

발간등록번호

11-1543000-002100-01

미래 전략형 글루텐 프리 식품개발 및 수출 기반 구축

최종보고서

2018 . 2. 28.

주관연구기관 / (주)동성식품

협동연구기관 / 한국생명공학연구원

협동연구기관 / 남부대학교산학협력단

농림축산식품부

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “미래전략형 글루텐 프리식품 개발 및 수출 기반 구축”(개발기간 : 2014. 11. 28. ~ 2017. 11. 27.)과제의 최종보고서로 제출합니다.

2018. 01. 12.

주관연구기관명 : (주)동성식품

(대표자) 이용택 (인)

협동연구기관명 : 한국생명공학연구원

(대표자) 장규태 (인)

협동연구기관명 : 남부대학교산학협력단

(대표자) 정상원 (인)

주관연구책임자 : 윤종영

협동연구책임자 : 김중수

협동기관책임자 : 유민정

국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정 제18조에 따라 보고서 열람에 동의합니다.

보고서 요약서

과제고유번호	114007-3	해당단계 연구기간	2016.08.01.~ 2017.07.31	단계구분	1/1
연구사업명	단위사업	농식품기술개발사업			
	사업명	고부가가치식품기술개발사업			
연구과제명	대과제명	(해당 없음)			
	세부 과제명	미래 전략형 글루텐 프리 식품 개발 및 수출 기반 구축			
연구책임자	해당단계 참여 연구원 수	총: 14 명 내부: 14 명 외부: 명	해당단계 연구개발비	정부: 800,000천원 민간: 270,000천원 계: 1,070,000천원	
	총 연구기간 참여 연구원 수	총: 14 명 내부: 14 명 외부: 명	총 연구개발비	정부: 800,000천원 민간: 270,000천원 계: 1,070,000천원	
연구기관명 및 소속부서명	(주)동성식품 기업부설연구소			(주)동성식품 기업부설연구소	
위탁연구	해당사항 없음			연구책임자: 윤종영	
				보고서 면수 : 483 페이지 (총 면수 : 499 페이지)	

〈 국문 요약 〉

	코드번호	D-01
연구의 목적 및 내용	<p>[연구 목적]</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 밀가루 대체 글루텐 프리형 고품질 한식의 글로벌 가공 식품 개발 2. 밀전분 내 gluten 저감화용 발효균주 확보 및 이를 이용한 글루텐 발효 제품 개발 3. 곡류전분으로부터 글루텐 프리형 프리믹스 및 글루텐 정량 분석법 개발을 통한 고품질 글루텐 프리형 한식 제품 개발과 이의 글로벌화를 위한 기반구축을 최종 목표로 함 <p>[연구 내용]</p> <p>[1차년도]</p> <p>1. 밀가루 대체 글루텐 프리형 고품질 한식의 글로벌 가공 식품 개발</p> <ol style="list-style-type: none"> ① 밀가루를 대체할 수 있는 가공용 파우더 개발 ② 글루텐 프리 파우더의 물리화학적 특성을 활용한 고품질의 한식 제품 개발 ③ 밀가루 대비 가격 경쟁력을 확보할 수 있는 핵심 기술 개발 ④ 식사용 글루텐 프리 한식 제품에 적합한 ‘노인 맞춤형 소스’ 및 ‘어린이용 소스’ 개발 ⑤ 개발 제품 별 대량 생산 공정 확립 및 품질 관리 기준 확보 ⑥ 글루텐 프리 제품의 공신력 확보를 위한 핵심 기술 개발 ⑦ 글루텐 프리 및 저감화 제품에 대한 홍보, 마케팅 전략 수립 및 시장 진입을 위한 전략 보고서 ⑧ 글루텐 프리 및 저감화 제품에 대한 해외 수출 기반 구축 및 해외 시장 진입을 위한 전략 보고서 ⑨ 개발 제품에 대한 국가별 전략 제품 도출 및 해외 상품화 <p>2. 밀전분 내 gluten 저감화용 발효균주 확보 및 이를 이용한 글루텐 발효 제품 개발</p> <ol style="list-style-type: none"> ① 전통 발효식품으로부터 글루텐을 분해능을 갖는 미생물 확보 ② 글루텐을 분해능을 갖는 유산균의 동정 및 생화학적 특성 분석 ③ 확보 유산균의 배양학적 특성 및 Lab scale 대량 배양 ④ 유산균이 생산하는 gluten 분해 효소 특성 분석 ⑤ Pilot scale에서의 유산균 배양 조건 및 밀반죽 조건의 확립 ⑥ 유산균 및 유산균 배양액을 이용한 글루텐 저감화 제품화 기술 개발 	

<p>연구의 목적 및 내용</p>	<p>3. 곡류전분으로부터 글루텐 프리형 피리믹스 및 글루텐 정량 분석법 개발</p> <p>① 글루텐 프리제품에 대한 국내동향 조사 ② 글루텐 물성형성 소재의 선정과 배합비의 선정 ③ 빵류 제조와 물성의 확인 ④ 누룩균과 유산균을 이용한 빵류 제조과정 이용으로 빵류 물성의 개선 ⑤ 밀 이외 전분, 단백질소재에 대한 발효조건의 탐색 및 최적화 ⑥ 글루텐 함량에 대한 측정법과 산업적으로 이용되는 최적측정법의 조사 ⑦ 측정법에 따른 장단점의 비교분석 및 경제성, 안정성, 편리성 시험법의 정립 ⑧ 글루텐 함량 분석 방법을 표준화하여 식품공전에 등재</p>
<p>연구개발 성과</p>	<p>[연구 개발 성과]</p> <p>[1차년도]</p> <p>1. 글루텐 프리형 전분에 적합한 당류, 검류 등의 첨가제 선정 2. 파우더 (프리믹스) 제조 공정 확립 및 시제품 개발 및 소비자 기호도 조사 3. 전통 발효식품으로부터 글루텐을 분해능을 갖는 미생물 확보, 확보된 유산균의 글루텐 분해능 분석을 완료하였으며, 확보 유산균의 배양학적 특성 및 Lab scale 대량 배양 및 최적 조건 확립 4. 글루텐 프리 제품에 대한 국내동향 조사 5. 글루텐 물성형성 소재의 선정과 배합비의 선정과 이를 이용한 빵류제조와 물성의 확인 :빵으로서의 물성, 제조된 dough의 물성, 색도, 물리적 성질 확인 6. 글루텐 프리 밀가루의 시제품으로서의 최적화 및 관능검사 및 기호도 보정 7. 글루텐 함량에 대한 측정법과 산업적으로 이용되는 최적측정법의 조사</p> <p>[2차년도]</p> <p>1. 유산균 발효 기술 적용 글루텐 프리형 제품 개발 프리형 우동 및 스파게티 2종 제품 개발 완료하였음. 2. 개발 제품에 대한 관능 검사 실시함. 3. 글루텐 프리형 우동 및 스파게티 제품에 적합한 성인(노인형) 및 어린이용 소스 개발과 개발 제품 별 대량 생산 공정 확립 및 품질 관리 기준 확보 4. 글루텐 프리형 우동 및 스파게티 제품화 기술 개발 및 사업화 6. 국내 발효 식품으로부터 글루텐 활성이 우수한 유산균의 확보함 7. 유산균이 생산하는 gluten 분해 효소 특성 분석 8. 글루텐 발효 시제품과 기존 제품과의 품질 및 효능 비교 검증 및 보존성 비교 9. 빵류 제조에 사용되는 글루텐 프리 발효기술에 대한 조사 10. 누룩균과 유산균을 이용한 빵류 제조과정 시 빵류 물성의 개선 11. 밀 이외 전분, 단백질소재에 대한 발효조건의 탐색 및 최적화</p>

연구개발 성과	<p>[연구 개발 성과]</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 다단 압축 기술 적용 글루텐 프리형 제품 4종 개발완료 2. 글루텐 발효 제품 2종 개발과 개발 제품에 대한 관능 검사 수행 4. 개발 제품 별 대량 생산 공정 확립 및 품질 관리 기준 확보 5. 글로벌 시장 진출을 위한 글루텐 프리형 제품화 기술 개발 및 사업화 6. Pilot scale에서의 유산균 배양 조건 최적 ,C,N source의 선정, gluten-degration 유산균의 생산조건 확립함. 7. 글루텐 발효 제품 생산기술 개발 8. 분해된 gluten에 빵 물성 형성 첨가물로 최적화, gluten-free 빵류 개발 9. gluten-free에 적합한 최적 방법은 개별적 사용이 가능한 ELISA법이 최적이고 gluten단백질에 대한 epitope을 다양하게 이용한 미량측정법이 최적임. 10. 대량 시험법은 산업적 요구에 필요하나 미량 시험법에 대한 validation 실시와 실제 시료에 적용, 정합성 검토 완료 및 논문 투고중임. 11. gluten 미량측정법에 대한 validation 결과를 논문화 및 이를 식약처에 신문고를 활용 미량 측정법 국내 제정을 요청함.
------------	--

연구개발성
과의
활용계획
(기대효과)

1. 글루텐 프리 기반 기술 확보를 통한 세계 글루텐 프리 시장 및 기술 선도

- ① 글루텐 프리 시장이 확산되고, 기술 선점 경쟁이 심화되는 상황에서, 독창적이고 혁신적인 기반 기술을 확보함으로써 글루텐 프리 시장 및 기술을 선도함
 - 밀가루를 주식으로 하는 북미, 유럽, 호주 등으로부터 셀리악병, 비만, 소화 문제 등의 이유로 밀가루 기피 현상이 점차 확산되고 있으며, 글루텐 프리 제품에 대한 수요가 매년 10% 이상 확대되고 있으며, 2018년 세계 글루텐 프리 제품의 시장규모가 620만 달러가 될 것으로 추산되고 있음
 - 이런 추세에 따라 세계 식품 기업들은 앞 다투어 글루텐 프리 기술 개발 및 제품 개발 경쟁에 나서고 있음
- ② 표준화된 글루텐 함량 분석 방법 및 도구 개발을 통한 글루텐 프리 제품의 공신력 확보
 - 글루텐 함량 분석 방법을 표준화하여 식품공전에 등재

2. 밀가루를 대체할 수 있는 가공용 파우더 상품화를 통한 매출 증대 및 고용 창출

- ① 밀가루 대비 가공 적성이 우수한 ‘글루텐 프리 파우더’ 상품화
- ② 주관기관을 통해 사업화할 경우 연간 15억원 (국내 밀가루 시장규모의 0.1%)의 매출 및 1명의 신규 고용(생산직 남자 1명) 창출이 기대됨.
- ③ 주관기관인 (주)동성식품은 소비자용 소포장 제품(500g, 1kg 포장)을 상품화하여 기존의 협력업체인 (주)홈플러스, (주)롯데마트, 농협 하나로마트 등 유통전문 대기업과 홈쇼핑, 인터넷 판매 등을 계획하고 있으며, 업소용 벌크 제품(20kg 지대 포장)을 상품화하여 계열회사인 (주)동성제분을 통해 기존 납품처인 냉면전문점, 중화요리 체인점 등 외식업체에 판매를 계획하고 있음
- ④ 제분협회 자료에 따르면, 2013년도 기준, 밀의 국내 수입량은 연간 약 220만톤, 밀가루의 국내 소비량은 연간 약 170만톤, 세계 소비량은 연간 약 4억6천톤으로 추산하고 있으며, 국내 밀가루 시장규모는 연간 약 1조5천억원, 세계 밀가루 시장규모는 약 420조원으로 추산하고 있음
- ⑤ 밀가루에 대한 소비자의 기피 현상이 점차 확대되고 있는 추세로 본다면 밀가루 대체 가공용 파우더에 대한 수요는 점차 확대될 것으로 예상됨

3. 식사용 글루텐 프리 한식 제품 상품화를 통한 매출 증대 및 고용 창출

- ① 맛, 쫄깃하고 부드러운 질감 등 소비자 기호에 맞는 ‘글루텐 프리 한식 제품’ 상품화
- ② 글루텐 프리 칼국수, 우동, 자장면, 냉면, 수제비 등의 한식 제품을 상품화할 경우 주 관기관을 통하여 연간 10억원 이상의 매출 창출 및 1명의 신규 고용(연구직 남자 1명) 창출이 기대됨.

<p>연구개발성 과의 활용계획 (기대효과)</p>	<p>③ 주관기관은 현재 전국 고속도로휴게소에 25개의 우동전문점을 운영하고 있으며, 약 45개의 우동전문점에 우동면과 소스를 납품 중인 바, 고속도로휴게소 소비자들의 건강, 안전, 고품질에 대한 욕구가 점차 높아지는 것을 반영하여 최근 우리밀 우동 전문점, 통밀 우동 전문점 등을 오픈하여 히트한 경험이 있고, 본 과제 수행 후 글루텐 프리 우동 전문점을 신규로 오픈할 경우 연간 약 10억원 정도의 추가 매출을 기대할 수 있음</p> <p>④ 주관기관은 현재 식품 대기업인 P사, C사에 한식 면류를 OEM 형태로 납품 하고 있는 바, 건강한 먹거리에 대한 관심이 많고 소비자의 밀가루 기피 트렌드를 예의 주시하고 있는 P사와 C사의 마케팅 능력을 활용하여 ODM 납품을 진행한다면 연간 10억원 이상의 추가 매출이 가능할 것으로 예상됨</p> <p>⑤ 주관기관은 현재 H사, L사, NH사 등의 유통대기업에 한식 면류를 납품하고 있는 바, ‘글루텐 프리 한식 면류 제품’ 을 NB 또는 PB 브랜드로 납품할 경우 연간 10억원 이상의 추가 매출을 기대할 수 있음</p> <p>⑥ 주관기관은 현재 방위사업청 입찰을 통해 한식 면류를 군에 납품하고 있는 바, 본 과제 수행 후, 대한민국 국군의 건강을 위하여 ‘글루텐 프리 한식 면류’ 의 군 급식을 건의할 계획이며, 건의가 받아들여 질 경우 추가 매출을 기대할 수 있음</p> <p>⑦ 주관기관은 현재 미국내 식자재 전문 유통회사인 T사, 홍콩내 한국 식자재 전문 유통회사인 K사, 중국내 한국 식자재 전문 유통회사인 H사를 통하여 미국, 홍콩, 중국에 한식 면류를 수출하고 있는 바, 본 과제 수행 후 ‘글루텐 프리 한식 면류 제품’ 을 수출할 경우 연간 10억원 이상의 추가 매출을 기대할 수 있음</p> <p>4. 글루텐 프리 한식 제품용 소스 개발을 통한 매출 증대 및 고용 창출</p> <p>① 글루텐 프리 한식 제품에 적합한 맞춤형 소스 개발 및 상품화</p> <p>② 글루텐 프리 제품의 핵심 고객층인 어린이를 위한 맞춤형 소스 개발 및 상품화</p> <p>③ 주관기관은 현재 H사, L사, NH사 등의 유통대기업, 고속도로휴게소, 용우동, 미소야, 채선당 등 외식 프랜차이즈에 소스류를 납품하고 있는 바, 글루텐 프리 한식 제품에 적합한 맞춤형 소스를 납품할 경우 추가 매출을 기대할 수 있음</p>
---	--

< SUMMARY >

	<p>[Purpose of project]</p> <ol style="list-style-type: none">1. Development of Gluten Free Gluten-free High-Quality Korean Food2. Obtaining fermentation strains for reducing gluten in wheat starch and developing gluten fermentation products using them3. Development of gluten-free pre-mix and gluten quantitative analysis from cereal starch <p>The goal is to develop high-quality gluten-free Korean-style products and build a foundation for globalization of these products.</p>
	<p>[Research content]</p> <ol style="list-style-type: none">1. Development of global processed food of gluten-free type high-quality Korean meal replacing flour<ol style="list-style-type: none">① Development of powder for processing that can replace flour② Development of high quality Korean food product utilizing physicochemical properties of gluten-free powder③ Development of key technologies to secure price competitiveness against flour④ Development of “Seniors Customized Sauce“ and “Children’s Sauce“ for gluten-free Korean food⑤ Establishment of mass production process and quality control standard for each product to be developed⑥ Development of core technology for ensuring the credibility of gluten-free products⑦ Strategic report for promotion, marketing strategy and entry into the market for gluten-free and reduced products⑧ Strategic report for establishment of overseas export base for gluten free and reduced products and entry into overseas market⑨ Development of strategic products by developed countries and overseas commercialization2. Development of fermented microorganism which can lower gluten in wheat starch and development of fermented product using gluten<ol style="list-style-type: none">① Screening of microorganisms that have the ability to degrade gluten from traditional fermented foods② Identification and biochemical characterization of lactic acid bacteria having gluten-resolving ability③ The culture characteristics of acquired lactic acid bacteria and Lab scale mass culture

<p>Expected Contribution</p>	<ul style="list-style-type: none"> ④ Characterization of gluten degrading enzymes produced by lactic acid bacteria ⑤ Establishment of lactic acid bacteria culturing condition and milky condition in pilot scale ⑥ Development of gluten-reducing commercialization technology using lactic acid bacteria and lactic acid bacteria culture <p>3. Development of Gluten-Free freemix and Gluten Quantitative Analysis from Grain Starch</p> <ul style="list-style-type: none"> ① domestic trends on gluten-free products ② Selection of materials with gluten substitution properties and selection of compounding ratio ③ Identification of gluten free breads and their physical properties ④ Improvement of the physical properties of breads by using the process of making breads using Mycobacterium tuberculosis and lactic acid bacteria ⑤ Search and optimization of fermentation conditions for starch and protein materials other than wheat ⑥ Investigation of the measurement method of gluten content and the optimal measurement method used industrially ⑦ Comparative analysis of strengths and weaknesses according to measuring methods and establishment of economical, stability and convenience test methods ⑧ Standardized method of gluten content analysis
	<p>[R & D achievement] [First year]</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Selection of additives such as sugars and gums suitable for gluten-free starch 2. Establishment of manufacturing process of powder (premix), development of prototype and survey of consumer preference 3. Glucose-resolving ability of traditional fermented foods was confirmed and the analysis of gluten resolution of the obtained lactic acid bacteria was completed. Cultivation characteristics of lactic acid bacteria and lab scale and establishment of optimal conditions were established. 4. Domestic trends on gluten-free products 5. Selection of gluten-forming materials and selection of blending ratio, and preparation of breads and confirmation of physical properties: Properties of bread, physical properties, color and physical properties of prepared dough 6. Optimization of gluten-free flour as a prototype and sensory evaluation and preference correction 7. Measurement of gluten content and investigation of the best method for industrial use

[Second Year]

1. Completed the development of gluten-free noodles and spaghetti products with the development of gluten-free products using lactic acid bacteria.
2. Sensory test on the developed product.
3. Development and development of adult (aged) and children's sauce suitable for gluten-free udon and spaghetti products Establishment of mass production process and quality control standard for each product
4. Development and commercialization of gluten-free noodle and spaghetti commercialization technology
6. Acquisition of lactic acid bacteria having excellent gluten-decomposing activity from domestic fermented foods
7. Characterization of gluten degrading enzymes produced by lactic acid bacteria
8. Comparison of quality and efficacy of gluten degradation prototypes and existing flour products
9. Investigation of gluten-free fermentation technology used in the manufacture of breads
10. Confirm the effect of improvement of the physical properties of bread during the manufacturing process of the bread using the lactic acid bacteria
11. Search for and optimize fermentation conditions for starch and protein materials other than wheat.

[Third Year]

1. Developed four kinds of gluten-free products using multi-stage compression technology
2. Development and development of two kinds of gluten fermented products
4. Establishment of mass production process and quality control standard for each product
5. Development and commercialization of gluten-free commercialization technology for global market entry
6. Optimization of lactic acid culture conditions on pilot scale, selection of C, N optimum source, and establishment of production conditions of gluten-degradation lactic acid bacteria.
7. Development of gluten fermentation product production technology
8. Formation of bread properties in degraded gluten Optimized for additives, development of gluten-free breads
9. The optimal method for gluten-free is the most suitable ELISA method that can be used individually, and the most suitable method is micro-measurement using various epitopes for gluten protein.
10. The mass test method is necessary for industrial requirements but validation of the micro-test method is applied to the actual sample, the completion of the consistency examination and the submission of the thesis.
11. The validation results of the gluten microanalysis method were submitted to the papers, and a microarray method using the journal was requested.

<p>Application plans of research products</p>	<p>1. GLUTEN-FREE MARKET AND TECHNOLOGY LEADING WITH GLUTEN-FREE BASED TECHNOLOGY</p> <p>① Leading the gluten-free market and technology by securing the original and innovative base technology in the situation where the gluten-free market spreads and competition for technology preoccupation deepens.</p> <p>- Flour-free flour has been spreading from North America, Europe, and Australia, where flour is used as a stock, due to selijye disease, obesity, and digestion problems. Demand for gluten-free products is increasing by more than 10% every year. The market for gluten-free products is estimated to be \$ 6.2 million.</p> <p>This trend has prompted global food companies to compete in gluten-free technology development and product development.</p> <p>② Securing the trust of gluten-free products through the development of standardized gluten content analysis methods and tools</p> <p>- standardized method of gluten content analysis</p> <p>2. Increase sales and job creation by commercialization of powder for processing powder that can replace flour</p> <p>① Commercialized 'gluten-free powder', which is superior in processing aptitude compared to flour</p> <p>② If commercialization is made through a leading organization, it is expected to generate annual sales of ₩1.5bn (0.1% of the domestic flour market) and one new employment (one male production man).</p> <p>③ Dongsung Foods Co., Ltd., a leading agency, commercialized small-sized consumer products (500g, 1kg package) and provided home shopping, home shopping, and Internet shopping with major retailers such as Homeplus, Lotte Mart and Nonghyup Hanaro Mart, We are planning to sell bulk products for business (20kg package) and sell them to other food service companies such as cold noodle specialty store and Chinese food chain store through DongSung mill, which is a affiliate company.</p> <p>④ According to the milling association data, domestic import of wheat is estimated to be about 2.2 million tons per year, domestic consumption of wheat is about 1.7 million tons per year, world consumption is about 466 thousand tons per year as of 2013, It is estimated that the market size of the world wheat flour is about 420 trillion won.</p> <p>⑤ Demand for flour substitute processing powder is expected to increase gradually as consumers are increasingly avoiding wheat flour.</p> <p>3. Increased sales and job creation through commercialization of gluten-free Korean products</p> <p>① Commercialization of 'gluten-free Korean food products' that meet taste of consumers, such as taste, texture and soft texture</p>
---	--

Application plans of research products	<p>② When commercializing Korean food products such as gluten-free chilled noodles, udon, japanese noodles, cold noodles, and hand-made noodles, it is expected to generate more than 1 billion won annually and create one new employment (one male researcher).</p> <p>③ The organizers are currently operating 25 udon specialty stores at national highway rest areas, and are supplying udon noodles and sauces to about 45 udon specialty stores, reflecting the growing need for health, safety and high quality of consumers at highway rest areas. Recently, we have experienced opening and selling of Udon specialty shop, Udon specialty store, etc., and if we open a new specialty store of gluten free Udon after this project, we can expect additional annual sales of about 1 billion won</p> <p>④ The main organization is currently supplying Korean food noodles to P and C companies, which are large food corporations, as an OEM type, so that they can utilize the marketing power of P company and C company that are interested in healthy food and watch consumers' flour avoidance trend. If ODM is delivered, additional sales of over W1bn annually are expected.</p> <p>⑤ The main agency is currently supplying Korean food to large companies such as H, L, and NH, and expects to generate more than KRW1bn annually when delivering gluten-free Korean-style noodles to NB or PB brands. Can</p> <p>⑥ The Organizing Authority is currently supplying Korean food to the military through the bidding of the DAPA. After this task, the government plans to propose a "gluten-free Korean-style noodle" for the health of the ROK Armed Forces. Additional sales can be expected if imported</p> <p>⑦ The main organization is exporting Korean food noodles to USA, Hong kong and China through T company, which is a food material distribution company in the United States, K company, a Korean food material distribution company in Hong Kong, and H company, a Korean food materials distribution company in China After exporting 'gluten-free Korean-style noodle product' after the completion of this project, we can expect additional annual sales of more than KRW 1 billion</p> <p>4. Increase sales and job creation by developing source for gluten-free Korean products</p> <p>① Develop and commercialize customized sauces suitable for gluten-free Korean products</p> <p>② Development and commercialization of customized source for children, a core customer of gluten-free products</p> <p>③ The main organization is supplying sauces to restaurants, such as H Company, L Company, NH Company, highway rest area, Yong Udong, Smiley, and Chosun, etc., and supply customized sauces for gluten-free Korean food. If you do, you can expect additional sales.</p>				
key word	Gluten-free	Gluten fermentation	Gluten analysis	Global Product	

<Content>

1. Overview of research project	1
2. Current trends in research	52
3. Research results	66
4. Accomplishments and expected contribution	462
5. Application of research results	465
6. Overseas scientific information collected during the study	466
7. Research securities	466
8. Status of research equipment registered at NTIS	466
9. Laboratory safety management performance	466
10. Representative research achievements	468
11. Other Matters	468
12. References	469

〈 목 차 〉

1. 연구개발과제의개요	1
2. 국내외 기술개발 현황	52
3. 연구수행 내용 및 결과	66
4. 목표달성도 및 관련분야에의 기여도	462
5. 연구결과의 활용계획 등	465
6. 연구과정에서 수집한 해외과학기술정보	466
7. 연구개발성과의 보안등급	466
8. 국가과학기술종합정보시스템에 등록된 연구시설·장비현황	466
9. 연구개발과제 수행에 따른 연구실 등의 안전조치 이행실적	466
10. 연구개발과제의 대표적 연구실적	468
11. 기타사항	468
12. 참고문헌	469

〈별첨1〉 연구개발보고서 초록

〈별첨2〉 자체평가의견서

〈별첨3〉 연구 성과 활용 계획서

8. 뒷면지

주 의

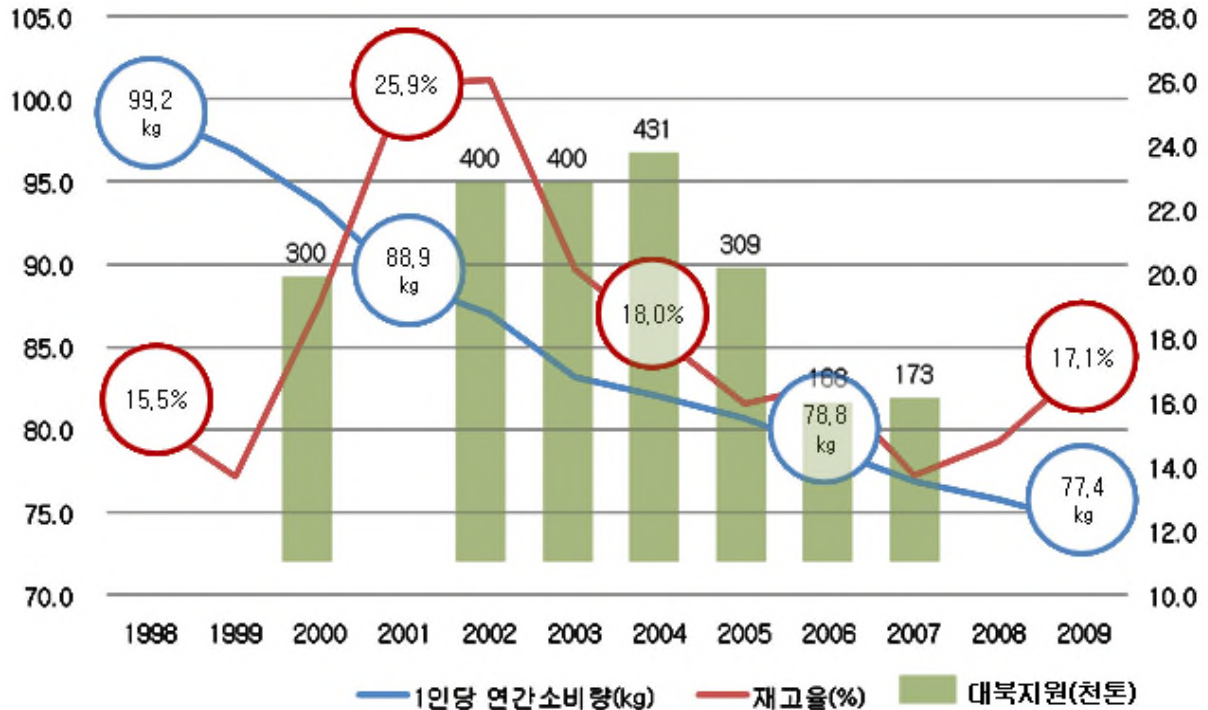
1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 고부가가치식품기술개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표하는 때에는 반드시 농림축산식품부에서 시행한 고부가가치식품기술개발사업의 연구 결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니됩니다.

1. 연구개발과제의 개요

코드번호	D-03
------	------

가. 기술개발의 필요성

- 밀가루는 우리나라 식품산업에서 가장 중요한 원료의 하나로서 주용도는 제면·제과·제빵으로 2001년도 밀가루 생산량은 1,779,000만톤 이 중 제면용이 37.7%, 제과·제빵용이 21.9%를 차지하고 있음.
- 우리나라에서 생산되는 밀가루는 강력 밀가루, 중력 밀가루, 박력 밀가루로서 1986년부터 생산된 혼합 밀가루와 전립 밀가루가 있는데, 혼합 밀가루는 제면용으로 중력 밀가루에 속함. 전립 밀가루는 밀 전체를 분쇄한 것으로 특수 제빵·제과용으로 이용되며, 강력 밀가루는 주로 미국의 경질봄 밀(Dark Northern Spring, DNS)로 만들며, 1991년부터 캐나다의 CWRS(Canada Western Red Spring)도 제빵용으로 이용되기 시작하였음.
- 중력 밀가루는 미국 밀을 원료로 하는 경우 흰 밀(Western White)과 경질 겨울 밀(Hard Red Winter)을 같은 비율로 섞어 제분하여 생산하며 주로 제면용과 가정용 다목적 밀가루로 쓰이고 있음.
- 최근에는 제면용 밀가루로 호주 밀을 이용하기도 하며, 호주 밀은 크게 호주 표준 흰 밀(Australian Standard White), 호주 흰 밀(Australian White)과 호주 경질 밀(Australian Hard)등으로 이루어져 있으며, 최근 국수 종류의 다양화와 품질의 고급화에 따라 호주 밀의 주종인 ASW의 선호도가 크게 증가함에 따라 도입량 면에서도 해마다 증가하고 있는 추세임.
- 밀가루의 경우, 100여 년 동안 체계적인 연구 축적과 산업화가 이뤄져 각각의 음식에 최적화된 수백 가지 제품이 생산되고 있으며, 밀을 주식으로 하는 서구 사회에서는 대부분 밀가공 식품인 빵, 과자, 국수, 튀김, 피자 등으로 발전해 왔으며, 탄수화물을 주로 하는 가공에 있어서 밀 가공식품은 거의 대부분임.
- 최근 국내의 경우에서도 음식문화가 점차적으로 서구화되면서 쌀이 주식이기는 하나 매년 1인당 쌀 소비량이 1998년에 99.2 kg 에서 2009년에는 77.4 kg으로 약 23 % 감소하고 있으며, 쌀 대신 밀가루 음식의 소비는 점차 증가하고 있는 추세임.



자료: 통계청, 농림수산물주요통계(2010)

그림. 국내 쌀 소비 현황

- 전분은 식물체의 주요한 저장 탄수화물이자 인간의 음식물의 주된 탄수화물 공급원으로 식물체의 세포내 색소체에 의하여 광합성 작용으로 합성되는 고분자 화합물이며 생물자원으로서 풍부함과 다양한 용도 특성측면에서 매우 중요한 산업적 생물고분자(industrial bio-polymer)임.
- 전분의 사용분야는 식품뿐만 아니라 건축, 제지, 섬유, 의약품, 화학물질의 전구체 등으로 다양하며 석유 에너지의 대체 가능성이 가장 큰 소재로서 태양에너지, 원자력 에너지와 함께 3대 에너지 원으로 중요시되고 있음. 전분은 천연고분자 중 유일하게 입자형태를 가지고 있으며, 전분의 합성은 식물체내의 기본 구성단위인 색소체(plastid) 중의 하나인 아밀로플라스트(amyloplast)내에서 일어나는데 다양한 효소들에 의하여 포도당이 중합되어 사슬 및 가지를 형성하며 또한 최종적인 구조가 결정됨.
- 옥수수, 밀, 카사바, 사고나무, 쌀 등으로부터 얻을 수 있는 탄수화물인 무미, 무취의 백색 가루인 전분은 α -D-glucose가 α -1,4 결합과 α -1,6결합으로 연결된 형태를 이루고 있으며 포도당 분자의 결합정도를 나타내는 D.E (dextrose equivalent)가 500~20,000인 비교적 저분자인 아밀로오즈와 수백만의 분자량을 지닌 아밀로펙틴 두 가지 성분으로 구성된 polymeric mixture 형태임

표. 국내 국수의 정의 및 분류표

-
1. 건면류 : 밀가루 등의 곡분 또는 전분을 주원료로 하여 만든 생면 또는 숙면을 건조시킨 것을 말한다.
 - (1) 국수 : 밀가루 등의 곡분을 주원료로 하여 제조한 것을 말한다.
 - (2) 냉면 : 메밀가루(5%이상), 밀가루, 곡분 또는 전분의 혼합물을 주원료로 하여 압출, 성형 등 제조·가공한 것을 말한다.
 - (3) 당면 : 전분(80%이상)을 주원료로 하여 제조한 것을 말한다.
 2. 생면류 : 면발을 성형한 후 바로 포장한 것이거나 표면만 건조시킨 국수, 수제비류, 만두류 등을 말한다.
 3. 숙면류 : 면발을 성형한 후 익힌 것 또는 면발의 성형과정 중 익힌 것으로서 국수, 냉면, 당면, 수제비류 등을 말한다.
 4. 유탕면류 : 면발을 익힌 후 유탕 처리한 것을 말한다.
 5. 호화건면류 : 면발을 호화한 후 건조한 것을 말한다.
 6. 개량숙면류 : 면발을 성형하고 찌거나 삶은 다음 밀봉포장 후 가열 살균하여 장기 보존이 가능한 것을 말한다.
 7. 냉동면류 : 생면 또는 숙면을 냉동(-15℃이하)한 것을 말한다.
 8. 파스타류 : 듀럼, 세몰리나, 파리나 또는 밀가루를 주원료로 하여 파스타 성형기로 고압 압출 후, 절단하여 숙성, 건조한 것으로서 마카로니, 스파게티, 버미셀리를 말한다.
 - (1) 마카로니 : 구멍이 있는 모양 또는 그 외의 형상(둥근 모양 및 납작한 모양을 제외함)으로 성형한 것을 말한다.
 - (2) 스파게티 : 직경이 1.2mm이상 2.5mm미만의 굵기에 둥근 모양 또는 납작한 모양으로 성형한 것을 말한다.
 - (3) 버미셀리 : 직경이 1.2mm미만의 굵기에 둥근 모양으로 성형한 것을 말한다.
-

- 아밀로오스는 기본적으로 직쇄상의 구조로 잘 알려진 탄수화물로 표현되나 부분적으로 가지모양의 구조를 포함하며, 나선형의 형태를 이루고 있고 그 내부는 수소결합을 이루고 있어 소수성을 나타내며, 아밀로펙틴은 가지구조를 가지지 않은 바깥부분인 A-chain과 가지구조를 지닌 안

쪽의 B-chain, 한 개의 환원성 말단기를 지닌 C-chain으로 구성되어 있음

- 전분입자는 분자를 둘러싸는 어떠한 형태의 막도 존재하지 않지만 직·간접 또는 물분자를 통한 수소결합에 의하여 강한 연결을 이루고 있으며 일정한 형태의 micelle을 형성하고 있으며, 아밀로펙틴의 구조는 Nikuni에 의하여 처음 제안되었음.
- French는 많은 가지들이 서로 평행하게 배열되어 큰 결정화도를 지닌다는 cluster 모델을 제시하였고, 현재까지는 cluster 모델이 가장 합리적인 것으로 여겨지고 있으며, 전분의 입자구조는 결정성 영역과 비결정성 영역의 두 가지로 구분되며 전분입자는 편광하에서 복굴절 현상 (birefringence)을 나타낸다.

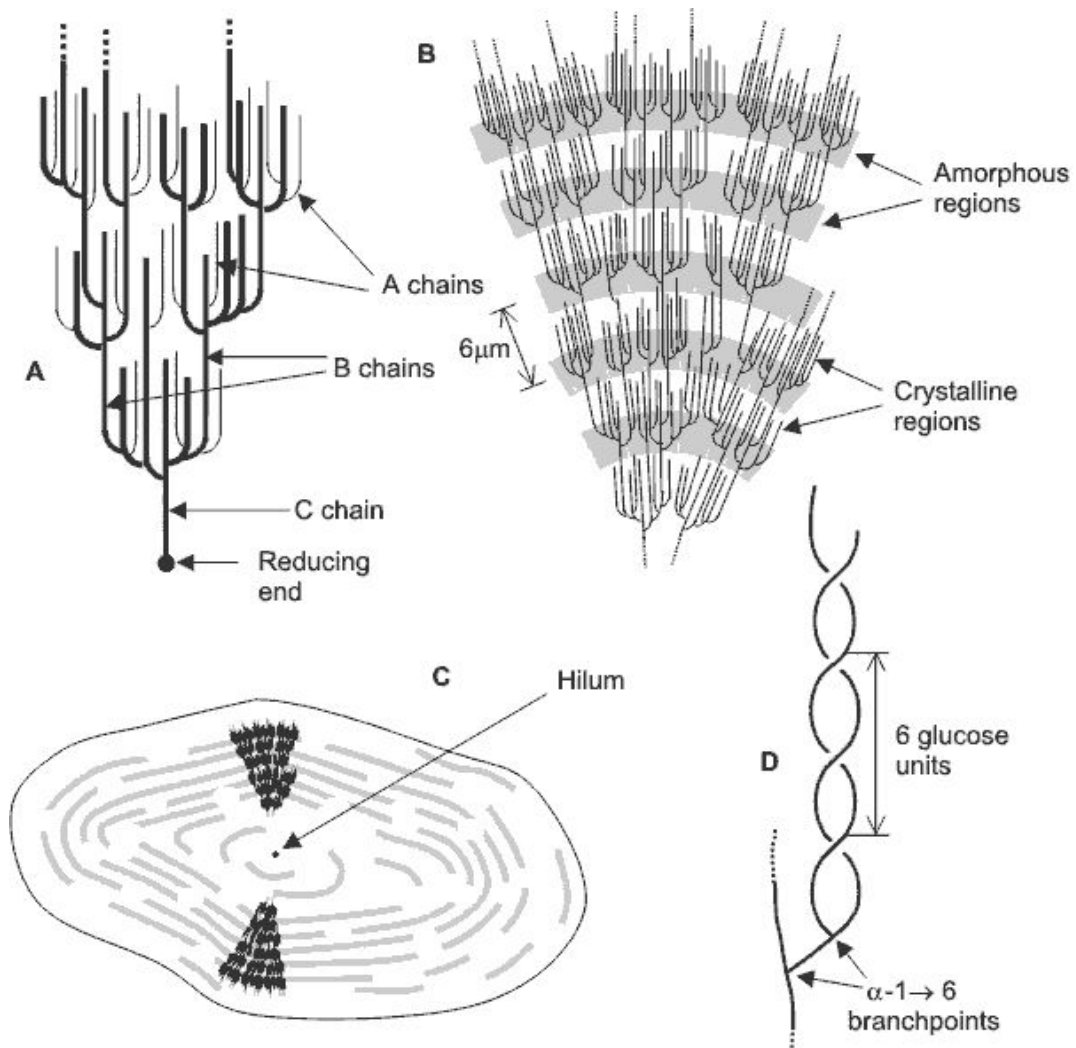


그림. Diagrams of amorphous and crystalline region for starch

- 전분의 호화(gelatinization)는 주로 열과 수분의 존재 하에서 일어나는 현상으로 수화와 팽윤과정을 거친 전분에서 급격히 비가역적인 입자의 팽윤이 발생하면서 전분 고유의 결정성이 상실되는 현상이 일어나는데 이것이 전분의 호화임. 전분의 호화 특성은 전분 결정성 영역의 특성 및 입자의 크기와 매우 밀접한 관계를 가지고 있으며 입자 크기가 작을수록 호화온도는 낮아짐
- 전분의 호화 과정이 진행되는 동안 전분 내의 아밀로오스 분자들의 용출이 일어나면서 전분용액의 점도가 상승함과 함께 결정성에 동반하는 복굴절 현상이 사라지게 되며, 전분의 호화에 관여하는 용매는 주로 물이지만 암모니아, 포름산, dimethyl sulfoxide 등도 전분의 호화에 관여하며 전분의 호화에 영향을 미치는 요인으로는 수분함량, pH, 염류의 종류 및 농도 등이 알려져 있음.
- 아밀로펙틴 중 감자전분 아밀로펙틴의 phosphate기는 물분자의 hydroxy기와 결합을 형성하기 때문에 친수성이 증가하면서 팽윤력이 급격히 상승하게 되어 다른 전분에 비하여 감자전분은 팽윤력이 높게 형성되며, 전분의 호화 과정에서 일어나는 팽윤력은 전분입자의 구조, 화학적 조성, 아밀로오스와 지질의 함량, 전분입자의 크기에 따라 달라짐
- 전분의 호화특성은 아밀로펙틴의 사슬길이에 따라 주로 영향을 받으며 입자의 크기에 따라서 전분의 팽윤력, 용해도, 호화특성, 결정성 및 효소 반응성 등이 변하게 된다. 전분의 효소적 가수분해(enzymatic hydrolysis)에서는 전분입자의 크기가 작을수록 상대적으로 쉽게 가수분해가 이루어지며 이 같은 결과는 α -amylase를 이용하여 전분입자의 표면구조를 관찰 한 연구 결과가 있음.
- 호화된 gel 상태의 전분은 냉각이나 저장 과정에서 분자간의 회합이 이루어져 노화(retrogradation)가 진행되며 각 분자사이의 수소결합이 형성되어 안정화되며, 노화된 전분은 열에 매우 안정한 특성을 지니며 소화효소의 접근이 이루어 지지 않는 난소화성 전분을 형성하기도 한다. 전분의 노화는 이중나선 구조(helical structure)³³⁾를 하고 있는 아밀로오스 분자들 사이에서 주로 형성되며 노화의 진행은 그림과 같이 진행된다
- 쌀은 농업소득의 46.9%를 점하고 있는 농업소득원의 중심작목으로서 농업부문의 안정화 측면에서 그 역할이 매우 중요하나 2004년 쌀 재협상을 앞두고 있는 지금 쌀 산업을 둘러싼 국내외 여건은 그 어느 때보다 불리한 방향으로 전개되고 있는 상황임

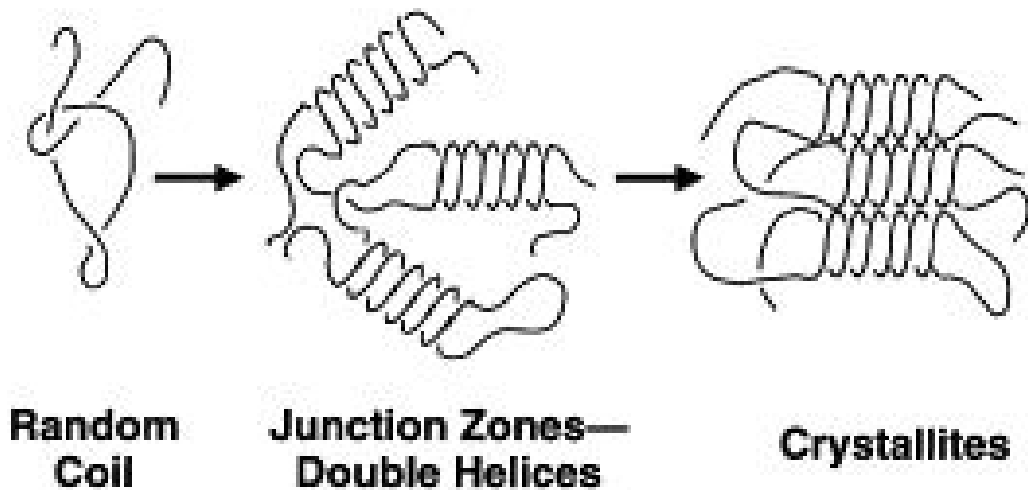
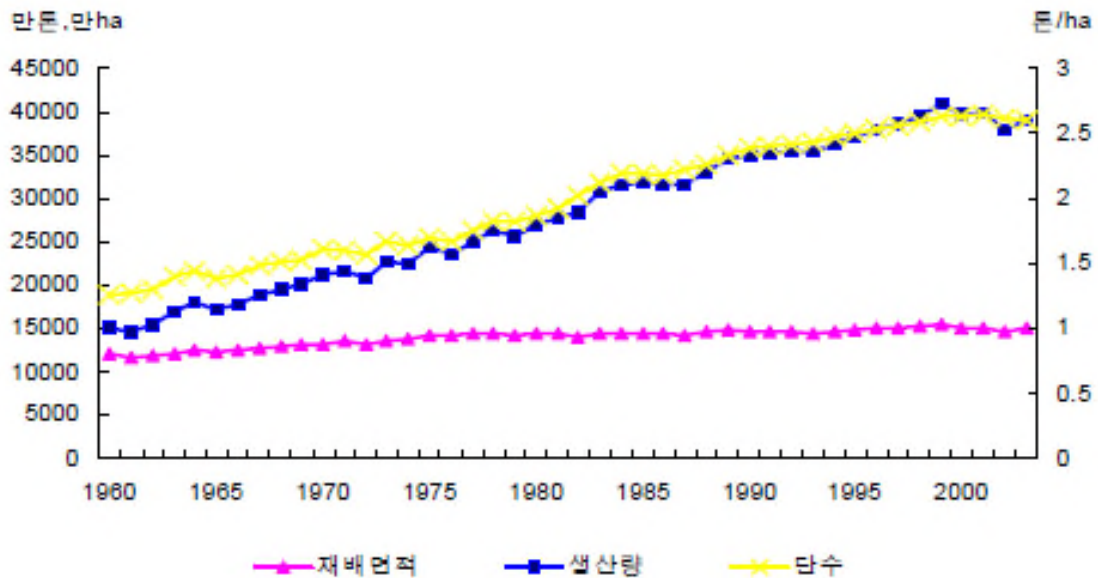


Fig. Scheme of amylose retrogradation

- 1995년 WTO의 출범으로 농산물 시장개방 및 DDA출범, 쌀재협상, FTA체결 등으로 그동안 자급 자족의 형태를 추구해온 쌀 시장 또한 국제경쟁체제에 본격적으로 진입하였고, 이런 상황에서 중국은 2002년 WTO에 정식 가입하였으며, 곡물 중 유일하게 경쟁력이 높은 쌀을 주로 수출에 주력할 것으로 예상됨
- 자포니카 최대산지인 동북 3개성의 쌀 식부면적 증가추세가 과거 15년 동안 거의 4배정도로 급격히 증가한 것을 보면 알 수 있으며, 미국은 휴경폐지에 의해 증가되는 쌀 생산량의 증가분을 주로 수출 쪽으로 돌려 수출량 증가에 주력하고 있음
- 따라서 주요 쌀 수출국들의 국내 쌀 시장에 대한 수출압력이 더욱 커질 것으로 예상되며, 뿐만 아니라 미국과 유럽연합(EU)이 농산물 관세인하 방식, 농업보조금 감축폭 등 핵심 쟁점 사항에 전격적으로 합의함에 따라 2004년 쌀 재협상이 한층 더 험난해질 것으로 예상됨. 이러한 시장 개방의 흐름 속에서 농업부존자원 및 국제경쟁력이 열악한 우리 쌀 시장은 대외 의존도가 계속적으로 증가할 것으로 전망됨
- 세계 쌀 재배 면적은 1960년 1억 2,014만 ha에서 1999년 1억 5,514만 ha로 꾸준히 증가하여 연평균 0.7%의 증가율을 나타냈으며, 세계 쌀 재배면적은 1975년도에 식량위기를 경험하면서 크게

늘어나 1990년대 초반까지 1억 4천만 ~ 1억 4,700만ha 수준을 유지해 왔으며, 그 후 WTO체제의 출범과 농산물 무역자유화의 진전으로 재배면적이 다시 늘어나기 시작하여 1999년도에 1억 5,514만 ha까지 증가하였음.



자료 : <http://worldfood.muses.tottori-u.ac.jp>
<http://usda.gov>

그림. 국내 쌀 재배 면적 및 생산량

- 그러나 최근 들어 국제가격이 하락함에 따라 재배면적이 약간 줄어들고 있는 추세이다. 이러한 세계 쌀 재배 면적의 증가율은 계속적으로 감소 추세를 보이고 있으며, 1960년대 평균재배면적은 1억 2,468만 ha, 1970년대에는 1억 3,986만 ha로 12.2% 증가했으나 그 이후 증가율이 점점 감소하여 1980년대에는 1억 4,459만 ha, 1990년대에는 1억 4,947만 ha로 각각 3.4%씩의 증가율을 나타냈음. 2000년 이후 약간의 감소를 보였으나 2003년에는 전년대비 2.9%증가한 1억 4,981만 ha를 기록하였고, 세계 쌀 생산은 품종개량 및 농업기술의 발전으로 인하여 단위면적당 평균 수확량세계 쌀 재배 면적은 1960년 1억 2,014만 ha에서 1999년 1억 5,514만 ha로 꾸준히 증가하여 연평균 0.7%의 증가율을 나타내고 있음
- 주요 쌀 수출입국의 단수는 나이지리아를 제외한 모든 주요수출국 및 수입국이 증가성향을 보이고 있다. 세계 단수는 연평균 2.4%씩 증가하였으며 주요 쌀 수출국과 수입국은 각각 1.8%와 1.5%씩 증가하였으며, 1990년대에 2.5%로 가장 큰 증가율을 나타내었음

표. 주요 쌀 수출입국의 재배면적

(단위 : 만ha)

	1960년대	1970년대	1980년대	1990년대	2003년	연평균증가율
world	12,468	13,986	14,459	14,947	14,981	0.5
주요수출국	4,922	5,500	5,941	6,333	6,534	0.9
미 국	76	101	112	125	121	2.0
호 주	3	8	11	14	8	7.3
태 국	632	811	945	941	1,030	1.9
베 트 남	473	516	586	708	735	1.4
인 도	3,602	3,889	4,087	4,321	4,400	0.7
파키스탄	138	174	201	224	240	2.4
주요수입국	1,531	1,812	1,965	2,099	2,647	1.2
브 라 질	420	539	525	388	350	0.2
E U	29	31	32	39	41	1.0
인도네시아	744	855	988	1,141	1,160	1.4
필 리 핀	318	353	335	366	410	0.6
나이지리아	21	34	85	165	180	19.8
기 타 국 가						
미얀마	465	481	465	548	640	1.3
멕시코	15	16	14	8	5	-1.5
이집트	39	45	41	57	62	2.4
일본	324	264	222	199	166	-1.1
중 국	2,959	3,498	3,268	3,116	2,710	-0.3

자료 : <http://worldfood.muses.tottori-u.ac.jp>
<http://usda.gov>

- 중국과 필리핀이 각각 연평균 5.0%와 4.3%로 가장 큰 증가율을 보였다. 주요연대별로 살펴볼 때 대부분의 나라들이 꾸준한 증가추세를 보이고 있으나 최근 전 세계적으로 이상기후현상이 나타나는 등 기후적 여건이 악화됨으로 인해 단위당 국제 쌀 생산량은 감소추세를 보이고 있으며, 2003년에는 전년대비 0.4%감소한 2.6톤/ha를 기록하였음.
- 재배면적의 증가와 단수의 증가에 따라 세계 쌀 생산량은 연평균 3.6% 증가율을 보였으며 주요 쌀 수출국은 1960년대 5,400만 톤에서 1970년대에는 28.9% 증가한 6,960만 톤으로 증가하였으며 1980년대와 1990년대에는 각각 9,369만 톤과 1억 2,444만 톤으로 34.6%와 32.8% 증가하였음
- 주요 쌀 수출국 중 미국, 호주, 파키스탄이 5.9%, 12.0%, 8.5%씩 큰 폭의 증가율을 보여 주요 쌀 수출국의 연평균 증가율은 4.1%에 달하였으며, 주요 쌀 수입국의 경우 1970년대와 1980년대에 50.8%와 61.2%씩의 큰 증가율을 보인데 반해 1990년대에는 그 증가폭이 크게 감소하여 20.0% 증가율을 나타내고 있음
- 주요 쌀 수출국은 1960년대 이후 지속적인 재배면적의 증가율을 보이고 있으며 일본과 한국의 수입개방에 따라 중단립종의 주요 수출국인 파키스탄과 호주가 각각 연평균 2.4%와 7.3%의 증

가를 보였음. 1960년대 주요 쌀 수출국의 평균 생산량은 4,922만 ha, 1970년대는 11.7% 증가한 5,500만 ha, 1980년대는 5,941만 ha로 8% 증가하였음

- 1990년대에는 6.6% 증가한 6,333만 ha로 그 증가율이 계속 감소하고 있는 추세이나 2003년에는 전년대비 7.1% 증가한 6,534만 ha를 기록하였음. 주요 쌀 수입국 또한 모든 나라에서 증가율을 보여 주요수입국의 쌀 재배면적은 1960년대 1,531만 ha에서 2003년에는 전년 대비 3.0%증가한 2,647만 ha를 기록하였음
- 1960년대 1,886만 톤에서 1990년대에는 4,926만 톤으로 연평균 5.0%씩 증가하여 주요수출국 에 비해 증가율이 더 큰 폭으로 증가했다. 나이지리아와 필리핀, 인도네시아의 증가율이 큰 폭으로 증가하였다. 이러한 세계 쌀 생산량의 증가는 재배면적 확대에 의한 생산량의 증가라기보다는 다수확 품종의 개발 및 보급, 재배기술의 발전, 화학비료의 사용증가에 의한 즉 기술 발전에 의한 단위 증가의 결과라 볼 수 있다.

표. 주요 쌀 수출입국의 단위

(단위 : 톤/ha)

	1960년대	1970년대	1980년대	1990년대	2003	연평균증가율
world	1.4	1.7	2.2	2.5	2.6	2.4
주요수출국	2.1	2.2	2.6	3.1	3.4	1.8
미국	3.3	3.6	4.2	4.6	5.2	2.1
호주	4.8	4.2	5.0	6.1	6.4	1.1
태국	1.2	1.2	1.3	1.6	1.7	1.2
베트남	1.3	1.4	1.8	2.5	2.9	2.8
인도	1.0	1.2	1.5	1.9	2.0	2.3
파키스탄	1.1	1.6	1.6	1.8	2.0	3.1
주요수입국	1.6	1.7	2.1	2.3	2.6	1.5
브라질	1.0	1.0	1.3	1.8	2.3	2.2
EU	3.4	3.5	3.9	4.0	4.1	0.7
인도네시아	1.4	1.9	2.7	2.8	3.0	2.6
필리핀	0.9	1.2	1.7	1.9	2.2	4.3
나이지리아	1.2	1.1	1.1	1.1	1.2	-0.1
기 타 국 가						
미얀마	1.0	1.2	1.6	1.7	1.6	1.2
멕시코	1.6	1.9	2.4	3.0	2.2	1.0
이집트	3.5	3.6	4.0	5.2	6.3	2.0
일본	3.7	4.1	4.4	4.5	4.3	0.5
중국	1.9	2.6	3.7	4.3	4.2	5.0

자료 : <http://worldfood.muses.tottori-u.ac.jp>
<http://usda.gov>

- 그러나 최근 전 세계적인 이상기후 현상으로 인한 단수의 감소로 국제 쌀 생산량은 2001년 이후 감소추세를 보이고 있으며, 특히 주요 중단립종 생산국가인 미국, 중국, 일본의 생산량 감소로 인해 국제 시장에 서의 중단립종 쌀 가격이 급격히 증가하고 있는 실정임
- 세계 쌀 소비량을 변동시키는 요인으로는 인구증가, 소득증가, 식품소비행태의 변화 등을 들 수 있다. 특히 쌀을 주식으로 하는 아시아의 인구증가율에 따라 쌀 소비량의 변화가 크며, 아시아 인구 성장률을 보게 되면 세계 인구성장률이 1980년부터 1995년 까지가 약 1.8%, 1990년부터 1995년까지가 약 1.6% 인데 반해 대부분의 쌀을 주식으로 하는 대부분의 아시아 지역의 인구성장률은 이를 상회하는 것으로 판단됨
- 특히 개발도상국들이 많이 위치해있는 동남아시아와 중남아시아 지역의 인구성장률이 동아시아 지역에 비해 큰 것으로 나타났으며, 이처럼 세계 인구의 증가 특히 아시아 지역의 인구증가로 인해 세계 쌀 소비량은 꾸준한 증가추세를 보이고 있어 1960년 ~ 2003년 동안 1억 5,614만 톤에서 4억 1,281만 톤으로 증가하였으며, 세계 쌀 소비량의 연평균 증가율은 3.7% 정도임

표. 주요 수출입국의 쌀 소비량

(단위 : 만톤, kg)

	1960년대		1970년대		1980년대		1990년대		2003	
	총소 비량	일인당 소비량	총소 비량	일인당 소비량	총소 비량	일인당 소비량	총소 비량	일인당 소비량	총소 비량	일인당 소비량
world	17,586	52.3	23,696	57.4	30,755	62.9	37,257	65.1	41,291	65.5
주요수출국	5,141	76.9	6,468	75.1	8,433	75.3	10,741	79.4	12,033	85.5
미국	110	5.6	154	7.1	235	9.9	339	12.6	395	13.3
호주	5	4.0	6	4.6	11	6.9	30	16.6	38	19.3
태국	591	183.4	781	183.5	837	162.0	970	147.0	1,020	159.7
베트남	634	171.4	758	156.6	1,048	173.2	1,454	197.4	1,820	223
인도	3,665	73.8	4,571	72.9	6,089	78.8	7,803	84.0	8,500	81
파키스탄	137	23.4	199	26.2	215	21.5	245	19.1	270	17.9
주요수입국	1,984	49.6	2,843	54.9	4,242	65.0	5,330	69.0	6,099	71.0
브라질	414	49.9	514	46.4	685	49.3	786	47.9	830	45.6
EU	124	3.8	132	3.9	147	4.1	190	5.1	223	5.9
인도네시아	1,132	101.9	1,726	123.7	2,699	155.7	3,356	161.7	3,665	156
필리핀	289	96.7	414	91.6	577	99.4	750	102.9	1,025	121.1
나이지리아	25	5.6	56	9.1	135	16.6	249	22.7	356	26.6
기 타 국 가										
미얀마	370	147.1	528	172.2	657	180.5	984	219.1	1,020	239.9
멕시코	23	5.0	33	5.4	42	5.5	55	5.8	73	6.9
이집트	92	30.4	141	37.4	155	30.8	257	39.9	330	44.2
일본	1,170	118.4	1,079	96.9	1,004	83.2	933	74.4	866	68.1
중국	5,657	77.9	8,621	93.5	11,240	105.4	13,118	108.4	13,500	104.9

자료 : <http://worldfood.muses.tottori-u.ac.jp>
<http://usda.gov>

- 동남아 국가 중 인도네시아와 필리핀 그리고 중동의 이란, 이라크, 사우디아라비아 등 쌀 부족 국가들의 수입수요가 빠르게 증가하고 있으며, 남미의 브라질, 아프리카의 나이지리아역시 주요 쌀 수입 국가이다. WTO 출범이후 일본, 한국, EU의 수입량이 증가하고 있으며 순수출국이었던 대만의 경우 WTO 가입에 따라 순수입국이 될 것으로 전망된다. 인도네시아와 EU의 경우 2003년도 수입액이 각각 200만 톤과 93만 톤이었으며, 브라질의 경우 2002년도 125만톤이던 것이 2003년도에는 50만 톤으로 60%의 감소를 보였다. 재고량의 경우 1960년 이후 꾸준한 증가를 보이던 것이 최근 국제 교역이 증가함으로 인해 2001년 이후 급격한 감소추세를 보여 2003년에는 전년대비 22.3%감소하여 1983년 이후 최저치인 8,260만 톤을 기록하였다.

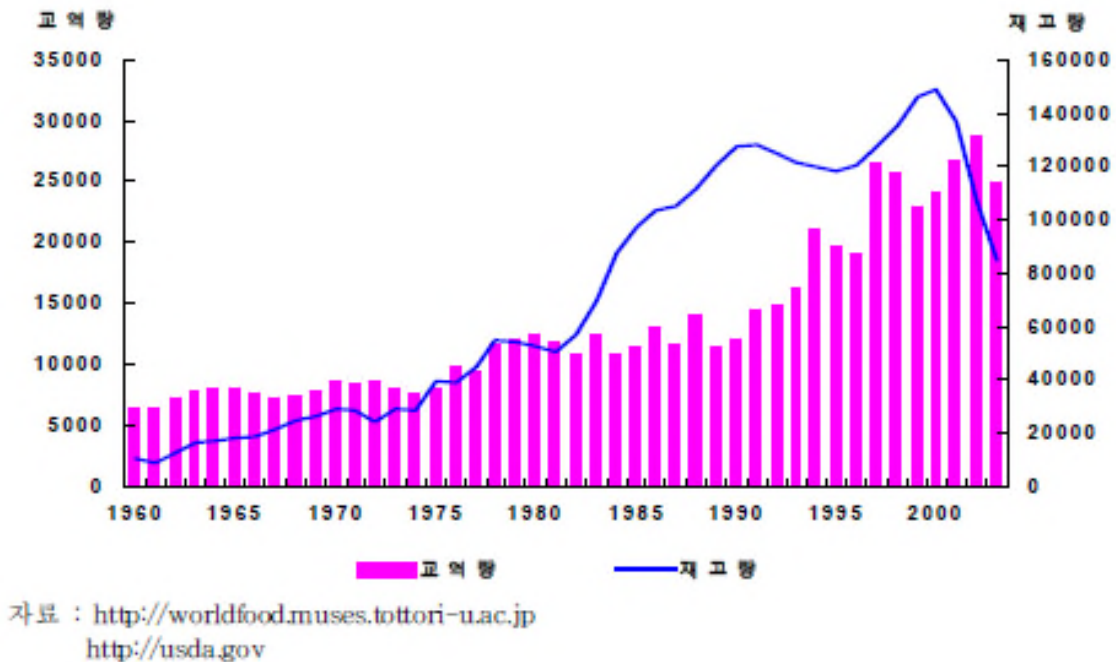


그림. 국제 쌀 교역량 및 재고량

- 우리나라 쌀 재배면적은 1960년 112만 ha에서 2003년에는 102만 ha로 전년대비 3.5% 감소하였다. 주요 연대별 벼 재배면적을 살펴보면 1960년대에는 118만 ha에서 1970년대는 2.6% 증가한 121만 ha, 1980년대와 1990년대에는 124만 ha와 110만 ha로 1980년대에는 2%증가하였으나 1990년대에는 꾸준한 감소를 보여 1980년대 대비 11.4%가 감소하였다. 특히 1987~96년에는 재고과잉에 따른 쌀 가격 하락으로 연평균 2만 1,000ha감소하여 1996년에는 105만 ha까지 감소하였다.

이 같은 급속한 재배 면적의 감소와 1993년과 1995년의 냉해로 인해 1996년 재고량이 급속히 감소하여 쌀 가격의 상승으로 인해 1996년 이후 2001년까지 재배면적이 연평균 5,500ha 증가하여 2001년에는 108만 3천까지 증가하였으나 연속 풍작, MMA 수입 증대에 따른 쌀 가격하락으로 2003년에는 재배면적이 전년대비 약 3.5%감소한 102만 ha로 감소하였다.

표. 국내 쌀 생산현황

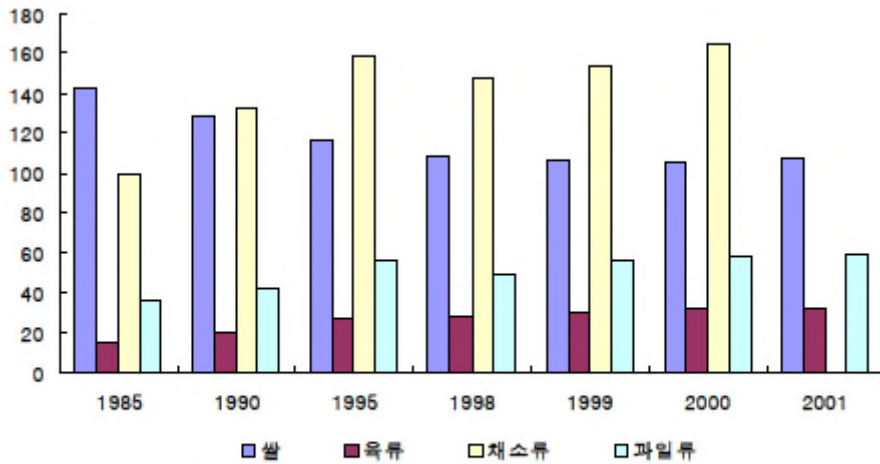
	1960년대	1970년대		1980년대		1990년대		2002년		2003년	
			증가율		증가율		증가율		증가율		증가율
재배면적	118	121	2.6	124	2.0	110	-11.4	105	-2.8	102	-3.5
단 수	3.0	3.9	28.8	4.5	15.1	4.7	5.1	5.1	-8.1	4.4	-5.8
생산량	359	474	32.2	556	17.2	517	-7.1	493	-10.7	445	-9.7

자료 : 농림부, 「양정자료」, 각 연도
 통계청, <http://www.nso.go.kr>

- 국내 쌀 소비량은 1960년대 평균 소비량이 379만 톤이었던 것이 1970년에는 34.6%나 급증한 511만 톤으로 증가하였고 1980년대에는 553만 톤으로 8.2% 증가하는 등 꾸준한 증가추세를 나타내었음
- 식생활 구조의 변화에 따라 육류, 과일류 등 대체식품의 다양화와 건강·미용을 위한 다이어트, 현대인의 바쁜 일과 등으로 결식횟수 증가로 인해 1990년대에는 5.3% 감소한 524만 톤으로 감소하였으며 1999년에는 499만 톤까지 감소는 추세임 이처럼 식생활 환경의 변화, 여성의 사회진출 확대, 핵가족화 등으로 쌀 소비량은 감소추세를 보이고 있는 반면 육류, 채소류, 과일류는 증가추세를 보이고 있음
- 1인당 쌀 소비량은 1960년대 132.4kg 이었으며 1970년대 연평균 1인당 소비량은 143.3kg으로 8.2%증가하였으나, 1980년대에는 5.6%감소한 135.2kg, 1990년대에는 115.6kg으로 1980년대 대비 14.5% 감소하는 등 지속적인 감소를 보여 2003년에는 83.2kg까지 감소하였음.
- 이처럼 1인당 쌀 소비량은 지속적인 감소추세를 보이고 있으나 일본의 2002년 1인당 소비량인 70.6kg에 비해 여전히 높은 수준을 유지하고 있으며, 이는 가공용 소비는 1980년 36천 톤에서 2003년 212천 톤으로 증가하였으며 1991년부터 급속하게 증가하기 시작하여 1991년 148천 톤이

던 것이 1994년에는 365천 톤에 달하였음

- 하지만 그 후 지속적인 감소를 보여 1997년에는 1991년 이후 가장 낮은 수준인 141천 톤에 이르렀으며, 이러한 쌀 생산량의 감소와 가공 소비의 증가로 쌀 자급률은 1990년부터 2002년까지 평균 99.4%를 나타냈으며 1992부터 1996년까지는 100% 수준에 미치지 못했으며, 그 이후 1999년 96.6%를 제외하고 2002년까지 자급률이 100%를 넘는 수준을 기록하였으며 2003년에는 전년대비 9.0%감소한 97.4%를 기록하였음



자료 : 농림부, 「양정자료」, 각 연도
 농림부, 「농림수산물통계연보」, 각 연도
 통계청, <http://www.nso.go.kr>

- 국내 쌀 가격은 수매가격, 농가판매가격 및 소비자가격 모두 1980년 이후 급격하게 증가율이 감소하고 있으며 특히 쌀 수입량이 증가하기 시작한 2001년과 2002년에는 모든 쌀 가격이 감소추세를 보이고 있음
- 최근 시장개방 압력의 증가로 인해 더 이상 정부의 가격지지정책도 쓸 수 없게 되면서 정부는 또한 공공비축제를 실시하기로 결정하여 쌀 가격은 점점 감소할 것으로 예상됨.
- UR협상의 결과 관세화에 의한 쌀 개방을 유예하고 1995~04년까지 1988~90년을 기준년도로 하여 평균 소비량의 1% 즉 5만 1천 톤에서 4%인 20만 5천 톤까지 수입량을 증가시키기로 되었음
- 1995년부터 2002년까지 총 85만 5천 톤이 수입되었으며 이중 중단립종과 장립종이 각각 79.7%와 20.3%를 차지하였다. 중단립종의 경우 중국으로부터만 수입이 되었으나 2001년부터는 미국과 호주산도 수입되었음

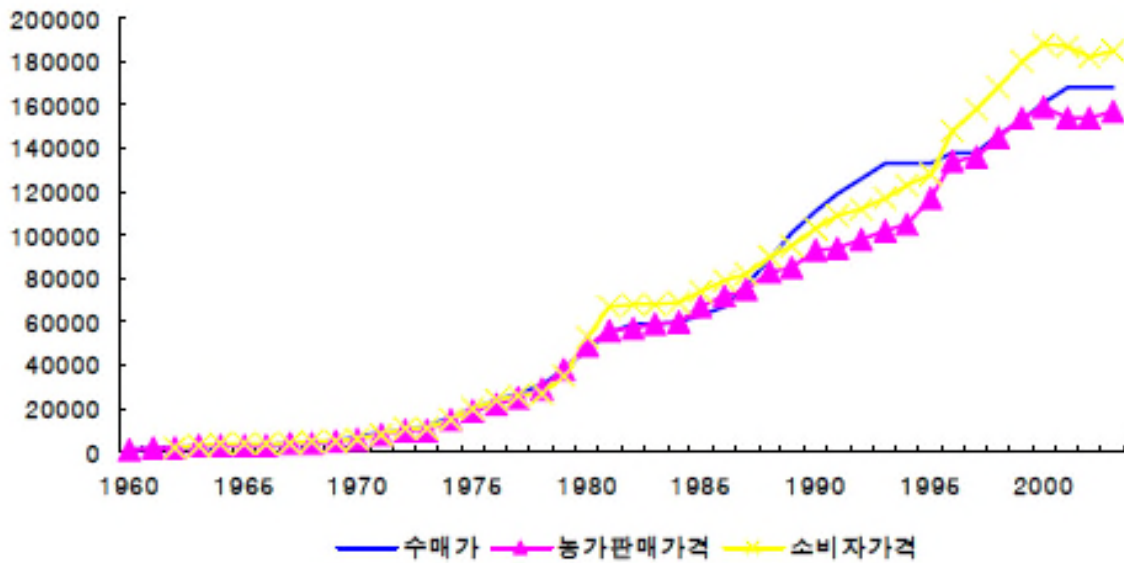
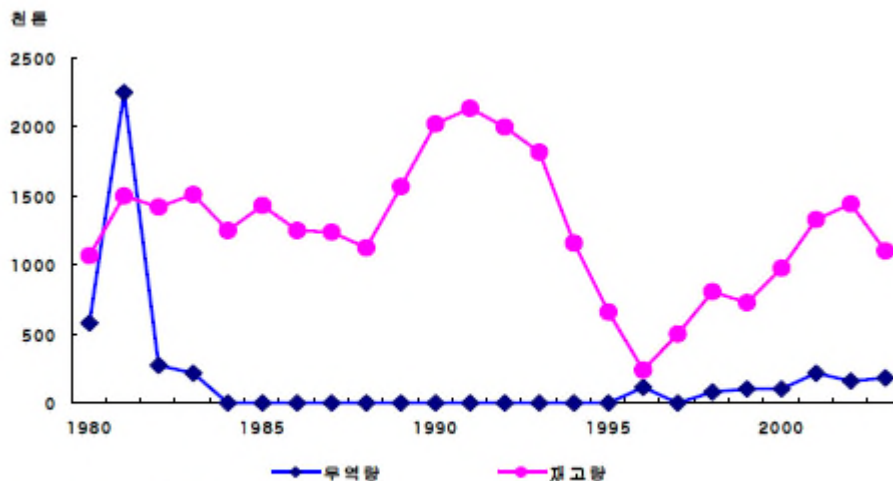


그림. 국내 쌀 가격 동향

- 장립종의 경우에는 태국에서 절반이 넘는 61%를 수입하였고 나머지는 인도와 베트남 산이 수입되었으며, 이러한 수입쌀의 경우 대부분 가공용으로 저가에 방출되고 있으며 연간 소비량은 7만 톤 내외 수준으로 주로 떡이나 면류, 제과, 제빵, 장류 등으로 사용되고 있으며 소비량은 연각 7만 3천 톤과 향후 수입량 증가를 감안하면 2004년의 수입쌀 재고량은 51만 톤까지 증가될 것으로 전망됨.



자료 : 농림부, 『양정자료』, 각 연도
 농림부, 『농림수산물통계연보』, 각 연도
 통계청, <http://www.nso.go.kr>

그림. 국내 쌀 무역량 및 재고량 현황

- 국내 쌀 재고량은 1970년대에 889천 톤, 1980년대에는 전 년대에 비해 61.0% 증가한 1,431천 톤에 달하였으며 1990년대에는 1,102천 톤으로 전 년대 대비 23.0% 감소하였으며, UR협상 이후 즉 1995 - 03년까지의 평균 재고량은 865천 톤으로 연평균 8.4% 씩 증가하였으며, 재고량이 급속도로 증가하기 시작한 것은 1997년 이후 2002년까지이며 2003년에는 전년도대비 24.1% 감소한 1,099천 톤을 기록하였으며, 이처럼 쌀 시장의 개방에 따른 수입쌀 재고량의 증가와 소비감소로 인해 국내 재고량은 1990년 이후 급격한 감소추세를 보였으나 1997년 이후 2002년까지 재고율이 계속적으로 증가하여 2002년에는 1993년 이후 최고치인 1,447천 톤에 달하고 있음

나. 개발 대상 기술제품의 개요

(1) 국수의 현재와 과거

- 한국인이 잔치국수라 부르며 가장 즐겨먹는, 마른 밀국수인 소면은 한국의 고유 발명품이 아니며, 중국에서 기본이 탄생하고 일본에서 완성된 음식으로 볼 수 있음. 한국인은 밀가루를 반죽해 그때그때 먹는 생면 형태의 국수를 많이 먹어왔으며, 소면은 일제강점기를 거치면서 부산과 일대의 지역 특성이 낳은 근대적 먹거리 중의 하나임. 밀가루 국수의 전통이 오랫동안 지속된 지역적 특성과 일본과 가까운 지리적 특징에 근대화, 현대화 과정에서 싸고 양 많고 쉽게 먹을 수 있는 밀가루 국수는 부산과 일대의 문화로 자리 잡았음.



그림 1. 가내제면 국수집

- 하지만 소면의 한반도 출현은 <조선왕조실록> 세종 5년 (1423년) 1월 1일 기사에 구주 총관 원의

준이 사람을 시켜 바친 토산물 중 ‘소면 30근’ 이 등장하며, 우리나라 제분공장의 효시는 일본인이 1918년 진남포에 세운 만주제분주식회사 진남포공장으로 볼 수 있음.

- 그 후 1931년 풍국제분주식회사 용산공장이 설립됐고, 35년에는 현 대한제분의 전신인 일본제분주식회사 인천공장과 제등제분주식회사 인천공장이 세워지면서 제면 사업이 본격적으로 시작되었으며, 1996년 미국의 PL480호에 의한 원조소맥이 11만 4000톤이나 무상으로 들어오면서 59년부터 밀가루 국수는 가장 대중적인 음식으로 본격화 되었음.

**“국수는 대한민국의 오랜 전통과 역사속에서 대중적인 음식으로 자리잡고 있으며
그 비중이 크다 ”**

(2) 글루텐의 문제점

- 글루텐은 보리나 밀 등 곡류에 들어 있는 불용성단백질로, 탄력성이 있어 밀가루 반죽을 쫄깃하게 하고, 빵을 가볍고 폭신하게 만드는 역할을 함
- 글루텐은 밀전분 생산 시 발생하는 부산물로 물에 불용성 단백질이다. 주로 gliadin과 glutenin으로 구성되어 있으며 gliadin은 분자량이 30,000 ~ 80,000 Da이고, glutenin은 수백만 Da 정도임. 글루텐의 gliadin은 알코올에 용해하나 glutenin은 불용인데, 제빵에서 중요한 역할을 하는 것은 glutenin임.
- 밀가루를 물과 혼합하면 글리아딘(gliadin)과 글루테닌(Glutenin)이 결합하여 글루텐을 형성하며, 글루텐 단백질 중 글리아딘은 점성과 신장성이 있고 글루테닌은 탄력성을 가지고 있다. 이 2개의 단백질이 밀가루 종류에 따라 점유하는 비율이 다르게 됨.
- 이러한 것은 밀가루만이 가지고 있는 독특한 성질로서, 예를 들면 빵을 만드는데 사용하는 강력분용 밀에는 글리아딘이 65%, 글루테닌이 35%이고 케이크류를 만드는데 사용하는 박력분용 밀에는 글리아딘이 75%,글루테닌이 25%를 함유하며, 이것의 역할은 빵의 부피에 관계있으며 반죽의 골격형성과 발효 중 생성되는 가스를 보유하는 기능을 갖게 됨
- 밀가루에 물을 첨가하여 만든 반죽덩어리를 물로 씻어내면 젖은 글루텐(Wet Gluten)이 되고 이것

을 처리하여 수분을 제거시킨 것은 마른 글루텐(Dry Gluten)이 된다. 이들의 성분은 아래와 같다.

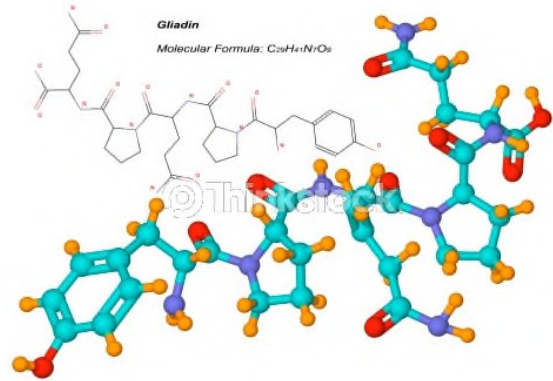


그림 2. 밀과 글루텐 구조

- 하지만 글루텐은 그 자체로 소화가 잘 안 되며 글루텐 불내증에 걸리면 피부, 신경계, 면역계, 체력, 관절, 치아를 비롯하여 행동과 기분까지 악영향을 받게 되며, **흔히 글루텐 알레르기라고 알려져 있지만, 실제 병명은 ‘글루텐 과민성 장 질환’ 임**
- 글루텐 과민성 장 질환은 글루텐을 소화시키는 효소가 없거나 부족하여 생기는 증상으로, 글루텐을 섭취하면 장을 자극하고 장 점막의 돌기가 위축돼 영양소를 흡수할 수 없는 상태가 됨. 이러한 글루텐 부작용은 유전적인 요인이며, 선천적으로 글루텐 소화 효소가 없는 사람에게만 생기는 유전질환으로 일단 글루텐 과민성 장 질환으로 진단받으면 평생 식사를 통해 조절해야 함.
- 불내증이란 영양분이 몸 안에 들어왔을 때 우리 몸이 영양분을 흡수하지 못하고 거부하는 반응이다. 대표적인 글루텐 불내증 증상으로 설사, 복통, 변비, 복부팽만 등 소화기능 장애가 있다.

“글루텐은 밀과 같은 곡류에 들어있는 단백질이지만, 섭취시 여러 가지 문제를 일으키는 것으로 보고되고 있다.”

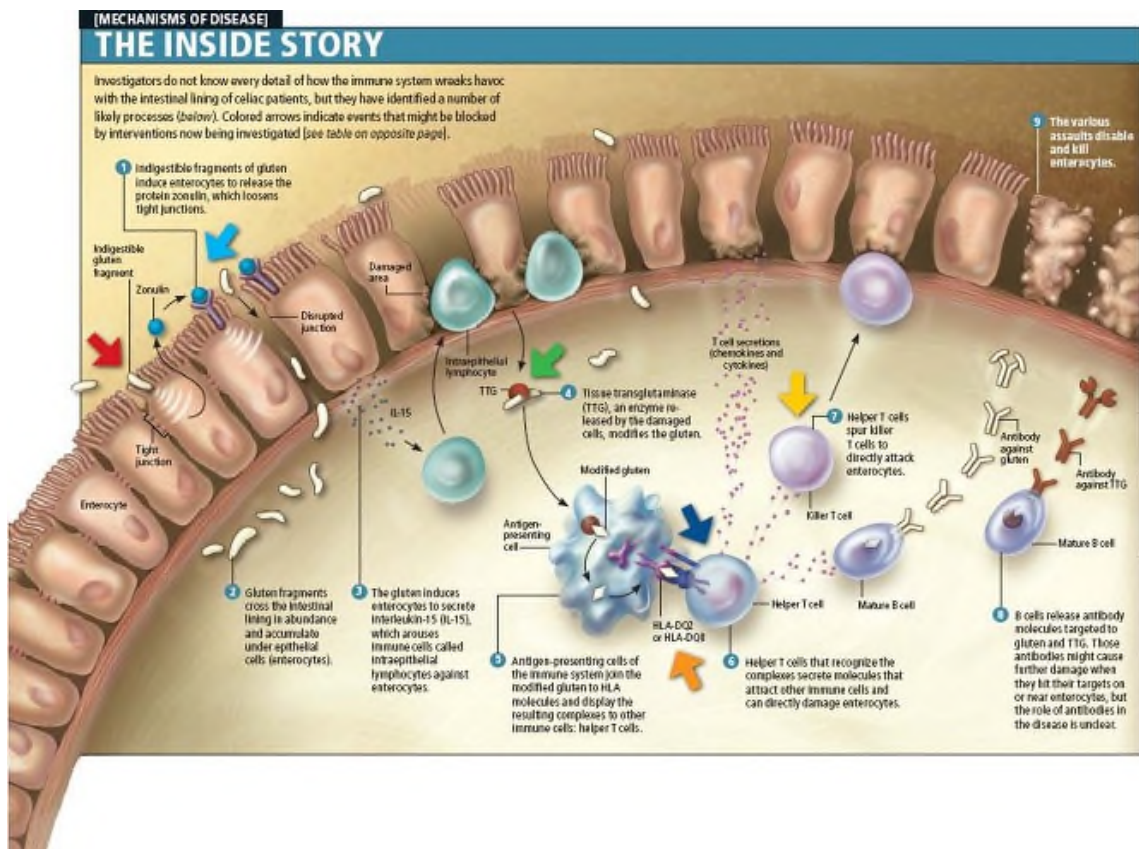


그림 3. 글루텐 과민성 장질환 기작

- 흔히 알려져 있듯이 글루텐 저항증인 셀리악 질병(Celiac disease, DC)은 소장에서 일어나는 알레르기 질환으로 장내 영양분 흡수를 저해하는 글루텐에 대한 감수성이 일어남으로서 증세가 나타나는 질병임. 대부분 유아기에 시작하지만 드물게는 성인이 되어서 처음 나타나는 경우도 있음(Laurin et al., 2002)
- 미국인들 가운데는 최소한 133명중 1명의 비율로 Celiac disease를 겪고 있는 것으로 이보다 세 배 이상의 인구가 글루텐에 대한 예민 증상을 갖고 있는 것으로 추정하고 있으며(Crockett et al., 2011) 최근 유럽인(특히 북유럽)에게 급격히 발생하고 있고 라틴아메리카계인, 흑인 그리고 아시아인 또한 질병 발생 인구가 증가하는 추세임.(Celiac Disease Foundation, 2011).
- Celiac disease의 일반적인 특징으로 설사, 체중감소, 영양실조, 위 팽만감, 복부통증 등의 증상이 있으며 대부분은 유전되며 (Laurin et al., 2002; Celiac Disease Foundation, 2011), 글루텐이 함유된 제품을 섭취하게 되면 이런 증상이 나타나기 시작하는데 Celiac disease의 해경을 위한 유일

한 방법은 글루텐을 섭취하지 않는 것으로 환자들은 gluten-free의 식이를 하고 있음(Celiac Disease Foundation, 2011).

(3) 밀가루를 주 원료로 한 전통적인 국수류의 문제점

(가) 글루텐의 난소화성으로 인한 소화불량 문제

- 글루텐 소화효소의 경우 대부분 선천적으로 결정되며, 유전적으로 글루텐 소화효소가 없는 경우 글루텐 불내당증 현상을 겪게 됨. 또한 글루텐의 구조상 물을 흡수하는 성질이 뛰어나기 때문에 위에 들어가서 위장 안에서 소화에 도움이 되는 진액들이 제 기능을 다하지 못하게 되며, 밀이 주식인 서양에서는 셀리악병(Celiac Disease)라고 불리는 글루텐 알레르기 반응이 심한 사람들이 전체 인구의 0.5~1%가 존재한다.

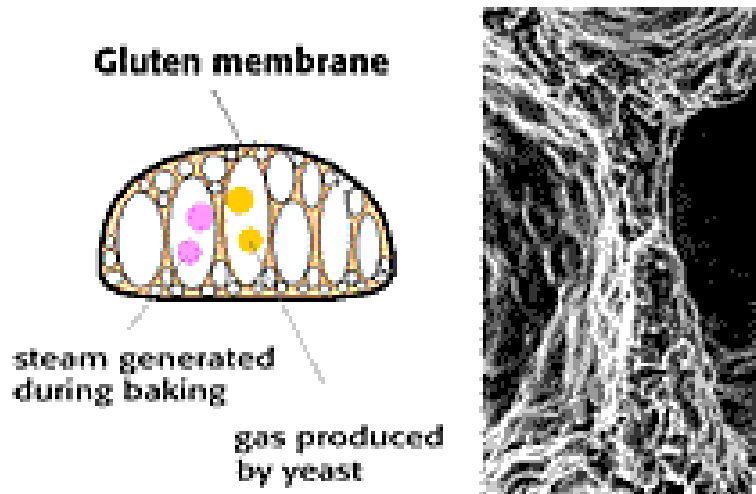


그림 4. 글루텐의 조직(출처 : Riken Food Emulsifier ;google)

(나) 탄수화물의 과잉 섭취로 인한 비만 유발 문제

- 밀의 구조는 외피층(seed coats)과 호분층(aleurone layer), 배젖(endosperm)과 배아(embryo)층으로 나눌 수 있는데 외피층 바로 밑인 호분층(aleurone layer)에 미네랄, 단백질, 비타민, 효소, 지방 등이 풍부하게 들어 있음 하지만 배젖(endosperm)에는 대부분 전분만이 분포하고 있는데, 밀가루를 제분 할 때 이의 외피층과 호분층을 제외한 배젖을 정제한 것이 밀가루로 이렇듯 영양성분을 제외한 탄수화물 덩어리만을 섭취하였을 시 영양불균형과 탄수화물 과잉섭취로 인한 건강상의 문제가 야기될 수 있음

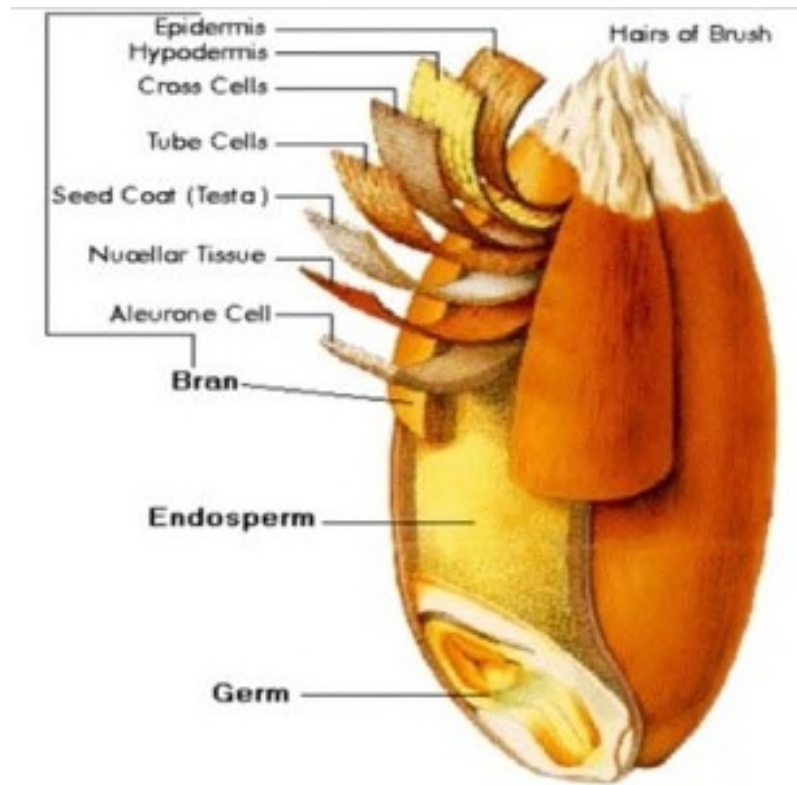


그림 5. 밀의 구조(출처 : Classofood ; google)

- 셀리악 질병 환자들이 섭취하지 말아야 할 식품으로는 대표적으로 미국 등지에 주식으로 섭취하는 빵을 만드는 밀이 있으며 호밀, 보리 등이 있으며(Fasano and Catassi, 2001), 예전에는 귀리도 섭취제한 음식에 들어갔으나 과학계는 최근 귀리가 셀리악 환자들이 섭취하는데 문제가 없다고 발표함.
- 현재 미국, 유럽에서는 이러한 셀리악 질병 환자의 증가로 글루텐이 없는 식품에 대한 연구가 활발히 진행되고 있음. 특히 쌀가루를 비롯하여, 메밀, 수수 등을 이용하여 다양한 제품을 연구 개발하고 있고(Peressini et al., 2011; Schober et al., 2008) 제품을 상용화하여 실제 생산판매가 되고 있는 상황임.

(3) 글루텐에 대한 시장흐름의 변화와 글루텐 프리 제품에 대한 니즈 증대

- ‘글루텐 알레르기’ 를 나타내는 만성 소화장애 환자들이 적지 않은 관계로 글루텐 함유를 배제한 빵과 과자류 등이 일종의 기능성 식품으로 존재감을 확대되고 있으며, 바로 ‘글루텐 배제’ (gluten-free) 식품을 지칭한 것이다. 밀가루가 들어간 식품만 드시면 속이 불편하다고 하시

던 우리네 어르신들을 떠올리게 하는 대목임.

- 2012년 8월, Packaged Facts가 실시한 소비자 조사에 따르면 성인 소비자의 18%는 무글루텐 식품을 구입, 소비하고 있고, 2010년 10월 조사 결과인 15%보다 증가했으며, 무글루텐 식품은 건강에 좋다는 소비자의 인식이 구입 동기가 되고 최근 셀리악병과 식품 알레르기 질환에 대한 인식이 높아지고 있어 글루텐 프리에 대한 소비자들의 관심도도 지속적으로 이어지고 있음.
- 이 글루텐 배제 식품이 최근들어 갈수록 발빠른 팽창세를 거듭하고 있다. 영국 런던에 소재한 국제적 시장조사기관 유로모니터 인터내셔널사는 올해(2012년) 미국의 글루텐 배제식품매출실적이 13억1,000만 달러에 달해 지난 2005년과 비교했을 때 2배 이상 확대될 것으로 전망했으며, 또한 글루텐 배제 식품의 글로벌 마켓이 올해 총 26억7,000만 달러 볼륨을 형성할 것으로 예상하고 있음.
- 유로모니터측은 아울러 오는 2015년에 이르면 미국의 글루텐 배제 식품 매출이 16억8,000만 달러에 이르고, 세계시장은 33억8,000만 달러 규모에 도달할 것이라며 앞으로도 거침없는 성장세를 낙관하고 있는 상황임.



그림 6. 글루텐 프리를 슬로건으로 내세운 식품들

- 우리나라 역시 서구화된 식생활로 건강에 이상을 호소하는 사람들이 늘어나면서 글루텐프리 제품에 대한 관심 또한 증가하고 있는 상황으로 글루텐프리는 글루텐이 없는 식품으로 글루텐은 밀이나 보리, 귀리 등 곡류에 들어있는 불용성단백질로 밀가루 반죽을 쫄깃하게 하고 빵을 가볍고 폭신하게 만드는 역할을 함
- 하지만 글루텐은 그 자체로 소화가 잘 안되며 글루텐 불내증에 걸리면 피부, 신경계, 면역계, 체력, 관절에 악영향을 미치고 설사, 복통, 변비 등 소화기능 장애를 야기함
- 미국에서 지난 몇 년간 중요한 식품 트렌드였던 ‘글루텐-프리’ 시장은 쇠퇴하지 않았으며 오히려 성장해 가고 있는 중이며, 미국의 글루텐-프리 식음료시장은 2001년 2억 1천만불이었던 것이 연간 27% 정도 급성장하여 2012년에는 20억불로 추산되고 현재까지도 급속히 성장하고 있는 상황임
- 국내에서도 이러한 시장흐름에 따라 글루텐프리제품의 선호도가 높아지고 있고 다양한 국내 글루텐 프리제품들이 앞 다투어 출시되고 있다.

“국수를 통한 글루텐섭취는 장내 불내증, 셀리악병, 불편한 포만감 등과 같은 문제를 유발하며 때에 따라서는 면역체계교란을 일으키기도 하는 문제점을 가지고 있다.”

- 이 중에서도 쌀을 이용한 국수, 빵 등에 대한 연구가 가장 활발하게 진행되고 있으나, 곡류 중 단백질이 비슷한 밀, 호밀, 보리 등은 셀리악 질병 환자가 섭취할 수 없기 때문에(Fasano and Catassi, 2001) 셀리악 질병을 위한 환자섭취도 가능할 수 있게 개발한다면 시장 가치가 충분할 것으로 판단됨

표. 국내의 글루텐프리 제품

브랜드	제품명	사진
아워홈	글루텐프리 쌀파스타	
청정원	옛날식 짜장분말	
강동오케익	우리쌀로 만든 화련	

다. 국내의 연구 및 시장 동향

(1) 세계 (가공)식품산업 동향

① 세계 식품시장 규모

- 식품산업 중 가공식품의 세계시장 규모는 2012년 2조 4,411억달러로 2011년 2조 3,599억달러에서 3.4% 가량 성장한 것으로 추정된다. 식품산업은 최근 5년간 연평균 3.4%의 꾸준한 성장세를 이어나가고 있다.

표 6. 식품시장 세계시장 규모 및 성장률

(단위:십억달러,%)

구분	2008	2009	2010	2011	2012	연평균 성장률 ('09~' 12)
식품세계시장	2,132.6	2,202.7	2,279.4	2,359.9	2,441.1	3.4
(전년대비성장률)	(3.7)	(3.4)	(3.5)	(3.5)	(3.4)	

자료 : DATAMONITOR Interactive Consumer Database. 2014.2

- 지역별 가공식품 시장규모는, 유럽시장이 8,300억 달러로 세계시장의 34%를 차지해 규모가 가장 크고, 아메리카 7,940억 달러(32.5%), 아시아-태평양 7,632억 달러(31.3%), 아프리카 & 중동 539억 달러(2.2%) 순으로 나타났다. 아시아-태평양과 아프리카 & 중동은 2008년 글로벌 금융위기에도 불구하고 최근 5년간 시장규모가 꾸준히 성장해 온 반면, 유럽과 아메리카는 시장규모가 소폭 감소하는 양상을 보이고 있다. 국가별 가공식품의 시장규모를 보면 미국이 4,578억달러로 전 세계 시장의 18.8%를 차지해 시장규모로 1위를 차지했고, 그 다음으로 중국 3,366억달러(13.8%), 일본 2,212(9.1%), 브라질 1,541억달러(6.3%), 독일 1,435(5.9%) 순으로 시장규모 상위 5위국가로 나타났다. 특히 미국, 일본, 독일 등 선진국의 세계시장 비중은 감소세인 반면 중국, 브라질은 시장규모가 성장하는 추세이다.

표 7. 지역별 식품 세계시장 규모 / ()값은 세계시장 대비 비중

(단위 : 백만달러, %)

구분	2008	2009	2010	2011	2012	연평균 성장률 ('09~' 12)
세계	2,132.6 (100.0)	2,202.7 (100.0)	2,279.4 (100.0)	2,359.9 (100.0)	2,441.1 (100.0)	3.4
유럽	747.5 (35.1)	767.7 (34.9)	788.5 (34.6)	809.2 (34.3)	830.0 (34.0)	2.7
아메리카	698.0 (32.7)	720.8 (32.7)	744.2 (32.7)	768.4 (32.6)	794.0 (32.5)	3.3
아시아-태평양	643.8 (30.2)	668.5 (30.3)	698.4 (30.6)	731.2 (31.0)	763.2 (31.3)	4.3
아프리카 & 중동	43.2 (2.0)	45.7 (2.1)	48.4 (2.1)	51.1 (2.2)	53.9 (2.2)	5.7

자료 : DATAMONITOR Interactive Consumer Database. 2014.2

(2) 국내 식품산업 동향

① 식품 시장 규모

- 2012년 국내 식품시장규모는 49조 7,587억원으로 지난 5년간 연평균 5.2%의 성장률을 기록한 것으로 나타났다.

표 8. 국내 식품시장 현황

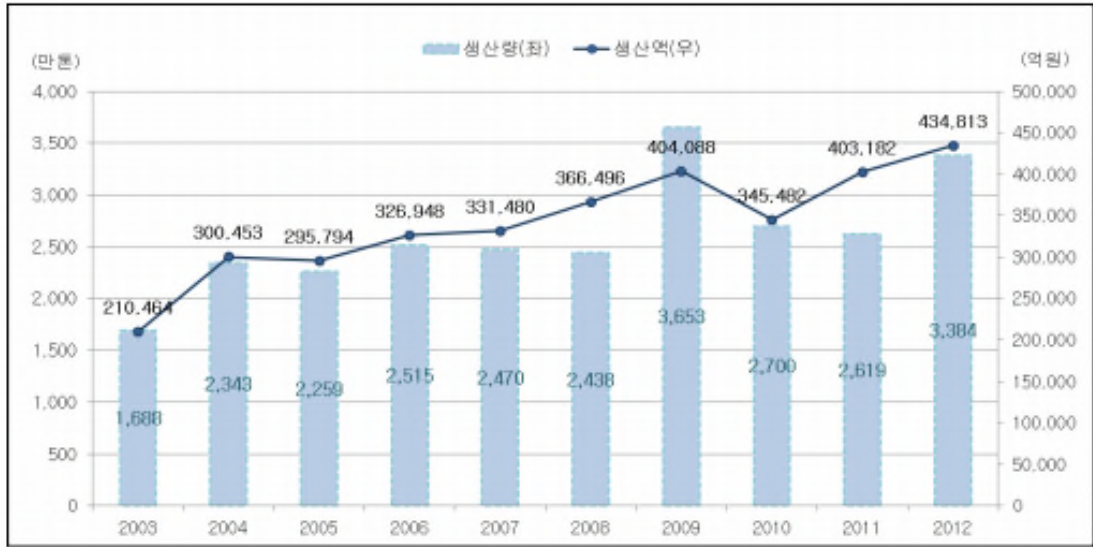
(단위 : 백만원, %)

구분	2008	2009	2010	2011	2012	연평균성장률 ('08~' 12)
생산	36,649,627	40,408,833	34,548,230	40,318,186	43,478,331	4.4
수출	2,557,852	2,589,076	2,966,831	3,571,062	3,771,553	10.2
수입	6,472,566	6,719,512	7,425,710	8,970,489	10,052,019	11.6
무역수지	-3,914,714	-4,130,437	-4,458,879	-5,399,428	-6,280,467	12.5
시장규모	40,564,341	44,539,270	39,007,109	45,717,614	49,758,798	5.2

자료 : 식품의약품안전처, 식품 및 식품첨가물 생산실적, 각 연도

② 생산실적 및 현황

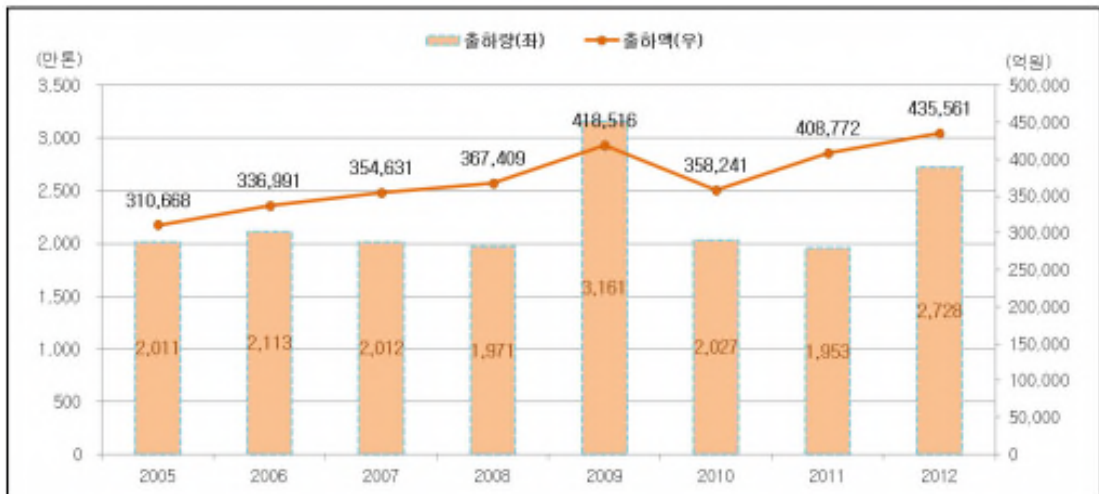
- 2012년 식품 및 식품첨가물 생산량은 3,384만톤으로 전년대비 29.2% 증가하였으며, 생산액은 434,783억원으로 전년대비 7.8% 증가하였다. 식품산업 생산액의 전년대비 성장률(7.8%)은 국내총생산 성장률(3.0%)의 약 2배, 제조업 생산액 성장률(2.2%)의 약 3배에 이르는 높은 수준이다. 업종별 생산액은 (가공)식품이 가장 높은 35조 1,195억원으로 80.5%의 생산 비중을 보이고 있으며 기구,용기,포장지(6조 283억원) 13.9%, 식품첨가물(1조 3,770억원) 3.2%, 건강기능식품(1조 525억원) 2.4%의 비중을 차지하고 있다.



자료 : 식품의약품안전처, 식품 및 식품첨가물 생산실적, 각 연도

그림 20. 식품과 식품첨가물의 생산액 및 생산량 추이(2003~ 2012)

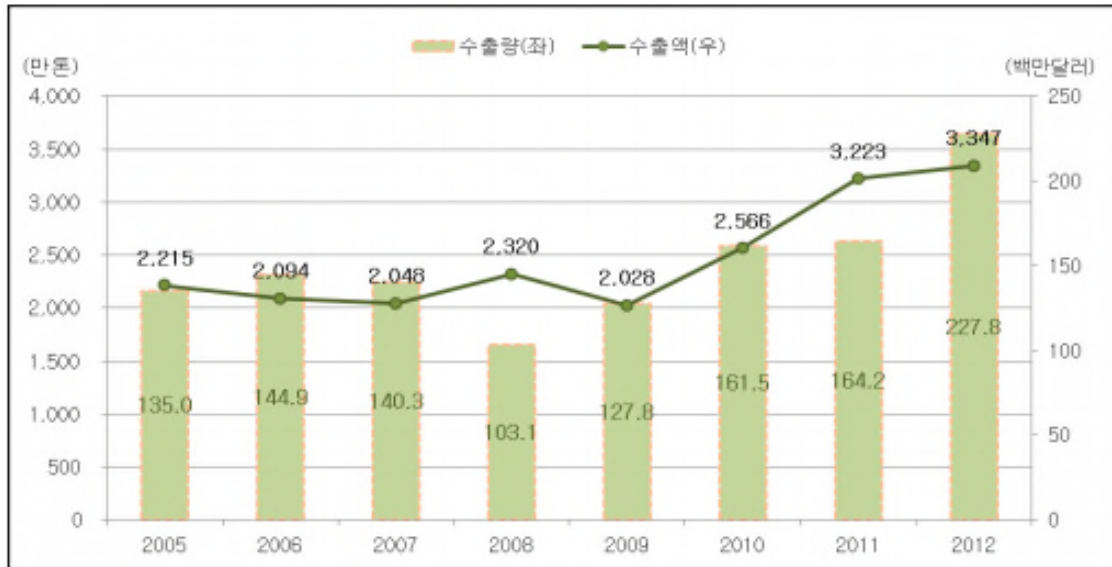
- 2012년 식품 및 식품첨가물 매출액(총 출하액 = 출하액 + 수출액)은 47조 3,277억원(생산액 43조 4,783억원 대비 108.9%)으로 전년대비 6.5% 증가하였다. 출하액은 43조 5,561억원으로 전년대비 6.6% 증가하였고, 출하량은 2,728만톤으로 전년대비 39.7% 증가하여 생산량 성장률(29.2%)보다 높게 나타났다. 수출액은 3,347백만달러로 전년대비 3.9% 증가하였고, 수출량은 227.8만톤으로 전년대비 38.8% 증가하여 출하량의 성장과 함께 큰 증가를 보였다.



자료 : 식품의약품안전처, 2012년도 식품 및 식품첨가물 생산실적, 2013

그림 21. 출하액 및 출하량 추이(2005-2012)

- 품목군별 수출액 1위는 기구·용기·포장지로 전년대비 4.3% 증가한 594.3백만달러가 수출되었다. 전년대비 수출액 성장률이 높은 품목으로는 특수용도식품(56.5%), 과자류(39.5%), 음료류(30%) 등이 있었고, 용기류(217.3%)는 품목군 중 최대 성장률을 보였으나 전체 수출액의 0.001%인 5만8천달러에 불과했다.



자료 : 식품의약품안전처, 2012년도 식품 및 식품첨가물 생산실적, 2013

그림 22. 수출액 및 수출량 추이 (2005~ 2012)

- 수출액 상위 10개 품목군의 수출액 합계는 2,844백만달러로 총 수출액의 85%를 차지하고 있어 상위 10개 품목이 식품 및 식품첨가물 총 수출의 대부분을 차지하고 있다고 해도 과언이 아니다. 수출액 상위 10개 세부 품목명을 살펴보면, 즉석섭취식품(도시락)이 전체 식품 수출의 9.9%(373백만달러), 백설탕 7.5%(281백만달러), 수산물가공품 7.0%(263백만달러)를 차지했다. 아울러 수출 상위 10개 세부 품목이 전체 수출에서 차지하는 비중은 47.1%로 절반에 가까운 수치를 보였다.

표 9. 수출액 상위 10개 품목

순 위	2011		2012		
	품목명	수출액	품목명	수출액	점유율
1	즉석섭취식품(도시락)	297,794,528	즉석섭취식품(도시락)	373,135,830	9.9
2	백설탕	273,785,444	백설탕	281,019,487	7.5
3	수산물가공품(기타)	252,852,215	수산물가공품(기타)	263,154,949	7.0
4	수산물가공품(어류)	132,386,089	폴리에틸렌(PE) 및 폴리프로필렌(PP)	184,702,085	4.9
5	기타가공품	91,496,416	수산물가공품(어류)	155,040,100	4.1
6	식물성크림	90,544,939	기타(기구및용기포장)	117,980,244	3.1
7	배추김치	84,544,939	기타가공품	108,613,907	2.9
8	조미김	74,496,877	조미김	101,245,053	2.7
9	인스턴트커피	67,923,758	배추김치	97,628,598	2.6
10	유탕면류(봉지라면)	62,599,432	식물성크림	89,627,071	2.4
	계	1,428,427,083	계	1,772,147,324	47.1

자료 : 식품의약품안전처, 2012년도 식품 및 식품첨가물 생산실적, 2013

(3) 목표시장 정의 및 규모

① 예상 최종제품의 목표시장을 정의하고 연도별 규모 및 그 근거

2012년을 기준으로 국내 식품 시장규모는 약 49조원으로 지난 5년간 연평균 5.2%의 성장률을 기록한 것으로 나타났다. 품목별 가공식품 세계시장 규모를 보면 Chilled food 가 7,7억달러로전체의 34%를 차지하여 1위를 기록했다. 다음으로 Bakery & Cereals(3,8억달러), Dairy food(3,7억 달러)등의

순으로 시장규모가 큰 것으로 나타났다.

(단위: 백만원, %)

구분	2008	2009	2010	2011	2012	연평균성장률 ('08-'12)
생산	36,649,627	40,408,833	34,548,230	40,318,186	43,478,331	4.4
수출	2,557,852	2,589,076	2,966,831	3,571,062	3,771,553	10.2
수입	6,472,566	6,719,512	7,425,710	8,970,489	10,052,019	11.6
무역수지	-3,914,714	-4,130,437	-4,458,879	-5,399,428	-6,280,467	12.5
시장규모	40,564,341	44,539,270	39,007,109	45,717,614	49,758,798	5.2

주 : 1) 시장규모는 생산 - 수출 + 수입

2) 무역수지는 수출 - 수입, △는 적자를 나타냄

3) 수출입액은 한국은행 원/달러 연평균환율을 적용하여 계산함

4) 식품 = 식품(축산물가공식품 포함) + 건강기능식품 + 식품첨가물 + 기구·용기·포장

* 2010년부터 식품 생산에는 축산물가공품 제외

자료 : 1) 식품의약품안전처, 식품 및 식품첨가물 생산실적, 각 연도

2) 식품의약품안전처, 수입식품 등 검사연보, 각 연도

(가) 유탕면 시장현황

면 시장규모는 1조 8000억원으로 유탕면류는 약 1조 5000억원규모로 면 시장의 대부분을 차지하고 있다. 생면류(숙면, 냉동면, 냉장면)의 경우 약 3000억 규모로 전체 면시장의 20%를 차지하고 있고 2003년 이후 웰빙트렌드와 맞물려 매해 15%이상 꾸준한 성장률을 기록하고 있다. 그 중 냉장 유통면(숙면류)가 1338억원, 냉동 유통면이 186억원, 식재 냉동면이 814억원으로 나타났다.

면 시장에서 가장 큰 비중을 차지하는 유탕면류 시장점유율은 농심이 1조 2000억원으로 라면시장의 72%를 차지하였다. 농심은 장수브랜드인 ‘신라면’, ‘안성탕면’, ‘짜파게티’가 각각 1, 2, 3위로 15% 내외의 비슷한 성장을 보이며 매출 성장을 주도했다.

2위인 삼양식품은 올해 2500억원의 성장을 기록했으며 특징적으로 쌀라면, 쌀설렁탕 등 쌀가공 라면을 출시하여 웰빙을 추구하는 소비자를 타겟으로 성장하였다.

3위 오뚜기는 400억을 기록하며 ‘진라면’, ‘스낵면’, ‘오동통면’, 등 장수제품이 20%내외로 성장을 나타냈으며 4위 한국야쿠르트 또한 30% 이상의 매출 신장을 기록했다. 최근 트렌드는 이러한 대형프랜차이즈 뿐만 아니라 대형마트의 PB상품들의 자체개발상품들이 늘어나고 있고 저렴한 가격과 다양한 상품개발로 소비자의 이목을 끌고 있다.

표 10. 식품 및 식품첨가물 생산규모 및 품목별 비중

(단위 : 백만원, %)

구분	매출액	출하액		수출액	
			비중		비중
기구 및 용기포장	6,427,198	5,757,481	89.6	669,717	10.4
기타 식품류	4,918,336	4,276,882	87.0	641,454	13.0
음료류	4,433,795	4,277,687	96.5	156,108	3.5
규격외 일반가공식품	3,957,533	3,353,429	84.7	604,104	15.3
과자류	3,219,798	3,073,678	95.5	146,121	4.5
빵 또는 떡류	3,048,933	3,020,278	99.1	28,654	0.9
조미식품	2,763,839	2,696,109	97.5	67,730	2.5
면류	2,456,264	2,285,370	93.0	170,894	7.0
식용유지류	1,739,322	1,698,526	97.7	40,797	2.3
커피	1,481,043	1,348,922	91.1	132,121	8.9
식품첨가물	1,413,042	1,111,448	78.7	301,594	21.3
설탕	1,339,147	1,056,843	78.9	282,304	21.1
코코아기공품류 또는 초콜릿류	1,277,559	1,202,461	94.1	75,097	5.9
장류	1,078,018	1,035,663	96.1	42,356	3.9
김치류	1,043,204	942,239	90.3	100,964	9.7
다류	893,520	806,473	90.3	87,047	9.7
어육가공품	690,992	672,852	97.4	18,140	2.6
두부류 또는 묵류	619,023	617,297	99.7	1,726	0.3
절임식품	503,645	496,936	98.7	6,708	1.3
특수용도식품	352,145	329,303	93.5	22,842	6.5
엿류	351,111	349,201	99.5	1,910	0.5
건포류	330,782	323,329	97.7	7,454	2.3

자료 : 식품의약품안전처, 식품 및 식품첨가물 생산실적, 각년도

(나) 생면 시장현황

2003년 이후 꾸준히 15% 이상의 성장률을 보이고 있으며 일본의 생면시장이 전체 면시장의 50%를 차지하고 있는 특징이 있다. 계절상품류(냉면, 메밀면, 칼국수, 우동)제품들의 판매율이 사계절 내내 성장하고 있는 것도 소비자들의 유통시장에서 볼 수 있는 특징이다.

생면시장의 경우 풀무원이 시장점유율 40%로 지속적인 1위를 차지하고 있으며 특이한 점은 프리미엄급의 고급 숙면류들이 상위랭크를 기록하고 있다는 것이다. 냉장 생면류의 매출 또한 경기

침체에도 불구하고 20%대의 성장률을 거두는 등 크게 성장하고 있다. CJ는 26%의 시장점유율을 기록하며 풀무원 다음으로 높은 성장률을 보였는데 CJ제품은 우동 등의 숙면류에서 가장 높은 매출이 나타났다. 오뚜기는 13% 점유율을 기록하며 3위에 그쳤다.

근래 “0% 합성첨가물” 을 슬로건으로 내세운 브랜드 마켓오가 프리미엄 생면시장에 진입하고 있으며 유당면류와 마찬가지로 대형마트의 저렴하고 다양한 PB상품들이 저가생면시장에서 강세를 보이고 있다.



그림 23. 유통되고 있는 다양한 생면제품

(다) 떡류 시장현황

떡은 2006년 이후 3조원이상의 규모로 블루오션으로 자리잡을 만큼 시장의 수요가 높아지고 있으나 최근 떡시장의 규모는 두가지로 발전 가능성을 시사 하고 있다.

첫째는 고급 떡 시장으로 지자체를 중심으로 발전하고 있으며, 고급스러운 이미지와 프리미엄을 붙여 고가의 떡 시장이 지자체를 중심으로 형성하고 있다. 각 지자체에서 특징을 살린 떡 상품 개발에 투자하고 있다.

두 번째는 일반 유통 시장용 대규모 양산 체제의 떡시장이다. 제조 시장의 떡류가 차지하는 비중은 2000억에 불과하여 그 규모가 작아 프랜차이즈화를 통한 대량양산유통의 떡 시장이 형성되

고 있다.

유통시장제품들은 풀무원 기술연구소 이상협 연구원이 발표한 '떡류 제품 개발과 활성화 방안'에 따르면 현재 포장 떡류 시장은 약 200억원 규모로 매출의 40%이상이 떡국류이며 떡볶이류가 전체 떡 매출의 약70%를 차지한다.



그림 24. 유통되고 있는 다양한 떡류제품

(라) 쌀면류 시장현황

쌀 가공식품의 시장규모는 약 1조원(떡류 2500억원, 쌀음료 1500억원, 쌀과자 1500억원, 주류 1500억원, 즉석밥 1200억원, 쌀죽 1000억원, 쌀국수 100억원, 쌀라면 6억원)으로 전체식품매출액의 약 2%를 차지한다. 쌀면류의 시장은 새로운 외식상품의 하나로 성장을 준비하고 있는 단계이며 쌀국수의 대중화와 함께 프랜차이즈 쌀국수집이 많이 생겨나고 있다.

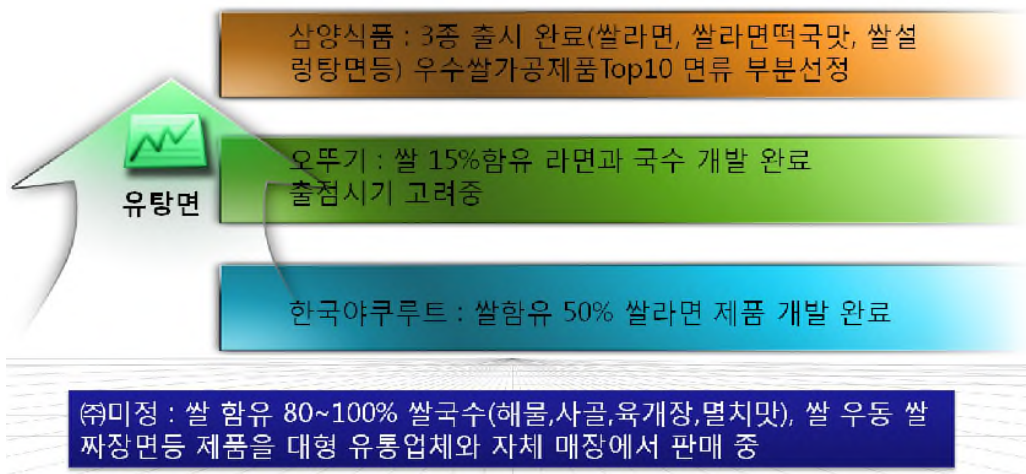


그림 25. 쌀면류 시장현황

(마) 다양한 첨가물이 가미된 기능성 면류 시장의 성장

생존하기 위해 음식을 먹었던 세대와 달리 질적인 측면이 높아지는 가운데 국수 역시 단순한 밀가루로 만든 음식이 아닌 다양한 첨가물과 기능적 측면, 영양적 측면으로 발달되고 있다. 첨가물의 종류에는 기능성을 갖는 약용식물, 약재, 곡물, 해조류 등 그 제한이 없고 다양하다. 일반 밀로 만든 국수보다 첨가물이 가미된 국수의 경우 조리시 탁도가 높아지고 첨가물이 용출되어 일반 국수보다 짧은 시간으로 조리하는 것이 바람직하다. 또한 첨가물로 인해 식감의 증대, 영양적 측면의 발달, 다양한 색깔 등 긍정적인 효과를 나타낸다.



그림 26. 첨가물이 들어가 색을 띠는 국수

현재 시장에서 활발하게 이용되고 있는 첨가물이 가미된 면류는 클로렐라면, 녹차면, 치자면, 백년초면 등 색을 띠는 첨가물이 들어간 면류가 뛰어난 색깔을 자랑하며 유통되고 있다. 그 외에도 칩전분이나 고구마 전분을 첨가하여 만든 면류와 발효액기스 등을 반죽에 첨가하여 만드는 면류 등 다양한 첨가 면류들이 유통되고 있다.

② 연도별 시장 확대가능성 및 성장률

2013년도 식품산업 분석 보고서에 의하면 면류의 생산현황은 2011년 대비 2012년도에 약 9.8% 성장하였으며, 금액으로는 2.5조원 가량 생산된 것으로 집계되었다. 식품산업 중 가공식품의 세계시장 규모는 2012년 2조 4천억 달러로 2011년 2조 2천억 달러에서 3.4% 가량 성장한 것으로 추정된다. 식품산업은 최근 5년간 연평균 3.4%의 꾸준한 성장세를 이어가고 있다.

표 11. 세계식품시장의 연간 성장률

(단위 : 십억달러, %)

구 분	2008	2009	2010	2011	2012	연평균 성장률 (‘08~’12)
식품세계시장	2,132.6	2,202.7	2,279.4	2,359.9	2,441.1	3.4
(전년대비성장률)	(3.7)	(3.3)	(3.5)	(3.5)	(3.4)	

주 : 2012년 데이터는 연간 추정치를 이용한 자료임

자료 : DATAMONITOR Interactive Consumer Database. 2014.2

지역별 가공식품 시장규모를 보면, 유럽시장이 8300억 달러로 세계시장의 34%를 차지해 규모가 가장 크고, 아메리카 7940억달러(32.5%), 아시아-태평양 7632억달러(31.3%), 아프리카 & 중동 539억달러(2.2%) 순으로 나타났다. 아시아-태평양과 아프리카 & 중동은 2008년 글로벌 금융위기에도 불구하고 최근 5년간 시장규모가 꾸준히 성장해 온 반면, 유럽과 아메리카는 시장규모가 소폭 감소하는 양상을 보이고 있다.

표 12. 지역별 가공식품 시장규모 및 성장률

(단위 : 십억달러, %)

구 분	2008	2009	2010	2011	2012	연평균 성장률 (‘08~‘12)
세계	2,132.6 (100.0)	2,202.7 (100.0)	2,279.4 (100.0)	2,359.9 (100.0)	2,441.1 (100.0)	3.4
유럽	747.5 (35.1)	767.7 (34.9)	788.5 (34.6)	809.2 (34.3)	830.0 (34.0)	2.7
아메리카	698.0 (32.7)	720.8 (32.7)	744.2 (32.6)	768.4 (32.6)	794.0 (32.5)	3.3
아시아-태평양	643.8 (30.2)	668.5 (30.3)	698.4 (30.6)	731.2 (31.0)	763.2 (31.3)	4.3
아프리카 & 중동	43.2 (2.0)	45.7 (2.1)	48.4 (2.1)	51.1 (2.2)	53.9 (2.2)	5.7

주 : 1) 2021년 데이터는 연간 추정치를 이용한 자료임

2) () 값은 세계시장 대비 비중임

자료 : DATAMONITOR Interactive Consumer Database. 2014.2

(3) 목표시장 예상 참여자수와 경쟁관계

① 제품화 이후 예상되는 경쟁업체 수와 경쟁강도

(주)CJ, (주)풀무원 등 식품 대기업에서 관심을 가지고 기초 연구를 진행 중인 것으로 파악되었음. 생산액을 기준으로 하여 상위 10대 업체를 조사한 결과 (주)농심, (주)CJ, (주)오뚜기 등과 같은 업체들이 상위권에 포진해 있으며, 매년 면류의 생산 증가율이 꾸준하게 증가되는 통계를 바탕으로 유추해보면 향후 관련 기술에 대한 경쟁과 시장에서의 수요가 더욱 많아질 것으로 예상된다.

표 13. 기업별 식품첨가물 생산실적

(단위 : 백만원, %)

순위	2012		
	업체명	생산액	점유율
1	(주)농심	1,925,277	4.7
2	씨제이제일제당(주)	1,783,283	4.3
3	롯데칠성음료주식회사	1,314,272	3.2
4	롯데제과(주)	1,238,579	3.0
5	(주)오리온	722,730	1.8
6	주식회사 오투기	693,829	1.7
7	동서식품(주)	597,891	1.5
8	대상(주)	557,280	1.4
9	해태제과식품(주)	476,837	1.2
10	(주)삼양사	456,680	1.1
상위 10대 업체 합계		9,766,658	23.8
식품 업체 생산액 총계		41,040,466	100.0

자료 : 식품의약품안전처, 2012 식품 및 식품첨가물 생산실적, 2013

주 : 식품 기업 생산액 합계 = 식품제조가공업 생산액 + 기구·용기 제조업 생산액

② 과제신청 주체의 독과점, 과점, 경쟁 등 예상정도

제면 적성에 맞는 발효 균주를 선발하고, 제면 적성에 적합한 발효 조건을 확립하여, 결과적으로 기존 국수 보다 더 건강한 발효 국수를 상품화 하고자 하는 본 기술이 성공적으로 수행되고 제품이 출시될 경우 국내 HMR(Home Meals Replacement) 국수류 시장에 큰 변화를 일으킬 것으로 사료되며, 소비자는 건강에 대한 염려 없이 맘 편하게 다양한 국수를 맛있게 먹을 수 있고, 제조사는 부가가치를 통한 매출과 이익의 확대를 기대할 수 있을 것으로 사료됨. 뿐만 아니라 해당기술에 대한 지적재산권을 청구하여 권리를 주장하게 되면 어느 정도의 과점이 가능할 것으로 예상되지만, 새로운 생물자원으로 신규 발효기술 개발 및 새로운 발효기술을 접목시킨 제면기술 등과 같이 기술력이 확보되면 새로운 경쟁구도로 시장흐름이 흘러갈 것으로 예상된다. 따라서 본 기술은 생물자원을 확보하고, 발효조건 확립, 적절한 제면기술 구축 등과 같이 기술연구에 시간이 상당히 요구되므로 우선적으로 기술연구개발이 완료되는 업체가 시장에서 선점 가능할 것으로 예상된다.

③ 신청과제의 예상되는 목표시장 점유율

- 2013년도에 발간된 식품산업 분석보고서에 의하면 2012년 식품 및 식품첨가물의 품목별 생산액 중 면류는 약 5.9%의 점유율을 차지하고 있는 것으로 조사되었고 매년 성장률 상위 10개 품목에 해당되는 것으로 조사되었음.
- 현재는 시장 점유율이 다른 품목대비 크지 않아 성장할 수 있는 가능성이 크며, 현재 문제점이 되고 있는 글루텐과 같은 문제점이 해결되면 소비자들의 니즈에 적합할 것이며, 고속성장과 동시에 시장에서 우점할 수 있는 기대효과가 예상됨.

표 14. 품목별 식품 및 식품첨가물 생산실적

(단위 : 백만원, %)

구 분	2011		2012		
	생산액	점유율	생산액	점유율	성장률
기구및용기포장	5,202,380	12.9	6,018,243	13.8	15.7
기타식품류	4,006,288	9.9	4,517,710	10.4	12.8
규격외일반가공식품	3,594,439	8.9	3,690,850	8.5	2.7
음료류	3,234,832	8.0	3,547,664	8.2	9.7
과자류	2,819,364	7.0	3,029,200	7.0	7.4
빵또는떡류	2,572,385	6.4	2,711,799	6.2	5.4
면류	2,337,943	5.8	2,566,611	5.9	9.8

자료: 식품의약품안전처, 식품 및 식품첨가물 생산실적, 각년도

③ 면류시장별 규모

- 2011년 3월 면류기업 인터뷰에 따르면, 상온면의 시장규모는 1천~1천2백억 원 수준이며, 냉장면은 1천 6백억 원 수준임. 상온면과 냉장면을 합친 전체 면 시장 규모(라면 제외)는 2천 6백~2천 8백억 원 임. 국수시장에서 오투기가 50~60%, CJ제일제당과 샘표를 합쳐 10% 수준임.

표 15. 2010년 면류 시장규모

구분	상온면(국수)	냉장면
시장규모	1천 억 ~ 1천 2백억 원	1천 6백억 원

주 : 시장규모는 AC닐슨 자료를 이용하여 업체에서 추정 한 수치이며, 2011년 3월 기업 조사 결과 국수 외 상온면 시장은 알 수 없다고 함.

자료 : 2011년 3월 면류기업 3사 인터뷰 결과

- 2008년 1천 6백억 원으로 집계된 냉장면 시장은 우동이 350억원, 냉면부문이 450억 원으로 우동과 냉면이 집중되어 있음. 우동시장에서는 CJ제일제당이, 냉면시장은 풀무원의 우위를 보임.
- 우동부문에서는 CJ제일제당이 연간 60% 이상 점유율을 보이고, 냉면시장은 풀무원이 35%로 1위를 차지하고 있으며 CJ제일제당이 26%, 오뚜기가 12%를 차지함.
- 카테고리 분류 방법에 따라 기업별 점유율이 달라지게 되는데, 마찬가지로 우동시장 범위를 어디까지 볼 것인가에 따라 업계 1위가 달라짐.

표 16. 냉장면 시장규모 및 점유율

구분	우동	냉면
시장규모	350억 원	450억 원
CJ제일제당	60%	35%
풀무원	-	26%
오뚜기	-	12%

자료 : 한국식품정보원(2009), "2010 면류시장 분석보고서"

(4) 국내외 개발기술동향

- ① 현재 국내외 유사기술 연구개발 및 제품화 현황은 없음
- ② (주)CJ, (주)풀무원 등 식품 대기업에서 관심을 가지고 기초 연구를 진행 중인 것으로 파악되었음
- ③ 제면 적성에 맞는 발효 균주를 선발하고, 제면 적성에 적합한 발효 조건을 확립하여,

결과적으로 기존 국수 보다 더 건강한 발효 국수를 상품화 하고자 하는 본 기술이 성공적으로 수행되고 제품이 출시될 경우 국내 HMR(Home Meals Replacement) 국수류 시장에 큰 변화를 일으킬 것으로 사료되며, 소비자는 건강에 대한 염려 없이 맘 편하게 다양한 국수를 맛있게 먹을 수 있고, 제조사는 부가가치를 통한 매출과 이익의 확대를 기대할 수 있을 것으로 사료됨

④ 건강한 먹을거리와 웰빙에 대한 소비자 관심이 높아지고, 소비자들이 식품 소비의 안전성과 원산지를 중시하면서 식품기업들은 우리밀과 우리쌀 가공제품 생산에 적극 나서고 있음. CJ제일제당은 전라남도와 국산밀 산업화를 위한 업무 협약을 맺고 2014년까지 6만 톤을 가공한다는 계획임.

- CJ제일제당은 우리밀 부침가루, 튀김가루, 국수 등 11종 우리 밀 제품을 취급하고 있음. CJ제일제당은 향후 우동, 생면류 등 면 제품과 프리믹스 제품에서 지속적으로 우리밀 제품을 출시할 계획임.

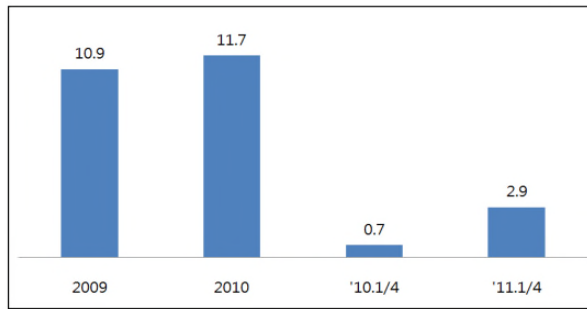
- CJ제일제당에서 출시한 우리밀 국수는 국내 산 밀을 97.3% 사용하여 재료의 안심을 강조하였고, 전통 밀가루 전문회사 백설의 기술력으로 면의 부드럽고 쫄깃함을 살렸음.

- 대상 청정원 오푸드는 2010년 우리밀로 무표백, 무방부제 처리한 1등급만을 사용한 우리 밀 찰진 국수를 출시하였음. 반죽에는 올리브유를 넣어 쫄깃하고 찰지며 맛 역시 부드러우며, 사각 형태로 볼륨감을 줘 식감을 높였음. 특히, 기존 국수 보다 4cm 짧은 18cm 면발로 작은 냄비에 들어가도 조리가 편리한 것이 특징임.

- 부산 대학교 생물자원웰빙제품 RIS사업단에서 2011년 3월 밀앙의 주산물인 맥문동, 대추, 갯잎 등을 원료로 한 유기농전통전병과 유기농 우리밀 국수 등을 내놓은 바 있음.

⑤ 최근 우리밀 국수 제품 판매가 증가하고 있음. A 대형유통업체 서울지역A지점의 2010년 우리밀 국수 제품 판매액은 1천 170만원으로 전년대비7.9% 증가하였고, 2011년 1분기 우리밀 국수 제품 판매액은 3천 만원으로 전년 동기대비 290% 증가함.

(단위 : 백만 원)



주 : 우리밀국수 = 오투기 옛날우리밀국수(400g), 오투기 옛날수연소면우리밀(500g), 칠갑농산 우리밀국수(1kg), 백설 우리밀국수(800g)
 자료 : A유통업체 A지점

그림 19. 우리밀 (마른)국수 제품 매출액

- 본 과제 개발을 완료한 후 주관기관은 현재 자체 운영 중인 약 60여개의 고속도로 휴게소 우동 매장에서 발효 우동을 판매할 예정이며, 현재 각종 면류를 PB 형태로 납품 중인 (주)홈플러스, (주)롯데마트, 농협 하나로클럽 등을 통해서 PB 상품 형태로 더 건강한 발효 국수 시리즈 제품을 판매할 예정이고, 현재 OEM 형태로 면류와 떡류를 납품 중인 (주)풀무원 브랜드로 더 건강한 발효 국수 HMR 시리즈 제품을 납품할 예정임

(5) 개발하고자 하는 기술의 혁신성

- 1800년대 알콜 발효로 거슬러 올라가는 발효 기술이 아직 응용되지 못한 분야인 제면 공정에 발효 기술을 세계에서 최초로 적용하고자 함
- 빵의 발효에 사용하는 효모 역시 처음에는 자연 상태로 존재하는 효모균을 이용하다가 중세기에 맥주 효모가 개발되면서 맥주효모균(Brewer's yeast)을 이용하였고, 그 이후 열에 약한 단점을 보완 하고자 주정효모균(Distiller's yeast)을 이용하였고, 현재에는 세계적인 제빵업체에서 제빵에 적합한 균주를 개발하여 사용하고자 하는 추세에 있는 바, **아직 시도된 바 없는 국수 제조용 발효 공정에 사용하고자 하는 균주를 처음부터 국수 제조에 최적화된 균주를 탐색하고 선발해서 사용하고자 하는 기술은 혁신적인 접근 방식이라 사료됨**
- ③ 국수는 전 세계적으로 오랜 세월 동안 사랑 받아 온 대표적인 밀 가공식품으로 기호성과 편의성은 뛰어난 반면, 건강적인 측면에서는 취약점을 가지고 있는 것이 현실인 바, 전통 기술인 발효 공정의 접목과 gluten free 제품의 개발을 통해 **국수 섭취로 인한 소화 불량 등의 문제, 비만, 당뇨 등의 건강 문제를 획기적으로 개선할 수 있다면 전 세계의 국수류 소비자들에게 특히 국**

수를 좋아하는 어린이들의 건강에 이바지 할 수 있는 좋은 기술이라 사료됨

- ④ Gluten free 시 제면에 적합한 결착제의 선정 등 제품의 개발과 제면 적성에 맞는 발효 균주를 선발하고, 제면 적성에 적합한 발효 조건을 확립하여, 결과적으로 기존 국수 보다 더 인체 친화적인 발효 국수를 상품화 하고자 하는 본 연구 과제는 세계 최초의 시도라는 측면에서 혁신적인
- ⑤ 제면 적성에 맞는 발효 균주를 선발하고, 제면 적성에 적합한 발효 조건을 확립하여, 결과적으로 기존 국수 보다 더 건강한 발효 국수를 상품화 하고자 하는 본 기술 및 제품은 소비자의 욕구(Needs)는 있으나 아직 출시 된 제품은 없는 상황이므로 수명주기(Life Cycle Time)상 예상되는 위치는 D (도입기) 임

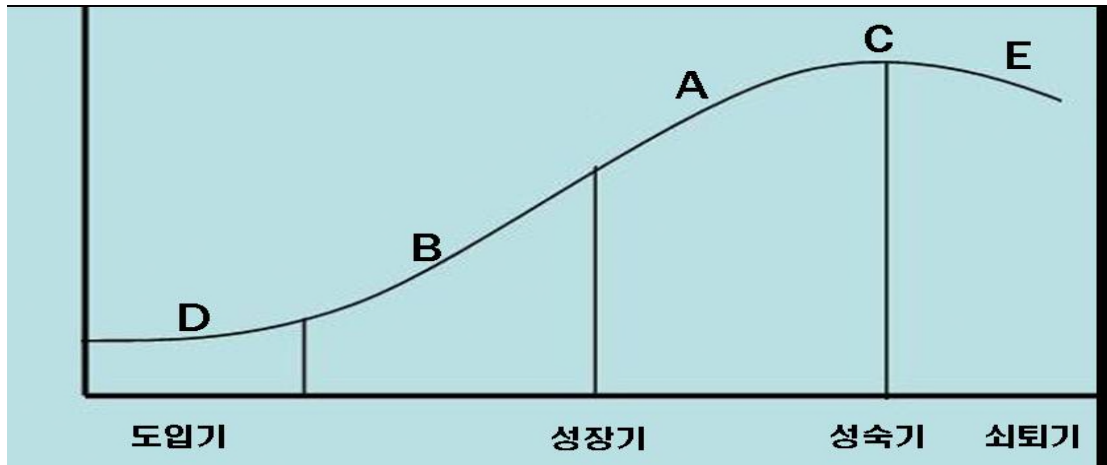


그림 18. 제품의 수명주기

2) 개발하고자 하는 기술의 수준 및 경쟁력

(1) 기술로 인해 구현되는 제품의 기능 및 성능 측면에서 기존 기술과의 차별점 및 경쟁력

- ① 국수의 제조에 발효 기술을 접목시킴에 있어 발효 균주으로써 기존의 빵 제조에 범용적으로 사용하고 있는 효모를 사용하지 않고 제면 적성에 최적화된 새로운 미생물을 탐색하고 분리, 동정, 등록하여 사용하고 함으로써 세상에 하나밖에 없는 미생물 균주를 특허 등록을 통해 독점적으로 사용함.

② 발효 국수는 기존 국수에 비해 다음과 같은 경쟁력을 가질 것으로 예상 됨

- 글루텐의 난소화성으로 인한 소화 불량 문제 없음
- 발효 과정에서 생성된 소화 효소(Amylase, Protease)로 인해 소화 기능이 약한 노인이나 환자의 소화 기능에 도움을 줌
- 발효 과정에서 생성된 유기산(Lactic acid)으로 인해 배변 활동에 도움이 되므로 비만 억제에 도움을 줌
- 발효 과정에서 생성된 알코올과 유기산의 역할로 인해 제품의 유통기한(Shelf-Life)를 자연스럽게 연장시킬 수 있으며 유통의 편의성을 높여 줄 수 있음
- 발효 과정에서 생성되는 구수한 풍미가 국수의 맛을 좋게 하여 관능적인 선호도를 높여 줄 수 있음

(2) 기술의 모방가능성, 출시 제품에 대한 역공학 (Reverse Engineering)을 통한 모방가능성

- ① 본 기술은 제면에 최적화된 발효 균주를 개발하고 특허 등록하여 독점적으로 사용하고자 하며, 국수 제조에 최적화된 발효 조건을 확립 하려고 하는 것으로 후발업체가 모방 하고자 하여도 최소 1~2년은 소요될 것으로 사료 됨
- ② 주관 기관은 경쟁사가 모방을 위해 필요한 1~2년의 기간 동안 시장 및 소비자의 인식 속에 발효 국수의 선도자로 각인시킴으로써 시장을 선도해 나갈 수 있을 것으로 사료되며, 다양한 응용 상품을 개발하기 위한 준비를 할 것 임.

(3) 기술의 응용 및 확장가능성

- ① 본 기술이 응용/확장될 수 있는 분야는 어린이 건강을 위협할 수 있는 대표적인 길거리 음식, 재래시장 음식인 호떡, 붕어빵, 호두과자 등의 반죽에 적용할 수 있으며, 그럴 경우 어린이 비만 문제 및 건강 문제를 개선할 수 있는 가능성이 클 것으로 사료됨
- ② 피자의 반죽에 적용될 수 있을 것이며, 더 건강한 피자를 통해 국민 건강에 기여할 수 있을 것으로 기대됨.

1-3. 연구개발 범위

[제1세부] (주)동성식품

연구목표

밀가루 대체 글루텐 프리형 고품질 한식의 글로벌 가공 식품 개발

제1 협동에서는

1. 밀가루 대비 가격 경쟁력을 확보할 수 있는 핵심 기술 개발을 통한 밀가루 대체형 글루텐 프리형 고품질의 한식화 제품 개발
2. 식사용 글루텐 프리 한식 제품에 적합한 ‘노인 맞춤형 소스’ 및 ‘어린이용 소스’ 개발
3. 개발 제품 별 대량 생산 공정 확립 및 품질 관리 기준 확보
4. 글루텐 프리 및 저감화 제품에 대한 홍보, 마케팅 전략 수립 및 국내외 시장 진입을 통한 글로벌 제품화 기술 개발을 목표로 함

(가) 1차년도 (글루텐 프리형 프리믹스 개발)

1. 글루텐 프리형 제품에 적합한 전분 소재 확보

- ① 글루텐 프리형 제품에 적합한 전분 소재의 물성 분석
 - 쌀, 옥수수, 고구마, 아마란스, 퀴노아 등 각각의 전분 소재에 대한 물성측정은 물성 측정 장치 (Compac-100, Sun Scientific Co., Ltd, Japan)와 이와 연결된 측정용 프로그램을 이용하여 측정 분석함
 - Farinograph를 이용한 소맥분의 반죽 물성 측정 및 각 전분의 반죽 물성 비교 분석
- ② 글루텐 프리형 전분에 적합한 첨가제 선정
 - 글루텐 프리형 전분에 점도 증가를 위한 다당체 소재, 첨가단백질소재, 유화제 펙틴류 등의 점도 증진용 소재 선정 기준
 - Farinograph를 이용한 글루텐 프리형 전분에 적합한 첨가 소재의 확보

2. 파우더 (프리믹스) 제조 공정 확립 및 시제품 개발

- ① 증자 또는 로스팅 공정 적용 개발

- 파우더의 점착력을 높이기 위해 분쇄 전에 곡물을 적당한 조건으로 증자
- 파우더의 점착력과 관능적 특성을 높이기 위해 분쇄 전에 곡물을 적당한 조건으로 로스팅

② 입도 기준 설정

- 각 전분 별 입자크기를 측정하기 위해 Malvern 입도분석기 (Mastersizer 2000, Malvern Instruments, Worcestershire, UK)로 측정
- 우동용, 스파게티용, 만두용, 칼국수용, 냉면용 및 수제비용 등 각 프리믹스 제품 별 입도에 따른 반죽 조건 확립

③ 배합비 및 배합 방법 연구

- 각 전분과 전분 소재에 적합한 점도 증가를 위한 다당체 소재, 첨가단백질소재, 유화제 펙틴류 등의 점도 증진용 소재와의 배합비 및 배합 방법 연구
- 2회 반복 압착 시험을 통해 시료의 견고성(hardness), 부착성(adhesiveness), 응집성(cohesiveness), 탄력성(springiness), 겹성(gumminess) 등을 측정

④ 프리믹스 시제품 개발

- 우동용, 스파게티용, 만두용, 칼국수용, 냉면용 및 수제비용 프리믹스의 개발 및 각 프리믹스 별 특성 분석

3. 소비자 기호도 조사

① 개발 제품에 대한 성인(노인형) 및 어린이 제품에 대한 선호도 조사

- 개발 예정 제품의 종류 별로 각각 500 명 이상의 성인(노인형) 및 어린이를 대상으로 선호하는 제품에 대한 선호도 조사 실시 및 시중 판매되고 있는 제품에 대한 시장 조사 결과와 비교 분석하여 개발 제품에 적용

② 개발 제품에 적합한 성인(노인형) 및 어린이용 소스에 대한 선호도 조사

- 성인(노인형) 및 어린이 제품에 대한 선호도 조사결과 및 시장 조사 보고서에 따른 결과를 근거로 하여 개발 제품에 적합한 노인(노인형) 및 어린이용 소스에 대해 각각 500 명 이상의 성인(노인형) 및 어린이를 대상으로 선호도 조사

(나) 2차년도 (글루텐 프리 한식 제품 및 이에 적합한 소스 개발)

1. 다단 압축 기술 적용 글루텐 프리형 제품 개발

① 다단 압출 방식을 적용한 점탄성 증진 면류 개발

- 다단 압출 방식을 적용한 프리믹스 반죽의 온도 조절을 통한 점탄성 증진 면류 개발

- ② 다단 압출 방식이 적용된 글루텐 프리형 우동 및 스파게티 2종 제품 개발

2. 개발 제품에 대한 관능 검사 수행

- ① 5점 척도법을 이용한 관능 검사 수행
 - 다단 압출 방식이 적용된 글루텐 프리형 우동 및 스파게티 제품에 대한 외관, 경도, 조직감 및 기호도 등의 항목에 대해 5점 척도법을 이용한 관능 검사 수행
- ② 관능 검사를 통한 글루텐 프리형 우동 및 스파게티 제품의 품질 조절

3. 글루텐 프리형 우동 및 스파게티 제품에 적합한 성인(노인형) 및 어린이용 소스 개발

- ① 글루텐 프리형 우동 및 스파게티 제품에 적합한 성인(노인형) 및 어린이가 선호하는 맛이나 형태에 대한 소스 소재 선정
- ② 제품에 적합한 소스 형태 개발

4. 개발 제품 별 대량 생산 공정 확립 및 품질 관리 기준 확보

- ① 글루텐 프리형 우동 및 스파게티 제품에 대한 대량 생산 공정 확립
 - 다단 압출 방식이 적용된 글루텐 프리형 우동 및 스파게티 제품에 대한 대량 생산 공정 확립
- ② 제품 별 품질 관리 기준 확보
 - 글루텐 프리형 우동 및 스파게티 제품에 대한 품질 관리 기준 확보

5. 글루텐 프리형 우동 및 스파게티 제품화 기술 개발 및 사업화

- ① 국내 시장 진입을 위한 전략 보고서 작성
 - 글루텐 프리 제품에 대한 국내 시장 동향 조사 및 시장 진입을 위한 전략 보고서 작성
- ② 다단 압출 방식이 적용된 글루텐 프리형 우동 및 스파게티 제품에 대한 관능 검사 결과에 따른 제품화 기술 개발 및 시장 진출

(다) 3차년도 (글루텐 프리형 글로벌 제품화 기술 개발)

1. 다단 압출 기술 적용 글루텐 프리형 제품 4종 개발

- ① 다단 압출 방식을 적용한 점탄성 조절을 통한 제품 4종 개발
 - 다단 압출 방식을 적용한 각 제품 별 프리믹스 반죽의 온도 조절을 통한 점탄성 조절
- ② 다단 압출 방식 활용 글루텐 프리형 칼국수, 수제비, 냉면 및 만두피 제품 4종 개발

2. 글루텐 발효 제품 2종 개발

- ① 글루텐 분해 정도에 따른 밀 반죽 특성 분석 및 발효 국수 제형화
- ② 글루텐 발효형 빵류 생산 조건 확립 및 제품화

3. 개발 제품에 대한 관능 검사 수행

- ① 5점 척도법을 이용한 관능 검사 수행
 - 글루텐 프리형 및 발효 제품에 대한 외관, 경도, 조직감 및 기호도 등의 항목에 대해 5점 척도법을 이용한 관능 검사 수행
- ② 관능 검사를 통한 글루텐 프리형 및 발효 제품의 품질 조절

4. 개발 제품 별 대량 생산 공정 확립 및 품질 관리 기준 확보

- ① 글루텐 프리형 4종 및 발효 2종 제품에 대한 대량 생산 공정 확립
 - 다단 압출 방식이 적용된 글루텐 프리형 칼국수, 수제비, 냉면 및 만두피 제품에 대한 대량 생산 공정 확립
- ② 제품 별 품질 관리 기준 확보
 - 글루텐 프리형 및 발효형 제품에 대한 품질 관리 기준 확보

5. 글로벌 시장 진출을 위한 글루텐 프리형 제품화 기술 개발 및 사업화

- ① 해외 시장 진입을 위한 전략 보고서 작성
 - 해외 시장 진입을 위한 글루텐 프리 제품에 대한 해외 시장 동향 조사 및 시장 진입을 위한 전략 보고서 작성
- ② 글루텐 프리형 시제품에 대한 관능 검사 결과 및 해외 바이어를 통한 각국의 선호 제품 동향 조사 및 이에 적합한 제품화 기술 개발 및 시장 진출

[제1협동] 한국생명공학연구원

연구목표

밀전분 내 gluten 저감화용 발효균주 확보 및 생산 공정 개발

제 1협동에서는

밀가루에 함유되어 있는 글루텐을 분해능을 갖는 GRAS 급의 안전한 미생물 확보 및 확보된 미생물을 이용한 밀 발효 기술을 이용한 글루텐 발효 제품 개발을 목표로 함

(가) 1차년도 (글루텐 발효용 미생물 확보 및 분해능 연구)

1. 전통 발효식품으로부터 글루텐을 분해능을 갖는 미생물 확보

- ① 전통 발효식품으로부터 글루텐 분해능 유산균 자원의 확보
 - 국내 전통 발효식품으로부터 글루텐 분해능이 우수한 유산균 자원의 발굴
 - 글루텐 분해 효소의 활성의 경우 haemoglobin을 기질로 하여 반응 산물을 leucine 분석을 통한 endo 또는 exo 형태의 글루텐 분해능 분석
 - 글루텐 분해능, 젖산 등의 유기산 생성능, Amylase Protease 등의 소화 효소 생산능 및 상온, 저온, 냉동 등의 각각의 유통 조건에서의 생육 정도에 따른 선정 기준안 마련 그에 따른 유산균 자원의 확보
- ② 확보된 미생물 자원으로부터 gluten 발효에 의한 저감화 기술 개발
 - Response surface method를 이용한 밀에 함유된 gluten의 분해 최적화 공정 확보
 - 확보 미생물이 생산하는 글루텐 발효 효소와 상용화된 효소와의 글루텐 분해능 및 특성 비교 분석
- ③ 확보된 미생물 자원으로부터 gluten 발효에 의한 저감화 기술 개발

2. 글루텐을 분해능을 갖는 유산균의 동정 및 생화학적 특성 분석

- ① 글루텐을 분해능을 갖는 미생물의 동정
 - 유산균의 16s rDNA의 universal primer를 이용한 확보 유산균의 동정
- ② 유산균의 생화학적 특성 분석
 - 탄소원, 질소원 이용성 등의 실험을 통한 유산균의 생화학적 특성 분석

3. 확보 유산균의 배양학적 특성 및 Lab scale 대량 배양

- ① 유산균의 배양학적 특성

- 다양한 배지 성분 및 배양 조건에 따른 유산균 배양 조건 확립
- 배양 조건에 따른 세포 성장 및 글루텐 분해 효소 생성능 관련성 연구
- ② 5 L 발효조를 이용한 Lab-scale에서의 대량 배양 조건 최적화

(나) 2차년도 (미생물의 생리학적 글루텐 분해 특성 분석 및 효능 시험 연구)

1. 유산균이 생산하는 gluten 분해 효소 특성 분석

- ① 유산균이 생산하는 gluten 분해 효소의 정제
 - 유산균 배양액으로부터 lab-on-the-chip technique을 이용한 Capillary electrophoresis 방법으로 gluten 분해 효소 분리, 정제
- ② 정제 단백질의 amino acid 특성 sequencing 분석 및 crystallography 확보

2. 글루텐 발효 시제품과 기존 제품과의 품질 및 효능 비교 검증

- ① 관능적 선호도 비교
 - 관능검사는 5점 척도법을 이용하여 실시하며, 기호도의 평가 항목은 경도, 탄력성, 향미, 전반적인 기호도로 분석 실시함
- ② 글루텐 발효 시제품과 기존 제품과의 소화 효능에 대한 *in vitro* 시험
 - 글루텐 발효 시제품에 대한 *in vitro* 소화력 시험은 KFDA 규정에 따라 수행하며, 전분 당화력은 다음과 같은 수식을 통해 계산함
$$\text{전분당화력} = \text{포도당의 양(mg)} \times 1/10 \times 1/W \times k$$
 - W = 검액 1 ml 중의 시료의 무게(g)
 - k = 회석 배수
 - 1/10 = 방치 시간
- ③ 보존성(Shelf-Life) 비교
 - 냉장(0~10℃) 1개월, 냉동(-18℃ 이하) 12개월, 실온(0~30℃) 1개월, 각각의 유통 조건 별로 일반 세균, 대장균군의 증식 추이 비교 (경시 변화 측정)

(다) 3차년도(글루텐 발효 제품 생산을 위한 대량 생산 공정 개발)

1. Pilot scale에서의 유산균 배양 조건

- ① Pilot scale에서의 유산균 배양 조건 확립

- 500 ~ 5,000 L 급의 발효조를 이용한 Pilot scale에서의 유산균 대량 배양과 gluten 분해 효소 생성능 증진을 위한 최적화 공정 개발

2. 글루텐 발효 제품 생산기술 개발

- ① 확보 유산균을 이용한 밀 반죽의 발효 조건의 확립
 - 발효 우동 및 국수에 적합한 확보 유산균을 이용한 밀 반죽 조건의 확립
 - 스타터로서 유산균 초기 농도에 따른 밀 반죽의 발효 조건
 - 유산균 발효액을 이용한 밀 반죽의 발효 조건
- ② 글루텐 분해 정도에 따른 밀 반죽 및 발효 국수 제형 분석
 - 발효 반죽 내 initial & residual gluten 농도에 따른 발효 제품의 제형화 특성 분석
 - 발효 국수 및 기존 제품에 대한 2회 반복 압착 시험을 통해 시료의 견고성(hardness), 부착성(adhesiveness), 응집성(cohesiveness), 탄력성(springiness), 검성(gumminess) 등의 texture analysis 시험
- ③ 관능적 선호도 비교
 - 관능검사는 5점 척도법을 이용하여 실시하며, 기호도의 평가 항목은 경도, 탄력성, 향미, 전반적인 기호도로 분석 실시함
- ④ 발효 국수 제품에 대한 안정성 및 안전성 분석

[제3협동] 남부대학교

연구목표

곡류전분으로부터 글루텐 프리형 피리믹스 및 글루텐 정량 분석법 개발

제 3 협동에서는

글루텐이 함유되어 있지 않는 전분과 물성향상의 첨가물을 이용한 글루텐 프리 분말을 개발하고 이의 제조공정을 최적화 한다. 그리고 글루텐에 대한 간결하고 정확한 분석법을 확립하며, 이를 식품의약품안전처의 식품 공전에 등록을 목표로 함.

(가) 1차년도 (글루텐 프리 밀가루의 개발)

① 글루텐 프리제품에 대한 국내동향 조사

- 국내외 글루텐 프리제품의 경향과 해외의 규제사항 및 글루텐 프리제품의 해외 연구 및 개발 동향의 조사

② 글루텐 물성형성 소재의 선정과 배합비의 선정

- 글루텐 물성을 나타낼수 있는 각종 곡물류의 분말과 점질성 및 교질성을 줄수 있는 hydrocolloids를 이용, protein의 가교를 이용한 글루텐 유사물성의 모사실험 그리고 이를 위한 최적화 와 상품화를 위한 최적배합비 산출
- 물성의 개선을 위한 유화제의 선택과 최적 유화제 배합비 선정

③ 빵류 제조와 물성의 확인 : 최적화된 배합비로서의 제조된 dough의 물성확인, 모델제품으로서의 빵의 제조와 관련 물성, 색도, 물리적 성질의 측정

④ 관능검사를 통한 기호도의 보정

- 글루텐 프리 제품으로서의 관능 적합도 검사(일반 글루텐 함유제품)를 실시, 물성, 기호를 보정

⑤ 글루텐 프리 밀가루의 시제품으로서의 최적화 시제품의 생산

(나) 2차년도(곡물소재 전분과 단백질의 발효를 통한 물성의 개선)

① 빵류 제조에 사용되는 글루텐 프리 발효기술에 대한 조사

- 발효를 통하여 글루텐 프리제품의 물성 개질관련 세계 연구동향 및 산업화 동향의 조사와 향후 전망 조사

② 누룩균과 유산균을 이용한 빵류 제조과정 이용으로 빵류 물성의 개선

- 미생물의 종류에 따라 미치는 영향과 글루텐 프리 제품의 물성 개선과 물성 개선과 관련한 기작의 규명
- 글루텐 프리 제품 물성에 적합한 최적화 균의 선정 및 반응 최적화 조건 탐색

③ 밀 이외 전분, 단백질소재에 대한 발효조건의 탐색 및 최적화

- 글루텐 프리 제품에 적용 가능한 전분소재와 단백질 소재에 대한 물성개선 가능 미생물의 적용과 발효조건의 확인

④ 발효산물의 빵류로서의 안정성 시험 및 유통기한 설정.

- 발효 가능한 소재확인 및 소재의 빵으로서의 제품화 안정성 조사

⑤ 빵류 시작품 제작 및 관능 평가와 기호도 보정

(다) 3차년도(글루텐 함량의 측정 및 분석방법의 확립)

① 연구에서의 글루텐 함량에 대한 측정법과 산업적으로 이용되는 최적측정법의 조사

- 산업적으로 이용되는 글루텐 함량 측정방법들의 조사 및 이의 정확도, 편의성에 대한 자료조사
로 간편, 정확 방법의 확립

② 측정법에 따른 장단점의 비교분석

- 밀가루의 글루텐 저분자화 및 celiac 병에 영향이 없는 함량에 적합하게 이용 가능한 글루텐 측정법의 장단점확인 및 data 화

③ 경제성, 안정성, 편리성 시험법의 정립

- 저분자화 및 변화된 글루텐의 측정에 적합한 시험법의 선택과 이의 편의성을 개선하는 시험 매뉴얼의 확립

④ 정립시험법에 대한 시료별 data 구축

- 정립시험법에 따른 다양한 글루텐 분석시료의 data구축으로 저분자에서 고분자, 저함량에서 고함량까지 이용 가능한 data 구축

2. 국내외 기술개발 현황

코드번호

D-04

가. 생산 및 시장현황

1) 국내 제품생산 및 시장 현황

전세계 발효시장은 2000년 152억달러(13조원 상당)에서 2010년 730억달러(약 75조8300억원)으로 4배의 성장세를 보였다. 국내 발효식품 산업 규모는 2010년 4조원에 불과하다. 이 가운데 50%가 한국인이 즐겨먹는 장류 등 전통 발효식품이다. 발효미생물 산업규모가 2010년 기준 8조4000억원에 이르는 등 10년새 10배나 성장한 것을 고려하면 발효시장의 전망은 밝다는 것이 바이오화순 측 설명이다. 또 막걸리의 인기에 힘입어 주류와 건강음료로 각광받는 식초, 젓갈류, 발효화장품 등까지 포함하면 발효산업은 어마어마한 부가가치를 창출하는 블루오션이 될 수 있다는 것이다.

“ 발효의 우수성이 알려지면서 많은 사람들이 발효식품에 대한 관심이 뜨겁다.”

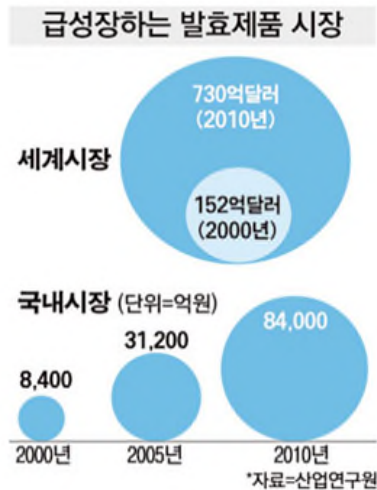


그림. 발효제품 시장규모와 발효곡물

(1) 발효식품의 특징

발효란 역사상 가장 오래된 기술이면서 최신 기술이기도 하다. 특히 식품발효는 전세계적으로 가장 널리 이용되어 온 기술이며 전통발효식품에 대한 이해는 첨단 생물공학을 개발하는 첩경이기도 하다. 전통적인 발효의 정의는 “효모를 포함한 미생물이 유기화합물을 분해하여 알코올류, 유기산류, 이산화탄소 등을 만드는 작용”을 말한다. 이러한 정의에 들어가지 않는 발효분야로는 사일레

지 제조, 차 발효, 잎 담배의 건조, 커피알곡의 수확 등이 있다.

주류를 비롯한 발효식품은 향미(香味)가 주요한 품질관리 항목이며 주류 이외의 발효식품에도 향미, 특히 향기에 대한 평가가 중요하다. 이상발효로 부패취와 화락취(火落臭)가 생기면 제품의 품질의 손상이 야기된다.

대표적인 발효식품으로는 주류(와인, 브랜디, 맥주, 탁주, 청주, 소주, 럼 등), 발효조미료(식초, 어장, 곡장, 된장 등), 발효해산물식품(젓갈, 스테이스트리밍 등), 발효유제품(치즈, 발효유 등)이 있으며 우리나라의 대표적인 발효식품인 김치가 있다.

발효식품의 특이점은 동서양의 발효식품이 확연히 구분되는 점인데, 서양은 목축업의 발달에 힘입어 축산발효식품이 발달되어 있고 농수산물도 발달한 동양에서는 농수산물을 이용한 발효식품이 발달되어 있다.

“발효는 여러 가지 물질을 분해하여 저분자 물질로 전환하며, 유익한 측면이 크고 응용할 수 있는 분야가 다양.”

(2) 한국 발효식품의 현황과 세계 속의 위치

국내 발효식품의 경우 오랜 역사와 함께 우리네 독특한 식문화 형성에 기인해 왔으며, 최근 “살아있는 식품”인 건강식품의 하나로 인식되고 있다. 가장 대표적인 발효식품인 김치의 경우 전체 생산량의 43%가 공장에서 생산되고 있으며, 2009년 8,938만달러로 54개국에 수출 하고 있다.

된장, 간장, 고추장의 경우 각각 57%, 63%, 82%가 공장에서 생산되고 있으며 지속적으로 시장점유율을 넓혀가고 있다. 건강증진에 대한 발효식품과 장내미생물이 주목받고 있는데 최근 각광 받고 있는 프로바이오틱스(Probiotics, 살아있는 균을 섭취했을 때 장내 유익한 활동을 돕는 미생물들)는 결국 발효식품이다. 인체에 유익한 작용을 하는 장내미생물의 경우 잘 알려진 것은 젖산균(Lactic acid bacteria)이 있으며 김치, 요구르트 등 다양한 식문화를 발전시켜왔다.

전세계적으로 생물자원확보 경쟁에서 우리 발효식품은 중요한 미생물 자원이 될 수 있으며 국가적 차원에서 미생물 자원확보가 중요하다.

(3) 발효기술의 일반적인 적용 분야

- 알코올 제조 및 주류 제조 (맥주, 위스키, 사케, 청주, 막걸리 등)
- 전통 발효 식품의 제조 (간장, 된장, 김치, 젓갈, 치즈, 요거트, 식초 등)

- 빵의 제조
- 항생물질 및 항암물질의 제조 (Penicillin, Streptomycin 등)
- 유기산의 제조 (젖산, 구연산, 초산 등)
- 아미노산의 제조 (MSG, Lysine, Threonine, Tryptopan 등)
- 효소 생산 (Amylase, Protease, Cellulase 등)
- 생리활성 물질의 합성 (비타민, Gibberellin 등)
- 핵산의 제조 (Inosinic acid, Guanylic acid 등)
- 기타 산업에의 응용 (폐수처리, 메탄발효, 공해방지, 탈황, 구리 채광 등)

“발효기술을 이용한 식품은 다양한 장점이 존재하며, 유용한 물질 전환에 탁월하다.”

① 인류 발효연구의 시작, 제1세대 발효

인류의 역사는 식품의 역사, 발효식품 개발의 역사라 할 수 있는데, 오래 전부터 수많은 전통식품들이 발효라는 인류가 발견해낸 지혜로운 식품처리 방식으로 생산되었다. 이미 기원전 6천년부터 맥주 제조에 효모가 사용되어 왔고, 치즈를 만드는데 곰팡이를, 식초 생산에 초산균을 이용했다는 사실은 잘 알려져 있다. 발효를 이용한 다양한 발효식품 개발에 우리도 한몫을 담당해왔는데, 한국인이 애호하는 발효식품으로는 장, 김치, 젓갈, 식초, 식혜, 술 등이 있으며, 이와 같은 식품들을 통해 다양하고 조화된 향을 즐기고, 건강을 지켜왔다. 이와 같은 발효식품은 미생물 혹은 효소를 이용하여 먹을거리의 특성을 사람에게 이롭게 변화시켜 얻을 수 있다. 결국 발효 기술은 먹을거리의 맛과 물성 향상, 그리고 냉동이나 식품저장을 위한 다른 형태의 기술을 사용하지 않고 저장성을 증진시키기 위해 오래 전부터 자연스럽게 터득한 ‘인류의 식품가공 지혜’라 할 수 있다. 1990년대 초반, 화장품 성분의 다각화를 고민하던 화장품 업계는 식품에 사용되어온 발효 기술을 화장품 소재 개발에 접목하고자 다양한 연구를 시도했으나 그때까지만 해도 결과물이 미미하여 산업적 이용이 매우 제한적이었다. 발효 식품이 자연적으로 발생하는 미생물을 활용하는 1차원적인 발효 기술을 활용했다면 발효 화장품은 더 앞선 기술을 필요로 했기 때문이다. 자연 발생된 다양한 미생물로부터 순수한 미생물을 분리해 신규 원료로 개발, 이를 제조하는 과정에서 발생하는 미생물 특유의 냄새, 미생물의 사후 변형 등 공정 상의 어려움을 뛰어넘을 발효 기술력이 절대적으로 필요했다.

② 발효기술의 양산화·제2세대 발효

단순히 전통적인 발효방법을 이용한 것이 1세대 발효라면 2세대 발효는 효능물질의 실용화기술 개발이었다. 히알루론산(HA), 소이폴(나토검), 베타글루칸 등의 기능성 다당류들은 피부에 유용한 생리활성을 가진 천연물질로 밝혀져 있지만 자연적으로 얻을 수 있는 양이 매우 적어 산업화가 불가능했던 성분이다. 예를 들면 피부의 보습 유지에 탁월한 효과를 가지고 있는 HA는 발효 기술 개발 전에는 닭의 뼈에서 추출하였으나 생산량이 매우 적고, 동물성 유래 원료라는 점에서 대단히 제한적으로 이용돼 왔다. 같은 효과가 있는 성분인 소이폴은 일본의 청국장인 ‘나토’에서 제조할 수 있다는 것으로 알려져 있었으나 대량제조를 위한 기술 확보와 설비가 필요했다. 또한 베타글루칸 성분은 곡류, 버섯류 등에 존재하며 보습효과를 가지는데, 이 물질은 물에 녹지 않는 성질을 가지고 있어서 원료화가 어려웠다. 이러한 문제점들을 단순발효, 즉 잡균 접종, 목표물질이 없는 발효가 아닌 유용한 생리활성 물질만을 대량으로 생산할 수 있는 고도의 발효생산기술을 통해 극복함으로써 화장품 기능성소재산업의 기틀을 마련하였다.

③ 생물전환기술 이용한 타게팅, 제3세대 발효

20세기 들어 화학공업의 급속한 발전은 전자, 기계, 금속산업을 포함한 모든 산업발전에 획기적인 기여를 해왔다. 그러나 인류생활을 보다 풍요롭고 윤택하게 하기 위한 과학발달이 심각한 환경문제를 일으키고 있는 것도 주지의 사실이다. 따라서 고온, 고압, 고독성의 시약 및 용매 하의 극렬한 반응조건을 요구하는 화학공정을 상온, 상압, 안전한 용매계를 사용하는 온화한 조건의 생물반응공정으로 대체하려는 연구가 일찍부터 시작되었다,

표 2. 기존 화학기술과 생물화학기술의 차이점

	생물화학기술		화학합성기술
	생물전환기술	발효기술	
이용기술	생체 및 생물촉매	생체(생육)	촉매
반응	생화학반응	생명현상	화학반응
반응조건	상온상압	상온상압	고온고압
에너지이용	에너지절약형	에너지절약형	에너지소비형
특이성	높음	높음	낮음
생성물의 종류	천연, 비천연물	천연물	비천연물
생성물의 농도	낮음(일부 높음)	낮음	높음
사용장치의 규모	소규모	대규모의 장치산업	대규모의 장치산업
환경오염문제	환경적합형	환경적합/환경부적합형	환경부적합형

자료 : 생물전환기술의 원리 및 응용 현황, '바이오인더스트리', 1996.

그 결과 많은 화학공정이 생물반응계로 대체되고 있다. 생물전환기술이란 생물전환, 생합성, 생촉매 등의 용어와 의미상 중복성을 가지며, 미생물이 갖고 있는 효소적 기능을 이용하여 전구물질로부터 원하는 산물을 제조하는 기술을 말한다.

따라서 생체기능을 세포 또는 효소단계에서 이용하는 생물전환기술은 유용물질 생산을 주요 목적으로 하여 현재의 생물공업을 구성하는 주요한 공정과정이라 할 수 있다. 참고로 생물전환기술과 발효기술의 차이에 대해 간략하게 요약한다면, 생물전환 공정은 기존의 발효공정과 비교해 볼 때, 두 공정이 생물반응계를 이용한다는 점에서 공통점을 갖지만, 발효공정이 상대적으로 간단한 원료물질(주로 균체 성장에 필요한 영양성분)에서 출발하여 균체 내의 생명현상을 이용하여 생산물을 얻어내는 반면 생물전환 공정은 미생물 또는 효소의 기질에 대한 선택성을 이용, 전구물질을 도입하여 목적하는 화합물을 생산한다는 점에서 차이가 있다.

2) 국외 제품생산 및 시장 현황

네덜란드 라이덴대학교 의료센터 면역혈액학 수혈과의 프리츠 코닝 교수(Frits Koning, professor of immunology at Leiden University Medical Center)팀은 「미국생리학저널-위장관 간생리학」(American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology) 5월 호에 발표한 보고서에서 원래 식품 가공용으로 개발된 「AN-PEP」란 효소가 글루텐을 소장에 도달하기 전 위에서 효율적으로 분해시킬 수 있다고 밝혔다.

글루텐(gluten) 과민성 장질환은 인체 면역계가 소장에서 밀가루 음식에 혼한 단백질인 글루텐에 과민 반응해 글루텐과 함께 소장 점막을 손상시켜 영양분의 흡수를 저해하는 자가면역질환이다. 현재 글루텐을 함유한 식품의 섭취를 피하는 것이 유일한 대책이나 결코 쉬운 일이 아니다.

연구팀은 이러한 식이 제한 없이 간단히 AN-PEP 효소를 보충해 글루텐 과민성 장질환을 해결할 수 있다는 것이어서 주목된다. AN-PEP는 혼한 진균인 아스페르질루스 니거(*Aspergillus niger*: AN) 유래 프로릴 엔도프로테아제(prolyl endoprotease: PEP)를 말한다.

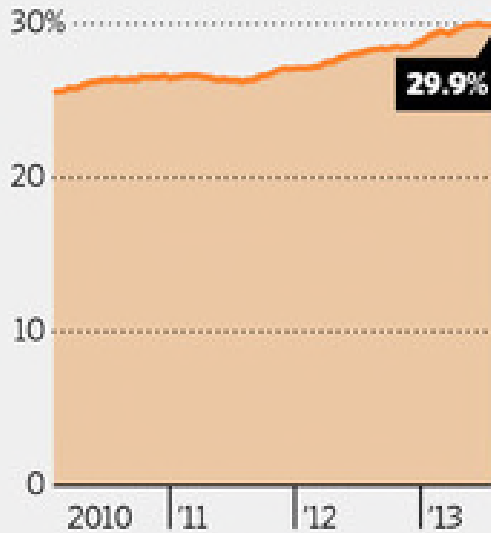
AN-PEP는 글루텐을 신속하고도(평균 4분) 거의 완전히 분해했다. 아울러 이 효소는 인간 위에서 발견되는 생리 환경과 동일한 조건에서 가장 잘 작용했다. 즉 pH 4~5에서 최적 효과를 보였고 pH 2에서도 안정적이었으며 위액 속 펩신에 의한 소화에도 완전 내성이었다. 이전 유망 효소는 위장과 같은 산성 조건에서 비효과적이었고 펩신에 의해 불활성화 됐다.

따라서 AN-PEP를 경구 보조하면 글루텐이 소장에 도달하기 전 위에서 완전히 단편으로 분해돼 소장에 염증성 T세포 반응을 유발하지 않을 것으로 기대된다. 그리고 연구개발이 완료되면 현재 식이 제한 밖에 대책이 없는 글루텐 과민성 장질환(또는 셀리아병)(celiac disease)을 간단히 효소 보조로 해결할 수 있을 전망이다.

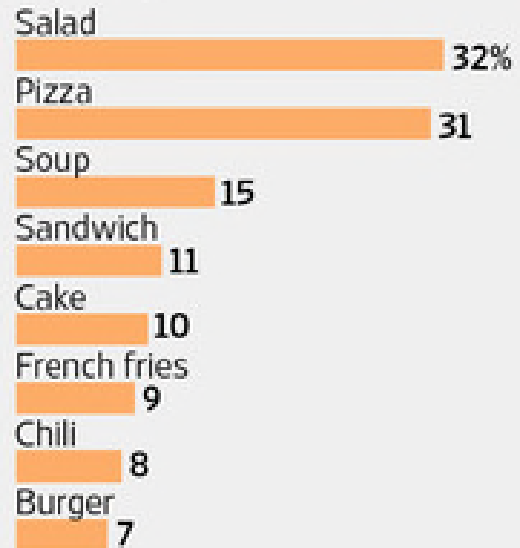
Going Gluten-Free

As more Americans shun gluten, restaurants are changing their menus.

Americans who say they are trying to cut back or avoid gluten



Menu dishes mentioning gluten-free



Sources: NPD Group; Food Genius Reports, November 2013

The Wall Street Journal

그림. 미국의 Gluten free 메뉴 및 제품

보스턴 소재 ‘셀리악병연구치료센터’에 따르면 약 200~300만 미국인 혹은 미국 인구의 거의 1%는 글루텐 섭취가 영양분 흡수를 방해하는 자기면역질환인 셀리악병(만성소화장애증)을 앓고 있다. ‘전미 셀리악병 인식고취 재단’은 또다른 1,800만 미국인이 ‘글루텐 민감성’을 지니고 있다고 추산한다.



그림. 가장 즐겨먹는 국수의 형태

○ 발효우유식품의 단백질 분해

우유·마유·산양유 등과 같은 동물의 젖을 원유라고 한다. 원유는 완전식품으로 그대로 마시기도 있지만, 발효를 통하여 영양과 기능성이 향상된 발효우유식품으로 이용하기도 한다. 발효우유식품은 보통 유산균을 이용하여 발효하고, 원유에서 카제인 단백질과 기름을 분리하여 다양한 발효식품을 만들기도 한다. 치즈는 흰곰팡이(*Penicillium camemberti*), 푸른곰팡이(*Penicillium roqueforti*), 프로피온산세균(*Propionibacterium freudenrichii*) 등으로 발효하여 펩티드로 분해한 후, 런넷(Rennet)이라는 효소(Enzym)로 응고시켜 숙성하는 과정을 거친다. 이러한 발효 과정 중 우유단백질인 카제인을 저분자인 펩티드와 아미노산으로의 분해가 이루어지며 치즈의 경우 응유효소와 알칼리성 단백질분해효소(protease) 1차분해 작용에 관여하는 것으로 확인되었다. 유당불내증을 가져 우유 섭취시 불편감을 느끼는 환자들이 치즈나 발효유를 먹었을 때는 괜찮은 이유가 발효과정을 거쳐 단백질분해가 이루어졌기 때문이다.

“발효기술을 이용한 제면기술은 아직 연구가 기초적인 단계이며, 많은 상품화연구가 필요한 상황.”

표 1. 국외의 글루텐프리 제품 (수정 필요)

브랜드	제품명	사진
아워홈	글루텐프리 쌀파스타	
청정원	옛날식 짜장분말	
강동오케익	우리쌀로 만든 화련	

나. 개발기술의 산업화 방향 및 기대효과

1. 최종제품이 속할 것으로 예상되는 산업의 특성

2013년 발간된 식품산업 분석 보고서에 의하면 식품산업은 성장률이 약 7.8% 국내총생산 성장률 3%의 2배가량에 이르는 높은 성장률의 산업으로써, 최근 3년간 업종별 생산액 현황을 보면, 식품과 식품첨가물의 생산비중이 소폭 감소하고 기구 및 용기, 포장의 비중이 증가하는 경향을 보이고 있다.

(1) 면류의 정의

- 면류는 곡류와 전분을 주원료로 가늘고 길게 썰거나 뽑아내어 삶아먹거나 비벼먹는 음식을 총칭하는 것으로, 식품공전에서는 넓게 용도에 따라 국수, 냉면, 당면, 파스타류로 분류하고 있음.

- 국수는 국수용으로 사용되는 면류로 곡분 또는 전분 등을 주원료로 하여 제조한 것을 말함.
- 냉면은 냉면용으로 사용되는 면류로 메밀가루, 곡분 또는 전분 등을 주원료로 하여 압출 성형한 것을 말함.
- 당면은 주로 잡채용으로 사용되는 면류로 전분을 80%이상으로 제조한 것을 말함.
- 파스타는 주로 파스타로 사용되는 면류로 듀럼 세몰리나, 듀럼가루, 파라나 또는 밀가루를 주원료로 하여 파스타 성형기로 제조한 것을 말함. 카로니, 스파게티 등이 파스타에 포함됨.

(2) 면류의 분류

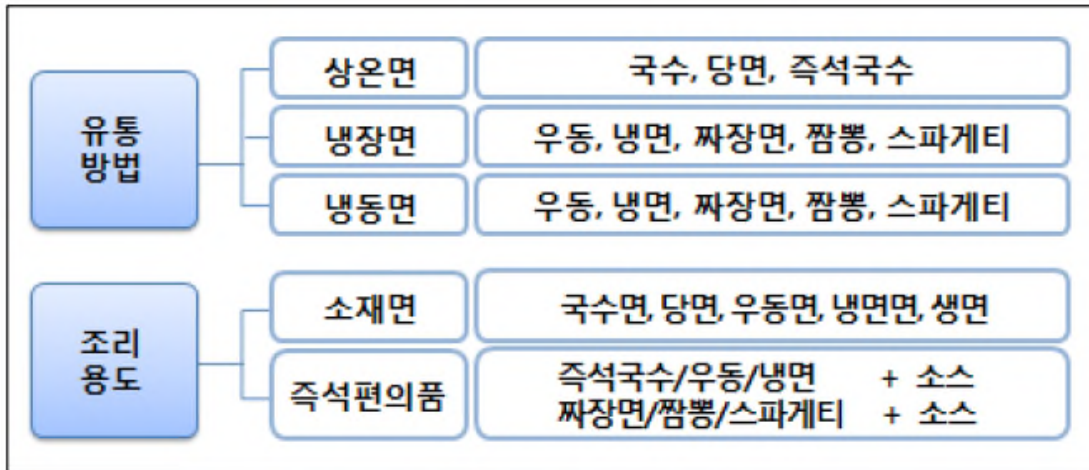
① 조리형태에 따른 분류

- 면류는 주원료 및 가공방법 등 다양한 기준으로 분류할 수 있으며, 주원료에 따라 밀을 넣은 밀국수, 메밀을 넣은 메밀국수(냉면), 쌀을 넣은 쌀국수, 전분(옥수수, 감자 가루)을 넣은 당면, 듀럼밀로 만든 이태리의 스파게티가 있음. 이외에도 가공방법, 면발의 너비, 성형방법에 따라 나눌 수 있음.
- 건면은 수분이 13~14% 정도가 되게 건조시킨 면, 생면은 반죽한 것을 끈 모양으로 만들어 가열한 면, 유당면은 기름에 튀긴 것으로 주로 즉석라면을 가리킴.
- 성형방법에 따라 칼국수와 같이 얇게 민 반죽을 칼로 가늘게 자른 절면법, 반죽을 잡아당겨 가늘게 뽑은 납면법, 뜨겁게 반죽한 밀가루나 메밀가루를 구멍으로 뚫어 찌면법, 마카로니와 같이 강한 압력으로 뽑아낸 것 등이 있음.

② 업계의 면류 분류

- 2011년 3월 면류기업 인터뷰 결과에 의하면, 업계에서는 면류를 크기는 유통방법, 세부적으로는 메뉴별로 분류하고 있음. 더불어 조리용도로 소제면과 가공품으로 구분하고 있음.

- 상온면은 생면을 삶은 후 건조시킨 후 장기 보존 할 수 있도록 한 면, 냉장면은 반죽에서 면을 갖 뽑아 포장한 생면과 생면을 삶아서 포장한 숙성면을 냉장 유통한 것임. 냉동면은 생면을 삶아서 급속냉동시킨 것 임.
- 생면은 면을 갖 뽑아 포장하고, 이 생면을 삶아서 포장한 것이 숙성면(숙면)임. 업계에서는 생면과 숙면을 구분하지 않고 냉장면으로 통칭함.
- 메뉴별로는 국수, 당면, 우동, 냉면, 짜장면, 짬뽕, 스파게티 등이 있음.
- 또, 조리용도별로 소재면과 가공품으로 구분하고 있는데, 소재면은 오직면만 포장되어 집에서 육수 혹은 소스 등에 조리하는 것을 말하고, 가공품은 즉석국수, 우동, 냉면, 짜장면, 짬뽕, 스파게티에 소스가 별첨되어 5~6분 이내 조리가 가능한 편의식품을 말함.
- 유탕면인 라면을 제외하면 대기업(CJ,풀무원,오뚜기,농심,대상,동원,삼립등)과 중소기업(면사랑,송학,칠갑,동성,천일,영우,미정,한일,두영등)이 경쟁하고 있으며 B2C시장에서는 대기업이 90%이상을 점유하고 있고 중소기업은 주로 B2B시장과 고속도로휴게소, 수출 등의 시장에서 점유율을 높혀 가고 있다.
- 국수류, 냉면류의 주요 원자재인 밀은 대부분 수입에 의존하고 있으며 호주, 미국, 캐나다 등에서 수입하여 국내 제분사 (CJ,대한제분,삼양사,한국동아제분)에서 제분하여 사용하고 있는데, 해마다 그 가격이 인상되고 있는 추세이다.



자료 : 2011년 3월 면류기업 3사 인터뷰 결과

그림. 유통방법과 조리용도에 따른 제품현황

2. 개발기술의 생산특성

1) 생산형태 및 최종제품에 사용이 예상되는 핵심원재료 리스트

발효가 접목된 최종 결과물의 생산 형태는 1차로 냉장 유통이 가능한 우동면과 냉동 유통이 가능한 우동면 2품목을 개발 목표로 하고 있으며, 향후 자장면, 칼국수, 냉면, 쫄면, 잔치국수, 수제비 등으로 생산 품목을 확대할 계획임. (첨부 파일 사진 참조) 핵심원재료는 밀가루, 전분, 소금, 물, 발효균주 일 것으로 예상됨

2) 핵심원재료의 가격(현재시점)과 과거 가격추이 및 조달 측면상 용이성

핵심원재료인 밀가루의 경우 밀의 주요 원산지인 호주, 미국, 캐나다의 작황에 따라 영향을 받고 또한 국제 투기 자본의 동향에 따라 가격의 등락에 영향을 받는데, 최근 10년을 기준으로 보면 연 2~3% 내외의 완만한 오름세를 보여 왔고 최근 3년 기준으로 보면 보합세를 보이고 있음

3) 생산규모와 원료투입 및 예상 Lead-Time

최종 산출물인 발효우동의 경우 증숙 및 냉각 설비가 필요 하므로 상업적 생산량을 확보하기

위해서는 대규모 생산시설이 필요하며 영세 업체의 진입이 어려운 특성을 가지고 있고, 주관기관인 (주)동성식품은 시간당 6,000인분의 생산이 가능한 자동화된 증숙 및 급속냉각 시설을 보유하고 있음.

예상 Lead-Time은 균주 접종 후 발효를 위해 소요되는 시간 48시간, 밀가루 투입 후 완제품 생산까지 소요 시간 1시간

2. 산업 및 시장의 예상 risk정도

1) 최종제품이 속한 산업 및 시장의 예상되는 위험정도 작성.

최근 미국 농무부에서 발표한 자료에 의하면, 세계 곡물수급전망이 당분간은 원활한 수급이 이루어 질 것으로 예상되어 곡물 가격이 안정세를 나타내고 있지만, 갈수록 증가되는 인구와 환경오염 그리고 지구온난화에 따른 곡물수급이 원활하지 않을 것이라는 각종 보고에 의해 곡물가격이 언제 증가할지 모르는 위험이 있다.

국내에서 식품은 필수재로 경기가 악화되더라도 소비를 빠르게 감소시키지 힘든 특성을 가지고 있다. 따라서 식품 가격이 인상되더라도 수요의 비탄력적 성향에 의해 다른 소비재의 가격인상보다 물가 상승에 더 큰 영향을 주게 된다. 그런데 최근 국제 곡물가격 등 원재료 가격이 하향 안정화된 시기임에도 불구하고 갈수록 가격인상이 단행되어 소비자 부담이 가중됨으로써 소비심리를 위축하고 있다는 것도 참고해야 할 사항이다.

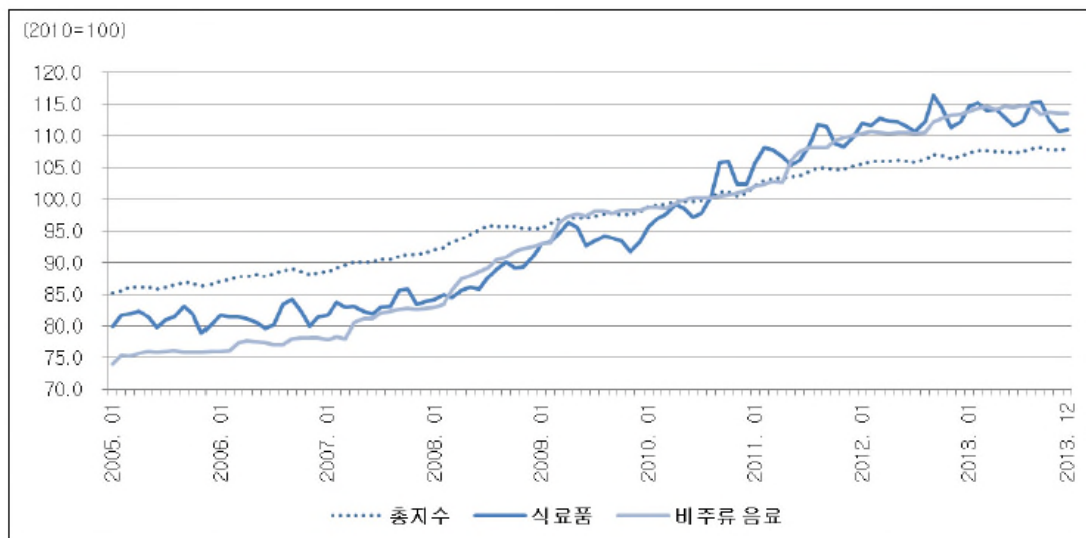


그림 28. 음식료 소비자물가지수 추이(2005-2013)

하지만 위에 서술한 것과 같은 문제점들은 미리 예측이 가능하고 지속적인 농업기술의 발전과 대책 마련으로 안정 및 극복이 가능할 것으로 예상되며 세계적으로 2008년부터 매년 3%이상의 안정적인 성장세를 본다면 식품시장의 위험정도는 크지 않을 것으로 예상된다.

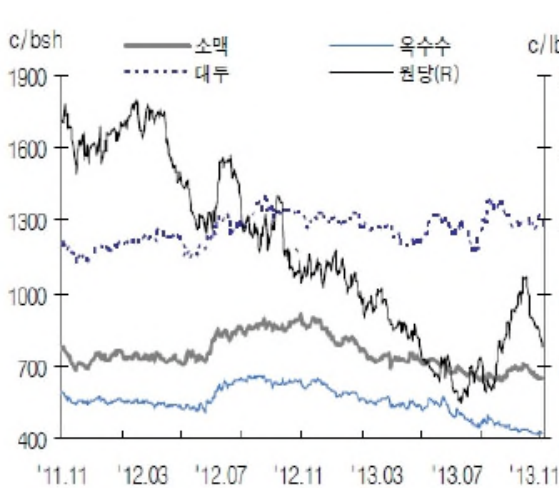


그림 28 주요 곡물가격 추이

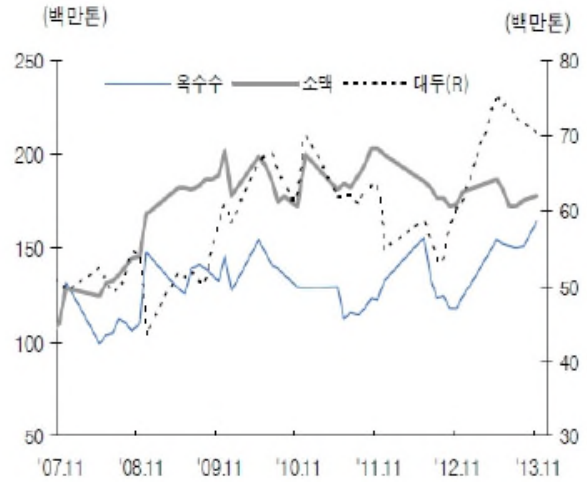
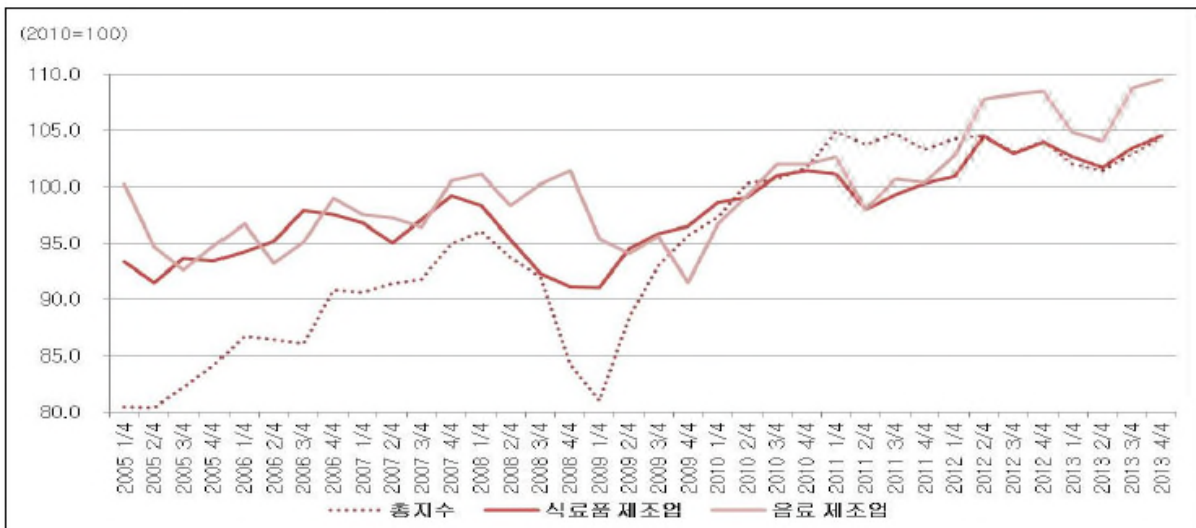


그림 29 주요 곡물 기말 재고량

자료 : Bloomberg

그림 29. 중 곡물가격과 재고량 추이



자료 : 통계청, '광업제조업동향조사'

그림 30. 식품관련제조업 현황

3. 연구수행 내용 및 결과

코드번호

D-05

(주) 동성식품 [주관기관]

1차년도

1. 글루텐 프리형 제품에 적합한 전분 소재 확보

글루텐 프리 면류 제조 전 주원료로 사용될 원료들을 소량 반죽하여 각 원료별 반죽 특성을 파악하고, 프리믹스에 적합한 원료를 선정한다.

가. 실험 재료

각 원료들은 주원료와 전분류, 당류, 검류로 분류 하여 사용하였다.

<표1> 실험에 사용된 각 재료별 분류

1) GRAS, generally recognized as safe

주원료	전분류	당류	검류
쌀가루	고구마전분	올리고당류	Beta-Glucan
돼지감자가루	감자전분	액상과당	젤라틴
초미분쇄쌀가루	생타피오카전분	폴리글리시톨	구아검
호화쌀가루	타피오카초산변성전분	솔비톨	카라기난
볶은쌀가루	타피오카인산변성전분	글리신	글루코만난
생메밀가루	찰옥전분		한천
볶은메밀가루	옥수수전분		펙틴
찐메밀가루	칩전분		글루코겔
수수가루	ISP		잔탄검
귀리가루			
아마란스분말			
퀴노아분말			
마가루			
도토리가루			
볶은콩가루			

나. 프리믹스 제조

글루텐 프리 프리믹스 제조를 위해 표1 과 같이 각 특성별로 분류된 원료들을 칭량하여 사용하였다. 모든 분말 재료를 반죽기에 넣고 기타원료들을 첨가하여 고르게 혼합한 뒤 물을 조금씩 투입하면서 실온에서 10분간 믹싱하여 작은 덩어리로 만들었다. 이후 두께를 2 mm가 되도록 압연기를 이용해 밀어 면을 제조하였다. 제조된 면은 끓는 물에 5~7분간 삶은 후 실험에 사용하였다.

3. 실험방법

3-1. 각 시제품의 물리적 특성 측정

기계적 특성은 Texture Analyzer (CT310K, BROOKFIELD)를 이용하여 표 2와 같은 조건으로 측정하였다. 시료는 면을 조리한 다음 체에 받쳐 5초 동안 찬물에 헹구고 물기를 제거 한 후 조직감을 측정하였다. 5회 정도 반복 측정하여 경도(hardness), 응집성(cohesiveness), 씹힘성(chewiness)을

평균값으로 나타냈다.



[그림1] Texture Analyzer

표 2. Texture Analyzer 측정조건

Sample Dimentions	Block
Test Type	TPA
Target Load	Load 2000g
General Test Parameters	Trigger Load 7 g

3-2. 주요 원료별 파리노그래프 특성 비교

밀가루를 물과 계속 반죽할 때 생기는 점성 저항의 변화를 측정하는 기계로 가루를 물로 반죽하는 혼합기를 다이내모미터로 회전시켜 그때 필요한 힘을 그래프로 나타낸다. 협력업체인 동아원의 파리노그래프(Brabender Farinograph)를 사용하였다. 측정조건은 표 3 과 같다.



[그림2] Farinograph

표 3. Farinograph 측정조건

Method	BRABENDER/ICC/BIPEA
Mixer	300g
Speed	631/min

3-3. 주요 원료의 글루텐 함량 분석

밀가루의 글루텐 함량을 확인하고 각 원료에 글루텐이 함유되어있는지 확인하기 위해 글루텐함량분석을 실시했다. 협력업체인 동아원의 Glutomatic(MHK TRADING, PERTEN)을 사용하였다.



그림 3. 글루텐 함량 분석용 Glutomatic 장비

3-4. 각 시제품의 관능적 특성 검사

관능검사는 동성식품 직원 패널 10명을 대상으로 실시하였고, 검사방법과 평가특성을 잘 인식하도록 설명하고, 7점 척도를 이용하여 동일 설문지로 평가하였다. 기호도의 평가 항목은 경도, 탄력성, 향미, 전반적인 기호도로 1점 (매우나쁘다)로부터 7점 (매우좋다)로 나타내었다. 시료는 생면을 끓는 물에 각 특성 별 조리시간에 맞춰 조리한 뒤 찬물에 5초간 헹구고 물기를 제거하여 5 g 씩 담아 제공하였다.

4. 실험결과

4-1. 주원료 반죽 특성 비교

각 분말 재료를 표4와 같이 반죽기에 넣고 기타원료들을 첨가하여 고르게 혼합한 뒤 물을 조금씩 투입하면서 실온에서 10분간 믹싱하여 작은 덩어리로 만들었다.

표 4. 주원료 반죽 제조

sample	합량 (kg)	가수율30%	가수율40%	가수율50%	가수율60%
		물(kg)			
밀가루	3	0.9	1.2	1.5	1.8
쌀가루	3	0.9	1.2	1.5	1.8
생메밀가루	3	0.9	1.2	1.5	1.8
아마란스분말	3	0.9	1.2	1.5	1.8
퀴노아분말	3	0.9	1.2	1.5	1.8
마가루	3	0.9	1.2	1.5	1.8
도토리가루	3	0.9	1.2	1.5	1.8
초미분쇄쌀가루	3	0.9	1.2	1.5	1.8
귀리가루	3	0.9	1.2	1.5	1.8
볶은쌀가루	3	0.9	1.2	1.5	1.8
찐메밀가루	3	0.9	1.2	1.5	1.8
호화쌀가루	3	0.9	1.2	1.5	1.8
수수가루	3	0.9	1.2	1.5	1.8
볶은콩가루	3	0.9	1.2	1.5	1.8
돼지감자가루	3	0.9	1.2	1.5	1.8
볶은메밀가루	3	0.9	1.2	1.5	1.8
감자전분	3	0.9	1.2	1.5	1.8
옥수수전분	3	0.9	1.2	1.5	1.8

위의 배합비대로 칭량하여 각 원료 3kg에 수분을 가하면서 반죽해 원료별 가수량을 정하고 점성, 탄력, 반죽 적합성 등을 확인했다.

표 5. 반죽실험 결과

sample	가수율 (%)	특징
밀가루(대조구)	35	점성과 탄력 모두 보유함.
<u>쌀가루</u>	<u>45</u>	<u>점성은 있으나 탄력이 없음</u>
생메밀가루	45	점성이 없어 압출제조에 사용 가능함.
아마란스분말	50	약간의 점성은 있으나 입자가 커 수제비 만두에 가능
<u>퀴노아분말</u>	<u>50</u>	<u>점성이 조금있고 입자가 큼.</u>
<u>마가루</u>	<u>50</u>	<u>반죽이 잘되며 점성이 있어 우동, 칼구수용에 적합함.</u>
<u>도토리가루</u>	<u>50</u>	<u>반죽성이 좋고 향이 강해 수제비, 만두용으로 적합</u>
초미분쇄쌀가루	40	일반미분보다 소량의 가수량에서 반죽되나 질감은 같음.
<u>귀리가루</u>	<u>50</u>	<u>점성과 탄력이 약간있으나 단독으로 사용하기 어려움.</u>
볶은쌀가루	50	반죽이 거칠어 스파게티용으로 적합해 보임.
찐메밀가루	50	점성은 좋으나 색, 맛, 향을 고려해 냉면용 프리믹스에 적합해 보임.
<u>호화쌀가루</u>	<u>50</u>	<u>점성과 탄력이 매우 강해 단독으로 사용 불가하며 소량 첨가하여 글루텐 역할을 할 수 있음.</u>
수수가루	50	반죽질감이 거칠어 스파게티 용으로 적합
볶은콩가루	40	뭉쳐지나 쉽게 부서져 첨가물로 사용 가능.
<u>돼지감자가루</u>	<u>40</u>	<u>점성이 좋고 반죽이 부드러우며 약간의 점성 보유</u>
볶은메밀가루	40	향이 좋으나 반죽질감이 거칠고 쓴맛이 강함.
감자전분	x	반죽되지 않음.
옥수수전분	x	반죽되지 않음.



그림 4. 선정된 주원료의 반죽 형태 예시 (좌우로부터 귀리가루 반죽, 퀴노아분말 반죽, 도토리가루 반죽, 쌀가루 반죽, 마가루 반죽, 돼지감자가루 반죽)

4-2 주원료 물성 측정 결과

시료는 반죽을 제조한 뒤 2 mm의 두께로 압연 한 뒤 끓는 물에 6~7분가량 삶는다. 조리된 면을 5 초 동안 찬물에 헹구고 물기를 제거 한 후 물성을 측정하였다. 5회 정도 반복 측정하여 경도(hardness), 응집성(cohesiveness), 씹힘성(chewiness)을 평균값으로 나타냈다(표 6).

표 6. 주원료 물성 측정 결과

sample	Hardness(g/cm ²)	Cohesiveness(%)	Chewiness(mJ)
밀가루	74	0.53	14.5
쌀가루	23	0.85	15.9
생메밀가루	16	0.88	12.7
아마란스분말	19	0.67	9.3
퀴노아분말	18	0.86	17.8
마가루	27	0.60	7.0
도토리가루	18	0.80	11.0
초미분쇄쌀가루	20	0.85	15.0
귀리가루	21	0.82	14.1
볶은쌀가루	46	0.80	15.6
찐메밀가루	33	0.66	11.4
호화쌀가루	-	-	-
수수가루	58	0.61	31.8
볶은콩가루	-	-	-
돼지감자가루	11	0.71	6.4
볶은메밀가루	17	0.74	10.6
감자전분	-	-	-
옥수수전분	-	-	-

- 삶은 뒤 물성 측정된 결과 밀가루와 가장 흡사한 원료는 수수였다.
- 그러나 반죽적성이 좋지 않아 압연기가 아닌 압출기로 생산하는 스파게티, 냉면용 프리믹스에 적합하며 볶은 콩가루, 호화쌀가루는 단독으로 반죽을 형성하는데 어려움이 있었지만 쌀가루와 함께 우동, 칼국수용 프리믹스에 소량 첨가하면 맛, 식감 등에 효과를 낼 것으로 사료된다.

4-2. 주원료 파리노그래프 측정결과

주로 사용된 원료들의 파리노그래프 측정결과는 표6과 같다. 호화 쌀가루의 경우 점성이 매우 강해 반죽기에 이상이 발생하여 그래프가 그려지지 않았다(표 7, 그림 5, 그림 6, 그림 7)

<표7> 파리노 그래프 측정 결과표

	밀가루	쌀가루	호화쌀가루
Water absorption	61.5 %	54.2 %	92.6 %
Consistency	498 BU	867 BU	1282 BU
Stability	27.1 min	1.4 min	0 min
Degree of softening	13 BU	383 BU	273 BU

그림 5. 밀가루 파리노 그래프

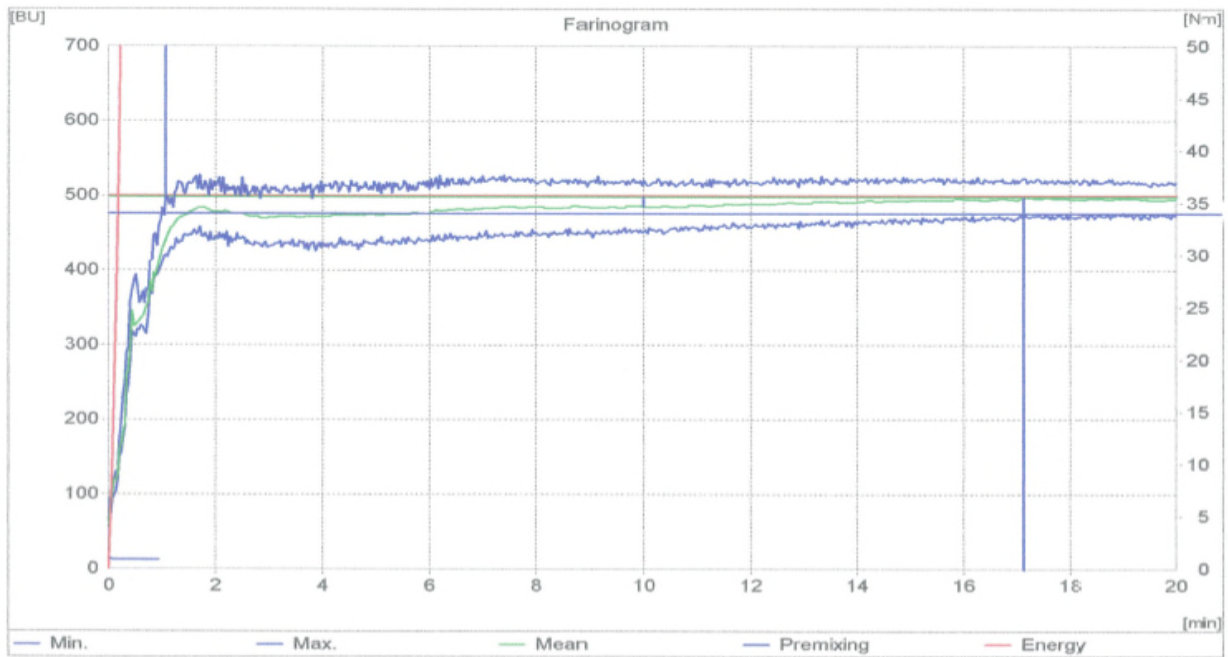


그림 6. 쌀가루 파리노 그래프

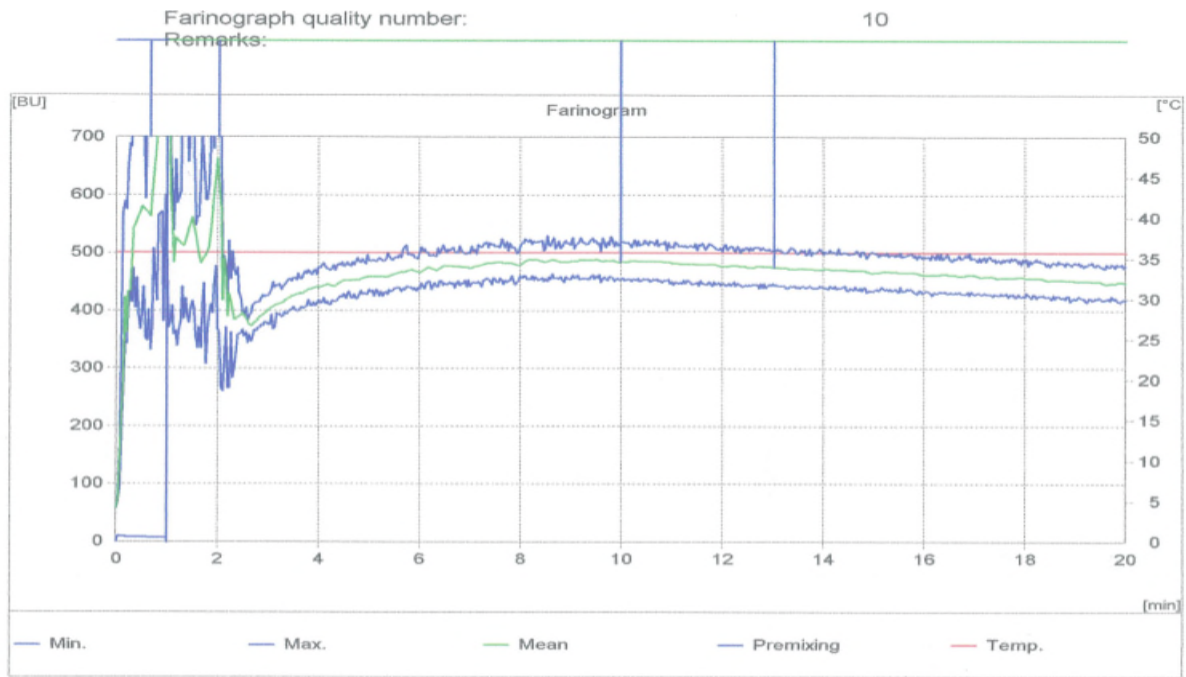
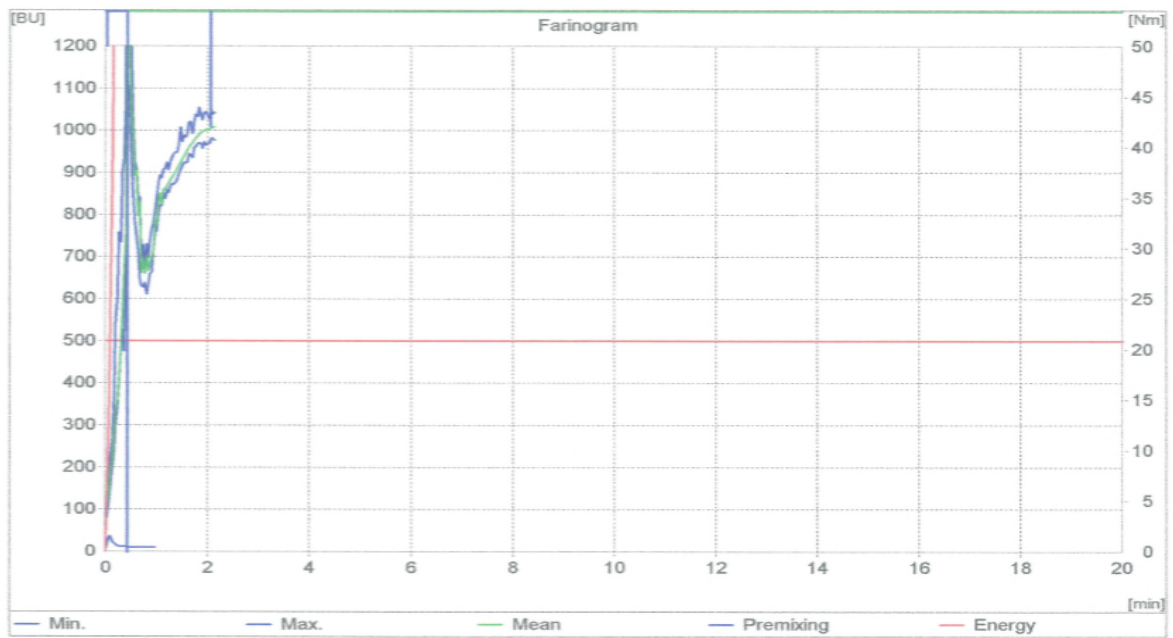


그림 7. 호화쌀가루 파리노그래프



4-3. 주원료 글루텐 함량 분석 결과

1) 밀가루 (글루텐 생성 확인을 위해 진행하였다.)

- 10g의 밀가루에서 3.21g의 습부 글루텐을 얻을 수 있었다(그림 8).



그림 8. 글루텐 정량 결과(좌)와 글루텐 분석 장비(우)

2) 아마란스

- 아마란스의 경우, 발생되는 입자가 커 고형분이 여과되지 않았지만 글루텐 등 뭉쳐지는 고형물 발생하지 않는 특징을 나타내었다(그림 8).

3) 감자전분

- 전분질의 입자가 메쉬망 보다 작아서 모두 통과하고 메쉬망에 걸러지는 것이 없었다. 이는 글루텐이 전혀 없다는 것을 의미한다(그림 9).



그림 9. 감자전분의 글루텐 정량 분석 실험

4) 쌀가루

- 글루텐 검출되지 않음.([그림10] 참조)

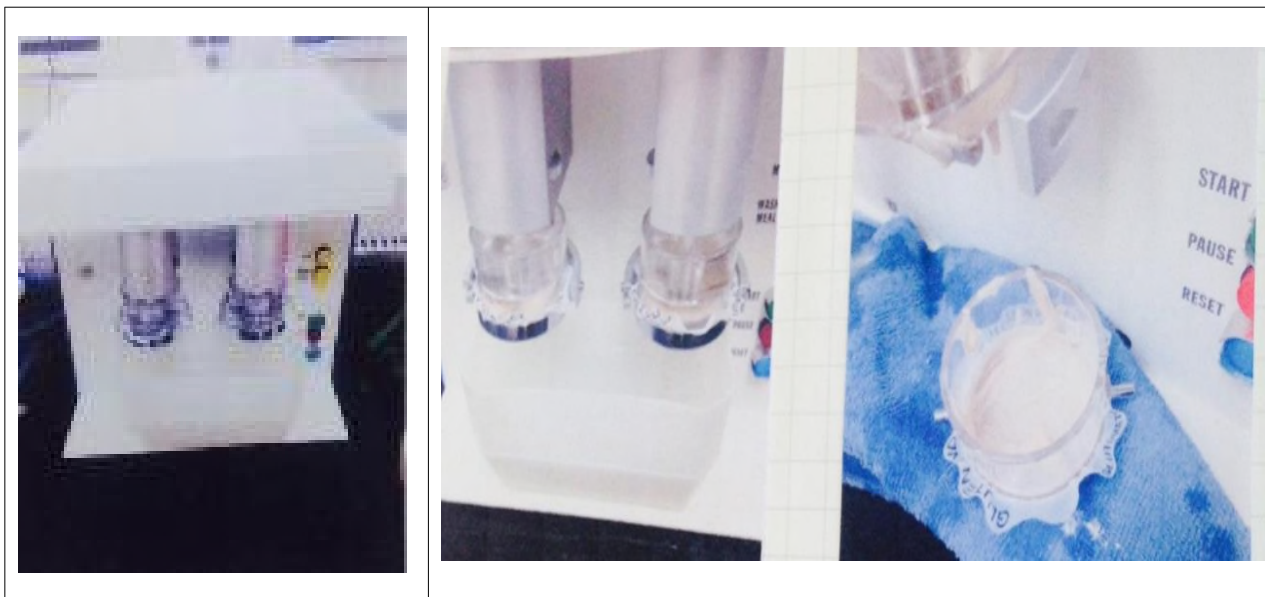


그림 10. 쌀가루(좌)와 생 메밀가루(중, 우)의 글루텐 정량 분석 결과

5) 분리대두단백, 생메밀가루, 퀴노아, 돼지감자가루, 마가루, 귀리가루, 도토리가루

- 전부 글루텐 검출 되지 않음(그림 11과 그림12).

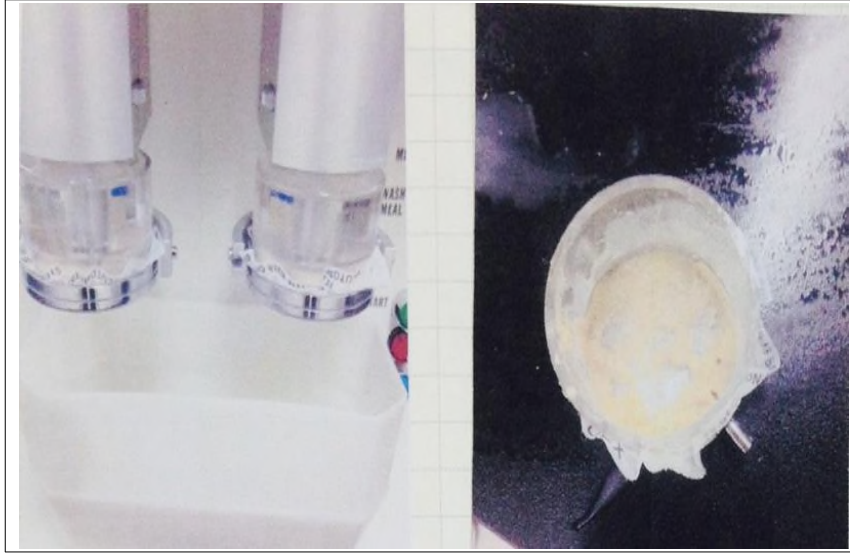


그림 11. 퀴노아 분말의 글루텐 정량 분석



그림 12. 찰옥전분의 글루텐 정량 분석 결과

- 실험 결과

글루텐 함량 측정 결과 각 원료 모두 글루텐 형성이 되지 않았다.

5. 각 프리믹스에 적합한 1차 원료 및 2차 원료 선정

- 주원료의 반죽 특성 비교 실험 결과를 토대로 각 프리믹스에 적합한 1차 원료 및 2차 원료를 선정 하였다.

1) 우동, 칼국수용 프리믹스

1차원료	2차원료
쌀가루	감자전분
돼지감자가루	생타피오카전분
초미분쇄쌀가루	타피오카초산변성전분
호화쌀가루	타피오카인산변성전분
아마란스분말	
퀴노아분말	
마가루	
볶은콩가루	

2) 스파게티용 프리믹스

1차원료	2차원료
볶은쌀가루	옥수수전분
수수가루	ISP
귀리가루	

3) 수제비, 만두용 프리믹스

1차원료	2차원료
아마란스분말	찰옥전분
퀴노아분말	
쌀가루	
도토리가루	

4) 냉면용 프리믹스

1차원료	2차원료
생메밀가루	고구마전분
볶은메밀가루	츄전분
찐메밀가루	

6. 우동, 칼국수용 프리믹스 배합 실험

1) 주원료 배합실험

1차원료	2차원료
쌀가루	감자전분
돼지감자가루	생타피오카전분
초미분쇄쌀가루	타피오카초산변성전분
호화쌀가루	타피오카인산변성전분
아마란스분말	
퀴노아분말	
마가루	
볶은콩가루	

1차원료와 2차원료를 교차 배합하여 총 32개의 배합을 함량별로 나눠 반죽했다. 배합비는 표 8과 같이 제조하였다.

표 8. 1차 원료와 2차 원료 혼합 배합비

Test	1차 원료	합량(kg)	2차 원료	합량(kg)
1	쌀가루	1~9	감자전분	9~1
2	쌀가루	1~9	생타피오카전분	9~1
3	쌀가루	1~9	타피오카초산변성전분	9~1
4	쌀가루	1~9	타피오카인산변성전분	9~1
5	돼지감자가루	1~9	감자전분	9~1
6	돼지감자가루	1~9	생타피오카전분	9~1
7	돼지감자가루	1~9	타피오카초산변성전분	9~1
8	돼지감자가루	1~9	타피오카인산변성전분	9~1
9	초미분쇄쌀가루	1~9	감자전분	9~1
10	초미분쇄쌀가루	1~9	생타피오카전분	9~1
11	초미분쇄쌀가루	1~9	타피오카초산변성전분	9~1
12	초미분쇄쌀가루	1~9	타피오카인산변성전분	9~1
13	호화쌀가루	1~9	감자전분	9~1
14	호화쌀가루	1~9	생타피오카전분	9~1
15	호화쌀가루	1~9	타피오카초산변성전분	9~1
16	호화쌀가루	1~9	타피오카인산변성전분	9~1
17	아마란스분말	1~9	감자전분	9~1
18	아마란스분말	1~9	생타피오카전분	9~1
19	아마란스분말	1~9	타피오카초산변성전분	9~1
20	아마란스분말	1~9	타피오카인산변성전분	9~1
21	퀴노아분말	1~9	감자전분	9~1
22	퀴노아분말	1~9	생타피오카전분	9~1
23	퀴노아분말	1~9	타피오카초산변성전분	9~1
24	퀴노아분말	1~9	타피오카인산변성전분	9~1
25	마가루	1~9	감자전분	9~1
26	마가루	1~9	생타피오카전분	9~1
27	마가루	1~9	타피오카초산변성전분	9~1
28	마가루	1~9	타피오카인산변성전분	9~1
29	볶은콩가루	1~9	감자전분	9~1
30	볶은콩가루	1~9	생타피오카전분	9~1
31	볶은콩가루	1~9	타피오카초산변성전분	9~1
32	볶은콩가루	1~9	타피오카인산변성전분	9~1



그림 13. 쌀가루 반죽 모습



그림 14. 호화쌀가루 반죽 모습

2) 주원료 배합실험 결과

- 실험 결과 쌀가루와 감자전분, 타피오카 초산변성전분의 조합이 반죽이 잘 되었다.(그림 13)
- 그러나 돼지감자가루, 아마란스분말, 퀴노아분말, 마가루, 볶은콩가루는 특유의 향과 맛이 있어 일반적인 칼국수/우동용에는 적합하지 않으며, 반죽은 형성이 되나 면대 형성이 어렵다. (글루텐이 없어 얇게 면대를 밀면 부서졌다.)
- 또한 호화쌀가루는 점성이 매우 강해 전분을 첨가해도 반죽 형성이 문제점이 있었다.(그림 14)

3) 호화 쌀가루의 함량을 달리한 반죽 제조 실험

- 실험 내용

쌀가루에 소량의 호화쌀가루를 첨가하여 사용하면 호화쌀가루가 글루텐 작용을 해 반죽의 부서지는 현상을 제어할 수 있을 것으로 사료되었다. 이에 쌀가루와 호화쌀가루의 함량을 달리 혼합하여 반죽 특성을 파악했다(표 9).

표 9 쌀가루와 호화쌀가루의 함량별 배합비.

Test	쌀가루	호화쌀가루
1	1	9
2	2	8
3	3	7
4	4	6
5	5	5
6	6	4
7	7	3
8	8	2
9	9	1
10	10	1

- 실험 결과

쌀가루:호화쌀가루의 비율이 7:3인 경우까지는 호화쌀가루의 함량이 높아 반죽이 되지 않았으나 8:2인 경우부터는 반죽이 잘 되기 시작했다. 그러나 기계적 적성이 맞지 않아 쌀가루:호화쌀가루의 비율은 10:1이 가장 적합하였다.

4) 당류 첨가 실험

- 실험 내용

주원료 배합에서 반죽성이 우수한 1차원료 2차원료 배합으로 당류를 소량 첨가하여 반죽하여 당류 첨가시 반죽 특성을 확인하였다. 이 때 감자전분과 초산변성전분의 함량을 다르게 한 두가지 조합으로 당류를 첨가하여 배합하였다(표 10).

표 10. 당류 첨가 실험 배합비

No	1차원료	kg	2차원료	kg	당류	kg
1	쌀가루	5	감자전분	0.3	올리고당	0.1
	호화쌀가루	0.5	초산변성전분	0.2		
2	쌀가루	5	감자전분	0.2	올리고당	0.1
	호화쌀가루	0.5	초산변성전분	0.2		
3	쌀가루	5	감자전분	0.3	액상과당	0.1
	호화쌀가루	0.5	초산변성전분	0.2		
4	쌀가루	5	감자전분	0.2	액상과당	0.1
	호화쌀가루	0.5	초산변성전분	0.2		
5	쌀가루	5	감자전분	0.3	폴리글리시톨	0.1
	호화쌀가루	0.5	초산변성전분	0.2		
6	쌀가루	5	감자전분	0.2	폴리글리시톨	0.1
	호화쌀가루	0.5	초산변성전분	0.2		
7	쌀가루	5	감자전분	0.3	솔비톨	0.1
	호화쌀가루	0.5	초산변성전분	0.2		
8	쌀가루	5	감자전분	0.2	솔비톨	0.1
	호화쌀가루	0.5	초산변성전분	0.2		
9	쌀가루	5	감자전분	0.3	글리신	0.1
	호화쌀가루	0.5	초산변성전분	0.2		
10	쌀가루	5	감자전분	0.2	글리신	0.1
	호화쌀가루	0.5	초산변성전분	0.2		

- 실험 결과

액상과당, 폴리글리시톨, 글리신등의 당류 첨가 시 점성은 생기나 탄력이 부족하였다. 면대형성이 어렵고 계속해서 끊어지는 현상이 나타났다(그림 15).



그림 15. 액상과당을 첨가한 경우의 반죽 및 면대

그러나 그림 16에서 나타난 바와 같이 당류 중에서는 올리고당과 솔비톨 첨가 시 가장 점성이 좋았으며 반죽형성에도 좋았다.



그림 16. 솔비톨을 첨가한 경우의 반죽 및 면대

5) 검류 첨가 실험

- 실험 내용

1차원료, 2차원료 실험, 당류첨가 실험 중 가장 우수한 조합 2가지를 바탕으로 검류첨가 실험을 진행하였다(표 11).

표 11. 검류첨가 실험 배합비

No	1차원료	kg	2차원료	kg	당류	kg	검류	kg
1	쌀가루	5	감자전분	0.3	올리고당	0.1	Beta-glucan	0.1
	호화쌀가루	0.5	초산변성전분	0.2				
2	쌀가루	5	감자전분	0.3	솔비톨	0.1	Beta-glucan	0.1
	호화쌀가루	0.5	초산변성전분	0.2				
3	쌀가루	5	감자전분	0.3	올리고당	0.1	젤라틴	0.1
	호화쌀가루	0.5	초산변성전분	0.2				
4	쌀가루	5	감자전분	0.3	솔비톨	0.1	젤라틴	0.1
	호화쌀가루	0.5	초산변성전분	0.2				
5	쌀가루	5	감자전분	0.3	올리고당	0.1	구아검	0.1
	호화쌀가루	0.5	초산변성전분	0.2				
6	쌀가루	5	감자전분	0.3	솔비톨	0.1	구아검	0.1
	호화쌀가루	0.5	초산변성전분	0.2				
7	쌀가루	5	감자전분	0.3	올리고당	0.1	카라기난	0.1
	호화쌀가루	0.5	초산변성전분	0.2				
8	쌀가루	5	감자전분	0.3	솔비톨	0.1	카라기난	0.1
	호화쌀가루	0.5	초산변성전분	0.2				
9	쌀가루	5	감자전분	0.3	올리고당	0.1	글루코만난	0.1
	호화쌀가루	0.5	초산변성전분	0.2				
10	쌀가루	5	감자전분	0.3	솔비톨	0.1	글루코만난	0.1
	호화쌀가루	0.5	초산변성전분	0.2				
11	쌀가루	5	감자전분	0.3	올리고당	0.1	한천	0.1
	호화쌀가루	0.5	초산변성전분	0.2				
12	쌀가루	5	감자전분	0.3	솔비톨	0.1	한천	0.1
	호화쌀가루	0.5	초산변성전분	0.2				
13	쌀가루	5	감자전분	0.3	올리고당	0.1	펙틴	0.1
	호화쌀가루	0.5	초산변성전분	0.2				
14	쌀가루	5	감자전분	0.3	솔비톨	0.1	펙틴	0.1
	호화쌀가루	0.5	초산변성전분	0.2				
15	쌀가루	5	감자전분	0.3	올리고당	0.1	글루코젤	0.1
	호화쌀가루	0.5	초산변성전분	0.2				
16	쌀가루	5	감자전분	0.3	솔비톨	0.1	글루코젤	0.1
	호화쌀가루	0.5	초산변성전분	0.2				
17	쌀가루	5	감자전분	0.3	올리고당	0.1	잔탄검	0.1
	호화쌀가루	0.5	초산변성전분	0.2				
18	쌀가루	5	감자전분	0.3	솔비톨	0.1	잔탄검	0.1
	호화쌀가루	0.5	초산변성전분	0.2				

- 실험 결과

Beta-glucan, 젤라틴, 글루코만난, 한천, 펙틴, 글루코젤은 반죽 형성에는 영향을 주었지만 면대를 만드는데 필요한 탄력에는 효과를 나타내지 않았다. 잔탄검은 탄력에 효과를 보였지만 너무 반죽이 늘어져 면대형성이 어려웠다(그림 17). 구아검과 카라기난이 반죽 및 면대형성에 좋은 효과를 냈으며 특히 솔비톨과 구아검의 조합이 가장 우수했다.(그림 18).



그림 17. 잔탄검 첨가 반죽 형태



그림 18. 구아검을 첨가하여 반죽, 면대형성 되는 과정

6) 구아검과 카라기난의 함량을 달리한 반죽 제조 실험

- 실험 방법

검류 실험 중 가장 우수했던 구아검과 카라기난의 함량을 달리하여 실험했다.
(<표12> 참조)

<표12> 구아검과 카라기난의 함량을 달리한 반죽 제조 배합비

No	1차원료	kg	2차원료	kg	당류	kg	검류	kg
1	쌀가루	5	감자전분	0.3	솔비톨	0.1	구아검	0.1
	호화쌀가루	0.5	초산변성전분	0.2				
2	쌀가루	5	감자전분	0.3	솔비톨	0.1	구아검	0.2
	호화쌀가루	0.5	초산변성전분	0.2				
3	쌀가루	5	감자전분	0.3	솔비톨	0.1	구아검	0.3
	호화쌀가루	0.5	초산변성전분	0.2				
4	쌀가루	5	감자전분	0.3	솔비톨	0.1	카라기난	0.1
	호화쌀가루	0.5	초산변성전분	0.2				
5	쌀가루	5	감자전분	0.3	솔비톨	0.1	카라기난	0.2
	호화쌀가루	0.5	초산변성전분	0.2				
6	쌀가루	5	감자전분	0.3	솔비톨	0.1	카라기난	0.3
	호화쌀가루	0.5	초산변성전분	0.2				

- 실험 결과

카라기난과 구아검 모두 함량 높아질수록 검류 특유의 맛을 내며 식감이 좋지 않았으며 검류 특유의 달라붙는 현상이 발생해 기계 적성이 맞지 않는 것으로 사료된다.

7) 우동/칼국수용 프리믹스 최종배합비 선정 관능검사

구아검과 카라기난의 함량을 달리한 실험 결과 우수하게 나온 2종의 시제품으로 관능검사를 진행했다(표 13)

<표13> 관능검사용 시제품 배합비

No	1차원료	kg	2차원료	kg	당류	kg	검류	kg
1	쌀가루	5	감자전분	0.3	솔비톨	0.1	구아검	0.1
	호화쌀가루	0.5	초산변성전분	0.2				
2	쌀가루	5	감자전분	0.3	솔비톨	0.1	카라기난	0.1
	호화쌀가루	0.5	초산변성전분	0.2				

- 실험 방법

기호도의 평가 항목은 경도, 탄력성, 향미, 전반적인 기호도로 1점 (매우나쁘다)로 부터 7점 (매우좋다)로 나타내었다. 시료는 생면을 끓는 물에 각 특성별 조리시간에 맞춰 조리한 뒤 찬물에 5초간 행구고 물기를 제거하여 5g 씩 담아 제공하였다.

- 실험 결과

관능검사 결과 1번 시제품이 경도, 향미, 전체적인 기호도 부분에서 우수한 결과를 나타낸 1번 시제품의 배합비를 최종 배합비로 선정하여 제조를 진행하였다(그림 19).

그림 19 우동/칼국수용 프리믹스 최종 배합비 선정 관능검사 결과

8) 우동, 칼국수용 프리믹스 최종 배합비

상기 실험 결과에 따라 우동 및 칼국수용 프리믹스는 위의 표14과 같이 확정 되었으며 제조과정은 그림 20과 같다.

표 14. 우동, 칼국수용 프리믹스 최종 배합비

1차원료	함량 kg	배합비 %
쌀가루	5	80.6
호화쌀가루	0.5	8.0
감자전분	0.3	4.9
초산변성전분	0.2	3.3
솔비톨	0.1	1.6
구아검	0.1	1.6
합계	6.2	100



그림 20. 우동, 칼국수용 프리믹스 개발품 사용한 면류 제조 과정

7. 스파게티용 프리믹스 배합 실험

1) 주원료 배합 실험

1차원료	2차원료
볶은쌀가루	옥수수전분
수수가루	ISP
귀리가루	

- 실험 방법

1차원료와 2차원료를 교차 배합하여 총 6개의 배합을 함량별로 나눠 반죽하였다. 그리고 스파게티 면은 다단압출기를 사용하여 제조했다(표 15).

표 15. 1차원료와 2차원료 혼합 배합비

Test	1차원료	함량 kg	2차원료	함량 kg
1	볶은쌀가루	1~9	옥수수전분	9~1
2	볶은쌀가루	1~9	ISP	9~1
3	수수가루	1~9	옥수수전분	9~1
4	수수가루	1~9	ISP	9~1
5	귀리가루	1~9	옥수수전분	9~1
6	귀리가루	1~9	ISP	9~1

- 실험 결과

수수가루는 압출되며 점성이 높아져 스파게티 식감으로 적합하지 않았다. ISP는 다단압출기 성형 시 발생된 열로 인해 변성이 일어나며 토출 시 건조되며 빠르게 굳어 기계적 적성이 맞지 않았다.

2) 볶은 쌀가루와 귀리가루의 함량을 달리한 반죽 제조 실험

- 실험 방법

볶은 쌀가루와 귀리가루의 함량을 달리하여 가장 적합만 배합비율을 찾아 주원료로 선정하였다(표 16).

표 16. 볶은 쌀가루와 귀리가루의 함량을 달리한 반죽 실험 배합비

Test	볶은 쌀가루	귀리가루
1	1	9
2	2	8
3	3	7
4	4	6
5	5	5
6	6	4
7	7	3
8	8	2
9	9	1
10	10	1

- 실험 결과

귀리가루는 색과 맛으로 인해 함량이 높아질수록 스파게티의 맛에 영향을 주었다. 볶은 쌀가루 10 : 귀리가루 1의 함량으로 배합한 것이 식감, 기계적 적성에 가장 적합하였다.

3) 옥수수전분의 함량을 달리한 반죽 제조

- 실험 방법

확정된 볶은 쌀가루, 귀리가루의 배합비에 옥수수전분의 함량을 달리하여 배합 실험을 진행하였다(표 17).

- 실험 결과

옥수수 전분의 함량을 달리하여 반죽한 결과 1kg 을 첨가한 시제품이 가장 식감이 우수하였다. 옥수수전분의 함량이 높아지면서 반죽이 거칠었지만 다단 압출되며 시제품의 경도가 낮아지는 경향을 보였다

표 17. 옥수수전분 함량별 반죽 제조 실험 배합비

No	1차원료	kg	2차원료	kg
1	볶은 쌀가루	5	옥수수전분	1
	귀리가루	0.5		

2	볶은 쌀가루	5	옥수수전분	2
	귀리가루	0.5		
3	볶은 쌀가루	5	옥수수전분	3
	귀리가루	0.5		

4) 당류 첨가 실험

- 실험 방법

확정된 볶은 쌀가루, 귀리가루, 옥수수전분의 배합비에 당류를 종류별로 첨가하여반죽, 시제품의 물성을 확인하였다. 실험 배합비는 표 18과 같다.

표 18. 당류 종류별 반죽 제조 실험 배합비

No	1차원료	kg	2차원료	kg	당류	kg
1	볶은 쌀가루	5	옥수수전분	1	올리고당	0.1
	귀리가루	0.5				
2	볶은 쌀가루	5	옥수수전분	1	액상과당	0.1
	귀리가루	0.5				
3	볶은 쌀가루	5	옥수수전분	1	폴리글리시톨	0.1
	귀리가루	0.5				
4	볶은 쌀가루	5	옥수수전분	1	솔비톨	0.1
	귀리가루	0.5				
5	볶은 쌀가루	5	옥수수전분	1	글리신	0.1
	귀리가루	0.5				

- 실험 결과

반죽에 당을 첨가 하면 압출되어 나온 면발에 윤기는 있으나 빠르게 건조되지 않아 스파게티용 프리믹스에는 적합하지 않은 것으로 확인 되었다.

5) 검류 첨가 실험

- 실험 방법

확정된 볶은 쌀가루, 귀리가루, 옥수수전분의 배합비에 당류를 첨가하지 않고 검류를 종류별로 첨가하여 스파게티용 프리믹스 최적의 배합비를 선정하였다.(표 19 참조).

표 19. 검류 종류별 반죽 제조 실험 배합비

No	1차원료	kg	2차원료	kg	검류	kg
1	볶은 쌀가루	5	옥수수전분	1	Beta-gulcan	0.1
	귀리가루	0.5				
3	쌀가루	5	옥수수전분	1	젤라틴	0.1
	귀리가루	0.5				
4	쌀가루	5	옥수수전분	1	구아검	0.1
	귀리가루	0.5				
5	쌀가루	5	옥수수전분	1	카라기난	0.1
	귀리가루	0.5				
6	볶은 쌀가루	5	옥수수전분	1	글루코만난	0.1
	귀리가루	0.5				
7	쌀가루	5	옥수수전분	1	한천	0.1
	귀리가루	0.5				
8	쌀가루	5	옥수수전분	1	펙틴	0.1
	귀리가루	0.5				
9	쌀가루	5	옥수수전분	1	글루코젤	0.1
	귀리가루	0.5				
10	쌀가루	5	옥수수전분	1	잔탄검	0.1
	귀리가루	0.5				

- 실험 결과

검류는 다단압출기 제면적성에 맞지 않았다. Beta-gulcan, 젤라틴 한천, 펙틴, 글루코젤 등은 열이 빠르게 올라가 제품에 타공이 생기는 현상이 발생하였고 구아검, 카라기난 잔탄검 등은 기계에 달라붙어 토출이 쉽게 되지 않았다.

6) 스파게티용 프리믹스 최종 배합비 선정 관능검사

스파게티용 프리믹스 최종 배합비 선정 관능검사는 스파게티 제조 적성과 맞지 않는 당류와 검류를 제외한 옥수수전분의 함량별 시제품의 관능검사로 진행하였다(표20).

표 20. 관능검사용 시제품 배합비

No	1차원료	kg	2차원료	kg
1	볶은 쌀가루	5	옥수수전분	1
	귀리가루	0.5		
2	볶은 쌀가루	5	옥수수전분	2
	귀리가루	0.5		
3	볶은 쌀가루	5	옥수수전분	3
	귀리가루	0.5		

- 실험 방법

기호도의 평가 항목은 경도, 탄력성, 향미, 전반적인 기호도로 1점 (매우나쁘다)로 부터 7점 (매우좋다)로 나타내었다. 시료는 생면을 끓는 물에 각 특성별 조리시간에 맞춰 조리한 뒤 찬물에 5초간 헹구고 물기를 제거하여 5g 씩 담아 제공하였다.

- 실험 결과

옥수수전분의 함량이 높아지면서 경도가 낮아지며 스파게티의 식감을 내지 못했고 향미부분에서는 큰 차이를 보이지 않았다. 탄력성 역시 옥수수전분 첨가 스파게티는 탄력이 좋게 나타나며 스파게티의 식감과는 맞지 않는 경향을 보였다(그림 21).

그림 21. 스파게티용 프리믹스 최종 배합비 선정 관능검사 결과

7) 스파게티용 프리믹스 최종 배합비

따라서 상기 실험 및 관능검사에 따라 스파게티용 프리믹스는 위의 표 21과 같이 확정 되었으며, 제조과정은 그림 22와 같다.

표 21. 스파게티용 프리믹스 최종 배합비

1차 원료	함량 kg	배합비 %
볶은쌀가루	5	77
귀리가루	0.5	7.7
옥수수전분	1	15.3
합계	6.5	100



그림 22 스파게티 제조 모습(좌)과 시제품을 이용한 메뉴 시연(우)

8. 수제비, 만두피용 프리믹스 배합 실험

1) 주원료 배합 실험

1차원료	2차원료
아마란스분말	찰옥전분
퀴노아분말	
쌀가루	
도토리가루	

- 실험 방법

1차원료와 2차원료를 교차배합하여 총 4개의 배합을 함량별로 나눠 반죽하였다(표 22).

표 22. 1차 원료와 2차 원료 혼합 배합비

No	1차원료	함량 kg	2차원료	함량 kg
1	아마란스분말	1~9	찰옥전분	9~1
2	퀴노아분말	1~9	찰옥전분	9~1
3	쌀가루	1~9	찰옥전분	9~1
4	도토리가루	1~9	찰옥전분	9~1

- 실험 결과

아마란스분말, 퀴노아분말, 도토리가루는 함량이 높을수록 맛과 향이 강하며 입자가 커서 만두피용으로 적합하지 않았다. 찰옥 전분은 함량이 높을수록 반죽이 쉽게 마르고 갈라지는 현상이 나타났다. 도토리가루는 향과 맛이 진하며 만두피로 만들기 어려움이 있었다.

2) 찰옥전분 함량을 달리한 반죽 제조

- 실험 방법

쌀가루, 아마란스분말, 퀴노아분말 혼합 배합비에 찰옥전분의 함량을 달리하여 배합 실험을 수행하였다(표 23).

- 실험 결과

찰옥 전분의 함량이 높을수록 반죽은 쉽게 건조해져 만두를 빚거나 수제비를 제조하는 과정에서 찢어지는 현상이 많이 발생했다. 본 실험에서는 0.1 kg을 첨가한 제품이 가장 부드럽고 반죽 특성이 우수하게 평가 되었다.

표 23 찰옥전분의 함량을 달리한 반죽 제조 실험 배합비

No	1차원료	함량 kg	2차원료	함량 kg
1	쌀가루	5	찰옥전분	0.1
	아마란스분말	0.5		
2	쌀가루	5	찰옥전분	0.2
	아마란스분말	0.5		
3	쌀가루	5	찰옥전분	0.3
	아마란스분말	0.5		
4	쌀가루	5	찰옥전분	0.1
	퀴노아분말	0.5		
5	쌀가루	5	찰옥전분	0.2
	퀴노아분말	0.5		
6	쌀가루	5	찰옥전분	0.3
	퀴노아분말	0.5		

3) 아마란스, 퀴노아 함량을 달리한 반죽, 만두 제조 실험

- 실험 방법

찰옥전분의 첨가량을 0.1kg으로 한 배합에서 아마란스분말과 퀴노아분말의 함량을 달리하여 우수한 배합비를 찾는 실험을 진행했다(표 24).

표 24 아마란스분말과 퀴노아분말의 함량을 달리한 반죽 제조 실험 배합비

No	1차원료	함량 kg	2차원료	함량 kg
1	쌀가루	5	찰옥전분	0.1
	아마란스분말	1.5		
2	쌀가루	5	찰옥전분	0.1
	아마란스분말	1		
3	쌀가루	5	찰옥전분	0.1
	아마란스분말	0.5		
4	쌀가루	5	찰옥전분	0.1
	퀴노아분말	1.5		
5	쌀가루	5	찰옥전분	0.1
	퀴노아분말	1		
6	쌀가루	5	찰옥전분	0.1
	퀴노아분말	0.5		

- 실험 결과

아마란스 분말과 퀴노아분말은 입자가 크기 때문에 0.1kg을 첨가한 제품이 가장 부드럽고 반죽 특성이 우수하게 평가 되었다. 함량이 높아질수록 반죽이 어려우며 쉽게 갈라졌다. 또한 아마란스 분말은 맛과 향이 강해 소량첨가한 제품에서도 식감이 거칠며 좋지 않아 퀴노아분말이 수제비/만두피용 프리믹스에 적합할 것으로 사료되었다. 그리고 분말 아마란스 1.5 kg을 첨가한 제품은 만두피가 찢어져 시제품 제조가 불가능하였다(그림 23, 그림 24).

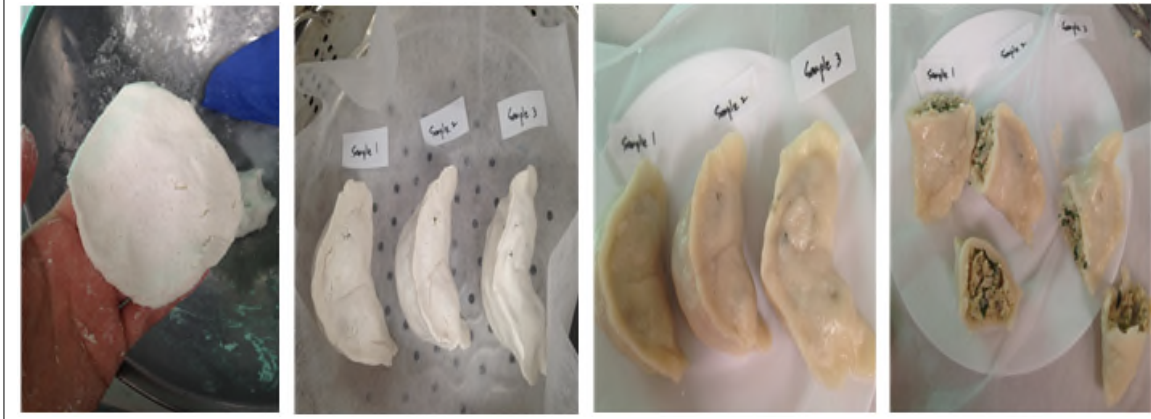


(A)



(B)

그림 23. 아마란스분말 함량을 달리한 만두피(A), 수제비(B) 제조



(A)



(B)

그림 24. 퀴노아분말 함량을 달리한 만두피(A), 수제비(B) 제조

4) 당류 첨가 실험

- 실험 방법

당류 첨가 시 쉽게 건조되는 반죽을 부드럽게 유지시켜주는 보습작용이 가능할 것으로 사료되어 본 실험을 진행하였다(표 25).

표 25. 당류 종류별 반죽 제조 실험 배합비

No	1차원료	kg	2차원료	kg	당류	kg
1	쌀가루	5	찰옥전분	0.1	올리고당	0.1
	퀴노아분말	0.5				
2	쌀가루	5	찰옥전분	0.1	액상과당	0.1
	퀴노아분말	0.5				
3	쌀가루	5	찰옥전분	0.1	폴리글리시톨	0.1
	퀴노아분말	0.5				
4	쌀가루	5	찰옥전분	0.1	솔비톨	0.1
	퀴노아분말	0.5				
5	쌀가루	5	찰옥전분	0.1	글리신	0.1
	퀴노아분말	0.5				

- 실험 결과

당류 첨가 시 쉽게 건조되는 반죽을 부드럽게 유지시켜주는 작용을 하였다. 올리고당, 폴리글리시톨은 제품을 끈적하게 만들어 반죽에 어려움이 있었지만 글리신은 반죽에서 윤기가 나고 부드럽게 유지시켜 주는 역할을 해 수제비/만두피용 프리믹스에는 글리신이 적합한 것으로 확인 되었다.

5) 검류 첨가실험

- 실험 방법

수제비, 만두피 제조 시 쉽게 갈라지는 현상을 제어하기 위해 검류첨가 실험을 진행하였다. 기본 배합은 위에서 우수한 결과를 낸 쌀가루, 퀴노아분말, 찰옥전분, 글리신의 배합비로 진행했다(표 26).

표 26. 검류 종류별 반죽 제조 실험 배합비

No	1차원료	함량 kg	2차원료	함량 kg	당류	함량 kg	검류	함량 kg
1	쌀가루	5	찰옥전분	0.1	글리신	0.1	Beta-gulcan	0.1
	퀴노아분말	0.5						
2	쌀가루	5	찰옥전분	0.1	글리신	0.1	젤라틴	0.1
	퀴노아분말	0.5						
3	쌀가루	5	찰옥전분	0.1	글리신	0.1	구아검	0.1
	퀴노아분말	0.5						
4	쌀가루	5	찰옥전분	0.1	글리신	0.1	카라기난	0.1
	퀴노아분말	0.5						
5	쌀가루	5	찰옥전분	0.1	글리신	0.1	글루코만난	0.1
	퀴노아분말	0.5						
2	쌀가루	5	찰옥전분	0.1	글리신	0.1	한천	0.1
	퀴노아분말	0.5						
3	쌀가루	5	찰옥전분	0.1	글리신	0.1	펙틴	0.1
	퀴노아분말	0.5						
4	쌀가루	5	찰옥전분	0.1	글리신	0.1	글루코젤	0.1
	퀴노아분말	0.5						
5	쌀가루	5	찰옥전분	0.1	글리신	0.1	잔탄검	0.1
	퀴노아분말	0.5						

- 실험 결과

앞서 우동/칼국수용 프리믹스 검류실험과 마찬가지로 수제비/만두피용 프리믹스에 적합한 검류는 구아검과 잔탄검이었다. 젤라틴, 한천, 펙틴의 첨가물은 수분 보유력을 높여줬지만 탄력에 효과를 나타내지 못한 결과를 확인하였다.

6) 수제비/만두피용 프리믹스 최종 배합비 선정 관능검사

수제비/만두피용 프리믹스 최종 배합비 선정 관능검사는 구아검과 잔탄검으로 검류를 달리한 시제품 2종으로 관능검사로 진행했다(표 27).

표 27. 관능검사용 시제품 배합비

No	1차원료	합량 kg	2차원료	합량 kg	당류	합량 kg	검류	합량 kg
1	쌀가루	5	찰옥전분	0.1	글리신	0.1	구아검	0.1
	퀴노아분말	0.5						
2	쌀가루	5	찰옥전분	0.1	글리신	0.1	잔탄검	0.1
	퀴노아분말	0.5						

- 실험 방법

기호도의 평가 항목은 경도, 탄력성, 향미, 전반적인 기호도로 1점 (매우나쁘다)로부터 7점 (매우좋다)로 나타내었다. 시료는 생면을 끓는 물에 각 특성별 조리시간에 맞춰 조리한 뒤 찬물에 5초간 헹구고 물기를 제거하여 5g 씩 담아 제공하였다.

- 실험 결과

관능검사 결과 향미부분에서는 구아검과 잔탄검 간의 차는 없었으나 경도, 탄력성, 전체체적인 기호도에서는 구아검이 우수하게 나왔다. 잔탄검은 삶은 뒤 늘어지는 경향이 있어 수제비나 만두피를 매우 부드럽게 해 적합하지 않은 것으로 사료된다. (그림 25)

그림 25. 스파게티용 프리믹스 최종 배합비 선정 관능검사 결과

7) 수제비, 만두피용 프리믹스 최종 배합비

수제비, 만두피용 프리믹스의 배합비는 표 28과 같이 최종 확정 되었다.

표28> 수제비, 만두피용 프리믹스 최종 배합비

1차원료	함량 kg	배합비 %
쌀가루	5	86.3
퀴노아분말	0.5	8.6
옥수수전분	0.1	1.7
글리신	0.1	1.7
구아검	0.1	1.7
합계	5.8	100

9. 냉면용 프리믹스 배합 실험

1) 주원료 배합 실험

1차원료	2차원료
생메밀가루	고구마전분
볶은메밀가루	츄전분
찜메밀가루	

- 실험 방법

1차원료와 2차원료를 교차 배합하여 총 6개의 배합을 함량별로 나눠 반죽했다. 배합비는 표 29와 같이 배합하여 실험에 사용하였다.

표 29. 1차 원료와 2차 원료 혼합 배합비

Test	1차원료	함량 kg	2차원료	함량 kg
1	생메밀가루	1~9	고구마전분	9~1
2	생메밀가루	1~9	츄전분	9~1
3	볶은메밀가루	1~9	고구마전분	9~1
4	볶은메밀가루	1~9	츄전분	9~1
5	찜메밀가루	1~9	고구마전분	9~1
6	찜메밀가루	1~9	츄전분	9~1

- 실험 결과

볶은 메밀가루는 향과 맛이 매우 강해 단독으로 사용할 수 없는 것으로 사료된다. 고구마전분과 찰전분 역시 10%이내의 소량을 사용해야 제면적성에 적합하며 이에 따른 맛과 향은 보유하지 않았다.

2) 생 메밀가루와 볶은 메밀가루의 함량을 달리한 반죽 제조 실험

- 실험 방법

볶은 메밀가루는 맛과 향이 매우 강해 단독으로 사용할 수 없어 맛과 향이 부족한 생 메밀가루와 혼합하여 사용하는 것이 적절할 것으로 사료된다. 이에 볶은 메밀가루의 함량을 달리하여 반죽 제조 실험을 진행하였다(표 30).

표 30. 볶은메밀가루의 함량을 달리한 반죽 제조 실험

Test	생메밀가루	볶은메밀가루
1	5	0.1
2	5	0.3
3	5	0.5
4	5	0.7
5	5	1.0

- 실험 결과

볶은 메밀가루의 함량이 높아질수록 향이 강해지고 쓴맛이 강해져 향미부분에서 큰 차이를 보였으나 반죽상태와 물성은 압출면 제조방법에 따라 영향을 주지 않았다. 관능검사 결과 볶은 메밀가루 0.3 kg을 첨가한 2 번 샘플이 전체적인 기호도에서 가장 높게 평가되었다(그림 26).

그림 26. 볶은 메밀가루의 함량을 달리한 시제품의 관능검사 결과

3) 고구마전분과 칩전분 함량을 달리한 반죽 제조 실험

- 실험 방법

고구마전분과 칩전분의 함량을 달리하여 냉면용 프리믹스에 적합한 전분을 선정하기 위해 이 실험을 진행했다(표 31).

표 31. 고구마전분과 칩전분의 함량을 달리한 반죽 제조 실험 배합비

No	1차원료	kg	2차원료	kg
1	생메밀가루	5	고구마전분	0.1
	볶은메밀가루	0.3		
2	생메밀가루	5	고구마전분	0.2
	볶은메밀가루	0.3		
3	생메밀가루	5	참전분	0.1
	볶은메밀가루	0.3		
4	생메밀가루	5	참전분	0.2
	볶은메밀가루	0.3		

- 실험 결과

고구마전분은 0.1kg을 첨가한 제품이 적합하였으며 0.2kg을 넣은 제품은 탄력이 매우 강하게 나타났습니다. 또한 참전분은 탄력에는 영향을 주지 않았으나 맛이나 향, 색의 차가 조금 있었다. 볶은 메밀가루의 향을 보유하고 있는 시제품 프리믹스에는 고구마전분을 첨가한 제품이 좀 더 우수한 결과를 냈다.

4) 당류첨가 실험

- 실험 방법

생메밀가루와 볶은메밀가루 함량, 고구마전분 확정 후 당류 첨가실험을 진행하였다. (표 32)

표 32. 당류 종류별 반죽 제조 실험 배합비

No	1차원료	kg	2차원료	kg	당류	kg
1	생메밀가루	5	고구마전분	0.1	올리고당	0.1
	볶은메밀가루	0.3				
2	생메밀가루	5	고구마전분	0.1	액상과당	0.1
	볶은메밀가루	0.3				
3	생메밀가루	5	고구마전분	0.1	폴리글리시톨	0.1
	볶은메밀가루	0.3				
4	생메밀가루	5	고구마전분	0.1	솔비톨	0.1
	볶은메밀가루	0.3				
5	생메밀가루	5	고구마전분	0.1	글리신	0.1
	볶은메밀가루	0.3				

- 실험 결과

올리고당과 폴리글리시톨을 첨가한 제품이 반죽이 끈적여 기계적성에 적합하지 않았으나 압출기로 토출된 후에는 제품에 차이를 보이지 않았다. 또한 기타 당류를 첨가한 제품도 물성에서 큰 차이를 보이지 않았다. 압출만의 공정으로 인해 당류 첨가는 제품에 영향을 주지 않는 것으로 확인 되었다.

5) 검류첨가 실험

- 실험 방법

당류 첨가실험을 진행한 후 당류는 제품에 영향을 주지 않는 것으로 판단되어 생 메밀가루와 볶은 메밀가루 혼합품에 검류를 첨가하는 실험을 진행하였다(표 33).

표 33. 검류 종류별 반죽 제조 실험 배합비

No	1차원료	kg	2차원료	kg	검류	kg
1	생메밀가루	5	고구마전분	0.1	Beta-gulcan	0.1
	볶은메밀가루	0.3				
2	생메밀가루	5	고구마전분	0.1	젤라틴	0.1
	볶은메밀가루	0.3				
3	생메밀가루	5	고구마전분	0.1	구아검	0.1
	볶은메밀가루	0.3				
4	생메밀가루	5	고구마전분	0.1	카라기난	0.1
	볶은메밀가루	0.3				
5	생메밀가루	5	고구마전분	0.1	글루코만난	0.1
	볶은메밀가루	0.3				
6	생메밀가루	5	고구마전분	0.1	한천	0.1
	볶은메밀가루	0.3				
7	생메밀가루	5	고구마전분	0.1	펙틴	0.1
	볶은메밀가루	0.3				
6	생메밀가루	5	고구마전분	0.1	글루코젤	0.1
	볶은메밀가루	0.3				
7	생메밀가루	5	고구마전분	0.1	잔탄검	0.1
	볶은메밀가루	0.3				

- 실험 결과

냉면은 압출방식으로 제품이 제조 되면서 글루텐이 없는 분말 원료로도 면을 제조할 수 있다. 압출면 역시 젤라틴, 한천, 펙틴, 글루코젤이 첨가된 시제품에서는 타공이 발생하여 제품성이 저하되었다. 또한 Beta-glucan, 구아검, 카라기난, 글루코만난, 잔탄검 역시 탄력에 큰 영향을 주지 않았다.

6) 냉면용 프리믹스 최종 배합비 선정 관능검사

냉면용 프리믹스 최종 배합비 선정 관능검사는 구아검과 카라기난 검류를 달리한 시제품 2종으로 관능검사로 진행했다.(<표34>참조)

표 34. 관능검사용 시제품 배합비

No	1차원료	kg	2차원료	kg	검류	kg
1	생메밀가루	5	고구마전분	0.1	Beta-gulcan	0.1
	볶은메밀가루	0.3				
2	생메밀가루	5	고구마전분	0.1	젤라틴	0.1
	볶은메밀가루	0.3				

- 실험 방법

기호도의 평가 항목은 경도, 탄력성, 향미, 전반적인 기호도로 1점 (매우나쁘다)로 부터 7점 (매우좋다)로 나타내었다. 시료는 생면을 끓는 물에 각 특성별 조리시간에 맞춰 조리한 뒤 찬물에 5초간 헹구고 물기를 제거하여 5g 씩 담아 제공하였다.

- 실험 결과

관능검사 결과 미첨가 제품이 구아검, 카라기난을 첨가한 제품과 경도, 탄력성, 향미 부분에서 큰 차이가 없었으며 전체적인 기호도에서 미첨가 제품이 우수한 것으로 조사되었다(그림 27).

그림 27. 냉면용 프리믹스 최종 배합비 선정 관능검사 결과

7) 냉면용 프리믹스 최종 배합비

표 35. 냉면용 프리믹스 최종 배합비

1차원료	함량 kg	배합비 %
생메밀가루	5	92.6
볶은메밀가루	0.3	5.6
고구마전분	0.1	1.8
합계	5.4	100

따라서 냉면용 프리믹스는 위의 표 35와 같이 확정 되었으며 제조과정은 그림 28과 같다.



그림 28. 냉면용 반죽제조(좌)와 압출된 냉면 제조 모습(우)

[글루텐 프리형 프리믹스 제조 공정 확립]

1. 서 론

가. 실험 배경 및 목적

파우더의 점착력과 관능적 특성을 높이기 위해 곡물의 증자 또는 로스팅 최적 조건을 파악하기 위함.

각 프리믹스의 반죽 최적 조건을 확립하기 위한 입도기준을 파악하기 위함.

나. 실험 방향 및 특징

- ① 파우더의 증자 또는 로스팅 조건에 따른 점착력 및 관능적 특성 파악
- ② 각 프리믹스의 반죽 최적 조건 확립을 위한 입도 기준수립
- ③ 프리믹스 제조공정도 수립

다. 사용 원료

정부양곡 쌀가루 (수입산 : 중국산, 미국산)

2. 본 론

가. 증자 공정 적용 기술 개발

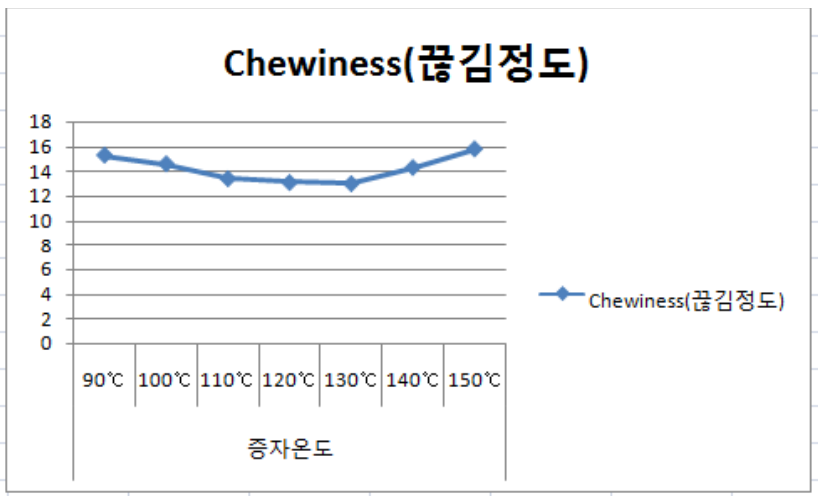
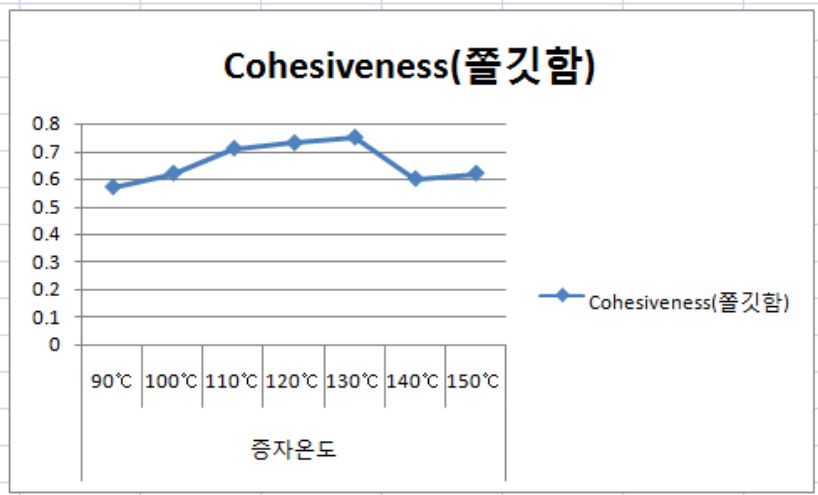
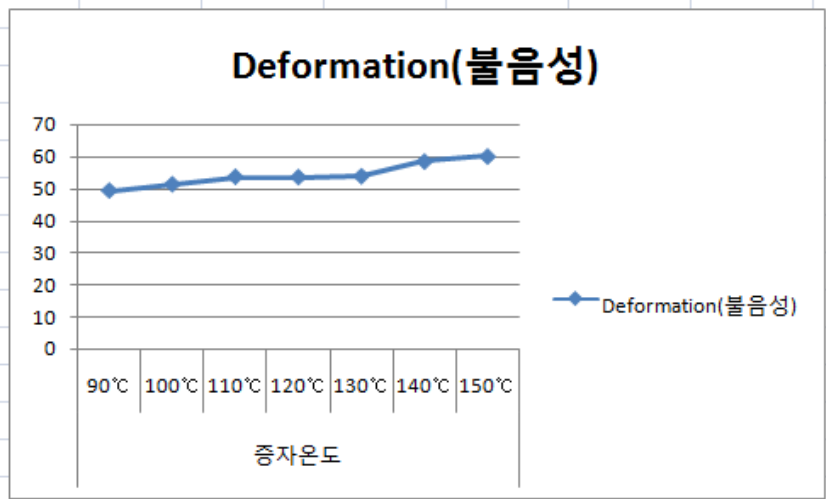
가-1) 증자 실험 조건 설정

- 1-1. 증자 온도 90°C
- 1-2. 증자 온도 100°C
- 1-3. 증자 온도 110°C
- 1-4. 증자 온도 120°C
- 1-5. 증자 온도 130°C
- 1-6. 증자 온도 140°C
- 1-7. 증자 온도 150°C

가-2) 실험 결과

		Deformation (불음성)	Cohesiveness (졸깃함)	Chewiness (씹김정도)	관능 특징
증자 온도	90℃	49.3	0.57	15.3	면발 형성이 잘 안되며 졸깃함이 떨어지고 면발이 잘 끈김
	100℃	51.3	0.62	14.6	면발 형성이 잘안되며 졸깃함이 떨어짐
	110℃	53.7	0.71	13.4	면발 형성이 양호하고 졸깃함과 끈기가 좋음
	120℃	53.6	0.73	13.1	면발 형성이 양호하고 졸깃함과 끈기가 양호
	130℃	53.9	0.75	13.0	면발 형성이 양호하고 졸깃함과 끈기가 양호
	140℃	58.6	0.64	14.3	면발 형성은 양호하나 졸깃함이 떨어짐
	150℃	60.2	0.62	15.8	면발 형성이 잘 안되고 탄맛이 나고 면발이 끈김

: 증자 온도를 110 ~ 130℃에서 증자 시 면발 형성이 양호하고 면발이 졸깃하며 면발의 씹김 현상이 적은 것으로 확인됨.



나. 로스팅 공정 적용 기술 개발

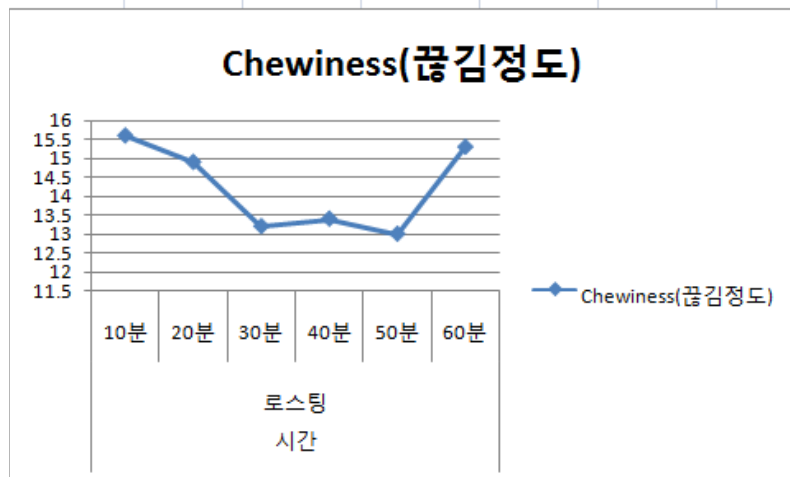
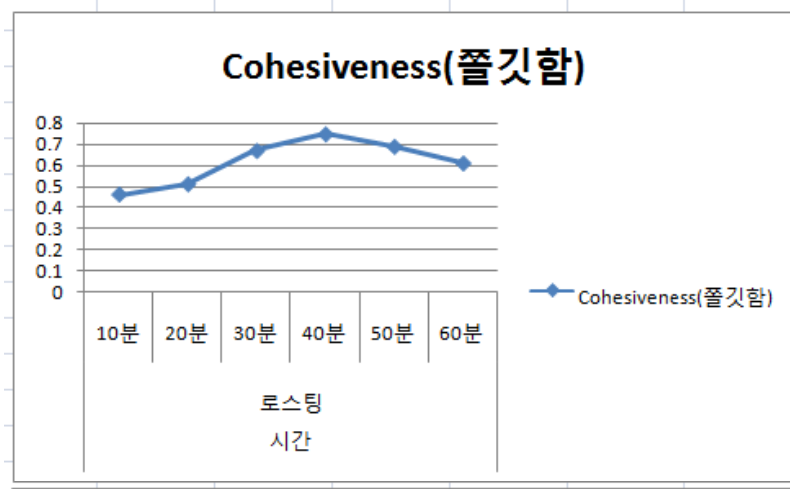
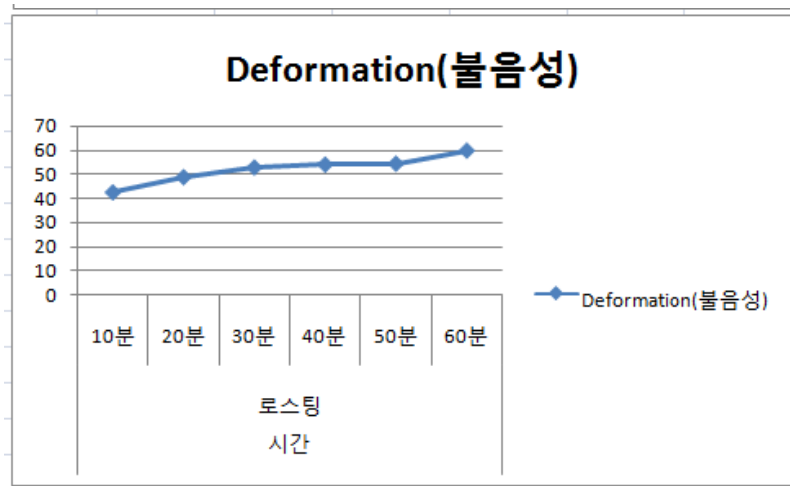
나-1) 로스팅 실험 조건 설정

- 1-1. 로스팅 온도 200±10°C 시간 10분
- 1-2. 로스팅 온도 200±10°C 시간 20분
- 1-3. 로스팅 온도 200±10°C 시간 30분
- 1-4. 로스팅 온도 200±10°C 시간 40분
- 1-5. 로스팅 온도 200±10°C 시간 50분
- 1-6. 로스팅 온도 200±10°C 시간 60분

나-2) 실험 결과

		Deformation (불음성)	Cohesiveness (졸깃함)	Chewiness (끊김정도)	관능 특징
로스팅 시간	10분	42.4	0.46	15.6	면발 형성이 잘 안되며 졸깃함이 떨어지고 면발이 잘 끈김
	20분	48.7	0.51	14.9	면발 형성이 잘안되며 졸깃함이 떨어지고 면발이 잘 끈김
	30분	52.7	0.67	13.2	면발 형성이 양호하나 졸깃함이 떨어짐
	40분	53.9	0.75	13.4	면발 형성이 양호 면발이 졸깃하고 탄력이 양호함.
	50분	54.3	0.69	13.0	면발 형성이 양호하나 졸깃함과 탄력이 떨어짐
	60분	59.7	0.61	15.3	면발 형성은 잘 안되며 졸깃함과 탄력이 떨어짐 탄맛이 남

: 로스팅 온도 200±10°C에서 로스팅을 40분정도 실시 후 분쇄 시 면발 형성이 양호하고 면발이 졸깃하며 면발의 끊김 현상이 적은 것으로 확인되었다. 따라서 최종 로스팅 시간은 40분 ±5분이 적당할 것으로 판단된다.



다. 입도 기준 설정에 따른 반죽 조건 확립

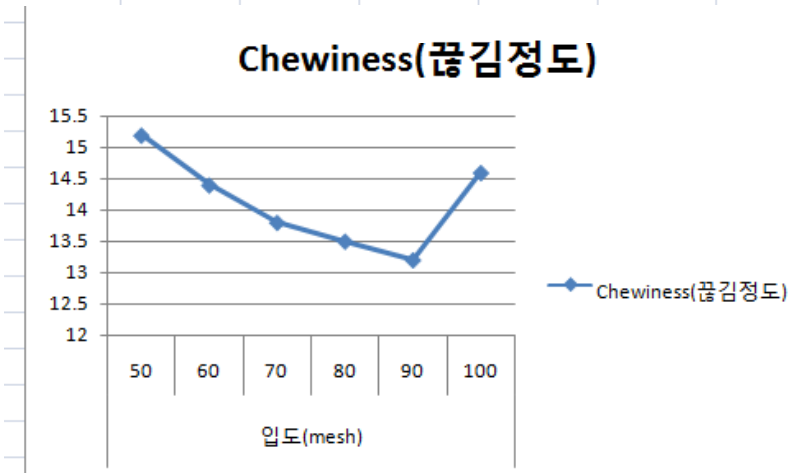
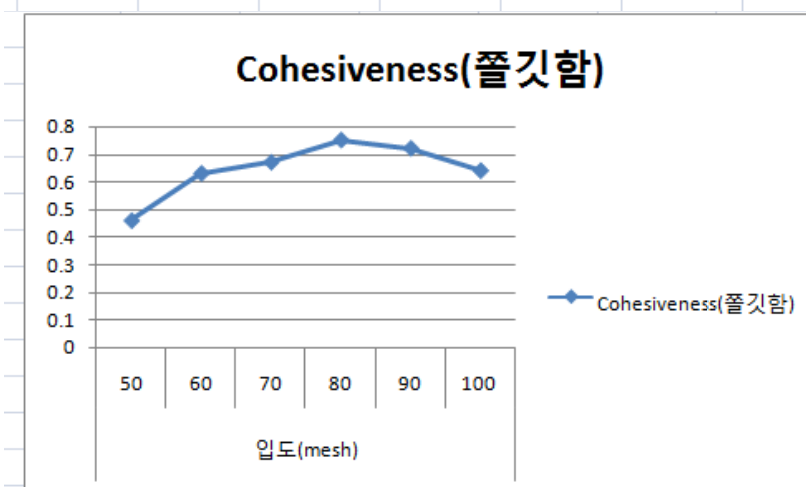
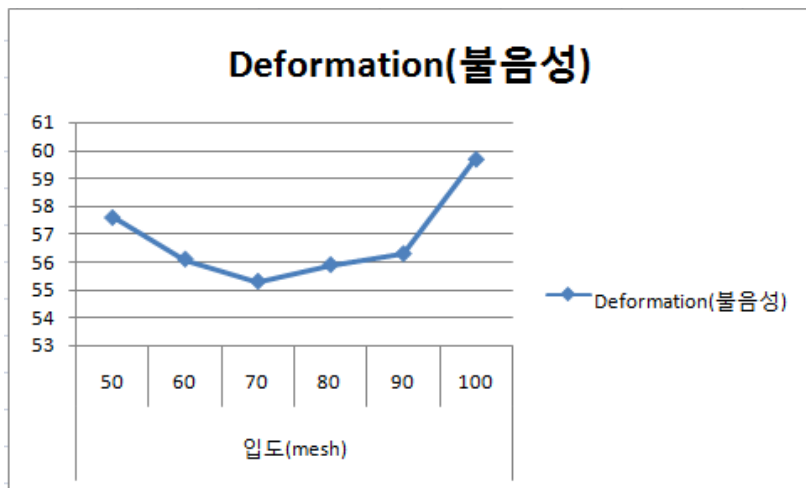
다-1) 입도 실험 조건 설정

- 1-1. 입도 50 mesh
- 1-2. 입도 60 mesh
- 1-3. 입도 70 mesh
- 1-4. 입도 80 mesh
- 1-5. 입도 90 mesh
- 1-6. 입도 100 mesh

다-2) 실험 결과

		Deformation (불음성)	Cohesiveness (졸깃함)	Chewiness (끓김정도)	관능 특징
입도 (mesh)	50	57.6	0.46	15.2	면발 형성이 잘 안되며 졸깃함이 떨어지고 면표면이 거침
	60	56.1	0.63	14.4	면발 형성이 양호하나 졸깃함이 떨어지고 면표면이 거침
	70	55.3	0.67	13.8	면발 형성이 양호 졸깃함과 면표면이 약간 거침.
	80	55.9	0.75	13.5	면발 형성이 잘되고 면발이 졸깃하고 탄력이 양호함. 면표면이 매끄러움.
	90	56.3	0.72	13.2	면발 형성이 양호하나 졸깃함과 탄력이 떨어짐
	100	59.7	0.64	14.6	면발 형성은 잘 안되며 졸깃함과 탄력이 떨어짐 배합시 분진이 많이 발생함

: 입도를 80mesh로 하여 면제조시 면발 형성이 잘되고 면발이 졸깃하며 면발의 끓김 현상이 적고 면표면이 매끄럽고 관능적으로 우수함. 입도는 면품질과 생산공정 고려시 70 ~ 90 mesh가 적당할 것으로 판단됨



라. 프리믹스 반죽 조건 확립

라-1) 반죽 실험 조건 설정

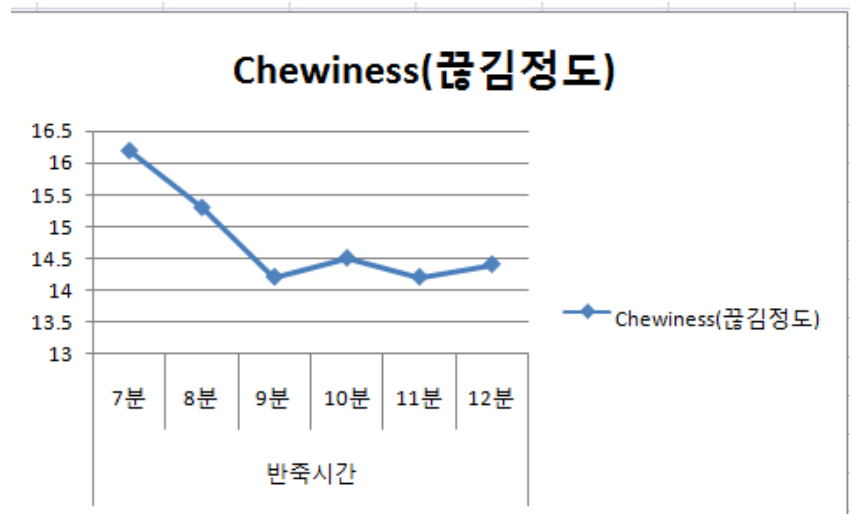
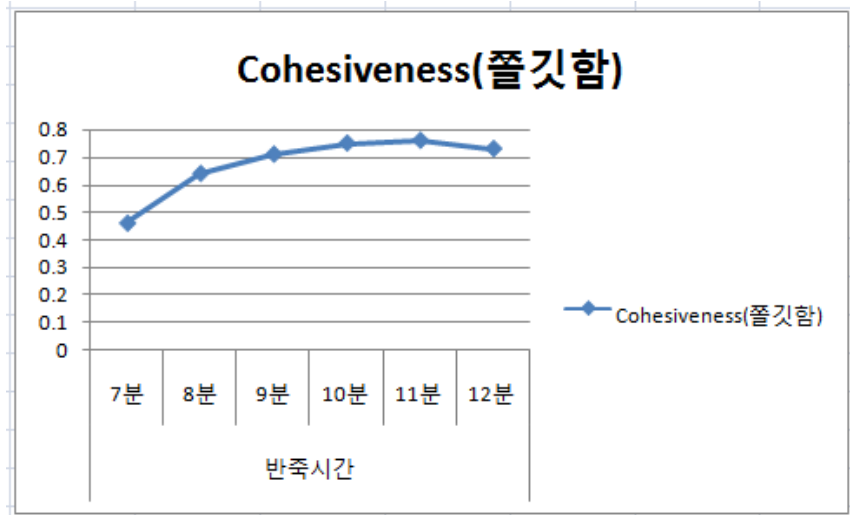
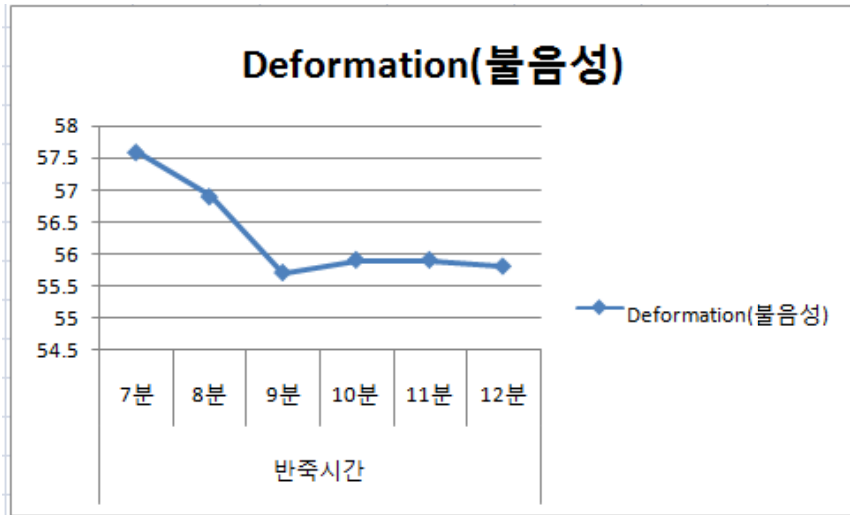
1-1. 반죽 조건 RPM(80~100), 시간 7분

- 1-2. 반죽 조건 RPM(80~100), 시간 8분
- 1-3. 반죽 조건 RPM(80~100), 시간 9분
- 1-4. 반죽 조건 RPM(80~100), 시간 10분
- 1-5. 반죽 조건 RPM(80~100), 시간 11분
- 1-6. 반죽 조건 RPM(80~100), 시간 12분

라-2) 실험 결과

		Deformation (불음성)	Cohesiveness (졸깃함)	Chewiness (씹김정도)	관능 특징
반죽 시간	7분	57.6	0.46	16.2	면발 형성이 잘 안되며 졸깃함과 탄력이 떨어짐
	8분	56.9	0.64	15.3	면발 형성이 양호하나 졸깃함과 탄력이 약함
	9분	55.7	0.71	14.2	면발 형성이 양호 졸깃함과 탄력이 양호
	10분	55.9	0.75	14.5	면발 형성이 잘되고 면발이 졸깃하고 탄력이 양호함.
	11분	55.9	0.76	14.2	면발 형성이 잘되고 졸깃함과 탄력이 양호
	12분	55.8	0.73	14.4	면발 형성이 잘되고 졸깃함과 탄력이 양호

: 반죽 조건 RPM(80~100), 시간 9분 이상 반죽시 면발 형성이 잘되고 면발이 졸깃하며 면발의 씹김 현상이 적고 면표면이 매끄럽고 관능적으로 우수함. 생산성을 고려하여 반죽시간은 9분에서 11분이 적당할 것으로 판단됨.

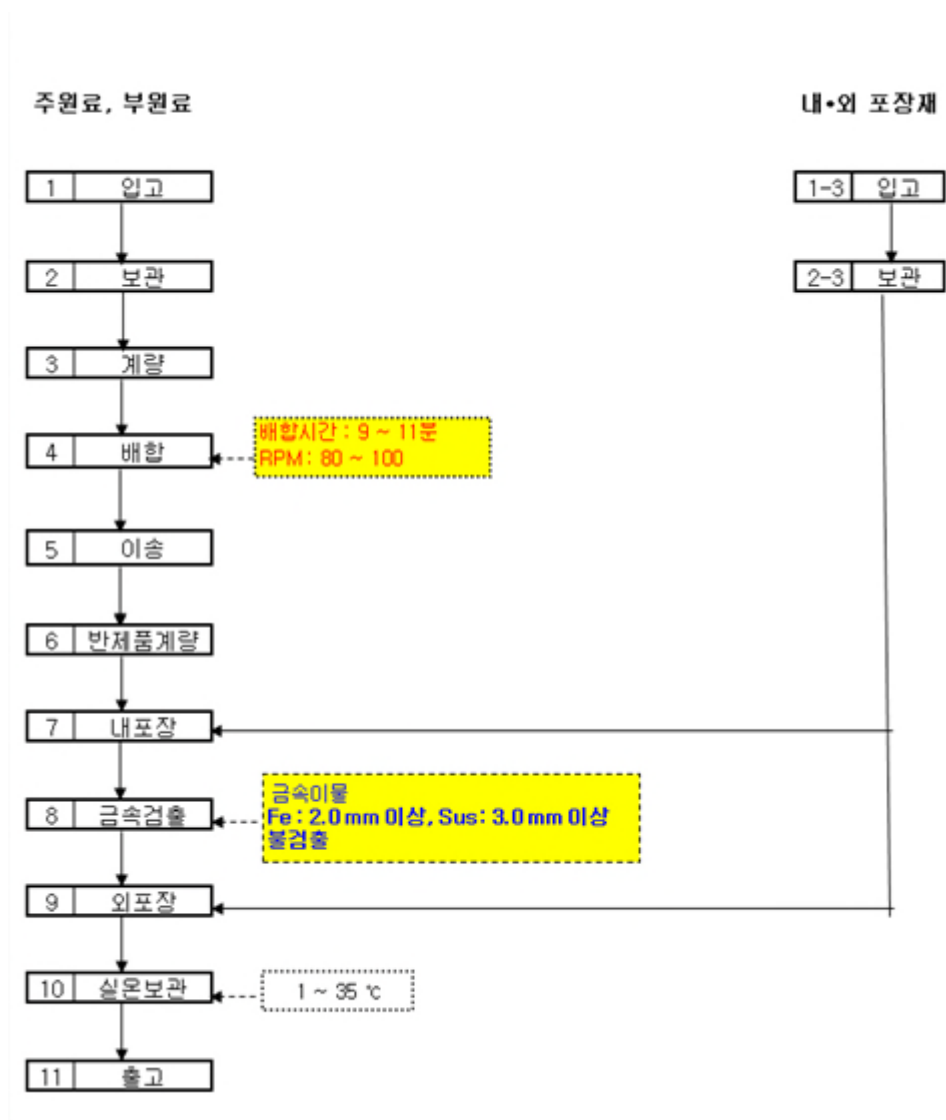


3. 결론

가. 원료 증자/로스팅/입도 조건/프리믹스 반죽시간

- 증자 온도 : 110 ~ 130°C
- 로스팅 온도 200±10°C에서 로스팅 시간 : 40분 ±5분
- 입도 : 70 ~ 90 mesh
- 프리믹스 반죽시간 : 9분 ~ 11분

나. 프리믹스 제조공정도



[어린이용 소스 선호도 조사 결과]

1. 조사 내용

- 1) 어린이들이 선호하는 소스가 어떤 것인지?
- 2) 어린이들이 좋아하는 맛은 어떤 맛인지?
- 3) 학부모들이 어린이용 소스를 선택할 때 고려하는 사항은 무엇인지?
- 4) 어린이가 좋아하는, 또는 기피하는 소스의 특징은 무엇인지?

2. 조사 기간 : 2014년 8월 1일 ~ 2014년 8월 15일

3. 조사 대상

- 1) 서울 구로구 구로동 다우리 어린이집 어린이 29명
- 2) 서울 중랑구 망우동 금란교회 유치부(45명),유년부(24명),초등부(25명)어
- 3) 경기도 용인시 처인구 운학동 운학초등학교 어린이 69명
- 4) 경기도 용인시 처인구 고림동 파랑새 유치원 어린이 63명
- 5) 총 255명의 어린이를 대상으로 조사

구분	남자	여자	합계
미취학	64	70	134
초등학생	59	62	121
합계	123	132	255

4. 조사 결과

구분	전체		미취학(남)		미취학(여)		초등학생(남)		초등학생(여)	
선호메뉴 (%)	떡볶이	26	짜장면	26	스파게티	20	떡볶이	32	떡볶이	36
	짜장면	22	스파게티	22	짜장면	19	짜장면	24	짜장면	16
	스파게티	19	우동	18	떡볶이	19	스파게티	19	스파게티	15
	우동	14	떡볶이	18	우동	19	우동	7	우동	13
맛 (%)	달콤한맛	53	달콤한맛	48	달콤한맛	44	달콤한맛	63	달콤한맛	58
	매콤한맛	24	매콤한맛	23	짭짤한맛	23	매콤한맛	23	매콤한맛	30
	짭짤한맛	15	짭짤한맛	17	매콤한맛	20	짭짤한맛	11	짭짤한맛	7
부모관심 (%)	영양	35	영양	37	영양	34	첨가물	35	영양	38
	첨가물	31	첨가물	36	아이기호	34	아이기호	33	아이기호	32
	아이기호	31	아이기호	25	첨가물	24	영양	28	첨가물	30
선호습성 (명)	숟가락	131	숟가락	36	젓가락	39	숟가락	26	숟가락	39
	젓가락	115	젓가락	30	숟가락	30	젓가락	20	젓가락	26
	국물	22	국물	19	야채	16			잘라먹기	4
기피습성 (명)	묻는것	122	묻는것	30	묻는것	39	묻는것	17	묻는것	36
	딱딱한것	102	딱딱한것	25	딱딱한것	32	딱딱한것	15	딱딱한것	30
	많이씹음	14	많이씹음	2	많이씹음	2	야채	14	많이씹음	8

5. 어린이용 소스의 개발 방향

제품	떡볶이소스	짜장소스	스파게티소스	우동소스
맛의 특징	1. 어린이들이 좋아하는 달콤한 맛을 강조 2. 살짝 매콤한 맛으로 포인트를 줌 - 어린이들의 상당수가 아주 맵지는 않지만 살짝 매콤한 맛을 선호함 3. 적당한 염도 - 어린이들은 싱거운 맛 보다는 적당히 짭짤한 맛을 선호함			
고려 사항	1. 성장기 어린이에게 필요한 필수 영양의 밸런스 고려 2. 인체 유해성 논란이 있는 첨가물 제한 3. 제품의 물성에는 큰 제약이 없음 - 숟가락, 젓가락을 사용하는 것은 불편사항이 아님 4. 건더기 소재를 선택할 때 딱딱한 것, 많이 씹어야 하는 것은 배제 5. 흘러 내리는 물성 보다는 한입에 딱 떨어지는 물성 선호 - 떡이나 면에 접착성이 우수하여 잘 흘러 내리지 않는 물성 고려			
연구 과제	1. 어린이들이 선호하고, 영양이 좋으면서, 인체에 해가 적은 감미 소재 탐색 2. 소스별로 어린이들이 선호하는 감미도(당도) 설정 3. 어린이들의 입맛을 자극할 수 있는 기분 좋은 매운 맛을 내는 매운맛 소재 탐색 4. 어린이들이 선호하는 적정 염도 및 최적의 염미 소재 탐색 5. 부모의 관심을 끌 수 있는 영양 강화 소재 탐색 6. 기존 소스류에 일반적으로 사용하고 있는 첨가물을 최대한 첨가하지 않고 적정 물성, 맛, 유통기한을 확보할 수 있는 가공기술 연구 7. 소스가 옷이나 입에 최대한 묻지 않을 수 있도록 소스의 물성(발림성) 연구 8. 어린이가 선호하는 딱딱하거나 오래 씹지 않아도 되는 부드러운 물성의 건더기 소재 탐색			

[2차년도]

1. 유산균 발효 기술 적용 글루텐 프리형 제품 개발 및 관능검사

1-1. 실험 방법

가. 1차년도 글루텐 프리형 프리믹스 보완 실험

본 실험은 1차년도 글루텐 프리형 프리믹스 4종 실험에 대하여 물성 보완이 필요할 것으로 판단되어 진행하였으며 실험에 사용된 원료는 쌀가루, 돼지감자가루, Beta-glucan, 올리고당, 액상과당, 솔비톨, 글리신, 초미분쇄쌀가루, 호화쌀가루, 볶은쌀가루, 생메밀가루, 볶은메밀가루, 찐메밀가루, 찹옥전분, 옥수수전분, 수수가루, 귀리가루, 고구마전분, 생타피오카전분, 타피오카인산변성전분, 아마란스분말, 퀴노아분말, 찹전분, 마가루, 도토리전분, 볶은콩가루, ISP, 젤라틴, 구아검, 카라기난, 글루코만난, 한천, 펙틴, 글루코겔, 잔탄검을 사용하였다.

나. 글루텐 저감 유산균 발효우동면 제조

실험에 사용된 밀가루는 중력분을 사용 하였으며, 소금은 순도 99%이상의 정제염을 사용 하였다. 초산 전분, 감자전분, 폴리글리시톨, 알긴산프로필렌글리콜, 치자황색소, 미림, Trans glutaminase(다인소재), 카라기난검, 증점다당류PU(선인), 냉소다(서도BNI)를 사용 하였다.

다. 글루텐 프리형 프리믹스 개발

모든 분말 재료를 반죽기에 넣고 기타원료들을 첨가하여 고르게 혼합한 뒤 물을 조금씩 투입하면서 실온에서 10분간 믹싱하여 작은 덩어리로 만들었다. 이후 두께를 2 mm가 되도록 압연기를 이용해 밀어 면을 제조하였다. 제조된 면은 끓는 물에 5~7분간 삶은 후 실험에 사용하였다.

라. 글루텐 저감 발효 우동면의 제조

우동면의 제조를 위해 표 1과 같이 각 종류의 재료를 배합량에 따라 전자저울(ARC120, OHAUS, USA)을 사용하여 칭량하여 첨가하였다.

우동면 제조에 사용된 배합비는 자사 냉동면의 배합비와 동일하게 적용하였다. 모든 분말 재료를 반죽기에 넣고 기타원료 들을 첨가하여 고르게 혼합한 뒤 유산균 발효액을 조금 씩 투입하면서 실온에서 10분간 믹싱하여 작은 덩어리로 만들었다. 작은 덩어리를 비닐 포장 하여 Incubator (BI-P-250, LabHouse, 한국)에 넣어 35°C에서 24시간 숙성하였다. 이것 30g을 다시백에 넣고 용기에 담은 물에 전분을 흘려보낸 후 걸러진 글루텐 함량을 측정하였다. 또한 숙성된 반죽을 두께 3mm가 되도록 압연기를 이용해 면을 제조하였다. 제조된 면을 끓는 물에 5~7분간 삶아 물성 측정, 관능검사 등에 사용하였다.

<표 1> 예비 시제용 발효우동 배합비

원 료 명	배합량(Kg)	배합비(%)
소맥분	162.800	57.81
변성전분	80.000	28.41
감자전분	26.600	9.45
폴리글리시톨	1.580	0.56
알긴산프로필렌글리콜	0.028	0.01

치자황색소	0.028	0.01
미림	1.370	0.49
Trans glutaminase	1.400	0.50
정제염	6.000	2.13
유산균 발효액	121.000	

위의 배합비대로 시제하여 평가한 후 재료, 유산균 발효액의 첨가량을 변경하며 배합비를 확정하였다.

[3차년도]

< 과제개발 내용 및 방법 >

1-1. 개발에 사용된 재료

1. 1차년도 글루텐 프리형 프리믹스 보완실험

본 실험은 1차, 2차년도에 글루텐 프리형 프리믹스 4종 실험에 대하여 물성 보완이 필요할 것으로 판단되어 진행하였으며 실험에 사용된 원료는 ISP, 젤라틴, 구아검, 카라기난, 글루코만난, 한천, 펙틴, 글루코겔, 잔탄검, 돼지감자가루, Bata-glucan, 올리고당, 과당, 폴리글리시톨, 솔비톨, 글리신을 사용하였다.

2. 글루텐 저감 유산균 발효우동 보완실험

실험에 사용된 밀가루는 중력분을 사용 하였으며, 소금은 순도 99%이상의 정제염을 사용하였다. 초산전분, 감자전분, 폴리글리시톨, 알긴산프로필렌글리콜, 치자황색소, 미림, Trans glutaminase(다인소재) 를 사용하였다.

2-2. 실험 방법

1. 글루텐 프리형 프리믹스 개발

모든 분말 재료를 반죽기에 넣고 기타원료들이 첨가하여 고르게 혼합한 뒤 물을 조금씩 투입하면서 실온에서 10분간 믹싱하여 작은 덩어리로 만들었다. 이후 두께를 2mm가 되도록 압연기를 이용해 면을 제조하였다. 제조된 면은 끓는 물에 5~7분간 삶은 후 실험에 사용하였다.

2. 글루텐 저감 발효우동의 제조

우동면의 제조를 위해 표 1과 같이 각 종류의 재료를 배합량에 따라 전자저울(ARC120, OHAUS, USA)을 사용하여 칭량하고 첨가하였다.

우동면 제조에 사용된 배합비는 자사 냉동면의 배합비와 동일하게 적용하였다.

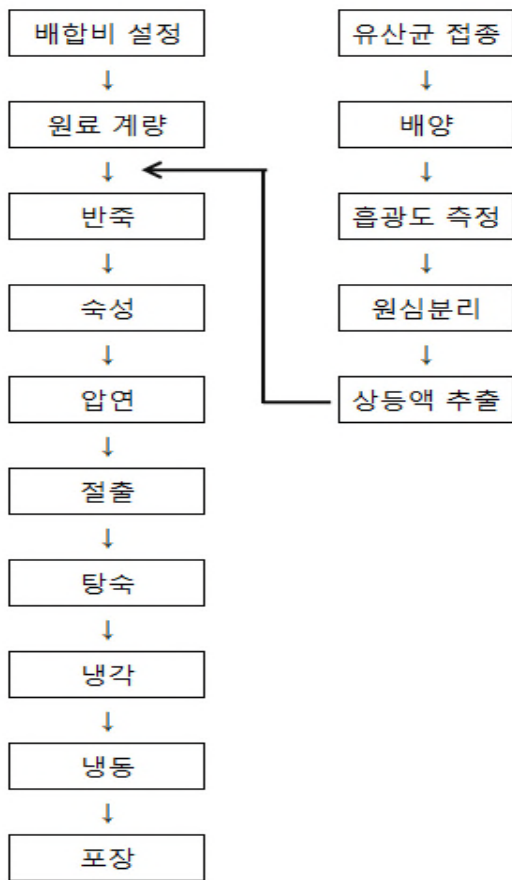
모든 분말 재료를 반죽기에 넣고 기타원료 들을 첨가하여 고르게 혼합한 뒤 유산균 발효액 또는 유산균분말을 배합수에 첨가하여 조금씩 투입하면서 실온에서 10분간 믹싱하여 작은 덩어리로 만들었다.

작은 덩어리를 비닐 포장하여 Incubator (BI-P-250, LabHouse, 한국)에 넣어 35°C에서 24시간 숙성하였다. 숙성된 반죽 30g을 다시백에 넣고 용기에 물을 담은 후 전분을 흘려보내고 걸러진 글루텐 함량을 측정하였다. 또한 숙성된 반죽을 두께 3mm가 되도록 압연기를 이용해 면을 제조하였다. 제조된 면을 끓는 물에 5~7분간 삶아 물성 측정, 관능검사 등에 사용하였다.

<표 1> 2차년도 압연방식 글루텐저감 발효우동 최종 배합비

원 료 명	배합량(Kg)	배합비(%)
소맥분	59.40	43.21
변성전분	29.25	21.28
감자전분	9.75	7.09
폴리글리시톨	0.58	0.42
Transe glutaminase	0.50	0.36
MRS 배지 상등액	40.00	27.64

위의 배합비 대로 생산한 후 MRS배지 상등액이 관능상의 영향을 주는 것으로 확인되어 유산균액을 첨가하거나 유산균 분말을 첨가하는 등 보완실험을 진행하고 배합비를 확정하였다.



[그림 1] 글루텐 저감 발효우동 제조과정

3. 글루텐 분해율 측정

숙성된 반죽을 30g 계량하여 필터백에 넣고 물이 담긴 볼에서 손으로 주물러 전분이 빠져나가도록 하였다. 전분이 전부 빠져 나간 후 이 물을 필터백에 다시한번 걸러 빠져나간 글루텐을 다시 포집하여 습부 글루텐을 얻었다.

이 필터백을 75°C의 Dry oven (DO-42, HYSC, 한국)에 넣고 3시간 건조 시켜 건부 글루텐의 무게를 칭량하였다. 이를 사용해 글루텐 분해율을 측정하였다.

또한 정확한 글루텐 함량을 측정을 위해 협력업체인 동아원의 Glutomatic(MHK TRADING, PERTEN, 스웨덴)을 사용하였다.



[그림 2] Glutomatic

4. 각 시제품의 물리적 특성 측정

면의 물성은 압착시험을 통해 측정하였다. 물성측정은 Texture Analyzer (CT310K, BROOKFIELD)와 이와 연결된 측정용 프로그램을 이용하여 표 2와 같은 조건으로 TPA(Texture profile analysis)를 측정하였다. 면 시료 하나를 시료대에 올려놓고 시료를 고정 시킨 후 지름 20mm의 원형의 plunger 형태의 어댑터를 이용하여 1회 압착한 후 바로 이어서 한번 더 압착하는 2회 반복 압착실험을 통해 시료의 견고성(hardness), 응집성(cohesiveness), 씹힘성(chewiness)을 측정하였다. 각 실험구에 대해 모두 3회 반복 측정한 후 평균값을 구하였다.

<표 2> Texture Analyzer 측정조건

Sample Dimentions	Block
Test Type	TPA
Target Load	Load 2000g
General Test Parameters	Trigger Load 7g



[그림 3] Texture Analyzer

5. 색도 측정

제조된 면의 색도는 Colorimeter(Color reader CR-400, Konica Minolta, Japan)를 이용하였고 Hunter 색계인 L(lightness, 명도), a(redness, 적색도), b(yellowness, 황색도) 값으로 나타내었다. 각 실험구에 대해 3번 반복 측정 한 후 그 평균값을 구하였다.



[그림 4] Colorimeter

6. 관능검사

관능검사는 동성식품 임직원을 대상으로 실시하였고, 검사방법과 평가특성을 잘 인식하도록 설명하였으며, 7점 척도를 이용하여 동일 설문지로 평가하였다. 기호도의 평가 항목은 색상, 경도, 탄력성, 전반적인 기호도로써 대단히 좋다 : 7점, 좋지도 싫지도 않다 : 4~5 점 대단히 싫어한다 1점으로 나타내었다.

시료는 생면을 100°C에서 최적 조리시간까지 조리한 다음 찬물에 살짝 헹구고 체에 받쳐 물

기를 제거한 후 흰 접시에 담아 제공하였다.

7. 유산균액, 유산균 분말의 사용

한국 생명공학연구원에서 배양하여 분리한 유산균 액과 이를 동결건조한 유산균 분말을 제공받아 사용하였다. 제공받은 유산균의 유산균 수를 파악하기 위해 spectrophotometer(V-5000, 휴먼코퍼레이션, 한국)를 사용 하였다. 흡광도 수치 1.7 이상임을 확인하고 유산균수가 적정한 것으로 확인 되어 매 반죽 실험 전 흡광도 측정 후 반죽실험을 진행하였다.

<표 3> Spectrophotometer 측정조건

Wavelength	600nm
Spectral Bandwidth	4nm
Optical System	Single Beam, Grating 1200lines/mm
Photometric Range	-0.097-1.999A 0-125%T

또한 흡광도 측정을 완료한 배양액은 Centrifuge(1248R, LABOGENE, 한국)를 사용해 상등액과 고형분을 분리 한 후 상등액만을 배합수로 사용하였다.

<표 4> Centrifuge 측정조건

Temperature	-4℃
Speed (RPM)	6000
TIME	15 min



[그림 5] Spectrophotometer



[그림 6] Centrifuge

제 3 장 과제개발 내용 및 방법

3-1. 글루텐 프리형 프리믹스 보완실험

1차년도에 제작되고 2차년도에 보완완료 되었지만 시제품의 판매가 부진하여 보완실험을 계속하여 진행하고 제품의 품질을 높이도록 하였다.

1. 우동, 칼국수용 프리믹스

<표 5> 우동, 칼국수용 프리믹스 배합비

원 료 명	배합량(Kg)	배합비(%)
쌀가루	100.00	80.6
호화쌀가루	10.00	8.0
감자전분	6.00	4.9
초산전분	4.00	3.3
구아검	2.00	1.6
솔비톨	2.00	1.6

기존 우동, 칼국수용 프리믹스 배합비에 검류, 당류 등을 첨가하여 개선실험을 진행하였다.

<표 6> 우동, 칼국수용 프리믹스 개선 실험 배합비

Sample	쌀가루	호화 쌀가루	감자전분	초산전분	구아검	솔비톨	올리고당	글리신
S1	100.00	10.0	6.0	4.0	2.0	2.0	1.0	-
S2	100.00	10.0	6.0	4.0	2.0	2.0	2.0	-
S3	100.00	10.0	6.0	4.0	2.0	2.0	-	1.0
S4	100.00	10.0	6.0	4.0	2.0	2.0	-	2.0
S5	100.00	10.0	6.0	4.0	2.0	2.0	1.0	1.0

위의 5가지 샘플 실험 결과 올리고당과 글리신을 1kg씩 첨가하는 제품이 제품의 품질에 좋은 영향을 주었으나 프리믹스로서 사용하기에 어려움이 있었다.

이에 기존의 배합비를 유지하도록 하였다.

2. 스파게티용 프리믹스

<표 7> 스파게티용 프리믹스 배합비

원 료 명	배합량(Kg)	배합비(%)
볶은 쌀가루	100.00	77.0
수수가루	5.00	3.9
옥수수전분	25.00	19.1

2차년도 실험 시 수수가루를 첨가하여 쫄깃함, 부드러움을 강조하였으나, 색상의 변화로 인해 거부감이 있었던 것으로 확인되었다.

이에 재 실험을 진행하였다.

<표 8> 스파게티용 프리믹스 실험

Sample	볶은 쌀가루	옥수수 전분	돼지감자 가루	구아검	카라기난	글루코만난
S1	100.00	25.0	-	1.0	-	-
S2	100.00	25.0	-	-	1.0	-
S3	100.00	25.0	-	-	-	1.0
S4	100.00	15.0	10.0	1.0	-	-
S5	100.00	15.0	10.0	2.0	-	-

검류를 첨가하여 스파게티의 식감을 높이는 TEST를 진행하였다. 구아검이 첨가되었을 때 스파게티 특유의 식감이 나타났으며 카라기난, 글루코만난을 첨가하였을 시 식감에 큰영향을 주지 않은 것으로 확인 되었다. 이로써 S1을 최종 배합비로 선정하였다.

3. 수제비, 만두피용 프리믹스

<표 9> 수제비, 만두피용 프리믹스 배합비

원 료 명	배합량(Kg)	배합비(%)
쌀가루	100.00	86.3
귀노아분말	10.00	8.6
옥수수전분	2.00	1.7
글리신	2.00	1.7
구아검	2.00	1.7

2차 실험시 기존의 배합비를 유지했으나 당류를 더 첨가하여 제품 표면에 영향을 주는지 다시 실험을 진행하였다.

<표 10> 수제비, 만두피용 프리믹스 실험

Sample	쌀가루	귀노아	옥수수 전분	글리신	구아검	올리고당	과당	폴리글리시톨
S1	100.00	10.0	2.0	2.0	2.0	-	-	-
S2	100.00	10.0	2.0	2.0	2.0	2.0	-	-
S3	100.00	10.0	2.0	2.0	2.0	-	2.0	-
S4	100.00	10.0	2.0	2.0	2.0	-	-	2.0
S5	100.00	10.0	2.0	2.0	2.0	-	-	1.0

수제비, 만두피용 프리믹스 표면개선 실험 결과 폴리글리시톨을 소량 첨가한 S5 제품이 가장 우수한 결과를 나타냈다.

기존제품과 식감에서는 차이가 없었으나 표면이 매끄러워지는 것을 확인하고 이 배합비를 확정하였다.

4. 냉면용 프리믹스

<표 11> 냉면용 프리믹스 배합비

원 료 명	배합량(Kg)	배합비(%)
생메밀가루	100.00	92.6
볶은메밀가루	1.00	0.9
찐메밀가루	5.00	4.6
고구마전분	2.00	1.9

찐메밀가루의 공급이 어려운 점이 있어 찐메밀가루의 함량을 줄여 제품을 개선하고자 하였다.

<표 12> 냉면용 프리믹스 실험

Sample	생메밀 가루	볶은메밀 가루	고구마 전분	한천	펙틴	글루코젤	과당
S1	100.00	2.0	2.0	-	-	-	-
S2	100.00	2.0	2.0	1.0	-	-	-
S3	100.00	2.0	2.0	-	1.0	-	-
S4	100.00	2.0	2.0	-	-	1.0	-
S5	100.00	2.0	2.0	-	-	-	1.0

찐메밀가루를 첨가하지 않고 볶은메밀가루의 함량을 높이고 기타 첨가물을 첨가하는 실험을 동시에 진행하였다. 그 결과 생메밀가루, 볶은메밀가루, 고구마전분 만을 첨가한 S1 제품이 가장 적합한 것으로 확인되었다.

이에 Sample 1을 최종 배합비로 선정하였다.

3-2. 유산균 분리액 함량에 따른 분해율 확인

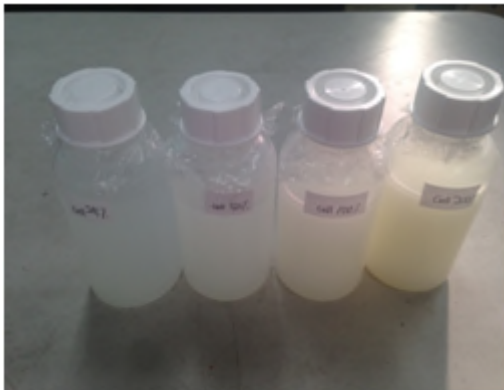
2차년도 실험에서 선정된 유산균 *L.paracasei*의 배양 상등액에서 분리한 액상유산균을 한국생명공학연구원에서 제공받아 반죽의 배합수로 사용하여 실험을 진행하였다.

<표 13> 발효우동 배합비

원 료 명	Test 1-1	배합비(%)
소맥분	59.40	59.71
변성전분	29.25	29.40
감자전분	9.75	9.80
폴리글리시톨	0.58	0.58
Transe glutaminase	0.50	0.50
액상 유산균		
총 계	99.5	100.0

액상 유산균의 함량은 각 실험구별 2.5%, 5%, 10%, 25%, 50%, 100%, 200%로 첨가 하였고 소량첨가 시 물을 첨가하여 함량을 조절하였다.

이 액상 유산균은 배합수로서 사용되었으며 유산균을 첨가하여 만든 반죽은 35°C에서 24시간 발효하였다.



[그림 7] 액상유산균 (*L.paracasei*)



[그림 8] 액상유산균 첨가 반죽(좌), 24시간 배양 후 건부글루텐(우)

반죽의 30g을 칭량하여 다시팩에 넣고 고인 물에서 전분과 글루텐을 분리하였으며 다시팩에서 빠져나간 글루텐을 다시 걸러 습부 글루텐을 얻었다. 이 습부 글루텐을 Dry oven에서 건조하여 건부글루텐을 얻은 후 이를 칭량하여 글루텐 분해율을 확인 할 수 있었다.

<표 14> 액상유산균 첨가 함량 별 글루텐 분해율

	건부글루텐(g)	분해율	평균
대조구	1.85	0.00	
cell 2.5%	1.67	9.73	13.784
	1.52	17.84	
cell 5%	1.34	27.57	23.243
	1.50	18.92	
cell 10%	1.20	35.14	40.541
	1.00	45.95	
cell 25%	0.43	76.76	72.703
	0.58	68.65	

cell 50%	0.36	80.54	85.135
	0.19	89.73	
cell 100%	0.06	96.76	97.838
	0.02	98.92	
cell 200%	0.02	98.92	98.919
	0.02	98.92	

실험 결과 액상유산균 첨가 시 cell 50%이상 첨가 실험구에서 글루텐이 80%이상 분해되었다. cell 10%이하 첨가 실험구에서는 글루텐이 50%미만으로 분해됨을 알 수 있었다.

3-3. 분말 유산균 첨가에 따른 분해율 확인

선정된 유산균 *L.paracasei*의 배양 상등액에서 분리한 액상유산균을 동결건조하여 분말화한 분말 유산균을 한국생명공학연구원에서 제공받아 반죽의 첨가제로서 사용하여 실험을 진행하였다.

1. 분말 유산균 첨가 및 정제염첨가, 익반죽 비교실험

<표 15> 정제염 유무, 익반죽 실험 배합비

원 료 명	Test 2-1	Test 2-2	Test 2-3	배합비(%)
소맥분	244.20	244.20	244.20	59.47
변성전분	120.00	120.00	120.00	29.22
감자전분	39.90	39.90	39.90	9.72
폴리글리시톨	2.37	2.37	2.37	0.58
Transe glutaminase	2.37	2.37	2.37	0.58
유산균	1.80	1.80	1.80	0.44
정제염			10.00	0.00
물				0.00

Test 2-1 : 기본배합 + 분말유산균 0.44%

Test 2-2 : 기본배합 + 분말유산균 0.44% (익반죽)

Test 2-3 : 기본배합 + 분말유산균 0.44% (염첨가)



[그림 9] 분말유산균 첨가 반죽



[그림 10] 분말유산균 첨가 건부 글루텐

<표 16> 정제염 첨가 유무비교 및 익반죽 시 글루텐 분해율

	건부글루텐(g)	분해율	평균
대조구	1.85	0.00	
기본배합 + 유산균 0.44%	0.58	68.65	72.703
	0.43	76.76	
기본배합 + 유산균0.44% 익반죽	0.38	79.46	68.649
	0.78	57.84	
기본배합 + 유산균0.44% 염첨가	1.11	40.00	37.027
	1.22	34.05	

실험 결과 기본 배합보다 정제염 첨가 시 정제염이 글루텐 활성화에 영향을 주어 분해율을 낮추는 것을 알 수 있었다. 익반죽 역시 글루텐을 빠르게 형성하였지만 기존반죽과 큰 차이를 보이지 않았다.

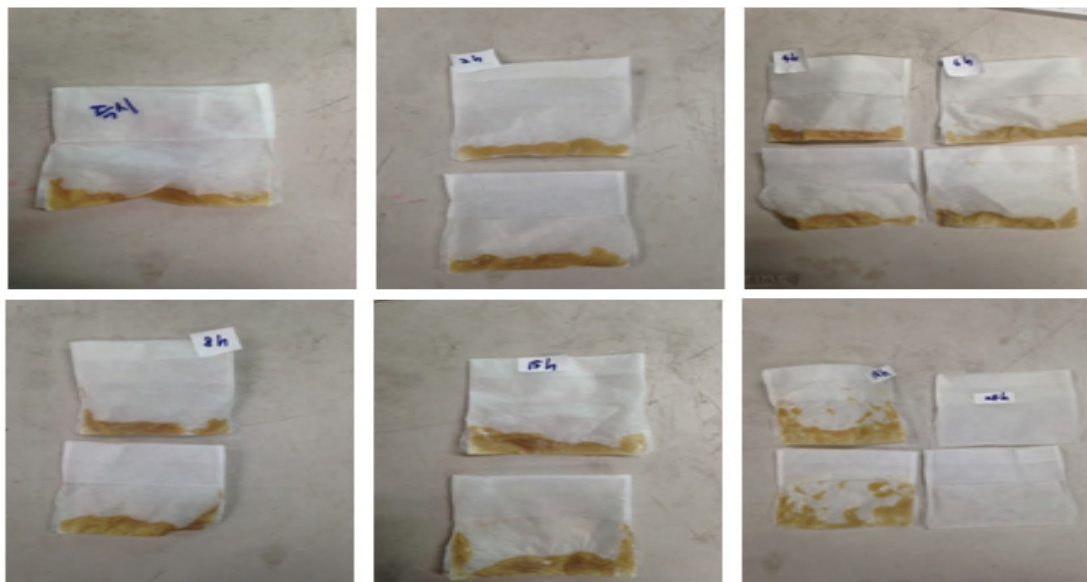
2. 분말유산균을 첨가하여 숙성시간대별 분해율 확인 실험

<표 17> 숙성시간대별 분해율 확인 실험 배합비

원료명	Test 3-1	배합비(%)
소맥분	244.20	59.47
변성전분	120.00	29.22
감자전분	39.90	9.72
폴리글리시톨	2.37	0.58
TG	2.37	0.58
유산균	1.80	0.44
물	181.0	0.00



[그림 11] 숙성시간대별 분해율 확인 실험 반죽



[그림 12] 숙성시간대별 분해율 확인 실험 건부 글루텐

<표 18> 숙성시간대별 글루텐 분해율

		건부글루텐(g)	분해율	평균
대조구		1.85	0.00	
반죽 직후		1.67	9.73	
기본배합 + 유산균 0.44%	2 h	1.75	5.41	5.676
		1.74	5.95	
	4 h	1.82	1.62	2.432
		1.79	3.24	
	6 h	1.72	7.03	6.486
		1.74	5.95	
	8 h	1.74	5.95	7.838
		1.67	9.73	
	15 h	1.81	2.16	3.514
		1.76	4.86	
	18 h	1.41	23.78	21.081
		1.51	18.38	
	21 h	1.73	6.49	20.541
		1.21	34.59	
	24 h	0.02	98.92	97.838
		0.06	96.76	

숙성시간대별 글루텐 분해율 확인 실험 결과 반죽 후 4시간까지 글루텐 분해율이 낮아지는 것으로 보아 글루텐형성이 활발히 일어나는 것을 알 수 있었다. 그 후 18시부터 유산균이 활동을 시작해 24시간 숙성 시 분해가 가장 잘 일어나는 것으로 확인 되었다.

3. 분말유산균 첨가량에 따른 분해율 확인 실험(1)

위 실험 결과 분말유산균 0.44% 첨가 시 24시간 이상 숙성하여야 90% 이상 분해가 됨을 알 수 있었다. 이에 유산균 함량을 늘려 단시간 내에 분해가 되는 지를 확인하기 위해 첨가량에 따른 분해율 확인 실험을 진행하였다.

<표 19> 유산균 첨가량에 따른 분해율 확인 실험 배합비

원 료 명	Test 4-1	Test 4-2	Test 4-3
소맥분	244.20	244.20	244.20
변성전분	120.00	120.00	120.00
감자전분	39.90	39.90	39.90
폴리글리시톨	2.37	2.37	2.37
TG	2.37	2.37	2.37
유산균	1.50	2.50	5.00



[그림 13] 유산균 첨가량에 따른 분해율 확인 실험 반죽



[그림 14] 유산균 첨가량에 따른 분해율 확인 실험 건부글루텐

<표 20> 유산균 첨가량에 따른 시간대별 분해율

	4-1	4-2	4-3
1 H	31.89	27.83	27.02
5 H	21.35	18.64	17.29
16 H	36.75	-	-
19 H	23.78	-	-
21 H	35.13	63.24	80.27
24 H	70.00	84.86	87.83

실험결과 분말유산균의 함량이 높아도 일정한 숙성시간을 거치지 않을 경우 분해는 거의 일어나지 않는 것으로 확인되었다.

이에 글루텐 분해를 위해선 35°C에서 24시간 숙성이 필요한 것으로 확인 되었다.

4. 분말유산균 첨가량에 따른 분해율 확인 실험(2)

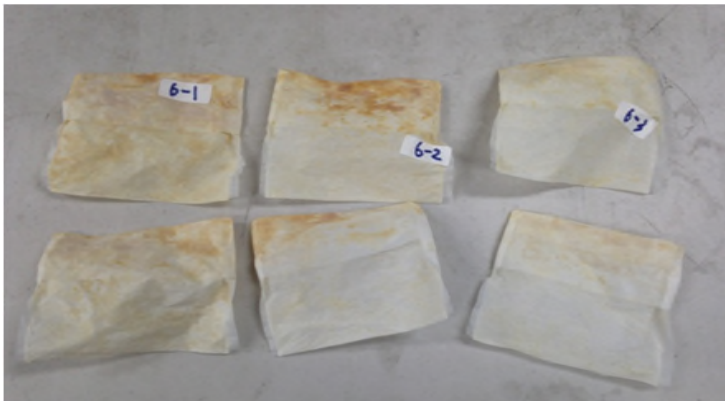
위 실험 결과 분말유산균 0.37% 첨가 시 24시간 숙성하면 글루텐 분해율은 70% 정도로 확인 되었다. 그러나 발효우동 본 제품을 생산하기 위해서는 글루텐 분해율이 높을수록 제품의 식감을 좋지 않아 적정 분해율을 찾고자 유산균 함량을 줄여가며 재 실험을 진행하였다.

<표 21> 유산균 첨가량에 따른 글루텐 분해율 확인 실험 배합비

원 료 명	Test 6-1	Test 6-2	Test 6-3	배합비율(%) Test6-1	배합비율(%) Test6-2	배합비율(%) Test6-3
소맥분	244.20	244.20	244.20	59.66	59.66	59.66
변성전분	120.00	120.00	120.00	29.32	29.32	29.32
감자전분	39.90	39.90	39.90	9.75	9.75	9.75
폴리글리시톨	2.37	2.37	2.37	0.58	0.58	0.58
TG	2.37	2.37	2.37	0.58	0.58	0.58
유산균	0.50	1.00	1.50	0.12	0.24	0.37



[그림 15] 유산균 첨가량에 따른 글루텐 분해율 확인 실험 반죽



[그림 16] 유산균 첨가량에 따른 글루텐 분해율 확인 실험 건부 글루텐

<표 22> 유산균 첨가량에 따른 글루텐 분해율

	건부글루텐(g)	분해율	평균
대조구	1.85	0.00	
6-1	1.15	37.84	44.865
	0.89	51.89	
6-2	0.53	71.35	61.351
	0.9	51.35	
6-3	0.49	73.51	73.243
	0.5	72.97	

위의 실험 결과 분말 유산균 0.24% 첨가 시 글루텐 분해율 60%정도로 발효우동 시제품 생산 시 생산성과 관능 상 가장 적합할 것으로 확인 되었다.

5. 숙성온도에 따른 분해율 확인 실험

현장 시생산시 숙성온도를 35°C로 유지할 경우 숙성실의 개선이 필요하여

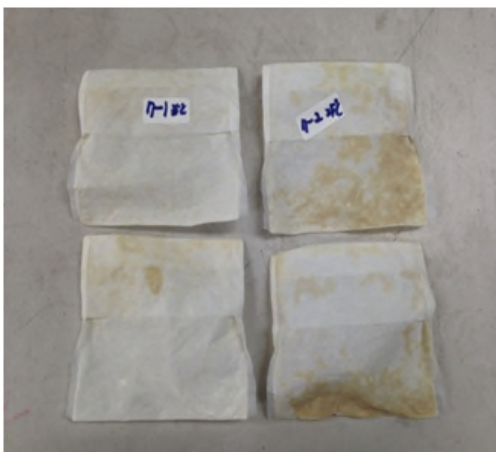
현장 숙성실 온도인 25°C와 비교 실험을 진행하기로 하였다.

<표 23> 숙성온도 비교 실험 배합비

원 료 명	Test 7-1	현장배합량	배합비(%)
소맥분	244.20	69.77	59.58
변성전분	120.00	34.29	29.28
감자전분	39.90	11.40	9.74
폴리글리시톨	2.37	0.68	0.58
TG	2.37	0.68	0.58
유산균	1.00	0.29	0.24



[그림 17] 숙성온도에 따른 분해율 확인 실험 반죽



[그림 18] 숙성온도에 따른 분해율 확인 실험 건부 글루텐

<표 24> 숙성온도에 따른 글루텐 분해율

		건부글루텐(g)	분해율	평균
대조구		1.85	0.00	
35°C	7-1	0.72	61.08	60.541
		0.74	60.00	
25°C	7-2	1.36	26.49	21.351
		1.55	16.22	

숙성온도에 따른 글루텐 분해율 확인 실험 결과 25°C에서 24시간 숙성시킨 발효우동반죽은 20%대로 낮은 분해율을 보였다.

이에 숙성온도는 35°C로 확정 하였다.

6. 2차 분말유산균 첨가량에 따른 분해율 확인 실험(1)

분말 유산균의 함량을 확정하였으나 한국생명공학연구원에서 시생산된 유산균을 받아 유산균 첨가량을 재설정하는 실험을 다시 진행하였다.

<표 25> 유산균 첨가량에 따른 글루텐 분해율 확인 실험 배합비

원료명	Test 8-1	Test 8-2	Test 8-3	현장배합비	배합비율(%) Test8-1	배합비율(%) Test8-2	배합비율(%) Test8-3
소맥분	244.20	244.20	244.20	69.77	59.71	59.71	59.71
변성전분	120.00	120.00	120.00	34.29	29.34	29.34	29.34
감자전분	39.90	39.90	39.90	11.40	9.76	9.76	9.76
폴리글리시톨	2.37	2.37	2.37	0.68	0.58	0.58	0.58
TG	2.37	2.37	2.37	0.68	0.58	0.58	0.58
유산균	0.16	0.10	0.20	0.05	0.04	0.02	0.05

원료명	Test 9-1	Test 9-2	Test 9-3	현장배합비	배합비율(%) Test9-1	배합비율(%) Test9-2	배합비율(%) Test9-3
소맥분	244.20	244.20	203.50	69.77	59.73	59.73	49.77
변성전분	120.00	120.00	100.00	34.29	29.35	29.35	24.46
감자전분	39.90	39.90	33.25	11.40	9.76	9.76	8.13
폴리글리시톨	2.37	2.37	1.98	0.68	0.58	0.58	0.48
TG	2.37	2.37	-	0.68	0.58	0.58	-
유산균	0.02	0.05	0.042	0.01	0.005	0.01	0.01



[그림 19] 유산균 첨가량에 따른 글루텐 분해율 확인 실험 반죽, 건부글루텐

<표 26> 유산균 첨가량에 따른 글루텐 분해율

	건부글루텐(g)	분해율	평균
대조구	1.85	0.00	
8-1	0.49	73.51	67.027
	0.73	60.54	
8-2	0.69	62.70	69.730
	0.43	76.76	
8-3	0.75	59.46	58.108
	0.8	56.76	
9-1	1.26	31.89	48.649
	0.64	65.41	
9-2	0.60	67.57	63.243
	0.76	58.92	
9-3	0.53	71.35	75.405
	0.38	79.46	

위 실험 결과 새로 제공받은 분말 유산균의 함량이 제일 낮게 첨가된 9-1번 샘플이 48% 정도의 분해율을 보여 시생산에 적합할 것으로 확인 되었다.

3-4. 시생산

위의 실험들을 바탕으로 현장에서 반죽, 숙성, 절출, 탕숙, 냉동, 포장 등 시생산을 진행하였다.

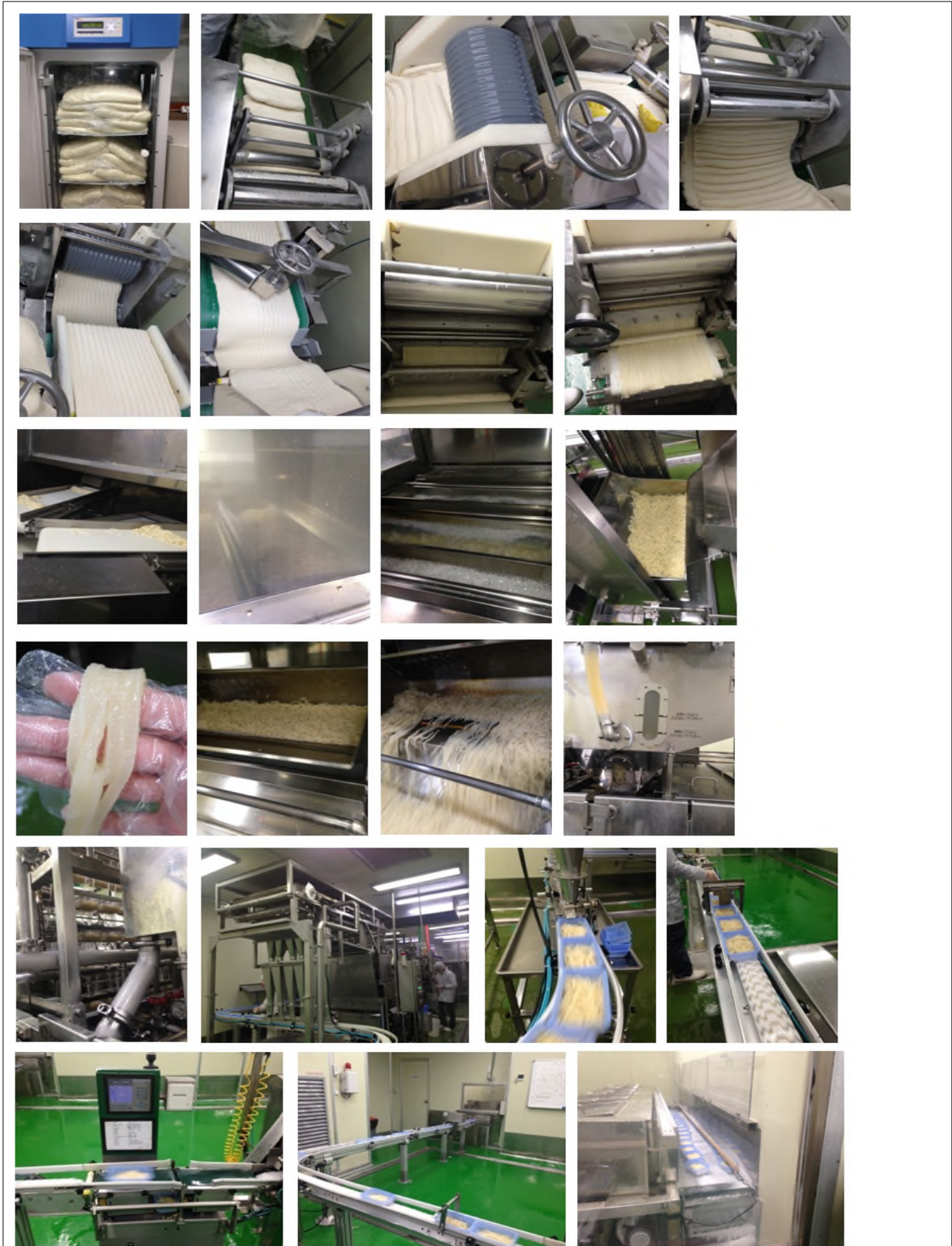
1. 1차 시생산

<표 27> 1차 시생산 배합비

원 료 명	Test 1	현장배합량	배합비(%)
소맥분	244.20	69.77	59.73
변성전분	120.00	34.29	29.35
감자전분	39.90	11.40	9.76
폴리글리시톨	2.37	0.68	0.58
TG	2.37	0.68	0.58
유산균	0.02	0.006	0.005



[그림 20] 첨가원료준비 및 반죽



[그림 21] 숙성, 탕숙 및 냉각, 냉동

위의 배합비 대로 반죽한 뒤 35°C에서 24시간 실험실 인큐베이터에서 숙성을 진행하였다. 반

죽을 떼내 글루텐 분해율 확인용으로 사용하고 나머지 반죽은 우동 면발로 제면하여 8분간 탕숙 후 냉각, 냉동 공정을 진행하였다.

숙성된 반죽에서 떼어낸 발효우동 반죽 30g을 다시팩에 담아 전분과 글루텐을 분리하여 습부글루텐과 건부글루텐을 얻었다.

<표 28> 1차시생산 글루텐 분해율

대조구	건부글루텐(g)	분해율	평균
	1.85	0.00	
시생산	0.19	89.73	88.649
	0.23	87.57	

1차 시생산 결과 분해율이 매우 높게 나와 생산과정에서 면발이 끊기는 등 생산이 어려웠다. 생산된 제품을 영업팀과 관능검사를 진행한 결과 표면이 거칠고 면이 끊어져 상품으로 사용 불가 판정을 받았다.

상품으로써 사용, 판매 하려면 기존제품과 동일한 식감으로 유지하여야 한다.

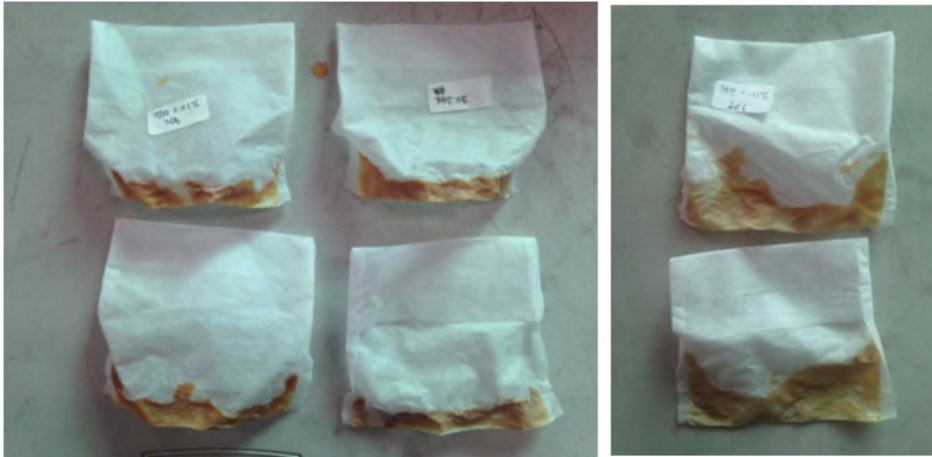
2. 2차 시생산

1차 시생산 결과 기존의 냉동면과 동일한 스펙을 구현하기 위하여 기존 냉동 우동면 배합비에서 유산균을 첨가하여 2차 시생산을 진행하였다.

<표 29> 2차시생산 배합비

원 료 명	배합량(Kg)	배합비(%)
소맥분	81.420	59.40
변성전분	40.093	29.25
감자전분	13.364	9.75
폴리글리시톨	0.795	0.58
알긴산프로필렌글리콜	0.014	0.01
치자황색소	0.014	0.01
분말 유산균	0.014	0.010
정제염	0.685	0.50

유산균 증식에 영향을 줄 수 있는 미림은 첨가하지 않았다.



[그림 22] 2차 시생산제품의 건부 글루텐

<표 30> 2차 시생산 제품의 글루텐 분해율

대조구	건부글루텐(g)	분해율	평균
	1.85	0.00	
시생산	1.64	11.35	14.324
	1.53	17.30	

2차 시생산 결과 정제염이 첨가된 반죽에서는 글루텐 분해가 잘 일어나지 않음을 다시 확인하였다.

관능 상 식감은 기존 제품과 유사하나 글루텐 분해율이 15%이하로 나와 3차 시생산을 진행하였다.

3. 3차 시생산

2차 시생산 결과 정제염을 첨가하지 않고 미림을 첨가하여 면의 표면을 매끄럽게 하도록 배합비를 설정하였다. 또한 유산균의 함량을 더 줄여 0.002%를 첨가하여 실험을 진행하였다.

<표 31> 3차 시생산 배합비

원료명	배합량(Kg)	배합비(%)
소맥분	81.420	59.400
변성전분	40.776	29.748
감자전분	13.364	9.750
폴리글리시톨	0.795	0.580
알긴산프로필렌글리콜	0.014	0.010
치자황색소	0.014	0.010
미림	0.685	0.500
분말 유산균	0.003	0.002



[그림 23] 3차 시생산

반죽 후 롤링공정을 거친 면대가 숙성됨에 따라 글루텐이 분해되어 면대가 늘어져 제면에 어

려움이 있어 반죽을 롤링하지 않은 상태에서 숙성을 진행하였다.
35°C에서 24시간 숙성 후 반죽을 롤링하여 압연, 절출 과정을 진행하였다.



[그림 24] 3차 시생산 건부글루텐

<표 32> 3차 시생산 글루텐 분해 결과

대조구	건부글루텐(g)	분해율	평균
	1.45	0.00	
시생산	0.25	82.76	85.517
	0.17	88.28	

글루텐 분해 결과 분해율은 85% 이상으로 대부분 분해되어 면대가 자주 끊어지며 압연, 절출 과정이 어려웠다.

이에 면 표면이 매우 거칠고 짧게 끊기는 등 우동면 상품으로 판매가 어려울 것으로 확인되었다.

4. 4차 시생산, 완제품 생산

앞선 실험결과 글루텐 분해율이 높아 우동면 생산이 어려워 숙성시간을 4시간으로 줄여 글루텐 분해율을 낮춰 생산을 진행하기로 하였다.

<표 33> 4차 시생산 배합비

원 료 명	배합량(Kg)	배합비(%)
소맥분	81.420	59.400
변성전분	40.776	29.748
감자전분	13.364	9.750
폴리글리시톨	0.795	0.580
알긴산프로필렌글리콜	0.014	0.010
치자황색소	0.014	0.010
미림	0.685	0.500
분말 유산균	0.003	0.002

위의 배합비 대로 반죽 후 4시간 동안 숙성을 진행하였다.

<표 34> 4차 시생산 글루텐 분해율

대조구	건부글루텐(g)	분해율	평균
	1.85	0.00	
시생산	1.37	25.95	25.405
	1.39	24.86	

4차 시생산 후 반죽의 글루텐 분해율을 확인 해본 결과 25% 정도로 확인 되었다. 이에 품질에 영향을 줄 가능성이 낮아 면대형성, 절출, 탕숙 등 후속공정을 진행하였다.



[그림 25] 4차 시생산 완제품 포장 공정

4차 시생산 배합비에 따라 반죽 후 25°C에서 4시간 숙성을 진행하였다. 이 반죽을 압연, 절출, 당숙, 계량, 냉동 과정을 거쳐 5인분씩 포장했다.

절출은 #9번 칼날로 두께 2.7로 맞춰 기존의 사누끼우동면과 동일하게 하였다.

이 제품은 국민대학교에서 CJ 냉동우동면과 비교 관능검사와 동물실험을 진행하였다.

제 4 장 해외 박람회 참가

중국 출장 보고서

이종식 차장, 이지선 대리

1. 출장개요

- 1) 출장목적 : Anufood China 2017 베이징 식품 전시회 참가
- 2) 출장인원 : 이종식 차장, 이지선 대리
- 3) 출장기간 : 2017년 8월 29일 ~ 9월 2일(4박5일)
- 4) 출장지역 : 중국 북경
- 5) 내용 : 자사 생산제품(냉동면, 생면, 떡, 안출면, 소스 등) 전시
제품(치즈떡볶이) 시식
바이어 상담
시장조사

2. 출장일정

- 1) 8월 29일 : 중국 북경 출국, 박람회장 제품 및 홍보자료 설치
- 2) 8월 30일~9월 1일 : 전시회 참가(바이어 상담)/제품 시식 및 시장조사
- 3) 9월 2일 : 한국 입국

3. 출장내용

1) Anufood China 2017 베이징 식품 전시회 참가

- 냉동면, 생면, 떡, 압출면, 소스류 등 전시



- 떡류(치즈떡볶이) 시식

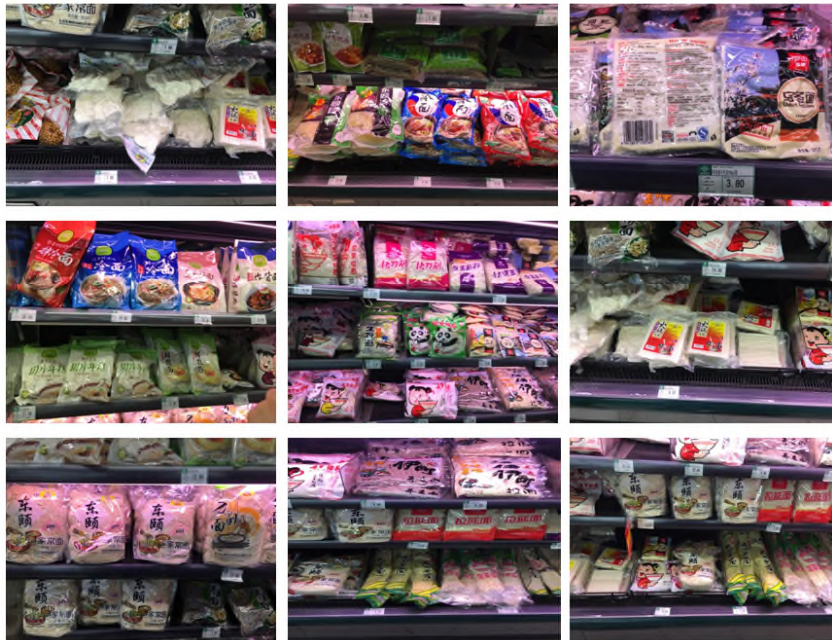


1) Anufood China 2017 베이징 식품 전시회 참가

- 바이어 상담



2) 시장조사



4. 출장결과

- 1) 중국 바이어 및 소비자들이 한국 제품에 대한 관심도가 높으며 고품질로 판단하여 비교적 제품단가가 고가여도 구매 의사가 있음.
- 2) 떡볶이에 대한 관심도가 높고 관능검사 결과 품질의 만족도가 높았음. 수출시 유통기한 최소 6개월 이상의 상온제품이나 냉동제품의 개발이 필요할 것으로 판단됨.
- 3) 중국 최대 인터넷 쇼핑몰 JD.COM 및 대형 마트 Wumart Stores, Inc 등 바이어들이 자사 제품에 관심을 보여 추후 미팅을 통해 거래가 가능할 것으로 판단됨.
- 4) 사드 여파인지 바이어들이 전년대비 30%이상 줄었다고 함. 실제로 양질의 바이어는 많지 않은 것으로 판단되나 방문 관람객들은 전체적으로 건강식 HMR제품에 많은 관심을 보임.

4-2. Worldfood Moscow 2017 전시회 참가

러시아 출장 보고서

임주희 과장, 이지선 대리

1. 출장개요

- 1) 출장목적 : WORLDFOOD MOSCOW 2017 전시회 참가
- 2) 출장인원 : 임주희 과장, 이지선 대리
- 3) 출장기간 : 2017년 9월 10일 ~ 9월 16일(6박7일)
- 4) 출장지역 : 러시아 모스크바
- 5) 내용 : 자사 생산제품(냉동면, 생면, 떡, 압출면, 소스 등) 전시
제품(냉동 우동면) 시식
바이어 상담
시장조사

2. 출장일정

- 1) 9월 10일 : 러시아 모스크바 출국
- 2) 9월 11일~9월 14일 : 박람회장 제품 및 홍보자료 설치
전시회 참가(바이어 상담)/제품 시식
시장조사 및 업체모니터링(현 수출제품)
- 3) 9월 16일 : 한국 입국

3. 출장내용

1) WORLDFOOD MOSCOW 2017 전시회 참가

- 냉동면, 생면, 떡, 압출면, 소스류 등 전시

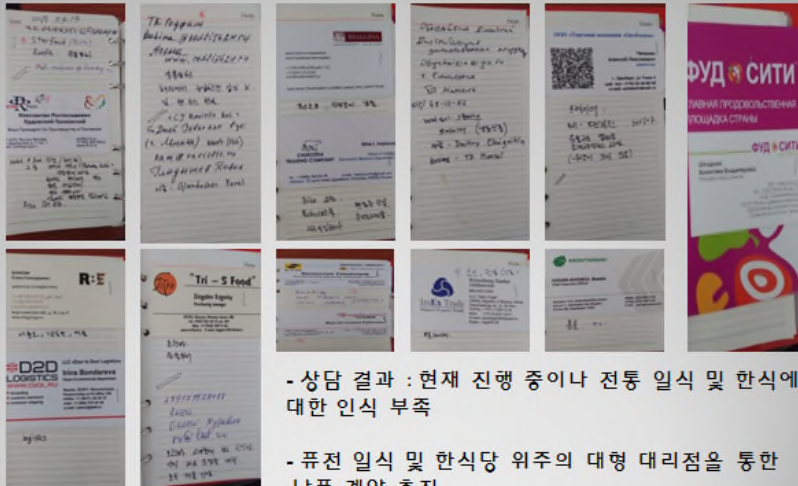


- 냉동면(우동) 시식



1) WORLDFOOD MOSCOW 2017 전시회 참가

- 바이어 상담



- 상담 결과 : 현재 진행 중이나 전통 일식 및 한식에 대한 인식 부족

- 퓨전 일식 및 한식당 위주의 대형 대리점을 통한 납품 계약 추진

2) 마트 시장조사 (라면류, 소스류, 냉동식품(만두류))



3) 업체모니터링 (러시아 수출 냉동면 관능검사)



- 현 수출업체 : 러시아 대표 유명 퓨전 일식 체인점 "야키도리아"
- 납품 품목 : 사누끼우동 250g
- 시식 결과 : 면 퍼짐이 있어 개선 요청 및 추가 한식 및 일식 메뉴 제안, 긍정적 검토

4. 출장결과

1) 동성식품 유럽시장 진출은 중장기적 시점으로 봤을 때 희망이 있다.

- 퓨전 일식이 성행하며, 한류 열풍에 힘입어 한류에도 관심이 많아 냉동 떡 및 소스, 우동 등 현지화된 스타일의 제품을 추진한다면 좋은 성과를 낼 것으로 예상된다.

2) 초기 진출은 현지 퓨전 일식당을 중심으로 삼고, 중장기적으로 한식집 및 일반 국민들 대상의 현지화 제품을 목표로 삼는다.

- 박람회 참석 결과 아직은 일식 및 한식에 대한 이해도가 높지 않았다. 퓨전 일식은 성행하고 있으므로, 이를 발판 삼고 한류를 이용한 냉동 떡 제품 및 소스, 면 제품을 취급하여 전 국민이 쉽게 즐길 수 있는 현지화된 동성만의 제품이 필요해 보인다.

연구과제명	글루텐 프리(gluten-free) 밀가루를 이용한 소화기능 개선 검증 연구 및 우동과 떡볶이 소스의 소비자 기호도 검사					
연구책임자	소속기관(부서)	국민대학교 식품영양학과				
	성 명	고광웅	직위(직급)	조교수		
	연 락 처	전 화 : 00-000-0000 휴대폰 : 000-0000-0000 e-mail : 0000@0000000.00.00				
지원연구비	33,000,000 원		연구기간	2017.6.01. ~ 2017.10.31.		
참여연구원	성 명	홍재희	소 속	국민대학교	직 급	부교수
	성 명	류용선	소 속	국민대학교	직 급	박사과정
	성 명	널리지모요	소 속	국민대학교	직 급	박사과정
	성 명	정정호	소 속	국민대학교	직 급	석사과정
	성 명	박기범	소 속	국민대학교	직 급	석사과정
	성 명	박혜원	소 속	국민대학교	직 급	석사과정
	성 명	최서윤	소 속	국민대학교	직 급	석사과정
<p>본인은 귀 업체에서 정한 제반사항을 준수하여 연구를 수행하였으며, 연구결과를 붙임과 같이 보고합니다.</p> <p>붙 임 : 연구결과보고서 1부</p> <p>2017 년 11 월 7 일</p> <p>연구책임자 고 광 웅 (서명 또는 인)</p> <p>주식회사 동성식품 귀하</p>						

1. 연구목표

- *L. paracasei*를 통한 글루텐-프리(gluten-free) 밀가루의 소화기능 개선과 소비자 기호도를 평가함으로써 산업에 활용될 수 있는 기능성 소재로서 잠재력을 검증하고자 함.

제 1 연구목표	제 2 연구목표
○ 발효 글루텐-프리 밀가루가 소화기능 개선에 효과를 보이는지 소화장애 및 장염 유발 동물을 이용하여 확인하고자 함.	○ 발효 글루텐-프리 밀가루를 활용하여 제조한 우동의 한국인/외국인 소비자 기호도 검사를 실시하여 우동 수프 1종에 대한 2종의 면의 조합에 따른 기호도 변화 및 기호도에 영향을 주는 맛 특정 인자를 규명함. ○ 동성 식품에서 제조한 떡볶이 소스 1종에 대하여 한국인/외국인 소비자 기호도 검사를 실시하여, 떡볶이 소스에 대한 시장 가능성을 평가함.

2. 연구내용 및 방법

2.1. 동물실험

2.1.1. 동물실험 설계

- 동물실험은 다음과 같이 설계함(표 1)
 - 1) 일반사료(UT; untreated)
 - 2) 일반사료 + 일반 밀가루 30%(w/w) (CTL; control, 음성대조군)
 - 3) 일반사료 + 일반 밀가루 27% + 글루텐-프리 밀가루 3%(저농도)
 - 4) 일반사료 + 일반 밀가루 12% + 글루텐-프리 밀가루 18%(중농도)
 - 5) 일반사료 + 글루텐-프리 밀가루 30%(고농도)

Groups	UT	CTL	Gluten-free		
			Low	Medium	High
% kcal from fat	18	18	18	18	18
% kcal from wheat	-	60	60	60	60
Gluten noodles (% w/w)	-	30	27	18	0
Gluten-free noodles (% w/w)	-	0	3	12	30
Number of animal	12	12	12	12	12
Sex	male	male	male	male	male
Feeding (week)	8	8	8	8	8

표 1. 동물실험 설계

- C57BL/6 마우스는 1921년 C.C. Little이 C57BR과 C57L을 발전시킨 Miss Abby Lathrop's stock을 교배시켜 개발한 모델임. 자연발생 종양이 적게 발생하며 사람의 소화 기관과 유사한 단위동물 특징이 있어 본 연구의 동물모델로 선택함.
- 총 60수의 4주령 C57BL/6 수컷 마우스를 임의적으로 그룹 배치한 후 일주일동안 순화기간을 거침.
- 순화기간 종료 후 UT군을 제외한 모든 군에 일주일동안 멸균증류수 중 5% Dextran Sulfate Sodium (DSS)을 음수로 급여함. DSS는 음수 중 2-5%로 소화장애가 유도되며 이는 체중과 배변을 통해 알 수 있음. 소화장애 유무 판단을 위해 급여 기간 중 매일 체중 측정과 배변 채취를 하여 비교함.
- 소화장애 유도 이후 실험식이를 8주간 급여하며 매주 사료섭취량과 체중을 측정함.
- Gluten noodle과 gluten-free noodle은 동결건조하여 파우더 형태로 만든 후 사료에 배합 제조함.

2.1.2. 체성분 분석

- Dual Energy X-ray Absorptiometry (DEXA, Medikors, Seongnam, Korea)를 이용하여 마우스 희생 전 체중, 체지방 함량, 근육량, 골밀도 등의 체성분을 비파괴적인 방법으로 측정함(그림 1).
- 약 5분간 진행되는 스캔작업의 안정적 수행을 위해 실험 동물에게 복강주사 마취(케타민 100 mg/kg BW + 자일라진 10 mg/kg BW)를 실시함.



그림 1. 실험동물 엑스선 체성분분석기, DEXA

2.1.3. 소화관 흡수능 분석

- 소화관 흡수능은 간접적으로 분변 중 지방량을 분석하여 측정 가능함.
- 마우스의 분변을 0, 2, 4, 6, 8주에 채취함.
- 1 g 분변에 Folch용액(chloroform:methanol=2:1)을 가해 일정시간 반응 후 여과함. 여과액을 원심분리 후 상층액을 제거하고 남은 여과액에 질소가스를 주어 유기용매를 날린 후 지방을 추출함. 추출된 지방의 무게를 측정하여 이를 분변의 무게로 나누어줌.

$$\text{faecal fat (\%)} = \{\text{faecal fat weight (g)} / \text{faeces weight (g)}\} \times 100$$

2.1.4. 혈중 공복 혈당, 중성지방, 총 콜레스테롤 분석

- 8주간 실험식이를 급여한 마우스에 6시간 금식 후 안와채혈을 실시함. 전혈은 상온에서 30분간 응고 후 원심분리(2,000 g, 15 min)를 통해 혈청(serum)을 분리하고 추후 분석까지 -80°C 에 보관함.
- 혈중 내 공복 혈당, 중성지방, 총 콜레스테롤은 분리된 혈청의 효소반응에 따른 분광광도계 측정법으로 상업용 키트(Wako Pure Chemical Industries, Japan)를 이용하여 측정함.

2.1.5. 혈중 소화관련 호르몬 분비 분석

- 가스트린은 위 말단에서 분비되는 호르몬으로 혈액으로 이동하며 위, 이자, 소장, 대장에서 위산 분비, 이자액 생산 촉진, 장 운동 촉진 등의 기능을 함.
- 펩타이드 YY (PYY)는 장관 내분비 세포에서 생성되며 위 배출 억제, 위산 분비 억제, 취장 기능 억제, 장 통과시간 지연 등의 기능을 함.
- 혈중 가스트린과 PYY는 6시간 금식을 가진 마우스의 혈청에서 측정하였으며, 상업용 키트 (Elabscience, USA)를 이용하여 효소면역측정법(ELISA)으로 측정함.

2.1.6. 췌장 소화효소 분비 분석

- 췌장 아밀라아제(amylase)는 침샘과 췌장에서 합성 및 분비되며 췌장액에 함유된 전분 소화효소로 전분을 맥아당, 말토트리오스, 올리고당 등 저분자 물질로 분해함. 이는 실험동물에서 분리한 일정량의 췌장 조직을 PBS에 혼합 및 분쇄한 후 원심분리하여 얻은 상층액(췌장 용해물)을 이용함. 췌장 용해물은 상업용 효소면역측정법 키트(Biovision, CA)를 이용하여 측정함.
- 췌장 프로테아제(Protease)는 췌장액에 함유된 소화효소로 단백질과 펩타이드 등의 펩타이드 결합을 가수분해하는 효소임. 이는 췌장 용해물을 이용하며 상업용 프로테아제 진단 키트(Biovision)을 이용하여 측정함.
- 췌장 라이페이스(Lipase)는 췌장에서 합성되어 췌장액에 함유되어 분비하는 지방 가수분해 효소로 중성지방을 지방산과 글리세롤로 가수분해하는 반응을 촉진시킴. 이는 췌장 용해물을 이용하며 상업용 효소면역측정법 키트(Elabscience)로 측정함.

2.1.7. 소장 내 운동 능력 관련 단백질 분석

- 세로토닌(5-HT; 5-hydroxytryptamine)는 위장관에서 분비되는 신경전달물질이며 수용체를 통해 위장관의 운동과 감각을 조절한다. 5-HT₄ 수용체(5HT₄R)는 위장관 전체에 분포하며 장 연동, 전해질 분비를 매개하는 역할을 함.
- 도파민(dopamine)은 신경전달물질로서 위장관 운동을 억제하는 역할하며 수용체를 통해

위장관 운동을 조절함. Dopamine-D₂ 수용체(D2DR)가 차단되면 도파민 작용을 막고 위 수축 항진을 통해 위장관 운동을 증진됨.

- 소장 내 운동 능력 관련 단백질 분석을 위해 실험동물의 소장 말단인 회장(ileum)을 채취하여 이용함.
- 일정량의 회장을 RIPA 완충액과 혼탕하여 조직 용해물(lysate)을 제조하고 Bradford법으로 단백질 농도를 측정한 후 Laemmli 완충액에 용해시킴. Bio-Rad의 mini-gel system으로 전기영동을 실시하고, 총 단백질을 PVDF 막으로 옮겨 1차 항체와 horseradish peroxidase (HRP)가 접합된 2차 항체를 이용하여 면역블로팅을 실시함. ImageLab 소프트웨어(Bio-Rad)로 단백질을 정량함. 사용된 항체는 5-HT₄ receptor (Abcam, UK), D2DR (Santa cruz, USA), GAPDH (Cell signaling, USA)를 이용함.

2.1.8. 통계분석

- 실험결과는 ANOVA를 이용하여 $p < 0.05$ 수준으로 유의성을 검정함. 대조군과 실험군의 비교를 위해 F-test 이후 Fisher's LSD 분석을 실시함.

2.2. 소비자 기호도 검사

2.2.1. 시료

2.2.1.1. 우동

- 동성식품에서 생산한 발효우동 면 1종과 시중에 유통되는 일반우동 면 1종을 사용하여 총 2종의 우동을 평가하였음 (표 2).
- 우동 육수는 동성식품에서 생산한 '프리미엄 사누끼 우동소스'를 사용하여 2종의 우동에 동일하게 적용하였음.

2.2.1.2 떡볶이

- 동성식품에서 생산한 떡볶이 떡 및 소스로 조리한 떡볶이를 평가하였음 (표 2).

우동			떡볶이	
우동 면		우동 소스	떡	소스
발효 우동	일반 우동		떡	소스
				
천연유산균을 첨가한 발효우동	CJ 사누끼 우동	프리미엄 사누끼우동소스	소담방아 쌀떡볶이	감동별미 떡볶이소스

표 2. Sample information

2.2.2. 시료의 준비 및 제시

2.2.2.1. 우동 조리

- 1.5L의 물을 끓인 후, 물이 끓기 시작하면 발효 및 일반 우동 면을 각 2개 (230g*2)씩 넣고 2분 동안 더 끓인 후 체로 건져내었음.
- 우동 육수는 소스 160g과 물 1760g을 섞어 4인분을 한꺼번에 조리하였으며, 10분 동안 끓였음.
- 시료는 면 60±2g과 우동 육수 100mL씩 소분하여 제공되었으며, 평가시간 동안 동일한 온도로 유지하기 위해 보온병 (Igloo Products Corp., 500mL)에 끓는 물 200mL을 넣고 10oz 종이컵 2장을 끼워 만든 개인용 hot water bath에 65±5°C 로 제공되었음.



그림 2. Preparation process of Udon samples

2.2.2.2. 떡볶이 조리

- 떡 300g을 100°C의 물에 5분 동안 불려 준비함.
- 떡 300g과 소스 400g을 2개의 냄비에 각각 계량하여 중불에서 6분 동안 끓인 후, 떡 5개 (약 40g)씩 소스와 함께 소분하여 제시하였음.



그림 159. Preparation process of Tteok-bok-ki samples

2.2.2.3. 시료 제시

- 감각적 피로도가 관능평가에 미치는 영향을 최소화하기 위해 먼저 우동 2종을 평가한 후 떡볶이를 평가하도록 하였음.

- 하나의 시료를 평가한 후 다음 시료를 평가하는 monadic sequence 방법을 사용하였음.
- 2종의 우동 시료는 William Latin square design에 따라 제시되고 난수표에서 추출한 세 자리 숫자로 표기하였음.
- 입가심 시료로 실온 ($22\pm 2^{\circ}\text{C}$)의 물을 제공하였음.

2.2.3. 검사 요원

2.2.3.1. 한국인 소비자

- 맛을 평가하는데 문제가 되지 않는 건강한 50명을 선발하였음 (남-22, 여-28).

2.2.3.2. 중국인 소비자

- 서울권 내 대학의 한국어학당, 국민대학교 중국인 유학생 community 등에 모집문을 게시하여, 한국에 거주하며 본국의 일반적인 소비자를 대표할 수 있는 중국인 소비자 34명을 선발하였음 (남-11, 여-23).

2.2.4. 평가 절차

- 시료에 대한 전반적인 기호도 및 외관, 향미, 조직감의 기호도를 9점 항목척도 (1-매우 싫다, 9-매우 좋다)로 평가하였음.
- 구매의향은 7점 항목척도(1-전혀 그렇지 않다, 9-매우 그렇다)로 평가하였음.
- 제품에 대한 좋은 점과 싫은 점을 주관식 응답으로 수집하였음.
- 5점 JAR 척도 (1-너무 약하다, 3-적당하다, 5-너무 강하다)를 이용하여 우동 및 떡볶이에서 느껴지는 특성의 적합강도를 평가하였음.
- 면과 국물의 조화도(우동) 및 떡과 소스의 조화도(떡볶이)는 5점 항목척도(1-매우 조화롭지 않다, 5-매우 조화롭다)로 평가하였음.
- 마지막으로 인구통계학적 요인(성별, 연령, 우동 및 떡볶이 섭취 관련 식습관, 등)을 평가하였음.
- 평가에 관련된 모든 내용 검사 요원에 따라 한국어 또는 중국어로 번역되어 제시되었음.



그림 160. Process of evaluation

2.2.5. 결과 분석

- T-검정

: 대응표본 t-검정을 실시하여 각 국적별 발효우동과 일반우동 간의 기호도, 구매의향, 조화도의 유의적인 차이를 분석하였음.

: 일표본 t-검정을 실시하여 JAR 척도의 3점 (적당하다)과 유의적인 차이를 분석하였음.

: SPSS (ver. 23.0, IBM Corp., Armonk, NY, USA) ($p < 0.05$)를 이용하여 분석하였음.

3. 연구수행 내용 및 결과

3.1. 동물실험

3.1.1. 소화 장애 유도

- 순화기간 이후 UT군을 제외한 모든 실험군에게 1주일간 5% Dextran Sulfate Sodium (DSS) 음수를 통해 마우스의 소화장애를 유도함.
- 소화장애 유무를 판단하기 위해 매일 체중 측정과 분변을 채취하여 관찰함. DSS급여군은 4일째부터 체중감소가 나타났으며 7일 후 약 20%의 체중 감소율을 나타냄(그림 5). 또한 DSS급여군은 분변 중 혈액이 관찰됨(그림 6). 따라서 DSS에 의한 소화장애가 정상적으로 유도됨.

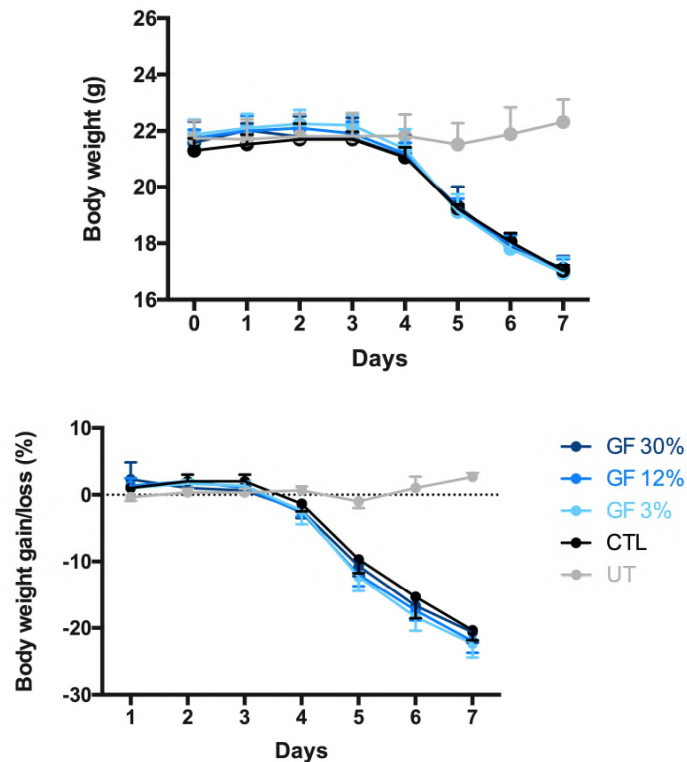


그림 5. 소화장애 유도 마우스의 체중 및 체중 손실률



Bloody mice stools
(7 days 5% DSS)



Stools for untreated mice

그림 6. 소화장애 유도 마우스의 분변

3.1.2. 성장인자 분석

3.1.2.1 체중

- 체중은 매주 일정시간에 8주간 측정함(그림 7). 0주차(실험시작)에 소화장애 유도 마우스와 정상 마우스의 체중 차이가 있었으나 실험기간 동안 소화장애 유도 마우스의 체중이 회복 되는 경향을 보임. 8주차에 음성대조군과 글루텐-프리 밀가루 급여군들 간 유의적인 체중 차이는 나타나지 않음.

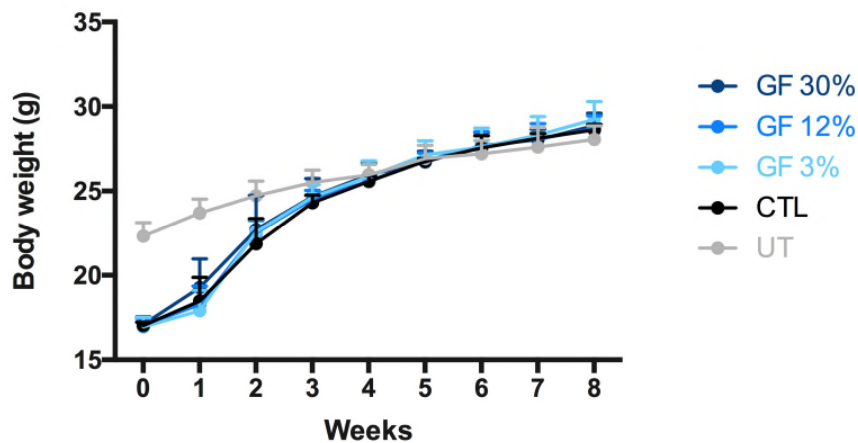


그림 7. 글루텐-프리 밀가루를 급여한 마우스의 체중

3.1.2.2 사료 섭취량

- 매주 일정시간에 8주간 사료 섭취량을 측정함(그림 8). 사료 섭취량은 8주까지 모든 실험군 간 유의적인 차이가 나타나지 않음. 이는 체중 변화에 사료 섭취량이 영향을 미치지 않음.

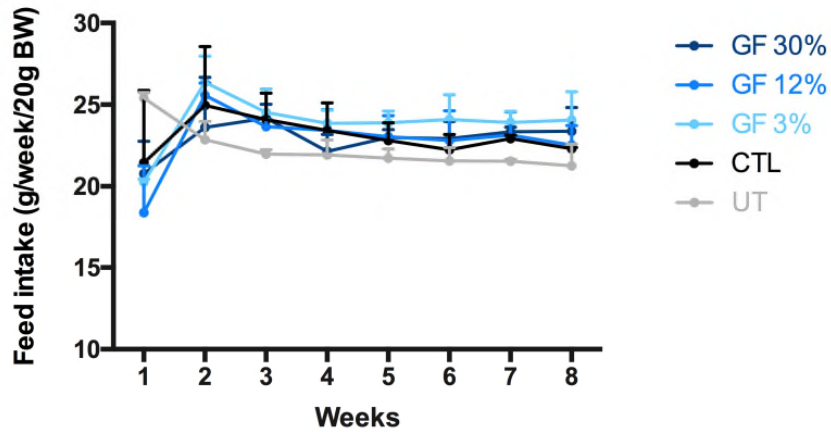
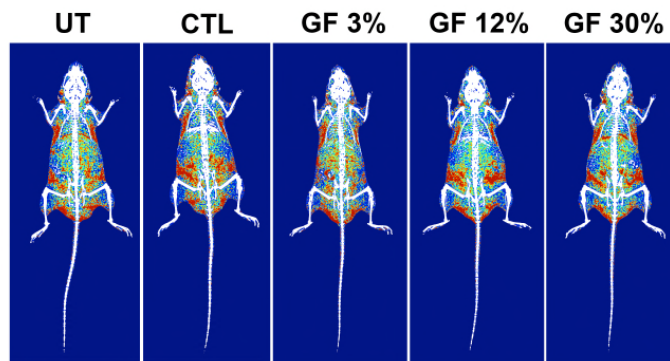


그림 8. 글루텐-프리 밀가루를 급여한 마우스의 사료 섭취량

3.1.3. 체성분 분석

- 글루텐-프리 밀가루를 급여한 마우스의 희생 직전 DEXA 기기를 이용하여 체지방과 제지방 등 체성분을 비파괴적으로 분석함(그림 9).
- 체지방률은 모든 실험군에서 유의적인 차이가 나타나지 않음. 제지방량은 지방을 제외한 나머지 근육 및 수분 등을 포함하는 무게로 모든 실험군들 간 유의적인 차이가 나타나지 않음.
- 이는 글루텐-프리 밀가루가 체지방 축적 또는 억제에 영향을 미치지 않음.



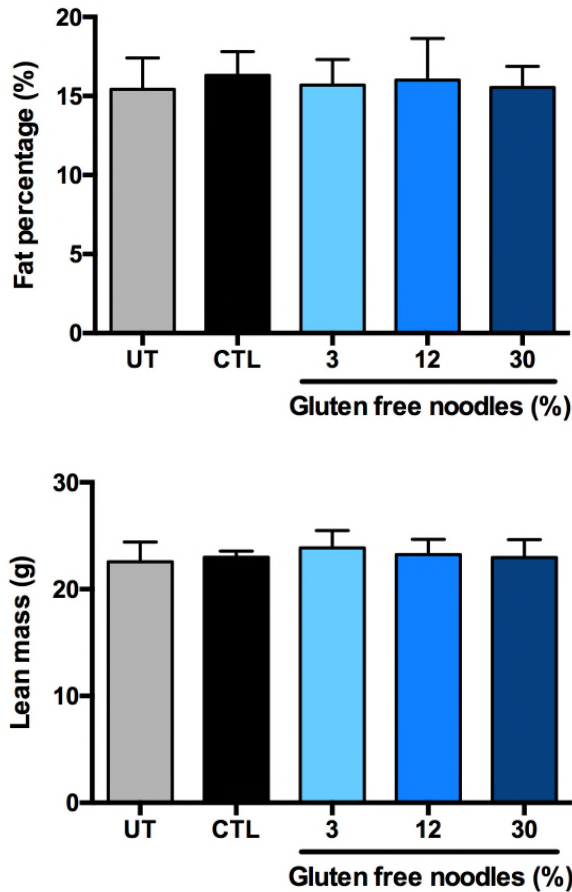


그림 9. 글루텐-프리 밀가루를 급여한 마우스의 체지방률과 제지방량

3.1.4. 소화관 흡수능 분석

- 소화관 흡수능은 간접적으로 분변 내 지방률을 통해 알 수 있음. 식이지방의 대부분은 소장 에서 소화, 흡수가 이루어지며 대장과 배설물에는 소량이 남음. 배설된 지방의 증가는 소장의 지방 소화 및 흡수의 불량을 의미할 수 있음.
- 0, 2, 4, 6, 8 주차에 분변을 채취하여 분변 내 총 지방률을 측정하였을 때, 음성대조군과 실험군 간 유의적인 차이가 나타나지 않음(그림 10).
- 이는 글루텐-프리 밀가루의 급여에 따른 마우스 소장에서 지방 흡수 능력 개선 효능이 없음.

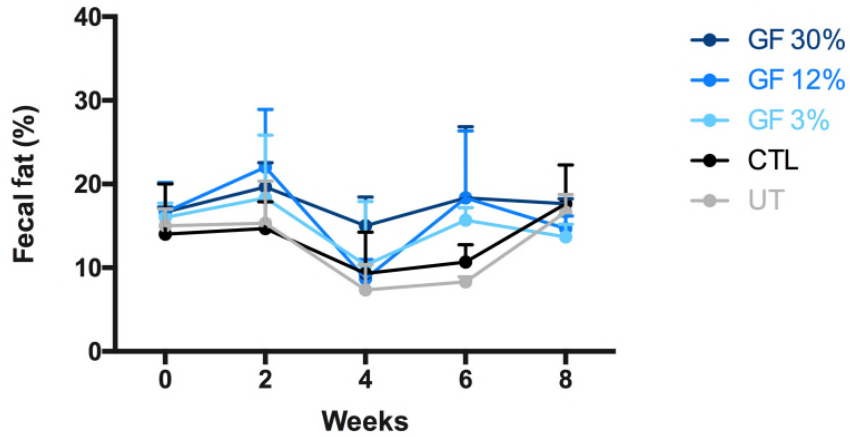


그림 10. 글루텐-프리 밀가루 급여에 따른 분변 내 총 지방률

3.1.5. 혈중 공복 혈당, 중성지방, 콜레스테롤 분석

- 혈중 공복 혈당은 단시간의 혈당 변화를 나타내는 지표로 8주간 실험식이 급여를 한 마우스를 6시간 금식 후 채혈한 혈액에서 측정함(그림 11). 음성대조군은 215.2 ± 29.31 mg/dL의 공복 혈당치를 나타내었으며, 글루텐-프리 밀가루 중농도는 264.1 ± 28.47 mg/dL을 나타내어 음성대조군 대비 23% 증가함($p < 0.01$).
- 혈중 중성지방 측정 결과, 글루텐-프리 밀가루 중농도는 34.38 ± 6.2 mg/dL로 음성대조군의 42.32 ± 7.85 mg/dL 대비 19% 감소하였으나 유의적인 차이는 없음($p = 0.08$)(그림 12).
- 혈중 총 콜레스테롤 측정 결과, 음성대조군은 92.5 ± 25.89 mg/dL을 나타냈으며, 글루텐-프리 밀가루 중농도는 117.3 ± 24.31 mg/dL, 고농도는 123.5 ± 19 mg/dL를 나타내어 각각 27, 34% 증가를 보임(각각 $p < 0.05$, $p < 0.01$)(그림 13).

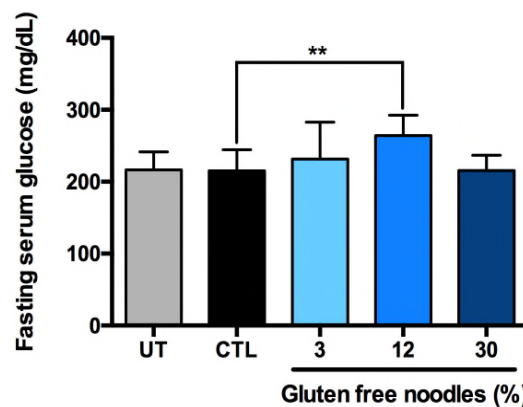


그림 11. 글루텐-프리 밀가루 급여에 따른 혈중 공복 혈당 (** $p < 0.01$)

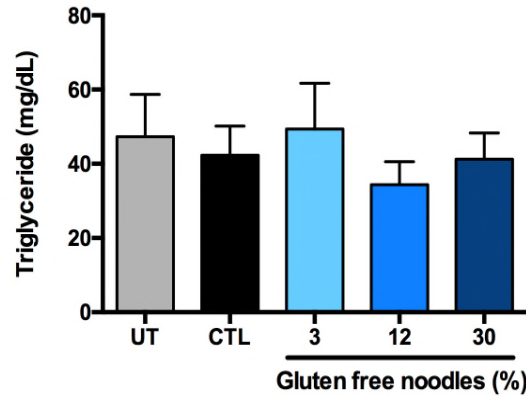


그림 12. 글루텐-프리 밀가루 급여에 따른 혈중 중성지방

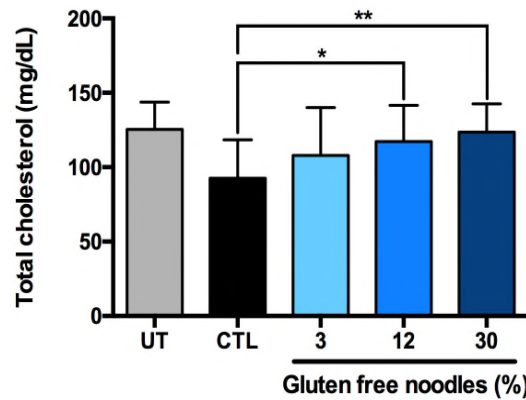


그림 13. 글루텐-프리 밀가루 급여에 따른 혈중 총 콜레스테롤
(* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$)

3.1.6. 혈중 소화관련 호르몬 분석

3.1.6.1 혈중 가스트린

- 혈중 가스트린을 상업용 진단 키트를 사용하여 측정함(그림 14). 가스트린은 위전정부 G 세포에서 분비되는 호르몬으로서 위액 분비를 촉진시키고, 위장 운동에 도움을 줌.
- 측정 결과, 음성대조군은 37.33 ± 9.06 pg/mL, 글루텐-프리 밀가루 고농도는 59.64 ± 18.48 pg/mL를 나타내어 음성대조군 대비 글루텐-프리 밀가루 고농도에서 60% 증가함($p < 0.01$). 이는 글루텐-프리 밀가루급여는 가스트린 분비를 촉진하여 위장 소화 개선에 도움을 줄 수 있을 것으로 판단됨.

3.1.6.2 혈중 펩타이드 YY 호르몬

- 펩타이드 YY는 말단 회장, 대장, 직장의 L형 내분비 세포에서 생성되는 펩타이드로서 혈액 내에서 PYY1-36과 PYY3-36의 두 가지 형태로 존재함. PYY1-36은 담낭수축을 억제하며, PYY3-36은 위 배출 억제, 위산 분비 억제, 췌장의 분비 기능 억제, 장 통과시간 지연 등의

역할을 함.

- 혈중 펩타이드 YY은 음성대조군이 37.33 ± 9.06 pg/mL로 측정되었으며, 글루텐-프리 밀가루 급여군과 유의적인 차이 없음(그림 15). 이는 혈중 펩타이드 YY 호르몬에 의한 소화 개선 효과가 없음.

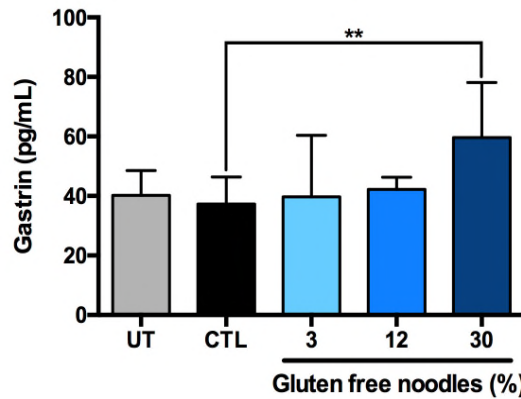


그림 14. 글루텐-프리 밀가루 급여에 따른 혈중 가스트린 (** $p < 0.01$)

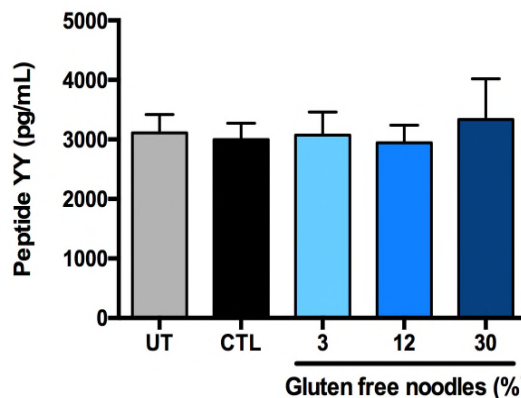


그림 15. 글루텐-프리 밀가루 급여에 따른 혈중 펩타이드 YY

3.1.7. 췌장 소화효소 분비 분석

3.1.7.1 췌장 아밀라아제

- 아밀라아제는 다당류의 글리코시드 결합을 가수분해하는 효소로서 활성이 증가하면 소화에 도움을 줄 수 있음. 췌장 조직을 분해하여 췌장 아밀라아제를 측정된 결과, 음성대조군은 0 ± 0.0005 mU/mL을 나타냄. 글루텐-프리 밀가루 저농도 급여군 0.004 ± 0.001 mU/mL, 중농도 급여군은 0.005 ± 0.002 mU/mL, 고농도 급여군은 0.008 ± 0.002 mU/mL을 나타내어 각각 40, 50, 80% 유의적으로 증가함. 이는 글루텐-프리 밀가루에 의해 췌장 당분해효소의 활성이 증가됨(모두 $p < 0.001$)(그림 16).

3.1.7.2 췌장 프로테아제

- 프로테아제는 단백질과 펩타이드 등의 펩타이드 결합을 가수분해하는 효소로서 활성이 증가하면 단백질 소화 증진을 기대할 수 있음. 췌장 조직을 분해하여 췌장 프로테아제를 측정 한 결과, 글루텐-프리 밀가루 급여에 따른 췌장 프로테아제 활성이 나타나지 않음(그림 17).

3.1.7.3 췌장 리파아제

- 리파아제는 주로 췌장에서 합성되어 중성지방을 지방산과 글리세롤로 가수분해하는 효소로서 활성이 증가하면 지방 소화가 증진됨. 췌장 조직을 분해하여 췌장 리파아제를 측정한 결과, 글루텐-프리 밀가루 급여에 따른 췌장 리파아제의 활성이 나타나지 않음(그림 18).

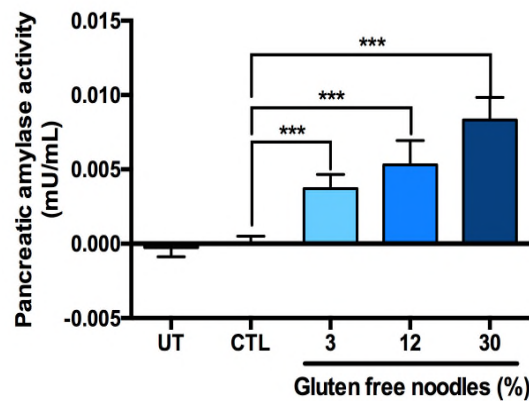


그림 16. 글루텐-프리 밀가루 급여에 따른 췌장 아밀라아제 (***)
(***) $p < 0.001$)

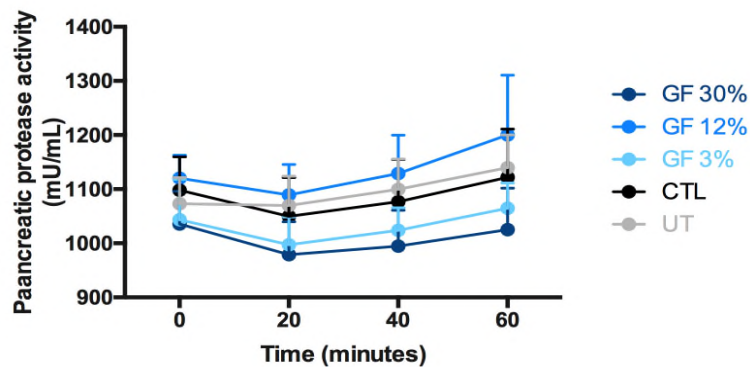


그림 17. 글루텐-프리 밀가루 급여에 따른 췌장 프로테아제

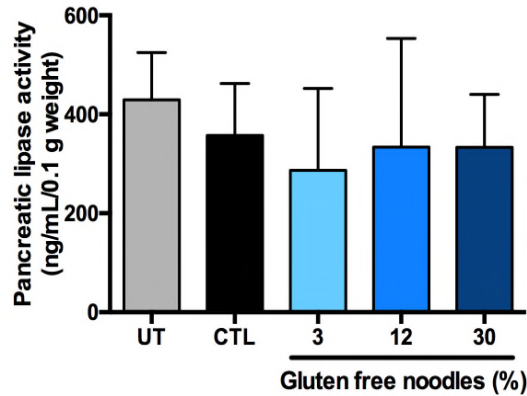
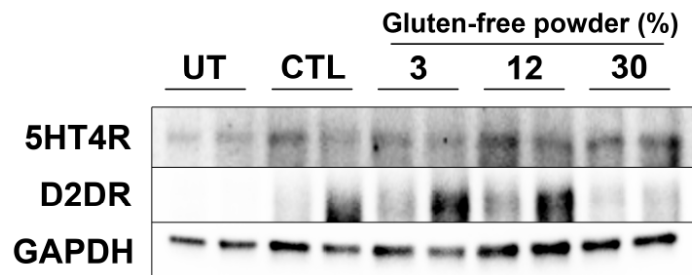


그림 18. 글루텐-프리 밀가루 급여에 따른 췌장 리파아제

3.1.8. 소장 내 운동 능력 관련 단백질 분석

- 5-HT₄ 수용체(5HT₄R)는 위장관에서 세로토닌 수용체로 작용하며 장 연동, 내장 구심성 감각을 매개하는 역할을 함. 5HT₄R 발현이 증가하면 위장관 운동의 증진에 도움을 줌. Dopamine-D₂ 수용체(D2DR)는 위장관에서 도파민 수용체로 작용하며 도파민은 위장관 운동을 억제하는 역할을 함. D2DR 발현이 감소하면 도파민의 작용을 막아 위장관 운동을 증진시킬 수 있음.
- 소장 말단인 회장에서 단백질을 추출하여 Immunoblotting을 통하여 5HT₄R과 D2DR의 발현을 확인함(그림 19). 측정 결과, 두 단백질 모두 글루텐-프리 밀가루 급여에 따른 유의적인 차이가 나타나지 않음. 이는 글루텐-프리 밀가루는 소장 내 운동에 영향을 주지 않음.



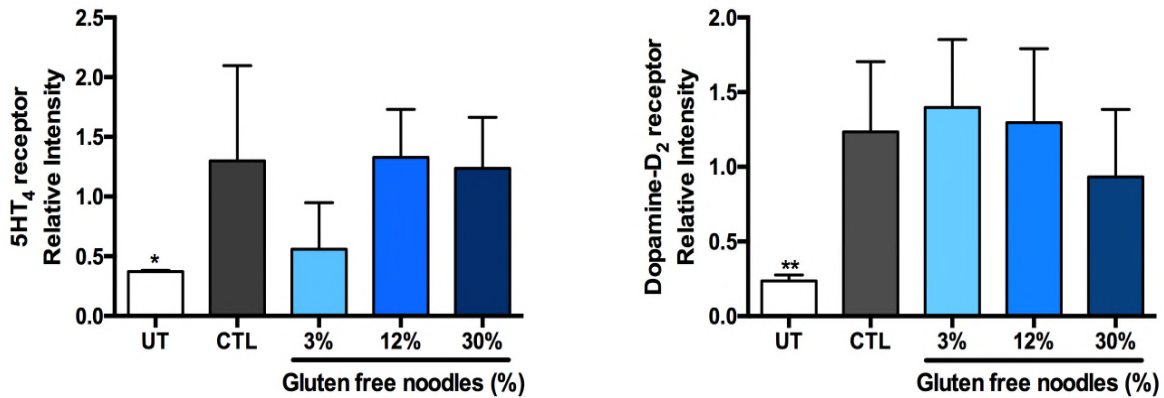


그림 19. 소장 내 운동 능력 관련 인자

3.2. 소비자 기호도 검사

3.2.1 한국인 소비자 기호도 검사

3.2.1.1 한국인 소비자 demographics

- 50명의 한국인 소비자에 대한 정보는 표 3과 같음.
- 소비자 중 남성은 44%, 여성 56%이었으며, 모두 20대의 학생 소비자를 대상으로 조사를 실시하였음.
- 연 가계 소득은 3000만원 이상-4000만원 미만, 4000만원 이상인 사람이 28%로 가장 높게 나타났으며, 1000만원 미만인 사람은 20%로 나타남.
- 우동 섭취 빈도는 한 달에 한 번 이상 먹는 사람이 40%로 가장 높게 나타났으며, 일주일에 한 번 이상 먹는 사람은 36%로, 전체 소비자 중 우동의 섭취 빈도가 그리 적지 않은 것으로 나타남.
- 우동을 섭취하는 장소로는 식당이 56%로 가장 높게 나타났으며, 편의점, 집에서 직접 조리, 고속도로 휴게소에서 주로 섭취한다고 응답한 사람들의 비율이 비슷하게 나타났음.
- 주로 섭취하는 우동의 형태로는 조리된 우동 형태로 섭취하는 사람이 72%로 대부분을 차지하였으며, 끓여먹는 봉지 형태의 인스턴트가 18%, 용기 형태의 인스턴트가 10%로 나타났다.
- 떡볶이의 섭취 빈도는 한 달에 한 번 이상 먹는 사람이 60%로 가장 높게 나타났으며, 일주일에 한 번 이상 먹는 소비자는 22%로 그 다음으로 많은 응답수를 나타냄.
- 떡볶이를 주로 섭취하는 장소에 대해서는 우동과 마찬가지로 식당이 78%로 가장 높게 나타났으며, 포장마차 형태의 길거리 가게에서 종종 판매하는 떡볶이의 특성 상, 길거리라고 응답한 사람이 16%로 그 다음으로 높게 나타남.
- 주로 섭취하는 떡볶이의 형태로는 조리된 떡볶이가 94%로, 거의 대부분의 소비자가 조리된 형태의 떡볶이를 섭취하는 것으로 나타났으며, 봉지 및 용기 형태의 인스턴트를 섭취하는

소비자는 1-2명으로 나타남.

Classification		Percent (%)
Gender	Male	44.0
	Female	56.0
Age	19-29	100.0
Occupation	Student	100.0
Household income	Under 10 million won	20.0
	10-20 million won	8.0
	20-30 million won	16.0
	30-40 million won	28.0
	Over 40 million won	28.0
Frequency of Udon intake	Every day	2.0
	More than once a month	36.0
	More than once a 2-3 months	40.0
	More than once a 6 months	14.0
	Rarely	8.0
Place where consumers intake Udon	Restaurant	56.0
	Convenience store	12.0
	Home	14.0
	Expressway rest area	10.0
	Street vendor	6.0
	Others	2.0
Type of udon consumed	cooked Udon	72.0
	ready-to-cook; packed in plastic	18.0
	ready-to-eat: cup type	10.0
Frequency of Tteok-bok-ki intake	More than once a week	22.0
	More than once a month	60.0
	More than once a 2-3 months	10.0
	More than once a 6 months	8.0
Place where consumers intake Tteok-bok-ki	Restaurant	78.0
	Convenience store	2.0
	Home	2.0
	Street vendor	16.0
	Others	2.0
Type of Tteok-bok-ki consumed	cooked Tteok-bok-ki	94.0
	ready-to-cook; packed in plastic	4.0
	ready-to-eat; cup type	2.0

표 3. Korean consumer demographic profile and food habits related Udon and Tteok-bok-ki

3.2.1.2 전반적인 기호도 및 구매의향

- 전반적으로 발효우동이 일반우동보다 기호도 점수가 높게 나타남.
- 외관 기호도를 제외한 전반적($T_{49,0.05}=-4.789$, $p<0.001$), 전체적인 맛($T_{49,0.05}=-2.553$,

p=0.014), 면의 조직감($T_{49,0.05}=-3.763$, $p<0.001$) 기호도에서 발효우동의 기호도가 일반우동보다 유의적으로 높게 나타남 (그림 20).

- 구매의향($T_{49,0.05}=-4.874$, $p<0.001$) 및 면과 국물의 조화도($T_{49,0.05}=-2.682$, $p=0.01$)도 발효우동이 일반우동보다 유의적으로 높은 점수를 보임 (그림 21).
- 떡볶이의 평균 기호도, 구매의향, 떡과 소스의 조화도는 모든 항목에서 각 척도의 중앙값 이상으로 높게 나타남 (그림 20, 21).

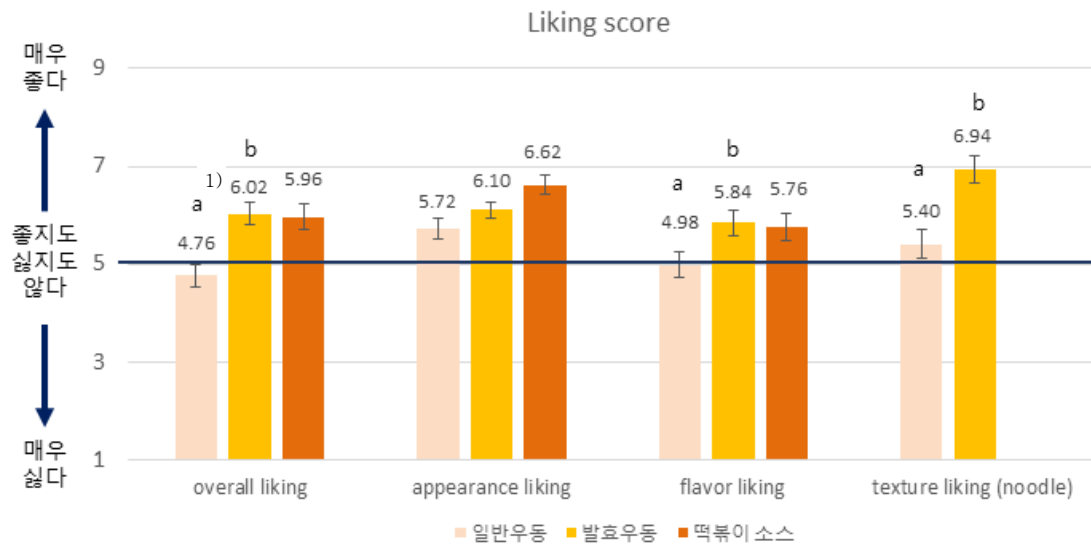


그림 20. Mean values of Korean consumers' overall, appearance, flavor, and texture liking scores for 2 Udots and Tteok-bok-ki 1) Different alphabet letters indicate significant difference between Udots ($p<0.05$)

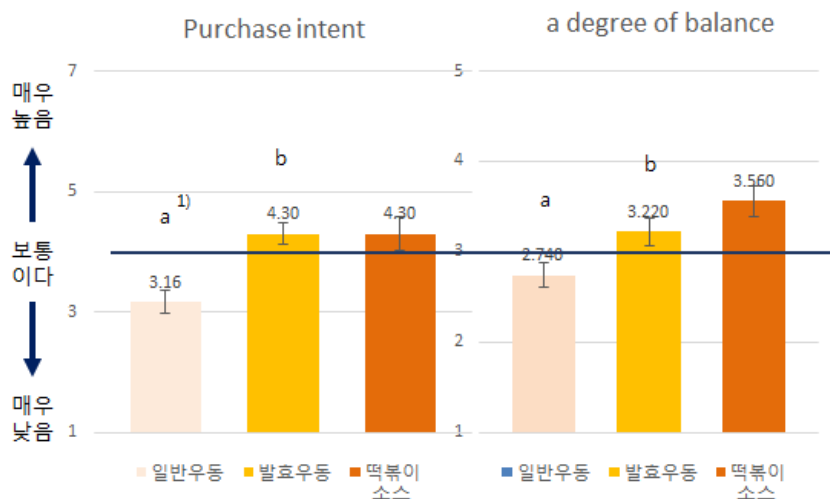


그림 21. Mean value of Korean consumers' purchase intent and a degree of balance between soup/sauce and noodle for 2 Udots and Tteok-bok-ki 1) Different alphabet letters indicate significant difference between Udots ($p<0.05$)

3.2.1.3 적합강도 (JAR) 평가

- 국물의 ‘단맛’은 발효우동($T_{49,0.05}=-2.759$, $p=0.008$)과 일반우동($T_{49,0.05}=-2.621$, $p=0.012$) 모두에서 적당하다는 3점과 유의적인 차이를 보여 단맛이 약간 부족하다고 평가됨 (그림 22A).
- 발효우동은 면의 ‘매끄러운 정도’($T_{49,0.05}=3.500$, $p=0.001$)와 ‘쫄깃한 정도’($T_{49,0.05}=2.201$, $p=0.032$)가 3점보다 유의적으로 높게 나타남. 즉, 소비자들은 발효우동면이 적당한 수준보다 약간 지나치게 매끄럽고 쫄깃하다고 판단함. 그러나 발효우동면의 기호도 점수가 일반 우동면의 기호도 점수보다 높은 것을 보아, 이러한 차이가 수용 가능한 정도인 것으로 판단됨.
- 일반우동은 국물의 ‘짠맛’($T_{49,0.05}=3.055$, $p=0.004$)이 3점보다 유의적으로 높게 나타남. 동일한 우동 소스를 사용하여 조리하였음에도 짠맛에 대한 적합강도에 차이를 보이는 것은 면 자체의 나트륨 함량에 따른 차이 (면 1개(230g)당 나트륨 함량: 발효우동-30mg, 일반우동-270mg)로, 상대적으로 나트륨 함량이 높은 일반우동 면에서 더 많은 나트륨이 국물로 우려나왔을 것으로 판단됨.
- 떡볶이는 ‘짠맛’($T_{49,0.05}=3.645$, $p=0.001$)과 ‘단맛’($T_{49,0.05}=2.585$, $p=0.013$)이 3점보다 유의적으로 높게 평가되어 떡볶이 소스의 단맛과 짠맛이 약간 강한 것으로 나타남 (그림 22B).

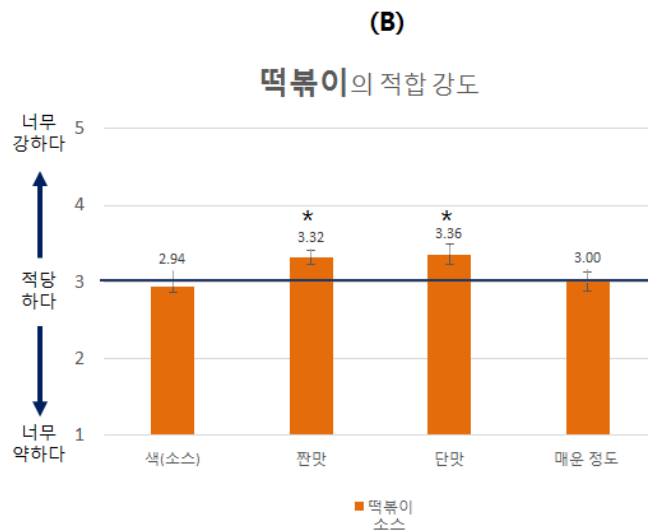
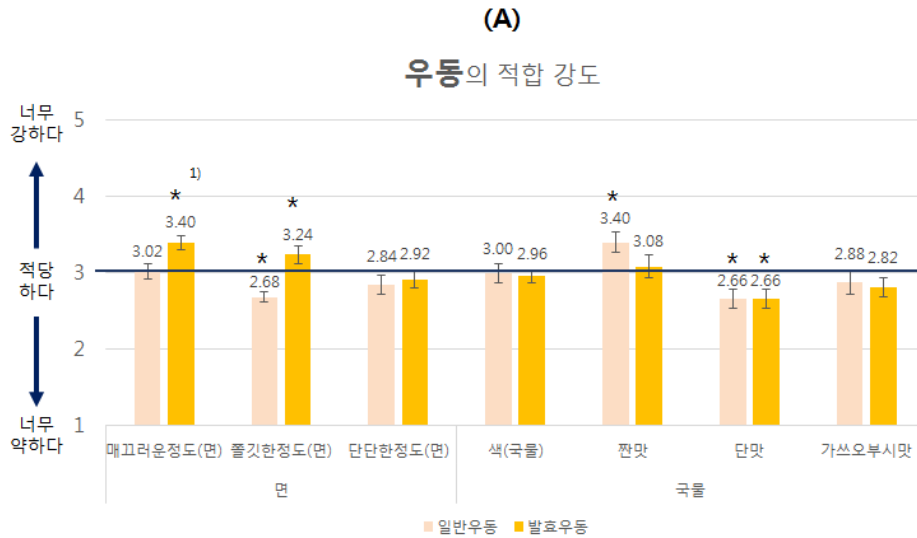


그림 22. Mean rating of JAR attributes of (A) Udon samples and (B) a Tteok-bok-ki sample by Korean consumers 1) * indicate significant difference with 3 (Just-about-right point)

3.2.1.4 주관식 응답

- 우동 및 떡볶이를 먹고 난 뒤, 제품에 대하여 좋은 점, 싫은 점을 주관식 응답으로 수집 하였음 (표 4).
- 발효우동의 좋은 점으로 ‘쫄깃한 면’이 가장 많이 언급되었고 ‘탄력 있는 면’도 언급됨. 일반우동에서도 면의 조직감과 관련된 특성으로 좋은 점에서 ‘쫄깃한 면’이, 싫은 점에서 쫄깃하지 않은 면이 언급됨. 이에 따라 우동의 기호 유발 요인으로 면의 조직감에 대한 감각적 특성이 중요할 것이라 판단됨. 응답수와 JAR 특성 분석 결과를 고려할 때 일반우동에서 더 쫄깃한 면의 조직감이 요구됨.
- 발효우동 및 일반우동은 개인의 기호 차이에 의해 ‘짠맛’을 선호하는 소비자와 그렇지 않

은 소비자로 구분되었음. 그러나 발효우동의 싫은 점으로는 ‘짠맛 약간 강함’ 과 ‘약간 싱거움’이, 일반우동의 싫은 점으로 ‘짠맛 너무 강함’을 언급되어 두 가지 우동시료에 대한 차이를 보임. 이는 다른 두 종류 면의 나트륨 함량에 따른 차이로 보이며, 일반우동이 발효우동과 비교하여 면 자체에 짠맛이 더 강했음.

- 일반우동의 싫은 점으로는 ‘밀가루 맛’이 가장 많이 언급되어 이를 개선할 필요가 있음.
- 떡볶이는 ‘매운맛’과 ‘단맛’의 특성이 가장 많이 언급되었음. ‘단맛’과 ‘매운맛’ 에 대하여 각 특성을 좋아하는 소비자와 그렇지 않은 소비자로 구분되었으나, 단맛과 매운맛 특성에 대하여 적당하다는 응답이 상대적으로 더 많음.

Product	Things that are liked	Things that are disliked
Fermented noodle Udon	- 쫄깃한 면 (19) ¹⁾	- 짠맛 약간 강함 (8)
	- 간이 적당함 (9)	- 깊은 맛이 없음 (8)
	- 탄력 있는 면 (6)	- 약간 싱거움 (5)
	- 육수의 맛이 좋음 (5)	- 얇은 면 (5)
Normal Udon	- 쫄깃한 면 (9)	- 밀가루 맛 (17)
	- 간이 적당함 (8)	- 짠맛 너무 강함 (9)
		- 면과 육수의 부조화 (7)
		- 쫄깃하지 않은 면 (6)
Tteok-bok-ki	- 매운맛 적당함 (26)	- 케찹 맛 (7)
	- 단맛 적당함 (14)	- 짠맛 약간 강함 (7)
	- 쫄깃한 떡 (13)	- 신맛 약간 강함 (7)
	- 떡의 식감이 좋음 (5)	- 단맛 매우 강함 (7)
		- 매운맛 약간 강함 (6)
	- 단단한 떡 (6)	

¹⁾The numbers in parentheses indicate response number

표 4. Comments about things that are liked/disliked by Korean consumers

3.2.2 중국인 소비자 기호도 검사

3.2.2.1 중국인 소비자 demographics

- 34명의 중국인 소비자에 대한 정보는 표 5 과 같음.
- 소비자 중 남성은 32.4%, 여성 67.6%이었으며, 모두 20대의 학생 소비자를 대상으로 조사를 실시하였음.
- 연 가계 소득은 2000만원 이상-3000만원 미만인 사람이 47.1%로 가장 높게 나타났으며, 4000만원 이상인 사람이 20.6%로 그 다음으로 높게 나타남.
- 조사에 응한 중국인 소비자들은 모두 우동을 한 번씩은 섭취해 본 경험이 있었으며, 우동 섭취 빈도는 한 달에 1번, 혹은 2-3달에 1번 먹는다는 사람이 각 29.4%로 가장 많았

음. 1주일에 1번 이상 먹는 중국인 소비자도 17.6%로 나타남.

- 우동을 섭취하는 장소로는 식당이 58.8%로 가장 높게 나타났으며, 길거리, 편의점이 그 다음으로 많은 응답수를 나타냄.
- 주로 섭취하는 우동의 형태로는 조리된 우동 형태로 섭취하는 사람이 73.5%로 절반 이상이 조리된 우동을 섭취하는 것으로 나타났으며, 끓여먹는 봉지형 인스턴트 형태로 섭취하는 소비자가 20.6%, 용기 형태의 인스턴트 형태로 섭취하는 소비자가 5.9%로 나타남.
- 전체 소비자 34명 중 1명의 소비자는 떡볶이를 한 번도 섭취해 본 적이 없는 소비자로, 본 실험에서 처음 떡볶이를 접해 봄으로 나타남.
- 떡볶이 섭취 경험이 있는 소비자 대상 조사 결과 떡볶이 섭취 빈도는 한 달에 한 번 이상 먹는 사람이 33.3%로 가장 높게 나타났으며, 일주일에 한 번 이상 먹는 소비자는 24.2%로 그 다음으로 많은 응답수를 나타냄.
- 떡볶이를 주로 섭취하는 장소에 대해서는 한국인 소비자와는 다르게 길거리가 84.8%로 압도적인 응답률을 나타내었음. 중국인 소비자 중 15.2%만이 주로 떡볶이를 식당에서 섭취한다고 응답하였음.
- 주로 섭취하는 떡볶이의 형태로는 조리된 떡볶이가 94%로, 거의 대부분의 소비자가 조리된 형태의 떡볶이를 섭취하는 것으로 나타났으며, 봉지 및 용기 인스턴트 형태의 떡볶이를 섭취하는 소비자는 항목별로 각 1명씩 나타남.

Classification		Percent (%)
Gender	Male	32.4
	Female	67.6
Age	19-29	100.0
Occupation	Student	100.0
Household income	Under 10 million won	2.9
	10-20 million won	17.6
	20-30 million won	47.1
	30-40 million won	11.8
	Over 40 million won	20.6
Frequency of Udon intake	More than once a week	17.6
	More than once a month	29.4
	More than once a 2-3months	29.4
	More than once a 6months	11.8
	More than once a year	5.9
	Rarely	5.9
Place where consumers intake Udon	Restaurant	58.8
	Convenience store	11.8
	Home	5.9
	Expressway rest area	5.9
	Road	14.7
	Others	2.9
Type of udon consumed	cooked Udon	73.5
	plastic package	20.6
	container package	5.9
Tteok-bok-ki intake experience	yes	97.06
	no	2.94
Frequency of Tteok-bok-ki intake	More than once a week	24.2
	More than once a month	33.3
	More than once a 2-3months	18.2
	More than once a 6months	9.1
	More than once a year	3.0
	Rarely	12.1
Place where consumers intake Tteok-bok-ki	Restaurant	15.2
	Road	84.8
Type of Tteok-bok-ki consumed	cooked Tteok-bok-ki	94.0
	plastic package	3.0
	container package	3.0

표 5. Chinese consumer demographic profile and food habits related Udon and Tteok-bok-ki

3.2.2.2 전반적인 기호도

- 우동의 전반적, 외관, 향미, 면의 조직감의 기호도는 중앙값(5점) 이상으로 높게 나타났으나, 모든 항목에서 발효우동과 일반우동의 유의적 차이는 나타나지 않음 (그림 23).
- 구매의향 및 면과 국물의 조화도에서도 발효우동과 일반우동의 유의적 차이는 나타나지 않음 (그림 24).

- 떡볶이의 평균 기호도 및 구매의향, 떡과 소스의 조화도도 각각의 중앙값 이상으로 높은 값을 보임 (그림 23, 24).

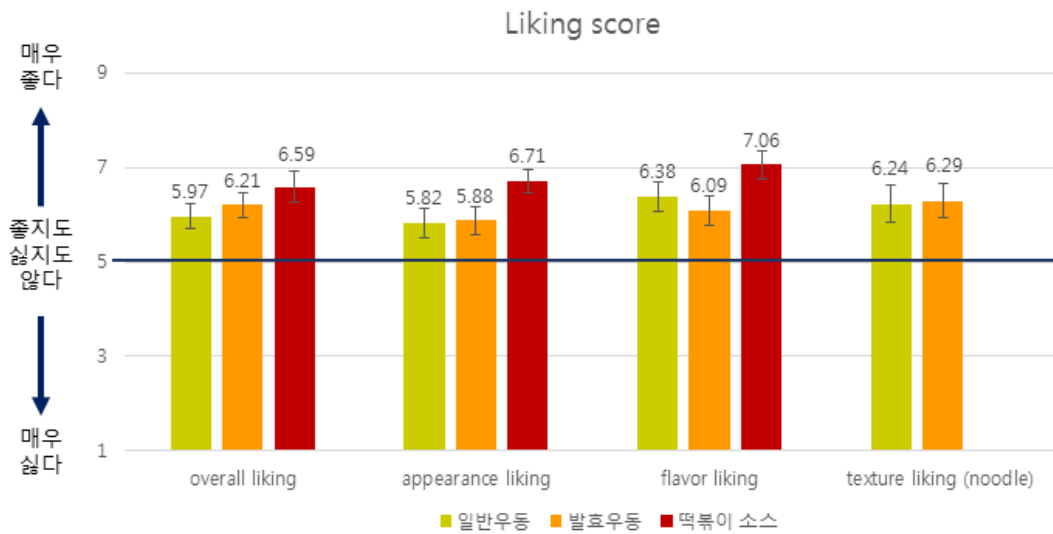


그림 23. Mean value of Chinese consumers' overall, appearance, flavor and texture liking scores for 2 Udons and Tteok-bok-ki

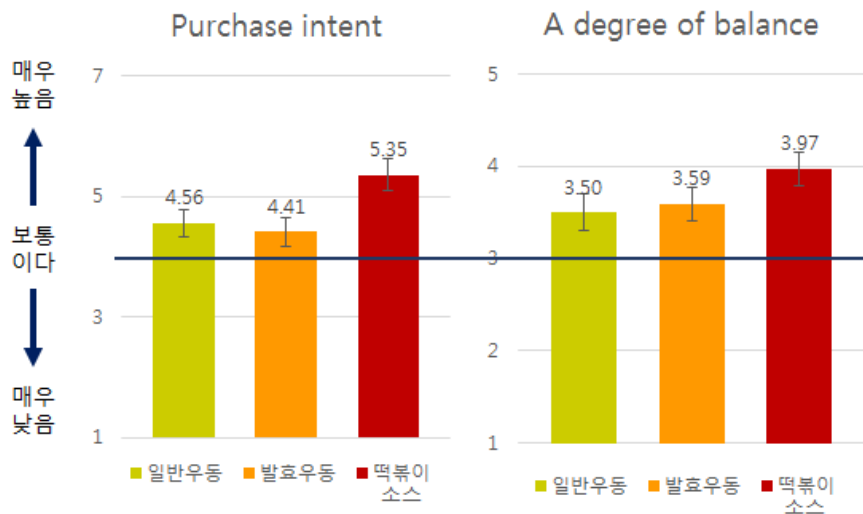


그림 24. Mean value of Chinese consumers' purchase intent and a degree of balance between soup/sauce and noodle for 2 Udons and Tteok-bok-ki

3.2.2.3 적합강도 (JAR) 평가

- 발효우동은 ‘단맛’을 제외한 특성에 대하여 3점과 유의적인 차이가 없어 각 특성의 적합강도가 적당하다고 평가됨 (그림 25A).
- 국물의 ‘단맛’은 발효우동과 일반우동 모두에서 3점보다 낮게 나타나 단맛이 부족하다고 평가됨. ‘단맛’ 특성은 한국과 중국 소비자 모두에게 약간 부족하다고 평가됨 (그림 22A, 그림 25A).

- 일반우동은 국물의 ‘가쓰오부시맛’이 3점보다 유의적으로 높게 나타나 가쓰오부시 향미가 조금 강하다고 평가됨 (그림 25A).
- 떡볶이는 ‘소스의 색’이 3점보다 유의적으로 낮게 평가되어 적당하다는 3점보다 유의적으로 조금 밝다고 평가됨 (1-너무 밝다, 3-적당하다, 5-너무 어둡다) (그림 25B).
- 떡볶이의 ‘매운 정도’는 3점보다 유의적으로 높게 나타남. 한국 소비자는 ‘매운 정도’를 적당하다고 평가했으나, 중국 소비자는 ‘매운 정도’를 너무 강하다고 평가하여 국가 간 평가 경향에 차이를 보임 (그림 22B, 그림 25B).

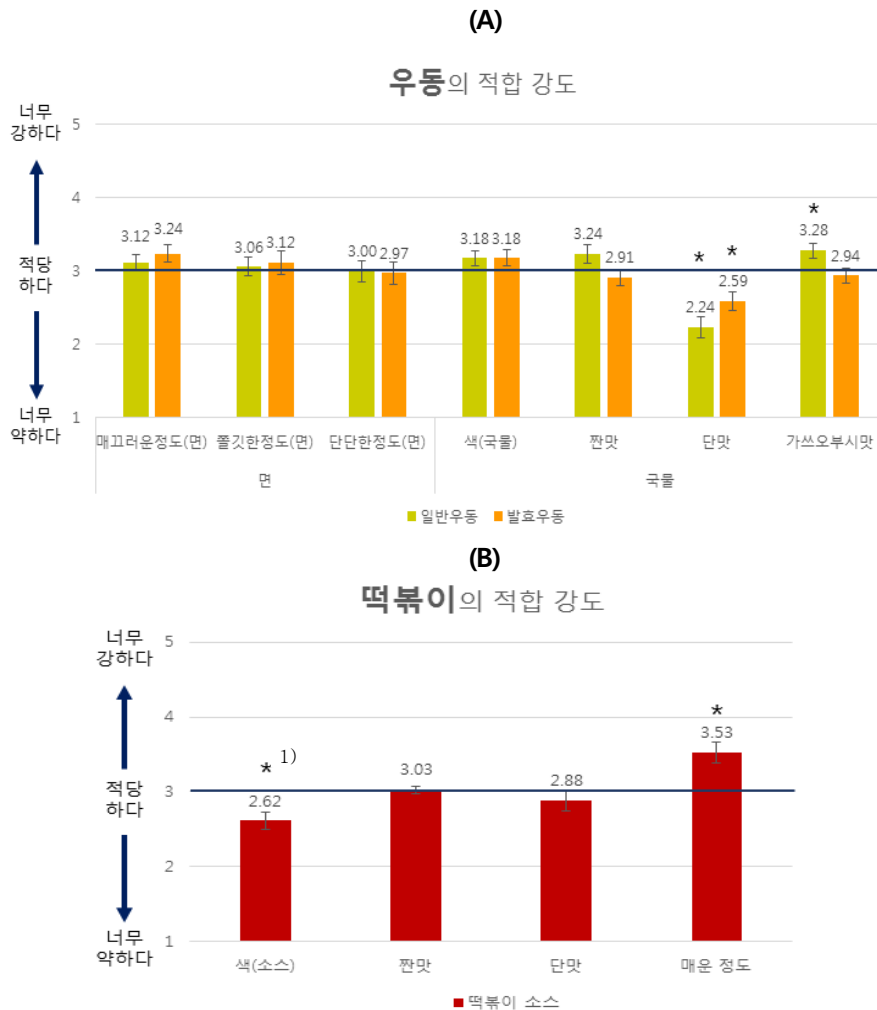


그림 25. Mean rating of JAR attributes of (A) Udon samples and (B) a Tteok-bok-ki sample by Chinese consumers 1) * indicate significant difference with 3 (Just-about-right point)

3.2.2.4 주관식 응답

- 표 6에 중국 소비자의 제품에 대한 주관식 응답 결과를 나타냄.
- 중국 소비자를 대상으로 한 주관식 응답에서도 발효우동과 일반우동의 좋은 점으로 ‘쫄깃한 면’, ‘면의 식감이 좋음’ 이 높은 응답률을 보임. 한국과 마찬가지로 우동에 있어 면

의 조직감이 중요한 기호인자로 작용할 수 있을 것으로 보이거나 향후 정량적인 검사가 요구됨.

- 중국 소비자는 발효우동과 일반우동의 싫은 점으로 ‘부재료 부족’을 많이 언급하였음. 중국 수출용 우동의 개발을 위해서는 부재료(파, 유부 등 채소 건더기 재료)를 보충해야 할 것으로 판단됨.
- 떡볶이는 좋은 점으로 ‘쫄깃한 떡’과 ‘단맛’, ‘매운맛’, ‘색’ 이 적당하다는 응답이 많았음. ‘매운맛’ 특성은 좋은 점과 싫은 점 모두에서 언급 되었으나, 싫은 점으로 언급된 ‘매운맛 너무 강함’의 응답수가 현저하게 높았음. 이는 JAR 특성 분석에서 ‘매운 정도’가 약간 강하다고 평가되었던 결과와 일치하는 경향을 보임 (표 6, 그림 25B).

Product	Things that are liked	Things that are disliked
Fermented noodle Udon	- 육수의 맛이 좋음 (9) ¹⁾ - 쫄깃한 면 (8) - 면의 식감이 좋음 (6)	- 부재료 부족 (8) - 육수가 연함 (5) - 면에 간이 배지 않음 (5)
Normal Udon	- 육수의 맛이 좋음 (12) - 쫄깃한 면 (11) - 맛있음 (5)	- 짠맛 약간 강함 (7) - 부재료 부족 (8) - 너무 담백함 (5)
Tteokbokki	- 쫄깃한 떡 (9) - 단맛 적당함 (9) - 매운맛 적당함 (7) - 소스가 맛있음 (6) - 색이 적당함 (6)	- 매운맛 너무 강함 (15)

¹⁾The numbers in parentheses indicate response number

표 6. Comments about things that are liked/disliked by Chinese consumers

3.3. 결론

글루텐-프리 밀가루 급여한 마우스에서 위장 운동에 도움을 주는 혈중 가스트린이 고농도 (30%) 급여군에서 유의적으로 증가하였으며 췌장 당분해효소인 아밀라아제가 모든 군에서 유의적으로 증가함. 혈중 공복 혈당과 총 콜레스테롤은 각각 글루텐-프리 밀가루 중농도(12%), 중농도와 고농도에서 유의적으로 증가함. 마우스의 체중 및 체성분(체지방, 제지방)은 모든 군들 간 유의적 차이 없음. 위장관 소화 기능에 관련된 소화관 흡수능, 혈중 펩타이드 YY는 유의적 차이 없음. 췌장 소화효소인 췌장 프로테아제, 췌장 리파아제는 모든 군들간 유의적 차이 없음. 위장관 운동 관련 단백질인 세로토닌 수용체, 도파민 수용체는 모든 군들간 유의적 차이

없음. 위 결과들로 보아 글루텐-프리 밀가루는 위장 운동 촉진과 췌장 내 당분해에 도움이 된다고 판단됨.

한국인 소비자의 기호도 및 구매의향 등은 발효우동이 일반우동보다 유의적으로 높아 발효우동 상품화가 긍정적으로 판단됨. 중국인 결과에서는 발효우동과 일반우동의 유의적인 차이가 없었으나, 기호도와 구매의향 모두 보통 이상으로 나타났음. 중국인의 경우 우동을 한국보다는 덜 자주 섭취하여 전반적으로 우동에 대한 관심도 및 섭취 경험이 낮다는 것이 원인의 하나라고 판단됨. 적합강도 평가에서는 한국인과 중국인 모두 발효우동과 일반우동 국물의 '단맛'이 약간 부족하다고 평가함. 떡볶이의 기호도 및 구매의향, 떡과 소스의 조화도는 한국인과 중국인 모두에 의해 중앙값 이상의 높은 결과를 보임. 떡볶이의 적합강도는 한국인의 경우 '짠맛'과 '단맛'이 약간 강하게, 중국인의 경우 '매운 정도'가 약간 강하게 평가함.

한국생명공학연구원 [제 1 협동기관]

[1차년도]

1. 전통 발효식품으로부터 글루텐 분해능을 갖는 미생물 확보

가. 실험 방법

(1) 젓갈에서 유산균 분리

전라북도 부안군에서 구입한 젓갈류 12 종(그림 1)과 충청남도 강경에서 구입한 젓갈류 20 종(그림 2. A&B)에서 유산균을 분리하기 위해 MRS (1% skim milk) 배지(Difco, USA) 100mL에 젓갈 10 g을 넣고 overnight하여 배양하였다. 0.1% peptone 희석액에 10^5 까지 십진 희석하여 원액, 희석액을 각각 MRS pH 5.4 배지에 도말하였다. 48시간 배양한 후 육안으로 관찰하여 서로 다른 콜로니를 선별하였다. 선별한 콜로니는 MRS 배지에 streaking하여 단일 균주를 얻었으며 다음 실험에 사용하였다.



그림 1. 유산균 확보를 위한 발효식품류

국내 발효식품 중 김치 등이 아닌 젓갈류로부터 유산균을 분리한 이유는 본 연구의 목적이 글루텐

분해용 유산균을 확보하는 것으로서 식품성 발효 식품보다는 동물성 발효식품에서 단백질 분해 효소의 확보가 용이하기 때문이었다.



(A)



(B)

그림 2. 유산균 확보를 위한 발효식품류

유산균 분리 및 배지 조성

- 젓갈+MRS with skim milk 1% (ON)
- 각 샘플은 연속 희석하여 MRS pH 5.4 배지에 드말
- 37°C에서 48시간 배양한 후 서로 다른 콜로니 (노랑, 노기, 새) 분리
- 각 샘플에서 50개 콜로니 분리
- BCP 배지를 통해 (purple→yellow) 유산균 확인

Selected 650 strains

MRS medium (L)

peptone	1.0% (10g)
egg extract (boiled extract)	0.8% (8g)
yeast extract	0.4% (4g)
glucose	2.0% (20g)
sodium acetate (CH ₃ COONa)	0.3% (3g)
polysorbate 80 (also known as Tween 80)	0.1% (1g)
dipotassium hydrogen phosphate (K ₂ HPO ₄)	0.2% (2g)
ammonium citrate	0.2% (2g)
magnesium sulfate (MgSO ₄)	0.02% (0.2g)
manganese sulfate (MnSO ₄)	0.003% (0.03g)
agar	1.3% (13g)
BCP (chromococci purple)	0.004% (0.04g)

KWILAB 한국과학기술연구원

그림 3. 유산균 분리용 배지 조성 및 분리방법

(2) 유산균의 단백질 분해능 분석

젖갈에서 분리한 유산균은 TSA (1% skim milk) 배지(Difco, USA)에 streaking하여 콜로니 주변에 clear zone 생성 유무를 확인하였다. 또한 paper disc assay를 통해 clear zone 생성 유무를 확인하는 실험을 하였다. 글루텐 분해용 유산균을 확보하기 위해서 우선적으로 단백질 분해능이 우수한 유산균주를 선별하였다. 글루텐은 밀전분 생산 시 발생하는 부산물로 물에 불용성 단백질이다. 주로 gliadin(그림 3 (A))과 glutenin(그림 3(B))으로 구성되어 있으며 gliadin은 분자량이 30,000~80,000 Da이고, glutenin은 수백만 Da 정도임. 글루텐의 gliadin은 알코올에 용해하나 glutenin은 불용인데, 제빵에서 중요한 역할을 하는 것은 glutenin이다.

따라서, 밀가루를 물과 혼합하면 글리아딘(gliadin)과 글루테닌(Glutenin)이 결합하여 글루텐(그림 3 (C))을 형성하며, 글루텐 단백질 중 글리아딘은 점성과 신장성이 있고 글루테닌은 탄력성을 가지고 있다. 이 2 개의 단백질이 밀가루 종류에 따라 점유하는 비율이 다르게 된다. 이에 본 연구에서는 단백질 분해 효소를 분비하는 유산균을 우선적으로 선별하였다.

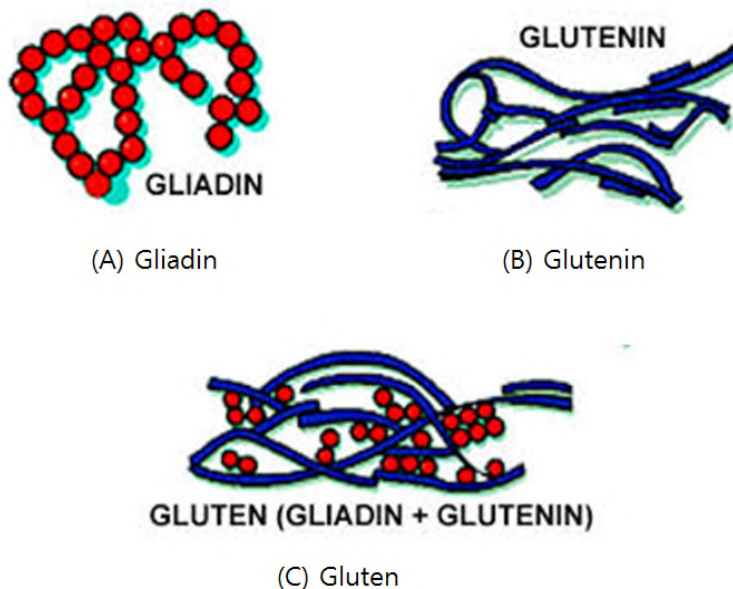


그림 3. 전분 내 Gliadin, glutenin 및 gluten

(3) BCP 배지에서 유산균 확인

선별한 콜로니가 유산균임을 확인하기 위해 MRS 배지에 BCP (Bromocresol purple, Sigma) 0.004%가 포함된 한천배지에 각각의 유산균을 streaking하여 24시간 배양한 후 배지 색의 변화로 유산균임을 확인하였다. 또한 분리한 유산균은 각각 단일 콜로니로 분리하여 MRS 고체 배지에 배양한 후, 저온 냉장 보관하면서 실험에 사용하였다.

가. 실험 결과

(1) 젓갈에서 유산균 분리

전라북도 부안군에서 구입한 젓갈류 12 종(그림 1)과 충청남도 강경에서 구입한 젓갈류 20 종(그림 2, A&B)으로부터 약 1,550종의 유산균을 분리하였고, 각각의 분리된 유산균은 그림 4와 같았다. 또한 분리한 유산균은 각각 단일 콜로니로 분리하여 MRS 고체 배지에 배양한 후, 저온 냉장 보관하면서 실험에 사용하였다.

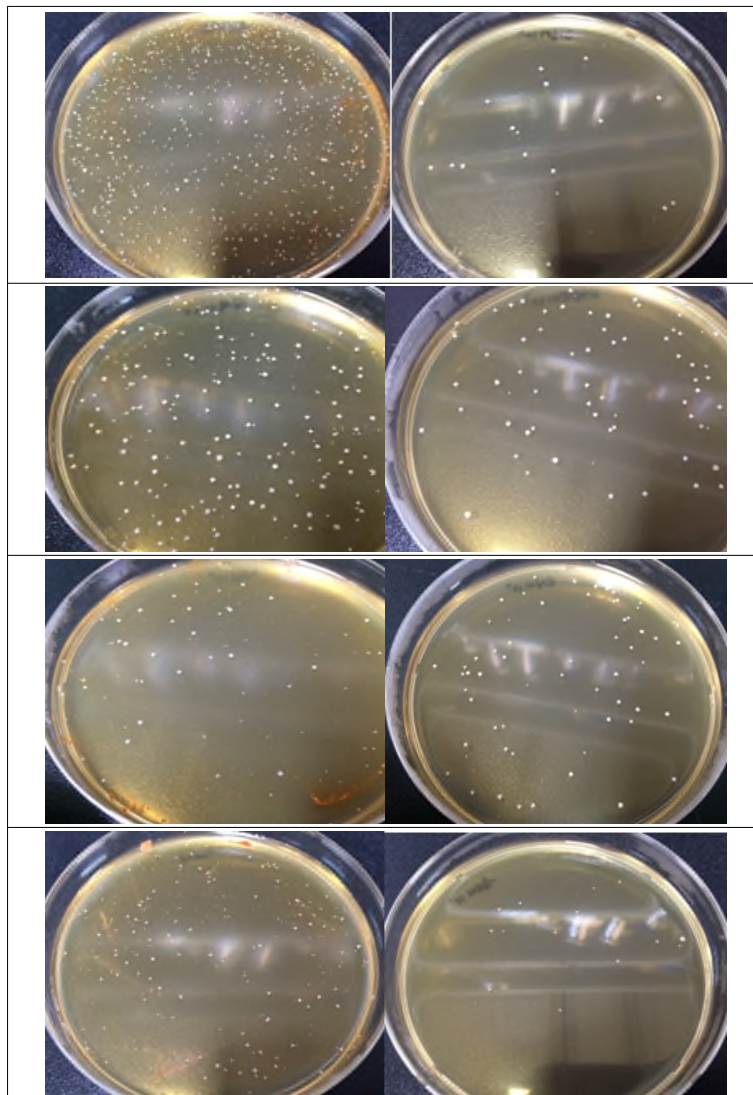


그림 4. 젖갈에서 분리한 유산균

(2) 단백질 분해능 확인

유산균은 E. coli나 yeast와 비교했을 때 낮은 proteinase 생산 활성을 지니지만 우유에 존재하는 casein을 peptide 수준이나 아미노산 수준까지 분해시켜 이용할 수 있다. 아미노산은 유산균의 생육에 필요한 성분이나, 우유 중에는 소량 존재하기 때문에 casein을 아미노산 수준으로 분해시킬 수 있는 복잡한 proteolytic system을 가지고 있다. 유산균의 proteolytic system은 micelle로 존재하는 casein을 분열시키는 작용과 큰 peptide를 가수분해시켜 작은 peptide나 아미노산 상태로 흡수시킬 수 있는 운반 작용을 포함한다(Law and Haandrinkman, 1997). 젖갈류로부터 분리한 콜로니의 모양, 크기, 색 등의 차이로 선별된 유산균은 600 여 종이었고 각각의 유산균에 대한 단백질 분해능이 있는지 확인하였으며, 결과는 그림 3과 같았다. 불투명한 TSA skim milk 배지에 단백질 분해능이 있는 유산균 주변이 투명하게 clear zone이 형성되었음을 확인하였다.

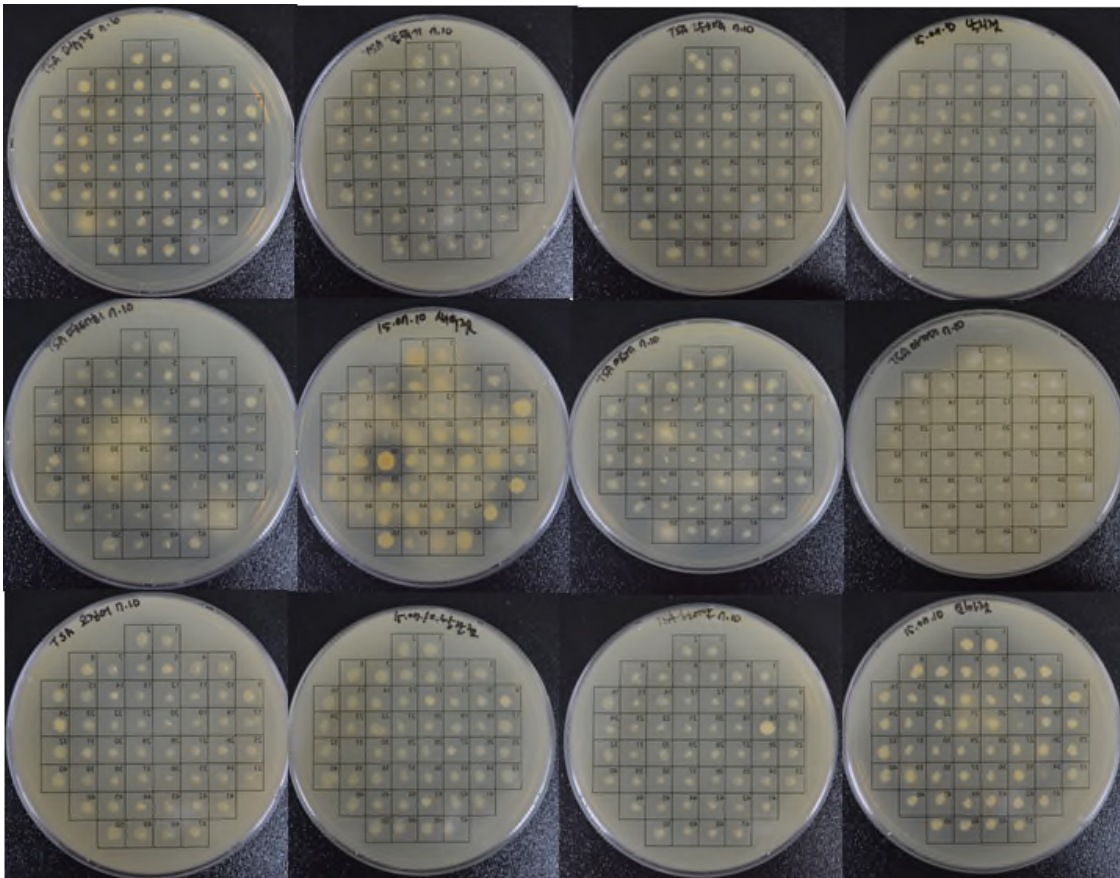


그림 5. 유산균의 단백질 분해능 확인

(3) BCP 배지에서 유산균 확인

단백질 분해능이 있는 것으로 판단되는 콜로니 100 여 종을 선별하여 콜로니가 유산균임을 확인하기 위해 보라색을 띄는 BCP 배지에 콜로니를 streaking 하여 배지가 노란색으로 변하는지 확인하였다 (그림 6). BCP 배지를 이용한 유산균의 확인 방법은 생물 산업 분야에서 활용되는 유산균의 검출 및 계수 방법으로서, 유산균을 포함한 여러 종의 미생물이 동시에 존재할 때 효과적인 유산균의 검출 및 계수 방법에 대하여 규정한다.

특히, 식품공전에서 발효유 또는 유산균 음료 중의 유산균수 측정용으로 규정하고 있는 배지로서, 평판측정용 한천 배지에 브롬크레졸퍼플(bromocresol purple, BCP)을 0.004~0.006 % 첨가한 배지이다. 브롬크레졸퍼플이 pH 5.2에서 노랑을, pH 6.8에서 보라색을 나타내는 원리를 이용하여, 배양 후 나타난 황색 집락을 유산균 집락으로 계측한다.

또한, 식품공전에서는 BCP 첨가 평판측정용 한천 배지의 조성을 다음과 같이 규정하고 있다.

표 1. BCP 첨가 평판측정용 한천 배지의 조성

시약	무게 (g/L)
효모 추출물 (yeast extract)	2.5
펩톤 (peptone)	5.0
포도당 (dextrose)	1.0
폴리옥시 에틸렌 솔비탄 모노올레이트 (polyoxyethylene sorbitan monooleate)	1.0
L-시스테인 (L- cysteine)	0.1
한천 (agar)	15.0

따라서 본 연구에서도 젓갈류로부터 분리한 유산균을 BCP 배지에서 pH 5.2 이하 조건에서 노란색으로 변하는 특징을 이용하여 유산균임을 확인하는 실험을 수행하였다. 선별된 미생물은 배지색이 노란색으로 변한 것을 확인할 수 있었다(그림 6).

2. 글루텐 분해능 유산균의 확보

가. 실험 방법

(1) 유산균의 단백질 분해능 분석

젖갈에서 분리한 유산균은 TSA (1% skim milk) 배지(Difco, USA)에 streaking하여 콜로니 주변에 clear zone 생성 유무를 확인하였다. 또한 paper disc assay를 통해 clear zone 생성 유무를 확인하는 실험을 하였다(그림 8).

(2) 선별 유산균의 글루텐 분해능 분석

TSA skim milk 배지에서 clear zone 생성을 보여준 미생물을 선별하여 MRS 배지에서 24시간 배양한 후, 글루텐 배지 (glucose 1%, fructose 0.5%, maltose 0.5%, yeast extract 0.3%, dipotassium phosphate 0.2%, tween 80 0.1%, magnesium sulfate 0.01%, manganese sulfate 0.005%, L-cystein HCl 0.05%, gluten 1%, pH 6)에 1% 접종하여 72시간 배양하였다. 배양 후, 각각의 시료에서 불투명한 글루텐 배지로부터 글루텐 변화에 따른 변화를 확인하였다.

(3) gluten assay

글루텐 배지에서 시험균 배양 후, 글루텐 양을 측정하는 assay 분석 (gluten assay kit, Neogen)을 실시하였다. 시험균은 시간별로 샘플링 하였으며, 배양액은 dilution solution과 섞어주고 gluten microwell plate에 100 ul 분주하였다. microwell은 plate shaker에서 60분 배양한 후, microwell의 액체는 버리고 wash solution으로 세 번 세척하였다. 그리고 anti-gliadin peroxidase conjugate (monoclonal antibody)를 100ul 분주하고 30분 동안 plate shaker에서 배양하였다. wash solution을 이용해 세 번 세척한 후, TMB substrate 100 ul를 분주하고 평편한 바닥에서 strip를 충분히 섞어주었다. 상온에서 30분 배양한 후, stop solution 50 ul를 분주하고 충분히 섞어주었다. 450 nm에서 흡광도를 측정하였다(그림 7).

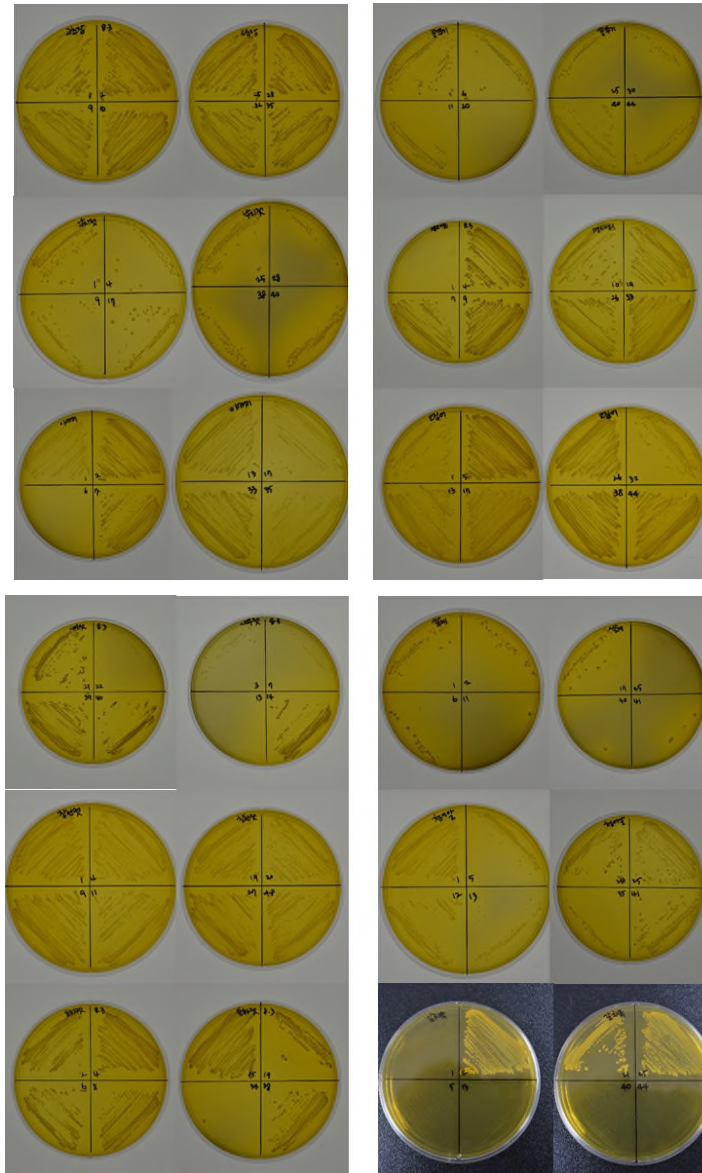


그림 6. BCP 배지에서 유산균 확인

글루텐 분해확인 및 배지 조성

- 글루텐 1% 액체배지에 분리 유산균 접종
 - Gluten dissolution: propylene glycol
 - 37°C에서 2~3일 배양
 - 배지 상태 확인
- ↓
- Selected **19** strains

Gluten medium	
Glucose	1.0% (10g)
Fructose	0.5% (5g)
Maltose	0.5% (5g)
Yeast extract	0.3% (3g)
Dipotassium phosphate	0.2% (2g)
Tween 80	0.1% (1g)
Magnesium sulfate	0.01% (0.1g)
Manganese sulfate	0.005% (0.05g)
L-cysteine HCl	0.05% (0.5g)
agar	1.5% (15g)
Adjust pH 6.0 with 1N HCl	

KRIBB 한국생명공학연구원

그림 7. 글루텐 분해능 확인을 위한 배지 조성 및 실험 방법

나. 실험 결과

(1) 선별 유산균의 단백질 분해능 확인

최종 유산균으로 선별된 100 여 종의 유산균은 1% skim milk가 함유된 TSA skim milk 배지에서 단백질 분해능 유무를 확인하였다 (그림 8). 각 선별 유산균은 콜로니 주변으로 clear zone을 형성하였음을 확인하였다.

(2) 유산균의 글루텐 분해능 분석

단백질 분해능 실험을 통하여 단백질 분해능이 우수한 유산균 중 19 여 종을 선별하여 글루텐 분해능을 확인하기 위해 1%(w/v) 글루텐이 함유된 액체 배지에 선별된 19 종의 유산균을 배양하였고, 각각의 배지에 함유된 글루텐에 의한 배지의 변화를 조사하였다 (그림 9). 배양 전 배지와 비교하여 새우 39, 꿀뚜기 25, 꿀뚜기 40, 청어알 1, 청어알 25 배양액의 배지는 불투명 정도가 감소하였음을 확인하였다.

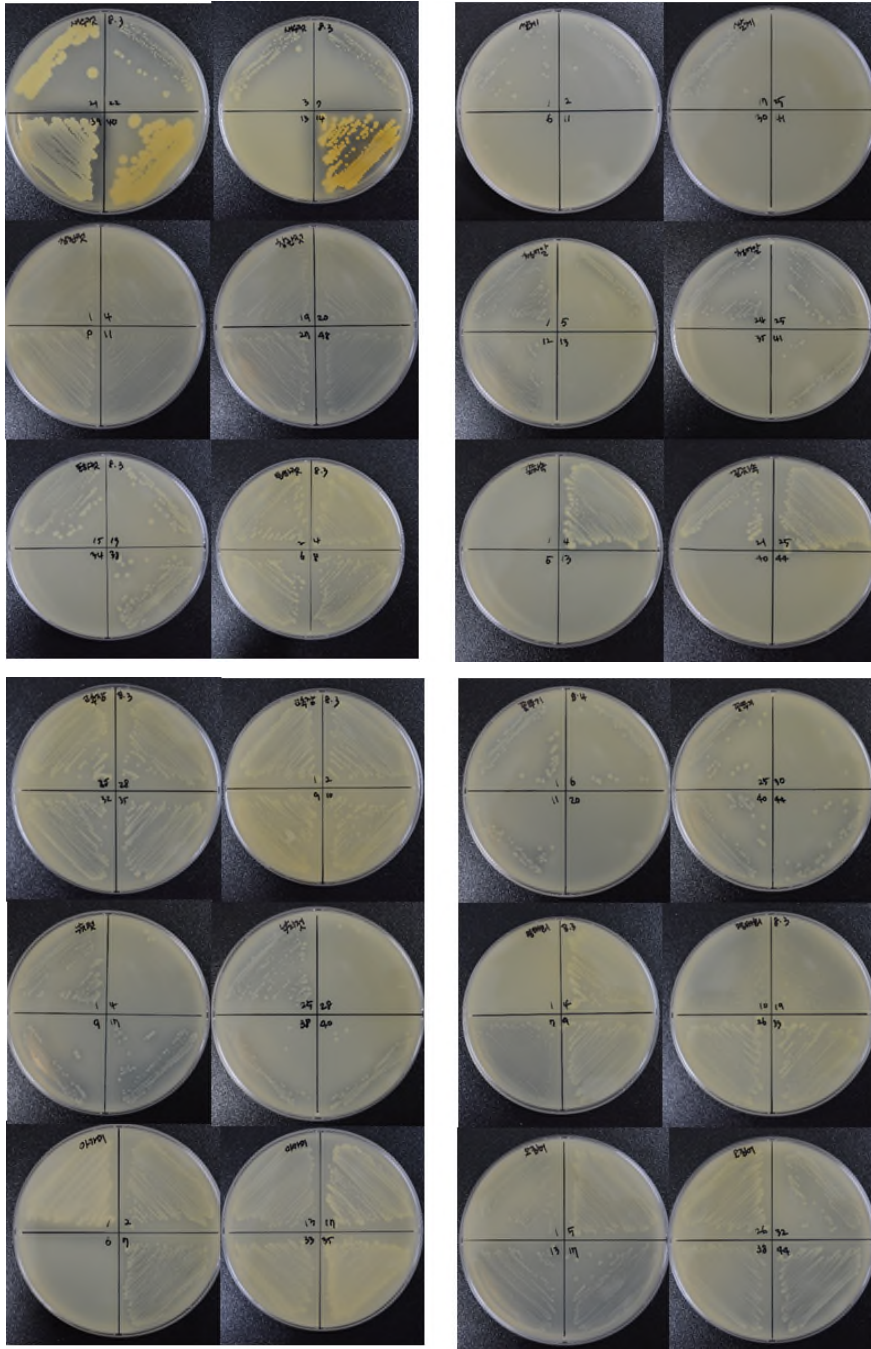


그림 8. 유산균의 단백질 분해능 확인



(A)

(B)



그림 9. 선별 유산균의 글루텐 분해능 확인
a) 배양전 글루텐 배지, b) 선별 유산균 배양후 글루텐 배지

3. 글루텐 분해능을 갖는 유산균의 동정 및 생화학적 특성 분석

가. 글루텐 분해능을 갖는 미생물의 동정

(1) 실험 방법

1) API 50CHL kit 동정

분리 유산균은 MRS broth에서 24시간 배양한 배양액이나 MRS agar의 단일 콜로니를 CHL medium 에 접종한다. API 50CHL 스트립은 건조된 기질을 함유하고 있는 50개의 튜브로 되어 있다. 각 cupules에 시험균을 접종하고 37°C에서 48시간 배양한 후, 색의 변화를 체크한다. 50개 탄수화물이 유일한 탄소원으로 들어있는 kit의 cupules에 배양한 후 시험균이 당을 이용할 수 있는지 여부를 색의 변화로 판정할 수 있다. 보라색의 배지는 각각의 당을 이용하면서 노란색으로 변하게 되며, 이를 양성(+)으로 표시한다 (그림 10). 시험 결과 값은 API web software에서 확인하였다.

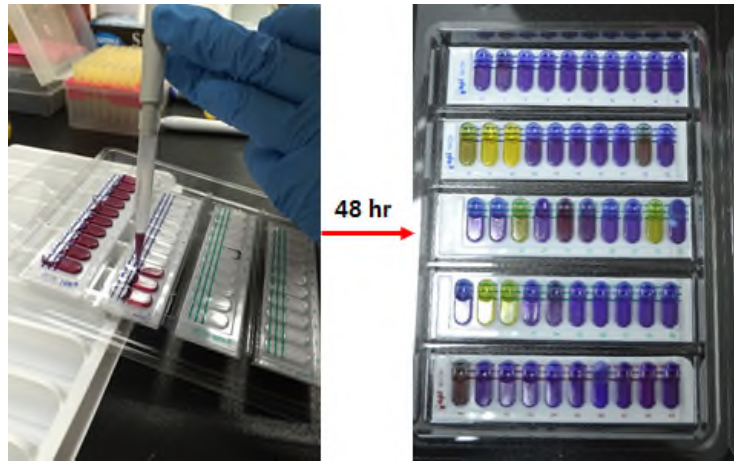


그림 10. API 50 CHL kit 동정

2) 16S rRNA sequencing 분석

분리 균주는 MRS broth에 접종한 다음 37°C에서 18시간 2차 계대 배양하여 배양액 2mL을 4,000 rpm에서 10분 동안 원심분리 하였다. 원심분리 하여 얻은 세포 침전물을 0.85% NaCl로 3회 세척하였다. 세척 후, lysozyme (10 mg/mL) 0.5mL을 첨가하여 37°C, 1시간 동안 처리하였다. Protease K (mg/mL) 20 μ L와 10% sodium dodecyl sulfate (SDS) 25 μ L를 첨가한 후, 60°C water bath에서 30분 처리한 후 RNase 1 μ L 첨가하여 37°C, 1시간 처리하였다. 동량의 Phenol-Chloroform- Isoamyl alcohol (25:24:1)을 첨가하여 현탁한 후, 14,000 rpm으로 5분 동안 4°C에서 원심분리 하여 상층액만 취한 다음 2회 반복하였다. 상층액 양의 1/2 volume의 3M ammonium acetate (pH4.8)와 2 volume의 100% alcohol을 첨가하고 -20°C에서 1시간 정치하였다. 3,000 rpm으로 5분 동안 4°C에서 원심분리 하여 세포 침전물을 확인하고, 상층액을 완전히 제거한 후에 70% ethanol 1mL을 넣고 다시 3,000 rpm으로 5분 동안 4°C에서 원심분리 하였다. 상층액 제거 후에 Dry 시키고 TE buffer나 증류수로 현탁하여 DNA를 분리하였다. 미생물의 16s rRNA를 증폭하기 위해 universal primer인 forward primer(27f) : (5'- AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG -3') 와 reverse primer(1492r) : (5'- GGT TAC CTT TGT TAC GAC TT -3')를 사용하였다. PCR 조건은 94°C에서 5분간 처리 후, 94°C에서 1분, 62°C에서 40초, 72°C에서 40초로 30cycles을 반복하였으며, 72°C에서 7분으로 반응을 종료하였다. PCR 반응 산물을 0.8% agarose gel로 전기영동을 실시하여 확인하였다. 염기서열을 분석하여 NCBI BLASTN 프로그램을 사용하여 bacteria species를 동정하였다.

(2) 실험 결과

1) API 50 CHL kit를 이용한 선별 유산균의 동정

1 %(w/v) 글루텐 함유 액체 배지에서 글루텐 분해능이 우수하여 불투명 정도가 감소하였던 유산균

11여종을 대상으로 API 50 CHL kit를 이용해 동정한 결과는 표 2와 같이 나타났다. 대부분의 선별 유산균은 *Lactobacillus* 종과 *Weissella* 종으로 동정되었다. 또한 *Weissella confusa* 유산균의 API 50 CHL kit 활용 동정 결과 표 3과 같이 나타났다.

표 2. API 50 CHL 동정결과

Strain	Description	Identities(%)
청어알 1	<i>Lactobacillus fermentum</i>	-
청어알 12	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	57.7
청어알 25	<i>Weissella viridescens</i>	44.1
꿀뚜기 1	<i>Weissella confusa</i>	92.3
꿀뚜기 25	<i>Weissella confusa</i>	93.4
꿀뚜기 40	<i>Lactobacillus brevis</i>	94.5
낙지 1	<i>Weissella confusa</i>	99.9
낙지 9	<i>Weissella confusa</i>	99.2
쌀게 2	<i>Weissella confusa</i>	94.8
오징어 44	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	97
새우 39	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	56.6

표 3. *Weissella confusa*의 API 50 CHL test 결과

API 50 CHL			
Control	-	Esculin	-
Glycerol	-	salicin	-
Erythritol	-	D-cellobiose	-
D-Arabinose	-	D-maltose	+
L-Arabinose	-	D-lactose	+
Ribose	+	D-melibiose	+
D-xylose	-	D-sacharose	+
L-xylose	-	D-trehalose	-
Adonitol	-	Inulin	-
Methyl-B-D-Xylopyranoside	-	D-melezitose	-
D-galactose	+	D-raffinose	+
D-glucose	+	Amidon	-
D-fructose	+	Glycogene	-
D-mannose	+	Xylitol	-
L-sorbose	-	Gentiobiose	-
L-rhamnose	-	D-turanose	-
Dulcitol	-	D-Lyxose	-
Inositol	-	D-Tagatose	-
D-mannitol	-	D-Fucose	-
D-sorbitol	-	L-Fucose	-
Methyl- α ,D-Mannopyranoside	-	D-Arabitol	-
Methyl- α ,D-Glucopyranoside	-	L-Arabitol	-
N-Acetyl-Glucosamine	-	Gluconate	-
Amygdaline	-	2-Keto-Gluconate	-
Arbutin	-	5-Keto-Gluconate	-

동정결과: *Weissella confusa* (99.9%)

API 50 CHL kit 동정, + : 양성, - : 음성

2) 16S rRNA sequencing 분석으로 선별 유산균 동정

API 50 CHL kit를 이용해 동정한 선별 유산균은 16s rRNA sequencing 분석으로 동정하였다 (표 3). API 50 CHL 동정결과와 비교하였을 때, 16S rRNA sequencing 분석 결과는 대부분의 선별 유산균이 *Weissella* 종으로 동정되었다.

표 4. 16S rRNA sequencing 동정결과

Strain	Description	Identities (%)
청어알1	<i>Weissella cibaria</i> strain II-I-59	99
청어알12	<i>Weissella cibaria</i> strain II-I-59	99
청어알24	<i>Weissella cibaria</i> strain II-I-59	99
청어알25	<i>Weissella cibaria</i> strain II-I-59	99
꿀뚜기1	<i>Weissella cibaria</i> strain II-I-59	99
꿀뚜기25	<i>Weissella cibaria</i> strain II-I-59	99
꿀뚜기40	<i>Weissella cibaria</i> strain II-I-59	99
낙지1	<i>Weissella confusa</i> strain JCM 1093	99
낙지9	<i>Weissella cibaria</i> strain II-I-59	99
낙지25	<i>Weissella confusa</i> strain JCM 1093	99
오징어44	<i>Pediococcus acidilactici</i> DSM 20284	99
새우14	<i>Staphylococcus hominis</i> subsp. <i>hominis</i> strain DM 122	99
새우39	<i>Staphylococcus epidermidis</i> RP62A strain RP62A	99

• API 50 CH kit

16s rRNA sequencing

strains	Description	Identities (%)		Description	Identities (%)
Cf44	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	97		<i>Pediococcus acidilactici</i> DSM 20284	99
Cr2	<i>Weissella confusa</i>	94.8		-	-
Lo1	<i>Weissella confusa</i>	99.9		<i>Weissella confusa</i> strain JCM 1093	99
Lo9	<i>Weissella confusa</i>	99.2	→	<i>Weissella cibaria</i> strain II-I-59	99
Hr1	<i>Lactobacillus fermentum</i>	-		<i>Weissella cibaria</i> strain II-I-59	99
Hr12	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	57.7		<i>Weissella cibaria</i> strain II-I-59	99
Bs1	<i>Weissella confusa</i>	92.3		<i>Weissella cibaria</i> strain II-I-59	99
Bs40	<i>Lactobacillus brevis</i>	94.5		<i>Weissella cibaria</i> strain II-I-59	99

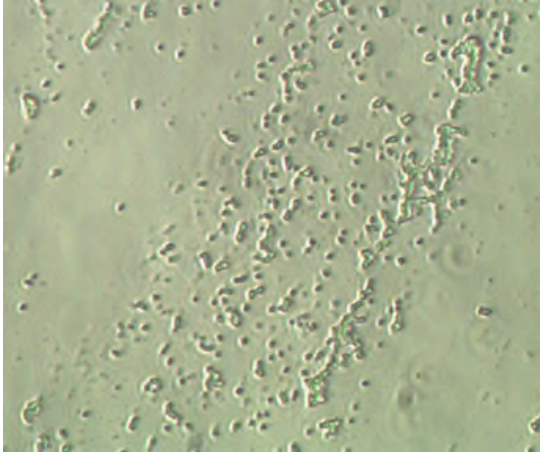
Cf, 오징어, Lo, 낙지, Hr, 청어알, Bs, 꿀뚜기, Sp, 새우

그림 11. API kit와 16s rRNA sequencing 분석 결과 비교

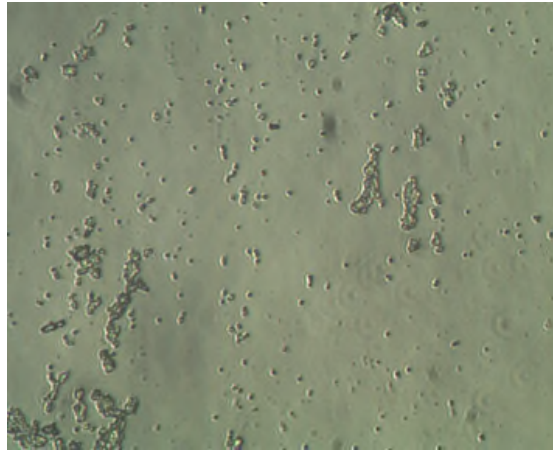
4. 글루텐 분해능을 갖는 미생물의 확인

가. 선별 유산균의 현미경 사진

글루텐 분해능을 갖는 선별 유산균인 *Weissella confusa*와 *Weissella cibaria*의 현미경 사진은 그림 12와 같았으며, 짧은 간균 형태임을 확인 할 수 있었다.



Weissella confusa



Weissella cibaria

그림 12. *Weissella* strain 현미경 사진

나. 확보된 유산균의 생화학적 특성 분석

(1) 실험 방법

1) 내산성 분석

주로 식품이나 사료 첨가제로 사용되는 프로바이오틱스 유산균은 장의 건강유지에 중요한 역할을 하는데, 정상작용을 수행하기 위해서는 pH 2~3인 사람이나 동물의 위를 통과하면서 사멸하지 않고 장까지 도달하여야 한다. 프로바이오틱스 유산균이 위를 통과하기 위해서는 위액에 대한 내성이 있어야 하며, 위를 통과한 후 장관에 도달하여 내인성 미생물의 균형과 대사에 영향을 줄 수 있다. 따라서 본 연구에서는 분리된 유산균의 내산성 여부를 조사하였다. 전배양한 분리 유산균을 10 mL MRS pH 2.0 배지에 10% 접종하였다. 37°C에서 2시간 동안 방치한 후 연속 희석하여 10^4 , 10^5 , 10^6 배양액 100 μ L를 MRS agar 배지에 도말하였다. 48시간 배양한 후 균체의 총 수를 세어 산에 대한 내성을 조사하였다.

2) 내담즙성 분석

위를 통과하여 소장의 첫 부분인 십이지장에 도달하였더라도 담즙산에 의한 생육제해를 극복해야 대

장에 도달할 수 있다. 췌장에서 십이지장으로 분비되는 담즙산은 지질과 지방산으로 이루어진 세포막을 파괴함으로써 미생물의 생존율을 저하시키며, 이로 인해 세포막과 외부환경 간의 상호작용에도 영향을 미친다. 따라서 본 연구에서는 분리된 유산균의 내담즙성 여부를 조사하였다. 전배양한 분리 유산균을 10 mL MRS 0.3% oxgall 배지에 10% 접종하였다. 37°C에서 4시간 동안 방치한 후 연속 희석하여 10⁴, 10⁵, 10⁶ 배양액 100 uL를 MRS agar 배지에 도말하였다. 48시간 배양한 후 균체의 총 생균수를 세어 담즙산에 대한 내성을 조사하였다.

3) 내열성 분석

전배양한 분리 유산균을 10mL MRS 배지에 10% 접종하였다. 50°C에서 1시간 동안 방치한 후 연속 희석하여 10⁴, 10⁵, 10⁶ 배양액 100uL를 MRS agar 배지에 도말하였다. 48시간 배양한 후 균체의 총 수를 세어 열에 대한 내성을 조사하였다.

4) 병원성 미생물에 대한 항균활성 분석

프로바이오틱스 유산균은 *in vitro* 조건에서 식품 유래의 병원성 세균과 부패세균의 생육을 억제한다고 알려져 있으며 이러한 억제 기작은 유산균에 의해서 생성된 유산, 저급 지방산, hydrogen peroxide, diacetyl, 박테리오신(bacteriocin), 항생물질 및 면역 체계 자극 등의 작용이라고 설명된다. 박테리오신에 관한 연구는 20년 전부터 가속화되어 유럽이나 미국에서는 이미 산업화 단계에 있으며 우량 균주 확보 및 기술 개발과 특허 출현 등 다양한 연구가 진행되고 있다. 따라서 본 연구에서는 분리된 유산균의 병원성 미생물에 대한 항균 활성 여부를 조사하였다. 37°C에서 24시간 배양된 병원성 미생물 (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*)을 Nutrient agar (Difco, USA)에 200 uL 도말하였다. 도말된 평판배지에 직경 8 mm의 paper disc를 놓고 37°C MRS broth에서 24시간 배양된 분리균을 각각 40 uL씩 일정하게 가한다. 37°C에서 24시간 배양한 후 disc 주위의 생육저지환 생성 여부를 확인하였다.

(2) 실험 결과

1) 선별 유산균의 내산성 평가

선별 유산균 14 여 종은 pH 2.0으로 조정된 MRS 배지에서의 내성을 평가하였고 그림 13의 결과를 얻었다. 오징어 44가 99% 생존율을 보이며 내산성이 가장 높았다. Havenaar 등(1992)은 한 숙주에서 분리한 미생물 중 pH 2와 bile salt 2%의 환경에 내성을 나타내었고, 동일 숙주의 소장에서 프로바이오틱스로서 기능을 하였다고 보고하였으며, Tambekar와 Bhutada(2010)는 *L. plantarum*과 *L. rhamnosus*가 pH 9에 있어서는 민감했지만 pH 3에서는 내성이 있다고 보고하였다. Liong와

Shah(2005)는 *Lactobacillus*속은 정도의 차이는 있지만 pH 2.0에서 2시간 동안 배양했을 때 모든 균이 내산성보였으며, *Lactobacillus acidophilus*가 *L. casei*와 비하여 더 우수한 내 산성을 나타내었다고 보고하였다. Boylston등(2004)은 비피더스균들은 pH 4.6이하의 조건에서 매우 민감하다고 보고하였으며, Matto 등(2004)은 *Bifidobacterium animalis*는 다른 비피더스균들에 비해 내산성이 뛰어나다고 보고하였다. 따라서 본 연구에서 확보된 글루텐 분해 유산균의 경우도 유사한 연구 보고와 같이 우수한 내산성을 갖음으로써 향후 식품 산업에 활용 가능성이 우수하다고 할 수 있다.

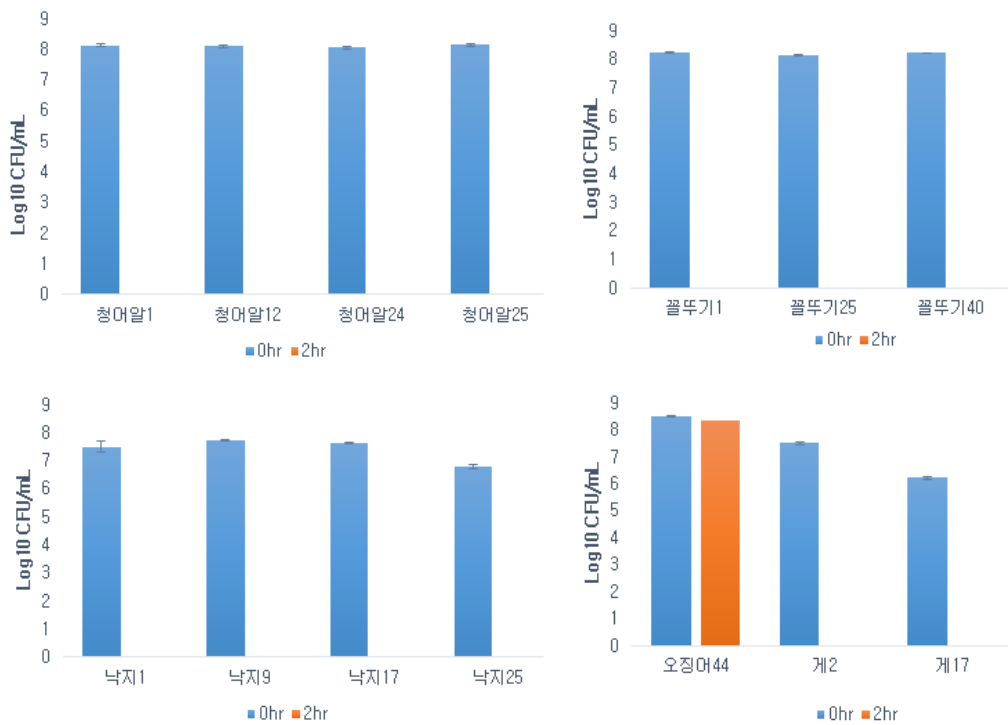


그림 13. 선별 유산균의 내산성 평가

2) 선별 유산균의 내담즙성 평가

선별 유산균 14여종은 oxgall 0.3% MRS 배지에서 내성을 평가하였고 (그림 14) 테스트 유산균 모두는 95% 이상의 생존율을 보이며 내담즙성이 높았음을 확인하였다. Klaenhammer 등(1981)은 *Lactobacillus*와 같은 유산 간균은 담즙에 대한 내성이 그 세포 형태에 따라 다르며,표면이 매끈한 형태 보다는 거친 형태의 표면을 가진 *L. acidophilus*가 다른 *Lactobacilli*에 비하여 담즙에 대한 내성이 매우 높게 나타났고 이에 따라 프로바이오틱으로서 이용성이 뛰어나다고 보고하였다. Gilliland(1984)은 담즙산에 대한 내성이 약한 균주는 담즙산이 존재하지 않는 배지에서도, 내성이 강한 균주보다 성장속도가 낮다고 보고하였으며, Terashima등 (1980) 각종 유산균에 대한 담즙산 내성조사에서 *L. casei*, *L.*

acidophilus 및 *L. plantarium*은 담즙산에 대한 내성이 높으나 *L. bulgaricus*, *L. helveticus*, *L. jugurti* 및 *S. thermophilus*는 내성이 낮다고 보고하였다. 상기 연구 보고된 논문에서 밝혀진 Lactobacilli 계열의 유산균의 경우, 높은 내담즙성을 갖는다는 보고는 본 연구 결과를 통하여 확보된 Weisella 종과는 다른 결과를 나타내었으며, 본 연구 결과 확보된 Weisella 종은 높은 내산성 및 내담즙성을 갖는 신규 유산균으로 활용이 가능할 것으로 판단된다.

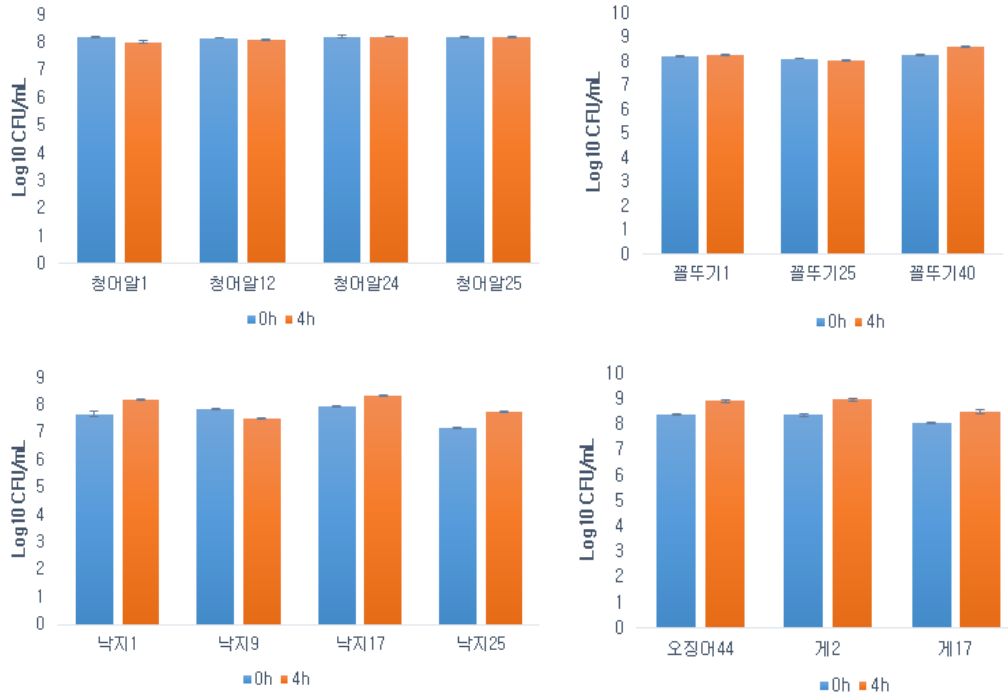


그림 14. 선별 유산균의 내담즙성 평가

3) 선별 유산균의 내열성 평가

선별 유산균 14여종은 50°C에서의 내성을 평가하였고 (그림 15) 대부분의 유산균은 80% 이상의 열에 대한 내성을 확인하였다.

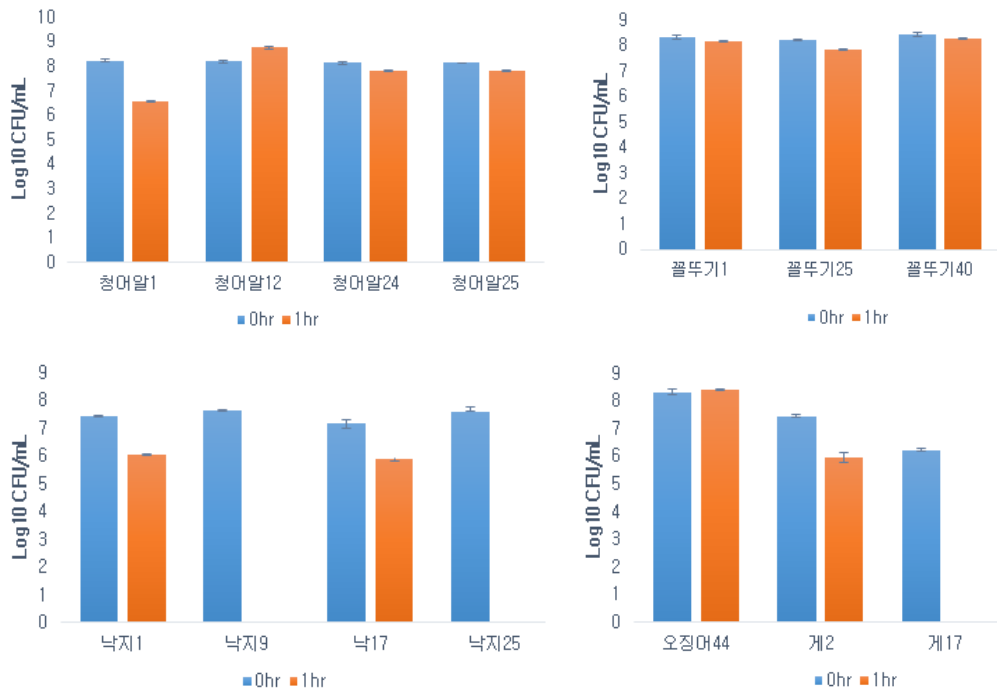


그림 15. 선별 유산균의 내열성 평가

4) 병원성 미생물에 대한 항균활성

Lactobacillus 속은 인체에 유익한 미생물로 다양한 발효 유제품의 starter로 이용되고 있으며, 이러한 발효 유제품을 섭취함으로써 인체의 장 내에 유해세균의 증식을 억제한다는 연구 결과가 밝혀짐에 따라 가치가 높아지고 있다(강 등, 2001). 임 (2007) 등은 *L. salivarius* CPM-7균주의 배양시간에 따른 항균력을 조사한 결과, 대수기에 속하는 12시간 이후부터 대장균 억제력이 뚜렷하게 나타났으며 48 시간까지는 억제능이 지속되었다고 보고하고 있다. 따라서 본 연구에서도 선별 유산균 10 여 종은 병원성 미생물에 대한 항균활성을 평가하였으며, 결과는 표 3, 그림1 6과 같았다. *E. coli*, *B. cereus*에 대해 각 유산균 disc 주위에 생육 저지환을 확인하였고, 항균활성을 가지는 것으로 판단된다.

따라서 본 연구에서는 글루텐 발효능 및 내산성 내담즙성 등의 생리활성이 우수한 *Weissella confusa* 균주를 최종 확보하고 확보균주를 CJE-0201로 명명하였으며, 한국생명공학연구원 미생물자원 센터(KCTC)에 2015년 9월 18일자 특허균주를 기탁하고 기탁번호 KCTC 12908BP를 부여받았으며, 향후 특허 균주에 대한 실험을 계속 수행하였다.

표 3. 선별 유산균의 병원성 미생물에 대한 항균활성

Incubator strain	Activity									
	오징어 44	계2	낙지1	낙지9	청어알 1	청어알 12	청어알 25	꿀뚜기 1	꿀뚜기 25	꿀뚜기 40
<i>E. coli</i>	+ ¹⁾	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>B. cereus</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>S. aureus</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

¹⁾ Degree of clarity of clear zone by growth inhibition; -,none, +; below 5 mm

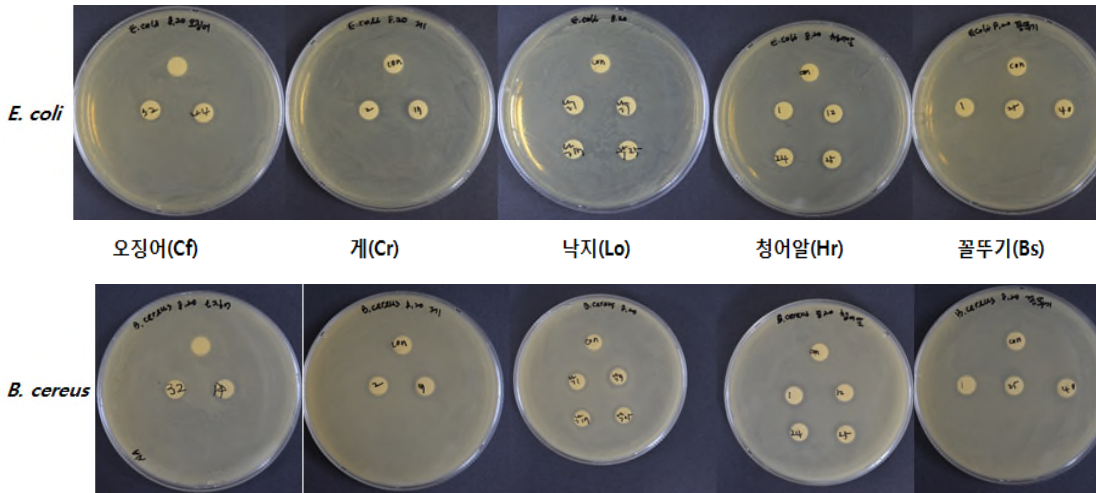


그림 16. 선별 유산균의 병원성 미생물에 대한 항균활성

4. *Weissella confusa* CJE-0201 유산균의 생화학적 특성 및 글루텐 분해능 분석

가. 실험방법

(1) 내산성 분석

유산균이 probiotics으로의 기능을 발휘하기 위해서는 소화관 내의 조건에서 생존해야 한다. 구강을 통해 섭취된 유산균은 위액과 각종 효소가 존재하는 위를 통과하고, 담즙이 존재하는 십이지장을 거쳐 최종 목적 부위인 장에 도달해야 정상적 효과를 기대할 수 있다. 그중에서도 유산균이 위에서 위산과

같은 낮은 pH에서 생존하기 위해서 위산에 대한 내성을 나타내야 하며(Saarela *et al.*, 2000; Sim *et al.*, 1995), 담즙성에 대한 내성을 지니는 것이 probiotics의 기본 특성이다(Gilliland, 1979). 따라서 본 연구에서는 최종 확보된 *Weissella confusa* CJE-0201 유산균를 이용하여 10 mL MRS pH 2 ~ 10 배지에 10% 접종하였다. 37°C에서 2시간 동안 방치한 후 연속 희석하여 10^4 , 10^5 , 10^6 배양액 100 uL를 MRS agar 배지에 도말하였다. 48시간 배양한 후 균체의 총 수를 세어 산에 대한 내성을 조사하였다.

(2) 내담즙성 분석

위를 거쳐 장에 도달하기 위해서는 담즙이 분비되는 췌장과 십이지장을 통과하게 되며, 최종적으로 장내로 들어오기 위해서는 담즙액에 대한 내성이 있어야 한다. 담즙산은 세균의 성장을 억제하는 기능을 지니고 있으며 특히 장내 유래세균이 아닌 경우 담즙산이 함유된 환경에서 자랄 수 없다고 알려져 있으며, Gilliland 등은 probiotic 생균이 가져야 할 담즙액에 대한 내성은 0.3%의 oxgall이 함유된 배지에서 성장할 수 있어야 한다고 보고하였다. 본 연구에서는 최종 확보된 *Weissella confusa* CJE-0201 유산균를 이용하여 10 mL MRS 0.1 ~ 1% oxgall 배지에 10% 접종하였다. 37°C에서 4시간 동안 방치한 후 연속 희석하여 10^4 , 10^5 , 10^6 배양액 100 uL를 MRS agar 배지에 도말하였다. 48시간 배양한 후 균체의 총 수를 세어 담즙산에 대한 내성을 조사하였다.

(3) 내열성 분석

전배양한 분리 유산균을 10 mL MRS 배지에 10% 접종하였다. 30 ~ 70°C에서 1시간 동안 방치한 후 연속 희석하여 10^4 , 10^5 , 10^6 배양액 100uL를 MRS agar 배지에 도말하였다. 48시간 배양한 후 균체의 총 수를 세어 열에 대한 내성을 조사하였다.

(4) 병원성 미생물에 대한 항균활성 분석

37°C에서 24시간 배양된 병원성 미생물 (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes*, *Shigella flexneri*, *Shigella sonnei*, *Ewinia rhapontici*)을 Nutrient agar (Difco, USA)에 200 uL 도말하였다. 도말된 평판배지에 직경 8 mm의 홀을 만들고 37°C MRS broth에서 24시간 배양된 글루텐 발효 유산균을 100 uL씩 일정하게 가한다. 37°C에서 24시간 배양한 후, 홀 주위의 생육 저지환 생성 여부를 확인하였다.

(5) 글루텐 발효 유산균의 protease 활성 측정

TSA skim milk 배지에 8 mm의 홀을 만들고 24시간 배양한 글루텐 발효 유산균을 100 uL 가한다. 37°C에서 48시간 배양한 후, 홀 주변에 clear zone 생성 유무를 확인하였다.

(6) 선별 유산균의 글루텐 분해능 분석

글루텐 배지 (glucose 1%, fructose 0.5%, maltose 0.5%, yeast extract 0.3%, dipotassium

phosphate 0.2%, tween 80 0.1%, magnesium sulfate 0.01%, manganese sulfate 0.005%, L-cystein HCl 0.05%, pH 6)를 0.1%, 0.5%, 1% gluten 양을 다르게 하여, MRS 배지에서 24시간 배양한 선별 유산균을 1% 접종하여 72시간 배양하였다. 그리고 불투명한 글루텐 배지의 변화를 확인하였다.

(7) 글루텐 발효 유산균의 유기산 분석

유기산 분석은 글루텐 배지에서 72시간 배양된 배양액을 시료로 사용하였으며, 시료 1 mL을 0.45 um syringe filter로 여과하여 column에서 이동상 흐름속도 0.7 mL/min, column oven 온도 25°C, injection volume 20 uL, UV 210 nm에서 분석하였다. 분석용 기기는 HPLC를 사용하였다.

나. 실험내용

(1) 글루텐 발효 유산균의 내산성 평가

위 장관 이라는 특정 부위에 생존하면서 생리적인 활성을 유지해야 하기 때문에 외부 유입 미생물에 대한 사람이나 동물의 위장관내 방어 장벽을 극복해야 하는 것이 필수적이다. 본 실험에서 *Weissella confusa* CJE-0201은 pH 2 ~ 10 범위에서 내성을 측정하였고 결과는 그림 17와 같았다. pH 2에서 내성은 없는 것으로 나타났지만, pH 3 이상의 조건에서는 85% 이상의 생존율을 유지하였다. 따라서 글루텐 분해용 유산균이 식품 산업에 활용될 경우, 유산균의 효능까지 부여될 것으로 판단된다.

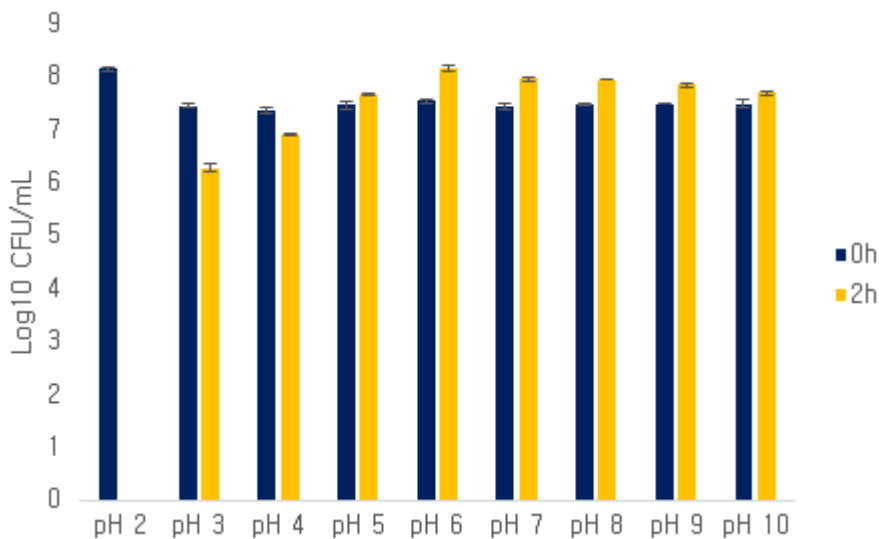


그림 17. pH 2 ~ 10에서 *Weissella confusa* CJE-0201의 내산성

(2) 글루텐 발효 유산균의 내담즙성 평가

오늘날 가장 일반적으로 이용되고 있는 생균제는 유산균이며, 유산균 속 중 *Lactobacillus*와 *Bifidobacterium* 속의 유익한 효과는 오래 전부터 인정되어 왔다. 이 두 속의 유산균은 사람이나 동물의 장내 방어 장벽 즉, 위산과 담즙산염, 췌장 효소에 내성이 있고 장 점막에 부착하여 쉽게 군락을 형성할 수 있는 특징을 가지고 있는 무해한 균으로서 위장관의 균 총에서 중요한 균주로 여겨지고 있다. Invitro 실험 결과 유산균은 많은 장내 병원성 미생물의 성장을 억제하는 것으로 나타났다. *Weissella confusa* CJE-0201은 oxgall 0.1 ~ 1% 내에서 내성을 평가하였고 oxgall 0.1%에서 100% 생존율을 가졌으며, 1%에서 94% 내성을 유지하는 것으로 측정되었다 (그림 17). 따라서 이러한 결과를 근거로 할 때 *Weissella confusa* CJE-0201은 글루텐 발효 유산균으로 적합하며, 또한 발효 제품 개발 시 체내에서 유용하게 작용할 수 있을 것으로 판단된다.

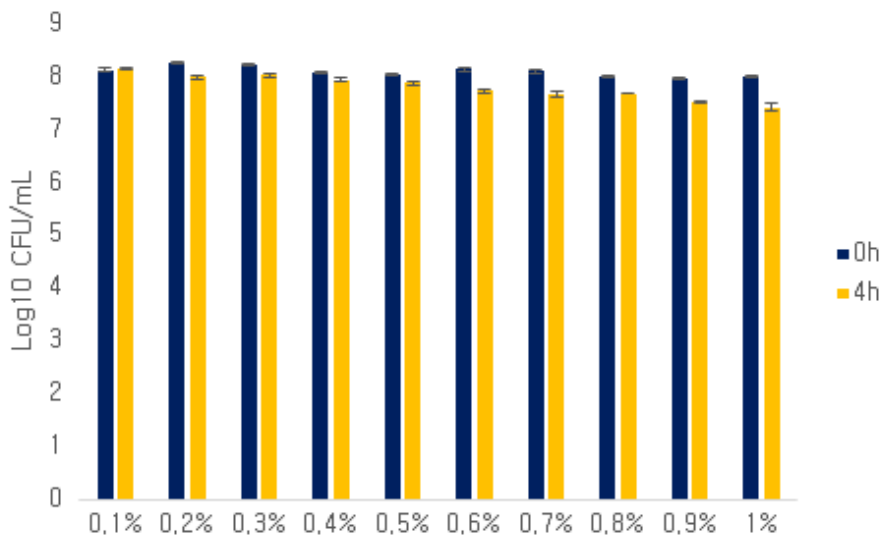


그림 18. oxgall 0.1 ~ 1%에서 *Weissella confusa* CJE-0201의 내담즙성

(3) 글루텐 발효 유산균의 내열성 평가

Weissella confusa CJE-0201은 30 ~ 70°C 범위에서 내성을 평가하였고 30°C, 40°C에서 100%, 50°C에서 72% 내성을 유지하였으나 60°C 이상에서는 내성이 없는 것으로 나타났다(그림 19).

(4) 글루텐 발효 유산균의 병원성 미생물에 대한 항균활성

8종의 병원성 미생물에 대한 *Weissella confusa* CJE-0201의 항균활성을 측정한 결과는 표4와 그림 19와 같이 나타났다. *S. aureus*는 저해환이 생성되지 않았고, 나머지 병원성 균주는 5 mm 이하의 저해환이 생성되어 항균활성을 갖는 것으로 나타났다. 특히 *Shigella sonnei*, *Shigella flexneri*는 6 mm 이

상의 저해환이 생성되었다.

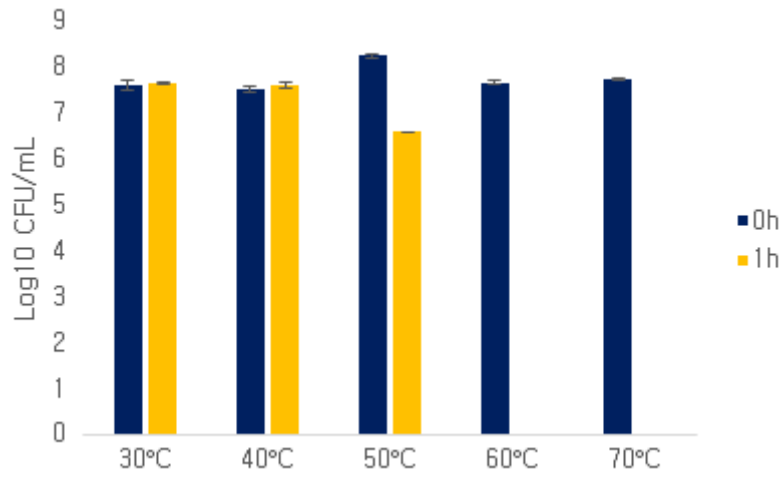
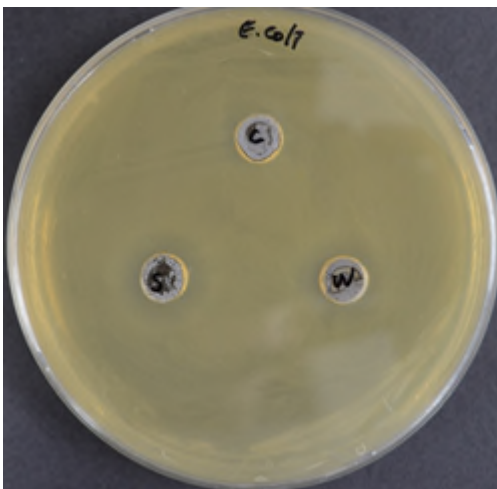


그림 19. 30 ~ 70°C 에서 *Weissella confusa* CJE-0201의 내열성

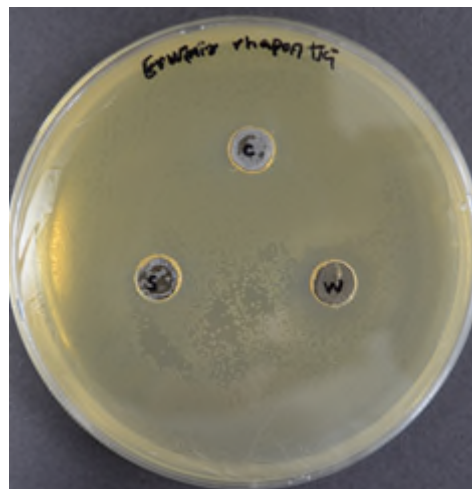
표 4. 병원성 미생물에 대한 *Weissella confusa* CJE-0201의 항균활성

Incubator strain	Activity							
	<i>E. coli</i>	<i>Erwinia rhapontici</i>	<i>B. cereus</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Shigella sonnei</i>	<i>Shigella flexneri</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>S. aureus</i>
<i>Weissella</i>	+ ¹⁾	+	+	+	+	++	++	-

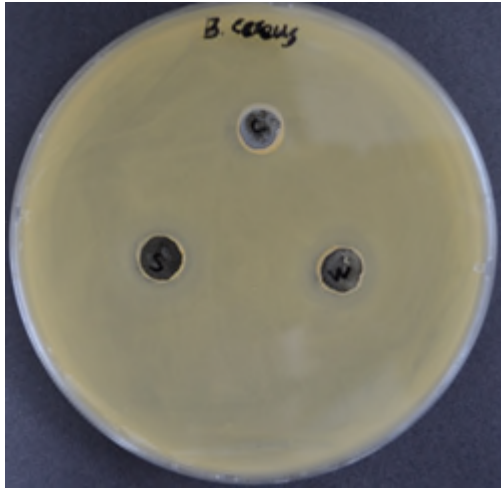
¹⁾Degree of clarity of clear zone by growth inhibition; -, none, +; below 5 mm, ++; 6-10 mm



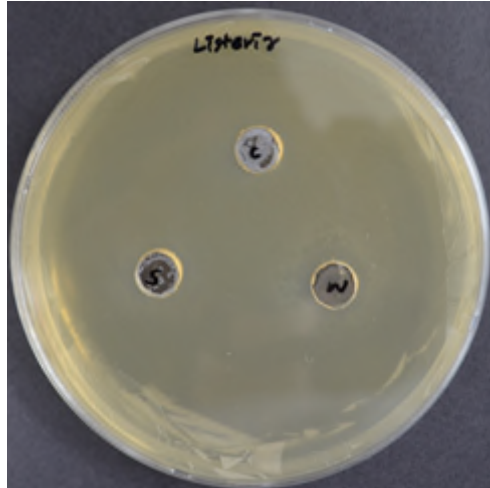
E. coli



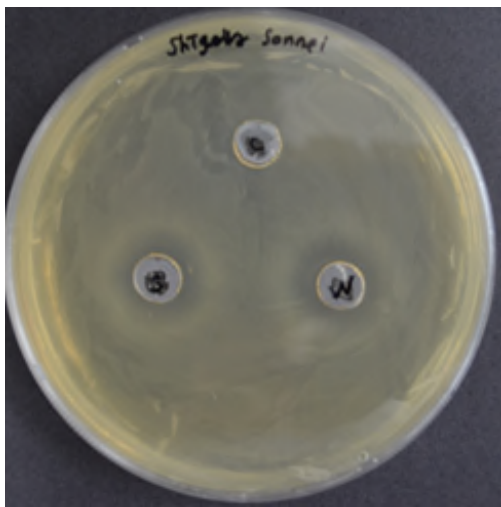
Erwinia rhapontici



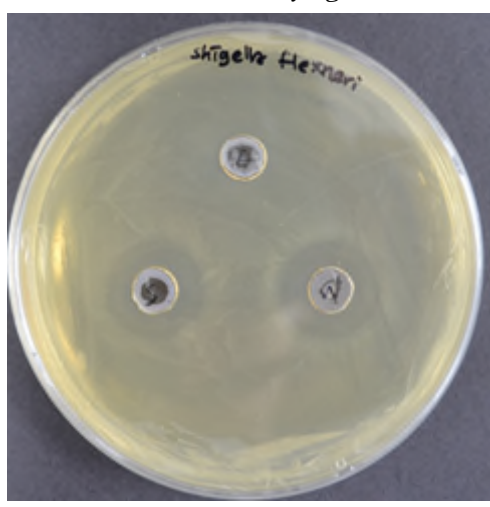
B. cereus



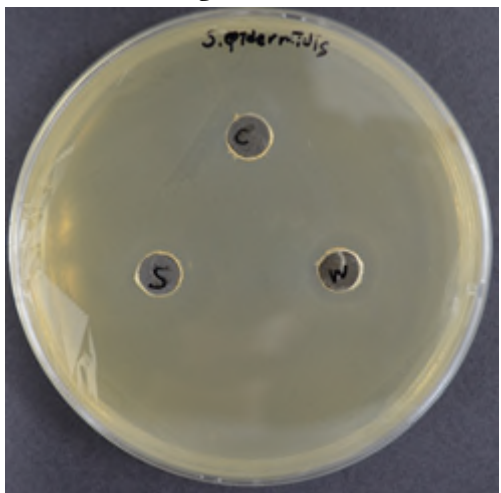
Listeria monocytogenes



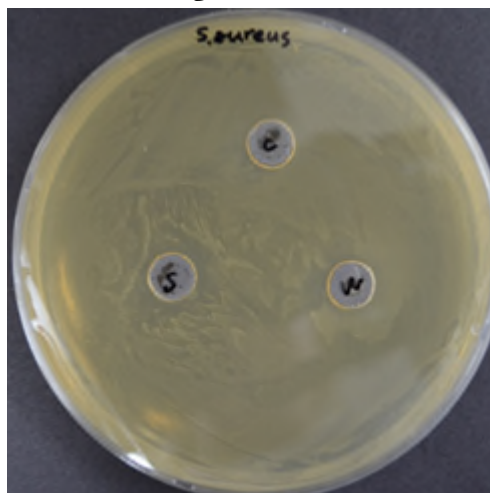
Shigella sonnei



Shigella flexneri



S. epidermidis



S. aureus

그림 20. *Weissella confusa* CJE-0201의 식품 병원성 미생물에 대한 항균활성

clear zone을 형성하였다(그림 21). 글루텐 발효 상태에서 유산균은 단백질 분해 효소의 활성을 갖는 것으로 판단된다.



그림 21. TSA skim milk 배지에서 청어알1의 protease 활성
 -; negative control, +; positive control, s; supernatant of *Weissella* in gluten medium, w; whole cells of *Weissella* in gluten medium, m; *Weissella* in MRS

(5) 선별 유산균의 글루텐 분해능 및 정량 분석

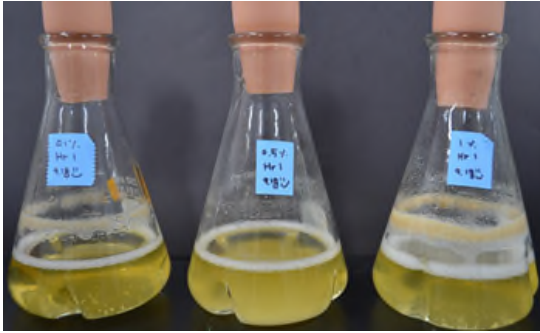
글루텐 배지 내 글루텐 농도를 0.1, 0.5, 1%로 하여 *Weissella*를 배양한 결과 글루텐 배지의 투명도가 변한 것을 확인할 수 있었다 (그림22).



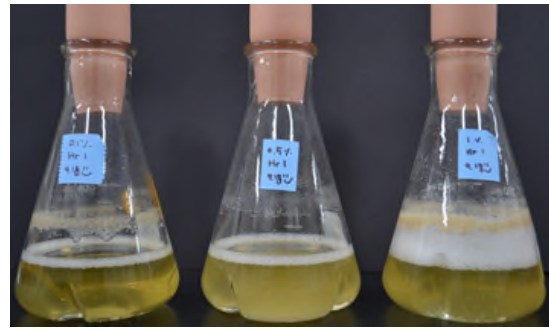
0 day



1 day



2 day



3 day

그림 22. 글루텐 농도에 따른 *Weissella*의 글루텐 분해

글루텐 배지에 글루텐 함량을 0.1, 0.5, 1%로 다르게 하여 *Weissella*를 배양하고 day에 따라 글루텐 함량 변화를 조사한 결과는 그림 23과 같았다. 0.1% 글루텐 배지는 23 ~ 25 ng/mL, 0.5% 배지는 29 ~ 31 ng/mL 그리고 1% 배지는 29.8 ~ 33 ng/mL 글루텐을 함유하고 있었다.

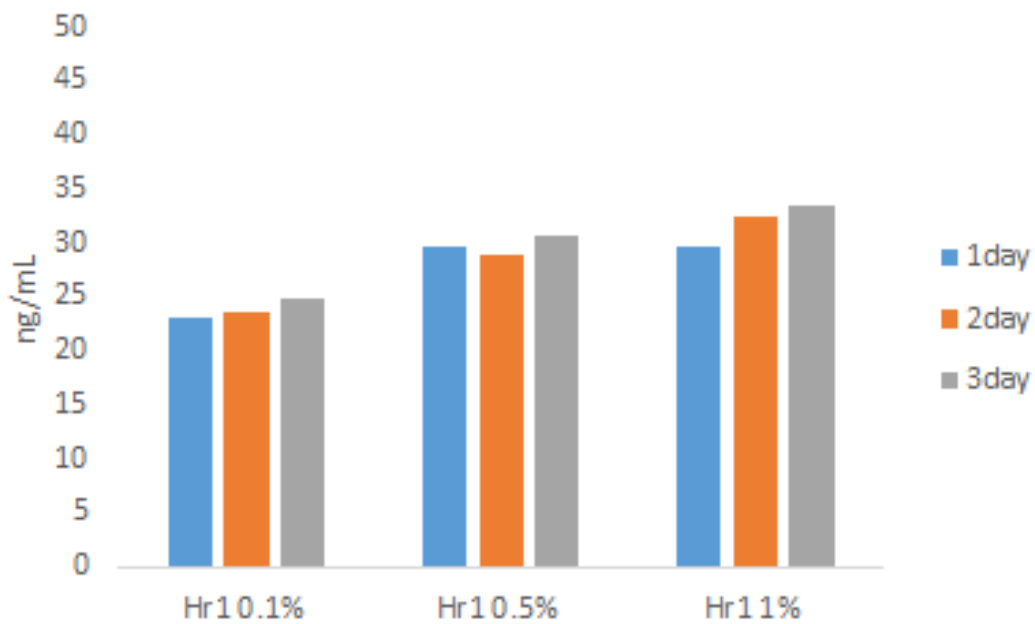


그림 23. 글루텐 배지 내 글루텐 함량

(6) 글루텐 발효 유산균의 유기산 분석

글루텐 배지에서 배양한 *Weissella*의 유기산을 분석하였고, 결과는 그림 24과 같았다. MRS에 배양한 *Weissella*는 유기산 중 acetic acid와 oxalic acid가 각각 14mg/mL, 1.84 mg/mL로 높게 나타났다.

또한 gluten 배지에서 1일 배양한 *Weissella*는 acetic acid가 2.3mg/mL, oxalic acid가 0.07mg/mL이었고 3일 배양한 경우 acetic acid는 3.6mg/mL, oxalic acid 0.095mg/mL로 나타났다. 이 결과는 글루텐 발효 과정 중 유기산을 사용하였기 때문에 함량이 감소하는 것으로 판단된다.

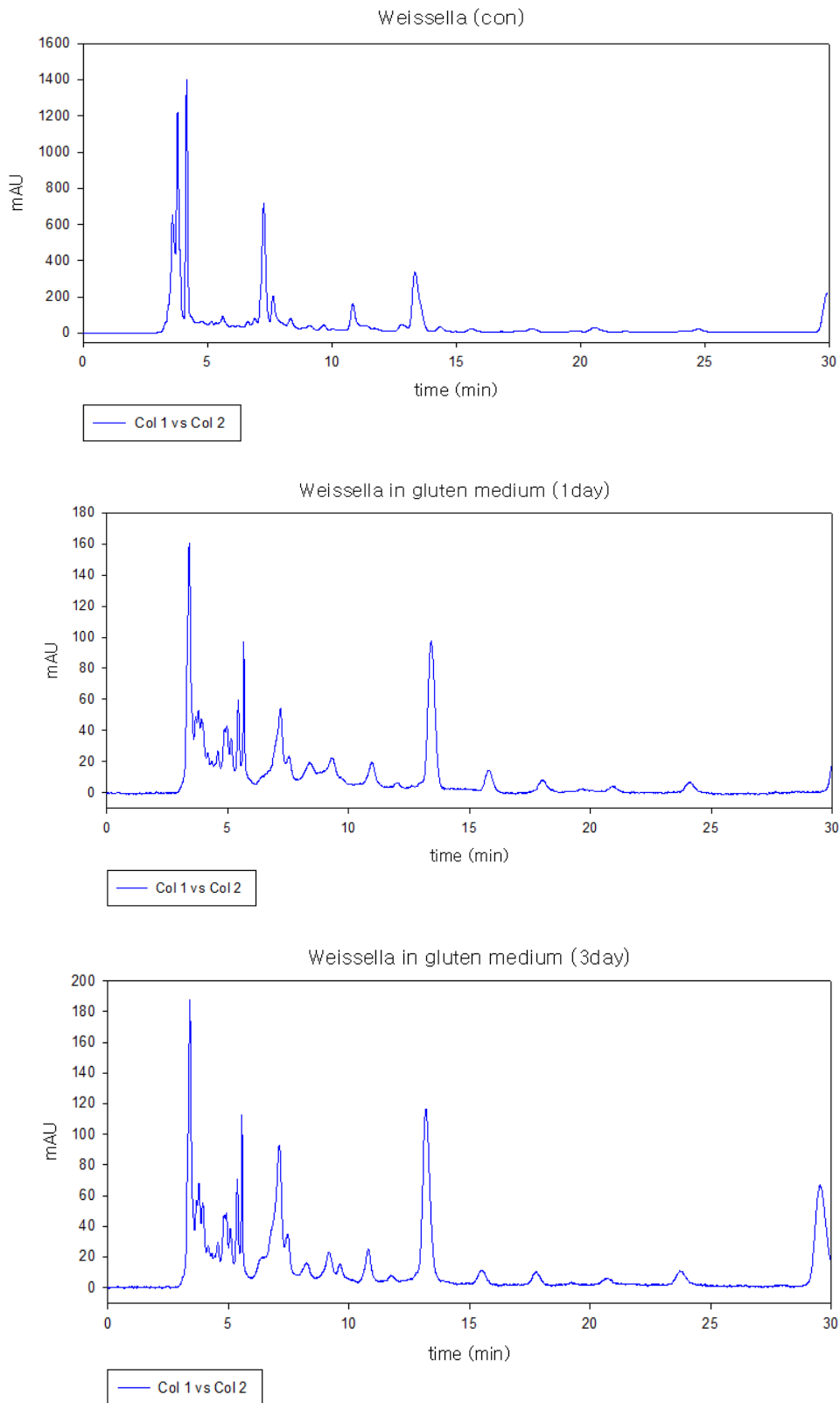


그림 24. 글루텐 배지 내 *Weissella* 배양액의 유기산 생성, con; *Weissella* in MRS

5. 확보 유산균(*Weissella confusa* CJE-0201)의 배양학적 특성 및 Lab scale 대량 배양

가. 유산균의 배양학적 특성

(1) 실험 방법

1) MRS 배지에서의 세포 성장 및 글루텐 분해능

최종 확보된 유산균주인 *Weissella confusa* CJE-0201의 1 % 글루텐이 함유된 MRS 배지상의 세포 성장과 글루텐 분해능 특성은 Jar Fermenter (Kobiotech, Korea)를 이용하여 각각 MRS broth에 pH 조절없이 30°C에서 48시간 동안 배양하며 6시간 간격으로 540 nm에서 흡광도를 측정하여 세포 성장을 분석하였고, 글루텐 분석은 글루텐 함유 배지에서 시험균 배양 후, 글루텐 양을 측정하는 assay 분석 (gluten assay kit, Neogen)을 실시하였다. 시료는 시간별로 샘플링 하였으며, 배양액은 dilution solution과 섞어주고 gluten microwell plate에 100ul 분주하였다. microwell은 plate shaker에서 60 분 배양한 후, microwell의 액체는 버리고 wash solution으로 세 번 세척하였다. 그리고 anti-gliadin peroxidase conjugate (monoclonal antibody)를 100 ul 분주하고 30분 동안 plate shaker에서 배양하였다. wash solution을 이용해 세 번 세척한 후, TMB substrate 100 ul를 분주하고 평편한 바닥에서 strip를 충분히 섞어주었다. 상온에서 30 분 배양한 후, stop solution 50 ul를 분주하고 충분히 섞어주었다. 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

2) 탄소원의 분석

최종 확보된 유산균주인 *Weissella confusa* CJE-0201의 세포성장을 위한 최적 탄소원을 결정하기 위해 1% yeast extract, 0.1% ammonium citrate를 함유한 기본 배지에 0.5%의 sucrose, fructose, glucose, galactose 등을 각각 첨가하여 30°C에서 24시간 배양 후 540 nm에서 흡광도를 측정하여 세포 성장과 글루텐 분해능이 가장 우수한 당을 최적 탄소원으로 선정하였다.

3) 질소원의 분석

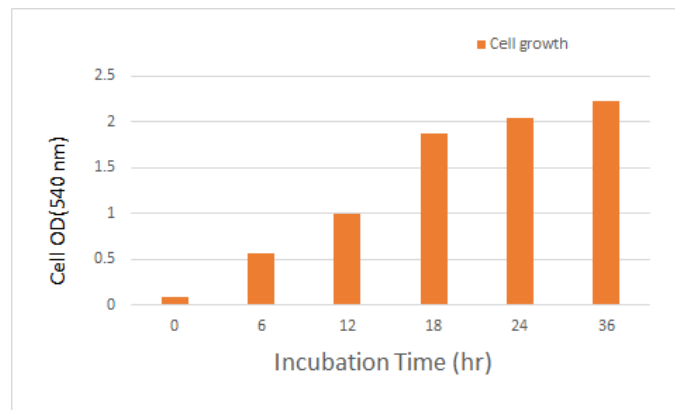
Weissella confusa CJE-0201 균주의 세포성장을 위한 최적 무기질소원을 결정하기 위해 1% yeast extract, 0.5% glucose, 0.05% Potassium dihydrogen phosphate, 0.2% Dipotassium phosphate, 0.02% Magnesium sulfate로 구성된 기본배지에 0.1%의 $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ (Diammonium phosphate), $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ (Ammonium dehydrated phosphate), NH_4NO_3 (Ammonium nitrate), NaNO_3 (sodium nitrate), KNO_3 (Potassium nitrate)를 각각 첨가하고 30°C에서 48 시간 배양 후 540 nm에서 흡광도를 측정하여 세포 성장 및 글루텐 분해능을 비교하였다. 또한 유기질소원의 영양을 알아보기 위하여 1%

ammonium citrate, 0.5% glucose, 0.05% Potassium dihydrogen phosphate, 0.2% Dipotassium phosphate, 0.02% Magnesium sulfate로 구성된 기본배지에 0.1%의 Tryptone, Protose peptone, Poly peptone, Meat extract등의 유기질소원을 첨가하여 35°C에서 24시간 배양 후 540 nm에서 흡광도를 측정하여 무기질소원을 첨가하지 않은 대조군과 세포성장 및 글루텐 분해능 분석을 비교하였다.

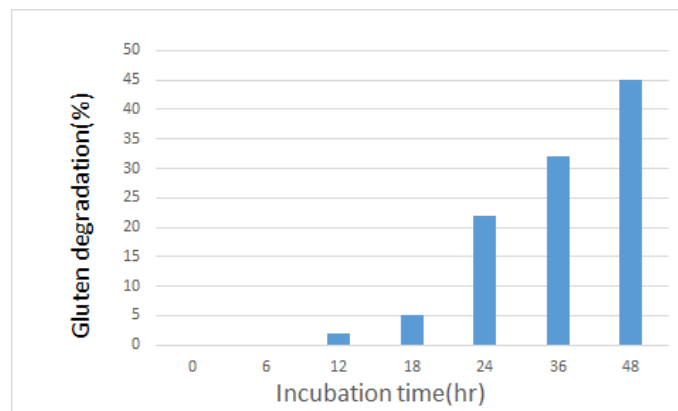
(나) 실험 결과

1) MRS 배지에서의 세포 성장 및 글루텐 분해능

Weissella confusa CJE-0201의 1 % 글루텐이 함유된 MRS 배지상에서의 성장을 특성을 조사한 결과 그림 25에 나타난 바와 같이 세포 성장은 배양 24시간에 cell OD 1.87로 나타났으며, 글루텐 분해능은 48 시간에 최대 45% 정도 분해되는 것으로 나타났다. 따라서 초기 사용 글루텐 사용량의 45% 분해가 일어남을 알 수 있었다.



(A)

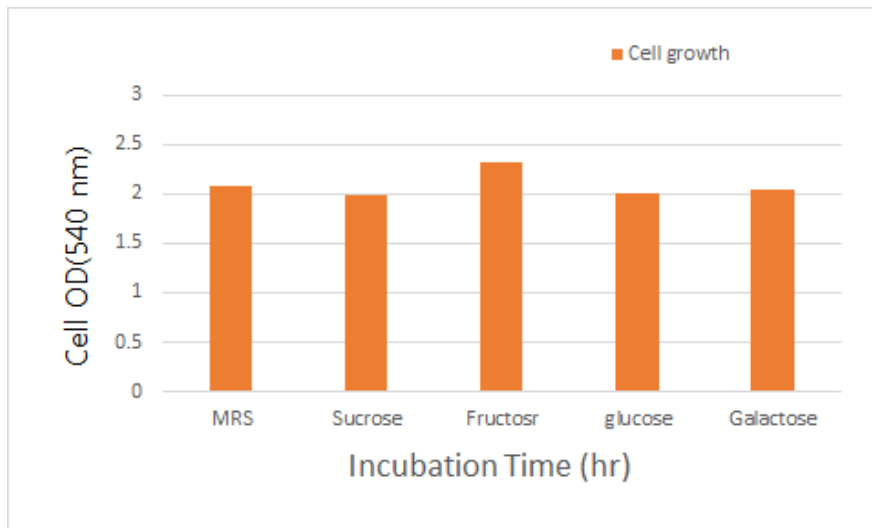


(B)

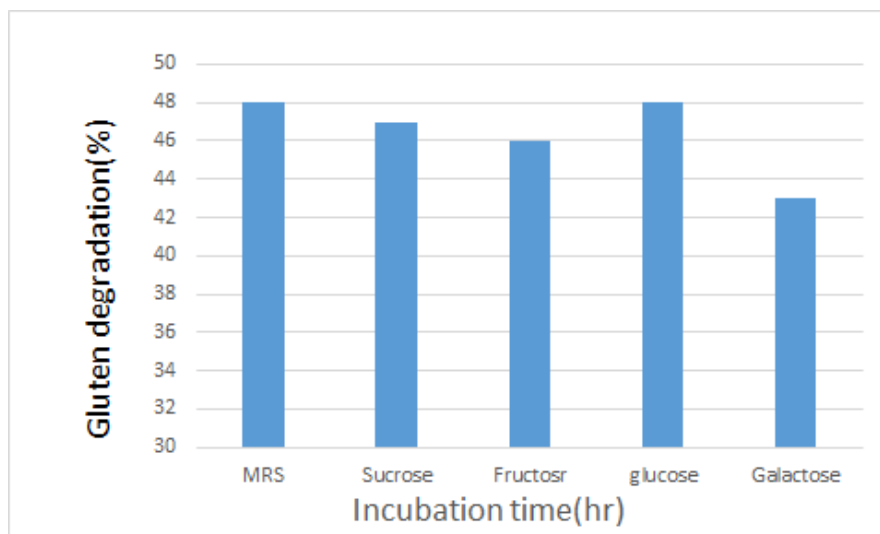
그림 25. 1% 글루텐 함유 MRS에서 *Weissella confusa* CJE-0201의 세포 성장 및 글루텐 분해능

2) 탄소원의 분석

최종 확보된 유산균주인 *Weissella confusa* CJE-0201의 세포성장을 위한 최적 탄소원을 결정하기 위해 1% yeast extract, 0.1% ammonium citrate를 함유한 기본 배지에 0.5%의 sucrose, fructose, glucose, galactose 등을 각각 첨가하여 30°C에서 48시간 배양 후 540 nm에서 흡광도를 측정하여 세포 성장과 글루텐 분해능이 가장 우수한 당을 최적 탄소원으로 선정하였다. 그림 23에 나타난 바와 같이 탄소원의 종류에 따라 세포 성장은 크게 차이가 나지 않았으며, 글루텐 분해능 역시 43 ~ 48 % 정도로 큰 차이는 나타내지 않았다. 또한 glucose를 탄소원으로 사용하였을 경우, MRS 배지를 사용한 것과 같이 글루텐 분해능은 48% 정도로 유사하게 나타났으며, 이러한 결과에 근거하여 탄소원으로는 glucose를 선정하였다.



(A)

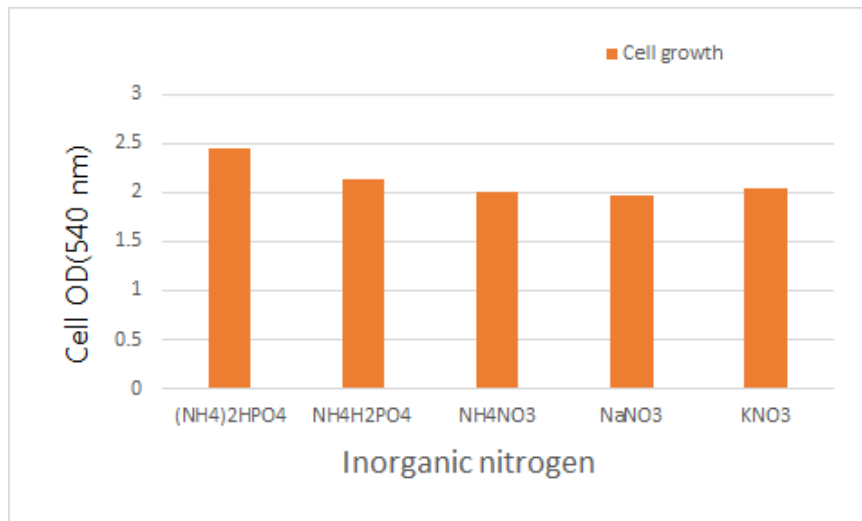


(B)

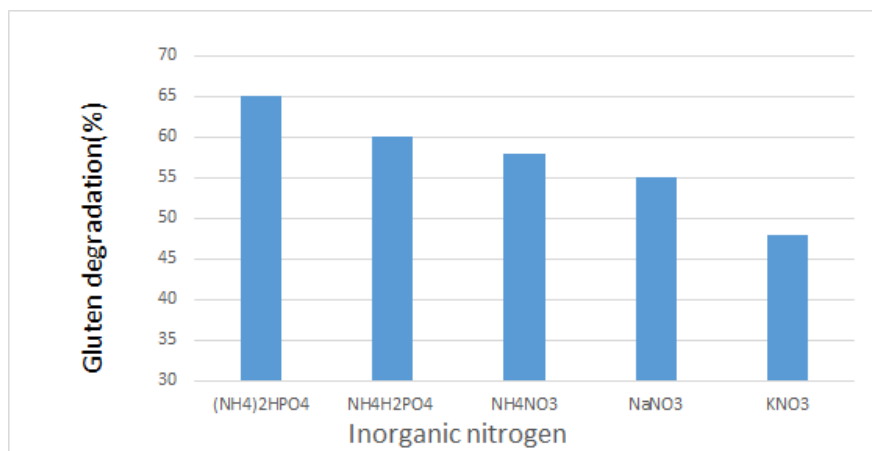
그림 26. 탄소원의 종류에 따른 *Weissella confusa* CJE-0201의 세포 성장 및 글루텐 분해능

3) 질소원의 분석

Weissella confusa CJE-0201 균주의 세포성장을 위한 최적 무기질소원을 결정하기 위해 1% yeast extract, 0.5% glucose, 0.05% Potassium dihydrogen phosphate, 0.2% Dipotassium phosphate, 0.02% Magnesium sulfate로 구성된 기본배지에 0.1%의 $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ (Diammonium phosphate), $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ (Ammonium dehydrated phosphate), NH_4NO_3 (Ammonium nitrate), NaNO_3 (sodium nitrate), KNO_3 (Potassium nitrate)를 각각 첨가하고 30°C에서 48시간 배양 후 540 nm에서 흡광도를 측정하여 무기질소원을 첨가하지 않은 대조군과의 세포성장 및 글루텐 분해능을 비교하였다. 그림 27에 나타난 바와 같이 무기 질소원의 종류에 따라 세포 성장은 큰 차이를 나타내지 않았으나, 글루텐 분해능은 $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ (Diammonium phosphate)를 사용한 결과 약 65% 글루텐 분해능을 나타냈으며, 이는 $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 의해 글루텐 분해 효소의 생산에 많은 영향을 미친다는 것을 알 수 있었다.



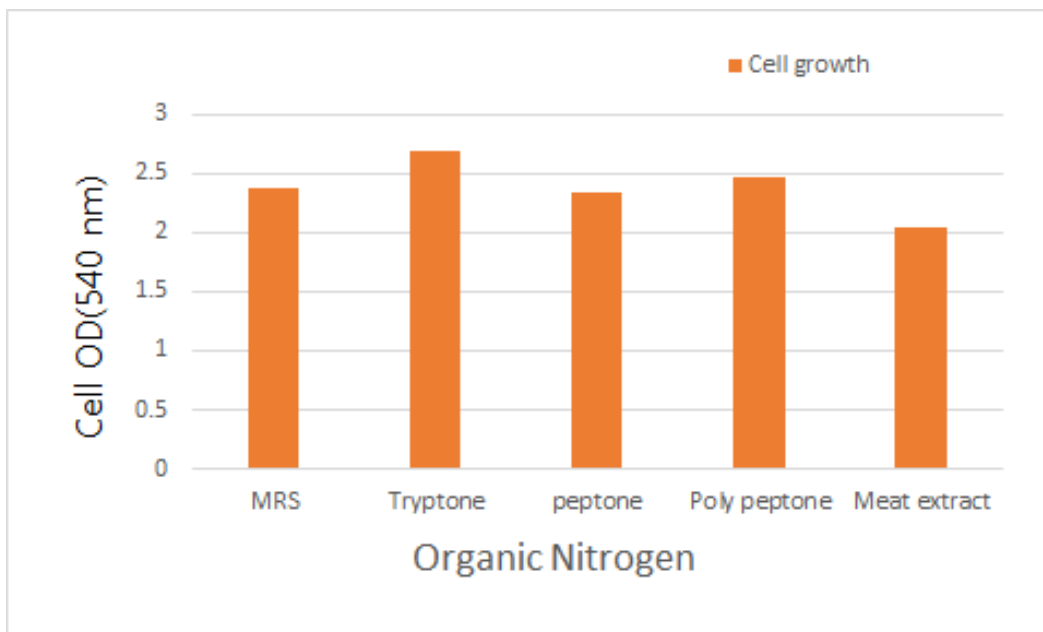
(A)



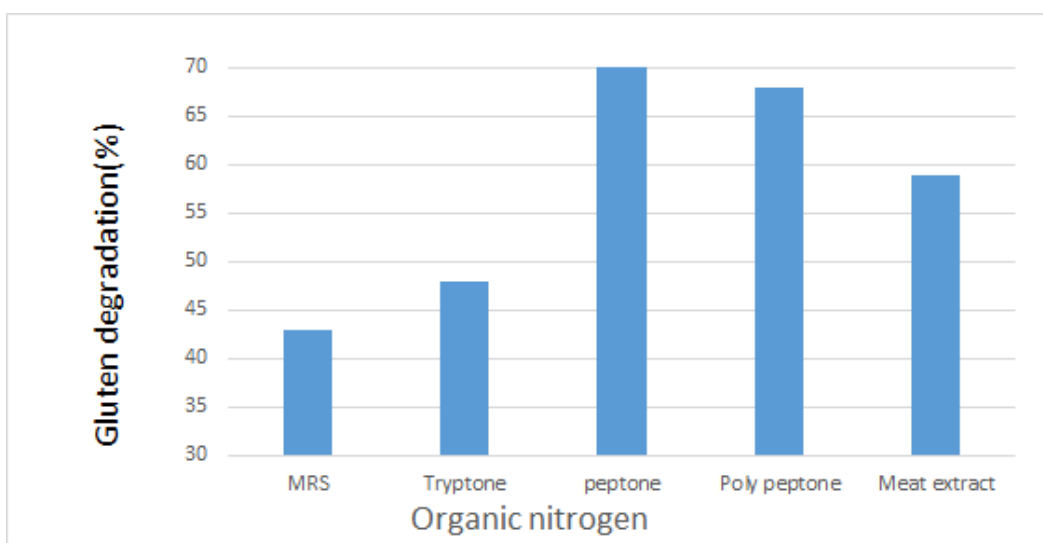
(B)

그림 27. 무기 질소원의 종류에 따른 *Weissella confusa* CJE-0201의 세포 성장 및 글루텐 분해능

또한 유기질소원의 영양을 알아보기 위하여 1% ammonium citrate, 0.5% glucose, 0.05% Potassium dihydrogen phosphate, 0.2% Dipotassium phosphate, 0.02% Magnesium sulfate로 구성된 기본배지에 0.1%의 Tryptone, peptone, Poly peptone, Meat extract 등의 유기질소원을 첨가하여 30°C에서 48시간 배양 후 540 nm에서 흡광도를 측정하여 무기질소원을 첨가하지 않은 대조군과의 세포성장 및 글루텐 분해능 분석을 비교하였다. 그림 28에 나타난 바와 같이 유기 질소원의 종류에 따라 세포 성장은 2.47 ~ 2.69 정도로 MRS 배지에 비해 성장이 높게 나타났다 또한, 글루텐 분해능의 경우에도 MRS 배지에 비하여 48 ~ 75 % 글루텐 분해능을 나타냈으며, 이는 유산균이 유기질소원을 쉽게 이용함으로써 세포 성장 특히 글루텐 분해에 대한 효능이 우수함을 나타낸다.



(A)



(B)

그림 28. 유기 질소원의 종류에 따른 *Weissella confusa* CJE-0201의 세포 성장 및 글루텐 분해능

[2차년도]

1. 국내 발효식품으로부터 글루텐 분해능을 갖는 미생물 확보

가. 실험 방법

(1) 요구르트에서 유산균 분리

요구르트 5종(그림 29)에서 유산균을 분리하기 위해 MRS (1% skim milk) 배지(Difco, USA) 100mL에 요구르트를 각각 5g을 넣고 overnight하여 배양하였다. 0.1% peptone 희석액에 10⁶까지 십진 희석하여 원액, 희석액을 각각 MRS pH 5.4 배지에 도말하였다. 48시간 배양한 후 육안으로 관찰하여 서로 다른 콜로니를 선별하였다. 선별한 콜로니는 MRS 배지에 streaking하여 단일 균주를 얻었으며 다음 실험에 사용하였다.



그림 29. 4종의 요구르트

국내 발효식품 중 김치 등이 아닌 요구르트로부터 유산균을 분리한 이유는 본 연구의 목적이 글루텐 분해용 유산균을 확보하는 것으로서 식물성 발효 식품보다는 동물성 발효식품에서 단백질 분해 효소의 확보가 용이하기 때문이었다.

유산균 분리 및 배지 조성

- 젓갈+MRS with skim milk 1% (ON)
- 각 샘플은 연속 희석하여 MRS pH 5.4 배지에 도말
- 37°C에서 48시간 배양한 후 서로 다른 콜로니 (보양, 프기, 씨) 분리
- 각 샘플에서 50개 콜로니 분리
- BCP 배지를 통해 (purple→yellow) 유산균 확인

↓

• Selected 650 strains

MRS medium (L)	
peptone	1.0% (10g)
egg extract (beef extract)	0.8% (8g)
yeast extract	0.4% (4g)
glucose	2.0% (20g)
sodium acetate (CH ₃ COONa)	0.3% (3g)
polyorbate 80 (also known as Tween 80)	0.1% (1g)
dipotassium hydrogen phosphate (K ₂ HPO ₄)	0.2% (2g)
ammonium citrate	0.2% (2g)
magnesium sulfate (MgSO ₄)	0.02% (0.2g)
manganese sulfate (MnSO ₄)	0.005% (0.05g)
agar	1.5% (15g)
BCP (bromocresol purple)	0.004% (0.04g)

KRIBB 한국생명공학연구원

그림 30. 유산균 분리용 배지 조성 및 분리방법

(2) 유산균의 단백질 분해능 분석

요구르트에서 분리한 유산균은 TSA (1% skim milk) 배지(Difco, USA)에 streaking하여 콜로니 주변에 clear zone 생성 유무를 확인하였다. 글루텐 분해용 유산균을 확보하기 위해서 우선적으로 단백질 분해능이 우수한 유산균주를 선별하였다. 글루텐은 밀전분 생산 시 발생하는 부산물로 물에 불용성 단백질이다. 주로 gliadin(그림 31(A))과 glutenin(그림 31(B))으로 구성되어 있으며 gliadin은 분자량이 30,000~80,000 Da이고, glutenin은 수백만 Da 정도임. 글루텐의 gliadin은 알코올에 용해하나 glutenin은 불용인데, 제빵에서 중요한 역할을 하는 것은 glutenin이다.

따라서, 밀가루를 물과 혼합하면 글리아딘(gliadin)과 글루테닌(Glutenin)이 결합하여 글루텐(그림 31(C))을 형성하며, 글루텐 단백질 중 글리아딘은 점성과 신장성이 있고 글루테닌은 탄력성을 가지고 있다. 이 2 개의 단백질이 밀가루 종류에 따라 점유하는 비율이 다르게 된다. 이에 본 연구에서는 단백질 분해 효소를 분비하는 유산균을 우선적으로 선별하였다.

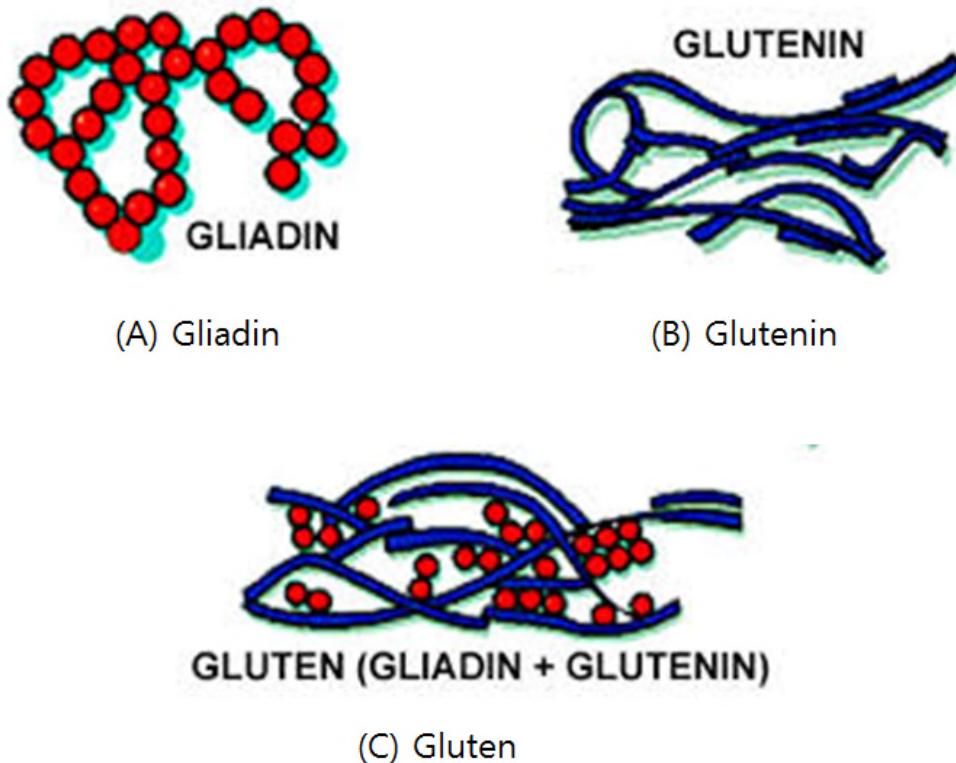


그림 31. 전분 내 Gliadin, glutenin 및 gluten

(3) BCP 배지에서 유산균 확인

선별한 콜로니가 유산균임을 확인하기 위해 MRS 배지에 BCP (Bromocresol purple, Sigma) 0.004%가 포함된 한천배지에 각각의 유산균을 streaking하여 24시간 배양한 후 배지 색의 변화로 유산균임을 확인하였다. 또한 분리한 유산균은 각각 단일 콜로니로 분리하여 MRS 고체 배지에 배양한 후, 저온 냉장 보관하면서 실험에 사용하였다.

나. 실험 결과

(1) 요구르트에서 유산균 분리

4종의 요구르트(그림 29)으로부터 약 100여종의 유산균을 분리하였고, 또한 분리한 유산균은 각각 단일 콜로니로 분리하여 MRS 고체 배지에 배양한 후, 저온 냉장 보관하면서 실험에 사용하였다.

(2) 단백질 분해능 확인

유산균은 E. coli나 yeast와 비교했을 때 낮은 proteinase 생산 활성을 지니지만 우유에 존재하는 casein을 peptide 수준이나 아미노산 수준까지 분해시켜 이용할 수 있다. 아미노산은 유산균의 생육에 필요한 성분이나, 우유 중에는 소량 존재하기 때문에 casein을 아미노산 수준으로 분해시킬 수 있는 복잡한 proteolytic system을 가지고 있다. 유산균의 proteolytic system은 micelle로 존재하는 casein을 분열시키는 작용과 큰 peptide를 가수분해 시켜 작은 peptide나 아미노산 상태로 흡수시킬 수 있는 운반 작용을 포함한다(Law and Haandrinkman, 1997). 젓갈류로부터 분리한 콜로니의 모양, 크기, 색 등의 차이로 선별된 유산균은 30 여 종이었고 각각의 유산균에 대한 단백질 분해능이 있는지 확인하였으며, 결과는 그림 32과 같았다. 불투명한 TSA skim milk 배지에 단백질 분해능이 있는 유산균 주변이 투명하게 clear zone이 형성되었음을 확인하였다.

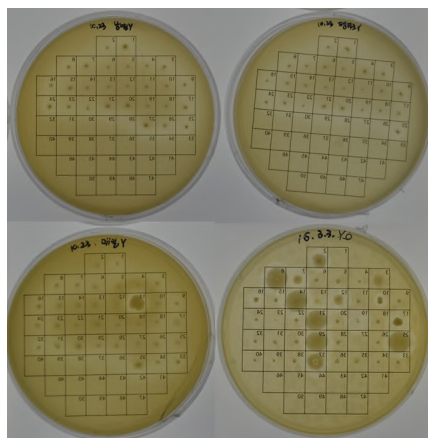


그림 32. 유산균의 단백질 분해능 확인

(3) BCP 배지에서 유산균 확인

단백질 분해능이 있는 것으로 판단되는 콜로니 30 여 종을 선별하여 콜로니가 유산균임을 확인하기 위해 보라색을 띠는 BCP 배지에 콜로니를 streaking 하여 배지가 노란색으로 변하는지 확인하였다. BCP 배지를 이용한 유산균의 확인 방법은 생물 산업 분야에서 활용되는 유산균의 검출 및 계수 방법으로서, 유산균을 포함한 여러 종의 미생물이 동시에 존재할 때 효과적인 유산균의 검출 및 계수 방법에 대하여 규정한다.

특히, 식품공전에서 발효유 또는 유산균 음료 중의 유산균수 측정용으로 규정하고 있는 배지로서, 평판측정용 한천 배지에 브롬크레졸퍼플(bromocresol purple, BCP)을 0.004~0.006 % 첨가한 배지이다. 브롬크레졸퍼플이 pH 5.2에서 노랑을, pH 6.8에서 보라색을 나타내는 원리를 이용하여, 배양 후 나타난 황색 집락을 유산균 집락으로 계측한다.

또한, 식품공전에서는 BCP 첨가 평판측정용 한천 배지의 조성을 다음과 같이 규정하고 있다.

표 1. BCP 첨가 평판측정용 한천 배지의 조성

시약	무게 (g/L)
효모 추출물 (yeast extract)	2.5
펩톤 (peptone)	5.0
포도당 (dextrose)	1.0
폴리옥시 에틸렌 솔비탄 모노올레이트 (polyoxyethylene sorbitan monooleate)	1.0
L-시스테인 (L- cysteine)	0.1
한천 (agar)	15.0

따라서 본 연구에서도 젓갈류로부터 분리한 유산균을 BCP 배지에서 pH 5.2 이하 조건에서 노란색으로 변하는 특징을 이용하여 유산균임을 확인하는 실험을 수행하였다. 선별된 미생물 중 6종을 제외한 나머지 균들은 배지색이 노란색으로 변한 것을 확인할 수 있었다(그림 33).

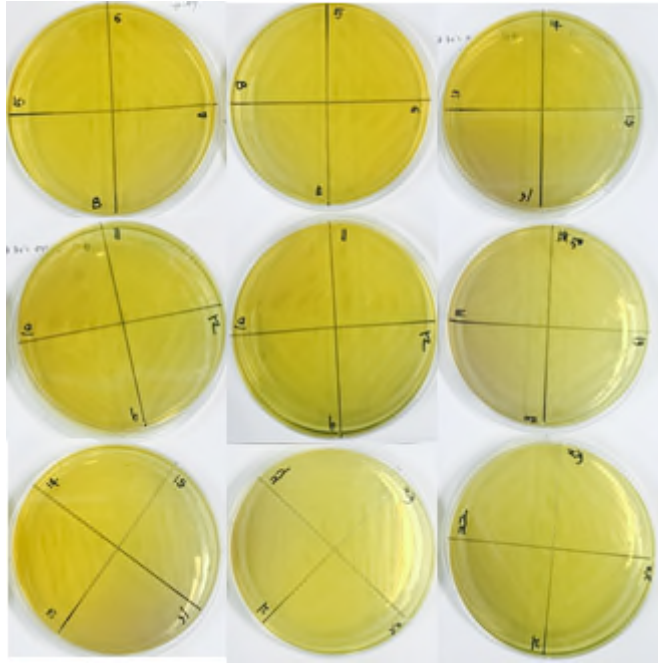


그림 33. BCP 배지에서 유산균 확인

2. 글루텐 분해능 유산균의 확보

가. 실험 방법

(1) 유산균의 단백질 분해능 분석

요구르트에서 분리한 유산균은 TSA (1% skim milk) 배지(Difco, USA)에 streaking하여 콜로니 주변에 clear zone 생성 유무와 그 크기를 확인하였다.

(2) Gluten assay

단백질 분해능이 우수한 균주 6 여 종의 배양상등액과 글루텐으로 만든 반죽을 이용하여 글루텐 양을 측정하는 assay 분석 (gluten assay kit, Neogen) 을 실시하였다. 선별된 균주를 각각 MRS 배지에 37°C에서 24시간 배양 후 원심분리(6000rpm, 20min, 4°C)하여 배양상등액을 얻었다. 글루텐 10g과 배양상등액 10ml로 반죽하였으며 대조군은 배양 상등액 대신에 멸균수 10ml을 글루텐 10g과 반죽하였다. 반죽의 발효 0시간과 24시간에 샘플링 하였으며, gluten assay kit를의 실험 방법에 따라 실험을 진행하였다(그림 34).

유산균 gluten assay

- **글루텐 발효**
 - Control : gluten 10 g + 물 10 mL
 - Samples : 유산균 배양액 10 mL (washX2) + gluten 10g
 - Incubation : 37°C, 24 hr
- **Gluten assay protocol**
 - Gluten 2g + extract buffer 20 mL → homogenize for 90 s
 - >500g centrifuge for 10 min
 - Supernatant 10 ul + dilution buffer 490 ul
 - 100 ul sample extract in gluten plate (for 60 min)
 - Wash X3 with Washing buffer
 - Anti-gliadin peroxidase conjugate 100 ul in gluten plate (for 30 min)
 - Wash X3
 - TMB substrate 100 ul (for 30min) → blue color
 - Stop solution 50 ul → yellow color
 - Absorbance 450 nm

KRIBB 한국생명공학연구원

그림 34. 글루텐 분해능 확인을 위한 실험 방법

(3) SDS-PAGE를 활용한 gluten 분해능 확인

단백질 분해능이 확인된 선별 균주의 글루텐 분해능을 확인하기 위해 SDS-PAGE를 실시하였다. SDS-PAGE는 질량 차이를 이용한 단백질 분리 방법이며, 결과에 나타난 밴드의 위치로 단백질 분자량을 확인 할 수 있다. 글루텐이 함유된 GBM(gluten based medium) 배지에서 선별 균주들을 배양하였다. GBM의 조성은 gluten from wheat flour (9%), glucose (2%), KH₂PO₄ (1%), K₂HPO₄ (1%), Tween-80 (0.1%, v/v) 이며, 100ml씩 제조하여 전배양액 1%를 접종한 후 37°C에서 24시간, 140rpm으로 배양하였다. 0시간, 12시간, 24시간 배양액을 샘플링 하였고, control은 GBM배지를 사용하였다. 원심분리(6000rpm, 20min, 4°C)하여 얻은 상등액을 sample loading buffer로 2배 희석하여 5분간 열처리하여 SDS-PAGE Gel의 sample well에 각각 주입하였다. sample이 stacking gel을 내려갈 때는 전압을 60 v로 유지했다가 separating gel을 내려올 때는 110v로 전압을 올려주었다.

나. 실험 결과

(1) 선별 유산균의 단백질 분해능 확인

최종 유산균으로 선별된 30 여 종의 유산균은 1% skim milk가 함유된 TSA skim milk 배지에서 단백질 분해능 유무를 확인하였다 (그림 35). 각 선별 유산균은 콜로니 주변으로 clear zone을 형성하였음을 확인하였다. clear zone의 크기가 큰 6종의 유산균은 선별하여 다음 실험에 사용하였다.

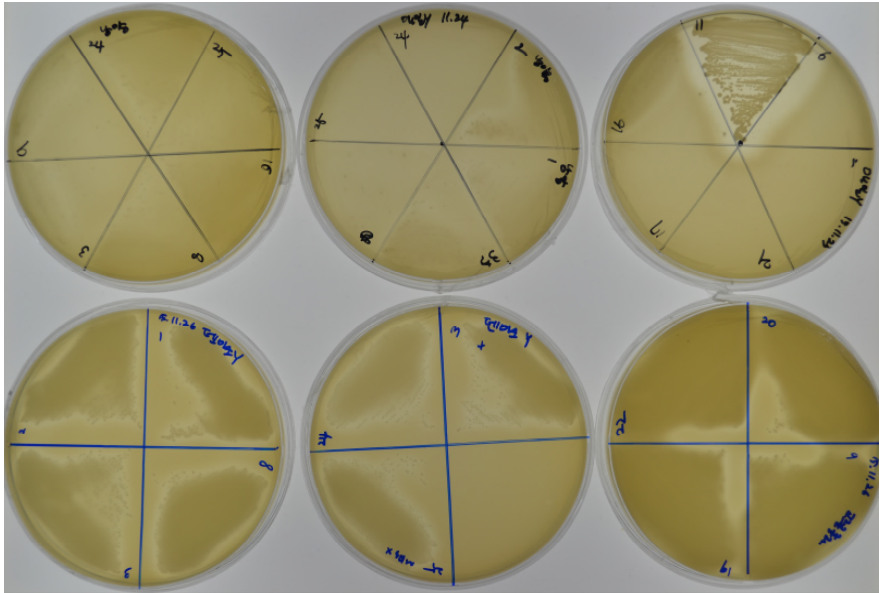


그림 35. 유산균의 단백질 분해능 확인

(2) 유산균의 글루텐 분해능 분석

단백질 분해능 실험을 통하여 단백질 분해능이 우수한 유산균 중 6 여 종을 선별하였다. 균주들의 글루텐 분해능을 확인하기 위해 글루텐 분석 실험을 하였다. 6 여 종의 유산균 배양상등액과 글루텐을 반죽하였고, 발효전과 후의 글루텐 양의 변화를 확인하였다(그림 36). 반죽의 발효 전과 24시간 후의 글루텐 양을 비교하였고, 요15, 요26, 요8, 요2 의 글루텐 양이 감소한 것을 확인하였다.

(3) SDS-PAGE를 활용한 gluten 분해능 확인

글루텐 분해능을 확인하기 위하여 *Lactobacillus casei*와 *Lactobacillus acidophilus*를 GBM broth 에 접종한 후 12시간 간격으로 24시간까지 샘플링하여 SDS-PAGE를 실시하여 확인하였다. con은 GBM 배지이며 0h, 12h, 24h는 배양시간마다 샘플링 한 배지이다. 배양 12시간과 24시간에는 밴드가 내려와 있는 것을 확인하였고, 이는 글루텐의 분해로 인해 분자량이 감소한 단백질이 측정된 것이다.

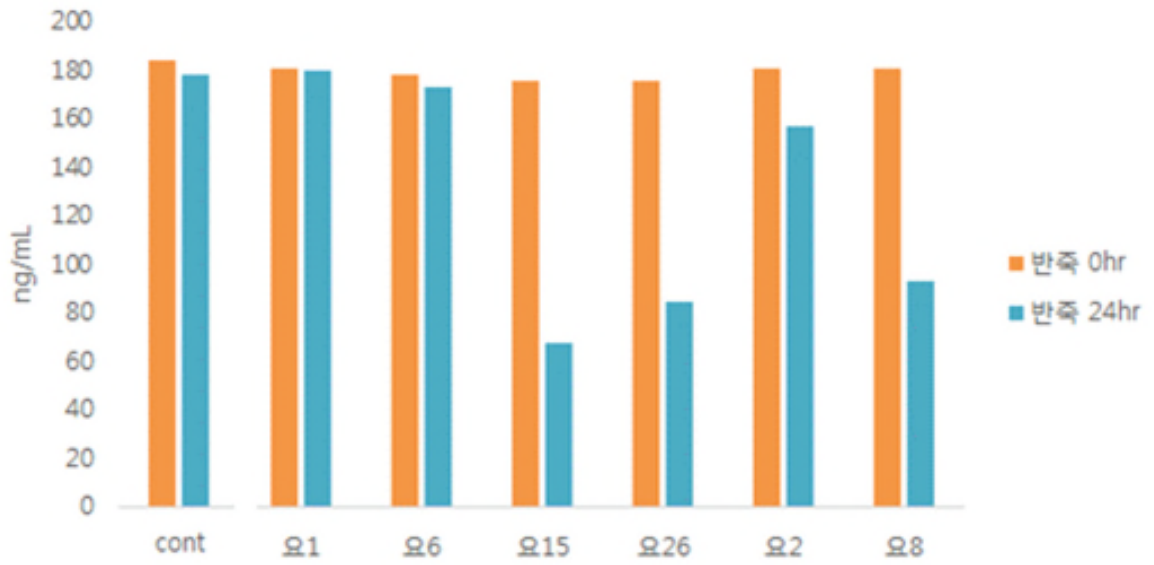


그림 36. 글루텐 assay 결과

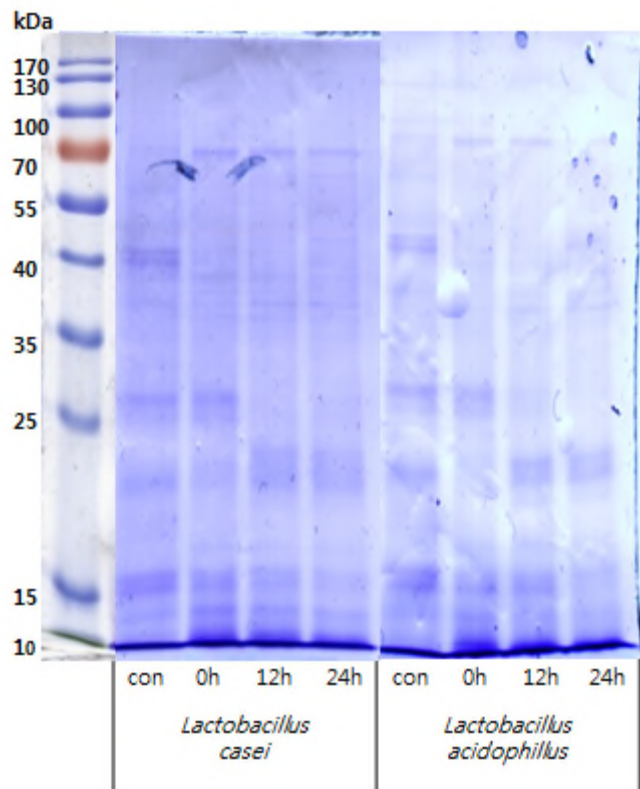


그림 37. SDS-PAGE 결과

3. 글루텐 분해능을 갖는 유산균의 동정 및 생화학적 특성 분석

가. 글루텐 분해능을 갖는 미생물의 동정

(1) 실험 방법

1) API 50CHL kit 동정

분리 유산균은 MRS broth에서 24시간 배양한 배양액이나 MRS agar의 단일 콜로니를 CHL medium 에 접종한다. API 50CHL 스트립은 건조된 기질을 함유하고 있는 50개의 튜브로 되어 있다. 각 cupules에 시험균을 접종하고 37°C에서 48시간 배양한 후, 색의 변화를 체크한다. 50개 탄수화물이 유일한 탄소원으로 들어있는 kit의 cupules에 배양한 후 시험균이 당을 이용할 수 있는지 여부를 색의 변화로 판정할 수 있다. 보라색의 배지는 각각의 당을 이용하면서 노란색으로 변하게 되며, 이를 양성(+)으로 표시한다 (그림 38). 시험 결과 값은 API web software에서 확인하였다.

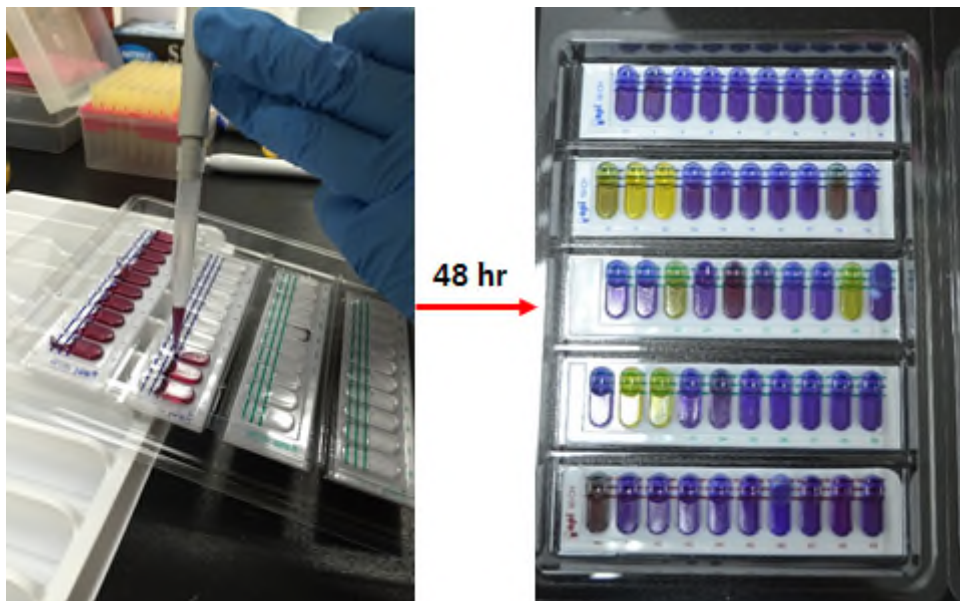


그림 38. API 50 CHL kit 동정

2) 16S rRNA sequencing 분석

분리 균주는 MRS broth에 접종한 다음 37°C에서 18시간 2차 계대 배양하여 배양액 2mL을 4,000 rpm에서 10분 동안 원심분리 하였다. 원심분리 하여 얻은 세포 침전물을 0.85% NaCl로 3회 세척하였다. 세척 후, lysozyme (10 mg/mL) 0.5mL을 첨가하여 37°C, 1시간 동안 처리하였다. Protease K (mg/mL) 20 μ L와 10% sodium dodecyl sulfates (SDS) 25 μ L를 첨가한 후, 60°C water bath에서 30분

처리한 후 RNase 1 μ L 첨가하여 37°C, 1시간 처리하였다. 동량의 Phenol-Chloroform- Isoamyl alcohol (25:24:1)을 첨가하여 현탁한 후, 14,000 rpm으로 5분 동안 4°C에서 원심분리 하여 상층액만 취한 다음 2회 반복하였다. 상층액 양의 1/2 volume의 3M ammonium acetate (pH4.8)와 2 volume의 100% alcohol을 첨가하고 -20°C에서 1시간 정치하였다. 3,000 rpm으로 5분 동안 4°C에서 원심분리 하여 세포 침전물을 확인하고, 상등액을 완전히 제거한 후에 70% ethanol 1mL을 넣고 다시 3,000 rpm으로 5분 동안 4°C에서 원심분리 하였다. 상층액 제거 후에 Dry 시키고 TE buffer나 증류수로 현탁하여 DNA를 분리하였다. 미생물의 16s rRNA를 증폭하기 위해 universal primer인 forward primer(27f) : (5'- AGA GTT TGA TCM TGG CTC AG -3') 와 reverse primer(1492r) : (5'- GGT TAC CTT TGT TAC GAC TT -3')를 사용하였다. PCR 조건은 94°C에서 5분간 처리 후, 94°C에서 1분, 62°C에서 40초, 72°C에서 40초로 30cycles을 반복하였으며, 72°C에서 7분으로 반응을 종료하였다. PCR 반응 산물을 0.8% agarose gel로 전기영동을 실시하여 확인하였다. 염기서열을 분석하여 NCBI BLASTN 프로그램을 사용하여 bacteria species를 동정하였다.

(2) 실험 결과

1) API 50 CHL kit를 이용한 선별 유산균의 동정

글루텐 분해능이 우수하여 글루텐 assay 결과가 감소하였던 유산균 4 여 종을 대상으로 API 50 CHL kit를 이용해 동정한 결과는 표 2와 같이 나타났다. 대부분의 선별 유산균은 *Lactobacillus* 종으로 동정되었다. 또한 *Lactobacillus paracasei* 유산균의 API 50 CHL kit 활용 동정 결과 표 3과 같이 나타났다.

표 2. API 50 CHL 동정 결과

Strain	Description	Identities(%)
Yogurt2	<i>Lactobacillus paracasei</i>	99.8
Yogurt8	<i>Lactobacillus paracasei</i>	99.8
Yogurt15	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	98.8
Yogurt26	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	99.8

표 3. *Lactobacillus paracasei*의 API 50 CHL test 결과

API 50 CHL			
Control	-	Esculin	+
Glycerol	-	salicin	+
Erythritol	-	D-cellobiose	+
D-Arabinose	-	D-maltose	+
L-Arabinose	-	D-lactose	+
Ribose	+	D-melibiose	-
D-xylose	-	D-sacharose	+
L-xylose	-	D-trehalose	+
Adonitol	-	Inulin	+
Methyl-B-D-Xylopyranoside	-	D-melezitose	-
D-galactose	+	D-raffinose	-
D-glucose	+	Amidon	-
D-fructose	+	Glycogene	-
D-mannose	+	Xylitol	-
L-sorbose	-	Gentiobiose	+
L-rhamnose	-	D-turanose	-
Dulcitol	-	D-Lyxose	-
Inositol	-	D-Tagatose	+
D-mannitol	+	D-Fucose	-
D-sorbitol	-	L-Fucose	-
Methyl- α ,D-Mannopyranoside	-	D-Arabitol	-
Methyl- α ,D-Glucopyranoside	-	L-Arabitol	-
N-Acetyl-Glucosamine	+	Gluconate	-
Amygdaline	-	2-Keto-Gluconate	-
Arbutin	+	5-Keto-Gluconate	-

동정결과: *Lactobacillus paracasei* (99.8%)

API 50 CHL kit 동정, + : 양성, - : 음성

2) 16S rRNA sequencing 분석으로 선별 유산균 동정

API 50 CHL kit를 이용해 동정한 선별 유산균은 16s rRNA sequencing 분석으로 동정하였다 (표 4). API 50 CHL 동정결과와 비교하였을 때, 16S rRNA sequencing 분석 결과도 대부분의 선별 유산균이 *Lactobacillus* 종으로 동정되었다. Yogurt15만 API 50 CHL 동정결과와 16S rRNA sequencing 분석 결과가 달랐다. Yogurt2와 Yogurt8은 *Lactobacillus paracasei*로 동일한 균이었고, Yogurt15와 Yogurt26은 *Lactobacillus acidophilus*로 동일한 균으로 확인되었다. 반죽 실험에서 글루텐 분해능이 우수했던 *Lactobacillus paracasei* strain R094를 최종균주로 선별하였다.

표 4. 16S rRNA sequencing 동정결과

Strain	Description	Identities (%)
Yogurt2	<i>Lactobacillus paracasei</i> strain R094	100
Yogurt8	<i>Lactobacillus paracasei</i> strain R094	100
Yogurt15	<i>Lactobacillus acidophilus</i> NCFM strain	100
Yogurt26	<i>Lactobacillus acidophilus</i> NCFM strain	100

나. 글루텐 분해능을 갖는 미생물의 확인

(1) 선별 유산균의 현미경 사진

글루텐 분해능을 갖는 선별 유산균인 *Lactobacillus paracasei*의 현미경 사진은 그림 39와 같았으며, 기다란 간균 형태임을 확인 할 수 있었다.

(2) *Lactobacillus paracasei*의 생화학적 특성 분석

(가) 실험 방법

1) 내산성 분석

주로 식품이나 사료 첨가제로 사용되는 프로바이오틱스 유산균은 장의 건강유지에 중요한 역할을 하는데, 정장작용을 수행하기 위해서는 pH 2~3인 사람이나 동물의 위를 통과하면서 사멸하지 않고 장

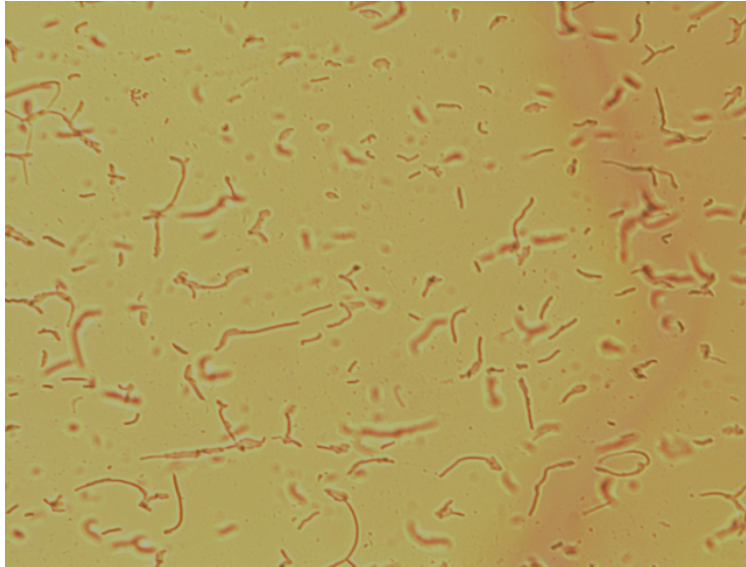


그림 39. *Lactobacillus paracasei* 현미경 사진

까지 도달하여야 한다. 프로바이오틱스 유산균이 위를 통과하기 위해서는 위액에 대한 내성이 있어야 하며, 위를 통과한 후 장관에 도달하여 내인성 미생물의 균형과 대사에 영향을 줄 수 있다. 따라서 본 연구에서는 분리된 유산균의 내산성 여부를 조사하였다. 전배양한 분리 유산균을 pH 2.0부터 pH 10.0까지 pH 1 단위로 조절한 10 mL MRS배지에 각각 10% 접종하였다. 37°C에서 2시간 동안 방치한 후 연속 희석하여 10^4 , 10^5 , 10^6 배양액 100 uL를 MRS agar 배지에 도말하였다. 48시간 배양한 후 균체의 총 수를 세어 산에 대한 내성을 조사하였다.

2) 내담즙성 분석

위를 통과하여 소장의 첫 부분인 십이지장에 도달하였더라도 담즙산에 의한 생육제해를 극복해야 대장에 도달할 수 있다. 췌장에서 십이지장으로 분비되는 담즙산은 지질과 지방산으로 이루어진 세포막을 파괴함으로써 미생물의 생존율을 저하시키며, 이로 인해 세포막과 외부환경 간의 상호작용에도 영향을 미친다. 따라서 본 연구에서는 분리된 유산균의 내담즙성 여부를 조사하였다. oxgall 0.1% 부터 1%까지 0.1% 단위로 조절하였고, 전배양한 *L.paracasei*를 각 농도별 oxgall MRS배지 10ml에 10% 접종하였다. 37°C에서 4시간 동안 방치한 후 연속 희석하여 10^4 , 10^5 , 10^6 배양액 100 uL를 MRS agar 배지에 도말하였다. 48시간 배양한 후 균체의 총 생균수를 세어 담즙산에 대한 내성을 조사하였다.

3) 내열성 분석

전배양한 분리 유산균을 10mL MRS 배지에 온도별로 각각 10% 접종하였다. 30°C, 40°C, 50°C에서 1시간 동안 방치한 후 연속 희석하여 10^4 , 10^5 , 10^6 배양액 100uL를 MRS agar 배지에 도말하였다. 48

시간 배양한 후 균체의 총 수를 세어 열에 대한 내성을 조사하였다.

4) 병원성 미생물에 대한 항균활성 분석

프로바이오틱스 유산균은 *in vitro* 조건에서 식품 유래의 병원성 세균과 부패세균의 생육을 억제한다고 알려져 있으며 이러한 억제 기작은 유산균에 의해서 생성된 유산, 저급 지방산, hydrogen peroxide, diacetyl, 박테리오신(bacteriocin), 항생물질 및 면역 체계 자극 등의 작용이라고 설명된다. 박테리오신에 관한 연구는 20년 전부터 가속화되어 유럽이나 미국에서는 이미 산업화 단계에 있으며 우량 균주 확보 및 기술 개발과 특허 출현 등 다양한 연구가 진행되고 있다. 따라서 본 연구에서는 분리된 유산균의 병원성 미생물에 대한 항균 활성 여부를 조사하였다. 37°C에서 24시간 배양된 병원성 미생물 8종(표 6)을 Nutrient agar (Difco, USA) plate에 100 uL 도말하였다. 도말된 평판배지에 직경 8 mm의 흡을 뚫고, 흡 안에 배양상등액을 각각 200uL 분주하였다. 배양상등액은 37°C MRS broth에서 24시간 배양된 *L.paracasei*의 배양액을 원심 분리하여(6000rpm, 20분, 4°C) 얻었다. 상등액이 가해진 plate를 각 병원성 미생물 생육 최적온도에서 24시간 배양한 후 흡 주위의 생육저지환 생성 여부를 확인하고 환의 크기를 측정하였다.

표 6. pathogenic bacterium

No.	Strain name		temp(°C)	Media
1	<i>Escherichia coli</i>		37	Nutrient Agar
2	<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>aureus</i>	KCTC 1928	37	Nutrient Agar
3	<i>Erwinia raphontici</i>	KCTC 2567	30	Nutrient Agar
4	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	KCTC 1917	37	Nutrient Agar
5	<i>Listeria monocytogenes</i>	KCTC 3569	37	Brain heart infusion agar
6	<i>Shigella flexneri</i>	KCTC 3624	37	Nutrient Agar
7	<i>Shigella sonnei</i>	KCTC 2518	37	Nutrient Agar
8	<i>Bacillus cereus</i>	KCTC 2517	30	Nutrient Agar

(나) 실험 결과

1) *Lactobacillus paracasei*의 내산성 평가

*L. paracasei*의 pH 2부터 pH 10까지 조정된 MRS배지에서의 내성을 평가하였고, 그림 40과 표 6의 결과를 얻었다. 선별 유산균 여 종은 pH 2.0으로 조정된 MRS 배지에서의 내성을 평가하였고 그림 13의 결과를 얻었다. 신 등(1999)은 사람의 분변에서 분리한 *L. acidophilus* KY 2104는 pH 3.0에서 2 시간 정치시 초기농도의 100% 생존율을 보였고, pH 2.5에서는 90%의 생존율을 보였으나, pH 2.0에서 64% 생존하는 것을 보고하였다. 또한 박 등(2003)에 의하면 발효유와 의약품용 정장제에서 분리한 *L. acidophilus* A는 pH 3.0까지는 초기 접종균수를 유지하다가 pH 2.5 이하에서는 급격하게 사멸하기 시작하여 pH 2.0에서는 103 cfu/ml 이하로 생존하였으며, B는 pH 2.3 이하에서는 거의 생존하지 않는다고 하였다. Conway 등(1987)도 pH 2.5에서 105 cfu/ml 이하로 생존하는 것으로 보고하였다. 본 실험에서 사용된 *L. paracasei* 는 pH 3.0에서 2시간 경과시 84%의 높은 생존율을 나타내고 있었으며, pH 2.0에서는 사멸하는 것으로 확인하였다. 이는 유사한 연구 보고와 같이 우수한 내산성을 가짐으로써 향후 식품 산업에 활용 가능성이 우수하다고 할 수 있다.

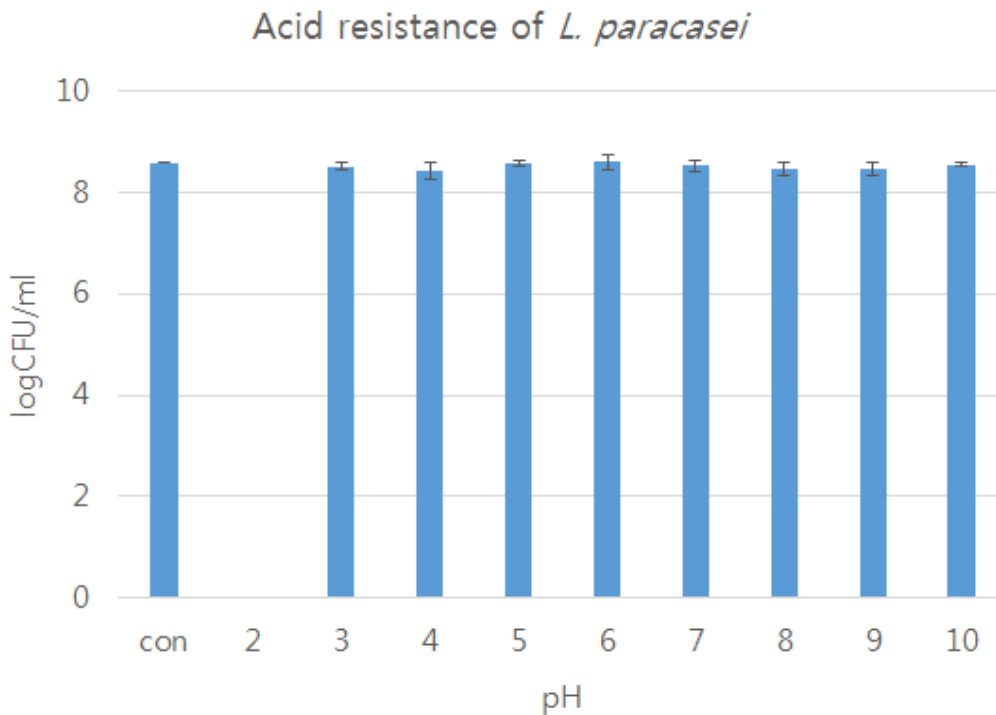


그림 40. *Lactobacillus paracasei* 의 내산성 평가

표 7. *Lactobacillus paracasei*의 내산성 평가 (pH별 생존율)

pH	Initial cell number	After 2 hour	Survival(%)
2	3.90E+08	-	0%
3	3.90E+08	3.27E+08	84%
4	3.90E+08	3E+08	70%
5	3.90E+08	4E+08	97%
6	3.90E+08	4.13E+08	106%
7	3.90E+08	3.4E+08	87%
8	3.90E+08	2.97E+08	76%
9	3.90E+08	3.03E+08	78%
10	3.90E+08	3.55E+08	91%

$$\text{survival(\%)} = \text{final}(\text{cfu/ml}) / \text{control}(\text{cfu/ml}) \times 100$$

2) *Lactobacillus paracasei*의 내담즙성 평가

*L. paracasei*의 내담즙성을 평가하였고 결과는 그림 41와 표 7에 나타내었다. 미생물이 생존한 상태로 장관에 도달하려면 췌장에서 십이지장으로 분비되는 담즙에 대한 내성이 있어야 하며 유산균이 probiotics로서의 기능을 발휘하기 위해서는 oxgall이 0.3% 함유된 배지에서 성장할 수 있을 정도의 내성을 갖고 있어야 한다 (Gilliland 등, 1984). 담즙산을 각각 0.1%, 0.2%, 0.3%, 0.4%, 0.5%, 0.6%, 0.7%, 0.8%, 0.9%, 1.0% 첨가한 MRS 액체배지에 *L. paracasei*의 내담즙성 실험을 실시한 결과, 0.3% 이하에서는 균이 자라지 못하는 것을 볼 수 있었다. 또한 0.1%에서는 오히려 잘 성장했지만(생존률 403%) 0.2%와 0.3%는 크게 감소한 모습을 보였고, 생존율은 0%였다. 이 등(2013)에 의하면 *L. paracasei* 균은 0.5% oxgall 농도에서 아무런 생육억제 현상이 없었으나 2.0%의 oxgall이 함유된 배지에서는 약간의 균수 감소현상이 있다고 하였다. 신 등(1995)에 의하면 *Lactobacillus* 균주의 경우 0.3% bile salt를 첨가하였을 때 1~100% 정도의 생존율을 나타내었고. 장내에서 유래되지 않는 *Lactobacillus*의 경우 oxgall이 0.15% 함유된 LBS 배지에서 성장하지 못함을 보고하였으며, 장내 유래 세균이 아닌 경우는 아주 적은 농도의 담즙에 대해서도 민감하다고 하였다. 또한 유산균이 probiotics로서의 기능을 수행하려면 oxgall이 0.3% 함유된 배지에서 성장할 수 있을 정도의 내성을 가지고 있어야 한다는 Gilliland 등의 보고와 비교시 본 실험에 사용한 *L. paracasei*는 담즙에 대하여 매우 강한 내성을 지고 있다고 보긴 어렵다.

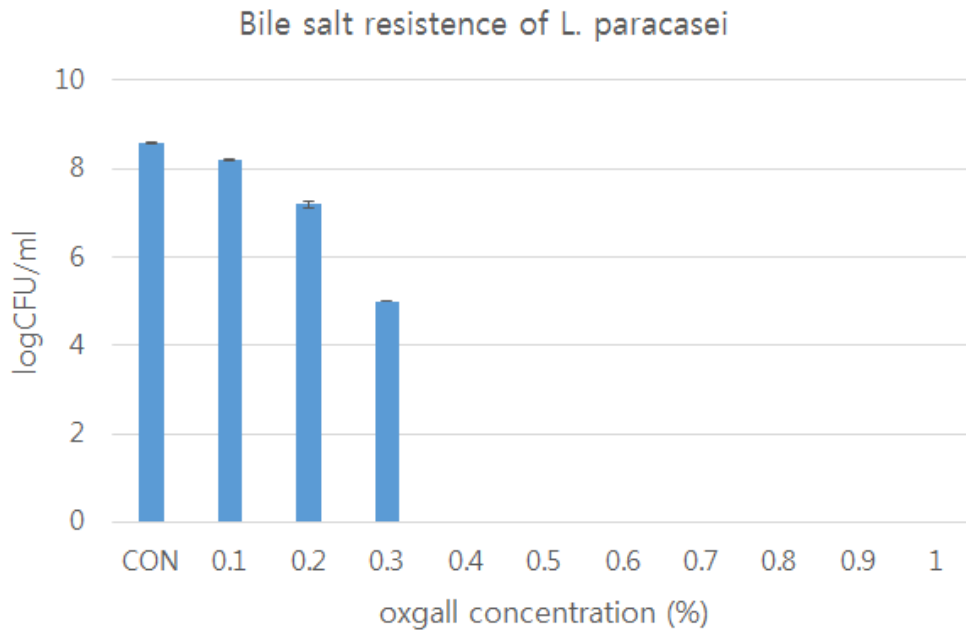


그림 41. 선별 유산균의 내담즙성 평가

표 8. *Lactobacillus paracasei*의 내담즙성 평가 (oxgall 농도별 생존율)

% oxgall	initailcell number	After 4 hour	Survival(%)
0.1	3.9E+13	1.57E+14	403%
0.2	3.9E+13	15633333	0%
0.3	3.9E+13	100000	0%

$$\text{survival(\%)} = \text{final}(\text{cfu/ml}) / \text{control}(\text{cfu/ml}) \times 100$$

3) *Lactobacillus paracasei*의 내열성 평가

*L. paracasei*의 열에 대한 안정성을 조사하기 위해 MRS broth에서 배양한 배양액을 40°C부터 10°C간격으로 50°C까지 2시간 열처리 후 생균수 및 내열성을 확인하였다 (그림 42, 표 8.). 일반적으로 *Bifidobacterium sp.*의 경우 50°C 이상의 온도에서는 열 안정성이 감소하는 것으로 알려져 있으며, Mario(2006)의 연구에 의하면 *Streptococcus sp.*의 경우엔 50°C이상의 온도에 열처리했을 때 안정한 것으로 알려져 있다. *L. paracasei*는 40°C에서 생존율이 7%로 감소되는 모습을 보였고, 50°C 이상의 온도에서는 사멸하는 것을 확인하였다.

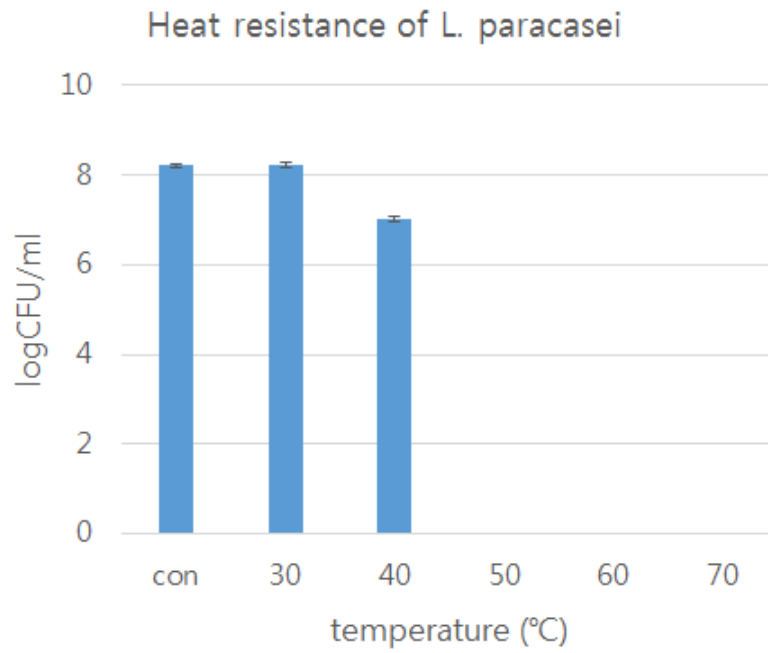


그림 42. 선별 유산균의 내열성 평가

표 9. *Lactobacillus paracasei*의 내열성 평가 (온도별 생존율)

temp(°C)	initail cell number	after 2 hour	Survival(%)
30	1.63E+08	176000000	108%
40	1.63E+08	10766666.67	7%
50	1.63E+08	100000	0%

$$\text{survival}(\%) = \text{final}(\text{cfu/ml}) / \text{control}(\text{cfu/ml}) \times 100$$

4) 병원성 미생물에 대한 항균활성

Lactobacillus 속은 인체에 유익한 미생물로 다양한 발효 유제품의 starter로 이용되고 있으며, 이러

한 발효 유제품을 섭취함으로써 인체의 장 내에 유해세균의 증식을 억제한다는 연구 결과가 밝혀짐에 따라 가치가 높아지고 있다(강 등, 2001). 임 (2007) 등은 *L. salivarius* CPM-7균주의 배양시간에 따른 항균력을 조사한 결과, 대수기에 속하는 12시간 이후부터 대장균 억제환이 뚜렷하게 나타났으며 48 시간까지는 억제능이 지속되었다고 보고하고 있다. 따라서 본 연구에서도 8종의 병원성 미생물에 대한 *Lactobacillus paracasei* strain의 항균활성을 평가하였으며, 결과는 표9와 그림 43과 같이 나타났다. 8종의 병원성균에서 모두 clear zone이 형성되었다. 특히 *E. rhapsontici*와 *B. cereus*는 10mm의 저해환이 생성되어 높은 항균활성을 갖는 것을 확인하였다. *S. epidermidis*는 가장 적은 저해환을 나타내었으며 나머지는 5 mm 이상의 저해환을 생성되어 항균활성을 갖는 것을 확인하였다.

표 10. *Lactobacillus paracasei*의 항균활성

	1	2	3	4	5	6	7	8
strain	<i>E. coli</i>	<i>S. Aureus</i>	<i>E. rhapsontici</i>	<i>S. epidermidis</i>	<i>Listeria</i>	<i>Sh. Flexneri</i>	<i>Sh. sonnei</i>	<i>B. cereus</i>
<i>L. paracasei</i>	+++	+++	+++++	++	+++	+++	++++	+++++

Degree of clarity of clear zone by growth inhibition: +; 0-2 mm, ++; 2.1-4 mm, +++; 4.1-6 mm, ++++; 6.1-8 mm, +++++; 8.1-10 mm.

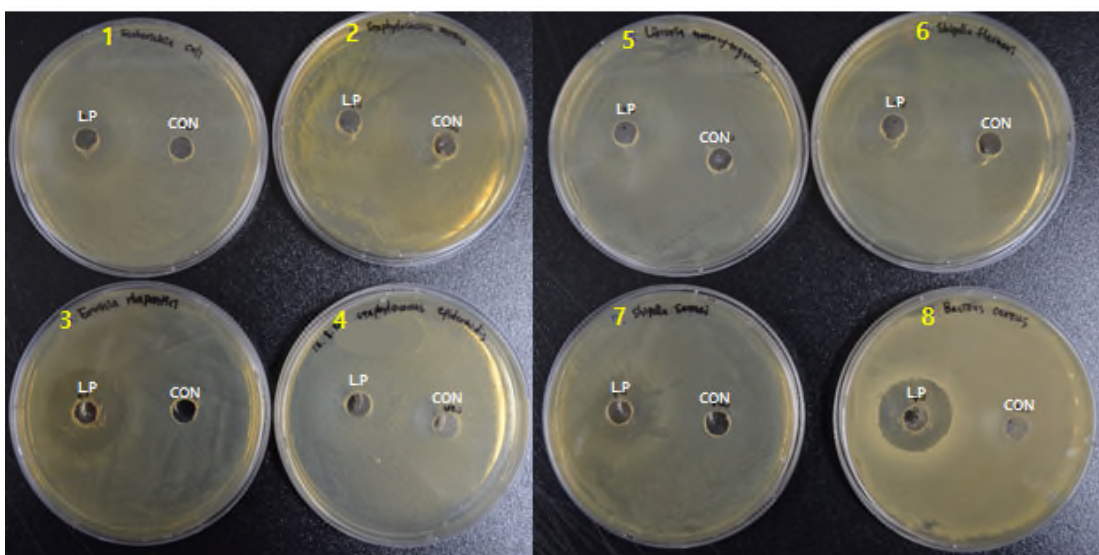


그림 43. *Lactobacillus paracasei*의 병원성 미생물에 대한 항균활성

4. *Lactobacillus paracasei* strain의 배양조건 탐색

가. *Lactobacillus paracasei* strain의 배양학적 특성

(1) 실험 방법

1) MRS 배지에서의 세포 성장

최종 확보된 유산균주인 *Lactobacillus paracasei* strain의 MRS 배지상의 세포 성장을 37°C에서 24시간 동안 배양하며 6시간 간격으로 600 nm에서 흡광도를 측정하고, 생균수를 측정하여 세포 성장을 분석하였다. 생균수는 6시간 간격으로 샘플링한 배양액을 연속 희석하여 10⁴, 10⁵, 10⁶ 희석액 100 uL를 MRS agar 배지에 도말하고, 37°C.에서 48시간 배양후 plate상의 colony를 counting하였다.

2) 탄소원의 탐색

최종 확보된 유산균주인 *Lactobacillus paracasei* strain R094의 세포성장을 위한 최적 탄소원을 결정하기 위해 MRS 조성에서 탄소원인 glucose를 제하고 다른 탄소원으로 제조한 MRS 배지에 균을 배양하고 세포성장을 확인하였다. MRS 조성은 peptone 1.0%, beef extract 0.8%, yeast extract 0.4%, glucose 2.0%, sodium acetate 0.5%, tween 80 0.1%, dipotassium hydrogen phosphate 0.2%, ammonium citrate 0.2%, magnesium sulfate 0.02%, manganese sulfate 0.005% 이며, glucose 대체 탄소원으로 monosaccharides인 fructose, galactose, xylose와 , disaccharides인 lactose, sucrose, maltose, trihalose를 각각 2% 첨가하여 배지를 제조였다. 대조군으로 glucose를 사용하였다. 탄소원이 다른 각각의 배지 100ml에 전배양액 1% 접종하여 37°C에서 24시간 배양 후 600 nm에서 흡광도를 측정하여 세포성장을 확인하였다. 세포성장이 가장 우수한 당을 최적 탄소원으로 선정하였다.

3) 탄소원의 농도별 세포성장 확인

최적 탄소원으로 선정된 탄소원의 농도를 0.5%에서 3.0%까지 0.5% 단위로 조정하여 농도별 세포성장을 확인하였다. 탄소원 농도별로 제조한 각각의 배지 100ml에 전배양액 1% 접종하여 37°C에서 24시간 배양하였다. 0시간과 24시간 배양액을 600m에서 흡광도를 측정하여 세포성장을 확인하였으며, 농도별 세포성장을 비교하였다. 세포성장이 가장 우수한 탄소원 농도를 최적탄소원 농도로 선정하였다.

4) 유기질소원의 탐색

Lactobacillus paracasei strain R094 균주의 세포성장을 위한 최적 유기질소원을 결정하기 위해 기본 MRS 배지에 주요 질소원인 peptone을 제하고 soytone(enzyme digest of soybean meal)과 trptone(pancreatic digest of casein)을 각각 1% 첨가하여 배지를 제조하였다. 유기질소원의 비교를 위해 일반적으로 세포성장에 큰 영향을 미치는 beef extract와 yeast extract를 조성에서 제외하였다. peptone이 질소원으로 들어간 기존의 MRS를 대조군으로 하였다. 각각의 배지 100ml에 전배양액 1% 접종하고 37°C에서 24시간 배양 후 600 nm에서 흡광도를 측정하여 세포성장을 확인하였다. 세포성장이 가장 우수한 유기질소원을 최적유기질소원으로 선정하였다.

5) 유기질소원의 농도별 세포성장 확인

최적 유기질소원으로 선정된 탄소원의 농도를 0.5%에서 3.0%까지 0.5%단위로 각 농도별 배지를 제조하고, 각 배지 100ml에 전배양액 1%를 접종하여 37°C에서 24시간 배양하였다. 24시간 배양 후 배양액의 생균수와 600nm에서 흡광도를 측정하여 세포성장을 확인하였으며 농도별 세포성장을 비교하였다. 세포성장이 가장 우수한 농도를 최적유기질소원 농도로 선정하였다.

6) 무기질소원의 탐색

Lactobacillus paracasei strain R094 균주의 세포성장을 위한 최적 무기질소원을 결정하기 위해 기본 MRS배지에 무기질소원인 ammonium acetate와 다양한 무기질소원들을 대체하여 배지를 제조하고, 균주를 접종하여 37°C에서 24시간 배양 후 세포성장을 확인하였다. 탐색한 무기질소원들은 Ammonium citrate(control), Ammonium sulfate ((NH₄)₂SO₄), Ammonium nitrate (NH₄NO₃), Sodium nitrate (NaNO₃), Potassium nitrate (KNO₃)이며, 기존 MRS 배지에 있던 0.2% ammonium acetate와 동일한 농도로 대체하여 제조하였다. 각 제조된 배지 100ml에 전배양액 1% 접종하여 37°C에서 24시간 배양 후 생균수와 600nm에서 흡광도를 측정하여 세포성장을 확인하였다. 세포성장이 가장 우수한 무기질소원을 최적 무기질소원으로 선정하였다.

7) 배양 온도, 초기 pH의 최적 조건 탐색

Lactobacillus paracasei strain R094 균주의 세포성장을 위한 배양 조건 (온도, pH)을 결정하기 위해 MRS 배지에 균주를 접종한 후 다양한 조건에서 배양하여 세포성장을 확인하였다. 먼저 배양 최적 온도를 결정하기 위해 MRS 배지 100ml에 전배양액 1%를 접종하여 25°C, 30°C, 37°C, 40°C 각 온도에 24시간 배양하였다. 배양 전과 배양 후의 OD600값과 생균수를 측정하여 세포성장을 확인하였다. 또한 배양 최적 pH를 결정하기 위해 pH 3부터 pH 10까지 각 pH 1 단위로 MRS배지를 제조하였다. 각 pH MRS 100ml에 전배양액 1%를 접종하고 37°C에서 24시간 배양하였다. 배양 전과 배양 후의 OD600값과 생균수를 측정하여 세포성장을 확인하였다. 세포성장이 가장 우수한 온도와 pH를 최적 배양 온도, 최적

배양 pH로 선정하였다.

(2) 실험 결과

1) MRS 배지에서의 세포 성장

Lactobacillus paracasei strain R094의 MRS 배지상에서의 성장을 특성을 조사한 결과 그림 44에 나타난 바와 같이 세포 성장은 배양 24시간에 cell OD600 2.318로 나타났다. 배양 후 6시간부터 12시간 까지가 가장 세포수가 증폭되는 시기이며 12시간 이후부터 stational phase임을 확인 할 수 있었다.

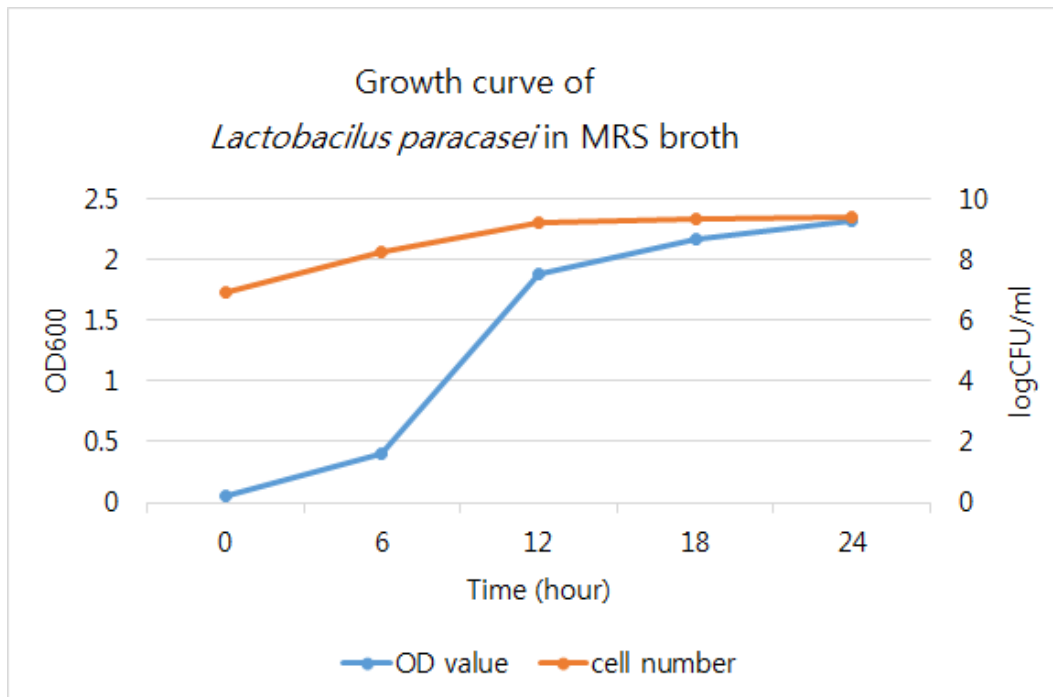


그림 44. MRS에서 *Lactobacillus paracasei* strain R094의 세포 성장

2) 최적탄소원의 확인

최종 확보된 유산균주인 *Lactobacillus paracasei* strain R094의 세포성장을 위한 최적 탄소원을 결정하기 위해 MRS 기본 배지에 2%의 glucose를 다른 탄소원으로 대체하여 만든 배지에 접종하여 37°C에서 24시간 배양 후 600 nm에서 흡광도를 측정하여 세포성장이 가장 우수한 당을 최적 탄소원으로 선정하였다. 그림 45과 표11에 나타난 바와 같이 탄소원의 종류에 따라 24시간 배양 후의 생균수 차이가 있었다. 24시간 후의 생균수와 OD값이 가장 큰 탄소원은 trehalose이고, glucose, lactose, sucrose, fructose 또한 OD값이 2.0이상, \log_{10} CFU/ml값은 9.0이상으로 *L. paracasei*의 성장에 좋은 탄소원임을 확인 하였다. xylose, galactose, maltose는 OD값이 1.0이하이며 \log_{10} CFU/ml값은 9.0 이

하인 것을 보아 균주의 성장에는 비교적 효율이 떨어지는 것을 확인하였다. 균주의 성장에 가장 효율적인 trehalose를 최적 탄소원으로 선정하려 했으나, trehalose의 성장 효율이 가격대비 떨어지기 때문에 경제적, 균주의 성장 효율적으로 적합한 탄소원 glucose를 선정하였다.

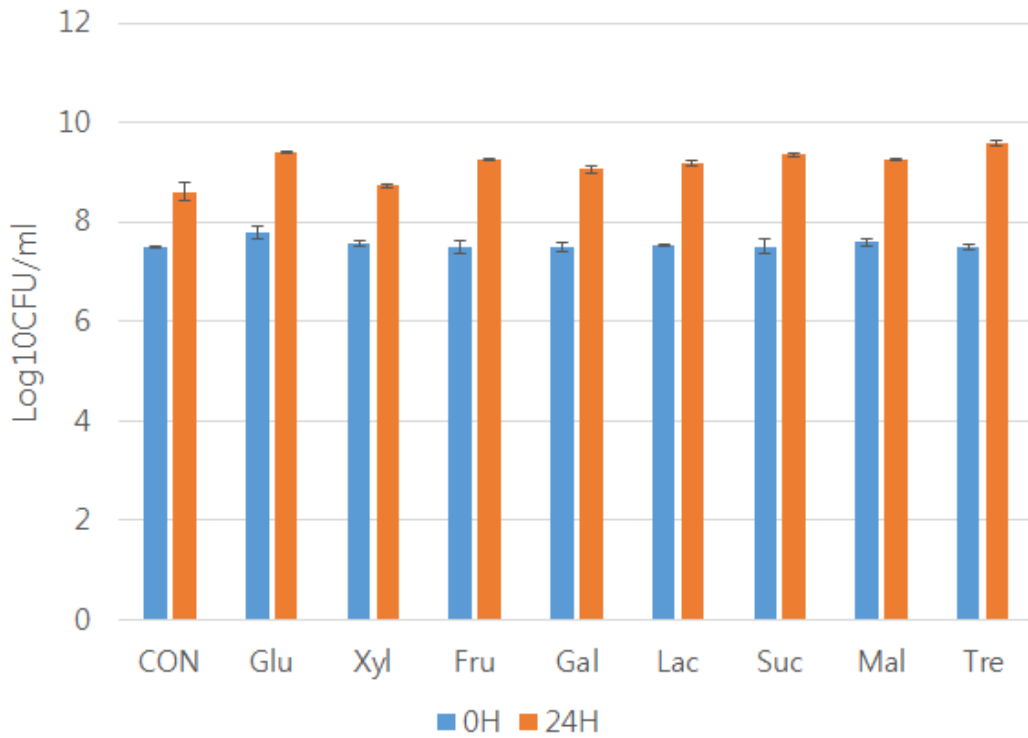


그림 45. 탄소원의 종류에 따른 *Lactobacillus paracasei* strain R094의 세포 성장 (생균수)

표 11. 탄소원의 종류에 따른 *Lactobacillus paracasei* strain R094의 세포성장 (OD값)

	CON	Glu	Xyl	Fru	Gal	Lac	Suc	Mal	Tre
0H	0.047	0.055	0.045	0.052	0.05	0.051	0.053	0.054	0.042
24h	0.407	2.129	0.323	2.048	0.076	2.153	2.122	0.867	2.67

(3) 탄소원의 농도 확인

최종 확보된 유산균주인 *Lactobacillus paracasei* strain R094의 세포성장을 위한 최적 탄소원 농도를 결정하기 위해 최종선별된 탄소원인 glucose를 0.5%부터 3.0%까지 0.5%단위로 제조한 MRS배지에

균주를 접종하여 37°C에서 24시간 배양 후 생균수와 600 nm에서 흡광도를 측정(OD값)하였다. 균주의 성장에 효과적인 농도를 최적탄소원 농도로 선정하였다. 그림 46과 표 12에 나타난 바와 같이 탄소원의 농도에 따라 24시간 배양 후의 생균수 차이가 있었다. glucose 농도 의존적으로 균의 성장도 증가하였으나 3.0%부터는 오히려 감소하는 것을 확인하였다. 또한 glucose를 1.5% 첨가한 배지에서 2.0% 첨가한 배지보다 OD값과 생균수 더 높게 나타났다. 경제성과 효과성을 종합하여 가장 효율적인 농도인 1.5% glucose 배지를 최적탄소원 농도로 선정하였다.

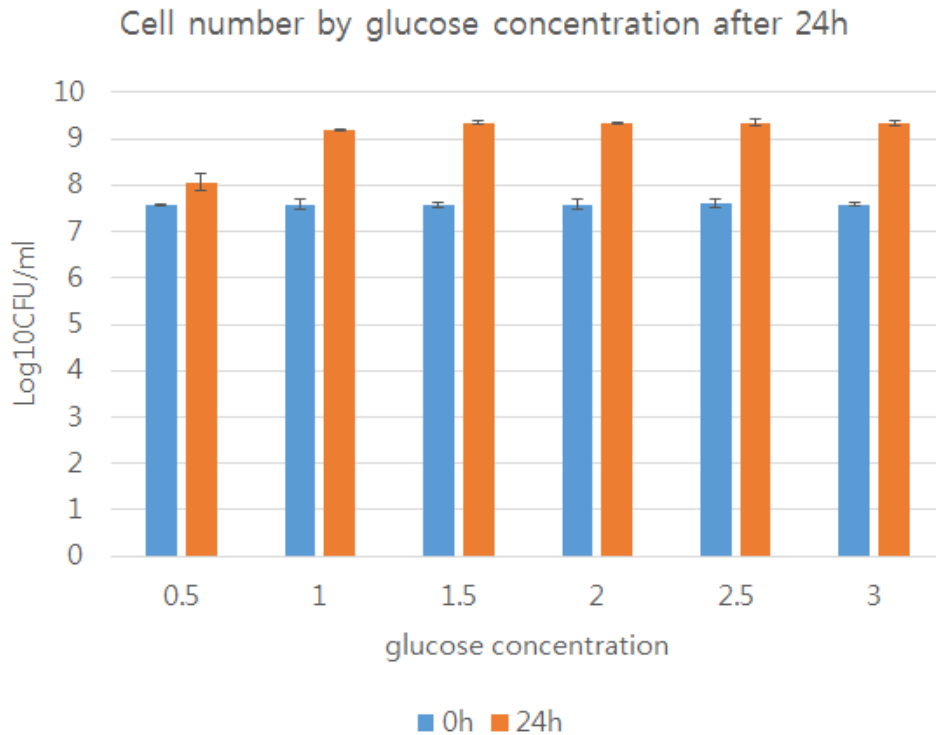


그림 46. Glucose의 농도에 따른 *Lactobacillus paracasei* strain R094의 세포성장 (생균수)

표 12. Glucose 농도에 따른 세포성장(OD값) 결과

Glucose concentration (%)		0.5	1	1.5	2	2.5	3
OD600	0h	0.046	0.047	0.045	0.048	0.051	0.047
	24h	1.486	2.044	2.319	2.308	2.337	2.318

4) 유기질소원의 탐색

Lactobacillus paracasei strain R094 균주의 세포성장을 위한 최적 유기질소원을 결정하기 위해 기본 MRS 배지에 주요 질소원인 peptone을 제하고 soytone(enzyme digest of soybean meal)과 trptone(pancreatic digest of casein)을 각각 1% 첨가하여 배지를 제조하였다. 각 배지에 접종하여 37°C에서 24시간 배양 후 600 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표 13에 나타난 바와 같이 기존의 MRS 배지 조성에 있는 peptone 보다 soytone에서의 세포성장이 우수함을 확인하였다. 최적 유기질소원을 soytone으로 선정하였다.

표 13. 유기질소원의 종류에 따른 세포성장 (OD값) 결과

Carbon source		soytone	peptone	tryptone
OD600	0h	0.062	0.059	0.059
	24h	0.938	0.625	0.424

5) 유기질소원의 농도 탐색

최종 확보된 유산균주인 *Lactobacillus paracasei* strain R094의 세포성장을 위한 최적 유기질소원 농도를 결정하기 위해 최종선별된 유기질소원인 soytone을 0.5%부터 3.0%까지 0.5%단위로 제조한 MRS배지에 균주를 접종하여 37°C에서 24시간 배양 후 생균수와 600 nm에서 흡광도를 측정(OD값)하였다. 균주의 성장에 효과적인 농도를 최적 유기질소원 농도로 선정하였다. 그림 47와 표 14에 나타난 바와 같이 soytone의 농도에 따라 24시간 배양 후의 생균수 차이가 있었었다. soytone의 농도 의존적으로 균의 성장 증가하였으나 3.0%부터는 오히려 감소하는 것을 확인하였다. 또한 soytone을 1.5% 첨가한 배지에서 2.0% 첨가한 배지보다 OD값과 생균수 더 높게 나타났다. 경제성과 효과성을 종합하여 가장 효율적인 농도인 1.5% soytone 배지를 최적 유기질소원 농도로 선정하였다.

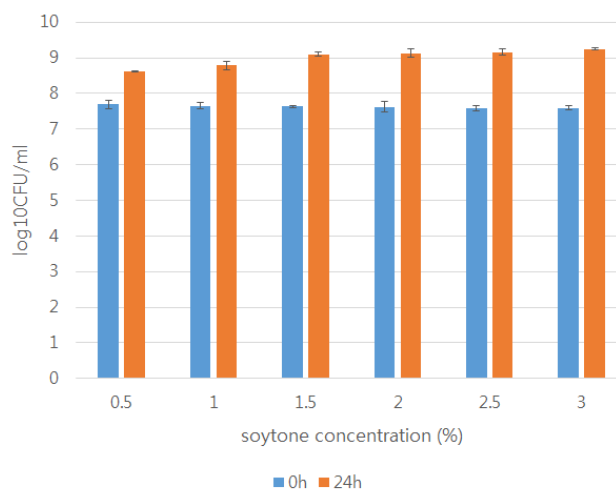


그림 47. Soytone의 농도에 따른 *Lactobacillus paracasei* strain의 세포성장 (생균수)

표 14. Soytone의 농도에 따른 *Lactobacillus paracasei* strain의 세포성장 (OD600)

Soytone concentration (%)		0.5	1	1.5	2	2.5	3
OD600	0h	0.065	0.058	0.056	0.054	0.049	0.048
	24h	0.689	0.857	0.932	0.914	1.131	1.281

6) 무기질소원의 탐색

Lactobacillus paracasei strain R094의 무기질소원에 의한 세포성장을 확인하기 위하여 MRS 기본배지에 Ammonium acetate(control)를 제하고 Ammonium sulfate ((NH₄)₂SO₄), Ammonium nitrate (NH₄NO₃), Sodium nitrate (NaNO₃), Potassium nitrate (KNO₃)등의 무기질소원을 첨가하여 37°C에서 24시간 배양 후 600 nm에서 흡광도를 측정하여 대조군과의 세포성장을 비교하였다. 그림 48 과 표 15에 나타난 바와 같이 무기 질소원의 종류에 따라 세포 성장은 OD600값이 2.207 ~ 2.31 정도로 크게 차이가 나지 않았다. 1번~4번까지의 무기질소원들 보다 control이 제일 높은 생균수와 OD600값을 나타내어 Ammonium acetate를 최적 무기질소원으로 선정하였다.

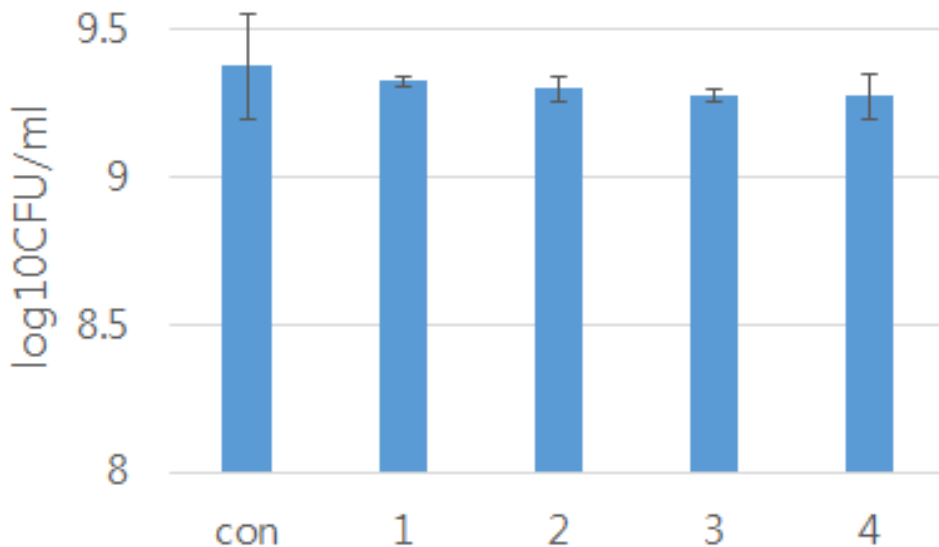


그림 48. 무기질소원의 종류에 따른 *Lactobacillus paracasei* strain R094의 24시간 배양 후 생균수

(con : Ammonium citrate, 1 : Ammonium sulfate (NH₄)₂SO₄, 2 : Ammonium nitrate (NH₄NO₃), 3 : Sodium nitrate (NaNO₃), 4 : Potassium nitrate (KNO₃))

표 15. 무기질소원의 종류에 따른 *Lactobacillus paracasei* strain의 24시간 배양 후 OD600

Kinds of inorganic nitrogen		con	1	2	3	4
OD600	0h	0.056	0.052	0.056	0.053	0.052
	24h	2.31	2.248	2.221	2.217	2.207

(con : Ammonium citrate, 1 : Ammonium sulfate (NH₄)₂SO₄, 2 : Ammonium nitrate (NH₄NO₃), 3 : Sodium nitrate (NaNO₃), 4 : Potassium nitrate (KNO₃))

7) 배양 온도, 초기 pH의 최적 조건 탐색

Lactobacillus paracasei strain R094 균주의 세포성장을 위한 배양 조건 (온도, pH)을 결정하기 위해 MRS 배지에 균주를 접종한 후 온도와 pH를 달리하여 배양하였고, 배양 후 세포성장을 확인하였다. 배양 최적온도를 결정하기 위해 25°C, 30°C, 37°C, 40°C 각 온도에 24시간 배양하였다. 배양 전과 배양 후의 OD600값과 생균수를 측정하여 세포성장을 확인하였다. 그림 49과 표 16에 나타난 바와 같이 37°C에서 세포성장이 가장 우수함을 확인 하였다. 30°C부터 37°C사이의 조건에서는 세포의 성장에 무리가 없는 것을 확인 하였다. 한 배양 최적 pH를 결정하기 위해 pH 3 ~ pH 10 각 pH에 37°C에서 24시간 배양하였다. 배양 전과 배양 후의 OD600값과 생균수를 측정하여 세포성장을 확인하였다. 그림 22와 표 17에 나타난 바와 같이 pH7에서의 세포성장이 가장 우수함을 확인하였다. pH5부터 pH8까지는 세포의 성장에 무리가 없는 것으로 확인 하였으나 pH5 미만이나 pH8 초과할 경우엔 세포의 성장이 약간 저해되는 것도 확인하였다. 세포성장이 가장 우수한 37°C와 pH7을 최적 배양 온도, 최적 배양 pH로 선정하였다.

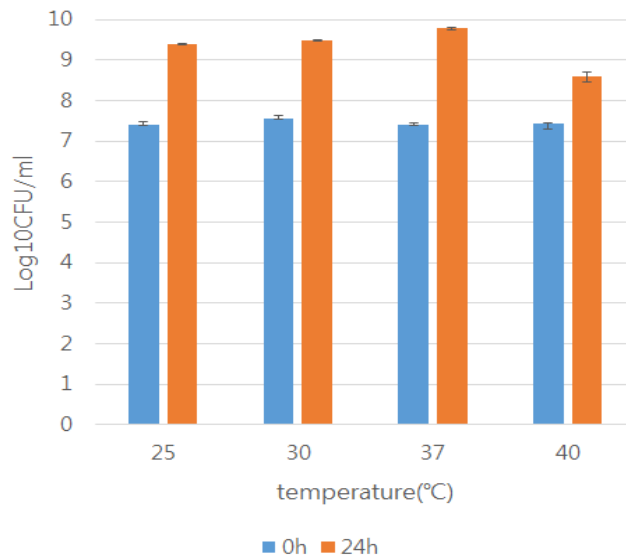


그림 49. 배양 온도에 따른 세포성장 비교 (생균수)

표 16. 배양 온도에 따른 세포성장 비교 (OD600)

		25°C	30°C	37°C	40°C
OD600	0h	0.047	0.044	0.045	0.05
	24h	1.791	2.063	2.129	1.703

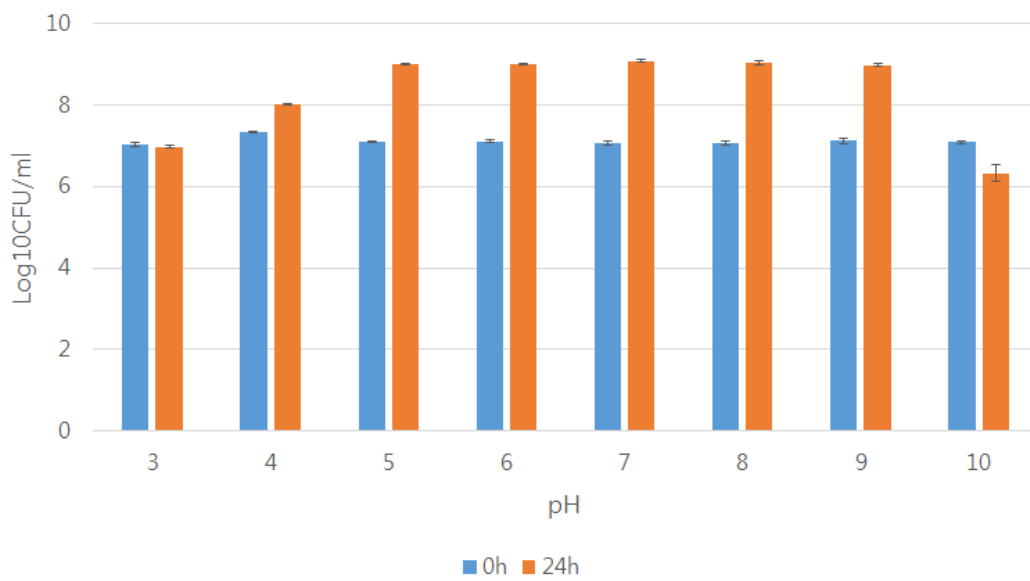


그림 50. 초기 pH에 따른 세포성장 비교 (생균수)

표 17. 초기 pH에 따른 세포성장 비교 (OD600)

		ph3	ph4	ph5	ph6	ph7	ph8	ph9	ph10
OD600	0h	0.068	0.07	0.054	0.053	0.052	0.049	0.038	0.021
	24h	0.113	0.727	2.118	2.26	2.284	2.259	1.905	0.233

5. *Lactobacillus paracasei* strain R094 의 밀반죽 글루텐 분해능 평가

가. 글루텐 분해능을 갖는 균주 배양

(1) 실험 내용

Lactobacillus paracasei strain R094의 배양 조건 탐색 결과를 활용하여 최소배지 제조 및 배양을 하였다. 유산균 최소배지 조성은 peptone 0.5%, sodium acetate 0.5%, tween 80 1%, dipotassium hydrogen phosphate 0.2%, ammonium citrate 0.2%, magnesium sulfate 0.01%, manganese sulfate 0.01% 이며, 탄소원 glucose 1.5%, 질소원 soytone 1.5%, 무기질소원 ammonium acetate 0.2%로 조정하여 배지 100ml씩 4개를 제조하였다. 멸균된 최소배지 100ml에 전배양액을 1% 접종하였다. 배양 조건은 37°C에서 초기 배양 pH를 7로 조정하였다. 접종 후 12시간 단위로 36시간 까지 샘플링 하였다. 12시간 간격으로 배양완료 후 원심분리(6000rpm, 20min, 4°C)하여 상등액을 얻었고, 밀가루 반죽을 실험에 활용하였다.

(2) 실험 결과

Lactobacillus paracasei strain R094를 최소배지에서 배양하여 12시간 간격으로 배양 완료 후 OD600값을 측정하였고, 원심분리하여 얻은 배양 상등액을 밀가루 반죽에 사용하였다. 600nm에서 측정 한 흡광도는 표 18에 나타난 바와 같이 배양시간이 36시간 됐을 때까지 1.0이 넘지 않은 것을 확인하였다.

표 18. 최소배지에서 시간에 따른 세포성장

	OD600
0h	0.052
12h	0.857
24h	0.897
36h	0.899

나. 밀가루 반죽 발효 및 글루텐 함량 확인

(1) 실험 내용

밀반죽의 글루텐 함량이 감소하는지를 확인하기 위하여 배양 상등액을 활용하여 밀가루 반죽 실험을

진행하였다. 밀가루 반죽의 배합 비율을 표 19에 나타내었다. 이는 주관기관인 동성식품에서 사용하는 배합비율과 같다. control은 상등액 대신 멸균수를 사용하여 반죽하였다. 배합 비율에 맞춘 밀가루와 전분에 12시간, 24시간, 36시간 의 배양 상등액을 각각 첨가하여 반죽하였고, rapping하여 35°C에서 24시간 발효 하였다. 24시간 발효가 끝난 반죽은 식품공전에 제시된 글루텐 분석방법을 활용하여 글루텐 함량을 측정하였다. 발효가 끝난 반죽을 10g 취하여 다시팩에 넣고 흐르는 물에 전분을 씻어 주었다. 다시팩에 남은 글루텐은 60°C dry oven에서 3시간 건조시킨 후 무게를 측정하였다.

표 19. 반죽의 배합 비율

재료	질량 및 비율
밀가루 (중력분)	11.2g
전분	6g
상등액 (or 물)	7.88ml (40%)

(2) 실험 결과

배양상등액을 활용하여 만든 밀가루반죽의 글루텐 함량이 감소하는지 확인하였다. 멸균수를 넣은 반죽의 글루텐 양과 배양상등액을 넣은 반죽의 글루텐 양을 비교하였다. 그림 52과 그림 24에 나타난 바와 같이 12시간 배양액을 넣은 반죽의 글루텐양이 가장 많이 감소한 것을 확인하였다. 또한 표 20에 나타난 바와 같이 12시간에서 글루텐 분해율이 51%로 나타났다. 이는 글루텐 저감화 밀가루 제품 제조에 활용하기에 적합한 균주임을 확인하였다.

글루텐 건조 후

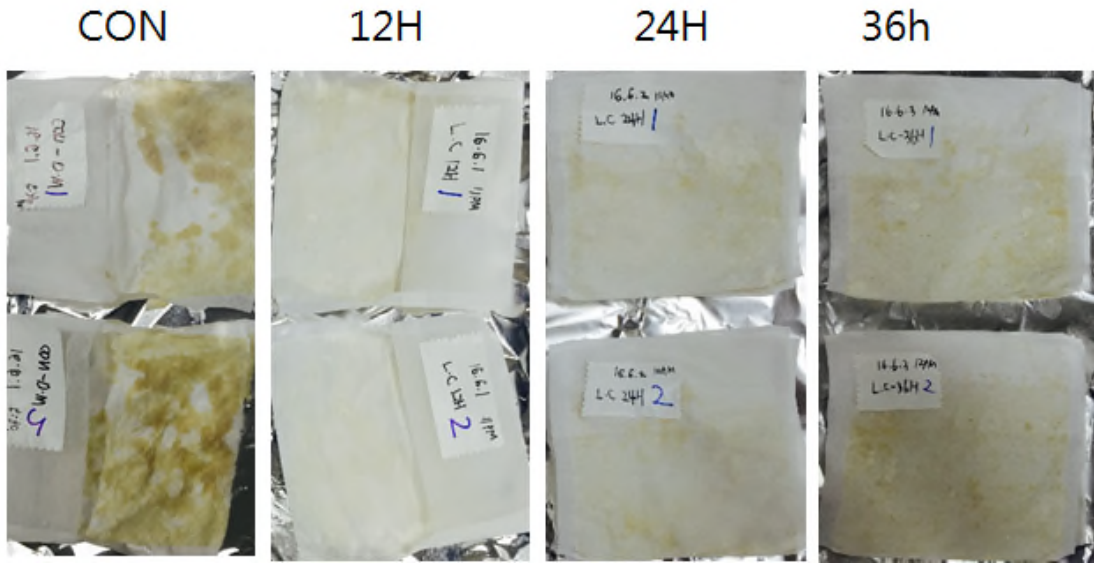


그림 51. 배양 시간에 따른 밀가루 반죽의 글루텐 분석

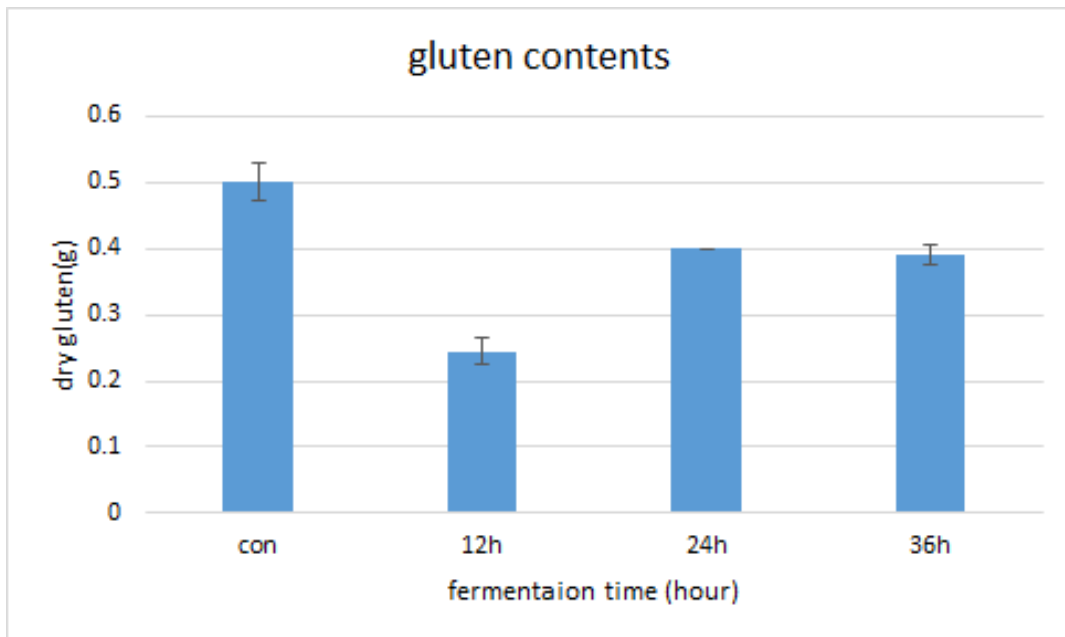


그림 52. 건부 글루텐 무게 측정 결과

표 20. 배양 시간에 따른 글루텐 분해율

	분해율(%)
con	-
12h	51.0
24h	20.0
36h	22.0

6. *Lactobacillus paracasei* strain R094 이 생산하는 효소의 특성 분석

(1) Prep HPLC를 이용한 효소의 분리 정제

국내 발효식품으로부터 최종 선별한 *Lactobacillus paracasei* strain R094이 생산하는 글루텐 분해효소의 특성 분석을 위하여 prep HPLC를 이용하여 효소의 분리정제를 수행하였다. *Lactobacillus paracasei* strain R094를 5 L 배양하여 prep HPLC에 loading한 후, 이를 Cation 및 anion exchange column을 통과하여 각 분획을 획득하였다(그림 53). 얻어진 각 분획을 글루텐 배지에서 paper disk 방법을 이용하여 활성을 나타내는 분획을 확보하였다(그림 54). 따라서 이후에는 얻어진 분획을 다시 한번 micro-filtration 한 후, prep HPLC를 이용하여 정제하여 효소의 아미노산 서열 분석을 수행할 예정이다.



그림 53. *Lactobacillus paracasei* strain R094이 생산하는 글루텐 분해효소의 정제 과정

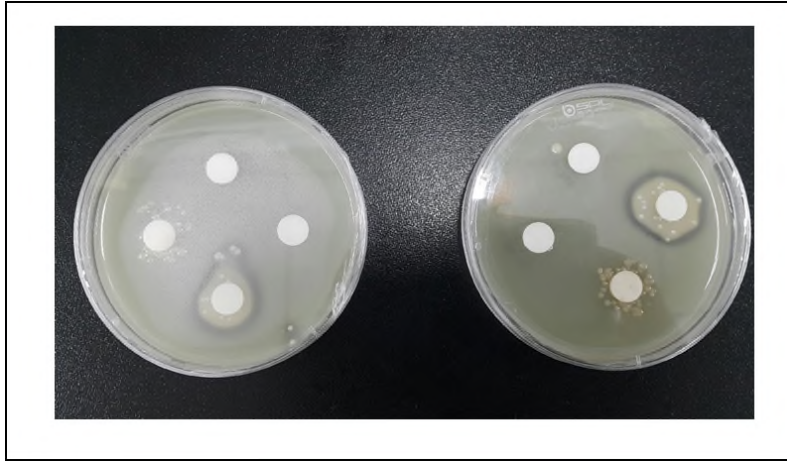


그림 54. 분획된 글루텐 분해효소의 활성 분석

7. 글루텐 발효유산균 유래 글루텐 분해효소의 분리 정제

가. Column chromatography를 이용한 효소의 정제

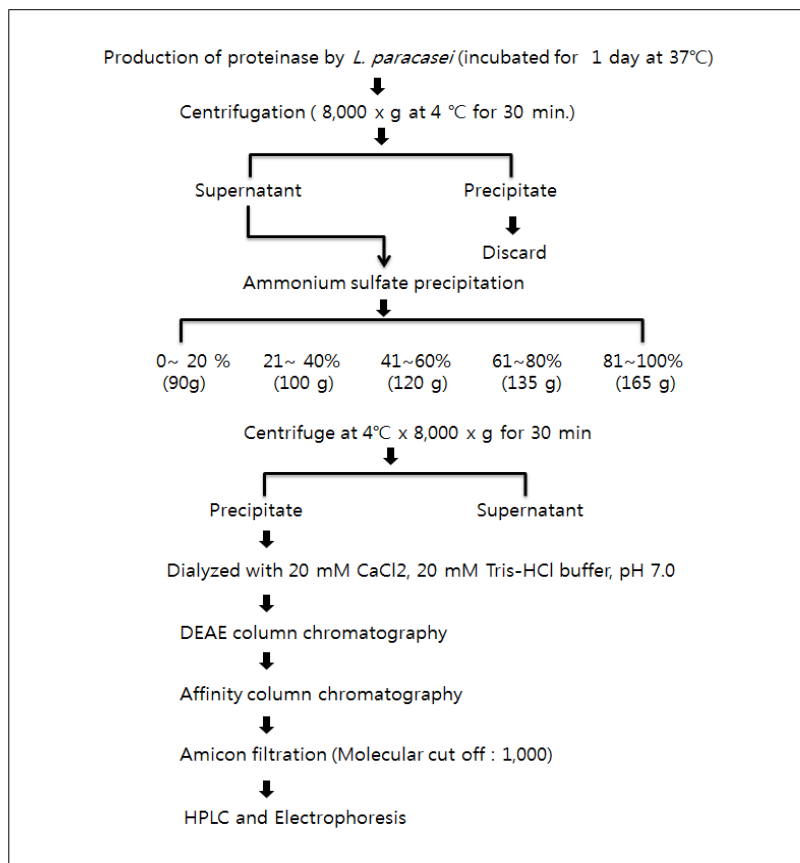


그림 55. Schematic diagram for the purification of gluten degradation enzyme of *L. paracasei*

1) 실험 방법

가) Ammonium sulfate 침전

L. paracasei 가 생산하는 효소의 분리, 정제를 위해 MRS 배지 1.5 L를 배양하였다. *L. paracasei* 배양액에서 4°C, 5,000 rpm으로 30분간 원심분리한 후, 상층액 1L만을 취하여 여기에 ammonium sulfate을 이용하여 4°C 조건에서 0~20%, 20~40%, 40~60%, 60~80% 및 80~100%로 포화되도록 첨가하고, 4°C에서 12시간 동안 방치하면서 각 단계별 농도로 단백질을 침전시켰다. 각각의 투석물은 효소 활성 측정 방법에 따라 활성을 측정하였고 활성이 가장 높은 구간을 ammonium sulfate 분획 농도로 선택하였다. 생성된 침전물을 증류수로 용해시켜 선택된 기질과 반응하여 가장 활성이 높은 농도의 분획을 모아 이를 조효소로 하고 -20°C에 보관하면서 제반 실험의 시료로 사용하였다. Ammonium sulfate의 침전 농도가 40~60%인 조효소로부터 글루텐 분해효소를 순수분리하기 위해 *L. paracasei*를 MRS 배지에서 1.5L를 배양하여, ammonium sulfate 40~60% 조건 하에서 조효소를 확보하였다.

나) DEAE column chromatography

유출된 단백질 분획 100 μ l, 기질 100 μ l, 완충용액 200 μ l를 각각 첨가하여 37°C에서 16시간 반응시킨 후 분광측광기로 선택한 기질에 따른 파장의 흡광도를 측정하여 활성도가 높은 분획을 수집하였다. 수집된 효소액을 증류수에 2시간 간격으로 3번 투석한 후 amicon membrane(M.W. 1,000)을 사용하여 amicon concentrator(Amicon)로 농축하였다. 농축된 시료는 20mM Tri-HCl 완충용액으로 용해시켜 다음 실험의 시료로 사용하였다.

다) Affinity column chromatography

DEAE column chromatography에 의해 부분 정제한 시료를 대상으로 affinity chromatography를 실시하였다. 이때 affinity ligand로 gelatin이 부착되어 있는 bead를 사용하였다. 실험조건은 유속 0.1 mL/min, 분획은 5 mL/tube로 실시하였으며, 비흡착 단백질은 충분히 완충용액을 통과시켜 추출하고 ligand에 흡착된 단백질은 linear NaCl 농도구배를 주어 유출시켰다. 유출된 단백질 분획을 기질로 반응시켜 활성이 높은 분획을 선택하여 DEAE column chromatography 실험과 동일하게 투석한 후, 농축하여 제반실험에 시료로 사용하였다. 이 때 유속은 0.4 mL/min, 분획은 5 mL/tube로 실시하였으며, 비결합 단백질은 column 전체 부피의 약 2배 정도의 완충용액을 통과시켜 추출하고 결합단백질의 유출은 0에서 1 M NaCl까지 농도 구배를 주어 흡착된 단백질을 유출시켰다. 이때 농도 구배는 0.1 M, 0.15 M, 0.25 M, 0.5 M, 0.75 M, 1 M로 실시하였다.

라) 단백질 정량

L. paracasei 유래 글루텐 분해 효소의 분리 정제를 위한 시험 과정은 그림 55에 나타난 바와 같이 진행하였다. 단백질 정량은 Lowry 등(1951)의 방법에 따라 분광광도계 UV-VIS 1700, Shimadzu, Japan)를 이용하여 750nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준 단백질 bovine serum albumin(BSA, Sigma. Co., USA)을 사용하여 작성한 표준곡선으로부터 단백질 함량을 계산하였다.

정제된 효소의 분자량 측정은 Choi(2008)의 방법에 따라 다음과 같이 방법으로 진행하였다. DEAE column chromatography(2.5×100cm)을 이용하였으며 분자량 계산은 void volume에 대한 글루텐 분해 효소의 용출 부피의 비로 측정하였다. 분자량 측정을 위한 표준 곡선은 표준 단백질 cytochrome C(MW 12,400), carbonic anhydrase (MW 29,000), albumin(MW 66,000), alcohol dehydrogenase(MW 150,000), 및 apoferritin(MW 443,000)로 작성하였다.

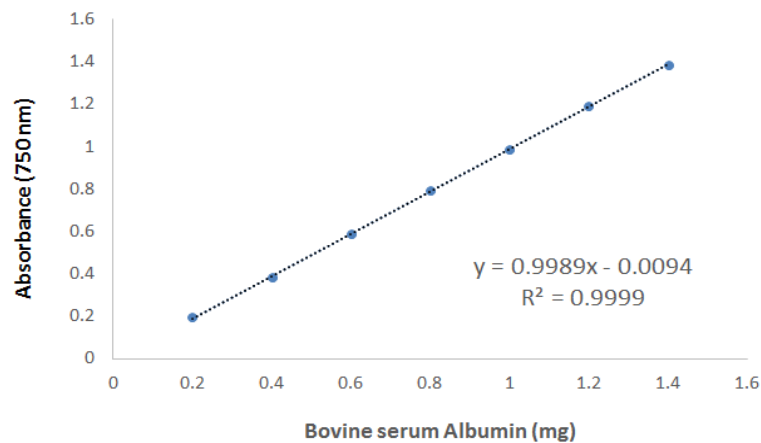


그림 56. Standard curve for determination of protein concentration.

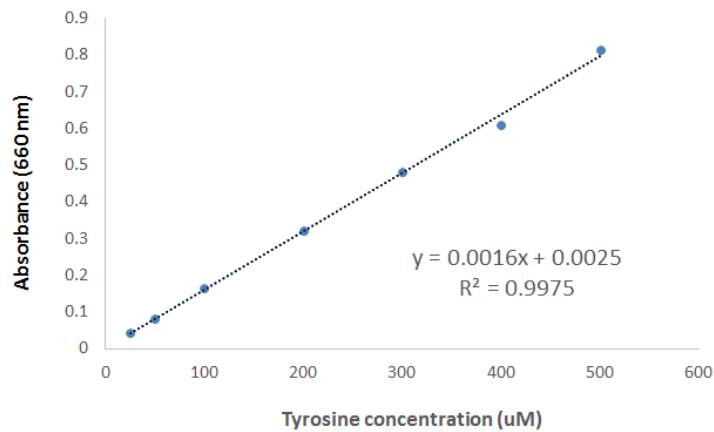


그림 57. Standard curve for determination of tyrosine concentration.

마) 글루텐 분해 효소의 활성 측정

효소 활성 측정은 기질인 casein의 가수분해 정도를 tyrosine 정량법(Wrolstad, 2000)을 이용하여 측정하였다. 시료액 100 μ l를 40°C의 water bath에서 5분간 pre-incubation 시킨 다음 1% 기질 용액 900 μ l를 첨가하여 동일한 온도에서 60분간 가수분해 시키고 10% TCA 용액 1,000 μ l를 첨가하여 효소 반응을 중지시켰다. 가수분해 되지 않은 단백질은 상온에서 10분간 방치한 후 10,000rpm에서 10분간 원심분리 하여 제거시켰다. 상등액 200 μ l와 0.55 M Na_2CO_3 800 μ l를 첨가한 후 혼합하여 15분 동안 방치하였다. 여기에 1.0 N Folin Ciocalteu's phenol 용액 200 μ l를 첨가하여 혼합하고 30분 동안 방치한 후 660 nm에서 흡광도를 측정하였다. 효소 활성 단위는 시료액 1.0 mL가 1분 당 생성하는 tyrosine 1 μ M을 1 unit 으로 정의하였으며, tyrosine을 사용하여 작성한 표준곡선으로부터 units을 계산하였다.

바) 글루텐 분해 효소의 분자량 측정

(1) Ion exchange chromatography

pH 7로 조정된 MRS 배지 1 L에서 *Lactobacillus paracasei*을 1% 접종하여 24시간 동안 배양하였다. 배양액을 400mL의 원심분리용 튜브에 넣어 6,000 rpm에서 20분간 원심분리를 통해 균체를 제거하여 얻은 상등액을 실험에 사용하였다.

양이온 컬럼인 Hitrap SP HP column과 음이온 컬럼인 Hitrap Q HP column (GE healthcare, UK, 5×5 mL)를 동시에 연결하였으며, 20 mM Tris-HCl buffer (pH 7.0)로 평형화시켰다. 1M

Tris-HCl buffer (pH 7.0) 50 mL를 넣은 상등액 1 L를 주입하여 크로마토그래피를 실시하였다. 용출은 NaCl의 농도를 0~100%로 증가시키면서 4 mL/min의 유속으로 실시하였다. 용출액은 분획기인 fast protein liquid chromatography(FPLC : GE healthcare, UK)로 5mL씩 분획을 받아 단백질 사이즈와 효소활성을 확인하였다.

(2) Size exclusion chromatography

배양 상등액 100 mL에 효소가 자가분해 되지 않도록 Complete ultra tablets (Roche, Germany)를 첨가한 후 PM 10 막을 사용하는 ultrafiltration (Amicon : a Grace company, Beverly, U.S.A)에 의해 100배 농축하여 얻은 1mL의 상등액을 gel column의 sample로 사용하였다. column으로는 Hi Load 16/600 Superdex 75 pg (GE healthcare, UK)를 사용하였다. sample을 주입하고, 1 mL/min 유속으로 50mM Tris-HCl 150mM NaCl pH7 buffer를 이용하여 sample을 loading 하였다. 용출액은 분획기를 이용하여 1ml씩 분획을 받아 단백질 사이즈와 효소활성을 확인하였다.

(3) 단백질의 사이즈 확인

분획물들은 10배 농축하여 Sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)으로 단백질의 사이즈를 확인하였다. acrylamide농도는 12%로 하여 gel을 만들어 사용하였고, sample loading buffer로 2배 희석하여 5분간 열처리하여 SDS-PAGE Gel의 sample well에 각각 주입하였다. sample이 stacking gel을 내려갈 때는 전압을 60v로 유지했다가 separating gel을 내려올 때는 110 v로 전압을 올려주었다. Coomassie brilliant blue R-250을 사용하여 단백질 밴드를 염색하고, 10% ethanol-10% acetic acid 혼합 용액으로 탈색하였다.

2) 실험 결과

가) Ammonium sulfate 침전

글루텐 분해 효소의 분리 정제를 위하여 우선적으로 ammonium sulfate를 0~20%, 20~40%, 40~60%, 60~80% 및 80~100%로 포화되게 첨가하면서 각각의 농도에서 침전되는 단백질을 10mM CaCl₂, 20mM Tris-HCl(pH 7.0) buffer에 용해시킨 후 동일한 완충액으로 4°C에서 12시간 동안 투석하였다. 투석물을 조효소로 하여 각각 100ul씩 분취하여 1.5% skim milk가 함유된 MRS 고체배지에 agar diffusion 방법을 이용하여 활성을 측정하였다.

그 결과 단백질 분해효소 활성은 ammonium sulfate 40~60% 포화 구간에서만 측정되었으므로 단백질 분해 효소정제를 위해 위 구간을 선택하였다(그림 58).

ammonium sulfate(40~60%)에서 회수된 단백질들은 ion exchange chromatography의 초기 완충액

20mM CaCl₂, 20mM Tris-HCl(pH 7.0) buffer로 투석하였다.

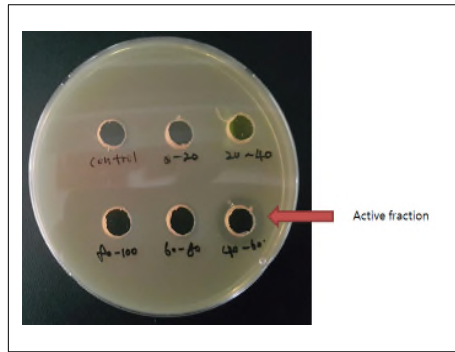


그림 58. Active fraction from ammonium sulfate precipitant.

나) DEAE column chromatography

Ammonium sulfate 침전을 통해 얻어진 조효소를 DEAE-sepharose column chromatography 방법을 이용하여 정제 실험을 수행하였다. 이 때, NaCl은 0~1 M의 농도 구배를 주었다. 각각의 fraction별로 각각 100 μ l씩 분취하여 1.5% skim milk가 함유된 MRS 고체배지에 agar diffusion 방법을 이용하여 활성을 측정하였으며, 또한 1% casein이 함유한 효소 활성과 단백질 함량을 분석하였다. 그림 58에서 나타난 바와 같이 column 내 NaCl함량이 높아질수록 용출 되는 효소단백질의 양은 점차적으로 증가함을 알 수 있었다. 효소 활성 부분은 49~55 fraction에서 용출 되었으며 효소활성은 단백질 함량이 가장 높은 fraction number 52에서 최대 활성을 나타내었다. 49~55 fraction만을 수집하여 효소액을 증류수에 2시간 간격으로 3번 투석한 후 amicon membrane(M.W. 1,000)을 사용하여 amicon concentrator(Amicon)로 농축하였다. 농축된 시료는 20 mM Tri-HCl 완충용액으로 용해시켜 다음 실험의 시료로 사용하였다.

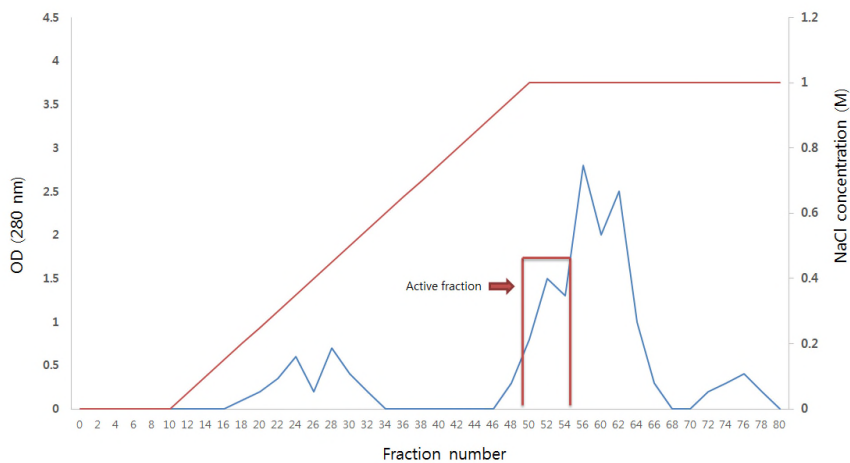


그림 59. DEAE-sepharose column chromatogram after salting-out by saturated ammonium

sulfate solution in the range of 40~60%

다) Affinity column chromatography

DEAE-sepharose column chromatography 실험으로부터 얻어진 활성 fraction을 모아 affinity column chromatography 실험을 수행하였다. 각각의 fraction별로 각각 100 μ l씩 분취하여 1.5% skim milk가 함유된 MRS 고체배지에 agar diffusion 방법을 이용하여 활성을 측정하였으며, 또한 1% casein이 함유한 효소 활성과 단백질 함량을 분석하였다. 그림 60에서 보는 바와 같이 9~16 fraction에서 글루텐 분해 활성을 갖는 peak를 확인할 수 있었다. 그림 61에서 나타난 바와 같이 다른 종류의 단백질 peak가 있어 얻어진 9~16 fraction을 모아 2차 affinity column chromatography 실험을 수행하여 단일 peak의 active fraction을 수집하였다.

이렇게 최종적으로 정제된 효소의 specific activity는 49.4 unit/mg, 수율은 4.9%, 정제도는 17.4 배로 나타났다(Table 13).

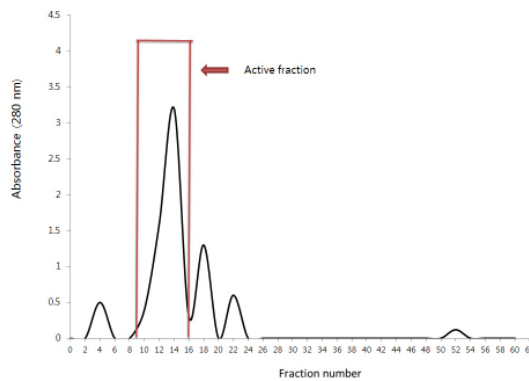


그림 60. 1st filtration chromatogram (1.6×60cm) of active fraction from Affinity column chromatography

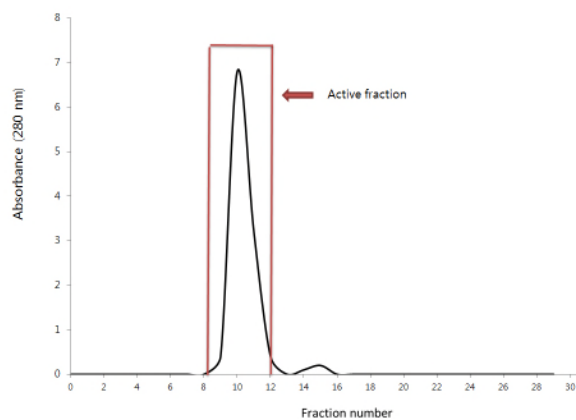


그림 61. 2nd filtration chromatogram (1.6×60cm) of active fraction from Affinity column chromatography.

라) 글루텐 분해 효소의 활성 측정

효소 활성 측정은 기질인 casein의 가수분해 정도를 tyrosine 정량법(Wrolstad, 2000)을 이용하여 측정하였다. 시료액 100 μ l 40°C의 water bath에서 5분간 pre-incubation 시킨 다음 1% 기질용액 900 μ l를 첨가하여 동일한 온도에서 60분간 가수분해 시키고 10% TCA 용액 1,000 μ l를 첨가하여 효소 반응을 중지시켰다. 가수분해 되지 않은 단백질은 상온에서 10분간 방치한 후 10,000 rpm에서 10분간 원심분리 하여 제거시켰다. 상등액 200 μ l와 0.55 M Na₂CO₃ 800 μ l를 첨가한 후 혼합하여 15분 동안 방치하였다. 여기에 1.0N Folin Ciocalteu's phenol 용액 200 μ l를 첨가하여 혼합하고 30분 동안 방치한 후 660nm에서 흡광도를 측정하였다. 효소 활성 단위는 시료액 1.0 mL가 1분 당 생성하는 tyrosine 1 μ M을 1 unit 으로 정의하였으며, tyrosine을 사용하여 작성한 표준곡선으로부터 units을 계산하였다.

표 12. Purification step of gluten degradation enzyme produced from *L. paracasei*

Purification step	Total activity (Unit)	Total protein (mg)	Specific activity ⁽¹⁾ (U/mg)	Yield ⁽²⁾ (%)	Purification fold
Supernatant	38,456	13,564	2.9	100	1
Ammonium sulfate	16,877	1,856	9.1	43.9	3.2
DEAE-sepharose	6,587	448	14.7	17.1	5.2
1st Affinity chromatography	2,566	66	38.8	6.7	13.7
2nd Affinity chromatography	1,878	38	49.4	4.9	17.4

1) Specific activity = total activity / total protein.

2) Yield = (total activity)/(total activity of supernatant) * 100.

마) 글루텐 분해효소의 분자량 측정

DEAE column chromatography(1.6×60cm)을 이용하여 최종 정제된 글루텐 분해효소의 분자량 측정은 Choi(2008)의 방법에 따라 분자량 계산은 void volume에 대한 단백질 분해 효소의 용출 부피의 비(V_e/V_0)로 측정하였다.

분자량 측정을 위한 표준 곡선은 표준 단백질 cytochrome C(MW 12,400), carbonic anhydrase (MW 29,000), albumin(MW 66,000), alcohol dehydrogenase(MW 150,000), 및 apoferritin(MW 443,000)로 작성하였다. 각각의 표준단백질의 용출 부피의 비를 통해 표준곡선을 작성하였다. 이 때 표준곡선은 지수식으로 작성하였고, 표준곡선은 $y = 1E+07e^{-2.932x}$ 이었으며, 신뢰도는 $R^2 = 0.9968$ 로 나타났다. 이렇게 작성한 표준곡선의 지수식에 정제한 글루텐 분해 효소의 용출부피를 도입하여 분자량을 계산하였으며, *L. paracasei* 가 생산하는 글루텐 분해효소의 분자량 측정을 위한 계산식은 다음과 같다.

$$1. V_r = V_m + KV_s$$

$$2. K = \frac{V_r - V_m}{V_s} = \frac{V_r - V_0}{V_s}$$

$$3. K_{av} = \frac{V_r - V_0}{V_t - V_0}$$

V_t = total bed volume, column 내 total volume

V_0 = void volume, DEAE column chromatography 내 gel 입자 사이의 공간 volume

V_i = inner volume, 수분을 포함하는 gel 입자들의 volume

V_e = elution volume, 글루텐 분해효소가 용출될 때까지의 volume

$V_t = V_0 + V_i$

K = 분배계수, 단백질이 gel 입자내부를 통해 이동한 부피량/정지상의 부피량

K_{av} = 평균 분배계수

V_m = 이동상의 부피 = V_0

V_s = 정지상의 부피 = V_i

V_r = 글루텐 분해효소가 머무른 부피 = V_e

따라서 상기와 같은 식을 통해 *L. paracasei* 가 생산하는 글루텐 분해효소의 분자량을 측정한 결과, 그림 62에 나타난 바와 같이 글루텐 분해효소의 용출 부피의 비(V_e/V_0)는 1.8, 분자량은 약 67,000Da으로 나타났다.

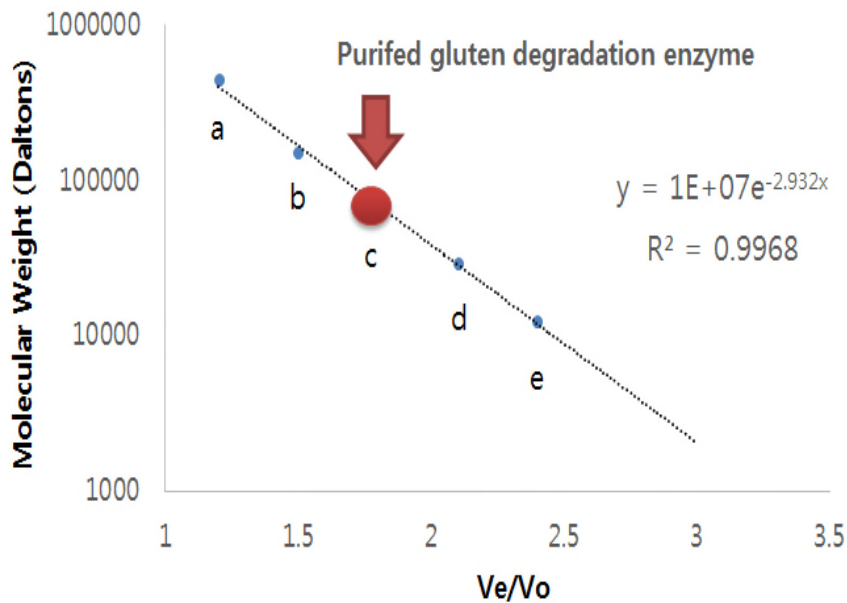


그림 62. Determination of the molecular weight of the purified gluten degradation enzyme.

a : Apoferritin(443,000), b : Alcohol dehydrogenase(150,000),
 c : Albumin(66,000), d : Carbonic anhydrase(29,000),
 e : Cytochrome C(12,400).

8. 글루텐 발효유산균 유래 글루텐 분해효소의 특성 분석

가. 실험 방법

1) 글루텐 분해 효소의 최적 반응 온도

정제된 글루텐 분해 효소의 최적 반응 온도를 확인하기 위하여 pH 7의 조건 하에서 1% casein 기질용액 500 μ l와 정제 효소액 200 μ l를 혼합하여 10~80°C에서 60분간 반응시킨 후 25% TCA(Tri-chloroacetic acid) 용액 300 μ l를 첨가하여 효소 반응을 중지시켰다. 상온에서 30분간 방치한 후 생성된 침전물을 6,000 rpm에서 15분간 원심분리한 후, 상등액의 효소 활성을 측정하였다.

2) 글루텐 분해 효소의 최적 pH

정제된 효소의 활성에 미치는 pH의 영향을 검토하기 위해 sodium phosphate buffer(pH 5~7), Tris-HCl buffer(pH 7~9), sodium carbonate-HCl(pH 9~11)를 20 mM 농도가 되도록 제조하여 각각의 시험구에 완충액 500 μ l, 정제 효소액 200 μ l, 1% casein 기질용액을 500 μ l 첨가하여 30°C에서 60분간 반응시킨 후 25% TCA 용액 300 μ l를 첨가하여 효소반응을 중지시켰다. 상온에서 30분간 방치한 후 생성된 침전물을 8,000 rpm에서 15분간 원심분리하여 제거한 후, 상등액의 효소 활성을 측정하였다.

3) SDS-PAGE를 활용한 gluten 분해 패턴 분석

단백질 분해능이 확인된 선별 균주의 글루텐 분해능을 확인하기 위해 SDS-PAGE를 실시하였다. SDS-PAGE는 질량 차이를 이용한 단백질 분리 방법이며, 결과에 나타난 밴드의 위치로 단백질 분자량을 확인 할 수 있다. 글루텐이 함유된 GBM(gluten based medium) 배지에서 선별 균주들을 배양하였다. GBM의 조성은 gluten from wheat flour(9%), glucose(2%), dipotassium phosphate(1%), tween-80(0.1%, v/v) 이며, 100 mL씩 제조하여 전배양액 1%를 접종한 후 37°C에서 24시간, 140 rpm으로 배양하였다. 0시간, 12시간, 24시간 배양액을 샘플링 하였고, control은 GBM 배지를 사용하였다. 원심분리(6000 rpm, 20 min, 4°C)하여 얻은 상등액을 sample loading buffer로 2배 희석하여 5분간 열처리하여 SDS-PAGE Gel의 sample well에 각각 주입하였다. sample이 stacking gel을 내려갈 때는 전압을 60 v로 유지했다가 separating gel을 내려올 때는 110 v로 전압을 올려주었다. 확보한 조효소를 DEAE column chromatography를 실시하여 정제실험을 수행하였다.

4) 효소의 활성 확인

분획물을 1% skim milk가 첨가된 TSA (trypton 1.7%, soyton 0.3%, dextrose 0.25%, sodium chloride 0.5%, dipotassium phosphate 0.25%) 에서 단백질 분해 활성을 확인하였다. 배지에 직경 8 mm의 흡을 뚫고, 흡 안에 분획물을 각각 200 μ l를 분주하였다. 분획물이 가해진 plate를 24시간동안 37°C에서 방치한 후 흡 주위의 clear zone 여부를 확인하였다.

나. 실험 결과

1) 글루텐 분해 효소의 최적 반응 온도

정제된 글루텐 분해 효소의 최적 반응 온도를 확인하기 위하여 pH 7의 조건 하에서 1% casein 기질용액 500ul와 정제 효소액 200 μ l를 혼합하여 10~80°C에서 60분간 반응시킨 후 25% TCA(Tri-chloroacetic acid) 용액 300 μ l를 첨가하여 효소 반응을 중지시켰다. 상온에서 30분간 방치한 후 생성된 침전물을 6,000 rpm에서 15분간 원심분리한 후, 상등액의 효소 활성을 측정하였다.

그림 64에 나타난 바와 같이 글루텐 분해효소의 활성도는 30~40°C에서 상대적으로 높은 활성을 나타내었고, 37°C에서 가장 높은 활성을 나타내었다. 이는 글루텐 분해 효소를 생산하는 *L. paracasei* 유산균의 배양 온도와 일치함을 알 수 있었다. 또한 반응 온도가 50°C 이상에서는 활성이 급격히 떨어지는 현상이 나타났으며, 이는 *L. paracasei* 유산균 유래 글루텐 분해 효소는 열에 대해 안정하지 않음을 확인할 수 있었다.

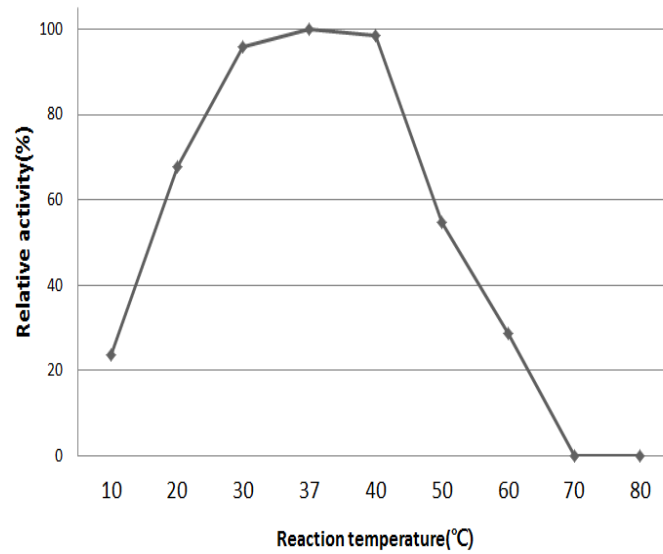


그림 64. Effect of temperature on the activity of the purified gluten degradation enzyme. The used buffer in the reaction mixtures was 50mM Tris-HCl(pH 7.0).

2) 글루텐 분해 효소의 최적 pH

정제된 효소의 활성에 미치는 pH의 영향을 검토하기 위해 sodium phosphate buffer(pH 5~7), Tris-HCl buffer(pH 7~9), sodium carbonate-HCl(pH 9~11)를 20 mM 농도가 되도록 제조하여 각각의 시험구에 완충액 500 μ l, 정제 효소액 200 μ l, 1% casein 기질용액을 500 μ l 첨가하여 30°C에서 60분간 반응시킨 후 25% TCA 용액 300 μ l를 첨가하여 효소반응을 중지시켰다. 상온에서 30분간 방치한 후 생성된 침전물을 8,000 rpm에서 15분간 원심분리하여 제거한 후, 상등액의 효소 활성을 측정하였다. 그림 65에 나타난 바와 같이 글루텐 분해효소의 활성도는 pH 5부터 증가하기 시작하여 20 mM sodium phosphate buffer, 20mM Tris-HCl buffer pH 7에서 최대 활성을 나타냈다.

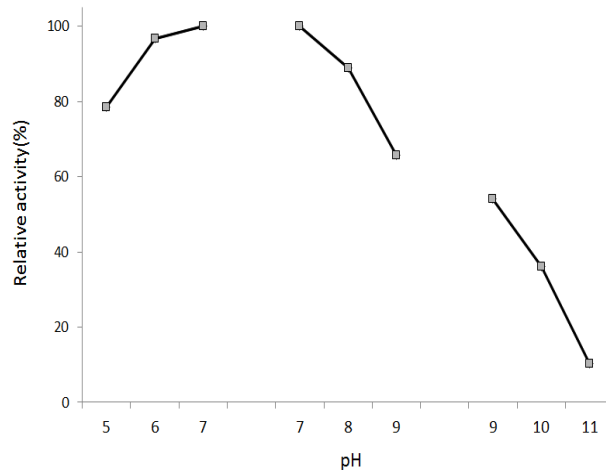


그림 65. Effect of pH on the activity of the purified gluten degradation enzyme.

The used buffers in the reaction mixtures were 20mM sodium phosphate buffer(pH 5~7), Tris-HCl buffer(pH 7~9), sodium carbonate-HCl(pH 9~11)

3) SDS-PAGE를 활용한 gluten 분해 패턴 분석 및 효소 활성

가) 글루텐 분해 효소 확인 (at pH 7 buffer)

양이온 컬럼인 Hitrap SP HP column과 음이온 컬럼인 Hitrap Q HP column (GE healthcare, USA, 5 × 5 mL)에 20 mM Tris-HCl buffer (pH 7.0)로 평형시킨 후 sample 1 L를 loading하고 NaCl을 1M로 gradient하였으며 4 mL/min 속도로 용출하여 5mL씩 분획을 받아 단백질의 사이즈와 효소활성을 측정하였다. 분획 C1~C10과 A1~A10을 모아 측정한 결과는 그림 66에 나타내었다. 또한 그림 66A에서 2, 3, 4번에서 단백질의 밴드를 확인하였고, 가장 뚜렷한 C2로 Size Exclusion Chromatography를 실시하였으며, 그 결과는 그림 66D에 나타났다. C2-9에서는 100 kDa, C2-10에서는 100, 170 kDa의 밴드를 확인하였다. 10 kDa 이하의 밴드는 MRS에 첨가된 yeast, beef extraction 등의 질소원이다. 먼저 배양액 내의 글루텐 분해효소의 정보가 없기 때문에 찾고자 하는 효소의 사이즈를 확인하고자 하였다. 사용한 buffer의 pH를 7로 맞추고 양이온과 음이온 컬럼 모두를 사용하여 상등액을 loading 하였다. 실험 결과 양이온 컬럼에서는 단백질이 검출되지 않았고, 음이온 컬럼에서만 검출되는 것을 확인하였다(그림 66A, 그림 66B). 상등액에 pH 7의 buffer를 사용하였고, 양이온 컬럼에서만 검출된 것을 보아 찾고자 하는 단백질의 등전점이 pH 7 이상이며, - 전하를 띠는 단백질로 추정하였다. 동시에 단백질 밴드가 가장 뚜렷한 C2로 Size Exclusion Chromatography를 실시하였으며, 그 결과는 그림 66D에 나타난 바와 같이 C2-9에서는 100 kDa, C2-10에서는 100, 170 kDa의 밴드를 확인하였다.

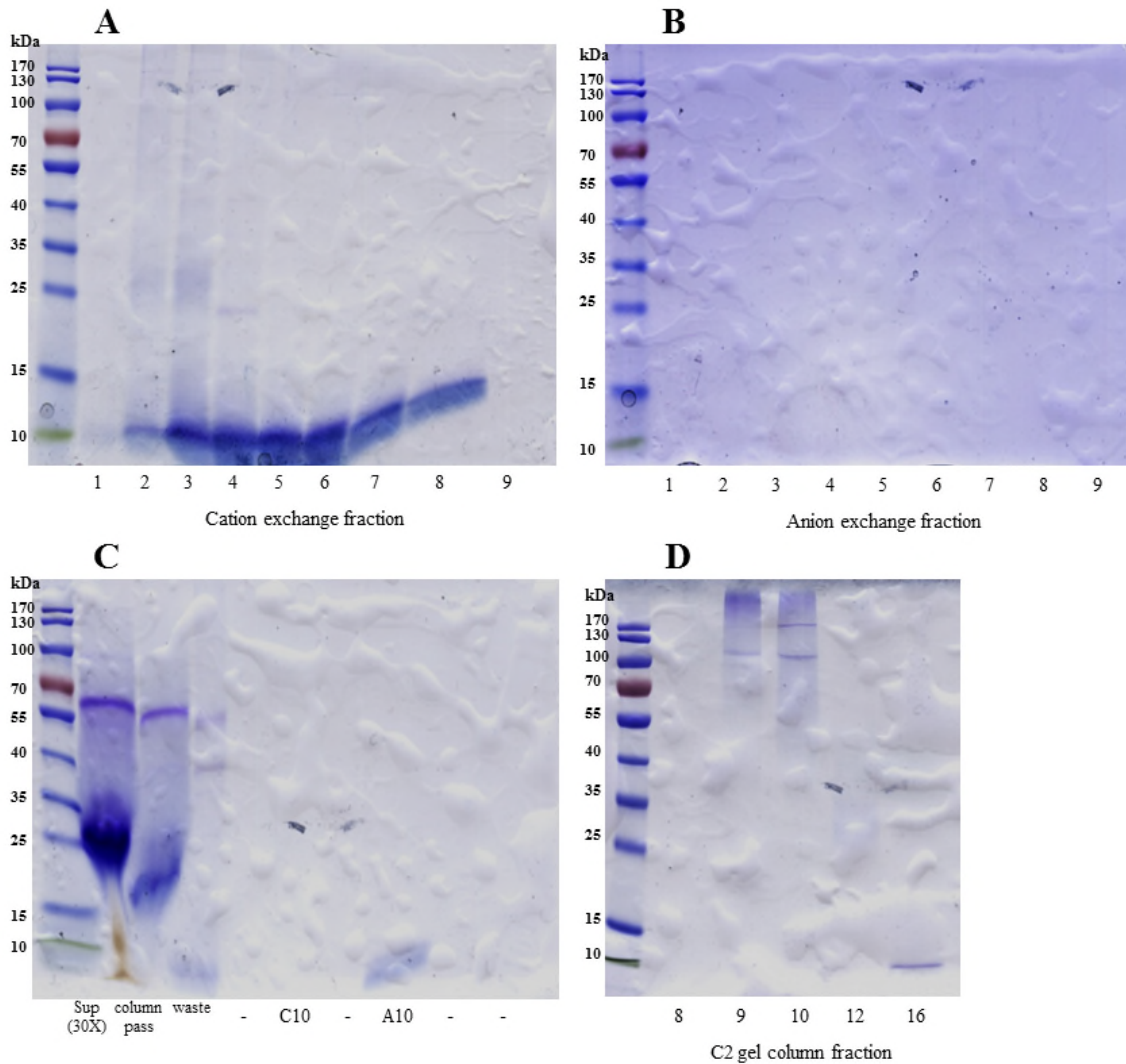


그림 66. pH 7.0에서의글루텐의 Particle size

그림 66은 pH 7.0의 buffer가 첨가된 상등액을 loading하여 NaCl로 gradient하여 받은 분획물의 단백질 사이즈를 확인한 결과이다. 분획물은 양이온 컬럼의 C1~C10, 음이온 컬럼의 A1~A10이며, 대조군으로 30배 농축한 상등액 Sup(30X)과 컬럼을 통과한 column pass를 사용하였다. Sup(30X)은 상등액의 30배 농축액이고, A, B, 및 C는 Ion Exchange Chromatography를 사용하여 얻은 분획물이며, D는 A에서 2번 분획물(C2)을 Size Exclusion Chromatography를 사용하여 얻은 분획물이다.

나) 효소의 글루텐 분해 활성 확인

그림 66A에서 2, 3, 4번 fraction에서 확인된 단백질이 글루텐 분해능이 있는 단백질인지 활성을 확인하였으며, 그 결과는 그림 67에 나타내었다. 배양 상등액과 column pass에서만 clear zone을 확인하였고, 그 외의 fraction에서는 활성이 나타나지 않았다. 또한 C2 fraction을 Size Exclusion Chromatography하여 얻은 C2-9와 C2-10의 활성 또한 나타나지 않았다. 배양 상등에 있는 효소가

column내의 충전물과 결합하지 않고 모두 빠져 나온 것으로 사료되어 buffer의 pH를 6.5와 8를 제조하여 각각 재실험을 하였다. C의 sample은 A의 C2를 gel column으로 얻은 분획물이다.

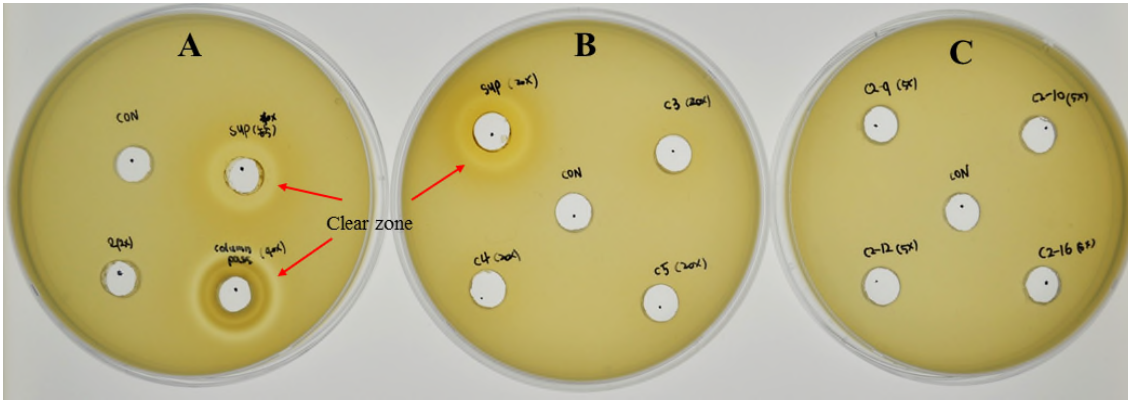


그림 67. pH 7.0에서 글루텐 분해 활성

A : con, sup(40X), C2(2X), column pass(40X)

B : sup, C3, con, C4, C5 (All samples are concentrated by 20 times)

C : C2-9, C2-10, con, C2-12, C2-16 (All samples are concentrated by 5 times)

다) 글루텐 분해 효소 확인 (at pH 6.5 and pH 8 buffer)

buffer를 pH 7로 맞추어 진행한 실험과 같은 조건으로 buffer의 pH만 6.5와 8로 변경하여 재 실험한 결과를 그림 68과 69에 나타내었다. pH 6.5와 pH 8의 결과 모두 양이온에서 단백질이 확인되었다. pH 6.5의 fraction의 번호가 커짐에 따라 확인되는 밴드의 크기가 커지는 것을 볼 수 있었다. 단백질 사이즈가 작은 것들이 먼저 나오고 크게 뒤에 나왔음을 확인하였다. pH 8에서는 음이온 1, 2번에서도 100kDa의 밴드가 희미하게 보였다(그림 69B). 밴드가 확인된 fractions은 단백질 분해 활성을 확인하였다.

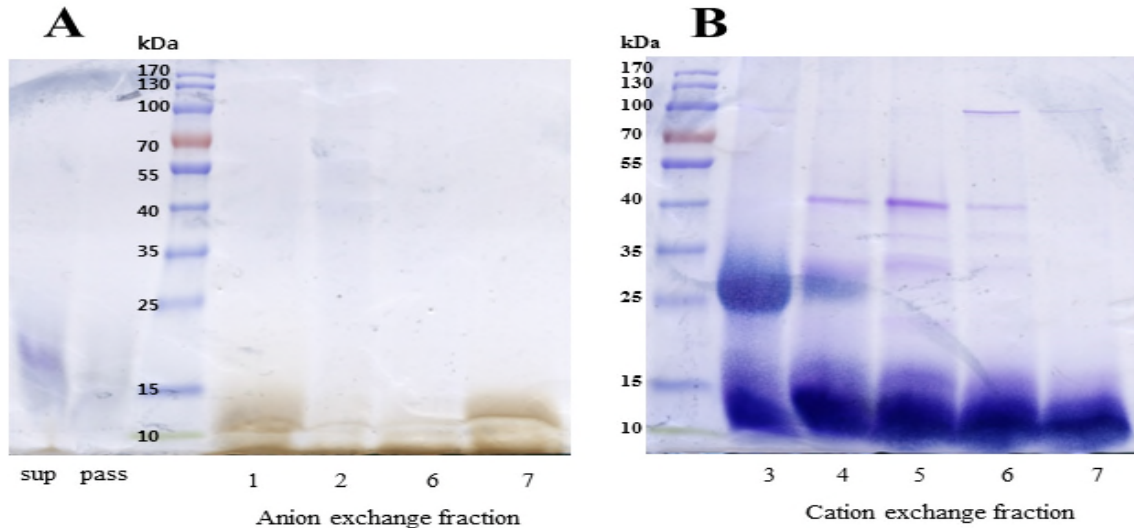


그림 68. pH 6.5에서 각 fraction 글루텐 크기

- Sup : Supernatant, pass : Column pass (All samples are concentrated by 10 times)

그림 68은 pH 6.5의 buffer가 첨가된 상등액을 loading하여 NaCl로 gradient하여 받은 분획물의 단백질 크기를 확인한 결과이다. 분획물은 양이온 컬럼의 C3 ~ C7, 음이온 컬럼의 A1, A2, A6, A7이며, 대조군으로 상등액, 컬럼을 통과한 column pass를 사용하였다. 그림 68는 pH 6.5의 buffer가 첨가된 상등액을 loading하여 NaCl로 gradient하여 받은 분획물의 단백질 크기를 확인한 결과이다. 분획물은 양이온 컬럼의 C6~C9, 음이온 컬럼의 A1~A10이며, 대조군으로 상등액, 컬럼을 통과한 column pass를 사용하였다.

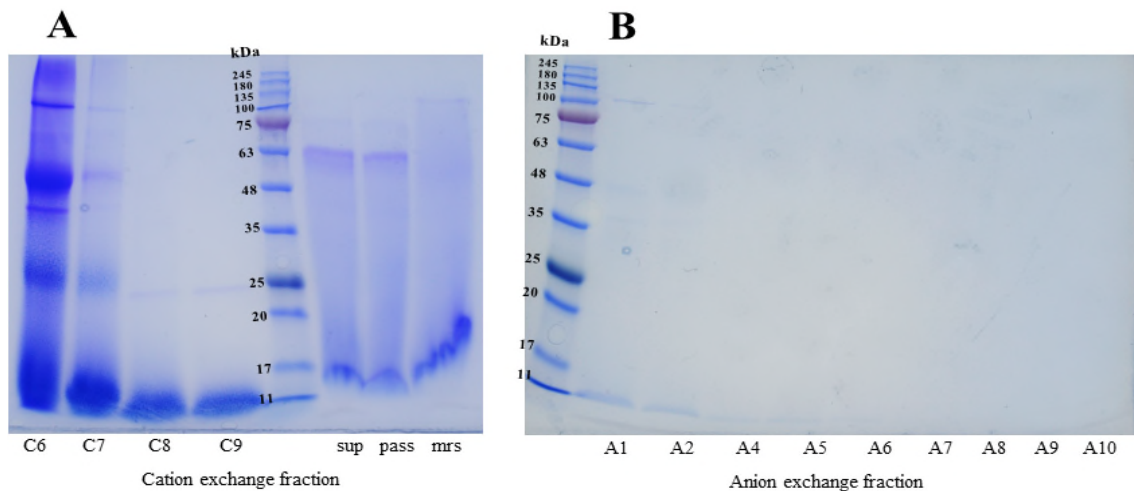


그림 69. Protein size of each fraction at pH 8.0

Sup : Supernatant, pass : Column pass, mrs : control (All samples are concentrated by 10 times)

라) 효소의 글루텐 분해 활성 확인 (at pH 6.5 and pH 8 buffer)

buffer의 pH를 6.5와 8로 변경하여 얻은 효소의 글루텐 분해 활성을 확인한 결과는 그림 70와 71에 나타냈다. pH 7의 결과와 마찬가지로 sup(상등액)과 pass(column pass)에서만 clear zone이 확인되었고, 다른 fraction에서는 활성을 나타내지 않았다. 결과적으로 SDS-PAGE에서 확인된 단백질의 밴드들은 모두 찾고자 하는 효소가 아닌 것으로 판단된다. 양이온과 음이온 컬럼을 이용하여 단백질을 분리하고자 하였으나 단백질이 컬럼내 충전제에 결합되지 않고 흘러나오기 때문인 것으로 추정된다. 또한 배양 상등액 내에는 배지의 성분들이 많기 때문에 저분자의 질소성분들이 먼저 binding 되어 고분자의 효소나 대사산물들의 binding을 어렵게 만드는 것으로 사료된다. 그림 68A에서 sup과 pass의 밴드를 보면 10 kDa 이하의 밴드는 배지성분의 질소원들이며, sup에서는 진하게 나타난 25~35kDa의 밴드가 pass에서는 대부분이 사라진 것을 보면 column에서 loading 할 때 그 사이즈의 분자들이 binding되어 fraction에서 용출되었음을 확인할 수 있다. 일반적인 효소는 고분자 생체물질이기 때문에 75 kDa 이상일 것이며, 추후 size exclusion chromatography를 통해 고분자의 단백질들을 분리하여 활성을 확인함으로써 효소의 분리정제를 진행하는 것이 필요하다.

글루텐은 글루테닌과 글리아딘으로 구성되어 있는데, 글루텐 불내증(celiac disease)의 원인 물질은 글리아딘으로 알려져 있다(Matsuo et al, 2005). 글리아딘 분자내의 S-S결합을 분해하고 체내에서 항원으로 인식하지 않도록 저분자의 아미노산 크기로 분해해준다고 알려져 있는 효소는 DPP4가 있다(Battais et al, 2005). 이 효소는 총 3가지가 알려져 있는데, NCBI에서 알려진 아미노산 서열을 Just bio에서 분석한 결과 대략 83~88kDa으로 확인되었다. 같은 기능의 효소일지라도 마우스와 사람에게서 얻어진 효소보다 미생물에서 얻은 효소의 사이즈가 더 큰 것이 일반적이므로 추후에 size exclusion chromatography를 통해 추가 실험을 진행 할 때 참고 할 수 있을 것이다. 또한 이들은 마우스의 근육이나 사람의 체내에서 분리해낸 효소이며 본 연구에서 분리하고자 하는 효소는 미생물에서 분리하는 것이므로 그 의의가 큰 것으로 사료된다.

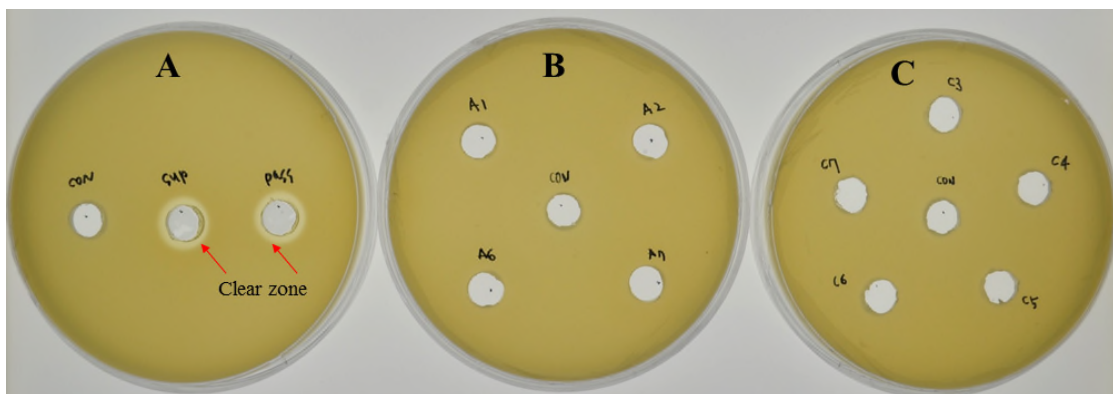


그림 70. Activity of gluten degradation enzymes at pH 6.5

A : con, sup, pass

B : A1, A2, con, A6, A7 (All samples are concentrated by 10 times)

C : C3, C4, C5, C6, C7, (All samples are concentrated by 10 times)

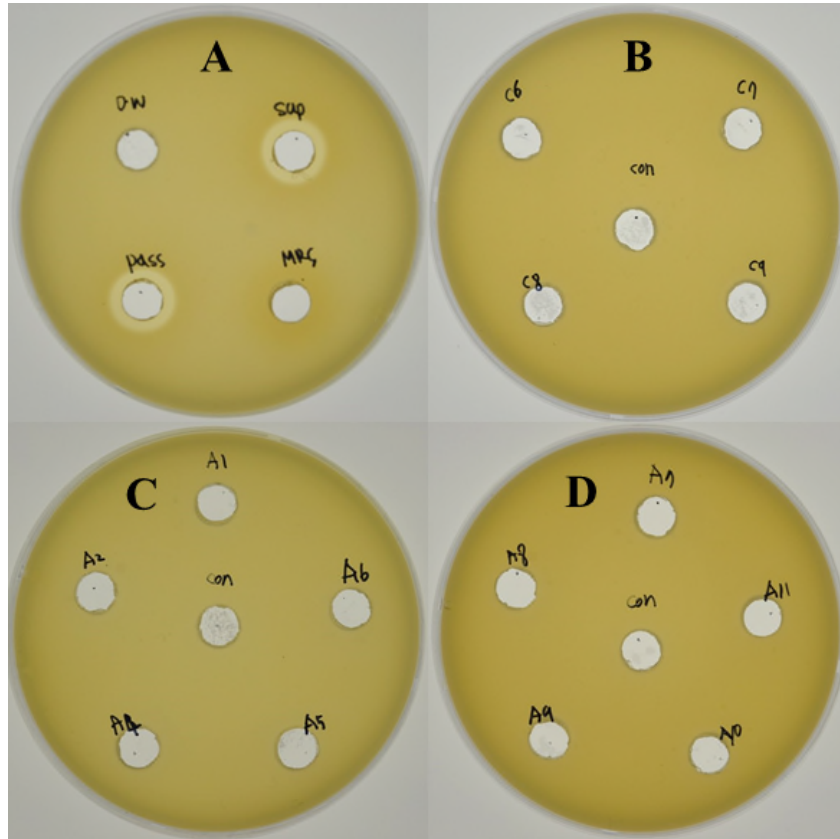


그림 71. Activity of gluten degradation enzymes at pH 8.0

- A : D.W, sup, pass, MRS (All samples are concentrated by 10 times)
B : C6, C7, C8, C9, con (All samples are concentrated by 10 times)
C : A1, A2, A4, A5, A6, con (All samples are concentrated by 10 times)
D : A7, A8, A9, A10, con (All samples are concentrated by 10 times)

[3차년도]

1. Lab scale (flask)에서의 유산균 생육 증진용 배지 조건 확립

가. 탄소원의 종류 및 농도 설정

(1) 실험 방법

(가) MRS 배지에서의 세포 성장 및 글루텐 분해능

최종 확보된 유산균주인 *L. paracasei*를 1 % 글루텐이 함유된 MRS 배지상의 세포 성장과 글루텐 분해능에 대한 특성 분석은 Jar Fermenter (Kobiotech, Korea)를 이용하여 각각 MRS broth에 pH 조절 없이 30°C에서 48시간 동안 배양하며 6시간 간격으로 540 nm에서 흡광도를 측정하여 세포 성장을 분석하였고, 글루텐 분석은 글루텐 함유 배지에서 시험균 배양 후, 글루텐 양을 측정하였다. 시료는 시간별로 샘플링 하였으며, 배양액은 dilution solution과 섞어주고 gluten microwell plate에 100 ul 분주하였다. microwell은 plate shaker에서 60분 배양한 후, microwell의 액체는 버리고 wash solution으로 세 번 세척하였다. 그리고 anti-gliadin peroxidase conjugate (monoclonal antibody)를 100 ul 분주하고 30분 동안 plate shaker에서 배양하였다. wash solution을 이용해 세 번 세척한 후, TMB substrate 100 ul를 분주하고 평편한 바닥에서 strip를 충분히 섞어주었다. 상온에서 30 분 배양한 후, stop solution 50 ul를 분주하고 충분히 섞어주었다. 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

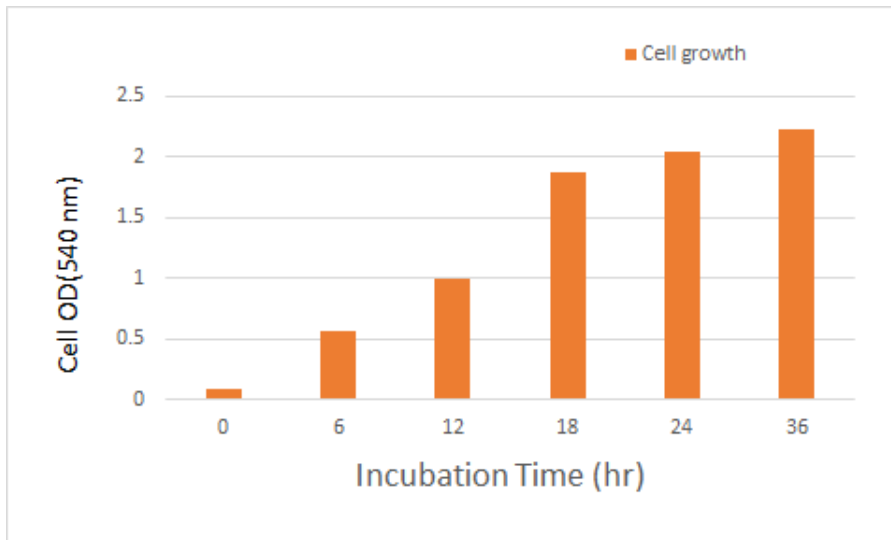
(나) 탄소원의 선정

최종 확보된 유산균주인 *L. paracasei*의 세포성장을 위한 최적 탄소원을 결정하기 위해 1% yeast extract, 0.1% ammonium citrate를 함유한 기본 배지에 0.5%의 sucrose, fructose, glucose, galactose 등을 각각 첨가하여 30°C에서 24시간 배양 후 540 nm에서 흡광도를 측정하여 세포성장과 글루텐 분해능이 가장 우수한 당을 최적 탄소원으로 선정하였다.

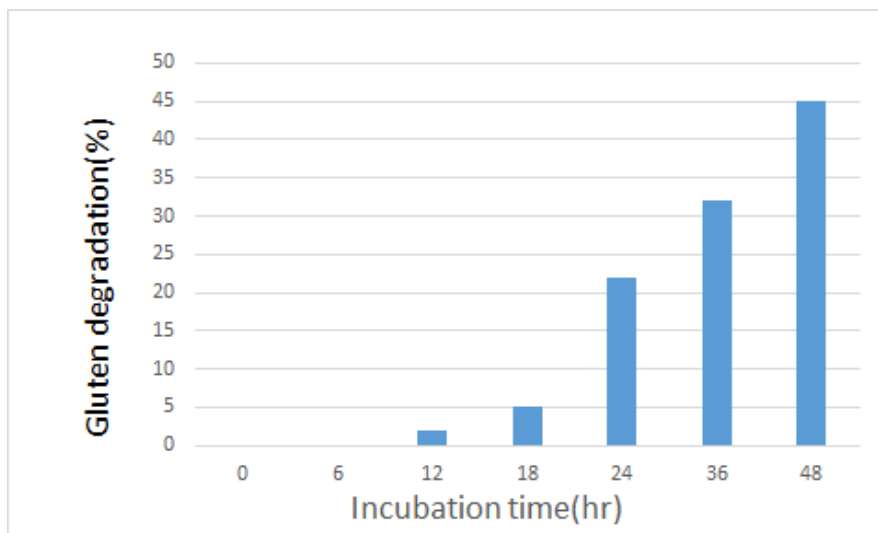
(2) 실험 결과

(가) MRS 배지에서의 세포 성장 및 글루텐 분해능

*L. paracasei*를 1 % 글루텐이 함유된 MRS 배지상에서의 성장을 특성을 조사한 결과 그림 72에 나타난 바와 같이 세포 성장은 배양 24시간에 cell OD 1.87로 나타났으며, 글루텐 분해능은 48 시간에 최대 45% 정도 분해되는 것으로 나타났다. 따라서 초기 사용 글루텐 사용량의 45% 분해가 일어남을 알 수 있었다.



(A)



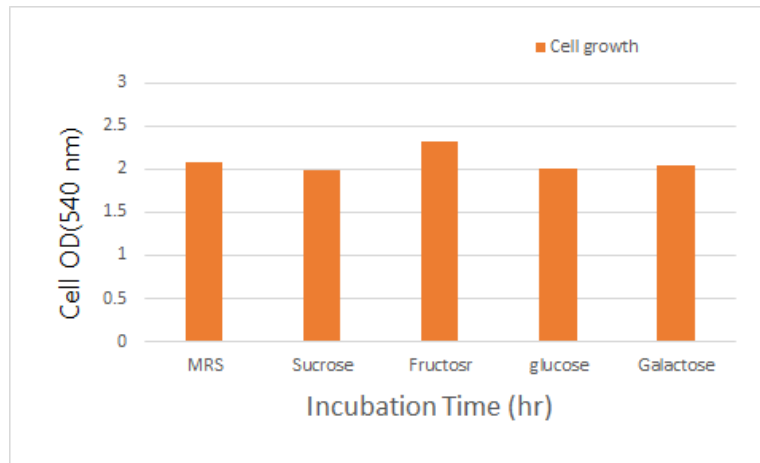
(B)

그림 72. 1% 글루텐 함유 MRS에서 *L. paracasei*의 세포 성장 및 글루텐 분해능

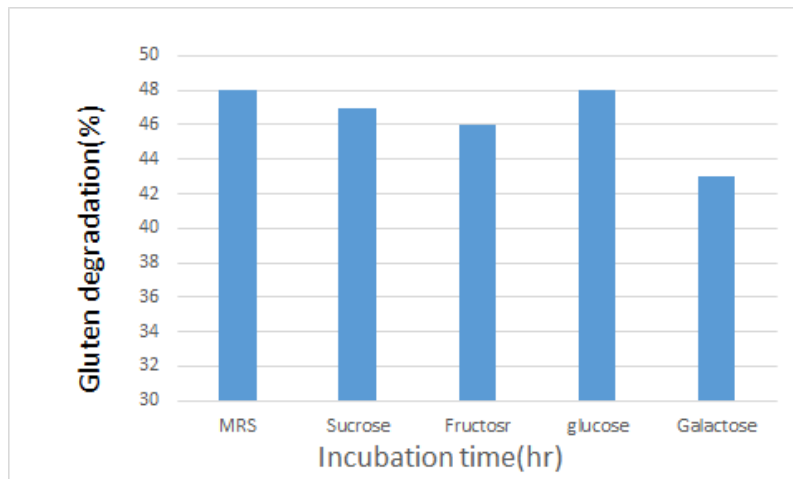
(나) 탄소원의 분석

최종 확보된 유산균주인 *L. paracasei*의 세포성장을 위한 최적 탄소원을 결정하기 위해 1% yeast extract, 0.1% ammonium citrate를 함유한 기본 배지에 0.5%의 sucrose, fructose, glucose, galactose 등을 각각 첨가하여 30°C에서 48시간 배양 후 540 nm에서 흡광도를 측정하여 세포성장과 글루텐 분해능이 가장 우수한 당을 최적 탄소원으로 선정하였다. 그림 73에 나타난 바와 같이 탄소원의 종류에 따라 세포 성장은 크게 차이가 나지 않았으며, 글루텐 분해능 역시 43 ~ 48 % 정도로 큰 차이는 나타내지 않았다. 또한 glucose를 탄소원으로 사용하였을 경우, MRS 배지를 사용한 것과 같이 글루텐 분해능은 48% 정도로 유사하게 나타났으며, 이러한 결과에 근거하여 탄소원으로는 glucose를 선정하였

다.



(A)



(B)

그림 73. 탄소원의 종류에 따른 *L. paracasei*의 세포 성장 및 글루텐 분해능

나. 유기 또는 무기 질소원 농도 및 종류에 따른 유산균 생산 증진 조건 확립

(1) 실험 방법

(가) 유기 및 무기 질소원에 따른 유산균 성장 및 글루텐 분해능

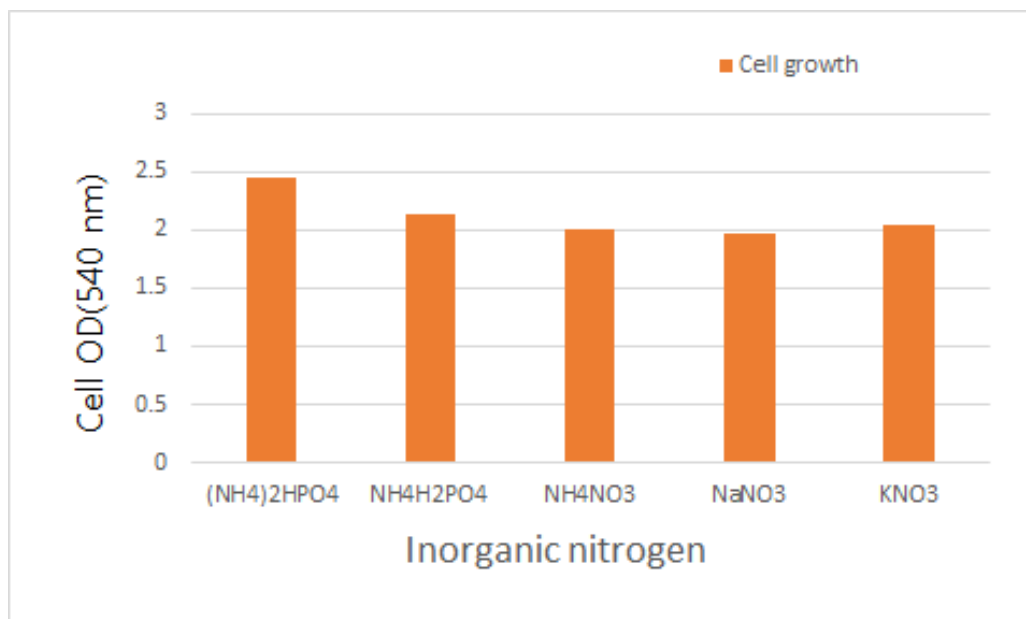
L. paracasei 균주의 세포성장을 위한 최적 무기질소원을 결정하기 위해 1% yeast extract, 0.5% glucose, 0.05% Potassium dihydrogen phosphate, 0.2% Dipotassium phosphate, 0.02% Magnesium sulfate로 구성된 기본배지에 0.1%의 $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ (Diammonium phosphate), $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ (Ammonium dehydrated phosphate), NH_4NO_3 (Ammonium nitrate), NaNO_3 (sodium nitrate), KNO_3

(Potassium nitrate)를 각각 첨가하고 30°C에서 48 시간 배양 후 540 nm에서 흡광도를 측정하여 세포 성장 및 글루텐 분해능을 비교하였다. 또한 유기질소원의 영양을 알아보기 위하여 1% ammonium citrate, 0.5% glucose, 0.05% Potassium dihydrogen phosphate, 0.2% Dipotassium phosphate, 0.02% Magnesium sulfate로 구성된 기본배지에 0.1%의 Tryptone, Protose peptone, Poly peptone, Meat extract등의 유기질소원을 첨가하여 35°C에서 24시간 배양 후 540 nm에서 흡광도를 측정하여 무기질소원을 첨가하지 않은 대조군과 세포성장 및 글루텐 분해능 분석을 비교하였다.

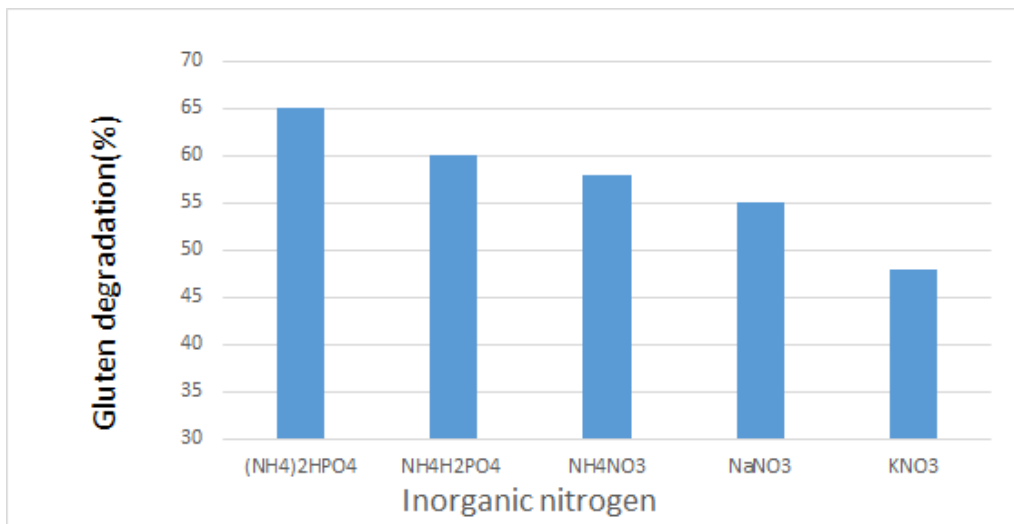
(2) 실험 결과

(가) 유기 및 무기 질소원에 따른 유산균 성장 및 글루텐 분해능

L. paracasei 균주의 세포성장을 위한 최적 무기질소원을 결정하기 위해 1% yeast extract, 0.5% glucose, 0.05% Potassium dihydrogen phosphate, 0.2% Dipotassium phosphate, 0.02% Magnesium sulfate로 구성된 기본배지에 0.1%의 $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ (Diammonium phosphate), $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ (Ammonium dehydrated phosphate), NH_4NO_3 (Ammonium nitrate), NaNO_3 (sodium nitrate), KNO_3 (Potassium nitrate)를 각각 첨가하고 30°C에서 48시간 배양 후 540 nm에서 흡광도를 측정하여 무기질소원을 첨가하지 않은 대조군과의 세포성장 및 글루텐 분해능을 비교하였다. 그림 74에 나타난 바와 같이 무기 질소원의 종류에 따라 세포 성장은 큰 차이를 나타내지 않았으나, 글루텐 분해능은 $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ (Diammonium phosphate)를 사용한 결과 약 65% 글루텐 분해능을 나타냈으며, 이는 $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 의해 글루텐 분해 효소의 생산에 많은 영향을 미친다는 것을 알 수 있었다.



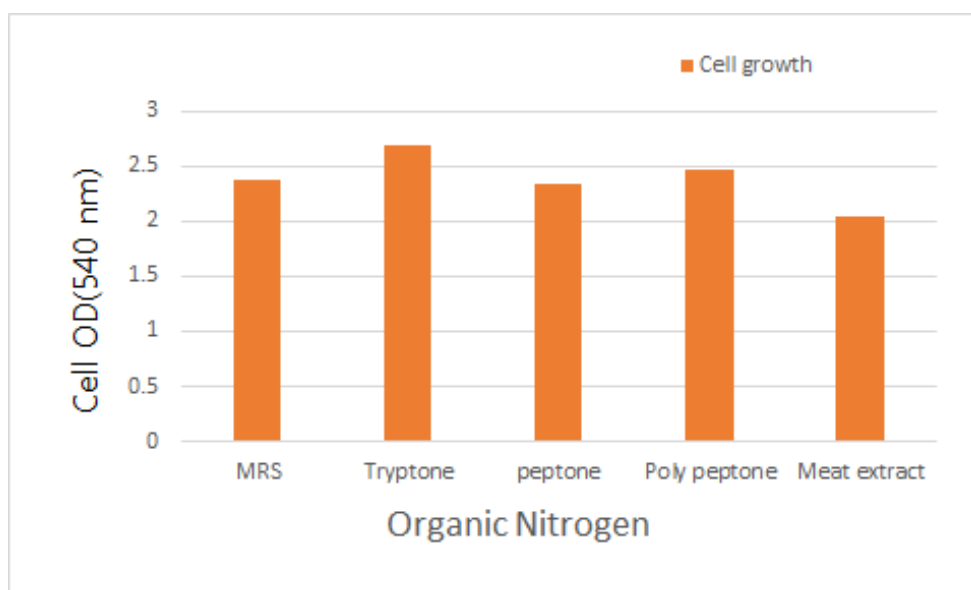
(A)



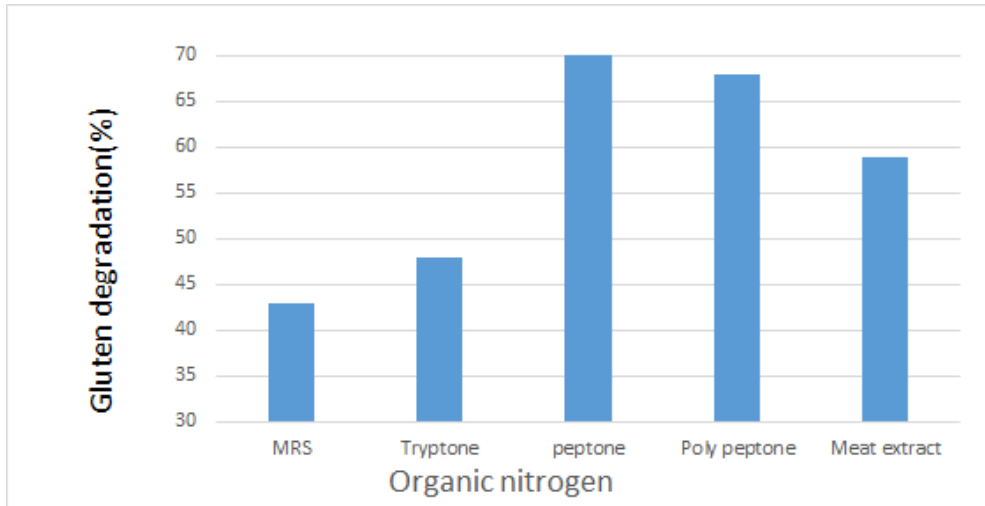
(B)

그림 74. 무기 질소원의 종류에 따른 *L. paracasei*의 세포 성장 및 글루텐 분해능

또한 유기질소원의 영양을 알아보기 위하여 1% ammonium citrate, 0.5% glucose, 0.05% Potassium dihydrogen phosphate, 0.2% Dipotassium phosphate, 0.02% Magnesium sulfate로 구성된 기본배지에 0.1%의 Tryptone, peptone, Poly peptone, Meat extract 등의 유기질소원을 첨가하여 30°C에서 48시간 배양 후 540 nm에서 흡광도를 측정하여 무기질소원을 첨가하지 않은 대조군과의 세포성장 및 글루텐 분해능 분석을 비교하였다. 그림 75에 나타난 바와 같이 유기 질소원의 종류에 따라 세포 성장은 2.47 ~ 2.69 정도로 MRS 배지에 비해 성장이 높게 나타났다 또한, 글루텐 분해능의 경우에도 MRS 배지에 비하여 48 ~ 75 % 글루텐 분해능을 나타냈으며, 이는 유산균이 유기질소원을 쉽게 이용함으로써 세포 성장 특히 글루텐 분해에 대한 효능이 우수함을 나타낸다.



(A)



(B)

그림 75. 유기 질소원의 종류에 따른 *L. paracasei*의 세포 성장 및 글루텐 분해능

다. 배양 온도 및 초기 pH의 최적 조건 탐색

(1) 실험 방법

L. paracasei 균주의 세포성장을 위한 배양 조건 (온도, pH)을 결정하기 위해 MRS 배지에 균주를 접종한 후 다양한 조건에서 배양하여 세포성장을 확인하였다. 먼저 배양 최적온도를 결정하기 위해 MRS 배지 100 ml에 전배양액 1%를 접종하여 25°C, 30°C, 37°C, 40°C 각 온도에 24시간 배양하였다. 배양 전과 배양 후의 OD₆₀₀값과 생균수를 측정하여 세포성장을 확인하였다. 또한 배양 최적 pH를 결정하기 위해 pH 3부터 pH 10까지 각 pH 1 단위로 MRS배지를 제조하였다. 각 pH MRS 100 ml에 전배양액 1%를 접종하고 37°C에서 24시간 배양하였다. 배양 전과 배양 후의 OD₆₀₀ 값과 생균수를 측정하여 세포성장을 확인하였다. 세포성장이 가장 우수한 온도와 pH를 최적 배양 온도, 최적 배양 pH로 선정하였다.

(2) 실험 결과

Lactobacillus paracasei strain R094 균주의 세포성장을 위한 배양 조건 (온도, pH)을 결정하기 위해 MRS 배지에 균주를 접종한 후 온도와 pH를 달리하여 배양하였고, 배양 후 세포성장을 확인하였다. 배양 최적온도를 결정하기 위해 25°C, 30°C, 37°C, 40°C 각 온도에 24시간 배양하였다. 배양 전과 배양 후의 OD₆₀₀값과 생균수를 측정하여 세포성장을 확인하였다. 그림 76과 표 1에 나타난 바와 같이 37°C에서 세포성장이 가장 우수함을 확인 하였다. 30°C부터 37°C사이의 조건에서는 세포의 성장에 무리가 없는 것을 확인 하였다. 또한 배양 최적 pH를 결정하기 위해 pH 3 ~ pH 10 각 pH에 37°C에서 24시간 배양하였다. 배양 전과 배양 후의 OD₆₀₀값과 생균수를 측정하여 세포성장을 확인하였다. 그림 76와 표 2

에 나타난 바와 같이 pH7에서의 세포성장이 가장 우수함을 확인하였다. pH5부터 pH8까지는 세포의 성장에 무리가 없는 것으로 확인 하였으나 pH5 미만이나 pH8 초과할 경우엔 세포의 성장이 약간 저해되는 것도 확인하였다. 세포성장이 가장 우수한 37°C와 pH7을 최적 배양 온도, 최적 배양 pH로 선정하였다.

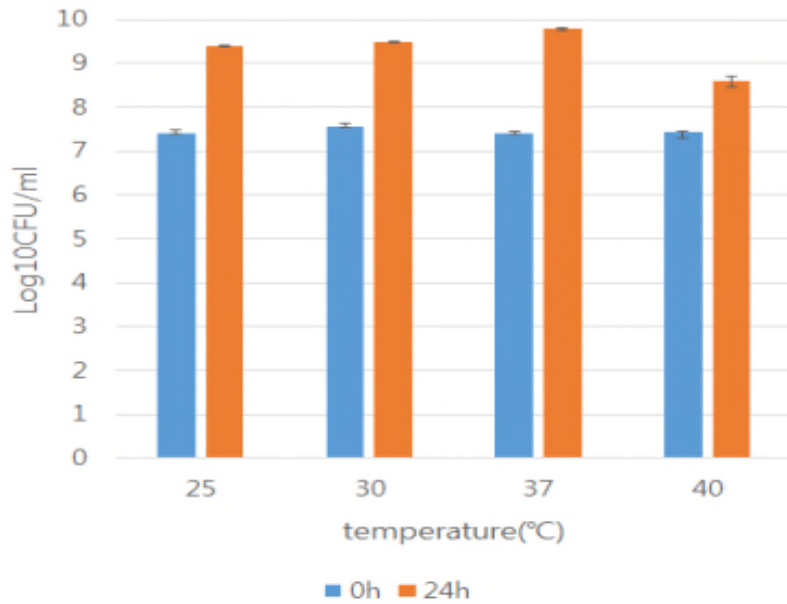


그림 76. 배양 온도에 따른 세포성장 비교 (생균수)

표 1. 배양 온도에 따른 세포성장 비교 (OD₆₀₀)

시간별 OD값		25°C	30°C	37°C	40°C
OD600	0h	0.047	0.044	0.045	0.05
	24h	1.791	2.063	2.129	1.703

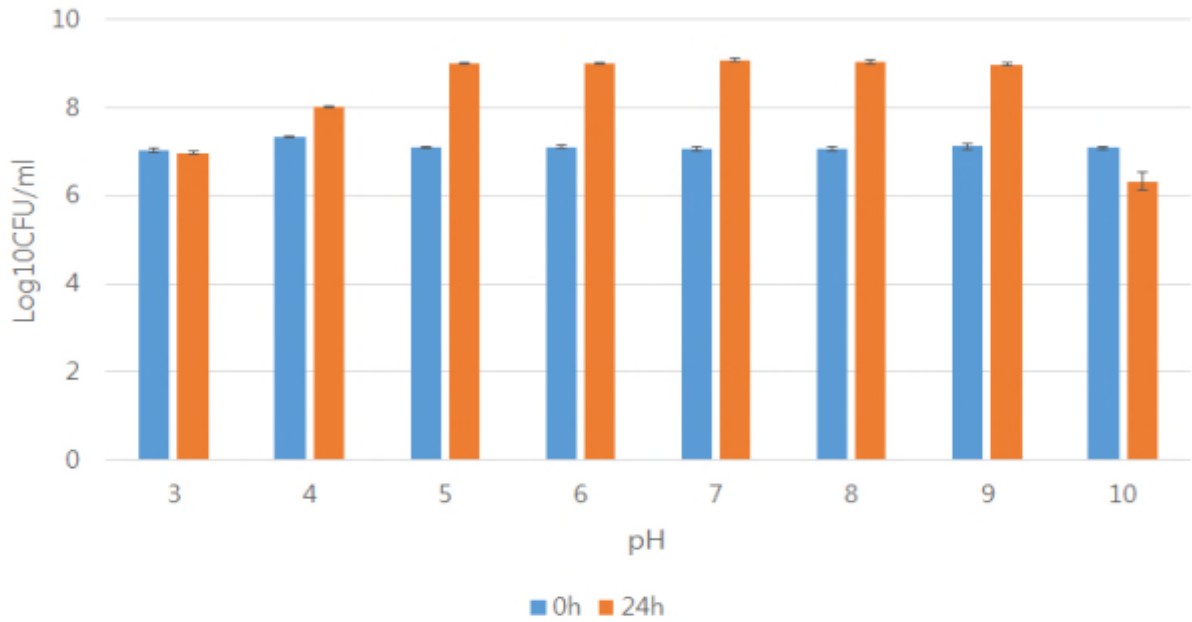


그림 77. 초기 pH에 따른 세포성장 비교 (생균수)

표 2. 초기 pH에 따른 세포성장 비교 (OD₆₀₀)

시간별 OD값	pH3	pH4	pH5	pH6	pH7	pH8	pH9	pH10
0h	0.068	0.07	0.054	0.053	0.052	0.049	0.038	0.021
24h	0.113	0.727	2.118	2.26	2.284	2.259	1.905	0.233

2. 발효조를 이용한 유산균 배양 조건 확립

가. O₂ 및 agitation에 따른 유산균 생산 증진 조건 확립

(1) 마이크로 버블(micro-bubble) 장치

미생물 균체는 배양과정에서 발효조 내의 impeller에 의한 agitation이나 공기의 과다한 공급으로 인해 파쇄됨에 따라 세포의 성장과 생산물질의 감소를 유발함. 따라서 미생물의 고농도 배양과 product의 고농도 생산을 위해서는 단시간 배양을 통해 높은 생산량을 위해서는 배양기내 효율적인 산소공급이 매우 중요하다. 일반적으로 교반(stir)형 배양기에서 고농도의 산소 공급을 위해서는 교반속도, 공기공급

량을 높여야 하는데 이는 미세조류 배양 과정중 배양기 내의 전단응력의 증가로 균체가 쉽게 파괴되는 단점을 가지고 있다. 유용 물질 생산성 증가를 위한 미생물 배양의 경우, 생산성 증가를 통한 미세조류 배양의 경제성 확보 및 현재 보급되고 있는 배양장치의 낮은 산소전달효율로 인한 과잉 공기 공급에 따른 높은 에너지 비용 소모 문제의 해결을 통한 경제성 확보는 여전히 해결해야하는 문제 중 하나이다.

(2) 균사체 배양 시 마이크로 버블 적용 및 산소전달효율 증가의 효과

배양조 내 마이크로 버블 공급은 높은 산소전달효율을 가지는 마이크로 버블 특성으로 인해 미생물 배양에 소모되는 에너지 비용을 절감시킬 뿐만 아니라, product의 생산성 증가에 필요한 중요한 요인이다. 표준형 배양장치와 기포탑 배양장치 내 공기는 표 4에서 제시된 바와 같이 다양한 형태의 sparger를 이용하여 공급되고 (공급 버블 크기: 600 μm 내외), 표준형 배양장치의 교반은 다양한 형태의 impeller를 이용하여 이루어지며(교반범위: 0 ~ 1,200 RPM), 기포탑 배양기의 교반은 드래프트 튜브(유리관)를 통한 공기의 순환에 의해 이루어진다.

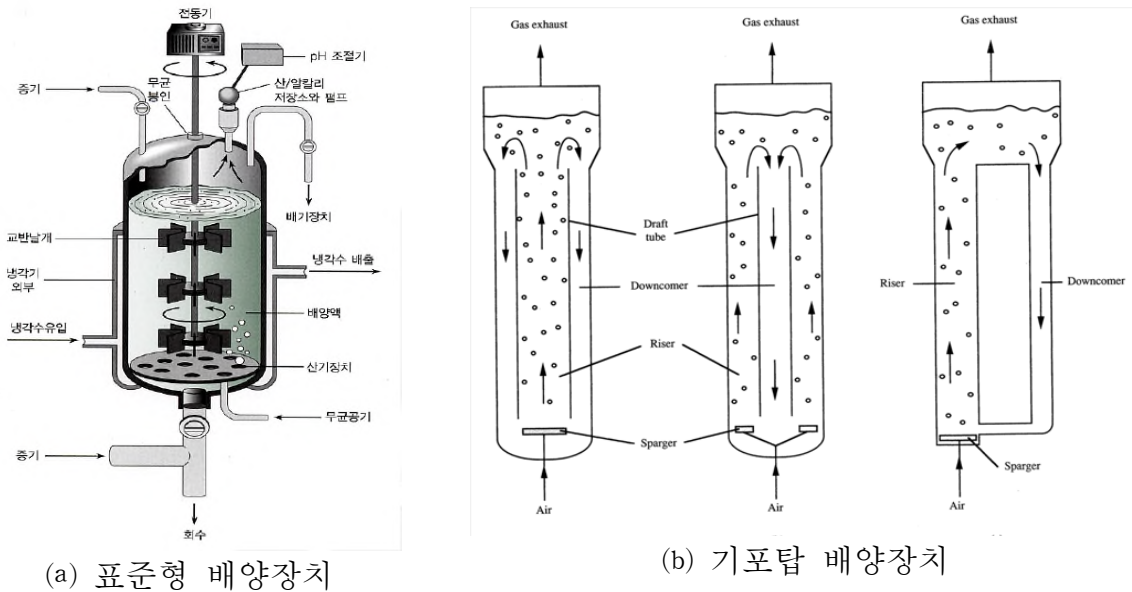


그림 78. 표준형 배양장치 및 기포탑 배양장치 구조

(3) 마이크로 버블(micro-bubble) 장치의 개발

배양기에 마이크로버블 발생장치를 적용하기 위해서 먼저 아래의 제한사항을 고려하여 정치를 설계함에 있어서 최적화된 시안을 고안 하도록 하였다. 고속전단방식의 설계 초안은 아래의 그림 8과 같다.

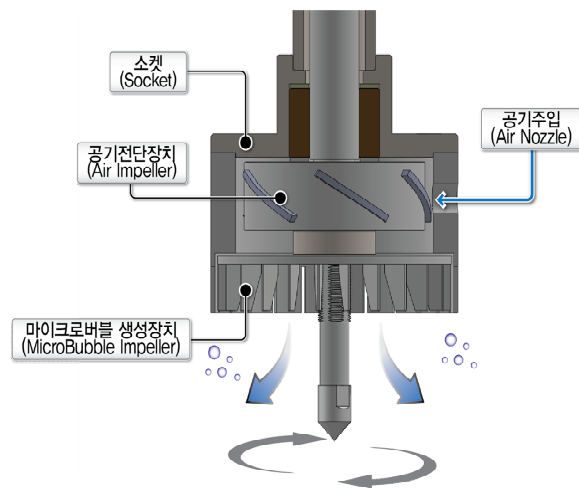
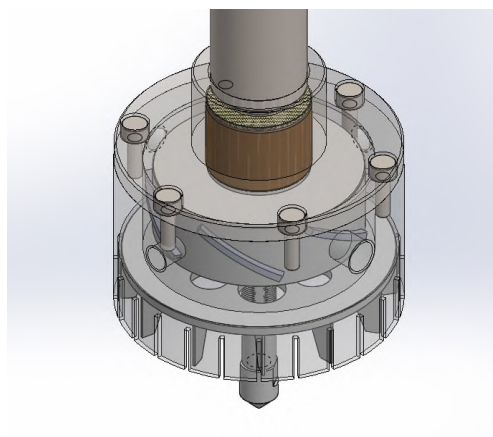


그림 79. 고속전단방식 마이크로버블 발생기 설계 초안

외부의 공기를 공기노즐을 통해 소켓내부로 주입한 이후 공기전단장치의 회전으로 소켓 상단에 공기가 일정방향으로 회전하면서 고르게 분포하게 된다. 이때 공기전단장치에 있는 블레이드는 상단의 유체(물+공기)를 아래로 밀어주는 역할을 하고 아래의 마이크로버블 생성장치는 고속 회전을 하면서 마이크로버블을 생성하게 된다.

마이크로버블 생성장치(Master Model)



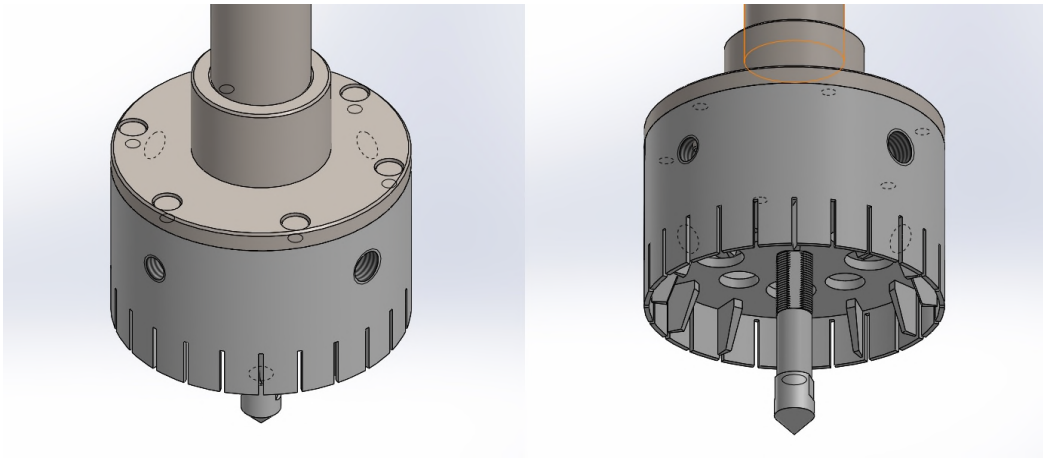


그림 80. 마이크로 버블 발생장치 제작

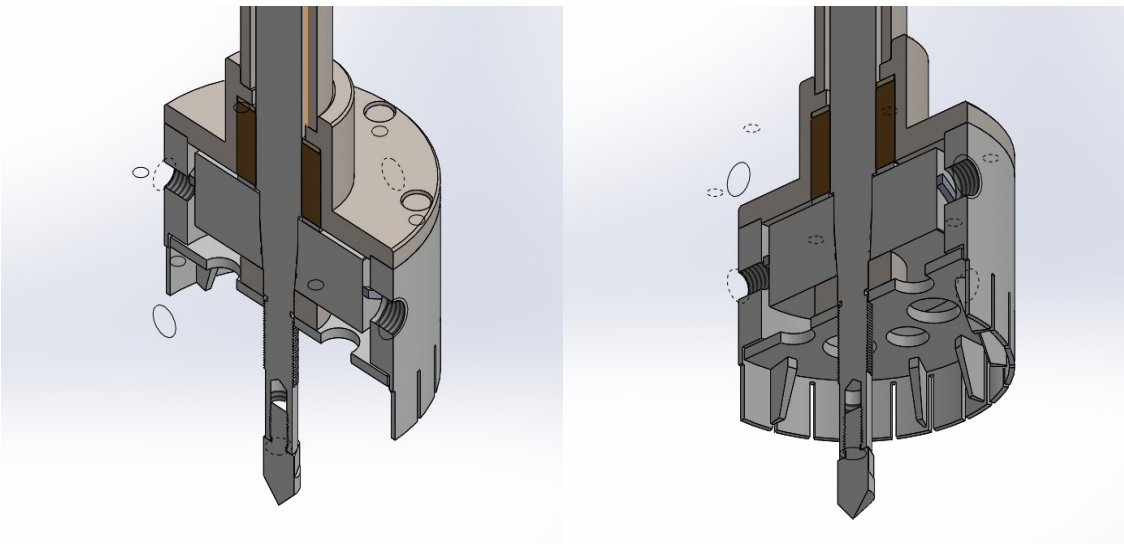


그림 81. 마이크로 버블 발생장치 제작 단면도



(A)



(B)

그림 82. 기존 발효조(A) 및 마이크로 버블 발생장치를 장착한 발효조(B)의 기포 발생

(4) 마이크로 버블(micro-bubble) 장치를 이용한 유산균의 발효

(가) 용존산소 포화농도($C_{s\infty}$, mg/L) 및 산소전달 계수(KLa , h⁻¹) 분석

각 샘플링 위치별로 다음 식에 따라 비선형 분석법으로 용존산소 포화농도와 산소전달 계수를 계산한다.

$$C_t = C_{s\infty} = (C_{s\infty} - C_0) \exp(-KLa t)$$

여기에서

C_t : 시간 t 에서의 용존산소 농도(mg/L)

$C_{s\infty}$: 용존산소 포화농도 추정값(mg/L)

C_0 : 시험 초기 용존산소 농도(mg/L)

KLa : 산소전달 계수(min^{-1})

t : 샘플링 시간 또는 용존산소 측정 시간(min)

나. 표준 상태의 용존산소 포화농도($C_{s\infty 20}$, mg/L)

위에서 구한 용존산소 포화농도 값으로 다음 식에 따라 계산한다.

$$C_{S\infty 20} = C_{S\infty T} \times (C_{S20}/C_{ST}) \times (P_s/P)$$

여기에서

$C_{S\infty 20}$: 표준 상태에서의 용존산소 포화농도(mg/L)

C_{S20} : 20 °C에서의 용존산소 포화농도(mg/L)

C_{ST} : T °C에서의 용존산소 포화농도(mg/L)

P_s : 표준 상태의 대기압(kPa)

P : 시험시 대기압(kPa)

다. 표준 산소전달 계수(KLa_{20} , h^{-1})

가에서 구한 산소전달 계수 값으로 다음 식에 따라 계산한다.

$$KLa_{20} = KLa_T \cdot \theta^{(20-T)}$$

여기에서

KLa_{20} : 표준 상태에서의 산소전달 계수(min^{-1})

KLa_T : 온도 T °C일 때 산소전달 계수(min^{-1})

θ : 온도보정 계수

라. 표준 산소전달량(SOTR, kg/h)

KLa_{20} 및 $C_{S\infty 20}$ 값을 사용하여 다음 식에 따라 계산한다.

$$SOTR = V \times KLa_{20} \times C_{S\infty 20}$$

여기에서

SOTR : 표준 산소전달량(kg/h)

V : 시험수량(m^3)

마. 산소전달효율 측정

산기관으로 공급되는 총 통기량을 측정하여 다음 식에 따라 계산한다.

$$W_{O_2} = \rho \times Q_n \times 0.232$$

여기에서

W_{O_2} : 산소 공급량(kg/h)

ρ : 표준 상태의 공기밀도(kg/m³)

Q_n : 표준 상태로 환산한 총 통기량(m³/h)

0.232 : 공기 중 산소의 무게분율

바. 표준 산소전달 효율(SOTE, %)

라와 마에서 계산한 값으로 다음 식에 따라 계산한다.

$$SOTE = (SOTR/W_{O_2}) \times 100$$

여기에서

SOTE : 표준 산소전달 효율(%)

W_{O_2} : 산소 공급량(kg/h)

○ 기존 발효조 및 마이크로버블 발효조의 두 가지 형태의 배양조를 제작하여 각 배양조에서 용존산소를 측정하여 위 식을 근거로 산소전달효율을 계산한 산소전달효율 데이터는 아래 표에 나타내었다. 또한 배양조에 적용된 마이크로버블 형태에 따른 용존산소의 변화와 시간 당 용존산소 변화율을 그림에 제시하였음.

표 3. 용존산소 측정 데이터(Case 1)

시간 (min)	C:DO (mg/L)	Cs-C (mg/L)	$\ln[(Cs-Ct)/(Cs-C0)]$	$-\ln[(Cs-Ct)/(Cs-C0)]$
0	0.0	11.9	0.0000	0.0000
2	5.3	6.6	-0.5895	0.5895
4	6.4	5.5	-0.7718	0.7718
6	7.1	4.8	-0.9079	0.9079
8	7.7	4.2	-1.0415	1.0415
10	9.1	2.8	-1.4469	1.4469
12	9.1	2.8	-1.4469	1.4469
14	9.2	2.7	-1.4833	1.4833
16	9.4	2.5	-1.5602	1.5602

18	9.6	2.3	-1.6436	1.6436
20	9.6	2.3	-1.6436	1.6436
22	9.9	2.0	-1.7834	1.7834
24	9.9	2.0	-1.7834	1.7834
26	9.9	2.0	-1.7834	1.7834
28	10.0	1.9	-1.8347	1.8347
30	10.1	1.8	-1.8888	1.8888
35	10.3	1.6	-2.0065	2.0065
40	10.5	1.4	-2.1401	2.1401
45	10.6	1.3	-2.2142	2.2142
50	10.9	1.0	-2.4765	2.4765
55	11.0	0.9	-2.5819	2.5819
60	11.1	0.8	-2.6997	2.6997
70	11.3	0.6	-2.9874	2.9874
80	11.4	0.5	-3.1697	3.1697
90	11.5	0.4	-3.3928	3.3928
100	11.5	0.4	-3.3928	3.3928
110	11.5	0.4	-3.3928	3.3928
120	11.5	0.4	-3.3928	3.3928

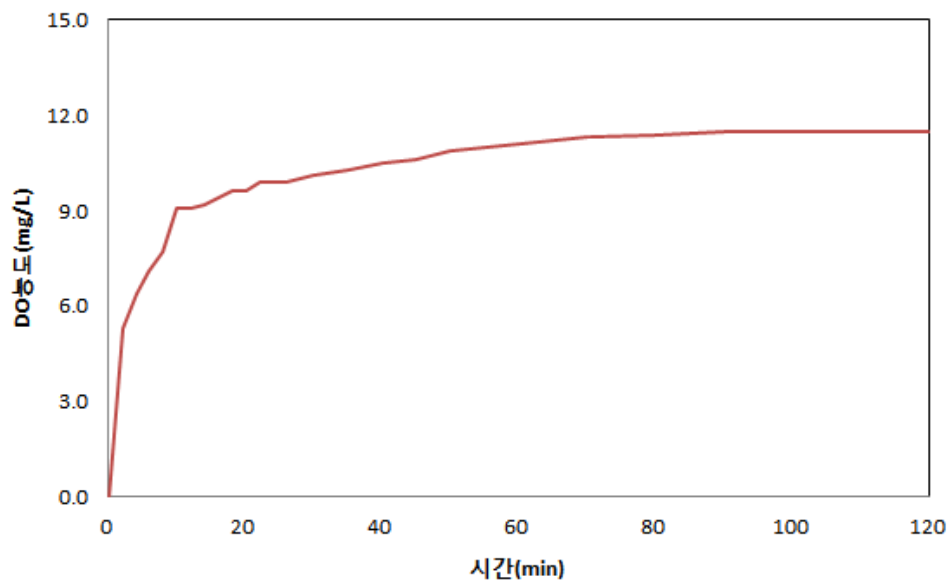


그림 83. 시간에 따른 용존산소 변화 (CASE 1)

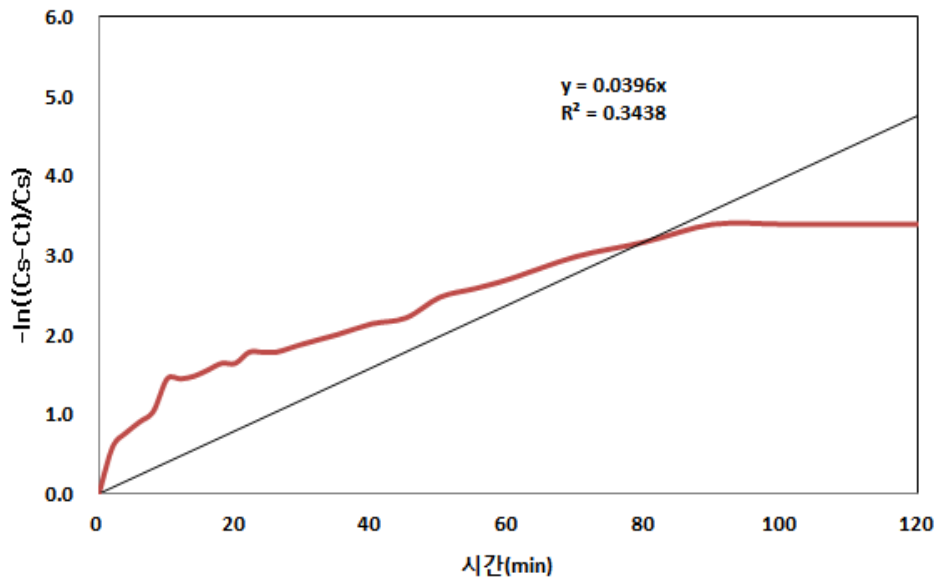


그림 84. 시간에 따른 포화 용존산소 대비 산소 변화율 (CASE 1)

표 4. 용존산소 측정 데이터(Case 2)

시간 (min)	C:DO (mg/L)	Cs-C (mg/L)	$\ln[(Cs-Ct)/(Cs-C0)]$	$-\ln[(Cs-Ct)/(Cs-C0)]$
0	0.0	11.9	0.0000	0.0000
2	3.2	8.7	-0.3132	0.3132
4	3.6	8.3	-0.3579	0.3579
6	4.3	7.6	-0.4484	0.4484
8	5.2	6.7	-0.5744	0.5744
10	5.8	6.1	-0.6682	0.6682
12	6.3	5.6	-0.7538	0.7538
14	6.7	5.2	-0.8279	0.8279
16	7.1	4.8	-0.9079	0.9079
18	7.6	4.3	-1.0179	1.0179
20	7.7	4.2	-1.0415	1.0415
22	7.8	4.1	-1.0656	1.0656

24	7.9	4.0	-1.0902	1.0902
26	8.0	3.9	-1.1156	1.1156
28	8.1	3.8	-1.1415	1.1415
30	8.2	3.7	-1.1682	1.1682
35	8.3	3.6	-1.1956	1.1956
40	8.4	3.5	-1.2238	1.2238
45	8.5	3.4	-1.2528	1.2528
50	8.5	3.4	-1.2528	1.2528
55	8.5	3.4	-1.2528	1.2528
60	8.6	3.3	-1.2826	1.2826
70	8.6	3.3	-1.2826	1.2826
80	8.7	3.2	-1.3134	1.3134
90	8.7	3.2	-1.3134	1.3134
100	8.7	3.2	-1.3134	1.3134
110	8.7	3.2	-1.3134	1.3134
120	8.7	3.2	-1.3134	1.3134

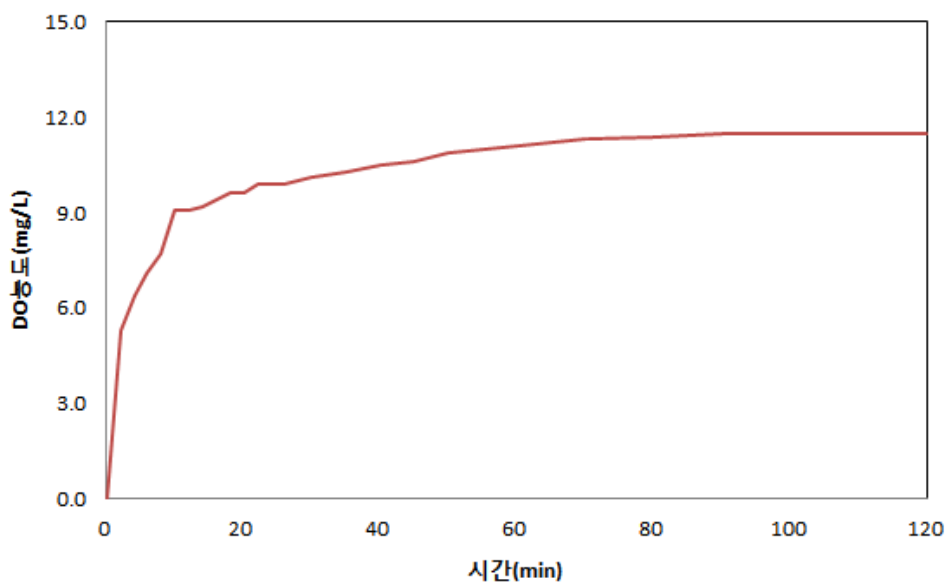


그림 85. 시간에 따른 용존산소 변화 (마이크로버블 발효조)

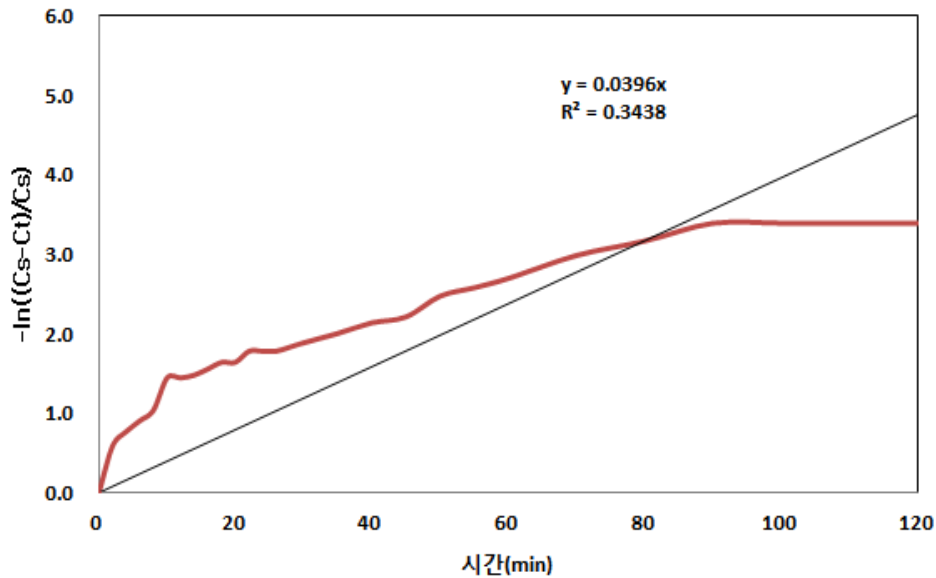


그림 86. 시간에 따른 포화 용존산소 대비 산소 변화율 (마이크로버블 발효조)

프로펠러 타입 회전체를 마이크로버블 발효조에 적용하여 각 시간에 따른 용존산소의 변화를 측정한 결과, 초기 용존산소 농도 0 mg/L에서 시작하여 2분 후 3.2, 6분 후 4.3 mg/L에 도달하였으며 120분 반응 후 최종 용존산소 농도는 8.7 mg/L로 나타났다.

5) 마이크로버블 발효조에서 *L. paracasei* 배양

기존의 발효조 및 마이크로버블 발효조에서 *L. paracasei*를 배양한 결과 그림 87과 같이 초기 5시간 동안에서의 세포 성장 정도에는 차이가 없었으며, 이는 미생물이 배양환경에 적응하는 기간이기 때문으로 판단된다. 배양 10시간 후부터는 배양 속도의 차이가 나타나기 시작하였다. 배양 시간 15 이후에는 세포의 성장이 stationary phase에 진입함에 따라 세포의 수는 일정하게 유지되었으며 이는 배지 내 영양성분이 고갈되었기 때문으로 판단된다. 따라서 마이크로버블 발효조를 활용할 경우 기존의 발효조에 비해 배양시간을 약 3시간 정도 단축할 수 있음을 확인하였다.

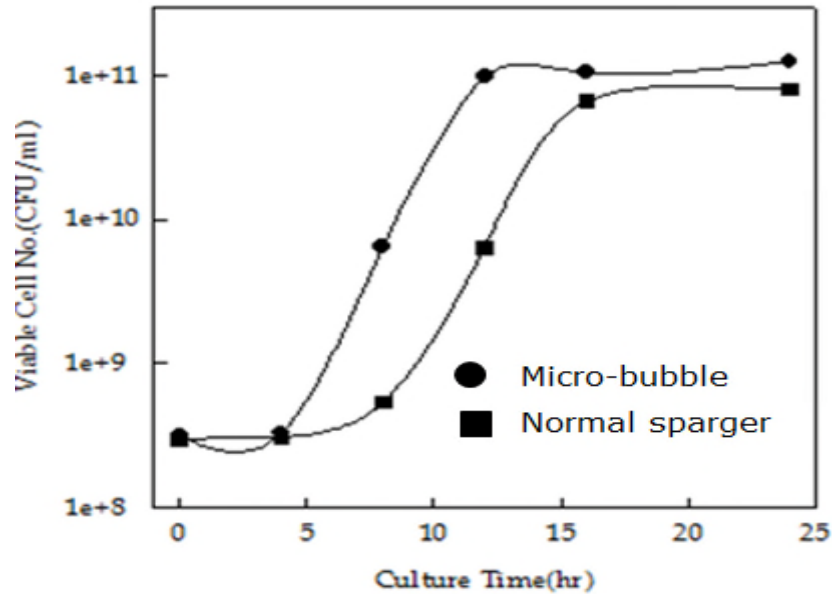


그림 87. 기존 발효조 및 마이크로 버블 장치를 이용한 *L. paracasei*의 배양

3. 1톤 발효조를 이용한 유산균 배양 scale-up

가. 유산균 배양 배지조건 확립을 통한 고농도 배양 기술 정립

앞선 연구결과에서 1톤 발효조의 글루텐 발효 유산균의 시제품 생산을 위해 식용배지의 조성을 설정하였다. 따라서 이러한 식용배지의 조성이 pilot scale에서 MRS broth와 유사한 유산균 수를 나타내는지 평가하였다. 유산균 수 평가는 자체평가 결과를 얻었다.

자체분석 결과, MRS broth로 배양한 대조군(MRS broth)의 유산균 수는 1×10^{11} cfu/mL로 평가되었으며, 식용배지로 배양한 실험군(식용배지)의 유산균 수는 5×10^{10} cfu/mL로 평가되었다(그림 17). 공인분석기관을 통한 유산균 수 평가결과는 MRS broth로 배양한 대조군(MRS broth)의 유산균 수는 1.3×10^{10} cfu/mL로 평가되었으며, 식용배지로 배양한 실험군(식용배지)의 유산균 수는 1×10^{10} cfu/mL로 평가되었다(그림 18). 이렇게 자체분석 결과와 공인분석기관을 통한 분석결과가 상이한 이유는 자체분석은 샘플을 채취하여 바로 분석이 가능하지만 공인분석기관으로의 샘플 전달에 시간이 소요되어 차이가 발생한 것으로 판단된다. 하지만 자체분석과 공인시험분석기관의 결과 모두 기술개발 목표치에 해당하는 유산균 수 1×10^{10} cfu/mL에 도달하였다.

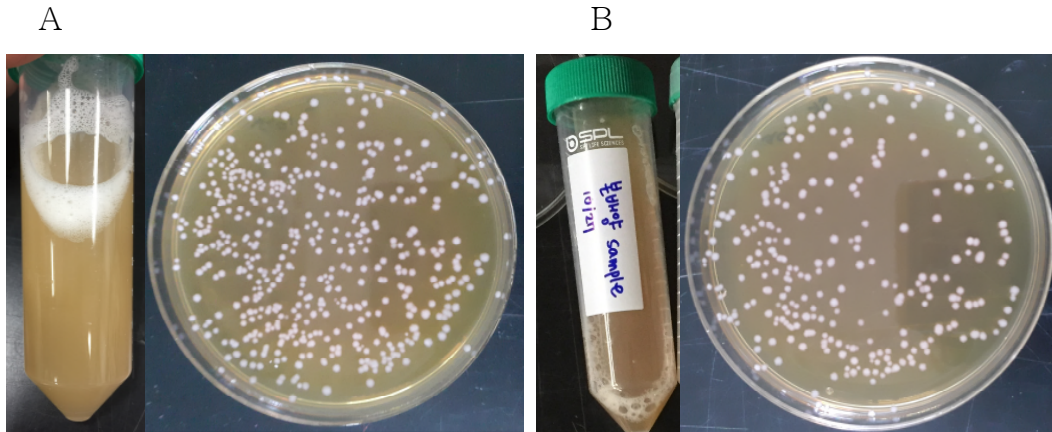


그림 88. 유산균 배양 배지조건 확립을 통한 고농도 배양기술 정립 결과(유산균 수)
A. MRS broth로 배양한 유산균, B. 식용배지로 배양한 유산균

나. 글루텐 발효 유산균 시제품 생산

1) Lab scale에서의 시제품 생산

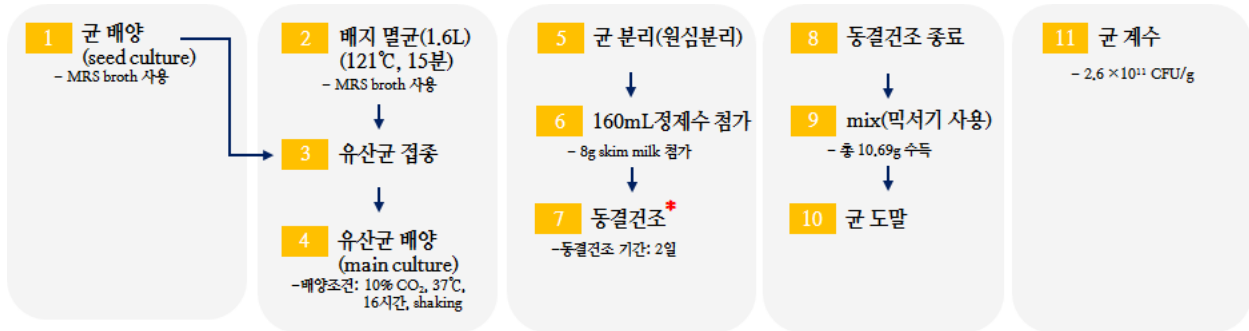
글루텐 발효 면 제조용 *L. paracasei*의 제품화를 위해서 1차적으로 Lab scale에서 2 L 발효조를 이용하여 분말화 유산균에 대한 시제품 개발에 대한 기본적인 실험을 수행하였다. 이 때 사용된 배지는 MRS 배지를 사용하였으며, 2L 발효조에서 seed culture한 유산균을 16시간동안 배양하였다. 배양조건은 37°C, shaking 조건으로 다음 그림과 같다(그림 19). 본 배양이 종료된 후 유산균을 분리하기 위해 배양액을 원심분리하였다. 원심분리된 침전물(유산균)을 동결보호제(5% skim milk)가 포함된 멸균 수에 현탁 시켰다. 이후 -30°C(180min), -20°C(300min), -20°C(300min), -10°C(300min), -10°C(300min), 0°C(300min), 0°C(300min), 10°C(300min), 10°C(300min), 20°C(유지) 조건으로 약 2일간 동결건조하였다.

동결건조 결과 총 10.69 g으로 유산균 수는 2.66×10^{11} CFU/g이었으며, 다른 미생물에 의한 오염은 없었다. 또한 그림에서 나타난 바와 같이 MacConkey agar에서 아무런 미생물이 나타나지 않으므로써 식품과 관련된 장내병원성 미생물도의 검출되지 않음을 확인하였다(그림 20). 또한 확인된 유산균은 다음과 같은 특성을 보였다.

○ Lab scale에서 생산된 글루텐 발효 유산균(시제품)의 특성

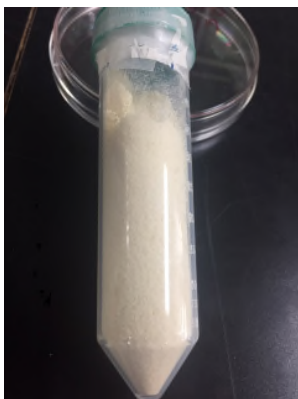
- 유산균 수 : 2.66×10^{11} CFU/g, 10.69 g
- colony 색 : 옅은 베이지~ 흰색
- colony 냄새 : 약간 시큼
- colony 형태

- colony의 질 : smooth colony (활면형 집락)
- colony의 형태 : circular colony (원형)
- colony의 고도 : convex colony (볼록 용기)
- colony의 가장자리 : serrate (파상형 톱니모양)
- Gram stain : 그람양성 간균의 1종 균 확인
- MacConkey agar : 장내병원세균 미검출

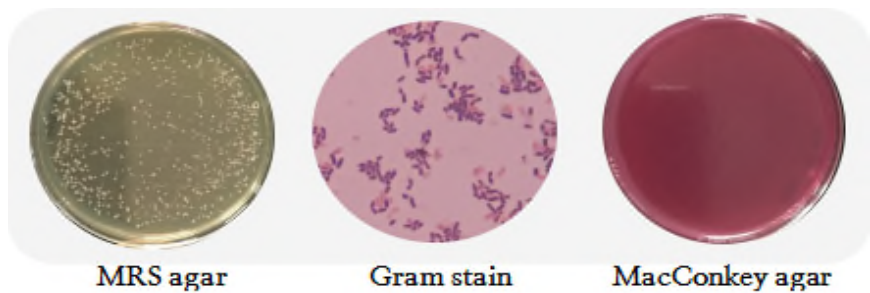


<유산균 1차배양> <균 원심분리> <균 동결건조> <유산균 계수>

그림 89. Lab scale에서의 글루텐 발효 유산균(시제품) 생산과정



<성상>



<유산균 수 및 오염 확인>

그림 90. Lab scale에서의 시제품 평가

(2) Pilot scale에서의 글루텐 발효 유산균(시제품) 생산

생산 scale(pilot scale)에서의 글루텐 발효 유산균 시제품 생산은 총 10회를 목표 하였으나 2017.10.30. 기준 총 11회 생산하여 최종적으로 목표하는 유산균 수를 달성하였다(표 5). pilot scale에서의 글루텐 발효 유산균의 생산은 그림 91와 같이 0.5톤 발효기 멸균, 식용배지 멸균, 유산균 접종(이전에 seed culture-sub culture 준비), 유산균 배양(24시간), 원심분리, 동결보호제 첨가, 동결건조, 동결건조 종료 후 유산균 수 평가 및 오염균 확인, 추가 부형제 첨가, 포장 순으로 진행되었다.

1차 시제품의 경우 최종적으로 제조된 시제품의 총 생산량은 10 kg 이었으며, 유산균 수는 1×10^7 CFU/g로 확인되었다. 최종 시제품에서의 장내 병원성 미생물은 관찰되지 않았으나, 목표하는 유산균 수에 도달하지 못하였다. 그 이유로 배양조건에서 온도조절 센서의 문제로 판단되어 이후의 시제품 생산은 보완하여 생산하였다.

이후 2-10차 시제품 생산에서 생산과정의 조건을 변경하여 생산한 결과 목표하는 유산균 수 미달, 생산자의 생산 미숙, 이송펌프 내 오염과 같은 다양한 원인으로 시제품 생산의 시행착오가 발생하였다.

11차 시제품 생산의 경우 최종적으로 제조된 시제품의 총 생산량은 약 2 kg으로 유산균 수는 4.65×10^{10} CFU/g으로 확인되며 목표한 유산균 수 1×10^9 CFU/g 대비 목표치에 도달하였다. 또한 Gram stain과 MacConkey agar에서 장내 병원성 미생물을 확인한 결과 유산균 이외의 이종(異種)의 미생물은 관찰되지 않았다. Pilot scale에서의 글루텐 발효 유산균의 최종 시제품과 평가는 그림 22-23에 나타내었다.

○ Pilot scale에서 생산된 글루텐 발효 유산균(시제품)의 특성

- 유산균 수 : 4.65×10^{10} CFU/g, 2 kg (1×10^9 CFU/g, 91 kg 제조 가능)
- colony 색 : 옅은 베이지~ 흰색
- colony 냄새 : 약간 시큼
- colony 형태
 - colony의 질 : smooth colony (활면형 집락)
 - colony의 형태 : circular colony (원형)
 - colony의 고도 : convex colony (볼록 용기)
 - colony의 가장자리 : serrate (파상형 톱니모양)
- Gram stain : 그람양성 간균의 1종 균 확인
- MacConkey agar : 장내병원세균 미검출



그림 91. pilot scale에서의 글루텐 발효 유산균(시제품) 생산 공정

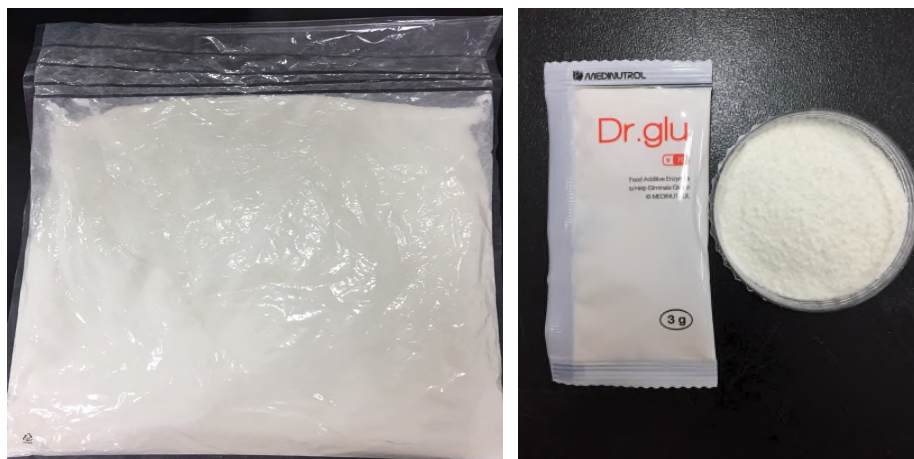


그림 92. pilot scale에서의 글루텐 발효 유산균의 최종 시제품

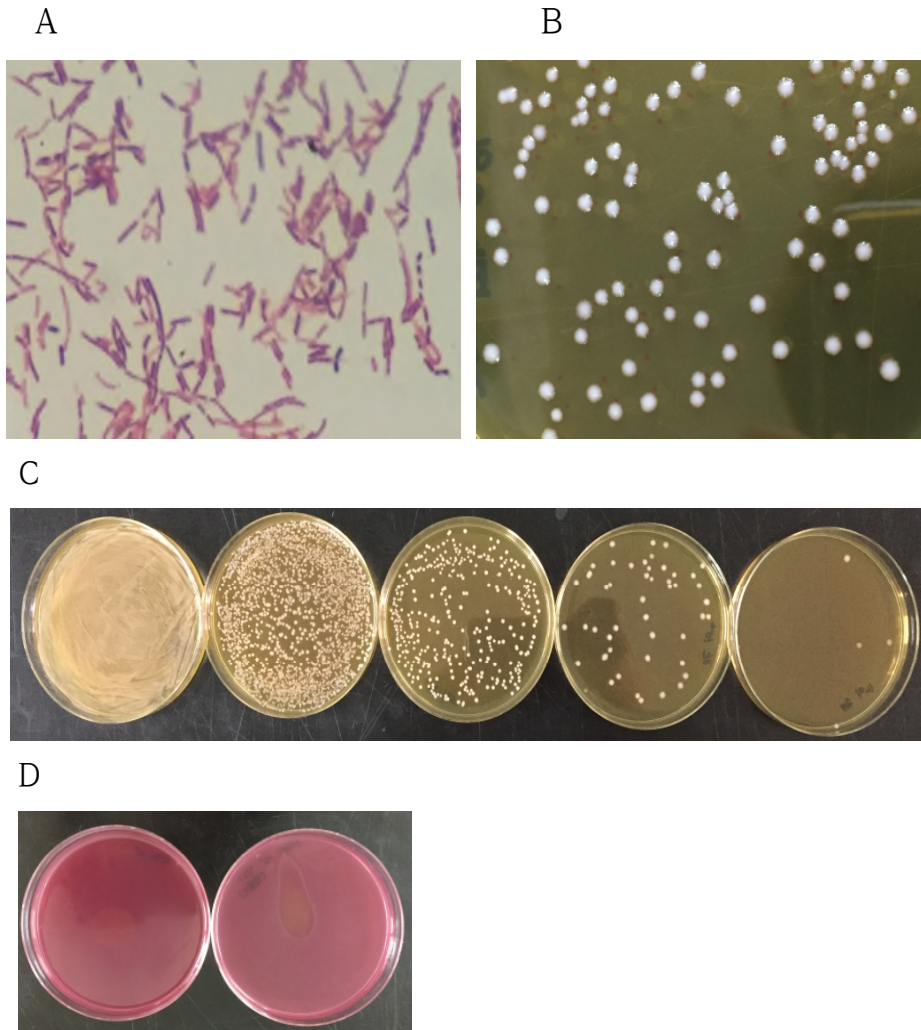


그림 93 pilot scale에서의 글루텐 발효 유산균의 최종 시제품 평가
 A. Gram stain, B. 유산균 집락, C. 유산균 수 평가(MRS agar), D. MacConkey agar

4. 동결건조 조건의 확립

가. 부형제의 선정

(1) 실험 방법

(가) 생균제의 제조와 보존성 조사

*L. paracasei*를 MRS 배지에서 18 ~ 20 시간 배양하고 원심분리하여 균체만 회수하였다. 회수된 균체에 안정제로 0.5% glutamate, 0.5% ascorbate와 2% sucrose를 함유한 10% skim milk 용액과 10% whey에 각각 현탁한 뒤 동결건조하여 10^{10} CFU/g인 시험 생균제 원말을 제조하였다. 시험 생균제를 4°C와 30°C에서 각각 보관하면서 생존율로서 시험 생균제의 보존성을 조사하였다.

(나) 동결건조를 위한 부형제 (보호제)의 선정

*L. paracasei*를 MRS 액체 배지에 접종하여 30°C에서 18~20 시간 동안 정치 배양하여 유산균의 농도가 $10^9 \sim 10^{10}$ CFU/ml이 되도록 하였다. 배양된 유산균은 두 번 세척하고 유산균의 농도가 10^{10} CFU/ml가 되도록 각각 10% sorbitol, 10% glycerol, 10% skim milk 또는 2% sucrose, 0.5% ascorbate와 0.5% glutamate를 함유한 10% skim milk를 첨가하고 균일하게 교반한 후 동결 건조하였다. 제조된 유산균 분말은 각각 4°C와 30°C에서 보관하면서 생존율을 측정하였다.

(다) 기능성 생체 polymer 부형제 (보호제)의 선정

MRS 액체 배지에 접종하여 30°C에서 18~20 시간 동안 정치 배양하여 유산균의 농도가 $10^9 \sim 10^{10}$ CFU/ml가 되도록 한 후, polymer를 첨가하여 *L. paracasei*를 각각 10% PEG, 2% gelatin, 2% starch, 2% dextran을 첨가하여 30 분간 교반하면서 *L. paracasei*를 coating하고 다시 0.5% ascorbate와 0.5% glutamate를 함유한 10% skim milk를 첨가하여 동결 건조하였다. 이와 같이 *L. paracasei*의 코팅 방법에 의해 제조된 분말은 각각 4°C와 30°C에서 보관하면서 생존율을 측정하였다.

(1) 실험 결과

(가) 생균제의 제조와 보존성 조사

*L. paracasei*를 MRS 배지에서 18 ~ 20 시간 배양하고 균체를 회수한 후, 0.5% glutamate, 0.5% ascorbate, 2% sucrose를 함유한 10% skim milk와 10% whey 용액에 각각을 현탁하고 동결 건조하여 10^{10} viable cells/g인 시험 생균제 원말을 제조하였다. 4°C와 30°C에서 보관하면서 생존율을 조사한 결과, 젖산균 모두 30°C에서 보다는 4°C에서 저장하는 경우 보존성이 증가하였으며, 안정제로서 0.5% glutamate, 0.5% ascorbate와 2% sucrose 등을 함유하는 경우 생균제의 보존성은 더욱 증가하였다(그림 94). 또한 생균제 원말의 안정제로 whey 보다는 skim milk를 사용하는 경우에 생균제의 보존력을 증가시킬 수 있었다.

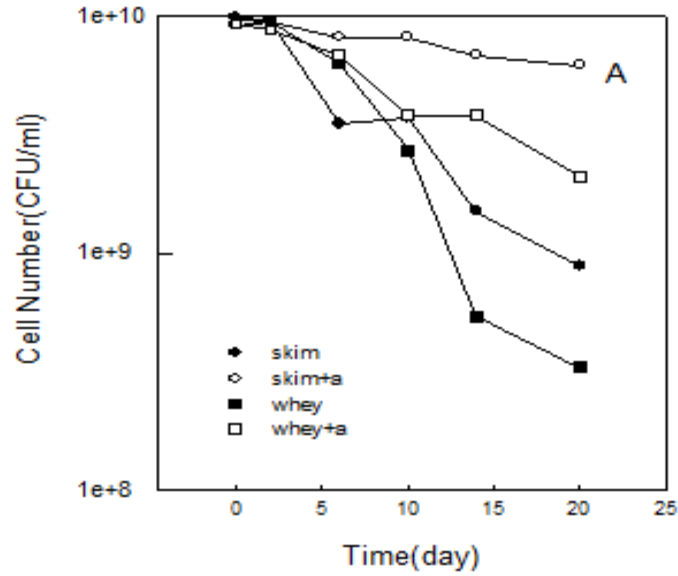


그림 94. 동결 보호제 종류에 의한 *L. paracasei*의 생존 효능

(나) 동결건조를 위한 보호제의 선정

*L. paracasei*의 저장성 증진 가능성을 확인하기 위하여 분말 형태로 동결 건조할 때의 동결 보호제 선정과 저온 및 상온에서의 보존성에 관한 실험을 수행하였다. *L. paracasei*를 MRS 배지에 접종하여, 30°C에서 18~20 시간 동안 정지 배양하여 세포의 농도가 약 10^{10} CFU/ml이 되도록 하였다. 배양된 젖산균은 두 번 세척하고 동결 보호제를 첨가하여 균일하게 교반한 후 동결 건조하여 4°C에서 보관하면서 생존율을 측정하였다. 그 결과, glycerol이나 sorbitol 보다 0.5% glutamate, 0.5% ascorbate와 2% sucrose이 함유된 skim milk를 사용하는 것이 효과적이었다(그림 95).

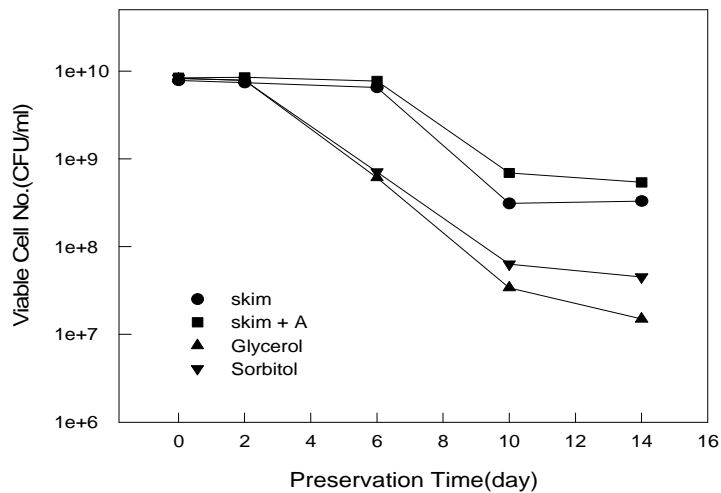


그림 95. *L. paracasei*의 동결건조 시 다양한 코팅제에 의한 생존 효과

(다) 기능성 생체 polymer 보호제의 선정

생균제의 보존 시 생존율을 증가시키기 위해 다양한 polymer를 첨가하여 분말 젖산균을 제조하고 4°C에서 보관하면서 2 개월 동안 생존율을 측정하는 결과, coating제로서 gelatin을 사용한 경우 2 개월 동안 95% 이상의 viability를 유지하였으며, gelatin과 PEG를 사용한 경우 보존 2 개월 후 80% 이상의 viability를 유지함으로써 분말 젖산균의 보존력을 증가시킬 수 있었다(그림 96).

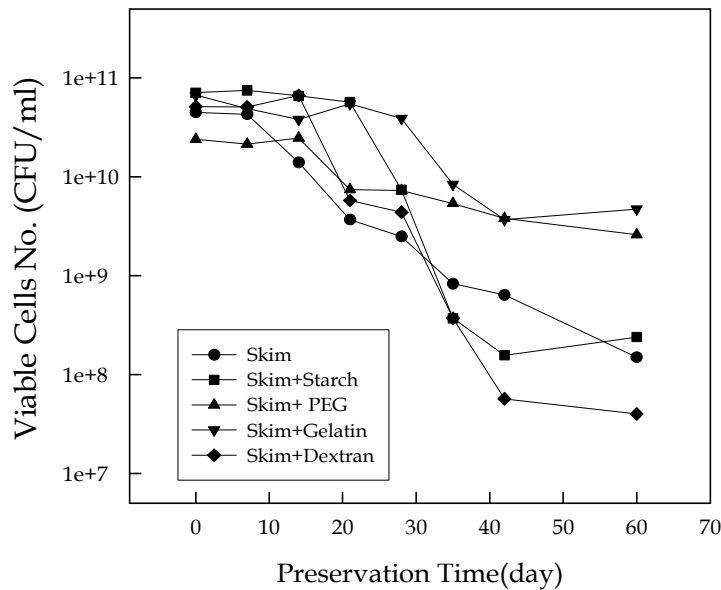


그림 96. *L. paracasei*의 동결건조 시 다양한 코팅제에 의한 생존 효과

5. 글루텐 발효 제품의 생산 기술 개발

글루텐은 밀전분 생산 시 발생하는 부산물로 물에 불용성 단백질이다. 주로 gliadin(그림 97 (A))과 glutenin(그림 97(B))으로 구성되어 있으며 gliadin은 분자량이 30,000~80,000 Da이고, glutenin은 수백만 Da 정도임. 글루텐의 gliadin은 알코올에 용해하나 glutenin은 불용인데, 제빵에서 중요한 역할을 하는 것은 glutenin이다. 따라서, 밀가루를 물과 혼합하면 글리아딘(gliadin)과 글루테닌(Glutenin)이 결합하여 글루텐(그림 97 (C))을 형성하며, 글루텐 단백질 중 글리아딘은 점성과 신장성이 있고 글루테닌은 탄력성을 가지고 있다. 이 2 개의 단백질이 밀가루 종류에 따라 점유하는 비율이 다르게 된다.

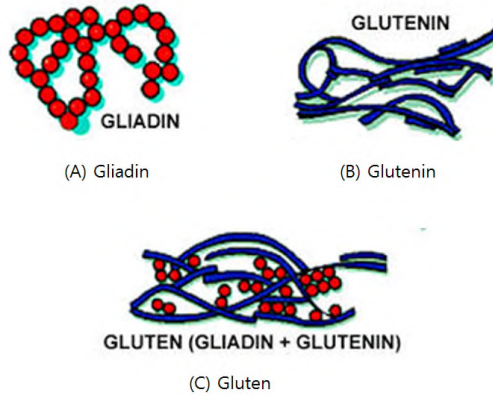


그림 97. 전분 내 Gliadin, glutenin 및 gluten

가. 공시 유산균 적용 밀가루 글루텐 분해율 평가

(1) 실험 방법(글루텐 함량 분석)

숙성된 반죽을 30 g 측정하여 필터백에 넣고 이것을 물이 담긴 볼에서 손으로 살짝 주물러 전분이 빠져나가도록 하였다. 전분이 전부 빠져 나간 후 이 물을 필터백에 한번 더 걸러 빠져나간 글루텐을 다시 포집하여 습식 글루텐을 얻었다. 이 필터백을 75°C의 Dry oven (DO-42, HYSC, 한국)에 넣고 3시간 건조시켜 건식 글루텐의 무게를 칭량하였다. 이를 사용해 글루텐 분해율을 측정하였다. 또한 정확한 글루텐 함량 확인을 위해 협력업체인 동아원의 Glutomatic(MHK TRADING, PERTEN, 스웨덴)을 사용하였다.



그림 98 글루텐 분석 장비 Glutomatic



그림 99. 유산균 첨가 반죽의 글루텐 분리 과정

(2) 실험 결과(*L. paracasei*의 배양 시간 별 글루텐 분해율 시험)

*L. paracasei*에 대한 최적의 배양 조건은 18시간으로 14시간부터 22시까지 2시간 간격으로 흡광도와 글루텐 분해율을 측정하였다. 배양액의 상등액을 배합수로서 100% 반죽에 첨가하여 반죽을 제조한 후 25°C, 35°C에서 24시간 숙성하였다. 숙성된 반죽의 30 g을 필터백에 담아 전분과 글루텐을 분리하여 얻어진 습부 글루텐을 75°C에서 3시간 건조하여 건부글루텐을 얻을 수 있었다. 이를 대조구 대비 글루텐의 분해율으로 확인하였다. 실험 결과 *L. paracasei*의 분해율이 85.41%로 다른 type strain의 유산균 중 가장 높은 분해능을 지닌 것으로 확인 되었다. *L. paracasei*의 적정 배양시간 역시 18시간으로 14~22시 배양 결과 18시를 기점으로 가장 높은 글루텐 분해율을 보였다(표 6). 흡광도 역시 18시간 배양 시 가장 높게 측정되었다(표 7).

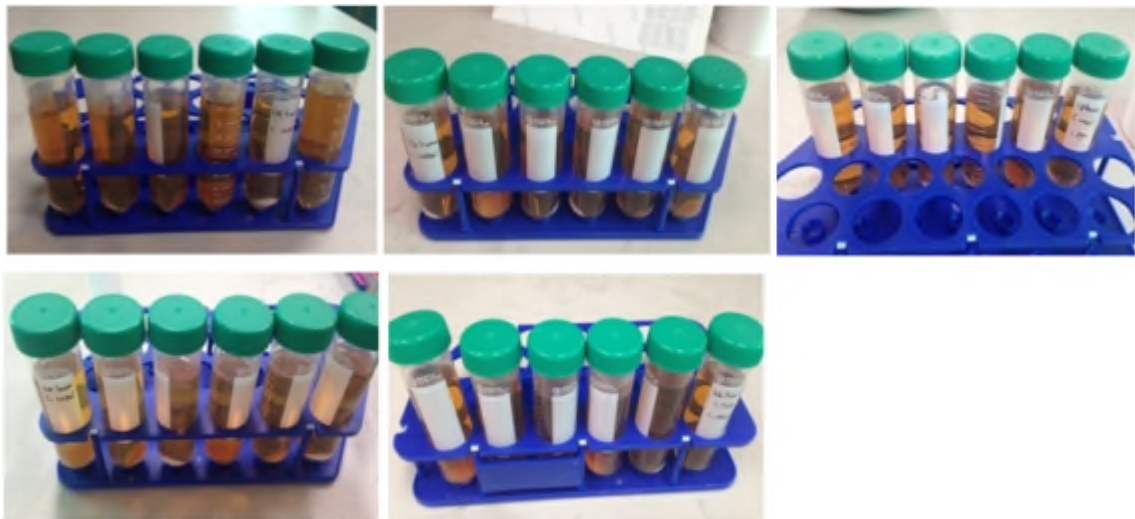


그림 100. 배양 시간별 *L. paracasei* 배양액의 상등액

표 6. 유산균 첨가에 따른 글루텐 분해율

배양온도	Sample	건부글루텐(g)	분해율
25℃	대조구	1.85	0.00
	<i>L. paracasei</i>	0.82	55.68
	<i>L. acidophilus</i> KCTC3145	1.18	36.22
	<i>L. casei</i> KCTC 3109	1.17	36.76
	<i>L. paracasei</i> KCTC 3510	0.95	48.64
	<i>L. delbrueckii spp bulgaricu</i> KCTC3635	1.36	26.49
	<i>L. helveticus</i> KCTC 3545	1.47	20.54
	<i>L. fermentu</i> KCTC 3112	1.28	30.81
	<i>L. plantarum</i> KCTC 3108	1.08	41.62
	<i>L. rhamnosus</i> KCTC 13088	0.99	46.49
	<i>Lc. lactis</i> KCTC 3769	1.54	16.76
	<i>S. thermophilus</i> KCTC 3658	1.04	43.78
	<i>B. animalis ssp. lactis</i> KCTC 5854	1.11	40.0
	35℃	대조구	1.85
<i>L. paracasei</i>		0.27	85.41
<i>L. acidophilus</i> KCTC3145		0.97	47.57
<i>L. casei</i> KCTC 3109		0.68	63.24
<i>L. paracasei</i> KCTC 3510		0.47	74.59
<i>L. delbrueckii spp bulgaricu</i> KCTC3635		0.68	63.24
<i>L. helveticus</i> KCTC 3545		0.87	52.97
<i>L. fermentu</i> KCTC 3112		0.75	59.45
<i>L. plantarum</i> KCTC 3108		0.66	64.32
<i>L. rhamnosus</i> KCTC 13088		0.42	77.29
<i>Lc. lactis</i> KCTC 3769		0.65	64.86
<i>S. thermophilus</i> KCTC 3658		0.47	74.59
<i>B. animalis ssp. lactis</i> KCTC 5854		0.87	52.97



그림 101. 필터백에 담긴 분리된 건부글루텐

표 7. *L. paracasei*의 글루텐 분해율과 흡광도

배양시간	숙성온도	건부글루텐 (g)	분해율(%)	흡광도
대조구	25°C	1.85	0.00	-
14		1.27	31.35	
16		1.33	28.11	
18		1.01	45.41	
20		1.18	36.22	
22		1.22	34.05	
대조구	35°C	1.85	0.00	-
14		0.9	51.35	1.736
16		1.05	43.24	1.801
18		0.17	90.81	1.890
20		0.3	83.78	1.849
22		0.76	58.92	1.768

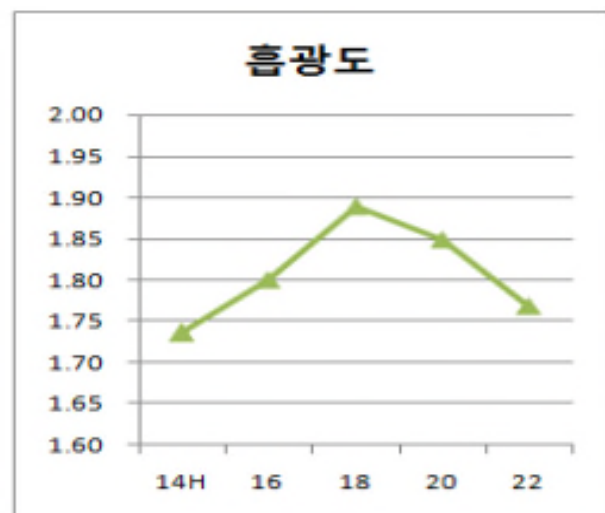
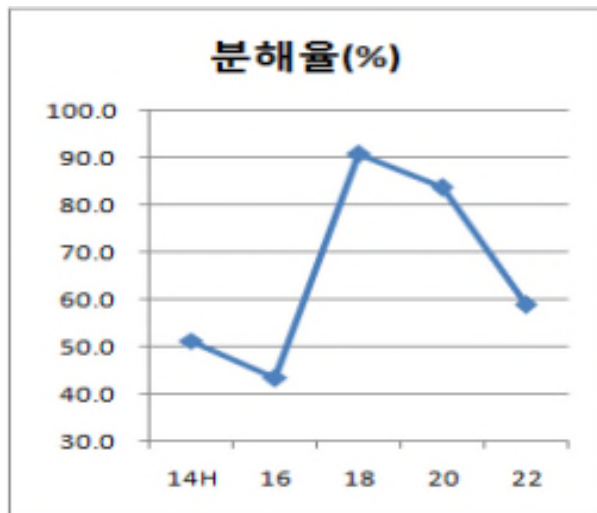


그림 102. 35°C에서 숙성된 반죽 글루텐 분해율(좌), 배양액의 흡광도(우)

나. 글루텐 발효 유산균(시제품) 적용 밀가루 글루텐 분해능의 우수성 평가

(1) 실험 방법

(가) GRAS¹⁾ 인정, 식품용 유산균 10종의 표준 균주 준비

GRAS 인정 식품용 유산균은 KTCT 생물자원센터(Korean Collection for Type Culture)에서 10종을 분양받아 각 배양조건에 맞는 배지와 환경에 맞추어 배양하고 준비하였으며 그 종류는 표 8와 같다. 분양 균주 10종을 대조로 평가하고자 한 글루텐 발효 유산균(*L. paracasei*)는 pilot sale에서 생산된 시제품을 처리하여 밀가루 내 글루텐 분해능을 평가하여 본 기술개발 핵심소재인 글루텐 발효 유산균(*L. paracasei*)의 글루텐 분해능 우수성을 평가하고자 하였다.

(나) *L. paracasei* 와 type strain 유산균의 배양 및 특성 확인

글루텐 분해능 평가에 앞서 분양받은 10종의 유산균과 본 기술개발의 핵심소재인 글루텐 발효 유산균(*L. paracasei*)의 특성을 파악하고자 gram stain, 유산균 배양용 배지(BCP agar, MRS agar) 및 유산균의 크기를 비교하였다.

(다) 글루텐 함량 분석

분양받은 표준균주 10종은 MRS broth에 키워 준비하고 글루텐 발효 유산균(*L. paracasei*)은 시제품을 준비한다. 글루텐 발효 유산균(시제품) 적용 밀가루 글루텐 분해능의 우수성 평가를 위한 실험 방법은 다음과 같다. 밀가루(중력분) 50 g에 각 유산균이 농도별로 첨가된 25 mL 물을 넣으면서 섞고 잘 이겨 반죽한다. 이때, 대조균은 유산균이 미포함된 물을 사용하였으며 글루텐 발효 유산균(시제품)은 분말화 시제품을 농도별로 첨가하였다. 이때, 각 실험균은 3반복하여 실험하였다. 균별로 반죽을 숙성하기 위해 랩으로 잘 감싸서 35°C에서 16시간 동안 숙성시킨다. 16시간 후, 숙성된 반죽을 꺼내 손바닥에 올려놓고 흐르는 따뜻한 물에 전분을 흘려 보내 글루텐만을 분리한다. 분리된 글루텐의 물기를 빼고 글루텐 덩어리의 무게를 측정하여 습성 글루텐(습맥: wet gluten)의 양을 측정하고 습성 글루텐을 건조기(60°C)에서 약 36시간동안 완전히 건조시켜 무게를 측정하였다. 이때의 무게를 건성 글루텐(건맥: dry gluten)양으로 측정하였다. 밀가루 중 글루텐의 습부량 및 건부량 계산법은 아래와 같다.

$$\text{습부량(\%)} = (\text{습부중량}/\text{밀가루중량}) \times 100$$

$$\text{건부량(\%)} = (\text{건부중량}/\text{밀가루중량}) \times 100$$

자세한 실험방법은 그림 33에 자세히 나타내었으며 본 실험방법은 농촌진흥청 국립식량과학원에서 고시한 식품단백질의 분리(밀가루부터 gluten의 분리) 방법을 사용하였다.

표 8. GRAS 인정, 식품용 유산균 11종의 준비

No.	Genus	Species
1	<i>Lactobacillus</i>	<i>acidophilus</i>
2	<i>Lactobacillus</i>	<i>casei</i>
3	<i>Lactobacillus</i>	<i>paracasei</i>
4	<i>Lactobacillus</i>	<i>delbrueckii spp bulgaricus</i>
5	<i>Lactobacillus</i>	<i>helveticus</i>
6	<i>Lactobacillus</i>	<i>fermentum</i>
7	<i>Lactobacillus</i>	<i>plantarum</i>
8	<i>Lactobacillus</i>	<i>rhamnosus</i>
9	<i>Lactococcus</i>	<i>lactis</i>
10	<i>Streptococcus</i>	<i>thermophilus</i>

A

농촌진흥청 국립식량과학원

기초이론과 조직 성분분석 기기분석 효소분석 품질평가 식품가공 위생검사 부록

성분분석

밀가루gluten분리

URL 복사 인쇄

밀가루gluten분리 우유casein분리 난백eggalbumin분리 난황vitelin분리

4-1 밀가루로부터 gluten의 분리

▶ 원 리

밀가루 중에 존재하는 단백질은 그의 용해도 특성에 의하여 분리할 수 있다. 밀가루 중에 존재하는 가장 중요한 단백질은 gluten으로, 이것은 alcohol에 녹는 gliadin과 알칼리에 녹는 glutenin으로 구성되어 있다. 이밖에 밀가루 중에는 물에 녹는 albumin과 묽은 알칼리화 중성 염류에 녹는 globulin을 각각 소량씩 함유하고 있다. 따라서 이들의 성질을 이용하여 밀가루단백질을 분리할 수 있으며, 밀가루 중 중요한 단백질인 gluten의 함량에 따라 그용도가 다르다.

▶ 시료및기구

밀가루 20g에 물 12ml를 가하여 반죽(dough)을 잘 한 후 30°C의 물속에 약 30분간 담근 후 이것을 원경주머니로 싸서 물 속에 담가 두면 견본 집과 가용성 물질은 물 속으로 나가고 남는 것(처음에는 흐르는 물에서, 나중에는 커내어 물 속에서 잘 이기면 원본질이 셋겨 나간다.) 이 gluten 단백질이다. 이것을 습부(wet gluten)라 하고, 이를 150°C에서 약 5~6시간 건조하면 얻어지는 gluten을 건부(dry gluten)라 하며 각각 %로 표시한다.

▶ 계 산

밀가루 중의 습부량 및건부량은 다음식에 의해 계산한다.

습부량(%) = (습부중량 / 밀가루중량) × 100

건부량(%) = (건부중량 / 밀가루중량) × 100

(표준식품분석학, 채수규등, 지구문화사)

B



그림 103. 공시 유산균(시제품) 적용 밀가루 글루텐 분해율 평가 방법

A. 글루텐 분석 방법(출처: 농촌진흥청 국립식량과학원), B. 실제 분석방법

(2) 실험 결과

(가) *L. paracasei* 와 type strain 유산균의 배양 및 특성 확인

GRAS 인정 식품용 유산균과 본 기술개발 소재인 글루텐 발효 유산균은 모두 유산균의 특성과 함께 표 9와 같은 특성을 나타내었다(표 9). 또한 KTCT에서 분양받은 *L. paracasei*와 본 연구진의 유산균주는 동일한 그람양성의 간균의 형태를 보였지만 gram stain 결과 간균의 사이즈가 약간의 차이를 보였다(그림 104).

(나) 글루텐 발효 유산균(시제품) 적용 밀가루 글루텐 분해능의 우수성 평가 결과

본 실험에서는 앞서 분석한 공시 유산균 적용 밀가루 글루텐 분해를 평가에서 나아가 글루텐 발효 유산균(시제품)을 적용하여 밀가루 글루텐 분해능의 우수성을 평가하였다. 그 결과, 글루텐 발효 유산균(시제품)의 경우 *L. rhamnosus*와 *S. thermophilus*를 제외한 분양 유산균 주와 비교 시 월등히 뛰어난 글루텐 분해능(~60%)을 보였다(그림 105).

*L. rhamnosus*와 *S. thermophilus*의 경우 글루텐 발효 유산균(시제품) 보다 많은 글루텐 분해능을 보였지만 낮은 글루텐 분해능을 보인 밀가루에서 글루텐의 이상 현상(흘러내림)을 보였다. 이러한 결과는 *L. rhamnosus*와 *S. thermophilus* 적용 밀가루의 경우 글루텐 저하로 인해 면 제작이 불가능할 것으로 판단하였다. 종합적으로 본 기술개발의 핵심소재인 글루텐 발효 유산균(시제품)의 글루텐 분해의 우수성을 재차 확인하였다.

표 9. *L. paracasei*와 11종의 type strain의 특성 분석

Lactic acid bacteria	Lactobacillus									Lactococcus	Streptococcus
	acidophilus	casei	paracasei subsp. paracasei	fermentum	Plantarum subsp. plantarum	rhamnosus	helveticus	delbrueckii subsp. bulgaricus	paracasei subsp. Paracasei (Isolated)	lactis subsp. lactis	slivarius subsp. thermophilus
Agar culture											
Gram stain											
Size (width-length; μm)	2-10	2.0-4.0 × 0.7-1.1	2.0-4.0 × 0.8-1.0	1.0-10 × 0.5-1.2	1.0-10 × 0.5-1.1	3-6.5	6.0 × 0.7-0.9	1.0-9.0 × 0.5-0.8	2.0-4.0 × 0.8-1.0	0.5-1.5	0.5-2.0

Lactobacillus paracasei
(KTCT 3510, isolated from milk product)

Lactobacillus paracasei
(isolated from salted seafood)

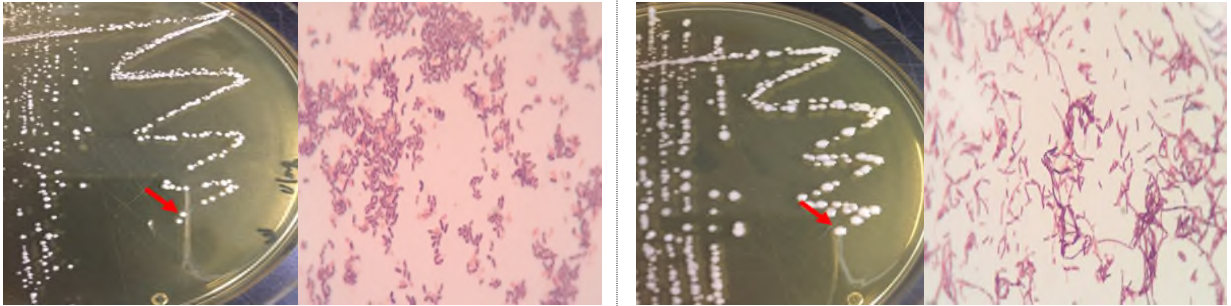


그림 104. 동일 *L. paracasei*의 gram stain 비교

	Control	<i>L. Acidophilus</i> (cfu/mL)		<i>L. casei</i> (cfu/mL)	
		1.1×10^5	2.8×10^5	4.0×10^5	1.0×10^6
Dough					
Wet gluten					
Dry gluten					
분쇄율	0(기준)	0.2	4.45	4.71	8.17
		<i>L. fermentum</i> (cfu/mL)		<i>L. plantarum</i> (cfu/mL)	
		9.0×10^5	2.2×10^5	4.9×10^4	1.2×10^5
		13.1	12.4	14.5	15.6
		<i>L. rhamnosus</i> (cfu/mL)		<i>L. helveticus</i> (cfu/mL)	
		3.9×10^5	9.9×10^5	8.0×10^5	2.0×10^6
		17.3	100	8.43	11.73
		<i>L. paracasei</i> (KTCT) (cfu/mL)		<i>L. paracasei</i> (medintrol) (cfu/mL)	
		4.0×10^5	1.0×10^6	2.1×10^5	5.3×10^5
		16.3	15.2	22.3	60.0
		<i>L. bugarius</i> (cfu/mL)		<i>Lc. lactis</i> (cfu/mL)	
		5.1×10^4	1.2×10^5	1.5×10^5	3.7×10^5
		7.48	14.4	5.2	11.2
		<i>S. thermophilus</i> (cfu/mL)			
		1.5×10^5	3.7×10^5	7.5×10^5	
		39.8	100	100	

그림 105. 글루텐 발효 유산균(시제품) 적용 밀가루 글루텐 분해능의 우수성 평가

<글루텐 분해력>



0% 10-60% 70%이상 100%

그림 106. 글루텐 발효 유산균(시제품) 적용 밀가루 글루텐 분해능의 우수성 평가

다. 글루텐 발효 유산균을 이용한 발효 우동면 시제품 제조

(1) 글루텐 발효 유산균(제품명: 닥터글루 V70) 적용 발효 우동면 제조

우동면의 제조를 위해 표 10과 같이 각 종류의 재료를 배합량에 따라 전자저울(ARC120, OHAUS, USA)을 사용하여 칭량하여 첨가하였다. 우동면 제조에 사용된 배합비는 자사 냉동면의 배합비와 동일하게 적용하였다. 모든 분말 재료를 반죽기에 넣고 기타원료 들을 첨가하여 고르게 혼합한 뒤 유산균 발효액을 조금 씩 투입하면서 실온에서 10분간 믹싱하여 작은 덩어리로 만들었다. 작은 덩어리를 비닐 포장 하여 incubator (BI-P-250, LabHouse, 한국)에 넣어 35°C에서 24시간 숙성하였다. 이것 30g을 다시백에 넣고 용기에 담은 물에 전분을 흘려보낸 후 걸러진 글루텐 함량을 측정하였다. 또한 숙성된 반죽을 두께 3mm가 되도록 압연기를 이용해 면을 제조하였다.

표 10. 예비 시제품 발효우동 배합비

원료명	배합량 (kg)	배합비 (%)
소맥분	162.800	57.81
변성전분	80.000	28.41
감자전분	26.600	9.45
폴리글리시톨	1.580	0.56
알긴산프로필렌글리콜	0.028	0.01
치자황색소	0.028	0.01
미림	1.370	0.49
Trans glutaminase	1.400	0.50
정제염	6.000	2.13
유산균 발효액	121.000	-

의 배합비대로 시제하여 평가한 후 재료, 유산균 발효액의 첨가량을 변경하며 배합비를 확정하였다. 이러한 배합비를 통해 제조한 우동면은 그림 38과 같으며 이를 이용한 제품 출시를 앞두고 있다.

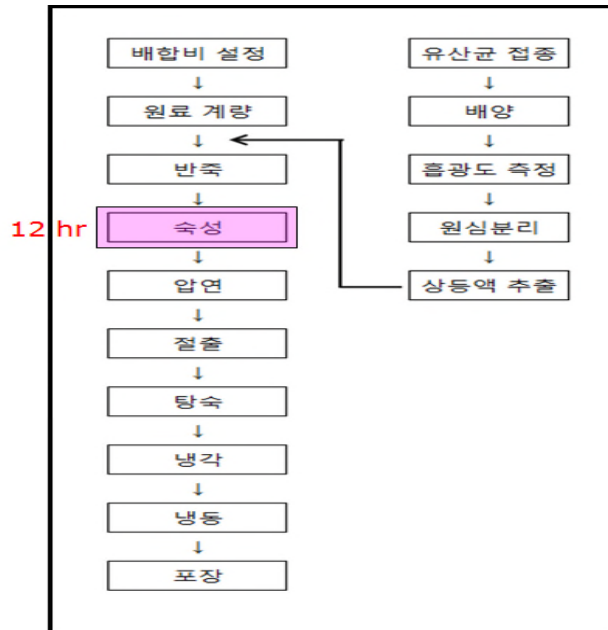


그림 107. 글루텐 발효 유산균을 이용한 발효 면 제조 과정



(A)

8.95%의 글루텐 함량을 보였다. 이러한 수치는 중력분은 약 $10 \pm 2\%$ 의 글루텐 함량을 보이는데 중력분의 글루텐 함량을 보였다. 시험군 5는 대조군(100%) 대비 16%의 글루텐 분해를 보여 약 84%의 글루텐 함량을 보였으며 시험군 2는 16.6%의 글루텐 분해를 보여 약 83.4%의 글루텐 함량을 보였다. 시험군 1은 28.7%의 글루텐 분해로 약 71.3%의 글루텐 함량을 보였으며 시험군 0.5는 가장 많은 47.7%의 글루텐 분해를 보여 52.3%의 글루텐이 함유된 것을 확인하였다. 따라서 시험군 5, 2, 1, 0.5는 글루텐 분해 유산균(시제품)의 배합 농도에 따라 글루텐 분해율이 증가함을 보였다(표 11). 본 연구결과는 공인분석기관에서 글루텐 시험 결과서와 같다(그림 109).

표 11. 글루텐 발효 유산균 적용 우동면의 글루텐 분해율 평가

시험군	글루텐 함량 (%)	글루텐 분해력 (%)
대조군	8.95	0 (100% 함유, 기준)
시험군 5	7.51	16.0 (대조군 대비 84% 함유)
시험군 2	7.46	16.6 (대조군 대비 83.4%)
시험군 1	6.38	28.7 (대조군 대비 71.3%)
시험군 0.5	4.68	47.7 (대조군 대비 47.7%)

[1차년도]

[글루텐 프리 제품에 대한 국내외 시장동향 조사]

I. 밀가루의 기원

- 밀의 종실은 밀가루를 만들어 반죽을 거쳐 빵, 면 등으로 만들어 이용된다. 밀에는 무기양분으로 비타민 B6, 니아신, 티아민, 엽산 리보플라빈, 판토텐산 등이 풍부하고 비타민 E와 비타민 K도 많은 양은 아니나 영양학적으로 가치 있는 함량을 보인다. 밀의 칼로리는 100g 당 339.0 kcal 정도이다. 밀은 통밀일때와 밀가루로 가공하였을 경우 그 영양학적인 차이가 나타나는데, 이는 밀 종실의 특성상 제분시 밀기울로 빠져나가는 부위인 호분층과 배에 다양한 양분이 존재하기 때문이다. 밀가루는 통밀에 비해 단백질 함량이 다소 낮으나 칼로리는 다소 높은 반면 식이섬유와 미네랄 함량은 낮은 특징.
- 우리나라의 일인당 연간 밀소비량은 1991년 30kg에서 2010년 34kg으로 안정적인 소비량을 보이고 있는 반면 자급률은 많은 노력에도 불구하고 1991년 0.05%에서 2010년 1.7%로 크게 변하지 않아 거의 대부분을 수입하고 있으며, 국산밀의 소비량은 일인당 연간 1kg도 되지 않아 국산밀의 소비 확대가 절실한 실정이다. 국산밀과 외국(수입)밀의 품질적인 차이는 주곡이 쌀인 우리나라의 특성을 감안하면 집중적인 품종 육성 노력이 크게 부족하고 생산 과정에서 중요한 재배 관리와 수확 후 관리 수준이 낮음을 감안하면 가공 품질이 외국밀에 비해 낮음.
- 식량작물 특히 곡류의 품질은 여러 측면에서 접근해 볼 수 있다. 먼저 전통적인 품질 기준이 되는 식미와 영양가 등을 들 수 있고 밀의 경우는 가공 적성을 들 수 있다. 밀의 품질에서 가공적성만을 기준으로 하는 것도 문제가 있다. 아래의 표. 1 에서 볼 수 있는 것처럼 농산물 구매 시 가장 중요한 기준은 신선도, 원산지, 가격, 안전성, 맛, 영양 순이다. 이 중 원산지와 신선도는 안전성과 깊은 연관이 있는 항목으로 볼 수 있어 안전성이 가장 중요한 기준이라 볼 수 있다. 국산밀은 다른 농산물과 마찬가지로 안전성 면에서 우위에 있다고 보여지므로 국산밀의 갖는 장점은 안전성이 가장 크다고 볼 수 있다. 안전성은 크게는 농산물 구매시 건강과 밀접한 것으로 크게 볼 때 농산물 구매시 제일 중요한 요인은 건강 증진 요소라 할 수 있다.

표. 1. 응답자 특성별 농산물 구매 시 고려요인(%)

단위 : %

구분	사례수	가격	안전성	맛	신선도	영양	원산지	기타	
전체	1,809	16.5	7.5	6.7	47.1	0.8	20.1	1.2	
연령별	20대	65	25.1	10.7	7.9	40.7	0.0	13.3	2.3
	30대	326	13.8	9.7	7.1	45.3	0.3	22.5	1.3
	40대	601	16.2	9.6	8.1	42.3	1.2	21.8	0.9
	50대	418	11.4	6.8	6.1	51.9	0.7	21.6	1.5
	60대이상	374	22.6	4.0	5.0	50.1	1.0	16.2	1.0
	무응답	25	11.7	7.4	11.3	51.9	0.0	17.8	0.0
교육 수준별	중학교졸업	350	20.1	5.8	7.4	46.2	0.8	19.3	0.5
	고등학교졸업	869	16.0	6.5	5.2	48.7	1.0	21.5	1.2
	대학교졸업	548	14.7	9.6	9.0	45.1	0.7	19.3	1.6
	대학원졸업	20	10.8	19.4	0.0	61.0	0.0	8.8	0.0
	무응답	22	23.0	16.3	3.3	40.8	0.0	12.8	3.8
소득 수준별	400만원이상	519	11.5	8.3	7.6	49.6	0.7	21.6	0.8
	200~400만원미만	843	14.8	8.3	6.5	47.7	0.8	20.6	1.4
	200만원미만	404	23.9	5.6	6.6	44.2	1.1	17.4	1.2
	무응답	43	25.3	6.0	1.8	41.5	0.0	23.0	2.3

※ Base : 최종소비자 전체

(출처: 농산물유통공사, AT); (사)국산밀산업협회, 심상인(경상대학교수) 우리밀의 건강기능성 참조.

- 밀은 쌀 소비량의 40%를 넘어선 한국인의 식생활에서 곡류로서 그 위치가 중요하다. 따라서 주식으로 가장 큰 비중을 차지하는 것으로서 그 섭취량이 많음을 감안 할 때 밀에 들어있는 건강기능성 성분은 그 함량이 낮더라도 매우 중요하다고 볼 수 있다. 기능성 성분이란 기본 영양적 측면을 넘어서는 생리 활성을 갖는 성분을 일컫는 말로서 모든 기능성 성분은 적정 섭취량이 있으며 특정 성분의 경우 과다 섭취시 부작용을 나타낼 수 있어 곡류의 경우 특정 기능성 성분 함량을 지나치게 강화시키는 것은 바람직하다고 볼 수 없다. 그러나 밀의 기능성 성분 중 최근 그 증가세가 두드러지는 만성질환을 비롯한 성인병에 효과가 있는 것으로 알려진 성분 중 대표적인 것은 폴리페놀과 식이섬유를 들 수 있다. 이들 성분은 특정 질환을 단기간에 치료하는 효과를 나타내기 보다는 장기적 섭취 시 예방과 억제를 하는 효과가 있다고 알려져 있어 식량으로 소비되는 밀의 경우 중요한 성분임.
- 폴리페놀은 항산화 효과를 가지고 있어 다양한 스트레스에 좋은 효과를 갖는 물질로 밀에서는 대표적인 물질인 페룰산(ferulic acid)이 다량 함유되어 있다. 밀 100g 당 300 μ mol 정도로 함유되어 있는 페룰산은 항산화 효과와 더불어 운동 능력 향상 등의 효과를 갖는 물질로서 밀의 호분층으로 대표되는 껍질층에 많이 함유되어 있는 물질로 그 효능이 각광받고 있다. 폴리페놀 외에도 밀에는 눈 건강에 좋다고 알려진 루테인(lutein), 제아잔틴(zeaxanthin), β -크립토잔틴(β -cryptoxanthin)과 같은 카로티노이드 성분을 함유하고 있어 이들 성분에 대한 연구가 진행.
- 밀을 포함하는 곡류가 육류보다 건강상 장점을 갖는 대표적인 요인은 식이섬유의 존재이

다. 펙틴과 같은 수용성 식이섬유와 리그닌, 셀룰로오스 등의 불용성 섬유소들은 각기 건강학적으로 혈당 조절, 콜레스테롤 수치 제어와 대장 질환 예방 등 성인병 예방과 관련된 중요한 역할을 담당하는데, 최근 그 중요성이 더욱 커지고 있다. 통밀에는 11 ~ 17%의 식이섬유가 존재하나 밀기울에는 36 ~ 52% 정도로 높은 함량을 보인다. 밀에는 이외에도 식이섬유의 한 종류로서 최근 각광받는 성분으로는 prebiotics성분이 함유되어 있어 이에 대한 연구가 진행되고 있다. 프리바이오틱스는 우리 몸에 좋은 미생물 또는 그 성분을 일컫는 프로바이오틱스의 활성을 조절하는 물질로서 대표적인 것이 프락토 올리고당 등임. 이 프리바이오틱스는 최근 건강 특히 장의 건강과 관련되어 관심이 커지는 물질로서 밀에는 프락탄 형태로 비교적 많이 함유되어 있다. 밀에는 프락탄은 약 0.9% 정도로 낮지 않은 함량을 보이고 있어 앞으로 건강 기능성과 연관되어 프락탄 함량 증진에 대한 노력이 필요.

- 1조 원대 규모의 밀가루는 전체시장의 99%이상이 수입한 밀을 가공하기 때문에 밀가루 역시도 경제적 환경에 따라 가격인상의 반열에 절대 빠지지 않는 주인공.이에 정부와 지자체는 국산밀 재배 및 가치 증진을 위한 전략적 방안을 세우는 가운데 주요 대기업에서도 세계곡물 시장에 대한 걱정을 덜기 위한 한 방편이자 트렌드에 대한 기획의 시장인 우리밀 산업에 뛰어들고 있는 상황이다.밀은 제 2의 주식으로서 쌀 옥수수 조 보리 등과 같이 사람의 먹거리 중에서 가장 기본이 되는 곡물로서 식생활에서 차지하는 비중이 큼.
- 대부분의 밀은 제분 공정을 거쳐 밀가루로 사용되는데 밀가루의 용도는 제면용으로 대부분 이용되며 그외 제과 제빵용, 가정용, 요식 업소용, 주조용 등으로 소비되고 있다.환율로 인한 가격인상, 우리밀 전성시대 속에서 재조명 받고 있는 밀의 종류와 구조를 통해 사전적 정보와 제분공업에서 차지하는 종류별 생산량을 알아본다.
- 국내 제분공업의 개황한국제분공업협회에 따르면 국내 제분업계는 연간 약 230만톤 내외의 밀을 가공, 160만톤 정도의 밀가루를 생산하며 99%이상을 수입밀에 의존하고 있다. 수입밀 가공밀가루는 과거에 거의 100% 미국에서 수입해 왔으나 국내 식품 시장의 발달과 다양화로 현재는 호주와 캐나다 등의 국가에서도 수입되고 있다. 각 원산지별 도입량은 지난해 약 227만톤의 밀을 수입한 가운데 기준 미국산 밀이 64.7%, 호주산이 29.0%, 캐나다산이 6.2%의 분포.

표. 2. 밀의 종류별 생산량과 종류별 도입량

■ 종류별 생산량

(단위: 톤)

연도	중력밀가루		강력밀가루		박력밀가루		합계
	생산량	비율(%)	생산량	비율(%)	생산량	비율(%)	
2001	1,182,000	66.5	303,000	17.0	293,000	16.5	1,778,000
2002	1,133,000	64.6	316,000	18.0	306,000	17.4	1,755,000
2003	1,116,000	64.2	318,000	18.3	304,000	17.5	1,738,000
2004	1,165,000	65.1	323,000	18.0	303,000	16.9	1,791,000
2005	1,104,000	64.1	316,000	18.3	303,000	17.6	1,723,000
2006	1,120,000	64.7	309,000	17.9	302,000	17.4	1,731,000
2007	1,084,000	65.8	293,000	17.8	270,000	16.4	1,647,000
2008	1,078,000	68.4	286,000	18.2	211,000	13.4	1,575,000

■ 종류별 밀 도입량

(단위: 톤)

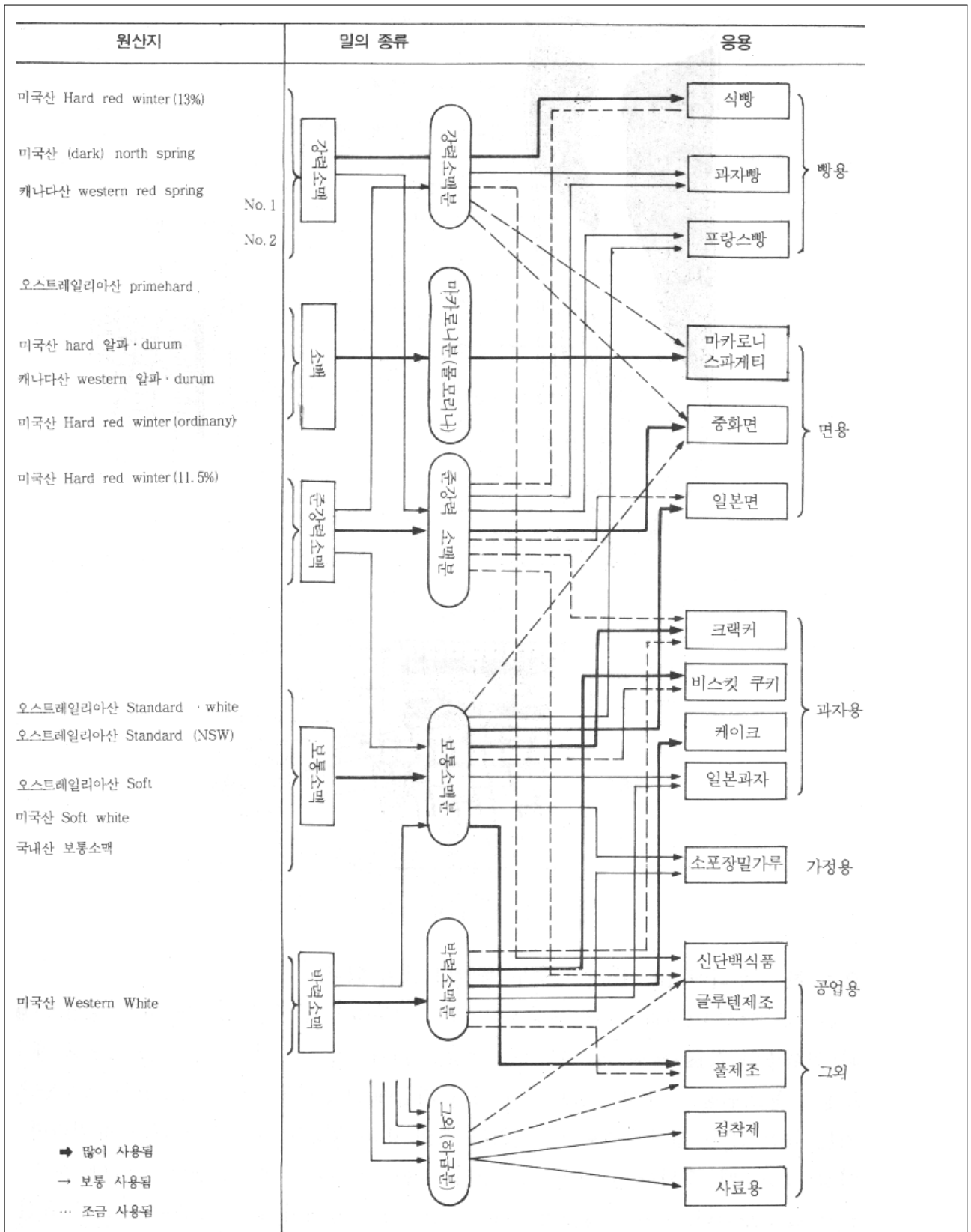
생산지	품종	2006년		2007년		2008년	
		수량	비율(%)	수량	비율(%)	수량	비율(%)
미국	WW/SW	394,859	17.6	462,725	22.4	574,704	25.2
	WW/SW(8.5)	98,097	4.4	44,613	2.2	38,958	1.7
	WW/SW(9.5)	39,550	1.8	77,759	3.7	93,242	4.1
	WC	455	0.0				
	HW					2,620	0.1
	HRW(11.5)	217,138	9.7	242,224	11.7	385,921	17.0
	DNS(14.0)	325,492	14.5	312,039	15.1	355,541	15.6
	DNS(14.5)	34,245	1.5	31,303	1.5	15,747	0.7
	SRW	7,121	0.3	5,063	0.2	6,885	0.3
소계	1,116,957	49.8	1,175,546	56.8	1,473,618	64.7	
호주	AS	8,700	0.4	2,131	0.1	5,300	0.2
	ASW	917,976	40.9	717,263	34.7	593,514	26.1
	AH	92,822	4.1	79,793	3.8	61,506	2.7
	소계	1,019,495	45.4	799,187	38.6	660,320	29.0
캐나다	2CWRS(13.5)	108,119	4.8	94,908	4.6	141,547	6.2
	소계	108,119	4.8	94,908	4.6	141,547	6.2
기타	유기농밀					1,844	0.1
	소계					1,844	0.1
합계		2,244,574	100	2,069,641	100	2,277,329	100

- 특히 수입해서 국내 유통되는 밀가루의 종류는 수입밀 가공 밀가루, 수입밀가루로 나뉘는데 수입밀가루는 캐나다, 중국, 인도네시아, 헝가리 등지로부터 완제품 밀가루를 수입하는 7만톤의 규모로서 국내 제분업계에서 밀을 수입해서 국내에서 가공하는 수입밀 가공 밀가루와 엄연히 다른 것.
- 국내에서 생산되고 있는 밀가루는 크게 중력, 강력, 박력밀가루로 나뉘지며 종류별로 회분 함량에 따라 각각 1~3등급으로 분류되고 있다. 강력분의 단백질은 1등급이 11%이상, 2등급이 12%이상, 3등급이 13.5%로 3등급이 단백질은 많으나 회분은 1등급이 0.55%이하, 2등급이 0.75%이하, 3등급이 1.4%이하로 2등에서 3등급으로 갈수록 밀가루의 질은 낮아진다. 용도는 빵제조용으로 사용된다. 준강력분은 1등급이 단백질과 회분은 각각 10%, 0.55%, 2등급이 11%와 0.75%, 3등급이 12%와 1.4%이다. 프랑스빵과 과자빵 등

에 사용된다. 중력분은 우리나라의 농수산부의 규격에서 단백질 함량의 범위가 1,2,3등급의 구분없이 8~11%로만 정해 있으나 일본의 경우 1등급은 단백질과 회분은 각각 8%와 0.5%, 2등급은 9.5%와 0.7%, 3등급은 11%와 1.3%이다. 주로 가정용으로 쓰이고 제면 등에 사용한다. 박력분은 1등급이 단백질과 회분은 각각 8%이하, 0.5%이며 2등급은 8.5%이하 0.7%, 3등급은 10.5%이하 1.3%이다. 주로 과자류에 사용한다. 이를 제분시 구성되는 종류를 구분하면 강력분의 경우 미국밀 특맥 100%, 캐나다산 적색 춘소맥 100% 또는 특맥과 적색 춘소맥을 적절하게 배합해 2차 가공 적성에 가장 좋은 제품을 생산한다. 중력분의 경우 미국밀과 호주맥중에서 적절하게 혼합해 회분과 단백질 등의 규격과 2차 가공제품의 물성에 적합한 제품을 생산하며, 박력분은 백맥 100% 또는 호주밀을 배합해 제품을 만든다. 단백질·회분 함량 따라 1~3등급 구분제과·케이크 주로 박력·중력 밀가루 사용

- 밀가루는 밀알은 3개 부분(겉질, 배아, 배유)으로 분류할 수 있는데, 겉질층 즉 밀기울로 14.5%를 차지하며 밀가루로부터 분리되어 사료로 많이 사용하나 최근에는 섬유질이 많아 전립분으로 겉질채 빵아 제빵에 사용한다. 배아는 2.5%로 제분시에 제거되어 사료로 사용했으나 배아중에 함유된 비타민E를 토코페롤 제제의 약품으로 사용되며 배유는 83%를 차지하며 주로 배유에서 밀가루를 만듦. (자료: 한국제분공업협회, 우리밀 살리기 운동본부)

표. 3. 밀의 종류와 생산조건에 따른 응용범위



II. Celiac Disease

- 식품 알레르기란 식이 형태로 우리 몸에 들어온 음식물의 특정 물질에 대하여 면역계가 과민하게 반응하여 여러 가지 증상을 일으키는 것을 가리키며 천식, 가려움을 동반한 발

진, 발열 등의 전신증상과 알레르기성 간장이완증후군으로 대표되는 신경증상, 설사, 복통, 구토 등의 소화기 장애 등 여러 사례가 나타난다(IFT's Expert Panel on Food Safety and Nutrition).

- 특히, 식품 알러지 중 전 세계적으로 인류의 주식을 담당하고 있는 밀의 알레르기가 알려져 있다(Rocher A. et al. 1995). ALF 알레르기는 기도를 경유한 항원자극으로 발생하여 천식이나 비염을 일으키는데, α -amylase inhibitor가 주요 알레르겐으로 동정(Kenny G et al. 1995) 되어 있으며 경구섭취에서는 밀의 주요 단백질인 gluten eh 알레르기 증상을 일으키는 것으로 알려짐(Shon DH 2000).
- 또한 예로부터 celiac disease 라는 매우 심한 위장 증상을 나타내는 질환이 알려져 있다. 밀을 비롯한 소맥류(밀, 보리, 귀리 등)를 섭취함으로써 이와 유사하게 발증하며, 특히 소장에서의 염증, 전반적인 흡수불량을 증상으로 한다(Bushuk W et al. 1969).
- Celiac disease (CD)는 식용 gluten에 의한 만성위장염증반응인 비정상적인 면역반응의 일종이다. 평생동안 gluten-free식을 요구됨.
- 밀 의존형 운동에 의해 유발되는 알레르기 병증은 운동전에 혈압상승, 호흡곤란, 일반적 두드러기같은 알러지반응을 일으키는 밀을 섭취를 통해 발생하는 알러지의 심각한 형태이다(Kidd JM et al. 1983). 밀 의존형 운동에 의해 유발되는 알레르기 병증을 나타내는 환자는 밀가루에 들어있는 단백질에 Ig E항체를 가지고 있고, 증세는 type I 알러지 반응에 의해 발생(Palosuo K et al. 2003).
- 밀 의존형 운동에 의해 유발되는 알레르기 병증에서 운동에 의해 유도된 염증 증상의 machanism 은 운동이 장관으로부터 혈류로 allergen흡수를 촉진하는 것으로 추측(Matsuo H et al. 2005. Kozai H et al. 2006)
- 밀 의존형 운동에 의해 유발되는 알레르기 병증에 대한 가장 신뢰할만한 처치법은 밀제품을 확실하게 금지하거나, 밀 섭취후 운동의 제한이다. 따라서 밀 섭취후 이어지는 운동에 의한 자극시험에 의해 확실한 진단을 하는 것이 매우 중요하다. 그러나 이러한 직접적인 자극시험은 심각한 알러지 쇼크같은 심각한 알러지반응 위험을 내포하고 있다. Sampson 는 달걀, 우유, 땅콩, 그리고 물고기 알러지에 대한 의학적 반응을 예측하는데 식품에 특이적인 Ig E의 serum 농도를 측정하는 방법이 유용하다고 제시(Sampson HA.2001).

III. Gluen-free

- 웰빙식품과 비웰빙식품을 구분하는 명확한 기준은 없으나, 곽창근·장종근(2008)은 유기농

식품과 화학첨가물을 넣지 않은 신선편의식품을 웰빙식품의 범주로 정의하였으며, 한성희(2010)는 선행연구들을 바탕으로 웰빙식품의 범주를 친환경식품, 웰빙을 지향하는 식품 및 건강기능성 식품으로 구분하였다. 웰빙식품의 등장은 안전하고 건강에 도움이 되는 식품개발을 촉구하는 다양한 소비자들의 요구에 기인한 결과로써, 최근 새롭게 각광 받고 있는 글루텐프리(Gluten-free)식품 또한 이에 해당.

- gluten-free식품은 밀가루에 포함된 ‘글루텐(Gluten)’이라는 성분에 알러지 반응을 보이는 특정 소비자들을 위한 식품이다. 최근에 이 식품 및 음료에 대한 수요가 글루텐 알러지 환자와 상관없이 늘어나고 있다. 미국 국가생물공학센터(National Center for Biotechnology Information)1)에 따르면, 글루텐 관련 알러지를 앓고 있는 환자는 미국 전체 인구의 0.5~1%로 인구 133명 당 1명에 불과하다. 그럼에도 불구하고 미국의 gluten-free식품 및 음료 시장은 2008~2012년간 연평균 복합성장률(Compound Annual Growth Rate, CAGR) 28%의 성장을 기록하였다(Packaged Facts, 2012).
- 이러한 gluten-free식품 시장의 성장은 미국뿐만 아니라 전 세계적으로 나타나고 있다. 유럽의 시장조사기관 ‘유로모니터 인터내셔널’의 2011년 보도자료에 의하면, 경제 불황에도 불구하고 2009년에 gluten-free식품은 전 세계적으로 약 23억 달러의 매출액을 기록하여 전년 대비 11% 성장한 것으로 나타났다. 이는 같은 시기에 전체 건강 및 웰빙식품의 3% 성장과 비교할 때 주목할 만한 수치라고 할 수 있다. 이러한 상황에 맞추어 최근 국내에서도 gluten-free식품에 대한 표시기준이 고시되고, 이에 따라 gluten-free식품의 개발과 판매가 이루어지고 있다. 그러나 아직까지 gluten-free식품의 종류나 판매량은 미미한 수준임.
- 현재까지 gluten-free식품과 관련된 연구는 주로 식품공학분야에 한정되어 있는데, 이영택·박영서(2009), 최윤희 외(2012), 강태영 외(2013), 김유진 외(2013)와 같이 식품제조 공정, 품질 개선, 신제품 개발 등 gluten-free제품 성분 개선에 관한 연구가 주로 이루어져 있음.

1절. gluten-free식품 정의

- gluten-free식품은 셀리악병 및 글루텐 알러지를 가진 소비자를 대상으로 만들어진 대체 식품이라 할 수 있다. 이 식품에 대한 기준은 국가별로 다소 차이가 있는 상황이나, 일반적으로 제조과정에 있어서 밀의 전분입자와 유사한 gluten-free 전분을 사용하여 글루텐성분함량을 일정 수준 이하로 낮춘 식품으로 정의할 수 있다. 또한 글루텐 성분이 전혀 없는 쌀가루로 제조된 식품 역시 gluten-free식품에 포함된다. gluten-free 전분은 고도의 정제과정을 거쳐 글루텐 성분을 낮추기 때문에 일반식품에 비해 상대적으로 제조비용이 상승.

- 글루텐은 밀과 호밀, 보리 등에서 자연적으로 생성되는 불용성 단백질로, 밀가루 반죽을 쫄깃하게 하고 빵을 만들 때 부풀어 오르게 하는 등의 역할을 한다(한국식품과학회, 2008). 또한 발효과정에서 발생하는 가스과 수분이 새어나지 않게 막아주어 빵·과자의 조직과 식감을 좋게 하는 역할을 한다. 글루텐은 밀, 호밀, 보리 등에 주로 들어있는 성분이기 때문에, 밀가루, 빵, 쿠키, 맥주, 시럽, 시리얼 그리고 파스타와 같은 식품이 주된 gluten-free 식품의 대상.
- 이 글루텐은 특정 체질을 가진 사람에게 설사나 복통 등 소화 장애를 일으키는데, 특히 셀리악병을 앓고 있는 사람에게 위험한 알러지를 일으킨다. 셀리악병은 글루텐에 대해 민감하게 반응하여 만성소화장애가 발생하는 소화기관 질병이다. 이는 일종의 유전성 알러지 질환으로써, 소장 내벽이 글루텐 성분으로 인해 공격받게 됨에 따라 신체 내 항체 반응이 발현되는 현상이다. 장의 내벽이 건강하지 못하면 신체는 필요로 하는 영양성분을 흡수할 수 없게 되는데, 이러한 영양흡수장애는 적혈구의 숫자 부족과 같은 빈혈증 또는 뼈가 취약해지거나 부서지기 쉬운 상태가 되는 골다공증과 같은 현상을 초래할 수 있다. 그 외에도 당뇨, 자가면역갑상선 질환, 소장암과 같은 심각한 문제를 유발할 수 있다(FDA ; Food and Drug Administration, 2014a).
- 현재까지 국내에서 셀리악 유병률이나 환자 수에 대한 공식적인 자료는 발표되지 않고 있다. 다만 셀리악병은 인종 간 유전적 차이로 유럽 및 북미 지역이 아시아 지역보다 발병률이 높다고 여겨져 왔으나, 최근에 와서 유전적 요인뿐만 아니라 밀의 소비 증가와 민족 간 이동 등의 요인이 영향을 미친다는 연구결과가 발표되고 있다. Cataldo and Montalto(2007)와 Cummins and Roberts-Thomson(2009) 등은 쌀 위주의 식단에서 밀 함유량이 높은 서구 식단으로 변화할수록 셀리악병의 발병 가능성이 높아진다고 제시하였으며, 이에 따라 중국·인도 등 아시아 지역에서의 발병률 또한 높아질 가능성을 주장하였다. 이러한 연구결과를 바탕으로 했을 때, 국내에서도 식단의 서구화가 진행됨에 따라 셀리악병의 발병 가능성이 점차 증가할 것으로 예측.
- 미국 소비자들의 건강에 대한 관심도가 높아짐에 따라 gluten-free 식품이 차세대 건강식품으로서 각광받고 있는데 미국 식품 연구 및 개발자들은 미개척 분야인 gluten-free 식품을 개발하기 위해 노력하고 있다. 연구진들은 배아곡물, 발아씨앗, 콩, 감자 전분을 통해 gluten-free 식품 제조를 위한 혁신적인 기술 개발을 통해, 고대 곡물(예: 퀴노아)들은 gluten-free 식품 제조를 위한 사용 가능성을 확인. 연구진들은 충분한 영양소(예: 섬유질, 단백질, 오메가-3 지방산)를 포함한 예를 들어 유통기한 긴 등의 높은 품질의 gluten-free 식품을 개발하기 위해 노력
- 소아지방변증(Coeliac Disease)을 앓고 있는 소비자들은 gluten-free 식품을 섭취가 필

요하며 반면, 대다수의 소비자들은 gluten-free 식품의 필요성을 인지하지 못할 수도 있어 상품의 품질이 판매고를 올리는데 주된 요인이 될 전망이다. 미국 옥수수 가공 전문업체인 Didion Milling은 2015년 gluten-free 식품 시장의 전망은 밝다고 언급과 소아 지방변증을 앓고 있는 소비자들은 약품을 대체할 수 있는 gluten-free 식품을 필요로 하여 수요는 지속적으로 증가할 전망

표. 4. 글루텐 함유 곡물



wheat : 밀
 Kamut (Khorasan wheat) : 카뮤 호라산 밀
 spelt (dinkel wheat, hulled wheat) : 스펠트밀
 durum (durum wheat) : 듀럼밀
 semolina (course grind durum wheat) : 세몰리나
 farina (soft wheat) : 곡식가루
 bulgur (white wheat) : 벌거
 cracked wheat : 빵은 밀
 graham flour (whole wheat flour) : 통밀가루
 barley : 보리
 rye : 호밀
 triticale : 트리티케일

자료: Ingredion, Inc.

2절. 각국의 gluten-free(Gluten Free) 인증제도

- (한국) 「식품 등의 표시기준」, 재료에 밀·호밀·보리 등 미사용, 글루텐 함량이 20ppm 미만일 경우 업체가 자율적으로 gluten-free 표시 가능
- (미국) FDA는 gluten-free 라벨링법을 시행하고 gluten-free 관한 가이드라인을 제시하고 있다. 글루텐 함량이 20ppm 미만인 제품에만 gluten-free 표시 가능하며, 셀리악병환자 협회 등 민간 인증마크 활용, FDA는 감시·관리를 하고 있다. 정부차원의 직접인증제가 아닌 개별 사업자가 공인된 시험연구기관의 분석 후 표시 가능하게 되어 있음.
- (캐나다, 프랑스) 미국과 유사한 제도를 도입하여 활용하고 있음
- 전세계의 글루텐프리(Gluten Free) 식품 시장 동향으로는 글루텐 민감성 소비자뿐만 아니라 웰빙을 추구하는 소비자까지 확대되는 추세로, 세계시장은 '16년 265억불까지 성장 전망(영국, 민텔社 추정)

3절. 글루텐 함유하지 않은 곡물

1. 아마(flax)와 치아(Chia)

- 미국 제분업체 Bay State Milling는 아마씨와 치아씨를 이용하여 머핀을 제조하는데 성공하였다. 치아와 아가가 높은 점성 물질을 생성하는 것을 확인함으로써 잔탄검, 인스틴트 스타치 등을 대체할 수 있을 전망하는데 Bay State Milling에 따르면 치아와 아마를 물과 혼합할 경우 점도를 높이는 친수콜로이드(hydrocolloid)를 생성, 이로써 잔탄검이나 호화전분을 사용하지 않은 gluten-free 식품 제조가 가능하고 또한 치아와 아가는 섬유질과 단백질, 오메가-3 지방산의 함유량이 높음

2. 고대 곡물

- 미국 제빵 및 제분업체들은 고대 곡물들을 gluten-free 식품 개발에 사용함으로써 고대 곡물들을 재조명되고 있는데 미국 제분업체인 Bay State Milling에 따르면 고대 곡물을 이용한 gluten-free 아티산 빵(Artisan Bread)을 제조하는 미국 제빵 및 제분업체는 많지 않으나, gluten-free 식품 수요는 증가하는 추세이다. 따라서 gluten-free 식품(예: 아티산 빵)을 제조하는 미국 제빵 및 제분업체들은 증가할 전망으로 gluten-free 시장도 커질 전망
- 미국 제분업체인 Bay State Milling에 따르면, gluten-free 고대 곡물들은 통밀, 호밀과 같이 발효종으로 개발이 가능하다. gluten-free 고대 곡물로 만든 발효종은 기존 발효종들과 달리 특유의 맛과 향, 질감 등을 가질 것으로 예상된다. 고대 곡물들을 이용하여 만들 수 있는 발효종의 혼합 경우의 수는 다양하여 많은 수의 독특한 발효종이 개발될 전망이며, Bay State Milling은 고대 곡물인 수수와 테프(teff)를 이용하여 발효종을 제조할 방법을 찾았다고 언급
- 미국 제빵업체인 Ardent Mills는 고대 곡물(예: 아마란스, 메밀, 기장, 퀴노아, 수수, 테프 등)로 만든 제품들을 출시하였다. Ardent Mills의 Elizabeth Arndt 연구 교수에 따르면 고대 곡물들은 섬유질, 단백질, 전분, 불포화지방, 비타민, 미네랄과 기타 식물성 영양소의 함유량이 풍부하며, 테프와 아마란스는 다른 곡물들에 비해 가장 많은 철분을 함유하고 있고 밀에 비해 최소 4.5배 이상의 칼슘을 함유.
- 퀴노아와 아마란스, 메밀은 다른 곡물들(예: 옥수수, 쌀 등)과 대비 높은품질의 단백질을 함유하고 있고, 호밀, 귀리, 밀에 비해 6배 많은 엽산을 함유하고 있으며 gluten-free 수수, 현미, 아마란스, 퀴노아, 기장, 메밀의 7가지곡물과 쌀을 51:49 비율로 섞어 gluten-free 잡곡빵을 만들 수 있다고 설명

표. 5. gluten-free 식품 제조에 사용되는 곡물

--



amaranth : 아마란스 arrowroot : 애로우루트 bean flour : 콩가루 buckwheat : 메밀 corn bran : 옥수수겨 corn flour : 옥수수 가루 corn meal : 거친 옥수수 가루 corn starch : 옥수수 전분 chickpea flour : 이집트콩 가루 flax : 아마 lentil flour : 렌즈콩 가루 mesquite flour : 메스키티 가루 millet : 기장 Montina (Indian rice grass) : 몬티나 nut flours (almond, chestnut, hazelnut) : 견과류 가루 oat (pure uncontaminated) : 귀리	pea flour : 완두콩 가루 potato flour : 감자 가루 potato starch : 감자 전분 quinoa : 퀴노아 rice bran : 쌀겨 rice flour : 쌀가루 rice polish : 정미된 쌀 rice starch : 쌀 전분 sago : 사고 sorghum flour : 수수 가루 soy flour : 대두 가루 sweet potato flour : 고구마 가루 tapioca flour (cassava, manioc) : 타피오카 가루 tapioca starch : 타피오카 전분 taro : 토란 teff : 테프
--	---

자료: Ingredient, Inc.

- 미국 제빵 및 제분 업체인 Archer Daniels Midland Co.(이하 ADM)는 영양소가 풍부한 통곡 수수가루를 제공하고 있는데 ADM이 진행한 연구는 수수가루는 gluten-free 재료로써 밀가루를 대체할 수는 없으나, 다른 재료들의 성분(예: 단백질, 전분 등)과 결합되어 사용될 경우 밀가루를 대체할 수 있는 것을 확인함.
- 미국 식품업체인 Honeyville, Inc.도 gluten-free 식품 개발 및 유통을 위해 노력하고 있는데, Honeyville, Inc.에 따르면 지난 2년간 gluten-free 식품(예: 시리얼, 영양바)들의 수요가 크게 증가하였고, 수수, 퀴노아, 기장과 같은 고대 곡물들의 수요 역시 크게 증가하였다. Honeyville, Inc.는 gluten-free 재료들로 코코넛가루, 호두가루, 쌀가루, 헤이즐넛 가루 등을 개발 및 판매 중임

3. 발아 곡물

- 미국 소비자들의 건강식품에 대한 관심이 증가하는 가운데, 발아 곡물들이 건강식품 재조를 위한 재료로 재조명 받고 있다. 미국 제빵업체인 Ardent Mills에 따르면 이론적으로 증식(재생산)가능한 곡물씨앗은 발아가 가능한데, 발아 곡물은 일반 곡물에 비해 비타민과 미네랄, 단백질, 섬유질 등이 풍부하여 건강상 유익하다. 곡물이 발아되면 기존에 갖고 있

던 영양성분들은 증폭되는 동시에 피틴산 같은 영양흡수억제성분을 감소로 이어짐.

4. 콩가루

- 미국 식품재료 유통업체인 Ingredion Inc.는 콩가루를 글루텐 無함유 식품에 영양성분을 보충하기 위한 재료로 적합하다고 설명한다. Ingredion Inc.는 지난 10월 미국 로드아일랜드주에서 열린 AACC 국제연례회의에서 렌즈콩, 이집트콩 등의 콩가루를 이용하여 gluten-free 식품의 영양성분을 보충할 수 있다고 설명한다. 콩가루를 통해 gluten-free 식품들의 클린라벨이 가능함과 동시에 식품의 영양성분 질을 향상 가능

5. 글루텐 함유하지 않은 전곡

- 글루텐 함유하지 않는 전곡(예: 옥수수, 쌀)을 이용하여 영양성분 프로필을 개선할수 있을 전망이다. 미국 옥수수 가공 전문업체인 Didion Milling은 유통기한을 늘린 전곡 옥수수 가루를 개발하고 있는데, 개발 중 지방함유량이 높아짐에 따라 악취를 풍기는 효소활동도 증가하는 것을 발견, 해당 효소의 활동을 억제시켜 유통기한을 늘림.
- 미국 식품유통업체인 Cargill은 전분을 대체할 전곡 옥수수 가루를 개발 및 유통하고 있다. Cargill의 전곡 옥수수 가루는 다른 재료(예: 쌀, 귀리 등)에 비해 산화방지 성분을 다량 함유하고 있는데, 미국 식품유통업체인 Beneo, Inc.는 전곡 쌀가루를 이용한 글루텐 無함유 빵을 제조 및 판매 하는데, 이 빵의 경우 매 섭취시 7.5 g의 섬유질을 제공
- 미국 식품유통업체인 SunOpta, Inc.는 쌀로 만든 gluten-free 식품(식이성 섬유질을 다른 재료에 비해 90% 이상 함유)을 판매하고 있다. SunOpta에 따르면 쌀 섬유를 이용하여 구운음식, 빵, 쿠키, 크래커, 고기, 영양바, 스낵, 칩, 파스타, 애견사료, 토피아, 음료 등 다양한 형태로 가공 가능하며, 미국 식품제조업체인 Penford에 따르면 감자는 글 gluten-free 식품으로써 곡물이 주성분인 구운음식의 고형지방 50%를 대체할 수 있음 또한 감자는 쇼트닝, 버터, 마가린, 크림치즈 등의 고지방 재료들을 대체 가능

출 처: Food Business News, Ingredion, Inc.

4절. 글루텐 함유하지 않은 쌀의 이용

- 최근 세계적으로 쌀가루를 원료로 하는 제과 및 제빵 분야의 연구 및 제품화가 활발하게 진행되고 있는데, 쌀은 나트륨, 단백질, 식이섬유의 함량이 적고 소화성탄수화물의 함량이 높아 소화가 용이하며 글루텐이 없기 때문에 알레르기반응을 일으키는 사람들에게 적합한 곡류이다(Nishita et al.,1976). 제과 및 제빵 제품에 밀가루를 일부 대체하여 쌀가루를 혼합하여 사용하거나 gluten-free 제과, 제빵 제품의 생산을 위해 쌀가루를 활용하

는 연구가 시도되어 오고 있으나, 쌀은 글루텐을 함유하지 않고 있기 때문에 제과 및 제빵 분야에서 고품질의 제품을 생산하는데 어려운 한계점이 있어 옴(Torbica et al., 2010).

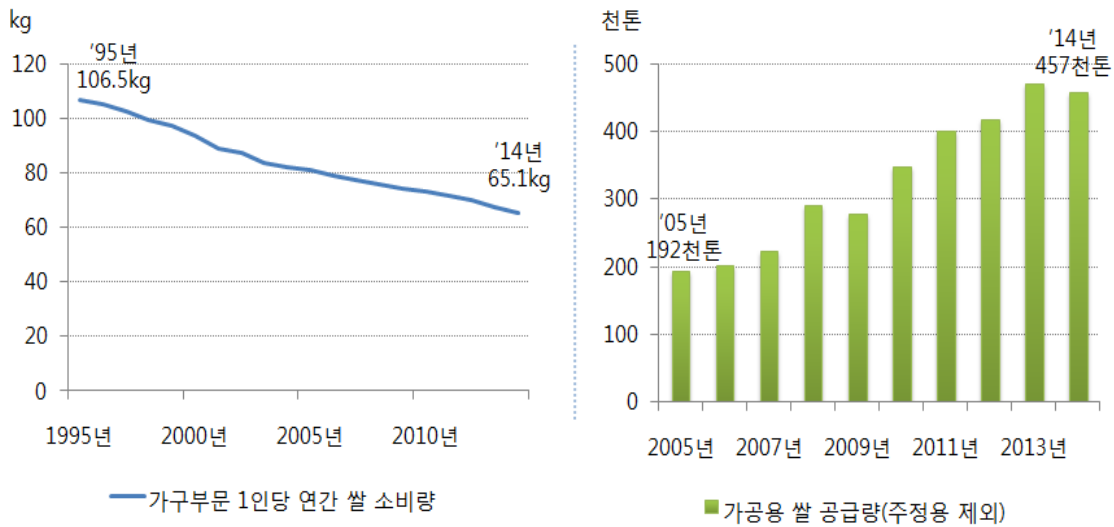
- 기존의 쌀 식빵 제조와 관련한 연구에 따르면 제빵 적성에 영향을 미치는 주요요인은 쌀 품종, 쌀가루 입자크기, 호화특성, 제분방법 등에 의해 영향을 받는 것으로 보고되고 있다 (Kang et al., 2000; Han et al., 2012). 특히, 쌀 품종은 쌀 식빵의 제조에 영향을 주는 가장 주요한 요인으로 생각되는데, 쌀 품종에 따라 원료 쌀가루의 전분결정 구조, 아밀로스 함량, 아밀로스와 아밀로펙틴의 비율이 다르며 이에 수반하여 호화특성 및 제분특성에도 영향을 주기 때문이다(Sivaramakrishnan et al., 2004). 최근 국내에서는 기능성 부여 및 가공용 다수확 생산을 목적으로 한 다양한 쌀 품종들을 개발하여 보급하고 있는데, 쌀은 품종별로 일반성분, 호화특성 등의 이화학적 특성의 차이에 의해 가공특성이 다르게 나타나므로 (Lee et al., 2012) 최종제품인 쌀식빵 가공적성에 적합한 쌀 품종에 대한 연구가 필요.
- 쌀 식빵을 제조하는데 있어 쌀의 구성성분 중 아밀로스 함량은 20-25%가 적합한데 (Perdon & Juliano, 1975), 아밀로스 함량이 높은 쌀로 식빵을 제조할 경우 식빵의 부풀림성이 낮고 노화가 빨리 진행되어 부스러지기 쉬운 조직감을 갖는다고 알려져 있다. 쌀에는 반죽에 탄성을 부여하고 공기를 포집할 수 있는 능력을 갖는데 글루텐이 없기 때문에 이를 보완할 필요가 있는데, 반죽개량제로서 다양한 하이드로콜로이드가 적용되어 왔다(Lazaridou et al., 2007).
- 이 중 hydroxypropyl methylcellulose(HPMC)는 글루텐 프리 빵에 있어 가장 적합한 것으로 알려져 있는데(Marco & Rosell, 2008), HPMC는 반죽의 적성을 개량하고 관능적인 특성에도 좋은 영향을 미치며 노화작용을 억제하는 역할을 한다(Anton & Artfield, 2008). 또한 쌀가루에 함유된 손상전분은 반죽 경도의 감소와 공기 포집 능력을 떨어뜨려 제빵 적성에 적합하지 않다고 보고 되고 있다(Barrera et al., 2007). 따라서 쌀 품종별 gluten-free 쌀 식빵을 제조 연구를 통하여 제빵 적성에 부합하는 쌀 품종을 선별하고 쌀 품종 차이가 쌀 식빵의 품질에 미치는 영향을 연구하는 것이 필요.
- 밥쌀용 쌀 소비 감소에 따라 전체 소비량도 감소하고 있다. 식생활 서구화, 먹거리 다양화 등 국민 식생활의 변화로 가구 부문에서의 밥쌀용 쌀 소비가 지속 감소하고 있는데, 가구부문 1인당 연간 쌀 소비량 1995년에 106.5kg에서 2005년에는 80.7 kg 그리고 2014년에는 65.1 kg까지 떨어졌다. 증감률로 보면 2005년에서 2009년 평균 2.04% 감소, 2010년에서 2014년에는 2.52%가 감소
- 한편, 간편 식품에 대한 선호가 높은 1인, 맞벌이 가구 증가에 따른 쌀 가공식품 수요 증대로 가공용 쌀 소비는 지속 증가하고 있는데 1인당 연간 가공용 쌀 소비량은 2005년

4.1kg에서 2010년 6.9kg 그리고 2014년 8.9kg 까지 지속적으로 증가하여 왔음.

표. 6. 1인당 연간 쌀 소비(밥쌀용, 가공용 합계) 현황

구분	2009	2010	2011	2012	2013	2014
밥쌀용 쌀 소비(kg)	74.0	72.8	71.2	69.8	67.2	65.1
가공용 쌀 소비(kg)	5.4	7.0	7.9	8.3	9.2	8.9
계(kg)	79.4	79.8	79.1	78.1	76.4	74.0

표. 7. 가구부문, 사업체부문 쌀 소비 현황



- 또한 연이은 풍작과 지속적인 쌀소비 감소로 수급불균형 심화 우려되는데 KREI, 2015 농업 전망에 따르면 쌀 생산량보다 소비량이 큰 폭으로 감소할 것으로 전망하는데 2014년에 424천톤, 2017년 396천톤, 2020년 386천톤, 2025년에는 370천톤의 생산량이 예상되어지는 데 소비량은 2014년 65.1kg, 2017년 61.7kg, 2020년 58.4 kg 그리고 2025년에는 52.5kg으로 줄어 들것으로 예측
- 2014년 말 기준 17,380개 업체가 종사 중이며, 총 매출액 약 4.2조원 규모로 전체 식품 산업 매출액의 2% 수준인데 매출액은 '08년 1.8조원에서 '14년 4.2조원으로 133.3% 증가하였음.

표. 8. 품목별 쌀 가공산업 현황, '14년 기준

구 분	업체수	쌀소비량		매출액	
		(천톤)	비중(%)	(억원)	비중(%)
합 계	17,380	457	100.0	41,775	100.0
떡 류	16,596	188	41.2	13,900	33.3
밥 류	39	98	21.5	13,332	31.9
주 류	10	47	10.4	8,223	19.7
음 식 료	81	11	2.3	1,168	2.8
전 분 류	135	13	2.8	382	0.9
면 류	75	10	2.2	282	0.7
장 류	19	12	2.7	3,049	7.3
과 자 류	291	7	1.5	509	1.2
기 타	134	71	15.4	930	2.2

* 업체수는 '13년 조사 기준, 매출액은 품목별 대표제품 시장가격으로 추정

- 2014년 기준 쌀 소비량은 457천톤으로, 전년 대비 14천톤 감소하였다. 자세한 내용을 보면 떡류 제조업(41.2%), 도시락·식사용 조리식품 제조업(21.6), 기타 곡물가공품 제조업(11.7%) 순이고, 정부양곡(227천톤) 또는 민간구매(230천톤 : 계약재배, RPC 등)를 통해 원료 확보되고 있으며, 정부양곡 가공용 쌀은 주로 냉동떡, 막걸리, 쌀가루 등에 활용되며, 민간 구매 신곡은 주로 전통떡, 프리미엄 쌀 가공제품에 활용
- 품목별 수출 통계에서 보는바와 같이 쌀의 소비가 국내에서 지속적으로 감소하고 있으므로 해외에서 국내쌀을 소비하는 방법이 최근 각광을 받고 있어 이에 대한 다양한 노력을 기울이고 있음.

1절 미국의 Gluten-free 식품시장

- 미국 식품의약국(FDA)에서는 2013년 8월부터 1년간 식품업체가 gluten-free 표시제를 자발적으로 준수할 수 있도록 유예기간을 제공하였으며, 2014년 8월부터 의무적으로 적용되는 gluten-free 통합기준을 발표하였다(US FDA 2014). 이 기준에 따르면, 글루텐 함량이 20ppm 이하일 경우 'gluten-free' 표기를 허용하도록 하였는데, 생산자 및 판매자는 'gluten-free', 'free of gluten', 'without gluten', 'no gluten'으로 표시.
- 2014년 기준 전 세계 gluten-free식품시장 가운데 미국 gluten-free식품시장이 약 59%를 차지하고 있는 것으로 나타났다(KOTRA, 2014). 미국 gluten-free식품시장은 2011년도에서 2013년도 사이에 약 69% 가량 성장하였으며, 2014년도 예상 매출규모

가 121억 달러 규모에 달하고, 2016년에는 약 156억 달러로 성장할 것으로 전망되고 있다(Statista, 2014). 같은 자료에 따르면, 2013년 미국의 gluten-free식품 세부품목 별 매출규모 상위품목들은 빵·과자(25억 달러), 유제품(22억 달러), 음료수(19억 달러)로 조사됨.

- 식품 트렌드 및 소비자 조사기관인 Hartman Group은 2009년 7월 1,730명의 미국 소비자들에 대한 조사를 바탕으로 전체 응답자의 13.2%가 gluten-free식품을 소비한 경험이 있으며, 이들 중 7.5% 만이 자신 혹은 가족 구성원의 셀리악병 치료를 위해 구매한 것으로 제시하였다(Hartbeat, 2009). 또한 시장조사기관 Mintel(2013)의 보고서에 의하면, 2013년 6월 gluten-free식품을 구매한 경험이 있는 18세 이상 247명의 미국 소비자들 중 약 53%가 이 식품의 섭취가 건강에 도움이 된다고 인식하고 있으며, 22%가 체중 조절을 위해 섭취한 것으로 나타났다. 반면에 6%만이 셀리악병 치료를 위해 섭취하였다고 응답함으로써 글루텐 프리식품을 소비한 약 94%의 응답자가 셀리악병 치료가 아닌 다른 이유로 소비.
- Mintel사의 조사결과에 의하면, 미국에서 글루텐이 없는 식품 시장 (The gluten-free market)이 2014년에 8억8천만달러 판매에 도달되었다고 한다. 이는 2012년과 2014년 사이에 63% 증가를 의미한다. 민텔 (Mintel)은 만성소화장애 (coeliac disease)의 진단 및 다른 글루텐 과민증의 진단이 증가된 결과와 식생활상의 알려진 건강상의 잇점으로 인하여 글루텐이 없는 식품에 대한 인식의 증가가 식료품점에서 소비자들로 하여금 글루텐이 없는 식품의 선택 증가에 큰 기여

가. 미국 식품시장의 규모

- 미국 상무부가 2012년 9월 14일 발표한 센서스 자료에 의하면 2012년 8월까지 식음료스토어 Food & Beverage Stores의 식품류 소매매출은 4,188억 달러에 달하며, 지난 8개월 동안 식품스토어Grocery Stores의 소매매출은 3,768억 달러로 조사되었다. 지난해 같은 기간보다 각각 3.7%와 3.4% 증가한 수치이며, 또한 캐나다 농업식품청의 보고서에 따르면, 지난 2009년 미국 내 전반적인 음식소비량은 1% 정도 감소한 반면 가정 내 음식소비량은 증가세를 보였다. 이는 미국의 경기침체가 장기화되고 있는 가운데 외식보다는 집에서 식사하는 사람이 늘고 건강한 라이프스타일을 찾는 미국인들이 증가하면서 유기농이나 내추럴식품, 에스닉푸드에 대한 구매가 늘고 있다는 것.

표 1. 미국의 월별 식품류 소매매출

(단위 : 억 달러)

구분	식음료스토어	식품스토어	맥주, 와인, 리커스토어
‘11.7월	530.05	475.70	38.25
‘11.8월	520.54	468.41	36.58
‘12.6월	531.81	475.79	38.61
‘12.7월	533.85	478.77	37.77
‘12.8월	542.43	486.91	-

자료 : US Census Bureau, Table 1. Estimated Monthly Sales for Retail Trade and Food Services, by Kind of Business



* 출처 : www.census.gov/retail/marts/www/marts_current.pdf

**출처 : 3월 보고서 <북미 특수 식품시장(The Specialty Food Market in North America)>

나. 미국 식품산업의 동향

- 식재료 가격인상과 고유가, 유럽과 아시아의 재정위기가 2012년에도 지속됨에 따라 미국의 경기회복이 늦어지고 있다. 그러나 다른 산업에 비해 식품산업은 꾸준한 성장을 보이고 있는데, 이는 경기불황에 맞춘 새로운 트렌드가 나타나면서 소비자들의 소비패턴에 변화가 일고 있기 때문이다. 미국 상무부의 ‘Business Monitor International’자

료에 의하면, 2010년 1인당 식품소비 비용은 약 2,555달러이며, 식품 전체 소비는 8,290억 달러로 집계되었다. 이는 2006년부터 꾸준히 상승한 수치.

표 2. 미국 식품 소비현황

구 분	2006년	2007년	2008년	2009년	2010년
식품소비 금액 (억 달러)	7,713	7,989	8,140	8,150	8,290
1인당 식품소비 금액 (달러)	2,579	2,645	2,670	2,650	2,555
전체 식품소비 성장률	3.6%	3.6%	1.9%	0.1%	0.5%
1인당 식품소비 성장률	2.6%	2.6%	1.0%	-0.8%	0.2%
GDP에서 차지하는 식품소비 비율	5.8%	5.7%	5.6%	5.7%	5.5%

표 3. 미국의 유통경로별 매출액 현황

(단위 : 억 달러)

구 분	2006년	2007년	2008년	2009년	2010년	연 평균 성장률
Supermarkets (소매점)	5,670	5,790	5,850	5,870	5,900	0.09%
Hypermarkets (대형할인점)	2,890	3,000	3,080	3,100	3,120	1.9%
Coops (협동조합)	1,170	1,190	1,200	1,210	1,190	0.4%
Discount Stores (할인점)	1,500	1,540	1,570	1,580	1,590	1.4%
Convenience Stores (편의점)	540	570	580	590	610	0.3%
TOTAL	11,770	12,090	12,290	12,350	12,410	1.3%

자료 : 미국 상무부, Business Monitor International

- 미국 식품유통업계의 2010년 매출액을 기준으로 할 때, 슈퍼마켓의 매출은 약 5,900억 달러(47.5%)로 가장 비중이 높았고, 다음으로 대형할인점Hypermarket 3,120억 달러(25.1%), 할인점Discount Store 1,590억 달러(12.8%) 순이었다. 소비자들의 낮아진 구매력에도 불구하고 미국 식품산업의 지속적인 성장은 그 속에서 성장을 주도하는 분야가 있기 때문이다. 바로 유기농식품시장으로 틈새시장으로만 여겨졌던 것에서 이제는 당당히 주류시장의 한 부분으로 입지를 다지고 있다. 식품의 안정성 문제가 잇따라

대두되면서 건강한 먹거리에 대한 소비자들의 관심이 상대적으로 높아진 것.

- 미 유기농산업협회(Organic Trade Association) : OTA가 2012년 4월 23일 발표한 통계자료에 따르면, 2011년 유기농 시장의 매출규모는 전년보다 11% 증가한 321억 달러를 기록했다. 이 가운데 식품과 음료부문은 2010년보다 9.4% 증가한 292억 달러로 매출의 대부분을 차지했다. 이는 일반식품의 4.7%에 비해 2배 이상 성장한 것으로 2011년에만 29억 달러나 신장되었다. 이 같은 성장세에 힘입어 유기농식품의 매출규모는 올해 354억 달러에 이르고, 2년후엔 400억 달러가 넘어설 것으로 전망.
- 유기농식품의 성장세는 외식보다는 집에서 요리하는 가정이 늘어남에 따라 소비자들의 식재료 구매패턴이 건강하고 간편한 식품 위주로 변하고 있음을 반영한다. 또한 일반 가정의 식품소비 지출이 연도별로 꾸준히 증가<표5 참조>하는 것은 조리시간, 영양가, 편리함을 고려한 조리식품이나 건강식품을 구입해 집에서 조리하는 경우가 늘었기 때문이다. 미국인들은 식사준비를 평균 30분 내로 마치길 원하기 때문에 개별 포장된 냉동제품과 바로 섭취가 가능한 제품, 오븐이나 전자레인지에 조리가 가능한 준비된 식품들을 선호.
- 시카고 국제시장조사기관인 민텔(Mintel)의 2011년 설문조사에 의하면, 응답자 10명 중 6명이 집에서 식사를 한다고 답했다. 또 집에서 식사를 한다고 답한 응답자의 절반 이상인 54%는 간단하게 준비할 수 있는 식사를, 26%는 데우기만 하면 되는 식품을 이용한다고 밝혔다. 이는 경기침체가 장기화되면서 소비자들의 구매패턴이 외식을 자제하는 쪽으로 변화되었음을 보여줌.
- 또 이런 변화는 조리된 식품시장규모에 바로 영향을 미쳤다. 포장식품 마켓리서치 출판사인 Packaged Facts의 최근 보고서에 따르면, 10명 중 2명이 슈퍼마켓과 대형할인점 등 대형유통업체에서 판매되는 조리식품을 구입하는 것으로 나타났다. 이같은 분위기로 전문가들은 조리식품의 2012년 판매규모가 전년대비 7.5% 늘어난 325억 달러에 이를 것으로 예상하고 있다. 또한 건강식품으로 인정받고 있는 코셔식품(Kosher Foods)의 매출도 눈에 띄게 증가했다. 유대인의 음식으로 알려져 있던 코셔식품이 까다로운 검사를 통해 안전성에 믿음을 주면서 소비자들의 시선을 끌고 있다. Lubicom Marketing and Consulting의 2010년 자료에 의하면 미국 내 코셔 식품을 취급하는 슈퍼마켓은 12만 5천 곳에 이르며, 지난 2005년부터 5년간 평균 10~15%씩 꾸준히 성장했다. 또 코셔식품을 구입하는 미국 소비자들은 1,200만 명에 이르고 있으며 이중 정기적으로 코셔식품을 구입하는 비율도 21%나 되는 것으로 조사되었다. 이런 성장률을 바탕으로 2010년 기준 미국 내 코셔식품의 매출규모는 125억 달러에 이른다.
- 유기농식품의 선전은 상대적으로 다른 식품부문에 도 영향을 미쳤다. 북미냉동식품

(Frozen Foods in North America)에 따르면, 지난 2010년 미국 내 냉동식품의 소비량은 줄어든 것으로 나타났다. 냉동식품 통계를 발표하는 닐슨 컴퍼니(Nielsen Company)가 집계한 2011년 3월 미국 내 전체 냉동식품의 소매매출은 전년 동월대비 0.8% 감소한 402억 달러를 기록했다. 미국 소비자들의 식생활과 소비패턴의 변화는 냉동식품의 매출감소의 가장 큰 요인이 되었다. 가정 내 요리가 증가하면서 신선식품에 대한 관심이 증가했기 때문.

- 보고서의 설문조사에 따르면 소비자의 57%가 냉동식품을 외면하는 가장 큰 이유로 신선식품에 대한 선호도가 높아진 것을, 35%는 집에서 요리하는 횟수가 늘어난 점을 지적했다. 반면 냉동식품이 맛이 없거나 영양이나 품질을 믿을 수 없어 구입을 안 한다는 소비자는 20% 이하임.

다. 글루텐 무함유 맛 보강, 신제품 개발

- GFCO(Gluten Free Certification Organization)에서는 글루텐 무함유 식품에 대해 이를 인증하는 레이블을 제공, 소비자들의 식품 선택에 도움을 주고 있다. 미국 대형마켓들도 매장 내 별도 매대를 갖추고 글루텐을 함유하지 않은 케이크나 스낵류, 파스타, 시리얼 등을 판매할 정도로 관심이 높은 식품군이다.
- 민텔의 조사에 따르면 응답자의 21%는 스낵 구입시 글루텐 무함유 여부를 확인하는 것으로 나타났다. 그러나 밀가루에서 글루텐 성분을 제거하면 일반식품에 비해 맛이 떨어진다. 따라서 식품업체들은 다양한 재료와 요리법을 개발해 맛을 보강하고 있으며, 대체 식품으로 쌀이나 콩, 옥수수를 이용한 식품들을 선보이고 있음.
- 글루텐이 없는 스낵(Gluten-free snacks) 분야 가장 큰 성장 : 모든 글루텐 프리 식품 분야가 지난해 성장하였으며, 그 중에서도 스낵 분야가 가장 큰 성장을 달성하였다. 글루텐 프리 스낵 분야는 2012년과 2014년 사이에 163%가 성장하였고 2억8천만 달러의 판매를 기록하였다. 감자칩 (potato chip) 판매가 456% 증가하여 전체 판매 증가의 주요인이 되었다. 한편, 육류/육류 대체품 분야가 2014년에 1억6천만 달러를 기록하여 판매 분기에서 두 번째로 높은 판매 성장을 기록하였다. 이는 2012년에 비하여 14%가 성장한 것이다. 제빵분야와 시리얼 분야는 같은 기간 동안 43%가 성장하였고, 올해 1억3천만달러의 판매에 도달하는 것을 목표로 한다. 빵과 시리얼은 전체 글루텐 프리 제품에서 단지 1%를 차지했으며, 글루텐 프리 제품으로 성장할 수 있는 좋은 기회
- gluten-free 제품이 모든 사람들의 건강에 유익한 것은 아님: 그러나, 모든 사람들이 글루텐 프리 식생활이 건강상에 유익하다는 것에 동의하는 것은 아니다. 조사기관 민텔(Mintel)은 2013년에 조사 응답자의 33%가 글루텐이 없는 식생활은 일시적인 유행일

뿐이라는 의견에 동의하였고, 이 숫자는 2014년에 44%까지 증가하였다고 한다. 그러나 이러한 것이 글루텐 프리 식생활의 유행에 큰 영향을 미치지 않는다고 있다. 2013년에 15%였던 것과 비교시, 미국인의 22%가 현재 글루텐이 없는 식생활을 따르고 있음.

라. 최근 소비자 동향

- 웰빙과 건강을 추구하는 소비자의 요구와 맞물려 시작하였다. 글루텐 프리 식품 소비자는 35%가 건강을 위해 27%가 다이어트를 위해, 21%가 탄수화물 섭취를 줄이기 위한 목적인. 또한, 글루텐에 과민반응을 보이는 가족이 있는 소비자는 15%에 달함. 미셸 오바마 여사가 ‘건강 식단’ 캠페인을 벌이면서, 최근 미국의 소비자는 다이어트와 체력 증진을 위해 글루텐을 먹지 않는 것이 유행함. 미국의 의사가 원인 불명의 질병을 치료하기 위해 환자에게 글루텐 프리 식단 도입을 권유하기도 함. 미국인의 5%가 글루텐으로 소아지방변증(Celiac disease)을 앓고 있으며, 90%가 음식 알레르기를 가져 글루텐 프리 식품에 관심이 높아짐.

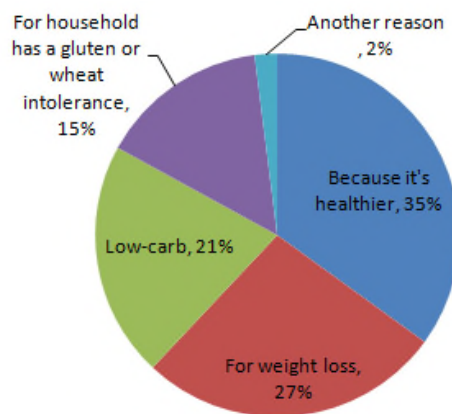
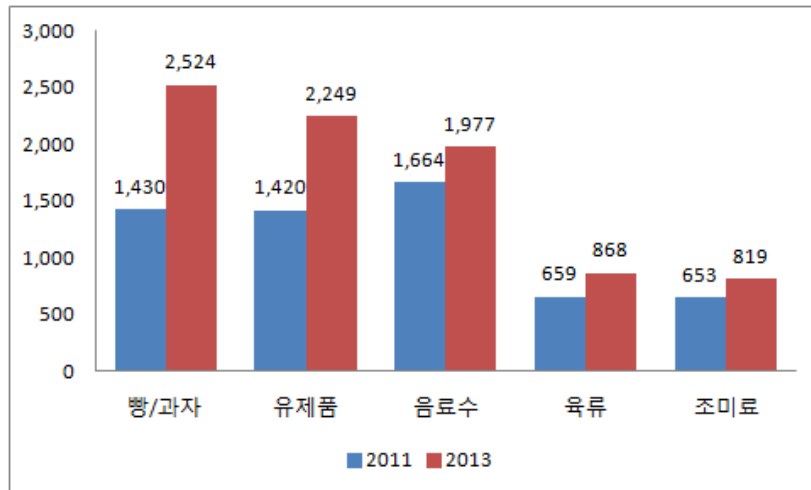


그림 1. 글루텐 프리 식품 선호 이유

자료원: Mintel

- 2016년까지 156억 달러로 48% 성장 전망하고 있는데 2014년에 글루텐 프리 식품시장이 105억 달러 규모로 성장하였다. 민텔(Mintel)의 조사에 따르면, 2013년 글루텐 프리 식품으로 빵·과자가 25억 달러, 유제품이 22억 달러, 그리고 음료수가 19억 달러 어치 판매하였고, 글루텐 프리 식품의 판매 품목으로 빵·제과가 46%, 스낵이 20%의 통계를 보임. 미국 글루텐 프리 식품은 전 세계 글루텐 프리 식품시장의 59%를 차지함.

(단위: US\$ 백만)



자료원: Mintel

그림 2. 글루텐 프리 상품 판매 현황

- 주요 생산업체로는 General Mills, Inc.는 글루텐 프리라고 표시한 상품을 600개 이상 출시하며, 그 중 대표적인 시리얼 상품인 '첵스(CheX)'는 2008년 출시 후 매년 판매 신장을 거듭하며 큰 인기를 얻고 있고, Hain Celestial, Inc.는 유기농 및 친환경 식품 전문회사로 글루텐 프리 제품으로 쌀과 콩으로 만든 음료, 아이스크림, 그리고 파스타 등을 판매함. 최근 글루텐 프리 치킨 너깃, 시머(simmer), 소스, 그리고 허브 차 등 100개의 신상품을 출시함. 특히 최근 글루텐 프리 식품의 대표 브랜드인 Rudi's Organic Bakery를 인수해 소비자의 요구에 부응하는 상품 출시 전략을 꾀함. Rudi's Organic Bakery는 식빵, 베이글, 토르티야, 그리고 스낵 등 60개 이상의 유기농 및 글루텐 프리 상품을 생산



자료원: Google

그림 3. 미국에서의 글루텐 프리 제품

- 글루텐이 없는 쌀과 콩으로 만든 한국 전통 음식과 빵, 과자 등을 미국 소비자 입맛에 맞게 상품을 개발할 필요가 있음. 다양한 영양소와 저염 및 화학조미료 무첨가 같은 정확한 제품 라벨 표시로 우리나라 식품에 신뢰를 부여하는 것이 필요하고, 새로운 시장에 진출할 수 있는 기회로서 작용할 것임.

2절. 프랑스의 Gluten-free 식품시장

- 프랑스는 최근 바이오(Bio) 식품 열풍에 이어 글루텐 프리(Gluten Free) 식품 매출이 급증하는 추세이다. 프랑스 시장조사기관인 Xerfi-France에 따르면 프랑스의 글루텐 프리 식품 매출액은 4000만 유로로 전년 대비 40% 증가한 것으로 나타났으며, 향후 2년 내에 매출액은 2000만 유로 이상 성장할 것으로 예상함.
- 식품 알레르기가 있는 프랑스인은 전체 프랑스 인구의 3%로 극소수이지만 글루텐 프리 제품이 건강식품으로 인식됨에 따라 프랑스 소비자들의 글루텐 프리 제품 수요 증., 주요 식품 매장에는 스파게티 면, 피자, 빵뿐만 아니라 글루텐 프리 맥주까지 다양하게 판매됨. 특히, 글루텐 프리 식품은 일반 식품보다 3배 이상 높은 가격으로 판매됨에도 불구하고 프랑스 소비자들은 건강식 혹은 다이어트 제품으로 여겨 기꺼이 구매하고 있음. 또한 프랑스의 글루텐 알레르기 양성 반응자 협회(AFDIAG)에서는 프랑스 소비자들이 안심하고 글루텐 프리 식품을 구매할 수 있도록 글루텐 프리 로고를 제작했으며 대부분의 글루텐 프리 제품에 협회의 인증마크가 표시돼 있음.



그림 4. 글루텐 프리 로고

자료원: 글루텐 알레르기 양성반응자협회(AFDIAG) 공식 홈페이지

- 프랑스 식품업계는 글루텐 프리 식품 개발 및 판매에 앞장서고 있다. 프랑스 식품업체 Fleury Michon은 2012년, 밀가루 전분 대신 글루텐이 들어가지 않은 옥수수 전분이 함유된 계맛살을 출시 및 판매하고 있으며 2014년 15개의 냉동 글루텐 프리 식품을 프랑

스 병원 및 진료소에도 납품하고 있으며, 프랑스 최대 식품유통매장인 까르푸 (Carrefour)는 미국의 유기농 및 비유전자재조합식품 및 냉동식품 생산업체인 Amy's Kitchen과 합작해 냉동 글루텐 프리 식품을 개발 및 판매하고 있음.

- 프랑스 바이오 및 글루텐 프리 식품업체 ABCD Nutrition은 매년 20% 이상씩 성장하고 있으며 연 매출액의 5%는 글루텐 프리 식품개발에 투자함으로써 일반 글루텐 프리 비스킷, 케익, 파스타 \뿐만 아니라 냉동식품까지 다양한 글루텐 프리 식품 개발에 앞장 서고 있음.



그림 5. 글루텐 프리 식품

자료원: Fleury Michon 및 les recettes de celiane 공식 홈페이지

- 주류시장에도 글루텐 프리 제품 등장하고 있는데, 프랑스 맥주 생산업체인 Castelain은 기존에 출시한 유기농 맥주에 이어 글루텐 프리 맥주 Jade를 개발해 프랑스 대형 식품 유통매장에서 판매되고 있다. 아울러, 또 다른 맥주 생산업체 Britt도 최근 퀴노아로 양조한 글루텐 프리 맥주 Altiplano를 개발해 판매하고 있음.



그림 6. 글루텐 프리 맥주

자료원: Castelain 및 Britt 공식 홈페이지

자료원: 프랑스 경제일간지 Les Echos, Castelain 및 Britt 공식 홈페이지, 글루텐 알레르기 양성 반응자 협회(AFDIAG) 공식 홈페이지, KOTRA 파리 무역관 자료 종합

3절. 국내의 Gluten-free 식품시장

- 리서치조사기관 Dadamonitor(2010)는 한국이 2014년 아시아 및 오세아니아 지역 전체에서 gluten-free식품 1인당 소비액이 가장 높을 것이며, 전 세계적으로는 브라질과 함께 가장 큰 성장률을 보일 것으로 전망하였다. 2011년 11월에 국내 식품의약품안전처에서 만성소화장애 환자 등 글루텐에 민감한 소비자의 식품 선택을 돕고 국제기준과의 조화를 이루기 위하여, 글루텐 함량이 20mg/kg이하인 제품의 경우 gluten-free식품 표시를 할 수 있는 표시기준을 고시.
- gluten-free식품의 시장규모가 큰 북미권 시장에서는 관련통계들이 발표되고 있으나, 도입기를 맞이하는 국내시장에서는 현재까지 공식적인 통계조사가 이루어지지 않고 있다. 따라서 개별 제조사의 홈페이지를 통해 현재 국내 제조현황을 살펴보면, 대상 청정원이 우리 쌀로 만든 ‘옛날식 짜장 분말’과 ‘매콤한 삼선짜장 분말’을 상품화 하였으며, 농촌진흥청에서 100% 쌀로 만든 빵인 ‘보람찬’을 개발하였고, 아워홈에서 ‘gluten-free 쌀 파스타’ 제품을 선보였다(the Food Us, 2013). 현재 gluten-free식품은 같은 품목의 일반식품보다 가격이 다소 높게 형성되어 있다. <표 15>에 제시된 바와 같이, 아워홈의 ‘gluten-free 쌀 파스타’가 풀무원과 오뚜기에서 제조되고 있는 크림스파게티 보다 평균적으로 100g당 약 87원이 더비싼 것으로 나타났다. 또한 청정원의 ‘옛날식 짜장 분말’과 ‘매콤한 삼선짜장 분말’이 오뚜기의 ‘짜장’, ‘사천짜장’ 그리고 ‘간짜장’ 보다 평균적으로 10g당 약 27원이 비싼 것으로 나타나 가격 프리미엄이 형성되어 있는 것을 알 수 있음.

표 4. gluten-free식품과 일반식품 가격비교(2014년 4월 기준)

(단위 : 원)

	크림스파게티(가격)	짜장 분말(가격)
글루텐프리식품	아워홈 크림 파스타 (1,134)	청정원 짜장 분말 (217)
일반식품	풀무원 크림 스파게티 (1,055)	오뚜기 짜장 분말 (166)
	오뚜기 크림 스파게티 (1,039)	오뚜기 사천 짜장 (188)
		오뚜기 삼선간짜장 (214)

주 : 1. 크림스파게티 100g 당 가격으로 환산.
2. 짜장 분말 10g 당 가격으로 환산.



그림 7. 국내에서 생산하는 gluten-free 제품들

***아워홈(OURHOME) : gluten-free면**

- 면, 소스까지 밀가루를 쓰지 않았다.
- 쌀짬뽕, 쌀짜장면, 쌀볶음면 : 쌀가루(64.26%), 옥수수전분, 트레할로스, 혼합체제-D소르비톨액, 대두유, 유화제, 주정, 잔탄검, 구아검, 정제염, 치자황색소
- 쌀파스타 : 쌀가루(82.3%), 옥수수전분, 트레할로스, 혼합체제-D소르비톨액, 대두유, 유화제, 주정, 잔탄검, 구아검, 정제염

***외계인방앗간 : 100% 쌀빵, 발효종을 사용해 글루텐 성질 생성**

- 빵 : 쌀가루, 흑미가루, 홍국가루, 유기농 당, 소금, 올리브, 호두, 밤, 쌀조청
- 카스테라 : 쌀가루, 계란, 유기농 당, 버터, 올리브오일, 올리고당, 쌀조청
- 쌀발효종 : 흑미쌀가루, 백미쌀가루, 고구마전분고량, 무화가절임, 원당, 보리액기스, 소량의 참기름, 정수된 솔잎물 5일동안 발효



- gluten-free홍국쌀빵
:무글루텐 홍국쌀가루 믹스, 천일염, 인스턴트 드라이이스트, 포도당가루, 100%우리현미유

- gluten-free강황쌀빵

: 무글루텐 강황쌀가루 믹스, 천일염, 인스턴트 드라이이스트, 포도당가루, 100%우리현미유

- 현미쌀빵



*대디앤맘 : gluten-free빵

[글루텐 물성형성 소재의 선정과 배합비의 선정]



1) 실험 방법

gluten-free 빵을 제조하기 위하여 1차로 gluten-free에 적합한 소재를 선별하고자 하였다. 사용 소재로는 감자(뚜레반, 경기도 고양시, Korea), 콩단 Isolated Soy Protein, 수입원: 대한제당, 인천시 중 광역시 사상구, Korea), 그리고 쌀가루((햇살마루)대두 농심미분, 충남 안산시 탕정면 Korea)을 사용하여 소재중에서 gluten물성을 모사할수 있는 소재를 중심으로 검류를 첨가하여 물성을 조절하였다. 쌀가루는 대두식품과 농심미분에서 생산한 두종류로 사용하였는데 둘다 건식제분 쌀가루(수분함량: 12.1%)를 지역에서 구입하여 사용하였으며, 여기에 지역에서 생산한 습식쌀가루(불린 쌀가루)도 사용하여 타당성을 검토하였다. 설탕, 소금, 탈지분유, 건조효모는 시중에서 구입하여 실험하였다. 또 실험에 사용한 검류로 methyl cellulose(MC), hydroxypropylmethyl cellulose(HPMC)는 삼성정밀화학(Suwon, Kyongki-do, Korea)에서 제공받아 사용하였고, 이외의 소재들로 xanthan gum은 (주)엠에스 씨(Yangsan, Korea)에서 구입하여 사용하였다. 유화제로 sodium stearoyl lactylate(SSL)을 (주)일신웰스 (Seoul, Korea)에서 제공받아 사용하였다.

(2) 실험 결과

gluten-free 소재에 점탄성과 네트워크를 형성하여 빵류와 같은 부품성을 형성할수 있는 소재를 선정하기 위하여 식품용 고분자소재 중에서 식품의 물성을 개선하는데 많이 사용되고, 외국문헌과 상업적 사용으로 많이 알려진 Xanthan gum, MC(methyl cellulose), HPMC(hydroxypropyl methyl cellulose)를 선정하였다. 또한 빵류의 제조는 gluten-free 소재는 아니지만 빵류의 형성에 충분하지 않아 부품성이 떨어지는 호밀을 대상으로 실시하여 상용화된 제품과의 비교를 통하여 고분자소재의 빵류에서의 가능성을 평가하였다.

그림 1에서 나타난 시중에서 글루텐이 소량(10% 추가) 첨가된 호밀빵과 비교를 하였다. xanthan gum은 물성형성능을 보였으나 기공이 고르지 못하여 질감을 반감시켰고, 빵류의 반

죽에서 호밀과의 결합력이 떨어져, xanthan gum 끼리 서로 결합하는 성질을 가져, 반죽을 성형하는데 많은 애로사항을 보였다. 그리고 MC와 HPMC는 전체적으로 고른 기공성과 빵류 제조에 적합한 하였으나 methyl cellulose의 경우, 학생중심의 간이 기호도 평가에서 신맛이 느껴진다는 이미지를 많은 지적이 나왔다. methyl cellulose는 무색, 무미이고 식품에 사용에 제한성이 없는 것으로 알려져 있으나, 호밀빵하교의 결합과정에서 이미지를 발생하여 적합한 소재로서 제외되었다.

한편 HPMC의 경우 부품성에서는 약 소량첨가(0.59%)하였음에도 빵류의 제조에서 2.5배의 부품성을 보이고 있어 최적화시에 충분한 기대가 되었다. 또한 HPMC는 기호도 면에서 자료에는 나타나 있지 않지만 쌀을 주제로 하는 빵류제조에서 떡류와 비슷한 맛을 내는 것이 아니라 보다 빵과 같은 질감과 맛을 제공하고 있어 gluten-free형 제품에 적합한 것으로 나타나고 있다.

밀빵에서는 밀가루에 물을 첨가하여 반죽할 때 불용성의 단백질이 수화하여 반죽내의 gluten망상구조가 형성되고 이로 인한 반죽의 점탄성이 효모가 형성한 CO₂ 가스를 보유함과 아울러 발효 시 적절히 신장함으로써 반죽을 팽창시킨다. 밀가루와 달리 쌀가루에는 빵의 구조를 형성하는 글루텐 단백질이 없어 쌀빵의 제조에는 기술적인 어려움이 따른다(Kulp et al., 1974). 쌀빵의 제조 시에 밀가루의 이러한 기능을 부여하기 위하여 활성글루텐(vital gluten) 뿐만 아니라 검(gum)류 등 첨가 재료의 사용이 연구되어 왔다(Kang et al., 1997).

국내에서 시판되고 있는 쌀식빵의 경우 대부분 활성글루텐을 약 17% 첨가하여 제조하고 있으며(Kim et al., 2009) 이는 강력분 밀가루의 단백질 함량보다 높은 비율의 글루텐을 함유하고 있다. 한편 밀가루에 알레르기를 나타내는 사람들을 위하여 밀가루가 아닌 타곡분이나 전분을 이용하여 다양하게 빵을 제조하거나(Jong et al., 1968) 다양한 검류의 첨가에 의한 글루텐이 없는(gluten-free) 쌀빵의 제조방법들이 제시된 바 있다 (McCarthy et al., 2005; Nishita et al., 1976; Sivaramakrishnan et al., 2004).



잔탄검 함유 호밀빵과 시중 글루텐 함유 호밀빵(상)과의 비교



MC 함유 호밀빵과 글루텐 함유 호밀빵(좌)과의 비교



HPMC 함유 호밀빵의 제조



HPMC 함유 호밀빵의 제조

그림 1. Xanthan gum, MC, HPMC를 포함하는 호밀빵의 제조

일반적으로 밀가루에 반죽강화제로 불리는 유화제를 첨가하였을 때 반죽의 내구성 개선, 주저앉음에 대한 저항성, 가스보유력 강화를 통해서 궁극적으로 빵의 부피증가, 조직감개선 및 균일하고 미세한 기공을 보유하도록 하며, 연화제의 경우 전분의 결정화 속도를 지연시켜 빵 속이 단단해지는 것을 방지하도록 한다(Stempfli & Bersten, 1995). 또한 α - amylase, xylanase, hemicellulase, glucose oxidase, lipase 등 효소를 혼합적으로 사용함으로써 빵의

품질을 향상시키는 효과를 얻을 수 있다고 하였다(Caballero et al., 2007; Pylar, 1988). 쌀빵의 제조 시에도 α -amylase나 glucose oxidase의 첨가가 빵의 제조적성을 향상시킬 수 있다고 보고된(Gujral & Rosell, 2004; Lee et al., 2008) 바 있음.

다. 빵류 제조와 물성의 확인

(1) 실험 방법

1) gluten-free소재에 점탄성과 네트워크를 형성하여 빵류와 같은 부품성을 형성할수 있는 소재를 선정하기 위하여 식품용 고분자소재 중에서 식품의 물성을 개선하는데 많이 사용되고, 외국문헌과 상업적 사용으로 많이 알려진 Xanthan gum, MC(methyl cellulose), HPMC(hydroxypropyl methyl cellulose)를 선정하였다. 또한 빵류의 제조는 gluten-free소재는 아니지만 빵류의 형성에 충분하지 않아 부품성이 떨어지는 호밀을 대상으로 실시하여 상용화된 제품과의 비교를 통하여 고분자소재의 빵류에서의 가능성을 평가하였다.

2) gluten-free 식빵 제조

gluten-free 식빵 제조는 Hera의 방법을 조금 변형한(Hera et al., 2013) 직접 반죽법을 Kitchen-Aid mixer를 이용하여 제조하였고 배합비는 쌀가루 100%, 물 80%, 인스턴트 이스트 3%, 소금 2%, 설탕 5%, 카놀라유 6%, 검류 0.5% 이다. 이를 중심으로 사용하였고, 반죽의 특성에 따라 비율의 변화를 실시하였다. 밀가루 대체소재와 검류를 1분간 혼합하고 설탕, 소금, 이스트를 물과 함께 2분간 혼합한 후 카놀라유를 넣고 6분간 혼합하였다. 완성된 반죽을 170 g씩 분할한 후 동일한 형태로 성형하였다. 완성된 반죽을 틀에 넣고 온도 30°C, 습도 90%로 미리 설정해 놓은 발효기 40분간 1차 발효를 진행한 후 윗불 185°C, 아랫불 185°C에서 25분간 구워 식빵을 제조하였다. 제조된 gluten-free 식빵은 1시간 실온에서 보관 후 플라스틱 팩에 넣어 데시케이터에 보관하였고 24시간 이내에 모든 측정을 완료하였으며, 아래 그림 2에 조성 및 제조공정에 대해 나타내었다.

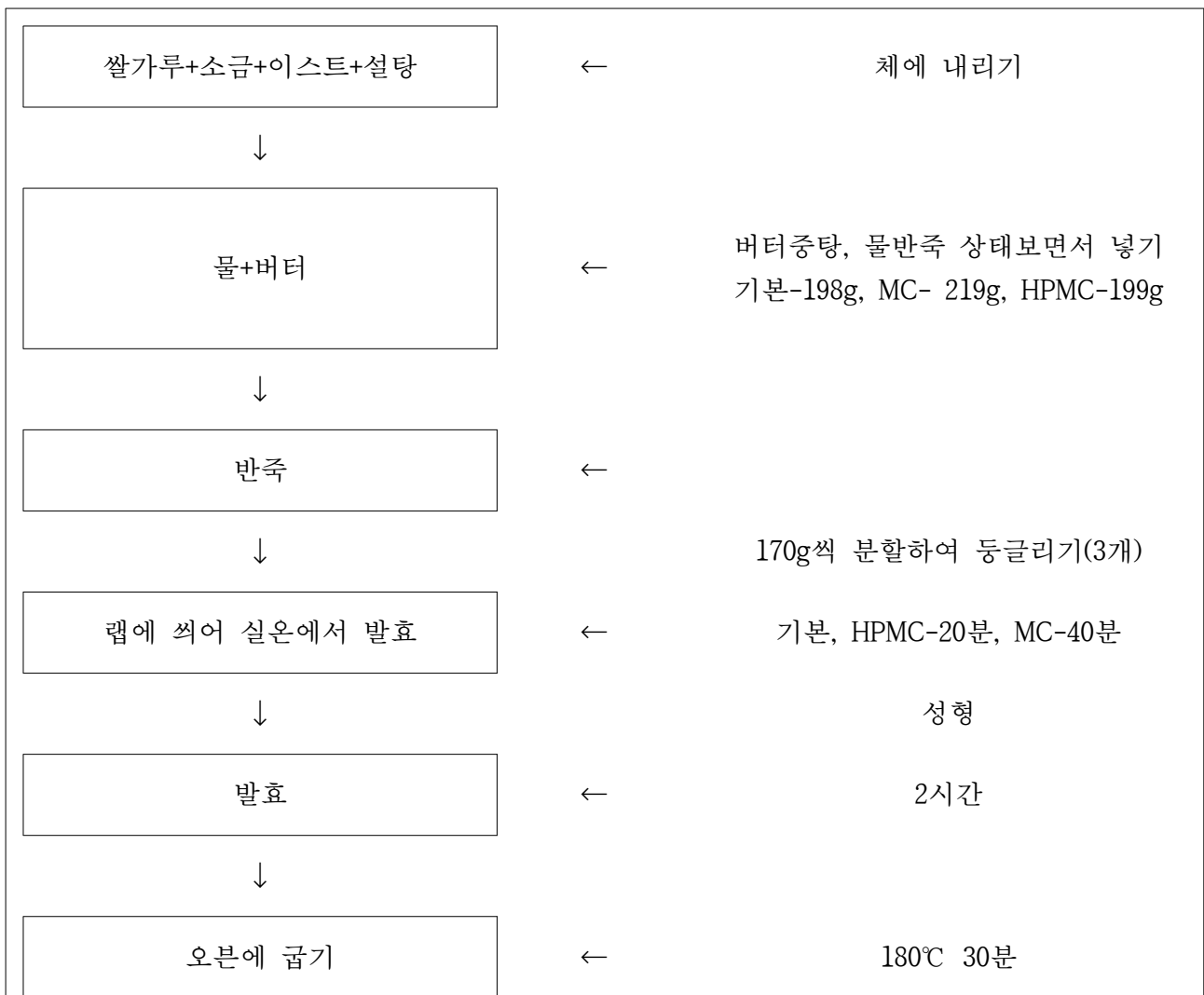


그림 2. gluten-free 식빵의 제조 순서

3) 부피측정

발효된 빵류의 부피를 측정하기 위하여 첨가물 첨가로 제조된 빵류에 AACCC방법에 따라 혼합이 완료된 직후 반죽을 각각 40 g 씩을 분할하여 100 mL의 메스실린더에 넣어 발효시간과 동일하게 유지(30°C, R/H 80%)시킨 후 메스실린더에 부풀어 오른 부피를 측정하였다.

4) Texture 측정

쌀 식빵의 crumb 부분의 물성을 측정하기 위해 texture analyzer(TMS-Pro, Food Technology Co., Sterling, VA, USA)를 사용하였다. 제조된 식빵을 두께 2 cm로 자르고 플랫폼 위에 올려 놓은 후 지름 20 mm 플라스틱 프로브 (probe)로 변화율 50%, 프로브 이동속

도 20 mm/min 조건으로 2회 압축하여 측정하였다. 측정된 수치는 경도(hardness), 검성(gumminess), 씹힘성(chewiness)로 나타내었고 6회 반복 측정하여 측정값을 나타내었다.

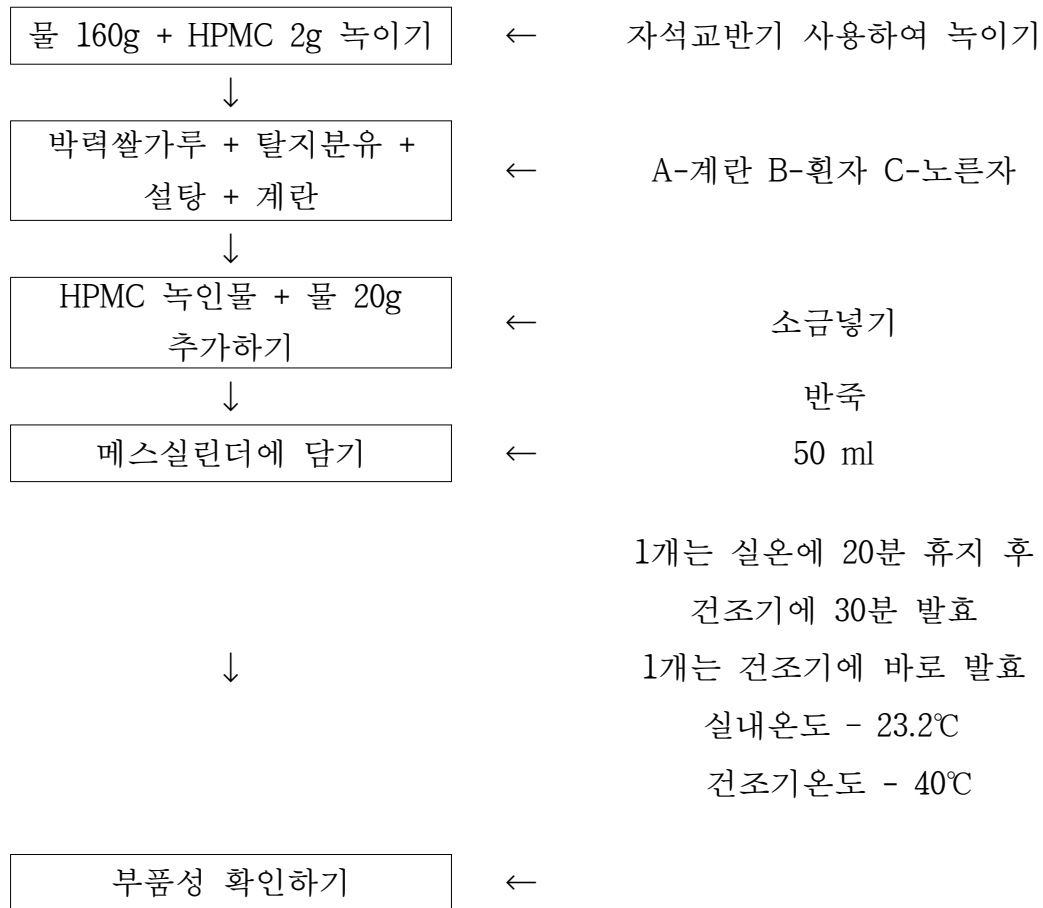


그림 3. gluten-free 식빵의 부피 측정

5) 색도 분석

색차계(CR-300, Minolta Co., Ltd., Osaka, Japan)를 이용하여 제조된 gluten-free 식빵의 Crust 부분을 측정하여 L(명도), a (적색도), b(황색도) 값으로 나타내었다. 6회 반복 측정하였으며 이때 색차계의 표준값은 L=98.07, a=0.18, b=1.57이었다.

6) 식빵 단면 사진

gluten-free식빵 crumb 구조 및 gluten-free 식빵 형태를 알아보기 위해 시료의 가장 높은 위치에서 단면 방향으로 시료를 잘랐다. 자른 시료를 형광등을 켜진 상태에서 디지털카메라

를 이용하여 촬영하였다.

표 1. Baking formula for gluten-free bread

Ingredients	Flour basis(g)
Rice flour or free ingredients	260g
HPMC	2g
Salt	5g
Sugar	20g
egg	50g
defated milk	6g
dried yeast	5g
Water	180g

검류의 첨가량을 결정하기 이전에 gluten-free소재에서 빵류로서의 가능성이 우선 검증 및 선택이 되어야 하였으므로 gluten-free소재를 이용하여 낮은수준의 검류를 첨가하는 상태에서 빵류의 기초적 물성(부품성, 빵의 질감, 기호도)을 고려하여 선정되어졌다. 그림 6에서 보는바와 같이 옥수수, 감자가루를 이용한 gluten-free빵의 부품성이 낮고 빵에 대한 질감에서 매우 높은 점질성, 빵류보다는 떡 그리고 낮은 부품성 때문에 점질성이 더욱 돋보여져 기호성을 떨어뜨렸다. 또한 외피의 경우 특이적으로 부품성이 나타나 딱딱한 외피막을 형성하는 독특함을 보였다. 그러나 전체적으로 빵류를 제조하는데 기본적인 질감을 형성하지 못하는 문제점을 보였다. Gluten-free 빵을 제조하는데 적합한 소재를 선정에서 쌀가루는 총 3종류를 달리하여 사용하였다. 농심미분에서 생산한 우리쌀가루와 대두식품에서 생산한 햇살마루(박력쌀가루, 쌀함량 100%) 그리고 증편제조용으로 주로 사용되는 습식 불린 쌀가루를 이용하여 쌀빵을 제조하였고 또한 쌀과 더불어 옥수수전분, 감자전분을 gluten-free소재로 사용 빵을 제조하였다. 예비실험(data was not shown)결과로 쌀가루라 할지라도 검류의 첨가 없이는 부품성이 나타나지 않아 떡류의 질감을 그대로 유지하고 있어 이에 대한 첨가를 결정하였다.

그림 5에서는 검류를 특히 HPMC를 0.59% 첨가하여 쌀빵을 제조하였는데 기본적인 부품

성과 기공을 충분히 고르게 형성하여 빵류로서의 가능성을 확인하였다. 농심미분에서 생산한 우리쌀가루의 경우 떡의 질감이 우수하였다면, 햇살마루의 경우 오히려 빵의 질감과 맛을 간이 기호도에서 나타나 앞으로 기본적인 빵류제조의 물성으로 삼고자 하였다. 그리고 마지막으로 비교 첨부하였던 불린 쌀가루의 경우, 증편을 제조하는 기본적인 쌀가루로서 소금간이 이미 첨가되어 위에서 제시한 기본조성에 소금이 더 첨가되어 짠맛을 내었다. 그러나 그러한 기본적인 빵의 물성을 나타내지 못하고 동일한 조건에서 구웠을 때에도 떡류의 질감을 보여줘 불린 쌀가루로서는 어렵다는 것이 결정됨. 글루텐 함량이 낮은 호밀, 보리로 빵을 만들면 효모가 발생하는 이산화탄소가 글루텐 함량이 낮아 떨어지는 네트워크로 가스를 가둘수 있는 포집력이 저하되어 부피가 큰 양질의 빵을 만들수 없다. 또한 gluten이 없는 gluten-free소재의 경우 부품성이 낮고 딱딱한 빵류 만을 만들 수 있는 저급의 빵만을 생산가능하기 때문에 이와 같은 소재를 개선하기 위하여 이런 gluten-free 제품에는 점탄성을 갖는 hydrocolloid (Lazaridou A et al. 2007)나 효소, 콩단백, 계란흰자 등을 이용하고 있다(Ribotta PD 2004).

(2) 실험 결과

1) Gluten을 함유한 소재로부터 빵의 제조

Gluten-free 빵류를 제조하기 이전에 밀가루를 비롯한 호밀, 보리와 같이 gluten을 함유하고 있는 빵류를 제조하여 아래 그림 3과 같은 조건에서 빵류의 형성정도를 확인하였다. 또한 그림 4와 같은 과정으로 빵류를 제조하였다.





제조한 호밀빵과 시중 글루텐 함유 호밀빵(상)과의 비교

그림 4. 밀 글루텐 함유 빵 제조 공정

gluten을 함유하는 밀, 호밀, 보리에서 빵류는 밀에 특히 부품성이 우수하여 부드럽고 풍미가 우수하였다. 이스트에서 발생한 이산화탄소가 gluten에 포집되어 적절한 기공이 형성되고 부품의 결과로 풍성한 부피, 수분이 포괄되어 부드러움이 유지되었고, 향미에서는 이스트의 발효 결과로 더해져 우수성이 있었다. 그러나 호밀이나 보리의 경우 빵류의 형성이 크게 나타나지 않았고 형성이 되더라도 적은 형태의 기포(스폰지 케일의 수준보다 약간 우수한 수준)를 유지하여 질감이 크게 개선되지 않았다. 또한 먹는 질감에서 호밀과 보리는 질퍽한 질감을 유지하고 있어 마치 우리 떡의 증편이나 인절미의 질감을 연상하게 되어 서양인들에게 적용 가능 여부는 명확하지 않다. 따라서 gluten이 함유되어 있는 빵류에서 글루텐이 빵류의 형성에 크게 작용하는 사실을 확인하였고 부품성의 정도를 목표로 정하였다. 빵의 부피를 증가시키기 위하여 활성글루텐을 첨가하는데, 활성글루텐은 밀전분 생산 시 발생하는 부산물로 물에 불용성 단백질이다. 주로 gliadin과 glutenin으로 구성되어 있으며 gliadin은 분자량이 30,000~80,000 Da이고, glutenin은 수백만 Da이다(Shewry PR et al. 1992). 생산량이 많고 가격이 저렴하여 제빵이외에 시리얼, 애완동물 사료, 육가공 등에 이용하고 있다(Wang JS et al 2006).



박력쌀가루-계란

박력쌀가루-흰자



박력쌀가루-노른자

우리쌀가루-계란



우리쌀가루-흰자

우리쌀가루-노른자



불린쌀가루(계란)

불린쌀가루(흰자)

불린쌀가루(노른자)

그림 6. 3 가지 종류의 쌀가루로 제조된 gluten-free 빵류

2) Gluten-free소재의 선정

Gluten-free 빵류를 제조하는데 적합한 소재를 선별하고자 감자전분, 콩분말, 옥수수전분, 그리고 쌀가루를 가지고 표 1의 방법에 따라서 제시한 gluten-free빵을 제조하였다. 제조과정은 아래의 그림 6에서 나타낸 그림처럼 실시하여 빵을 제조, 평가에 사용하였다. gluten-free소재에 점탄성과 네트워크를 형성하여 빵류와 같은 부품성을 형성할수 있는 소재를 선정하기 위하여 식품용 고분자소재 중에서 식품의 물성을 개선하는데 많이 사용되고, 외국문헌과 상업적 사용으로 많이 알려진 Xanthan gum, MC(methyl cellulose), HPMC(hydroxypropyl methyl cellulose)를 선정하였다. 또한 빵류의 제조는 gluten-free소재는 아니지만 빵류의 형성에 충분하지 않아 부품성이 떨어지는 호밀을 대상으로 실시하여 상용화된 제품과의 비교를 통하여 고분자소재의 빵류에서의 가능성을 평가하였다.

그림 4에서 나타난 시중에서 글루텐이 소량(10% 추가) 첨가된 호밀빵과 비교를 하였다. xanthan gum은 물성형성능을 보였으나 기공이 고르지 못하여 질감을 반감시켰고, 빵류의 반죽에서 호밀과의 결합력이 떨어져, xanthan gum 끼리 서로 결합하는 성질을 가져, 반죽을 성형하는데 많은 애로사항을 보였다. 그리고 MC와 HPMC는 전체적으로 고른 기공성과 빵류 제조에 적합한 하였으나 methyl cellulose의 경우, 학생중심의 간이 기호도 평가에서 신맛이 느껴진다는 이미지를 많은 지적이 나왔다. methyl cellulose는 무색, 무미이고 식품에 사용에 제한성이 없는 것으로 알려져 있으나, 호밀빵하고의 결합과정에서 이미지를 발생하여 적합한 소재로서 제외되었다. 한편 HPMC의 경우 부품성에서는 약 소량첨가(0.59%)하였음에도 빵류의 제조에서 2.5배의 부품성을 보이고 있어 최적화시에 충분한 기대가 되었다. 또한 HPMC는 기호도 면에서 자료에는 나타나 있지 않지만 쌀을 주제로 하는 빵류제조에서 떡류와 비슷한 맛을 내는 것이 아니라 보다 빵과 같은 질감과 맛을 제공하고 있어 gluten-free형 제품에 적합한 것으로 나타나고 있다. 밀빵에서는 밀가루에 물을 첨가하여 반죽할 때 불용성의 단백질이 수화하여 반죽내의 gluten망상구조가 형성되고 이로 인한 반죽의 점탄성이 효모가 형성한 CO₂ 가스를 보유함과 아울러 발효 시 적절히 신장함으로써 반죽을 팽창시킨다. 밀가루와 달리 쌀가루에는 빵의 구조를 형성하는 글루텐 단백질이 없어 쌀빵의 제조에는 기술적인 어려움이 따른다(Kulp et al., 1974). 쌀빵의 제조 시에 밀가루의 이러한 기능을 부여하기 위하여 활성글루텐(vital gluten) 뿐만 아니라 검(gum)류 등 첨가 재료의 사용이 연구되어 왔다(Kang et al., 1997).

국내에서 시판되고 있는 쌀식빵의 경우 대부분 활성글루텐을 약 17% 첨가하여 제조하고 있으며(Kim et al., 2009) 이는 강력분 밀가루의 단백질 함량보다 높은 비율의 글루텐을 함유하고 있다. 한편 밀가루에 알레르기를 나타내는 사람들을 위하여 밀가루가 아닌 타곡분이나 전분을 이용하여 다양하게 빵을 제조하거나(Jong et al., 1968) 다양한 검류의 첨가에 의한 글루텐이 없는(gluten-free) 쌀빵의 제조방법들이 제시된 바 있다 (McCarthy et al., 2005; Nishita et al., 1976; Sivaramakrishnan et al., 2004).

○ 일반적으로 밀가루에 반죽강화제로 불리는 유화제를 첨가하였을 때 반죽의 내구성 개선, 주저앉음에 대한 저항성, 가스보유력 강화를 통해서 궁극적으로 빵의 부피증가, 조직감개선 및 균일하고 미세한 기공을 보유하도록 하며, 연화제의 경우 전분의 결정화 속도를 지연시켜 빵 속이 단단해지는 것을 방지하도록 한다(Stempfli & Bersten, 1995). 또한 α -amylase, xylanase, hemicellulase, glucose oxidase, lipase 등 효소를 혼합적으로 사용함으로써 빵의 품질을 향상시키는 효과를 얻을 수 있다고 하였다(Caballero et al., 2007; Pyle, 1988). 쌀빵의 제조 시에도 α -amylase나 glucose oxidase의 첨가가 빵의 제조적성을 향상시킬 수 있다고 보고된(Gujral & Rosell, 2004; Lee et al., 2008) 바 있다.

3) 첨가된 hydrocolloids에 따른 부피측정

우리 쌀가루로 제조한 쌀 식빵의 부피는 앞서 제시한 Fig. 7에 나타나 있다. 우리쌀로 제조된 쌀 식빵의 부피는 xanthan gum 이 112.5 ml, MC가 124.2ml, HPMC는 153.4ml을 나타내어 HPMC가 부피성이 확실히 크게 증가하였음을 알수 있었다. Mara와 Cristina(2006)는 part baked 빵 제조에 밀가루 대비 HPMC를 첨가하였을 때, 부피가 증가가 일어났다고 하는데, 본 실험에서 검류를 첨가한 시험구의 부피가 크게 증가한 것으로 나타나 유사한 결과를 보임. Rosell et al. (2001)은 단백질 함량 12.48%의 밀가루에 sodium alginate, κ -carrageenan, xanthan gum, HPMC 등을 0.5% 첨가하여 제조한 빵의 비용적을 측정한 결과 sodium alginate 를 첨가한 것은 비용적이 작아졌으나 HPMC를 첨가한 것은 커졌다고 하였는데, 본 실험에서도 HPMC가 가장 높은 증가율을 보였다. Ribotta et al. (2005)이 sodium alginate, κ -carrageenan, ι -carrageenan, λ -carrageenan, carob gum, guar gum 등의 검류를 첨가하여 제조한 빵의 부피를 측정한 결과, sodium alginate 첨가시 부피가 가장 컸다고 하였으며, 검류 첨가시 부피가 커지는 것은 반죽 제조 시 검류에 수화되어 결합하고 있는 물이 오븐에서 고온으로 가열 시 분리되어 전분과 단백질 간에 상호작용으로 막을 형성하여 굽기 중 방출되는 가스를 포집하기 때문인 것으로 생각된다.

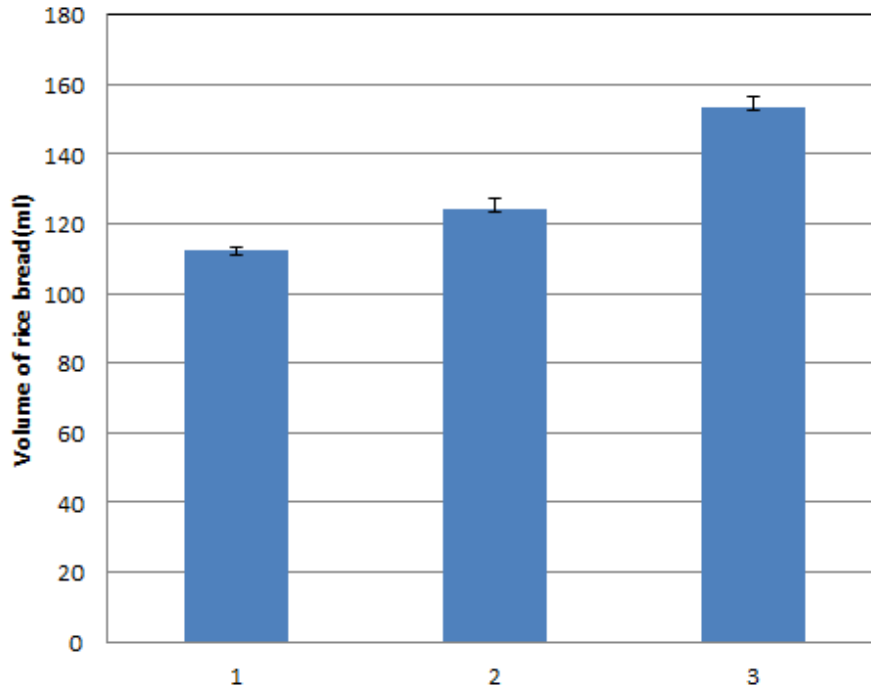
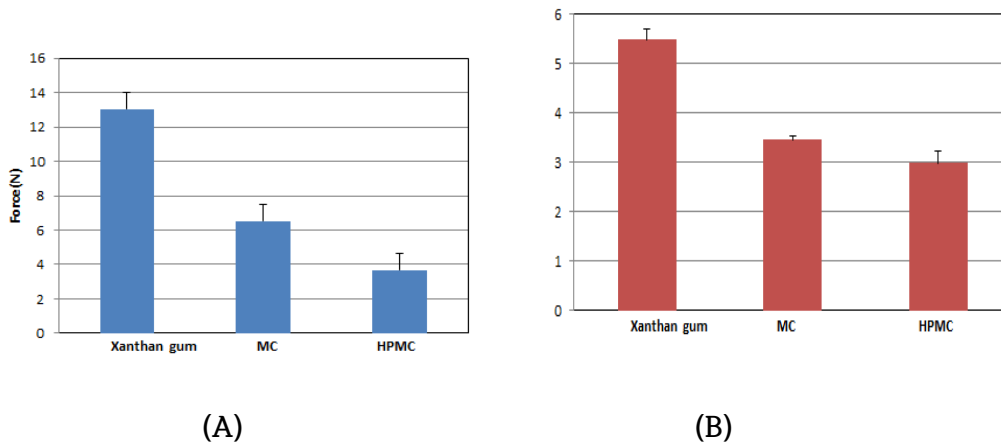
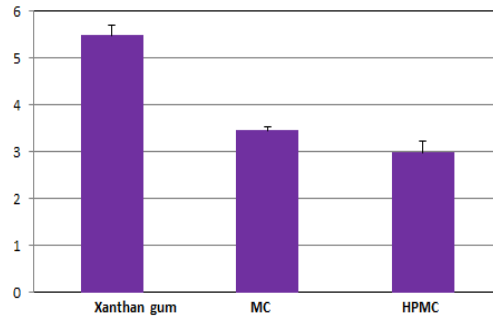


그림 7. 다른 hydrocolloids를 사용한 빵의 부피 변화
1: xanthan gum, 2: MC, 3: HPMC

4) 쌀 식빵의 물성평가

제조된 쌀 식빵의 물성학적 특성을 파악하기 위해 TPA실험을 수행하였다. 그 결과 경도, 검성, 씹힘성 값 모두 Xanthan gum > MC > HPMC순으로 높게 나왔다. Crumb의 경도는 Xanthan gum 첨가군이 2.66 ± 0.2 N, MC첨가군이 6.79 ± 0.9 N, HPMC 첨가군이 12.88 ± 0.6 N 으로 나타났으며, 이 때 빵의 부피와 crumb의 경도 사이에는 반비례의 관계가 보였다. 이 결과는 이전의 연구와 유사성을 나타내었다(Marco et al., 2008). 이러한 이유로 부피가 큰 HPMC로 제조된 식빵의 경도가 가장 작은 수치를 나타낸 것으로 판단된다.





(C)

그림 8. 첨가된 hydrocolloids의 종류에 따라 제조된 빵류의 물성
(A): hardness, (B): Gumminess, (C): Chewiness

쌀 식빵의 부피 및 crumb의 경도에 있어서 아밀로스 함량은 중요요소로 지적하고 있다. 중간 정도(20-25%)의 아밀로스함량을 갖는 쌀 품종이 부드러운 crumb의 물성을 가질 수 있게 하며 이는 글루텐 프리 쌀 식빵을 제조하는데도 적합하다 평가하고 있음(Perdon et al. 1975).

5) 제조된 글루텐 프리 쌀 빵의 색도

쌀빵의 crust 색을 비교하기 위해 AACCC 제조법으로 만들어진 밀가루 식빵의 crust 색과 비교하였다.(Table 4. 참조) AACCC 제조법으로 제조한 밀가루 식빵의 색도는 $L = 63.24$ $a = +17.56$ $b = +29.84$ 로 나타났다. 본 실험에서 제조한 쌀빵은 첨가한 고분자물질에 따라 명도는 각각 xanthan gum이 74.3 ± 1.4 , MC가 76.4 ± 2.3 , HPMC가 71.3 ± 2.2 로 밀가루에 비하여 높은 값을 나타냈다. 한편 황색도(b 값) 값은 xanthan gum이 6.3 ± 1.9 , MC가 4.7 ± 2.3 , HPMC가 4.3 ± 2.0 로 낮게 나왔다. 이는 쌀빵에 대한 다른 연구결과와 유사하게 나타났다(Sciarini et al., 2010). 이와 같이 쌀 식빵과 밀 식빵의 crust의 색도에 영향을 준 주요 요인은 쌀 식빵에 첨가된 HPMC이다. 쌀 식빵은 글루텐 단백질의 부재로 인해 반죽의 물성을 개량하기 위하여 hydrocolloid를 사용하는 경우가 많은데, 본 실험에서 글루텐 대체재로 사용한 HPMC가 반죽 내 물의 분산과 물질의 이동과 분포에 영향을 미쳐 마일라드 반응과 카라멜 반응의 양상을 다르게 하였기 때문으로 설명하고 있다(Mezaize et al., 2009). 글루텐 프리 쌀 식빵의 제조에 있어 보다 나은 crust의 색을 얻기 위해 다른 종류의 곡류와의 혼합이나 유화제가 사용될 수 있는데(Demirkesen et al., 2010) 이와 같은 적용이 쌀 식빵의 품질 향상을 위한 방법으로 필요할 것으로 판단된다.

표 2. 첨가된 hydrocolloids의 종류에 따라 나타난 색도의 변화

Food ingredients	L	a	b
xanthan gum	74.3±1.4 ^a	6.3±1.9 ^a	26.4±0.9 ^a
MC	76.4±2.3 ^a	4.7±2.3 ^b	21.3±1.9 ^b
HPMC	71.3±2.2 ^{ab}	4.3±2.0 ^b	19.5±3.4 ^{bc}

빵 제조에 검류를 첨가하는 것은 품질개선과 노화를 연장하기 위한 것으로(Brcenas ME et al. (2004), 직날법으로 제조하는 빵에 HPMC를 첨가하면 HPMC가 유화제로서 작용하고 빵 내부의 기공벽을 강하게 하는 능력과 수분보유력 때문에 제품의 품질이 개선된다고 하였다 (Sarkar N and Walker LC. (1995)). Mara와 Cristina(2005)는 HPMC를 0.5% 첨가하여 제조한 part-baked 빵을 50°C에 10일간 보존하여 구운 후 경도를 측정된 결과 HPMC를 첨가한 것은 첨가하지 않은 것보다 경도가 낮았고, -25°C에서 42일간 저장 후 구웠을 경우에도 현저히 낮아 제품이 부드러웠다고 보고하였다. 또한 Guarda et al (2004)도 HPMC를 첨가하여 제조한 빵의 경도를 분석한 결과 crumb 경도가 현저히 감소하여 부드러웠고, SA도 경도를 감소시켰으나 HPMC보다는 효과가 적었다고 하였는데, 이러한 것에 대하여 Eidam et al. (1995)은 검류가 밀가루 전분이 수분분산과 보유하는 능력을 약하게 하여 crumb 저항을 감소시키기 때문이라는 가설을 제기하였고, Biliaderis et al(1997)은 검류가 전분입자의 팽윤을 감소시켜 견고성을 증가시킬 뿐만 아니라 검류의 종류에 따라 차이는 있으나 amylose 사슬간의 결합을 방해하여 전분을 약하게 한다.

라. 관능검사를 통한 기호도의 보정

밀가루 중량 대비 검류를 0.5% 첨가한 시험구와 첨가하지 않은 대조구 식빵의 관능검사를 분석한 결과는 그림 9 과 같다. HPMC와 MC가 맛, 색, 향, 기호도에서 유사하였지만 질감에서 HPMC가 더 우수한 것으로 보여졌고, 또한 앞서 지적하였듯이 빵류를 제조시 약간의 이취가 발생하여 기호도 면에서는 떨어지는 것으로 간이 조사되었다. 한편 Xanthan gum의 경우 밀가루의 품질을 개선하는데 많은 연구에서 우수하다는 평가를 하였으나 순수한 쌀을 주성분으로 하는 평가에서는 모든 평가에서 떨어지는 것으로 나타나 쌀을 주재료로 하는 빵과의 연

계는 타당하지 않는 것으로 평가됨. HPMC 등의 첨가 순으로 높은 점수를 얻어 HPMC를 첨가한 것을 가장 선호하였다. Mara와 Cristina(2005)는 HPMC를 첨가하여 제조한 part-baked 빵을 5°C에 10일간 보존 후 구워 관능검사로 외형, 향기, 맛, 조직 등을 분석한 결과 외형과 향기에서는 차이가 없었으나 맛과 조직에서는 HPMC를 첨가한 것이 좋은 점수를 얻었다 하여, 본 실험에서 HPMC를 첨가한 것이 맛, 식감, 조직에서 높은 점수를 얻은 결과와 유사하였다.

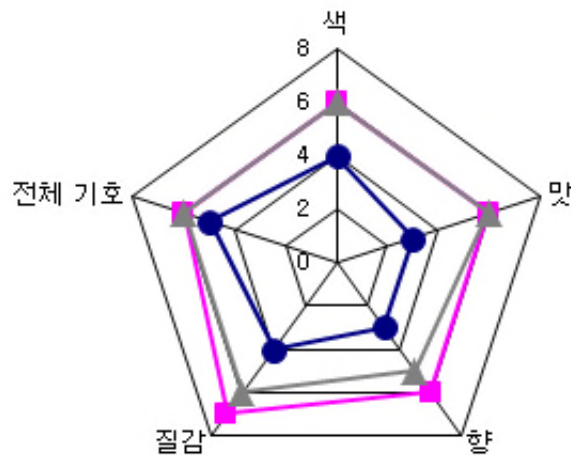


그림 9. hydrocolloids의 성분을 달리한 gluten-free빵의 기호도

○ 비록 적은 수의 학생대상이었지만 HPMC를 첨가하였을 때 관능검사에서 높은 점수를 얻는 것은 내부 조직이 부드럽게 되기 때문으로 생각된다. 이상의 실험에서 빵 제조시 검류를 현재는 낮은 수준에서 HPMC를 첨가하였음에도 충분한 부품성과 기호도를 보여, 최적의 비율을 찾는다면 수분 보유력이 증가하여 제품의 수분함량 증가, 경도 저하로 부드러움 개선, 부피증가 및 전분의 노화 지연 효과가 있어 제품의 품질과 저장성을 향상시킬 것으로 생각된다.

[글루텐에 의한 알레르기 반응 및 측정 시험법]

1. 식품 알레르기(food allergy)

- 히포크라테스가 우유는 어떤 사람에게 건강에 문제를 일으킬 수 있다고 지적한 이후 유럽에서는 1900년대 초에 음식알레르기 보고가 있었으며 1940년대에 전 세계의 의사들에게 음식알레르기가 알려짐. 음식 알레르기는 매우 가벼운 증상에서 생명을 위협할 정도로 다양함.
- 식품 알레르기란 식이 형태로 우리 몸에 들어온 음식물의 특정 물질에 대하여 면역계가과

민하게 반응하여 여러 가지 증상을 일으키는 것을 가리키며 천식, 가려움을 동반한 발진, 발열 등의 전신증상과 알레르기성 간장이완증후군으로 대표되는 신경증상, 설사, 복통, 구토 등의 소화기 장애 등 여러 방례가 나타난다.(IFT's Expert Panel on Food Safety and Nutrition. Food Allergen and Sensitivities. Food Technol 39:65-71(1985))

가장 가벼운 증상: 입이나 목구멍에 은근한 가려움증

기타증상

- 전신적 가려움증
- 피진, 발적이 때로는 전신에 발생
- 콧물이 줄줄 흐르거나 코나 눈이 가렵다.
- 구역, 구토
- 설사

심한 증상

생명을 위협하는 과민반응(Anaphylactic reaction) : 구강, 후두, 기관지에 부종이 생겨 호흡을 곤란하게해서 천명이나 의식소실도 일으킨다. 얼굴이 전반적으로 붓거나 전신적 두드러기가 생긴다. 이러한 때는 매우 응급상황이라고 말할 수 있으며 긴급조치가 필요.

1. 식품에 의한 알레르기 반응이나 알레르기 반응의 형태

- ㄱ. 식품 알레르기, 과민성, 예민성 : 보통 해가 없는 물질에 과도한 반응을 일으키는 신체의 면 역기관에 의한 면역반응으로 특정 식품에 항체(Ig E)를 생성함.
- ㄴ. 식품 불내성(Food intolerance) : 음식물이나 음식 첨가물에 신체적 반응이는 면역반 응이 필요한 것이 아니다.

유당(락토스)불내성 : 유당을 적당히 소화시킬 효소(lactase)가 부족할 때 생김

- ㄷ. 식품 아나필락시스(anaphylaxis) :때론 치명적인 극심한 알레르기반응이다. 처음엔 빨 강고 가려운 홍반이 생기고 따뜻한 기분이 들지만 어지럽고 숨쉬 기 힘들고 재채기, 배 와 자궁이 아프며 토하고 설사하며 혈압하강, 맥관부 종, 쇼크를 일으킬수 있는 위험한 반응임.

- ㄹ. 식중독 : 면역기관 기전에 의하지 않는 부작용 : 이는 독이나 박테리아 등 미생물, 기생충 같은 오염된 음식에 의해 생긴.
- ㅁ. 약리적 식품반응 (pharmacologic food reaction) : 음식이나 음식첨가물에 있는 화학물질이 약물같은 반응을 일으킨다. 즉 커피 속의 카페인을 안절부절감이 생긴다. 치즈의 타이라민, 초코렛의 페닐에칠아민 등은 두통을 일으킴.

2. 알레르기 반응을 일으키는 음식

- 1) 땅콩 2) 간장 3) 조개나 갑각류(작은 새우, 게) 4) 딸기류 5) 고추
- 6) 우유 단백질 **7) 밀(글루텐), 기타 곡물(밀, 옥수수, 호밀)**
- 8) 달걀 9) 대구 10) 바나나, 멜론 11) 두유
- 12) 기타

식품 알레르기는 증상이 약하게 시작하여 중증으로 발전할 수 있으며 먹는 양에 따라 달라질 수 있음. 그러나 조그만 양에도 극심한 증상이 나오는 경우도 있음.

식품 알레르기 반응은 대부분 단백질(분자량 12,000-70,000 dalton)이며, legumes류들이나 해산물 등은 가족 중의 한명이 알레르기 반응을 일으키면 다른 식구도 알레르기 반응을 일으킬 수 있다. 이를 교차반응(cross-reactivity)이라고 함.

땅콩에 알레르기 반응이 있는 사람은 호두보다 두유, 완두콩, 다른 레구먼 등에 알레르기 성이다. 그러나 특정한 사람은 호두나 땅콩 모두에 알레르기가 있는 사람도 있고, 동물성을 기본으로 한 식품류 내에서는 교차반응은 잘 보이지 않는다. 즉 우유에 알레르기가 있는 사람이라도 소고기를 먹을 수 있고 달걀에 알레르기가 있는 사람도 닭고기를 먹을 수 있음.

특정 음식물은 요리를 하면 알레르기 반응을 감소시키기도 하지만 항상 그런 것은 아니며 오히려 열을 가하면 어떤 단백질은 알레르기성이 유발되는 것도 있음.

우유는 2가지 단백질로 되어있다. 카세인(80%), 유장(whey 20%)이다. 이들 단백질은 열을 가해도 알레르기 성질이 없어지지 않는다. 달걀은 흰자 부분(ovalbumin)만이 알레르기성이 있고 요리나 가열해도 비알레르기성으로 되지않는다. 과일이 익어가는 자연현상도 식품 알레르기 성질에 영향을 주는데 도마토는 익으면 알레르기성이 됨.

- 특히, 식품 알러지 중 전 세계적으로 인류의 주식을 담당하고 있는 밀의 알레르기가 알려져 있다.(Rocher A, Soriano F, Molina E, Gonzalez-Limas G, Mendez E. Characterization of distinct α - and γ - type gliadins and low molecular weight components from wheat endosperm as celiac immunoreactive proteins. BBA. 1247-: 143-148(1995) ALF 알레르기는 기도를 경유한 항원자극으로 발생하여 천식이나 비염을 일으키는데, α -amylase inhibitor가 주요 알레르겐으로 동정(Kenny G, Denise-Anne MV. α -amylase contained in bread can induce food allergy. J. Allergy Clin. Immunol. 91: 343-349(1993), Bouer X, Czuppon AB. Allergy reaction after eating α -amylase(Asp-o-2)-containing bread. Allergy. 50: 85-87(1995))되어 있으며 경구섭취에서는 밀의 주요 단백질인 gluten eh 알레르기 증상을 일으키는 것으로 알려졌다. (Shon DH. The Food and Allergy. Food science and Industry. 33: 2-9(2000))
- 또한 예로부터 celiac disease 라는 매우 심한 위장 증상을 나타내는 질환이 알려져 있다. 밀을 비롯한 소맥류(밀, 보리, 귀리 등)를 섭취함으로써 이와 유사하게 발증하며, 특히 소장에서의 염증, 전반적인 흡수불량을 증상으로 한다.(Bushuk W.; Briggs, K. G.; SHEBESKI, L. H. Protein quantity and quality as factors in the evaluation of bread wheats. Canadian Journal of Plant Science, Ottawa, v. 49, p. 113-122, Mar. 1969.)

3. 식품에 의한 피부, 호흡기 반응

- 가장 흔한 피부작용은 두드러기이다. 피부가 빨갛고 가려우며 부풀어 오르기도 하며, 갑자기 생겼다 갑자기 사라지고 균발성으로 나타난다.
- 아토피 피부염에서는 때로 일시적이지만 대부분 만성으로 피부가 가려운 염증으로 발전한다. 많은 의사들은 유아들이 음식 알레르기 물질(우유)에 노출되거나 임신중이나 모유를 통해 노출되면 아토피성 피부염이 악화된다고 함.
- 코 알레르기는 고초열이라고도 부르며 알레르기 증상과 구강상부가 가렵고 재채기, 호흡 곤란, 눈 물등이 나올수 있다. 심한 경우 맥관부종으로 이행함. 천식은 식품 알레르기와 관계가 있을수 있다.

4. 위장관 반응

구토, 설사, 복부경련 등이 흔하게 생길수 있고 입주위에 붉은반점, 입과 목의 가려움과

부종, 구 역, 복통, 위부종, 가스가생긴다. 설사나 구토가 식품 알레르기에 가장 흔하며 유당 불내성은 성인 설사의 큰 원인이고 유아에서는 과일, 우유, 달걀흰자, 땅콩, 밀 등이 식품 알레르기를 일으키는 흔한 원인임.

5. 식품 첨가물에 의한 부작용

음식과 약물 염료로 사용하는 타트라진(tartrazine)은 아스피린 과민천식환자(사용가능한 약-아세 트아미노펜)에게 천식을 유발할 수 있다. 빨강과 노란 염료의 혼합색갈의 식품은 약물과 비슷한 효과를 나타내고 이러한 과민반응 아이들 에게는 더욱더 나빠질 수 있다. 중국 식당 증후군(chinese restaurant syndrome)이란 중국이나 일본의 식당에서 많이 사용하는 감미료 monosodium glutamate(MSG)를 과다하게 식품에 첨가하면 불안, 얼굴이 빨게지고 가슴의 압박감, 심장박동증가등을 느끼는 증상이 나오기도 함.

다른 보존제(BHT(butylate hydroxytoluene) /BHA(butylated hydroxyanisole)와 색소(노랑)은 성인 에서 만성 두드러기를 일으킬수 있다. 아황산염(sulfite)계통의 보존제는 식당에서 시들지 않게 샐러드위에 뿌리는 형태의 신선도를 유지 하는데 사용하거나 작은 새우, 버섯, 감자튀김, 말린 과일이나 포도주 같은 가공식품, 음료에서도 많이 사용된다. 규칙적인 약물요법이 필요한 성인 천식환자에서 아황산에 예민한 사람에서는 극심한 천식을 일으킬 수 있다. 이러한 반응은 두드러기, 속크나 죽음까지도 유발할 수 있다. 연구 보고에 의하면 이와 같은 음식물 보존제에 과민한 위험성은 모든 천식환자의 적어도 6% 정도임.

식품 과민성과 알레르기를 예방하는법 : 유아에서 우유를 회피하는 것이 음식알레르기 예방에대한 연구가 입증된 것은 아직 없다. 그러나 유아초기에 모유를 먹는 것이 어떤형태의 알레르기의 발생을 감소시키거나 지연시킬수 있다고 함.

6. 식품 알레르기 진단

식품알레르기 진단 방법

- 자세한 병력을 청취하고 이학적 검사

증상의 빈도, 계절성, 심한정도, 형태 등을 물어보고 음식을 먹고 반응이 올때까지의 시간을 알아야한다. 가족중에 식품 알레르기 있는지 확인(신체검사와 성장곡선 비교로 영양상태 확인, 습진, 비염,천식여부 확인)

- 음식 알레르기에 국한되어 도움이 될만한 음식일기를 작성

(먹은 종류, 양, 빈도수, 시간, 날짜, 증상, 요리된 식품의 재료, 생것여부, 색소, 향료사용여부 등 기록) 만약 먹은 음식이 한가지라면 어느기간동안 먹지 않도록해서 관찰해 본다. 만약 증상이 완화되면 다시 먹어서 증상이 생기는지 확인

- 알레르기 피부검사

알레르기를 일으키는 음식을 결정하는데 도움이 될 수 있으며 음식물 과민성 보다는 알레르기를 제거하는데 도움이 될 수 있다.

* 피부반응 검사 : 환자 등이나 팔에 음식에서 추출한 액체 일부를 놓고 바늘로 피부 표층을 통과 시킨다(단자시험). 식품에서 추출한 액체로 약간의 피부 표층에 상처를 낸다(소파검사)

만약 20분 이내에 팽진(부풀어남)이 생기면 양성반응이다. 새우, 계, 땅콩, 사과, 복숭아, 메밀 등에 서는 식품과 피부반응이 일치할 수 있다. 그러나 음식알레르기에서 이러한 피부반응검사는 일치하지 않는 경우가 많아 다른 알레르기 진단 방법만큼 유용하지 못함.

* 혈액검사(RAST 검사): 선택된 환자에서는 도움이 될 수 있지만 일반적으로 의심이 되는 음식의 제외나 유발 반응검사에는 도움이 되지 않음.

* Food cytotoxic blood test, sublingual provocation test: FDA에서 음식알레르기에 대한 검사로 입증되지 않았으므로 추천되지 않는다. 이러한 여러 검사에도 잘 알지 못할 때는 철저한 감시 하에 병원에서 의심되는 식품이나 식품첨가제를 투여해 봄.

○ 밀에는 몸에 이상을 동반하는 allergen으로 작용하는 문제(celiac disease)를 유발하고 있어 gluten-free식품이 건강식품을 넘어 혹은 건강식품의 범주로서 그리고 건강식품으로도 각광을 받고 있어 실제로 celiac 환자들 뿐만 아니라 일반일들에게도 많은 호응속에서 gluten-free가 식품산업의 중요한 이슈로 자리매김하고 있다. 따라서 우리에게 쌀을 주식으로 하는, gluten-free소재로서 아주 우수한 가능성이 있어 이를 산업적으로 확대하기 위해 노력이 필요함.

○ 현재 밀에 들어 있는 gluten을 바라보는 시각이 celiac disease의 allergen으로 바라보는 시각이 많은 것은 사실이다. 따라서 gluten을 정량하는 방법에서 ppm단위까지 매우 정밀하게 특히 allergen으로 작용하는 정도(limitation)까지를 요구하고 있어 미량측정법이 많이 개발되어 지고 있다. 한편으로는 gluten은 빵에 풍부한 향과 부드러움 그리고 질감을 내는데 있어 매우 중요한 단백질로서 작용하고 있다. 따라서 함량에 따라 다양한 용도가 개발되어지고

- 또한 예로부터 celiac disease 라는 매우 심한 위장 증상을 나타내는 질환이 알려져 있다. 밀을 비롯한 소맥류(밀, 보리, 귀리 등)를 섭취함으로써 이와 유사하게 발증하며, 특히 소장에서의 염증, 전반적인 흡수불량을 증상으로 한다.(Bushuk W.; Briggs, K. G.; SHEBESKI, L. H. Protein quantity and quality as factors in the evaluation of bread wheats. Canadian Journal of Plant Science, Ottawa, v. 49, p. 113-122, Mar. 1969.)
- Celiac disease (CD)는 식용 gluten에 의한 만성위장염증반응인 비정상적인 면역반응의 일종이다. 평생동안 gluten-free식을 요구한다.
- 밀 의존형 운동에 의해 유발되는 알레르기 병증의 진단을 위한 제조합 ω -5 gliadin-특이적인 IgE 의 감도와 특이성: 밀 의존형 운동에 의해 유발되는 알레르기 병증은 운동전에 혈압상승, 호흡곤란, 일반적 두드러기같은 알러지반응을 일으키는 밀을 섭취를 통해 발생하는 알러지의 심각한 형태. 밀 의존형 운동에 의해 유발되는 알레르기 병증을 나타내는 환자는 밀가루에 들어있는 단백질에 Ig E항체를 가지고 있고, 증세는 type I 알러지 반응에 의해 발생.
- 밀 의존형 운동에 의해 유발되는 알레르기 병증에서 운동에 의해 유도된 염증 증상의 machanism 은 운동이 장관으로부터 혈류로 allergen 흡수를 촉진하는 것으로 추측. 밀 의존형 운동에 의해 유발되는 알레르기 병증에 대한 가장 신뢰할만한 처치법은 밀제품을 확실하게 금지하거나, 밀 섭취 후 운동의 제한이다. 따라서 밀 섭취 후 이어지는 운동에 의한 자극시험에 의해 확실한 진단을 하는 것이 매우 중요하다. 그러나 이러한 직접적인 자극시험은 심각한 알러지 쇼크같은 심각한 알러지반응 위험을 내포하고 있다. Sampson et al 등은 달걀, 우유, 땅콩, 그리고 물고기 알러지에 대한 의학적 반응을 예측하는데 식품에 특이적인 Ig E의 serum 농도를 측정하는 방법이 유용하다고 제시함.

2. gluten 측정법 (산업적 수준)

- 현재 국내에서 식품공전상에 gluten을 측정하는 방법은 등록되어 있지 않다. 아직까지 국내에서 gluten을 측정하여 사회적으로 문제가 되지 않기 때문이지만 향후 국외로 gluten-free식품을 수출하기 위해서는 측정법과 교차오염에서 오는 미세한 함량까지 측정이 되어야 할것으로 봄.
- gluten을 측정하는 데에는 gluten이 들어있는 곡물에서 gluten을 형성시켜 이를 전체함량에서 측정하는 방법하고 celiac disease를 측정하는 측면에서는 미량의 gliadin을 검출하

는 것으로서 측정법을 개발하고 있다. 따라서 gluten을 측정하는 방법은 크게 2가지로 나뉜다.

○ Gluten Hand Wash method (AACC Method 38-10)

측정방법은 25g 밀가루 + 약 15ml 증류수를 붙고 스푼을 이용하여 밀가루 반죽이나 볼을 만든다. 단 밀가루 볼을 만드는 과정중에 스푼에 밀가루가 묻지 않아야 함. 2. 약 60GG 규격의 천 시브위에 밀가루 반죽을 놓고 수돗물을 흘려보내 가용성 성분들이 모두 빠져나갈 때 까지 놔둔다. 약 12분정도 실시. 3. gluten이 전분이 완전히 제거되었는지를 확인하는 방법은 gluten을 짚어봐서 1-2 방울을 투명한 비이커에 떨어뜨려 봐서 완전히 투명한 액이 되어야 제거된 것이다. 액중에 전분이 남아 있으면 불투명한 색으로 나타난다.

4. 물에 1시간동안 gluten을 놔둔다. 가능한 한 수준으로 손으로 짰 다음, ball형태로 만들어, 미리 무게를 잰 바닥이 평평한 그릇에서 무게를 잰다.(이를 wet-gluten이라 함)

5. 이것을 오픈으로 옮겨 100°C, 24시간정도 유지시켜 항중량이 될 때까지 건조시킨다. 그리고 이것을 dry gluten이라 칭함.

Note : 실제 조 gluten 은 순수한 단백질로만 구성되어 있지 않으며, 지질, 탄수화물(전분) 그리고 ash 등이 들어 있다.

$$\frac{\text{Gluten(g)}}{\text{Flour sample(g)}} \times 100\% = \% \text{ gluten}$$

AACC (1995) Approved Methods of the AACC, 9th ed. Method 02-52: pH and TTA determinations. American Association of Cereal Chemists. St. Paul, M.N.

○ wet-gluten함량의 측정 젓은 글루텐 함량은 Glutomatic 2200과 Gluten Index Centrifuge 2015(Perten Instruments AB, Huddinge, Sweden) 를 사용하여 AACC 방법(38-12)에 따라 측정



그림 글루텐 함량 분석용 Glutomatic 장비

- 밀가루 각 시료의 글루텐 측정은 Glutomatic(Glutomatic 2100, Falling Number, Stockholm, Sweden)을 이용하여 AACC방법 54-40A(2000)에 따라 각각의 시료 10 g 을 취하고, 측정용 챔버에 옮긴 후 2% NaCl 4.8 mL을 챔버에 분사한 후 자동으로 20 초 동안 반죽혼합하고 5분 동안 세척하여 분리된 글루텐의 양을 측정(AACC. 2000. Approved method of the AACC. 10th ed, Method 08-01. 38-10. 46-12. 54-40A American Association of Cereal Chemists, St. Paul, Minn. USA.)

- 미량의 gluten 측정법

표. Comparison of τ -gliadin enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) and R5 ELISA aQQPFP glutamine-glutamine-proline-phenylalanine-proline; bAOAC Association of Analytical Communities; ppm parts per million (4,7,8,10,11,13,15-19,21-23).

	ω-Gliadin ELISA	R5 ELISA
What it measures	Monoclonal antibody to ω -gliadin fraction of wheat gliadin	R5 monoclonal antibody to epitope QQPFPA, which is present in all fractions of wheat gliadin, barley hordein, and rye secalin
Limit of quantification	150 ppm gluten (official AOAC ^b method); high-sensitivity versions available	5 ppm ^c gluten
Intended use	To assess gluten content of heated and unheated foods	To assess gluten content of heated and unheated foods
Method of extraction	40% ethanol	Cocktail (mixture of extraction compounds)
Strengths	ω -Gliadin fraction not denatured when heated Can assess gluten content of native and heated proteins	QQPFPA resistant to heat Can assess gluten content of native and heated proteins Recognizes all fractions of wheat gliadin, barley hordein, and rye secalin
Drawbacks	Underestimates barley prolamins content in barley-contaminated foods Cannot quantify gluten that has been hydrolyzed May over- or underestimate gluten content, depending on gliadin standard used	Overestimates barley prolamins content in barley-contaminated foods (when Prolamin Working Group gliadin standard used) Cannot quantify gluten that has been hydrolyzed

A native or heated protein containing the celiac-toxic epitope QQPFPA (with "a" representing other amino acids) might appear as:

QQPFPAaaaaaaQQPFPAaaaaaaQQPFPAaaaaaaQQPFPAaaaaaaQQPFPAaaaaaaQQPFPA

Hydrolysis breaks the protein into fragments, such as:

QQPFPAaaaaaaQQPFPAa	aaaaaaQQPFPAa	aaaaQQPFPAaaa	aaaQQPFPAaaaaaaQQPFPA
sandwich R5 ELISA Can measure	sandwich R5 ELISA Can not measure	sandwich R5ELISA Can not measure	sandwich R5 ELISA Can measure

Because the sandwich R5 ELISA requires two celiac toxic epitopes for binding, not all fragments will be measured

Figure 2. Why a sandwich enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) (gliadin or R5) cannot be used to assess the gluten content of hydrolyzed foods and ingredients.

Method	Accuracy of results
ω -Gliadin ELISA ^a	Barley content underestimated; cross-reactivity of this assay 4%-8% for barley
Sandwich R5 ELISA using gliadin standard and multiplying results by a factor of 2 (standard protocol)	Barley content overestimated by a factor of 2.4 to 2.6
Sandwich R5 ELISA using a gliadin standard and not multiplying the results by 2	Barley content overestimated by a factor of 1.2 to 1.3
Sandwich R5 ELISA using a hordein standard	Barley content accurately measured

⌘. Assessing the gluten content in foods contaminated with barley only using various methods of analysis. aELISAenzyme-linked immunosorbent assay (9,26).

J Am Diet Assoc. 2008;108:1682-1687. Commercial Assays to Assess Gluten Content of Gluten-Free Foods: Why They Are Not Created Equal

Competitive indirect enzyme linked immunosorbent assay(Ci-ELISA)

- Gliadin의 항원성 변화를 알아보기 위해 Lee 등(25)의 방법을 변형하여 Ci-ELISA를 실시하였다. 0.2 M bicarbonate coating buffer(pH 9.6)를 이용하여 gliadin을 일정 농도로 희석한 뒤, costar 96-well flat bottom plate(469957; Nunc, Kamstrupvej, Denmark)의 well에 100 μ L씩 분주. 4°C에서 하룻밤 동안 coating 시킨 후 비특이적인 반응을 막기 위해 1% gelatin 용액으로 blocking 하였다. 0.01 M PBS(phosphate buffered saline, pH 7.3)를 이용하여 anti-gliadin IgG는 64 μ g/mL 농도로 희석하여 항원과 항체를 각각 50 μ L씩 분주하여 반응시켰다.
- 2차 항체(anti-rabbit IgG: 1:30,000)를 넣은 다음 OPD(o-phenylenediamine, Sigma-Aldrich Co.) 용액으로 발색시켰다. 그 후 2 M H₂SO₄로 반응을 중지시켜 ELISA reader(Model 550, Bio-Rad, Hercules, CA, USA)의 490 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다. 각 단계별 반응 조건은 37°C에서 2시간이며 각 단계가 끝날 때마다 0.01 M PBST[phosphate buffered saline containing 0.1% tween 20(v/v)]용액으로 4회씩 수세함. (Lee JW, Park JH, Kim SB, Kim CJ, Hyun CK, Shin HK. 1998. Application of competitive indirect enzyme-linked immunosorbent assay (ci-ELISA) for monitoring the degree of denaturation of bovine myosin. Int J Food Sci Technol 33: 401-410.)

식품에 오염된 gluten의 측정방법(미량 측정법)

- gluten-free식품에서 gluten오염은 완전히 피할 수는 없을 뿐 아니라, gluten 에 대한 안전한 threshold은 아직 논란이 많은 상태다. 독성이 있는 gluten 항원을 검출하는 한 가지 방법은 ELISA를 이용하는 방법인데, 식품에 들어 있는 면역에 독성이 있는 peptides에 특이적인 단일항체클론(monoclonal antibodies (MAB))를 이용하는 방법.
- 이 방법은 민감도가 매우높고, 특이적이며 재생이 가능한 것이 특징이다. 그러나 이러한 방법은 사용되는 MAB나 이 MAB에 타깃이 되는 단일 peptide나 전체 단백질에 따라 달라진다는 점이다. 일부 상업적 kit들이 밀이나 호밀에는 있으나 보리에는 존재하지 않는 u-gliadin에 대한 항체를 사용하고 있기도 한다. (62 Skerritt JH and Hill AS. Enzyme immunoassay for determination of gluten in foods: collaborative study. J Assoc Off Anal Chem, 74, 257-264, 1991.)
- Valdes et al.는 밀, 보리 그리고 호밀의 prolamins을 타깃으로 하는 항체를 사용하였다. (63 Valdés I, García E, Llorente M and Méndez E. Innovative approach to

low-level gluten determination in foods using a novel sandwich enzyme-linked immunosorbent assay protocol. *Eur J Gastroenterol Hepatol*, 15(5), 465-747, 2003.) 이 연구에서, 그들은 gliadin을 1.56 ppm, gluten을 3.2 ppm의 수준까지 정량화 할수 있었다.

- 다른 kit들도 gliadins, hordeins, secalins을 3가지의 MAB를 혼합하는 방식을 사용하여 같은 범위로 검출하였다. (64 Sorellb L, López JA, Valdésa I, Alfonso P, Camafeitaa E, Acevedob B, Chirdoc F, Gavilondob J and Méndeza E. An innovative sandwich ELISA system based on an antibody cocktail for gluten analysis. *FEBS Lett*, 439(1-2), 46-50, 1998.) 또 다른 문제는 MAB들이 B-cell 항원을 타겟으로 한다는 사실이다.
- Celiac disease가 T-cell과의 반응의 결과로 발생하는 것이기 때문에 Spaenij-Dekking et al는 α - 와 γ -gliadin의 T-cell 항원을 검출이 가능한 면역혈청을 개발하였다.(53 Spaenij-Dekking EH, Kooy-Winkelaar EM, Nieuwenhuizen WF et al. A novel and sensitive method for the detection of T cell stimulatory epitopes of alpha/beta- and gamma-gliadin. *Gut*, 53, 1267-1273, 2004.) gluten 정량은 타겟하는 식품에 따라서나, 시험하는 식품에 독성이 있는 항원에 의존하기때문에 사용되는 방법이 완벽하게 정확하지는 않을 수도 있다. glutenin을 시험하는 방법이 새롭게 개발될 것으로 예측.

1. Kidd JM, Cohen SH, Sosman AJ, FinkJN. Food-dependent exercise-inducedanaphylaxis. *J Allergy Clin Immunol*1983;71:407-411.
2. Palosuo K. Update on wheat hypersen-sitivity. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*2003;3:205-209.
3. Matsuo H, Morimoto K, Akaki T,Kaneko S, Kusatake K, Kuroda T et al.Exercise and aspirin increase levels ofcirculating gliadin peptides in patientswith wheat-dependent exercise-inducedanaphylaxis. *Clin Exp Allergy*2005;35:461-466.
4. Kozai H, Yano H, Matsuda T, Kato Y.Wheat-dependent exercise-induced ana-phyllaxis in mice is caused by gliadin andglutenin treatments. *Immunol Lett*2006;102:83-90
5. Sampson HA. Utility of food-specificIgE concentrations in predicting symp-tomatic food allergy. *J Allergy ClinImmunol* 2001;107:891-896.
6. Matsuo H, Morita E, Tatham AS,Morimoto K, Horikawa T, Osuna Het al. Identification of the IgE-bindingepitope in x-5 gliadin, a major allergenin

- wheat-dependent exercise-induced anaphylaxis. *J Biol Chem* 2004;279:12135-12140.
7. Palosuo K, Alenius H, Varjonen E, Koivuluhta M, Mikkola J, Keskinen H et al. A novel wheat gliadin as a cause of exercise-induced anaphylaxis. *J Allergy Clin Immunol* 1999;103:912-917.
 8. Matsuo H, Kohno K, Niihara H, Morita E. Specific IgE determination to epitope peptides of α -5 gliadin and high molecular weight glutenin subunit is a useful tool for diagnosis of wheat-dependent exercise-induced anaphylaxis. *J Immunol* 2005;175:8116-8122.
 9. Matsuo H, Kohno K, Morita E. Molecular cloning, recombinant expression and IgE-binding epitope of α -5 gliadin, a major allergen in wheat-dependent exercise-induced anaphylaxis. *FEBS J* 2005;272:4431-4438.
 10. Battais F, Mothes T, Moneret-Vautrin DA, Pineau F, Kanny G, Popineau Y et al. Identification of IgE-binding epitopes on gliadins for patients with food allergy to wheat. *Allergy* 2005;60:815-821.
 11. Morita E, Kameyoshi Y, Mihara S, Hiragun T, Yamamoto S. γ -Gliadin: a presumptive allergen causing wheat-dependent exercise-induced anaphylaxis. *Br J Dermatol* 2001;145:182-184.
 12. Morita E, Yamamura Y, Mihara S, Kameyoshi Y, Yamamoto S. Food-dependent exercise-induced anaphylaxis: a report of two cases and determination of wheat- γ -gliadin as the presumptive allergen. *Br J Dermatol* 2000;143:1059-1063.
 13. Sampson HA. Food allergy - accurately identifying clinical reactivity. *Allergy* 2005;60 (Suppl. 79):19-24.
 14. Daengsuwan T, Palosuo K, Phankingthongkum S, Visitsunthorn N, Jirapongsananuruk O, Alenius H et al. IgE antibodies to α -5 gliadin in children with wheat-induced anaphylaxis. *Allergy* 2005;60:506-509.
 15. Palosuo K, Varjonen E, Kekki OM, Klemola T, Kalkkinen N, Alenius H et al. Wheat α -5 gliadin is a major allergen in children with immediate allergy to ingested wheat. *J Allergy Clin Immunol* 2001;108:634-638

[2차년도]

1. 빵류 제조에 사용되는 글루텐 프리 발효기술의 조사

서론

- 소비자들은 사회가 발전함에 따라 보다 나은 삶을 위해 소비활동에 있어서 웰빙(well-being)을 지향하고 있다. 특히 경제 성장과 기술 발전에 따라 식품 섭취의 목적이 단순한 생명유지에서 보다 복잡하고 다양한 형태로 변해가고 있다. 즉, 과거의 생존과 배고픔을 해결하기 위한 측면에서 개인의 정신적 만족, 건강 증진과 같은 측면이 점차 강조되고 있는 것임.
- 웰빙식품과 비웰빙식품을 구분하는 명확한 기준은 없으나, 곽창근·장종근(2008)은 유기농 식품과 화학첨가물을 넣지 않은 신선편의식품을 웰빙식품의 범주로 정의하였으며, 한성희(2010)는 선행연구들을 바탕으로 웰빙식품의 범주를 친환경식품, 웰빙을 지향하는 식품 및 건강기능성 식품으로 구분하였다. 웰빙식품의 등장은 안전하고 건강에 도움이 되는 식품개발을 촉구하는 다양한 소비자들의 요구에 기인한 결과로써, 최근 새롭게 각광받고 있는 글루텐프리(Gluten-free)식품 또한 이에 해당.
- gluten-free가 국내에서는 시장이 형성되어지는 단계이지만 서구유럽에서는 Celiac disease 환자가 전체 빵을 주식으로 하는 인구의 1%에 달하고 있으며 이들과 유사한 증상을 보이는 환자가 10%에 달한다는 보고가 있다. 글루텐프리식품은 밀가루에 포함된 ‘글루텐(Gluten)’이라는 성분에 알러지 반응을 보이는 특정 소비자들을 위한 식품이다. 최근에 이 식품 및 음료에 대한 수요가 글루텐 알러지 환자와 상관없이 늘어나고 있다. 미국 국가생물공학센터(National Center for Biotechnology Information)¹⁾에 따르면, 글루텐 관련 알러지를 앓고 있는 환자는 미국 전체 인구의 0.5~1%로 인구 133명 당 1명에 불과하다. 그럼에도 불구하고 미국의 글루텐프리식품 및 음료 시장은 2008~2012년간 연평균 복합성장률(Compound Annual Growth Rate, CAGR) 28%의 성장을 기록(Packaged Facts, 2012).
- 이러한 글루텐프리식품 시장의 성장은 미국뿐만 아니라 전 세계적으로 나타나고 있다. 유럽의 시장조사기관 ‘유로모니터 인터내셔널’의 2011년 보도자료에 의하면,²⁾ 경제 불황에도 불구하고 2009년에 글루텐프리식품은 전 세계적으로 약 23억 달러의 매출액을 기록하여 전년 대비 11% 성장한 것으로 나타났다. 이는 같은 시기에 전체 건강 및 웰빙식품의 3%

성장과 비교할 때 주목할 만한 수치라고 할 수 있다. 이러한 상황에 맞추어 최근 국내에서도 글루텐프리식품에 대한 표시기준이 고시되고, 이에 따라 글루텐프리식품의 개발과 판매가 이루어지고 있다. 그러나 아직까지 글루텐프리식품의 종류나 판매량은 미미한 수준임.

- 글루텐 프리 식품 소비자는 35%가 건강을 위해 27%가 다이어트를 위해, 21%가 탄수화물 섭취를 줄이기 위한 목적임. 또한, 글루텐에 과민반응을 보이는 가족이 있는 소비자는 15%에 달하며, 미셸 오바마 여사가 ‘건강 식단’ 캠페인을 벌이면서, 최근 미국의 소비자는 다이어트와 체력 증진을 위해 글루텐을 먹지 않는 것이 유행하였다. 미국의 의사가 원인 불명의 질병을 치료하기 위해 환자에게 글루텐 프리 식단을 도입을 권유하기도 함.
- 현재까지 글루텐프리식품과 관련된 연구는 주로 식품공학분야에 한정되어 있는데, 이영택·박영서(2009), 최윤희 외(2012), 강태영 외(2013), 김유진 외(2013)와 같이 식품제조공정, 품질 개선, 신제품 개발 등 글루텐프리제품 성분 개선에 관한 연구가 주로 이루어져 왔음.
- 본 review에서는 gluten-free를 이루는 제품들의 경향과 기술적 도달과정을 살펴보고자 한다. 이를 통해 현재까지의 기술적 성공과 기술에 이르는 문제점

I. 글루텐프리식품 현황

1. 글루텐프리식품 정의

- 글루텐프리식품은 셀리악병 및 글루텐 알러지를 가진 소비자를 대상으로 만들어진 대체식품이라 할 수 있다. 이 식품에 대한 기준은 국가별로 다소 차이가 있는 상황이나, 일반적으로 제조과정에 있어서 밀의 전분입자와 유사한 글루텐프리 전분을 사용하여 글루텐 성분량을 일정 수준 이하로 낮춘 식품으로 정의할 수 있다. 또한 글루텐 성분이 전혀 없는 쌀가루로 제조된 식품 역시 글루텐프리식품에 포함된다. 글루텐프리 전분은 고도의 정제과정을 거쳐 글루텐 성분을 낮추기 때문에 일반식품에 비해 상대적으로 제조비용이 상승하게 됨.
- 글루텐은 밀과 호밀, 보리 등에서 자연적으로 생성되는 불용성 단백질로, 밀가루 반죽을 쫄깃하게 하고 빵을 만들 때 부풀어 오르게 하는 등의 역할을 한다(한국식품과학회, 2008). 또한 발효과정에서 발생하는 가스나 수분이 새어나지 않게 막아주어 빵·과자의 조직과 식감을 좋게 하는 역할을 한다. 글루텐은 밀, 호밀, 보리 등에 주로 들어있는 성분이기 때문에, 밀가루, 빵, 쿠키, 맥주, 시럽, 시리얼 그리고 파스타와 같은 식품이 주된 글루텐프리식품의 대상이 됨.

- 현재까지 국내에서 셀리악 유병률이나 환자 수에 대한 공식적인 자료는 발표되지 않고 있다. 다만 셀리악병은 인종 간 유전적 차이로 유럽 및 북미 지역이 아시아 지역보다 발병률이 높다고 여겨져 왔으나, 최근에 와서 유전적 요인뿐만 아니라 밀의 소비 증가와 민족 간 이동 등의 요인이 영향을 미친다는 연구결과가 발표되고 있음.
- Cataldo and Montalto(2007)와 Cummins and Roberts- Thomson (2009) 등은 쌀 위주의 식단에서 밀 함유량이 높은 서구 식단으로 변화할수록 셀리악병의 발병 가능성이 높아진다고 제시하였으며, 이에 따라 중국·인도 등 아시아 지역에서의 발병률 또한 높아질 가능성을 주장하였다. 이러한 연구결과를 바탕으로 했을 때, 국내에서도 식단의 서구화가 진행됨에 따라 셀리악병의 발병 가능성이 점차 증가할 것으로 예측해볼 수 있으나 아직 셀리악 질병에 대한 국내보고는 없는 상황임. 그러나 국내 식품뿐 아니라 해외의 셀리악병 환자들을 대상으로 하는 셀리악병에 안전한 식품을 개발하여 시장을 확대하고 국내의 소재를 활용하는 방법이 새로운 식품분야로 확대되고 있어 우리에게 기대감을 불러넣고 있으며, 국내에 환자들은 없자만 세계의 조류에 따라서 국내에서도 유행의 가능성 있어 이에 대한 조사가 필요함.

2. 셀리악 병

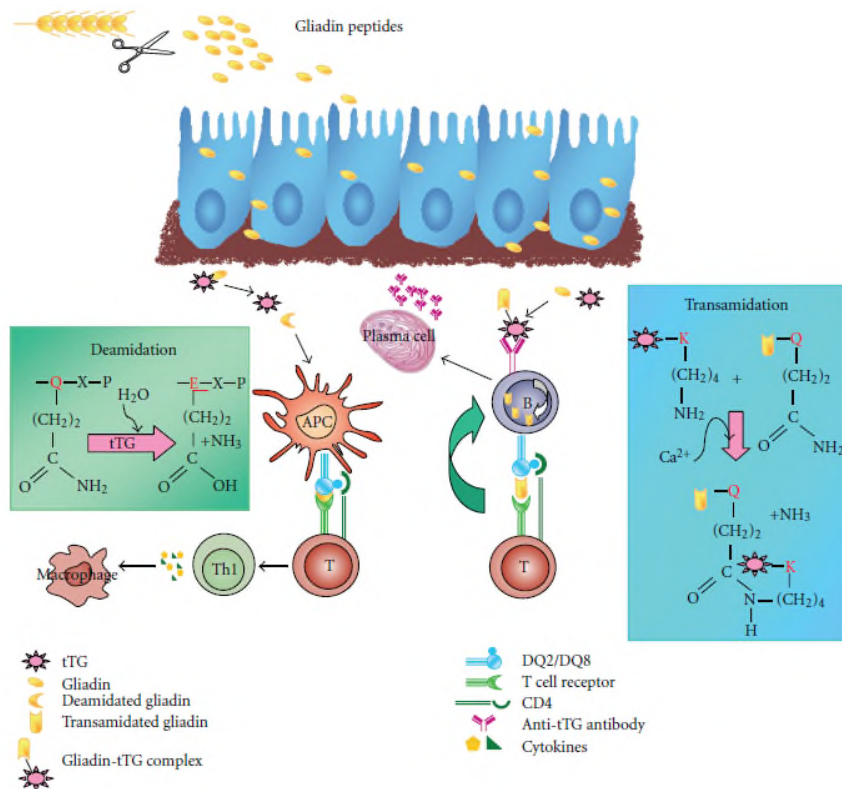
정의

- 셀리악병이란 소장에서 일어나는 알레르기 질환으로, 장 내의 영양분 흡수를 저해하는 글루텐에 대한 감수성이 일어남으로써 증세가 나타나는 질병이다. 셀리악병은 유전되는 것으로 알려져 있고, 자가면역 질환이며 모든 연령에서 발병할 수 있다. 대부분 생후 2주의 유아에서부터 1년 정도의 어린이에게서 글루텐 섭취를 시작하면서 나타나며, 드물게는 성인이 된 후에 처음 나타나는 경우도 있음.

원인

- 대부분의 곡물에 들어 있는 단백질인 글루텐에 대한 감수성이 생겨 일어나는 것으로 선천적인 자가면역 질환이다. 글루텐이란 밀, 보리, 호밀, 귀리 등의 곡물에 함유되어 있는 단백질을 말하는데 대부분의 사람들은 특별한 문제 없이 글루텐을 소화한다.
- 그러나 셀리악병에서는 글루텐이 위장관에서 면역반응을 일으켜 소화기관 점막세포에 염증이 생겨 융모(villi)가 손상되며, 융모는 소화기관의 점막에 손가락 모양으로 돌출되어 있는 구조물로, 영양분을 흡수하는 데 중요한 역할을 하는데 이러한 융모가 손상되면 소화기관은 영양분을 흡수할 수 없게 되어 영양실조에 걸립니다. 셀리악병은 유전적 소인을 가지고 있

는 사람에서 수술이나 임신 및 출산, 바이러스 감염, 심한 정신적인 스트레스와 같은 유발 요인에 의해 발병하는 것으로 추정하고 있음.



증상

- 셀리악병의 증상과 심한 정도는 사람마다 매우 다양한데, 셀리악병을 앓고 있더라도 증상이 매우 경미해 진단되지 않을 수도 있고, 다른 소화기관의 질병으로 잘못 진단되는 경우도 있음. 증상은 밀가루 음식을 먹기 시작한 유아의 경우에 체중감소 또는 체중증가가 서서히 나타나며, 식욕저하가 일어난다. 배설물은 주로 설사를 많이 하는데, 색이 옅으며 양이 많고 나쁜 냄새가 나며 자주 방귀를 뀌니다. 또한 배가 부풀어 오르거나 통증이 있어 많이 보채며, 성장장애나 성장지연이 있을 수 있다.
- 어른 환자에서 나타나는 주요한 증상은 만성 설사, 냄새가 심하고 색이 옅으면서 매끈거리는 대변, 냄새가 지독한 방귀, 자주 재발하는 복부 팽만감. 체중감소, 피곤함, 불임이나 생리불순, 우울한 감정, 기분변화, 몸의 균형을 잡기가 힘들어짐, 발작, 두통, 다리가 저리거나 찌릿거리는 증상과 같은 신경학적 증상들, 가렵고 아픈 피부 발진, 입안에 궤양, 빈혈이나 비타민 결핍증이 나타남.



【 설사 】

진단

- 증상들에 대한 자가진단으로 이상여부를 관찰하고, 혈액에 특정 항체(gliadin, endomysial, transglutaminase에 대한 항체)가 있는지 확인하는 검사가 셀리악병 진단에 이용됩니다. 이러한 항체들은 정상인에서는 거의 발견되지 않지만 셀리악병 환자의 대부분에서 발견되고 있어 진단에 용이합니다. 또한 셀리악병이 의심되면 소화기관 점막의 조직검사를 시행할 수도 있습니다. 조직검사는 상부위장관내시경 시술로 소화기관 점막의 일부를 떼어 내서 현미경으로 관찰하는데 소화기관 점막의 용모가 파괴되어 정상에 비해 점막이 평평해진 것을 확인할 수 있음.

치료

- 효과적인 치료법은 우선 글루텐이 함유된 음식을 중단하는 것인데 2~3주 정도면 증상이 호전되기 시작하며, 수개월 이내에 장의 염증도 치료된다. 그 다음에는 영양실조로 인한 빈혈 치료를 위해 철 및 엽산 함유 제제나 칼슘과 복합 비타민 함유 제제 등을 복용한다. 만일 글루텐 제거 식이만으로 증상이 호전되지 않거나 장의 염증이 매우 심한 경우라면 장의 염증을 줄이기 위하여 스테로이드제와 같은 약물을 복용할 수 있음. 현재까지의 gluten 불내성 환자에 대한 약물치료가 불가능한 상태다. 사회적 비용이 들어가더라도, 장기간에 걸쳐 gluten-free 식이가 가장 안전하고 효과적인 처치임. gluten-free 식이에 접근하는 것은 감지할수 있는 삶의 질에 심각한 부정적 영향끼칠수 있고, 심리적, 감정적 그리고 경제적 스트레스를 만들 수 있으며, 더 나아가 식이조건을 지키기 위한 조건으로 식이로부터 밀, 호밀, 보리를 배제시키는 것이 매우 어려운 일이며 이것들은 임.
- 장기간에 걸친 gluten-free 식이는 우편용품, 립스틱같은 화장품, 일부 약물을 포함하는 것은 물론 간장이나 맥주같은 비 전분성 식품에도 들어있을수 있어 매우 어려운 상황임. 셀

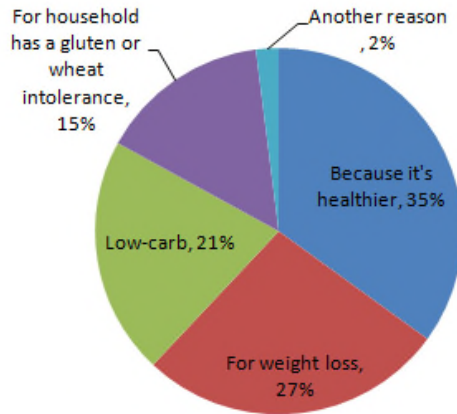
리악환자는 쉽게 gluten에 노출될수 있고, gluten 회피의 수년후에도 gliadin에 면역력을 얻을수 없고, 항원에 노출은 다시 재발하게 되어 매우 어려움. 식용 gluten의 제거에 따라 도 2-5%의 셀리악환자는 의학적으로 향상이 어렵다. 이를 불응성 셀리악병이라 칭하며, T-cell 림프종과 연관된 심각한 장질환을 일으킬수 있는 심각한 위험성을 내포하고 있음.

- 2000년 국제식품규격위원회와 FAO는 밀이나 spelt, kamut, durum 밀, 보리, 호밀, 귀리 그리고 이들의 잡종들로부터 prolamine을 함유한 gluten 함량이 20 ppm이 넘지 말아야 한다고 gluten-free식품에 대하여 규정함. 현재 gluten-free식품은 매우 비싸게 판매되고 맛이 떨어지고 보존기간이 짧아 일반적이지 않게 유통되고 있음. 현재의 R&D는 gluten-free식품의 맛, 향, 물성의 개량에 집중하고 있음. gluten은 밀가루 도우의 대부분의 점탄성에 기여하고 있어 이것이 없을 때 빵은 깨지는 물성, 나쁜 색조, 대부분의 빵을 제조한 후에 나쁜 효과를 보임. 이런 이유로 인해, 일반적 생활과는 배치되는 안전하고 효과적인 gluten-free 식이에 대한 대체법을 찾고 있으며, 이점이 매우 중요함. gliadin과 유사한 길항작용이 나타나도록 조작할수 있는 gliadin peptide 유사체로 33개의 peptide로 이루어진 T-세포 자극 gliadin 서열체의 동정한 것이 매우 중요한 사실임.

3. Gluten free 시장 현황

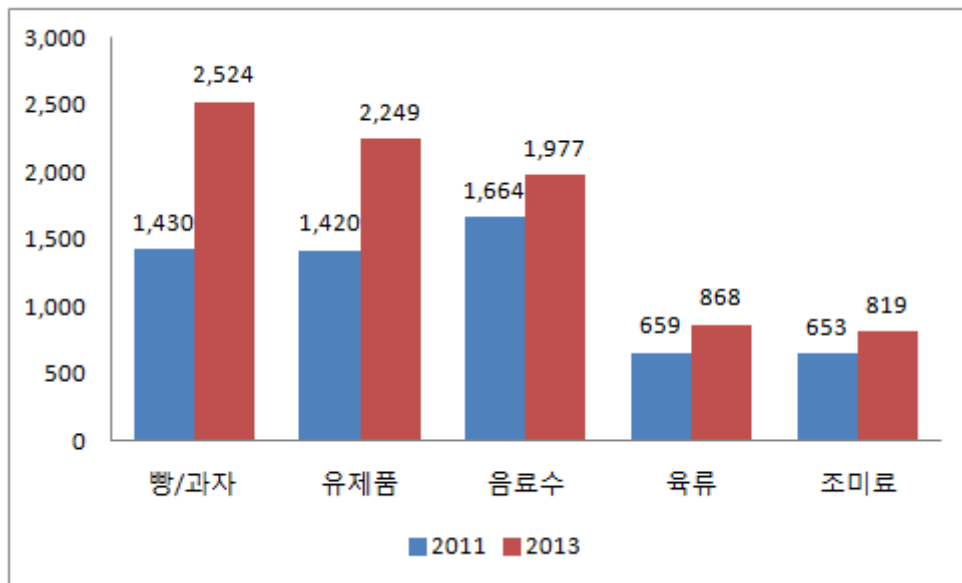
가. 미국시장

- 미국 식품의약국(FDA)에서는 2013년 8월부터 1년간 식품업체가 글루텐프리 표시제를 자발적으로 준수할 수 있도록 유예기간을 제공하였으며, 2014년 8월부터 의무적으로 적용되는 글루텐프리 통합기준을 발표하였다.3) 이 기준에 따르면, 글루텐 함량이 20ppm 이하일 경우 ‘글루텐프리’ 표기를 허용하도록 하였는데, 생산자 및 판매자는 ‘gluten-free’, ‘free of gluten’, ‘without gluten’, ‘no gluten’으로 표시할 수 있음.
- 2014년 기준 전 세계 글루텐프리식품시장 가운데 미국 글루텐프리식품시장이 약 59%를 차지하고 있는 것으로 나타났다(KOTRA, 2014). 미국 글루텐프리식품시장은 2011년도에서 2013년도 사이에 약 69% 가량 성장하였으며, 2014년도 예상 매출규모가 121억 달러 규모에 달하고, 2016년에는 약 156억 달러로 성장할 것으로 전망되고 있다(Statista, 2014). 같은 자료에 따르면, 2013년 미국의 글루텐프리식품 세부품목별 매출규모 상위품목들은 빵·과자(25억 달러), 유제품(22억 달러), 음료수(19억 달러)로 나타났다.



글루텐 프리 식품 선호 이유 (자료원: Mintel)

- 2014년에 글루텐 프리 식품시장이 105억 달러 규모로 성장하였으며, 2016년까지 156억 달러로 48% 성장. 미국 글루텐 프리 식품은 전 세계 글루텐 프리 식품시장의 59%를 차지함.



글루텐 프리 상품 판매 현황 (단위: US\$ 백만)자료원: Mintel

- 트렌드 및 소비자 조사기관인 Hartman Group은 2009년 7월 1,730명의 미국 소비자들에 대한 조사를 바탕으로 전체 응답자의 13.2%가 글루텐프리식품을 소비한 경험이 있으며, 이들 중 7.5% 만이 자신 혹은 가족 구성원의 셀리악병 치료를 위해 구매한 것으로 제시하였다(Hartbeat, 2009).
- 또한 시장조사기관 Mintel(2013)의 보고서에 의하면, 2013년 6월 글루텐프리식품을 구매한

경험이 있는 18세 이상 247명의 미국 소비자들 중 약 53%가 이 식품의 섭취가 건강에 도움이 된다고 인식하고 있으며, 22%가 체중 조절을 위해 섭취한 것으로 나타났다. 반면에 6%만이 셀리악병 치료를 위해 섭취하였다고 응답함으로써 글루텐 프리식품을 소비한 약 94%의 응답자가 셀리악병 치료가 아닌 다른 이유로 소비한 것으로 나타났다.

- 최근 내추럴 마케팅 연구소의 보고서에 따르면 글루텐프리 식품이 다른 식품에 비해 더 건강할 것이라는 인식하에 소비자들의 구매가 지속적으로 증가하고 있어, 조만간 글루텐 프리 식품시장은 현재 통곡물 식품시장을 위협한 만한 규모로 성장하게 될 것으로 전망됐다.
- 보고서에 따르면 2014년 미국 내 글루텐 프리 식품의 가정 침투율은 46%로 2006년 29%였던 것에서 큰 폭으로 증가한 것으로 나타났다. 또 46% 이상의 가정이 글루텐프리식품을 구입하고, 45%는 글루텐 식품을 가끔 구입하는 것으로 조사되었으며, 44%는 글루텐 성분이 함유된 식품을 기피하고, 11%는 글루텐 프리 식단으로만 식사하는 것으로 나타났다.
- 또한 셀리악병을 앓고 있는 사람들은 반드시 글루텐 성분을 피해야 하지만 불과 6%의 소비자들만이 해당 이유로 글루텐 프리식품을 선택한 것으로 나타난 반면에 51%가 전신건강 증진을 위해, 38%가 편안한 식사를 위해 선택하는 것으로 나타나 글루텐 프리 식품에 대한 소비자들의 관심이 높아지고 있음.
- 아울러 현재까지 미국 내 약 17,000여 개의 글루텐 프리 식품과 음료가 출시되어 있고 2005년, 홀 그레인 협회 측에서 일정 양 이상의 통곡물이 사용된 제품에 부착할 수 있는 'Whole Grain Stamp'를 개발한 이래, 전 세계적으로 약 1만 개 이상의 제품이 해당 인증 마크를 부착하고 출시된 상황.
- 주요 생산하는 회사들을 보면, General Mills, Inc.는 글루텐 프리라고 표시한 상품을 600개 이상 출시하며, 그 중 대표적인 시리얼 상품인 '첵스(CheX)'는 2008년 출시 후 매년 판매 신장을 거듭하며 큰 인기를 얻음. Hain Celestial, Inc.는 유기농 및 친환경 식품 전문 회사로 글루텐 프리 제품으로 쌀과 콩으로 만든 음료, 아이스크림, 그리고 파스타 등을 판매함. 최근 글루텐 프리 치킨 너깃, 시머(simmer), 소스, 그리고 허브 차 등 100개의 신상품을 출시함. 특히 최근 글루텐 프리 식품의 대표 브랜드인 Rudi's Organic Bakery를 인수해 소비자의 요구에 부응하는 상품 출시 전략을 꾀함. Rudi's Organic Bakery는 식빵, 베이글, 토르티야, 그리고 스낵 등 60개 이상의 유기농 및 글루텐 프리 상품을 생산하고 있음.



자료원: Google

나. 프랑스시장

- 프랑스에서 글루텐 프리 식품이 인기몰이를 하고 있는데, 대한무역투자공사(KOTRA)는 최근 프랑스 시장조사기관인 Xerfi-France의 조사 결과를 인용, 지난해 글루텐 프리 식품 매출액은 4천만 유로로 전년 대비 40% 증가했다고 전했다. 여기다 앞으로 2년 이내에 2천만 유로 이상 성장할 것으로 예상돼 50%의 증가율을 보일 것이란 전망도 제시.
- 프랑스의 이같은 글루텐 프리 식품의 매출 증가 이유는 건강식이나 다이어트 제품으로 알려졌기 때문으로, 프랑스인 중 식품 알레르기가 있는 인구는 3% 내외로 극소수에 불과하지만 일반인들도 글루텐 프리 식품을 건강식으로 여겨 3배 이상 비싼 가격에도 구매하고 있으며, 최근 프랑스의 '글루텐 알레르기 양성 반응자협회(AFDIAG)'에서는 글루텐 프리 로고를 제작, 대부분의 관련 제품에 해당 마크를 표시하고 있음.
- 이같은 글루텐 프리 식품 인기에 맞춰 프랑스 최대의 식품유통매장인 까르푸(Carrefour)는 미국의 유기농 및 비유전자재조합식품 및 냉동식품 생산업체인 Amy's Kitchen과 합작해 냉동 글루텐 프리 식품을 개발, 판매하고 있다. 또 프랑스의 식품업체 Fleury Michon은 지난 2012년 밀가루 전분 대신 글루텐이 들어가지 않은 옥수수 전분이 함유된 게맛살을 출시 및 판매 중이고 2014년 15개의 냉동 글루텐 프리 식품을 프랑스 병원 및 진료소에도 납품하고 있음.
- 바이오 및 글루텐 프리 식품업체 ABCD Nutrition은 매년 20% 이상씩 성장하면서 연 매출액의 5%를 새로운 식품개발에 투자하는 등 글루텐 프리 비스킷, 케이크, 파스타뿐만 아니라 냉동식품까지 다양한 글루텐 프리 식품 개발에 앞장서고 있음.
- 글루텐 프리 식품 열풍은 주류업계에도 불고 있는데, 프랑스의 맥주 생산업체 Castelain은

기존에 출시한 유기농 맥주에 이어 글루텐 프리 맥주 Jade를 개발해 프랑스 대형 식품유통 매장에서 판매하고 있다. 다른 맥주 생산업체 Britt도 최근 퀴노아로 양조한 글루텐 프리 맥주 Altiplano를 개발해 유통 중이기도 하다. 프랑스 일간지 르피가로는 이러한 글루텐 프리 식품시장이 오는 2020년까지 지속적으로 성장, 전 세계적으로 약 30억 유로 규모를 달성할 것으로 전망하고 있으며, 특히 최근 프랑스 소비자들이 쌀을 대표적인 글루텐 프리 식품으로 인식하고 있어 관련 시장 확대가 예상된다. 이밖에 글루텐 프리 식품의 주요 식자재인 콩을 이용한 두부요리 수요도 크게 확대될 전망이다.

나. 국내시장

- 리서치조사기관 Dadamonitor(2010)는 한국이 2014년 아시아 및 오세아니아 지역 전체에서 글루텐프리식품 1인당 소비액이 가장 높을 것이며, 전 세계적으로는 브라질과 함께 가장 큰 성장률을 보일 것으로 전망하였다. 2011년 11월에 국내 식품의약품안전처에서 만성 소화장애 환자 등 글루텐에 민감한 소비자의 식품 선택을 돕고 국제기준과의 조화를 이루기 위하여, 글루텐 함량이 20mg/kg이하인 제품의 경우 글루텐프리식품 표시를 할 수 있는 표시기준을 고시함.
- 글루텐프리식품의 시장규모가 큰 북미권 시장에서는 관련통계들이 발표되고 있으나, 도입기를 맞이하는 국내시장에서는 현재까지 공식적인 통계조사가 이루어지지 않고 있다. 따라서 개별 제조사의 홈페이지를 통해 현재 국내 제조현황을 살펴보면, 대상 청정원이 우리쌀로 만든 ‘옛날식 짜장 분말’과 ‘매콤한 삼선짜장 분말’을 상품화 하였으며, 농촌진흥청에서 100% 쌀로 만든 빵인 ‘보람찬’을 개발하였고, 아워홈에서 ‘글루텐프리 쌀 파스타’ 제품을 선보였다(the Food Us, 2013). 현재 글루텐프리식품은 같은 품목의 일반식품보다 가격이 다소 높게 형성되어 있음.
- <표 1>에 제시된 바와 같이, 아워홈의 ‘글루텐프리 쌀 파스타’가 풀무원과 오뚜기에서 제조되고 있는 크림스파게티보다 평균적으로 100g당 약 87원이 더 비싼 것으로 나타났다. 또한 청정원의 ‘옛날식 짜장 분말’과 ‘매콤한 삼선짜장 분말’이 오뚜기의 ‘짜장’, ‘사천짜장’ 그리고 ‘간짜장’ 보다 평균적으로 10g당 약 27원이 비싼 것으로 나타나 가격 프리미엄이 형성되어 있는 것을 알 수 있음.

<표 1> 글루텐프리식품과 일반식품 가격비교(2014년 4월 기준)

(단위 : 원)

	크림스파게티(가격)	짜장 분말(가격)
글루텐프리식품	아워홈 크림 파스타 (1,134)	청정원 짜장 분말 (217)
일반식품	풀무원 크림 스파게티(1,055) 오뚜기 크림 스파게티(1,039)	오뚜기 짜장 분말(166) 오뚜기 사천 짜장(188) 오뚜기 삼선간짜장(214)

주 : 1. 크림스파게티 100g 당 가격으로 환산.

2. 짜장 분말 10g 당 가격으로 환산.

- 최근 연구발표에 따르면 전 세계적으로 인구 100명당 1명이 밀단백질에 의한 알러지 (celiac disease)에 의해 고통 받고 있으며, 특히 Ireland에서는 인구 60명에 1명꼴로 밀알러지를 지니고 있고 미국의 경우 밀알러지 환자 100명중 단 1명만이 자신의 증상에 대해 알고 있다고 한다. 일명 밀알러지로 불리는 celiac disease는 밀, 호밀, 보리가 포함된 음식물의 섭취를 피해야 하며(경우에 따라서는 귀리 포함) 결국 일상적인 음식인 빵, 피자, 비스킷, 맥주 등을 먹을 수 없다.
- Ireland의 University College Cork에서 2007년 9월 12일-14일 “glutenfree cereal products and beverage”에 관한 제 1회 국제 syposium이 개최되었으며, 이러한 밀알러지에 대한 관심은 알러지원이 없는 쌀을 이용한 다양한 베이커리 제품의 개발이 활발히 이루어 질 것으로 기대됨.
- 세계적으로 빵은 주로 밀가루를 이용하여 제조하고 있지만 일부 빵, 케이크, 쿠키 등 베이커리제품에 쌀가루가 이용되어 왔다. 지금까지 연구결과에 의하면 쌀가루의 제빵특성은 쌀의 종류, amylose와 amylopectin 비율, 입자의 크기, 소화특성 등 물리화학적 특성, 제분 방법 또는 제분기의 종류 등 여러 요인에 의해 영향을 받는 것으로 보고되었다. 서구에서 쌀빵의 개발은 밀빵에 알러지가 있는 사람들을 위하여 밀가루의 대체 수단으로서 시도되었다. 밀빵 알러지에는 설사, 복부경련, 가스생성 등을 발병하는 셀리악 질병(celiac disease)을 포함하며 심하면 장의 과사까지 발생하며 이는 밀단백질인 글루텐(gluten)중 gliadin에 기인하는 것으로 알려져 있음.

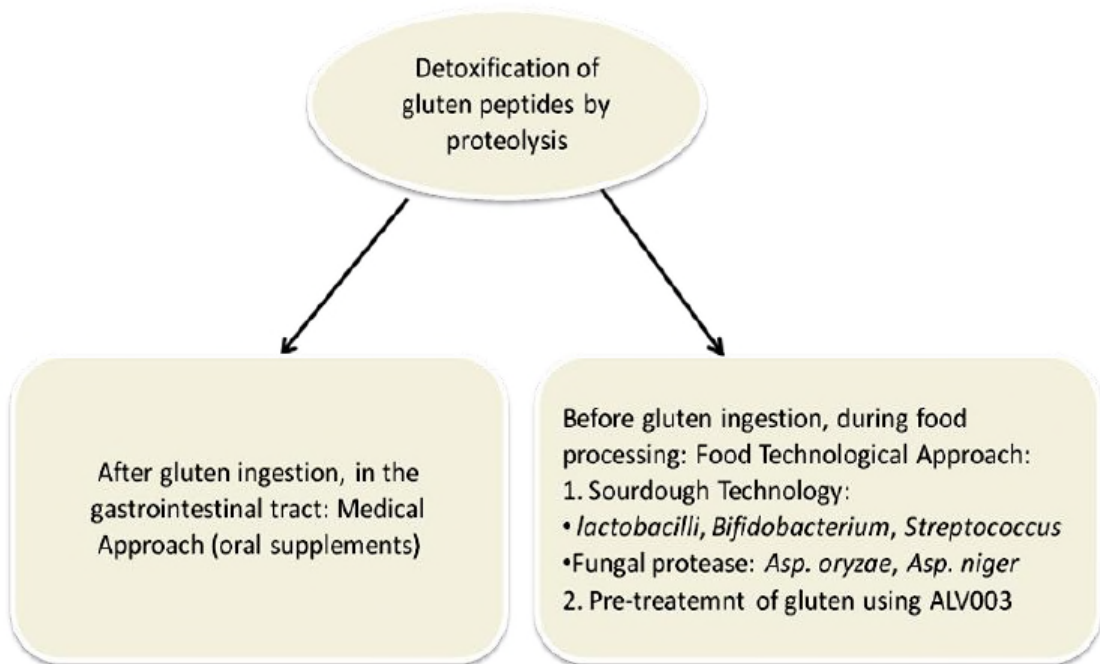
- 밀가루에 알러지가가 있는 사람은 식단에서 밀가루 제품을 피하는 것이 권장되며 밀 gluten 뿐 만 아니라 호밀, 귀리, 보리가루의 단백질 또한 gluten 대체재로 바람직하지 못하다. 우리나라의 경우 밀 알레르기 인구에 대한 통계가 발표된 적이 없지만, 본 연구에서 수도권 주민을 대상으로 한 연구에서 밀 알레르기에 대한 정보를 제공한 후 스스로 밀 알레르기가 있다고 생각하는 비율은 매우 심하다는 비율이 0.3%, 약간 심하다는 비율이 1.7%, 약간 있다는 비율이 29.4%에 이르는 등 약간 이라도 밀 알레르기가 있다고 생각하는 비율이 31.4%에 이르고 있어 , 밀 알레르기가 없는 쌀 빵이 출시되어 일반 밀 빵을 소비할 때 느꼈던 뱃속의 거북함이 사라진다면 쌀 빵의 시장규모는 크게 확대될 수 있을 것으로 전망됨.
- 이외에도 웰빙 트렌드에 맞추어 일반소비자를 대상으로 하는 경우에도 소비자의 기호 적성에 맞는 쌀 빵을 개발하거나 가공적성이 좋은 밀가루와 쌀가루의 독특한 씹힘을 조화한 개량형 쌀 빵 개발도 쌀 빵 시장의 확대를 위해서 필요할 것으로 판단된다.
- 이와같이 gluten-free 시장의 확대가 지속적으로 주요 식품분야에서 조목을 끌고 있다. 따라서 치료 처치, 유전자 변형 기술, 품종개량 등은 적절한 베이킹 품질, 낫거나 또는 면역 독성이 없는 입자를 개발하는 것을 목표로 다양한 시도가 되어짐. 그러나 밀같은 시리얼은 hexaploid이기 때문에 시리얼 단백질과에서 서열 유사성의 중복과 수의 어려움이 있음. 따라서 생물학적인 방법보다는 다양한 후처리 공정을 이용한 gluten-free제품을 개발하는 것이 보다 현실적이고 산업적 측면에서 가능성을 인정받고 있으며 이를 통해 상용화 가능성이 높음.

두가지의 gluten 무독화를 위한 효소적, 미생물학적 접근법(섭취후 효소제의 섭취와 먹기전 gluten을 분해시키는 방법)(ALV003 는 두가지의 gluten분해효소의 혼합물로 보리 발아삭에서 얻은 cysteine endoprotease와 *Sphingomonas capsulata*로부터 얻은 prolyl endopeptidase).

II. Gluten degradation을 통한 Gluten free

1. 효소 섭취를 통한 gluten free

- 이와 같이 gluten을 분해하는 방법으로 효소급여 치료법이 있는데 이는 면역반응을 일으키는 gluten 항원결정체의 불활성화에 맞춰져 있음. bacterial Endopeptidase 의 섭취는 gluten을 식이로 섭취후 분해된 glutendl 소장에서 분해된다. 그러나 gliadine peptide갈



이 특별한 고 proline-glutamine 함량 때문에 장관트랙에 존재하는 효소들에 의해 분해가 떨어지게 된다. 이런 경우 효소섭취방식이 gluten-free 식이치료법의 대안으로 제시되고 있음.

- 시험되어 적합한 효소들로서는 prolyl oligosaccharidase로 *Flavobacterium meningosepticum*, *Sphingomonas capsulate*과 *Myxococcus xanthus* 과 같은 미생물로부터 얻어짐. 이들의 효소들은 vitro 장관트랙에서 단백질 분해효소에 의해 분해에 저항성이 있는 것들임. 이들 효소는 위의 pepsin, 산성 pH에 의해 비가역적으로 불활성화되어 소장에 도착하기 전에 gluten 분해에 어려움이 있음. 이에 encapsulation 기술을 사용하여 극복하기도 하고, 최근, 모사소장시험의 ex vivo 연구에서, 높은 농도의 prolyl oligosaccharidase 가 장관구분에서 면역유발 peptide의 축적을 제거하는 것으로 나타남. 이는 encapsulation 기술이 효소의 활성을 떨어뜨려 비효율적임을 나타냄.
- 최근 개발된 *Aspergillus niger*로부터 얻어진 prolyl endopeptidase가 위에서 효과적으로 분해하고 충분히 분해하여 십이지장에서 gluten을 검출하기 어려울 정도로 분해하였으며, 최적 pH가 위에서도 충분히 견딜수 있으며 pepsin에도 충분한 저항성이 있는 것으로 나타남. 또한 이 효소는 식품사용이 가능한 미생물로부터 얻어져 산업적 생산이 가능함. 이 효소는 입을 통해 섭취되어 소장 도달전에 충분한 gluten-free 효과를 얻을수 있음.
- 최근에 위장관에 활성이 높은 조합 처치법이 시행되어 효과를 보고 있는데 glutamine-specific endoprotease와 *Sphingomonas capsulata*에서의 prolyl-specific

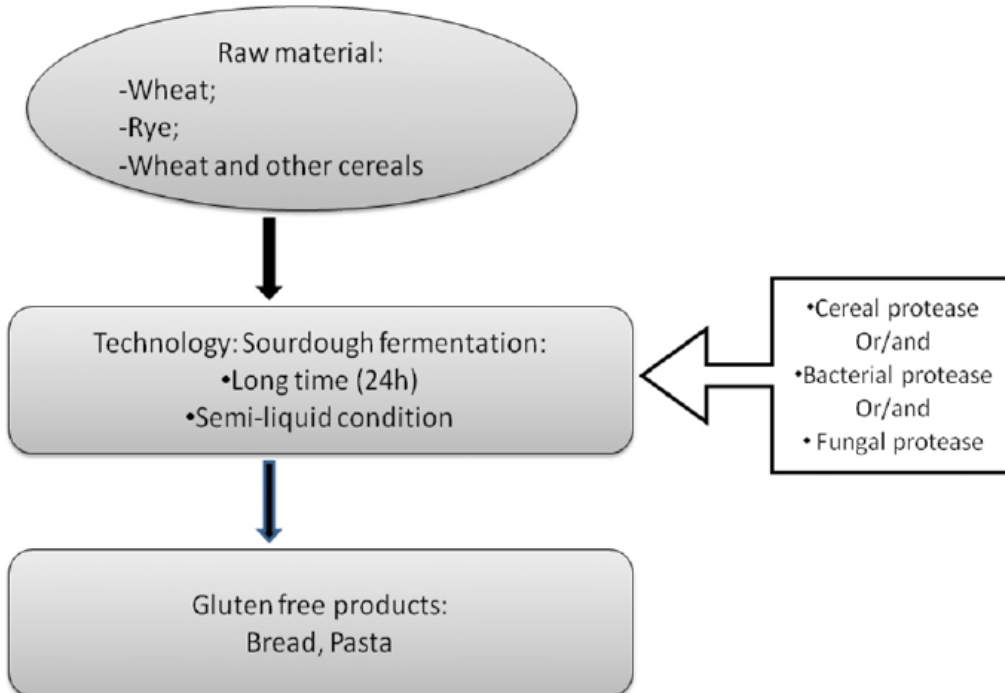
endopeptidase 이 두 효소도 위장관의 조건에서 gluten을 효과적으로 분해하는 능을 가지고 있음. Endoprotase는 상대적으로 짧은 oligopeptide에서 gluten network를 효과적으로 광범위하게 분해하고 prolyl-specific endopeptidase는 앞의 효소에 의한 1차 gluten 분해 후에 oligopeptide들을 빠르게 분해하여 무독한 물질화하는 수준까지 proline 잔기를 제거함. 이 조합형의 두 효소는 위에서 활성과 안정성을 가지고 있어 동결건조 분말을 캡슐이나 타블릿형태로 이용가능.

2. 식품가공 과정에서 효소를 이용한 gluten free

- 또 다른 방법으로서 환자에 섭취전 또는 식품가공 과정에서 미생물 유래 peptidase 를 처리하여 밀 gluten을 무력화시켜 무독화 gluten을 얻는 방법임. 특정한 sourdough 유산균으로 장시간의 발효를 포함하는 전통적인 시리얼푸드 얻는 방법은 빵발효 효모제나 화학물질 사용으로 대체되었는데, 이런 환경에서 시리얼은 제조 과정중에 매우 적거나 아니면 분해가 일어나지 않게 되는데 이과정이 전통적이나 옛날 sourdough 빵을 구울 때 와 비교해서 소화흡수율이 떨어지게 되는 원인으로 추정함.
- albumin, globulin, 밀 sourdough 발효중에 gliadin fraction을 잘 분해하는 특성을 가진 4가지의 sourdough 유산균을 이용하였는데, 이 유산균들은 vitro 상에서 A-gliadin의 31-43 fragment를 분해하는 특성을 가지고 있으며, 분해후 gliadin의 독성이 있는 peptic-tryptic 소화에 의한 K 562응집현상을 크게 완화시키는 것으로 나타남. 이런 결과를 바탕으로 사람에게 gluten 불내성을 완화시킬 목적으로 시험에서 사용된 균주에 의한 밀, 비죽성 귀리, 매밀, 기장 가루의 혼합물로부터 sourdough 생산하기 위해 사용되었고, 다양한 Proline이 풍부한 peptide를 분해하는데 사용됨. 24시간 배양후 밀가루 gliadinrhk 저분자 물질, 알콜용해성 polypeptide는 거의 다 분해되었고, sourdough로부터 추출된 단백질질을 vitro상에서 K562 subclone cell에 대한 응집시험에 사용되었고 이 gluten 2g이 사용된 빵 2종류를 만들었다. 그리고 만든 빵을 셀리악 환자를 대상으로 하는 vivo 맹검법 시험에 사용에서 향상된 30% 밀가루를 함유한 빵의 내성을 보였고 K 562 응집반응에서 향상을 보임. 이 자료를 통해 특정 유산균을 함유한 장시간의 발효과정은 gluten에 의한 독성을 완화시키는데 필수적이라는 것을 제시함.

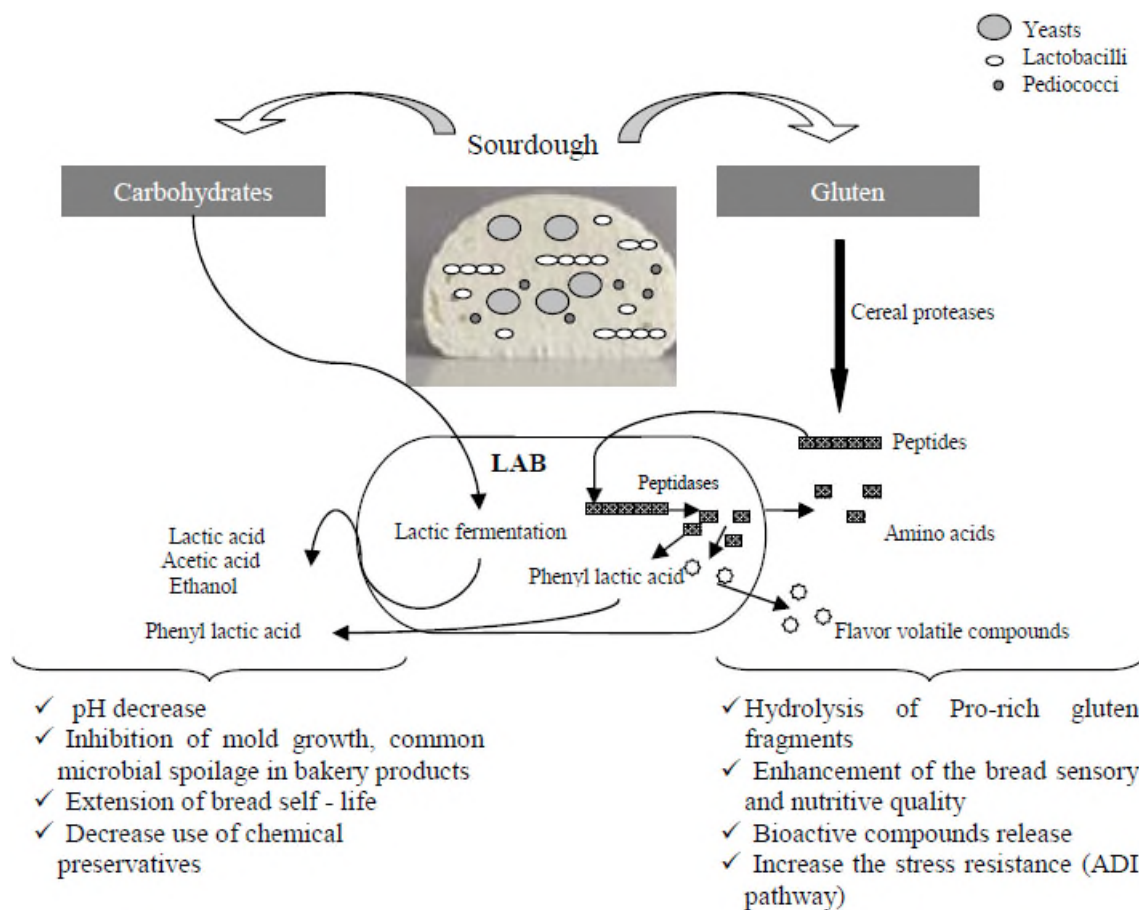
Proteolysis by sourdough fermentation: a tool for making gluten free products.

- 단백질 분해능이 있는 다양한 다른 유산균을 사용하는 것은 각자의 다양한 기질 특이성이 나 서로의 특이성으로 부터의 차이에 의해 다양해 질것으로 예상하고 있음. 또한 다양한 다



른 probiotics를 혼합하여 사용했을 때(고농도의 유산과 bifidobacteria는 gliadin 유래 epitope을 분해하는 것으로 나타났음. 대부분의 유산균들은 균총의 변화, 안정을 통한 정상 작용을 수행하여 장내건강을 증진시키는 것으로 알려져 있다. 또한 여러 probiotic bacterial 균주들이 상피세포를 보호할수 있는데, 이는 다양한 균총의 정균작용에 의한 작용과 염증관련 cytokine들의 조절에 의한 것임.

- sourdough 유산균의 복합 처방에 의한 발효에서 gluten의 농도를 10ppm이하로 농도를 줄이는 것으로 나타났고, 특히 10종의 sourdough에서 특정의 Proline 이 풍부한 peptide 가수분해능을 가진 미생물로 사용되고 여기에 곰팡이 유래의 단백질분해효소가 제빵산업의 향상에 이용되었음. 이를 통해 만들어진 밀, 호밀빵 그리고 파스타에서 그리고 여기에 gluten-free 빵을 만드는데 첨가되는 구조결합물질이 첨가된다면 셀리악환자들에게 맞춤형도 있다고 생각함. 이들의 실증실험에서 밀가루 30%가 함유된 빵의 향산된 내성을 K562 응집시험과 vivo시험에서 증진된 것을 보였음. 셀리악 환자를 대상으로하는 추가시험에서 선택된 유산균과 곰팡이 유래 단백질 분해효소로 혼합 gluten 발효를 한 연구에서 감소된 독성이 확인됨.
- 적어도 4-5년이상의 gluten-free식이를 실시한 12 이상의 셀리악환자를 대상으로 하는 매일 10g의 gluten분해물을 섭취하도록 하여 2단간의 실험을 실시하였는데, 셀리악 혈청 항체와 십이지장, 면역조직학 등의 실험에서 모든 지표들이 정상적이었음.



Potential enzyme therapies for celiac disease.

Target for detoxification	Detoxifying agent	Mechanism of action	Status of research
Ingested gliadin peptides	Prolyl endopeptidases from: <i>S. capsulate</i> [49] <i>F. meningosepticum</i> [50] <i>M. xanthus</i> [51]	Hydrolysis of proline-rich peptides of gliadin	Preclinical
	Prolyl endopeptidases from: <i>A. niger</i> [52]		Clinical trial
	Prolyl endopeptidases from: <i>S. capsulate</i> in combination with a glutamine-specific endoprotease (EP)-B2 from germinating barley [53]		Clinical trial
Flour	Sourdough lactobacilli-derived peptidases [56]	Hydrolysis of proline-rich peptides of gliadin	Clinical trial
	Sourdough lactobacilli-derived peptidases in combination with fungal proteases [64]		Clinical trial
Flour	Transglutaminase enzymes [67]	Transamidation of gliadin peptides with lysine methyl ester	Preclinical
Mucosal tTG	Irreversible thiol-reactive reagents, competitive peptidic, and nonpeptidic substrates [69]	unspecific or specific tTG inhibition	Preclinical

3. Gliadin의 아미노 전이에 의한 gluten free

- 자연적으로 소화된 gluten peptide들의 특정 glutamine 잔기의 특이 tissue transglutaminase 촉매에 의한 탈아미노화는 잠재적 T cell 활성화에 관여하는 HLA-DQ2/DQ8 molecules 에 향상된 결합력과 붙는 음성으로 차지된 아미노산을 생산함. 이러한 축적에 의해 불활성화 면역반응을 일으키는 peptide 항원결정기에 만들고, 식품그라이드 효소와 적절한 아민 공여자를 통한 단백질 구조의 온전성을 보존하는데 기여하는 것으로 추측되며, transamination 은 커다란 항원결정기 목록의 면역반응을 중화시키는 것으로 나타남. 미생물 transglutaminase를 이용할 때 유사한 결과가 나타나는데, 이 미생물 유래 transglutaminase는 조직 유래 transglutaminase가 칼슘 의존적이고 미생물 유래 transglutaminase가 저분자량의 단백질이어서 식품공업에 활용하는데 유리한 면을 가지고 있을 것으로 평가함. 또한 이 효소는 현재도 dough의 향상제로 dough의 안정성과 신축성을 향상시키는데 이용되어지고 있어 상용화하는데 유리한 가능성을 가지고 있음. 또한 빵 볼륨, 크럼 물성은 미생물 유래 transglutaminase를 첨가에 의해 긍정적으로 영향을 주고 있음.

4. transglutaminase 억제제

- 조직유래의 transglutaminase는 탈아미노화를 촉매하고 특정 gluten peptide의 상호결합을 촉매하고, 내장 T-cell들에 의해 잠재적 항원결정기로 촉매함으로써 셀리악 병에 중요한 역할을 수행함. 식이 gluten에 대한 T-cell을 매개하는 면역반응의 제한하기 위해서는 세포유래 transglutaminase가 잠재적 치료 타겟으로 주목되고 있음. 자연적으로 소화된 gluten peptide들 속의 특정 glutamine의 세포유래 transglutaminase의 탈 아미노화의 억제제는 음으로 나타내는 아미노산 잔기의 생산을 억제함으로써 사실 잠재적 T-cell 활성화에 작용하는 HLA-DQ2/DQ8 molecules에 붙는 것을 증가시키지 않게 되어 자연적으로 셀리악 병을 증가시키지 않게 됨.
- transglutaminase의 가교결합의 타겟이 제시되고 vitro상에서 시험되는 다양한 기작이 제시 및 실시됨. 세포유래 transglutaminase의 억제제 중에서 여러 비특이적 비가역적 thiol 반응성 물질을 여러 발견하였고, 이들을 자살 transglutaminase 억제제들이라 명명하였으며, 여기에는 cystamine 같은 것이 있고 데 효소와 억제제 결합체를 형성하므로써 세포유래 transglutaminase를 억제할수 있음. 또한 가지로는 경쟁적 비특이 세포유래 transglutaminase 아민 공여체 물질들(1,4-diaminobutane같은 물질로 비정성 창상치료에 사용되는 외상치료용으로 사용됨), 경쟁적 peptidic 세포유래 transglutaminase

amino 공여체 임.

참고문헌

1. Juliano BO. Production and utilization of rice. pp. 1-16. In: Rice Chemistry and Technology AACC (1985)
2. Kum JS, Lee CH, Baek KH, Lee SH, Lee HY. Influence of cultivar on rice starch and cooking properties. Korean J. Food Sci. Technol. 27: 365-369 (1995)
3. Sandhya Rani MR, Bhattacharya KR. Microscopy of rice starch granules during cooking. Starch 46: 334-337 (1995)
4. Schober TJ, Messerschmidt M, Bean SR, Park S-H, Arendt EK. Gluten-free bread from sorghum: Quality differences among hybrids. Cereal Chem. 82: 394-404 (2005)
5. Olexova L, Dovicovicova L, Svec M, Siekel P, Kuchta T. Detection of gluten-containing cereals in flours and gluten-free bakery products by polymerase chain reaction. Food Control 17: 234-237 (2006)
6. Song JY, Shin M. Effects of soaking and particle sizes on the properties of rice flour and gluten-free bread. Food Sci. Biotechnol. 16: 759-764 (2007)
7. Kang HJ, Hwang IK, Kim KS, Choi HC. Comparative structure and physicochemical properties of 'Ilpumbyeo', a high-quality japonica rice, and its mutant, 'Suweon' 464. J. Agr. Food chem. 51: 6598- 6603 (2003)
8. Kang HJ, Seo HK, Hwang IK. Comparison of gelatinization and retrogradation characteristics among endosperm mutant rices derived from 'Ilpumbyeo'. Korean J. Soc. Food Sci. 36: 879-884(2004)
9. Chun AR, Song J, Hong HC, Son JR. Improvement of cooking properties by milling and blending in rice cultivar 'Goami 2'. Korean J. Soc. Food Sci. 50: S88-S93 (2005)
10. Lee JH, Seo HS, Kim SH, Lee JR, Hwang IK. Soaking properties and quality characteristics of Korean white gruel with different blending time of high-dietary fiber rice 'Goami 2'. Korean J. Food Cookery Sci. 21: 927-935 (2005)
11. Kim C, Lee ES, Hong ST, Ryu GH. Manufacturing of Goami flakes by using extrusion process. Korean J. Soc. Food Sci. 39: 146-151 (2007)
12. Jung YJ, Seo HS, Myung JE, Shin JM, Lee EJ, Hwang IK. Physicochemical and sensory characteristics of rice cookies based on 'Goami 2' with sesames (white and black) and perilla seeds. Korean J. Food Cook. Sci. 23: 785-792 (2007)

13. Lee JH, Seo HS, Kim SH, Lee JR, Hwang IK. Soaking properties and quality characteristics of Korean white gruel with different blending time of high dietary fiber rice 'Goami 2'. Korean J. Soc. Food Sci. 21: 927-935 (2005)

1) National Center for Biotechnology Information, 2012, "Celiac disease : Prevalence, diagnosis, pathogenesis and treatment", <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3496881/#B32>

2) Euromonitor International, 2011, "Gluten-free remains one of the most dynamic health and wellness categories", <http://blog.euromonitor.com/2011/02.html>

Packaged Facts, "Gluten-Free Foods and Beverages in the U.S., 4th Edition", 2012, <http://www.packagedfacts.com/gluten-free-foods-7144767>, 본문참고날짜 2013년 11월 24일.

곽창근·장종근, "웰빙식품산업 활성화 방안 : 신선편의식품 시장을 중심으로", 『식품산업과영양』, 제13권 제1호, 한국식품영양과학회, 2008, pp.17~27.

한성희, "기혼여성의 라이프스타일 유형에 따른 웰빙지향 식품에 대한 중요도 및 구매만족도", 『한국가족자원경영학회지』, 제14권 제4호, 한국가족자원경영학회, 2010, pp.239~262.

이영택·박영서, "활성 글루텐 첨가가 쌀베이글의 품질 특성에 미치는 영향", 『산업식품공학』, 제13권 제1호, 한국산업식품공학회, 2009, pp.50~55.

최윤희·이정은·김은미·박신영, "활성 글루텐 및 쌀 입국 첨가에 의한 쌀 찌빵의 품질변화", 『한국식품영양학회지』, 제25권 제2호, 한국식품영양학회, 2012, pp.253~258.

강태영·최은혜·조혜영·윤미라·이점식·고상훈, "자포니카형 쌀 품종 차이가 글루텐 프리 쌀 식빵의 품질에 미치는 영향", 『산업식품공학』, 제17권 제4호, 한국산업식품 공학회, 2013, pp.305~310

김유진·이정훈·최미정·최두리·이시경, "활성글루텐이 저항전분을 함유한 식빵의 품질 특성에 미치는 영향", 『한국식품영양과학회지』, 제42권 제1호, 한국식품영양과학회, 2013, pp.76~82.

한국식품과학회, 식품과학기술대사전, "글루텐[gluten]" 2008, <http://terms.naver.com/entry.nhn?docId=292595&cid=42412&categoryId=42412>, 본문참고날짜 2013년 11월 14일.

U.S Food and Drug Administration, "『Gluten-Free』 Now Means What It Says", 2014, <http://www.fda.gov/ForConsumers/ConsumerUpdates /ucm363069.htm>, 본문참고날짜 2014년 8월 20일.

3) U.S Food and Drug Administration, 2014b, "Foods Labeled Gluten-Free Must

Now Meet FDA's Definition”, <http://www.fda.gov/food/newsevents/constituentupdates/ucm407867.htm>

Cataldo, F. and Moltaldo, G., Celiac Disease in the Developing Countries : A New and Challenging Public Health Problem, *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 13(15), 2007, pp.2153 - 2159

Cummins, A. G. and Roberts-Thomson, I. C., Prevalence of Celiac Disease in the Asia-Pacific Region, *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 24(8), 2009, pp.1347~1351.

Statista, “Retail dollar sales of gluten-free products in the United States from 2011 to 2016”, 2014, <http://www.statista.com/statistics/301621/us-retail-dollar-sales-of-gluten-free-products>, 본문참고날짜 2014년 4월 13일.

Hartbeat, “Making Sense of the Gluten-Free Trend”, 2009, <http://www.hartman-group.com/hartbeat/making-sense-of-the-gluten-free-trend>, 본문참고날짜 2014년 1월 27일.

MINTEL Oxygen, “Gluten-free Foods - US - September 2013”, 2013, http://reports.mintel.com/sinatra/oxygen/list/id=637717&type=RCItem#0_1___page_RCItem=0, 본문참고날짜 2014년 1월 27일.

Datamonitor, “The Future of Gluten-Free : Consumer Insight and Product Opportunities”, 2010, <http://www.datamonitor.com/kc/consumer>, 본문참고날짜 2014년 12월 17일.

T. Marti, Ø. Molberg, Q. Li, G. M. Gray, C. Khosla, and L. M. Sollid, “Prolyl endopeptidase-mediated destruction of T cell epitopes in whole gluten: chemical and immunological characterization,” *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, vol. 312, no. 1, pp. 19-26, 2005.

J. Gass, J. Ehren, G. Strohmeier, I. Isaacs, and C. Khosla, “Fermentation, purification, formulation, and pharmacological evaluation of a prolyl endopeptidase from *Myxococcus xanthus*: implications for Celiac Sprue therapy,” *Biotechnology and Bioengineering*, vol. 92, no. 6, pp. 674-684, 2005.

C. Mitea, R. Havenaar, J. W. Drijfhout et al., “Efficient degradation of gluten by a prolyl endoprotease in a gastrointestinal model: implications for coeliac disease,” *Gut*, vol. 57, no. 1, pp. 25-32, 2008.

J. Gass, M. T. Bethune, M. Siegel, A. Spencer, and C. Khosla, “Combination enzyme therapy for gastric digestion of dietary gluten in patients with Celiac Sprue,” *Gastroenterology*, vol. 133, no. 2, pp. 472-480, 2007.

M. Gobbetti, “The sourdough microflora: interactions of lactic acid bacteria and

yeasts,” Trends in Food Science and Technology, vol. 9, no. 7, pp. 267-274, 1998.

Strategy used	Protease from microorganism and/ or cereal	Reference
Bacterial protease	<i>Flavobacterium meningosepticum</i>	Shan et al. (2002)
	<i>Myxococcus xanthus</i>	Piper et al. (2004)
	<i>Sphingomonas capsulata</i>	Gass et al. (2005)
	<i>Lactobacillus helveticus</i>	Chen et al.(2003)
Fungal protease	<i>Aspergillus niger</i>	Stepaniak et al. (2006)
Germinated cereal protease (GCP)	Wheat, rye and barley	Hartmann et al. (2006) and Loponen et al. (2007,2009)
Mixture: GCP and bacterial protease	GCP from barley (EP-B2) and PEP: <i>Sphingomonas capsulata</i> (SC-PEP)	Siegel et al. (2006), Gass et al. (2007) and Tye-Din et al. 2010
LAB used as « starter »	<i>Lactobacillus</i>	Di Cagno et al. (2002, 2004, 2008), Rollán et al. (2005) and
	<i>Lactobacillus+Streptococcus+Bifidobacterium</i>	De Angelis et al. (2006,2007)
	<i>Enterococcus</i>	M'hir et al. (2008)
Mixture: fungal protease and bacteria used as « starter »	<i>Lactobacillus</i> + Po <i>Aspergillus oryzae</i> +Pn <i>Aspergillus niger</i> <i>Enterococcus</i> + S <i>Rhizopus oryzae</i>	Rizzello et al. (2007), Greco et al. (2011) and M'hir et al. (2009)

PEP, Prolyl endopeptidases; Po, purified protease from *Aspergillus oryzae*; Pn, purified protease from *Aspergillus niger*; S, supernatant containing protease of *Rhizopus oryzae*

2. 누룩균과 유산균을 이용한 빵류 제조과정 이용으로 빵류 물성의 개선

(1) 실험 방법

(가) Gluten-free 빵류 제조에 사용된 누룩균과 유산균

- gluten-free 빵류의 제조에 사용하는 사용된 균주는 산성누룩((유)금정산성토산주, 부산, 대한민국), 바이오누룩(한국효소주식회사, 경기, 대한민국), 송학곡자((송학곡자, 광주, 대한민국)을 사용하였고, 사용된 유산균은 생명공학연구원에서 제공한 균주 3종류(*Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus acidophilus*, *Weissella confusa*속)와 제공받은 유산균인 청각 요구르트(전남해양바이오연구센터, 완도, 대한민국)를 이용하여 gluten 분해를 실시하였으며, gluten 분해에 사용한 재료로는 gluten이 들어있는 대표 곡물인 wheat flour(큐원, 삼양사, 서울, 대한민국) 강력분(단백질함량 13.4 %)을 이용하여 실시하였다.
- 실험에 사용한 유산균은 de Man, Rogosa, Sharpe (MRS) medium에서 36°C, overnight 으로 유산균을 배양, 미리 배양된 유산균의 배양곡선을 따라 10⁹ CFU를 얻었고, 이를 원심분리, 상등액을 조심하게 흘려보낸 다음, 남은 균체에 살균된 생리식염수를 넣어 현탁시키고 다시 2회를 현탁, 세척한 후 농도를 조정된 후 첨가되는 물과 함께 gluten 분해를 위해 준비된 강력밀가루와 배합물에 첨가하여 반죽을 만들고, 여기에 35°C 에서



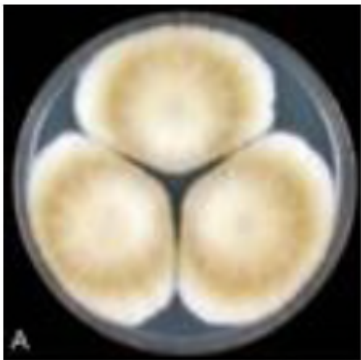
산성누룩



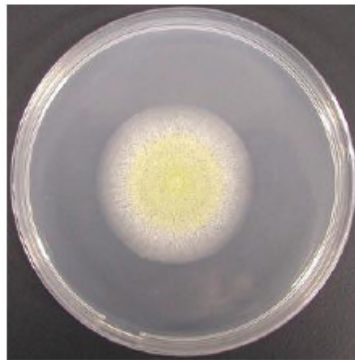
바이오 누룩



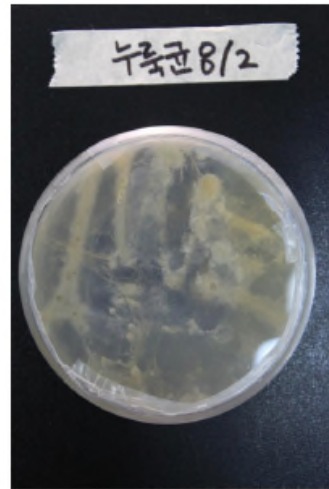
소울곡



산성누룩



바이오누룩

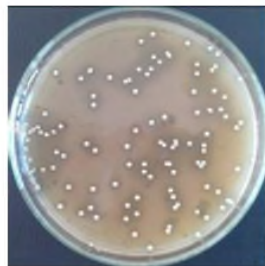


송학곡자

- 24시간 반응에 따라 분해정도를 측정하였다.



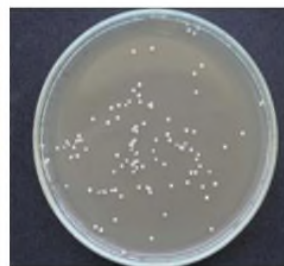
생공연제품 1



생공연제품 2



생공연제품 3



청각 유산균

- 한편 누룩의 배양은 누룩 500 g 을 증류수 1 L에 충분히 분해하여 슬러리를 만든다음, 정치하였다. 이 여액을 거즈로 2회 거른 다음, 위의 유산균과 같이 첨가되는 물의 량에 100 mL에 대한 무게비율로 걸러진 누룩액을 첨가하여 누룩균에 대한 gluten의 분해정도를 확인하였다.

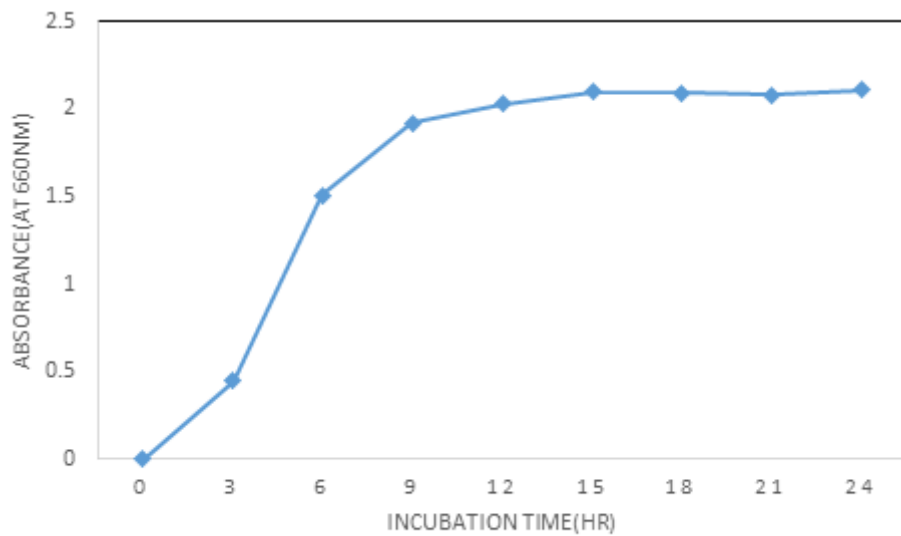


Fig. 유산균의 Growth Curve

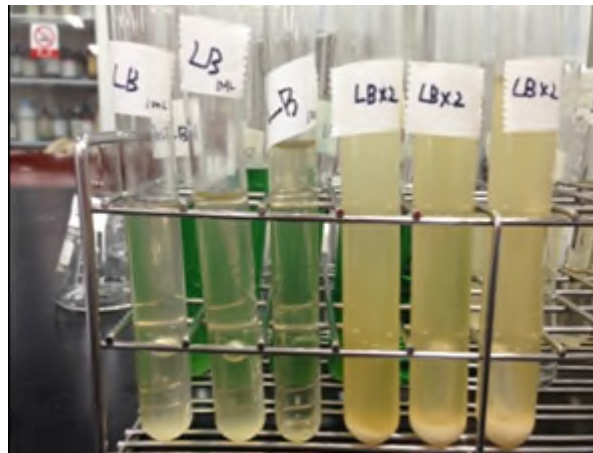


Fig. 유산균의 배양장면

● 발효를 통한 gluten 분해 시험

- gluten의 분해시험에는 밀가루 600g에 설탕 30g, 물(tap water) 390 ml을 넣고서 여기에 유산균은 35°C에서, 누룩균은 30°C에서 배양하였으며, 배양시간은 두가지 다 공히 24시간을 측정하였다. 누룩의 경우 예비실험에서 반응이 천천히 이뤄져 24시간 이후까지 측정하였으나 변질의 우려가 있어 gluten-free를 얻는 방법으로 타당하겠지만 식품소재의 안전성 측면에서는 문제점이 있어 24시간의 반응시간으로 한정하였다.

● gluten 분해의 측정

gluten 분해의 측정에는 3가지의 방법을 사용하였는데 강력분에서 단백질의 함량이 크기 때문에 wet-gluten 측정법(AACC Method 38-10), gluten 기기측정법, ELISA method(Enzyme-linked Immunoassay (ELISA) R5 Mendez Method.)를 사용하였다.

1. gluten 측정법 (gluten 형성 수처리법)

현재 국내에서 식품공전상에 gluten을 측정하는 방법은 등록되어 있지 않다. 아직까지 국내에서 gluten을 측정하여 사회적으로 문제가 되지 않기 때문이지만 향후 국외로 gluten-free식품을 수출하기 위해서는 측정법과 교차오염에서 오는 미세한 함량까지 측정이 되어야 할 것이다.

○ Gluten Hand Wash method (AACC Method 38-10)

측정방법은 25g 밀가루 + 약 15ml 증류수를 붙고 스푼을 이용하여 밀가루 반죽이나 볼을 만든다. 단 밀가루 볼을 만드는 과정에서 스푼에 밀가루가 접촉되지 않아야 한다. 다음, 약 60GG 규격의 천 시브위에 밀가루 반죽을 놓고 수돗물을 흘려보내 전분과 같은 가용성 성분들이 모두 빠져나갈 때 까지 흘려 놔둔다. 약 12분정도 실시하면 대체로 흘러 나간다. 이후 gluten이 전분이 완전히 제거 되었는지를 확인하는 방법은 gluten을 째 쥐어봐서 1-2 방울을 증류수가 들어있는 투명한 비이커에 떨어뜨려 봐서 흐린 물질이 떨어지지 않는 완전히 투명한 액이 되어야 gluten이 제거된 것이다. 액중에 전분이 남아 있으면 불투명한 색으로 나타나 추가적인 제거과정이 반복되어야 한다. 이후 물에 1시간동안 gluten을 정치하고서, 가능한 한 수준으로 손으로 짰 다음, ball형태로 만들어, 미리 무게를 잰 바닥이 평평한 그릇에서 무게를 잰다.(이를 wet-gluten이라 함) 그리고, 이것을 오픈으로 옮겨 100°C, 24시간정도 유지시켜 항중량이 될 때까지 건조시킨다. 그리고 이것을 dry gluten이라 한다. Note : 실제 조 gluten 은 순수한 단백질로만 구성되어 있지 않으며, 지질, 탄수화물(전분) 그리고 ash 등이 들어 있다.(AACC (1995) Approved Methods of the AACC, 9th ed. Method 02-52: pH and TTA determinations. American Association of Cereal Chemists. St. Paul, M.N.)

$$\frac{\text{Gluten(g)}}{\text{Flour sample(g)}} \times 100\% = \% \text{ gluten}$$

○ 기기를 이용한 wet-gluten함량의 측정 잦은 글루텐 함량은 Glutomatic 2200과 Gluten Index Centrifuge 2015(Perten Instruments AB, Huddinge, Sweden) 를 사용하여

AACC 방법(38-12)에 따라 측정한다.



그림 글루텐 함량 분석용 Glutomatic 장비

- 밀가루 각 시료의 글루텐 측정은 Glutomatic(Glutomatic 2100, Falling Number, Stockholm, Sweden)을 이용하여 AACC방법 54-40A(2000)에 따라 각각의 시료 10 g을 취하고, 측정용 챔버에 옮긴 후 2% NaCl 4.8 mL을 챔버에 분사한 후 자동으로 20 초 동안 반죽혼합하고 5분 동안 세척하여 분리된 글루텐의 양을 측정(AACC. 2000. Approved method of the AACC. 10th ed, Method 08-01. 38-10. 46-12. 54-40A American Association of Cereal Chemists, St. Paul, Minn. USA.)

- 미량의 gluten 측정법
 - Enzyme-linked Immunoassay (ELISA) R5 Mendez Method를 대표적인 방법으로 ELISA방법이 사용되고 있는데 현재 gluten 함량 20 mg/kg을 검지하기 위하여 사용하고 있으며 on-off방식과 함량을 정량으로 측정하는 방법이 이용되고 있다. 본 실험에서는 Wheat/gluten(Gliadin) ELISA kit II(Wheat ELISA kit)(Morinaga, Yokohama, Japan)을 이용하였다. Wheat ELISA kit의 특징은 gliadin을 antigen으로 하며 wheat gluten을 검출하는데 사용하고 있다.

 - 측정방법에는 측정하고자 하는 시료 1g에 시료추출용액 19 mL을 넣고 30초간 혼합한 다음, 100°C에서 10분간 정치 후 강하게 혼합한 다음, NaOH로 pH 6-8로 조정한다. 조정된 반응액을 3,000g에서 20-30°C를 유지하면서 10분간 원심분리를 돌려 조사할 상등액



을 얻는다. 얻어진 상등액을 표준 gluten 용액과 함께 ELISA kit에 분주한 다음, 20-25°C에서 한시간 동안 반응을 시키고, buffer 로 충분히(6회) washing한다. 물기가 제거된 kit에 antibody가 결합된 효소를 각 well에 분주하여 20-25°C에서 30분 동안 2차 반응을 시킨다. 이후 반응된 효소액을 6회정도 buffer로 세척후 물기를 충분히 제거한다 다음, 효소기질을 각기의 well에 분주하여 항체와 결합된 부착되어 있는 효소와 반응하도록 하는 20-25°C에서 30분정도 반응을 이뤄지도록 하고 이때 암실에서 반응이 실행되어진다. 그리고 반응후 stop 용액을 첨가하여 반응을 종료하고 반응의 확인은 400 nm에서 실시되었다.ELISA 시험 manual에 따라 실시하였으며, 본 방법은 정성적인 sandwich ELISA 측정방법이며 표준 측정범위로는 0.26 - 17 ppm Gluten, 0.31 - 20 ppm Wheat이고, 고범위 측정으로는 1.25 - 80 ppm Gluten, 1.05 - 68 ppm Wheat이다. (Rakhi Panda et al. 2015)

(2) 상용화된 단백질 분해효소에 의한 gluten degradation 실험

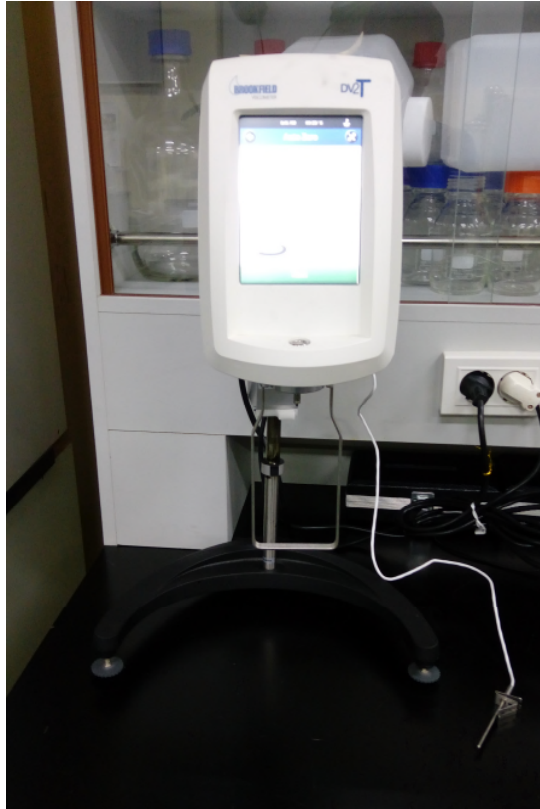
- celliac 병을 감소시키기 위해서 gluten degradation가 필수적인데 미생물을 이용하여 gluten분해를 시도하고 있으나 이와 더불어 상용화된 효소를 이용한 시험을 실시하였다. 사용한 효소로는 Alcalase(EC 3.4.21.62)와 Neutrase(EC 3.4.22)(Novozymes, Copenhagen, Denmark)를 사용하여 gluten 분해를 실시하였고, 효소의 특징을 보면 Alcalase(EC 3.4.21.62)가 pH 7-9, Temp 30-65°C 그리고 활성은 2.4 AU-A/g 이다. 그리고 Neutrase(EC 3.4.22)는 pH 7, Temp 40-50°C, 0.8 AU/gotease의 활성을 가지고 있다.
- 효소를 이용하여 gluten 분해의 실험에 사용하는 방식으로는 상기한 미생물을 이용한 방식



과 유사하게 진행되었는데 밀가루 600g에 설탕 30g, 물(tap water) 390 ml을 넣고서 여기에 위의 효소를 0, 0.1, 0.2, 0.3%를 넣고서 Alcalase는 35°C에서 배양하였으며, Neutrase는 pH 7, 40 °C배양시간은 두가지 다 공히 6, 12, 18, 24시간을 측정하였다. 24시간 이후에는 반죽으로서의 기능을 상실하여 반응을 중지하여, 24시간의 반응시간으로 한정하였다.

(3) 실험 결과

(가) 누룩균과 유산균을 이용한 gluten의 분해



Brookfield-viscometer

- gluten-free 빵류의 제조에 사용하는 사용된 균주는 산성누룩, 바이오누룩, 송학곡자의 누룩을 사용하였고 을 사용하였고, 사용된 유산균은 생명공학연구원에서 제공한 균주 3종류 (*Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus acidophilus*, *Weissella confusa* 속)와 청각 요구르트(전남해양바이오연구센터, 완도, 대한민국)을 사용하여 밀가루의 분해를 시도하였다.
- 밀가루에 균주의 첨가량은 앞서 설명하였고 측정에서 반죽의 특성을 확인하여야 하나, 반응 과정에서 gluten의 분해과정 중에 발생하여 반죽의 특성을 비교하는 것은 실제 gluten 분해도를 측정하는 것과는 차이가 있고 실질적 평가의 방법으로는 적당하지 않다. 따라서 본 실험에서는 gluten 분해의 확인은 점도의 비교로 확인하였다. 미생물과 밀가루의 경시적인 점도 변화는 배양중은 0, 6, 12, 18, 24 시간째에 시료를 채취하여 각각 측정하였다. 미생물 배양이 실시되는 Brookfield-viscometer (DV2T, Brookfield Engineering, USA)를 사용하여 spindle No. 4, speed 12 rpm 조건으로 3분간씩 3반복 측정하였다.

표 미생물의 배양에 의한 점도의 변화

		점도(cPS)			
		0hr	6hr	12hr	24hr
누룩	산성	-	2597.2±25.25	893.3±15.84	504.3±12.7
	바이오	-	2304.7±86.4	953.2±18.6	467.6±25.4
	송학	-	2436.2±46.37	816.9±25.5	455.5±28.5
유산균	생공 1	-	1327.1±31.2	309.9±24.4	158.1±18.2
	생공 2	-	1873.6±26.9	386.7±21.1	197.4±11.4
	생공 3	-	984.6±36.54	128.3±22.46	52.7±21.3
	청각	-	1796.7±45.4	521.3±26.72	234.8±23.5

미생물 발효에 의한 밀가루 점도의 변화

- 누룩균과 유산균을 이용한 gluten-degradation 효과를 알아보기 위해 밀가루에 균을 접종하여 적합한 발효온도에서 누룩균과 유산균을 배양하였다. 각기 첨가시간에 대하여 점도의 변화를 측정하였으며 최기값은 반고형의 gluten을 형성하고 있어 처음점으로 하고 매 6시간마다 점도의 변화를 확인하였는데 2597.2±25.25 cPs에서 24시간 배양에서 504.3±12.7 cPs까지 떨어졌고, 바이오누룩의 경우 2304.7±86.4 cPs에서 24시간 배양에서 467.6±25.4 cPs까지 떨어졌고, 송학누룩의 경우 2436.2±46.37 cPs에서 24시간 배양에서 455.5±28.5 cPs까지 떨어졌다.
- 한편 유산균의 경우 생공 1의 경우 1327.1±31.2 cPs에서 24시간 배양에서 158.1±18.2 cPs까지 떨어졌고, 생공 2는 1873.6±26.9 cPs에서 24시간 배양에서 197.4±11.4 cPs까지 떨어졌고, 생공 3는 984.6±36.54 cPs에서 24시간 배양에서 52.7±21.3 cPs까지 떨어졌으며, 청각의 경우 1796.7±45.4 cPs에서 24시간 배양에서 234.8±23.5 cPs까지 떨어졌다.
- 이상의 결과로 각기 누룩과 유산균을 이용하여 배양을 시켰을 때 성장의 nutrient로 작용 가능한 것이 gluten 밖에 없게 때문에 gluten degradation으로 작용했을 것으로 보인다. 그러나 누룩에서는 분명히 단백질 분해에 의해 이뤄졌지만 24시간의 변화에서도 충분한 degradation이 이뤄지지 않았고, 그러나 유산균의 경우 생공 3의 경우 유산균과 함께 배양 24시간에 52.7±21.3 cPs까지 떨어져 degradation이 충분하게 이뤄지고 있음을 알수가 있었다. 이는 발효과정에 나타나는 일부문제(암모니아취의 발생)를 제외한 매우 우수한 내

용으로 판단된다.

- Raffaella Di Cagno et al. (2002)에 따르면 sourdough에 사용되는 유산균을 이용하여 밀가루의 단백질분해를 실시한 결과, celiac patients에게 위대한 것으로 알려진 A-gliadin의 31-43 fragment를 효과적으로 분해하는 것으로 나타났으며, gliadin의 위해 peptide분해도를 확인했을 때 0.218 g/liter에서 완전히 응집효과를 가지는 것으로 나타나 gluten-free에 효과적임을 보여줬다.
- 최근 여러 연구에서, 단백질 분해 효소, sourdough에서 사용되는 유산균을 이용하여 식품 가공과정중에 gluten의 분해에 효과를 보이는 peptidases를 이용한 연구들이 많이 수행되었다. 또한 이러한 연구와 더불어 유산균 자체를 이용하는 연구와 유산균배양액을 이용한 연구가 수행되었는데 두 경우 모두다 in vitro(예로 agglutination and Caco-2/TC assays), ex vivo (biopsy-derived T cells), 그리고 acute in vivo (intestinal permeability) tests를 실시하였는데 gliadin fraction을 효과적으로 분해하는 것은 확인이 되었지만, 완전분해되지는 않는 것으로 확인되었다.
- 한편 Engström, N(2015)에 따르면, 최근에 밀가루 단백질인 gluten을 부분적으로 분해시키는 전통적인 sourdough발효에서 보여지는데 이러한 연구에서 2-gliadin이나 gluten과 ransglutaminase 2 사이의 상호결합을 막지는 못하는 것으로 나타나 gluten-free식품을 만드는데 안전하지는 않는 것으로 주목되고 있다. 그러나 이것은 밀가루의 gluten 독성을 완전하지는 않지만 gluten-free제품의 교차 오염의 위험을 줄이는데는 매우 설득력이 있다.
- 본 실험의 결과로 gluten의 위험성을 내포하는 A-gliadin의 31-43 fragment를 분해하는 것은 확인하지 못하였지만 분해가 충분히 이뤄질 수 있음을 확인하였다. 그러나

미생물 발효에 의한 밀가루 gluten의 측정

- 누룩균과 유산균을 이용한 gluten degradation측정에서 Glutomatic을 이용한 wet-gluten 측정과 수작업을 통한 dry-gluten 측정법을 수행하였다. 두가지의 gluten 측정방법은 AACC Method 38-10 방법에 기초하고 있는데 Glutomatic방법은 Wet-gluten을 측정하는 방법이고 이를 향량이 되도록 건조하여 건조무게를 비교하는 것은 dry-gluten측정방법이다.
- 표에서 보는 바와 같이 누룩에 의한 gluten degradation은 24시간이 지났음에도 수율이 50%를 넘지 못하고 있어 미생물의 반응시간을 높여 분해를 촉진하는 것이 필요하다. 그러나 실제적으로는 오랜시간 발효과정 중에 단백질 분해에 의한 암모니아취의 발생과 dough 표면의 건조에 의한 물성의 변화가 문제점으로 대두되고 있다. 추가실험에서 24시간 이상의 밀가루 발효를 실시하였으나 누룩으로 발효를 통해 gluten degradation을 충분한 정도로 얻기에는 문제점이 있다는 것을 확인하였다.(data was not shown)

표. Gluten-hand washing method 및 dry-gluten method에 따른 중량

		Gluten contents(g/100 g sample)			
		0hr	6hr	12hr	24hr
누룩	산성	13.2	12.9±0.6	11.6±0.3	8.5±0.3
	바이오	-	12.1±0.4	11.2±0.1	7.9±0.3
	송학	-	12.5±0.4	10.9±0.5	7.8±0.2
유산균	생공 1	-	10.9±0.4	7.6±0.5	3.2±0.1
	생공 2	-	9.8±0.3	7.2±0.5	3.4±0.3
	생공 3	-	8.4±0.2	5.8±0.4	2.2±0.3
	청각	-	9.4±0.4	7.3±0.2	2.9±0.4



산성누룩



바이오누룩



송학곡자

그림 . hand-washing 방법에 의해 얻어진 gluten의 건물사진



생공 1



생공 2



생공 3



청 각

그림 . hand-washing 방법에 의해 얻어진 유산균 발효 gluten

- 그림에서 보는 바와 같이 유산균에 의한 gluten degradation은 누룩균에 비하여 매우 효율적으로 분해되는 것을 볼수가 있고 생공 3의 경우 발효 24시간만에 gluten의 함량이

80%이상이 분해되어 dry gluten으로 회수되지 않고 있다. 이는 유산균을 이용한 sourdough 발효 등이 gluten-free에 적절한 가능성을 제공하고 있다는 최근의 많은 연구들에 같은 동의를 하고 있다.

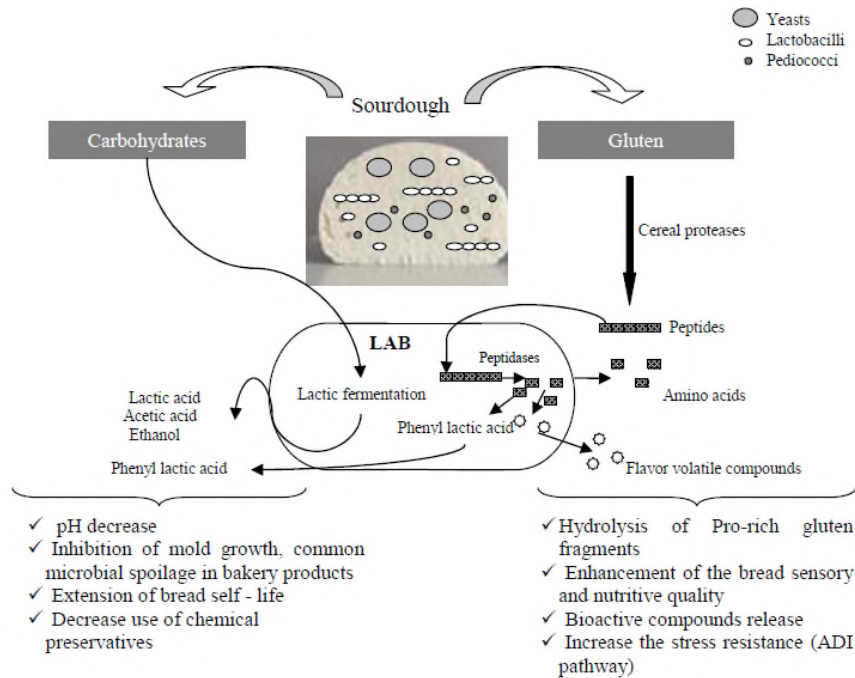


Fig. 유산균에 의한 sourdough fermentation(G. Rollán et al.(2010) Current Reserach Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology 1168-1174)

- 위의 그림에서 나타난 것처럼 sourdough는 밀가루의 발효과정을 통해서 탄수화물과 gluten을 분해하게 된다. gluten degradation과정을 통해 peptide를 생산하면 유산균에 의해 이 peptide가 에너지나 작은 amino acid로 분해되어, 맛, 풍미를 증진시키는데 기여를 하게된다. 한편 탄수화물의 경우 유산균의 에너지를 생산하는 주요 물질로 사용되며 또한 젖산, 초산, ethanol 등을 생산하는 기본 물질로 사용되게 된다.
- 유산균을 이용한 sourdough fermentation은 같은 기간 yeast에 의한 발효는 free amino acid의 감소를 일으키지만 유산균은 proteolysis과정을 통해 free amino acid의 함량을 증가시키 식품으로서의 우수성을 증진시키게 된다(Gobbetti M(1998)).

(나) 상용화된 단백질 분해효소를 이용한 gluten의 분해

- 유산균을 이용한 gluten degradation에서 celiac disease환자들에게 충분한 gluten degradation 효율을 제공하기에는 한계가 있어 이를 보완하고자 상용화된 효소를 이용하여 gluten degradation을 실시하였다. 상용화된 효소로는 Alcalase(EC 3.4.21.62)와 Neutralse(EC 3.4.22)(Novozymes, Copenhagen, Denmark)를 사용하여 gluten 분해를 실시하였고, 효소의 특징을 보면 Alcalase(EC 3.4.21.62)가 pH 7-9, Temp 30-65°C 그리고 활성은 2.4 AU-A/g 이다. 그리고 Neutralse(EC 3.4.22)는 pH 7, Temp 40-50°C, 0.8 AU/gotease의 활성을 가지고 있다.
- 실험은 밀가루 600g에 설탕 30g, 물(tap water) 390 ml을 넣고서 여기에 위의 효소를 0, 0.1, 0.2, 0.3%를 넣고서 Alcalase는 35°C에서 배양하였으며, Neutralse는 pH 7, 40 °C배양시간은 두가지 다 공히 6, 12, 18, 24시간을 측정하였다. 24시간 이후에는 반죽으로서의 기능을 상실하여 반응을 중지하여, 24시간의 반응시간으로 한정하였다.

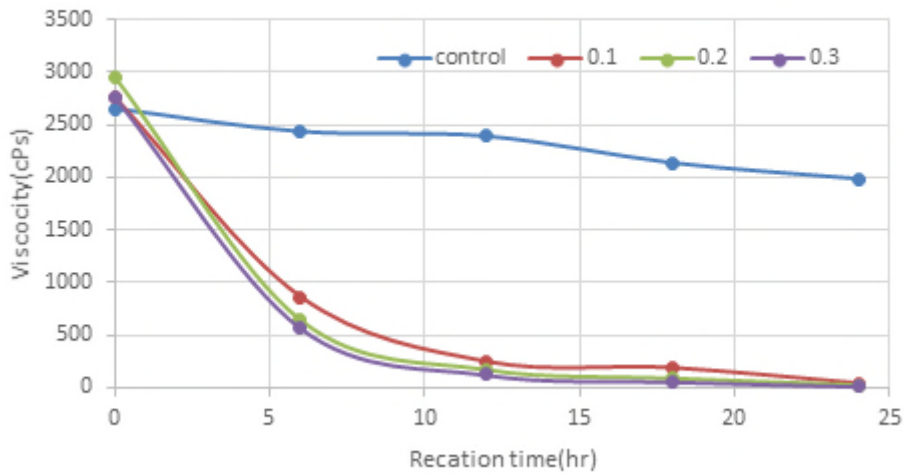


표. Alcalase효소 농도와 반응시간에 따른 점도의 변화

	반응시간	점도(cPs)				
		0	6	12	18	24
Alcalase	control	2647.2	2432.7	2389.1	2137.8	1987.6
	0.1	2768.4	863.1	243.6	184.3	36.7
	0.2	2956.2	643.3	168.9	86.7	23.5

	0.3	2768.6	567.4	120.2	54.3	10.3
--	-----	--------	-------	-------	------	------



Alcalase 효소첨가 직후



Alcalase 효소첨가 6hr 후



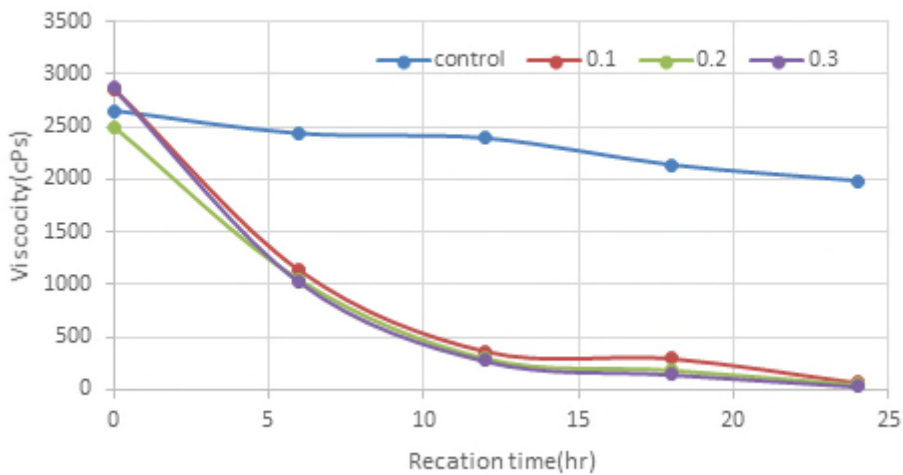
Control



Alcalase 각기 농도 첨가 24hr 후

그림. alcalase처리와 시간에 따른 형상의 변화

- alcalase의 처리에 따른 밀가루의 gluten degradation 경향을 나타내고 있다. 반응 6시간 초기에 급격한 감소가 일어났다. 또한 반응이 24시간이 경과하면 gluten의 분해가 충분히 일어나 점도형성이 일어나지 않는 상태로 진행되어져 분해가 진행되었음을 알수가 있었다.
- 효소의 농도 0.1%(g/w)에서 시간이 경과함에 따라 점도가 급격히 감소하였고, 24시간에는 wet gluten 조사를 하기 위하여 gluten 형성을 실시하였으나 형성이 되지 않을 정도로 gluten degradation이 충분히 진행되었음을 알수 있었으며 gluten 단백질의 검출을 위해서는 추가적인 검토방법이 필요하였다.



	반응시간	점도(cPs)				
		0	6	12	18	24
Neutrased	control	2647.2	2432.7	2389.1	2137.8	1987.6
	0.1	2864.2	1138.2	367.5	298.7	68.9
	0.2	2497.6	1043.6	297.5	186.7	48.3
	0.3	2868.7	1026.4	274.3	146.8	32.8

표. Neutrased 효소 농도와 반응시간에 따른 점도의 변화

- Neutrased에 의한 효소처리에서도 alkalased와 비슷한 경향을 보이고 있으나 neutrased의 효소 제품 특성에 따라 활성이 조금 낮게 나타난 것으로 판단된다. 이 효소 또한 반응시간이 이뤄진다면 충분한 gluten degradation 효과를 얻을 수 있을 것으로 보이며 이를 통한 gluten-free products의 상용화 가능성이 높다고 할 수 있다.
- 한편 본 Neutrased에서도 앞서의 alkalased와 마찬가지로 wet gluten 측정법으로 검출하고자 하였는데 gluten 을 형성할 수 없을 정도로 충분히 가용화되어져 gluten을 형성하지 못하여 고농도로 측정하는데 적합한 wet-gluten 측정법인 hand washing method로서는 검출이 불가능하여 미량의 gluten 측정 방법이 요구되었다.

(다) ELISA methods를 이용한 gluten의 미량검출 확인

- Enzyme-linked Immunoassay (ELISA) R5 Mendez Method를 대표적인 방법으로 ELISA 방법이 사용되고 있는데 현재 gluten 함량 20 mg/kg을 검지하기 위하여 사용하고 있으며 on-off 방식과 함량을 정량으로 측정하는 방법이 이용되고 있다. 본 실험에서는 Wheat/gluten(Gliadin) ELISA kit II(Wheat ELISA kit)(Morinaga, Yokohama, Japan)을 이용하였다. Wheat ELISA kit의 특징은 gliadin을 antigen으로 하며 wheat gluten을 검출하는데 사용하고 있다.
- 측정방법에는 측정하고자 하는 시료 1g에 시료추출용액 19 ml를 넣고 30초간 혼합한 다음, 100°C에서 10분간 정치 후 강하게 혼합한 다음, NaOH로 pH 6-8로 조정한다. 조정된 반응액을 3,000g에서 20-30°C를 유지하면서 10분간 원심분리를 돌려 조사할 상등액을 얻는다. 얻어진 상등액을 표준 gluten 용액과 함께 ELISA kit에 분주한 다음, 20-2

5°C에서 한시간 동안 반응을 시키고, buffer 로 충분히(6회) washing한다. 물기가 제거된 kit에 antibody가 결합된 효소를 각 well에 분주하여 20-25°C에서 30분 동안 2차 반응을 시킨다. 이후 반응된 효소액을 6회정도 buffer로 세척후 물기를 충분히 제거한다음, 효소기질을 각기의 well에 분주하여 항체와 결합된 부착되어 있는 효소와 반응하도록 하는 20-25°C에서 30분정도 반응을 이뤄지도록 하고 이때 암실에서 반응이 실행되어진다. 그리고 반응후 stop 용액을 첨가하여 반응을 종료하고 반응의 확인은 400 nm에서 실시되었다.ELISA 시험 manual에 따라 실시하였으며, 본 방법은 정성적인 sandwich ELISA 측정방법이며 표준 측정범위로는 0.26 - 17 ppm Gluten, 0.31 - 20 ppm Wheat이고, 고범위 측정으로는 1.25 - 80 ppm Gluten, 1.05 - 68 ppm Wheat이다. (Rakhi Panda et al. 2015)

3. 단백질소재에 대한 gluten free 발효조건의 탐색 및 최적화

- gluten 으로 부터의 안전성을 높이기 위한 방법으로 gluten degradation을 통한 gluten 저감화 방법과 함께 gluten-free소재를 이용한 빵류의 제조도 많은 주목의 대상이 되고 있다. celiac환자들을 위한 글루텐이 없는 쌀이나 메밀과 같은 곡물로 밀을 대체하는 가공식품개발이 진행되고 있으며 (Vallons et al., 2011), 글루텐 대체물로 pre-gelatinized 전분을 이용하는 방법도 활발히 연구되고 있다. Clerici et al.(2009)는 압출 성형법을 이용하여 pre-gelatinized extruded 전분을 제조하여 글루텐을 대체하는 연구를 수행하였다.
- gluten-free를 확보하는 방법으로 gluten 미함유하고 있지 않는 다양한 전분소재와 식용이 가능한 polymer를 첨가하여 gluten과 유사한 network를 형성 가능하도록 하는 방법을 사용하고 있다. 쌀 식빵을 제조하는데 있어 쌀의 구성성분 중 아밀로스 함량은 20-25%가 적합한데(Perdon & Juliano, 1975), 아밀로스 함량이 높은 쌀로 식빵을 제조할 경우 식빵의 부풀림성이 낮고 노화가 빨리 진행되어 부스러지기 쉬운 조직감을 갖는다고 알려져 있다. 쌀에는 반죽에 탄성을 부여하고 공기를 포집할 수 있는 능력을 갖는데 글루텐이 없기 때문에 이를 보완할 필요가 있는데, 반죽개량제로서 다양한 하이드로콜로이드가 적용되어 왔다 (Lazaridou et al., 2007).
- 이 중 hydroxypropyl methylcellulose(HPMC)는 글루텐 프리 빵에 있어 가장 적합한 것으로 알려져 있는데(Marco & Rosell, 2008), HPMC는 반죽의 적성을 개량하고 관능적인 특성에도 좋은 영향을 미치며 노화작용을 억제하는 역할을 한다(Anton & Artfield, 2008). 또한 쌀가루에 함유된 손상전분은 반죽 경도의 감소와 공기 포집 능력을 떨어뜨려 제빵 적성에 적합하지 않다고 보고되고 있다(Barrera et al., 2007). 한편 gluten을 대체하는 단백질원을 이용하여 단백질의 가교결합력을 높이는 transglutaminase를 이용한 network 형

성에 관한 연구들이 수행되었다.

- 본 실험에 앞서 단백질원으로 대두단백, 콜라겐, 젤라틴을 이용하여 gluten-free bread를 제조하여 보았다. 그러나 빵성형이 깨지는 문제점을 충분히 해결하지 못하였으며 이상발효에 의한 거품꺼짐 현상, 이취, 외부 성형의 불안전성, 조직의 치밀성 부재 등이 해결되지 못하였다. 따라서 본 실험에서는 gluten-free를 얻기 위하여 탄수화물 위주의 gluten-free 빵제조의 최적화를 시도하였다.



대두단백



콜라겐



젤라틴

- Gluten-free소재의 선정

Gluten-free 빵류를 제조하는데 적합한 소재를 선별하고자 감자전분, 콩분말, 옥수수전분, 그리고 쌀가루를 이용하였고 아래 표의 방법에 따라서 제시한 gluten-free빵을 제조하였다.

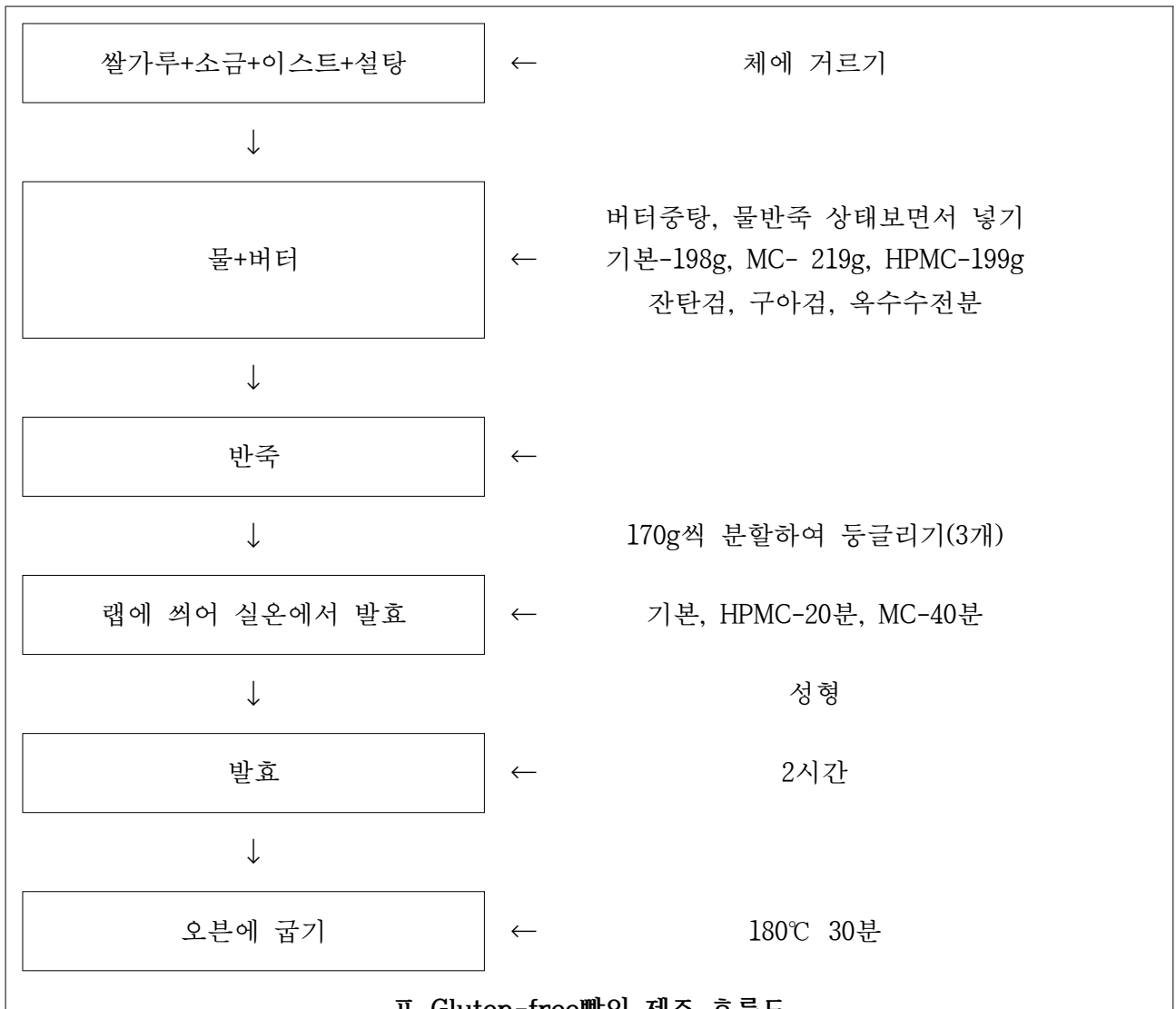


표 Gluten-free빵의 제조 흐름도

제조과정은 아래의 그림 6에서 나타낸 그림처럼 실시하여 빵을 제조, 평가에 사용였다. gluten-free소재에 점탄성과 네트워크를 형성하여 빵류와 같은 부품성을 형성할수 있는 소재를 선정하기 위하여 식품용 고분자소재 중에서 식품의 물성을 개선하는데 많이 사용되고, 외국 문헌과 상업적 사용으로 많이 알려진 Xanthan gum, MC(methyl cellulose), HPMC(hydroxypropyl methyl cellulose)를 선정하였다. 또한 빵류의 제조는 gluten-free소재는 아니지만 빵류의 형성에 충분하지 않아 부품성이 떨어지는 호밀을 대상으로 실시하여 상용화된 제품과의 비교를 통하여 고분자소재의 빵류에서의 가능성을 평가하였다.



그림. 빵류 제조 공정도에 따른 제조 과정사진

gluten free 빵류의 최적 발효를 실시하기 위하여 사용한 빵류 재료의 조합은 아래와 같으며 아래의 물성을 측정된 시료이다.

1. 쌀 160g + 감자 100g + 물 180g + 노른자 50g + 설탕 25g + 소금 5g + 탈지분유 6g
2. 쌀 160g+ 감자 100g + 물 120g + 노른자 50g + 설탕 25g + 소금 5g + 탈지분유 6g+이스트 5g(발효 : 38도/40분, 오븐 위아래 170도 40분)
3. 쌀 318g + 타피오카 150g + 감자 50g + 옥수수 2g + 노른자 6g + 설탕 30g + 소금 10g +잔탄검 6g + MC 6g + 이스트 10g + 구아검 3g + 버터 75g
4. 쌀 318g + 타피오카 150g + 감자 50g + 옥수수 2g + 노른자 6g + 설탕 30g + 소금 10g +잔탄검 6g + MC 6g + 이스트 10g + 구아검 3g + 마요네즈 75g
5. 밀가루 600g + 물 390g + 이스트 12g + 소금 12g + 버터 30g + 설탕 30g
6. 쌀 300g + 타피오카 100g + 옥수수 100g + 이스트 10g + 설탕 30g + 소금 5g + 전란 3개 +구아검 5g + 베이킹파우더 5g + 탈지분유 10g + 물 212(오븐 위아래 170도)
7. 쌀 300g + 타피오카 100g + 옥수수 100g + 이스트 10g + 설탕 30g + 소금 5g + 전란 3개 +구아검 5g + 베이킹파우더 5g + 탈지분유 10g + 물 212g(오븐 위아래 150도)

○부피측정

발효된 빵류의 부피를 측정하기 위하여 첨가물 첨가로 제조된 빵류에 AACC방법에 따라 혼합이 완료된 직후 반죽을 각각 40g 씩을 분할하여 100 mL의 메스실린더에 넣어 발효시

간과 동일하게 유지(30°C, R/H 80%)시킨후 메스실린더에 부풀어 오른 부피를 측정하였음.

- 그림 1에서 나타난 시중에서 글루텐이 소량(10% 추가) 첨가된 호밀빵과 비교를 하였다. xanthan gum은 물성형성능을 보였으나 기공이 고르지 못하여 질감을 반감시켰고, 빵류의 반죽에서 호밀과의 결합력이 떨어져, xanthan gum 끼리 서로 결합하는 성질을 가져, 반죽을 성형하는데 많은 애로사항을 보였다. 그리고 MC와 HPMC는 전체적으로 고른 기공성과 빵류 제조에 적합한 하였으나 methyl cellulose의 경우, 학생중심의 간이 기호도 평가에서 신맛이 느껴진다는 이미지를 많은 지적이 나왔다. methyl cellulose는 무색, 무미이고 식품에 사용에 제한성이 없는 것으로 알려져 있으나, 호밀빵하고의 결합과정에서 이미지를 발생하여 적합한 소재로서 제외되었다.
- 한편 HPMC의 경우 부품성에서는 약 소량첨가(0.59%)하였음에도 빵류의 제조에서 2.5배의 부품성을 보이고 있어 최적화시에 충분한 기대가 되었다. 또한 HPMC는 기호도 면에서 자료에는 나타나 있지 않지만 쌀을 주제로 하는 빵류제조에서 떡류와 비슷한 맛을 내는 것이 아니라 보다 빵과 같은 질감과 맛을 제공하고 있어 gluten-free형 제품에 적합한 것으로 나타나고 있다. 밀빵에서는 밀가루에 물을 첨가하여 반죽할 때 불용성의 단백질이 수화하여 반죽내의 gluten망상구조가 형성되고 이로 인한 반죽의 점탄성이 효모가 형성한 CO₂ 가스를 보유함과 아울러 발효 시 적절히 신장함으로써 반죽을 팽창시킨다. 밀가루와 달리 쌀가루에는 빵의 구조를 형성하는 글루텐 단백질이 없어 쌀빵의 제조에는 기술적인 어려움이 따른다(Kulp et al., 1974). 쌀빵의 제조 시에 밀가루의 이러한 기능을 부여하기 위하여 활성글루텐(vital gluten) 뿐만 아니라 검(gum)류 등 첨가 재료의 사용이 연구되어 왔다(Kang et al., 1997).
- 국내에서 시판되고 있는 쌀식빵의 경우 대부분 활성글루텐을 약 17% 첨가하여 제조하고 있으며(Kim et al., 2009) 이는 강력분 밀가루의 단백질 함량보다 높은 비율의 글루텐을 함유하고 있다. 한편 밀가루에 알레르기를 나타내는 사람들을 위하여 밀가루가 아닌 타곡분이나 전분을 이용하여 다양하게 빵을 제조하거나(Jong et al., 1968) 다양한 검류의 첨가에 의한 글루텐이 없는(gluten-free) 쌀빵의 제조방법들이 제시된 바 있다 (McCarthy et al., 2005; Nishita et al., 1976; Sivaramakrishnan et al., 2004).
- 일반적으로 밀가루에 반죽강화제로 불리는 유화제를 첨가하였을 때 반죽의 내구성 개선, 주저앉음에 대한 저항성, 가스보유력 강화를 통해서 궁극적으로 빵의 부피증가, 조직감개선 및 균일하고 미세한 기공을 보유하도록 하며, 연화제의 경우 전분의 결정화 속도를 지연시켜 빵 속이 단단해지는 것을 방지하도록 한다(Stempfli & Bersten, 1995). 또한 α -amylase, xylanase, hemicellulase, glucose oxidase, lipase 등 효소를 혼합적으로 사용함으로써 빵의 품질을 향상시키는 효과를 얻을 수 있다고 하였다(Caballero et al., 2007; Pyler, 1988). 쌀빵의 제조 시에도 α -amylase나 glucose oxidase의 첨가가 빵의 제조적 성을 향상시킬 수 있다고 보고된(Gujral & Rosell, 2004; Lee et al., 2008) 바 있다.

- 첨가된 hydrocolloids에 따른 부피측정

우리 쌀가루로 제조한 쌀 식빵의 부피는 앞서 제시한 Fig. 7에 나타나 있다. 우리쌀로 제조된 쌀 식빵의 부피는 xanthan gum 이 112.5 mL, MC가 124.2mL, HPMC는 153.4mL 을 나타내어 HPMC가 부피성이 확실히 크게 증가하였음을 알수 있었다. Mara와 Cristina(2006)는 part baked 빵 제조에 밀가루 대비 HPMC를 첨가하였을 때, 부피가 증가가 일어났다고 하는데, 본 실험에서 검류를 첨가한 시험구의 부피가 크게 증가한 것으로 나타나 유사한 결과를 보임. Rosell et al. (2001)은 단백질 함량 12.48%의 밀가루에 sodium alginate, κ -carrageenan, xanthan gum, HPMC 등을 0.5% 첨가하여 제조한 빵의 비용적을 측정한 결과 sodium alginate 를 첨가한 것은 비용적이 작아졌으나 HPMC를 첨가한 것은 커졌다고 하였는데, 본 실험에서도 HPMC가 가장 높은 증가율을 보였다. Ribotta et al. (2005)이 sodium alginate, κ -carrageenan, λ -carrageenan, carob gum, guar gum 등의 검류를 첨가하여 제조한 빵의 부피를 측정한 결과, sodium alginate 첨가시 부피가 가장 컸다고 하였으며, 검류 첨가시 부피가 커지는 것은 반죽 제조 시 검류에 수화되어 결합하고 있는 물이 오븐에서 고온으로 가열 시 분리되어 전분과 단백질 간에 상호작용으로 막을 형성하여 굽기 중 방출되는 가스를 포집하기 때문인 것으로 생각된다.

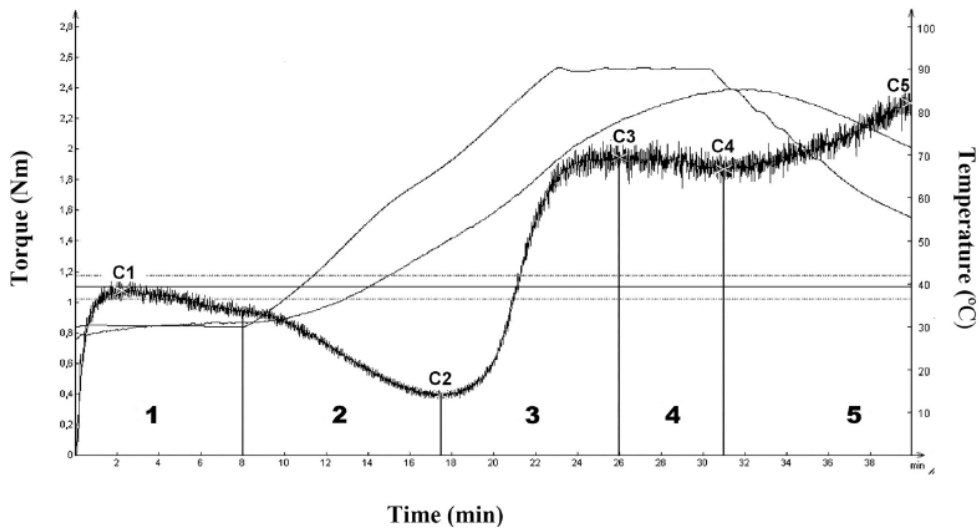
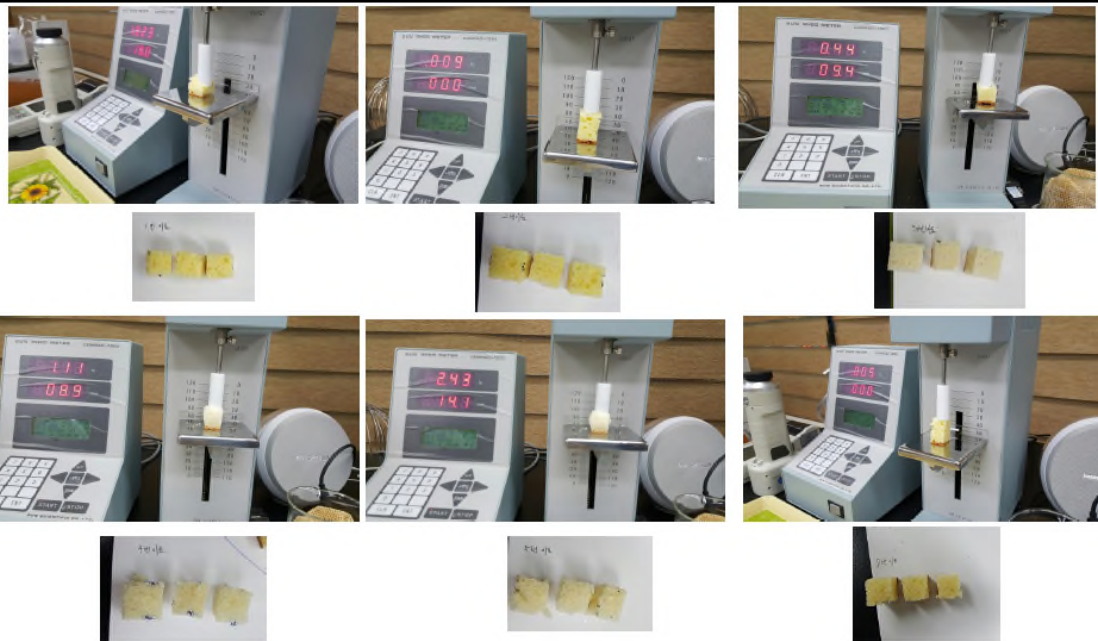
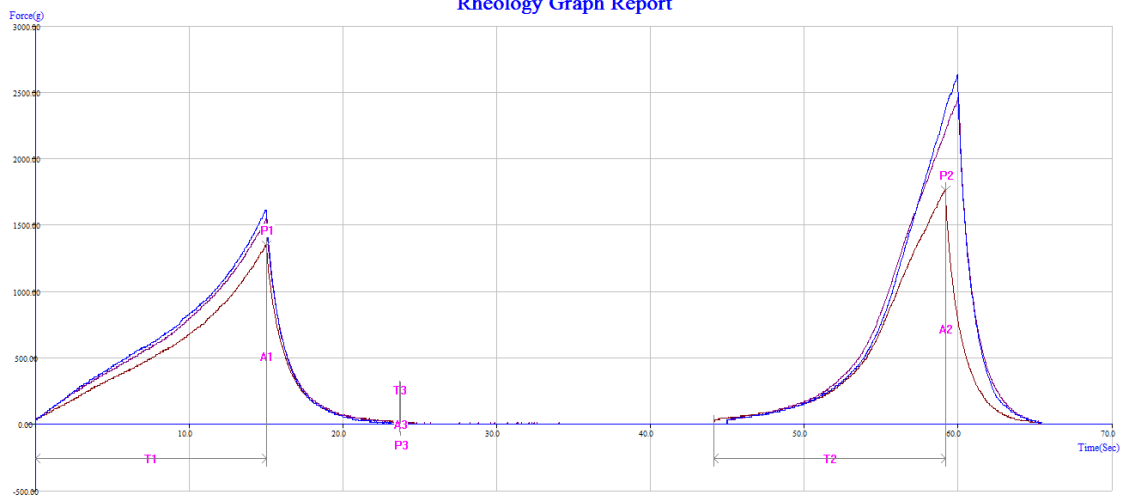


표. 밀가루를 이용한 전형적인 Ferinograph

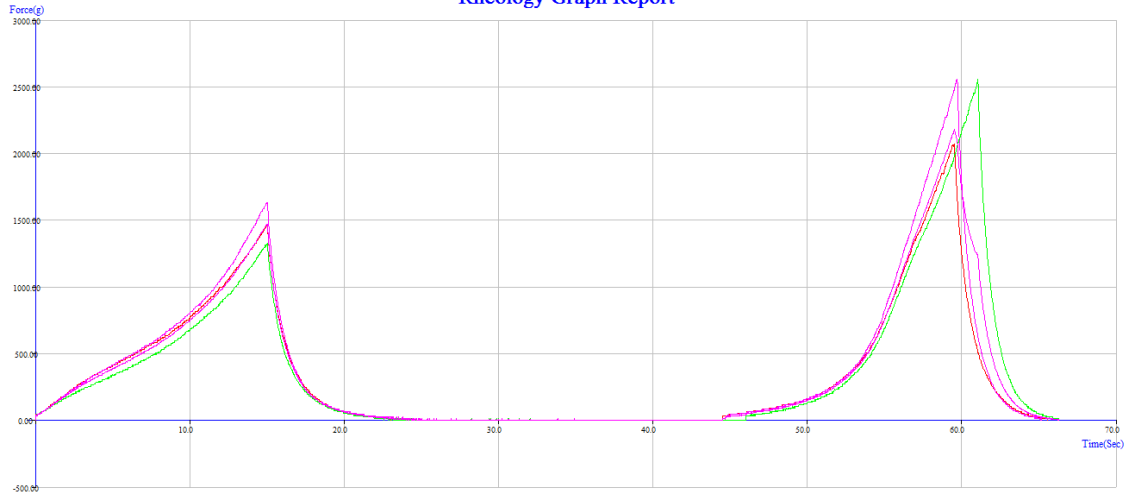


Rheology Graph Report



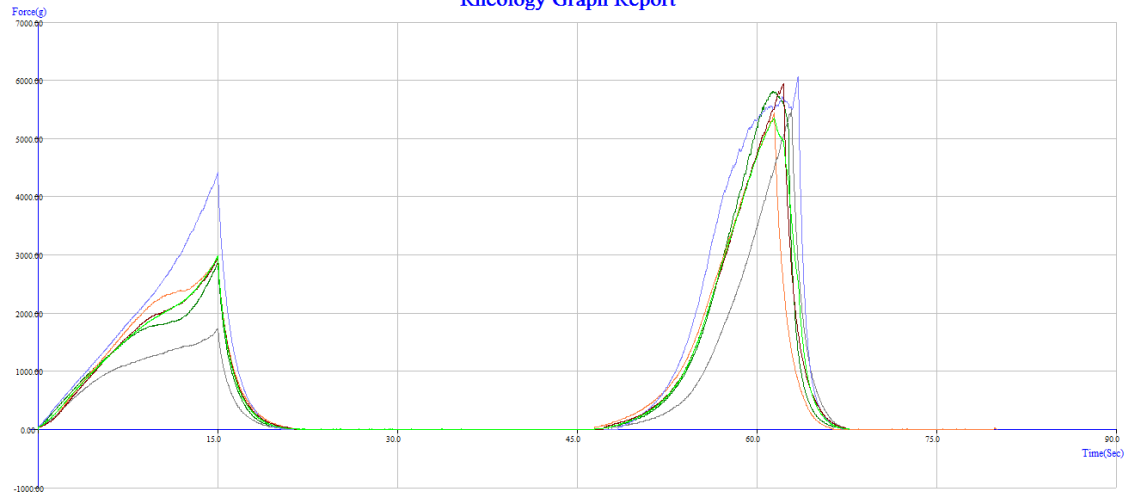
sample 1

Rheology Graph Report



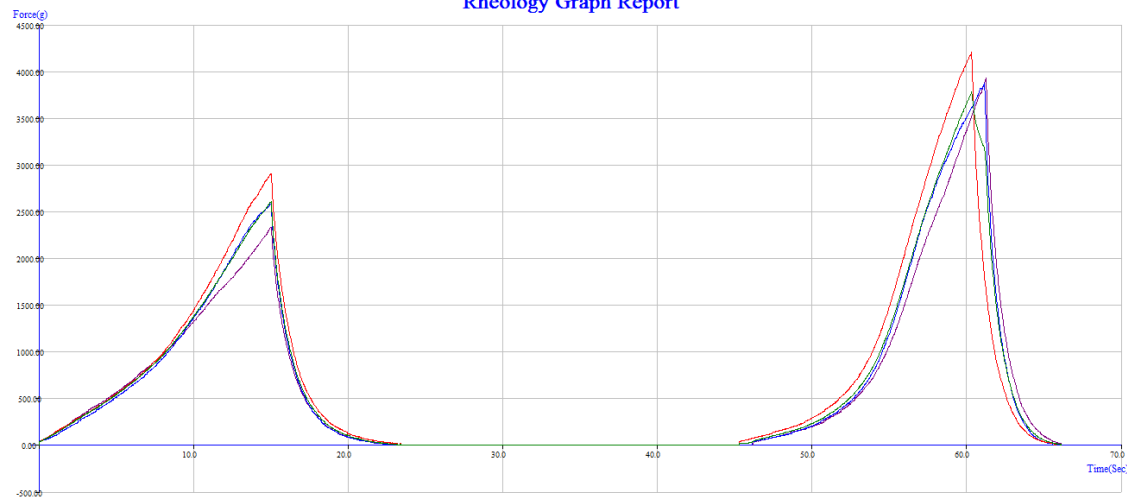
sample 2

Rheology Graph Report



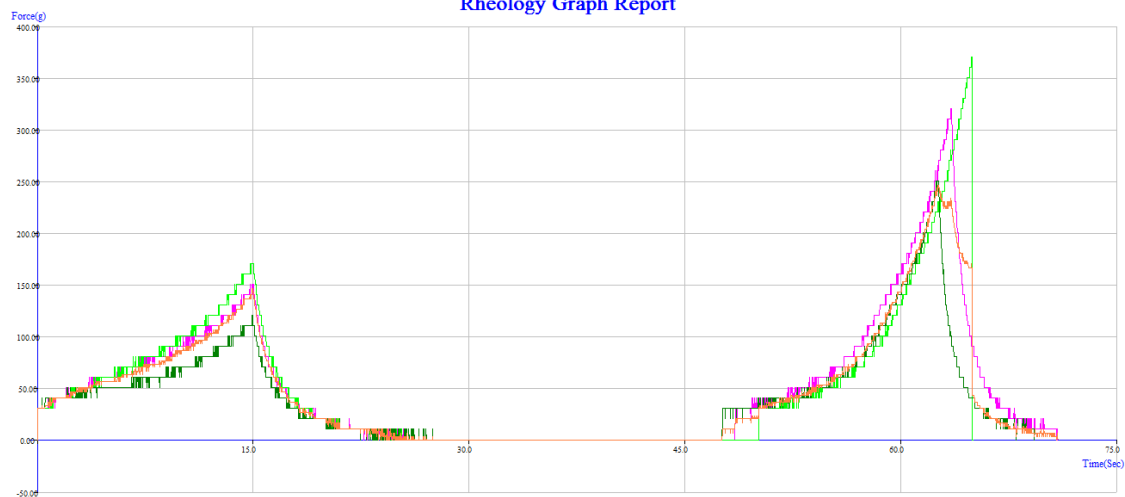
sample 3

Rheology Graph Report



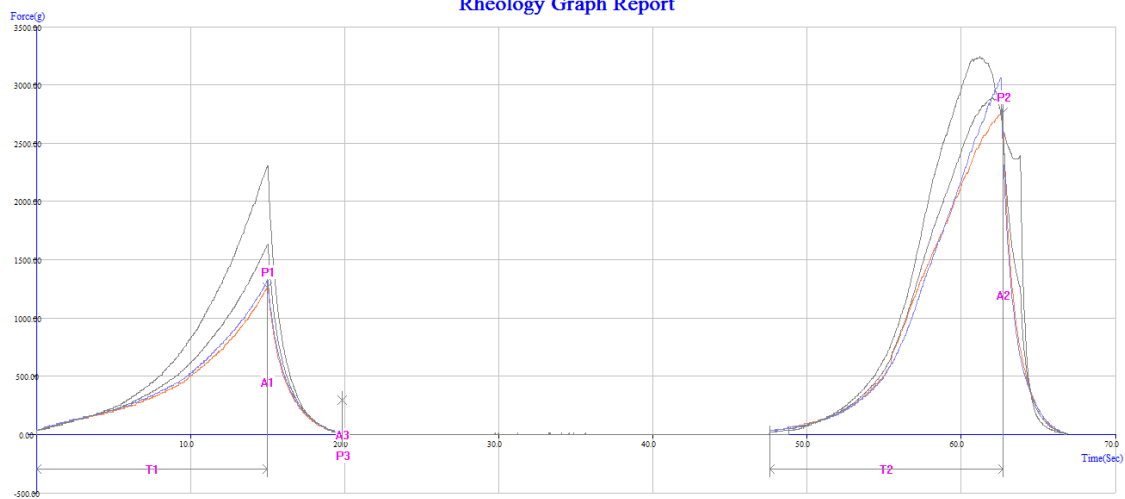
sample 4

Rheology Graph Report



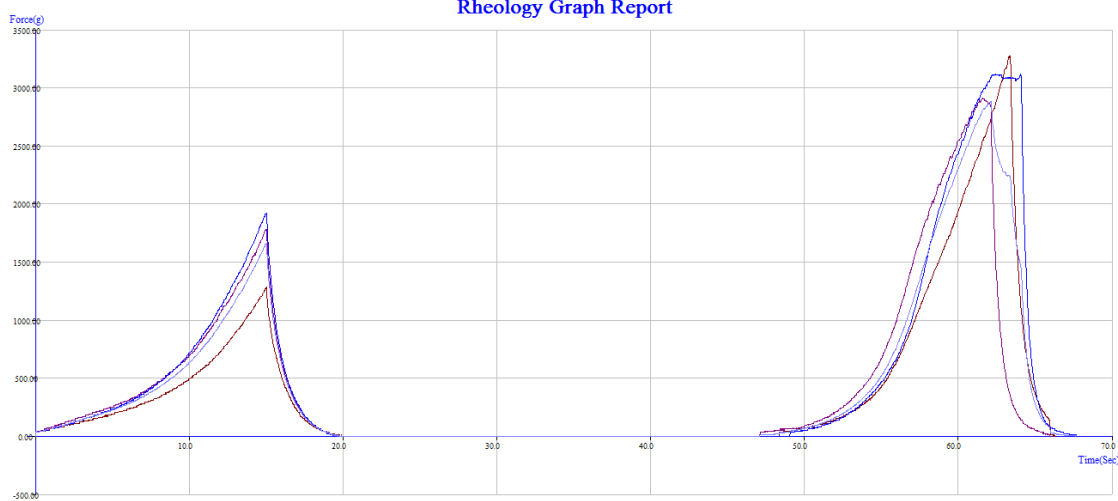
smaple 5

Rheology Graph Report



sample 6

Rheology Graph Report



sample 7

[3차년도]

1. Gluten-free 식품의 gluten 함량 측정을 위한 미량시험측정법 검정

서론

시리얼 곡물은 상업적으로 식품에 사용하는 중요한 곡물중 하나로서, 수많은 식품에서 영양뿐만 아니라 기능적 역할을 한다. 1.2 시리얼 곡물의 주요 단백질인 글루텐은 전체 종자단백질의 75-85 %를 차지하고, 단백질 prolamins과 glutelins의 복합체이다. 글루텐은 밀, 호밀, 보리, 귀리, 옥수수과 같은 일부 곡물의 내피 속 전분과 결합된 것들이 존재하는데, 물에 녹지 않기 때문에 밀 씨앗의 전분을 씻어 내면 정제할 수 있고, 반죽형성에서 유변학적 성질을 부여하는 역할을 한다.³

프로라민은 저장 단백질로 proline과 glutamine이 풍부하게 존재하며 알콜에 용해되고 장의 프로테아제와 펩티다제 같은 단백질 분해효소에 저항성을 가지고 있다. 4-6 글루텐 함유 식품 섭취 후 Celiac disease(CD)에 걸리기 쉬운 사람에게 경우 소장 점막에 면역 독성을 띠는 펩타이드가 될수 있는데, 밀, 보리 및 호밀의 prolamins과 glutelins 분획은 강력한 체액성 및 세포성 면역 반응을 일으킬 수 있는 풍부한 아미노산 결정기를 가지고 있다.⁷ 특히, 이들 펩타이드 모티프 및 탈아미노화된 유사체는 HLA markers에 선택적으로 유전적인 감수성이 높은 사람들에게서 CD의 특징을 나타내는 T 세포 반응을 유도한다. CD는 전 세계 인구의 약 1 %에 영향을 미치고 있으며, 최근 몇 년 동안 뚜렷하고 지속적인 발병율을 보인다. 8-10

글리아딘은 α/β -, γ -, $\omega 2$ - 및 $\omega 5$ - 아형으로 분류되는 단량체 단백질이며, 글루텐은 저분자 및 고분자량 글루테닌 subunits(LMW-GS 및 HMW-GS)으로 분류되는 고분자 단백질이다.¹¹ 알파 글리아딘 (α -gliadin)의 일부분은 장 사이의 막세포(enterocytes)를 자극하여 더 큰 분자가 세포 사이의 실란트 주변을 통과하도록 한다. 이러한 tight junctions의 붕괴는 세계로 구성된 아미노산보다 큰 펩타이드가 혈액으로 유입 및 순환 가능하게 한다. 글리아딘 중에서 길이가 33 개 아미노산 인 $\alpha 2$ -gliadin 단편들이 흡수되는데, 일단 장벽이 33-mer 펩타이드를 흡수하면, 복강 내 스프루 환자의 항원 제시 세포가 다른 백혈구에 신호를 보내 공격한다. 그 결과 장 벽에 흡수된 세포와 용모가 파괴되어 CD를 일으키게 된다. 이로 인한 심한 체강 질병은 창백하고, 느슨하고 기름기가 많은 대변(steatorrhea), 체중 감소 또는 체중 증가 실패(어린 아이들)의 특징적인 증상을 유발하며, 소장에서의 염증, 전반적인 흡수불량을 증상으로 한다.^{12,13}

CD가 글루텐을 섭취한 결과 나타나는 것처럼, 이 질병 관리는 엄격한 식이를 회피에 초점을 맞춰져 있다.¹⁴ CD환자의 발생이 글루텐 제한으로 초점이 맞춰지면서, 글루텐 프리 제품의

출연을 촉발시켰으나, 자연적으로 "글루텐이 없는"식품은 가공 중에 미량성분이나 교차 오염을 통한 글루텐 오염 가능성 때문에 실제로 글루텐없는 식품(gluten-free foods)은 엄격하게 확인하고 찾기가 쉽지 않다. 이러한 우려를 해결하기 위해 규제 당국은 "글루텐 프리 (glutenfree)"라고 표시된 식품의 글루텐 함량에 대해 허용 가능한 임계치 수준을 구현했습니다. Codex alimentarius는 CD 환자에게 안전한 음식으로 글루텐 20 mg/kg의 기준치를 정하고 있다.¹⁵ 이 기준치를 "gluten-free"이라고 인정한다. 최근 VITAL Scientific Expert Panel은 밀 단백질에 1mg의 용량으로 밀 알레르기 환자의 95 %에서 증상이 나타나지 않는다는 사실을 입증하여 20 mg/kg 기준치가 밀 알레르기 환자에게도 적합하다는 것을 시사하고 있다.¹⁶

현재 국내에서 식품공전상에 gluten을 측정하는 방법은 등록되어 있지 않다. 아직까지 국내에서 gluten을 측정하여 사회적으로 문제가 되지 않기 때문이지만 향후 국외로 gluten-free식품을 수출하기 위해서는 측정법과 교차오염에서 오는 미세한 함량까지 측정이 되어야 할 것으로 본다. gluten을 측정하는 방법으로는 크게 2가지의 방법으로 나누어 지는데 강력, 중력, 박력과 같이 gluten의 함량이 많은 경우 사용되는 방법(17) 과 CD에 기준이 되는 20 mg/kg를 측정할수 있는 방법으로 나누어 진다. 이러한 방법으로는 글루텐에 존재하는 펩타이드 서열에 특이적인 면역적 진단의 사용을 통해 이루어진다. 글루텐 검출의 현재 표준은 밀, 보리, 호밀에 함유하고 있는 프롤린 분획에 존재하는 에피토프 QQPFP, QQQFP, LQPFP 및 QLFPFP를 인식하는 R5 monoclonal antibody(mAb)의 사용에 기초한다.^{18,19} 이들 결합 부위에서 글루타민(Q) 잔기의 존재는 항원 결정기가 탈아미드화에 어렵게 만든다. 사실, 글루타민이 그 유도체인 글루탐산으로 전환되면 항체-항원 상호 작용에 관련된 정전기적 및 공간적 보완이 영향을 받으며 글루텐의 물리 화학적 성질이 크게 달라진다. 이들 항원결정기에서 탈 아미드화의 효과는 매우 중요한데, R5 mAb는 산업용 글루텐에 대한 친화도 및 상업용 R5 기반 competitive ELISAs (20,21)를 이용한 분석에 근거한 키트 표준을 기준으로 산업 및 실험실에서 만들어진 탈 아미드 글루텐에 대한 친화도가 ≥ 125 배 감소한 것으로 나타났다. 이러한 시그니처 R5 에피토프의 항원 성을 결정하는데 있어서 글루타민의 중요성을 강조했다.

본 연구에 목적은 국내에는 아직 규정이 없는 gluten-free 시험법에 대하여 AOAC 및/ 또는 해외의 규제 당국에서 인정되고 있는 방법중에 gluten allergen ELISA 방법에 대한 유효성 확인 하고자 한다. 향후 gluten-free식품이나 소재의 국제적인 유통에 대비, 수출의 경우 발생 가능한 gluten-free 식품의 인증요구에 효과적인 대응방법이 될 자료로 제공코자 한다.

재료 및 방법

재료

gluten-free 측정을 위하여 밀가루 반죽을 제조하였는데 밀가루는 강력분(큐원, 경기도, 대한민국)을 사용하여 밀가루 반죽을 제조하였고 여기에 상용화된 효소 Protamex® (EC

3.4.24.28)를 첨가, 분해반응을 실시 이를 분해도의 정확성을 검증하는데 사용하였다.

상용화된 단백질 분해효소에 의한 gluten degradation 실험

gluten 분해물을 얻기 위해서 상용화된 효소를 이용하여 gluten분해를 시도하였다. 사용한 효소로는 Protamex® (EC 3.4.24.28, from *Bacillus subtilis*)(Novozymes, Copenhagen, Denmark)를 사용하여 gluten 분해를 실시하였고, 효소의 특징을 보면 Protamex®는 pH 5-11에서 활성이 있고, pH 8에서 최적의 활성을 보이나, 단백질 안정화를 위하여 최적 pH는 7.0으로 선정하였다. pH 5.5-7.5에서 잘 작동하며, 35-60°C에서 95%의 활성을 유지하며, 85°C, 10분처리에 불활성화된다. Protamex®는 효소 제제의 단백질 분해 활성은 Anson [22]에 따라 결정되었다. Protamex®를 이용하여 gluten 분해실험은 밀가루 600g에 설탕 30g, 물(tap water) 390 mL을 넣고서 여기에 위의 효소를 0, 0.1, 0.2, 0.3%를 넣고서 중간 중간 저어 주면서 pH 7, 40 °C 반응시켰고, 반응시간은 0, 1, 2, 3, 4시간으로 반응시켰으며 반응후 90°C에서 15분간의 열처리를 통해 효소의 반응을 중지시켰고, 반응된 시료를 건조시켜 시료로 사용하였다. 분해된 시료의 점도측정은 Brookfield-viscometer (DV2T, Brookfield Engineering, USA)를 사용하여 spindle No. 4, speed 12 rpm 조건으로 3분간씩 3반복 측정하였다.

Gluten의 함량분석

gluten 고함량에 대한 gluten degradation측정에서 Glutomatic을 이용한 wet-gluten 측정과 수작업을 통한 dry-gluten 측정법을 수행하였다. 두가지의 gluten 측정방법은 AACC Method 38-10 방법에 기초하고 있는데 Glutomatic방법은 Wet-gluten을 측정하는 방법이고 이를 함량이 되도록 건조하여 건조무게를 비교하는 것은 dry-gluten측정방법이다.(23)

Gluten 미량측정을 위하여 사용된 kit

AgraQuant® Gluten G12 Assay, COKAL0200 (4-200 ppm) (Romer Labs® Tulln, Austria)

AgraQuant® 글루텐 G12 분석법은 샌드위치 효소 결합 면역 흡착 분석법 (ELISA)이다. 이 단일 클론 항체는 33개 아미노산으로 구성되어 있는 글루텐 면역 독성의 주요 유발하는 알파-2-글리아딘 fraction으로부터 생성된다. 33-mer는 효소 분해에 매우 저항성이 강하며 분석 마커로 적합하다. G12 항체는 복강 내 환자에서 자가면역반응을 유발하는 글루텐의 독성 펩타이드를 표적으로 하므로 식품 안전성보다 적합하다. 글루텐의 독성 분획물에 대한 단클론 G12 항체는 마이크로 웰 표면에 미리 코팅되어 있는데, 추출된 샘플을 웰에 넣어 글루텐은 항체에 결합하게 한다. 세척 단계 후, 글루텐 G12 단백질에 특이적인 효소 결합 모노클로 날 항체를 웰에 가하고 반응시킨다.

시험방법은 최소 sample 5g을 균질화 시키고, 0.25g sample/2.5 mL Extraction solution을

넣어 다시 균질화시켰다. 그리고 50 °C에서 40분간 자주 섞어주어 추출한다. 그다음, 80% ethanol 7.5 mL을 넣고 혼합, 상온에서 60분간 교반시킨 후, 2000g에서 10분간 원심분리하여 상등액 만을 얻는다. 얻은 상등액은 dilution buffer에 1/10 비율로 희석하여 분석에 사용한다. 분석방법으로는 microwell 준비하고 각 well에 standard와 sample을 100 µL씩 첨가하여 상온에서 20분간 반응시킨다. 그리고 세척용액을 이용하여 이를 5-6회 반복 세척한 후 종이 towel을 이용, 바닥의 물이 완전히 제거한 후, 각 well에 conjugate solution 100 µL씩 첨가하여 상온에서 20분간 반응시킨 다음, 5-6회정도 세척한다. 그리고 평면에 종이 towel을 깔 후, 바닥의 물이 완전히 제거 한 다음, 각 well에 substrate solution 100 µL씩 첨가, 암실에서 상온, 20분간 반응시키고, 각 well에 stop solution 100 µL씩 첨가 시켜 색이 blue에서 yellow로 전환되어지는데 이를 450nm 흡광도 측정한다.

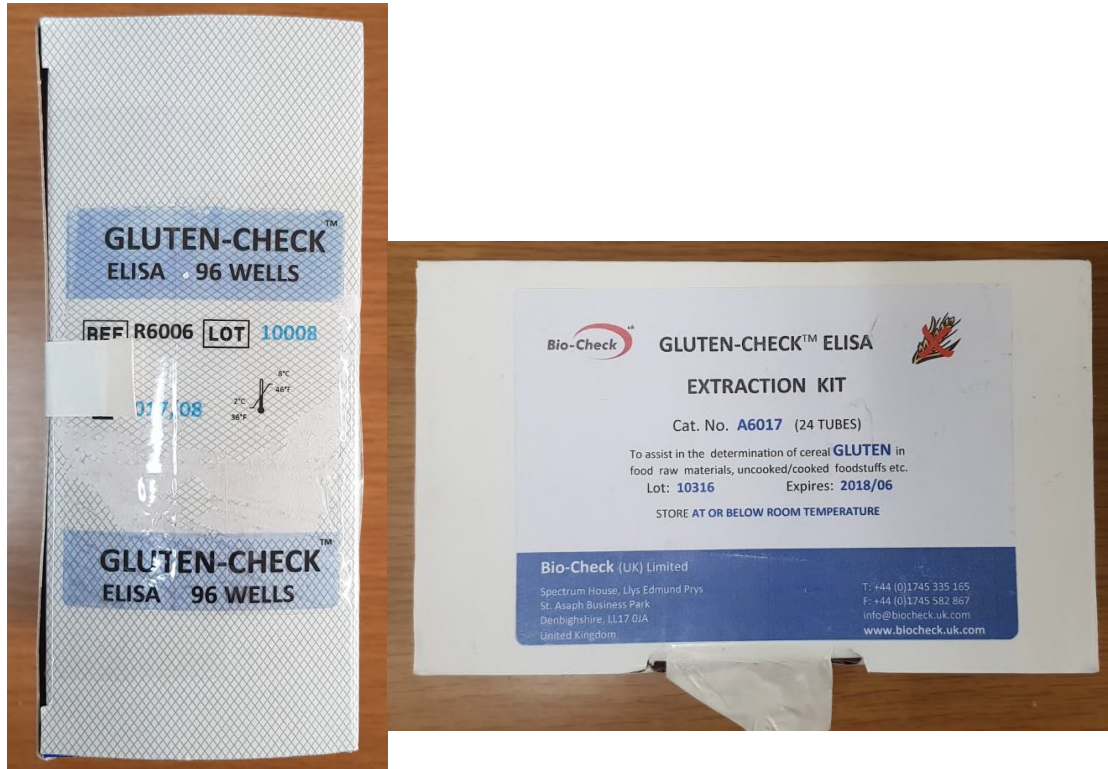


GLUTEN-CHECK™ ELISA kit (Bio-Check [UK]) Bio-Check (UK) Ltd, LL17 0JA, UK)

음식 재료, 식품 등의 낮은 수준의 gluten의 정량 분석에 적합한 방법으로 Skerrit 과 Hill은 AOAC(Official Agricultural Chemist Association)의 공식 방법으로 승인된 샌드위치 형식을 개발했으며 이 방법은 열 안정성이 있는 wheat-gliadin 분획을 인식하는 항체를 기반으로 한다. 23-25 이것은 음식의 열처리 과정에서 변하지 않기 때문에 이점이 있다. 그러나 이 방법의 단점은 gluten이 들어 있는 다른 상대적인 곡류 중에 wheat-분획의 함량 값이 달라질수 있는 점이 있는 점에서 곡물의 단백질 조성에 강한 영향을 미친다. 이러한 단백질 구성의 변화가 있을 때 면역 분석 결과에 영향을 준다. 또 다른 단점으로는 보리 호르딘에 대한 반응이 약한 점도 가지고 있다. 이 방법은 일반적으로 사용되지 않으나 여전히 쉽게 사용되어지는 방법이다. 시료의 준비는 Sample 을 균일하게 분쇄한 다음에 희석액은 1/10 희석한 다음, 완전히 섞일 때까지 2-45분 섞어주면서 추출한다. 2000 g에서 10분이나 또는 30분 침전으로 분리로 상등액을 얻는다. 이 액을 1/20 비율로 희석시키켜 시료를 만든다. ELISA 측정방법은 각 well에 diluted Sample/Control Extracts & Standards 100 µL 넣은 다음, 20분간 상온에서 반응을 시키고, 3회 wash solution으로 세척한다. 여기에 각 well에 Anti-Gliadin HRP 100µL 넣고, 다시 20분간 상온에서 반응시킨 다음, 4회정도 wash solution으로 세척한다. 그리고 각

well에 TMB Substrate 100 μ L 넣고 20분간 상온반응후 각 well에 acid stop solution 100 μ L 넣어 반응을 종료시키고 450nm에서 측정한다.

Calculation : Gluten 결과 = Controls/Samples = mg/kg (PPM)



Wheat/gluten(Gliadin) ELISA kit II (Wheat ELISA kit)(Morinaga, Yokohama, Japan)

Enzyme-linked Immunoassay R5 Mendez Method(26)를 대표적인 방법으로 ELISA방법이 사용되고 있는데 현재 gluten 함량 20 mg/kg을 검지하기 위하여 사용하고 있으며 on-off 방식과 함량을 정량으로 측정하는 방법이 이용되고 있다. 이 Wheat ELISA kit의 특징은 gliadin을 antigen으로 하며 wheat gluten을 검출하는데 사용하고 있다. 측정방법에는 시료 1g에 시료추출용액 19 ml를 넣고 30초간 혼합한 다음, 100°C에서 10분간 정치 후 강하게 혼합한 다음, NaOH로 pH 6-8로 조정한다. 조정한 반응액을 3,000g에서 20-30°C를 유지하면서 10분간 원심분리를 실시, 분석할 상등액을 얻는다. 얻어진 상등액을 표준 gluten 용액과 함께 ELISA kit에 분주한 다음, 20-25°C에서 1 시간 동안 반응을 시키고, buffer로 충분히(6회) 세척한다. 물기가 제거된 kit에 antibody가 결합된 효소를 각 well에 분주하여 20-25°C에서 30 분 동안 2차 반응을 시킨후 반응된 효소액을 6회 buffer로 세척 후 물기를 충분히 제거한 다음, 효소기질을 각기의 well에 분주하여 항체와 결합된 부착되어 있는 효소와 반응하게 하는 20-25°C에서 30분정도 반응을 이뤄지도록 하고 이때 암실에서 반응이 실행되어진다. 그리고 반응후 stop 용액을 첨가하여 반응을 종료하고 반응의 확인은 400 nm에서 실시되었다. ELISA 시험 manual에 따라 실시하였으며, 본 방법은 정성적인 sandwich ELISA 측정방법이며 표준 측정범위로는 0.26 - 17 ppm Gluten, 0.31 - 20 ppm Wheat이고, 고범위 측정으

로는 1.25 - 80 ppm Gluten, 1.05 - 68 ppm Wheat이다. (27)



통계처리

본 연구는 SPSS (Statistical Package for the Social Science) version 22 프로그램을 이용하여 분석하였으며, 모든 측정 결과는 평균(mean)±표준편차(standard deviation, SD)로 표시하였음. 그룹간의 통계적 유의성을 Duncan's multiple range test를 실시하였으며 $p < 0.05$ 수준에서 유의성의 여부를 검증하였다.

결과 및 고찰

효소를 이용한 gluten의 분해

gluten분해를 실시하기 위하여 상용화된 효소 Protamex®를 첨가 밀가루 반죽으로부터 분해를 실시하였다. gluten분해물에 대한 측정은 gluten 함량이 많을 때 측정하는 방법을 이용하여 측정하고자 하였으나 분해가 이뤄지면서 gluten의 형성력이 급격히 떨어져 분해를 간접 측정할수 있는 점도로서 측정하였다. 분해된 시료의 점도 측정은 Brookfield-viscometer를 사용하여 spindle No. 4, speed 12 rpm 조건으로 3분간씩 3반복 측정하였다. 또한 초기값은 측정하기에 부적합한 점도를 보여 1/20 배수의 희석을 통한 점도로서 보정하여 측정하였고 분해 반응 1시간 이후부터 측정하였다. Fig. 1에서 보는 바와 같이 gluten에 Protamex®처리농도와 시간에 따라 변화하는 것을 확인하였다. 효소처리가 이뤄지지 않은 control group은 시작점에서 3456 cps에서 효소처리군과 함께 4시간 처리에서도 3140.1 cps로 크게 변화가 없었던 반면 0.1% Protamex®를 처리군에서는 처리 1시간후 2623.9 cps에서 4시간처리에서는 240.3 cps로 급격하게 떨어졌고, 0.3% Protamex® 처리군에서는 더 급격히 떨어져 4시간 효소처리에서는 32.2 cps까지 떨어졌다. 이후의 시험에서는 시간과 관계없이 더 떨어 지지는 않았는데 이는 잔류하는 탄수화물소재들의 영향으로 점도에 변화가 없을 것으로 판단된다. 또한 이때의 단백질성분인 gluten이 gluten-free를 측정하기에 적합한 소재로 삼았다. gluten-free를

이루기 위하여 다양한 방법의 처리법들을 활용하였는데 크게 효소와 유산균, 그리고 이를 혼합하여 이용하는 방법을 사용하였다. Dariusz Stepniak 등의 보고에 따르면 *A. niger prolyl* endoprotease가 4-5 pH 최적활성이고 위에서 작용에 필요한 pH 2 에서도 안정적이며, 최종 펩신으로 완전히 소화된다고 하며, 또한, *A. niger* 유래 효소는 손상되지 않은 글루텐 분자뿐만 아니라 시험한 모든 T 세포 자극 펩티드를 효과적으로 분해하며, 평균적으로 *A. niger* endoprotease는 prolyl oligopeptidase보다 60 배 빠른 글루텐 펩타이드를 분해한다고 발표하였고(28) 합니다. AN-PEP는 어떤 글루텐도 십이지장 부분에 거의 도달하지 못하게 위장 내 글루텐의 분해를 촉진시켰다. *A. niger* endoprotease(AN-PEP)를 이용하여 장관모델에서 효율성을 시험하였는데 이 효소는 생체 내 소화와 유사하게 위장 시스템에서 글루텐의 분해를 촉진하였고, 글루텐 식사와 AN-PEP의 동시 투여가 글루텐 독성을 제거하여 celiac 환자에게 엄격한 gluten-free 식이를 하지않아도 될 가능성을 제공할수 있다고 소개하고 있다.(29) 유산균과 곰팡이 프로테아제와 함께 사용하여 gluten을 20ppm 이하로 감소시켰는데, 면역원성 에피토프의 생성없이 33-mer를 분해하기 인큐베이션 14 시간 후, 33-mer (200 mM)를 완전히 가수 분해하여 유리 아미노산화 하였다(30).

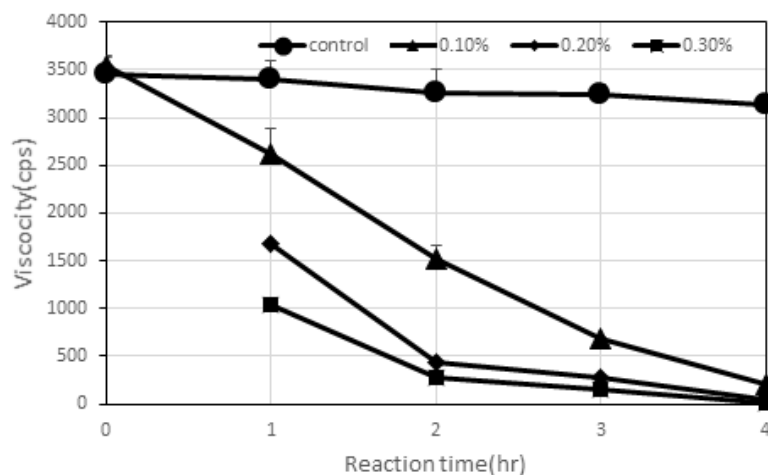


Fig. 1. Change of viscosity with enzyme reaction time

Gluten 미량측정

gluten의 분해물에 대한 미량측정을 위하여 3가지 kit로 위의 상용효소 Protamex®를 처리한 시료에 대하여 gluten함량을 분석하였다. 분석한 시료에 앞서 각기 kit에 대한 calibration curve를 작성하였다. Fig. 2.에서 보는 바와 같이 A, B, C가 내부 수장한 표준용액을 이용하여 calibration curve는 최대 농도 110 ppm 까지 포함하여 작성하였다. 모두 R^2 값이 0.99 이상으로 직선성을 만족하였다. gluten 미량 측정을 위한 kit들이 모두 celiac disease 환자들을 위한 측정 한계치인 20 ppm을 측정하는데 정확도가 맞춰져 있어서 정확한 것이라 판단된다.

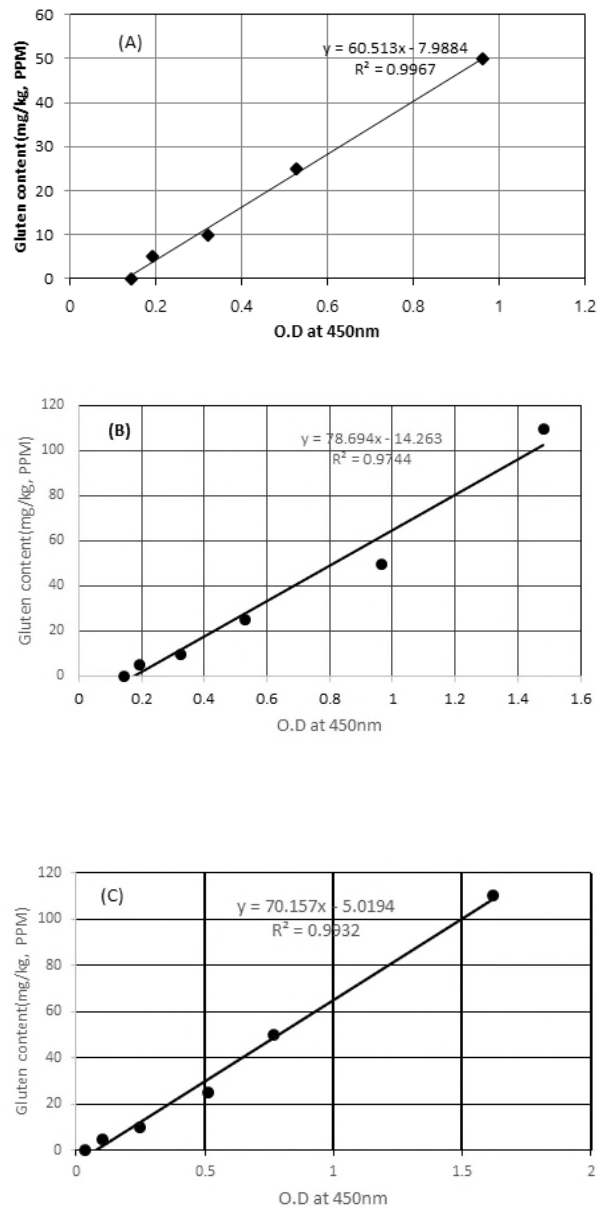


Fig. 1. Change of viscosity with enzyme reaction time.

gluten 미량 측정용 kit를 이용한 gluten 분해물의 검정

강력분 밀가루를 실측용 시료로 하여 gluten을 산업용 효소 Protamex®를 처리, 이를 gluten 분해도 측정용 시료로 사용하였는데 사용하기에 앞서 강력분 밀가루의 gluten함량은 AACC Method 38-10 방법에 기초한 wet-gluten측정법을 측정하였다. 이 방법은 밀가루에서 수분을 사용, gluten을 형성시키고 내부에 존재하는 탄수화물을 충분히 제거하여 함량이 되도록 건조시켜 측정하는 방법으로 gluten이 형성되어 물성변화를 일으키는 많은 gluten이 함유하고 있는 곡물에서 측정에 적합하고 본 연구의 기초 시료가 되는 강력분의 gluten의 함량이 13.2 g/100g으로 나타났다.

간 처리구에 1057.4 mg/kg에서 최종 4시간처리구에서는 8.9 mg/kg으로 나타났다. 앞서의 0.3%, 4시간 처리구에서 8.6 mg/kg보다는 높았으나 gluten-free수준을 벗어나지 않았다. , 0.1% 처리구나, 0.2% 처리구에서 초기 시간대에 높은 분해율로 측정된 것이 차별점으로 평가 되고 또한 분해시간에 따라 gluten의 함량이 감소함과 함께 표준편차도 함께 크게 줄어 드는 것을 확인하였다.

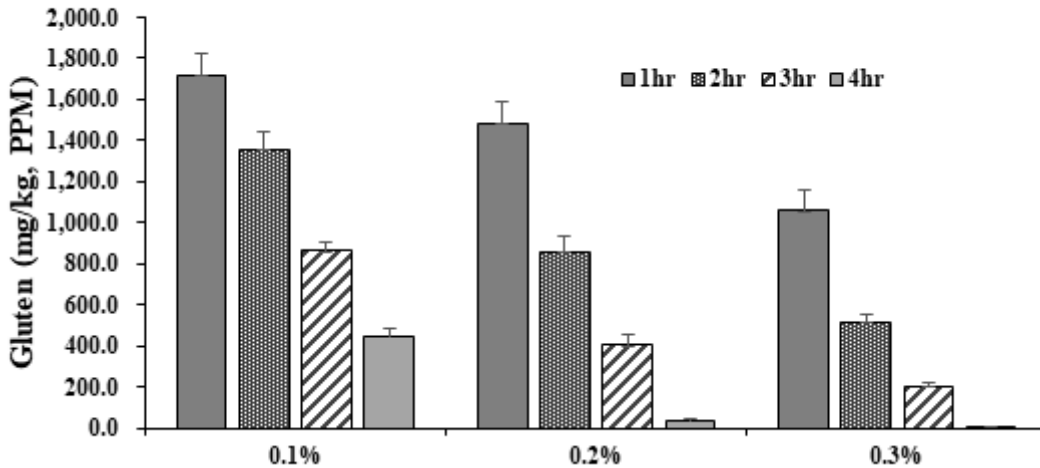


Fig. 4. GLUTEN-CHECK™ ELISA kit of Enzyme-Treated Gluten Samples

3) Wheat/gluten(Gliadin) ELISA kit를 이용한 측정

Wheat/gluten(Gliadin) ELISA kit II(Wheat ELISA kit)를 이용하여 위와 동일하게 Protamex® 0.1~0.3%를 처리하여 4시간까지 반응, gluten을 분해 시도하였다. Fig. 5에서 보는 바와 같이, 단백질 분해효소 0.1%를 처리하여 1시간 분해에서 1698.7 mg/kg, 1시간 처리에 1343.2 g, 3시간 처리에 856.2 mg/kg, 4시간 처리에 435.6 mg/kg을 나타내었고, Protamex®효소 0.3%처리구에서는 1~4시간의 처리에서 각각 1036.8, 498.6, 193.4, 8.4 mg/kg을 나타내었다.

높은 gluten함량을 보인 Protamex® 0.1%처리, 1시간 처리에서는 GLUTEN-CHECK™ ELISA kit가 1718.6 mg/kg 이였고, 다음으로 AgraQuant® Gluten G12 Assay kit가 1802.6 mg/kg이였고 Wheat ELISA kit이 1698.7 mg/kg을 나타내어 저농도과 고농도간의 차이가 측정된 시료의 6.1%에 달하는 차이를 보여 매우 작은 편차로 보였다. 한편 효소 처리 군 0.3%에서 4시간 처리에서는 3가지의 kit가 매우 유사한 값들을 나타내었고 gluten-free 인정기준에 매우 부합하여 gluten kit의 측정 적합성을 만족한다고 평가한다.

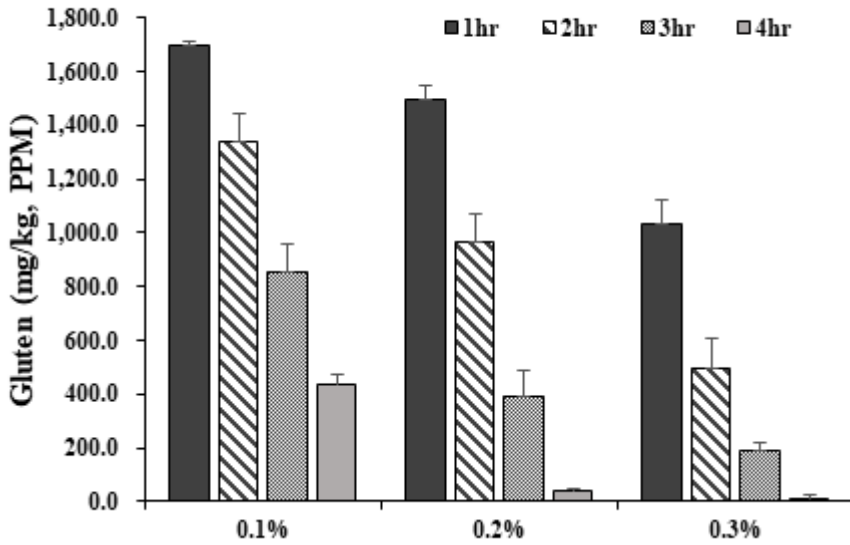


Fig. 5. Wheat/gluten(Gliadin) ELISA kit of Enzyme-Treated Gluten Samples

가열, 비가열처리를 통한 Gluten의 측정

gluten 함량에 대한 kit의 validation을 확인하는데 gluten 시료의 변화중 주로 섭취는 생식보다는 식이 과정중에 혼입될 경우를 산정하여 동일시료에 대하여 가열, 비가열 처리를 하여 이들의 정확도의 차이를 확인하고자 하였다. Fig. 6에서 보는바와 같이 밀가루의 gluten을 가열, 비가열처리시 현격한 차이를 보이는 것을 확인하였는데 단백질 분해효소 Protamex® 0.3%처리구를 2시간 반응하였을 때 가열처리한 시료에서 gluten함량이 1067.7 mg/kg을 나타내었는데 반하여 비가열처리구에서는 437.1 mg/kg으로 나타나 가열, 비가열 처리사이에 특이적인 측정변화가 있음을 확인할 수 있다. 또한 Protamex® 0.3%에 4시간 처리구에서는 가열처리시 861.9 mg/kg이었는데 반하여 비가열 처리구에서는 2.0 mg/kg으로 나타나 효소처리과정에 대한 확인이 필요할 것으로 보인다. 예상되는 시험과정의 혼선은 비처리구에서 잔존하는 효소들이 ELISA에 결합시킨 항체 단백질들을 일부 공격을 하거나 또는 γ -glidin 처럼 heat에 저항성이 있는 경우 가열, 비가열처리에서 차이가 발생할 수 있을 것으로 보인다.

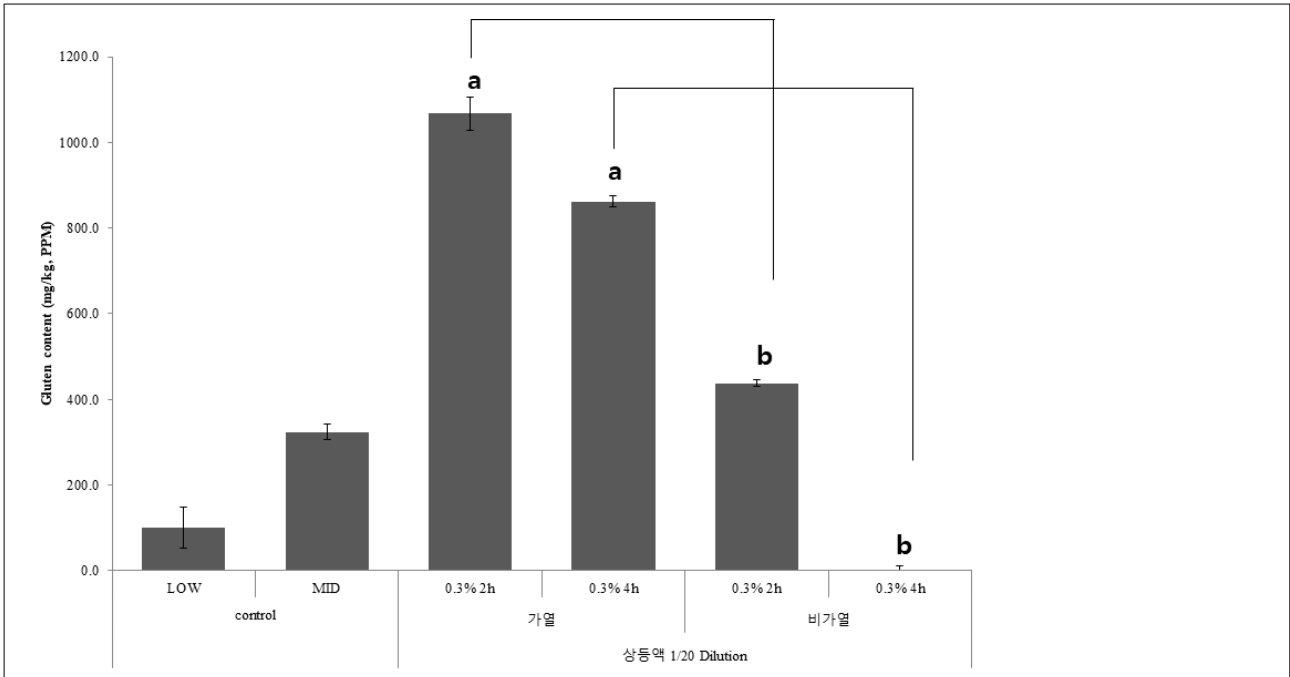


Fig. 6. Change of gluten measurement by heating and non-heating treatment.

글루텐은 밀, 호밀, 보리 그리고 아마도 귀리에서 발견되는 저장 단백질의 그룹이며, 그 교잡 종이다. glutelin과 gliadin으로 구성되는 단백질특성 말고도 글루텐 단백질은 구조적 특성에 따라 나눌수도 있는데 Table 1.에서 보는 바와 같이 밀 글루텐의 고 분자량의 prolamins과 Sulfur(S)가 풍부한 prolamins을 함유하고 있는데 prolamins은 점탄성과 반죽 구조를 형성하는데 중요한 역할을 한다. 밀, 호밀, 보리 그리고 밀가루를 포함한 제품에는 빵, 파스타, 쿠키 및 맥주가 여기에 해당한다. 이들의 물리적 성질 때문에 밀 글루텐은 종종 제품 품질을 향상시키기 위한 증점제, 유화제 또는 유동 제로서 다른 식품에 넣어 사용하기도 한다 (31).

Table 1 Classification of gluten proteins based on structural properties and aggregation state[38].

	Structure (Tatham et al)			Aggregation state (Osborne)	
	S-rich prolamins	S-poor prolamins	HMW prolamins	Prolamins	Glutelins
Wheat	a-gliadins g-gliadins	v-gliadins		Gliadins	Glutelins
	B-type LMW glutenins	D-type LMW glutenins			
	C-type LMW glutenins				
Rye	g-secalins	v-secalins	HMW secalins	Secalins	Glutelins
Barley	g-hordeins	C hordeins	D hordeins	Hordeins	Glutelins
	B hordeins				
Oat	avenins*			Avenins	Glutelins

*Existence of subgroups uncertain.

S: Sulphur, HMW: High Molecular Weight, LMW: Low Molecular Weight.

Celiac disease (CD)은 유전적으로 일부사람들이 보리와 호밀, 밀이 함유한 단백질에서 글루텐 단백질을 섭취함으로써 발병되는 트랜스글루타미나제 조직에서 자가 면역 질병이다. 위, 장관이 gluten을 섭취하게 되면 다양한 수준의 염증과 소장 손상이 발생하고, 대부분의 환자는 gluten-free 식이요법으로 신체적, 정신적 상태가 개선 될 수 있으며, 현재까지 가능한 유일한 치료법이다. CD 발병의 주요 유전적 위험인자는 대부분의 환자가 DQ2 heterodimer를 함유한 HLA 클래스 II 분자인 HLA-DQ2와 HLA-DQ8을 코딩하는 유전형이다. 그러나 유럽의 인구 중 약 1/3이 DQ2 heterodimer를 보유하고 있으나 실제 약 1%의 유럽인구가 CD를 앓고 있어 질병 발달에 기여하는 다른 요소가 있음을 의미하고, CD를 발병 위험을 증가시키는 또 다른 요인으로는 다양한 유형의 감염과 글루텐을 섭취하는 연령이 있는데, (32,33,34,35). CD는 모든 연령대에서 진단 할 수 있지만 글루텐을 섭취한 후 어린아이에서 가장 흔하게 발견되며 여성과 남성의 경우 각각 40 세에서 50 세 사이에 확인된다 (36,37).

식품에서 글루텐 분석에 가장 많이 사용되는 방법은 면역 분석방법이다. 면역학적 측정방법은 글루텐 단백질에서 발견되는 다른 프로타민 분획 또는 특정 서열에 대해 생성 된 항체를 기반으로 한다. 분석에 필요한 것은 어떤 식품 또는 어떤 제조 공정의 유형에 관계없이 gluten 단백질과 펩타이드를 측정가능 해야 할 것이다(38).

Gliadin / 글루텐 / 밀 단백질의 정량 분석에 사용할 수있는 많은 면역 분석 기반의 상업용 키트가 있는데, sandwich 와 competitive 방식으로 sandwich 방법은 두 가지 항체를 기반으로 한다. 첫 번째는 코팅 항체 및 두 번째 검출 항체로 코팅 항체는 마이크로 플레이트 웰의 바닥에 결합되고 검출 항체는 코팅 항체에 부착 된 항원을 인식하는 데 사용된다. sandwich 기술은 가수 분해 된 단백질에 적합하지 않다. competitive 방식은 샘플 단백질과 표준 단백질 간의 경쟁에 기반하는데, 이 분석에는 오직 하나의 항체 만 사용되어 미량의 가수 분해된 단백질과 펩타이드를 검출하는 데 적합하다.

Skerrit and Hill(22,23)은 AOAC (Official Agricultural Chemist Association)의 공식 방법으로 승인 된 열 안정성 ω -gliadin 분획을 인식하는 항체를 기반으로 하여 음식의 처리 과정에서 변하지 않기 때문에 이점이 있다. 그러나 이 방법의 단점은 곡류 중 ω -gliadin의 서로 다른 상대적 함량이 양적 결과에 상당한 변화를 가져온다는 것이다. 다른 단점은 이 방법이 보리 호르 딘에 대한 반응이 약하여 사용이 제한적이다.

α -gliadins 검출을 위한 ELISA 방법은 Koning 및 동료들에 의해 개발되었다. T 세포 자극 에피토프에 대한 몇 가지 항체를 개발했으며(28), 항체는 α -gliadin, γ -gliadin, LMW glutenin 및 HMW glutenin에서 T 세포 자극성 에피토프를 나타내는 합성 펩타이드에 대해 생성되었다. 항체는 그들이 생성 된 에피토프에 매우 특이적이고 다른 곡물 (보리, 귀리, 밀, 호밀 및 triticale)의 상동성 에피토프를 검출 할 수 있었다. 항체는 밀과 비교하여 호데인과 세칼린과 교차 반응을 일으키므로 이들이 함께 들어 있는 식품에서 보리와 호밀 단백질 함량

을 적게 평가할 것이다.

sandwich R5 ELISA는 글루텐 단백질 검출에 사용되는 가장 일반적인 효소 면역 측정법으로, 매우 민감하고 글루텐 단백질에 특이하며 특히 농도가 낮거나 다량의 다른 비 글루텐 단백질을 함유 한 샘플에 포함되어 있거나 둘 모두에 포함되어있을 때 항원의 정량화에 유용하다. 이 분석은 항원의 다른 부위에 결합하는 두 항체 (R5 항체와 R5 접합 항체)를 사용하여 R5 항체를 기반으로 한다. R5 항체는 Gliadin 33 mer 펩타이드, Gliadin 26 mer 펩타이드 및 Gliadin 25와 같은 toxic-celiac 펩타이드에 포함되어 있는 prolamins, 주로 QQFPF, QQQFP, PQFPF, LQFPF, QQPYP, QLPYP에서 반복적으로 발생하는 잠재적인 독성 peptide를 인식한다. 이 ELISA에는 글리아딘 1.56 ppm의 정량 한계가 있으며, 각테일 추출 용액으로 알려진 것과 결합하여 글루텐 프리 식품에서 글루텐 함량을 측정하는 방법으로 국제 식품 규격위원회 (Codex Alimentarius Commission)에서 국제적으로 인정되었다. 가수 분해 식품에서 sandwich R5 ELISA로 글루텐 정량화는 정량화하기 위해 2 개의 온전한 에피토프가 필요하므로 정확히 측정하는데 어려움이 있다.

최근에 celiac 분야에서는 두개의 단일클론 항체 A1과 G12가 면역력이 있는 펩타이드 33-mer에 대하여 개발되었다. α -2 글리아딘의 33-mer 펩타이드는 글루텐 면역 독성의 주된 원인으로, 이 항체들의 반응성은 단백질이 추출된 식이 곡물의 잠재적인 면역 독성과 상관 관계가 있다. 단일 클론 G12 및 A1 항체를 사용하는 sandwich ELISA는 시료 범위 전반에 걸친 글루텐 분석에 대해 매우 우수한 결과를 나타냈다. 이 방법은 밀, 보리 및 호밀 프로타민의 검출 한계가 0.6 ng/mL이었다. 또한 이들 항체의 반응성은 단백질이 추출된 식이 곡물의 잠재적인 면역 독성과 관련되어 일부 시리얼 품종이 면역 반응을 유발하는 이유에 대한 합리적인 설명을 제공하며 글루텐에서 이러한 종류의 존재를 막아준다.

이 이외에 western Blot, PCR 등을 비롯한 다양한 방법들이 경제적 시험법으로는 사용하기에는 문제점 들이 많아 ELISA방법이 가장 쉽게 이용되어 지고 있고 또한 ELISA방법에서도 더욱 쉽게 측정이 가능한 DIP-stick 형태 등으로 진화하고 있어 사용자 편리형의 용이성과 사용의 간편성 방향으로 나아가고 있다. 본 시험의 목적으로 제시하였던 국제교역을 위한 gluten-free의 인증을 위한 국내의 시험법 정립이 필요한바 이에 대한 대량시험법, 미량시험법을 검토하였고 또한 validation과정을 통하여 미량에서 정확한 gluten-free를 측정할수 있는 여러 test 시험법을 선별하였다.

Table 2 Commercially available immunochemical gluten detection kits[37].

Test format	Antibody	Main epitope	Type of test	Test manufacturers*
ELISA	401/21	-	Sandwich	Diagnostic Innovations; ELISA Systems; ELISA Technologies; Neogen
	R5	QQFPF	Sandwich/ Competitive	BioControl Systems; Ingenasa; Neogen; RBiopharm

	G12	QPQLPY	Sandwich/ Competitive	Biomedal Diagnostics; Romer Labs
	Glia-a20	RPQQPYP	Competitive	Europroxima
	pAb, not specified	-	Sandwich/ Competitive	Astori Lab; Diagnostic Automation; Immunolab GmbH; Incura; Morinaga Institute of Biological Science; Neogen
	401/21			Diagnostic Innovations; ELISA Technologies; Neogen
LFA Oat	R5	QQPPF		R-Biopharm
	G12	QPQLPY		Incura; Romer Labs

References

- (1) Arendt, E.; Zannini, E. *Cereal Grains for the Food and Beverage Industries*; Woodhead Publishing: Cambridge, UK, 2013.
- (2) Day, L.; Augustin, M. A.; Batey, I. L.; Wrigley, C. W. Wheatgluten uses and industry needs. *Trends Food Sci. Technol.* 2006, 17, 82–90.
- (3) Wieser, H. Chemistry of gluten proteins. *Food Microbiol.* 2007, 24, 115–119.
- (4) Battais, F.; Richard, C.; Jacquenet, S.; Denery-Papini, S.; Moneret-Vautrin, D. A. Wheat Grain Allergies: An Update on Wheat Allergens. *Eur. Ann. Allergy Clin Immunol* 2008, 40, 67–76.
- (5) Battais, F.; Courcoux, P.; Popineau, Y.; Kanny, G.; Moneret- Vautrin, D.-A.; Denery-Papini, S. Food Allergy to Wheat: Differences in Immunoglobulin E-Binding Proteins as a Function of Age or Symptoms. *J. Cereal Sci.* 2005, 42, 109–117.
- (6) Tatham, A. S.; Shewry, P. R. Allergens to Wheat and Related Cereals. *Clin. Exp. Allergy* 2008, 38, 1712–1726.
- (7) Ciccocioppo, R.; Di Sabatino, A.; Corazza, G. R. The immune recognition of gluten in coeliac disease. *Clin. Exp. Immunol.* 2005, 140, 408–416.
- (8) Reilly, N. R.; Green, P. H. Epidemiology and clinical presentations of celiac disease. *Semin. Immunopathol.* 2012, 34, 473–478.
9. Tranquet O, Lupi R, Echasserieau-Laporte V, Pietri M, Larré C, Denery-Papini S. (2015) Characterization of Antibodies and Development of an Indirect Competitive Immunoassay for Detection of Deamidated Gluten *J. Agric. Food Chem.* 2015, 63, 5403–5409
- (10) van Heel, D. A.; West, J. Recent advances in coeliac disease. *Gut* 2006, 55, 1037–1046.

- (11) Kim, C. Y.; Quartsen, H.; Bergseng, E.; Khosla, C.; Sollid, L. M. Structural basis for HLA-DQ2-mediated presentation of gluten epitopes in celiac disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2004, 101, 4175–4179.
12. Bushuk W.; Briggs, K. G.; SHEBESKI, L. H. Protein quantity and quality as factors in the evaluation of bread wheats. *Canadian Journal of Plant Science*, Ottawa, v. 49, p. 113-122, Mar. 1969.
- (13) Lebwohl, B.; Ludvigsson, J. F.; Green, P. H. Celiac disease and non-celiac gluten sensitivity. *BMJ* 2015, 5, h4347.
- (14) Hischenhuber, R.; Crevel, R.; Jarry, B.; Makis, M.; Moneret-Vautrin, D. A.; Romano, A.; Troncone, R.; Ward, R. Review article: safe amounts of gluten for patients with wheat allergy or coeliac disease. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 2006, 23, 559–575.
- (15) Codex Alimentarius Commission. Codex Standard 118-1979 (revised 2008), Foods for Special Dietary Use for Persons Intolerant to Gluten; In FAO/WHO, Rome, 2008.
- (16) Taylor, S. L.; Baumert, J. L.; Kruizinga, A. G.; Remington, B. C.; Crevel, R. W. R.; Brooke-Taylor, S.; Allen, K. J.; Houben, G. F. Establishment of Reference Doses for Residues of Allergenic Foods: Report of the VITAL Expert Panel. *Food Chem. Toxicol.* 2014, 63, 9–17.
- 17 AACC International. 2000. Approved Methods of the American Association of Cereal Chemists, 10th Ed. Methods 38-10. The Association: St. Paul, MN.
- (18) Osman, A. A.; Uhlig, H. H.; Valdes, I.; Amin, M.; Mendez, E.; Mothes, T. A monoclonal antibody that recognizes a potential coeliactoxic repetitive pentapeptide epitope in gliagins. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* 2001, 13, 1189–1193.
- (19) Kahlenberg, F.; Sanchez, D.; Lachmann, I.; Tuckova, L.; Tlaskalova, H.; Mendez, E.; Mothes, T. Monoclonal antibody R5 for detection of putatively celiac-toxic gliadins peptides. *Eur. Food Res. Technol.* 2006, 222, 78–82.
- (20) Kanerva, P. M.; Brinck, O.; Sontag-Stohm, T.; Salovaara, H.; Loponen, J. Deamidation of gluten proteins and peptides decreases the antibody affinity in gluten analysis assays. *J. Cereal Sci.* 2011, 53, 335–339.
- (21) Tranquet, O.; Lupi, R.; Echasserieau-Laporte, V.; Pietri, M.; Larre, C.; Denery-Papini, S. Characterization of antibodies and development of an indirect competitive immunoassay for detection of deamidated gluten. *J. Agric. Food Chem.* 2015, 63, 5403–5409.
22. Rukhlyadeva A. P., Polygalina G. V. - Methods for determination of activity of

hydrolytic enzymes. Moscow, Legk. Pishch. Prom (1981) 118-124

AACC. 2000. Approved method of the AACC. 10th ed, Method 38-10. American Association of Cereal Chemists, St. Paul, Minn. USA.

23. Skerritt JH, Hill AS. Enzyme immunoassay for determination of gluten in foods: collaborative study. *J Assoc Off Anal Chem.* 1991; 74(2): 257-64. PMID:2050607

24. Skerritt JH, Hill AS. Monoclonal antibody sandwich enzyme immunoassays for determination of gluten in foods. *Journal of agricultural and food chemistry.* 1990; 38(8): 1771-8.

25. Skerritt, J.H., Hill, A.S. Enzyme immunoassay for determination of gluten in foods: Collaborative study. *J AOAC Int.* 1991;74:257-264.

26. Mena MC, Lombardia M, Hernando A, Mendez E, Albar JP. 2012 Comprehensive analysis of gluten in processed foods using a new extraction method and a competitive ELISA based on the R5 antibody. *Talanta.* 91, 33-40.

27. Rakhi P. Hans F.Z, Chung Y.C, Lauren S.J, ERIC A.E. G. (2015) Detection and Quantification of Gluten during the Brewing and Fermentation of Beer Using Antibody-Based Technologies *Journal of Food Protection,* 78, 1167-1177

28. Stepniak D, Spaenij-Dekking L, Mitea C, Moester M, Ru A, Baak-Pablo R, van Veelen P, Edens L, Koning Frits 2006 Highly efficient gluten degradation with a newly identified prolyl endoprotease: implications for celiac disease. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 291, G621-G629

29. Mitea C, Havenaar R, Wouter Drijfhout J, Edens L, Dekking L, Koning F 2008; Efficient degradation of gluten by a prolyl endoprotease in a gastrointestinal model: implications for coeliac disease. *Gut* 57, 25-32.

30. Angelis MD, Cassone A, Rizzello CG, Gagliardi F, Minervini F, Calasso M, Cagno RD, Francavilla R, Gobetti M. 2010 Mechanism of Degradation of Immunogenic Gluten Epitopes from *Triticum turgidum* L. var. durum by Sourdough Lactobacilli and Fungal Proteases *Appl. Environ. Microbiol.* 76, 508-518

31. Day L, Augustin MA, Batey IL, Wrigley CW. 2006 Wheat-gluten uses and industry needs. *Trends Food Sci. Tech.* 17, 82-90.

31. Agostoni, C.; Decsi, T.; Fewtrell, M.; Goulet, O.; Kolacek, S.; Koletzko, B.; Michaelsen, K.F.; Moreno, L.; Puntis, J.; Rigo, J.; et al. Complementary feeding: A commentary by the ESPGHAN committee on nutrition. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 2008, 46, 99-110.

32. Sandberg-Bennich, S.; Dahlquist, G.; Källén, B. Coeliac disease is associated with intrauterine growth and neonatal infections. *Acta Pædiatr.* 2002, 91, 30-33.

33. Plot, L.; Amital, H. Infectious associations of celiac disease. *Autoimmun. Rev.* 2009, 8, 316-319.
34. Molberg, O.; McAdam, S.N.; Korner, R.; Quarsten, H.; Kristiansen, C.; Madsen, L.; Fugger, L.; Scott, H.; Noren, O.; Roepstorff, P.; et al. Tissue transglutaminase selectively modifies gliadin peptides that are recognized by gut-derived t cells in celiac disease. *Nat. Med.* 1998, 4, 713-717.
35. Tack, G.; Verbeek, W.; Schreurs, M.; Mulder, C. The spectrum of coeliac disease: Epidemiology, clinical aspects and treatment. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* 2010, 7, 204-213.
36. Abadie, V.; Sollid, L.; Barreiro, L.; Jabri, B. Integration of genetic and immunological insights into a model of celiac disease pathogenesis. *Annu. Rev. Immunol.* 2011, 29, 493-525.
37. I. D. Bruins Slot, H. J. van der Fels-Klerx, M. G. E. G. Bremer & R. J. Hamer (2016) Immunochemical Detection Methods for Gluten in Food Products: Where Do We Go from Here? *Critical Reviews in Food Science and Nutrition Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 56, 2455-2466
38. Denery-Papini S, Nicolas Y, Popineau Y. 1999 Efficiency and Limitations of Immunochemical Assays for the Testing of Gluten-free Foods. *Journal of Cereal Science.* 30, 121-31.

2. 재성형 글루텐프리 빵에 대한 관능 평가와 기호도 보정

연구개요

1. 밀첨가 식품의 글루텐 단백질과 알러지

- 식품 알레르기란 식이 형태로 우리 몸에 들어온 음식물의 특정 물질에 대하여 면역계가 과민하게 반응하여 여러 가지 증상을 일으키는 것을 가리키며 천식, 가려움을 동반한 발진, 발열 등의 전신증상과 알레르기성 간장이완증후군으로 대표되는 신경증상, 설사, 복통, 구토 등의 소화기 장애 등 여러 사례가 나타남(IFIT's Expert Panel on Food Safety and Nutrition).
- 특히, 식품 알러지 중 전 세계적으로 인류의 주식을 담당하고 있는 밀의 알레르기가 알려져 있다(Rocher A. et al. 1995). ALF 알레르기는 기도를 경유한 항원자극으로 발생하여 천식이나 비염을 일으키는데, α -amylase inhibitor가 주요 알러젠(allergen)으로 동정(Kenny G et al. 1995) 되어 있으며 경구섭취에서는 밀의 주요 단백질인 gluten 알레르기 증상을 일으키는 것으로 알려짐.(Shon DH 2000).

- 밀에 대한 알러지 성 질환을 Celiac disease(CD)라고 하며, 예로부터 CD는 심한 위장 증상을 나타내는 질환이 알려져 있다. 밀을 비롯한 소맥류(밀, 보리, 귀리 등)를 섭취함으로써 이와 유사하게 발증하며, 특히 소장에서의 염증, 전반적인 흡수불량을 증상으로 나타남.(Bushuk W et al. 1969). 밀 의존형 운동에 의해 유발되는 알레르기 병증은 운동전에 혈압상승, 호흡곤란, 일반적 두드러기같은 알러지반응을 일으키는 밀을 섭취를 통해 발생하는 알러지의 심각한 형태이다(Kidd JM et al. 1983). 밀 의존형 운동에 의해 유발되는 알레르기 병증을 나타내는 환자는 밀가루에 들어있는 단백질에 Ig E항체를 가지고 있고, 증세는 type I 알러지 반응에 의해 발생(Palosuo K et al. 2003).
- CD환자의 경우 평생을 거쳐 글루텐프리식품을 먹어야 하는데, 글루텐프리소재를 이용한 다양한 식품이 개발되어 지고 있어 이에 대한 회사들의 경쟁이 치열하다. 여기에는 아마씨와 치아씨를 이용하여 머핀 제조가 가능한데, 치아와 아가가 높은 점성 물질을 생성하는 것을 확인함으로써 잔탄검, 인스턴트 스타치 등을 대체할 수 있을 전망하는데 Bay State Milling에 따르면 치아와 아마를 물과 혼합할 경우 점도를 높이는 친수콜로이드(hydrocolloid)를 생성, 이로써 잔탄검이나 호화전분을 사용하지 않은 글루텐프리 식품 제조가 가능하고 또한 치아와 아가는 섬유질과 단백질, 오메가-3 지방산의 함유량이 높음.
- 글루텐프리인 고대 곡물들은 통밀, 호밀과 같이 발효종으로 개발이 가능한데, 미국 제빵업체인 Ardent Mills는 고대 곡물(예: 아마란스, 메밀, 기장, 퀴노아, 수수, 테프 등)로 만든 제품들을 제조함. Ardent Mills의Elizabeth Arndt 연구 교수에 따르면 고대 곡물들은 섬유질, 단백질, 전분, 불포화지방, 비타민, 미네랄과 기타 식물성 영양소의 함유량이 풍부하며, 테프와 아마란스는 다른 곡물들에 비해 가장 많은 철분을 함유하고 있고 밀에 비해 최소 4.5배 이상의 칼슘을 함유.
- 퀴노아와 아마란스, 메밀은 다른 곡물들(예: 옥수수, 쌀 등)과 대비 고품질의 단백질을 함유하고 있고, 호밀, 귀리, 밀에 비해 6배 많은 엽산을 함유하고 있으며 글루텐프리 곡물 7가지(예: 수수, 현미, 아마란스, 퀴노아, 기장, 메밀)와 쌀을 51:49 비율로 섞어 글루텐프리 잡곡빵을 만들 수 있다고 설명).

2. 재성형 글루텐프리 빵의 관능평가 및 기호도 분석

- 본 연구에서는 밀가루로부터 발생하는 celiac disease를 회피하도록 돕게 개발된 글루텐

프리 빵의 관능적 특징을 분석하며, 동시에 기호도 분석을 통해 소비자가 선호하는 수준의 글루텐프리 빵을 보정 및 개선 하는데 도움을 줄 분석자료를 제공하고자 한다.

II. 연구 목표

1. 재성형 글루텐프리 빵의 관능적 특징 분석
2. 재성형 글루텐프리 빵의 소비자 기호도 조사 및 분석

III. 연구내용 및 방법

1. 패널 선정 및 훈련

20~60세 일반인을 대상으로 미각테스트를 통해 50명을 선발하여 진행하였다. 패널의 관능 평가 훈련은 삼점검사, 단순차이 검사, 묘사분석 등의 평가방법을 활용하여 훈련하였다.

2. 소비자 기호도 분석

- 재성형 글루텐프리 빵과 기존 시장에 판매되고 있는 유사한 종류의 빵을 비교하여 기호도를 조사하였다.

- 재성형 글루텐프리 빵의 색 및 외관, 향기 및 냄새 (달콤한향, 고소한향, 이취), 맛(단맛, 고소한맛, 이상한 맛), 질감(부드러움, 쫄깃함, 촉촉함), 전체적 기호도 등을 조사하여 QDA 형식으로 표현하였다.

- 관능평가 점수는 7점척도법 평가를 이용하였다.

3. 통계분석

- 재성형 글루텐프리 빵의 관능적 특성 및 소비자 기호도 분석은 SPSS 10.1 통계 프로그램을 이용하여 ANOVA 분석 후 5% 유의수준에서 ($\alpha=0.05$) Duncan's multiple range test를 이용하여 유의성을 검증하였다.

IV. 연구결과

1. 재성형 글루텐프리빵에 대한 관능평가

1) 재성형 글루텐프리 빵의 관능적 품질 특성

- 재성형 글루텐프리 빵과 비교를 위한 밀가루로 만든 빵(대조군), 시판쌀식빵(알비, 광주 화정동)의 관능평가에 참여한 패널은 전체 50명이었으며, 여성 27명, 남성 23명이 참여하였다. 또한 20대에서 60대까지 다양한 연령층이 참여하였으나, 주로 빵을 좋아하고 빵이 친숙한 20대를 패널로 활용하였다.

- 본 관능평가에 참여한 패널은 '빵을 좋아한다' 고 응답한 사람이 21명, '빵을 보통 좋아한다' 고 답한 사람이 23명, '빵을 좋아하지 않는다' 고 응답한 사람이 5명, '빵을 싫어한다'고 답한 사람이 1명으로 대부분은 빵에 대해 호의적이었다.

- 관능평가는 총 11개의 항목으로 외관, 향 및 냄새, 맛, 질감, 전체적인 기호도를 포함하여 평가하였다.

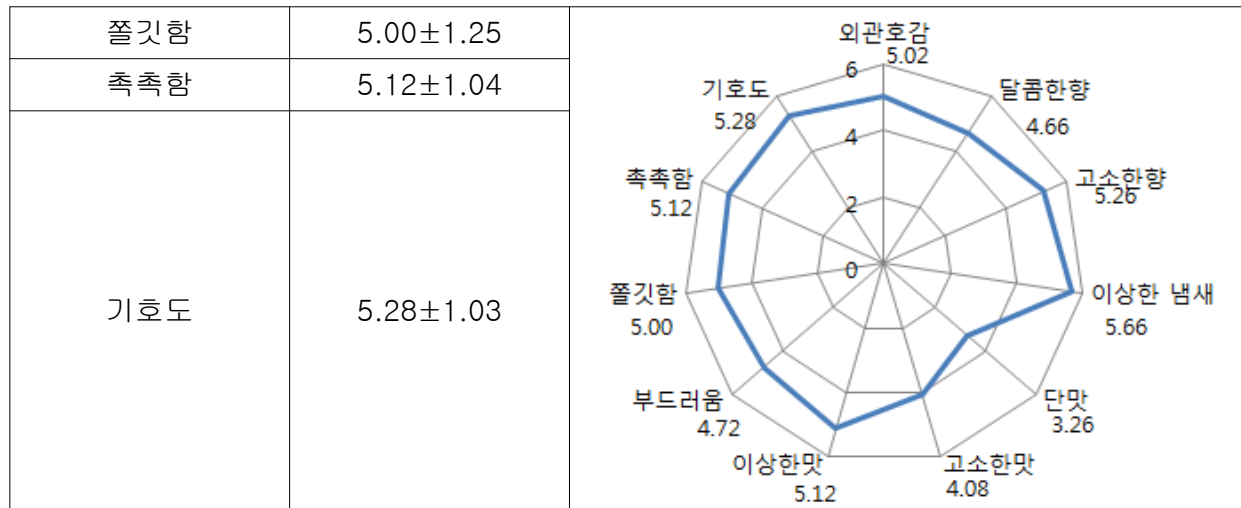
	전체	여성	남성	20대	30-40대	50-60대
참여자 (명)	50	27	23	27	16	7

- 재성형 글루텐프리빵의 관능적 특성은 '단맛' 특성이 가장 낮았으며, '고소한향' 특성이 가장 높았다. '달콤한향', '고소한맛', '부드러움' 특성은 보통정도로 나타났고, '부드러움', '쫄깃함', '촉촉함' 등의 질감 특성은 보통보다 높게 평가 되었다.

- 전체적인 기호도는 5.28점으로 보통보다 높게 평가되어 긍정적이었다.

- 이상한냄새나 이상한 맛은 5.1점 이상으로 거부감을 주는 특이적인 이상한 냄새와 맛 특성은 약한 것으로 평가되었다.

재성형 글루텐프리빵의 관능특성 및 QDA	
색 및 외관호감도	5.02±1.67
달콤한향	4.66±1.33
고소한향	5.26±1.45
이상한냄새	5.66±1.66
단맛	3.26±1.69
고소한맛	4.08±1.47
이상한맛	5.12±1.67
부드러움	4.72±0.95



2. 시판 제품(쌀빵)과의 관능특성 및 기호도 비교

1) 시판제품과의 관능특성 비교

- 재성형 글루텐프리빵과, 대조군으로 밀가루로 만든(글루텐빵) 빵과 시중에서 판매되고 있는 쌀빵(알비, 우유식빵, 광주 화정동)과 관능특성을 비교 평가하였다.
- 시판쌀빵은 글루텐 단백질이 5% 함유된 쌀가루로 만든 우유식빵이었으며, 알비라는 쌀빵 브랜드의 광주 체인점에서 구입하였다.
- 3종의 평가 시료 중 밀가루빵(글루텐빵)의 관능특성에 대한 평가 점수가 다른 두 시료(재성형 글루텐프리빵, 시판쌀빵)보다 낮았다.
- 색 및 외관호감도는 3종의 시료 사이에서 유의차가 없었다.
- 달콤한향, 고소한향, 이상한냄새 특성에 대해 시판쌀빵과 재성형 글루텐프리빵에 대해 유의차를 느끼지 않은 것으로 나타났다.
- 고소한맛, 이상한맛, 부드러움, 쫄깃함, 촉촉함 특성에 대해 재성형글루텐 프리빵은 밀가루빵과 유의차가 없었으나, 시판쌀빵과는 유의차가 나타났고, 패널들은 시판쌀빵에 대해 좀 더 긍정적으로 평가했다.
- 단맛에 대해 3종류의 시료간 유의차는 분명하여, 시판쌀빵을 좀 더 달게 느꼈고, 밀가루 빵을 가장 덜 달게 느낀 것으로 나타났다.
- 기호도는 시판쌀빵이 5.54로 가장 높았으며, 시판쌀빵과 유의차는 없었으나 재성형 글루텐프리빵이 5.28점으로 평가되었다. 재성형 글루텐프리빵의 기호도는 시판쌀빵과 유의차가 없었으나, 밀가루빵과도 유의차가 없는 것으로 나타났다.
- 관능특성 결과를 정리해 볼 때, 식빵의 기호도에 영향을 미친 것은 고소한맛과 질감(부드러움, 쫄깃함, 촉촉함)으로 판단되어졌으며, 특히 쫄깃한 정도가 기호도에 영향을 많이 미치는 것

으로 판단되어졌다.

재성형 글루텐프리 빵의 관능평가 결과 (전체)			
	밀가루 빵	재성형 글루텐프리빵	시판쌀빵
색 및 외관호감도	4.70±1.25 ^a	5.02±1.67 ^a	5.02±1.38 ^a
달콤한향	3.54±1.49 ^b	4.66±1.33 ^a	4.42±1.60 ^a
고소한향	3.80±1.73 ^b	5.26±1.45 ^a	4.82±1.52 ^a
이상한냄새	4.48±2.11 ^b	5.66±1.66 ^a	5.62±1.63 ^a
단맛	2.54±1.30 ^c	3.26±1.69 ^b	3.88±1.65 ^a
고소한맛	4.16±1.04 ^b	4.08±1.47 ^b	5.22±1.42 ^a
이상한맛	5.30±1.37 ^{ab}	5.12±1.67 ^b	5.80±1.40 ^a
부드러움	4.76±1.08 ^b	4.72±0.95 ^b	5.50±1.37 ^a
쫄깃함	4.72±1.13 ^b	5.00±1.25 ^b	6.08±1.08 ^a
촉촉함	4.68±1.20 ^b	5.12±1.04 ^b	5.78±1.30 ^a
기호도	4.84±0.93 ^b	5.28±1.03 ^{ab}	5.54±1.47 ^a

*a,b,c : ANOVA 분산분석후, Tukey test 및 Duncan의 다중비교분석에 의한 결과 그룹간 동일 알파벨은 유의차가 없음(p<0.05).
1: 가장 특성 및 강도가 낮음, 7: 가장 특성 및 강도가 높음

2) 관능특성 요인별 비교

○ 색 및 외관(눈으로 보아서 느껴지는 호감정도)

- '색 및 외관호감도'에 대해 성별간 유의적인 차이는 나타나지 않았다.
- 연령별로는 40대 이하에서는 3 종류의 시료사이에서 '색 및 외관호감도' 특성에 대해 유의차를 느끼지 않은 것으로 나타났으며, 50-60대는 재성형 글루텐프리빵과 시판쌀빵에 대해서는 유의차를 느끼지 않으나, 시판쌀빵과 밀가루빵에 대해서는 유의차를 느끼는 것으로 나타났다.
- 빵을 좋아하거나 보통 좋아하는 패널들은 '색 및 외관호감도' 특성에서 3종류의 시료간 유의차를 느끼지 않은 것으로 나타났다.

색 및 외관 호감정도				
		밀가루 빵	재성형 글루텐프리빵	시판쌀빵
패널전체		4.70±1.25 ^a	5.02±1.67 ^a	5.02±1.38 ^a
성별	남자	4.61±1.16 ^a	4.96±1.55 ^a	5.04±1.36 ^a
	여자	4.78±1.34 ^a	5.07±1.80 ^a	5.00±1.41 ^a
연령	20대	4.89±1.12 ^a	4.96±1.65 ^a	5.22±1.28 ^a
	30-40대	4.75±1.34 ^a	4.88±1.67 ^a	4.63±1.67 ^a
	50-60대	3.86±1.35 ^b	5.57±1.90 ^a	5.14±0.90 ^{ab}
빵에 대한 기호도	빵을 좋아한다	4.86±1.20 ^a	5.38±1.60 ^a	5.10±1.51 ^a
	빵을 보통좋아한다	4.74±1.32 ^a	4.57±1.80 ^a	5.04±1.26 ^a

*a,b,c : ANOVA 분산분석후, Tukey test 및 Duncan의 다중비교분석에 의한 결과
그룹간 동일 알파벨은 유의차가 없음(p<0.05).

1: 가장 특성 및 강도가 낮음, 7: 가장 특성 및 강도가 높음

○ 달콤한향

- '달콤한향'에 대해 재성형 글루텐프리빵과 시판쌀빵은 유의차가 없었으며, 밀가루 빵과는 유의차가 나타났다.
- 재성형 글루텐프리빵의 달콤한향은 4.66점으로 보통수준의 단향이 나는 것으로 평가되었다.
- 성별로는 남녀 패널모두 재성형글루텐프리빵과 시판쌀빵과의 유의차를 느끼지 못했고, 밀가루빵과는 유의적인 차이를 느낀 것으로 나타났다.
- 연령별로는 30-40대를 제외하고 재성형 글루텐프리빵과 시판쌀빵과의 유의차를 느끼지 않은 것으로 나타났다. 30-40대는 '달콤한 향' 특성에 대해 3종류의 시료에서 시료간 유의차이를 느끼지 않은 것으로 나타났다.

달콤한향			
	밀가루 빵	재성형	시판쌀빵

		글루텐프리빵		
패널전체		3.54±1.49 ^b	4.66±1.33 ^a	4.42±1.60 ^a
성별	남자	3.39±1.50 ^b	4.57±1.24 ^a	4.39±1.50 ^a
	여자	3.67±1.49 ^b	4.74±1.43 ^a	4.44±1.72 ^{ab}
연령	20대	3.74±1.61 ^b	4.56±1.40 ^{ab}	4.70±1.61 ^a
	30-40대	3.69±1.30 ^a	4.69±1.14 ^a	4.19±1.76 ^a
	50-60대	2.43±0.98 ^b	5.00±1.63 ^a	3.86±1.07 ^a
빵에 대한 기호도	빵을 좋아한다	3.48±1.33 ^a	4.48±1.54 ^a	4.29±1.95 ^a
	빵을 보통좋아한다	3.43±1.53 ^b	4.87±1.22 ^a	4.39±1.41 ^{ab}
<p>*a,b,c : ANOVA 분산분석후, Tukey test 및 Duncan의 다중비교분석에 의한 결과 그룹간 동일 알파벨은 유의차가 없음(p<0.05). 1: 가장 특성 및 강도가 낮음, 7: 가장 특성 및 강도가 높음</p>				

○ 고소한향

- '고소한향'에 대해서는 재성형 글루텐프리빵이 5.26점으로 3종류의 시료 중에서 가장 높게 평가 되었으나, 시판쌀빵과는 유의적인 차이는 없는 것으로 나타났다.
- 성별로 살펴보았을 때, 재성형 글루텐프리빵과 시판쌀빵의 '고소한향' 특성은 유의적인 차이가 없는 것으로 나타났다.
- 연령별로는 20-40대는 재성형 글루텐프리빵과 시판쌀빵의 '고소한향' 특성의 차이를 느끼지 못하는 거سو 나타났으며, 50-60대는 재성형 글루텐프리빵이 좀 더 '고소한향' 특성이 강하다고 판단했다.
- 유의차는 없었으나 20대는 시판 쌀빵의 '고소한향' 특성을 좀 더 높게 평가했고, 30-40대는 재성형 글루텐프리빵의 고소한향 특성을 좀 더 높게 평가했다.

고소한향			
	밀가루 빵	재성형 글루텐프리빵	시판쌀빵

패널전체		3.80±1.73 ^b	5.26±1.45 ^a	4.82±1.52 ^a
성별	남자	3.52±1.68 ^b	5.39±1.44 ^a	4.70±1.46 ^a
	여자	4.04±1.76 ^b	5.15±1.49 ^a	4.93±1.59 ^a
연령	20대	4.04±1.79 ^b	5.07±1.52 ^a	5.22±1.25 ^a
	30-40대	3.50±1.75 ^b	5.50±1.51 ^a	4.75±1.57 ^{ab}
	50-60대	3.57±1.51 ^b	5.43±1.13 ^a	3.43±1.72 ^b
빵에 대한 기호도	빵을 좋아한다	3.81±2.06 ^b	5.19±1.72 ^a	5.05±1.43 ^{ab}
	빵을 보통좋아한다	3.96±1.52 ^b	5.39±1.34 ^a	4.43±1.59 ^{ab}
<p>*a,b,c : ANOVA 분산분석후, Tukey test 및 Duncan의 다중비교분석에 의한 결과 그룹간 동일 알파벨은 유의차가 없음(p<0.05). 1: 가장 특성 및 강도가 낮음, 7: 가장 특성 및 강도가 높음</p>				

○ 이상한 냄새(이취)

- '이상한냄새' 특성에 대해 3 종류의 시료는 4.46점 이상으로 평가되어 이상한냄새 특성이 보통 수준으로 나타났다.
- 패널들은 재성형 글루텐프리빵과 시판쌀빵의 '이상한냄새' 특성은 유의차를 느끼지 않았으나, 밀가루빵과는 다른 냄새 특성을 느낀 것으로 나타났다.
- 남자패널은 밀가루빵과 시판쌀빵과의 '이상한냄새' 특성은 다르게 느끼면서도 재성형글루텐프리빵과 밀가루빵, 재성형글루텐프리빵과 시판쌀빵 간에는 '이상한냄새' 특성에 대해 유의차를 느끼지 않은 것으로 나타났다.
- 여자패널은 재성형글루텐 프리빵과 밀가루빵의 '이상한냄새' 특성에 대해 유의적인 차이가 있다고 평가했다.
- 50-60대는 3 종류의 시료사이에서 '이상한냄새' 특성에 대해 유의차를 느끼지 않은 것으로 나타났으나, 20-40대는 재성형글루텐 프리빵과 시판쌀빵에서 '이상한냄새' 특성에 대해 유의차가 없는 것으로 평가했다.

이상한냄새				
		밀가루 빵	재성형 글루텐프리빵	시판쌀빵
패널전체		4.48±2.11 ^b	5.66±1.66 ^a	5.62±1.63 ^a
성별	남자	4.26±2.32 ^b	5.30±1.84 ^{ab}	5.74±1.48 ^a
	여자	4.67±1.94 ^b	5.96±1.45 ^a	5.52±1.76 ^{ab}
연령	20대	4.48±2.14 ^b	5.48±1.87 ^{ab}	5.96±1.45 ^a
	30-40대	4.25±2.24 ^b	5.75±1.39 ^a	5.27±1.81 ^{ab}
	50-60대	5.00±1.91 ^a	6.14±1.46 ^a	5.14±1.77 ^a
빵에 대한 기호도	빵을 좋아한다	4.38±2.25 ^b	5.48±1.86 ^{ab}	5.67±1.68 ^a
	빵을 보통좋아한다	4.48±2.00 ^b	5.83±1.37 ^a	5.43±1.62 ^{ab}

*a,b,c : ANOVA 분산분석후, Tukey test 및 Duncan의 다중비교분석에 의한 결과
 그룹간 동일 알파벨은 유의차가 없음(p<0.05).
 1: 가장 특성 및 강도가 낮음, 7: 가장 특성 및 강도가 높음

○ 단맛

- 패널들은 3 종류의 빵의 '단맛'에 대해 다르게 느끼는 것으로 나타났다. 3 종류의 빵 모두 3.88점 미만으로 보통이하의 단맛 수준으로 평가하였으나, 시판쌀빵을 좀 더 달게, 재성형글루텐 프리빵을 다음으로 달게, 밀가루빵을 가장 덜 달게 느끼는 것으로 나타났다.
- 성별로는 남녀 패널 모두 밀가루빵을 가장 덜 달게 느꼈고, 재성형 글루텐프리빵과 시판쌀빵의 '단맛' 정도를 비슷하게 느껴 두 시료간에는 유의차가 나타나지 않았다.
- 20대는 시판쌀빵을 가장 달게 느꼈고, 밀가루빵과 재성형글루텐 프리빵의 단맛 특성에 유의차가 없는 것으로 평가했으며, 30대 이상의 연령에서는 3 종류의 시료간 '단맛' 특성에 대해 유의차를 느끼지 않은 것으로 나타났다.
- 빵을 좋아하는 패널들은 시판쌀빵의 '단맛' 특성만 유의적인 차이가 있는 것으로 느꼈고, 빵을 보통 좋아하는 패널들은 밀가루빵을 가장 덜 달지 않게 느끼는 것으로 나타났다.

단맛				
		밀가루 빵	재성형 글루텐프리빵	시판쌀빵
패널전체		2.54±1.30 ^c	3.26±1.69 ^b	3.88±1.65 ^a

성별	남자	2.78±1.17 ^b	3.48±1.81 ^{ab}	4.17±1.70 ^a
	여자	2.33±1.39 ^b	3.07±1.59 ^{ab}	3.63±1.60 ^a
연령	20대	2.52±1.42 ^b	3.19±1.78 ^b	4.22±1.63 ^a
	30-40대	2.31±1.01 ^a	2.94±1.53 ^a	3.31±1.78 ^a
	50-60대	3.14±1.35 ^a	4.29±1.50 ^a	3.86±1.21 ^a
빵에 대한 기호도	빵을 좋아한다	2.38±1.43 ^b	2.57±1.43 ^b	3.81±1.63 ^a
	빵을 보통좋아한다	2.87±1.22 ^b	3.78±1.68 ^a	3.91±1.62 ^a

*a,b,c : ANOVA 분산분석후, Tukey test 및 Duncan의 다중비교분석에 의한 결과 그룹간 동일 알파벨은 유의차가 없음(p<0.05).

1: 가장 특성 및 강도가 낮음, 7: 가장 특성 및 강도가 높음

○ 고소한맛

- '고소한맛'의 특성은 시판쌀빵이 5.22 점으로 가장 높게 평가 되었고, 재성형 글루텐프리빵과 밀가루 빵사이에서는 유의적인 차이를 느끼지 않은 것으로 나타났다.
- 남녀 패널 모두 시판쌀빵을 유의적으로 좀 더 고소한맛이 있다고 평가했다.
- 30-60대는 3 종류의 시료사이에서 '고소한맛' 특성에 대한 유의차를 느끼지 않은 것으로 나타났다.
- 빵을 보통 좋아하는 패널은 재성형 글루텐프리빵과 시판쌀빵의 '고소한맛' 특성에 대해 유의차가 없는 것으로 평가했다.

고소한맛				
		밀가루 빵	재성형 글루텐프리빵	시판쌀빵
패널 전체		4.16±1.04 ^b	4.08±1.47 ^b	5.22±1.42 ^a
성별	남자	4.26±0.96 ^b	4.26±1.54 ^b	5.30±1.18 ^a
	여자	4.07±1.11 ^b	3.93±1.41 ^b	5.15±1.61 ^a
연령	20대	4.22±1.01 ^b	3.85±1.46 ^b	5.48±1.37 ^a
	30-40대	4.13±1.26 ^a	4.06±1.39 ^a	4.88±1.59 ^a

	50-60대	4.00±0.58 ^a	5.00±1.53 ^a	5.00±1.15 ^a
빵에 대한 기호도	빵을 좋아한다	4.14±1.15 ^b	3.57±1.40 ^b	5.29±1.52 ^a
	빵을 보통좋아한다	4.17±1.07 ^b	4.48±1.56 ^{ab}	5.09±1.28 ^a

*a,b,c : ANOVA 분산분석후, Tukey test 및 Duncan의 다중비교분석에 의한 결과 그룹간 동일 알파벨은 유의차가 없음(p<0.05).
1: 가장 특성 및 강도가 낮음, 7: 가장 특성 및 강도가 높음

○ 이상한 맛(이미)

- '이상한맛' 특성은 3종류의 시료 모두 5.12점 이상으로 평가되어 빵으로서 이상한맛 특성은 문제가 없는 긍정적인 평가를 받았다.
- 그러나 재성형 글루텐프리빵의 '이상한맛' 특성은 가장 낮게 평가되었고, 밀가루빵과는 유의차가 없었으나, 시판쌀빵과는 유의적인 차이가 있는 것으로 나타났다.
- 성별로 비교해 볼 때, 남녀패널 모두 3종류의 빵 시료에서 '이상한맛' 특성에 대해 유의차이를 느끼지 않은 것으로 나타났으나, 연령별로 비교할 때 20대는 시판쌀빵을 가장 긍정적으로 평가했고, 밀가루빵과 재성형 글루텐 프리빵의 '이상한맛' 특성에 유의차가 없는 것으로 평가했다.

이상한맛				
		밀가루 빵	재성형 글루텐프리빵	시판쌀빵
패널전체		5.30±1.37 ^{ab}	5.12±1.67 ^b	5.80±1.40 ^a
성별	남자	5.30±1.22 ^a	5.35±1.56 ^a	5.83±1.30 ^a
	여자	5.30±1.51 ^a	4.93±1.77 ^a	5.78±1.50 ^a
연령	20대	5.07±1.44 ^b	4.85±1.73 ^b	6.00±1.18 ^a
	30-40대	5.44±1.21 ^a	5.00±1.63 ^a	5.25±1.69 ^a
	50-60대	5.86±1.46 ^a	6.43±0.98 ^a	6.29±1.25 ^a
빵에 대한	빵을 좋아한다	5.00±1.48 ^a	4.71±1.68 ^a	5.71±1.49 ^a

기호도	빵을 보통좋아한다	5.48±1.16 ^a	5.26±1.71 ^a	5.83±1.34 ^a
*a,b,c : ANOVA 분산분석후, Tukey test 및 Duncan의 다중비교분석에 의한 결과 그룹간 동일 알파벨은 유의차가 없음(p<0.05). 1: 가장 특성 및 강도가 낮음, 7: 가장 특성 및 강도가 높음				

○ 부드러운 질감

- 패널들은 시판쌀빵을 3 종류의 빵 중에서 가장 부드럽게 느꼈고(5.5점), 밀가루빵과 재성형 글루텐 프리빵은 보통정도의 부드러움으로 평가했다.
- 남자패널은 3종류의 시료에서 '부드러운 정도'에 대해 유의차를 느끼지 않은 데 비해, 여자 패널은 시판쌀빵을 확실하게 부드럽게 느낀 것으로 나타났다.
- 연령별로는 20대만 시판쌀빵이 가장 부드럽다고 느꼈고, 다른 연령대에서는 3종류의 시료간 부드러운 질감의 차이를 느끼지 않은 것으로 나타났다.
- 빵을 좋아하는 패널들은 3 종류의 빵에서 부드러운 질감의 차이를 느끼지 않은 것으로 나타났으나, 빵을 보통 좋아하는 패널들은 시판쌀빵을 더 부드럽게 평가했다.

부드러운정도				
		밀가루 빵	재성형 글루텐프리빵	시판쌀빵
패널전체		4.76±1.08 ^b	4.72±0.95 ^b	5.50±1.37 ^a
성별	남자	4.83±0.94 ^a	4.87±0.76 ^a	5.39±1.41 ^a
	여자	4.70±1.20 ^b	4.59±1.08 ^b	5.59±1.37 ^a
연령	20대	4.56±1.15 ^b	4.59±0.97 ^b	5.44±1.50 ^a
	30-40대	4.81±0.83 ^a	4.88±0.81 ^a	5.50±1.21 ^a
	50-60대	5.43±1.13 ^a	4.86±1.21 ^a	5.71±1.38 ^a
빵에 대한 기호도	빵을 좋아한다	4.86±0.91 ^a	4.76±0.94 ^a	5.43±1.50 ^a
	빵을 보통좋아한다	4.83±1.15 ^b	4.74±1.01 ^b	5.57±1.38 ^a
*a,b,c : ANOVA 분산분석후, Tukey test 및 Duncan의 다중비교분석에 의한 결과				

그룹간 동일 알파벨은 유의차가 없음(p<0.05).

1: 가장 특성 및 강도가 낮음, 7: 가장 특성 및 강도가 높음

○ **쫄깃한 정도**

- 패널들은 시판쌀빵을 가장 쫄깃하다고 평가했고(6.08점), 밀가루빵과 재성형 글루텐 프리빵의 쫄깃한 질감은 차이가 없는 것으로 평가했다.

- 성별 및 연령별, 빵에 대한 기호도에 따라 나누어 분석해도, 참여한 패널들은 시판쌀빵을 유의적으로 가장 쫄깃하다고 느꼈으며, 밀가루빵과 재성형 글루텐 프리빵의 쫄깃한 정도는 유의차가 없는 비슷한 정도로 느낀 것으로 나타났다.

쫄깃한 정도				
		밀가루 빵	재성형 글루텐프리빵	시판쌀빵
패널 전체		4.72±1.13 ^b	5.00±1.25 ^b	6.08±1.08 ^a
성별	남자	4.78±1.17 ^b	4.96±1.11 ^b	5.96±1.15 ^a
	여자	4.67±1.11 ^b	5.04±1.37 ^b	6.19±1.04 ^a
연령	20대	4.59±1.19 ^b	5.15±1.29 ^b	5.96±1.22 ^a
	30-40대	5.13±1.09 ^b	5.13±1.09 ^b	6.06±1.00 ^a
	50-60대	4.29±0.76 ^b	4.14±1.21 ^b	6.57±0.53 ^a
빵에 대한 기호도	빵을 좋아한다	4.62±1.12 ^b	5.05±1.16 ^b	6.00±1.34 ^a
	빵을 보통좋아한다	4.83±1.11 ^b	4.87±1.36 ^b	6.13±0.92 ^a

*a,b,c : ANOVA 분산분석후, Tukey test 및 Duncan의 다중비교분석에 의한 결과
그룹간 동일 알파벨은 유의차가 없음(p<0.05).

1: 가장 특성 및 강도가 낮음, 7: 가장 특성 및 강도가 높음

○ **촉촉한 정도**

- 패널들은 시판쌀빵을 가장 촉촉하다고 평가했고(5.78점), 밀가루빵과 재성형 글루텐 프리빵의 촉촉한 정도는 차이가 없는 것으로 평가했다.
- 남자 패널들은 시판쌀빵을 유의적으로 좀 더 촉촉하다고 평가한 데 비해, 여자 패널은 시판쌀빵과 재성형글루텐프리빵의 촉촉한 정도가 비슷하다고 느끼는 것으로 나타났으며, 밀가루빵과 재성형 글루텐프리빵의 촉촉한 정도에 대해 유의차가 없는 것으로 평가했다.
- 연령별로 볼 때, 20대는 재성형 글루텐프리빵과 시판쌀빵의 촉촉한 정도에 유의차가 없는 것으로 평가했으며, 30대이상은 시판쌀빵이 다른 2 종류의 빵과 다르게 좀 더 촉촉하다고 느낀 것으로 나타났다.

촉촉한정도				
		밀가루 빵	재성형 글루텐프리빵	시판쌀빵
패널전체		4.68±1.20 ^b	5.12±1.04 ^b	5.78±1.30 ^a
성별	남자	4.87±1.22 ^b	5.13±0.87 ^b	6.17±0.89 ^a
	여자	4.52±1.19 ^b	5.11±1.19 ^{ab}	5.44±1.50 ^a
연령	20대	4.44±1.15 ^b	5.19±1.11 ^a	5.67±1.57 ^a
	30-40대	5.00±0.82 ^b	5.19±0.98 ^b	5.81±0.98 ^a
	50-60대	4.86±1.95 ^b	4.71±0.95 ^b	6.14±0.69 ^a
빵에 대한 기호도	빵을 좋아한다	4.86±0.91 ^a	5.24±1.04 ^a	5.33±1.68 ^a
	빵을 보통좋아한다	4.70±1.43 ^b	4.96±1.07 ^b	6.00±0.85 ^a

*a,b,c : ANOVA 분산분석후, Tukey test 및 Duncan의 다중비교분석에 의한 결과
그룹간 동일 알파벨은 유의차가 없음(p<0.05).

1: 가장 특성 및 강도가 낮음, 7: 가장 특성 및 강도가 높음

○ 전체적인 기호도

- '전체적인 기호도'에 대해 시판쌀빵은 5.54점, 재성형 글루텐 프리빵은 5.28점, 밀가루빵은 4.84 점으로 평가 되었다. 재성형 글루텐 프리빵은 시판쌀빵과 유의차가 없는 것으로 나타났고, 밀가루빵과도 기호도 면에서 유의차가 없는 것으로 나타났다.
- 남자패널은 유의차는 없었으나 재성형 글루텐 프리빵의 기호도(5.65점)를 시판쌀빵(5.39점)보

다 좀 더 높게 평가했고, 여자패널은 시판쌀빵을 가장 긍정적으로 평가하여 시판쌀빵과 재성형 글루텐 프리빵의 기호도에서 유의적인 차이가 나타났다. 그러나 밀가루빵과는 유의적인 차이가 없었다.

- 연령별로는 20대는 시판쌀빵을 가장 선호했으며, 50-60대는 재성형 글루텐 프리빵을 가장 선호했고, 30-40대는 3 종류의 빵에 대해 비슷한 기호도를 갖는 것으로 나타났다.

전체적인 기호도				
		밀가루 빵	재성형 글루텐프리빵	시판쌀빵
패널전체		4.84±0.93 ^b	5.28±1.03 ^{ab}	5.54±1.47 ^a
성별	남자	4.83±0.78 ^b	5.65±0.78 ^a	5.39±1.37 ^{ab}
	여자	4.85±1.06 ^b	4.96±1.13 ^b	5.67±1.57 ^a
연령	20대	4.74±1.02 ^b	5.07±1.07 ^b	5.93±1.17 ^a
	30-40대	5.13±0.81 ^a	5.25±0.86 ^a	5.25±1.65 ^a
	50-60대	4.57±0.79 ^b	6.14±0.90 ^a	4.71±1.80 ^b
빵에 대한 기호도	빵을 좋아한다	5.05±1.12 ^a	5.14±0.96 ^a	5.62±1.66 ^a
	빵을 보통좋아한다	4.78±0.74 ^a	5.39±1.16 ^a	5.43±1.41 ^a

*a,b,c : ANOVA 분산분석후, Tukey test 및 Duncan의 다중비교분석에 의한 결과
 그룹간 동일 알파벨은 유의차가 없음(p<0.05).
 1: 가장 특성 및 강도가 낮음, 7: 가장 특성 및 강도가 높음

○ 결론

- 개발한 재성형 글루텐프리빵은 시판쌀빵 및 밀가루 빵과 비교할 때, 여러 관능특성에서 시판 쌀빵과 유사한 관능특성을 갖는 것으로 평가되나, 고소한 맛, 부드러운 질감, 촉촉한 질감, 쫄깃한 질감 특성에서는 시판쌀빵보다는 덜 긍정정인 평가를 받았다.

- 밀가루빵보다는 긍정적인 평가를 받았고, 기호도 측면에서 밀가루 빵(글루텐빵)과도 유의적인 차이가 없고, 시판쌀빵과도 유의적인 차이가 나타나지 않았으므로 제품화되어 시장에 진입하는 것에 어려움이 없을 것으로 판단되었다.

- 좀 더 경쟁력 높은 제품으로 만들기 위해 촉촉한 질감 과 쫄깃한 질감을 좀 더 높이고, 보

관중 호화를 좀 더 길게 유지 시키는 방안을 제안하고자 한다.

□ 참고문헌

Bushuk W.; Briggs, K. G.; SHEBESKI, L. H. 1969. Protein quantity and quality as factors in the evaluation of bread wheats. Canadian Journal of Plant Science, Ottawa, v. 49, p. 113-122, Mar.

Kidd JM, Cohen SH, Sosman AJ, FinkJN. Food-dependent exercise-induced anaphylaxis. J Allergy Clin Immunol 1983;71:407-411.

Kenny G, Denise-Anne MV. 1993. α -amylase contained in bread can induce food allergy. J. Allergy Clin. Immunol. 91: 343-349.

Palosuo K, Alenius H, Varjonen E, Koivuluhta M, Mikkola J, Keskinen H et al. A novel wheat gliadin as a cause of exercise-induced anaphylaxis. J Allergy Clin Immunol 1999;103:912-917.

Shon DH. The Food and Allergy. Food science and Industry. 33: 2-9(2000)

Wang JS, Zhao MM, Yang XQ, Jiang YM. 2006. Improvement of emulsifying properties of wheat gluten hydrolysate/ λ -carrageenan conjugates. Food Technol Biotechnol 44: 25-32

관능평가 평가지-시료3종-1면

관능평가 평가지-시료3종-2면

관능검사

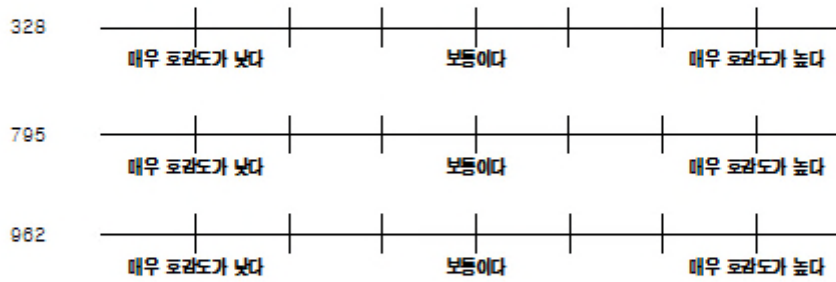
본 검사는 재성형 글루텐프리 빵에 대한 관능평가입니다.

다음 질문의 순서에 따라 평가를 진행하여 주십시오.

맛에 대한 강도에 따라 7개의 **눈금** 중 하나에 동그라미(O)로 표해 주십시오.
반드시 눈금 위에 표시해 주세요.



1. 색 또는 외관의 느낌(눈으로 보아서 느껴지는 호감도)



2. 달콤한향



7. 이상한 맛



8. 부드러운 질감

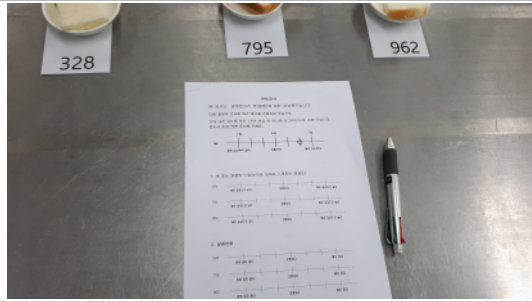


9. 졸깃한 느낌(빵에서 느껴지는 탄력있는 질감)



10. 촉촉한 느낌





시료 및 평가지



시료 및 평가지



관능평가 모습



시판 쌀떡
(알비, 광주 화정동)

통계 분석 결과 표

재성형 글루텐프리 빵의 관능평가 결과-남자

	밀가루 빵	재성형 글루텐빵	시판쌀빵
색 및 외관호감도	4.61±1.16 ^a	4.96±1.55 ^a	5.04±1.36 ^a
달콤한향	3.39±1.50 ^b	4.57±1.24 ^a	4.39±1.50 ^a
고소한향	3.52±1.68 ^b	5.39±1.44 ^a	4.70±1.46 ^a
이상한냄새	4.26±2.32 ^b	5.30±1.84 ^{ab}	5.74±1.48 ^a
단맛	2.78±1.17 ^b	3.48±1.81 ^{ab}	4.17±1.70 ^a
고소한맛	4.26±0.96 ^b	4.26±1.54 ^b	5.30±1.18 ^a
이상한맛	5.30±1.22 ^a	5.35±1.56 ^a	5.83±1.30 ^a
부드러움	4.83±0.94 ^a	4.87±0.76 ^a	5.39±1.41 ^a
쫄깃함	4.78±1.17 ^b	4.96±1.11 ^b	5.96±1.15 ^a
촉촉함	4.87±1.22 ^b	5.13±0.87 ^b	6.17±0.89 ^a
기호도	4.83±0.78 ^b	5.65±0.78 ^a	5.39±1.37 ^{ab}

*a,b,c : ANOVA 분산분석후, Tukey test 및 Duncan의 다중비교분석에 의한 결과 그룹간 동일 알파벨은 유의차가 없음(p<0.05).

1: 가장 특성 및 강도가 낮음, 7: 가장 특성 및 강도가 높음

재성형 글루텐프리 빵의 관능평가 결과-여자

	밀가루 빵	재성형 글루텐빵	시판쌀빵
색 및 외관호감도	4.78±1.34 ^a	5.07±1.80 ^a	5.00±1.41 ^a
달콤한향	3.67±1.49 ^b	4.74±1.43 ^a	4.44±1.72 ^{ab}
고소한향	4.04±1.76 ^b	5.15±1.49 ^a	4.93±1.59 ^a
이상한냄새	4.67±1.94 ^b	5.96±1.45 ^a	5.52±1.76 ^{ab}
단맛	2.33±1.39 ^b	3.07±1.59 ^{ab}	3.63±1.60 ^a
고소한맛	4.07±1.11 ^b	3.93±1.41 ^b	5.15±1.61 ^a
이상한맛	5.30±1.51 ^a	4.93±1.77 ^a	5.78±1.50 ^a
부드러움	4.70±1.20 ^b	4.59±1.08 ^b	5.59±1.37 ^a
쫄깃함	4.67±1.11 ^b	5.04±1.37 ^b	6.19±1.04 ^a
촉촉함	4.52±1.19 ^b	5.11±1.19 ^{ab}	5.44±1.50 ^a
기호도	4.85±1.06 ^b	4.96±1.13 ^b	5.67±1.57 ^a

*a,b,c : ANOVA 분산분석후, Tukey test 및 Duncan의 다중비교분석에 의한 결과 그룹간 동일 알파벨은 유의차가 없음(p<0.05).

1: 가장 특성 및 강도가 낮음, 7: 가장 특성 및 강도가 높음

재성형 글루텐프리 빵의 관능평가 결과-20대

	밀가루 빵	재성형 글루텐빵	시판쌀빵
색 및 외관호감도	4.89±1.12 ^a	4.96±1.65 ^a	5.22±1.28 ^a
달콤한향	3.74±1.61 ^b	4.56±1.40 ^{ab}	4.70±1.61 ^a
고소한향	4.04±1.79 ^b	5.07±1.52 ^a	5.22±1.25 ^a
이상한냄새	4.48±2.14 ^b	5.48±1.87 ^{ab}	5.96±1.45 ^a
단맛	2.52±1.42 ^b	3.19±1.78 ^b	4.22±1.63 ^a
고소한맛	4.22±1.01 ^b	3.85±1.46 ^b	5.48±1.37 ^a
이상한맛	5.07±1.44 ^b	4.85±1.73 ^b	6.00±1.18 ^a
부드러움	4.56±1.15 ^b	4.59±0.97 ^b	5.44±1.50 ^a
쫄깃함	4.59±1.19 ^b	5.15±1.29 ^b	5.96±1.22 ^a
촉촉함	4.44±1.15 ^b	5.19±1.11 ^a	5.67±1.57 ^a
기호도	4.74±1.02 ^b	5.07±1.07 ^b	5.93±1.17 ^a

*a,b,c : ANOVA 분산분석후, Tukey test 및 Duncan의 다중비교분석에 의한 결과 그룹간 동일 알파벨은 유의차가 없음(p<0.05).

1: 가장 특성 및 강도가 낮음, 7: 가장 특성 및 강도가 높음

재성형 글루텐프리 빵의 관능평가 결과(30-40대)

	밀가루 빵	재성형 글루텐빵	시판쌀빵
색 및 외관호감도	4.75±1.34 ^a	4.88±1.67 ^a	4.63±1.67 ^a
달콤한향	3.69±1.30 ^a	4.69±1.14 ^a	4.19±1.76 ^a
고소한향	3.50±1.75 ^b	5.50±1.51 ^a	4.75±1.57 ^{ab}
이상한냄새	4.25±2.24 ^b	5.75±1.39 ^a	5.27±1.81 ^{ab}
단맛	2.31±1.01 ^a	2.94±1.53 ^a	3.31±1.78 ^a
고소한맛	4.13±1.26 ^a	4.06±1.39 ^a	4.88±1.59 ^a
이상한맛	5.44±1.21 ^a	5.00±1.63 ^a	5.25±1.69 ^a
부드러움	4.81±0.83 ^a	4.88±0.81	5.50±1.21 ^a
쫄깃함	5.13±1.09 ^b	5.13±1.09 ^b	6.06±1.00 ^a
촉촉함	5.00±0.82 ^b	5.19±0.98 ^b	5.81±0.98 ^a
기호도	5.13±0.81 ^a	5.25±0.86 ^a	5.25±1.65 ^a

*a,b,c : ANOVA 분산분석후, Tukey test 및 Duncan의 다중비교분석에 의한 결과 그룹간 동일 알파벨은 유의차가 없음(p<0.05).

1: 가장 특성 및 강도가 낮음, 7: 가장 특성 및 강도가 높음

재성형 글루텐프리 빵의 관능평가 결과(50-60대)

	밀가루 빵	재성형 글루텐빵	시판쌀빵
색 및 외관호감도	3.86±1.35 ^b	5.57±1.90 ^a	5.14±0.90 ^{ab}
달콤한향	2.43±0.98 ^b	5.00±1.63 ^a	3.86±1.07 ^a
고소한향	3.57±1.51 ^b	5.43±1.13 ^a	3.43±1.72 ^b
이상한냄새	5.00±1.91 ^a	6.14±1.46 ^a	5.14±1.77 ^a
단맛	3.14±1.35 ^a	4.29±1.50 ^a	3.86±1.21 ^a
고소한맛	4.00±0.58 ^a	5.00±1.53 ^a	5.00±1.15 ^a
이상한맛	5.86±1.46 ^a	6.43±0.98 ^a	6.29±1.25 ^a
부드러움	5.43±1.13 ^a	4.86±1.21 ^a	5.71±1.38 ^a
쫄깃함	4.29±0.76 ^b	4.14±1.21 ^b	6.57±0.53 ^a
촉촉함	4.86±1.95 ^b	4.71±0.95 ^b	6.14±0.69 ^a
기호도	4.57±0.79 ^b	6.14±0.90 ^a	4.71±1.80 ^b

*a,b,c : ANOVA 분산분석후, Tukey test 및 Duncan의 다중비교분석에 의한 결과 그룹간 동일 알파벨은 유의차가 없음(p<0.05).

1: 가장 특성 및 강도가 낮음, 7: 가장 특성 및 강도가 높음

재성형 글루텐프리 빵의 관능평가 결과(빵을 좋아하는 그룹)

	밀가루 빵	재성형 글루텐빵	시판쌀빵
색 및 외관호감도	4.86±1.20 ^a	5.38±1.60 ^a	5.10±1.51 ^a
달콤한향	3.48±1.33 ^a	4.48±1.54 ^a	4.29±1.95 ^a
고소한향	3.81±2.06 ^b	5.19±1.72 ^a	5.05±1.43 ^{ab}
이상한냄새	4.38±2.25 ^b	5.48±1.86 ^{ab}	5.67±1.68 ^a
단맛	2.38±1.43 ^b	2.57±1.43 ^b	3.81±1.63 ^a
고소한맛	4.14±1.15 ^b	3.57±1.40 ^b	5.29±1.52 ^a
이상한맛	5.00±1.48 ^a	4.71±1.68 ^a	5.71±1.49 ^a
부드러움	4.86±0.91 ^a	4.76±0.94 ^a	5.43±1.50 ^a
쫄깃함	4.62±1.12 ^b	5.05±1.16 ^b	6.00±1.34 ^a
촉촉함	4.86±0.91 ^a	5.24±1.04 ^a	5.33±1.68 ^a
기호도	5.05±1.12 ^a	5.14±0.96 ^a	5.62±1.66 ^a

*a,b,c : ANOVA 분산분석후, Tukey test 및 Duncan의 다중비교분석에 의한 결과 그룹간 동일 알파벨은 유의차가 없음(p<0.05).

1: 가장 특성 및 강도가 낮음, 7: 가장 특성 및 강도가 높음

재성형 글루텐프리 빵의 관능평가 결과(빵을 보통 좋아하는 그룹)

	밀가루 빵	재성형 글루텐빵	시판쌀빵
색 및 외관호감도	4.74±1.32 ^a	4.57±1.80 ^a	5.04±1.26 ^a
달콤한향	3.43±1.53 ^b	4.87±1.22 ^a	4.39±1.41 ^{ab}
고소한향	3.96±1.52 ^b	5.39±1.34 ^a	4.43±1.59 ^{ab}
이상한냄새	4.48±2.00 ^b	5.83±1.37 ^a	5.43±1.62 ^{ab}
단맛	2.87±1.22 ^b	3.78±1.68 ^a	3.91±1.62 ^a

고소한맛	4.17±1.07 ^b	4.48±1.56 ^{ab}	5.09±1.28 ^a
이상한맛	5.48±1.16 ^a	5.26±1.71 ^a	5.83±1.34 ^a
부드러움	4.83±1.15 ^b	4.74±1.01 ^b	5.57±1.38 ^a
쫄깃함	4.83±1.11 ^b	4.87±1.36 ^b	6.13±0.92 ^a
촉촉함	4.70±1.43 ^b	4.96±1.07 ^b	6.00±0.85 ^a
기호도	4.78±0.74 ^a	5.39±1.16 ^a	5.43±1.41 ^a

*a,b,c : ANOVA 분산분석후, Tukey test 및 Duncan의 다중비교분석에 의한 결과 그룹간 동일 알파벨은 유의차가 없음(p<0.05).

1: 가장 특성 및 강도가 낮음, 7: 가장 특성 및 강도가 높음

4. 목표달성도 및 관련분야 기여도

코드번호	D-06
<p>4-1. 목표달성도</p> <p>본 연구의 목표는 gluten을 분해하는 유산균을 이용하여 gluten degraded 제품들을 개발하고 gluten을 분해하는 유산균을 screening에서 유산균의 특성을 파악하고 gluten 분해 발효조건, 최적화 그리고 최적 분해 효소의 생산조건을 적용한 발효조건 확립과 gluten을 측정하는 방법의 확립 및 국내외의 gluten-free 시장의 흐름을 파악, 산업화를 하는 것으로 하였다.</p> <p>가. 주관기관인 동성식품에서는 1차로 gluten을 첨가하지 않은 상태에서 물성을 얻는 방법과 이를 이용한 상용화 제품개발을 하여 gluten첨가제품과 유사성을 얻었고, gluten발효물 제공시료에서 상용화가 가능한 시제품, 상용화 제품을 개발 이의 적합한 물성 완료를 하였고, 이러한 발효우동이나 스파게티의 상용화를 이뤘고, 글루텐 발효 제품 2종 개발과 개발 제품에 대한 관능검사 그리고 이들 개발 제품 별 대량 생산 공정 확립 및 품질 관리 기준 확보하여 현재 시판 중에 있고 이에 대한 상용화 실적이 매우 크게 진행되고 있는 상황임.</p> <p>나. 협동기관 한국생명공학연구원에서는 전통 젓갈 같은 발효식품으로부터 글루텐을 분해능을 갖는 미생물 확보, 분리한 유산균 중에서 글루텐 분해능 분석을 완료하였으며, 확보 유산균의 배양학적 특성 및 Lab scale 대량 배양 및 최적 조건을 차례로 확립하다. 또한 선별 유산균으로부터 생산하는 단백질 분해 효소의 특성분석, 분리, 생산 최적화 조건의 특성분석을 완료하였고, 이를 바탕으로 산업적으로 이용이 가능한 발효물의 첨가형 최적화 공정을 확립, 기술이전화 하였음.</p> <p>다. 협동기관 남부대학교에서는 현재 gluten-free시장의 국내·외 동향에 대한 조사와 유산균이 아닌 sourdough와 유사활성을 나타내는 효소나 누룩균을 활용한 gluten-free의 만들어 보고자 실시하였고, 빵의 제조로서 이와 유사한 물성을 유지 실현하였고, 향후 gluten-free시장을 국내·외에 측정 매뉴얼을 확립하고자 해외의 gluten측정시험법의 정성 및 미량시험법의 조사와 쉽고 저가의 미량시험법을 선정 이에 대한 validation을 실시하였고 검정한 내용을 국내 측정시험방법으로 도입코자 논문 투고 및 국민신문고에 활용한 미량시험법의 시험법 등록을 요청, 추진하였음.</p> <p>이상과 같이 국내에 안전한 먹거리로 관심이 증가하여 고급화 시장을 형성하고 있는 gluten-free 시장에 과학적 근거를 도입하여 기호도가 높은 상품개발과 이를 실현할 수 있는 미생물과 발효물을 국내 미생물로부터 얻었고, 향후 해외시장에서 gluten-free시장을 진출하기 위한 국제 공인된 방법의 확인을 통한 도입을 추진하였다. 또한 이러한 내용은 gluten-free시장에 관심을 갖고 있는 주관기관의 적극적인 드라이브를 통해 이뤄졌고 해외시장에서도 2018년도 초순에는 우수한 결과가 도출될 것으로 예견한다.</p>	

당초목표	당초연구목표 대비 연구결과
1. 면용 글루텐 프리 프리믹스 시제품의 유통기한	- gluten-free mix에 대한 연구와 시제품, 상용화 제품 출시되었음.
2. 글루텐 분해 GRAS급 미생물 확보	- 국내 젓갈류로부터 글루텐 분해 유산균의 선별과 16s subunit 분석을 완료하여 균주 등록함.
3. 확보 유산균의 배양 최적화	- 유산균의 생육조건, 영양조건, 최적배양, 대량배양 조건을 완료하여 산업적 수준에서 최적화 완료하였음.
4. 빵용 글루텐 프리 프리믹스 시제품의 유통기한	- gluten이 들어 있지 않는 조건에서 빵류 형성조건과 이를 gluten-free mix제품을 개발하였고 이에 대한 유통기한 설정을 외부기관 인증을 통해 완료함.
1. 글루텐 프리용 성인(노인용) 및 어린이용 소스 제품 2종의 선호도	- gluten-free용에서 달라진 물성조건, 기호조건에 따라 이에 적합한 새로운 종류의 소스를 개발하였고 이에 대한 성인(노인)과 어린이를 대상으로 선호도 조사완료하였음.
2. 글루텐 발효 시제품의 소화 효능 시험	- gluten은 celiac disease를 일으키는 물질이라 특이 소화장애를 일으키는 물질로 작용하여 동물대상의 시험을 통해 소화효능에 대한 차이를 시험 규명하였음.
3. 글루텐 발효 우동 제품화	- 밀가루에 유산균을 첨가하여 최적 발효시켜 gluten이 분해진행된 우동제품을 개발, 제품화 및 상용화됨.
4. 글루텐 측정법 비교 분석 및 검증	- 미량측정법 kit로 gluten 분해율을 시험실시함.
1. 글루텐 프리 면류 시제품 4종의 글루텐 함량 측정 및 물성확인	- 동일한 유산균과 발효물을 이용, 상용화과정에서 개발된 4종류의 제품에 대한 분해도 진행, 함량과 분해도에 따른 물성변화를 확인함.
2. 글루텐 프리 제품의 해외 시장 진입을 위한 전략 보고서 작성	- 개발된 제품의 국내뿐만 아니라 해외진출을 위하여 내외 시장의 전략보고서를 마련함
3. pilot scale 유산균 배양 최적화	- 유산균을 직접넣어 사용하는 방법 이외에 발효물을 첨가하여 빠른 변화를 이룰수 있는 배양액을 얻는 최적 배양법을 완료
4. gluten 시험법의 validation	- gluten-free에 실제 사용적합한 ELISA시험법의 정확도, 적합도를 실시 이를 검증하였음.
5. 효소와 누룩균을 이용한 gluten-free의 실현과 첨가제를 활용한 gluten-free로 물성개량	- 상용효소와 미생물 특히 누룩을 사용한 gluten-free실현 - 첨가물을 사용한 무gluten소재에서 빵 물성 실현
6. 산업적으로 이용되는 gluten 시험법 과 미량시험법에 대한 검토	- 고 gluten 소재에 대한 수처리 법의 실시와 정확도, 편의성, 경제성을 고려 선별된 ELISA법간의 시험법 비교 완료
7. 제조 gluten-free빵류의 기호도 측정 및 보정	- 제조한 gluten-free빵의 기호도 보정으로 상용화 시도.
8. 글루텐 시험법의 식품 공전 등재	- 측정된 시험법을 논문화 및 식약처에 시험법으로 등재 추천하고자 논문화를 실시하였고 이를 국민신문고를 통해 시험법으로 등재 검토를 요청하는 제안을 하였음.

4-2. 관련분야 기여도

가. 기술적 기여도

- (1) gluten-free의 국내시장은 단순히 gluten에 영향이 없어서 인지 엄격하게 지켜지지 않고 왜곡된 시장으로 진행하고 있는데 본격적으로 정량적, 실제적 gluten-free제품을 출시 및 규정을 만들고자 하였다는 점에서 gluten-free시장에 기여를 하였다고 본다. 또한 해외시장에서는 celiac disease의 질병으로 인하여 엄격한 규정이 지켜지기 때문에 무책임한 시장흐름을 정상화하고 해외시장에 진출하기 위한 기본적 토대를 마련하였다고 생각함.
- (2) gluten을 첨가하지 않은 상태에서 물성을 얻는 방법과 이를 이용한 상용화 제품개발을 하여 gluten첨가제품과 유사성을 얻었고, gluten발효물 제공시료에서 상용화가 가능한 시제품, 상용화 제품을 개발 이의 적합한 물성 완료를 하였고, 이러한 발효우동이나 스파게티의 상용화를 이뤘고, 글루텐 발효 제품 2종 개발과 개발 제품에 대한 관능검사 그리고 이들 개발 제품 별 대량 생산 공정 확립 및 품질 관리 기준 확보하여 현재 시판 중에 있고 이에 대한 상용화 실적이 매우 크게 진행되고 있는 상황임.
- (3) 협동기관 한국생명공학연구원에서는 전통 젓갈 같은 발효식품으로부터 글루텐을 분해능을 갖는 미생물 확보, 분리한 유산균 중에서 글루텐 분해능 분석을 완료하였으며, 확보 유산균의 배양학적 특성 및 Lab scale 대량 배양 및 최적 조건을 차례로 확립하다. 또한 선별 유산균으로부터 생산하는 단백질 분해 효소의 특성분석, 분리, 생산 최적화 조건의 특성분석을 완료하였고, 이를 바탕으로 산업적으로 이용이 가능한 발효물의 첨가형 최적화 공정을 확립, 기술이전화 하였음.
- (4) 협동기관 남부대학교에서는 현재 gluten-free시장의 국내·외 동향에 대한 조사와 유산균이 아닌 sourdough와 유사활성을 나타내는 효소나 누룩균을 활용한 gluten-free의 만들어 보고자 실시하였고, 빵의 제조로서 이와 유사한 물성을 유지 실현하였고, 향후 gluten-free시장을 국내·외에 측정 매뉴얼을 확립하고자 해외의 gluten측정시험법의 정성 및 미량시험법의 조사와 쉽고 저가의 미량시험법을 선정 이에 대한 validation을 실시하였고 검정한 내용을 국내 측정시험방법으로 도입코자 논문 투고 및 국민신문고에 활용한 미량시험법의 시험법 등록을 요청, 추진하였음.

나. 경제적 기여도

- (1) 현재 발효우동이라는 제품으로 gluten분해제품이 국내 기업에 판매되어 상용화 시장에 출시되고 있다. 뒷부분에 이에 대한 직접매출로서 충분히 효과적이고 성장하고 있다는 점을 확인할수있으며, 또한 발효우동 말고도 다양한 제품과 소스도 함께 개발되어 고도화된 고급시장을 형성하고 있으며, 해외시장에서도 짧은 기간안에 우수한 결과를 보여줄 것임.
- (2) 발효우동을 비롯한 발효제품에 첨가되는 유산균과 발효물은 2, 3차로 세분화하여 새로운 산업을 창출하고 있고 전문적인 생산이 연계되고 있어 유산균의 원료소재 사업화 및 이를 유효성분으로 하는 식품, 건강기능성식품 및 화장품 등 고부가가치식품산업으로의 용도 개발이 가능할 것으로 판단됨

5. 연구결과의 활용계획

코드번호

D-07

1. gluten분해 유산균의 활용 계획

- 가. 생명공학연구원에서 개발한 등록된 gluten degrading 유산균을 현재 산업적 이용이 되고 있으나 발효빵으로 유명한 sourdough에도 충분한 활성을 보여 이를 상용화 하는제품에도 가능성이 보이고 밀과 관련한 특히 gluten과 관련한 다양한 제품군 활용가능하여 이의 원료사업화를 진행하고 있음
- 나. 동성식품에서는 첨가형 유산균을 냉동 dough나 냉동제품으로 개발하여 전국을 완제품화된 제품에서 현장에서 발효과 진행되어 보다 고급화된 제품을 유통가능하게 하여 새로운 고급마케팅이 가능하도록 할 예정임.
- 다. 현재 해외 주요 고객과 상용화 과정에 대한 상담이 진행되고 있는데 해외로 진출할 경우 이를 해외로 이전하여 일차적으로 발효제품생산에 주력하고 발효물 활용은 발효물을 이용한 육류의 연화 등에서도 효과적이어서 2차적으로 활용할 계획을 가지고 있음.
- 라. 발효 gluten 소화시험에서 나타난 현상이지만 식이에서도 크게 체중증가가 둔화와 체중유지가 유의한 것으로 보아 소화기능 유지와 체중감소에 일부 효과가 있는 것으로 알려진바 이와 관련한 연구를 추가 진행하여 이에 대한 기능적 특성의 규명과 차세대 제품화까지 연구를 추진을 계획하고 있음.

2. gluten 미량시험법의 활용 계획

- 가. gluten 미량시험법의 validation 을 통하여 경제적, 정확성, 편의성이 있는 ELISA법을 식약처에 시험등록 하고자 하여 이에 대한 지속적인 validation 과정을 확인하는 중심으로, 다른 회사들에게 도움을 줄수 있는 시험법을 정립하고 자 함.

6. 연구과정에서 수집한 해외과학기술정보

	코드번호	D-08

7. 연구개발결과의 보안등급

	코드번호	D-09
○ 국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정」 제24조의4에 따른 분류 일반과제		

8. 국가과학기술종합정보시스템에 등록된 연구시설·장비 현황

					코드번호	D-10		
구입 기관	연구시설/ 연구장비명	규격 (모델명)	수량	구입 연월일	구입 가격 (천원)	구입처 (전화번호)	비고 (설치 장소)	NTIS장비 등록번호

9. 연구개발과제 수행에 따른 연구실 등의 안전조치 이행실적

	코드번호	D-11
<p>○ 본 사업과 관련하여 관련된 내용은 주관기관에서 관리하고 참여기관의 경우 자체 연구 보안지침에 따라 기술 유출 방지를 위해 노력함</p> <p>○ 본 사업과 관련하여 국가연구개발사업 공통 보안관리지침 (과학기술부 훈령 제238호)에 의거하여 연구개발사업의 결과에 대해 기술 유출을 방지함</p> <p>○ 동법 제 2장 6조에 근거하여 중소벤처기업 등 조직체계상 연구보안심의회의 운영이 어려운 연구기관에서는 연구기관의 장의 검토로 연구보안심의회의 기능을 대신 함</p> <p>○ 연구실 안전공제 보험에 가입하여 연구활동 중 발생된 사고에 대한 보상기준 및 조치 방안을 마련함</p> <p>○ 참여기관(한국생명공학연구원)의 경우, 2001년 이 규정은 “연구실 안전보건 관리규정” 을 신설하</p>		

였음. 이 규정은 산업안전보건법과 동법 시행령 및 동법 시행규칙(이하 “법령”이라 한다.)이 규정하는 바에 의하여 한국생명공학연구원(이하 “연구원”이라 한다.)의 사고와 재해방지 및 사후 처리에 관한 사항을 정함으로써 직원의 생명과 건강을 보호하고 연구소의 재산을 보존함을 목적으로 하고 있음.

- 각 연구실의 최종 퇴실자는 연구실 내 가동 장비의 현황, 콘센트 전원 확인 연구실 이상 유무를 확인하고 이를 기록지에 점검 후 퇴실하며, 이에 대한 자료를 기반으로 매월 각 부서는 보안 및 안전점검 기록부를 확인하여 연구원에 제출함. 또한 전 직원은 매년 1회 이상의 연구실 안전관리에 대한 교육훈련을 의무적으로 받고 있으며, 각 연구실에는 기본적인 개인 안전장비 및 연구실 안전 장비를 확보하고 있음
- 또한 연구개발사업 보안관리지침에 따라 “국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정” 및 원규 “보안업무취급요령”에 의거하여 한국생명공학연구원(이하 “연구원”이라 한다.)이 수행하는 연구개발사업의 보안 관리에 필요한 기준과 절차를 규정하고 있음
- 연구 보안책임자 “정”은 해당과제를 수행하는 연구책임자가 맡으며, 보안책임자 “부”는 참여 연구원 중에서 연구책임자가 지정한 연구원이 수행하며, 연구개발과제의 보안등급은 “국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정” 제24조의4(분류기준) 및 원규 “보안업무취급요령” 제23조에 의거 보안 등급을 분류함
- “연구원”은 국가연구개발사업과 관련된 중요 연구정보의 국외 유출을 방지하기 위하여 동 지침 제8조의2(보안등급에 따른 조치)에 따른 국가연구개발사업 보안관리 조치사항과 그 밖에 “연구원”이 필요하다고 인정하는 사항을 포함하여 자체 보안대책을 수립·시행하고 있음
- 또한 모든 과제의 비밀자료, 서류는 원규 “보안업무취급요령” 제3장에 의하여 관리하며, 연구 책임자는 보안과제로 분류된 연구과제와 관련된 자료를 원규 “보안업무취급요령”에 따라 보관 될 수 있도록 함
- 2014년 미래창조과학부 장관 서한(2014. 03. 11. 정보보안 및 개인정보 보호 조치 강화)에 따라 내부 정보 유출 방지 강화를 통한 기관 중요 정보 보호, 원내 정보시스템 및 업무용 PC 개인정보 보안사고 방지, 국정원 및 미래부 등의 정읍 보안 기준 강화 준수, 정보통신망법 및 개인정보보호법 등 법적의무 준수 등 정보 보안을 강화하고 있음
- 안전에 관한 사항의 입안 및 통제는 안전주관부서장이 보건의 사항은 보건주무부서장이 담

당하고, 부서장은 소관 작업장내 안전보건에 관한 책임을 지며, 모든 직원은 안전보건에 관한 규정과 지시를 준수함

- 원장은 법령에서 정한 자격이 있는 자 중에서 안전관리자를 임명하며, 안전관리자는 관리규정 5조 5항의 각 호에 해당되는 사항을 준수하여 실험실 안전 관리를 수행하고, 제 6 조의 화기책임자는 화재 및 폭발사고의 예방을 위하여 작업장마다 화기책임자 정, 부를 두되 책임자 “정”은 소속 부서장이 되고, “부”는 해당작업장에 근무하는 직원중에 부서장이 선임하여 제 6조 각 호의 해당되는 사항을 준수함
- 제 7조의 안전유지담당자는 업무상 위해한 작업을 수행하는 부서장은 소관구역에서의 사고 또는 재해발생을 예방하기 위하여 소속직원 중에서 안전유지 담당자를 선임하여 안전주관부서장에게 통보하여야 하며, 안전유지 담당자는 안전관리에 관하여 소속부서장을 보좌하여 다음 제 7조 각 호의 사항을 담당함
- 또한 관리규정 제 3 장 위해관리를 위해 전 직원은 위험물 및 유해물을 저장, 취급 및 처리한 구역내에서는 제 9조 각 호의 사항을 준수함

10. 연구개발과제의 대표적 연구실적

번호	구분 (논문/ 특허/ 기타)	논문명/특허명/기타	소속 기관명	역할	논문게재지/ 특허등록국 가	코드번호		D-12	
						Impact Factor	논문게재일 /특허등록일	사사여부 (단독사사 또는 중복사사)	특기사항 (SCI여부/인 용횟수 등)
1	논문	첫갈로부터 분리한 글루텐 분해능을 가지는	동성식품	주저자	한국식품저장유통학회지		2016.10.	단독	scopus
2	논문	글루텐 분해 효소의 분리, 정제 및 특성 분석	동성식품	주저자	식품산업과 영양		2017.6.	단독	KCI
3									
4									
5									
6									

11. 기타사항

코드번호		D-13
○ 해당사항 없음		

12. 참고문헌

코드번호	D-14
(1) Arendt, E.; Zannini, E. Cereal Grains for the Food and Beverage Industries; Woodhead Publishing: Cambridge, UK, 2013.	
(2) Day, L.; Augustin, M. A.; Batey, I. L.; Wrigley, C. W. Wheatgluten uses and industry needs. Trends Food Sci. Technol. 2006, 17, 82–90.	
(3) Wieser, H. Chemistry of gluten proteins. Food Microbiol. 2007, 24, 115–119.	
(4) Battais, F.; Richard, C.; Jacquenet, S.; Denery-Papini, S.; Moneret-Vautrin, D. A. Wheat Grain Allergies: An Update on Wheat Allergens. Eur. Ann. Allergy Clin Immunol 2008, 40, 67–76.	
(5) Battais, F.; Courcoux, P.; Popineau, Y.; Kanny, G.; Moneret-Vautrin, D.-A.; Denery-Papini, S. Food Allergy to Wheat: Differences in Immunoglobulin E-Binding Proteins as a Function of Age or Symptoms. J. Cereal Sci. 2005, 42, 109–117.	
(6) Tatham, A. S.; Shewry, P. R. Allergens to Wheat and Related Cereals. Clin. Exp. Allergy 2008, 38, 1712–1726.	
(7) Ciccocioppo, R.; Di Sabatino, A.; Corazza, G. R. The immune recognition of gluten in coeliac disease. Clin. Exp. Immunol. 2005, 140, 408–416.	
(8) Reilly, N. R.; Green, P. H. Epidemiology and clinical presentations of celiac disease. Semin. Immunopathol. 2012, 34, 473–478.	
9. Tranquet O, Lupi R, Echasserieau-Laporte V, Pietri M, Larré C, Denery-Papini S. (2015) Characterization of Antibodies and Development of an Indirect Competitive Immunoassay for Detection of Deamidated Gluten J. Agric. Food Chem. 2015, 63, 5403–5409	
(10) van Heel, D. A.; West, J. Recent advances in coeliac disease. Gut 2006, 55, 1037–1046.	
(11) Kim, C. Y.; Quartsen, H.; Bergseng, E.; Khosla, C.; Sollid, L. M. Structural basis for HLA-DQ2-mediated presentation of gluten epitopes in celiac disease. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 2004, 101, 4175–4179.	
12. Bushuk W.; Briggs, K. G.; SHEBESKI, L. H. Protein quantity and quality as factors in the evaluation of bread wheats. Canadian Journal of Plant Science, Ottawa, v. 49, p. 113–122, Mar. 1969.	
(13) Lebowl, B.; Ludvigsson, J. F.; Green, P. H. Celiac disease and non-celiac gluten sensitivity. BMJ 2015, 5, h4347.	
(14) Hischenhuber, R.; Crevel, R.; Jarry, B.; Makis, M.; Moneret-Vautrin, D. A.; Romano, A.; Troncone, R.; Ward, R. Review article: safe amounts of gluten for patients with wheat allergy or coeliac disease. Aliment. Pharmacol. Ther. 2006, 23, 559–575.	
(15) Codex Alimentarius Commission. Codex Standard 118-1979 (revised 2008), Foods for Special Dietary Use for Persons Intolerant to Gluten; In FAO/WHO, Rome, 2008.	
(16) Taylor, S. L.; Baumert, J. L.; Kruizinga, A. G.; Remington, B. C.; Crevel, R. W. R.; Brooke-Taylor, S.; Allen, K. J.; Houben, G. F. Establishment of Reference Doses for Residues of Allergenic Foods: Report of the VITAL Expert Panel. Food Chem. Toxicol.	

2014, 63, 9–17.

17 AACC International. 2000. Approved Methods of the American Association of Cereal Chemists, 10th Ed. Methods 38–10. The Association: St. Paul, MN.

(18) Osman, A. A.; Uhlig, H. H.; Valdes, I.; Amin, M.; Mendez, E.; Mothes, T. A monoclonal antibody that recognizes a potential coeliacotoxic repetitive pentapeptide epitope in gliagins. *Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.* 2001, 13, 1189–1193.

(19) Kahlenberg, F.; Sanchez, D.; Lachmann, I.; Tuckova, L.; Tlaskalova, H.; Mendez, E.; Mothes, T. Monoclonal antibody R5 for detection of putatively celiac-toxic gliadins peptides. *Eur. Food Res. Technol.* 2006, 222, 78–82.

(20) Kanerva, P. M.; Brinck, O.; Sontag-Stohm, T.; Salovaara, H.; Loponen, J. Deamidation of gluten proteins and peptides decreases the antibody affinity in gluten analysis assays. *J. Cereal Sci.* 2011, 53, 335–339.

(21) Tranquet, O.; Lupi, R.; Echasserieau-Laporte, V.; Pietri, M.; Larre, C.; Denery-Papini, S. Characterization of antibodies and development of an indirect competitive immunoassay for detection of deamidated gluten. *J. Agric. Food Chem.* 2015, 63, 5403–5409.

22. Rukhlyadeva A. P., Polygalina G. V. – Methods for determination of activity of hydrolytic enzymes. Moscow, Legk. Pishch. Prom (1981) 118–124

AACC. 2000. Approved method of the AACC. 10th ed, Method 38–10. American Association of Cereal Chemists, St. Paul, Minn. USA.

23. Skerritt JH, Hill AS. Enzyme immunoassay for determination of gluten in foods: collaborative study. *J Assoc Off Anal Chem.* 1991; 74(2): 257–64. PMID:2050607

24. Skerritt JH, Hill AS. Monoclonal antibody sandwich enzyme immunoassays for determination of gluten in foods. *Journal of agricultural and food chemistry.* 1990; 38(8): 1771–8.

25. Skerritt, J.H., Hill, A.S. Enzyme immunoassay for determination of gluten in foods: Collaborative study. *J AOAC Int.* 1991;74:257–264.

26. Mena MC, Lombardia M, Hernando A, Mendez E, Albar JP. 2012 Comprehensive analysis of gluten in processed foods using a new extraction method and a competitive ELISA based on the R5 antibody. *Talanta.* 91, 33–40.

27. Rakhi P. Hans F.Z, Chung Y.C, Lauren S.J, ERIC A.E. G. (2015) Detection and Quantification of Gluten during the Brewing and Fermentation of Beer Using Antibody-Based Technologies *Journal of Food Protection,* 78, 1167–1177

28. Stepniak D, Spaenij-Dekking L, Mitea C, Moester M, Ru A, Baak-Pablo R, van Veelen P, Edens L, Koning Frits 2006 Highly efficient gluten degradation with a newly identified prolyl endoprotease: implications for celiac disease. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 291, G621–G629

[별첨 1]

연구개발보고서 초록

과 제 명	(국문)미래 전략형 글루텐 프리 식품 개발 및 수출 기반 구축				
	(영문) Development of gluten free food for future strategy and Set-up export infra				
주관연구기관	(주)동성식품		주 관 연 구	(소속) (주)동성식품	
참 여 기 업	-		책 임 자	(성명) 윤종영	
총연구개발비 1,200,000천원)	계	1,070,000	총 연 구 기 간	2014.11.28.~2017.11.27.(3년)	
	정부출연 연구개발비	800,000	총 참 여 연 구 원 수	총 인 원	14
	기업부담금	270,000		내부인원	14
	연구기관부담 금	-		외부인원	-

○ 연구개발 목표 및 성과

본 사업은

1. 밀가루 대체 글루텐 프리형 고품질 한식의 글로벌 가공 식품 개발
2. 밀전분 내 gluten 저감화용 발효균주 확보 및 이를 이용한 글루텐 발효 제품 개발
3. 곡류전분으로부터 글루텐 프리형 프리믹스 및 글루텐 정량 분석법 개발을 통한 고품질 글루텐 프리형 한식 제품 개발과 이의 글로벌화를 위한 기반구축을 최종 목표로 함

○ 연구 내용 및 결과

[연구 내용]

[1차년도]

1. 밀가루 대체 글루텐 프리형 고품질 한식의 글로벌 가공 식품 개발

- ① 밀가루를 대체할 수 있는 가공용 파우더 개발
- ② 글루텐 프리 파우더의 물리화학적 특성을 활용한 고품질의 한식 제품 개발
- ③ 밀가루 대비 가격 경쟁력을 확보할 수 있는 핵심 기술 개발
- ④ 식사용 글루텐 프리 한식 제품에 적합한 ‘노인 맞춤형 소스’ 및 ‘어린이용 소스’ 개발
- ⑤ 개발 제품 별 대량 생산 공정 확립 및 품질 관리 기준 확보
- ⑥ 글루텐 프리 제품의 공신력 확보를 위한 핵심 기술 개발
- ⑦ 글루텐 프리 및 저감화 제품에 대한 홍보, 마케팅 전략 수립 및 시장 진입을 위한 전략 보고서
- ⑧ 글루텐 프리 및 저감화 제품에 대한 해외 수출 기반 구축 및 해외 시장 진입을 위한 전략 보고서
- ⑨ 개발 제품에 대한 국가별 전략 제품 도출 및 해외 상품화

2. 밀전분 내 gluten 저감화용 발효균주 확보 및 이를 이용한 글루텐 발효 제품 개발

- ① 전통 발효식품으로부터 글루텐을 분해능을 갖는 미생물 확보
- ② 글루텐을 분해능을 갖는 유산균의 동정 및 생화학적 특성 분석
- ③ 확보 유산균의 배양학적 특성 및 Lab scale 대량 배양
- ④ 유산균이 생산하는 gluten 분해 효소 특성 분석
- ⑤ Pilot scale에서의 유산균 배양 조건 및 밀반죽 조건의 확립
- ⑥ 유산균 및 유산균 배양액을 이용한 글루텐 저감화 제품화 기술 개발

3. 곡류전분으로부터 글루텐 프리형 피리믹스 및 글루텐 정량 분석법 개발

- ① 글루텐 프리제품에 대한 국내동향 조사
- ② 글루텐 물성형성 소재의 선정과 배합비의 선정
- ③ 빵류 제조와 물성의 확인
- ④ 누룩균과 유산균을 이용한 빵류 제조과정 이용으로 빵류 물성의 개선
- ⑤ 밀 이외 전분, 단백질소재에 대한 발효조건의 탐색 및 최적화
- ⑥ 글루텐 함량에 대한 측정법과 산업적으로 이용되는 최적측정법의 조사
- ⑦ 측정법에 따른 장단점의 비교분석 및 경제성, 안정성, 편리성 시험법의 정립
- ⑧ 글루텐 함량 분석 방법을 표준화하여 식품공전에 등재

[연구 개발 성과]

[1차년도]

1. 글루텐 프리형 전분에 적합한 당류, 검류 등의 첨가제 선정
2. 파우더 (프리믹스) 제조 공정 확립 및 시제품 개발 및 소비자 기호도 조사
3. 전통 발효식품으로부터 글루텐을 분해능을 갖는 미생물 확보, 확보된 유산균의 글루텐 분해능 분석을 완료하였으며, 확보 유산균의 배양학적 특성 및 Lab scale 대량 배양 및 최적 조건 확립
4. 글루텐 프리 제품에 대한 국내동향 조사
5. 글루텐 물성형성 소재의 선정과 배합비의 선정과 이를 이용한 빵류제조와 물성의 확인 :빵으로서의 물성, 제조된 dough의 물성, 색도, 물리적 성질 확인
6. 글루텐 프리 밀가루의 시제품으로서의 최적화 및 관능검사 및 기호도 보정
7. 글루텐 함량에 대한 측정법과 산업적으로 이용되는 최적측정법의 조사

[2차년도]

1. 유산균 발효 기술 적용 글루텐 프리형 제품 개발 프리형 우동 및 스파게티 2종 제품 개발완료하였음.
2. 개발 제품에 대한 관능 검사 실시함.

3. 글루텐 프리형 우동 및 스파게티 제품에 적합한 성인(노인형) 및 어린이용 소스 개발과
개발 제품 별 대량 생산 공정 확립 및 품질 관리 기준 확보

4. 글루텐 프리형 우동 및 스파게티 제품화 기술 개발 및 사업화

6. 국내 발효 식품으로부터 글루텐 활성이 우수한 유산균의 확보함

7. 유산균이 생산하는 gluten 분해 효소 특성 분석

8. 글루텐 발효 시제품과 기존 제품과의 품질 및 효능 비교 검증 및 보존성 비교

9. 빵류 제조에 사용되는 글루텐 프리 발효기술에 대한 조사

10. 누룩균과 유산균을 이용한 빵류 제조과정 시 빵류 물성의 개선

[3차년도]

1. 다단 압축 기술 적용 글루텐 프리형 제품 4종 개발완료

2. 글루텐 발효 제품 2종 개발과 개발 제품에 대한 관능 검사 수행

4. 개발 제품 별 대량 생산 공정 확립 및 품질 관리 기준 확보

5. 글로벌 시장 진출을 위한 글루텐 프리형 제품화 기술 개발 및 사업화

6. Pilot scale에서의 유산균 배양 조건 최적 ,C,N source의 선정, gluten-degration 유산균의 생산조건 확립함.

7. 글루텐 발효 제품 생산기술 개발

8. 분해된 gluten에 빵 물성 형성 첨가물로 최적화, gluten-free 빵류 개발

9. gluten-free에 적합한 최적 방법은 개별적 사용이 가능한 ELISA법이 최적이고 gluten단백질에 대한 epitope을 다양하게 이용한 미량측정법이 최적임.

10. 대량 시험법은 산업적 요구에 필요하나 미량 시험법에 대한 validation 실시와 실제 시료에 적용, 정합성 검토 완료 및 논문 투고중임.

11. gluten 미량측정법에 대한 validation 결과를 논문화 및 이를 식약처에 신문고를 활용 미량 측정법 국내 제정을 요청함.

[연구 성과 활용 계획]

1. 글루텐 프리 기반 기술 확보를 통한 세계 글루텐 프리 시장 및 기술 선도

- ① 글루텐 프리 시장이 확산되고, 기술 선점 경쟁이 심화되는 상황에서, 독창적이고 혁신적인 기반 기술을 확보함으로써 글루텐 프리 시장 및 기술을 선도함
 - 밀가루를 주식으로 하는 북미, 유럽, 호주 등으로부터 셀리악병, 비만, 소화 문제 등의 이유로 밀가루 기피 현상이 점차 확산되고 있으며, 글루텐 프리 제품에 대한 수요가 매년 10% 이상 확대되고 있으며, 2018년 세계 글루텐 프리 제품의 시장규모가 620만 달러가 될 것으로 추산되고 있음
 - 이런 추세에 따라 세계 식품 기업들은 앞 다투어 글루텐 프리 기술 개발 및 제품 개발 경쟁에 나서고 있음
- ② 표준화된 글루텐 함량 분석 방법 및 도구 개발을 통한 글루텐 프리 제품의 공신력 확보
 - 글루텐 함량 분석 방법을 표준화하여 식품공전에 등재

2. 밀가루를 대체할 수 있는 가공용 파우더 상품화를 통한 매출 증대 및 고용 창출

- ① 밀가루 대비 가공 적성이 우수한 ‘글루텐 프리 파우더’ 상품화
- ② 주관기관을 통해 사업화할 경우 연간 15억원 (국내 밀가루 시장규모의 0.1%)의 매출 및 1명의 신규 고용(생산직 남자 1명) 창출이 기대됨.
- ③ 주관기관인 (주)동성식품은 소비자용 소포장 제품(500g, 1kg 포장)을 상품화하여 기존의 협력업체인 (주)홈플러스, (주)롯데마트, 농협 하나로마트 등 유통전문 대기업과 홈쇼핑, 인터넷 판매 등을 계획하고 있으며, 업소용 벌크 제품(20kg 지대 포장)을 상품화하여 계열회사인 (주)동성제분을 통해 기존 납품처인 냉면전문점, 중화요리 체인점 등 외식업체에 판매를 계획하고 있음
- ④ 제분협회 자료에 따르면, 2013년도 기준, 밀의 국내 수입량은 연간 약 220만톤, 밀가루의 국내 소비량은 연간 약 170만톤, 세계 소비량은 연간 약 4억6천톤으로 추산하고 있으며, 국내 밀가루 시장규모는 연간 약 1조5천억원, 세계 밀가루 시장규모는 약 420조원으로 추산하고 있음
- ⑤ 밀가루에 대한 소비자의 기피 현상이 점차 확대되고 있는 추세로 본다면 밀가루 대체 가공용 파우더에 대한 수요는 점차 확대될 것으로 예상됨

3. 식사용 글루텐 프리 한식 제품 상품화를 통한 매출 증대 및 고용 창출

- ① 맛, 쫄깃하고 부드러운 질감 등 소비자 기호에 맞는 ‘글루텐 프리 한식 제품’ 상품화
- ② 글루텐 프리 칼국수, 우동, 자장면, 냉면, 수제비 등의 한식 제품을 상품화할 경우 주관기관을 통하여 연간 10억원 이상의 매출 창출 및 1명의 신규 고용(연구직 남자 1명) 창출이 기대됨.
- ③ 주관기관은 현재 전국 고속도로휴게소에 25개의 우동전문점을 운영하고 있으며, 약 45개의 우동전문점에 우동면과 소스를 납품 중인 바, 고속도로휴게소 소비자들의 건강, 안전, 고품질에 대한 욕구가 점차 높아지는 것을 반영하여 최근 우리밀 우동 전문점, 통밀 우동 전문점 등을 오픈하여 히트한 경험이 있고, 본 과제 수행 후 글루텐 프리 우동 전문점을 신규로 오픈할 경우 연간 약 10억원 정도의 추가 매출을 기대할 수 있음

- ④ 주관기관은 현재 식품 대기업인 P사, C사에 한식 면류를 OEM 형태로 납품 하고 있는 바, 건강한 먹거리에 대한 관심이 많고 소비자의 밀가루 기피 트렌드를 예의 주시하고 있는 P사와 C사의 마케팅 능력을 활용하여 ODM 납품을 진행한다면 연간 10억원 이상의 추가 매출이 가능할 것으로 예상됨
- ⑤ 주관기관은 현재 H사, L사, NH사 등의 유통대기업에 한식 면류를 납품하고 있는 바, ‘글루텐 프리 한식 면류 제품’ 을 NB 또는 PB 브랜드로 납품할 경우 연간 10억원 이상의 추가 매출을 기대할 수 있음
- ⑥ 주관기관은 현재 방위사업청 입찰을 통해 한식 면류를 군에 납품하고 있는 바, 본 과제 수행 후, 대한민국 국군의 건강을 위하여 ‘글루텐 프리 한식 면류’ 의 군 급식을 건의할 계획이며, 건의가 받아들여 질 경우 추가 매출을 기대할 수 있음
- ⑦ 주관기관은 현재 미국내 식자재 전문 유통회사인 T사, 홍콩내 한국 식자재 전문 유통회사인 K사, 중국내 한국 식자재 전문 유통회사인 H사를 통하여 미국, 홍콩, 중국에 한식 면류를 수출하고 있는 바, 본 과제 수행 후 ‘글루텐 프리 한식 면류 제품’ 을 수출할 경우 연간 10억원 이상의 추가 매출을 기대할 수 있음

4. 글루텐 프리 한식 제품용 소스 개발을 통한 매출 증대 및 고용 창출

- ① 글루텐 프리 한식 제품에 적합한 맞춤형 소스 개발 및 상품화
- ② 글루텐 프리 제품의 핵심 고객층인 어린이를 위한 맞춤형 소스 개발 및 상품화
- ③ 주관기관은 현재 H사, L사, NH사 등의 유통대기업, 고속도로휴게소, 용우동, 미소야, 채선당 등 외식 프랜차이즈에 소스류를 납품하고 있는 바, 글루텐 프리 한식 제품에 적합한 맞춤형 소스를 납품할 경우 추가 매출을 기대할 수 있음

[별첨 2]

자체평가의견서

1. 과제 현황

			코드번호	D-15	
			과제번호	114007-3	
사업구분	고부가가치식품기술개발사업				
연구분야	기능성식품			과제구분	단위
사업명	고부가가치식품기술개발사업				주관
총괄과제	-			총괄책임자	-
과제명	미래 전략형 글루텐 프리 식품 개발 및 수출 기반 구축			과제유형	개발
연구기관	(주)동성식품			연구책임자	윤종영
연구기간 연구비 (천원)	연차	기간	정부	민간	계
	1차년도	2014.11.28.~ 2015.11.27.	300,000	90,000	400,000
	2차년도	2015.11.28.~ 2016.11.27.	300,000	90,000	400,000
	3차년도	2016.11.28.~ 2017.11.27.	200,000	63,000	270,000
	계	2014.11.28.~ 2017.11.27.(3년)	800,000	243,000	1,070,000
참여기업	-				
상대국	-	상대국연구기관	-		

2. 평가일 : 2018. 01.11.

3. 평가자(연구책임자) :

소속	직위	성명
(주)동성식품	전무	윤종영

4. 평가자(연구책임자) 확인 :

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

확약	윤종영
----	-----

I. 연구개발실적

※ 다음 각 평가항목에 따라 자체평가한 등급 및 실적을 간략하게 기술(200자 이내)

1. 연구개발결과의 우수성/창의성

■ 등급 : (아주우수, 우수, 보통, 미흡, 불량)

본 과제는 매우 적절한 현장중심형 과제이다. gluten-free 는 향후 식품시장의 주요 trend이기 때문에 매우 중요하며 관련기술(gluten-free 미생물 확보, 최적 발효조건 확립, 관련 gluten 분해 측정기술 확립 그리고 발효를 통한 gluten 분해 제품)을 확보하여 gluten-free 식품시장에서 장기 전망가짐.

2. 연구개발결과의 파급효과

■ 등급 : (아주우수, 우수, 보통, 미흡, 불량)

현재 시장에 유통되는 제품이 개발되어졌고 이에 대한 수요가 지속적으로 증가하고 있으며, 또한 해외수출에서도 청신호가 있는 것만으로도 우수성이 있다. 또한 gluten-free시장 전반에 걸쳐서 충분히 이해하고 사업방향을 진행할수 있는 결과이다. 3가지 결과물, gluten분해 유산균, 분해최적화된 제품균, 미량측정기술 등에서 충분한 경험치가 큰 도움이 될것으로 판단됨.

3. 연구개발결과에 대한 활용가능성

■ 등급 : (아주우수, 우수, 보통, 미흡, 불량)

유산균의 활용성이 1차적으로 가능성이 높다. 단백질 분해력이 우수하여 이를 활용한 소화촉진 발효 제품개발, 소스류 개발 등과 육류제품의 연화제, 그리고 prebiotics로서 활용가능할 것으로 판단되고 추진예정임.

4. 연구개발 수행노력의 성실도

■ 등급 : (아주우수, 우수, 보통, 미흡, 불량)

충분하게 자주 소통하지 못한 점 빼고는 매우 우수함.

5. 공개발표된 연구개발성과(논문, 지적소유권, 발표회 개최 등)

■ 등급 : (아주우수, 우수, 보통, 미흡, 불량)

동물 소화관련 논문이 SCI급으로 하나 더 추진되었으면 하는 바램있음. (추진중이라 함.)

II. 연구목표 달성도

세부연구목표 (연구계획서상의 목표)	비중 (%)	달성도 (%)	자체평가
1. 면용 글루텐 프리 프리믹스 시제품의 유통기한	5	100	- gluten-free mix에 대한 연구와 시제품, 상용화 제품 출시되었음.
2. 글루텐 분해 GRAS급 미생물 확보	5	100	- 국내 젓갈류로부터 글루텐 분해 유산균의 선별와 16s subunit 분석을 완료하여 균주 등록함.
3. 확보 유산균의 배양 최적화	10	100	- 유산균의 생육조건, 영양조건, 최적배양, 대량배양 조건을 완료하여 산업적 수준에서 최적화 완료하였음.
4. 빵용 글루텐 프리 프리믹스 시제품의 유통기한	5	100	- gluten이 들어 있지 않는 조건에서 빵류 형성조건과 이를 gluten-free mix제품을 개발하였고 이에 대한 유통기한 설정을 외부기관 인증을 통해 완료함.
1. 글루텐 프리용 성인(노인용) 및 어린이용 소스 제품 2종의 선호도	10	100	- gluten-free용에서 달라진 물질조건, 기호조건에 따라 이에 적합한 새로운 종류의 소스를 개발하였고 이에 대한 성인(노인)과 어린이를 대상으로 선호도 조사완료하였음.
2. 글루텐 발효 시제품의 소화 효능 시험	5	100	- gluten은 celiac disease를 일으키는 물질이라 특이 소화장애를 일으키는 물질로 작용하여 동물대상의 시험을 통해 소화효능에 대한 차이를 시험 규명하였음.
3. 글루텐 발효 우동 제품화	10	100	- 밀가루에 유산균을 첨가하여 최적 발효시켜 gluten이 분해진행된 우동제품을 개발, 제품화 및 상용화됨.
4. 글루텐 측정법 비교 분석 및 검증	5	100	- 미량측정법 kit로 gluten 분해율을 시험실시함.
1. 글루텐 프리 면류 시제품 4종의 글루텐 함량 측정 및 물성확인	5	100	- 동일한 유산균과 발효물을 이용, 상용화과정에서 개발된 4종류의 제품에 대한 분해도 진행, 함량과 분해도에 따른 물성변화를 확인함.
2. 글루텐 프리 제품의 해외 시장 진입을 위한 전략 보고서 작성	5	100	- 개발된 제품의 국내뿐만 아니라 해외진출을 위하여 내외 시장의 전략보고서를 마련함
3. pilot scale 유산균 배양 최적화	5	100	- 유산균을 직접넣어 사용하는 방법 이외에 발효물을 첨가하여 빠른 변화를 이룰수 있는 배양액을 얻는 최적 배양법을 완료
4. gluten 시험법의 validation	5	100	- gluten-free에 실제 사용적합한 ELISA시험법의 정확도, 적합도를 실시 이를 검증하였음.
5. 효소와 누룩균을 이용한 gluten-free의 실현과 첨가제를 활용한 gluten-free로 물성개량	5	100	- 상용효소와 미생물 특히 누룩을 사용한 gluten-free실현 - 첨가물을 사용한 무gluten소재에서 빵 물성 실현
6. 산업적으로 이용되는 gluten 시험법과 미량시험법에 대한 검증	5	100	- 고 gluten 소재에 대한 수처리 법의 실시와 정확도, 편의성, 경제성을 고려 선별된 ELISA법간의 시험법 비교 완료
7. 제조 gluten-free빵류의 기호도 측정 및 보정	5	100	- 제조한 gluten-free빵의 기호도 보정으로 상용화 시도.
8. 글루텐 시험법의 식품 공전 등재	10	90	- 측정된 시험법을 논문화 및 식약처에 시험법으로 등재 추천하고자 논문을화 실시하였고 이를 국민신문고를 통해 시험법으로 등재 검토를 요청하는 제안을 하였음.
합계	100점		

Ⅲ. 종합의견

1. 연구개발결과에 대한 종합의견

- 상용화를 시작하였으니 이를 통해 시장의 1차 검증과 해외시장에서의 통용가능성을 확인하고 싶으며 이를 지속적으로 지원, 확대할수 있도록 도움을 요청함.

2. 평가시 고려할 사항 또는 요구사항

- 해당 사항 없음

3. 연구결과의 활용방안 및 향후조치에 대한 의견

- 해당 사항 없음

IV. 보안성 검토

※ 보안성이 필요하다고 판단되는 경우 작성함.

1. 연구책임자의 의견

- 해당 사항 없음

2. 연구기관 자체의 검토결과

- 해당 사항 없음

[별첨 3]

연구성과 활용계획서

1. 연구과제 개요

사업추진형태	<input type="checkbox"/> 자유응모과제 <input checked="" type="checkbox"/> 지정공모과제	분 야	발효식품	
연구과제명	미래 전략형 글루텐 프리 식품 개발 및 수출 기반 구축			
주관연구기관	(주)동성식품	주관연구책임자	윤 종 영	
연구개발비	정부출연 연구개발비	기업부담금	연구기관부담금	총연구개발비
	800,000	270,000		1,070,000
연구개발기간	2014.11.28. ~ 2017.11.27.(3년)			
주요활용유형	<input checked="" type="checkbox"/> 산업체이전 <input type="checkbox"/> 교육 및 지도 <input type="checkbox"/> 정책자료 <input checked="" type="checkbox"/> 기타(자체사업화) <input type="checkbox"/> 미활용 (사유:)			

2. 연구목표 대비 결과

당초목표	당초연구목표 대비 연구결과
1. 면용 글루텐 프리 프리믹스 시제품의 유통기한	- gluten-free mix에 대한 연구와 시제품, 상용화 제품 출시되었음.
2. 글루텐 분해 GRAS급 미생물 확보	- 국내 젓갈류로부터 글루텐 분해 유산균의 선별와 16s subunit 분석을 완료하여 균주 등록함.
3. 확보 유산균의 배양 최적화	- 유산균의 생육조건, 영양조건, 최적배양, 대량배양 조건을 완료하여 산업적 수준에서 최적화 완료하였음.
4. 빵용 글루텐 프리 프리믹스 시제품의 유통기한	- gluten이 들어 있지 않는 조건에서 빵류 형성조건과 이를 gluten-free mix제품을 개발하였고 이에 대한 유통기한 설정을 외부기관 인증을 통해 완료함.
1. 글루텐 프리용 성인(노인용) 및 어린이용 소스 제품 2종의 선호도	- gluten-free용에서 달라진 물성조건, 기호조건에 따라 이에 적합한 새로운 종류의 소스를 개발하였고 이에 대한 성인(노인)과 어린이를 대상으로 선호도 조사완료하였음.
2. 글루텐 발효 시제품의 소화 효능 시험	- gluten은 celiac disease를 일으키는 물질이라 특히 소화장애를 일으키는 물질로 작용하여 동물대상의 시험을 통해 소화효능에 대한 차이를 시험 규명하였음.
3. 글루텐 발효 우동 제품화	- 밀가루에 유산균을 첨가하여 최적 발효시켜 gluten이 분해진행된 우동제품을 개발, 제품화 및 상용화됨.
4. 글루텐 측정법 비교 분석 및 검증	- 미량측정법 kit로 gluten 분해율을 시험실시함.
1. 글루텐 프리 면류 시제품 4종의 글루텐 함량 측정 및 물성확인	- 동일한 유산균과 발효물을 이용, 상용화과정에서 개발된 4종류의 제품에 대한 분해도 진행, 함량과 분해도에 따른 물성변화를 확인함.
2. 글루텐 프리 제품의 해외 시장 진입을 위한 전략 보고서 작성	- 개발된 제품의 국내뿐만 아니라 해외진출을 위하여 내외 시장의 전략보고서를 마련함
3. pilot scale 유산균 배양 최적화	- 유산균을 직접넣어 사용하는 방법 이외에 발효물을 첨가하여 빠른 변화를 이룰수 있는 배양액을 얻는 최적 배양법을 완료
4. gluten 시험법의 validation	- gluten-free에 실제 사용적합한 ELISA시험법의 정확도, 적합도를 실시 이를 검증하였음.
5. 효소와 누룩균을 이용한 gluten-free의 실현과 첨가제를 활용한 gluten-free로 물성개량	- 상용효소와 미생물 특히 누룩을 사용한 gluten-free 실현 - 첨가물을 사용한 무gluten소재에서 빵 물성 실현

3. 연구목표 대비 성과

성과 목표	사업화지표										연구기반지표									
	지식 재산권			기술 실시 (이전)		사업화					기술 인증	학술성과			교육 지도	인력 양성	정책 활용·홍 보		기 타 (정 책 건의)	
	특 허 출원	특 허 등록	품 종 등록	건 수	기 술 료	제 품 화	매 출 액	수 출 액	고 용 창 출	투 자 유 치		논문		학 술 발 표			정 책 활 용	홍 보 전 시		
												SCI	비 SCI							논 문 평 균 IF
단위	건	건	건	건	백만원	건	백만원	백만원	명	백만원	건	건	건	건	명	건	건	건		
가중치																				
최종목표	5	5	0	1	0	8	0	0	12	0	0	2	3		6	0	6	0	3	1
연구 기간 내 달성 실적	3	2	1	5	0	9	436	330	37	0	0	0	3		6	0	6	0	2	1
달성율(%)	60	40	200	500		113			308			0	100		100		100		67	100

4. 핵심기술

구분	핵심기술명
①	gluten저감화 발효제품의 개발
②	유산균을 활용한 gluten 발효 최적화
③	gluten 저감화 상품의 해외 진출
④	gluten-free대응 미량측정법 확립

5. 연구결과별 기술적 수준

구분	핵심기술 수준					기술의 활용유형(복수표기 가능)				
	세계 최초	국내 최초	외국기술 복 제	외국기술 소화흡수	외국기술 개선개량	특허 출원	산업체이전 (상품화)	현장애로 해 결	정책 자료	기타 (자체 사업화)
①의 기술	○					○				○
②의 기술					○	○				○
③의 기술		○								○
④의 기술	○								○	

6. 각 연구결과별 구체적 활용계획

핵심기술명	핵심기술별 연구결과활용계획 및 기대효과
①의 기술	1. 발효우동, 발효스파게티, 발효자장면, 발효냉면, 발효만두 등을 제품화 2. 고속도로휴게소, 외식, 마트 등의 채널을 활용하여 내수 판매
②의 기술	1. Gluten 분해 유산균 및 효소의 생산 표준화를 통한 대량 생산 2. Gluten 분해 유산균 및 효소를 상품화하여 일반식품, 건강기능식품, 제약, 화장품 등의 원료로 판매
③의 기술	1. 발효우동, 발효스파게티, 발효자장면, 발효냉면, 발효만두 등을 제품화 2. 미국, 홍콩, 러시아, 중국 등 해외 수출
④의 기술	1. Gluten 미량 측정법을 표준화하여 식품공전 등재

7. 연구종료 후 성과창출 계획

성과목표	사업화지표										연구기반지표								
	지식 재산권			기술실시 (이전)		사업화					기술인증	학술성과			교육지도	인력양성	정책 활용·홍보		기타 (타연구활용등)
	특허출원	특허등록	품종등록	건수	기술료	제품화	매출액	수출액	고용창출	투자유치		논문		학술발표			정책활용	홍보전시	
												SCI	비SCI						
단위	건	건	건	건	백만원	건	억원	억원	명	백만원	건	건	건	건	명				
가중치																			
최종목표																			
연간내 달성실적																			
연구종료 후 성과창출 계획							25	15											

과제 종료 후 5년간 성과 목표

8. 연구결과의 기술이전조건(산업체이전 및 상품화연구결과에 한함)

- 해당사항 없음

핵심기술명 ¹⁾			
이전형태	<input type="checkbox"/> 무상 <input type="checkbox"/> 유상	기술료 예정액	천원
이전방식 ²⁾	<input type="checkbox"/> 소유권이전 <input type="checkbox"/> 전용실시권 <input type="checkbox"/> 통상실시권 <input type="checkbox"/> 협의결정 <input type="checkbox"/> 기타()		
이전소요기간		실용화예상시기 ³⁾	
기술이전시 선행조건 ⁴⁾			