

발간등록번호

11-1543000-000257-01

미강발효 가바 생산기술을 이용한 쾌면 유도 기능성  
쌀 개발

(Using gaba production technology by fermented rice  
bran, develop of functional rice for deep sleep)

폴앤필바이오

농림축산식품부

# 제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “고부가가치식품기술개발사업에 관한 연구” 과제(세부과제 “미강발효 가바 생산기술을 이용한 쾌면 유도 기능성 쌀 개발에 관한 연구”)의 보고서로 제출합니다.

2013 년 9 월 18 일

주관연구기관명 : 풀앤필바이오

주관연구책임자 : 박 미 연

세부연구책임자 : 최 승 태

연 구 원 : 전 윤 이 나

연 구 원 : 박 영 미

협동연구기관명 : 신라대학교 산학협력단

협동연구책임자 : 하 종 명

연 구 원 : 김 안 드 레

연 구 원 : 이 정 광

연 구 원 : 김 옥 주

연 구 원 : 박 지 혜

# 요 약 문

I. 제 목 : 미강발효 가바 생산기술을 이용한 쾌면 유도 기능성 쌀 개발

## II. 연구개발의 목적 및 필요성

경제성장에 따른 사회 발전과 더불어 현대인들이 받는 스트레스는 점점 증가하고 있으며 이로 인해 수면장애를 겪는 인구수도 점차 증가하는 추세이다. 이로 인하여 수면보조제 관련 시장은 미국의 경우 1000억 달러에 이르고 있으며 연 30% 가까이 증가세를 보이고 있다. 수면 유도와 관련된 제품은 졸피뎀과 잘레플론과 같은 의약품과 가바(gaba), 멜라토닌(melatonin)과 같은 식품류가 있으나 멜라토닌의 경우 생체조직 보호 작용과 더불어 수면 유도를 위한 치료제로서 많은 연구가 진행되고 있음에도 불구하고 국내의 경우 합성호르몬제제로 분류되어 허가가 되지 않고 있어 수면에 관련된 치료제나 식품 등으로 이용이 불가능한 실정이며 가바의 경우 식품에 함유된 양이 너무 적어 특정 약리작용을 발휘하기까지 자연적 섭취가 불가능한 실정이다.

가바는 포유류의 뇌나 척수에 존재하는 신경전달물질로 고혈압, 간보호, 이뇨작용, 수면 유도 등의 여러 가지 생리작용에 관한 연구가 진행되고 있으며, 가바의 생산을 위한 연구도 많이 수행되어지고 있다.

가바를 식품의 원료나 약의 원료로 생산하기 위해서는 생산 효율과 같은 기술적 문제와 생산 비용 등의 경제적 문제가 먼저 해결되어야 하며, 단순 기능성 식품원료나 의약품 제제로 가바를 사용하는 것 보다는 첨단 기술을 가미시켜 고부가가치 상품으로 개발하는 것이 경제·산업 측면에서 더 효율적인 방법이라고 생각된다. 고부가가치 식품으로의 개발을 위해서는 동물실험이나 임상실험 등의 검증 과정을 거쳐 그 기능성을 인정받아야 하며 기능성원료로 허가를 받게 되면 새로운 건강기능식품 시장을 선점할 것으로 기대됨.

## III. 연구개발 내용 및 범위

### 1. 생물전환을 통한 가바(GABA) 생산 공정 개발

농업 부산물인 미강과 쌀뜨물 그리고 쌀가루를 유산균 배양 배지로한, 유산균주 배양을 통한 GABA를 생성한다. 이는 기존 GABA 생산 배지인 MRS배지보다 경제성이 뛰어나다.

Monosodium Glutamate(MSG)를 가바로 전환하기 위해 사용되는 균주 확보 및 기존 균주의 배양 배지보다 경제적인 배지 개발하였다.

### 2. 가바 코팅한 기능성 쌀 제조 공정 개발

○ 쌀을 단순 침지시키면 건조 후에 쌀의 표면이 갈라지는 crack 현상이 나타나 상품성이 떨어지므로 crack이 발생되지 않게 코팅하는 기술을 개발함.

- 쌀표면에 코팅된 가바(GABA)의 함량이 일정하게 유지 되도록 함
- 밥을 지었을 때 현미보다 식감이 좋게 하는 기능성 기술 개발함.
- 종자 펠릿기에 쌀을 붓고 펠릿기가 회전시키면서 가바 침지 추출액을 5%로 준비하여 쌀에 분무하면서 (알콜로 코팅액을 제조하여 상온에서 코팅) 건조하여 가바 코팅쌀을 제조함.

### 3. 가바(GABA) 코팅된 기능성 쌀 생산

- 쌀을 단순 침지시키면 건조 후에 쌀의 표면이 갈라지는 crack 현상이 나타나 상품성이 떨어지므로 crack이 발생되지 않게 코팅하는 기술을 개발함.
- 쌀표면에 코팅된 가바(GABA)의 함량이 일정하게 유지 되도록 함
- 밥을 지었을 때 현미보다 식감이 좋게 하는 기능성 기술 개발함
- 종자 펠릿기에 쌀을 붓고 펠릿기가 회전시키면서 가바 침지 추출액을 5%로 준비하여 쌀에 분무하면서 (알콜로 코팅액을 제조하여 상온에서 코팅) 건조하여 가바 코팅쌀을 제조함.

### 4. 동물 실험을 통한 체내 가바 함량 측정

- 생산된 가바(GABA)의 성분 및 함량 검사
- 가바(GABA)의 체내 증가량을 검증 할 수 있는 동물모델 및 핵자기공명분광기(NMR)를 이용한 실험동물의 혈액 및 뇌의 변화량 측정

### 5. 개별인정형 건강기능식품 기능성원료 신청 자료준비

식품의약품안전청에 제출할 개별인정형 건강기능식품 기능성 원료 신청 자료를 완성하여 제출 준비 완료.

## IV. 연구개발결과

### 1. 생물전환을 통한 가바(GABA) 생산 공정 개발

#### 1-1. Monosodium Glutamate(MSG)를 가바로 전환하기 위해 사용되는 균주 확보

가바 생산을 위해 글루탐산탈탄산효소를 생산하는 유산균 *Lactobacillus brevis* RB-28을 스크리닝 하여 가바 생산 균주로 활용함.

#### 1-2. 기존 균주의 배양 배지보다 경제적인 배지 개발

유산균 *Lactobacillus brevis* RB-28을 이용한 가바(GABA) 생산을 위해 유산균주인 *Lactobacillus brevis* Rb-28을 이용한 GABA 생성 조건 확립 및 SYS 배지를 개발 하였다.

### 2. 가바 코팅한 기능성 쌀 제조 공정 개발

## 2-1. 가바 코팅한 기능성 쌀 제조

쌀을 단순 침지시키면 건조 후에 쌀의 표면이 갈라지는 crack 현상이 나타나 상품성이 떨어지므로 crack이 발생되지 않게 코팅하는 기술을 개발함. 가바 함유량은 17.1mg/g까지 농도를 조절함

## 2-2. 가바 코팅한 기능성 쌀 제조 공정 개발

○ 종자 펠릿기에 쌀을 붓고 펠릿기가 회전시키면서 가바 침지 추출액을 5%로 준비하여 쌀에 분무하면서 (알콜로 코팅액을 제조하여 상온에서 코팅) 건조하여 가바 코팅쌀을 제조함.

## 3. 가바(GABA) 코팅된 기능성 쌀 생산

○ 쌀을 단순 침지시키면 건조 후에 쌀의 표면이 갈라지는 crack 현상이 나타나 상품성이 떨어지므로 crack이 발생되지 않게 코팅하는 기술을 개발함.

○ 쌀표면에 코팅된 가바(GABA)의 함량이 일정하게 유지 되도록 함

○ 밥을 지었을 때 현미보다 식감이 좋게 하는 기능성 기술 개발함

○ 종자 펠릿기에 쌀을 붓고 펠릿기가 회전시키면서 가바 침지 추출액을 5%로 준비하여 쌀에 분무하면서 (알콜로 코팅액을 제조하여 상온에서 코팅) 건조하여 가바 코팅쌀을 제조함.

## 4. 동물 실험을 통한 체내 가바 함량 측정 및 수면유도효과 측정

### 4-1. 생산된 가바(GABA)의 성분 및 함량 검사

생후 4주령 된 Sprague-Dawley rat 암컷에게 가바 및 가바쌀을 복용시켜 혈액내에 가바의 농도와 수면효과에 영향을 주는 멜라토닌, 세로토닌의 양을 측정함.

멜라토닌의 경우 GABA 코팅 쌀을 공급한 실험군은 멜라토닌이  $3.578 \pm 0.158$  pg/mL이 생성되었고 일반미 보다 멜라토닌 생성량이 42.7%의 증가율을 나타냈다.

세로토닌의 경우 GABA 코팅 쌀을 공급한 실험군은 세로토닌이  $5.918 \pm 0.169$  ng/mL이 생성되었고 일반미는  $4.784 \pm 0.108$  ng/mL로 측정되었다.

### 4-2. 수면유도효과 측정

20대 건강한 남자 6명 여자 9명 총 15명을 선별하여 각각 7일간 GABA쌀을 100g씩 밥을 지어 하루 3번 복용시킨 후 복용 전후 뇌파를 측정하였고  $\delta$  wave (less than 4Hz)와  $\alpha$  wave (8Hz ~ 13Hz)의 증폭은 EEG-3000R 뇌파 측정 분석 프로그램을 이용하여 측정 하였다.

숙면 시 나타나는 뇌파 중  $\delta$  wave (less than 4Hz)가 20% 이상 증가하며, 몸이 이완되거나 깨난할 때 느껴지는  $\alpha$  wave (8Hz ~ 13Hz)가 20%이상 증가 되는 가에 효과를 알아볼 수 있는 뇌파 측정 장치를 setting 하여 임상실험을 실시하였다.

GABA쌀을 복용한 경우가 복용하지 않을 때에 비하여  $\delta$  wave와  $\alpha$  wave의 증가를 보였는데 남자의 경우  $\delta$  wave가  $20.17 \pm 1.17\%$ ,  $\alpha$  wave가  $20.5 \pm 1.87\%$  증가 하였으며, 여자의 경우  $\delta$  wave가  $19.40 \pm 2.13$ ,  $\alpha$  wave가  $19.90 \pm 2.37\%$  증가하였다.

## 5. 개별인정형 건강기능식품 기능성원료 신청 자료준비

식품의약품안전처에 제출할 개별인정형 건강기능식품 기능성 원료(신청원료명 : 유산균발효 가바분말, 시청기능성 : 기타(숙면))로 신청 자료를 완성하여 제출 준비 완료함.

#### V. 연구성과 및 성과활용 계획

1. MSG 효소 전환 GABA 대량 생산으로 기능성 쌀 년 3,000포 생산에 공급 가능한 가바(GABA)의 양인 50 kg을 생산할 예정임.

#### 2. GABA 코팅 쌀 생산

년 20 kg/포 기능성 쌀 년 3,000포 생산 예정임.

# SUMMARY

## (영문요약문)

I. Title : Using gaba production technology by fermented rice bran, develop of functional rice for deep sleep

### II. The Purpose of the Research and Significance

Stress that modern human and social development due to economic growth is subjected is increasing more and more due to this there is a tendency for the population suffer from sleep disorders also increases gradually. In the United States, sleep aid related markets, has reached \$ 100 billion. This is showing a tendency to increase nearly 30% per year. The products related to sleep induction, there is a food GABA and drugs such as Jarefuron of zolpidem (gaba), melatonin, such as (melatonin), but in the case of melatonin, many as a treatment for sleep induction and living tissue protective effect it is a reality studies though in fact it is advanced, in Japan, Arrow has not been and is classified as a hormone formulations comprehensive utilization can not be such as foods and therapeutic agents that are related to sleep, governance for it is a reality natural intake is impossible until exerts pharmacological actions of certain amount in food is too small.

Physiological effects various high blood pressure, liver protection, diuretic, and sleep induction is underway in neurotransmitter present in the spinal cord and brain of mammals, GABA is many rows research for the production of GABA is cracked.

In order to produce as a raw material for medicine raw materials and food GABA, it is necessary to solve the first economic problems, such as production costs and technical problems such as production efficiency, simple and drug and functional food ingredients it is believed that without the use of GABA as a formulation, be taken into account advanced technology to develop as a high value-added products is the more efficient method in economic and industrial surfaces. Upon receiving the authorization as a functional material through the verification of such clinical trials or animal studies for the development of a high value-added foods, it must admit its functionality, may precede acquire new functional health food market is expected.

### III. Scope and Contents of the Project

1. Switching of organisms can be developed of GABA (GABA) production process.

We generate the lactic acid bacteria culture medium rice flour and rice-rinsing of rice and rice bran of waste, the GABA through the culture of lactic acid bacteria. This

economy is better than the MRS medium is a GABA production medium existing. Secures the strain that is used to convert to the governor (MSG) Monosodium Glutamate, to Button develop more economical culture of the strain of the existing.

## 2. Development of the manufacturing process of functional rice and GABA coating

- When is immersed simple rice, because the crack phenomenon breaking the surface of the rice after drying appeared, product is lowered, to develop a technique of coating crack does not occur.
- GABA content that is coated on the surface of the rice (GABA) is to be kept constant
- texture to functional technology development better than brown rice when it took up rice.
- Put the rice seed pellet machine, sprayed on rice prepares to 5% bleeding 漬抽 immersion gabardine while being giga rotation of food, Gabbana (to prepare a coating solution with alcohol, and coating at room temperature) and dried I to produce the coating rice.

## 3. Production of functional GABA rice is (GABA) coating

- When is immersed simple rice, because the crack phenomenon breaking the surface of the rice after drying appeared, product is lowered, to develop a technique of coating crack does not occur.
- GABA content that is coated on the surface of the rice (GABA) is to be kept constant
- texture to functional technology development better than brown rice when it took up rice.
- Put the rice seed pellet machine, sprayed on rice prepares to 5% bleeding immersion gabardine while being giga rotation of food, Gabbana (to prepare a coating solution with alcohol, and coating at room temperature) and dried I to produce the coating rice.

## 4. Measurement of body GABA content in the animal experiment

- inspection of content and ingredient GABA, which is the production of (GABA)
- measurement of the amount of change in cerebral blood and experimental animals using nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy and animal models can be used to verify the in-vivo increase in GABA (GABA)

## 5. Preparation of routine health functional food functional ingredient dossier personal

Complete the shaping health functional food functional ingredient application documents individual to be submitted to the Food and Drug Administration, submission ready.

#### IV. Result

##### 1. Switching of organisms can be developed of GABA (GABA) production process

###### 1-1. Ensure strain that is used to convert to the GABA (MSG) Monosodium Glutamate

Were screened lactic acid bacteria *Lactobacillus brevis* RB-28 to produce the glutamic acid decarboxylase for the production of GABA, it is used as GABA production strain.

###### 1-2. Development of economic badge from the culture fluid of strain existing

I developed a SYS badge and establishment of GABA production conditions using the host *Lactobacillus brevis* Rb-28 of lactic acid bacteria for GABA using lactic acid bacteria *Lactobacillus brevis* RB-28 of (GABA) production.

##### 2. Development of the manufacturing process of functional rice and GABA coating

###### 2-1. Production of functional rice were coated GABA

When is immersed simple rice, because the crack phenomenon breaking the surface of the rice after drying appeared, product is lowered, to develop a technique of coating crack does not occur. I adjust the concentration of up to 17.1mg / g is GABA content

###### 2-2. Development of the manufacturing process of functional rice and GABA coating

○ Put the rice seed pellet machine, sprayed on rice prepares to 5% bleeding 漬抽 immersion gabardine while being giga rotation of food, Gabbana (to prepare a coating solution with alcohol, and coating at room temperature) and dried I to produce the coating rice.

##### 3. production of functional GABA rice is (GABA) coating

○ When is immersed simple rice, because the crack phenomenon breaking the surface of the rice after drying appeared, product is lowered, to develop a technique of coating crack does not occur.

○ GABA content that is coated on the surface of the rice (GABA) is to be kept constant

○ texture to functional technology development better than brown rice when it took up rice

○ Put the rice seed pellet machine, sprayed on rice prepares to 5% bleeding immersion gabardine while being giga rotation of food, Gabbana (to prepare a coating solution with alcohol, and coating at room temperature) and dried I to produce the coating

rice.

4. Sleep-inducing effect measurements and the body of GABA content in the animal experiment

4-1. Examination of the content and component GABA produced of (GABA)

Melatonin that affect the effect of sleep and concentration of the blood in the governor allowed to take Gabba Gabba and rice in Sprague-Dawley rat female 4-week-old, I want to measure the amount of serotonin.

If melatonin,  $3.578 \pm 0.158$  pg/mL is created melatonin, experimental groups were fed GABA coating rice showed an increase rate of 42.7% is production of melatonin than the general United States.

For serotonin, the experimental groups were fed GABA coating rice,  $5.918 \pm 0.169$  ng/mL is created serotonin general rice was measured at  $4.784 \pm 0.108$  ng/mL.

4-2. Sleep-inducing effect measurement

After being taken three times a day to make the rice each 100g of GABA rice for 7 days, respectively, as sorting a total of 15 people nine six women of healthy people in their 20s, to measure the brain waves of taking before and after , the amplification and  $\delta$ wave (less than 4Hz)  $\alpha$ wave of (8Hz ~ 13Hz), was measured using the EEG-3000R EEG analysis program.

It is possible to examine the effect (8Hz ~ 13Hz) is has increased more than 20%  $\alpha$ wave to be felt (less than 4Hz) is increased by 20% or more  $\delta$ wave of brain waves that appear during sleep, the body relax, when you Pyonan were clinical trials by setting the EEG measuring apparatus.

It showed increased  $\alpha$ wave and  $\delta$ wave compared to when not taking if it is taking GABA Rice

For men,  $\delta$ wave is  $20.17 \pm 1.17\%$ , an increase of  $20.5 \pm 1.87\%$  is  $\alpha$ wave, for women,  $\delta$  wave is  $19.40 \pm 2.13$ , an increase of  $19.90 \pm 2.37\%$  to  $\alpha$ wave.

5. Preparation of routine health functional food functional ingredient dossier personal

And complete the application form to, to be submitted Ready ((deep sleep): Other lactic acid bacteria fermentation GABA powder, viewing function application material name) shaping health functional food functional ingredient individual to be submitted to the Food and Drug destination....

V. Proposal for Application

1. We are expected to produce 50 kg GABA amount that can be supplied to the production of 3000 for years of functional rice MSG enzymatic conversion mass production of GABA (GABA).

2. Production of GABA rice coating

It is a production scheduled for 3000 bags of 20 kg package in years.

# 목 차

요약문 .....	2
SUMMARY .....	6
<b>제 1 장 연구개발과제의 개요</b> .....	<b>12</b>
<b>제 2 장 국내외 기술개발 현황</b> .....	<b>14</b>
1. 가바의 기술 현황 .....	14
2. 국내 가바 연구개발의 필요성 .....	15
<b>제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과</b> .....	<b>16</b>
<b>제 1 절 가바(GABA) 생산 균주 확보 및 가바 생산 기술 개발</b> .....	<b>16</b>
1. 가바 생성 균주 확보.....	16
2. 기존 균주의 배양 배지보다 경제적인 배지 개발.....	17
<b>제 2 절 쾌면 유도 가바(GABA) 코팅 쌀 제조</b> .....	<b>26</b>
1. 유산균주를 이용한 GABA의 대량 생산.....	26
2. 가바(GABA)를 쌀에 분무 코팅 및 함유시키는 기술 개발.....	26
3. 가바(GABA) 코팅 쌀 제조.....	26
4. 가바(GABA) 코팅 쌀 중 GABA 함량 측정.....	29
<b>제 3 절 가바 및 가바 코팅쌀의 동물 실험</b> .....	<b>31</b>
1. 동물실험을 통한 가바의 수면유도효과 입증.....	31
2. 숙면임상 실험.....	37
<b>제 4 절 개별인정형 건강기능식품 원료 신청</b> .....	<b>46</b>
<b>제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도</b> .....	<b>50</b>
<b>제 1 절 목표 달성도</b> .....	<b>50</b>
1. 1차년도 연구 목표 및 달성도.....	50
2. 2차년도 연구 목표 및 달성도.....	51
<b>제 2 절 관련 분야에의 기여도</b> .....	<b>53</b>
1. 기술적 측면.....	53
2. 경제·산업적 측면.....	53
<b>제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획</b> .....	<b>54</b>
<b>제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보</b> .....	<b>55</b>
<b>제 7 장 연구시설·장비 현황</b> .....	<b>56</b>
<b>제 8 장 참고문헌</b> .....	<b>57</b>

## 제 1 장 연구개발과제의 개요

경제성장에 따른 사회 발전과 더불어 현대인들이 받는 스트레스는 점점 증가하고 있으며 이로 인해 수면장애를 겪는 인구수도 점차 증가하는 추세이다. 이로 인하여 수면보조제 관련 시장은 미국의 경우 1,000억 달러(Chu, 2006, Walsh, 2004)에 이르고 있으며 연 30% 가까이 증가세를 보이고 있다. 수면 유도와 관련된 제품은 졸피뎀과 잘레플론과 같은 의약품(Edinger, 2005)과 가바(gaba), 멜라토닌(melatonin)과 같은 식품류가 있으나 멜라토닌의 경우 생체조직 보호 작용과 더불어 수면 유도를 위한 치료제로서 많은 연구가 진행되고 있음에도 불구하고 국내의 경우 합성호르몬제제로 분류되어 허가가 되지 않고 있어 수면에 관련된 치료제나 식품 등으로 이용이 불가능한 실정이며 가바의 경우 식품에 함유된 양이 너무 적어 특정 약리작용을 발휘하기까지 자연적 섭취가 불가능한 실정이다.

가바는 포유류의 뇌나 척수에 존재하는 신경전달물질로 고혈압, 간보호(Bae et. al., 2009), 이뇨작용, 수면 유도(Difiglia et. al. 1990, Fields et. al. 1994) 성장호르몬 분비(Katrin et. al. 2005, Horisu et. al. 1990) 등의 여러 가지 생리작용에 관한 연구가 진행되고 있으며, 가바의 생산을 위한 연구도 많이 수행되어지고 있다(Ryu et. al., 2004, Brown et. al, 1997, Hirusi at. al 2000).



Fig. 1. 가바(GABA)의 효능

가바 생산과 관련된 현재까지의 연구는 글루탐산탈탄산효소를 이용하거나 이를 생산해내는 균주를 이용하여 글루타민산을 가바로 변환하는 방법이 많이 이용되고 있으나(Kitaka et. al. 2000, Yokoyama et. al 2002) 가바를 만들어 내는 생산율(가바 전환율)이나 비용 등의 문제로 아직 이용이 활발하지 않고 있다.

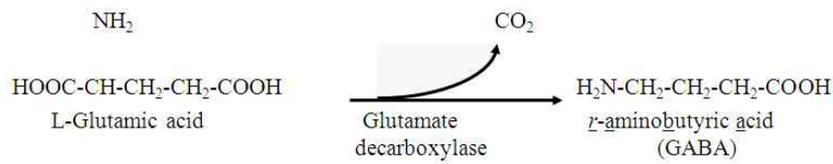


Fig. 2. Glutamate decarboxylase에 의한 MSG의 가바(GABA) 전환 과정

쌀 또는 미강에 포함된 자체 탈탄소효소를 활성화시켜 이를 가바(GABA) 증강에 사용하는 데는 한계성이 있기 때문에 최근에는 유산균(*Lactobacillus brevis*) 또는 젖산균(*Lactobacillus fermentum*) 등을 이용한 발효 가바(GABA)가 상품화되기 시작하였다. 하지만 유산균이나 젖산균을 이용한 가바(GABA)는 배양 배지의 가격이 더 고가이므로 고농도 GABA의 생산은 가능하지만 아직까지 생산 단가를 낮추어야 하는 문제점이 남아 있다. 가바의 가격은 30만원/kg 선인 반면에 배지의 한 구성성분인 MRS의 경우에만 25만원/kg 선으로 여러 가지 영양 성분을 감안한다면 배지의 가격은 40만원/kg을 상회 한다.

따라서 가바를 식품의 원료나 약의 원료로 생산하기 위해서는 생산 효율과 같은 기술적 문제와 생산비용 등의 경제적 문제가 먼저 해결되어야 하며, 단순 기능성 식품원료나 의약품 제제로 가바를 사용하는 것 보다는 첨단 기술을 가미시켜 고부가가치 상품으로 개발하는 것이 경제·산업측면에서 더 효율적인 방법이라고 생각된다. 고부가가치 식품으로의 개발을 위해서는 동물실험이나 임상실험 등의 검증 과정을 거쳐 그 기능성을 인정받아야 하며 기능성원료로 허가를 받게 되면 새로운 건강기능식품 시장을 선점할 것으로 기대된다.

## 제 2 장 국내외 기술개발 현황

쌀 또는 미강에 포함된 자체 탈탄소효소를 활성화시켜 이를 가바(GABA) 증강에 사용하는 데는 한계성이 있기 때문에 최근에는 유산균(*Lactobacillus brevis*) 또는 젖산균(*Lactobacillus fermentum*) 등을 이용한 발효 가바(GABA)가 상품화되기 시작하였다. 하지만 유산균이나 젖산균을 이용한 가바(GABA)는 배양 배지의 가격이 더 고가이므로 고농도 GABA의 생산은 가능하지만 아직까지 생산 단가를 낮추어야하는 문제점이 남아 있다. 가바의 가격은 30만원/kg 선인 반면에 배지의 한 구성성분인 MRS의 경우에만 25만원/kg 선으로 여러 가지 영양 성분을 감안한다면 배지의 가격은 40만원/kg을 상회 한다.

### 1. 가바의 기술 현황

#### 가. 가바 생산 국내 관련기술 현황

국내에서는 (주)MSC, (주)비피도를 비롯하여 몇 개의 중소기업에서 가바의 개발을 진행하였으나, 국내의 가바 표기문제로 인한 마케팅의 장벽으로 인하여 시장형성이 되지 않아 사업화에 성공하지 못하고 현재 개발 및 생산이 원활치 못하고 있는 상황으로 보인다. 그러나 일본이나 미국의 가바시장 형성 분위기로 미루어 보아 국내에 가바 시장은 곧 크게 형성될 것으로 예측되며, 국내 및 해외에서 가바(GABA)관련 시장이 성숙될 경우, 신속하게 대응할 수 있는 기술과 시스템을 확립할 필요가 있다고 판단된다.

#### 나. 가바 생산 국외 관련기술 현황

일본 Pharma food사의 경우 유산균 배지 사용하여 미강 추출물을 주 발효원으로 한 제품의 경우 완제품 중 미강 유래 고형분이 30% 이상이며, 가바 함량이 20% 이상 함유되어 있다. 미강을 이용하기 때문에 미강 유래 단백질 및 영양소가 많이 함유되어 있으며 특히 양질의 단백질인 알부민과 글로불린이 함유 되어 있다. 보건산업진흥원 분석 결과에 따르면 칼륨 438 mg/100g, 마그네슘 80 mg/100g, 칼슘 18 mg/100g, 아연 3.5 mg/100g, 철 3.6 mg/100g이 함유되어 있다.

일본 Fujicco사의 유산균 및 효모균과의 혼합발효의 경우 유산균이 생산하는 각종 유기산 함유되어 있는 특징이 있다. 또한 미강 발효 추출물, 쌀눈 발효 추출물, 대두 발효 추출물 등의 다양한 발효원을 이용하여 가바 외의 기능성분들도 함유된 복합제제의 기능식품으로 생산하고 있다.

#### 다. 가바를 이용한 국내 식품 개발 기술

가바의 기능성에 관한 고혈압, 간보호 등의 기초연구가 CJ를 비롯한 대기업위주로 수행되고 있으며 기초 연구 결과를 바탕으로 가바 자체를 개별인정형 기능성원료로 신청하거나 신청할 계획 중에 있다.

가바 자체를 개별인정형 기능성 원료로 허가를 받게 되면 이를 일부 첨가하여 다양한 형태의 제품으로 생산이 가능하나 쌀과 같은 농산물 소비와는 직접 관련이 없는 산업으

로 발전할 것이다.

현재, 시중에는 가바가 증강된 쌀이나 현미를 개발하여 판매하고 있으나 가바의 양이 많게는 8배 정도 증강 시켰으나 수면 장애에 도움을 줄 정도의 함량에는 못 미치고 있어 새로운 기술 개발이 요구되고 있다.

#### 라. 가바를 이용한 국외 식품 개발 기술

미국이나 일본의 경우 가바를 정제나 캡슐화하여 고혈압 관련 건강기능식품형태나 수면 유도 건강기능식품 형태로 판매하고 있으나 가바를 저렴하게 생산하는 기술이 개발되어지지 않아 아직까지 고가의 가격대를 형성하고 있다.



Fig. 3. 해외 판매중인 GABA 관련 제품

## 2. 국내 가바 연구개발의 필요성

가바를 식품의 원료나 약의 원료로 생산하기 위해서는 생산 효율과 같은 기술적 문제와 생산비용 등의 경제적 문제가 먼저 해결되어야 하며, 단순 기능성 식품원료나 의약품 제제로 가바를 사용하는 것 보다는 첨단 기술을 가미시켜 고부가가치 상품으로 개발하는 것이 경제·산업측면에서 더 효율적인 방법이라고 생각된다. 고부가가치 식품으로의 개발을 위해서는 동물실험이나 임상실험 등의 검증 과정을 거쳐 그 기능성을 인정받아야 하며 기능성원료로 허가를 받게 되면 새로운 건강기능식품 시장을 선점할 것으로 기대된다.

# 제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

## 제 1 절 가바(GABA) 생산 균주 확보 및 가바 생산 기술 개발

### 1. 가바 생성 균주 확보

가바 생산을 위해 글루탐산탈탄산효소를 생산하는 균주로 주로 유산균을 이용하는데 이들 유산균주 중에서 가장 경제적 생산성이 뛰어난 균종을 김치(Seok et. al., 2008)로부터 스크리닝 하였다.

균종의 선별 방법은 MRS배지에 Bromcresol purple과 sodium azide를 첨가한 plate에 smear한 후 37°C에서 48시간 배양한 다음 노란색 colony중 각기 다른 모양의 colony를 선별하고 순수분리를 위해 MRS agar에 streaking하여 얻어진 colony를 triptic soy agar slant에 37°C에서 18시간 배양한 다음 균주를 분리하였다(Lu et. al. 2009).

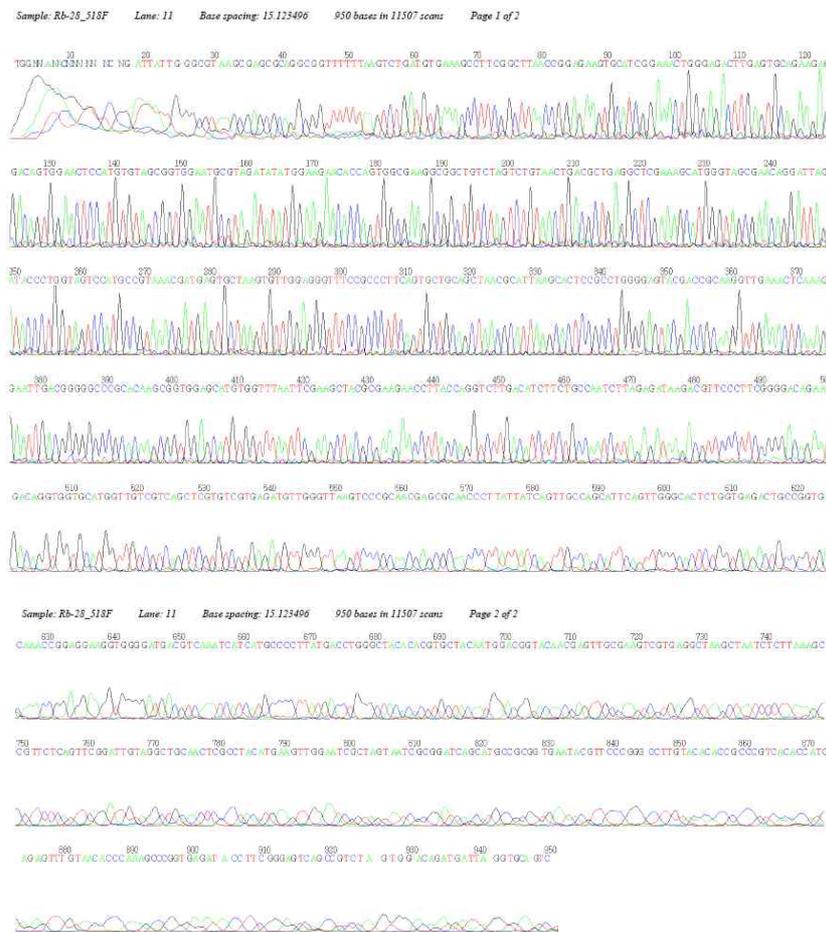


Fig. 4. *Lactobacillus brevis* RB-28의 염기서열

Table 1. *Lactobacillus brevis* RB-28의 16srRNA 확인

Name	Length	Start	End	DB	AC
101224-11_E01_Rb-28-518F.ab1	950	20	943	gb	HM104306.1
Gene	Ref.				
Lactobacillus brevis strain 0945 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&amp;db=Nucleotide&amp;list_uids=297380937&amp;dopt=GenBank">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&amp;db=Nucleotide&amp;list_uids=297380937&amp;dopt=GenBank</a>				

## 2. 기존 균주의 배양 배지보다 경제적인 배지 개발

유산균 배양을 위해 사용되는 기존 MRS배지는 다음과 같이 많은 성분(Pancreatic digest of gelatin 10.0g + Beef extract 8.0g +Dextrose 20.0g + Dipotassium phosphate 2.0g + Polysorbate 80 1.0 g + Sodium acetate 5.0g + Ammonium citrate 2.0g + Magnesium sulfate 0.2g + Manganese sulfate 0.05g) 이 함유되어 복잡하고 제조 단가가 높은 반면에 본 연구에서는 미강 추출물을 이용한 간단한 영양분과 제조과정을 거쳐 생산 단가가 경제적인 배지를 개발 하였다.

### 가. 유산균 *Lactobacillus brevis* RB-28을 이용한 가바(GABA) 생산

(1) 유산균주인 *Lactobacillus brevis* Rb-28을 이용한 GABA 생성 조건 확립 및 SYS 배지

(가) SYS 배지의 제조 방법

미배아를 수거하여 여기에 미배아 10배(w/w)의 수도수를 가하고 설탕 4%(w/w)와 쌀가루 1%(w/w)를 기본 배지성분으로 넣은 후 가바생성을 위해 MSG 1%(w/w)를 첨가 후 오토클레브에서 121℃로 3시간 추출 후 상온으로 식혀 제조 하였다.

※ SYS 배지는 주관기관에서 자체 개발한 *Lactobacillus brevis* Rb-28 배양용 배지로 기존 유산균 배지인 MRS 배지에 비하여 15% 이하의 저가로 제조 할 수 있다.

(나) 유산기 초기 접종농도

유산균 *Lactobacillus brevis* Rb-28를 SYS 배지에 접종하고 30℃에서 48시간 동안 배양하여 배양된 배지를 4℃에서 5000×g로 20분간 원심분리하여 cell만 수집해서 동결건조한 후 powder 상태로 -70℃에 보관한 후 실험 스타터로 사용하였다. 초기 유산균 접종 농도는 0.9 (O.D 600nm)로 하여 접종하였다.

(다) 배양온도

유산균 *Lactobacillus brevis* Rb-28의 배양 조건은 30℃로 하였다.

(라) 가바 생성 분석

TLC를 이용한 분석을 위해 균주배양액 0.7  $\mu$ l를 TLC 판에 분주하여 butanol : acetic acid : water = 4 : 1 : 1를 전개용매로 사용하여 전개 하였다. 전개된 TLC 판을 0.2% ninhydrin을 이용하여 발색하여 생성물 가바 spot과 기질 MSG를 확인하였다.

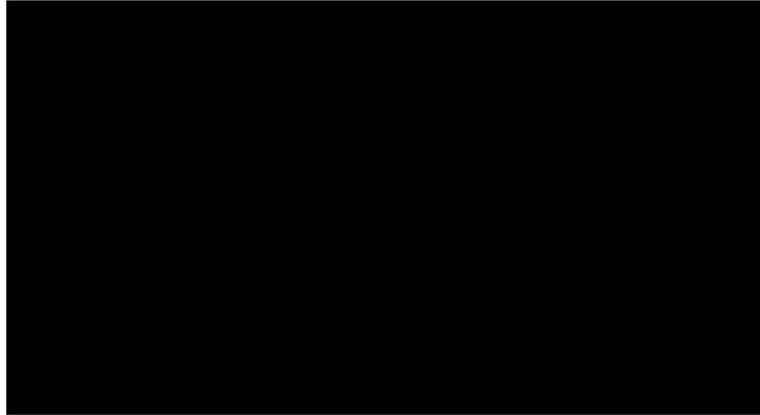


Fig. 5. *Lactobacillus brevis* Rb-28의 SYS배지에서 GABA 생성 및 성장

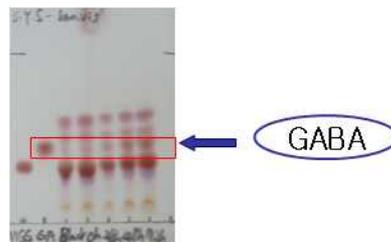


Fig. 6. *Lactobacillus brevis* Rb-28의 SYS배지에서 GABA 생성 확인 TLC

(2) 유산균 *Lactobacillus brevis* RB-28을 이용한 GABA 생성 조건 확립 및 SS 배지

(가) SS 배지의 제조

미배아를 수거하여 여기에 미배아 10배(w/w)의 수도수를 가하고 설탕 4%(w/w)를 기본 배지 성분으로 넣은 후 가바생성을 위해 MSG 1%(w/w)를 첨가 후 오토클레브에서 121 $^{\circ}$ C로 3시간 추출 후 상온으로 식혀 제조 하였다.

※ SS 배지는 주관기관에서 자체 개발한 *Lactobacillus brevis* Rb-28 배양용 배지로 MRS 배지에 비하여 5% 이하의 저가로 제조 할 수 있다.

(나) 유산기 초기 접종농도

유산균 *Lactobacillus brevis* Rb-28를 SS 배지에 접종하고 30℃에서 48시간 동안 배양하여 배양된 배지를 4℃에서 5000×g로 20분간 원심분리하여 cell만 수집해서 동결건조한 후 powder 상태로 -70℃에 보관한 후 실험 스타터로 사용하였다. 초기 유산균 접종 농도는 1.25 (O.D 600nm)로 하여 접종하였다.

(다) 배양온도

유산균 *Lactobacillus brevis* Rb-28의 배양 조건은 30℃로 하였다.

(라) 가바 생성 분석

TLC를 이용한 분석을 위해 균주배양액 0.7 µl를 TLC 판에 분주하여 butanol : acetic acid : water = 4 : 1 : 1를 전개용매로 사용하여 전개 하였다. 전개된 TLC 판을 0.2% ninhydrin을 이용하여 발색하여 생성물 가바 spot과 기질 MSG를 확인하였다.

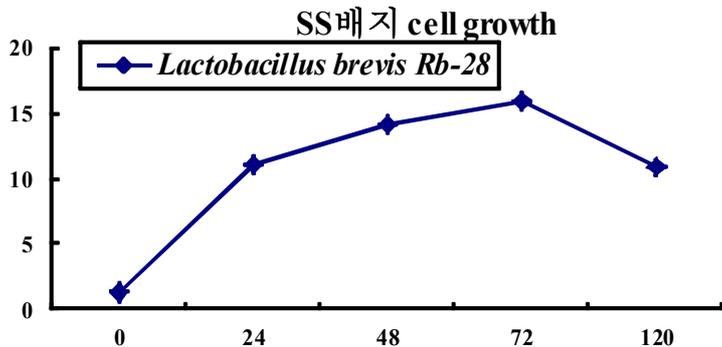


Fig. 7. *Lactobacillus brevis* Rb-28의 SS배지에서 GABA 생성

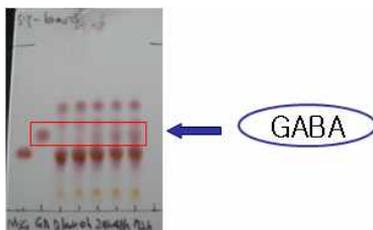


Fig. 8. *Lactobacillus brevis* Rb-28의 SS배지에서 GABA 생성 확인 TLC

Table. 2. GABA 생산을 위한 MRS 배지, SYS 배지, SS 배지의 가격 비교

	MRS배지	SYS배지	SS배지
원료가격	MRS배지 125,000원/500g MSG 180,000원/25Kg 설탕 4,000원/3KG 쌀 40,000원/20Kg		
비용 (1 L 기준)	MRS배지 12,500원(50g) MSG72원(10g)	미강 무상 수거 가능 설탕 54원(40g) 쌀 60원(30g) MSG 72원(10g)	미강 무상 수거 가능 쌀 60원(30g) MSG 72원(10g)
총 비용 (1 L 기준)	12,572원	186원 (15%)	132원 (10%)

(3) 유산균 *Lactobacillus brevis* RB-28을 이용한 GABA 생성 시스템 개발

(가) Lab scale 배양 시스템

0.5 L 혹은 1.0 L flask에 1-5%의 MSG가 함유된 SYS 또는 SS 배지를 절반 정도 넣은 후, 스타터로 준비된 유산균 *Lactobacillus brevis* Rb-28를 접종 농도 0.7에서 1.25 (O.D 600nm)로 하여 접종하고 incubator에서 30℃에서 48에서 72시간 동안 정지 배양 또는 shaking incubation 하여 유산균을 배양 한다.



Fig. 9. *Lactobacillus brevis* RB-28의 lab scale 배양 시스템

(나) 500L pilot scale 배양 시스템

500 L scale의 pilot 배양기에 1-5%의 MSG가 함유된 SYS 또는 SS 배지 200 L를 넣은 후, 스타터로 준비된 유산균 *Lactobacillus brevis* Rb-28를 접종 농도 1.0에서 1.25 (O.D 600nm)로 하여 접종하고 incubator에서 30℃에서 48에서 72시간 동안 정치 배양하여 유산균을 배양 한다.



Fig. 10. *Lactobacillus brevis* RB-28의 500L pilot scale 배양 시스템

배양기 안에서 유산균에 의한 탈탄산 작용으로 MSG가 변환된 GABA 용액은 농축기에서 90℃, 12시간 농축과정을 수분이 20%의 농축액으로 농축되고 이를 쌀에 코팅하여 가바쌀을 제조한다. 이때 농축액을 분무건조하여 완전 건조를 시키면 가바가 함유된 기능성 파우더로 생산된다.

나. MSG의 GABA 전환율 측정을 위한 system 개발

MSG의 GABA 전환율은 TLC를 이용하여 측정하거나 HPLC로 측정하는 것이 일반적인 실험 방법이다. 그러나 TLC는 MGG와 GABA의 양이 신속하게 확인 할 수는 있으나 정확 하계는 측정할 수가 없고 HPLC는 정확하게 측정 가능하나 측정 시간이 오래걸리는 단점이 있다.

따라서 본 연구에서는 이러한 단점이 없는 빠르고 정확한 MSG의 GABA 전환율을 측정하는 방법을 개발하였다.

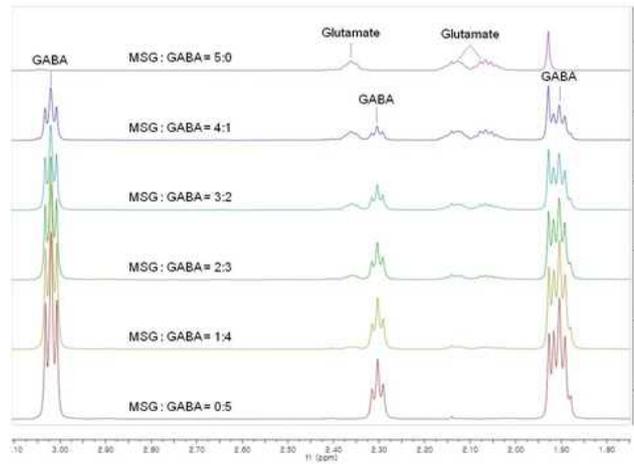


Fig. 11. MSG와 GABA의 용량에 따른 핵자기공명분광기(NMR) spectrum

Fig. 11은 MSG와 GABA를 함량 변화에 따라 농도 titration한 그림으로 MSG의 양과 GABA의 양이 각각 5:0, 4:1, 3:2, 2:3, 1:4, 0:5으로 측정하였다. 다음의 측정값들을 바탕으로 실제 배양액 속에 들어 있는 MSG의 GABA 전환율을 측정하여 그 변화량을 계산하였다. Table 4은 MRS 배지 속에서 유산균에 의해 MSG가 GABA로 전환되는 과정을 72시간 동안 매 6시간 마다 샘플링하여 측정한 MSG와 GABA 그리고 아미노산의 함량 변화들이다. 초기 MSG와 GABA의 비율이 5:0일 때 NMR로 측정된 함량은 0.0856 : 11.1473으로 측정되다가 배양이 끝난 72시간 후에는 MSG와 GABA의 비율이 33.9 : 0.29로 전환되었고, 그 외 다른 아미노산의 변화는 크지 않았다.

Table 3. NMR을 이용해 분석한 MSG와 GABA 및 아미노산 함량변화

MSG:GABA	0:5	1:4	2:3	3:2	4:1	5:0
γ-Aminobutyrate	33.9196	30.7236	22.4933	14.8659	8.6813	0.0856
Acetate	17.0253	16.7771	13.9955	12.4212	11.6139	9.2702
Alanine	1.172	1.3433	1.3839	1.3941	1.7111	1.412
Glucose	18.4309	25.4106	28.5544	35.4558	44.0342	38.3153
Glutamate	0.2943	2.9818	4.684	6.863	10.6096	11.1473
Glutamine	0.0664	0.1942	0.1067	0.139	0.2198	0.1817
Isoleucine	0.6061	0.7201	0.6871	0.715	0.7913	0.6805
Lactate	0.2414	0.4686	0.3668	0.4334	0.5954	0.4128
Lactose	1.5727	2.117	1.9638	2.1541	2.6324	2.0539
Leucine	1.2245	1.451	1.9824	1.6434	2.2674	1.7061
Methionine	0.2306	0.2817	0.2835	0.2694	0.3506	0.2626
Phenylalanine	0.6841	0.877	1.0082	0.9133	1.41	1.0785
Proline	0.3711	0.2228	0.4453	0.5279	0.6517	0.488
Threonine	0.203	0.2652	0.2479	0.4115	0.5592	0.3679
Tryptophan	0.147	0.1886	0.2174	0.1924	0.2187	0.193
Tyrosine	0.4692	0.5631	0.5687	0.5538	0.6964	0.5738
Valine	0.819	0.9658	0.9605	0.9902	1.1643	0.9315

또한 fig. 12은 MSG와 GABA를 함량 변화에 따라 농도 titration한 TLC 그림으로 왼쪽 그림은 MSG의 양과 GABA의 양이 각각 5:0, 4:1, 3:2, 2:3, 1:4, 0:5으로 NMR과 같은 농도로 측정하였으며, 오른쪽 그림은 실제 MRS 배지속에서 전환된 MSG와 GABA의 농도를 측정한 그림이다. 이 역시 NMR과 같은 패턴을 나타내고 있다.

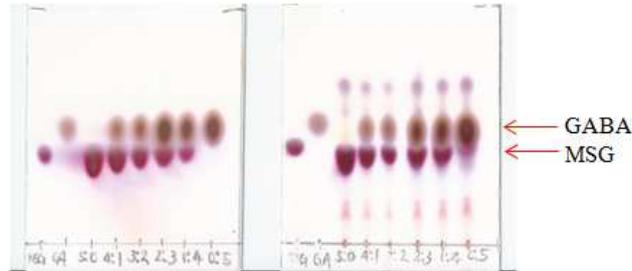


Fig. 12. MSG titration 5 to 0 % and GABA titration 0 to 5 % by TLC. MRS media (right).

Fig. 13는 fig. 11과 12에서와 같이 MSG의 양과 GABA의 양이 각각 5:0, 4:1, 3:2, 2:3, 1:4, 0:5으로 측정된 HPLC 분석 자료로 MSG의 GABA전환률을 확인 할 수 있는 자료이다.

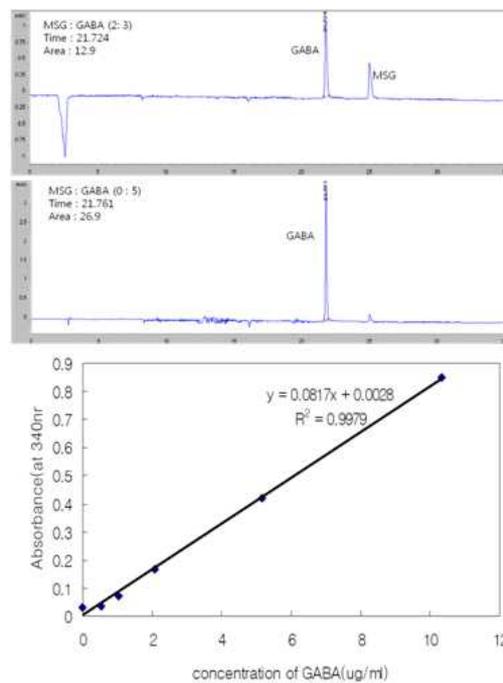


Fig. 13. MSG and GABA titration by HPLC and GABA calibration curve.

따라서 본 연구에서는 MSG의 양과 GABA의 양이 각각 5:0, 4:1, 3:2, 2:3, 1:4, 0:5으로 각각 NMR, TLC, HPLC로 측정하여 그 농도 변화를 확인하였다.

TLC는 MSG의 양과 GABA의 양을 신속하게 확인 할 수는 있으나 그 정확한 양을 측정하기가 어렵고 HPLC는 정확한 양을 측정 가능하나 sample측정을 위한 전처리를 하여야 하며, 측정시간이 많이 소요되는 단점이 있다. 그러나 NMR은 신속하고 정확한 농도를 측정할 수가 있고 sample을 전처리 할 필요가 없이 유산균 배지를 바로 측정함으로써 MSG의 GABA 전환률을 측정에 유용하게 사용할 수 있다.

특히, 최종 변환 생성되는 가바의 전환 데이터를 계산하여보면 첨가된 MSG의 질량은 50.00 g/1,000 ml (5%, w/w)이며 이 때의 몰농도는 267.2 mmol(M. W. 187.13) 이었고, 생성된 GABA의 양은 27.02 g/1,000 ml로 262.1 mmol(M. W. 103.12)로 전환율 98.1%로 측정되었다.

## 제 2 절 껌면 유도 가바(GABA) 코팅 쌀 제조

### 1. 유산균주를 이용한 GABA의 대량 생산

본 연구에서는 농업 부산물인 미강을 이용한 SS 배지를 이용하여 협동연구기관에서 제공한 유산균주(*Lactobacillus brevis* RB-28) 배양을 통한 GABA 분말을 생성하였고 이는 기존 유산균 발효 배지인 MRS에 비하여 10% 정도로 아주 저렴한 저생산 비용이 소요될 뿐만 아니라 MRS 배지에서 생산된 가바는 추출 공정을 거쳐야만 다음 제품으로 이용이 가능하다. 하지만 본 여누에서 개발된 배지는 미강추출물을 이용한 것으로 그 대로 농축 후 분말화 하여 복용 및 제품화가 가능함으로 관련 산업 시장 성장에 큰 도움이 되리라 생각된다.



Fig. 14. 가바쌀 제조 공정(왼쪽부터 발효를 통한 가바제조, 가바 함유 발효 원료, 쌀코팅액 제조 과정, 가바쌀 제조 과정)

### 2. 가바(GABA)를 쌀에 분무 코팅 및 함유시키는 기술 개발

- 쌀을 단순 침지시키면 건조 후에 쌀의 표면이 갈라지는 crack 현상이 나타나 상품성이 떨어지므로 crack이 발생되지 않게 코팅하는 기술을 개발함.
- 쌀표면에 코팅된 가바(GABA)의 함량이 일정하게 유지 되도록 함
- 밥을 지었을 때 식감이 좋게 하는 기능성 기술 개발

### 3. 가바(GABA) 코팅 쌀 제조

- 코팅기에 쌀을 붓고 코팅기를 회전시키면서 가바 침지 추출액을 5%로 준비하여 쌀에 분무하면서 열풍 혹은 알콜을 이용하여 상온에서 건조하여 가바 코팅쌀을 제조함.

#### 가. 제조과정

##### (1) 세척 - 잔류 농약이나 이물질을 제거

30℃ 이하의 냉수를 사용하며, 수용성 영양성분의 유출을 방지하기 위하여 가능한 30분 이내의 짧은 시간에 처리하였다. 위생적이고 효율적인 가공을 위해서 청결미(수세미)를 사용할 수 있다.

(2) 배양액제조

유산균 성장 촉진을 위해 고가인 효모추출물, 펩톤, 트립톤 및 소이톤을 대신하여 미강 고압추출물, 쌀뜨물, 쌀가루, 설탕 등을 첨가하고 미량원소로 이용 가능한 마그네슘 설페이트, 소듐아세테이트, 망가닉 설페이트, 페릭 설페이트, 칼슘 클로라이드를 0.1% 정도 첨가하였다. 여기에 MSG와 유산균을 첨가 배양하여 GABA를 생성하였다. 이때 가바 생성에 최적 효율을 나타내는 MSG 첨가 농도를 찾았다.

실험방법은 다음과 같다.

SS배지에 5% MSG를 넣어 *lactobacillus brevis*를 1.25 nmol로 접종후 배양시간(24, 48, 72, 96, 120h)별로 1.5ml E-tube에 sampling하고 sampling하여 원심분리(12,000 rpm× 5min)후 냉장 보관 하여 TLC 또는 NMR로 MSG가 GABA전환되는 비율을 확인하였다. TLC조건은 전개용매로 propanol : D.W.의 비율이 각각 5 : 5의 비율로 사용하였으며 발색제는 Ninhydrin용액을 사용하였다. NMR은 600MHz로 CPMG pulse sequence를 이용하여 26도에서 nt=128 로 측정하였다.



Fig. 15. 생성된 GABA의 쌀코팅 과정



Fig. 16. GABA가 코팅된 깨면 유도쌀 시제품.

단호박분말 1.5% 첨가로 색상 및 기능성을 강화(왼쪽)쌀과 강황 첨가 가바코팅쌀(오른쪽)

(3) 발효

미강-쌀배아 함유 배양액에 유산균을 초기 균수가  $10^5-10^8$  cfu/g 또는  $10^5-10^8$  cfu/ml 이 되게 접종 후 35°C에서 72시간 발효를 진행시킨다.

(4) 가바 추출물 정제

배양액 속에 생성된 가바를 주정으로 침전 후 정제하여 쌀코팅에 사용하였다.

(5) 생산된 가바는 쌀 코팅이외에도 기능성 식품, 화장품 원료 등으로 용도에 맞게 생산한다.



Fig. 17. 가바 코팅 쌀 제조 공정

\* 가바(GABA) 함량이 적은 일반쌀에 가바(GABA)를 코팅시킨 기능성 쌀로 고부가가치 상품화 - 새로운 개별인정형 기능성 소재로 이용 가능하다. 가바 함유량은 17.1mg/g까지 농도를 조절하였다.



Fig. 18. 분무건조방식의 가바 코팅 공정

구분		표준공정도					문서번호	FB13-0515
품명							제정일자	2013.05.15
규격							페이지	1
순위	공정명	공정 설명	관리항목	검사항목	관리조건 또는 검사기준	관리방법 또는 검사 방법	기특명	비 고
1	▽ 원재료 입고	원재료 입고	-	-	-	-	거래명세서	
2	□ 검사	검사기준에 따른 원료의 검수	수세미	이물혼입	이물혼입없을것	전수 관능검사	원료검사 일지	수입검사기준참조
3	○ 배합	제한한 가바와 적당량의 알콜 혼합	용해도		침전물없이 용해시킬 것	코팅액 투입 후 바닥의 침전물 확인		Color를 타내내기 위해서 천연색소 첨가 가능, 그 외 다양한 기능성 원료를 혼합하여 분무 가능
4	○ 투입	코팅탱크에 수세미 투입, 분무기에 코팅액 투입	중량 g, kg	-	-	배합비에 따른다	작업일지	작업일지에 기록
5	○ 분무	알콜을 혼합한 코팅액 분무	증발 정도	표면 건조 상태	-	쌀 표면의 건조 상태 확인	작업일지	작업일지에 기록
6	○ 건조	코팅액의 분무 후 건조	표면수분	상온	-	분무된 표면 알콜의 증발 정도 확인 후 분무를 반복	작업일지	작업일지에 기록
7	○ 포장	건조 완료 후 포장	영킴	쌀의 영킴 정도	과도한 코팅에 의한 영킴 현상	과도한 코팅에 의한 쌀의 영킴현상 발생. 코팅기 내에서의 쌀의 흐름성 확인	작업일지	작업일지에 기록

Fig. 19. 분무건조방식의 가바 코팅쌀 제조 공정도

#### 4. 가바(GABA) 코팅 쌀 중 GABA 함량 측정

GABA 함량 측정은 한국분석기술연구소(BUSAN, Korea)에 의뢰하여 건강기능식품 기능성원료 인정서 제 2011-22호 감마아미노부티르산( $\gamma$ -Aminobutyric acid) 시험방법에 따라 시행하였다. 분쇄한 GABA 코팅 쌀 1 g을 100 mL의 증류수에 녹인 후 0.02 N HCl 용액으로 20배 희석한 후 0.20  $\mu$ m membrane filter로 여과시켜 Table 1의 조건으로 고속액체 크로마토그래피(Agilent 1260 series)를 이용하여 측정하였다. 이때 측정된 GABA의 함량은 17.1 mg/g으로 측정되었다. 이 농도는 발아현미(4~8 mg/100g)에 비하여 2,000배가 높은 수치이다.

#### 검 사 성 적 서

발급번호 : G130003707      검사책임자 (성) 최선미 (부) 이원주

접수번호	1306-0296	검 사 목 적	표고원
제 품 명	가바쌀	제 조 일 자	2013.06.01
제 품 유 형		유통 기 한	..
업 소 명	용연방바이오	의 회 인	백미연
소 재 지	경상남도 김해시 라임면 창방로 83		
접수년월일	2013.06.05	검사완료일	2013.06.13
<b>시 험 결 과</b>			
시험항목	기준규격	결 과	판 정
$\gamma$ -aminobutyric acid(mg/g)	-	17.1	-
2013년 06월 13일 <b>(주) 한국분석기술연구원장</b>			
<small>*식품위생감사기관 지정, 평가 기준 제4조의2에 따라 위위 공인 시험성적서를 발급합니다.  *이 성적서만 제출한 공제에 한하며, 의뢰목적 이외의 상품 선진, 상질분, 판매처상의 분장 등에 사용될 수 없으며 법적효력이 없음.  *성적서를 받으신 후 꼭 확인하시고 영인할 때 영인하신 영인하십시오.  주소 : 부산시 동구 조영1동 1213-17 해림빌딩 3층, 전화 : 051-466-1231, 팩스 : 051-466-3298.  양식번호(KATF9-P-24-01)      개정번호(01)      개정일자(2006.12.15)</small>			

Fig. 20. 가바쌀에 함유된 가바량 분석 시험성적서

Table 4. Analytical condition of High Performance Liquid Chromatography (HPLC).

Instrument	Agilent 1260 series		
Detector	Model Agilent 1260 series, Agilent		
Column	CAPCELL PAK C18 4.6X250mm(5.0 $\mu$ m)		
Flow solvent	A: 50 mM Sodium acetate(pH 6.5)		
column oven	B: Acetonitril : MeOH : Water (45 : 45 : 10)		
Gradient	Model UV-8010, TOSOH, 40 $^{\circ}$ C		
	time	A(%)	B(%)
	0'	90	10
	12'	60	40
	13'	10	90
	17'	10	90
	17.1'	90	10
	23'	90	10
Injection volume	20 $\mu$ L		
Flow rate	1 mL/min		

또한 완성된 께면 유도 기능성 쌀의 가속화 실험을 수행할 예정이다.

표준조건에서 수행한 가속실험은 1, 3, 6개월 저장 시 수분의 함량, 변색도, 지표물질인 GABA의 함량을 측정할 예정이다.

### 제 3 절 가바 및 가바 코팅쌀의 동물 실험

#### 1. 동물실험을 통한 가바의 수면유도효과 입증

##### 가. 실험동물 및 사육환경

본 실험에서 사용된 동물은 생후 4주령 된 Sprague-Dawley rat 암컷을 (주) 샘타코로부터 구입하여 동물사육실에서 일주일간 적응 기간을 거쳤다. 적응기간 중 동물의 체중을 매일 측정하고, 체중 300 g내외의 선택한 동물들은 각 군당 30마리로 최대한 균일하게 한 cage에 한 마리씩 분포시켜 온도:  $22\pm 2^{\circ}\text{C}$ , 습도:  $50\pm 5\%$ , 명암: 12시간 light/dark cycle로 환경조건을 설정하였다.



Fig. 21. GABA와 GABA 코팅쌀을 경구투여한 쥐와 대조군(control)의 사육 과정  
경구투여한 쥐와 대조군(control)의 사육 과정

##### 나. GABA 코팅 쌀과 약물투여

GABA 코팅 쌀과 일반미를 일반사료와 같이 분쇄한 후 지름 5 mm 펠릿(pellet)으로 제조하여 매일 먹이로 공급하였다. 60 kg인 사람의 하루 쌀 섭취량을 300 g으로 보았을 때 실험군은 rat의 체중 g당 0.5 g 수준으로 GABA 코팅 쌀을 공급하였다. 양성대조군으로는 일반미를 rat의 체중 g당 0.5 g 수준으로 공급 하였고, GABA는 25 mg을 증류수 1 mL에 녹여 경구투여 하였다. 정상군은 아무런 조건 변화도 주지 않았다.

##### 다. 시약

혈액내 melatonin과 serotonin의 측정을 위해 melatonin ELISA kit와 serotonin ELISA kit는 GENWAY(San Diego, USA)사로부터 구입하였고, 양성대조군으로 사용된 GABA( $\gamma$ -Aminobutyric acid)는 Sigma-Aldrich Korea(St, Louis, MO, USA)사에서 구입하였다.

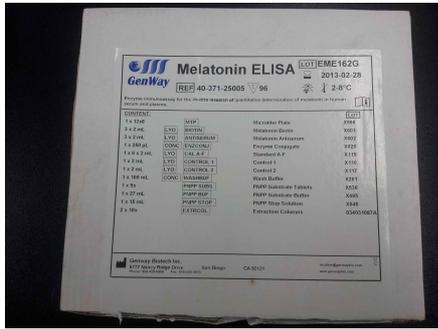


Fig. 22. Melatonin 측정 ELISA kit



Fig. 23. Serotonin 측정 ELISA kit

라. 혈액채취

혈액의 채취는 3일 간격으로 각 군을 CO<sub>2</sub> 가스실에서 희생시키고 복부정중선을 따라 개복하고 복부 대동맥으로부터 채혈하고 4 °C, 3,000 rpm에서 30 min 동안 원심분리 후 분리된 혈청을 사용하였다. 이렇게 얻어진 혈청은 melatonin, serotonin 측정에도 사용되었다.



Fig. 24. 실험동물의 혈액 채혈 과정



Fig. 25. 실험동물의 혈액 원심분리 과정

#### 마. Melatonin 정량

혈청 50  $\mu\text{L}$ 을 ELISA용 well plate에 넣고 50  $\mu\text{L}$ 의 melatonin-biotin과 50  $\mu\text{L}$ 의 melatonin 항혈청을 가하고, 접착 foil로 싸서 밀봉하고 2-8  $^{\circ}\text{C}$ 에서 14-20시간 반응시켰다. 상층액을 제거하고 250  $\mu\text{L}$ 의 assay buffer로 3번 씻은 후에 잔류액을 제거하였다. 피펫으로 secondary anti-body인 150  $\mu\text{L}$ 의 enzyme과 결합시키고 foil로 다시 싸서 상온에서 120분간 반응시킨 후 washing을 3회 반복하였다. 각각의 well에 200  $\mu\text{L}$ 의 para-nitrophenylphosphate(PNPP) 기질용액을 넣은 후, 상온에서 orbital shaker로 500 rpm으로 30분간 반응시켰다. NPP stop solution(3M, NaOH)을 50  $\mu\text{L}$ 씩 넣어 반응을 중지시킨 다음 405 nm에서 흡광도를 측정하였다.

#### 바. Serotonin 정량

피펫으로 50  $\mu\text{L}$ 의 standard와 acylated sample을 ELISA용 well plate에 각각 넣고, 50  $\mu\text{L}$ 의 serotonin-biotin과 50  $\mu\text{L}$ 의 serotonin 항혈청을 가하고 plate를 조심스럽게 흔들어 주고 나서, plate를 접착 foil로 싸서 2-8  $^{\circ}\text{C}$ 에서 16-20시간 반응시켰다. Washing buffer(phosphate buffer)로 3번 세척한 후, washing buffer액을 조심스럽게 제거하였다. 피펫으로 150  $\mu\text{L}$ 의 anti biotin을 각 well에 넣은 후에 orbital shaker 위에서 120분간 상온에서 반응시켰다. 그리고 washing buffer(phosphate buffer)로 3번 세척한 후, 잔류액을 조심스럽게 제거하였다. 각각의 well에 200  $\mu\text{L}$ 의 para-nitro-phenyl-phosphate(PNPP) substrate solution을 넣은 후 상온의 orbital shaker상에서 60분간 반응시켰다. PNPP stop solution(3M, NaOH)을 50  $\mu\text{L}$ 씩 넣어 반응을 중지시킨 다음 405 nm에서 흡광도를 측정하였다.

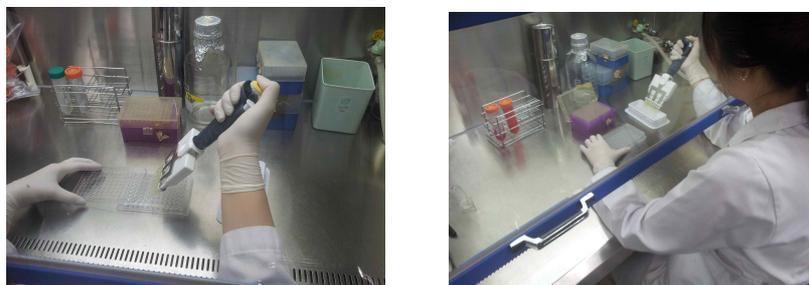


Fig. 26. 실험동물의 혈액으로부터 Melatonin 농도 측정과정



Fig. 27. 실험동물의 혈액으로부터 Serotonin 농도 측정과정

#### 사. 통계

본 실험에 대한 모든 실험 결과는 SPSS 12.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA)를 이용하여 평균치와 표준편차로 나타내었고, 통계적 유의성은 one-way ANOVA로 검정하였으며, 사후 검증으로 Duncan's post-hoc test를 실시하였고 유의성은  $p < 0.05$ 로 하였다.

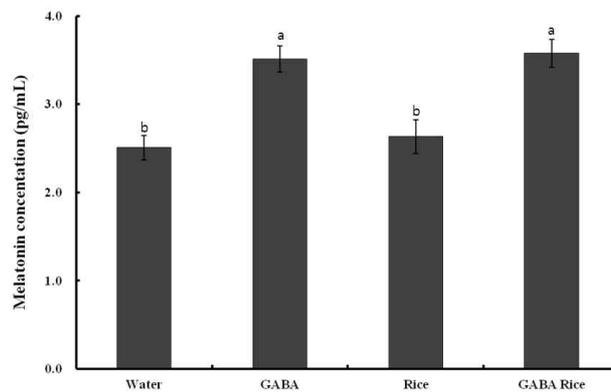


Fig. 28. Rats에 GABA, 가바쌀, 네거티브 컨트롤로 일반쌀 그리고 대조구로 물을 복용 후 채취한 혈액에서의 melatonin 농도 측정(1일). (Data are expressed as mean±SD, a, b are different group by one-way ANOVA with Duncan's post-hoc test.)

본 연구에서 GABA 코팅 쌀의 섭취에 의한 멜라토닌 효과를 확인하기 위해 물, GABA(25 mg/mL), 일반미, GABA 코팅 쌀을 쥐에게 공급하여 각각의 멜라토닌 생성량을 측정하였다. 이 결과 물만 공급한 control군의 혈청 멜라토닌의 양은  $2.508 \pm 0.139$  pg/mL이며, 양성대조군으로 사용된 GABA(25 mg/mL)와 일반미는 각각  $3.515 \pm 0.149$  pg/mL,  $2.632 \pm 0.188$  pg/mL으로 측정되었다. GABA 코팅 쌀을 공급한 실험군은  $3.578 \pm 0.158$  pg/mL이 생성되었다(Figure 2). 이 결과들을 백분율로 나타내었을 때 25 mg/mL의 GABA의 경우 40.2%, 일반미의 경우 멜라토닌 생성량은 4.9%인 반면, GABA 코팅 쌀을 섭취한 경우 42.7%의 증가를 보였다. 직접적으로 GABA를 섭취하는 것이 아닌 주

식으로 사용하는 쌀이라는 것을 감안한다면 일반미보다 GABA 코팅 쌀의 멜라토닌 유도효과는 8.7배정도 높은 것을 알 수 있었다. GABA 코팅 쌀은 주식으로 섭취하기 때문에 GABA의 혈중 영향 농도를 보기 위해 공급일별 혈중 멜라토닌 수치를 Figure 3로 나타내었다. 이 결과 GABA 코팅 쌀의 지속적인 섭취에 멜라토닌 평균함량은 유의적인 증가가 있었지만, 멜라토닌의 누적효과는 확인할 수 없었다. 이처럼 GABA 코팅 쌀의 섭취로 인해 혈액내의 멜라토닌의 함량이 증가하여 수면유도에 영향을 줄 수 있지만, 누적효과는 없어 식품으로 지속적으로 섭취해도 안전하며 수면유도 및 항 불면에 그 효과를 지속시킬 수 있을 것으로 생각된다.

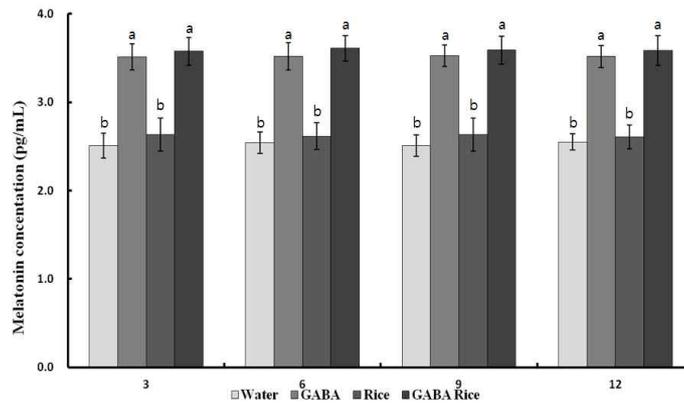


Fig. 29. 3, 6, 9, 12일간 rats에 GABA, 가바쌀, 네거티브 컨트롤로 일반쌀 그리고 대조구로 물을 복용 후 채취한 혈액에서의 melatonin 농도 측정. (Data are expressed as mean±SD, a, b are different group by one-way ANOVA with Duncan's post-hoc test.)

세로토닌 측정 또한 마찬가지로 삼일 간격으로 물, GABA(25 mg/mL), 일반미, GABA 코팅 쌀을 공급하였고 이때 쥐의 혈청 내에서 생성된 세로토닌의 양을 측정하였다. 물만 투여한 control군의 경우  $4.732 \pm 0.114$  ng/mL이며, 양성대조군인 GABA(25 mg/mL) 투여군은  $5.183 \pm 0.142$  ng/mL, 일반미 공급군은  $4.784 \pm 0.108$  ng/mL이 생성되었으며, GABA 코팅 쌀 공급군은  $5.918 \pm 0.169$  ng/mL의 세로토닌이 혈청에서 측정되었다(Figure 30). 이를 백분율로 나타냈을 때 control보다 GABA(25 mg/mL)의 경우 22.8%, 일반미는 1.1%, GABA 코팅 쌀은 25.1%의 세로토닌이 증가하였고 일반미에 비해서는 약 22.8배 높은 것으로 확인되었다. Kim 등의 연구에서 GABA(120 mg/mL)을 쥐에 투여 후 세로토닌의 증가율인 13.5%보다 약 1.9배 정도 더 높은 것을 알 수 있었다[19]. 또한 지속적인 GABA 코팅 쌀의 공급에 의한 세로토닌 함량의 유의적인 증가는 있었지만 멜라토닌과 마찬가지로 누적효과는 확인할 수 없었다(Figure 5). 이 결과로 GABA 코팅 쌀을 지속적으로 섭취함으로써 인해 세로토닌의 분비를 원활하게 만들어 정신적 안정을 가져와 수면유도효과를 기대할 수 있게 되었다.

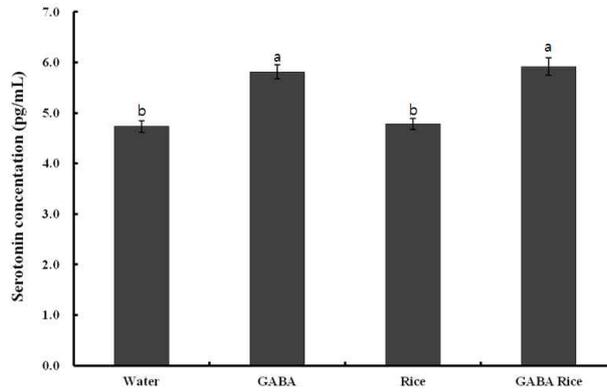


Fig. 30. Rats에 GABA, 가바쌀, 네거티브 컨트롤로 일반쌀 그리고 대조구로 물을 복용 후 채취한 혈액에서의 serotonin 농도 측정(1일). (Data are expressed as mean±SD, a, b are different group by one-way ANOVA with Duncan's post-hoc test.)

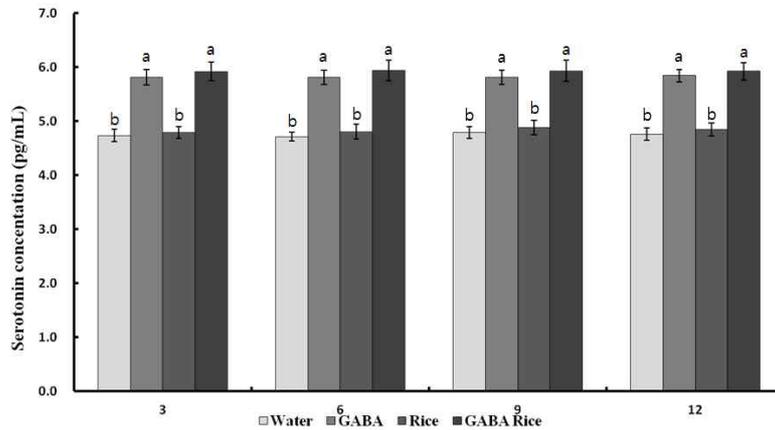


Fig. 31. 3, 6, 9, 12일간 rats에 GABA, 가바쌀, 네거티브 컨트롤로 일반쌀 그리고 대조구로 물을 복용 후 채취한 혈액에서의 melatonin 농도 측정. (Data are expressed as mean±SD, a, b are different group by one-way ANOVA with Duncan's post-hoc test.)

또한 GABA의 복용이 뇌에 어떠한 영향을 미치는 가를 조사하기 위하여 gaba를 7일간 경구 투여한 랫트를 CO<sub>2</sub> 가스실에서 희생시킨 후 소뇌와 대뇌는 분리적출 하였고 적출된 샘플은 -20℃로 1차 냉동 후 -70℃로 급랭하여 보관하여 사용하였다. 1차년도에는 본 실험을 위한 시스템을 확립하였고 2차년도에 200 ~ 250 g 수컷 랫트에 가바를 1~100 mg/kg/day씩 1일, 2일, 3일, 5일, 7일, 2주, 4주 단위로 gaba를 위내로 직접 투여 후 사육하여 측정하였다. NMR은 600MHz로 CPMG pulse sequence를 이용하여 측정하였고 data는 ChenomX 7.1을 이용하여 정량분석 하였다.

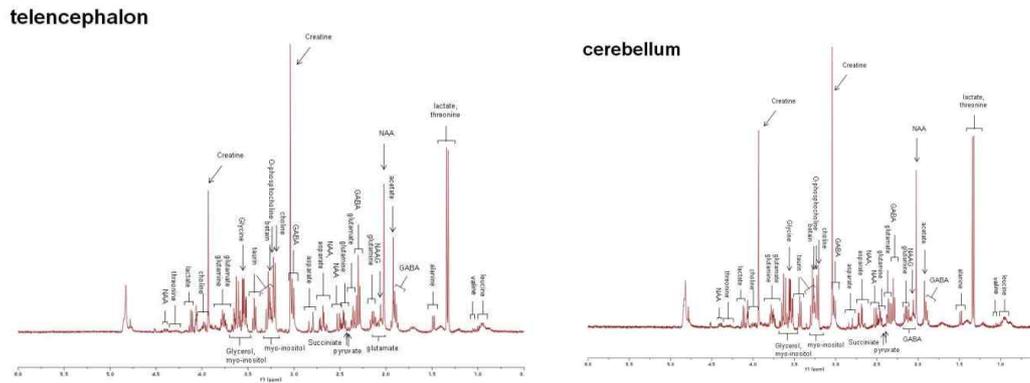


Fig. 32. GABA쌀을 섭취한 쥐의 뇌 NMR data, 대뇌(조), 소뇌(우)

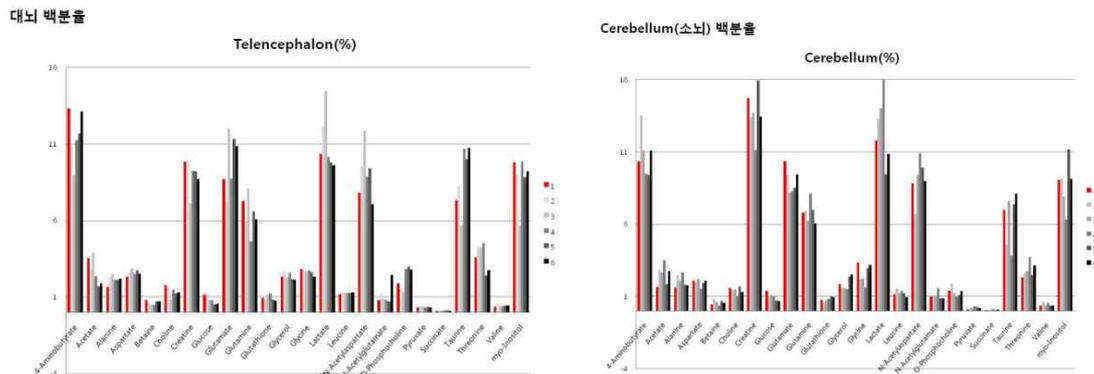


Fig. 33. GABA쌀을 섭취한 쥐의 혈액 내 아미노산 성분 변화 측정 NMR data

## 2. 숙면임상 실험

### 가. GABA 숙면 관련 뇌파 측정 시험

지원자들을 선정하여 GABA 쌀 복용 전·후의 뇌파 파형 증폭 정도를 면밀히 관찰하였다.

지원자는 20대 건강한 남자 6명 여자 9명 총 15명을 선별(TanaKa. et. al. 2009)하여 각각 7일간 GABA쌀을 100g씩 밥을 지어 하루 3번 복용시킨 후 복용 전후 뇌파를 측정하였고  $\delta$  wave (less than 4Hz)와  $\alpha$  wave (8Hz ~ 13Hz)의 증폭은 EEG-3000R 뇌파 측정 분석 프로그램을 이용하여 측정 하였다(Marike et. al).

숙면 시 나타나는 뇌파 중  $\delta$  wave (less than 4Hz)가 20% 이상 증가하며, 몸이 이완되거나 피난할 때 느껴지는  $\alpha$  wave (8Hz ~ 13Hz)가 20%이상 증가 되는 가에 효과를 알아볼 수 있는 뇌파 측정 장치를 setting 하여 임상실험을 실시하였다.

GABA쌀을 복용한 경우가 복용하지 않을 때에 비하여  $\delta$  wave와  $\alpha$  wave의 증가를 보였는데 남자의 경우  $\delta$  wave가  $20.17 \pm 1.17\%$ ,  $\alpha$  wave가  $20.5 \pm 1.87\%$  증가 하였으며, 여자의 경우  $\delta$  wave가  $19.40 \pm 2.13$ ,  $\alpha$  wave가  $19.90 \pm 2.37\%$  증가하였다.

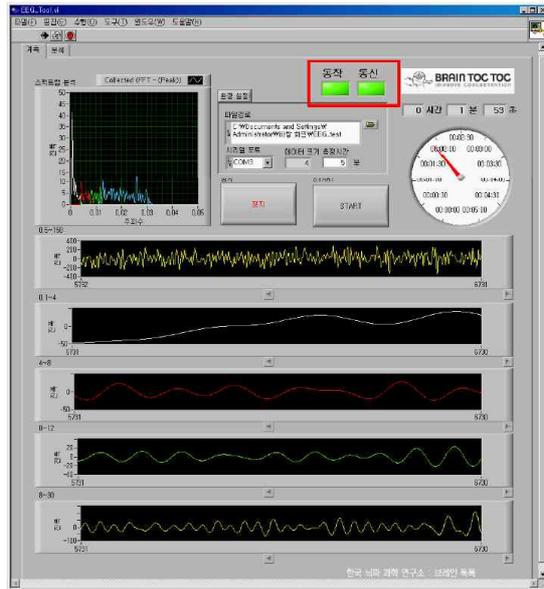
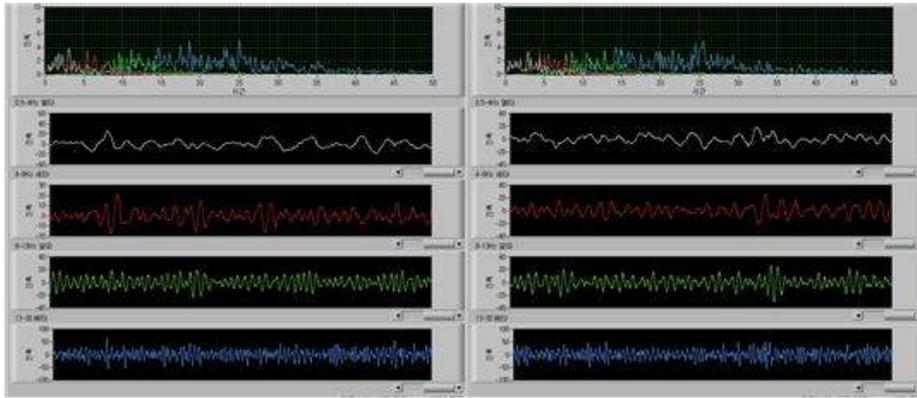


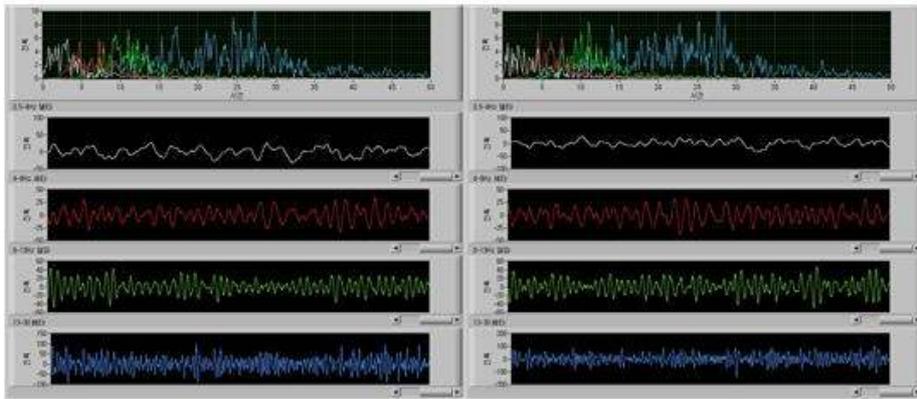
Fig. 34. 뇌파 측정기(EEG-3000R)를 이용한 수면관련 뇌파 측정 분석 프로그램



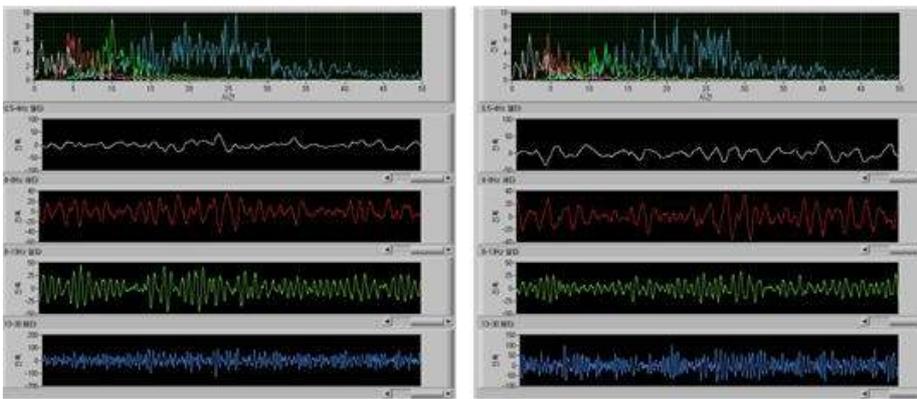
Fig. 35. 가바쌀 복용 후 뇌파를 측정하고 있는 피실험자들의 모습



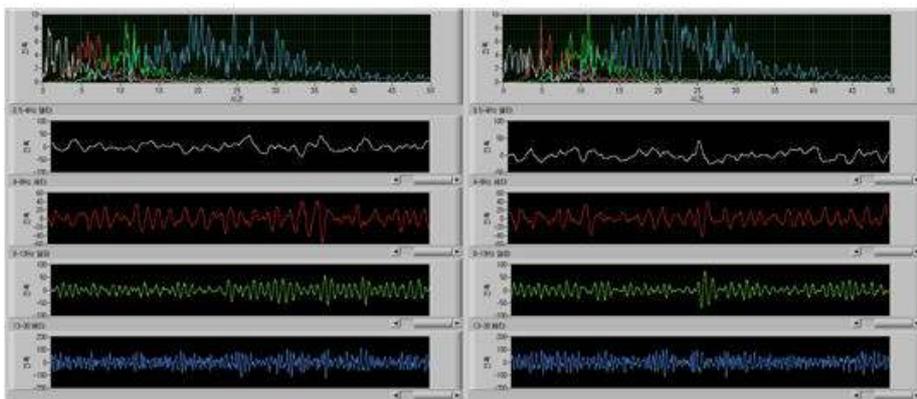
KJH 5,6



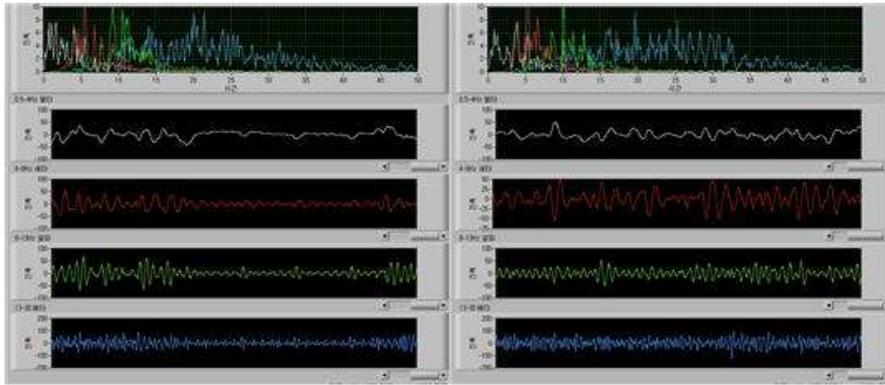
KHG 5,6



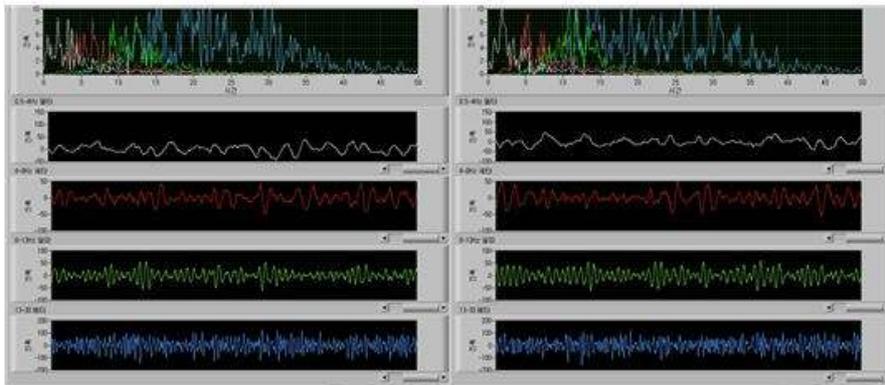
KHJ 5,6



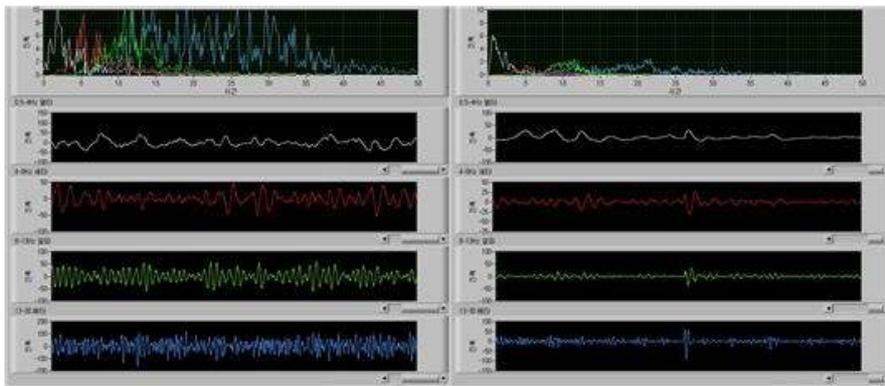
MDH 5,6



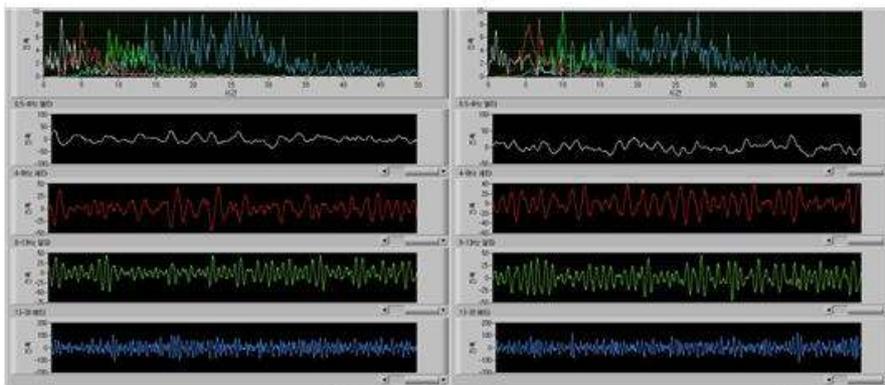
PSH 5,6



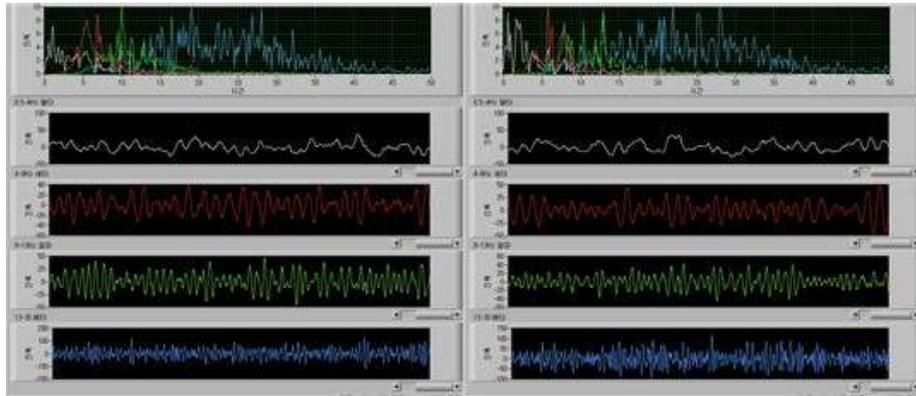
PJH 5,6



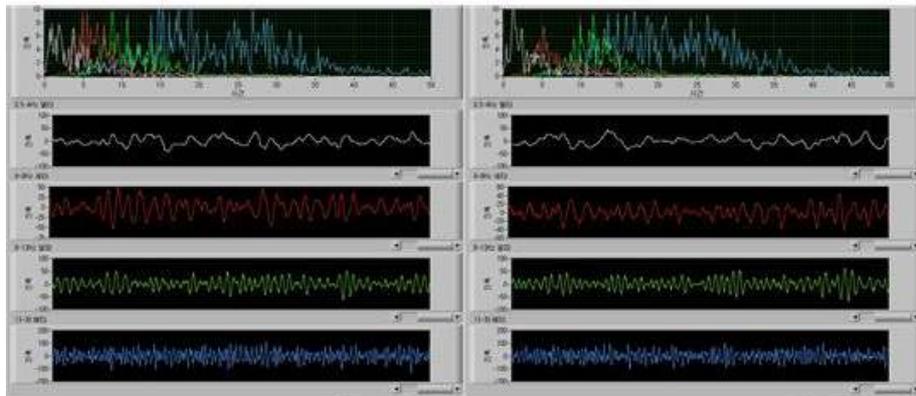
PHJ 5,4



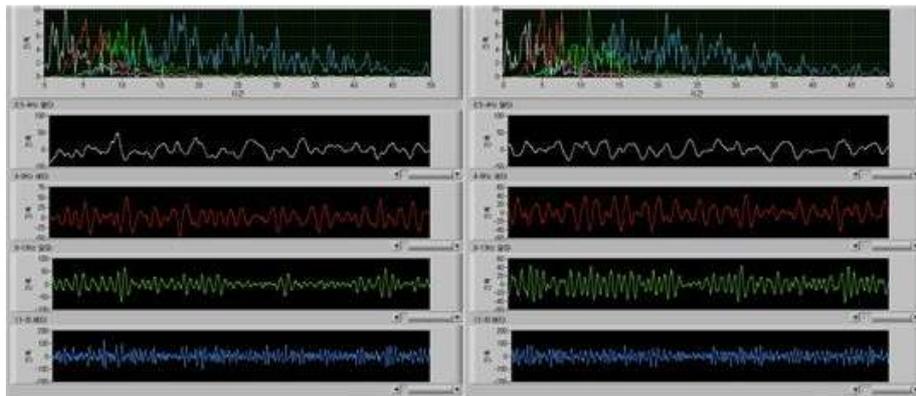
SAR 5,7



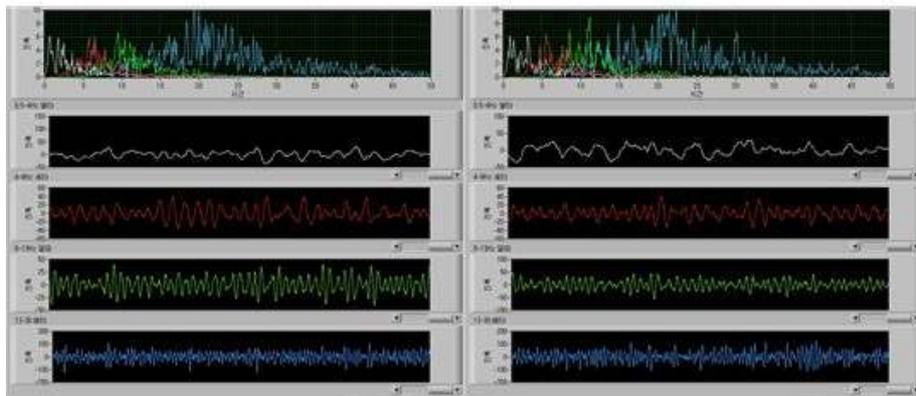
LSJ 5,7



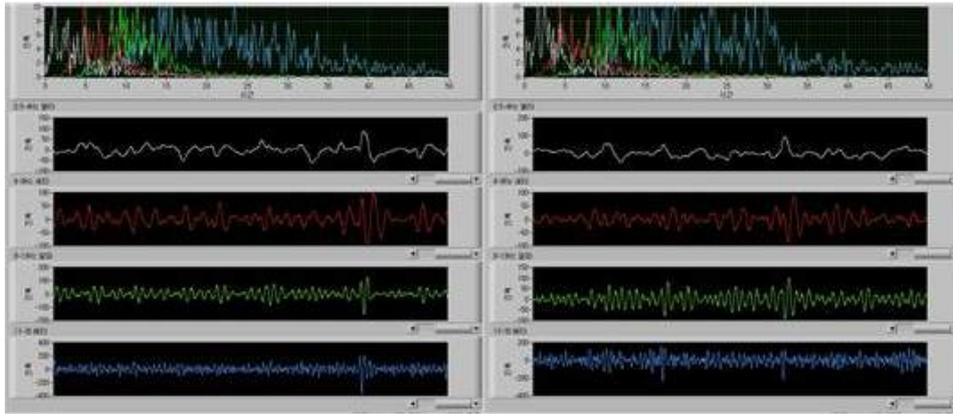
LHJ 8,9



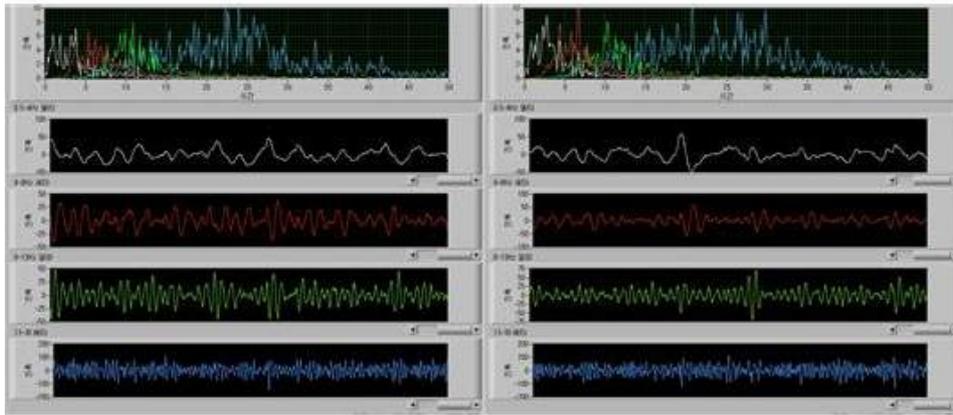
JMK 3,4



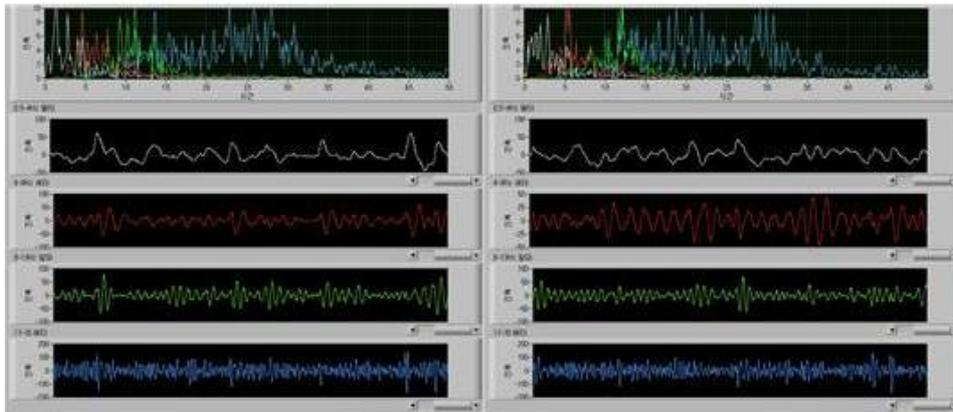
JDW 7,8



JDU 3,6



JSY 2,5



CMK 2,4

Fig. 36. 가바쌀 복용 이후 측정된 피실험자들의 뇌파 비교

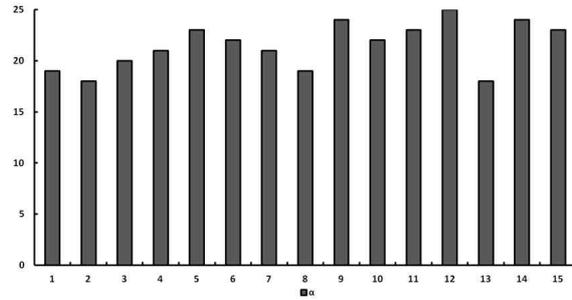


Fig. 37. 가바쌀 복용 전후 측정된 피실험자들의  $\alpha$  wave 비교

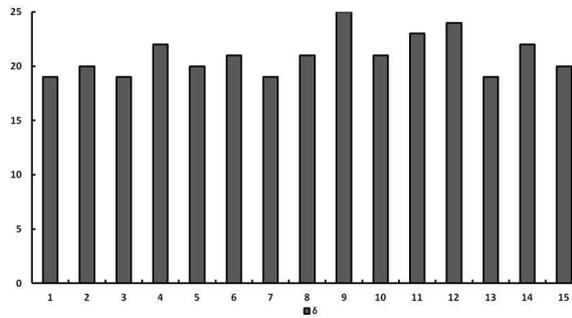


Fig. 38. 가바쌀 복용 전후 측정된 피실험자들의  $\delta$  wave 비교

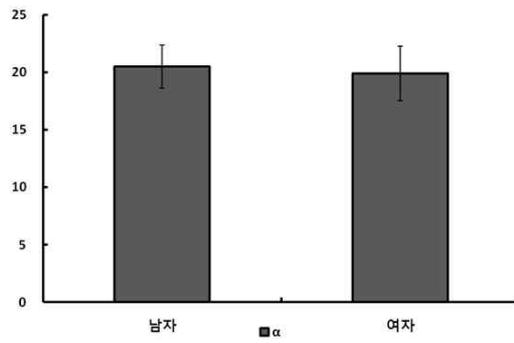


Fig. 39. 가바쌀 복용 전후 측정된 남녀 피실험자들의  $\alpha$  wave 비교

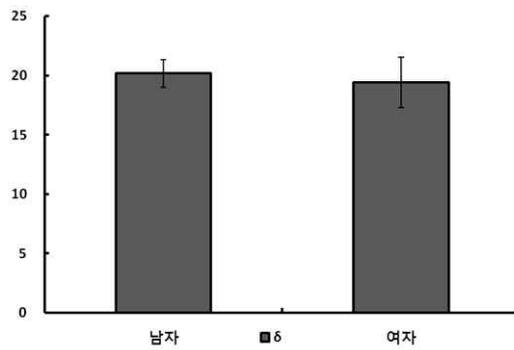


Fig. 40. 가바쌀 복용 전후 측정된 남녀 피실험자들의  $\delta$  wave 비교

## 제 4 절 개별인정형 건강기능식품 원료 신청

○ ‘유산균 발효 가바분말’ 개별인정형 건강기능식품 원료 등재 신청서 작성 신청서에는 다음과 같은 항목의 자료들로 구성하였다.

1. 제출자료 전체의 총괄 요약본
2. 기원, 개발경위, 국내외 인정 및 사용현황 등에 관한 자료
3. 제조방법 및 그에 관한 자료
4. 원료의 특성에 관한 자료
5. 기능성분(또는 지표성분)에 대한 규격 및 시험방법에 관한 자료
6. 유해물질에 대한 규격 및 시험방법에 관한 자료
7. 안전성에 관한 자료
8. 기능성 내용 및 그에 관한 자료
9. 섭취량, 섭취 시 주의사항 및 그 설정에 관한 자료
10. 의약품과 같거나 유사하지 않음을 확인하는 자료
11. 원료를 사용하여 제조하고자하는 건강기능식품의 기준 및 규격에 관한 자료

I-1. 제출자료 전체의 총괄 요약본

□ 신청원료 개요

(별첨표, 단변경)

회사명	홍원식품(주) (대표이사: 박민경)		
영업허가(신고번호)	제조업 <input checked="" type="checkbox"/> 제 2005-00025	수입업 <input type="checkbox"/>	
주소 및 연락처	*경남 김해시 안동면 개산면 695번지 *(연락처) 851) 757-1943 (팩스 851) 757-8508 담당자 (직) 황승태 (연락처) 851) 757-1943		
신청 원료명	유산균 발효 개량제		
심사 대상 분류	새로운 원료 <input checked="" type="checkbox"/>	신형 기능성 <input type="checkbox"/>	기타(예외) <input type="checkbox"/>
	개별인정 <input type="checkbox"/>	신형 섭취량 <input type="checkbox"/>	20mg/day
고시된 원료	기능성 추가 <input type="checkbox"/>	연령 간 <input type="checkbox"/>	
	섭취량 변경 <input type="checkbox"/>	신형 원료 <input type="checkbox"/>	
	제조방법 변경 <input type="checkbox"/>	제조방법 변경 <input type="checkbox"/>	
	기준규격 변경 <input type="checkbox"/>	기준규격 변경 <input type="checkbox"/>	
	시험방법 변경 <input type="checkbox"/>	시험방법 변경 <input type="checkbox"/>	
국내제조 수입원료 <input type="checkbox"/>	수입원료 <input type="checkbox"/>	수출원료 <input type="checkbox"/>	
	경우 <input type="checkbox"/>	제조원사 <input type="checkbox"/>	
	소재지 <input type="checkbox"/>		
인증번호 <input type="checkbox"/>	분사 날짜: <input type="text"/>		
품질보증서 <input type="checkbox"/>	회장 날짜: <input type="text"/>		

1) (별첨) 고시되지 않고 새로운 개별인정 신청하는 원료 (별첨) 고시된 원료 또는 개별인정원료의 기능성 추가 또는 변경(섭취량, 제조기준, 기준규격, 시험방법 또는 시험방법)

□ 제출자료 체크리스트

연번	제출자료	제출여부	첨부분호
<b>1. 제출자료 전체의 총괄 요약본</b>			
1.1	1. 제출자료 전체의 총괄 요약본	<input checked="" type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> 아니요	1-1
<b>2. 기형, 불량상태, 회색·외·연장 및 사용연장 등에 관한 자료</b>			
2.1	기형	<input checked="" type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> 아니요	2.1-1
2.2	불량상태	<input checked="" type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> 아니요	2.2-2
2.3	회색 및 연장 추가 현황	<input checked="" type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> 아니요	2.3-1
2.4	회색 및 사용 연장	<input checked="" type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> 아니요	2.4-1
<b>3. 제조방법 및 그에 관한 자료 ※ 수입기준기능성식품은 경우 제조원사기 영한한 자료 함께 제출</b>			
3.1	제조공정표	<input checked="" type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> 아니요	3.1-1
3.2	원재료별 단위공정별 제조방법 설명	<input checked="" type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> 아니요	3.2-1
3.3	사용된 원료 첨가물이 식품 및 첨가물규정에 적합인지 여부	<input checked="" type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> 아니요	3.3-1
3.4	단위공정별 기능성분(또는 지표성분) 함량태화	<input checked="" type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> 아니요	3.4-1
3.5	단위공정별 수율 태화	<input type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/> 아니요	
<b>4. 원료의 특성 등에 관한 자료</b>			
4.1	원료의 특성(식품·의약품·농산물 등)	<input checked="" type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> 아니요	4.1-1
4.2	기능성분(또는 지표성분) 및 근거	<input checked="" type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> 아니요	4.2-1
4.3	영양성분정보자료	<input checked="" type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> 아니요	4.2-2
<b>5. 기능성(또는 지표성분) 규격 및 시험방법에 관한 자료</b>			
5.1	기능성분(또는 지표성분)의 규격 및 근거	<input checked="" type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> 아니요	5.1-1
5.2	시험방법(또는 지표성분)의 시험성적서 및 분석자료 포함	<input checked="" type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> 아니요	5.1-1-1
5.3	표준물 질분 (자사표준물의 경우 순도, 구조통형, 유효기간 등 정보 추가)	<input checked="" type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> 아니요	5.2-1
5.4	기능성분(또는 지표성분)의 시험방법 (자사방법의 경우 알리데이션 자료 추가)	<input checked="" type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> 아니요	5.3-1
<b>6. 유효성분(또는 지표성분)에 대한 규격 및 시험방법에 관한 자료</b>			
6.1	유효성분 규격 합성(산, 컷드물, 중성소, 중수분)의 규격 및 근거	<input checked="" type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> 아니요	6.1-1
6.2	유효성분 규격 합성(산, 컷드물, 중성소, 중수분)의 시험성적서 및 분석자료 포함	<input checked="" type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> 아니요	6.1-1-1
6.3	유효성분 규격 태화(산/중성/중수분)의 시험성적서 및 분석자료 포함	<input checked="" type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> 아니요	6.2-1
6.4	유효성분 규격 태화(산/중성/중수분)의 시험성적서 및 분석자료 포함	<input checked="" type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> 아니요	6.3-1
6.5	※ 추가 합성의 시험성적서 및 분석자료 포함	<input type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/> 아니요	
6.6	유효성분 규격 태화(산/중성/중수분)의 시험성적서 및 분석자료 포함	<input checked="" type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> 아니요	6.4-1

연번	제출자료	제출여부	첨부분호
<b>7. 안전성에 관한 자료 (연사규정도 : )</b>			
7.1	섭취근거 정보	<input checked="" type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> 아니요	7.1-1
7.2	기능성분 또는 관련 물질에 대한 안전성 검토 정보	<input checked="" type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> 아니요	7.2-1
7.3	섭취량 평가 정보	<input checked="" type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> 아니요	7.3-1
7.4	영양평가, 영양학적유용성, 인체기능시험 정보	<input checked="" type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> 아니요	7.4-1
7.5	독성시험	단위공정별 독성시험	<input type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/> 아니요
		3개월 영생독성시험	<input type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/> 아니요
		유전자독성시험	<input type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/> 아니요
	특수독성(생식, 항암성, 면역, 발달성)	<input type="checkbox"/> <input checked="" type="checkbox"/> 아니요	
<b>8. 기능성 태화 및 그에 관한 자료</b>			
8.1	시험성적서	■ 신형원료 (논문 11 편) □ 유사원료 (논문 7 편)	8.1-1
8.2	동등시험	■ 신형원료 (논문 7 편) □ 유사원료 (논문 7 편)	8.2-1
8.3	인체기능시험	■ 신형원료 (논문 11 편, 논문 1 편) □ 유사원료 (논문 11 편, 논문 1 편)	8.3-1
<b>9. 섭취량, 섭취방법, 섭취 시 주의사항 및 그 설정에 관한 자료</b>			
9.1	섭취량 및 근거	<input checked="" type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> 아니요	9.1-1
9.2	섭취방법 및 근거	<input checked="" type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> 아니요	9.2-1
9.3	섭취 시 주의사항 및 근거	<input checked="" type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> 아니요	9.3-1
<b>10. 유효성분 근거나 유사성 근거를 확인하는 자료</b>			
10.1	건강기능식품에 사용될 수 있는 원료 여부	<input checked="" type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> 아니요	10.1-1
10.2	유효성분과 같거나 유사한 건강기능식품 여부	<input checked="" type="checkbox"/> <input type="checkbox"/> 아니요	10.2-1

Fig. 41. 개별인정형 건강기능식품 원료 신청서 내용





# 제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

## 제 1 절 목표달성도

본 연구는 유산균주를 이용한 GABA 생산 시스템을 개발하고 이를 쌀에 코팅하여 쾌면 유도 효과를 갖는 기능성 쌀을 개발하는 것이다. 따라서 다음과 같은 목표와 계획을 설정하여 연구를 수행 하였다.

### 1. 1차년도 연구 목표 및 달성도

#### 가. 연구 목표

##### (1) 쾌면 유도 가바(GABA) 코팅 쌀 제조

- (가) 유산균주를 이용한 GABA의 대량 생산
- (나) 가바(GABA)를 쌀에 침지 코팅 및 함유시키는 기술 개발
- (다) 가바(GABA) 코팅 쌀 제조

##### (2) 가바(GABA) 생산 기술 개발

- (가) Monosodium Glutamate(MSG)를 가바로 전환하기 위해 사용되는 균주 확보
- (나) 기존 균주의 배양 배지보다 경제적인 배지 개발

#### 나. 달성도

##### (1) 쾌면 유도 가바(GABA) 코팅 쌀 제조

- (가) 유산균주를 이용한 GABA의 대량 생산

유산균주 *Lactobacillus brevis* RB-28를 이용한 GABA의 lab scale 생산과 500 L pilot scale 의 대량 생산 시스템 개발을 완료 하였다.

- (나) 가바(GABA)를 쌀에 침지 코팅 및 함유시키는 기술 개발

쌀에 기능성 액을 침지시키면 건조 후에 쌀의 표면이 갈라지는 crack 현상이 발생하여 쌀이 상품성이 떨어진다는 따라서 본 연구에서는 쌀에 기능성 물질인 GABA를 분무 코팅하여도 crack이 가지 않는 코팅법을 개발하여 상품화 하였다.

또한 GABA 함유 분무액을 코팅 후 쌀이 엉켜 붙지 않는 최적 농도를 결정하여 쾌면유도 가능성을 갖는 쌀을 상품화 하였다.

- (다) 가바(GABA) 코팅 쌀 제조

최적의 코팅액 제조를 통하여 엉키지 않는 가바코팅쌀 제조를 제조하였고 GABA의 함유 농도는 17.1 mg/g으로 쌀 대비 1.7%까지 GABA의 함량을 높일 수 있다.

##### (2) 가바(GABA) 생산 기술 개발

- (가) Monosodium Glutamate(MSG)를 가바로 전환하기 위해 사용되는 균주 확보

GABA 생산 균주인 *Lactobacillus brevis* RB-28 확보하였고 이것의 16S rRNA 확인을 통해

*Lactobacillus brevis* 임을 확인 하였다.

(나) 기존 균주의 배양 배지보다 경제적인 배지 개발  
유산균주인 *Lactobacillus brevis* Rb-28을 이용한 GABA 생성 조건 확립 및 SYS 배지 및 SS 배지 개발하였고 이는 기존 유산균 배양 배지인 MRS 배지에 비해 각각 생산 단가가 15%와 10%로 저렴하다.

또한 500 L 배양기를 이용한 대량배양과 농축기와 분무건조기를 이용한 GABA 함유 분말 제조 기술 개발로 효율적으로 배지를 상품화 및 제품화가 가능해 졌다.

## 2. 2차년도 연구 목표 및 달성도

### 가. 연구 목표

#### (1) 가바 및 가바 코팅 쌀의 동물실험

(가) 동물실험을 통한 가바의 수면 유도 효과 검증

(나) 숙면 임상시험

#### (2) 개별인정형 건강기능식품 원료 신청

(가) 수면 유도 효과를 갖는 개별인정형 건강기능식품 원료 등재 신청

### 나. 달성도

#### (1) 가바 및 가바 코팅 쌀의 동물실험

(가) 동물실험을 통한 가바의 수면 유도 효과 검증

쥐의 혈액을 추출하여 숙면과 관련된 Melatonin 혹은 serotonin을 이용한 측정하여 일반미보다 GABA 코팅 쌀의 멜라토닌 유도효과는 8.7배정도 높은 것을 알 수 있었고 serotonin의 양은 일반미에 비해서는 약 22.8배 높은 것으로 확인되었다.

(나) 숙면 임상시험

건강한 남자 6명 여자 9명 총 15명을 선별하여 각각 7일간 GABA쌀을 100g씩 밥을 지어 하루 3번 복용시킨 후 복용 전후 뇌파를 측정하여 남자의 경우  $\delta$  wave가  $20.17 \pm 1.17\%$ ,  $\alpha$  wave가  $20.5 \pm 1.87\%$  증가 하였으며, 여자의 경우  $\delta$  wave가  $19.40 \pm 2.13$ ,  $\alpha$  wave가  $19.90 \pm 2.37\%$  증가함을 측정하였다.

#### (2) 개별인정형 건강기능식품 원료 신청

(가) 수면 유도 효과를 갖는 개별인정형 건강기능식품 원료 등재 신청

‘유산균 발효 가바분말’ 개별인정형 건강기능식품 원료 등재 신청서 작성에 필요한 항목의 자료를 아래와 같이 구성하였다.

① 제출자료 전체의 총괄 요약본

② 기원, 개발경위, 국내외 인정 및 사용현황 등에 관한 자료

③ 제조방법 및 그에 관한 자료

④ 원료의 특성에 관한 자료

⑤ 기능성분(또는 지표성분)에 대한 규격 및 시험방법에 관한 자료

⑥ 유해물질에 대한 규격 및 시험방법에 관한 자료

- ⑦ 안전성에 관한 자료
- ⑧ 기능성 내용 및 그에 관한 자료
- ⑨ 섭취량, 섭취 시 주의사항 및 그 설정에 관한 자료
- ⑩ 의약품과 같거나 유사하지 않음을 확인하는 자료
- ⑪ 원료를 사용하여 제조하고자하는 건강기능식품의 기준 및 규격에 관한 자료

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	달성도 (%)	연구개발 수행내용
1차 년도 (2011)	○ 쾌면 유도 가 바(GABA) 코팅 쌀 제조	유산균주를 이용한 GABA의 대량 생산	100	유산균주 <i>Lactobacillus brevis</i> RB-28 를 이용한 GABA의 대량 생산 시 스템 개발
		가바(GABA)를 쌀에 침지 코팅 및 함유시키는 기술 개발	100	침지시키면 건조 후에 쌀의 표면 이 갈라지는 crack 현상이 발생되 지 않는 코팅 기술 개발 코팅 후 쌀이 영겨붙지 않는 최적 농도 결정
		가바(GABA) 코팅 쌀 제조	100	최적의 코팅액 제조를 통하여 영 키지않는 가바코팅쌀 제조
	○ 가 바 (GABA) 생산 기술 개발	Monosodium Glutamate(MSG) 를 가바로 전환하기 위해 사용 되는 균주 확보	100	GABA 생산 균주인 <i>Lactobacillus brevis</i> RB-28 확보
		기존 균주의 배양 배지보다 경 제적인 배지 개발	100	유산균주인 <i>Lactobacillus brevis</i> Rb-28을 이용한 GABA 생성 조건 확립 및 SS 배지 개발 교반기를 이용한 효율적이고 대량 의 미강 추출액 제조
2차 년도 (2012)	○ 가 바 및 가 바 코팅 쌀의 동물실 험	동물실험을 통한 가바의 수면 유도 효과 검증	100	쥐의 혈액을 추출하여 숙면과 관련 된 Melatonin 혹은 serotonin을 이 용한 측정.
		숙면 임상시험	100	숙면시 나타나는 뇌파인 $\delta$ 파와 $\alpha$ 파를 측정하여 숙면에 관한 효과 측정
	○ 개별인정형 건 강기능식품 원료 신청	수면 유도 효과를 갖는 개별인 정형 건강기능식품 원료 등재 신청 및 기능성 쌀 허가 신청	100	식품의약품안전청에 제출할 개별인 정형 건강기능식품 기능성 원료 신 청 자료를 완성

## 제 2 절 관련분야에의 기여도

### 1. 기술적 측면

- 가. 기존 유산균 배양 배지인 MRS 배지보다 10%이하의 경제적인 SYS 배지 및 SS 배지를 개발함으로써 GABA 생산 단가를 낮출 수 있다.
- 나. GABA 복용에 따른 쾌면정도를 측정할 수 있는 동물시험법을 개발 하였다.
- 다. MSG의 GABA 전환률을 신속하고 정확하게 할 수 있는 측정법을 개발하였다.

### 2. 경제·산업적 측면

- 가. 수면 유도제를 복용하지 않고 쾌면에 이를 수 있는 기능성 쌀로 인해 관련 의료비 절감 효과를 얻을 수 있다.
- 나. 기존 선진국인 미국이나 일본의 가바 수입의 대체 효과를 얻을 수 있다.
- 다. 위축된 쌀소비를 촉진 시켜 농가 소득에 도움을 줄 수 있다.
- 라. 개별인정형 기능성원료를 통해 새로운 건강기능식품 시장을 형성할 수 있다.   마.

## 제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

### \* 실용화·산업화 계획(기술실시 등)

- 식품의약품안전처로부터 쾌면유도에 도움을 줄 수 있는 개별인정형 건강기능식품 소재로 허가를 취득 후 건강기능식품 사업화와 쾌면유도 기능성 쌀을 상품화 하여 내수 및 해외로 수출할 계획이다.

### \* 교육·지도·홍보 등 기술확산 계획 등

- 본 연구결과로 개발된 MSG의 GABA 전환 측정 시스템은 GABA 생산을 하는 기업이나 연구자에게 도움을 줄 있는 시스템으로 특허 등록 후 기술 이전이나 홍보 등에 이용할 계획이다.
- MRS 배지에 비해 생산 단가가 10%정도인 SYS 배지와 SS 배지 관련 특허를 등록 후 기술 이전을 할 계획이다.

### \* 특허, 품종, 논문 등 지식재산권 확보계획 등

#### - 특허 출원 2건 출원

감마-아미노부티릭산 생산 유산균 배양 시스템(출원번호 10-2012-0106173)과 쾌면 효과를 갖는 가바 코팅쌀 및 가바 코팅쌀 제조방법(출원번호 10-2013-0069433)의 2건의 특허를 출원 하였다.

#### - 비SCI 논문 1편 게재 및 1편 투고

Mono sodium glutamate (MSG) 발효로 얻은 GABA 코팅 쌀에 의한 수면유도 효과, 한국공업화학회지, 2013. Vol24(6) 게재 및 SCI 논문 1편을 더 투고할 예정이다.

## 제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

해당사항 없음

## 제 7 장 연구시설·장비 현황

해당사항 없음

## 제 8 장 참고문헌

- Bae Mi-Ok, Hye-Jin Kim, Youn-Soo Cha, Myung-Ki Lee, and Suk-Heung Oh, 2009, Effects of Kimchi Lactic Acid Bacteria *Lactobacillus* sp. OPK2-59 with High GABA Producing Capacity on Liver Function Improvement, *J Korean Soc Food Sci Nutr.*, 38(11), 1499~1505.
- Bown, A. W. and B. J. Shelp. 1997. The metabolism and functions of  $\gamma$ -aminobutric acid. *Plant Physiol.* 115, 1-5.
- Chu Min Kyung, 2006, Pharmacologic Treatments of Insomnia, *J. Kor. Sleep Soc.*, Vol. 1, 45-51.
- Difiglia, M. 1990. Aronin, Synaptic interactions between GABAergic neurons and trigemiothalamic cells in the rat trigeminal nucleus caudalis. *Synapse* 6, 358-363.
- Edinger JD, Means MK. 2005, Overview of Insomnia: Definition, Epidemiology, Differential Diagnosis and Assessment. In: Kryger MH, Roth T, Dement WC. Principles and Practice of Sleep Medicine. 4th ed. Philadelphia: Elsevier Saunders. 702-713.
- Fields, H.L. and A. I. Basbaum. 1994. Central nervous system mechanisms of pain modulation, pp. 243-257 In P.D. and Wall, R. Melzak, (Eds.), Textbook of Pain, 3rd ed., Churchill Livingstone, Edinburgh.
- Hirusi, K. 2000. Recent studies on Biological function of GABA, On improvements of hypertension and brain function, *Food & Develop.*, 36(6), 4-6.
- Horisu, M., Y. Maseda and K. Kawai. 1990. A new process for soy sauce fermentation by immobilized yeasts. *Agric. Biol. chem.* 54, 295-324.
- Katrin End, Katia Gamel-Didelon, PhD, Heike Jung, MD, Markus Tolnay, MD, Dieter Lüdecke, MD, Manfred Gratzl, MD, and Artur Mayerhofer, MD, 2005, Receptors and Sites of Synthesis and Storage of  $\gamma$ -Aminobutyric Acid in Human Pituitary Glands and in Growth Hormone Adenomas, *Anatomic Pathology*, 124, 550-558.
- Kitaka, A., T. Dosya and O. Dakenori. 2000. Development of a super GABA by lactic acid fermentation. *Food & Develop.* 36(6), 12-14.
- Lu Xiao Xue, Chunyan Xie and ZhenXin Gu, 2009, Optimisation of Fermentative

Parameters for GABA Enrichment by *Lactococcus lactis*, *Czech J. Food Sci.*, Vol. 27, No. 6: 433 - 42.

Marike Lancel, Johannes Faulhaber & Rudolf A. Deisz, 1988, Effect of the GABA uptake inhibitor tiagabine on sleep and EEG power spectra in the rat, *British Journal of Pharmacology*, 123, 1471 - 1477.

Ryu Beung Ho and Jae Ho Jeon, 2004, Continuous Production of  $\gamma$ -aminobutyric Acid by Immobilization of *Lactobacillus brevis*, *Journal of Life Science*, Vol. 14. No. 1. 167-173.

Seok JH, Park KB, Kim YH, Bae MO, Lee MK, Oh SH., 2008. Production and characterization of Kimchi with enhanced levels of  $\gamma$ -aminobutyric acid. *Food Sci Biotechnol.* 17: 940-946.

Tanaka Hiroko, Kenichi Watanabe, Meilei Ma, Masao Hirayama, Takashi Kobayashi, Hiroshi Oyama, Yoshiko Sakaguchi, Mitsuo Kanda, Makoto Kodama, and Yoshifusa Aizawa, 2009, The effect of  $\gamma$ -aminobutylic acid, vinegar, and dried bonito on blood pressure in normotensive mildly or moderately hypertensive volunteers, *J. Clin. Biochem. Nutr.*, 45, 93 - 100.

Walsh JK. 2004, Clinical and socioeconomic correlates of insomnia. *J. Clin. Psychiatry.*, Vol. 65, 13-19.

Yokoyama, S., J. I. Hiramatsu and K. Hayakawa. 2002. Production of  $\gamma$ -aminobutyric acid from alcohol distillery lees by *Lactobacillus brevis* IFO-12005. *J. Biosci. Biotech.*, 93, (1), 95-97.