(뒷면)

주 의
(편집순서 8)

(15 포인트 고딕계열)

↑
6cm
↓

지속가능한 바이오매스의 고부가식품소재화 발효기술과 제품화 연구

농림축산식품부

↑
3cm
↓

(앞면)

발간등록번호
11-1543000-000970-01

5cm
↓

지속가능한 바이오매스의 고부가식품소재화 발효기술과 제품화 연구

(A Study of Fermentation Technology and Product Development of Sustainable Biomass)

농업회사법인 청맥(주)

↑
9cm
↓

농 림 축 산 식 품 부

↑
4cm
↓

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

이 보고서를 "지속가능한 바이오매스의 고부가식품소재화 발효기술과 제품화 연구" 과제의 보고서로 제출합니다.

2015 년 8 월 일

주관연구기관명 : 농업회사법인 청맥(주)
주관연구책임자 : 김 재 주
연 구 원 : 김 혜 진
연 구 원 : 조 영 돈
연 구 원 : 김 금 순
협동연구기관명 : (주)남양농산
협동연구책임자 : 신 도 철
연 구 원 : 조 진 순
협동연구기관명 : 우석대학교 산학협력단
협동연구책임자 : 오 석 홍
연 구 원 : 김 수 곤
연 구 원 : 김 지 선
연 구 원 : 김 은 선
연 구 원 : 이 요 셉
협동연구기관명 : (재)전북생물산업진흥원
협동연구책임자 : 한 두 원
연 구 원 : 송 윤 석
연 구 원 : 김 영 아
연 구 원 : 이 근 하

요 약 문

Ⅰ. 제 목

지속가능한 바이오매스의 고부가식품소재화 발효기술과 제품화 연구

Ⅱ. 연구성과 목표 대비 실적

(단위 : 건수)

구분	특허출원	논문(비SCI)	기술실시(이전)	상품화	언론홍보
목표	5	2	3	3	1
실적	6	-	3	3	1

Ⅲ. 연구개발의 목적 및 필요성

"지속가능한 발전"은 정부 및 기업의 발전관련 행위의 중심적 지침으로써 "지속가능성"이란 맥락에서 다양한 물질 및 에너지를 동시에 생산할 수 있는 바이오매스(biomass)의 사용은 필수불가결하다. 현재, BT분야의 정부 정책방향은 석유화학 기반 경제에서 바이오매스 기반 경제로 변화되고 있기 때문에 부산물, 폐기물, 저평가된 지속가능한 바이오매스의 발굴 및 적극적 활용을 통한 바이오매스 기반의 산업 육성이 필요한 실정이다.

쌀과 보리는 세계 3대 곡물에 포함되고, 쌀을 주식으로 하는 인구는 세계 인구 전체의 34%인 약 30억 명에 이른다(2011, 농촌진흥청). 쌀 및 보리의 도정과정에서 발생되는 미강의 연간 생산량은 약 40만 톤, 맥강 생산량은 약 6만 2,000톤이다(2011, 국제연합식량농업기구, 2012, 축산연구소). 아시아 국가들은 쌀과 보리를 주식으로 하기 때문에 지속적인 인구증가와 함께 미강과 맥강의 생산량 증가가 예상된다. 미강과 맥강은 GABA, Ornithine, 비타민류, 미네랄, 식이섬유 등 다양한 기능성 물질이 함유되어 있고, 이 중 GABA와 Ornithine은 항비만 및 항스트레스 효능이 보고되었다. 현재, 미강과 맥강은 농업 부산물로서 가축사료 등으로 사용되고 있고, 일부는 폐기되는 상황이므로 이러한 지속가능한 바이오매스의 고부가가치 자원화 기술이 절실히 필요하다.

세계보건기구(WHO)는 비만을 '세계적인 전염병'으로 언급하였고, 2015년까지 비만인구가 15억 명에 달할 것으로 예상하고 있으며, 실제 OECD국가 평균 비만율는 48.9%에 달한다(2010, 통계청). 국내 성인 남성(35.6%) 및 여성(26.5%)의 비만율 또한 증가 추세이고, 그에 따른 의료비 지출은 일반인에 비해 36%이상 추가 지출하고 있는 실정이다(2010, 통계청, 2012, 기획재정부).

다른 한편, 2009년 과로, 스트레스 등에 따른 뇌·심혈관계 질환 사망자는 320명이고, 국내 청소년의 70%는 스트레스를 인지하고 있으며, 청소년 자살율은 10만 명당 15.3명에 이른다(2010, 한국산업안전보건공단, 2011, 통계청). 따라서, 항비만 및 항스트레스 식품개발이 필요한

시점이다.

이에 본 연구에서는 미강과 맥강을 주원료로 하여 GABA 및 Ornithine의 고생산 유산균을 활용한 발효를 통해 GABA 및 Ornithine 함량을 증진시키고, 그 발효소재를 이용한 고부가가치 기능성 식품을 개발하고자 한다.

Ⅳ. 연구개발 목표 및 내용

1. 연구개발 최종목표

- ○ 바이오매스(미강/맥강)를 이용한 항스트레스 및 항비만 효능 발효소재(GABA, Ornithine) 확보
- ○ 기능성 발효소재의 항스트레스 및 항비만 효능평가
- ○ 기능성 발효소재(GABA, Ornithine)의 제조공정 확립
- ○ 항스트레스 및 항비만 기능성의 쿠키, 선식, 코팅곡물 개발

2. 연구개발 주요내용

- ○ 미강과 맥강을 이용한 GABA 및 Ornithine 발효기술 개발
- ○ 발효물의 소재화공정 확립
- ○ 항스트레스 및 항비만 기능성의 쿠키, 선식, 코팅곡물의 제조공정 개발
- ○ 기능성 소재 및 제품의 항스트레스 및 항비만 효능평가(*in vitro/in vivo*)
- ○ 쿠키, 선식, 코팅곡물제품의 네이밍 및 패키지디자인 개발

Ⅴ. 연구개발결과

본 연구에서는 미강과 맥강을 발효원료로 사용하여 유산균에 의해 GABA(γ-aminobutyric acid)와 Ornithine을 생산하고, 소재화하여 항스트레스 및 항비만 기능성의 쿠키, 코팅곡물, 선식제품 개발을 수행하였다. 본 연구는 크게 (1)GABA 발효소재를 이용한 항스트레스 쿠키 및 코팅곡물 개발과 (2)Ornithine 발효소재를 이용한 항비만 선식개발로 나누어 진행하였다.

첫 번째로, 전통 된장과 간장으로부터 GABA 생산능이 탁월한 MMD-11(*Enterococcus faeium*)과 SOM-6(*Lactobacillus sakei*)을 분리·동정하였다. MMD-11은 20%(w/v) 미강과 1%(w/v) MSG(monosodium glutamate)를 첨가한 발효에서 1,089 mg/100 g의 GABA를 생산하였고, 20%(w/v) 맥강과 1%(w/v) MSG(monosodium glutamate)를 첨가한 발효에서는 1,272 mg/100 g의 GABA를 생산하였다. 그 후, 미강과 맥강의 발효물은 액상(원심분리→여과→농축)과 분말(원심분리→동결건조) 소재화공정을 거쳐 각각의 미강발효물 액상소재(11,878 mg/100 g) 및 분말소재(13,968 mg/100 g), 맥강발효물 액상소재(12,894 mg/100 g) 및 분말소재(14,534 mg/100 g)를 제조하였다. GABA 발효소재의 대량생산은 SOM-6에 의해 20%(w/v) 미강 또는 맥강과 1%(w/v) MSG를 첨가한 100 L 발효에서 수행하였다. 미강발효를 위한 공정조건으로 온도 35℃, 교반속도 100 rpm, 통기량 0.4 vvm이 결정되어 1,176 mg/100 g의 GABA를 생산하였고, 맥강발효는 35℃, 120 rpm, 0.6 vvm 조건에서 1,207 mg/100 g의 GABA를 생산하였다. 각 발효액은 여과 및 동결건조 공정에 의해 각각 13,401 mg/100 g, 13,882 mg/100 g의 GABA

분말소재를 수득하였다. GABA 쿠키를 개발하기 위해 GABA 분말소재가 각각 0, 0.4, 0.7, 1.0%(w/w) 첨가된 반죽의 특성을 조사한 결과, 대조구와 비교하여 pH는 유사하였고, 밀도는 약간 감소하였으며, 색도의 a value와 b value는 약간 낮은 값을 나타낸 반면, L value는 첨가된 GABA 분말소재의 증가에 따라 증가하는 경향을 나타내었다. 위 반죽으로 제조한 쿠키의 특성을 대조구와 비교한 결과, pH, 수분함량, 팽창율은 유사하였고, 손실률은 증가하였으며, 색도의 L value는 증가, a value는 감소, b value는 유사하였다. 또한 첨가된 GABA함량이 쿠키제조 후에도 소실되지 않고 유지되는 것을 확인하였다. 쿠키는 배합, 반죽, 성형, 냉동(-20℃, 4시간), 절단, 굽기(180℃, 10분), 냉각(상온, 2시간)공정에 의해 제조하였고, GABA 코팅곡물은 현미의 세척, 건조(80℃, 4시간) 후 GABA 분말소재 용액을 분사하여 건조(80℃, 5시간)시켜 제품을 제조하였다. GABA 발효소재와 쿠키 및 코팅곡물의 항스트레스 효능(*in vivo*)은 실험동물의 체중, 식이섭취량, 혈중 지질농도, 간 지질농도, AST(Aspartate aminotransferase)농도, ALT(Alanine aminotransferase)농도, 혈중 corticosterone 농도, ACTH(Adrenocorticotropic hormone)농도를 분석하여 항스트레스 효능을 검증하였다. GABA 쿠키 및 코팅곡물의 유통기한 시험결과, 각각 12개월과 36개월로 설정되었고, '프리미엄 통곡물수제쿠키'와 힐미(힐米)로 네이밍되어 제품화하였다.

두 번째로, 미강과 맥강으로부터 Ornithine을 생산하는 RBO1-49(*Pediococcus pentosaceus*)과 BBO1-48(*Weissella cibaria*)을 분리·동정하였다. RBO1-48은 20%(w/v) 미강과 1%(w/v) L-arginine을 첨가한 발효에서 1,032 mg/100 g의 Ornithine을 생산하였고, BBO1-48은 20%(w/v) 맥강과 1%(w/v) L-arginine을 첨가한 발효에서 1,085 mg/100 g의 Ornithine을 생산하였다. 그 후, 각 발효물은 액상(원심분리→여과→농축)과 분말(원심분리→동결건조) 소재화공정을 거쳐 각각의 미강발효물 액상소재(11,428 mg/100 g) 및 분말소재(13,051 mg/100 g), 맥강발효물 액상소재(10,757 mg/100 g) 및 분말소재(12,894 mg/100 g)를 제조하였다. 미강을 이용한 Ornithine 발효소재의 대량생산은 RBO1-49에 의해 20%(w/v) 미강과 1%(w/v) L-arginine을 첨가한 100 L 발효에서 수행하였다. 공정조건으로 온도 30℃, 교반속도 100 rpm, 통기량 0.4 vvm이 결정되어 1,177 mg/100 g의 Ornithine을 생산하였다. 맥강발효는 BBO1-48에 의해 20%(w/v) 맥강과 1%(w/v) L-arginine을 첨가하여 100 L 발효에서 30℃, 120 rpm, 0.6 vvm 조건에서 1,134 mg/100 g의 Ornithine을 생산하였다. 각 발효액은 여과 및 동결건조 공정에 의해 각각 14,007 mg/100 g, 13,948 mg/100 g의 Ornithine 분말소재를 수득하였다. Ornithine 선식은 세척, 증자(100℃, 30분) 건조(55℃, 24시간), 볶음(95℃, 20분), 분쇄, 혼합공정을 거쳐 제품을 제조하였다. Ornithine 발효소재와 선식의 항비만 효능(*in vivo*)은 실험동물의 체중, 식이섭취량, 부고환 지방량, 간 중량, 혈중 지질농도, 간 지질농도, 공복 혈당, 혈중 인슐린농도, 혈중 렙틴농도를 분석하여 항비만 효능을 검증하였다. Ornithine 선식의 유통기한은 2개월로 설정되었고, 천천히 즐기는 식사를 의미하는 '슬로우밀(Slow Meal)로 네이밍되어 제품화하였다.

Ⅵ. 연구개발 성과 및 성과활용 계획

1. 연구개발 성과

○ 특허출원(6건)

번호	특허명	국가명	출원일	출원번호	비고
1	오르니틴을 함유하는 미강 또는 맥강 발효소재의 제조방법 및 그 제조방법에 의해 제조된 오르니틴을 함유하는 미강 또는 맥강 발효소재	대한민국	2014.07.21	10-2014-0091901	출원
2	가바를 함유하는 미강 또는 맥강 발효소재의 제조방법 및 그 제조방법에 의해 제조된 가바를 함유하는 미강 또는 맥강 발효소재	대한민국	2014.07.21	10-2014-0091904	출원
3	상표등록출원(힐米)	대한민국	2015.02.05	45-2015-0001115	출원
4	보리가루발효물을 이용한 쿠키 및 이의 제조방법	대한민국	2015.07.20	10-2015-0102222	출원
5	보리가루발효물을 이용한 선식 및 이의 제조방법	대한민국	2015.07.20	10-2015-0102226	출원
6	쌀가루발효물을 코팅하여 가바가 함유된 현미 및 이의 제조방법	대한민국	2015.07.20	10-2015-0102229	출원

○ 논문(2건 심사 중)

번호	논문제목	투고일	저널명
1	GABA enriched barley bran lowers ACTH and corticosterone levels in immobilized stressed rats	2015.08	Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry.
2	오르니틴 고 함유 보리가루 발효물을 이용한 선식 개발 및 항비만 효능 검증	2015.09	한국식품과학회

○ 기술이전(3건)

번호	기술이전 내용	이전일	기관
1	국제기탁 균주 기술이전(*Lactobacillus sakei* SOM-6)	2015.08	청맥(주)
2	국제기탁 균주 기술이전(*Weissella cibaria* BBO1-48)	2015.08	청맥(주)
3	국제기탁 균주 기술이전(*Pediococcus pentosaceus* RBO1-49)	2015.08	청맥(주)

○ 상품화(3건)

번호	제품명	식품유형	품목제조보고일자
1	프리미엄슬로우밀	곡류가공품	2015.07.10
2	프리미엄통곡물수제쿠키	과자	2015.07.10
3	힐미	곡류가공품	2015.07.10

○ 언론홍보(1건)

번호	기사 제목	일자	언론사명
1	농업부산물 활용 고부가가치 제품개발	2015.07.15	전북일보

○ 시식회(2건)

번호	행사명	일자	내용
1	고창 청보리밭축제	2015.05.04 ~ 05.07	쿠키/선식/코팅곡물 시식회
2	부산 국제식품대전	2015.06.17 ~ 06.20	

2. 성과활용 계획

○ 개발제품의 상품화

- 참여기업에 의한 개발된 가공제품의 상품화
- 미강 및 맥강 발효소재를 이용하여 다양한 가공제품 개발

○ 논문 창출

- 미강과 맥강 발효소재의 항스트레스 및 항비만에 대한 세포/동물실험 결과 발표

○ 지적재산권 확보

- 기 출원된 미강 및 맥강 발효소재관련 특허를 핵심특허로 하여 추후 개발되는 다양한 가공제품의 지적재산권 확보

○ 타연구 활용

- 미강 및 맥강 발효소재의 건강기능식품 개별인정원료(체지방 감소) 획득관련 연구에 도출된 전임상 결과 활용

○ 개발기술의 지도·홍보

- 농·식품 부산물의 고부가가치 식품소재화 기술에 대한 성공사례로 홍보
- 농·식품 부산물 배출기업에 대한 부산물 활용기술 지도

SUMMARY

Ⅰ. Title

A study of fermentation technology and product development of sustainable biomass

Ⅱ. Scope and content of this study

1. The purpose of this study

- ○ Development of fermented materials(GABA/Ornithine) for anti-stress or anti-obesity from the rice bran/barley bran
- ○ Evaluation of anti-stress and anti-obesity efficacy of fermented materials
- ○ Establishment of manufacturing processes for fermented materials
- ○ Development of cookie, sunsik and coated grain for anti-stress or anti-obesity

2. The main contents of this study

- ○ Development of fermentation technology for GABA or ornithine production from the rice bran/barley bran
- ○ Establishment of materialization processes of fermentation products
- ○ Development of manufacturing processes of cookie, sunsik and coated grain for anti-stress or anti-obesity
- ○ Evaluation of anti-stress and anti-obesity efficacy of functional materials and products(*in vitro*/*in vivo*)
- ○ Development of trade name and package design for cookie, sunsik and coated grain

3. The range of this study

(1) Standardization of raw materials

① Establishment of manufacturing processes for rice bran/barley bran

② Analysis of main ingredients in rice bran/barley bran

(2) Development of fermentation technology for GABA or ornithine production from the rice bran/barley bran

① Strain selection for high GABA or ornithine production

② Optimization of fermentation conditions for GABA or ornithine production

③ Scale-up of fermentation process

(3) Standardization of materialization processes of fermentation products

① Establishment of filtration, concentration and drying processes

(4) Development of manufacturing processes of functional products

① Development of manufacturing process for cookie

② Development of manufacturing process for sunsik

③ Development of manufacturing process for coated grain

④ Identification of sensory characteristics

(5) Evaluation of efficacy and safety of functional materials and products

① Evaluation of anti-stress efficacy

② Evaluation of anti-obesity efficacy

③ Evaluation of acute and subacute toxicity

(6) Development of package designs for products

① Development of trade name and package design for cookie

② Development of trade name and package design for sunsik

③ Development of trade name and package designs for grain

Ⅲ. Results

In this study, the rice bran and barley bran were used to produce GABA(γ -aminobutyric acid) and ornithine by lactic acid bacteria, which were then used to develop cookie, coated grain, and sunsik products that were found to have anti-stress and anti-obesity effects. This study was largely divided into two parts: 1) GABA was used as the functional material to develop cookie and coated grain that have anti-stress effects, and 2) Ornithine was used as the functional material to develop sunsik that has anti-obesity effects.

First, MMD-11(*Enterococcus faeium*) and SOM-6(*Lactobacillus sakei*) were identified and separated from soy bean paste and soy sauce, which are known to produce a large amount of GABA. MMD-11 produced 1,089 mg/100 g of GABA in the fermentation that contained 20%(w/v) rice bran and 1%(w/v) MSG(monosodium glutamate), and 1,272 mg/100 g of GABA in the fermentation that contained 20%(w/v) barley bran and 1%(w/v) MSG. The fermented products of rice bran and barley bran were used to make concentrate(11,878 mg/100 g) and powder(13,968 mg/100 g) from the rice barn, and concentrate(12,894 mg/100 g) and powder(14,534 mg/100 g) from the barley bran. The concentrates were obtained through the process of centrifugation, filtration, and concentration, and the powders were obtained through the process of centrifugation and freeze-drying. In addition to MMD-11, SOM-6 was also used to produce a large amount of GABA in 100 L fermentation that contained 20%(w/v) rice bran or barley bran and 1%(w/v) MSG. The fermentation of rice bran resulted in 1,176 mg/100 g of GABA under the controlled conditions of 35°C, 100 rpm,

and 0.4 vvm, and the fermentation of barley bran resulted in 1,207 mg/100 g of GABA under the controlled conditions of 35°C, 120 rpm, and 0.6 vvm. After that, 13,401 mg/100 g and 13,882 mg/100 g of GABA powders were obtained from the filtration and freeze-drying of the fermented products. The GABA cookie was manufactured by mixing, dough, figuration, refrigeration(-20℃, 4 hr), cutting, baking(180℃, 10 min), cooling(25℃, 2 hr) processes. Moreover, the GABA coated grain was rinsing, drying, jet, and drying to make the final product. The anti-stress effects of GABA, cookie, and coated grain were evaluated and verified by examining the body weight, food consumption, lipid levels in the blood and the liver, AST(Aspartate aminotransferase) levels, ALT(Alanine aminotransferase) levels, blood corticosterone levels, ACTH(Adrenocorticotropic hormone) levels of a laboratory animal. The shelf life of the cookie and coated grain is determined to be 12 months and 36 months, respectively, and the cookie was named as "Premium Whole Grain Handmade Cookie" and coated grain as "Heal米."

Secondly, RBO1-49(*Pediococcus pentosaceus*) and BBO1-48(*Weissella cibaria*) were identified and separated from rice bran and barley bran to produce ornithine. RBO1-49 produced 1,032 mg/100 g of ornithine in the fermentation that contained 20%(w/v) rice bran and 1%(w/v) L-arginine, and BBO1-48 produced 1,085 mg/100 g of ornithine in the fermentation that contained 20%(w/v) barley bran and 1% L-arginine. The fermented products of rice bran and barley bran were used to make concentrate(11,428 mg/100 g) and powder(13,051 mg/100 g) from the rice bran, and concentrate(10,757 mg/100 g) and powder(12,894 mg/100 g) from the barley bran. The process for obtaining these concentrates and powders are the same as described previously. RBO1-49 was used to produce a large amount of ornithine in 100 L fermentation that contained 20%(w/v) rice bran and 1%(w/v) L-arginine, and 1,177 mg/100 g of ornithine was produced under the controlled conditions of 30°C, 100 rpm, and 0.4 vvm. BBO1-48 was also used to produce a large amount of ornithine in 100 L fermentation that contained 20%(w/v) barley bran and 1%(w/v) L-arginine, and 1,134 mg/100 g of ornithine was produced under the conditions of 30°C, 120 rpm, and 0.6 vvm. After that, 14,007 mg/100 g, and 13,948 mg/100 g of ornithine powders were obtained from the filtration and freeze-drying of the fermented products. The ornithine sunsik were manufactured by rinsing, steaming(100°C, 30 min), drying(55°C, 24 hr), roasting(95°C, 20 min), pulverization, mixing processes. The anti-obesity effects of ornithine and sunsik were evaluated and verified by examining the body weight, food consumption, epididymal fat percentage, liver weight, lipid levels in the blood and the liver, fasting blood glucose levels, insulin levels in the blood, and the leptin levels in the blood of a laboratory animal. The shelf-life of the sunsik is determined to be 2 months, and the sunsik is named as "Slow Meal," in hopes that people would take the time to enjoy their meal.

CONTENTS

Chapter 1 Outline of Research and Development ····· 15

Chapter 2 Current Status of Domestic-International Research Progress ····· 20

Chapter 3 Research Result ····· 25
Section 1 Development of GABA Material and Anti-Stress Product ····· 25
1. Material and Method ····· 25
2. Standardization of Rice Bran and Barley Bran ····· 26
3. Analysis of Main Ingredients in Rice Bran and Barley Bran ····· 27
4. Isolation and Identification of GABA Production Microbe ····· 28
5. Production of GABA Material ····· 35
6. Safety Evaluation of GABA Material ····· 48
7. Anti-Stress Efficacy of GABA Material ····· 51
8. Development of Cookie and Coated Grain ····· 56
9. Anti-Stress Efficacy of Cookie and Coated Grain ····· 62
10. Quality Evaluation of Cookie and Coated Grain ····· 70
11. Development of Trade Name and Package Design for Products ····· 91
Section 2 Development of Ornithine Material and Anti-Obesity Product ····· 95
1. Material and Method ····· 95
2. Isolation and Identification of Ornithine Production Microbe ····· 96
3. Production of Ornithine Material ····· 101
4. Safety Evaluation of Ornithine Material ····· 117
5. Anti-Obesity Efficacy of Ornithine Material ····· 119
6. Development of Sunsik ····· 126
7. Anti-Obesity Efficacy of Sunsik ····· 127
8. Quality Evaluation of Sunsik ····· 131
9. Development of Trade Name and Package Design for Sunsik ····· 144

Section 3 Sensory Characteristics and Consumer Acceptance ····· 146
1. Food Tasting Event ····· 146

Chapter 4 Achievements and Contribution to Relevant Field ····· 150
Section 1 Research Objective Achievement ····· 150
Section 2 Contributios to Relevant Field ····· 150

Chapter 5 Outcome and Utilization Plan of Research Results ····· 151

Section 1 Outcome of Research Results ····· 151
Section 2 Utilization Plan of Research Results ····· 156

목 차

제1장 연구개발과제의 개요 및 성과목표 ····· 15
제1절 연구개발의 목적 및 필요성 ····· 15
제2절 연구개발의 내용 및 범위 ····· 16
제3절 연구성과 목표 대비 실적 ····· 17

제2장 국내·외 기술개발 현황 ····· 20
제1절 기능성식품, 과자류, 선식류, 기능성 곡물의 시장조사 ····· 20
1. 기능성식품 시장 ····· 20
2. 과자류, 선식류, 기능성 곡물 시장현황 ····· 21
3. 경제성 분석 ····· 24

제3장 연구개발 수행내용 및 결과 ····· 25
제1절 미강 및 맥강을 이용한 GABA 소재 및 항스트레스 제품개발 ····· 25
1. 연구수행 방법 ····· 25
2. 미강 및 맥강의 표준화 ····· 26
3. 미강 및 맥강의 주요성분 분석 ····· 27
4. GABA 생산균주 분리 및 동정 ····· 28
5. GABA 소재의 제조공정 확립 및 대규모화 ····· 35
6. GABA 소재의 안전성 평가 ····· 48
7. GABA 소재의 항스트레스 효능평가 ····· 51
8. GABA 소재 함유 쿠키 및 코팅곡물 개발 ····· 56
9. GABA 소재 함유 쿠키 및 코팅곡물의 항스트레스 효능평가 ····· 62
10. GABA 소재 함유 쿠키 및 코팅곡물의 품질평가 ····· 70
11. 쿠키 및 코팅곡물의 네이밍 및 패키지 디자인 개발 ····· 91
제2절 미강 및 맥강을 이용한 Ornithine 소재 및 제품개발 ····· 95
1. 연구수행 방법 ····· 95
2. Ornithine 생산균주 분리 및 동정 ····· 96
3. Ornithine 소재의 제조공정 확립 및 대규모화 ····· 101
4. Ornithine 소재의 안전성 평가 ····· 117
5. Ornithine 소재의 항비만 효능평가 ····· 119
6. Ornithine 소재 함유 선식개발 ····· 126
7. Ornithine 소재 함유 선식의 항비만 효능평가 ····· 127
8. Ornithine 소재 함유 선식의 품질평가 ····· 131

9. 선식제품의 네이밍 및 패키지 디자인 개발 ····· 144
제3절 소비자 기호도 분석 ····· 146
1. 시식행사 ····· 146
제4장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도 ····· 150
제1절 연구개발 목표달성도 ····· 150
제2절 관련분야 기여도 ····· 150
제5장 연구개발 성과 및 성과활용 계획 ····· 151
제1절 연구개발성과 ····· 151
제2절 성과활용계획 ····· 156

제1장 연구개발과제의 개요 및 성과목표

제1절 연구개발의 목적 및 필요성

1. 바이오매스 기반 산업 육성
   가. "지속가능한 발전"은 정부 및 기업의 발전관련 행위의 중심적 지침
   나. "지속가능성"이란 맥락에서 다양한 물질 및 에너지를 동시에 생산할 수 있는 바이오매스(biomass)의 사용은 필수불가결
   다. 현재, BT분야의 정부 정책방향은 석유화학 기반 경제에서 바이오매스 기반 경제로의 변혁
   라. 따라서, 부산물, 폐기물, 저평가된 지속가능한 바이오매스의 발굴 및 적극적 활용을 통한 바이오매스 기반 산업 육성 필요
2. 지속가능한 바이오매스로서의 미강과 맥강
   가. 쌀과 보리는 세계 3대 곡물에 포함되고, 쌀을 주식으로 하는 인구는 세계 인구 전체의 34%인 약 30억 명(2011, 농촌진흥청)
   나. 국내 연간 미강 생산량은 약 40만 톤, 맥강 생산량은 약 6만 2,000톤(2011, 국제연합식량농업기구, 2012, 축산연구소)
   다. 아시아 국가들은 쌀과 보리를 주식으로 하기 때문에 지속적인 인구증가와 함께 미강과 맥강의 생산량 증가 예상
   라. 미강과 맥강은 GABA, Ornithine, 비타민류, 미네랄, 식이섬유 등 다양한 기능성 물질 함유
   마. 이 중, GABA와 Ornithine은 항비만 및 항스트레스 효능 보고
   바. 현재, 미강과 맥강은 농업 부산물로서 가축사료 등으로 사용되고 있고, 일부는 폐기되는 상황이므로 이러한 지속가능한 바이오매스의 고부가가치 자원화 기술 필요
3. GABA와 Ornithine의 항비만 및 항스트레스 효능
   가. GABA의 항비만 효과, 진정 및 항스트레스 효능 보고(2009, 한국유가공기술과학회지)
   나. Ornithine은 비만을 예방하는 식품소재로서 선진국을 중심으로 이용 증가(2009, 한국미생물학회지)
   다. 따라서, 미강과 맥강을 이용한 고기능성 식품 개발 필요
4. 비만과 스트레스의 사회·경제적 문제점
   가. 세계보건기구(WHO)는 비만을 '세계적인 전염병'으로 언급하였고, 2015년까지 비만 인구가 15억 명에 달할 것으로 예상(2006)
   나. OECD국가 평균 비만율 48.9%(2010, 통계청)
   다. 국내 성인 남성(35.6%) 및 여성(26.5%)의 비만율은 증가 추세이고, 그에 따른 의료비 지출은 일반인에 비해 36%이상 추가 지출(2010, 통계청, 2012, 기획재정부)
   라. 2009년 개별인정형 제품 중 체지방 감소 제품이 전체의 26%로 1위 차지(2010, 식품의약품안전처)
   마. 2009년 과로, 스트레스 등에 따른 뇌·심혈관계 질환 사망자 320명(2010, 한국산업안전보건공단)
   바. 국내 청소년의 70%는 스트레스 인지, 청소년 자살율은 10만 명당 15.3명(2011, 통계청)

5. 바이오매스(미강/맥강)를 이용한 항비만 및 항스트레스 식품개발 필요

가. 최근 L-글루타민산 유래 GABA 함유 분말이 혈압조절 기능성으로 식품의약품안전처에서 개별인정형 기능성 원료로 인정됨으로써 향후 상품화 속도가 빠를 것으로 예상

나. 국내에서 GABA와 Ornithine은 식품첨가물로 미등록 되어있기 때문에 순수한 형태로 이용 불가능

다. 일본의 경우, 현미, 쌀배아, 녹차 등에 존재하는 효소를 활성화시켜 GABA 함량을 증진시킨 제품 생산

라. 원료 내 효소 활성화에 의한 GABA와 Ornithine의 함량 증가는 한계 존재(약 400 mg/100 g)

마. 국내·외에서 산업적으로 생산되고 있는 Ornithine은 전구물질인 arginine에 효소를 처리하여 생산

바. 고정화된 효소를 이용한 공정은 고가의 효소, 원료, 고정화 비용으로 인하여 공정비용 상승

사. 따라서, 경제적인 공정비용을 위하여 지속가능한 바이오매스(미강/맥강)와 GABA 및 Ornithine의 고생산능 미생물을 이용한 산업화 공정개발이 절실히 필요

아. 본 연구에서 미강/맥강을 주원료로 하여 GABA 및 Ornithine 고생산 유산균을 활용한 발효를 통해 GABA 및 Ornithine 함량을 증진시키고, 그 발효소재를 이용한 고부가가치 기능성식품을 개발하고자 함

제2절 연구개발의 내용 및 범위

1. 연구개발 최종목표

가. 바이오매스(미강/맥강)를 이용한 항스트레스 및 항비만 효능 발효소재(GABA, Ornithine) 확보

나. 기능성 발효소재의 항스트레스 및 항비만 효능평가

다. 기능성 발효소재(GABA, Ornithine)의 제조공정 확립

라. 항스트레스 및 항비만 기능성의 쿠키, 선식, 코팅곡물 개발

2. 연구개발 주요내용

가. 미강과 맥강을 이용한 GABA 및 Ornithine 발효기술 개발

나. 발효물의 소재화공정 확립

다. 항스트레스 및 항비만 기능성의 쿠키, 선식, 코팅곡물의 제조공정 개발

라. 기능성 소재 및 제품의 항스트레스 및 항비만 효능평가(*in vitro/in vivo*)

마. 쿠키, 선식, 코팅곡물제품의 네이밍 및 패키지디자인 개발

3. 연구개발 범위

가. 미강 및 맥강원료의 표준화

(1) 미강, 맥강의 균일한 제조공정 확립

(2) 미강, 맥강의 주요일반성분 분석

나. 미강 및 맥강을 이용한 기능성 발효소재의 함량증진 기술 개발

(1) GABA 및 Ornithine의 고생성능 균주 선발

(2) GABA 및 Ornithine 함량 증진 발효공정 확립

(3) 발효공정 scale up

다. 미강 및 맥강 발효물의 소재화공정 표준화

(1) 여과·농축·건조공정 확립

라. 기능성식품 제조공정 및 제품개발

(1) 쿠키 제조공정 확립

(2) 선식 제조공정 확립

(3) 코팅곡물 제조공정 확립

(4) 소비자 기호도 분석

마. 기능성 소재 및 제품의 효능 및 안전성 평가

(1) 스트레스에 의해 유발되는 단백질 및 인자들의 분포 분석

(2) 혈중 스트레스 호르몬 농도 분석

(3) 지질축적 억제효과 및 지질대사 관련 유전자 발현 조절 검증

(4) 체내 지질상태, 체지방, 비만지표 개선 검증

(5) 급성 및 아급성 독성평가

바. 제품의 네이밍 및 패키지디자인 개발

(1) 쿠키제품의 네이밍 및 패키지디자인 개발

(2) 선식제품의 네이밍 및 패키지디자인 개발

(3) 코팅곡물제품의 네이밍 및 패키지디자인 개발

제3절 연구성과 목표 대비 실적

1. 연구개발결과의 성과 목표

가. 연구성과 목표

(단위 : 건수)

구분	특허		논문	
	출원	등록	SCI/SCIE	비SCI
1차년도	1	-	-	-
2차년도	4	-	-	2
계	5	-	-	2

나. 연구성과 활용 목표

(단위 : 건수)

구분	기술실시(이전)	상품화	정책자료	교육지도	언론홍보	시식회
활용건수	3	3	-	-	1	-

2. 연구개발결과의 성과 실적

가. 연구성과 실적

(단위 : 건수)

구분	특허		논문	
	출원	등록	SCI/SCIE	비SCI
1차년도	2	-	-	-
2차년도	4	-	1(심사 중)	-
계	6	-	1	-

(1) 특허: 6건

번호	특허명	국가명	출원일	출원번호	비고
1	오르니틴을 함유하는 미강 또는 맥강 발효소재의 제조방법 및 그 제조방법에 의해 제조된 오르니틴을 함유하는 미강 도는 맥강 발효소재	대한민국	2014.07.21	10-2014-0091901	출원
2	가바를 함유하는 미강 또는 맥강 발효소재의 제조방법 및 그 제조방법에 의해 제조된 가바를 함유하는 미강 또는 맥강 발효소재	대한민국	2014.07.21	10-2014-0091904	출원
3	상표등록출원(힐米)	대한민국	2015.02.05	45-2015-0001115	출원
4	보리가루발효물을 이용한 쿠키 및 이의 제조방법	대한민국	2015.07.20	10-2015-0102222	출원
5	보리가루발효물을 이용한 선식 및 이의 제조방법	대한민국	2015.07.20	10-2015-0102226	출원
6	쌀가루발효물을 코팅하여 가바가 함유된 현미 및 이의 제조방법	대한민국	2015.07.20	10-2015-0102229	출원

(2) 논문: 1건(심사 중), 1건(투고예정)

번호	논문제목	투고일	저널명
1	GABA enriched barley bran lowers ACTH and corticosterone levels in immobilized stressed rats	2015.08	Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry.
2	오르니틴 고 함유 보리가루 발효물을 이용한 선식 개발 및 항비만 효능 검증	2015.09	한국식품과학회

나. 연구성과 활용 실적

(단위 : 건수)

구분	기술실시(이전)	상품화	정책자료	교육지도	언론홍보	시식회
활용건수	3	3	-	-	1	2

(1) 기술이전: 3건

번호	기술이전 내용	이전일	기관
1	국제기탁 균주 기술이전(*Lactobacillus sakei* SOM-6)	2015.08	청맥(주)
2	국제기탁 균주 기술이전(*Weissella cibaria* BBO1-48)	2015.08	청맥(주)
3	국제 탁 균주 기술이전(*Pediococcus pentosaceus* RBO1-49)	2015.08	청맥(주)

(2) 상품화: 3건

번호	제품명	식품유형	품목제조보고일자
1	프리미엄슬로우밀	곡류가공품	2015.07.10
2	프리미엄통곡물수제쿠키	과자	2015.07.10
3	힐미	곡류가공품	2015.07.10

(3) 언론홍보: 1건

번호	기사 제목	일자	언론사명
1	농업부산물 활용 고부가가치 제품개발	2015.07.15	전북일보

(4) 시식회: 2건

번호	행사명	일자	내용
1	고창 청보리밭축제	2015.05.04 ~ 05.07	쿠키/선식/코팅곡물 시식회
2	부산 국제식품대전	2015.06.17 ~ 06.20	

제2장 국내·외 기술개발현황

제1절. 기능성식품, 과자류, 선식류, 기능성 곡물의 시장조사

1. 기능성식품 시장

가. 기능성 식품시장 현황

(1) 고령화 및 삶의 질 향상에 대한 욕구가 높아지면서 기능성식품에 대한 관심이 더욱 고조되고 있으며, 다양한 제형의 기능성 식품들이 출시되면서 매년 20~30% 성장

(2) 2007~2011년 5년간 국내 기능성 식품 생산액은 17.3% 증가

(3) 2012년 시장 매출규모가 2조 7,979억원을 나타내었고, 2년 전(1조 9,944억원) 대비 40% 이상 증가 (식약처, 2013)

나. 기능성 식품 소비행태

(1) 건강기능식품은 여자, 40-50대, 소득이 높을수록 구입률 및 섭취율이 높음

구분		2010년 건강기능식품 섭취율(%)	2010년 건강기능식품 구입률(%)	2012년 건강기능식품 섭취율(%)	2012년 건강기능식품 구입률(%)
Total		57.9	43.5	65.7	45.7
성별	남자	51.1	28.4	58.2	27.6
	여자	64.6	58.5	73.2	63.8
연령별	20대	33.5	22.2	42.9	28.1
	30대	49.1	48.4	58.1	54.5
	40대	64.7	53.4	75.1	54.7
	50대	68.8	48.9	75.5	50.7
	60대	69.5	37.1	72.6	33.3
가구소득	249만원이하	54.8	31.2	64.0	36.7
	250399만원	56.7	43.5	62.9	51.9
	400만원이상	60.9	50.1	69.1	44.8
구분		2012년 1인당 평균구입 비용(구입자기준)(원)	2012년 시장규모 6대 도시 기준(억원)	2010년 금액 구성비(%)	2012년 금액 구성비(%)
Total		374,994(291,127)	27,969(19,944)	100.0	100.0
성별	남자	350,321(296,475)	7,649(6524)	32.7	27.3
	여자	385,208(288,597	20,319(13,420)	67.3	72.7
연령별	20대	248,897(162,425)	2,306(1,298)	6.5	8.2
	30대	300,779(255,061)	6,123(4,599)	23.1	21.9
	40대	449,199(310,869)	9,478(6,382)	32.0	33.9
	50대	393,075(348,675)	6,676(5,249)	26.3	23.9
	60대	492,296(350,675)	3,385(2,416)	12.1	12.1
가구소득	249만원이하	318,540(218,303)	3,623(2,517)	12.6	13.0
	250399만원	334,540(259,079)	10,861(7,240)	36.3	38.8
	400만원이상	438,443(316,944)	13,485(10,187)	51.1	48.2

자료: 이화여자대학교 바이오푸드 네트워크, 한국건강기능식품협회, 대상(건강기능식품 시장구조(2010/2012))

2. 과자류, 선식류, 기능성 곡물 시장현황

가. 과자류 시장의 변화

(1) 프리미엄 제품 선호(고급과자, 웰빙과자, 건강과자)

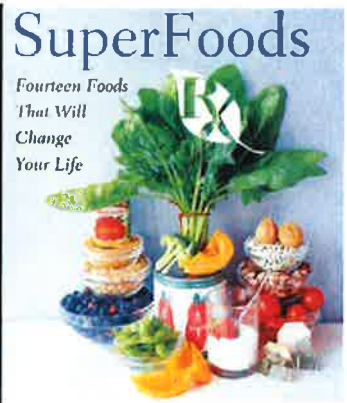
(가) 오리온 - "닥터유"

(나) 크라운 제과 - "후레쉬 스토리"

(다) 오리온 - "마켓오"

(라) 롯데제과 - "마더스 핑거"

(마) 해태제과 - "뷰티스타일"



(2) 프리미엄 쿠키의 성공사례

시판 중인 프리미엄 과자 비교

브랜드(제조사)	특징	제품(용량)	출시 시기	희망 소비자가격
닥터유(오리온)	유태우 박사팀과 공동연구, 영양균형을 고려	시리얼바(58g)	2008년 2월	1400원
		초콜릿 케익(168g)		2400원
		식이섬유 크래커(96g)	2008년 4월	1200원
마켓오(오리온)	합성 첨가물 없음, 천연재료만 사용	리얼 브라우니(80g)	2008년 12월	편의점 판매가 2700원 내외
		브레드칩(100g)		- 3600원 내외
		순수감자 프로마즈(85g)		- 2500원 내외
마더스핑거(롯데제과)	수입 밀가루 대신 국내산 쌀 사용	초코쿠키(72g)	2009년 2월	1500원
		오트그린티(84g)		1500원
		블루베리(45g)		1500원
뷰티스타일 슈퍼푸드(해태제과)	저칼로리 장수식품 (슈퍼푸드)을 원료로 사용	발효 크래커(90g)	2009년 2월	편의점 판매가 3000원 내외
		바나나유(72g)		- 3600원 내외
		골드키위케익(162g)		- 3600원 내외

(가) 오리온 닥터유

① 콩, 보리, 통밀 같은 곡물을 주원료로 칼로리를 낮추고 단백질, 비타민, 식이섬유의 함량 높임

② 더할 건 더 하고 : 철분, 칼슘, 단백질, DHA, 식이섬유, 비타민A, B1, B2, D, 콜라겐, 오메가3

③ 뺄건 빼고 : 3無(합성보존료, 합성착색료, L-글루타민산나트륨), 저감화(단순당, 총지방, 포화지방, 콜레스테롤, 트랜스지방, 나트륨)

(나) 오리온 마켓오

① 과자에 첨가 가능한 합성첨가물 조차 전혀 넣지 않은 자연이 만든 순수한 과자

② 10여 가지의 천연재료만 사용

③ 과자반죽 : 대관령목장의 유기농 요구르트에서 얻은 유산균과 효모균의 배양물인 천연 발효종 사용

(다) 롯데제과 마스터핑거

① 수입 밀가루를 전혀 넣지 않고, 국산 쌀가루를 주원료로 함

(라) 해태제과 뷰티스타일 슈퍼푸드

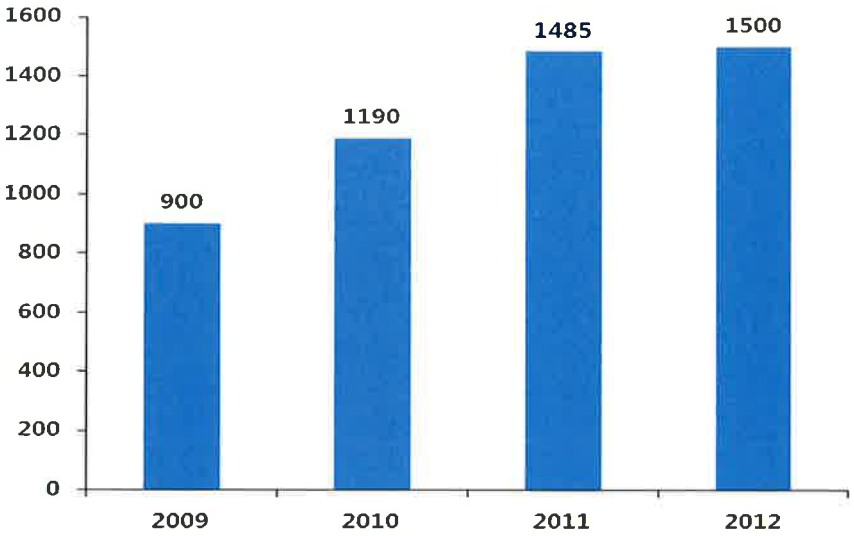
① 뷰티스타일: 좋은 원료를 통해 건강한 아름다움을 전함

② 엄선된 원료를 사용하여 더욱 신선하고 안전

③ 현대인에게 꼭 필요한 영향을 더한 균형 잡힌 영양

④ 긍정적인 생활습관을 통한 건강한 라이프 스타일

⑤ 몸에 좋은 원료로 정직하게 만들어 몸과 마음을 건강하게 하는 슈퍼푸드: 내과 의사이자 식품 권위자인 미국 스티븐프랫박사가 제안 " 장수하는 나라 식단에 공통되는 식품으로 건강하고 장수하기 위한 몸에 좋은 식품



프리미엄 제과 매출액. (단위: 억원) (자료: 신한금융투자, 2013.)

나. 선식류의 시장변화

(1) 건강식, 편의식으로의 인식 전환

(가) 식품가공 기술의 발달에 따라 다양한 제품형태로 개발 가능성 확대

(나) 기능성 식품의 등장으로 인한 소비자의 기호도 변화로 인하여 변화 요구

(다) 특정연령에 국한되지 않고 다수의 질환에 대해 예방효과를 동시에 기대할 수 있는 용도

(라) 선식에 2종 이상의 다양한 식품성분이 강화된 제품 개발 및 소비자층 다양화

(마) 선식의 일반적인 성상인 가루형태의 제품에서 벗어나 시리얼바, 쿠키 형태의 제품 확대

(바) 쉽게 구입할 수 있고, 조리과정을 최소화할 수 있는 편의식의 요구

(사) 자연식품이 주는 영양성, 편의성이 대용식 시장을 상당부분 잠식할 수 있게 됨

(아) 최근 선식 소비량의 증대와 함께 관심이 급증

[국내 판매 중인 선식 및 미숫가루 제품]

제품명	우리땅우리곡물선식	제품명	선식건강플러스	제품명	발아현미선식	제품명	청국선식
제조사	웰츄럴	제조사	웰츄럴	제조사	웰츄럴	제조사	알천농원

제품명	석류 미숫가루	제품명	17곡 미숫가루	제품명	현미 미숫가루	제품명	옛날 미숫가루
제조사	웰츄럴	제조사	웰츄럴	제조사	웰츄럴	제조사	웰츄럴

다. 기능성 곡물시장변화

(1) 기능성 곡물 및 곡물 스낵 제품

(가) 가바(GABA)쌀

① 뇌 대사를 촉진시켜 집중력 강화 및 기억력 증진

② 콜레스테롤 제거와 당뇨병 개선 및 예방, 고혈압 등 성인병 예방에 효과

③ 미국, 일본, 인도네시아 등에 수출 중

3. 경제성 분석

가. 기존 제품시장에서 시도하지 않은 발효소재를 이용한 제품 개발을 통해 새로운 시장 창출

나. 기존 쿠키 시장 소비자가격 범위는 g당 24~35원으로 형성되어 있으며 본 과제를 통해 개발된 제품은 g당 11원의 가격 형성을 통해 가격 경쟁력 확보

다. 코팅곡물 시장은 kg당 12,000원의 가격을 형성하고 있으며 기능성 소재를 이용한 코팅곡물 제품은 8,000원의 가격을 통해 매출을 증대시킬 수 있음

라. 선식제품은 500g 기준으로 18,000원~20,000원의 가격을 형성하고 있으며, 본 과제를 통해 개발된 선식은 11,000원의 판매를 통해 가격 경쟁력에서 우위 확보 가능

[개발된 선식, 쿠키, 코팅곡물의 제조원가]

선식(500g 제품 기준)			쿠키(120g 제품 기준)		코팅곡물(1kg 제품 기준)	
구분		단가(원)	구분	단가(원)	구분	단가(원)
재료비	보리	915	우리밀가루	19.2	현미	3,000
			찰보리가루	38.5		
	귀리	200	아몬드	1.9	GABA 분말	475
			버터	25.0		
	현미	225	설탕	23.0		
			계란	11.5		
	목이버섯	2,000	베이킹파우더	0.6		
			소금	0.2		
	Ornithine 분말	298	GABA 분말	57		
가공비	인건비	900	인건비	480	인건비	300
	건조기	29	전기료	112	건조기	29
	볶음기	20	포장지	250	분사기	35
	분쇄기	1			포장지	100
	포장지	200				
합계		4,788	합계	1,019	합계	3,939

제3장 연구개발 수행내용 및 결과

제1절 미강 및 맥강을 이용한 GABA소재 및 항스트레스 제품개발

1. 연구수행 방법

가. GABA 생산능 보유 미생물의 분리 및 동정

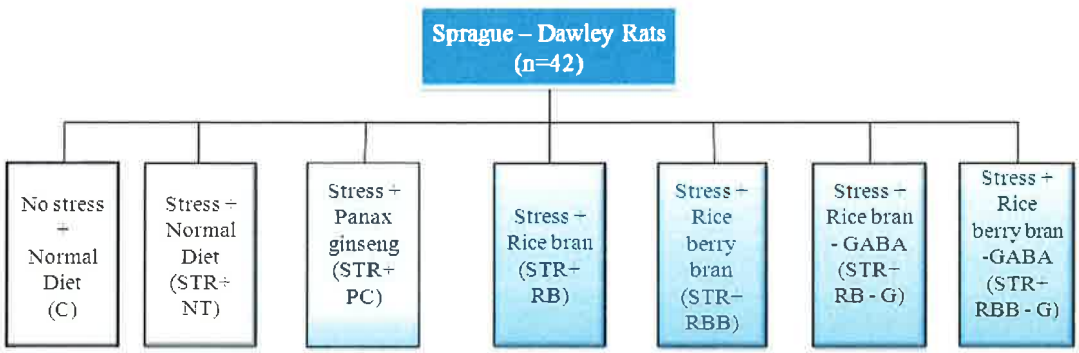
- MRS+1%MSG 액체 배지에서 후보 균주를 1% 접종하고 30℃에서 48시간 배양하였다. 이어 펩톤수 희석을 통해 선택배지에 도말한다. 단일 Colony를 배양하여 다시 MRS+1%MSG 액체 배지에 접종하여 GABA 생성 여부를 TLC를 통하여 1차 선발을 하고 HPLC를 통해 2차 최종 선발한다.

나. GABA 분석

- TLC를 이용한 GABA 분석 : GABA 추출 방법을 이용하여 추출 된 시료를 TLC silica gel에 1㎕를 loading하여 GABA 전개용매(butanol: acetic acid; dichloromethan: water=5:3:3)에 전개 시키고 ninhydrin으로 염색하여 standard 1~100mg/ml의 GABA spot 크기와 sample spot 크기를 비교하여 분석하였다.
- HPLC를 이용한 GABA 분석 : HPLC (Waters, USA) 분석을 위해 시료는 6-aminoquioly-N-hydroxysuccinimidyl carbonate (AQC)로 유도체화 하고, 3.9×150mm AccQ · Tag™(Nova-Pak™C18, Waters) 칼럼으로 유도체들을 분리하였다. GABA 함량은 표준 GABA의 HPLC 분석결과를 토대로 작성한 표준곡선을 이용하여 산출하였다.

다. GABA소재, 쿠키, 코팅곡물의 항스트레스 효능평가

- 실험동물은 중앙실험동물(서울, 한국)에서 구입한 7주령 수컷 SD rat 42마리를 1주일 동안 환경에 적응시킨 후 무작위로 정상대조군(C), 스트레스대조군(STR+NT), 양성대조군인 인삼 스트레스군(STR+PC), 0.5% 미강 스트레스군(STR+RB), 0.5% 맥강 스트레스군(STR+RBB), 0.5% GABA 첨가 미강 스트레스군(STR+RB-G), 0.5% GABA 첨가 맥강 스트레스군(STR+RBB-G) 총 7군으로 군 당 6마리씩 나누어 21일 동안 사육하였다.



라. 혈장 및 장기 채취

- 총 21일간의 본 실험을 위한 사육이 끝난 실험동물은 12시간 절식과 급성 immonilization stress 후 희생시켰다. 혈액은 1,100×g, 4℃에서 15분간 원심분리 후 혈청을 분리하여 분석 전까지 -80℃에 보관하였다.
- 간은 채혈 후 즉시 적출하여 무게를 측정한 후 -80℃에 보관하였다.

마. 혈중 및 간 지질 농도

- 혈중 및 간 중의 중성지방(TG), 총 콜레스테롤(TC)은 효소법(Asan Phamaceutical Co., Seoul, Korea)으로 분석하였다. 혈중 HDL-콜레스테롤은 phosphotungstic acid/MG2+ 침전효소법(Asan Phamaceutical Co., Seoul, Korea)으로 분석하였다.

바. 혈중 AST, ALT 농도

- 혈중 AST(Aspartate transaminase), ALT(Alanine transaminase)는 효소법(Asan Phamaceutical Co., Seoul, Korea)으로 분석하였다.

사. 혈중 corticosterone 및 adrenocorticotropic hormone (ACTH) 농도

- 혈중 corticosterone 농도는 실험 1, 10, 20일째 4시간의 immonilization stress 후 rat의 꼬리정맥으로부터 채혈하여 commercial kit(Abcam, Cambridge, UK)를 사용하여 분석하였다. 혈중 adrenocorticotropic hormone (ACTH) 농도는 혈청으로부터 commercial kit(Cusabio biotech, China)를 사용하여 분석하였다.

아. 통계처리

- 통계처리는 SPSS 12.0 for windows program(SPSS Inc., Chicago, IL, USA)을 이용하여 평균(mean)±표준편차(standard deviation, SD)로 나타내었다. 각 군 간의 통계적 유의성 검증은 ANOVA 분석을 하였다. 각 군 간에 유의한 차이가 있을 경우 $P<0.05$ 수준에서 Duncan's multiple range test를 실시하여 검증하였다.

2. 맥강 및 미강의 표준화

가. 맥강의 표준화

(1) 고창구 내 10개 읍.면 작목반을 통하여 원곡(보리)을 확보하였다.

(2) 수매 원곡을 도정하는 과정에서 발생하는 맥강을 원료로 사용하였다.

(3) 정맥 과정 중 2-6개의 정맥기를 통과하는 과정을 실험한 결과, 2-4개의 정맥기를 통과한 맥강은 불순물이 많아 재료로 사용하기 적합하지 않기 때문에 6개의 정맥기를 통과한 맥강을 원료로 사용하였다(그림1).

그림 1. 맥강 원료의 표준화 공정도.

나. 미강의 표준화

(1) 현미와 백미를 도정하는 과정에서 생산되는 미강을 원료로 사용하였다.

(2) 세척 및 석발이 완료된 원곡을 1-15(channel)로 도정한 미강을 원료로 사용하였다.

3. 미강, 맥강의 주요성분 분석

가. 미강, 맥강의 일반성분 및 미네랄 분석

(1) 미강, 맥강의 일반성분 분석에서는 탄수화물, 지방, 식이 섬유소 성분이 맥강이 높게 나타났으며, 단백질, 수분, 회분은 미강이 높게 분석되었다(표1).

(2) 미네랄 분석에서는 나트륨, 칼슘이 맥강에서 높게 분석되었으며, 마그네슘, 칼륨은 미강에서 높게 분석되었다(표2).

표 1. 미강, 맥강의 일반성분 분석

시료명	탄수화물 (g/100g)	지방 (g/100g)	단백질 (g/100g)	수분 (%)	회분 (%)	식이 섬유소 (%)
미강	53.9	14.2	12.0	10.0	10.0	20.6
맥강	65.0	18.0	4.4	8.1	4.5	34.2

분석기관 : 다산생명과학원(주)

표 2. 미강, 맥강의 미네랄 분석

시료명	나트륨 (mg/kg)	칼슘 (mg/kg)	마그네슘 (g/kg)	칼륨 (g/kg)
미강	97.7	632.3	9.4	19.2
맥강	359.4	1,243.2	3,1	10.5

분석기관 : 다산생명과학원(주)

4. GABA 생산균주 분리 및 동정

가. GABA 생산균주 분리

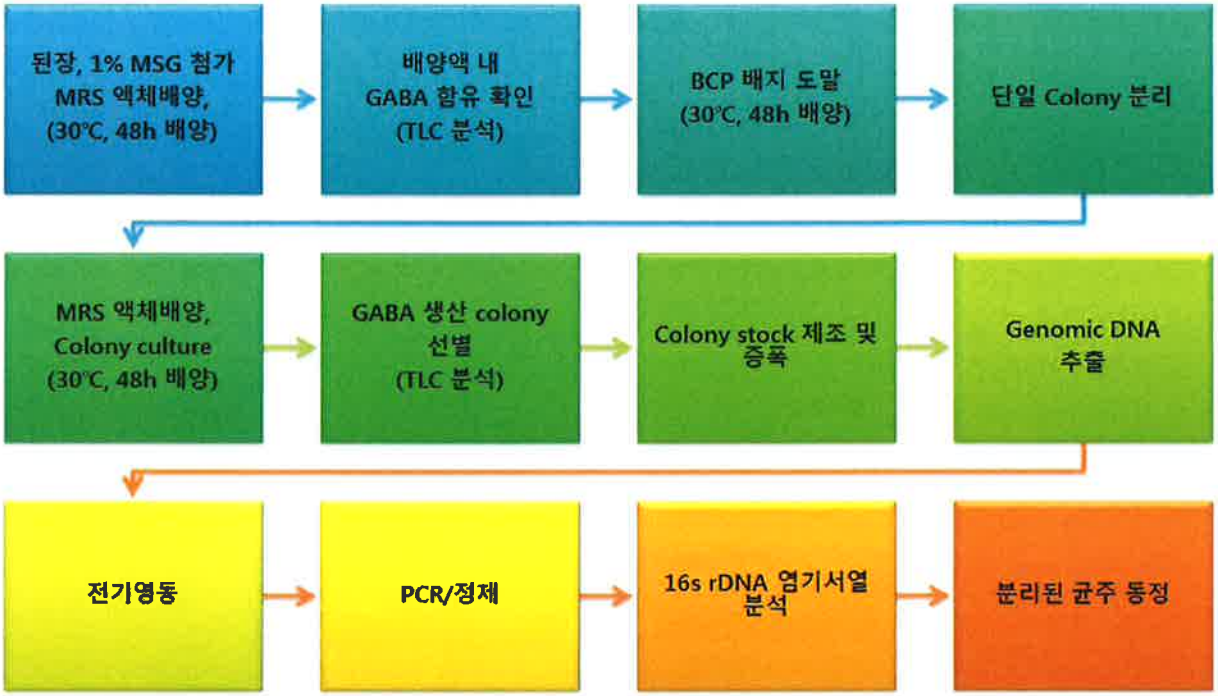


그림 2. 된장 유래 GABA 생산능 보유 균주 분리 및 동정 프로세스 모식도.

나. 전통 된장 유래 GABA 생산균주 동정

(1) 된장 유래 GABA 생산 균주 동정을 위해 후보균주로부터 genomic DNA를 DNeasy® Blood & Tissue kit (QIAGEN, Hilden, Germany)를 이용하여 분리하였다. 16S rDNA의 클로닝을 위해 Primer는 5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3' (Forward)와 5 '-ACGGGCGGGTGTGTRC-3'(Reverse)를 이용하여 PCR 증폭을 시행하였고, 16S rDNA sequencing을 통해 MMD-11의 염기서열 정보를 획득하였다(표3).

(2) 분리된 균주는 *Enterococcus faecium*과 98%의 염기서열 동질성을 보였으며, 이상의 결과로 분리된 균주를 *Enterococcus faecium* MMD-11로 명명하였다.

표 3. 전통 된장 유래 MMD-11 균주의 16S rDNA 염기서열

Query : MMD-11 (분리균주), 동질성 : 98%
Subject : *Enterococcus faecium*

```
Query  10   CATGCAAGTCGTACGCTTCTTTTTCCACCGGGAGCTTGCTCCACCGGAAAAAGAGGAGTG  69
            ||||||||||||||||||||||||||||||| ||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  47   CATGCAAGTCGTACGCTTCTTTTTCCACC-GGAGCTTGCTCCACCGGAAAAAGAGGAGTG  105

Query  70   GCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGGTAACCCTGCCCATCAGAAGGGGATAACACTTGGAA  129
            ||||||||||||||||||||||||| ||| ||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  106  GCGAACGGGTGAGTAACACGTGGG-TAA-CCTGCCCATCAGAAGGGGATAACACTTGGAA  163

Query  130  ACAGGTGCTAATACCGTATAACAATCGAAACCGCATGGTTTTGATTTGAAAGGCGCTTTC  189
            ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
```

```
Sbjct  164   ACAGGTGCTAATACCGTATAACAATCGAAACCGCATGGTTTTGATTTGAAAGGCGCTTTC  223

Query  190   GGGTGTCGCTGATGGATGGACCCGCGGTGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACC  249
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  224   GGGTGTCGCTGATGGATGGACCCGCGGTGCATTAGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACC  283

Query  250   AAGGCCACGATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGG  309
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  284   AAGGCCACGATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGG  343

Query  310   CCCAAACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCGGCAATGGACGAAAGTCTGACCG  369
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  344   CCCAAACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCGGCAATGGACGAAAGTCTGACCG  403

Query  370   AGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGTTTTCGGATCGTAAAACTCTGTTGTTAGAGAAGAA  429
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  404   AGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGTTTTCGGATCGTAAAACTCTGTTGTTAGAGAAGAA  463

Query  430   CAAGGATGAGAGTAACTGTTCATCCCTTGACGGTATCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACT  489
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  464   CAAGGATGAGAGTAACTGTTCATCCCTTGACGGTATCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACT  523

Query  490   ACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTA  549
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  524   ACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTA  583

Query  550   AAGCGAGCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCCGGCTCAACCGGGGAGGG  609
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  584   AAGCGAGCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCCGGCTCAACCGGGGAGGG  643

Query  610   TCATTGGAAACTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAATTCCATGTGTAGCGGT  669
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  644   TCATTGGAAACTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAATTCCATGTGTAGCGGT  703

Query  670   GAAATGCGTAGATATATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTCTCTGGTCTGTAACTG  729
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  704   GAAATGCGTAGATATATGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTCTCTGGTCTGTAACTG  763

Query  730   ACGCTGAGGCTCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCG  789
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  764   ACGCTGAGGCTCGAAAGCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCG  823

Query  790   TAAACGATGAGTGCTAAGTGTTGGAGGGTTTCCGCCCTTCAGTGCTGCAGCTAACGCATT  849
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  824   TAAACGATGAGTGCTAAGTGTTGGAGGGTTTCCGCCCTTCAGTGCTGCAGCTAACGCATT  883

Query  850   AAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTG-AACTCAAAGGAATTGACGGGGGCC  908
              |||||||||||||||||||||||||||||||||| |||||||||||||||||||||||||
Sbjct  884   AAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCC  943

Query  909   CGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAAT-CGAAGCA-CGCGAA-AACCTTACCAGGTCT  965
              |||||||||||||||||||||||||||| ||||||| |||||| ||||||||||||||||
Sbjct  944   CGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCT  1003

Query  966   TGACATCCTT-GACCACTCTA-AGATA-AGCTTCCCCTTCGGGGGGCAAA-TGACAGGTG  1021
              |||||||||| |||||||||| ||||| |||||||||||||||||| |||| |||||||||
Sbjct  1004  TGACATCCTTTGACCACTCTAGAGATAGAGCTTCCCCTTCGGGGG-CAAAGTGACAGGTG  1062

Query  1022  GTGCATGGTTGTC-TCCCCTCGTGTC-TGAAAATGTTGGGTTAA-TCCC-CAACGAGCGC  1077
              |||||||||||||  ||  |||||||| ||| | |||||||||| |||| ||||||||||
Sbjct  1063  GTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGA-TGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGC  1121

Query  1078  A-CCCTT  1083
              | |||||
Sbjct  1122  AACCCTT  1128
```

분석기관 : ㈜제노텍

다. MMD-11 균주의 탄소원 이용 특성

(1) 분리된 균주의 다양한 당 발효패턴 특성을 조사하기 위하여 API 50 CHL kit (BioMerieux, France)를 제조사의 지침에 따라 사용하였으며, 결과는 표4에 요약하였다.

표 4. MMD-11 균주의 다양한 탄소원 이용 여부

번호	탄소원	이용 여부	번호	탄소원	이용 여부
1	Control	+[1)]	26	Esculin citrate de for	+
2	Glycerol	-[2)]	27	Salicin	+
3	Erythritol	-	28	D-Cellobiose	+
4	D-Arabinose	-	29	D-Maltose	+
5	L-Arabinose	+	30	D-Lactose	+
6	D-Ribose	+	31	D-Melibiose	+
7	D-Xylose	+	32	D-Saccharose	+
8	L-Xylose	-	33	D-Trehalose	+
9	D-Adonitol	-	34	Inulin	-
10	b-Methyl-D-Xyloside	-	35	D-Melezitose	-
11	D-Galactose	+	36	D-Raffinose	+
12	D-MSGcose	+	37	Amidon	-
13	D-Fructose	+	38	Glycogen	-
14	D-Mannose	+	39	Xylitol	-
15	L-Sorbose	-	40	Gentiobiose	+
16	D-Rhamnose	-	41	D-Turanose	-
17	Dulcitol	-	42	D-Lyxose	-
18	Inositol	-	43	D-Tagatose	+
19	D-Mannitol	+	44	D-Fucose	-
20	D-Sorbitol	-	45	L-Fucose	-
21	a-Methyl-D-Mannoside	+	46	D-Arabitol	-
22	a-Methyl-D-MSGcoside	-	47	L-Arabitol	-
23	N-Acethyl-MSGcosamine	+	48	MSGconate	-
24	Amygdalin	+	49	2-Keto-MSGconate	-
25	Arbutin	+	50	5-Keto-MSGconate	-

+[1)] Positive, -[2)] Negative

라. 전통 간장 유래 GABA 생산균주 동정

(1) 된장 유래 GABA 생산 균주 대체를 위해 기존에 확보된 간장 유래 GABA 생성 유산균으로 대처하고 genomic DNA를 DNeasy® Blood & Tissue kit (QIAGEN, Hilden, Germany)를 이용하여 분리하였다. 16S rDNA의 클로닝을 위해 Primer는 5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3' (Forward)와 5 '-ACGGGCGGGTGTGTRC-3'(Reverse)를 이용하여 PCR 증폭을 시행하였고, 16S rDNA sequencing을 통해 SOM-6의 염기서열 정보를 획득하였다(표5).

(2) 분리된 균주는 *Lactobacillus sakei*와 98%의 염기서열 동질성을 보였으며, 이상의 결과로 분리된 균주를 *Lactobacillus sakei* SOM-6로 명명하였다.

표 5. 전통 간장 유래 SOM-6 균주의 16S rDNA 염기서열

Query : SOM-6 (분리균주) 동질성:98%
Sbjct : *Lactobacillus sakei*

Query	9	CATGCAGTCGAACGCACTCTCGTTTAGATTGAAGGAGCTTGCTCCTGATTGATAAACATT	68
Sbjct	1	CATGCAGTCGAACGCACTCTCGTTTAGATTGAAGGAGCTTGCTCCTGATTGATAAACATT	60
Query	69	TGAGTGAGTGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCCTAAAGTGGGGGATAAC	128
Sbjct	61	TGAGTGAGTGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCCTAAAGTGGGGGATAAC	120
Query	129	ATTTGGAAACAGATGCTAATACCGCATAAAACCTAACACCGCATGGTGTAGGGTTGAAAG	188
Sbjct	121	ATTTGGAAACAGATGCTAATACCGCATAAAACCTAACACCGCATGGTGTAGGGTTGAAAG	180
Query	189	ATGGTTTCGGCTATCACTTTAGGATGGACCCGCGGTGCATTAGTTAGTTGGTGAGGTAAA	248
Sbjct	181	ATGGTTTCGGCTATCACTTTAGGATGGACCCGCGGTGCATTAGTTAGTTGGTGAGGTAAA	240
Query	249	GGCTCACCAAGACCGTGATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTAATCGGCCACACTGGGACTG	308
Sbjct	241	GGCTCACCAAGACCGTGATGCATAGCCGACCTGAGAGGGTAATCGGCCACACTGGGACTG	300
Query	309	AGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGACGAAAG	368
Sbjct	301	AGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGACGAAAG	360
Query	369	TCTGATGGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGTTTTCGGATCGTAAAACTCTGTTGTTG	428
Sbjct	361	TCTGATGGAGCAACGCCGCGTGAGTGAAGAAGGTTTTCGGATCGTAAAACTCTGTTGTTG	420
Query	429	GAGAAGAATGTATCTGATAGTAACTGATCAGGTAGTGACGGTATCCAACCAGAAAGCCAC	488
Sbjct	421	GAGAAGAATGTATCTGATAGTAACTGATCAGGTAGTGACGGTATCCAACCAGAAAGCCAC	480
Query	489	GGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTAT	548
Sbjct	481	GGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTAT	540
Query	549	TGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCTTCGGCTCAACC	608
Sbjct	541	TGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCTTCGGCTCAACC	600
Query	609	GAAGAAGTGCATCGGAAACTGGGAAACTTGAGTGCAGAAGAGGACAGTGGAACTCCATGT	668
Sbjct	601	GAAGAAGTGCATCGGAAACTGGGAAACTTGAGTGCAGAAGAGGACAGTGGAACTCCATGT	660
Query	669	GTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAAGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTGTCTGGTC	728
Sbjct	661	GTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAAGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTGTCTGGTC	720
Query	729	TGTAACTGACGCTGAGGCTCGAAAGCATGGGTAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGT	788
Sbjct	721	TGTAACTGACGCTGAGGCTCGAAAGCATGGGTAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGT	780
Query	789	CCATGCCGTAAACGATGAGTGCTAGGTGTTGGAGGGTTTCCGCCCTTCAGTGCCGCAGCT	848
Sbjct	781	CCATGCCGTAAACGATGAGTGCTAGGTGTTGGAGGGTTTCCGCCCTTCAGTGCCGCAGCT	840
Query	849	AACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGA	908

```
Sbjct  841   AACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGA  900

Query  909   CGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAA-TCGAAGCACCGCGAAGAACCTTA  967
              |||||||||||||||||||||||||||||||||||| |||||||| ||||||||||||||
Sbjct  901   CGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTA  960

Query  968   CCAGGTCTTGACATCCTTTGACC-CTCTA-A-ATAGAGCTTTCC-T-CGGGGAC-AAGTG  1021
              |||||||||||||||||||||| ||||| | |||||||||||| | ||||||| |||||
Sbjct  961   CCAGGTCTTGACATCCTTTGACCACTCTAGAGATAGAGCTTTCCCTTCGGGGACAAAGTG  1020

Query  1022  ACAGGTGGGGCATGGTTGTC-TCACCTC-TGTCCTGAAATTTTGGGTTAATTCCCCCA-C  1078
              |||||||| |||||||||| ||| ||| |||| ||| || ||||||||| |||| || |
Sbjct  1021  ACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAAC  1080

Query  1079  GA  1080
              ||
Sbjct  1081  GA  1082
```

분석기관 : ㈜제노텍

표 6. SOM-6 균주의 다양한 탄소원 이용 여부

번호	탄소원	이용 여부	번호	탄소원	이용 여부
1	Control	+[1)]	26	Esculin citrate de for	+
2	Glycerol	-[2)]	27	Salicin	+
3	Erythritol	-	28	D-Cellobiose	+
4	D-Arabinose	-	29	D-Maltose	+
5	L-Arabinose	+	30	D-Lactose	+
6	D-Ribose	+	31	D-Melibiose	+
7	D-Xylose	-	32	D-Saccharose	+
8	L-Xylose	-	33	D-Trehalose	+
9	D-Adonitol	-	34	Inulin	-
10	b-Methyl-D-Xyloside	-	35	D-Melezitose	-
11	D-Galactose	+	36	D-Raffinose	+
12	D-MSGcose	+	37	Amidon	-
13	D-Fructose	+	38	Glycogen	-
14	D-Mannose	+	39	Xylitol	-
15	L-Sorbose	-	40	Gentiobiose	+
16	D-Rhamnose	-	41	D-Turanose	-
17	Dulcitol	-	42	D-Lyxose	-
18	Inositol	-	43	D-Tagatose	+
19	D-Mannitol	+	44	D-Fucose	-
20	D-Sorbitol	-	45	L-Fucose	-
21	a-Methyl-D-Mannoside	+	46	D-Arabitol	-
22	a-Methyl-D-MSGcoside	-	47	L-Arabitol	-
23	N-Acethyl-MSGcosamine	+	48	MSGconate	-
24	Amygdalin	+	49	2-Keto-MSGconate	-
25	Arbutin	+	50	5-Keto-MSGconate	-

+[1)] Positive, -[2)] Negative

마. MMD-11 균주 이용 미강 및 맥강 발효물 생성

(1). MMD-11 균주의 생장에서 미강 또는 맥강 첨가량의 영향

(가) 미강 첨가량에 따른 GABA 생성 균주 MMD-11 균수 변화 실험을 증류수에 10, 20, 30% 미강을 첨가하여 멸균 과정을 거친 후 스타터 0.1%를 접종하여 1일 간격으로 3일간 변화를 측정하였다. 10% 미강에서는 최대 0.6E+08로 나타났으며, 20% 첨가한

발효시 에는 1.6E+09로 균수가 증가하는 것을 확인하였고, 30% 첨가 시에는 점도가 높고 수분활성도가 낮아 균주 성장이 이루어지지 않았다. 분석 결과를 토대로 10%는 성장 속도가 더디게 나타났고, 30%에서는 균주 성장에 적합하지 않았으며, 20%의 미강 첨가량이 적합한 것으로 판단하였다(표7).

(나) 맥강 역시 10%로 첨가 시, 최대 0.5E+07로 나타났으며 20% 첨가한 발효 시에는 1.6E+08로 균수가 증가하는 것을 확인하였으며, 30%는 점도가 높고 수분활성도가 낮아 균주 성장이 이루어지지 않았다. 분석 결과를 토대로 10%는 20% 첨가에 비해 낮게 나타났으며, 30%는 균주 성장에 적합하지 않았으며, 20%의 미강 첨가량이 적합한 것으로 판단하였다(표8).

표 7. 미강 첨가량에 따른 발효액의 세포농도 변화

구 분	발효시간(Day)	세포농도(cfu/ml)
10% 미강 + 0.1% MMD-11	1	0.2E+07
	2	0.4E+08
	3	0.6E+08
20% 미강 + 0.1% MMD-11	1	0.9E+08
	2	1.2E+09
	3	1.6E+09

표 8. 맥강 첨가량에 따른 발효액의 세포농도 변화

구 분	발효시간(Day)	세포농도(cfu/ml)
10% 맥강 + 0.1% MMD-11	1	0.1E+06
	2	0.3E+07
	3	0.5E+07
20% 맥강 + 0.1% MMD-11	1	1.0E+07
	2	0.9E+08
	3	1.6E+08

(2). 미강 또는 맥강이 첨가된 최적 발효조건에서 산도와 pH 변화 및 GABA 생산량 비교

(가) 20%미강+0.1% MMD-11(RN), 20%미강+1%MSG+0.1%MMD-11(RG)를 제조하여 3일간 발효를 통해 발효물을 제조 하였으며, 1일 간격으로 산도 변화를 측정하였다. 1일간 RN에서는 0.42, RG에서는 0.34으로 형성 되었으며, 최종 3일간 발효 후에는 각각 0.8과 0.78로 비슷한 산도를 나타내었다(표9).

(나) 20%맥강+0.1% MMD-11(BN), 20%맥강+1%MSG+0.1%MMD-11(BG)를 제조하여, 3일간 발효를 통해 발효물을 제조 하였으며, 1일 간격으로 산도 변화를 측정하였다. 1일간

BN에서는 0.36, BG에서는 0.3으로 미강보다 낮게 형성 되었으며, 최종 3일간 발효 후에는 각각 0.42와 0.5로 미강에서 나타난 산도보다 낮은 결과를 나타내었다(표9).

(다) 20%미강+0.1% MMD-11(RG), 20%미강+1%MSG+0.1%MMD-11(RG) pH 변화를 측정 한 결과, 발효 1일차에는 RN은 5.57, RG는 5.87로 나타났으며, 발효 기간 지남에 따라 낮아지는 결과를 얻었고, 최종 발효 3일차에는 각각 4.62와 5.02를 나타내었다(표11).

(라) 20%맥강+0.1% MMD-11(BN), 20%맥강+1%MSG+0.1%MMD-11(BG) pH 변화를 측정 한 결과, 발효 1일차에는 BN은 4.7, BG는 5.24로 높게 나타났으며, 발효 기간이 지남에 따라 낮아지는 결과를 얻었으며, 최종 발효 3일차에는 각각 4.38, 4.73으로 미강보다는 낮은 pH를 형성하는 결과를 나타내었다(표10).

(마) 20%미강+1%MSG+0.1%MMD-11(RG), GABA 함량을 HPLC를 통하여 비교 한 결과, BG는 1,272 mg/100 g으로 함량을 나타냈다. RG 보다는 BG 발효물이 높은 GABA 함량을 함유하고 있었다(그림3).

표 9. 미강 또는 맥강 발효액의 산도 변화

구 분	발효시간(Day)		
	1	2	3
RN	0.42	0.62	0.80
RG	0.34	0.70	0.78
BN	0.36	0.42	0.42
BG	0.30	0.42	0.50

표 10. 미강 또는 맥강 발효액의 pH 변화

구 분	발효시간(Day)		
	1	2	3
RN	5.57	4.88	4.62
RG	5.87	5.18	5.02
BN	4.70	4.52	4.38
BG	5.24	4.89	4.73

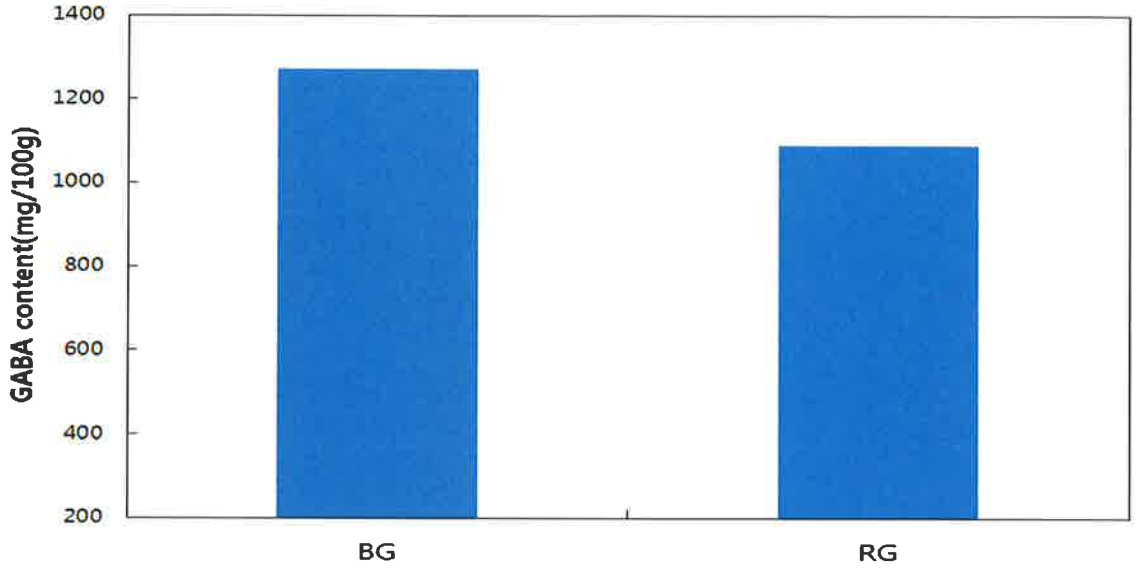


그림 3. 미강 또는 맥강이 첨가된 최적 발효조건에서 MMD-11균주에 의한 GABA 생산량 비교.
RG : 20%미강+1%MSG+0.1%MMD-11, BG : 20%맥강+1%MSG+0.1%MMD-11

5. GABA 소재의 제조공정 확립 및 대규모화

가. 액상 및 분말소재 표준화

(1). 액상소재의 표준화

MMD-11, SOM-6균주에 의한 미강 또는 맥강이 첨가된 발효에서 GABA 발효물의 액상 소재화는 원심분리→여과→감압농축에 의하여 수행되었다. 각 단계별로 시료를 채취하여 TLC를 이용하여 GABA를 분석하였다(그림4).

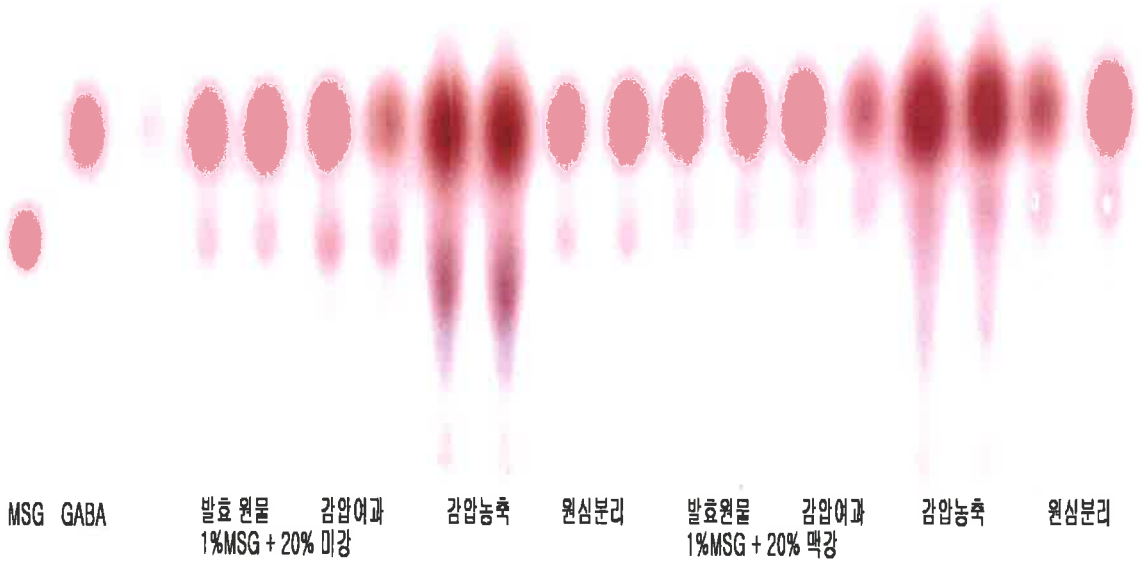


그림 4. 미강 및 맥강 발효물의 액상 소재화 공정별 GABA 농도 변화.

(가) MMD-11균주에 의한 미강 발효물의 액상 소재화(GABA)

그림5은 MMD-11균주에 의한 미강 발효물의 액상 소재화 공정별 공정물을 보여준다. 발효물 내 GABA 함량은 1,013 mg/100 g이었다(전환율 94.2%). 원심분리 및 여과 공정에 의해 GABA 함량은 거의 변화하지 않았고, 감압농축 후 GABA 함량은 11,878 mg/100 g으로 증가하였다(그림6).

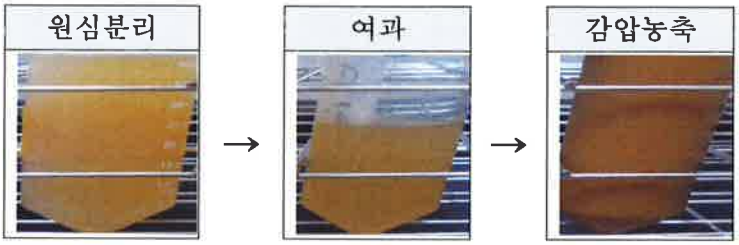


그림 5. MMD-11균주에 의한 미강 발효물의 액상 소재화 공정별 사진.

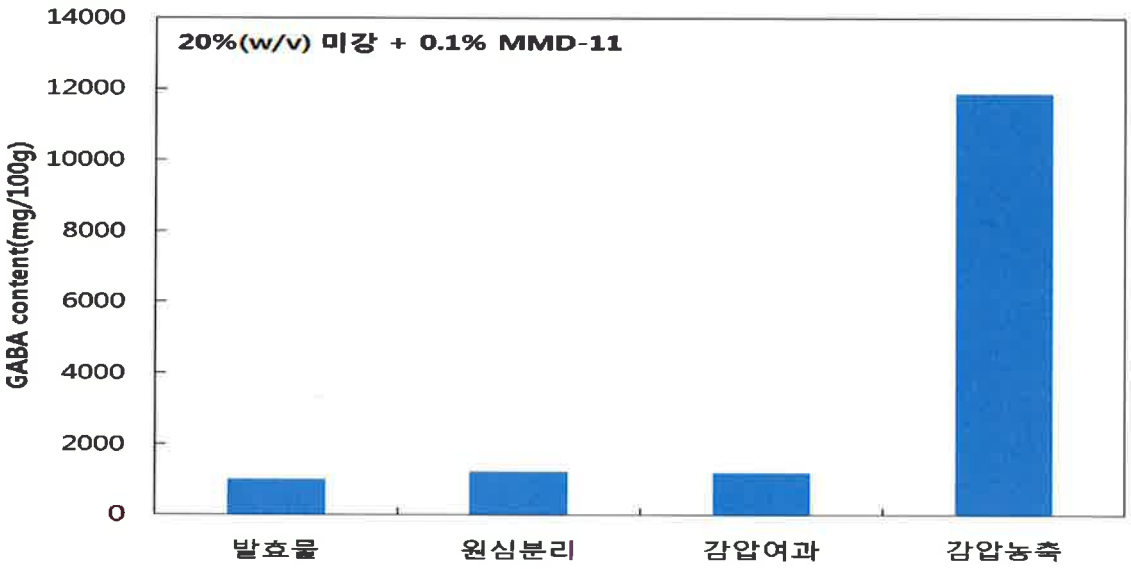


그림 6. MMD-11균주에 의한 미강 발효물의 액상 소재화 공정별 GABA 농도 변화.

(나) MMD-11균주에 의한 맥강 발효물의 액상 소재화(GABA)

그림7은 MMD-11균주에 의한 맥강 발효물의 액상 소재화 공정별 공정물을 보여준다. 발효물 내 GABA 함량은 1,272 mg/100 g이었다(전환율 96.3%). 원심분리 및 여과 공정에 의해 GABA 함량은 거의 변화하지 않았고, 감압농축 후 GABA 함량은 12,894 mg/100 g으로 증가하였다(그림8).

그림 7. MMD-11균주에 의한 맥강 발효물의 액상 소재화 공정별 사진.

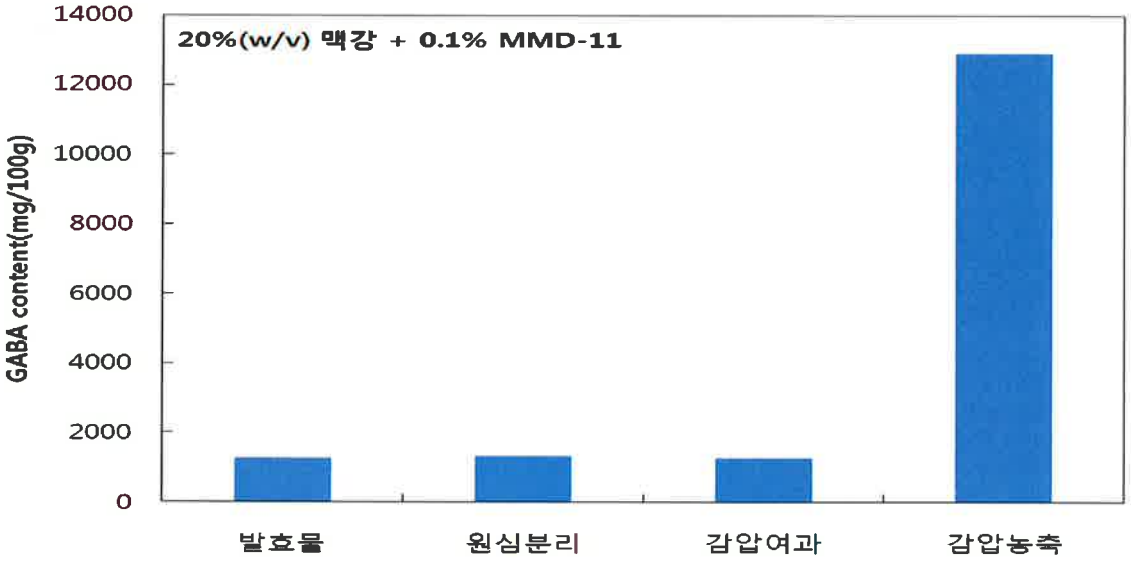


그림 8. MMD-11균주에 의한 맥강 발효물의 액상 소재화 공정별 GABA 농도 변화.

(2) 분말소재의 표준화

(가) MMD-11균주에 의한 미강 발효물의 분말 소재화(GABA)

그림9은 MMD-11균주에 의한 미강 발효물의 분말소재를 보여준다. 발효물 내 GABA 함량은 1,013 mg/100 g이었다. 동결건조 후 GABA 함량은 13,968 mg/100 g으로 증가하였다(그림10).

그림 9. MMD-10균주에 의한 미강 발효물의 분말소재.

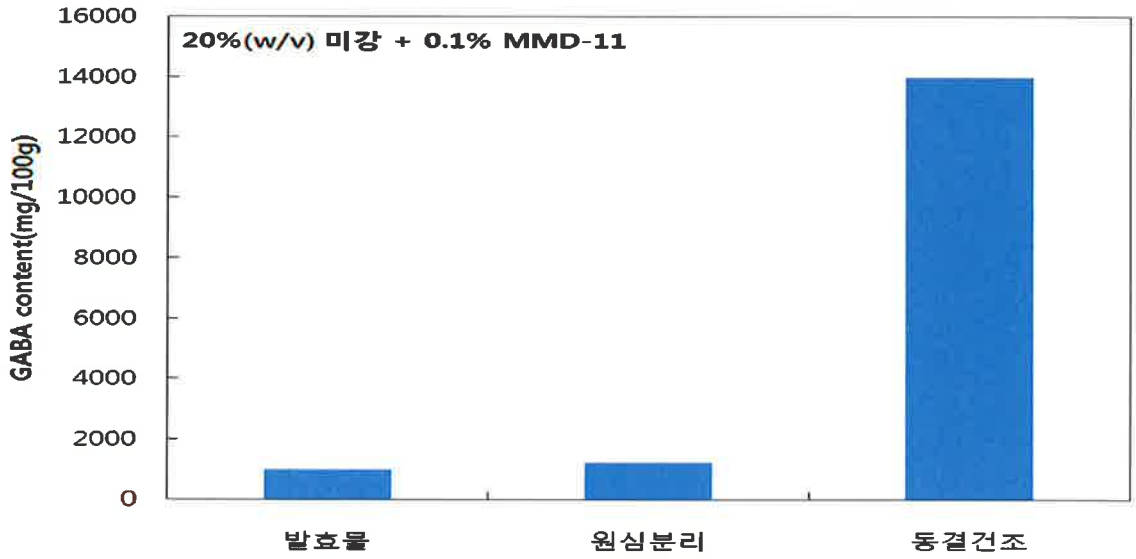


그림 10. MMD-11균주에 의한 미강 발효물의 분말 소재화 공정별 GABA 농도 변화.

(나) MMD-11균주에 의한 맥강 발효물의 분말 소재화(GABA)

그림11는 MMD-11균주에 의한 맥강 발효물의 분말소재를 보여준다. 발효물 내 GABA 함량은 1,272 mg/100 g이었다. 동결건조 후 GABA 함량은 14,534 mg/100 g으로 증가하였다(그림12).

그림 11. MMD-11균주에 의한 맥강 발효물의 분말소재.

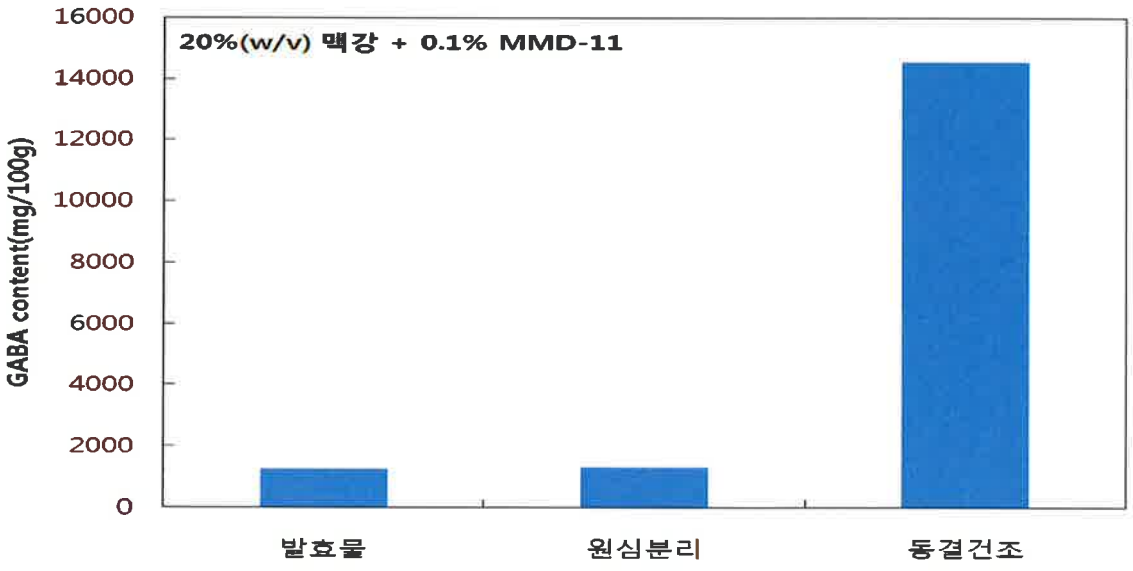


그림 12. MMD-11균주에 의한 맥강 발효물의 분말 소재화 공정별 GABA 농도 변화.

나. 소재화 가공공정 확립

(1) 액상 및 분말소재의 가공공정

MMD-11, SOM-6균주에 의한 미강 또는 맥강이 첨가된 발효에서 GABA 발효물의 액상과 분말 소재화공정은 그림13와 같이 확립하였고, 표11은 각 공정의 주요 공정변수를 나타낸다.

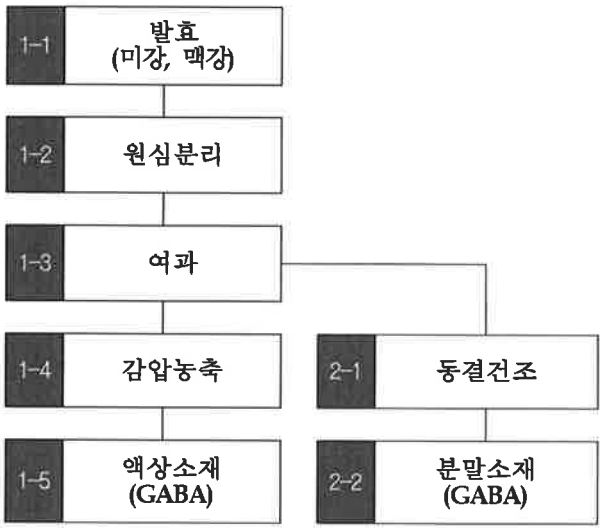


그림 13. 미강/맥강 발효물의 소재화 공정도.

표 11. 미강 및 맥강 발효물의 소재화공정 설명

No	공 정	공 정 요 약
1-1	발효	· GABA 발효 - MMD-11(대체 SOM-6), 20%(w/v) 미강 또는 맥강, 1%(w/v) MSG, 온도 35℃, pH 6.5
1-2	원심분리	· 12,000 rpm, 20분
1-3	여과	· ADVANTEC No. 1(6 μm, 110 mm)
1-4	감압농축	· 온도 40℃, ×10 농축
1-5	액상소재	· GABA 함량 1,000 mg 이상/100 g
2-1	동결건조	· -50℃, 48h
2-2	분말소재	· GABA 함량 10,000 mg 이상/100 g

다. 기능성 소재의 대량생산 시스템 구축

(1) 미강 및 맥강의 발효공정(100 L) 확립

미강 및 맥강을 이용한 GABA 발효는 300 L 부피의 생물교반반응기(stirred-tank bioreactor)에서 작업량(working volume) 100 L 규모에서 수행하였다(그림14). 발효에 첨가된 미강과 맥강의 함량은 20%(w/v)이었고, 발효에 1.0%(w/v) MSG, 균주를 0.1%(w/v) 접종하여 72시간 동안 발효하였다.

그림 14. GABA 발효에 사용한 300 L 생물교반반응기.

(2) 미강을 이용한 GABA 발효공정 확립

(가) 온도 확립

미강을 이용한 GABA 발효는 SOM-6에 의해 수행되었다. 그 결과, 35℃로 발효하였을 때, 1,048 mg/100 g의 GABA가 생산되어 최적 온도는 35℃로 결정하였다(그림15).

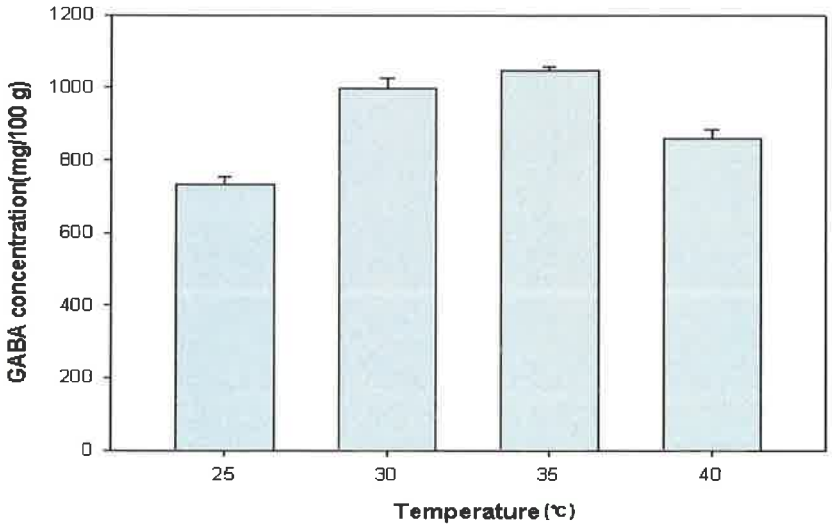


그림 15. SOM-6에 의한 미강 이용 GABA 발효에서 온도에 따른 GABA 생산량 변화.

(나) 교반속도 확립

미강을 이용한 GABA 발효에서 교반속도의 영향은 60-120 rpm 사이에서 조사하였다. 그림16과 같이, 교반속도의 증가에 따라 GABA 생산량이 증가하는 경향을 나타내었지만 100 rpm 이상에서는 더 이상 증가하지 않았다. 이러한 결과는 100 rpm 이상으로 교반하여도 물질전달에 미치는 영향이 미미함을 의미하는 것으로 100 rpm(1,066 mg/100g)을 최적 교반속도로 결정하였다.

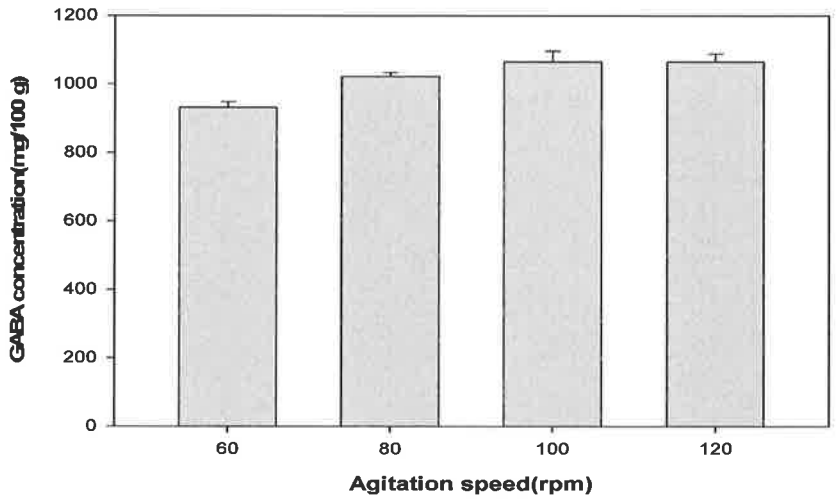


그림 16. SOM-6에 의한 미강 이용 GABA 발효에서 교반속도에 따른 GABA 생산량 변화.

(다) 통기량 확립

미강을 이용한 GABA 발효에서 통기량의 영향은 0.2-0.8 vvm 사이에서 조사하였다. 그 결과, 0.4 vvm으로 발효하였을 때, 1,176 mg/100 g의 GABA가 생산되어 최적 통기량은 0.4 vvm으로 결정하였다(그림17).

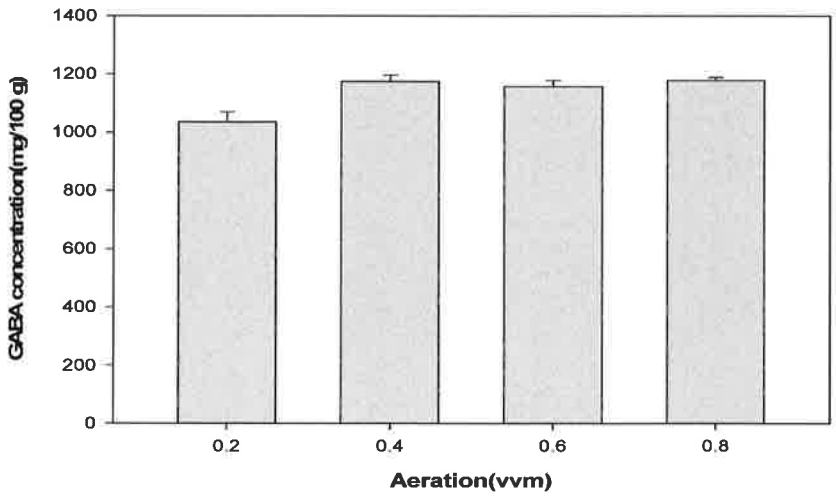


그림 17. SOM-6에 의한 미강 이용 GABA 발효에서 통기량에 따른 GABA 생산량 변화.

(3) 맥강을 이용한 GABA 발효공정 확립

(가) 온도 확립

맥강을 이용한 GABA 발효는 SOM-6에 의해 수행되었다. 그 결과, 35℃로 발효하였을 때, 1,011 mg/100 g의 GABA가 생산되어 최적 온도는 35℃로 결정하였다(그림18).

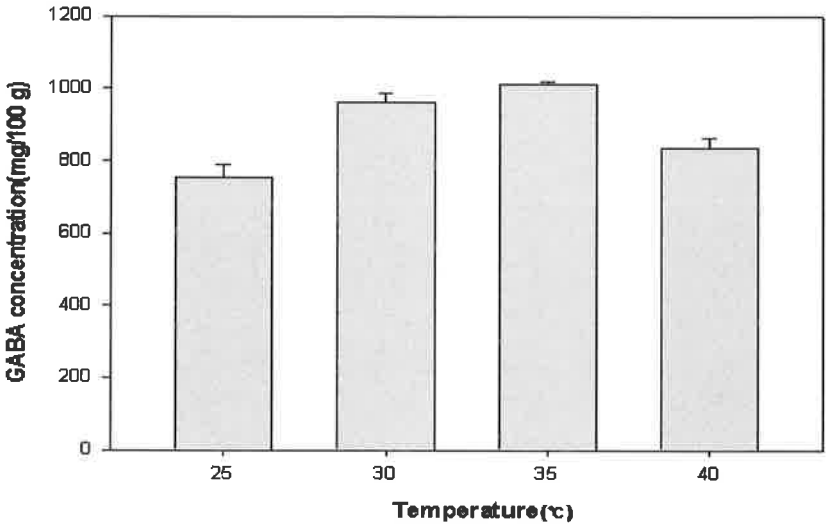


그림 18. SOM-6에 의한 맥강 이용 GABA 발효에서 온도에 따른 GABA 생산량 변화.

(나) 교반속도 확립

맥강을 이용한 GABA 발효에서 교반속도의 영향은 100-160 rpm 사이에서 조사하였다. 그림19와 같이, 120 rpm 이상에서는 GABA 생산량이 더 이상 증가하지 않았다. 따라서, 120 rpm(1,077 mg/100 g)을 최적 교반속도로 결정하였다.

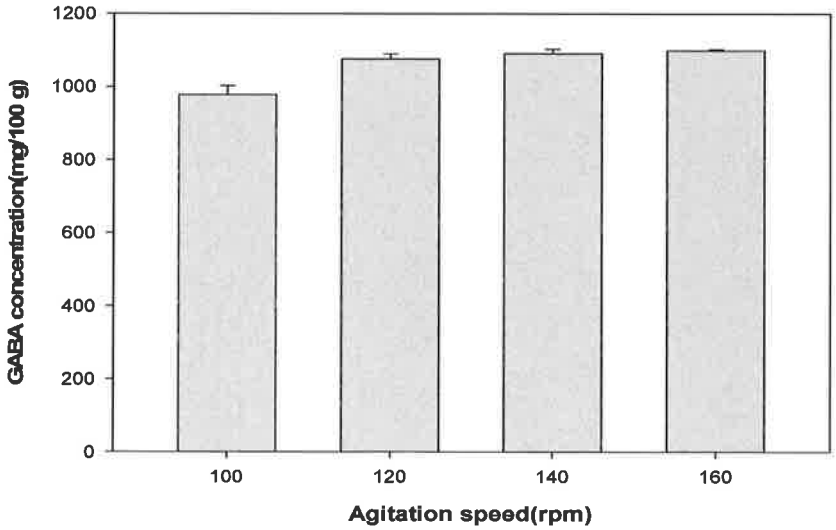


그림 19. SOM-6에 의한 맥강 이용 GABA 발효에서 교반속도에 따른 GABA 생산량 변화.

(다) 통기량 확립

맥강을 이용한 GABA 발효에서 통기량의 영향은 0.2-0.8 vvm 사이에서 조사하였다. 그 결과, 0.6 vvm으로 발효하였을 때, 1,207 mg/100 g의 GABA가 생산되어 최적 통기량은 0.6 vvm으로 결정하였다(그림20).

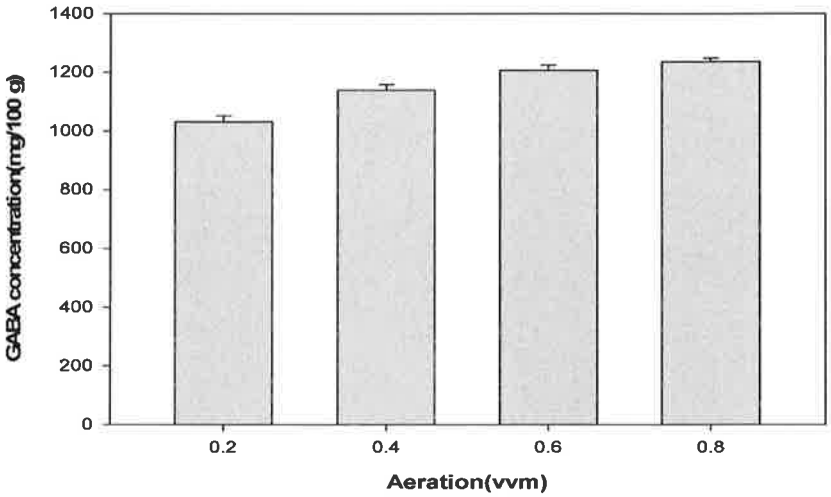


그림 20. SOM-6에 의한 맥강 이용 GABA 발효에서 통기량에 따른 GABA 생산량 변화.

(4) 미강 및 맥강발효물의 소재화공정 확립

(가) 미강 및 맥강발효물의 분말 소재화공정 확립

① 미강발효물의 GABA분말 소재화

그림21는 SOM-6에 의한 미강 발효물의 분말소재화 공정별 GABA 함량을 나타낸다. 발효액 내 GABA 함량은 1,176 mg/100 g이었고, 여과공정에 의해 GABA의 손실은 일어나지 않았으며, 동결건조 후 GABA 함량은 13,401 mg/100 g이었다.

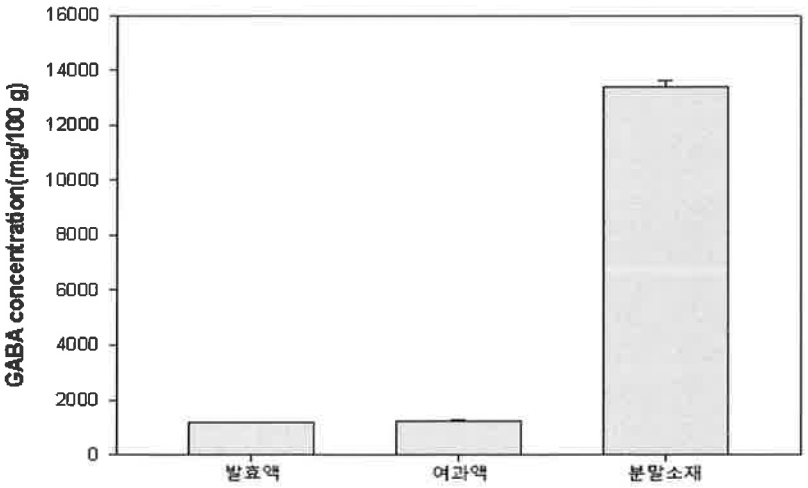


그림 21. SOM-6에 의한 미강 발효물의 분말 소재화 공정에 따른 GABA 함량 변화.

(나) 맥강발효물의 GABA분말 소재화

그림22은 SOM-6에 의한 맥강 발효물의 분말 소재화 공정별 GABA 함량을 나타낸다. 발효액 내 GABA 함량은 1,207 mg/100 g이었고, 여과공정에 의해 GABA의 손실은 일어나지 않았으며, 동결건조 후 GABA 함량은 13,882 mg/100 g이었다.

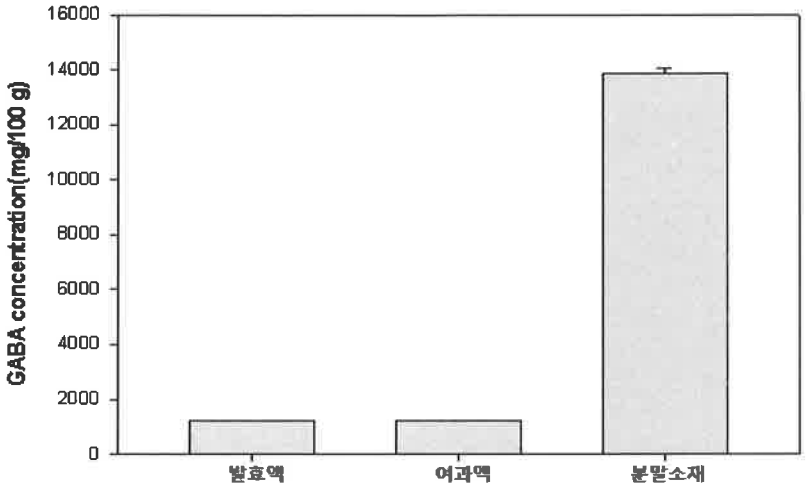


그림 22. SOM-6에 의한 맥강 발효물의 분말 소재화 공정에 따른 GABA 함량 변화.

(다) 발효물의 분말 소재화공정 확립

SOM-6에 의한 미강 또는 맥강이 첨가된 발효에서 GABA 발효물의 분말 소재화 공정은 그림23과 같이 확립하였고, 표12는 각 공정의 주요 공정변수를 나타낸다.

그림 23. 미강 및 맥강 발효물의 분말 소재화 공정도.

표 12. 미강/맥강 발효물의 분말 소재화공정 설명

No	공 정	공 정 요 약
1-1	발효	· GABA 발효 - 0.1% SOM-6, 20%(w/v) 미강, 1%(w/v) MSG, 온도 35℃, pH 6.5, 100 rpm, 0.4 vvm - 0.1% SOM-6, 20%(w/v) 맥강, 1%(w/v) MSG, 온도 35℃, pH 6.5, 120 rpm, 0.6 vvm · GABA 함량: 1,000 mg 이상/100 g
1-2	압착여과 (Filter press)	· 압력: 1.5 kg/cm^2 이하 · 여과포 size: 600*600*30 mm
1-3	동결건조	· 온도변화: -40~25℃ · 시간: 72h · 진공: 600 mTorr 이하
1-4	분말소재	· GABA 함량: 10,000 mg 이상/100 g · 수분함량 함량: 7% 이하 · 미생물: 대장균군, 살모넬라, 황색포도상구균, 바실러스 세레우스, 장염비브리오균, 리스테리아 모노사이토제네스, 클로스트리디움 퍼프린젠스 음성

(라) GABA 분말소재의 제조를 위한 공정비용 산출

미강 및 맥강을 이용하여 발효, 여과, 동결건조 공정을 거쳐 GABA 분말소재를 제조하는 공정비용은 100 L 발효기준, 1,188,400원으로 계산되었다(표13).

표 13. GABA 분말소재 제조원가

구분		단위	단가(원)	수량	금액(원)
재료비	미강/맥강	kg	300	20	6,000
	MSG	kg	10,000	1	10,000
	접종균주	L	4,000	0.1	400
가공비	300L 발효기 임차비	일	181,000	3	54,3000
	압착여과기 임차비	일	129,000	1	129,000
	동결건조기 임차비	일	250,000	2	500,000
합계					1,188,400

(마) GABA 분말소재의 품질평가

① 미생물 분석

GABA 분말소재의 미생물 분석(일반세균, 대장균, 대장균군, 살모넬라, 황색포도상구균, 바실러스 세레우스, 장염비브리오균, 리스테리아 모노사이토제네스, 클로스트리디움 퍼프린젠스)을 수행하였다. 그 결과, 일반세균을 제외한 모든 항목에서 미생물이 불검출 되었다(표14).

표 14. 분말소재의 미생물 분석결과

분석항목	분석결과	
	BG	RG
일반세균(CFU/g)	23	25
대장균군(CFU/g)	0	0
대장균(CFU/g)	0	0
살모넬라	음성	음성
황색포도상구균(CFU/g)	0	0
바실러스 세레우스(CFU/g)	0	0
장염비브리오균	음성	음성
리스테리아 모노사이토제네스	음성	음성
클로스트리움 퍼프린젠스(CFU/g)	0	0

분석기관 : 다산생명과학원(주)

BG : 20% 맥강 추출물 + 1%MSG + 0.1%SOM-6, RG : 20% 미강 추출물 + 1%MSG + 0.1%SOM-6

② 중금속 분석

GABA 분말소재의 중금속 분석(납, 카드뮴, 수은, 비소)을 분석하였다. 분석한 결과를 표 15에 나타내었고, kg 기준으로 제시하였다.

표 15. 분말소재의 중금속 분석결과

분석항목	분석결과	
	BG	RG
납(mg/kg)	0.2940	0.2285
카드뮴(mg/kg)	0.0351	0.0716
수은(mg/kg)	0.0090	0.0125
비소(mg/kg)	0.0660	2.1082

분석기관 : 다산생명과학원(주)

BG : 20% 맥강 추출물 + 1%MSG + 0.1%SOM-6, RG : 20% 미강 추출물 + 1%MSG + 0.1%SOM-6

③ 9대영양소 분석

GABA 분말소재의 영양성분(열량, 탄수화물, 당류, 단백질, 지방, 포화지방, 트랜스지방, 콜레스테롤, 나트륨)을 분석하였다. 분석한 결과를 표16에 나타내었고, 100g 기준으로

제시하였다.

표 16. 분말소재의 영양성분 분석결과

분석항목	분석결과	
	BG	RG
열량(kcal/100g)	362	305
수분(g/100g)	3.63	4.35
회분(g/100g)	10.20	23.41
조단백질(g/100g)	15.51	15.24
탄수화물(g/100g)	67.24	53.75
당류(g/100g)	0.7821	0.7516
조지방(g/100g)	3.42	3.23
포화지방(g/100g)	0.8156	0.7298
트랜스지방(g/100g)	0.0270	0.0178
콜레스테롤(mg/100g)	불검출	불검출
나트륨(g/100g)	2.28	2.28

분석기관 : 다산생명과학원(주)

BG : 20% 맥강 추출물 + 1%MSG + 0.1%SOM-6, RG : 20% 미강 추출물 + 1%MSG + 0.1%SOM-6

④ 잔류농약 분석(320종)

GABA 분말소재에 대하여 320종의 잔류농약 분석을 하였다. 그 결과, tricyclazole를 제외한 모든 항목에서 농약이 불검출 되었다(표17).

표 17. 분말소재의의 잔류농약 분석결과

BG	RG
불검출	Tricyclazole 0.023 mg/kg

분석기관 : 다산생명과학원(주)

BG : 20% 맥강 추출물 + 1%MSG + 0.1%SOM-6, RG : 20% 미강 추출물 + 1%MSG + 0.1%SOM-6

6. GABA 소재의 안전성 평가

가. 액상 및 분말소재의 미생물 안전성 평가

(1) 액상소재의 미생물 분석

GABA 액상소재에 대하여 일반세균, 대장군균, 대장균, 살모넬라, 황색포도상구균, 바실러스 세레우스, 유산균 등 7항목의 미생물 분석을 하였다(표18).

표 18. GABA 액상소재의 미생물 분석

시료명 / 항목	RG 액상	BG 액상
(1) 일반세균 정량(단위:cfu/g)	1.16×10^{7}	3.45×10^{8}
(2) 대장군균 정량(단위:cfu/g)	불검출	불검출
(3) 대장균 정량(단위:cfu/g)	불검출	불검출
(4) 살모넬라 정성	음성	음성
(5) 황색포도상구균 정량(단위:cfu/g)	불검출	불검출
(6) 바실러스 세레우스 정량(단위:cfu/g)	불검출	불검출
(7) 유산균 정량(단위:cfu/g)	9.10×10^{5}	1.00×10^{7}

분석기관 : 다산생명과학원(주)

BG : 20% 맥강 추출물 + 1%MSG + 0.1%SOM-6, RG : 20% 미강 추출물 + 1%MSG + 0.1%SOM-6

(2) 분말소재의 미생물 분석

GABA 분말소재에 대하여 일반세균, 대장군균, 대장균, 살모넬라, 황색포도상구균, 바실러스 세레우스, 유산균 등 7항목의 미생물 분석을 하였다(표19).

표 19. GABA 분말소재의 미생물 분석

샘플명 / 항목	RG 분말	BG 분말
(1) 일반세균 정량(단위:cfu/g)	1.60×10^{6}	2.60×10^{7}
(2) 대장군균 정량(단위:cfu/g)	불검출	불검출
(3) 대장균 정량(단위:cfu/g)	불검출	불검출
(4) 살모넬라 정성	음성	음성
(5) 황색포도상구균 정량(단위:cfu/g)	불검출	불검출
(6) 바실러스 세레우스 정량(단위:cfu/g)	불검출	불검출
(7) 유산균 정량(단위:cfu/g)	1.10×10^{5}	9.85×10^{4}

분석기관 : 다산생명과학원(주)

BG : 20% 맥강 추출물 + 1%MSG + 0.1%SOM-6, RG : 20% 미강 추출물 + 1%MSG + 0.1%SOM-6

나. 동물실험을 통한 안전성 평가(*in vivo*)

- 미강, 맥강을 이용한 GABA 분말소재에 대한 급, 아급성 평가 결과, 사망한 동물은 없었으며, 몸무게 변화도 일반군과 비슷하게 나타났다. GOT, GPT 측정 결과에서도 미강, 맥강 GABA소재가 독성이 없고, 일반군과 비슷하거나 낮게 측정되어 안전성을 확보한 결과를 얻었다(그림24-26).

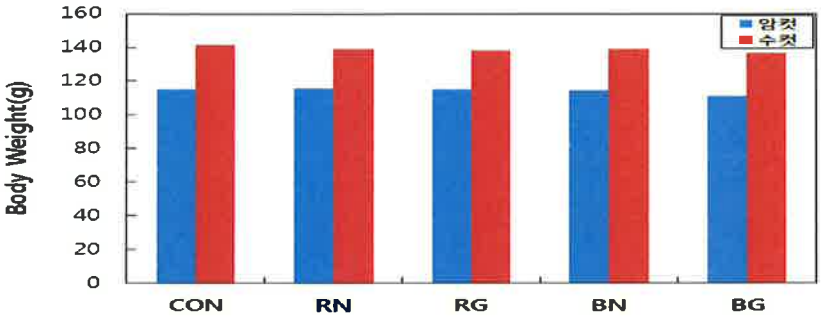


그림 24. 안정성 평가 동물 모델 몸무게 측정.

RN : 20% 맥강 추출물, RG : 20% 미강 추출물 + 1%MSG + 0.1%SOM-6

BN : 20% 맥강 추출물, BG : 20% 맥강 추출물 + 1%MSG + 0.1%SOM-6

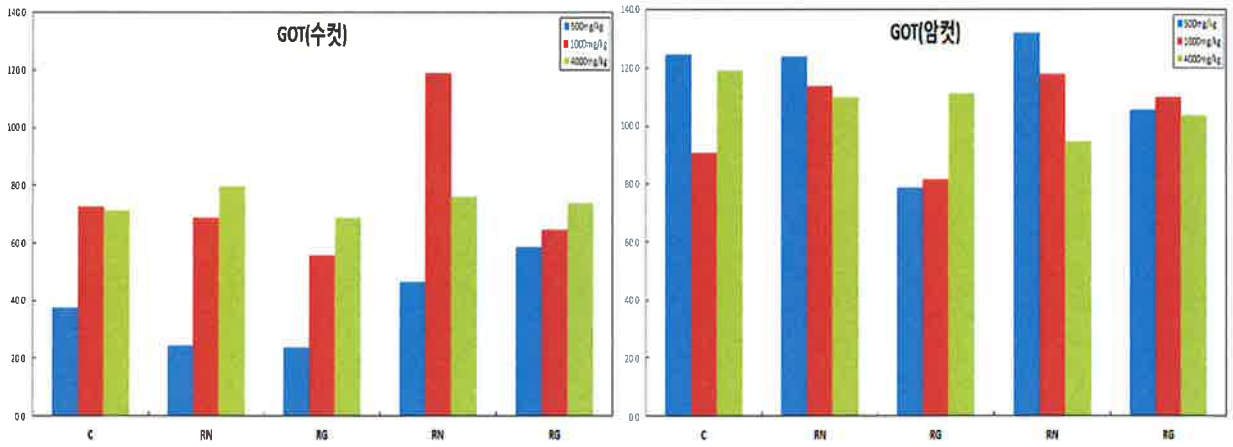


그림 25. 안정성 평가 동물 모델 GOT 측정.

RN : 20% 맥강 추출물, RG : 20% 미강 추출물 + 1%MSG + 0.1%SOM-6

BN : 20% 맥강 추출물, BG : 20% 맥강 추출물 + 1%MSG + 0.1%SOM-6

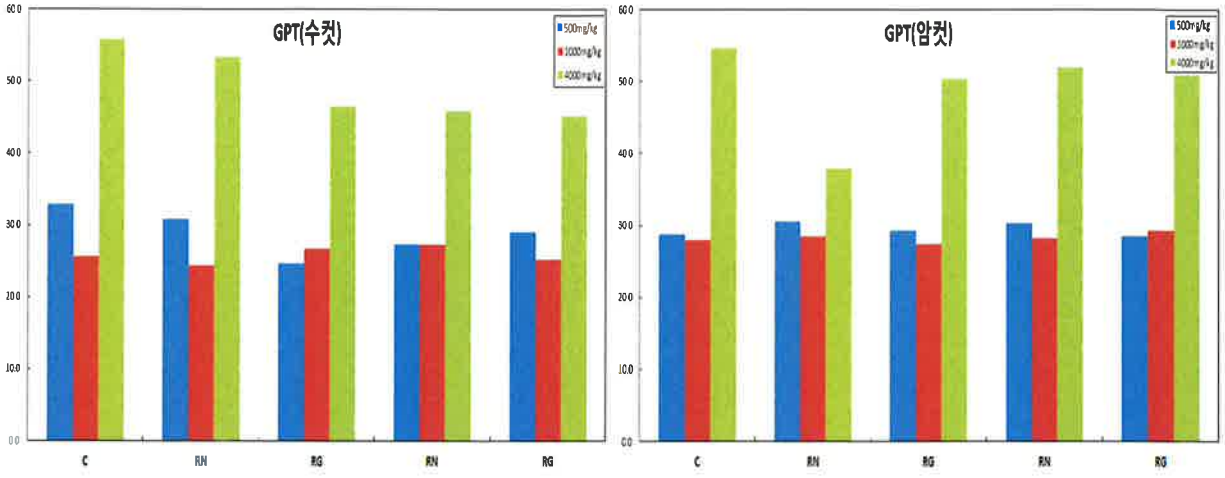


그림 26. 안정성 평가 동물 모델 GTP 측정.

RN : 20% 맥강 추출물, RG : 20% 미강 추출물 + 1%MSG + 0.1%SOM-6

BN : 20% 맥강 추출물, BG : 20% 맥강 추출물 + 1%MSG + 0.1%SOM-6

7. GABA 소재의 항스트레스 효능평가

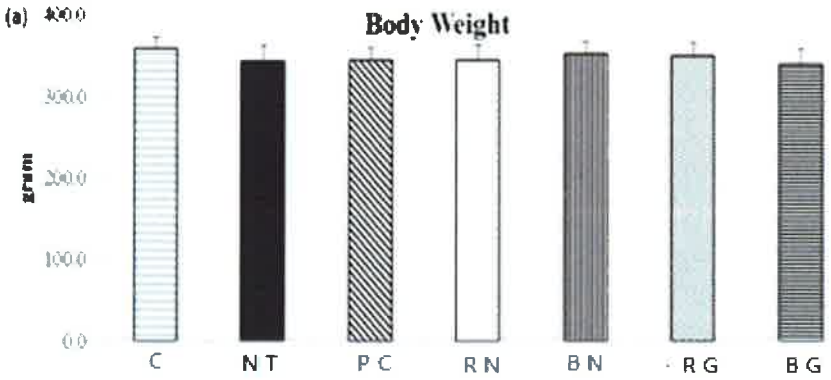
가. 미강, 맥강 및 GABA 첨가 미강, GABA 첨가 맥강

(1) 체중, 식이섭취량

(가) 실험동물에 미강, 맥강 및 GABA 첨가 미강, GABA첨가 맥강을 21일 동안 급여한 후, 체중증가량, 식이섭취량은 그림27에 나타내었다.

(나) 식이섭취량은 스트레스 대조군(NT)에 비해 정상대조군(C)에서 증가하였다. 스트레스 대조군에 비해 스트레스를 준 모든 군[인삼 스트레스군(PC), 0.5% 미강 스트레스군(RN), 0.5% 맥강 스트레스군(BN), 0.5% GABA 첨가 미강 스트레스군(RG), 0.5% GABA 첨가 맥강 스트레스군(BG)]에서 유의적으로 증가하였다.

(다) 체중증가량은 모든 군간의 유의적인 차이가 없었으나, 정상대조군에 비해 스트레스 대조군에서 낮은 경향을 나타내었다.



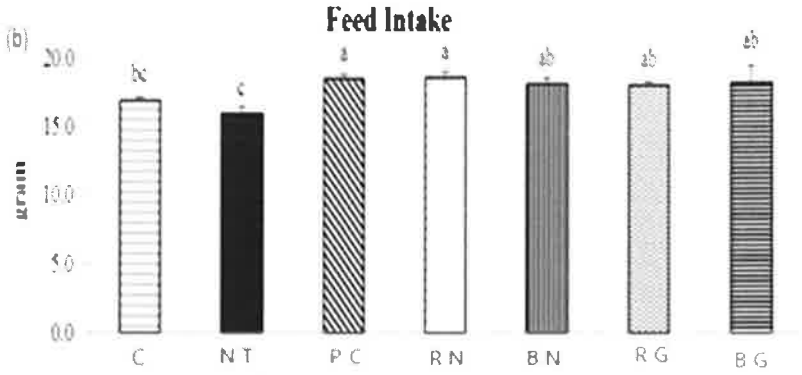


그림 27. 실험동물의 체중, 식이섭취량 비교.

C : 정상대조군, NT : 스트레스 대조군, PC : 인삼 스트레스군

RN : 20% 맥강 추출물 섭취군, RG : 20% 미강 추출물 + 1%MSG + 0.1%SOM-6 섭취군

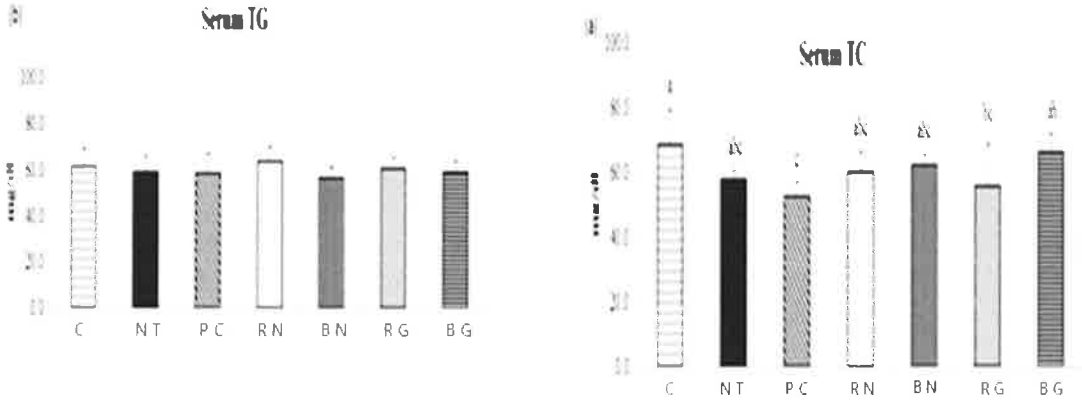
BN : 20% 맥강 추출물 섭취군, BG : 20% 맥강 추출물 + 1%MSG + 0.1%SOM-6 섭취군

(2) 혈중 및 간 지질 농도

(가) 혈중 지질농도를 비교하여 그림28에 나타내었다. 혈중 중성지방은 모든 군 간의 유의적인 차이를 나타내지 않았다.

(나) 혈중 총콜레스테롤은 정상대조군(C)에 비해 스트레스 대조군(NT)에서 낮은 수준을 나타냈다. 스트레스 대조군(NT)에 비해 0.5% 미강 스트레스군(RN), 0.5% 맥강 스트레스군(BN), 0.5% GABA 첨가 맥강 스트레스군(BG)에서 증가하는 경향을 보였으며, 정상대조군 수준으로 회복되었다. 양성대조군인 인삼 스트레스군(PC)은 정상대조군에 비해 유의적으로 감소하였다.

(다) 혈중 HDL콜레스테롤은 정상대조군에 비해 스트레스 대조군에서 유의적으로 감소하였다. 스트레스 대조군에 비해 인삼 스트레스군, 0.5% 미강 스트레스군, 0.5% 맥강 스트레스군에서 증가하는 경향을 보였으며, 0.5% GABA 첨가 미강 스트레스군, 0.5% GABA 첨가 맥강 스트레스군에서는 유의적으로 증가하였다.



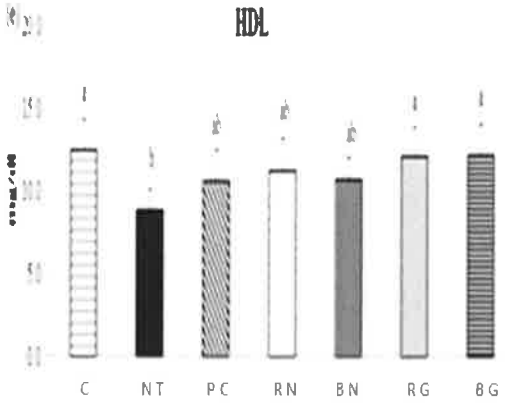


그림 28. 혈중 지질 농도 비교.

C : 정상대조군, NT : 스트레스 대조군, PC : 인삼 스트레스군
RN : 20% 맥강 추출물 섭취군, RG : 20% 미강 추출물 + 1%MSG + 0.1%SOM-6 섭취군
BN : 20% 맥강 추출물 섭취군, BG : 20% 맥강 추출물 + 1%MSG + 0.1%SOM-6 섭취군

(라) 간 중 지질농도를 비교하여 그림29에 나타내었다. 간 중 중성지방은 정상대조군에 비해 스트레스 대조군에서 유의적으로 감소하였다. 스트레스 대조군에 비해 스트레스 처리군(인삼 스트레스군, 0.5% 미강 스트레스군, 0.5% 맥강 스트레스군, 0.5% GABA 첨가 미강 스트레스군, 0.5% GABA 첨가 맥강 스트레스군)에서 유의적으로 증가하였다.

(마) 간 중 총콜레스테롤은 정상대조군에 비해 스트레스 대조군에서 유의적으로 감소하였다. 스트레스 대조군에 비해 0.5% 미강 스트레스군, 0.5% 맥강 스트레스군, 0.5% GABA 첨가 미강 스트레스군, 0.5% GABA 첨가 맥강 스트레스군에서 유의적으로 증가하였다.

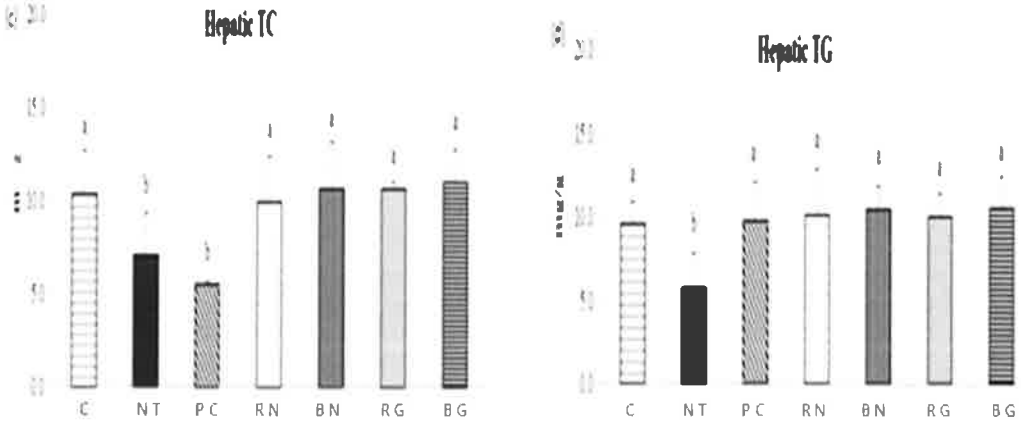


그림 29. 간 중 지질 농도 비교.

C : 정상대조군, NT : 스트레스 대조군, PC : 인삼 스트레스군
RN : 20% 맥강 추출물 섭취군, RG : 20% 미강 추출물 + 1%MSG + 0.1%SOM-6 섭취군
BN : 20% 맥강 추출물 섭취군, BG : 20% 맥강 추출물 + 1%MSG + 0.1%SOM-6 섭취군

(3) 혈중 AST, ALT 농도

(가) 혈중 AST, ALT 농도를 비교하여 그림30에 나타내었다. 혈중 AST, ALT는 정상대조군(C)에 비해 스트레스 대조군(NT)에서 유의적으로 증가하였다. 스트레스 대조군에 비해 스트레스처리군[인삼 스트레스군(PC), 0.5% 미강 스트레스군(RN), 0.5% 맥강 스트레스군(BN), 0.5% GABA 첨가 미강 스트레스군(RG), 0.5% GABA 첨가 맥강 스트레스군(BG)]에서 유의적으로 감소하였다. 0.5% GABA 첨가 맥강 스트레스군(BG)은 정상대조군에 비해 낮은 혈중 AST, ALT의 수준을 나타냈다.

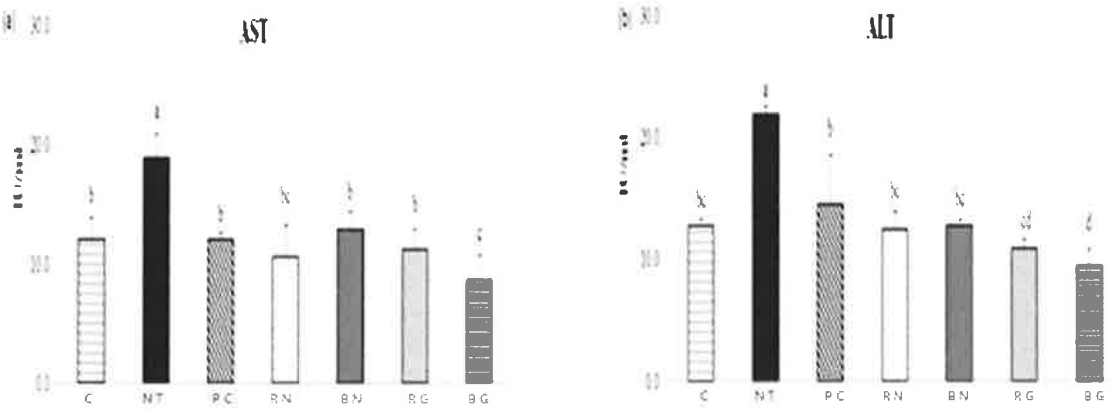


그림 30. 혈중 AST, ALT 농도 비교.

C : 정상대조군, NT : 스트레스 대조군, PC : 인삼 스트레스군

RN : 20% 맥강 추출물 섭취군, RG : 20% 미강 추출물 + 1%MSG + 0.1%SOM-6 섭취군

BN : 20% 맥강 추출물 섭취군, BG : 20% 맥강 추출물 + 1%MSG + 0.1%SOM-6 섭취군

(4) 혈중 corticosterone 및 adrenocorticotropic hormone(ACTH) 농도

(가) 혈중 corticosterone 농도를 비교하여 그림31에 나타내었다. 혈중 corticosterone 농도는 실험 0, 10일째에 유의적인 차이를 나타내지 않았으나, 실험 10일째에 정상대조군(C), 인삼 스트레스군(PC), 0.5% 미강 스트레스군(RN), 0.5% 맥강 스트레스군(BN), 0.5% GABA 첨가 미강 스트레스군(RG), 0.5% GABA 첨가 맥강 스트레스군(BG)에서 감소하는 경향을 나타냈다. 스트레스 대조군에 비해 스트레스 처리군에서 혈중 corticosterone 농도는 유의적으로 감소하였다. 양성대조군인 인삼 스트레스군에 비해 0.5% 맥강 스트레스군에서 혈중 corticosterone 농도가 감소하였으며, 스트레스 대조군에 비해 0.5% 미강 스트레스군, 0.5% GABA 첨가 미강 스트레스군에서 감소하였다. 0.5% 미강 스트레스군, 0.5% 맥강 스트레스군, 0.5% GABA 첨가 미강 스트레스군, 0.5% GABA 첨가 맥강 스트레스군에서 혈중 corticosterone 감소에 효과를 나타냈다.

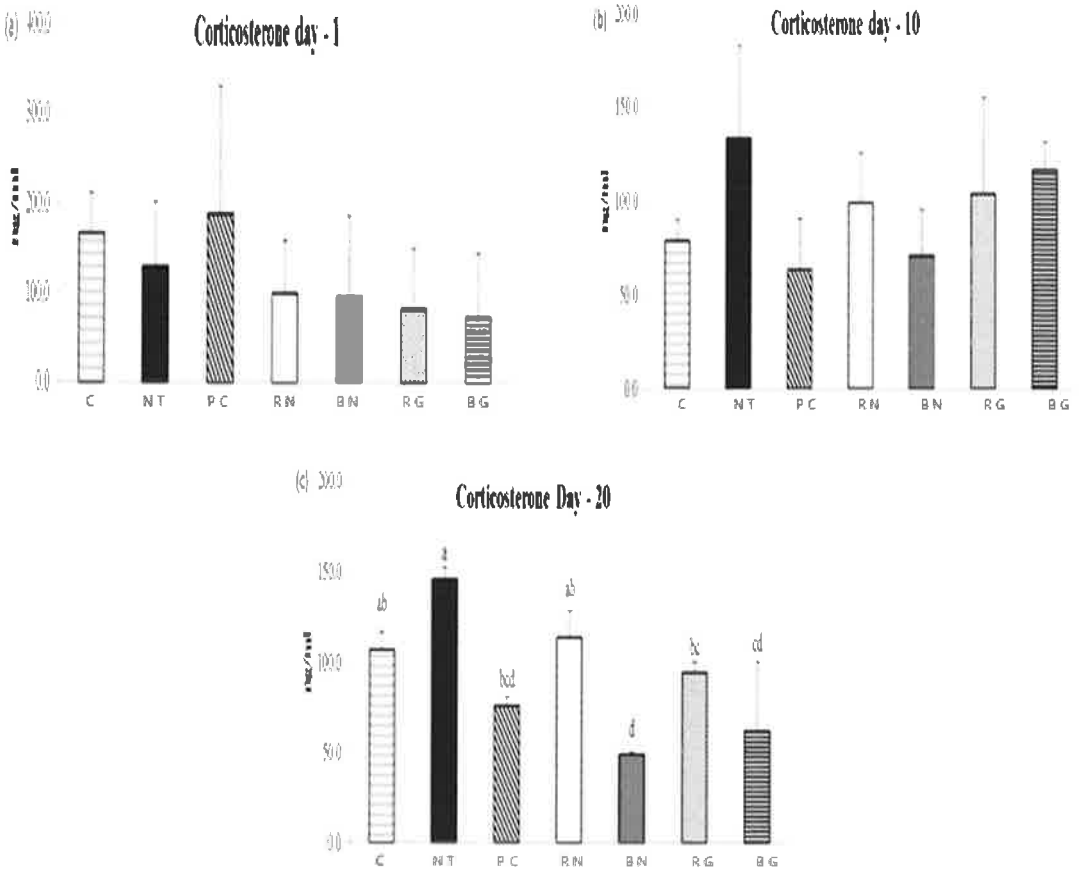


그림 31. 혈중 corticosterone 농도 비교.

C : 정상대조군, NT : 스트레스 대조군, PC : 인삼 스트레스군

RN : 20% 맥강 추출물 섭취군, RG : 20% 미강 추출물 + 1%MSG + 0.1%SOM-6 섭취군

BN : 20% 맥강 추출물 섭취군, BG : 20% 맥강 추출물 + 1%MSG + 0.1%SOM-6 섭취군

(나) 혈중 adrenocorticotropic hormone(ACTH) 농도를 비교하여 그림32에 나타내었다. 혈중 adrenocorticotropic hormone(ACTH) 농도는 정상대조군(C)에 비해 스트레스 대조군(NT)에서 유의적으로 증가하였다. 스트레스 대조군(NT)에 비해 0.5% 미강 스트레스군(RN), 0.5% 맥강 스트레스군(BN), 0.5% GABA 첨가 미강 스트레스군(RG)에서 높은 수준을 나타냈다. 0.5% GABA 첨가 맥강 스트레스군(BG)에서는 스트레스 대조군에 비해 유의적으로 감소하였으며, 양성대조군인 인삼 스트레스군(PC)에 비해 정상 수준으로 회복시켰다.

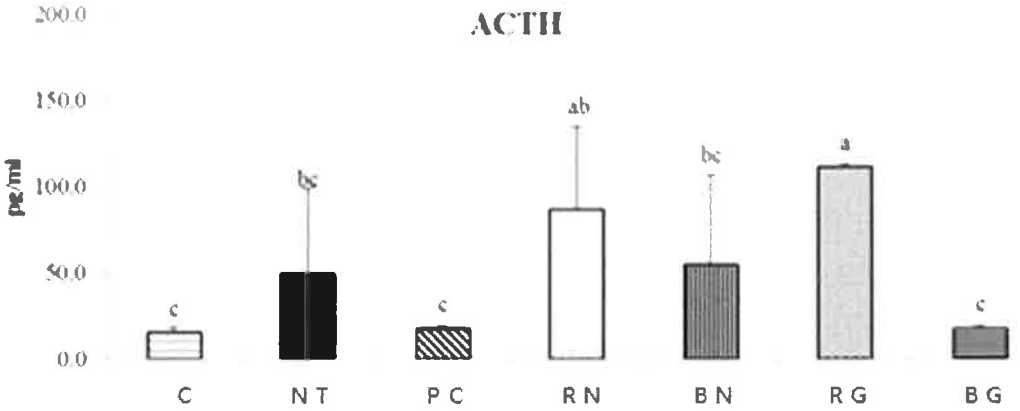


그림 32. 혈중 adrenocorticotropic hormone(ACTH) 농도 비교.

C : 정상대조군, NT : 스트레스 대조군, PC : 인삼 스트레스군

RN : 20% 맥강 추출물 섭취군, RG : 20% 미강 추출물 + 1%MSG + 0.1%SOM-6 섭취군

BN : 20% 맥강 추출물 섭취군, BG : 20% 맥강 추출물 + 1%MSG + 0.1%SOM-6 섭취군

8. GABA 소재 함유 쿠키 및 코팅곡물 개발

가. GABA 함유 쿠키

(1) 제조 공정 확립

GABA 함유 쿠키 제조를 위해서 배합에서 포장까지의 제조 공정을 확립하였다(그림33).

그림 33. 쿠키 제조 공정도.

(2) 배합비 확립

(가) GABA 함유 쿠키

GABA함유 쿠키 제조를 위해서 함유량별로 구분하여 control 쿠키와 GABA 함유량별 쿠키 배합비를 확립하였다(표20).

표 20 . GABA 함유 쿠키 제조를 위한 배합비

원 료	GABA 함유량(%)			
	Control	0.4	0.7	1.0
우리밀가루	14.9	14.9	14.9	14.9
찰보리가루	29.8	29.8	29.8	29.8
버터	19.4	19.4	19.4	19.4
정맥당	17.9	17.9	17.9	17.9
계란	14.9	14.9	14.9	14.9
아몬드	1.5	1.5	1.5	1.5
베이킹파우더	0.4	0.4	0.4	0.4
정제염	0.1	0.1	0.1	0.1
GABA	0	0.4	0.7	1

(3) GABA 소재 함유에 따른 반죽의 특성 분석

(가) 반죽의 pH 변화

pH는 완성된 쿠키의 향, 외관 색도, 기호도에 영향을 준다. pH는 대조군이 6.6, GABA 0.4% 함유군 6.45, 0.7% 함유군 6.33, 1.0% 함유군 6.54로 전제적으로 비슷하게 나타났다(표21).

표 21. GABA 소재를 함유한 반죽의 pH 변화

구 분	Control	GABA 함유량(%)		
		0.4	0.7	1.0
pH	6.6	6.45	6.33	6.54

(나) 반죽의 밀도 변화

밀도가 낮으면 쿠키가 딱딱해지고 밀도가 높으면 쉽게 부서져서 상품성이 낮아진다. 밀도는 대조군이 1.26 g/ml, GABA 0.4% 함유군 1.11 g/ml, 0.7% 함유군 1.12g/ml, 1.0% 함유군 1.24 g/ml로 전체적으로 비슷하게 나타났다(표22).

표 22. GABA 소재를 함유한 반죽의 밀도 변화

구 분	Control	GABA 함유량(%)		
		0.4	0.7	1.0
밀도 (g/ml)	1.26±0.01	1.11±0.00	1.12±0.01	1.24±0.01

(다) 반죽의 색도 변화

쿠키의 색에 영향을 주는 요인으로는 당에 의한 영향, 환원당에 의한 비효소적 갈변, 열에 의한 카라멜화 반응에 영향을 받는다. 밝기를 나타내는 L값, 적색도를 나타내는 a값, 황색도를 나타내는 b값으로 대조군은 62.51, 5.68, 24.86이었고, 함유군은 첨가량은 증가함에 따라서 증가하였다(표23).

표 23. GABA 소재를 함유한 반죽의 색도 변화

구 분		색도		
		L	a	b
Control		62.51±0.13	5.68±0.03	24.86±0.01
GABA 함유량(%)	0.4	63.49±0.13	5.25±0.01	24.46±0.04
	0.7	64.43±0.08	5.38±0.03	24.78±0.05
	1.0	65.59±0.09	5.55±0.04	24.85±0.01

(4) GABA 소재 함유에 따른 쿠키의 특성 분석

(가) GABA 함유 쿠키 제조

쿠키의 제조 공정도에 따라 Control, GABA 0.4%, 0.7%, 1.0% 함유량별로 제조하였다(표24).

표 24. GABA 소재로서 다양한 함량의 쿠키 외형

구 분			
Control	GABA 0.4% 함유	GABA 0.7% 함유	GABA 1.0% 함유

(나) 쿠키의 pH 변화

pH는 대조군이 6.33, GABA 0.4% 함유군 6.08, 0.7% 함유군 6.19, 1.0% 함유군 6.35로 함유량이 높아질수록 pH가 증가하였다(표25).

표 25. GABA 소재를 함유한 쿠키의 pH 변화

구 분	Control	GABA 함유량(%)		
		0.4	0.7	1.0
pH	6.33	6.08	6.19	6.35

(다) 쿠키의 색도 변화

밝기를 나타내는 L값, 적색도를 나타내는 a값, 황색도를 나타내는 b값으로 대조군은 68.43, 9.53, 24.61이었고, 함유군은 첨가량은 증가함에 따라서 증가하였다(표26).

표 26. GABA 소재를 함유한 쿠키의 색도 변화

구 분		색도		
		L	a	b
Control		68.43±0.01	9.53±0.01	24.61±0.01
GABA 함유량(%)	0.4	68.87±0.01	8.05±0.00	24.13±0.01
	0.7	69.63±0.01	8.44±0.01	24.63±0.00
	1.0	71.32±0.01	9.18±0.01	24.76±0.01

(라) 쿠키의 수분함량 변화

대조군의 수분함량은 2.24%이었으며, 함유군은 2.50~2.92%로 나타났다(표27).

표 27. GABA 소재를 함유한 쿠키의 수분함량 변화

구 분	Control	GABA 함유량(%)		
		0.4	0.7	1.0
수분(%)	2.24±0.14	2.25±0.00	2.50±0.00	2.92±0.14

(마) 쿠키의 손실률 및 팽창률 변화

쿠키의 손실률, 팽창률은 GABA 첨가량이 증가할수록 손실률이 높아졌다(표28).

표 28. GABA 소재를 함유한 쿠키의 손실률 및 팽창률 변화

구 분	Control	GABA 함유량(%)		
		0.4	0.7	1.0
손실률	12.63±1.59	14.28±0.00	15.87±1.03	16.66±0.00
팽창률	100±5.22	100±5.22	100±5.22	100±5.22

(5) 쿠키의 관능평가

(가) 우석대학교 식품생명공학과 연구원 15명을 대상으로 5점 척도법을 활용하여 GABA 소재를 함유하여 제조한 쿠키에 대하여 블라인드 테스트를 진행하였고, 그 결과를 그림34에 나타내었다.

(나) 조직감에서는 Control, GABA 0.7% 에서 가장 우수하게 평가되었다.

(다) 색에서는 GABA, Control 쿠키가 비슷한 평가를 얻었다.

(라) 향에서는 모든 쿠키에서 비슷한 평가를 얻었으며, GABA 소재 첨가가 영향을 주지 않는 것으로 판단되었다.

(마) 맛에서는 Control의 3.2 평가를 얻었으며, GABA 쿠키 제품에서는 2.9~3.0으로 Control 쿠키와 비슷한 평가를 받았다.

(바) 관능평가 패널들의 전박적인 기호도 분석한 결과, GABA, Control 쿠키는 2.5~3의 기호도 평가를 받았다.

(사) 상기 관능 평가 결과를 토대로 GABA 쿠키 Control 쿠키 제품과 동일한 평가를 얻어 쿠키제품의 가능성을 확인 할 수 있었다.

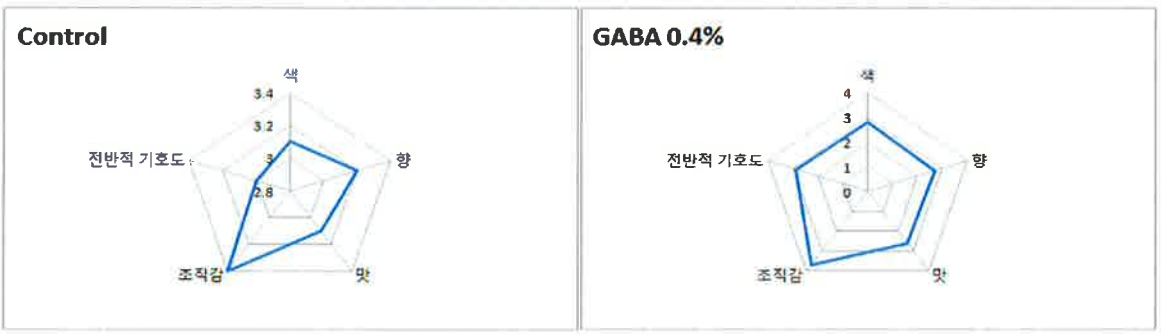


그림 34. GABA 함유량 증가에 따른 관능평가 결과.

(6) 쿠키의 GABA 함량 분석

(가) GABA 발효소재를 함유한 쿠키 제품의 GABA 함량을 HPLC를 이용하여 분석 하였다. Control 쿠키의 GABA 함량은 2.03 mg/100 g, 나타났으며, GABA 소재를 0.4, 0.7 1.0% 첨가하여 제조한 쿠키에서 GABA 함량은 51.98, 89.45, 104.57 mg/100 g으로, Control 쿠키보다 25~50배 이상을 함유하고 있었다(그림35).

(나) 상기 GABA 고함유 소재를 이용하여 쿠키를 제조시 Control 쿠키보다 높은 함량을 함유하는 것을 확인하였으며, 쿠키 제조 과정에서 GABA 소재가 소실되지 않고 유지되는 것을 알 수 있었다.

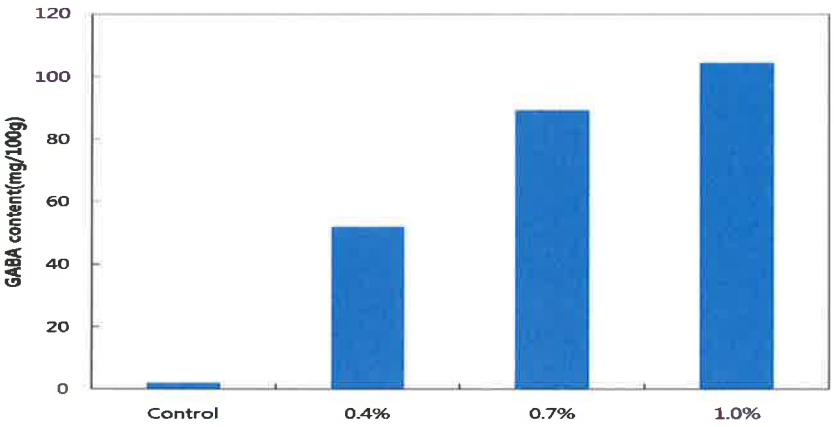


그림 35. GABA 발효소재 첨가량에 따른 GABA 함량변화.

나. GABA 함유 코팅곡물

(1) 제조공정 확립

GABA 코팅곡물 제조를 위해서 그림36과 같은 제조 공정을 확립하였다.

그림 36. GABA 코팅곡물 제조 공정도.

다. GABA의 열안정성 평가

(1) 쿠키제조 전 GABA 40~100 mg/100 g 첨가하여 쿠키를 제조한 결과, GABA 함량은 45~105 mg/100 g으로 분석되었으며, GABA는 소실되는 부분이 없었다.

9. GABA 소재 함유 쿠키 및 코팅곡물의 항스트레스 효능평가

가. 미강 코팅곡물 및 미강 GABA 코팅곡물

(1) 체중, 식이섭취량

(가) 실험동물에 미강 코팅곡물 및 미강 GABA 코팅곡물(100 mg/100 g)을 21일 동안 급여한 후, 체중증가량, 식이섭취량은 그림37에 나타내었다.

(나) 체중증가량은 정상대조군(Control)에 비해 스트레스 대조군(NT)에서 유의적으로 감소하였다. 50% 미강 GABA 코팅곡물 스트레스군(RGB)은 정상대조군과 비슷한 수준의 체중 증가량을 나타냈다.

(다) 식이섭취량은 유의적인 차이는 없지만, 스트레스 대조군에서 정상대조군에 비해 감소하는 경향을 나타내고, 50% 미강 코팅곡물 스트레스군과 50% 미강 GABA 코팅곡물 스트레스군은 증가하는 경향을 나타내었다.

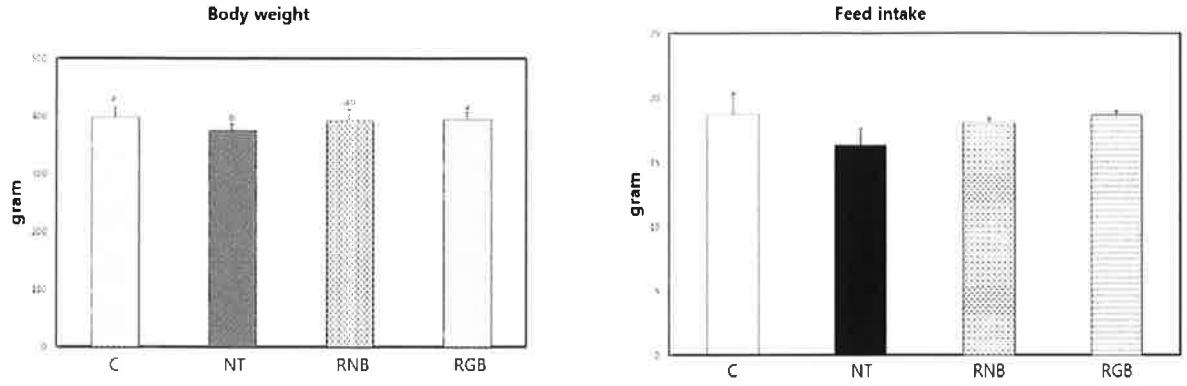


그림 37. 실험동물의 체중, 식이섭취량 비교.

C : 정상대조군, NT : 스트레스 대조군, RNB : 코팅곡물, RGB : GABA코팅곡물

(2) 혈중 및 간 지질농도

(가) 혈중 지질농도를 비교하여 그림38에 나타내었다. 혈중 중성지방은 정상대조군(Control)에 비해 스트레스 대조군(NT), 50% 미강 GABA 코팅곡물 스트레스군(RGB)에서 유의적으로 감소하였다. 50% 미강 코팅곡물 스트레스군은 스트레스 대조군에 비해 혈중 중성지방 수준이 정상대조군 수준으로 회복되었다.

(나) 혈중 총콜레스테롤은 모든 군 간의 유의적인 차이를 나타내지 않았다. 정상대조군에 비해 스트레스 대조군에서 증가하는 경향을 나타냈다.

(다) 혈중 HDL 콜레스테롤은 모든 군 간의 유의적인 차이를 나타내지 않았다.

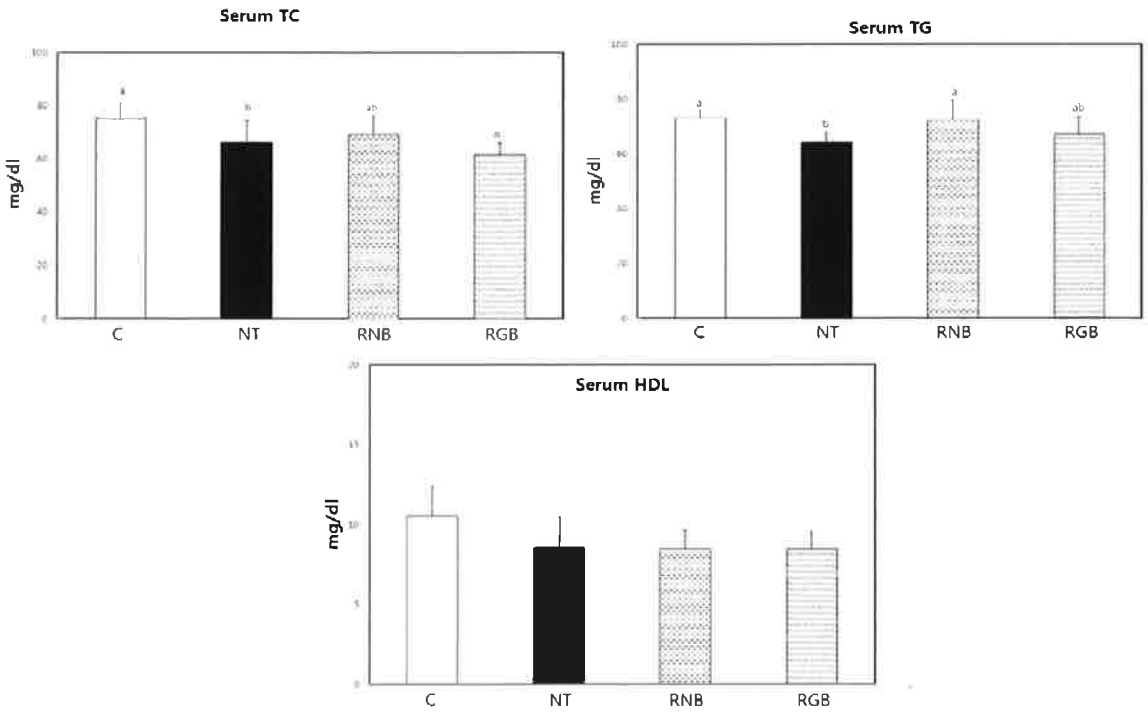


그림 38. 혈중 지질농도 비교.

C : 정상대조군, NT : 스트레스 대조군, RNB : 코팅곡물, RGB : GABA코팅곡물

(라) 간 중 지질농도를 비교하여 그림39에 나타내었다. 간 중 중성지방은 모든 군 간의 유의적인 차이를 나타내지 않았다.

(마) 간 중 총콜레스테롤은 모든 군 간의 유의적인 차이는 없었으나, 정상대조군에 비해 스트레스 대조군에서 증가하는 경향을 나타냈다.

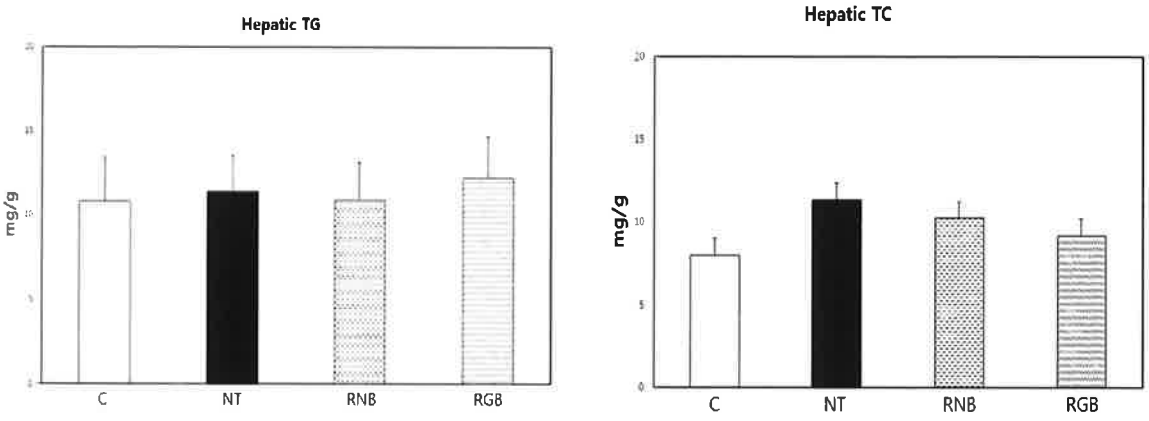


그림 39. 간 중 지질 농도 비교.

C : 정상대조군, NT : 스트레스 대조군, RNB : 코팅곡물, RGB : GABA코팅곡물

(3) 혈중 AST, ALT 농도

(가) 혈중 AST, ALT 농도를 비교하여 그림40에 나타내었다. 모든 군 간의 유의적인 차이는 없지만 스트레스 처리군[스트레스 대조군(NT), 50% 미강 코팅곡물 스트레스군(RNB), 50% 미강 GABA 코팅곡물 스트레스군(RGB)]에서 낮은 혈중 AST, ALT 수준을 나타냈다.

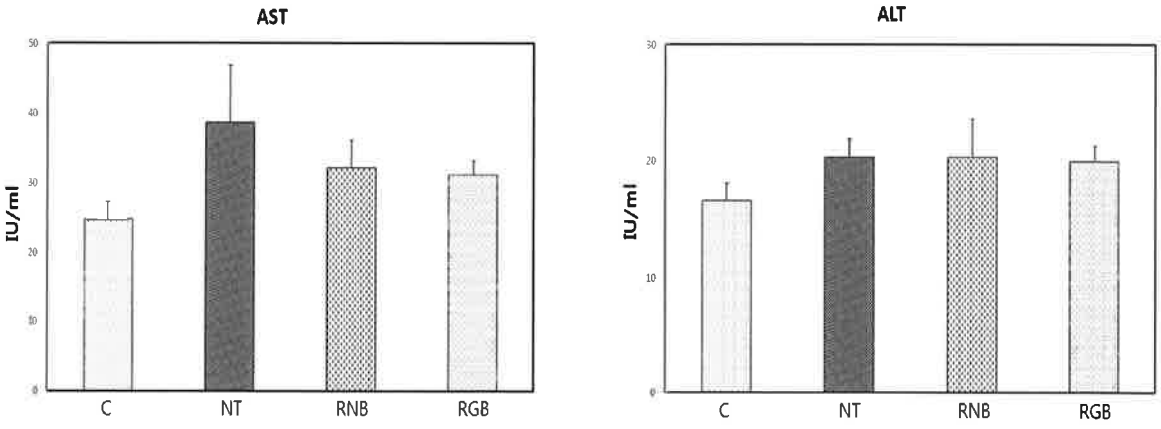


그림 40. 혈중 AST, ALT 농도 비교.

C : 정상대조군, NT : 스트레스 대조군, RNB : 코팅곡물, RGB : GABA코팅곡물

(4) 혈중 corticosterone 및 adrenocorticotropic hormone(ACTH) 농도

(가) 혈중 corticosterone 농도를 비교하여 그림41에 나타내었다. 혈중 corticosterone 농도는 실험 0, 10일째 사이에 정상대조군(Control)에 비해 스트레스 처리군(NT), 50% 미강 코팅곡물 스트레스군(RNB), 50% 미강 GABA 코팅곡물 스트레스군(RGB)에서 유의적인 차이를 나타내었다. 스트레스 대조군에 비해 50% 미강 코팅곡물 스트레스군, 50% 미강 GABA 코팅곡물 스트레스군에서 유의적으로 감소하였다. 실험 20일째의 혈중 corticosterone 농도는 정상대조군과 스트레스 대조군에서 유의적이지는 않지만 유사한 경향을 나타내었다.

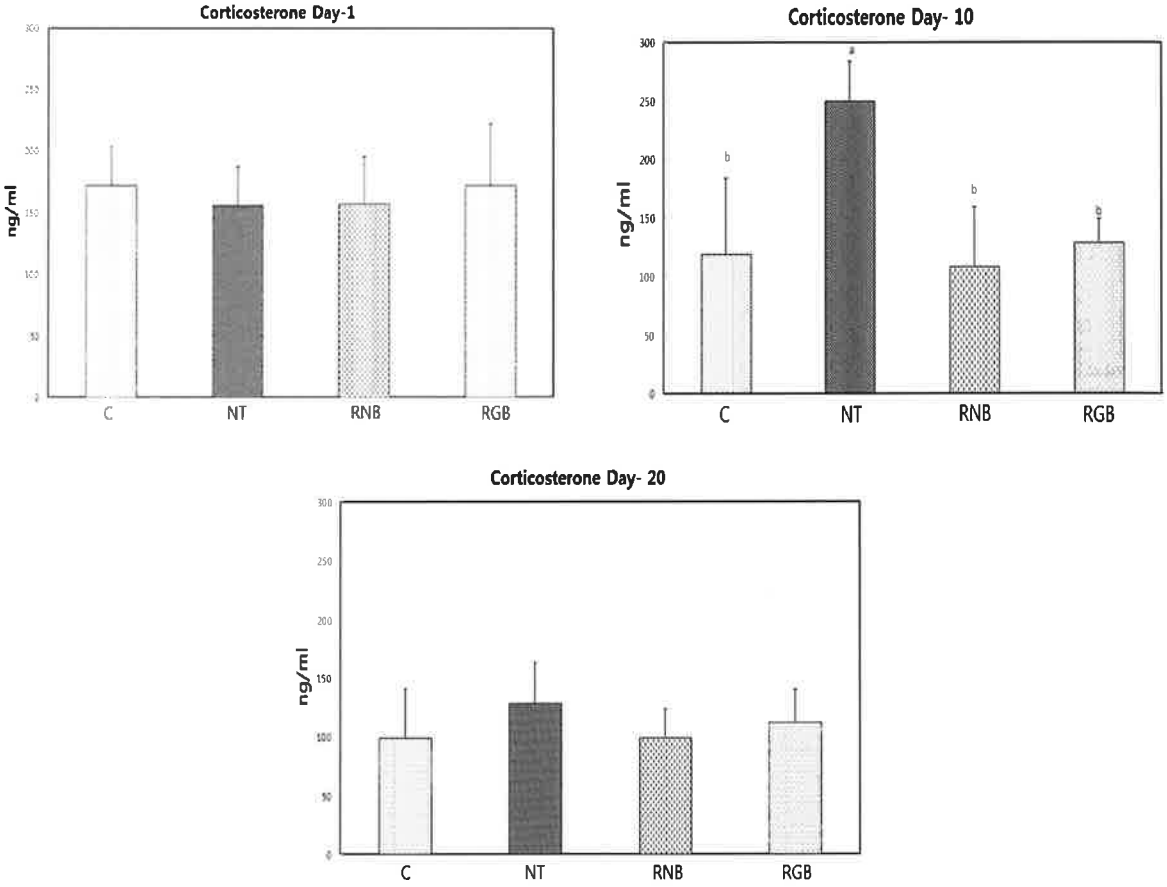


그림 41. 혈중 corticosterone 농도 비교.

C : 정상대조군, NT : 스트레스 대조군, RNB : 코팅곡물, RGB : GABA코팅곡물

(나) 혈중 adrenocorticotropic hormone(ACTH) 농도를 비교하여 그림42에 나타내었다. 혈중 adrenocorticotropic hormone(ACTH) 농도는 정상대조군(Control)에 비해 스트레스 대조군(NT)에서 유의적으로 증가하였다. 스트레스 대조군은 혈중 adrenocorticotropic hormone(ACTH) 농도를 정상 수준으로 회복시켰으며, 50% 미강 GABA 코팅곡물 스트레스군(RGB)은 스트레스 대조군에 비해 유의적으로 감소시켰다.

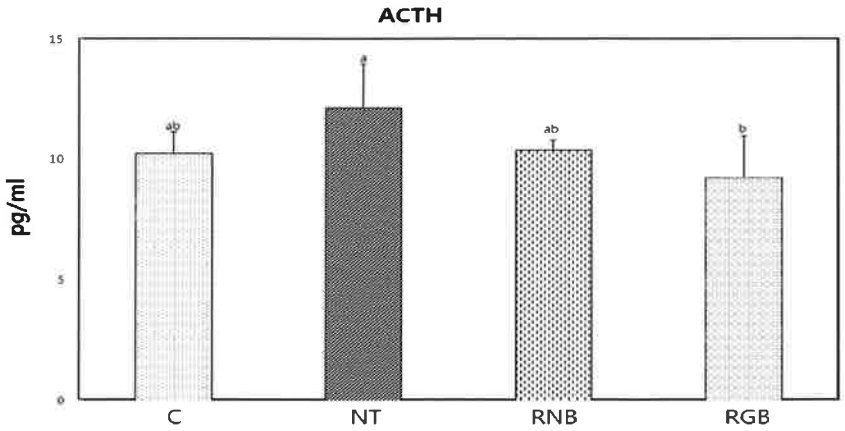


그림 42. 혈중 adrenocorticotropic hormone (ACTH) 농도 비교.

C : 정상대조군, NT : 스트레스 대조군, RNB : 코팅곡물, RGB : GABA코팅곡물

나. 맥강 쿠키 및 맥강 GABA 쿠키

(1) 체중, 식이섭취량

(가) 실험동물에 맥강 쿠키 및 GABA 첨가 쿠키(100 mg/100 g)를 21일 동안 급여한 후, 체중증가량, 식이섭취량은 그림43에 나타내었다.

(나) 체중증가량은 모든 군 간의 유의적인 차이는 나타내지 않았으나, 정상대조군(Control)에 비해 스트레스 대조군(NT)에서 감소하는 경향을 나타냈다.

(다) 식이섭취량은 모든 군 간의 유의적인 차이는 나타내지 않았으나, 정상대조군에 비해 스트레스 대조군에서 감소하는 경향을 나타내었고, 스트레스 대조군에 비해 50% 맥강 쿠키 스트레스군(BNC), 50% 맥강 GABA 첨가 쿠키 스트레스군(BGC)에서 증가하는 경향을 나타내었다.

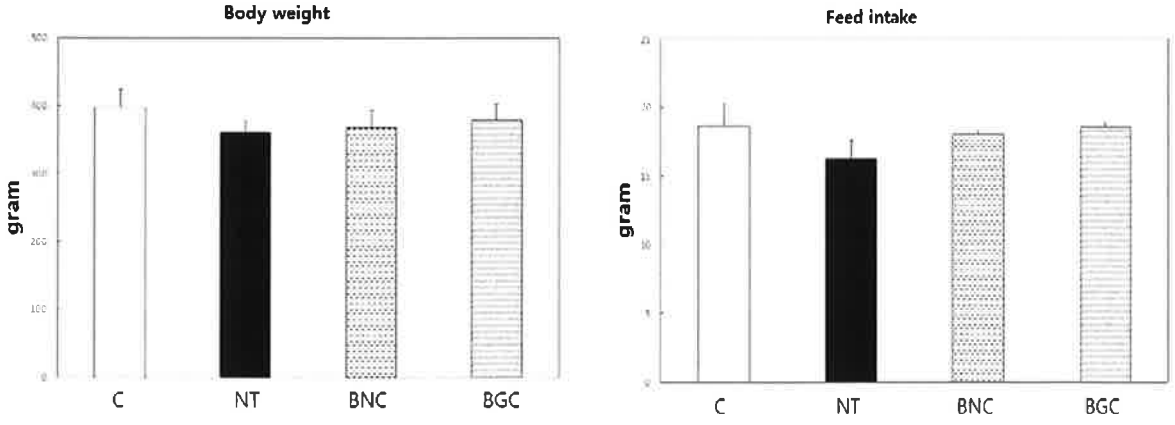


그림 43. 실험동물의 체중, 식이섭취량 비교.

C : 정상대조군, NT : 스트레스 대조군, BNC : 맥강 쿠키, BGC : 맥강 GABA 쿠키

(2) 혈중 및 간 지질농도

(가) 혈중 및 간 중 지질농도를 비교하여 그림44에 나타내었다. 혈중 총콜레스테롤은 정상대조군(C)에 비해 스트레스 대조군(NT), 50% 맥강 GABA 첨가 쿠키 스트레스군(BGC)에서 유의적으로 감소하였다. 50% 맥강 쿠키 스트레스군(BNC)은 스트레스 대조군에 비해 증가하는 경향을 보였다.

(나) 혈중 중성지방은 정상대조군에 비해 스트레스 대조군에서 유의적으로 감소하였다. 스트레스 대조군에 비해 50% 맥강 쿠키 스트레스군은 유의적으로 증가하였고, 50% 맥강 GABA 첨가 쿠키 스트레스군은 증가하는 경향을 나타내었다.

(다) 혈중 HDL콜레스테롤은 모든 군 간의 유의적인 차이는 없었으나, 정상대조군에 비해 스트레스 처리군(스트레스 대조군, 50% 맥강 쿠키 스트레스군, 50% 맥강 GABA 첨가 쿠키 스트레스군)에서 감소하는 경향을 나타냈다.

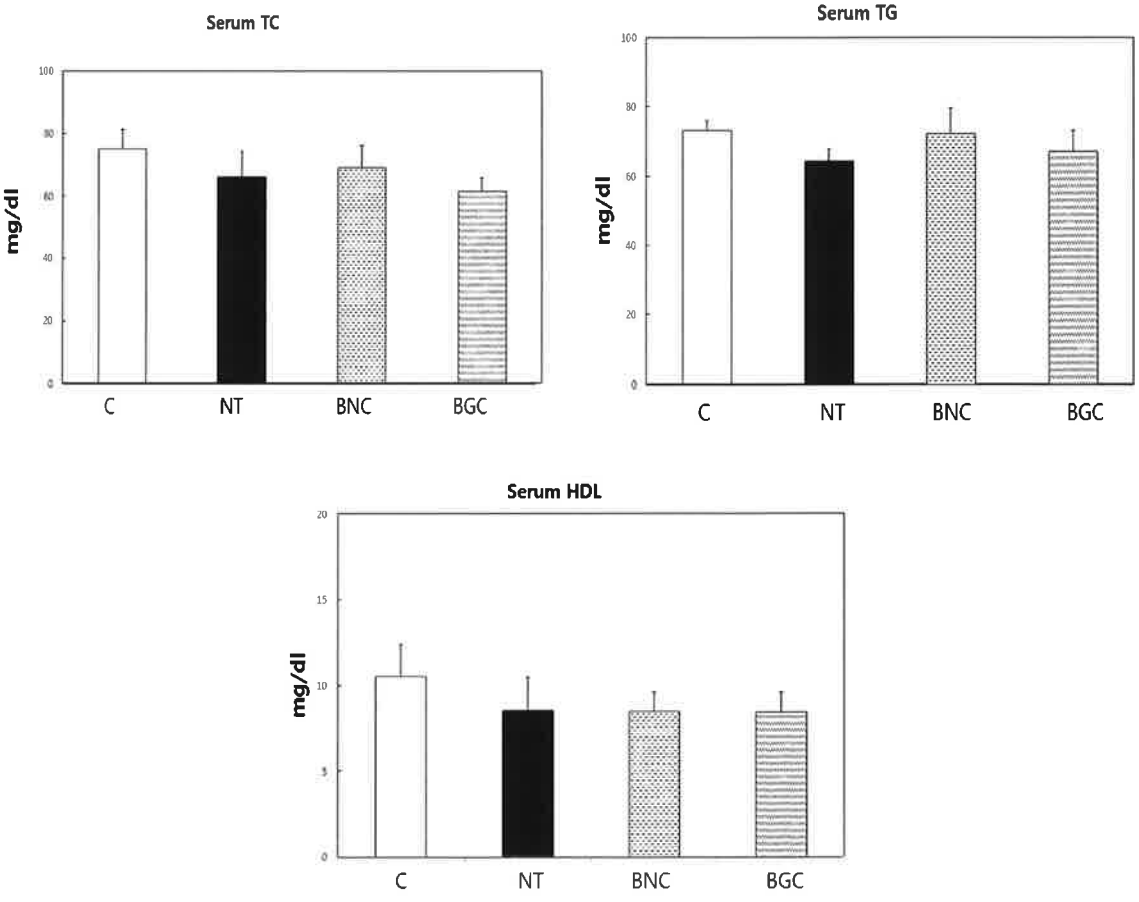


그림 44. 혈중 지질농도 비교.

C : 정상대조군, NT : 스트레스 대조군, BNC : 맥강 쿠키, BGC : 맥강 GABA 쿠키

(라) 간 중 지질농도를 비교하여 그림45에 나타내었다. 간 중 총콜레스테롤은 모든 군간의 유의적인 차이는 없었으나 스트레스 대조군에서 증가하는 경향을 나타냈다.

(마) 간 중 중성지방은 모든 군 간의 유의적인 차이를 나타내지 않았다.

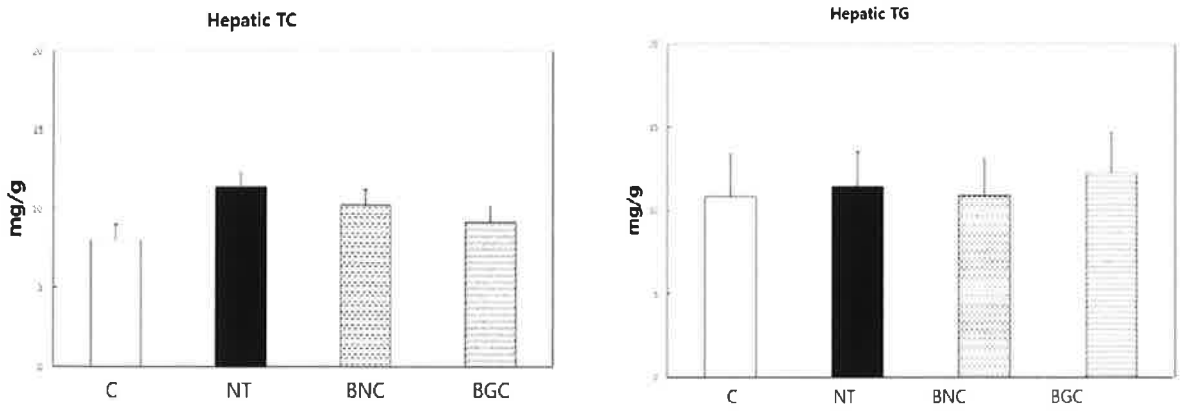


그림 45. 간 중 지질 농도 비교.

C : 정상대조군, NT : 스트레스 대조군, BNC : 맥강 쿠키, BGC : 맥강 GABA 쿠키

(3) 혈중 AST, ALT 농도

(가) 혈중 AST, ALT 농도를 비교하여 그림46에 나타내었다. 혈중 AST, ALT 농도는 정상대조군(Control)에 비해 스트레스 대조군(NT)에서 유의적으로 증가하였다. 50% 맥강 쿠키 스트레스군(BNC)은 혈중 AST농도를 정상대조군 수준으로 회복시켰고, 50% 맥강 GABA 첨가 쿠키 스트레스군(BGC)은 정상대조군에 비해 유의적으로 낮은 혈중 ALT 농도를 나타내었다.

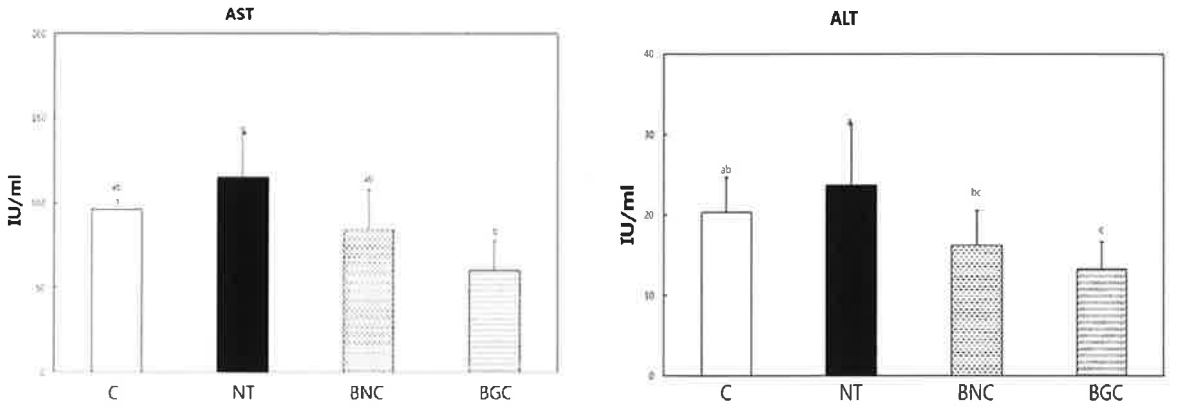


그림 46. 혈중 AST, ALT 농도 비교.

C : 정상대조군, NT : 스트레스 대조군, BNC : 맥강 쿠키, BGC : 맥강 GABA 쿠키

(4) 혈중 corticosterone 및 adrenocorticotropic hormone(ACTH) 농도

(가) 혈중 corticosterone 농도를 비교하여 그림47에 나타내었다. 혈중 corticosterone 농도는 실험 10일째에 정상대조군(Control)에 비해 스트레스 처리군[스트레스 대조군(NT), 50% 맥강 쿠키 스트레스군(BNC), 50% 맥강 GABA 첨가 쿠키 스트레스군(BGC)]에서 증가하는 경향을 보였다. 실험 20일째에 정상대조군에 비해 스트레스

처리군에서 혈중 corticosterone 농도는 유의적으로 증가하였으며, 50% 맥강 GABA 첨가 쿠키 스트레스군은 혈중 corticosterone 농도를 감소시켰다.

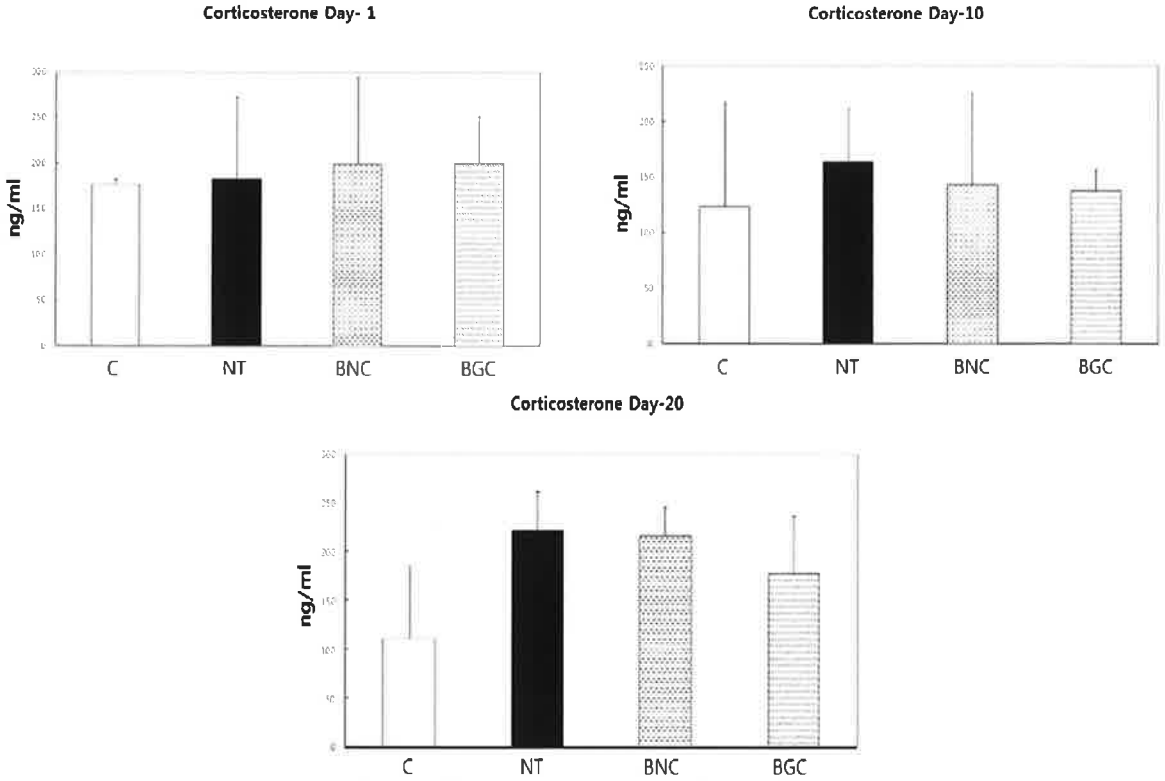


그림 47. 혈중 corticosterone 농도 비교.

C : 정상대조군, NT : 스트레스 대조군, BNC : 맥강 쿠키, BGC : 맥강 GABA 쿠키

(나) 혈중 adrenocorticotropic hormone(ACTH) 농도를 비교하여 그림 48에 나타내었다. 혈중 adrenocorticotropic hormone(ACTH) 농도는 정상대조군(Control)에 비해 스트레스 대조군(NT)은 증가하는 경향을 나타냈으며, 스트레스 처리군[스트레스 대조군(NT), 50% 맥강 쿠키 스트레스군(BNC), 50% 맥강 GABA 첨가 쿠키 스트레스군(BGC)]은 혈중 adrenocorticotropic hormone(ACTH) 농도를 정상 수준으로 회복시켰다.

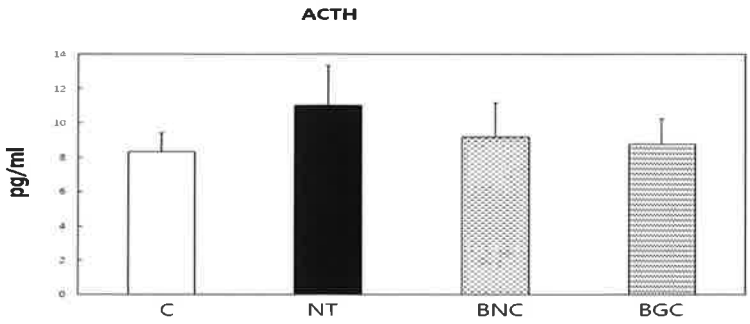


그림 48. 혈중 adrenocorticotropic hormone(ACTH) 농도 비교.

C : 정상대조군, NT : 스트레스 대조군, BNC : 맥강 쿠키, BGC : 맥강 GABA 쿠키

10. GABA 소재 함유 쿠키 및 코팅곡물의 품질평가

가. 9대 영양소 분석

GABA 함유 쿠키(100 mg/100 g)와 GABA 코팅곡물(100 mg/100 g)의 9대 영양소를 분석하였다(표29).

표 29. GABA 함유 쿠키, GABA 코팅곡물의 9대 영양소 분석결과

검사항목	쿠키	코팅곡물
열량(kcal/100g)	509	375
수분(g/100g)	0.34	8.37
회분(g/100g)	1.34	1.21
조단백질(g/100g)	8.91	6.47
탄수화물(g/100g)	66.19	81.32
당류(g/100g)	23.9419	1.2751
조지방(g/100g)	23.23	2.63
포화지방(g/100g)	11.9276	0.6678
트랜스지방(g/100g)	0.4182	0.0011
콜레스테롤(mg/100g)	66.0157	불검출
나트륨(mg/100g)	359.6392	13.5675

분석기관 : 다산생명과학원(주)

나. 관능검사

(1) 쿠키

(가) 실험방법

GABA 함유하지 않은 N 쿠키와, GABA 함유 쿠키(100 mg/100 g)에 대한 관능평가를 한국식품정보원에 의뢰하여 수행하였다. 관능검사에 사용된 기호도 검사 방법은 7점 척도법으로, 1점 '대단히 싫다', 2점 '싫다', 3점 '약간 싫다', 4점 '보통이다', 5점 '약간 좋다', 6점 '좋다', 7점 '대단히 좋다' 의 평가 항목으로 진행하였다. 기호도의 평가 속성은 제품의 '색상', '고소한 향', '고소한 맛', '식감', '전체적인 평가' 로 평가하였다. 정도는 1점 '대단히 약하다', 2점 '약하다', 3점 '약간 약하다', 4점 '보통이다', 5 점 '약간 강하다', 6점 '강하다', 7점 '대단히 강하다' 의 평가 항목으로 진행하였으며, 평가 속성은 '색상', '고소한 향', '고소한 맛', '식감' 에 대하여 평가하였다. 관능검사를

진행하기에 앞서, 대조군과 실험군은 그림49와 같이 한 접시에 쿠키 3개씩 소분하여 제공하였다.

그림 49. N 쿠키와 1% GABA 함유 쿠키.

그림 50. 관능검사용 시료 제공.

각 시료는 그림50과 같이 제공하였다. 관능검사 결과는 PASWStatistics18 program을 이용하여 평균과 표준편차를 구하고, 각 샘플간의 유의성은 독립표본 T-test로 유의성을 검증하였다($p<0.05$).

(나) 결과 및 해석

① 쿠키의 정도 검사 결과

N 쿠키(BNC)와 GABA 함유 쿠키(BGC)의 각 속성별 정도를 7점 척도법으로 검사한 결과는 그림51와 같다. 두 제품의 각 속성별 정도는 색상의 경우는 BNC 제품이 약간 높게 나타났으며, 식감의 경우는 BGC 제품이 약간 높게 나타났다. 고소한 향과 고소한 맛의 경우는 두 제품이 비슷한 것으로 나타났다.

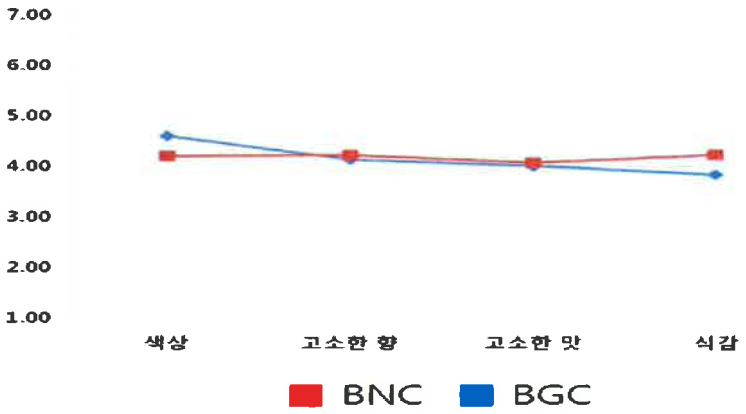


그림 51. 쿠키의 속성별 정도 결과.

BNC : 맥강 쿠키, BGC : 맥강 GABA 쿠키

② 쿠키의 기호도 검사 결과

N 쿠키(BNC)와 GABA 함유 쿠키(BGC)를 7점 척도법으로 검사한 기호도 결과는 그림52과 같다. 두 제품 모두 전체적인 평가, 색상, 고소한 향, 고소한 맛, 식감에서 두 제품의 기호도 점수간 차이가 없는 것으로 나타났다

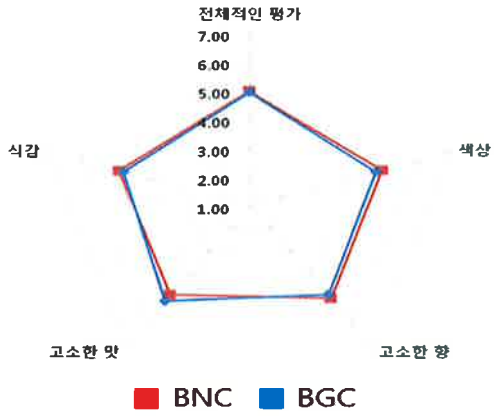


그림 52. 쿠키의 속성별 기호도 검사 결과.

BNC : 맥강 쿠키, BGC : 맥강 GABA 쿠키

③ 쿠키의 관능검사 유의차 검증 결과

표30은 N 쿠키(BNC)와 GABA 함유 쿠키(BGC) 유의차 검증을 나타낸 결과이다. 제품의 유의차 검증은 PASW Statistics18 program을 이용하여 독립표본 T-test를 실시하였으며, 모든 속성은 95%의 신뢰수준($p<0.05$)으로 검증하였다. 유의적 확률(p)이 0.05 이하이면 두 제품간 유의적 차이가 없다는 것으로, '제품간 차이가 없다' 로 판단할 수 있다. 색상의 정도에서는 BNC 제품이 3.60점

으로 '약간 약하다' 로 나타났으며, BGC 제품은 4.20점으로 '보통이다' 로 나타났다. 정도의 유의적 확률은 0.01 ($p<0.05$)로 유의적 차이가 있는 것으로 나타났다. 하지만, 색상 기호도는 BNC와 BGC 제품이 4.97점, 4.77점으로 보통(4.0점) 이상으로 나타났으며, 두 제품간 유의적 확률은 0.46 ($p>0.05$)으로 유의적 차이가 없는 것으로 나타났다. 고소한 향의 정도에서는 BNC와 BGC 제품이 4.13점, 4.23점으로 '보통이다' 로 나타났으며, 유의적 확률은 0.68 ($p>0.05$)로 유의적 차이가 없는 것으로 나타났다. 고소한 향 기호도는 BNC와 BGC 제품이 4.97점, 4.83점으로 보통(4.0점) 이상으로 나타났으며, 두 제품간 유의적 확률은 0.63 ($p>0.05$)으로 유의적 차이가 없는 것으로 나타났다. 고소한 맛의 정도에서는 BNC와 BGC 제품이 4.00점, 4.07점으로 '보통이다' 로 나타났으며, 유의적 확률은 0.79 ($p>0.05$)로 유의적 차이가 없는 것으로 나타났다. 고소한 맛 기호도는 BNC 제품은 4.83점으로 보통(4.0점) 이상으로 나타났으며, BGC 제품은 5.10점으로 약간 좋다(5.0점) 이상으로 나타났다. 두 제품간 유의적 확률은 0.29 ($p>0.05$)로 유의적 차이가 없는 것으로 나타났다. 식감의 정도에서는 BNC 제품은 3.83점으로 '약간 약하다' 로 나타났으며, BGC 제품은 4.23점으로 '보통이다' 로 나타났으나, 두 제품간 유의적 확률은 0.10 ($p>0.05$)으로 유의적 차이가 없는 것으로 나타났다. 식감 기호도는 BNC와 BGC 제품이 4.90점과 4.77점으로 보통(4.0점) 이상으로 나타났으며, 두 제품간 유의적 확률은 0.56 ($p>0.05$)로 유의적 차이가 없는 것으로 나타났다. 전체적인 평가는 BNC가 4.97점, BGC가 4.93점으로 보통(4.0점) 이상으로 나타났으며, 두 제품간 유의적 확률은 0.09 ($p>0.05$)로 유의적 차이가 없는 것으로 나타났다.

표 30. 쿠키 기존제품과 GABA 첨가제품의 관능검사 유의차 검증

특 성		시료명		유의적 확률[1)]
		BNC	BGC	
정도	색상	3.60±0.81	4.20±0.92	0.01
	고소한 향	4.13±1.04	4.23±0.77	0.68
	고소한 맛	4.00±0.91	4.07±1.08	0.79
	식감	3.83±0.87	4.23±0.97	0.10
기호도	색상	4.97±1.30	4.77±0.09	0.46
	고소한 향	4.97±1.16	4.83±0.95	0.63
	고소한 맛	4.83±1.02	5.10±1.06	0.29
	식감	4.90±1.03	4.77±0.94	0.56
전체적인 평가		4.97±1.03	4.93±0.91	0.90

BNC : 맥강 쿠키, BGC : 맥강 GABA 쿠키

[1)]유의적확률 : 확률값 p가 0.05보다 작을 때 유의적 차이가 있음.

◉ PASWStatistics18 program을 이용하여 독립표본 T-test를 실시하였으며, 신뢰수준 95%로 나타냄. ($p<0.05$)

(다) 결과

쿠키의 소비자 관능검사로, GABA가 함유하지 않은 N 쿠키를 대조군으로, GABA 함유 쿠키를 실험군으로 하여 속성별 정도의 차이를 알아보고 정도의 차이에 의해서 기호도에 영향을 주는지 알아보기 위하여 실시하였다. 두 쿠키제품의 속성별 정도를 알아본 결과 색상에서 유의적 차이가 있는 것으로 나타났으나 기호도에서는 유의적 차이가 없는 것으로 나타났다. 이러한 결과로 미루어보아 색상의 경우, 색상의 정도가 '약한 약하다', '보통이다' 로 나타나는 정도에서는 유의적 차이가 있어도 기호도에는 영향을 주지 않는 것으로 판단된다. 색상을 제외한 고소한 향, 고소한 맛, 식감의 정도에서는 두 제품간 유의적 차이가 없는 것으로 나타났으며, 기호도에도 영향을 주지 않는 것으로 판단된다. 또한 전체적인 평가에서도 두 제품간 차이가 없는 것으로 나타났다.

(2) 코팅곡물

(가) 실험방법

GABA 코팅하지 않은 N 코팅곡물과, GABA 코팅곡물(100 mg/100 g)에 대한 관능평가를 한국식품정보원에 의뢰하여 수행하였다. 관능검사에 사용된 기호도 검사 방법은 7점 척도법으로, 1점 '대단히 싫다', 2점 '싫다', 3점 '약간 싫다', 4점 '보통이다', 5점 '약간 좋다', 6점 '좋다', 7점 '대단히 좋다' 의 평가 항목으로 진행하였다. 기호도의 평가 속성은 제품의 '색상', '향', '단맛', '씹힘성', '전체적인 평가 로 검사하였다. 정도는 1점 '대단히 약하다', 2점 '약하다', 3점 '약간 약하다', 4점 '보통이

다', 5점 '약간 강하다', 6점 '강하다', 7점 '대단히 강하다' 의 평가 항목으로 진행하였으며, 평가 속성은 '색상', '향', '단맛', '씹힘성' 에 대하여 평가하였다. 관능검사를 진행하기에 앞서, 대조군과 실험군을 쌀과 혼합한 후 그림53와 같이 전기밥솥을 이용하여 조리하였다.

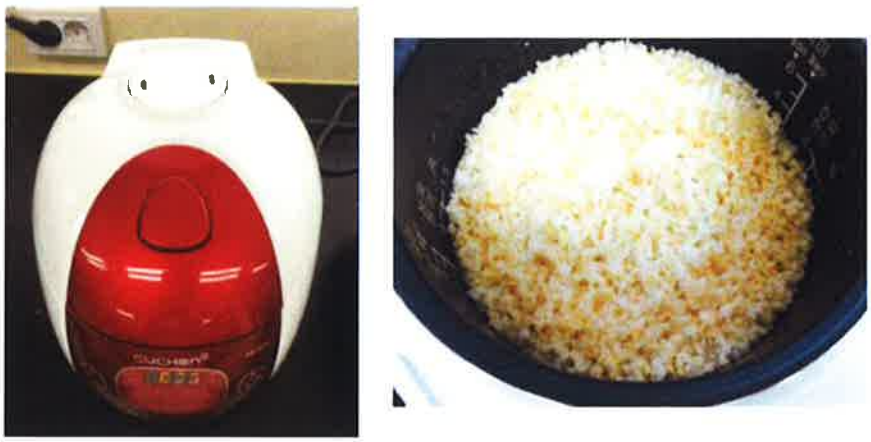


그림 53. 코팅곡물 조리.

그림 54. 관능검사용 시료 제공.

두 시료는 그림54와 같이 제공하였다. 관능검사 결과는 PASWStatistics18 program을 이용하여 평균과 표준편차를 구하고, 각 샘플간의 유의성은 독립표본 T-test로 유의성을 검증하였다 ($p<0.05$).

(나) 결과 및 해석

① 코팅곡물의 정도 검사 결과

GABA를 코팅하지 않은 N 코팅곡물(RNB)과 GABA 코팅곡물(RGB)을 각 속성별 정도를 7점 척도법으로 검사한 결과는 그림55와 같다. 두 제품의 각 속성별 정도는 RGB의 경우 색상과 향, 씹힘성에서는 RNB 보다 약간 높게 나타났으나, 단맛에서는 약간

낮게 나타났다.

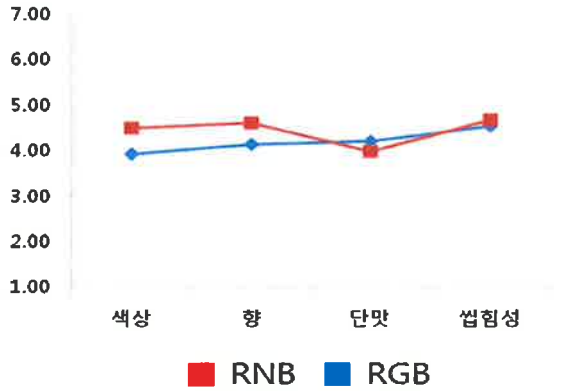


그림 55. 코팅곡물의 속성별 정도 결과.

RNB : 코팅곡물, RGB : 미강 GABA 코팅곡물

② 코팅곡물의 기호도 검사 결과

GABA를 코팅하지 않은 N 코팅곡물(RNB)과 GABA 코팅곡물(RGB)을 7점 척도법으로 검사한 기호도 결과는 그림56과 같다. RGB 제품이 색상과 향에서는 RNB 제품보다 약간 높은 것으로 나타났으나, 전체적인 평가, 단맛, 씹힘성에서는 약간 낮은 것으로 나타났다.

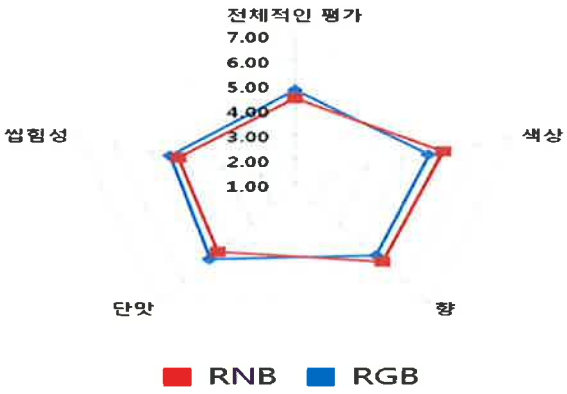


그림 56. 코팅곡물의 속성별 기호도 검사 결과.

RNB : 코팅곡물, RGB : 미강 GABA 코팅곡물

③ 코팅곡물의 관능검사 유의차 검증 결과

표31은 GABA를 코팅하지 않은 N 코팅곡물(RNB)과 GABA 코팅곡물(RGB)의 유의차 검증을 나타낸 결과이다. 두 제품의 유의차 검증은 PASW Statistics18 program을 이용하여 독립표본 T-test를 실시하였으며, 모든 속성은 95%의 신뢰수준($p<0.05$)으로 검증하였다. 유의적 확률(p)이 0.05 이하이면 두 제품간 유의적 차이가 없다는 것으로, '제품간 차이가 없다'로 판단할 수 있다. 색상의 정

도에서는 RNB 제품이 3.93점으로 '약간 약하다' 로 나타났으며, RGB 제품은 4.50점으로 '보통이다' 로 나타났다. 정도의 유의적 확률은 0.001 ($p<0.05$)로 두 제품간 유의적 차이가 있는 것으로 나타났다. 기호도에서는 RNB 제품이 4.70점, RGB 제품이 5.10점으로 보통(4.0점) 이상을 나타내었으며, 유의적 확률은 0.063 ($p>0.05$)로 유의적 차이는 없는 것으로 나타났다. 향의 정도에서는 RNB, RGB 제품이 4.13점, 4.60점으로 '보통이다' 로 나타났으며, 정도의 유의적 확률은 0.032 ($p<0.05$)로 두 제품간 유의적 차이가 있는 것으로 나타났다. 기호도에서는 RNB, RGB 제품이 4.63점, 4.93점으로 보통(4.0점) 이상을 나타내었으며, 유의적 확률은 0.194 ($p>0.05$)로 두 제품간 유의적 차이가 없는 것으로 나타났다. 단맛의 정도에서는 RNB 제품은 4.20점으로 '보통이다' 로 나타났으며, RGB 제품은 3.97점으로 '약간 약하다' 로 나타났다. 정도의 유의적 확률은 0.182 ($p>0.05$)로 두 제품간 유의적 차이가 없는 것으로 나타났다. 기호도에서는 RNB, RGB 제품이 4.80점, 4.43점으로 보통(4.0점) 이상을 나타내었으며, 유의적 확률은 0.054 ($p>0.05$)로 두 제품간 유의적 차이가 없는 것으로 나타났다. 씹힘성의 정도에서는 RNB, RGB 제품이 4.53점, 4.67점으로 '보통이다' 로 나타났다. 정도의 유의적 확률은 0.608 ($p>0.05$)로 두 제품간 유의적 차이가 없는 것으로 나타났다. 기호도에서는 RNB, RGB 제품이 4.47점, 4.23점으로 보통(4.0점) 이상인 것으로 나타났으며, 유의적 확률은 0.415 ($p>0.05$)로 두 제품간 유의적 차이가 없는 것으로 나타났다. 전체적인 평가는 RNB가 4.73점, RGB가 4.40점으로 보통(4.0점) 이상으로 나타났으며, 두 제품간 유의적 확률은 0.209 ($p>0.05$)로 유의적 차이가 없는 것으로 나타났다.

표 31. 코팅곡물의 관능검사 유의차 검증

특 성		시료명		유의적 확률[1)]
		RNB	RGB	
정도	색상	3.93±0.58	4.50±0.78	0.001
	향	4.13±0.82	4.60±1.07	0.032
	단맛	4.20±0.81	3.97±0.89	0.182
	씹힘성	4.53±0.94	4.67±1.27	0.608
기호도	색상	4.70±0.95	5.10±0.99	0.063
	향	4.63±0.76	4.93±1.11	0.194
	단맛	4.80±0.85	4.43±0.68	0.054
	씹힘성	4.47±1.20	4.23±1.19	0.415
전체적인 평가		4.73±1.01	4.40±1.10	0.209

RNB : 코팅곡물, RGB : 미강 GABA 코팅곡물

[1)]유의적확률 : 확률값 p가 0.05보다 작을 때 유의적 차이가 있음.

◉ PASWStatistics18 program을 이용하여 독립표본 T-test를 실시하였으며, 신뢰수준 95%로 나타냄. ($p<0.05$)

(다) 결과

코팅곡물의 소비자 관능검사로, GABA를 코팅하지 않은 N 코팅곡물 대조군으로, GABA 코팅곡물을 실험군으로 하여 속성별 정도의 차이를 알아보고 정도의 차이에 의해서 기호도에 영향을 주는지 알아보기 위하여 실시하였다. 두 가지 코팅곡물 제품의 속성별 정도를 알아본 결과 색상과 향에서 유의적 차이가 있는 것으로 나타났으며 기호도에서는 유의적 차이가 없는 것으로 나타났다. 색상과 향을 제외한 단맛, 맛, 씹힘성의 정도와 기호도에서는 두 제품간 유의적 차이를 나타내지 않았다. 색상과 향의 정도에서 유의적 차이를 나타냈지만, 전체적인 평가에서 두 제품간 유의적 차이는 나타나지 않았다. 이러한 결과로 미루어보아, GABA 코팅곡물은 색상과 향의 정도에서는 대조군과 차이가 있지만, 기호도 및 전체적인 평가에는 영향을 주지 않는 것으로 판단된다.

다. 쿠키의 기기분석

(1) 쿠키의 색도 분석

전문패널에 의한 쿠키제품의 관능평가 결과, BGC는 BNC와 비교하여 색상에서 더 강한 정도(4.20±0.92)를 나타내었다. 두 가지 시료의 색도를 분석한 결과, 표32에서 보듯이 BGC는 BNC와 비교하여 더 밝았고(L value=71.66), 적색도(a value=8.25)와

황색도(b value=25.59)는 약간 낮았다. 따라서, 소비자들은 밝은색의 쿠키에 대하여 색상이 더 강하다고 인식하는 것으로 판단된다(표 28).

표 32. 쿠키 시제품과 대조구의 색도 분석결과

구분		BNC	BGC
색도	L value	68.96	71.66
	a value	9.05	8.25
	b value	26.47	25.59

BNC : 맥강 쿠키, BGC : 맥강 GABA 쿠키

라. 코팅곡물의 기기분석

(1) 코팅곡물(현미/밥)의 색도 분석

전문패널에 의한 코팅곡물의 관능평가 결과, RGB는 RNB와 비교하여 색상에서 더 강한 정도(4.50±0.78)를 나타내었다. 두 가지 시료의 색도를 분석한 결과, 표33에서 보듯이 RGB는 RNB와 비교하여 더 약간 밝았고(L value=66.99), 적색도(a value=5.80)와 황색도(b value=23.08)는 약간 높았다. 따라서, 소비자들은 적색도와 황색도가 높은 밝은 색상의 현미를 더 강한 색상으로 인식하는 것으로 판단된다.

표 33. GABA 코팅곡물과 대조구의 색도 분석결과

구분		RNB	RGB
색도	L value	65.55	66.99
	a value	5.36	5.80
	b value	21.69	23.08

RNB : 코팅곡물, RGB : 미강 GABA 코팅곡물

위 두 가지 시료를 취반하여 색도를 분석한 결과, RGB밥이 RNB밥 보다 밝기(L value=62.92)는 낮았고, 적색도(a value=5.99)와 황색도(b value=20.42)는 더 높았다(표34).

표 34. 코팅곡물(밥) 시제품과 대조구의 색도 분석결과

구분		RNB	RGB
색도	L value	67.08	62.92
	a value	3.34	5.99
	b value	19.36	20.42

RNB : 코팅곡물, RGB : 미강 GABA 코팅곡물

마. 유통기한 설정

(1) 쿠키

(가) 실험방법

① 검체의 채취 및 취급방법

유통기한 설정은 한국식품정보원에 의뢰하여 수행하였다. 본 실험에 사용된 제품은 GABA 함유 쿠키(100 mg/100 g)이며, 제품을 15℃, 25℃, 35℃ 인큐베이터에 90일간 저장시키면서 실험주기는 저장기간 중 6회 이상이 되도록 15일 간격으로 실험을 수행하였다.

표 35. 품질지표 및 실험방법

품질지표		실험방법
미생물	일반세균	식품공전 제II권 제 9. 일반시험법 3. 미생물시험법 3.5 세균수
이화학	수분함량	적외선수분측정기(Infrared Moisture Determination Balance, FD-610, Kett Electric Laboratory, Japan)를 사용하여 측정
관능	종합기호도검사	식품의 유통기한 설정 실험 가이드라인 Ⅳ. 유통기한설정을 위한 관능검사 가이드라인 표 6. 기준차이 검사법

표 36. 실험조건

구분	실험방법
저장온도	15℃, 25℃, 35℃
저장기간	90일
실험주기	15일, 6회
실험반복수	3회

표 37. 품질한계

품질지표	품질한계	근거
일반세균	10^4 CFU/g 이하	식품공전 제 I 권 제 5. 식품별 기준 및 규격 1. 과자류 5) 규격 (6) 세균수 ① 과자, 캔디류 : 1 g 당 10,000 이하(다만, 유산균 함유 빙과류는 제외한다)
대장균군	음성	법적규격 없음(회사 자체기준 적용)
관능 (기호도척도법)	3점 이상 (5점 만점)	식품공전 제 II 권 9. 일반시험법 9.1 성상(관능검사) 채점한 결과가 평균 3점 이상이고 1점 항목이 없어야 한다.

(나) 실험결과

① 각 품질지표의 함량 변화 분석

표 38. 일반세균 품질변화

저장기간(일)	15℃	25℃	35℃
0	3.00×10^2		
15	1.30×10^1	1.65×10^1	1.20×10^1
30	1.90×10^2	1.55×10^2	7.00×10^1
45	2.20×10^2	2.10×10^2	1.70×10^2
60	1.95×10^2	1.45×10^2	1.45×10^2
75	1.90×10^2	7.50×10^1	2.00×10^2
90	1.95×10^2	1.70×10^2	2.50×10^2

표 39. 수분함량 품질변화

저장기간(일)	15℃	25℃	35℃
0	1.3		
15	1.7	2.1	2.2
30	1.6	1.7	2.1
45	1.8	2.2	2.1
60	1.8	1.9	2.5
75	2.1	2.2	2.5
90	2.2	2.0	2.3

표 40. 관능검사 품질변화

저장기간(일)	15℃	25℃	35℃
0	5.00		
15	5.00	5.00	5.00
30	5.00	4.93	4.93
45	4.83	5.00	4.93
60	4.83	4.83	4.87
75	4.80	4.67	4.80
90	4.73	4.50	4.53

② 품질지표별 반응속도상수(K)의 산출

식품의 품질변화에 대한 화학반응식은 시간과 속도 상수로서 표현되는 다음 식을 기초로 한다. 유통기한실험에서 얻은 결과는 저장기간에 따른 변화로서 이 결과로 품질손상의 반응속도(K)를 얻게 된다.

표 41. 수분함량 반응속도 상수

반응차수	온도(℃)	Slope(K)	Intercept(AO)	R^2
0	15	0.0007	2.0250	0.0205
	25	0.0026	2.0726	0.1725
	35	0.0083	2.0107	0.6960
1	15	0.0004	0.7013	0.0250
	25	0.0011	0.7289	0.1589
	35	0.0034	0.7064	0.6546

표 42. 관능검사 반응속도 상수

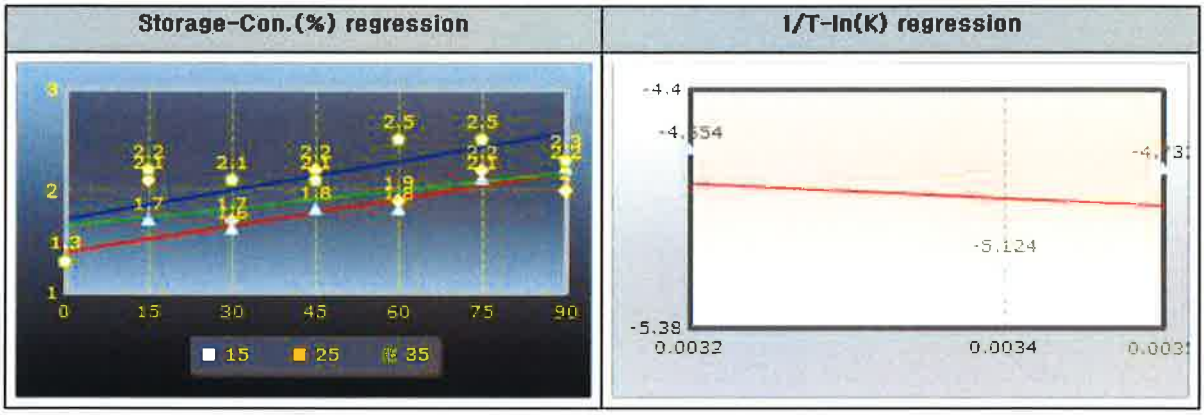
반응차수	온도(℃)	Slope(K)	Intercept(AO)	R^2
0	15	-0.0029	5.0333	0.7606
	25	-0.0034	5.0467	0.8935
	35	-0.0044	5.0383	0.9505
1	15	-0.0006	1.6164	0.7597
	25	-0.0007	1.6191	0.8933
	35	-0.0009	1.6176	0.9499

③ 품질지표별 활성화에너지와 반응식 차트

활성화에너지란 물질이 반응을 일으키는데 필요한 최소한의 에너지로서 레니우스 반응식으로부터 구한 K의 자연로그값(Ln값)인 LnK를 Y축으로 1/T를 X축으로하여 선형회귀분석한 후 얻은 직선의 기울기로부터 선정한 품질지표의 Ea(활성화에너지)를 구한다(데이터는 최소 3개의 가속온도로부터 구한 값이 요구된다).

1) 반응차수 0차 결과

Slope(K)	Intercept(A0)	R^2	Ea
-302.89	-3.82	0.0184	-601.85



2) 반응차수 1차 결과

Slope(K)	Intercept(A0)	R^2	Ea
-12.81	-5.36	0.0001	-25.45

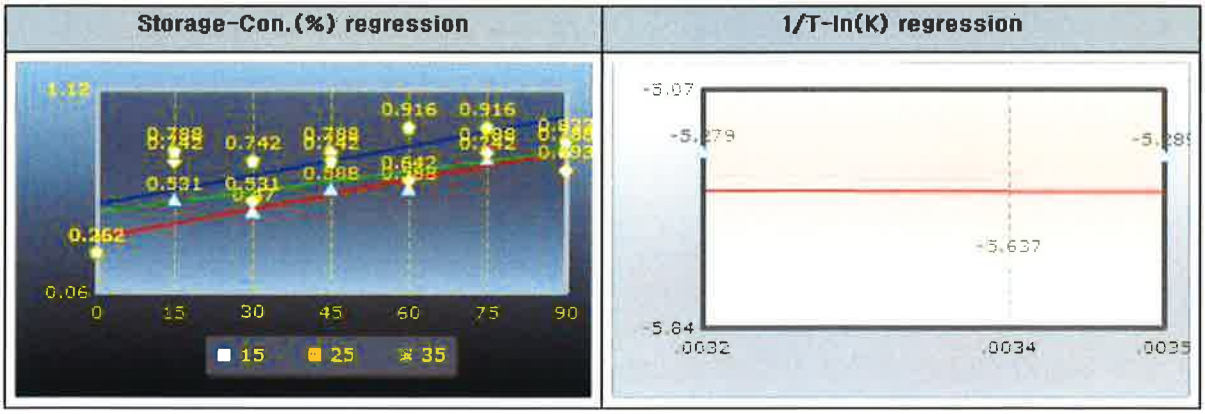
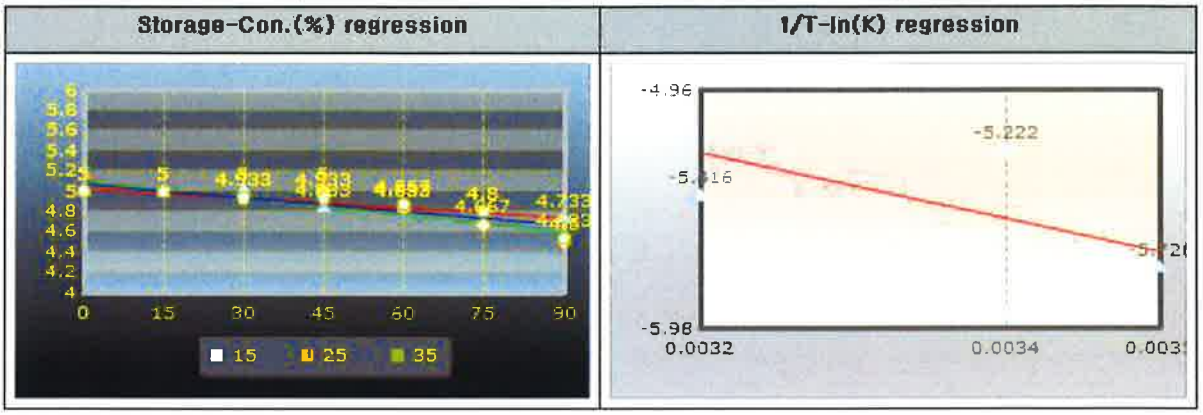


그림 57. 수분함량 활성화에너지와 반응식 차트.

1) 반응차수 0차 결과

Slope(K)	Intercept(A0)	R^2	Ea
-1417.01	-0.70	0.3919	-2815.59



2) 반응차수 1차 결과

Slope(K)	Intercept(A0)	R^2	Ea
-1496.35	-2.00	0.4007	-2973.25

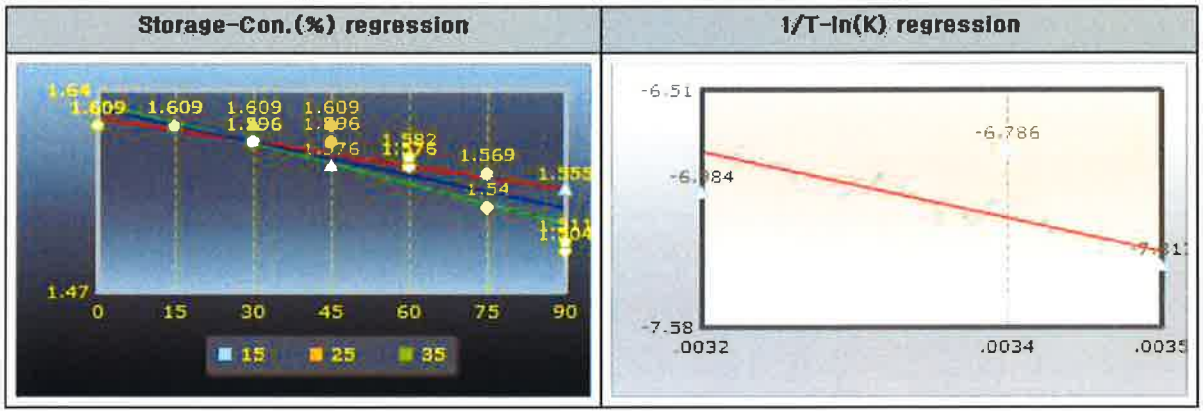


그림 58. 관능검사 활성화에너지와 반응식 차트.

④ 품질지표별 유통기한 산출

품질지표별 품질한계 규격값을 기준으로 한계값에 이르기 바로 직전 실험일을 한계일로 정하고, 여러 가지 품질지표 중에서 가장 먼저 한계일에 도달한 품질지표를 그 제품의 유통기한 기준으로 설정하였다.

표 43. 일반세균 유통기한 산출

차수	최초함량-품질규격	연간변화속도상수	유통기한(일)	유통기한(개월)
0	-9700.0000	352.67	10039.23	330.06
1	-3.5066	3.16	405.26	13.32

표 44. 수분함량 유통기한 산출

차수	최초함량-품질규격	연간변화속도상수	유통기한(일)	유통기한(개월)
0	-3.7000	2.90	466.00	15.32
1	-1.3471	1.65	298.76	9.82

표 45. 관능검사 유통기한 산출

차수	최초함량-품질규격	연간변화속도상수	유통기한(일)	유통기한(개월)
0	2.0000	1.83	399.61	13.14
1	0.5108	0.38	487.41	16.02

⑤ 결론

쿠키의 품질을 객관적으로 평가하기 위해 품질지표로 일반세균, 수분함량, 관능검사를 설정하고 저장온도(15℃, 25℃, 35℃) 및 기간(90일, 6회)에 따라 관찰하였다. 그 결과, 품질지표 중에서 결정계수가 가장 높은 수분함량 0차 반응식을 근거로 실온에서 유통되는 GABA 함유 쿠키의 유통기한은 15.32개월로 산출되었다. 여기에 유통과정 중의 안전을 고려하고자 안전계수 0.8을 곱하여 제품의 최종 유통기한은 12개월로 설정하였다.

⑥ 참고자료

㉮ 식품의약품안전처: 식품, 식품첨가물 및 건강기능식품의 유통기한설정기준 (제2014-174호, 2014. 11)

㉯ 식품의약품안전처:식품 및 축산물의 유통기한설정 실험가이드라인(2013.12)

(2) 곡물

(가) 실험방법

① 검체의 채취 및 취급방법

유통기한 설정은 한국식품정보원에 의뢰하여 수행하였다. 본 실험에 사용된 제품은 GABA 코팅곡물(100 mg/100 g)이며, 제품을 15℃, 25℃, 35℃ 인큐베이터에 90일간

저장시키면서 실험주기는 저장기간 중 6회 이상이 되도록 15일 간격으로 실험을 수행하였다.

표 46. 품질지표 및 실험방법

품질지표		실험방법
미생물	일반세균	식품공전 제Ⅱ권 제 9. 일반시험법 3. 미생물시험법 3.5 세균수
	대장균군	식품공전 제Ⅱ권 제 9. 일반시험법 3. 미생물시험법 3.6 대장균군
관능	종합기호도 검사	식품의 유통기한 설정 실험 가이드라인 Ⅳ. 유통기한설정을 위한 관능검사 가이드라인 표 6. 기준차이 검사법

표 47. 실험조건

구분	실험방법
저장온도	15℃, 25℃, 35℃
저장기간	90일
실험주기	15일, 6회
실험반복수	3회

표 48. 품질한계

품질지표	품질한계	근거
일반세균	10^5 CFU/g 이하	법적규격 없음(미생물학적 초기부패시점인 100,000 CFU/g이하)
대장균군	음성	법적규격 없음(회사 자체기준 적용)
관능 (기호도척도법)	3점 이상 (5점 만점)	식품공전 제Ⅱ권 9. 일반시험법 9.1 성상(관능검사) 채점한 결과가 평균 3점 이상이고 1점 항목이 없어야 한다.

(나) 실험결과

① 각 품질지표의 함량 변화 분석

표 49. 일반세균 품질변화

저장기간(일)	15℃	25℃	35℃
0	3.30×10^3		
15	8.90×10^3	5.15×10^3	6.30×10^3
30	6.60×10^3	6.80×10^3	7.00×10^3
45	5.80×10^3	6.85×10^3	6.95×10^3
60	7.70×10^3	7.30×10^3	5.35×10^3
75	1.16×10^4	8.35×10^3	8.15×10^3
90	1.09×10^4	9.50×10^3	9.25×10^3

표 50. 대장균 품질변화

저장기간(일)	15℃	25℃	35℃
0	음성		
15	음성	음성	음성
30	음성	음성	음성
45	음성	음성	음성
60	음성	음성	음성
75	음성	음성	음성
90	음성	음성	음성

표 51. 관능검사 품질변화

저장기간(일)	15℃	25℃	35℃
0	5.00		
15	5.00	5.00	5.00
30	5.00	5.00	5.00
45	4.98	5.00	4.97
60	4.97	4.95	4.95
75	5.00	4.97	4.93
90	4.93	4.90	4.87

② 품질지표별 반응속도상수(K)의 산출

식품의 품질변화에 대한 화학반응식은 시간과 속도 상수로서 표현되는 다음 식을 기초로 한다. 유통기한실험에서 얻은 결과는 저장기간에 따른 변화로서 이 결과로 품질손상의 반응속도(K)를 얻게 된다.

표 52. 일반세균 반응속도 상수

반응차수	온도(℃)	Slope(K)	Intercept(AO)	R^2
0	15	34.0476	7010.7143	0.2695
	25	25.0000	6339.2857	0.3329
	35	11.6667	6803.5714	0.0814
1	15	0.0036	8.8652	0.2132
	25	0.0034	8.7472	0.3170
	35	0.0014	8.8239	0.0565

표 53. 관능검사 반응속도 상수

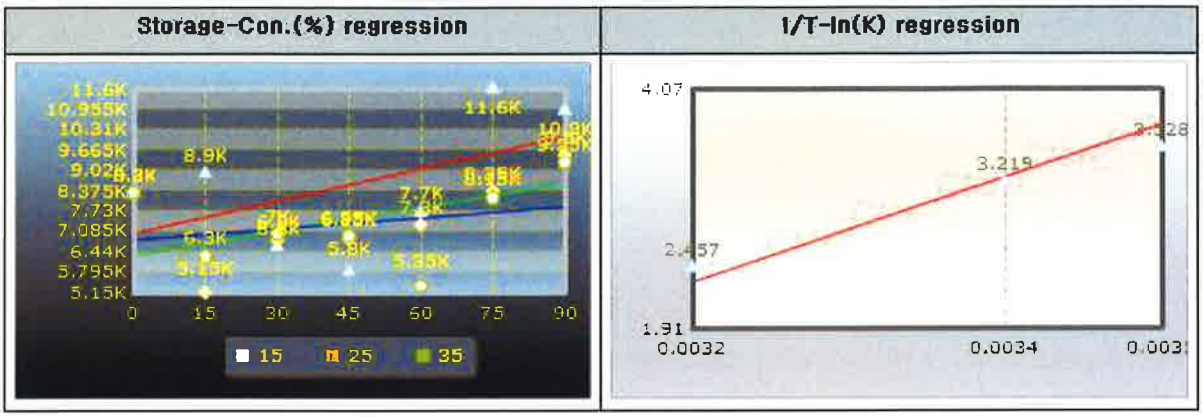
반응차수	온도(℃)	Slope(K)	Intercept(AO)	R^2
0	15	-0.0006	5.0083	0.5000
	25	-0.0010	5.0185	0.7038
	35	-0.0014	5.0220	0.8460
1	15	-0.0001	1.6111	0.5000
	25	-0.0002	1.6132	0.7027
	35	-0.0003	1.6139	0.8437

③ 품질지표별 활성화에너지와 반응식 차트

활성화에너지란 물질이 반응을 일으키는데 필요한 최소한의 에너지로서 아레니우스반응식으로부터 구한 K의 자연로그값(Ln값)인 LnK를 Y축으로 1/T를 X축으로하여 선형회귀분석한 후 얻은 직선의 기울기로부터 선정한 품질지표의 Ea(활성화에너지)를 구한다(데이터는 최소 3개의 가속온도로부터 구한 값이 요구된다).

1) 반응차수 0차 결과

Slope(K)	Intercept(A0)	R^2	Ea
4725.95	-12.80	0.9344	9390.46



2) 반응차수 1차 결과

Slope(K)	Intercept(A0)	R^2	Ea
4241.00	-20.21	0.7648	8426.86

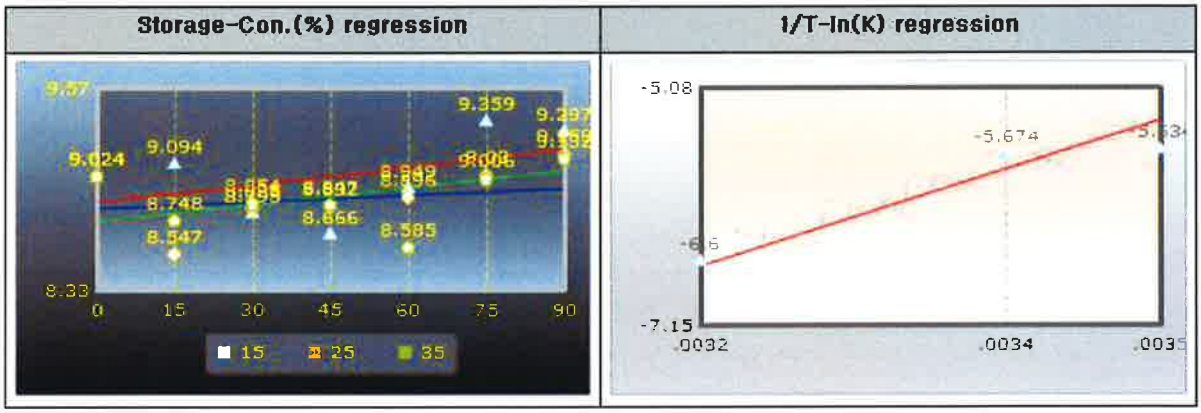
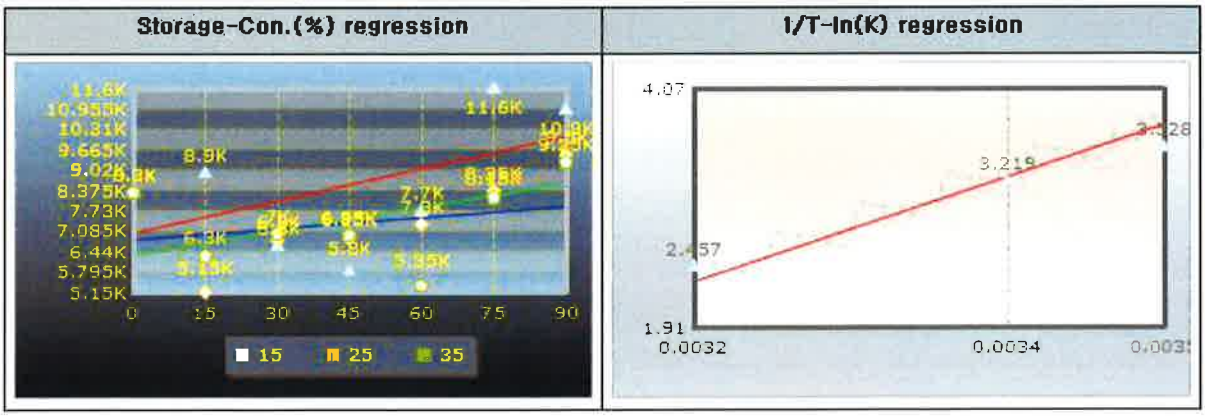


그림 59. 일반세균 활성에너지와 반응식 차트.

1) 반응차수 0차 결과

Slope(K)	Intercept(A0)	R^2	Ea
4725.95	-12.80	0.9344	9390.46



2) 반응차수 1차 결과

Slope(K)	Intercept(A0)	R^2	Ea
-4096.57	5.16	0.9828	-8139.88

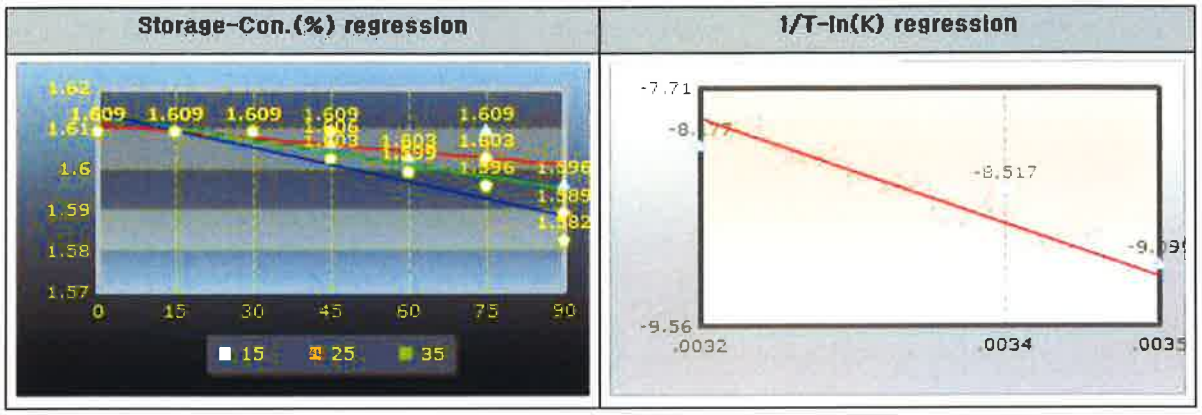


그림 60. 관능검사 활성에너지와 반응식 차트.

④ 품질지표별 유통기한 산출

품질지표별 품질한계 규격값을 기준으로 한계값에 이르기 바로 직전 실험일을 한계일로 정하고, 여러 가지 품질지표 중에서 가장 먼저 한계일에 도달한 품질지표를 그 제품의 유통기한 기준으로 설정하였다.

표 54. 일반세균 유통기한 산출

차수	최초함량-품질규격	연간변화속도상수	유통기한(일)	유통기한(개월)
0	-91700.0000	4632.58	7225.02	237.53
1	-2.4889	0.58	1562.22	51.36

표 55. 관능검사 유통기한 산출

차수	최초함량-품질규격	연간변화속도상수	유통기한(일)	유통기한(개월)
0	2.0000	0.53	1388.24	45.64
1	0.5108	0.11	1753.34	57.64

⑤ 결론

코팅곡물의 품질을 객관적으로 평가하기 위해 품질지표로 일반세균, 수분함량, 관능검사를 설정하고 저장온도(15℃, 25℃, 35℃) 및 기간(90일,6회)에 따라 관찰하였다. 그 결과, 품질지표 중에서 결정계수가 가장 높은 관능검사 0차 반응식을 근거로 실온에서 유통되는 GABA 코팅곡물의 유통기한은 45.64개월로 산출되었

다. 여기에 유통과정 중의 안전을 고려하고자 안전계수 0.8을 곱하여 제품의 최종 유통기한은 36개월로 설정하였다.

⑥ 참고자료

㉮ 식품의약품안전처:식품, 식품첨가물 및 건강기능식품의 유통기한설정기준 (제2014-174호, 2014. 11)

㉯ 식품의약품안전처:식품 및 축산물의 유통기한설정실험가이드라인(2013.12)

11. 쿠키 및 코팅곡물의 네이밍 및 패키지 디자인 개발

가. 쿠키제품의 네이밍 개발

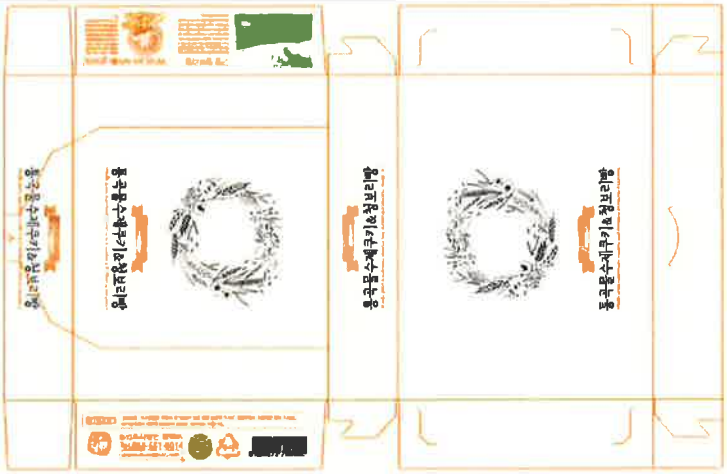
쿠키제품은 '기능성 소재가 첨가된 프리미엄급의 수제쿠키'를 의미하는 '프리미엄 통곡물수제쿠키'로 네이밍 되었다.

나. 쿠키제품의 패키지디자인 개발

쿠키제품의 패키지디자인을 표56과 같이 개발하였다. 소비자에게 순수함의 전달과 4가지 종류의 쿠키를 구별하기 위해 파스텔톤의 4가지 색상을 사용하였고, 개별포장과 小박스 및 大박스의 패키지디자인을 개발하였다.

표 56. 쿠키제품의 패키지디자인 및 샘플

구분	패키지디자인
개별포장	135*190(mm)

小박스	 180*180*60(mm)
大박스	 280*220*60(mm)
샘플	

다. 코팅곡물(현미)제품의 네이밍 개발

코팅곡물제품은 '섭취 시 힐링을 할 수 있는 곡물' 을 의미하는 '힐미(힐米)' 로 네이밍 되었다.

라. 코팅곡물제품의 패키지디자인 개발

코팅곡물제품의 패키지디자인을 표57과 같이 개발하였다. 네이밍에서 의미하는 힐링의 느낌을 소비자에게 전달하기 위해 하늘색을 사용하였고, 현미를 크게 나타내어 제품의 내용물을 한 눈에 알 수 있게 패키지를 디자인하였다. 내용물의 용량을 달리하여 500 g, 1 kg, 2 kg으로 패키지를 다양화하였다.

표 57. 코팅곡물제품의 패키지디자인 및 샘플

구분	패키지디자인
500g 파우치	180*260(mm)
1kg 파우치	210*300(mm)

2kg 파우치	 240*340(mm)
샘플	

제2절 미강 및 맥강을 이용한 Ornithine 소재 및 제품개발

1. 연구수행 방법

가. Ornithine 생산능 보유 미생물의 분리 및 동정

- MRS+1%Arg 액체 배지에서 후보 균주를 1% 접종하고 30℃에서 48시간 배양하였다. 이어 펩톤수 희석을 통해 선택배지에 도말함. 단일 Colony를 배양하여 다시 MRS+1%Arg 액체배지에 접종하여 오르니틴 생성 여부를 TLC를 통하여 1차 선발을 하고 HPLC를 통해 2차 최종 선발한다.

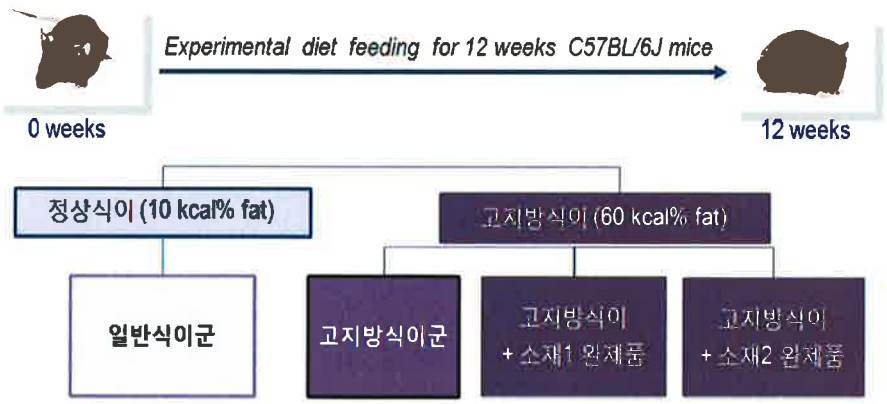
나. Ornithine 분석

- TLC를 이용한 오르니틴 분석 : 오르니틴 추출 방법을 이용하여 추출 된 시료를 TLC silica gel에 1㎕를 loading하여 오르니틴 전개용매(butanol: acetic acid; dichloromethan: water=5:3:3)에 전개 시키고 ninhydrin으로 염색하여 standard 1~100mg/ml의 오르니틴 spot 크기와 sample spot 크기를 비교하여 분석하였다.
- HPLC를 이용한 오르니틴 분석 : HPLC (Waters, USA) 분석을 위해 시료는 6-aminoquioly-N-hydroxysuccinimidyl carbonate (AQC)로 유도체화 하고, 3.9×150mm AccQ · Tag™(Nova-Pak™C18, Waters) 칼럼으로 유도체들을 분리하였다. 오르니틴 함량은 표준 오르니틴의 HPLC 분석결과를 토대로 작성한 표준곡선을 이용하여 산출하였다.

다. Ornithine소재, 쿠키, 코팅곡물의 항스트레스 효능평가

(1) 동물사육

- 실험에 사용될 동물은 생후 4주된 수컷 생쥐로서, C57BL/6J mice를 실험에 사용하였다. 1주일 동안 고형식이(Research Diets, New Brunswick, NJ USA)를 급여하여 환경에 적응시킨 후 난괴법(randomized block design)에 의해 4군으로 나눈 후 실험기간동안 실험군은 60% fat pellet diet 고지방식이를 공급하고 물과 식이는 자유로이 섭취하도록 한다. 식이섭취량은 2일 간격으로, 체중은 1주일에 한번 씩 기록하였다.



<동물실험 디자인>

(2) 체지방 축적 정도

- 사육 후 체내 복부지방(부고환지방) 및 내장지방(장간막지방) 등 지방 조직량을 측정하여 체지방 축적 조절 효과를 확인하였다.

(3)지질성분 함량 측정

- 혈중 총콜레스테롤(TC) 및 중성지방(TG)은 효소법(Eiken Co kit), HDL-콜레스테롤은 phosphotungstic acid-Mg 침전효소법(Eiken Co kit)으로 분석한다. 또한 LDL-콜레스테롤 및 VLDL-콜레스테롤은 Friedewald법에 의해 계산하여 혈중 지질 수준을 분석하였다. 분석 결과를 이용하여 HDL-콜레스테롤과 TC 비율(HDL/TC)을 산출함으로써 혈중 콜레스테롤 구성비를 확인한다.
- 간 조직중의 총콜레스테롤(TC) 및 중성지방(TG)은 효소법(Eiken Co kit)으로 측정하여 간 조직의 지질성상을 확인하였다.

(4) 체내 지질 대사 관련 효소들의 활성 및 발현 조절 효과 검증

- mRNA 수준 측정: 조직 내 지질 대사(지방합성 및 분해) 관련 효소의 발현 정도를 PCR을 이용해 측정하였다. 각 효소들의 reverse 및 forward primer, DNA polymerase, dNTPs를 첨가하여 PCR kit(SYBR Green)(ABgene, USA)를 이용한 Real-time PCR을 실시한 후 증폭된 PCR product를 확인하였다.

2. Ornithine 생산균주 분리 및 동정

가. Ornithine 생산균주 분리

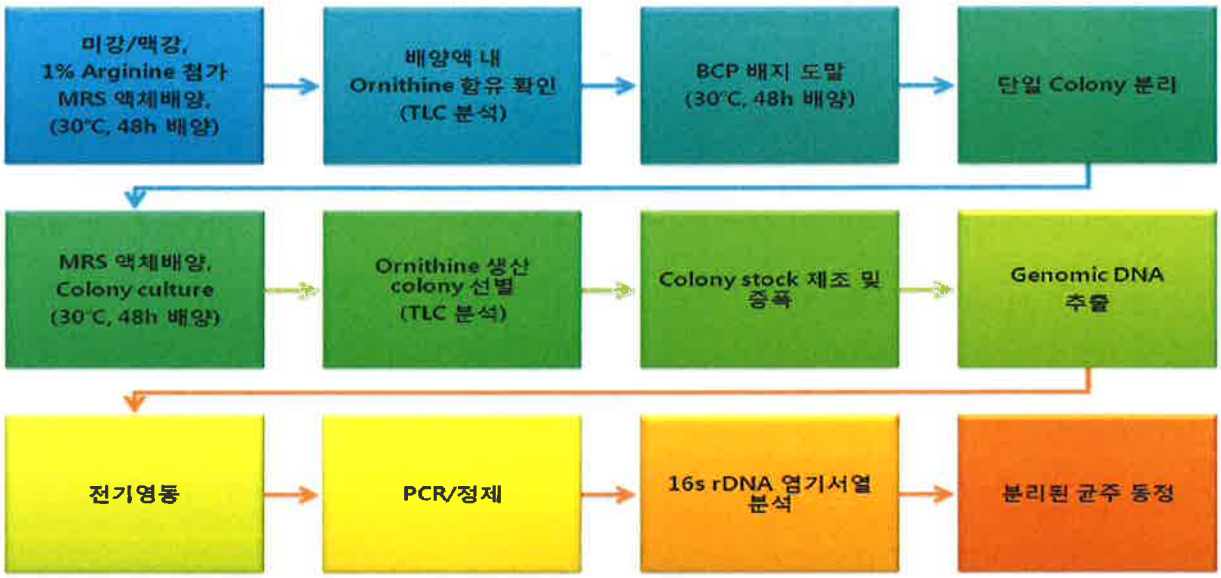


그림 61. 미강 및 맥강 유래 Ornithine 생산능 보유 균주 분리 및 동정 프로세스 모식도.

나. Ornithine 생산균주 동정

(1) 미강, 맥강 유래 Ornithine 생성 균주 동정을 위해 후보 균주로부터 genomic DNA

를 DNeasy® Blood & Tissue kit (QIAGEN, Hilden, Germany)를 이용하여 분리하였다. 16S rDNA의 클로닝을 위해 Primer는 5'-AGAGTTTGATCMTGGCTCAG-3'(Forward)와 5 '-ACGGGCGGGTGTGTRC-3'(Reverse)를 이용하여 PCR 증폭 시행하여, 16S rDNA sequencing을 통해 RBO1-49, BBO1-48의 염기서열 정보 획득하였다(표58,59)

(2) 미강에서 분리된 균주는 *Pediococcus pentosaceus*와 98%, 맥강에서 분리된 균주는 *Weissella cibaria*와 98%의 염기서열의 동질성을 보였으며 이상의 결과로 분리된 균주를 *Pediococcus pentosaceus* RBO1-49, *Weissella cibaria* BBO1-48로 각각 명명하였다.

표 58. 미강 유래 RBO1-49균주의 16S rDNA 염기서열

Query : RBO1-49 (분리균주), 동질성 : 98%

Subject : *Pediococcus pentosaceus*

Query	47	GATTTTTGATCATGACTTACTTGTACTGATTGAGATTTTAACACGAAGTGAGTGGCGAAC	106
Sbjct	10	GATTATTGATTATGACGTACTTGTACTGATTGAGATTTTAACACGAAGTGAGTGGCGAAC	69
Query	107	GGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCCAGAAGTAGGGGATAACACCTGGAAACAGATGC	166
Sbjct	70	GGGTGAGTAACACGTGGGTAACCTGCCCAGAAGTAGGGGATAACACCTGGAAACAGATGC	129
Query	167	TAATACCGTATAACAGAGAAAACCGCATGGTTTTCTTTTAAAAGATGGCTCTGCTATCAC	226
Sbjct	130	TAATACCGTATAACAGAGAAAACCGCATGGTTTTCTTTTAAAAGATGGCTCTGCTATCAC	189
Query	227	TTCTGGATGGACCCGCGGCGTATTAGCTAGTTGGTGAGGTAAAGGCTCACCAAGGCAGTG	286
Sbjct	190	TTCTGGATGGACCCGCGGCGTATTAGCTAGTTGGTGAGGTAAAGGCTCACCAAGGCAGTG	249
Query	287	ATACGTAGCCGACCTGAGAGGGTAATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTC	346
Sbjct	250	ATACGTAGCCGACCTGAGAGGGTAATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTC	309
Query	347	CTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGACGCAAGTCTGATGGAGCAACGCC	406
Sbjct	310	CTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGACGCAAGTCTGATGGAGCAACGCC	369
Query	407	GCGTGAGTGAAGAAGGGTTTCGGCTCGTAAAGCTCTGTTGTTAAAGAAGAACGTGGGTAA	466
Sbjct	370	GCGTGAGTGAAGAAGGGTTTCGGCTCGTAAAGCTCTGTTGTTAAAGAAGAACGTGGGTAA	429
Query	467	GAGTAACTGTTTACCCAGTGACGGTATTTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAG	526
Sbjct	430	GAGTAACTGTTTACCCAGTGACGGTATTTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAG	489
Query	527	CAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCG	586
Sbjct	490	CAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCG	549
Query	587	CAGGCGGTCTTTTAAGTCTAATGTGAAAGCCTTCGGCTCAACCGAAGAAGTGCATTGGAA	646
Sbjct	550	CAGGCGGTCTTTTAAGTCTAATGTGAAAGCCTTCGGCTCAACCGAAGAAGTGCATTGGAA	609
Query	647	ACTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGACAGTGGAACTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGT	706

```
Sbjct  610   ACTGGGAGACTTGAGTGCAGAAGAGGACAGTGGAACTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGT  669

Query  707   AGATATATGGAAGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTGTCTGGTCTGCAACTGACGCTGAGG  766
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  670   AGATATATGGAAGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTGTCTGGTCTGCAACTGACGCTGAGG  729

Query  767   CTCGAAAGCATGGGTAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCATGCCGTAAACGATG  826
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  730   CTCGAAAGCATGGGTAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCATGCCGTAAACGATG  789

Query  827   ATTACTAAGTGTTGGAGGGTTTCCGCCCTTCAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGTAATCC  886
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  790   ATTACTAAGTGTTGGAGGGTTTCCGCCCTTCAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGTAATCC  849

Query  887   GCCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAAGAATTGACGGGGGGCCCGCACAAG  946
              |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||| ||||||||||||||||
Sbjct  850   GCCTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAAGAATTGAC-GGGGGCCCGCACAAG  908

Query  947   CGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCTACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCT  1006
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  909   CGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCTACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCT  968

Query  1007  TCTGACAGTCTAAGAAGATTAGAGGTTCCCTTCGGGGACAGAATGACAGGTGGTTGCATG  1066
              ||||||||||||||| ||||||||||||||||||||||||||||||||||||| ||||||
Sbjct  969   TCTGACAGTCTAAG-AGATTAGAGGTTCCCTTCGGGGACAGAATGACAGGTGGT-GCATG  1026

Query  1067  GGTTGTCCTCCAGCTCGTGGTCATGAGAAGGTTGGGGTTAAGTCCCCGCAACAAACGAGC  1126
              | ||||| || |||||||| || |||||| | |||||| ||||||||| |||||| | ||  |
Sbjct  1027  G-TTGTCGTC-AGCTCGTG-TCGTGAGATG-TTGGG-TTAAGTCCC-GCAACGAGCG--C  1078

Query  1127  AACCCCTTAATTACTAGTTTGCTACCCATTAAATTTGGGCGACTC  1171
              ||||| ||| ||||||||| || | | ||||| || |||| ||||
Sbjct  1079  AACCC-TTA-TTACTAGTT-GCCAGC-ATTAAGTT-GGGC-ACTC  1117
```

분석기관 : ㈜제노텍

표 59. 맥강 유래 BBO1-48균주의 16S rDNA 염기서열

Query : BBO1-48(분리균주), 동질성 : 98%

Subject : *Weissella cibaria*

```
Query  1527  ACCGGCGGCGTGCTGATCCGCGATTACTAGCGATTACGACTTCATGTAGGCGAGTTGCAG  1586
             ||| |||||||||||||||||||||||||||||| ||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1372  ACC-GCGGCGTGCTGATCCGCGATTACTAGCGATTCCGACTTCATGTAGGCGAGTTGCAG  1314

Query  1587  CCTACAATCCGAACTGAGACGTACTTTAAGAGATTAGCTCACCCTCGCGGGTTGGCAACT  1646
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1313  CCTACAATCCGAACTGAGACGTACTTTAAGAGATTAGCTCACCCTCGCGGGTTGGCAACT  1254

Query  1647  CGTTGTATACGCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCAGGTCATAAGGGGCATGATGATTTGA  1706
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1253  CGTTGTATACGCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCAGGTCATAAGGGGCATGATGATTTGA  1194

Query  1707  CGTCATCCCCACCTTCCTCCGGTTTGTCACCGGCAGTCTCACTAGAGTGCCCAACTAAAT  1766
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1193  CGTCATCCCCACCTTCCTCCGGTTTGTCACCGGCAGTCTCACTAGAGTGCCCAACTAAAT  1134

Query  1767  GCTGGCAACTAGTAATAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCTCACGACA  1826
```

```
Sbjct  1133  GCTGGCAACTAGTAATAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATCTCACGACA  1074

Query  1827  CGAGCTGACGACAACCATGCACCACCTGTCACCTTGTCCCCGAAGGGAACGCTCCATCTC  1886
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1073  CGAGCTGACGACAACCATGCACCACCTGTCACCTTGTCCCCGAAGGGAACGCTCCATCTC  1014

Query  1887  TGGAGTTGTCAAGGGATGTCAAGACCTGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCTTCGAATTAAACC  1946
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  1013  TGGAGTTGTCAAGGGATGTCAAGACCTGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCTTCGAATTAAACC  954

Query  1947  ACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGTCCCCGTCAATTCCTTTGAGTTTCAACCTTGCGGTCG  2006
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  953   ACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGTCCCCGTCAATTCCTTTGAGTTTCAACCTTGCGGTCG  894

Query  2007  TACTCCCCAGGCGGAGTGCTTAATGCGTTAGCTGCGGCACTTAAGGGCGGAAACCCTCAA  2066
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  893   TACTCCCCAGGCGGAGTGCTTAATGCGTTAGCTGCGGCACTTAAGGGCGGAAACCCTCAA  834

Query  2067  ACACCTAGCACTCATCGTTTACGGTGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGCTACC  2126
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  833   ACACCTAGCACTCATCGTTTACGGTGTGGACTACCAGGGTATCTAATCCTGTTTGCTACC  774

Query  2127  CACACTTTCGAGCCTCAACGTCAGTTACAGTCCAGAAAGCCGCCTTCGCCACTGGTGTTC  2186
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  773   CACACTTTCGAGCCTCAACGTCAGTTACAGTCCAGAAAGCCGCCTTCGCCACTGGTGTTC  714

Query  2187  TTCCATATATCTACGCATTTCACCGCTACACATGGAGTTCCACTTTCCTCTACTGCACTC  2246
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  713   TTCCATATATCTACGCATTTCACCGCTACACATGGAGTTCCACTTTCCTCTACTGCACTC  654

Query  2247  AAGTCATCCAGTTTCCAAAGCAATTCCTCAGTTGAGCTGAAGGCTTTCACTTCAGACTTA  2306
              |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||| ||||||||||||||||||||
Sbjct  653   AAGTCATCCAGTTTCCAAAGCAATTCCTCAGTTGAGCTGAGGGCTTTCACTTCAGACTTA  594

Query  2307  AATAACCGTCTGCGCTCGCTTTACGCCCAATAAATCCGGATAACGCTTGGAACATACGTA  2366
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  593   AATAACCGTCTGCGCTCGCTTTACGCCCAATAAATCCGGATAACGCTTGGAACATACGTA  534

Query  2367  TTACCGCGGCTGCTGGCACGTATTTAGCCGTTCCTTTCTGGTAAGATACCGTCACACATT  2426
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  533   TTACCGCGGCTGCTGGCACGTATTTAGCCGTTCCTTTCTGGTAAGATACCGTCACACATT  474

Query  2427  GAACAGTTACTCTCAATGTCATTCTTCTCTTACAACAGTGTTTTACGAGCCGAAACCCTT  2486
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  473   GAACAGTTACTCTCAATGTCATTCTTCTCTTACAACAGTGTTTTACGAGCCGAAACCCTT  414

Query  2487  CATCACACACGCGGCGTTGCTCCATCAGGCTTTCGCCCATTGTGGAAGATTCCCTACTGC  2546
              ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  413   CATCACACACGCGGCGTTGCTCCATCAGGCTTTCGCCCATTGTGGAAGATTCCCTACTGC  354

Query  2547  TGCCTCCCGTAAGAATATGGGCCGTGTCTCAGTCCCATTGTGGCCGATCAGTCTCTCAAC  2606
              |||||||||||| || ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
Sbjct  353   TGCCTCCCGTAGGAGTATGGGCCGTGTCTCAGTCCCATTGTGGCCGATCAGTCTCTCAAC  294

Query  2607  TCGGCTATGCATCATCGTCTTGGGGAGCCATTACCTCACCAACTAATAAATGGACCGCGG  2666
              |||||||||||||||||||||| |||||||||||||||||||||||  |||| ||||||||
Sbjct  293   TCGGCTATGCATCATCGTCTTGGTGAGCCATTACCTCACCAACTAACTAATGCACCGCGG  234

Query  2667  GACC-TCTCCTTAATGAAAACAGAAACATCCTTTTAA-TAACAACCATGGGGGTGGGATT  2724
              |||| ||| |||| ||| | ||||| |||| |||||| || |||||||| || ||  |||
Sbjct  233   GACCATCT-CTTAGTGATAGCAGAACCATC-TTTTAAGTAGCAACCATGCGGTTGCTATT  176
```

```
Query  2725  GTGTA-ACGGAGATAGCAACTGGTTCCAAAAGGTATCCCCCCGCAAAAAGGAGGGTTGCA  2783
             || || ||||  ||||| ||| |||||||| | |||||||  || || |||  |||| |
Sbjct  175   GT-TATACGGTATTAGCATCTGTTTCCAAATGTTATCCCCT-GCTAAGAGGTAGGTTTC-  119

Query  2784  CCAGG-G-TACTCACCCGTTCGCCACTTTTTGCAA  2816
             ||| | | ||||||||||||||||||| |||||||
Sbjct  118   CCACGTGTTACTCACCCGTTCGCCACTCTTTGCAA  84
```

분석기관 : ㈜제노텍

다. 미강 및 맥강 유래 RBO1-49균주와 BBO1-48균주의 탄소 이용 특성 분석

(1) 미강, 맥강 유래 분리된 균주의 다양한 당 발효패턴 특성을 조사하기 위하여 API 50 CHL kit (BioMerieux, France)를 제조사의 지침에 따라 사용하였으며, 결과는 표60, 61에 요약하였다.

표 60. RBO1-49균주의 다양한 탄소원 이용 여부

번호	탄소원	이용 여부	번호	탄소원	이용 여부
1	Control	+[1)]	26	Esculin citrate de for	+
2	Glycerol	-[2)]	27	Salicin	+
3	Erythritol	-	28	D-Cellobiose	+
4	D-Arabinose	-	29	D-Maltose	+
5	L-Arabinose	+	30	D-Lactose	-
6	D-Ribose	+	31	D-Melibiose	+
7	D-Xylose	+	32	D-Saccharose	+
8	L-Xylose	-	33	D-Trehalose	+
9	D-Adonitol	-	34	Inulin	-
10	b-Methyl-D-Xyloside	-	35	D-Melezitose	-
11	D-Galactose	+	36	D-Raffinose	+
12	D-MSGcose	+	37	Amidon	-
13	D-Fructose	+	38	Glycogen	-
14	D-Mannose	+	39	Xylitol	-
15	L-Sorbose	-	40	Gentiobiose	+
16	D-Rhamnose	+	41	D-Turanose	-
17	Dulcitol	-	42	D-Lyxose	-
18	Inositol	-	43	D-Tagatose	+
19	D-Mannitol	-	44	D-Fucose	-
20	D-Sorbitol	-	45	L-Fucose	-
21	a-Methyl-D-Mannoside	-	46	D-Arabitol	-
22	a-Methyl-D-MSGcoside	-	47	L-Arabitol	-
23	N-Acethyl-MSGcosamine	+	48	MSGconate	+
24	Amygdalin	+	49	2-Keto-MSGconate	-
25	Arbutin	+	50	5-Keto-MSGconate	-

+[1)] Positive, -[2)] Negative

표 61. BBO1-48균주의 다양한 탄소원 이용 여부

번호	탄소원	이용 여부	번호	탄소원	이용 여부
1	Control	+[1]	26	Esculin citrate de for	+
2	Glycerol	-[2]	27	Salicin	+
3	Erythritol	-	28	D-Cellobiose	+
4	D-Arabinose	-	29	D-Maltose	+
5	L-Arabinose	+	30	D-Lactose	-
6	D-Ribose	+	31	D-Melibiose	+
7	D-Xylose	+	32	D-Saccharose	+
8	L-Xylose	-	33	D-Trehalose	+
9	D-Adonitol	-	34	Inulin	-
10	b-Methyl-D-Xyloside	-	35	D-Melezitose	-
11	D-Galactose	+	36	D-Raffinose	+
12	D-MSGcose	+	37	Amidon	-
13	D-Fructose	+	38	Glycogen	-
14	D-Mannose	+	39	Xylitol	-
15	L-Sorbose	-	40	Gentiobiose	+
16	D-Rhamnose	+	41	D-Turanose	-
17	Dulcitol	-	42	D-Lyxose	-
18	Inositol	-	43	D-Tagatose	+
19	D-Mannitol	-	44	D-Fucose	-
20	D-Sorbitol	-	45	L-Fucose	-
21	a-Methyl-D-Mannoside	-	46	D-Arabitol	-
22	a-Methyl-D-MSGcoside	-	47	L-Arabitol	-
23	N-Acethyl-MSGcosamine	+	48	MSGconate	+
24	Amygdalin	+	49	2-Keto-MSGconate	-
25	Arbutin	+	50	5-Keto-MSGconate	-

+[1] Positive, -[2] Negative

3. Ornithine 소재의 제조공정 확립 및 대규모화

가. 분리 균주 RBO1-49와 BBO1-48균주를 이용한 미강 및 맥강 발효물 생성

(1) 분리된 균주의 생장에서 미강 또는 맥강 첨가량의 영향

(가) 미강 첨가량에 따른 Ornithine 생성 균주 RBO1-49 균수 측정 변화 측정 결과, 10%로 첨가시 최대 0.9E+08로 나타났고, 20% 첨가한 발효시에는 1.9E+09로 균수가 증가하는 것을 확인하였으며, 30%는 점도가 높고 수분활성도가 낮아 균주 성장이 이루어지지 않았다. 분석 결과를 토대로 20%의 미강 첨가량이 적합한 것으로 판단하였다(표62).

(나) 맥강 첨가량에 따른 Ornithine 생성 균주 BBO1-48 균수 측정 변화 측정 결

과, 10%로 첨가시 최대 1.0E+07로 나타났고, 20% 첨가한 발효시에는 1.8E+09로 균수가 증가하는 것을 확인하였으며, 30%는 점도가 높고 수분활성도가 낮아 균주 성장이 이루어지지 않았다. 분석 결과를 토대로 20%의 미강 첨가량이 적합한 것으로 판단하였다(표63).

표 62. 미강 첨가량에 따른 RBO1-49균주 배양액의 세포농도 변화

구 분	발효시간(Day)	세포농도(cfu/ml)
10% 미강 + 0.1% RBO1-49	1	0.6E+07
	2	0.6E+08
	3	0.9E+08
20% 미강 + 0.1% RBO1-49	1	1.0E+08
	2	1.5E+09
	3	1.9E+09

표 63. 맥강 첨가량에 따른 BBO1-48 균주배양액의 세포농도 변화

구 분	발효시간(Day)	세포농도(cfu/ml)
10% 맥강 + 0.1% RBO1-49	1	0.7E+06
	2	0.9E+06
	3	0.8E+06
20% 맥강 + 0.1% RBO1-49	1	1.2E+08
	2	1.4E+09
	3	1.8E+09

(2) 미강 또는 맥강이 첨가된 최적 발효조건에서 산도 및 pH 변화 비교

(가) 20%미강+0.1% RBO1-49(RN), 20%미강+1%Arg+0.1%RBO1-49(RO)를 제조하여, 30℃에서 3일간 발효물을 제조하였으며, 1일 간격으로 산도를 측정하였다. 그 결과 발효 1일차 RN은 0.72, RO는 0.82로 RO가 약간 높은 산도를 나타냈으며, 최종 3일간 발효 후 역시 0.96, 1.02로 RO가 약간 높게 나타내었다(표64)

(나) 20%미강+0.1% RBO1-49(RN), 20%미강+1%Arg+0.1%RBO1-49(RO) 발효물의 1일차 pH는 RN이 4,81, RO 4.88로 비슷한 수치를 나타냈으며, 최종 3일에는 RN이 4.29, RO가 4.56으로 RA가 낮은 수치를 나타내었다(표65).

(다) 20%맥강+0.1% BBO1-48(BN), 20%맥강+1%Arg+0.1%BBO1-49(BO) 발효물의 산도는 발효 1일차에 BN가 0.38, BO가 0.36으로 비슷한 수치를 나타냈으며, 발효 3일차에는 BN가 0.56, BO가 0.42로 BN가 약간 높게 나타났다(표66).

(라) 20%맥강+0.1% BBO1-48(BN), 20%맥강+1%Arg+0.1%BBO1-49(BO) pH 변화에서는 1일차에 BN가 4.45, BO는 6.54로 BO가 높게 형성 되었고, 최종 발효 3일차에는

BN가 4.42, BO는 5.34 발효를 통해 낮아졌으며 3일 후에도 BO 각 높게 나타났다(표67).

표 64. RBO1-49균주에 의한 미강 발효액의 산도 변화

구 분	발효시간(Day)		
	1	2	3
RN	0.72	0.88	0.96
RO	0.82	1.14	1.02

RN : 20%미강 추출물, RO : 20% 미강 추출물 + 1%Arginine + 0.1%RBO1-49

표 65. RBO1-49균주에 의한 미강 발효액의 pH 변화

구 분	발효시간(Day)		
	1	2	3
RN	4.81	4.40	4.29
RO	4.88	4.54	4.56

RN : 20%미강 추출물, RO : 20% 미강 추출물 + 1%Arginine + 0.1%RBO1-49

표 66. BBO1-48균주에 의한 맥강 발효액의 산도 변화

구 분	발효시간(Day)		
	1	2	3
BN	0.38	0.40	0.56
BO	0.36	0.36	0.42

BN : 20%맥강 추출물, BO : 20% 맥강 추출물 + 1%Arginine + 0.1%BBO1-48

표 67. BBO1-48균주에 의한 맥강 발효액의 pH 변화

구 분	발효시간(Day)		
	1	2	3
BN	4.45	4.48	4.22
BO	6.54	6.38	5.34

BN : 20%맥강 추출물, BO : 20% 맥강 추출물 + 1%Arginine + 0.1%BBO1-48

(3) 미강 또는 맥강이 첨가된 최적 발효조건에서 Ornithine 생산량 비교

(가) 20%미강+1%Arg+0.1%RBO1-49(RO), 20%맥강+1%Arg+0.1%BBO1-48(BO)의 Ornithine 함량을 HPLC를 통하여 비교 한 결과, 발효물 RO는 1,032 mg/100 g의

함량을 나타냈으며, 발효물 BO는 1,085 mg/100 g의 함량을 나타냈다. RO 보다는 BO 발효물이 높은 Ornithine 함량을 함유하고 있었다(그림61).

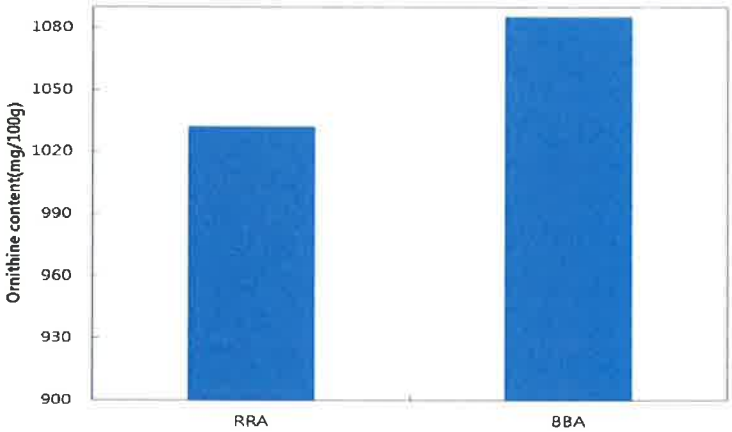


그림 62. 미강 또는 맥강이 첨가된 최적 발효조건에서 RBO1-49 및 BBO1-48균주에 의한 Ornithine 생산량: 비교.
RO : 20%미강+1%Arg+0.1%RBO1-49, BO : 20%맥강+1%Arg+0.1%BBO1-49

나. 액상소재의 표준화

RBO1-49, BBO1-48균주에 의한 미강 또는 맥강이 첨가된 발효에서 Ornithine 발효물의 액상 소재화는 원심분리→여과→감압농축에 의하여 수행되었다. 각 단계별로 시료를 채취하여 TLC를 이용하여 GABA 및 오르니틴을 분석하였다

그림 63. 미강 및 맥강 발효물의 액상 소재화 공정별 Ornithine 농도 변화.

(1) RBO1-49균주에 의한 미강 발효물의 액상 소재화(Ornithine)

그림64은 RBO1-49균주에 의한 미강 발효물의 액상 소재화 공정별 공정물을 보여준다. 발효물 내 Ornithine 함량은 1,032 mg/100 g이었다(전환율 95.4%). 원심분리 및 여과 공정에 의해 Ornithine 함량은 거의 변화하지 않았고, 감압농축 후 Ornithine 함량은 11,428 mg/100 g으로 증가하였다(그림65).

그림 64. RBO1-49균주에 의한 미강 발효물의 액상 소재화 공정별 사진.

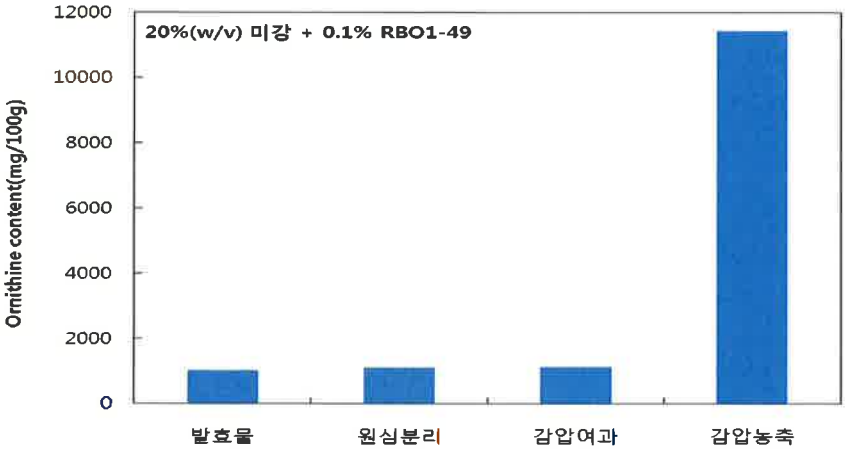


그림 65. RBO1-49균주에 의한 미강 발효물의 액상 소재화 공정별 Ornithine 농도 변화.

(2) BBO1-48균주에 의한 맥강 발효물의 액상 소재화(Ornithine)

그림66은 BBO1-48균주에 의한 맥강 발효물의 액상 소재화 공정별 공정물을 보여준다. 발효물 내 Ornithine 함량은 1,085 mg/100 g이었다(전환율 97.5%). 원심분리 및 여과 공정에 의해 Ornithine 함량은 거의 변화하지 않았고, 감압농축 후 Ornithine 함량은 10,757 mg/100 g으로 증가하였다(그림67).

그림 66. BBO1-48균주에 의한 맥강 발효물의 액상 공정별 단계별 사진.

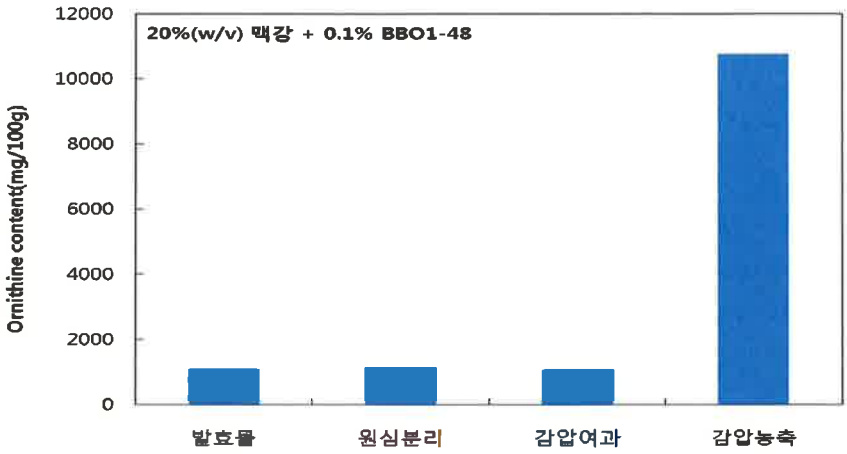


그림 67. BBO1-48균주에 의한 맥강 발효물의 액상 소재화 공정별 Ornithine 농도 변화.

(3) RBO1-49균주에 의한 미강 발효물의 분말 소재화(Ornithine)

그림68은 RBO1-49균주에 의한 미강 발효물의 분말소재를 보여준다. 발효물 내 Ornithine 함량은 1,032 mg/100 g이었다. 동결건조 후 Ornithine 함량은 13,051 mg/100 g으로 증가하였다(그림69).

그림 68. RBO1-49균주에 의한 미강 발효물의 분말소재.

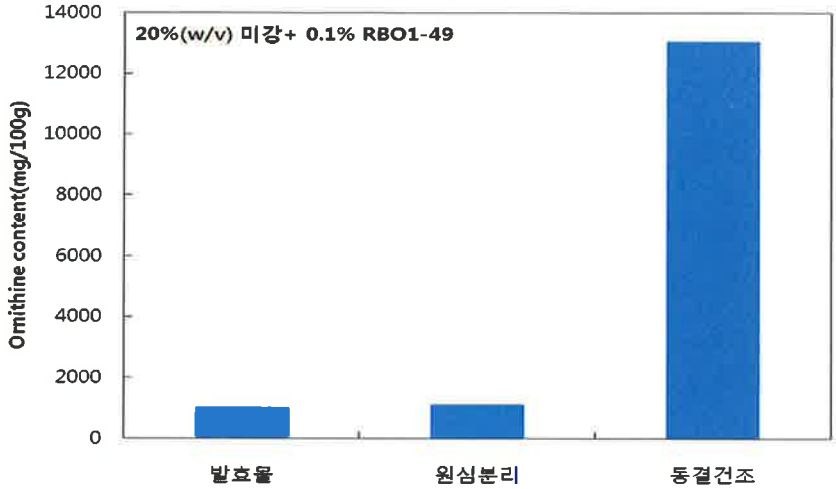


그림 69. RBO1-49균주에 의한 미강 발효물의 분말 소재화 공정별 Ornithine 농도 변화.

(4) BBO1-48균주에 의한 맥강 발효물의 분말 소재화(Ornithine)

그림70는 BBO1-48균주에 의한 맥강 발효물의 분말소재를 보여준다. 발효물 내 Ornithine 함량은 1,085 mg/100 g이었다. 동결건조 후 Ornithine 함량은 12,894 mg/100 g으로 증가하였다(그림71).

그림 70. BBO1-48균주에 의한 맥강 발효물의 분말소재.

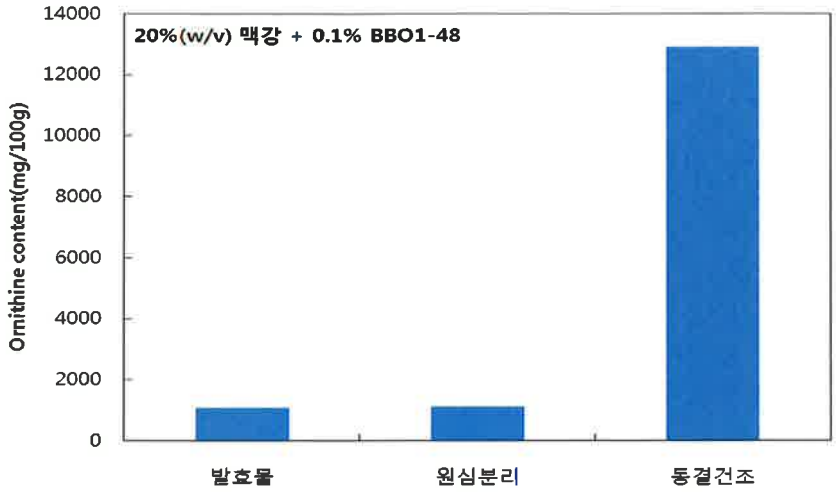


그림 71. BBO1-48균주에 의한 맥강 발효물의 분말 소재화 공정별 Ornithine 농도 변화.

다. 소재화 가공공정 확립

(1) 액상 및 분말소재의 가공공정

RBO1-49, BBO1-48균주에 의한 미강 또는 맥강이 첨가된 발효에서 Ornithine 발효물의 액상과 분말 소재화 공정은 그림72와 같이 확립하였고, 표72은 각 공정의 주요 공정변수를 나타낸다.

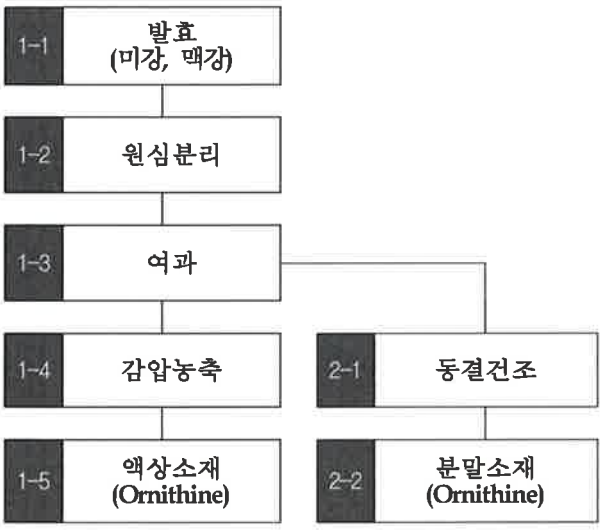


그림 72. 미강/맥강 발효물의 소재화 공정도.

표 68. 미강 및 맥강 발효물의 소재화 공정 설명

No	공 정	공 정 요 약
1-1	발효	· Ornithine 발효 - RBO1-49, 20%(w/v) 미강, 1%(w/v) Arginine, 온도 35℃, pH 6.5 - BBO1-48, 20%(w/v) 맥강, 1%(w/v) Arginine, 온도 35℃, pH 6.5
1-2	원심분리	· 12,000 rpm, 20분
1-3	여과	· ADVANTEC No. 1(6 μm, 110 mm)
1-4	감압농축	· 온도 40℃, ×10 농축
1-5	액상소재	· Ornithine 함량 1,000 mg 이상/100 g
2-1	동결건조	· -50℃, 48h
2-2	분말소재	· Ornithine 함량 10,000 mg 이상/100 g

라. Ornithine 소재의 대량생산 시스템 구축

(1) 미강 및 맥강의 발효공정(100 L) 확립

미강 및 맥강을 이용한 Ornithine 발효는 300 L 부피의 생물교반반응기(stirred-tank bioreactor)에서 작업량(working volume) 100 L 규모에서 수행하였다(그림73). 발효에 첨가된 미강과 맥강의 함량은 20%(w/v)이었고, 발효에 1.0%(w/v) L-arginine을 첨가하였으며, 균주를 0.1%(w/v) 접종하여 72시간 동안 발효하였다.

그림 73. Ornithine 발효에 사용한 300 L 생물교반반응기.

(2) 미강을 이용한 Ornithine 발효공정 확립

(가) 온도 확립

미강을 이용한 Ornithine 발효는 RBO1-49에 의해 수행되었다. 그 결과, 30℃로 발효하였을 때, 1,012 mg/100 g의 Ornithine이 생산되어 최적 온도는 30℃로 결정하였다(그림74).

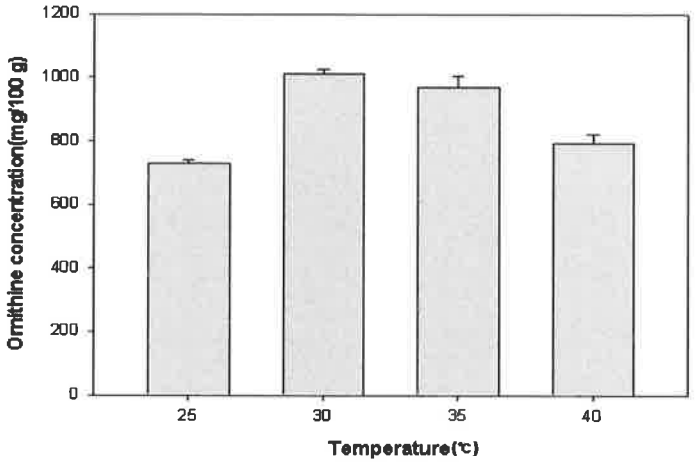


그림 74. RBO1-49에 의한 미강 이용 Ornithine 발효에서 온도에 따른 Ornithine 생산량 변화.

(나) 교반속도 확립

미강을 이용한 Ornithine 발효에서 교반속도의 영향은 60-120 rpm 사이에서 조사하였다. 그림75과 같이, 교반속도의 증가에 따라 Ornithine 생산량이 증가하는 경향을 나타내었지만 100 rpm 이상에서는 더 이상 증가하지 않았다. 따라서, 100 rpm(1,028 mg/100 g)을 최적 교반속도로 결정하였다.

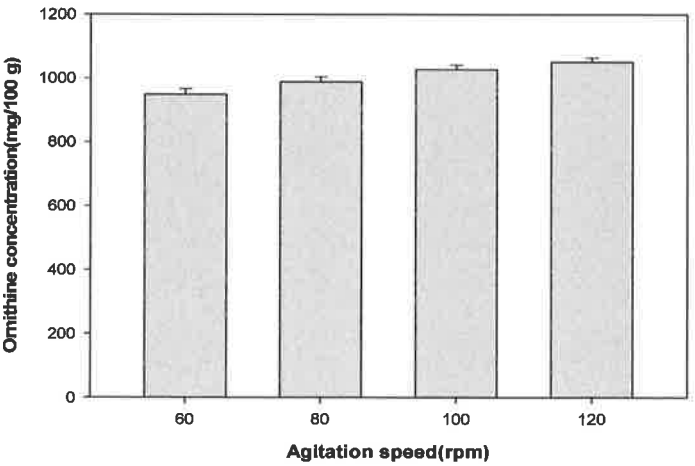


그림 75. RBO1-49에 의한 미강 이용 Ornithine 발효에서 교반속도에 따른 Ornithine 생산량 변화.

(다) 통기량 확립

미강을 이용한 Ornithine 발효에서 통기량의 영향은 0.2-0.8 vvm 사이에서 조사하였다. 그 결과, 0.4 vvm으로 발효하였을 때, 1,177 mg/100 g의 Ornithine이 생산되어 최적 통기량은 0.4 vvm으로 결정하였다(그림76).

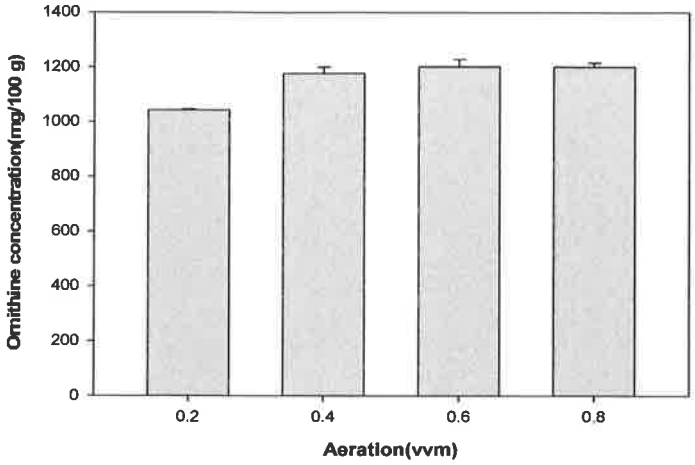


그림 76. RBO1-49에 의한 미강 이용 Ornithine 발효에서 통기량에 따른 Ornithine 생산량 변화.

(3) 맥강을 이용한 Ornithine 발효공정 확립

(가) 온도 확립

맥강을 이용한 Ornithine 발효는 BBO1-48에 의해 수행되었다. 그 결과, 30℃로 발효하였을 때, 962 mg/100 g의 Ornithine이 생산되어 최적 온도는 30℃로 결정하였다(그림77).

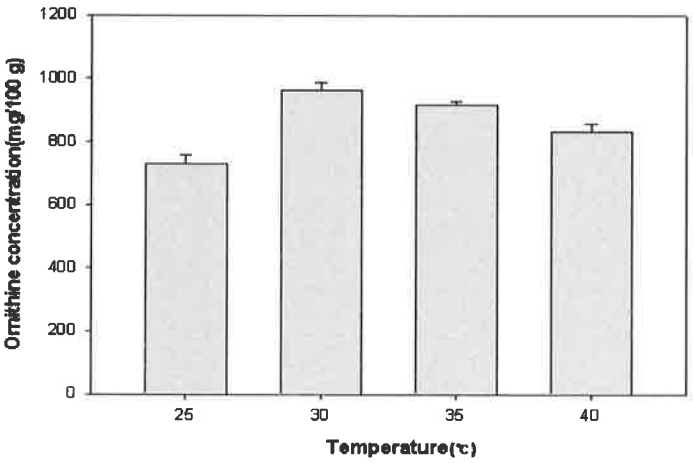


그림 77. BBO1-48에 의한 미강 이용 Ornithine 발효에서 온도에 따른 Ornithine 생산량 변화.

(나) 교반속도 확립

맥강을 이용한 Ornithine 발효에서 교반속도의 영향은 100-160 rpm 사이에서 조사하였다. 그림78과 같이, 120 rpm 이상에서는 Ornithine 생산량이 더 이상 증가하지 않았다. 따라서, 120 rpm(1,026 mg/100 g)을 최적 교반속도로 결정하였다.

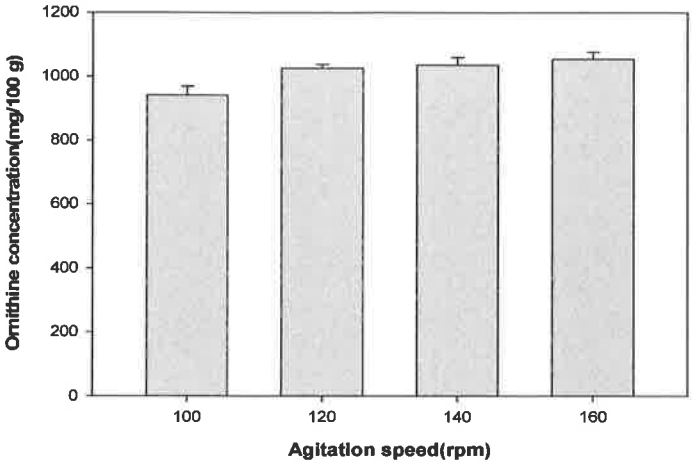


그림 78. BBO1-48에 의한 미강 이용 Ornithine 발효에서 교반속도에 따른 Ornithine 생산량 변화.

(다) 통기량 확립

맥강을 이용한 Ornithine 발효에서 통기량의 영향은 0.2-0.8 vvm 사이에서 조사하였다. 그 결과, 0.6 vvm으로 발효하였을 때, 1,134 mg/100 g의 Ornithine이 생산되어 최적 통기량은 0.6 vvm으로 결정하였다(그림79).

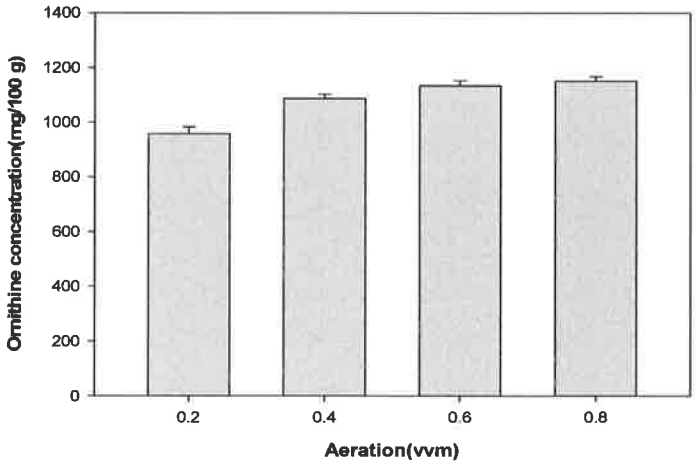


그림 79. BBO1-48에 의한 미강 이용 Ornithine 발효에서 통기량에 따른 Ornithine 생산량 변화.

(4) 미강, 맥강 발효물의 소재화 공정 확립

(가) 미강발효물의 Ornithine분말 소재화

그림80은 RBO1-49에 의한 미강 발효물의 분말 소재화 공정별 Ornithine 함량을 나타낸다. 발효액 내 Ornithine 함량은 1,177 mg/100 g이었고, 여과공정에 의해 Ornithine의 손실은 일어나지 않았으며, 동결건조 후 Ornithine 함량은 14,007 mg/100 g 이었다.

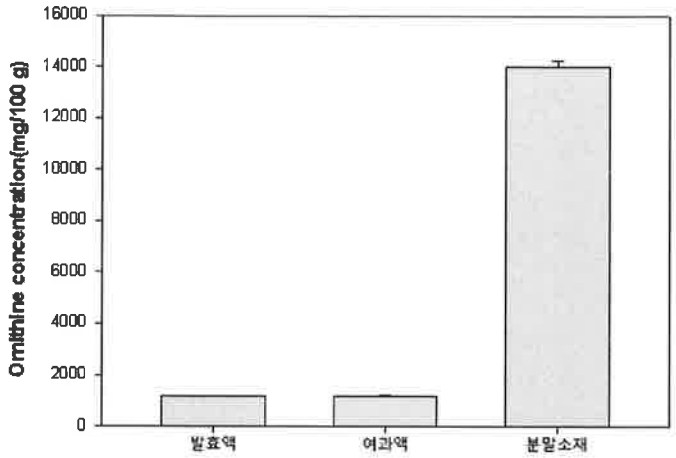


그림 80. RBO1-49에 의한 미강 발효물의 분말 소재화 공정에 따른 Ornithine 함량 변화.

(나) 맥강발효물의 Ornithine분말 소재화

그림81은 BBO1-48에 의한 맥강 발효물의 분말 소재화 공정별 Ornithine 함량을 나타낸다. 발효액 내 Ornithine 함량은 1,134 mg/100 g이었고, 여과공정에 의해 Ornithine의 손실은 일어나지 않았으며, 동결건조 후 Ornithine 함량은 13,948 mg/100 g 이었다.

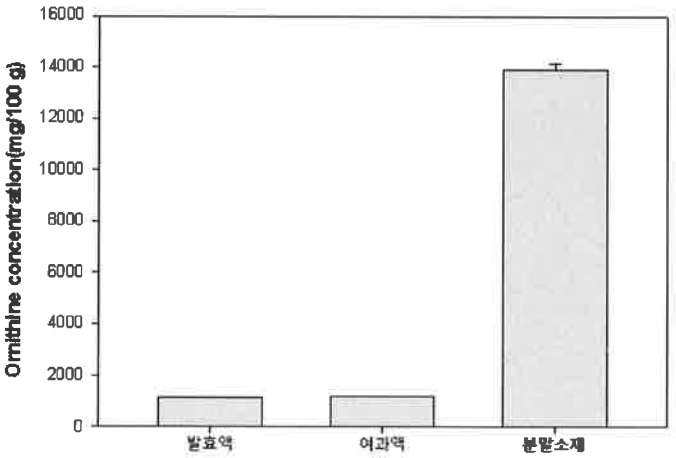


그림 81. BBO1-48에 의한 맥강 발효물의 분말 소재화 공정에 따른 Ornithine 함량 변화.

(다) 발효물의 분말 소재화공정 확립

RBO1-49, BBO1-48에 의한 미강 또는 맥강이 첨가된 발효에서 Ornithine 발효물의 분말 소재화 공정은 그림82와 같이 확립하였고, 표69는 각 공정의 주요 공정변수를 나타낸다.

그림 82. 미강 및 맥강 발효물의 분말 소재화 공정도.

표 69. 미강/맥강 발효물의 분말 소재화공정 설명

No	공 정	공 정 요 약
1-1	발효	· Ornithine 발효 - 0.1% RBO1-49, 20%(w/v) 미강, 1%(w/v) Arginine, 온도 30℃, pH 6.5, 100 rpm, 0.4 vvm - 0.1% BBO1-48, 20%(w/v) 맥강, 1%(w/v) Arginine, 온도 30℃, pH 6.5, 120 rpm, 0.6 vvm · Ornithine 함량: 1,000 mg 이상/100 g
1-2	압착여과 (Filter press)	· 압력: 1.5 kg/cm^2 이하 · 여과포 size: 600*600*30 mm
1-3	동결건조	· 온도변화: -40~25℃ · 시간: 72h · 진공: 600 mTorr 이하
1-4	분말소재	· Ornithine 함량: 10,000 mg 이상/100 g · 수분함량 함량: 7% 이하 · 미생물: 대장균군, 살모넬라, 황색포도상구균, 바실러스 세레우스, 장염비브리오균, 리스테리아 모노사이토제네스, 클로스트리디움 퍼프린젠스 음성

(라) Ornithine 분말소재의 제조를 위한 공정비용 산출

미강 및 맥강을 이용하여 발효, 여과, 동결건조 공정을 거쳐 Ornithine 분말소재를 제조하는 공정비용은 100 L 발효기준, 1,490,400원으로 계산되었다(표70).

표 70. Ornithine 분말소재 제조원가

구분		단위	단가(원)	수량	금액(원)
재료비	미강/맥강	kg	300	20	6,000
	Arginine	kg	312,000	1	312,000
	접종균주	L	4,000	0.1	400
가공비	300L 발효기 임차비	일	181,000	3	54,3000
	압착여과기 임차비	일	129,000	1	129,000
	동결건조기 임차비	일	250,000	2	500,000
합계					1,490,400

(마). Ornithine 분말소재의 품질평가

① 미생물 분석

Ornithine 분말소재의 미생물 분석(일반세균, 대장균, 대장균군, 살모넬라, 황색포도상구균, 바실러스 세레우스, 장염비브리오균, 리스테리아 모노사이토제네스, 클로스트리디움 퍼프린젠스)을 분석하였다. 그 결과, 일반세균을 제외한 모든 항목에서 미생물이 불검출 되었다(표71).

표 71. 분말소재의 미생물 분석결과

분석항목	분석결과	
	BO	RO
일반세균(CFU/g)	18	35
대장균군(CFU/g)	0	0
대장균(CFU/g)	0	0
살모넬라	음성	음성
황색포도상구균(CFU/g)	0	0
바실러스 세레우스 (CFU/g)	0	0
장염비브리오균	음성	음성
리스테리아 모노사이토제네스	음성	음성
클로스트리디움 퍼프린젠스 (CFU/g)	0	0

분석기관 : 다산생명과학원(주)

RO : 20%미강+1%Arg+0.1%RBO1-49, BO : 20%맥강+1%Arg+0.1%BBO1-49

② 중금속 분석

Ornithine 분말소재의 중금속 분석(납, 카드뮴, 수은, 비소)을 분석하였다. 분석한 결과를 표72에 나타내었고, kg 기준으로 제시하였다.

표 72. 분말소재의 중금속 분석결과

분석항목	분석결과	
	BO	RO
납(mg/kg)	0.1586	0.1825
카드뮴(mg/kg)	0.0694	0.0737
수은(mg/kg)	0.0215	0.0325
비소(mg/kg)	1.8793	2.2668

분석기관 : 다산생명과학원(주)

RO : 20%미강+1%Arg+0.1%RBO1-49, BO : 20%맥강+1%Arg+0.1%BBO1-49

③ 9대영양소 분석

Ornithine 분말소재의 영양성분(열량, 탄수화물, 당류, 단백질, 지방, 포화지방, 트렌스지방, 콜레스테롤, 나트륨)을 분석하였다. 분석한 결과를 표73에 나타내었고, 100g 기준으로 제시하였다.

표 73. 분말소재의 영양성분 분석결과

분석항목	분석결과	
	BO	RO
열량(kcal/100g)	363	299
수분(g/100g)	3.67	4.61
회분(g/100g)	19.09	23.63
조단백질(g/100g)	20.02	15.54
탄수화물(g/100g)	57.39	53.87
당류(g/100g)	0.7242	0.7292
조지방(g/100g)	3.82	2.36
포화지방(g/100g)	0.6625	0.5438
트랜스지방(g/100g)	0.0260	0.0177
콜레스테롤(mg/100g)	불검출	불검출
나트륨(g/100g)	2.12	2.10

분석기관 : 다산생명과학원(주)

RO : 20%미강+1%Arg+0.1%RBO1-49, BO : 20%맥강+1%Arg+0.1%BBO1-49

④ 잔류농약 분석(320종)

Ornithine 분말소재에 대하여 320종의 잔류농약 분석을 분석하였다. 그 결과, tricyclazole를 제외한 모든 항목에서 농약이 불검출 되었다(표74).

표 74. 분말소재의의 잔류농약 분석결과

BO	RO
불검출	Tricyclazole 0.023 mg/kg

분석기관 : 다산생명과학원(주)

RO : 20%미강+1%Arg+0.1%RBO1-49, BO : 20%맥강+1%Arg+0.1%BBO1-49

4. Ornithine 소재의 안전성 평가

가. 액상 및 분말소재의 미생물 안전성 평가

(1) 액상소재의 미생물 분석

Ornithine 액상소재에 대하여 일반세균, 대장균균, 대장균, 살모넬라, 황색포도상구균, 바실러스 세레우스, 유산균 등 7항목의 미생물 분석을 하였다(표75).

표 75. Ornithine 액상소재의 미생물 분석

시료명 / 항목	RO 액상	BO 액상
(1) 일반세균 정량(단위:cfu/g)	5.00×10^{4}	6.85×10^{6}
(2) 대장균균 정량(단위:cfu/g)	불검출	불검출
(3) 대장균 정량(단위:cfu/g)	불검출	불검출
(4) 살모넬라 정성	음성	음성
(5) 황색포도상구균 정량(단위:cfu/g)	불검출	불검출
(6) 바실러스 세레우스 정량(단위:cfu/g)	불검출	불검출
(7) 유산균 정량(단위:cfu/g)	1.63×10^{3}	4.98×10^{3}

분석기관 : 다산생명과학원(주)

RO : 20%미강+1%Arg+0.1%RBO1-49, BO : 20%맥강+1%Arg+0.1%BBO1-49

(2) 분말소재의 미생물 분석

Ornithine 분말소재에 대하여 일반세균, 대장균균, 대장균, 살모넬라, 황색포도상구균, 바실러스 세레우스, 유산균 등 7항목의 미생물 분석을 하였다(표76).

표 76. Ornithine 분말소재의 미생물 분석

항목 \ 샘플명	RO 분말	BO 분말
(1) 일반세균 정량(단위:cfu/g)	9.20×10^{6}	5.05×10^{6}
(2) 대장균균 정량(단위:cfu/g)	불검출	불검출
(3) 대장균 정량(단위:cfu/g)	불검출	불검출
(4) 살모넬라 정성	음성	음성
(5) 황색포도상구균 정량(단위:cfu/g)	불검출	불검출
(6) 바실러스 세레우스 정량(단위:cfu/g)	불검출	불검출
(7) 유산균 정량(단위:cfu/g)	2.79×10^{5}	1.51×10^{6}

분석기관 : 다산생명과학원(주)

RO : 20%미강+1%Arg+0.1%RBO1-49, BO : 20%맥강+1%Arg+0.1%BBO1-49

나. 동물실험을 통한 안전성 평가(*in vivo*)

미강, 맥강을 이용한 Ornithine 분말소재에 대한 급성, 아급성 평가결과, 사망한 동물은 없었으며, 몸무게 변화도 일반군과 비슷하게 나타났다. GOT, GPT 측정 결과에서도 미강, 맥강 Ornithine소재가 독성이 없고, 일반군과 비슷하거나 낮게 측정되어 안전성을 확보한 결과를 얻었다(그림83-85).

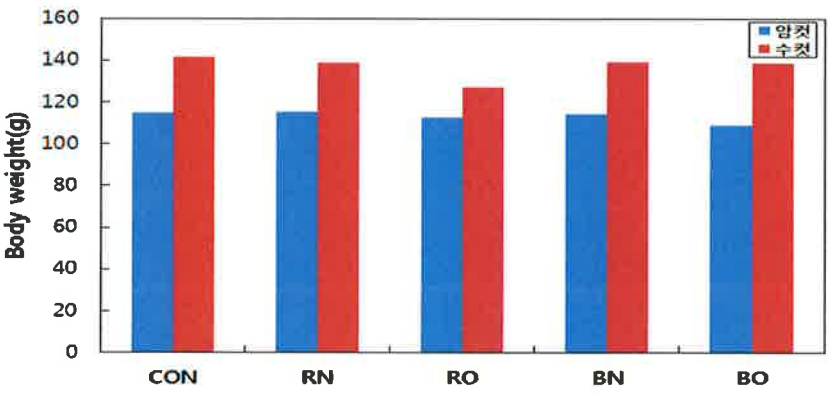


그림 83. 안정성 평가 동물 모델 몸무게 측정.

RN : 20% 맥강 추출물, RO : 20% 미강 추출물 + 1%Arginine + 0.1%RBO1-49

BN : 20% 맥강 추출물, BO : 20% 맥강 추출물 + 1%Arginine + 0.1%BBO1-48

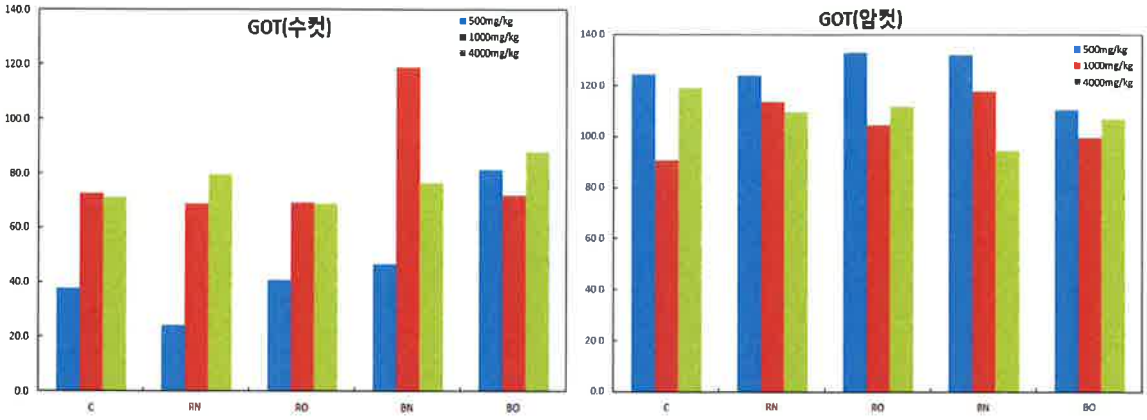


그림 84. 안정성 평가 동물 모델 GOT 측정.

RN : 20% 맥강 추출물, RO : 20% 미강 추출물 + 1%Arginine + 0.1%RBO1-49

BN : 20% 맥강 추출물, BO : 20% 맥강 추출물 + 1%Arginine + 0.1%BBO1-48

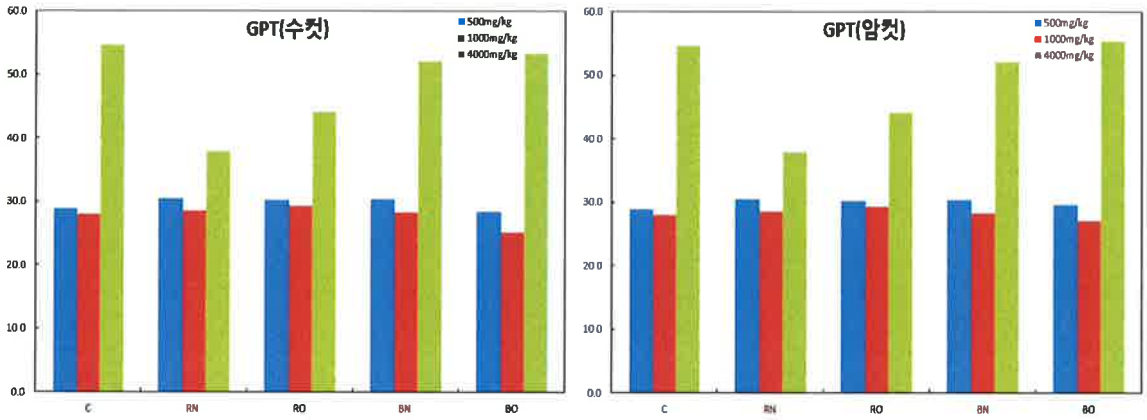


그림 85. 안정성 평가 동물 모델 GTP 측정.

RN : 20% 맥강 추출물, RO : 20% 미강 추출물 + 1%Arginine + 0.1%RBO1-49

BN : 20% 맥강 추출물, BO : 20% 맥강 추출물 + 1%Arginine + 0.1%BBO1-48

5. Ornithine 소재의 항비만 효능효과

가. 비만 세포주를 이용한 항비만 효능 분석(*in vitro*)

(1) 세포독성 실험

(가) 다양한 농도의 미강(RN) 처리 후, 세포성장률은 control에 비해 미강500(RN500) 처리군에서 유의적으로 감소하였다. 이 외에는 대조군에 비해 유의차이를 나타내지 않아 세포에 독성을 나타내지 않았다고 해석할 수 있다(그림86).

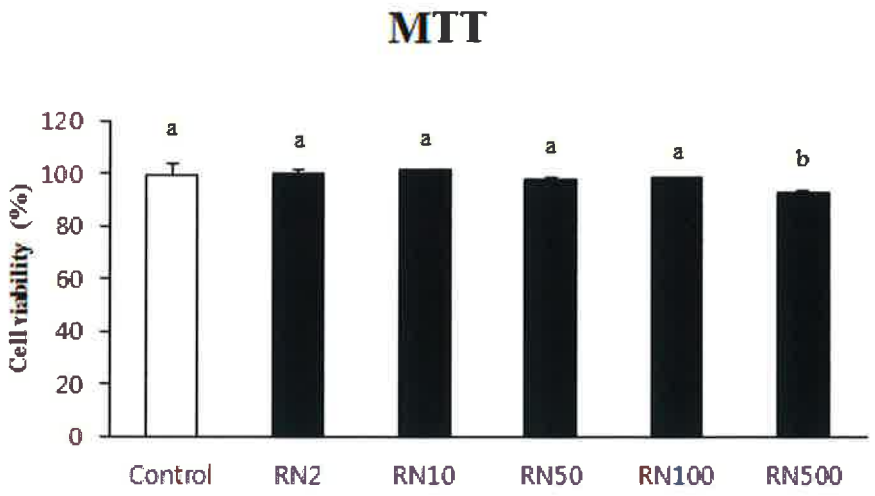


그림 86. 미강 오르니틴 소재 MTT assay.

RN : 20% 맥강 추출물

(나) 다양한 농도의 맥강(BN) 처리 후, 세포성장률은 control에 비해 맥강500처리군, 맥강오르니틴500처리군에서 유의적으로 감소하였다. 이 외에는 대조군에 비해 유의차이를 나타내지 않아 세포에 독성을 나타내지 않았다고 해석할 수 있다(그림87).

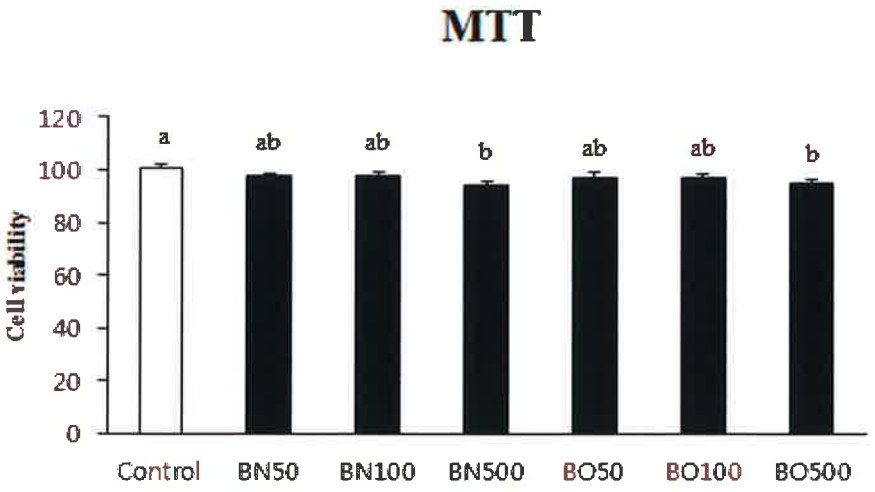


그림 87. 맥강 오르니틴 소재 MTT assay.

BN : 20% 맥강 추출물

(2) 세포 triglyceride 함량의 측정

(가) 미강(RN)과 오르니틴 미강(RO) 처리 시 샘플을 처리하지 않은 대조군에 비해 중성지방이 농도 의존적으로 감소하였다(그림88).

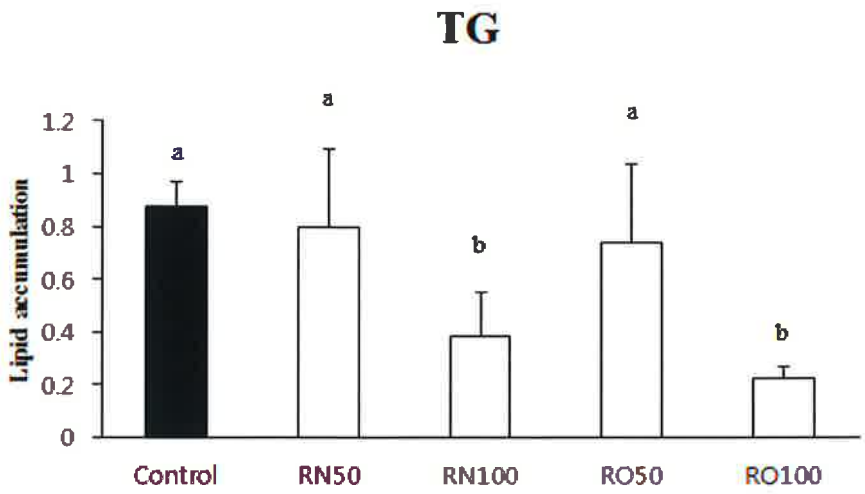


그림 88. 미강 오르니틴 소재 중성지방 평가.

RN : 20% 맥강 추출물, RO : 20% 미강 추출물 + 1%Arginine + 0.1%RBO1-49

(나) 맥강(BN)과 오르니틴 맥강(BO) 처리 시 샘플을 처리하지 않은 대조군에 비해 중성지방이 농도 의존적으로 감소하였다(그림89).

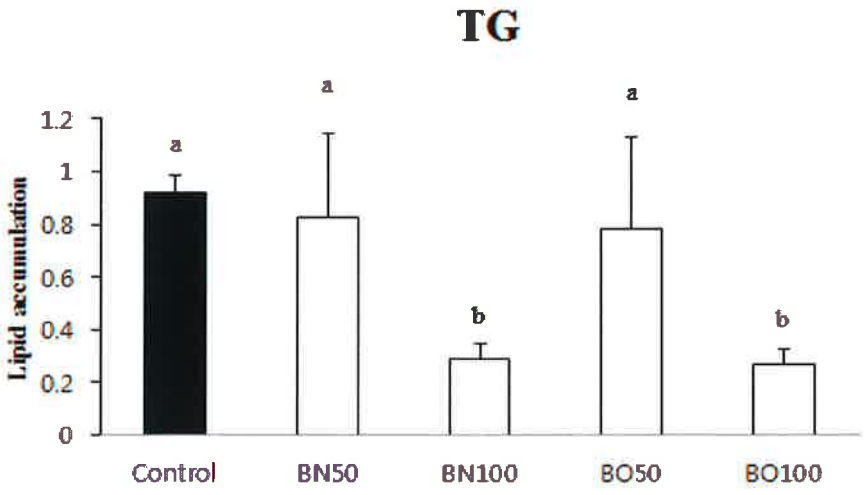


그림 89. 맥강 오르니틴 소재 중성지방 평가.

BN : 20% 맥강 추출물, BO : 20% 맥강 추출물 + 1%Arginine + 0.1%BBO1-48

(3) Real-time PCR

(가) Lipogenesis에 관여하는 PPAR γ (Peroxisome proliferator-activated receptor gamma)의 유전자 발현 결과, 맥강(BN)처리 시 샘플을 처리하지 않은 대조군에 비해 유전자 발현이 유의적으로 감소하였다. 오르니틴 맥강(BO)처리 시 대조군에 비해 유전자 발현이 농도 의존적으로 감소하였다(그림90).

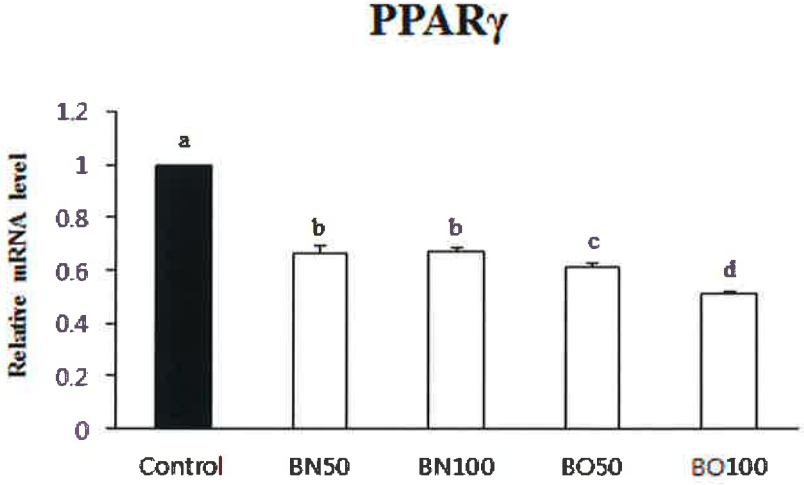


그림 90. 맥강 오르니틴 소재 PPAR γ 평가.

BN : 20% 맥강 추출물, BO : 20% 맥강 추출물 + 1%Arginine + 0.1%BBO1-48

(나) HSL(Hormone-sensitive lipase)의 유전자 발현 결과, 맥강50(BN50)처리 시 샘플을 처리하지 않은 대조군에 비해 유전자 발현이 유의적으로 감소하였다. 오르니틴 맥강30(BO30)처리 시 대조군에 비해 유전자 발현이 유의적이지는 않으나 감소하는 경향을 보였다(그림91).

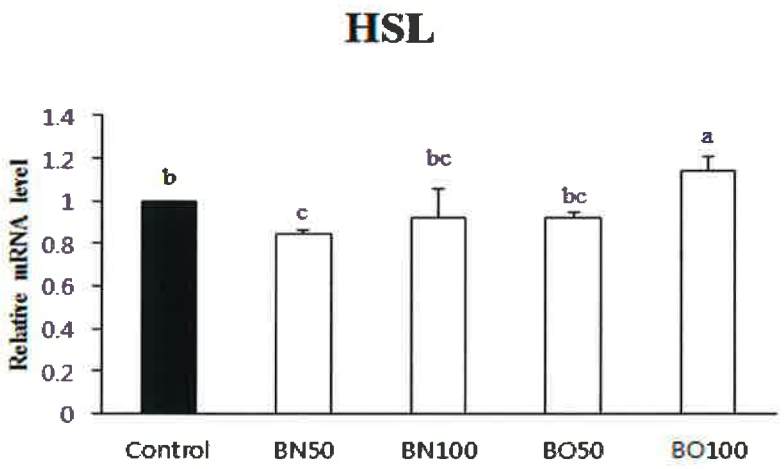


그림 91. 맥강 오르니틴 소재 HSL 평가.

BN : 20% 맥강 추출물, BO : 20% 맥강 추출물 + 1%Arginine + 0.1%BBO1-48

나. 항비만 효능 규명(*in vivo*)

(1) 미강, 맥강 및 오르니틴 첨가 미강, 오르니틴 첨가 맥강

(가) 체중, 식이섭취량, 부고환 지방량, 장기 중량

① 체중증가량은 고지방 식이를 섭취한 모든 군에서 정상대조군(ND)에 비해 유의적으로 증가하였으며, 고지방대조군(HD)에 비해 0.5%미강식이군(RN), 0.5%맥강식이군(BN), 0.5%오르니틴첨가미강식이군(RO), 0.5%오르니틴첨가맥강식이군(BBO)에서 유의적인 차이가 없었다. BN, BO은 RN, RO에 비해 낮은 수준을 보였다.

② 식이섭취량은 모든 군간의 유의적인 차이가 없었다.

③ 부고환 지방량은 고지방 식이를 섭취한 모든 군에서 ND군에 비해 유의적으로 증가하였으며, HD군에 비해 RN, BN, RO, BO군에서 유의적인 차이가 없었다. BN, BO군은 RN, RO군에 비해 낮은 수준을 보였다.

④ 간 무게는 모든 군간의 유의적인 차이가 없었다(표77).

표 77. 실험동물의 체중, 식이섭취량, 부고환 지방량, 장기 중량 비교

Groups	ND (정상대조군)	HD (고지방대조군)	오르니틴 미첨가 식이군		오르니틴 첨가 식이군	
			RN (0.5%미강식이군)	BN (0.5%맥강식이군)	RO (0.5%오르니틴 첨가 미강식이군)	BO (0.5%오르니틴 첨가 맥강식이군)
초기 체중 (g)	19.65±1.30	19.15±1.12	19.86±1.34	19.81±1.44	19.14±1.12	19.8±1.35
최종 체중 (g)	26.44±1.72^{c}	36.69±4.67^{ab}	35.45±5.16^{ab}	33.78±1.53^{b}	38.01±5.64^{a}	37.63±4.00ab
식이 섭취량 (g/day)	2.15±0.21	2.12±0.16	2.15±0.14	2.16±0.13	2.14±0.16	2.17±0.12
부고환 지방 (g)	0.34±0.18	1.84±0.67	1.67±0.76	1.46±0.27	1.86±0.66	1.92±0.46
간 (g)	0.98±0.14	1.06±0.14	0.89±0.18	0.97±0.16	1.07±0.28	1.03±0.25

ND : 정상식이군, HD : 고지방식이군

RN : 20% 맥강 추출물, RO : 20% 미강 추출물 + 1%Arginine + 0.1%RBO1-49

BN : 20% 맥강 추출물, BO : 20% 맥강 추출물 + 1%Arginine + 0.1%BBO1-48

(나) 혈중 및 간 지질농도

① 혈중 중성지방은 정상대조군(ND)에 비해 고지방식이를 섭취한 고지방대조군(HD),

0.5%미강식이군(RN), 0.5%맥강식이군(BN), 0.5%오르니틴첨가미강식이군(RO), 0.5%오르니틴첨가맥강식이군(BO)에서 유의적으로 증가하였으며, 고지방섭취군 간의 유의적인 차이는 없었다. 혈중 총콜레스테롤과 HDL 콜레스테롤은 모든 군 간의 유의적인 차이가 없었다(그림92).

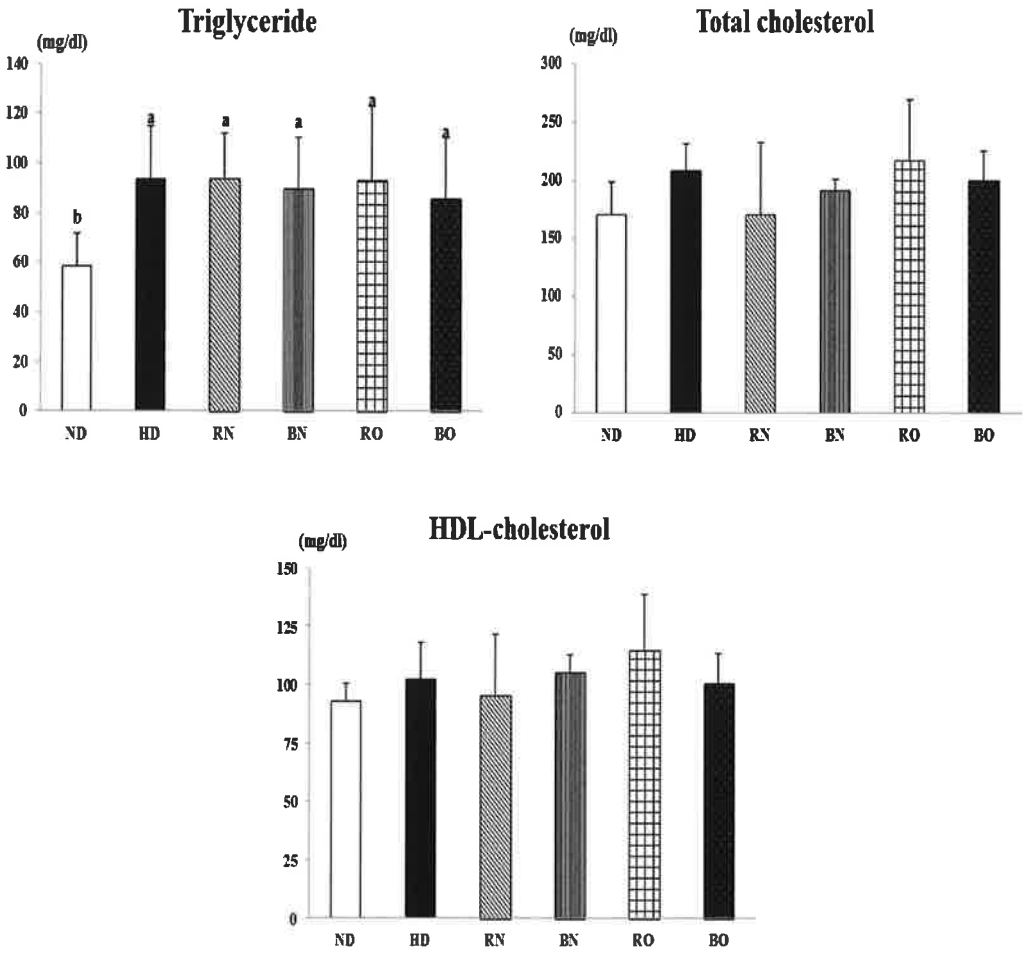


그림 92. 혈중 중성지방 및 총콜레스테롤, HDL 콜레스테롤 농도 비교.

ND : 정상식이군, HD : 고지방식이군

RN : 20% 맥강 추출물, RO : 20% 미강 추출물 + 1%Arginine + 0.1%RBO1-49

BN : 20% 맥강 추출물, BO : 20% 맥강 추출물 + 1%Arginine + 0.1%BBO1-48

② 간 중 중성지방은 모든 군 간의 유의적인 차이가 없었다. 간 중 총콜레스테롤은 정상대조군(ND)에 비해 고지방대조군(HD)에서 유의적으로 증가하였으며, 고지방식이를 섭취한 0.5%미강식이군(RN), 0.5%맥강식이군(BN), 0.5%오르니틴첨가미강식이군(RO), 0.5%오르니틴첨가맥강식이군(BO) 간의 유의적인 차이는 없었다(그림93).

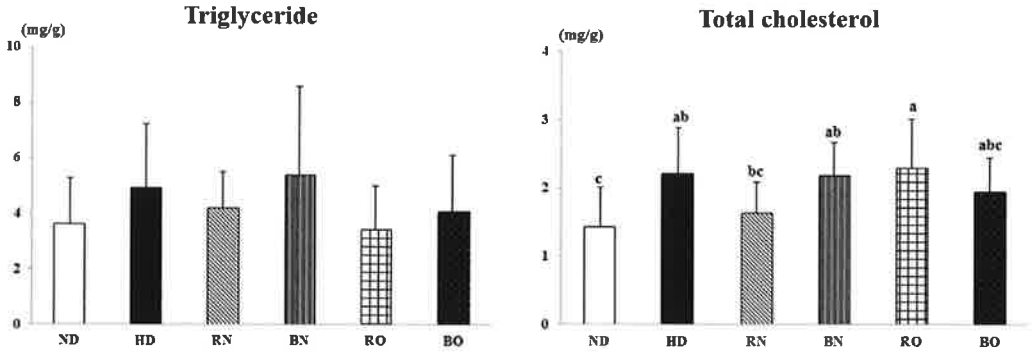


그림 93. 간중 중성지방 및 총콜레스테롤 농도 비교.

ND : 정상식이군, HD : 고지방식이군

RN : 20% 맥강 추출물, RO : 20% 미강 추출물 + 1%Arginine + 0.1%RBO1-49

BN : 20% 맥강 추출물, BO : 20% 맥강 추출물 + 1%Arginine + 0.1%BBO1-48

(다) 공복 혈당

① 실험 13주째 공복 혈당은 정상대조군(ND)에 비해 고지방대조군(HD)에서 유의적으로 증가하였다. 고지방대조군(HD)에 비해 0.5%미강식이군(RN)에서 유의적으로 감소하였다(그림94).

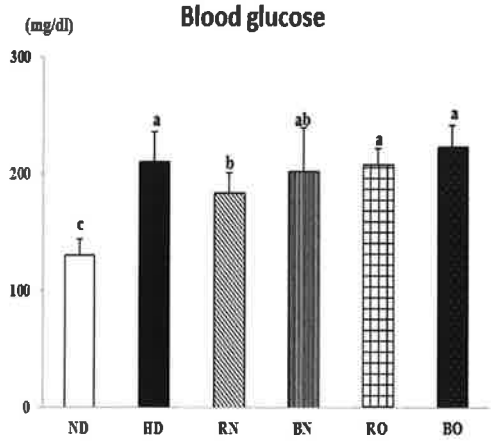


그림 94. 공복 혈당 비교.

ND : 정상식이군, HD : 고지방식이군

RN : 20% 맥강 추출물, RO : 20% 미강 추출물 + 1%Arginine + 0.1%RBO1-49

BN : 20% 맥강 추출물, BO : 20% 맥강 추출물 + 1%Arginine + 0.1%BBO1-48

(라) 혈중 인슐린 및 렙틴 농도

① 혈중 인슐린 농도는 정상대조군(ND)에 비해 고지방대조군(HD)에서 유의적으로 증가하였다. 고지방대조군(HD)에 비해 0.5%맥강식이군(BN)에서 유의적이지는 않으나 감소하는 경향을 보였다.

② 혈중 렙틴 농도는 정상대조군(ND)에 비해 고지방대조군(HD)에서 유의적으로 증가하였다. 혈중 인슐린 농도와 같이 고지방대조군(HD)에 비해 0.5%맥강식이군(BN)에서 유의적이지는 않으나 감소하는 경향을 보였다(그림95).

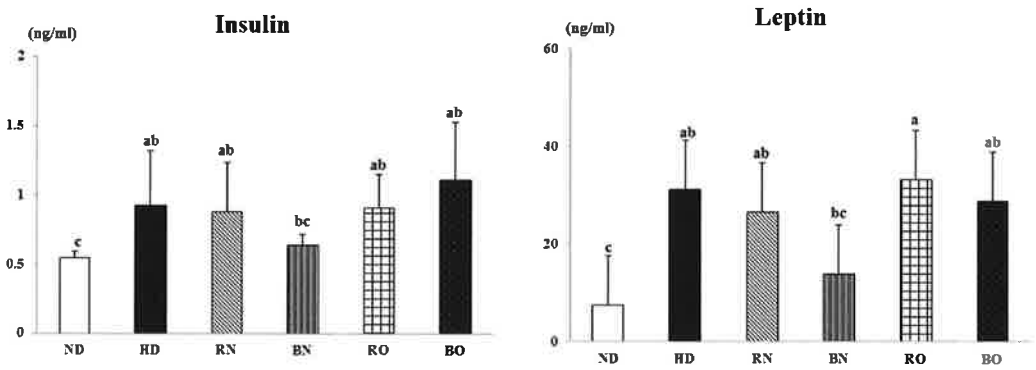


그림 95. 혈중 인슐린 및 렙틴 농도.

ND : 정상식이군, HD : 고지방식이군

RN : 20% 맥강 추출물, RO : 20% 미강 추출물 + 1%Arginine + 0.1%RBO1-49

BN : 20% 맥강 추출물, BO : 20% 맥강 추출물 + 1%Arginine + 0.1%BBO1-48

6. Ornithine 소재 함유 선식개발

가. Ornithine 함유 선식

(1) 선식원료 확립

(가) 곡물: 흑맥, 찰보리, 흑미, 현미, 찰현미, 대두, 율무, 수수, 검정콩

(2) 분말화 공정 확립

Ornithine 함유 선식 제조를 위해서 현미와 찰현미는 그림98과 같은 제조 공정을 확립하였다.

그림 96. 분말화 공정도.

(3) 배합비 확립

(가) Ornithine 함유 선식

Ornithine함유 선식 제조를 위해서 함유량별로 구분하여 control, Ornithine 함유량별 선식 배합비를 확립하였다(표78).

표 78. Ornithine 함유 선식 제조를 위한 배합비

원 료	함유량(%)			
	배합비1	배합비2	배합비3	배합비4
흑맥	61	60.6	60.3	60
귀리	20	20	20	20
현미	15	15	15	15
목이버섯	4	4	4	4
Ornithine	0	0.4	0.7	1

7. Ornithine 소재 함유 선식의 항비만 효능평가

가. 선식 및 오르니틴 첨가 선식

(1) 체중, 식이섭취량, 부고환 지방량, 장기 중량

(가) 체중증가량은 정상대조군(ND)에 비해 고지방대조군(HD)에서 유의적으로 증가하였다. HD군에 비해 50%선식식이군(BNS), 50%오르니틴 함유선식식이군(BOS, 100 mg/100 g)에서 유의적으로 감소하였으며, 정상식이군인 ND보다 유의적으로 감소하였다. BOS군에서 BNS보다 낮은 수준을 보였다.

(나) 식이섭취량은 모든 군간의 유의적인 차이가 없었다.

(다) 부고환 지방량은 ND군에 비해 HD군에서 유의적으로 증가하였다. HD군에 비해 BNS, BOS군에서 유의적으로 감소하였으며, 정상대조군인 ND보다 유의적으로 감소하였다. BOS군에서 BNS보다 낮은 수준을 보였다.

(라) 간 무게는 모든 군간의 유의적인 차이가 없었다.

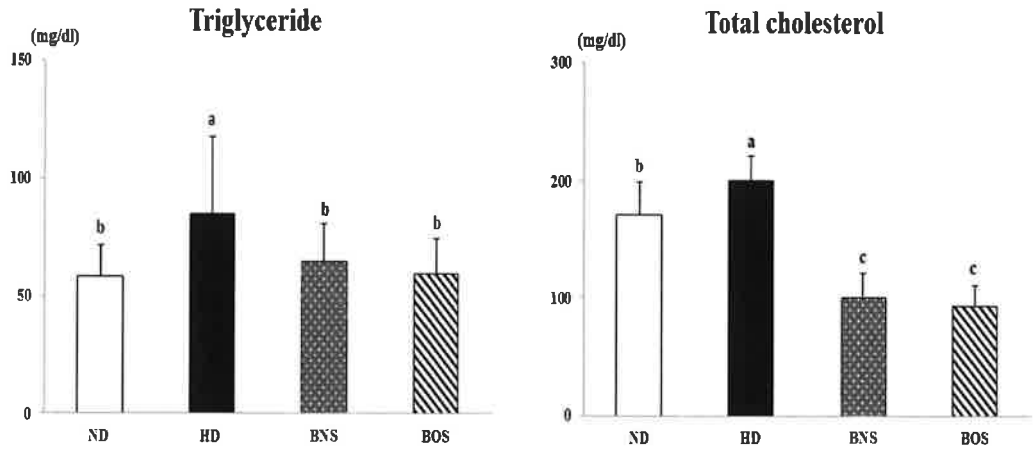
표 79. 실험동물의 체중, 식이섭취량, 장기 중량 및 지방량 비교

Groups	정상대조군 (ND)	고지방 대조군 (HD)	선식 식이군	
			50% 선식 식이군 (BNS)	50% 오르니틴 첨가 선식식이군 (BOS)
초기 체중 (g)	19.65±1.30	19.98±1.40	19.57±1.12	20.24±1.21
최종 체중 (g)	26.44±1.72[b]	33.35±2.62[a]	24.04±1.37[c]	23.02±1.32[c]
식이 섭취량 (g/day)	2.15±0.21	2.09±0.19	2.18±0.11	2.18±0.11
부고환 지방 (g)	0.34±0.18	1.26±0.57	0.32±0.20	0.22±0.11
간 (g)	0.975±0.14	1.01±0.20	0.93±0.20	0.89±0.19

ND : 정상식이군, HD : 고지방식이군, BNS : 선식, BOS : 오르니틴 선식

(2) 혈중 및 간 지질농도

(가) 혈중 중성지방은 정상대조군(ND)에 비해 고지방대조군(HD)에서 유의적으로 증가하였으며, HD군에 비해 50%선식식이군(BNS), 50%오르니틴함유선식식이군(BOS)에서 유의적으로 감소하였다. BOS군에서 BNS보다 낮은 수준을 보였다. 혈중 총콜레스테롤도 중성지방과 비슷한 양상을 보였는데, 정상대조군(ND)에 비해 고지방대조군(HD)에서 유의적으로 증가하였으며, HD군에 비해 50%선식식이군(BNS), 50%오르니틴함유선식식이군(BOS)에서 유의적으로 감소하였다. BOS군에서 BNS보다 낮은 수준을 보였다. 혈중 HDL콜레스테롤도 정상대조군(ND)에 비해 고지방대조군(HD)에서 유의적으로 증가하였으며, HD군에 비해 50%선식식이군(BNS), 50%오르니틴함유선식식이군(BOS)에서 유의적으로 감소하였다(그림97).



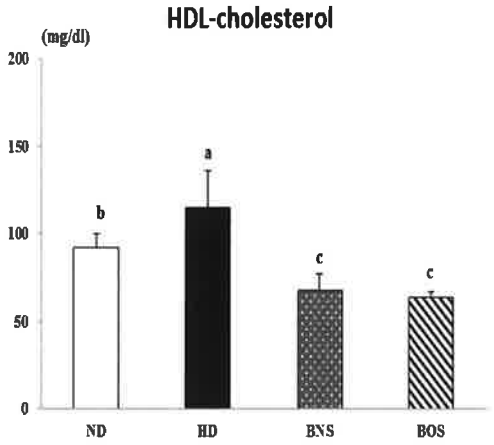


그림 97. 혈중 중성지방 및 총콜레스테롤, HDL콜레스테롤 농도 비교.

ND : 정상식이군, HD : 고지방식이군, BNS : 선식, BOS : 오르니틴 선식

(나) 간 중 중성지방과 총콜레스테롤은 유의적인 차이를 나타내지 않았다(그림98)

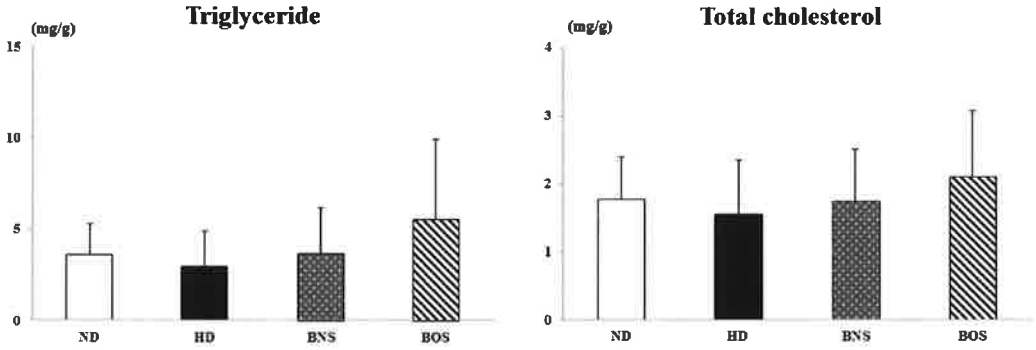


그림 98. 간중 중성지방 및 총콜레스테롤 농도 비교.

ND : 정상식이군, HD : 고지방식이군, BNS : 선식, BOS : 오르니틴 선식

(3) 공복 혈당

(가) 선식 및 오르니틴 함유 선식

① 실험 13주째 공복 혈당은 정상대조군(ND)에 비해 고지방대조군(HD)에서 유의적으로 증가하였다. 고지방대조군(HD)에 비해 50%선식식이군(BNS), 50%오르니틴함유 선식식이군(BOS)에서 유의적으로 감소하였다(그림99).

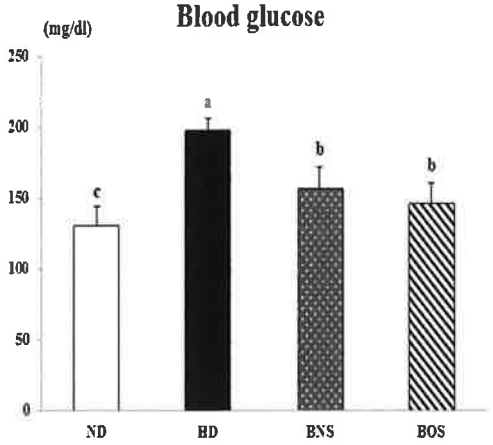


그림 99. 맥강 오르니틴 소재를 이용한 선식의 공복 혈당.

ND : 정상식이군, HD : 고지방식이군, BNS : 선식, BOS : 오르니틴 선식

(4) 혈중 인슐린 및 렙틴 농도

(가) 혈중 인슐린 농도는 정상대조군(ND)에 비해 고지방대조군(HD)에서 유의적으로 증가하였다. 고지방대조군(HD)에 비해 50%선식식이군(BNS), 50%오르니틴함유선식식이군(BOS)에서 유의적으로 감소하였다.

(나) 혈중 렙틴 농도는 정상대조군(ND)에 비해 고지방대조군(HD)에서 유의적으로 증가하였다. 고지방대조군(HD)에 비해 50%선식식이군(BNS), 50%오르니틴함유선식식이군(BOS)에서 정상대조군과 비슷한 수준으로 감소하는 경향을 보였다(그림100).

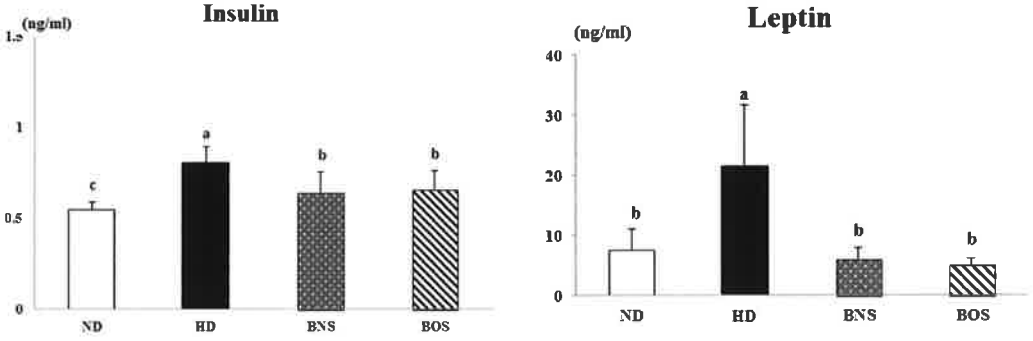


그림 100. 혈중 인슐린 및 렙틴 농도.

ND : 정상식이군, HD : 고지방식이군, BNS : 선식, BOS : 오르니틴 선식

8. Ornithine 소재 함유 선식의 품질평가

가. 9대 영양소 분석

Ornithine 함유 선식(100 mg/100 g)의 9대 영양소를 분석하였다(표80).

표 80. Ornithine 함유 선식의 9대 영양소 분석결과

검사항목	선식
열량(kcal/100g)	415
수분(g/100g)	0.03
회분(g/100g)	1.73
조단백질(g/100g)	13.20
탄수화물(g/100g)	81.18
당류(g/100g)	0.4424
조지방(g/100g)	3.86
포화지방(g/100g)	0.9078
트랜스지방(g/100g)	0.0058
콜레스테롤(mg/100g)	불검출
나트륨(mg/100g)	20.8878

분석기관 : 다산생명과학원(주)

나. 관능검사

(1) 실험방법

Ornithine 함유하지 않은 N 선식과, Ornithine 함유 선식(100 mg/100 g)에 대한 관능평가를 한국식품정보원에 의뢰하여 수행하였다. 관능검사에 사용된 기호도 검사 방법은 7점 척도법으로, 1점 '대단히 싫다', 2점 '싫다', 3점 '약간 싫다', 4점 '보통이다', 5점 '약간 좋다', 6점 '좋다', 7점 '대단히 좋다' 의 평가 항목으로 진행하였다. 기호도의 평가 속성은 제품의 '색상', '이물감', '고소한 맛', '전체적인 평가' 로 검사하였다. 정도는 1점 '대단히 약하다', 2점 '약하다', 3점 '약간 약하다', 4점 '보통이다', 5점 '약간 강하다', 6점 '강하다', 7점 '대단히 강하다' 의 평가 항목으로 진행하였으며, 평가속성은 '색상', '이물감', '고소한 맛' 에 대하여 평가하였다. 관능검사를 진행하기에 앞서, 대조군과 실험군의 농도설정을 위하여 그림101과 같이 가루선식과 물의 비율을 실험하여, 최적 비율을 선식3 : 물7의 비율로 설정하였다. 선식은 그림102와 같이

20g씩 소분하여 제공하였다.

그림 101. 가루선식 농도설정.

* 가루선식 농도설정

#1 : 205번(가루선식5 : 물5), #2 : 205번(가루선식4 : 물6), #3 : 205번(가루선식3: 물7),
#4 : 205번(가루선식2 : 물8), #5 : 448번(가루선식5: 물5), #6 : 448번(가루선식 4: 물6).
#7 : 448번(가루선식3 : 물7), #8 : 448번(가루선식2 : 물8)

그림 102. 선식 소분(20g).

그림 103 관능검사용 시료 제공.

두 시료는 그림103과 같이 제공하였다. 관능검사 결과는 PASWStatistics18 program을 이용하여 평균과 표준편차를 구하고, 각 샘플간의 유의성은 독립표본 T-test로 유의성을 검증하였다 ($p<0.05$).

(2) 결과 및 해석

(가) 선식의 정도 검사 결과

Ornithine을 함유하지 않은 N 선식(BNS)과, 1% Ornithine 함유 선식(BOS)을 7점 척도법으로 검사한 기호도 결과는 그림104와 같다. 두 제품의 각 속성별 정도는 Ornithine 함유하지 않은 N 선식(BNS) 제품의 경우 색상과 이물감은 1% Ornithine 함유 선식(BOS) 제품보다 약간 높게 나타났으며, 고소한 맛은 두 제품이 비슷하게 나타났다.

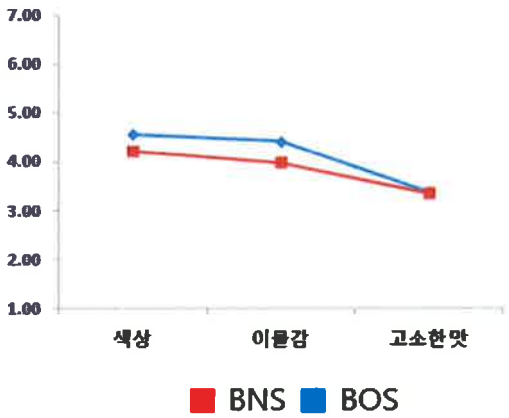


그림 104. 선식의 속성별 정도 결과.

BNS : 선식, BOS : 오르니틴 선식

(나) 선식의 기호도 검사 결과

Ornithine을 함유하지 않은 N 선식(BNS)과, Ornithine 함유 선식(BOS)을 7점 척도법으로 검사한 기호도 결과는 그림105와 같다. 두 제품 모두 전체적인 평가, 색상, 이물감, 고소한 맛에서 두 제품의 기호도 점수간 차이가 없는 것으로 나타났다.

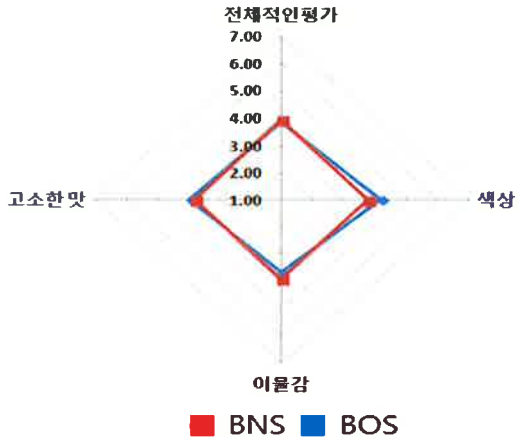


그림 105. 선식의 속성별 기호도 검사 결과.

BNS : 선식, BOS : 오르니틴 선식

(다) 선식의 관능검사 유의차 검증 결과

표83은 Ornithine을 함유하지 않은 N 선식(BNS)과 Ornithine 함유 선식(BOS)의 유의차 검증을 나타낸 결과이다. 두 제품의 유의차 검증은 PASW Statistics18 program을 이용하여 독립표본 T-test를 실시하였으며, 모든 속성은 95%의 신뢰수준($p<0.05$)으로 검증하였다. 유의적 확률(p)이 0.05 이하이면 두 제품간 유의적 차이가 없다는 것으로, '제품간 차이가 없다' 로 판단할 수 있다. 색상의 정도에서는 BNS, BOS 제품이 4.57점, 4.23점으로 보통(4.0점) 이상을 나타내었으며, 유의적 확률은 0.02 ($p<0.05$)로 두 제품간 유의적 차이가 있는 것으로 나타났다. 기호도에서는 BNS 제품이 4.17점으로 '보통정도' 로 나타났으며, BOS 제품은 3.77점으로 '약간 약하다' 로 나타났다. 정도의 유의적 확률은 0.04 ($p<0.05$)로 두 제품간 유의적 차이가 있는 것으로 나타났다. 이물감의 정도에서는 BNS, BOS 제품이 4.43점, 4.00점으로 '보통이다' 로 나타났으며, 유의적 확률은 0.00 ($p<0.05$)로 나타나 두 제품간 유의적 차이가 있는 것으로 나타났다. 기호도에서는 BNS, BOS 제품이 3.67점, 3.93점으로 보통(4.0점) 이하를 나타내었으며, 유의적 확률은 0.04 ($p<0.05$)로 두 제품간 유의적 차이가 있는 것으로 나타났다. 고소한 맛의 정도에서는 BNS, BOS 제품이 3.40점, 3.37점으로 '약간 약하다' 로 나타났으며, 유의적 확률은 0.90 ($p>0.05$)로 나타나 두 제품간 유의적 차이가 없는 것으로 나타났다. 기호도에서는 BNS, BOS 제품이 3.93점, 3.77점으로 보통(4.0점) 이하로 나타났으며, 유의적 확률은 0.50 ($p>0.05$)로 두 제품간 유의적 차

이가 없는 것으로 나타났다. 전체적인 평가는 BNS(Ornithine 함유하지 않은 N 선식)이 3.87점, BOS(Ornithine 함유 선식)이 3.93점으로 보통(4.0점) 이하로 나타났으며, 두 제품간 유의적 확률은 0.70 ($p>0.05$)로 유의적 차이가 없는 것으로 나타났다.

표 81. 선식 기존제품과 기능성물질 첨가제품의 관능검사 유의차 검증

특 성		시료명		유의적 확률[1)]
		BNS	BOS	
정도	색상	4.57±0.90	4.23±1.01	0.02
	이물감	4.43±1.04	4.00±1.08	0.00
	고소한 맛	3.40±1.35	3.37±1.25	0.90
기호도	색상	4.17±1.34	3.77±1.10	0.04
	이물감	3.67±1.06	3.93±1.01	0.04
	고소한 맛	3.93±1.11	3.77±1.33	0.50
전체적인 평가		3.87±1.01	3.93±1.28	0.70

BNS : 선식, BOS : 오르니틴 선식

[1)]유의적확률 : 확률값 p가 0.05보다 작을 때 유의적 차이가 있음.

◉ PASWStatistics18 program을 이용하여 독립표본 T-test를 실시하였으며, 신뢰수준 95%로 나타냄. ($p<0.05$)

(라) 결과

선식의 소비자 관능검사로, Ornithine 함유하지 않은 N 선식을 대조군으로, Ornithine 함유 선식을 실험군으로 하여 속성별 정도의 차이를 알아보고 정도의 차이에 의해서 기호도에 영향을 주는지 알아보기 위하여 실시하였다. 두 가지 선식 제품의 속성별 정도를 알아본 결과 색상과 이물감에서 유의적 차이가 있는 것으로 나타났으며 기호도에서도 유의적 차이가 있는 것으로 나타났다. 하지만, 고소한 맛의 정도에서는 두 제품간 유의적 차이를 나타내지 않았으며, 기호도에서도 유의적 차이를 나타내지 않았다. 색상과 이물감에서 정도와 기호도에서 차이를 나타내었지만, 전체적인 평가에서 두 제품간 유의적 차이는 나타나지 않았다. 이러한 결과로 미루어보아, 색상과 이물감은 제품의 전체적 평가에 영향을 주지 않는 것으로 판단된다.

다. 시제품의 관능평가에 대한 기기분석

(1) 선식의 기기분석

(가) 선식의 입도 분석

전문패널에 의한 선식제품의 관능평가 결과, BOS는 BNS와 비교하여 이물감에서 더 약한 정도(4.00±1.08)와 기호도(3.93±1.10)를 나타내었다. 두 가지 시료의 입도를 분석한 결과, BOS의 평균 입도는 76.4 μm이었고, 정규분포를 따랐다(그림106). 그러나 BNS의 입도는 평균 84.96 μm으로 시제품보다 컸으며, 그림107에서 보듯이 정규분포를 따르지 않아 이물감에서 BOS보다 더 강한 정도(4.43±1.04)와 더 낮은 기호도(3.67±1.06)를 나타낸 것으로 판단된다.

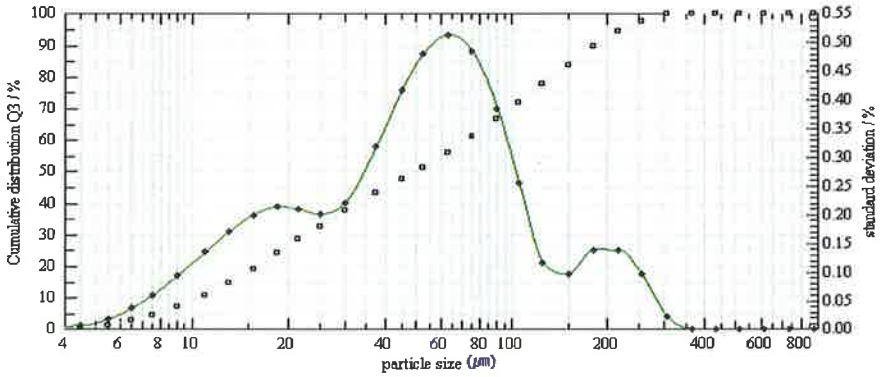


그림 106. BOS의 입도분석 그래프.

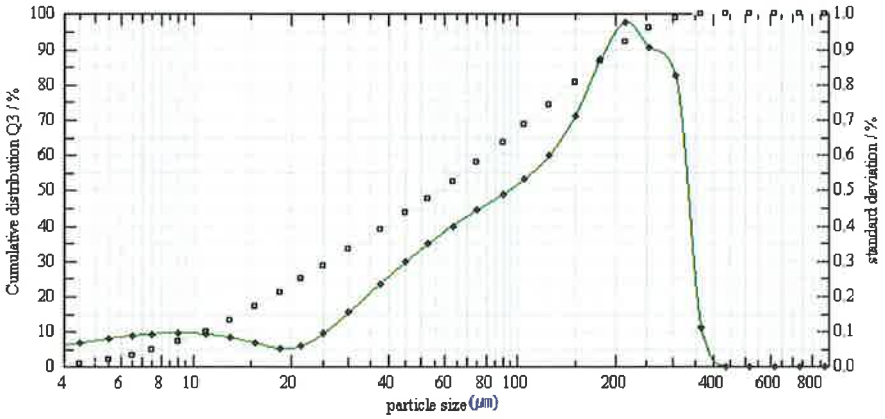


그림 107. BOS의 입도분석 그래프.

(나) 선식의 색도 분석

전문패널에 의한 선식제품의 관능평가 결과, BOS는 BNS와 비교하여 색상에서 더 약한 정도(4.23±1.01)와 더 낮은 기호도(3.93±1.10)를 나타내었다. 두 가지 시료의 색도를 분석한 결과, 표82에서 보듯이 BOS는 BNS와 비교하여 더 밝았고(L value=75.94), 적색도(a value=2.42)와 황색도(b value=12.56)는 낮았다. 따라서, 소비자들은 적색도와 황색도가 높고, 강한 색상의 선식을 선호하는 것으로 판단된다.

표 82. 선식 시제품과 대조구의 색도 분석결과

구분		BNS	BOS
색도	L value	73.91	75.94
	a value	3.08	2.42
	b value	14.37	12.56

BNS : 선식, BOS : 오르니틴 선식

라. 유통기한 설정

(1) 선식

(가) 실험방법

① 검체의 채취 및 취급방법

유통기한 설정은 한국식품정보원에 의뢰하여 수행하였다. 본 실험에 사용된 제품은 Ornithine 함유 선식(100 mg/100 g)이며, 제품을 15℃, 25℃, 35℃ 인큐베이터에 90일간 저장시키면서 실험주기는 저장기간 중 6회 이상이 되도록 15일 간격으로 실험을 수행하였다

표. 83. 품질지표 및 실험방법

품질지표		실험방법
미생물	일반세균	식품공전 제Ⅱ권 제 9. 일반시험법 3. 미생물시험법 3.5 세균수
	대장균군	식품공전 제Ⅱ권 제 9. 일반시험법 3. 미생물시험법 3.8 대장균군
	살모넬라	식품공전 제Ⅱ권 제 9. 일반시험법 3. 미생물시험법 3.11 살모넬라
	황색포도상구균	식품공전 제Ⅱ권 제 9. 일반시험법 3. 미생물시험법 3.12 황색포도상구균
	바실러스 세레우스	식품공전 제 Ⅱ권 제 9. 일반시험법 3. 미생물시험법 3.18 바실러스 세레우스
관능	종합기호도검사	식품의 유통기한 설정 실험 가이드라인 Ⅳ. 유통기한설정을 위한 관능검사 가이드라인 표 6. 기준차이 검사법

표 84. 실험조건

구분	실험방법
저장온도	15℃, 25℃, 35℃
저장기간	90일
실험주기	15일, 6회
실험반복수	3회

표 85. 품질한계

품질지표	품질한계	근거
일반세균	10^5 CFU/g 이하	식품공전 제 I 권 제 5. 식품별 기준 및 규격29. 기타 식품류 29-18 즉석섭취·편의식품류 5) 규격 (2) 세균수 : 1 g 당 100,000 이하(즉석조리 식품에 해당하며, 발효제품, 발효제품 첨가, 또는 유산균 첨가제품은 제외한다)
대장균군	음성	식품공전 제 I 권 제 5. 식품별 기준 및 규격 29. 기타 식품류 29-18 즉석섭취·편의식품류 5) 규격 (1) 대장균 : 1 g 당 10 이하(신선편의식품에 한하며 즉석섭취식품은 음성이어야 한다)
살모넬라	음성	식품공전 제 I 권 제 5. 식품별 기준 및 규격 29. 기타 식품류 29-18 즉석섭취·편의식품류 5) 규격 (4) 살모넬라 : n=5, c=0, m=0/25 g
황색포도상구균	10^2 CFU/g 이하	식품공전 제 I 권 제 5. 식품별 기준 및 규격 29. 기타 식품류 29-18 즉석섭취·편의식품류 5) 규격 (3) 황색포도상구균 : 1 g 당 100 이하
바실러스세레우스	10^3 CFU/g 이하	식품공전 제 I 권 제 5. 식품별 기준 및 규격 29. 기타 식품류 29-18 즉석섭취·편의식품류 5) 규격 (6) 바실러스 세레우스 : 1 g 당 1,000 이하 (즉석섭취식품, 신선편의식품에 한한다)
관능 (기호도척도법)	3점 이상 (5점 만점)	식품공전 제 II 권 9. 일반시험법 9.1 성상(관능검사) 채점한 결과가 평균 3점 이상이고 1점 항목이 없어야 한다.

(나) 실험결과

① 각 품질지표의 함량 변화 분석

표 86. 일반세균 품질변화

저장기간(일)	15℃	25℃	35℃
0	2.50×10^1		
15	2.70×10^2	2.50×10^2	1.50×10^2
30	1.20×10^2	5.10×10^2	7.50×10^2
45	1.10×10^2	5.00×10^1	3.00×10^2
60	1.20×10^2	3.50×10^1	1.00×10^2
75	1.45×10^2	8.00×10^1	7.50×10^1
90	1.20×10^2	1.75×10^2	3.20×10^2

표 87. 대장균 품질변화

저장기간(일)	15℃	25℃	35℃
0	음성		
15	음성	음성	음성
30	음성	음성	음성
45	음성	음성	음성
60	음성	음성	음성
75	음성	음성	음성
90	음성	음성	음성

표 88. 살모넬라 품질변화

저장기간(일)	15℃	25℃	35℃
0	음성		
15	음성	음성	음성
30	음성	음성	음성
45	음성	음성	음성
60	음성	음성	음성
75	음성	음성	음성
90	음성	음성	음성

표 89. 황색포도상구균 품질변화

저장기간(일)	15℃	25℃	35℃
0	불검출		
15	불검출	불검출	불검출
30	불검출	불검출	불검출
45	불검출	불검출	불검출
60	불검출	불검출	불검출
75	불검출	불검출	불검출
90	불검출	불검출	불검출

표 90. 바실러스 세레우스 품질변화

저장기간(일)	15℃	25℃	35℃
0	불검출		
15	불검출	불검출	불검출
30	불검출	불검출	불검출
45	불검출	불검출	불검출
60	불검출	불검출	불검출
75	불검출	불검출	불검출
90	불검출	불검출	불검출

표 91. 관능검사 품질변화

저장기간(일)	15℃	25℃	35℃
0	5.00		
15	5.00	5.00	5.00
30	4.97	5.00	4.80
45	5.00	4.93	4.10
60	4.77	4.30	3.40
75	4.53	3.30	2.80
90	4.27	2.90	2.60

② 품질지표별 반응속도상수(K)의 산출

식품의 품질변화에 대한 화학반응식은 시간과 속도 상수로서 표현되는 다음 식을 기초로 한다. 유통기한실험에서 얻은 결과는 저장기간에 따른 변화로서 이 결과로 품질손상의 반응속도(K)를 얻게 된다.

표 92. 일반세균 반응속도 상수

반응차수	온도(℃)	Slope(K)	Intercept(AO)	R^2
0	15	0.0833	126.2500	0.0014
	25	-0.8690	199.8214	0.0260
	35	0.2024	236.6071	0.0007
1	15	0.0082	4.3229	0.1381
	25	0.0021	4.4756	0.0038
	35	0.0101	4.5799	0.0859

표 93. 관능검사 반응속도 상수

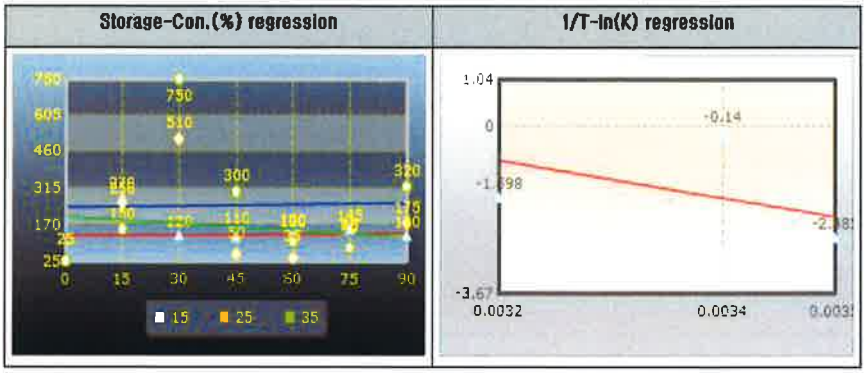
반응차수	온도(℃)	Slope(K)	Intercept(AO)	R^2
0	15	-0.0079	5.1476	0.7876
	25	-0.0248	5.4619	0.8022
	35	-0.0310	5.3500	0.9435
1그림	15	-0.0017	1.6414	0.7803
	25	-0.0062	1.7291	0.7842
	35	-0.0083	1.7153	0.9327

③ 품질지표별 활성화에너지와 반응식 차트

활성화에너지란 물질이 반응을 일으키는데 필요한 최소한의 에너지로서 아레니우스반응식으로부터 구한 K의 자연로그값(Ln값)인 LnK를 Y축으로 1/T를 X축으로하여 선형회귀분석한 후 얻은 직선의 기울기로부터 선정한 품질지표의 Ea(활성화에너지)를 구한다(데이터는 최소 3개의 가속온도로부터 구한 값이 요구된다).

1) 반응차수 0차 결과

Slope(K)	Intercept(A0)	R^2	Ea
-4122.43	12.44	0.1542	-8191.27



2) 반응차수 1차 결과

Slope(K)	Intercept(A0)	R^2	Ea
-759.59	-2.64	0.0100	-1509.30

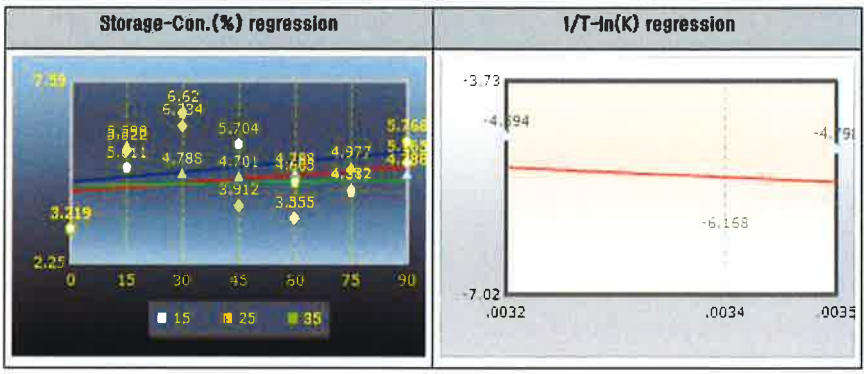
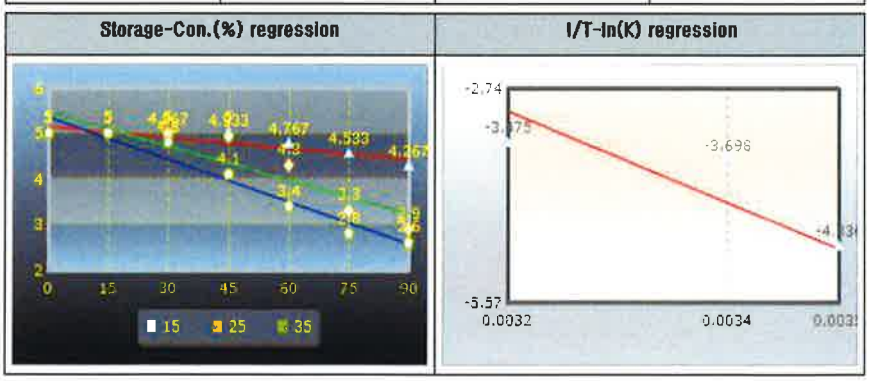


그림 108. 일반세균 활성에너지와 반응식 차트.

1) 반응차수 0차 결과

Slope(K)	Intercept(A0)	R^2	Ea
-6079.30	16.41	0.8819	-12079.57



2) 반응차수 1차 결과

Slope(K)	Intercept(A0)	R^2	Ea
-7062.25	18.30	0.8909	-14032.69

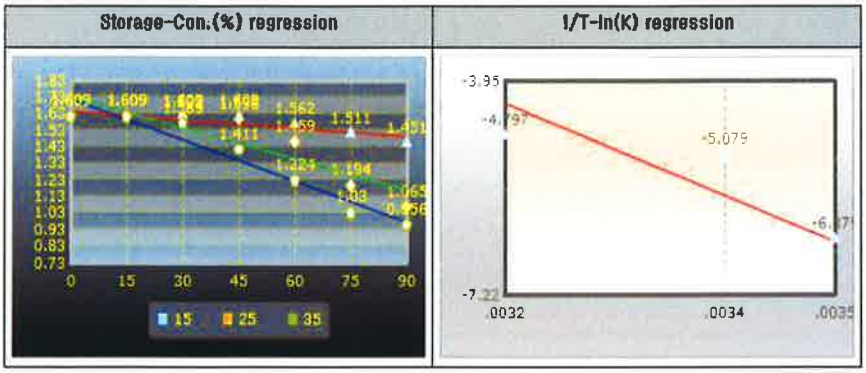


그림 109. 관능검사 활성화에너지와 반응식 차트.

④ 품질지표별 유통기한 산출

품질지표별 품질한계 규격값을 기준으로 한계값에 이르기 바로 직전 실험일을 한계일로 정하고, 여러 가지 품질지표 중에서 가장 먼저 한계일에 도달한 품질지표를 그 제품의 유통기한 기준으로 설정하였다.

표 94. 일반세균 유통기한 산출

차수	최초함량-품질규격	연간변화속도상수	유통기한(일)	유통기한(개월)
0	-99975.0000	90.26	404304.16	13291.90
1	-8.2940	2.04	1481.02	48.69

표 95. 관능검사 유통기한 산출

차수	최초함량-품질규격	연간변화속도상수	유통기한(일)	유통기한(개월)
0	2.0000	6.77	107.90	3.55
1	0.5108	1.65	113.14	3.72

(다) 결론

선식의 품질을 객관적으로 평가하기 위해 품질지표로 일반세균, 대장균, 살모넬라, 황색포도상구균, 바실러스 세레우스, 관능검사를설정하고 저장온도(15℃, 25℃, 35℃) 및 기간(90일, 6회)에 따라 관찰하였다. 그 결과, 일반세균은 저장기간 동안 2.5×10^1 ~ 7.5×10^2 CFU/g 수준으로 검출되었으며, 대장균, 살모넬라, 황색포

도상구균, 바실러스 세레우스는 검출되지 않았다. 품질지표 중에서 결정계수가 가장 높은 관능검사 0차 반응식을 근거로 상온에서 유통되는 선식의 유통기한은 3.55개월로 산출되었다. 여기에 유통과정 중의 안전을 고려하고자 안전계수 0.8을 곱하여 제품의 최종 유통기한은 2개월로 설정하였다.

(라) 참고자료

① 식품의약품안전처: 식품, 식품첨가물 및 건강기능식품의유통기한설정기준 (제2014-174호, 2014. 11)

② 식품의약품안전처:식품 및 축산물의 유통기한 설정 실험가이드라인(2013.12)

9. 선식제품의 네이밍 및 패키지 디자인 개발

가. 개발제품의 네이밍 개발

(1) 선식제품의 네이밍 개발

선식제품은 '천천히 즐기는 식사 '를 의미하는 ' 슬로우밀(Slow Meal) '로 네이밍 되었다.

나. 개발제품의 패키지디자인 개발

(1) 선식제품의 패키지디자인 개발

선식제품의 패키지디자인을 표96과 같이 개발하였다. 소비자에게 신선함과 따뜻함을 전달하기 위해 녹색과 노랑색을 사용하였고, 1회제공량을 위한 스틱포장과 內박스 및 外박스의 패키지 디자인을 개발하였다.

표 96. 선식제품의 패키지디자인 및 샘플

구분	패키지디자인
스틱포장	 150*100(mm)

內박스	90*50*150(mm)
外박스	253*93*153(mm)
샘플	

제3절 소비자 기호도 분석

1. 시식행사

가. 기호도 조사서

1. 귀하의 성별은 어떻습니까?
① 남　② 여

2. 귀하의 나이는 어떻게 됩니까?
① 10대　② 20대　③ 30대　④ 40대　⑤ 50대　⑥ 60대　⑦70대 이상

3. 프리미엄 통곡물 수제쿠키가 귀하의 입맛에 맞는지를 해당 점수에 ∨로 표시해 주세요.

1점: 싫다 , 3점: 보통이다 , 5점: 좋다

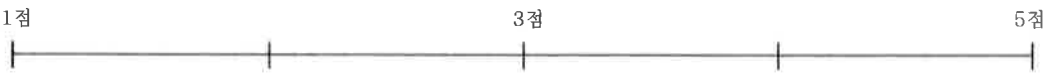
3-1. 색: 겉에서 관찰 했을 때 느끼는 정도

3-2. 향: 향을 맡았을 때 나는 정도

3-3. 맛: 시식 하였을 때 느끼는 맛의 정도

3-4. 식감: 시식 하였을 때 느끼는 식감의 정도

3-5. 전반적기호도



3-6. 맛에 대한 귀하의 의견이 있으시면 기록해 주세요.

_____

_____

※ 작성해 주셔서 감사합니다.

나. 시식행사 사진

그림 110. 고창 청보리밭축제 시식행사 현장모습.

그림 111. 부산 국제식품대전 시식행사 현장모습.

(1) 기호도 조사에 참여한 인원은 총 200명으로 남성 74명(37%), 여성 126명(63%)이었고, 연령대는 10대 13%, 20대 33%, 30대 14.5%, 40대 14%, 50대 15%, 60대 7%, 70대 이상이 3.5%로 분포하였다.

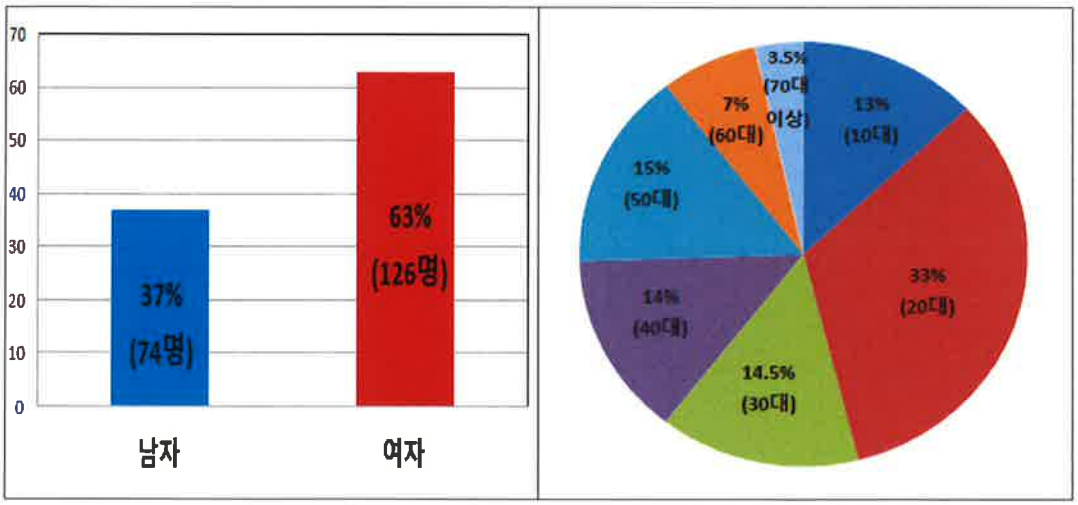


그림 112. 기호도 조사에 참여한 참가자의 성별 및 연령대 분포.

(2) 쿠키에 대한 일반인의 기호도 평가 결과 "고소하고 담백하다", "달콤하고 맛있다", "고소한 향과 맛이 좋다" 등 전체적으로 맛있다는 평가를 받았다. 그러나 일부 소비자들은 "텁텁하다", "쿠키만 먹기에는 입안이 빡빡하다", "신맛이 난다" 등 의 지적도 하였다.

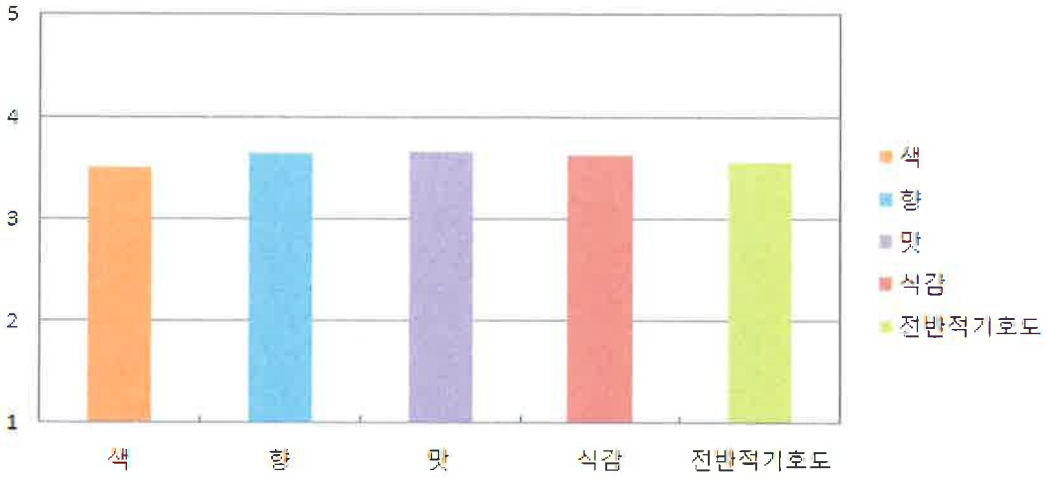


그림 113. 쿠키에 대한 일반인 소비자 기호도 평가결과.

제4장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

제1절 연구개발 목표 달성도

목 표	내 용	달성도 (%)
▪ 미강과 맥강을 이용한 GABA 및 Ornithine 발효기술 개발과 소재화공정 표준화	▪ 미강, 맥강의 균일한 제조공정 확립 ▪ 미강, 맥강의 주요일반성분 분석 ▪ GABA 및 Ornithine의 고생성능 균주 선발 ▪ GABA 및 Ornithine 함량 증진 발효공정 확립 ▪ 발효공정 scale up ▪ 여과·농축·건조공정 확립	100
▪ 항스트레스 및 항비만 기능성의 쿠키, 선식, 코팅곡물의 제조공정과 제품 개발	▪ 쿠키 제조공정 확립 ▪ 선식 제조공정 확립 ▪ 코팅곡물 제조공정 확립 ▪ 소비자 기호도 분석 ▪ 쿠키/선식/코팅곡물제품의 네이밍 및 패키지디자인 개발	100
▪ 기능성 소재 및 제품의 항비만 및 항스트레스 효능평가	▪ 스트레스에 의해 유발되는 단백질 및 인자들의 분포 분석 ▪ 혈중 스트레스 호르몬 농도 분석 ▪ 지질축적 억제효과 및 지질대사 관련 유전자 발현 조절 검증 ▪ 체내 지질상태, 체지방, 비만지표 개선 검증 ▪ 급성 및 아급성 독성평가	100

제2절 관련분야 기여도

1. 농·식품 부산물 활용 분야
   - ○ 저평가 또는 폐기되고 있는 미강 및 맥강의 식품소재화(고부가가치화)
   - ○ 미강 및 맥강의 활용분야 확대
2. 바이오매스의 발효기술 분야
   - ○ 미강 및 맥강의 발효미생물 확보
   - ○ 미강 및 맥강을 이용한 GABA와 Ornithine 발효기술 확립
3. 기능성 식품 분야
   - ○ 항비만 및 항스트레스에 대한 기능성 소재 개발
   - ○ 항비만 및 항스트레스 기능성식품의 다양화
4. 가공식품(쿠키/선식/곡물) 분야
   - ○ 쿠키, 선식, 곡물제품에 기능성 부여(항비만/항스트레스)

제5장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

제1절 연구개발 성과

1. 특허

번호	특허명	국가명	출원일	출원번호	비고
1	오르니틴을 함유하는 미강 또는 맥강 발효소재의 제조방법 및 그 제조방법에 의해 제조된 오르니틴을 함유하는 미강 도는 맥강 발효소재	대한민국	2014.07.21	10-2014-0091901	출원
2	가바를 함유하는 미강 또는 맥강 발효소재의 제조방법 및 그 제조방법에 의해 제조된 가바를 함유하는 미강 또는 맥강 발효소재	대한민국	2014.07.21	10-2014-0091904	출원
3	상표등록출원(힐米)	대한민국	2015.02.05	45-2015-0001115	출원
4	보리가루발효물을 이용한 쿠키 및 이의 제조방법	대한민국	2015.07.20	10-2015-0102222	출원
5	보리가루발효물을 이용한 선식 및 이의 제조방법	대한민국	2015.07.20	10-2015-0102226	출원
6	쌀가루발효물을 코팅하여 가바가 함유된 현미 및 이의 제조방법	대한민국	2015.07.20	10-2015-0102229	출원

관인생략

출원번호통지서

출 원 일 자 2014.07.21
특 기 사 항 심사청구(유) 공개신청(무)
출 원 번 호 10-2014-0091901 (접수번호 1-1-2014-0085025-04)
출원인 명칭 우석대학교 산학협력단(2-2004-006121-0) 외 3명
대리인 성명 김충호(9-2011-000208-6)
발명자 성명 오석흥 김수곤 이요셉 김은선 김지선 김재주 김혜진 한두원 송윤석 김영아 이근하 신두철 조진호
발명의 명칭 오르니틴을 함유하는 미강 또는 맥강 발효소재의 제조방법 및 그 제조방법에 의해 제조된 오르니틴을 함유하는 미강 또는 맥강 발효소재

특 허 청 장

관인생략

출원번호통지서

출 원 일 자 2014.07.21
특 기 사 항 심사청구(유) 공개신청(무)
출 원 번 호 10-2014-0091904 (접수번호 1-1-2014-0085041-23)
출원인 명칭 우석대학교 산학협력단(2-2004-006121-0) 외 3명
대리인 성명 김충호(9-2011-000208-6)
발명자 성명 오석흥 김수곤 이요셉 김은선 김지선 김재주 김혜진 한두원 송윤석 김영아 이근하 신두철 조진호
발명의 명칭 가바를 함유하는 미강 또는 맥강 발효소재의 제조방법 및 그 제조방법에 의해 제조된 가바를 함유하는 미강 또는 맥강 발효소재

특 허 청 장

관인생략

[상표견본]

출원번호통지서

출 원 일 자 2015.02.05
특 기 사 항
출 원 번 호 45-2015-0001115 (접수번호 1-1-2015-0125355-56)
출원인 성명 이자경(4-2014-036200-7)
대리인 성명 김중국(9-1998-000100-2)

특 허 청 장

관인생략

출원번호통지서

출 원 일 자 2015.07.20
특 기 사 항 심사청구(유) 공개신청(무)
출 원 번 호 10-2015-0102222 (접수번호 1-1-2015-0698561-38)
출원인 명칭 우석대학교 산학협력단(2-2004-006121-0) 외 2명
대리인 성명 김충호(9-2011-000208-6)
발명자 성명 오석흥 김수곤 이요셉 김은선 김지선 김재주 김혜진 한두원 송윤석 김영아 이근하
발명의 명칭 보리가루발효물을 이용한 쿠키 및 이의 제조방법

특 허 청 장

관 인 생 략

출 원 번 호 통 지 서

출 원 일 자	2015.07.20
특 기 사 항	심사청구(유) 공개신청(무)
출 원 번 호	10-2015-0102226 (접수번호 1-1-2015-0698580-06)
출원인 명칭	우석대학교 산학협력단(2-2004-006121-0) 외 2명
대 리 인 성 명	김충호(9-2011-000208-6)
발 명 자 성 명	오석홍 김수곤 이요셉 김은선 김지선 김재주 김혜진 한두원 송윤석 김영아 이근하
발 명 의 명 칭	보리가루발효물을 이용한 선식 및 이의 제조방법

특 허 청 장

관 인 생 략

출 원 번 호 통 지 서

출 원 일 자	2015.07.20
특 기 사 항	심사청구(유) 공개신청(무)
출 원 번 호	10-2015-0102229 (접수번호 1-1-2015-0698602-12)
출원인 명칭	우석대학교 산학협력단(2-2004-006121-0) 외 3명
대 리 인 성 명	김충호(9-2011-000208-6)
발 명 자 성 명	오석홍 김수곤 이요셉 김은선 김지선 김재주 김혜진 한두원 송윤석 김영아 이근하 신도철 조진순
발 명 의 명 칭	쌀가루발효물을 코팅하여 가바가 함유된 현미 및 이의 제조방법

특 허 청 장

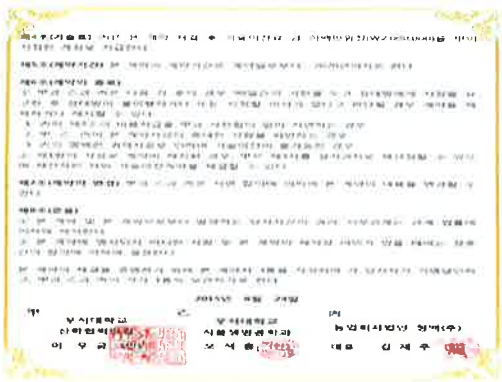
2. 논문

번호	논문제목	투고일	저널명
1	GABA enriched barley bran lowers ACTH and corticosterone levels in immobilized stressed rats Submitted Manuscripts Manuscript ID: BBB-150561 / Manuscript Title: GABA enriched barley bran lowers ACTH and corticosterone levels in immobilized stressed rats [View Submission] / Date Created: 11-Aug-2015 / Date Submitted: 11-Aug-2015 / Status: ADM: Office, Editorial Review in Process top	2015.08	Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry.
2	오르니틴 고 함유 보리가루 발효물을 이용한 선식 개발 및 항비만 효능 검증	2015.09	한국식품과학회

3. 기술이전

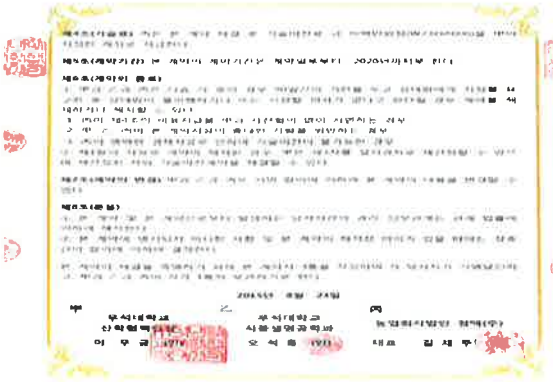
번호	기술이전 내용	이전일	기관
1	국제기탁 균주 기술이전(*Lactobacillus sakei* SOM-6)	2015.08	청맥(주)

기 술 이 전 계 약 서



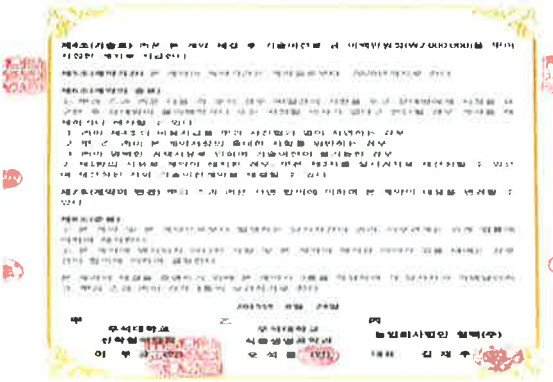
2	국제기탁 균주 기술이전(*Weissella cibaria* BBO1-48)	2015.08	청맥(주)

기 술 이 전 계 약 서



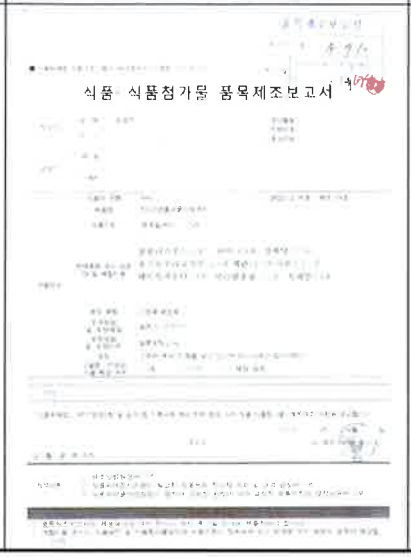
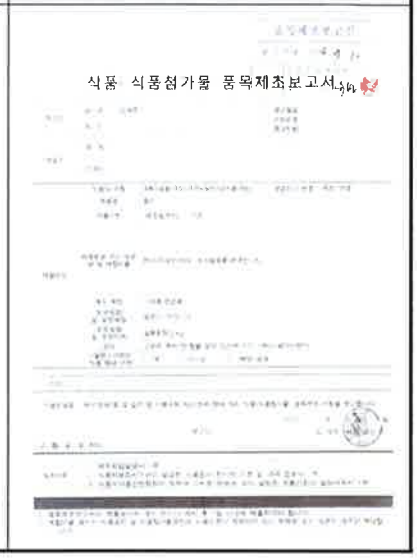
3	국제기탁 균주 기술이전(*Pediococcus pentosaceus* RBO1-49)	2015.08	청맥(주)

기 술 이 전 계 약 서



4. 상품화

번호	제품명	식품유형	품목제조보고일자
1	프리미엄슬로우밀	곡류가공품	2015.07.10
2	프리미엄통곡물수제쿠키	과자	2015.07.10
3	힐미	곡류가공품	2015.07.10

프리미엄슬로우밀	프리미엄통곡물수제쿠키	힐미
		

5. 언론홍보

번호	기사 제목	일자	언론사명
1	농업부산물 활용 고부가가치 제품개발	2015.07.15	전북일보

全北日報 검색 + 산학협력선도대

전체기사 정치 경제 사회 교육 문화 스포츠 지역 사람들 오피니언 기획

농업부산물 활용 고부가가치 제품 개발

전북생물산업진흥원,청맥(주)우석대 공동연구 성과

트위터 페이스북 구글플러스

[경제] 전체기사 | 경제일반 | 금융 · 증권 | 건설 · 부동산 | 산업 · 기업 | 서비스 · 스포츠 | IT · 과학 | 노동 · 노사

(재)전라북도생물산업진흥원(원장 김동수)은 농업회사법인 청맥(주)(대표 김재주) 및 우석대학교(교수 오석흥)와의 공동연구를 통해 항비만·항스트레스 효능 검증 및 고부가 제품 3건(통곡물 수제쿠키, 프리미엄 슬로우밀, 가바 힐미)을 개발 완료했다고 14일 밝혔다.

개발된 제품은 저가의 농업부산물인 미강(현미를 백미로 도정하는 공정에서 분리되는 고운 속겨)과 맥강(보리에서 보리쌀을 내고 남은 속겨)을 원료로 사용했고, 발효 특화기술을 접목시켜 가바(GABA·피페리딘산이라고 하며 학습능력을 증진하고 스트레스를 억제하는 효능)와 오르니틴(Ornithine·염기성 알파 아미노산의 하나로 운동 피로 저하와 지방산 대사작용 촉진 효능)의 기능성 성분을 극대화시킨 고부가가치 제품이다. 미강과 맥강은 대표적인 농업부산물로서 국내 생산량이 연간 43만 톤과 6만2000톤에 이르고 있다. 이러한 부산물들은 일부가 사료 또는 퇴비로 활용되고 있을 뿐, 대부분 폐기되고 있는 실정이다. 이에 생물산업진흥원은 미강과 맥강에 유용 유산균을 접종해 가바와 오르니틴의 함량을 100g 당 1200mg 까지 극대화시키는 핵심기술을 개발하는데 성공했다. 이번에 개발된 핵심기술과 제품 3건은 '2013년 농림축산식품부 고부가가치식품기술개발사업'의 일환으로 진행됐으며 2년간의 연구를 통해 이뤄낸 성과다.

6 . 시식회

번호	행사명	일자	내용
1	고창 청보리밭축제	2015.05.04 ~ 05.07	쿠키/선식/코팅곡물 시식회
2	부산 국제식품대전	2015.06.17 ~ 06.20	

<고창 청보리밭축제(5월4일-7일) 시식행사 현장모습>

<부산 국제식품대전(6월17-20일) 시식행사 현장모습>

제2절 성과활용 계획

1. 상품화

○ 참여기업에 의한 개발된 가공제품의 상품화

○ 미강 및 맥강 발효소재를 이용하여 다양한 가공제품 개발

구분	사업화년도				
	2015년	2016년	2017년	2018년	2019년
사업화 내용	·마케팅 자료확보 ·양산시스템 구축 ·판로확보	·제품 양산 ·국내판매 활성화	·제품 다변화 ·해외 판로확보	·제품 다변화 ·해외판매 활성화	·국내 1위 GABA/Ornithine 함유제품 생산기업 ·제품 다변화
제품	·쿠키 ·선식 ·코팅곡물	·쿠키 ·선식 ·코팅곡물	·쿠키/선식/곡물 ·음료 ·액상차	·쿠키/선식/곡물 ·음료/액상차 ·소스	·쿠키/선식/곡물 ·음료/액상차/소스
마케팅 계획	·하니로마트/미래원/흙마을 유통망 확보	·공영홈쇼핑 판매 ·이마트/홈플리스/롯데마트 유통망 확보	·중국(삼풍화무역유한공사) 유통망 확보	·대만(Tree X Great Int'l Corp) 유통망 확보	·홍콩(Ho Fung Food Ltd.) 유통망 확보
매출 계획	-	5억원	10억원	20억원	30억원

2. 논문

○ 미강 및 맥강 발효소재의 항스트레스 및 항비만에 대한 세포/동물실험 결과 발표

3. 특허

○ 기 출원된 미강 및 맥강 발효소재관련 특허를 핵심특허로 하여 추후 개발되는 다양한 가공제품의 지적재산권 확보

4. 타연구 활용

○ 미강 및 맥강 발효소재의 건강기능식품 개별인정원료화(체지방 감소) 연구에 도출된 전임상 결과 활용

5. 지도·홍보

○ 농·식품 부산물의 고부가가치 식품소재화 기술에 대한 성공사례로 홍보

○ 농·식품 부산물 배출기업에 대한 부산물 활용기술 지도

<첨부>

특허, 논문, 제품(시장) 분석보고서

1. 본 연구관련 국내외 기술수준 비교

개발기술명	관련기술 최고보유국	현재 기술수준		기술개발 목표수준	비고
		우리나라	연구신청팀		
미강/맥강을 이용한 GABA 고함유 발효소재 개발 및 생산	일본	70	70	100	주로 미강을 원료로한 GABA 소재 연구 진행됨
미강/맥강을 이용한 Ornithine 고함유 발효소재 개발 및 생산	일본	50	50	80	Ornithine 발효소재에 대한 국내연구는 상대적으로 매우 미흡

2. 특허분석

가. 특허분석 범위

대상국가	국내, 국외(미국, 일본, 유럽)
특허 DB	Kipris DB(www.kipris.or.kr)
검색기간	최근 5년간
검색범위	제목 및 초록

나. 특허분석에 따른 본 연구과제와의 관련성

(1) 식품의 Ornithine 증진과 관련된 특허를 분석한 결과, 핵심특허와의 관련성이 20% 이하로 본 연구과제와의 관련성이 낮은 것으로 분석

- 식품의 GABA 증진과 관련된 특허는 일본의 연구과 50% 관련성이 존재하고 있지만, 사용되는 원료와 최종산물 부분에서 확연한 차별성이 존재하는 것으로 분석

개발기술명		식품의 Ornithine 증진	식품의 GABA 증진
Keyword		식품 or Ornithine	식품 or GABA
검색건수		917	1,388
유효특허건수		193	439
핵심특허 및 관련성	특허명	Ornithine을 생산하는 능력이 있는 바이셀라 코리엔시스 OK1-6 균주, 상기 균주를 이용하여 Ornithine을 함유하는 김치의 제조방법 및 상기 방법에 의해 제조한 김치	쌀도정 부산물을 이용한 GABA의 제조방법
	보유국	한국	한국
	등록년도	2012	2006
	관련성(%)	20	20
	유사점	유산균 이용	미강을 배지로 이용한 GABA 제조
	차이점	**Ornithine을 증진시키는 식품의 종류 및 제조 방법이 다름**	**유산균을 이용한 GABA 함유 미강/맥강 발효 제품 개발**
핵심특허 및 관련성	특허명	L-Ornithine 생산능이 향상된 코리네박테리움 속 미생물 및 이를 이용한 L-Ornithine의 제조방법	감마아미노부틸산(GABA) 고생산성 균주인 락토바실러스 브레비스 OPK-3
	보유국	한국	한국
	등록년도	2010	2006
	관련성(%)	10	20
	유사점	Ornithine 증진	GABA 강화 김치
	차이점	**식품을 이용하여 Ornithine이 증진된 제품 개발**	**GABA 강화 미강/맥강 제품 개발**
핵심특허 및 관련성	특허명	Ornithine 생산능이 향상된 미생물 및 이를 이용하여 Ornithine을 생산하는 방법	Lactobacillus with ability to produce 7% γ-aminobutyric acid(GABA) food using the lactobacillus
	보유국	대한민국	일본
	등록년도	2011	2003
	관련성(%)	10	50
	유사점	Ornithine 생성능 미생물 사용	김치유산균 발효를 통한 GABA 강화
	차이점	**Ornithine을 생성하는 미생물을 이용한 맥강 및 미강 발효제품 개발**	**미강/맥강 GABA 증진**

3. 논문분석

가. 논문분석 범위

대상국가	한국, 미국, 일본, 유럽
논문 DB	국가과학기술정보센터(http://www.ndsl.kr/index.do), 국회도서관(www.nanet.go.kr)
검색기간	최근 5년간
검색범위	제목, 초록 및 키워드

나. 논문분석에 따른 본 연구과제와의 관련성

(1) 식품의 Ornithine 증진과 관련된 핵심논문을 분석해 본 결과, 본 연구과제와 관련성이 낮은 것으로 판단(관련성 20% 이하의 확률)

- 식품의 Ornithine 증진과 관련된 논문은 1,167건이 검색되었으며 유효논문건수는 전체의 4.9%에 속하는 57건 분석
- 57건의 논문 중 핵심논문을 분석한 결과, Ornithine을 사용한 유사점은 있지만, 소재와 사용 균주 등을 포함한 전반적인 부분에서 차이점을 보이므로 본 연구과제와 유사한 연구는 수행되지 않은 것으로 판단

개발기술명		식품의 오르니틴 증진	
Keyword		식품 or Ornithine	
검색건수		1,167	
유효논문건수		57	
핵심논문 및 관련성	논문명	Anti-obesity effect of kimchi fermented with *Weissella koreensis* OK1-6 as starter in high-fat diet-induced obese C57BL/6J mice	Enhancement of ornithine Production in poline-supplemented *Corynebacterium glutamicum* by ornithine cyclodeaminase
	학술지명	J. Applied Microbiology 113, 1507-1516 (2012).	Journal of Microbiology and Biotechnology
	저 자	Park JA et al.	Lee SY et al.
	게재년도	2012	2010
	관련성(%)	20	10
	유사점	유산균 이용 Ornithine 함유 김치	Ornithine 생산성 향상
	차이점	**미강/맥강 발효소재 및 제품**	**사용균주 및 목적하는 제품**

(2) 식품의 GABA 증진과 관련된 논문을 분석한 결과, 본 연구과제의 주요 기술인 미강/맥강 내의 GABA 증진과 관련된 내용은 존재하지 않는 것으로 분석

- 유산균을 이용한 GABA 증대라는 부분에서 유사성을 보이지만, 사용하는 원료 및 균주, 최종 생산하려는 제품의 형태가 다르므로, 본 연구과제만의 차별성이 존재하는 것으로 판단

개발기술명		식품의 GABA 증진	
Keyword		식품 or GABA	
검색건수		46,589	
유효논문건수		83	
핵심논문 및 관련성	논문명	Production of γ-aminobutyric acid(GABA) by *Lactobacillus buchneri* isolated from kimchi and its neuroprotective effect on meuronal cells	Production of yogurt with enhanced levels of gamma-aminobutyric acid and valuable nutrients using lactic acid bacteria and germinated soybean extract
	학술지명	Journal of Microbiology and Biotechnology	Bioresource Technology
	저 자	Cho YR et al.	Park KB & Oh SH
	게재년도	2007	2007
	관련성(%)	30	40
	유사점	김치유래 유산균에 의한 GABA 생산, 기능성 강화	GABA 강화 요쿠르트
	차이점	**원료, 제품 및 사용한 균주가 다름**	**사용균주, 원료, 제품 형태 다름**
핵심논문 및 관련성	논문명	Production of high γ-aminobutyric acid (GABA) sour kimchi using lactic acid bacteria isolated from *mukeunjee* kimchi	유산균 발효에 의한 GABA 함유 토마토 페이스트의 생산
	학술지명	Food Science and Biotechnology	한국식품영양학회지
	저 자	Cho SY et al.	국무창 등
	게재년도	2011	2012
	관련성(%)	40	40
	유사점	유산균에 의한 식품의 GABA 증진	유산균에 의한 식품의 GABA 증진
	차이점	**사용균주, 원료 및 최종제품 다름**	**사용균주, 원료 및 최종제품 다름**
핵심논문 및 관련성	논문명	Characteristics of red pepper paste by using germinated barley with increased γ-amino butyric acid	Enhanced production of γ-amminobutyric acid using rice bran extracts by *Lactobacillus sakei* B2-16
	학술지명	Journal of Food Science and Nutrition	Journal of Microbiology and Biotechnology
	저 자	Myung-Gon Shin, Gyu-Hee Lee	Kook MC et al.
	게재년도	2011	2010
	관련성(%)	20	20
	유사점	식품의 GABA 증진	GABA 생성 유산균 사용
	차이점	**사용방법, 원료, 최종제품 다름**	**사용방법, 원료, 최종제품 다름**

4. 제품 및 시장 분석

가. 생산 및 시장현황

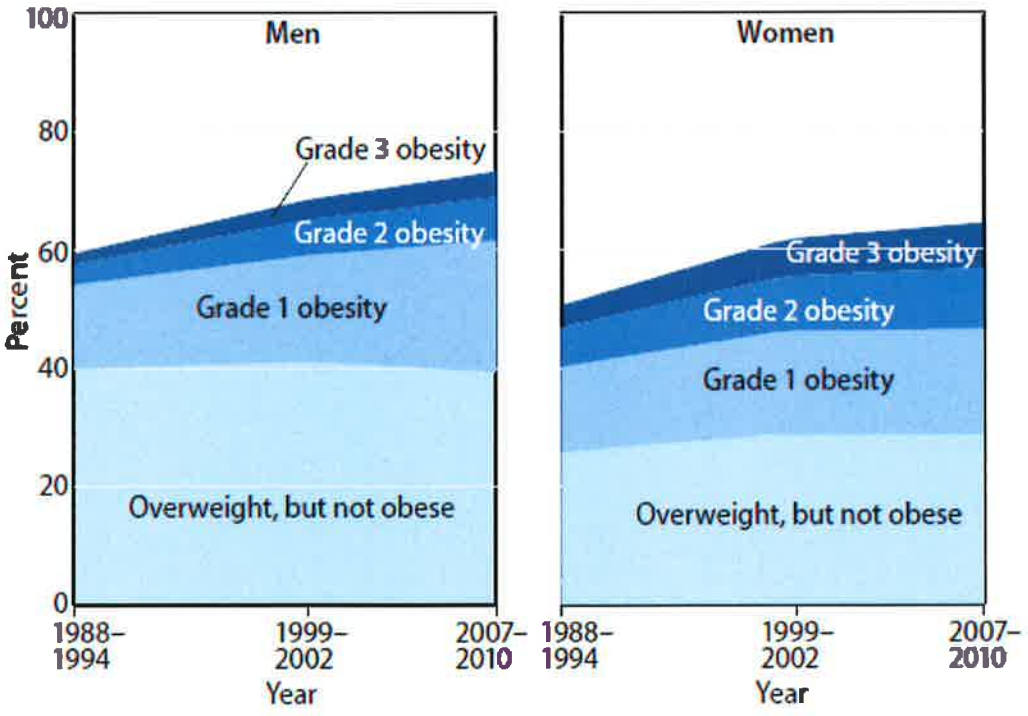
(1) 국외 시장 현황

(가) 다이어트 시장의 잠재고객인 비만인구가 전 세계적으로 증가하고 있음

- 세계보건기구(WHO)는 지난 2006년 비만을 세계적인 전염병으로 언급하였으며, 2015년 이면 전 세계 인구 중 23.4%가 비만(체질량 지수 30이상)에 속할 것으로 예측함
- 1988년부터 2010년까지의 미국 비만 인구의 비율을 조사한 결과, 고도비만 인구가 갈수록 증가하고 있으며 비만 3등급의 비율도 계속적으로 증가하고 있음
- 중국 전체 비만인구 비율은 23%이며, 베이징은 40%, 연해지역은 50%에 달해 이 수치는 선진국 수준과 비슷함

• 베이징 푸라이 언론이 실시한 설문조사 및 통계수치에 따르면, 베이징에 700만 명의 비만 인구가 있다고 보도됨

<미국의 20세 이상 성인의 비만 현황>



출처 : Health United State 2011 with special Feature on Socioeconomic Status and Health(2012)

(나) 비만 인구의 증가와 건강, 웰빙에 대한 관심이 고조되면서 다이어트 시장이 계속적으로 증가하고 있음

- 폴란드의 경우, 다이어트 및 웰빙 관련 시장의 규모가 2009년 158억 즈워티(대략 한화 6조 원)를 형성하였으며, 2014년까지 17억 즈워티(대략 7천억 원) 가량 추가 성장할 것으로 전망함(2010, Euromonitor International)

• 폴란드는 전체 인구의 30% 이상이 다이어트 중이며, 20세에서 30세까지는 약 68%가 다이어트에 관심을 가지고 있다고 보고됨

- 대만의 경우, 합법적인 다이어트 약품의 연간 소비금액만 6억 4,700억 대만달러에 달하는 것으로 나타나므로 미용, 피트니스 센터, 성형수술, 기타 각종 다이어트 관련 상품 시장규모까지 포함할 경우, 대만의 다이이트 시장규모는 1,000억 대만달러(한화 3조 6,000억 원 상당)에 달할 것으로 추정됨(2010, Grobal window)

• 대만 인터넷 설문조사 사이트 Pollster Online Survey에서 조사한 바에 따르면, 5,975명의 유효응답자 가운데 실제 BMI 지수가 정상인 응답자 비중은 59.4%, 저체중은 12.32%, 과체중은 28.28%로 나타났으나, 본인이 과체중이라고 생각하는 응답자가 무려 67.5%에 달하는 것으로 나타남

- 홍콩의 경우, 날씬함을 추구하는 여성 소비자들이 늘어나고, 어린이와 45세 이상 어른의 비만율이 늘어남에 따라 다이어트 제품의 판매량도 매년 높아짐(2010, Grobal window)

• 2009년에는 글로벌 금융위기에도 전년 대비 4% 성장을 보였으며, 시장규모는 2억7000만 홍콩달러에 달함

• 2009년에는 여러 가지 제품 중 끼니를 대신해 물이나 우유 등에 타먹는 식사 대체식품이 가장 큰 성장률을 보임

<홍콩 다이어트 제품별 판매 동향>

단위 : HK$ 백만

	2006년	2007년	2008년	2009년
식사대체식품	75.9	78.6	79.4	83.4
다이어트 차	14.7	15.6	16.4	17.1
다이어트 보충식품	145.3	148.9	151.9	155.7
기타 다이어트 식품	13.0	13.8	14.5	15.2
합계	248.9	256.9	262.2	271.3

출처 : Euromonitor(2010)

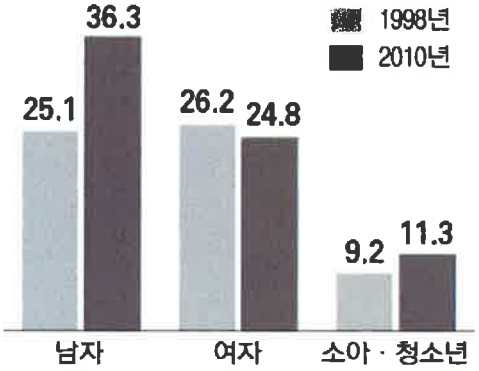
(2) 국내 시장 현황

(가) 세계적인 추세와 마찬가지로 국내의 비만 인구는 계속적으로 증가하고 있음

- 2010년에 남성 비만의 비율은 1998년 대비 11.2% 증가한 36.3%로 크게 증가하였으며 소아·청소년 비만은 2.1% 증가한 11.3%, 여자의 비만은 1.4%감소하여 24.8%를 차지함
- 여성들의 비만 비율은 감소하였지만 만족도가 낮아지면서 다이어트에 대한 욕구는 계속적으로 증가하고 있는 추세임

<국내 비만 인구 증가 형황>

단위 : %



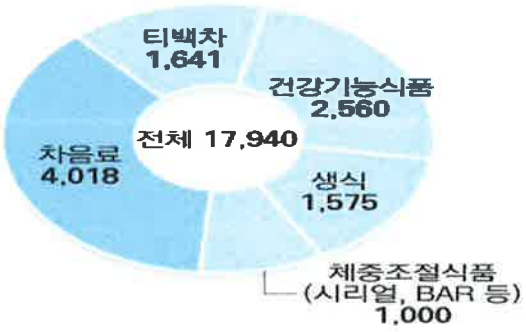
출처 : 지식경제부(2010)

(나) 2010년 국내 다이어트 식품 시장은 1조 7,940억 원으로 추정되며, 비만 인구의 증가와 함께 시장 규모가 계속적으로 성장할 것으로 보임

- 차음료를 이용한 다이어트 식품은 4,018억 원으로 가장 큰 시장을 형성하고 있으며, 건강기능식품은 2,560억원 티백차는 1,641억 원, 생식은 1,575억 원, 체중조절식품은 1,000억 원의 순서로 다이어트 시장을 형성하고 있음

<2010년 국내 다이어트 시장 규모>

단위 : 억원



출처 : 롯데헬스원

3) 국내·외 제품 현황

(가) 본 연구과제의 주요 원료인 미강/맥강을 이용한 제품 개발 현황을 살펴보면, 국내·외적으로 미강/맥강을 활용한 효소 제품과 건강기능성 식품 및 화장품으로 개발되어 판매되고 있음

- 푸른친구들의 '효소력' : 보리와 현미, 율무, 미강 등 곡물을 통발효시켜 곡물의 겉뿐만 아니라 속까지 발효한 것으로 효소 함유량이 많고 영양성분의 소화 흡수를 좀 더 빠르게 도와준다고 함
- 한국나락도정기농업회사에서는 미강을 75% 함유하는 가바환 제품을 출시하고 있으며, 천연뜰 회사에서는 유산균을 이용 미강을 발효하여 가루제품을 출시되어지고 있음
- 미국의 너트리아 회사에서 미강을 이용한 시리얼과 오일, 동물사료를 제품화하여 판매하고 있으며, 일본과 유럽에서도 과자제품이나 화장용품으로 제품을 개발하여 판매하고 있음

<미강/맥강을 이용한 제품>

(나) Ornithine을 이용한 제품 개발 현황을 살펴보면, 근육강화, 간장질환 개선의 효능으로 개발된 제품들이 주를 이루고 있음

- 국내에서는 아직 식약청에 식품첨가물로 등재되어 있지 않아 Ornithine자체로는 사용이 곤란하며, 식품이나 미생물 발효와 같은 자연적인 형태로 Ornithine을 증강시켜 섭취할 수 있음
- 간장질환 치료 및 예방용 의약품으로 사용되고 있으며 국내 기업에서 효소기술을 이용하여 Ornithine 고품위의 제품을 양산하여 미국, 유럽, 일본으로 전량 수출하고 있음

<국내·외 시판 중인 Ornithine 함유 제품>

제품명	1잔으로 재첩 70개분의 힘	Night diet	Ornithine	L-Arginine& L-Ornithine	L-Arginine& L-Ornithine	우라니틴	헬포빈인 퓨전 주사액
제품							
효능	하루사매 재첩 스프	다이어트보조제	근육성장	근육강화	근육조직 회복, 성장	간장질환용	간장질환용
제조회사 (국가)	(주)나가타니엔(일본)	(일본)	SOLGAR (미국)	GNC (미국)	SOLARAY (미국)	조아제약 (한국)	대원제약 (한국)

(다) GABA를 활용한 제품 생산 현황을 살펴보면, 국내·외적으로 건강기능성 식품이나 주름개선제와 같은 화장품 소재로 많이 사용되고 있음

- 국내에는 식약청에서 GABA가 혈압을 낮출 수 있는 개별인정형 기능식품으로 허가되었고, 아직 일반 식품첨가물로는 허가되어 있지는 않은 상태이기 때문에 미생물, 천연물, 효소 등에서 유래된 GABA를 이용하여 건강기능 식품으로 개발하고 있음
- 일본은 GABA 고함유 발아현미, 음료, 김치, 두부, 낫도, 두유, GABA팩밥, 레토르토 죽, 주먹밥, 도시락, 건강식품소재(분말·액·페이스트) 제품 등이 개발되어 판매되고 있음
- 미국은 GABA를 활용한 주름개선제 및 다이어트, 스트레스 완화제, 음료 등을 제품화하여 판매하고 있음

<현재 국내·외 시판중인 GABA 함유 제품>

제품명	갸바론차	눈이큰유기 현미효소	GABA 쵸콜렛	Brain Q 148	GABA	집중력	화장품
제품							
효능	혈압강하작용	건강기능성 제품	집중력	혈압강화작용	수면, 스트레스	집중력 강화	주름개선 피부보호
제조회사 (국가)	(일본)	웰빙장터 (한국)	(일본)	한국야쿠르트(한국)	Solgar (USA)	해태제과 (한국)	Dr.brandt (USA)

나. 개발기술의 산업화 방향 및 기대효과

(1) 산업화 방향

(가) 건강 증진의 기능(항스트레스, 항비만)을 강화하여 고부가가치의 미강/맥강 발효식품을 만들어 미강과 맥강을 자원화, 산업화 할 것임

(나) Ornithine과 GABA 고함유 미강/맥강 발효소재를 개발하고, 품질을 표준화하여 대량생산, 실용화 할 것임

(다) 항스트레스 및 항비만 효능을 갖는 쿠키, 선식, 곡물을 목표로 함

(라) 식물성 발효식품 유래의 Ornithine과 GABA 생산 능력을 보유하는 기능성 유산균을 이용하여 미강/맥강 액상발효물, 고체분말, Ornithine과 GABA 고함유 추출물을 생산하여 건강식품회사에 식품원료로 판매

(2) 산업화를 통한 기대효과

(가) 세계 각지의 수요 및 문화 등을 고려하여 상품을 개발하고 마케팅 전략을 세워 수출국을 다양화함

(나) 한국, 일본을 비롯한 쌀 문화 아시아계에 대해 그들의 식문화와 그들이 좋아하는 식품과 접목한 신제품의 개발과 함께 다양한 종류의 제품화와 우수성을 홍보

(다) 중국의 경우도 기능성 건강식품을 선호하고 고품질, 고가격의 제품으로 중국건강식품 산업을 리드하도록 할 것임

(라) 본 연구과제로 기능성이 증진된 미강/맥강 발효소재를 개발하여 과학적이고 체계적인 효능 평가를 실시하여 우리 제품의 우수성을 세계에 부각시키고 이를 통해 농업부산물의 이용 확대에 기여할 것임

(단위 : 백만원)

산업화 기준 / 항 목	1차년도	2차년도	3차년도	4차년도	5차년도	계
직접 경제효과	-	-	430	452	475	1,357
경제적 파급효과	-	-	915	962	1,011	2,888
부가가치 창출액	-	-	302	318	334	954
합 계	-	-	1,647	1,732	1,820	5,199

5. 3P(특허,논문,제품)분석을 통한 연구추진계획

가. 분석결과 향후 연구계획

(1) 특허분석 측면

(가) 기존 특허는 주로 미강을 다른 원료와 혼합 및 첨가하여 제품을 개발하는 분야에 치중되어 있으므로, 본 연구과제에서는 미강/맥강을 Ornithine과 GABA생성능을 가진 보유 유산균에 의해 발효하여 소재의 생성능을 향상시키고, 이를 활용한 제품을 개발하는 방향으로 연구를 추진하며, 이를 통한 국내 및 국외에 특허를 출원할 계획임

(2) 논문분석 측면

(가) 기존 논문은 김치 혹은 미강을 발효 시킬 때, 유산균을 이용하여 GABA를 증진시키는 분야에 치중되어 있으므로, 본 연구과제에서는 미강/맥강을 Ornithine 및 GABA를 생성하는 유산균을 이용하여 발효시켜 소재화 한 후, Ornithine 및 GABA 고함유 맥강/미강 소재의 항스트레스 및 항비만 효과를 입증하여 국제 SCI 학술지 등에 게재할 계획임

(3) 제품 및 시장분석 측면

(가) 국내·외 시장 분석 결과, 비만 인구의 계속적인 증가와 웰빙 및 미를 중시하는 사회적 트렌드에 맞추어 다이어트 시장이 계속 성장하고 있으므로, 본 연구과제에서는 미강/맥강을 원료로 GABA와 Ornithine의 함유량이 증진된 항비만 제품을 개발할 계획임

(나) 국내·외 제품을 분석한 결과, 다양한 기능성 식품 및 화장품 원료로 Ornithine와 GABA을 사용하고 있는 것을 확인 할 수 있었음. 따라서, 본 연구과제에서는 Ornithine과 GABA가 고함유되어 항비만과 항스트레스 효능이 증가된 미강/맥강 발효소재 및 제품을 생산하여 기능성 식품 제조 회사에 가격 경쟁력이 뛰어난 제품을 개발할 수 있도록 지원할 계획임

연구개발보고서 초록

<table>
<tr><td>과 제 명</td><td colspan="5">(국문) 지속가능한 바이오매스의 고부가식품소재화 발효기술과 제품화 연구
(영문) A study of fermentation technology and product development of sustainable biomass</td></tr>
<tr><td>주관연구기관</td><td colspan="2">농업회사법인 청맥(주)</td><td rowspan="2">주 관 연 구
책 임 자</td><td colspan="2">(소속) 농업회사법인 청맥(주)</td></tr>
<tr><td>참 여 기 업</td><td colspan="2">(주)남양농산, 우석대학교,
(재)전라북도생물산업진흥원</td><td colspan="2">(성명) 김재주</td></tr>
<tr><td rowspan="4">총연구개발비

(400,000 천원)</td><td>계</td><td>400,000</td><td>총 연 구 기 간</td><td colspan="2">2013.7.16. ~ 2015.7.15.(2년)</td></tr>
<tr><td>정부출연
연구개발비</td><td>320,000</td><td rowspan="3">총 참 여
연 구 원 수</td><td>총 인 원</td><td>14</td></tr>
<tr><td>기업부담금</td><td>80,000</td><td>내부인원</td><td>14</td></tr>
<tr><td>연구기관부담금</td><td>0</td><td>외부인원</td><td>0</td></tr>
</table>

○ 연구개발 목표 및 내용

1. 연구개발 최종목표

- 바이오매스(미강/맥강)를 이용한 항스트레스 및 항비만 효능 발효소재(GABA, Ornithine) 확보
- 기능성 발효소재의 항스트레스 및 항비만 효능평가
- 기능성 발효소재(GABA, Ornithine)의 제조공정 확립
- 항스트레스 및 항비만 기능성의 쿠키, 선식, 코팅곡물 개발

2. 연구개발 주요내용

- 미강과 맥강을 이용한 GABA 및 Ornithine 발효기술 개발
- 발효물의 소재화공정 확립
- 항스트레스 및 항비만 기능성의 쿠키, 선식, 코팅곡물의 제조공정 개발
- 기능성 소재 및 제품의 항스트레스 및 항비만 효능평가(*in vitro/in vivo*)
- 쿠키, 선식, 코팅곡물제품의 네이밍 및 패키지디자인 개발

○ 연구결과

본 연구에서는 미강과 맥강을 발효원료로 사용하여 유산균에 의해 GABA(γ-aminobutyric acid)와 Ornithine을 생산하고, 소재화하여 항스트레스 및 항비만 기능성의 쿠키, 코팅곡물, 선식제품 개발을 수행하였다. 본 연구는 크게 (1)GABA 발효소재를 이용한 항스트레스 쿠키 및 코팅곡물 개발과 (2)Ornithine 발효소재를 이용한 항비만 선식개발로 나누어 진행하였다.

첫 번째로, 전통 된장과 간장으로부터 GABA 생산능이 탁월한 MMD-11(*Enterococcus faeium*)과 SOM-6(*Lactobacillus sakei*)을 분리·동정하였다. MMD-11은 20%(w/v) 미강과 1%(w/v) MSG(monosodium glutamate)를 첨가한 발효에서 1,089 mg/100 g의 GABA를 생산하였고, 20%(w/v) 맥강과 1%(w/v) MSG(monosodium glutamate)를 첨가한 발효에서는 1,272 mg/100 g의 GABA를 생산하였다. 그 후, 미강과 맥강의 발효물은 액상(원심분리→여과→농축)과 분말(원심분리→동결건조) 소재화공정을 거쳐 각각의 미강발효물 액상소재(11,878 mg/100 g) 및 분말소재(13,968 mg/100 g), 맥강발효물 액상소재(12,894 mg/100 g) 및 분말소재(14,534 mg/100 g)를 제조하였다. GABA 발효소재의 대량생산은 SOM-6에 의해 20%(w/v) 미강 또는 맥강과 1%(w/v) MSG를 첨가한 100 L 발효에서 수행하였다.

미강발효를 위한 공정조건으로 온도 35℃, 교반속도 100 rpm, 통기량 0.4 vvm이 결정되어 1,176 mg/100 g의 GABA를 생산하였고, 맥강발효는 35℃, 120 rpm, 0.6 vvm 조건에서 1,207 mg/100 g의 GABA를 생산하였다. 각 발효액은 여과 및 동결건조 공정에 의해 각각 13,401 mg/100 g, 13,882 mg/100 g의 GABA 분말소재를 수득하였다. GABA 쿠키를 개발하기 위해 GABA 분말소재가 각각 0, 0.4, 0.7, 1.0%(w/w) 첨가된 반죽의 특성을 조사한 결과, 대조구와 비교하여 pH는 유사하였고, 밀도는 약간 감소하였으며, 색도의 a value와 b value는 약간 낮은 값을 나타낸 반면, L value는 첨가된 GABA 분말소재의 증가에 따라 증가하는 경향을 나타내었다. 위 반죽으로 제조한 쿠키의 특성을 대조구와 비교한 결과, pH, 수분함량, 팽창율은 유사하였고, 손실률은 증가하였으며, 색도의 L value는 증가, a value는 감소, b value는 유사하였다. 또한 첨가된 GABA함량이 쿠키제조 후에도 소실되지 않고 유지되는 것을 확인하였다. 쿠키는 배합, 반죽, 성형, 냉동(-20℃, 4시간), 절단, 굽기(180℃, 10분), 냉각(상온, 2시간) 공정에 의해 제조하였고, GABA 코팅곡물은 현미의 세척, 건조(80℃, 4시간) 후 GABA 분말소재 용액을 분사하여 건조(80℃, 5시간)시켜 제품을 제조하였다. GABA 발효소재와 쿠키 및 코팅곡물의 항스트레스 효능(*in vivo*)은 실험동물의 체중, 식이섭취량, 혈중 지질농도, 간 지질농도, AST(Aspartate aminotransferase) 농도, ALT(Alanine aminotransferase)농도, 혈중 corticosterone 농도, ACTH(Adrenocorticotropic hormone) 농도를 분석하여 항스트레스 효능을 검증하였다. GABA 쿠키 및 코팅곡물의 유통기한 시험결과, 각각 12개월과 36개월로 설정되었고, '프리미엄 통곡물수제쿠키'와 힐미(힐米)로 네이밍되어 제품화하였다.

두 번째로, 미강과 맥강으로부터 Ornithine을 생산하는 RBO1-49(*Pediococcus pentosaceus*)과 BBO1-48(*Weissella cibaria*)을 분리·동정하였다. RBO1-48은 20%(w/v) 미강과 1%(w/v) L-arginine을 첨가한 발효에서 1,032 mg/100 g의 Ornithine을 생산하였고, BBO1-48은 20%(w/v) 맥강과 1%(w/v) L-arginine을 첨가한 발효에서 1,085 mg/100 g의 Ornithine을 생산하였다. 그 후, 각 발효물은 액상(원심분리→여과→농축)과 분말(원심분리→동결건조) 소재화공정을 거쳐 각각의 미강발효물 액상소재(11,428 mg/100 g) 및 분말소재(13,051 mg/100 g), 맥강발효물 액상소재(10,757 mg/100 g) 및 분말소재(12,894 mg/100 g)를 제조하였다. 미강을 이용한 Ornithine 발효소재의 대량생산은 RBO1-49에 의해 20%(w/v) 미강과 1%(w/v) L-arginine을 첨가한 100 L 발효에서 수행하였다. 공정조건으로 온도 30℃, 교반속도 100 rpm, 통기량 0.4 vvm이 결정되어 1,177 mg/100 g의 Ornithine을 생산하였다. 맥강발효는 BBO1-48에 의해 20%(w/v) 맥강과 1%(w/v) L-arginine을 첨가하여 100 L 발효에서 30℃, 120 rpm, 0.6 vvm 조건에서 1,134 mg/100 g의 Ornithine을 생산하였다. 각 발효액은 여과 및 동결건조 공정에 의해 각각 14,007 mg/100 g, 13,948 mg/100 g의 Ornithine 분말소재를 수득하였다. Ornithine 선식은 세척, 증자(100℃, 30분) 건조(55℃, 24시간), 볶음(95℃, 20분), 분쇄, 혼합공정을 거쳐 제품을 제조하였다. Ornithine 발효소재와 선식의 항비만 효능(*in vivo*)은 실험동물의 체중, 식이섭취량, 부고환 지방량, 간 중량, 혈중 지질농도, 간 지질농도, 공복 혈당, 혈중 인슐린농도, 혈중 렙틴농도를 분석하여 항비만 효능을 검증하였다. Ornithine 선식의 유통기한은 2개월로 설정되었고, 천천히 즐기는 식사를 의미하는 '슬로우밀(Slow Meal)로 네이밍되어 제품화하였다.

○ 연구성과 활용실적 및 계획

1. 연구성과 활용실적

(단위 : 건수)

구분	특허출원	논문	기술실시(이전)	상품화	언론홍보
실적	6	2건(심사 중)	3	3	1

2. 연구성과 활용계획

- 개발제품의 상품화
  - 참여기업에 의한 개발된 가공제품의 상품화
  - 미강 및 맥강 발효소재를 이용하여 다양한 가공제품 개발
- 논문 창출
  - 미강과 맥강 발효소재의 항스트레스 및 항비만에 대한 세포/동물실험 결과 발표
- 지적재산권 확보
  - 기 출원된 미강 및 맥강 발효소재관련 특허를 핵심특허로 하여 추후 개발되는 다양한 가공제품의 지적재산권 확보
- 타연구 활용
  - 미강 및 맥강 발효소재의 건강기능식품 개별인정원료(체지방 감소) 획득관련 연구에 도출된 전임상 결과 활용
- 개발기술의 지도·홍보
  - 농·식품 부산물의 고부가가치 식품소재화 기술에 대한 성공사례로 홍보
  - 농·식품 부산물 배출기업에 대한 부산물 활용기술 지도

[별첨 2]

자체평가 의견서

<table>
<tr><td>연구개발분야</td><td colspan="2">고부가가치식품사업</td><td>과제구분</td><td colspan="2">□지정공모과제
■자유응모과제</td><td>관리번호</td><td colspan="2">113026-2</td></tr>
<tr><td>연구과제명</td><td colspan="8">지속가능한 바이오매스의 고부가식품소재화 발효기술과 제품화 연구</td></tr>
<tr><td>주관연구기관</td><td colspan="8">A study of fermentation technology and product develipment of sustainable biomass</td></tr>
<tr><td rowspan="5">연구담당자</td><td>주관연구책임자</td><td colspan="7">김재주</td></tr>
<tr><td rowspan="4">협동/위탁/세부
연구책임자</td><td>기관(부서)</td><td colspan="3">농업회사법인 청맥(주)</td><td>성 명</td><td colspan="2">김재주</td></tr>
<tr><td>기관(부서)</td><td colspan="3">(주) 남양농산</td><td>성 명</td><td colspan="2">신도철</td></tr>
<tr><td>기관(부서)</td><td colspan="3">우석대학교</td><td>성 명</td><td colspan="2">오석홍</td></tr>
<tr><td>기관(부서)</td><td colspan="3">(재)전북생물산업진흥원</td><td>성 명</td><td colspan="2">한두원</td></tr>
<tr><td>연구기간</td><td>총 기 간</td><td colspan="3">2013.7.16. - 2015.7.15.</td><td colspan="2">당해년도기간</td><td colspan="2">2014.7.16.-
2015.7.15</td></tr>
<tr><td>연구비(천원)</td><td>총 규 모</td><td colspan="3">400,000</td><td colspan="2">당해년도규모</td><td colspan="2">200,000</td></tr>
</table>

1. 연구는 당초계획대로 진행되었는가?

□ 당초계획 이상으로 진행 ■ 계획대로 진행 □ 계획대로 진행되지 못함

○ 계획대로 수행되지 않은 원인은?

2. 당초 예상했던 성과는 얻었는가?

■ 예상외 성과 얻음 □ 어느 정도 얻음 □ 얻지 못함

3. 연구과정 및 성과가 농림어업기술의 발전·진보에 공헌했다고 보는가?

■ 공헌했음 □ 현재로서 불투명함 □ 그렇지 않음

4. 경제적인 측면에서 농림어가의 소득증대에 공헌했다고 보는가?

□ 공헌했음 ■ 현재로서 불투명함 □ 그렇지 않음

5. 얻어진 성과와 발표상황

5-1 경제적 효과

□ 기술료 등 수익 수 익 :

□ 기업 등에의 기술이전 기업명 :

□ 기술지도 등 기업명 :

5-2 산업·지식재산권 등

■ 국내출원/등록 출원 6 건, 등록 건

□ 해외출원/등록 출원 건, 등록 건

5-3 논문게재·발표 등

■ 국내 학술지 게재 2 건

□ 해외 학술지 게재 건

■ 국내 학·협회 발표 1 건

■ 국내 세미나 발표 2 건

■ 국외 학·협회 발표 2 건

5-4 인력양성효과

■ 석 사 3 명

■ 박 사 2 명

■ 학 부 2 명

5-5 수상 등

□ 있 다 상 명칭 및 일시 :

■ 없 다

5-6 매스콤 등의 PR

■ 있 다 1 건

□ 없 다

6. 연구개발착수 이후 국내 다른 기관에서 유사한 기술이 개발되거나 또는 기술 도입함으로 연구의 필요성을 감소시킨 경우가 있습니까?

■ 없다 □ 약간 감소되었다 □ 크게 감소되었다

○ 감소되었을 경우 구체적인 원인을 기술하여 주십시오?

7. 관련된 기술의 발전속도나 추세를 감안할 때 연구계획을 조정할 필요가 있다고 생각하십니까?

■ 없다 □ 약간 조정필요 □ 전반적인 조정필요

8. 연구과정에서의 애로 및 건의사항은?

- 없음

(※ 아래사항은 기업참여시 기업대표가 기록하십시오)

1. 연구개발 목표의 달성도는?

■ 만족 □ 보통 □ 미흡

(근거 : 특허 6건, 논문 2건)

2. 참여기업 입장에서 본 본과제의 기술성, 시장성, 경제성에 대한 의견

가. 연구성과가 참여기업의 기술력 향상에 도움이 되었는가?

■ 충분 □ 보통 □ 불충분

나. 연구성과가 기업의 시장성 및 경제성에 도움이 되었는가?

□ 충분 ■ 보통 □ 불충분

3. 연구개발 계속참여여부 및 향후 추진계획은?

가. 연구수행과정은 기업의 요청을 충분히 반영하였는가?

■ 충분 □ 보통 □ 불충분

나. 향후 계속 참여 의사는?

■ 충분 □ 고려 중 □ 중단

다. 계속 참여 혹은 고려중인 경우 연구개발비의 투자규모(전년도 대비)는?

■ 확대 □ 동일 □ 축소

4. 연구개발결과의 상품화(기업화) 여부는?

□ 즉시 기업화 가능 ■ 수년 내 기업화 가능 □ 기업화 불가능

5. 기업화가 불가능한 경우 그 이유는?

구 분	소 속 기 관	직 위	성 명
주관연구책임자	농업회사법인 청맥(주)	대표	김재주 (인)
참여기업대표	농업회사법인 청맥(주)	대표	김재주 (인)

[별첨 3]

연구결과 활용계획서

1. 연구과제 개요

사업추진형태	■자유응모과제 □지정공모과제	분 야	고부가가치식품사업	
연 구 과 제 명	지속가능한 바이오매스의 고부가식품소재화 발효기술과 제품화 연구			
주관연구기관	농업회사법인 청맥(주)		주관연구책임자	김재주
연 구 개 발 비	정부출연 연구개발비	기업부담금	연구기관부담금	총연구개발비
	320,000	80,000	0	400,000
연구개발기간	2013.7.16. - 2015.7.15			
주요활용유형	■산업체이전 □교육 및 지도 □정책자료 □기타( ) □미활용 (사유:)			

2. 연구목표 대비 결과

당초목표	당초연구목표 대비 연구결과
① 기능성 발효소재(GABA, Ornithine) 생성 균주 2종 이상	○ GABA 발효소재 스타터 : *Enterococcus*속 1종, *Lactobacillus*속 1종 확보 ○ Ornithine 발효소재 스타터 : *Weissella*속 1종, *Pediococcus*속 1종 확보
② 기능성 발효소재(GABA, Ornithine) 각각 10,000㎎ 이상/100g	○ 미강 GABA 발효소재 함량 : 13,401 ㎎/100 g ○ 맥강 GABA 발효소재 함량 : 13,882 ㎎/100 ○ 미강 Ornithine 발효소재 함량 : 14,007 ㎎/100 g ○ 맥강 Ornithine 발효소재 함량 :13,948 ㎎/100 g
③ 기능성 발효소재의 항스트레스 및 항비만 효능 실험(*in vitro*)2건 이상	○ 미강 Ornitine 발효소재 항비만 효능(*in vitro*) 검증 ○ 맥강 Ornitine 발효소재 항비만 효능(*in vitro*) 검증
④ 기능성 쿠키, 선식, 곡물의 제조공정 최적화 3종 이상	○ GABA 발효소재 쿠키 및 코팅곡물 제조에 활용 및 제조 공정 최적화 2종 ○ Ornithine 발효소재 선식 제조에 활용 및 제조 공정 최적화 1종
⑤ 기능성 발효소재의 항스트레스 및 항비만 효능 특허 출원 1건 이상	○ 보리가루발효물을 이용한 쿠키 및 이의 제조방법 특허 출원 ○ 보리가루발효물을 이용한 선식 및 이의 제조방법 특허 출원 ○ 쌀가루발효물을 코팅하여 가바가 함유된 현미 및

	이의 제조방법 특허 출원
⑥ 시제품 항스트레스 및 항비만 효능 실험(in vivo) 2건 이상	○ 쿠키, 코팅곡물 항스트레스 효능(in vivo) 검증 ○ 선식 항비만 효능(in vivo) 검증
⑦ 시제품 항스트레스 및 항비만 효능 논문 2건 이상	○ GABA enriched barley bran lowers ACTH and corticosterone levels in immobilized stressed rats : Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry 투고중 ○ 오르니틴 고 함유 보리가루 발효물을 이용한 선식 개발 및 항비만 효능 검증 : 학국식품과학회 투고중
⑧ 시제품 기능성분(GABA, Ornithine) 함량 설정 각각 50~100㎎/100g	○ 기능성 발효소재 쿠키 GABA 함량 50mg/100g 이상 설정 ○ 기능성 발효소재 코팅곡물 GABA 함량 50mg/100g 이상 설정 ○ 기능성 발효소재 선식 Ornithine 함량 50mg/100g 이상 설정

3. 핵심기술

구분	핵 심 기 술 명
①	*Enterococcus*속 유산균을 이용한 미강, 맥강 GABA 소재 생산
②	*Lactobacillus*속 유산균을 이용한 미강, 맥강 GABA 소재 생산
③	*Weissella*속 유산균을 이용한 미강 Ornithine 소재 생산
④	*Pediococcus*속 유산균을 이용한 맥강 Ornithine 소재 생산

4. 연구결과별 기술적 수준

구분	핵심기술 수준					기술의 활용유형(복수표기 가능)				
	세계 최초	국내 최초	외국기술 복 제	외국기술 소화·흡수	외국기술 개선·개량	특허 출원	산업체이전 (상품화)	현장애로 해 결	정책 자료	기타
①의 기술	v					v	v			
②의 기술	v					v	v			
③의 기술	v					v	v			
④의 기술	v					v	v			

5. 각 연구결과별 구체적 활용계획

핵심기술명	핵심기술별 연구결과활용계획 및 기대효과
①의 기술	• 미강, 맥강 GABA 소재를 활용한 미용 및 건강기능식품 또는 의약품에 활용 • 신제품을 통한 수익 증대 및 일자리 창출
②의 기술	• 미강, 맥강 GABA 소재를 활용한 미용 및 건강기능식품 또는 의약품에 활용 • 신제품을 통한 수익 증대 및 일자리 창출
③의 기술	• 미강 Ornithine 소재를 활용한 비만 및 건강기능식품 또는 의약품에 활용에 활용 • 신제품을 통한 수익 증대 및 일자리 창출
④의 기술	• 맥강 Ornithine 소재를 활용한 비만 및 건강기능식품 또는 의약품에 활용에 활용 • 신제품을 통한 수익 증대 및 일자리 창출

6. 연구결과의 기술이전조건

핵심기술명	국제기탁 균주 기술이전(*Lactobacillus sakei* SOM-6)		
이전형태	□무상 ■유상	기술료 예정액	2,000천원
이전방식	□소유권이전 ■전용실시권 □통상실시권 □협의결정 □기타( )		
이전소요기간	3개월	실용화예상시기	향후 5년
기술이전시 선행조건	냉동고		

핵심기술명	국제기탁 균주 기술이전(*Weissella cibaria* BBO1-48)		
이전형태	□무상 ■유상	기술료 예정액	2,000천원
이전방식	□소유권이전 ■전용실시권 □통상실시권 □협의결정 □기타( )		
이전소요기간	3개월	실용화예상시기	향후 5년
기술이전시 선행조건	냉동고		

핵심기술명	국제기탁 균주 기술이전(*Pediococcus pentosaceus* RBO1-49)		
이전형태	□무상 ■유상	기술료 예정액	2,000천원
이전방식	□소유권이전 ■전용실시권 □통상실시권 □협의결정 □기타( )		
이전소요기간	3개월	실용화예상시기	향후 5년
기술이전시 선행조건	냉동고		

주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 고부가가치식품사업의 연구보고서 입니다.

2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림축산식품부에서 시행한 고부가가치식품사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.

3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니 됩니다.