

보안 과제(), 일반 과제(O) / 공개(), 비공개(O)발간등록번호(O)

고부가가치식품기술개발사업 최종보고서

발간등록번호

11-1543000-003048-01

Sulforaphane과 Cordycepin Conjugation의 다기능성 천연 보존제를 이용한 곡류 및 곡류 가공품의 유통 안전성 확보 기술개발

최종보고서

2020. 03. 31.

주관연구기관 / (주)비에스티

농림축산식품부
농림식품기술기획평가원

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

‘Sulforaphane과 Cordycepin Conjugation의 다기능성 천연 보존제를 이용한 곡류 및 곡류 가공품의 유통 안전성 확보 기술개발’(연구개발 기간 : 2018. 04. 20 ~ 2019. 12. 31.) 과제의 최종보고서 1부를 제출합니다.

2020. 03. 31.

주관연구기관명 : (주) 비에스티 (대표자) 이 호 (인)
협동연구기관명 : (대표자) (인)
참여기관명 : (대표자) (인)

주관연구기관책임자: 이 호
협동연구기관책임자:
참여기관책임자:

국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정 제18조에 따라 보고서 열람에 동의 합니다.

<보고서 요약서>

보고서 요약서

과제고유번호	11854-02	해 당 단 계 연 구 기 간	2018.04.30. ~ 2019.12.31	단 계 구 분	2년차/ 2년
연구사업명	단 위 사 업	농식품기술개발사업			
	사 업 명	고부가가치식품기술개발사업			
연구과제명	대 과 제 명	(해당 없음)			
	세부 과제명	Sulforaphane과 Cordycepin Conjugation의 다기능성 천연 보존제를 이용한 곡류 및 곡류 가공품의 유통 안전성 확보 기술개발			
연구책임자	이 호	해당단계 참여연구원 수	총: 6 명 내부: 6 명 외부: 명	해당단계 연구개발비	정부: 190 천원 민간: 65 천원 계: 255 천원
		총 연구기간 참여연구원 수	총: 6 명 내부: 6 명 외부: 명	총 연구개발비	정부: 336 천원 민간: 115 천원 계: 451 천원
연구기관명 및 소속부서명	(주) 비에스티 기업부설연구소			참여기업명	
국제공동연구	상대국명:			상대국 연구기관명:	
위탁연구	연구기관명:			연구책임자:	
연구개발성과의 보안등급 및 사유	일반 과제				

※ 국내외의 기술개발 현황은 연구개발계획서에 기재한 내용으로 같음

9대 성과 등록·기탁번호

구분	논문	특허	보고서 원문	연구시설 ·장비	기술요약 정보	소프트 웨어	화합물	생명자원		신품종	
								생명 정보	생물 자원	정보	실물
등록·기탁 번호	✓	✓									

국가과학기술종합정보시스템에 등록된 연구시설·장비 현황

구입기관	연구시설· 장비명	규격 (모델명)	수량	구입연월일	구입가격 (천원)	구입처 (전화)	비고 (설치장소)	NTIS 등록번호

요약

- 동충하초 배양 및 브로콜리 추출 공정 확립 : 동충하초 배양 온도, 습도, 광도 조절을 통한 Cordycepin 함량 최대 50% 증가 / 브로콜리 전처리 조건 확립을 통한 추출수율 최대 100% 증가
- 복합 추출물의 생물전환(Conjugation) 공정 확립 : 동충하초&브로콜리 배합비율 및 사용균주, 생물전환 시기 확립을 통한 복합추출물의 항균 활성 향상.
- 곡물 가공품 Challenge 평가 : 대표적인 곡물가공품 식빵, 떡, 생면에 대한 미생물 평가를 통한 사용방법 및 농도 확립.
 - 대표 곡물 가공품 모두 BGC 0.5 ~ 0.8% (in 90% EtoH) solution 처리시 무처리 대비 최대 10일 이상 연장
 - 상기 사용 농도는 Solution 농도이며, 곡물가공품에 적용 농도는 무게 대비로 환산하였을 때 0.01 ~ 0.05% 미만.
- 시제품의 기타 평가 : 시제품에 대한 안정성, 안전성, 기타 생리활성, 관능시험 평가를 통한 DB 확보 및 상용화 적합성 여부 확인
 - BGC의 DPPH RC₅₀은 592.52 µg/mL 생물전환 전 보다 2배이상 향상.
 - BGC 제형의 안정성은 열, 일광 가혹조건에서 침전, 이물 미발생 및 효능 유지
 - BGC 세포독성 결과 BGC 2.00% 첨가시 세포독성 없는 것으로 확인.
 - BGC 관능평가 민감도가 높은 음료에서 0.1% 첨가시 영향 없음 확인.

보고서 면수

35

<요약문>

<p>연구의 목적 및 내용</p>	<ul style="list-style-type: none"> ○ 천연 향균 소재에 대한 데이터베이스 구축 및 생물전환 등 기술력 확보 ○ 곡물 가공품에 최적화된 미생물 제어 및 기타 생리활성을 갖는 천연 향균 소재 개발 ○ 본 개발 제품을 통하여 곡물 가공품의 고부가가치 부여 및 경쟁력 확보 ○ 식품 보존제 관련 수입 제품 대체 효과 및 지적 재산권 확보를 통한 관련 분야 경쟁력 확보. 				
<p>연구개발성과</p>	<ul style="list-style-type: none"> ○ 동충하초 배양 및 브로콜리 추출 공정 확립 : 동충하초 배양 온도, 습도, 광도 조절을 통한 Cordycepin 함량 최대 50% 증가 / 브로콜리 전처리 조건 확립을 통한 추출수율 최대 100% 증가 ○ 복합 추출물의 생물전환(Conjugation) 공정 확립 : 동충하초&브로콜리 배합비율 및 사용균주, 생물전환 시기 확립을 통한 복합추출물의 향균 활성 향상. ○ 곡물 가공품 Challenge 평가 : 대표적인 곡물가공품 식빵, 떡, 생면에 대한 미생물 평가를 통한 사용방법 및 농도 확립. ○ 시제품의 기타 평가 : 시제품에 대한 안정성, 안전성, 기타 생리활성, 관능시험 평가를 통한 DB 확보 및 상용화 적합성 여부 확인 				
<p>연구개발성과의 활용계획 (기대효과)</p>	<p>[기술적 기대성과]</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 천연 Library 구축 및 업데이트를 통한 천연 소재의 활용도 및 상품화 촉진 2. Conjugation 도입 및 상품화를 통한 국내 연구 방향성 제시 및 확대 3. 생물 전환에 최적화된 미생물 선별 및 데이터 구축을 통한 발효 식품 또는 기능성 식품분야의 연구 활성화 유도 4. Broad한 미생물 제어력을 갖는 천연 향균제를 이용한 생활용품 적용 기술 기반 구축 5. 다기능성 천연 향균제 개발을 통한 소비자의 안전성 확보. <p>[사업적 성과]</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 빵, 떡 등 곡물 가공품의 미생물적 요인으로 인한 폐기율 최대 50% 감소시, 연간 2,000 ~ 3,000억원의 부가가치 창출 (폐기 비용 및 재생산 원가 비용 절감) 2. 고가의 수입 천연 향균제에 대한 의존도 대체를 통한 제조업 등 사용자의 원가 부담 절감 및 국내산의 천연 재료 활용을 통한 농민의 부가가치 증대 수입 천연 향균제 : 연간 약 50억 -> 자사 제품 대체 시 단가 30~40% 절감 가능 3. 곡물 가공품의 국내 시장 확대 및 해외 수출 기회 증대를 통한 소득 증대 4. 시장의 확대를 통한 쌀 등의 원료 생산자인 농민의 안정적 판매처 구축 및 재고 소비를 통한 소득 대폭 증대. 5. 친환경, 무농약 웰빙 등 소비 트렌드에 맞춘 상품화 및 고부가가치를 통한 소득 증대. 				
<p>국문핵심어</p>	<p>곡물 가공품</p>	<p>미생물</p>	<p>천연 보존제</p>	<p>코디세핀 -설포라판</p>	<p>유통기한</p>
<p>영문핵심어</p>	<p>Grain processed products</p>	<p>microorganism</p>	<p>natural preservative</p>	<p>Cordycepin - Sulforaphane</p>	<p>shelf life</p>

〈 목 차 〉

제 1 장 서론	6
제 1 절 연구개발 과제의 개요	6
1. 연구개발의 필요성	6
2. 연구개발의 총괄 목표	8
3. 연구개발범위	9
제 2 장 연구수행 내용 및 결과	13
제 1 절 연구개발 수행 방법 및 주요 연구결과	13
1. 향균활성을 갖는 천연 후보 물질 추가 선별	13
2. 동충하초(현미 배지 배양)의 배양 조건 확립	15
3. 브로콜리 전처리 및 추출 공정 확립	16
4. 유용성 미생물 선별	17
5. 복합 추출물의 Conjugation (생물전환)	17
6. 천연 보존제(BGC)의 제조 공정도	18
7. 천연 보존제(BGC)의 기타 생리활성	19
8. 1차 Lap scale pilot & Challenge 평가	20
9. 천연 보존제(BGC) 2차 Challenge 평가	22
10. 천연 보존제(BGC)의 안정성 평가	26
11. 천연 보존제(BGC)의 안전성 평가	27
12. 천연 보존제(BGC)의 관능 평가	28
제 2 절 연구개발 제품의 사업화 성과 및 매출실적	30
제 3 장 목표 달성도 및 관련 분야 기여도	31
제 4 장 연구결과의 활용 계획 등	32
붙임1. 참고 문헌	35

제 1 장 서론

제 1 절 연구개발과제의 개요

1. 연구개발의 필요성

- 곡물 제품에 적합한 천연 보존제 개발의 필요성

<div style="text-align: center;">  <p>인류주식 탄수화물 니즈 변화</p> </div> <p>탄수화물의 소비 형태 변화</p> <ul style="list-style-type: none"> - 식자재의 편의성 요구 - 간편하고, 맛있는 편이식품 <p>이면서, 인류의 주식인 탄수화물인 곡물가공식품 시장 확장 및 니즈 변화</p> <ul style="list-style-type: none"> - Ready To Eat(조리 과정 없이 곧바로 섭취 제품) 급증 	<div style="text-align: center;">  <p>곡물 가공식품 안전성 문제</p> </div> <p>안전성 제고 필요</p> <ul style="list-style-type: none"> - 곡류 가공제품의 품질 저하 및 식중독 유발 미생물 <i>Bacillus cereus, Salmonella spp., Vibrio parahaemolyticus, Escherichia coli, Staphylococcus aureus</i> - 곰팡이 독소(발암물질) 아플라톡신 및 푸모니신 - 안전한 천연 보존제 개발 시급 	<div style="text-align: center;">  <p>곡물 가공식품의 손실 및 폐기</p> </div> <p>안전성 문제로 상품 폐기</p> <ul style="list-style-type: none"> - 전국 빵 및 떡 생산량 105톤 경기도 40%(39.78%) '14기준 - 제빵 및 떡 유통경과 폐기 연간 6,500억원 손실 ('15 소비자원) - 유통기한 5~15일 연장시 최대 4,500억원의 피해액 절감 가능 ('15 식품 유통관련보고)
--	---	--

- 최근 식생활패턴 변화로 어린아이부터 어른까지 간편하게 먹을 수 있는 곡물 가공제품을 찾게 된다. 이전에는 간식으로 생각했던 빵, 떡, 면제품은 바쁘게 돌아가는 현대 사회에서 주식을 대체 할 수 있는 제품으로 여겨지면서 지속적으로 소비량이 증가하였다.
- 그 중 떡 제품은 2006년 이후 꾸준한 증가추세를 보이고 있으며, 매년 10 ~ 20% 성장률을 보이며 2010년에는 3,600억원 규모를 이루었다. 이러한 성장세는 소비자들의 건강에 대한 관심도가 점차적으로 증가한 요인과 쌀 소비에 대한 정부 및 지자체의 지속적 투자로 인하여 다양한 제품 출시가 소비자 취향에 대한 만족도를 높였기 때문이다.
- 빵의 경우 2005 ~ 2009년 평균 6.1%의 성장률을 보이고 있으며, 2012년 기준 약 1조 9,854억 원으로 추산된다. 올해의 경우 지난해 같은 기간(1 ~ 5월) 보다 평균 8.8% 매출액이 증가하였으며, 종류에 따라 최대 17% 증가한 제품도 있다.
- 이러한 빵, 떡, 생면 제품은 특히 곡물 가공제품 중 수분함량이 많은 편에 속해 미생물의 성장함에 있어 최적의 환경을 제공한다. 또한 유통 과정 중에 미생물에 대한 2차 노출 빈도가 높은 제품으로 위생상 안전성이 우려되는 실정이다. 포장 등으로 외부 환경을 차단하였더라도 여름에는 유통과정 중 저온과 고온 환경에 빈번히 노출되면서 세균의 급격한 번식 및 곰팡이 발병률이 높아진다.
- 곡류 가공제품의 품질을 저하시키는 미생물 외 *Bacillus cereus, Salmonella spp., Vibrio*

parahaemolyticus, Escherichia coli, Staphylococcus aureus 등은 식중독을 유발 시키는 균으로 알려져 있다. 시판 중인 제품 조사 결과 대장균군은 $10^3 \sim 10^4$ CFU/g, Bacillus cereus는 $10^1 \sim 10^2$ CFU/g 등 세균이, 곰팡이인 Aspergillus spp.도 $10^2 \sim 10^5$ CFU/g 검출되었다는 보고가 있다.

- 최근에는 한 제조업체에서 생산된 떡과 면에서 기준치의 110배에 달하는 미생물이 검출되기도 하였으며, 시리얼 제조 업체의 경우 최종 제품상 문제는 없었으나 중간 공정에서의 미생물 발생으로 이슈가 되었다.

- 상기 식중독 유발균들 중 곡류 가공제품에 많이 분포하는 Bacillus cereus, Salmonella spp.의 경우 토양에서 흔히 검출되는 미생물로 수확, 저장 과정에서 쉽게 오염이 될 수 있다. 이러한 미생물은 열에 대한 저항력을 형성하며, 고온의 제조 공정을 거치는 떡과 빵 제품이라도 완제품에 검출되는 경우가 종종 보고되고 있다. 또한 미생물은 독성 물질을 배출하는데, 이로 인하여 질병의 발병하기도 한다.

- 미생물적 위해요소를 해결하기 위하여 1930년대부터 빵, 면 등 곡물 가공제품에 프로피온산을 보존제로 사용하기 시작하였다. 미국의 CFR(Code of Federal Regulation)에서는 화학적 혹은 박테리아 발효에 의해 생성된다고 밝혔으며, WHO 등은 가장 흔히 천연에서 유래되는 전형적인 보존료 중의 하나라는 보고서가 발표되었다.

- 이러한 합성 보존제는 안전성에 대한 논란과 우려가 항상 존재한다. 사용량의 제한을 두어 안전성에 대한 논란을 잠식시키려 하지만, 안식향산 같은 경우 전 세계적으로 사용되는 원료임에도 특정한 작용기를 지니고 있어 두드러기 및 천식 같은 질병이 야기된다고 보고되어 있으며, 소르빈산의 경우 아질산염과 함께 사용 시 DNA 손상 물질이 생성되어 발암의 원인, 중추신경 마비, 출혈성 위염 등 다양한 부작용이 나타날 수 있다.

- 합성 보존제에 대한 문제 제기 및 소비자들의 인식 변화로 사용량을 점차 줄여나가며 공정 개선으로 미생물 제어를 꾀하고 있지만, 적지 않은 빈도로 미생물 등에 의한 질병 사고가 발생한다.

- 이에 합성 보존제를 대신할 소재를 찾기 위해 많은 연구와 시도들이 계속됐는데, 많은 연구가 식물의 정유 성분의 항균 활성을 이용하는 연구를 중심으로 집중되어 있다. 그 외 천연 추출물 관련 연구 결과, 논문 등 많은 보고가 있지만, 실질적 상용화를 하기에는 미비한 항균력, 항균 향상을 위한 농축/정제 공정으로 인한 단가 상승, 적용 제품에 관능적(맛, 향, 색 등) 영향으로 많은 어려움이 있다. 일부 상용화 제품 중에는 극히 제한되어 있는 식품군에 적용 중에 있으며, 이 또한 합성 보존제 또는 산도조절제의 보조 역할을 하는 데 그치고 있다. 단일 추출물은 다양한 미생물 제어가 어려우며, 특히 진균(효모/곰팡이)에 대한 항균 활성이 낮게 보고되고 있다. 이에 (주)비에스티는 이러한 문제점을 천연 추출물의 복합제제 및 생물 전환 공법 도입을 통하여 해결방안을 제시하고자 한다.

- 따라서 본 연구는 천연 추출물의 생물전환(Conjugation)을 통해 다기능적 항균 기작 작용으로 다양한 제품에 적용 가능한 범용성 확보 및 미생물의 내성 획득에 대한 확률 저하, 인체 유익균에 대한 영향력 최소화를 통하여 안전성 입증 및 관능적 영향이 적은 천연 보존제를 개발하고자 한다. 개발 제품을 통하여 미생물적 안전성을 확보하여, 곡물 가공 산업 성장에 기여할 수 있을 거라 사료되며, 더 나아가 다른 식품 분야에 대한 적용 연구를 통하여 합성 보존제를 대체 할 수 있는 천연 보존제의 상용화를 유도할 수 있을 것으로 사료된다.

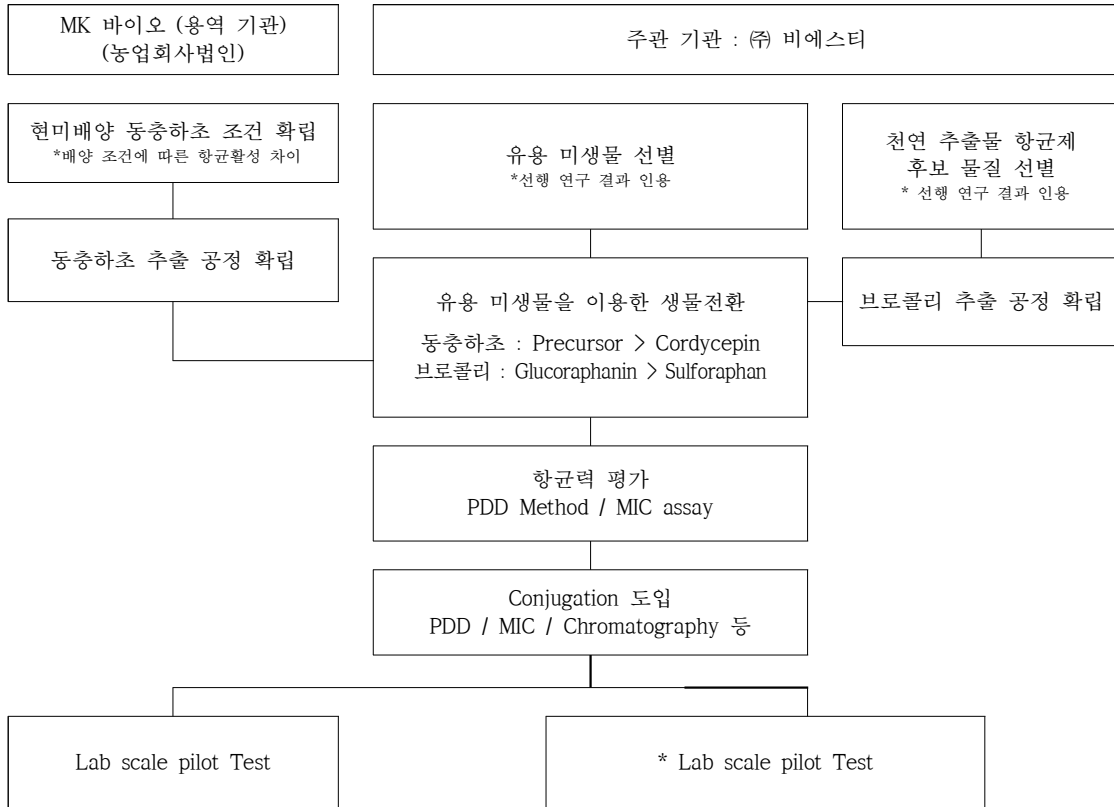
2. 연구개발의 총괄 목표

- 천연 항균 소재에 대한 데이터베이스 구축 및 Conjugation 등 기술력 확보
- 현 곡물 가공식품에 최적화된 미생물 제어 및 기타 생리활성을 갖는 천연 항균 소재 개발
- 본 개발 제품을 통하여 국내 곡물 가공식품의 고부가가치 부여 및 경쟁력 확보
 - 곡물 가공식품의 유통/판매 과정에서의 폐기율 감소 및 손실 비용 절감.
 - 안전한 먹거리를 소비자에게 제공함으로써 신뢰도 및 구매 의사 증가 유도.
 - 곡물 가공품의 유통 과정 다양화를 통한 소비자의 접근성 다양화
 - 국내 곡물 가공식품의 해외 진출 가능성 증대 및 전통 식품 세계화 유도.
- 식품 보존제 관련 수입제품 대체 효과 및 지적 재산권 확보를 통한 관련 분야 경쟁력 확보.
 - 곡물 가공식품 외 기타 식품에 적용을 통한 기존 합성 보존제 & (수입) 천연보존제 대체

3. 연구개발범위

가. 1차년도 연구개발 목표

(1) 1차년도 연구개발 절차

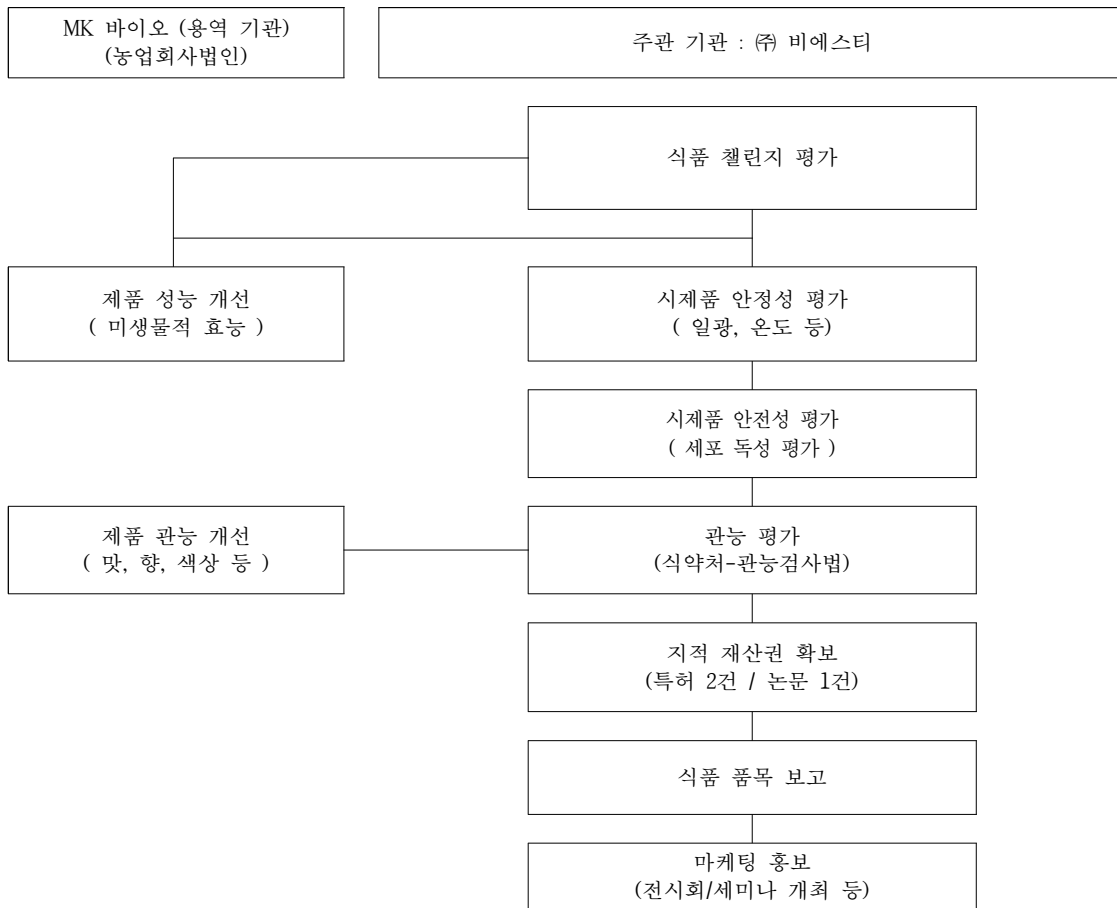


(2) 1차년도 연구개발 세부 내용

- 항균 활성을 갖는 천연 추출물 선별
 - > 천연 추출물 Screening을 통한 후보 물질 선별
 - > 브로콜리 추출 공정 개선 및 확립을 통한 Sulforaphan 활용 가능성 향상.
- 생물 전환 공법 최적화
 - > β -glycoside와 Esculin 반응을 이용한 유용 미생물 선별.
 - > 유용 미생물을 이용한 추출물 생물 전환을 통한 타겟 성분 함량 증가.
- 선별된 천연 추출물 평가
 - > Paper disc diffusion method : 1st - 8mm 이상 / 2nd - 10mm 이상
 - > Minimum Inhibitory Concentration assay : 1.0% 이하
- Lab scale pilot Test 진행시 유통 / 판매 환경 설정 및 가혹 조건 설정 설계.
 - > 미생물적 가혹 조건 설정 - 병원 미생물 접종 / 미생물 생육 최적 조건 형성
- 현미 배양 동충하초 재배 공정 개선 및 지표 성분 변화 여부 확인
- Lab scale pilot Test 진행 시 유통 / 판매 환경 설정 및 가혹 조건 설정 설계

나. 2차년도 연구개발 목표

(1) 2차년도 연구개발 절차



(2) 2차 년도 연구개발 세부 내용

- 시제품 곡물 가공 식품 챌린지 평가
 - > 곡물 가공 식품 2종 이상 선별하여 장기 평가 진행 (가속/가혹 조건)
- 시제품 제형적 안정성 & 안전성 평가
 - > 열 안정성 : 45℃에서 6개월 이상. / 광 안정성 : 일광 조건에서 6개월 이상.
 - 제형 안정성 : 정차 보관 6개월 이상.
 - > 안전성 평가 : 세포독성 평가를 통한 무처리구 대비 95% 이상 생존율 확인.
- 시제품 관능 평가 및 제품 문제점 개선
- 최종 시제품의 식품 품목 제조 등록을 통하여 안전성 및 사용 편의성 확보
- 제품 성능 / 관능 개선

다. 연구개발 목표 및 평가

주요 성능지표	단위	최종 개발 목표	가중치	비고
01. 항균 활성을 갖는 천연 후보 물질 평가		Clear zone - 최상위 5종 선발 MIC - 1.0% 이하	5	
02. 현미 배양 동충하초 조건 확립		동일 기간 내에 자실체 + 균사체 추출물의 유효 성분 함량 기준	5	
03. 추출 공정 개선을 통한 유효 성분 증가		추출 공정 개선 전 대비 10% 증가 [Cordycepin / Sulforaphan]	7.5	
04. 유용성 미생물을 이용한 성능 개선		전 단계 대비 5% 증가 유도 동충하초 : Precursor > Cordycepin 브로콜리 : Glucoraphanin > Sulforaphan	10	
05. 복합 추출물의 Conjugate 기술 접목		Clear zone 평가 - 10mm 이상 MIC 평가 - 1.0% 이하	12.5	
06. Lap scale pilot 평가		권장 사용 농도 확립 곡물 가공 식품 적용 가능성 확인.	5	
07. 식품 챌린지 평가		곡물 가공 식품 2종 병원성 미생물제어 99.9% 이상	17.5	
08. 제품 안정성 평가		광, 온도(저>고) 등 가혹 조건 6개월 성상 - 변화 없음 항균 활성 - 초기제품과 동등 미생물 - 불검출	10	
09. 제품 안전성 평가		무처리구 대비 95% 이상 생존	7.5	
10. 제품 관능 개선		맛, 향, 색상 등 관능 평가 - 7점 이상	2.5	
11. 지적 재산권 확보	건	특허 - 국내 1 / 국외 1 논문 - 1	5	
12. 식품 품목 보고	건	등록 2건	2.5	
13. 마케팅 홍보	건	전시회 참여 2건	5	

라. 연구개발 성과 목표

성과 목표											연구기반지표									
	지식 재산1권			기술 실시 (이전)		사업화					기술 인증	학술성과			교육 지도	인력 양성	정책 활용· 홍보		기 타 (타 연 구 활 용 등)	
	특 허 출 원	특 허 등 록	품 종 등 록	건 수	기 술 료	제 품 화	매 출 액	수 출 액	고 용 창 출	투 자 유 치		논 문		논 문 평 균 IF			학 술 발 표	정 책 활 용		홍 보 전 시
												S CI	비 S CI							
단위	건	건	건	건	백 만 원	건	백 만 원	백 만 원	명	백 만 원	건	건	건	건	명	건	건			
가중치	25					30			15				10					20		
최종 목표	1					2			3											
1차년도									1									1		
2차년도	1					2			2			1	1					2		
소 계	1					2			3			1	1					3		
종료 1차년도																				
종료 2차년도		1																		
종료 3차년도																				
종료 4차년도																				
종료 5차년도																				
소 계																				
합 계	1	1				2			3			1	1					3		

제 2 장 연구수행 내용 및 결과

제 1 절 연구개발 수행 방법 및 주요 연구 결과

1. 항균활성을 갖는 천연 후보 물질 추가 선별

가. 추출물 제조

본 과제에서 평가된 천연 추출물은 재래시장 및 인터넷을 통하여 구입하였으며, 원물을 세척수에 깨끗이 세척한 후 물기를 제거하였다. 물기가 제거된 원물을 적당한 크기로 세절하여 원물 중량 대비 10배수의 정제수로 열수 조건 ($100 \pm 10^\circ\text{C}$, 2 - 8시간)으로 추출하였고, 추출액은 여과지 (110mm, Advantec, Tokyo Roshi Kaish, Ltd., Tokyo, Japan)를 이용하여 여과액을 얻었다. 여과액은 회전감압농축기(EYELA, Rikakikai, Co., Tokyo, Japan)를 이용하여 $60 \pm 5.0^\circ\text{C}$ 에서 감압 농축하여 항균 활성을 비교하였다.

나. 후보 물질 평가 방법

(1) 사용 균주 및 배지

- 후보 물질 항균 활성 비교에 사용된 균주는 그람 음성균인 *Escherichia coli*를 사용하였으며, 3차 계대 배양을 통하여 활성화하여 준비하였다. 배지로는 Plate Count Agar (PCA, Difco, Detroit, MI, USA), 액체 배지는 LB Broth(Luria-Bertani Broth miller, Difco, Detroit, MI, USA)를 사용하였다.

(2) Paper disc assay

- 항균활성 측정을 위해 paper disc-diffusion method를 사용한다. 각 추출물들을 membrane filter로 채운 시킨 다음 균주 100 μl 가 균일하게 도발된 배지 위에 paper disc (ϕ 8mm)를 올려놓고 각 추출물을 40 μl /disc씩 흡수시켜 24시간 동안 incubator에서 배양한 후 disc 주위에 형성된 생육 저지대(clear zone)의 직경을 측정하여 항균 활성의 유무와 강도를 비교한다. 용해 용매인 DMSO 및 H₂O의 영향을 조사하기 위해 DMSO 및 H₂O를 대조구로 하였다.

(3) MIC (Minimal Inhibitory Concentration)

- 최소억제농도 측정은 활성화된 균주 100 μl 을 액체 배지에 접종한 후 배양하여 각 균주가 대수 증식기 중반기에 접어들 때 이를 각각의 새로운 배양배지 5 ml 에 100 μl 씩을 접종하였으며, 각각의 희석된 추출물을 1ml씩 첨가하여 최종 농도가 0.1 ~ 3.0%가 되도록 한다. 24시간 incubator에서 배양한 후 미생물의 생육정도를 UV-VIS spectro-photometer를 이용하여 620nm에서 흡광도를 측정한다. 배양 전 초기 O.D 값 또는 대조균를 reference로 설정하여 O.D 값이 변하지 않는 최고의 농도를 MIC value로 하였다.

다. Screening 평가를 통하여 천연 후보 물질 선별 결과

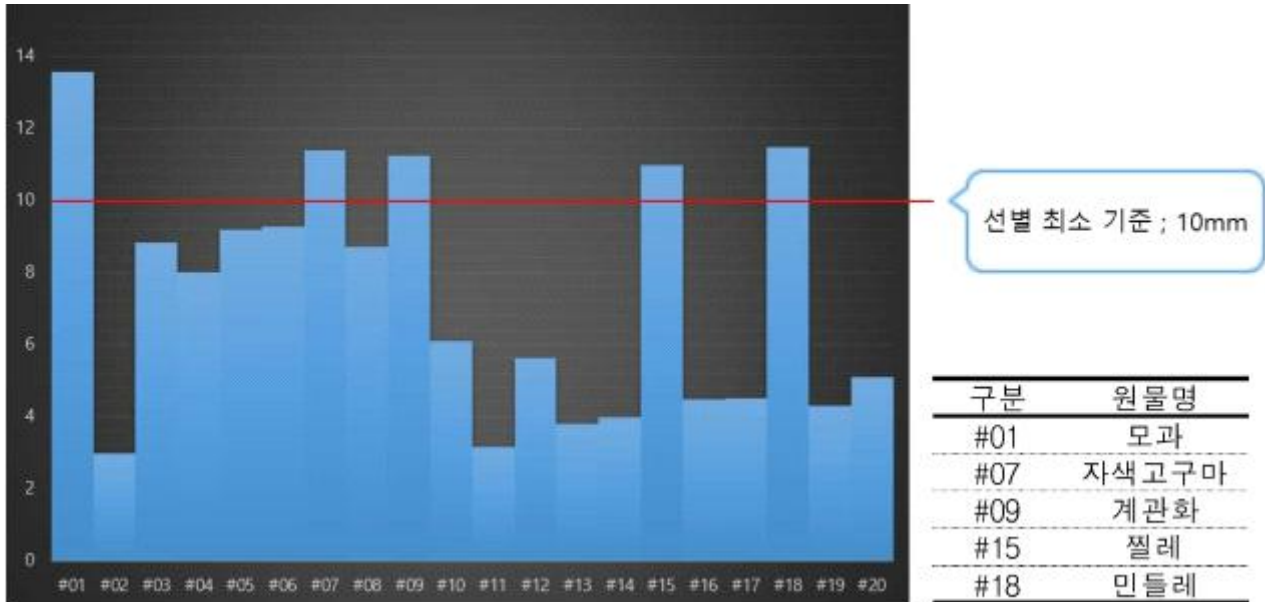


그림 1. 천연 후보 물질 Screening 평가 (Paper disc-diffusion method)

기존 천연 추출물의 20종의 천연 물질에 대한 항균 활성을 검토하였다. 신규 후보 물질에 대한 항균 활성은 Paper disc-diffusion method(이하 PDD method)를 통하여 비교 및 선별하였으며, 선별 기준인 clear zone 10mm 이상을 충족하는 5종을 선별하였다. 선별된 5종과 기존 후보 물질 16종을 MIC TEST를 시행한 결과 MIC value 1.0% 이하 해당되는 후보물질은 녹차, 마늘, 모과, 유자, 계관화, 민들레로 확인되었다. 이는 추후 동충하초/브로콜리 유효성분과 복합 구성을 통하여 다양한 종의 미생물 제어를 유도할 수 있을 것으로 사료된다.

2. 동충하초(현미 배지 배양)의 배양 조건 확립

표 1. 동충하초(현미 배지 배양)의 배양 조건에 따른 성장률 및 Cordycepin 함량 비교

구분	조 건	길이 (mm)	자실체 건조무게(g)	Cordycepin 함량 (mg/100g)	비고
----	-----	---------	-------------	-------------------------	----

◆ 재배 온도에 따른 성장률 & 함량 비교

#01	10.0 ± 0.2℃	45	3.6	470	
#02	12.0 ± 0.2℃	64	4.6	684	
#03	14.0 ± 0.2℃	85	6.0	680	
#04	16.0 ± 0.2℃	97	6.4	720	
#05	18.0 ± 0.2℃	100	6.9	780	
#06	20.0 ± 0.2℃	102	6.9	718	
#07	21.0 ± 0.2℃	86	6.1	684	

◆ 재배 습도에 따른 성장률 & 함량 비교

#08	70.0 %	76	5.2	712	
#09	75.0 %	85	5.7	705	
#10	80.0 %	88	6.2	718	
#11	85.0 %	92	6.5	740	
#12	90.0 %	102	6.9	780	
#13	95.0 %	104	6.9	718	

◆ 재배 광도에 따른 성장률 & 함량 비교

#14	200 Lux	98	6.7	524	
#15	500 Lux	97	6.6	550	
#16	1,000 Lux	101	6.8	650	
#17	1,500 Lux	99	6.4	731	
#18	2,000 Lux	102	6.9	780	

본 실험은 동충하초 재배 조건에 따른 길이, 무게, 코디세핀 함량을 비교하여 최적의 재배 조건을 설정하였다. 첫 번째로 온도에 따른 성장률 및 Cordycepin 함량을 측정하였을 때, 10℃ 부터 18℃까지 온도 상승함에 따라 성장률 및 Cordycepin 함량 모두 증가하였다(그림 2.). 하지만 18℃을 기점으로 추가 온도 상승시 모든 측정 수치가 감소하는 경향을 확인할 수 있었다. 재배 습도에 따른 비교에서는 습도 90%에서 Cordycepin 함량이 가장 높았으며, 습도 95%에서 는 성장률의 차이는 없으나 Cordycepin의 함량이 감소하는 것을 확인하였다. 마지막 조건인 광도에서는 200 Lux 부터 2,000 Lux까지 변화에 따른 성장률의 큰 차이를 보이지 않았지만 Co rdycepin의 함량은 광도의 세기에 따라 비례한 것을 확인하였다. 이를 통하여 동충하초의 현미 배지 배양 조건을 확립하였으며, 본 과제 개발의 원료뿐 아니라 추후 다양한 산업 분야에서 상업적 활용이 가능할 것으로 사료된다.



그림 2. 동충하초 (온도)조절별 성장률차이

3. 브로콜리 전처리 및 추출 공정 확립

표 2. 브로콜리 추출 조건에 따른 수율 및 항균 활성 비교

구분	추출 온도	추출 시간	기타 처리	¹⁾ 추출 수율	²⁾ 항균 활성
#01	4℃	3day	-	1.41	-
#02	4℃	7day	-	2.17	-
#03	4℃	3day	파쇄 후 6h정치 보관	1.82	-
#04	4℃	7day	파쇄 후 6h정치 보관	2.68	+
#05	60℃	4h	-	4.78	+
#06	60℃	8h	-	4.91	++
#07	60℃	4h	파쇄 후 6h정치 보관	5.32	++
#08	60℃	8h	파쇄 후 6h정치 보관	5.58	+++
#09	80℃	4h	파쇄 후 6h정치 보관	6.47	++
#10	80℃	8h	파쇄 후 6h정치 보관	6.93	++
#11	120℃	4h	파쇄 후 6h정치 보관	8.21	+++
#12	120℃	8h	파쇄 후 6h정치 보관	8.58	+++
#13	120℃	8h	파쇄 후 12h정치 보관	8.61	++~+++
#14	120℃	8h	파쇄 후 24h정치 보관	8.93	++
#15	120℃	8h	파쇄 후 48h정치 보관	9.47	++

+++ : 10mm 이상 / ++ : 7mm 이상 / + : 3mm 이상 / - : 측정불가

1) 추출수율 ; 추출 후 건조 감량 무게 / 추출에 사용한 원물 무게 * 100

2) 항균활성 ; Bio assay를 통한 Clear zone 비교 (mm)

본 실험은 브로콜리를 추출하는 데 최적의 조건을 설정하여, 제품 생산 단가 / 생산 공정의 균일화 / 제조된 제품의 재현성 등 도출하고자 하였다. 이에 추출 온도, 시간 변화에 따른 결과를 보면 온도가 증가하면 증가할수록 추출 수율이 증가하게 되며, 추출 시간 또한 늘어날수록 수율이 증가한 것을 확인할 수 있었다. 단, 추출 시간보다는 온도에 더 큰 영향을 받는 것으로 확인되었다. 또한, 파쇄 후 6h 정치 보관한 뒤 추출하는 것이 추출 수율에 유의미한 영향을 주는 것으로 확인되었는데, 이는 파쇄 후 브로콜리 내의 효소 반응에 의한 조직 유연화를 유도하여 추출 수율이 높아지는 것으로 판단된다. 항균 활성 또한 유사한 결과를 보여주고 있지만, 파쇄 후 24시간 이후 추출한 실험군(#14,#15)에서 항균 활성이 감소한 것으로 확인되었다. Kjaer(1963), Jung 외 등(2016)이 보고한 결과와 같이 증가된 유효 활성 물질은 일정 시간이 경과하면 효소 반응으로 인한 분해 또는 변환되어 항균 활성이 떨어지는 것으로 사료된다.

4. 유용성 미생물 선별

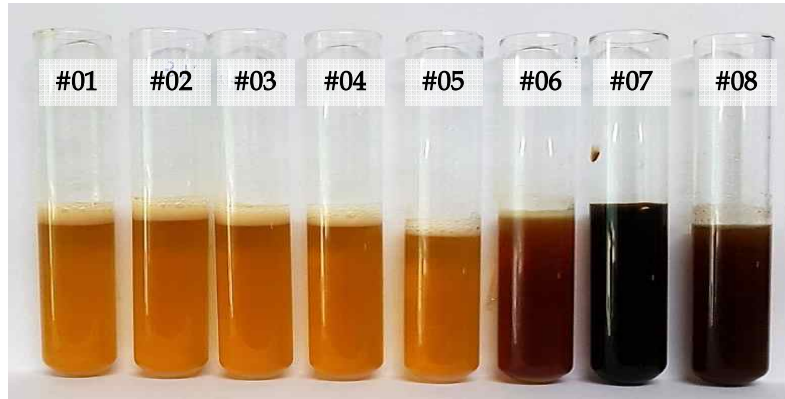


그림 3. Bill-Esculin Broth를 이용한 유용 미생물 선별

본 실험은 유효 미생물 선별을 위하여 Bill-Esculin Broth를 사용하였으며, 미생물 배양시 생성되는 β -glycosidase와 반응 경로를 통하여 흑갈색 또는 검은색을 발현하는 메카니즘을 이용하였다. 동일한 생균수의 균주를 Bill-Esculin Broth에 접종한 후 정치 배양을 통하여 최종 색의 차이로 미생물 균주를 선별하였다. 총 8종의 후보 균주 중 3종의 균주를 선별하였으며, 반응에 의한 발현 정도는 그림3과 같이 *Saccharomyces sp.*(#07), *Lactobacillus Plantarum*(#08), *Weissella cibaria*(#06) 순서로 확인되었다.

5. 복합 추출물의 Conjugation (생물전환)

표 3. 배합 비율 및 Conjugation에 의한 항균 활성 변화 평가

구분	동충하초 추출물	브로콜리 추출물	Cojungation(생물전환)	¹⁾ 항균 활성	비고
Group 1	100	0	-	++	
	100	0	²⁾ S / L	³⁾ +++	
	100	0	²⁾ S / W	++	
	75	25	-	++	
	75	25	S / L	++++	³⁾ Bio
	75	25	S / L	+++++	⁴⁾ Con
	75	25	S / W	+++	Con
Group 2	50	50	-	++	
	50	50	S / L	+++	Bio
	50	50	S / L	++++	Con
	50	50	S / W	+++	Con
Group 3	25	75	-	+	
	25	75	S / L	++	Bio
	25	75	S / L	+++	Con
	25	75	S / W	+++	Con
	0	100	-	+	
	0	100	S / L	++	
	0	100	S / W	++	

1) +가 많을수록 항균 활성 우수.

2) S ; *Saccharomyces sp.*, L ; *Lactobacillus Plantarum*, W ; *Weissella cibaria*

3) Bio ; each bioconversion → Mix

4) Con ; Mix → bioconversion = Conjugation

본 실험은 개발 원료의 항균 활성을 높임으로써 상품화 및 경쟁력 향상을 목표로 하고 있다. 배합 비율 및 Conjugation(생물전환) 공정 조건별 항균 활성을 테스트하였으며, 상대 비교를 통하여 가장 우수한 조건을 선별하였다. TEST는 크게 Group 1~3으로 설정하였으며, 이는 동충하초와 브로콜리 비율로 구분하였으며, 그 결과 동충하초가 약 50% 이상 혼합되었을 때 전반적으로 항균 활성이 높게 나타났다. Conjugation(생물전환) 조건으로는 미생물 종류 및 공정 적용 방법을 구분하였으며, 각각의 추출물을 생물전환 후 일정 비율로 혼합한 원료와 추출물을 혼합 후 생물전환 하였을 때를 비교하면, 전자의 항균 활성이 소폭 상승한 것을 확인하였다. 생물전환에 사용된 미생물의 경우 *Saccharomyces sp*와 *Lactobacillus Plantarum*을 혼합하여 사용하였을 때 항균 활성이 가장 높게 상승하였다. 이와 같은 항균 활성의 향상 원인을 Cojugation(생물전환)으로 사료되며, 성분의 변화 관찰을 위하여 HPLC 장비를 이용하여 분석하였다.

6. 천연 보존제(BGC)의 제조 공정도

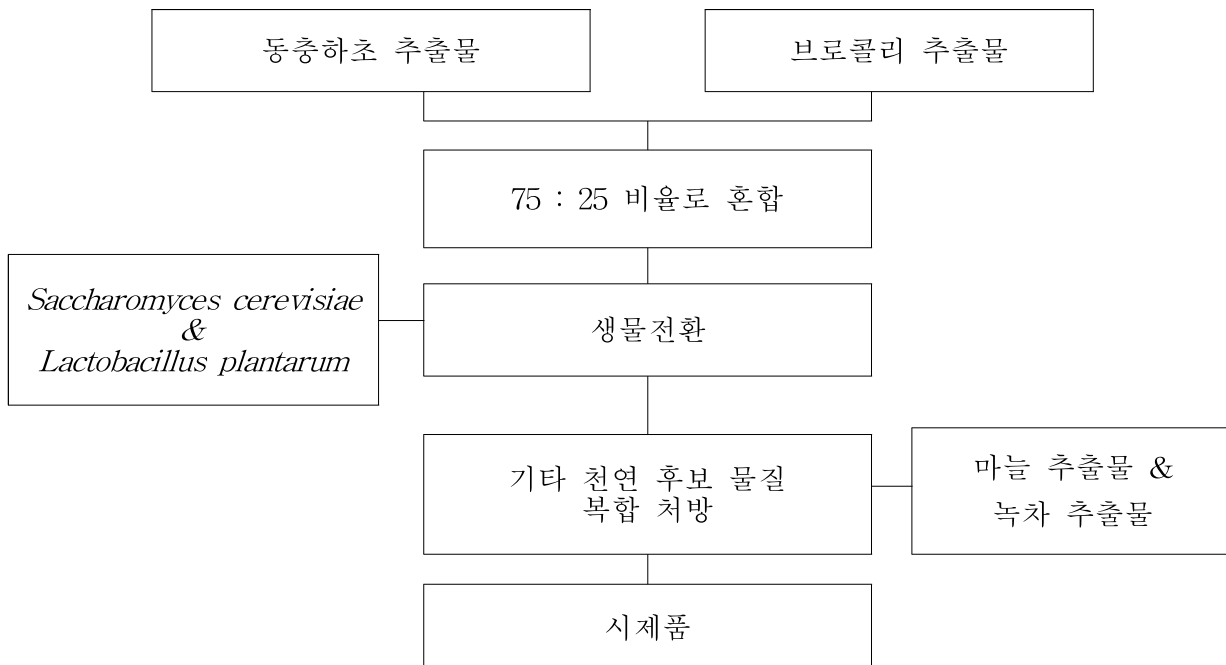


그림 4. 천연 후보 물질의 제조 및 복합 처방 모식도

앞서 동충하초의 배양 조건, 브로콜리 전처리, 유용성 미생물 및 생물전환 시기 등 조건을 확립하여 항균 활성을 향상 시킬 가능성을 확인하였다. 이에 추가적 선별된 후보 물질 녹차, 마늘, 모과, 유자, 계관화, 민들레 중 녹차와 마늘을 선별하여 복합 처방을 진행하였다. 이는 Choi 등(2012)은 그람 음성균 및 진균에 대하여 로스팅 커피 및 홍삼 단독 추출물의 항균 활성이 확인되지 않았으며, 특성 혼합비율로 추출하였을 때는 Clear zone이 그람음성 15mm, 진균 11mm로 확인되었다고 보고하였다. 이에 비에스티는 상기 언급한 바와 같이 곡물 가공품 및 더 나아가 다양한 식품, 기타 생활용품에 활용하기 위하여 천연 추출물을 복합처방하여 BGC라 명하였다.

7. 천연 보존제(BGC)의 기타 생리활성

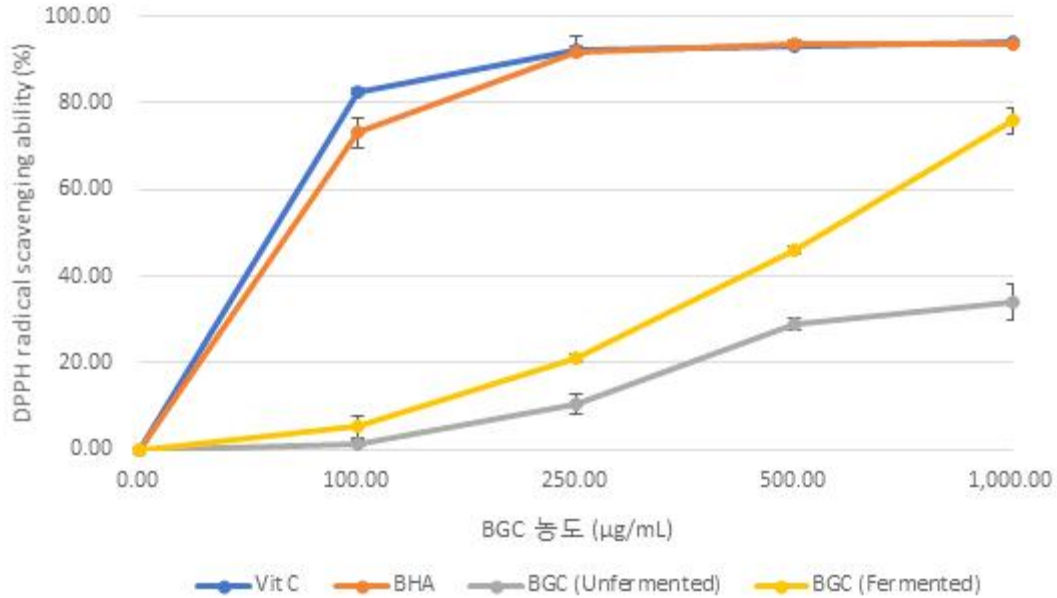


그림 5. 천연 후보 물질 생물전환에 따른 항산화 활성 비교

DPPH radical 소거능 결과는 <그림 5.>과 같으며, BGC의 경우 생물전환 전 / 후 모두 농도 의존적 경향을 보였다. DPPH radical을 50% 소거하는데 필요한 추출물의 첨가 농도는 양성대조군인 L-ascorbic acid와 BHA는 각각 49.95 µg/mL, 58.83 µg/mL로 나타났으며, BGC(동충하초&브로콜리 생물전환, 이하 발효 후 BGC)는 592.52 µg/mL로 나타났다. 발효 후 BGC는 양성 대조군에 비해 낮았으나, 발효 전 BGC(1,000 µg/mL 이상) 보다 항산화 활성이 높게 나타났다. 이는 Ahn 등(2013)은 총 7종의 미생물을 이용하여 동충하초 시료를 고형 발효시켰으며, 미생물 종류에 상관없이 발효 후 DPPH 소거능이 높게 나타났다고 보고하였다. Jang 등(2013)은 *Saccharomyces cerevisiae*, *Kluyveromyces fragilis*, *Lactobacillus plantarum* 혼합 균주를 이용하여 발효 시 발효 전 또는 단독 발효 추출물 보다 항산화 활성이 높게 나타났다고 보고하였으며, 본 연구 결과와 같이 혼합 균주 발효를 통한 항산화 활성이 향상된 것과 일치하였다.

8. 1차 Lap scale pilot & Challenge 평가

- 본 평가는 개발 원료 적용을 통한 곡물 가공품의 보존제로서 가능성 여부를 판단 및 2년 차 scale up 평가시 적용(권장) 농도를 설정하기 위하여 진행하였다. 곡물 가공품의 대표적 제품인 '제빵'을 택하여 평가하였다.

가. 제빵

(1) 비발효_제빵

- Challenge Test는 시중 [과운드 케익] 믹스 제품을 사용하였으며, 제조 방법은 믹스 파우더와 액상(우유or물) 균질하게 혼합 후 stock solution (식용유 + 농도별 개발 원료)을 첨가하였다. 180℃ 예열된 오븐에서 30~40분간 굽기 - 식힘 - 포장 과정을 거친 후 25±1.0℃ 인큐베이터에서 정치보관 하였다.

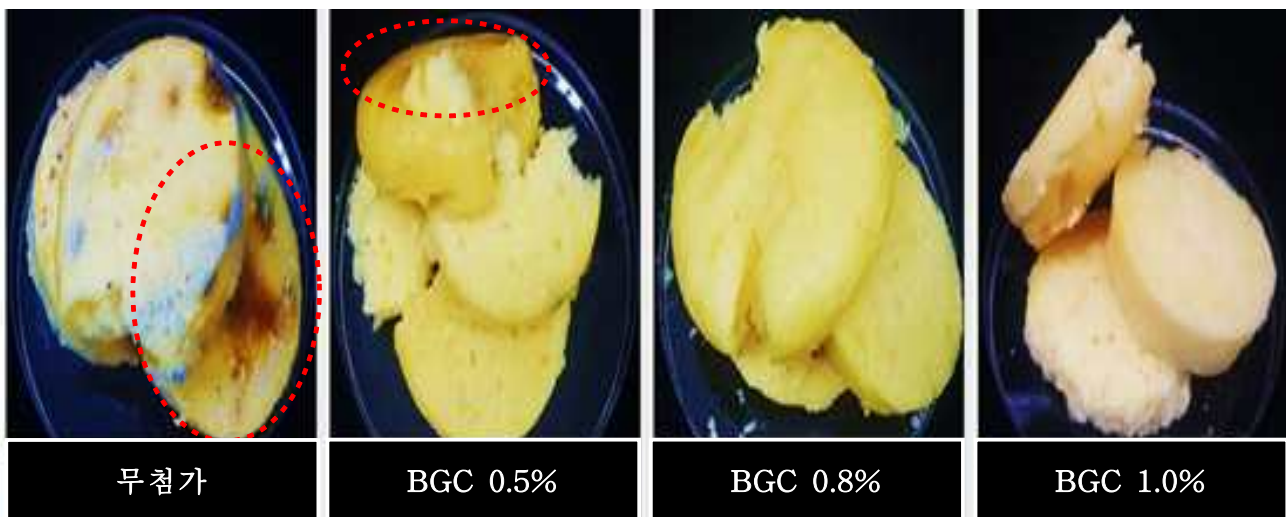


그림 6. 비발효 제빵 제품군에 개발 원료 적용 및 미생물 제어 평가

저장 10일 차에 무첨가구에서 곰팡이 [균사/포자]가 관찰되었으며, BGC가 첨가된 전 제품에서는 경시관찰이 되지 않았다. 이후 무첨가구는 점차 발병 면적률이 증가하였으며, 저장 20일 차에 BGC 0.2% 첨가구에서 곰팡이가 경시 관찰되었다. <그림 6.>과 같이 저장 30일 이후 무첨가구에서 다량의 곰팡이 및 갈변 현상이 관찰되었으며, BGC 0.5% 첨가구에서도 갈변 현상이 관찰되었다. 하지만 BGC 0.8%, 1.0% 첨가된 제품군에서는 곰팡이 및 갈변 현상이 경시 관찰되지 않는 것으로 보아 0.8% 이상 첨가하는 것이 미생물학적 안전성에 가장 효과적인 것으로 사료된다.

(2) 발효_제빵

Challenge Test는 시중 [식빵] 믹스 제품을 사용하였으며, 제조 방법은 믹스 파우더와 액상(우유or물), 이스트를 균질하게 혼합하였다. 본 제품군은 총 3단계 발효 공정이 포함되어 있어, Stock solution (식용유 + 개발 원료)을 발효 전, 마지막 발효 전 첨가하여 관찰하였다.

180℃ 예열된 오븐에서 20~30분간 굽기 - 식힘 - 포장 과정을 거친 후 25±1.0℃ 인큐베이터에서 정치보관 하였다.

(가) 개발 원료 첨가 시기에 따른 제빵 '반죽'의 상태 변화



그림 7. 투입 시기에 따른 반죽 상태 변화.

개발 원료 첨가 시기에 따른 반죽의 상태 변화를 관찰하였으며, 그 결과 발효 공정 전 첨가하여 준비된 반죽은 발효 과정을 거치면서 반죽의 응집력(탄력)이 손실되어 묽어진 것으로 확인되었다. 이에 발효 공정 전이 아닌 발효 공정 2단계 후 & 3단계 공정 전 첨가 진행을 통하여 반죽의 상태 변화를 추가 관찰하였다. 첨가 직후 및 3단계 발효 공정 후 반죽의 상태 변화를 유의미한 차이는 없는 것으로 관찰되었으며, 이는 개발 원료 첨가 후 발효 공정 시간과 반죽의 응집력(탄력) 간 반비례 관계인 것을 간접적으로 확인할 수 있었다. 따라서 본 개발 원료를 발효 제빵에 사용 시 마지막 발효 공정 전 또는 이후 첨가하여 사용하는 것이 제품에 영향을 주지 않는 가장 효과적인 방법으로 사료된다.

(나) 개발 원료 첨가 여부에 따른 미생물학적 차이

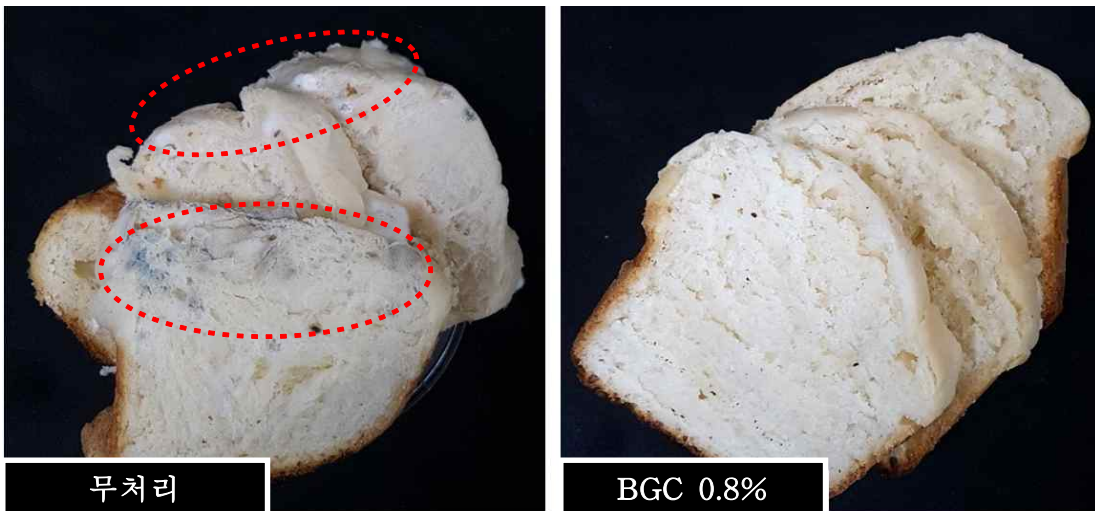


그림 8

본 실험은 무첨가구와 개발 원료 0.8% 첨가 제품의 미생물적 차이를 비교하였다. 개발 원료 첨가 제품의 경우 사전 ‘반죽 영향 평가’ 결과를 반영하여 마지막(3단계) 발효 공정 전에 투입하여 제조하였다. 무첨가구의 경우 10~14일 차에 곰팡이 [균사/포자]가 관찰되었으며, 그림 3.과 같이 20일 차에는 다량으로 분포된 것을 경시관찰을 통하여 확인되었다. 개발 원료 0.8% 첨가 제품의 경우 10~14일뿐 아니라 20일 차에서도 곰팡이 [균사/포자] 외 유의미한 변화가 관찰되지 않는 것으로 보아 개발 원료 0.8% 이상 첨가 시 미생물학적 안정성을 갖는 것으로 사료된다.

9. 천연 보존제(BGC) 2차 Challenge 평가

가. Challenge 평가 곡물 가공품 준비

은 믹스 제품(CJ, Seoul, Korea)을 사용하였으며, 물과 효모 파우더를 충분히 혼합 후 반죽기 볼에 넣고 믹스 파우더를 여러 번에 걸쳐 소분하여 투입하였다. 총 2차 발효([1st : 25°C 온, 30분], [2nd : 25°C, 120분])를 거친 반죽은 180°C로 예열된 오븐에서 30분간 구운 후 실온에서 30분간 식히는 과정을 거쳤다. 충분히 식힌 식빵을 15 mm로 커팅 후 200 g이 되도록 소분하였다. 떡의 경우는 멥쌀가루를 반죽기(Luxel 300w, Younggu, Seoul, Korea)에 넣고 2단계에서 지속적으로 교반 과정을 거치며, 이때 물을 조금씩 넣어 적당히 멍치는 상태로 만든다. 그 후 설탕을 넣은 후 5분간 교반 과정을 거쳐 얻어진 가루를 체를 통하여 균일하게 만든다. 균일화된 가루를 찜기에 넣은 후 20~30분간 찜 후 실온에서 식히는 과정을 거치고 50g씩 소분하였다. 생면은 소금을 녹인 물과 밀가루(중력분)를 반죽기에 넣고 3단계에서 8분간 반죽 과정을 거친 후 냉장에서 15분간 휴지시켰다. 휴지가 끝난 면을 두께 2.5 mm 너비 2 mm가 되도록 제면기를 이용하여 성형 후 100 g씩 소분하였다. 소분된 3가지 곡물 가공품은 농도별 BGC를 분무 처리하였으며, 이때 분무량은 10%(w/w) 이하가 되도록 하였다. 분무 처리한 식품은 실온에서 10분간 정치 후 밀봉 팩에 포장하였으며, 생면은 12°C, 떡과 식빵은 25°C에서 저장하면서 변화를 관찰하였다.

표 4. 곡물 가공품 배합 비율

곡물 가공품	재료	무게(g)
식빵	CJ 프리믹스	380
	물	220
떡	멥쌀가루	600
	설탕	60
	물	120
생면	밀가루	100
	소금	3
	물	40

나. BGC 처리 방법 변경

앞서 1차 Lap sacle pilot & Challenge 평가에서는 BGC를 곡물 가공품의 원료 혼합 공정 또는 마지막 발효 단계에 투입하였는데, 곡물 가공품 제조업체 미팅을 통하여 처리 시기 방법을 변경하였다. 변경된 처리방법은 기존 곡물 가공품에서 사용된 분무 처리 방식으로 90% EtOH를 사용하였지만, 진균 (효모 / 곰팡이)에 대한 항균 활성 및 지속성 부족으로 개선이 필요한 시점이었다. 이에 90% EtOH에 BGC를 농도별 희석하여 동일한 방식의 분무 처리를 하였다.

다. Challenge 평가 곡물 가공품 준비

(1) BGC를 처리한 식빵의 미생물 변화 관찰

BGC를 처리한 식빵의 저장 중 미생물 변화는 <표 5.>와 같이 확인되었다. 90% EtOH 처리구는 초기 총 세균과 효모/곰팡이 수는 각각 0.32 log cfu/g, 0.22 log cfu/g로 확인되었으며, 저장 10일차에 5.32 log cfu/g, 4.62 log cfu/g으로 증가하였다. BGC 처리구의 초기균은 90% EtOH 처리구와 유사하였으며, BGC 0.3% 처리구의 경우 저장 10일차에는 4.72 log cfu/g, 4.37 log cfu/g, BGC 0.5% 처리구의 경우 저장 10일차에 3.01 log cfu/g, 3.37 log cfu/g으로 미생물 증가 폭이 감소하는 경향을 확인하였다. 특히 BGC 0.8% 처리구에서는 총 세균수 1.32 log cfu/g, 효모/곰팡이 0.81 log cfu/g으로 90% EtOH 처리구 대비 99.9% 이상 미생물의 생육이 억제된 것을 확인하였다. Kang 등(2000)은 즉백 히노키티올 추출물을 첨가한 식빵의 미생물 변화를 조사하였다. 세균의 경우 4 log cfu/g 기준 대조구(무처리)는 2일차에 도달하였으나, 즉백 히노키티올 추출물 첨가 시 4일차에 도달하였다. 또한 Choi 등(2019)은 효소 처리한 밀 배아 추출물을 활용한 식빵의 품질특성을 조사하였다. 그 결과 대조구(무처리)는 저장 9일 차에 총 세균 5.91 log cfu/g, 진균 4.67 log cfu/g으로 확인하였으며, 추출물 첨가된 식빵의 경우 각각 2.75 log cfu/g, 3.79 log cfu/g으로 1~3 log cfu/g 감소한 것으로 확인하였다.

표 5. BGC를 처리한 식빵(25℃ 정치보관)의 미생물 변화.

구 분	농 도 (%)	저장 기간 (일)		
		0	5	10
총 세균	대조구(90% EtOH)	0.32±0.03 ^{cA}	2.11±0.77 ^{bA}	5.32±1.01 ^{aA}
	BGC 0.300	0.33±0.10 ^{bA}	2.06±0.05 ^{bA}	4.72±0.42 ^{aA}
	BGC 0.500	0.42±0.11 ^{bA}	1.11±0.60 ^{bAB}	3.01±0.33 ^{aA}
	BGC 0.800	0.48±0.23 ^{aA}	0.81±0.23 ^{aBC}	1.32±0.28 ^{aB}
효모 / 곰팡이	대조구(90% EtOH)	0.22±0.07 ^{bA}	1.31±0.51 ^{bA}	4.62±0.90 ^{aA}
	BGC 0.300	0.32±0.14 ^{bA}	1.73±1.03 ^{bA}	4.37±0.88 ^{aA}
	BGC 0.500	0.23±0.10 ^{cA}	2.21±0.37 ^{bA}	3.37±1.07 ^{aA}
	BGC 0.800	0.17±0.31 ^{aA}	0.42±0.03 ^{aB}	0.81±1.31 ^{aAB}

a~c) 소문자 알파벳은 Duncan's TEST를 통하여 저장 기간에 따른 통계적 유의성 뜻함 (p<0.05).

A~C) 소문자 알파벳은 Duncan's TEST를 통하여 BGC 첨가 농도에 따른 통계적 유의성 뜻함 (p<0.05).

(2) BGC를 처리한 떡의 미생물 변화 관찰

BGC를 처리한 떡의 저장 중 미생물 변화는 <표 6.>와 같이 확인되었다. 떡의 경우 저장 기간 초기(0일차)에 미생물 검출률이 다소 낮았으며, 이는 떡(백설기) 특성상 열기를 오래 머금고 있어 외부 미생물의 증식을 다소 억제 한 것으로 사료된다. 저장 기간 5일 차부터는 처리구별 차이가 확인하였으며, 90% EtOH 처리구는 총 세균과 효모/곰팡이 수는 각각 2.25 log cfu/g, 2.20 log cfu/g으로 증가하였다. 특히 10일차에는 6.93 log cfu/g, 4.54 log cfu/g으로 미생물의 증가 폭이 급격히 커진 것으로 확인하였다. 반면 BGC 0.3% 처리구는 5일차에 1.70 log cfu/g, 1.12 log cfu/g으로 90% EtOH 처리구와 유의미한 차이를 보이지 않으나, 10일차에 3.59 log cfu/g, 2.99 log cfu/g으로 대조구 대비 미생물이 1.5 ~ 3.3 log cfu/g 감소하였다. BGC 0.5 ~ 0.8% 처리구의 경우는 5일 1.0 log cfu/g, 10일차 2.0 log cfu/g을 넘지 않아 90% EtOH 대비 최대 99.99% 이상 미생물의 생육을 억제하는 것으로 확인하였다.

표 6. BGC를 처리한 떡(25℃ 정치보관)의 미생물 변화.

구 분	농 도 (%)	저장 기간 (일)		
		0	5	10
총 세균	대조구(90% EtOH)	불검출	2.25±0.63 ^{bA}	6.93±1.04 ^{aA}
	BGC 0.300	불검출	1.70±0.19 ^{bA}	3.59±0.40 ^{aB}
	BGC 0.500	불검출	0.33±0.47 ^{bb}	1.73±0.93 ^{aC}
	BGC 0.800	불검출	0.33±0.47 ^{bb}	1.69±0.27 ^{aC}
효모 / 곰팡이	대조구(90% EtOH)	0.20±0.14 ^{cA}	2.20±1.18 ^{bA}	4.54±1.08 ^{aA}
	BGC 0.300	불검출	1.12±0.78 ^{bA}	2.99±0.80 ^{aA}
	BGC 0.500	0.1±0.14 ^{cA}	0.71±0.53 ^{aA}	1.37±0.74 ^{aB}
	BGC 0.800	불검출	0.40±0.37 ^{bb}	1.01±0.27 ^{aB}

a~c) 소문자 알파벳은 Duncan's TEST를 통하여 저장 기간에 따른 통계적 유의성 뜻함 (p<0.05).

A~C) 소문자 알파벳은 Duncan's TEST를 통하여 BGC 첨가 농도에 따른 통계적 유의성 뜻함 (p<0.05).

(3) BGC를 처리한 생면의 미생물 변화 관찰

BGC를 처리한 생면의 미생물 변화는 <표 7.>와 같이 확인되었다. 90% EtOH 처리구의 초기 총 세균과 효모/곰팡이 수는 각각 2.01 log cfu/g, 1.34 log cfu/g이었으며, 저장 10일 차에 8.18 log cfu/g, 5.69 log cfu/g으로 급격하게 증가하였다. BGC 0.1% 처리구는 저장 5일 차에 총 세균 수 3.71 log cfu/g으로 미생물의 생육을 다소 억제하는 것으로 확인되었으나, 저장 10일 차에 6.22 log cfu/g으로 증가하였다. 또한, 효모/곰팡이의 생육 제어는 90% EtOH와 유의미한 차이를 보이지 않는 것으로 확인되었다. BGC 0.3% 처리구는 저장 10일 차에 총 세균수 3.75 log cfu/g로 미생물의 생육을 억제하는 것으로 조사되었으나, 효모/곰팡이의 생육이 저장 5일 차까지는 억제되다 저장 10일 차에 4.30 log cfu/g으로 급격하게 증가하는 것으로 확인되었다. BGC 0.5% 처리구는 저장 10일 차에 총 세균수 2.13 cfu/g, 효모/곰팡이 0.96 log cfu/g으로 미생물의 생육이 극히 억제되는 것으로 확인되었다. 특히 효모/곰팡이의 경우 초기 1.73 log cfu/g에서 0.96 log cfu/g으로 미생물의 수가 감소한 것으로 확인되었다.

표 7. BGC를 처리한 생면(12°C 정치보관)의 미생물 변화.

구 분	농 도 (%)	저장 기간 (일)		
		0	5	10
총 세균	대조구(90% EtOH)	2.01±0.49 ^{bA}	6.21±1.20 ^{aA}	8.18±0.93 ^{aA}
	BGC 0.100	1.96±0.27 ^{bA}	3.71±0.36 ^{bB}	6.22±0.48 ^{aB}
	BGC 0.300	2.29±0.81 ^{bA}	2.78±0.70 ^{abBC}	3.75±0.12 ^{aC}
	BGC 0.500	1.71±0.23 ^{aA}	1.89±0.24 ^{aC}	2.13±0.33 ^{aD}
효모 / 곰팡이	대조구(90% EtOH)	1.34±0.39 ^{cbA}	3.27±1.48 ^{bA}	5.69±0.54 ^{aA}
	BGC 0.100	2.42±0.46 ^{bA}	3.51±1.06 ^{bA}	6.13±0.87 ^{aA}
	BGC 0.300	1.98±0.83 ^{bA}	2.25±0.52 ^{bBA}	4.30±0.13 ^{aAB}
	BGC 0.500	1.73±0.27 ^{aA}	1.47±0.45 ^{aBC}	0.96±0.51 ^{aC}

a~c) 소문자 알파벳은 Duncan's TEST를 통하여 저장 기간에 따른 통계적 유의성 뜻함 (p<0.05).

A~C) 소문자 알파벳은 Duncan's TEST를 통하여 BGC 첨가 농도에 따른 통계적 유의성 뜻함 (p<0.05).

10. 천연 보존제(BGC)의 안정성 평가

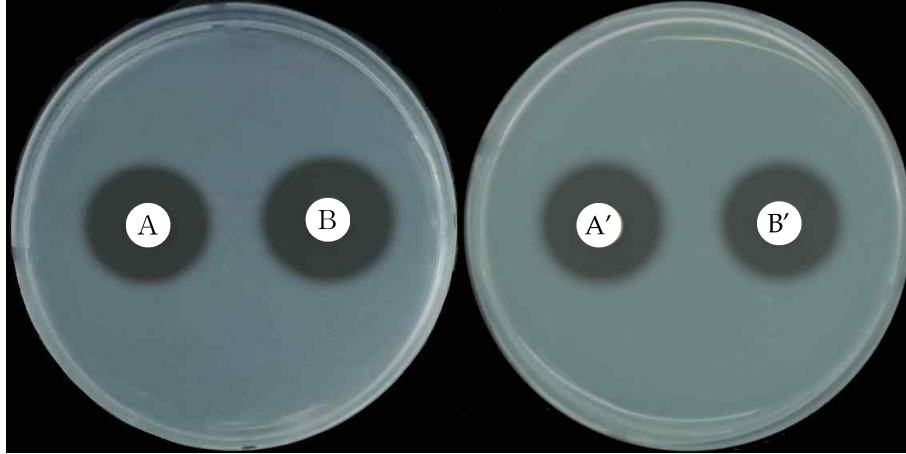


그림 9. 가혹 조건에 대한 BGC 항균 활성 평가
(좌 - 열 안정성 / 우 - 일광 안정성, (A - 무처리 / B - 가혹조건)

본 실험은 BGC 제품의 안정성 평가로 제형, 기능성에 대하여 가혹 조건 속에서 항상성을 갖는지를 확인하였다. 가혹 조건으로 열과 일광을 설정하였으며, 측정 항목으로는 외형관찰 및 항균 활성을 측정하였다. 첫 번째로 <그림 9.> 좌측은 열에 대한 안정성으로 BGC를 정치보관 시 -20℃부터 45℃까지 일정 주기로 변화를 주었다. 가혹조건을 주지 않은 A는 23.13mm 가혹 조건에 보관된 B는 24.33으로 오차 범위에서 유의미한 변화는 없는 것으로 확인하였다. <그림 9.> 우측은 일광에 대한 안정성 결과이며 가혹 조건을 주지 않은 A'는 22.26mm 가혹 조건에 보관된 B'는 20.13mm로 앞선 결과와 비슷한 경향을 보였다. 제형 안정성으로는 색, 침전물, 층 분리를 확인하였으며 <그림 10.>와 같이 조건에 따른 큰 변화는 없는 것으로 확인하였다.



그림 10. 가혹 조건에 대한 BGC 제형적 변화 관찰

11. 천연 보존제(BGC)의 안전성 평가

가. 세포독성 시험방법 (MTT assay)

본 시험은 MTT가 살아있는 세포에서 보라색 Formazan crystal을 생성하며, 이를 용해 과정을 거쳐 570nm에서 흡광도를 측정하여 그 값을 비교하는 시험방법이다. 세포주로는 CCD-986 SK (fibroblast, DMEM)를 사용하였으며, CO₂ 세포 배양기 (5% CO₂, 37 ± 1°C)에서 배양하여 사용하였다. 사전 활성화된 세포를 96 well plate에 3 x 10⁴(100μl/well)이 되도록 분주하고 CO₂ 세포 배양기에서 24 시간 배양 후 BGC가 희석된 배지로 교체하여 동일 조건에서 24시간 배양 하였다. 그 후 PBS로 2회 세척 후 MTT solution이 첨가된 배지로 교체하고 앞선 조건에서 3시간 정지 배양하였다. 배양이 끝난 후 배지를 제거해주고 DMSO를 well당 200μl씩 분주한 후 shaker에서 20-30분 추출하였다. ELISA를 이용하여 570nm에서 흡광도를 측정하였으며 무처리구를 기준으로 비교하였다.

나. 농도별 BGC 처리에 따른 세포독성 평가.

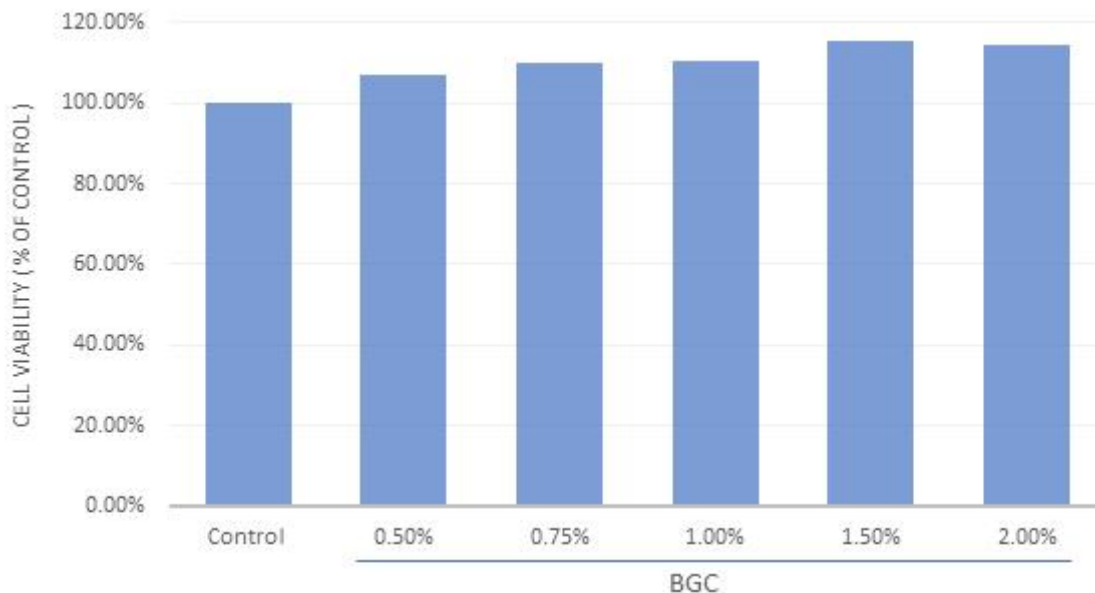


그림 11. CCD-986SK (Fibroblast)세포를 이용한 BGC 세포독성 평가

<Fig 11.>은 Fibroblast cell에 농도별 BGC를 처리한 후 24시간 경과에 따른 세포 생존율 즉, 세포독성 여부를 확인할 수 있다. 그 결과 BGC 0.50 ~ 1.50% 처리구에서는 세포 생존율이 107.02 ± 7.05 % ~ 115.16 ± 4.72 % 까지 농도 의존적으로 증가하였으며, 그 이후 농도에서는 114.47 ± 5.21 %로 비슷한 수준의 세포 생존율을 보였다. 이는 의뢰기관의 기준 세포 생존율이 무처리구의 70% 미만으로 감소시 잠재적 세포독성이 있는 것으로 판정하므로, BGC는 2.0% 이하 농도에서는 세포독성이 없는 것으로 사료된다. 또한 앞선 Challenge 평가에서 식빵, 떡, 면 등에 분무처리시 BGC의 함유량은 0.1% 미만이며, 기타 식품군에서도 0.2%를 넘지 않을 것으로 생각하는바, 본 과제에서 목표한 ‘권장농도의 10배수에서 무처리구 대비 95% 이상 세포 생존율’ 기준으로 판정 시 세포독성이 없는 것으로 사료된다.

12. 천연 보존제(BGC)의 관능 평가

가. 관능 검사 방법

관능검사는 20~50대 여성 31명을 무작위 선정하였으며, 사전 평가용 시료를 통하여 관능검사를 수행할 수 있도록 교육하였다. 물로 입가심을 한 다음 충분한 휴식시간을 가진 뒤 BGC가 농도별 첨가된 제품과 첨가되지 않은 제품을 제공하였다. 종합선호도는 총 제공된 제품간 순위를 선정하였으며, 기호 특성(인지 강도) 평가는 9점 척도로 진행하였다. 또한 곡물 가공품 중 블랙 보리 음료를 선별하여 진행하였는데, 그 이유는 첫 번째 개발된 천연보존제 BGC는 곡물 가공품 식빵, 떡, 면외 다른 식품군에 적용될 수 있으므로 보다 관능적 민감도가 높은 음료를 채택하였다. 두 번째 Challenge 평가를 통하여 3가지 곡물 가공품에 적용 시, 중량대비 첨가량이 0.1% 이하로 음료 0.1% 이상에서 관능적 영향이 없을 시 대입 가능할 것으로 사료되었다.

나. 농도별 BGC가 첨가된 블랙 보리 음료(곡물 음료)의 관능 평가

(1) 종합선호도 평가

<표 8.>는 종합선호 결과이며, 무처리구와 BGC 0.1%의 경우 57, 59점으로 두 제품 간 유사하게 평가된 것으로 판단된다. 하지만 BGC 0.3% ~ 0.5%의 경우 선호도가 급격히 낮아진 것으로 평가되었다. 또한 BGC를 생수에 첨가하여 제공한 제품의 경우 상대적 선호도 조사에서는 낮게 나왔지만 종합 기호도 평가에서는 전반적인 보통 수준으로 평가되었다.

표 8. 농도별 BGC 첨가시 블랙보리 음료에 대한 종합선호도

구분	종합선호 ¹⁾ (순위합)	1순위	2순위	3순위	4순위	5순위
무처리	57 ^{a 2)}	16	10	0	4	1
BGC 0.1%	59 ^a	11	13	6	1	0
BGC 0.3%	102 ^b	2	3	12	13	2
BGC 0.5%	142 ^c	1	0	1	7	22
BGC-water	105 ^b	1	5	12	7	6

¹⁾ 종합선호 : 순위합이 낮을수록 선호도가 높을 것을 의미함.

²⁾ 동일한 문자는 시료간 유의차가 없다는 것을 의미 (95% 신뢰수준)

(2) 기호 특성 평가

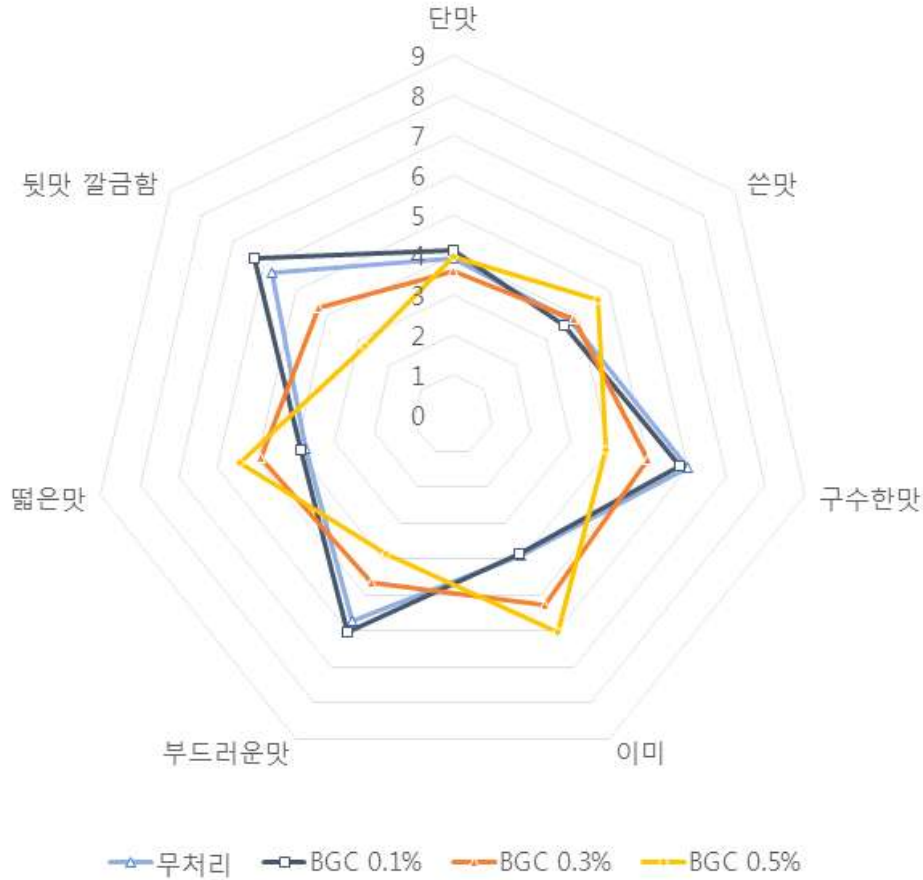


그림 12. 농도별 BGC 첨가시 블랙보리 음료에 대한 기호 특성 평가

<그림 12.>는 ‘블랙보리’ 음료에 대한 각각의 맛을 평가 후 9점 척도한 결과이며, 부정적 영향을 줄 수 있는 쓴맛, 이미, 뽀은맛 항목을 중점적으로 확인하였다. 그 결과 종합선호도와 유사한 경향을 보였으며 무처리와 BGC 0.1%는 매우 유사한 방사형 모양과 크기를 나타내었다. 단맛, 구수한 맛, 부드러운 맛, 뒷맛 깔끔함과 같이 소비자 기호도가 긍정적으로 반영되는 조사 항목의 경우 BGC 0.1%가 무처리 제품보다 높거나 유사한 경향을 보인 반면 BGC 0.3 ~ 0.5%의 경우 전체적으로 낮은 점수로 평가되었다. 특히, 부정적 영향을 줄 수 있는 3가지 항목에서는 BGC의 농도 의존적으로 항목의 점수가 높아지는 것을 확인 할 수 있었다. 이는 0.1 ~ 0.2% 이하 적용시 식빵, 떡, 면뿐만 아니라 민감도가 높은 곡물 음료에도 관능적 영향력을 주지 않을 것으로 사료되며, 천연보존제 BGC의 적용 식품군 시장이 더욱 넓어질 것으로 예상된다.

제 2 절 연구개발 제품의 사업화 성과 및 매출실적

1. 사업화성과 및 매출실적

(가) 사업화 예상 성과

항 목	세부 항목	예 상 성 과		
사업화 계획	사업화 소요기간(년)	과제 종료 1년 ~ 2년 내		
	소요예산(백만원)	수요 업체와의 협의 필요		
	예상 매출규모 (억원)	현재까지	3년후	5년후
		-	8.62	17.12
	시장 점유율	단위(%)	현재까지	3년후
국내 국외		점유율 산출 불가 기존 곡물 가공품에 최적화된 천연보존제가 극히 소수이거나 효능, 관능상 문제가 있었기에 본 개발 제품으로 시장 확대 및 신규 시장 창출.		
	향후 관련기술, 제품을 응용한 타 모델, 제품 개발계획	곡물 가공품 보존제외 기타 식품군 및 의약외품 적용 가능성 검토 및 개선 계획		
무역 수지 개선 효과	(단위: 억원)	현재	3년후	5년후
	수입대체(내수)	-	24.86	51.36
	수 출	-	11.21	26.08

(나) 연구개발 기간 사업화 진행 건

구 분	업 체 명	적 용 품 목	사 전 미팅 내용	예 상 수 요
1	엔트바이오	곡물 음료	기존 천연 보존제 효능이 없어 대체제 찾는 것에 어려움을 느낌.	100~200kg/월
2	지성에스엔피	과자	기존 천연 보존제의 경우 열에 대한 안정성이 부족하여 한계를 느꼈음. 이에 자사 열 안정성 평가 진행 및 결과 제시 예정	예상 수요 산출 불가
3	신라명과	과자, 빵	기존 천연 보존제 효능이 있는 농도까지 사용시 관능적 영향이 매우 큼. 곡물 음료에 대한 관능 결과 긍정적 입장.	200kg/월 (신제품만 산출)
4	코롬방제과	과자, 빵	개발 제품에 대한 컨셉 브리핑 완료. 코롬방제과 신제품 개발시 자사 원료 적극 검토 예정	50~150kg/월
5	과자의성	쌀과자	적용검토를 위하여 과제 종료 후 1차년도에 협업 테스트 진행 예정	예상 수요 산출 불가
6	웅기식품	곡물 발효 소스	발효 소스로 기존 산도 조절을 통한 미생물 제어에 한계가 있음. 산도(또는 pH)에 변화에 따른 항균 활성 변화 제시 예정	신제품 출시 예정
7	IXOM	업소용 베이커리	지속적 관심을 보여온 업체로 개발 제품 결과에 대한 자료는 2020년 해외전시회에서 공개하기로함.	2,000kg (당초 계획)
8	Jin Shin Food corp.	인터넷 판매용 베이커리	대만 업체로 제품에 대한 컨셉 전달. 2019년 해외 전시회에서 2차 미팅 2020년 시제품 및 결과 공유 하기로함.	1,000 ~ 1,500 kg (당초 계획)

제 3 장 목표 달성도 및 관련 분야 기여도

3-1. 목표

- 천연 항균 소재에 대한 데이터베이스 구축 및 생물전환 등 기술력 확보
- 곡물 가공품에 최적화된 미생물 제어 및 기타 생리활성을 갖는 천연 항균 소재 개발
- 본 개발 제품을 통하여 곡물 가공품의 고부가가치 부여 및 경쟁력 확보
- 식품 보존제 관련 수입 제품 대체 효과 및 지적 재산권 확보를 통한 관련 분야 경쟁력 확보.

3-2. 목표 달성여부

주요 성능지표	최종 개발 목표	달성 여부
1. 항균 활성을 갖는 천연 후보 물질 평가	Clear zone - 최상위 5종 선발 MIC - 1.0% 이하	5종 추가 선별
2. 현미 배양 동충하초 조건 확립	동일 기간 내에 자실체 + 균사체 추출물의 유효 성분 함량 기준	배양 조건 확립
3. 추출 공정 개선을 통한 유효 성분 증가	추출 공정 개선 전 대비 10% 증가 [Cordycepin / Sulforaphan]	달 성
4. 유용성 미생물을 이용한 성능 개선	전 단계 대비 5% 증가 유도 동충하초 : Precursor > Cordycepin 브로콜리 : Glucoraphanin > Sulforaphan	항균 활성 지표에 최적화를 위하여 변경
	유용성 미생물 적용 추출물 중 활성도 높은 2군 성분 확인	확인 완료
5. 복합 추출물의 Conjugation(생물전환)	Clear zone 평가 - 10mm 이상 MIC 평가 - 1.0% 이하	달 성
6. Lap scale pilot 평가	권장 사용 농도 확립 곡물 가공 식품 적용 가능성 확인.	달 성
7. 식품 챌린지 평가	곡물 가공 식품 2종 (식빵, 떡, 생면) 병원성 미생물제어 99.9% 이상	달 성
8. 제품 안정성 평가	광, 온도(저>고) 등 가혹 조건 6개월 성상 - 변화 없음 항균 활성 - 초기제품과 동등 미생물 - 불검출	외부기관 수행 불가로 자사 규격 진행
9. 제품 안전성 평가	무처리구 대비 95% 이상 생존 [시제품 및 가속조건 보관 시제품]	달 성
10. 제품 관능 개선	맛, 향, 색상 등 관능 평가 - 7점 이상	적용 농도 대비 무처리 동등
11. 제품 성능 보완	제품 적용 농도 - 1.0% 이하	달 성
12. 지적 재산권 확보	특허 - 국내 1 / 국외 1 논문 - 1	특허 출원 완료 논문 심사 중
13. 식품 품목 보고	등록 2건	달 성
14. 마케팅 홍보	전시회 참여 2건	달 성

3-3. 목표 미달성 시 원인(사유) 및 차후대책(후속연구의 필요성 등)

곡물 가공품 수요 업체와 미팅 중 적용방법에 대한 논의 중 변경 건으로 논문 현재 심사중

제 4 장 연구결과의 활용 계획 등

가. 기술적 활용

- (1) 천연 Library 구축 및 업데이트를 통한 천연 소재의 활용도 및 상품화 촉진
- (2) 생물전환(Conjugation) 도입 및 상품화를 통한 국내 연구 방향성 제시 및 확대
- (3) 생물 전환에 최적화된 미생물 선별 및 데이터 구축을 통한 발효 식품 또는 기능성 식품 분야의 연구 활성화 유도
- (4) Broad한 미생물 제어력을 갖는 천연 항균제를 이용한 다양한 생활용품 적용 기술 기반 구축
- (5) 다기능성 천연 항균제 개발을 통한 소비자의 안전성 확보.

나 사업적 활용 계획

- (1) 사업 종료 5차년도 내에 빵, 떡 등 곡물 가공품의 미생물적 요인으로 인한 폐기율 최대 25% 감소 유도. (연간 1,000 ~ 15,000억원의 폐기 비용 및 재생산 원가 비용 절감)
- (2) 고가의 수입 천연 항균제에 대한 의존도 대체를 통한 제조업 등 사용자의 원가 부담 절감 및 국내산의 천연 재료 활용을 통한 농민의 부가가치 증대
수입 천연 항균제 : 연간 약 50억 -> 자사 제품 대체 시 단가 30~40% 절감 가능
- (3) 곡물 가공품의 국내 시장 확대 및 해외 수출 기회 증대를 통한 소득 증대
- (4) 시장의 확대를 통한 쌀 등의 원료 생산자인 농민의 안정적 판매처 구축 및 재고 소비를 통한 소득 대폭 증대.
- (5) 친환경, 무농약 웰빙 등 소비 트렌드에 맞춘 상품화 및 고부가가치를 통한 소득 증대.

다. 사업화 계획

(1) 국내

구분	업체명	적용품목	사전 미팅 내용	예상수요
1	엔트바이오	곡물 음료	기존 천연 보존제 효능이 없어 대체제 찾는 것에 어려움을 느낌.	100~200kg/월
2	지성에스엔피	과자	기존 천연 보존제의 경우 열에 대한 안정성이 부족하여 한계를 느꼈음. 이에 자사 열 안정성 평가 진행 및 결과 제시 예정	예상 수요 산출 불가
3	신라명과	과자, 빵	기존 천연 보존제 효능이 있는 농도까지 사용시 관능적 영향이 매우 큼. 곡물 음료에 대한 관능 결과 긍정적 입장.	200kg/월 (신제품만 산출)
4	코롬방제과	과자, 빵	개발 제품에 대한 컨셉 브리핑 완료. 코롬방제과 신제품 개발시 자사 원료 적극 검토 예정	50~150kg/월
5	과자의성	쌀과자	적용검토를 위하여 과제 종료 후 1차년도에 협업 테스트 진행 예정	예상 수요 산출 불가
6	웅기식품	곡물 발효 소스	발효 소스로 기존 산도 조절을 통한 미생물 제어에 한계가 있음. 산도(또는 pH)에 변화에 따른 항균 활성 변화 제시 예정	신제품 출시 예정
7	노이텍크	떡볶이 떡	기존 떡볶이 떡 제품을 상온 유통 가능한 상품으로 개발 중 일본 및 아시아 지역 납품 진행	1,000~1,500 kg/ 분기
8	SPC	빵	적용 방식에 대한 미팅 진행. 기존 방식 탈피하여 천연 소재의 보존제 희망.	미정
9	CJ	곡물 음료	자사 기타가공품 납품 진행중으로 천연 보존제 소개 및 협약에 등 진입 장벽이 낮음.	신제품 개선 예정
10	풀무원	떡국 떡	미팅 예정	미정

- 곡물 음료, 곡물 발효 소스류 등 적용 가능성 및 미생물 평가 결과가 빠른 식품군은 자체 평가를 통한 제조 업체 공략 및 피드백 진행.
- 상기 방법은 자사에서 수년간 진행해온 기술영업으로 해당 제조사 마다 기존에 사용하던 원료와 비교 평가 및 결과를 제공해줌으로써 개발 제품의 신뢰성 확보.
- 떡볶이떡, 떡국떡 등과 같이 마트에서 판매되는 떡류는 자사 및 공인기관 시험 성적서를 통한 1차 미팅 유도 및 업체 환경에 맞는 제품의 사용 컨설팅 진행. 이미 자사 제품에 대한 신뢰성 및 신제품 개발 제조사를 확보하여 해당 업체를 통한 파생 영업 진행.
- 과자, 빵 등 제조 업체의 경우 규모가 크거나 대기업의 제품을 OEM 하는 경우가 많아 실무자 파악이 매우 중요. 자사는 기존 CJ, SPC, 롯데 등에 기타 추출물등을 납품하고 있으며 이를 통한 곡물 가공품 팀과 여러 차례 미팅을 진행하였음.
- 대기업의 경우 검증 및 진행 절차 기간이 김으로 시간 단축을 위한 담당 직원 배치 및 빠른 피드백을 통한 제품의 적용 유도 또는 개선 방안 등을 모색하여 매출로 유도.

(2) 국 외

구분	업 체 명	적 용 품 목	사전 미팅 내용	예 상 수 요
1	IXOM	업소용 베이커리	지속적 관심을 보여온 업체로 개발 제품 결과에 대한 자료는 2020년 해외전시회에서 공개하기로함.	2,000kg (당초 계획)
2	Jin Shin Food corp.	인터넷 판매용 베이커리	대만 업체로 제품에 대한 컨셉 전달. 2019년 해외 전시회에서 2차 미팅 2020년 시제품 및 결과 공유 하기로함.	1,000 ~ 1,500 kg (당초 계획)
3	Holiland	베이커리	중국 최대 매장을 보유한 베이커리 업체로 자사의 중국 지사를 통한 원료 컨셉 소개 진행	3,000kg/분기 (치즈케이크류 예상)
4	Shanghai Linghang	생면	중국 식품 전시회를 통해 자사 개발 제품 컨셉에 관심을 보임. 2020년 전시회에서 1차 미팅 및 제조 책임자 미팅 예정	500 - 1,000kg/월 (생면 2제품 고려)
5	Guangzhou Lailihong	전통 과자	중국 전통과자의 곡물 양금 및 일반 쿠키 제품 적용성에 대한 관심도가 높음.	미정

- 국외의 경우 시장성 접근이 좋은 중국 지역을 주타겟으로 목표하고 있음. 중국에 심천 지사를 보유하고 있어 국내 해외 담당자 및 지사 담당자의 협업을 통한 업체 접근성 극대화.
- 국내 기업들의 적용 사례를 활용한 신뢰성 확보 및 단가 경쟁력을 위한 물류비 등에서 절감.
- 특히 중국의 경우 생산량의 상당량이 유럽, 중동 쪽으로 수출되고 있어 보존제에 대한 필요성이 매우 높아 개발제품의 시장 진입이 보다 수월 할것으로 사료됨.
- 또한 유럽, 기타 국가에서 천연 소재에 대한 수요가 높거나 높아지고 있는 실정으로, 제품의 경쟁력, 고부가가치에 대한 Needs를 충분히 인지하고 있음.

라. SWOT분석을 통한 추진 사항

구분	내용	비고
S (강점)	<ol style="list-style-type: none"> 1. 기존 천연 소재의 원료 개발 경력 다수 2. 대기업 및 중소기업에서 20년간 자사 제품 이용 3. 전문인력 보유하여 제조사의 문의에 빠른 피드백 가능 4. 중국 심천 지사 및 협력 업체를 보유하고 있어 국내뿐 아니라 해외 접근성에 있어 유리함. 5. 제조사 맞춤형 쉐리니지 평가를 진행해주고 있음. 	
W (약점)	<ol style="list-style-type: none"> 1. 개발 제품에 대한 인지도는 높으나 중소기업으로서의 한계 > 개발 제품 포트폴리오 및 사전 평가 자료를 이용한 신뢰성 확보. 2. 천연 소재로서 합성 소재과 비교시 높은 단가 > 제조 시설 확충 및 공정 개선을 통한 생산 단가 절감 > 맞춤형 첨가량 체크를 통한 최적의 사용법 제공 3. 수요 과잉시 대응 인력 부족 > 연차 계획으로 대응 인력 충원 계획 중에 있으며, 급격한 수요시 내부적 판단으로 긴급 충원 의향 있음. 	
O (기회)	<ol style="list-style-type: none"> 1. 이미 오래전부터 웰빙, 건강, 천연 등에 대한 수요도가 높으나, 충족시킬 수 있는 제품 부족한 상황. 2. 사전 미팅을 통한 제품 컨셉에 대한 높은 호응도 및 수요도 확인. 3. 국내 곡물 가공품의 고부가가치화에 대한 중요성 및 한류로 인한 수출의 증가 추세. 	
T (위협)	<ol style="list-style-type: none"> 1. 원물 소재에 대한 가격 변동성. > 공급 업체와 사전 협약을 통한 가격 변동성 억제 및 대체 소재 또는 공급 업체 지속적 탐색. 2. 경쟁 상품의 출시로 인한 문제점. > 지적 재산권 확보 완료 및 자사 기술력 중 하나인 생물 발효 전환 적용을 통한 진입 장벽 설계. 3. 곡물 가공품 업체마다의 다른 작업 환경 등 접근 한계성 > 비밀 유지 협약 등을 통한 해당 업체의 정보를 취득 후 맞춤형 솔루션 제공. 	

붙임1. 참고문헌

- Ahn HY, Park KR, Kim YR, Cha JY, Cho YS. Chemical characteristics in fermented cordycepin-enriched *Cordyceps Militaris*, J Life Sci. 2013. 23:1032-1040.
- Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. Food Sci Tech. 1995. 28:25-30.
- Choi DM, Lee DS, Chung SK. Effects of fermentation pine needle Extract on the quality of plain bread. Korean J Food Preserv. 2007. 14: 154-159.
- Choi YS, Lee JK, Choi YH, Lee KH, Kang DW, Kum HI, et al. Quality characteristics of white pan bread with enzyme treated wheat germ extract. Korean J Food Cook Sci. 2019. 35:36-44.
- Devi JR, Thangam EB. Mechanisms of anticancer activity of sulforaphane from *Brassica oleracea* in HEp-2 human epithelial carcinoma cell line. Asian Pacific J Cancer Prevention. 2013. 13: 2095-2100.
- Jang IT, Kim YH, Na KC, Lee JS. Physiological functionality of fermented pear fruitlet product made by mixed fermentation of *Saccharomyces cerevisiae*, *Kluyveromyces fragilis* and *Lactobacillus plantarum*. Mycobiology. 2013. 41:33-37.
- Jo YY, Kweon HY, Kim HB, Ji SD. Characteristics of the fermentation products of *paecilomyces tenuipes* fermented using different microorganisms. J Mushrooms. 2017. 15:237-243.
- Kang DH, Kim HS. Functionality analysis of Korean medicine fermented by lactobacillus strains. Korean J Microbail Biotechnol. 2011. 39:259-265.
- Kang KJ, Kim JS. Effects of hinokitiol extract of tunja orientalis on shelf-life of bread. J Korean Soc Food Sci. Nutr. 2000. 29:624-628.
- Kim E, Kim MR. Antioxidant activity and cytotoxicity on cancer cells of extracts from glycyrrhizae radix cultured with Paecilomyces japonica mycelium. J East Asian Soc Diet Life. 2018. 28:188-196.
- Kim HS, Roh YJ, Choe M. *Cordyceps militaris* increases hepatic glucokinase activities. J. Korean Soc Food Sci Nutr. 2005. 34: 158-161.
- Lee JW, Lee HH, Rhim JW. Shelf-life extension of white rice cake and wet noodle by the treatment with chitosan. Korean J Food Sci Technol. 2000. 32: 828-833.
- Lim HW, Kwon YM, Cho SM, Kim JH, Yoon GH, Lee SJ et al. Antitumor activity of *Cordyceps militaris* on human cancer cell line. Nat Prod Sci. 2004. 35: 364-367
- Roberta R, Nicoletta P, Anna P, Ananth P, Min Y, Catherine RE. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization. Free Radical Biol. 1999. 26:1231-1237.
- Sung JH, Kim R, Moon JH, Park HY, Choi HD, Kim YS. Effects of activated calcium on the quality and shelf-life of wet noodle. J. Korean Soc Food Sci Nutr. 2010. 39:1373-1378.

주 의

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