup>8</sup>	6.0x10 <sup>9</sup>	ND	ND	ND	1.6x10 <sup>9</sup>	1.1x10 <sup>10</sup>	5.7x10 <sup>9</sup>	5.1x10 <sup>9</sup>	3.6x10 <sup>9</sup>	
42	감	7.2x10 <sup>10</sup>	2.9x10 <sup>8</sup>	3.4x10 <sup>8</sup>	1.3x10 <sup>9</sup>	ND	ND	ND	4.0x10 <sup>7</sup>	2.8x10 <sup>9</sup>	1.1x10 <sup>9</sup>	2.9x10 <sup>8</sup>	3.4x10 <sup>8</sup>	
43	야생오이	1.1x10 <sup>10</sup>	5.7x10 <sup>9</sup>	9.6x10 <sup>9</sup>	1.1x10 <sup>9</sup>	ND	ND	2.2x10 <sup>9</sup>	1.4x10 <sup>9</sup>	6.0x10 <sup>7</sup>	2.4x10 <sup>8</sup>	1.1x10 <sup>9</sup>	1.1x10 <sup>10</sup>	
44	फल	1.8x10 <sup>10</sup>	7.0x10 <sup>9</sup>	1.2x10 <sup>10</sup>	5.0x10 <sup>9</sup>	ND	ND	ND	2.0x10 <sup>7</sup>	2.9x10 <sup>8</sup>	3.4x10 <sup>8</sup>	7.0x10 <sup>9</sup>	1.2x10 <sup>10</sup>	

- ND : Not Detecting, TSA : Tryptic Soy Agar PDA(T) : PDA+Tartaric acid, BCP : BCP Plate Count Agar



Table 4. 44종 유기농 농산물중 4종 시료를 기준으로 발효일정별 균우점화 패턴변화와 관련한 당 이용성 조사 결과(목적균 우점화 관련 발효메카니즘 조사)

샘플종류	선별균의 먹이이용원에 대한 당변화 조사결과(ppm)																산도 (pH)	생성균	
	Sucrose				Glucose				Galactose				Fructose						
	24h	48h	72h	96h	24h	48h	72h	96h	24h	48h	72h	96h	24h	48h	72h	96h			
기본배지 <sup>a</sup>	49,318				NT				NT				NT				6.8		
4	적상추	46,616	44,181	40,323	41,545	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	1,574	ND	ND	ND	ND	3.88	일반균
28	꽃고추	43,438	34,616	29,463	29,112	ND	ND	ND	ND	2,853	9,583	12,745	25,401	ND	ND	ND	ND	2.63	유산균
37	딸기	45,669	41,951	38,696	33,357	ND	ND	ND	ND	4,843	6,559	8,462	9,807	ND	68	95	ND	2.91	효모
43	야생 오이	41,670	24,022	16,990	0	ND	ND	ND	ND	3,901	17,813	20,495	29,536	ND	ND	ND	ND	2.99	효모, 유산균

\*ND : Not Detecting, NT : Not Testing.

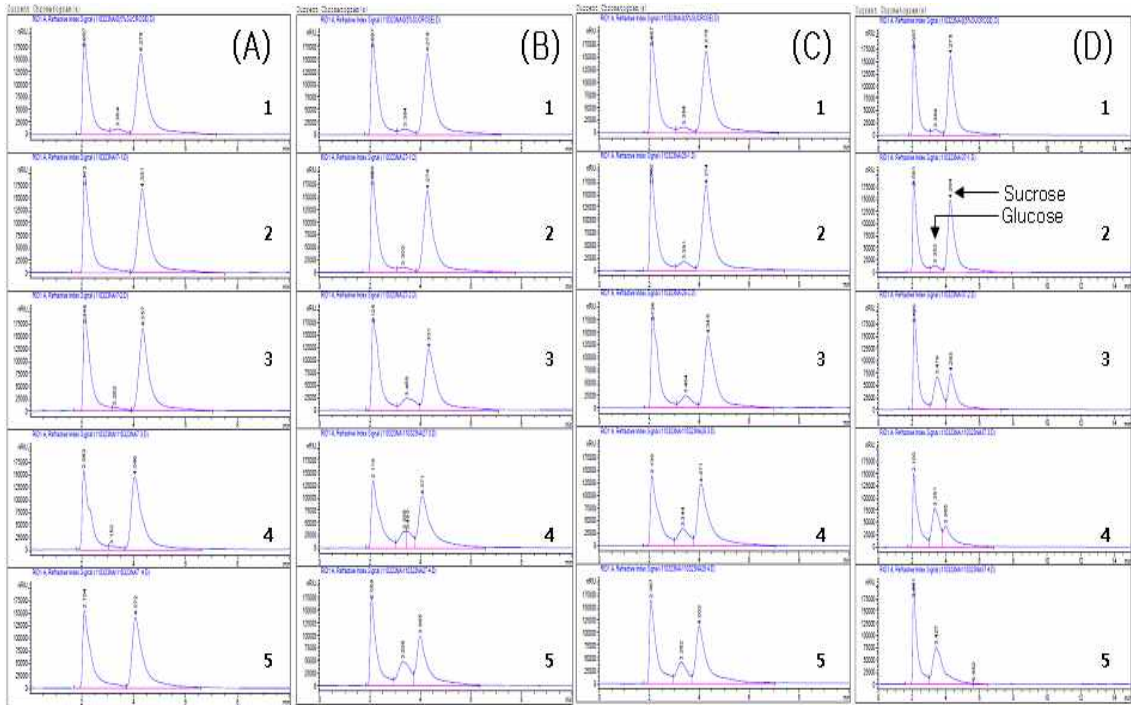


Fig 2. 발효에 따른 균우점화 형태별(일반균 우점화, 효모균 우점화, 유산균 우점화 및 효모 및 유산균 동시 우점화) 당이용성 분석 결과

A : 적상추(일반균 우점형), B; 풋고추(유산균 우점형), C : 딸기(효모균 우점형), D :야생오이(효모균 및 유산균 동시우점형), 1 : 5% Sucrose 용액(0 시간: 발효배양경과시간), 2 : 24시간, 3 : 48시간, 4 : 72시간, 5 : 96시간

Table 5. 44종 유기농 농산물중 4종 시료를 기준으로 발효일정별 당류변화(먹이이용성)와 균우점화 패턴과 관련한 유기산 증감 변화 조사(목적균 우점화 관련 발효메카니즘 조사)

시료 종류	배양 시간	선별균의 먹이이용원에 대한 유기산변화 조사결과(ppm)							생성균	
		Citric acid	Tartaric acid	D-Malic acid1	Lactic acid	Formic acid	Acetic acid	L-Malic acid2		
기본 배지	24h	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	5% Sucrose	
	48h	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT		
	72h	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT		
	92h	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT		
1	적 상 추	24h	2,747	2,785	2,537	5,614	ND	674	ND	일반균
		48h	2,247	2,028	2,639	7,770	493	2,747	ND	
		72h	2,245	1,780	7,519	7,418	997	3,680	ND	
		92h	2,475	1,992	3,643	5,368	911	3,320	ND	
2	꽃 고 추	24h	46,013	1,274	13,880	9,461	ND	4,531	ND	유산균
		48h	21,223	3,827	75,318	11,746	ND	4,955	ND	
		72h	25,306	3,571	45,518	9,081	ND	4,106	ND	
		92h	17,003	4,846	23,197	9,864	ND	4,616	ND	
3	딸 기	24h	28,426	3,880	33,555	16,376	ND	1,836	ND	효모
		48h	ND	5,318	37,239	13,433	ND	1,989	ND	
		72h	ND	5,518	34,247	18,366	ND	1,146	ND	
		92h	ND	4,197	31,407	19,461	ND	1,274	ND	
4	야 생 오 이	24h	2,174	9,605	98,748	65,746	488	10,827	ND	효모, 유산균
		48h	ND	9,107	148,540	48,195	764	11,571	ND	
		72h	ND	8,125	115,209	58,748	1,167	14,030	ND	
		92h	ND	6,228	90,298	50,298	2,046	14,294	ND	

- ND : Not Detecting, NT : Not Testing

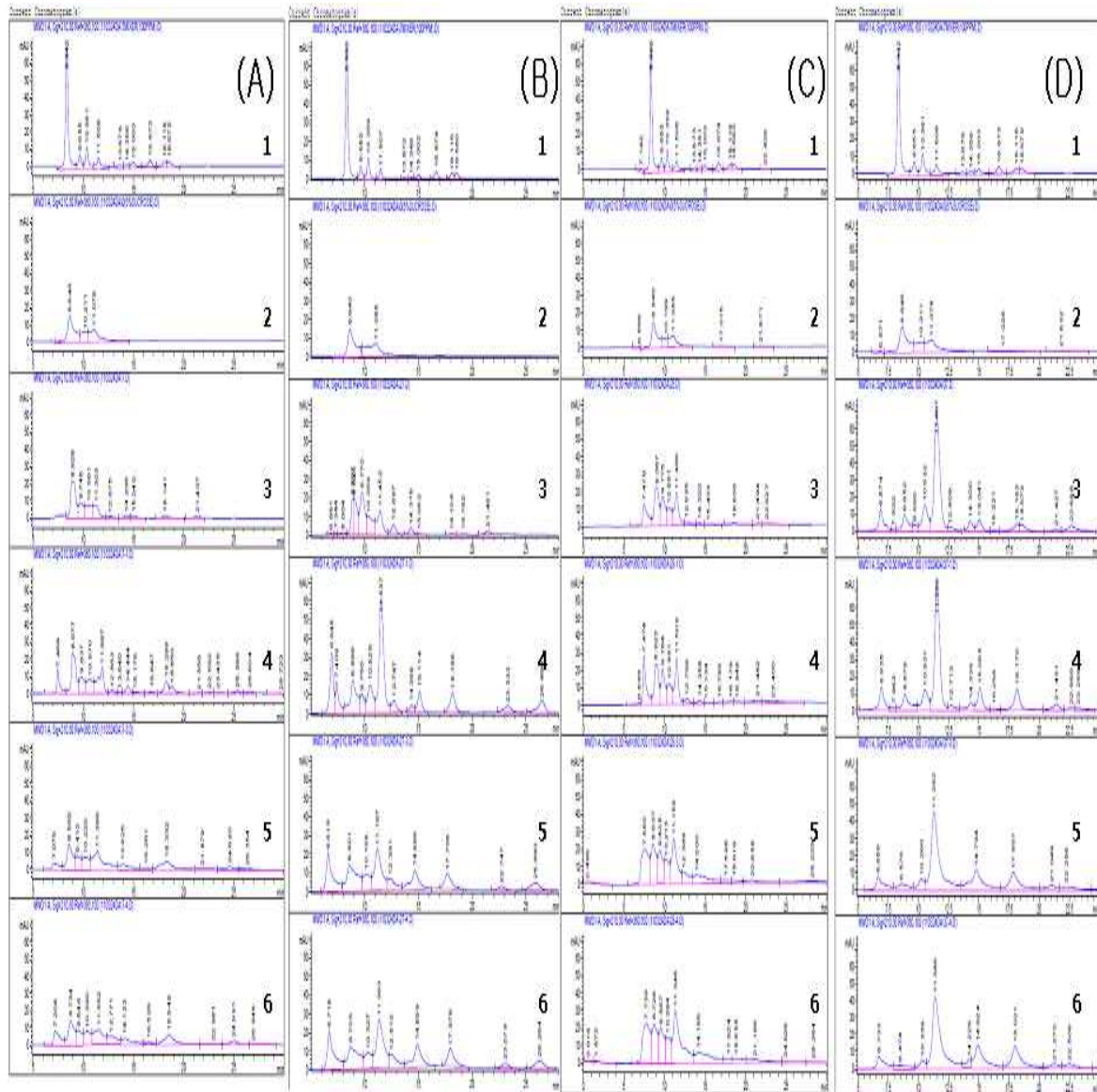


Fig 3. 44종 유기농 농산물중 4종 시료를 기준으로 발효일정별 당류변화(먹이이용성)와 균우 점화 패턴과 관련된 유기산 증감 변화 조사(목적균 우점화 관련 발효메카니즘 조사).

A : 적상추(일반균 우점형), B: 풋고추(유산균 우점형), C : 딸기(효모균 우점형), D :야생오이(효모균 및 유산균 동시우점형), 1 : 5% Sucrose 용액(0 시간), 2 : 24시간, 3 : 48시간, 4 : 72시간, 5 : 96시간

Table 6. 발효배지 기법을 적용한 수거유기농 농산물(44종)내 효모균분리를 위한 API kit 적용결과.

종류	%ID	동정결과	당 이용성 평가결과	비고
굴	82.7	<i>S. cerevisiae</i>	GLU+,XYL+,MDG+,MAL+,SAC+,MLZ+,RAF+	
야생오이	99.2	<i>S. cerevisiae</i>	GLU+,MDG+,MAL+,SAC+,RAF+	
시금치	98.9	<i>C. boidinii</i>	GLU+,GLY+XYL+,ADO+XLT+,SOR+	
배추 알배기	99.7	<i>C. guilliermondii</i>	GLU+,GLT,2KG+,ARA+,XYL+,ADO+XLT+,GAL+,SOR+,MDG+,NAG+,CEL+,MAL+,SAC+,MLZ+,RAF+	
다대기 오이	99.7			
오크립(적)	99.7			
금굴	99.7			
파프리카	99.7			
참외	99.7			
딸기	98.2	<i>C. famate</i>	GLU+,2KG+,ARA+,XYL+,ADO+XLT+,GAL+,SOR+,MDG+,NAG+,CEL+,MAL+,SAC+,LAC+,MLZ+,RAF+	
방울토마토	96.9			
양파	98.2			
매운고추	98.7	<i>C. magnoliae</i>	GLU+,2KG+,ARA+,XYL+,ADO+XLT+,GAL+,SOR+,MDG+,NAG+,CEL+,MAL+,SAC+,TRE+,MLZ+,RAF+	
대추	99.9	<i>C. luistaniae</i>	GLU+,GLT,2KG+,ADO+XLT+,SOR+,MDG+,NAG+,CEL+,MAL+,SAC+,TRE+,MLZ+	
감	99.9			

Table 7. 발효배지 기법을 적용한 수거유기농 농산물(44종)내 목적균 분리를 위한 API kit(유산균 분리용) 분석결과.

유기농산물 종류	%ID	동정결과	당 이용성 평가결과	비고
적근대	70.7	<i>Lactococcus lactis</i> spp <i>lactis1</i>	ADO+, GLU+, MNE+, NAG+,NAG+, ESC+, MAL+, MEL+, SAC+, RAF+	
청경자	70.7		ADO+, GLU+, MNE+, NAG+,NAG+, ESC+, MAL+, MEL+, SAC+, RAF+	
청피망	70.7		ADO+, GLU+, MNE+, NAG+,NAG+, ESC+, MAL+, MEL+, SAC+, RAF+	
사과	70.7		ADO+, GLU+, MNE+, NAG+,NAG+, ESC+, MAL+, MEL+, SAC+, RAF+	
파프리카	70.7		ADO+, GLU+, MNE+, NAG+,NAG+, ESC+, MAL+, MEL+, SAC+, RAF+	
매운고추	61.5	<i>Lactobacillus brevis1</i>	GLU+, FRU+, MNE+, MAN+, NAG+, ARB+, ESC+, SAL+, CEL+, MAL+, SAC+, TRE+, GEN+, TUR+, HNT+ 2KG+, 5KG+	
야생오이	99.7		LARA+, GLU+, <b>MDG+</b> , FRU+, MNE+, MAN+, NAG+,ARB+, ESC+, SAL+, CEL+,MAL+, SAC+, TRE+, GEN+, TUR+, HNT+ 2KG+, 5KG+	
감	70.7		LARA+, GLU+, FRU+, <b>FAF+</b> , MNE+, MAN+, NAG+, ARB+, ESC+, SAL+, CEL+, MAL+, SAC+, TRE+, GEN+, TUR+, HNT+ 2KG+, 5KG+	
치커리	87	<i>Leuconostoc citreum</i>	ARA+, GLU+, FRU+, MNE+, MDG+, NAG+, ARB+, ESC+, SAL+, CEL+, MAL+, SAC+, TRE+, GEN+, TUR+, HNT+ 2KG+, 5KG+	
풋고추	71	<i>Lactobacillus fermentum</i>	LARA+, RIB+, DXYL+, GAL+, GLU+, FRU+, SOR+, MDG+, NAG+, ARB+, ESC+, SAL+, MAL+, MEL+, TRE+, RAF+, HNT+, 5KG+	



Fig 4. 발효배지 기법을 적용한 수거유기농 농산물(44종)내 유산균 분리를 위한 API kit 적용 결과. (좌): 분리 유산균 접종 0h, (우): 분리유산균 접종 24시간 경과.

Table 8. 발효배지기법을 적용한 수거 유기농농산물(44종)내 목적균 분리를 위한 Vitek 시스템 적용결과.

당류	효모분리 수거 유기농 농산물 Vitek 결과															비고
	시금치	배추 알배기	다대기 오이	오크립 (적)	금귤	파프리카	참외	딸기	방 토마토	올 양파	매 울 고추	감	대추	양 생 오이	굴	
LysA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
TyrA	(-)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
dGLUa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
dRAFa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
IRHAa	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	
dTURa	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	
IGLTa	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	
IPROa	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	
IMLTa	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	
BNAG	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
LACa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
NAGA1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
XLTa	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	
dTREa	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	
dXYLa	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	
2KGa	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	
LeuA	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
ARBa	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	
MAdGa	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	
dMNEa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
dSORa	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	
NO3a	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
LATa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	
NAGa	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	
A R G	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	
AMYa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
dCELa	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	
dMELa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
SACa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
IARAa	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	
ACEa	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	
dGNTa	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	
ERYa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
dGALa	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	
GGT	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
dMLZa	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	
U R E	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
dGATa	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	
CITa	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	
GLYLa	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	
GENa	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	
dMALa	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	
ISBEa	-	(+)	+	(+)	+	+	-	(-)	-	-	-	+	+	-	-	
AGLU	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	
ESC	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
GRTas	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	
%ID	94	95	97	95	96	97	94	96	99	99	89	94	94	95	95	
동정 결과	<i>C. boidinii</i>	<i>C. guilliermondii</i>					<i>C. famate</i>			<i>C. magnoliae</i>	<i>C. luistanae</i>	<i>S. cerevisiae</i>				



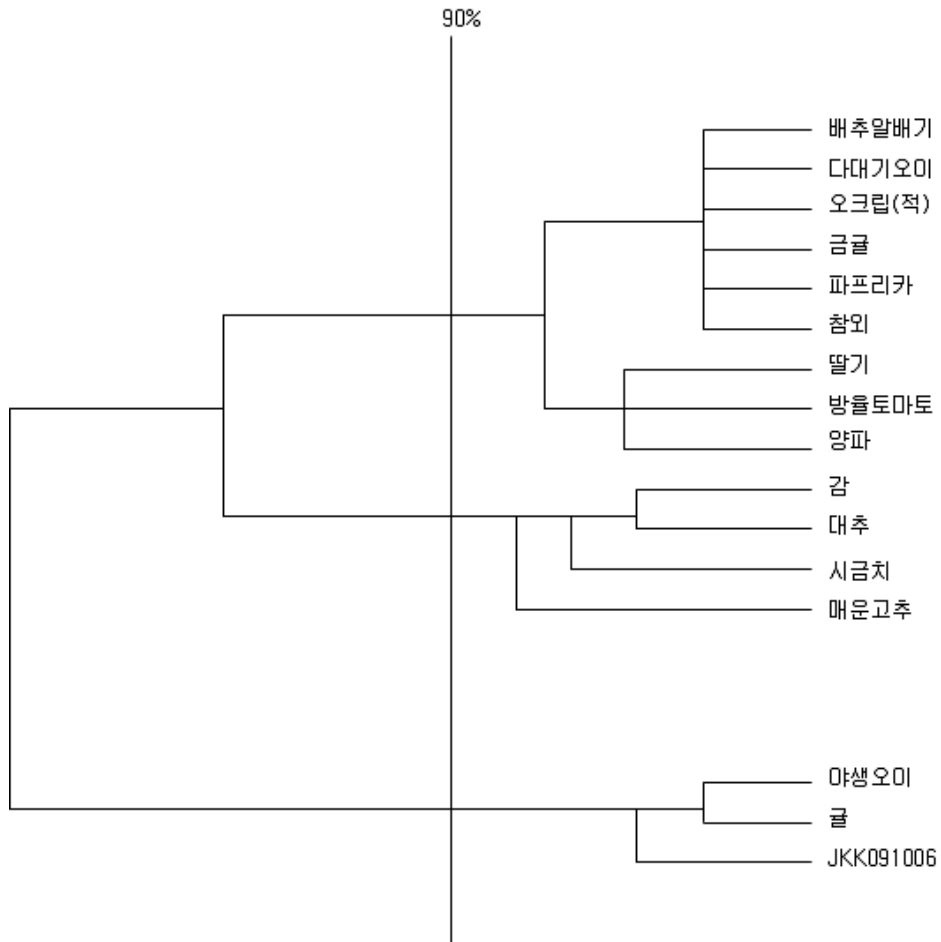


Fig 5. Diversilab시스템을 이용한 분리효모군의 상동성 평가 결과

- JKK091006 : 선행 확보 *S. cerevisiae*군, 야생오미 : 야생오미 분리효모(*S. cerevisiae*CKK110426), 굴 : 굴분리 효모(*S. cerevisiae* CKK110426)

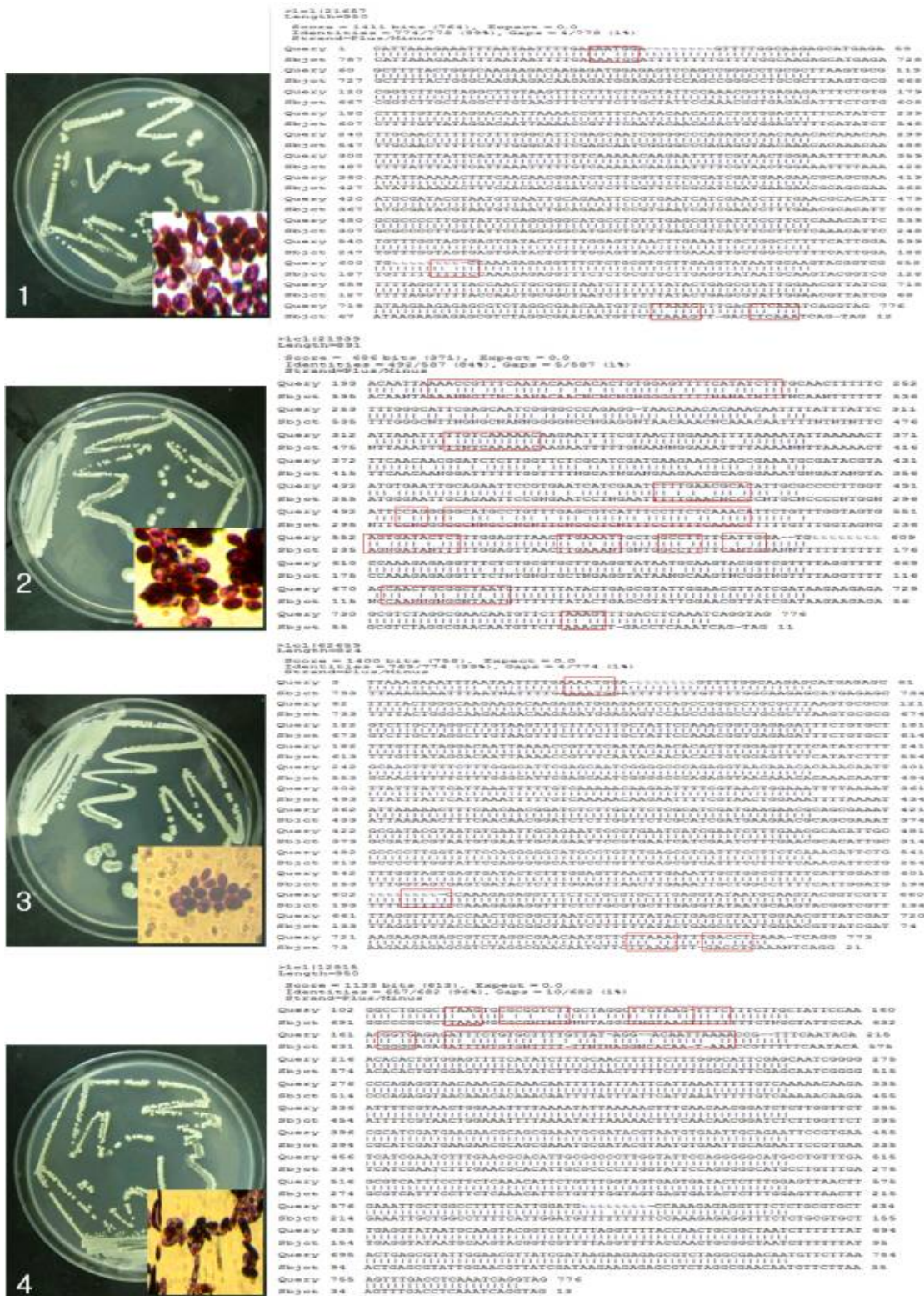


Fig 6. 유기농 농산물에서 분리 및 동정된 *S. cerevisiae*의 상동성 평가 결과(유전자원 확보)  
 1: *S. cerevisiae* JKK091006(선형연구 확보균주, NCBI ID : 99%), 2 : 상업효모 (J사, NCBI ID : 99%), 3: *S. cerevisiae* CKK 110426(분리시료 : 야생오이, NCBI ID : 99%), 4: *S. cerevisiae* OKK110427(분리시료 : 꿀, NCBI ID: 96%)

### 3-2. 유기농 농산물내 유산균 분리, 동정 및 유전자 확보(2차)

#### 1. 연구배경 및 목적

제빵 및 제과 제조에 유산균을 사용한 국내외 연구를 보면 유산균이 유기산 생성에 미치는 영향, Sourdough제조에 관여하는 미생물의 분리, 동정 및 빵의 저장성 개선을 위한 종균 배양방법 등의 연구가 보고 되고 있다.

이들 결과에서 유산균은 빵의 노화 지연과 상업적 수명의 연장이 가능하고, 반죽의 특성 등이 좋아지는 것으로 보고하고 있는데, 이용성 확대에 관한 연구가 점차적으로 진행되고 있다.

본 연구에서는 유산균을 제빵 및 제과분야에 적용하고자 선행과제인 “제빵용 한국 토종효모 개발” 과 연계하여 추가적인 유익 효모 및 유산균을 국내 유기농산물에서 분리 및 동정하고 유전자 상동성 평가를 통하여 유전자원을 확보함과 동시에 최종적으로 제빵 및 제과특성을 파악하여 동분야에 적용하기 위한 기초자료 확보를 목표로 하였다.

#### 2. 연구수행방법

##### 가. 미생물 분리원

미생물 분리는 국내에서 시판되는 유기농 농산물을 수거하여 미생물 분리원으로 사용하였으며, 곡류, 과실류, 야채류, 버섯류 등 총 96종(Table 1)에서 유산균을 분리하였다.

##### 나. 미생물 분리

유산균의 분리를 위하여 멸균된 5%((w/v) sucrose용액 300ml에 수거한 유기농 농산물 샘플을 10g씩 취하여 첨가하고, 이를 30℃에서 3일동안 배양과정을 실시하였다.

3일 배양과정이 완료되면, 여기에서 일정량을 분취하여 각각의 선택배지에 도말하여 1차 배양을 우선 실시하였는데, 배양균수가 많은 경우는 희석하여 사용하였는데, 유산균 분리를 위해서 선택배지로서 BCP agar(Eiken, Japan)를 사용하였다.

선택배지에서 생성된 유산균 생육시 특정하는 유산균형 콜로니를 1차 선별한 후 이를 3세대까지 반복적으로 순수분리 과정을 MRS agar(Difco, USA)를 사용하여 실시하였다.

최종 순수분리과정이 종료되면 이를 저온(-80℃)보존하면서 동정 및 유전

자 상동성 평가과정을 연계하여 수행하였다.

#### 다. 미생물 동정평가

순수 분리유산균에 대한 동정은 Kit와 분석기기를 이용하여 실시하였다. 즉, 당이용성 차이를 이용한 Kit분석은 Biomerieux사(프랑스)에서 구입한 유산균 전용동정Kit(모델 : API 50CH)를 권장방법에 준하여 사용하였으며, 결과 역시 동일사 API 데이터베이스를 적용 도출하였다.

즉, 순수분리 유산균은 API내 접종 및 밀봉후 24시간 및 48시간 배양(30 °C)후 성장색깔 및 성장변화) 변화를 비교함으로써 평가하였다.

Kit 동정이 완료되면, 이어서 MALDI-TOF기종(모델명 : microflex LT, Bruker사, 독일)과 역시 동일사의 데이터베이스(Maldi biotyper 3.0)를 권장방법에 따라 분석결과를 MSP Dendrogram에서 비교 제시하였다.

최종적으로, 동정이 완료된 유전자 상동성 평가는 전문분석기관에 외부의뢰하여 16S-ribosomal RNA sequencing공정을 수행함으로써 확인하였다.

#### 라. 16S-ribosomal RNA sequencing

동정이 완료된 유산균에 신규성을 확보하기 위한 16S-RNA 염기서열 분석은 전문분석기관인 Macrogen사(한국)에서 다음과 같이 진행하였다.

즉, 먼저 DNA 염기서열 분석을 위하여 균주에 200U Lyticase(Sigma, L4025)를 처리하고, 이어서 Dneasy Blood & Tissue kit(QIAGEN, 69504)를 이용하여 유산균의 genomic DNA를 순수분리과정을 연계 수행하였다.

이때 forward primer로 ITS1(5'-TCC GTA GGT GAA CCT GCG G-3 ')를 reverse primer로는 ITS4(5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT G-3')를 이용하였다.

그리고 PCR 실시를 통한 밴드패턴을 비교하고 저 First denature(95°C, 2min.), Denaturation(95°C, 45sec), Annealing(55°C, 45sec), Extension(72°C, 45sec , 2 to 4 33 cycles) 그리고 Final extension(72°C, 10min)의 순으로 16S-ribosomal RNA sequencing과정을 실시하였다.

#### 마. 선발 유산균에 대한 신규성 검토

유전자 상동성 평가가 완료된 16S-ribosomal RNA sequencing결과는 다음과 같이 2단계로 진행하였다.

1 단계는 L.p 1종, L.f(3종) 2종 각각 및 동일종내 16S-ribosomal RNA sequencing를 비교하였고, 이중 L.f(3종)의 경우는 3종류가 동정됨에 따라 동일종내 당이용성 평가차이를 세분화 비교함으로써 우선 신규성을 확인하였다.

2 단계는, 1단계 과정에서 확정된 유산균별 차이를 연계하여 16S-ribosomal RNA sequencing 결과 각각을 세계유전자 은행 NCBI와 비교하여 상동성 차이(ID, %) 비교 확인하였다.

이를 위한 유전자 상동성 평가를 위한 16s RNA의 염기서열은 Multiple sequence alignment(CLUSTAL 2.0.11)를 실시하여 비교하였다.

3단계는, 분리 유산균별 당이용성 평가 및 MSP Dendrogram결과와 유전자 상동성 평가결과를 연계하여 신규성에 대한 일괄성을 추가 검증하였다.

### 3. 결과

#### 가. 미생물 분리결과

총 96개 시료에서 1차로 분리된 미생물은 효모의 경우 32종, 유산균의 경우 35종 분리되었다. 이들을 순수분리하여 그람염색, 현미경 검경 등을 통하여 기초동정을 실시한 결과 최종 분리된 효모는 12종, 유산균은 14종으로 확인되었다.

#### 나. 미생물 동정결과

신규수거 유기농산물 96종내 분리된 유산균에 대한 분석과는 다음과 같다. 우선, MALDI-TOF 분석결과 유산균은 14종으로 동정되었으며, 이중 *Lactobacillus* sp. 4종, *Lactococcus* sp. 9종 및 *Leuconostoc* sp. 1종이 동정되었다.

Kit 검정결과, *Lactobacillus spp*속 4종이 본 연구개발목표와 가장 합당한 유산균으로 판단되어 당이용성을 세부적으로 확인하여 보았더니 *L.fermentum* 1종, *L.plantarum* 3종으로 구분 동정되었다(Table 1).

Kit내 50종의 당종류중 *L.plantarum*에 대한 당이용성 평가결과를 살펴보았더니, 이용된 당류는 17종(LARA+, RIB+, DXYL+, GAL+, GLU+, FRU+, SOR+,MDG+, NAG+, ARB+, ESC+, SAL+, MAL+, MEL+, TRE+, RAF+ 및 HNT+)이었다.

신규성과 관련한 당이용성 비교결과에서 DARA와 5KG의 이용성에서 큰 차이를 보였다. 즉, *L.plantarum* 93은 2종 당류를 동시 이용하는 특성을 보였는데, *L.plantarum* 86은 DARA가, *L.plantarum* 85는 두종류의 당이용성

의 이용성은 없는 것으로 차이를 보였다.

그리고, 상동성 평가(ID, %)를 살펴보았더니, *L. fermentum* 27의 ID수치는 67.3%였으며, *L. plantarum*속 3종중 *L. plantarum* 85는 99.9%, *L. plantarum* 86은 98.3% 그리고 *L. plantarum* 93은 99.9%의 상동성 수치를 보였다.

#### 다. 16S-RNA 염기서열 분석결과

제빵 및 제과 제조에 유산균을 사용한 국내 외 연구 결과를 보면, 일반적으로 *Lactobacillus* 속이 대부분 이용되는 보고가 많다. 따라서, 본 연구에서도 분리 및 동정이 완료된 *Lactobacillus*속 4종만을 대상으로 유전자 분석(NCBI)을 진행하였다.

염기서열 분석결과(NCBI), *L. fermentum* 27번 균주의 경우는 NCBI(CLUSTAL 2.0.11, Multiple sequence alignment) 비교결과 *L. fermentum* strain NM98-5과 99%의 상동성을 보였다.

*L. plantarum*계열중, 85번, 86번 그리고 93번 균주의 경우는 *L. plantarum* strain IB-1과 각각 99%, 98%, 99%의 상동성을 나타내었다.

#### 4. 결론

본 연구에서는 제빵 및 제과분야에 활용 가능한 한국 토종자원의 효모 및 유산균을 분리 선별하여 제과 및 제빵분야에 특화성을 부여할 수 있는 균주 선발을 실시하였다.

선행연구에서 정립된 분리방법을 사용하여 유기농산물 96종에서 효모 32종, 유산균 35종을 1차로 분리하였으며, 그람염색 및 형태관찰 등을 통하여 효모 12종, 유산균 14종을 우선 분리 및 동정하였다. 이중 유기농산물에서 분리 및 동정된 *Lactobacillus* 계열의 유산균만을 대상으로 유전자 상동성(16s-RNA 염기서열 분석)을 수행한 결과, 최종 *L. fermentum* 1종, *L. plantarum* 3종을 신종균으로 최종 선발하였다. 최종선발 *L. fermentum* 1종은 *L. fermentum* 27으로 명명하였고, 그리고 *L. plantarum* 3종에 대하여는 각각 *L. plantarum* 85, *L. plantarum* 86 그리고 *L. plantarum*93으로 명명하였다.

연구결과는 지적소유권 관련 특허수탁 및 발효유 적용성 검정을 실시한 후 향후 특허 기탁을 통하여 유전자원을 확보하고 분리된 유산균의 제품 적용성과 기능성 물질 탐구 등을 통하여 이를 상용화 관련 추가적인 연구를 진행할 예정이다.

Table 1. 미생물 선발용 유기농 농산물

번호	종류	주소	비고
1	토마토	정선농협(강원정선군 임계면 임계2리)	
2	캠벨포도	상주농협(경북상주시 모서면 석산리)	
3	미숫가루	경북 칠곡군 가산면 천평리 612-31	
4	무농약 쌀	충남 부여군 농협 쌀조합	
5	유기농 쌀	충북 청원군 오창읍 괴정리 220	
6	유기농 건채리	미국	
7	유기농 실라타	터키	
8	유기농 건자두	미국	
9	식혜	서정쿠키(경기 이천시 서둔면 서이천로 863번지길	
10	건대추	경북경산시 남천면 협석리 409-2	
11	무농약찰현미	월드그린영농조합법인(충북 괴산군 장연면 추정리 536)	
12	유기농 찹쌀	월드그린영농조합법인(충북 괴산군 장연면 추정리 536)	
13	유기농 찰현미	월드그린영농조합법인(충북 괴산군 장연면 추정리 536)	
14	유기농 찰보리쌀	월드그린영농조합법인(충북 괴산군 장연면 추정리 536)	
15	무농약 차좁쌀	월드그린영농조합법인(충북 괴산군 장연면 추정리 536)	
16	무농약 찹쌀	월드그린영농조합법인(충북 괴산군 장연면 추정리 536)	
17	무농약 기장쌀	월드그린영농조합법인(충북 괴산군 장연면 추정리 536)	
18	무농약 검정현미	월드그린영농조합법인(충북 괴산군 장연면 추정리 536)	
19	무농약 현미	월드그린영농조합법인(충북 괴산군 장연면 추정리 536)	
20	무농약 백태	월드그린영농조합법인(충북 괴산군 장연면 추정리 536)	
21	유기농 검정현미	월드그린영농조합법인(충북 괴산군 장연면 추정리 536)	
22	유기농 서리태	월드그린영농조합법인(충북 괴산군 장연면 추정리 536)	
23	무농약 수수쌀	월드그린영농조합법인(충북 괴산군 장연면 추정리 536)	
24	엿기름 가루	월드그린영농조합법인(충북 괴산군 장연면 추정리 536)	
25	13옛날 미숫가루	충북 청원군 오창읍 송대리 319-3	
26	13전통 미숫가루	충북 청원군 오창읍 송대리 319-3	
27	무농약 혼합9곡	경기 김포시 통진읍 가현리 109-1	
28	무농약 발아현미	청면 바이오(강원 원주시 신림면 용암3리 82-9)	
29	건취나물	경기 남양주시 진접읍 내곡리 108-21	
30	토토리묵가루	함양농협	
31	토종밀가루	함양농협	
32	등글래	(주)건농 (경기 남양주시 진접읍 장현리 580-5)	
33	헛개열매	(주)건농 (경기 남양주시 진접읍 장현리 580-5)	
34	오미자	(주)건농 (경기 남양주시 진접읍 장현리 580-5)	
35	구기자	(주)건농 (경기 남양주시 진접읍 장현리 580-5)	
36	유기농 표고버섯	청계영농조합(전남 장흥군 안양면 기산리 241-11)	
37	무농약 발아현미	청면 바이오(강원 원주시 신림면 용암3리 82-9)	
38	무농약보리쌀	월드그린영농조합법인(충북 괴산군 장연면 추정리 536)	
39	무농약 발아현미	청면 바이오(강원 원주시 신림면 용암3리 82-9)	
40	상황버섯	청계영농조합(전남 장흥군 안양면 기산리 241-11)	
41	유기농 흑미	충북 진천군 문백면 봉죽리 137	
42	찹쌀	충북 충주시 소태면 양촌리 398-2	
43	영양11곡	경기 여주군 점동면 처리 204	
44	느타리버섯	경기 포천시 군내면 유교리 709-2	
45	친환경 새송이	충남 천안시 서북구 입장면 신주리 32-2	
46	참맛느타리	용인시 처인구 포두읍 연문리 66	
47	손질새송이	충남 아산시 도고면 시전리 259-4	
48	미니느타리버섯	한울타리 영농조합(경기도 용인시 포곡면 영문리66)	
49	무농약 새송이	글로벌유농인영농조합(경북 김천시 아포읍 대설리 720)	

50	표고버섯	충남 청양군 청남면 대흥리	
51	백일간 송이	참맛버섯 영농 조합(경기 여주군 대신면 계림리157-8)	
51	클래식 느타리	한올타리 영농조합(경기도 용인시 포곡면 영문리66)	
53	팽이버섯	전남대산학협력단(전남함평 학교면 죽정리)	
54	팽이버섯970	호남버섯영농조합법인(전남 나주시 노안면 오정리)	
55	건목이버섯	(주)일집	
56	와이즐랙 포도	은자골 유기영농법인(경북 상주시 은척면)	
57	복숭아	가주친환경작목반	
58	캠벨어리(포도)	상주농협(경북상주시 모동면 용호리 37-2)	
59	쌈배추	정선농협(강원정선군 임계면 임계2리)	
60	거봉포도	경북 경산시 남사면 편저리	
61	방울토마토	롯데마트	
62	완숙토마토	경기 여주군 가남면 송림리	
63	배	경북 상주시 사혈면 부흥리	
64	자두	경북 경산시 마론면 소월리	
65	감귤	제주 서귀포시 남원읍 신흥리	
66	참외	월향농협협동조합(경북성주군 월향면 안포리 353-5)	
67	미니토마토	강원 횡성군 둔내면 마양리	
68	키위	제스프리(뉴질랜드)	
69	오이맛 고추	강원 평창군 봉평면 유포리	
70	청양고추	강원 양구군 해안면 현리 61	
71	풋고추	강원 양구군 해안면 현리 61	
72	깻잎	경남밀양시 산외면 남기리 1096-98	
73	가지	강원 횡성군 둔내면 영양리 301	
74	오이	경북김천시 어모면 동좌리 681	
75	애호박	강원 양구군 남면 죽리	
76	친환경사과	경북포항시 북구 죽장면 방흥리	
77	친환경배	공림한결배 작목반(경북상주시 공림면 화동리)	
78	파프리카	(주)농산(전북 김제시 순동)	
79	알로에	경남 거제시 거제면 서정리	
80	적상추	경기 양주시 남면 암암리	
81	청양(연천)고추	경기 연천군 청산면 장탄리	
82	풋(연천)고추	경기 연천군 청산면 장탄리	
83	친환경 오이고추	산세로자연영농조합(강원 횡성군 둔내면 상교리)	
84	유기농깻잎	경남 합천군 가회면 장대리	
85	황금송이	경북 청도군 이서면 대곡리 359	
86	친환경 양상추	산세로자연영농조합(강원 횡성군 둔내면 상교리)	
87	파리고추	경기 연천군 청산면 장탄리	
88	신선초	경기 양주시 백석읍 흥죽리	
89	쌈케일	전북완주군 웅진면 용흥리	
90	피망	산세로자연영농조합(강원 횡성군 둔내면 상교리)	
91	양배추	경기 파주시 적성면 석현리	
92	간마늘	경북 영천시 화산면 대한리	
93	만가닥버섯	경기 여주군 대신면 계림리 157-8	
94	고기맛 느타리	경기 광주시 곤지암읍 진업리	
95	유기농 표고	전남 장흥군 안양면 기산리241-1	
96	유기 새송이	전남 장흥군 안양면 기산리241-1	



Table 2. MALDI-Biityper를 이용한 미생물 동정결과

번호	종류	효모	유산균	비고
2	캠벨포도	Candida_sorbosa[ana] (Issatchenkia_occidentalis[teleo]#) CBS 1910 CBS		
6	유기농 견채리	Candida magnoliae DSM 70639		
7	유기농 설라타	Candida_krusei[ana] # (Issatchenkia_orientalis[teleo]) RV491_Sep09_D LBK		
27	무농약 혼합9곡	Candida_krusei[ana] # (Issatchenkia_orientalis[teleo]) RV491_Sep09_D LBK	Lactobacillus fermentum DSM 20055 DSM	
29	13옛날 미숫가루		Lactococcus lactis ssp lactis DSM 20175 DSM	
33	헛개열매		Leuconostoc mesenteroides ssp mesenteroides DSM 20241 DSM	
42	참쌀	Candida_lusitaniae[ana] (Clavispora_lusitaniae[teleo]#) DSM 70102 DSM		
43	영양11곡	Candida glabrata 10035463_101 USH		
44	느타리 버섯		Lactococcus lactis ssp lactis DSM 20384 DSM	
45	친환경 새송이		Lactococcus lactis IBS_MS_6 IBS	
46	참맛 느타리		Lactococcus lactis ssp lactis DSM 20661 DSM	
51	백일간 송이	Candida tropicalis DSM 1346 DSM	Lactococcus lactis ssp lactis DSM 20661 DSM	
51	클래식 느타리	Candida_guilliermondii[ana] (Pichia_guilliermondii[teleo]#) DSM 11947 DSM	Lactococcus lactis ssp lactis DSM 20661 DSM	
60	거봉 포도	Candida_krusei[ana] # (Issatchenkia_orientalis[teleo]) RV491_Sep09_D LBK	Lactococcus lactis ssp lactis DSM 20661 DSM	
66	참외		Lactococcus lactis ssp lactis DSM 20661 DSM	
78	파프리카	Candida_krusei[ana] # (Issatchenkia_orientalis[teleo]) RV491_Sep09_D LBK		
85	황금송이		Lactobacillus plantarum DSM 2601 DSM	
86	친환경 양상추	Candida tropicalis DSM 1346 DSM	Lactobacillus plantarum DSM 20246 DSM	
90	피망	Candida_krusei[ana] # (Issatchenkia_orientalis[teleo]) RV491_Sep09_D LBK	Lactococcus lactis IBS_MS_6 IBS	
93	만가닥 버섯		Lactobacillus plantarum DSM 1055 DSM	

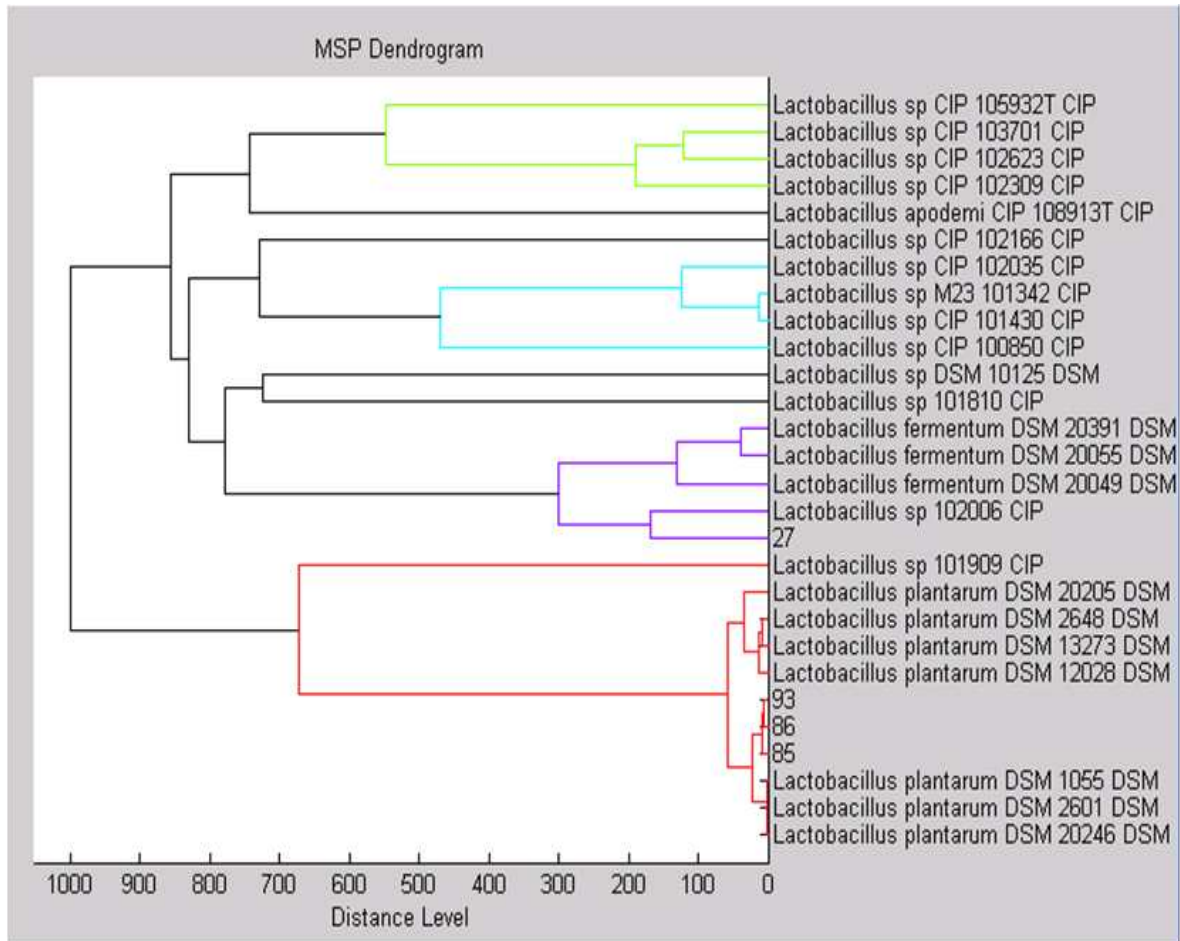


Fig. 분리 유산균 4종에 대한 Dendrogram

27: *L. fermentum* 27 85: *L. plantarum* 85, 86: *L. plantarum* 86, 93:*L. plantarum*93

Table 3. 수거유기농 농산물내 *Lactobacillus. spp* 당이용성 및 API kit분석결과

분리농산물 시료 No.	동정결과	당 이용성	%ID	비고
27	<i>L. fermentum</i>	GLU+, FRU+, MNE+, MAN+, NAG+, ARB+, ESC+, SAL+, CEL+, MAL+, SAC+, TRE+, GEN+, TUR+, HNT+ 2KG+, 5KG+	67.3	<i>L. fermentum</i> 27
85	<i>L.plantarum</i>	LARA+, RIB+, DXYL+, GAL+, GLU+, FRU+, SOR+, MDG+, NAG+, ARB+, ESC+, SAL+, MAL+, MEL+, TRE+, RAF+, HNT+,	99.9	<i>L. plantarum</i> 85
86	<i>L.plantarum</i>	LARA+, RIB+, DXYL+, GAL+, GLU+, FRU+, SOR+,MDG+, NAG+, ARB+, ESC+, SAL+, MAL+, MEL+, TRE+, RAF+, HNT+, <b>5KG+</b>	98.3	<i>L. plantarum</i> 86
93	<i>L.plantarum</i>	<b>DARA+</b> ,LARA+, RIB+, DXYL+, GAL+, GLU+, FRU+, SOR+,MDG+, NAG+, ARB+, ESC+, SAL+, MAL+, MEL+, TRE+, RAF+, HNT+, <b>5KG+</b>	99.9	<i>L. plantarum</i> 93

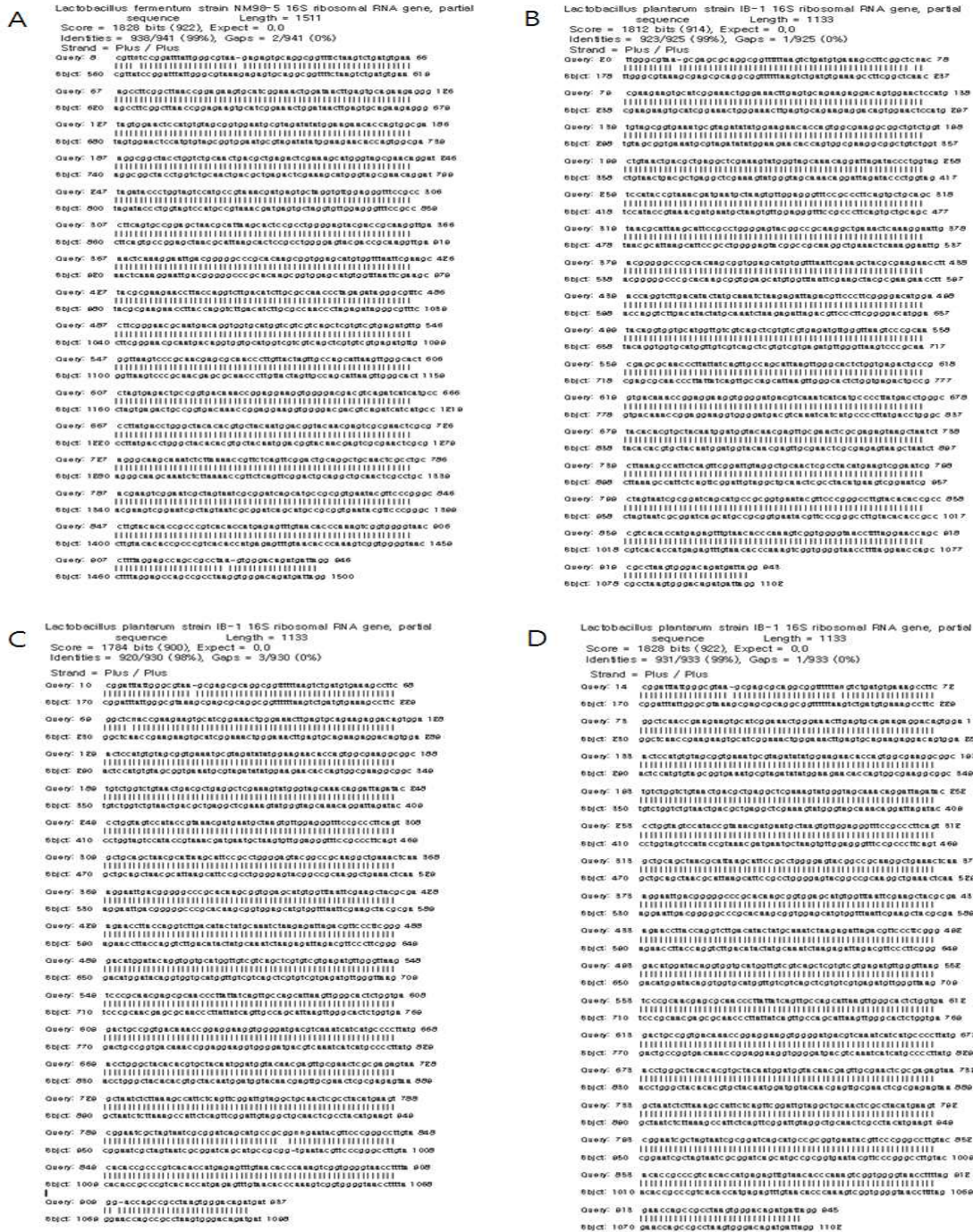


Fig . 유기농 농업현장에서 분리한 농산물내에서 분리한 유산균 4종에 염기서열 분석 결과  
 A: *L. fermentum* 27(분리시료 : 혼합9곡) B: *L. plantarum* 85(분리시료: 황금송이), C: *L. plantarum* 86(분리시료 : 양상추), D: *L. plantarum* 93(분리시료: 만가닥 버섯)

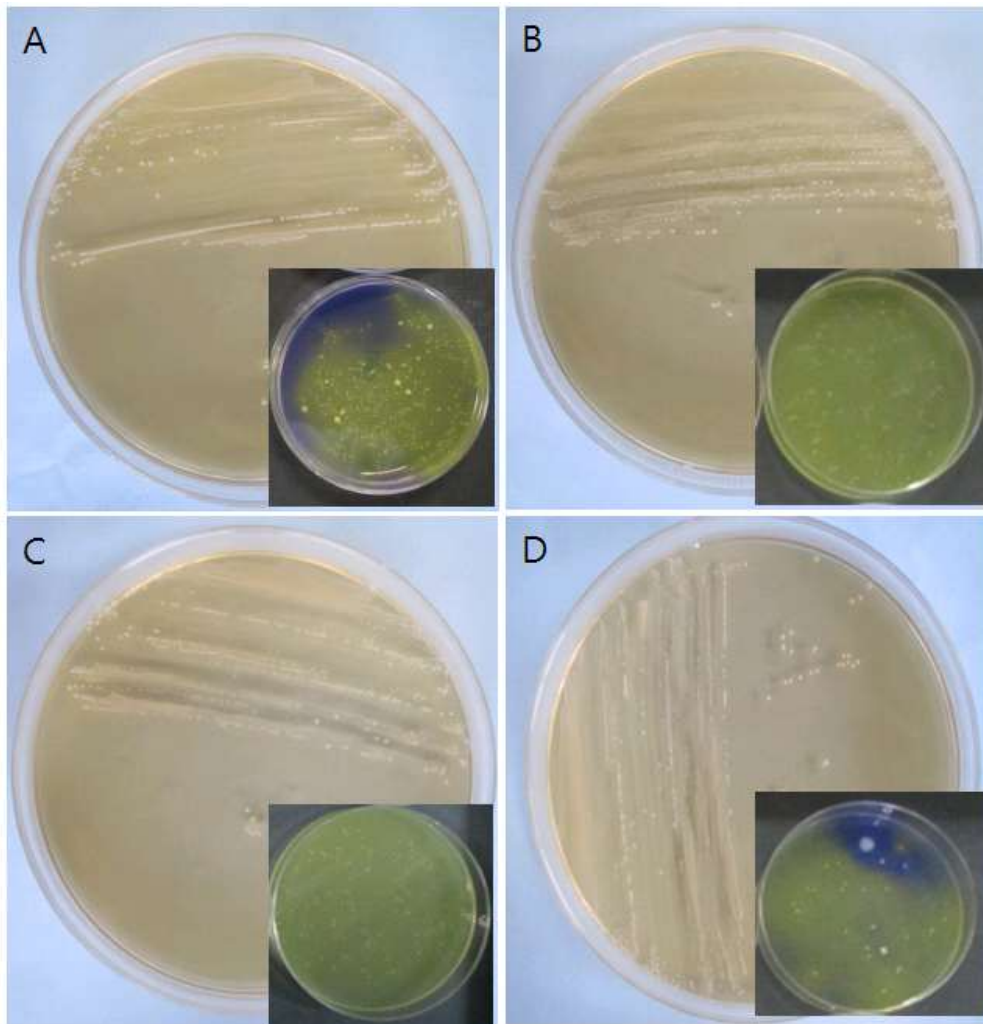


Fig. 분리 유산균 4종에 대한 형태관찰 결과

A: *L. fermentum* 27(분리시료 : 혼합9곡) B: *L. plantarum* 85(분리시료:황금송이), C: *L. plantarum* 86(분리시료 :양상추), D:*L. plantarum* 93(분리시료:만가닥 버섯)

## 제 4 절 개발효모 대량생산시스템 정립

### 4-1 효모 대량생산형 배지 및 배양조건 정립

#### 1, 연구 목적

본 연구에서는 유기농 농산물에서 분리된 2종의 효모 *S.cerevisiae*, 및 *C. utilis*를 선발하고, 소형생산스케일(50L 배양조, Working Vol. 30L 기준)조건에서 생산수율 향상형 배지선발과 이를 적용한 배양조건을 정립함으로써 목표수율을 최종 5%(동결건조 분말 기준)로 도달토록 연구를 완료하였다. 이를 기준으로 추가 선발 효모류에 대한 최종 대량생산시스템(10톤 배양조, Working Vol. : 70톤)구축과 이를 이용한 기능성 소재생산 및 이를 적용한 특화제과(제빵)적용 레시피 정립까지 일련의 시스템 구축을 위한 기초조건을 선행 정립하는데 그 목적이 있다.

#### 2. 연구 수행방법

##### 가. 선발효모 TYPE별(*S.cerevisiae*, 및 *C. utilis*) 증식형 배지선발

선발효모 TYPE별 증식형 최적 기본배지는 “제 3-1절”에서 선발된 배지를 사용하였다. 즉 *C. utilis*는 Glucose 그리고 *S.cerevisiae*는 Sucrose 및 당밀배지를 정립된 배양조건(Cluture Medium, TES Medium, Vitamine Sol.)에 적용하여 Culture Method에 따라 대량생산 시스템 정립을 실시하였다. 시험은 생산수율에 실험기준을 두었으며, 이에따라 선발효모균의 생산효율이 목표대비 낮은경우, Cluture Medium 과 TES조건을 재정립을 통하여 최종 대량생산형 배양조건을 정립하였다(Table 1, Fig 1).

##### 나. 선발효모 TYPE별 대량생산형 배양조건 정립

###### 1) 선발효모 TYPE별 대량생산형 Cluture Medium조건 정립

###### 가) *C.utilis*

선발 *C.utilis*에 대한 핵심 먹이원으로서 배지는 2.5% Glucose (Food grade)로 정하였으며, 이외의 기본배양액 조성물은 1.0%  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 0.5%  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0.15%  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0.5% Yeast extract, 0.02% Urea 및 0.04%  $\text{ZiSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 으로 혼합하여 조성하였다.

기본배양액에 첨가한 TES 및 Vitamine Stock solution은 다음과 같이 조성한 후 이를 배양액에 일정액을 첨가하여 배양간 적용하였다. 즉, TES Stock solution 조성능위하여, 멸균수 1L당 EDTA 15g,  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  5.75g,  $\text{MnCl}_2$  0.32g,  $\text{CuSO}_4$  0.5g,  $\text{CoCl}_2$  0.47g,  $\text{Na}_2\text{MoO}_4$  0.48g,  $\text{CaCl}_2$  2.9g 및  $\text{FeSO}_4$  2.8g를 용해하여 준비하였

고, Vitamin류 Stock solution은 멸균수 1L당 Biotin 0.2g, Calcium pantothenate 4.0g, Nicotinic acid 4.0g, Myo-inositol 100.0g, Thiamine hydrochloride 4.0g, Pyridoxol hydrochloride 4.0g 및 p-Aminobenzoic acid 0.8g을 각각 첨가 및 용해하여 준비하였다. TES 및 Vitamine Stock solution중 TES Stock solution은 배양액 1L당 3ml/L를, 비타민 Stock Solution을 4배 희석한 후 역시 배양액 1L당 1.25ml를 첨가하는 조건으로 조성하였다(Table 1).

#### 나) *S.cerevisiae*

##### (1) 선택배지 Sucrose 적용형

선택배지 *S. cerevisiae* 대한 조성은 2.5% Sucrose(Food grade)를 기본배양액에 첨가하는 조건이외는 *C.utilis*조건과 같이 실시하였다(Table 1).

##### (2) 선택배지 당밀 적용형

선택배지 Sucrose 적용 1차시제 실시결과 2.9%의 낮은 생산수율을 보였음에 따라 이를 향상 시키기 위하여 기본배지를 TMS를 변경하여 실시하였다. 이는 당밀을 기본배지로 사용시 효모가 성장하면서 질소, 인, 마그네슘 등이 다소 부족하게 되는데, 이는 당밀에는 질소원이 0.5~2% 이내로 존재하고 있으나, 대부분 다른 물질과 결합한 형태로 실제 효모가 사용할 수 있는 질소원은 극히 소량이기 때문이다. 따라서, 배지에 추가적으로 첨가되는 TES(Trace element solution)의 조건을 조절하여 TMS를 정립하여 첨가하였다.

핵심 먹이원으로서 배지는 46.6% 당밀배지를 Sucrose를 대체하여 사용하였으며, 이외의 기본배양액 조성물은 동일하게 적용하였다. 그러나, TES 대신 TMS배지를 적용하였는데 조성은  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$  50g,  $CuSO_4 \cdot 5H_2O$  0.5g,  $MgSO_4$  60g,  $Na_2MoO_4 \cdot 7H_2O$  0.48g,  $CaCl_2$  2.9g 및  $CoCl_2$  0.02g를 조성물로 변경하였다. 따라서, 기본배양액에 첨가되는 TMS Stock Solution은  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$  50g,  $CuSO_4 \cdot 5H_2O$  0.5g,  $MgSO_4$  60g,  $Na_2MoO_4 \cdot 7H_2O$  0.48g,  $CaCl_2$  2.9g 및  $CoCl_2$  0.02g를 혼합한 조성액을 각각 사전 준비한 후 TMS Vitamine Stock solution중 TMS Stock solution은 배양액 1L당 3ml/L를, 비타민 Stock Solution을 4배 희석한 후 이를 배양액 1L당 1.25ml를 첨가하는 조건으로 배양간 사용하였다(Table 1).

##### (3) 선택배지 및 배양조건 적용 대량생산시스템 정립

(50L 배양조 기준, Culture Method)

##### (가) 염 내성 및 알코올 내성 균주의 선발

NaCl 1~10%가 포함된 PDB broth에 미리 배양한 종배양액(*S.cerevisiae*)을 넣어 1~2일간 30℃, 200 rpm에서 배양하여 한계 성장점을 확인하고, 이로부터 단

계별로 염 농도를 높여가며 염 내성을 부여하였다. 또한 비슷한 방법으로 알코올 내성을 부여하였다. 선발된 균주는 당밀 전처리, 배지 최적화 및 발효 공정 설계를 위해 최종 glycerol 15% 용액이 되도록  $-70^{\circ}\text{C}$ 에서 동결 보존하였다.

(나) 배지 원료의 전처리 공정 설계

당밀 (필리핀, 해바라기 유기농)을 적당히 희석하여 암모니아(Junsei chemical Co., Ltd., minimum 28%), 인산(85%), 기타 미네랄을 첨가하여 발효조에서 효모의 성장 패턴을 분석하였으며, 성장 속도 및 생장율이 가장 좋은 패턴의 조건을 설정하였다. 또한 당밀 내의 미네랄 성분을 ICP분석기를 이용하여 제빵효모가 필요한 영양성분이 함유될 수 있도록 추가적인 미네랄을 첨가하였다.

(다) 고농도 배양 방법 설계 및 최적화

당밀의 전처리 최적화와 함께 천연 유래 효모의 최적화 생산을 위해 intermittent feeding strategy, constant feeding strategy을 이용한 fed-batch 최적화, 기타 효모 생장에 따라 feeding 속도를 증대하는 방법 등을 통하여 효모의 성장성과 생균수 증대를 높이기 위해 가장 적합한 생산 방법을 개발하였다.

(라) 압착효모 생산 방법에 대한 고찰

산업적인 생산에서 일반적으로 사용하는 압착효모 생산 방법과 이로부터 발생할 수 있는 장단점에 대하여 고찰하며, 실험실 수준에서 수행 할 수 있는 방법으로 시제품을 생산하였다.

### 3. 연구수행결과

#### 가. 선발*C.utilis*.에 대한 생산수율 증대형 배지선발 및 배양조건 정립

(시작품; 생산수율 5%)

선발 *C.utilis*. 에대한 생산수율 증대형 배지선발 및 배양조건 정을 위한 실험결과, 최적 기본배지 2.5% Glucose (Food grade)에 1.0%  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 0.5%  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0.15%  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0.5% Yeast extract, 0.02% Urea, 0.04%  $\text{ZiSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , Trace element solution (TES, 3ml/L-broth), 4x Vitamin solution 1.25ml/L를 50L 규모의 Working Vol.30L에 맞추어 Cluture Mediumdmf 조성하고 Trace element solution (TES, 3ml/L, broth), 4X Vitamin solution 2.5ml/L를 첨가하여 정립된 배양조건에 준하여 실시하였다.

배양조건 결과로서, *C.utilis*. 1차 시제시 효모균의 성장 속도가 일정수준으로 유지되었고 2th seeding부터 효모균의 성장 속도 일정속도로 빨라짐을 보였다. RPM 및 pH는 안정적으로 유지됨을 확인할 수 있었다(Fig 2~3. Table 2.).



최종 결과로서, 대량생산형 배양조건을 적용하여 실시한 시제에서, 순수분리한 효모에 대한 동결건조시 5%의 생산수율을 확보하여 목표 수율에 도달함을 확인하였으며, 이때 효모 균수는 g당  $9.6 \times 10^{10}$  cfu/g을 보여 *C.utilis* 에 대한 대량생산형 배지선발과 배양조건 정립은 확립되었음을 알 수 있었다. 이 결과를 기초로 본과제와 관련하여 10톤규모의 대형시제시 활용하였다.

나1. 선발 *S. cerevisiae* 에 대한 배지 및 배양조건 정립(1차 시제, 생산수율 : 2.9%)

*S.cerevisiae* 1차 시제 또한 최적 기본배지 선발 예비실험결과에 따라 2.5% Sucrose (Food grade)를 기본으로 Cluture Mediumdmf 조성하고 Trace element solution (TES, 3ml/L-broth), 4x Vitamin solution 1.25ml/L를 첨가하여 정립된 배양조건에 준하여 실시하였다(Fig 2). 배양조건 결과로서, *S.cerevisiae* 1차 시제는 배양 중반에서 스트레스성 성장속도 감소가 보였으며, pH의 급격한 변화가 관찰되었다(Fig 4). 이에 따른 최종 결과로서, *S.cerevisiae* 에 대한 1차 시제에서는 건조 효모 기준 700g을 얻어 생산수율이 2.9%로 낮게 나타났으며, 효모균수 또한  $2.6 \times 10^{10}$  cfu/g을 보여 *C.utilis*. 결과대비 낮은수치를 보였다(Table 3).

다. 선발 *S. cerevisiae* 에 대한 생산수율 증대형 배지선발 및 배양조건 정립

(2차 시제, 생산수율 : 5.4%)

1) 배지 원료의 전처리 공정설계

가) 비용해성 성장저해 물질의 제거

전처리 공정에서 가장 중요한 부분은 최종 산물 (제빵효모)의 품질을 유지하며, 발효시 효모의 성장을 최대로 올릴 수 있는 조성을 유지하는 것이다.

당밀은 원료의 특징상 다량의 당분 (40~48%)과 질소원, 기타 미네랄 및 비타민을 보유하고 있는 좋은 배지 성분이나 미생물이 사용할 수 없는 다량의 비용해성 칼슘과 비용해성 회분을 보유하고 있어서 이를 제거해야 만이 안정적인 제빵효모를 생산할 수 있다. 따라서 당밀의 전처리 공정 설계는 효모 생산 발효 및 최종 제품의 품질에 아주 큰 영향을 미치는 요인이다.

Fig. 5은 당밀을 전처리 (열처리, 105℃, 30 분)할 때, 비용해성 물질 제거에 pH의 영향을 보기 위한 것으로 pH 값이 높을수록 침전물량이 증대되는 것을 알 수 있다(침전 방법; 105℃, 30 분 열처리>실온까지 냉각>4,000×g 20분간 원심분리). 이러한 원인으로는 Ca침전물 및 회분(금속착화합물)은 pH 값이 중성 또는 알칼리성으로 갈수록 용해성이 떨어지는 것이 가장 큰 원인이며, 이러한 칼슘염, 칼륨염, 나트륨염 등을 생장에 필요한 수준을 제외하고 최대한 제거할수록 효모의 생장률은 높아지는 것이 일반적이라 할 수 있다.

결국 열처리를 수행할 때 pH가 높을수록 좋으나, 그 후 당밀 배지로서의 균형을

위해서 적절한 상승폭을 조절할 필요성이 있다. 본 연구에서는 pH 6.2~7.0 부근이 좋은 것으로 판단하였다.

#### 나) 당밀 전처리 공정 설계 I

앞에서 당밀 전처리 중 Ca염 등의 제거를 위해 pH 상승시켜 수행하였다. 하지만, pH를 증가시키기 위해 NaOH 등을 사용하게 되면, 배지로서 당밀의 효용가치는 상당히 낮아지게 되는데, 나트륨염이 효모의 생장에 negative 영향이 크기 때문이다. 따라서 당밀에 부족한 성분을 이용하여 pH를 상승시키는 전략이 필요하며, 본 연구에서는 암모니아수를 이용하여 질소원을 보충하고, 또한 pH를 상승시켜, 105℃에서 30분간 열처리하여 당밀을 전처리할 수 있게 하였다. 이후 실온으로 냉각시켜 당밀에 부족한 인산을 추가로 공급시켜 pH 밸런스를 유지하며, 효모의 성장성을 높이려고 하였다.

Fig. 6는 실험실 수준에서 일반적으로 수행되어지는 당밀의 전처리 조건과 암모니아와 인산을 이용한 전처리 조건 등을 설정한 것이다. 4가지의 조건으로 당밀을 전처리 및 4배 희석(v/v)하여 발효조에서 회분배양을 실시하였다. 그 결과 암모니아수를 첨가하여 pH 6.2으로 조정 후 105℃ 30분간 열처리하여 인산으로 pH 5.5로 조정된 당밀을 4배 희석된 배지로 사용한 발효조에서 기준 시간 (25시간)에서 가장 균체 생장이 좋은 결과를 나타냈다. 같은 당밀 농도로 발효를 진행했음에도 전처리 방법에 따라 최종 효모의 성장성이 각각 다른 것을 알 수 있으며, 이는 당밀 전처리 조건에 따라 생산수율 및 효모성장성, 효모의 생균수에 다양한 영향성을 확인 할 수 있다.

Fig. 7은 Fig. 6에서 나온 결과를 참고로 fed-batch 형태의 발효로 진행한 결과를 나타내고 있다. 하지만, 완전한 fed-batch형 발효는 아니며, 당밀의 전처리 효과를 보기 위하여 임의적인 시간 (22시간) 이내로 발효를 종료하였다. 회분배양용 배지는 암모니아수를 첨가하여 pH 6.2으로 조정 후 105℃ 30분간 열처리한 후 원심분리 (실온 냉각 및 4000×g 30분)하여 인산으로 pH를 5.5로 조정된 다음 8배 희석한 전처리 당밀을 사용하였으며, feeding 용액을 전처리 당밀액 또는 KOH로 전처리한 당밀액, 인산을 과량 사용하여 pH 5.0으로 보정한 feeding 용액을 사용하였다. 테스트 결과에 따르면, 약간의 황산마그네슘을 첨가해주면, 성장 속도가 증가하였다. 인산을 과량 첨가해 주어도 성장속도면에서 도움이 되지 못함을 알 수 있으며, 인산 농도는 pH 5.5로 조정하는 것이 합당한 수준임을 알 수 있었다. 즉, 기본적으로 당밀에서 효모가 성장하는데, 부족한 성분으로는 질소, 인, 마그네슘 등이 다소 부족한 것으로 파악된다. 문헌상, 당밀에는 질소원이 0.5~2% 이내로 존재하고 있으나, 대부분 다른 물질과 결합한 형태로 실제 효모가 사용할 수 있는 질소원은 극히 소량으로 나타나고 있었다.

인성분 또한 설탕 제조공정에서 여러물질과 착화합물형태로 전환되면서, 사용 가능성이 낮게 변화하며, 본 전처리 공정에서도 다량 침전물 형태로 제거된다. 참고로

인 성분이 적어진 배지에서 성장하게 되면 에탄올 생성이 증가하며, 균체 생산성이 떨어지게 된다. 본 실험을 수행해본 결과, K의 농도를 증대시키면 효모의 성장 속도가 떨어지는 현상을 보이며, P의 농도를 증대시키면 성장 속도는 증대되나, 효모가 제빵시 오븐 점핑, 즉 CO<sub>2</sub> 생산성이 낮아지는 현상이 있다. 따라서, K는 최소한으로 조정하여야 하며, P의 농도는 성장에 합당한 수준에서 제어 할수 있도록 최종 발효를 디자인하였다.

#### 다) 당밀 전처리 공정 설계 II

1차 확정된 당밀의 전처리 조건을 이용하여 실제 생산 여부를 확인하기 위하여 Fig. 8과 같이 Fed-batch 배양을 수행하였다. 이때 발효 조건은 Table 5와 같다.

총 1L feeding 용액을 첨가하여 발효를 마친 최종 효모의 농도는 42g/L의 건조중량, 배양액 내의 생균수는  $1.6 \times 10^9$  CFU/ml, 원심분리법으로 회수한 압착효모(76% 수분함유)의 생균수는  $1.2 \times 10^{10}$  CFU/g를 나타내며, one batch(최종 부피 2.5L 기준) 당 420g/batch의 압착효모(76% 수분함유량)를 생산하였으며, 이는 순수 당밀 730g으로부터 생산된 것임을 고려할 때 당밀 g 당 0.57g의 압착효모가 생산되어 압착효모 수율은 57% (76% 수분함량)이었으며, 건조효모를 기준으로 하면 14.4%의 수율로 나타내었다.

발효액 부피당 생산성(% ,  $w/v \times 100$ )은 압착효모의 기준으로는 16.6%, 건조 효모의 기준으로는 4.2%를 나타내었다. 이러한 결과는 최종 목표치에 부족한 결과를 나타내고 있으며, 최대 비성장 속도( $\mu_{max}$ )는  $0.33 \text{ h}^{-1}$  를 나타내고 있지만, 이중성장시점이 지난 후 fed-batch 시점에 도달할수록 성장속도가 느려지는 것을 확인할 수 있었다. 이는 첨가해주는 feeding 용액의 배지농도 및 initial batch 배지의 농도가 낮아 성장 속도에 비해 점점 희석 속도가 빨라지는 문제가 발생하는 것으로 판단하게 되었다. 따라서 초기 성장배지의 농도를 증대시키고, feeding에 사용되는 전처리 당밀의 농도 증가 및 추가적인 분석을 통해 생산성을 증대하고자 시도하였다.

초기 배지 농도를 높게 되면, 과량의 당 농도로 인해 효모는 호기적인 조건에서도 부산물인 에탄올을 생성하게 된다. 이로 인해 한정된 기질(당밀)로부터 생산되는 효모 생산성이 떨어지는 것이 일반적이다.

본 연구에서 초기 배지에 당 농도를 5.73%까지 높여도 생산성에는 저농도 당배지에 비해 차이가 나지 않았다. 이는 성장의 저해를 주는 요인이 작기 때문에 부산물 생성에 에너지가 투입되지 않았기 때문이라고 판단된다. 또한 초기 배지에서 성장 속도를 빠르게 하기 위하여 유기 질소원과 암모늄염을 첨가하는 실험을 수행하였지만, 성장속도 증대 및 성장성에는 많은 차이가 나지 않았으며, 발효 시 뜻하지 않은 pH변동현상으로 발효 컨트롤을 어렵게 하는 요인이 되었다.

Fig. 7와 같이 고농도 전처리 당밀을 사용하여 발효 실험을 수행하였다. 이때 발효 조건은 Table 6과 같았다. 총 1L feeding 용액을 첨가하여 발효를 마친 최종 효모의 농도는 53.8g/L의 건조 중량, 배양액 내의 생균수는  $2.53 \times 10^9$  CFU/ml 였

으며, 기존에 비해 60% 증대하였다.

One batch (최종 부피 2.6L 기준) 당 140g/batch의 건조효모를 생산하였으며, 이는 순수 당밀 860g으로부터 생산된 것임을 고려할 때, 건조효모 수율은 16.2%였으며, 저농도 당밀 배지 발효에 비해 1.6% 수율을 증대 시켰다. 발효액 부피당 생산성(% ,  $w/v \times 100$ )은 건조 효모의 기준으로는 5.38%를 나타내었다. 저농도 당밀 배지에 비해 배양액 내의 생균수 및 균체 생산 수율 증대는 황산 아연 첨가와 순수산소 공급에 따른 결과로 판단된다. 저농도 당밀 배지에서는 순수산소 공급이 없이 고속의 교반 속도 (최대 1300 rpm)로 DO (dissolved oxygen)를 유지한 결과 share stress 조건하에서 배양되었으며, 배양 후반에 충분한 산소 요구도를 만족하지 못하여 생균수와 수율이 감소하였다. 고농도 전처리 당밀 및 순수산소를 이용하여 최종 생산성을 건조효모 목표치인 5%를 달성하였으며, 압착효모의 생산성을 극대화시킬 수 있었다. 하지만, 배양 말기에 비생장속도( $\mu$ )가 떨어지는 패턴을 보이며, 이는 역시 성장속도가 배지의 희석속도를 따라가지 못하기 때문이다. 이보다 높은 수준의 생산성을 만들기 위해서는 repeated fed-batch culture를 수행하면 되지만 이 또한 한계가 발생할 것이다.

최대 7% 생산성이 한계점이 될 것이며, 그 원인은 K, Na, Ca 이온의 배지내에 고농도로 존재하게 되면서, 성장속도를 낮추게 될 것으로 추정된다.

추가적인 한계 요인은 6% 이상의 고농도 배양은 발효조 내에 배양액의 점도 상승과 교반 속도 증대의 영향으로 share stress 요인이 증대되어 성장 및 수율이 억제될 것으로 추정된다. 따라서 고농도 배양으로 인해 순수 산소를 공급 해야만 당밀 대비 생산 수율을 확보 할 수 있다. 즉, 효모가 요구하는 DO 수준을 맞추고, share stress를 줄일 뿐만 아니라 에탄올 같은 부산물 생산을 줄여 생산 수율을 증대시킨다.

따라서, 사업화시엔 순수 산소 공급 장치를 설치해야만, 본 연구 결과와 유사한 결과로 생산 할 수 있을 것으로 판단된다. 단순히 5.3% 건조효모를 생산하는 경우는 순수 산소 공급 장치를 설치할 필요가 없지만, 당밀 대비 수율 즉 경제성을 목표로 한다면 순수 산소 공급 장치를 설치해야 에탄올과 같은 부산물 생산성의 감소와 효모의 생균수를 안정적으로 유지 할 수 있을 것이다.

Fig. 7의 발효 완료한 상등액과 이때 사용한 전처리 당밀을 ICP분석하여, 최종 발효 배지를 확정하였다. ICP분석 결과는 Table 7에 나타내었다.

최종 배양 상등액에 잔존하는 원소의 함량은 전처리 당밀을 2배 희석한 당밀 배지에 TMS와 발효 중 첨가물을 넣은 배지성분에서 효모가 배양 중 소모한 원소량을 뺀 수치와 동일하다. 즉, 효모가 58.3g/L 성장하는 동안 K, Na, Mg, Ca, Mn, Zn, Fe, Cu, P를 각각 830, 7, 164, 101, 2.7, 20.7, 16, 3이상, 255 ppm를 소비하였다. 이를 바탕으로 Table 8에 최종 배지와 배양 방법을 결정하였다. 이러한 배양조건하에서 발효 결과를 Fig. 7에 나타내었다. 여기서는 열처리 후 배지와 feeding 용액에 첨가되는 filter 여과 살균물(TMS; Trace Metal Solution)의 단

순화 및 배양시 발효 온도(30℃)를 상승시켜 30시간 이내로 발효가 종료되게 성장 속도를 증대시켰다.

총 1L feeding 용액을 첨가하여 발효를 마친 최종 효모의 농도는 54g/L의 건조 중량, 배양액 내의 생균수는  $2.85 \times 10^9$  CFU/ml, 원심분리법으로 회수한 압착효모(75% 수분함유)의 생균수는  $1.33 \times 10^{10}$  CFU/g를 나타내었다.

One batch(최종 부피 2.6L 기준) 당 561.6g/batch의 압착효모(75% 수분함유량)를 생산하였으며, 이는 순수 당밀 860g으로부터 생산된 것임을 고려할 때 이는 당밀 g 당 0.65g의 압착효모를 생산하는 것으로 수율 65% (75% 수분함량 포함)을 보이며, 건조효모를 기준으로 하면 16.3%의 수율로 나타난다. 그리고, 발효액 부피당 생산성(%w/v\*100)은 압착효모의 기준으로는 최대 21.6%, 건조 효모의 기준으로는 최대 5.4%를 나타내었다.

결론적으로, 기본 조건은 동일하게 *S. cerevisiae* 수율 향상형 배지 및 배양조건을 적용하여 2차 시제를 실시한 결과, 생산수율이 5.4%로 증가하였음을 확인 하였다.

생산수율 증대와 관련한 중요 인자는 Sucrose에서 당밀배지로 그리고 TES에서 TMS배지로 교체하였으며, 배양시 발효에 따른 time-profile을 보면 *C. utilis*. 1차 시제와 유사하게 효모균의 성장 속도가 일정수준으로 유지되었고 2th seeding부터 효모균의 성장 속도 일정속도로 빨라짐을 보였다. 배양이 종료되는 시점의 배양액 내 균수는  $2.5 \times 10^9$  cfu/g 을 보였으며 동결건조형 수율은 1차 시제기준 2.9%에서 2차시제 기준 5.4%(균수 :  $1.1 \times 10^{10}$  cfu/g)로 증가하는 결과를 나타내었다(Fig 11, Table 4).

#### 라) 고농도 배양 방법 설계 및 최적화

전처리 당밀의 최적화와 함께 발효방식 즉, intermittent feeding strategy 혹은 constant feeding strategy을 이용한 Fed-batch 방식과 Repeated fed-batch 방식을 사용하여 효모의 성장성과 생균수를 증대시킬 수 있다.

본 연구에서는 repeated fed-batch 발효법에 대해서 연구하지 않았지만, 제빵효모 생산에서는 대중화된 발효법이다. 유가배양 방식으로 생산하게 되면 고농도까지 발효하는데 시간이 장시간 소요되는 문제로 인해 단위 시간당 생산성이 떨어진다.

이러한 문제를 해결하기 위해 발효 중인 발효액의 일부를 다른 탱크로 이송하여 종배양부터 진행하던 유가식 발효와는 달리 발효의 연속성을 유지하여 생산 시간을 줄이고 생산성을 높이는 방법이다 (유가배양된 발효액의 농도에 영향을 받아 최종 생산물의 생산성이 떨어진 경우 수행하는 것으로 유가배양과 동일한 방법이다). 또한 연속 생산을 위해서는 continuous culture (키모스텟이나 터비도스텟)과 같은 방법으로 효모를 특정 성장 조건 (질소원 기아 등의 특정 조건에서의 배양)에서 발효하여 최종 압착효모의 품질 균질성을 유지시키기도 한다.

당밀 배지를 사용한 효모의 고농도 배양은 효모의 성장속도 및 수율에 영향을 받

는다. 효모 균주의 비성장속도 ( $\mu$ )와 당밀 이용률이 높을수록 당밀 사용률이 줄어들며 효모 생산 수율이 증가할 수 있다.

야생분리 효모는 탄소원 이용성 조절 기작이 효모의 성장 관련 유전자를 제어하게 된다. 따라서 효모는 다양한 탄소원이 함유된 당밀배지에서 2중생장이라고 불리는 형태로 성장하게 되는데, 이 때 배지내에 잔존하는 탄소원에 따라 대수 증식 구간, 생장이 정지하는 구간 그리고 지수(또는 대수) 성장 구간으로 나누어지게 된다. 이러한 시기를 포함한 평균 비성장속도는 대수 증식 구간 속도의 절반 정도의 속도를 나타낸다.

효모의 고농도 배양은 batch 시기와 fed-batch 시기로 나누어진다. batch 시기에는 함유되어져 있는 배지 성분을 사용하여 성장하며, fed-batch 시기에는 첨가되는 feeding 용액의 성분과 농도에 의존해 성장되도록 디자인되어 있다. batch 배지의 농도와 feeding하는 용액의 농도에 따라 효모의 최종 농도가 달라지며, 고농도로 자랄 때에도 배양액의 점도와 교반 속도에 따라 share stress라는 효모 성장에 스트레스 요인이 발생하게 된다. 이로 인해 투입된 당밀 대비 효모 생산 수율이 떨어진다. 하지만, 순수 산소를 공급하여 배양액 내에 DO 수준과 교반 속도를 적절히 조절하면 share stress가 줄어들고, 부산물 생성이 최소한으로 조정되어 최적 효모 생산 할 수 있다.

본 연구에서는 비성장속도 증대와 당밀 배지의 효율적 사용을 위해 당밀 전처리 공정 설계 및 ICP분석으로부터 효모의 성장에 부족한 미네랄을 공급하였고, 공기와 순수 산소를 혼합 공급하여 배양액 내에 효모가 최적 성장할 수 있는 DO 수준과 교반 속도를 유지하려고 하였다.

마지막으로 본 연구에서는 수행하지 않았지만, 당밀 전처리 공정으로 설계된 당밀 배지와 순수 산소를 공급하면서 repeated fed-batch 발효 (주발효조의 발효액을 종배양액으로 사용하거나 새로운 발효조로 이송하여 연속적인 발효를 수행하는 발효법)를 수행하게 되면, 현재의 수준 보다 배양액 내에 당밀 농도가 더 증대 될 것이며, 높은 생산성 (실험실 수준에서 최대 7%의 효모 생산)를 만들 수 있을 것이다. 또 이 방법을 사용하게 되면, 초기 batch 배양시기에 성장 지연을 제거 할 뿐 아니라, 실제 생산에서도 매일 효모를 생산 할 수 있는 유용한 생산 방법이 될 것이라 판단한다.

제과(제빵)특성을 위해 제조한 최종 시제품은 fed-batch 배양시기에서 feeding 용액이 200ml 남았을 때부터 암모니아수를 이용한 pH 보정을 pH 5.0으로 setting 하여 자연적으로 pH를 강하시켜 배지내에 질소원 수치를 낮추었다.

#### 4. 결론

본 과제의 주요연구개발 핵심은 선발효모의 대량생산시스템 정립(건조효모기준, 생산수율 목표 : 5%이상 기준)과 대량생산 효모를 이용한 기능성 소재개발 및 이의 제과 적용성 평가를 통한 레시피 정립에 있다. 따라서, 본 연구에서는 대량생산

생산 시스템 구축을 위한 배지 및 배양조건 확립에 대한 결과를 성공적으로 완료하였다.

선발효모에 대한 대량생산시스템 정립항목은 Cluture Medium, TES(Trace element solution), Vitamin solution 및 Cluture Method순으로 정립되었으며, 생산수율은 5%(동결건조 기준)를 기준으로 배양조건을 확립되었다.

결과로서, 기본효모 생산방법 대비 선발효모 적용 대량생산형 배지 및 배양조건 확립을 위한 본 연구결과를 종합적으로 검토하여 본 결과, Cluture Medium 조성물 중 기본 먹이원과 TES조성물이 가장 주요인자인 것으로 인정되었다.

이에 따라 상용효모배지 및 배양조건을 기준으로 먹이원을 검토하였더니, *C.utilis*류는 Glucose배지를 사용한 배양조건에서, *S. cerevisiae*류는 Sucrose와 당밀배지를 적용한 경우가 적절한 것으로 확인되었다. 그리고, 선발 *S. cerevisiae*는 당밀배지의 경우가 목표수율(동결건조 기준 : 5%)에 가장 적합한 최적 먹이원임이 확인되었다(Table 5).

선발 *C. utilis*에 대하여 정립된 대량생산형 배지 및 배양조건을 적용하여 시작품 실시결과, 생산수율은 목표치인 5%로 도달하였으며, 배양액내 효모균수는  $1.54 \times 10^9$ cfu/g을 보였으며 제형화 TYPE별 생산 수율은 압착효모는 17.5%(균수:  $1.0 \times 10^{10}$ cfu/g, 수분 : 70~72%), 동결건조형 수율은 5%( $9.6 \times 10^{10}$ cfu/g)의 결과를 얻었다.

선발 *S. cerevisiae*에 대하여 대량생산형 배지 및 배양조건을 적용하여 시제실시 결과는 Sucrose를 적용한 경우에는 생산수율 2.9%보임에 따라 목표생산수율에 도달하지 못하였다.

따라서, 다중배지에 대한 효모성장효과 평가를 거쳐 당밀배지와 TMS배지 선발 및 이를 적용한 2차 시제를 실시한 바 목표수율을 5.4%로 높히는데 성공하였다. 즉, 생산수율 증대와 관련한 중요 인자는 Sucrose에서 당밀배지로 그리고 TES에서 TMS배지로 교체후 배양시 생산수율은 5.4%수율로 증가하였다.

배양종료 후 배양액내 균수는  $2.5 \times 10^9$ cfu/ml을, 생산단계별 수율을 살펴보았더니, 압착효모는 1차 시제에서는 9%였는데, 2차 시제 기준 18%(균수 :  $1.15 \times 10^{10}$ cfu/g, 수분 : 74%이상)로 증가하였으며, 이를 동결건조하여 보았더니 5.4%(균수 :  $1.1 \times 10^{10}$ cfu/g)로 증가하는 결과를 확인 하였다(Table 4).

결론적으로, 1년차 연구목표 대비 선발효모 2종(*C. utilis*, *S. cerevisiae*)에 대한 대량생산시스템은 정립된 것으로 인정할 수 있었으며, 이는 당해연도(2차년) 대량생산시스템 구축(10톤 규모, Working Vol. : 7톤, 효모생산수량 : 400Kg)과 연계 최종 완료할 예정이다.

Table 1. 선발효모 2종(*C. utilis*, *S.cerevisiae*)에 대한 생산수율 증대형 대량생산시스템 정립을 위한 배지 및 배양조건 정립내역

선발효모	시제 실시 내역	선발효모 생산수율향상형 배지조성표			Culture method
		Basal Medium	TE(M)S(/liter)	Vitamin Sol.(/liter)	
<i>C. utilis</i>	시작품 (정립 완료)	2.5% glucose 1.0% (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0.5% KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 0.15% MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O 0.5% Yeast extract 0.02% Urea 0.04% ZrSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O TES :3ml/L-broth 4X Vitamin Sol.: 2.5ml/L-broth	TES배지 EDTA 15g ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O 5.75g MnCl <sub>2</sub> 0.32g CuSO <sub>4</sub> 0.5g CoCl <sub>2</sub> 0.47g Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> 0.48g CaCl <sub>2</sub> 2.9g FeSO <sub>4</sub> 2.8g	Biotin 0.2g Calcium pantothenate 4.0g Nicotinic acid 4.0g Myo-inositol 100.0g Thiamine hydrochloride 4.0g Pyridoxol hydrochloride 4.0g p-Aminobenzoic acid 0.8g	Initial pH 5.5(pH control : ammonia water) Airation 0.5~1.0 vvm 1th seeding 50ml YPD 2th seeding 300ml*1EA YPD Main (fed-batch type culture, 2 intermittant feed, 1% inoculation) Feeding solution (40% sucrose 4L, 1.6 kg) DO > 5% Agitation 150~340 rpm
		생산수율(동결건조기준)			5%
<i>S.cerevisiae</i>	1차 시제 (저수율)	2.5% Sucrose 1.0% (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0.5% KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 0.15% MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O 0.5% Yeast extract 0.02% Urea 0.04% ZrSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O TES:3ml/L(broth) 4X Vitamin. solution : 1.25ml/L-broth	TES배지 EDTA 15g ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O 5.75g MnCl <sub>2</sub> 0.32g CuSO <sub>4</sub> 0.5g CoCl <sub>2</sub> 0.47g Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> 0.48g CaCl <sub>2</sub> 2.9g FeSO <sub>4</sub> 2.8g	Biotin 0.2g Calcium pantothenate 4.0g Nicotinic acid 4.0g Myo-inositol 100.0g Thiamine hydrochloride 4.0g Pyridoxol hydrochloride 4.0g p-Aminobenzoic acid 0.8g	Initial pH 5.5(pH control : ammonia water) Airation 0.5~1.0 vvm 1th seeding 50ml YPD 2th seeding 300ml*1EA YPD Main (fed-batch type culture, 2 intermittant feed, 1% inoculation) Feeding solution(40% sucrose 4L,1.6 kg) DO > 5% Agitation 150~340 rpm
		생산수율(동결건조기준)			2.9%
<i>S.cerevisiae</i>	2차시제 (정립 완료)	46.5% 당밀배지 1.0% (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 0.5% KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 0.15% MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O 0.5% Yeast extract 0.02% Urea 0.04% ZrSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O TES : 3ml/L(broth) 4X Vitamin Sol. 1.25ml/L-broth	TMS배지 ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O 50g CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O 0.5g MgSO <sub>4</sub> 60g Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O 0.48g CaCl <sub>2</sub> 2.9g CoCl <sub>2</sub> 0.02g	Biotin 0.2g Calcium pantothenate 4.0g Nicotinic acid 4.0g Myo-inositol 100.0g Thiamine hydrochloride 4.0g Pyridoxol hydrochloride 4.0g p-Aminobenzoic acid 0.8g	Initial pH 5.5(pH control : ammonia water) Airation 0.5~1.0 vvm 1th seeding 50ml YPD 2th seeding 300ml*1EA YPD Main (fed-batch type culture, 2 intermittant feed, 1% inoculation) Feeding solution (40% sucrose 4L, 1.6 kg) DO > 5% Agitation 150~340 rpm
		생산수율(동결건조기준)			5.4%

TES :Trace element Solution



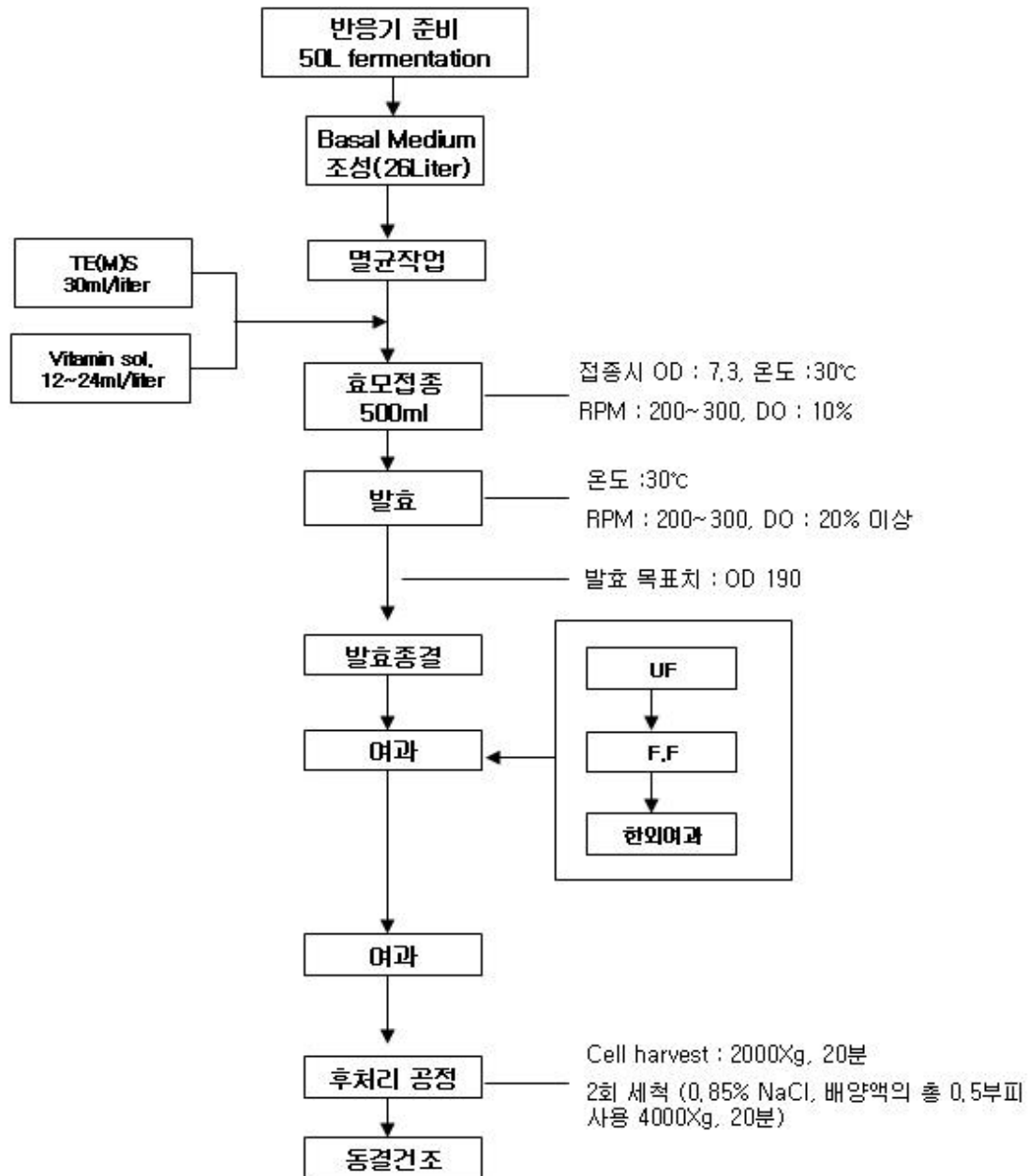


Fig 1. 선발효모 2종(*C. utilis*, *S.cerevisiae*)에 대한 생산수율 증대형 대량생산시스템 정립을 위한 배지 및 배양조건 정립내역

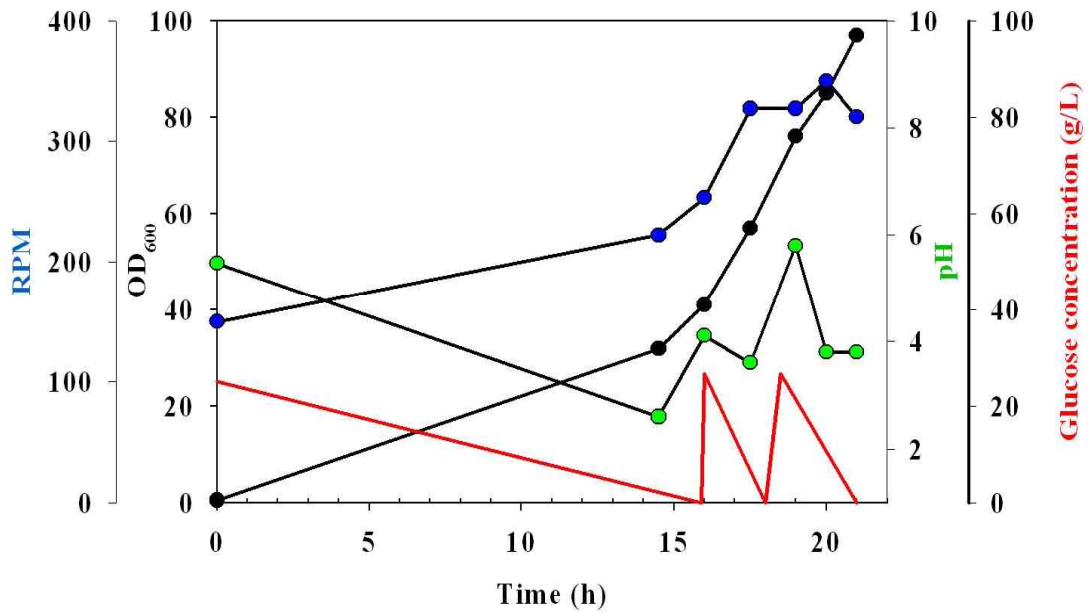


Fig 2. 선발 *Candida utilis*에 대한 대량생산기법 정립결과(1차 시작품, 생산수율 : 동결건조 기준 5%, Glucose배지사용조건하에서 Fed-batch 발효에 따른 Time-profile, 배양조 50L, Working Vol.30L)

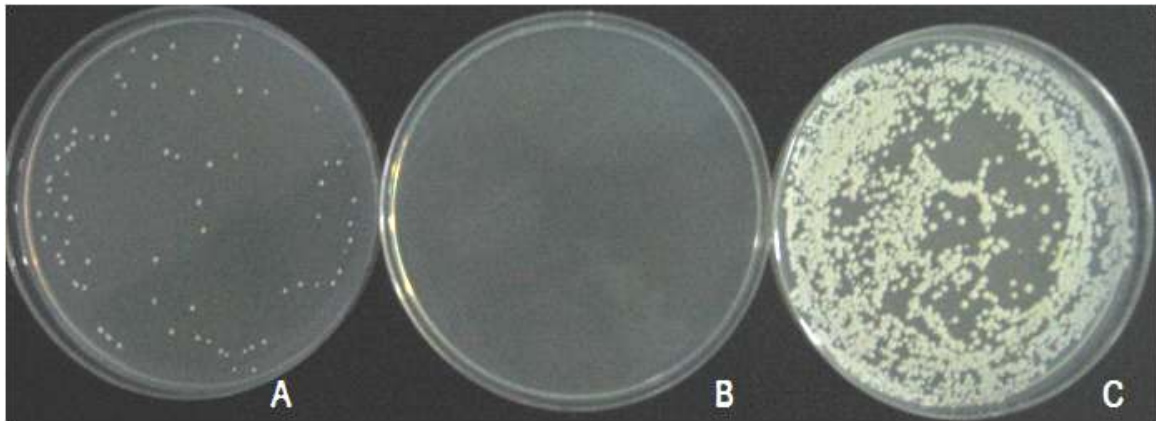


순수효모(FD) 효모+배양액(FD) 배양액(SD)

Fig 3. 선발 *C. utilis*에 대한 생산수율 증대형 대량생산기법 정립을 위한 시작품 제조 결과 (생산 Scale : 배양조 50L, Working Vol. 30L)

Table 2. 선발 *Candida utilis*.에 대한 대량생산기법 정립결과(1차 시작품, 생산수율 : 동결건조 기준 5%, Glucose배지사용조건하에서 Fed-batch 발효에 따른 Time-profile, 배양조 50L, Working Vol.30L)

Products	효모균수 (cfu/g)	생산수율 (%)	염도 (%)	pH	비고
전체배양액	$1.54 \times 10^{10}$	4.48	20.0 (배지성분 유래)	4.12	동결건조(A)
배양상등액	ND	1.25	49.5	3.0	열풍건조(B)
균체	$9.6 \times 10^{10}$	5	3.9	5.55	동결건조 (C, 희석배수 : $10^{-4}$ )



- ND: Not Detecting

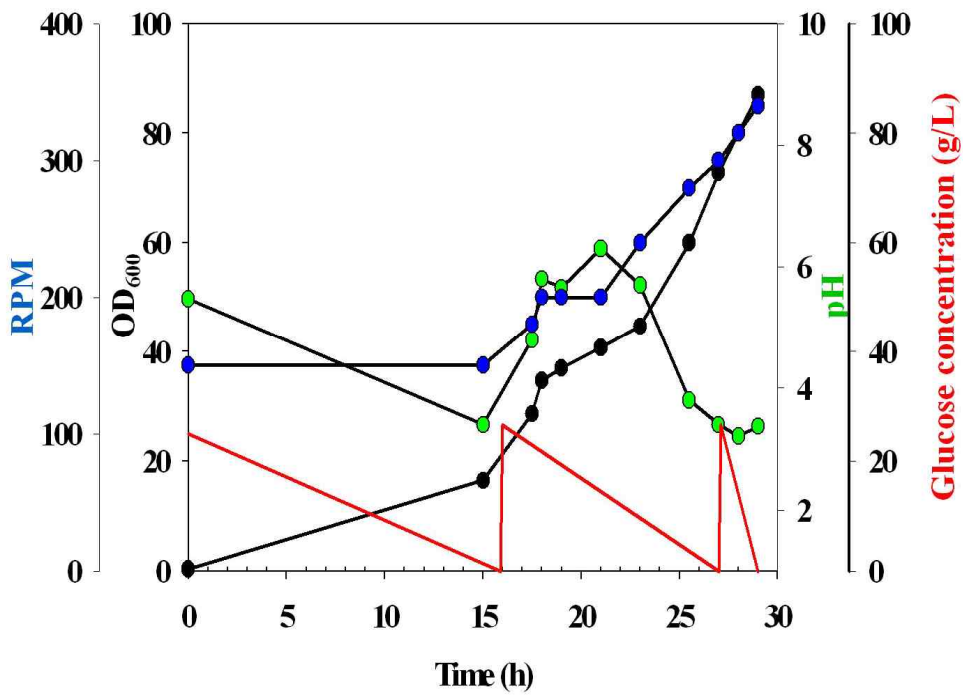


Fig 4. 선발 *S.cerevisiae* 에 대한 대량생산기법 정립결과(1차 시제결과, 생산수율 : 동결건조 기준 2.9%, Sucrose 배지사용조건하에서 Fed-batch 발효에 따른 Time-profile, 배양조 50L, Working Vol.30L)

Table 3. 선발 *S.cerevisiae* 에 대한 대량생산기법 정립결과(1차 시제결과, 생산수율 : 동결건조 기준 2.9%, Sucrose배지 사용조건하에서 Fed-batch 발효에 따른 Time-profile, 배양조 50L, Working Vol. 30L)

Products	효모균수 (cfu/g)	생산 수율 (%)	염도 (%)	pH	비고
전체배양액	$1.0 \times 10^{10}$	4.36	23.0 (배지성분 유래)	4.12	동결건조
배양상등액	ND	1.9	-	3.0	열풍건조
균체	$2.6 \times 10^{10}$	2.9	4	5.55	동결건조

- ND: Not Detecting

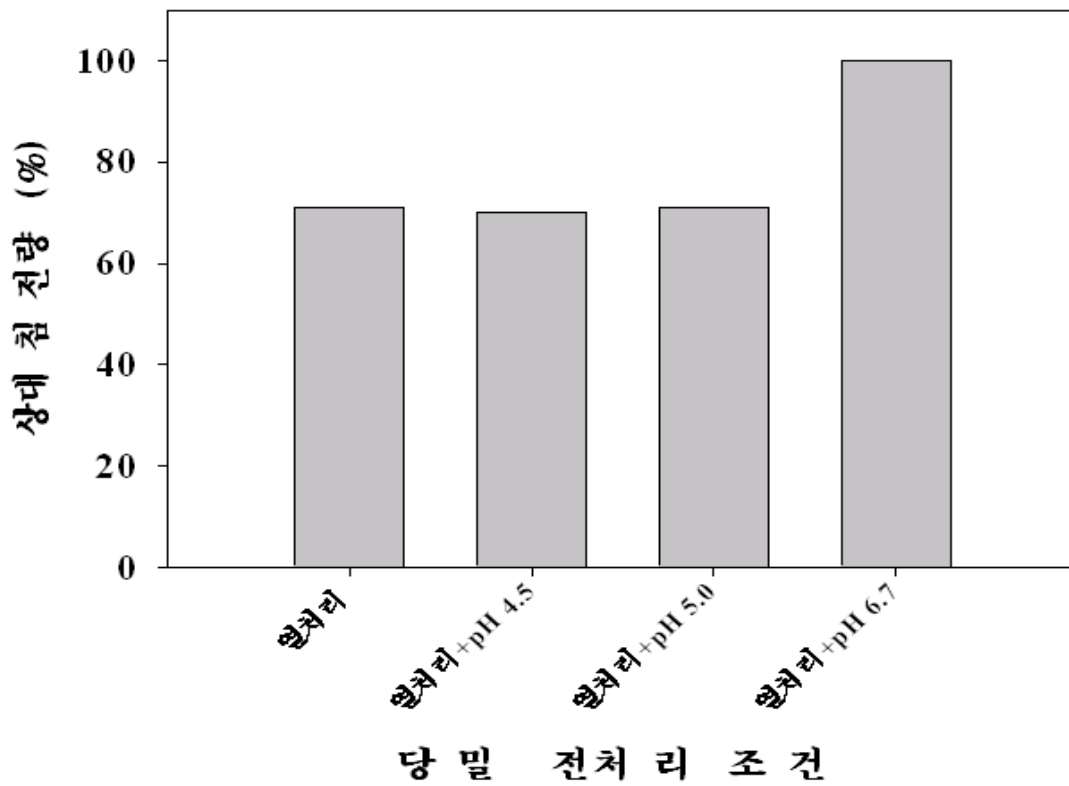


Fig. 5. 당밀의 열처리 및 pH 변화에 따른 당밀 침전물량의 변화

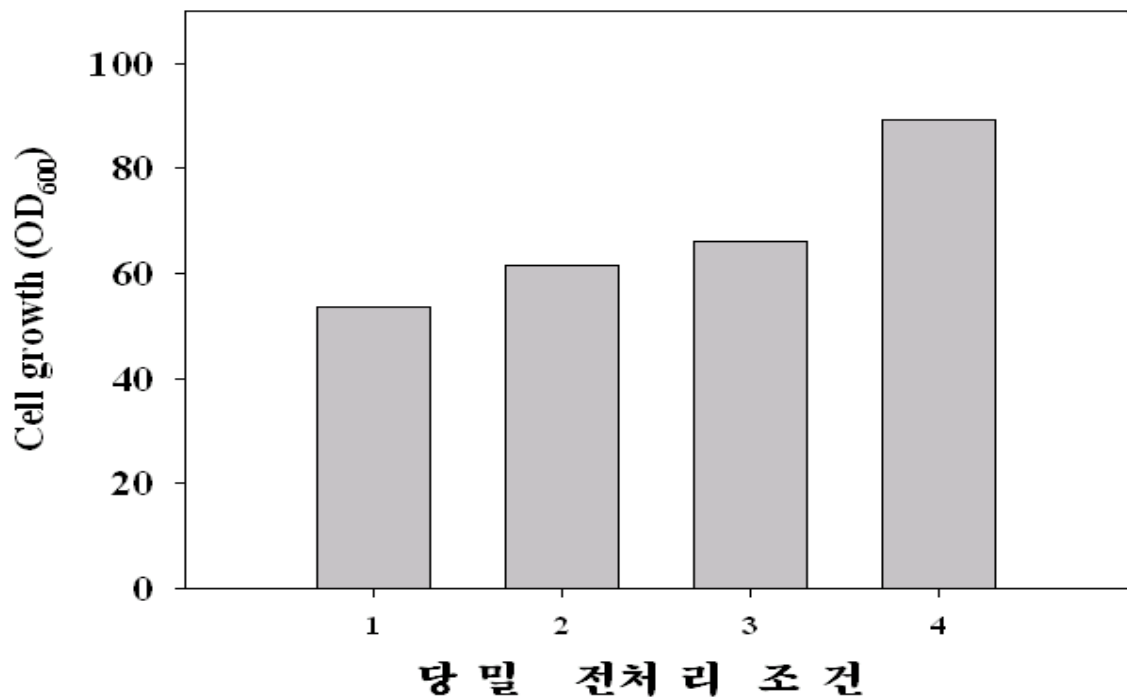


Fig. 6. 당밀 전처리 조건에 따른 효모의 생장 (1) (발효조 회분배양 결과)  
 1, 0.05% 황산마그네슘 및 pH 5.5 조정하여 105℃ 30분간 열처리; 2, 0.05% 황산마그네슘과 0.15% 황산암모늄 및 pH 5.5 조정하여 105℃ 30분간 열처리; 3, KOH를 첨가하여 pH 6.3으로 조정 후 105℃ 30분간 열처리하여 인산으로 pH 5.5로 조정; 4, 암모니아수를 첨가하여 pH 6.2으로 조정 후 105℃ 30분간 열처리하여 인산으로 pH 5.5로 조정



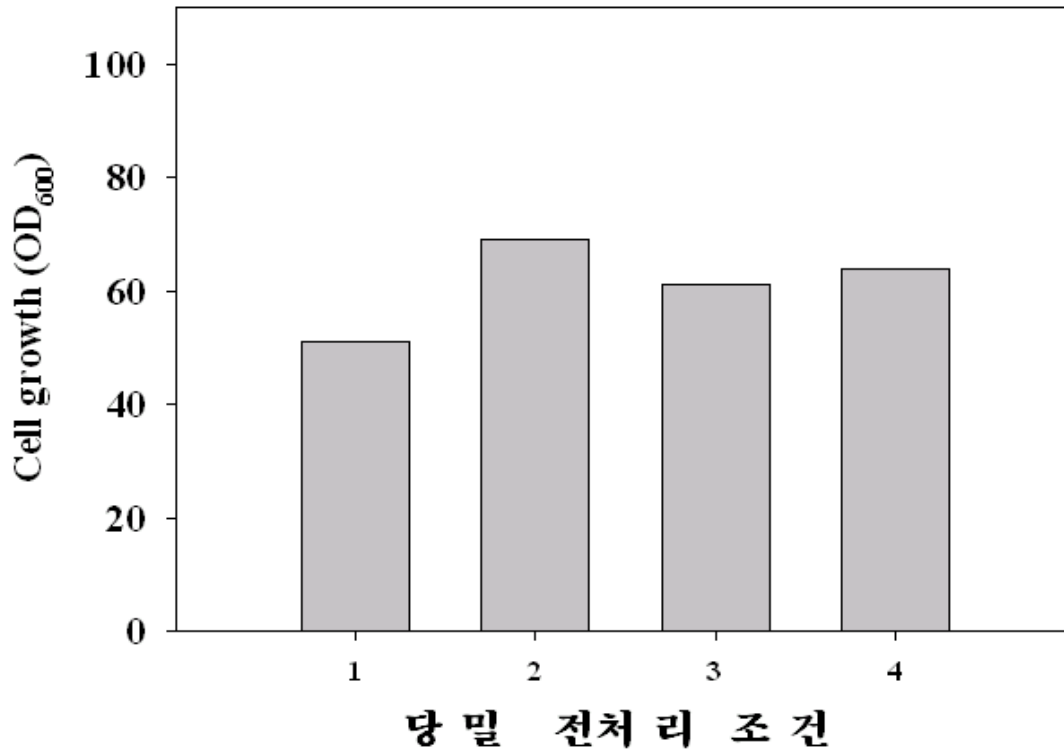


Fig. 7. 당밀 전처리 조건에 따라 효모의 성장 속도 (2) (발효조 회분배양 결과)

1, 암모니아수를 첨가하여 pH 6.2으로 조정 후 105℃ 30분간 열처리 한 후 인산으로 pH 5.5로 조정한 전처리 당밀을 8배 희석한 batch 배지에 4.8ml/batch TMS 첨가한 배지 사용; 2, 앞 1의 batch 배지에 0.2g 황산마그네슘 및 feeding 용액에도 0.05% 황산마그네슘 첨가하여 배양; 3, KOH 및 암모니아를 첨가하여 pH 6.3으로 조정 후 105℃ 30분간 열처리한 후 인산으로 pH 5.5로 조정한 feeding 용액 첨가하여 배양; 4, 암모니아수를 첨가하여 pH 6.2으로 조정 후 105℃ 30분간 열처리한 후 인산으로 pH 5.0로 조정한 feeding 용액 첨가하여 배양

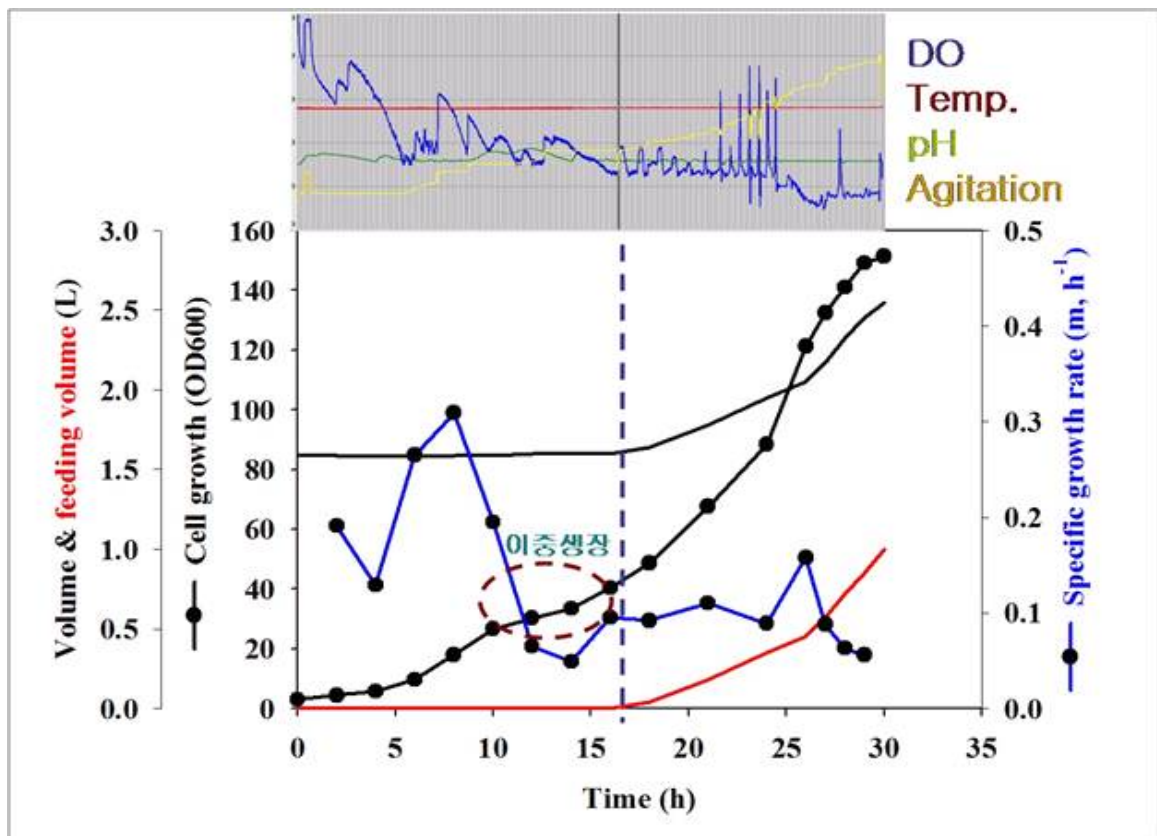
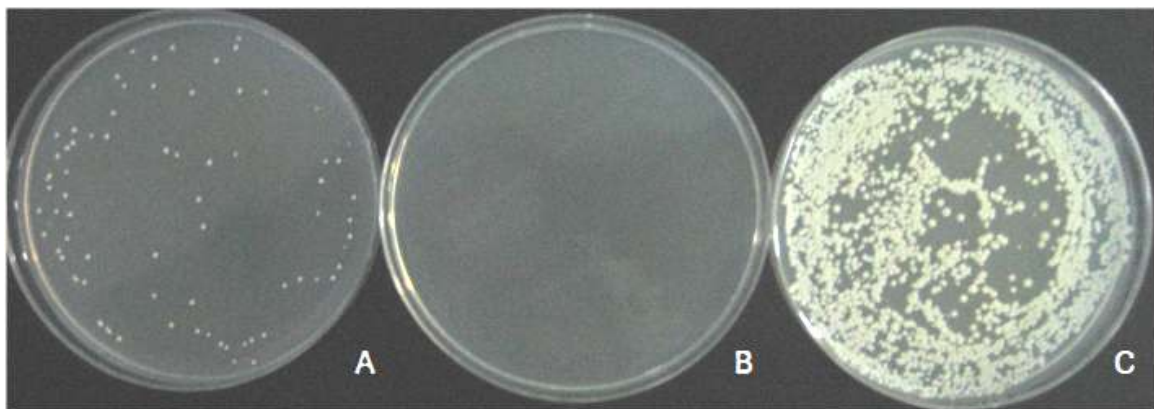


Fig. 8. 1차 결정된 당밀 전처리 조건하에서 Fed-batch 발효에 따른 time-profile

Table 4. 선발 *S.cerevisiae* 에 대한 고수율확보형 대량생산기법 정립결과(2차 시제결과, 생산수율 : 동결건조 기준 5.4%, 최종선발 당밀배지 사용한 Fed-batch 발효에 따른 Time-profile, 배양조 50L, Working Vol. 30L)

Products	효모균수	생산수율 (%)	비고
전체배양액(cfu/ml)	$2.5 \times 10^{10}$	NT	동결건조(A)
배양상등액(cfu/g)	ND	11.5	열풍건조(B)
압착효모(cfu/g)	$1.15 \times 10^{10}$	18	수분 74%
균체(cfu/g)	$2.6 \times 10^{10}$	5.4	동결건조 (C, 희석배수 : $10^{-4}$ )



- ND: Not Detecting, NT :Not Testing

Table 5. 1차 당밀 전처리 조건 및 이를 사용한 Fed-batch 발효조건

	열처리전	열처리후	기타
<b>당밀 전처리</b>	당밀 1kg+물 1kg +암모니아 10ml(pH 6.3) >105°C, 30분 autoclave	>실온 냉각 >원심분리(4000×g, 20분) >인산(85%) 3ml (pH 5.5)	42% v/v =50%w/v =50% w/w
<b>Batch medium</b>	전처리 당밀 200ml+증류수 1.4L+Biotin 0.01g >121°C, 30분 autoclave	별도 살균된 살균물 첨가 >20% 황산마그네슘 2ml >TMS 4.8ml	
<b>Feeding solution</b>	전처리 당밀 1L >121°C, 30분 autoclave	별도 살균된 살균물 첨가 >황산마그네슘 0.5g/L	
<b>발효 공정</b>	Culture temprature : 28°C Agitation speed : 200~1200rpm pH control : 28% 이상 ammonia water Pure O2 : No input, DO=10%이상 유지 Pressure : yes (not detected) Airation : 1vvm Feed strategy : intermittant & constant		
<b>후처리 공정</b>	Cell harvest : 2000×g, 20분 2회 washing (0.85% NaCl와 함께 배양액의 총 0.5부피 사용) 4000×g, 20분		

TMS :Table 4 참조

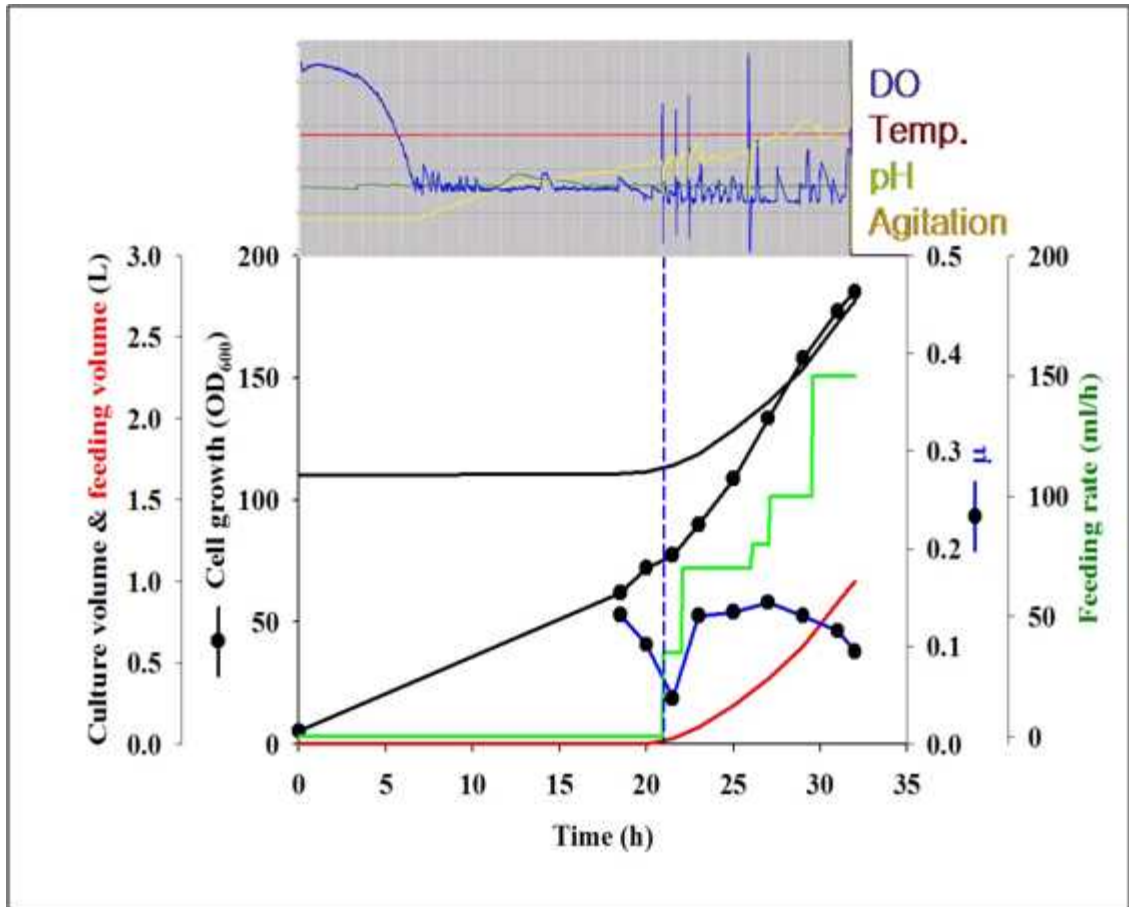


Fig. 9. 고농도 전처리 당밀을 사용한 Fed-batch 발효에 따른 time-profile

Table 6. 고농도 전처리 당밀 조건 및 이를 사용한 Fed-batch 발효조건

	열처리전	열처리후	기타
<b>당밀 전처리</b>	당밀 2.75kg+물 2.2kg +암모니아 26ml(pH 6.2) >105℃, 30분 autoclave	>실온 냉각 >원심분리(4000×g, 20분) >인산(85%) 8ml (pH 5.4)	46.5% v/v =65.2% w/v =55.6% w/w
<b>Batch medium</b>	전처리 당밀 320ml+증류수 1.28L+Biotin 0.01g >121℃, 30분 autoclave	별도 살균된 살균물 첨가 >20% 황산마그네슘 3ml >10% 황산아연 1.5ml >TMS 4.8ml	
<b>Feeding solution</b>	전처리 당밀 1L >121℃, 30분 autoclave	별도 살균된 살균물 첨가 >20% 황산마그네슘 2.5ml >10% 황산아연 1.0ml	
<b>발효 공정</b>	Culture temprature : 28℃ Agitation speed : 200~1000rpm pH control : 28% 이상 ammonia water Pure O2 : input, DO=20%이상 유지 Pressure : No Airation : total 0.5~1vvm Feed strategy : intermittant & constant		
<b>후처리 공정</b>	Cell harvest : 2000×g, 20분 2회 washing (0.85% NaCl와 함께 배양액의 총 0.5부피 사용) 4000×g, 20분		

Table 7. 전처리 당밀과 발효종료액내 미네랄 함유량 조사(ICP분석)

	5배 희석한 전처리 당밀 (ppm)	2배 희석한 전처리 당밀 + TMS+첨가물(ppm)	최종 배양상등액 (ppm)
K	1,559	3,897	3,064
Na	40	100	93
Mg	184	502	338
Ca	459	1,167	1,066
Mn	3.2	10.7	8
Zn	0	21	0.32
Fe	12	41	25
Cu	0	3	0
P	118.8	297	41.8

Table 8. 최종 전처리 당밀 조건 및 이를 사용한 Fed-batch 발효 조건

	열처리전	열처리후	기타
<b>당밀 전처리</b>	당밀 2.75kg+물 2.2kg +암모니아수 26ml(pH 6.2) >105℃, 30분 autoclave	>실온 냉각 >원심분리(4000×g, 20분) >인산(85%) 8ml (pH 5.4)	46.5% v/v =65.2%w/v =55.6% w/w
<b>Batch medium</b>	전처리 당밀 320ml+증류수 1.28L+Biotin 0.01g >121℃, 30분 autoclave	별도 살균된 살균물 첨가 >nTMS 3ml	nTMS 조성 (per liter): 50g ZnSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O, 60g MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O, 0.5g CuSO <sub>4</sub> 5H <sub>2</sub> O, 0.03g CoCl <sub>2</sub> , 0.02g NaMoO <sub>4</sub>
<b>Feeding solution</b>	전처리 당밀 >121℃, 30분 autoclave	별도 살균된 살균물 첨가 >nTMS 7ml	
<b>발효 공정</b>	Culture temprature : 30℃ Agitation speed : 200~1000rpm pH control : 28% 이상 ammonia water Pure O <sub>2</sub> : input, DO=20%이상 유지 Pressure : No Airation : total 0.5~1vvm Feed strategy : intermittant & constant		
<b>후처리 공정</b>	Cell harvest : 2000×g, 20분 2회 washing (0.85% NaCl와 함께 배양액의 총 0.5부피 사용) 4000×g, 20분		



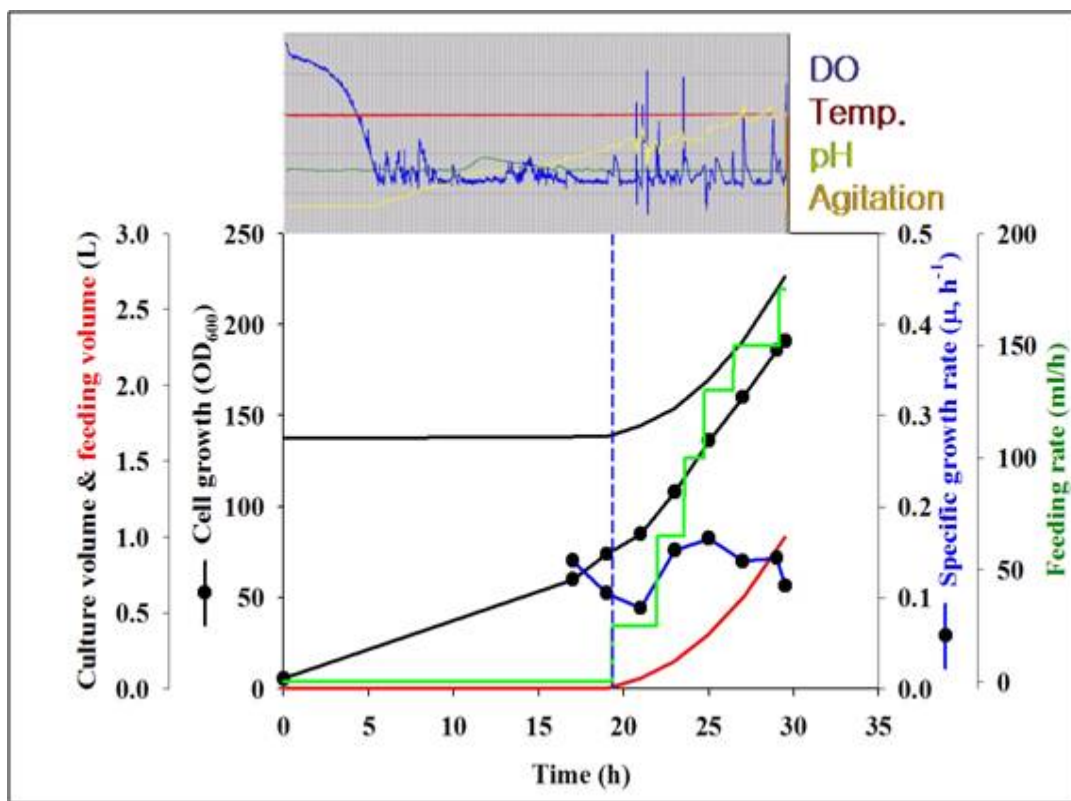


Fig. 10. 최종 전처리 당밀을 사용한 Fed-batch 발효에 대한 time-profile

Table 9. 유화제 및 비타민C 첨가에 따른 동결건조시 생균수 증감에 미치는 영향 분석

SPAN60 (%)	Vitamin C (%)	효모수 (CFU/g)	고형분함량 (%)
0	0	1.0*10 <sup>9</sup>	>95%
0.5	0	7.5*10 <sup>8</sup>	>95%
1.0	0	1.4*10 <sup>9</sup>	>95%
1.5	0	1.1*10 <sup>9</sup>	>95%
0.5	0.2	3.3*10 <sup>9</sup>	>95%
1.0	0.2	1.35*10 <sup>9</sup>	>95%
1.5	0.2	1.0*10 <sup>9</sup>	>95%



Fig. 11. 선발 *S.cerevisiae* 에 대한 고수율 확보형 대량생산기법 정립결과 (2차 시제결과)

## 4-2 선발효모 기능성 소재 최적분리조건 사전정립

### 1. 연구목적

기능성소재 개발의 핵심은, 사전 기능성 성분분석 결과를 토대로 선발효모의 기능성 성분별(세포벽 및 추출물 구분)로 분리법 정립이라 할 수 있다. 따라서, 기능성소재 개발과 관련하여, 기능성소재 및 영양원 보존기준으로 목적 소재성분의 비파괴적 분리방법 정립이 필요함에 따라 세포벽 파괴 및 추출물 분리방법을 세분화(물리적 방법 및 화학적 및 천연물질을 이용한 항균기작 메카니즘 활용)하여 정립코져 하였다. 이를 위해 사용되는 물질 및 기법은 식품첨가물로서 허가된 물질과 허용된 제조기법 범위내에서 영유아식 소재 및 제품제조간 적용하였다. 또한, 세포벽 및 추출물 분리를 위한 과정에서 세포벽 파괴용 시스템 및 선발물질의 경우, 유출되는 추출물(단백질류, 지방류 및 미네랄류 등)과 화학적 변화를 유발하지 않는 조건을 충족시킬 수 있는 물질과 시스템을 기본조건으로 정립하였다.

### 2. 연구수행방법

#### 가. 선발효모내 영양성분 조성차이 조사

대조효모 대비 개발효모류에 대한 영양성분 조사를 통하여, 효모성분중 기능성 소재개발 사전 타당성을 검토하고자, 단백질(아미노산류), 미네랄 함유량 조사, 세포벽 및 추출물의 성상변화를 관찰하였다.

#### 나. 단백질(아미노산) 함유량 조사

본 연구간 사용된 공시균주는 *S.cerevisiae*(Jenico사, 대조), *Candida utilis*(Kojin사, 대조), *Geotricum spp.*(개발효모, 대조) 및 *S.cerevisiae*(개발효모)로서 4종을 대상으로 하였다. 공시균주별 영양성분중 단백질(아미노산류) 함유량 조사를 위하여, 대조 및 개발 효모를 대상으로 순수배양후 분리 및 이를 동결건조처리한 분말시료로 하여 아미노산류 분석을 실시하였다. 미네랄류 조사 방법은 제 1 절 필수분석법 정립결과를 그리고 기능성 소재별 형태는 전자현미경(SEM)을 이용하여 검정하였다..

#### 다. 기능성 소재 및 영양원 보존형 효모세포벽 최적 파괴법 정립

본 연구의 핵심인 선발효모내 목적 기능성 성분인 세포벽 및 추출물 성분분리를 위하여, 기능성 소재 및 영양원 보존을 전제로 한 분리방법을 정립코져 하였다.

본 연구개발을 위하여 검토된 시험법은 물리적 방법과 화학적 방법 및 항균성 천연물을 이용하는 방법으로 하여 구분 실시하였다. 이를 위한 수단으로 물리적 방법은 HPP시스템, 천연항균 소재물질로는 항균성 물질을 선발하고 이들이 보유하고 있는 항균성 메카니즘을 이용하는 방법을 적용하였으며, 화학적 방법으로는 산(미네랄 분리)/ 알칼리(단백질 분리) 및 알콜(지방류 및 색소 제거)적용방법으로 하는 일련의 상용방법을 적용하였다.

### 1) HPP시스템

공시균주 및 단백질원의 변화조사를 위하여, 준비된 순수분리균주(공시균주)와 검정 단백질원으로는 개발효모(분말을 멸균수에 농도별 조성(초유단백분말 1 기준, 멸균수 2.5배, 5배, 7배 및 9배로 희석용액 제조)한 후 HPP시스템(모델명 : QFP-35L, 제조사: QUINTUS사, 스웨덴)기종에서 1회처리시 변화를 확인하였는데, 이때 시스템 운영은 권장방법에 따라 실시하였다. 즉, 압력조건은 500MPa의 조건에서 15분 1회 처리하는 조건으로 실시하였으며, 결과도출은 조건별 단백질 변성에 따른 겔화 및 색상등의 성상변화를 HPP처리전/후로 구분하여 비교하였다

### 2) 천연항균소재물질 선발

본 연구에서는 유기농 농산물에서 분리한 효모균에서 기능성 소재(세포벽 및 추출물)을 분리하기 위하여는 목적 기능성 소재와의 결합현상이 유발하지 않는 조건하에서 세포벽을 파괴하는 과정이 반드시 정립되어야 한다. 이를 위하여 세균과 선발 효모균에 대하여 선발한 Sialic acid(식품첨가물공전 미등재), 지방산유도체(Surfactant, 식품첨가물공전 등재) 및 키토산(식품첨가물공전 등재)을 대상으로 공시균에 대한 항균성 검정과 SEM관찰 결과를 연계하여 세포벽파괴에 있어 효과적 소재를 선발코저 하였다.

공시균으로 *E. coli* O157과 효모(*S. cerevisiae*)을 시험간 사용하였으며, 시험균 조성은 다음과 같이 실시하였다. 즉, 공시균주 *E. coli* O157는 배양액중  $5 \times 10^5$ CFU/ml 되게 준비한 후 Sialic acid(2.5mg/ml), nano-Sialic acid(2.5 mg/ml) 및 Surfactant(1.25 mg/ml)을 각각 처리한 후 37℃에서 20분 처리후 고정하여 SEM(Scanning Electron Microscopy)를 이용하여 각 시료의 항균효과를 관찰하였다. 공시균주중 효모(*S. cerevisiae*)에 대하여는 배양액중 초기 효모균수를  $5 \times 10^5$ CFU/ml되게 조정한 시험관에 Sialic acid(5mg/ml), Nano-Sialic acid(5 mg/ml) 및 지방산에스터(Surfactant ,2.5 mg/ml)을 각각 처리한 후 28℃에서 30분 경과시 고정하여 SEM관찰 하였다.

### 3) 화학적(산, 알칼리)분리 방법

선발효모의 대량생산(정립완료 대량생산시스템 적용)과 관련하여 시제품 제작후 확보된 시료(대량필요)에 대하여 실시내용을 다음과 같다. 즉, 추출물 소재(엑기스)는 효모세포 → 알칼리 → 원심분리(불용성양분) → 알칼리+열처리(2회이상) → 원심분리(불용성양분) → 세척(pH4~7 범위) → 산가수분해(3회이상) → 원심분리(불용성양분) → 수증열탕(2회이상) → 에탄올 처리(2회이상) → 원심분리(불용성양분) → 세척(2회이상) → 단계별 취합후 건조(Spray dryer) → 완성품 단계로 진행하고, 세포벽 소재(글루칸)의 경우는 추출물 분리 후 비수용성 성분에 대하여 Spray dryer 공정을 거쳐 완성품을 제조하는 과정으로 진행하였다(Fig 6~7).

## 3. 연구수행결과

선발효모별내 기능성 성분조사는 순수분리효모균체에 대하여 성분조사(미네랄류, 아미노산류 등)결과, 성분종류별 함유량의 차이가 인정되었다(Table 1~3).

그리고, 동일 효모류에 대하여 기능성 소재 분리 및 생산법 정립은 식품산업에 도입되고 있는 초고압(HPP)시스템, 산(미네랄 제거)/알카리(단백질 제거)/에탄올(지방 및 색소)처리 방법 및 세포벽 파괴형 천연항균물질을 적용방법으로 3가지 방법을 대상으로 실시하였다(Fig 6~7).

효모추출액을 대상으로 HPP처리에 따른 단백질 성상 변화는 희석용액의 농도가 진할수록 응고(겔화) 및 색상이 갈변화 되는 결과를 보였다(Table 4~5, Fig 1~2). 따라서, HPP 방법은 효모의 기능성소재개발에 있어 부적절한 방법으로 확인되어 시험간 제외하였다.

효모의 세포벽 파괴로 인하여 유출되는 추출물(단백질류, 지방류 및 미네랄류 등)과 화학적 변화를 유발여부는, 우유 첨가(Spiking Test)를 통하여 세포벽 파괴효과(항균성 보유)가 탁월하면서 추출물과의 미반응성 효과를 보이는 경우로 구분하여 선발하였다.

이를 위한 소재로서 선발한 키토산, Sialic acid 및 Surfactant의 전체 항균효과는 높은 것으로 평가되었다. 이를 기준으로 단백질원과의 반응성을 비교 검토하여 보았더니, 키토산의 경우는 단백질원과 결합능력이 가장 탁월하였는데, 결합이 이루어지면 추가 항균성(세포벽 파괴)은 인정되지 않았으며, 누출되는 단백질과의 강력한 결합능을 보임으로 인하여, 이는 효모 추출물의 분리를 위한 소재로서 사용할 수 없음을 확인하였다.

그러나, 또 다른 선발물질인 Sialic acid과 Surfactant의 경우는 우유내 단백질원 등과의 결합능력이 인정되지 않았으며, 항균성(세포벽 파괴 관련) 또한 감소되지 않은 것으로 조사되었다. 따라서, 효모의 기능성 소재 분리(세포벽 파괴)에 있어 Sialic acid 및 Surfactant가 적절한 물질로 인정되었으나, 가격이 고가임에 따라 대량생산 시스템의 소재로서 제외하였다(Fig 3~4).

특히, 항균성 소재별 항균메카니즘을 살펴보았더니, Sialic acid의 경우는, 처리구의 박테리아의 표면이 파괴되어 aggregation되어 있는 것이 관찰되었으며(Fig 3), 효모의 경우는 대조군에 비해 처리구의 효모의 표면에 크고 작은 구멍이 생겼음이 관찰되었다(Fig 4).

지방산유도체(Surfactant)는 균종류에 상관없이 세포막을 붕괴시키는 것으로 조사되었는데, 전체시험간 세포벽 파괴와 관련된 항균성(MIC) 농도는 0.5%(w/w) 이상의 경우에서 3분이내에 99%이상의 항균성을 나타내었으나, 단백질의 분자량 변화가 관찰됨으로 인하여 역시 제외하였다(Fig 3~4).

결론적으로, HPP법, 키토산, Sialic acid 및 Surfactant를 이용한 효모 세포벽 파괴와 더불어 기능성 물질 분리법은 가능성은 확인하였으나, 예비 실험에서 적용간 경제성, 첨가시 단백질 등과의 반응(킬레이팅 효과) 유발현상이 발생함에 따라 물성변화 초래 및 사용시료의 제거공정의 불편함 등으로 인하여 제외하고, 기본적으로 화학적 방법을 대량생산 시스템에 기본 제조법으로 적용하는 것으로 결론지었다.

Table 1. 대조효모 대비 개발효모의 영양성분(아미노산 기준) 비교분석결과

아미노산 성분	대조효모 대비 개발효모의 영양성분 비교분석결과				비고
	<i>S.cerevisiae</i> (Jenico사)	<i>Candida utilis</i> (Kojin사)	<i>Geotricum spp.</i> (개발효모)	<i>S.cerevisiae</i> (개발효모)	
아스파라긴산	11.5	5.48	4.35	4.49	
트레오닌	5.5	1.34	2.29	1.67	
세린	5.7	1.4	2.12	2.66	
글루탐산	15.8	48.98	5.93	6.81	
Proline	-	-	2.34	0.28	
글리신	5.5	14.08	2.66	2.58	
알라닌	9.5	7.64	8.43	8.32	
Cystine	-	-	0.24	0.05	
발린	7	2.17	3.21	3.17	
메티오닌	1.9	0.51	0.77	0.31	
이소류신	5.8	1.66	2.28	2.12	
류신	8.27	2.87	4.40	4.20	
타이로신	3.3	1.78	1.75	1.14	
페닐알라닌	4.8	2.42	2.09	1.91	
히스티딘	2.7	1.4	1.06	1.06	
라이신	9.5	2.8	3.58	3.93	
아르기닌	2.8	1.02	2.70	2.56	
Ammonia	NT	NT	1.20	0.72	
Thiamine	0.003	NT	NT	NT	
Riboflavin	0.0119	NT	NT	NT	
Pyridoxine	0.0023	NT	NT	NT	
Niacin	0.068	NT	NT	NT	
Folic acid	0.0031	NT	NT	NT	
Pantothenate	0.03	NT	NT	NT	
Biotin	0.00025	NT	NT	NT	
비고	-NT : Not tested -단위 : %				

Table 2. 대조효모 대비 개발효모의 영양성분(미네랄 성분 기준) 비교분석결과(1년차 완료예정)

미네랄성분	대조효모 대비 개발효모의 영양성분(미네랄) 비교분석결과(ppm±SD)				비교
	<i>S.cerevisiae</i> (Jenico사)	<i>Candida utilis</i> (Kojin사)	<i>Candida utilis</i> (개발효모)	<i>S.cerevisiae</i> (개발효모)	
Ca				10,210±69	
P				15,880±666	
S				1,244±21	
K				12,860±106	
Fe				235±19	
Mg				3,775±140	
Mn				94±4	
Zn				778±33	
Cu				ND	
Na				9,856±50	

-NT : Not tested, ND : Not detected



Table 3. 대조효모 대비 개발효모의 영양성분(Nucleotides류) 비교분석결과(1~2차 연계 실시예정)

구분성분	대조효모 대비 개발효모의 영양성분(핵산류) 비교분석결과(%)				비고
	<i>S.cerevisiae</i> (Jenico사)	<i>Candida utilis</i> (Kojin사)	<i>Candida utilis</i> (개발효모)	<i>S.cerevisiae</i> (개발효모)	
5' -IMP		10.5			
5' -GMP		10.5			
5' -CMP		7.2			
5' -UMP		8.2			
5' -AMP		-			
TOTAL		36.4			

-NT : Not tested, ND : Not detected

Table 4. 선발효모 대상 초고압(HPP) 시스템적용 전후의 영양성분 변화 조사 결과

아미노산 및 비타민 성분	대조 및 개발효모의 HPP 처리에 따른 영양성분변화(%)				비고
	<i>Getricum</i> (Fresh)	<i>Geotricum</i> (HPP)	<i>S.cerevisiae</i> (Fresh)	<i>S.cerevisiae</i> (HPP)	
아스파라긴산	4.35	3.66	4.49	4.06	
트레오닌	2.29	2.71	1.67	3.58	
세린	2.12	2.17	2.66	3.22	
글루탐산	5.93	6.38	6.81	6.19	
Proline	2.34	2.40	0.28	0	
글리신	2.66	2.52	2.58	2.97	
알라닌	8.43	8.02	8.32	8.20	
Cystine	0.24	0.20	0.05	0.21	
발린	3.21	2.98	3.17	3.39	
메티오닌	0.77	0.70	0.31	0.73	
이소류신	2.28	2.12	2.12	2.99	
류신	4.40	4.12	4.20	5.16	
타이로신	1.75	1.60	1.14	1.99	
페닐알라닌	2.09	1.92	1.91	2.49	
히스티딘	1.06	0.99	1.06	1.16	
라이신	3.58	3.29	3.93	3.84	
아르기닌	2.70	2.56	2.56	2.76	
Ammonia	1.20	1.08	0.72	1.31	
Thiamine	NT	NT	NT	NT	
Riboflavin	NT	NT	NT	NT	
Pyridoxine	NT	NT	NT	NT	
Niacin	NT	NT	NT	NT	
Folic acid	NT	NT	NT	NT	
Pantothenate	NT	NT	NT	NT	
Biotin	NT	NT	NT	NT	
비 고	-NT : Not tested -단위 : g/100ml(Jenico사 : %)				

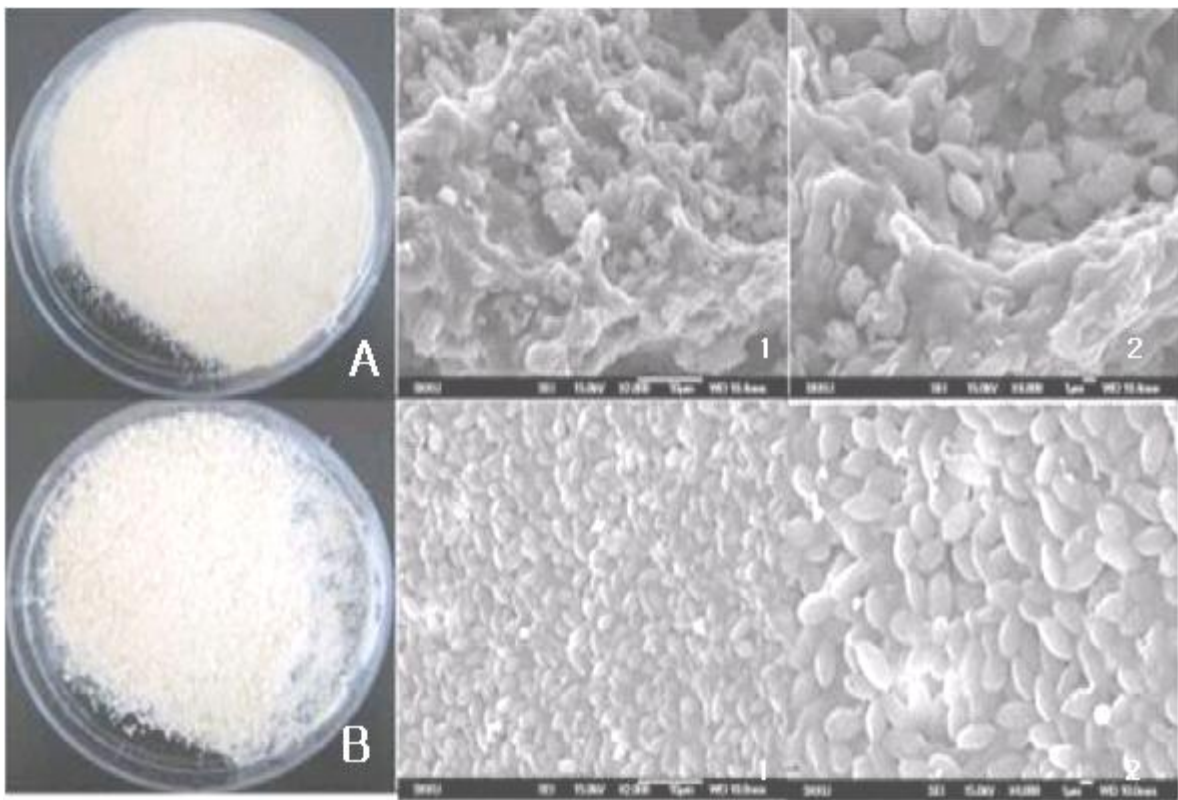


Fig 1. 선발효모 대상 초고압(HPP) 시스템 적용전/후의 성장변화 조사 결과(SEM)  
 A: 개발 *S.cerevisiae*(HPP 처리전), *S.cerevisiae* (HPP처리후), 1: SEM 확대배수(x2,000), 2: SEM확대배수(x4,000).

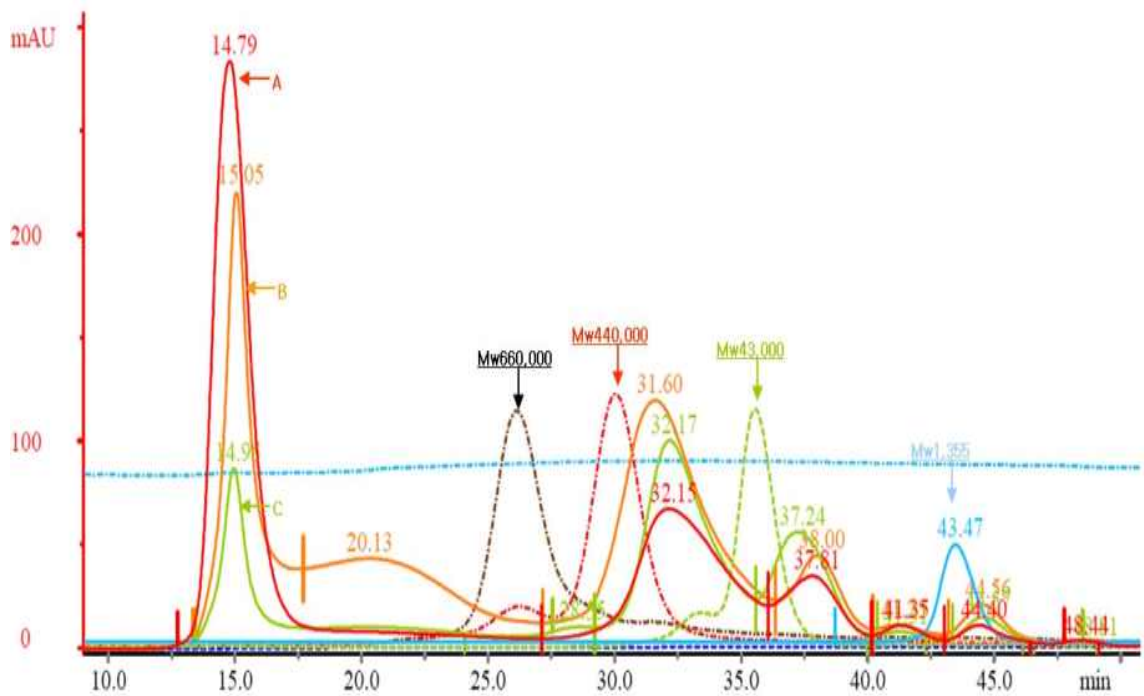


Fig 2. 선발효모 대상 초고압(HPP) 시스템적용 전/후의 영양성분(분자량) 변화 조사 결과 조사 (FPLC분석)

A: 열처리 시험구(대조구), 효모추출분말 대비 멸균수 희석배수(1:9) 및 열처리 조건 (85°C, 10min., 1회),

B : HPP처리 시험구 , 효모추출분말 대비 멸균수 희석배수 (1:9) 및 HPP처리조건( 500MPa, 15min., 1회),

C : HPP처리전 비교구, 효모추출분말 대비 멸균수 희석배수 (1:9),, Mw 1,396~ 660,000: 분자량 표준체

Table 5. 효모추출액분말(희석용액)의 초고압(HPP) 시스템 적용에 따른 형태변화

시험구 (시료분말 : 멸균수 비율)		시험구구성내역	HPP처리에 따른 성상(응고 및 색상)변화
HPP (1:2.5)	HPP처리전	효모추출액분말(1): RO수 (2.5) 혼합 -> 균 접종 ->HPP무처리	
	HPP처리후	효모추출액 분말(1): RO수 (2.5) 혼합->균접종->HPP처리(500MPa, 15 분, 1회)	
HPP (1:5)	HPP처리전	효모추출액 분말(1): RO수 (5) 혼합->균접종->HPP무처리	
	HPP처리후	효모추출액(1): RO수(5) 혼합->균접종->HPP처리 (500MPa, 15분, 1회)	
HPP (1:7)	HPP처리전	효모추출액(1): RO수 (2.5) 혼합->균접종 ->HPP무처리	
	HPP처리후	효모추출액(1): RO수(5) 혼합->균접종->HPP처리 (500MPa, 15분, 1회)	
HPP (1:9)	HPP처리전	효모추출액(1): RO수(9) 혼합->균접종->HPP무처리	
	HPP처리후	효모추출액(1): RO수(9) 혼합->균접종->HPP처리 (500MPa, 15분, 1회)	
비고			(대조 : 멸균유) (HPP처리전) (HPP처리후)

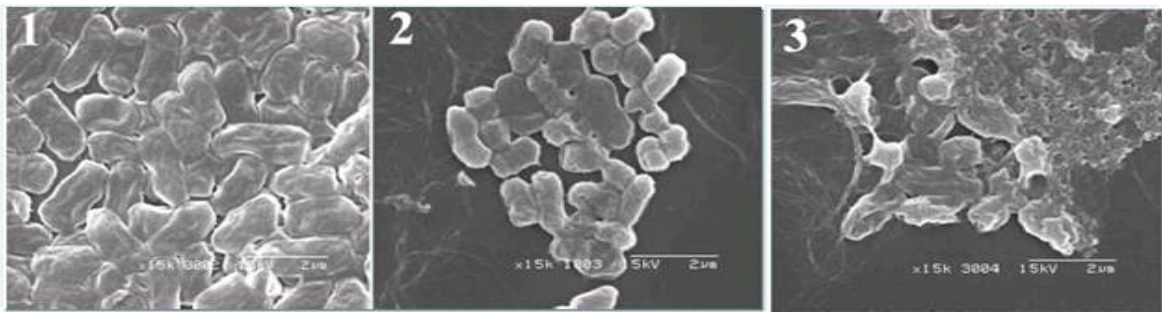


Fig 3. *E.coli* O157:H7공시균에 대하여, Sialic acid 및 surfactant(700PS)의 항균메카니즘(SEM) 구명. 1: *E. coli* O157, 2: *E. coli* O157+Sialic acid , 3:*E. coli* O157+Surfactant



Fig 4 효모균에 대하여 Sialic acid 및 surfactant의 항진균메커니즘(SEM) 구명.  
1: *S. cerevisiae*, 2: *S. cerevisiae*+Sialic acid 3: *S. cerevisiae*+Surfactant

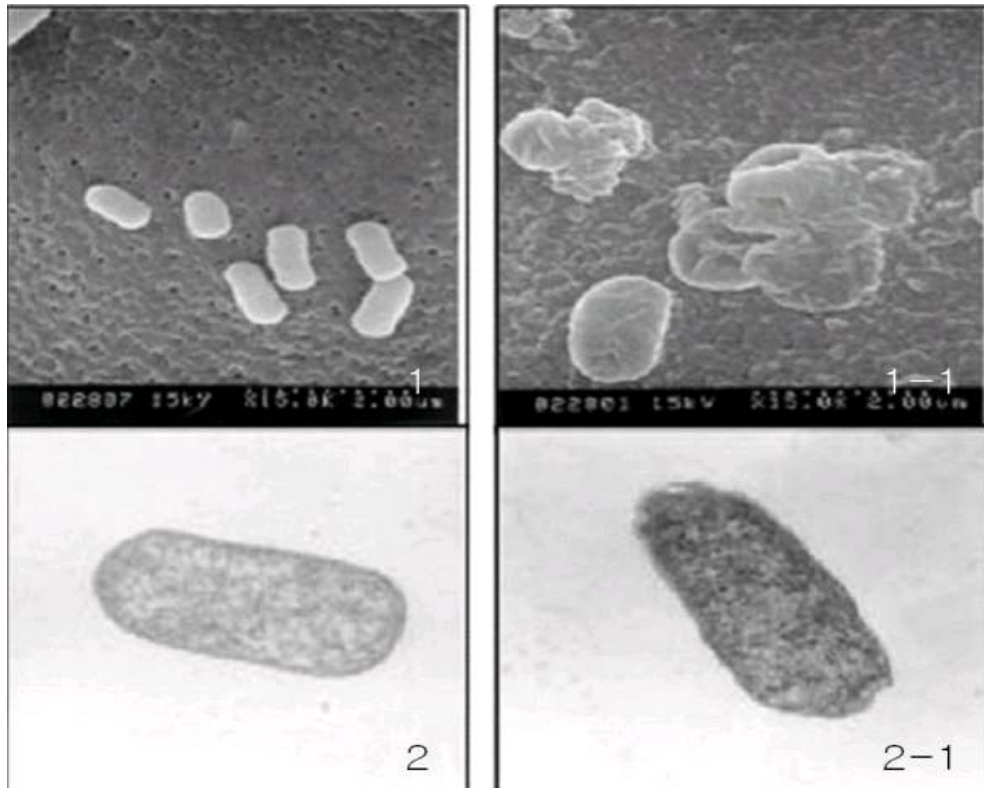


Fig 5. 천연소재(0.1% Chitosan)적용 선발효모(유산균 포함)내 기능성 소재 분리법 정립을 위한 항균메카니즘(세포벽 파괴)구명 결과

1: *E. coli* O157(대조, SEM관찰), 1-1: *E. coli* O157(0.1% Chitosan 처리구, SEM관찰), 2 : *E. coli* O157(대조, TEM관찰), 2-1 : *E. coli* O157(0.1% Chitosan 처리구, TEM관찰)



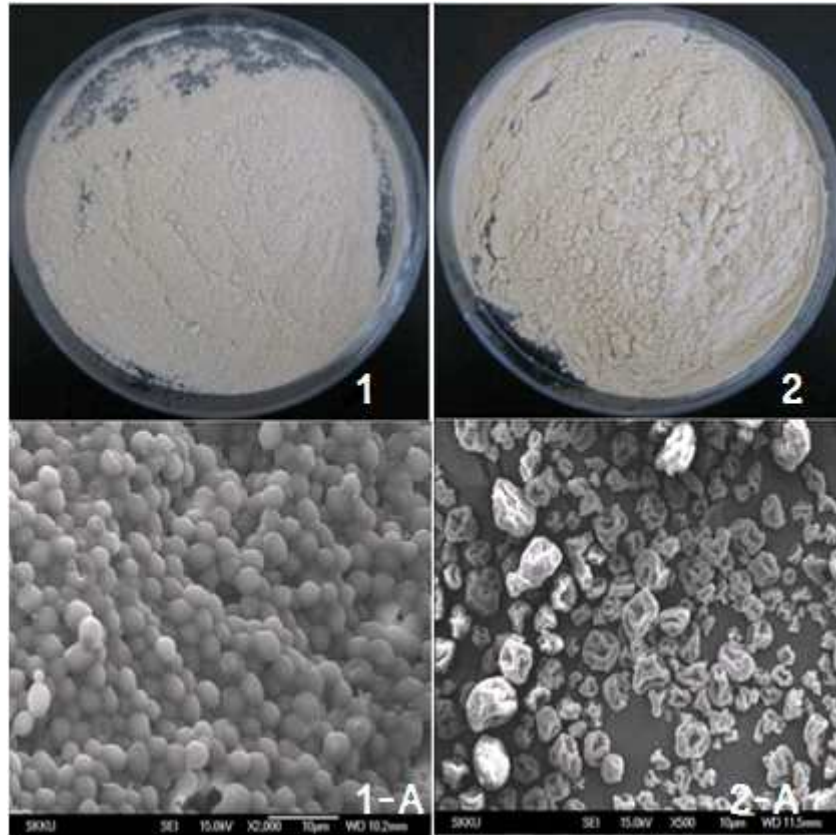


Fig 6. 선발효모 *S.cerevisiae*를 대상으로 기능성 소재별(세포벽 및 추출물) 분리를 위한 산/알카리법 처리후 분리된 세포벽( $\beta$ -glucan)의 정상조사(SEM 관찰). 정상효모(1, 1-A) 및 산/알카리법 처리후 분리 세포벽( $\beta$ -glucan, 2, 2-A)

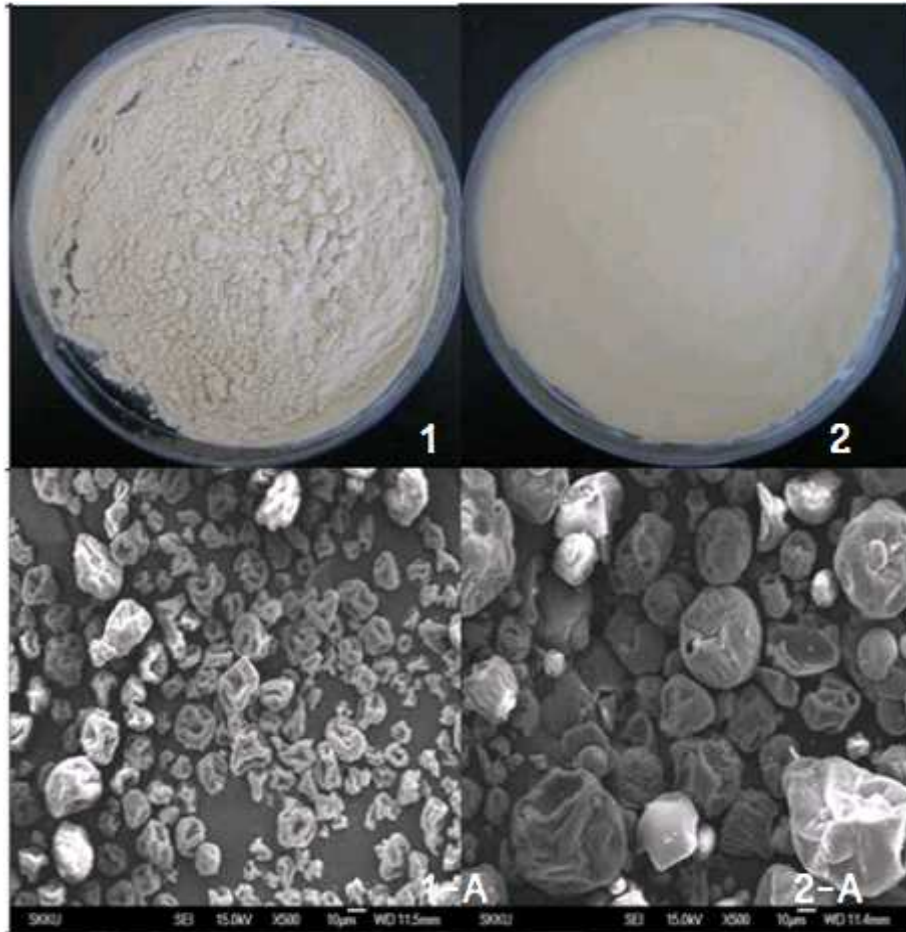


Fig 7. 선발효모 *C.utilis*를 대상으로 산/알카리 처리방법을 적용하여 분리한 세포벽 ( $\beta$ -glucan, 1, 1-A)과 효모추출물(2, 2-A)의 성장조사(SEM)

### 4-3. 선발효모 및 기능성소재 대량생산시스템 정립

#### 1. 연구목적

선행연구를 통해 정립된 선발효모 대량생산시스템 및 기능성 소재류 분리 기법을 이용하여 추가선발된 효모류에 대한 공통적 대량생산성 가능여부를 확인하였는데, 주관 기관에서 선발한 야생효모 5종류(대조 상업효모 포함) 및 당밀배지를 기준으로 발효 효율 검정을 수행하였다(Table 1).

즉, 기존 적립된 배양배지 및 배양조건에서 생산성이 좋다고 판단[매일유업(주)에서 결정]되는 2종의 효모를 비교구로 하여 선발효모류에 대하여 상업적 생산성을 검정함과 동시에 제빵/제과 적용성 평가를 실시하였으며, 시제는 압착효모와 동결건조 형태로 제조하였다.

더불어, 생산효율이 가장 높은 효모를 선발 및 이를 대상으로 기능성 소재류 분리를 위한 동시 대량생산시스템 기법 정립을 아미코젠(주)에 의뢰하여 OEM사가 보유한 시스템을 이용하여 최종 확인하였다.

실제 대량생산기기를 이용하여 발효액으로부터 효모추출물 및 세포벽 분획 생산시 공정에 따라 생산 수율을 확인하였는데, 배양액으로부터 효모를 회수하여 세포파쇄기를 이용하여 파쇄한 효모와 비파쇄한 효모를 autolysis(단백 분해효소 투입)하여 효모추출물 및 세포벽 분획의 생산성을 확인하였다.

즉, 비파쇄 효모를 이용한 효모추출물 및 세포벽 분획 생산이 더 좋은 것으로 판단되었는데, 결과를 토대로 효모추출물 분말 및 세포벽 분획물별 대량생산시스템을 정립하였다. 전체 연구수행방법 및 결과는 다음과 같다.

#### 2. 연구수행방법

##### 가. 목표 시제품명

매일유업이 제공한 효모류(4종) 및 선행연구결과를 적용하여 야생효모류에 대하여 공통적으로 경제성이 확보되는 효모 대량생산시스템 검정과 더불어 대량생산된 효모류 중 제빵 및 제과적용성 평가를 통하여 목표기준점을 통과한 효모를 최종선발 하였다.

그리고, 이를 원료로 목표 기능성 소재에 대한 대량생산시스템 구축까지 일련의 시스템을 4단계에 걸쳐 일련의 시스템으로 정립하였다. 즉, 정립된 배지조성(당밀원료) 및 배양법을 기준으로 효모류별 생산성을 검증하고, 또한 효모로부터 기능성 소재인 cell wall 분획 및 효모추출물을 생산하여 생산수율을 확인하고 저 하였다.

##### 나. 시제품 생산의 목적

본 연구는 매일유업(주)이 천연 유래 효모 및 관련 제품의 경제적 생산을 위하여 제공된 기술을 적용하여 아미코젠(주)에 시제품 생산으로서 위탁하였으며, 본 시제품 생산을 통하여 효모 생산 수율 및 관련 제품의 생산 방법을 개발하고 사업화 가능성을

평가하는데 그 목적이 있다.

#### 다. 시제품 제조의 일정 및 내용

전체 일정은 4단계로 하여 일관되게 정립하였다.

##### 1) 시제품 제조 내용

###### 가) 배양배지 및 배양조건 확인, 선발효모 5L 발효 테스트(1단계)

매일유업(주)에서 선발하여 제공된 4종의 효모 [*S.cereviase*JKK091002(선행연구), 2종의 *S. cerevisiae*OKK110427, *S. cerevisiae*CKK110426 및 *Candida utilis*]를 우선 5L lab 발효기를 사용하여 발효하고 생산된 효모를 생리식염수와 함께 세척하여 압착효모 형태로 제조하여 이를 주관기업에 공여함과 동시에 선행연구에서 정립된 고수율 효모생산 배지 및 배양배지가 추가 선발된 효모류에 동일기법으로 적용시 생산효율을 확인코져 하였다(Table . 1~2., Fig 1~5).

###### 나) 선발효모류 생산효율검정(50L 발효조, 2단계)

선행연구 결과를 토대로 정립된 대량생산시스템을 적용한 5L Lab 발효테스트에서 생산효율이 기준점을 통과(동결건조 효모 기준 으로 생산수율 5%이상)하는 조건을 충족하고 동시에 제빵적용성 평가를 통하여 제빵 성상 및 발효율 등을 기준점을 충족한 2종의 효모를 최종 선발하였다. 그리고, 선발효모 2종에 대하여 50L 발효기에서 재검정 생산하여 이를 압착효모와 동결건조된 효모 형태로 제조하여 대량생산시스템 정립 전 생산효율 및 제빵적용성 평가를 병행 하였다(Table 3., Fig 5~6).

###### 다) 세포벽 및 효모추출물 분리 생산기법 정립(3단계)

50L 배양시스템에서 생산된 효모를 이용하여 효모추출물 제조 및 세포벽 분획을 생산하는 기법을 우선 정립하되, 고수율생산을 위한 효모추출물 제조기법을 매일유업(주)의 연구결과를 기준으로 가능성 및 문제점을 확인하였다. 이를 위하여, 세포파쇄기를 이용한 파쇄법과 비파쇄법을 적용하고, 효모용해는 2종의 단백질 분해효소(endo 및 exo type)를 첨가하여 autolysis시켜 수행하였다. 이때 생산용 기기 및 실험용 기기를 이용하여 생산수율 등을 확인하였다(Table 4~5., Fig 9~11)..

###### 라) 시제품 제작(4단계)

50L 발효조에서 확인된 기능성 소재 분리 및 생산 문제점을 사전 대량생산시스템 정립절차에서 확인과 동시에 생산효율을 동시에 평가하기 위하여 10톤 반응조에서 시제품을 제작하였다. 이를 위하여, 사전 제조된 제빵용 압착효모를 이용하여 시제품(효모추출물 및 세포벽 분획)을 제조하고, 목표 기능성 소재별 물성평가 및 제빵적용성 평가를 실시하도록 매일유업(주) 중앙연구소에 제공하였다(Table 6~7., Fig 12~14).

이때 효모추출물 및 세포벽 분획은 생산효율 및 물성의 변화를 최소화 하기 위하여 열풍건조가 아닌 동결건조법을 이용하여 건조하였다.

## 2) 시제품 제조 일정

번호	사업 내용	추진 일정 (월)												기간 (주)	
		10	11	12	1	2	3	4	5	6	7	8	9		
<b>1단계 : 배양배지 및 배양 조건 확인, 선발효모 5L scale 발효 테스트</b>															
1	기존 배양 조건 확립	■	■												(4)
2	선발된 효모 배양 테스트		■	■											(4)
<b>2단계 : 효모별 생산 효율 검정</b>															
3	1단계 선발 효모 50L 발효			■											(12)
4	압착효모 및 건조 효모 제작			■											(12)
<b>3단계 : 세포벽 및 효모추출물 분리 생산기법 정립 (파쇄 및 비파쇄 기법, 생산수율)</b>															
5	공정 확립 및 수율 확보			■	■										(12)
<b>4단계 : 시제품 제조</b>															
6	효모추출물 제조(동결건조)					■	■								(2)
7	세포벽 분획 제조(동결건조)					■	■								(2)

## 3. 연구수행결과

### 가. 배양배지 및 배양조건 확인, 선발효모 5L 발효 테스트

Table 1의 조건으로 전처리 당밀을 제조하여, 매일유업에서 분리한 4종의 효모 균주를 발효하였으며, 선발 4종의 효모 발효시 time-profile은 Fig. 1 ~ 5에 나타내었다. 4종의 효모 균주를 발효 후 생균수, 압착효모 생산성, 등의 결과는 Table 1과 2에 비교하여 나타내었다.

*C. utilis*의 경우 압착효모 및 건조효모 기준으로는 다른 3종과 비교하여 40% 이상 생산성이 좋지만, 단위 부피당 생균수는 1/2정도 떨어지는 것을 알 수 있었으며, cell의 부피가 *S. cerevisiae*의 2배 이상되는 것을 추정할 수 있었다.

*S.cerevisiae* JKK와 대조 *S. cerevisiae*는 압착효모에서 비슷한 생균수, 수분함량을 보였으나, *C.utilis*는 수분함량이 많아 후공정인 원심분리 및 세척 공정에서 JKK와 *S. cerevisiae*에 비해 어려움이 있었다. 즉, 수분함량이 높으면 원심분리 후 분리상이 완벽히 이루어지지 않는 현상이 발생하였다.

#### 나. 선발효모별 생산효율 검증(50L 발효조)

5L-scale 발효 결과물을 매일유업에 제출하였으며, 효모균수 및 제빵적용성 평가를 거쳐 50L-scale 발효를 *S. cerevisiae*CKK110426와 *C. utilis*를 최종 선정하여 발효를 진행하였다(Table 3., Fig 6~8.).

발효 후 원심분리 (관상연속원심분리, 12,000rpm or 15,000×g, 50L/h flow rate, 7L bow volume)하여 효모 pellet과 상등액을 분리하였다. 뿐만 아니라, 분리된 효모 pellet은 생리식염수를 이용하여 현탁 및 원심분리하여 2회 세척하였다. 이렇게 분리된 효모 pellet은 압착효모 하여 압착효모형, 동결건조효모 및 배양 상등액 동결건조물로 제조하여 제빵/제과 적용성 평가 및 이화학적 분석을 위한 시료로 사용하였다.

5L-scale 발효에 비해 압착효모의 수분함량이 낮은 것은 고속의 원심분리를 통해 압착효모의 수분함량을 최소로 하였기 때문이다. 하지만, 5L-scale 발효의 결과와 마찬가지로 *C. utilis*의 압착효모의 수분함량은 배 유래 *S. cerevisiae*에 비해 다소 높은 것을 알 수 있었다(Fig 6., 8.).

Cell의 크기는 평균적으로 *S. cerevisiae*가 더 큰 것으로 알려져 있으나, *Candida utilis*은 성장 조건에 따라 출아형태와 유사균사(pseudohyphae) 성장 형태로 증식하여, 실제 생균수(평판생균계수법)가 발효 환경에 따라 다양한 값을 나타내는 경우가 일반적이고, 증식 패턴에 따라 세포의 크기가 다양하다. 이 두 효모 모두 세포 크기를 기준으로  $g(1cm^3, 10^{12} \mu m^3)$  부피당  $5 \times 10^{10}$  CFU 이상 나올수 없다 (min.  $0.256 \times 10^2 \mu m^3/yeast\ cell$ ). 하지만, 배양 방법에 따라 single spore 또는 자낭포자(ascospore)를 형성할 수 있기 때문에 배양 방법에 따라 이론적인 생균수 보다 다소 많은 생균수가 나올 수 있다. 실제 생균수 측정시 다소 작은 colony는 계수하지 않는 것이 현명한 방법이라 하겠다.

*C. utilis*는 초기 발효액 부피가 2L 정도 높았다. 이는 전처리 당밀과 물 혼합시 물 투입량이 2L 더 투입 되었기 때문이다. 이로 인해 실제 배양 부피당 생산성(% $g-DCW/L \times 100$ ), 배양액내 효모량 등은 28L의 배양 부피로 계산하였기 때문에 5L scale 발효 결과에 비해 다소 낮게 나타났다. 하지만, 최종 압착효모량 및 건조효모량을 확인한 결과 배 유래 *S. cerevisiae* 보다 높은 값을 나타내었다 (Table 3).

#### 다. 세포벽 분획(cell wall 분획) 및 효모추출물 분리 생산기법 정립

Cell wall 분획 및 효모추출물 분리 및 생산과 수율을 확인하기 위한 시생산을 진행하였다(전체 공정도는 Fig. 9~11). 실제 당밀을 이용한 대량의 발효를 진행하여야 하지만, 당밀 수급상의 문제점과 아미코젠(주)에서 보유하고 있는 대용량의 발효기가 고농도 발효에 적합하지 않는 문제로 인해 10톤 발효조를 이용하여 저농도 효모 발효액(비당밀 배지)에서 성장한 효모를 원료로 효모추출물과 cell wall 분획을 제조 생산하는 기법을 정립하려 하였다.

10톤 발효액 중 1톤 발효액(OD600=22, wet weight 15kg)은 원심분리(Alfalaval, Clara200) 및 정제수를 투입하여 세척하여 농축 현탁액(크림효모)을 제조

하였다. 크림효모 (PCV 21%, 43L) 중 23L는 고압세포파쇄기(Micronox, Picomax, 압력 13,000 psi, 유속 500L/h)를 이용하여 세포파쇄하고 20L는 비파쇄한 2가지 시료를 Autolysis시켜 효모추출물과 cell wall 분획에 대한 생산수율 등을 확인하였다. Autolysis는 두 가지 시료에 같은 방법으로 진행하였으며, Fig 8과 9에 나타내었다. 상세하게는, 일반적인 상업용 저염 효모추출 공정을 적용하였다.

가성소다를 사용하여 사용 효소의 최적 pH 6.3으로 보정하였으며, endo-peptidase인 alcalase(Novozymes, 2.4 AU/ml) 50m를 넣고, 온도를 서서히 가온하여 55℃에서 약 4.5~6시간 반응하였다. 반응의 증단은 반응 시간 동안 반응액의 Brix 증가 패턴을 확인하여 단위 시간 당 증가되는 비율이 감소되는 것을 기준으로 하였다.

반응완료 후 가열하여 90℃에서 15분간 살균하여 endo-peptidase를 비활성화시키고, 다시 냉각시켜, 50℃에서 exo-peptidase인 Protamax(Novozymes, 1.5 AU/g) 20g와 Flavourzyme(Novozymes, 500LAPU/g) 20g를 넣어 약 15~20시간 처리하였다. 반응이 종료된 후 95℃에서 10~30분간 살균하여 효소활성제거 및 살균을 겸하였다.

세포파쇄 유무에 따른 autolysis 결과, 세포파쇄한 시료는 상등액으로 녹아나오는 단백질 또는 아미노산이 비파쇄한 시료에 비해 낮은 것으로 나타났으나, 세포파쇄한 시료를 autolysis할 경우 효모추출물 제조시 수율이 떨어지는 것을 확인할 수 있었다.

autolysis 완료된 시료는 원심분리(관형원심분리기)를 진행하여 상등액은 효모추출물 제조 공정으로 진행하고, pellet(세포용해물)은 cell wall 분획 제조공정으로 진행하였다. 상등액은 농축기(lab scale, 10L bow, inlet temp. 50℃)에서 3~5L (15~25 Brix) 수준으로 농축하여 여과(filterpad, 0.2μm) 및 살균(95℃, 30분)하여 분무건조(pilot scale, 50L)하였다(Fig 9~13).

매일유업에서 효모추출물의 성분분석을 감안하고 수율을 확인하기 위해 분무건조시 부형제를 넣지 않고, 진행하였는데, 투입된 액량 대비 생산 수율이 좋지 않게 나왔으며, 대부분이 분무건조기 내부 벽면에 침착되어 타버렸다. 이론상 수율은 분무건조 직전의 살균한 시료의 Brix기준으로 계산하였다(실제 분무건조상 분말 손실은 약 3~5%이며, 휘발성 물질에 대한 2가지 내용은 보정하지 않음).

최종 살균액 및 Brix 값을 기준으로 실제 비파쇄 시료의 경우 31.2g/L-크림효모, 파쇄한 시료는 36.95g/L-크림효모 정도 생산되었지만, 파쇄한 시료의 경우 최종 열처리 후 불용성 물질이 다량 발생하여 실제 효모추출물로 사용하기가 좋지 않은 것으로 판단하였다. 본 결과에 대한 공정 중 측정값은 Table 4에 나타내었다.

Table 5.는 효모추출물 제조시 나오는 pellet(세포용해물)로부터 cell wall 분획 제조시 처리 단계에 따른 함량 변화를 나타내었다. 크림효모와 달리 autolysis 후의 pellet은 검은 색상을 나타내었다.

크림효모는 완전한 아이보리색의 것은 아니지만, 세척과정을 거치면서, 연노랑색인 것을 감안하면, autolysis 과정 중 잔존한 배지성분과 결합해서 변색된 것으로 판단된

다. 따라서, 당밀 배지를 사용하여 본 효모추출물 생산 및 cell wall 분획 제조시엔 배지 성분을 잘 제거할 수 있도록 공정에 신경써야 할 것으로 판단된다.

autolysis 후의 pellet은 3% 가성소다 처리 과정에서 다소 탈색되었지만, 최종 공정까지 색상이 잔존하였다. 가성소다 처리 2회 및 가성소다 첨가 후 열처리는 잔존 단백질, 핵산 성분 제거와 지방산 일부를 비누화시켜 제거하는 목적으로 수행하였다. pH를 낮추어 세척하고, 에탄올 처리는 잔여 지방을 용해시켜 제거하려 하였다. 에탄올 처리 및 원심분리를 마친 시료는 약 1kg 정도의 wet weight를 가지나 동결건조 후엔 약 110~120g 정도로 85~90%의 수분 함량을 가지는 것으로 판단되었다.

#### 라. 시제품 제작

기능성 소재인 Cell Wall과 효모추출물의 분리 및 생산을 위한 원료인 압착효모 80kg을 기능성 소재 생산용 시료로 사용하였으며, 기능성 소재 생산을 위한 전체공정은 다음과 같다(Table 6~9., Fig 9~13.).

우선 autolysis 공정을 진행하기 위해 압착효모 80kg(수분함량 67%, 건조함량 23kg 이상)을 반응탱크에 300L(PPV 27%, pH 4.3) 되게 현탁하였다.

현탁시 온도를 가온하여 약 35~40℃를 1~2시간 유지하고, 가성소다를 이용하여 pH 6.3~6.5로 보정하였다(약 20% NaOH 2L). 이후 온도를 천천히 올려 약 55~58℃로 변경하고, endo-peptidase인 alcalase(Novozymes, 2.4AU/ml) 200ml과 exo-peptidase인 flavourzyme 500MG (Novozymes, 500LAPU/g) 150g 을 투입하였다. 반응시간 동안 분해 활성이 좋지 않아 95% 에탄올 약 5L를 투입하여 반응을 촉진시켰다(고급 알코올 계열을 첨가하면 autolysis가 촉진).

반응시간은 약 20~22시간 진행하였으며, 95℃ 30분간 살균 후 반응액은 약 6% 정도의 PPV 값이 감소하고, 반응액의 농도는 0.5Brix에서 6.7Brix까지 증가하였다.

생산용 연속원심분리기(Alfalaval, Clara200)를 이용하여 200L 상등액과 100L 슬러지(cell wall 분획 및 상등액이 포함)를 분리하였으며, 슬러지에 물을 200L 투입하여 상등액을 추가로 세척하여 회수하였다. 회수된 상등액은 총 500L, 4.8Brix이며, 이를 진공가온농축(45℃) 하여 27Brix, 70L 의 농축액으로 제조하고, 여과 및 동결건조를 수행하였다(Fig 9~13).

동결건조는 회수되는 최종 수율을 확인하기 위함이었으나, 동결건조(Large scale, 100kg 급, -40℃, 12시간 냉동)에서 완전히 동결되지 않아 이론 수율(Brix 값을 기준으로 16.9kg)에 비해 42% 수준인 7kg의 분말 효모추출물을 생산하였다.

손실된 부분으로는 완전동결이 되지 않아 동결건조 되지 않은 부분과 부풀어 건조 트레이에서 외부로 흘러나간 요인이다.

세척된 슬러지는 cell wall 분획 제조를 위해 200L 정도의 정제수와 가성소다를 최종 2~3%되게 투입하여, 원심분리기를 이용하여 슬러지와 가성소다 용출액을 분리하였다(cell wall 분획의 고형분과 가성소다가 포함된 불순물은 원심분리법으로 분리함).

가성소다를 투입 및 원심분리를 1회 더 진행하여 상등액에 포함되어져 있는 단백질



성분을 최대한 제거하였다. 3회째 가성소다 투입시는 90~95℃, 30분간 처리하여 비누화를 진행하였으며, 지용성 성분 및 단백질을 제거하도록 하였다. 35% HCl를 투입하여 pH 수준을 산성 또는 약산성으로 보정하여 산에 녹는 물질 및 미네랄 등을 제거하려 하였다. 추가 세척 단계를 1회 더 진행하였으며, 에탄올로 세척하여 지용성 성분을 제거하였다(원심분리시 폭발 위험으로 인해 실험용 원심분리기 사용).

최종 50L(PPV 21%)의 cell wall 분획을 확보하였으며, 이를 동결건조하여 약 3.35kg의 cell wall 분획 건조분말을 제조하였다(Table 6., Fig 14.).

#### 마. 사업성 가능성 평가(경제성 평가)

##### 1) 선발효모류 경제성 평가

현재 압착효모 (크림타입효모 포함)의 국내의 시장 규모는 6,600톤(210억, 소매 시판가)/년으로 보고 있으며, 대규모 시설투자가 필요한 장치 산업이다. 따라서 특화된 내용이 없다면, 시장 진입시 문제가 발생할 가능성이 높은 것으로 보고 있는데, 주관 기관에서 본 시장에 진입할 경우 마케팅 측면에서 천연효모를 강조하여야 할 것이라 판단되었다(Table 7.).

본 연구는 선행연구 결과를 토대로 추가선발된 효모류에 대한 1단계 생산효율 검정을 통하여 정립된 배지 및 배양법을 적용하여 수율을 조사한 결과 동결건조 기준으로 4~5%의 유사한 결과가 확인되었기 때문에 제빵적용성 평가를 거쳐 가장 발효율이 우수하였던 *S. cerevisiae* CKK110426을 대상으로 경제성을 검토하였다(Table 9).

발효조 크기 (생산규모와 시장 점유율)에 따라 원료 사용량과 압착효모 생산량을 비례할 것이라고 가정하고 생산 규모에 따른 사업 가능성을 시뮬레이션하였다(인건비, 가공비 및 투자비용은 정비례하지 않음).

5톤 발효조 4기를 사용하는 규모로 repeated fed-batch 발효 방법 (fed-batch 발효된 발효액을 종배양액으로 사용하거나, 생산성을 증대시키기 위해 다른 발효조로 일부의 발효액을 이동시켜 추가 발효를 진행하는 방법)을 기준으로 생산할 때, 5톤 발효조 4기와 유틸리티, seed 배양용 발효조 2기 (100L, 1,000L), 순수 산소 공급 장치, 원료 혼합 탱크, 크림효모 보관용 냉장 탱크 (5~8℃), 부형제 혼합기, 압착기, 포장기, 연속 살균기, 여과 냉각수 공급기, 원심분리기 3기(당밀 청정기 1기 및 효모 분리세척기 2기)등의 기기와 공장부지 및 공장 건축이 필요하며, 투자비용은 약 55억으로 판단하였다.

5톤 발효조 4기 (2기씩 40시간 발효를 진행하여 매일 효모가 연속 생산 될 수 있게 4기를 운영)를 이용하여 매일 5,400~6,000L (건조효모 기준 5.5% 함유)의 발효액을 얻는다고 가정하였다. 이때 압착효모 (70% 수분함량)의 1일 생산량은 1,080kg이며, 완제품 2,160 ea (500g/ea)를 생산 할 수 있다.

당밀의 원료가는 200원/kg으로 가정하고, 2,000 kg의 당밀 가격 400,000원과 기타 원료인 SPAN60, 비타민(Biotin), 미네랄, 암모니아, 인산, 포장용지 (압착효모용

포장지) 등을 포함하여 550,000원/batch의 원료비용이 소요될 것으로 판단하였다.

가공비 (에너지, 전기, 폐수처리, 수도 사용료 등)는 5톤 발효 기준으로 1회 생산 시 비용을 500,000원/batch로 하였다.

생산인원은 2인 2교대, 주간 1인 추가로 365일 근무와 원료분석 및 완제품 분석 연구원 1인의 인건비로 1,000,000원/batch으로 가정하였다. 5톤 생산 수준 및 생산 규모에 따른 손익 가능성을 추정하여 Table 6에 나타내었다.

압착효모의 시중 소매가는 500g 당 2,500~5,000원 정도에 거래되고 있으며, 본 시물레이션에서는 판매가격을 1,200원으로 가정하였다.

최종 제품의 부피당 가격이 낮고, 유통기한이 1개월 정도인 것을 감안하면, 유통과정에서 파기되는 비용도 막대할 것이다. 따라서 효모의 생산과 소비가 직접 연결되거나, 유통 라인이 잘 정비되어 있어야 사업성이 높을 것으로 사료된다. 주관기관의 유통 라인을 잘 이용한다면, 유통과정에서 발생할 수 있는 위험 요소는 최소로 줄일 수 있을 것으로 판단된다.

국내 시장의 최소 20%(4톤-압착효모/일, 20톤 발효기 4기 운영)의 시장점유율 이상을 확보 할 수 있는 시설을 운영하여야 제빵효모 사업에서 수익 구조로 전환되었다. 투자대비 수익을 얻기 위해서는 1일 10톤 이상의 압착효모를 생산 기준으로 투자를 한다면, 연간 최대 34억원 (연간 투자 대비 수익률 20.6%)의 수익이 발생할 것으로 판단한다 (소모품 교체비용, 투자자금에 대한 이자비용 및 유통과정에서의 손해 비용 비포함).

#### 나. 기능성 소재(효모추출물) 경제성 평가

핵산류, 미네랄류 및 아미노산류가 함유되어 있는 기능성 소재(효모 추출물) 제조시 반응용량 및 생산기간에 따른 원가산정을 통한 효모추출물의 생산성 및 경제성을 평가하여 보았다. 이를 위하여, 정립된 대량생산기법으로 효모를 원료로 사용하는 전제에서 430Kg의 효모추출물을 1회 생산 기준(10톤 반응조, Working Vol. 8톤 기준)으로 평가하여 보았다(Table 8).

결과로서, 소형반응조(0.5톤 반응조, Working Vol. : 300L)에서 생산시는 효모추출물의 1Kg당 생산단가는 113,8660원이었으나, 반응조를 확대(10톤 반응조, Working Vol. 8톤 기준)하여 제조시는 생산단가는 29,677원, 조업기간(25일 조업/월)을 고려한 경우에는 생산단가는 27,489원으로 나타났는데, 현재 1Kg당 국제시세가 50,000원임을 감안하면 연구결과에서 확보한 효모추출물 대량생산시스템 정립과 소재의 경제성은 확보되었다고 인정되었다.

#### 다. 기능성 소재( $\beta$ -Glucan) 경제성 평가

기능성소재( $\beta$ -Glucan) 제조시 반응용량 및 생산기간에 따른 원가산정을 통한  $\beta$ -Glucan 생산성 및 경제성을 평가하여 보았다. 이를 위하여, 효모추출 후 고형분을 원료로 사용하는 전제이므로 원료가는 0원으로 산정하고, 월 2.225톤을 생산하는 기

준(10톤 반응조, Working Vol. 8톤 기준)으로 평가하여 보았다(Table 9).

결과로서, 소형반응조(0.5톤 반응조, Working Vol. : 300L)에서 생산되는  $\beta$ -Glucan의 생산단가는 735,940원이었으나, 반응조를 확대(10톤 반응조, Working Vol. 8톤 기준)하여 제조되는 생산단가는 119,616원으로 감소하였다.

조업기간(25일 조업/월)을 고려한 경우에는, 월생산량은 2.225톤이 가능하고, 이때 생산단가는 106,685원으로 나타났는데, 현재  $\beta$ -Glucan의 1Kg당 국제시세가 1,000,000원임을 감안하면 연구결과에서 확보한 대량생산시스템 정립과 소재의 경제성을 확보하였다고 인정되었다.

Table 1. 당밀 전처리 조건 및 5L scale 발효 조건

공정단계	열처리전	열처리후	기타
당밀 전처리	당밀 2.75kg+물 2.2kg +암모니아수 26ml(pH 6.2) >105℃, 30분 autoclave	>실온 냉각 >원심분리 (4000 × g, 20분) >인산(85%) 8ml (pH 5.4)	46.5% v/v =65.2%w/v =55.6% w/w
Batch medium	전처리 당밀 320ml+증류수 1.28L >121℃, 30분 autoclave	별도 살균된 살균물 첨가 >nTMS 3ml	TMS 조성 (per liter): 50g ZnSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O, 60g
Feeding solution	전처리 당밀 >121℃, 30분 autoclave	별도 살균된 살균물 첨가 >nTMS 7ml	MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O, 0.5g CuSO <sub>4</sub> 5H <sub>2</sub> O, 0.03g CoCl <sub>2</sub> , 0.02g NaMoO <sub>4</sub>
발효 공정	Culture temprature : 30℃ Agitation speed : 200~1000rpm pH control : 28% 이상 ammonia water Pure O <sub>2</sub> : input, DO=20%이상 유지 Pressure : No Airation : total 0.5~1vvm Feed strategy : intermittant & constant		
후처리 공정	Cell harvest : 2000×g, 20분 2회 washing (0.85% NaCl와 함께 배양액의 총 0.5부피 사용) 2000×g, 20분		

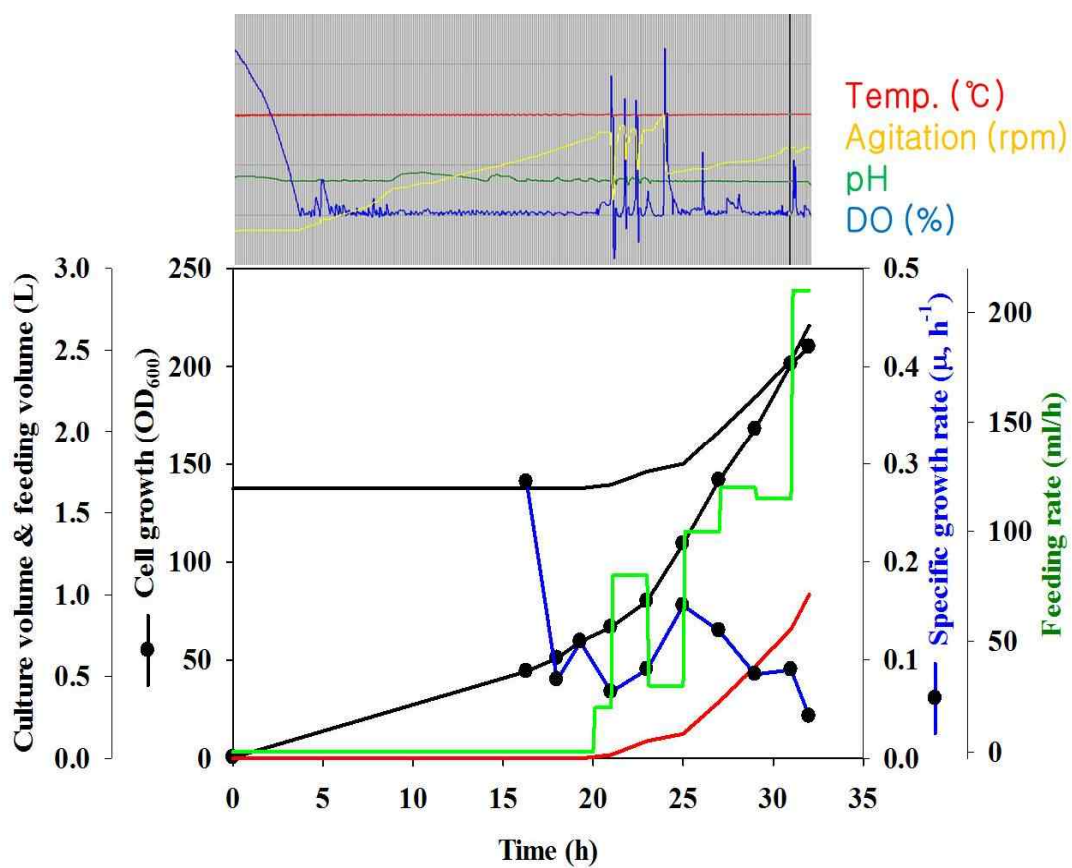


Fig. 1. 선형 선발효모 *S.cerevisiae*JKKJJKK09100 strain의 5L-scale 발효 time-profile. Red line, feeding volume(L); black line, culture volume(L)

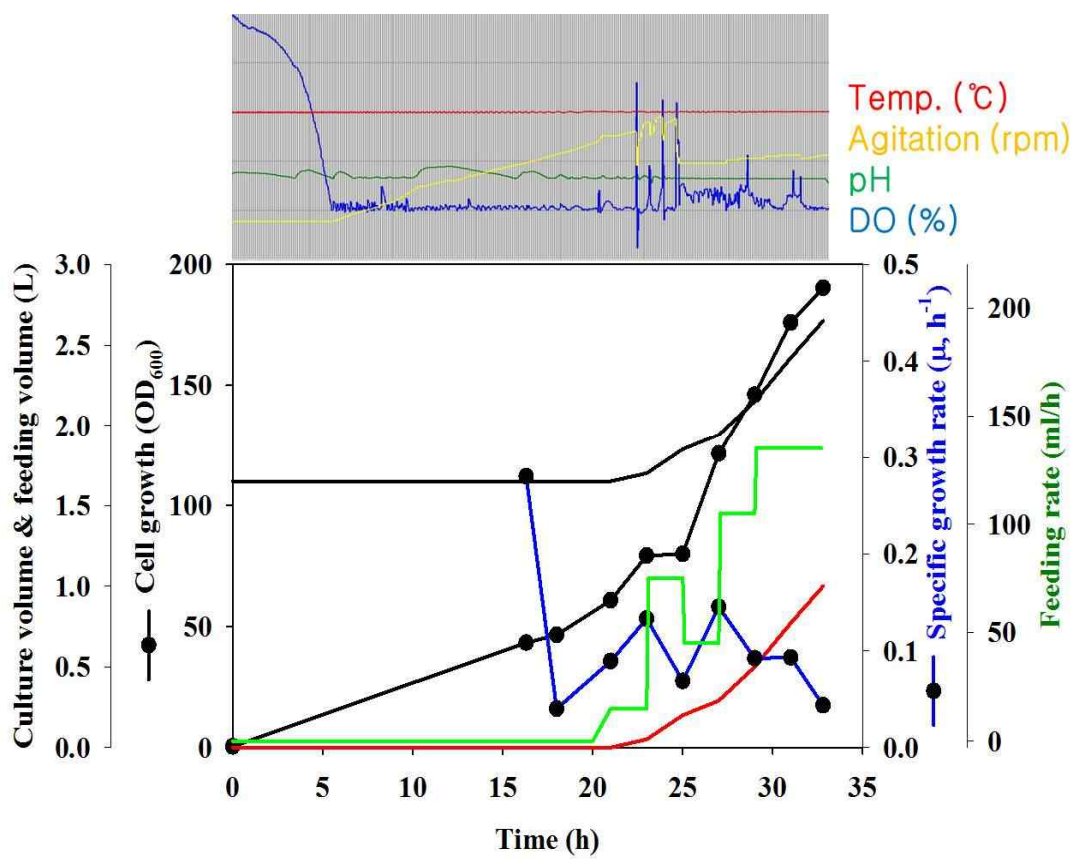


Fig. 2. *S. cerevisiae* CKK110426 strain의 5L-scale 발효 time-profile  
 Red line, feeding volume(L); black line, culture volume(L)

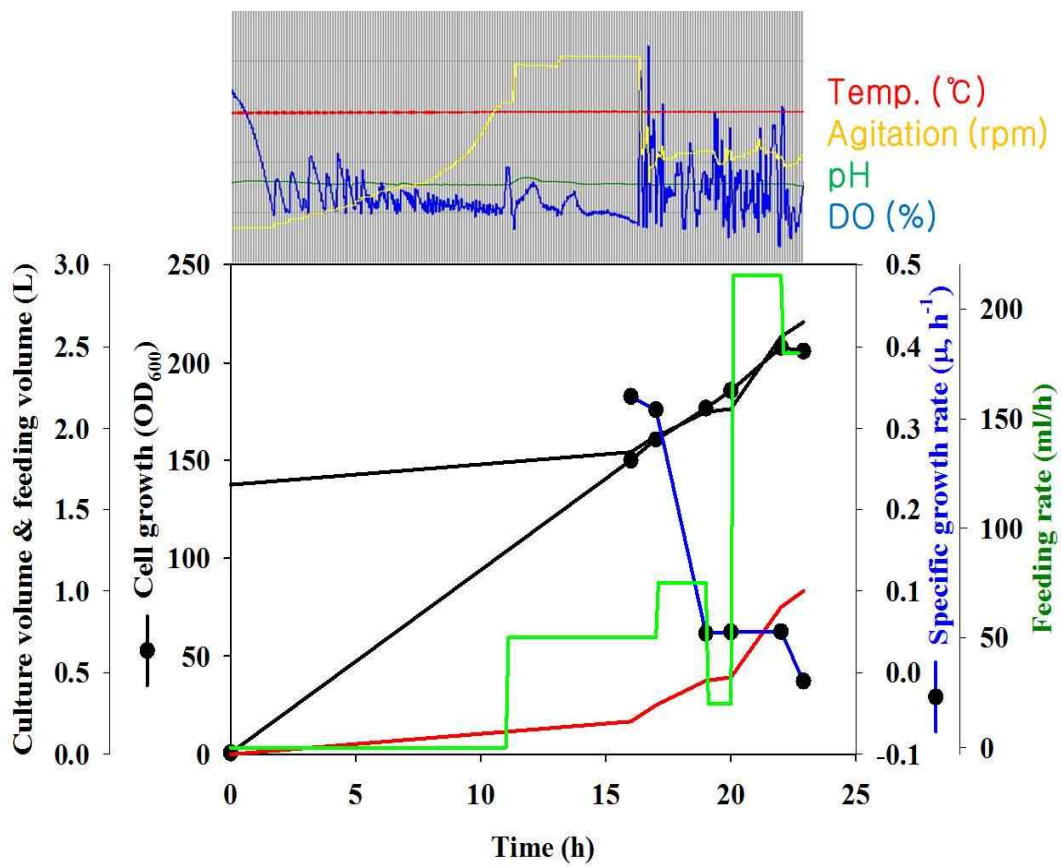


Fig. 3. *Candida utilis* strain의 5L-scale 발효 time-profile  
 Red line, feeding volume(L); black line, culture volume(L)

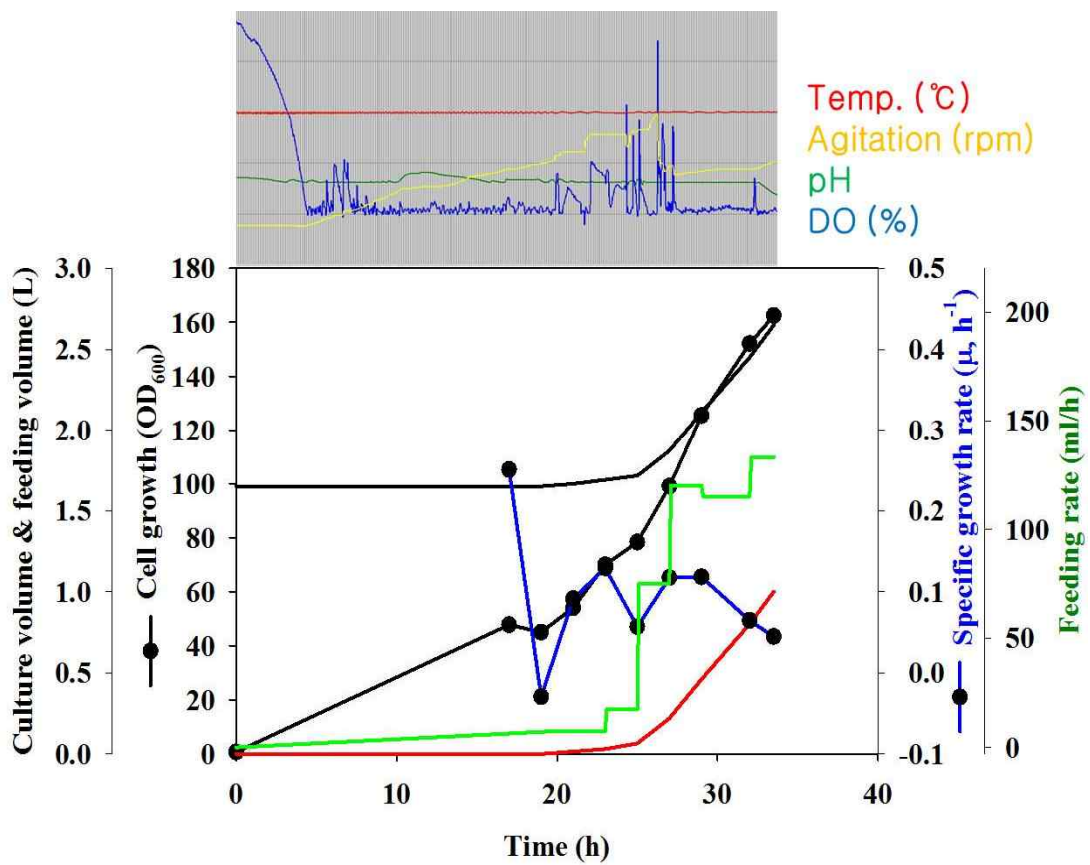


Fig. 4. *S. cerevisiae* OKK11047 strain의 5L-scale 발효 time-profile  
 Red line, feeding volume(L); black line, culture volume(L)



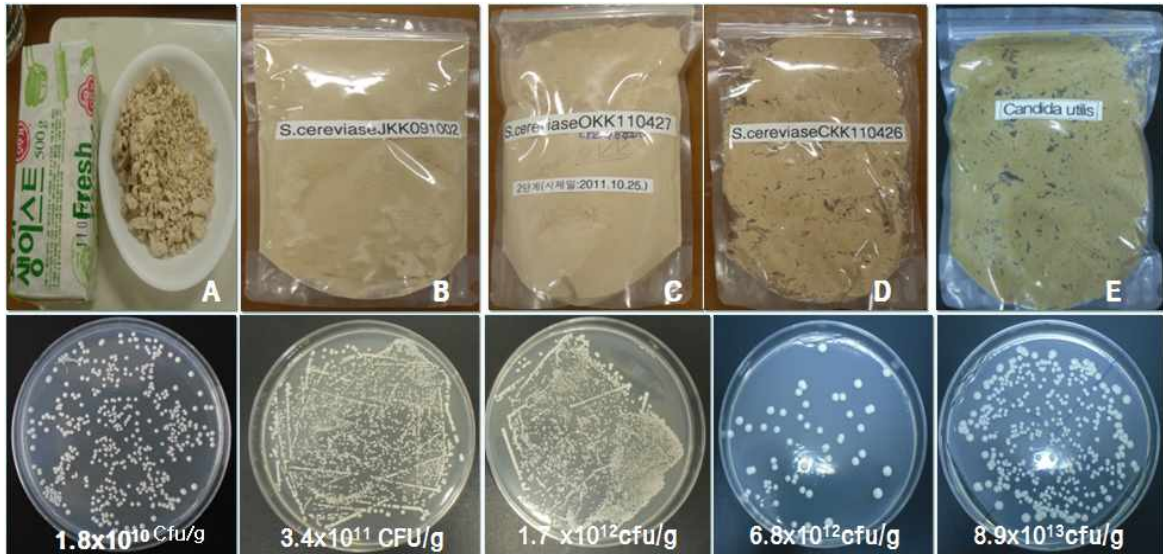


Fig. 5 . 상업효모 대비 유기농산물 분리 선발효모균(4종)의 대량생산시스템 정립 기법에 따라 제조된 효모균별 특성 및 생산수율(동결건조 기준) 조사

A : *S.cereviase*(상업효모), B : *S.cereviase* JKK091002 (생산수율 : 20.8%), C : *S.cereviase* OKK110427(생산수율: 19.4%), D : *S.cereviase*CKK110426(생산수율: 16.8%), E : *C.utilis*(생산수율: 35%)

Table 2. 정립배지 및 배양법을 적용한 선발효모 4종에 대한 공통 발효특성 평가결과 (5L Pilot발효결과)

항목	<i>S. cerevisiae</i> JKK091002	<i>S. cerevisiae</i> CKK110426	<i>Candida utilis</i>	<i>S. cerevisiae</i> OKK110427
최종배양액량(L)	2.6	2.6	2.6	2.6
배양 시간 (hr)	32	32.8	22.9	33.5
생장도(OD <sub>600</sub> )	210	190	206	162
소모한 당밀량(g)	860	860	860	860
배양액내 효모량(g/L)	65.1	58.1	87.8	47.5
배양액내 생균수 (CFU/ml)	2.4*10 <sup>9</sup>	1.8*10 <sup>9</sup>	2.0*10 <sup>9</sup>	1.3*10 <sup>9</sup>
압착효모량(g)	618	573	952	454
건조효모량(g)	169.3	151.2	228.4	123.4
압착효모 생균수 (CFU/g)	1.2*10 <sup>10</sup>	1.1*10 <sup>10</sup>	6.5*10 <sup>9</sup>	1.1*10 <sup>10</sup>
압착효모 수분함량(%)	72.6	73.6	76.0	72.8
생산수율 (%, Y <sub>건조효모/원료</sub> )	19.6	17.5	26.5	14.3
생산성 (%, g-DCW/L*100)	6.5	5.8	8.7	4.7

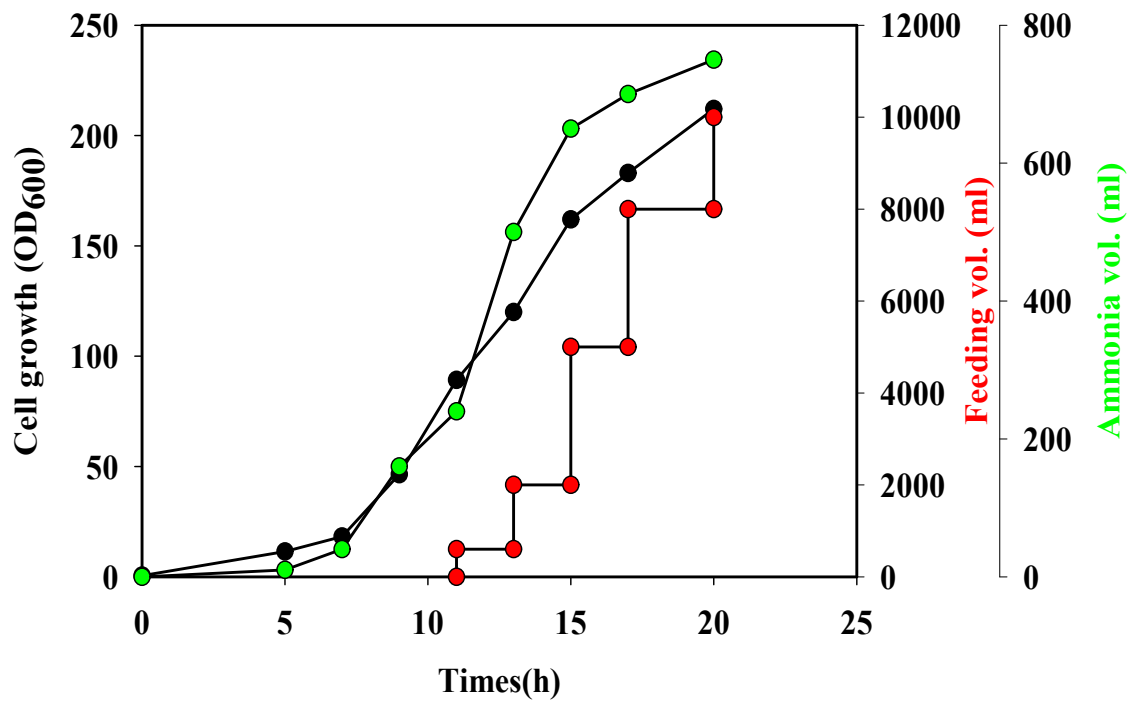


Fig. 6. *Candida utilis* strain의 50L-scale 발효 time-profile

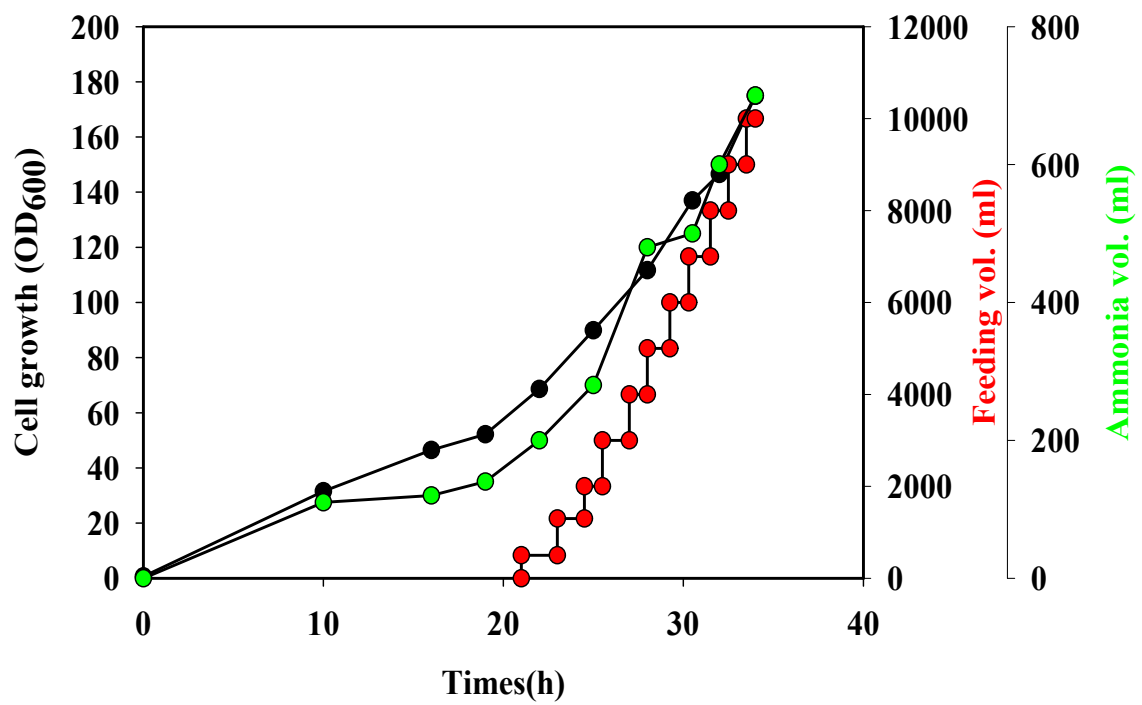


Fig. 7. *S. cerevisiae* CKK110426 strain의 50L-scale 발효 time-profile



Fig. 8 . 수거 유기농 시료분리 및 제빵적용성 평가를 거쳐 선발된 제빵용 신규효모(A: *S.cerevisiae* CKK110426)와 기능성 소재 분리용 효모(B: *C.utilis*)에 대한 대량배양시스템 정립 시제결과. Working Vol. : 30L(총볼륨 : 50L), A-1 및 B-1 : 건조분말 TYPE, A-2 및 B-2 : 압착효모 TYPE

Table 3. 최종선발 2종효모의 대량생산시스템 정립을 위한 시제 결과  
(50L scale 발효)

	<i>Candida utilis</i>	<i>S. cerevisiae</i> CKK110426
최종배양액량(L)	28	26
배양 시간 (hr)	20	34
생장도(OD <sub>600</sub> )	212	175
소모한 당밀량(g)	8600	8600
배양액내 효모량(g/L)	47.8	46.4
배양액내 생균수(CFU/ml)	4.95*10 <sup>9</sup>	4.25*10 <sup>9</sup>
압착효모량(g)	5400	4100
건조효모량(g)	1340	1205
압착효모 생균수(CFU/g)	1.45*10 <sup>10</sup>	1.55*10 <sup>10</sup>
압착효모 수분함량(%)	75.2	70.6
생산수율(%, Y <sub>건조효모/원료</sub> )	15.6	14.0
생산성(%,g-DCW/L*100)	<b>4.78</b>	<b>4.60</b>

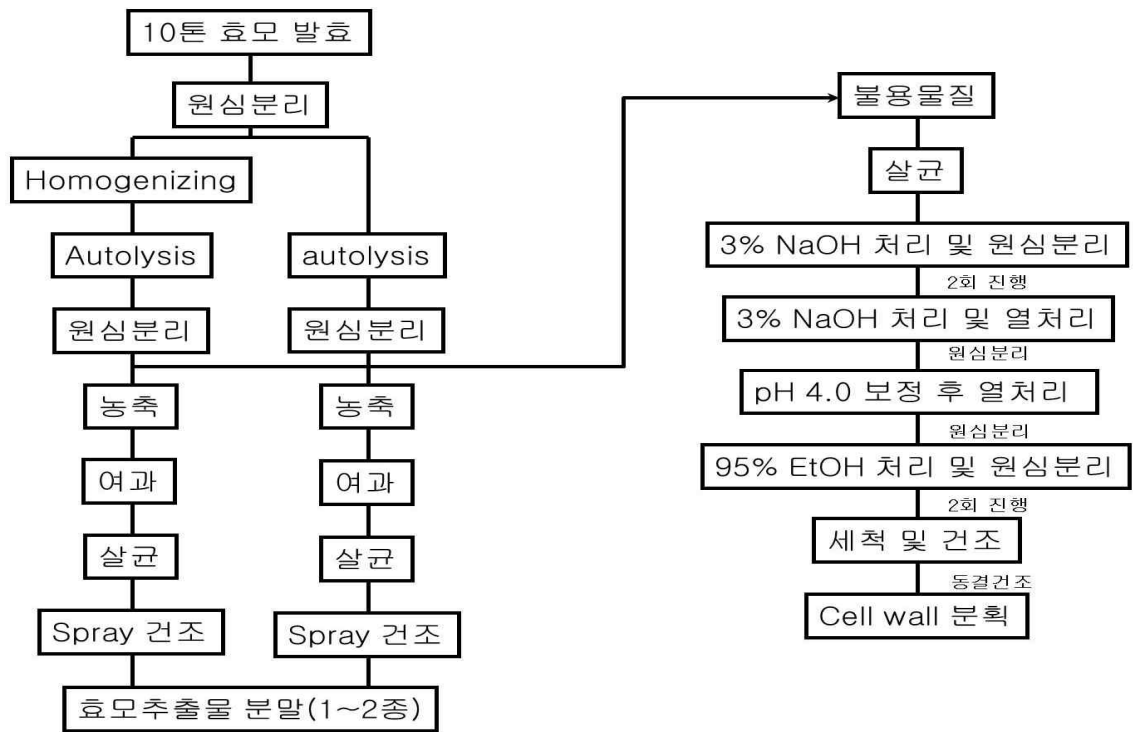


Fig. 9. 효모 (*S. cerevisiae*CKK110426) 추출물 및 세포벽 분획 제조 공정도

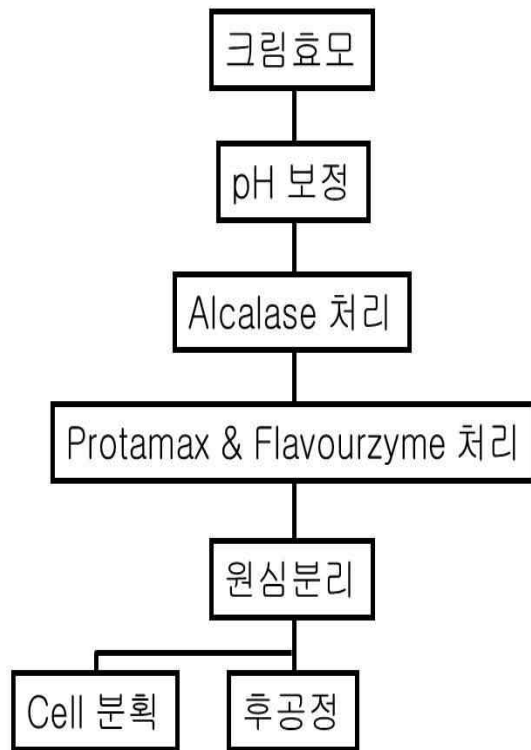


Fig. 10. 2단계 효소 분해법을 적용한 Autolysis 공정도



Table 4. 효모(*S. cerevisiae*CKK110426) 파쇄 유무에 따른 효모추출물 제조 공정 결과

	비파쇄한 효모추출물 제조			파쇄한 효모추출물 제조		
	부피 (L)	농도 (Brix)	Wet weight (kg)	부피 (L)	농도 (Brix)	Wet weight (kg)
발효액	1,000	–	<15	1,000	–	<15
원심분리	20	0	4.2	23	0	4.8
세포파쇄	–	–	–	29	0.5	4.0
Autolysis1 <sup>st</sup>	20	3.6	3.0	29	2.7	3.3
Autolysis2 <sup>st</sup>	20	5.2	2.4	29	3.2	2.5
원심분리	17.5	5.2	1.8	27	3.2	2.0
농축, 여과	4.5	15	–	3.4	25	–
살균	4.5	15	–	3.4	25	–
건조	–	–	>140g	–	–	>210g

Table 5. 효모(*S. cerevisiae*CKK110426)과쇄 유무에 따른 세포벽 분획 제조 공정 결과

	비과쇄한 세포벽 분획 제조			과쇄한 세포벽 분획 제조		
	부피 (L)	농도 (Brix)	Wet weight (kg)	부피 (L)	농도 (Brix)	Wet weight (kg)
원심분리	4	2.0	1.8	4	1.2	2.0
3% NaOH *2	3	4.0	1.5	3	4.0	1.7
NaOH+열처리	2	4.4	1.2	2	4.7	1.2
EtOH 처리	2	-	1.0	2	-	1.0
동결건조	-	-	>110g	-	-	>110g



Fig. 11. 선발효모내 기능성 소재 별 최적 분리기법 정립을 위한 시제실시 결과

1 : 효모파쇄공정 적용후 생산된 Cell Wall 분획물(동결건조), 2 : 효모파쇄공정 미 적용후 제조된 Cell Wall 분획물(동결건조), 3 : 효모파쇄공정 적용후 생산된 효모추출물(동결건조), 4: 효모파쇄공정 미적용후 생산된 효모추출물(동결건조), 5 : 효모추출물 농축 경제성 및 성상확인을 위한 열풍건조 실시결과

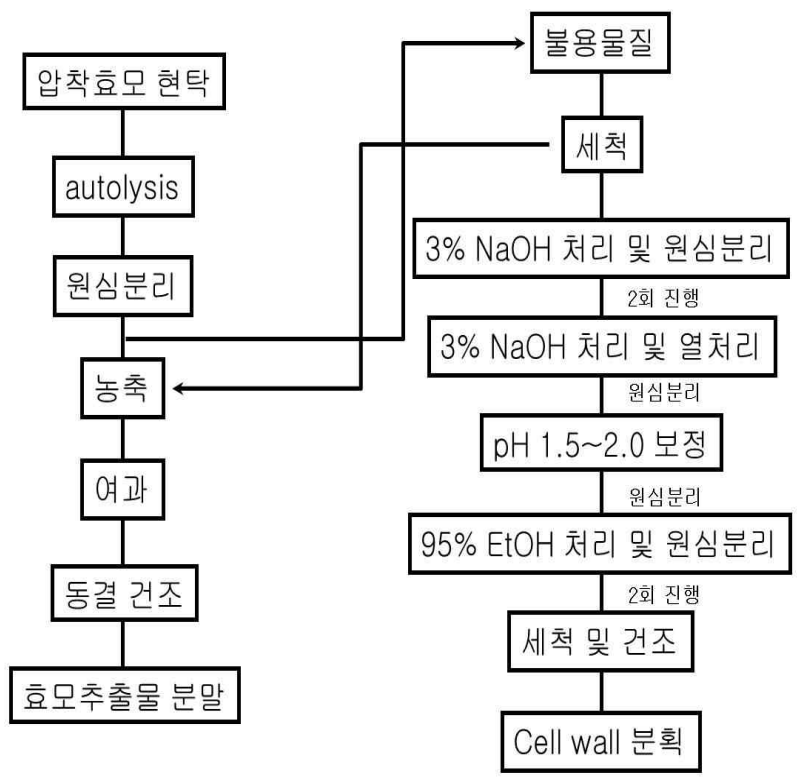


Fig. 12. 효모추출물 및 세포벽 분획 시제품 제조 공정도

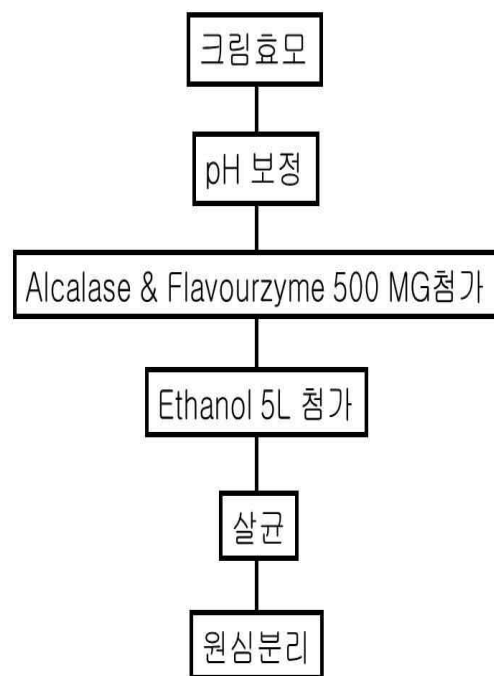


Fig. 13. 1단계 효소 분해법을 적용한 Autolysis 공정도

Table 6. 효모(*S. cerevisiae*CKK110426)추출물 및 세포벽 분획후 시제품 생산결과

Yeast extract process	부피 (L)	농도(Brix)	pH	PPV* (%)
Autolysis	300	6.6	6.3	27
살균	300	6.7	6.8	21
세척	500	4.8	6.8	-
농축	70	27	5.9	-
여과	65	26	5.8	-
동결건조	-	-	-	7 (16) kg
Cell wall fraction process	부피 (L)	농도(Brix)	pH	PPV(%)
NaOH 처리 1 <sup>st</sup>	300	5.8	13.0	20
NaOH 처리 2 <sup>nd</sup>	300	6.2	13.0	20
NaOH 처리 및 열처리	300	7.0	13.0	15
산처리	300	1.6	1.6	12
세척	170	0.6	3.0	20
EtOH 처리	50	-	-	41
동결건조	-	-	-	3.35 kg

\* PPV, Packed pellet volume



Fig. 14 . 효모 기능성 물질(세포벽 추출물 :  $\beta$ -glucan, 효모추출물 : 핵산함유추출물)대  
 량생산 정립시스템 적용 시제품 생산결과

Table 7. 선발 효모류 공통생산시스템 적용에 따른 생산 규모에 따른 손익 비교

	5 ton X 4기	50 ton X 4기	500 ton X 4기	비고
1일 생산 부피 (L)	6,000	60,000	600,000	
1일 사용 당밀 (kg)	2,000	20,000	200,000	
압착효모 생산 (kg)	1,080	10,800	108,000	
제품수 (500g/ea)	2,160	21,600	216,000	
생산총원가 (1,200원/ea)	2,592,000	25,920,000	259,200,000	
1일 가공비 (원)	500,000	3,500,000	13,000,000	
장비 투자 감가상각 (원/일)	1,510,000 (55억)	4,520,000 (165억)	15,070,000 (550억)	
1일 원료가 (원)	550,000	5,500,000	55,000,000	
1일 인건비 (원)	1,000,000	3,000,000	5,000,000	
1일 대차비교 (원)	-968,000	9,400,000	171,130,000	
년간 수익 (원)	-353,320,000	3,431,000,000	62,462,450,000	
년간 매출 (시장 점유율, %)	946,080,000 (6%)	9,460,800,000 (60%)	94,608,000,000 (600%)	

산출근거 : Repeated fed-batch 배양법과 4기의 발효조를 사용하여 24시간(1일) 동안 생산되는 압착효모와 비용을 산출한 결과이다. 시장 점유율은 국내 제빵효모의 시장규모 6,600톤/년과 비교하여 환산하였으며, 압착효모의 소매 판매가는 1,600원/500g 임을 감안할 때 제품생산원가는 1,200원으로 가정하였다.



Table 8. 효모(*S. cerevisiae*CKK110426) 추출물 제조에 따른 반응용량 및 생산기간에 따른 경제성평가

원료	단가 (원)	300L 반응 (16kg 생산기준)			8,000L 반응 (430kg 생산기준)			8,000L반응 (25일조업/달 기준)		
		사용량	개별비용	원 /kg-YE	사용량	개별비용	원 /kg-YE	사용량	개별비용	원 /kg-YE
압착효모 (kg)	3,000	80	40,000	15,000	2,160	6,480,000	15,070	54,000	62,000,000	15,070
정제수 (t)	1,000	1	500	31	14	13,500	31	338	337,500	31
에탄올 (L)	2,000	5	10,000	625	135	270,000	628	3,375	6,750,000	628
효소(2종, kg)	100,000	0	35,000	2,188	9	945,000	2,198	236	23,625,000	2,198
가성소다 (50%함량, L)	600	1	600	38	27	16,200	38	675	405,000	38
염산 (L)	400	-	-	-	-	-	-	-	-	-
기타부형제 (kg)	3,000	-	-	-	-	-	-	-	-	-
원료비 합계			286,100	17,881	-	7,724,700	17,964		193,117,500	17,964
제조										
소모성 자재 (필터 등)	40,000	1	40,000	2,500	10	400,000	930	12	480,000	45
에너지 (LPG, kg)	2,400	70	168,000	10,500	700	1,680,000	3,907	17,500	42,000,000	3,907
전력 (KW)	550	200	110,000	6,875	3,000	1,650,000	3,837	75,000	41,250,000	3,837
폐수처리비 (원/t)	35,500	1	17,750	1,109	3	106,500	248	75	2,662,500	248
감가상각(일)	2	200,000	400,000	25,000	200,000	400,000	930		6,000,000	558
인건비(원/일)	200,000	4	800,000	50,000	4	800,000	1,860	4인*30일	1,000,000	930
<b>제조비 합계</b>			<b>1,535,750</b>	<b>95,984</b>	-	<b>5,036,500</b>	<b>11,713</b>		<b>488,627,500</b>	<b>9,525</b>
<b>총 비용</b>			<b>1,821,850</b>	<b>113,866</b>	-	<b>12,761,200</b>	<b>29,677</b>		<b>681,745,000</b>	<b>27,489</b>
비 고	감 가상각 적용: 200,000원/일									

Table 9. 기능성소재(세포벽 분리물,  $\beta$ -Glucan) 제조시 반응용량 및 생산기간에 따른 원가 산정결과

원료	단가 (원)	300L 반응 (16kg 생산기준)			8,000L 반응 (430kg 생산기준)			8,000L반응 (25일조업/달 기준)		
		사용량	개별비용	원 /kg-YE	사용량	개별비용	원 /kg-YE	사용량	개별비용	원 /kg-YE
정제수(t)	1,000	5	5,000	1,493	135	135,000	1,517	3,375	3,375,000	1,517
에탄올(L)	2,000	50	100,000	29,851	1,350	2,700,000	30,337	33,750	67,500,000	30,337
가성소다 (50%함량, L)	600	50	30,000	8,955	1,350	810,000	9,101	33,750	20,250,000	9,101
염산(L)	400	2	800	239	54	21,600	243	1,350	540,000	243
기타(kg)	3,000		-	-	-	-	-	-	-	-
원료비 합계			135,800	40,537		3,666,600	41,198		91,665,000	41,198
<b>제조</b>										
소모성 자재 (필터 등)	40,000	1	40,000	11,940	10	400,000	4,494	12	480,000	216
전력(KW)	550	500	275,000	82,090	300	165,000	1,854	7,500	4,125,000	1,854
폐수처리비 (원/t)	35,500	5	184,600	55,104	140	4,984,200	56,002	3,510	124,605,000	56,002
감가상각	3	210,000	630,000	188,060	210,000	630,000	7,079	5,250,000	6,500,000	2,921
인건비 (원/일)	200,000	6	1,200,000	358,209	4	800,000	8,989	4인*30일	10,000,000	4,494
<b>제조비 합계</b>			2,329,600	695,403		6,979,200	78,418		329,040,000	65,488
<b>총 비용/Kg당 생산단가(원)</b>			<b>2,465,400</b>	<b>735,940</b>	-	<b>10,645,800</b>	<b>119,616</b>		<b>420,705,000</b>	<b>106,685</b>
비 고	감 가상각 적용: 200,000원/일									

-효모추출후 고형분을 원료로 하며 원료가는 0원으로 계산(월: 2.225톤/월 생산기준)

## 제 5 절 개발 기능성소재류 제품적용성 사전평가

### 5-1. 개발 기능성소재류 제품적용성 사전평가(성분분석)

#### 1. 연구목적

유기농산물에서 분리한 효모류(4종) 및 선행연구결과를 적용하여 야생효모류에 대하여 공통적으로 경제성이 확보되는 효모 대량생산시스템 적용 후 생산된 효모에서 분리한 분리하고 분석된 핵심 기능성 소재별( $\beta$ -Glucan, 효모추출물 및 5종 핵산류)로 제빵 및 제과 적용성 평가시 전체과정에서 물리 및 이화학적 가혹조건이 주어졌을 때에 발생할 수 있는 물성변화 등을 사전 예측코 저 하였다.

그리고, 사전평가를 토대로 기능성 소재별 특성을 파악함과 동시에 보관조건 및 제과제빵 제조과정에서 반죽, 성형, 발효에서 굽기까지 전과정에서 기능성 소재의 최적 적용 관련 및 물성관련 등 기초자료를 확보하고, 관련 메카니즘 재확인과 동시에 개발효모에 대한 제형별 제과 및 제빵 제조 레시피를 정립시 핵심자료로 활용을 목표로 하였다.

#### 2. 연구수행방법

##### 가. 선발 효모류내 아미노산 함유량 조사

제조된 4종 및 대조(제니코사, 제빵용 상업효모)에 대한 목표 기능성 소재류 함유량 분석을 위한 효모(압착형 및 분말형)를 준비하여, 효모별로 18종 아미노산을 기준으로 분석을 실시하였으며, 총 세포벽 및 효모추출물을 제외한 기능성 물질로서 아미노산류의 함유량 차이를 비교하였다(Table 1).

아미노산 분석은 식품공전(2011, 제 10. 일반시험법 1. 식품성분시험법1.1 일반성분 시험법 1.1.3 질소화합물 1.1.3.3 아미노산 가. 아미노산 자동분석기에 의한 정성 및 정량)에 준하여 실시하였다.

분석시스템은 HPLC(Agilent 1200series)을 사용하였으며, 아미노산 분석기(Biochrom 30 Amino acid Analyser), 자외부흡광광도검출기(UV Detector-570nm,440nm), Cataion seperation Column Sodium 4.6X150mm(Biochrom 30)과 DAD Detector]를 시스템으로 분석하였다.

결과로서, 18종의 아미노산을 기준으로 상용효모(대조, 제니코사)의 경우, 효모 100g당 총14mg의 아미노산 함유량이 검출되었는데, *S. cerevisiae*JKK091002의 경우는 11.3mg, *S. cerevisiae*CKK110426은 11.2mg, *S. cerevisiae*OKK110427는 11.4mg으로 유의한 차이는 없었다. 그러나, 이종 효모인 *C.utilis*의 경우는 7.7mg으로 나타나 같은 효모류라 하더라도 분류에 따라 차이가 있음을 알 수 있었다(Table 3).

그리고, 아미노산 종류별 함유량 차이를 비교하여 목표인 기능성 부분을 선정코 저하였다. 결과로서, 18종 아미노산 총량(100%)기준으로 비교시, Glutaminic acid가 14%~17%의 점유율을 보여 가장 높게 나타났으며, 다음으로 Asparatic acid가 9.8%~11%범위의 점유율을 보였으며, 이외의 아미노산류는 각각이 최대 8.4%이내의 범위를 보이는 것으로 평가 되었다.

결론적으로, 전체 선발효모류의 아미노산 함유량에 있어 유의한 차이는 없는 것으로 조사 되었고, 따라서, 단백질내 아미노산의 함유량 차이를 이용한 기능성 제과/제빵제조 소재항목에서 제외하였다.

#### 나. 선발 효모류내 미네랄 함유량 조사

정립배지 및 배양법을 적용한 선발효모 4종의 기능성 인자중 미네랄류를 대상으로 이들 함유량 차이를 검정하므로써, 미네랄류의 함유량이 높은 적정효모를 선발코 저하였다(Table 4).

이를 검정하기 위한 미네랄류는 Ca 이온을 기준으로 P, Mg, Fe, Zn, S 및, Mn으로 총 7종을 분석대상 이온으로 정하였으며, 분석시스템은 기정립된 분석법(제 3 장, 제 2절)에 준하여 ICP분석시스템을 사용하였고, 결과확인을 위한 측정단위는 mg/Kg으로 하였다.

#### 다. 효모추출물내 핵산류 조사

유기농 현장선발 효모(*S. cereviase*CKK110426)의 대량배양 및 이를 이용한 기능성 소재의 대량생산시스템이 정립되었으며, 이를 제과제빵 및 관련 산업으로의 용도·용법을 확대코 저 효모추출물 내 핵산류 및 함유량의 차이를 조사 하였다.

예비분석을 통하여 검정한 결과를 토대로 효모추출물내 함유되어 있는 핵산류는 기본적으로 5종이었으므로, 이에 따라 영유아식품 등에 첨가(두뇌 발달)중인 상용 핵산류를 5' -UMP, 5' -CMP, 5' -AMP, 5' -GMP, 5' -IMP를 각각 구입하여 효모내 함유되어 있는 핵산류(시험구)와의 비교를 위한 대조구로 사용하였다.

준비된 기능성 소재별로 제빵적용성 평가전 열처리시 물성 변화 및 풍미 등에 미치는 효과를 사전검정하기 위하여, 풍미인자 검정용 시험용기(50ml, GC-Mass)내 동일량을 각각 충전한 후 열처리 조건별(무처리, 75℃, 90℃ 및 110℃)로 풍미인자를 분석하였다.

핵산분석을 위한 표준체로서는 19종(5' -CMP, -UMP, -dCMP, -CDP, -UDP, -GMP, -IMP, -CTP, -UTP, -GDP, -TMP, -AMP, -dGMP, -GTP, -TDP, -ADP, -TTP, -dAMP, -ATP)을 Sigma사에서 구입하여 사용하였다.

표준체 및 효모내 함유된 핵산류 검정을 위한 분석조건은 HPLC-Mass시스템을 적용하였으며, 분석방법은 식품중 식품첨가물 분석법(식약청 2011, 제 11장 기타, 6아데닐산)인 뉴클레오티드류 검정법을 기준으로 하였다.

분석법은 다음과 같이 실시하였다. 우선 구입 표준체별 1ml당 각각의 표준품을 1,000 μg/ml(1,000ppm)의 농도로 하되 3%(w/w) 초산을 첨가하여 제조하였으며, 혼합표준

용액은 준비된 각각의 표준용액을 3% 초산으로 적당한 농도로 혼합하여 제조하였다.

효모추출물내 함유되어 있는 핵산류 검정을 위한 시료 전처리는 다음과 같이 실시하였다. 검체 1g을 취하여 3% 초산 10ml를 가한 후 10분간 초음파 추출후 이를 10분동안 3,000rpm에서 분리한 후 상등액을 멤브레인 필터로 여과한 후 시험용액으로 하였다.

전처리된 시험용액내 핵산류 검정을 위한 기기 분석조건으로서 분석기종을 HPLC-UVD(Agilint 1200series)을 사용하였으며, 이때 적용 Deteter는 DAD(260nm)였다.

핵산검출을 위한 컬럼은 YMC-Pack ODS-AM(5um x 4.6 x 250mm)를 Flow rate는 1.0ml/min.으로 하고 시험용액을 20ul를 주입하여 검정하였다. 검정을 위한 Mobile Phase는 A용액(0.2M triethylamine, pH 6.6) 그리고 B용액[0.2M triethylamine(pH 6.6)/acetonitrile(95/5)]로 각각 조성한 후 농도구배 차이를 적용하였다. 즉 0min.(B용액 4%)→10min.(B용액 4%)→30min.(B용액 100%)→37min.(B용액, 4%)→45min.(B용액, 4%)순으로 시간별 농도구배 조건을 부여하였다.

#### 라. 효모추출물 분자량 조사

유기농 현장선발 효모(*S. cerevise*CKK110426)의 대량배양 및 이를 이용한 기능성 소재의 대량생산시스템이 정립되었으며, 이를 제과제빵 및 관련 산업으로의 용도용법을 확대코저 함에 따라서, 기능성 소재 중 효모추출물을 대조(상용효모추출물)와 비교함으로서 분리물의 순도 및 특성 평가하였다,

이를 위해 *S. cerevise*OKK110427에서 추출한 추출물 동결건조 시료(YE-Maeil), *C.utilis*에서 분리한 추출물(일본 KOHJIN사, 제품명 : AROMILD, YE-Japan)을 각각 준비하였으며, FPLC분석간 표준체로서는 분말 GMP(1g)+분말 CMP(1g)+분말 AMP(1g)+분말 IMP(1g)혼합 후, 정제수 50g mass up한 조성액에 대하여 FPLC분석을 실시한 비교구(SGCAI)와 분자량이 309로 알려진 NANA를 1%(w/w) 희석후 FPLC분석을 실시한 NANA시험구를 사용하였다.

시험구 조성은 다음과 같이 조성하였다. 즉, 대조구(YE-Japan)와 시험구로서는 YE-Maeil를 2%(w/w)되게 희석용액을 각각 제조 한 후 정립된 FPLC분석을 실시하여 분자량 차이를 검정하므로써 개발 효모추출물과의 차이를 확인 하였다.

대조 대비 선발효모로부터 분리한 효모추출물에 대한 분자량 검정을 위한 FPLC분석법은 제 3장 제 1절의 정립된 분석법에 준하여 실시하였다.

#### 마. 세포벽 분리물의 성분조사

유기농 현장선발 효모(*S. cerevise*CKK110426)의 대량배양 및 이를 이용한 기능성 소재의 대량생산시스템이 정립 후 생산된 기능성 소재중 세포벽 분리물에 대한 성분조사를 실시 하였다. 이를 위하여, 대조로서는 *S.cerevise*에서 분리한 BBG( $\beta$ -1,3/1,6-Glucan, 일본 오리엔탈사)를 구입하여 이를 사용하였고(G-Japan), 이를 비교구로 하여 선발효모인 *S.cerevise*CKK110426에서 분리한 세포벽 추출물

(G-Maeil)과 비교하였다.

G-Japan 대비 G-Maeil의 성분 분석은 FT-IR분석시스템을 적용하여 이들의 순도 (Peak analysis System)를 조사하였으며, 영양학적 조성물은 단백질 함유량은 Kjeldahl분석법으로, 조지방 함유량은 Gerber분석법을, 회분의 경우는 회회로 시스템 (650°C, 3시간)분석을 통하여 비교 조사하였다.

### 3. 연구수행결과

#### 가. 선발 효모류내 아미노산 함유량 조사

제조된 4종 및 대조(제니코사, 제빵용 상업효모)에 대한 목표 기능성 소재류 함유량 분석을 위한 효모(압착형 및 분말형)를 준비하여, 효모별로 18종 아미노산을 기준으로 분석을 실시하였으며, 세포벽 및 효모추출물을 제외한 기능성 물질로서 아미노산류의 함유량 차이를 비교하였다(Table 1).

결과로서, 18종의 아미노산을 기준으로 상용효모(대조, 제니코사)의 경우, 효모 100g당 총14mg의 아미노산 함유량이 검출되었는데, *S. cerevisiae*JKK091002의 경우는 11.3mg, *S. cerevisiae*CKK110426은 11.2mg, *S. cerevisiae*OKK110427는 11.4mg으로 유의한 차이는 없었다. 그러나, 이중 효모인 *C.utilis*의 경우는 7.7mg으로 나타나 같은 효모류라 하더라도 분류에 따라 차이가 있음을 알 수 있었다. 그리고, 아미노산 종류별 함유량 차이를 비교하여 목표인 기능성 부분을 선정코져 하였다. 18종 아미노산별 총량(100%)기준으로 비교시, Glutaminic acid가 14%~17%의 점유율을 보여 가장 높게 나타났으며, 다음으로 Asparatic acid가 9.8%~11%범위의 점유율을 보였으며, 이외의 아미노산류는 각각이 최대 8.4%이내의 범위를 보이는 것으로 평가 되었다. 결론적으로, 전체 선발효모류의 아미노산 함유량에 있어 유의한 차이는 없는 것으로 조사 되었고, 따라서, 단백질내 아미노산의 함유량 차이를 이용한 기능성 제과/제빵제조 소재항목에서 제외하였다.

#### 나. 선발 효모류내 미네럴 함유량 조사 결과

정립배지 및 배양법을 적용한 선발효모 4종의 기능성 인자중 미네럴류를 대상으로 이들 함유량 차이를 검정하므서, 미네럴류의 기능성화 여부와 해당 적정효모를 선발코져 하였다(Table 2).

결과로서, 전체 효모류중 *C.utilis*의 미네럴류의 함유량이 전체 *S.cereviase*류에 비하여 전체 미네럴류의 함유량이 전체적으로 높게 나타났다. 즉 상업효모의 경우 칼슘의 함유량은 47mg/Kg이었는데, *C.utilis*의 경우는 11,222mg/Kg으로 나타나 약 26배의 높은 수치를 나타내었으며, *S.cereviase*의 경우는 상업효모는 47mg/Kg이었는데, 선발효모의 경우는 170~812mg/Kg의 함유량차이를 보였고, 칼슘이외 Fe, Zn, Mg 및 P 이온의 검출량도 유사한 경향을 나타냈다.

*S.cereviase*류간 차이를 비교한 결과, 상업효모(대조)의 경우가 전체 선발효모류 4종과

비교할 때, 전체 미네랄 함유량 수치가 가장 낮게 나타났는데, 이는 아마도 실험실적 조건에 적용된 대조효모에 비하여 선발효모의 경우는 야생효모임에 따라 미네랄 함유량 등 전체적인 생리특성이 다르기 때문인 것으로 판단되었다.

선발 *S.cereviase*류간 칼슘을 비롯한 전체 미네랄류를 비교한 결과, *S.cereviase* OKK110427이 가장 높은 수치를 보였으며, 다음으로 *S.cereviase* CKK110426 그리고 *S.cereviase*JKK091002순이었다.

결론적으로, 선발효모중 *C.utilis*의 경우 Fe, Zn 그리고 칼슘순으로 미네랄 고함유 기능성 원료로서 제빵제과 제조시 적용이 가능하다고 판단되었으나, 제빵 발효율과는 무관한 천연 미네랄을 이용하기 위한 첨가 원료로서만 이용할 수 있음을 알 수 있었다. 그리고, 제빵제조가 가능한 발효율을 보였던 *S.cereviase*류의 경우는 미네랄 함유량 수치가 낮음에 따라 효모가 보유한 천연 유기태화 미네랄의 기능성을 활용은 기대할 수 없음을 확인 하였다.

#### 다. 효모추출물내 핵산함유량 분석

대조로 사용한 효모추출물내 핵산류의 함유량 조사를 하여보았더니, 표준체 핵산 19종 대비 Yeast NT(일본 KOHJIN사)의 경우, IMP는 검출되지 않았으며, GMP 9.9%, CMP는 7.6% 그리고 UMP는 8.5% 그리고 AMP의 경우 10.9%가 검출되므로써 이때 전체 핵산류 총합은 36.9%였다.

또 다른 대조로서 효모추출물인 Aromild(KOHJIN사, 일본)의 경우를 살펴 보았더니, IMP는 10.5%, GMP 10.5%, CMP는 7.2% 그리고 UMP는 8.2%였으나, AMP의 경우는 검출이 되지 않았으며, 이때 전체 핵산류 총합은 36.4%였다.

개발효모인 *S.cereviase*CKK110426을 배양시 분취한 효모와 배양액 상등액내 핵산류를 검정하여 보았더니, RNA미분해로 인하여 19종 핵산류중 어떠한 핵산도 검출되지 않았는데, 대량생산시스템을 통한 효모추출물의 경우는 CMP는 65,705ppm, UMP는 82,143ppm, GMP 48,851ppm, IMP 27,365ppm 그리고 AMP의 경우는 6,567ppm의 함유량을 보유하고 있었으며 총량은 27.9%였다.

이상의 결과를 살펴보면 동일한 추출방법을 적용하여 제조하였음에도 불구하고, 핵산별 보유 수치 및 총량등의 차이를 보이는 이유는 아마도 대조 효모추출물의 경우는 *C.utilis*, 그리고 개발효모추출의 경우는 *S.cereviase*기원성임에 따라 효모류라 하더라도 아마 다소 차이를 보이는 것이 아닌가 하고 판단되었다.

#### 라. 효모추출물 분자량 조사 결과

선발효모(*S.cereviase*CKK110426에서 분리한 효모추출물 YE-Maeil와 상업효모추출물 YE-Japan의 분자량을 FPLC검정을 실시하여 분자량 차이를 검정하므로써 개발 효모추출물과의 차이를 확인 하였다(Table 3., Fig 1).

Fig 1.과 Table 3은 분자량을 알고 있는 표준체인 NANA(MW 309)를 기준으로 효모추출분말내 함유되어 있는 핵산류(5종 혼합액)을 기준으로 FPLC분석을 통한 분

자량 검출시간을 검정하여 보았더니 분자량이 309인 경우는 42.44min.에서 검출되었다. 이를 기준으로 상업효모추출물(YE-Japan)과 개발 효모추출물의 분자량을 확인 하여 보았더니, YE-Maeil의 경우는 41.83min.에서 90%가 YE-Japan의 경우는 42.08min.에서 90%가 검출되었다. 이는 NANA분자량이 309임을 감안하고 핵산의 분자량이 평균적으로 140~160Mw임을 감안하면 효모추출물의 경우는 309보다는 분자량이 크지만, 정립된 계산식에 적용시 평균적으로 1,000Mw이하임을 알 수 있었다. 또한, 효모에서 효모추출물을 분리시 가수분해 공정을 적용하였음과 수용성임을 감안하면 대부분이 아미노산 형태로 전환 되어 있음을 알 수 있었다. 10%이내의 분자량 차이를 보이는 이유는 추출 효모종의 차이로 인한 것과 추출방법의 차이로 인한 것으로 판단되었다.

#### 마. 세포벽 분리물의 성분조사

유기농 현장선발 효모(*S. cerevisiae*CKK110426)의 대량배양 및 이를 이용한 기능성 소재의 대량생산시스템이 정립 후 생산된 기능성 소재중 세포벽 분리물에 대한 성분조사를 실시 하였다. 이를 위하여 *S.cerevise*에서 분리한 BBG( $\beta$ -1,3/1,6-Glucan, 일본 오리엔탈사)를 구입하여 이를 대조로 하고(G-Japan), 선발효모인 *S.cerevise*CKK110426에서 분리한 세포벽 추출물(G-Maeil)과 *S.cerevise*OKK110427 두종류를 비교구로 하여 성상을 비교 확인(SEM)하여 보았더니, G-Japan과 유사한 형태를 보였다(Fig 2).

이어서 FT-IR(Peak analysis System)를 조사를 통하여 생화학적 패턴을 조사한 결과에서도 동일한 패턴을 보였으므로 효모별 세포벽 분리체는  $\beta$ -Glucan( $\beta$ -1,3/1,6-Glucan)인 것으로 최종 확인 되었다(Fig 3).

영양학적 함유량을 조사를 통하여 개발한  $\beta$ -Glucan의 순도를 판단하여 보았더니, 단백질 함유량은 0.1% 이내, 조지방의 경우는 검출되지 않았으며 그리고 회분의 경우도 0.1% 이내의 수치를 보여  $\beta$ -Glucan의 순도는 98% 이상임을 알 수 있었다..



Table 1. 정립배지 및 배양법을 적용한 선발효모 4종의 기능성 소재 개발을 위한 아미노산 구성 분석결과(5L Pilot발효결과)

아미노산 종류		아미노산농도(mg/100g)					아미노산(%)				
		SC-CNTL	SC-JKK	SC-CKK	SC-OKK	CU	SC-CNTL	SC-JKK	SC-CKK	SC-OKK	CU
1	Asparatic acid	1,565	1,144	1,131	1,130	750	1.57	1.14	1.13	1.10	0.75
2	Threonine	670.4	579.1	601.3	521.9	427.9	0.67	0.58	0.60	0.52	0.43
3	Serine	737.0	564.5	540.4	559.3	452.9	0.74	0.56	0.54	0.56	0.45
4	Glutamic acid	1,975.6	1,807.2	1,762.5	1,714.3	1,309.5	1.98	1.81	1.76	1.71	1.31
5	Proline	1,014.7	949.7	944.3	943.7	600.6	1.01	0.95	0.94	0.94	1.60
6	Glycine	680.7	518.6	512.2	477.5	352.4	0.68	0.52	0.51	0.48	0.35
7	Alanine	941.6	695.8	750.8	844.9	505.6	0.94	0.70	0.75	0.84	0.51
8	Cysteine	255.4	200.7	202.4	250.6	128.4	0.26	0.20	0.20	0.25	0.13
9	Vline	861.2	565.9	694.9	674.9	484.2	0.86	0.57	0.69	0.67	0.48
10	Methionine	213.8	181.2	204.2	156.6	94.3	0.21	0.18	0.20	0.16	0.09
11	Isoleusine	723.9	558.2	504.1	532.3	359.6	0.72	0.56	0.50	0.53	0.36
12	Leusine	1,026.9	817.3	807.7	799.6	576.9	1.03	0.82	0.81	0.80	0.58
13	Throsine	453.6	286.0	273.8	313.9	188.0	0.45	0.29	0.27	0.31	0.19
14	Phenylalanine	590.8	348.8	156.7	432.2	127.3	0.59	0.35	0.16	0.43	0.13
15	Histidine	330.6	258.0	252.7	253.4	162.2	0.33	0.26	0.25	0.25	0.16
16	Lysine	1,241.6	984.1	1,033.6	1,054.8	583.4	1.24	0.98	1.03	1.05	0.58
17	Arginine	752.2	752.4	735.3	712.8	526.5	0.75	0.75	0.74	0.71	0.53
18	Tryptophane	79.7	80.7	71.1	34.0	53.1	0.08	0.08	0.07	0.03	0.06
합계		14,115	11,292	11,179	10,277	7,683	14.11	11.30	11.15	11.34	8.69

SC-CNTL: *S.cereviase* (Jenico co.), SC-JKK: *S.cereviase* JKK091002, SC-CKK : *S.cereviase* CKK110426, SC-OKK : *S.cereviase* OKK110427, CU: *C.utilis*

Table 2. 정립배지 및 배양법을 적용한 선발효모 4종의 기능성 소재 개발을 위한 미네랄류 함유량 분석결과 (5L Pilot발효결과)

효모류	ICP 측정결과 (Mean±SD, mg/Kg)						
	Ca	P	Mg	Fe	Zn	S	Mn
SC-CNTL	47.0±9.6	3,563±5.1	562.8±3.2	16.2±0.03	129±0.3	2,279±15	ND
SC-JKK	170±7.4	3,039±42	529.5±19.3	31.0±0.1	135±6.5	1,855±11.3	ND
SC-CKK	497±2.3	3,162±26	593.6±2.8	44.6±0.3	157±0.9	1,765±8.9	ND
SC-OKK	812±11	7,887±49	1,602±23	138±0.94	388±2.7	2,706±26	ND
CU	1,222±6.9	11,860±63	1,789±14	103±6.9	543±6.4	2,856±45	ND

SC-CNTL: *S.cereviase* (Jenico co.), SC-JKK: *S.cereviase* JKK091002, SC-CKK :*S.cereviase* CKK110426, SC-OKK : *S.cereviase* OKK110427, CU: *C.utilis*

Table 3 . 상용 효모추출물 대비 개발효모 분리 효모추출물의 성분비교 조사(FPLC)

검출시간별 (RT)	대조(NANA 및 SGCAI) 대비 상용효모추출물 대비 개발 효모추출물 의 분자량 비교조사 결과				비고
	NANA	SGCAI	YEAR	YEMaeil	
41.83	-	-	-	69	
42.08	-	-	90	-	
42.44	100	-	-	-	NANA(MW309)
42.72	-	100	-	-	
45.13	-	-	4.4		
48.93	-	-	4.5	10.9	
52.81	-	-	0.2	19.1	
56.93	-	-	0.8	1.0	
합계	100	100	100	100	

-SGCAI : 분말 GMP(1g)+분말 CMP(1g)+분말 AMP(1g)+분말 IMP(1g) 혼합후, 정제수 50g mass up 조성액중 10ml 분취시료에 대하여 FPLC분석

\* S :Solution, G :5' -GMP, C:5' -CMP, A:5' -AMP, I:5' -IMP

- NANA:1%(w/w) 희석후 FPLC분석

-YE-Japan: *C.utilis* 유래 상용효모추출분말(KOHJIN사, 일본, 상품명 :AROMILD)에 대하여 2% 희석용액 조성후 FPLC분석

- YE-Maeil : *S.cereviase* OKK110427 유래 효모추출물에 대하여 2% 희석용액 제조 후 FPLC분석

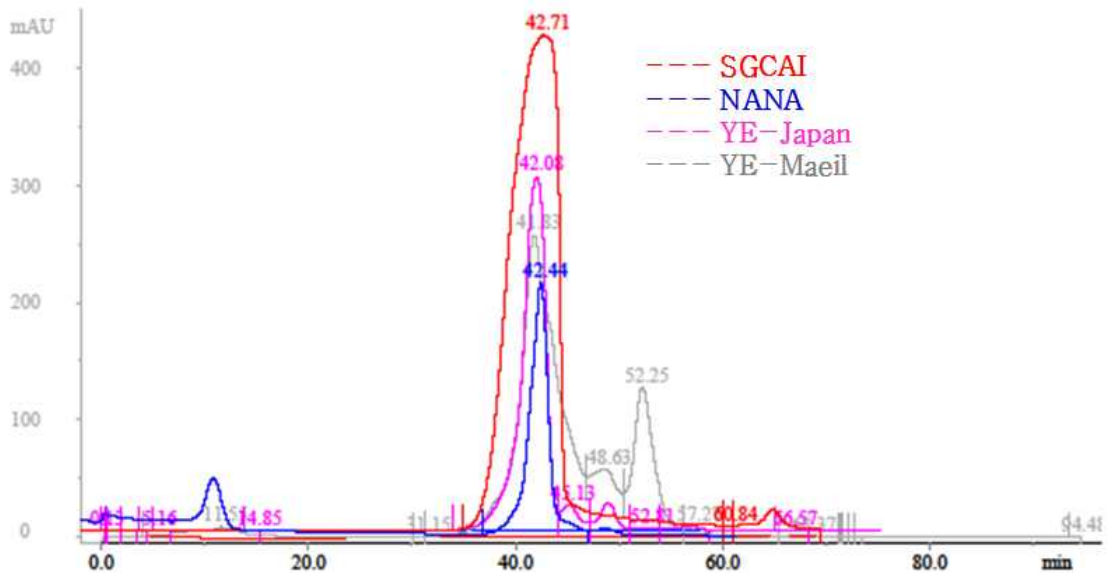


Fig . 1 . 상용 효모추출물 대비 개발효모 분리 효모추출물의 성분비교 조사(FPLC)  
 -SGCAI : 분말 GMP(1g)+분말 CMP(1g)+분말 AMP(1g)+분말 IMP(1g) 혼합 후, 정제수 50g mass up 조성액중 10ml 분취시료에 대하여 FPLC분석  
 \* S :Solution, G :5' -GMP, C:5' -CMP, A:5' -AMP, I:5' -IMP  
 - NANA:1% (w/w) 희석후 FPLC분석  
 -YE-Japan: *C.utilis*유래 상용효모추출분말(KOHJIN사, 일본, 상품명 :AROMILD)에 대하여 2% 희석용액 조성후 FPLC분석  
 - YE-Maeil : *S.cereviase* OKK110427유래 효모추출물에 대하여 2% 희석용액 제조후 FPLC분석

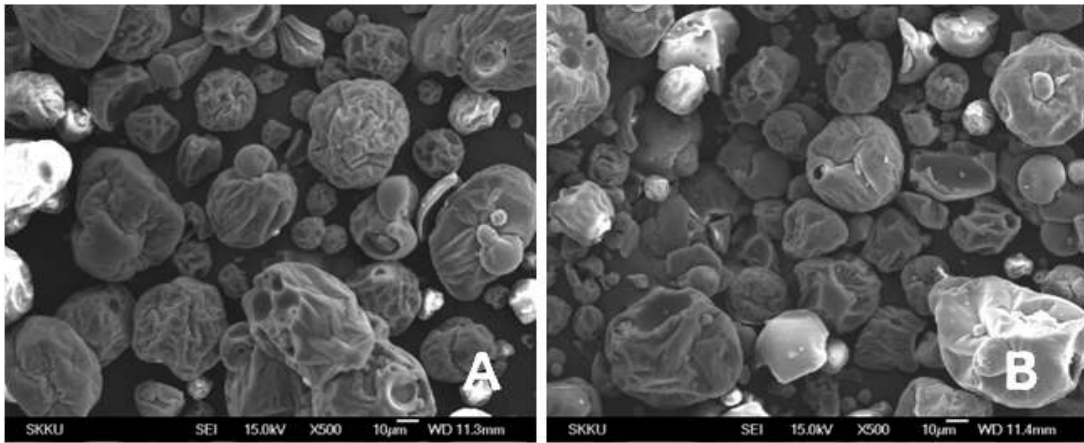


Fig. 2 . 상용효모 분리 세포벽(A) 대비 선발효모로부터 분리한 세포벽(B) 정상 비교 조사(x500, SEM)

A: 대조 *S.cerevisiae* 분리 효모 (오리엔탈사, 일본) B : 선발 *S.cerevisiae* OKK110427로부터 분리한 세포벽 동결건조물

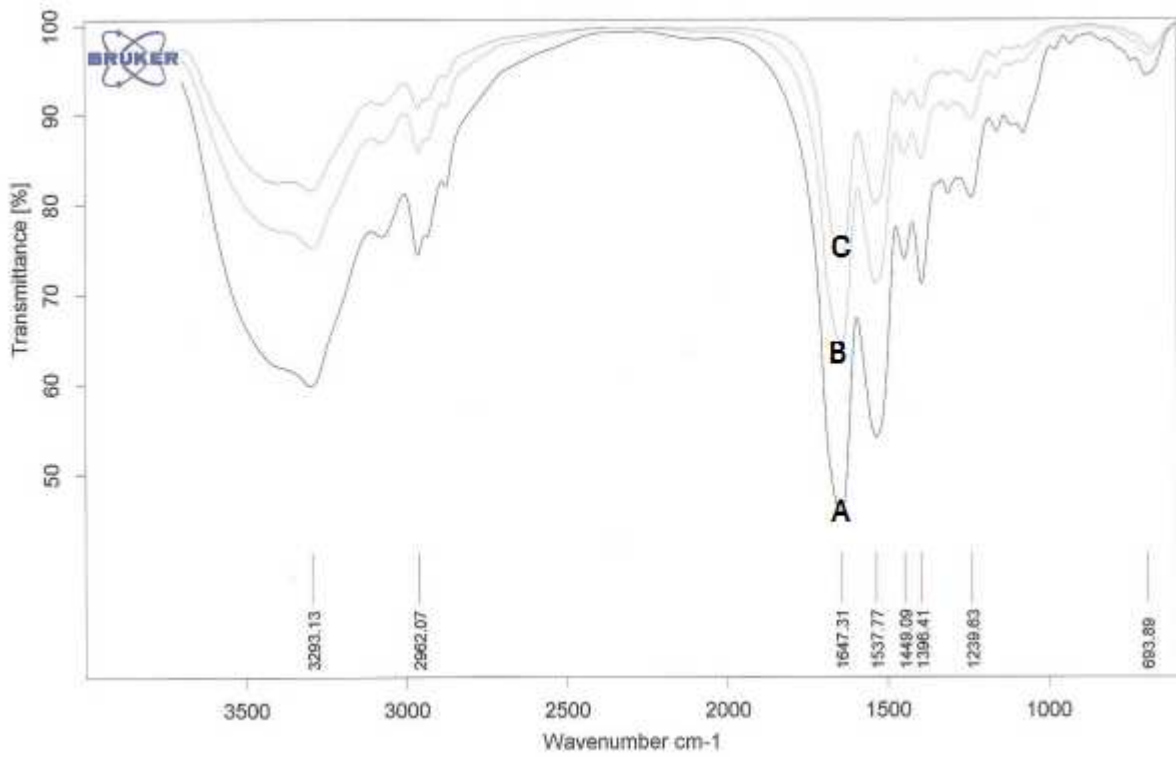


Fig. 3 . 상용효모 분리 세포벽(A) 대비 선발효모로부터 분리한 세포벽(B, C) 정상 비교 조사(x500).

A: 대조 *S.cereviase* 분리효모(오리엔탈사, 일본), B : *S.cereviase* OKK110427,  
 C: *S.cereviase*CKK110426

## 5-2. 선발효모 제형별 장기 보관성 평가

### 1. 연구목적

본 연구는 유기농 농업현장에서 분리한 개발효모가 Wild type임에 따라 제품화 제형별(압착형, 건조분말형), 보관조건(상온, 냉장)을 다르게 조성한 후 장단기 경과시간에 따른 균수의 변화를 검정하였으며, 검정결과를 토대로 최종 제품화에 있어 가장 중요한 표기 항목인 보관기간 및 보관방법을 설정코 저 하였다.

### 2. 연구수행방법

#### 가. 선발효모 제형별 장기 보관성 평가

본 연구간 공시효모균은 상업용 및 개발효모를 대상으로 제형별로 구분하여 사용하였다. 즉, 상업효모(Jenico사, 한국)는 압착형(수분 : 70%)과 건조분말형으로 구분 구입하여 대조구로 사용하였으며, 시험구는 개발효모(*S. cereviase* JKK100902)를 역시 압착형(수분 : 74%)과 건조분말형(동결건조)으로 구분 비교검정하였다.전체 시험간 사용된 재료는 완제품을 기준으로 사용하였다(Fig 1).

장기 보관성을 확인하기 위한 보관온도는 상온(25℃)과 냉장(5℃)로 구분하였고, 보존기간은 0일, 30일 그리고 1년(365일)으로 정하여 실시하였다.

결과확인온 보관기간별로 색상, 형태변화 및 이취 등의 발생유무 및 곰팡이균 발생 유무를 조사하였고, 시간경과별로 효모콜로니수를 병행 조사하였다(PDA, 25℃, 24 시간 배양).

#### 나. 선발효모 장기보관에 따른 제빵발효율 증감조사

##### 1) 선발효모별 발효율 평가

선발효모 장기보관에 따른 제빵발효율의 증감에 미치는 효과 평가는 “식빵”을 시료로 하여 기본 제조법은 일반 상용효모를 적용하여 진행되는 과정에 준하여 실시하였다. 즉, 밀가루 1,200g기준으로 물 744g, 생이스트 50g(분말형 25g), 이스트푸드 2g, 소금 24g, 설탕 60g,쇼트닝 36g 그리고 탈지분유 48g을 기본 배합비로 하여, 반죽과정에 이어 1차 발효, 성형 및 패닝과정과 2차 발효과정을 거쳐 최종 굽기과정까지 일관되게 진행하였는데, 상업효모 대신 선발효모를 대체 사용하는 이외는 전체 공정을 동일하게 적용하였다. 이를 위해 적용된 식빵 레시피는 Table 2과 같으며, 스테이트법을 기준으로 하였다.

평가를 위해 사용된 선발효모(*S.cereviase*OKK110427)를 우선 냉장조건하에서 45일동안 보관하고, 목표 시간이 경과시 제빵 발효율의 증감에 미치는 효과를 “식빵”을 대상으로 비교 하였다.

대조로서 분말형과 압착효모형 상업효모를 구입(르샤프사, 프랑스)한 후 이를 대조

로 하여 45일간 냉장보관된 선발효모(*S.cereviase*OKK110427)을 역시 압착효모형 및 동결건조형으로 구분하여 식빵레시피에 적용하여 발효율 및 상품성(관능평가)를 비교 확인하였다(Fig 1).

검정항목으로서, 제빵의 높이(mm, Y축), oven jumping(mm), 폭(mm, X축) 및 폭(mm, Z축)으로 구분하여 비교하였으며 최종발효율(상용효모 대비, %)을 확인하였다.

## 2) 선발효모 제빵적용성 평가(관능평가)

선발효모 장기보관에 따른 제빵발효율의 증감에 미치는 효과 평가는 “식빵”을 제조 후 상품성 평가를 위한 관능평가를 실시하였는데, 전문 교육을 이수한 관능평가 패널(n=18명) 검정을 통하여 비교하였는데, 본 연구의 핵심이 장기보관시 발효율에 미치는 효모 활성이므로, 관능평가 항목은 식감과 효모취로만 구분하여 실시하였다(Table 3).

## 3) 통계처리

상업효모 대비 개발효모 종류별 제빵적용성 평가에 따른 기호성은 SAS Program을 이용하여 통계분석을 실시 하였는데, 이때 유의성 차이는 95%수준(P<0.05)에서 ANOVA Test후 Duncan's multiple range test에 의해 검정하였다.

## 3. 연구수행결과

### 가. 선발효모 제형별 장기 보관성 평가

장단기 보관에 따른 효모균수 변화 조사결과, 상업효모 대비 개발효모 공히 1개월 이상 장기보관시(최초 : $10^{10}$ cfu/g)는 제형 및 보관온도에 상관없이 최대 20%까지( $\times 10^7 \sim \times 10^8$ cfu/g) 균감소 결과를 보였는데, 이때 보관온도조건과는 무관하였다(Table 1, P<0.05).

시간경과 및 보관조건에 따라 성장 변화에 미치는 결과로서, 압착효모의 경우는 시간이 경과하면 곰팡이, 갈변화 및 이취 심하게 발생하였으며, 건조효모는 제조 미제품특성상 이와는 무관하였다(Fig 2, P<0.05).

보존기간 30일(냉장보관)이 경과시에 압착효모기준으로 효모균수 변화를 검정(0일 기준)하여 보았더니, 개발효모가 72배( $1.3 \times 10^{12}$ cfu/g) 증가하였는데 반하여 상업효모는 43배( $4.3 \times 10^{11}$ cfu/g)가 증가하는 결과를 보였는데, 이는 개발효모다 야생에서 분리한 특성으로 인한 것으로 판단 되었으나, 1년이 경과시는 100배가 감소하는 것으로 조사되었다. 이 결과로 보아 개발효모를 장기보관시 생존능력이 우월하다는 것을 알 수 있었으며, 제빵적용시도 역시 우위를 보일 것으로 예상되었다(P<0.05).

이러한 결과는 냉장조건하에서 1개월 경과시(기준), 제빵 적용성 평가가 필요하다고, 이 결과를 토대로 보존성 결과를 결정하여야 할 것으로 판단되었다(Table 1).



결론적으로 개발효모의 경우는 냉장조건하에서 압착효모의 보관성은 1개월 이내 그리고 분말형은 1년으로 결정하였다.

나. 선발효모 장기보관(45일, 냉장보관)에 따른 제빵발효율 증감조사

Fig 3~4 및 Table 3은 선발효모(*S.cereviase*OKK110427)에 대하여 냉장조건하에서 45일이 경과시 제빵 발효율의 증감에 미치는 효과를 “식빵”을 대상으로 비교하였다. 대조로서 분말형과 압착효모형 상업효모를 구입(르샤프사, 프랑스)한 후 이를 대조로 하여 45일간 냉장보관된 선발효모(*S.cereviase*OKK110427)을 역시 압착효모형 및 동결건조형으로 구분하여 식빵레시피에 적용하여 발효율 및 상품성(관능평가)를 비교 확인하였다.

결과로서, 구입 및 제조후 즉시 사용한 대조와 선발효모(압착효모)의 경우에서, 대조(분말형)구의 발효율은 100~110%, 선발효모(압착효모형)의 경우는 102~113%의 발효율을 보였다. 그러나, 45일 이 경과시 선발효모에서 분말형의 경우는 90%의 발효율을 보임으로서 선행연구에서 결과와 큰 차이를 보이지 않음으로서 효모의 활성을 보유하고 있는 것으로 평가 되었으나, 압착효모의 경우는 발효율이 40%로 감소되어 있었다. 따라서, 압착효모의 경우 보관 시간이 경과하면 할 수록 효모의 활성이 감소되는 것을 추가로 확인할 수 있었다.

또한, 45일 보관후 시험구별 제빵 제조후 각각에 대한 관능평가를 실시한 결과, 45일이 경과되더라도 분말형 선발효모의 경우는 대조 대비 효모취는 감소되었고 식감 또한 증대되는 효과를 유지하는 것으로 평가 되었다.

Table 1. 상업효모 대비 개발효모의 제형별, 보관조건에 따른 장단기경과시 균수변화에 미치는 결과

효모종류	보관기간(일)	효모의 보관조건(기간 및 온도)에 따른 효모균수 변화조사(cfu/g)	
		상온(25℃)	저온(5℃)
상업효모 (압착형)	0	$1.0 \times 10^{10}$	$1.0 \times 10^{10}$
	30	NT	$4.3 \times 10^{11}$
	365	$8.2 \times 10^7$	$2.4 \times 10^7$
상업효모 (건조형)	0	$2.7 \times 10^{10}$	$2.7 \times 10^{10}$
	30	NT	$1.6 \times 10^{12}$
	365	$6.0 \times 10^7$	$2.7 \times 10^8$
개발효모 (압착형)	0	$1.8 \times 10^{10}$	$1.8 \times 10^{10}$
	30	NT	$1.3 \times 10^{12}$
	365	$9.2 \times 10^7$	$3.2 \times 10^8$
개발효모 (건조형)	0	$2.6 \times 10^{10}$	$2.6 \times 10^{10}$
	30	NT	$1.7 \times 10^{10}$
	365	$3.1 \times 10^7$	$2.8 \times 10^8$



Fig 1 . 상업효모 대비 개발효모의 제형별(압착형 및 건조형) 성상  
 (A): 상용효모(압착형), (B): 개발효모(압착형), (C): 상업효모(건조분말형),  
 (D) : 개발효모(동결건조형)



Fig 2 . 상업효모 대비 개발효모의 보관조건별(A : 25℃ 상온, B : 5℃ 저온), 장기경과(1년)시 효모성장 변화조사.

1 : 상업효모(건조형, 상온, 0일보관), 1-1 : 개발효모(건조형, 상온 0일), 2 : 상업효모(압착형, 상온 0일), 2-1: 개발효모(압착형, 상온 0일), 3 : 상업효모(건조형, 상온 ,1년보관), 3-1 : 개발효모(건조형, 상온 1년), 4 : 상업효모(압착형, 상온 1년), 4-1: 개발효모(압착형, 상온 1년), 5 : 상업효모(건조형, 저온, 0일보관), 5-1 : 개발효모(건조형, 저온 0일), 6 : 상업효모(압착형, 저온 0일), 6-1: 개발효모(압착형, 저온 0일), 7 : 상업효모(건조형, 저온 ,1년보관), 7-1 : 개발효모(건조형, 저온 1년), 8 : 상업효모(압착형, 저온 1년), 8-1: 개발효모(압착형, 저온 1년)

Table 3. 식빵 레시피를 기준으로 선발효모의 제형별 장기보관(45일, 냉장보관)이 제빵/제과 발효성에 미치는 평가를 위한 시험디자인

시험항목		장기 보관에 따른 제빵 적용성평가를 위한 레시피		
		분말형 상업효모 (대조,르사프사)	분말형 개발효모 (S.cereviaseOKK110427)	압착효모형 개발효모 (S.cereviaseOKK110427)
적용제조 레시피 (g)		강력분 1,400	강력분 1,400	강력분 1,400
		물 744	물 744	물 744
		분말형 25	분말효모 25	압착효모 50
		이스트푸드 2	이스트푸드 2	이스트푸드 2
		소금 24	소금 24	소금 24
		설탕 60	설탕 60	설탕 60
		쇼트닝 36	쇼트닝 36	쇼트닝 36
		탈지분유 48	탈지분유 48	탈지분유 48
제빵적용성 평가 (숙성조건: 온도/습도/ 시간)	1차 발효	37℃/78%/30분		
	중간 발효	실온/20~30%/25분		
	2차 발효	37℃/78%/30분		
제빵적용성평가 (굽기: 온도,분)		170℃(오븐상층)/190℃오븐하층), 25분		



Fig. 3. 식빵 레시피를 기준으로 선발효모의 제형별 장기보관(45일, 냉장보관)이 제빵/제과 발효성에 미치는 평가 결과



분말형상업효모(르샤프사)

분말형개발효모

압착형개발효모

***S.cereviaseOKK110427***

Fig. 4 . 식빵 레시피를 기준으로 선발효모의 제형별 장기보관(45일, 냉장보관)이 제빵/제과 발효성에 미치는 평가 결과

Table 3. 식빵 레시피를 기준으로 선발효모(*S.cereviase*OKK110427)의 제형별 장기보관(45일, 냉장보관)이 제빵/제과(원형) 발효율에 미치는 영향 및 관능평가 결과

적용효모	높이(mm)		시간경과별 발효율(% , 35℃, 수분 80%)		식감	효모취	비고
	전체	Oven Jumping	30분	90분			
<i>S.cereviase</i> (POWDER, 7day)	138±0.8	55±0.4	100	110	2 (기준)	### (기준)	상업효모 (동결건조형, 르샤프사)
OKK-COMPACT (7 day)	141±1.3	56±0.6	102	113	2	#	제조후 7일이내
OKK-POWDER (45day)	102±0.7	33±0.8	50	90	3	#	동결건조형 (45일후)
OKK-COMPACT (45day)	86.3±0.3	28±0.5	30	40	-	-	압착효모형 (45일후)

식감(대조 대비):: 1(매우나쁨), 2(보통), 3(좋음), 4(매우좋음)

효모취(대조 대비) : ###(매우심함), ##(심함), #(보통)

- : Not Testing



## 제 6 절. 개발 효모 및 기능성소재별 제품적용성 평가

### 1. 연구목적

유기농 현장선발 효모(*S.cereviase* CKK110426)에서 분리한 기능성 소재별(세포벽:  $\beta$ -Glucan, 핵산 함유 효모추출물)의 경우는 소재별 특성이 각기 다르다 예측할 수 있는데, 적용성 확대를 위한 차원에서 이들의 특성 파악은 중요하다 할 수 있다. 그 중 본 과제와 관련 제과·제빵분야로의 소재 개발을 위하여는 열안전성 평가는 중요한 항목이라 할 수 있다.

기능성 소재류중 효모추출물의 경우는 단백질원이므로 60℃이상의 열처리 조건에서는 열변성이 발생이 예상되며, 동시에 핵산류 및  $\beta$ -Glucan(세포벽)성분을 포함한 개발된 기능성 소재들에 대한 열처리조건에 대한 안정(전)성 결과를 확보는 필요한 항목이다.

따라서, 유기농 현장선발 효모와 분리 기능성 소재(세포벽:  $\beta$ -Glucan, 핵산 함유 추출물)별로 구분한 후 이를 액상형(2%, w/w)과 분말형으로 조성하여 여기에 저온에서부터 고온범위까지 온도구배 조건에서 열안정성 검정 결과를 토대로 최종 제과·제빵용 적용시 염려되는 기능성소재가 보유하고 있는 기능성의 소멸여부와 관련한 안전(정)성을 미리 예측코져 하였다.

### 2. 연구수행방법

#### 가. 개발효모 및 기능성 소재별 열안전성 평가

##### 1) 기능성 소재 준비

기능성 소재류에 대한 열안전성 평가를 위해 총 7종의 소재를 준비하여 사용하였다. 대조구로서는 전지분유(매일유업, 이하, W-Milk)를 사용하였으며, 비교구로서는 *S.cereviase*유래 세포벽 동결건조시료(일본 오리엔탈사, 이하 G-Japan), *C.utilis*유래 효모추출물 동결건조시료(제품명: YEAST-NT, 일본 KOHJIN사, 이하 YENT-Japan), 동일 *C.utilis*유래 효모추출물하면서 핵산의 함유량이 다른 동결건조 효모추출물시료(제품명: AROMILD., 일본 KOHJIN사, 이하 YEA-Japan)를 구입하여 사용하였다.

본 연구개발간 목표인 제과·제빵 적용성 평가를 위한 시험구로서는 개발효모인 *S.cereviase*OKK110427(이하SCOKK)와 동일효모에서 분리한 세포벽 동결건조시료(이하, G-Maeil)와 효모추출물 동결건조시료(이하, YE-Maeil)를 각각 준비하여 전체 시험간 적용하였다.

##### 2) 시료 준비

준비된 기능성 소재의 열안전성 평가를 위하여, 고상형의 경우는 자체를 열안전성 평가용 시료병에 동일량을 채취한 후 열처리를 공정을 실시하였다. 고상형 개발기능성 소재

에 대한 열처리 조건은 Table 1에 제시하였다.

특히 고상형의 경우는 열안전성 평가시, 고온조건에서 외부완충(수분 등) 관련 인자가 존재하지 않기 때문에 직접적인 관능평가가 가능하지만 외부완충 인자를 몰로서 부여한 조건인 액상형의 경우는 열처리 조건에 따라 다른 결과가 도출될 것으로 판단되어 동일 고상시료를 각각 2% (w/w)되에 정제수에 희석하여 동일열처리 조건으로 실시하였다. 이를 위하여 소재로는 효모추출물만을 대상으로 실시하였는데, 대조로서는 *C.utilis*유래의 효모추출물(상품명, Aromild, 일본 KOJIN사) 그리고 시험구로서는 개발 *S.cerevise*OKK110427에서 분리한 효모추출물을 사용하였으며, 액상형으로 조성된 개발기능성 소재에 대한 열처리 조건은 Table 2에 제시하였다.

열안전성 평가를 위한 열처리조건은 고상형으로 각각 준비된 기능성 소재에 대하여, 비열처리구를 대조로 열처리 조건을 3등급(75℃, 90℃, 110℃), 액상형의 경우는 121℃를 추가하여 실시하였으며, 전체시험구에 대하여 처리시간 및 횟수는 30분, 1회로 정하여 적용하였다(Table 1~2).

### 3) 핵산류에 대한 열안전성 평가

선발효모에서 추출한 효모추출액을 RNAase처리시 효모추출물 이외 기능성 소재인 핵산류는 4종(GMP, CMP, AMP, UMP)이 대표적으로 함유 되어 있었다. 따라서, 기능성 소재인 핵산류의 제과·제빵적용성 및 용도용법 확대를 위하여, 고상형 및 액상(2%, w/w)상태에서 열안정성 검정을 실시하였다.

검정을 위한 핵산류 표준체인 5' -CMP, 5' -AMP, 5' -GMP, 5' -IMP를 각각 구입(CJTIDE사, 한국)하여 이를 사용하였다.

핵산류에 대한 열안전성 평가를 위한 시험구 조성은 다음과 같이 고상형과 액상형으로 구분하여 조성하였다.

고상형의 경우는 구입한 4종 표준체 각각을 검정병(50ml)내에 1g씩을 충전하였고, 액상형의 경우는 STock 용액을 조성후 이를 역시 검정병내에 동일량을 분취하여 온도조건 별 열안전성 평가에 적용하였다.

핵산류가 열에 대한 완충인자(물)에 대한 열안전성에 미치는 효과를 평가하기 위한 조성용액은 다음과 같이 준비하였다. 즉, 분말 GMP(1g)+분말 CMP(1g)+분말 AMP(1g)+분말 IMP(1g) 혼합한 휴 여기에 정제수를 추가하며 최종 50g mass up후 이를 5등분후 사용하였다.

열안전성 평가를 위한 열처리조건은 각각 준비된 기능성 소재(고상 분말형, 액상형)에 대하여, 비열처리구를 대조로 열처리 조건을 4등급(75℃, 90℃, 110℃ 및 121℃)으로 정하여 실시하였으며, 전체 시험구에 대하여 처리시간 및 횟수는 30분, 1회로 정하여 적용하였으며, 전체 시험구 및 시험구별 조성 내역은 Table 3에 제시하였다.

### 4) 액상조건에서 핵산류의 장기보관성 평가

핵산류의 화학구조는 리보오스 1분자와 특정 아미노산 및 P을 보유하고 있는 공통 구

조를 보유하고 있는데 이는 구조적으로 볼때 분말상이 아닌 액상상태에서 시간이 경과하면 분자구조의 안전성이 문제가 생길 수 있다고 판단되었다.

따라서, 본 실험에서는 상기 5종의 핵산류 Mixer용액을 장기보관시 안정성 평가과정을 FPLC분석을 실시함으로써 제품적용시 효능을 확보코져 하였다

이를 확인 하여 보고져 본 실험에서는 상기 5종의 핵산류 Mixer용액을 장기보관시 안정성 평가과정을 FPLC분석을 실시함으로써 제품적용시 효능을 확보코져 하였다.

이를 위한 시험구는 구입된 표준 핵산을 CMP 0.1g, GMP 0.1g, AMP 0.1g 및 IMP 0.1g을 혼합한 후 여기에 정제수 10g 혼합하는 용액으로 조성하고 즉시 FPLC검정을 통하여 분자량을 조사하였다.

그리고, 25℃ 항온보관 조건에서 31일 경과시 추가 FPLC검정을 실시하여 최초결과와 비교함으로써 장가 보관에 따른 물성변화를 평가하였다. 분석간 표준체로서는 1%(w/w)로 희석한 NANA용액(Mw : 309)을 FPLC검정시 즉시 만들어 검정에 따른 신뢰도를 확인하였다.

#### 5) 결과 도출

선발 효모 및 기능성 소재를 대상으로 한 열안전성 평가를 위하여, 대조인 전지분유를 기준으로 선발 소재별로 열처리조건별 차이를 비교하였다.

즉, 분말형의 경우는 성상변화(관능평가)만을 비교하였고, 액상형의 경우는 성상변화와 더불어 FPLC 검정(제 3절 필수분석법 정립 참고)을 실시하여 열처리 전후의 분자량 변화를 비교하여 열안전성 결과를 평가 하였다.

### 3. 연구수행결과

#### 가. 개발효모 및 기능성 소재별 열안전성 평가

##### 1) 세포벽( $\beta$ -Glucan) 및 효모추출물

유기농 현장선발 효모와 분리 기능성 소재(세포벽:  $\beta$ -Glucan, 핵산 함유 추출물)별로 구분한 후 이를 액상형(2%, w/w)과 분말형으로 조성하여 여기에 저온에서부터 고온 범위까지 온도구배 조건에서 열안정성 검정 결과를 토대로 최종 제과·제빵용 적용시 염려되는 기능성소재가 보유하고 있는 기능성의 소멸여부와 관련한 안전(정)성을 미리 예측코져 하였다(Table 1~2).

결과로서, 분말형의 경우는 세포벽 분리물( $\beta$ -Glucan)의 경우는 비열처리 대비 온도별 열처리 조건에서 외형적인 변화는 없었다. 그러나, 세포벽 분리물( $\beta$ -Glucan)이외의 선발 소재의 경우는 온도에 비례하여 갈변화가 심하게 발생하는 결과를 보였다(Fig 1).

대조 소재인 전지분유를 기준으로 비열처리(상온)와 75℃범위에서는 성상의 변화가 유발되지 않았는데, 이는 유단백질이 열처리시 70℃ 부터 변성이 일어나기는 하지만 외형의 변화는 인지 되지 않는다는 기보고 결과와 일치하였다.

전지분유의 열처리 결과를 기준으로 효모추출물 소재의 온도별 처리에 따른 성상변화를 평가하여 보았더니, 역시 90℃이상의 열처리 성상변화(갈변화)가 유발되었으며, 온도가 높아지면 비례하는 결과를 보였다. 이는 세포벽 이외의 효모추출물의 경우 단백질원이 주성분임을 감안 할 때 역시 온도에 따른 성상변화는 단백질원의 변성에 따른 것이라는 것을 알 수 있었다.

분말형이 직접적인 열원의 영향을 받으면서 변성이 일어났음에 비교하여, 열원에 대한 완충인자로서 물을 사용한 액상형의 경우에는 어떠한 차이점이 나타나는지를 확인하여 보았더니 분말형과 다르게 성상변화(갈변화) 및 분자량 변화는 없었다. 이러한 결과는 전체 기능성 소재를 제과·제빵 레시피에 적용시, 배합재료중 물을 사용하고 굽기과정에서 표면온도(상관온도 170~200℃, 바닥온도 190~200℃)와는 다르게 대상 제빵 및 제과의 내부온도가 100℃범위이며, 굽기시간이 30분 이내임을 고려하면 기능성 소재의 적용에 문제가 없을 것으로 판단되었다.

따라서, 기능성 소재를 제과·제빵 적용성에 있어 고상형보다는 액상형 처리가 효과적이라고 판단되었다.

## 2) 핵산류에 대한 열안정성 평가 결과

선발효모에서 추출한 효모추출액을 RNAase처리시 효모추출물 이외 기능성 소재인 핵산류는 4종(GMP, CMP, AMP, UMP)이 대표적으로 함유 되어 있었다. 따라서, 기능성 소재인 핵산류를 제과·제빵적용성 및 용도용법 확대를 위하여, 고상형 및 액상(2%, w/w)상태에서 열안정성 검정을 실시하였다.

즉, 분말형이 직접적인 열원의 영향을 받으면서 변성이 일어났음에 비교하여, 열원에 대한 완충인자로서 물을 사용한 액상형의 경우에는 어떠한 차이점이 나타나는지를 확인하여 보았더니, 대조 대비 고상 및 액상형 시험구에서 공히 70℃이상의 고열에서 핵산류 고유분자구조가 파괴되면서 성상(갈변화)변화가 나타났는데, 이는 온도에 비례하여 증가하는 결과를 보였다(Table 4., Fig 6~7).

액상처리구중 대조(비열처리) 대비 열처리 조건별 분자량의 변화를 확인함으로써 실제적인 물성변화가 일어나는 패턴을 확인하여 보았다(Table 4., Fig 7).

결과로서, 4종 핵산류가 혼합된 핵산조성액의 비열처리시 FPLC 검출량은 100%였으며, 이를 기준으로 75℃의 열처리조건에서는 98%의 검출량을 보여 2%정도의 분자량 감소 효과가 발생하였으며, 감소된 부분의 패턴을 조사하여 보았더니 분자량이 당초 분자량보다 적은 물성 즉 핵산분자가 파괴됨으로 감소된 결과였다.

이를 기준으로 90℃조건으로 열처리시는 92%, 110℃에서는 64% 그리고 최고고온조건인 121℃조건에서는 55%의 검출량을 보여 온도가 90℃이상의 조건에서는 급격한 핵산고유분자의 파괴현상이 발생하는 것으로 조사되었다.

따라서, 효모추출물내 핵산의 기능성을 유지하기 위하여는 90℃이하의 적용조건을 준수하여야 함을 알 수 있었으며, 본 연구의 목표인 제과 및 제빵 레시피 정립간 기본 굽기조건에서 핵산류의 기능성을 기대하기는 어려울 것으로 판단되었으며, 사용시는 열을 사용

하지 않는 제품 및 소재로의 활용이 필요하다고 판단되었다.

### 3) 액상조건에서 핵산류의 장기보관성 평가

핵산류의 화학구조는 리보오스 1분자와 특정 아미노산 및 P를 보유하고 있는 공통 구조를 보유하고 있는데, 이는 구조적으로 볼때 분말상이 아닌 액상상태에서 시간이 경과하면 분자구조의 안전성이 문제가 생길 수 있다고 판단되었다. 따라서, 본 실험에서는 상기 5종의 핵산류 Mixer용액을 31일간 장기보관시 안정성 평가과정을 FPLC분석을 실시함으로써 제품적용시 효능을 확보코저 하였다

결과로서, 액상조건에서는 핵산류는 시간이 경과되면 열처리시와 동일하게 최초의 핵산 분자구조가 파괴되어 저분자화 되는 방향으로 분자량 변화가 유발되었는데, 이는 핵산류의 제품화 적용시는 분말상 보관 및 액상적용시는 단시간에 사용하여야 함을 알 수 있었다(Fig 9).

Table 1. 기능성 소재별(고상형 기준) 열안전성 평가를 위한 시험디자인

시험구		시험구조성내역	비고
Control	Wmilk(CNTL)	전지분유(매일유업) 비열처리(대조) - :	
	WMilk( 75)	전지분유(매일유업) 열처리(75℃,30분, 1회)	
	WMilk( 90)	전지분유(매일유업) 열처리(90℃,30분, 1회)	
	WMilk(110)	전지분유(매일유업) 열처리(110℃,30분, 1회)	
비교구	GJapan (CNTL)	<i>S.cereviase</i> ( $\beta$ -glucan) 비열처리(대조)	
	GJapan(75)	<i>S.cereviase</i> ( $\beta$ -glucan) 열처리(75℃,30분, 1회)	
	GJapan(90)	<i>S.cereviase</i> ( $\beta$ -glucan) 열처리(90℃,30분, 1회)	
	GJapan(110)	<i>S.cereviase</i> ( $\beta$ -glucan) 열처리(110℃,30분, 1회)	
	YEA-Japan(CNTL)	<i>C.utilis</i> 효모추출물(AROMILD) 비열처리(대조)	
	YEA-Japan(75)	<i>C.utilis</i> 효모추출물(AROMILD) 열처리(75℃,30분, 1회)	
	YEA-Japan(90)	<i>C.utilis</i> 효모추출물(AROMILD) 열처리(90℃,30분, 1회)	
	YEA-Japan(110)	<i>C.utilis</i> 효모추출물(AROMILD) 열처리(110℃,30분, 1회)	
	YENT-Japan(CNTL)	<i>C.utilis</i> 효모추출물(Yeast-NT) 비열처리(대조)	
	YENT-Japan(75)	<i>C.utilis</i> 효모추출물(Yeast-NT) 열처리(75℃,30분, 1회)	
	YENT-Japan(90)	<i>C.utilis</i> 효모추출물(Yeast-NT) 열처리(90℃,30분, 1회)	
	YENT-Japan(110)	<i>C.utilis</i> 효모추출물(Yeast-NT) 열처리(110℃,30분, 1회)	
처리구	SCOKK(CNTL)	<i>S.cereviase</i> OKK110427 비열처리(대조)	
	SCOKK(75)	<i>S.cereviase</i> OKK110427 열처리(75℃,30분, 1회)	
	SCOKK(90)	<i>S.cereviase</i> OKK110427 열처리(90℃,30분, 1회)	
	SCOKK(110)	<i>S.cereviase</i> OKK110427 열처리(110℃,30분, 1회)	
	GMaeil(CNTL)	<i>S.cereviase</i> OKK110427Cel wall 분리(비열처리,대조)	
	GMaeil(75)	<i>S.cereviase</i> OKK110427CellWall분리(75℃,30분,1회)	
	GMaeil(90)	<i>S.cereviase</i> OKK110427CellWall분리(90℃,30분,1회)	
	GMaeil(110)	<i>S.cereviase</i> OKK110427CellWall분리(110℃,30분,1회)	
	YEMaeil(CNTL)	<i>S.cereviase</i> OKK110427효모추출물(비열처리, 대조)	
	YEMaeil(75)	<i>S.cereviase</i> OKK110427효모추출물(75℃,30분, 1회)	
	YEMaeil(90)	<i>S.cereviase</i> OKK110427효모추출물(90℃,30분, 1회)	
	YEMaeil(110)	<i>S.cereviase</i> OKK110427효모추출물(110℃,30분, 1회)	

Table 2. 상용 및 개발 효모추출물을 대상으로 액상조건에서 열처리가 물성에 미치는 열안 전성 평가를 위한 시험디자인

시험구	시험구구성내역
YEA-Japan(CNTL)	<i>C.utilis</i> 효모추출물 (AROMILD) 비열처리 (대조)
YEA-Japan(75)	<i>C.utilis</i> 효모추출물 (AROMILD) 열처리 (75℃,30분, 1회)
비교구 YEA-Japan(90)	<i>C.utilis</i> 효모추출물 (AROMILD) 열처리 (90℃,30분, 1회)
YEA-Japan(110)	<i>C.utilis</i> 효모추출물 (AROMILD) 열처리 (110℃,30분, 1회)
YEA-Japan(110)	<i>C.utilis</i> 효모추출물 (AROMILD) 열처리 (121℃,30분, 1회)
YEMaeil(CNTL)	<i>S.cereviase</i> OKK110427효모추출물 (비열처리, 대조)
YEMaeil(75)	<i>S.cereviase</i> OKK110427효모추출물 (75℃,30분, 1회)
시험구 YEMaeil(90)	<i>S.cereviase</i> OKK110427효모추출물 (90℃,30분, 1회)
YEMaeil(110)	<i>S.cereviase</i> OKK110427효모추출물 (110℃,30분, 1회)
YEMaeil(121)	<i>S.cereviase</i> OKK110427효모추출물 (121℃,30분, 1회)

Table 3. 혼합핵산류를 대상으로 분말형 및 액상형 조건에서 열처리가 물성에 미치는 열 안전성 평가를 위한 시험디자인

시험구	시험구조성내역
PGCAI-CNTL	분말 GMP(1g)+분말 CMP(1g)+분말 AMP(1g)+분말 IMP(1g) 혼합, 비열처리(대조)
PGCAI(75)	분말 GMP(1g)+분말 CMP(1g)+분말 AMP(1g)+분말 IMP(1g) 혼합, 열처리(75℃,30분, 1회)
분말형 PGCAI(90)	분말 GMP(1g)+분말 CMP(1g)+분말 AMP(1g)+분말 IMP(1g) 혼합, 열처리(90℃,30분, 1회)
PGCAI(110)	분말 GMP(1g)+분말 CMP(1g)+분말 AMP(1g)+분말 IMP(1g) 혼합, 열처리(110℃,30분, 1회)
PGCAI(110)	분말 GMP(1g)+분말 CMP(1g)+분말 AMP(1g)+분말 IMP(1g) 혼합, 열처리(121℃,30분, 1회)
SPGCAI-CNTL	액상형 STock 조성액(*), 비열처리(대조)
SPGCAI(75)	액상형 STock 조성액(*), 열처리(75℃,30분, 1회)
액상형 S PGCAI(90)	액상형 STock 조성액(*), 열처리(90℃,30분, 1회)
SPGCAI(110)	액상형 STock 조성액(*), 열처리(110℃,30분, 1회)
SPGCAI(110)	액상형 STock 조성액(*), 열처리(121℃,30분, 1회)

-액상형 STock 조성액: 분말 GMP(1g)+분말 CMP(1g)+분말 AMP(1g)+분말 IMP(1g) 혼합후, 정제수 50g mass후 5등분후 열처리 시험구로 사용





Fig. 1. 유기농 현장 선발 효모에서 분리한 기능성 소재별 열안전성(고형분) 평가 결과

120424가1 : *S.cereviase* OKK110427 비열처리(대조), 120424가2 : *S.cereviase* OKK110427 열처리(75℃,30분, 1회), 120424가3 : *S.cereviase* OKK110427 열처리(90℃,30분, 1회), 120424가4 : *S.cereviase* OKK110427 열처리(110℃,30분, 1회), 120424가5 : *S.cereviase* OKK110427로부터 cell wall 분리후 비열처리(대조), 120424가6 : *S.cereviase* OKK110427로부터 Cell Wall분리후 열처리(75℃,30분, 1회), 120424가7 : *S.cereviase* OKK110427로부터 Cell Wall분리후 열처리(90℃,30분, 1회), 120424가8 : *S.cereviase* OKK110427로부터 Cell Wall 분리후 열처리(110℃,30분, 1회), 120424가9 : *S.cereviase* OKK110427로부터 추출물 분리후 비열처리(대조), 120424가10 : *S.cereviase* OKK110427로부터 추출물 분리후 열처리(75℃,30분, 1회), 120424가11 : *S.cereviase* OKK110427로부터 추출물 분리후 열처리(90℃,30분, 1회), 120424가12 : *S.cereviase* OKK110427로부터 추출물 분리후 열처리(110℃,30분, 1회), 120424가13 : *S.cereviase* 분리 cell Wall( $\beta$ -glucan, Oriental사) 비열처리, 120424가14 : *S.cereviase* : *S.cereviase* 분리 cell Wall( $\beta$ -glucan, Oriental사) 열처리(75℃,30분, 1회), 120424가15 : *S.cereviase* : *S.cereviase* 분리 cell Wall(?-glucan, Oriental사) 열처리(90℃,30분, 1회), 120424가16 : *S.cereviase* : *S.cereviase* 분리 cell Wall( $\beta$ -glucan, Oriental사) 열처리(110℃,30분, 1회), 120424가17 : *C.utilis* 분리 추출물(AROMILD, KOHJINI사) 비열처리(대조), 120424가18 : *C.utilis* 분리 추출물(AROMILD, KOHJINI사) 열처리(75℃,30분, 1회), 120424가19 : *C.utilis* 분리 추출물(AROMILD, KOHJINI사) 열처리(90℃,30분, 1회), 120424가20 : *C.utilis* 분리 추출물(AROMILD, KOHJINI사) 열처리(110℃,30분, 1회), 120424가21 : *C.utilis* 분리 추출물(NT, KOHJINI사) 비열처리(대조), 120424가22 : *C.utilis* 분리 추출물(NT, KOHJINI사) 열처리(75℃,30분, 1회), 120424가23 : *C.utilis* 분리 추출물(NT, KOHJINI사) 열처리(90℃,30분, 1회), 120424가24 : *C.utilis* 분리 추출물(NT, KOHJINI사) 열처리(110℃,30분, 1회), 120424가25 : 전지분유(매일유업) 열처리(75℃,30분, 1회), 120424가26 : 전지분유(매일유업) 열처리(90℃,30분, 1회), 120424가27: 전지분유(매일유업) 열처리(110℃,30분, 1회)

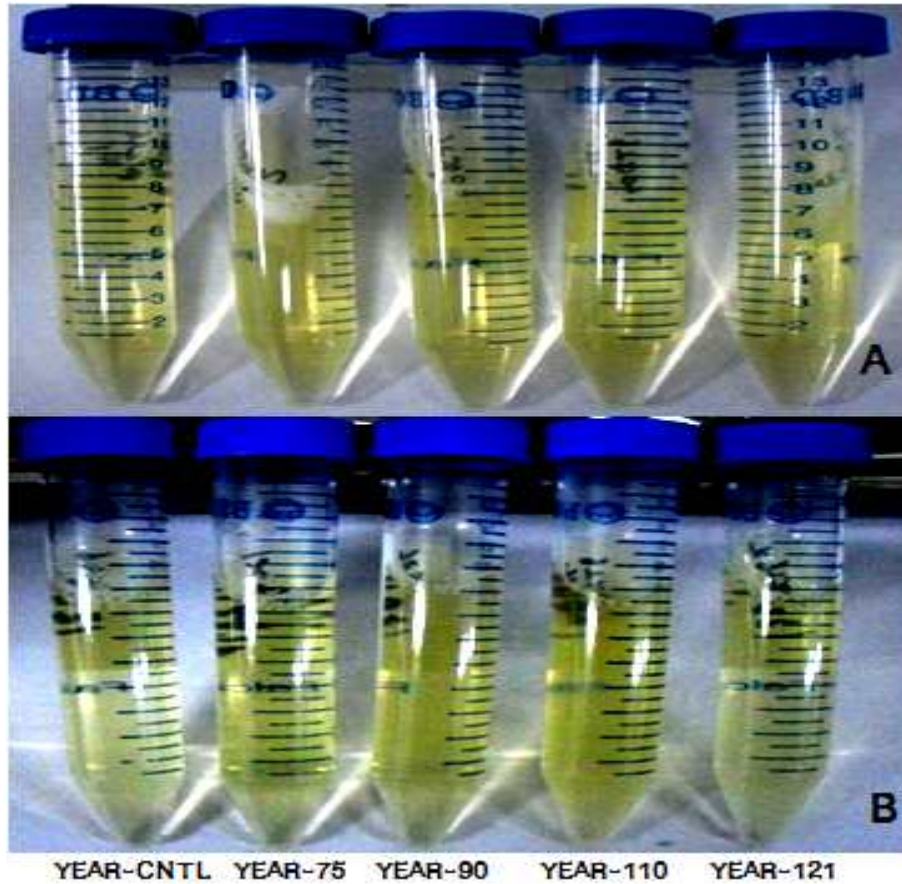


Fig. 2 . *Candida utilis*에서 분리한 효모추출물(액상, 2%)의 열안전성 평가  
A ; 열처리전, B:열처리후

YEAR-CNTL: *C.utilis* 분리 추출물(AROMILD, KOHJINI사) 2%(w/w) 조성액 비열처리(대조)., YEAR-75: *C.utilis* 분리 추출물(AROMILD, KOHJINI사) 2%(w/w) 조성액 열처리(75℃,30분, 1회)., YEAR-90: *C.utilis* 분리 추출물(AROMILD, KOHJINI사) 2%(w/w) 조성액 열처리(90℃,30분, 1회)., YEAR-110 : *C.utilis* 분리 추출물(AROMILD, KOHJINI사) 2%(w/w) 조성액 열처리(110℃,30분, 1회).,YEAR-121: *C.utilis* 분리 추출물(AROMILD, KOHJINI사) 2%(w/w) 조성액 열처리(121℃,15분, 1회)

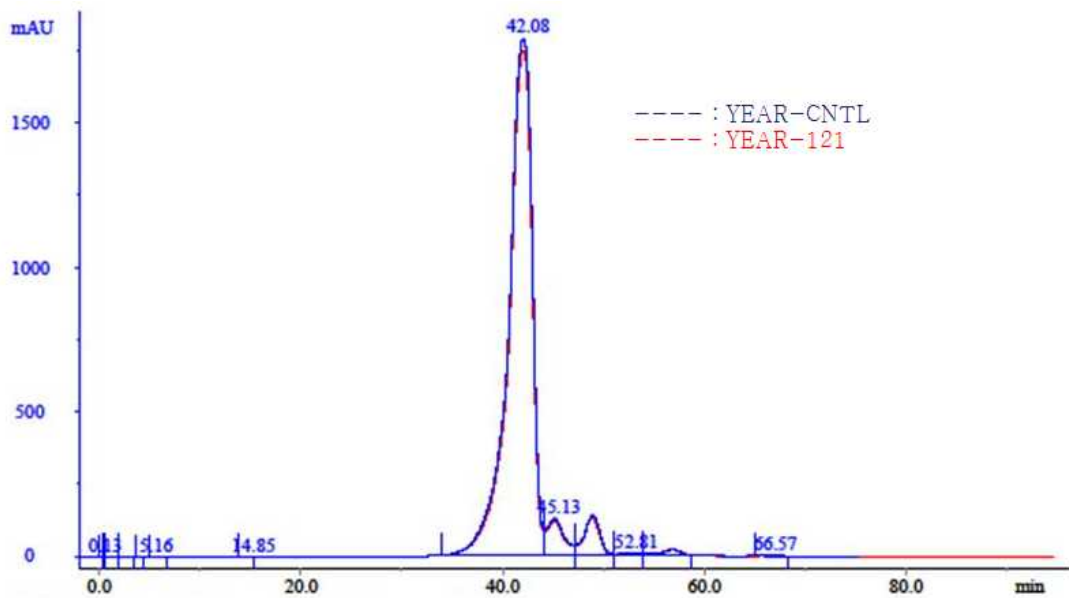


Fig. 3 . *Candida utilis*에서 분리한 효모추출물(액상, 2%)의 열안전성 평가

A ; 열처리전, B:열처리후

YEAR-CNTL: *C.utilis* 분리 추출물(AROMILD, KOHJINI사) 2%(w/w) 조성액 비열처리(대조)., YEAR-121:*C.utilis* 분리 추출물(AROMILD, KOHJINI사) 2%(w/w) 조성액 열처리(121°C,15분, 1회)

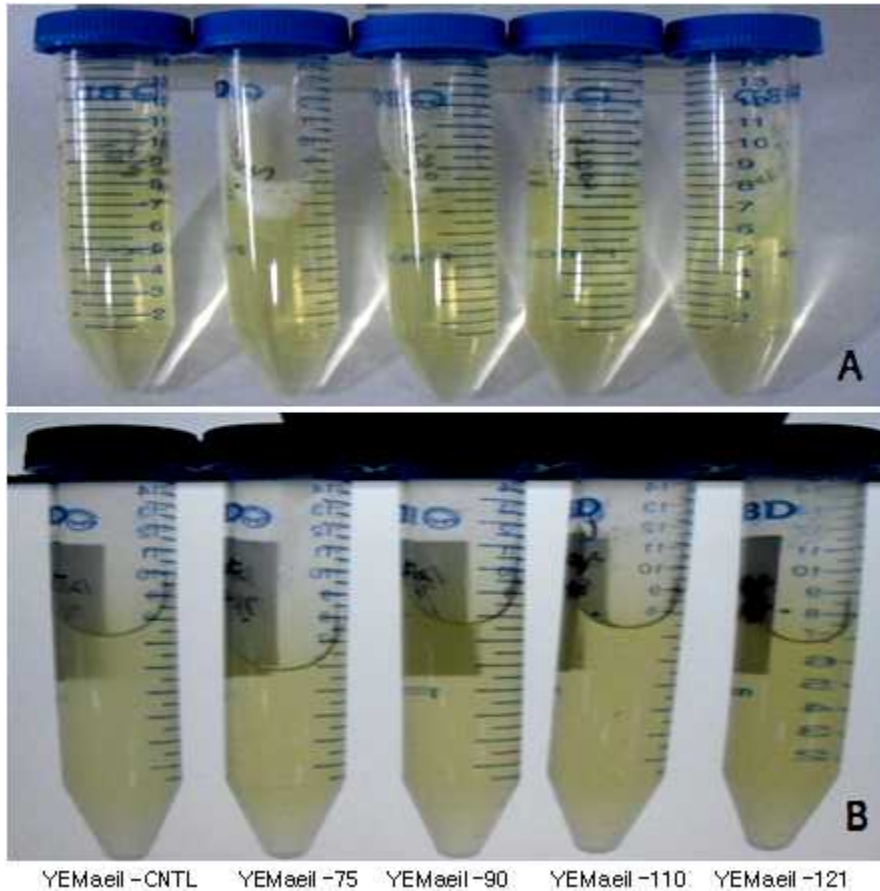


Fig. 4 . 유기농현장 선발효모 *S.cereviase* OKK110427)에서 분리한 기능성 소재(추출물 동결시료)에 대하여 액상조건(2%,w/w)에서 열처리조건에 따른 열안전성 평가 결과(A:열처리전, B : 열처리후)

YEMaeil-CNTL: *S.cereviase* OKK110427로부터 제조한 추출물 2%(w/w) 조성액 비열처리(대조)., YEMaeil -75:*S.cereviase* OKK110427로부터 제조한 추출물 2%(w/w) 조성액 열처리(75°C,30분, 1회)., YEMaeil-90:*S.cereviase* OKK110427로부터 제조한 추출물 2%(w/w) 조성액 열처리(90°C,30분, 1회)., YEMaeil-110:*S.cereviase* OKK110427로부터 제조한 추출물 2%(w/w) 조성액 열처리(110°C,30분, 1회)., YEMaeil -121:*S.cereviase* OKK110427로부터 제조한 추출물 2%(w/w) 조성액 열처리(121°C,15분, 1회)

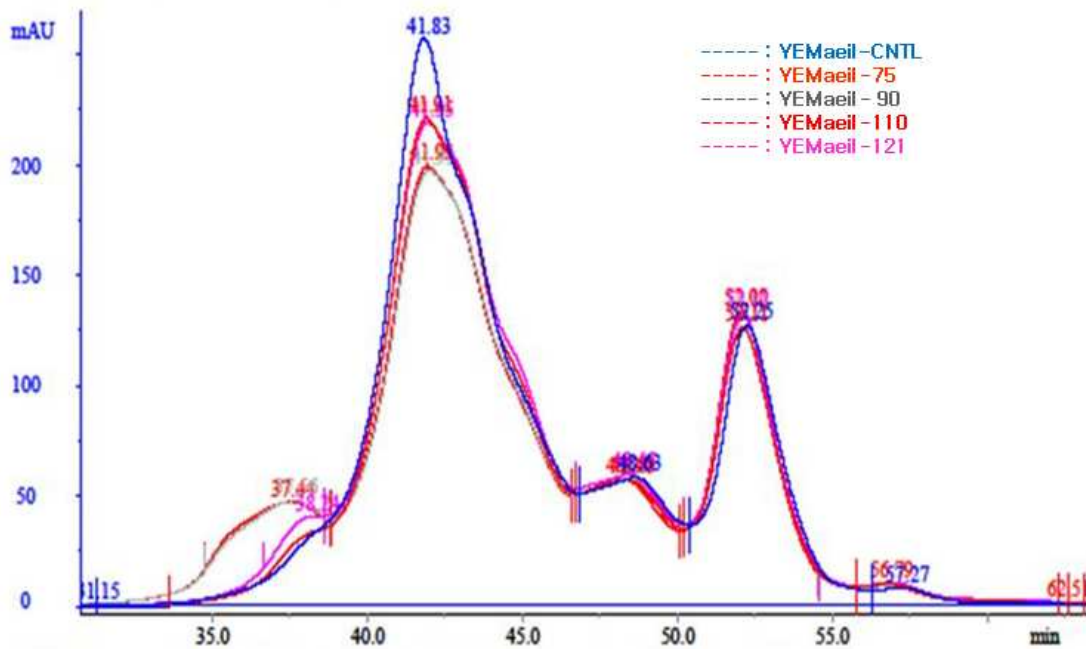


Fig. 5 . 유기농현장 선발효모에서 분리한 기능성 소재(액상, 2%)에 대한 열안전성 평가 결과(FPLC)

YEMaeil-CNTL: *S.cereviase* OKK110427로부터 제조한 추출물 2%(w/w) 조성액 비열처리(대조)., YEMaeil -75 : *S.cereviase* OKK110427로부터 제조한 추출물 2%(w/w) 조성액 열처리(75°C,30분, 1회)., YEMaeil -90 : *S.cereviase* OKK110427로부터 제조한 추출물 2%(w/w) 조성액 열처리(90°C,30분, 1회)., YEMaeil -110 : *S.cereviase* OKK110427로부터 제조한 추출물 2%(w/w) 조성액 열처리(110°C,30분, 1회)., YEMaeil -121 : *S.cereviase* OKK110427로부터 제조한 추출물 2%(w/w) 조성액 열처리(121°C,15분, 1회)

Table 4. 효모추출물내 함유되어 있는 핵산류만을 대상으로 액상상태 [2% (w/w)]에서 열 처리에 따른 분자량 변화 조사

검출시간별 (RT)	열처리 조건에 따른 분자량 변화(점유율 변화)					비고
	CNTL	75℃	90℃	110℃	121℃	
42.44	53.9	-	-	-	-	NANA(MW309)
42.72	13,588	12,657	13,146	12,015	11,422	
45.31	-	-	-	1,969	2,910.50	
48.99	-	169	275	3,353	4,489	
52.33	-	9.65	-	753	1,072	
52.97	-	27.4	-	-	-	
54.07	-	-	433.4	-	-	
56.44	-	52.9	28.4	-	-	
57.31	-	-	-	393.9	856	
61.01	-	-	-	-	1.52	
66.77	-	-	-	103.9	137	
합계	13,588	12,916	14,241	18,671	20,890	

SGCAI-CNTL : 분말 GMP(1g)+분말 CMP(1g)+분말 AMP(1g)+분말 IMP(1g) 혼합 후, 정제수 50g mass up 조성액중 10ml 분취 시료에 대하여 미열처리(대조)., SGCAI-75: 조성액중 10ml 분취 시료에 대하여 열처리(75℃,30분, 1회)., SGCAI-90 : 조성액중 10ml 분취 시료에 대하여 열처리(90℃,30분, 1회)., SGCAI-110: 조성액중 10ml 분취 시료에 대하여 열처리(110℃,30분, 1회)., SGCAI-121 : 조성액중 10ml 분취 시료에 대하여 열처리(121℃,15분, 1회), S:Solution, G:5' -GMP, C:5' -CMP, A:5' -AMP, I:5' -IMP

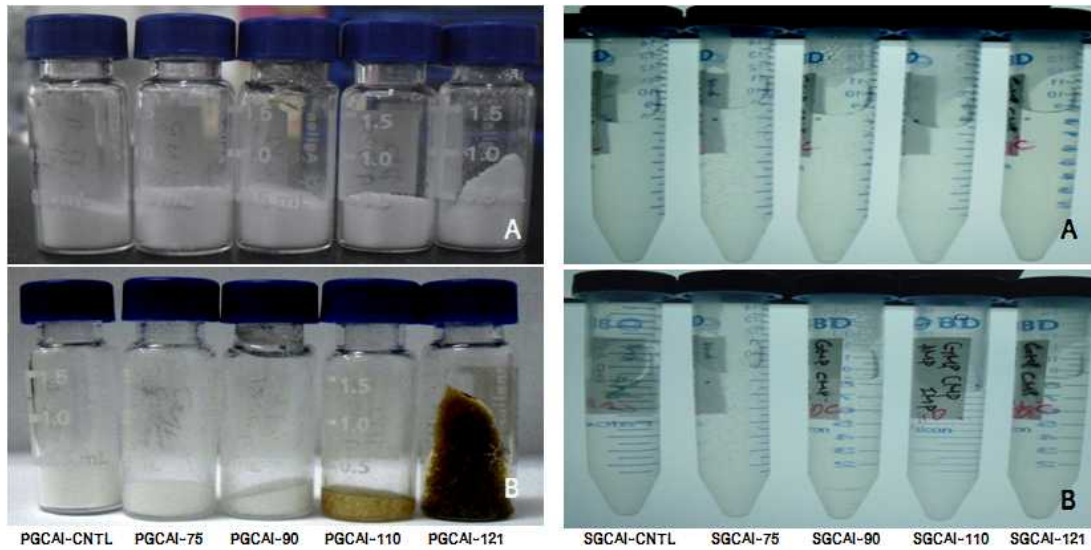


Fig. 6 . 효모추출물내 함유되어 있는 핵산류의 고형(I) 및 액상상태[II, 2%(w/w)]에서의 열안전성 평가(A;열처리전, B:열처리후) 결과

PGCAI-CNTL: 분말 GMP(1g)+분말 CMP(1g)+분말 AMP(1g)+분말 IMP(1g) 혼합후 미열처리(대조)., PGCAI-75: 분말 GMP(1g)+분말 CMP(1g)+분말 AMP(1g)+분말 IMP(1g) 혼합후 열처리(75℃,30분, 1회)., PGCAI-90: 분말 GMP(1g)+분말 CMP(1g)+분말 AMP(1g)+분말 IMP(1g) 혼합후 열처리(90℃,30분, 1회)., PGCAI-110: 분말 GMP(1g)+분말 CMP(1g)+분말 AMP(1g)+분말 IMP(1g) 혼합후 열처리(110℃,30분, 1회)., PGCAI-121 : 분말 GMP(1g)+분말 CMP(1g)+분말 AMP(1g)+분말 IMP(1g) 혼합후 열처리(121℃,15분, 1회)

SPGCAI-CNTL : 분말 GMP(1g)+분말 CMP(1g)+분말 AMP(1g)+분말 IMP(1g)혼합후, 정제수 50g mass up 조성액중 10ml 분취 시료에 대하여 미열처리(대조)., SPGCAI-75: 조성액중 10ml 분취 시료에 대하여 열처리(75℃,30분, 1회)., SPGCAI-90 : 조성액중 10ml 분취 시료에 대하여 열처리(90℃,30분, 1회)., SPGCAI-110: 조성액중 10ml 분취 시료에 대하여 열처리(110℃,30분, 1회)., SPGCAI-121: 조성액중 10ml 분취 시료에 대하여 열처리(121℃,15분, 1회)

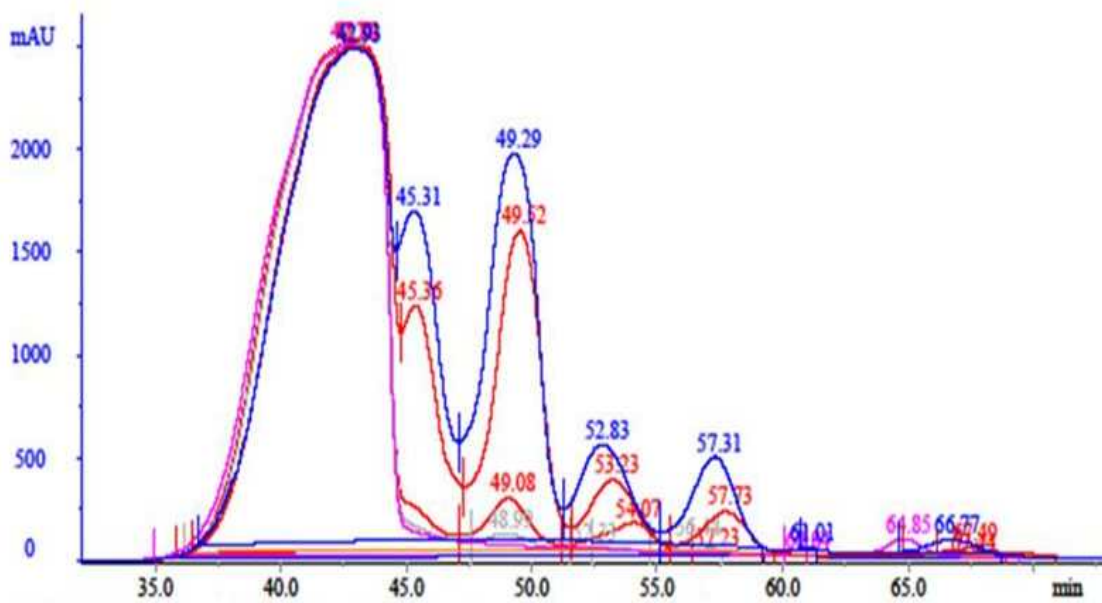


Fig. 7 . 효모추출물내 함유되어 있는 핵산류를 액상상태 [ 2% (w/w) ] 조건에의 열안전성 평가

SPGCAI-CNTL : 분말 GMP(1g)+분말 CMP(1g)+분말 AMP(1g)+분말 IMP(1g) 혼합후, 정제수 50g mass up 조성액중 10ml 분취 시료에 대하여 미열처리 (대조) ., SPGCAI-75: 조성액중 10ml 분취 시료에 대하여 열처리(75℃,30분, 1회) ., SPGCAI-90 : 조성액중 10ml 분취 시료에 대하여 열처리(90℃,30분, 1회) ., SPGCAI-110: 조성액중 10ml 분취 시료에 대하여 열처리(110℃,30분, 1회) ., SPGCAI-121: 조성액중 10ml 분취 시료에 대하여 열처리(121℃,15분, 1회)



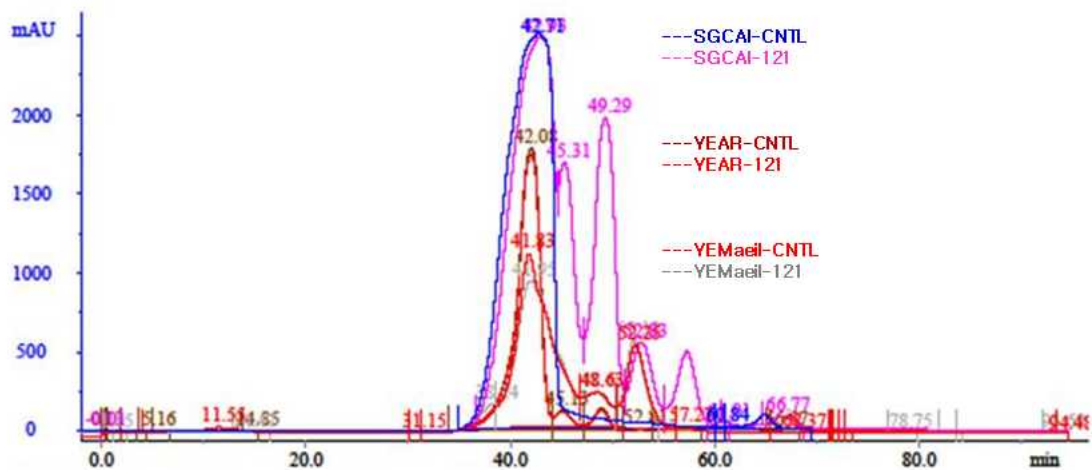


Fig. 8 . 효모추출물 구성성분별 열안전성 평가 결과

SGCAI-CNTL : 4종 핵산 혼합조성액[분말 GMP(1g)+분말 CMP(1g)+분말 AMP(1g)+분말 IMP(1g)혼합후, 정제수 50g mass up]중 10ml 분취 시료에 대하여 미열처리(대조), SGCAI-121: 4종 핵산 혼합 조성액중 10ml 분취시료에 대하여 열처리(121℃,15분, 1회)., YEAR-CNTL: *C.utilis* 분리 추출물(AROMILD, KOHJINI사) 2%(w/w) 조성액 비열처리(대조)., YEAR-121:*C.utilis* 분리 추출물(AROMILD, KOHJINI사) 2%(w/w) 조성액 열처리(121℃,15분, 1회)., YEMaeil : *S.cereviase* OKK110427로부터 제조한 추출물 2%(w/w) 조성액 비열처리(대조)., YEMaeil-121 : *S.cereviase* OKK110427로부터 제조한 추출물 2%(w/w) 조성액 열처리(121℃,15분, 1회), S:Solution, G:5' -GMP, C:5' -CMP, A:5' -AMP, I:5' -IMP

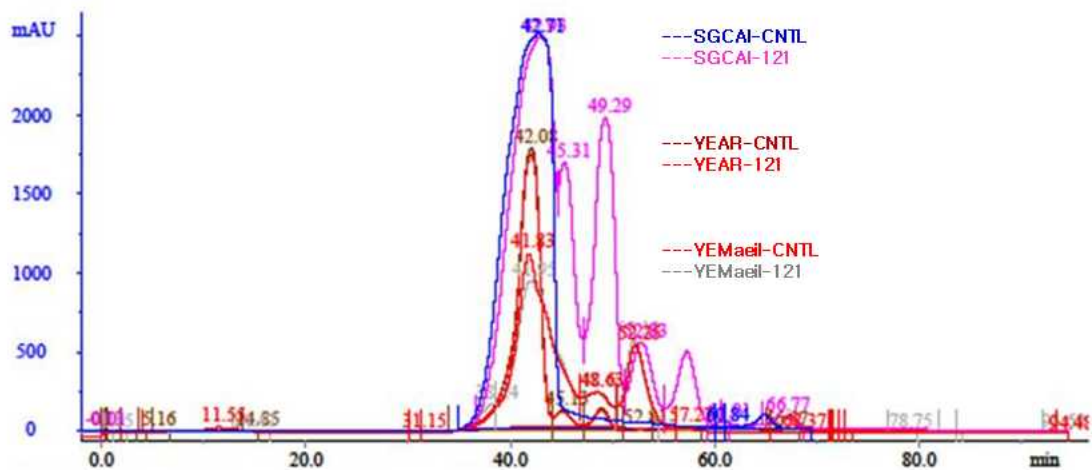


Fig. 8 . 효모추출물 구성성분별 열안전성 평가 결과

SGCAI-CNTL : 4종 핵산 혼합조성액[분말 GMP(1g)+분말 CMP(1g)+분말 AMP(1g)+분말 IMP(1g)혼합후, 정제수 50g mass up]중 10ml 분취 시료에 대하여 미열처리(대조), SGCAI-121: 4종 핵산 혼합 조성액중 10ml 분취시료에 대하여 열처리(121℃,15분, 1회)., YEAR-CNTL: *C.utilis* 분리 추출물(AROMILD, KOHJINI사) 2%(w/w) 조성액 비열처리(대조)., YEAR-121:*C.utilis* 분리 추출물(AROMILD, KOHJINI사) 2%(w/w) 조성액 열처리(121℃,15분, 1회)., YEMaeil : *S.cereviase* OKK110427로부터 제조한 추출물 2%(w/w) 조성액 비열처리(대조)., YEMaeil-121 : *S.cereviase* OKK110427로부터 제조한 추출물 2%(w/w) 조성액 열처리(121℃,15분, 1회), S:Solution, G:5' -GMP, C:5' -CMP, A:5' -AMP, I:5' -IMP

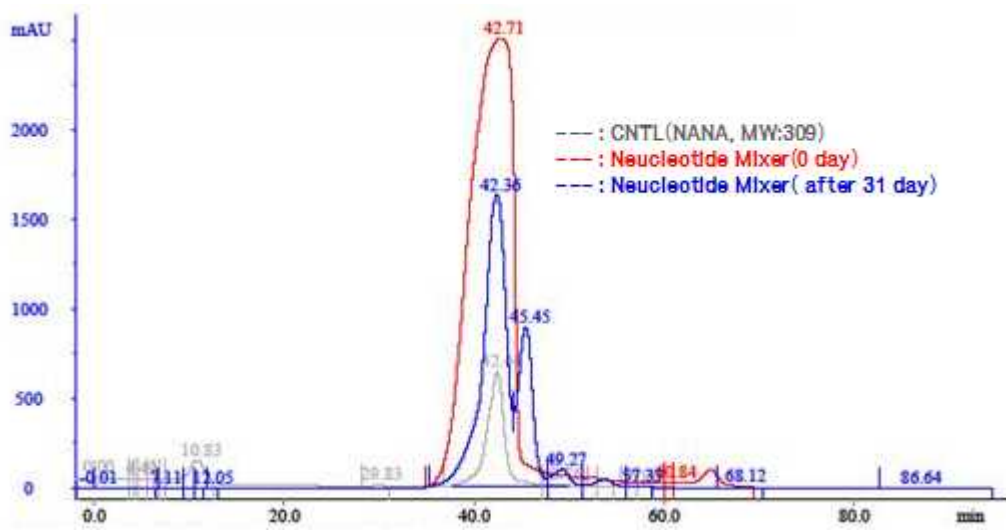


Fig. 9 . 액상형 핵산류(2%, w/w)에 대하여, 장기보관(31일, 상온)시 FPLC분자량 변화 검정을 통한 안정성 평가 결과

## 제 7 절 천연특화 제과·제빵 레시피 정립 (선발효모 및 기능성소재류 적용)

### 7-1. 개발효모 제형별(압착형 및 분말형) 제빵적용성 평가

#### 1. 연구목적

예비실험에서 상업효모 대비 개발효모의 동일한 효모균수 적용 제빵제조시 발효율은 80%수준 이하였다. 이를 해결하고 저 제빵적용형 효모활성부여 관련 검정을 실시하여 보았더니 제빵발효와 관련한 최저 효모균수는  $1.5 \times 10^{10}$  cfu/g ~  $10^{11}$  Cfu/g) 범위였다. 즉, 이를 충족하지 못하는 경우는 사전 배양시간을 3시간 이상 적용하여야 함을 알 수 있었다. 따라서, 예비결과를 실제 제빵 제조에 적용하므로서 관련 메카니즘(효모활성과 관련 당류소모 및 제빵발효 연계성 파악) 재확인과 동시에 개발효모에 대한 제형별 제빵 제조 레시피를 정립코 저 하였다.

#### 2. 연구수행방법

연구간 공시효모균은 상업용 및 개발효모를 대상으로 제형별로 구분하여 사용하였다. 즉, 상업효모는 압착형[Jenico사(한국),수분 70%]과 건조분말형(Jenico사, 한국)으로 구분 구입하여 대조구로 사용하였으며, 시험구는 개발효모(*S. cerevise* JKK100902)는 압착형(수분:74%)과 분말형(동결건조) 완제품을 사용하였다.

제빵제조 레시피에 적용된 개량제는 S 500(퓨리토스코리아, 한국)를 구입하여 사용하였다. 또한, 시험간 사용한 효모재료는 구입(상업효모) 및 생산(개발효모)후 7일 이내에 사용하는 것을 원칙으로 하였다(냉장보관).

전체실험구는 대조구로서 상업효모(압착형) 및 상업효모(건조형) 그리고 시험구로서는 개발효모(압착형) 및 개발효모처리구(분말형)로 4개 시험구로 설정하였다.

첫 번째 준비단계인 제형별 상업 및 개발효모균의 사전활성유도를 위한 배지조성은 다음과 같이 준비하였다. 즉, 우선 물 600g에 설탕 60g을 용해시킨 10% Sucrose용액을 3반복으로 제조한 후 여기에 제형별 준비된 상업효모 및 개발효모를 각각 40g 혼합하고 이를 0시간(최초), 3시간 및 6시간동안 배양하였다. 이때 배양조건으로 온도는 25℃, 수분은 50%로 조절하였다.

두 번째 단계로서, 배양시간이 경과하면 이중 1개조씩을 꺼내 제빵제조를 위한 반죽에 사용하였다. 본 연구간 제빵 제조 레시피는 일단 상업효모 적용 제빵제조 레시피에 준하여 실시하였다[강력분 1kg+물 600g+설탕 60g+소금 20g+버터 80g+개량제(S 500) 10g+효모 40g].

결과도출은 시험구별 배양시간이 경과시 배양액을 분취 및 이를 PDA에 도말 후 배양하고 관측되는 효모균 콜로니수를 계측하였는데, 이를 사용한 반죽 및 숙성과정을 거쳐 최종 제빵제조 전단계까지 동일하게 적용하였다.

제빵제조 발효율에 미치는 결과 확인을 위하여, 시험구별 제조된 제빵의 높이(mm, Y축), oven jumping(mm), 폭(mm, X축), 폭(mm, Z축) 및 발효율(상용효모 대비, %)을 계측 비교하였다. 시험구별 특화성(풍미)에 미치는 효과 검정을 위하여, 시험구별 제조제빵의 샘플을 채취 후 6종 당류분석(Maltose, Fructose, Sucrose, Glucose, Galactose 및 Lactose) 및 풍미관련 이화학적 조사를 실시하였다(Table 6). 효모의 먹이원 이용성과 관련한 당류분석은 식품공전(제10 일반시험법, 5)탄수화물, 2009)에 준하여 실시하였으며, 풍미 성분분석은 GC-MS시스템을 이용하여 분석하였다(Table 1).

### 3. 연구결과

순수분리 개발효모를 기준 제형별 적용성, 제빵제조 제시피 정립 및 제형별 풍미에 미치는 조사는 다음과 같이 실시하였다.

최적 제빵발효율과 관련한 효모수치는  $1.5 \times 10^{10}$ cfu/g이상이었으며(Fig 1, Table 3), 개발효모의 제빵제조에 따른 발효율 검정(상업효모 대비)결과, 개발압착효모는 100%이상, 개발건조효모는 65~95%이내의 발효율을 나타내었다. 이는 개발효모는 제빵발효율을 보장할 수 있는 사전발효(활성)조건에 대한 추가검정이 필요하다 판단되었다(Fig 2, Table 3~4). 제형별 효모의 먹이원 활용 및 이의 풍미관련성을 연계하여 살펴보았더니, 제형별 구분없이(압착형 및 분말형) 3시간 이내에 100% Sucrose를 먹이원으로 소모하였고(Table 6), 제빵제조시 대부분 알콜류 기원 풍미를 나타내는 것으로 조사되었다. 효모제형별 비교결과, 전체적으로 시간이 경과하면 알콜성 풍미수치가 높아졌으며, 압착효모가 먹이이용성과 더불어 풍미발현성도 높게 나타나는 것으로 조사되었다(Fig 3, Table 5).

제형별 구분 상업효모 대비 시간경과별 풍미발현 효과를 조사하여 보았더니, 순수효모는 풍미(특화성)에 미치는 효과는 없었으며, 압착효모는 최초(상업효모 : 1,986, 개발효모 : 1,689 기준) 대비 3시간 경과시 상업효모는 1.8배, 6시간이 경과시는 1.7배로 나타났으나, 개발효모는 1.7배에서 3.4배로 유의한 증가수치를 보였다.

개발효모는 최초(상업효모 : 1,615, 개발효모 : 910 기준) 대비 3시간 경과시 상업효모는 1.6배 1.78배, 6시간이 경과시는 3.5배로 나타났으며, 개발효모 또한 1.71배에서 2.4배로 유의한 증가수치를 보였다. 전체 향기성분중 알콜류 점유비율 조사결과, 압착형은 71~약 90%범위를 분말형은 59~82%범위를 보여 제형에 관계없이 높은 점유율을 보였다(Fig 2, Table 5). 효모균수 증감 및 시간별 먹이원 이용성과 제빵 발효율 연계성 평가 : 동일 연계성을 갖는 것으로 판단되었다(Fig 2, Table 3~6). 순수분리 제형별 효모의 제빵제조 제시피 정립 결과로서, 상용효모 제조제조법과 동일하게 정립됨으로서 소비자 사용시 편리성이 확보되었다(Table 6). 기본적으로 정립된 제조 레시피는 강력분 1kg, 물 600g, 설탕 60g, 소금 20g, 버터 80g, 개량제(S 500) 10g 그리고 효모의 경우는 40g을 배합하는 레시피였으며, 이는 상용제빵 제조 레시피와 비교하여 동등성을 확보하였다.

Table 1. 향기분석 적용 시스템 및 운영조건

분석시스템	분석 시스템 운영조건
GC/MS analysis	<ul style="list-style-type: none"> <li>• G/C Model name: Agilent 5975C(Agilent Technologies, Palo Alto, California, U.S.A)</li> <li>• Inlet temperature: 260° C</li> <li>• Column:DB-WAX(30mx250 μ mx0.25 μ m, Agilent Technologies, Palo Alto, California, U.S.A)</li> <li>• Carrier gas: helium</li> <li>• Flow rate: 1ml/min</li> <li>• Oven temperature program : from 40° C(5 min)→4° C/min→250° C(5min)</li> <li>• M/S detector : Agilent 5975C MSD (EI mode)               <ul style="list-style-type: none"> <li>- Detector voltage was 70eV</li> <li>- The mass spectral data acquisition scan interval time 2.86 sec and data were collected over a mass range of m/z 40~550 amu.</li> </ul> </li> </ul>
SPME analysis	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Phase: Triple</li> <li>• Fiber size: 50/30 μ m divinylbenzoene→50 μ m carboxen /polydimethylsiloxane →30 μ m 혼합 코팅 DVB/ Carboxen / PDMS(divinylbenzene /carboxen / polydimethylsiloxane) purchased from Supelco Co.(bellefonte, PA, USA)</li> <li>• Sampler : GERSTEL MPS2 Auto sampler</li> <li>• Sample equilibration time               <ul style="list-style-type: none"> <li>-incubation temp. 60° C</li> <li>-incubation time 40min</li> <li>-extraction time 10min</li> <li>-desorption time 10min</li> </ul> </li> </ul>

Table 2. 제형별 적용성 및 제빵제조 제시피 정립을 위한 시험디자인

시험항목	사전배양(활력유도)후 제빵적용성 평가(발효율 최적화)를 위한 시험디자인 내역			
	상업효모(대조, Jenico사)		개발효모(JKK100902)	
	압착형	건조분말형	압착형	건조분말형
적용제빵제조 Recipe	강력분 1kg+물 600g+설탕 60g+소금 20g+버터 80g+개량제 (S 500) 10g+Jenico상업효모 40g(수분함유량:70%)	강력분 1kg+물 600g+설탕 60g+소금 20g+버터 80g+개량제 (S 500) 10g+Jenico효모 40g	강력분 1kg+물 600g+설탕 60g+소금 20g+버터 80g+개량제 (S 500) 10g+개발효모 40g(수분함유량:74%)	강력분 1kg+물 600g+설탕 60g+소금 20g+버터 80g+개량제 (S500) 10g+개발효모 40g
사전효모활력부여조건	10% (w/w) Sucrose용액 조성+효모 접종 ( $4.1 \times 10^9$ cfu/g)	10% (w/w) Sucrose용액 조성+효모 접종 ( $1.0 \times 10^{10}$ cfu/g)	10% (w/w) Sucrose용액 조성+효모 접종 ( $7.4 \times 10^{10}$ cfu/g)	10% (w/w) Sucrose용액 조성+효모 접종 ( $1.0 \times 10^{10}$ cfu/g)
사전 활력부여시간	0시간, 3시간 및 6시간 경과시반죽 적용			
제빵적용성 평가 (숙성조건:온도/습도/시간)	1차발효	25℃/ 50%/ 90분		
	중간발효	실온/20~30%/20분		
	2차발효	40℃/80%/ 45분		
제빵적용성 평가 (굽기: 온도,분)	160(오븐상층)/180℃(오븐하층),35분			

Table 3. 압착형(수분 70~74%) 및 건조형 상업효모(Jenico사) 대비 개발효모(*S. cerevisiae* JKK091002)의 시간 차이를 부여하여 사전배양 (10% Sucrose, w/w) 및 이를 적용한 반죽 후 숙성단계별 효모균수(PDA, 25°C) 및 제빵 발효율에 미치는 효과조사 결과

효모처리구		사전효모배양액 혼합반죽후 숙성단계별 균수변화(cfu/g)					제빵 발효율(%)
효모종류	숙성 시간(hr)	초기균수	반죽	1차	중간	2차	
상업효모 (압착형)	0	1.0x10 <sup>10</sup>	2.4x10 <sup>10</sup>	NT	1.7x10 <sup>9</sup>	1.5x10 <sup>9</sup>	100(기준)
	3	1.4x10 <sup>10</sup>	2.7x10 <sup>9</sup>	5.1x10 <sup>9</sup>	3.6x10 <sup>9</sup>	6.4x10 <sup>9</sup>	100(기준)
	6	2.7x10 <sup>10</sup>	2.9x10 <sup>9</sup>	1.5x10 <sup>10</sup>	2.5x10 <sup>9</sup>	7.2x10 <sup>9</sup>	100(기준)
상업효모 (건조형)	0	2.7x10 <sup>10</sup>	2.6x10 <sup>9</sup>	7.8x10 <sup>9</sup>	NT	5.8x10 <sup>9</sup>	100(기준)
	3	1.0x10 <sup>10</sup>	2.7x10 <sup>9</sup>	3.2x10 <sup>8</sup>	2.0x10 <sup>7</sup>	1.5x10 <sup>9</sup>	100(기준)
	6	1.0x10 <sup>10</sup>	3.0x10 <sup>8</sup>	NT	1.0x10 <sup>7</sup>	9.8x10 <sup>9</sup>	100(기준)
개발효모 (압착형)	0	1.8x10 <sup>10</sup>	7.0x10 <sup>9</sup>	1.2x10 <sup>10</sup>	5.0x10 <sup>9</sup>	NT	94.3
	3	1.8x10 <sup>10</sup>	2.8x10 <sup>9</sup>	1.1x10 <sup>9</sup>	1.1x10 <sup>10</sup>	7.2x10 <sup>9</sup>	110.5
	6	1.1x10 <sup>10</sup>	5.7x10 <sup>9</sup>	9.6x10 <sup>9</sup>	1.1x10 <sup>9</sup>	1.1x10 <sup>10</sup>	96.0
개발효모 (건조형)	0	2.6x10 <sup>10</sup>	2.2x10 <sup>8</sup>	3.0x10 <sup>8</sup>	NT	5.8x10 <sup>8</sup>	64.8
	3	1.1x10 <sup>10</sup>	2.2x10 <sup>10</sup>	2.5x10 <sup>9</sup>	9.0x10 <sup>8</sup>	NT	75.5
	6	7.2x10 <sup>10</sup>	2.9x10 <sup>8</sup>	3.4x10 <sup>8</sup>	1.3x10 <sup>9</sup>	1.4x10 <sup>10</sup>	91.8
	11	2.1x10 <sup>10</sup>	7.0x10 <sup>8</sup>	3.8x10 <sup>9</sup>	4.0x10 <sup>7</sup>	2.3x10 <sup>9</sup>	92.2

숙성시간 : 10% Sucrose용액 조성(Sucrose 60g+멸균수 600g)후 효모 40g첨가후 25°C(수분 : 50%) 시험조건별 배양시간 부여, 초기균수 : 10% Sucrose배양액내 초기효모균  
 NT : Not Testing



Table 4. 압착형(수분 70~74%) 및 건조형 상업효모(Jenico사) 대비 개발효모 (JKK091002)의 시간차이를 부여하여 사전배양 (10% Sucrose, w/w) 및 이를 적용한 제빵 적용성 평가 결과

효모처리구		사전효모배양액 혼합반죽후제빵발효특성에 미치는 효과				제빵 발효율 (%)
효모종류	숙성 시간(hr)	높이 (mm,Y축)	Oven Jumping(mm)	폭 (mm,X축)	폭 (Cm,Z축)	
상업효모 (압착형)	0	131.32	48.85	84.37	185	100(기준)
	3	118.07	35.16	86.59	195	100(기준)
	6	115.47	35.09	86.62	195	100(기준)
상업효모 (건조형)	0	116.28	34.54	91.60	190	100(기준)
	3	113.47	38.24	94.31	195	100(기준)
	6	105.03	26.94	86.54	195	100(기준)
개발효모 (압착형)	0	123.79	47.49	84.20	195	94.3
	3	130.47	40.67	84.37	195	110.5
	6	111.72	37.63	85.07	195	96.0
개발효모 (건조형)	0	75.40	21.81	85.05	195	64.8
	3	85.65	20.7	85.60	195	75.5
	6	96.41	25.19	85.82	195	91.8

제빵발효율(%) : (제형별 상용효모 적용 제빵 높이 / 개발효모 적용 제빵 높이) x 100

Table 5 . 상업효모 대비 개발효모의 제형 및 사전배양 시간차이가 제빵풍미에 미치는 효과 비교 (단위 : Areax1000)

분류	성분명	상업효모 대비 개발효모의 제형 및 사전배양 시간차리가 제빵 풍미에 미치는효과											
		압착형 효모						건조분말형 효모					
		사전발효 (0hr)		사전발효 (3hr)		사전발효 (6hr)		사전발효 (0hr)		사전발효 (3hr)		사전발효 (6hr)	
		상업	개발	상업	개발	상업	개발	상업	개발	상업	개발	상업	개발
Alcohols	ethanol	1,986	1,696	3,543	2,941	3,502	5,792	1,615	910	2,545	1,552	5,623	2,199
	isobutanol	18	25	29	57	28	61	54	25	52	96	99	102
	2-methyl-1-butanol	18	12	45	28	43	48	164	15	58	17	128	18
	3-methyl-1-butanol	190	74	263	218	271	233	205	64	241	174	257	196
	1-hexanol	1	2	1	0	1	3	1	24	1	7	15	1
	nonanol	3	6	2	2	1	2	4	5	2	3	2	2
	phenyl ethyl alcohol	387	24	449	120	459	110	166	16	152	120	196	191
Aldehydes	hexanal	7	14	8	6	5	18	16	25	10	8	13	10
	benzaldehyde	25	24	39	25	41	42	23	12	28	23	33	34
Carboxylic acid	acetic acid	23	53	6	31	7	63	48	40	53	41	142	52
	isobutyric acid	11	27	14	23	13	25	57	55	56	72	78	63
	butanoic acid	4	5	11	4	8	4	10	8	5	7	10	7
	hexanoic acid	7	29	12	23	12	24	53	70	40	66	52	57
	octanoic acid	13	8	16	7	12	3	8	19	5	11	6	9
Esters	2-pentylfuran	4	8	4	6	4	1	11	7	7	7	2	6
	ethylcaproate	9	6	15	11	15	9	6	2	9	5	11	7
	ethyl octanoate	25	8	40	28	42	20	14	2	18	5	20	9
	ethyl decanoate	4	1	13	7	14	4	2	0	2	1	3	2
Ketones	acetoin	38	57	2	9	4	38	72	71	60	483	140	758
SUM		2,774	2,077	4,512	3,547	4,482	6,501	2,529	1,369	3,343	2,699	2,945	3,724

Table 6. 상업효모(Jenico사) 대비 개발효모(JKK091002)의 제빵제조후 당류분석(HPLC)을 통한 발효특성 평가(풍미변화 연계)

시험구		효모의 사전배양 시간별 당류변화 검정(%)						제빵 발효율(%)
효모종류	숙성시간(hr)	Maltose	Fructose	Sucrose	Glucose	Galactose	Lactose	
최초투여량(%)		0	0	10	0	0	0	
상업효모 (압착형)	0	6.34	1.05	ND	ND	ND	ND	100(기준)
	3	2.54	ND	ND	ND	ND	ND	100(기준)
	6	2.54	ND	ND	ND	ND	ND	100(기준)
상업효모 (건조형)	0	7.02	2.38	ND	ND	ND	ND	100(기준)
	3	NT	NT	ND	ND	ND	ND	100(기준)
	6	6.77	1.33	ND	ND	ND	ND	100(기준)
개발효모 (압착형)	0	7.86	2.7	ND	ND	ND	ND	94.3
	3	8.06	ND	ND	ND	ND	ND	110.5
	6	6.97	ND	ND	ND	ND	ND	96.0
개발효모 (건조형)	0	6.04	2.93	ND	ND	ND	ND	64.8
	3	6.31	2.62	ND	ND	ND	ND	75.5
	6	5.69	1.84	ND	ND	ND	ND	91.8

NT : Not Testing , ND : Not Detecting

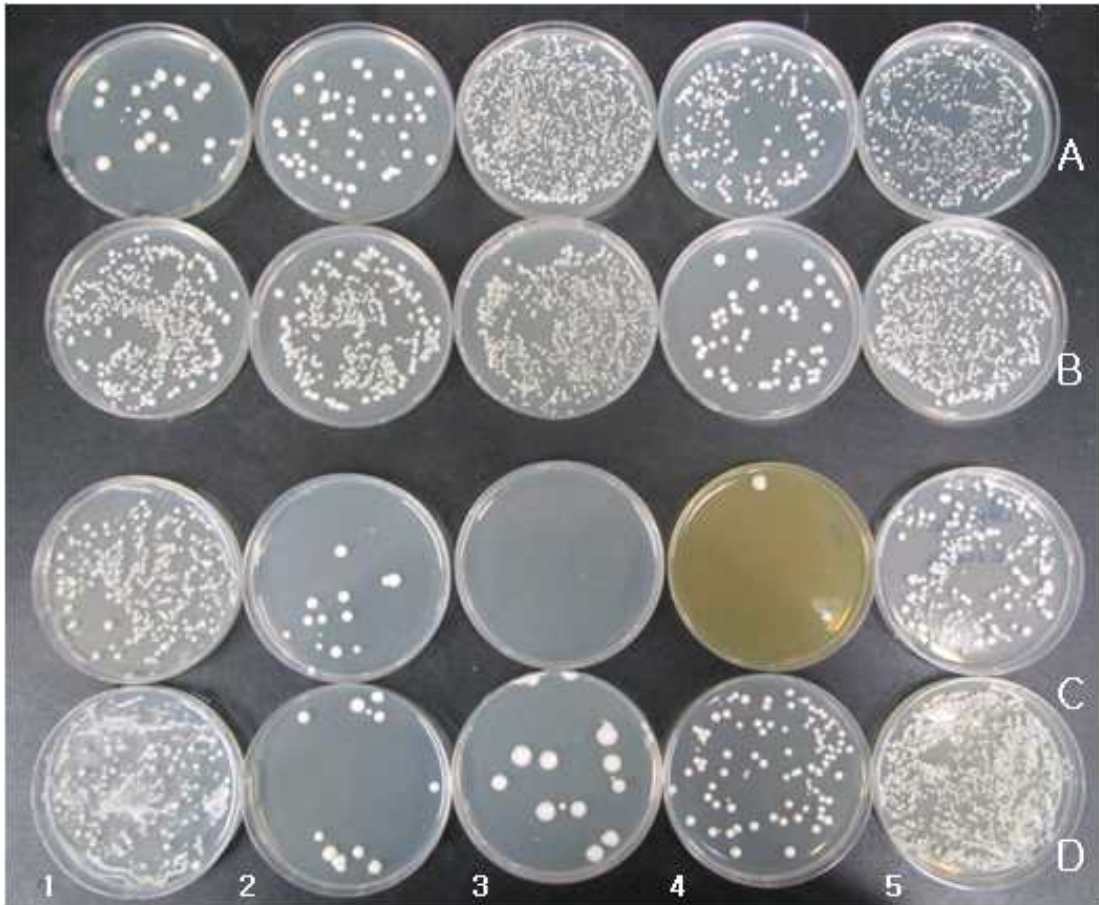


Fig 1 . 압착형(수분 70~74%) 및 건조형 상업효모(Jenico사) 대비 개발효모(JKK091002)의 시간차이를 부여하여 사전배양(10% Sucrose, w/w, 6시간 배양) 및 이를 적용한 반죽 후 숙성단계별 효모균수(PDA, 25℃) 및 제빵 발효율에 미치는 효과조사

A; 상업효모(압착형), B:개발효모(압착형), C:상업효모(건조분말형), D:개발효모(건조분말형), 1:초기효모균수(in 10% sucrose Sol. 6시간 배양후), 2:반죽, 3: 1차숙성, 4:중간발효, 5 : 2차발효

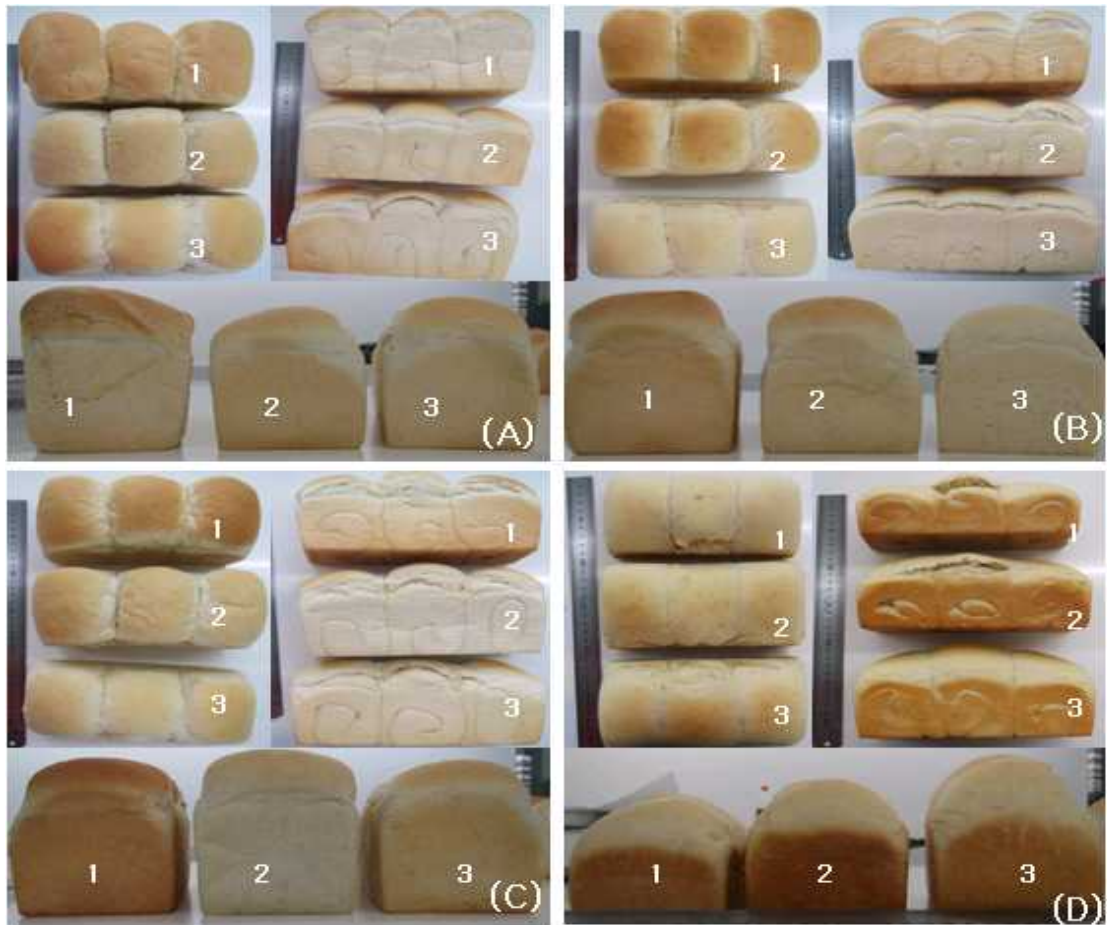


Fig 2. 압착형(수분 70~74%) 및 건조형 상업효모(Jenico사) 대비 개발효모(JKK091002)의 시간차이를 부여하여 사전배양 (10% Sucrose, w/w) 및 이를 적용한 제빵 적용성 평가(외형)결과.  
 (A)상업효모(압착형), (B):상업효모(건조형), (C): 개발효모(압착형), (D) : 개발효모(건조분말형), 1: 효모 0시간 사전배양, 2: 효모 3시간 사전배양, 3: 효모 6시간 사전배양

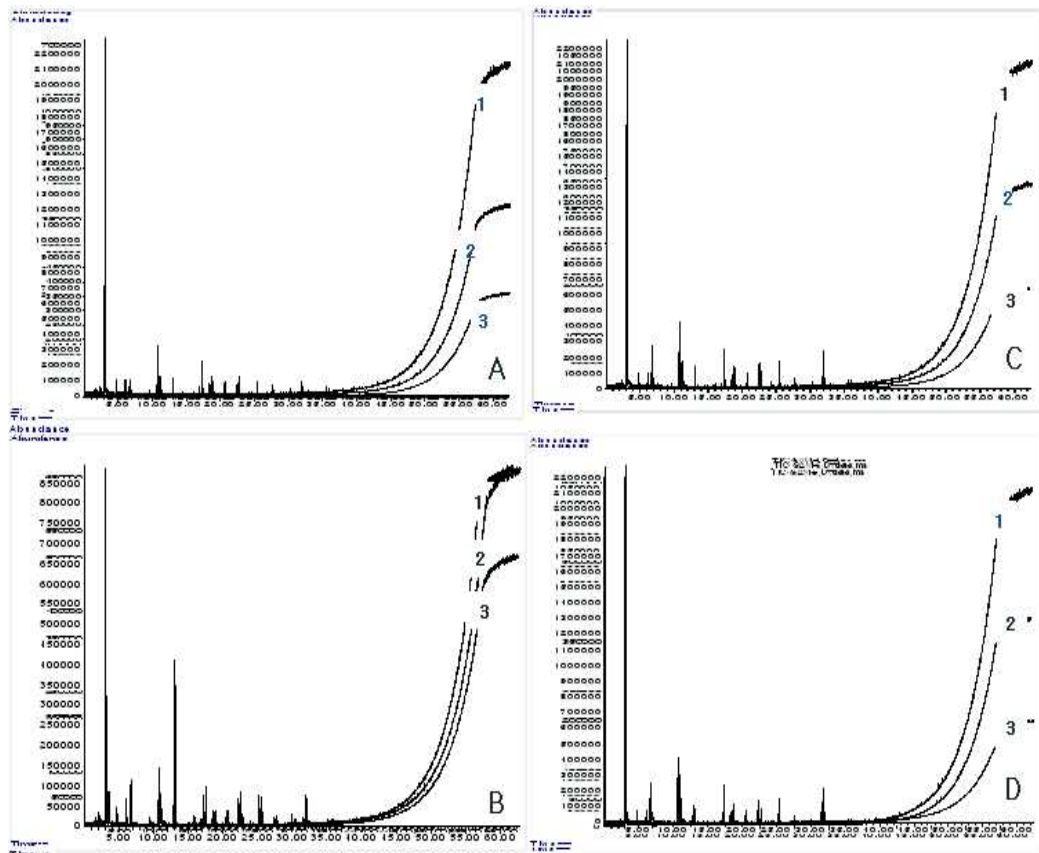


Fig 3. 상업효모 대비 개발효모의 제형 및 사전 배양시간 차이가 제빵 풍미에 미치는 효과 비교

A : 상업효모(압착형), B:개발효모(압착형), C:상업효모(건조형), D:개발효모(건조형), 1: 사전발효 부여시간(0hr), 2: 사전발효 부여시간(3hr), 3:사전발효 부여시간(6h)

## 7-2. 선발효모별 제빵적용성 평가(발효특성)

### 1. 연구목적

상업효모 및 상용 효모유래 기능성 소재 대비 개발효모 및 개발효모로부터 분리한 기능성 소재별 사전안전성 및 기능성(항염증 증대효과, 세포독성 및 성장관련)평가 결과를 토대로 개발효모 및 역시 개발 기능성 소재별로 제과/제빵 적용성 평가를 실시하였다.

개발효모 및 기능성 소재별 발효율과 풍미증가에 미치는 제과/제빵 적용성을 평가하고, 또한 단일 개발효모적용 및 단일 기능성 소재 첨가조건과 이들을 동시 사용에 따른 최종 제과/제빵 제조 레시피 및 이를 적용에 따른 레시피를 정립코져 하였다.

### 2. 연구수행방법

상업효모와 이들 유래 기능성 소재 대비 개발효모 및 개발효모로부터 분리한 기능성 소재별 사전안전성 및 기능성(항염증 증대효과, 세포독성 및 성장관련)평가 결과를 토대로 개발효모 및 기능성 소재별로 제과/제빵 적용성 평가를 실시하였다.

최종 정립코져하는 제과-제빵 레시피는 연구결과의 산업화시, 관련산업 종사자의 적용성에 있어 혼란과 복잡성을 부여하지 않는 상용레시피를 범위에서 개발 하고져 하였으며, 이를 위하여 기 보고된 제과분야 24항목 그리고 제빵분야 24항목을 선발하고 각각에 대하여 예비 적용성 평가를 실시한 후, 최종적으로 “식빵”, “프랑스빵” 및 “하드롤” 를 최적 레시피로 선발하였다(Table 2~3).

선발기준은 효모와 기능성 소재의 특성을 가장 정확히 파악 할 수 있는 레시피를 각각 선발하였는데, 효모의 경우는 발효율 및 제빵 특성파악에 가장 용이한 “식빵” 을 선정하였다. 역시 제과적용성 평가를 위하여 최저원료(밀가루, 물, 소금, 효모)만을 사용함으로써 개발소재별 평가와 결과확인이 용이한 “프랑스빵” 과 “하드롤” 을 대표 레시피로 선발하였다.

본 연구에서는 이중 제빵 및 제과 적용성 평가를 통한 목표 항목중 발효율과 개발효모 및 기능성 소재에 의한 최종제품의 품질평가를 기준으로 하였으며, 이상의 배경을 토대로 개발효모 및 기능성 소재별 발효율과 풍미증가에 미치는 제과/제빵 적용성을 평가하고, 단일 개발효모적용 및 단일 기능성 소재 첨가조건과 이들을 동시 사용에 따른 최종 제과/제빵 제조 레시피 및 이를 적용에 따른 레시피를 정립코져 하였다.

### 가. 선발효모류의 제빵적용성 평가(식빵기준)

선발효모의 가장 중요한 시험항목은 제빵 적용성이며, 이때 가장 중요한 평가 항목은 동일 레시피 적용을 기준으로 발효율과 상품성이라 할 수 있다. 이를 위하여 발효율 및 제빵 특성파악에 가장 용이한 레시피 로서 “식빵” 을 선정하였다. 세부적인 시험방

법 및 항목은 다음과 같다.

#### 1) 선발효모 제빵적용성 평가 레시피

상업효모 대비 유기농업현장에서 분리한 선발효모가 발효율 및 상품성에 관여하는 물성 및 특성평가를 위한 레시피는 가장 보편적면서 평가가 용이한 “식빵”을 대상으로 하였으며, 제빵적용성 평가를 위하여 비상스트레이트법이 아닌 스트레이트 법을 적용하였다(Table 3).

#### 2) 선발효모별 발효율 평가

평가를 위한 기본 제조법은 일반 상용효모를 적용하여 진행되는 과정에 준하여 실시하였다, 즉, 밀가루 1,200g기준으로 물 744g, 생이스트 48g, 이스트푸드 2g, 소금 24g, 설탕 60g,쇼트닝 36g 그리고 탈지분유 48g을 기본 배합비로 하여, 반죽과정에 이어 1차 발효, 성형 및 패닝과정과 2차 발효과정을 거쳐 최종 굽기과정까지 일관되게 진행하였는데, 개발효모 처리구의 경우 상업효모 대신 선발효모를 대체 사용하는 이외는 전체공정을 동일하게 적용하였다. 이를 위해 적용된 식빵 레시피는 Table 1과 같으며, 스트레이트법을 기준으로 하였다(Table 3).

상업효모 대비 유기농업현장에서 분리한 선발효모를 적용하며 최종 식빵을 제조 후 발효율에 미치는 결과 확인을 위한 검정항목으로서, 제빵의 높이(mm, Y축), oven jumping(mm), 폭(mm, X축) 및 폭(mm, Z축)으로 구분하여 비교하였으며 최종발효율(상용효모 대비, %)을 확인하였다.

전체시험간 사용효모재료는 구입(상업효모) 및 생산(개발효모)후 냉장보관 조건하에서 7일 이내에 사용하는 것을 원칙으로 하였다.

#### 3) 선발효모 제빵적용성 평가(관능평가)

상업효모 대비 유기농업현장에서 분리한 선발효모별 제빵의 특화성 결과는 전문 교육을 이수한 관능평가 패널(n=18명) 검정을 통하여 비교하였다. 이를 위한 관능평가 주요항목은 냄새(냄새의 이미이취 정도, 냄새의 선호도 구분), 조직감(표면의 바삭한 느낌정도, 안의 부드러움 정도 그리고 조직감의 선호도로 구분) 및 맛[신맛의 정도, 이미,이취정도 그리고 전체적인 선호도로 구분)으로 3항 및 8세부항목으로 구분하여 실시하였다(Table 4).

#### 4) 통계처리

상업효모 대비 개발효모 종류별 제빵적용성 평가에 따른 기호성은 SAS Program을 이용하여 통계분석을 실시 하였는데, 이때 유의성 차이는 95%수준(P<0.05)에서 ANOVA Test후 Duncan's multiple range test에 의해 검정하였다.

### 나. 선발효모류의 제빵적용성 평가(하드롤 기준)



식빵레시피를 기준으로 상업효모 대비 발효율과 연계하여 전체적인 상품적 우수성(선호도)을 종합적으로 평가하여 본 결과 *S.cereviase* CCK110426가 가장 우수한 것으로 나타났으며, 다음으로는 *S.cereviase* OKK110427, 상업효모 그리고 *S.cereviase* JKK091002 순이었다. 따라서, 이중 제빵에서도 유사한 결과를 보이는지를 평가하여 보았다.

이를 위하여 제빵종류 중 “하드롤 레시피”를 선발하여 이를 기준으로 검정하였는데, 이는 최종 굽기과정이 종료되면 최종성상이 제과와 제빵의 특성을 함께 보유하기 때문에 이를 선정하게 되었다(Table 3).

전체검정을 위한 수행방법 및 결과도출을 위하여, 식빵과 비교시 배합 레시피 및 최종굽기 온도를 제외한 발효율 및 관능평가 등의 전체적인 방법 및 결과확인은 동일하게 적용하였다.

즉, 밀가루 800g기준으로 물 464g, 생이스트 40g, 이스트푸드 2g, 소금 2g, 설탕 16g,쇼트닝 16g, 흰자 1개와 탈지분유 8g을 기본 배합비로 하여, 반죽과정에 이어 1차 발효, 성형 및 패닝과정과 2차 발효과정을 거쳐 최종 굽기과정(윗불 200℃, 아랫불 온도 150℃)까지 일관되게 진행하였는데, 개발효모 처리구의 경우 상업효모 대신 선발효모를 대체 사용하는 이외는 전체공정을 동일하게 적용하였다(Table 6).

### 3. 연구수행결과

#### 가. 선발효모류의 제빵적용성 평가(식빵 레시피 적용)

##### 1) 발효특성 조사

상업효모 대비 유기농업현장에서 분리한 선발효모가 발효율 및 상품성에 관여하는 물성 및 특성평가를 평가가 용이한 “식빵”을 대상으로 하였으며, 그 결과는 다음과 같다(Table 4, Fig 1).

상업효모 대비 유기농업현장에서 분리한 선발효모 4종을 대상으로 동일 식빵 레시피와 제조과정을 굽기과정이 완료된 시점에서 발효특성 및 성상과 이들에 대한 관능평가를 실시한 결과, 우선 개발효모인 *S.cereviase*류와 *C. utilis*의 경우 대조 대비 *S.cereviase*류는 정상적인 발효특성을 보였으나, *C.utilis*의 경우는 발효특성을 보이지 않았다.

상업효모(100% 기준) 대비 개발 *S.cereviase*에 대한 발효특성을 비교하면, 개발효모의 발효율은 약 95%에서 100%의 수준을 보여 상업효모 대비 발효율에서 차이를 보이지 않는 것으로 인정되었다( $P<0.05$ ). 또한, 관능평가 과정을 실시하여 상용효모 적용시 식빵의 식감 및 효모취 증감여부를 비교한 결과, 선발효모의 경우는 식감을 증가 시키면서 효모취가 감소하는 결과를 보이는 것으로 평가 되었다( $P<0.05$ ).

따라서, 본 연구의 최종 목표 중 한가지인 상업효모를 대체함에 있어서도 문제가 없으면서, 동시에 제빵의 품질을 높힐 수 있는 소재로 적합함을 알 수 있었다.

## 2) 관능평가

상업효모 대비 야생 개발효모(*S.cereviase*)는 상용제빵 제조기법을 변형 시키지 않으면서, 발효율의 차이를 보이지 않고 동시에 전체적으로 효모취 감소와 식감을 동시에 증가 시키는 결과를 보이는 것으로 나타났는데, 이를 냄새(냄새의 이미이취 정도, 냄새의 선호도 구분), 조직감(표면의 바삭한 느낌정도, 안의 부드러움 정도 그리고 조직감의 선호도로 구분) 및 맛[신맛의 정도, 이미,이취정도 그리고 전체적인 선호도로 구분)으로 3항 및 8세부항목으로 구분하여 조사하였다(Table 5)

Table 4는 상업효모 대비 유기농업현장에서 분리한 선발효모 4종 적용 제빵제조 세부항목별로 구분하여 관능평가를 실시한 결과이다.

결과로서, 상업효모(100% 기준) 대비 냄새, 조직감 및 맛으로 구분하고 각 항목별 선호도를 평가하여 보았더니, 냄새와 관련하여 이미·이취는 전체 개발효모 처리구에서 약 99%에서 127%의 증가하는 경향을 보였으며, 선호도 역시 약 106%에서 108%범위에서 높게 나타났다.

조직감의 경우에서도 표면의 기호성인 바삭한 느낌 평가에서도 106%~108%, 안의 부드러움 정도평가 결과는 86%~133%로 나타났기 때문에 전체적인 조직선호도를 살펴 보았더니, 101%에서 116%로 냄새와 동일하게 높게 나타났다.

냄새와 조직감 증가가 혹시 발효과정에서 유기산(Acetic acid 및 Isobutric acid)의 증가로 인한 것인지 등의 차이를 확인하여보았다.

우선 신맛의 정도의 수치를 비교하여 보았더니, 상업효모(3.50 기준) 대비 *S.cereviase* JKK091002의 경우는 4.67의 수치를 보여 133%의 증가수치를 보였기 때문에 유기산의 증가로 인한 것일 것이라고 예측되었는데, *S.cereviase* CKK110426과 *S.cereviase* OKK110427경우는 오히려 18%~38%까지 검출량이 감소하는 경향을 보였다. 이는 효모류 마다 제빵 발효과정에서 유기산을 발생시키는 패턴이 다른 것이 아닌가 하고 판단되었기 때문에 추후 풍미분석을 통하여 이를 확인할 필요가 있었다.

또한, 유기산의 증가와 더불어 맛과 관련하여 이미·이취정도를 연계하여 비교하여 보았더니 역시 선발효모류에서 오히려 118%에서 최대 130% 까지 증가하는 경향을 보였다.

최종적으로 맛과 관련하여 전체적인 선호도를 평가하여 보았더니, *S.cereviase* JKK091002의 경우는 88%로 나타나 상업효모 대비 18%의 선호도 감소결과를 보였는데 반하여 *S.cereviase* CKK110426과 *S.cereviase* OKK110427의 경우는 공히 130%의 수치를 보였다.

따라서, 상업효모 대비 전체적인 선호도를 평가하여 본 결과 *S.cereviase* CKK110426가 가장 우수한 것으로 나타났으며, 다음으로는 *S.cereviase* OKK110427, 상업효모(Jenico사) 그리고 *S.cereviase* JKK091002 순이었다.

## 나. 선발효모류의 제빵적용성 평가(하드롤 레시피 적용)

식빵레시피를 기준으로 상업효모 대비 발효율과 연계하여 전체적인 상품적 우수성(선효도)을 종합적으로 평가하여 본 결과를 기준으로, 제빵종류 중 “하드롤 레시피”를 선발하여 이중 제빵종류에서도 동일한 평가가 도출되는지를 확인하여 보았다(Table 7, Fig 2).

상업효모 대비 유기농업현장에서 분리한 선발효모 4종을 대상으로 동일 “하드롤” 레시피와 제조과정을 굽기과정이 완료된 시점에서 발효특성 및 성상과 이들에 대한 관능평가를 실시한 결과, 우선 개발효모인 *S.cereviase*류와 *C. utilis*의 경우 대조 대비 *S.cereviase*류는 정상적인 발효특성을 보였으나, *C.utilis*의 경우는 발효특성을 보이지 않았는데, 이 결과는 식빵의 경우와 동일한 것이었다(Table 5).

상업효모(100% 기준) 대비 개발 *S.cereviase* 각각에 대한 발효특성을 비교해 보았더니, 개발효모를 적용시 높이에서는 약 91%에서 약 96%의 수치를 보여 감소하는 것으로 나타나는 듯 보였으나, 길이와 폭의 수치는 오히려 101%에서 103%의 범위로 증가하는 것을 알 수 있었다. 따라서, 제빵제조시 발효과정 등을 조절 할 수 있음을 가정하면 전체적으로 선발효모가 상업효모보다 발효율에서 차이점은 인정되지 않았다(Table 5~6.,  $P<0.05$ )

또한, 관능평가 과정을 실시하여 상용효모 적용시 식빵의 식감 및 효모취 증감여부를 비교한 결과, 선발효모의 경우는 식빵에서의 적용성 평가와 유사하게 식감을 유의성 있게 증가 시키면서 효모취 또한 감소시키는 결과를 보여, 일치하는 경향이였다(Table 5.,  $P<0.05$ ).

따라서, 하드롤 레시피를 적용한 경우와 식빵의 발효율 및 총체적 관능평가 결과를 종합하여 보면, 개발 효모는 상업효모와 동등성 있는 발효율과 상품성을 확보할 수 있으며, 또한 이러한 결과가 시사하는 것은 개발효모는 모든 제빵종류에서 사용이 가능하다는 것을 시사한 다 할 수 있었다.

결론적으로 본 연구의 최종 목표 중 한가지인 상업효모를 대체함에 있어서도 문제가 없으면서, 동시에 모든 제빵의 품질을 높힐 수 있는 소재로서 적합함을 다시 한번 확인 할 수 있었다.

Table 1. 식빵 및 압착효모형을 기준으로 상업효모 대비 개발효모 4종에 대한 제빵/제과 적용성 평가를 위한 시험디자인

시험항목	개발 효모의 제빵 적용성평가를 위한 레시피				
	상업효모 (대조, Jenico)	개발효모 (JKK 091002)	개발효모 (CKK 110426)	개발효모 (OKK 110427)	개발효모 ( <i>C.utilis</i> )
적용 제조 레시피 (g)	강력분 1,400	강력분 1,400	강력분 1,400	강력분 1,400	강력분 1,400
	물 744	물 744	물 744	물 744	물 744
	생이스트 48	JKK 48	CKK 48	OKK 48	<i>C.utilis</i> 48
	이스트푸드 2	이스트푸드 2	이스트푸드 2	이스트푸드 2	이스트푸드 2
	소금 24	소금 24	소금 24	소금 24	소금 24
	설탕 60	설탕 60	설탕 60	설탕 60	설탕 60
	쇼트닝 36	쇼트닝 36	쇼트닝 36	쇼트닝 36	쇼트닝 36
	탈지분유 48	탈지분유 48	탈지분유 48	탈지분유 48	탈지분유 48
제빵적용성 평가 (숙성조건: 온도/습도/ 시간)	1차 발효	37℃/78%/30분			
	중간 발효	실온/20~30%/25분			
	2차 발효	37℃/78%/30분			
제빵적용성평가 (굽기: 온도, 분)	170℃(오븐상층)/190℃(오븐하층), 25분				

Table 2. 개발효모 및 기능성소재 제빵적용성 평가를 위한 선발 레시피 내역

번호	작품명	반죽제조	시간	1차발효	성형및팬닝	온도
						윗불-아랫불
1	식빵(비상법)	최종후기	3시간	37℃,15-20분	팬목밑1.5cm	170-190
1-1	식빵(스트레이트법)	최종단계	3시간	37℃,15-20분	팬목밑1.5cm	170-190
2	우유식빵	최종단계	4시간20분	27℃ 습도80%	팬목위1cm	170-190
3	옥수수식빵	최종단계	4시간20분	“	“	170-190
4	건포도식빵	최종단계	4시간30분	“	“	170-190
5	폴먼식빵	최종단계	4시간20분	“	팬목	180-200
6	호밀빵	발전단계	4시간20분	“	타원형	190-160
7	프랑스빵	발전단계	4시간20분	“	타원형	200-180
8	하드롤	발전단계	4시간20분	“	원형	200-150
9	더취빵	최종단계	4시간20분	“	타원형	180-150
10	단팥빵(비상법)	최종후기	3시간	30℃15-20분	도넛형	190-140
11	크림빵	최종단계	4시간20분	27℃ 습도80%	발가락형	190-140
12	소보로빵	최종단계	4시간20분	“	원형	200-150
13	과자빵(트위스트)	최종단계	4시간20분	“	8자 이중8자	190-140
14	스위트롤	최종단계	4시간20분	“	야자잎,트리플형 말밥굽형	190-150
15	데니쉬페이스트리	발전단계	5시간	냉장휴지	크로와상,포켓형 바람개비	200-150
16	빵도넛	최종단계	3시간	27℃ 습도80%	8자,파베기	185℃
17	브리오슈	최종단계	4시간	“	눈사람	170-160
18	햄버거빵	최종단계	4시간10분	“	원형	190-140
19	피자	발전단계	3시간	“	원형	210-160
20	모카빵	최종단계	4시간20분	“	타원형	180-150
21	버터롤	최종단계	4시간20분	“	번데기	200-150
22	버터톱식빵	최종단계	3시간30분	“	한 덩이	170-180
23	밤식빵	최종단계	3시간30분	“	한 덩이	160-190
24	치즈스틱	발전단계	3시간	“	막대형	180-130

Table 3. 개발효모 및 기능성소재 제과적용성 평가를 위한 선발 레시피 내역

번호	작품명	제법	시간	비중	팬닝	온도	
						윗볼-아랫볼	
1	옐로우레이어케익	크림법	2시간	0.8±0.05	50%	165-160	
2	화이트레이어케익	크림법	2시간	0.8±0.05	60%	160-160	
3	초콜릿케익	크림법	2시간	0.8±0.05	60%	160-160	
4	테블스푸드케익	블랜딩법	2시간	0.8±0.05	50%	160-160	
5	파운드케익	크림법	3시간	0.75-0.80	70%	180-165	
6	과일케익	별립법(복합)	3시간	0.80±0.05	80%	170-160	
7	버터스펀지케익	공립법	2시간	0.55±0.05	60%	180-160	
8	버터스펀지케익	별립법	2시간	0.55±0.05	50%	180-150	
9	소프트롤케익	별립법	2시간	0.45±0.05		170-150	
10	젤리롤케익	공립법	2시간	0.50-0.55		170-150	
11	오믈렛	별립법	3시간	0.45±0.05		190-145	
12	쇼트브레드쿠키	크림법	2시간30분		두께1cm	190-145	
13	핑거쿠키	공립법	2시간		길이5cm	160-145	
14	케익도넛	공립법	2시간		두께1cm	185℃	
15	슈크림		2시간30분		직경3cm	160-180 210-150	
16	퍼프페이스트리	스트레이트법 (프랑스식)	4시간		두께1cm 가4.5 세12	200-150	
17	사과파이	스코트랜드식	3시간		바닥0.3 달걀0.2	180-180	
18	쉬폰케익	쉬폰법	2시간	0.45±0.05	80-90%	160-165	
19	밤과자	공립법	2시간30분			170-140	
20	마카롱쿠키	머랭	2시간		직경3cm	180-140	
21	버터쿠키	크림법	2시간			180-140	
22	마드레느	1단계법	2시간			180-160	
23	다쿠와즈	머랭	2시간30분			180-140	
24	마테이라컵케익	크림법	2시간30분		80%	180-170	

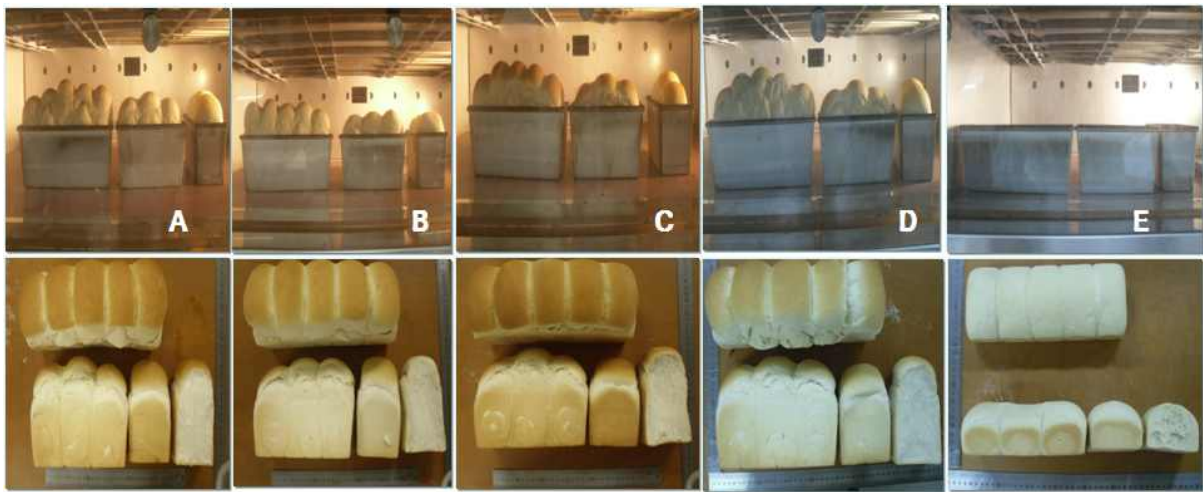


Fig. 1. 상업효모 대비 유기농업현장에서 분리한 선발효모 4종의 제빵적용성 평가 결과  
 A : *S.cereviase*(상업효모), B : *S.cereviase* JKK09100, C : *S.cereviase* CKK110426, D : *S.cereviase* OKK110427, E : *C.utilis.*, 굽기 : 170°C/190°C,30분

Table 4. 식빵을 기준으로 상업효모 대비 유기농업현장에서 분리한 선발효모 4종 적용 제빵제조 발효율 및 관능평가 결과(n=18)

적용효모	높이(mm)		길이 (X,mm)	폭 (Z,mm)	식감	효모취	비고
	전체	Oven Jumping					
<i>S.cereviase</i>	138	51.4	18.6	87.4	+( 기준)	##( 기준)	상업효모 (압착형)
<i>S.cereviase</i> JKK091002	135.3	56.2	18.6	79.6	+++	#	
<i>S.cereviase</i> CKK110426	131	38.2	18.6	83.1	+++	#	
<i>S.cereviase</i> OKK110427	138.1	50.8	18.6	84.6	+++	#	
<i>C. utilis</i>	51.4	0	18	84	-	#	미발효

식감(대조 대비) : -(매우나쁨), +(보통), ++(좋음), +++(매우좋음)

효모취(대조 대비) : ###(매우심함), ##(심함), #(보통)



Table 5. 식빵을 기준으로 상업효모 대비 유기농업현장에서 분리한 선발효모 4종 적용 제빵제조 세부항목별 비교 관능평가 결과(n=18)

적용 효모	1. 냄새		2. 조직감			3. 맛		
	1)냄새이미 이취 정도	2)냄새 선호도	1) 표면의 바삭한 느낌정도	2) 안의 부드러움 정도	3)조직감 선호도	1)신맛의 정도	2) 이미, 이취 정도	3)전체적인 선호도
상업효모	5.00 ±2.30	4.25 ±1.22	4.83 ±1.27	5.75 ±1.06	5.42 ±1.08	3.50 ±1.45	3.75 ±1.29	5.67 ±1.07
<i>S.cerevise</i> JKK091002	4.92 ±2.19	4.37 ±2.05	5.08 ±1.78	4.92 ±1.16	5.50 ±1.45	4.67 ±2.02	4.42 ±1.98	5.00 ±1.41
<i>S.cerevise</i> CKK110426	6.34 ±3.24	5.43 ±1.67	5.12 ±2.10	6.43 ±1.86	6.26 ±1.32	2.86 ±1.88	4.48 ±0.32	6.78 ±2.12
<i>S.cerevise</i> OKK110427	5.79 ±1.36	4.87 ±1.03	5.23 ±1.75	6.26 ±0.76	5.84 ±1.65	2.17 ±0.65	4.87 ±1.21	6.76 ±2.15
<i>C. utilis</i>	0.01 ±0.01	0.01 ±0.01	0.01 ±0.01	0.01 ±0.01	0.01 ±0.01	0.01 ±0.03	0.01 ±0.03	0.01 ±0.01

Table 6. 하드롤 레시피 및 압착효모 제형 적용기중 상업효모 대비 개발효모 4종에 대한 제빵/제과 적용성 평가를 위한 시험디자인

시험항목	개발 효모의 제빵 적용성평가를 위한 레시피				
	상업효모 (대조, Jenico)	개발효모 (JKK 091002)	개발효모 (CKK 110426)	개발효모 (OKK 110427)	개발효모 ( <i>C.utilis</i> )
적용제빵제조 레시피 (g)	강력분 800	강력분 800	강력분 800	강력분 800	강력분 800
	물 464	물 464	물 464	물 464	물 464
	생이스트 40	JKK 40	CKK 40	OKK 40	C.utilis 40
	이스트푸드 2	이스트푸드 2	이스트푸드 2	이스트푸드2	이스트푸드2
	소금 12	소금 12	소금 12	소금 12	소금 12
	설탕 16	설탕 16	설탕 16	설탕 16	설탕 16
	쇼트닝 16	쇼트닝 16	쇼트닝 16	쇼트닝 16	쇼트닝 16
	흰자 1Ea	흰자 1Ea	흰자 1Ea	흰자 1Ea	흰자 1Ea
	탈지분유 8	탈지분유 8	탈지분유 8	탈지분유 8	탈지분유 8
제빵적용성 평가 (숙성조건: 온도/습도/ 시간)	1차 발효	37℃/78%/30분			
	중간 발효	실온/20~30%/5분			
	2차 발효	37℃/78%/30분			
제빵적용성평가 (굽기: 온도, 분)	200℃ (오븐상층)/150℃ 오븐하층), 25분				

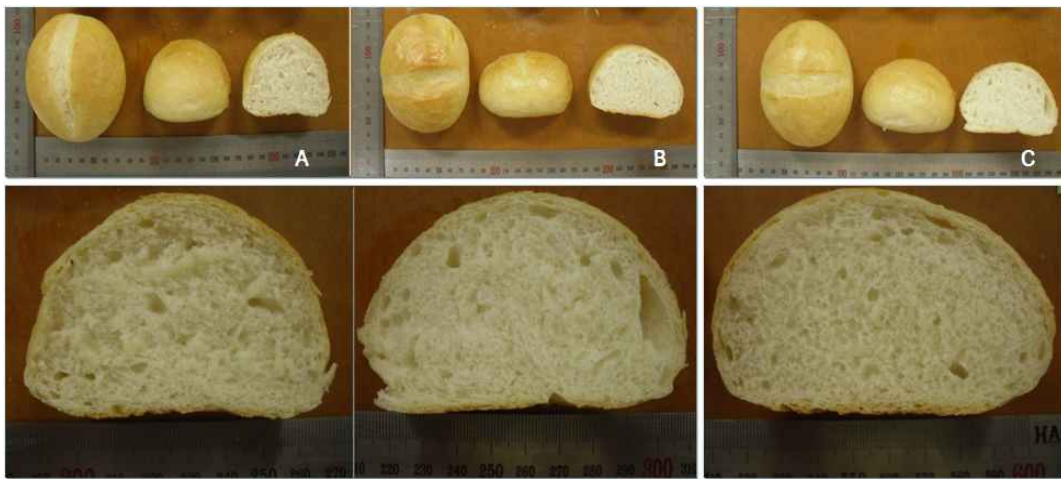


Fig. 2. 하드롤 레시피 및 압착효모 제형 적용기중 상업효모 대비 개발효모 4종에 대한 제빵/제과 적용성 평가결과. A:*S.cereviase*(상업효모), B:*S.cereviase* JKK091002), C:*S.cereviase* CKK110422

Table 7. 하드롤 레시피 및 압착효모 제형 적용기중 상업효모 대비 개발효모 4종에 대한 제빵/제과 적용성 평가결과

적용효모	높이 (Y,mm)	길이 (X, mm)	폭 (Z,mm)	식감	효모취	비고
<i>S.cereviase</i>	50.6±2.4	81.6±1.4	74.6±3.2	+ (기준)	## (기준)	상업효모 (대조)
<i>S.cereviase</i> JKK091002	48.6±3.2	82.5±2.2	76.6±2.8	+++	#	개발효모
<i>S.cereviase</i> CKK110426	46.7±1.8	84.1±1.4	76.5±2.3	+++	#	개발효모
<i>S.cereviase</i> OKK110427	46.2±2.2	83.8±2.3	76.7±4.2	+++	#	개발효모
<i>C. utilis</i>	NC	NCT	NC	NC	NC	미발효

식감(대조 대비) : -(매우나쁨), +(보통), ++(좋음), +++(매우좋음)

효모취(대조 대비) : ###(매우심함), ##(심함), #(보통)

NC :미발효로 인하여 결과 불측정

### 7-3. 개발 기능성소재류별 제과적용성 평가(발효율 및 상품특화성)

#### 1. 연구목적

선행연구에서 하드롤 레시피를 적용한 경우와 식빵의 발효율 및 총체적 관능평가 결과를 종합하여 보면, 개발효모 전체는 상업효모와 동등성 있는 발효율과 상품성을 확보할 수 있으며, 또한 이러한 결과가 시사하는 것은 개발효모는 모든 제빵종류에서 사용이 가능하다는 것을 시사한 다 할 수 있었다.

본 과제 의 최종 목표 중 한가지인 상업효모를 대체함에 있어서도 문제가 없으면서, 동시에 모든 제빵의 품질을 높힐 수 있는 소재로서 적합함을 다시 한번 확인 할 수 있었다. 이를 위하여 제빵종류 중 “프랑스빵 레시피”를 선발하여 이를 기준으로 검정하였는데, 이는 최종 굽기과정이 종료되면 최종성상이 제과와 제빵의 특성을 함께 보유하기 때문에 이를 선정하게 되었다.

이를 위하여 플레인 Bread인 프랑스제빵 레시피를 기준으로 기능성 소재 첨가에 따른 발효율 및 상품성을 연계하여 평가하므로서 최종 목표인 고부가 가치형 레시피 정립을 완료코 저 하였다.

#### 2. 연구수행방법

##### 가. 기능성 소재 준비

상업효모 적용 프랑스 빵 제조 레시피를 적용함을 기준으로 개발 기능성 소재별 및 농도별 첨가 후 제과 및 제빵 적용성 평가를 위한 기능성 소재는 다음과 같다.

*S. cerevisiae*OKK110427(이하, SCOKK), *S. cerevisiae*OKK110427에서 분리한 세포벽 동결건조 시료(이하, GMaeil), *S. cerevisiae*OKK110427에서 추출한 추출물 동결건조 시료(이하, YEMaeil), *S. cerevisiae*에서 분리한 세포벽 동결건조 시료(일본 오리엔탈사, 이하 GJapan)와 *C. utilis*에서 분리한 추출물(일본 KOHJIN사, 이하 YEAR, 상품명 AROMILD)을 시료로 준비하였다(Table 1~2).

##### 나. 시험구 조성(제조 레시피)

상업효모 적용 프랑스빵 제조 레시피를 기준으로 기능성 소재별 및 농도별 첨가에 따른 특성파악을 위한 소재는 다음과 같다(Table 1~2).

대조구는 강력분 1,000g을 기준으로 물 600g, 상용 압착효모(제니코) 50g, 소금 18g을 기본 배합비율로 정하고, 반죽은 최종단계까지, 그리고 1차 발효(30℃, 수분: 80%, 30분) 및 성형(270g로드형, 270g 원형, 60g 원형), 중간발효(30분, 상온), 2차발효(30℃, 수분: 80%, 40분) 단계를 거쳐 최종 굽기(200℃/180℃, 25분)과정을 연계하여 진행하는 것으로 정하였다.

시험구는 강력분 1,000g, 물 600g, 상업용 압착효모(제니코) 50g, 소금 18g, 각 기능성 소재 10g(1%, w/w) 혹은 50g(5%, w/w)으로 기능성 소재만을 첨가하는 조건이외에는

대조구와 동일하게 시험을 실시하였다.

성형 및 패닝은 프랑스빵의 기본형태인 로드형(270g 분할)을 기본으로 하였으며, 결과 분석의 편리성을 확보하기 위해 원형(270g 및 60g 분할)으로 3종류로 구분하여 준비하였다.

기능성 소재 첨가에 따른 제과제빵 특성변화 확인은 발효율과 관능평가항목으로 크게 구분하였으며, 발효특성비교는 대조구 대비 시험구와의 발효단계별(1차발효, 중간발효, 2차 발효, 굽기후) 및 굽기후 제품에 대하여 폭 및 높이(mm)의 차이를 비교하였다.

발효율과 더불어 상품성과 관련한 관능평가는 5항목 및 13세부항목으로 구분하여 관능평가를 실시 하였다(Table 2). 즉, 냄새(1냄새의 이미이취정도, 2 umami정도, 3 냄새의 선호도), 조직감(4 표면의 바삭바삭한 정도, 5 안의 부드러움 정도, 6 기공의 조성정도, 7 조직감의 선호도), 맛(8 신맛의 정도, 9 구수한맛 정도, 10 이미이취정도, 11 전체적인 선호도), 색상(12 선호도), 종합(13 종합선호도)으로 구분하여 전문교육과정을 이수한 패널을 대상(n=32)으로 관능평가를 실시하였다.

결과도출을 위하여, 식감 및 색상의 경우는 1은 “매우나쁨”, 2는 “나쁨”, 3은 “보통”, 4는 “좋음” 그리고 5는 “매우 좋음” 으로 하여 성적을 부여하였다. Umami와 짠맛의 평가는 -의 경우는 “없음”, +의 경우는 “보통”, ++는 “심함” 그리고 +++로 표시한 경우는 “매우 심함” 으로 정하였으며, 마지막으로 색상(갈변현상)의 경우로서 - 표시는 “변화 없음”, +의 경우는 “보통”, ++는 “심함” 그리고 +++의 경우는 “매우심함” 으로 구분 정리하였다.

### 3. 연구수행결과

#### 가. 효모종별 분리 효모추출물이 발효율에 미치는 효과

전체 기능성 소재의 농도별 처리에 따른 차이를 확인하기 위한 농도는 1%와 5%로 정하여 소재별 차이점을 비교하여 보기 위하여, 우선 효모종류가 다른 경우인 *C.utilis*(YE-Japan) 및 *S.cereviase*(YE-Maeil)에서 각각 분리한 효모추출물의 농도차이가 제빵 발효율(굽기후 기준)에 미치는 결과를 무첨가구에 대비하여 살펴 보았다 (Table 3~5, Fig 1~6),

결과로서, 효모추출물을 1% 첨가한 경우, 무첨가(100% 기준) 대비 발효율은 YE-Japan의 경우는 약 108%, YE-Maeil의 경우는 110%로 나타나 효모종류에 상관없이 발효율 증대에 기여하는 것으로 나타났다(Table 3~4., Fig 1~3., P<0.05).

이를 기준으로 5%로 첨가농도를 증가시켰더니, YE-Japan처리구의 경우는 1차 발효시 80%에서 굽기후는 97%의 발효율의 감소 결과를 보였다. 그러나, YE-maeil처리구의 경우는 1차 발효, 중간 발효 및 2차 발효 전체과정에서 110%의 발효율을 나타내었는데 YE-maeil처리구는 발효율을 증가시키는 차이를 보였으며, 최종 굽기후는 102%로 다소 감소하는 패턴을 보였다(Table 5., Fig 4~6., P<0.05).

이러한 이유는 이는 급격한 발효로 인하여 반죽이 처짐현상이 발생하였고 굽기과정에서

감소하는 결과로 도출되었기 때문이었다. 따라서, 우선 효모종별 효모추출물은 성분 등에서 차이를 보이며, 이러한 원인에 의하여 제빵 및 제과 제조시 핵심인 효모발효에 있어 영향을 미치고, 이는 첨가농도에 따라 크게 차이를 보일 수 있음을 예측할 수 있었다.

결국, 식품첨가물로서 인정이 되어 있다 하더라도 제빵 및 제과 레시피 정립에 있어 사용 농도는 중요하다 할 수 있었으며, 이 결과를 근거로 기능성 소재중 효모추출물의 경우는 1%이내 혹은 최대 5%이내의 범위에서 적용함이 적절 하다고 판단되었다.

#### 나. 효모종별 분리 세포벽 성분이 발효율에 미치는 효과

대조로 구입한 세포벽성분(G-Japan)과 동일 *S.cereviase*OKK110427에서 분리한 세포벽 성분(G-Maeil)을 대상으로 이들의 농도차이(1% 및 5%)가 제빵 발효율(굽기후 기준)에 미치는 결과를 무첨가구에 대비하여 살펴 보았다(Table 3~5., Fig 1~6).

세포벽 성분을 1%의 농도로 첨가 한 후, 대조(관행 제조, 100% 기준) 대비 발효율이 G-Japan처리구는 111% 그리고 G-Maeil처리구의 경우는 110%의 수치를 보여 전체적으로 발효율을 증가시키는 결과를 보였으며, 시료별 차이는 인정되지 않았다. 이러한 경향은 반죽후 발효단계별에서도 유사한 경향을 보이는 것으로 조사되었다(Table 3~5., Fig 1~3.,  $P<0.05$ ).

그러나, 세포벽 시료를 5%로 첨가농도를 증가시킨 경우에서, 제빵 발효율은 G-Japan 처리구는 1차 발효시는 70%에서 최종 굽기후는 93%의 수준으로 감소하였는데, G-maeil처리구의 경우는 1차 발효시 80%에서 굽기가 완료된 시점에서 100%의 발효율을 나타내어 다소 차이는 있었지만 1%에 비교하면 전체적으로 첨가 농도가 증가하면 발효율은 감소시키는 경향을 보였다(Table 5., Fig 4~6.,  $P<0.05$ ).

이러한 이유로서 세포벽 분리물의 경우는 효모 활성을 억제시키는 역할을 수행하던지 혹은 기본 제빵 레시피에 첨가시 반죽의 밀도를 단단하게 함으로서 발효시 부품현상(CO<sub>2</sub>)을 저해하였을 수도 있을 것이라고 판단되었으나, 동일효모종에서 분리된 세포벽 성분이고, 제빵 제조시 발효시간은 편차가 있을 수 있음을 감안하면 제빵 제조 레시피 정립간 유의성은 인정 되지 않았다( $P<0.05$ ).

결국, 효모추출물과 동일하게 세포벽성분의 경우도 제빵 및 제과 레시피 정립에 있어 사용 농도는 중요하다 할 수 있었으며, 역시 1%이내 혹은 최대 5%이내의 범위에서 제빵 및 제과 레시피에 적용함이 적절 하다고 판단되었다.

#### 다. 관능평가(냄새, 조직감, 맛 및 색상)에 미치는 효과

프랑스빵 제조 레시피를 기준으로 기능성소재(효모추출물 및 세포벽 분리물)의 농도별 혼합이 제빵의 상품성에 미치는 효과를 관능평가(굽기후)를 실시하여 비교하여 보았는데, 평가항목으로서 냄새, 조직감, 맛 및 색상으로 구분하여 선호도 평가를 대조(무첨가구) 대비 비교하였다(Table 3~5).

우선 효모추출물의 경우는 제빵 및 제과 적용성 평가시 첨가농도를 높이면 높힐수록 umami 로 인한 맛과 향이 증가함과 동시에 짠맛도 증가하는 결과를 보였으나, 색상의 기

호도는 반대로 매우 높게 나타났으며 YE-Japan 및 YE-Maeil 공히 유사한 경향이였다.

즉, 효모추출물을 5% 첨가 및 굽기후에 효모취의 증감차이를 조사한 결과에서는 차이는 인정되지 않았으며, 핵산류로부터 기인한 umami 및 짠맛의 평가지표는 ++(매우심함), 나타나 첨가 농도가 높으면 상품성(기호성)을 저하시킬 수 있음을 확인 하였다(Table 5).

빵 표면색의 변화에 미치는 결과를 비교하여 보았더니, 대조(2 기준) 대비 YE-Japan의 경우는 5(매우 좋음) 그리고 YE-Maeil의 경우는 3(보통)으로 조사되었으며, 식감의 경우도 대조(2 기준) 대비 YE-Japan와 YE-Maeil 공히 4(보통) 나타나 효모추출물은 색상과 식감향상에 기여하는 것으로 조사 되었으며 첨가농도는 1% 이내였다. 그러나 5%를 기준으로 첨가한 세포벽 분리물의 경우는, 대조 대비 전체항목에서 차이가 인정되지 않았다(Table 5, Fig 4~6).

각각의 기능성 소재별(효모추출물 및 세포벽)로 5% 첨가농도를 기준으로 한 관능평가에서, 효모 추출물의 경우 식감과 색상의 품질을 높힐 수 있었으나, 반대로 umami 및 짠맛 등의 증가로 인하여 섭취에 있어 문제점이 대두되었으며, 세포벽 성분의 경우는 대조 대비 차이가 인정되지 않음을 확인 한 결과를 토대로 1%의 첨가 조건에서 프랑스빵을 제조하고, 5항목 및 13세부항목으로 구분하여 관능평가를 실시 하였다(Table 4).

즉, 냄새(1냄새의 이미이취정도, 2 umami정도, 3 냄새의 선호도), 조직감(4 표면의 바삭바삭한 정도, 5 안의 부드러움 정도, 6 기공의 조성정도, 7 조직감의 선호도), 맛(8 신맛의 정도, 9 구수한맛 정도, 10 이미이취정도, 11전체적인 선호도), 색상(12 선호도), 종합(13 종합선호도)으로 구분하여 전문교육과정을 이수한 패널을 대상(n=32)으로 관능평가를 실시하였다(Table 5).

5항목 15세부항목 기준으로 종합 선호도를 비교조사 한 결과, 대조의 경우는 5.32의 수치를 보였는데, 효모추출물인 YE-Japan처리구의 경우는 6.25, YE-Maeil처리구의 경우는 5.12로 조사되었으며, 세포벽 첨가구인 G-Japan은 5.28 그리고 G-Maeil처리구의 경우는 6.54로 조사되었는데, 이는 전체 기능성 소재를 최대 1%로 첨가시 상품성을 향상시킬 수 있음을 확인 하였다(Table 4).

종이 다른 효모균에서 분리한 효모추출물별 차이를 보았더니, YE-Japan은 6.25 그리고 YE-Maeil의 경우는 5.12로 조사되어 *C.utilis*유래의 효모추출물이 선호도를 높이는 데 보다 효과적인 것으로 조사되었다. 이는 효모추출물을 5% 첨가시 핵산류에서 기인한 umami 맛 과 향으로 인한 차이와 또한 냄새, 조직감 그리고 맛에서의 항목별 선호도가 대조 대비 높거나 차이를 보이지 않았음을 기준으로 판단하면 YE-Japan처리구에서의 제빵 표면 색상이 선호도에 영향을 미친 것으로 판단되었으며, 이러한 경향은 세포벽 성분을 첨가한 경우에서도 유사한 경향을 보였다. 즉, YE-Japan처리구와 G-Maeil처리구에서 색상선호도 수치가 6.32와 8.32로 높게(대조 5.32) 나타났음을 생각하면 시각적인 부분이 아마도 전체선호도에 영향을 미친 것으로 판단되었다.

결론으로서 제빵 및 제과제조 레시피 정립에 있어 기능성 소재별 첨가에 따른 발효율 및 상품성(관능평가 결과)을 향상 시키기 위하여는 전체 기능성 소재는 1%의 첨가 농도가 적절한 것으로 파악되었다.



Table 1. 프랑스빵 레시피를 기준으로 개발효모 *S.cereviase* CKK110426에서 분리한 기능성 소재별 첨가(1%,w/w) 및 굽기시 성상변화 및 풍미변화조사(적용효모 : Jenico사 상업효모) 시험디자인

시험항목		기능성 소재 첨가의 제빵제과 특성 및 풍미인자 변화 조사를 위한 적용 레시피				
		상업효모 (대조)	효모추출물 (비교, Aromild)	$\beta$ -Glucan (비교, 오리엔탈)	효모추출물 (아미코젠)	Cell wall (아미코젠)
적용제빵제조 레시피 (g)		강력분 1,000 물 600 압착효모 50 소금 18	강력분 1,000 물 600 압착효모 50 소금 18 Aromild 10	강력분 1,000 물 600 압착효모 50 소금 18 $\beta$ -Glucan 10	강력분 1,000 물 600 압착효모 50 소금 18 효모추출물 10	강력분 1,000 물 600 압착효모 50 소금 18 Cell wall 10
제빵적용성 평가 (숙성조건: 온도/습도/ 시간)	1차 발효	34°C/80%/30분				
	중간 발효	실온/20~30%/20분				
	2차 발효	33°C/78%/30분				
제빵적용성평가 (굽기: 온도,분)		200°C (오븐 상층)/150°C (오븐 하층), 30분				

Table 2. 프랑스빵 레시피를 기준으로 개발효모 *S.cereviase* CKK110426에서 분리한 기능성 소재별 첨가(5%,w/w) 및 굽기시 성상변화 및 풍미변화조사(적용효모 : Jenico사 상업효모) 시험디자인

시험항목		기능성 소재 첨가의 제빵제과 특성 및 풍미인자 변화 조사를 위한 적용 레시피				
		상업효모 (대조)	효모추출물 (비교, Aromild)	$\beta$ -Glucan (비교, 오리엔탈)	효모추출물 (아미코젠)	Cell wall (아미코젠)
적용제빵제조 Recipe (g)		강력분 1,000 물 600 이스트 50 소금 18 효모추출물 50	강력분 1,000 물 600 이스트 50 소금 18 효모추출물 50	강력분 1,000 물 600 이스트 50 소금 18 $\beta$ -Glucan 50	강력분 1,000 물 600 이스트 50 소금 18 효모추출물 50	강력분 1,000 물 600 이스트 50 소금 18 Cell wall 50
제빵적용성 평가 (숙성조건: 온도/습도/시간)	1차 발효	34°C/80%/30분				
	중간 발효	실온/20~30%/20분				
	2차 발효	33°C/78%/30분				
제빵적용성평가 (굽기: 온도,분)		200°C (오븐상층)/150°C 오븐하층), 25분				

Table 3 . 프랑스빵 레시피 기준, 선발효모(*S.cereviase* OKK110427)에서 분리한 기능성 소재 첨가(첨가량 : 1%)에 따른 제빵제과(분할 및 패닝: 60g , 원형 기준) 적용성 평가 결과

시험구	발효특성비교		발효단계별 발효율비교 (대조대비, %)				비고
	폭 (X,mm)	높이 (Y,mm)	1차발효	중간발효	2차발효	굽기	
대조	67.0±0.22	52.9±1.32	100±0.32	100±1.94	100±1.94	100±0.34	(관행, 기준)
YE-Japan	72.2±0.21	50.4±0.12	104±0.28	108±1.23	102±1.39	102±0.75	
YE-Maeil	77.0±1.24	47.0±1.02	101±0.25	105±2.03	105±1.08	103±1.33	
G-Japan	74.3±0.33	46.2±0.14	100±0.45	100±1.30	100±2.43	101±1.22	
G-Maeil	73.7±0.28	50.9±1.04	103±0.22	104±2.26	104±1.23	104±0.97	

- 제조 레시피 : 강력분 1,000g, 물 600g, 압착효모(제니코) 50g, 소금 : 18g, 반죽제조 : 최종단계, 1차발효(30℃, 수분: 80%, 30분), 분할 및 성형(270g로드형, 270g 원형, 60g 원형), 중간발효: 30분, 2차발효(30℃, 수분: 80%, 40분), 굽기 : 200℃/180℃ (25℃)
- 시험구 : 배합시 소재 각 10g첨가
- G: β-Glucan., YE: Yeast Extract

Table 4 . 프랑스빵 레시피 기준, 선발효모(*S.cereviase* OKK110427)에서 분리한 기능성 소재별 1% 첨가후 제조한 제빵의 관능평가 결과

시험구 (기능성 소재)	1. 냄새			2. 조직감				3. 맛				4.색상	5.종합
	1)냄새 의 이미 이취 정 도	2)미원 취정도	3)냄새 선호도	1)표면 의 바삭 한느낌 정도	2) 안 부의 드러움 정도	3)기공 조 성 정 도	3) 조직 감 의 선 호도	1)신맛 의 정 도	2) 구수 한맛정 도	3)이미, 이취 정도	4)전체 적인 선호도	선호도	전 체 선 호도
대조	5.00 ±2.30	2.23 ±0.28	4.25 ±1.22	6.83 ±1.27	5.75 ±1.06	6.34 ±1.68	5.42 ±1.08	3.50 ±1.45	5.32 ±1.53	3.75 ±1.29	5.67 ±1.07	5.32 ±1.34	5.32 ±1.20
YE-Japan	5.00 ±2.30	2.35 ±0.30	5.24 ±0.63	6.18 ±0.76	5.85 ±1.24	6.25 ±1.03	6.12 ±1.05	3.45 ±1.21	7.19 ±1.64	3.88 ±1.32	6.45 ±1.07	6.32 ±0.34	6.25 ±1.54
YE-Maeil	4.87 ±3.23	2.20 ±0.41	4.17 ±1.42	5.68 ±1.21	5.61 ±1.14	6.21 ±1.32	5.38 ±1.68	3.53 ±1.34	5.35 ±1.28	3.63 ±1.74	5.67 ±1.07	4.26 ±0.23	5.12 ±1.03
G-Japan	4.94 ±1.23	2.18 ±0.35	4.03 ±0.65	5.75 ±1.08	5.59 ±1.38	6.12 ±1.17	5.24 ±1.22	3.53 ±1.33	5.28 ±1.22	3.68 ±1.04	5.58 ±1.57	4.28 ±1.53	5.28 ±1.39
G-Maeil	5.85 ±1.20	2.38 ±0.72	5.86 ±0.34	6.67 ±0.39	6.43 ±1.36	6.47 ±1.22	7.37 ±1.83	3.56 ±1.23	7.26 ±1.48	4.10 ±2.01	5.56 ±1.54	8.32 ±0.83	6.54 ±0.82

- 제조 레시피 : 강력분 1,000g, 물 600g, 압착효모(제니코) 50g, 소금 : 18g, 반죽제조 : 최종단계, 1차발효(30℃, 수분: 80%, 30분), 분할 및 성형(270g로드형, 270g 원형, 60g 원형), 중간발효: 30분, 2차발효(30℃, 수분: 80%, 40분), 굽기 : 200℃/180℃ (25℃)
- 시험구 : 배합시 소재 각 10g첨가
- G:  $\beta$ -Glucan., YE: Yeast Extract

Table 5 . 프랑스빵 레시피 기준, 선발효모(*S.cereviase* OKK110427)에서 분리한 기능성 소재별 5% 첨가에 따른 발효율 및 관능평가 결과

시험구 (기능성 소재)	발효특성비교						관능평가					비고
	폭 (X,mm)	높이 (Y,mm)	발효단계별 발효율비교 (대조대비, %)				색상	식감	짠맛	효모취	umami	
			1차발효	중간발효	2차발효	굽기						
대조	75.3 ±3.2	47.7 ±2.8	100	100	100	100	2	2	-	+	-	관행,기준
YE-Maeil	76.8 ±2.2	48.3 ±5.1	110	110	110	102	5	4	++	+	++	
YE-Japan	69.3 ±2.8	50.4 ±0.3	80	90	98	97	3	4	+	+	++	
G-Japan	64.5 ±0.3	49.8 ±1.8	70	75	91	93	2	2	-	+	-	
G-Maeil	70.6 ±0.2	52.6 ±1.5	80	80	90	100	2	2	-	+	-	

- 제조 레시피 : 강력분 1,000g, 물 600g, 압착효모(제니코) 50g, 소금 : 18g, 반죽제조 : 최종단계, 1차발효 (30℃, 수분: 80%, 30분), 분할 및 성형(270g로드형, 270g 원형, 60g 원형), 중간발효: 30분, 2차발효(30℃, 수분: 80%, 40분), 굽기 : 200℃/180℃ (25℃), 시험구 : 배합시 소재 각 50g첨가
- 식감 및 색상(1 : 매우나쁨, 2 : 나쁨, 3 : 보통, 4 : 좋음, 5: 매우 좋음), 효모취, 미원취 및 짠맛(-: 없음, +:보통, ++:심함, +++:매우심함), 색상(갈변현상): -: 없음, +:보통, ++ : 심함, +++ : 매우심함
- YE-Maeil : 대조(관행)제조공정 동일, 배합시 *S.cereviase* OKK110427 분리 추출물 동결시료 50g 첨가., G-Japan : 대조(관행) 제조공정 동일, 배합시 *S.cereviase* 분리 ?-glucan(Oriental사, Japan)시료 50g 첨가., YE-Japan : 대조(관행)제조공정 동일, 배합시 *C.utilis*분리추출물(Kohjin사, Japan)시료 50g 첨가., G-Maeil : 대조(관행)제조공정 동일, 배합시 *S.cereviase* 분리 Cell Wall추출물 동결시료 50g 첨가

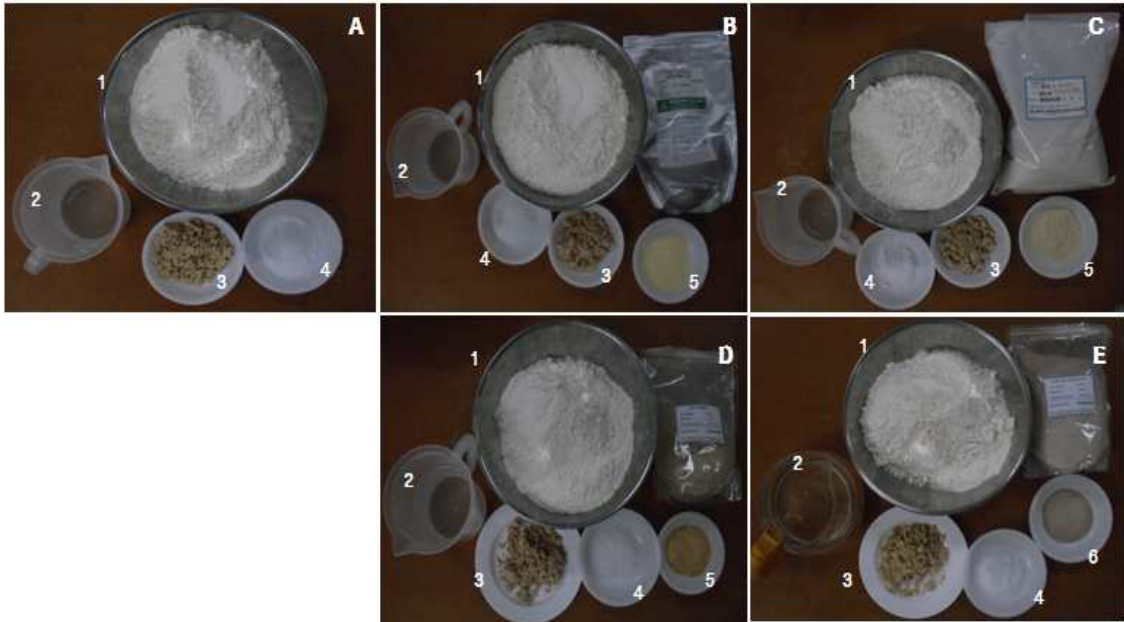


Fig. 1 . 프랑스빵 제조 레시피 적용, 선발효모 (*S.cereviase* OKK110427)에서 분리한 기능성 소재 첨가(1%, w/w)에 따른 제빵/제과 적용성 평가를 위한 준비사항

- 대조(관행, A) : : 강력분 1,000g, 물 600g, 압착효모(제니코) 50g, 소금 : 18g, 반죽제조 : 최종단계, 1차발효(30℃, 수분: 80%, 30분), 성형(270g로드형, 270g 원형, 60g 원형), 중간발효: 30분, 2차발효(30℃, 수분: 80%, 40분), 굽기(시간) : 200℃/180℃(30분)., YE-Japan( B) : 대조(관행)제조공정 동일, 배합시 *C.utilis* 분리추출물(Kohjin사, Japan)시료 10g 첨가., G-Japan(C): 대조(관행)제조공정 동일, 배합시 *S.cereviase* 분리  $\beta$ -glucan(Oriental사, Japan)시료 10g 첨가., YE-Maeil(D) : 대조(관행)제조공정 동일, 배합시 *S.cereviase* OKK110427 분리추출물 동결시료 10g 첨가., G-Maeil( E) : 대조(관행)제조공정 동일, 배합시 *S.cereviase* 분리 Cell Wall추출물( $\beta$ -glucan) 동결시료 10g 첨가
- 1 : 강력분, 2: 물, 3:압착효모(제니코사), 4:소금, 5 : 기능성 소재

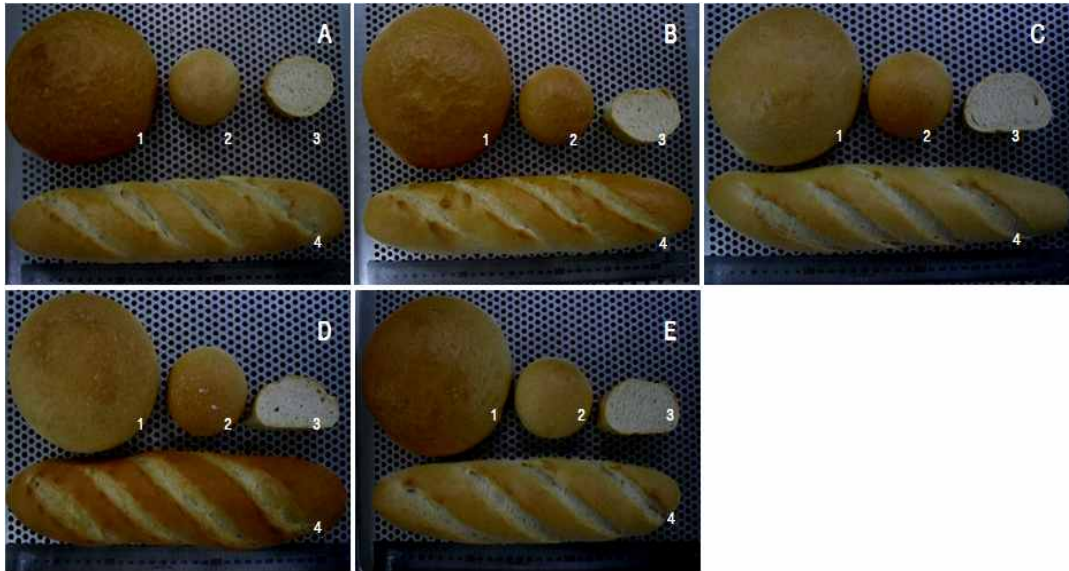


Fig. 2 . 프랑스빵 제조 레시피 적용, 선발효모 (*S.cereviase* OKK110427)에서 분리한 기능성 소재 첨가(1%, w/w)에 따른 제빵/제과 적용성 평가 결과

- 대조(관행, A) : 강력분 1,000g, 물 600g, 압착효모(제니코) 50g, 소금 : 18g, 반죽제조 : 최종단계, 1차발효(30℃, 수분: 80%, 30분), 성형(270g로드형, 270g 원형, 60g 원형), 중간발효: 30분, 2차발효(30℃, 수분: 80%, 40분), 굽기(시간) : 200℃/180℃(30분)., YE-Japan(B) : 대조(관행) 제조공정 동일, 배합시 *C.utilis* 분리추출물(Kohjin사, Japan)시료 10g 첨가., G-Japan(C) : 대조(관행) 제조공정 동일, 배합시 *S.cereviase* 분리  $\beta$ -glucan(Oriental사, Japan)시료 10g 첨가., YE-Maeil(D) : 대조(관행) 제조공정 동일, 배합시 *S.cereviase* OKK110427 분리추출물 동결시료 10g 첨가., G-Maeil(E) : 대조(관행) 제조공정 동일, 배합시 *S.cereviase* 분리 Cell Wall추출물 동결시료 10g 첨가
- 1: 성형(원형) 및 패닝 270g, 2: 성형(원형) 및 패닝 60g, 3: 조직 성상, 4: 성형(로드형) 및 패닝 270g



Fig. 3 . 프랑스빵 제조 레시피 적용, 선발효모 (*S.cereviase* OKK110427)에서 분리한 기능성 소재 첨가(1%, w/w)에 따른 제빵/제과 적용성 평가 결과  
 - 대조(관행, 1) : 강력분 1,000g, 물 600g, 압착효모(제니코) 50g, 소금 : 18g, 반죽제조 : 최종단계, 1차발효(30℃, 수분: 80%, 30분), 성형(270g로드형, 270g 원형, 60g 원형), 중간발효: 30분, 2차발효(30℃, 수분: 80%, 40분), 굽기(시간) : 200℃/180℃(30분)., YE-Japan(2) : 대조(관행)제조공정 동일, 배합시 *C.utilis*분리추출물(Kohjin사, Japan)시료 10g 첨가., G-Japan(3) : 대조(관행)제조공정 동일, 배합시 *S.cereviase* 분리  $\beta$ -glucan(Oriental사, Japan)시료 10g 첨가., YE-Maeil(4) : 대조(관행)제조공정 동일, 배합시 *S.cereviase* OKK110427 분리 추출물 동결시료 10g 첨가., G-Maeil(5) : 대조(관행)제조공정 동일, 배합시 *S.cereviase* 분리 Cell Wall추출물 동결시료 10g 첨가  
 - 발효성상 평가( A : 폭, B: : 높이, C: 조직



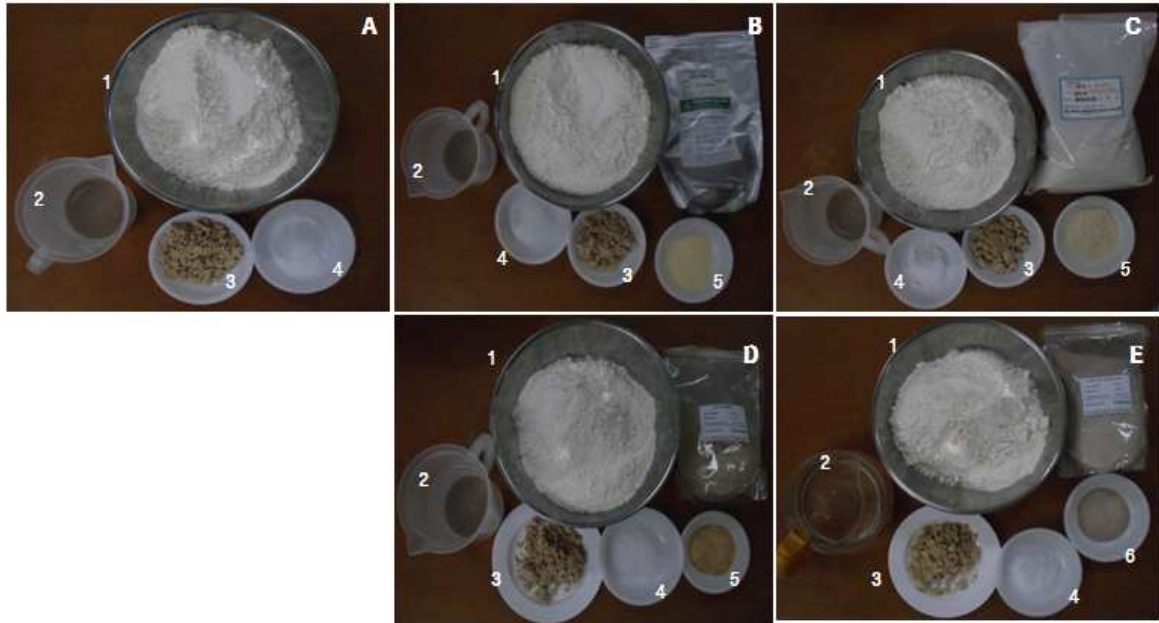


Fig. 4 . 프랑스빵 제조 레시피 적용, 선발효모 (*S.cereviase* OKK110427)에서 분리한 기능성 소재 첨가(5%, w/w)에 따른 제빵/제과 적용성 평가를 위한 준비사항

- 대조(관행, A) : 강력분 1,000g, 물 600g, 압착효모(제니코) 50g, 소금 : 18g, 반죽제조 : 최종단계, 1차발효(30℃, 수분: 80%, 30분), 성형(270g로드형, 270g 원형, 60g 원형), 중간발효: 30분, 2차발효(30℃, 수분: 80%, 40분), 굽기(시간) : 200℃/180℃(30분)., YE-Japan( B) : 대조(관행)제조공정 동일, 배합시 *C.utilis* 분리추출물(Kohjin사, Japan)시료 10g 첨가., G-Japan(C): 대조(관행)제조공정 동일, 배합시 *S.cereviase* 분리  $\beta$ -glucan(Oriental사, Japan)시료 10g 첨가., YE-Maeil(D) : 대조(관행)제조공정 동일, 배합시 *S.cereviase* OKK110427 분리추출물 동결시료 10g 첨가., G-Maeil( E) : 대조(관행)제조공정 동일, 배합시 *S.cereviase* 분리 Cell Wall추출물( $\beta$ -glucan) 동결시료 10g 첨가
- 1 : 강력분, 2: 물, 3:압착효모(제니코사), 4:소금, 5 : 기능성 소재



Fig. 5 . 프랑스빵 제조 레시피 적용, 선발효모 (*S.cereviase* OKK110427)에서 분리한 기능성 소재 첨가(5%, w/w)에 따른 제빵제과 적용성 평가 결과  
 대조(관행) : 강력분 1,000g, 물 600g, 압착효모(제니코) 50g, 소금 : 18g, 반죽제조 : 최종단계, 1차발효(30℃, 수분: 80%, 30분), 성형(270g로드형, 270g 원형, 60g 원형), 중간발효: 30분, 2차발효(30℃, 수분: 80%, 40분), 굽기 : 200℃/180℃(25℃)., YE-Maeil : 대조(관행)제조공정 동일, 배합시 *S.cereviase* OKK110427 분리 추출물 동결시료 50g 첨가., G-Japan : 대조(관행)제조공정 동일, 배합시 *S.cereviase* 분리  $\beta$ -glucan(Oriental사, Japan)시료 50g 첨가., YE-Japan : 대조(관행)제조공정 동일, 배합시 *C.utilis*분리추출물(Kohjin사, Japan)시료 50g 첨가., G-Maeil :대조(관행)제조공정 동일, 배합시 *S.cereviase* 분리 Cell Wall추출물 동결시료 50g 첨가

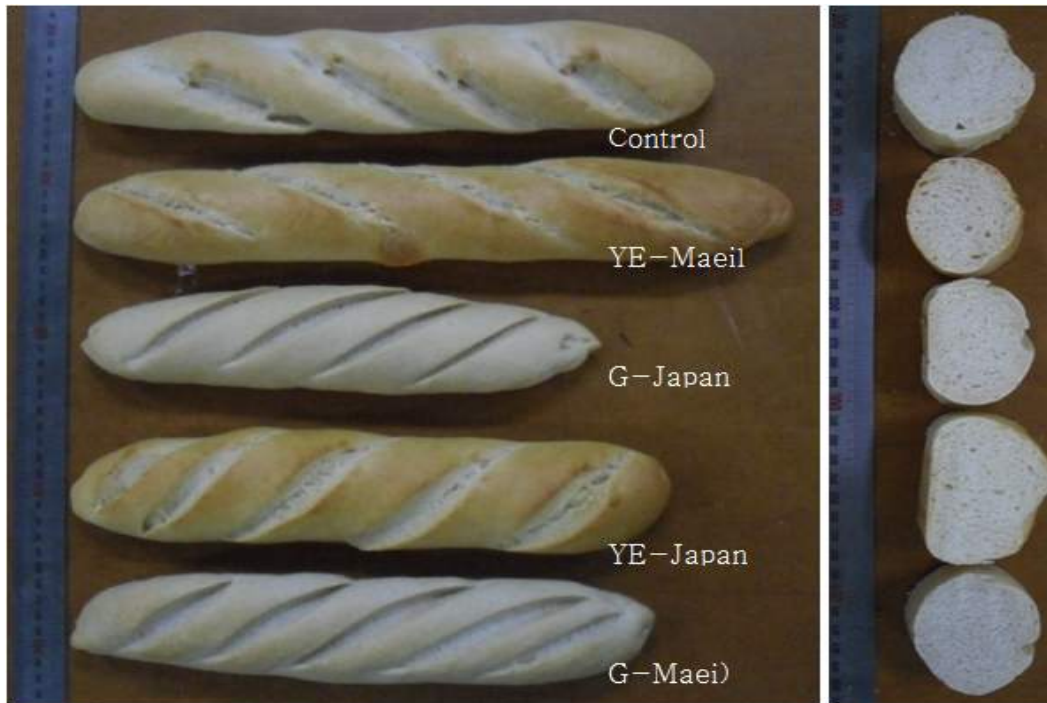


Fig. 6 . 프랑스빵 제조 레시피 적용, 선발효모 (*S.cereviase* OKK110427)에서 분리한 기능성 소재 첨가(5%,w/w)에 따른 제빵제과 적용성 평가 결과

대조(관행) : 강력분 1,000g, 물 600g, 압착효모(제니코) 50g, 소금 : 18g, 반죽제조 : 최종단계, 1차발효(30℃, 수분: 80%, 30분), 성형(270g로드형, 270g 원형, 60g 원형), 중간발효: 30분, 2차발효(30℃, 수분: 80%, 40분), 굽기 : 200℃/180℃(25℃)., **YE-Maeil** : 대조(관행)제조공정 동일, 배합시 *S.cereviase* OKK110427 분리 추출물 동결시료 50g 첨가., **G-Japan** : 대조(관행)제조공정 동일, 배합시 *S.cereviase* 분리  $\beta$ -glucan(Oriental사, Japan)시료 50g 첨가., **YE-Japan** : 대조(관행)제조공정 동일, 배합시 *C.utilis*분리추출물(Kohjin사, Japan)시료 50g 첨가., **G-Maeil** : 대조(관행)제조공정 동일, 배합시 *S.cereviase* 분리 Cell Wall추출물 동결시료 50g 첨가

## 7-4. 선발효모 및 기능성소재류 특화성 분석(풍미)

### 1. 연구목적

본 연구에 앞서 제빵의 풍미증가(카라멜향)에 있어 주요한 인자는 과일내 풍부히 함유되어 있는 유기산(Tartaric acid)와 Glucose가 중요한 인자임을 보고한 바 있다.

이를 기준으로 개발 기능성 소재별 사전안전성 및 기능성(항염증 증대효과, 세포독성 및 성장 관련평가) 결과를 토대로 기능성 소재4종 Mix 핵산류, 제과/제빵 적용성 평가를 실시하였는데, 상용 제조레시피가 알려진 제과분야 24항목 그리고 제빵분야 24항목에 대한 예비 적용성 평가를 실시한 후 ‘프랑스빵’, “하드롤 ‘ 및 ’ 식빵”을 최적시료로 선발하여 이를 기준으로 발효율과 풍미증가에 이치는 제과/제빵 적용성을 평가하였다. 또한, 제과/제빵 제조 레시피 설정은 단일 개발효모적용 및 단일 기능성 소재 첨가조건과 동시 첨가에 따른 최종 제과/제빵 제조 레시피 및 이를 적용에 따른 레시피를 정립코 저 하였다. 그리고, 상업효모(분말형, 압착형) 대비 개발효모(*S.cereviase* OKK110427, JKK091002 및 CKK110426)의 제과/제빵(식빵, 프랑스빵) 적용에 따른 성장변화 및 풍미변화조사를 하였다.

### 2. 연구수행방법

연구간 공시효모균은 상업효모 대비 개발효모를 대상으로 제형별(압착효모 및 동결분말형)로 구분하여 제빵적용성 평가와 더불어 풍미발현인자로 구분하여 검정하였다. 기능성 소재류 또한 상용소재를 구입 이를 기준으로 동일한 평가를 실시하였다.

#### 가. 공시효모 준비

대조로서 사용한 효모는 상업효모인 압착형[르샤프사(프랑스),수분 70%]과 건조분말형[르샤프사(프랑스)]을 구입하였고, 시험구로서 개발효모인 *S.cereviase* OKK110427, JKK091002, CKK110426 그리고 *C.utilis*을 압착형(수분:74%)과 분말형(동결건조)으로 구분하여 완제품을 사용하였다.

제빵제조 레시피에 적용된 효모재료는 구입(상업효모) 및 생산(개발효모)후 7일 이내에 냉장보관 조건에서 사용하는 것을 원칙으로 하였다.

#### 나. 기능성 소재 준비 및 분석법 정립

개발효모인 *S.cereviase*CKK110426에서 분리한 효모추출물 및 세포벽만 순수분리한 cell wall 완제품을 시험구로 하여, 대조시료로서는 *S. cereviase*에서 분리한 세포벽 동결건조 시료(일본 오리엔탈사)와 *C.utilis*에서 분리한 효모추출물 Yeast NT(상품명, 일본 KOHJIN사), 효모추출물 Aromild(상품명, 일본 KOHJIN사)를 구입하여 사용하였다.

예비분석을 통하여 검정한 결과를 토대로 효모추출물내 함유되어 있는 핵산류는 기본적으로 5종이었으므로 이에 따라 영유아식품 등에 첨가(두뇌 발달)중인 상용 핵산류를

5' -UMP, 5' -CMP, 5' -AMP, 5' -GMP 그리고 5' -IMP를 각각 구입하여 효모내 함유되어 있는 각각 핵산류(시험구)와 동일량을 정량하여 대조구로 사용하였다.

준비된 기능성 소재별로 제빵적용성 평가전 열처리시 물성 변화 및 풍미 등에 미치는 효과를 사전검정하기 위하여, 풍미인자 검정용 시험용기(50ml, GC-Mass)내 동일량을 각각 충전한 후 열처리 조건별(무처리, 75℃, 90℃ 및 110℃)로 풍미인자를 분석하였다.

핵산분석을 위한 표준체로서는 19종(5'-CMP, -UMP, -dCMP, -CDP, -UDP, -GMP, -IMP, -CTP, -UTP, -GDP, -TMP, -AMP, -dGMP, -GTP, -TDP, -ADP, -TTP, -dAMP, -ATP)을 Sigma사에서 구입하여 사용하였다.

표준체 및 효모내 함유된 핵산류 검정을 위한 분석조건은 HPLC-Mass시스템을 적용하였으며, 분석방법은 식품중 식품첨가물 분석법(식약청 2011, 제 11장 기타, 6아데닐산)인 뉴클레오티드류 검정법을 기준으로 하였다.

분석법은 다음과 같이 실시하였다. 우선 구입 표준체별 1ml당 각각의 표준품을 1,000 µg/ml(1,000ppm)의 농도로 하되 3%(w/w) 초산을 첨가하여 제조하였으며, 혼합표준용액은 준비된 각각의 표준용액을 3% 초산으로 적당한 농도로 혼합하여 제조하였다.

효모추출물내 함유되어 있는 핵산류 검정을 위한 시료 전처리는 다음과 같이 실시하였다. 검체 1g을 취하여 3% 초산 10ml를 가한 후 10분간 초음파 추출후 이를 10분동안 3,000rpm에서 분리한 후 상등액을 멤브레인 필터로 여과한 후 시험용액으로 하였다.

전처리된 시험용액내 핵산류 검정을 위한 기기 분석조건으로서 분석기종을 HPLC-UVD(Agilint 1200series)을 사용하였으며, 이때 적용 Deteter는 DAD(260nm)였다.

핵산검출을 위한 컬럼은 YMC-Pack ODS-AM(5µm x 4.6 x 250mm)를 Flow rate는 1.0ml/min.으로 하고 시험용액을 20ul를 주입하여 검정하였다. 검정을 위한 Mobile Phase는 A용액(0.2M triethylamine, pH 6.6) 그리고 B용액[0.2M triethylamine(pH 6.6)/acetonitrile(95/5)]로 각각 조성한 후 농도구배 차이를 적용하였다. 즉 0min.(B용액 4%)→10min.(B용액 4%)→30min.(B용액 100%)→37min.(B용액, 4%)→45min.(B용액, 4%)순으로 시간별 농도구배 조건을 부여하였다.

#### 다. 선발효모 및 기능성 소재별 제빵·제과 적용성 평가

선발효모 및 기능성 소재 적용성 평가를 위한 제빵·제과 검정레시피는 선발효모의 경우는 “식빵” 과 “하드롤” 을 기준으로 그리고 제과부분은 프랑스빵을 선정하였고, 이들의 표준 제조레시피의 밀반죽에서부터 굽기단계까지 단계별 특성 차이를 비교하였으며 전체적인 순서는 다음과 같다.

선발효모별 발효율 및 풍미 등에 미치는 비교평가를 위하여, “식빵” 과 “하드롤” 제조 레시피를 기준으로 상용효모(대조) 첨가량 대비 선발효모별 동일량을 대체하는 조건 이외에는 전체 공정을 동일하게 실시하였다.

기능성 소재의 경우는 사전평가 결과를 토대로, “프랑스빵”과 ”하드롤“ 레시피에 1%(w/w) 및 5%(w/w)되게 첨가하는 조건 이외에는 상용 레시피와 동일하게 적용하여

발효율, 물성(색상 등) 및 풍미 등에 미치는 결과를 역시 확인하였다.

이를 위하여 재료 정량, 밀반죽, 1차발효, 성형 및 패닝, 중간발효 그리고 2차 발효 과정과 굽기과정을 거쳐 최종 완료하는 일반적인 제조법에 준하여 실시하였다(Table 2.~Table 6.에 제시하였다).

제빵의 반죽은 실온에서 믹서(Bear Varimixer, Bear, 덴마크)를 이용해 15분간 실시하였다. 반죽의 형태는 프랑스빵의 경우 로드형 및 원형으로 하여 구분하여 굽기를 진행하였다.

발효는 제과 냉동/냉장기기(Panem,프랑스)를 사용하여 온도 33~34℃ 습도 78~80% 시간은 30분에서 발효를 진행하였다.

베이킹을 위한 데크 오븐(MIWE Condo, Type : CO 3.1208, Arnstein, 독일)의 온도는 프랑스빵의 경우 200℃(상층)/150℃(하층) 25분간 굽기를 하였고, 식빵의 경우 170℃(상층)/190℃(하층) 30분간 굽기를 진행하였다. 그리고, 시험구별 특화성(풍미)에 미치는 효과 검정을 위하여, 시험구별 제조제빵의 샘플을 채취 후 18종 성분[Alcohol(6종), Aldehyde(2종), Acid(5종), Ester(4종) 및 Ketone(1종)]에 대해서 분석 및 풍미관련 이화학적 조사를 실시하였다. 풍미 성분분석은 정립된 GC-MS시스템을 이용하여 분석하였다(Table 1.).

### 3. 연구수행결과

개발효모 및 기능성 소재의 제빵제조 발효율과 풍미에 미치는 결과는 구분하여 정리하였으며, 다음과 같다.

#### 가. 발효율에 미치는 효과

개발효모에서 분리한 기능성 소재의 제빵/제과(식빵 및 프랑스빵) 적용평가를 위한 시험 디자인은 Table 2.~6.에 따라 실시하였다. 결과로서, 4종 시제품 개발효모에 대한 제빵적용성 평가(식빵 기준)에서, 상용효모 대비 *C. utilis*외 3종 선발 *S.cereviase*류는 제빵 적용성(발효율 및 상품성)에 있어 적합한 것으로 평가되었다( $P<0.01$ ).

개발효모 및 기능성 소재 첨가에 따른 발효특성 차이를 비교(발효단계별 발효율 비교)한 결과, 제과·제빵 제조용 및 기능성 소재 제조용으로 동시적용이 가능한 효모는 3종효모(*S.cereviase* JKK091002, *S.cereviase* CKK110426, *S.cereviase* OKK110427)였으며, 그리고 *C.utilis*는 기능성 소재 제조용으로 적합하였다( $P<0.01$ ).

기능성 소재중 세포벽 분리시료를 첨가시, 제빵발효율은 대조 대비 80%수준이었으며, 효모 추출물 소재의 첨가시는 *S.cereviase* 발효율은 대조대비 110%이상이었다. 그러나, *C.utilis*은 98%수준으로 나타나 *S.cereviase*의 경우가 *C.utilis*보다 제빵 및 제과 제조시 발효율을 보다 증대시키는 것으로 조사되었다( $P<0.01$ ).

효모추출물의 경우, 굽기후에 관능평가를 실시하여 본 결과 1% 이상 첨가시는 우마미 및 짠맛이 다소 높게 나타났으며, 첨가농도가 높을수록 비례하여 빵 표면색의 고급화(황

갈색)에 영향을 미치는 것으로 조사되었다( $P < 0.01$ ).

#### 나. 풍미인자(카라멜향 증대)에 미치는 효과

선발효모류에 대한 대량생산시스템을 정립한 후 생산된 제형별 효모에 대하여 상업 효모 대비 개발효모의 발효율과 풍미발현에 관련되는 인자를 조사하여 보았다.

이를 위하여, 효모추출물, 세포벽 성분 및 핵산류에 대하여 기준 제빵제조레시피내 1~5%되게 첨가한 후 구운 제빵시험구별 동일량의 샘플에 대하여 GC-MS검정을 실시하였다. 결과는 다음과 같다.

선발 효모류 및 기능성 소재류를 농도별 첨가한 후 제조한 제빵 풍미인자를 GC-MS분석을 통하여 검정한 결과 총 18종의 성분이 검출되었으며(Table 7~12), 전체분석 수치(100% 기준)중 알콜류 점유비율이 60%~90% 범위에서 가장 높게 나타났다.

선행연구(제 5 절)에서 풍미발현(카라멜향)인자는 효모 보다는 유기산(malic 및 Tataric acid)과 Glucose 및 Sucrose으로 확인 한 바 있는데, 이와 비교시 순수효모만을 분리하여 사용한 선발효모와 기능성 소재류는 풍미발현에 영향을 미치지 않으며, 발효와 관계하면서 알콜성 풍미발현에 영향을 미치는 것으로 조사되었다..

개발효모에서 분리한 기능성 소재별 내열성(무처리, 75°C, 90°C 및 110°C) 평가에 따른 풍미변화조사를 하였다(Table. 7., Fig 1).

결과로서, 제빵 발효율 관련인자인 알콜류의 점유율이 가장 높았는데 그 중에서 Ethanol이 가장 높은 점유율을 보였다.

개발효모(*S.cereviase*CKK110426)의 경우에서, 비가열시 전체 풍미인자에서 Ethanol는 약 63%의 점유율을 보였으며, 75°C로 처리한 경우는 약 65.9%, 90°C는 66.5% 그리고 110°C로 가열처리시는 67.3%로 나타나 가열온도가 증가하면 비례하여 다소 증가하는 경향을 보였으나, 유의한 차이는 인정되지 않았다( $P < 0.05$ ).

이러한 경향은 효모를 제빵 및 제과에 적용 시, 반죽, 발효 및 굽기 과정에서 빵 안의 온도가 100°C정도임을 감안하면 Ethanol이 풍미에 있어 주요한 인자일 것으로 예측되었다.

개발효모의 풍미인자 분석을 기준으로 기능성 소재별 풍미인자의 온도별 수치를 비교하여 보았다((Table 7)

동일종인 *S.cereviase*에서 분리한 세포벽 성분이라 하더라도 차이를 보였는데, 대조인  $\beta$ -Glucan(오리엔탈사, 일본)의 경우는 비열처리구에서 74%였는데, 열처리를 한 경우에서도 74%의 수준으로 검출되었다. 그러나, 개발 Cell Wall분리물을 처리한 경우에는 비열처리시 약 93%였는데 열처리를 한 경우에는 43~49%의 검출수치를 보여 약 50%의 감소결과를 보여 대조와는 큰 차이를 보였다.

기능성 소재별의 비열처리 대비 열처리시 기능성 소재별 풍미인자 분석을 위한 시료 전처리 및 분석절차가 준수되었기 때문에 같은 효모종이라 하더라도 제빵/제과 적용시 발효와 더불어 알콜성 풍미의 발현이 차이가 있을 것으로 예측되었다.

효모추출물이 풍미에 미치는 인자 및 검출량을 조사하여 보았더니, 대조시료인 Yeast NT와 Aromild의 경우는 비열처리 및 열처리에 상관없이 Ethanol의 검출량이 0.1~1.1% 범위였는데, *S.cereviase* CKK110426에서 분리한 효모추출물의 경우에는 비열처리시 약 44%, 열처리시는 37%~39% 범위에서 수치증가효과를 보였다.

이러한 수치차이는 *S.cereviase*와 *C.utilis*에서 분리한 효모추출물의 경우, 기능성 데빵 및 제과 적용성 평가시 풍미와 발효율이 반대현상을 보일 수 있음을 시사하였다.

즉, *S.cereviase* 분리 효모추출물의 경우는 발효율 증가와 동시에 Ethanol의 발생량을 증가시키면서 결국 알콜성 풍미증가에 영향을 미칠 것으로 예측되었으나, *C.utilis*의 경우는 오히려 발효율을 억제함과 동시에 제빵원료인 밀가루 냄새만 증가시키는 역현상을 보일 것으로 예측되었다.

선행연구에서 특화제빵의 특성을 부여함에 있어 유기산중 furfural이 목표 풍미인 카라멜향의 증가시키는 주요 유기산임을 알 수 있었는데, 이를 기준으로 효모 및 기능성 소재류 전체에 대하여 비열처리 및 온도 차이를 부여한 열처리시 검출되는 유기산류를 검정하여 보았다.

결과로서, 효모 뿐만 아니라 전체시료에서 Acetic acid, Isobutyric acid, Butanoic acid Hexanoic acid 및 Octanoic Acid까지 5종이 대표적으로 검출되었는데, 그 중 연구 목표인 풍미(카라멜향)과는 거리가 먼 역한 냄새유발 유기산인 Isobutyric acid와 신냄새 유발 유기산인 Acetic acid가 전체 유기산중 대부분을 차지하는 것으로 나타났으며, 시료에 따라 2종류 유기산의 함유량이 바뀌는 경향을 보였다.

전체소재(선발효모류, 기능성 소재류중 세포벽 분리물류과 효모추출물류)중 Isobutyric acid가 가장 많이 검출된 소재는 효모였으며 검출량은 11~13%범위에서 나타났는데, 이때 Acetic acid는 3.9%~4.5% 범위에서 검출되었다.

또한, 온도별 차이를 부여한 조건에서 이들 유기산의 증감에 영향을 미칠 수 있는지를 조사하여 보았더니, 열처리 온도가 높으면 높을수록 비례하여 최대 1.7%이내에서 감소하는 경향을 보였지만 전체적인 유의성은 인정되지 않았다( $P < 0.05$ ). 이를 기준으로 *S.cereviase*효모유래 Cell Wall분리물과 *S.cereviase*유래 및 *C.utilis*유래 효모추출물 차이를 비교하여 풍미발현에 미치는 소재의 순위를 확인하여 보았다.

우선 개발 *S.cereviase*효모유래 및 대조( $\beta$ -Glucan, 일본 Oriental사) Cell Wall 분리물이 유기산의 발현과 풍미에 미치는 결과를 살펴보았더니, 대조의 경우 Isobutyric acid는 0.1%~1.1%범위, Acetic acid는 2.0~3.5%범위로 검출되었는데, 개발효모에서 분리한 효모추출물은 0.3%~7.2%와 0.2%~1.3%로 유사한 경향을 보였는데, 이는 기능성 소재중 Cell Wall성분은 풍미발현에 있어 주요한 영향을 미치지 않는 것으로 결론 지을 수 있었다.

그리고, 개발 *S.cereviase*효모유래 및 대조( $\beta$ -Glucan, 일본 Oriental사) 효모추출물이 유기산의 발현과 풍미에 미치는 결과를 역시 살펴보았더니, 효모류와 Cell Wall 분리물들과는 전혀 다른 패턴을 보였다.



선발효모에서 분리한 효모추출물의 경우는 발효와 관련된 Ethanol이 37%~44%범위에서 검출됨과 동시에 Acetic Acid와 Isobutyric acid도 28~40% 및 2.4%~2.8%범위에서 동시 검출되는 특성을 보였는데, 비교구 효모추출물인 Aromild와 Yeast NT의 경우는 발효관련 Ethanol의 검출수치는 최저 0.1%에서 최대 1.1%였는데 반하여 Acetic Acid는 37%에서 최대 약57%까지 증가함과 동시에 Isobutyric acid도 역시 0.7%에서 최대 11%까지 증가하는 특성을 보였는데, 이는 효모류의 결과와 비교하면 *S.cereviase*효모 및 *S.cereviase*효모추출물은 제빵 발효율 증대와 더불어 풍이에 기여하는 경향을 보이는 반면에 *C.utilis* 및 이들유래 효모추출물은 발효를 억제함과 동시에 풍이에 있어 Acetic acid유래의 신냄새를 발생시키는 Negative효과를 나타내는 것으로 조사되었다.

따라서, *C.utilis*효모 및 기능성 소재류의 경우, 기능성 소재로서 선택함에 있어 제빵 제조시는 Cell Wall을 제외한 나머지 소재류는 사용농도의 고려에 있어 제빵제조시 발효율과 기본 풍미를 보장 할 수 있을 것으로 예상되었다. 그러나, Baking Powder를 이용하여 제빵 제조간 효모의 발효력을 대체하는 레시피가 적용되는 제과분야에서는 효모 추출물이 보유하는 umami맛과 향을 최소화 하는 배합비율 조절 이외의 별다른 제약없이 제조 레시피 정립이 가능할 것으로 예상되었다.

또한 *S.cereviase* 효모 및 이들에게서 분리한 기능성 소재류의 경우는 제빵 및 제과 적용성 평가시, 발효율과 처짐현상 및 umami향 및 맛을 고려한 혼합농도 조절이외에는 제조 레시피 정립간 문제가 없을 것으로 판단되었다.

#### 다. 효모추출물내 핵산함유량 분석

대조로 사용한 효모추출물내 핵산류의 함유량 조사를 하여보았더니, 표준체 핵산 19종 대비 Yeast NT(일본 KOHJIN사)의 경우, IMP는 검출되지 않았으며, GMP 9.9%, CMP는 7.6% 그리고 UMP는 8.5% 그리고 AMP의 경우 10.9%가 검출되므로써 이때 전체 핵산류 총합은 36.9%였다.

또 다른 대조인 Aromild(KOHJIN사, 일본)의 경우를 살펴 보았더니, IMP는 10.5%, GMP 10.5%, CMP는 7.2% 그리고 UMP는 8.2%였으나, AMP의 경우는 검출이 되지 않았으며, 이때 전체 핵산류 총합은 36.4%였다.

개발효모인 *S.cereviase*CKK110426을 배양시 분취한 효모와 배양약 상등액내 핵산류를 검정하여 보았더니, RNA미분해로 인하여 19종 핵산류중 어떠한 핵산도 검출되지 않았는데, 대량생산시스템을 통한 효모추출물의 경우는 CMP는 65,705ppm, UMP는 82,143ppm, GMP 48,851ppm, IMP 27,365ppm 그리고 AMP의 경우는 6,567ppm의 함유량을 보유하고 있었으며 총량은 27.9%였다.

이상의 결과를 살펴보면 동일한 추출방법을 적용하여 제조하였음에도 불구하고, 핵산별 보유 수치 및 총량등의 차이를 보이는 이유는, 아마도 대조 효모추출물의 경우는 *C.utilis*, 그리고 개발효모추출의 경우는 *S.cereviase*기원성임에 따라 효모류라 하더라도 아마 다소 차이를 보이는 것이 아닌가 하고 판단되었다.

라. 효모별 제빵적용성 평가에 따른 풍미인자 분석

상업효모(압착형) 대비 3종 개발 효모(*S.cereviase* JKK091002, *S.cereviase* CKK110426, *S.cereviase* OKK110427)의 제빵·제과(하드롤, 식빵 및 프랑스빵 기준) 적용에 따른 풍미변화를 조사 하였다(Table 8.~Table 10.).

제빵 레시피중 “하드롤” 및 “프랑스빵” 을 기준으로 평가시, 발효율은 차이가 크게 없었으나, 알콜성 풍미와 관련한 Ethanol만 전체시험구에서 62~89%범위로 검출됨으로서 목표하는 풍미와는 거리가 먼 일반적인 것이었다(Table 8).

또 다른 제빵 레시피중 식빵에 대한 경우에서도 동일한 경향을 보였는데, 이때 Ethanol의 수치는 24%~38%범위를 나타내어 “하드롤” 및 “프랑스빵” 의 경우보다 낮은 수치를 보였는데, 이는 풍미분석을 위한 시료채취시간의 지연 때문인 것으로 판단되었다(Table 9).

효모 제형별 풍미인자 발현차이를 비교한 경우에서도, 역시 Ethanol의 수치만 전체 시험구에서 76~89%이내범위로 검출되어 역시 동일한 경향을 보였다(Table 9).

따라서, 순수효모의 경우는 목표 풍미(카라멜향)인자 발현에 관여하지 않으며, 제빵 발효율과 관련되는 Ethanol성 풍미발현에만 영향을 미치는 것으로 확인되었다.

상용 기능성 소재 대비 개발효모에서 분리한 기능성 소재의 제빵/제과(프랑스빵) 적용성 평가후 역시 풍미변화를 조사하였다.

결과로서 세포벽 성분별로 1% 및 5%로 농도별 차이를 부여하여 제빵제조 후 풍미에 미치는 차이를 조사하여 보았더니, 무첨가구인 대조시험구의 경우 알콜성 풍미수치가 약 75%였는데, 기능성 소재를 5% 첨가한 경우는 80~83%로 5%~8%의 수치증가가 있었으며, 1%를 첨가한 경우는 유의한 차이가 없었다. 따라서, 1% 이상의 농도로 기능성 소재를 제빵 레시피내 첨가시 발효에 영향을 미치는 것으로 판단되었다(Table 11~12., Fig 1`~2.)

기능성 소재를 5% 제빵 레시피내 첨가하여 비교하면, 상업효모에 비해 Etanol의 점유율이 20%까지 증가하는 결과와 유기산중 Acetic acid의 변화와 연계하여 비교시,  $\beta$ -Glucan(대조) 및 개발효모에서 추출한 Cell wall에서만 동일하게 감소한 경향이 있으나, 큰 차이는 나지 않는 것으로 판단되었다(Fig 2).

Table 1. 개발효모 및 기능성 소재 단일 및 제빵적용에 따른 풍미변화 조사를 위한 분석시스템 및 조건

분석시스템	분석 시스템 운영조건
GC/MS analysis	<ul style="list-style-type: none"> <li>• G/C Model name: Agilent 5975C(Agilent Technologies, Palo Alto, California, U.S.A)</li> <li>• Inlet temperature: 260° C</li> <li>• Column:DB-WAX(30mx250 μ mx0.25 μ m, Agilent Technologies, Palo Alto, California, U.S.A)</li> <li>• Carrier gas: helium</li> <li>• Flow rate: 1ml/min</li> <li>• Oven temperature program : from 40° C(5 min)-&gt;4° C/min-&gt; 250° C(5min)</li> <li>• M/S detector : Agilent 5975C MSD (EI mode)               <ul style="list-style-type: none"> <li>- Detector voltage was 70eV</li> <li>- The mass spectral data acquisition scan interval time 2.86 sec and data were collected over a mass range of m/z 40~550 amu.</li> </ul> </li> </ul>
SPME analysis	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Phase: Triple</li> <li>• Fiber size: 50/30 μ m divinylbenzoene-&gt;50 μ m carboxen /polydimethylsiloxane -&gt;30 μ m DVB/ Carboxen / PDMS(divinylbenzene /carboxen / polydimethylsiloxane) purchased from Supelco Co.(bellefonte, PA, USA)</li> <li>• Sampler : GERSTEL MPS2 Auto sampler</li> <li>• Sample equilibration time               <ul style="list-style-type: none"> <li>-incubation temp. 60° C</li> <li>-incubation time 40min</li> <li>-extraction time 10min</li> <li>-desorption time 10min</li> </ul> </li> </ul>

Table 2. 하드롤 레시피 및 압착효모 제형 적용기중 상업효모 대비 개발효모 *S.cereviase*JKK091002 및 CKK110426의 제빵/제과 적용성 평가를 위한 시험 디자인

시험항목		개발 효모제형별 제빵제과 특성 및 풍미인자 변화 조사		
		상업효모(대조,)	개발효모 (JKK091002)	개발효모 (CKK110426)
적용제빵제조 레시피 (g)		강력분 800 물 464 생이스트 40 이스트푸드 2 소금 2 설탕 16 쇼트닝 16 흰자 1ea 탈지분유 8	강력분 800 물 464 JKK 40 이스트푸드 2 소금 2 설탕 16 쇼트닝 16 흰자 1ea 탈지분유 8	강력분 800 물 464 CKK 40 이스트푸드 2 소금 2 설탕 16 쇼트닝 16 흰자 1ea 탈지분유 8
제빵적용성평가 (숙성조건:온도/ 습도/시간)	1차발효	33℃/78%/30분		
	중간발효	실온/20~30%/5분		
	2차발효	33℃/78%/36분		
제빵적용성평가 (굽기: 온도,분)		200℃(오븐상층)/150℃(오븐하층), 25분		

Table 3. 식빵 레시피 및 압착효모형 적용기준으로 상업효모 대비 개발효모 *S.cereviase*JKK091002 및 CKK110426의 제과-제빵 적용성 평가를 위한 시험 디자인

시험항목		개발효모의 제빵제과 특성 및 풍미인자 변화 조사		
		상업효모(대조,)	개발효모 (JKK091002)	개발효모 (CKK110426)
적용제빵제조 레시피 (g)		강력분 1,200 물 744 생이스트 48 이스트푸드 2.4 소금 24 설탕 60 쇼트닝 36 탈지분유 48	강력분 1200 물 744 JKK 50 이스트푸드 2.4 소금 24 설탕 60 쇼트닝 36 탈지분유 48	강력분 1200 물 744 CKK 50 이스트푸드 2.4 소금 24 설탕 60 쇼트닝 36 탈지분유 48
제빵적용성평가 (숙성조건:온도/ 습도/시간)	1차발효	35℃/85%/20분		
	중간발효	실온/20~30%/5분		
	2차발효	33℃/78%/30분		
제빵적용성평가 (굽기: 온도,분)		170℃(오븐상층)/190℃(오븐하층), 30분		

Table 4. 식빵 레시피를 기준으로 상업효모 대비 제형별(압착효모형 및 분말효모형) 제조된 개발효모 *S.cereviase* OKK110427의 제빵·제과 적용성 평가에 따른 성상 변화 및 풍미변화조사를 위한 시험디자인

시험항목		개발 효모제형에 따른 제빵제과 특성 및 풍미인자 변화 조사		
		상업효모 (대조, 동결분말형)	개발효모 (OKK110427, 동결분말형)	개발효모 (OKK110427, 압착효모형)
적용제빵제조 레시피 (g)		강력분 1,200 물 740 생이스트 48 소금 24 설탕 60 쇼트닝 36 탈지분유 40	강력분 1,200 물 740 OKK 48 소금 24 설탕 60 쇼트닝 36 탈지분유 40	강력분 1200 물 740 OKK 48 소금 24 설탕 60 쇼트닝 36 탈지분유 40
제빵적용성평가 (숙성조건: 온도/ 습도/시간)	1차발효	34℃/80%/30분		
	중간발효	실온/20~30%/20분		
	2차발효	33℃/78%/30분		
제빵적용성평가 (굽기: 온도, 분)		170℃(오븐상층)/190℃(오븐하층), 30분		

Table 5. 프랑스빵 레시피를 기준으로 개발효모 *S.cereviase* CKK110426에서 분리한 기능성 소재별 첨가(5%,w/w) 및 굽기시 성상변화 및 풍미변화조사(적용효모 : Jenico사 상업효모) 시험디자인

시험항목		기능성 소재 첨가의 제빵제과 특성 및 풍미인자 변화 조사를 위한 적용 레시피				
		상업효모 (대조)	효모추출물 (비교, Aromild)	$\beta$ -Glucan (비교, 오리엔탈)	효모추출물 (아미코젠)	Cell wall (아미코젠)
적용제빵제조 Recipe (g)		강력분 1,000 물 600 이스트 50 소금 18 효모추출물 50	강력분 1,000 물 600 이스트 50 소금 18 효모추출물 50	강력분 1,000 물 600 이스트 50 소금 18 $\beta$ -Glucan 50	강력분 1,000 물 600 이스트 50 소금 18 효모추출물 50	강력분 1,000 물 600 이스트 50 소금 18 Cell wall 50
제빵적용성 평가 (숙성조건: 온도/습도/시간)	1차 발효	34°C/80%/30분				
	중간 발효	실온/20~30%/20분				
	2차 발효	33°C/78%/30분				
제빵적용성평가 (굽기: 온도,분)		200°C (오븐상층)/150°C 오븐하층), 25분				

Table 6. 프랑스빵 레시피를 기준으로 개발효모 *S.cereviase* CKK110426에서 분리한 기능성 소재별 첨가(1%,w/w) 및 굽기시 성장변화 및 풍미변화조사(적용효모 : Jenico사 상업효모) 시험디자인

시험항목		기능성 소재 첨가의 제빵제과 특성 및 풍미인자 변화 조사를 위한 적용 레시피				
		상업효모 (대조)	효모추출물 (비교, Aromild)	$\beta$ -Glucan (비교, 오리엔탈)	효모추출물 (아미코젠)	Cell wall (아미코젠)
적용제빵제조 레시피 (g)		강력분 1,000 물 600 압착효모 50 소금 18	강력분 1,000 물 600 압착효모 50 소금 18 Aromild 10	강력분 1,000 물 600 압착효모 50 소금 18 $\beta$ -Glucan 10	강력분 1,000 물 600 압착효모 50 소금 18 효모추출물 10	강력분 1,000 물 600 압착효모 50 소금 18 Cell wall 10
제빵적용성 평가 (숙성조건: 온도/습도/시간)	1차 발효	34°C/80%/30분				
	중간 발효	실온/20~30%/20분				
	2차 발효	33°C/78%/30분				
제빵적용성평가 (굽기: 온도,분)		200°C (오븐 상층)/150°C (오븐 하층), 30분				



Table 7. 개발효모 및 기능성 소재별 내열성 평가에 따른 성장변화 및 풍미변화조사

결과		개발효모에서 분리한 기능성 소재별 내열성 평가에 따른 성장변화 및 풍미변화조사											
		개발효모(OKK110427)				Cell wall(아미코젠)				β-Glucan(오리엔탈)			
		비열처리	75℃	90℃	110℃	비열처리	75℃	90℃	110℃	비열처리	75℃	90℃	110℃
Alcohols	Ethanol	63.4	65.9	66.5	67.3	92.9	47.0	43.2	49.2	74.0	74.2	74.3	74.1
	Isobutanol	2.4	2.1	1.7	3.7	0.1	1.1	1.5	1.7	0.0	0.0	0.0	0.1
	2-methyl-1-butanol	0.6	0.7	0.5	0.7	0.0	0.0	0.0	0.0	13.2	12.8	13.0	11.7
	3-methyl-1-butanol	6.0	3.5	4.7	5.6	0.0	0.0	0.0	0.0	2.0	2.0	0.1	1.8
	Nonanol	0.1	0.1	0.1	0.0	1.8	12.1	10.9	7.6	1.1	1.4	1.5	2.0
	Phenyl ethyl alcohol	4.6	4.5	4.1	3.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.3	0.2	0.0	0.2
Aldehydes	Hexanal	0.0	0.1	0.0	0.0	1.4	9.5	9.4	8.9	0.4	0.5	0.7	0.7
	Benzaldehyde	0.3	0.3	0.3	0.2	0.4	3.5	5.0	8.1	2.8	2.9	3.6	4.6
Acids	Acetic acid	4.5	4.2	4.3	3.9	0.2	1.3	1.1	1.0	3.5	3.4	3.1	2.0
	Isobutyric acid	12.7	13.2	12.6	11.5	0.8	6.3	7.2	0.3	0.1	0.1	1.1	0.5
	Butanoic acid	0.6	0.6	0.6	0.4	0.0	0.0	0.3	0.0	0.0	0.2	0.2	0.0
	Hexanoic acid	3.9	4.1	3.8	3.1	0.0	0.1	0.2	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
	Octanoic acid	0.1	0.1	0.1	0.0	1.9	14.7	15.6	11.6	1.7	1.4	1.4	0.9
Esters	2-Pentylfuran	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	1.4	1.7	5.3	0.1	0.1	0.1	0.2
	Ethylcaproate	0.1	0.1	0.0	0.0	0.1	0.7	1.0	1.5	0.0	0.0	0.0	0.0
	Ethyl octanoate	0.2	0.3	0.2	0.1	0.1	1.4	2.0	3.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	Ethyl decanoate	0.2	0.2	0.1	0.1	0.0	0.1	0.2	0.3	0.0	0.0	0.0	0.0
Ketones	Acetoin	0.0	0.0	0.0	0.1	0.1	0.6	0.8	1.1	0.5	0.6	0.7	1.0
SUM(%)		100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100

결과		개발효모에서 분리한 기능성 소재별 내열성 평가에 따른 성장변화 및 풍미변화조사											
		효모추출물(아미코젠)				효모추출물 Aromild(Kohjin)				효모추출물 Yeast NT(Kohjin)			
		비열처리	75℃	90℃	110℃	비열처리	75℃	90℃	110℃	비열처리	75℃	90℃	110℃
Alcohols	Ethanol	43.9	39.0	38.1	37.8	0.3	0.6	0.3	0.4	0.4	0.3	0.1	1.1
	Isobutanol	0.5	0.0	0.0	0.0	0.0	0.1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	2-methyl-1-butanol	0.0	0.0	0.0	0.0	50.3	46.2	46.0	32.3	43.6	43.5	38.1	21.5
	3-methyl-1-butanol	0.0	0.0	0.0	0.0	7.6	7.0	0.2	0.2	0.3	0.2	0.2	0.1
	Nonanol	0.0	0.0	0.0	0.1	0.0	0.1	0.0	0.2	0.1	0.1	0.2	0.1
	Phenyl ethyl alcohol	20.4	21.4	20.4	14.3	0.1	0.1	0.1	0.2	0.4	0.4	0.0	0.0
Aldehydes	Hexanal	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	Benzaldehyde	0.5	0.6	0.8	1.0	0.4	0.5	0.6	0.5	0.6	0.6	0.7	0.8
Acids	Acetic acid	28.4	32.2	34.3	40.0	37.3	39.7	43.2	54.6	44.7	43.7	45.1	56.4
	Isobutyric acid	2.6	2.8	2.8	2.4	0.7	1.1	2.0	3.1	4.6	5.5	8.1	10.8
	Butanoic acid	1.4	1.6	1.5	1.2	2.6	3.7	5.8	6.6	1.9	2.0	2.2	1.8
	Hexanoic acid	1.9	2.1	2.1	1.6	0.1	0.2	0.4	0.8	0.5	0.5	1.0	2.5
	Octanoic acid	0.2	0.2	0.0	0.1	0.3	0.3	0.8	1.1	1.0	0.8	1.0	0.6
Esters	2-Pentylfuran	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	Ethylcaproate	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	Ethyl octanoate	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.1	0.1	0.0	0.0	0.0	0.0
	Ethyl decanoate	0.0	0.0	0.0	0.1	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Ketones	Acetoin	0.1	0.1	0.0	1.4	0.0	0.4	0.5	0.0	2.0	2.2	3.1	4.3
SUM(%)		100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100

Table 8. 하드롤 레시피(압착효모 적용)기준으로 상업효모 대비 개발효모 *S.cereviase*JKK091002 및 CKK110426의 제빵·제과 적용평가에 따른 정상변화 및 풍미변화조사

풍미인자		결과	상업효모 및 개발효모별 제빵적용시 풍미인자 변화 조사		
			상업효모(대조)	개발효모 (JKK091002)	개발효모 (CKK110426)
Alcohols	Ethanol	73.3	78.9	77.1	
	Isobutanol	0.4	0.4	0.5	
	2-methyl-1-butanol	0.3	0.1	0.2	
	3-methyl-1-butanol	2.3	1.0	1.0	
	Nonanol	0.7	1.2	1.8	
	Phenyl ethyl alcohol	11.8	6.1	4.9	
Aldehydes	Hexanal	1.3	1.0	2.3	
	Benzaldehyde	1.7	2.4	3.4	
Acids	Acetic acid	0.7	1.9	3.2	
	Isobutyric acid	1.4	1.7	1.2	
	Butanoic acid	0.4	0.5	0.5	
	Hexanoic acid	2.4	1.3	0.5	
	Octanoic acid	0.9	1.0	1.1	
Esters	2-Pentylfuran	1.1	1.2	1.6	
	Ethylcaproate	0.1	0.0	0.0	
	Ethyl octanoate	0.8	1.0	0.5	
	Ethyl decanoate	0.2	0.3	0.1	
Ketones	Acetoin	0.0	0.1	0.1	
SUM(%)		100	100	100	

Table 9. 식빵 레시피 및 압착효모 적용기준으로 상업효모 대비 선발효모 *S.cerevise* JKK091002와 CKK110426 제빵적용성 평가에 따른 성상 및 풍미변화조사

결과		상업효모 및 개발효모별 제빵적용시 풍미인자 변화 조사		
		상업효모 (대조, Jenico사)	개발효모 (비교, JKK091002)	개발효모 (CKK110426)
Alcohols	Ethanol	31.3	23.9	37.3
	Isobutanol	2.4	1.7	2.5
	2-methyl-1-butanol	1.2	1.9	1.2
	3-methyl-1-butanol	11.7	17.0	15.0
	Nonanol	4.1	3.5	3.3
	Phenyl ethyl alcohol	10.0	22.7	9.6
Aldehydes	Hexanal	3.9	6.7	4.7
	Benzaldehyde	5.3	4.3	5.6
Acids	Acetic acid	9.5	2.9	5.5
	Isobutyric acid	3.1	2.4	3.4
	Butanoic acid	1.0	0.8	0.8
	Hexanoic acid	1.5	2.9	2.3
	Octanoic acid	3.1	2.1	1.9
Esters	2-Pentylfuran	2.9	3.3	1.0
	Ethylcaproate	0.1	0.3	0.1
	Ethyl octanoate	1.3	2.2	1.1
	Ethyl decanoate	0.1	0.2	0.1
Ketones	Acetoin	7.5	1.1	4.6
SUM(%)		100	100	100

Table 10. 식빵 레시피를 기준으로 상업효모 대비 제형별(압착효모형 및 분말효모형) 제조된 개발효모 *S.cereviase* OKK110427의 제빵·제과 적용성 평가에 따른 성상변화 및 풍미변화조사

결과		개발효모 제빵적용에 따른 풍미인자 분석결과		
		상업효모 (대조, 동결분말형)	개발효모 (OKK110427, 분말형)	개발효모 (OKK110427, 압착효모형)
Alcohols	Ethanol	85.4	76.7	88.6
	Isobutanol	2.1	3.2	2.0
	2-methyl-1-butanol	0.5	0.6	0.6
	3-methyl-1-butanol	3.8	6.4	1.3
	Nonanol	0.5	0.9	1.0
	Phenyl ethyl alcohol	1.7	3.2	1.7
Aldehydes	Hexanal	0.3	0.5	1.2
	Benzaldehyde	0.7	0.9	0.4
Acids	Acetic acid	0.5	1.1	0.5
	Isobutyric acid	0.5	1.8	0.2
	Butanoic acid	0.4	0.0	0.0
	Hexanoic acid	0.4	0.6	0.1
	Octanoic acid	0.3	0.5	0.6
Esters	2-Pentylfuran	0.3	0.9	0.9
	Ethylcaproate	0.1	0.1	0.0
	Ethyl octanoate	1.3	0.7	0.2
	Ethyl decanoate	0.2	0.1	0.0
Ketones	Acetoin	1.0	1.8	0.7
SUM(%)		100	100	100

Table 11. 프랑스빵 레시피를 기준으로 개발효모 *S.cereviase* CKK110426에서 분리한 기능성 소재별 첨가(5%,w/w) 및 굽기시 성상변화 및 풍미변화조사(적용효모 : Jenico사 상업효모)

시료별 분석 분석항목		개발 기능성 소재 첨가가 제빵 풍미인자에 미치는 효과(단위: %)				
		상업효모 (대조)	효모추출물 (비교, Aromild)	효모추출물 (아미코젠)	$\beta$ -Glucan (비교, 오리엔탈사)	$\beta$ -Glucan (아미코젠)
Alcohols	Ethanol	74.4	80.3	62.8	83.0	83.1
	Isobutanol	0.7	1.0	0.8	1.0	0.8
	2-methyl-1-butanol	0.7	1.3	2.9	1.6	1.0
	3-methyl-1-butanol	4.3	5.5	8.7	3.9	3.8
	Nonanol	0.9	0.5	2.7	0.5	0.7
	Phenyl ethyl alcohol	12.8	7.0	14.5	6.9	7.2
Aldehydes	Hexanal	0.3	0.2	0.0	0.0	0.3
	Benzaldehyde	0.0	0.0	0.1	0.1	0.4
Acids	Acetic acid	1.1	1.6	1.4	0.4	0.4
	Isobutyric acid	0.9	0.4	0.0	0.3	0.0
	Butanoic acid	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	Hexanoic acid	0.8	0.5	0.7	0.4	0.4
	Octanoic acid	0.3	0.5	0.2	0.4	0.6
Esters	2-Pentylfuran	1.8	0.3	3.3	0.6	0.8
	Ethylcaproate	0.1	0.0	0.1	0.1	0.0
	Ethyl octanoate	0.7	0.5	1.1	0.6	0.4
	Ethyl decanoate	0.3	0.2	0.4	0.2	0.1
Ketones	Acetoin	0.0	0.1	0.1	0.1	0.1
SUM(%)		100	100	100	100	100

Table 12. 프랑스빵 레시피를 기준으로 개발효모 *S.cereviase* CKK110426에서 분리한 기능성 소재별 첨가(1%,w/w) 및 굽기시 성상변화 및 풍미변화조사(적용효모 : Jenico사 상업효모)

시료별 분석		개발 기능성 소재 첨가가 제빵 풍미인자에 미치는 효과(단위: %)				
		상업효모 (대조)	효모추출물 (비교, Aromild)	효모추출물 (아미코젠)	$\beta$ -Glucan (비교, 오리엔탈사)	$\beta$ -Glucan (아미코젠)
Alcohols	Ethanol	77.5	77.4	72.1	78.4	78.8
	Isobutanol	0.7	0.7	0.5	0.7	0.7
	2-methyl-1-butanol	0.2	0.3	0.7	0.7	0.9
	3-methyl-1-butanol	4.2	4.0	1.6	3.2	3.3
	Nonanol	1.4	1.6	1.7	1.2	1.2
	Phenyl ethyl alcohol	7.2	7.4	12.0	8.8	9.9
Aldehydes	Hexanal	0.4	0.5	0.8	0.6	0.5
	Benzaldehyde	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
Acids	Acetic acid	1.0	1.7	0.9	0.7	0.4
	Isobutyric acid	0.6	0.7	0.7	0.6	0.2
	Butanoic acid	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
	Hexanoic acid	0.7	0.9	1.3	0.9	0.6
	Octanoic acid	0.4	0.5	1.3	1.0	0.5
Esters	2-Pentylfuran	3.8	2.7	5.7	2.6	2.0
	Ethylcaproate	0.2	0.1	0.1	0.1	0.1
	Ethyl octanoate	1.3	1.0	0.5	0.4	0.6
	Ethyl decanoate	0.4	0.4	0.2	0.1	0.2
Ketones	Acetoin	0.1	0.1	0.1	0.1	0.0
SUM(%)		100	100	100	100	100

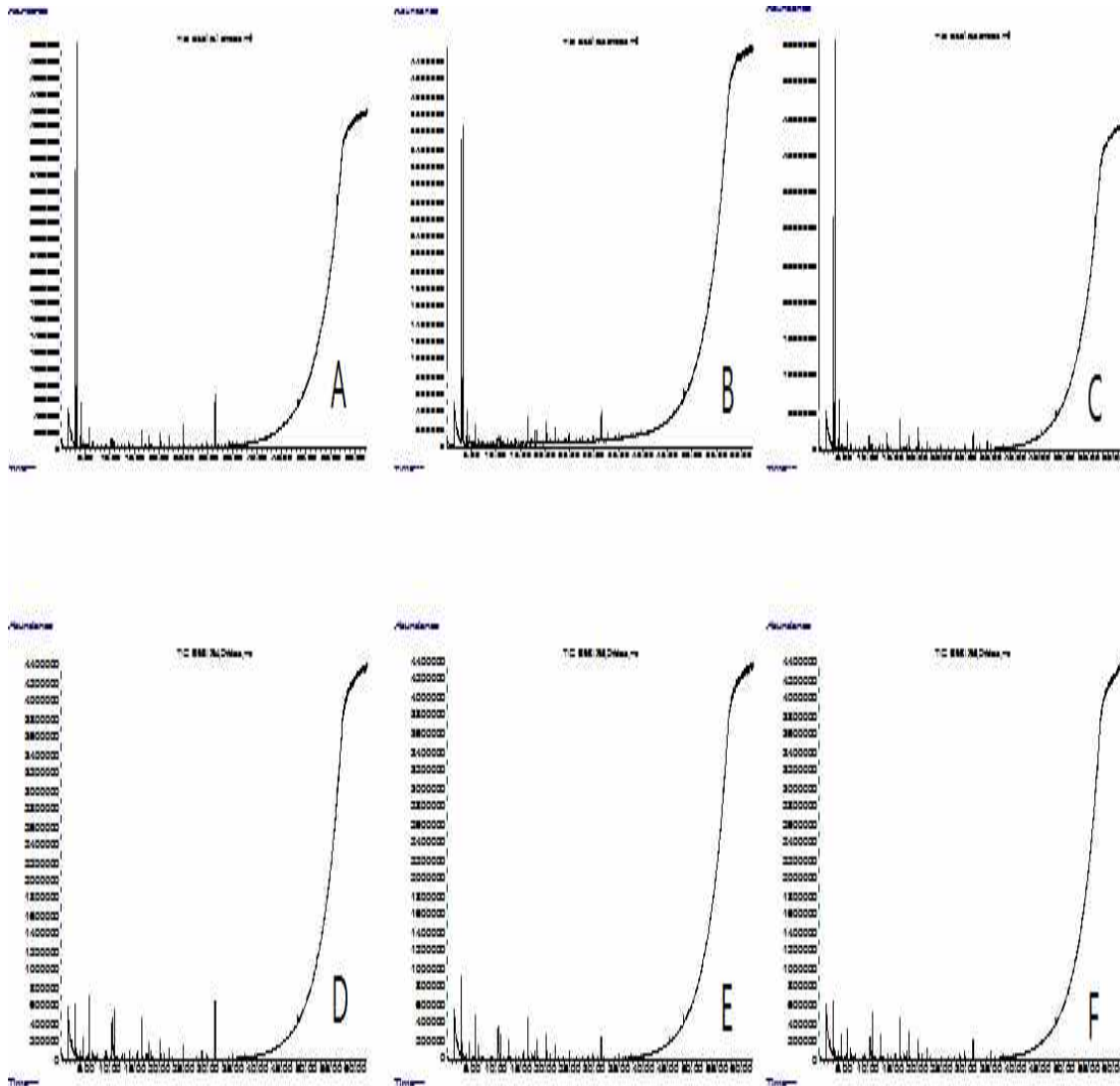


Fig. 1. 상업효모(압착형) 대비 개발효모별 제빵적용에 따른 풍미인자 조사결과  
 A, B 및 C : 하드롤 레시피 적용, D, E 및 F : 식빵레시피 적용., A와 D:  
 상업효모(Jenico사), B와 E: *S.cereviase* JKK091002, C와 F :  
*S.cereviase* CKK110426

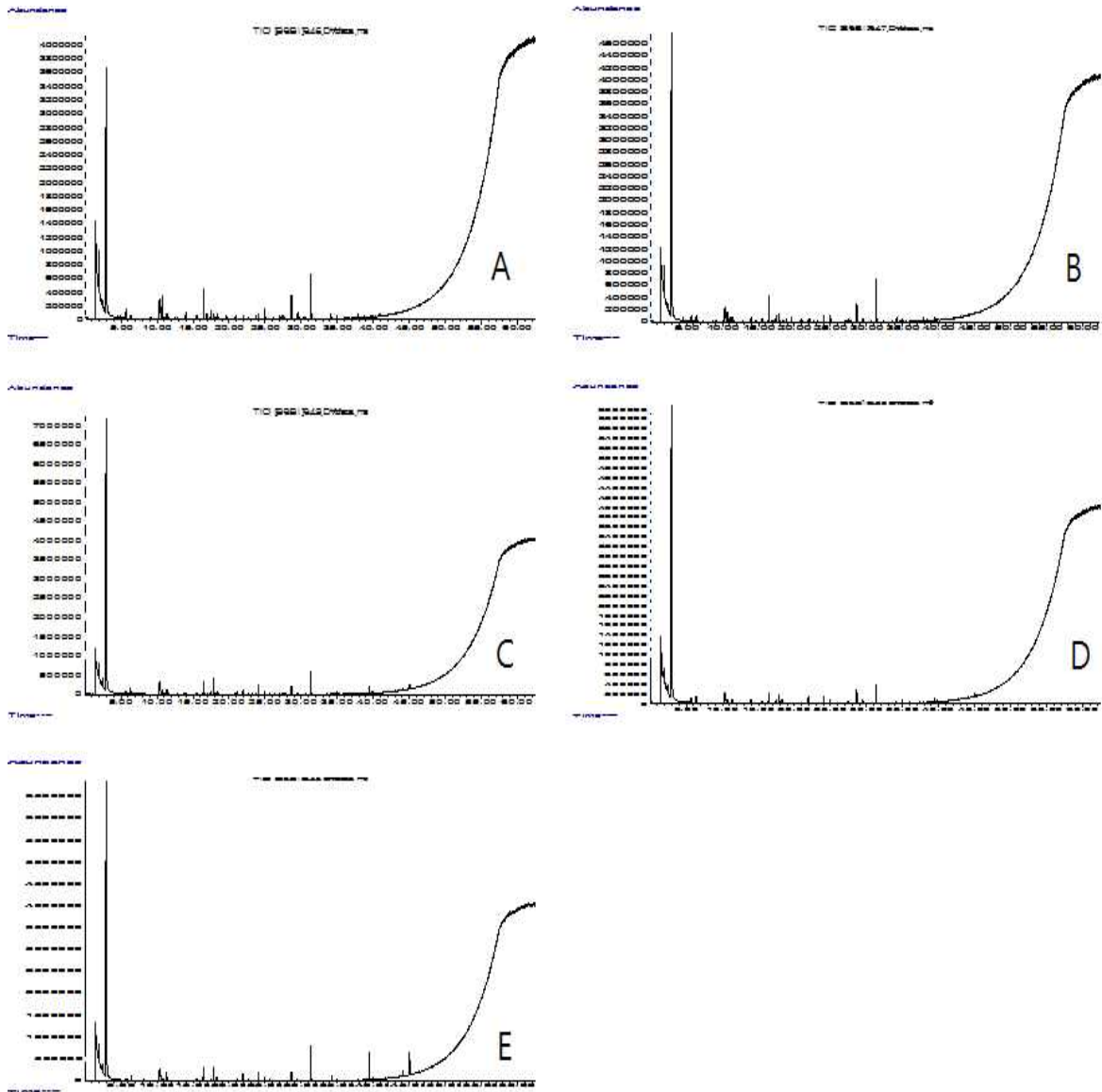


Fig. 2. 상업효모(압착형) 대비 개발효모 분리한 기능성 소재별 제빵적용에 따른 차이가 풍미에 미치는 효과 비교.

A : 상업효모(압착효모) [르샤프사(프랑스),수분 70%], B: 효모추출물 Aromild [오리엔탈(일본)], C:  $\beta$ -Glucan [오리엔탈(일본)], D: 효모추출물 [아미코젠(주)], E:  $\beta$ -Glucan [아미코젠(주)]



## 7-5. 풍미보유 특화제빵·제과 레시피 정립(풍미확보 기법)

### 1. 연구목적

6-4절 연구결과에서 순수분리 개발효모만을 대상으로 제형별호 평가 결과, 순수분리 효모는 특화성을 갖는 풍미를 형성하지 못함을 알 수 있었다.

제형별 순수효모의 먹이원 활용 및 이의 풍미관련성을 연계하여 선행연구에서 살펴 보았더니, 상업효모 대비 제형별 뚜렷한 차이가 인정되지 않았다. 또한, 먹이원 대비 이의 효모 이용성과 제빵제조시 풍미성분 발현과의 연계하여 분석하여 본 결과, 대부분 알콜류 기원 풍미성분임을 확인할 수 있었다.

따라서, 본 연구에서는 유기농산물에서 효모분리과정에서 과일 발효배지를 조성 및 제빵 제조에 적용 시, 특화제빵의 핵심인 풍미성을 나타낼 수 있을 것이라 판단되어 실시 및 결과를 도출코 저 하였다.

최종적으로 결과가 도출시 “풍미가 보강된 특화제빵 제조관련 레시피 “로 정립하고 저 하였다.

### 2. 연구수행방법

#### 가. 과일발효배지 첨가형 특화제빵 및 제과 정립연구

본 연구간 대조효모로서는 상업효모(Jenico사, 한국)을 구입 사용하였으며, 시험구는 거봉발효배지를 준비하여 이를 시험간 사용하였다.

과일발효배지 제조용 거봉포도(하초 거봉, *Vitis labruscana* cv. “Kyoho”)는 유기농 농산물 생산단체인 한들영농법인(한국)에서 구입하여 사용하였다.

거봉발효배지 조성은 다음과 같다. 즉, 멸균수 300g에 설탕 35g(백설탕 흰설탕, 삼양사)를 우선 용해시킨 후 여기에 준비된 분쇄 거봉 400g첨가(첨가전 분쇄공정 실시)하였는데, 이때 당도 13~14 Brix를 유지되도록 하였다. 발효숙성조건으로서 30℃(습도 85~90%)조건에서 48시간동안 진행하였다(Fig 1).

거봉배지가 발효과정이 완료된 시점인 48시간이 경과 시, 효모균수 검정을 통하여  $1 \times 10^7 \sim 1 \times 10^{10}$ cfu/ml 범위를 나타낼 때 제빵제조에 적용하였다.

특화제빵 및 제과 제조기법 정립을 위한 적용시료는 유럽빵 종류중 “르방”을 선정하여 시험을 진행하였는데, 이는 과일배지 첨가 및 평가의 용이성이 적절하다고 판단되었기 때문이며, 상업효모 레시피에 준하여 실시하였다(Fig 1, Fig 3, Table 3).

과일발효배지 첨가에 따른 특화제빵 및 제과 특화성 결과는 전문 교육을 이수한 관능평가 패널(n=12명) 검정을 통하여 관능평가를 통하여 도출 하였다(Table 4). 이를 위한 관능평가 주요항목은 냄새[ 1)냄새의 이미이취 정도, 2)냄새의 선호도 구분], 조직감[ 1) 표면의 바삭한 느낌정도, 2) 안의 부드러움정도, 3) 조직감의 선호도로 구분] 및 맛[ 1) 신맛의 정도, 2) 이미,이취.정도, 3) 전체적인 선호도로 구분]

으로 3항 및 8세부항목으로 구분하여 실시하였다.

특화성(풍미 등)과 관련하여 과일발효배지 조성 후 배양일정별(0일, 24시간, 48시간 및 72시간)으로 구분 분취한 배양액내 5종 당류분석(Fructose, Sucrose, Glucose, Galactose 및 Lactose) 및 8종 유기산(Tartaric acid, Malic acid, Lactic acid, Oxalic acid, Citric acid, Succinic acid, Formic acid 및 Acetic acid) 변화를 비교 하였다(Table 1, Table 2). 이를 위하여 효모의 먹이원 이용성과 관련한 당류와 유기산 분석을 병행 실시하였는데, 이중 당류분석은 식품공전(제10 일반시험법, 5)탄수화물, 2009)에 준하여 실시하였다.

유기산 분석은 HPLC시스템을 그리고 분석간 사용한 컬럼은 Aminex컬럼, Flow ratio는 1.0ml/min., 그리고 컬럼 온도는 30℃로 설정한 후, UV Detector(210nm)에서 10mM H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>을 이동상으로 하여 분석을 실시하였다. 배양단계별 유기산 및 당류의 변화를 비교검정하기 위한 대조구로서는 콩코드 적포도 액기스(64Brix)를 구입 이를 9,4brix로 희석하고 이를 비교하였다(Fig 2, Table 1~2).

최종 배양단계별 먹이원의 증감변화 양상과 이화학적 분석결과를 기준으로 제빵 제조후 분취시료에서 풍미분석 일련되게 실시하였는데, 이는 이들의 연계성 판단을 위함이었다. 풍미분석을 위하여는 GC-MS시스템으로 분석하였으며, 분석조건은 결과 3-3절(Table 1)에 제시하였다(Fig 4, Table 5).

#### 나. 과일액기스 첨가형 특화제빵 및 제과 레시피 정립연구

본 연구는 과일발효배지를 적용한 천연특화제빵 제조법 정립결과를 기준으로 순수 효모와 여기에 Fructose와 Tartaric acid함유량이 높은 것으로 알려진 순수과일액기스를 구입 및 제빵적용평가와 관련특화성을 확인 및 평가를 위하여 실시하였다.

연구간 사용한 효모제형은 압착형만을 대상으로 검정하였으며, 이때 구입 사용한 상업효모는 Jenico사(한국, 70%)를, 시험구로서 개발효모(*S. cerevisiae*JKK100902)는 압착형(수분 : 74%)완제품을 사용하였다.

전체시험간 사용효모재료는 구입(상업효모) 및 생산(개발효모)후 7일 이내에 사용하는 것을 원칙으로 하였다(냉장보관).

제빵적용성 평가를 위한 시험은 식빵을 대상으로 정였으며, 반죽, 숙성 및 굽기 등 기본 제조레시피는 상업효모에 준하여 실시하였으나, 다만 시험구는 선발된 백포도 및 적포도 과일액기스를 첨가하는 조건만을 다르게 하였다.

전체 실험구는 대조구로서 상업효모(과일액기스 무첨가) 및 개발효모(과일액기스 무첨가)구로서 정하였고, 시험구로서는 상업효모(백포도 과일액기스 첨가) 및 개발효모(백포도 과일액기스 첨가) 그리고 상업효모(적포도 과일액기스 첨가) 및 개발효모(적포도 과일액기스 첨가)구로 하여 총 6개 시험구로 설정하였다.

선발 과일액기스는 당도 68Brix인 농축 백포도액기스(ATACAMA사, 칠레)와 동일 농도 및 당도를 가지고 있는 농축 적포도액기스(ATACAMA사, 칠레)를 구입하여 이를 시험간 사용하였다.

과일액기스 조성은 구입 과일원액 원료(68Brix 기준)를 제빵제조용 물에 10% (w/w)되게 첨가하는 것으로 하였다.

제빵제조 레시피 조성을 위하여, 우선 물 600g과 농축과일액기스를 30g을 희석한 용액을 준비하고, 강력분 1kg과 설탕 60g, 소금 20g, 무염버터 80g, 개량제 10g 및 압착효모 40g을 혼합 반죽, 숙성 및 굽기과정을 상업효모 적용레시피와 동일하게 진행하였다.

결과도출은 시험구별 배양시간이 경과시 배양액을 분취 및 이를 PDA에 도말 후 배양하고 관측되는 효모균 콜로니수를 계측하였는데, 이를 사용한 반죽 및 숙성과정을 거쳐 최종 전단계까지 동일하게 적용하였다.

특화제빵 및 제과 제조시 발효율에 미치는 결과 확인을 위하여, 시험구별 제조된 제빵의 높이(mm, Y축), oven jumping(mm), 폭(mm, X축), 폭(mm, Z축) 및 발효율(상용효모 대비, %)을 계측 비교하였다. 그리고, 시험구별 특화성(풍미)에 미치는 효과 검정을 위하여, 시험구별 제조제빵의 샘플을 채취 후 6종 당류분석(Maltose, Fructose, Sucrose, Glucose, Galactose 및 Lactose)을 실시하였다.

효모의 먹이원 이용성과 관련한 당류분석은 식품공전(제10 일반시험법, 5)탄수화물, 2009)에 준하여 실시하였으며, 풍미 성분분석은 GC-MS시스템을 이용하여 분석하였다(3-3절의 Table 1 참조).

### 3. 연구수행결과

#### 가. 과일발효배지 첨가형 특화제빵 및 제과 제조 레시피 정립연구

선행연구에서 제형별 순수효모의 먹이원 활용 및 이의 풍미관련성을 연계하여 선행 연구에서 살펴보았더니, 상업효모 대비 제형별 뚜렷한 차이가 인정되지 않았다. 또한, 먹이원 대비 이의 효모 이용성과 제빵제조 시 풍미성분 발현과의 연계하여 분석하여 본 결과, 대부분 알콜류 기원 풍미성분임을 확인할 수 있었다.

이를 위하여 유기농산물에서 효모분리과정에서 과일 발효배지를 조성 및 제빵 제조에 적용 시, 특화제빵의 핵심인 풍미성을 나타낼 수 있을 것이라 판단되어 검정을 실시한 결과, 목표 풍미인 카라멜향과 관련한 주요향기 성분은 Furfural(35%)과 알콜류(18%)로 대별되었으며(Fig 4, Table 5), 특화빵과 관련한 주요향기(Maillard반응)는 카라멜향, 캔디향 및 아몬드향으로 이를 발현하는 물질은 Furfural였다(Fig 4, Table 5).

상업효모 대비(100기준) 주분포 성분인 Furfural과 알콜류의 증감결과를 비교하여 보았더니, Furfural성분은 약 28배가 증가 되었는데, ethanol류는 오히려 약 48%가 감소하는 것으로 조사되었다. 따라서, 과일발효배지는 특화제빵 및 제과 제조와 관련한 풍미성 발현에 최적방법임을 알 수 있었다(Fig 4, Table 5).

과일배지 발효단계별 당류의 먹이이용성이 풍미와 관련됨에 따라 이의 증감효과를 검정하였더니, 발효배지 조성 및 발효 후 24시간 이내에 첨가된 Sucrose는 100% 먹

이원으로 활용되었으며, 이에 따라 발효전 45,000ppm의 수치를 보였던 Glucose는 미생물 먹이원으로 이용에 따라 점차적으로 감소하는 경향과 균형성을 유지(72시간 경과시 34,984ppm)하면서 효모발효가 진행되는 것으로 조사되었다(Table 2).

과일발효배지를 이용한 특화성(풍미) 보유 제빵 및 제과의 제조 메카니즘 정립결과는 다음과 같다.

즉, 최적 과일배지의 발효조건은 48시간~ 72시간 이내였으며, 이때 배지내 존재하는 효모량( $1 \times 10^7 \sim 1 \times 10^{10}$ cfu/ml), 당류(Glucose : 57,000ppm ~ 35,000ppm) 및 과일유래 유기산(Tartaric acid : 1,800 ~ 2,000ppm)는 특화제빵 및 제과 제조시 효모의 활성을 극대화 함으로서 발효율과 Glucose 및 Tartaric acid로 인한 특화성(풍미)를 증가시키고 특화빵 특유의 조직감 맛을 창출한 것으로 결론을 얻었다(Fig 1~4, Table 1~5).

연구결과를 토대로 특화성(풍미)발현을 위한 배지조성법은, 10% Sucrose용액 대비 10%(w/w)과일첨가 후 및 72시간 발효(25~30℃, 습도 50%)조건으로 정립하였다.

결과를 종합한 과일발효배지 첨가형 레시피는 다음과 같이 정립되었다.

1) 과일발효배지 조성 레시피 : 100% Sucrose용액 대비 10%(w/w)과일첨가 후 및 72시간 발효(25~30℃, 습도 50%)

2) 제빵제조레시피 : 강력분 1kg+과일발효배지 600g+설탕 60g+소금 20g+무염버터 80g+개량제+압착형 효모 40g(수분함유량:70~74%)

최종 특화제빵 및 제과 정립과 관련한 평가는 다음과 같다. 즉, 냄새와 관련 디아세틸 및 이소부틸산 발생으로 인한 상업효모의 특유 이미 및 이취는 과일발효 배지적용에 의하여 감소하는 하는 경향을 보였으나, 유의성은 인정되지 않았다. 그러나, 선호도는 차이가 안정되지 않았다(Fig 4, Table 5).

맛에 미치는 결과를 살펴보았더니, 상업효모에 의한 신맛은 약34%와, 이미.이취는 18%가 감소하는 것으로 조사되었고, 전체적인 맛에 대한 선호도는 13%가 증가하는 경향을 보임으로서 과일발효배지 적용시 천연특화제빵제조가 가능한 것으로 나타났다.(Table 4, Fig 3.).

조직감과 관련 하며 표면의 바삭한 정도는 약5%, 안의 부드러움은 약 17% 그리고 조직감의 선호도는 전반적으로 증가하는 경향을 보였는데, 이는 천연특화빵의 특성이 조직을 질기고 딱딱하게 하는 특성이 있음을 시사한다 할 수 있었다(Table 4, Fig 1,-3.).

상업효모를 적용 제조한 르방빵의 내부조직(성상)은 고르게 나타났으나, 과일발효배지 적용 르방빵의 내부조직은 기공이 크고 불균형성을 보이는 특징을 보이는 것으로 조사되었는데, 아마도 사전발효과정에서 활성이 극대화 된 효모의 먹이원 이용성의 증대와 이로 인한 CO<sub>2</sub>가스발생량도 증가함에 따른 이유인 것으로 판단되었다(Fig 1, Fig 3).

#### 나. 과일엑기스 첨가형 특화제빵 및 제과제조 레시피 정립연구

압착효모를 적용한 특화성 부여 특화빵 및 제과제조 레시피 정립결과는 다음과 같다. 천연특화성이 발현되는 특화빵 및 제과제조 기본 레시피는 상업효모 적용 제빵제조 레시피에 준하게 정립함으로서 소비자 편리성을 확보하였으며, 제빵제조시 발효율 확보를 위한 최적 효모균수는 중요한 변수임이 확인되었다. 즉, 효모균수  $2.2 \times 10^{10}$  cfu/g 첨가시 제빵 발효율(상업효모 대비)은 약 102%였는데, 이보다 적은  $2.0 \times 10^{10}$  cfu/g를 사용한 경우는 98.8%,  $1.8 \times 10^{10}$  cfu/g는 94.3%로 제빵 발효율은 감소하는 것으로 확인되었다(Fig 5~6, Table 6~7),

기호성이 부합한 풍미를 보유한 특화빵 및 제과제조와 관련한 주요향기 성분은 Furfural과 알콜류로 대별되었음을 기준으로 과일엑기스 적용 제빵제조후 Furfural는 검출되지 않았으며 알콜(ethanol)의 생성이 급격하게 증가하였다.

적포도 및 백포도 엑기스 첨가에 따른 조직감 및 풍미성분(알콜류) 증가에 미치는 결과로서, 전체 향기성분량 증가에 있어 대조 상업효모(2,774 기준) 및 개발효모(2,077 기준) 적포도 엑기스 첨가시, 상업효모는 1.85배 증가량을 보였는데 개발효모의 경우는 3.5배가 증가하는 것으로 조사되었는데, 백포도 엑기스 첨가군의 경우도 유사한 결과를 보였으며 조직감은 매우 부드럽게 형성되는 특성을 보였다.

특화빵 및 제과제조와 관련한 특화성(풍미 : 카라멜향, 캔디향 및 아몬드향)에 관여하는 인자가 유기산(Tartaric acid), Glucose가 주인자임을 기준으로 비교할 때, 소량의 과일엑기스는 풍미발현에 효과를 인정할 수 없었다. 또한, 풍미발현 관련 당류인 Fructose는 과일엑기스 첨가가 소량이었던 점을 감안하면 풍미발현에 영향을 미치지 못하였음을 알 수 있었다(Fig 7, Table 8).

특화빵 및 제과제조 후 당류의 먹이이용성이 결국 풍미와 관련됨에 따라 증감효과를 검정하였더니,, 제조시 첨가된 Sucrose는 반죽 및 숙성과정에서 100% 먹이원으로 활용되었으며, 관련한 당류인 Glucose, Galactose 및 Lactose는 검출되지 않아 먹이원으로 이용성이 높고 또한 발효율로 연계된 것으로 판단되었다. 그리고 Maltose는 먹이원으로 이용되지 않는 것으로 조사되었다(Table 7).

따라서, 과일엑기스첨가형 특화빵 및 제과제조 레시피는 다음과 같이 정립되었다(Table 9).

1) 배지조성레시피 : 과일원액 원료(68Brix 기준) 5~10% 희석 적용

2) 특화빵 및 제과제조 제조레시피 : 강력분 1kg+(물 600g+68Brix 과일엑기스 30~60g)+설탕 60g+소금 20g+무염버터 80g+개량제+압착형 효모 40g(수분함유량:70~74%)

식감(Soft) 증대형 특화빵 및 제과제조 레시피는 다음과 같이 정립하였다.

1) 배지조성레시피 : 과일원액 원료(68Brix 기준) 5~10% 희석 적용

2) 특화제빵 및 제과 제조레시피 : 강력분 1kg+(물 600g+68Brix 과일엑기스 30~60g)+설탕 60g+소금 20g+무염버터 80g+개량제+압착형 효모 40g(수분함유량 : 70~74%)

결론으로서 목표 풍미(카라멜향)가 보장되는 특화제빵 및 제과 제조 레시피는 다음

과 같이 정립되었다.

특화제빵 및 제과 제조레시피는 식빵을 기준으로 정립되었으며, 이 결과는 제과부분 까지 연계 하였다. 순수분리효모는 특화성(풍미, 성상 및 식감 증대 등)에 영향을 주지 않았으며, 발효성은 건조분말형보다 압착형이 효과적이었다.

개발효모를 적용한 특화 제빵 및 제조는, 과일발효배지 적용형과 과일엑기스 첨가형으로 구분하여 정립되었다(Table 9).

천연과일배지 적용형 특화제빵 및 제과 제조 메카니즘은 다음과 같다. 즉, 제빵제조 레시피는 상업효모적용과 기본적으로는 동일하게 정립되었으며, 최적 과일배지 발효 조건은 48시간~72시간범위이고, 이때  $1 \times 10^7 \sim 1 \times 10^{10}$  cfu /ml범위의 천연효모량이 우점종으로 존재하면서 일반세균 및 곰팡이균 등은 소멸되었다.

최적 과일배지 발효조건은 48시간~ 72시간범위에서 효모가 우점종으로 활동토록 먹이원으로 공급된 Sucrose 범위는 5~10%가 적절범위였다으며, 특화성(풍미) 발현량 증대효과는, 발효시간이 경과하면서 존재하는 Glucose(57,000ppm~35,000ppm) 및 과일유래 유기산(Tartaric acid: 1,800~ 2,000ppm)이 제빵발효시 풍미를 대폭 증가시키는 것으로 확인되었다.

특화성(성상, 맛, 조직감 등)부여효과는, 48시간~72시간 범위에서 효모의 활성이 극대화 함으로서 발효율 증대와 특화빵 특유의 풍미, 조직감 및 맛등을 창출한 것으로 결론을 얻었다.

과일엑기스 첨가형을 이용한 특화제빵 및 제과 제조 메카니즘은 다음과 같다. 즉, 제조 레시피는 상업효모적용과 기본적으로는 동일하게 정립되었으며, 특화제빵 및 제과 제조와 관련하여 과일엑기스 선별기준은 Fructose 및 Tartaric acid의 함유량이 높은재료가 중요한 선별기준이이고, 희석시 9Brix 이상의 당도수치가 필요하였다.

특화성(풍미) 발현량 증대효과는, Glucose가 중요한 인자이므로 반죽용액 제조시 5~10%Sucrose 사전 발효조건을 형성시킴이 중요하였는데, Glucose ( 57,000ppm ~ 35,000ppm) 및 과일유래 유기산(Tartaric acid : 1,800 ~ 2,000ppm)이 제빵발효시 풍미를 대폭 증가시키는 최적배지조건으로 확인되었다.

특화성(성상, 맛, 조직감 등)부여효과는, 부드러운 조직감 및 식감 증대형 발효율 증대와 특유의 풍미, 조직감 및 맛 등이 어울어져 종합적으로 발현되었다.

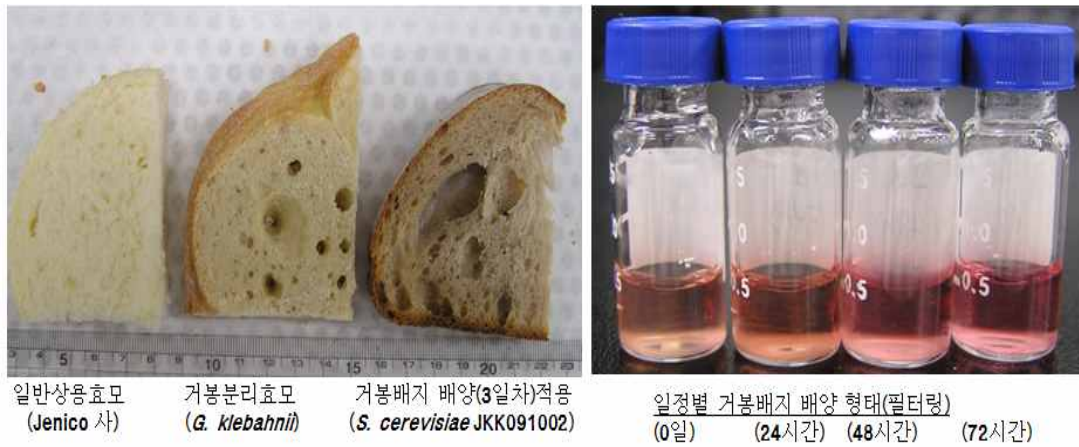


Fig 1. 상업효모 대비 선발효모 (*S. cerevisiae* JKK091002) 적용 제빵 및 배양형태 (필터링) 결과

Table 1. 과일발효배지 시간경과별 8종 유기산의 증감 조사 결과

시험구(배양일정)	유기산 증감 변화 확인결과							
	Tartaric Acid (ppm)	Malic Acid (ppm)	Lactic Acid (ppm)	Oxalic Acid ( $\mu$ mol)	Citric Acid ( $\mu$ mol)	Succinic Acid ( $\mu$ mol)	Formic Acid ( $\mu$ mol)	Acetic Acid ( $\mu$ mol)
롱코드 액기스(적포도 (68Brix→9.4Brix 희석))	1,306	D-: 4,875 L-: ND	ND	ND	ND	22.6	ND	ND
거봉 배지 (Sucrose 무첨가 : 9.4Brix)	1,427	D-:2,766 L-: 267	ND	ND	2.74	12.2	ND	200
거봉배지 (5% Sucrose 첨가, 배양 0시간)	1,213	D-:3,329 L-: 282	ND	ND	ND	13.1	ND	ND
거봉배지 (5% Sucrose 첨가, 배양 24시간)	1,472	D-:3,061 L-: 889	277	ND	ND	16.2	ND	ND
거봉배지 (5% Sucrose 첨가, 배양 48시간)	1,862	D-:3,255 L-: 679	288	ND	ND	17.1	ND	384
거봉배지 (5% Sucrose 첨가, 배양 72시간)	1,944	D-:3,170 L-: 386	298	ND	ND	18.5	ND	526



Table 2. 과일발효배지 시간경과별 당류 변화 조사 결과

시험구(배양일정)	당류 증감 변화 확인결과(ppm)				
	Sucrose	Fructose	Galactose	Glucose	Lactose
콩코드 액기스(적포도. 68Brix->9.4Brix 희석)	ND	44,194	ND	36,440	900
거봉 배지(Sucrose 무첨가 : 9.4Brix)	ND	44,237	ND	45,530	777
거봉배지(5%Sucrose 첨가, 배양 0시간)	ND	67,359	ND	70,224	799
거봉배지(5%Sucrose 첨가, 배양 24시간)	ND	36,300	ND	25,911	ND
거봉배지(5%Sucrose 첨가, 배양 48시간)	ND	59,338	ND	56,554	ND
거봉배지(5%Sucrose 첨가, 배양72시간)	ND	44,067	ND	34,984	ND

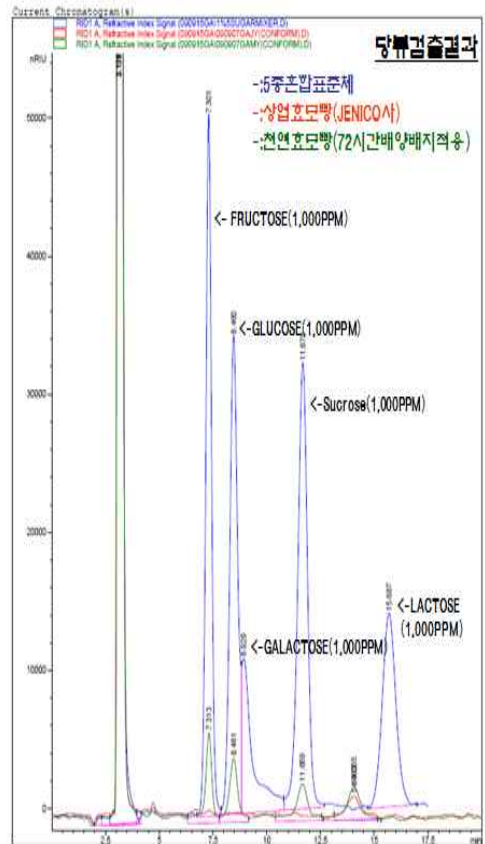
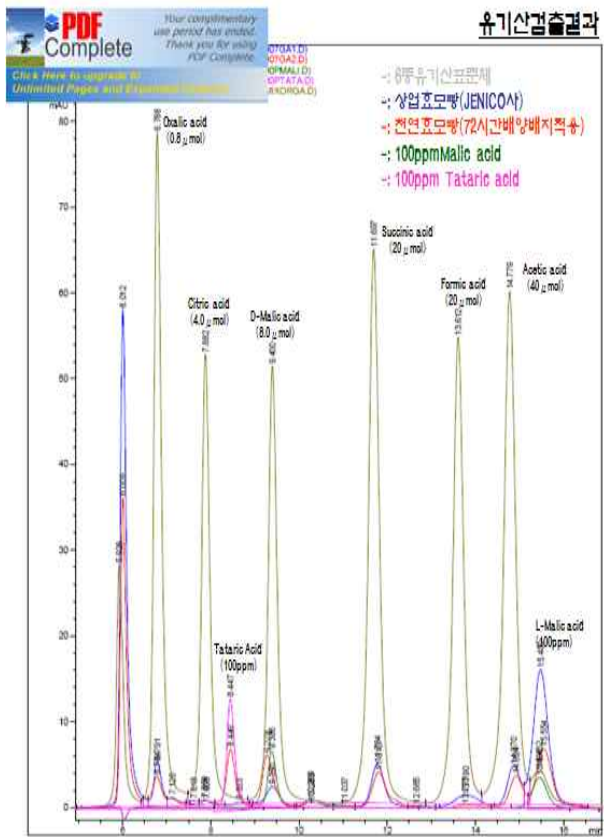


Fig 2. 과일발효배지 시간경과별 유기산 및 당류의 증감조사 결과(HPLC)

좌: 유기산 분석, 우: 당류분석

Table 3. 천연특화제빵 제조법 정립 (과일발효배지 첨가형) 연구에 적용된 표준제빵(유립빵 ; 르방) 제조 레시피(상: 상업효모, 하 : 과일발효배지)

1. 중중			2. 본반죽		
재료	중량(g)	배합률(%)	재료	중량(g)	배합률(%)
강력분	650	100	강력분	800	100
<b>상업효모</b>	26	4(강력분대비)	중력분	200	25
물	780	127	물	440	55
감자가루	50	7.69	소금	35	4.38
설탕	22	3.38	설탕	35	4.38
<제조공정> 1. 전재료를 가볍게 혼합하여 약 2시간 정도 발효 시킨다 2. 반죽온도 : 30℃ 3. 냉장실로 이동시켜 약 15시간 정도 저온 숙성 시킨다			감자가루	50	6.25
			무화과 , 햄(각각)	200	25
			<제조공정> 1. 중중반죽과 본반죽의 원료를 함께 넣고 약 90%정도 믹싱한다 2. 반죽온도 : 26℃ 3.1차발효 : 약1시간(중간 펀치) 4. 분할 : 大370g, 小100g 5. 휴지 : 20~30分 6. 성형 : 봉상형에 반죽을 역어서 올림 7. 2차발효 : 30℃/ 80%/ 50분 8. 굽기 : 上220℃/ 下230℃/ 스팀주입 후 약 30분, 10분 후 下210℃ 로 맞춰서 굽기한다		

1. 중중			2. 본반죽		
재료	중량(g)	배합률(%)	재료	중량(g)	배합률(%)
강력분	650	100	강력분	800	100
<b>거봉발효액</b>	580	89.23	중력분	200	25
물	200	30.77	거봉배양액	440	55
감자가루	50	7.69	소금	35	4.38
설탕	22	3.38	설탕	35	4.38
<제조공정> 1. 전재료를 가볍게 혼합하여 약 2시간 정도 발효 시킨다 2. 반죽온도 : 30℃ 3. 냉장실로 이동시켜 약 15시간 정도 저온숙성 시킨다			감자가루	50	6.25
			무화과 , 햄(각각)	200	25
			<제조공정> 1. 중중반죽과 본반죽의 원료를 함께 넣고 약 90%정도 믹싱한다 2. 반죽온도 : 26℃ 3.1차발효 : 약1시간(중간 펀치) 4. 분할 : 大370g, 小100g 5. 휴지 : 20~30分 6. 성형 : 봉상형에 반죽을 역어서 올림 7. 2차발효 : 30℃/ 80%/ 50분 8. 굽기 : 上220℃/ 下230℃/ 스팀주입 후 약 30분, 10분 후 下210℃ 로 맞춰서 굽기한다		

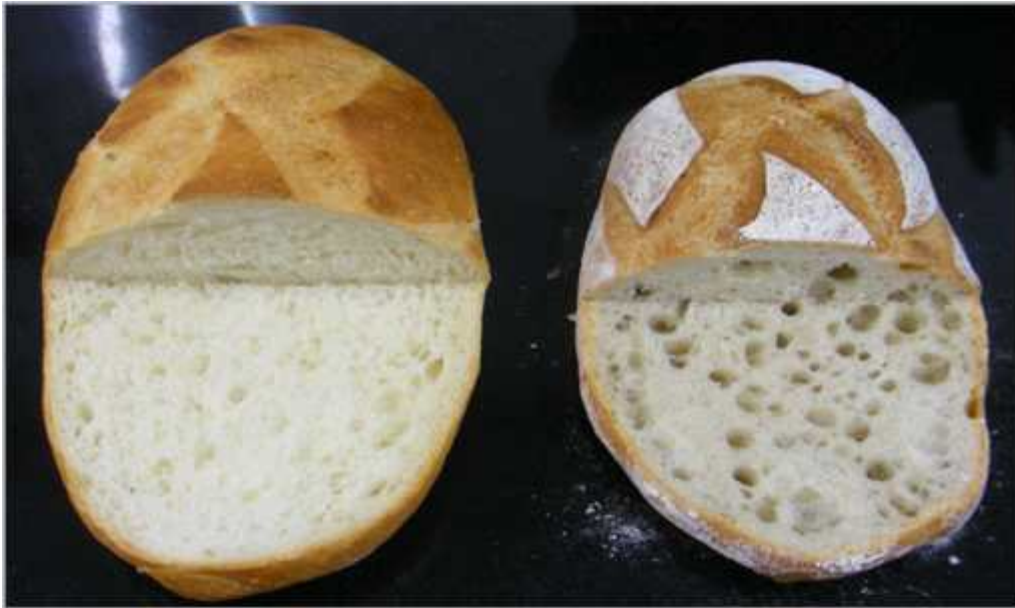


Fig 3. 천연특화제빵 제조법 정립(과일발효배지 첨가형)연구에 적용된 표준제빵(유럽빵 ; 르방) 제조 결과(좌: 상업효모, 우 : 과일발효배지)

Table 4. 천연특화제빵 제조법 정립(과일발효배지 첨가형)연구에 적용된 표준제빵(유럽빵 ; 르방)에 대한 관능평가 결과

적용 효모	1. 냄새		2. 조직감			3. 맛		
	1)냄새 이미 이취 정도	2)냄새 선호도	1) 표면의 바삭한 느낌정도	2) 안의 부드러움 정도	3)조직감 선호도	1)신맛의 정도	2) 이미, 이취 .정도	3)전체적인 선호도
상업 효모	5.00 ±2.30	4.25 ±1.22	4.83 ±1.27	5.75 ±1.06	5.42 ±1.08	3.50 ±1.45	3.75 ±1.29	5.67 ±1.07
과일 발효 배지	4.92 ±2.19	4.25 ±2.05	5.08 ±1.78	4.92 ±1.16	5.50 ±1.45	4.67 ±2.02	4.42 ±1.98	5.00 ±1.41

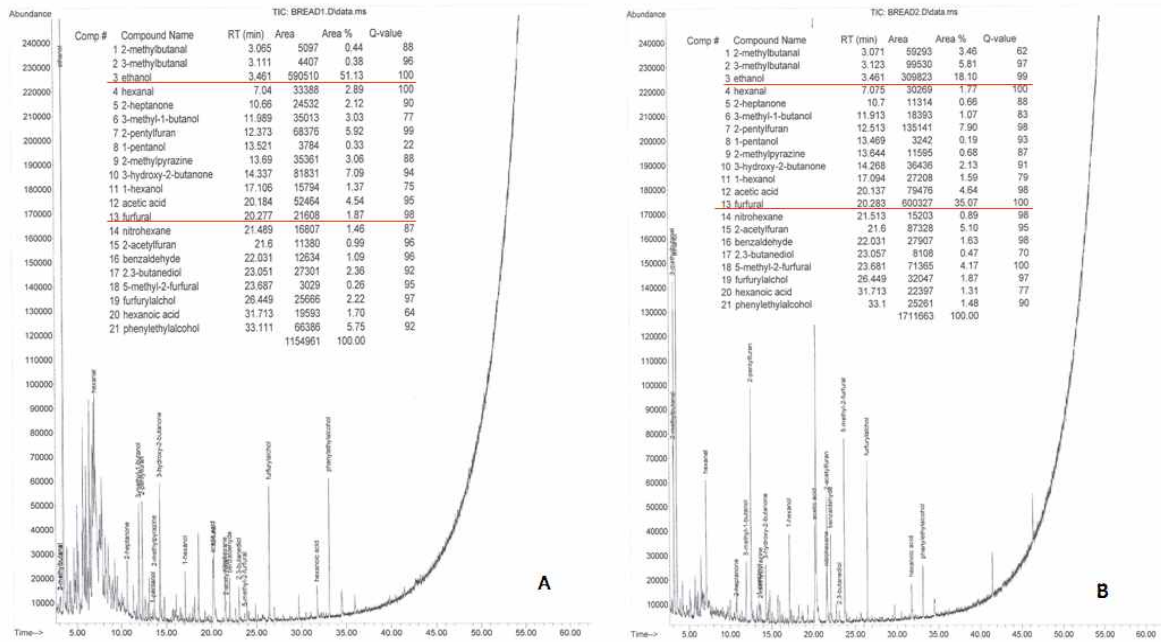


Fig 4. 상업효모 대비 과일발효배지 적용제조한 제빵 풍미 분석결과  
 A : 상업효모(압착형), B: 과일발효배지 적용 제조 르방빵

Table 5. 천연특화제빵 제조법 정립(과일발효배지 첨가형)연구에 적용된 표준제빵(유럽빵 ; 르방)에 대한 풍미성분 분석결과(( 빵굽기온도 180℃이상)

No.	Compound Name	향기특성	상업효모빵		천연효모빵1		천연효모빵2	
			Area	Area %	Area	Area %	Area	Area %
1	2-methylbutanal		5,097	0	59,293	3	42,767	7.04
2	3-methylbutanal		4,407	0	99,530	6	41,276	6.80
3	ethanol	- CH <sub>3</sub> COCH(OH)CH <sub>3</sub> 기인 - C 5이하 :채소,과일,청주 - 불포화 결합알콜:어린잎(뽕내) - 방향족알콜:꽃향기	590,510	51	309,823	18	6,075	14.18
4	hexanal		33,388	3	30,269	2	31,236	5.14
5	2-heptanone		24,532	2	11,314	1	15,812	2.60
6	3-methyl-1-butanol		35,013	3	18,393	1	8,950	1.47
7	2-pentylfuran		68,376	6	135,141	8	136,849	22.54
8	1-pentanol		3,784	0	3,242	0	1,956	0.32
9	2-methylpyrazine		35,361	3	11,595	1	16,917	2.79
10	3-hydroxy-2-butanone		81,831	7	36,436	2	3,663	0.60
11	1-hexanol		15,794	1	27,208	2	47,965	7.90
12	acetic acid	식초향	52,464	5	79,476	5	6,003	0.99
13	furfural	- Glucose : 탄 캔디향 - Tartaric acid : 탄 캔디향 - Fructose : 육즙냄새 - Sucrose : 육즙냄새	21,608	2	600,327	35	20,348	3.35
14	nitrohexane		16,807	1	15,203	1	36,944	6.08
15	2-acetylfuran		11,380	1	87,328	5	24,942	4.11
16	benzaldehyde	캔디향	12,634	1	27,907	2	10,651	1.75
17	2,3-butanediol		27,301	2	8,108	0	473	0.08
18	5-methyl-2-furfural		3,029	0	71,365	4	3,253	0.54
19	furfurylalcohol	타는 향(Glucose등 당류기인)	25,666	2	32,047	2	11,926	1.96
20	hexanoic acid		19,593	2	22,397	1	19,300	3.18
21	phenylethylalcohol	장미향	66,386	6	25,261	1	39,830	6.56
합계(%)				100.00		100.00		100.00

Table 6 . 과실액 혼합이 제빵 반죽 및 숙성(숙성시간 : 0시간)시 효모균수(PDA, 25℃), 제빵 발효율 및 특화성(풍미보유)에 미치는 변화조사

효모(압착형)처리구		과일엑기스 첨가에 따른 제빵 발효관련 효모균수 변화(cfu/g)					제빵 발효율 (%)
효모종류	과일엑기스 혼합*	초기균수	반죽	1차	중간	2차	
상업효모 (Jenico사)	대조구	1.0x10 <sup>10</sup>	2.4x10 <sup>10</sup>	NT	1.7x10 <sup>9</sup>	1.5x10 <sup>9</sup>	100(기준)
	적포도	2.4x10 <sup>10</sup>	1.8x10 <sup>9</sup>	6.6x10 <sup>9</sup>	9.1x10 <sup>9</sup>	4.6x10 <sup>9</sup>	112.6
	백포도	2.8x10 <sup>10</sup>	1.5x10 <sup>9</sup>	4.7x10 <sup>9</sup>	5.2x10 <sup>9</sup>	1.6x10 <sup>9</sup>	101.6
개발효모 (JKK100902)	대조구	1.8x10 <sup>10</sup>	7.0x10 <sup>9</sup>	1.2x10 <sup>10</sup>	5.0x10 <sup>9</sup>	NT	94.3
	적포도	2.2x10 <sup>10</sup>	1.8x10 <sup>9</sup>	4.1x10 <sup>9</sup>	4.5x10 <sup>9</sup>	7.3x10 <sup>8</sup>	101.6
	백포도	2.0x10 <sup>10</sup>	1.2x10 <sup>10</sup>	1.3x10 <sup>9</sup>	1.4x10 <sup>9</sup>	5.8x10 <sup>8</sup>	98.8

\* : 과일엑기스(68 Brix) 30g+물 600g+설탕 60g+압착효모(수분 70~74%) 40g

NT : Not Testing, 대조구 : 일반제빵 반죽조





Fig 5 .과실액 혼합이 제빵 반죽 및 숙성(숙성시간 : 0시간)시 효모균수 변화에 미치는 효과  
 A : 상업효모(압착형), B : 개발효모(압착형), 1 : 초기효모균수, 2:반죽, 3 : 1차숙성, 4 : 중간발효, 5 : 2차발효) , 배양조건 : PDA(25℃), 24시간

Table 7. 압착효모 대상 제빵제조시 과일엑기스 추가첨가가 제빵 발효특성(풍미)에 미치는 효과

효모처리구		개발효모 대상과일엑기스 첨가가제빵 발효특성에 미치는 효과				제빵 발효율(%)
효모종류	과일엑기스 처리구*	높이 (mm, Y축)	Oven Jumping (mm)	폭 (mm, X축)	폭 (Cm, Z축)	
상업효모 (압착형)	대조구	131.32	48.85	84.37	185	100(기준)
	적포도	147.91	56.72	85.64	195	112.6
	백포도	133.38	43.52	84.71	195	101.6
개발효모 (압착형)	대조구	123.79	47.49	84.20	195	94.3
	적포도	133.49	59.06	89.58	180	101.6
	백포도	129.75	52.57	87.74	185	98.8

- 제빵발효율(%) : (시험구 제빵높이/상용효모 대조구 제빵높이) x100.

- \* : 강력분 1kg+ (물 600g+ 68Brix 과일엑기스 30g) + 설탕 60g+소금(꽃소금, 남도식품, 한국) 20g+무염버터(매일유업, 한국) 80g+개량제(S500, 퓨라토스코리아, 한국) 10g+ 효모(대조 : 상업압착효모, 시험구 : 개발압착효모) 40g

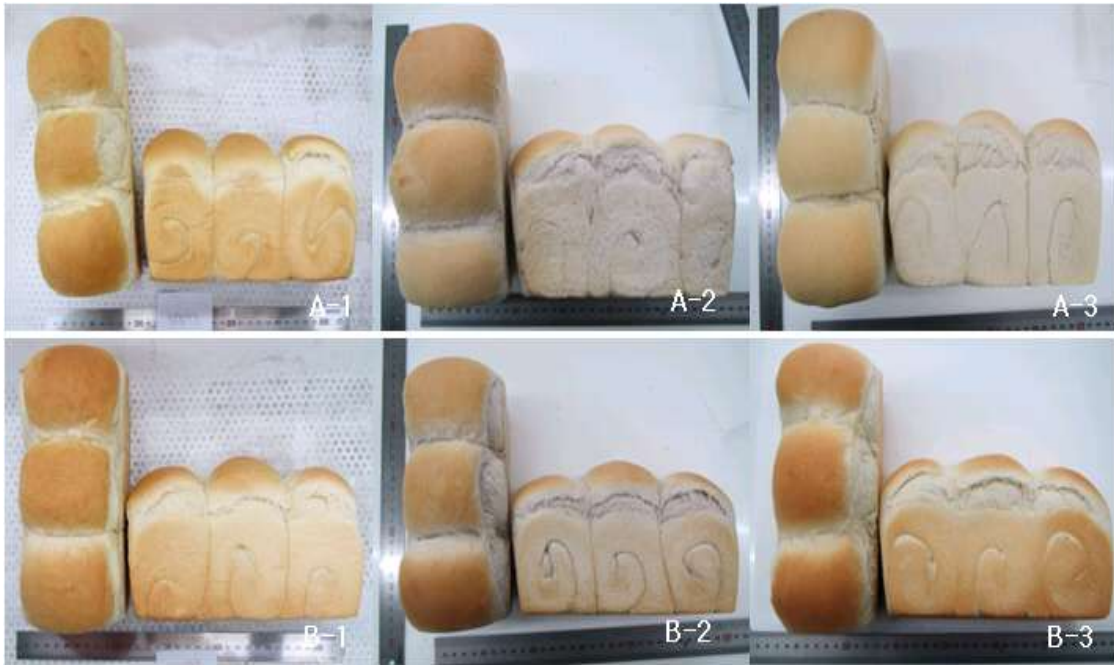


Fig 6 . 압착효모 대상 제빵제조시 과일엑기스 추가첨가가 제빵 발효특성(형태변화)에 미치는 효과

A : 상업효모(압착형), B: 개발효모(압착형), 1: 대조(only Yeast), 2: 효모+적포도, 3:효모+백포도

Table 7 . 압착효모 대상 제빵제조시 과일엑기스 추가첨가가 제빵 발효특성(풍미)에 미치는 효과

시험구		과일엑기스 첨가가 제빵제조후 당류변화에 미치는 효과(%)						제빵 발효율 (%)
		Maltose	Fructose	Sucrose	Gluctose	Galactose	Lactose	
최초투여량(%)		0	0	10	0	0	0	
상업효모 (압착형)	대조구	6.34	1.05	ND	ND	ND	ND	100 (기준)
	적포도	5.91	1.80	ND	ND	ND	ND	112.6
	백포도	6.08	ND	ND	ND	ND	ND	101.6
개발효모 (압착형)	대조구	7.86	2.7	ND	ND	ND	ND	94.3
	적포도	5.33	2.71	ND	ND	ND	ND	101.6
	백포도	7.53	3.43	ND	ND	ND	ND	98.8

- 제빵발효율(%) : (시험구 제빵높이/상용효모 대조구 제빵높이) x100.

- \* : 강력분 1kg+ (물 600g+ 68Brix 과일엑기스 30g) + 설탕 60g+소금(꽃소금, 남도 식품, 한국) 20g+무염버터(매일유업, 한국) 80g+개량제(S500, 푸라토스코리아, 한국) 10g+ 효모(대조 : 상업압착효모, 시험구 : 개발압착효모) 40g

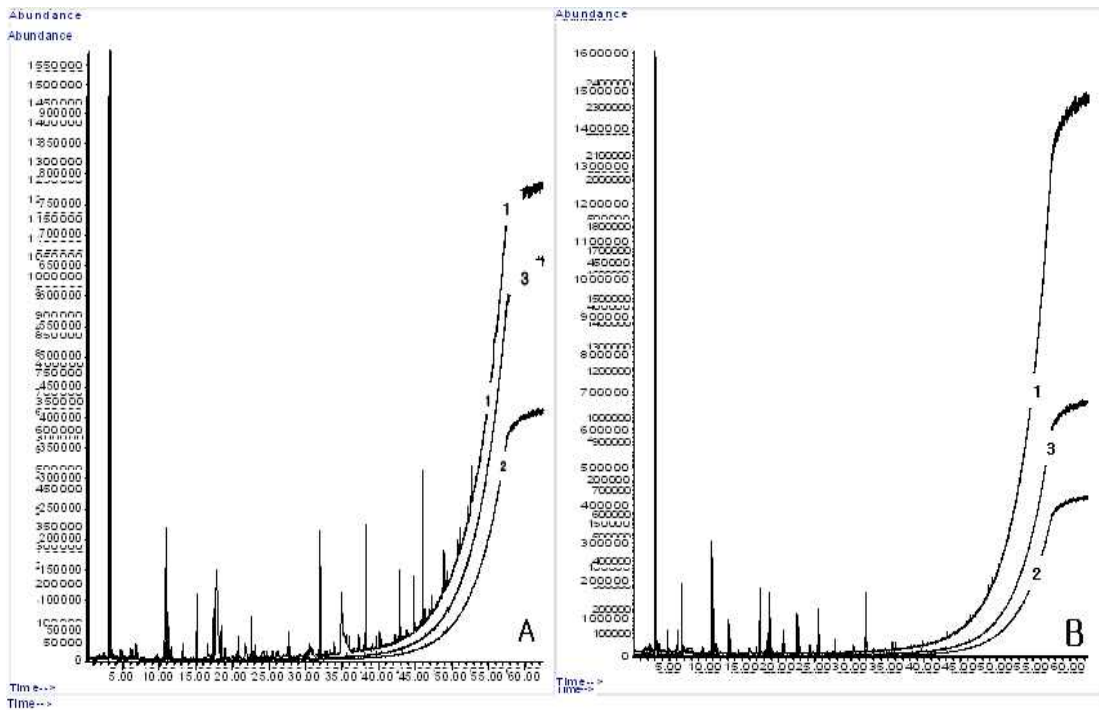


Fig 7. 압착효모 대상 제빵제조시 과일엑기스 추가첨가가 제빵 발효특성(풍미)에 미치는 효과

A : 상업효모(압착형), B: 개발효모(압착형), 1: 대조(only Yeast), 2: 효모+적포도, 3:효모+백포도

Table 8 . 압착효모 대상 제빵제조시 과일엑기스 추가첨가가 제빵 발효특성(풍미)에 미치는 효과 (단위:Area x 1,000)

분류	성분명	과일엑기스 첨가시 향미성분 변화 분석 결과					
		압착효모(0hr)		압착효모(0hr) +적포도		압착효모(0hr) +백포도	
		상업	개발	상업	개발	상업	개발
Alcohols	ethanol	1,986	1,696	4,187	6,590	2,248	4,474
	isobutanol	18	25	24	10	26	22
	2-methyl-1-butanol	18	12	55	20	24	20
	3-methyl-1-butanol	190	74	247	68	234	73
	1-hexanol	1	2	1	15	0	16
	nonanol	3	6	2	3	2	2
	phenyl ethyl alcohol	387	24	413	45	296	26
Aldehydes	hexanal	7	14	6	9	10	11
	benzaldehyde	25	24	22	22	11	26
Carboxylic acid	acetic acid	23	53	30	138	8	243
	isobutyric acid	11	27	17	32	11	41
	butanoic acid	4	5	5	7	5	8
	hexanoic acid	7	29	12	31	10	43
	octanoic acid	13	8	8	9	8	11
Esters	2-pentylfuran	4	8	1	9	5	9
	ethylcaproate	9	6	9	6	10	5
	ethyl octanoate	25	8	31	9	27	9
	ethyl decanoate	4	1	6	2	7	1
Ketones	acetoin	38	57	74	174	3	166
합계		2,774	2,077	5,150	7,198	2,945	6,785

Table 9. 개발 효모 적용 특화제빵 및 제과 제조 레시피 정립 내역

풍미 보장형 특화 제빵 및 제과 레시피 항목		개발 효모 적용 특화 제빵 제조레시피내역	비고
발효율 확보 기초효모균수 (cfu/g)		1.5x10 <sup>10</sup> 이상(PDA, 25℃, 24시간)	
기본제빵제조Recipe		강력분 1kg+물 600g+설탕 60g+소금 20g+무염버터 80g+개량제(S 500)10g+압착형효모 40g(수분함유량:70~74%)	
풍미보장형 천연특화제빵제 조 Recipe	과일엑기스 첨가형	강력분 1kg+(물 600g+68Brix 과일엑기스 30~60g)+설탕 60g+소금 20g+무염버터 80g+개량제+압착형효모 40g(수분함유량:70~74%)	
	과일배지 발효형	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 1단계(배지조성): 멸균수 300g+ 설탕 35g(백설탕/흰설탕, 삼양사)+선발 과일 400g첨가(첨가전 마쇄공정 실시)-&gt;숙성(30℃, 48~72시간, 습도 85~90%) <ul style="list-style-type: none"> <li>. 효모균수: x10<sup>7-10</sup>cfu/ml이상</li> </ul> </li> <li>- 2단계(중종레시피) : 강력분 500g+거봉(하초, 한들영농법인) 분쇄배양액(30±1℃, 72시간 배양) 325g+Sucrose 15g</li> <li>- 3단계(본반죽) : 강력분 1,000g+물 680g(물 500g+거봉배양액180g)+소금 1.8%(중종 강력분 500g+본반죽 강력분 1,000g기준 첨가량, %)+설탕 35g+버터 50g&gt;</li> </ul>	
숙성조건 (온도/습도 /시간)	1차발효	25℃/ 50%/ 90분	
	중간발효	실온/20~30%/20분	
	2차발효>	40℃/80%/ 45분	
굽기( 온도, 분)		160(오븐상층)/180℃(오븐하층),35분	

## 제 8 절. 개발 기능성소재의 사전 안전성 평가

### 8-1. 표준체 Sialic acid를 이용한 안전성 평가기법 사전정립 (*in vitro*, 표준 세포주 활용)

#### 1. 연구목적

전체 연구개발의 핵심 목표는 유기농 농산물에서 분리하고, 동정 및 유전자 확보가 완료된 효모에서 대량 분리한 기능성 소재별로 최종 동물전임상 평가 및 제품화 적용 레시피를 정립하고 정립된 결과를 산업화를 목표로 농축산업을 포함한 낙농 및 유가공 관련 산업에 이익을 제공하고 저 하였다. 이 과정에서 기능성 소재 및 관련 물질에 대한 동물전임상 및 제품화 적용성(제빵·제과레시피 정립) 평가전에 광역적인 결과를 저비용 실험을 통하여 사전에 예측할 필요가 있다. 즉, 표준세포주를 사용하여 세포독성이 있는 지, 염증저하효과 및 면역증가 등에 대한 기초자료를 확보하고자 함에 있다. 목표 기능성 소재로서는 세포벽 성분( $\beta$ -glucan( $\beta$ -1,3/1,6-Glucan)과 효모추출물(미네랄류, 아미노산류 및 핵산류 함유), 핵산류(대조)를 선정하였다.

따라서, 본 연구에서는 목표 기능성 소재의 대량생산시스템 정립전에 표준주를 이용한 안전성 평가법을 사전정립 한 후 정립된 평가법을 적용하여 개발 기능성소재별 및 농도별 안전성 평가를 실시하고 저 하였다.

#### 2. 연구수행 방법

가. 선발효모 유래 기능성 소재별, 농도별로 광역 안전성 스펙트럼을 사전확인하기 위한 표준체로서 Sialic acid는 매일유업(주) 중앙연구소에서 기증받아 사용(순도 : 98%)하였으며, 우선 생리식염수에 10%(w/w)되게 희석용액을 제조한 후, 전체시험간 희석하여 사용하였다.

#### 나. 표준주 및 세포배양

HEK 293 cell (human embryonic kidney cell), RAW 264.7 cell (macrophage cell)을 사용하였으며 세포배양은 ATCC 권장방법에 준하여 HEK 293 cell, 는 DMEM에 10% fetal bovine serum (이하, FBS라 함), 100  $\mu$ g/ml penicillin, 100 $\mu$ g/ml streptomycin을 혼합한 배지를 사용하여 37 $^{\circ}$ C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 배양하였으며 RAW264.7 cell은 RPMI를 사용하여 배양조건을 확립하였다.

교차검정을 위하여 추가 3종 human erythrocyte(적혈구 용혈성평가), HaCaT(독성평가), HIH3T3 cell(독성평가)에 대한 배양도 이루어졌으며 배양법은 HEK 293 cell 과 같았다(Fig 3.).

#### 다. MTT assay (세포독성 평가)



각각의 cell을 culture dish ( $1 \times 10^5$  /ml)에서 세포 배양조건에 의해 24시간 전 배양하고 24시간 이후 새 배지로 교환해주고 배양중인 cell 배지 100  $\mu$ l에 MTT solution을 10 $\mu$ l씩 섞어서 세포에 처리해 준 후 37 $^{\circ}$ C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 3~4시간 incubation 하고, media를 모두 제거하고 DMSO(1000 $\mu$ l)를 각각의 sample에 넣어 반응시킨 후(최소 6시간, microplate reader(Molecular Devices, Sunnyvale CA, U. S. A)를 이용하여 540nm에서 흡광도 값을 측정하여 결과 확인하였다. 시험간 표준체인 Sialic acid는 사전준비된 희석용액을 0.1%(w/w), 0.25% 및 0.5%의 농도가 되게 배양액에 첨가하여 사용하였다(Fig 1~2).

#### 라. 염증관련 인자 NO (Nitric oxide) 측정 평가

세포배양액에서 생성된 NO의 양은 NO<sub>2</sub><sup>-</sup>의 형태로 Griess시약을 이용하여 측정하였다. 상층액을 96well plate에 각각 분주한 후 Griess reagent(0.8% sulfanilamide/0.75% N-(naphthylethylene)diamine in 0.5N HCl, Sigma) 100 $\mu$ l를 첨가 하였다. 15 분간 실온에서 방치한 후, 540 nm파장에서 microplate reader(Molecular Devices, Sunnyvale, CA, U.S.A)를 이용하여 nitrite 농도를 측정하였다. Sodium nitrate(0.5~100M)를 nitrite 표준으로 이용하였다. 시험간 표준체인 Sialic acid는 사전준비된 희석용액을 0.05%(w/w)와 0.1% 농도가 되게 배양액에 첨가하여 사용하였다(Fig 1 및 4).

#### 마. 면역 관련 인자 측정

TNF- $\alpha$ 와 IL-6등의 cytokine의 측정 방법은 manufacturers instruction에 따랐다. 방법은 다음과 같다. 50 $\mu$ l 분석 희석액(assay diluent)을 제공된 well에 각각 넣고, 각 사이토카인에 대한 표준용액과 실험액을 각각 50 $\mu$ l씩 well의 중심부에 첨가하여 잘 섞이도록 plate를 가볍게 바닥에 두들긴 다음 제공된 밀폐용 테이프로 덮어 2시간 동안 실온에서 반응시켰다. 밀폐용 테이프를 제거하고 제공된 washing buffer로 5회 세척과정을 반복하였다.

측정하고자 하는 cytokine의 conjugate용액 100 $\mu$ l를 각 well에 넣고 밀폐용 테이프로 덮어 2시간 동안 반응시킨 후, washing buffer로 5회 세척 과정을 반복하였다. 100 $\mu$ l 기질용액을 각 well에 넣고 30분 동안 실온에서 차광상태로 보관하면서 반응시켰다. 그 후, 정지 용액을 각 well에 100 $\mu$ l씩 넣고 30분 이내에 세포배양액에 분비되어 kit내 반응시약과 반응한 TNF- $\alpha$ , IL-6 분비량을 각각 측정 하였다(micro reader : 450nm, wavelength correction : 570nm, U.S.A.). 시험간 표준체인 Sialic acid는 사전준비된 희석용액을 0.05%(w/w)와 0.1% 농도가 되게 배양액에 첨가하여 사용하였다(Fig 5~6).

#### 바. 염증관련 cell signal pathway

Western blot 분석은 다음과 같이 실행하였다. Sample들을 10 mM Tris-HCl

(pH 7.4), 1mM EDTA, 150 mM NaCl, 1% Nonidet P-40, 1% deoxycholic acid, 1 mM phenylmethyl sulfonyl fluoride (PMSF), protease inhibitor cocktail이 혼합된 완충용액에서 일정하게 균질화시킨 후 4°C에서 12,000 rpm, 10분간 원심 분리하였다. 원심 분리 후 상층액을 취하여 실험에 이용하였으며 단백질량의 측정은 BCA protein assay kit (Pierce, Rockford, IL, USA)로 측정하였다.

동량의 단백질(20 $\mu$ g)을 sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) 겔로 전기 영동시키고, PVDF membrane에 전이시킨 다음, 막을 5% 탈지유에 반응시켜 blocking 과정을 거친 후에 1차 항체(p-38, p-p38, p-SAPK/JNK, p-p SAPK/JNK,  $\beta$ -actin(Cell Signal Technology, Santa Cruz Biotechnology, CA, USA)를 각각 4°C에서 12~14 시간 반응시켰다. 그 후, 2차 항체를 1~2 시간 동안 4°C에서 반응시켰다. ECL kits(Santa Cruz Biotechnology, CA, U.S.A.)로 반응시킨 후, Luminescent image analysis (LAS-4000 mini, Fujifilm, JAPAN) 장치를 이용하여 밴드를 확인하였다.

시험간 표준체인 Sialic acid는 사전준비된 희석용액을 0.05%(w/w)와 0.1% 농도가 되게 배양액에 첨가하여 사용하였다(Fig 7).

### 3. 연구수행결과

#### 가. 세포독성평가

MTT assay는 세포의 증식을 측정하기 위한 실험실 시험법으로써 준 비색분석법(standard colorimetric assay)이라고 할 수 있다. 생명과학분야에서 세포의 증식을 정확하고 신속하게 결정할 수 있는 방법은 기본적인 기술이다.

일반적으로 hemocytometer를 이용하여 생존세포수를 세거나 광학밀도(optical density)를 측정하는 방법이 사용되지만 많은 양을 측정 시 시간과 노력이 필요이상으로 요구되고 부정확한 결과를 가져올 수 있다. 이를 대체하기 위해 개발된 MTT assay는 살아있는 세포의 미토콘드리아 탈수소 효소작용(dehydrogenases)에 의하여 노란색의 수용성 기질인 MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide, Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide)를 자주색을 띠는 비수용성의 MTT-formazan 결정으로 환원시키는 미토콘드리아의 능력을 이용하는 검사법으로써 신속하고 정확하게 많은 양의 세포 증식거동을 측정할 수 있다.

자주색 결정은 DMSO에 용해되고 흡광도(Optical Density)는 540nm의 파장에서 최대가 되며, 이 파장에서 측정된 흡광도는 살아있는 세포의 수와 직선적인 상관관계를 나타내게 된다. 실험법 정립을 위해 대조물질로 사용한 Sialic acid가 실험에 사용한 세포들에 대해 세포독성이 있는지를 관찰하기 위하여 MTT assay를 실시하였다. 실험 농도는 0.02, 0.04, 0.08, 0.1, 0.25, 0.5, 1% 이었고 측정 시간은 6, 12, 24시간 이었다. HEK 293과 RAW 264.7 cell 모두 0.1% 농도까지는 관찰 시

간대에 세포 독성이 관찰되지 않았다. 하지만, 두 세포 모두 0.25% 농도 이상에서는 24 시간째에 약 20% 정도 세포활성도가 감소되는 관찰할 수 있었다(Fig 1~3).

이에 따라 본 연구에서는 human erythrocyte(적혈구 용혈성평가), HaCaT(독성평가), HIH3T3 cell(독성평가)에 대한 교차검정을 실시 하였으며, HaCaT(독성평가), HIH3T3 cell(독성평가)에서는 고농도(15mg/ml)이하에서는 독성이 관찰되지 않았으며 이에 본 연구팀 5개 표준주에 대한 세포독성평가 정립을 완료하였다.

#### 나. 염증관련 인자 NO (Nitric oxide) 측정

Nitric oxide (이하, NO)는 염증 반응이 유발될 경우 분비되어지는 대표적인 염증성 물질이다. 실험에 사용되어진 glycerol과 LPS 모두 대표적인 염증 유발 물질로서 NO 생성을 유발시켰다. HEK 세포의 경우 glycerol만 단독 처치한 군 (Sialic acid를 처치 하지 않은 군)에 비해 Sialic acid를 처치한 모든 군에서 NO생성량을 감소시키는 것을 확인할 수 있었다. 하지만, RAW 세포의 경우에는 Sialic acid (0.05%) 처치 군에서만 NO 생성량을 감소시켰을 뿐, Sialic acid (0.1%) 처치 군에서는 큰 차이가 확인되지 않았다(Fig 4).

#### 다. 면역 관련 인자 측정 결과

##### 1) TNF- $\alpha$ 생성 억제 실험 결과

TNF- $\alpha$ 는 염증 유발 시 생성되어 여러 세포들을 자극하여 염증성 CYTOKINE을 분비시키는 대표적인 염증성 물질이다. 실험에 사용되어진 glycerol과 LPS 모두 대표적인 염증 유발 물질로서 TNF- $\alpha$  생성을 12시간째에 유발시켰다. HEK 세포의 경우 glycerol만 단독 처치한 군 (Sialic acid를 처치 하지 않은 군)에 비해 Sialic acid를 처치한 모든 군에서 NO생성량을 감소시키는 것을 확인할 수 있었다. 또한, RAW 세포의 경우에도 Sialic acid(0.05, 0.1%)를 처치한 모든 군에서만 TNF- $\alpha$  생성량을 감소시켰다(Fig 5).

##### 2) IL-6생성억제 효능평가

IL-6는 TNF- $\alpha$ 의 자극을 받아 생성되어지는 염증성 CYTOKINE이다. 실험에 사용되어진 glycerol과 LPS 모두 대표적인 염증 유발 물질로서 TNF- $\alpha$  생성을 12시간째에 유발시켰다. HEK 세포의 경우 glycerol만 단독 처치한 군(비교군)에 비해 Sialic acid를 처치한 모든 군에서 NO생성량을 감소시키는 것을 확인할 수 있었다. 또한, RAW 세포의 경우에도 Sialic acid (0.05 및 0.1%)를 처치한 모든 군에서만 TNF- $\alpha$  생성량을 감소시켰다. 하지만, Fig. 3.에와 마찬가지로 0.1 % 처치 군에서 IL-6 생성량의 감소가 0.05 % 군보다 약함을 확인할 수 있었다(Fig 6).

#### 라. 염증관련 cell signal pathway(Western blot)평가

MAPKinases는 염증에 관여하는 cell signal pathway이다. HEK 세포의 경우 glycerol만 단독 처리한 군 (Sialic acid를 처리 하지 않은 군)에 비해 Sialic acid를 처리한 모든 군에서 MAPKinsase 일종인 p-38과 p-SAPK/JNK의 발현을 현저하게 억제시키는 것을 확인할 수 있었다. 또한, RAW 세포의 경우에도 Sialic acid (0.05, 0.1%)를 처리한 모든 군에서만 MAPKinsase 일종인 p-38과 p-SAPK/JNK의 발현을 억제시키는 것을 확인할 수 있었다. 하지만, 0.1 % 처리 군에서 발현량의 감소가 0.05 % 군보다 큰 차이를 나타내지 않음을 확인할 수 있었다 (Fig 7).

#### 4. 결론

현재 본 연구에서는 개발효모의 이질이 보유하는 기능성 물질의[세포벽 성분 :  $\beta$ -glucan( $\beta$ -1,3/1,6-Glucan, 추출물 : 미네랄(효모유래 유기태화 미네랄 제제 포함), 특수 아미노산(기능성), 핵산(풍미 및 기능성) 경우 시품첨가물로서 허가가 되어 있다 하더라도 안전성 평가는 필수 항목임에 본 연구에서는 Sialic acid(우유 추출물)을 표준물질로 하여 안전성 평가기법을 사전정립하였다.

이를 기초로 선발효모 대량생산 기법정립과 기능성 물질 분리 후 사전독성 평가에 적용하고, 이 결과를 토대로 동물임상실험시 투여량과 연계하여 최종 안전성 및 기초 효능 검정을 확인하였다.

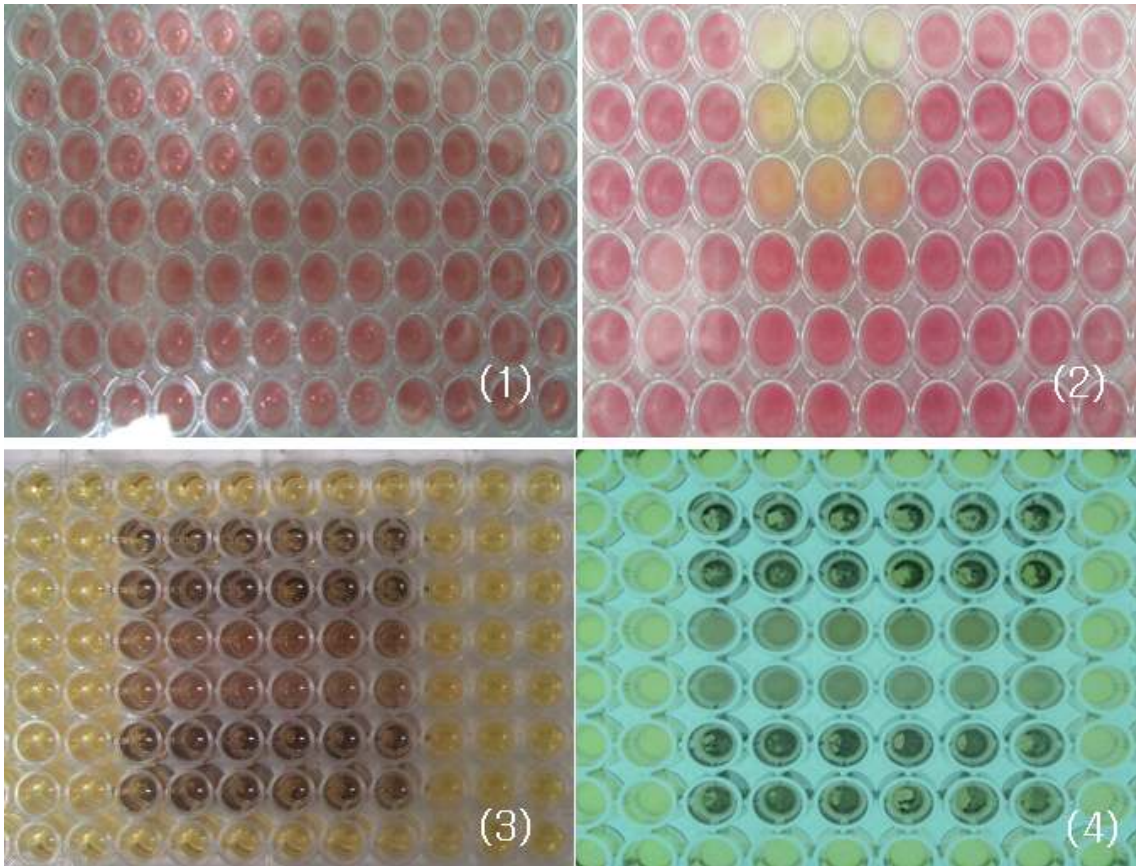


Fig 1. 선발효모유래 분리 기능성 소재의 안전성 평가를 위한 시험법 검정을 위한 표준 체인 Sialic acid를 이용한 MTT assay 정립결과  
 1 : 세포 전 배양, 2 : Sialic acid 처리구, 3 : MTT solution처리 후, 4 : MTT solution처리 후(24시간)

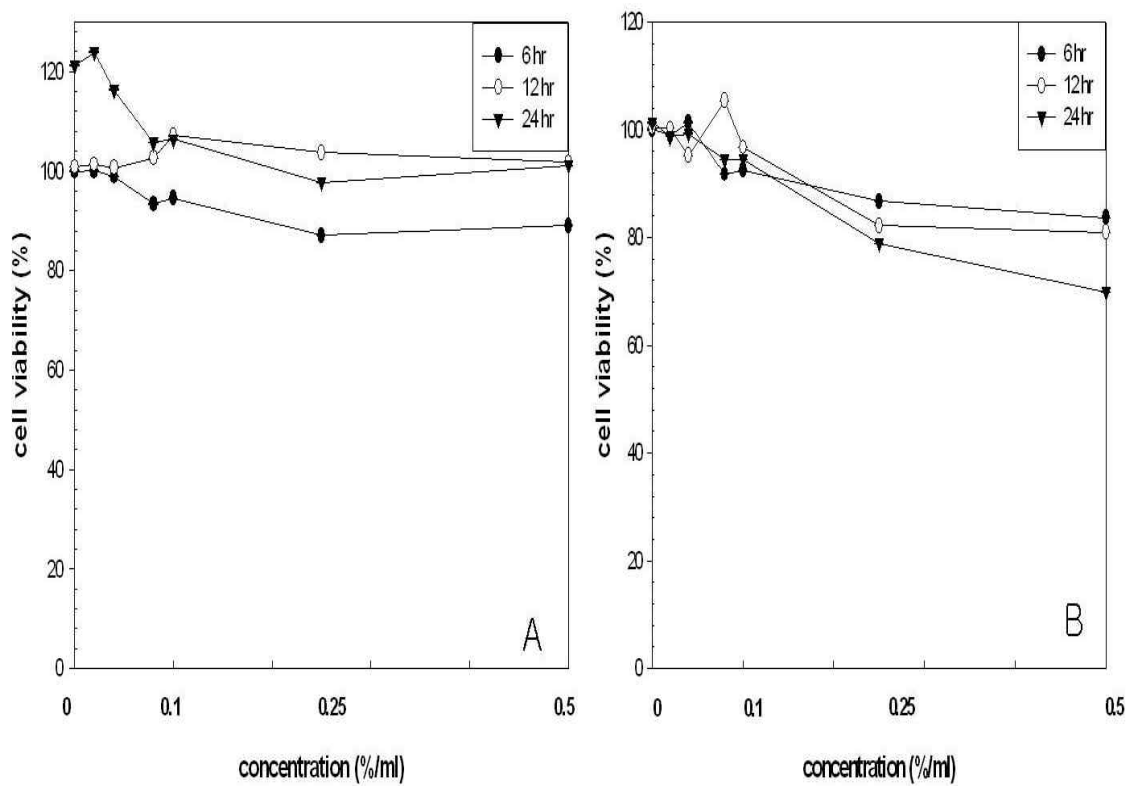


Fig 2. 선발효모에서 분리한 기능성 소재의 독성평가법 사전정립을 위해 독성평가법 사전 정립을 위해 표준체인 Sialic acid의 농도별 처리가 독성에 미치는 효과 평가결과 (MTT assay). A: HEK 293 cell, B; RAW 264.7 cell

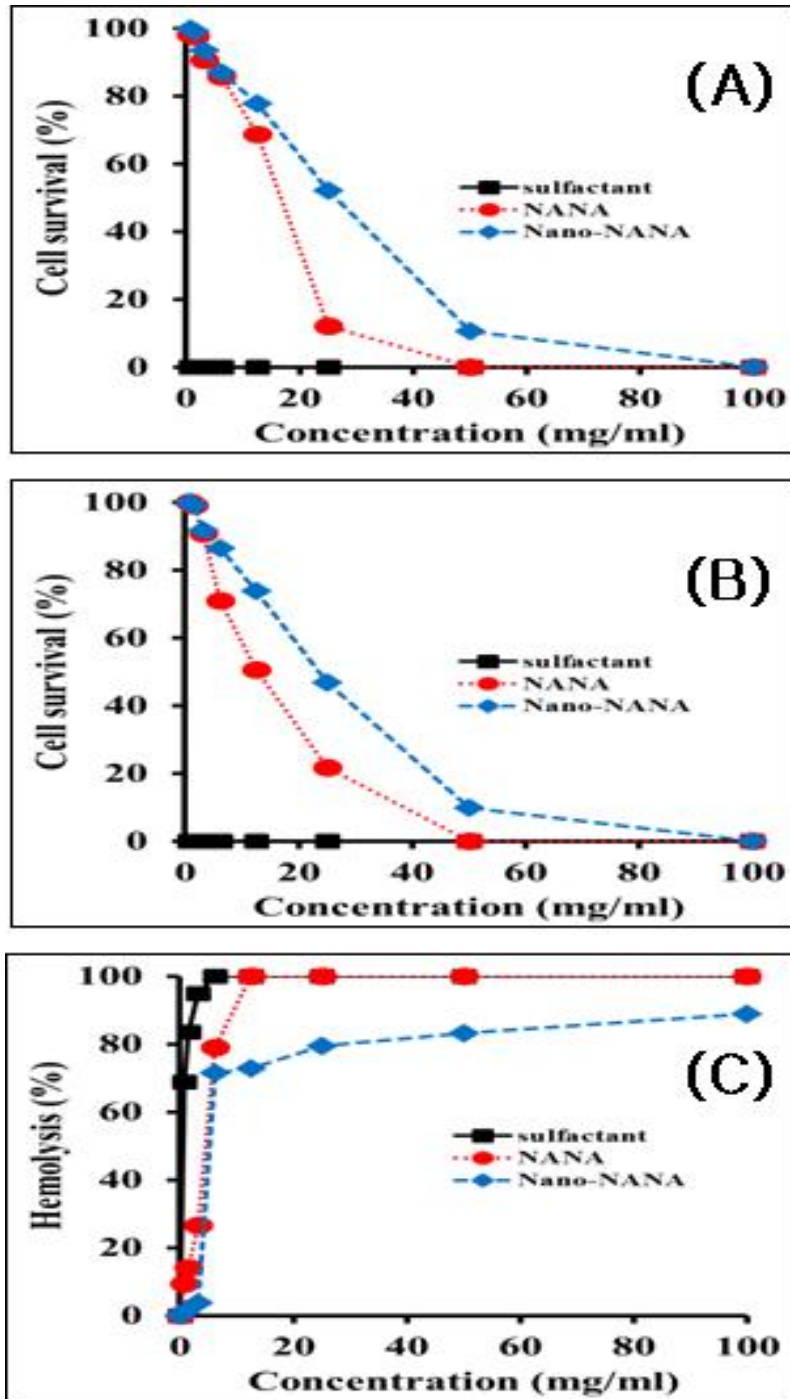


Fig 3. 선발효모에서 분리한 기능성 소재의 독성평가법 사전정립을 위해 표준체인 Sialic acid의 농도별 처리가 표준주별 독성에 미치는 효과 평가결과. A :human erythrocyte, B: HaCaT, C : HIH3T3 cell

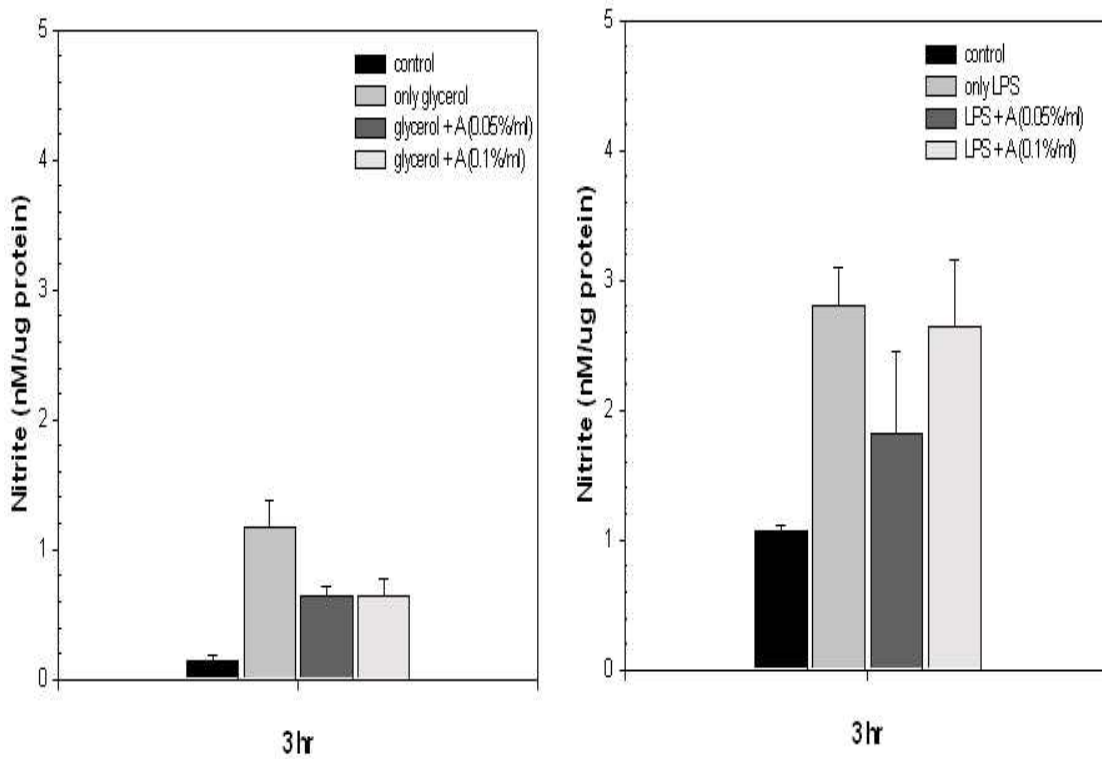


Fig 4. 선발효모에서 분리한 기능성 소재의 독성평가법 사전정립을 위해 독성평가법 사전정립을 위해 표준체인 Sialic acid의 농도별 처리가 인위적 염증인자 활성화유발(Glycerol 및 LPS) 표준주에 대한 면역관련 인자증감에 미치는 효과평가 결과(NO). 좌 : HEK 293 cell, 우 : RAW 264.7 cell



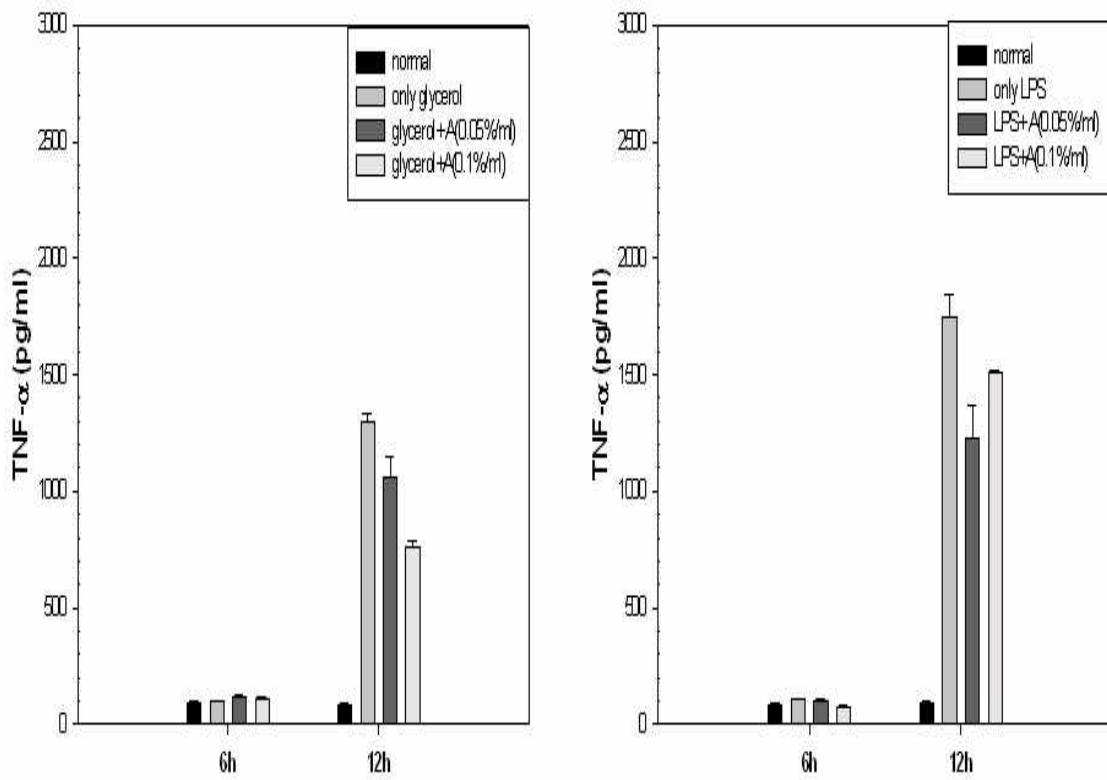


Fig 5. 선발효모에서 분리한 기능성 소재의 독성평가법 사전정립을 위해 독성평가법 사전정립을 위해 표준체인 Sialic acid의 농도별 처리가 인위적 면역인자 활성화유발(Glycerol 및 LPS) 표준주에 대한 개발 기능성 소재의면역관련 인자증감에 미치는 효과 (TNF- $\alpha$ )평가기법 사전정립결과. 좌 : HEK 293 cell, 우 : RAW 264.7 cell

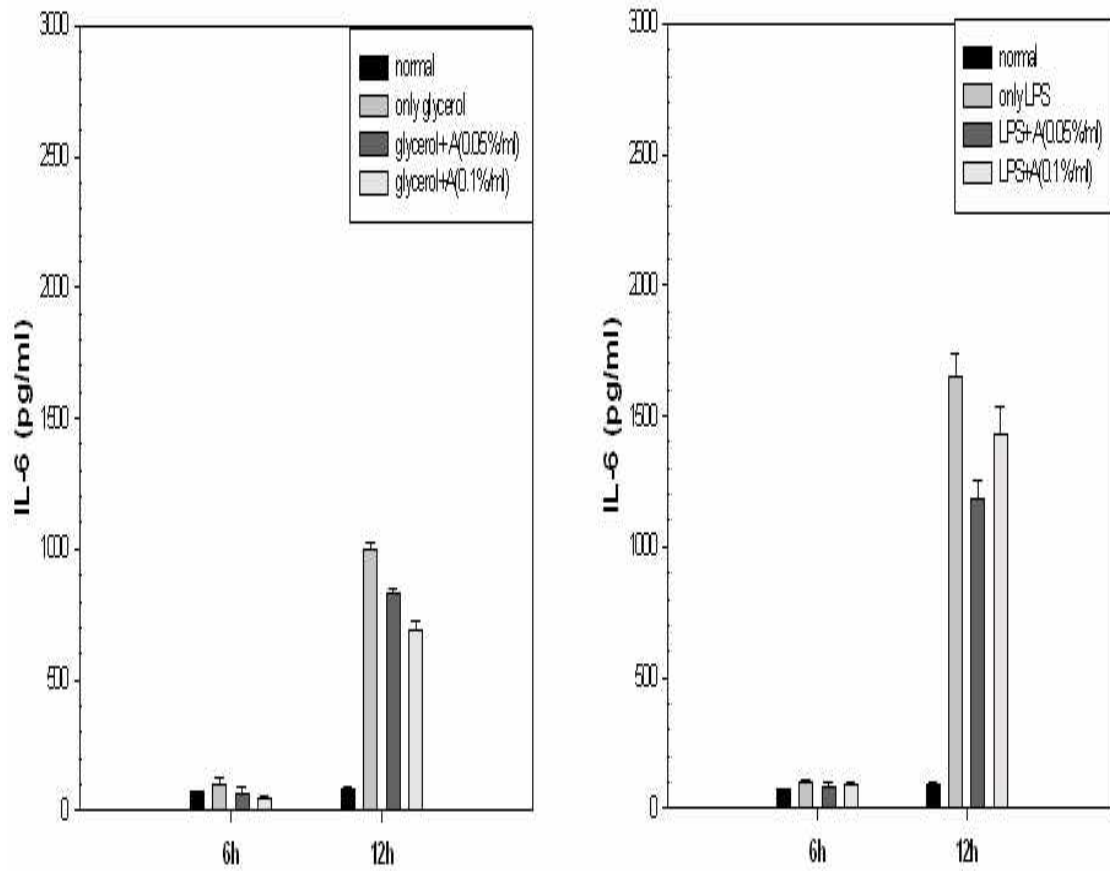


Fig 6. 선발효모에서 분리한 기능성 소재의 독성평가법 사전정립을 위해 독성평가법 사전정립을 위해 표준체인 Sialic acid의 농도별 처리가 인위적 면역인자 활성화유발 (Glycerol 및 LPS) 표준주에 대한 개발 기능성 소재의면역관련 인자증감에 미치는 효과(IL-6)평가기법 사전정립결과. 좌 : HEK 293 cell, 우 : RAW 264.7 cell

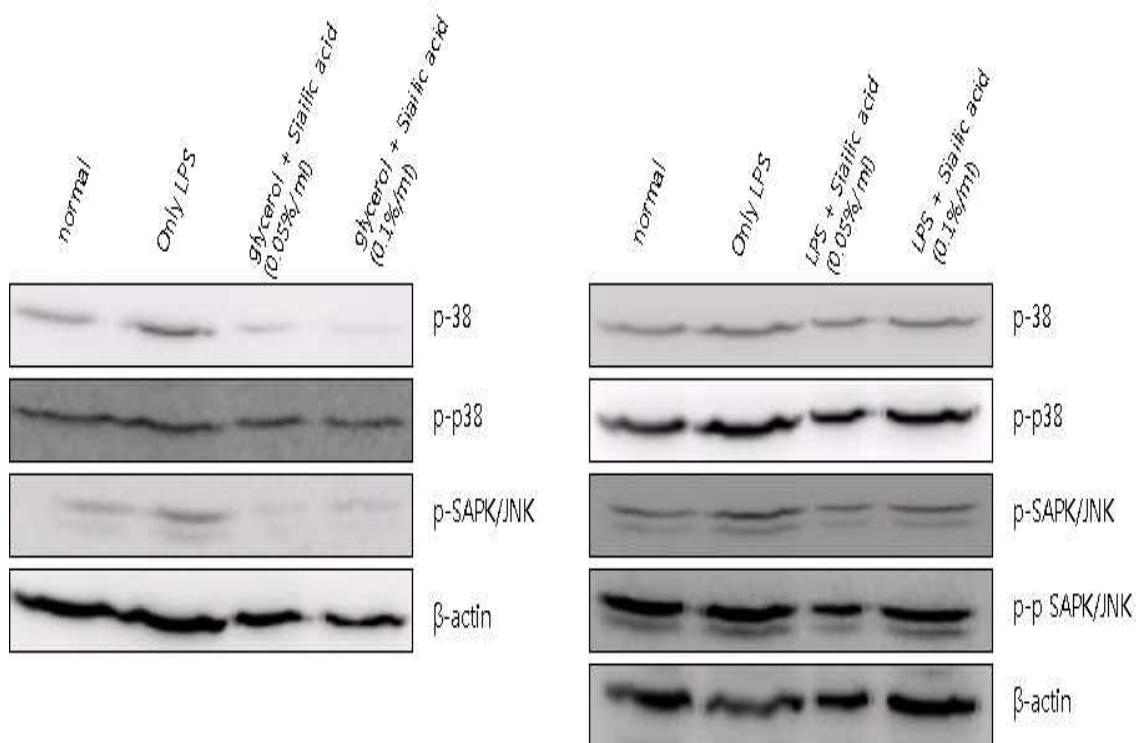


Fig 7. 선발효모에서 분리한 기능성 소재의 독성평가법 사전정립을 위해 독성평가법 사전정립을 위해 표준체인 Sialic acid의 농도별 처리가 인위적 염증유발(Glycerol 및 LPS) HEK 293 표준주에 대한 염증증감효과(Western blot)평가기법 사전정립결과. 좌 : Glycerol유도, 우: LPS유도

## 8-2. 선발효모 분리 기능성 소재별 사전 안전성 평가 (*in vitro* : 표준 세포주 활용)

### 1. 연구목적

기능성 소재 개발전 우선 실시한 선행연구(제 3장, 8-1절)에서 표준세포주를 이용한 사전 안전성 평가를 위해 정립된 시험법에 준하여, 기능성 소재 및 관련 물질에 대한 동물전임상 및 제품화 적용성(제빵·제과레시피 정립)평가전에 광역적인 결과를 저비용 실험을 통하여 사전에 예측하고자 하였다.

따라서, 본 연구에서는 선발 효모를 원료로 하여 대량생산된 기능성 소재 핵산류를 대상으로 사전안전성(표준세포주 : RAW 264.7 적용) 및 기초효능 평가를 실시 후 동물임상 및 제과·제빵 적용성 평가시 기능성 발현관련 사전결과 예측 및 관련한 최적 첨가 농도를 설정근거를 확보하고자 하였다.

### 2. 연구수행 방법

#### 가. 기능성 소재 및 재료준비

선발효모 유래 기능성 소재로서 세포벽 성분( $\beta$ -glucan)과 효모추출물(*S.cerevisiae*CKK110426) 및 효모추출물내 함유된 5종 핵산류를 주요대상으로 하였다.

시험재료인 기능성소재는 수용성 및 불용성 여부를 우선 평가한 후 이중 수용성 소재만을 대상으로 우선 10%(w/w) Stock sol.을 조성한 후 전체시험간 필요량을 희석하여 사용하였다. 따라서, 기능성 소재중 세포벽 성분( $\beta$ -glucan)의 경우는 불용성임에 따라 시험대상에 제외하였으며, 제빵·제과 적용성 평가 단계와 동물전임상 단계에서 곧바로 사용하였다.

개발효모인 *S.cerevisiae*CKK110426을 배양시 분취한 효모와 배양액중 상등액내 핵산류를 검정하여 보았더니, RNA미분해로 인하여 19종 핵산류중 어떠한 핵산도 검출되지 않았는데, 대량생산시스템을 통한 효모추출물의 경우는 5종의 핵산이 검출되었고 이중 CMP는 65,705ppm, UMP는82,143ppm, GMP 48,851ppm, IMP 27,365ppm 그리고 AMP의 경우는 6,567ppm의 함유량을 보유하고 있었으며 전체총량은 27.9%였다.

전체시험간 사용된 표준세포주로서는 RAW 264.7을 공시 Cell line으로 사용하였으며, 핵산류는 효모추출물내 핵산종류 및 함유량 평가(HPLC)를 통하여 확인된 5종 핵산류 표준체( 5' -UMP, 5' -CMP, 5' -AMP, 5' -GMP 및 5' -IMP)를 Sigma(USA)사에서 구입하여 대조시료로 사용하였다.

#### 나. 시험구 조성

본 연구의 핵심은 제빵제과 적용성 평가시 기능성 소재별 혼합농도와 동물전임상시 사료내 혼합농도 설정을 위한 사전 안전성 및 기초효능 평가를 위함이기 때문에, 검정항목

으로서 NO(Nitric Oxide)와 MTT(Cell viability)를 선정하였으며, 전체평가과정은 총 2단계로 진행하였다.

#### 1) 1단계(안전성 평가 범위 사전평가)

1 단계는 우선 핵산류에 대한 표준세포주의 안전성 및 기초효능 평가를 통하여 안전성 관련 범위를 평가하고, 2단계에서는 이를 기준으로 선발된 모든 기능성 소재별, 농도별 정밀 시험을 실시하였다. 따라서, 1단계에서는 PBS만을 사용한 대조구(Blank)와 단일 LPS만을 사용한 비교구, 그리고 단일성분 및 3종 혼합 핵산류 처리구로 구분 조성한 후 실시하였는데, 단일 핵산처리구는 AMP와 IMP를 그리고 혼합 핵산류(GMP, UMP, CMP)처리구로 조성하였으며, 개발 효모추출물내 함유된 각각 핵산종류별 함유량을 100%로 하여, 이를 기준으로 대조 핵산의 첨가량을 0.5%(v/v)와 1%(v/v)로 하여 시험법에 준하여 평가하였다. 전체시험은 시험구별 4반복을 실시한 후 평균±표준편차로 결과를 도출하였으며, 안전성 및 기초효능 평가를 위한 1단계 시험구 조성은 다음과 같다 (Table 1).

#### 2) 2단계(기능성 소재별/농도별 안전성 정밀평가)

1 단계의 핵산류만을 대상으로 표준세포주의 안전성 및 기초효능 평가를 통하여 안전성 평가결과를 기초로 하여, 2단계에서는 선발된 모든 기능성 소재별, 농도별 정밀 시험을 실시하였다. 이를 위하여 2단계에서는 시험구로서 5종 핵산류 각각에 단일농도 처리구, 5종의 핵산류가 혼합된 시험구와 대조 혼합핵산류와 동일한 핵산류가 함유된 효모추출물을 소재로 정하고, 처리농도를 0.5%, 0.75%, 1%, 2% 그리고 10% 농도군으로 하여 시험구를 조성하였으며, 이외 전체 시험은 1단계와 동일하게 실시하였다.

전체시험은 시험구별 4반복을 실시한 후 평균±표준편차로 결과를 도출하였으며, 안전성 및 기초효능 평가를 위한 2단계 시험구 조성은 다음과 같다(Table 2).

#### 나. 표준주 및 세포배양

준비된 RAW 264.7 cell(macrophage cell)의 세포배양은 ATCC권장방법에 준하여, RPMI에 10% fetal bovine serum, 100 µg/ml penicillin, 100µg/ml streptomycin을 혼합한 배지를 사용하여 37°C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 배양하였다.

#### 다. 선발효모 분리 기능성 소재별 안전성 및 기초효능 평가

본 연구에서는 효모 유래 기능성 소재별로 안전성 및 기초효능평가 항목으로서는 독성 평가는 MTT검정을 통하여 안전성을 평가하였고, NO결과는 항염증증가 효과를 평가하고, 연계하여 독성이 발생하지 않으면서 항염증증가 결과를 보이는 수치를 확인한 후 이를 제빵제과 적용성 및 동물전임상 실시시 기준첨가 농도로 설정 하고자 하였다. 이를 확인하기 위한 MTT 및 NO평가 검정은 다음과 같이 실시하였다.

### 1) MTT assay (세포독성 평가)

각각의 cell을 culture dish ( $1 \times 10^5$  /ml)에서 세포 배양조건에 의해 24시간 전 배양하고 24시간 이후 새 배지로 교환해주고 배양중인 cell 배지 100  $\mu$ l에 MTT solution을 10 $\mu$ l씩 섞어서 세포에 처리해 준 후 37 $^{\circ}$ C, 5% CO<sub>2</sub> incubator에서 3~4시간 incubation 하고, media를 모두 제거하고 DMSO(1000 $\mu$ l)를 각각의 sample에 넣어 반응시킨 후(최소 6시간, microplate reader(Molecular Devices, Sunnyvale CA, U. S. A)를 이용하여 540nm에서 흡광도 값을 측정하여 결과 확인하였다. 시험간 대상 기능성 소재의 첨가농도 Table 1과 2와 같으며, 조성액은 배양액에 첨가하여 사용하였다.

### 2) 염증관련 인자 NO (Nitric oxide) 측정 평가

세포배양액에서 생성된 NO의 양은 NO<sub>2</sub><sup>-</sup>의 형태로 Griess시약을 이용하여 측정하였다. 상층액을 96well plate에 각각 분주한 후 Griess reagent(0.8% sulfanilamide/0.75% N-(naphthylethylene)diamine in 0.5N HCl, Sigma) 100 $\mu$ l를 첨가 하였다. 15 분간 37 $^{\circ}$ C에서 방치한 후, 540 nm파장에서 microplate reader(Molecular Devices, Sunnyvale, CA, U.S.A)를 이용하여 nitrite 농도를 측정하였다. Sodium nitrate(0.5~100M)를 nitrite 표준으로 이용하였다. 시험간 대상 기능성 소재의 첨가농도 Table 1과 2와 같으며, 조성액은 배양액에 첨가하여 사용하였다.

### 라. 통계처리

상업효모 대비 개발효모 종류별 제빵적용성 평가에 따른 기호성은 SAS Program을 이용하여 통계분석을 실시 하였는데, 이때 유의성 차이는 95%수준(P<0.05)에서 ANOVA Test후 Duncan's multiple range test에 의해 검정하였다.

## 3. 연구수행결과

본 연구에서는 선발 효모를 원료로 하여 대량생산된 기능성 소재 핵산류를 대상으로 사전안전성(표준세포주 : RAW 264.7 적용) 및 기초효능 평가를 실시 후 동물임상 및 제과·제빵 적용성 평가시 기능성 발현관련 사전결과 예측 및 관련한 최적 첨가 농도를 설정근거를 확보하고 저 하였다.

### 가. 1단계(안전성 평가 범위 사전평가) 평가 결과

1 단계는 우선 핵산류에 대한 표준세포주의 안전성 및 기초효능 평가를 통하여 안전성 관련 범위를 평가하고, 이를 기준으로 선발된 모든 기능성 소재별 및 농도별 정밀 시험을 실시하였으며, 1단계 안전성 평가 결과는 다음과 같다.

NO수치변화(항염증저하)와 관련하여 RPMI배양액내 PBS를 0.5%처리한 Blank의 경우는 NO수치는 0.025 그리고 1%는 0.029의 결과치를 보였는데, 이를 기준으로 0.5% 농도로 처리한 전체 핵산처리구의 결과를 비교하여 본 결과 유의한 차이는 인정되지 않

았으나, 1% 처리구에서는 AMP는 0.026, Mixer처리구는 0.039 그리고 IMP처리구에서는 0.040의 수치차이를 보였다. 이러한 결과는 AMP는 0.5%~1%범위에서 항염증 관련 효능이 인정 되지 않았으나, IMP처리구와 3종 핵산류를 혼합한 경우에는 AMP와는 다르게 항염증 저하와 관련한 효능을 보유하고 있는 것으로 조사되었다( $P<0.05$ ).

MTT수치변화(세포성장 촉진) 평가결과를 토대로 기능성 소재의 안전성을 평가하여 보았더니, RPMI배양액내 PBS를 0.5%처리한 Blank의 경우는 0.42 그리고 1%를 처리한 경우에는 0.54의 수치결과를 보였다.

이를 기준으로 복합 핵산처리구(Mixer)의 경우를 살펴 보았더니, 0.5% 처리시는 0.49 그리고 1% 처리구의 경우는 0.52의 범위를 보임으로서 핵산을 복합적으로 처리하더라도 세포독성은 없는 것으로 인정되었다( $P<0.05$ ).

단일 핵산인 AMP처리구와 IMP처리구의 경우를 보았더니, AMP처리구는 0.5%에서는 0.49 그리고 1% 처리구에서는 0.61의 범위를 보였으며, IMP의 경우는 0.46과 0.69 수치를 보였는데 이는 세포독성은 없으면서 세포활성을 유도하는 결과를 보였다.

결론으로서, 핵산류중 IMP는 0.5% 이상처리시 세포의 성장 촉진(MTT)과 더불어 항염증 효과(NO)가 동시에 인정되었으며( $P<0.01$ ), APM는 0.5% 이상의 농도에서 항염증 효과 보다는 세포생장에 유의한 효과가 있는 것으로 평가되었다( $P<0.01$ ).

그러나, 핵산류 3종 혼합처리시는 항염증수치가 다소 증가하였으나 유의성은 인정되지 않았는데, 이러한 원인은 GMP, UMP 및 CMP의 경우는 단일 핵산류는 각각 기능성을 보유하고 있으나 혼합처리시 결합 등의 물성변화로 인하여 기능성을 상실하였음을 예측할 수 있고 또는 고유 특성으로서 기능성을 미보유하고 있는 원인으로 판단되었으므로 추후 정밀실험이 필요하다고 사료되었다 ( $P<0.05$ ).

#### 나. 2단계(기능성 소재별/농도별 안전성 정밀평가)평가 결과

전체 기능성 소재류를 대상으로 0.5%에서 10%범위의 농도를 처리시, 모든 소재류에서 표준세포주에 대하여 독성유발(MTT) 관련 농도범위가 인정되었으며 전반적으로는 0.5%~2% 범위였다. 이중 세포독성(MTT) 유발 소재와 농도를 살펴 보았더니, UMP와 CMP는 0.5%로 가장 높았으며, 다음으로는 효모추출물, AMP 및 IMP의 경우였는데 공통적으로 0.75%였으며, 5종혼합핵산류는 1% 그리고 GMP소재는 2%이상의 농도를 첨가시 독성이 있는 것으로 평가 되었다(Table 3.,  $P<0.05$ ).

동일처리조건에서 항염증 저하(NO)효능을 보이는 농도는 0.5%~10%범위를 보였는데, 효모추출물의 경우에서 0.5%, 5종 핵산혼합처리구와 GMP처리구는 2% 그리고 CMP처리구의 경우는 10%이상의 농도처리시 유의성이 인정되었으며, 기타 소재에서는 인정되지 않았다(Table 3.,  $P<0.05$ ).

본 연구와 관련하여 연구개발 목표인 기능성 효과로서, 세포활성과 항염증 저하효과를 동시에 보이는 소재 선발과 더불어 최적 농도범위를 선정하기 위하여, MTT와 NO결과를 연계하여 평가하여 보았더니, 효모추출물의 경우가 가장 우수한 소재로 평가 되었으며 첨가농도는 0.5%~1%범위였고, 다음으로는 혼합핵산처리구로서 1~2%, GMP는 2%

이상 그리고 CMP의 경우는 10% 이상의 농도일때 안전성이 확보 되면서 항염증 저하등의 복합 가능성을 나타내는 것으로 최종 평가 되었다.

따라서, 전체평가를 통하여 제과제빵 적용성 평가와 동물전임상 평가시 안전성과 더불어 항염증 저하 등 기호성이 충족되는 최적소재는 효모추출물이었으며 적용농도는 0.5%~1%범위였으며 다음으로는 혼합핵산류였는데 1~2%의 농도범위를 보였다. 특히, 효모추출물내 함유되어 있는 동일종류의 핵산류에 대하여 동일농도로 비교할 때, 천연핵산(효모추출물)의 경우 독성이 25% 감소된 것으로 조사되었다.

또한, 효모추출물의 세포활성과 항염증저하를 동시에 유발하는 범위가 0.5%~1%로서 핵산혼합처리구의 1~2%보다 낮은 것으로 보아 관련인자가 있을 것으로 판단되었는데, 전체 결과를 종합하면 관련이자중 한가지는 GMP가 아닐까 하고 판단되었다.

세부 시험구별 MTT 및 NO 그리고 세포활성 유도과 동시에 항염증저하 효과를 유발하는 농도범위 평가 결과는 다음과 같다.

효모 추출물의 경우, 대조구(PBS)대비 0.75%에서 2%범위의 농도를 처리시 전체적으로 세포활성을 억제(MTT)효과를 보이는 농도는 0.75%이상이었으며, 동시에 항염증 저하(NO) 관련 효능을 보이는 농도는 0.5%이상에서 유의성이 인정되었다( $P<0.05$ ). 그리고, 세포활성을 유도하면서 동시에 항염증 저하효과를 나타내는 농도는 0.5%~1%범위였다( $P<0.05$ ).

이를 기준으로 효모추출물내에 함유되어 있는 동일 종류의 핵산류에 대하여 동일 농도 구배차이를 부여하여 검정을 실시한 Mixer(5종핵산 혼합)처리구에서 세포활성을 억제(MTT)효과를 보이는 농도는 1%이상 그리고 항염증 저하(NO) 관련 농도는 2%이상 농도에서는 유의성이 인정되었으나, 1% 이하의 농도에서는 차이가 없었다. 그리고, 세포활성과 항염증 저하효과를 동시에 보이는 농도는 1%~2%범위였다( $P<0.05$ ).

단일 핵산처리구중 GMP의 경우, 전체적으로 세포활성을 억제(MTT)와 항염증 저하(NO) 효능을 보이는 농도는 2%이상 이었고, 세포활성과 항염증 저하효과를 동시에 보이는 농도는 2%범위였다.

또 다른 단일 핵산처리구중 UMP의 경우, 전체적으로 세포활성을 억제(MTT)효과를 보이는 농도는 0.5%이상이었었는데, 항염증 저하(NO) 관련 효능과 세포활성과 항염증 저하효과를 동시에 보이는 농도는 인정되지 않았다.

CMP처리구 경우, 전체적으로 세포활성을 억제(MTT)효과를 보이는 농도는 0.5%이상 이었는데, 이때 항염증 저하(NO) 관련 효능은 10%이상의 고농도를 처리하는 경우에서 발현되었으며, UMP와 동일하게 세포활성과 항염증 저하효과를 동시에 보이는 농도 역시 인정되지 않았다.

AMP 및 IMP처리구의 경우도 UMP와 CMP처리구의 경우와 유사한 경향을 보였는데, 전체적으로 세포활성을 억제(MTT)효과를 보이는 농도는 0.75%이상이었으며, 항염증 저하(NO) 관련 효능 및 세포활성과 항염증 저하효과를 동시에 보이는 농도는 인정되지 않았다.



Table 1. 개발 효모추출물내 핵산류 함유량을 기준으로 대조 핵산류를 이용한 사전 안전성 평가를 위한 시험디자인(NO:염증저하, MTT:독성)

시험구		PBS (%)	LPS ( $\mu$ g/ml)	Mixer ( $\mu$ g/ml)			AMP ( $\mu$ g/ml)	IMP ( $\mu$ g/ml)	비고
				GMP	UMP	CMP			
Control	-0.5	0.5	1					PBS	
	-1	1	1						
LPS	-0.5	0.5	1						
	-1	1	1						
Mixer	-0.5	0.5	1	2.25	4.05	3.25			
	-1	1	1	4.5	8.1	6.5			
AMP	-0.5	0.5	1				0.36		
	-1	1	1				0.72		
IMP	-0.5	0.5	1					1.35	
	-1	1	1					2.7	

- 효모추출물내 검출핵산 및 함유량 : CMP(65,705ppm), UMP(82,143ppm), GMP (48,851ppm), IMP(27,365ppm),AMP(6,567ppm)

Table 2. 효모추출물내 핵산류 함유량을 기준으로 효모유래 기능성 소재별 및 농도별 안전성 평가를 위한 시험디자인 (NO:염증저하, MTT:독성)

시험구	PBS (%)	LPS ( $\mu\text{g/ml}$ )	효모 추출물 (%)	Mixer ( $\mu\text{g/ml}$ )					GMP ( $\mu\text{g/ml}$ )	UMP ( $\mu\text{g/ml}$ )	CMP ( $\mu\text{g/ml}$ )	AMP ( $\mu\text{g/ml}$ )	IMP ( $\mu\text{g/ml}$ )	비고
				GMP	UMP	CMP	AMP	IMP						
Control	-0.5	0.5	1											PBS
	-0.75	0.75	1											
	-1	1	1											
	-2	2	1											
	-10	10	1											
LPS	-0.5	0.5	1											
	-0.75	0.75	1											
	-1	1	1											
	-2	2	1											
	-10	10	1											
Yeast Extract	-0.5	0.5	1	0.5	2.25	4.05	3.25	0.36	1.35					Mixer: 효모추출물내 고 유함량
	-0.75	0.75	1	0.75	3.38	6.08	4.88	0.54	2.03					
	-1	1	1	1	4.5	8.1	6.5	0.72	2.7					
	-2	2	1	2	9	16.2	13	1.44	5.4					
	-10	10	1	10	45	81	65	72	27					
Mixer	-0.5	0.5	1		2.25	4.05	3.25	0.36	1.35					
	-0.75	0.75	1		3.38	6.08	4.88	0.54	2.03					
	-1	1	1		4.5	8.1	6.5	0.72	2.7					
	-2	2	1		9	16.2	13	1.44	5.4					
	-10	10	1		45	81	65	72	27					
GMP	-0.5	0.5	1							2.25				
	-0.75	0.75	1							3.38				
	-1	1	1							4.5				
	-2	2	1							9				
	-10	10	1							45				
UMP	-0.5	0.5	1								4.05			
	-0.75	0.75	1								6.08			
	-1	1	1								8.1			
	-2	2	1								16.2			
	-10	10	1								81			
CMP	-0.5	0.5	1									3.25		
	-0.75	0.75	1									4.88		
	-1	1	1									6.5		
	-2	2	1									13		
	-10	10	1									65		
AMP	-0.5	0.5	1										0.36	
	-0.75	0.75	1										0.54	
	-1	1	1										0.72	
	-2	2	1										1.44	
	-10	10	1										72	
IMP	-0.5	0.5	1											1.35
	-0.75	0.75	1											2.03
	-1	1	1											2.7
	-2	2	1											5.4
	-10	10	1											27

- 효모추출물내 검출핵산 및 함유량 : CMP(65,705ppm), UMP(82,143ppm), GMP (48,851ppm), IMP(27,365ppm),AMP(6,567ppm)

Table 3. 개발 효모추출물내 핵산류 함유량을 기준으로 대조 핵산류를 이용한 사전 안전성 평가 결과(NO:염증저하, MTT:독성)

NO	PBS		LPS(1ug/ml)		Mixer (GMP+UMP+CMP)		AMP		IMP	
	0.50%	1%	0.50%	1%	0.50%	1%	0.50%	1%	0.50%	1%
1	0.028	0.023	0.034	0.03	0.025	0.038	0.025	0.024	0.026	0.038
2	0.028	0.024	0.051	0.032	0.026	0.039	0.026	0.025	0.027	0.039
3	0.029	0.025	0.087	0.034	0.026	0.039	0.026	0.025	0.028	0.039
4	0.032	0.026	0.101	0.038	0.028	0.04	0.028	0.028	0.03	0.042
Mean ±SD	0.029 ±0.002	0.025 ±0.001	0.068 ±0.031	0.034 ±0.003	0.026 ±0.001	0.039 ±0.001	0.026 ±0.001	0.026 ±0.002	0.028 ±0.002	0.04 ±0.002
MTT	PBS		LPS(1ug/ml)		Mixer (GMP+UMP+CMP)		AMP		IMP	
	0.50%	1%	0.50%	1%	0.50%	1%	0.50%	1%	0.50%	1%
1	0.409	0.511	0.452	0.505	0.46	0.493	0.473	0.604	0.444	0.643
2	0.412	0.5274	0.467	0.537	0.479	0.495	0.483	0.604	0.451	0.647
3	0.421	0.533	0.47	0.546	0.495	0.549	0.494	0.618	0.476	0.649
4	0.428	0.571	0.492	0.549	0.504	0.557	0.499	0.619	0.486	0.652
Mean ±SD	0.418 ±0.009	0.536 ±0.025	0.47 ±0.017	0.534 ±0.020	0.485 ±0.019	0.524 ±0.034	0.487 ±0.012	0.611 ±0.008	0.464 ±0.020	0.648 ±0.004

Table 4 효모추출물내 핵산류 함유량을 기준으로 효모유래 기능성 소재별 및 농도별 안전성 평가결과(NO:염증저하, MTT:독성)

NO assay	PBS	LPS (1ug/ml)	0.50%	0.75%	1%	2%	10%
Mixer	0.0190 ±0.0006	0.1125 ±0.0013	0.0185 ±0.0006	0.0175 ±0.0006	0.0200 ±0.0012	0.0540 ±0.0024	0.1160 ±0.0012
Aromild	0.0198 ±0.0005	0.1163 ±0.0025	0.0285 ±0.0006	0.0368 ±0.0017	0.0408 ±0.0030	0.0250 ±0.0008	NT
GMP	0.0210 ±0.0008	0.1145 ±0.0037	0.0203 ±0.0005	0.0198 ±0.0010	0.0203 ±0.0005	0.0400 ±0.0032	0.0863 ±0.0026
UMP	0.0203 ±0.0010	0.1013 ±0.0021	0.0193 ±0.0015	0.0208 ±0.0010	0.0210 ±0.0000	0.0193 ±0.0010	0.0215 ±0.0013
CMP	0.0185 ±0.0008	0.1125 ±0.0037	0.0185 ±0.0013	0.0175 ±0.0006	0.0178 ±0.0005	0.0198 ±0.0010	0.0555 ±0.0079
AMP	0.0185 ±0.0013	0.1125 ±0.0029	0.0170 ±0.0012	0.0168 ±0.0005	0.0173 ±0.0005	0.0170 ±0.0016	0.0195 ±0.0013
IMP	0.0185 ±0.0013	0.1125 ±0.0008	0.0185 ±0.0013	0.0148 ±0.0043	0.0200 ±0.0008	0.0195 ±0.0006	0.0185 ±0.0013

MTT assay	PBS	LPS (1ug/ml)	0.50%	0.75%	1%	2%	10%
Mixer	0.5370 ±0.022	0.4798 ±0.024	0.5250 ±0.017	0.5128 ±0.009	0.4793 ±0.017	0.4500 ±0.039	0.4365 ±0.023
Aromild	0.5458 ±0.020	0.4870 ±0.005	0.5568 ±0.028	0.5138 ±0.010	0.4825 ±0.015	0.3890 ±0.008	NT
GMP	0.4635 ±0.012	0.5003 ±0.016	0.3023 ±0.017	0.3103 ±0.016	0.4753 ±0.038	0.2975 ±0.005	0.2345 ±0.010
UMP	0.5558 ±0.005	0.5868 ±0.006	0.3773 ±0.030	0.3443 ±0.012	0.3925 ±0.019	0.3090 ±0.011	0.2898 ±0.020
CMP	0.5590 ±0.018	0.5750 ±0.025	0.5060 ±0.027	0.4995 ±0.015	0.4853 ±0.050	0.4365 ±0.065	0.4388 ±0.025
AMP	0.5470 ±0.018	0.5515 ±0.018	0.5130 ±0.009	0.4873 ±0.011	0.4993 ±0.023	0.4995 ±0.021	0.4878 ±0.008
IMP	0.5678 ±0.016	0.5578 ±0.020	0.5413 ±0.019	0.5113 ±0.018	0.4853 ±0.021	0.4773 ±0.034	0.4103 ±0.021

-Mixer=GMP+UMP+CMP+AMP+IMP, cell 수 : 6 x 10<sup>4</sup> cells/well

-NT : Not Testing(회석농도로 인하여 검정 불가)

## 제 9절 동물전임상 평가(기능성 소재)

### 9-1. 선발효모에서 분리한 핵심기능성 소재 첨가 사료의 제조 및 일정별 사료섭취량과 일일성장률 평가

#### 1. 연구목적

전체 연구개발의 핵심 목표는 유기농 농산물에서 분리하고, 동정 및 유전자 확보가 완료된 효모에서 대량 분리한 기능성 소재별로 최종 동물임상 평가 및 제품화 적용 레시피를 정립하고 정립된 결과를 산업화를 목표로 농축산업을 포함한 낙농 및 유가공 관련 산업에 이익을 제공하고 저 하였다.

현재 본 연구개발 결과의 제품화와 관련하여 규제기관 및 관련법에 있어, 효모(*S. cerevisiae* 및 *C. utilis*) 및 동일 효모에서 추출된 효모추출물을 제외한 기능성 물질은 동물전임상(안전성 및 유효성) 관련 등에 대하여 신뢰성 있는 평가결과 제출을 요구받고 있다.

따라서, 상술한 표준주를 대상으로 선발효모에서 대량생산된 기능성 소재별 및 농도별 안전성 및 기초효능 평가를 기준으로 동물 전임상 및 제품적용성(제빵·제과 레시피 정립) 평가를 위한 기준농도를 설정하고, 농도차이를 부여한 사료를 제조한 후 식약청 권고 사항에 따라 성장기 마우스를 대상으로 8주간 섭이에 따른 안전성 및 기초효능 평가를 실시하였다.

#### 2. 연구 내용 및 방법

##### 가. 실험설계

동물전임상 평가를 위한 소재는 제5절에서 상술한 바와 같이 “개발 기능성 소재류 제품적용성 사전평가” 에서 각 기능성 소재별 성분분석을 실시하였다.

결과로서 동일종인 *S.cerevisiae*에서 분리한 세포벽 분리물의 경우, 대조(오리엔탈사,  $\beta$ -Glucan)와 개발 세포벽 성분 및 구조(FT-IR)의 비교를 실시한 결과 순도 및 성분의 조성은 동일하였으며, 역시 효모 추출물의 경우도 미노산 조성 및 분자량 차이를 비교한 결과 90%이상이 동일함을 알 수 있었다. 또한, 제조된 기능성 소재의 표준세포주를 적용한 안전성(세포활성) 및 효능(항염증 저하) 평가 결과에서 세포활성증가 및 항염증저하 효과를 보였던 농도가 0.5~1%범위 였으므로 1%를 기준으로 동물전임상 시험 시 섭이농도 설정의 근거를 정하였다(제 8 절).

따라서, 성분분석 및 안전성 평가를 토대로 기능성 소재의 장기섭이시 안전성 및 기초효능 평가를 위한 동물전임상 시험은 다음과 같이 실시하였다(Table 1).

우선 동물임상평가를 위한 기본 사료레시피는 AIN-76A를 적용하였으며, 이를 기준으로 기능성 소재가 첨가된 사료조성은 대한바이오링크(한국)에 주문하여 제조하였다.

대조구는 AIN-76A사료를 전체 시험기간(8주) 동안 섭이시키는 조건으로 하였으며, 비교구로서 핵산(5종 핵산혼합)과 효모추출물로서는 상품명 Yeast NT(KOHJIN사, 일

본)을 구입하여 AIN-76A에 농도별로 혼합하여 제조한 2개시험구를 조성하였다. 이를 기준으로 개발 기능성 소재를 첨가한 처리구는  $\beta$ -Glucan과 효모추출물을 대상으로 하였으며, AIN-76A사료내 첨가농도는 1%(w/w., L: Low), 5%(M ; Medium) 및 10%(H;High)로 농도구배차를 두어 제조하였다.

실험식이와 식수는 자유 급여법으로 급여하였다. 실험 동물 사육실 환경은 온도  $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ , 상대습도  $55\pm 10\%$ 로 유지 하였으며 명암은 12시간 주기(light : 06:00~18:00)로 조절하였다.

#### 나. 시험군 조성

본 시험에서는 갓 이유한 3주령의 특정병원체 부재(specific pathogen free)수컷 ICR 마우스(대한바이오링크(주)) 128마리를 실험 조건을 일정하게 하기 위해 10일간 정상 식이로 순화 적응시킨 후 건강한 동물을 3마리씩 5군(대조구 1군, 비교구 2군, 실험구 2군)으로 임의 배치하여 사용하였다.

#### 다. 체중과 사료섭취량 측정

시험에 사용된 모든 동물에 대하여 최초 10일간은 일일단위로 13시~15시 사이에 체중 및 사료섭취량을 측정하였고 이 후, 5일 간격으로 측정하였다.

#### 라. 통계처리

실험결과는 SAS program을 이용하여 통계분석하고(SAS,1999), 실험군 간의 유의성은 ANOVA로 검증한 후 Duncan`s multiple range test로 비교 분석하여(Duncan,1955) 평균치와 표준편차로 나타내고 5% 수준에서 유의성을 표시하였다.

### 3. 연구수행결과

#### 가. 사료섭취 및 효율

기능성소재를 혼합한 사료가 마우스의 장단기 섭이시, 마우스의 체중 및 일일섭취량을 AIN-76A 식이만 섭취한 대조구와 비교함으로써 기능성 소재 농도별 섭취가 전체시험간 성장률이 더불어 사료섭취량에 영향을 미쳤는지를 조사하였다(Table 2~3). 즉, 기능성 소재 섭취의 성장률 및 사료섭취량에 미치는 결과는 일정별, 4주 및 8주경과시를 세세하게 비교 조사하는 것으로 결과를 보았다.

우선 10일동안의 결과를 대조 대비 살펴보았더니, 최초 체중량은 31.6g(100% 기준)이었으며, 5일후는 32.1g 그리고 10일 경과시는 33.2g으로 나타나 약 102% 및 105%의 성장결과를 보였으나, 최초 일일 사료섭취량은 최초 4.4g에서 3.1g 그리고 2.5g으로 조사되어 성장이 이루어지면서 오히려 일일 사료섭취량은 감소하는 경향을 보였으며 이에 대조 결과를 기준으로 기능성 소재류 섭취에 따른 체중량 및 사료섭취량을 확인하여 보았다.

비교구 중 핵산처리구를 확인하였더니, 전체 핵산처리구의 경우는 최초(투여 직후)

30.7~32.1g이었던 체중량이 5일 경과시 31.6~32.3g, 10일후는 31.1~34.2g으로 나타났는데, 저농도 처리구가 32.4g 및 중농도 31.1g 그리고 고농도의 경우는 34.2g으로 나타나 대조 대비 기능성 소재가 체중변화에 미치는 유의성은 인정되지 않았다.

사료섭취량은 최초는 2.0~3.3g 이었는데, 5일이 경과시는 2.3g~4.7g 그리고 10일 경과시는 3.8g~3.9g의 섭취량을 보임으로서, 대조 대비 섭취량이 초기에는 약 25~50% 정도의 감소수치를 보였지만, 5일 이후부터는 오히려 증가하는 경향을 보였다. 초기 사료 섭취량이 감소한 이유로서는 핵산이 보유한 특유의 umami유래 이미·이취로 인하여 섭취량이 감소하였던 이유로 판단되었고, 일정이 지나면서 적응으로 인하여 사료섭취량과 체중량이 동시에 증가하여 핵산류로 인한 문제는 발생하지 않는 것으로 판단되었다.

일일별로 10일간 관찰결과를 기준으로 최초 대비(기능성 소재 혼합사료 섭이직전), 4주(25일), 6주(40일) 및 8주(50일)가 경과시 장단기 경향을 역시 동일하게 평가하여 보았다.

대조구의 4주경과시 체중량은 35.3g, 6주 경과시 37.8g, 8주 경과시 38.7g으로 112%~123%의 체중증가를 보였으며, 사료섭취량은 4주 경과시 3.6g, 6주 경과시 5.5g, 8주에는 4.2g으로 지속적으로 섭이시 일일 섭취량이 마우스 마리당 4g정도 내외로 섭취하는 것으로 확인되었다.

농도 구별 없이 핵산류 섭취 마우스의 체중량을 보면, 4주 경과시 34.7g~37.2g이고 6주 경과시 36.7g~40g 및 8주 경과시 36g~43.5g으로 나타나 핵산류의 섭취가 대조 대비 체중의 변화에 영향을 주지 않는 것으로 판단되었다. 또한, 핵산류 섭취마우스의 사료 섭취량을 보면 4주 경과시 2.3g~3.5g, 6주 경과시 4g~4.6g 및 8주 경과시 3.8g~4g으로 대조 대비 핵산구의 사료 섭취량의 변화는 없었다. 따라서, 핵산류의 장기간 섭이시 초기(1일) 발생하였던 이미·이취에 대한 적응이 되었음을 확인 하였다.

다음으로, 비교구의 상업효모에서 분리한 YeastNT 섭취 마우스의 체중량을 보았다. 농도 구별없이 YeastNT의 최초 체중량은 29.4g~30.9g, 5일 경과시 30.4g~31.4g, 10일 경과시 32.4g~33.1g으로 대조 대비 YeastNT 재가 체중변화에 미치는 변화는 확인되지 않았다.

YeastNT 섭취 마우스의 사료섭취량은 최초 1.1g~2.4g, 5일 경과시 3.9g~4.2g, 10일 경과시 3.7~4.4g이다. 초기에는 대조 대비 섭취량이 25%~55%정도 감소하였지만 5일, 10일 경과시 사료섭취량이 대조구 수준으로 증가하는 것을 확인 하였다. 핵산류 섭취 마우스와 마찬가지로 초기 사료섭취량이 감소한 이유는 YeastNT의 핵산 함유량이 약 27%차지하기 때문에 핵산에 의한 umami에 기인한다고 판단된다.

장단기 YeastNT의 농도 구별없이 전체 체중량을 보면 4주경과시 35.1g~37g, 6주 경과시 35.3g~40g, 8주 경과시 37.8g~41.5g으로 대조 대비 체중량의 차이는 통계적인 유의성을 찾아볼 수 없었다. 동일 기간의 사료섭취량을 보면, 4주 경과시 2.6g~3.9g. 6주 경과시 5.6g~6.2g, 8주 경과시 4.7g~5.5g으로 측정시 오차로 판단되는 6주경과시의 사료섭취량을 제외하면 기간 경과함에 따라 사료섭취량이 증가하는 경향을 나타내었으며, 대조 대비 YeastNT의 사료섭취량이 증가한 경향이 있으나 통계적으로 유의하지

않는 것으로 판단되었다.

따라서, 실험구의 효모추출물을 확인하여 보았다. 농도 구별 없이 초기 체중량은 29.7g~32.7g이고, 5일 경과시 30.7g~32.5g, 10일 경과시 31g~33.5g으로 10일경과 시까지 체중량의 지속적인 증가를 보였으며, 대조 대비 체중량의 차이는 없었다.

농도 구별없이 초기 사료섭취량은 2.7g~3.4g이고 5일 경과시 3.8g~3.9g, 10일 경과 시 3.1g~3.9g으로 섭취기간 경과시 초기 이미·이취의 영향없이 사료섭취율이 증가하는 것으로 보인다. 또한, 대조 대비 초기 사료섭취량은 감소(61.4%~77.3%)하였지만, 비교구인 YeastNT(저농도 3.8g, 중간농도 3.7g 및 고농도 3.9g) 대비 저농도 246% 중간농도 129% 고농도 170% 증가하였다. 이는, 효모추출물 사료가 상업효모에서 분리한 YeastNT에 비해 초기 섭취가 용이한 것으로 판단되어진다.

4주, 6주 및 8주 경과 시 효모추출물의 체중량 및 사료섭취량을 살펴보았다. 우선 4주 경과시 체중량은 34.3g~37.1g, 6주 경과시 37.8g~41.7g, 8주 경과시 36.3g~43.8g으로 관찰되었다. 장기간(4주, 6주 및 8주) 섭이시 농도의존적으로 체중량이 증가하는 것으로 관찰되었다(P<0.5).

동일 기간 농도 구별없이 사료섭취량을 확인하여 보았다. 4주 경과시 3.6g~4.5g, 6주 경과시 5.9g~6g 및 8주 경과시 4.7g~5.4g으로 관찰되었다. 각 기간별 고농도의 효모추출물을 섭이한 마우스의 대조(100%기준) 대비 사료섭취량(4주 4.5g, 6주 6g, 8주 5.4g)을 보면 4주경과시 125%, 6주 경과시 109% 및 8주 경과시 129%증가하였으며 통계적인 유의성이 보여진다. 따라서, 고농도의 효모추출물 섭이 마우스 기준으로 볼 때, 지속적인 섭이시 사료섭취량의 증가로 기인하여 체중량 증가로 이어지는 것으로 판단되어진다.

결론적으로, 효모추출물의 섭이는 장기 섭이시 마우스의 성장에 부정적인 영향을 주지 않으며, 오히려 사료섭취량의 증가에 따라 체중량이 증가하는 것으로 관찰하였다.

마지막으로, 기능성소재인  $\beta$ -Glucan의 체중량 및 사료섭취량을 살펴보았다. 농도 구별없이 초기  $\beta$ -Glucan의 체중량은 30.7g~31.7g이고, 5일 경과시 32.1g~32.4g, 10일 경과시 32.5g~33g으로 지속적으로 증가하였다.  $\beta$ -Glucan의 체중량은 대조와 차이가 없음을 확인하였다. 동일 기간동안의 농도 구별없이 사료섭취량은 보면, 초기에는 1.7g~2.7g, 5일 경과시 4.2g~4.3g, 10일 경과시 3.6g~4.0g으로 5일 경과시 사료섭취량을 제외했을 때 초기 사료섭취량(100% 기준) 대비 10일 경과시 133%~235% 증가하였다. 대조(AIN-76A 섭이 마우스) 대비 초기 사료섭취량은 66%~77% 감소를 나타냈으며 초기  $\beta$ -Glucan에 대한 마우스의 이미·이취로 판단되었다. 그러나 10일 경과시 대조(100%기준) 대비 사료 124%~156%증가 하여, 이미·이취에 대한 적응으로 판단하였다.

장단기(4주, 6주 및 8주)기간별 농도 구별 없이  $\beta$ -Glucan 섭이 마우스의 체중량을 보면, 4주 경과시 35.9g~36.7g, 6주 경과시 35g~39.5g, 8주 경과시, 37.5g~40g으로 4주(100% 기준) 대비 8주 경과시 최대 111%증가 하였다. 8주 기준으로 대조(100% 기준) 대비  $\beta$ -Glucan 섭이 마우스의 체중이 97%~105% 증감을 보이거나 통계적으로



유의하지는 않는다.  $\beta$ -Glucan 섭취 마우스의 사료섭취량은 농도 구별없이 4주 경과시 3.5g~4.1g, 6주 경과시 5.7g~6g 및 8주 경과시 4.8g~5.9g으로 8주 기준으로 사료섭취량을 보면, 4주 경과시의 사료섭취량을 100%으로 볼 때 최대 169% 증가하였다. 장기간 섭이시에도 초기 발생하였던 이미·이취가 없음을 확인하였다.  $\beta$ -Glucan 섭취가 마우스 성장에 저해되지 않음을 확인하였다.

결론으로, 효모추출물 및 핵산을 혼합한 사료의 일일섭취량은 대조구와 비교하였을 때 마우스가 기능성 소재류 혼합사료 섭취에 거부감이 없는 것으로 나타났으며, 체중량은 오히려 증가(효모추출물)하거나 유의적인 차이가 없는 것으로 보아 마우스 성장에는 부정적인 영향은 미치지 않는 것으로 판단되었다.

Table 1. 선발효모에서 분리한 핵심기능성 소재의 안전성 및 기초효능평가를 위한 동물 전임상 시험구 및 사료조성내역

시험구	사료조성내역(Kg당)	비고	
대조구	기본 AIN-76A diet		
비교구	핵산 L(1%)	기본AIN-76A+5종핵산(CMP0.65g+UMP0.81g+GMP 0.45 g+IMP 0.27 g + AMP 0.07 g)	
	핵산 M(5%)	기본AIN-76A+5종핵산(CMP3.25g+UMP4.05g+GMP 2.25 g+IMP 1.35 g + AMP 0.33 g)	
	핵산 H(10%)	기본AIN-76A+5종핵산(CMP6.5g+UMP8.1g+GMP 4.5 g+IMP 2.7 g +AMP 0.7 g)	
	YeastNT L(1%)	기본AIN-76A + 8g 상업효모추출물 + 2g Maltodextrin	
	YeastNT M(5%)	기본AIN-76A + 40g 상업효모추출물 + 10g Maltodextrin	
	YeastNT H(10%)	기본AIN-76A + 80g 상업효모추출물 + 20g Maltodextrin	
실험구	$\beta$ -Glucan L(0.1%)	기본 AIN-76A+1 g $\beta$ -Glucan	
	$\beta$ -Glucan M(0.5%)	기본 AIN-76A+5 g $\beta$ -Glucan	
	$\beta$ -Glucan H (1%)	기본 AIN-76A+10 g $\beta$ -Glucan	
	효모추출물 L(1%)	기본 AIN-76A+10 g 효모추출물	
	효모추출물 M(5%)	기본 AIN-76A+50 g 효모추출물	
	효모추출물H(10%)	기본 AIN-76A+100 g 효모추출물	

Table 2. 선발효모에서 분리한 핵심기능성소재 첨가사료를 단기(10일) 섭이에 따른 일당성장률 및 사료효율 조사결과

구 분	1일		2일		3일		4일		5일		
	섭취량	무게	섭취량	무게	섭취량	무게	섭취량	무게	섭취량	무게	
Control	4.4±0.5	31.6±0.5	3.5±0.3	30.9±0.3	3.8±0.3	31.1±0.2	3.9±0.2	31.2±2.7	3.1±0.3	32.1±0.2	
핵산	L	2.0±2.1	30.7±0.7	3.7±1.5	30.7±2.0	2.7±0.8	31.1±0.4	3.4±0.9	31.3±0.7	4.7±0.9	32.3±0.5
	M	3.3±0.3	32.1±0.6	4.8±0.1	32.3±0.1	4.0±0.3	32.4±0.6	4.0±0.3	32.5±2.0	2.3±0.7	31.7±0.3
	H	2.4±1.0	30.8±0.7	4.5±0.5	31.2±1.0	3.5±0.3	31.4±0.2	4.0±0.1	31.5±0.1	3.8±0.6	31.6±0.3
Yeast NT	L	1.1±3.5	29.4±2.0	3.1±3.7	29.8±0.3	4.4±2.2	31.1±0.3	4.5±2.3	31.3±0.3	3.9±2.2	31.4±0.3
	M	2.4±3.1	30.3±3.0	3.5±4.5	29.5±0.5	3.5±2.6	30.7±0.7	4.2±1.9	31.3±0.4	4.2±1.8	31.5±0.8
	H	2.0±2.3	30.9±2.5	2.8±4.0	30.1±2.7	3.0±5.3	29.8±2.5	2.8±5.3	30.0±0.8	4.1±5.5	30.4±0.5
β-glucan	L	1.7±1.5	30.7±1.1	4.3±0.6	31.5±0.8	4.1±1.1	31.4±0.5	4.0±1.5	31.8±0.2	4.3±1.7	32.2±0.1
	M	2.7±2.0	30.7±0.1	4.4±1.4	31.2±0.2	3.8±1.5	31.5±0.2	4.1±1.3	32.0±0.4	4.2±1.4	32.1±0.3
	H	2.3±0.2	31.7±0.2	4.2±0.1	31.7±0.1	3.9±0.4	31.7±0.7	3.6±1.0	32.1±0.4	4.3±1.0	32.4±0.2
효모 추출물	L	2.7±2.0	29.7±0.2	4.1±1.8	29.8±0.2	3.8±1.1	30.0±0.3	4.2±1.1	30.3±0.4	3.8±0.5	30.7±0.3
	M	3.1±1.4	32.7±0.6	4.7±1.3	32.4±0.6	3.6±1.7	32.4±0.9	3.5±2.7	33.2±0.3	3.9±3.0	33.6±0.4
	H	3.4±0.2	32.0±0.2	4.3±0.5	32.1±0.5	4.6±0.5	32.5±0.3	4.4±0.6	32.4±0.1	3.8±0.9	32.7±0.5
구 분	6일		7일		8일		9일		10일		
	섭취량	무게	섭취량	무게	섭취량	무게	섭취량	무게	섭취량	무게	
Control	4.0±0.3	32.8±0.3	4.4±0.3	32.1±0.8	3.8±0.9	32.1±0.3	4.0±1.0	32.6±1.1	2.5±1.1	33.2±3.6	
핵산	L	3.3±2.4	32.9±0.6	3.5±0.6	31.5±0.8	3.9±2.3	31.5±0.5	3.8±2.4	31.6±0.4	3.8±2.9	32.4±0.3
	M	3.9±0.4	32.8±0.1	4.4±0.1	33.2±0.6	4.3±0.9	31.5±0.2	4.2±1.0	30.7±0.2	3.9±1.2	31.1±0.2
	H	4.0±1.2	31.8±1.2	3.1±1.2	27.5±5.1	4.0±5.9	29.7±0.8	3.8±0.6	33.6±0.4	3.8±0.8	34.2±0.8
Yeast NT	L	4.0±2.0	32.4±0.3	3.9±0.3	32.2±1.9	3.8±1.7	32.2±0.3	4.2±1.8	32.6±0.6	3.7±1.6	32.9±1.7
	M	4.1±1.0	32.0±1.3	4.9±1.3	32.1±0.8	3.3±0.7	31.8±0.6	3.9±0.9	32.1±0.2	3.9±0.8	32.4±0.8
	H	4.5±2.4	32.2±0.6	4.7±0.6	32.8±2.1	3.5±2.2	32.5±0.7	4.3±2.4	32.8±0.4	4.4±2.3	33.1±2.6
β-glucan	L	3.5±1.8	32.0±0.1	4.5±0.1	32.1±1.6	3.9±1.3	32.1±0.4	4.0±1.4	32.2±0.2	4.0±1.4	32.5±0.9
	M	3.9±1.8	32.4±0.2	4.1±0.2	32.8±1.5	3.6±1.8	32.4±0.3	3.8±1.7	32.5±0.1	3.6±1.8	33.0±1.3
	H	3.7±0.3	32.3±0.1	3.9±0.1	32.3±0.5	4.1±0.6	32.3±0.4	3.9±0.7	32.5±0.5	3.6±0.9	32.5±1.0
효모 추출물	L	3.8±1.1	30.4±0.8	4.0±0.8	30.8±0.8	4.3±1.7	30.4±0.5	4.1±1.8	30.5±0.5	3.1±1.8	31.0±1.3
	M	4.1±1.2	32.9±0.6	5.2±0.6	33.8±1.6	4.6±1.0	32.9±0.5	4.2±1.0	33.1±0.6	3.9±0.9	33.3±3.4
	H	4.1±1.4	32.8±0.2	5.1±0.2	33.7±1.0	4.1±2.4	33.0±0.3	4.2±2.4	33.2±0.2	3.7±2.4	33.5±3.9

Table 3. 선발효모에서 분리한 핵심기능성소재 첨가사료를 장단기(50일 경과) 섭이에 따른 안전성(성장률 및 사료효율) 조사결과

구 분		15일		20일		25일		30일	
		섭취량	무게	섭취량	무게	섭취량	무게	섭취량	무게
Control		3.3±0.4	33.9±1.1	4.6±0.2	33.8±1.8	3.6±0.2	35.3±0.2	4.9±0.0	35.3±0.4
핵산	L	3.2±0.5	32.8±7.9	4.5±0.4	33.1±0.3	3.5±0.6	34.8±5.6	4.7±1.4	34.9±2.8
	M	1.9±0.2	32.6±0.5	2.7±0.1	33.9±3.7	2.3±0.1	34.7±0.8	3.4±0.2	34.3±0.5
	H	1.6±0.2	35.1±0.6	3.4±0.4	36.0±2.0	3.1±0.5	37.2±2.9	4.6±0.7	37.1±0.4
Yeast NT	L	2.3±0.5	33.8±1.3	4.4±0.6	34.0±3.2	2.6±0.3	35.3±6.6	4.1±1.6	36.3±0.7
	M	3.5±0.2	33.7±1.8	4.7±0.1	34.2±1.2	3.9±0.2	35.1±1.5	4.9±0.4	35.4±2.8
	H	3.2±0.3	35.6±0.6	4.3±0.2	35.5±5.1	3.5±0.3	37.0±1.9	4.4±0.5	38.1±1.2
β-glucan	L	3.3±0.4	34.2±2.4	3.9±0.2	34.7±3.4	4.1±0.1	35.9±2.4	4.7±0.6	35.7±1.7
	M	3.1±0.4	34.4±0.5	5.0±0.5	34.8±1.8	3.5±0.5	36.4±3.0	4.1±0.8	38.3±1.5
	H	3.4±0.3	34.7±0.8	4.7±0.3	35.0±1.4	3.7±0.3	36.7±1.8	4.5±0.5	35.9±1.8
효모 추출물	L	3.6±0.4	32.5±1.8	5.2±0.3	33.0±5.0	4.0±0.4	34.3±2.9	4.1±0.7	33.9±2.4
	M	3.8±0.5	35.4±0.6	5.0±0.4	35.2±1.9	3.6±0.5	37.1±1.1	4.1±0.3	38.2±1.1
	H	3.9±0.4	35.4±1.2	5.1±0.1	35.3±4.2	4.5±0.5	37.1±2.5	4.5±0.6	39.2±1.6
구 분		35일		40일		45일		50일	
		섭취량	무게	섭취량	무게	섭취량	무게	섭취량	무게
Control		5.4±0.8	36.6±0.6	5.5±0.1	37.8±0.2	4.3±0.9	36.8±1.6	4.2±0.2	38.7±0.5
핵산	L	4.3±0.0	36	4.6±0.0	36.7	4.2±0.0	38	4.0±0.0	36
	M	5.6±0.6	38.0±0.4	4.4±0.3	39.3±1.1	3.5±0.4	39.0±1.4	3.8±0.4	40.3±2.5
	H	5.2±0.0	39	4.0±0.0	40	3.7±0.0	41	3.8±0.0	43.5
Yeast NT	L	5.4±1.1	37.4±0.3	5.6±0.5	38.0±0.0	4.9±1.0	36.2±3.1	4.7±0.2	37.8±1.2
	M	5.3±1.0	35.8±1.7	6.0±0.0	35.3±3.3	5.7±0.5	37.3±2.5	5.2±1.0	38.1±2.7
	H	5.8±1.0	38.6±0.6	6.2±0.9	40.0±1.4	5.0±0.3	39.8±1.2	5.5±0.7	41.5±0.7
β-glucan	L	5.8±0.1	35.7±0.8	6.0±0.0	35.0±0.4	6.0±0.1	37.6±0.5	5.9±0.1	37.5±0.0
	M	5.5±0.2	39.2±1.0	5.7±0.3	39.5±1.6	5.6±0.1	39.1±0.8	4.8±0.4	40.8±1.6
	H	6.0±0.0	37.4±0.8	5.8±0.3	37.2±2.1	5.4±0.2	37.7±4.2	5.3±0.8	37.9±2.2
효모 추출물	L	5.5±0.3	37.5±2.2	5.9±0.2	37.8±4.5	5.8±0.3	37.2±1.2	5.2±0.5	36.3±0.0
	M	5.7±0.3	37.3±1.8	6.0±0.2	37.5±2.6	5.2±0.0	37.3±2.8	4.7±0.1	39.5±2.1
	H	5.8±0.1	40.2±1.1	6.0±0.0	41.7±0.9	5.7±0.4	43.0±1.4	5.4±0.8	43.8±2.1

## 9-2. 선발효모에서 분리한 핵심기능성 소재 식이 마우스의 생체중 및 기관별 무게변화

### 1. 연구목적

전체 연구개발의 핵심 목표는 유기농 농산물에서 분리하고, 동정 및 유전자 확보가 완료된 효모에서 대량 분리한 기능성 소재별로 최종 동물임상 평가 및 제품화 적용 레시피를 정립하고 정립된 결과를 산업화를 목표로 농축산업을 포함한 낙농 및 유가공 관련 산업에 이익을 제공하고 저 하였다.

현대, 본 연구개발 결과의 제품화와 관련하여 규제기관 및 관련법에 있어, 효모(*S. cerevisiae* 및 *C. utilis*) 및 동일 효모에서 추출된 효모추출물을 제외한 기능성 물질은 동물전임상(안전성 및 유효성) 관련 등에 대하여 신뢰성 있는 평가결과 제출을 요구받고 있다.

따라서, 상술한 표준주를 대상으로 선발효모에서 대량생산된 기능성 소재별 및 농도별 안전성 및 기초효능 평가를 기준으로 동물 전임상 및 제품적용성(제빵·제과 레시피 정립)평가를 위한 기준농도를 설정하고, 농도차이를 부여한 사료를 제조한 후 성장기 마우스를 대상으로 8주간 섭이에 따른 안전성 및 기초효능 평가를 실시하였다.

많은 생체이물들이 체내에 분포되고, 종종 오로지 특정 표적장기만 영향을 미친다. 그러나, 어떤 것들은 그들이 접촉하는 세포나 조직에 손상을 입히기도 한다. 표적장기 및 골조직들은 투여량과 노출경로에 따라 아주 다양하게 영향을 받게 된다. 이에 대조(일반식이) 대비 기능성소재류 섭취 마우스의 근조직(간, 비장 및 신장) 및 골조직(척추뼈 및 대퇴골)을 확인하고 저 한다.

### 2. 연구수행방법

#### 가. 실험 설계와 동물사육

본 시험에서는 갓 이유한 3주령의 특정병원체 부재(specific pathogen free)수컷 ICR 마우스(대한바이오링크(주)) 128마리를 실험 조건을 일정하게 하기 위해 10일간 정상 식이로 순화 적응시킨 후 건강한 동물을 3마리씩 5군(대조구 1군, 비교구 2군, 실험구 2군)으로 임의 배치하여 사용하였다.

동물임상평가를 위한 사료 레시피는 AIN-76A를 기본으로 하여 Table 1.과 같이 비교구 2군(5종 핵산혼합, Yeast NT) 및 실험구 2군( $\beta$ -Glucan,, 효모추출물)으로 하였고, 각 농도는 1%(L;low), 5%(M;Medium) 및 10%(H;High)로 혼합 조성하였다 (Table .) 실험식이와 식수는 자유 급여법으로 급여하였다. 실험 동물 사육실 환경은 온도  $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ , 상대습도  $55\pm 10\%$ 로 유지 하였으며 명암은 12시간 주기(light : 06:00~18:00)로 조절하였다.

#### 나. 부검

대조구(AIN-76A 사료식이 마우스), 비교구(핵산, Yeast NT 혼합사료 섭취마우스)

및 실험구( $\beta$ -Glucan., 효모추출물 혼합사료 섭취마우스) 4주, 8주 2차례에 걸쳐 생존한 마우스 3마리씩을 ether로 마취시킨 후 흉부절개를 한 다음 복부대동맥에서 혈액을 채취하여 항응고제 튜브(EDTA 및 헤파린)에 보관하였다. 실험동물의 장기조직(5개 기관: Liver, Kidney, Spleen, Heart 및 Lung)은 혈액 채취 후 즉시 적출하여 PBS(phosphate buffered saline)용액에 1차례 세척 후 생조직의 무게를 측정 후 10% 포르말린용액에 보관하였다. 골조직은 양쪽 대퇴골, 척추골을 적출하였다. 대퇴골은 부착되어 있는 근육, 지방, 인대 등 부착물을 모두 제거한 다음 자연건조( $25 \pm 2^\circ\text{C}$ , 상대습도  $50 \pm 10\%$ )에서 48시간 후 무게를 측정하였다.

다. 통계처리

실험결과는 SAS program을 이용하여 통계분석하고(SAS,1999), 실험구 간의 유의성은 ANOVA로 검증한 후 Duncan`s multiple range test로 비교 분석하여(Duncan,1955) 평균치와 표준편차로 나타내고 5% 수준에서 유의성을 표시하였다.

### 3. 연구수행결과

기능성소재의 장단기 섭취 후 근조직(간, 신장 및 비장) 및 골조직(대퇴골)에 대한 무게변화를 확인함으로써 효모추출물의 안전성지표로 각 조직의 성장 변화를 확인하여 보았다(Figure 1., Table 4., 5., 6., 7.).

간은 혈액 내 독성물질을 걸러내는 역할을 하며 신장은 체내의 불필요한 물질들을 배설하고 체액 및 전해질 균형의 유지한다. 비장은 면역기관으로 노화된 적혈구를 거르거나 림프구를 생성하는 기관으로 면역유지의 중요한 장기이다. 또한, 골조직은 조직의 소멸과 생성이 균형있고 연속적으로 일어나는 기관으로 마우스 신체 중 가장 긴 골조직인 대퇴골을 선정하여 적출하였다.

기능성소재를 섭취한 마우스의 근조직 및 골조직의 무게변화는 시험구별 혼합사료(AIN-76A 기본 식이)를 자유급여법으로 섭취 후 4주(9주령) 및 8주(13주령)차에 부검을 통해 확인하였다.

우선 4주 경과 시 근조직의 무게변화를 살펴보면, 동일 기간의 AIN-76A 기본식이 섭취한 마우스의 체중량을 1로 기준하였을 때, 대조구 근조직의 무게는 간0.065, 신장 0.021 및 비장 0.009이며 8주 경과시 근조직의 무게는 간 0.059, 신장 0.019, 비장 0.004으로 4주간 기본식이(AIN-76A)로 섭취한 마우스의 근조직의 무게를 100% 기준으로 기준하였을 때, 8주차의 신장 무게차이는 없었으나 간(91%), 비장(44%) 감소하였다.

이에, 비교구 (핵산 및 Yeast NT 섭취 마우스) 및 실험구( $\beta$ -Glucan., 효모추출물)와 비교하였다.

비교구 핵산류 섭취마우스 4주차 및 8주차의 농도 구별없이 체중량을 1로 기준으로 하여 근조직 무게를 살펴보면 4주차는 간 0.06~0.066, 비장 0.004, 신장 0.018~0.019으로 관찰되었다. 농도(저농도, 중간농도 및 고농도)에 따른 근조직의 측정된 비중(체중

량 1기준)차이는 없었지만, 대조(100% 기준) 대비 통계적인 유의성을 보이는 것은 비장(44% 감소)으로 관찰 되었다. 이 외의 대조 대비 간 및 신장의 무게 차이에 대한 유의성은 없었다. 핵산류의 장기간(8주) 섭이시 근조직의 체중 대비 비중을 보면 간 0.051~0.056, 비장 0.003~0.006, 신장 0.016~0.029으로 간을 제외하고는 비장(저농도 0.006, 중간농도 0.004, 고농도 0.003), 신장(저농도 0.029, 중간농도 0.018, 고농도 0.016)의 농도간 차이가 있음을 확인하였다. 동일 기간 대조(100%) 대비 간(전체농도), 비장(중간농도 및 고농도), 신장(중간농도 및 고농도)을 제외하고는 저농도의 핵산류 섭이 마우스의 비장은 150%증가, 신장은 153%증가하였다.

또한 핵산류의 지속적인 섭이시 4주 대비 8주차 근조직의 비중은 저농도 섭이 마우스의 장기무게(비장, 신장 약 150%증가)를 제외하고는 차이가 없었다.

결론적으로, 핵산류의 장기간 섭이시 대조 대비 근조직이 차지하는 비중이 크게 차이나지는 않으나 저농도의 핵산류를 장기간(8주)섭이한 비장 및 신장의 무게는 증가하는 패턴을 보였다. 이런 차이는 농도 의존적으로 나타나지 않고 저농도의 핵산 섭이 조건에서만 나타났다.

비교구의 상업효모추출물에서 분리한 YeastNT의 4주차 근조직(간, 비장 및 신장)의 비중을 체중량 1 기준으로 하여 농도구별 없이 보면, 간(0.059~0.064) 비장(0.003~0.006) 신장(0.017~0.025)로 대조 대비 통계적인 유의성을 보이는 비장의 비중을 보면 대조(100% 기준) 대비 최대 300% 감소하였다.

또한, 농도 의존적으로 체중량 대비 비장의 비중(저농도 0.006, 중간농도 0.005 및 고농도 0.003)이 감소하는 패턴을 보였다.

YeastNT의 장기간(8주) 섭이 시 근조직의 동일기간 체중량(1 기준) 대비 간 0.048~0.08, 비장 0.004~0.005 및 신장 0.016~0.028으로 대조 대비 YeastNT 섭취 마우스의 근조직 비중이 통계적으로 유의성 차이는 없으나, 중간농도로 YeastNT를 섭이한 마우스의 간 비중(0.08)이 대조(100% 기준) 대비 105% 증가하였다.

결론적으로, 상업효모에서 분리한 YeastNT의 섭취를 통한 근조직의 무게는 비장을 제외하고는 통계적인 유의성이 없었다. 비장의 무게는 초기(4주)에는 감소하였지만, 지속적인 섭이시(8주) 대조 대비 통계적인 차이점이 없었다. 전체적으로 볼 때 YeastNT의 지속적인 섭이는 대조 대비 근조직 무게에 차이가 없음을 확인하였다.

실험구인  $\beta$ -Glucan의 4주 및 8주 섭이시의 근조직 무게를 보면 농도 구별 없이 4주차의 근조직의 체중 대비 비중을 보면 간 0.061~0.069, 비장 0.006~0.013 및 신장 0.019~0.024이며 8주차의 근조직은 간 0.046~0.053, 비장 0.004~0.006 및 신장 0.016~0.018로 4주 및 8주동안의  $\beta$ -Glucan 섭이시 대조 대비 통계적인 차이를 관찰할 수 없었으며, 4주 대비 8주의 무게변화도 없는 것으로 관찰되었다.

따라서,  $\beta$ -Glucan의 장단기 섭이시 마우스 성장에 부정적이 영향을 주지 않는 것을 관찰하였다.

마지막으로 실험구인 효모추출물의 4주 및 8주 섭이시 마우스의 근조직 무게를 살펴보았다.

효모추출물을 4주동안 섭취시 체중량(1 기준) 대비 농도 구별 없이 근조직의 비중을 보면, 간 0.059~0.062, 비장 0.005~0.007 및 신장 0.02~0.022이며 8주 섭취시 근조직 무게는 동일기간 체중량(1 기준) 대비 간 0.046~0.056, 0.003~0.007 및 신장 0.017~0.02으로 나타났다. 4주 섭취 대비 8주 동안 섭취한 근조직의 통계적인 유의성을 찾아 볼 수 없었지만 4주 동안 저농도 및 고농도의 효모추출물을 섭취한 마우스의 비장 비중이 대조(100% 기준) 대비 180% 감소하는 것을 관찰 하였다. 그러나, 지속적인 섭취시(8주) 대조 대비 차이점을 관찰할 수 없었다. 따라서, 효모추출물 역시 동물 성장에 부정적 영향을 주지 않았다.

종합적으로 볼 때, 4주 경과시 비교구의 전체적인 비장의 무게가 대조 대비 낮았으나 지속적으로 섭취시 차이가 없었으며, 나머지 근조직에 대해서는 유의적인 차이가 없었다. 대조구 대비 실험구( $\beta$ -Glucan, 효모추출물)의 근조직의 무게 변화를 비교하였더니, 전체적으로 기간별 농도별 대조 대비 근조직의 유의적인 차이가 없었다( $P < 0.05$ ).

골조직(대퇴골)의 무게는 두 가지 방법으로 측정하였다. 첫 번째로 대퇴골 적출 후 거즈를 통해 근조직을 최대한 제거 후 대퇴골 무게를 측정하였다(생체무게). 두 번째로, 대퇴골에 연결된 근조직 무게에 대한 오차를 줄이기 위해 대퇴골을 건조 후 근조직을 떼어낸 상태에서 순수 대퇴골의 무게만을 측정하였다(건조무게)(Table 6~7.). 결과는 다음과 같다.

우선 AIN-76A 기본 식이를 섭취한 대조구의 경우 4주경과시(체중량 1기준) 생체무게는 0.0042이고 건조무게는 0.0021이다. 장기간(8주) 섭취시 생체무게는 0.0037이고 건조무게는 0.002이다. 4주 대비 8주차 경과후 대퇴골의 생체무게 및 건조무게는 유의적인 차이가 없었다. 즉, 체중에 따라 균형적인 골조직의 형성이 이뤄 졌음을 확인할 수 있다.

이에, 전체적으로 볼 때, 대조 대비 비교구 및 실험구 동일하게 대퇴골의 비중에 대한 통계적인 유의성 차이를 관찰할 수 없었다. 4주 경과시 비교구의 핵산류 및 YeastNT 섭취마우스의 구분없이 대퇴골의 무게는 생체무게 0.0039~0.0046, 건조무게 0.0017~0.0023으로 감소하거나 증가하는 경향이 있지만 통계적으로 유의 하지는 않았다. 8주 경과 기준으로 볼 때에도 대조 대비 비교구의 대퇴골 비중이 통계적인 차이가 없으나, 저농도의 핵산(생체무게 0.005, 건조무게 0.0025)의 경우 대조(100% 기준) 대비 생체무게는 135%, 건조무게는 125% 증가하였다. 이는 근조직의 무게증가와 일치하며, 저농도의 핵산군에서만 차이가 보이는 이유는 개체차로 인한 오차 이거나 저농도의 핵산 마우스 성장을 촉진 시킬 수 있음을 시사할 수 있지만 실험 개체수를 늘려 세세히 연구할 필요성이 있다고 판단된다. 높은 농도(중간농도 및 고농도)의 핵산류를 섭취한 마우스의 대퇴골의 무게는 대조 대비 차이가 없었다.

4주 경과시 실험구( $\beta$ -Glucan, 효모추출물)의 전체적인 대퇴골의 비중(체중량 1기준)이 생체무게 0.0032~0.0046, 건조무게 0.0017~0.0022으로 관찰되었다. 이 중 통계적으로 유의한 차이를 보인 실험구는 효모추출물 섭취 마우스로 저농도의 효모추출물 섭취 마우스의 대퇴골의 생체무게 비중(체중량 1기준)이 0.0032로 대조(100% 기준) 대



비 대퇴골의 비중이 76%로 감소한 하였고, 건조무게(0.0017)의 경우 대조 비중의 90%로 감소하였다. 하지만 8주 경과시 대조구 대퇴골(생체무게 및 건조무게)의 차이가 없었으며 다른 실험구( $\beta$ -Glucan 및 중간농도/고농도의 핵산섭취 마우스)의 대퇴골(생체무게 및 건조무게)의 차이는 없었다.

결론적으로, 기능성소재의 장단기적 농도별 골조직(대퇴골)의 무게 변화에 유의적인 차이가 없는 것으로 보아 기능성소재가 골조직 형성 및 성장에도 영향을 주지 않는 것을 확인 하였다. 종합적으로 볼 때 기능성소재류의 섭취는 마우스 성장에 부정적 영향을 주지 않는 것으로 판단되어진다.

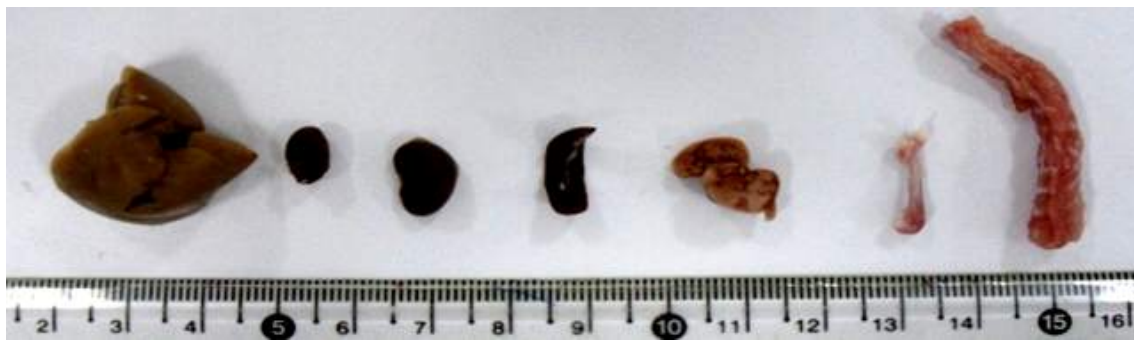


Fig. 1. 선발효모에서 분리한 핵심기능성소재의 장단기 섭취에 따른 동물전임상 안전성 실험을 위한 마우스 생체기관내 조직. 1 : Liver, 2 : Heart, 3 : Kidney, 4 : Spleen, 5 : Lung, 6 : Femur, 7 : Vertebra

Table 4. 선발효모에서 분리한 핵심기능성소재의 농도별 함유 사료의 섭취기간 경과에 따른 생체중에 따른 기관별 무게변화조사(4주차, 9주령 마우스).

구 분(4주차, 9주령)		체중	간	비장	신장
대조구	Control	1.000±0.012	0.065±0.004	0.009±0.001	0.021±0.001
비교구	핵산(L)	1.000	0.066	0.004	0.018
	핵산(M)	1.000	0.060	0.004	0.018
	핵산(H)	1.000	0.060	0.004	0.019
	Yeast NT(L)	1.000±0.027	0.064±0.012	0.006±0.002	0.017±0.000
	Yeast NT(M)	1.000±0.078	0.066±0.012	0.005±0.001	0.025±0.001
	Yeast NT(H)	1.000±0.044	0.059±0.001	0.003±0.000	0.020±0.001
실험구	β-Glucan(L)	1.000±0.048	0.069±0.002	0.013±0.007	0.021±0.001
	β-Glucan(M)	1.000±0.040	0.061±0.004	0.006±0.001	0.019±0.001
	β-Glucan(H)	1.000±0.051	0.068±0.005	0.006±0.002	0.024±0.001
	효모추출물(L)	1.000±0.021	0.062±0.004	0.005±0.000	0.020±0.004
	효모추출물(M)	1.000±0.024	0.059±0.014	0.007±0.003	0.021±0.001
	효모추출물(H)	1.000±0.081	0.069±0.013	0.005±0.001	0.022±0.002

Table 5. 선발효모에서 분리한 핵심기능성소재의 농도별 함유 사료의 섭이기간 경과에 따른 생체중에 따른 기관별 무게 변화조사(8주차, 13주령 마우스).

구 분 (8주차, 13주령)		체중	간	비장	신장
대조구	Control	1.000±0.071	0.059±0.002	0.004±0.001	0.019±0.000
비교구	핵산(L)	1.000	0.056	0.006	0.029
	핵산(M)	1.000±0.048	0.055±0.004	0.004±0.000	0.018±0.001
	핵산(H)	1.000	0.051±0.003	0.003±0.001	0.016±0.001
	Yeast NT(L)	1.000±0.037	0.062±0.004	0.005±0.000	0.028±0.002
	Yeast NT(M)	1.000±0.089	0.080±0.011	0.004±0.000	0.020±0.003
	Yeast NT(H)	1.000±0.054	0.048±0.005	0.004±0.000	0.016±0.001
실험구	β-Glucan(L)	1.000±0.005	0.049±0.006	0.004±0.001	0.018±0.001
	β-Glucan(M)	1.000±0.002	0.046±0.016	0.004±0.001	0.016±0.001
	β-Glucan(H)	1.000±0.037	0.053±0.002	0.006±0.002	0.020±0.002
	효모추출물(L)	1.000±0.006	0.050±0.008	0.007±0.004	0.020±0.002
	효모추출물(M)	1.000±0.049	0.056±0.007	0.004±0.001	0.018±0.001
	효모추출물(H)	1.000±0.049	0.046±0.010	0.003±0.000	0.017±0.001

Table 6. 선발효모에서 분리한 핵심기능성소재의 농도별 함유 사료의 섭취기간 경과에 따른 생체중에 따른 대퇴골의 무게 변화조사(4주차, 9주령 마우스).

구 분(4주차, 9주령)		대퇴골 변화(체중 1기준)	
		생체무게	건조무게
대조구	Control	0.0042±0.0002	0.0021±0.0001
비교구	핵산(L)	0.0046±0.0003	0.0021
	핵산(M)	0.0040±0.0001	0.0017
	핵산(H)	0.0039±0.0000	0.0020
	Yeast NT(L)	0.0044±0.0001	0.0023±0.0001
	Yeast NT(M)	0.0045±0.0005	0.0023±0.0001
	Yeast NT(H)	0.0042±0.0001	0.0020±0.0002
실험구	β-Glucan(L)	0.0044±0.0002	0.0022±0.0003
	β-Glucan(M)	0.0036±0.0005	0.0019±0.0001
	β-Glucan(H)	0.0046±0.0002	0.0022±0.0000
	효모추출물(L)	0.0032±0.0003	0.0017±0.0002
	효모추출물(M)	0.0037±0.0005	0.0019±0.0001
	효모추출물(H)	0.0042±0.0005	0.002

Table 7. 선발효모에서 분리한 핵심기능성소재의 농도별 함유 사료의 섭이기간 경과에 따른 생체중에 따른 대퇴골의 무게 변화조사(8주차, 13주령 마우스).

구 분(8주차, 13주령)		대퇴골 변화(체중 1기준)	
		생체무게	건조무게
대조구	Control	0.0037±0.0003	0.0020±0.0000
비교구	핵산(L)	0.0050±0.0002	0.0025
	핵산(M)	0.0039±0.0004	0.0021±0.0001
	핵산(H)	0.0039±0.0003	0.0019±0.0000
	Yeast NT(L)	0.0037±0.0002	0.0021±0.0002
	Yeast NT(M)	0.0038±0.0003	0.0021±0.0000
	Yeast NT(H)	0.0031±0.0002	0.0018±0.0000
실험구	β-Glucan(L)	0.0041±0.0002	0.0022±0.0003
	β-Glucan(M)	0.0034±0.0001	0.0018±0.0002
	β-Glucan(H)	0.0038±0.0004	0.0021±0.0000
	효모추출물(L)	0.0037±0.0005	0.0022±0.0001
	효모추출물(M)	0.0038±0.0005	0.0018±0.0001
	효모추출물(H)	0.0036±0.0003	0.0018±0.0001

### 9-3. 선발효모에서 분리한 핵심기능성 소재 식이 마우스의 혈액학적검사, 혈액 생화학적 검사 및 염색체이상 검사

#### 1. 연구목적

전체 연구개발의 핵심 목표는 유기농 농산물에서 분리하고, 동정 및 유전자 확보가 완료된 효모에서 대량 분리한 기능성 소재별로 최종 동물임상 평가 및 제품화 적용 레시피를 정립하고 정립된 결과를 산업화를 목표로 농축산업을 포함한 낙농 및 유가공 관련 산업에 이익을 제공하고 저 하였다.

현대, 본 연구개발 결과의 제품화와 관련하여 규제기관 및 관련법에 있어, 효모(*S. cerevisiae* 및 *C. utilis*) 및 동일 효모에서 추출된 효모추출물을 제외한 기능성 물질은 동물전임상(안전성 및 유효성) 관련 등에 대하여 신뢰성 있는 평가결과 제출을 요구받고 있다.

따라서, 상술한 표준주를 대상으로 선발효모에서 대량생산된 기능성 소재별 및 농도별 안전성 및 기초효능 평가를 기준으로 동물 전임상 및 제품적용성(제빵·제과 레시피 정립)평가를 위한 기준농도를 설정하고, 농도차이를 부여한 사료를 제조한 후 성장기 마우스를 대상으로 8주간 섭이에 따른 안전성 및 기초효능 평가를 실시하였다.

이에, 기능성소재류 섭취 마우스의 4주 및 6주 경과 후 혈액을 채취하여 혈액학적검사, 혈액생화학적검사 및 말초혈액세포에서의 미소핵(MN)분석을 통해 염색체이상조사를 함으로써 기능성 소재류의 안전성을 확보하고자 하였다.

#### 2. 연구수행방법

##### 가. 실험 설계와 동물사육

본 시험에서는 갓 이유한 3주령의 특정병원체 부재(specific pathogen free)수컷 ICR 마우스(대한바이오링크(주)) 128마리를 실험 조건을 일정하게 하기 위해 10일간 정상 식이로 순화 적응시킨 후 건강한 동물을 3마리씩 5군(대조구 1군, 비교구 2군, 실험구 2군)으로 임의 배치하여 사용하였다.

동물임상평가를 위한 사료 레시피는 AIN-76A를 기본으로 하여 Table 1.과 같이 비교구 2군(5종 핵산혼합, Yeast NT) 및 실험구 2군( $\beta$ -Glucan., 효모추출물)으로 하였고, 각 농도는 1%(L;low), 5%(M;Medium) 및 10%(H;High)로 혼합 조성하였다.

실험식이와 식수는 자유 급여법으로 급여하였다. 실험 동물 사육실 환경은 온도  $22 \pm 2^\circ\text{C}$ , 상대습도  $55 \pm 10\%$ 로 유지 하였으며 명암은 12시간 주기(light : 06:00~18:00)로 조절하였다.

##### 나. 혈액채취

대조구, 비교구 및 실험구 4주, 8주 2차례에 걸쳐 생존한 마우스 3마리씩을 ether로 마취시킨 후 흉부절개를 한 다음 복부대동맥에서 혈액을 채취하여 혈액학적검사는 EDTA가 들어있는 용기(SARSTEDT, Germany)에 넣어 백혈구, 적혈구, 혈소판 수는

동물용 자동 혈액분석기 (SEAC, Italy)를 이용하여 분석하였다. 혈액생화학적 검사는 헤파린이 들어있는 용기(SARSTEDT, Germany)에 채혈한 혈액을 넣고 ALT, ALP, 총 단백질 외 11 종류의 생화학적 마커는 동물용 혈액생화학 측정기(VETSCAN, USA)를 이용하여 분석하였다.

#### 다. 미소핵 분석

대조구, 비교구 및 실험구 4주, 8주 2차례에 걸쳐 생존한 마우스 3마리씩의 꼬리정맥에서 혈액을 3ul 채취하여 미리 아크리딘오렌지가 도말된 슬라이드에 올려 커버글라스로 포배 하여 냉장(4℃)보관 하였으며 7일 이내에 관찰하였다. 적혈구내 미소핵분석은 Hayashi 등(Hayashi et al, 1983)이 기술한 방법에 따랐다. 대조구의 적혈구는 개체당 1,000개~2000개씩 관찰하였으며, 실험구는 개체당 1,000개씩 계수하여 MN의 비율을 측정 하였다.

#### 라. 통계처리

실험결과는 SAS program을 이용하여 통계분석하고(SAS,1999), 실험군 간의 유의성은 ANOVA로 검증한 후 Duncan`s multiple range test로 비교 분석하여(Duncan,1955) 평균치와 표준편차로 나타내고 5% 수준에서 유의성을 표시하였다.

### 3. 연구수행결과

기능성 소재의 장단기 섭취 후 체내 흡수 시 기능성 소재로 인한 마우스의 혈액의 혈액학적검사, 혈액생화학적 검사 및 염색체이상 검사를 통해 대조구와 비교하여 기능성 소재의 안전성을 확인하여 보았다.

기능성 소재의 안전성지표로 혈액학적검사를 수행하여 백혈구, 림프구, 적혈구 및 혈소판의 수치를 측정하였다(Table 8.~9.). 우선 4주, 8주 2차례의 대조구의 혈액학적 수치 범위를 보면, 4주차를 기준으로 했을 때 대조구의 혈액분석결과 백혈구 3.8, 림프구 1.51, 적혈구 6.2 및 혈소판 1613으로 측정하였다.

8주차 대조구의 혈액분석결과 백혈구 2.25, 림프구 1.05, 적혈구, 4.23 및 혈소판 948로 측정되었다. 4주(100% 기준) 대비 8주경과시 전체적으로 백혈구 59%, 림프구 70%, 적혈구 68% 및 혈소판 59%수준으로 감소하였지만, 대조구의 체중, 사료섭취량, 근조직 및 골조직의 무게를 통해 정상적인 성장을 관찰하였고, 이에, 혈액학적검사 수치가 정상적 범위의 수준으로 인정하고 동일 기간에 따른 비교구 및 대조구의 혈액학적검사를 확인하였다.

4주 경과 후 농도구별없이 비교구의 핵산섭취 마우스의 백혈구 1.05~1.66, 림프구 0.69~1.14, 적혈구 5.88~7.49 및 혈소판 83~5118로 대조(100%) 대비 백혈구는 27%~44% 수준으로 감소하였으며 46%~76% 수준으로 감소하였다. 백혈구와 림프구의 경우 인체방어기전을 담당하기에 핵산 섭취를 통해 인체방어기전이 약해질 것으로 판단되어진다. 8주 경과 후의 핵산류 섭취마우스의 백혈구(1.67~2.09) 및 림프구



(0.72~1.07)의 수치를 보면 대조(100% 기준) 대비 백혈구는 74%~92.8%, 림프구는 69%~102% 수준으로 회복되었음을 관찰하였다. 4주 경과시 혈소판의 수치는 대조(100%) 대비 5%~317%(저농도 317%) 수준으로 측정오차로 인한 결과로 보여지지만, 지속적인(8주차) 저농도로 핵산류를 섭취한 마우스의 혈소판 수치(2,063)는 동일기간 대조(100% 기준) 대비 217% 증가한 것으로 보아 저농도의 핵산류는 혈소판의 증가로 인한 혈전을 일으킬 가능성이 있다. 적혈구의 수치는 농도구별없이 4주 경과시 5.88~7.49, 8주 경과시 5.64~6.94로 대조구와 비교했을 때 정상범위임을 확인하였다. 핵산류 섭취마우스의 혈액학적분석을 통해 특히, 저농도의 핵산섭취는 혈액내 혈구세포에 부정적 영향을 끼치는 것으로 판단되어진다.

비교구의 상업효모에서 분리한 YeastNT의 경우를 살펴보았다.

농도 구별없이 4주경과시 혈액학적 조사결과를 보면, 백혈구 1.44~3.84, 림프구 0.67~1.22, 적혈구 3.72~6.86 및 혈소판 1097~2273으로 적혈구 및 혈소판의 수치는 이상이 없는 것으로 판단되어진다. 그러나, 저농도의 YeastNT 섭취마우스 백혈구(1.44) 및 림프구(0.69)의 수치는 대조(100% 기준) 대비 백혈구 38%, 림프구 46% 수준으로 감소하였으나, 8주 경과시 백혈구(1.26)는 동일기간 대조(100% 기준) 대비 56%, 림프구(0.75)는 71%수준으로 회복하였다. 적혈구와 혈소판 수치는 기간구별 없이 정상적인 수준의 수치로 확인되었다.

대조구의  $\beta$ -Glucan을 4주간 섭취한 마우스의 혈액학적 수치는 적혈구 및 혈소판의 수치를 제외하고는 농도에 따라 차이를 보인다. 백혈구(저농도 5.94, 중간농도 4.75 및 고농도 2.2) 림프구(저농도 0.36, 중간농도 1.49 및 고농도 1.1)으로 관찰되었다. 특히, 저농도의  $\beta$ -Glucan 섭취 시 백혈구의 수치는 증가하였지만, 림프구의 수치는 오히려 감소하는 것으로 보아 면역력에 이상이 있을 가능성이 있다. 이에, 8주 경과시 저농도  $\beta$ -Glucan 섭취 마우스의 혈액수 수치(백혈구 2.96, 림프구 1.53, 적혈구 5.05 및 혈소판 882)를 보면 대조 대비 백혈구 131%, 림프구 145%, 적혈구 119% 및 혈소판 93%로 이상이 없음을 확인하였다. 8주 경과시에도 중간농도 및 고농도  $\beta$ -Glucan 섭취 시 이상이 없음을 확인하였다.

다음으로, 효모추출물의 혈액학적 분석결과를 보면, 농도구별없이 4주 경과 후 백혈구 1.98~2.06, 림프구 0.88~1.3, 적혈구 5.35~6.2 및 혈소판 874~1317로 대조 대비 큰 차이가 없었으나 림프구의 경우 대조(100% 기준) 대비 최대 58% 수준으로 감소한 것을 확인 하였고, 8주 경과시에도 림프구(0.68~0.89)수치가 최대 65% 수준으로 감소하였다. 8주 경과시 효모추출물 섭취 마우스의 백혈구 수치(저농도 3.8, 중간농도 1.2 및 고농도 1.66)를 보면 감소하는 경향을 보이며 최대 53%수준으로 감소하였다. 하지만 림프구의 수치(0.68~0.89)는 대조 대비 통계적으로 유의한 차이를 관찰할 수 없었다.

종합적으로 볼 때, 기능성소재류의 섭취시 초기(4주)에는 백혈구 및 림프구 수의 감소로 면역력의 이상으로 판단되어지나, 지속적인 섭이시 정상범위이거나 정상 수치에 근접한 결과를 통해 안전성에는 크게 이상이 없는 것으로 보인다.

다음으로, 성장관련 안전성지표로, 혈액생화학적 검사를 수행하여 간기능 지표인

ALB(albumin), ALP(alkaline phosphatase), ALT(alanine aminotransferase) 및 TBIL(total bilirubin)과 신장 기능 지표인 BUN(blood urea nitrogen) 및 CRE(creatinine) 그리고 비장 기능 지표인 AMY(amylase) 및 GLU(glucose) 갑상선 기능 지표인 PHOS(phosphorus), 전해물질인 Na, Ca 및 K 그리고 TP(total protein), GLOB(globulin)총 14종을 조사하였다.(Table 10., 11.) 우선 생체 내 생리활성의 지표인 전해물질(Na, Ca, K)의 수치를 확인함으로써, 마우스 생체내의 항상성이 유지하는지를 판단하였다. 4주차 기준으로 하여 대조구(Na<sup>+</sup> 162, Ca<sup>++</sup> 12.3, K<sup>+</sup> 5.4) 대비 비교구 및 실험구의 혈액 내 전해질의 수치는 성숙 마우스 표준 범위의 임상 화학적 수치 범위안에 포함되어 있으므로 안전성을 확인하였다. 이에 따른 대조 대비 비교구 및 실험구와 차이는 없었다.

마우스의 영양상태지표인 TP의 수치는 대조구(5.4) 대비 비교구(5.5~5.7) 및 실험구(5.6~6.3)를 통해 정상임을 확인하였다. 전체 시험구의 마우스는 정상상태에서 실험이 진행되었음을 증명하였다. 이에 간(ALB, ALP, ALT 및 TBIL), 신장(BUN 및 GLU), 비장(AMY 및 GLU) 및 갑상선(PHOS) 손상에 대해 각각의 지표를 통해 확인하였다. 4주 경과시 일반(AIN-76A) 식이를 한 대조구 마우스의 기간별 생화학적 수치는 각각 ALB 2.2, ALP 17, ALT 30, TBIL 0.2, BUN 27, CRE 0.2, AMY 1,301, GLU 193 및 PHOS 12.3으로 정상범위에 포함되어 있다. 기능성소재를 혼합한 사료 섭취 마우스에 대한 혈액 생화학적 수치는 고농도 핵산(ALP 14, ALT 461)섭취 마우스군과 저농도 YeastNT(ALP 38, ALT 221)를 제외하고는 모두 정상범위안에 포함되는 것으로 관찰되었다.

4주 경과시 고농도의 핵산 및 저농도 YeastNT 섭취 마우스군에서 높은 ALT는 각각 15배 및 7배정도 증가하였다. ALT는 급성 간세포 손상시 나타나는 지표로서 마우스의 간기능에 문제가 있음으로 판단되었으나, 지속적인 섭이 시(8주차)에는 대조구(ALP 32, ALT 36) 대비 비교구 및 실험구의 간기능 수치가 정상범위에 포함되어 있었다.

8주 경과 후 대조구의 생화학적 수치는 ALB 2.6, ALP 32, ALT 36, TBIL 0.3, BUN 21, CRE 0.2, AMY 1,654, GLU 321 및 PHOS 7.5로 정상범위에 포함되어 있다.

비교구 및 실험구의 혈액생화학적 수치는 비교구의 중간 농도의 YeastNT 섭취마우스의 간기능에 대한 지표인 ALP(51), ALT(464)로 대조군에 비해 각각 1.6배 및 13배 정도의 증가하였다. 그러나 동일기간 저농도(ALP 28, ALT 43) 및 고농도(ALP 30, ALT 31)의 수치가 대조 대비 정상범위의 수치로 관찰되는 것으로 보아 검사된 개체에서 급성 간세포의 손상이 있으나, 기능성소재가 마우스 건강지표에 부정적 영향을 주지 않음을 시사할 수 있다.

다음으로, 말초혈액내의 미소핵분석법을 통한 염색체이상을 조사하였다.

아크리딘오미소핵분석은 기능성소재를 섭취한 마우스의 염색체이상분석법인 미소핵(MN, Micronuclei)분석을 통한 염색체이상조사를 확인하였다(Table 12., 13.). 염색체 이상조사 중 MN분석이 가장 보편화되어 있는 방법이며 0.1% acridine orange를 통해

적혈구를 염색하는 방법을 사용하였다. 이 방법은 마우스를 치사시키지 않고 꼬리정맥에서 혈액을 채취함으로써 지속적인 관찰을 할 수 있는 장점이 있다. 이에 MN분석을 통해 기능성소재의 안전성을 확인하였다.

기능성소재를 섭취한 마우스의 장단기 동안 2차례(4주, 8주)에 걸쳐 MN을 조사하였으며 통계적으로 유의한 결과를 얻기 위해 적혈구가 acridine orange로 70% 이상 염색된 적혈구 세포 3,130~9,950개를 계수하였으며 이 중 MN(염색된 DNA)이 포함된 적혈구의 개수를 파악하였다. 일반적으로 1,000개를 계수 했을 때 1~2개의 MN(0.002%)을 발견된다. 기간별 농도별 상관없이 모든 개체에서 정상범위인 0.002%내를 벗어나지 않았다(대조군 0.0004~0.0006%, 비교구 0.0002~0.0011%, 실험구 0~0.0007%). 따라서, 동물안전성시험 중 미소핵분석을 통한 염색체이상조사를 통해 핵산 및 효모추출물을 섭취한 마우스의 염색체이상은 관찰할 수 없었다.

결론적으로, 기능성소재는 장단기적 및 처리 농도별 성장 안전성 지표인 혈액학적, 혈액생리학적 및 염색체 이상조사에 안전성을 확인하였다. 혈액학적 지표를 통해 4주차에서는 백혈구 및 림프구의 저하로 감염 위험이 있는 것으로 판단되었으나, 지속적인 섭이 시 마우스의 면역 항상성 유지에 이상이 없는 것을 확인하였다.

혈액생리학적 지표를 통해 효모추출물인 YeastNT와 5종혼합핵산을 섭취한 마우스의 혈액이화학적 분석을 통해 초기 간세포가 손상된 수치를 얻었으나, 지속적인 섭이 시 정상범위로 회복 되었으며, 그 외의 지표로 통해 다른 중요장기 및 질병에도 이상이 없음을 확인하였다. 또한 MN분석을 통해 기능성소재를 섭취한 마우스의 염색체에 이상이 없음을 재차 확인하였다.

따라서, 전체적으로 볼 때 기능성소재의 제과·제빵 적용시 가장 적절한 농도는 마우스의 선발효모의 핵심기능성소재의 섭취에 따른 장단기별, 농도별 확인 결과, 혈액학적, 혈액생리학적 및 염색체이상은 전체농도에서 지속적으로 섭이시 이상이 없지만, 가장 적절한 농도는 저농도로 장기적으로 섭이에도 안전성이 유지됨을 확인하였다.

Table 8. 선발효모에서 분리한 핵심기능성소재의 장단기 섭취에 따른 마우스 혈액이상 (혈액생리학적 지표반응 분석) 조사결과(4주차, 9주령)

구 분 (4주차 ,9주령)		백혈구 ( $10^9/L$ )	림프구 ( $10^9/L$ )	적혈구 ( $10^{12}/L$ )	혈소판 ( $10^9/L$ )
대조구	Control	3.8	1.51	6.2	1613
비교구	핵산(L)	1.66	1.14	7.49	5118
	핵산(M)	1.05	0.73	6.77	83
	핵산(H)	1.05	0.69	5.88	395
	Yeast NT(L)	1.44	0.67	3.72	2273
	Yeast NT(M)	3.84	1.22	6.71	1116
	Yeast NT(H)	1.91	1.22	6.86	1097
실험구	$\beta$ -Glucan(L)	5.94	0.36	4.01	1649
	$\beta$ -Glucan(M)	4.75	1.49	7.06	1544
	$\beta$ -Glucan(H)	2.2	1.1	6.86	1011
	효모추출물(L)	2.05	0.99	6.09	893
	효모추출물(M)	1.98	0.88	8.11	1317
	효모추출물(H)	2.06	1.3	5.35	874

Table 9. 선발효모에서 분리한 핵심기능성소재의 장단기 섭취에 따른 마우스 혈액이상 (혈액생리학적 지표반응 분석) 조사결과(8주차, 13주령)

구 분 (8주차, 13주령)		백혈구 ( $10^9/L$ )	림프구 ( $10^9/L$ )	적혈구 ( $10^{12}/L$ )	혈소판 ( $10^9/L$ )
대조구	Control	2.25	1.05	4.23	948
비교구	핵산(L)	1.67	0.79	5.64	2063
	핵산(M)	$2.02 \pm 0.30$	$1.07 \pm 0.09$	$6.94 \pm 0.65$	$966 \pm 107$
	핵산(H)	$2.09 \pm 0.56$	$0.72 \pm 0.15$	$6.09 \pm 1.73$	$825 \pm 267$
	Yeast NT(L)	$1.26 \pm 0.11$	$0.75 \pm 0.11$	$5.27 \pm 0.55$	$557 \pm 51$
	Yeast NT(M)	$2.28 \pm 0.88$	$0.84 \pm 0.31$	$6.19 \pm 0.06$	$3023 \pm 3356$
	Yeast NT(H)	$2.14 \pm 0.23$	$1.41 \pm 0.01$	$8.33 \pm 0.75$	$802 \pm 134$
실험구	$\beta$ -Glucan(L)	$2.96 \pm 0.38$	$1.53 \pm 0.13$	$5.05 \pm 0.96$	$882 \pm 203$
	$\beta$ -Glucan(M)	$1.64 \pm 1.31$	$1.10 \pm 0.93$	$5.69 \pm 2.09$	$686 \pm 378$
	$\beta$ -Glucan(H)	$2.23 \pm 2.55$	$0.99 \pm 0.98$	$4.74 \pm 4.00$	$527 \pm 494$
	효모추출물(L)	$3.80 \pm 1.77$	$0.75 \pm 0.26$	$4.66 \pm 1.91$	$789 \pm 310$
	효모추출물(M)	$1.20 \pm 0.43$	$0.68 \pm 0.33$	$6.35 \pm 1.72$	$669 \pm 108$
	효모추출물(H)	1.66	0.89	6.83	899

Table 10. 선발효모에서 분리한 핵심기능성소재의 장단기 섭이에 따른 마우스 혈액이상 (혈액생화학적 지표반응 분석) 조사결과(4주차, 9주령)

구 분 (4주차, 9주령)		Liver				Kidney		Spleen		Thyr oid	전해질 및 영양				
		ALB	ALP	ALT	TBIL	BUN	CRE	AMY	GLU	PHOS	Na+	Ca <sup>+</sup> <sub>+</sub>	K+	TP	GIQB
		(g/dl)	(U/L)	(U/L)	(mg/dl)	(mg/dl)	(mg/dl)	(U/L)	(mg/dl)	(mg/dl)	(mmol/dl)	(mg/dl)	(mmol/dl)	(g/dl)	(g/dl)
대조구	Control	2.2	17	30	0.2	27	0.2	1301	193	12.3	162	12.3	8.5	5.4	3.2
비교구	핵산(L)	3.4	29	46	ND	37	0.2	1628	264	10.4	152	6.6	ND	5.6	2.2
	핵산(M)	3.4	25	58	0.3	28	0.2	1699	274	8.1	151	10.1	ND	5.7	2.4
	핵산(H)	ND	14	461	0.2	37	0.2	1383	282	17.7	155	11.6	9.7	5.5	ND
	Yeast NT(L)	2.5	38	221	0.3	20	0.2	1339	147	7.5	155	10.9	8.5	5.5	3
	Yeast NT(M)	2.6	39	60	0.3	24	0.2	1607	296	10.3	155	11.3	8.5	5.5	2.9
	Yeast NT(H)	2.9	50	28	0.3	25	0.2	1886	487	10.5	156	12.5	8.5	6.1	3.1
실험구	β-Glucan(L)	2.3	16	29	0.3	20	0.2	1146	335	10.3	157	12.7	8.5	5.6	3.3
	β-Glucan(M)	2.6	43	57	0.5	21	0.2	1521	182	7.5	149	11	6.6	5.7	3.1
	β-Glucan(H)	2.7	37	39	0.2	21	0.2	1421	316	9.4	156	11.8	8.5	5.6	2.8
	효모추출물(L)	2.8	29	33	0.2	25	0.2	1475	299	11.5	157	11.6	8.5	5.7	2.9
	효모추출물(M)	3.2	39	68	0.3	25	0.2	1672	491	13.7	158	13.1	8.5	6.3	3.1
	효모추출물(H)	3.2	17	66	0.3	22	0.2	1572	370	11.7	157	12.5	8.5	6.3	3.1

Table 11. 선발효모에서 분리한 핵심기능성소재의 장단기 섭이에 따른 마우스 혈액이상 (혈액생화학적 지표반응 분석) 조사결과(4주차, 9주령)

구 분 (8주차, 13주령)		Liver				Kidney		Spleen		Thyroid	전해질 및 영양				
		ALB	ALP	ALT	TBIL	BU N	CRE	AMY	GLU	PHOS	Na+	Ca <sup>+</sup> <sub>+</sub>	K+	TP	GlO B
		(g/dl)	(U/L)	(U/L)	(mg/ dl)	(mg/ dl)	(mg/ dl)	(U/L)	(mg/ dl)	(mg/dl)	(mmol/dl)	(mg/dl)	(mmol/dl)	(g/dl)	(g/dl)
대조구	Control	2.6	32	36	0.3	21	0.2	1654	321	7.5	150	11.4	7.8	5.9	3.3
비교구	핵산(L)	2.7	42	48	0.4	25	0.2	1801	290	9.9	159	11.1	8.5	5.9	3.1
	핵산(M)	2.8	41	45	0.4	25	0.2	1775	290	10.0	153	11.1	8.5	5.8	2.9
	핵산(H)	3.2	35	40	0.3	26	0.2	1482	367	9.2	156	11.5	8.5	6.1	2.9
	Yeast NT(L)	3.0	28	43	0.2	29	0.2	1921	322	17.4	159	12.8	8.2	6.1	3.0
	Yeast NT(M)	3.2	51	464	0.3	20	0.2	1524	242	4.9	153	11.8	7.5	5.3	2.1
	Yeast NT(H)	3.2	30	31	0.3	25	0.2	1728	297	7.8	152	11.2	7.7	6.2	3.0
실험구	β-Glucan(L)	2.8	28	30	0.3	23	0.2	1433	148	8.4	154	10.3	8.0	5.6	2.8
	β-Glucan(M)	2.8	32	30	0.3	21	0.2	1562	225	9.2	151	10.8	8.5	5.8	3.0
	β-Glucan(H)	1.9	24	30	0.3	24	0.2	1321	226	10.2	156	11.0	8.5	5.2	3.3
	효모추출물(L)	1.9	29	28	0.3	22	0.2	1231	189	8.0	155	11.0	7.9	5.5	3.6
	효모추출물(M)	2.8	33	26	0.3	21	0.2	1753	252	8.8	154	11.4	7.8	5.8	2.9
	효모추출물(H)	3.1	33	26	0.3	24	0.2	1562	294	9.1	155	10.9	8.4	5.6	2.5

Table 12. 선발효모에서 분리한 핵심기능성소재의 장단기 섭취에 따른 마우스 혈액이상 (혈액생리학적 지표반응 분석) 조사결과(단위 : mean±SD)(4주차, 9주령)

구분 (4주차, 9주령)		MN 발생 빈도율	계수한 세포	MN 수
대조구	Control	0.0004±0.0006	9950	4
비교구	핵산(L)	0.0004±0.0001	5220	2
	핵산(M)	0.0002±0.0002	6440	1
	핵산(H)	0.0002±0.0003	4640	1
	Yeast NT(L)	0.0007±0.0004	4290	3
	Yeast NT(M)	0.0004±0.0004	7130	3
	Yeast NT(H)	0.0007±0.0003	4180	3
실험구	β-Glucan(L)	0.0003±0.0002	7220	2
	β-Glucan(M)	0.0004±0.0004	7310	3
	β-Glucan(H)	0.0007±0.0003	6980	5
	효모추출물(L)	0.0008±0.0011	4290	3
	효모추출물(M)	0.0002±0.0003	4220	1
	효모추출물(H)	0.0002±0.0003	5260	1



Table 13. 선발효모에서 분리한 핵심기능성소재의 장단기 섭취에 따른 마우스 혈액이상 (혈액생리학적 지표반응 분석) 조사결과(단위 : mean±SD)(8주차, 13주령)

구분 (8주차,13주령)		MN 발생 빈도율	계수한 세포	MN 수
대조구	Control	0.0006±0.0003	4590	3
비교구	핵산(L)	0.0003	3480	1
	핵산(M)	0.0003±0.0004	3580	1
	핵산(H)	0.0003±0.0004	3130	1
	Yeast NT(L)	0.0011±0.0016	4780	5
	Yeast NT(M)	0.0000±0.0000	3260	0
	Yeast NT(H)	0.0006±0.0001	5520	3
실험구	β-Glucan(L)	0.0000±0.0000	7350	0
	β-Glucan(M)	0.0006±0.0002	4630	3
	β-Glucan(H)	0.0003±0.0003	6720	2
	효모추출물(L)	0.0005±0.0005	6880	3
	효모추출물(M)	0.0002±0.0004	4900	1
	효모추출물(H)	0.0001±0.0002	6080	1

## 9-4. 선발효모에서 분리한 핵심기능성 소재의 장내 미생물 분포변화 조사

### 1. 연구목적

전체 연구개발의 핵심 목표는 유기농 농산물에서 분리하고, 동정 및 유전자 확보가 완료된 효모에서 대량 분리한 기능성 소재별로 최종 동물임상 평가 및 제품화 적용 레시피를 정립하고 정립된 결과를 산업화를 목표로 농축산업을 포함한 낙농 및 유가공 관련 산업에 이익을 제공하고 저 하였다.

현재, 본 연구개발 결과의 제품화와 관련하여 규제기관 및 관련법에 있어, 효모(*S. cerevisiae* 및 *C. utilis*) 및 동일 효모에서 추출된 효모추출물을 제외한 기능성 물질은 동물전임상(안전성 및 유효성) 관련 등에 대하여 신뢰성 있는 평가결과 제출을 요구받고 있다.

따라서, 상술한 표준주를 대상으로 선발효모에서 대량생산된 기능성 소재별 및 농도별 안전성 및 기초효능 평가를 기준으로 동물전임상 및 제품적용성(제빵/제과 레시피 정립) 평가를 위한 기준농도를 설정하고, 농도차이를 부여한 사료를 제조한 후 식약청 권고사항에 따라 성장기 마우스를 대상으로 8주간 섭이에 따른 안전성 및 기초효능 평가를 실시하였다.

본 절에서는 기능성 소재를 장단기간 섭이시, 장내 미생물총의 변화를 살펴보았는데 총 균수 대비 대장균과 유산균의 변화를 살펴봄과 동시에 이들의 변화가 장내 영양원의 체내흡수에 있어 영향을 미치는지(Probiotic효과)를 동시에 확인하고 저 하였다.

### 2. 연구수행방법

#### 가. 실험 설계와 동물사육

본 시험에서는 갓 이유한 3주령의 특정병원체 부재(specific pathogen free)수컷 ICR 마우스(대한바이오링크(주)) 128마리를 실험 조건을 일정하게 하기 위해 10일간 정상 식이로 순화 적응시킨 후 건강한 동물을 3마리씩 5군(대조구 1군, 비교구 2군, 실험구 2군)으로 임의 배치하여 사용하였다.

동물임상평가를 위한 사료 레시피는 AIN-76A를 기본으로 하여 Table 1.과 같이 비교구 2군(5종 핵산혼합, Yeast NT) 및 실험구 2군( $\beta$ -Glucan., 효모추출물)으로 하였고, 각 농도는 1%(L;low), 5%(M;Medium) 및 10%(H;High)로 혼합 조성하였다.

실험식이와 식수는 자유 급여법으로 급여하였다. 실험동물 사육실 환경은 온도  $22 \pm 2^\circ\text{C}$ , 상대습도  $55 \pm 10\%$ 로 유지 하였으며 명암은 12시간 주기(light : 06:00~18:00)로 조절하였다.

#### 나. 시료채취

마우스의 분변은 부검들어가기 전일 30분내에 배설한 변을 채취하여 멸균된 1.5 ml 튜브에 넣고  $4^\circ\text{C}$ 에 보관 하였다.

#### 다. 시료 전처리 및 배양조건

채취한 분변시료를 멸균된 식염수(0.9% NaCl)에 십진 희석 방법을 이용하여 희석하였다. 사용된 배지는 유산균을 확인하기 위해 BCP 한천배지(Eiken), 대장균을 확인하기 위해 MacConkey 한천배지(BD), 총 균수를 확인하기 위해 TSA 한천배지(Tryptic Soy Agar, BD)를 사용하였다. 희석된 시료를 각 배지에 50  $\mu$ l씩 도말하여 평판배양법으로 37°C 24시간(BCP, 48시간 배양) 배양하였다. 배양 후 세포의 수가 30~300개인 플레이트의 세포수를 측정기로 각 균의 세포수를 측정하였다.

#### 라. 미생물 동정

미생물의 동정에는 Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF) Bruker사의 microflex제품을 사용하여 분석하였다.

#### 마. 분변에서의 영양원 분석

채취한 분변 시료를 0.9%생리식염수에 희석 후 원심분리(10000rpm 5분) 후 상층액을 0.25 nm 필터를 이용하여 HPLC(High-Performance Liquid Chromatography) (Agilent 1100; Agilent Technologies)분석시료를 준비하였다.

분석을 위한 Column은 Aminex<sup>®</sup> HPX-87H Ion Exclusion Column(Bio-Rad)을 사용하여 분석하였다.

### 3. 연구수행결과

상업효모 및 선발효모에서 분리한 기능성소재[비교구 2군(5종 핵산혼합, Yeast NT) 및 실험구 2군( $\beta$ -Glucan, 효모추출물)의 농도별(1%, 5% 및 10%) 및 섭이기간(4주 및 8주)에 따라 장내미생물총 변화를 유발하는지를 총 균수(TSA 배지) 대비 대장균수(MacConkey 배지) 및 유산균수(BCP 배지)로 구분하여 호기조건하에서 확인하였다.

본 연구는 기능성 소재의 제과·제빵 적용시 최근 화두가 되고 있는 장내미생물의 변화에 미치는 영향에 대한 평가를 통하여, 장내 정상작용 유발(유산균 증가), 면역증진 및 영양학적 이용성 증진 등에 대하여 영향을 미치는지에 관한 기초연구 결과를 확인하고자 하였으며, 결과는 다음과 같다(Table 14~16., Fig 2~3.).

기능성 소재별 사료내 첨가 및 식이 후 4 및 8주가 경과시, 전체적인 장내 미생물총의 검출패턴을 조사하여 보았더니 전체시험구에서 5종이 대표적으로 검출되었는데, *E. coli*, *S. sciuri*, *S. aureus*, *P. kilonensis*, *E. faecalis*였다.

장내미생물총의 변화를 살펴보기 위하여 사용한 선택배지별(TSA배지: 총균수 검출, MacConkey Agar배지 :대장균 검출, BCP : 유산균 검출)검출결과를 기준으로 유효성을 살펴보았다. 결과로서, *E. coli*의 경우는 MacConkey Agar배지와 TSA배지에서 검출되었는데, 호기성 유산균인 *E. faecalis*경우는 BCP고체배지와 역시 총균수 확인을 위한 TSA에서 동시에 검출되었으며, TSA에서는 5종의 세균이 동시에 검출됨으로서 선택

배지를 이용한 장내미생물총의 변화패턴 검정에 있어 유효성은 인정되었다( $P < 0.05$ ).

기능성 소재류를 장단기 섭이시킨 마우스 장내미생물총의 변화를 목표기간이 경과하면 이들의 분변을 채취하여 Maldi-Toff분석을 통하여 장내미생물총 변화를 확인하여 보았다(Table 14~16.).

결과로서, 기본사료인 AIN-76A만을 섭이시킨 대조구의 경우는 4주가 경과하면 유산균인 *E. faecalis*만이  $0.8 \sim 2.5 \times 10^8$  cfu/g만이 검출되었으나 8주가 경과하면  $7.5 \sim 9.1 \times 10^8$  cfu/g로 증가하면서 안정화 되는 패턴을 보였고, 동시에 대장균의 경우도  $2.6 \times 10^7$  cfu/g 수치로 증가하는 패턴을 보였다. 즉, 마우스의 일령이 9주령인 경우는 유산균이 장내미생물총에서 우점화하였지만, 13주령이 경과되면 유산균을 포함한 전체적인 장내미생물총이 균형을 유지하는 패턴을 보였다.

대조구의 장내미생물총의 변화를 기준으로 전체 기능성소재류에 대하여 장단기 섭이시 장내 미생물총의 변화 패턴을 살펴보았더니, 4주가 경과하면 기본적으로 유산균이 우점화 패턴을 보인 후, 점차적인 시간이 경과하여 8주에 경과하면 유산균의 성장률도 증가하면서 동시에 4주경과시 소량만이 검출되었던 대장균과 일반균도 동시에 증가하는 패턴을 보였는데, 이는 대조구와 비교시 유사한 패턴이었다.

그러나, 기능성 소재류별 및 이들 기능성 소재류의 첨가농도별 장단기 섭이에 따른 장내미생물총의 우점화 관련 미생물총의 성장률은 많은 차이를 보였다. 즉, 기능성 소재류를 4주 섭이시, 대조구를 포함한 전체시험구에서 대장균은 대조구를 포함하여 검출되지 않거나 최대  $1.1 \times 10^6$  cfu/g의 범위에서 검출되는 패턴을 보였다.

일반균의 경우는 *S. sciuri*만이 검출되었는데, 대조구의 경우는 불검출이었음에 비하여 기능성 소재류를 섭이한 경우에는 전체시험구에서  $0.3 \times 10^8$  cfu/g~ $8.4 \times 10^9$  cfu/g의 범위로 검출되었고 기타균은 검출되지 않았다.

그러나, 유산균의 경우는 대장균과는 다른 패턴을 보였는데, 대조구의 경우에는  $0.8 \times 10^8$  cfu/g 검출되었는데 핵산(M)처리구의 경우는  $2.4 \times 10^9$  cfu/g, 비교구 Yeast NT(H)처리구의 경우는  $3.9 \times 10^8$  cfu/g, 시험구인 효모추출물(L)처리구의 경우는  $2.8 \times 10^9$  cfu/g의 검출량을 보였다.

따라서, 대조구 대비 기능성 소재류를 섭이시 4주 경과시는 장내미생물총중 유산균인 *E. faecalis*과 일반균인 *S. sciuri*가 동시에 우점화 패턴을 보였으며 대장균은 미미한 수준을 보이는 경향이였다.

4주 결과를 기준으로 8주경과시 장내 미생물총의 변화를 살펴 보았더니 가장 큰 차이점을 보였던 것은 4주차에서 우점종을 보였던 유산균인 *E. faecalis*은 우점화 패턴을 꾸준히 유지하였으나, 일반균인 *S. sciuri*는 소멸하고 대장균이 우점균 수준으로 성장을 이루고 있었다.

그리고, 8주간 섭이시는 4주의 비교시 장내미생물총중 유산균의 증가율이 가장 높았던 소재는  $\beta$ -Glucan( $1.07 \times 10^{10}$  cfu/g)였으며, 다음으로 대조구( $9.1 \times 10^8$  cfu/g), 핵산( $8.6 \times 10^9$  cfu/g), 효모추출물( $4.9 \times 10^9$  cfu/g) 및 Yeast NT( $6.9 \times 10^9$  cfu/g)순이었지만  $\beta$ -Glucan을 제외한 나머지 소재류의 경우는 유의성은 인정되지 않았으며, 이때 대장균

및 기타균류의 증가패턴도 유사한 경향 이었다.

따라서, 기능성 소재별 및 농도별 섭취에 따른 장내미생물총 우점화 패턴을 조사한 결과에서 기능성소재를 꾸준히 섭취시 Probiotic 효과를 얻을 수 있으며, 이때 단일혼합핵산류는 1일 섭취량은 1~5g,  $\beta$ -Glucan은 0.5g 그리고 효모추출물의 경우는 1g의 경우가 적절하다고 평가되었다.

기능성 소재류 섭취시 장내미생물의 변화패턴(Probiotic패턴)에 따른 분변내 영양원(단백질류, 지방류 및 탄수화물류 등)의 변화를 비교함으로써, 기능성 소재류 기인성 영양이용성을 판단하여 본 결과는 다음과 같다(Fig. 4~5., Table 17.).

기능성 소재류중 장단기 및 농도별 식이차이에 따라 마우스 변내 세균총의 변화와 관련하여 전체적인 균형성에 있어 문제는 없는 것으로 조사되었으며, 섭취기간에 따라 유산균의 우점화 추세가 뚜렷한 경향을 보였는데, 대조 대비 순위를 부여한다면  $\beta$ -Glucan이 가장 우수한 경우였으며, 다음으로 대조구, 핵산처리구, 효모추출물 그리고 Yeast-NT순이었으며, 관련하여 섭취농도와 유산균의 성장과는 비례하지는 않았다.

이상의 기능성 소재류의 섭취시 장내미생물의 변화를 기준으로 영양원의 이용성 분석을 연계하여 실시하였는데 이는 유산균을 기준으로 장내미생물총의 변화와 영양원 이용성과를 연계하여 평가가 필요하여 이를 분석하였으며, 이중 유산균의 우점화가 높았던  $\beta$ -Glucan 및 핵산처리구의 영양원 분석을 나타내었다(Figure 4~5). 그 결과 유산균 우점화가 가장 높았던 중간농도의  $\beta$ -Glucan을 8주간 섭취 했을 때의 그래프 양상을 면적을 통해 나타내면 대조(100% 기준) 대비 76% 수준으로 낮아짐을 확인 할 수 있었다.

핵산을 8주간 섭취시 전체농도에서 유산균의 우점화가 나타났으며 핵산 섭취 마우스의 분변내 영양원 분석을 살펴보면 대조(100% 기준) 대비 저농도 73%, 중간농도 60% 및 고농도 59%로 그래프 양상이 낮아짐을 확인 하였다(Figure 5.). 따라서, 유산균의 우점화에 따라 장내 영양원의 이용이 증가함으로써 상대적으로 분변내 영양원의 양이 낮게 나타났음을 확인 할 수 있었다.

이에, 기능성소재를 기간별 농도별 섭취한 마우스 분변내 영양원의 분석된 그래프의 면적을 수치화 하여 나타내었다.

HPLC분석 결과 전체적으로 20가지 정도의 물질이 검출되었으나 유산균 우점화를 통한 Probiotic 패턴시 크로마토그래프의 양상이 낮아지나, 일부 물질에 대한 그래프의 양상이 기능성소재류별 및 유산균 우점화 양상과도 다르게 나타나는 부분 및 분석시 사용되는 10mM H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>용액으로 인한 크로마토그래프(초기발생 그래프)의 면적(Figure 4의 \*표시)을 제외하고 측정하였다(Table 17.). 결과는 다음과 같다.

대조구의 경우, 분변 내 영양원(단백질류, 지방류 및 탄수화물류, 수용성 단백질류 및 수용성 탄수화물류 별 검출 량 합계 100% 기준)이 골고루 검출되었다.

4주차 비교구의 핵산 섭취시 마우스의 분변내 영양원은 대조 대비 27%~78% 수준이며 8주경과시 59%~73% 수준으로 포함되어 있었다. 실제 핵산류 섭취마우스의 장내 유산균의 우점화가 관찰되었으며, 이에 따라 분변 내 영양원이 감소 한 것으로 보인다. 즉, 장내 영양원의 이용도가 높아 졌음을 확인 할 수 있었다.

상업효모에서 분리한 YeastNT를 4주간 섭취한 마우스의 분변내 영양원의 분포가 농도 구별없이 확인하여 보았더니, 대조 대비 49%~101%였다. 특히, 저농도의 YeastNT의 영양원이 대조 대비 49%로 나타났지만 실제 미생물 분포에서는 일반균(*S. sciuri*)의 우점화가 가장 컸다. 8주 경과시에도 유산균의 우점화는 확인 할 수 없었고, 영양원의 분포도 대조 대비 132%~192%로 관찰되었다.

실험구의  $\beta$ -Glucan의 경우 4주차 유산균의 우점화가 전체 농도에서 나타났으며 이에 따른 HPLC 분석결과 분변내 영양원이 대조 대비 51%~68% 수준으로 낮아 졌으며 특히 유산균 우점화가 높았던 8주차의 중간농도의  $\beta$ -Glucan 섭취 마우스 분변내 영양원은 76%로 나타났다.

효모추출물의 경우 4주차에는 저농도 및 중간농도의 효모추출물 섭이시 유산균 우점화를 관찰하였으며 영양원 분석 결과도 저농도 14% 및 중간농도 72%로 미생물분석 결과와 일치하였으며, 8주 경과시는 저농도의 효모추출물에서만 유산균 우점화가 관찰되었고 영양원 분석 결과 역시 대조 대비 59%로 관찰되었다.

결론적으로, 기능성소재류의 섭이에 따라 유산균이 우점균으로 증가하면, 공통적으로 분변내 영양원은 감소하는 결과를 보였다( $P<0.01$ ).

총 균수와 유산균등도 동시에 활성화 됨으로 인하여, 장내에서 영양분해 및 영양원으로 사용됨에 따라 대조구에서 검출되었던 단백질류 및 지방류 등은 검출되지 않았다. 이는 유산균이 증가되면 단백질류 및 지방류가 대부분 분해 및 체내 흡수 메카니즘으로 인한 것으로 판단되어 결국 효모에서 분리한 기능성소재는 섭이농도 및 기간 등을 적절히 배분하여 활용 시 Probiotic 효과가 뛰어날 것으로 확인되었다( $P<0.01$ ).

Table 14. 기능성소재류별로 농도별 및 장단기 차이를 부여하여 섭이(4주)에 따른 마우스의 장내 미생물총 변화 조사

선택배지별 동정균류 (4주차, 9주령)		검출균수 (cfu/feces 1g)					
		MacConkey (x 10 <sup>6</sup> )	TSA (x 10 <sup>8</sup> )				BCP (x 10 <sup>8</sup> )
			<i>E. coli</i>	<i>S. sciuri</i>	<i>S. aureus</i>	<i>P. kilonensis</i>	
대조구	AIN-76A	0.0	0.0	0.0	0.0	2.5	0.8
비교구	핵산(L)	0.0	71.8	0.0	0.0	1.1	0.0
	핵산(M)	0.7	90.0	0.0	0.0	16.6	24.3
	핵산(H)	0.5	8.3	0.0	0.0	4.7	4.4
	Yeast NT (L)	0.0	83.6	0.0	0.0	0.3	1.4
	Yeast NT (M)	0.0	2.5	0.0	0.0	0.0	0.0
	Yeast NT (H)	0.0	24.3	0.0	0.0	1.9	3.9
실험구	$\beta$ -Glucan (L)	2.2	9.9	0.0	0.0	12.1	24.3
	$\beta$ -Glucan (M)	1.1	9.7	0.0	0.0	141.3	127.0
	$\beta$ -Glucan (H)	0.0	10.2	0.0	0.0	1.7	0.3
	효모추출물 (L)	0.0	32.8	0.0	0.0	21.8	27.9
	효모추출물 (M)	0.0	10.8	0.0	0.0	0.0	0.3
	효모추출물 (H)	0.1	0.3	0.0	0.0	0.0	0.3

Table 15. 기능성소재류별로 농도별 및 장단기 차이를 부여하여 섭이(8주)에 따른 마우스의 장내 미생물총 변화 조사

선택배지별 동정균류 (8주차, 13주령)		검출균수 (cfu/feces 1g)					
		MacConkey (x 10 <sup>6</sup> )	TSA (x 10 <sup>8</sup> )				BCP (x 10 <sup>8</sup> )
			<i>E. coli</i>	<i>S. sciuri</i>	<i>S. aureus</i>	<i>P. kilonensis</i>	
대조구	AIN-76A	25.5	0.0	0.9	0.0	7.5	9.1
비교구	핵산(L)	5.3	0.0	0.0	10.0	69.8	56.5
	핵산(M)	1.2	0.0	0.0	5.0	28.7	36.5
	핵산(H)	20.5	0.0	0.0	2.3	75.7	86.2
	Yeast NT (L)	3.3	1.6	0.0	0.0	0.2	0.0
	Yeast NT (M)	0.0	1.6	0.0	0.0	0.5	0.0
	Yeast NT (H)	18.7	0.0	0.0	3.6	42.6	69.3
실험구	B-Glucan (L)	*NT	NT	NT	NT	NT	NT
	B-Glucan (M)	35.6	0.9	0.0	0.0	66.1	107.2
	B-Glucan (H)	6.2	0.5	0.0	0.0	7.5	10.5
	효모추출물 (L)	3.5	0.2	0.0	0.0	20.7	22.6
	효모추출물 (M)	14.6	11.4	0.0	0.0	35.6	48.8
	효모추출물 (H)	1.1	13.0	0.0	0.0	0.7	1.4

\*NT : Not tested



Table 16. 선발효모에서 분리한 핵심기능성소재의 농도별 기간별(4주, 8주) 섭이에 따른 장내 미생물 총 변화 조사(총균수 100기준)

구분		4주차, 9주령(총균수 100 기준)			8주차, 13주령(총균수 100기준)		
		총균수 (TSA)	유산균수 (BCP)	대장균수 (MacConkey)	총균수 (TSA)	유산균수 (BCP)	대장균수 (MacConkey)
대조구	AIN-76A	100	1.0	0.000	100	108.1	0.303
비교구	핵산(L)	100	0.0	0.000	100	70.9	0.007
	핵산(M)	100	22.8	0.001	100	108.1	0.003
	핵산(H)	100	34.0	0.004	100	110.5	0.026
	Yeast NT (L)	100	1.6	0.000	100	0.0	0.181
	Yeast NT (M)	100	0.0	0.000	100	0.0	0.000
	Yeast NT (H)	100	14.7	0.000	100	149.8	0.040
실험구	B-Glucan (L)	100	110.0	0.010	*NT	NT	NT
	B-Glucan (M)	100	84.1	0.001	100	159.9	0.053
	B-Glucan (H)	100	2.3	0.000	100	131.4	0.078
	효모추출물(L)	100	51.0	0.000	100	107.6	0.017
	효모추출물(M)	100	2.6	0.000	100	103.9	0.031
	효모추출물(H)	100	100.0	0.030	100	10.0	0.008

\* NT : Not tested

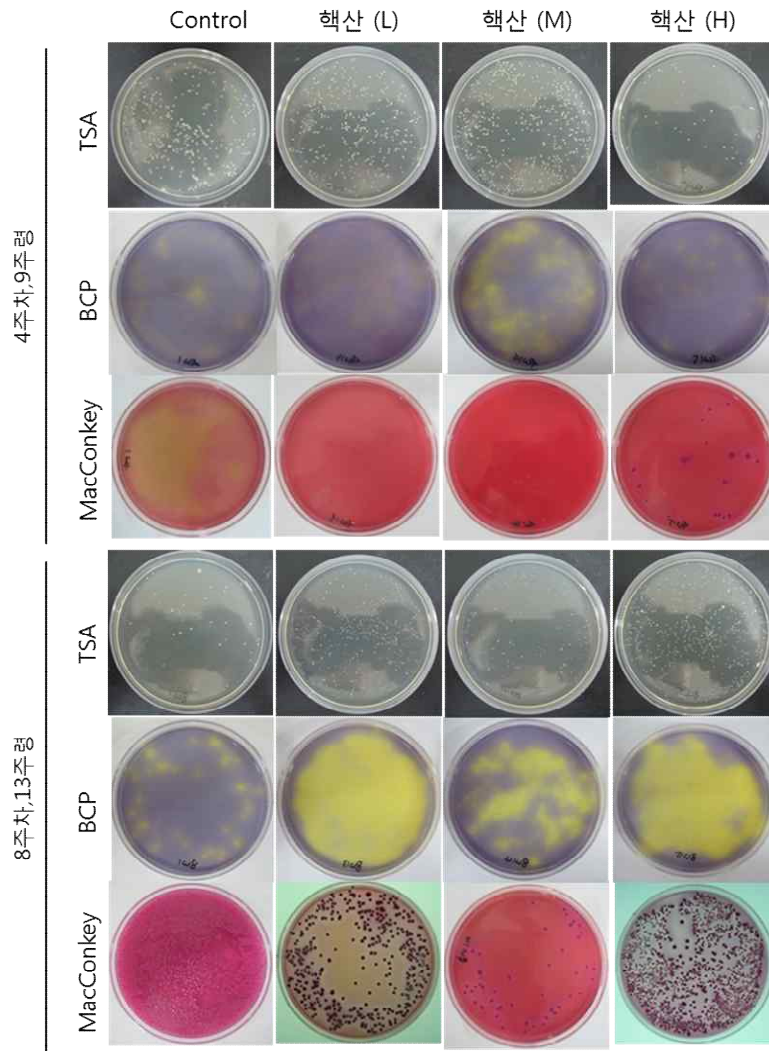
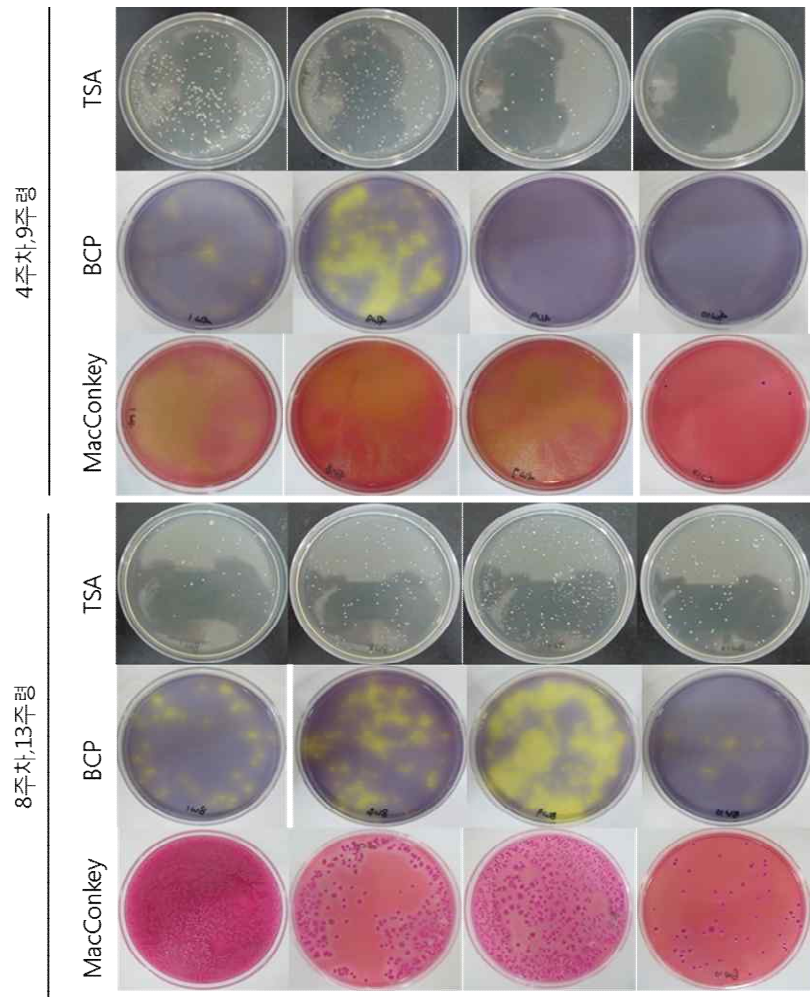


Fig. 2. 마우스를 대상으로 대조구(AIN-76A 식이) 대비 비교구(AIN-76A+5종혼합 핵산 식이) 소재를 농도별 및 장단기(4주, 8주)섭이에 따른 장내 미생물총 변화.

L : 1%, M: 5%, H: 10% 5종(GMP, CMP, UMP AMP 및 IMP) 혼합핵산,  
 TSA: 총균수 확인배지, BCP: 유산균 확인배지, MacConkey: 대장균 확인배지,  
 TSA 및 BCP 희석배수:  $2.5 \times 10^6$ cfu/g, MacConkey 희석배수:  $2.5 \times 10^3$ cfu/g



Control      효모추출물(L)   효모추출물(M)   효모추출물(H)

Fig. 3. 마우스를 대상으로 대조구(AIN-76A 식이) 대비 실험구(AIN-76A+효모추출물 식이) 소재를 농도별 및 장단기(4주, 8주)섭이에 따른 장내 미생물총 변화.

L : 1%, M: 5%, H: 10% 효모추출물, TSA: 총균수 확인배지, BCP: 유산균 확인배지, MacConkey: 대장균 확인배지, TSA 및 BCP 희석배수:  $2.5 \times 10^6$ cfu/g, MacConkey 희석배수 :  $2.5 \times 10^3$ cfu/g

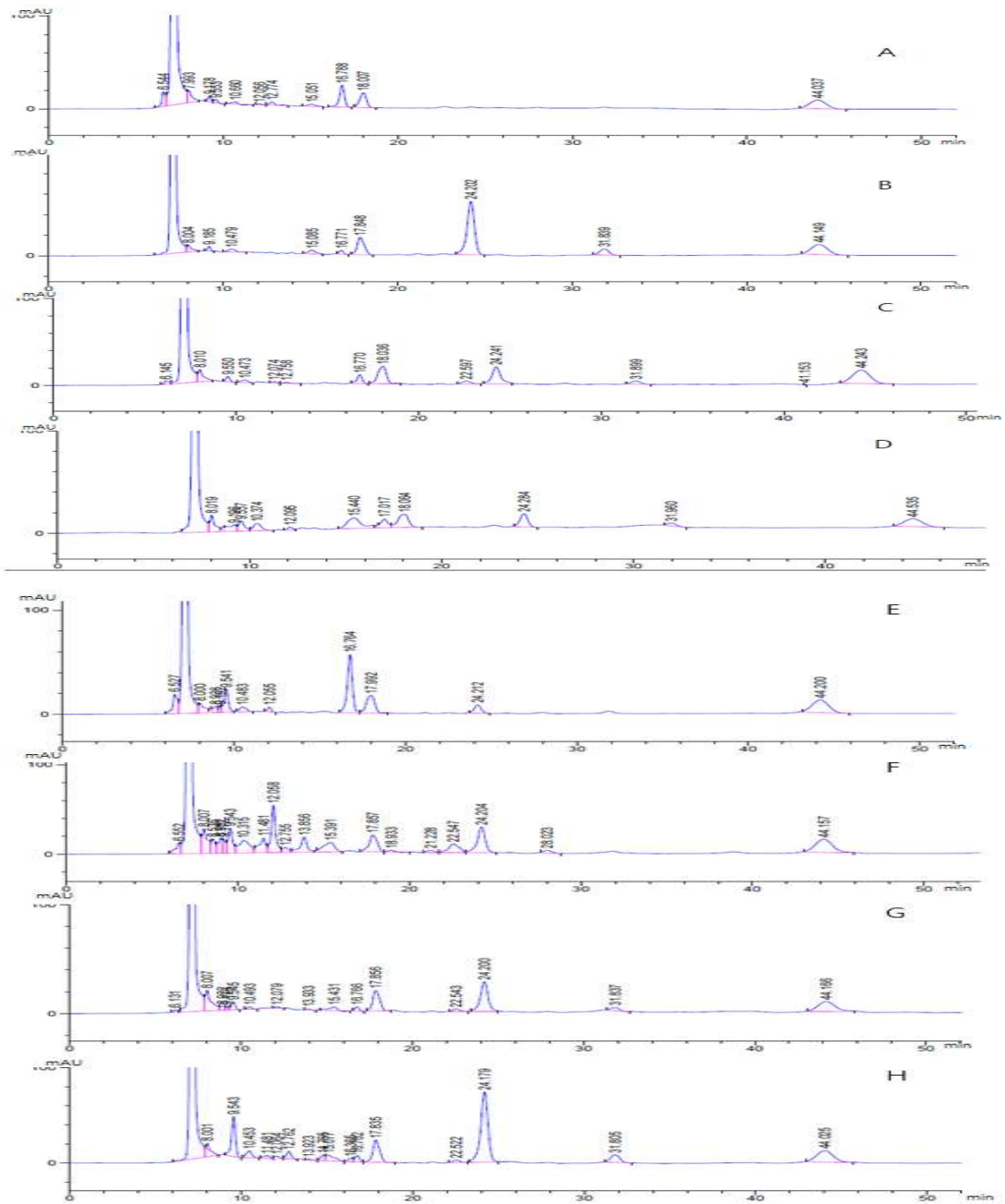


Fig. 4. 마우스를 대상으로 대조구(AIN-76A 식이) 대비  $\beta$ -Glucan을 농도별 및 장단기(4주 및 8주)섭이에 따른 장내 영양원 분포패턴(HPLC) 비교결과

A : 4주간 기본(AIN-76A)식이, B : 4주간 저농도(0.1%)  $\beta$ -Glucan, C : 4주간 중간농도(0.5%)  $\beta$ -Glucan, D : 4주간 고농도(1%)  $\beta$ -Glucan, E : 8주간 기본(AIN-76A)식이, F : 8주간 저농도(0.1%)  $\beta$ -Glucan, G : 8주간 중간농도(0.5%)  $\beta$ -Glucan, H : 8주간 고농도(1%)  $\beta$ -Glucan 섭취구

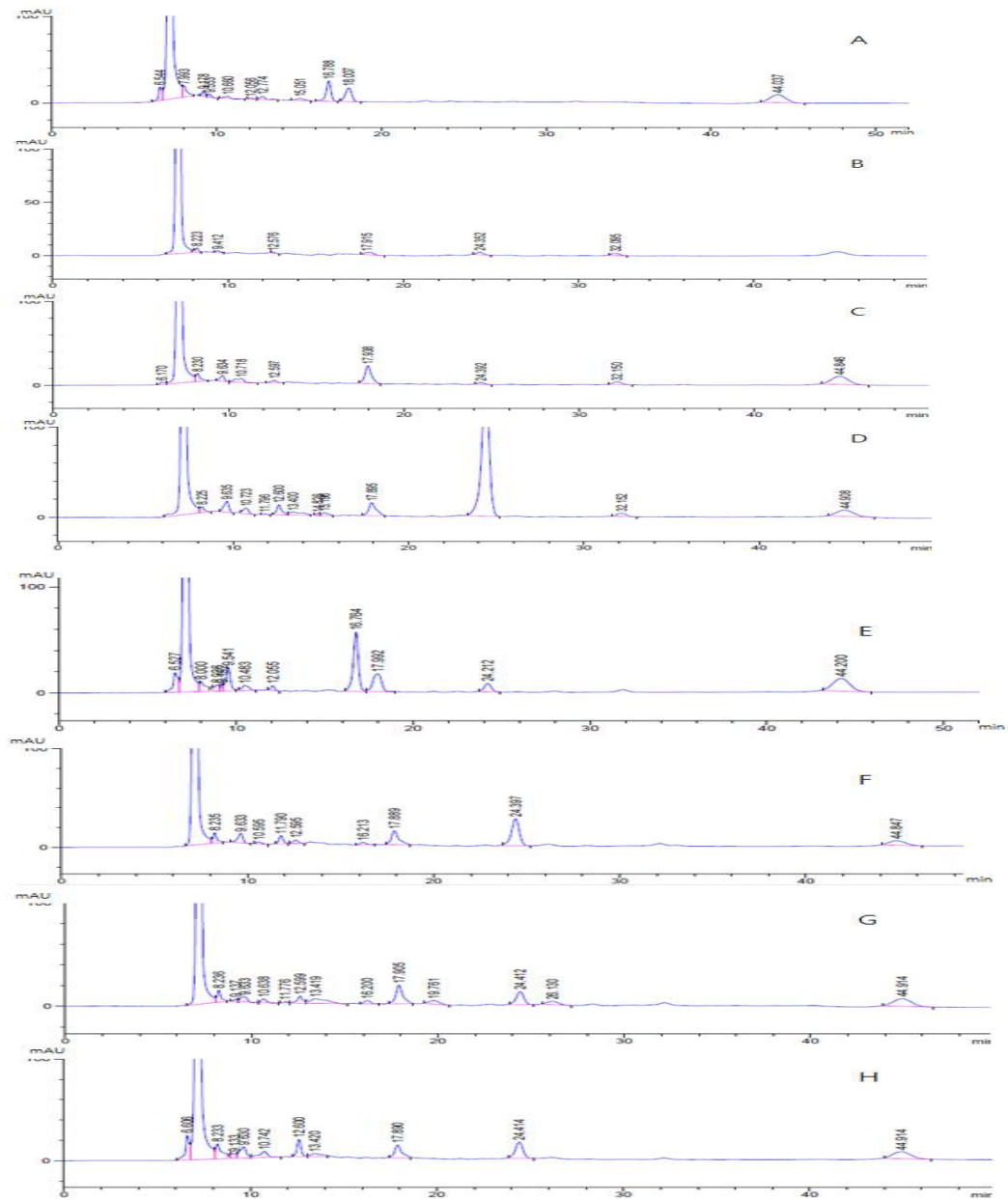


Fig. 5. 마우스를 대상으로 대조구(AIN-76A 식이) 대비 5종혼합핵산을 농도별 및 장단기(4주 및 8주)섭이에 따른 장내 영양원 분포패턴(HPLC) 비교결과  
 A : 4주간 기본(AIN-76A)식이, B : 4주간 저농도(1%)핵산, C : 4주간 중간농도(5%) 핵산, D : 4주간 고농도(10%) 핵산, E : 8주간 기본(AIN-76A)식이, F : 8주간 저농도(1%)핵산, G : 8주간 중간농도(5%) 핵산 및 H : 8주간 고농도(10%) 핵산 섭이구

Table 17. 마우스를 대상으로 대조구(AIN-76A 식이) 대비 기능성소재료를 농도별 및 장단기(4주 및 8주)섭이에 따른 장내 영양원 분포패턴(HPLC) 비교결과

구분(4주차,9주령)		면 적	비율(%)	구분(8주차,13주령)		면 적	비율(%)		
대조구	Control	3,071	100	대조구	Control	3,157	100		
비교구	핵산	L	826	27	비교구	핵산	L	2,304	73
		M	2,010	65			M	1,892	60
		H	2,405	78			H	1,858	59
	YeastNT	L	1,495	49		YeastNT	L	4,161	132
		M	3,057	100			M	9,197	291
		H	3,103	101			H	5,809	184
실험구	$\beta$ -Blucan	L	1,575	51	실험구	$\beta$ -Blucan	L	5,718	181
		M	1,708	56			M	2,399	76
		H	2,090	68			H	4,357	138
	효모추출물	L	424	14		효모추출물	L	1,853	59
		M	2,221	72			M	3,643	115
		H	4,294	140			H	4,976	158

## 9-5. 골조직 및 분변에서 미네랄 분포 조사

### 1. 연구목적

전체 연구개발의 핵심 목표는 유기농 농산물에서 분리하고, 동정 및 유전자 확보가 완료된 효모에서 대량 분리한 기능성 소재별로 최종 동물임상 평가 및 제품화 적용 레시피를 정립하고 정립된 결과를 산업화를 목표로 농축산업을 포함한 낙농 및 유가공 관련 산업에 이익을 제공하고 저 하였다.

현재, 본 연구개발 결과의 제품화와 관련하여 규제기관 및 관련법에 있어, 효모(*S. cerevisiae* 및 *C. utilis*) 및 동일 효모에서 추출된 효모추출물을 제외한 기능성 물질은 동물전임상(안전성 및 유효성) 관련 등에 대하여 신뢰성 있는 평가결과 제출을 요구받고 있다.

따라서, 상술한 표준주를 대상으로 선발효모에서 대량생산된 기능성 소재별 및 농도별 안전성 및 기초효능 평가를 기준으로 동물전임상 및 제품적용성(제빵/제과 레시피 정립) 평가를 위한 기준농도를 설정하고, 농도차이를 부여한 사료를 제조한 후 식약청 권고사항에 따라 성장기 마우스를 대상으로 8주간 섭이에 따른 안전성 및 기초효능 평가를 실시하였다.

그러므로, 실험동물의 기능성소재류에 따른 농도별 기간별로 단계를 구분하고 동물 임상 검정을 기초로 일반식이(AIN-76A) 섭취 마우스 대비 기능성소재류 장단기 섭취시 안전성, 체내 미네랄의 변화를 토대로 기능성소재류에 대한 특징 및 개발 확립 및 실용화(제품화)에 최종 목적을 두었다.

### 2. 연구수행방법

#### 가. 실험 설계와 동물사육

본 시험에서는 갓 이유한 3주령의 특정병원체 부재(specific pathogen free)수컷 ICR 마우스(대한바이오링크(주)) 128마리를 실험 조건을 일정하게 하기 위해 10일간 정상 식이로 순화 적응시킨 후 건강한 동물을 3마리씩 5군(대조구 1군, 비교구 2군, 실험구 2군)으로 임의 배치하여 사용하였다.

동물임상평가를 위한 사료 레시피는 AIN-76A를 기본으로 하여 Table 1.과 같이 비교구 2군(5종 핵산혼합, Yeast NT) 및 실험구 2군( $\beta$ -Glucan,, 효모추출물)으로 하였고, 각 농도는 1%(L;low), 5%(M;Medium) 및 10%(H;High)로 혼합 조성하였다.

실험식이와 식수는 자유 급여법으로 급여하였다. 실험동물 사육실 환경은 온도  $22 \pm 2^\circ\text{C}$ , 상대습도  $55 \pm 10\%$ 로 유지 하였으며 명암은 12시간 주기(light : 06:00~18:00)로 조절하였다.

#### 나. 부검

대조구(AIN-76A 사료식이 마우스), 비교구(핵산, Yeast NT 혼합사료 섭취마우스)

및 실험구( $\beta$ -Glucan., 효모추출물 혼합사료 섭취마우스) 4주, 8주 2차례에 걸쳐 생존한 마우스 3마리씩을 ether로 마취시킨 후 흉부절개를 한 다음 복부대동맥에서 혈액을 채취하여 항응고제 튜브(EDTA 및 헤파린)에 보관하였다. 실험동물의 장기조직(5개 기관: Liver, Kidney, Spleen, Heart 및 Lung)은 혈액 채취 후 즉시 적출하여 PBS(phosphate buffered saline)용액에 1차례 세척 후 생조직의 무게를 측정 후 10% 포르말린용액에 보관하였다. 골조직은 양쪽 대퇴골, 척추골을 적출하였다. 대퇴골은 부착되어 있는 근육, 지방, 인대 등 부착물을 모두 제거한 다음 자연건조( $25 \pm 2^\circ\text{C}$ , 상대습도  $50 \pm 10\%$ )에서 48시간 후 무게를 측정하였다.

#### 다. 시료 전처리

마우스로부터 채취한 시료(간, 신장, 비장, 심장, 폐, 대퇴골, 척추골, 자연건조된 분변)를 전자저울에 무게를 측정한 후 microwave용 테플론 가압분해용기(teflon vessel)에 담아 7ml 질산(동우화인캠(주)), 1 mL 및 과산화수소수(동우화인캠(주))를 첨가 후 시료를 microwave(ETHOS1, MILESTONE)에 장착시켜  $198^\circ\text{C}$ , 1,000 W에서 45분간 용해하였다. 시료가 담긴 teflon vessel을 분리하여 RT(Room temp.)에서 식힌 후 용해된 시료를 50 mL 튜브에 담아 3차 증류수로 부피를 맞춘 후 ICP 분석을 진행하였다.

#### 라. 미네랄 분석

미네랄(Ca, Fe, Zn, Cu, Se, P, S, Mn, Mg) 분석은 유도 결합 플라즈마 분광분석기(Inductively coupled plasma-optical emission spectrometer, ICP-OES)는 PerkinElmer사의 Optima 5300 DV를 사용하였다. 표준체는 Tin Dstandard Solution(Wako Pure Chemical Industries)을 이용하였다.

#### 마. 통계처리

실험결과는 SAS program을 이용하여 통계분석하고(SAS,1999), 실험군 간의 유의성은 ANOVA로 검증한 후 Duncan`s multiple range test로 비교 분석하여(Duncan,1955) 평균치와 표준편차로 나타내고 5% 수준에서 유의성을 표시하였다.

### 3. 연구수행결과

기능성 소재류의 장단기 섭취 후 장내 흡수 및 체내이행과정을 거쳐 최종 장내로 축적되고 배설되는 과정에서 기능성소재류로 인한 미네랄(Ca외 8종)이 체내 기관별 증가 및 감소결과와 분변을 통한 배출되는 경향을 비교함으로써 기능성 소재류의 안전성을 확인하여 보았다. 이에, 기관중 골조직(Femur 및 Vertebra)과 분변과 연계성을 가지고 평가하였다(Table 18~23.).



기능성 소재류의 장단기(4주 및 8주) 섭취 마우스 골조직의 Femur, Vertebra 및 분변에서 다량으로 함유하고 있는 미네럴은 Ca, P, S 및 Mg으로 조직내 95%이상 함유하고 있다. 따라서, 주요 미네럴인 Ca와 3종 중심으로 기능성 소재의 골조직 및 분변내 미네럴 함유량을 중심으로 살펴보았다.

기본식이(AIN-76A)를 4주간 섭취한 대조구의 Femur 미네럴 함유량은 Ca(103,600ppm), P(50,820ppm), Mg(2,338ppm), S(646ppm) 순으로 함유하고 있으며, 8주 섭취시 Ca(110,100ppm), P(54,620ppm), Mg(2,434ppm), S(808ppm)순으로 함유하는 것으로 관찰하였다.

4주(100% 기준) 대비 8주 경과 후 미네럴의 변화는 각각 Ca 106%, P 107%, Mg 104%, S 125% 증가하였다. 이에, 기본식이가 Femur내 미네럴의 큰 변화없이 정상적인 마우스 성장을 하는 것을 관찰하였다.

기본식이를 4주간 섭취한 마우스의 vertebra에서는 미네럴 함유량은 Ca(30,610ppm), P(17,350ppm), S(900ppm) 및 Mg(744ppm) 순으로 함유하고 있으며, 8주 섭취시 Ca(28,890ppm), P(16,160ppm), S(861ppm) 및 Mg(705ppm)순으로 함유하는 것으로 관찰하였으며, 4주 대비 8주 경과 후 미네럴의 변화차이는 유의성이 없었다.

또한, 배변에서의 미네럴 함유량은 Ca(73,750ppm), P(32,060ppm), Mg(4,995ppm), S(4,105ppm) 순으로 함유하고 있으며, 8주 섭취시 Ca(56,190ppm), P(25,150ppm), Mg(4,093ppm), S(3,317ppm)로 4주(100% 기준) 대비 8주 경과 후 미네럴의 함유량은 Ca 76%, P 79%, Mg 82%, S 81% 수준으로 감소하였다.

결과적으로, 대퇴골과 연계되어 봤을 때, 정상적인 마우스 성장시(8주) 골조직내의 주요 Ca와 3종 미네럴을 축적시키고 동일기간의 분변에서는 상대적으로 미네럴 함유량이 낮아지는 것을 확인 할 수 있었다.

기능성 소재류 섭취 마우스의 장단기 농도별 골조직 및 분변내 미네럴 함유량을 살펴 보았으나, 기능성 소재류 중 핵산 및 효모추출물 섭취 마우스의 변화 양상이 뚜렷했으며 이를 중심으로 기술하였다.

4주 경과시 대조(100%기준) 대비 농도 구별없이 핵산 섭취 마우스의 Femur내 주요 미네럴 함유량은 Ca 79%~94%, P 83%~94%, S 66%~133% 및 Mg 86%~98% 범위에서 감소하거나 증가하였다.

8주 경과시 대조(100%기준) 대비 농도 구별없이 핵산 섭취 마우스의 Femur내 주요 미네럴 함유량은 Ca 79%~87%, P 88%~100%, S 108%~119% 및 Mg 83%~95% 범위에서 감소하거나 증가하였다. 이는 4주나 8주 경과시 핵산 섭취마우스의 미네럴 변화 양상과 동일하였으며, 핵산 섭취시(저농도 및 중간농도) 대부분의 미네럴을 킬레이팅

시키는 것으로 판단되어진다.

4주 경과시 대조(100%기준) 대비 농도 구별없이 핵산 섭취 마우스의 vertebra내 주요 미네럴 함유량은 Ca 63%~117%, P 66%~121%, S 86%~186% 및 Mg 74%~134%로 관찰되었으며, 8주 경과시 Ca 95%~115%, P 93%~111%, S 111%~118% 및 Mg 96%~114%으로 전체적인 변화 패턴이 같음을 확인 하였으나 농도간의 유의성은 없었다.

따라서, 핵산 섭취 마우스의 Femur와 분변내의 미네럴 함유량을 연계하여 살펴보았다. 4주 경과시 분변내의 미네럴 함유량은 농도 구별없이 대조(100% 기준) 대비 Ca 88%~113%, P 90%~113%, S 49%~69% 및 Mg 83%~127%로 동일기간 Femur내 미네럴 함유량 Ca(대조 대비 79%~94%) 기준으로 볼 때 분변내 미네럴 함유량이 증가하는 것으로 관찰 하였다. 8주 경과시 분변내의 미네럴 함유량은 대조(100% 기준) 대비 Ca 106%~131%, P 124%~130%, S 68%~91% 및 Mg 114%~133%로 동일기간 Femur내 미네럴 함유량 Ca(대조 대비 79%~87%) 기준으로 볼 때 분변내 미네럴 함유량이 증가된 것을 관찰하였다.

핵산 섭취(저농도 및 중간농도)는 마우스의 대퇴골내 미네럴 감소패턴(다량 미네럴 중 S는 증가패턴)을 보이며, 분변을 통해 배설 함으로써 분변내 미네럴 함량의 증가로 나타나는 것으로 보인다.

4주 경과시 대조(100%기준) 대비 농도 구별없이 효모추출물 섭취 마우스의 Femur내 주요 미네럴 함유량은 Ca 85%~109%, P 88%~114%, S 109%~143% 및 Mg 83%~122% 범위에서 감소하거나 증가하였다.

8주 경과시 대조(100%기준) 대비 농도 구별없이 효모추출물 섭취 마우스의 Femur내 주요 미네럴 함유량은 Ca 67%~95%, P 75%~102%, S 110%~128% 및 Mg 69%~101% 범위에서 감소하거나 증가하였다. 이는 4주나 8주 경과시 효모추출물 섭취 마우스의 미네럴 변화 양상과 동일하였으며, 4주 및 8주간 효모추출물 섭이시 농도가 증가 할수록 미네럴 함량(8주차 Ca 기준 대조 대비 저농도 95%, 중간농도 84% 및 고농도 67%),이 감소하는 것을 관찰하였다.

4주 경과시 대조(100%기준) 대비 농도 구별없이 효모추출물 섭취 마우스의 vertebra내 주요 미네럴 함유량은 Ca 92%~96%, P 92%~102%, S 106%~141% 및 Mg 91%~112%로 관찰되었으며, 8주 경과시 Ca 81%~138%, P 81%~133%, S 111%~122% 및 Mg 80%~138%으로 전체적인 변화 패턴이 Femur와 같음을 확인 하였으나 농도간의 유의성은 없었다.

효모추출물 섭취 마우스의 Femur와 분변내의 미네럴 함유량을 연계하여 살펴보았다.

4주 경과시 분변내의 미네럴 함유량은 농도 구별없이 대조(100% 기준) 대비 Ca

77%~95%, P 79%~133%, S 39%~87% 및 Mg 79%~146%로 동일기간 Femur내 미네랄 함유량 Ca(대조 대비 85%~109%) 기준으로 볼 때 분변내 미네랄 함유량이 증가하는 것으로 관찰 하였다. 8주 경과시 분변내의 미네랄 함유량은 대조(100% 기준) 대비 Ca 98%~156%, P 121%~155%, S 58%~84% 및 Mg 121%~152%로 동일기간 Femur내 미네랄 함유량 Ca(대조 대비 67%~95%) 기준으로 볼 때 분변내 미네랄 함유량이 증가된 것을 관찰하였다.

효모추출물 섭취도 핵산 섭취 마우스와 동일패턴으로 마우스의 대퇴골내 미네랄 감소 패턴을 보이며, 분변을 통해 배설 함으로써 분변내 미네랄 함량의 증가로 나타나는 것으로 보인다.

기능성 소재중 YeastNT 및  $\beta$ -Glucan 섭취마우스의 골조직 및 분변내 미네랄 함유량 변화 패턴은 대조 대비 유의적인 차이가 없었다.

결론으로, 전술 내용에서 핵산 및 효모추출물의 경우 장단기적으로 골조직의 미네랄 증가(S)와 감소패턴(Ca, P 및 Mg)과 분변을 통한 배설량을 비교하여 보면, 체내에 흡수된 이후에 1일이내 대부분이 배설되는 메카니즘에서 기존 기관별 축적된 미네랄과 신규 공급되는 미네랄의 치환반응을 유발하는 효과 있는 것이 아닌가 하고 판단되었다. 이러한 근거로 핵산 및 효모추출물 섭취마우스 Femur내 Ca 기준으로 볼 때 4주(100% 기준)대비 8주차의 Ca 함유량이 10%내외의 차이가 나지 않는 것으로 보아 지속적인 미네랄의 감소를 일으키기 보다는 골조직내 미네랄의 순환 효과가 높은 것으로 판단되어진다.

Table 18. 대조구(AIN-76A섭이 마우스) 대비 기능성소재류 4주간 섭이에 따른 마우스 생체기관별(Femur,생체중량)미네랄 분포조사(ppm)

Femur (4주차, 9주령)	구분	Ca	Fe	Zn	Cu	Se	P	S	Mn	Mg
대조구	AIN-76A	103,600 ±5,563	16.32 ±0.138	65 ±1.2	0.57 ±0.36	25.8 ±6.8	50,820 ±726	646 ±32	0.09 ±0.03	2,338 ±36
비교구	핵산(L)	93,550 ±4,610	26.7 ±0.3	52.5 ±1.1	ND	35.1 ±12.5	45,890 ±1,560	879 ±70	0.06 ±0.01	2,157 ±49
	핵산(M)	82,230 ±3,494	29.1 ±0.4	52.4 ±0.4	ND	29.3 ±13.5	42,560 ±1,134	876 ±35	0.08 ±0.02	2,021 ±70
	핵산(H)	96,950 ±3,733	22.7 ±0.4	57.6 ±1	ND	29.1 ±26.4	47,790 ±136	767 ±53	0.12 ±0.02	2,287 ±13
	Yeast NT(L)	115,200 ±8,134	40.2 ±0.89	69.6 ±2.4	ND	53.4 ±20.6	56,260 ±1,594	730 ±52	0.11 ±0.01	2,559 ±62
	Yeast NT(M)	119,000 ±5,870	32.44 ±0.55	75.8 ±1.4	ND	18.2 ±9.4	60,120 ±658	665 ±48	0.15 ±0.03	2,938 ±40
	Yeast NT(H)	103,800 ±6,297	52.7 ±0.44	61.6 ±1.2	ND	22.3 ±10.3	52,040 ±517	654 ±86	0.06 ±0.02	2,253 ±11.7
실험구	β-Glucan(L)	96,280 ±3,219	10.4 ±0.19	59.5 ±0.9	ND	6.7 ±4.3	49,470 ±1,234	824 ±22	0.1 ±0.02	2,312 ±44
	β-Glucan(M)	104,400 ±4,947	36.9 ±0.56	65.1 ±1	ND	32.5 ±12.9	55,060 ±941	920 ±100	0.12 ±0.03	2,617 ±35
	β-Glucan(H)	88,260 ±5,487	21.7 ±0.5	51.2 ±0.9	ND	21.4 ±10.8	44,910 ±1,537	588 ±77	0.11 ±0.03	2,030 ±57
	효모추출물(L)	113,200 ±4,543	39.2 ±0.7	70.5 ±1	ND	38.8 ±34	57,890 ±1,800	921 ±34	0.13 ±0.02	2,851 ±77
	효모추출물(M)	89,821 ±3,398	15.4 ±0.2	50.8 ±0.1	ND	16.6 ±13	47,490 ±1,154	805 ±67	0.04 ±0.05	2,215 ±49
	효모추출물(H)	87,870 ±4,734	19 ±0.7	51.3 ±1.2	ND	6.2 ±7.4	44,530 ±856	706 ±97	0.02 ±0.02	1,942 ±39

Table 19. 대조구(AIN-76A섭이 마우스) 대비 기능성소재류 4주간 섭이에 따른 마우스 생체기관별(Vertebra, 생체중량) 미네랄 분포조사(ppm)

Vertebra <sup>a</sup> (4주차, 9주령)	구분	Ca	Fe	Zn	Cu	Se	P	S	Mn	Mg
대조구	AIN-76A	30,610 ±1,300	15.4 ±0.1	23.6 ±0.3	ND	4.14 ±6.53	17,350 ±391	900 ±47	0.097 ±0.005	744 ±14
비교구	핵산(L)	24,920 ±1,298	20.6 ±0.4	21.5 ±0.6	0.133 ±0.025	4.73 ±0.67	14,760 ±387	1,091 ±17	0.095 ±0.002	691 ±14
	핵산(M)	35,850 ±1,181	28.8 ±0.2	33.2 ±0.5	0.522 ±0.051	4.19 ±0.86	20,960 ±258	1,676 ±34	0.129 ±0.005	995 ±11
	핵산(H)	19,330 ±1,020	15.9 ±0.3	17.3 ±0.4	ND	5.34 ±3.61	11,450 ±133	773 ±34	0.084 ±0.003	551 ±5
	Yeast NT(L)	30,320 ±1,335	27.1 ±0.5	23.7 ±0.4	ND	6.01 ±2.07	16,620 ±496	1,021 ±9	0.109 ±0.005	764 ±3
	Yeast NT(M)	30,520 ±1,424	23.4 ±0.6	27.1 ±0.6	ND	3.21 ±8.12	17,690 ±371	1,031 ±18	0.117 ±0.004	806 ±10
	Yeast NT(H)	26,350 ±1,101	23.4 ±0.8	22.2 ±0.4	ND	6.38 ±4.13	15,730 ±538	939 ±19	0.089 ±0.002	638 ±21
실험구	β-Glucan(L)	35,580 ±1,062	21.6 ±0.4	25.0 ±0.4	ND	3.04 ±3.31	20,360 ±44	1,035 ±24	0.120 ±0.001	860 ±14
	β-Glucan(M)	28,970 ±1,204	27.1 ±0.5	21.4 ±0.5	ND	6.94 ±4.04	17,260 ±202	1,145 ±25	0.091 ±0.004	712 ±4
	β-Glucan(H)	28,480 ±1,109	19.6 ±0.3	21.6 ±0.5	ND	5.19 ±5.02	16,850 ±328	905 ±18	0.098 ±0.002	683 ±9
	효모추출물(L)	29,710 ±1,387	26.7 ±0.5	25.8 ±0.2	ND	7.61 ±0.84	17,730 ±308	1,265 ±10	0.124 ±0.006	834 ±28
	효모추출물(M)	28,080 ±1,758	19.8 ±0.4	21.8 ±0.4	ND	4.34 ±0.86	16,030 ±300	1,089 ±45	0.091 ±0.002	727 ±11
	효모추출물(H)	29,130 ±1,424	25.2 ±0.6	23.1 ±0.6	0.356 ±0.007	5.31 ±8.12	15,980 ±371	958 ±18	0.122 ±0.004	677 ±10

Table 20. 대조구(AIN-76A섭이 마우스) 대비 기능성소재류 4주간 섭이에 따른 마우스 생체기관별(Feces,건조중량)미네럴 분포조사(ppm)

Feces (4주차, 9주령)	구분	Ca	Fe	Zn	Cu	Se	P	S	Mn	Mg
대조구	AIN-76A	73,750 ±4,320	423 ±4	341 ±3	29.4 ±0.1	ND	32,060 ±814	4,105 ±157	77 ±2	4,995± 131
비교구	핵산(L)	82,930 ±8,744	684 ±8	369 ±16	ND	ND	33,270 ±548	ND	83 ±2.0	6,326± 159
	핵산(M)	65,140 ±3,491	344 ±1	322 ±2	24.6 ±0.3	60.7 ±61.9	28,710 ±226	2,845 ±289	71.2 ±1.6	4,140± 118
	핵산(H)	70,470 ±2,605	360 ±5	324 ±8	27.4 ±0.2	59.3 ±55.4	36,310 ±751	2,003 ±188	78.1 ±1.1	5,385± 59
	Yeast NT(L)	77,670 ±1,901	458 ±3	446 ±2	24.4 ±0.8	12 ±68	36,040 ±388	5,205 ±344	86 ±0	5,885 ±80
	Yeast NT(M)	58,130 ±3,309	305 ±4	297 ±4	34.3 ±0.4	40 ±53	29,280 ±527	2,428 ±241	65 ±1	4,318 ±62
	Yeast NT(H)	77,210 ±2,481	452 ±7	592 ±13	21.1 ±0.2	53 ±62	36,820 ±581	3,375 ±89	84 ±2	6,384 ±93
실험구	β-Glucan(L)	77,200 ±2,873	393 ±3	421 ±4	59.9 ±0.8	52 ±24	33,880 ±145	2,886 ±84	86 ±1	4,687 ±72
	β-Glucan(M)	63,940 ±3,087	314 ±6	314 ±9	32.0 ±0.6	55 ±5	26,270 ±501	2,496 ±50	66 ±1	3,966 ±64
	β-Glucan(H)	71,590 ±3,252	367 ±4	355 ±12	33.9 ±0.5	40 ±12	31,310 ±249	2,980 ±254	76 ±1	4,713 ±55
	효모추출물(L)	56,930 ±2,609	304 ±3	277 ±3	24.1 ±0.6	7 ±34	25,420 ±422	2,207 ±90	60 ±1	3,939 ±34
	효모추출물(M)	70,130 ±2,024	391 ±7	448 ±3	37.8 ±0.3	54 ±33	32,220 ±553	3,581 ±23	81 ±1	4,937 ±62
	효모추출물(H)	67,030 ±2,766	369 ±3	319 ±4	32.7 ±0.2	89 ±63	42,610 ±1,073	1,616 ±55	79 ±1	7,266 ±121

Table 21. 대조구(AIN-76A섭이 마우스) 대비 기능성소재류 8주간 섭이에 따른 마우스 생체기관별(Femur,생체중량)미네랄 분포조사(ppm)

Femur (8주차, 13주령)	구분	Ca	Fe	Zn	Cu	Se	P	S	Mn	Mg
대조구	AIN-76A	110,100 ±3,724	23.5 ±0.3	64.0 ±0.6	N D	24.12 ±9.81	54,620 ±1,807	808 ±69	0.10 ±0.03	2,434 ±68
비교구	핵산(L)	87,150 ±4,104	21.1 ±0.3	48.8 ±0.4	N D	22.09 ±17.94	47,780 ±1,091	871 ±86	0.08 ±0.03	2,018 ±34
	핵산(M)	90,670 ±3,834	40 ±0.7	58.3 ±1.4	N D	14.32 ±8.99	49,510 ±1,579	871 ±87	0.11 ±0.02	2,117 ±67
	핵산(H)	96,12± 4,087	28.9 ±0.8	58.1 ±1.4	N D	9.75 ±26.01	54,400 ±1,356	961 ±34	0.09 ±0.02	2,299 ±57
	Yeast NT(L)	107,100 ±4,571	31.3 ±0.6	60.5 ±1.3	N D	24.06 ±15.70	55,350 ±1,052	883 ±55	0.08 ±0.00	2,481 ±48
	Yeast NT(M)	95,930 ±2,999	66.3 ±0.7	57.6 ±0.4	N D	43.46 ±13.83	47,630 ±1,025	958 ±38	0.02 ±0.02	2,120 ±34
	Yeast NT(H)	103,000 ±4,949	54.1 ±0.4	62.2 ±0.9	N D	29.28 ±25.74	52,790 ±438	1,001 ±34	0.05 ±0.02	2,388 ±3
실험구	β-Glucan(L)	97,410 ±4,642	27.5 ±0.4	57.3 ±1.3	N D	23.23 ±3.89	48,840 ±670	764 ±17	0.07 ±0.02	2,190 ±17
	β-Glucan(M)	104,800 ±4,250	43.8 ±0.5	62.7 ±1.2	N D	37.17 ±8.41	52,860 ±742	950 ±38	ND	2,386 ±29
	β-Glucan(H)	113,700 ±6,396	16.2 ±0.8	64.6 ±2.0	N D	33.82 ±19.26	59,520 ±1,316	793 ±83	0.07 ±0.02	2,687 ±47
	효모추출물(L)	104,400 ±5,023	18.8 ±0.3	63.8 ±0.5	N D	36.60 ±14.02	55,930 ±299	1,035 ±60	0.05 ±0.01	2,468 ±11
	효모추출물(M)	92,820 ±4,751	34.4 ±0.5	53.6 ±1.0	N D	2.34 ±16.63	49,240 ±876	1,039 ±19	0.03 ±0.02	2,203 ±33
	효모추출물(H)	74,010 ±1,094	38.4 ±0.6	48.6 ±0.9	N D	21.60 ±6.33	41,130 ±509	891 ±16	ND	1,679 ±28

Table 22. 대조구(AIN-76A섭이 마우스) 대비 기능성소재류 8주간 섭이에 따른 마우스 생체기관별(Vertebra, 생체중량) 미네랄 분포조사(ppm)

Vertebra (8주차, 13 주령)	구분	Ca	Fe	Zn	Cu	Se	P	S	Mn	Mg
대조구	AIN-76A	28,890 ±1,410	17.4 ±0.2	23.6 ±0.2	ND	5.78 ±5.26	16,160 ±376	861 ±10	0.077± 0.000	705 ±13
비교구	핵산(L)	32,360 ±1,772	22.5 ±0.3	23.6 ±0.5	0.65 ±0.01	4.89 ±2.22	17,260 ±231	1,020 ±24	0.081± 0.004	791 ±10
	핵산(M)	33,200 ±1,939	20.3 ±0.2	23.4 ±0.4	0.52 ±0.02	6.67 ±3.81	17,880 ±451	977 ±22	0.081± 0.002	803 ±22
	핵산(H)	27,450 ±1,757	20.8 ±0.2	20.8 ±0.2	0.64 ±0.02	3.06 ±3.30	14,950 ±494	959 ±9	0.07±0 .004	674 ±19
	Yeast NT(L)	30,030 ±1,687	21.9 ±0.0	23.1 ±0.1	ND	2.96 ±1.42	16,630 ±153	881 ±10	0.087± 0.009	688 ±7
	Yeast NT(M)	34,070 ±2,239	35.9 ±0.2	27.7 ±0.7	ND	9.63 ±6.27	19,090 ±118	937 ±21	0.122± 0.004	828 ±9
	Yeast NT(H)	28,920 ±903	30.9 ±0.2	22.1 ±0.3	ND	7.03 ±7.96	16,590 ±116	903 ±14	0.079± 0.003	726 ±4
실험구	β-Glucan(L)	33,810 ±1,057	22.7 ±0.3	25.8 ±0.6	ND	8.41 ±2.05	19,290 ±94	860 ±29	0.092± 0.006	879 ±4
	β-Glucan(M)	31,050 ±1,469	19.8 ±0.3	25.4 ±0.5	ND	8.08 ±3.58	17,330 ±614	1,049 ±17	0.112± 0.002	774 ±23
	β-Glucan(H)	36,660 ±1,339	25.9 ±0.2	27.7 ±0.4	ND	10.12 ±5.58	20,300 ±440	907 ±12	0.178± 0.008	931 ±8
	효모추출물(L)	39,770 ±2,259	27.1 ±0.2	31.5 ±0.2	ND	6.46 ±2.64	21,510 ±32	1,051 ±30	0.106± 0.002	970 ±7
	효모추출물(M)	23,330 ±1,087	26.1 ±0.3	21.1 ±0.5	1 ±0	7.38 ±2.45	13,100 ±146	957 ±28	0.062± 0.001	566 ±4
	효모추출물(H)	24,760 ±1,092	23.7 ±0.3	21.6 ±0.3	1 ±0	5.55 ±3.52	13,710 ±205	1,027 ±27	0.061± 0.005	595 ±10



Table 23. 대조구(AIN-76A섭이 마우스) 대비 기능성소재류 8주간 섭이에 따른 마우스 생체기관별(Feces,건조중량)미네랄 분포조사(ppm)

Feces (8주차, 13주령)	구분	Ca	Fe	Zn	Cu	Se	P	S	Mn	Mg
대조구	AIN-76A	56,190 ±1,781	246 ±3	265 ±7	35.0 ±0.1	48.5 ±32.6	25,150 ±81	3,317 ±100	58.9 ±0.8	4,093 ±23
비교구	핵산(L)	72,300 ±2,824	315 ±7	311 ±9	45 ±0.5	75.2 ±50.4	31,330 ±670	2,587 ±57	70.9 ±1.3	5,030 ±52
	핵산(M)	73,790 ±3,368	343 ±5	350 ±10	61.3 ±0.9	91.8 ±33.3	32,730 ±443	3,020 ±175	79 ±1	5,452 ±128
	핵산(H)	59,270 ±2,861	266 ±4	255 ±4	37.3 ±0.4	43.3 ±38.7	31,190 ±346	2,264 ±160	59.3 ±0.8	4,644 ±28
	Yeast NT(L)	67,140 ±2,862	313 ±4	329 ±7	40.4 ±0.5	50.1 ±27.2	27,690 ±733	3,571 ±95	67.8 ±1.8	4,940 ±105
	Yeast NT(M)	20,430 ±1,147	101 ±1	170 ±4	28.4 ±0.5	15.5 ±17.1	8,697± 124	4,031 ±332	23.7 ±0.3	2,318 ±18
	Yeast NT(H)	41,290 ±2,106	229 ±2	290 ±6	28.0 ±0.1	28.2 ±46.7	20,020 ±282	2,334 ±45	45.2 ±0.9	3,869 ±68
실험구	β-Glucan(L)	64,300 ±3,393	283 ±1	300 ±2	39.7 ±0.2	25.0 ±8.3	29,590 ±924	4,221 ±79	63.9 ±1.8	4,847 ±122
	β-Glucan(M)	55,530 ±1,609	259 ±8	252 ±2	31.1 ±0.2	59.0 ±31.2	22,740 ±793	2,158 ±74	52.8 ±1.3	3,844 ±114
	β-Glucan(H)	63,400 ±3,043	268 ±2	299 ±8	41.9 ±0.4	18.2 ±21.3	25,890 ±232	3,261 ±195	60.5 ±0.5	4,288 ±31
	효모추출물(L)	87,890 ±2,573	380 ±6	405 ±5	42.7 ±0.5	30.6 ±36.7	39,120 ±235	2,612 ±279	87.9 ±1.9	6,206 ±99
	효모추출물(M)	59,600 ±2,370	260 ±2	259 ±5	28.4 ±0.1	60.8 ±18.5	30,430 ±247	1,924 ±155	58.4 ±0.2	5,415 ±31
	효모추출물(H)	55,210 ±2,866	225 ±5	268 ±6	21.8 ±0.3	64.9 ±69.6	33,770 ±483	2,791 ±243	61.2 ±0.9	4,954 ±116

## 9-6. 핵산섭이에 따른 생식기관(정소)이상조사

### 1. 연구목적

현재, 영유아식품내 혼합핵산류를 첨가(식품첨가물, 식약청)하고 있으며, 목적은 두뇌발달으로 첨가하고 있다.

선발효모내 효모추출물을 기준으로 핵산류 함유량을 조사한 결과, 5종 핵산류(CMP, UMP, GMP, AMP 및 IMP)를 보유하고 있었으며, 이들 각각 및 혼합물에 대한 표준주를 이용한 농도별 사전안전성 및 기초유효성 평가를 실시한 결과, 독성은 없는 것으로 인정되었다.

그러나, 동물전임상 평가중 핵산류 섭취후 2일이 경과시, 성적 난폭성이 나타남에 따라, 표준주의 결과와는 다른 차이를 보일 수 있을 것으로 예측할 수 있었다. 즉, 고환 조직은 수컷의 생식계통으로 정자형성과정과 스테로이드 호르몬을 생성하는 곳임에 따라 정소의 생성장소인 곱슬세정관의 형태는 정자형성과정에서 중요한 변수라고 할 수 있다(Fig. 6~7.).

따라서, 핵산류의 농도별 섭취에 따른 긍정적 혹은 부정적 생체반응결과를 확인하므로써, 이 결과를 기초로 제빵·제과 제품적용성 평가와 관련 제품화 연구방향을 설정코져 하였다.

이를 확인하기 위하여, 기본 AIN-76A기본사료에 농도별로 다르게 첨가 및 조성한 사료를 1주 동안 급여 후 마우스 고환을 적출하여 PBS buffer에서 수세한 후 각 조직의 무게를 정량하고 조직을 10% natural buffered paraformaldehyde(NBP)에 12시간 이상 고정시킨 다음 흐르는 물에 24시간 동안 조직을 세수한 후 automated tissue processing에서 paraffin embedding하여 paraffin block을 만들었다. 그리고, 절편기(microtome)이용하여 두께 5 $\mu$ m의 연속절편을 만들어 slide glass에 부착 후 xylene으로 탈과라핀화 하였다. 그 후 100%, 90%, 80%, 70%, 60% ethanol 순으로 수화(hydration)시키고 hematoxylin으로 각 조직의 핵을 염색한 후 1% HCl로 탈색한 다음 0.3% ammonia water로 중화를 시켰다. 세포질 염색을 위해 eosin Y로 세포질의 대비 염색한 후 60%, 70%, 80%, 90%, 100% ethanol 순으로 탈수과정을 거쳤다. 이어서, 청명과정으로 xylene I 및 II에 담갔다가 canada balsam으로 mounting하여 광학현미경(Olympus CX40, Japan)으로 조직을 관찰하고 사진작업을 수행하였으며, 시편제조 후 각 고환의 변화를 검사하였다.

### 2. 연구수행방법

#### 가. 실험 설계와 동물사육

본 시험에서는 갓 이유한 3주령의 특정병원체 부재(specific pathogen free)수컷 ICR 마우스(대한바이오링크(주)) 128마리를 실험 조건을 일정하게 하기 위해 10일간 정상 식이로 순화 적응시킨 후 이 중 5마리씩 5종혼합핵산을 농도별(L 1%, M 5%, H 10%) 조성한 건강한 동물을 5마리씩 식이하였다.

동물임상평가를 위한 사료 레시피는 AIN-76A를 기본으로 하여 Table 1.에 표기하였다. 실험식이와 식수는 자유 급여법으로 급여하였다. 실험 동물 사육실 환경은 온도

22±2℃, 상대습도 55±10%로 유지 하였으며 명암은 12시간 주기(light : 06:00~18:00)로 조절하였다.

#### 나. 실험식이 조성

대조구로 AIN-76A diet를 기본으로 사용하였고 비교구는 효모 추출물인 Aromild(상품명, 일본 KOHJIN사)의 핵산 함량을 분석(CMP 7.1%, UMP 8.9%, GMP 5.3%, IMP 3%, AMP 0.7%)하여 핵산을 기본식이에 첨가하였다.

AIN-76A diet를 기본으로한 혼합사료의 제조는 대한바이오링크(주)에서 생산하였다.

#### 다. 부검

대조구(AIN-76A 사료식이 마우스), 실험구(5종혼합핵산 섭취마우스)로 설정하였으며, 성적난폭성이 시작(2일째) 하여 진행중인 1주차에 ether로 마취시킨 후 흉부절개를 한 다음 복부대동맥에서 혈액을 채취하여 항응고제 튜브(EDTA 및 헤파린)에 보관하였다. 실험동물의 장기조직(5개 기관: Liver, Kidney, Spleen, Heart, Lung 및 정소)은 혈액 채취 후 즉시 적출하여 PBS(phosphate buffered saline)용액에 1차례 세척 후 생조직의 무게를 측정 후 10% NBP에 보관하였다. 골조직은 양쪽 대퇴골, 척추골을 적출하였다. 대퇴골은 부착되어 있는 근육, 지방, 인대 등 부착물들을 모두 제거한 다음 자연건조(25±2℃, 상대습도 50±10%)에서 48시간 후 무게를 측정하였다.

#### 라. 근조직의 hematoxylin & eosin 염색

조직을 10% NBP에 12시간 이상 고정시킨 다음 흐르는 물에 24시간 동안 조직을 세수 한 후 automated tissue processing에서 paraffin embedding하여 paraffin block을 만들었다. 절편기(microtome)이용하여 두께 5 μm의 연속절편을 만들어 슬라이드글라스에 부착 후 xylene으로 탈파라핀화 하였다. 그리고 100%, 90%, 80%, 70%, 60% ethanol 순으로 수화(hydration)시키고 hemeatoxylin으로 각 조직의 핵을 염색한 후 1% HCl로 탈색한 다음 0.3% ammonia water로 중화를 시켰다. 세포질 염색을 위해 eosin Y로 세포질의 대비 염색한 후 60%, 70%, 80%, 90%, 100% ethanol 순으로 탈수과정을 거쳤다. 청명과정으로 xylene I 및 II에 담갔다가 canada balsam으로 mounting하여 광학현미경(Olympus)으로 조직을 관찰하고 사진작업을 수행한다. 각 조직 손상의 조직학적 검사는 손상 범주에서 세포의 배열상태, 핵 응축 및 necrosis(괴사)를 검사한다.

### 3. 연구결과

고환조직은 수컷의 생식계통으로 정자형성과정과 스테로이드 호르몬을 생성하는 곳이다. 따라서 정소의 생성장소인 곱슬세정관의 형태는 정자형성과정에서 중요한 변수라고 할 수 있다.

기본사료만을 섭취시킨 대조구와 처리구(Low, medium, high dosage)의 고환을 적출

하여 조직학적 검증을 실시하였더니, 대조구의 경우에는 곱슬정세관에서 정자 형성과정과 관계되는 정원세포부터 정자세포까지 모두 관찰되었으나, 실험구의 정세관에서 정자형성과정은 정자방출과정이 우선함으로서 정세관의 내강이 비어있는 것처럼 관찰되었다. 이것은 핵산처리군의 저농도군, 중간농도와 고농도 처리구에서 농도와 관계없이 동일한 결과를 보였다(Fig. 8.)

이러한 결과는 핵산섭이에 따라 정상적인 생식활동보다는 정자방출이 우선함으로서 생식행동의 변화를 초래했을 것으로 판단된다. 이러한 결과를 정밀하게 확인하기 위하여는 추가적으로 시간적인 부분과 관련 호르몬 조사를 병행하면서 성적 관련 호르몬 변화 패턴을 세세하게 조사할 필요성이 대두 되었다



Fig. 6. 마우스 대상으로 대조구(AIN-76A 식이) 대비 비교구(AIN-76A+5종핵산 혼합 식이)섭취(7일)에 따른 마우스 이상조사(공격성향평가,등부위).

Control : 단일 AIN-96A사료섭이구., 5종혼합핵산 : AIN-96A사료내 5종혼합핵산 혼합섭이구.

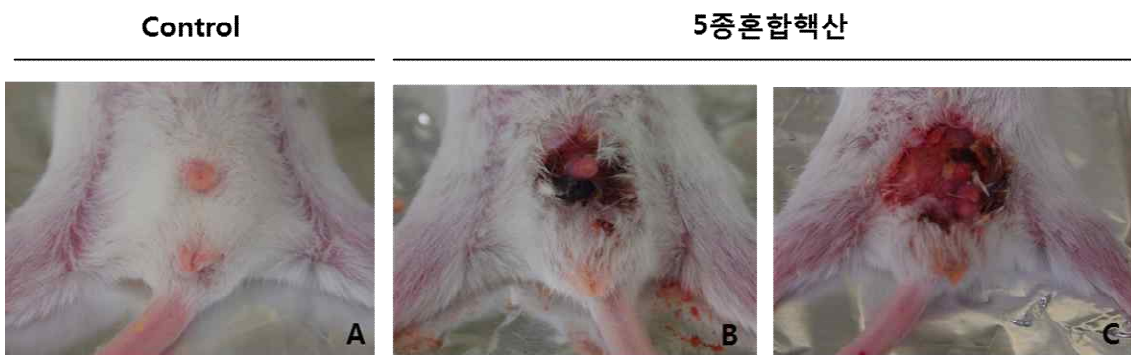


Fig. 7. 마우스 대상으로 대조구(AIN-76A 식이) 대비 비교구(AIN-76A+5종핵산 혼합 식이) 섭취(7일)에 따른 마우스 이상조사(공격성향평가, 생식기관부위).

Control : 단일 AIN-96A사료섭이구., 5종혼합핵산 : AIN-96A사료내 5종혼합핵산 혼합섭이구.

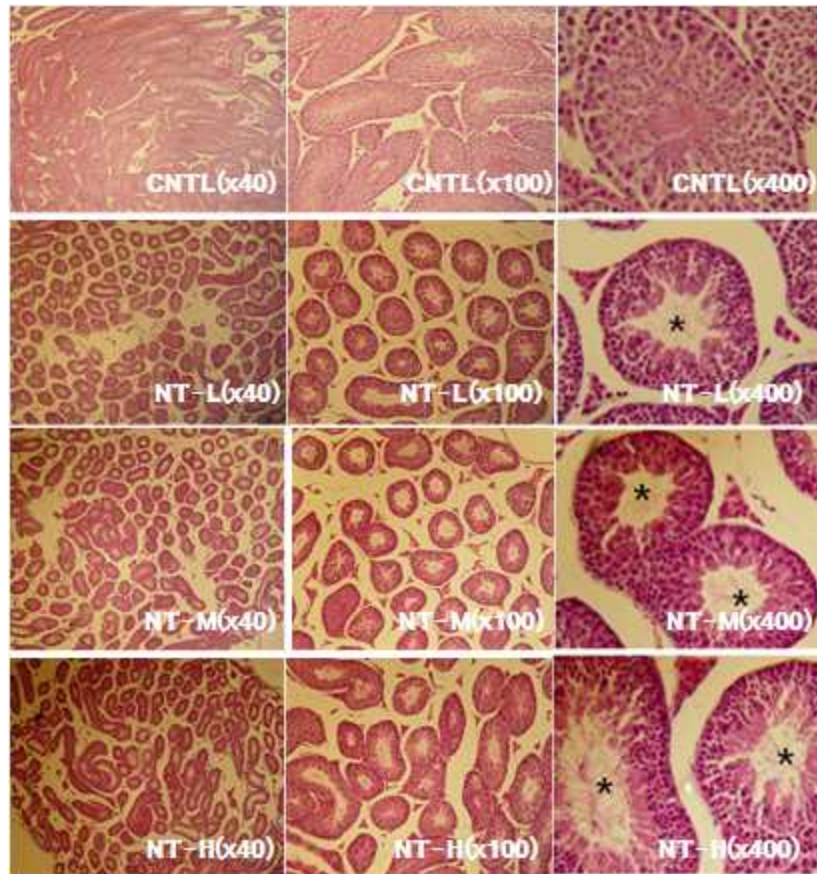


Fig. 8. 효모추출물내 핵산류 함유량 대비 대조 핵산류를 농도별로 섭이(7일)에 따른 마우스 고환내 생식관련 조직변화에 미치는 효과.

CNTL(Control, 대조구) : 단일 AIN-96A사료섭이구., NT : AIN-96A사료내 5종혼합핵산 혼합섭이구., L, M 및 H : 5종 혼합핵산류 저농도, 중농도 및 고농도 사료첨가구., x40, x100 및 x400 : 시료관찰배수

## 제 4 장 목표 달성도 및 관련분야에 기여도

### 제 1 절 목표달성도

본 연구개발의 핵심기술은 제빵 및 제과적용이 가능한 유기농업 현장에서 한국토종 효모자원 발굴과 이를 자원화(유전자 확보)하고 이를 이용하여 상업효모 대체가 가능할 수 있는 대량생산기법 정립 및 대량생산효모로부터 기능성소재를 개발함과 동시에 국내외 소비자 기호성에 충족이 가능한 고품질 천연특화제빵 및 제과용 소재개발이며, 일련의 시스템이 완료 되었다. 이에 대한 핵심 연구 달성도는 다음과 같다.

연구내용	달성도 (%)	연구개발 수행내용
1. 제과·제빵용 한국토종효모자원 선발 및 유전자원 확보	100	<ol style="list-style-type: none"> <li>유기농 현장(64장소)내 140종의 유기농 시료(과일류, 과채류, 채소류, 버섯류 등)내 효모류 및 유산균류 분리 동정(완료)               <ul style="list-style-type: none"> <li>- <i>S.cereviase</i> 효모류 4종, <i>Candida spp</i> 13종, 유산균류는 14종 (<i>Lactococcus spp</i>, <i>Leuconostoc spp</i>, <i>Lactobacillus spp</i>류)</li> </ul> </li> <li>5종 한국토종효모자원 개발 및 유전자원확보(완료)               <ul style="list-style-type: none"> <li>- <i>S.cereviase</i> JKK091006, <i>S.cereviase</i> JKK091002, <i>S.cereviase</i> CKK110426 및 <i>S.cereviase</i> OKK110427, <i>C.utilis</i></li> </ul> </li> <li>선행특허출원(2건, 효모특허수탁포함, 제빵.제과 적용성평가 기준)               <ul style="list-style-type: none"> <li>- <i>S.cerevisiae</i> OKK091006, <i>S.cerevisiae</i> CKK110426</li> <li>- 유전자 자원 확보 및 특허수탁포함</li> </ul> </li> <li>기능성 소재의 이용성관련 특허출원.               <ul style="list-style-type: none"> <li>- 동물안전성 평가 종료후 최종출원완료예정( '12.07.30.예정)</li> </ul> </li> </ol>
2. 논문투고 및 경연대회 참가 (목표 1건)	100	<ol style="list-style-type: none"> <li>논문투고 : 특허등록후 발표예정(지적소유권 보호)               <ul style="list-style-type: none"> <li>- 배포제한요청절차 진행후 특허등록과 동시에 투고예정임</li> </ul> </li> <li>경연대회 출시 및 수상(금상이상) : 1건               <ul style="list-style-type: none"> <li>- 제7회. 전국여성제과기술인 경연대회.최우수상 (노동부장관상, 2010.03.29.)</li> </ul> </li> </ol>
3. 제과용 선발효모 대량배양 및 생산기법 정립	100	<ol style="list-style-type: none"> <li>선발효모류 공동적용 대량생산형기법 정립(완료)               <ul style="list-style-type: none"> <li>가. 대량생산형 배지 및 배양조건 정립</li> <li>나. 저가배지 및 배양조건 정립 : 당밀배지</li> </ul> </li> <li>선발효모 대량배양시스템 정립(완료)               <ul style="list-style-type: none"> <li>가. 효모제형별 생산수율 정립                   <ol style="list-style-type: none"> <li>1) 동결건조분말형(목표 :5%) : 4~5% (w/w)이상</li> <li>2) 압착형 : 16.8~20.8%(수분함유량 : 70~74%, w/w)</li> </ol> </li> <li>나. 장단기 보관성 및 제빵적용성 평가</li> <li>다. 생산시스템 구축계획(스케일별 )정립완료                   <ol style="list-style-type: none"> <li>1) 생산규모 : 1,800톤 /년(건조형 효모기준)</li> <li>2) 규모(3단계) : 5톤, 50톤 및 500톤</li> <li>3) 생산규모별 경제성 평가 완료</li> </ol> </li> </ul> </li> <li>지적재산권 확보(특허출원)               <ul style="list-style-type: none"> <li>- 발명명칭(출원번호):제빵용 효모의 대량생산방법(선행연구) (제10-2011-0029589호. 2011.03.31)</li> </ul> </li> </ol>



연구내용	달성도 (%)	연구개발 수행내용
4. 선발효모내 기능성 소재 대량생산 시스템 정립(4단계, 시제 및 시작품 제조 실시)	100	1. 선발효모(Wild-Type) 공통 생산수율 증대형 배지 및 배양조건 정립(완료) - 상업효모 대비 개발효모 4종 검정(5L-Jar Fermenter) 2. 최종 선발효모의 대량생산시스템 정립(완료) 가. 선발효모( <i>S.cereviase</i> CKK110426) 적용(50L Pilot Test) 나. 개발효모별 기능성 소재 함유량 조사(완료) 3. 선발효모내 기능성 소재(10톤 배양조, 세포벽: $\beta$ -Glucan, 효모추출물) 대량생산시스템 정립(완료) 4. 제과제빵용 및 기능성 소재 개발용 효모 구분선발(완료) 가. 제빵제과용: <i>S.cereviase</i> JKK091006, <i>S.cereviase</i> JKK091002, <i>S.cereviase</i> CKK110426 및 <i>S.cereviase</i> OKK110427 나. 기능성 소재 제조용: <i>S.cereviase</i> JKK091006, <i>S.cereviase</i> JKK091002, <i>S.cereviase</i> CKK110426 및 <i>S.cereviase</i> OKK110427, <i>C.utilis</i>
5. 개발효모 제형화 별 제과·제빵 발효성 필요수조건 정립	100	1. 건조형 개발효모(선행연구, 완료) 가. 적용 레시피: Starter로 적용 나. 기본균수: $1.5 \times 10^{10}$ cfu/g 이상 다. 보관성: 1년(냉장조건 기준) 2. 압착효모 개발효모(선행연구, 완료) 가. 적용 레시피: 제빵제조용 나. 발효율 확보형 효모균수 정립: $1.5 \times 10^{10}$ cfu/g 이상 다. 보관성: 1개월(냉장조건기준) 3. 효모제형별 레시피 정립(선행연구, 완료) 가. 안정성(유화제) 및 적용편리성(부형제) 부여 나. 보관온도(상온 및 냉장) 및 장단기(0일, 30일, 1년)안정성 평가
6. 대량생산 기능성 소재별 물리/이화학적 특성 평가(제품 적용성 사전평가)	100	1. 개발효모별 기능성 소재내 기초영양성분 함유량 조사(완료) - 아미노산 조성 및 기초영양성분(총단백질, 조지방, 탄수화물, 회분 및 미네랄 함유량 차이조사) 2. 효모추출물내 기능성소재 함유량 조사(완료) - 핵산류: UPM, GMP, AMP, CMP 4종 함유(총함유량: 25%) 3. 효모추출물 분자량(FPLC, 대조: 상용 효모추출물) 조사(완료) - 90%이상 분자량 동등성 확보 4. 개발 기능성 소재의 열안전성(고형상 및 액상구분) 평가(완료) 가. 효모추출물: 90℃이상에서 열변성 발생 나. 효모세포벽: 열안전성 확보 다. 핵산류: 70℃이상에서 분자량 변화 발생 5. 효모추출 핵산류(복합핵산류)의 장단기 보관안전(정)성 평가(완료) 가. 상온보관조건에서 시간경과시 분자량 변화 발생 나. 제품보관조건: 고형상 보관 및 액상화시 즉시 사용원칙 준수 6. 효모분리 단일 및 복합핵산류에 대한 미네랄 간섭효과(킬레이팅) 평가 가. 핵산류는 미네랄과 킬레이팅 능력보유(불용성화) 나. 핵산류별 킬레이팅(칼슘) 효과 평가 결과 -AMP(81.5%)>GMP(74%)>IMP(70%)>혼합(3.6%)>CMP(1.2%)순

연구내용	달성도 (%)	연구개발 수행내용
7. 개발 기능성 소재별 제과·제빵 적용성 평가	100	<p>1. 기능성 소재별 제과·제빵 제조 레시피내 첨가농도 정립(완료)  가. (세포벽) <math>\beta</math>-Glucan : 5% 이내  나. 효모추출물 및 핵산류 : 1% 이내</p> <p>2. 기능성 소재 첨가형 제과·제빵 제조레시피 구분 정립(완료)  가. 기본레시피(프랑스빵 기준) : 재료정량[강력분 1,000g+물 600g+압착효모 50g(분말효모 25g)+소금 : 18g+기능성소재(세포벽 : 10g, 효모추출물: 5g, 핵산 1g ]-&gt;반죽제조(최종 전단계)-&gt; 1차 발효(30℃, 수분: 80%, 30분)-&gt;분할( 270g)-&gt; 중간발효(30분, 상온)-&gt;정형(로드형 및 원형) 및 패닝-&gt; 2차발효(30℃, 수분: 80%, 40분)-&gt; 굽기 : 200℃/180℃ (25℃)  나. 제조레시피 구분 정립  1) 단일 기능성소재 첨가형(밀가루 대비) : 0.1%~1%(w/w)  2) 개발효모 및 기능성 소재 동시 첨가형</p> <p>3. 기능성 소재 첨가에 따른 물리/이화학적 특성 평가(완료)  가. 단계별 발효율: 초기, 1차, 중간, 2차 및 굽기후  나. 관능평가(굽기후) : 색상, 식감, 짠맛, 효모취, UMAMI(미원취)</p>
8. 개발효모 제형별 제빵제조 레시피 정립	100	<p>1. 상업효모 대비 개발효모류별 발효특성비교(완료)  - 제빵류 :24종, 제과류 24종 적용후 최종 프랑스빵 선발</p> <p>2. 상업효모 대비 장단기 보관(상온 및 냉장)시 제형별 개발효모(분말형, 압착형)의 발효특성평가  가. 보관일수 : 압착형(30일 이내), 분말형(1년 이내)  나. 적용성 평가 : 제빵제과용(압착효모), 분말형(Starter)</p> <p>3. 제형별(압착형, 분말형) 제빵제조 레시피 구분 정립(완료)  - 기본레시피(프랑스빵 기준) : 재료정량[강력분 1,000g+물 600g+압착효모 50g(분말효모 25g)+소금 : 18g]-&gt;반죽제조(최종 전단계)-&gt; 1차 발효(30℃, 수분: 80%, 30분)-&gt;분할( 270g)-&gt; 중간발효(30분, 상온)-&gt;정형(로드형 및 원형) 및 패닝-&gt; 2차발효(30℃, 수분: 80%, 40분)-&gt; 굽기 : 200℃/180℃ (25℃)</p> <p>4. 상업효모 대비 개발효모 동일 적용레시피 정립(완료)  5. 제형별 제빵제조 관련 물리/이화학/생물학적 메카니즘 구명(완료)</p>
9. 특화성(풍미) 제빵제조 레시피 정립	100	<p>1. 상업효모 대비 개발효모별 발효특성 및 특화성(풍미) 평가(완료)  2. 효모기원성 풍미인자 구명완료(선행연구, 완료)  3. 풍미발현형 제빵제조 레시피 정립(완료)</p>
10. 개발 기능성 소재의 사전안전성 및 동물임상 평가	100	<p>1. 개발기능성 소재 사전안전성 (<i>in vitro</i>)평가(완료)  가. 표준세포주(RAW 264.7 cell)  나. 검증법 정립 : NO, MTT assay  다. 동물검정시 기능성소재 첨가농도 평가 : 0.1%~10%</p> <p>2. 동물임상 평가(완료)  가. 동물검정용 기능성 소재 함유 사료레시피 설정 및 제조  나) 장단기(4주, 8주, 13주) 섭이시 안전성 평가</p> <p>3.장내미생물 우점변화(총균수,대장균구,유산균구 구분)비교조사</p>
11. 사업화	100	<p>1. 사업화 진행 로드맵 설정  가. 1단계 : 지적소유권 확보(특허 출원 및 등록)후 학술발표  나. 2단계 : 관련기관(식약청, 수과원) 기술컨설팅 실시  다. 3단계 : GLP검정(천연물신약 분야 : 천연항균제)  라. 4단계:선발효모 및 기능성소재 대량생산시스템 사업화 로드맵 설정</p> <p>2. 홍보 및 마케팅실시(종료후 3년 소요예상)</p>

## 제 2 절 관련분야의 기여도

본 연구개발의 핵심기술은 제빵 및 제과적용이 가능한 유기농업 현장에서 한국토종 효모자원 발굴과 이를 자원화(유전자 확보)하고 이를 이용하여 상업효모 대체가 가능할 수 있는 대량생산기법 정립 및 대량생산효모로부터 기능성소재를 개발함과 동시에 국내외 소비자 기호성에 충족이 가능한 고품질 천연특화제빵 및 제과용 소재개발이며, 일련의 시스템이 완료 되었다. 연구성과에 대한 관련분야의 기여도는 다음과 같다.

### 1. 기술적 측면

- 가. 다국적 기업 종속형 핵심기술 개발로 제빵·제과산업 및 식품산업 요구성 충족형 효모체제의 대체화 가능으로 국가기술력 증대
- 나. 제빵관련 연구자 들에 대하여 신규효모체제 개발기법 체계화 기여
- 다. 저가 잉여 축산물의 신규 이용성 방향제시 및 수익창출기여
- 라. 효모 개발간 획득 KNOW-HOW의 응용성 및 용도용법 창출에 대한 새로운 지표 제시 기여
- 마. 관련 식품분야, 유가공 및 연구자들에 대한 신규연구개발 방향 제시

### 2. 경제적·산업적 측면

- 가. 과거 단편적 및 제한적 연구개발에서 벗어나 고부가 가치화를 통한 산업체의 수익 창출 및 국제경쟁력 확보
- 나. 잉여 우유소재 및 제빵분야 소요처 창출을 통한 관련 농축산업의 수익증대 기여
- 다. 신규시장 개척을 위한 소재 및 제빵분야 응용제품개발로 관련산업 경쟁력 증대 기여

### 3. 제빵·제과분야 요구성 충족(국내 제빵업계 현황분석 및 요구성)

- 가. 국내외 제빵업계 현황에 대한 요구성 충족에 기여
  - 1) 특화된 제품 개발인력 및 시스템 결여로 인하여 특화성 보유 신제품 개발 불가
  - 2) 특화성 결여로 인한 시장 적응성 및 창출성 결여
    - 전문 Know-How로 품질 불균일화 및 소비자 충족형 제품없음.
    - 수작업으로 인한 일정한 Productivity , Quality 결여
    - 미숙련자, 비기술인 생산 어려움
  - 3) 인건비, 원재료비 상승, 가계운영 어려움
  - 4) 긴급 주문 및 대량주문 신속한 대응 어려움(호텔 등)
- 나. 요구성 충족부분
  - 1) 베이커리 전체시장 매출규모 추정 약 3조원대이고, 새로운 접근법으로 파이를 더욱 키울 수 있을 것으로 기대됨.
  - 2) 양산, 프렌차이즈 연간 10%대 볼륨 증가추세
    - 전문화 정착과 시장변화로 점차 프렌차이즈 볼륨은 감소하나, 전문 윈도우베이커리 시장볼륨은 증가할 것으로 조사되었는데, 이는 결국, 5~10년 이내에 판도변화 예상됨

## 제 5 장 연구개발성과 및 활용계획

### 제 1 절 연구개발성과

#### 1. 연구목표 대비 개발성과

본 연구개발의 핵심기술은 제빵 및 제과적용이 가능한 유기농업 현장에서 한국토종 효모자원 발굴과 이를 자원화(유전자 확보)하고 이를 이용하여 상업효모 대체가 가능할 수 있는 대량생산기법 정립 및 대량생산효모로부터 기능성소재를 개발함과 동시에 국내외 소비자 기호성에 충족이 가능한 고품질 천연특화제빵 및 제과용 소재개발이며, 일련의 시스템이 완료 되었다. 이에 대한 핵심 연구성과는 다음과 같다.

- 가. 상업효모 대체형 한국토종효모자원의 추가개발과 관련 지적소유권은 확보되었다.
- 나. 선발 효모류 및 목표 기능성소재류에 대한 대량생산시스템이 정립되었다.
- 다. 대량생산 효모 및 기능성 소재류에 대한 제과-제빵 생산을 위한 발효기술 및 제품화 적용 기술개발(프랑스빵 기준)이 완료되었다.
- 다. 효모 배양배지 및 효모류에 대한 제빵적용성 및 특화성 평가를 통하여, 일반 및 천연특화성제빵 제조레시피로 상업적 적용부분까지(편리성) 고려되어 정립되었다.
- 라. 상업적 생산 타당성 검토 및 산업화 기초정보를 확보하였다.
- 마. 현재, 대기업의 제빵제과업 진출에 대한 반국민적 정서로 인하여, 자체사업적용에 적용하고 있는 시점에 있다. 따라서, 주관기관은 중소기업 상생의 방법을 모색 중이다.

#### 2. 지적재산권 확보

가. 특허출원부분 : 2건 출원완료

1) 특허출원-1(제10-2012-0089105, 2012.08.14)

- 발명명칭 : 한국 토종 효모 사카로미세스 세레비제 CKK110426 및 그를 이용한 제과 기능성 소재의 제조방법

2) 특허출원- 2(제10-2012-0089106호, 2012.08.14)

- 발명명칭 : 한국 토종 효모 사카로미세스 세레비제 OKK110427 및 그를 이용한 제과 기능성 소재의 제조방법

나. 논문부분 : 특허등록후 발표예정(근거 : 연구협약서)

- 1) 본 연구결과는 국내외적으로 식품관련회사 뿐만 아니라, 관련산업 전반에서 절실히 요구되는 바, 고품질 제품생산과 마케팅에 활용할 것이므로, 특허등록(향후 1년 소요예정) 후 논문발표부분을 제외한 모든 자료는 비밀보존을 원칙으로 할 것임.
- 2) 또한, 절차에 의거 비밀유지요청과정을 실시할 것임.
- 3) 단기 및 장기적 논문 및 특허진행 결과는, 매년 활용보고서 제출 시 보고 할 것임.

다. 국제경연대회 참가(개발기술 적용) : 1건(최우수상)

- 제7회. 전국여성제과기술인경연대회 최우수상(노동부장관상, 2010.03.29.)

다. 추후 지식재산권 확보계획 : 현재 개발결과의 고부가가치 제품화를 위하여, 관련 허가기관(식약청)에 자료를 이첩 예정임. 따라서, 절차협의 결과에 따라 2단계에 준하여 순차적으로 지적재산권(특허 및 논문) 확보와 산업화를 진행할 예정임.

1) 1단계 : 개발효모 제빵·제과적용 신청예정(허가사항 필요없음.)

2) 2단계 : 건강보조식품개발(동물전임상 결과 활용)

3. 경연대회 수상실적 : 1건

- 제 7 회 전국여성제과기술인경연대회.최우수상(노동부장관상, 일시: 2010.03.29.)

4. 과제를 통한 인력양성 및 고용창출 결과

가. 인력고용(현재, 주관기관 연구소 정규직 근무) : 3인(석사급 연구원)

- 근무처 : 매일유업 중앙연구소 김재홍 연구원, 김민호 연구원, 김성진 연구원

나. 인력양성결과 : 해당사항없음

## 제 2 절 연구결과 활용계획

본 연구개발의 핵심기술은 제빵 및 제과적용이 가능한 유기농업 현장에서 한국토종 효모자원 발굴과 이를 자원화(유전자 확보)하고 이를 이용하여 상업효모 대체가 가능할 수 있는 대량생산기법 정립 및 대량생산효모로부터 기능성소재를 개발함과 동시에 국내외 소비자 기호성에 충족이 가능한 고품질 천연특화제빵 및 제과용 소재개발이며, 일련의 시스템이 완료 되었다. 따라서, 연구간 확보된 효모생산 및 제형화 기술의 KNOW-HOW는 다음과 같이 활용할 계획이다.

### 1. 기술개발결과 및 KNOW-HOW 측면

#### 가. 한국토종효모자원 확보

- 1) 한국토종효모 확보와 자원화를 통한 제빵제과 사업화에서 국제 우위성 확보 기대
- 2) 효모균의 탐구 기초기술 확보와 지속적인 유용균 선발에 활용가능
- 3) 종속된 다국적사 효모균에 의한 국내제빵산업 기술발전 저해요인 해소

#### 나. 개발효모류 및 기능성 소재류 대량생산기법 정립

- 1) 친환경 유기농 제빵제과 원료의 국내 조달로서, 관련산업 수익창출 기여
- 2) 국내 효모자원의 대량생산 및 경쟁력 확보를 통한 수입효모 대체과 기대

#### 다. 개발효모류 및 기능성소재류 제형화별 적용레시피 정립

- 1) 기존 제빵제과업체의 제빵제과 기술의 진보에 기여 가능
- 2) 미잉여 유기농농업 현장 유익균의 산업응용성 확대 방안 제시
- 3) 기존 제빵 특화성(풍미 및 식감 등) 신규부여 연구개발법 제시로 국내 제빵산업 특성화 기초 제시

### 2. 특허분석 측면

가. 기존 특허는 상업용 효모만을 사용하여 균일화된 제품생산 분야에 치중되어 있음.

나. 본 연구과제에서는 한국 토종 이미지와 친환경 유기농 원료를 접목하면서 국제기호성에 충족될 수 있는 과학적 분석결과까지 확보되는 청구항목의 신규한 제빵·제과 개발이라는 방향으로 연구를 추진예정임.

다. 이 결과를 토대로 한국토종 효모균(유전자원 특허 수탁 예정)과 특화된 제빵·제과에 대한 일반, 실용신안 및 상표특허 등을 국내 및 국외에 출원할 계획임.

### 3. 논문분석 측면

가. 기존 논문은 상용되는 효모(압착효모)는 사용방법과 생산 기법이 정형화 되어 있음.

나. 현재, 본 연구와 관련하여서 비교하면, 유산균과 시료(맥아당), 숙성중인 제빵내에서의 균들의 동태를 파악하는 분야 등에 연구논문이 발표되고 있음.

다. 본 연구와 관련하여 보면, 신종효모에 대한 개발이라는 측면에서 연구는 진행되고 있지 않으며, 이에 따라 역시 효모균과 관련하여 특화성을 부여하는 연구 역시 진행되는 것은 없는 것으로 현재 파악되고 있는 바, 개발보다는 현상 규명분야에 치중하고 있음.

라. 본 연구과제에서는 신종효모에 대한 개발과 선발 효모균을 적용한 특화성을 부여하

는 제품개발이라는 방향으로 연구를 추진하여 미생물 동정과 제품개발에 관한 논문 등을 미생물학회지, 한국영양학회지 등에 게재할 계획임

#### 4. 제품 및 시장분석 측면

가. 국내 및 국외시장 분석결과 상용되는 효모균과 혹은 유산균 등을 이용한 제빵·제과의 생산 및 판매가 이루어지고 있으나, 현재 쇠퇴기에 접어들었음.

나. 본 연구과제에서는 한국형 토착균을 제빵에 적용하는 방향으로 연구를 추진하여 한국의 독특한 국내외 소비자 기호성에 충족되는 특화성 부여 제품 등을 생산하여 국내 및 국외에 판매할 계획임.

#### 5. 추가연구, 타연구에 활용계획

가. 본 연구개발간 KNOW-HOW로서 유기농업의 시스템 및 효모선발용 과일선발 및 발효기법을 통한 효모분리 동정에서 대량생산 및 제빵적용성에 관한 일련의 메커니즘을 완벽히 파악하였으며 결과 또한 축적된 상태임.

나. 따라서, 연구 KNOW-HOW를 활용한 이중 효모 및 유익균 개발을 연계 진행할 것이며, 역시 확보된 특화제빵 제조 결과를 기초자료로 활용하여 고부가가치화 소재 및 제품화 개발을 진행 할 것임.

#### 6. 교육·지도·홍보 등 기술확산계획

가. 대형 국가연구비를 통한 연구수행 및 개발결과는 사업화에 있어 주요한 판매전략 지침자료로 재편성할 것임.

나. 사업화를 위한 허가기관의 검증절차가 완료되면, 국내외적 관련 식품산업분야 기술을 선도함과 동시에 농축산업의 수익창출에 기여토록 할 것임.

#### 7. 실용화·산업화 활용계획(기술실시등)

가. 현재 주관기관(매일유업(주))은 국내대표적인 유업체로서 연구개발결과의 실용화 및 산업화를 위해 필요한 기초원료 및 개발기술을 적용할 수 있는 기반시설 및 인력 등의 인프라를 완벽히 구비하고 있어 별도의 투자가 필요 없음.

나. 개발결과의 실용화는 관련산업체중 1곳(매일유업 아산공장, 주사업분야 : 제빵제조 및 유청분말 제조)를 선정하고, 기술이전 및 실용화를 실시할 예정임. 이유로서, 현재 맥도날드사와 공동사업을 위한 저가의 햄버거 제품만을 생산하고 이를 납품하고 있으나, 기술이전 실시를 통하여 고부가가치화 특화 제빵·제과사업을 시작토록 건의할 것임.

#### 8. 제품화 활용계획(수익성 창출)

관련산업에 전파를 위하여, 다음과 같은 제품군을 준비하고 동시에 관련기술을 자료화 하여 사업화에 적극 활용할 것임.

가. 완제품 공급형 : 프리믹스 TYPE(개발 레시피) : 개발효모 40g+밀가루 1,000g+ 버터 100~150g+설탕 100~150g+소금 18~20g+생크림 30~50g+우유 1Kg+탈지분유 200g+ 기능성 소재 10g

나. 원부자재별 공급형 : 개발효모(Kg, 압착 혹은 분말형), 기능성 소재류, 우유, 탈지분유, 가공버터, 생크림, 유기농밀가루

다. 대상: 초기(주관관리 제과제빵업체, 5,000업소 대상)→후기(국내산업체로 확대)

## 제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

### 1. 국내외 관련분야 환경변화

#### 가. 국외 제품생산 및 시장 현황

1) 일본 : JT(생지 제조)사 등 유명 베이커리방문 및 박람회(2009 IFIA)참관

가) 기존의 일반 기능성 소재(키토산, 카로티노이드, 베타글루칸 등)적용 제품화 단계에서 벗어나지 못하고 있음

나) 저칼로리 및 저감미도 등의 원료소재 적용으로 건강기능성(항산화, 고지혈 등) 제품컨셉에 치중하고 있음

2) 유럽 : 프랑스, 스위스, 독일내 총 25개업소 방문 및 박람회(2010 유로빵)참관

가) 제품 및 원료의 세분화로 다양한 제품컨셉 사용되고 있으며, 한정된 유기농 인증원료를 활용하고 있으며, 빵은 샌드위치, 구움 과자류등과 매치시켜 시너지 효과 극대화하고 있음

나) 주력품목을 기본으로, 제품의 다양화로 소비층의 구매력을 끌어들이는 전략을 구사

#### 나. 국내 제과·제빵분야 시장 현황 : 약 4조원

1)현재, 대기업의 제빵제과업 진출에 대한 반국민적 정서로 인하여, 개발기술을 자체사업적용에 적용하고 있는 시점에 있다. 따라서, 주관기관은 중소기업 상생의 방법을 모색중임.

2) 국내 제과·제빵 업계의 현황분석[근거 : 국내 유명 햄버거 및 샌드위치 전문점(6개업소)]

가) 제품컨셉이나 인테리어 판매방식의 차이외에 제품의 특화성은 결여되어 있으며, 일반효모의 이용으로 특화시키기에는 한계성이 있어 보임

나) 내용물은 햄버거패티, 햄, 치즈 등 다양한 재료를 사용하고 있으나, 소스와 빵의 조화가 맞지 않아 고급원료를 사용함에도 좋은 맛과 제품특화성 컨셉에는 미흡함.

3)국내 제과·제빵업계 및 건기식 분야의 시장성 평가

가)국내 베이커리 시장 M/S(2006~2008년기준) : 4조원 이상 추정

나) 국내제과시장(1,100억), 제빵시장(2,750억)이상임을 감안(매출액, 22,550업체 기준)하고, 개발 기능성 소재의 신규시장(수입대체효과)은 171억 이상으로 판단되었음.

#### 다. 국내 제과·제빵업계 및 건기식 분야의 시장성 평가

1)국내 베이커리 시장 M/S(2006~2008년기준) : 4조원 이상 추정

2)국내제과시장(1,100억), 제빵시장(2,750억)이상임을 감안(매출액, 22,550업체 기준)하고, 개발 기능성 소재의 신규시장(수입대체효과)은 171억 이상으로 판단되었음(표 1)



라. 개발대상 유래 기능성 소재 제품시장 조사

- 1) 세포벽(글루코만난): 현재 소비자가는 Kg당 1,250,000원을 형성하고 있으며, 국내외적으로 대표적인 회사는 일본의 오리엔탈사였음(표 2).
- 2) 효모추출물 : 제품은 핵산을 제거한 경우(55,000원/Kg)와 제거하지 않은 경우(60,000원/Kg)로 대별되어 제품화 되어 있으며, 선두적 연구개발 그룹은 KOHJIN사(일본)였음(표 2).

표 1. 국내 제과.제빵업 분야 시장성 평가 .

분 류	업 체	업체수	매출액(단위:억)		
			제빵	제과	전체매출
양산베이커리	삼립, 사니, 기린등	편의점, 마트 등 10,000곳 이상	약 300	약 200	약 500
프랜차이즈	파리바게트, 뚜레쥬르, 크라운, 신라명과 등	약 4,200여 업소	약 1,050	약 450	약 1,500
원도우베이커리	김영모, 나폴레옹 등	약 7,000여 업소	약 1,125	약 375	약 1,500
할인매장	이마트, 롯데마트 등	약 300-400여 업체	200-300	100	300-400
호텔,뷔페 등	위커텔, 인터콘티넨탈 등	100여 업체이상	-	-	추산불가
기 타	외식업체, 제과업체 (롯데, 크라운등), OEM	약 1,000곳 이상	-	-	추산불가
합 계	-	약 22,550업체	2,750이상	1,100이상	3,850이상
비 고	<ul style="list-style-type: none"> <li>▪ 호텔, 외식업체 등은 식사 및 디저트로 제공되어 때문에 판매액으로 환산 어려움</li> <li>▪ 이 외에도 각 지역 곳곳의 OEM 등으로 생산하는 업체는 조사불가</li> <li>▪ 추정 불가시장을 포함하면 약 5조원을 상회할 것으로 보임(수입제품 등)</li> </ul>				

표 2. 개발 기능성 소재의 신규시장(수입대체효과) 런칭분석결과.

생산회사(국가)	생산제품별 단가(원/Kg)		비고
	세포벽(글루코만난)	추출물(아미노산, 핵산, 비타민, 미네랄 등)	
오리엔탈사(일본)	1,250,000	-	소비자가
KOHJIN사(일본)	-	55,000	소비자가(핵산제거)
	-	60,000	소비자가(핵산포함)
자사(매일유업) <sub>1</sub>	38,000	21,000	생산단가
생산예정량(톤/년) <sub>2</sub>	<b>53.2억원(140톤)</b>	<b>117.6억원(560톤)</b>	생산단가
비고	-산출근거 1. 자사(매일유업) : 30L 효모분말제조 생산기준(목표수율 : 세포벽소재 20%, 추출물소재 80%) - 71,000원(재료비)+1,416,000원(인건비등 제조경비)+446,000원(간접비)=1,933,000원 2. 생산예정량(7,000톤/년 생산화보기준)		

표 3. 국내 베이커리 품목별 출하액 변동현황(근거 : '08기준. 식품안전정책과, 식약청)

\*는 2008년도 신규코드임(출하액:천원, 점유율·신장율:%)

품목명	2005년			2006년			2007년			2008년		
	출하액	점유율	신장율	출하액	점유율	신장율	출하액	점유율	신장율	출하액	점유율	신장율
빵류(식빵)	631,702,563	42.98	4.51	640,139,557	41.25	1.34	171,449,957	9.38	20.69	166,807,652	8.63	-2.71
*빵류(카스텔라)							32,923,423	1.70		10.15		
*빵류(핫도그)							7,811,597	0.40				
*빵류(기타)							621,461,272	32.16				
빵류(케이크)	384,322,735	26.15	24.78	463,058,314	29.84	20.49	502,522,963	27.51	8.52	527,469,337	27.30	4.96
빵류(도넛)	74,531,910	5.07	19.93	82,994,466	5.35	11.35	94,006,670	5.15	13.27	81,680,556	4.23	-13.11
빵류(피자)	217,790,004	14.82	50.69	168,792,799	10.88	-22.50	4,310,533	0.24	43.11	18,461,238	0.96	328.28
빵류(파이)							7,848,421	0.43		11,029,427	0.57	40.53
만두류							229,408,479	12.56		200,338,843	10.37	-12.67
떡류	161,294,529	10.98	12.32	196,722,981	12.68	21.97	216,205,645	11.83	9.90	264,135,527	13.67	22.17
총계	1,469,641,741	100.00	16.39	1,551,708,117	100.00	5.58	1,826,908,176	100.00	17.74	1,932,118,872	100.00	5.76

- 제빵·제과 품목은 성장추세를 보이고 있으며, 기본 제빵(식빵)품목은 기존상업효모 유래의 한계성으로 인한 특화성의 결여로 하락세를 보이는 것으로 판단됨.(특화성확보필요)

표 4. 국내 건기식품 생산현황('05~'08, 근거 : '08기준. 식품안전정책과, 식약청)

구 분	총 생산액 (억원)	내수용(억원, 톤)		수출용	
		생산액 (효모관련)	생산량	생산액(억원)	생산량(톤)
2005	6,856	6,433(196)	11,844	423	1,128
2006	7,008	6,637(184)	10,933	371	667
2007	7,235	6,888(146)	10,239	346	339
2008	8,030 <sup>1)</sup>	7,516(179)	12,990	514 <sup>1)</sup>	697
'08/'07(%)	△11.0	△9.1(△23)	△26.9	△48.6	△105.7
비 고	<sup>1)</sup> 1\$ = 1,310(2008)				

- 건기식의 생산량은 점차 증가추세를 보이고 있으나, 효모관련 품목은 07년대비 23%가 증가했지만, 평균적으로 총생산량 대비 2%의 평균점유율(정체)를 보이며, 소비자 기호성(건강기능요 구성)에 충족시 그 성장률은 기대할 수 있음.

#### 마. 국내 제품생산 및 시장현황

- 1) 본 과제와 관련하여 유기농 토종효모자원 유래 개발소재의 제과제품화는 적용사례가 없는 데, 이는 소재개발 및 산업화에 있어서, 기본 대량생산 시스템 및 판매망의 구축이 필요하기 때문에 영세 제조업체가 이를 산업화 하기에는 장단기적으로 곤란하기 때문임.
- 2) 주관기관은 현재 효모자원의 7,000톤/년의 생산력을 확보 및 제빵업체인 부첼라(주)를 인수완료 하였으며, 사업화시 보유 영업판매망 적극활용할 예정임.[제조사(주관) → 기존 구축 대리점 전국 50 특판대리점 → 기존관리 전국제빵제과업소 5,000사보유]
- 3) 현재 본 과제 관련하여 효모유래 기능성 소재별 판매가격은 글루코만난(효모세포벽 소재)는 1,250,000원/Kg(일본 오리엔탈사, *Saccharomyces cereviase*), 효모추출물(*Candida utilis*, 핵산 포함) 경우는 60,000원/kg(일본, KOHJIN사), 효모추출물(핵산 제거제품)은 55,000원/kg으로 고가였음.
- 4) 소재별 최종 제제의 예정가격(원료비+가공+마진포함)은 글루코만난 600,000원/kg, 효모추출물 핵산포함 30,000원/kg, 핵산제거 20,000원/kg으로 책정할 예정임.
- 5) 기능성 소재 활용방안에 따른 제과제품화는 ‘프랑스빵’ 레시피를 적용할 예정임. 레시피 적용시 1~2%사용으로 추출물 소재(핵산포함제품)의 경우 150~300원의 추가비용이 소요되는데, 이는 기존 제품 대비 기능성 소재 적용함에 있어서의 가격경쟁력이 뛰어남.
- 6) 따라서 본 과제는 점차적으로 증가하는 제과제빵 및 건강기능식품 시장을 선도할 수 있음을 시사함.

## 2. 개발기술의 산업화 방향 및 기대효과

### 1) 산업화 방향

- 가) 자사 베이커리 시장 본격진출시, 주력품목을 설정하고 지역컨셉에 맞는 제품을 적용시켜 지역과 소비층이 원하는 제품군을 제공해야 할 것으로 판단

- 나) 유럽, 일본 등 선진 트렌드로 천연, 기능성, 유기농 제품을 구축 및 이를 적용시켜 건강과 식품안정을 동시에 충족시킬 수 있는 방향으로 구축해야 할 것으로 판단
- 다) 자사 베이커리 사업시 차별화 전략으로는, 천연효모와 기능성 소재를 바탕으로 저배합과 씨리얼을 넣은 제품을 Base로 차별화 해야 할것으로 사료됨
- 라) 기본에 특화 샌드위치, 브리오쉬, 마카롱, 푸딩, 마들렌 등의 제품 컨셉으로 방향성을 모색 해야 할 것으로 사료됨
- 마) 시장 점유우위를 위한 제과·제빵의 핵심은 특화성(기능성) 보유 천연효모의 개발로 풍미 및 식감을 높이며, 이의 상용화에 집중하여야 함
- 바) 브랜드 파워를 구축하기 위해서는 기존과는 차별화된 전략으로 제품을 생산하고, 특화된 원료를 사용하는 것이 핵심성공요인으로 판단됨

2) 기대효과

- 가) 국제경쟁력 있는 한국도종효모자원 대량생산(과제연계)에 따른 잉여효모의 추가 소모 방안 (수익성 극대화) 구축
- 나) 국내 “천연효모 기원성 기능성소재 제과제품화” 를 통한 제과업계 선도적 위치 점유 효과 기대
- 다) 국제적으로 상용되는 효모유래 소재의 가격대비 경제성 확보
- 라) 기능성 제과제품 개발로 기존 제품과의 차별화 함으로서 소비자 요구성 충족
- 마) 기능성 소재의 자사 제품 적용을 통한 품질향상(매출신장)기대

3) 산업화를 통한 기대효과

(단위 : 백만원)

항 목 \ 산업화 기준	1차년도	2차년도	3차년도	4차년도	5차년도	계
직접 경제효과	-	0	3,570	8,925	17,850	30,345
경제적 파급효과	-	0	5,520	14,610	37,387	57,517
부가가치 창출액	-	0	1,428	3,570	7,140	12,138
합 계	0	0	10,518	26,655	62,377	<b>100,000</b>

- 산출근거(완제품 공급형 적용)

$$: 10,200\text{원(완제품 500g, 1업소 1일판매기준)} \times 350\text{일 조업/1업소} \times 5,000\text{업소(현재관리업소)} = 17,850\text{백만원}$$

3. 3P(특허,논문,제품)분석을 통한 연구추진계획

가. 분석결과 향후 연구계획

1) 특허분석 측면

- 가) 기존 특허는 효모유래 기능성 소재의 제조 혹은 이용성에 기준을 두고 개발된 측면이 강하고, 이를 혼합하는 조성물분야에 치중하고 있음.
- 나) 본 연구과제에서는 한국토종천연효모자원을 확보 및 발굴함으로써 이를 이용한 다양한 기능성 소재를 개발하여, 임상동물시험을 통해 안전성을 확보함에 따라 이를 제과제품 사업화로 완료함.
- 다) 또한, 국제 경쟁력 있는 한국토종천연효모자원(유전자원확보포함) 유래 기능성 소재의 개발로 기능성·고품질·고영양성 제과제품제조에 적용하는 연구를 추진하여 국내 및 특허 등을 국내 및 국외에 출원할 계획임

2) 논문분석 측면 : 기존 논문은 단순히 효모 유래 기능성 소재들의 효과를 규명하여 이들에 대한 단일 효과를 탐구하는 임상분야 및 미생물 기능성을 활용하기 위한 균주개발(돌연변이주)에 치중되어있음. 본 연구과제에서는 기능성 소재에 대한 임상동물실험을 기본으로 확보 및 발굴을 통한 한국토종천연효모 유래 소재의 개발기법의 정립과 이들의 안정성 및 다기능성 등을 종합하여 효과적인 방향으로 연구를 추진함으로써 식품영양 및 식품공학 분야의 학술지 등에 게재할 계획임.

3) 제품 및 시장분석 측면

- 가) 국내 및 국외시장은 과제관련 효모의 미이용성 및 이의 개발 중요성은 충분히 인식하고 있으나, 현재 국내외적으로 체계화된 연구가 부족한 실정이며,
- 나) 단순히 자가배양(비정형화 효모제조) 및 제품의 적용을 위한 생산과 소비 패턴을 보이며, 이는 인해 기존상용효모유래 제과·제빵시장은 증가하고 있는 반면 질적인 측면보다는 소비자의 기호성(풍미위주)에 맞는 충실하고 있음
- 다) 따라서, 본 연구과제에서는 이들의 문제점(단점)을 장점화(천연효모유래 다기능성 소재 개발)로 해결하는 방향으로 연구·개발함으로써, 본 과제 수행간 습득된 기술을 접목 하여 다기능성 천연효모자원의 발굴과 이를 제과제품제조 레시피를 확보, 사업화 국내 및 국외에 판매할 계획임

## 제 7 장 참고문헌

- Azushi N. 신규빵 효모 및 그것을 이용한 빵(특허등록 10-0858177)
- Kakuta. T.1989. Bio industry.6(2).134-143.
- Kreger-van RN. 1984. The yeast, a taxonomic study, 3rd ed. Elsevier science publishers B.V., Amsterdam, Netherlands. pp 399-413
- Lodder j. and Kreger-van RN. 1952. The yeasts. 2nd ed. North Holland publishing Co. Amsterdam, Netherlands. pp 713
- Reiko Hirasawa *et al.* 2001. Improving the Freeze Tolerance of Bakers' Yeast by Loading with Trehalose. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 65 (3), 522-526.
- Sujaya IN, Antara NS, Sone T, Tamura Y, Aryanta WR, Yokota A, Asano K, Tomita F. 2004. Identification and Characterization of Yeasts in Brem, a Traditional Balinese Rice Wine. *World Journal of Microbiol Biotechnol* 20:143-150
- Yarrow D. 1998. Methods for the Isolation, Maintenance and Identification of Yeasts. In: Kurtzman C.P. and Fell JW. eds, *The Yeasts: A Taxonomic Study* 4th ed. Elsevier Science Publ., Amsterdam, Netherlands. pp 77-100
- 강옥주. 2008. 발효차로부터 효모의 분리 및 동정. *Korean J. Food Cookery Sci.* 24(1): 11-15
- 김문용, 전순실. 2008. Sourdough대체가 호밀-밀 혼합빵의 품질특성에 미치는 영향. *한국식품영양학회지.* 37(5).625-632.
- 김재범, 권미정, 남희섭, 김재훈, 남수완. 2001. 당밀배지를 이용한 고함량 RNA 효모의 유가배양. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* Vol. 29, No. 4, 234-239.
- 김주현. 2009. 미생물에 의한 생물계면활성제 대량 생산을 위한 기술 개발. 석사학위논문
- 김진옥, 박장서. 1997. 효모의 분류, 특성 및 산업적 이용. *생물산업.* Vol.10. No. 2. 26-33.
- 노정혜, 김영봉, 길복임. 2002. 국내산 키위연육제 제조과정 중 부형제의 첨가가 키위분말의 품질에 미치는 영향. *Kor. J. Food Sci. Technol.* Vol.34, No. 5, 805-810.
- 서정훈. 2000(3ed). *공업미생물학*. 형설출판사
- 신해현, 조정섭, 박혜영, 변유량. 1992. 재조합 *Saccharomyces cerevisiae*의 Invertase 발현에 미치는 아미노산과 용존산소의 영향. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* Vol. 20, No. 3, 348-354.
- 월간제과제빵사.1990. 제과제빵. 27(9).
- 이기평. 물엿 전처리 효모를 이용한 빵의 제조방법(등록번호: 제 10-0430040호)
- 정현식, 홍주현, 윤광섭. 2005. 부형제 종류에 따른 아가리쿠스버섯 과립의 품질 특성. *Kor. J. Food Preserv.* Vol. 12, No. 3, 247-251.
- 한국특허.신규한 전분자화성 효모와 그 용도(제0767383호)

황성희, 홍주현, 정용진, 윤광섭. 2002. 부형제의 혼합비에 따른 분말식초의 품질 특성.  
*Kor. J. Food Preserv.* Vol. 9, No. 2, 189-193.