

발 간 등 록 번 호

11-1541000-001064-01

상업효모 대체형 한국토종효모 자원선발과 이를
이용한 고품질 특화제빵사업화
(Development of organic Bread through selection
of yeast native to Korea)

상업효모 대체형 한국토종효모 자원선발
(Selection of yeast native to Korea)

매일유업(주) 중앙연구소

농림수산식품부

제 출 문

농림수산식품부 장관 귀하

이 보고서를 상업효모대체형 한국토종효모 자원선발과 이를 이용한 고품질 특화제빵사업화 과제(세부과제 “상업효모 대체형 한국토종효모 자원선발”)의 보고서로 제출합니다.

2011년 12월 05일

주관연구기관명 : 매일유업(주)
주관연구책임자 : 김 희 경
세부연구책임자 : 김 희 경
연 구 원 : 김 재 홍
연 구 원 : 신 호 재
연 구 원 : 김 민 호
연 구 원 : 전 민 선
연 구 원 : 박 해 미
협동연구기관명 : 연세대(원주)
협동연구책임자 : 윤 성 식
연 구 원 : 김 기 환
연 구 원 : 송 태 석
연 구 원 : 김 경 휘

요 약 문

I. 제 목

상업효모 대체형 한국토종효모 자원선발과 이를 이용한 고품질 특화제빵사업화

II. 연구개발의 목적 및 필요성

1. 연구개발의 목적

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

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

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

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

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

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

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

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

2. 연구개발 필요성

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

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

따라서, 유전자원이 확보된 효모균의 선발은 제과제빵 발전의 중요한 연구개발 항목임을 전체적으로 깊이 공감하고 있으나, 특화된 효모균이 개발되었다 하더라도 이를 제과제빵분야에서 별다른 조치없이 즉시 활용할 수 있는 제품레시피 및 사용방법이 정립되지 않으면 이 역시 사장될 수 있다.

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

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

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

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

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

따라서, 본 연구에서는 이를 위하여 한국 토착형 효모에 대한 유전자원확보, 상업 효모대체가 가능할 수 있는 개발 효모의 대량생산시스템 정립 및 이의 제품화(제형화)와 잉여 농축산물 적용형 천연특화 제빵제조 레시피 확립까지 일련의 시스템을 정립코져 하였다.

Ⅲ. 연구개발 내용 및 범위

1. 상업효모 대체형 한국토종효모자원 개발 및 유전자원 확보

가. 한국 유기농 농산물내(시설원예) 토종 효모균 선발

- 1) 유기농 과실(사과, 파인애플, 캠벨,거봉), 곡류(호밀) 대상 한국 토착형 효모선발
- 2) 선발효모동정 및 유전자원 확보(18s-RNA판정)
- 3) 배양조건별 CO2량(부형제 조건 포함), 미생물총 변화 확인 및 동정
- 4) 선발효모의 배양 및 배지조건 확립

나. 선발효모 지적소유(특허) 확보

- 1) 상업효모 대체형 효모자원 선발(특허출원)
- 2) 유전자 자원 확보(특허수탁)

2. 개발효모 대량생산기법 정립

가. 개발효모(Wild Type)적용 대량생산형 배지 및 배양조건 정립

- 생산수율 증대형 배지 및 배양조건(경제성 적합형)

나. 대량생산시스템 정립

3. 개발효모 제형별(압착형 및 분말형) 적용성 및 제빵제조 fp시피 정립

가. 개발효모제형별 적용(용도.용법) 레시피

나. 제빵제조 레시피 정립을 위한 제빵발효율(최저균수) 평가

다. 대량생산 효모의 제품화(압착형, 건조분말형 구분) 레시피 정립

- 부형제, 유화제(제빵적용시 균질분산능력 확보) 및 영양제 탐구

4. 개발효모 제형별(압착형 및 분말형) 장기보관성 검정

가. 장단기(0일, 30일, 1년) 보관안전(정)성 평가

나 온도조건별(상온 및 냉장) 보관안전(정)성 평가

5. 개발효모 제형별(압착형 및 분말형)제빵제조시 풍미에 미치는 효과

가. 순수분리효모의 풍미발현 효과 판정

나. 제빵제조레시피 정립

6. 효모 제형별(압착형 및 분말형) 제품화 리세피 정립

가. 선발 첨가제(유화제, 부형제 및 영양제) 첨가조건 확립

나. 제형별 제품화 레시피 정립

7. 천연특화제빵 제조레시피 정립

가. 개발효모 적용 제빵제조에 따른 풍미발현 효과 판정

나. 풍미발현인자 구명 및 배지조성법 정립

- 1) 효모기원성 풍미인자 구명
- 2) 특화성(풍미)발현 물리/이화학/생물학적 메카니즘 구명

다. 천연특화제빵 제조 레시피 정립(풍미 및 식감 향상형)

- 1) 배지발효 제빵적용형
- 2) 풍미인자 보유 과일엑기스 제빵적용형

8. 사업화

가. 경제성 평가 : 효모단일제품화, 완제품구성 레시피형

나. 효모 대량생산시스템 및 사업화 로드맵 설정

- 1) 연간 효모사용량, 연간예상판매액, 생산시설구축예정예산, 소요대지
- 2) 시설디자인 예정(주관기관 승인후)

IV. 연구개발결과

1. 상업효모 대체형 한국토종효모자원 개발 및 유전자원 확보

유기농 과일(사과, 파인애플, 캠벨 및 거봉)을 대상으로 한국토착형 효모선발을 위하여, 5% sucrose 배지내 과일표피를 분취 및 분쇄하여 접종하고 3일동안 배양(30℃, 습도 : 50 %)을 실시함으로써, 효모 분리를 위한 배지 및 배양조건 하였다.

효모 분리를 위하여, 일정별 분취배양액을 TSA(총균수 확인), PDA(효모선발) 및 BCP(유산균) 고체영양배지에 배양후 Colony의 형태를 육안 및 현미경으로 검경을 통하여 효모분리균 1차 분리한후 이를 계대순수분리(3세대, PDA)하여 동정하였다.

계대분수분리 효모균의 동정은, 1단계(API Kit, Model :C-AUX), 2단계 Vitek 분석시스템(BioMerieux VITEK사, 프랑스) 및 Kit(Model : YST), 그리고 3단계는 Diversilab시스템(BioMerieux VITEK사, 프랑스) 및 Kit(Model : Saccharomyces Kit)를 사용하여 동정을 완료하였다.

분리 및 동정이 완료된 효모는 (주)마크로젠사(한국)에 의뢰하여 Gene cloning 동정을 실시하였으며, Chromatogram과 Sequencing 결과비교(Blast, NCBI)를 통하여 99% 유전자 상동성을 확인하였다.

결과로서, 유기농 과일중 거봉에서 분리한 효모균을 *Saccharomyces cerevisiae* JKK091006으로 명명하였으며(특허출원 : 제10-2009-0134773), 특허수탁이 완료(취득번호 : KCCM11056P)되었다.

2. 개발효모 대량생산기법 정립

천연 유래 선발효모(Wild Type)의 경제적 생산을 위한 필수조건인 대량생산용 배지선발 및 배양조건 정립과 투입되는 원료대비 고효율의 효모 생산성(성장성 향상) 및 수익성을 극대화 할 수 있는 생산시스템 확립을 완료하였다.

필수정립항목으로서, 염 및 알코올 내성균주의 선발, 선발배지 원료의 전처리 공정설계, 고농도 배양방법 설계, 배양법 최적화(농도 fed-batch배양, 발효종료시 후처리 방법 정립), 압착효모 생산방법 정립 및 규모별 생산시스템 구축계획으로 구분 일관되게 정립하였다.

제빵효모 생산 발효기술 및 제품화 기술개발결과는 다음과 같다.

가. 염 내성 및 알코올 내성 균주의 선발

NaCl 1~10%가 포함된 PDB broth에 미리 배양한 종배양액(*Saccharomyces*

cerevisiae JKK091006)을 넣어 1~2일간 30℃, 200 rpm에서 배양하여 한계 성장 점을 확인하고, 이로부터 단계별로 염 농도를 높여가며 염 내성을 부여하였다. 또한 비슷한 방법으로 알코올 내성을 부여하였다. 선발된 균주는 당밀 전처리, 배지 최적화 및 발효 공정 설계를 위해 최종 동결보존한다.

나. 배지 원료의 전처리 공정 설계

당밀을 희석(65%, w/v)하여 암모니아(minimum 28%), 인산(85%) 및 기타 미네랄을 첨가하여 발효조에서 효모의 성장패턴을 분석하였으며, 성장 속도 및 성장율이 가장 좋은 패턴의 조건을 설정하였다. 또한 당밀내 미네랄 성분을 ICP분석기를 이용하여 제빵효모가 필요한 영양성분이 함유될 수 있도록 추가적인 미네랄을 첨가방법을 정립하였다.

다. 고농도 배양 방법 설계 및 최적화

당밀의 전처리 최적화와 함께 천연효모의 최적화 생산(45%, v/v)을 위해 intermittent feeding strategy, constant feeding strategy을 이용한 fed-batch 최적화, 기타 효모 성장에 따라 feeding 속도를 증대하는 방법 등을 통하여 효모의 성장성과 생균수 증대를 높이기 위해 가장 적합한 생산방법을 개발하였다.

라. 고수율 압착효모 생산 및 제품화(제형화) 정립

산업적인 생산에서 일반적으로 사용하는 압착효모 생산 방법과 이로부터 발생할 수 있는 장단점에 대하여 고찰하며, 실험실 수준에서 수행할 수 있는 방법으로 시제품 생산 및 시제품으로 정하고 이를 제빵특성 검정에 활용하였다,

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

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

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

마. 수익성 확보형 생산시스템 구축

년간 효모제품 생산규모는 1,800톤/년(압착효모형 완제품 기준), 생산시스템 규모는 5톤, 50톤 및 500톤으로 3단계로 구분하여 경제성 평가를 완료하였다.

3. 개발효모 제빵적용성 평가

가. 개발효모 제형별(압착형 및 분말형) 적용성 및 제빵제조 레시피 정립 완료

개발효모에 대한 제빵적용 레시피 정립연구는 상업효모 대비 동일한 제조 레시피 정립에 기준을 두고 실시하였다.

1) 개발효모 제빵 레시피는, 상업효모 대비 동일한 제빵제조 레시피로 정립하였다.

- 제조레시피 : 강력분 1kg+물 600g+설탕 60g+소금 20g+무염버터 80g+개량제 10g+압착형 효모 40g(수분함유량 : 70~74%)

2) 제형별 적용성 평가결과, 분말형의 경우는 Starter 그리고 압착형의 경우는 제빵제조에 효과적이었다.

3) 제빵발효율 보장형 기본효모균수(압착형 기준)는 1.5×10^{10} cfu/g이상에서 제빵 발효율이 보장(상업효모 대비)되었다.

4) 효모제형별 제빵발효율 비교결과(동일균수 : 2.0×10^{10} cfu/g), 분말형은 64~92%범위를 보였으나, 압착효모형은 94~110%범위를 나타냈다. 이때 압착형의 경우는 상업효모 대비 우수한 것으로 조사되었다.

5) 제형별 제빵발효율 확보를 위한 사전활성조건(10% sucrose, 3~11시간 이상) 부여여부 판정결과는 다음과 같다.

가) 압착형 효모는 사전효모활성과정 없이 제빵발효율이 확보(상업효모 대비)되었다(효모균수 : 2×10^{10} cfu/g이상)

나) 분말형 효모는 75~92%범위의 낮은 발효율(상업효모 대비, 효모균수; 2×10^{10} cfu/g이상 기준)을 나타냈다. 이는 분말형의 경우, 제빵적용성 정립 관련 연구가 더 필요할 것으로 판단되었다.

나. 개발효모 제형별(압착형 및 분말형) 장단기 보관성 검증

개발효모제형별 장단기(0일, 30일 및 1년) 및 보관온도별(상온 및 냉장)보관성 평가결과는 다음과 같다.

1) 유효보관기간 평가결과, 냉장조건하에서 압착효모형은 1개월, 분말형은 1년이내였으며, 이는 상업효모 대비 동등성을 보유하고 있었다.

2) 효모균수 변화 : 1개월 이상 장기보관 시, 제형 및 보관온도에 상관없이 최대 20%까지(최초 : 1.0×10^{10} cfu/g → 30일~360일후 : $10^7 \sim 10^8$ cfu/g) 균감소 결과를 보였다.

3) 성장변화

가) 압착효모의 경우, 단시간 경과(1개월이상)시 갈변화 및 이취가 심하게 발생하였다.

나) 제형별 및 보관온도별 차이는 있었지만 장시간 경과시는 동일 성장변화를 유발하였다.

다. 개발효모 제형별(압착형 및 분말형) 제빵제조시 풍미에 미치는 효과 분석

순수분리 개발효모의 제형별 풍미에 미치는 결과조사는 다음과 같이 실시하였다.

1) 제형별 구분없이(압착형 및 분말형) 3시간 이내에 100% Sucrose를 먹이원으로 소모하였고, 제빵제조시 대부분 알콜류 기원 풍미를 나타내는 것으로 조사되었다.

2) 효모제형별 비교결과, 전체적으로 시간이 경과하면 알콜성 풍미수치가 높아졌으며, 압착효모가 먹이이용성과 더불어 풍미발현성도 높게 나타나는 것으로 조사되었다.

3) 제형별 구분 상업효모 대비 시간경과별 풍미발현 효과를 보사하여 보았다.

가) 압착효모는 최초(상업효모 : 1,986, 개발효모 : 1,689 기준) 대비 3시간 경과시 상업효모는 1.8배, 6시간이 경과시는 1.7배로 나타났으나, 개발효모는 1.7배에서 3.4배로 유의한 증가수치를 보였다.

나) 개발효모는 최초(상업효모 : 1,615, 개발효모 : 910 기준) 대비 3시간 경과시 상업효모는 1.6배 1.78배, 6시간이 경과시는 3.5배로 나타났으며, 개발효모 또한 1.71배에서 2.4배로 유의한 증가수치를 보였다.

다) 전체 향기성분중 알콜류 점유비율 조사결과, 압착형은 71~약90%범위를 분말형은 59 ~ 82%범위를 보여 제형에 관계없이 높은 점유율을 보였다.

라) 효모균수 증감 및 시간별 먹이원 이용성과 제빵발효율 연계성 평가 : 동일 연계성을 갖는 것으로 판단되었다.

4. 천연특화제빵 제조레시피 정립

가. 효모 제형에 있어 도우에 효모가 잘 믹스 될 수 있도록 유화제와 효모건조시 생존력 확보를 위한 영양제 선발 및 이에 대한 배합 레시피 연구결과는 다음과 같다.

- 1) 선발 유화제는 SPAN-60, 첨가농도는 0.5%(w/w)로 정하였다.
- 2) 선발 영양제로서 Vitamine C를 첨가농도는 0.2%(w/w)로 설정하였다.
- 3) 정립된 효모제품화(제형별) 레시피는 다음과 같다.
 - 가) 분말형 효모 : 효모 94.3%+수분 5%+SPAN 60 0.5%+Vitamin C 0.2%
- 효모균수 : $5.0\sim 7.12 \times 10^9$ cfu/g
 - 나) 압착형 개발효모 : 효모 30~27%+수분 70~73%+SPAN 60 0.5%+Vitamin C 0.2%
- 효모균수 : $1.54\sim 1.62 \times 10^{10}$ cfu/g

나. 개발효모를 적용한 특화성 부여 제빵제조 레시피는 개발연구결과는 다음과 같다.

- 1) 개발효모 적용 제빵제조시 풍미발현에 미치는 효과
 - 가) 순수효모는 풍미(특화성)에 미치는 효과는 없었다.
 - 나) 과일배지발효액 첨가시, 풍미(특화성)발현에 효과적이었다.
- 2) 특화성(풍미 : 카라멜향)에 관여하는 인자는 유기산(Tartaric acid), Glucose 및 과일발효(유기산 및 Glucose 함유)였다.
- 3) 특화성(풍미)발현을 위한 배지조성법은 다음과 같이 정립하였다.
- 10% Sucrose용액 대비 10%(w/w)과일첨가 및 발효(72시간, 25~30℃, 습도 50%)
- 4) 천연특화제빵 제조레시피는 발효배지형과 과일엑기스적용형으로 구분정립되었다.
- 5) 식감(Soft) 증대형 제빵제조 레시피는 다음과 같이 정립하였다.
 - 가) 배지조성레시피 : 과일원액 원료(68Brix 기준) 5~10% 희석 적용
 - 나) 제빵제조레시피 : 강력분 1kg+(물 600g+68Brix 과일엑기스 30~60g)+설탕 60g+소금 20g+무염버터 80g+개량제+압착형 효모 40g(수분함유량:70~74%)

5. 사업화

가. 경제성 평가는 효모단일제품화, 완제품구성 레시피형으로 구분평가완료 되었다.

나. 효모 대량생산시스템 및 사업화 로드맵(년간효모사용량, 연간예상판매액, 생산시설 구축예정예산, 소요대지 등) 정립완료 되었다.

다. 시설장비에 대한 디자인은 추후 진행예정이다.

6. 종합결론

가. 상업효모 대체형 한국토종효모자원의 개발과 지적소유권은 확보되었다.

나. 빵효모 생산을 위한 발효기술 및 제품화 기술개발이 완료되었다.

다. 천연특화성제빵 제조레시피가 완료되었다.

라. 상업적인 면에서 생산 타당성을 검토 및 산업화에 필요한 기초정보를 확보하였다.

V. 연구성과 및 성과활용 계획

1. 연구성과

연구목표	연구성과
1. 상업효모 대체형 국토종효모자원 확보	1. 상업효모대체형 효모자원 선발(유전자자원확보) 완료 가. 선발완료 효모 : <i>Saccharomyces cerevisiae</i> JKK091006 나. 유전자 자원 확보 : 특허수탁완료(취득번호 : KCCM11056P) 2. 지적재산권 확보(특허출원) - 발명명칭(출원번호) : 신규 효모 및 그를 이용한 빵의 제조방법 (제10-2009-0134773, 2009.12.03)
2. 개발효모 대량생산기법 정립	1. 선발효모 대량생산형기법 정립완료 가 효모 대량생산형 배지 및 배양조건 정립완료 나. 저가배지 및 배양조건 정립 : 당밀배지 2. 선발효모 대량배양시스템 정립완료 가. 효모제형별 생산수율 정립 1) 동결건조분말형 (5%, w/w) 2) 압착형 : 18%(수분함유량 : 70~74%, w/w) 나. 장단기 보관성 및 제빵적용성 평가 다. 생산시스템 구축계획(스케일별) 정립완료 1) 생산규모 : 1,800톤 /년(건조형 효모기준) 2) 규모(3단계) : 5톤, 50톤 및 500톤 3) 생산규모별 경제성 평가 완료 3. 지적재산권 확보(특허출원) - 발명명칭(출원번호):제빵용 효모의 대량생산방법 (제10-2011-0029589호, 2011.03.31)
3. 개발효모 제형화별 적용 레시피 정립	1. 건조형 개발효모 가. 적용 레시피 : Starter로 적용 나. 기본균수(1.5×10^{10} cfu/g 이상) 및 보관성 : 1년(냉장조건 기준) 2. 압착효모 개발효모 가. 적용 레시피 : 제빵제조용 나. 발효율 확보형 효모균수 정립: 1.5×10^{10} cfu/g 이상 다. 보관성 : 1개월(냉장조건기준) 3. 효모제형별 레시피 정립 가. 안정성(유화제) 및 적용편리성(부형제) 부여 나. 보관온도(상온 및 냉장) 및 장단기(0일, 30일, 1년)안정성 평가
4. 효모 제형별 제빵제조 레시피 정립	1. 상업효모 적용 제빵제조 레시피와 동일 정립 2. 제형별 제빵제조 레시피 구분 정립 3. 제형별 제빵제조 관련 물리/이화학/생물학적 메카니즘 구명 - 사전활성부여 조건에 따른 제빵적용성 평가(풍미 등)
5. 특화성(풍미)부여 제빵제조레시피 정립	1. 상업효모와 동일적용 제빵제조 레시피 정립 2. 효모 기원성 풍미인자 구명완료 3. 풍미발현 물리/이화학/생물학적 메카니즘 구명완료 4. 풍미발현 인자대입형 제빵제조 레시피 정립완료 가. 배지발효 제빵적용형 나. 풍미인자 보유 과일엑기스 적용형
6. 사업화	가. 경제성 평가완료 - 효모단일제품화, 완제품구성 레시피형 나. 효모 대량생산시스템 및 사업화 로드맵 설정 완료 - 연간효모사용량, 연간예상판매액, 생산시설구축예정예산, 소요대지 다. 시설장비 디자인 예정(추후)

2. 성과활용계획

핵심연구결과	연구성과활용계획
1. 상업효모 대체형 효모 확보 결과	가. 토종효모 확보와 자원화를 통한 제빵제과 사업화에서 국제 우위성 확보기대 나. 효모균의 탐구 기초기술 확보와 지속적인 유용균 선발에 활용가능다. 다. 종속된 다국적사 효모균에 의한 국내제빵산업 기술발전 저해요인 해소
2. 개발효모 대량생산 기법 정립결과	가. 친환경 유기농 제빵제과 원료의 국내 조달로서, 관련산업 수익창출 기여 나. 국내 효모자원의 대량생산 및 경쟁력 확보를 통한 수입효모 대체과 기대
3. 개발효모 제형화별 적용레시피 정립 결과	가. 기존 제빵제과업계의 제빵제과 기술의 진보에 기여 가능 나. 미잉여 유기농 농업현장 유익균의 산업응용성 확대 방안 제시 다. 제빵 특화성(풍미 및 식감 등) 신규부여 KNOW-HOW 국내 제빵산업 특성화 방향

SUMMARY

I. Title

The Development of organic Bread through selection of yeast native to Korea

II. Objective and Significance

This study was proposed to develop Korean native Baker's yeast strains as a key factor in the bread-making process in order to make an integrated effort to combine independent research works related to the dairy- and baking industry. For developing the value-added ingredients or products using agricultural resources including organic agri-produce and surplus dairy products of cow's milk, butter, cream, and so forth, commercial Baker's yeast strains, which are often blamed to produce unacceptable flavors, are exclusively supplied by few international culture companies abroad. Thus, the ethnic yeast strains need to be developed not only as an alternative to the imported yeast cultures to enhance the overall quality of bread but also to strengthen the competitiveness of domestic dairy industry by solving both the surplus or shortage of milk production, that is thought a main obstacle to the sustainable development of Korean dairy industry.

III. Contents and Scope

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

To organic agricultural product (Apple, pineapple, Campbell and kyoho grape) for the Korean native Baker's yeast selection, we was established on culture medium and culture condition for yeast isolation.

It was used 5% sucrose solution and than inoculation of the organic agricultural product outer layer of skin and tried culture (temperature : 30°C, humidity : 50 %) for three days. For yeast isolation,

We tried culture of different time point culture medium with TSA, PDA and BCP nutrient agar medium. afterward confirmation colony of morphology to naked eye and microscope and than tried 3 times yeast isolation.

Identification of yeast isolation was finished to use 1st API systeme, 2ed Vitek analysis systeme and 3rd Diversilab systeme. The finished whole process after commit to MacroGen company (Korea). MacroGen was tried to Identification of Gene cloning and confirmed genetic homology 99% through Chromatogram and Sequencing results comparison.

As a result, The yeast which separated kyoho grape under organic agricultural product. we give a name to JKK091006.

2. Established of production technique mass development yeast.

We was established on culture medium and culture condition and to be able to production system of maximize yeast productivity (growth and development elevation) and profitability for essential condition for economic production of natural derivation selection yeast.

The established on essential items, the salt and alcohol tolerance strain selection, pre-treatment process design of selection culture medium raw materials, method design of high density culture, established optimization of compression yeast cultivation method and productive system construction by scale. Baker's yeast Productive fermentation technology and Product technology development results are as follows.

A. The selection of salt and alcohol tolerance strain

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

B. A pre-treatment process design of culture medium raw materials.

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

C. Designs and optimization of High density culture method

We used intermediate feeding strategy, constant feeding strategy for optimization production of pre-treatment optimization of syrup and natural derivation yeast and we developed a productive method to be most suitable in order to raise growing pattern expansion of yeast through method to increase a feeding speed etc. according to fed-batch optimization, other yeast growing.

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

Generally, we consider it about the merits and demerits that can occur from commercialization yeast, and than we tried to method to be able to accomplishment in laboratory levels. thereafter we confirmation can applica

bility made bread.

- 1) Showed to high density total cell count. such as culture medium was 2.5×10^9 CFU/ml and compression yeast was 1.15×10^{10} CFU/g.
- 2) The productive yield certification results of develop culture medium a product, showed high productive efficiency such as 5.4% of freeze-dried yeast and 18% of compression yeast.
- 3) We was established on develop a product of productive yeast classified it to dry and compression type.

E Profitability obtain of productive construction system

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

3. Established of recipe for manufacturing bread and apply from different type of development yeast(Dry or compression type)

We tried to Bread application recipe establishment study regarding development yeast a basis to the same manufacturing recipe for commercial yeast.

- A. As a result of different types development yeast to apply manufacturing bread, we established it to recipe manufacturing the same bread for commercial yeast with compression yeast bases.
 - Commercial Recipe: strong flour 1kg +water600g+ sucrose60g+ salt20g+unsalted butter80g+flour improver 10g+compression yeast 40g(water content :70~74%)
- B. The evaluation results of different types development yeast to apply manufacturing bread, showed to effect such as dry yeast was starter and compression yeast was manufacturing bread.
- C. Numerical basic yeast fermentation of bread guarantee (a basis-type a compression) was more than 1.5×10^{10} cfu/g.
- D. The comparative results of different types yeast was showed to 64~92% of dry yeast and 94~110% of compression yeast and at this time commercial a case of compression was investigated to excellent things.
- E. The results are as follows a type of yeast bread fermentation rate obtain

of pre- activity condition grant or not.

- 1) Compression yeast was do not pre- activity condition grant.
- 2) Dry yeast showed with low fermentation rate of 75–92% range. so we need more can study.

4. Storage evaluation of long term or short term for development yeast

The Different type of development yeast(dry or compression type) storage evaluation results by different period and temperature are as follows.

- A. The Effective storage validity evaluation results showed that dry and compression yeast was under cold storage condition in 1 year or 1 month.
- B. Numerical change of yeast: keep it on 1 month was showed the decrease of total cell number results until the maximum 20%(First time : 1.0×10^{10} cfu/g \rightarrow 30~360 after day : $10^7 \sim 10^8$ cfu/g) without reference to storage temperature or type.
- C. Change of state : As time passed and than occurred mold, browning reaction and a nasty smell(excepte of dry yeast).

5. Effective analysis to cause development yeast to fragrance

We tried it as follows for Effective analysis to cause pure isolation development yeast to fragrance.

- A. All yeast consumed 100% sucrose with feed within three hours and we was investigated in case of bread manufacture showed by fragrance of most alcohol (ethanol) system.
- B. The comparative results of Different type of development yeast, If time passed generally, alcohol flavor numerical value rose, and we was investigated so that compression yeast appeared feed used and flavor revelation too high.
- C. We tried to investigate other flavor revelation effect for commercial yeast without type in process of time.
 - 1) The first(Commercial yeast 1,986,development yeast 1,689) Compression yeast in case of 3 hours process of time. Commercial yeast was appeared with 1.8 fold of 3hours after and 1.7 fold of 6hours, but development yeast was showed the increase numerical value rose with 1.7 to 3.4 fold.
 - 2) The first(Commercial yeast 1,615,development yeast 910) Compression

yeast in case of 3 hours process of time. Commercial yeast was appeared with 1.6 or 1.78 fold of 3hours after and 3.5 fold of 6hours, and development yeast was showed the increase numerical value rose with 1.71 to 2.4 fold.

3) It was the type of alcohol occupation ratio investigation results during total fragrance components. such as dry yeast showed 59–82% range, and compression yeast was 71~ 90% range. It was showed high position regardless of type.

D. Connectivity result of bread fermentation rate, increase or decess numerical yeast and yeast consumed : It was confirmed same connection.

6. Established of recipe for manufacturing Different type of development yeast.

The result of manufacturing Different type of development yeast resear ch was as follows for nutrients combination recipe.

A. An emulsifying agent addition density decided with 0.5% (w/w) to SPAN–60

B. Addition density set up Vitamine C with 2% (w/w) as prior nutritional supplements.

C. Established of recipe

1) Dry yeast : yeast 94.3%+water 5%+SPAN 60 0.5%+Vitamin C 0.2%

– Total yeast number : $5.0\sim 7.12\times 10^9$ cfu/g

2) Compression yeast : Yeast 30~27%+water 5%+SPAN 60 0.5%+Vitamin C 0.2%

– Total yeast number : $1.54\sim 1.62\times 10^{10}$ cfu/g

7 Established of natural specialization bread recipe

Development result of research was same as the following of established of natural specialization bread recipe.

A. An effect to cause it to flavor revelation in case of development yeast application bread manufacture.

1) There wasn't effect that pure yeast wascause to flavors (specialization)

2) In case of fruit undiluted solution addition it was effective in flavor (specialization) revelation.

B. Organic acid(Tataric acid), Glucose and fruit fermentation a factor to

participate in to specialization(flavor : caramel)

C. Culture medium creation for specialization (a flavor) revelation established it as follow .

- 10% (w/w) fruit addition preparing for 10% sucrose solution and fermentation(72h, 25~30°C, humidity 50%)

D. We was established of natural specialization bread recipe to fermentation Culture medium and application fruit undiluted solution application.

E. Recipe manufacturing bread established texture (Soft) increase as follows

- 1) Recipr of Culture medium: fruit undiluted solution(base: 68Brix) and dilution application of 5~10%.
- 2) Bread manufacture Recipe: strong flour 1kg +(water600g+fruit undiluted solution(68Brix) 30~60g+ sucrose60g+ salt20g+unsalted butter80g+flour improver 10g+compression yeast 40g(water content :70~74%)

8. commercialization

A. Completion of Economy evaluation

- A product single yeast, Finished goods configuration recipe.

B. We finished large scale yeast production systems and industrialize rod map setting

- Yeast amount used between year, Expectation sales amount between year, Productive facilities construction plan budget, The disturbance eart.

C. Facilities equipment design plan

9. conclusion

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

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

C. Established of natural specialization bread recipe

D. We ensured necessary basic information to productive feasibility examinations and industrialization in commercial aspects

V. Achievements and contribution to the related fields

1. Achievements

goal of study	Achievements of research
1. Replace commercial yeast with obtain Korean native Baker's yeast.	1. Development of Korean native Baker's yeast resources Korean substitute commercial yeast and Intellectual Property Right were ensured. a. Selection completion yeast : <i>Saccharomyces cerevisiae</i> JKK091006 나. Obtain of genetic resources : completion of patent(acquisition of number : KCCM11056P) 2. Intellectual Property Right were ensured.(a patent application) - official name(acquisition of number) : A manufacturing method of the bread which used new yeast (10-2009-0134773. 2009.12.03)
2. Established of production technique mass development yeast.	1. Established of production technique large development yeast. a. Establishment and completion large Production of yeast culture medium and culture condition. b. Establish of Low price culture medium and culture condition. : syrup culture medium 2. Established of production technique large development selection yeast. a. Established of productive yield 1) powdery freeze-drying(5%, w/w) 2) Compression type: 18%(water content : 70~74%, (w/w) b. Evaluation of long term or short term for development yeast and manufacturing bread c. Establishment completion deliberate a productive system construction. 1) Productive scale : 1,800ton /year(base of dry yeast) 2) Scale(3step) : 5ton, 50ton and 500ton 3) Completion of different Productive scale Economy evaluation 3. Intellectual Property Right were ensured.(a patent application) - official name(acquisition of number):Method for mass production method of Baker's yeast (10-2011-0029589호. 2011.03.31)
3. Established of recipe for manufacturing different type of development yeast.	1. Dry development yeast a. Application recipe : Apply of starter b. Base cell number : more than 1.5×10^{10} cfu/g c. storage : 1year(base of cold storage condition) 2. compression development yeast a. Application recipe : manufacturing bread b. Base cell number : 1.5×10^{10} cfu/g c. storage : 1month(base of cold storage condition) 3. Established of different types development yeast to apply manufacturing bread a. Stability (emulgens) and application convenience anger (diluting agent) grant b. Test of development yeast(dry or compression type) storage evaluation results by different period and temperature
4. Established of different types development yeast to apply manufacturing bread	1. development yeast a basis to the same manufacturing recipe for commercial yeast. 2. Recipe distribution established manufacturing bread 3. The study and investigation of physical/physics and chemistry/biological mechanism - Bread applicability evaluation pre-activity grant condition 7 (flavor act..)
5. Established of natural specialization bread recipe	1. development yeast a basis to the same manufacturing recipe for commercial yeast. 2. investigation of Yeast origin flavor factor 3. The study and investigation of Yeast origin flavor factor mechanism 4. Recipe establishment completion manufacturing flavor revelation factor apply bread. a. Bread application of culture medium fermentation b. Flavor factor possession fruit undiluted solution application
6. commercialization	A. Completion of Economy evaluation - A product single yeast, Finished goods configuration recipe. B. We finished large scale yeast production systems and industrialize rod map setting - Yeast amount used between year, Expectation sales amount between year, Productive facilities construction plan budget, The disturbance eart. C. Facilities equipment design plan

2. Contribution of Achievement and development

Results	Contribution of Achievement and development
1. results of Replace commercial yeast with obtain Korean native Baker's yeast.	<p>A. Expectation of an international predominance security in baker and baking business through native yeast obtain and resources.</p> <p>B. It was utilization possibility to a technology obtain basic research of yeast and the continuous helpful cells selection.</p> <p>C. domestic bread industrial technology development problem solution by yeast.</p>
2. results of method for mass production method of Baker's yeast	<p>A. As domestic supplies of organic agricultural product raw materials it was related industry profit invention contribution.</p> <p>B. Expectation of income yeast through mass production and competitiveness obtain of domestic yeast resources</p>
3. results of recipe for manufacturing different type of development yeast.	<p>A. It was contribution possibility to a technical progress manufacturing bread.</p> <p>B. Application industrial of helpful cells field organic farming agriculture for don't use surplus.</p> <p>C. A characteristic industrial of bread domestic grant KNOW-HOW new bread specialization (flavors and SikGam etc.)</p>

CONTENTS

Chapter 1.	Introduction	-----	21
Chapter 2.	International and domestic trends of the technical development	-----	24
Chapter 3.	Results and discussion	-----	26
Section 1.	Replace commercial yeast with obtain Korean native Baker's yeast.	-----	26
Section 2.	Established of production technique mass development yeast.	-----	65
Section 3.	Established of recipe for manufacturing bread and apply from different type of development yeast	-----	88
Section 3-1	Established of recipe for manufacturing Different type of development yeast.	-----	88
Section 3-2	Storage evaluation of long term or short term for development yeast	-----	92
Section 3-3	Effective analysis to cause development yeast to fragrance	-----	94
Section 4.	Established of natural specialization bread recipe	-----	105
Chapter 4.	Achievements and contribution to the related fields	-----	128
Section 1.	Achievements of research and development	-----	128
Section 2.	Contribution of research and development	-----	129
Chapter 5.	Application	-----	130
Section 1.	Results of study	-----	130
Section 2.	Plans for application	-----	132
Chapter 6.	International techniques	-----	134
Chapter 7.	References	-----	138

목 차

제 1 장 연구개발과제의 개요	----- 21
제 2 장 국내외 기술개발 현황	----- 24
제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과	----- 26
제 1 절 상업효모 대체형 한국토종효모자원 개발	----- 26
제 2 절 개발효소 대량생산기법 정립	----- 65
제 3 절 개발효모 제빵 적용성 평가	----- 88
1. 제형별 장기보관성 검정	----- 88
2. 개발효모 제형별 제빵발효율 확보관련 사전배양조건 확립	----- 92
3. 순수분리효모적용 천연특화제빵 적용성 평가	----- 94
제 4 절 천연특화제빵 제조레시피 정립	----- 105
제 4 장 목표 달성도 및 관련분야에 기여도	----- 128
제 1 절 목표달성도	----- 128
제 2 절 관련분야의 기여도	----- 129
제 5 장 연구개발성과 및 활용계획	----- 130
제 1 절 연구결과 성과	----- 130
제 2 절 연구결과 활용계획	----- 132
제 6 장 연구개발 과정에서 수집한 해외과학 기술정보	----- 134
제 7 장 참고문헌	----- 138

제 1 장 연구개발과제의 개요

제 1 절 . 상업효모대체형 한국토종효모자원 개발

현재 국내 제과시장은 약 4조이고, 관련 국내의 제빵·제과인은 20만명을 넘고 있는데 “제과제빵 연구개발 현황”을 분석하면, 연구개발 인원의 부족에 따라 단순 제조 테크닉 단계에 머물러 있다.

이는 가장 필요한 핵심원료인 상업효모(특허등록)가 세계 몇개 회사에서 독점적으로 공급되고 있는 바(5,000원~10,000원/Kg), 이를 사용함에 따라 제조사 및 소비자가 장기적인 적응됨으로서 연구개발의 제한요인이 되어왔다. 따라서, 유전자원이 확보된 효모균의 선별은 제과제빵 발전의 중요한 연구개발 항목임을 전체적으로 깊이 공감하고 있다.

현재 세계적으로 분리 및 동정된 효모는 60여 Genera, 500여 Species이고, 이중 빵효모 *S.cerevisiae*는 대표적으로 유전학, 생화학, 세포생물학 및 생물학분야 등 각 분야에서 모델시스템으로 이용되고 연구되어 왔다(김 등, 1997).

이는 산업적 응용성에 대한 다양한 연구결과가 축적되어 왔음을 시사하고, 전세계적으로 200만톤의 시장성을 보유하고 있는 것으로 알려지고 있는데, 이중 빵효모 또는 식용효모는 90%를 점유하고 있을 정도로 이용성 및 안전성에 대해 보고 되었다.

또한, 효모가 가지는 이용성중 기능성 물질이 주목받고 있는데 대표적으로 병원성 세균에 대한 면역시스템 활성화와 더불어 저항성 및 백신생성을 높여 주는 것으로 알려진 β -1.3/1.6 Glucan과 영유아 생육시 두뇌발달에 도움을 주는 것으로 알려진 핵산류에 대한 것이 대표적이지만 최근 계속 늘어나고 있다(Kakuta 1989, 김 등 1997).

빵의 제조에 있어서 효모, 즉 효모의 반죽 내 당분 발효특성은 제품의 품질(풍미, 식감 등)을 결정하는 가장 중요한 요소의 하나이므로 이를 개선하기 위한 연구개발이 활발하게 이루어지고 있다(김 등 1997),

예로서, 일본특허(특개평 6-52호)를 살펴보면 상업효모가 갖는 이미.이취(흙냄새 또는 비린냄새)를 개선하기 위하여 천연야생 효모를 해수로부터 분리 후 이를 교잡 및 변이육종 균주로 개량 후 제빵제조에 적용하여 풍미를 개선한 결과에 대한 특허가 있다.

한국공개특허(제2001-0040742호)는 “물엿 전처리 효모를 이용한 빵의 제조방법에 관한 것”으로 상용효모를 순수맥아당 또는 물엿배지에 처리하여 맥아당 발효에 관계되는 유전자의 발현을 사전유도 후 제빵제조시 특화성(풍미)를 신규부여 할 수 있는지 검정결과, 상업효모는 풍미 및 식감의 한계를 벗어날 수 없었다는 결과가 출원된 바 있다.

또 다른 한국특허 제0767383호에서 “신규한 전분 자화성 효모와 그 용도”에 관한 것으로 국산누룩에서 분리한 토종효모자원의 이용성에 관한 것이지만 알콜발효 이외 제빵용으로 활용되기는 어려운 것이었다. 이는 특정목적에 적합한 야생효모의 선별과 응용성 정립에 대한 연구개발이 결코 간단하지 않는 것을 시사하고 있다.

최근 우리나라에서도 천연 발효종을 제빵의 원료로 사용하여 제조하는 Sourdough 제빵이 건강빵으로 인식되면서 이에 대한 연구 및 상업적인 생산에 대한 접목연구가 급증하고 있으나, 천연 효모선발 후 필수적인 시설장비의 구축 및 대량생산시스템 부분 및 제품화 및 제빵 적용성까지 일관된 연구개발과정이 필요하고, 현실적으로 상용되는 저가 상업효모(5,000~10,000원/Kg) 대비 경쟁력 저하로 인해 실험실적 제한연구로 대부분 끝나고 있다(월간 제과제빵사 1990, 김 등 2008).

즉, 특화된 효모균이 개발되었다 하더라도 이를 제과·제빵분야에서 별다른 조치없이 즉시 활용할 수 있는 제품 레시피 및 사용방법이 정립되지 않으면 이 역시 사장될 수 있고, 또한, 가장 기본원료인 밀가루(900원/Kg, 원료별 특성보유), 낙농업소재 [우유(1,000원/Kg), 버터(8,000원/Kg), 생크림(5,000원/Kg) 등], 낙농미생물(첨가되는 낙농제품) 및 제빵제조시 종합적인 특성까지 고려된 효모균들의 안정된 생산과 장기적 공급에 대한 선행 준비가 필요하다(서, 2000).

따라서, 상기 분석결과를 토대로 본 연구에서는 국산효모자원 이용성에 대한 선행 연구(유기농 농업현장내 과실 및 과일표면 효모분리->제빵적용->관능평가)를 실시하여 본 바, 미이용 토종효모의 선점화 및 제빵산업에 적용시 “천연 고급브랜드화”가 가능(풍미, 맛, 색깔, 보존성 등)하다는 결론에 도달한 바 있었다.

이는 현재 한국은 시설원예분야에서 유기농인증 농업이 정착 및 대세인 점과 관련 미이용 토착효모에 대한 유전자원 확보는 중요한 현장애로기술 해결과 더불어 국제 경쟁력을 갖춘 사업화의 변수(제빵 사업화)가 될 수 있다는데 주목하게 되었다.

주관연구기관의 경우, 제빵·제과 연구개발 및 사업화에 있어 반드시 필요한 원료(우유, 버터 등) 및 제품화(축산, 유가공 및 낙농제품) 대량생산과 사업화에 대한 장기적(45년, 11년 기준)인 연구개발 및 사업화에 대한 KNOW-HOW가 두텁게 축적되어 있어 관련 연구개발과 사업화에 큰 장점을 갖을 수 있음도 중요한 요인이었다.

상기 분석결과를 토대로 낙농, 농업 및 제빵사업 전반의 기반보호와 육성이라는 종합 대안으로 제시함에 목적을 설정하였으며, 이에 따른 세부연구개발 목표는 다음과 같다.

1. 상업효모 대체형 천연효모 확보 및 개발효모 대량생산기법 정립
2. 개발효모 제형화별 적용 레시피 및 이의 제빵제조 레시피 정립
3. 특화성(풍미)부여 제빵제조 레시피 정립
4. 사업화(개발결과 관련산업 이전)

제 2 절 . 개발효모 대량생산시스템 정립

본 연구개발의 핵심기술은 제빵적용이 가능한 한국토종효모개발 및 자원화 하고 이를 이용하여 상업효모 대체가 가능할 수 있는 대량생산기법 정립 및 이의 국내외 소비자 기호성에 충족이 가능한 고품질 천연특화제빵 개발이며, 일련의 시스템 구축에 목표를 설정하였다.

따라서, 개발효모 대량생산 시스템 정립부분 연구개발과제의 개요는 하기 3가지에 대한 답을 위해서 산업화 기초 연구의 필요성이 제기되었다.

1. 천연 유래 효모의 산업적인 적용이 가능한가?
2. 산업화 한다면 투자규모와 수익성은 어떻게 될 것인가?
3. 시장의 크기와 시장성은 어떻게 될 것인가?

현재 한국의 압착효모 (크림타입 효모 포함)의 시장규모는 약 6,600톤 (210억원, 시장가)이나, 시장에서 소매되는 가격이 2,500~5,000원/500g(팩)으로 매우 낮은 점이 사업화의 문제가 되고 있다.

따라서, 본 연구를 수행함에 있어서, 경제적인 사업화가 가능할 것인가에 대한 연구가 핵심이며, 본 효모가 차지할 수 있는 시장의 규모도 사업화 의사결정에 영향을 미치는 요인이라 하겠다.

본 연구과제는 무엇보다 막대한 규모의 시설투자가 선행되어야 하기 때문에 더욱이 기초 연구의 중요성이 크다. 같은 제빵효모라도 회사에 따라 균주의 특징은 매우 상이한 경우가 많다. 이는 균주에 따라 차별화된 배양 공정을 개발해야 하는 이유이기도 하다.

당밀에 포함되어져 있는 당류는 포도당, 설탕, 과당, 람노우즈 등으로 구성되어져 있으며, 이러한 혼합당이 포함된 배지에서는 일반적인 생장 패턴이 아닌 2중 생장 패턴 및 낮은 생장 속도를 나타낸다. 하지만, 당밀의 배지로서의 가치는 비용 대비 영양성분 함유량이 높다는 것이며, 저가의 제빵효모를 생산하는데 없어서는 안되는 원료이다.

제빵효모 생산 시 대부분 당밀을 사용하는데, 당밀 제조업체에 따라 당밀 성분의 차이가 심하다. 당밀은 설탕 제조공정에서 나오는 부산물로서 자체 내에 상당한 회분과 물에 녹지 않는 다양한 물질이 포함되어져 있다. 이들의 칼슘착화합물 및 회분 등으로 이루어져 있으며 약 3~5% 정도를 차지한다. 이를 제거하지 않고 발효에 사용하게 되면 최종 산물인 효모의 품질에 막대한 영향을 미쳐 제품의 질이 떨어진다. 또한, 이러한 이유로 효모 생산성을 높이기 위해 효모생산 공정에서 당밀을 전처리 하는 공정이 가장 중요시 되고 있다.

당밀 전처리 공정은 일반적으로 영양성분의 균형을 조절하여 효모의 생장을 최적으로 만드는 단계를 포함한다.

따라서 본 연구는 효모의 성장성을 높게 하여, 투입되는 원료대비 고효율의 효모 생산 조건을 결정하고, 결과적으로는 경제성을 높여 효모 사업의 수익성을 극대화할 수 있는 조건을 탐색하고자 하였다.

제 2 장 국내외 기술개발 현황

1. 국외 천연특화제빵 연구개발 및 제품화 현황

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

가. 조사대상국 : 한국, 일본, 유럽(프랑스, 스위스, 독일)

나. 조사결과

- 1) 효모는 자가배양(비정형화 효모제조)후 제빵에 적용, 생산 및 소비 패턴을 보임.
 - 2) 제빵 및 제과제품 및 원료의 세분화로 다양한 제품컨셉 사용되고 있으며, 한정된 유기농 인증원료를 활용하고 있음.
 - 3) 천연효모 개발에 대한 필요성은 공감하고 있으며, 체계화 연구는 초기단계에 있으나, 근 시기에 정립될 것으로 예측됨.
 - 4) 큰 특징으로서, 국내외 관계없이 식품분야 적용소재가 개발 시, 가장 먼저 제과·제빵분야에 적용되고 있는데 이는 대량소모와 신속한 적용제품의 소비가 뒤따르는 점이 업계특성 때문임.
 - 5) 과제관련 효모의 이용성 및 이의 개발 중요성은 충분히 인식 하고 있으나, 현재, 국내외적으로 체계화된 연구 부재로 자가배양(비정형화 효모제조) 및 소량제품 생산과 소비(동일 일반제품 대비 2~5배) 패턴을 보이고 있음.
 - 6) 최근 효모자체의 이용성(단순 제빵용)을 넘어 효모가 보유하고 있는 기능성 소재 이용성 관련 연구개발 및 산업화(우선적 제과제빵 소재 적용)가 급속히 진행되고 있는 것으로 조사되었음.
- * 조사대상국 및 업소 : 한국(2009~2010 식품박람회 참관 및 6개업소), 일본(2009 식품박람회 참관, 10개업체), 유럽 3개국[2010 유럽빵 박람회 참관 및 프랑스(10개업소), 스위스(10개업소), 독일내(5개업소)]

2. 국내 제과·제빵분야 시장 현황 및 요구성

가. 시장성 : 약 4조원(해외시장 평가 불가)

나. 조사대상 : 국내 유명 햄버거 및 샌드위치 전문점(6개업소)

다. 조사결과

- 1) 제품컨셉이나 인테리어 판매방식의 차이외에 제품의 특화성은 결여
- 2) 일반효모에 대한 적용으로 인하여 특화시키기에는 현재 한계성이 있어 보임
- 3) 천연효모 필요성 공감과 체계화 연구에 대한 요구성은 매우 높으나, 전문연구진이 없음.
- 4) 제빵·제과 품목은 성장추세를 보이고 있으며, 기본 제빵(식빵)품목은 기존상업효모 유래의 한계성으로 인한 특화성의 결여로 하락세를 보이는 것으로 판단됨.
- 5) 국내외 관련연구의 현황으로서, 다국적 기업에 의한 효모, 상용효모를 이용한 정형화 제빵 제조, 생산 및 소비패턴에 종속되어 있으며, 핵심소재 및 기술에 주안점을 둔 단편적 연구가 학교(학회)주관으로 소규모적으로 수행되고 있음.

3. 국내외 낙농산업(핵심 원료) 현황

- 가. 선진 낙농국가의 원유 및 관련 유제품의 국내 가격경쟁력은 약 1/2~1/3수준임에 따라 농축산물 FTA와 시장개방에 속도에 따라 국내 낙농산업은 비례하여 피해(낙농 분야 : 416~594억원)가 증가될 것임.
- 나. 낙농제품 수출입 현황으로, '07년 무역적자는 약 2억\$[수출 :13천톤(42,241천\$), 총수입량 : 72천톤(233,951천\$)]에 달함.
- 다. 현재 국내 낙농업 현황으로서, 낙농산업 총생산액('07)은 1조 6천억원이고, 젖소 사육두수는 점차 감소하고 있으나 규모화 및 젖소두당 산유량 증가로 원유와 더불어 분유류의 재고량이 동시에 급격히 증가되고 있음.
- 라. 현재 국내 낙농산업의 주요 이슈는, 총체적인 고민거리인 잉여 원유('07 기말재고량 : 141천톤)의 안정적인 소비방법을 확보하는 것인데, 생산자는 정부에 전적으로 대책을 의존하고 있으며, 정부 또한 뚜렷한 대안(공급 및 가격관리, 유통 및 품질관리, 소비촉진과 신규 유제품개발)이 없어 결국 국내 낙농산업의 총체적인 피해로 연결되고 있음.
- 마. 시장전망에 대한 불확실성으로 극소수 연구자만의 산업화가 배제된 단편적 연구 활동에 치중하고 있음. 또한, 인력공급의 핵심인, 낙농 관련 대학/학과 등 관련분야의 축소 및 폐지 등으로 연구인력 인프라는 점차적으로 축소되고 있음.
- 바. 제조업체의 가격경쟁력 저하로 수입원료 대체 등으로 전반적인 취약성이 증가 일로에 있음.
- 사. 기존의 단편적인 연구개발과정을 통합연구개발시스템을 통한 첨단화 소재개발로 가격 경쟁력 확보 및 소비시장의 확대, 고부가가치 제품으로서 응용 및 용도/용법 확대에 필요성에 대하여는 절실히 공감하고 있음.
- 아. 본 연구와 관련된 전문연구원 , 연구센터 설립 및 검토 부분은 현재까지 없음[근거: 국가과학기술정보서비스(NTIS), 범부처 국가 R&D현황, 2001~2008]

4. 연구개발 당위성

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

제 3 장 연구개발 수행 내용 및 결과

제 1 절 상업효모 대체형 한국토종효모자원 개발

[협동 : 연세대(원주분교) 윤성식 교수]

1. 연구목적

농업자원과 잉여 국내산 원유소재를 이용한 기술우위의 고부가 가치의 소재 및 상품으로 개발하되, 균일화된 상업효모 사용으로 인한 국내외 제과제빵의 발전저해요소를 한국 토착형 효모균 개발을 통하여 신규산업화 방안을 창출 및 해결코저 하였다. 이를 위하여 우선 유기농 농산물(시설원예)내 존재하는 제빵용 효모균을 분리, 동정 및 유전자 조사를 통하여 한국토착효모균을 최종선발하고, 선발효모균의 배양 특성을 확인함에 목적을 두었다.

2. 연구수행방법

가. 유기농 농산물내 효모균 분리

1) 분리법 1

분리시료인 유기농 과일(사과, 파인애플, 캠벨, 거봉)을 껍질을 벗겨내어 잘게 (0.5cm x 0.5cm) 자른 후 1g을 취하여 증류수를 10ml 첨가하여 stomacher를 이용하여 blending(2min)한다. 이 sample을 1ml 취하여 10-1~10-5까지 peptone수에 십진 희석한 후 YPD배지에 도말하여 균의 형태를 확인하고, 효모를 분리하였다(강, 2008)

2) 분리법 2

효모분리를 위한 배양액 조성조건으로서, 유기농 과일(사과, 파인애플, 캠벨 및 거봉)을 대상으로 한국토착형 효모선발을 위하여, 5% sucrose 배지내 과일표피를 분취 및 분쇄하여 접종하고 3일동안 배양(30℃, 습도 : 50 %)을 실시함으로서, 효모분리를 위한 배지 및 배양조건으로 하였다.

효모분리는, 배양과정별 일정별로 일정액을 분취한 배양액을 TSA(총균수 확인), PDA(효모선발, 10% 주석산 혼입배지) 및 BCP(유산균) 고체영양배지에 배양하였다. 이어서, 형성되는 효모형 콜로니만을 선별 1차 분리한 후 이를 계대순수분리(3세대, PDA)하여 분리과정을 완료하였다.

선택배지별로 일정별 분리된 Colony의 형태는 육안 및 현미경으로 검경하여 분리균의 형태를 확인과정을 필요시 병행하였다.

나. 분리 효모균 동정

계대 순수분리효모균의 동정은, 1단계(API Kit, Model : 20C-AUX), 2단계 Vitek 분석시스템 및 Kit(Model : YST), 그리고 3단계는 Diversilab시스템 및 Kit(Model : Saccharomyces Kit)를 사용하여 권장방법에 따라 분석하였다.

PCR 분석(Table 1) 및 18S-RNA 염기서열 분석은, 분리균주 JKK091006가 표준균주 *S. cerevisiae* KCCM 12028 및 상업효모(J사, *S. cerevisiae*)를 대상으로 실시하였다. 즉, DNA 염기서열 분석을 위하여 200U Lyticase(Sigma, L4025)처리 하고 Dneasy Blood & Tissue kit (QIAGEN, 69504)를 이용하여 효모의 genomic DNA를 순수분리 한 후, 18S rRNA and 28S rRNA spacer region 분석 하기 위하여 forward primer로 ITS1 (5'-TCC GTA GGT GAA CCT GCG G-3 ')를 reverse primer로 ITS4 (5'-TCC TCC GCT TAT TGA TAT G-3')를 이용하여 First denature(95℃, 2min.), Denaturation(95℃, 45sec), Annealing(55℃, 45sec), Extension(72℃, 45sec , 2 to 4 33 cycles) 그리고 Final extension(72℃,10min)의 조건으로 PCR을 실시하여 밴드패턴을 확인하고, 제한효소 절단법을 이용하여 분리효모의 DNA를 표준표모균주와 비교하였다 (Sujaya, 2004). 또, 18s RNA의 염기서열을 CLUSTAL 2.0.11을 이용하여 Multiple sequence alignment를 실시하여 비교하였다.

또한, 표준효모(*S.cerevisiae* KCCM12028) 및 상업효모(Jenico) 대비 분리효모의 유전자의 확인을 위하여, Sma I과 Sau3AI을 이용하여 RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism)를 실시를 통하여, 분리효모인 JKK091006균이 표준효모 및 상업효모와의 패턴을 비교 하였다.

Table 1. 선발 분리효모의 유전자 분석결과(PCR)

PCR 항목	효모 genomic DNA 분리	DNA 염기서열 분석(동정) (18S rRNA and 28S rRNA spacer region 분석)
시험방법	1. 200U Lyticase(Sigma, L4025) 처리 : 37℃, 45분 2. Genomic DNA 순수 분리: Dneasy Blood & Tissue kit(QIAGEN, 69504)적용	1. PCR primers 가. forward primer ; ITS1(5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3 ') 나. reverse primer ; ITS4(5'-TCCTCCGCTTATTGATATG-3') 2. Condition of PCR reaction 가. First denature:95℃, 2min 나. Denaturation:95℃, 45sec 다. Annealing : 55℃, 45sec (33 cycles) 라. Extension: 72℃, 45sec 마. Final extension:72℃,10min
비교	REFERENCE 1. A Phylogenetic Analysis of Saccharomyces Species by the Sequence of 18S-28S rRNA Spacer Regions., YUJI ODA et al.,YEAST VOL. 13: 1243-1250, 1997 2. Evaluation of PCR primers and PCR conditions for specific detection of common airborne fungi., Zhihong Wu et al., J. Environ. Monit., 4, 377-382, 2002	

다. 배지선발(당밀배지에서 배양조건별 CO₂생성량 조사)

산업화를 위해서는 원가 절감을 위하여 값비싼 배지를 저렴한 원료인 당밀에서의 표준효모균주 및 상업효모와 분리균과의 배양특성 비교가 필요하다.

따라서, 산업적으로 효모를 배양하는 다수의 업체와 기존에 발표된 논문을 참고한 결과 산업용 배지로는 대체로 당밀을 많이 사용하고 있었다. 본 연구에서도, 가격이 저렴한 당밀을 이용하여 분리균주를 배양할 경우 배양조건에 따른 균수의 변화를 확인할 필요가 있었다(김, 2001). 통상 사용되는 배지와 함께 당밀의 농도를 다르게 (5%, 10% 및 15%)하여 표준효모(*S.cerevisiae* KCCM12028) 및 상업효모(Jenico)와 두 개의 분리균주(MG 1, JKK091006)의 growth curve를 측정하였다.

라. 선발배지 적용 배양조건 정립

분리균주 JKK091006의 산업화를 위하여 당밀배지에서의 활성도를 확인할 필요가 있다. 이를 위하여, 선발된 분리균주 JKK091006를 일반적으로 효모를 배양하는 PDB 배지에서와 당밀배지를 농도별로 조제하여 JKK091006의 growth curve를 측정하고, 당밀배지에 ammonium sulfate를 질소원으로 하여 농도별로 JKK091006의 growth curve를 측정하였다.

마. 선발효모 제품화 기초연구(부형제 선별)

빵효모의 산업적으로 생산함에 있어서 우수한 생존활성을 유지, 보존하기 위하여 5가지 종류의 부형제 효과 실험을 검토하였다(Table 6).

이를 위하여 *S.cerevisiae* JKK091006를 10%당밀, 2% ammonium sulfate를 첨가한 배지에 접종하여 shaking incubator에서 36hr 배양하여 (30°C/150rpm) centrifuge(6,000rpm/10min)를 이용하여 균을 회수하고 peptone water로 3~5회 세척한 후, 건조균체량이 약 0.5g/l의 균체를 30ml peptone water에 현탁하여 사용하였다(노, 2002; 정, 2005; 황, 2002).

부형제로는 skim milk, lactose, glucose, whey, dextrin을 증류수에 용해하여 20% 농도로 조제하여 peptone water에 현탁한 효모균체와 혼합하여 10%로 최종농도로 하여 -81°C와 60°C에서 각각 2hr 처리한 후, 실온으로 방치한 후, YPD 배지에 도말하여 생균수를 측정하였다(Reiko, 2001).

바. 개발효모 대량생산시스템 기초정립실험(배지 조건 검토)

효모를 산업적으로 생산하기 위하여 액체배지를 당밀로 교체하여 대량 생산시스템 시제품 제작전 실험실적 최종 정립을 위하여 실시하였다.

- 1) 재료 : 5L 삼각플라스크, shaking incubator(VS-8480SR, Vision)
- 2) 배지원료 : 당밀(유기농 해바라기), ammonium sulfate(덕산 1급), KH₂PO₄(덕산 1급), MgSO₄(덕산 1급), ZnSO₄(덕산 1급), Biotin(Sigma)

- 3) 배지조성(g/L): 당밀 10%, ammonium sulfate 2%, 미량원소(KH₂PO₄ 0.004%, MgSO₄ 0.02%, ZnSO₄ 0.02%), Biotin 0.0001%
- 4) 전처리 및 배지제조(4x, working volume 2L)
 - 가) 당밀 800ml를 증류수 800ml와 충분히 혼합한 후 8,000rpm(Supra 28K, Hanil Ltd.)에서 10분간 원심분리한다.
 - 나) 상등액을 조심스럽게 취한다.
 - 다) Ammonium sulfate는 160g을 당밀상등액에 용해한다.
 - 라) 무기질용액(KH₂PO₄ 0.004%, MgSO₄ 0.02%, ZnSO₄ 0.02%)와 Biotin 0.0001%를 첨가한다.
 - 마) 상기 당밀배지를 멸균(Autoclave 121°C, 15분)후 실온으로 냉각한다.
 - 바) 5L 삼각플라스크에 4배 농축액 500ml와 1차 증류수 1,500ml를 주입하여 최종부피가 2L가 되도록 배지를 제조한다.
- 5) 접종 및 배양조건
 - 가) 멸균된 배지를 대략 30도까지 냉각한 후, 미리 30ml YPD (Difco, yeast extract 10g, peptone 20g, Dextrose 20g)배지에서 하룻밤(8~10hr) 배양한 JKK091006 종배양액 10ml를 접종하고 5L 삼각플라스크를 shaking incubator(30°C/150rpm)에서 배양한다.
 - 나) 배양중인 샘플을 4시간씩마다 10ml씩 무균적으로 취하고, 각각 OD값(600nm), 균체량을 측정하였다.

사. 대체 질소원 CSL의 배지적용성 평가

대량 배양용 배지의 질소원을 배지의 가격을 고려하여 ammonium sulfate보다 저렴한 질소원인 CSL를 이용하여 효모의 배양 조건을 검토하였다. 질소원을 5%(v/v)의 CSL로 대체하여 “바 향”의 조성파 동일하게 배지를 조제하였다.

- 1) 재료 : 5L 삼각플라스크, shaking incubator(VS-8480SR, Vision)
- 2) 배지원료 : 당밀(유기농 해바라기), CSL(주콘프로덕츠코리아), KH₂PO₄(덕산 1급), MgSO₄(덕산 1급), ZnSO₄(덕산 1급), Biotin(Sigma)
- 3) 배지조성(g/L) : 당밀 10%, CSL 5%, 미량원소(KH₂PO₄ 0.004%, MgSO₄ 0.02%, ZnSO₄ 0.02%), Biotin 0.0001%
- 4) 전처리 및 배지제조(4x, working volume 2L)
 - 가) 당밀 800ml를 증류수 800ml와 충분히 혼합한 후 8,000rpm(Supra 28K, Hanil Ltd.)에서 10분 간 원심분리한다.
 - 나) 상등액은 취하여 멸균(Autoclave 121°C, 15분)후 실온으로 냉각한다.
 - 다) 질소원으로 CSL은 400ml를 취하여 상기와 동일하게 8,000rpm에서 10분간 원심분리한다(멸균처리는 생략하고 그대로 사용한다).
 - 라) 멸균된 당밀상등액과 CSL을 충분히 혼합한다(질소원으로 ammonium sulfate는 160g을 당밀상등액에 용해한다.)
 - 마) 10% 배지에 무기질용액(KH₂PO₄ 0.004%, MgSO₄ 0.02%, ZnSO₄ 0.02%)와 Biotin 0.0001%이 되도록 첨가한다.

바) 5L 삼각플라스크에 4배 농축액 500ml와 1차 증류수 1,500ml를 주입하여 최종 부피가 2L가 되도록 배지를 제조한다.

5) 접종 및 배양 조건

가) 멸균된 배지를 대략 30도까지 냉각한 후, 미리 30ml YPD (Difco, yeast extract 10g, peptone 20g, Dextrose 20g)배지에서 하룻밤(8~10hr) 배양한 JKK091006 종배양액 10ml를 접종하고 5L 삼각플라스크를 shaking incubator(30℃/150rpm)에서 배양한다.

나) 배양중인 샘플을 4시간마다 10ml씩 무균적으로 취하여 OD값(600nm)과 균체량을 측정한다.

아. 발효조를 이용한 효모의 유가배양

상기실험 결과를 바탕으로 효모의 유가배양에 대한 조건 검토를 실시하였다. 유가배양은 4X의 배지를 배양시작 8시간부터 4시간 간격으로 100ml씩 5번 실시하였으며, 회분배양은 배양 시작 후에는 아무런 처리를 하지 않았다.

유가배양중의 유가첨가 시간이나 첨가하는 배지의 양의 조건을 바꾸어가면서 배양 조건에 대한 검토를 진행하였다(신, 1992).

1) 배양조 Jar Fermenter : 발효조 5L(BIOTRON, LiFlus GX, Korea)

2)배지원료 :당밀(유기농 해바라기), CSL(㈜콘프로덕츠코리아), KH_2PO_4 (덕산 1급), MgSO_4 (덕산 1급), ZnSO_4 (덕산 1급), Biotin(Sigma), 소포체(Silicon oil, 지엘캡, 한국)

3)배지조성(g/L) : 당밀 10%, CSL 5%, 미량원소(KH_2PO_4 0.004%, MgSO_4 0.02%, ZnSO_4 0.02%), Biotin 0.0001%

4) 전처리 및 배지제조(4x, working volume 2L)]

가) 당밀 800ml를 증류수 800ml와 충분히 혼합한 후 8,000rpm(Supra 28K, Hanil Ltd.)에서 10분간 원심분리한다.

나) 상등액을 취하여 멸균(Autoclave 121℃, 15분)후 실온으로 냉각한다.

다) 질소원으로 CSL은 400ml를 취하여 상기와 동일하게 8,000rpm에서 10분간 원심분리한다(멸균처리는 생략하고 그대로 사용한다).

라) 멸균된 당밀상등액과 CSL을 충분히 혼합한다.

마)미량원소(KH_2PO_4 0.004%, MgSO_4 0.02%, ZnSO_4 0.02%)와 Biotin 0.0001%를 첨가한다.

바) 공멸균한 발효조에 4배 농축액 500ml를 주입하고, 1차 증류수 1,500ml를 추가로 주입하여 최종 2L배지를 제조한다.

사) 배지가 발효조에 들어있는 상태로 Autoclave(121℃, 15분)한다.

5) 접종 및 배양 조건]

가) 멸균된 배지를 대략 30도까지 냉각한 후, 미리 30ml YPD(Difco, yeast extract 10g, peptone 20g, Dextrose 20g)배지에서 하룻밤(8~10hr) 배양한 JKK091006 종배양액 10ml를 접종하고 발효조를 가동시킨다.

나) 운용조건: pH는 5.5(산도조절 1N NaOH, 1N HCl), Temp 30℃, 통기속도

1vvm을 유지하였다.

- 다) 4시간씩마다 배양중인 샘플을 10ml씩 무균적으로 취하고, 각각 OD값(600nm), 균체량, 환원당 정량(DNS법 사용)을 측정하였다.
- 라) 접종 후 8시간부터 유가배양을 시작하였다. 4시간 간격으로 4회 당밀(4x 농축액)을 유가배양하면서(8hr, 100 ml; 12hr, 200 ml; 16hr, 200 ml; 20hr, 100 ml), 총 32-40시간동안 배양하였다
- 마) 배양중 소포제(silicon oil)는 배양간 필요시 100ul씩 무균적으로 첨가하였다.

자. 제빵용 효모의 생산을 위한 시제제작

5L 발효조를 이용하여 검토된 유가배양 조건을 바탕으로 시제효모를 제작하였다.

3. 결과

가. 유기농 농산물내 효모균 분리, 동정 및 유전자원 확보

- 1) 유기농 과실중 거봉에서만 목적효모가 분리되었으며(Fig 1. Table 1), 분리법중 1법보다는 2법이 효율적인 분리법인 것으로 확인되었다.
- 2) 계대 순수분리효모균의 동정으로서, 1단계(API Kit, Model :C-AUX), 2단계 Vitek 분석시스템 및 Kit(YST), 그리고 3단계는 Diversilab시스템 및 Kit(Model : Saccharomyces Kit)를 사용하여 99%이상의 동정을 완료하였다(Table 1).
- 3) PCR을 실시한 결과, 분리균주 JKK091006가 표준균주 *S. cerevisiae* KCCM 12028 및 상업효모(J사, *S. cerevisiae*)와 같은 밴드패턴을 보이는 것을 확인할 수가 있었다(Fig 2).
- 4) 선발 효모의 동정 및 유전자원의 확보를 위하여, 표준균주 *S. cerevisiae* KCCM 12028 및 J사의 생이스트 (*S. cerevisiae*)와의 18sRNA의 염기서열을 CLUSTAL 2.0.11을 이용하여 Multiple sequence alignment를 실시하여 비교하였다(Fig 3).
- 5) 표준효모(*S.cerevisiae* KCCM12028) 및 상업효모(Jenico) 대비 분리효모의 유전자의 확인을 위하여, Sma I과 Sau3AI을 이용 RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism)를 실시한 결과, 분리효모인 JKK091006균이 표준효모 및 상업효모와 같은 패턴을 보임을 알 수 있었다(Fig 5).
- 6) 동정 효모균 유전자 상동성 분석 : 동정이 완료된 개발효모는 (주)마크로젠사(한국)에 의뢰하여 Gene cloning동정을 실시하였으며, Chromatogram과 Sequencing비교(Blast, NCBI)를 통하여 최종 99% 유전자 상동성 결과와 신중임을 입증되었다(Fig 4)
- 7) 결과로서, 유기농 과일중 거봉에서 분리한 효모균을 *Saccharomyces cerevisiae* JKK091006으로 명명하였으며(특허출원 : 제10-2009-0134773), 특허수탁이 완료(취득번호 : KCCM11056P)되었다.

다. 배지선발(당밀배지에서 배양조건별 CO₂생성량 조사)

- 1) 균의 활성을 알아보기 위하여 각 균주별로 큐네 발효관에서 배양하여 CO₂의 생성량을 비교하여 보았을 때, 분리균주인 MG1과 JKK091006의 경우 표준균주와 상업효모보다 균의 초기생장은 더디지만 균의 활성은 비슷한 것을 확인할 수 있었다.(Table 4)
- 2) 표준효모와 상업효모(*S.cerevisiae*)와 분리균주(MG1, JKK091006)와의 생장곡선을 보았을 때, MG1의 생장이 다른 균주들에 비하여 조금 떨어지긴 하지만 전체적으로는 큰 차이가 없었으며 분리균주인 JKK091006는 생장이 더 우수한 것을 확인할 수가 있었으며, 최종적으로 제빵에 사용될 수 있는 *S.cerevisiae* JKK091006를 선택하여 실험을 진행하였다(Table 5).

라. 선발배지 적용 배양조건 정립

분리균주 JKK091006의 산업화를 위하여 당밀배지에서의 활성도를 확인할 필요가 있다. 이를 위하여, 선발된 분리균주 JKK091006를 일반적으로 효모를 배양하는 PDB 배지에서와 당밀배지를 농도별로 조제하여 *S.cerevisiae* JKK091006의 growth curve를 측정하고, 당밀배지에 ammonium sulfate를 질소원으로 하여 농도별로 *S.cerevisiae* JKK091006의 growth curve를 측정하였다.

- 1) 결과로서, JKK091006 균을 선정하여 당밀배지에서의 균의 생장곡선과 생균수를 확인한 결과, 당밀의 농도에 따라서 OD값에 있어 차이가 인정되었다. 즉, PDB (Potato Dextrose Broth)보다는 당밀배지에서 생육이 좋았으며, 10% 당밀에서는 2.5×10^9 cfu/ml이었으며, 15% 당밀배지에서는 3.2×10^9 cfu/ml이었다.

배지의 농도가 높을수록 균의 수가 많아지지만 10%와 15%에서의 차이는 효율성으로 보았을 때, 큰 차이가 있는 것으로 판단되지 않아서 효모의 배양을 위한 당밀농도는 10%로 결정하였다.(Table 7)

- 2) Ammonium sulfate가 첨가된 당밀배지에서 농도에 따른 OD값을 측정해 보았을 때, 질소원이 첨가되지 않은 대조구에 비해서 질소원이 첨가된 시험구에서의 균체증식이 높은 것으로 나타났다(그림 8-9). 또한, OD값과 더불어 생균수를 측정하였는데 이 결과 역시 OD값에서 얻은 결론과 같은 결과가 도출되었다.
- 3) 대수증식기 이전에서 균의 증식이 부분적으로 약한 부분이 있지만 대수증식기 이후에는 질소원의 함량에 따라서 효모의 생육에 큰 차이가 없는 것으로 보아 당밀배지에서 ammonium sulfate의 농도는 2%로 하는 것이 원가 절감차원과 효모균체의 증식에 있어서 가장 바람직하다고 판단된다.(Fig 8~9)

마. 선발효모 제품화 기초연구(부형제 선별)

빵효모의 산업적으로 생산함에 있어서 우수한 생존활성을 유지, 보존하기 위하여 5가지 종류의 부형제 효과 실험을 검토하였다.

- 1) 동결처리를 했을 경우에 부형제의 종류에 따라서 효모 균체의 생존활성에 큰 차

이는 없는 것으로 측정되었다(Table 6, Fig 10).

2) 열처리에 의한 영향은 부형제의 종류에 따라서 뚜렷한 차이가 나타났는데, 처리를 하지 않은 시료와 비교하여 보았을 때 lactose에서는 26.1%, glucose에서는 10.9%, dextrin에서는 1.4%의 저조한 생존활성을 보였으나, 단백질과 당을 함께 함유한 유청분말(whey)과 탈지분유(skim milk)에서는 각각 76.8%와 52.2%의 우수한 효과를 나타냈다(Fig 10).

바. 개발효모 대량생산시스템 기초정립실험(배지 조건 검토)

효모를 산업적으로 생산하기 위하여 액체배지를 당밀로 교체하여 대량 생산시스템 시제품 제작전 실험실적 최종 정립을 위하여 실시하였다.

1) 당밀의 성분 분석

당밀의 탄소원 함량과 무기질원소의 함량을 HPLC와 ICP 분석을 통하여 실시하였으며, 그 결과는 아래의 표와 같다(Table 8).

당밀의 주요 탄소원은 sucrose(설탕) 29.1%, fructose(과당) 8.9%, glucose(포도당) 5.5% 로 10% 당밀배지에서 농도를 단당류로 환산하였을 때 약 7.5%의 함량으로 효모의 대량생산을 위한 배지로 적합하다고 생각되며, 무기질의 함량은 Mg를 제외하고는 다른 원소는 무시할만한 수준인 것으로 나타났다. Mg는 비당밀배지의 첨가량의 절반정도를 충당할 수 있을 것으로 판단된다.(Table 9)

2) 당밀배지에서 *S.cerevisiae* JKK091006의 생육특성

당밀배지에서 *S.cerevisiae* JKK091006의 생육특성을 보기 위하여 회분배양을 실시 결과 당밀배지에서 효모를 30hr동안 회분배양 하였을 때, 약 24hr 이후에는 균의 증식은 더 이상 일어나지 않는 것으로 보이며 OD값은 5.0 및 이때 건조균체량(DCW)은 약 14g/L로 나타났다(Fig 13).

사. 대체 질소원 CSL의 배지적용성 평가

대량 배양용 배지의 질소원을 배지의 가격을 고려하여 ammonium sulfate보다 저렴한 질소원인 CSL를 이용하여 효모의 배양 조건을 검토하였다.

당밀배지의 질소원에 따른 효모의 생육특성을 검토한 결과, 당밀의 질소원을 ammonium sulfate와 CSL을 이용하여 효모의 생육특성을 관찰하기 위하여 각각의 배지에 대하여 발효조에서 회분배양을 실시하였고 그 결과는 아래와 같다(Fig 14).

당밀배지에 ammonium sulfate와 CSL의 두 가지 질소원을 이용하여 선발균인 JKK091006를 회분배양하여 비교한 결과 OD 값은 2.7정도로 비슷하게 나타났지만 생균수는 질소원을 ammonium sulfate를 이용하여 배지에서는 1.0×10^8 CFU/ml, CSL을 이용한 배지에서는 2.0×10^8 CFU/ml 으로 약 2배 정도의 효과를 나타내었다.

예비실험을 통하여 CSL을 첨가할 경우 살균 후 다량의 부유물 및 침전물이 생성됨을 확인하였다. 이 침전물은 최종 효모제품에 이행(carry-over)되어 제빵의 품질에 영향을 미칠 수 있기 때문에 이것을 제거하고자 CSL을 첨가한 배지에 대하여 규모 조도 여과를 실시하였다.

그 결과, 살균 후 생성되는 협잡물을 완벽하게 제거할 수는 없었지만 배지의 조성에서 CSL사용량을 줄이고, yeast extract 또는 ammonium sulfate 등의 다른 질소원을 함께 적당량 사용할 경우 부유물 및 침전물의 생성을 상당량 감소시킬 수 있을 것으로 판단된다.

아. 발효조를 이용한 효모의 유가배양조건 정립

상기 실험결과를 바탕으로 효모의 유가배양에 대한 조건 검토를 실시하였다. 유가배양은 4X의 배지를 배양시작 8시간부터 4시간 간격으로 100ml씩 5번 실시하였으며, 회분배양은 배양 시작 후에는 아무런 처리를 하지 않았다. 유가배양중의 유가첨가 시간이나 첨가하는 배지의 양의 조건을 바꾸어가면서 배양조건에 대한 검토를 진행하였다(신, 1992).

1) 배양방법에 따른 효모의 생육특성

당밀의 질소원을 CSL을 이용하여 배양방법에 따른 효모의 생육특성을 관찰하기 위하여 유가배양과 회분배양을 발효조를 이용하여 실시하였고 그 결과는 아래와 같다(Fig 16).

유가배양에서는 10.8의 OD값과 28.2g/L의 건조균체량을 나타내었으며, 회분배양에서는 7.0의 OD값과 13.7g/L의 건조균체량을 나타내었다. 이 실험의 결과로 회분배양보다는 유가배양이 효모균체량을 증량하는데 더 좋은 조건임을 확인할 수가 있었다(Table 10).

2) 유가배양의 최적조건 검토

유가배양시 유가배양중의 배지의 첨가시간이나 첨가량의 조건을 바꾸어가면서 배양조건에 대한 최적 조건의 검토를 진행하였다. 배양시간에 따른 생육곡선을 살펴 보았을 때, 8hr에서 유가를 하는 것보다 10hr에서 유가를 하는 것이 효모의 생육에 더 효과적인 것으로 관찰되었으며, 유가배양시배지의 첨가량을 조절하였다.

최종적으로 CSL을 질소원으로 이용한 당밀 배지에서 효모의 배양은 위에서 보는 바와 같이 10hr(100ml), 14hr(200ml), 18hr(200ml), 22hr(100ml), 26hr(100ml)에서 유가를 하는 것이 효모의 증체에 우수한 조건으로 검토되었으며, 34hr 배양 시 OD값은 7.5로 관찰되었고, 건조균체량은 27.20g/L로 나타났다(Fig 17).

자. 제빵용 효모의 생산을 위한 시제제작

5L 발효조를 이용하여 검토된 유가배양 조건을 바탕으로 시제효모를 제작하였다. 발효 시 소량 배양에서와는 약간 다른 패턴의 발효 효율을 나타내며, 최대 OD가 50 (20g DCW/L) 정도로 성장하는 것으로 관찰이 되었고, 효모의 생육에는 큰 문제는 없는 것으로 보인다.

3번째 feeding 이후 DO가 상승하는 패턴을 보이며, 성장도가 떨어지는 것을 확인할 수 있었다. 원심분리 형태로 세척공정을 진행하였는데 세척이 용이하지 않아 세척 효율이 떨어졌다.

원심분리 형태로 세척할 경우, 위스펠리아 타입과 같이 크림형으로 pellet을 분리할 수 있는 소형분리장비를 이용하면 소량 생산 테스트에 유용할 것으로 생각된다.

당밀배지에 침전물이 발생하여 세척 시에 어려움이 발생하며 최종 효모생산품에 혼입될 가능성이 있다고 보인다(Fig 18).

고품질 제품의 생산과 원가절감을 위하여 유가배양 시 feeding time 및 첨가되는 배지의 양의 최적화와 배지조제 과정에서 당밀과 CSL에서 생성되는 부유물을 제거하기 위하여 규조토 등을 이용한 filtering의 과정을 거치는 등의 원료 전처리 공정을 대량배양에 알맞은 조건으로 보완할 필요성이 있는 것으로 생각된다.

차. 제형화(압착형 및 분말형) 효모의 활성 시험

1) 동결건조 조건 검토

가) 6가지의 후보물질(skim milk, whey, lactose, glucose, D.W, dextrin)을 이용하여 부형제 테스트(모든 부형제의 농도는 10%)를 실시한 결과 whey가 가장 우수한 효과를 나타내었다.

나) whey를 부형제로 하여 농도별로 test를 실시한 결과 10%에서 가장 좋은 효과를 나타내었다.

다) 10% whey에 효모의 주 이용원인 sucrose를 첨가하여 부형제 효과를 살펴본 결과 부형제에 따른 효과는 없는 것으로 나타났다.

라) 초기에는 효모slurry를 saline으로 현탁한 후 20% 부형제를 1 : 1(v/v)로 첨가하여 동결건조를 실시하였으나, 건조 시 효율을 고려하여 효모slurry를 10% whey 부형제를 이용하여 바로 현탁하여 동결건조를 실시한 결과 두 개의 처리군은 같은 효과를 나타내었다.

2) 생균수 측정 및 CO₂ 발생시험

가) 각각의 시료에 대한 생균수를 측정을 하였으며 그 결과는 아래와 같다(Table 11).

나) CO₂ 발생량은 큐네 발효관을 이용하여 측정하였다. 위의 결과를 바탕으로 발효관에 접종된 균의 양을 유추하여 희석하였으며 측정된 결과는 다음과 같다(Table 12~13). 각각의 샘플에 대하여 동량을 취한 후, 희석하여 접종한 결과 압착효모와 10%부형제를 첨가한 건조효모 샘플에서 CO₂ 발생이 가장 좋았으며, 그 다음으로는 건조효모, 그리고 상업효모의 CO₂ 발생량이 가장 낮을 것을 확인할 수 있었다.

다) 산술적으로 계산을 하였을 때 동량의 시료를 취하여 희석하였을 경우에 상업효모는 압착효모나 10%부형제를 첨가한 시료에 비하여 균체의 양이 1/4, 건조효모의 경우에는 1/2의 균체가 들어있다고 생각할 수 있으며 접종량의 차이 때문에 CO₂의 발생량이 차이가 날 가능성이 있기 때문에 효모의 접종량을 비슷하게 맞추어서 확인실험을 진행하였다(Table 14~15). 결과로서, 압착효모와 JKK091006 건조효모(10%부형제)가 초기 CO₂ 발생량은 우수한 것으로 나타났으며, JKK091006 효모제제는 6hr 배양에서 모두 20ml 이상 발생하였으며 상업효모(제니코)는 8hr 지나서야 CO₂ 발생량이 20ml 이상이 되었다.

라) 실험 결과 상업효모(제니코)에 비하여 선별균주인 JKK091006에서 CO₂ 발생량이 우수한 것을 확인할 수 있었고, 시제 제품에서는 균수를 맞추어서 접종을 하였을 경우 서로 간에 큰 차이는 없는 것으로 관찰되었으나 압착효모와 10%부형제를 첨가한 시제에서 g당 균수가 더 많기 때문에 시제는 압착효모의 형태나 부형제를 섞어서 동결건조한 분말의 형태로 이용하는 것이 더 효율이 좋을 것으로 판단된다.

4. 결론

가. 한국 토종 효모균 선별하기 위하여 유기농 과실(사과, 파인애플, 캠벨, 거봉) 및 곡류(호밀)에서 균주를 분리하였다. penicillin과 streptomycin을 각각 50 μ g/ml 함유한 PDA(1% potato extract, 2% dextrose, 1.5% agar, Becton, Dickinson and Company, USA) 배지를 이용하여 효모를 분리하였으며, 분리 균주의 형태학적, 생리학적 및 생화학적인 제반 특성 등을 효모의 분류동정법에 따라 분류를 하였다. 선별 효모의 동정을 위하여 18s-RNA염기서열의 similarity를 National Center for Biotechnology Information(NCBI)의 Genebank database와 비교 분석 결과 분리균주 MG1과 MG3가 *Saccharomyces cerevisiae*인 것으로 확인되었다.

나. 표준효모 및 상업효모(Jenico)대비 두 개의 분리효모(MG1, MG 3)의 CO₂ 발생량과 growth curve를 PDB 배지에서 비교한 결과 큰 차이가 없었으며 MG1보다 MG3의 생장이 우수하여 최종적으로 *Saccharomyces cerevisiae* JKK091006(특허)를 선택하였으며, 상업적인 생산을 위해 당밀배지에서의 균의 성장곡선과 생균수를 확인하였다. 배지내의 당밀의 배지의 농도가 높을수록 균체가 증가하지만 10%이상에서는 큰 차이가 없었으며, ammonium sulfate와 CSL의 두 가지 질소원을 비교한 결과 OD 값은 비슷하게 나타났지만 생균수는 질소원을 CSL을 이용한 배지에서 2배 정도의 효과를 나타내었다.

다. 부형제의 영향은 동결처리시에는 종류에 따라서 큰 차이는 없는 것으로 관찰되었지만, 열처리시에는 종류에 따라서 뚜렷한 차이가 나타났는데, 단백질과 당을 함께 함유한 유청분말(whey)에서 우수한 효과를 나타내었다.

라. 선별효모의 대량생산 시스템 구축을 위하여 배양 조건을 검토한 결과 유가배양시 균체회수량이 증가함을 알 수 있었으며 이를 바탕으로 시제를 제작하여 효모의 활성을 측정하였다. 상업효모(Jenico)보다 *S. cerevisiae* JKK091006에서 CO₂ 발생량이 우수한 것을 확인할 수 있었고, 동량의 균체로 접종하였을 경우에는 가스발생량이 비슷하게 관찰되었으나 압착효모와 10%부형제를 첨가한 시제에서 g당 균수가 더 많기 때문에 시제는 압착효모의 형태나 부형제를 첨가한 분말의 형태로 제작하는 것이 효율이 좋을 것으로 판단되며, 시제 제작시 고품질 제품의 생산과 원가절감을 위하여 배양 조건의 검토와 배지조제 과정에서 원료의 전처리 공정을 보완할 필요성이 있는 것으로 생각된다.

Table 1. The list of Korea native yeast as organic fruits sample

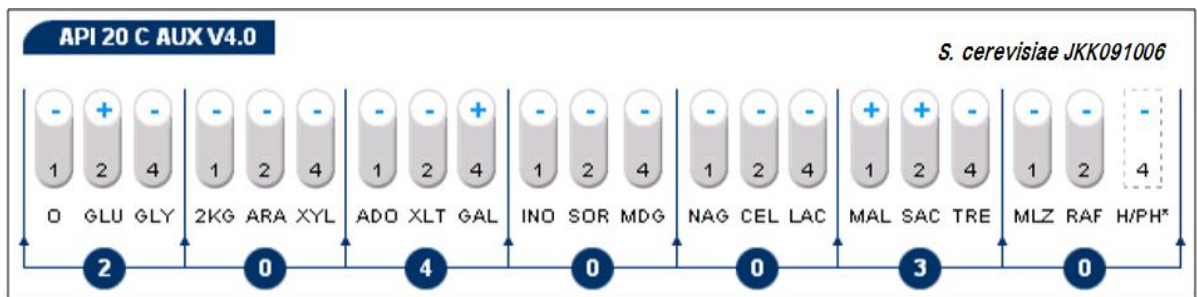
항목	시료별 한국토착형 효모(균)분리내역						비고
	분리시료(과일/곡류)	거봉(포도)	캠벨(포도)	사과	파인애플	배	
효모	5	ND	ND	ND	ND	ND	
유산균	3	NT	NT	NT	NT	NT	
기타세균	2	NT	NT	NT	NT	NT	
합 계	10						

ND : Not-Detection



Fig. 1. Morphology analysis of isolated yeast from Geobong
A: *Saccharomyces cerevisiae* JKK091006(Wild Type) , B: *Phichia* spp.
(wild type) , C: *Candida* spp.(wild type)

Table 2. Identification of isolate yeast with API Kit



선발효모	동정결과	%ID	당이용성	비고
효모KCCM12028	<i>S. cerevisiae</i>	97.0	GLU+, GAL+, CEL+, MAL+, SAC+	표준 효모균주
제니코 생이스트	<i>S. cerevisiae</i>	97.9	GLU+, GAL+, MDG+, MAL+, SAC+, RAF+	상업용효모
매일 거봉분리 효모(MG1)	<i>S. cerevisiae</i>	99.9	GLU+, GAL+, MDG+, MAL+, SAC+, TRE+, MLZ+, RAF+	거봉 포도 분리 효모
매일 거봉분리 효모 (JKK091006) - 배양 48, 72시간분리	<i>S. cerevisiae</i>	99.5	GLU+, GAL+, MAL+, SAC+	

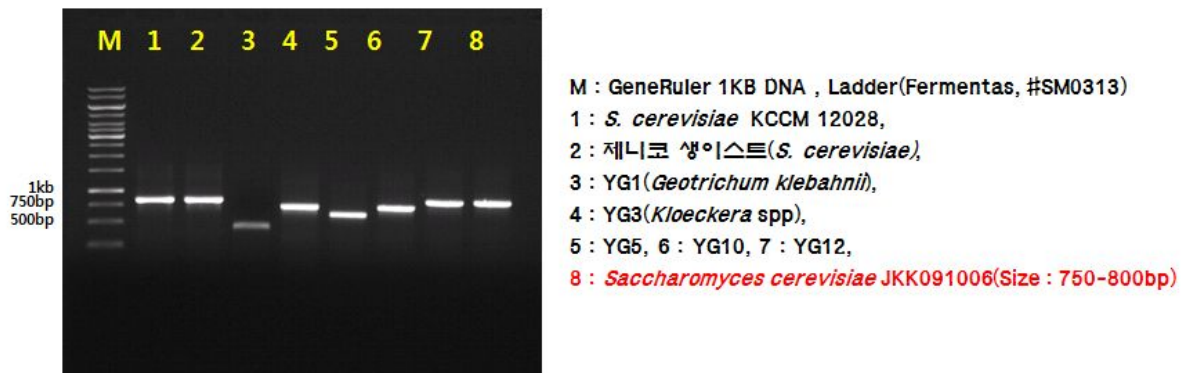


Fig. 2. PCR analysis of reference strain *S. cerevisiae* KCCM 12028, commercial *S. cerevisiae* (Jenico) and isolate yeast JKK091006

Table 3. Multiple sequence alignment of 18s RNA of reference strain *S. cerevisiae* KCCM 12028, commercial *S. cerevisiae* (Jenico) and siolate yeast JKK091006

표준 및 분리효모종류	동정결과	%ID	비고
KCCM12028	<i>S. cerevisiae</i>	99%	표준 효모
상업효모 (J사)	<i>S. cerevisiae</i>	99%	상업 효모
JKK091006	<i>S. cerevisiae</i>	99%	거봉분리효모
YG1	<i>Pichia sp.i</i>	99%	거봉분리효모
YG3	<i>Hanseniaspora uvarum</i>	99%	거봉분리효모

```

>XJH_cloning_2-M13F.ab1 966 0 966 ABI
TCCGTAGGTGA
ACCTGCGGAAGGATCATTAAAGAAATTAATAATTTGAAATGGATTT
TTTTTTTTGGCAAGAGCATGAGAGCTTTTACTGGCAAGAGACAAGAGA
TGGAGAGTCCAGCGGGCTGCGCTTAAAGTGCAGGCTTGTAGGCTTG
TAAGTTTCTTTCTGCTATTCCTAACGGTGAGAGATTTCTGTGCTTTGT
TATAGGACAATTAACCGTTTCAATACAACACTGTGGAGTTTTCATA
TCTTTGCAACTTTTCTTTGGGCATTGAGCAATCGGGGCCAGAGGTTA
ACAAACACAACAATTTTATCTATTCAATTAATTTTGTCAAAAACAAGA
ATTTTCGTAACGGAAATTTAAATATTAATAAACTTCAACAACGGATC
TCTTGGTTCTCGCATCGATGAAGAACGCAGCGAAATGCGATACGTAATGT
GAATTGCAGAATTCCTGAAATCATCGAATCTTGAACGCACATTGCGCCC
CTTGGTATTCAGGGGGCATGCTGTTTGAAGCTCATTTCTCTCAAAC
ATTCTGTTTGGTAGTGAGTGATACCTTTGGAGTTAACTGAAATTTGCTG
GCCTTTTCAATGGATGTTTTTTTTTCAAAAGAGAGGTTTCTCTGCGTGC
TTGAGGTATAATGCAAGTACGGTCTGTTTAGTTTTACCAACTGCGGCTA
ATCTTTTTTATCTGAGCGTATTGGAACGTTATCGATAAGAAGAGAGCGT
CTAGGCAACAATGTTCTTAAAGTTTGACTCAAATCAGGTAGGAGTACC
CGCTGAACCTAAGCATATCAATAAGCGGAGGA

```



```

Saccharomyces cerevisiae AVR11631 chromosome 12 chr12_46455_452740,
whole genome shotgun sequence
Length=6286

Score = 1485 bits (80%), Expect = 0.0
Identities = 844/848 (99%), Gaps = 4/848 (0%)
Strand=Plus/Plus

Query 13 TTTCCCTCCGCTTATTGATATGCTTAAGTTCAGCGGCTACTCTACCTGATTTGAGGTCAA 72
Sbjct 2547 TTTCCCTCCGCTTATTGATATGCTTAAGTTCAGCGGCTACTCTACCTGATTTGAGGTCAA 2606
Query 73 ACTTTAAGAACATTGTTCCGCTAGACGCTCTCTTCTTATCCATAACGTTCCAAATACGCTC 132
Sbjct 2607 ACTTTAAGAACATTGTTCCGCTAGACGCTCTCTTCTTATCCATAACGTTCCAAATACGCTC 2666
Query 133 ACTAT-AAAAAGATTACCCGCGTGGTAAACCTAAGACACCCCTACTTCCATATAC 191
Sbjct 2667 ACTAT-AAAAAGATTACCCGCGTGGTAAACCTAAGACACCCCTACTTCCATATAC 2726
Query 192 CTCAGCCGCGCAGACAAACCTCTCTTTCTG-AAAAA-AAAATCCAAATCAAAAGCCGCGCA 251
Sbjct 2727 CTCAGCCGCGCAGACAAACCTCTCTTTCTG-AAAAA-AAAATCCAAATCAAAAGCCGCGCA 2784
Query 252 ATTTCAAGTTAACTCCAAAGACTATGCTC-CACTCC-AAAACAGCAATCTTCAAAAGCAAT 311
Sbjct 2785 ATTTCAAGTTAACTCCAAAGACTATGCTC-CACTCC-AAAACAGCAATCTTCAAAAGCAAT 2844
Query 312 GACGCTCAAAACAGGCTATCCGCTCCAAATGCAATGCAAGCCGCAATGCTTCAAAAGATT 371
Sbjct 2845 GACGCTCAAAACAGGCTATCCGCTCCAAATGCAATGCAAGCCGCAATGCTTCAAAAGATT 2904
Query 372 GATGATTCAGCCGATTCGCAATTCGATTAAGTATCCGATTTCCGCTCCCTTCTGATCC 431
Sbjct 2905 GATGATTCAGCCGATTCGCAATTCGATTAAGTATCCGATTTCCGCTCCCTTCTGATCC 2964
Query 432 ATCCGACACCCAGAGATCCCTTCTTGAAGTTTAAATATTTAAATATTCGATAC 491
Sbjct 2965 ATCCGACACCCAGAGATCCCTTCTTGAAGTTTAAATATTTAAATATTCGATAC 3024
Query 492 AAAATTCCTCTTTTCAAAAATTTAAATGATAGATAAAATCTTCTCTCTTCTTACCC 551
Sbjct 3025 AAAATTCCTCTTTTCAAAAATTTAAATGATAGATAAAATCTTCTCTCTTCTTACCC 3083
Query 552 TCTGCCCCGCTTCTCCAAATGCCCCAAGAAAATTTCCAAAGATGAAACCTCCACA 611
Sbjct 3084 TCTGCCCCGCTTCTCCAAATGCCCCAAGAAAATTTCCAAAGATGAAACCTCCACA 3143
Query 612 GTGTCTGTATTCGAAACGCTTTAAATGCTCTATACAAAGACACAAATCTCTACCC 671
Sbjct 3144 GTGTCTGTATTCGAAACGCTTTAAATGCTCTATACAAAGACACAAATCTCTACCC 3203
Query 672 TTTCCAAATGCAAGTACGGTCTGTTTAGTTTTACCAACTGCGGCTA 731
Sbjct 3204 TTTCCAAATGCAAGTACGGTCTGTTTAGTTTTACCAACTGCGGCTA 3263
Query 732 CCGCTGCACTCCCACTCTCTGCTCTTCCGCAATAAACCTCTCATGCTCTTCCAAA 791
Sbjct 3264 CCGCTGCACTCCCACTCTCTGCTCTTCCGCAATAAACCTCTCATGCTCTTCCAAA 3323
Query 792 AC-AAAAATCCATTTCAAAATTAATATCTTTAATGATCCCTCCGAGGTTACC 851
Sbjct 3324 AC-AAAAATCCATTTCAAAATTAATATCTTTAATGATCCCTCCGAGGTTACC 3383
Query 852 TACCGAA 859
Sbjct 3384 TACCGAA 3391

```

Fig. 3. Multiple sequence alignment of 18s RNA of *S. cerevisiae* JKK091006.

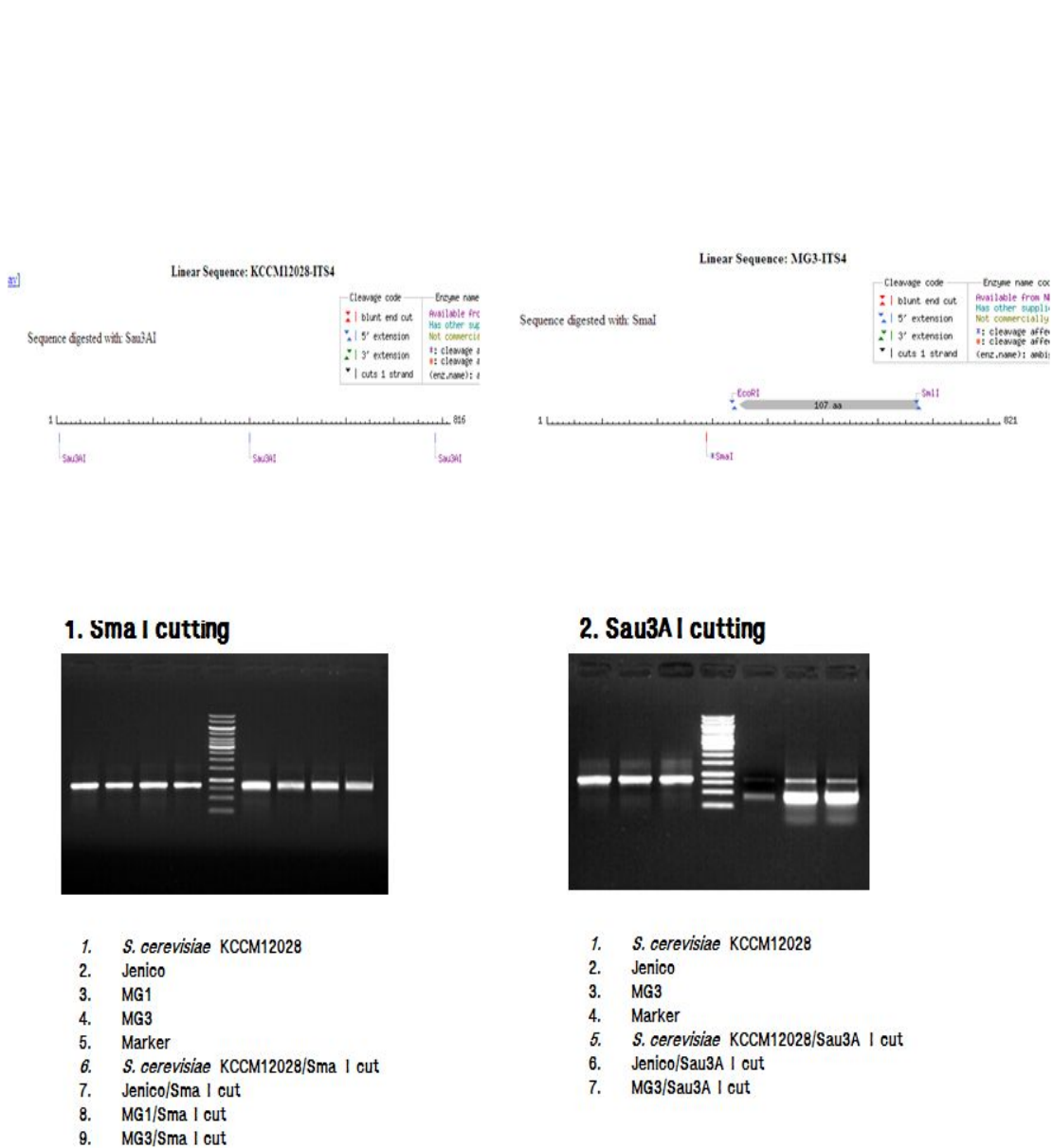


Fig. 4. RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) patterns with restriction enzyme *Sma* I and *Sma* I of reference strain *S. cerevisiae* KCCM 12028 and commercial *S. cerevisiae* (Jenico).

```

Saccharomyces cerevisiae AURI1631 chromosome 12 chr12_446455_452740,
whole genome shotgun sequence
Length=6286

Score = 1485 bits (88%), Expect = 0.0
Identities = 844/848 (99%), Gaps = 4/848 (0%)
Strand=Plus/Plus

Query 13   TTTCGCCCTTATGATGCTTAAGTCACCGCTACTCTACCTGATTGAGGTCAA 72
Sbjct 2547  TTTCCGCGCTTATGATGCTTAAGTCACCGCGTACTCTACCTGATTCAGGTCAA 2606
Query 73   ACTTAAAGACATTCTCCCTAGACGCTCTCTCTATCGATAGCTTCCATACGCTC 132
Sbjct 2687  ACTTAAAGACATTCTCCCTAGACGCTCTCTCTATCGATAGCTTCCATACGCTC 2666
Query 133  ACTG_AAGAAAGATACCCGACTGCTAAGACTAAGACACCGCTACTTGCATTATAC 191
Sbjct 2667  ACTGAAAGAAAGATACCCGCGCTTCTAAGACCGCTACTTGCATTATAC 2726
Query 192  CTCAGCCACGACAGAAACCTCTCTTGGAAAAGAAACATCCATGAAAGCCGACCA 251
Sbjct 2727  CTCAGCCACGACAGAAACCTCTCTTGGAAAAGAAACATCCATGAAAGCCGACCA 2784
Query 252  ATTTCAACTTAACTCCAAACGATATCAGAAAGCCAAACAGATCTTTCAGAGCAAT 311
Sbjct 2785  ATTTCAACTTAACTCCAAACGATATCAGAAAGCCAAACAGATCTTTCAGAGCAAT 2844
Query 312  GACCTCAGACAGCCATCCCGCTCGAATACAGAGCCCGCAATCTCCCTCAGAGATT 371
Sbjct 2845  GACCTCAGACAGCCATCCCGCTCGAATACAGAGCCCGCAATCTCCCTCAGAGATT 2904
Query 372  GATGATTACCGAATCTCGAATTCAGATTACCTATCCCATTCGCTCCCTCTCTATCC 431
Sbjct 2905  GATGATTACCGAATCTCGAATTCAGATTACCTATCCCATTCGCTCCCTCTCTATCC 2964
Query 432  ATCCGAGACCGAAGATCCCTTCTGAACTTTTAAATTTAAATTTCCAGTACCC 491
Sbjct 2965  ATCCGAGACCGAAGATCCCTTCTGAACTTTTAAATTTAAATTTCCAGTACCC 3024
Query 492  AAAATCTCTCTTTTCGCAAAATTAATCAATAGATAAATCTTCTCTTCTTA-CC 551
Sbjct 3025  AAAATCTCTCTTTTCGCAAAATTAATCAATAGATAAATCTTCTCTTCTTA-CC 3083
Query 552  TCTGGCCCCGATCTCCATGCCCAAGCAAAAGTCCAAAGATAGAAACTCCCA 611
Sbjct 3084  TCTGGCCCCGATCTCCATGCCCAAGCAAAAGTCCAAAGATAGAAACTCCCA 3140
Query 612  CTCTCTCTTATGAAAGCTTTAATTTCTCTATAGCAAGCCAGCAAACTCTCAGCC 671
Sbjct 3144  CTCTCTCTTATGAAAGCTTTAATTTCTCTATAGCAAGCCAGCAAACTCTCAGCC 3200
Query 672  TTGCAATGCAAGAAAGAAATTAAGAGCTTACCAAGACCGCCGCTTAGCCGAGCC 731
Sbjct 3209  TTGCAATGCAAGAAAGAAATTAAGAGCTTACCAAGACCGCCGCTTAGCCGAGCC 3269
Query 732  CGCTGGACTCTCAGTCTCTGCTCTTCCCACTAAGACTCTCACTCTCTCCAAA 791
Sbjct 3264  CGCTGGACTCTCAGTCTCTGCTCTTCCCACTAAGACTCTCACTCTCTCCAAA 3329
Query 792  ACAAAAAATCCATTTCAAAATTAATTTCTTAACTATCTTCCGAGCTTACC 851
Sbjct 3324  ACAAAAAATCCATTTCAAAATTAATTTCTTAACTATCTTCCGAGCTTACC 3383
Query 852  TACCGAA 859
Sbjct 3384  TACCGAA 3391

```



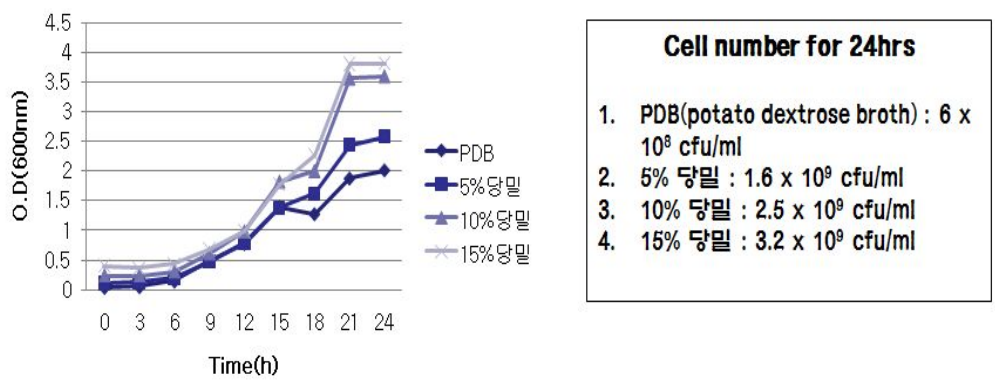
Fig 5. Result : *S. cerevisiae* JKK091006

Table 4. Comparison of CO₂ generation with time of reference strain *S. cerevisiae* KCCM 12028, commercial *S. cerevisiae* (Jenico) and isolated strain JKK091006.

	24 hr	42 hr	66 hr
표준효모	4ml	16ml	—
상업효모	1.5ml	14ml	—
MG1	0ml	5ml	18ml
JKK091006	0.5ml	6ml	20ml

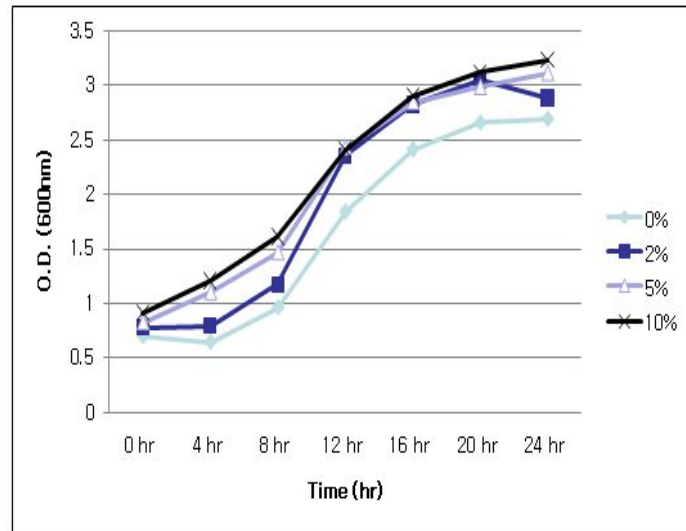
Table 5. Growth curve of type of yeast with molasses concentration

	0 hr	3 hr	6 hr	9 hr	12 hr	15 hr	18 hr	21 hr	24 hr
표준효모	0.087	0.118	0.281	0.657	0.899	1.335	1.573	1.876	1.804
상업효모	0.086	0.133	0.351	0.740	0.956	1.391	1.615	2.124	2.012
MG1	0.070	0.100	0.210	0.462	0.635	0.985	1.261	1.536	1.510
JKK091006	0.082	0.119	0.292	0.645	0.887	1.273	1.607	2.113	2.050



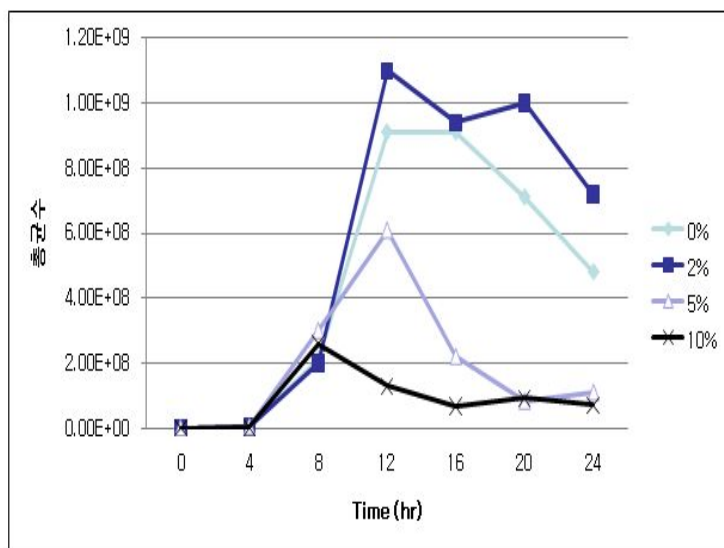
	0	3	6	9	12	15	18	21	24
PDB	0.043	0.054	0.148	0.494	0.778	1.396	1.277	1.875	2.012
5%당밀	0.111	0.132	0.195	0.474	0.786	1.383	1.617	2.439	2.581
10%당밀	0.239	0.239	0.308	0.61	0.98	1.819	1.997	3.559	3.599
15%당밀	0.401	0.36	0.437	0.676	0.986	1.772	2.261	3.807	3.813

Fig. 7. Growth curve of JKK091006 with molasses concentration.



	0 hr	4 hr	8 hr	12 hr	16 hr	20 hr	24 hr
0%	0.697	0.644	0.962	1.840	2.412	2.658	2.692
2%	0.779	0.794	1.172	2.356	2.822	3.044	2.882
5%	0.826	1.100	1.468	2.428	2.846	2.982	3.110
10%	0.916	1.210	1.614	2.412	2.902	3.120	3.234

Fig. 8. Growth curve of JKK091006 with concentration of nitrogen source.



	0 hr	4 hr	8 hr	12 hr	16 hr	20 hr	24 hr
0%	6.9×10^5	3.8×10^6	2.1×10^8	9.1×10^8	9.1×10^8	7.1×10^8	4.9×10^8
2%		3.8×10^6	2.0×10^8	1.1×10^9	9.4×10^8	1.0×10^9	7.2×10^8
5%		3.9×10^6	3.0×10^8	6.1×10^8	2.2×10^8	8.3×10^7	1.1×10^8
10%		3.3×10^6	2.6×10^8	1.3×10^8	6.8×10^7	9.3×10^7	7.2×10^7

Fig. 9. Viable cells of JKK091006 with nitrogen source concentration.

Table 6. Composition of medium for Mass Culture of yeast

<p style="text-align: center;">Culture Medium</p> <ul style="list-style-type: none"> • 2.5% Glucose (Food grade) • 1.0% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ • 0.5% KH_2PO_4 • 0.15% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ • 0.5% Yeast extract • 0.02% Urea • 0.04% $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ • Trace element solution (TES) - 3ml/L-broth • 4X Vitamin solution 1.25ml/L-broth 	<p style="text-align: center;">Trace element solution (TES) - per liter</p> <ul style="list-style-type: none"> • EDTA 15g • $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 5.75g • MnCl_2 0.32g • CuSO_4 0.5g • CoCl_2 0.47g • Na_2MoO_4 0.48g • CaCl_2 2.9g • FeSO_4 2.8g • This solution was sterilized at 121°C for 20 min
<p style="text-align: center;">4X Vitamin solution - per liter</p> <ul style="list-style-type: none"> • Biotin 0.2g • Calcium pantothenate 4.0g • Nicotinic acid 4.0g • Myo-inositol 100.0g • Thiamine hydrochloride 4.0g • Pyridoxal hydrochloride 4.0g • p-Aminobenzoic acid 0.8g • This solution was filter-sterilized before use 	<p style="text-align: center;">Culture method</p> <ul style="list-style-type: none"> • Initial pH 5.5 (pH control: ammonia water) • Aeration 0.5-1.0 vvm • 1st seed: 50ml YPD • 2nd seed: 300ml x 2EA YPD • Main (fed-batch type culture, 2 intermittent feed, 2% inoculation) • Feeding solution (40% glucose 4L, 1.6 kg) • DO > 5% • Agitation 150-340 rpm

동결처리 (-81°C/2hr) - 24hr 배양

	균수 (cfu/ml)	%
D.W.	6.1×10^7	-
Lactose	6.4×10^7	104.9
Whey	7.0×10^7	114.8
Dextrin	6.6×10^7	108.2
Skim milk	6.8×10^7	111.5
Glucose	6.5×10^7	106.6

열처리 (60°C/2hr) - 24hr 배양

	균수 (cfu/ml)	%
D.W.	6.0×10^5	-
Lactose	1.8×10^7	3000.0
Whey	5.3×10^7	8833.3
Dextrin	1.0×10^6	166.7
Skim milk	3.6×10^7	6000.0
Glucose	7.5×10^6	1250.0

Fig. 10. Viable cells of yeast with type of bulking agent.

D.W.:최종농도를 10% D.W.로 처리하여 동결 및 열처리, Lactose:최종농도를 10% lactose 수용액으로 처리하여 동결 및 열처리, Whey: 최종농도를 10% whey 수용액로 처리하여 동결 및 열처리, Dextrin : 최종농도를 10% dextrin 수용액으로 처리하여 동결 및 열처리, Skim milk :최종농도를 10% skim milk 수용액로 처리하여 동결 및 열처리, Glucose :최종농도를 10% glucose 수용액로 처리하여 동결 및 열처리

Table 8. Analysis of carbon of molasses (HPLC, R&D center Maeil Daries Co. Ltd.)

	fructose	glucose	sucrose
함량	8.9 %	5.5 %	29.1 %

Table 9. Analysis of inorganic of molasses (ICP, Chung-buk Technopark)

단위 : ppm

	Cu	Fe	Ge	K	Mg	Mn	Na
Blank	0.0056	0.0020	0.0009	0.0060	0.0843	0.0009	0.0000
Sample(3반복)	0.0453	0.8812	0.0017	68.07000	648.7000	1.1230	10.4500
Result	0.0397	0.8792	0.0008	68.0640	648.6457	1.1221	10.4500
	Se	Sn	Zn	Ca	N	P	S
Blank	0.0064	0.0065	0.0939	0.0172	4.7350	0.0000	0.000089
Sample(3반복)	0.0203	0.0216	2.0870	36.9600	13.9800	0.7727	22.5700
Result	0.0139	0.0151	1.9931	36.9428	9.2450	0.7727	22.5611
	Cd	Pb	As				
Blank	0.0000	0.0000	0.0000				
Sample(3반복)	0.0272	0.0000	0.1731				
Result	0.0272	0.0000	0.1731				

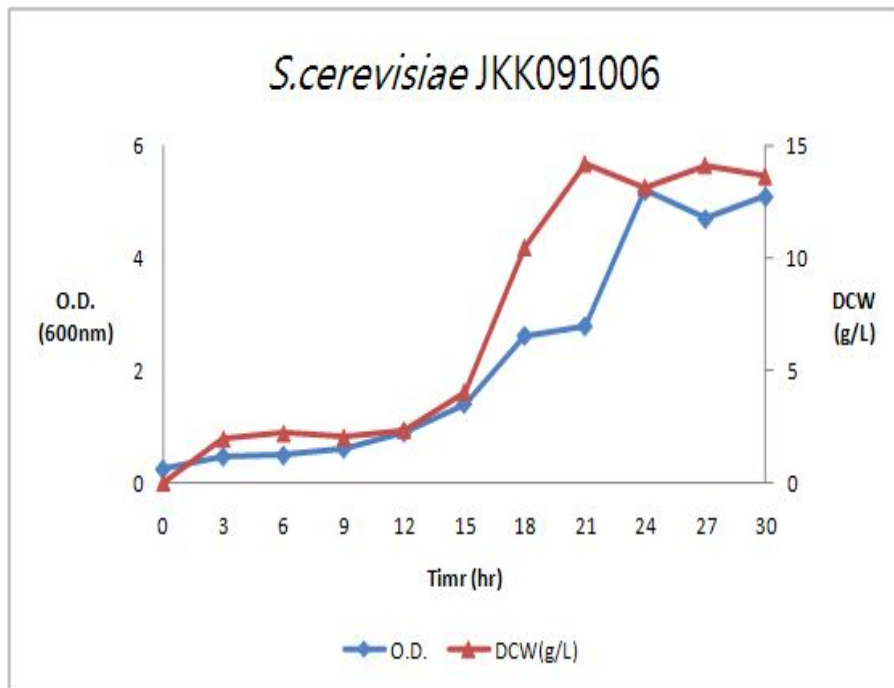


Fig. 13. Characteristics of JKK091006 with ammonium sulfate as nitrogen source.

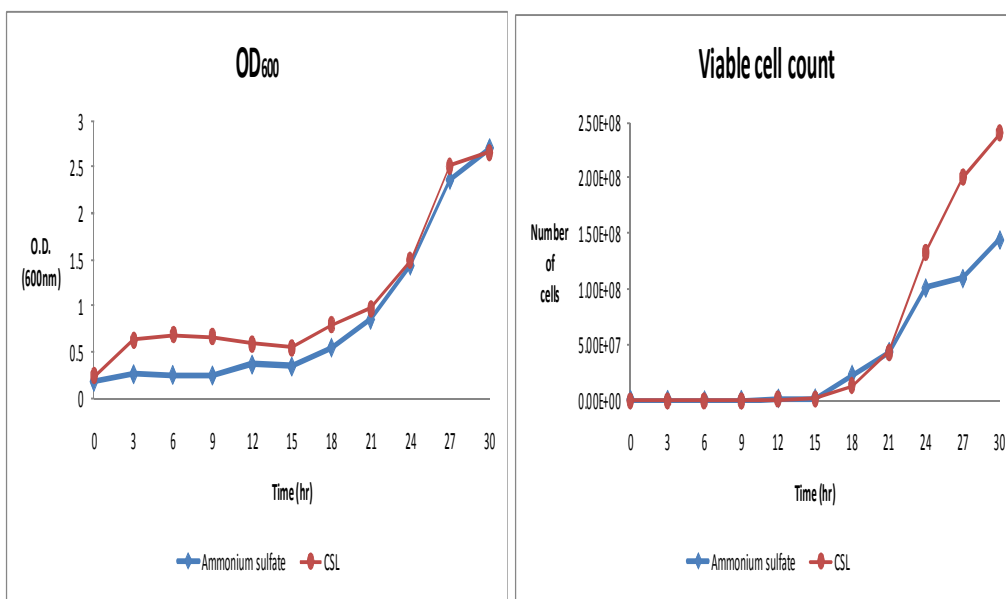


Fig. 14. Comparison of characteristics of JKK091006 with ammonium sulfate and CSL as nitrogen source.

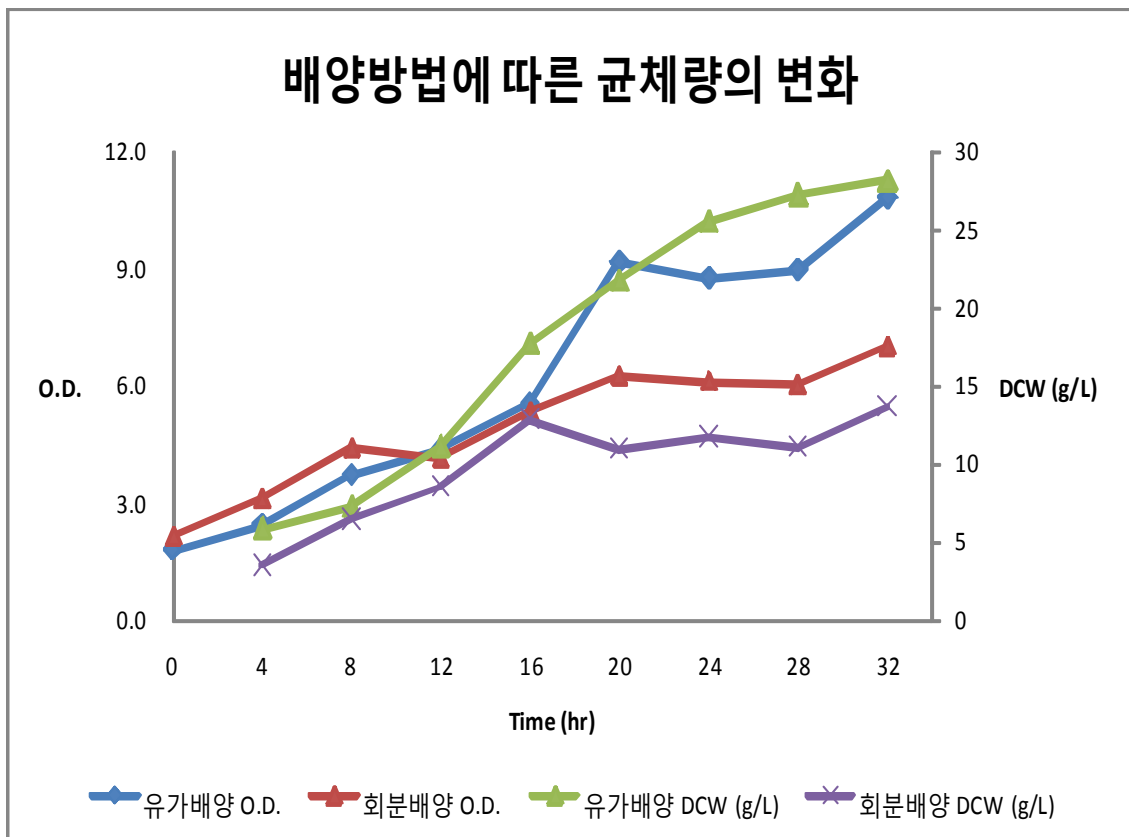


Fig. 16. Comparison of characteristics of JKK091006 with batch culture and fed-batch culture.

Table 10. Growth curve and D.C.W. (Dry cell weight) with condition of fed-batch culture.

	Time (hr)									
	0	4	8	10	14	18	22	26	30	34
OD ₆₀₀	0.135	1.200	1.392	1.616	2.304	5.828	6.008	7.096	7.540	7.404
DCW	5.65	6.32	6.57	8.27	15.23	18.73	20.03	24.62	26.85	27.20

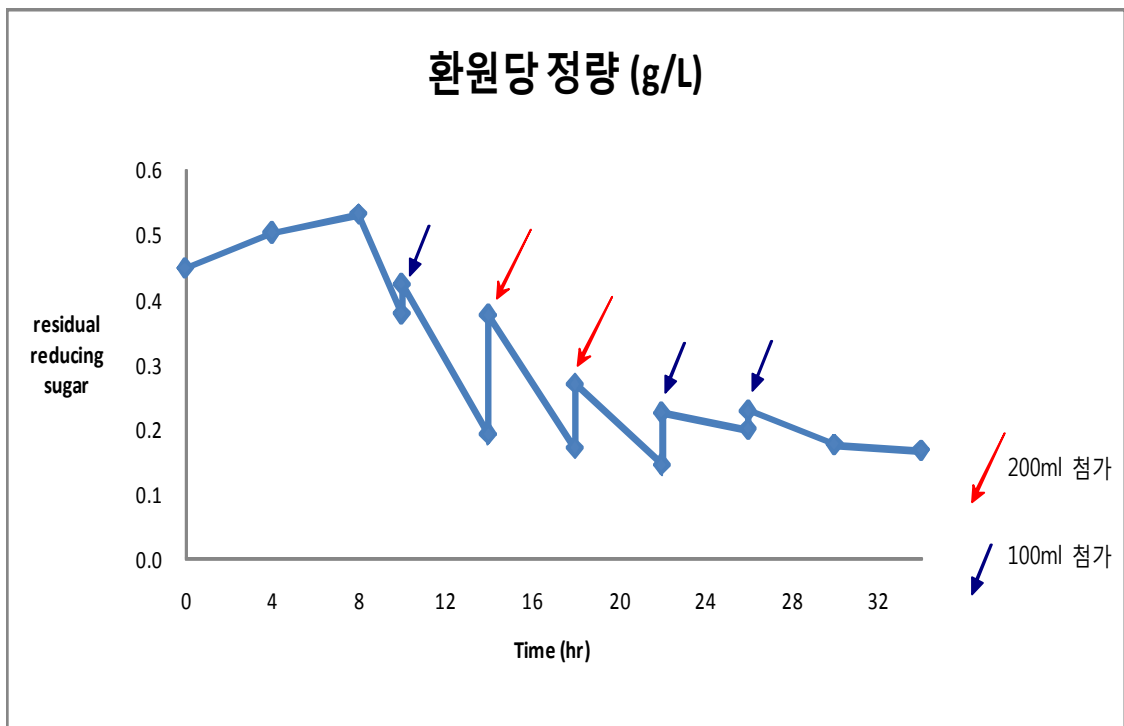


Fig. 17. Growth curve medium of addition volume and quantitative analysis of reducing sugar with condition of fed-batch culture.

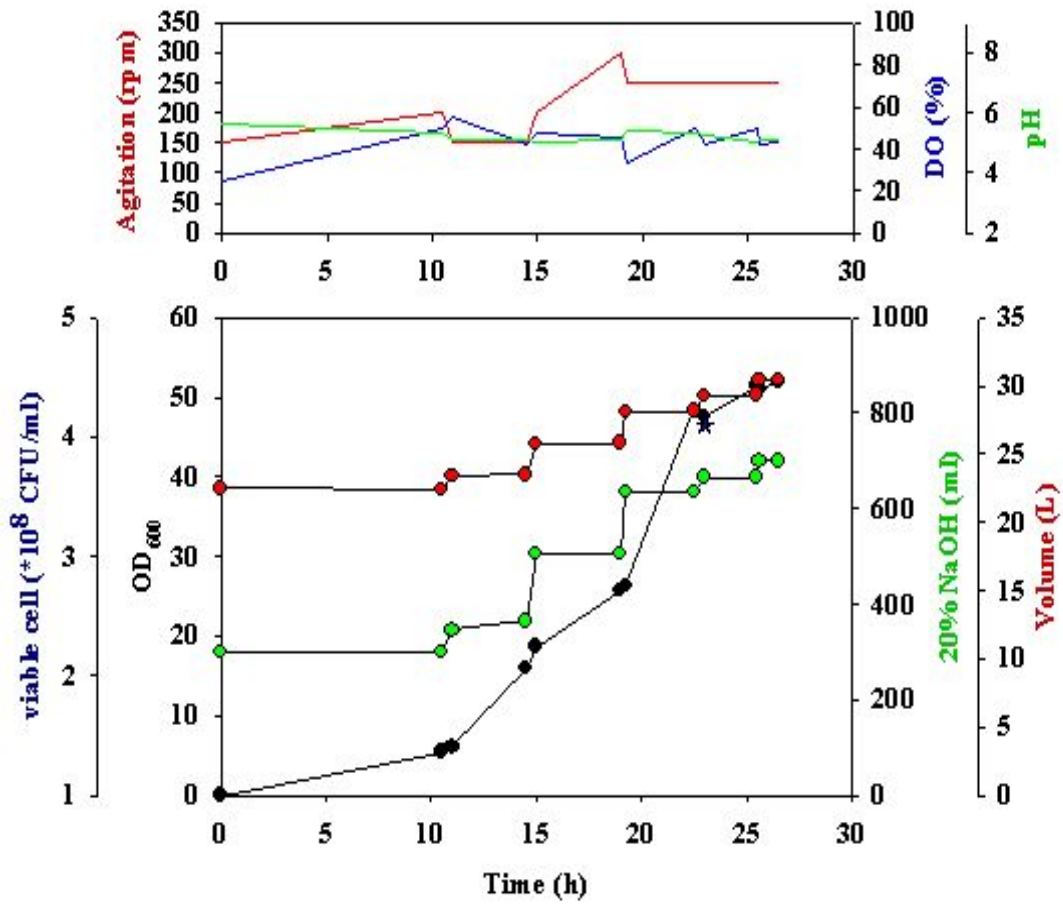


Fig. 18. Characteristics of JKK091006 with mass production by fed-batch culture.

Table 11. Viable cells of yeast material.

효모제재	생균수 (CFU/g)
상업효모 (제니코)	1.6×10^{10}
JKK091006 압착효모	6.3×10^9
JKK091006 건조효모	2.7×10^9
JKK091006 건조효모 (10% 부형제 첨가)	7.0×10^9

Table 12. Respected inoculation amount in cune fermentation

효모제재	희석비율	접종량	YPD 배지량	예상접종량
상업효모 (제니코)	10^2	1ml	39ml	약 0.4×10^6
JKK091006 압착효모	10	1ml	39ml	약 1.6×10^6
JKK091006 건조효모	10	1ml	39ml	약 0.7×10^6
JKK091006 건조효모 (10% 부형제 첨가)	10	1ml	39ml	약 1.8×10^6

Table 13. CO₂ generation with time by yeast material

효모제제	Time (hr)				
	0	3	6	9	12
상업효모 (제니코)	-	-	++	5.8ml	14ml
JKK091006 압착효모	-	1.2ml	20ml ↑	20ml ↑	20ml ↑
JKK091006 건조효모	-	++	9.4ml	20ml ↑	20ml ↑
JKK091006 건조효모 (10% 부형제 첨가)	-	0.8ml	20ml ↑	20ml ↑	20ml ↑

Table 14. Respected inoculation amount in cune fermentation tube

효모제재	희석비율	접종량	YPD 배지량	예상접종량
상업효모 (제니코)	10^2	4ml	36ml	약 1.6×10^6
JKK091006 압착효모	10	1ml	39ml	약 1.6×10^6
JKK091006 건조효모	10	2ml	38ml	약 1.4×10^6
JKK091006 건조효모 (10% 부형제 첨가)	10	1ml	39ml	약 1.8×10^6

Table 15. CO₂ generation with time by yeast material

효모제제	Time (hr)								
	0	1	2	3	4	5	6	7	8
상업효모 (제니코)	-	-	-	++	0.5ml	4.6ml	14.2ml	19.2ml	20ml ↑
JKK091006 압착효모	-	-	++	2.6ml	6.4ml	12.2ml	20ml ↑	20ml ↑	20ml ↑
JKK091006 건조효모	-	+	++	0.5ml	1.4ml	7.6ml	20ml ↑	20ml ↑	20ml ↑
JKK091006 건조효모 (10% 부형제 첨가)	-	+	++	1.0ml	4.4ml	11.2ml	20ml ↑	20ml ↑	20ml ↑

제 2 절 개발효모 대량생산기법 정립

1. 연구목적

본 연구는 연구를 통하여 산업용 당밀배지의 전처리 방법, 효모 생산배지의 최적화, 고농도 fed-batch 배양 및 발효 종료시 후처리 방법을 개발하고 사업화 가능성을 평가하는데 그 목적이 있다.

2. 연구수행방법

가. 염 내성 및 알코올 내성 균주의 선발

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

나. 배지 원료의 전처리 공정 설계

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

다. 고농도 배양 방법 설계 및 최적화

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

라. 압착효모 생산 방법에 대한 고찰

산업적인 생산에서 일반적으로 사용하는 압착효모 생산 방법과 이로부터 발생할 수 있는 장단점에 대하여 고찰하며, 실험실 수준에서 수행 할 수 있는 방법으로 시제품 생산 및 시제품을 주관기관으로 배송하여 제빵 특성을 확인 할 수 있도록 하였다.

마. 부형제 혼합 방법 및 건조 테스트 수행

현재 일반적인 건조 효모에 포함되어져 있는 부형제와 이와 혼합하는 방법을 본 연구에 적용하여, 시제품 생산 및 시제품을 주관기관으로 배송하여 제빵 특성을 확인 할 수 있도록 하였다.

3. 연구결과

천연 유래 선발효모(Wild Type)의 경제적 생산을 위한 필수조건인 대량생산용 배지선발 및 배양조건 정립과 투입되는 원료대비 고효율의 효모 생산성(성장성 향상) 및 수익성을 극대화 할 수 있는 생산시스템 확립을 완료하였다.

필수정립항목으로서, 염 및 알코올 내성균주의 선발, 선발배지 원료의 전처리 공정 설계, 고농도 배양방법 설계, 배양법 최적화(농도 fed-batch배양, 발효종료시 후처리 방법 정립), 압착효모 생산방법 정립 및 규모별 생산시스템 구축계획으로 구분 일관되게 정립하였다. 제빵효모 생산 발효기술 및 제품화 개발결과는 다음과 같다.

가. 천연 유래 효모의 염 내성 및 알코올 내성 균주의 선발

NaCl 1~10%가 포함된 PDB broth에 미리 종배양액(*Saccharomyces cerevisiae* JKK091006)을 넣어 1~2일간 30°C 200rpm에서 배양하여 한계 성장점을 확인하고, 이로부터 단계별로 염 농도를 높여가며, 염 내성을 부여하였다. 이를 계대배양 형태로 진행하여 최종 NaCl 4% 농도에서 안정하게 자라는 균주를 선발하였으며, 또한 이와 비슷한 방법으로 8~9% 알코올에 내성 가지는 균주를 선별하였다.

나. 배지 원료의 전처리 공정설계

1) 비용해성 성장저해 물질의 제거

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

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

Fig. 1은 당밀을 전처리 (열처리, 105°C, 30 분)할 때, 비용해성 물질 제거에 pH의 영향을 보기 위한 것으로 pH 값이 높을수록 침전물량이 증대되는 것을 알 수 있다(침전 방법; 105°C, 30 분 열처리>실온까지 냉각>4000×g 20분간 원심분리).

이러한 원인으로는 Ca침전물 및 회분(금속착화합물)은 pH 값이 중성 또는 알칼리성으로 갈수록 용해성이 떨어지는 것이 가장 큰 원인이며, 이러한 칼슘염, 칼륨염, 나트륨염 등을 생장에 필요한 수준을 제외하고 최대한 제거할수록 효모의 성장률은 높아지는 것이 일반적이라 할 수 있다.

결국 열처리를 수행할 때 pH가 높을수록 좋으나, 그 후 당밀 배지로서의 균형을 위해서 적절한 상승폭을 조절할 필요성이 있다. 본 연구에서는 pH 6.2~7.0 부근이 좋은 것으로 판단하였다.

2) 당밀 전처리 공정 설계 I

앞에서 당밀 전처리 중 Ca염 등의 제거를 위해 pH 상승시켜 수행하였다. 하지만,

pH를 증가시키기 위해 NaOH 등을 사용하게 되면, 배지로서 당밀의 효용가치는 상당히 낮아지게 되는데, 나트륨염이 효모의 성장에 negative 영향이 크기 때문이다.

따라서 당밀에 부족한 성분을 이용하여 pH를 상승시키는 전략이 필요하며, 본 연구에서는 암모니아수를 이용하여 질소원을 보충하고, 또한 pH를 상승시켜, 105°C에서 30분간 열처리하여 당밀을 전처리할 수 있게 하였다. 이후 실온으로 냉각시켜 당밀에 부족한 인산을 추가로 공급시켜 pH 밸런스를 유지하며, 효모의 성장성을 높이려고 하였다.

Fig. 2는 실험실 수준에서 일반적으로 수행되어지는 당밀의 전처리 조건과 암모니아와 인산을 이용한 전처리 조건 등을 설정한 것이다. 4가지의 조건으로 당밀을 전처리 및 4배 희석(v/v)하여 발효조에서 회분배양을 실시하였다.

그 결과 암모니아수를 첨가하여 pH 6.2으로 조정 후 105°C 30분간 열처리하여 인산으로 pH 5.5로 조정한 당밀을 4배 희석된 배지로 사용한 발효조에서 기준 시간(25시간)에서 가장 균체 생장이 좋은 결과를 나타냈다.

같은 당밀 농도로 발효를 진행했음에도 전처리 방법에 따라 최종 효모의 성장성이 각각 다른 것을 알 수 있으며, 이는 당밀 전처리 조건에 따라 생산수율 및 효모성장성, 효모의 생균수에 다양한 영향성을 확인 할 수 있다.

Fig. 3은 Fig. 2에서 나온 결과를 참고로 fed-batch 형태의 발효로 진행한 결과를 나타내고 있다. 하지만, 완전한 fed-batch형 발효는 아니며, 당밀의 전처리 효과를 보기 위하여 임의적인 시간(22시간) 이내로 발효를 종료하였다.

회분배양용 배지는 암모니아수를 첨가하여 pH 6.2으로 조정 후 105°C 30분간 열처리한 후 원심분리(실온 냉각 및 4000×g 30분)하여 인산으로 pH를 5.5로 조정한 다음 8배 희석한 전처리 당밀을 사용하였으며, feeding 용액을 전처리 당밀액 또는 KOH로 전처리한 당밀액, 인산을 과량 사용하여 pH 5.0으로 보정한 feeding 용액을 사용하였다.

테스트 결과에 따르면, 약간의 황산마그네슘을 첨가해주면, 성장 속도가 증가하였다. 인산을 과량 첨가해 주어도 성장속도면에서 도움이 되지 못함을 알 수 있으며, 인산 농도는 pH 5.5로 조정하는 것이 합당한 수준임을 알 수 있었다.

즉 기본적으로 당밀에서 효모가 성장하는데, 부족한 성분으로는 질소, 인, 마그네슘 등이 다소 부족한 것으로 파악된다. 문헌상, 당밀에는 질소원이 0.5~2% 이내로 존재하고 있으나, 대부분 다른 물질과 결합한 형태로 실제 효모가 사용할 수 있는 질소원은 극히 소량으로 나타나고 있었다.

인성분 또한 설탕 제조과정에서 여러물질과 착화합물형태로 전환되면서, 사용 가능성이 낮게 변화하며, 본 전처리 공정에서도 다량 침전물 형태로 제거된다. 참고로 인 성분이 적어진 배지에서 성장하게 되면 에탄올 생성이 증가하며, 균체 생산성이 떨어지게 된다.

본 실험을 수행해본 결과, K의 농도를 증대시키면 효모의 성장 속도가 떨어지는 현상을 보이며, P의 농도를 증대시키면 성장 속도는 증대되나, 효모가 제빵시 오븐 점핑, 즉 CO₂ 생산성이 낮아지는 현상이 있다. 따라서, K는 최소한으로 조정하여야 하며, P의 농도는 성장에 합당한 수준에서 제어 할수 있도록 최종 발효를 디자인하였다.

3) 당밀 전처리 공정 설계 II

1차 확정된 당밀의 전처리 조건을 이용하여 실제 생산 여부를 확인하기 위하여 Fig. 4와 같이 Fed-batch 배양을 수행하였다. 이때 발효 조건은 Table 1과 같았다. 총 1L feeding 용액을 첨가하여 발효를 마친 최종 효모의 농도는 42g/L의 건조 중량, 배양액 내의 생균수는 1.6×10^9 CFU/ml, 원심분리법으로 회수한 압착효모(76% 수분함유)의 생균수는 1.2×10^{10} CFU/g를 나타내며, one batch(최종 부피 2.5L 기준) 당 420g/batch의 압착효모(76% 수분함유량)를 생산하였으며, 이는 순수 당밀 730g으로부터 생산된 것임을 고려할 때 당밀 g 당 0.57g의 압착효모가 생산되어 압착효모 수율은 57% (76% 수분함량 포함)이었으며, 건조효모를 기준으로 하면 14.4%의 수율로 나타내었다.

발효액 부피당 생산성(% , $w/v \times 100$)은 압착효모의 기준으로는 16.6%, 건조 효모의 기준으로는 4.2%를 나타내었다.

이러한 결과는 최종 목표치에 부족한 결과를 나타내고 있으며, 최대 비성장 속도 (μ_{max})는 0.33 h^{-1} 를 나타내고 있지만, 이중성장시점이 지난 후 fed-batch 시점에 도달할수록 성장속도가 느려지는 것을 확인할 수 있었다.

이는 첨가해주는 feeding 용액의 배지농도 및 initial batch 배지의 농도가 낮아 성장 속도에 비해 점점 회석 속도가 빨라지는 문제가 발생하는 것으로 판단하게 되었다. 따라서 초기 성장배지의 농도를 증대시키고, feeding에 사용되는 전처리 당밀의 농도 증가 및 추가적인 분석을 통해 생산성을 증대하고자 시도하였다.

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

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

Fig. 5와 같이 고농도 전처리 당밀을 사용하여 발효 실험을 수행하였다. 이때 발효 조건은 Table 2와 같았다. 총 1L feeding 용액을 첨가하여 발효를 마친 최종 효모의 농도는 53.8g/L의 건조 중량, 배양액 내의 생균수는 2.53×10^9 CFU/ml 였으며, 기존에 비해 60% 증대하였다.

one batch (최종 부피 2.6L 기준) 당 140g/batch의 건조효모를 생산하였으며, 이는 순수 당밀 860g으로부터 생산된 것임을 고려할 때, 건조효모 수율은 16.2%였으며, 저농도 당밀 배지 발효에 비해 1.6% 수율을 증대 시켰다.

발효액 부피당 생산성(% , $w/v \times 100$)은 건조 효모의 기준으로는 5.38%를 나타내었다. 저농도 당밀 배지에 비해 배양액 내의 생균수 및 균체 생산 수율 증대는 황산아연 첨가와 순수산소 공급에 따른 결과로 판단된다.

저농도 당밀 배지에서는 순수산소 공급이 없이 고속의 교반 속도 (최대 1300 rpm)로 DO (dissolved oxygen)를 유지한 결과 share stress 조건하에서 배양되

었으며, 배양 후반에 충분한 산소 요구도를 만족하지 못하여 생균수와 수율이 감소하였다.

고농도 전처리 당밀 및 순수산소를 이용하여 최종 생산성을 건조효모 목표치인 5%를 달성하였으며, 압착효모의 생산성을 극대화시킬 수 있었다. 하지만, 배양 말기에 비성장속도(μ)가 떨어지는 패턴을 보이며, 이는 역시 성장속도가 배지의 회석속도를 따라가지 못하기 때문이다. 이보다 높은 수준의 생산성을 만들기 위해서는 repeated fed-batch culture를 수행하면 되지만 이 또한 한계가 발생할 것이다.

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

추가적인 한계 요인은 6% 이상의 고농도 배양은 발효조 내에 배양액의 점도 상승과 교반 속도 증대의 영향으로 share stress 요인이 증대되어 성장 및 수율이 억제될 것으로 추정된다. 따라서 고농도 배양으로 인해 순수 산소를 공급 해야만 당밀 대비 생산 수율을 확보 할 수 있다. 즉, 효모가 요구하는 DO 수준을 맞추고, share stress를 줄일 뿐만 아니라 에탄올 같은 부산물 생산을 줄여 생산 수율을 증대시킨다. 따라서, 사업화시엔 순수 산소 공급 장치를 설치해야만, 본 연구 결과와 유사한 결과로 생산 할 수 있을 것으로 판단된다. 단순히 5.3% 건조효모를 생산하는 경우는 순수 산소 공급 장치를 설치할 필요가 없지만, 당밀 대비 수율 즉 경제성을 목표로 한다면 순수 산소 공급 장치를 설치해야 에탄올과 같은 부산물 생산성의 감소와 효모의 생균수를 안정적으로 유지 할 수 있을 것이다.

Fig. 5의 발효 완료한 상등액과 이때 사용한 전처리 당밀을 ICP분석하여, 최종 발효 배지를 확정하였다. ICP분석 결과는 Table 3에 나타내었다.

최종 배양 상등액에 잔존하는 원소의 함량은 전처리 당밀을 2배 희석한 당밀 배지에 TMS와 발효 중 첨가물을 넣은 배지성분에서 효모가 배양 중 소모한 원소량을 뺀 수치와 동일하다. 즉, 효모가 58.3g/L 성장하는 동안 K, Na, Mg, Ca, Mn, Zn, Fe, Cu 및 P를 각각 830, 7, 164, 101, 2.7, 20.7, 16, 3이상, 255 ppm를 소비하였다. 이를 바탕으로 Table 4에 최종 배지와 배양 방법을 결정하였다. 이러한 배양 조건하에서 발효 결과를 Fig. 6에 나타내었다. 여기서는 열처리 후 배지와 feeding 용액에 첨가되는 filter 여과 살균물 (nTMS; Trace Metal Solution)의 단순화 및 배양시 발효 온도(30°C)를 상승시켜 30시간 이내로 발효가 종료되게 성장 속도를 증대시켰다.

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

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

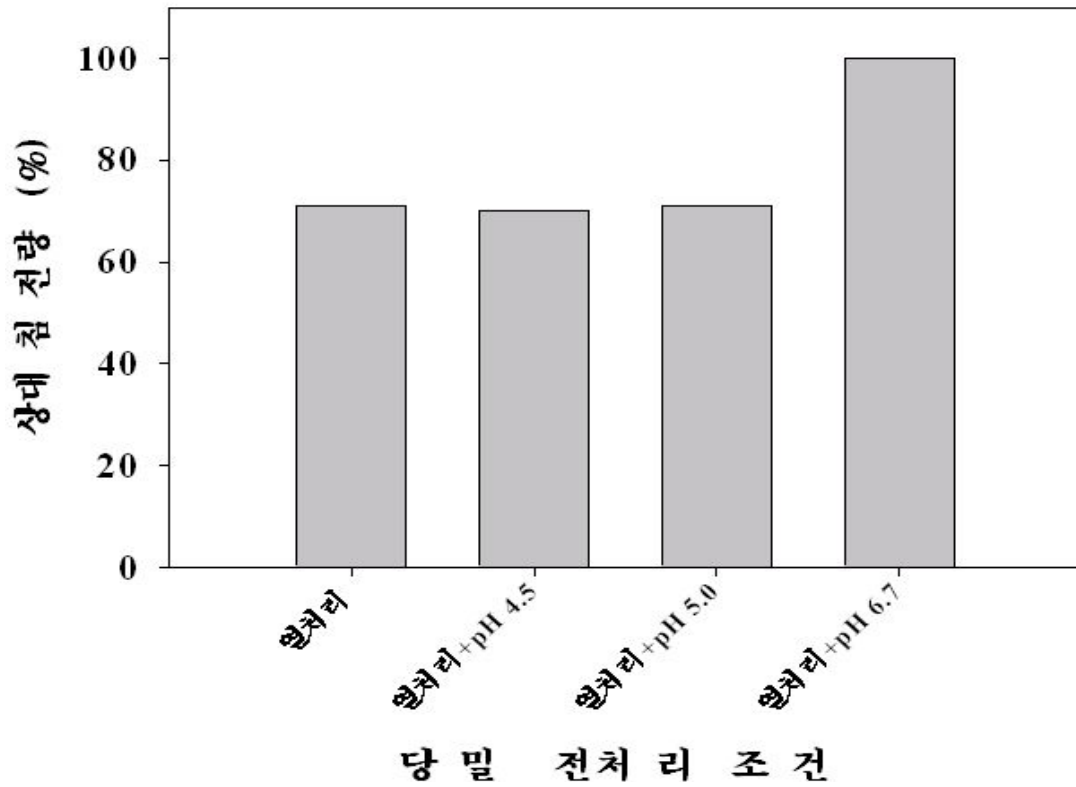


Fig. 1. 당밀의 열처리 및 pH 변화에 따른 당밀 침전물량의 변화

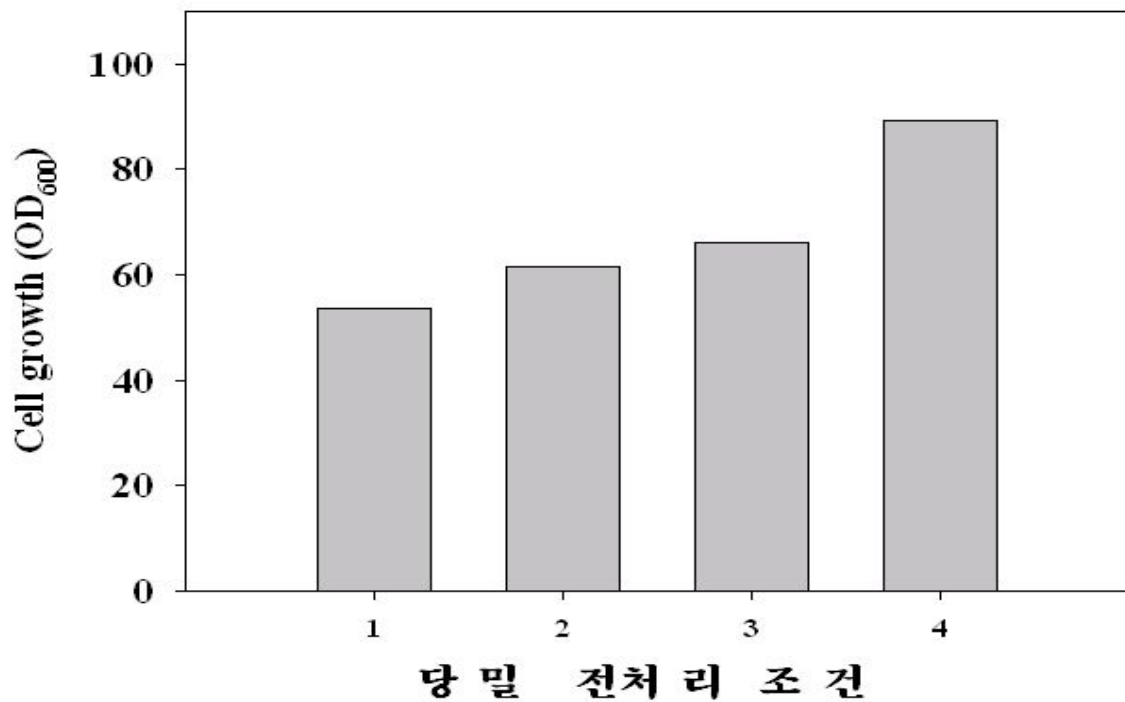


Fig. 2. 당밀 전처리 조건에 따른 효모의 성장 (1) (발효조 회분배양 결과)

1, 0.05% 황산마그네슘 및 pH 5.5 조정하여 105℃ 30분간 열처리; 2, 0.05% 황산마그네슘과 0.15% 황산암모늄 및 pH 5.5 조정하여 105℃ 30분간 열처리; 3, KOH를 첨가하여 pH 6.3으로 조정 후 105℃ 30분간 열처리하여 인산으로 pH 5.5로 조정; 4, 암모니아수를 첨가하여 pH 6.2으로 조정 후 105℃ 30분간 열처리하여 인산으로 pH 5.5로 조정

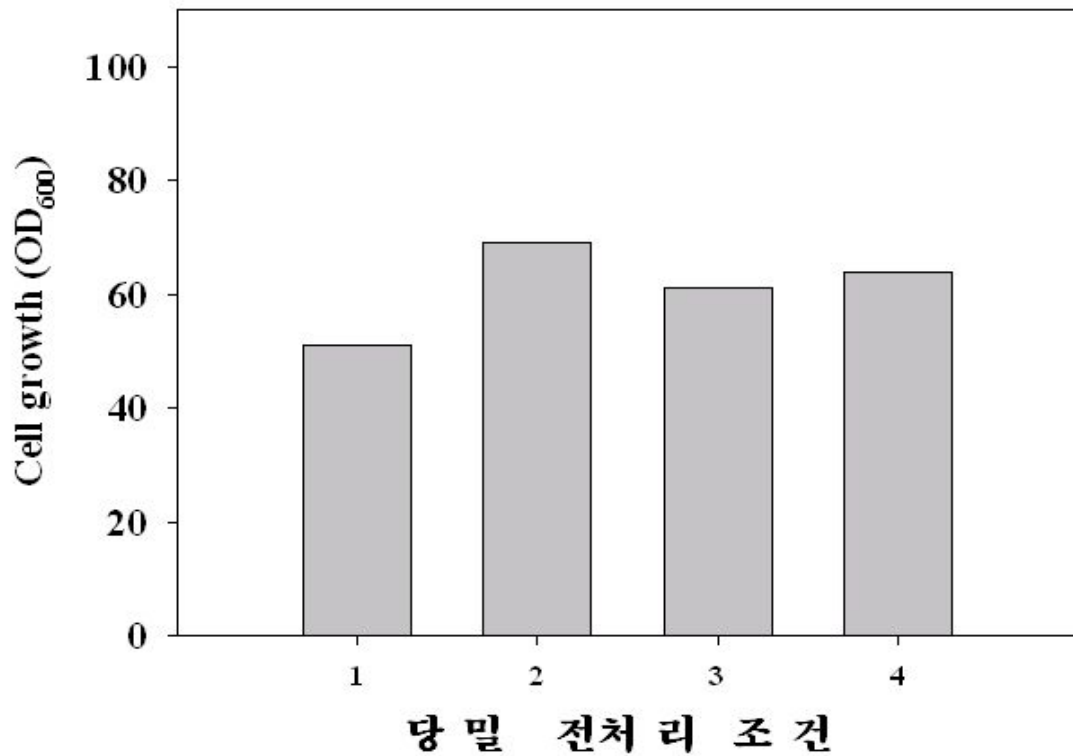


Fig. 3. 당밀 전처리 조건에 따라 효모의 성장 속도 (2) (발효조 회분배양 결과)

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

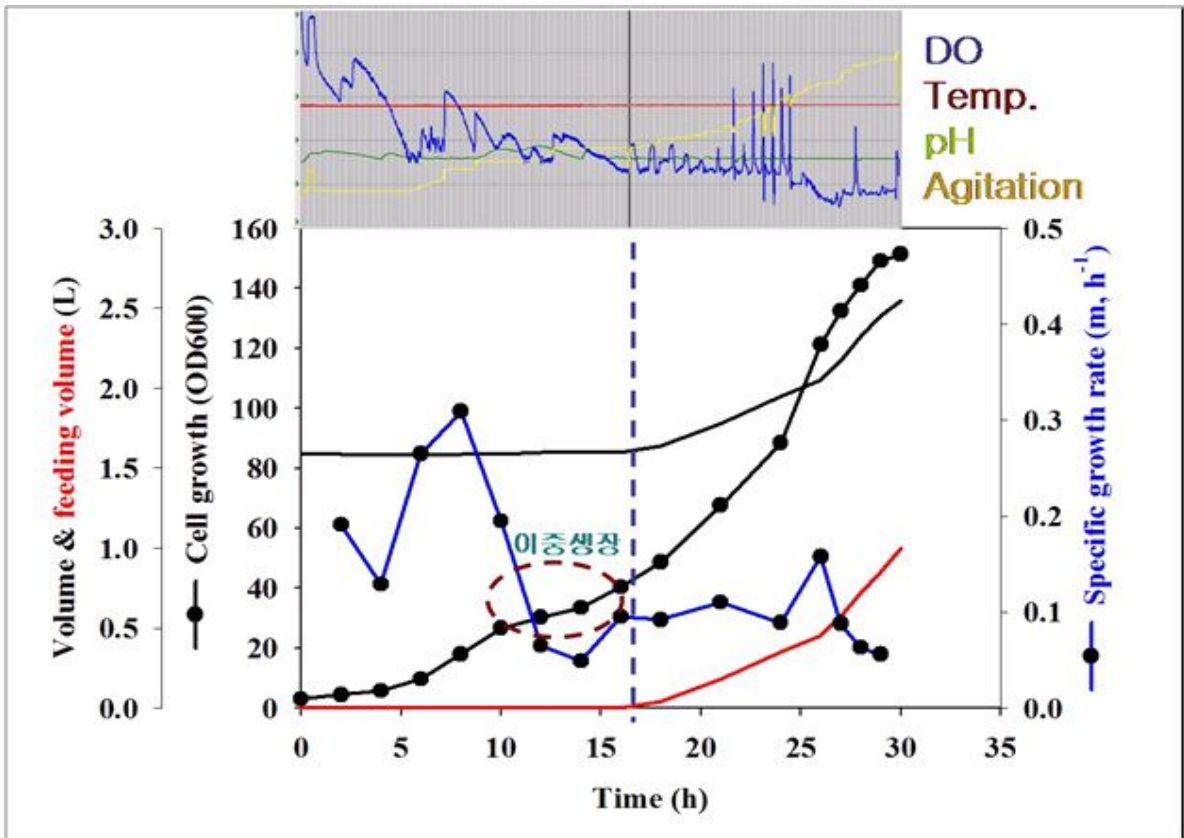


Fig. 4. 1차 결정된 당밀 전처리 조건하에서 Fed-batch 발효에 따른 time-profile

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

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

TMS :Table 4 참조

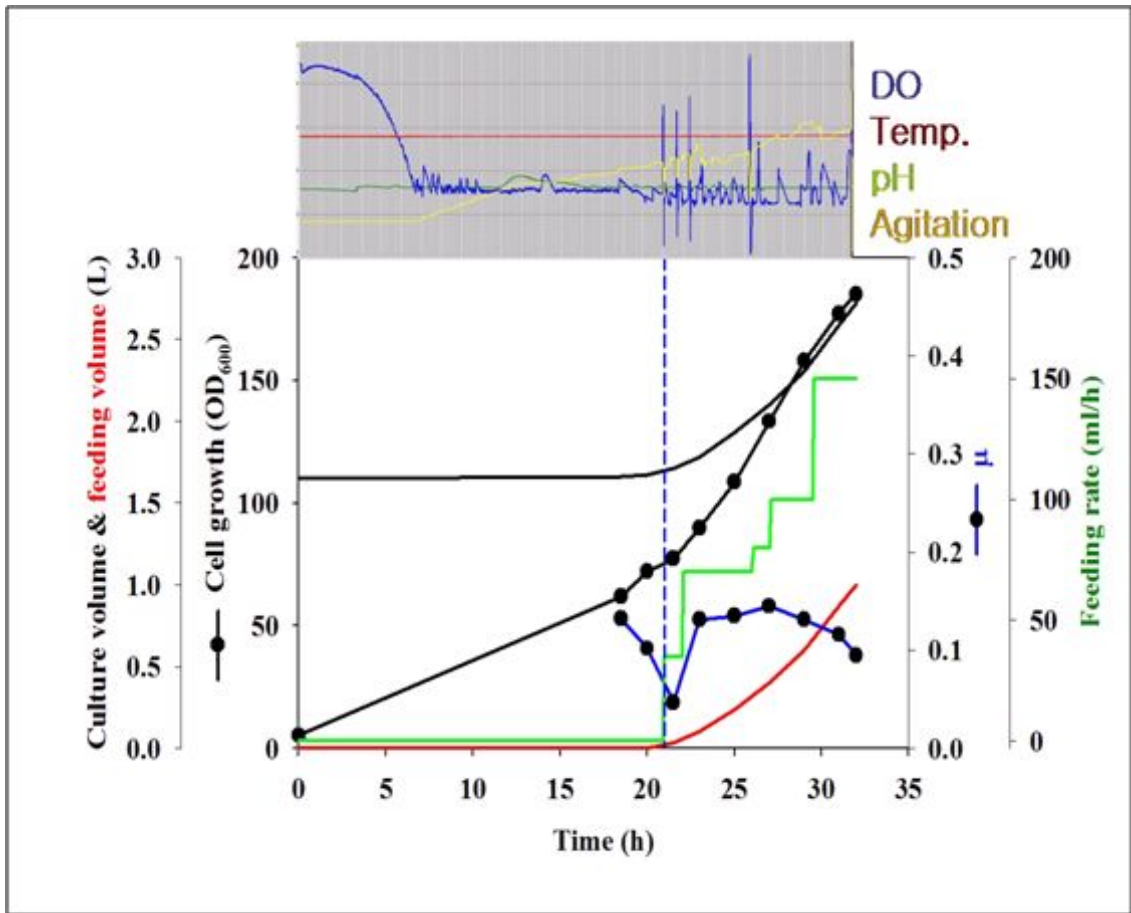


Fig. 5. 고농도 전처리 당밀을 사용한 Fed-batch 발효에 따른 time-profile

Table 2. 고농도 전처리 당밀 조건 및 이를 사용한 Fed-batch 발효조건

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

Table 3. 전처리 당밀과 발효 종료액의 ICP분석 결과

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

Table 4. 최종 전처리 당밀 조건 및 이를 사용한 Fed-batch 발효 조건

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

3. 고농도 배양 방법 설계 및 최적화

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

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

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

당밀 배지를 사용한 효모의 고농도 배양은 효모의 성장속도 및 수율에 영향을 받는다. 효모 균주의 비성장속도 (μ)와 당밀 이용률이 높을수록 당밀 사용률이 줄어들며 효모 생산 수율이 증가할 수 있다.

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

효모의 고농도 배양은 batch 시기와 fed-batch 시기로 나누어진다. batch 시기에는 함유되어 있는 배지 성분을 사용하여 성장하며, fed-batch 시기에는 첨가되는 feeding 용액의 성분과 농도에 의존해 성장되도록 디자인되어 있다.

batch 배지의 농도와 feeding하는 용액의 농도에 따라 효모의 최종 농도가 달라지며, 고농도로 자랄 때에도 배양액의 점도와 교반 속도에 따라 share stress라는 효모 성장에 스트레스 요인이 발생하게 된다. 이로 인해 투입된 당밀 대비 효모 생산 수율이 떨어진다. 하지만, 순수 산소를 공급하여 배양액 내에 DO 수준과 교반 속도를 적절히 조절하면 share stress가 줄어들고, 부산물 생성이 최소한으로 조정되어 최적 효모 생산 할 수 있다.

본 연구에서는 비성장속도 증대와 당밀 배지의 효율적 사용을 위해 당밀 전처리 공정 설계 및 ICP분석으로부터 효모의 성장에 부족한 미네랄을 공급하였고, 공기와 순수 산소를 혼합 공급하여 배양액 내에 효모가 최적 성장할 수 있는 DO 수준과 교반 속도를 유지하려고 하였다. 마지막으로 본 연구에서는 수행하지 않았지만, 당밀 전처리 공정으로 설계된 당밀 배지와 순수 산소를 공급하면서 repeated fed-batch 발효 (주발효조의 발효액을 종배양액으로 사용하거나 새로운 발효조로 이송하여 연속적인 발효를 수행하는 발효법)를 수행하게 되면, 현재의 수준 보다 배양액 내에

당밀 농도가 더 증대 될 것이며, 높은 생산성 (실험실 수준에서 최대 7%의 효모 생산)를 만들 수 있을 것이다. 또 이 방법을 사용하게 되면, 초기 batch 배양시기에 생장 지연을 제거 할 뿐 아니라, 실제 생산에서도 매일 효모를 생산 할 수 있는 유용한 생산 방법이 될 것이라 판단한다.

제빵특성을 위해 제조한 최종 시제품은 fed-batch 배양시기에서 feeding 용액이 200ml 남았을 때부터 암모니아수를 이용한 pH 보정을 pH 5.0으로 setting하여 자연적으로 pH를 강하시켜 배지내에 질소원 수치를 낮추었다.

이렇게 운영하게 되면, 제빵 테스트를 시행 할 때 효모가 도우상에서 탄소원 이용 능력이 높아져 CO₂ 생산성이 증대되는 것으로 알려져 있다. 즉, P의 배지내 잔존 또한 효모의 도우 적응성에 영향을 미치나, P의 함량이 부족해지면, 효모의 생산 수율이 떨어지며, 에탄올 생성능력이 증대되는 문제점이 있다.

4. 압착 효모 생산 방법에 대한 고찰

산업적인 압착 효모를 생산하는 방법에는 2가지 방법을 사용한다. 첫째, 전분을 matrix로 사용하여, 드럼여과 방식으로 전분과 효모 믹스형태로 여과하여 최종 압착기로 압착하여 제조하는 드럼여과 방식이며, 두 번째, 원심분리를 통해 배지 성분을 세척 및 농축하여 크립타입으로 1차 생산 후 압착 (filter pressure)하여 제조하는 원심분리법이 있다.

전자의 방법으로 생산하는 것은 효모의 함량이 고품분 기준으로 최종 약 50~70% 수준으로 낮은 것이 특징이며, 또한 당밀이 잔존하는 문제점으로 2차 드럼여과를 수행해야 압착효모의 품질을 만족할 수 있게 된다. 또한 전분으로 인해 오염 가능성 및 유통기한에 문제가 있다. 하지만, 제빵 도우 적응성이 좋아 오븐점프 능력이 탁월한 것으로 알려져 있다.

후자의 방식은 대부분의 압착효모를 생산하는 일반적인 방법이며, 웨스펠리아 타입의 (슬러지의) 자동세척 및 자동배출형 연속원심분리기를 사용하여 당밀 배지의 세척 및 효모를 분리하는 형태로 세척 및 분리를 1단계에서 해결하여, 공정비용이 단순화되는 형태로 비용을 줄이는 공정을 사용하고 있다.

비용 측면에서도 후자의 공정이 인력 운영 및 생산에 적합한 공정이라 할 수 있다. 본 연구에서도 원심분리 방법으로 압착효모 시생산하였으며, 제빵 테스트용으로 사용하였다.

5. 부형제 혼합 방법 및 건조 테스트 수행

부형제는 도우에 효모가 잘 믹스 될 수 있도록, 투입되는 유화제를 의미하며, 일부 회사에서는 효모의 건조시 생존력을 올리기 위하여 비타민C를 0.2%까지 투입하는 경우도 있으나, 대부분 유화제인 SPAN60(sorbitan monostearate, melting point 60°C)이라는 유화제를 60°C이상에서 물과 유화제를 혼합한 에멀전 형태로 압착효모와 건조효모에 최종 0.5~1.5%(건조효모 중량 대비 w/w 기준) 정도로 투입하여 완제품을 만들고 있다.

Table 5에서는 부형제 첨가에 따른 동결건조시 생균수를 나타내고 있으며, 실험에 사용한 압착효모는 동결전에 $1.23\sim 1.43 \times 10^{10}$ CFU/g이며, 동결건조 후 100%

생존할 경우 $4.67\sim 5.43\times 10^{10}$ CFU/g를 나타내어야 한다. 하지만, 부형제를 유무를 떠나서 동결 및 건조 충격으로 인해 90% 이상 사멸하는 것을 확인 할 수 있었다.

동결건조시의 문제점을 해결하고자 유동층 건조기를 사용하여 추후 진행예정이다.

제빵효모의 건조는 저온에서 운영 가능한 유동층 건조기를 사용하여 건조 효율 및 효모의 생존성을 증대시킬 수 있다. 건조 전문 업체인 아인시스템(주)에 효모 건조와 관련된 문의결과 압착기 (JG-SMG series, 과립형상기)와 저온 (35~40℃) 유동층 건조기 (FL-B series, 유동층 과립기)를 이용하여 수분 함량이 낮은 압착효모를 건조 생산하는 시스템을 확인 하였다.

6. 사업성 가능성 평가

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

본 연구를 기초로 하여, 사업 가능성 평가를 위한 가정을 확립하였다. 발효조 크기 (생산규모와 시장 점유율)에 따라 원료 사용량과 압착효모 생산량은 비례할 것이라고 가정하고 생산 규모에 따른 사업 가능성을 시뮬레이션 하였다(인건비, 가공비 및 투자비용은 정비례하지 않음).

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

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

당밀의 원료가는 200원/kg으로 가정하고, 2,000 kg의 당밀 가격 400,000원과 기타 원료인 SPAN60, 비타민(Biotin), 미네랄, 암모니아, 인산, 포장용지 (압착효모용 포장지) 등을 포함하여 550,000원/batch의 원료비용이 소요될 것으로 판단하였다.

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

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

압착효모의 시중 소매가는 500g 당 2,500~5,000원 정도에 거래되고 있으며, 본

시뮬레이션에서는 판매가격을 1,200원으로 가정하였다.

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

국내 시장의 최소 20%(4톤-압착효모/일, 20톤 발효기 4기 운영)의 시장점유율 이상을 확보 할 수 있는 시설을 운영하여야 제빵효모 사업에서 수익 구조로 전환되었다 (Fig. 7).

투자대비 수익을 얻기 위해서는 1일 10톤 이상의 압착효모를 생산 기준으로 투자를 한다면, 연간 최대 34억원 (연간 투자 대비 수익률 20.6%)의 수익이 발생할 것으로 판단한다 (소모품 교체비용, 투자자금에 대한 이자비용 및 유통과정에서의 손해비용 비포함).

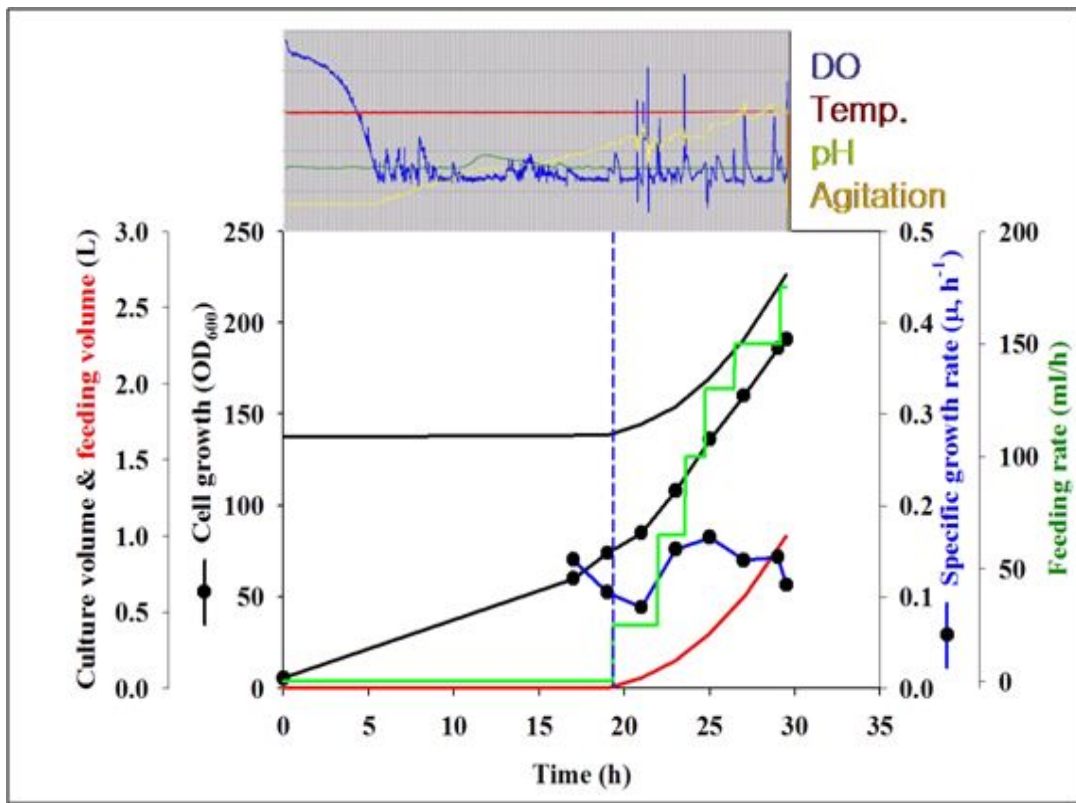


Fig. 6. 최종 전처리 당밀을 사용한 Fed-batch 발효에 대한 time-profile

Table 5. 유화제 및 비타민C 첨가에 따른 동결건조시 생균수 증감에 미치는 영향분석

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

Table 6. 제빵 효모 생산 규모에 따른 손익 비교

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

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

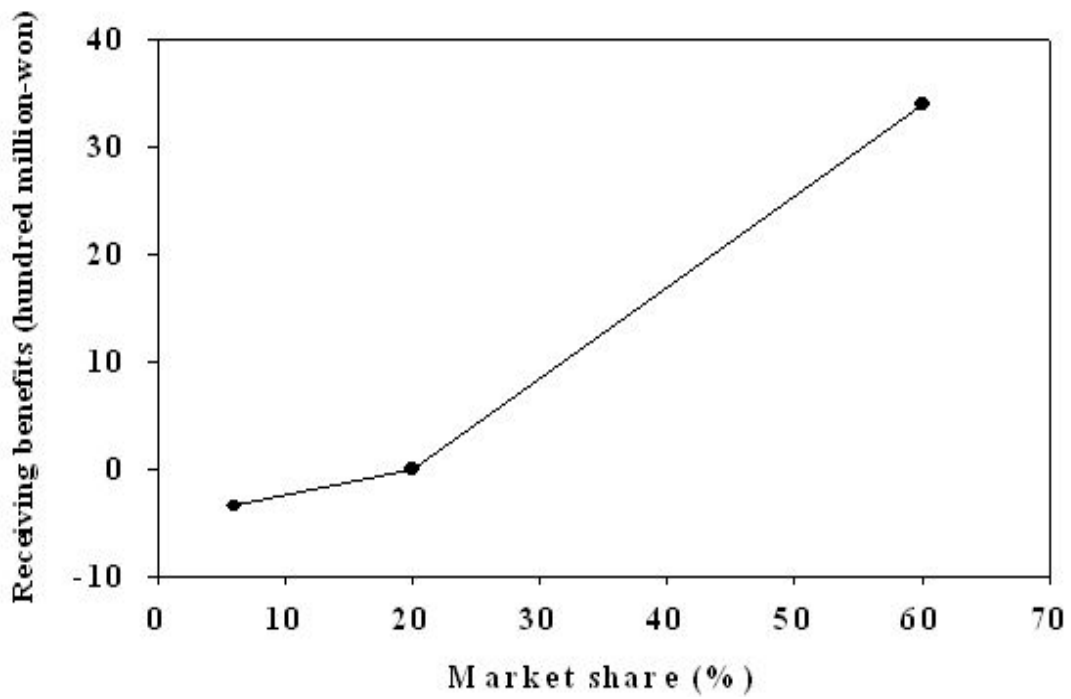


Fig. 7. 시장점유율에 따른 수익성 비교

7. 결론

개발효모의 대량생산시스템 정립은 다음과 같이 완료되었다.

- 가. 선발 천연형 야생효모를 이용하여 자연선택적인 방법(스트레스 적응)으로 알코올과 염농도에 대해서 저항성이 증가된 균주를 선발하였다.
- 나. 선발된 효모를 이용하여 당밀 전처리 기술개발과 당밀 첨가 방법 및 고농도 발효 기술을 개발하여 목표치 수율 5%를 초과 달성하였다.
- 다. 고농도 효모 배양결과로서, 배양액당 2.5×10^9 CFU/ml 이상 그리고 압착효모(수분 70~74% 함유)는 1.15×10^{10} CFU/g의 고농도 균수를 나타내었다(Fig 8).
- 라. 생산수율 검정결과, 동결건조형은 5.4%(w/w), 압착효모는 18%(수분함유량 : 70~74%, w/w)의 높은 생산효율을 보였다.
- 마. 개발효모 제품화(제형화)는 건조형(수분: 5%, w/w)과 압착형(수분함유량 : 70~74%, w/w)으로 구분하여 정립 완료하였다(Fig 8).
- 바. 산업적인 생산에서 일반적으로 사용하는 압착효모 생산 방법과 이로부터 발생할 수 있는 장단점에 대하여 고찰하며, 실험실 수준에서 수행할 수 있는 방법으로 시제품 생산 및 시제품으로 정하고 이를 제빵특성 검정에 활용하였다.



Fig. 8. 정립된 대량생산시스템 적용 제조한 제품화 시제품

(A) 개발효모(압착형, 500g/1팩), (B) : 개발효모(동결건조형, 500g/1 Box)

제 3 절 개발효모 제빵적용성 평가

(3-1: 제형별 장기보관성 검정)

1. 연구목적

본 연구는 유기농 농업현장에서 분리한 개발효모가 Wild type임에 따라 제품화 제형별(압착형, 건조분말형), 보관조건(상온, 냉장)을 다르게 조성한 후 장단기 경과시간에 따른 균수의 변화를 검정하였으며, 검정결과를 토대로 최종 제품화에 있어 가장 중요한 표기 항목인 보관기간 및 보관방법을 설정코져 하였다.

2. 연구수행방법

본 연구간 공시효모균은 상업용 및 개발효모를 대상으로 제형별로 구분하여 사용하였다. 즉, 상업효모(Jenico사, 한국)는 압착형(수분 : 70%)과 건조분말형으로 구분 구입하여 대조구로 사용하였으며, 시험구는 개발효모(*S. cerevisiae* JKK100902)를 역시 압착형(수분 : 74%)과 건조분말형(동결건조)으로 구분 비교검정하였다. 전체 시험간 사용된 재료는 완제품을 기준으로 사용하였다(Fig 1).,

장기 보관성을 확인하기 위한 보관온도는 상온(25℃)과 냉장(5℃)로 구분하였고, 보존기간은 0일, 30일 그리고 1년(365일)으로 정하여 실시하였다.

결과확인에는 보관기간별로 색상, 형태변화 및 이취 등의 발생유무 및 곰팡이균 발생유무를 조사하였고, 시간경과별로 효모콜로니수를 병행 조사하였다(PDA, 25℃, 24시간 배양).

3. 연구결과

가. 장단기 보관에 따른 효모균수 변화 조사결과, 상업효모 대비 개발효모 공히 1개월 이상 장기보관시(최초 : 10^{10} cfu/g)는 제형 및 보관온도에 상관없이 최대 20%까지($10^7 \sim 10^8$ cfu/g) 균감소 결과를 보였는데, 이때 보관온도조건과는 무관하였다(Table 1).

나. 시간경과 및 보관조건에 따라 성장 변화에 미치는 결과로서, 압착효모의 경우는 시간이 경과하면 곰팡이, 갈변화 및 이취 심하게 발생하였으며, 건조효모는 제조미 제품특성상 이와는 무관하였다(Fig 2).

다. 보존기간 30일(냉장보관)이 경과시에 압착효모기준으로 효모균수 변화를 검정(0일 기준)하여 보았더니, 개발효모가 72배(1.3×10^{12} cfu/g) 증가하였는데 반하여 상업효모는 43배(4.3×10^{11} cfu/g)가 증가하는 결과를 보였는데, 이는 개발효모다 야생에서 분리한 특성으로 인한 것으로 판단 되었다. 그러나, 1년이 경과시는 100배가 감소하는 것으로 조사되었다. 이 결과로 보아 개발효모가 장기보관시 생존능력이 우월하다는 것을 알 수 있었으며, 제빵적용시도 역시 우위를 보일 것으로 예상되었다(Table 1).

라. 이러한 결과는 냉장조건하에서 1개월 경과시(기준), 제빵 적용성 평가가 필요하다고, 이 결과를 토대로 보존성 결과를 결정하여야 할 것으로 판단되었다.

마. 결론적으로 개발효모의 경우는 압착효모의 보관성은 1개월, 분말형은 1년으로 결정하였다(냉장조건).

Table 1 . 상업효모 대비 개발효모의 제형별, 보관조건에 따른 장단기경과시 균수 변화에 미치는 결과

효모종류	보관기간(일)	효모의 보관조건(기간 및 온도)에 따른 효모균수 변화조사(cfu/g)	
		상온(25℃)	저온(5℃)
상업효모 (압착형)	0	1.0x10 ¹⁰	1.0x10 ¹⁰
	30	NT	4.3x10 ¹¹
	365	8.2x10 ⁷	2.4x10 ⁷
상업효모 (건조형)	0	2.7x10 ¹⁰	2.7x10 ¹⁰
	30	NT	1.6x10 ¹²
	365	6.0x10 ⁷	2.7x10 ⁸
개발효모 (압착형)	0	1.8x10 ¹⁰	1.8x10 ¹⁰
	30	NT	1.3x10 ¹²
	365	9.2x10 ⁷	3.2x10 ⁸
개발효모 (건조형)	0	2.6x10 ¹⁰	2.6x10 ¹⁰
	30	NT	1.7x10 ¹⁰
	365	3.1x10 ⁷	2.8x10 ⁸



Fig 1 . 상업효모 대비 개발효모의 제형별(압착형 및 건조형) 성상
 (A): 상용효모(압착형), (B): 개발효모(압착형), (C):
 상업효모(건조분말형), (D) : 개발효모(동결건조형)



Fig 2 . 상업효모 대비 개발효모의 보관조건별(A : 25℃ 상온, B : 5℃ 저온), 장기경과(1년)시 효모성상 변화조사.

1 : 상업효모(건조형, 상온, 0일보관), 1-1 : 개발효모(건조형, 상온 0일), 2 : 상업효모(압착형, 상온 0일), 2-1: 개발효모(압착형, 상온 0일), 3 : 상업효모(건조형, 상온 ,1년보관), 3-1 : 개발효모(건조형, 상온 1년), 4 : 상업효모(압착형, 상온 1년), 4-1: 개발효모(압착형, 상온 1년), 5 : 상업효모(건조형, 저온, 0일보관), 5-1 : 개발효모(건조형, 저온 0일), 6 : 상업효모(압착형, 저온 0일), 6-1: 개발효모(압착형, 저온 0일), 7 : 상업효모(건조형, 저온 ,1년보관), 7-1 : 개발효모(건조형, 저온 1년), 8 : 상업효모(압착형, 저온 1년), 8-1: 개발효모(압착형, 저온 1년)

제 3 절 개발효모 제빵적용성 평가

(3-2: 개발효모 제형별 제빵 발효율 확보 관련 사전배양조건 정립)

1. 연구목적

예비실험에서 상업효모 대비 개발효모의 동일한 효모균수를 적용 하여 제빵제조 시 발효율은 80%수준 이하였는데, 이는 제형별(압착형 및 동결건조형) 효모균의 활성과 관련한 제빵 발효율에 영향이 크게 미치는 것으로 조사 되었다. 이는 제형별(압착 및 동결건조형)로 현장시작품을 대상으로 기본 영양액(10% Sucrose용액)조건에서 시간별(25℃, 0시간, 3시간 및 6시간) 효모균수를 증가효과를 조사가 발효율 확보에 있어 중요한 요인일 수 있음이 시사되었다. 따라서, 검정결과의 발효율 확보를 위한 제빵레시피에 적용코 저 하였다.

2. 연구수행방법

본 연구간 공시효모균은 상업용 및 개발효모를 대상으로 제형별로 구분하여 사용하였다. 즉, 상업효모는 압착형[Jenico사(한국),수분 70%]과 건조분말형(Lesaffe사, 프랑스)으로 구분 구입하여 대조구로 사용하였으며, 시험구는 개발효모(*S. cerevisiae* JKK100902)를 역시 압착형(수분: 74%)과 건조분말형(동결건조) 제품으로 제조하여 사용하였다. 시험간 사용한 효모재료는 구입(상업효모) 및 생산(개발효모)후 7일 이내에 사용하는 것을 원칙으로 하였다(냉장보관).

사전배양조건 부여가 효모균의 활성에 미치는 영향을 검정하기 위한 배지조성은 다음과 같이 준비하였다. 즉, 우선 물 600g에 설탕 60g을 용해시킨 10% Sucrose용액을 제조한 후 여기에 제형별 준비된 상업효모 및 개발효모를 각각 40g 혼합하고 이를 0시간(최초), 3시간 및 6시간동안 배양하였다. 이때 배양조건으로 온도는 25℃, 수분은 50%로 조절하였다.

전체 실험구는 대조구로서 상업효모(압착형) 및 상업효모(건조형) 그리고 시험구로서는 개발효모(압착형) 및 개발효모처리구(분말형)로 4개 시험구로 설정하였다.

결과도출은 시험구별 배양시간이 경과시 배양액을 분취 및 이를 PDA에 도말 후 배양을 실시하였으며, 관측되는 효모균 콜로니수를 계측하여 제빵적용시 최적발효율에 관련되는 시간을 결정코 저 하였다.

3. 연구결과

가. 시간경과별 균수변화조사 결과로서, 초기균수 대비 전체시험구의 균수 감소경향은 보이지 않았으며, 시간 경과에 따라 동일한 성장패턴을 보였다(Table 1).

나. 사전배양과정(5% sucrose)을 통한 효모활성증가 효과는 인정되었으며, 이는 초기균수 조절만 정확하다면 뚜렷한 사전발효(활성) 조건을 불필요함이 확인되었다. 즉, 기준치 이상의 효모를 첨가하는 조건에서(1.5×10^{10} cfu/g이상) 제빵 발효율 확보를 위한 사전활성유도 전처리는 필요치 않는 것으로 조사되었다.

다. 개발 건조효모의 초기균수가 적게 투여되는 경우, 3간 이상의 사전배양시 제빵 제조시 발효율이 확보될 것으로 판단되었다.

라. 결론으로서, 압착형 효모는 사전효모활성유도과정 없이 제빵발효율이 확보될 것으로 판단되었으며, 건조효모는 사전배양(3시간 이상)을 통한 효모활성유도 과정이 필요할 것으로 조사되었다.

Table 1 . 상업효모 대비 개발효모 제형별(압착형 및 건조형)의 시간별 차이를 부여한 사전배양(10% Sucrose) 평가를 통한 제빵발효율 관련 최적 효모균수 확인결과

효모종류	Sucrose배양액내 접종효모의 시간경과별균수변화 확인결과 (cfu/ml)			비고
	0hr(접종직후)	3hr	6hr	
상업효모 (압착형)	1.0×10^{10}	1.4×10^{10}	2.7×10^{10}	Jenico사(한국)
상업효모 (건조분말형)	2.7×10^{10}	4.3×10^{11}	NT	Lesaffe사(프랑스)
개발효 (압착형)	1.8×10^{10}	1.8×10^{10}	1.1×10^{11}	
개발효모 (건조분말형)	2.6×10^8	1.1×10^{10}	7.2×10^{10}	

NT : Not Testing

제 3 절 개발효모 제빵적용성 평가

(3-3 : 순수분리효모 적용 천연특화제빵 적용성 평가)

1. 연구목적

예비실험에서 상업효모 대비 개발효모의 동일한 효모균수 적용 제빵제조시 발효율은 80%수준 이하였으며, 이를 해결하고 저 제빵적용형 효모활성부여 관련 검정을 실시하여 보았더니 제빵발효와 관련한 최저 효모균수는 1.5×10^{10} cfu/g ~ 1×10^{11} Cfu/g) 범위였다. 즉, 이를 충족하지 못하는 경우는 사전 배양시간을 3시간 이상 적용하여야 함을 알 수 있었다. 따라서, 예비결과를 실제 제빵 제조에 적용하므로써 관련 메카니즘(효모활성과 관련 당류소모 및 제빵발효 연계성 파악) 재확인과 동시에 개발효모에 대한 제형별 제빵 제조 레시피를 정립코져 하였다.

2. 연구수행방법

연구간 공시효모균은 상업용 및 개발효모를 대상으로 제형별로 구분하여 사용하였다. 즉, 상업효모는 압착형 [Jenico사(한국), 수분 70%] 과 건조분말형 (Jenico사, 한국)으로 구분 구입하여 대조구로 사용하였으며, 시험구는 개발효모 (*S. cerevisiae* JKK100902)는 압착형(수분:74%)과 분말형(동결건조) 완제품을 사용하였다.

제빵제조 레시피에 적용된 개량제는 S 500(퓨리토스코리아, 한국)를 구입하여 사용하였다. 또한, 시험간 사용한 효모재료는 구입(상업효모) 및 생산(개발효모) 후 7일 이내에 사용하는 것을 원칙으로 하였다(냉장보관).

전체실험구는 대조구로서 상업효모(압착형) 및 상업효모(건조형) 그리고 시험구로서는 개발효모(압착형) 및 개발효모처리구(분말형)로 4개 시험구로 설정하였다.

첫 번째 준비단계인 제형별 상업 및 개발효모균의 사전활성유도를 위한 배지조성은 다음과 같이 준비하였다. 즉, 우선 물 600g에 설탕 60g을 용해시킨 10% Sucrose용액을 3반복으로 제조한 후 여기에 제형별 준비된 상업효모 및 개발효모를 각각 40g 혼합하고 이를 0시간(최초), 3시간 및 6시간동안 배양하였다. 이때 배양조건으로 온도는 25℃, 수분은 50%로 조절하였다.

두 번째 단계로서, 배양시간이 경과하면 이중 1개조씩을 꺼내 제빵제조를 위한 반죽에 사용하였다. 본 연구간 제빵 제조 레시피는 일단 상업효모 적용 제빵제조 레시피에 준하여 실시하였다 [강력분 1kg+물 600g+설탕 60g+소금 20g+버터 80g+개량제(S 500) 10g+효모 40g].

결과도출은 시험구별 배양시간이 경과시 배양액을 분취 및 이를 PDA에 도말 후 배양하고 관측되는 효모균 콜로니수를 계측하였는데, 이를 사용한 반죽 및 숙성과정을 거쳐 최종 제빵제조 전단계까지 동일하게 적용하였다.

제빵제조 발효율에 미치는 결과 확인을 위하여, 시험구별 제조된 제빵의 높이(mm, Y축), oven jumping(mm), 폭(mm, X축), 폭(mm, Z축) 및 발효율(상업효모 대비, %)을 계측 비교하였다.

그리고, 시험구별 특화성(풍미)에 미치는 효과 검정을 위하여, 시험구별 제조제빵의 샘플을 채취 후 6종 당류분석(Maltose, Fructose, Sucrose, Glucose, Galactose 및 Lactose) 및 풍미관련 이화학적 조사를 실시하였다(Table 6). 효모의 먹이원 이용성과 관련한 당류분석은 식품공전(제10 일반시험법, 5)탄수화물, 2009)에 준하여 실시하였으며, 풍미 성분분석은 GC-MS시스템을 이용하여 분석하였다(Table 1).

3. 연구결과

순수분리 개발효모를 기준 제형별 적용성, 제빵제조 제시피 정립 및 제형별 풍미에 미치는 조사는 다음과 같이 실시하였다.

- 1) 최적 제빵발효효율 보장과 관련한 효모수치는 역시 1.5×10^{10} cfu/g 이상이었다(Fig 1, Table 3).
- 2) 개발효모의 제빵제조에 따른 발효율 검정(상업효모 대비)결과, 개발압착효모는 100% 이상, 개발건조효모는 65~95% 이내의 발효율을 나타내었다. 이는 개발효모는 제빵발효율을 보장할 수 있는 사전발효(활성)조건에 대한 추가검정이 필요하다 판단되었다(Fig 2, Table 3~4).
- 3) 제형별 효모의 먹이원 활용 및 이의 풍미관련성을 연계하여 살펴보았더니, 제형별 구분없이(압착형 및 분말형) 3시간 이내에 100% Sucrose를 먹이원으로 소모하였고(Table 6), 제빵제조시 대부분 알콜류 기원 풍미를 나타내는 것으로 조사되었다. 또한, 효모제형별 비교결과, 전체적으로 시간이 경과하면 알콜성 풍미수치가 높아졌으며, 압착효모가 먹이이용성과 더불어 풍미발현성도 높게 나타나는 것으로 조사되었다(Fig 3, Table 5).
- 4) 제형별 구분 상업효모 대비 시간경과별 풍미발현 효과를 보사하여 보았다(Fig 3, Table 5).
 - 가) 순수효모는 풍미(특화성)에 미치는 효과는 없었다.
 - 나) 압착효모는 최초(상업효모 : 1,986, 개발효모 : 1,689 기준) 대비 3시간 경과시 상업효모는 1.8배, 6시간이 경과시는 1.7배로 나타났으나, 개발효모는 1.7배에서 3.4배로 유의한 증가수치를 보였다.
 - 다) 개발효모는 최초(상업효모 : 1,615, 개발효모 : 910 기준) 대비 3시간 경과시 상업효모는 1.6배 1.78배, 6시간이 경과시는 3.5배로 나타났으며, 개발효모 또한 1.71배에서 2.4배로 유의한 증가수치를 보였다.
 - 라) 전체 향기성분중 알콜류 점유비율 조사결과, 압착형은 71~약90%범위를 분말형은 59~82%범위를 보여 제형에 관계없이 높은 점유율을 보였다(Fig 2, Table 5).
 - 마) 효모균수 증감 및 시간별 먹이원 이용성과 제빵발효율 연계성 평가 : 동일 연계성을 갖는 것으로 판단되었다(Fig 2, Table 3-6).
- 5) 순수분리 제형별 효모의 제빵제조 제시피 정립 결과로서, 상용효모 제조제조법과 동일하게 정립됨으로서 소비자 사용시 편리성이 확보되었다(Table 6).
 - 제조 레시피 : 강력분 1kg+물 600g+설탕 60g+소금 20g+버터 80g+개량제(S 500) 10g+효모 40g

Table 1. 향기분석 적용 시스템 및 운영조건

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

Table 2. 제형별 적용성 및 제빵제조 제시피 정립을 위한 시험디자인

시험항목	사전배양(활력유도) 후 제빵적용성 평가(발효율 최적화)를 위한 시험디자인 내역			
	상업효모(대조, Jenico사)		개발효모(JKK100902)	
	압착형	건조분말형	압착형	건조분말형
적용제빵제조 Recipe	강력분 1kg+물 600g+설탕 60g+소금 20g+버터 80g+개량제 (S 500)10g+Jenico상업효모 40g(수분함유량:70%)	강력분 1kg+물 600g+설탕 60g+소금 20g+버터 80g+개량제 (S 500)10g+Jenico효모 40g	강력분 1kg+물 600g+설탕 60g+소금 20g+버터 80g+개량제 (S 500)10g+개발효모 40g (수분함유량:74%)	강력분 1kg+물 600g+설탕 60g+소금 20g+버터 80g+개량제 (S500)10g+개발효모 40g
사전효모활력부여조건	10% (w/w) Sucrose용액 조성+효모 접종 (4.1×10^9 cfu/g)	10% (w/w) Sucrose용액 조성+효모 접종 (1.0×10^{10} cfu/g)	10% (w/w) Sucrose용액 조성+효모 접종 (7.4×10^{10} cfu/g)	10% (w/w) Sucrose용액 조성+효모 접종 (1.0×10^{10} cfu/g)
사전 활력부여시간	0시간, 3시간 및 6시간 경과시반죽 적용			
제빵적용성 평가 (숙성조건: 온도/습도/시간)	1차발효	25℃/ 50%/ 90분		
	중간발효	실온/20~30%/20분		
	2차발효	40℃/80%/ 45분		
제빵적용성 평가 (굽기: 온도, 분)	160(오븐상층)/180℃(오븐하층), 35분			

Table 3. 압착형(수분 70~74%) 및 건조형 상업효모(Jenico사) 대비 개발효모(*S. cerevisiae* JKK091002)의 시간 차이를 부여하여 사전배양 (10% Sucrose, w/w) 및 이를 적용한 반죽 후 숙성단계별 효모균수(PDA, 25°C) 및 제빵 발효율에 미치는 효과조사 결과

효모처리구		사전효모배양액 혼합반죽후 숙성단계별 균수변화(cfu/g)					제빵 발효율(%)
효모종류	숙성 시간(hr)	초기균수	반죽	1차	중간	2차	
상업효모 (압착형)	0	1.0x10 ¹⁰	2.4x10 ¹⁰	NT	1.7x10 ⁹	1.5x10 ⁹	100(기준)
	3	1.4x10 ¹⁰	2.7x10 ⁹	5.1x10 ⁹	3.6x10 ⁹	6.4x10 ⁹	100(기준)
	6	2.7x10 ¹⁰	2.9x10 ⁹	1.5x10 ¹⁰	2.5x10 ⁹	7.2x10 ⁹	100(기준)
상업효모 (건조형)	0	2.7x10 ¹⁰	2.6x10 ⁹	7.8x10 ⁹	NT	5.8x10 ⁹	100(기준)
	3	1.0x10 ¹⁰	2.7x10 ⁹	3.2x10 ⁸	2.0x10 ⁷	1.5x10 ⁹	100(기준)
	6	1.0x10 ¹⁰	3.0x10 ⁸	NT	1.0x10 ⁷	9.8x10 ⁹	100(기준)
개발효모 (압착형)	0	1.8x10 ¹⁰	7.0x10 ⁹	1.2x10 ¹⁰	5.0x10 ⁹	NT	94.3
	3	1.8x10 ¹⁰	2.8x10 ⁹	1.1x10 ⁹	1.1x10 ¹⁰	7.2x10 ⁹	110.5
	6	1.1x10 ¹⁰	5.7x10 ⁹	9.6x10 ⁹	1.1x10 ⁹	1.1x10 ¹⁰	96.0
개발효모 (건조형)	0	2.6x10 ¹⁰	2.2x10 ⁸	3.0x10 ⁸	NT	5.8x10 ⁸	64.8
	3	1.1x10 ¹⁰	2.2x10 ¹⁰	2.5x10 ⁹	9.0x10 ⁸	NT	75.5
	6	7.2x10 ¹⁰	2.9x10 ⁸	3.4x10 ⁸	1.3x10 ⁹	1.4x10 ¹⁰	91.8
	11	2.1x10 ¹⁰	7.0x10 ⁸	3.8x10 ⁹	4.0x10 ⁷	2.3x10 ⁹	92.2

숙성시간 : 10% Sucrose용액 조성(Sucrose 60g+멸균수 600g)후 효모 40g첨가후 25°C (수분 : 50%) 시험조건별 배양시간 부여, 초기균수 : 10% Sucrose배양액내 초기효모균
 NT : Not Testing

Table 4. 압착형(수분 70~74%) 및 건조형 상업효모(Jenico사) 대비 개발효모(JKK091002)의 시간차이를 부여하여 사전배양 (10% Sucrose, w/w) 및 이를 적용한 제빵 적용성 평가 결과

효모처리구		사전효모배양액 혼합반죽후제빵발효특성에 미치는 효과				제빵 발효율(%)
효모종류	숙성 시간(hr)	높이 (mm,Y축)	Oven Jumping(mm)	폭 (mm,X축)	폭 (Cm,Z축)	
상업효모 (압착형)	0	131.32	48.85	84.37	185	100(기준)
	3	118.07	35.16	86.59	195	100(기준)
	6	115.47	35.09	86.62	195	100(기준)
상업효모 (건조형)	0	116.28	34.54	91.60	190	100(기준)
	3	113.47	38.24	94.31	195	100(기준)
	6	105.03	26.94	86.54	195	100(기준)
개발효모 (압착형)	0	123.79	47.49	84.20	195	94.3
	3	130.47	40.67	84.37	195	110.5
	6	111.72	37.63	85.07	195	96.0
개발효모 (건조형)	0	75.40	21.81	85.05	195	64.8
	3	85.65	20.7	85.60	195	75.5
	6	96.41	25.19	85.82	195	91.8

제빵발효율(%) : (제형별 상용효모 적용 제빵 높이 / 개발효모 적용 제빵 높이) x 100

Table 5 . 상업효모 대비 개발효모의 제형 및 사전배양 시간차이가 제빵풍미에 미치는효과 비교 (단위 : Areax1000)

분류	성분명	상업효모 대비 개발효모의 제형 및 사전배양 시간차이가 제빵 풍미에 미치는효과 비교											
		압착형 효모						건조분말형 효모					
		사전발효 (0hr)		사전발효 (3hr)		사전발효 (6hr)		사전발효 (0hr)		사전발효 (3hr)		사전발효 (6hr)	
		상업	개발	상업	개발	상업	개발	상업	개발	상업	개발	상업	개발
Alcohols	ethanol	1,986	1,696	3,543	2,941	3,502	5,792	1,615	910	2,545	1,552	5,623	2,199
	isobutanol	18	25	29	57	28	61	54	25	52	96	99	102
	2-methyl-1-butanol	18	12	45	28	43	48	164	15	58	17	128	18
	3-methyl-1-butanol	190	74	263	218	271	233	205	64	241	174	257	196
	1-hexanol	1	2	1	0	1	3	1	24	1	7	15	1
	nonanol	3	6	2	2	1	2	4	5	2	3	2	2
	phenyl ethyl alcohol	387	24	449	120	459	110	166	16	152	120	196	191
Aldehydes	hexanal	7	14	8	6	5	18	16	25	10	8	13	10
	benzaldehyde	25	24	39	25	41	42	23	12	28	23	33	34
Carboxylic acid	acetic acid	23	53	6	31	7	63	48	40	53	41	142	52
	isobutyric acid	11	27	14	23	13	25	57	55	56	72	78	63
	butanoic acid	4	5	11	4	8	4	10	8	5	7	10	7
	hexanoic acid	7	29	12	23	12	24	53	70	40	66	52	57
	octanoic acid	13	8	16	7	12	3	8	19	5	11	6	9
Esters	2-pentylfuran	4	8	4	6	4	1	11	7	7	7	2	6
	ethylcaproate	9	6	15	11	15	9	6	2	9	5	11	7
	ethyl octanoate	25	8	40	28	42	20	14	2	18	5	20	9
	ethyl decanoate	4	1	13	7	14	4	2	0	2	1	3	2
Ketones	acetoin	38	57	2	9	4	38	72	71	60	483	140	758
SUM		2,774	2,077	4,512	3,547	4,482	6,501	2,529	1,369	3,343	2,699	2,945	3,724

Table 6. 상업효모(Jenico사) 대비 개발효모(JKK091002)의 제빵제조후 당류분석(HPLC)을 통한 발효특성 평가(풍미변화 연계)

시험구		효모의 사전배양 시간별 당류변화 검정(%)						제빵 발효율(%)
효모종류	숙성시간(hr)	Maltose	Fructose	Sucrose	Glucose	Galactose	Lactose	
최초투여량(%)		0	0	10	0	0	0	
상업효모 (압착형)	0	6.34	1.05	ND	ND	ND	ND	100(기준)
	3	2.54	ND	ND	ND	ND	ND	100(기준)
	6	2.54	ND	ND	ND	ND	ND	100(기준)
상업효모 (건조형)	0	7.02	2.38	ND	ND	ND	ND	100(기준)
	3	NT	NT	ND	ND	ND	ND	100(기준)
	6	6.77	1.33	ND	ND	ND	ND	100(기준)
개발효모 (압착형)	0	7.86	2.7	ND	ND	ND	ND	94.3
	3	8.06	ND	ND	ND	ND	ND	110.5
	6	6.97	ND	ND	ND	ND	ND	96.0
개발효모 (건조형)	0	6.04	2.93	ND	ND	ND	ND	64.8
	3	6.31	2.62	ND	ND	ND	ND	75.5
	6	5.69	1.84	ND	ND	ND	ND	91.8

NT : Not Testing , ND : Not Detecting

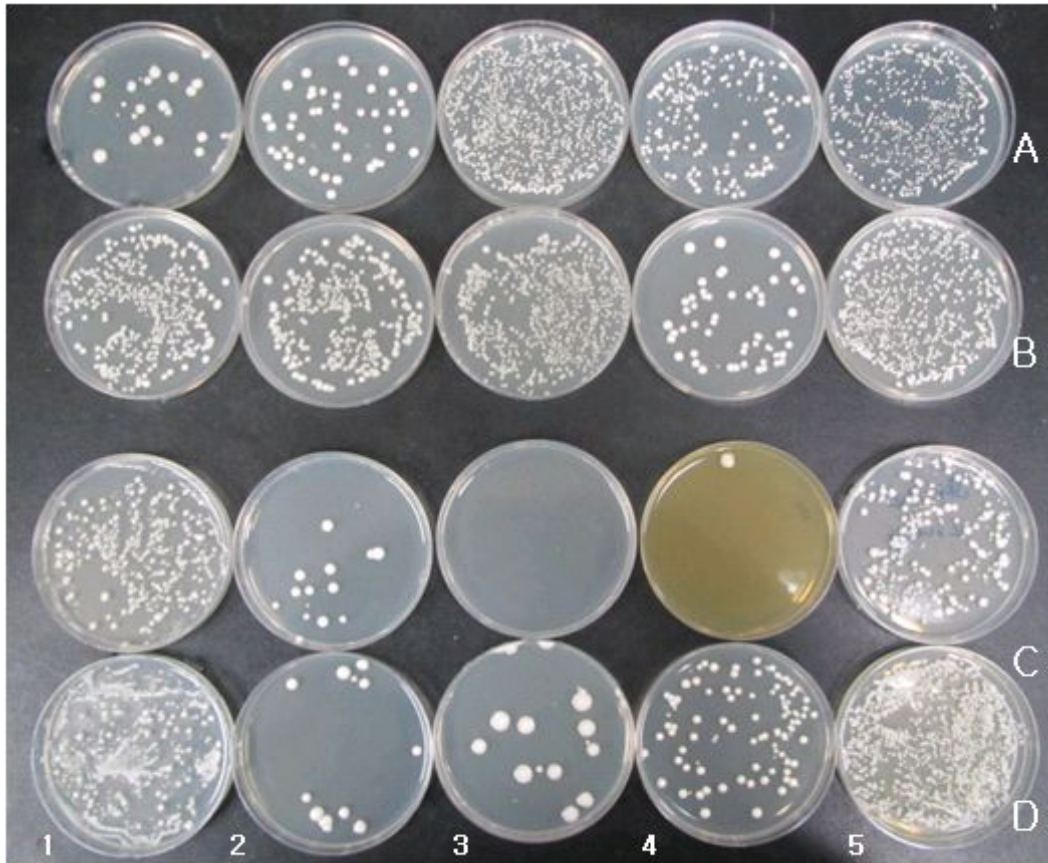


Fig 1 . 압착형(수분 70~74%) 및 건조형 상업효모(Jenico사) 대비 개발효모 (JKK091002)의 시간차이를 부여하여 사전배양(10% Sucrose, w/w, 6시간 배양) 및 이를 적용한 반죽 후 숙성단계별 효모균수(PDA, 25℃) 및 제빵 발효율에 미치는 효과조사

A: 상업효모(압착형), B:개발효모(압착형), C:상업효모(건조분말형), D:개발효모(건조분말형), 1:초기효모균수(in 10% sucrose Sol. 6시간 배양후), 2:반죽, 3: 1차숙성, 4:중간발효, 5 : 2차발효

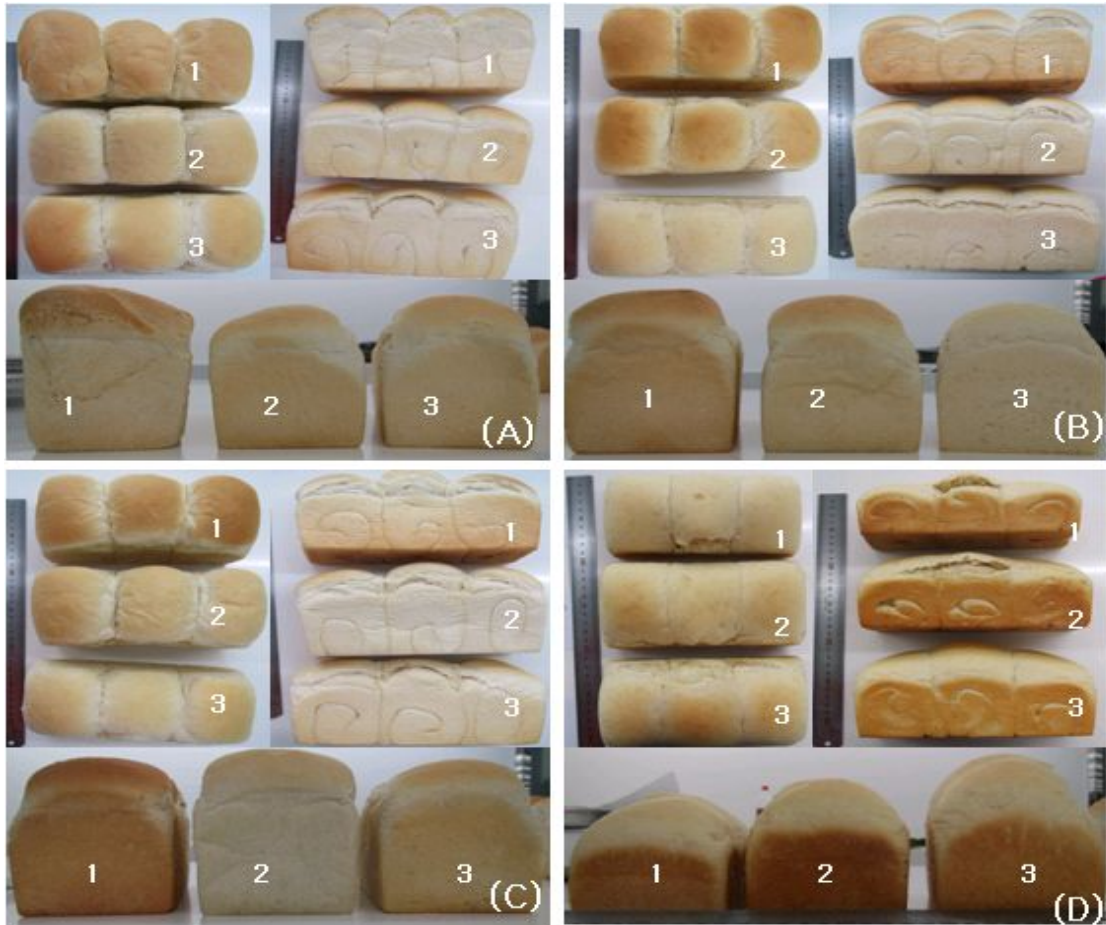


Fig 2. 압착형(수분 70~74%) 및 건조형 상업효모(Jenico사) 대비 개발효모(JKK091002)의 시간차이를 부여하여 사전배양 (10% Sucrose, w/w) 및 이를 적용한 제빵 적용성 평가(외형)결과.

(A)상업효모(압착형), (B):상업효모(건조형), (C): 개발효모(압착형), (D) : 개발효모(건조분말형), 1: 효모 0시간 사전배양, 2: 효모 3시간 사전배양, 3: 효모 6시간 사전배양

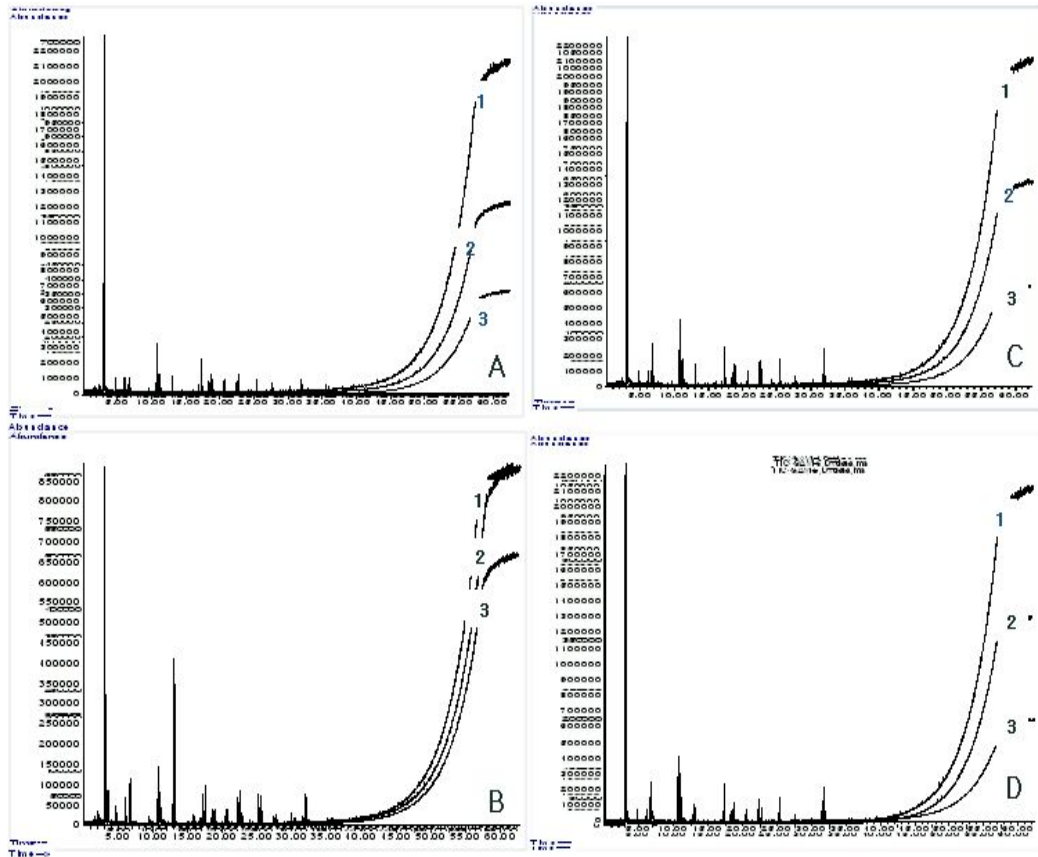


Fig 3. 상업효모 대비 개발효모의 제형 및 사전 배양시간 차이가 제빵 풍미에 미치는 효과 비교

A : 상업효모(압착형), B:개발효모(압착형), C:상업효모(건조형), D:개발효모(건조형), 1: 사전발효 부여시간(0hr), 2: 사전발효 부여시간(3hr), 3:사전발효 부여시간(6h)

제 4 절 천연특화제빵제조 레시피 정립

1. 연구목적

‘3-4절. 순수분리 개발효모만을 대상으로 제형별 천연특화제빵 적용성 평가’를 실시 결과, 순수분리 효모는 특화성을 갖는 풍미를 형성하지 못함을 알 수 있었다.

제형별 효모의 먹이원 활용 및 이의 풍미관련성을 연계하여 살펴보았더니, 상업효모 대비 제형별 뚜렷한 차이가 인정되지 않았다. 또한, 먹이원 대비 이의 효모 이용성과 제빵제조시 풍미성분 발현과의 연계하여 분석하여 본 결과, 대부분 알콜류 기원 풍미성분임을 확인할 수 있었다.

따라서, 본 연구에서는 과일(거봉) 발효배지를 조성 및 제빵제조에 적용 시, “천연특화제빵”의 핵심인 풍미성을 나타낼 수 있을 것이라 판단되어 실시 및 결과물을 도출코저 하였다. 최종적으로 결과가 도출시 “천연특화제빵 제조관련 레시피”로 정립하고 저 하였다.

2. 연구수행방법

가. 과일발효배지 첨가형 레시피 정립연구

본 연구간 대조효모로서는 상업효모(Jenico사, 한국)을 구입 사용하였으며, 시험구는 거봉발효배지를 준비하여 이를 시험간 사용하였다.

과일발효배지 제조용 거봉포도(하초 거봉, *Vitis labruscana* cv. “Kyoho”)는 유기농 농산물 생산단체인 한들영농법인(한국)에서 구입하여 사용하였다.

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

거봉배지가 발효과정이 완료된 시점인 48시간이 경과 시, 효모균수 검정을 통하여 $1 \times 10^7 \sim 1 \times 10^{10}$ cfu/ml 범위를 나타낼 때 제빵제조에 적용하였다. 시험간 적용제빵은 유럽빵 종류중 “르방”을 제조하였는데, 상업효모를 적용 제조 레시피에 준하여 실시하였다(Fig 1, Fig 3, Table 3).

과일발효배지 첨가에 따른 제빵의 특화성 결과는 전문 교육을 이수한 관능평가 패널(n=12명) 검정을 통하여 비교하였다(Table 4).

이를 위한 관능평가 주요항목은 냄새[1)냄새의 이미이취 정도, 2)냄새의 선호도 구분], 조직감[1) 표면의 바삭한 느낌정도, 2) 안의 부드러움정도, 3) 조직감의 선호도로 구분] 및 맛[1) 신맛의 정도, 2) 이미,이취.정도, 3) 전체적인 선호도로 구분]으로 3항 및 8세부항목으로 구분하여 실시하였다.

또한, 상업효모 대비 개발효모의 적용성 평가에 따른 기호성은 SAS program(버전 8.20)을 이용하여 통계분석을 실시하였는데, 이때 유의성 차이는 95%수준($P < 0.05$)에서 ANOVA test 후 Duncan's multiple range test에 의해 검증하였다.

특화성(풍미 등)과 관련하여 과일발효배지 조성 후 배양일정별(0일, 24시간, 48시

간 및 72시간)로 구분 분취한 배양액내 5종 당류분석(Fructose, Sucrose, Glucose, Galactose 및 Lactose) 및 8종 유기산(Tartaric acid, Malic acid, Lactic acid, Oxalic acid, Citric acid, Succinic acid, Formic acid 및 Acetic acid) 변화를 비교 하였다(Table 1, Table 2).

이를 위하여 효모의 먹이원 이용성과 관련한 당류와 유기산 분석을 병행 실시하였는데, 이중 당류분석은 식품공전(제10 일반시험법, 5)탄수화물, 2009)에 준하여 실시하였다.

유기산 분석은 HPLC시스템을 그리고 분석간 사용한 컬럼은 Aminex컬럼, Flow ratio는 1.0ml/min., 그리고 컬럼 온도는 30℃로 설정한 후, UV Detector(210nm)에서 10mM H₂SO₄을 이동상으로 하여 분석을 실시하였다. 배양단계별 유기산 및 당류의 변화를 비교검정하기 위한 대조구로서는 콩코드 적포도 액기스(64Brix)를 구입 이를 9,4brix로 희석하고 이를 비교하였다(Fig 2, Table 1~2).

최종 배양단계별 먹이원의 증감변화 양상과 이화학적 분석결과를 기준으로 제빵 제조후 분취시료에서 풍미분석 일련되게 실시하였는데, 이는 이들의 연계성 판단을 위함이었다. 풍미분석을 위하여는 GC-MS시스템으로 분석하였으며, 분석조건은 결과 3-3절(Table 1)에 제시하였다(Fig 4, Table 5).

나. 과일액기스 첨가형 레시피 정립연구

본 연구는 과일발효배지를 적용한 천연특화제빵 제조법 정립결과를 기준으로 순수 효모와 여기에 Fructose와 Tartaric acid함유량이 높은 것으로 알려진 순수과일액기스를 구입 및 제빵적용평가와 관련특화성을 확인 및 평가를 위하여 실시하였다.

연구간 사용한 효모제형은 압착형만을 대상으로 검정하였으며, 이때 구입 사용한 상업효모는 Jenico사(한국, 70%)를, 시험구로서 개발효모(*S. cerevisiae*JKK100902)는 압착형(수분 : 74%)완제품을 사용하였다.

전체시험간 사용효모재료는 구입(상업효모) 및 생산(개발효모)후 7일 이내에 사용하는 것을 원칙으로 하였다(냉장보관).

제빵적용성 평가를 위한 시험은 식빵을 대상으로 정였으며, 반죽, 숙성 및 굽기 등 기본 제조레시피는 상업효모에 준하여 실시하였으나, 다만 시험구는 선발된 백포도 및 적포도 과일액기스를 첨가하는 조건만을 다르게 하였다.

전체 실험구는 대조구로서 상업효모(과일액기스 무첨가) 및 개발효모(과일액기스 무첨가)구로서 정하였고, 시험구로서는 상업효모(백포도 과일액기스 첨가) 및 개발효모(백포도 과일액기스 첨가) 그리고 상업효모(적포도 과일액기스 첨가) 및 개발효모(적포도 과일액기스 첨가)구로 하여 총 6개 시험구로 설정하였다.

선발 과일액기스는 당도 68Brix인 농축 백포도액기스(ATACAMA사, 칠레)와 동일농도 및 당도를 가지고 있는 농축 적포도액기스(ATACAMA사, 칠레)를 구입하여 이를 시험간 사용하였다.

과일액기스 조성은 구입 과일원액 원료(68Brix 기준)를 제빵제조용 물에 10%(w/w)되게 첨가하는 것으로 하였다.

제빵제조 레시피 조성을 위하여, 우선 물 600g과 농축과일액기스를 30g을 희석한 용액을 준비하고, 강력분 1kg과 설탕 60g, 소금 20g, 무염버터 80g, 개량제 10g

및 압착효모 40g을 혼합 반죽, 숙성 및 굽기과정을 상업효모 적용레시피와 동일하게 진행하였다.

결과도출은 시험구별 배양시간이 경과시 배양액을 분취 및 이를 PDA에 도말 후 배양하고 관측되는 효모균 콜로니수를 계측하였는데, 이를 사용한 반죽 및 숙성과정을 거쳐 최종 제빵제조 전단계까지 동일하게 적용하였다.

제빵제조 발효율에 미치는 결과 확인을 위하여, 시험구별 제조된 제빵의 높이(mm, Y축), oven jumping(mm), 폭(mm, X축), 폭(mm, Z축) 및 발효율(상용효모 대비, %)을 계측 비교하였다. 그리고, 시험구별 특화성(풍미)에 미치는 효과 검정을 위하여, 시험구별 제조제빵의 샘플을 채취 후 6종 당류분석(Maltose, Fructose, Sucrose, Glucose, Galactose 및 Lactose)을 실시하였다.

효모의 먹이원 이용성과 관련한 당류분석은 식품공전(제10 일반시험법, 5)탄수화물, 2009)에 준하여 실시하였으며, 풍미 성분분석은 GC-MS시스템을 이용하여 분석하였다(3-3절의 Table 1 참조).

3. 연구결과

가. 과일발효배지 첨가형 천연특화제빵 제조 레시피 정립연구

- 1) 천연발효빵과 관련하여 주요향기 성분은 Furfural(35%)과 알콜류(18%)로 대별되었다(Fig 4, Table 5).
- 2) 특화빵과 관련한 주요향기(Maillard반응)는 카라멜향, 캔디향 및 아몬드향으로 이를 발현하는 물질은 Furfural였다(Fig 4, Table 5).
- 3) 상업효모 대비(100기준) 주분포 성분인 Furfural과 알콜류의 증감결과를 비교하여 보았더니, Furfural성분은 약 28배가 증가 되었는데, ethanol류는 오히려 약 48%가 감소하는 것으로 조사되었다. 따라서, 과일발효배지는 특화제빵 제조와 관련한 풍미성 발현에 최적방법임을 알 수 있었다(Fig 4, Table 5).
- 4) 과일배지 발효단계별 당류의 먹이이용성이 풍미와 관련됨에 따라 이의 증감효과를 검정하였다(Table 2). 발효배지 조성후 발효 후 24시간이내에 첨가된 Sucrose는 100% 먹이원으로 활용되었으며, 이에 따라 발효전 45,000ppm의 수치를 보였던 Glucose는 미생물 먹이원으로 이용에 따라 점차적으로 감소하는 경향과 균형성을 유지(72시간 경과시 34,984ppm)하면서 효모발효가 진행되는 것으로 조사되었다.
- 5) 과일발효배지를 이용한 천연특화제빵 메카니즘 정립결과는 다음과 같다.
최적 과일배지의 발효조건은 48시간~ 72시간 이내였으며, 이때 배지내 존재하는 효모량($1 \times 10^7 \sim 1 \times 10^{10}$ cfu/ml), 당류(Glucose : 57,000ppm ~ 35,000ppm) 및 과일유래 유기산(Tartaric acid : 1,800 ~ 2,000ppm)는 제빵 발효시 효모의 활성을 극대화 함으로서 발효율과 Glucose 및 Tartaric acid로 인한 특화성(풍미)를 증가시키고 특화빵 특유의 조직감 맛을 창출한 것으로 결론을 얻었다(Fig 1~4, Table 1~5).
- 6) 연구결과를 토대로 특화성(풍미)발현을 위한 배지조성법은, 10% Sucrose용액 대비 10%(w/w)과일첨가 후 및 72시간 발효(25~30℃, 습도 50%)조건으로 정

립하였다.

7) 과일발효배지 첨가형 레시피는 다음과 같이 정립되었다.

가) 과일발효배지 조성 레시피 : 100% Sucrose용액 대비 10%(w/w)과일첨가 후 및 72시간 발효(25~30℃, 습도 50%)

나) 제빵제조레시피 : 강력분 1kg+과일발효배지 600g+설탕 60g+소금 20g+무염버터 80g+개량제+압착형 효모 40g(수분함유량:70~74%)

8) 상업효모 대비 개발효모의 제빵제조후 특화성 평가결과는 다음과 같다.

가) 냄새와 관련 디아세틸 및 이소부틸산 발생으로 인한 상업효모의 특유 이미 및 이취는 과일발효 배지적용에 의하여 감소하는 하는 경향을 보였으나, 유의성은 인정되지 않았다(Fig 4, Table 5).

나) 맛에 미치는 결과를 살펴보았더니, 상업효모에 의한 신맛은 약 34%, 이미/이취는 18%가 감소하는 것으로 조사되었고, 전체적인 맛에 대한 선호도는 13%가 증가하는 경향을 보임으로서 과일발효배지 적용시 천연특화제빵제조가 가능한 것으로 나타났다(P<0.05, Table 4, Fig 3.). 그러나, 전체적인 선호도는 차이가 안정되지 않았는데, 이는 상업효모에 대한 장기적인 식습관이 적응되었음에 따라 신규한 천연발효빵에 대한 미적응으로 인한 결과인 것으로 파악되었다(P<0.05),

다) 조직감과 관련 하며 개발효모 적용성 평가에서, 표면의 바삭한 정도는 약5%, 안의 부드러움은 약 17% 그리고 조직감의 선호도는 전반적으로 증가하는 경향(P<0.05)을 보였는데, 이는 천연특화빵의 특성이 조직을 질기고 딱딱하게 하는 특성에 따른 결과라고 할 수 있었다(P<0.05, Table 4, Fig 1,~3.).

라) 상업효모를 적용 제조한 르방빵의 내부조직(성상)은 고르게 나타났으나, 과일발효배지 적용 르방빵의 내부조직은 기공이 크고 불균형성을 보이는 특징을 보이는 것으로 조사되었는데, 아마도 사전발효과정에서 활성이 극대화 된 효모의 먹이원 이용성의 증대와 이로 인한 CO2가스발생량도 증가함에 따른 이유인 것으로 판단되었다(P<0.05, Fig 1, Fig 3).

나. 과일엑기스 첨가형 천연특화제빵 제조 레시피 정립연구

압착효모를 적용한 특화성 부여 제빵제조 레시피 정립결과는 다음과 같다.

1) 천연특화성이 발현되는 제빵제조 기본 레시피는 상업효모 적용 제빵제조 레시피에 준하게 정립함으로써 소비자 편리성을 확보하였다.

2) 제빵제조시 발효율 확보를 위한 최적 효모균수는 중요한 변수임이 확인되었다. 즉, 효모균수 2.2×10^{10} cfu/g 첨가시 제빵 발효율(상업효모 대비)은 약 102%였는데, 이보다 적은 2.0×10^{10} cfu/g를 사용한 경우는 98.8%, 1.8×10^{10} cfu/g는 94.3%로 제빵 발효율은 감소하는 것으로 확인되었다(Fig 5~6, Table 6~7),

3) 천연발효빵과 관련하여 주요향기 성분은 Furfural과 알콜류로 대별되었음을 기준으로 과일엑기스 적용 제빵제조후 Furfural는 검출되지 않았으며 알콜(ethanol)의 생성이 급격하게 증가하였다.

4) 적포도 및 백포도 엑기스 첨가에 따른 조직감 및 풍미성분(알콜류) 증가에 미치는 결과는 다음과 같다.

- 가) 전체향기성분량 증가에 있어 대조 상업효모(2,774 기준) 및 개발효모(2,077 기준) 적포도 엑기스 첨가시, 상업효모는 1.85배 증가량을 보였는데 개발효모의 경우는 3.5배가 증가하는 것으로 조사되었는데, 백포도 엑기스 첨가군의 경우도 유사한 결과를 보였다
- 나) 조직감은 매우 부드럽게 형성되는 특성을 보였다.
- 다) 특화성(풍미 : 카라멜향, 캔디향 및 아몬드향)에 관여하는 인자가 유기산 (Tataric acid), Glucose가 주인자임을 기준으로 비교할때, 소량의 과일엑기스는 풍미발현에 효과를 인정할 수 없었다. 또한, 풍미발현 관련 당류인 Fructose는 과일엑기스 첨가가 소량이었던 점을 감안하면 풍미발현에 영향을 미치지 못하였음을 알 수 있었다(Fig 7, Table 8). 따라서, 추후 과일별 성분분석 검정을 기본으로 하여 사전발효조건 및 첨가량 조절 등을 통하여 세부정립예정이다.
- 5) 제빵제조후 당류의 먹이이용성이 결국 풍미와 관련됨에 따라 증감효과를 검정하였다(Table 7). 제빵제조시 첨가된 Sucrose는 반죽 및 숙성과정에서 100% 먹이원으로 활용되었으며, 관련한 당류인 Glucose, Galactose 및 Lactose는 검출되지 않아 먹이원으로 이용성이 높고 또한 발효율로 연계된 것으로 판단되었다. 그리고 Maltose는 먹이원으로 이용되지 않는 것으로 조사되었다.
- 6) 과일엑기스첨가형 레시피는 다음과 같이 정립되었다.
- 가) 배지조성레시피 : 과일원액 원료(68Brix 기준) 5~10% 희석 적용
- 나) 제빵제조레시피 : 강력분 1kg+(물 600g+68Brix 과일엑기스 30~60g)+설탕 60g+소금 20g+무염버터 80g+개량제+압착형 효모 40g(수분함유량:70~74%)
- 7) 식감(Soft) 증대형 제빵제조 레시피는 다음과 같이 정립하였다.
- 가) 배지조성레시피 : 과일원액 원료(68Brix 기준) 5~10% 희석 적용
- 나) 제빵제조레시피 : 강력분 1kg+(물 600g+68Brix 과일엑기스 30~60g)+설탕 60g+소금 20g+무염버터 80g+개량제+압착형 효모 40g(수분함유량:70~74%)

다. 결론

- 1) 천연특화제빵 제조 레시피는 다음과 같이 정립되었다.
- 가) 천연특화제빵 제조레시피는 식빵을 기준으로 정립되었다.
- 나) 천연특화제빵 제조시 건조분말형보다 압착형이 효과적이었다.
- 다) 순수분리효모는 특화성(풍미, 성상 및 식감 증대 등)에 영향을 주지 않았다.
- 라) 개발효모를 적용한 천연특화제빵 제조는, 과일발효배지 적용형과 과일엑기스 첨가형으로 구분하여 정립되었다.

특화 제빵레시피 항목	개발 효모 적용 특화 제빵 제조레시피내역	비고
천연특화제빵 발효율 확보 기초효모균수(cfu/g)	1.5x10 ¹⁰ 이상(PDA, 25℃, 24시간)	
천연특화제빵제조 Recipe	강력분 1kg+물 600g+설탕 60g+소금 20g+무염버터 80g+개량제(S 500)10g+압착형효모 40g(수분함유량:70~74%)	
풍미보장형 천연특화제빵 제조 Recipe	과일엑기스 첨가형	강력분 1kg+(물 600g+68Brix 과일엑기스 30~60g)+설탕 60g+소금 20g+무염버터 80g+개량제+압착형효모 40g(수분함유량:70~74%)
	과일배지 발효형	<ul style="list-style-type: none"> - 1단계(배지조성): 멸균수 300g+ 설탕 35g(백설탕, 황설탕, 삼양사)+선발 과일 400g첨가(첨가전마쇄공정 실시)-> 숙성(30℃, 48~72시간, 습도 85~90%) . 효모균수: x10⁷⁻¹⁰cfu/ml이상 - 2단계(중종레시피) : 강력분 500g+거봉(하초, 한들영농법인) 분쇄배양액(30±1℃, 72시간 배양) 325g+Sucrose 15g - 3단계(본반죽) : 강력분 1,000g+물 680g(물 500g+거봉배양액180g)+소금 1.8%(중종 강력분 500g+본반죽 강력분 1,000g기준 첨가량, %)+설탕 35g+버터 50g>
숙성조건 (온도/습도 /시간)	1차발효	25℃/ 50%/ 90분
	중간발효	실온/20~30%/20분
	2차발효>	40℃/80%/ 45분
굽기(온도, 분)	160(오븐상층)/180℃(오븐하층),35분	

2) 천연과일배지 적용형 천연특화제빵 제조 메카니즘은 다음과 같다.

가) 제빵제조 레시피는 상업효모적용과 기본적으로는 동일하게 정립되었다,

나) 최적 과일배지 발효조건은 48시간~72시간범위이고, 이때 1x10⁷~1x10¹⁰ cfu/ml범위의 천연효모량이 우점종으로 존재하면서 일반세균 및 곰팡이균 등은 소멸되었다.

다) 최적 과일배지 발효조건은 48시간~ 72시간범위에서 효모가 우점종으로 활동토록 먹이원으로 공급된 Sucrose 범위는 5~10%가 적절범위였다.

라) 특화성(풍미) 발현량 증대효과는, 발효시간이 경과하면서 존재하는 Glucose(

- 57,000ppm~35,000ppm) 및 과일유래 유기산(Tataric acid: 1,800~2,000ppm)이 제빵발효시 풍미를 대폭 증가시키는 것으로 확인되었다.
- 마) 특화성(성상, 맛, 조직감 등)부여효과는, 48시간~72시간 범위에서 효모의 활성이 극대화 함으로서 발효율 증대와 특화빵 특유의 풍미, 조직감 및 맛등을 창출한 것으로 결론을 얻었다.
- 3) 과일엑기스 첨가형을 이용한 천연특화제빵 제조 메카니즘은 다음과 같다.
- 가) 제빵제조 레시피는 상업효모적용과 기본적으로는 동일하게 정립되었다,
- 나) 천연특화제빵 제조와 관련하여 과일엑기스 선별기준은 Fructose 및 Tataric acid의 함유량이 높은재료가 중요한 선별기준이이고, 희석시 9Brix 이상의 당도 수치가 필요하다.
- 다) 특화성(풍미) 발현량 증대효과는, Glucose가 중요한 인자이므로 반죽용액 제조시 5~10%Sucrose 사전 발효조건을 형성시킴이 중요하다.
- 라) 가)~다)를 종합하여 보면, Glucose (57,000ppm ~ 35,000ppm) 및 과일유래 유기산(Tataric acid : 1,800 ~ 2,000ppm)이 제빵발효시 풍미를 대폭 증가시키는 최적배지조건으로 확인되었다.
- 마) 특화성(성상, 맛, 조직감 등)부여효과는, 부드러운 조직감 및 식감 증대형 발효율 증대와 특화빵 특유의 풍미, 조직감 및 맛 등을 종합적으로 발현할 수 있다.

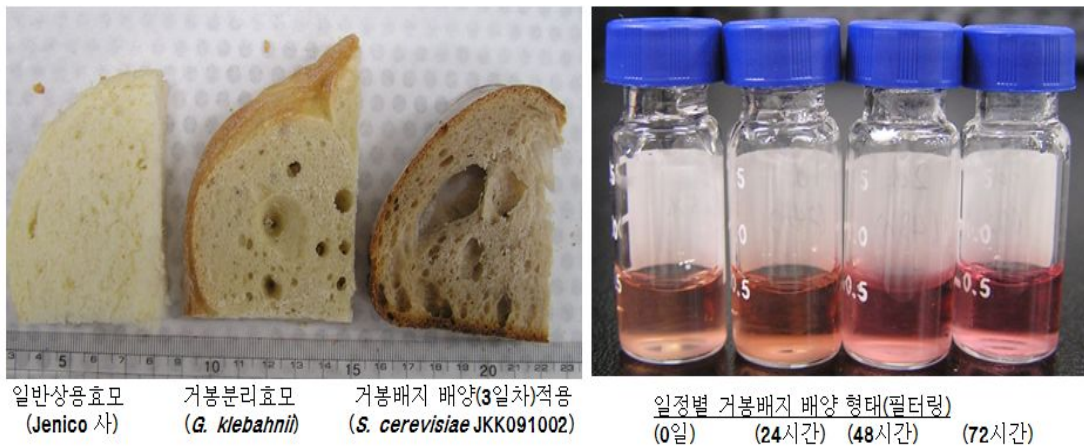


Fig 1. 상업효모 대비 선발효모(*S. cerevisiae* JKK091002) 적용 제빵 및 배양형태(필터링) 결과

Table 1. 과일발효배지 시간경과별 8종 유기산의 증감 조사 결과

시험구(배양일정)	유기산 증감 변화 확인결과							
	Tartaric Acid (ppm)	Malic Acid (ppm)	Lactic Acid (ppm)	Oxalic Acid (μ mol)	Citric Acid (μ mol)	Succinic Acid (μ mol)	Formic Acid (μ mol)	Acetic Acid (μ mol)
콩코드 액기스(적포도 (68Brix→9.4Brix 희석))	1,306	D-: 4,875 L-: ND	ND	ND	ND	22.6	ND	ND
거봉 배지(Sucrose 무첨가 : 9.4Brix)	1,427	D-:2,766 L-: 267	ND	ND	2.74	12.2	ND	200
거봉배지(5%Sucrose 첨가, 배양 0시간)	1,213	D-:3,329 L-: 282	ND	ND	ND	13.1	ND	ND
거봉배지(5%Sucrose 첨가, 배양 24시간)	1,472	D-:3,061 L-: 889	277	ND	ND	16.2	ND	ND
거봉배지(5%Sucrose 첨가, 배양 48시간)	1,862	D-:3,255 L-: 679	288	ND	ND	17.1	ND	384
거봉배지(5%Sucrose 첨가, 배양72시간)	1,944	D-:3,170 L-: 386	298	ND	ND	18.5	ND	526

Table 2. 과일발효배지 시간경과별 당류 변화 조사 결과

시험구(배양일정)	당류 증감 변화 확인결과(ppm)				
	Sucrose	Fructose	Galactose	Glucose	Lactose
콩코드 액기스(적포도, 68Brix→9.4Brix 희석)	ND	44,194	ND	36,440	900
거봉 배지(Sucrose 무첨가 : 9.4Brix)	ND	44,237	ND	45,530	777
거봉배지(5%Sucrose 첨가, 배양 0시간)	ND	67,359	ND	70,224	799
거봉배지(5%Sucrose 첨가, 배양 24시간)	ND	36,300	ND	25,911	ND
거봉배지(5%Sucrose 첨가, 배양 48시간)	ND	59,338	ND	56,554	ND
거봉배지(5%Sucrose 첨가, 배양72시간)	ND	44,067	ND	34,984	ND

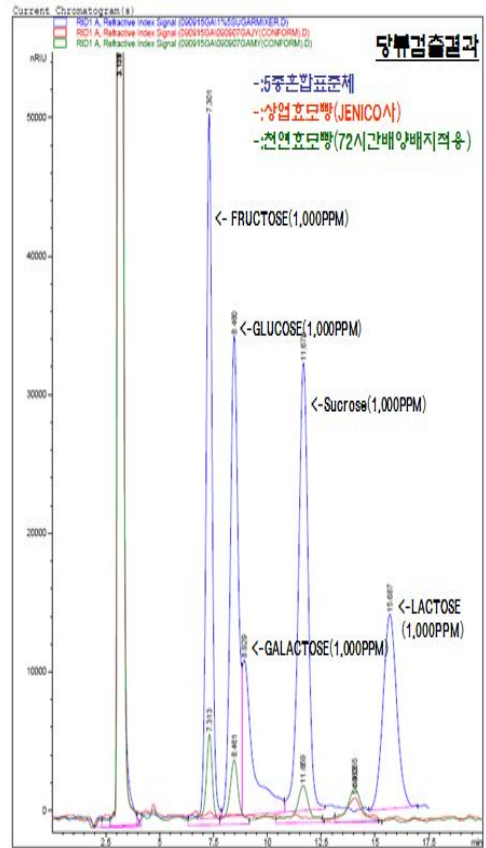
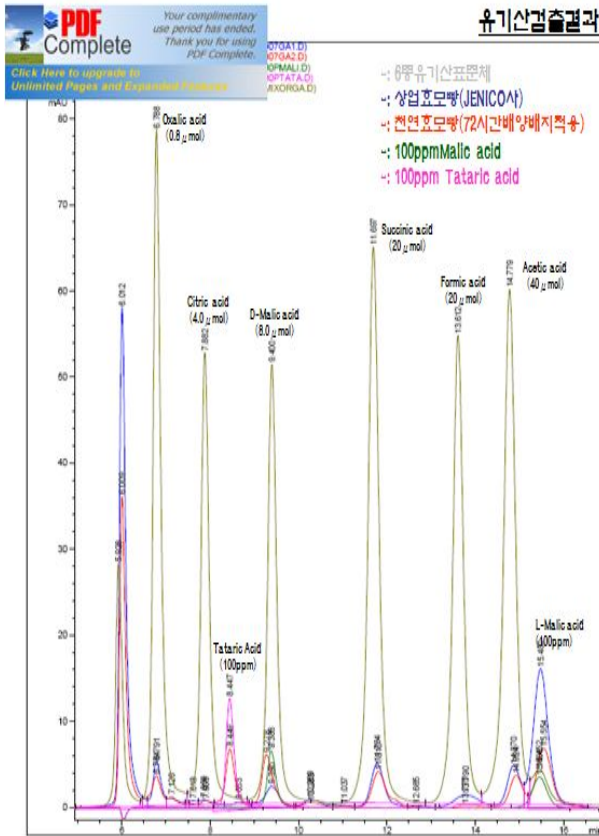


Fig 2. 과일발효배지 시간경과별 유기산 및 당류의 증감조사 결과(HPLC)
좌: 유기산 분석, 우: 당류 검정

Table 3. 천연특화제빵 제조법 정립 (과일발효배지 첨가형) 연구에 적용된 표준제빵 (유럽빵 ; 르방) 제조 레시피 (상: 상업효모, 하 : 과일발효배지)

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

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

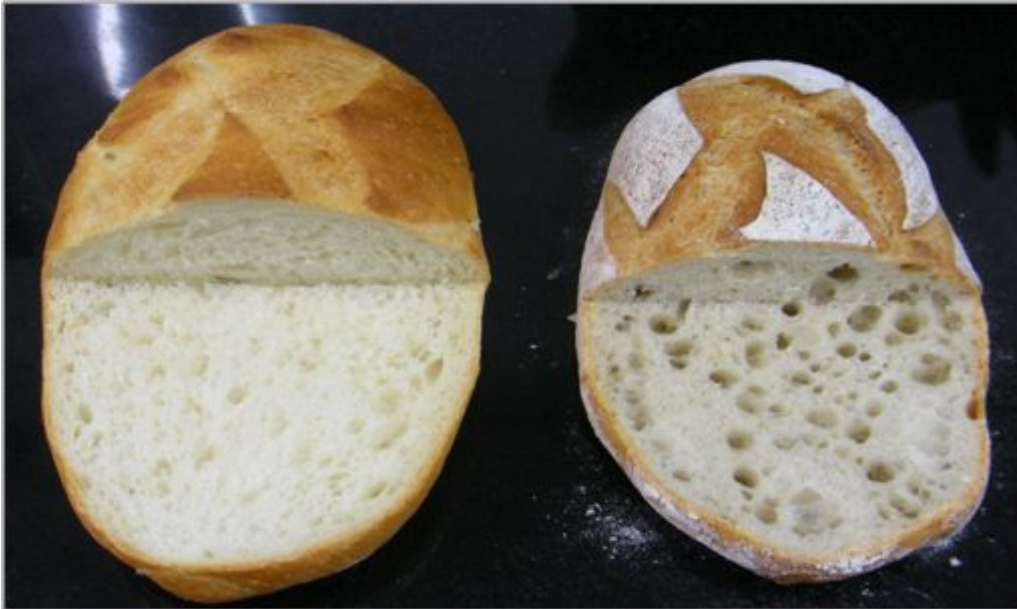


Fig 3. 천연특화제빵 제조법 정립(과일발효배지 첨가형)연구에 적용된 표준제빵(유럽 빵 ; 르방) 제조 결과(좌: 상업효모, 우 : 과일발효배지)

Table 4. 천연특화제빵 제조법 정립(과일발효배지 첨가형)연구에 적용된 표준 제빵(유럽빵 ; 르방)에 대한 관능평가 결과

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

* : P < 0.05

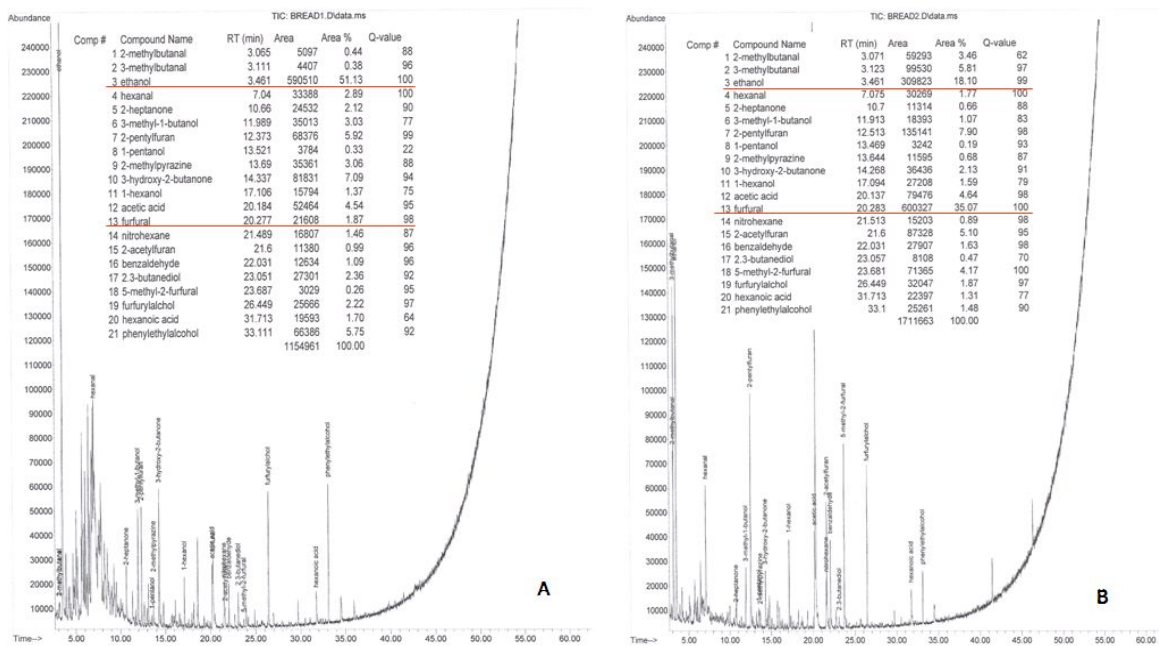


Fig 4. 상업효모 대비 과일발효배지 적용제조한 제빵(르방빵) 품미 분석결과
 A : 상업효모(압착형), B: 과일발효배지적용

Table 5. 천연특화제빵 제조법 정립(과일발효배지 첨가형)연구에 적용된 표준제빵(유럽빵 ; 르방)에 대한 풍미성분 분석결과((빵굽기온도 180℃이상)

No.	Compound Name	향기특성	상업효모빵		천연효모빵1		천연효모빵2	
			Area	Area %	Area	Area %	Area	Area %
1	2-methylbutanal		5,097	0	59,293	3	42,767	7.04
2	3-methylbutanal		4,407	0	99,530	6	41,276	6.80
3	ethanol	-CH ₃ COCH(OH)CH ₃ 기인 - C 5이하 :채소,과일,황주 -불포화 결합알콜:어린잎(뽕내) -방향족알콜:꽃향기	590,510	51	309,823	18	6,075	14.18
4	hexanal		33,388	3	30,269	2	31,236	5.14
5	2-heptanone		24,532	2	11,314	1	15,812	2.60
6	3-methyl-1-butanol		35,013	3	18,393	1	8,950	1.47
7	2-pentylfuran		68,376	6	135,141	8	136,849	22.54
8	1-pentanol		3,784	0	3,242	0	1,956	0.32
9	2-methylpyrazine		35,361	3	11,595	1	16,917	2.79
10	3-hydroxy-2-butanone		81,831	7	36,436	2	3,663	0.60
11	1-hexanol		15,794	1	27,208	2	47,965	7.90
12	acetic acid	식초향	52,464	5	79,476	5	6,003	0.99
13	furfural	-Glucose : 탄 캔디향 -Tataric acid : 탄 캔디향 -Fructose : 육즙냄새 -Sucrose : 육즙냄새	21,608	2	600,327	35	20,348	3.35
14	nitrohexane		16,807	1	15,203	1	36,944	6.08
15	2-acetyl furan		11,380	1	87,328	5	24,942	4.11
16	benzaldehyde	캔디향	12,634	1	27,907	2	10,651	1.75
17	2,3-butanediol		27,301	2	8,108	0	473	0.08
18	5-methyl-2-furfural		3,029	0	71,365	4	3,253	0.54
19	furfurylalcohol	타는 향((Glucose등 당류기인)	25,666	2	32,047	2	11,926	1.96
20	hexanoic acid		19,593	2	22,397	1	19,300	3.18
21	phenylethylalcohol	장미향	66,386	6	25,261	1	39,830	6.56
합계(%)				100.00		100.00		100.00

Table 6 . 과일액 혼합이 제빵 반죽 및 숙성(숙성시간 : 0시간)시 효모균수(PDA, 25℃), 제빵 발효율 및 특화성(풍미보유)에 미치는 변화조사

효모(압착형)처리구		과일액기스 첨가에 따른 제빵 발효관련 효모균수 변화(cfu/g)					제빵 발효율(%)
효모종류	과일액기스 혼합*	초기균수	반죽	1차	중간	2차	
상업효모 (Jenico사)	대조구	1.0x10 ¹⁰	2.4x10 ¹⁰	NT	1.7x10 ⁹	1.5x10 ⁹	100(기준)
	적포도	2.4x10 ¹⁰	1.8x10 ⁹	6.6x10 ⁹	9.1x10 ⁹	4.6x10 ⁹	112.6
	백포도	2.8x10 ¹⁰	1.5x10 ⁹	4.7x10 ⁹	5.2x10 ⁹	1.6x10 ⁹	101.6
개발효모 (JKK100902)	대조구	1.8x10 ¹⁰	7.0x10 ⁹	1.2x10 ¹⁰	5.0x10 ⁹	NT	94.3
	적포도	2.2x10 ¹⁰	1.8x10 ⁹	4.1x10 ⁹	4.5x10 ⁹	7.3x10 ⁸	101.6
	백포도	2.0x10 ¹⁰	1.2x10 ¹⁰	1.3x10 ⁹	1.4x10 ⁹	5.8x10 ⁸	98.8

- * : 과일액기스(68 Brix) 30g+물 600g+설탕 60g+압착효모(수분 70~74%) 40g

- NT : Not Testing

- 대조구 : 일반제빵 반죽조

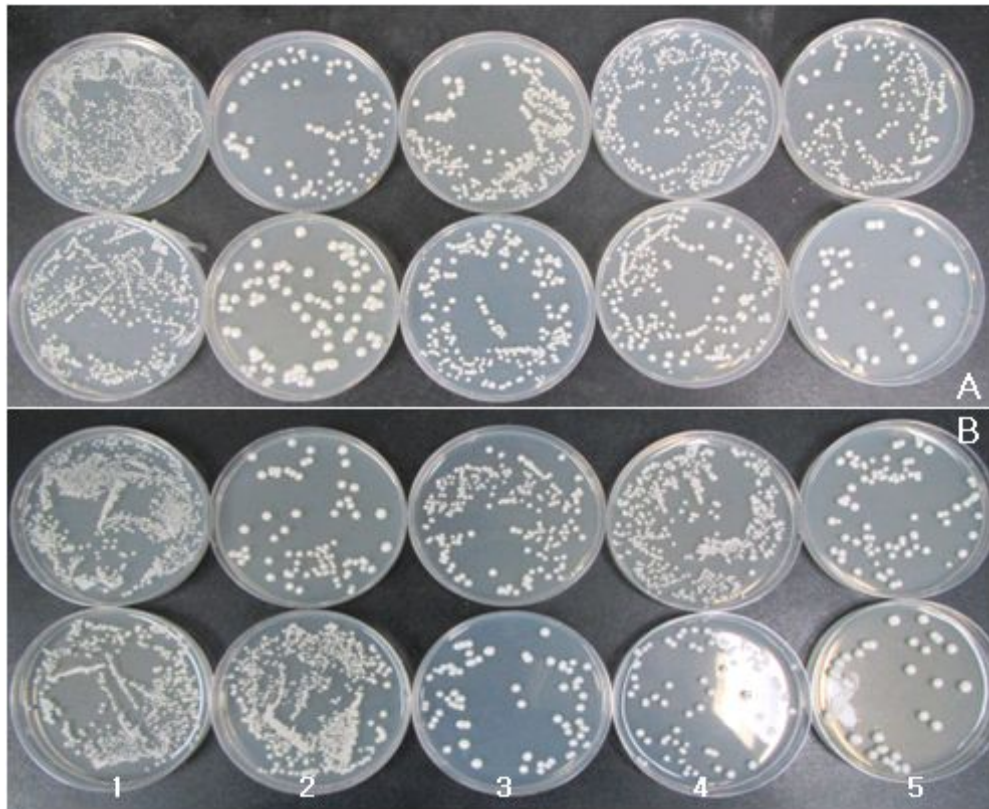


Fig 5 . 과실액 혼합이 제빵 반죽 및 숙성(숙성시간 : 0시간)시 효모균수 변화에 미치는 효과

A : 상업효모(압착형), B : 개발효모(압착형), 1 : 초기효모균수, 2:반죽, 3 : 1차숙성, 4 : 중간발효, 5 : 2차발효) , 배양조건 : PDA(25℃), 24시간

Table 7. 압착효모 대상 제빵제조시 과일엑기스 추가첨가가 제빵 발효특성(품미)에 미치는 효과

효모처리구		개발효모 대상과일엑기스 첨가가제빵 발효특성에 미치는 효과				제빵 발효율(%)
효모종류	과일엑기스 처리구*	높이 (mm, Y축)	Oven Jumping (mm)	폭 (mm, X축)	폭 (Cm, Z축)	
상업효모 (압착형)	대조구	131.32	48.85	84.37	185	100(기준)
	적포도	147.91	56.72	85.64	195	112.6
	백포도	133.38	43.52	84.71	195	101.6
개발효모 (압착형)	대조구	123.79	47.49	84.20	195	94.3
	적포도	133.49	59.06	89.58	180	101.6
	백포도	129.75	52.57	87.74	185	98.8

- 제빵발효율(%) : (시험구 제빵높이/상용효모 대조구 제빵높이) x100.

- * : 강력분 1kg+(물 600g+ 68Brix 과일엑기스 30g) +설탕 60g+소금(꽃소금, 남도식품, 한국) 20g+무염버터(매일유업,한국) 80g+개량제(S500, 푸라토스코리아, 한국) 10g+ 효모(대조 : 상업압착효모, 시험구 : 개발압착효모) 40g

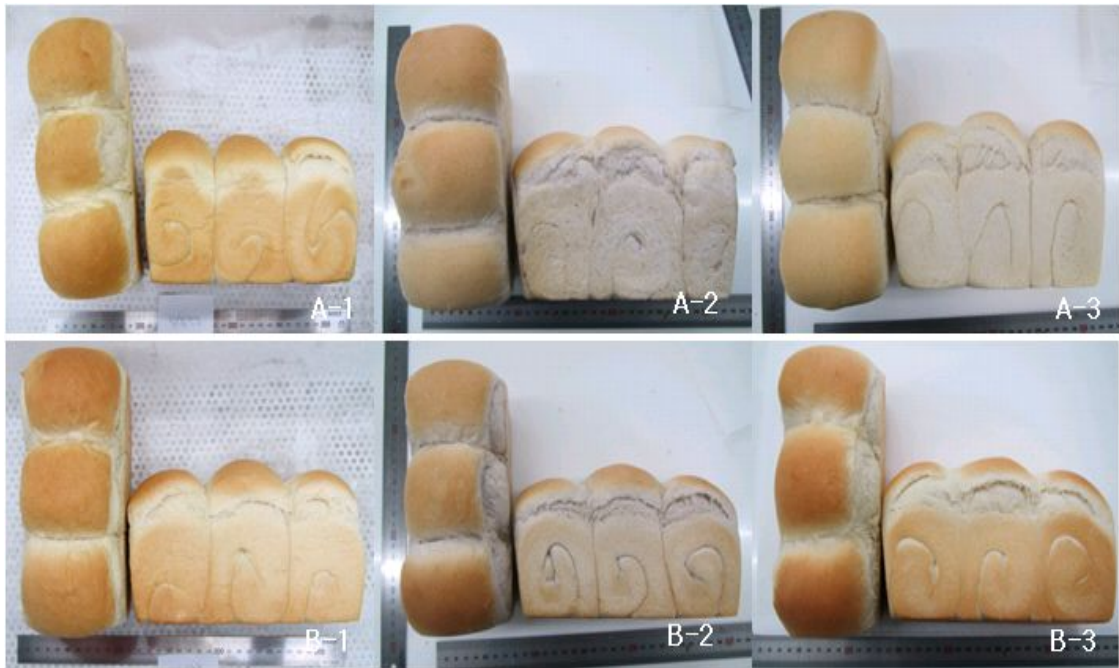


Fig 6 . 압착효모 대상 제빵제조시 과일엑기스 추가첨가가 제빵 발효특성(형태변화)에 미치는 효과

A : 상업효모(압착형), B: 개발효모(약착형), 1: 대조(only Yeast), 2: 효모+적포도, 3:효모+백포도

Table 7 . 압착효모 대상 제빵제조시 과일엑기스 추가첨가가 제빵 발효특성(품미)에 미치는 효과

시험구		과일엑기스 첨가가 제빵제조후 당류변화에 미치는 효과(%)						제빵 발효율 (%)
		Maltose	Fructose	Sucrose	Glucose	Galactose	Lactose	
최초투여량(%)		0	0	10	0	0	0	
상업효모 (압착형)	대조구	6.34	1.05	ND	ND	ND	ND	100 (기준)
	적포도	5.91	1.80	ND	ND	ND	ND	112.6
	백포도	6.08	ND	ND	ND	ND	ND	101.6
개발효모 (압착형)	대조구	7.86	2.7	ND	ND	ND	ND	94.3
	적포도	5.33	2.71	ND	ND	ND	ND	101.6
	백포도	7.53	3.43	ND	ND	ND	ND	98.8

- 제빵발효율(%) : (시험구 제빵높이/상용효모 대조구 제빵높이) x100.

- * : 강력분 1kg+(물 600g+ 68Brix 과일엑기스 30g) +설탕 60g+소금(꽃소금, 남도식품, 한국) 20g+무염버터(매일유업,한국) 80g+개량제(S500, 퓨라토스코리아, 한국) 10g+ 효모(대조 : 상업압착효모, 시험구 : 개발압착효모) 40g

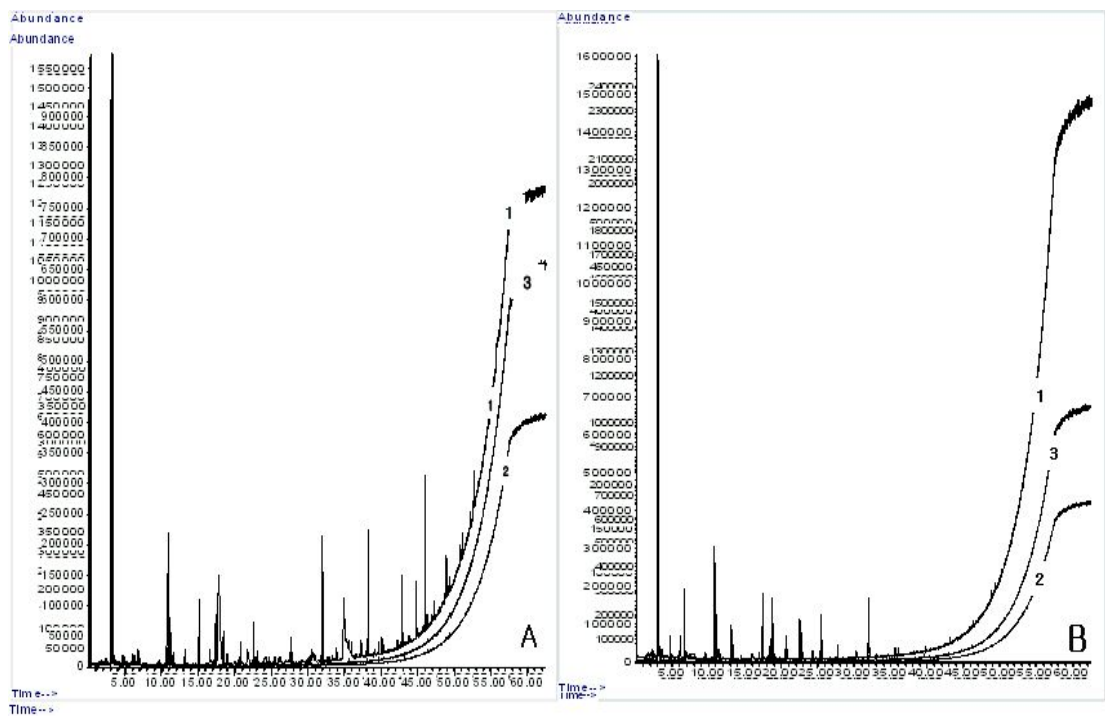


Fig 7. 압착효모 대상 제빵제조시 과일엑기스 추가첨가가 제빵 발효특성(풍미)에 미치는 효과

A : 상업효모(압착형), B: 개발효모(약착형), 1: 대조(only Yeast), 2: 효모+적포도, 3: 효모+백포도

Table 8 . 압착효모 대상 제빵제조시 과일엑기스 추가첨가가 제빵 발효특성(풍미)에 미치는 효과 (단위:Area x 1,000)

분류	성분명	과일엑기스 첨가시 향미성분 변화 분석 결과					
		압착효모 (0hr)		압착효모 (0hr) +적포도		압착효모 (0hr) +백포도	
		상업	개발	상업	개발	상업	개발
Alcohols	ethanol	1,986	1,696	4,187	6,590	2,248	4,474
	isobutanol	18	25	24	10	26	22
	2-methyl-1-butanol	18	12	55	20	24	20
	3-methyl-1-butanol	190	74	247	68	234	73
	1-hexanol	1	2	1	15	0	16
	nonanol	3	6	2	3	2	2
	phenyl ethyl alcohol	387	24	413	45	296	26
Aldehydes	hexanal	7	14	6	9	10	11
	benzaldehyde	25	24	22	22	11	26
Carboxylic acid	acetic acid	23	53	30	138	8	243
	isobutyric acid	11	27	17	32	11	41
	butanoic acid	4	5	5	7	5	8
	hexanoic acid	7	29	12	31	10	43
	octanoic acid	13	8	8	9	8	11
Esters	2-pentylfuran	4	8	1	9	5	9
	ethylcaproate	9	6	9	6	10	5
	ethyl octanoate	25	8	31	9	27	9
	ethyl decanoate	4	1	6	2	7	1
Ketones	acetoin	38	57	74	174	3	166
합계		2,774	2,077	5,150	7,198	2,945	6,785

제 4 장 목표 달성도 및 관련분야에 기여도

제 1 절 목표달성도

본 연구개발의 핵심기술은 제빵적용이 가능한 한국토종효모개발 및 자원화 하고 이를 이용하여 상업효모 대체가 가능할수 있는 대량생산기법 정립 및 이의 국내외 소비자 기호성에 충족이 가능한 고품질 천연특화제빵 개발이며, 일련의 시스템이 완료 되었다. 이에 대한 핵심 연구 달성도는 다음과 같다.

연구내용	달성도 (%)	연구개발 수행내용
1. 상업효모 대체형 한국 토종효모자원 확보	100	
가. 지적소유권 확보 (특허출원, 목표: 1건)	100	1. 특허출원부분 : 1건 출원완료 가. 특허출원-1(제10-2009-0134773, 2009.12.03) - 발명명칭 : 신규 효모 및 그를 이용한 빵의 제조방법 2. 유전자위 등록 : 1건 가. 개발효모 : <i>Saccharomyces cerevisiae</i> JKK091006 나.유전자 자원 확보: 특허수탁완료 - 취득번호 : KCCM11056P
나. 논문투고 (경연대회 포함, 목표 1건)	300	1. 논문투고 : 특허등록후 발표예정 2. 경연대회 출시 및 수상(금상이상) : 3건 - 제1회.강남-강동 기능장페스티벌. 금상수상 (유럽빵 부분, 2009.09.13). - 제14회. 서울국제빵과자경진대회. 금상수상 (유럽빵 부분, 2009.11.01). - 제7회. 전국여성제과기술인경연대회.최우수상 (노동부장관상, 2010.03.29.)
2. 개발효모 대량생산기법 정립(특허출원:목표 1건)	100	1. 선발효모 대량생산형기법 정립완료 2. 선발효모 대량배양시스템 정립완료 가. 효모제형별 생산수율 정립 나. 장단기 보관성 및 제빵적용성 평가 다. 생산시스템 구축계획(스케일별) 정립완료 3. 지적재산권 확보(특허출원 1건) - 발명명칭(출원번호):제빵용 효모의 대량생산방법 (제10-2011-0029589호, 2011.03.31)
3. 개발효모 제형화별 적용 레시피 정립	100	1. 건조형 개발효모 2. 압착효모 개발효모 3. 효모제형별 레시피 정립
4. 효모 제형별 제빵제조 레시피 정립	100	1. 상업효모 적용 제빵제조 레시피와 동일 정립 2. 제형별 제빵제조 레시피 구분 정립 3. 제형별 제빵제조 관련 물리/이화학/생물학적 메카니즘 구명
5. 특화성(풍미)부여 제빵 제조레시피 정립	100	1. 상업효모와 동일 제빵제조 레시피 정립 2. 효모기원성 풍미인자 구명완료 3. 풍미발현 물리/이화학/생물학적 메카니즘 구명완료 4. 풍미발현 인자대입형 제빵제조 레시피 정립완료
6. 사업화	100	가. 경제성 평가완료 - 효모단일제품화, 완제품구성 레시피형 나. 효모 대량생산시스템 및 사업화 로드맵 설정 완료 - 년간효모사용량, 예상판매액, 생산시설구축예정예산 및 대지 다. 시설장비 디자인 예정(추후)

제 2 절 관련분야의 기여도

본 연구개발의 핵심기술은 제빵적용이 가능한 한국도종효모개발 및 자원화 하고 이를 이용하여 상업효모 대체가 가능할수 있는 대량생산기법 정립 및 이의 국내외 소비자 기호성에 충족이 가능한 고품질 천연특화제빵 개발이며, 과제수행에 의하여 일련시스템이 완료 되었다. 연구성과에 대한 관련분야의 기여도는 다음과 같다.

1. 기술적 측면

가. 다국적 기업 종속형 핵심기술 개발로 제빵산업 및 식품산업 요구성 충족형 효모 체제의 대체화 가능으로 국가기술력 증대

나. 제빵관련 연구자 들에 대하여 신규효모체제 개발기법 체계화 기여

다. 저가 잉여 축산물의 신규 이용성 방향제시 및 수익창출기여

라. 효모 개발간 획득 KNOW-HOW의 응용성 및 용도용법 창출에 대한 새로운 지표제시 기여

마. 관련 식품분야, 유가공 및 연구자들에 대한 신규연구개발 방향 제시

2. 경제적·산업적 측면

가. 과거 단편적 및 제한적 연구개발에서 벗어나 고부가 가치화를 통한 산업체의 수익창출 및 국제경쟁력 확보

나. 잉여 우유소재 및 제빵분야 소요처 창출을 통한 관련 농축산업의 추가 수익증대 기여

다. 신규시장 개척을 위한 소재 및 제빵분야 응용제품의 개발로 관련산업 경쟁력 증대 기여

3. 제빵분야 요구성 충족(국내 제빵업계 현황분석 및 요구성)

가. 국내외 제빵업계 현황에 대한 요구성 충족에 기여

1) 특화된 제품 개발인력 및 시스템 결여로 인하여 특화성 보유 신제품 개발 불가

2) 특화성 결여로 인한 시장 적응성 및 창출성 결여

- 전문 Know-How로 품질 불균일화 및 소비자 충족형 제품없음.

- 수작업으로 인한 일정한 Productivity , Quality 결여

- 미숙련자, 비기술인 생산 어려움

3) 인건비, 원재료비 상승, 가계운영 어려움

4) 긴급 주문 및 대량주문 신속한 대응 어려움(호텔 등)

나. 요구성 충족부분

1) 베이커리 전체시장 매출규모 추정 약 3조원대이고, 새로운 접근법으로 파이를 더욱 키울 수 있을 것으로 기대됨.

2) 양산, 프랜차이즈 연간 10%대 불륵 증가추세

- 전문화 정착과 시장변화로 점차 프랜차이즈 불륵은 감소하나, 전문 윈도우베이커리 시장불륵은 증가할 것으로 조사되었는데, 이는 결국, 5~10년 이내에 변화 예상됨

제 5 장 연구개발성과 및 활용계획

제 1 절 연구개발성과

1. 연구목표 대비 개발성과

본 연구개발의 핵심기술은 제빵적용이 가능한 한국토종효모개발 및 자원화 하고 이를 이용하여 상업효모 대체가 가능할수 있는 대량생산기법 정립 및 이의 국내외 소비자 기호성에 충족이 가능한 고품질 천연특화제빵개발이며, 일련의 시스템이 완료 되었다. 이에 대한 핵심 연구성과는 다음과 같다.

- 가. 상업효모 대체형 한국토종효모자원의 개발과 지적소유권은 확보되었다.
- 나. 빵효모 생산을 위한 발효기술 및 제품화 기술개발이 완료되었다.
- 다. 천연특화성제빵 제조 레시피가 완료되었다.
- 라. 상업적 생산 타당성 검토 및 산업화 기초정보를 확보하였다.

2. 지적재산권 확보

가. 특허출원부분 : 2건 출원완료

1) 특허출원-1(제10-2009-0134773. 2009.12.03)

- 발명명칭 : 신규 효모 및 그를 이용한 빵의 제조방법

2) 특허출원- 2(제10-2011-0029589호. 2011.03.31)

- 발명명칭 : 제빵용 효모의 대량생산방법

나. 논문부분 : 특허등록후 발표예정(근거 : 연구협약서)

1) 본 연구결과는 국내외적으로 식품관련회사 뿐만 아니라, 관련산업 전반에서 절실히 요구되는 바, 고품질 제품생산과 마케팅에 활용할 것이므로, 특허등록(향후 1년 소요예정) 후 논문발표부분을 제외한 모든 자료는 비밀보존을 원칙으로 할 것임.

2) 또한, 절차에 의거 비밀유지 요청과정을 실시할 것임.

3) 단기 및 장기적 논문 및 특허진행 결과는, 매년 활용보고서 제출 시 보고 할 것임.

다. 추후 지식재산권 확보계획 : 현재 개발결과의 고부가가치 제품화를 위하여, 관련 허가기관(식약청)에 자료를 이첩 예정임. 따라서, 절차협의 결과에 따라 2단계에 준하여 순차적으로 지적재산권(특허 및 논문) 확보와 산업화를 진행할 예정임.

1) 1단계 : 개발효모 제빵적용 신청예정(허가사항 필요없음.)

2) 2단계 : 건강보조식품개발 허가시(동물임상)

3. 경연대회 수상실적 : 3건(Fig 1)

가. 제 1 회 강남-강동 기능장페스티벌. 금상수상(유럽빵 부분), 일시: 2009.09.13.

나. 제14회 서울국제빵과자경진대회. 금상수상(유럽빵 부분),일시: 2009.11.01.

다. 제 7 회 전국여성제과기술인경연대회.

최우수상(노동부장관상, 일시: 2010.03.29.)

4. 과제를 통한 인력양성 및 고용창출 결과

가. 인력고용(현재, 주관기관 연구소 정규직 근무) : 2인(석사급 연구원)


- 근무처 : 매일유업 중앙연구소 김재홍 연구원, 김민호 연구원

나. 인력양성결과 : 2명(석사 2명)

- 연세대 낙농미생물학과 : 송태석, 최지아

금 상 **내추럴한 빵의 신비**
전인선 매일유업(주)





유립빵은 거품 천연효모를 베이스로 풍미와 식감을 향상시키는 데 초점을 맞췄으며, 견조과일, 치즈 등을 집약시켜 맛있는 식감을 보장하여 맛의 조화를 이뤘다. 크로와상은 퓨어버터로 신선한 유통미를 최대한 살렸고, 브리오슈는 느끼한 맛을 제거하고 부드러운 맛을 한층 더 살렸다.

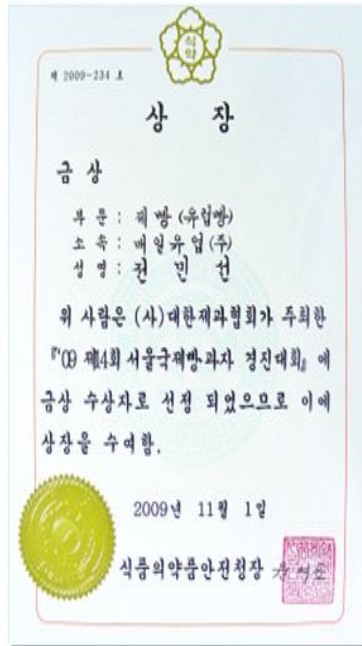
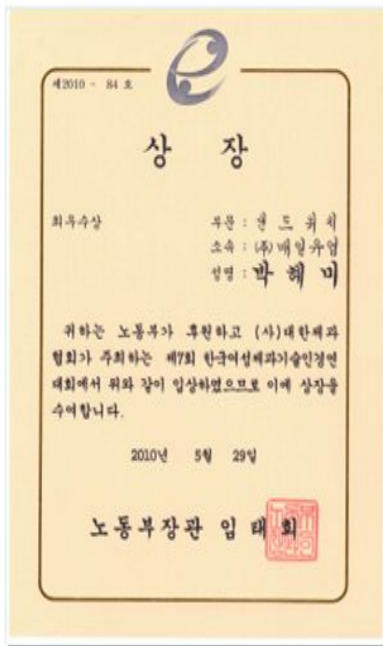


Fig 1. 연구개발결과(천연효모특화제빵) 적용 경연대회 수상실적

제 2 절 연구결과 활용계획

본 연구개발의 핵심기술은 제빵적용이 가능한 한국토종효모개발 및 자원화 하고 이를 이용하여 상업효모 대체가 가능할수 있는 대량생산기법 정립 및 이의 국내외 소비자 기호성에 충족이 가능한 고품질 천연특화제빵개발이며, 일련의 시스템이 완료 되었다. 따라서, 연구간 확보된 효모생산 및 제형화 기술의 KNOW-HOW는 다음과 같이 활용할 계획이다.

1. 기술개발결과 및 KNOW-HOW 측면

가. 상업효모 대체형 효모확보

- 1) 한국토종효모확보와 자원화를 통한 제빵제과 사업화에서 국제 우위성 확보 기대
- 2) 효모균의 탐구 기초기술 확보와 지속적인 유용균 선발에 활용가능
- 3) 종속된 다국적사 효모균에 의한 국내제빵산업 기술발전 저해요인 해소

나. 개발효모 대량생산기법 정립

- 1) 친환경 유기농 제빵제과 원료의 국내 조달로서, 관련산업 수익창출 기여
- 2) 국내 효모자원의 대량생산 및 경쟁력 확보를 통한 수입효모 대체과 기대

다. 개발효모 제형화별 적용레시피 정립

- 1) 기존 제빵제과업계의 제빵제과 기술의 진보에 기여 가능
- 2) 미잉여 유기농농업 현장 유익균의 산업응용성 확대 방안 제시
- 3) 기존 제빵 특화성(풍미 및 식감 등) 신규부여 연구개발법 제시로 국내 제빵산업 특성화 기초 제시

2. 특허분석 측면

가. 기존 특허는 상업용 효모만을 사용하여 균일화된 제품생산 분야에 치중되어 있음.

나. 본 연구과제에서는 한국 토종 이미지와 친환경 유기농 원료를 접목하면서 국제기 호성에 충족될 수 있는 과학적 분석결과까지 확보되는 청구항목의 신규한 제빵개발 이라는 방향으로 연구를 추진예정임.

다. 이 결과를 토대로 한국토종 효모균(유전자원 특허 수탁 예정)과 특화된 빵에 대한 일반, 실용신안 및 상표특허 등을 국내 및 국외에 출원할 계획임.

3. 논문분석 측면

가. 기존 논문은 상용되는 효모(압착효모)는 사용방법과 생산 기법이 정형화 되어 있음.

나. 현재, 본 연구와 관련하여서 비교하면, 유산균과 시료(맥아당), 숙성중인 제빵내에서 의 균들의 동태를 파악하는 분야 등에 연구논문이 발표되고 있음.

다. 본 연구와 관련하여 보면, 신종효모에 대한 개발이라는 측면에서 연구는 진행되고 있지 않으며, 이에 따라 역시 효모균과 관련하여 특화성을 부여하는 연구 역시 진행되는 것은 없는 것으로 현재 파악되고 있는 바, 개발보다는 현상 규명분야에 치중하고 있음.

라. 본 연구과제에서는 신종효모에 대한 개발과 선발 효모균을 적용한 특화성을 부여하 는 제품개발이라는 방향으로 연구를 추진하여 미생물 동정과 제품개발에 관한 논문 등 을 미생물학회지, 한국영양학회지 등에 게재할 계획임

4. 제품 및 시장분석 측면

가. 국내 및 국외시장 분석결과 상용되는 효모균과 혹은 유산균 등을 이용한 제빵의 생산 및 판매가 이루어지고 있으나, 현재 쇠퇴기에 접어들었음.

나. 본 연구과제에서는 한국형 토착균을 제빵에 적용하는 방향으로 연구를 추진하여 한국의 독특한 국내외 소비자 기호성에 충족되는 특화성 부여 .제품 등을 생산하여 국내 및 국외에 판매할 계획임.

5. 추가연구, 타연구에 활용계획

가. 본 연구개발간 KNOW-HOW로서 유기농업의 시스템 및 효모선발용 과일선발 및 발효기법을 통한 효모분리 동정에서 대량생산 및 제빵적용성에 관한 일련의 메카니즘을 완벽히 파악하였으며 결과 또한 축적된 상태임.

나. 따라서, 연구 KNOW-HOW를 활용한 이중 효모 및 유익균 개발을 연계 진행할 것이며, 역시 확보된 특화제빵 제조 결과를 기초자료로 활용하여 고부가가치화 소재 및 제품화 개발을 진행 할 것임.

6. 교육.지도.홍보 등 기술확산계획

가. 대형 국가연구비를 통한 연구수행 및 개발결과는 사업화에 있어 주요한 판매전략 지침자료로 재편성할 것임.

나. 사업화를 위한 허가기관의 검증절차가 완료되면, 국내외적 관련 식품산업분야 기술을 선도함과 동시에 농축산업의 수익창출에 기여토록 할 것임.

7. 실용화.산업화 활용계획(기술실시등)

가. 현재 주관기관(매일유업(주))은 국내대표적인 유업체로서 연구개발결과의 실용화 및 산업화를 위해 필요한 기초원료 및 개발기술을 적용할 수 있는 기반시설 및 인원 등의 인프라를 완벽히 구비하고 있어 별도의 투자가 필요 없음.

나. 개발결과의 실용화는 관련산업체중 1곳(매일유업 아산공장, 주사업분야 : 제빵제조 및 유청분말 제조)를 선정하고, 기술이전 및 실용화를 실시할 예정임. 이유로서, 현재 맥도날드사와 공동사업을 위한 저가의 햄버거 제품만을 생산하고 이를 납품하고 있으나, 기술이전 실시를 통하여 고부가가치화 특화제빵사업을 시작토록 건의 할 것임.

8. 제품화 활용계획(수익성 창출)

관련산업에 전파를 위하여, 다음과 같은 제품군을 준비하고 동시에 관련기술을 자료화 하여 사업화에 적극 활용할 것임.

가. 완제품 공급형 : 프리믹스 TYPE(개발 레시피) : 개발효모 40g+ 밀가루 1,000g+ 버터 100~150g+설탕 100~150g+소금 18~20g+생크림 30~50g+우유 1Kg+탈지분유 200g

나. 원부자재별 공급형 : 개발효모(Kg 압착 혹은 분말형), 우유, 탈지분유, 가공버터), 생크림, 유기농밀가루

다. 대상 :초기(주관관리 제과제빵업체, 5,000업소 대상)->후기(국내산업체로 확대)

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

제 1 절 제빵산업 시장현황 및 전망

1. 국내외 건기식품관련 시장성

세계시장은 2003년 1,152억\$, 2006년의 경우는 1,500억\$으로 증가추세였으며, 국내 총생산량은 7,008억(2006년, 효모관련제품 : 184억)→7,235억(2007년)→8,030(2008년)이이고, 이중 본 과제와 관련한 효모관련 제품시장은 약 2%의 평균점유율(정체) 나타내었음.

이는 소비자 기호성(건강기능 요구성)에 충족시(안정적 기능성 성분 보존 제품화 등) 그 성장률은 충분히 기대할 수 있음을 시사하고 있음(근거 : 2008년 건강기능식품 생산실적 통계자료, 식약청).

2. 효모자원 개발대상 소재별로 국제시장(소비자판매 가격)과 기술우위국 조사

글루코만난(효모세포벽 분리 소재)는 1,250,000원/Kg(일본 오리엔탈사, *Saccharomyces cerevisiae*), 효모추출물(*Candida utilis*, 핵산 포함) 경우는 60,000원/kg(일본, KOHJIN사), 효모추출물(핵산 제거제품)은 55,000원/kg으로 고가였음.

따라서, 주관연구기관의 확보 효모의 대량생산시스템의 구축에 따른 제과용 효모로의 소재 전환 시 국제 경쟁력을 가지는 저가화(과제 종료시 글루코만난 : 200,000원/Kg, 효모 추출물 : 25,000원/Kg 예상) 및 기능성 제품생산이 가능하리라 판단됨. 또한, 현재 기술개발과 제품관련 기술우위국은 일본이었음.

3. 국내 효모관련제품의 건강 기능성 시장

관련 효능재평가와 더불어 가격대비 소비자 불만이 팽배해지면서 일반식품군으로 전환된 바, 이는 소비자 기호성 대비 초기 기능성 소재로의 개발결과(효과보장형 레시피)에 대한 지속적인 연구 및 관리 부재에 따른 것이었음.

역설적으로, 국내시장현황과 반대로 국외(업체 및 연구기관)는 효모류에 관련 추후 개발가능성 및 중요성에 주목함과 동시에 효모자원 확보(특허 및 지적자원 선점)결과를 무기로 삼아 국내외 시장의 점유율에 대한 경쟁이 치열하게 전개될 것으로 판단되며, 이에 대한 국내 대비가 없는 경우, 근 시간내에 국내 효모관련 시장이 종속될 것으로 판단됨.(근거 : 주관시장조사 결과)

4. 제빵 생산 및 시장현황 : 예상 매출액 10,584억원(예상이익 : 4,000억, 10년후)

가. 국내 제과제빵 분야 시장 현황 : 4조원

- 국내 제빵업계의 현황 분석[근거 : 현장 방문조사(2007.09.06 ~ 10.02일(국내 6회, 해외1회), 국내 : 청아냉동, 베즐리, 김영모, 겐츠, 읍스 등, 일본 : JT(생지 제

조)사 등 유명 베이커리 방문조사]

나. 시장성 평가 및 향후계획 : 국내 제빵업계 프랜차이즈 현황: 4조원이상 추정(윈도우 베이커리, 호텔제과 및 외식업체 제외)되며 매년 32% 이상 증가 추세임

다. 국내 냉동 생지 제조 및 유통업체(국내 4대 대형업체 상용기준) : 약 4조원 추정

라. 국내 제빵원료(밀가루) 생산 및 수급현황(근거: '1999 ~ 2005' 세계통계 FAOSTAT DATABASE, '2000 ~재배면적통계, 농산물품질관리원)

1) 생산

가) 재배면적 : 2001년 전국 0.9천ha, 경남 0.4천ha , 2002년 전국 1.8천ha 경남 0.5천ha 2003년 전국 3.3천ha 경남 1.0 천ha로 나타났음.

나) 생산량 : 재배면적의 감소에 따라 생산량도 감소하고 있으며, 이는 국내 소비에는 크게 부족한 실정임(2001년 전국 2.8천톤, 경남 1.2천톤으로 감소하다, 2002년 전국과 경남 각각 5.8천톤, 1.5천톤 2003년 전국과 경남 각각 10.0천톤, 2.8천톤으로 다시 증가한 것으로 나타났음).

2) 소비 :밀의 1인당 소비량은 34.6kg/년, 연간 밀가루 소비량도 1,500천톤으로 안정적임.

3) 수출입 :국내소비량의 대부분을 수입에 의존하고 있으며, 앞으로도 수입의존도가 높아서 식량자급도에 크게 영향을 미칠 것으로 보임 . 2007년도 전체 수입량은 8,681천톤(4172천 USD)이며, 월간 대비 2008년은 약 2배의 증가추세를 보임..

4) 밀수급 현황: 대부분 수입에 의존하고 있고, 국내산은 2천톤('06)에 불과함.

5. 국내 제빵업계 현황분석 및 사업화 방안

가. 국내외 제빵업계 현황분석

- 1) 특화된 제품 개발인력 및 시스템 결여로 인하여 특화성 보유 신제품 개발 불가
- 2) 특화성 결여로 인한 시장 적응성 및 창출성 결여
- 3) 전문 Know-How로 품질 불균일화 및 소비자 충족형 제품없음.
- 4) 수작업으로 인한 일정한 Productivity , Quality 결여
- 5) 미숙련자, 비기술인 생산 어려움과 인건비, 원재료비 상승, 가계운영 어려움

나. 성장요인 및 전망

- 1) 베이커리 전체시장 매출규모 추정 약 3조원대이고, 본 과제는 새로운 접근법으로 파이를 더욱 키울 수 있을 것으로 기대됨.
- 2) 양산, 프랜차이즈 연간 10%대 볼륨 증가추세
- 3) 전문화 정착과 시장변화로 점차 프랜차이즈 볼륨은 감소하나, 전문 윈도우베이커리 시장볼륨은 증가할 것으로 조사되었음. 결국, 5~10년 이내에 판도변화 예상

제 2 절 관련산업(제과) 시장 및 전망

1. 생산 및 시장현황 :국내 약 4조원(해외 평가 불가)

가. 국외 제품생산 및 시장 현황

1) 일본 : JT(생지 제조)사 등 유명 베이커리방문 및 박람회(2009 IFIA)참관

가) 기존의 일반 기능성 소재(키토산, 카로티노이드, 베타글루칸 등)적용 제품화 단계에서 벗어나지 못하고 있음

나) 저칼로리 및 저감미도 등의 원료소재 적용으로 건강기능성(항산화, 고지혈 등) 제품컨셉에 치중하고 있음

2) 유럽 : 프랑스, 스위스, 독일내 총 25개업소 방문 및 박람회(2010 유로빵)참관

가) 제품 및 원료의 세분화로 다양한 제품컨셉 사용되고 있으며, 한정된 유기농 인증원료를 활용하고 있음

나) 빵은 샌드위치, 구움 과자류 등과 매치시켜 시너지 극대화(생산성+수익성)하고 있음

다) 주력품목을 기본으로, 제품의 다양화로 소비층의 구매력을 끌어들이는 전략을 구사

나. 국내 제과·제빵분야 시장 현황 : 약 4조원

1) 국내 제과·제빵업계의 현황분석[근거 : 국내 유명 햄버거 및 샌드위치 전문점(6개업소)]

가) 제품컨셉이나 인테리어 판매방식의 차이외에 제품의 특화성은 결여

나) 일반효모의 이용으로 특화시키기에는 한계성이 있어 보임

다) 내용물은 햄버거패티, 햄, 치즈 등 다양한 재료를 사용하고 있으나, 소스와 빵의 조화가 맞지 않아 고급원료를 사용함에도 좋은 맛과 제품특화성 컨셉에는 미흡함.

2) 국내 제과·제빵업계 및 건식식 분야의 시장성 평가

가) 국내 베이커리 시장 M/S(2006~2008년기준) : 4조원 이상 추정

분 류	업 체	업체수	매출액(단위:억)		
			제빵	제과	전체매출
양산베이커리	삼립, 샤니, 기린등	편의점, 마트 등 10,000곳 이상	약 300	약 200	약 500
프랜차이즈	파리바게트, 뚜레쥬르, 크라운, 신라명과 등	약 4,200여 업소	약 1,050	약 450	약 1,500
원도우베이커리	김영모, 나폴레옹 등	약 7,000여 업소	약 1,125	약 375	약 1,500
할인매장	이마트, 롯데마트 등	약 300-400여 업체	200-300	100	300-400
호텔,뷔페 등	위커킬, 인터콘티넨탈 등	100여 업체이상	-	-	추산불가
기 타	외식업체, 제과업체 (롯데, 크라운등), OEM	약 1,000곳 이상	-	-	추산불가
합 계	-	약 22,550업체	2,750이상	1,100이상	3,850이상
비 고	<ul style="list-style-type: none"> ■ 호텔, 외식업체 등은 식사 및 디저트로 제공되어 때문에 판매액으로 환산 어려움 ■ 이 외에도 각 지역 곳곳의 OEM 등으로 생산하는 업체는 조사불가 ■ 추정 불가시장을 포함하면 약 5조원을 상회할 것으로 보임(수입제품 등) 				

나) 국내 베이커리 품목별 출하액 변동현황 ; 제빵·제과 품목은 성장추세를 보이고 있으며, 기본 제빵(식빵) 품목은 기존산업효모 유래의 한계성으로 인한 특화성의 결여로 하락세를 보이는 것으로 판단됨.

품 목 명	2005년			2006년			2007년			2008년				
	출하액	점유율	신장율	출하액	점유율	신장율	출하액	점유율	신장율	출하액	점유율	신장율		
빵류(식빵)	631,702,563	42.98	4.51	640,139,557	41.25	1.34	171,449,957	9.38	20.69	166,807,652	8.63	-2.71		
*빵류(카스텔라)							32,923,423	1.70		601,155,508	32.91	7,811,597	0.40	10.15
*빵류(핫도그)							7,811,597	0.40						
*빵류(기타)							621,461,272	32.16						
빵류(케이크)	384,322,735	26.15	24.78	463,058,314	29.84	20.49	502,522,963	27.51	8.52	527,469,337	27.30	4.96		
빵류(도넛)	74,531,910	5.07	19.93	82,994,466	5.35	11.35	94,006,670	5.15	13.27	81,680,556	4.23	-13.11		
빵류(피자)	217,790,004	14.82	50.69	168,792,799	10.88	-22.50	4,310,533	0.24	43.11	18,461,238	0.96	328.28		
빵류(파이)							7,848,421	0.43		11,029,427	0.57	40.53		
만두류							229,408,479	12.56		200,338,843	10.37	-12.67		
떡류	161,294,529	10.98	12.32	196,722,981	12.68	21.97	216,205,645	11.83	9.90	264,135,527	13.67	22.17		
총 계	1,469,641,741	100.00	16.39	1,551,708,117	100.00	5.58	1,826,908,176	100.00	17.74	1,932,118,872	100.00	5.76		

*: 2008년도 신규코드임(출하액:천원, 점유율·신장율:%), 근거 :08기준. 식품안전정책과(식약청)

다) 국내 건기식품 생산현황 :건기식의 생산량은 점차 증가추세를 보이고 있으나, 효모관련 품목은 07년대비 23%가 증가했지만, 평균적으로 총생산량 대비 2%의 평균점유율(정제)를 보이며, 소비자 기호성(건강기능요구성)에 충족시 그 성장률은 기대할 수 있음.

구 분	총 생산액(억원)	내수용(억원, 톤)		수출용	
		생산액(효모관련)	생산량	생산액(억원)	생산량(톤)
2005	6,856	6,433(196)	11,844	423	1,128
2006	7,008	6,637(184)	10,933	371	667
2007	7,235	6,888(146)	10,239	346	339
2008	8,030 ¹⁾	7,516(179)	12,990	514 ¹⁾	697
'08/'07(%)	△11.0	△9.1(△23)	△26.9	△48.6	△105.7
비 고	¹⁾ 1\$ = 1,310(2008)				

근거 :08기준. 식품안전정책과(식약청)

다. 국내 제품생산 및 시장현황

- 1) 본 과제와 관련하여 유기농 토종효모자원 유래 개발소재의 제과제품화는 적용사례가 없는데, 이는 소재개발 및 산업화에 있어서, 기본 대량생산 시스템 및 판매망의 구축이 필요하기 때문에 영세 제조업체가 이를 산업화 하기에는 장단기적으로 곤란하기 때문임.
- 2) 제빵업체인 부첼라(주)를 인수완료 하였으며, 사업화시 보유 영업판매망 적극활용할 예정임. [제조사(주관) →기구축 대리점 전국 50 특판대리점 → 기존관리 전국제빵제과업소 5,000사보유]
- 3) 본 과제 관련하여 효모유래 기능성 소재별 판매가격은 글루코만난(효모세포벽 소재)는 1,250,000원/Kg(일본 오리엔탈사, *Saccharomyces cerevisiae*), 효모추출물(*Candida utilis*, 핵산 포함) 경우는 60,000원/kg(일본, KOHJIN사), 효모추출물(핵산 제거제품)은 55,000원/kg으로 고가였음.
- 4) 본 과제 결과는 점차적으로 증가하는 제과제빵 및 건강기능식품 시장을 선도할 수 있음을 시사함.

제 7 장 참고문헌

- Azushi N. 신규빵 효모 및 그것을 이용한 빵(특허등록 10-0858177)
- Kakuta. T.1989. Bio industry.6(2).134-143.
- Kreger-van RN. 1984. The yeast, a taxonomic study, 3rd ed. Elsevier science publishers B.V., Amsterdam, Netherlands. pp 399-413
- Lodder j. and Kreger-van RN. 1952. The yeasts. 2nd ed. North Holland publishing Co. Amsterdam, Netherlands. pp 713
- Reiko Hirasawa *et al.* 2001. Improving the Freeze Tolerance of Bakers' Yeast by Loading with Trehalose. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 65 (3), 522-526.
- Sujaya IN, Antara NS, Sone T, Tamura Y, Aryanta WR, Yokota A, Asano K, Tomita F. 2004. Identification and Characterization of Yeasts in Brem, a Traditional Balinese Rice Wine. *World Journal of Microbiol Biotechnol* 20:143-150
- Yarrow D. 1998. Methods for the Isolation, Maintenance and Identification of Yeasts. In: Kurtzman C.P. and Fell JW. eds, *The Yeasts: A Taxonomic Study* 4th ed. Elsevier Science Publ., Amsterdam, Netherlands. pp 77-100
- 강옥주. 2008. 발효차로부터 효모의 분리 및 동정. *Korean J. Food Cookery Sci.* 24(1): 11-15
- 김문용, 전순실. 2008. Sourdough대체가 호밀-밀 혼합빵의 품질특성에 미치는 영향. *한국식품영양학회지.* 37(5).625-632.
- 김재범, 권미정, 남희섭, 김재훈, 남수완. 2001. 당밀배지를 이용한 고함량 RNA 효모의 유가배양. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* Vol. 29, No. 4, 234-239.
- 김주현. 2009. 미생물에 의한 생물계면활성제 대량 생산을 위한 기술 개발. 석사학위논문
- 김진옥, 박장서. 1997. 효모의 분류, 특성 및 산업적 이용. *생물산업.* Vol.10. No. 2. 26-33.
- 노정해, 김영봉, 길복임. 2002. 국내산 키위연육제 제조과정 중 부형제의 첨가가 키위분말의 품질에 미치는 영향. *Kor. J. Food Sci. Technol.* Vol.34, No. 5, 805-810.
- 서정훈. 2000(3ed). *공업미생물학*. 형설출판사
- 신해현, 조정섭, 박혜영, 변유량. 1992. 재조합 *Saccharomyces cerevisiae*의 Invertase 발현에 미치는 아미노산과 용존산소의 영향. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* Vol. 20, No. 3, 348-354.
- 월간제과제빵사.1990. 제과제빵. 27(9).
- 이기평. 물엿 전처리 효모를 이용한 빵의 제조방법(등록번호: 제 10-0430040호)
- 정헌식, 홍주현, 윤광섭. 2005. 부형제 종류에 따른 아가리쿠스버섯 과립의 품질 특성. *Kor. J. Food Preserv.* Vol. 12, No. 3, 247-251.
- 한국특허. 신규한 전분자화성 효모와 그 용도(제0767383호)
- 황성희, 홍주현, 정용진, 윤광섭. 2002. 부형제의 혼합비에 따른 분말식초의 품질 특성. *Kor. J. Food Preserv.* Vol. 9, No. 2, 189-193.

주 의

1. 이 보고서는 농림수산식품부에서 시행한 농림기술개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림수산식품부에서 시행한 농림기술개발사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니됩니다.