

발간등록번호

11-1543000-003185-01

# 새싹보리의 식물성 유산균 발효물을 활용한 소아비만 및 배변 기능 개선 어린이용 음료개발 및 산업화

최종보고서

2020.07.17

주관연구기관 / 농업회사법인(주)프레쉬벨  
협동연구기관 / 대구대학교 산학협력단

농림축산식품부  
농림식품기술기획평가원







<제출문>

## 제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “새싹보리의 식물성 유산균 발효물을 활용한 소아비만 및 배변기능 개선 어린이용 음료개발 및 산업화”(개발기간 : 2017. 05. ~ 2019. 12.)과제의 최종보고서로 제출합니다.

2020. 07. 17.

주관연구기관명 : 농업회사법인(주)프레쉬벨 (대표자) 김 근 화

협동연구기관명 : 대구대학교 산학협력단 (대표자) 박 세 호



주관연구책임자 : 김 근 화

협동연구책임자 : 김 성 호

국가연구개발사업의 관리 등에 관한 규정 제18조에 따라 보고서 열람에  
동의합니다.

<보고서 요약서>

보고서 요약서

과제고유번호	817026-3	해 당 단 계 연 구 기 간	2017. 05. 01. - 2019 . 12. 31	단 계 구 분	1/1
연구사업명	단 위 사 업	농식품기술개발사업			
	사 업 명	기술사업화지원사업			
연구과제명	대 과 제 명				
	세부 과제명	새싹보리의 식물성 유산균 발효물을 활용한 소아비만 및 배변기능 개선 어린이용 음료개발 및 산업화			
연구책임자	김 근 화	해당단계 참여연구원 수	총: 11명 내부: 11명 외부: 0명	해당단계 연구개발비	정부:731,000천원 민간:244,000천원 계:975,000천원
		총 연구기간 참여연구원 수	총: 11명 내부: 11명 외부: 0명	총 연구개발 비	정부:731,000천원 민간:244,000천원 계:975,000천원
연구기관명 및 소속부서명	농업회사법인(주)프레쉬벨 대구대학교 산학협력단			참여기업명:	
국제공동연구	상대국명:			상대국 연구기관명:	
위탁연구	연구기관명:			연구책임자:	
※ 국내외의 기술개발 현황은 연구개발계획서에 기재한 내용으로 같음					
연구개발성과의 보안등급 및 사유	일반 과제				

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·장 비명	규격 (모델명)	수량	구입연월일	구입가격 (천원)	구입처 (전화)	비고 (설치장소)	NTIS 등록번호

요약

- 새싹채소(보리, 브로콜리, 땅콩) 유산발효를 위한  $\beta$ -glucosidase 활성능이 우수한 균주 3종 분리 동정 후 균주 기탁  
- *Lactobacillus fermentum* DU. La. EIJ-31, *Pedococcus acidilactici* Du. LAB. K-1, *Pedococcus pentosaceus* DU. La. P-11
- 식물성유산균주를 이용하여 새싹채소(보리, 브로콜리, 땅콩)의 유효성분 (saponarin, Quercetin, Resveratrol 등)이 증진된 새싹채소 발효 조건 설정 및 발효물 제조  
- 특허등록 1건, 특허 출원 2건
- 새싹채소(보리, 브로콜리, 땅콩) 유산발효물의 동물실험 및 세포배양 실험을 통한 기능개선(변비개선 및 항비만) 검증
- 새싹채소(보리, 브로콜리, 땅콩) 유산발효물을 활용한 어린이용 음료 시제품 개발

보고서 면수

<요약문>

<p>연구의 목적 및 내용</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 새싹보리의 유산균 최적발효조건에 의한 대량생산 scale up 조건 검토 (1차년도)             <ul style="list-style-type: none"> <li>; 반응표면 분석을 통한 최적 발효조건 검토</li> <li>; 최적 bioconversion 조건 검토 및 유도</li> <li>; 대량 배양조건에 맞는 원료를 포함한 식품용 유산균 배지조성</li> <li>; Lab- scale의 실험결과를 토대로 한 pilot 및 plant scale 생산</li> </ul> </li> <li>- 새싹보리 유산균 발효물 및 음료의 소아비만 및 배변기능 개선의 지표 물질(luteolin, lutoanarin, saponarin 및 <math>\beta</math>-glucan) 함량 및 데이터 확보 (1차년도)             <ul style="list-style-type: none"> <li>; HPLC 분석법에 의한 luteolin, lutoanarin, saponarin등 배당체화합물 함량측정</li> <li>; mixed-linkage beta-glucan kit 또는 효소법을 통한 <math>\beta</math>-glucan 함량법 측정</li> </ul> </li> <li>- 새싹보리 발효물 활용한 어린이용 음료의 formulation 확립과 관능평가 (2차년도)</li> <li>- 새싹보리 발효물 활용한 어린이용 음료의 기능개선 동물시험 확인 (2차년도)             <ul style="list-style-type: none"> <li>; Mouse를 활용한 고지방 식이를 통한 비만 유도 및 음료식이를 활용한 test</li> </ul> </li> <li>- 다양한 어린이 입맛 취향 관련 제품 출시(2차년도)</li> <li>- 새싹채소(땅콩 브로콜리 등 활용)관련 발효능 및 지표검사</li> <li>- 새싹채소 관련 다양한 시제품 생산과 관능검사 (2차년도)</li> <li>- 새싹채소(땅콩 브로콜리 등 활용) 제품의 효능 및 안전성 검사(3차년도)</li> <li>- 새싹채소(땅콩 브로콜리 등 활용)소비자 반응조사 및 마케팅(3차년도)</li> <li>- 새싹보리 발효물 활용 리뉴얼 음료제품 생산, 마케팅 및 BM방안 모색 (3차년도)</li> <li>- 새싹채소 관련 다양한 리뉴얼제품 출시(3차년도)</li> <li>- 새싹보리 유산균 발효물 활용한 어린이용 음료의 패키지 디자인 개발 (3차년도)</li> <li>- 전략적 수출상품 개발과 생산 및 해외 마케팅 (해외전시 및 시음행사 등)(3차년도)</li> </ul>
------------------------	--

<p>연구개발성과</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 목적성 어린이용 음료 제품 생산 및 출시 ; 어린이용 항비만 및 배변 기능 개선 음료 조성( formulation ; 3有(맛, 영양, 기능 有), 5無(무농약, 무설탕, 무첨가물, 무색소, 무방부제) 컨셉 ; 어린이 취향 관련 3종이상의 관련 제품 개발</li> <li>- 목적성 식물성 유산균 3종 특허기탁 ; 새싹보리 발효 최적화 유산균 동정 및 특허기탁(공인기탁기관).</li> <li>- 공정도 및 제조 매뉴얼 개발 및 제공 ; 본 연구결과를 바탕으로 음료제작에 필요한 새싹보리 전처리 조건기술 ; 새싹채소를 이용한 발효생산기술 및 발효물을 활용한 음료 조성( 배합비 등 생산기술에 필요한 매뉴얼을 제작</li> <li>- 최종시제품 관련한 생산을 위한 품목제조신고 3건</li> <li>- 특허 출원 3건, 등록 1건 및 상표등록3건</li> </ul>				
<p>연구개발성과의 활용계획 (기대효과)</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 새싹보리 활용 어린이용 발효음료 개발후 국내 대기업 납품 및 PB제품 런칭기대</li> <li>- 베트남 공기업인 ITPC와의 MOU를 통해 나노기술을 공유 등 기술사업화</li> <li>- 베트남 중심의 동남아 수출상품화 추구 및 전략(해외수출)</li> <li>- 다양한 새싹원료를 어린이용 음료 기술 고도화 및 다양한 제품개발.</li> </ul>				
<p>국문핵심어 (5개 이내)</p>	<p>새싹보리</p>	<p>식물성 유산균</p>	<p>항비만</p>	<p>배변기능 개선</p>	<p>어린이음료</p>
<p>영문핵심어 (5개 이내)</p>	<p>Barley sprouts</p>	<p>Vegetable lactic acid bacteria</p>	<p>Anti-obesity</p>	<p>Defecation functionality improvement</p>	<p>Childhood' s beverage</p>

※ 국문으로 작성(영문 핵심어 제외)

<본문목차>

< 목 차 >

제 1 장 연구개발과제의 개요 .....7  
제 1 절 연구개발의 필요성 .....7  
제 2 절 연구개발의 목표 및 내용 .....29

제 2 장. 연구 수행 내용 및 결과 .....36  
제1절 연구개발의 추진전략·방법 및 추진체계 .....36  
제2절 1차년도 연구수행 내용 및 결과 .....40  
제3절 2차년도 연구수행 내용 및 결과 .....103  
제4절 3차년도 연구수행 내용 및 결과 .....204  
제5절 주관기관 연구 수행 결과 .....237  
제6절 연구 개발 성과 .....263

제 3 장 목표 달성도 .....269

제 4 장 연구결과의 활용 계획 등 .....272

붙임. 참고 문헌 .....273

<별첨> 주관연구기관의 자체평가의견서

# 제 1 장. 연구개발과제의 개요

## 제 1 절. 연구개발의 필요성

### 1. 연구개발의 개요

#### 가. 개발 목표

#### (1) 새싹 보리의 식물성 유산균 발효물을 이용한 소아비만 및 배변기능 개선 어린이용 음료 개발 및 산업화

(가) 목표 : 새싹보리 활용 어린이용 음료개발

(나) 사양 : 소아 비만 및 배변 기능 개선 지표물질 (식이섬유,  $\beta$ -glucan, lutanarin 및 saponarin 등의 배당체 화합물과 luteolin 등의 aglycon 화합물)

(다) 성능 및 용도 : 혼합추출(발효)음료

(라) 기능 : 비만 및 배변기능 개선

(마) 새싹보리 내 주성분인 식이섬유 및  $\beta$ -glucan, lutanarin 및 saponarin 및 aglycon 화합물 등의 성분을 활용하여 비만 및 배변 기능 개선을 위한 어린이용 음료를 개발하여 어린이들의 건강 증진에 활용 할 수 있도록 복용이 편리하게 가공하여 관련 기능 증진 및 건강증강에 효과가 있는 성분을 활용한 제품을 산업화하여 생산, 국내 판매와 수출을 주목적으로 하고자 함.

#### (2) 개발내용

(가) 새싹보리의 유산균 최적발효조건에 의한 대량생산 scale up 조건 검토

① 반응표면 분석을 통한 최적 발효조건 검토

㉠ 원료농도 최적화, 부원료 농도 및 발효시간에 따른 균주 성장 및 유산발효능 검사

㉡ 유산도 및 생균수를 종속변수로 하는 반응표면분석을 통한 최적 발효조건 검사

② 최적 bioconversion 조건 검토 및 유도

㉠ 분리 유산균의  $\beta$ -glucosidase능에 의한 새싹보리내 배당체의 분해능 검토

㉡ 분리 유산균의 효소활성 조건 검토

㉢ 최적 bioconversion 조건 검토

㉣ 배당체 및 aglycon 화합물의 분석(발효능 및 지표성분 분석)

③ 대량 배양조건에 맞는 원료를 포함한 식품용 유산균 배지조성

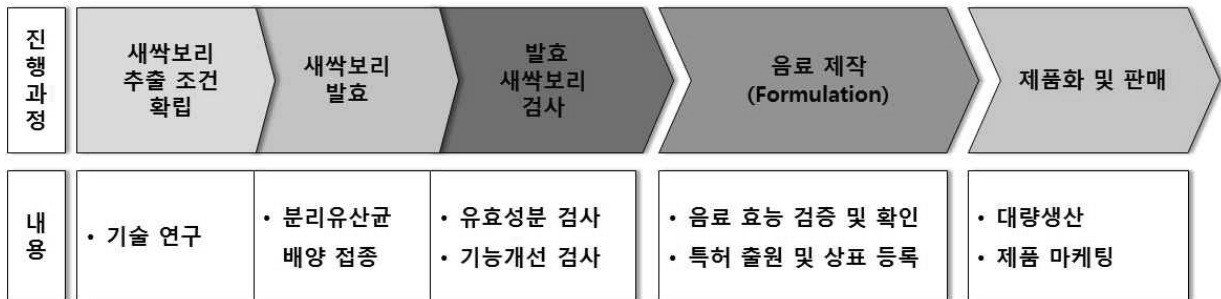
㉠ Lab- scale의 실험결과를 토대로 한 pilot 및 plant scale 생산

㉡ pilot 및 plant scale에서 생산조건 최적화



- (나) 새싹보리 유산균 발효물 및 음료의 소아비만 및 배변기능 개선의 지표물질(luteolin, lutanarin, saponarin 및  $\beta$ -glucan) 함량 검토 및 데이터 확보
- ㉞ HPLC 분석법에 의한 luteolin, lutanarin, saponarin 등 배당체화합물 함량측정
- (다) 새싹보리 유산균 발효물 활용한 어린이용 음료의 formulation 확립과 관능평가
- ㉟ 어린이 음료로서 목적성에 부합하게 3有(맛, 영양, 기능을 가짐), 5無(무농약, 무설탕, 무첨가물, 무색소, 무방부제)의 concept으로 조제
  - ㊱ 어린이가 선호하는 음료, 부모가 안전을 인정하는 제품, 또한 천연물과 발효물을 활용한 음료제품
  - ㊲ 어린이와 부모 대상 소비자 관능검사
- (라) 새싹보리 유산균 발효물 활용 어린이용 음료의 기능개선 관련 동물시험 확인
- ㉟ Mouse를 활용한 고지방 식이를 통한 비만 유도 및 음료식이를 활용한 test
- (마) 새싹보리 유산균 발효물 활용 어린이용 음료의 시생산과 마케팅 및 BM방안 모색
- ㉟ 새싹보리 유산균 발효물 활용 어린이용 음료의 패키지 디자인 개발
  - ㊱ 전략적 수출상품 개발과 생산 및 해외 마케팅 (해외전시 및 시음행사 등)

### (3) 연구개발 대상의 개념도



[그림] 연구개발 대상의 개념도

## 2. 연구개발 대상의 국내·외 현황

### 가. 국내 기술 수준 및 시장 현황

#### (1) 새싹보리

- (가) 새싹보리는 세계적으로 중요한 재배식품 중의 하나로 단백질, 각종, 비타민, 무기질이 풍부하다고 알려짐
- (나) 새싹보리에 함유된 다량의 식이섬유는 콜레스테롤 및 중성 지방 등의 흡수를 억제하여 고혈압, 동맥경화, 비만 등 만성질환 예방에 효과적임
- (다) 새싹보리의 폴리코사놀이란 성분은 몸에 유익한 콜레스테롤(HDL 콜레스테롤)의 수

치는 올리고, 해로운 콜레스테롤(LDL 콜레스테롤)의 수치를 낮추는 효과를 나타남

- (라) 2015년 기준으로 국내에서는 새싹보리의 최적 품종 선발과 재배 방법에 대한 연구가 진행되었으며, 2016년 기준에는 생산시기에 따른 새싹보리의 영양성분 비교의 연구가 진행되었음
- (마) 농촌진흥청에서는 2011년부터 새싹보리를 새로운 기능성 식품소재로 활용하는 연구를 추진 및 개발하고 있음
  - ① 새싹보리 생산 최적품종선발과 재배조건 확립
  - ② 새싹보리를 이용하여 전임상, 임상시험을 통한 고지혈증, 당뇨병 개선 효과 확인
  - ③ 새싹보리를 크로마토그래피를 통해 물질 분리 : 순수물질 농축
  - ④ 생활 습관병 개선 효과 핵심지표 성분과 작용원리 규명
  - ⑤ 이와 같이 농촌진흥청에서는 새싹보리에 대한 연구를 진행하면서, 세계 최초로 농촌진흥청에서 새싹보리 질병 예방·개선 효과 찾아 특허 8건 출원·등록함
- (바) 뿐만 아니라 2016년에는 새싹보리가 농가와 산업체의 소득을 올리는 상생협력모델로 자리 잡음
- (사) (주)청보리 식품에서는 폴리코사놀을 대량생산 기술을 개발 및 사업화를 성공하였음

## (2) 새싹보리 관련 기술 및 지식 재산권 현황

- (가) 국내 특허실용 현황을 살펴보면, 특허실용신안은 거절, 소멸, 등록, 공개 등과 같은 행정처분을 포함한 총 760개이며, 그 중 등록 및 공개 행정처분은 370개가 있음
- (나) 음식물을 제조하는 과정이 포함된 특허가 주를 이루며, 새싹보리로 만드는 새싹잎차, 두부, 치즈, 호빵, 비빔밥 등에 관한 특허가 있음
- (다) 농촌진흥청에서는 세계 최초로 새싹보리 질병 예방·개선 효과 찾아 특허 8건 출원·등록
- (라) 새싹보리에 관련 특허는 아래의 표와 같음

[표] 국내 새싹보리 특허 현황

연구자(기관)	연구주제	내용
대한민국 (농촌진흥청 장)	새싹보리 추출물을 포함하는 비만 억제용 조성물	출원번호 : 1020140057305 (2014.05.13.) 루토나린 또는 사포나린이 함유된 새싹보리 추출물 또는 그의 분획물을 포함하는 비만의 예방 또는 치료용 약학 조성물
	항산화 또는 혈당 강하 활성 성분 함량이 증가된 새싹보리 차	출원번호 : 1020160053270 (2016.04.29.) 항산화 또는 혈당 강하 활성 성분 함량이 증가된 새싹보리 차의 제조방법, 상기 방법으로 제조한 새싹보리 차
순천대학교 산학협력단	보리잎차 분말 및 헤미셀룰레아제를 첨가한 식빵 및 그의 제조방법	출원번호 : 1020090093988 (2009.10.01.) 보리잎차 분말을 첨가한 식빵 및 그의 제조방법

연구자(기관)	연구주제	내용
주식회사 부경식품	새싹 보리 치즈 및 그의 제조방법	출원번호 : 1020150165119 (2015.11.25.) 기호뿐만 아니라 건강에도 좋은 새싹 보리 치즈 및 그의 제조방법
전북대학교 산학협력단	청색광 파장의 L E D 조 사를 이용한 사포나린 함 량이 증가된 보리새싹의 제조방법	출원번호 : 1020130158502 (2013.12.18.) 보리새싹을 LED(light emitting diode)로 조사 하는 것을 특징으로 하는 사포나린(saponarin) 함량이 증가된 보리새싹의 제조방법 및 상기 보리새싹을 함유하는 가공식품의 제조방법
영광군, 김광석	새싹보리분말을 포함하는 프리믹스 조성물 및 이를 이용한 새싹보리음료의 제조방법	출원번호 : 1020150139683 (2015.10.05) 1~100 마이크로미터의 평균 입도 크기를 가 지는 새싹보리분말 20 ~ 50중량%, 당류 50 ~ 80 중량%를 포함하는 새싹보리분말 프리믹스 조성물 및 분말을 통한 제조방법



(마) 당사는 새싹보리 추출물을 포함하는 비만 억제용 조성물 특허를 기술 이전함

(바) 새싹보리 국내 시장은 산업으로서의 규모는 아직 초기단계이지만 최근 식품가공회  
사, 인터넷 쇼핑몰 등에서 새싹보리 생체, 분말, 어린보리잎차, 과립, 환, 녹즙 등으로  
가공해 판매되고 있고 매출도 꾸준한 상승세를 나타내고 있음

(사) 새싹보리 관련 제품은 아래 표와 같으며, 차, 분말형태, 카레, 녹즙, 크래키, 환, 쥬  
등의 제품 개발이 이루어져 있음, 그러나 어린이 음료에 대한 국내 제품은 없음

[표] 새싹 보리관련 국내 제품 현황

업체명	제품유형	제품명	판매제품	비고
(주)참선 진녹즙	- 생녹즙	- 새싹보리녹즙		항산화 활성이 높은 노 화방지용 생녹즙
(주)새뜸 원	- 분말	- 새싹보리		비만, 고혈당 경감 효과 가 우수한 새싹보리 스 틱형 분말

업체명	제품유형	제품명	판매제품	비고
청녹수	-분말형 녹즙	- 청녹수		세계최초 폴리코시놀 대량산산 기술개발 및 사업화 성공
(주)애농 영농조 합	- 차(茶) - 잼 - 카레	- 새싹을 마시 다 - 새싹담은 잼 - 채담카레		
주성팜	- 분말 - 환 - 크래커	- 새싹 보리 순 - 새싹보리 편 안, 강안		

### (3) 식물성 유산균 관련 기술 및 지식재산권 현황

- (가) 식물성 유산균에 관한 국내 특허실용 현황을 살펴보면, 특허실용신안은 거절, 소멸, 등록, 공개 등과 같은 행정처분을 포함한 총 2,151개이며, 그 중 등록 및 공개 행정 처분은 1,284개가 있음
- (나) 주로 유산균을 통한 제품(식품, 화장품)의 제조방법과 조성물 혹은 기능성(치료용, 회복용) 조성물에 대한 특허가 있음
- (다) 풀무원이 김치의 유산균을 독자적인 기술로 특허 등록한 식물성유산균은 *L. plantarum* PMO08(특허등록번호: 10-0264361)
- (라) 대표적인 국내 식물성 유산균 특허는 아래 표와 같이 정리하였음

[표] 국내 식물성 유산균 특허 현황

연구자(기관)	연구주제	내용
주식회사 웰빙엘에스	식물성유산균을 이용한 유산균 생성물질 제조방 법	출원번호 : 1020150056247 (2015.04.22.) 식물성유산균, 바실러스, 효모와 같은 종균을 액체 배양하여 농축 및 동결건조시켜 부형제 를 첨가한 후 고농도의 미생물 분말을 만드 는 단계와 식물성유산균, 바실러스균, 효모균 을 농도별로 집중하여 배양하는 단계와, 발효 가 종료된 유산균 생성물질을 고압멸균하여 열풍건조 또는 액상형태로 사용 하는 단계를

연구자(기관)	연구주제	내용
		포함하는 것을 특징으로 하는 유산균 생성물질의 제조방법
* 농업회사법인 주식회사 생생초	발효성 GABA 성분 함유 팽이버섯 추출물 유산균 발효액을 혼합한 블루베리 식물성 유산균 발효음료 조성물	출원번호 : 1020150135485 (2015.09.24.) 발효성 가바(GABA) 성분을 함유한 팽이버섯 추출물 유산균 발효액을 혼합한 블루베리 식 물성 유산균 발효음료 조성물에 관한 것 * 비고 : 본 특허물은 협동연구기관의 대구대 학교 김성호 교수와 공동연구로서 개발한 국가연구과제(중소기업청; 연 구마을 과제)에 의해 도출된 결과물 로서 공동연구자 김성호 교수의 기 술이전으로 특허가 출원되었도 공동 발명자로 등재 되어 있음.
(주)다손	식물성 유산균을 이용한 장개선과 변비개선효과를 나타내는 기능성 대두 발 효조성물 제조방법	출원번호 : 1020090052230 (2009.06.12.) 식물성 유산균과 바실러스를 이용한 장개선 및 변비개선효과를 나타내는 기능성 대두 발 효조성물 제조방법
주식회사 폴무원	항암 또는 항균 활성을 가지는 락토바실러스 플 란타룸 피엠오08 및 식물 성 원재료를 이용한 유산 균 발효제품의 제조방법	출원번호 : 1020090130699 (2009.12.24.) 락토바실러스 플란타룸 피엠오08를 유효성분 으로 포함하는 항암 또는 항균용 조성물

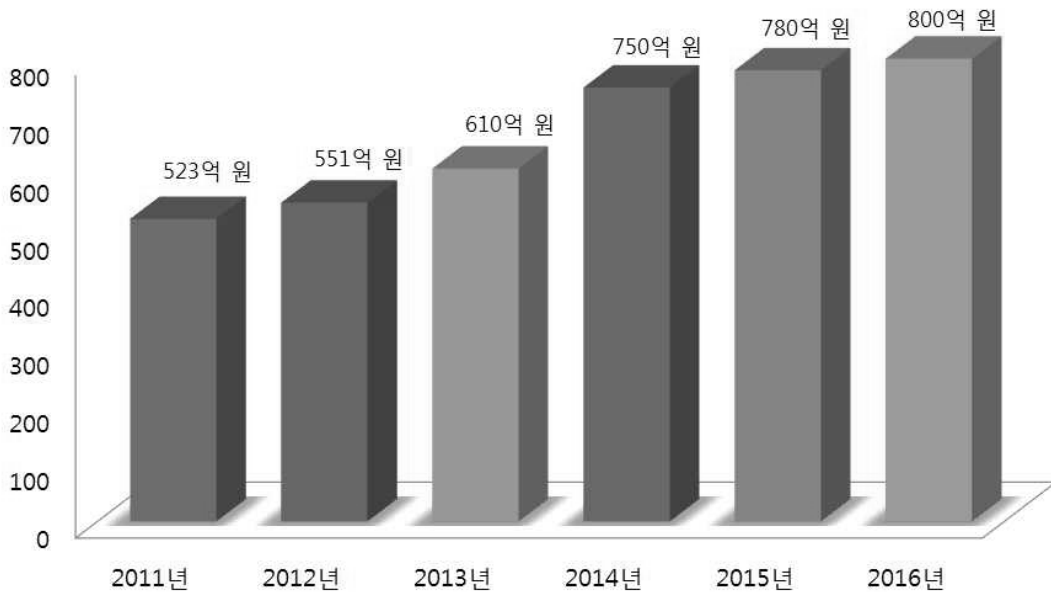
- (마) 식물성유산균은 김치, 장류, 과일 등 식물성 식품에서 생식하는 유산균으로 우유나 치즈에 함유된 동물성유산균과는 구분됨.
- (바) 식물성유산균의 종류는 200여 종 동물성유산균 종류는 10여 종으로 무엇보다 가장 큰 특징은 ‘강인한 생존력’
- ① 식물성유산균은 인공 위액(ph 2.5) 내 생존율은 90% 이상이나, 영양균형이 맞는 환경에서 생식하는 동물성유산균은 20~30%정도에 그침. 이는 폴무원식문화 실험결과에서도 밝혀짐
  - ② 채식 위주의 식생활을 해온 동양인은 서양인보다 장(腸)의 길이가 더 길어 동물성 유산균에 비해 식물성 유산균을 통한 유산균 섭취가 효과적임
- (사) 식물성 유산균에 대한 연구는 감 발효 음료를 제조하여, 그에 대한 특성을 연구하는 등 주로 약학적 효과에 대해 연구가 진행되었음. 또한, 배양법 및 발효기간에 따른 특성 연구가 진행되는 등 다양한 연구가 진행되고 있음
- (아) 숙주의 면역을 조절하는 새로운 생리활성인자를 탐색하고 이들의 유익한 효과를 학술적으로 밝히는 것의 미래 연구 주제로 보고 있음.

#### (4) 어린이 음료 시장현황

(가) 기능성 식품시장의 꾸준한 성장이 지속되며, 2016년 기준 국내 건강기능식품 시장 규모는 1조 4천억원의 거대시장을 형성하고 있으며, 평균 28.2 %씩 성장하고 있음. 또한, 연평균 10%이상의 성장잠재력을 가지고 있음

(나) 2016년 건강 트렌드 1위는 면역력 증진으로, 특히 아이들 건강과 성장 관리가 최대 관심사( '16 한국건강기능식품협회)

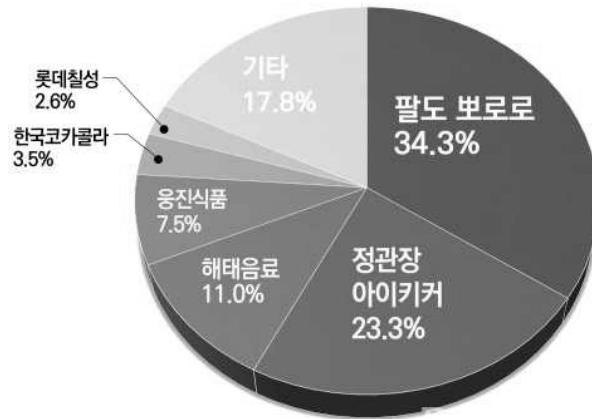
- ① 국내 어린이 음료시장은 2011년 523억원에서 2015년 780억원, 2016년 800억원으로 5년 만에 60% 가까이 빠르게 성장하고 있으며 향후 4~5년 내 1,000억원 규모로 성장할 것으로 전망됨
- ② 어린이 음료 시장은 현재 과즙음료와 홍삼음료가 주를 이루고 있으며 매년 시장 규모가 20% 이상 성장하고 있음
- ③ 어린이 음료 시장의 성장 원인은 저출산, 맞벌이 증가로 구매에 대한 자녀의 영향력이 커졌으며 건강에 대한 관심증대로 어른이 먹는 음료와 차별화 된 음료를 먹고자 하는 부모의 구매율 증가와 유치원, 학원 등 단체 활동의 증가로 인한 어린이 음료에 대한 수요 증가와 등으로 분석 됨
- ④ 어린이 음료 시장의 성장과 함께 식음료 업계에서는 건강과 맛을 생각한 다양한 기능성 제품들과 어린이들이 좋아하는 캐릭터를 사용한 제품들을 출시하고 있음



[그림] 국내 어린이 음료시장 규모

(다) 어린이 음료시장 업체별 점유율

- ① 어린이 음료 시장에서 업체별 점유율은 팔도(34.3%), 정관장(23.3%), 해태음료(11.0%), 웅진식품(7.5%)의 순으로 나타남



[그림] 어린이 음료시장 업체별 점유율(출처: 링크아즈텍)

(라) 어린이 음료시장 소비 트렌드

- ① 자녀의 건강에 대한 부모의 관심과 투자의 증가: 자녀의 면역력 강화와 발육에 대한 부모의 관심이 증대되었으며 이는 어린이 홍삼음료 시장의 성장에 영향을 미침. 어린이 홍삼음료 시장은 2014년 기준 1,500억원 규모로 성장했음
- ② 어린이를 대상으로 하는 건강기능 식품 시장의 성장: 2016년 기준 건강기능식품 주요 소비자층으로 중년여성(20.4%)의 뒤를 이어 어린이(13%)가 선정됨(2016년 한국건강기능식품협회 시장전망 보고서). 이는 건강기능식품의 구매 평균연령대가 점점 낮아지고 있음을 의미함
- ③ 어린이의 입맛과 부모들의 간간한 기준을 모두 만족시킬 수 있는 제품의 소비: 어린이를 대상으로 하는 음료의 경우 제품구매자와 사용자가 구분되어있음. 따라서 음료를 구매하는 부모의 기준(성분, 자녀의 건강에 도움이 되는 제품 등)과 어린이들의 기호(맛, 아이들의 눈높이에 맞는 캐릭터 사용 등)를 모두 충족시켜 줄 수 있는 제품을 소비함
- ④ 천연원료를 활용한 무첨가 제품의 선호: 부모들이 자녀의 건강을 위해 탄산음료의 구매는 기피하고 합성감미료를 첨가하지 않고 천연원료를 활용한 무첨가 제품을 구매함
- ⑤ 기존의 어린이 음료관련 기업들은 단순히 제품 종류를 늘리는 차원이 아니라 기존의 자사 제품, 이미지와 다른 유형의 상품을 통해 새로운 어린이 음료 시장을 개척하고 있음
- ⑥ 과거 어린이 대상 음료가 화려한 색깔과 당분으로 어린이들의 이목을 집중시켰다면, 최근에는 어린이들의 발육에 유익하다고 알려진 각종 영양성분이 들어있는 기능성제품이 개발되어 판매량이 증가하는 추세

(5) 경쟁기관현황

- (가) 어린이 음료 시장점유율은 팔도 뽀로로 음료, 정관장 아이키커, 한국코카콜라 쿠우, 이롬 앵그리버드, 한국야쿠르트 하루야채, 웅진식품 코코몽 순으로 나타남
- (나) 현재 어린이 음료는 크게 과.채주스, 과.채음료, 유산균 음료, 혼합음료, 건강기능식품 등의 형태로 다양한 제품이 출시되고 있음
- (다) 어린이 음료는 과.채주스, 과.채음료, 유산균음료, 혼합음료의 네 가지로 구분 할 수

있음(식품의약품안전처 어린이 기호식품 유형 기준)

① 팔도

- ㉠ 팔도는 어린이음료 시장에서 총 120억원의 매출을 올리며, 점유율 34.3%로 시장 1위를 지키고 있음
- ㉡ ‘뽀로로’ 4종(밀크/딸기/사과/블루베리)이 어린이 혼합음료로 식품의약품안전처에서 인증하는 어린이 기호식품 품질인증을 획득, 또한 지난 뽀로로 샘플, 뽀로로 스포츠를 출시하며 라인업을 강화함



② 정관장

- ㉠ KGC인삼공사의 ‘정관장 아이키커’가 23.3%의 점유율로 어린이음료 시장에서 2위 자리를 지키고 있음








③ 기타기관



- ㉠ ‘뽀로로 홍삼쭉쭉’ (팔도), ‘발삼 키플러스 코코몽’ (웅진식품), ‘착한 홍삼 키즈엔’ (농협), ‘홍삼 키즈 튼튼’ (이룸) 등이 지속적으로 출시되고 있음
- ㉡ ‘식물성 유산균 제품으로는 (주)월빙엘에스에서 유산균 핸드제품 (다른 과즙이나 우유/두유에 타서 마시는 제품)을 생산하여 판매하고 있음. 경쟁제품으로 볼 수 있으나 음료제품은 출시하지 않고 있음. 당사는 창업이후 식물성 유산균 과즙음료를 개발하여 1개 품목에 대하여 상용화하고 있음

[표] 경쟁기관 현황 도표

업체명	제품명	구분	제품사진	강점	비고
풀무원		유산균 음료		<ul style="list-style-type: none"> <li>- 국내산 배와 도라지를 발효시켜 열대과일을 넣은 어린이 건강음료</li> <li>- 국내산 배와 도라지를 풀무원의 특허 유산균인 식물성유산균으로 발효시켜 배의 달콤함은 더하고 도라지 특유의 쓴맛은 없앴</li> <li>- 당을 추가로 넣지 않아 당 함유량은 낮음</li> <li>- 열대과일로 어린이의 입맛에 맞춤</li> </ul>	
팔도	뽀로로	혼합음료		<ul style="list-style-type: none"> <li>- 식품의약품안전처 ‘어린이기호식품품질인증’ 획득</li> <li>- 식용 타르 색소나 합성</li> </ul>	



업체명	제품명	구분	제품사진	강점	비고
	홍삼 썩썩	혼합음료		보존료를 전혀 사용하지 않음 - 유아 성장에 도움이 되 는 비타민 B1을 1일 섭 취 영양소 기준치의 15%로 높여 품질을 강 화	
	뽀로로 비타썩 썩	혼합음료			
	뽀로로 망고, 멜론	유산균 음료		- 한국야쿠르트에서 개발 한 유산균 사용 - 어린이의 입맛에 맞는 열대과일 맛	
웅진식 품	발삼 키플러 스 코코몽	과채음료		- FMS 공법사용 특허 받은 발효홍삼 제 조법으로, 소화흡수가 어 려운 고분자 사포닌을 분 해해서 체내 흡수가 쉬운 저분자 사포닌으로 전환 시켜주는 기술사용	
정관장	아이키 커	과채음료		- 정관장 6년근 홍삼농축 액과 비타민, 칼슘, 천연 과즙이 함유된 어린이 홍삼 과즙음료 - 합성감미료나 합성보존 료를 무첨가	
롯데	우리아 이홍삼 장군	과채음료		- 6년근 홍삼 농축액과 함 께 비타민B2, B3, B6, C 등 성장기 어린이에게 필요한 영양 성분을 담 은 제품으로, 오렌지과즙 20%를 섞어 어린이들도 맛있게 즐길 수 있음	
한국야 쿠르트	한진생 발효홍 삼 k 키즈5+	유산균 음료		- 효소와 유산균의 이중 발효과정을 통해 사포닌 을 분해해서 소화흡수가 잘 됨	특허 (14097 61)

업체명	제품명	구분	제품사진	강점	비고
	하루야 채 뽀로로	과채음료		- 14가지 채소와 4가지 상 큼한 과일 100g이 함유 돼 있어 성장기 아이들 의 영양밸런스 강화에 도움을 주며, 면역력 강 화에도 효과적인 제품	
매일유 업	헬로엔 요	유산균 음료		- 어린이에게 필수적인 6 종 멀티 비타민과 칼슘 이 하루 권장량의 15% 이상 함유 - 당함량을 줄임 - 어린이기호식품 품질인 증 획득	

## (6) 표준화 현황

(가) 식품의약품안전처 “어린이 기호식품 품질인증”

- ① 어린이 기호식품은 어린이 식생활 안전관리 특별법 제 14조에 따라, 품질인증기준을 정함으로써, 어린이 기호식품의 제조, 가공, 유통, 판매를 권장하는 목적을 가짐
- ② 이와 같이 어린이 기호식품 품질인증은 안전, 영양, 식품첨가물의 사용에 관한 기준으로 나뉘어, 표준화가 되어 있음.

(나) 출입국검사 검역기관에서는 국경위생검역법, 식품위생법, 식품위생 국가표준 등 법률, 조례 및 표준에 따르고 있음

- ① 이에 영·유아용 주식품 및 보조식품은 반드시 위생부에서 제정한 영양위생표준에 부합해야 함.
- ② 식품위생 국가표준 GB10765, GB10766, GB10767, GB10769, 10770-1997, 《영·유아용 식품》(영아용 조제분유 I, II, III, 영·유아용 조제분유 및 영·유아용 보충 곡분, 이유기 보조식품, 이유기 보충식품) 포함; 국가표준GB10775-780-89 《영·유아용 보조 식품》, 사과즙, 당근즙, 육즙(肉泥), 골즙(骨泥), 닭고기 야채죽, 토마토 쥬스 등 포함

(다) 이와 같이 제조, 가공, 유통, 판매를 위해 어린이 기호식품 품질 인증, 수출을 위한 수입국의 식품 위생 관련 규정에 부합해야 하나 우선적으로 식품 위생 국가 표준등과 같이 표준이 있음

## 나. 국외 기술 수준 및 시장 현황

### (1) 해외 새싹보리 관련 연구 현황

- (가) 요시히데 하기와라 박사의 연구에 따르면 새싹보리가 연구한 150여개의 녹색식물 중 새싹보리가 영양소가 많으며, 그 외 미국에서도 새싹보리를 노출시켜 암세포성장을 억제하는 실험을 진행하기도 하였음
- (나) 호주, 일본 등 외국에서는 새싹보리의 영양성과 건강기능성을 인식하여 황산화 건강 식품을 개발하여 산업화 하고 있음
- (다) Behell JM 외 2인(2004)dp 의하면, 새싹보리에 풍부한 수용성 식이섬유소가 고지혈증을 비롯한 심혈관계 질환을 개선시키는 연구결과를 도출하였으며, Artiss J 외 4인(2006)에 의해 지방억제에 관한 연구와 같이, 새싹보리를 비롯한 새싹채소의 영양소에 대한 연구가 활발히 진행되고 있음
- (라) 일본 문부과학성 식품표준성분표의 자료에 의하면 비타민, 칼슘, 카로틴, 비타민, 무기성분함량이 풍부하여 외국에서도 새싹보리의 영양학적 가치가 증명됨

[표] 새싹보리의 영양적 가치

영양성분	함유량	생리활성
식이섬유	고구마의 20배	콜레스테롤, 변비
카로틴	호박의 16배	등맥경화 예방
비타민C	레몬의 2.3배	항산화 및 노화방지
칼슘	우유의 4.6배	골다공증 및 불면증
칼륨	우유의 14.7배	생리통, 신체 활력 증가
철	시금치의 25, 간의 12배	빈혈예방

\* 출처: 일본 식품표준성분표

### (2) 시장현황

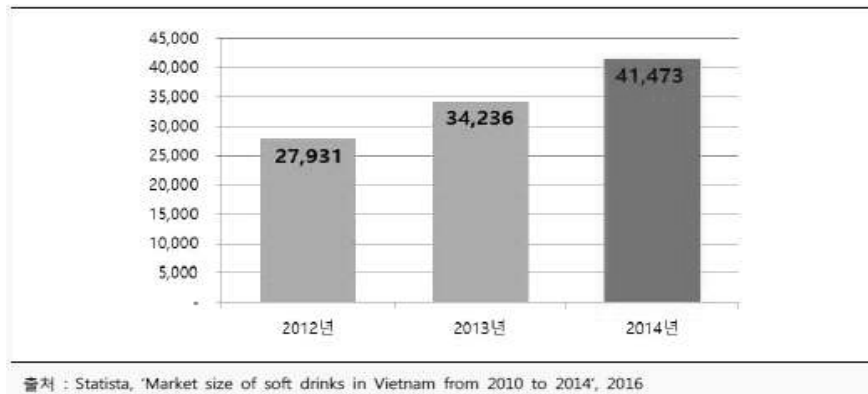
- (가) 국외에서는 영양학적 가치와 기능성을 확인해 이미 건강식품, 식품첨가물, 기능성화장품 소재 등 다양한 제품을 판매중임
- (나) 일본은 새싹보리가 함유된 제품이 약 1조원의 시장을 형성하고 있음 또한, 일본에서는 보리새싹은 주로 청즙(분말)형태로 대중화 되어 있음
- (다) 중국은 현재, 어린이 음료의 대다수가 유제품임. 즉, 유산균음료 및 요거트 등의 유제품
  - ① 현지 유통매장에서 조사한 어린이 음료 14가지 중 88%가 유제품이며, 중국의 소프트 드링크 시장향후, 시장규모가 지속적으로 커질 것으로 보여짐
  - ② 또한, 두 자녀 정책으로 인해 어린이 인구가 증가 할 것으로 전망됨으로써 어린이음료 시장은 더욱 성장 할 것으로 보여짐

### (3) 베트남 음료 시장 현황

#### (가) 베트남 음료시장 규모

- ① 2012년부터 2014년까지 베트남의 소프트 음료 시장은 꾸준한 성장세를 보임. 2012년부터 2014년까지 순차적으로 27조 9,310억 동(1,000동= 50.10원), 34조 2,360억 동, 41조 4,730억 동의 시장 규모가 확인되었으며, 3개년 연평균은 21.85% 성장률을 기록함
- ② 베트남 식품 및 음료 시장의 연간 성장률이 7~8%로 집계되어 발전가능성이 높은 시장으로 떠오름. 베트남인들의 지출에 있어 음식이 차지하는 비중이 매우 큼.

(단위 : 십억 동)



[그림] 베트남 음료 시장 규모

- ③ 어린이 음료의 주요 소비층인 0~9세 인구 비중의 경우, 베트남 전체 인구의 16%인 약 1,512만 5,004명으로 집계됨. 한국의 0~9세의 총 인구수가 460만 1,688명임을 감안하면, 베트남의 동 연령층의 규모가 3.29배 더 큰 것으로 나타남





#### (나) 베트남 음료시장 소비 트렌드

- ① 베트남 어린이 음료, 바이어 선호 스펙: 보편적으로 전 연령층이 음용할 수 있는 음료를 수입하며, 원산지, 브랜드, 테트라 팩에 담긴 포장 용기를 선호함
- ② 과거 베트남인들은 설탕을 많이 먹으면 머리가 좋아진다고 생각하여 설탕 섭취에 대한 거부 반응이 적었다고 함. 그러나 최근 당뇨병 등 성인병 환자가 증가하면서 설탕이 건강에 해롭다는 인식이 증가하고 있음
- ③ '건강' 이 트렌드로 부상하면서 저당, 탄산을 無첨가한 음료가 각광 받고 있음
- ④ 베트남 사람들이 좋아하는 한국 상품으로는 건강 및 웰빙을 마케팅 키워드로 한 홍삼, 김, 미역 제품이 있음

#### (다) 베트남 시장 내 경쟁기관 현황

- ① 베트남 시장에서는 Vina milk와 FrieslandCampina가 베트남 내에서 어린이에게 인기가 높은 것으로 나타남
- ② 한국기업의 경우 팔도사의 뽕로로 제품이 현지 매장에 가장 많이 진열된 것으로 나타났으며 조아제약의 스마트 디노와 룡디노는 2016년 7월 베트남 어린이 음료 시장에 진출한 것으로 나타남

[표] 베트남 시장 내 어린이 음료 현황

업체명	제품	제품사진	특징	비고
Vina milk	우유, 분유, 요거트, 과채즙이 함유된 음료		- Vina milk는 베트남에서 가장 큰 유제품 회사로 알려져 있으며 베트남 기업 중 상위 10위 내에 랭킹됨	
Friesland Campina	신선 우유, 분유, 요거트		- Dutch lady 브랜드를 통해 유아용 분유 시장에서 강세를 보이고 있으며 - 홈페이지나 제품 포장지 전면에 주로 서양 어린이를 인물로 삼는 경향이 있음. 이는 최근 베트남 소비자가 어려서부터 먹는 것을 바꾸면 외국인처럼 키도 크고 머리도 좋아진다는 인식을 가지면서 영양에 큰 관심을 두고 있기 때문인 것으로 사료됨	
조아제약	스마트 디노, 룡디노		- 2016년 7월 국내 제약기업인 조아 제약이 베트남 어린이 음료시장에 진출 - 베트남 어린이의 기호와 수요에 알맞도록 어린이용 기능성 음료제품을 1년간의 연구 끝에 개발 - 어린이의 키 성장에 도움이 되는 스마트 디노, 키 성장에 도움이 되는 룡디노	국내 기업
팔도	뽕로로 음료		- 현지 매장에 가장 많이 진열되어 있는 국내 제품	국내 기업

(라) 베트남 시장 진출 전략

- ① 유통망 확보: 베트남의 음료 시장은 주로 오프트레이드(하이퍼·슈퍼마켓, 면세점 등의 판매 시장)에서 유통이 더욱 효율적이라고 함(야후 Financial ‘2015 베트남 음료 시장 보고서’). 더불어 베트남 소비자들의 한국식품 주요 구매처가 하이퍼·슈퍼마켓과 같은 대형마트인 것으로 나타나 음료 제품의 진출 시 판매에 유리할 것으로 사료되는 하이퍼·슈퍼마켓을 제 1의 진출 경로로 설정해야 할 것임

[표] 베트남 주요 유통업체 리스트(슈퍼마켓/하이퍼마켓)






No	이름	특징	비고
1	Co. opmart	- 자사 PB 브랜드 개발, 제품 프로모션 진행 - 다수 레시피 제공 - 자사 PB 브랜드 개발 - 제품 프로모션 진행	
2	Lotte mart	- 유명 슈퍼마켓 중 유일하게 온라인 주문 가능 - 주요 이용객은 한인과 고소득 소비자층 - 자사 PB 브랜드 개발 - 상시 저가세일 진행 - 온라인 쇼핑몰 운영 - 2020년까지 60개의 아울렛을 오픈할 예정이라 밝힘. 규모를 확대하게 되면 Lotte mart 내부에 한국 식품관이 따로 개설되어 있기 때문에 한국산 제품 유통에 이점이 있을 것으로 사료됨	
3	Vinmart	- Vinmart, Vinmart+가 베트남 내 가장 많은 점포 수 보유 - 상시 저가세일 진행	
4	Big C	- 프랑스 계열 유통업체 - 2015년 5월 말 기준, 28개 운영 중	
5	Hapro	- 베트남 국영 유통기업 - 슈퍼마켓, 식품점, 의류소매체인 운영 중	
6	Parkson	- 말레이시아 계열 유통업체 - 백화점, 쇼핑센터 사업에 주력	

- ② 제품에 캐릭터 장난감을 부착하여 차별화된 마케팅 실행: 베트남에 판매되고 있는 제품80%가 캐릭터 이미지가 삽입된 포장용기를 사용한 것으로 나타났으며 주로 앞면에 뽀로로나 어린이 이미지, 스파이더 맨, 아이언 맨 같이 친근감을 주는 캐릭터를 사용함. 따라서 어린이의 이목을 끌수 있는 캐릭터를 활용함으로써 차별화된 마케팅을 진행해야 함
- ③ 음료의 기능을 강조: ‘건강’ 이 트렌드로 부상하면서 저당, 탄산을 無첨가한 음료와 비타민 등을 가미한 기능성 음료에 대한 정보를 제공함으로써 차별화를 해야 할 것임

#### (4) 새싹보리 관련 경쟁기관현황

(가) 해외의 새싹보리 관련 제품은 분말, 캡슐제형과 같이 아래 표로 정리할 수 있음

[표] 새싹보리 관련 제품개발 해외동향

업체명	제품유형	제품명	판매제품	비고
야마모토 한방공 장	- 보리새싹 분말	- 야마모토 한방 보리새싹잎차		
ITOH	- 보리새싹 분말	- 보리새잎		
프로피 에스	- 건강 기능 식품 (캡슐제형)	- 티얼라이브		보리새싹의 유효성분을 농축 및 그 외 3가지 녹색 식물과 함께 배합하여 황산화 물질을 포함한 식물성 캡슐제형의 건강기능식품
산토리	- 보리새싹 분말	- 극의 청즙		
호코니 코	- 보리새싹 분말	- 코다와리 효소 청즙		어린이들도 먹을 수 있게 약간의 단맛을 첨가

**(5) 새싹보리 관련 특허 현황**

- (가) 해외의 경우, 키프리스(특허정보넷)에 따르면 새싹보리 검색하였을 경우 5,375개의 결과가 나온
- (나) 새싹보리를 주로 다룬 특허는 없으며 새싹보리가 아닌 보리씨앗, 새싹채소를 이용한 조성물 혹은 식료품 제조방법 등에 관한 특허를 등록하였음

**(6) 식물성 유산균 관련 기술 및 지식재산권 현황**

- (가) 일본은 유산균 음료가 건강 기능성식품으로 제도화되어 발전하고 있음.
  - ① 일본에서는 84년 특정보건용 식품이 문부성의 특정연구과제로 출발하여 91년 기능성 식품으로 개칭하였고 95년 10개 품목이 97년에는 100개 품목으로 확대되었음. 지금은 167개 품목으로 성장하여 제품의 유효성과 안전성을 임상시험으로 규명한 유산균제제, 올리고당, 식이섬유, 대두단백질 등이 두각을 나타내고 있음. 일본에서 건강기능성식품 시장을 주도하고 있는 것은 소화기계 제품임. 설인유업, 야쿠르트, 메이지유업 등의 유가공업체가 중심이 되어 요구르트 등의 다양한 유산균음료를 개발 출시하였음
  - ② 일본 유산균 식품 학회지에서는 다음 표와 같이 식물성, 동물성 유산균의 차이점을 연구하는 등 식물성 유산균의 생존력의 차이를 확인하고 있음.

[표] 식물성, 동물성 유산균의 차이점 비교

식물성·동물성 유산균의 차이점		
	식물성 유산균	동물성 유산균
서식 장소	야채, 과일, 곡류, 장류	우유 및 우유 가공품
인공 위역 내 생존율(PH 2.5)	90% 이상	20~30%
종류	200여종	10여종
영양환경	고농도 염도, 영양이 풍부하지 않은 곳에서도 생식 가능	영양이 풍부하고 균형이 맞는 곳에서만 생식 가능
주요 함유 식품	김치, 절임류, 식물성 유산균 음료	요구르트, 유제품
음료 1병(150mL)당 열량	57~95kcal	135~150kcal

자료: 일본유산균식품학회지

- (나) 식물성 유산균에 대한 연구는 미진한 실정이나, 활발하게 진행될 것으로 전망됨
  - ① 발효 유제품 및 육제품, 사람의 분변에서 분리된 장내 유산균의 대상의 연구가 대부분
  - ② 동양인의 위장에는 동물성 유산균보다 식물성 유산균이 더 적합하다는 연구가 진행되는 등 생리 기능성에 대한 연구도 진행되고 있음

**(7) 표준화 현황**

- (가) 중국
  - ① AQSIQ,, 식품리콜제 관리법 : 2012년 10월부터 중국에 식품을 수출하는 모든 업체는 AQSIQ 등록 절차를 거쳐야 하며, 식품리콜제 관리법을 시행하는 등 안전한 먹거리를 위한 표준화가 진행되고 있음
- (나) 베트남



- ① 베트남의 최근이슈는 식품안전성 문제로 오염된 음식 유입을 막기 위해 기존 법규보다 훨씬 엄격한 법을 적용하는 등 식품안전위생의 기준에 대하여 표준화를 진행하고 있음
- ② 식품 안전법규 위반 관련 新형사법을 개정하였음
- ③ 이와 같이 오염된 음식의 유입을 억제하기 위해 보건복지부, 농업농촌개발부, 산업무역부 세 정부기관에 안전성 검사를 강화함.
- ④ 품질안정성, 창조적 혁신, 포장라벨링, 사회경제적인 효율성에 근거한 고품질 인증마크 같이 권장마크가 있음으로 보아 고품질 식품에 대해 표준화를 진행중에 있음.
- ⑤ 2015년 12월 20일부터 발효된 VKFTA를 통해, 원산지 기준이 기존보다 완화되는 등, 이익을 위한 제도적 기반을 구축하기도 함



[그림] 통관 및 검역 정보 표준

### 3. 연구개발의 중요성

기술적 중요성	경제산업적 중요성	사회문화적 중요성
<ul style="list-style-type: none"> <li>• 새싹보리 유산균 발효물 활용 어린이 유산균 음료 개발</li> <li>• 새싹보리 유산균 발효의 최적발효조건에 의한 제품 대량생산</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 안전한 새로운 기능 식·의약품을 창출하는 촉매로 작용함</li> <li>• 새싹보리의 식물성 유산균 발효물을 활용한 어린이용 음료개발 및 산업화를 통해 높은 성장률을 보이고 있는 국내 유산균 산업의 발전에 기여할 수 있음</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 어린이의 비만과 배변활동, 건강에 좋은 식품 개발을 통해 소비자의 식생활 개선과 안전에 기여할 수 있음</li> <li>• 소비자에게 인체에 안전한 식품을 제공함으로써 건강한 먹거리를 제공함</li> </ul>

[그림] 연구개발의 중요성

#### 가. 기술적 중요성

- (1) 비만은 일반적으로 체내에 지방 조직이 과다한 상태인 것을 의미하며, 음식물로 섭취한 에너지가 신체활동 등으로 소비한 에너지와 균형을 이루지 못하여 잉여의 에너지가 체지방으로 축적되는 현상임
- (2) 이러한 비만은 에너지 불균형에 의해 체지방이 비정상적으로 많아지면 당뇨병, 고지혈증, 심장병, 뇌졸중, 동맥경화증, 지방간 등의 각종 대사성 질환과 성인병이 유발되며, 이는 서구에서뿐만 아니라 우리나라에서도 심각한 사회문제로 대두되고 있음.
- (3) 전 세계적으로 비만 치료제의 개발을 위한 다각적인 측면의 연구가 진행되고 있음.
- (4) 비만치료용 약물은 크게 지방흡수 억제, 지방 분해 및 열 발생 촉진, 식욕 및 포만감의 조절, 단백질 대사 저해 그리고 음식물의 섭취와 관련된 정서 조절 기전으로 나뉘고 있음.
- (5) 대표적인 비만 치료제로는 오리스타트(Orlistat)를 원료로 하여 지방흡수를 억제하는 제니칼™(Xenical™)과 시부트라민(sibutramine)을 주원료로 교감신경계를 자극하여 식욕을 억제시키는 리덕틸™(Reductil™)이 있음.
- (6) 그러나 제니칼™의 경우 지방변, 복부통증, 구토, 가려움증, 간 손상등의 부작용이 보고되어 있으며, 리덕틸™의 경우는 두통, 식욕부진, 불면, 변비 등의 부작용뿐만 아니라 심각한 심혈관계 부작용을 일으킨다는 이유로 최근 사용 기준이 강화되는 등의 논란이 있음.
- (7) 이러한 비만치료제를 통한 약물요법 이외에도 비만을 예방하고 치료하기 위한 방법으로 음식물의 섭취를 제한하는 식이요법, 에너지 소비를 증가시키는 운동요법이 있으며, 정신요법, 행동요법, 외과요법 등도 실시되고 있음.
- (8) 바람직한 비만의 치료 방법으로는 운동을 통한 에너지 소비 촉진과 부작용이 적은 비만치료용 약제를 병행하는것이 가장 안전하고 효과적인 방법으로 제시됨.
- (9) 비만치료용 약제의 경우, 상기의 제니칼™과 리덕틸™의 예처럼 심각한 부작용들이 보

고되고 있으며 안전성에 대한 명확한 신뢰가 뒷받침되지 않고 있는 실정임.

- (10) 따라서, 인체에 대해서 항비만의 우수한 효능을 나타내면서도 안전성이 보장되는 물질의 개발이 요구되고 있음.
- (11) 특히 어린이 및 소아는 신체의 균형있는 영양물의 공급과 적절한 자극과 운동으로 신체 발달과 인체의 균형적 기관의 발달이 요구되는 시기임.
- (12) 그러나 최근 과도한 영양물의 공급, 잘못된 식습관, 잘못된 정보에 의한 식이의 조절 실패 등으로 우리나라 뿐만 아니라 전세계적으로 소아 시기부터 비만 인구가 늘고 있음.
- (13) 또한 소아와 어린이들은 활발한 신체 활동이 요구되고 있으나 최근 도시화의 팽창과 과도한 학업 등으로 인하여 인체활동 시간은 점차 줄고 과도한 학업으로 인한 스트레스와 전자기술의 발달과 컴퓨터, 스마트폰의 보급 등으로 신체의 활동은 더욱 더 줄어들고 있음.
- (14) 결국 이러한 사정으로 소아 및 어린이 비만 인구가 증가 하고 있고 이러한 과도한 영양공급과 비만은 결국 성인이 되어서는 각종 성인병의 원인이 되는 국민 전체의 건강의 적이 되고 있음.
- (15) 그러나 소아나 어린이는 성장과 밀접한 시기이기 때문에 위에서 언급한 각종 비만치료제의 사용과 치료에 소극적이 될 수 밖에 없는 실정임.
- (16) 당 기업(프레쉬벨)은 농진청이 연구한 대한민국 특허기술( 10-1645464 ) ‘새싹보리 추출물을 포함한 비만 억제용 조성물’의 기술 이전으로 새싹보리에 관련한 기술 실시를 행하고자 함.
- (17) 본 기술은 lutonarin, saponarin 을 포함하는 지방세포로의 분화 억제용 조성물, 동 조성물을 이용하여 지방세포로의 분화를 억제하는 방법, lutonarin 또는 saponarin이 함유된 새싹보리 추출물 또는 그의 분획물을 포함하는 비만의 예방 또는 치료용 약학 조성물, 비만의 예방 또는 개선용 식품 조성물, lutonarin, saponarin 또는 그들의 약학적으로 허용되는 염을 포함하는 비만의 예방 또는 치료용 약학 조성물 및 식품 조성물에 관한 것임.
- (18) 본 발명의 조성물을 이용하면, 비만의 원인이 되는 지방세포로의 분화를 억제하여 지방세포의 수를 감소시킬 수 있을 뿐만 아니라 생성된 지방세포에 포함된 콜레스테롤의 함량을 감소시킬 수 있으므로, 효과적인 비만의 치료에 널리 활용될 수 있음.
- (19) 한편 인체에 안전한 유산균을 사용하여 독성 및 부작용이 거의 없는 다양한 식품 제형에서 소재로 사용될 수 있음.
- (20) 유산균이 생산하는 다양한 glycosidase 중  $\beta$ -glucosidase는 셀룰로스나  $\beta$ -당쇄결합을 지니고 있는 기질로부터 포도당을 유리시키는 효소임.
- (21) 천연물질 배당체는 비 배당체와 당의 결합으로 이루어져 있으며 식물, 동물, 미생물 등 다양한 생물체에 존재. 배당체는 다양한 호르몬, 알칼로이드, 플라보노이드 등의 구조를 이루며 다양한 약물과 기능성 물질의 개발에 이용됨.
- (22) 배당체 자연계에서 존재할 때는 수용성을 부여하여 조직과 세포내에 골고루 분포되어 있으나 인체 내로 섭취된 후에는 상대적으로 장을 통한 혈액내로의 흡수가 낮음.
- (23) 배당체는 생물전환 또는 효소적 전환에 의하여 당이 가수분해 될 수 있음.

- (24) 일반적으로 **배당체는 인체의 장내에 있는 미생물에 의하여 비배당체로 전환되어지면 흡수율이 증가하지만 사람마다 장 내의 미생물에 의한 전환율과 전환 결과에 차이가 있음.**
- (25) 산과 알칼리의 화학적 처리는 epimerization, hydration, hydroxylation 등을 일으켜 다양한 부 반응산물을 생성하는 단점이 있고 효소 또는 타 미생물을 사용하는 경우에는 안정성에 대하여 고려하여야 함.
- (26) 이와 같은 점들을 고려하여 볼 때 건강증진 작용을 갖는 프로바이오틱스 균주와 식용 가능한 미생물을 이용하여 천연물 중에 존재하는 배당체의 생리활성 및 관능성을 증가시킬 수 있어 새로운 기능성 식품의 개발에 활용할 수 있음.
- (27)  $\beta$ -Glucosidase 등의 효소를 생산하는 유산균을 사용하여 생물전환을 유도하여 새싹보리내 유용성분을 효과적으로 분해하고 새싹보리를 발효시키면 **배당체인 성분을 비배당체로 효율적으로 전환할 수 있고 궁극적으로 생리작용이 우수한 기능성 식품으로 개발 가능함.**
- (28) 또한 발효기술을 이용하여 유산균 발효에 의하여 식이 용이한 맛과 천연의 물질을 효율적으로 이용 할 수 있으며, 설탕 등의 비만의 원인 되는 물질을 첨가 하지 않고도 충분한 맛과 기능을 지닌 음료의 개발이 가능함.

#### 나. 경제 산업적 중요성

- (1) 천연소재를 미생물의 다양한 효소와 생물전환 시스템에 의해 매우 안전한 새로운 기능식·의약품을 창출하는 촉매로 작용함.
- (2) 유산균으로 대표되는 프로바이오틱스 시장이 이처럼 성장한 배경으로는 어린이 장 건강과 인체 면역력 증진에 좋다는 소비 인식이 높아지고 있음으로 풀이됨.
- (3) 국내 프로바이오틱스 시장은 2013년 800억원에서 2014년 1400억원까지 가파르게 성장한 데 이어 **2017년까지 연평균 19.4% 성장할 것으로 전망됨.**

**빠르게 성장하는 프로바이오틱스 시장**  
(단위=억원)



[그림] 프로바이오틱스 시장 현황

- (4) 따라서 높은 성장률을 보이고 있는 **국내 유산균 시장에 새싹보리의 식물성 유산균 발효물을 활용한 소아비만 및 배변기능 개선 어린이용 음료개발 및 산업화를 통해 수익을 창출하고 산업의 발전에 기여할 수 있음**

## 다. 사회문화적 중요성

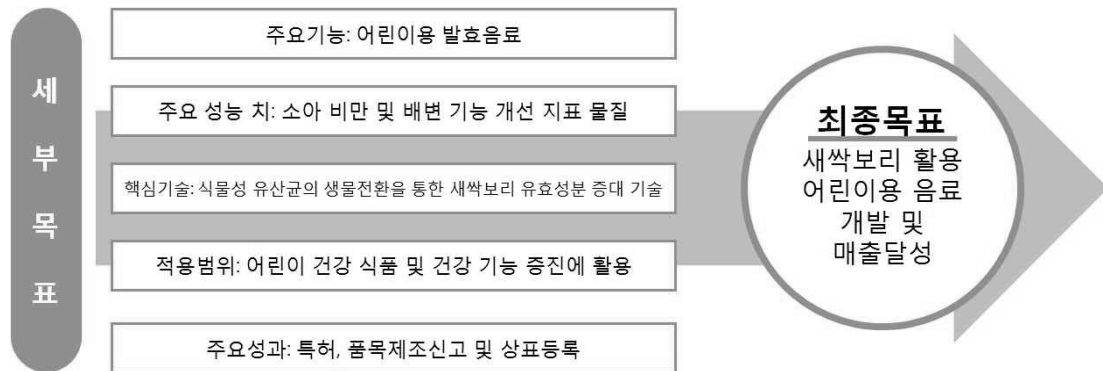
- (1) 최근 사회적으로 어린이의 비만과 어린이 식음료의 성분표시 강화, 어린이의 건강에 대한 관심이 증대되고 있음. 따라서 어린이의 비만과 배변활동, 건강에 좋은 새싹보리의 식물성 유산균 발효물을 활용하여 어린이용 음료를 개발함으로써 어린이의 비만 예방에 기여함
- (2) 인체에 안전한 유산균을 사용하여 독성 및 부작용이 거의 없는 다양한 식품 제형에서 소재로 사용함으로써 소비자에게 인체에 안전한 식품을 제공할 수 있음

## 제 2 절. 연구개발의 목표 및 내용

### 1. 연구개발의 최종목표

#### 가. 최종목표

새싹보리의 식물성 유산균 발효물을 활용한 소아비만 및 배변기능 개선 어린이용 음료 개발 및 산업화를 통한 매출 달성



[그림] 연구개발 목표

#### 나. 세부목표

##### (1) 주요 기능(또는 규격)

(가) 어린이용 혼합추출(발효)음료

##### (2) 주요 성능치

(가) 소아 비만 및 배변 기능 개선 지표물질

- ① 식이섬유
- ②  $\beta$ -Glucan
- ③ Lutonarin 및 saponarin 및 aglycon 화합물

##### (3) 핵심 기술

(가) 새싹보리의 식물성 유산균 및  $\beta$ -glucosidase 효소 활성화 및 bioconversion 기술

##### (4) 적용범위(또는 서비스)

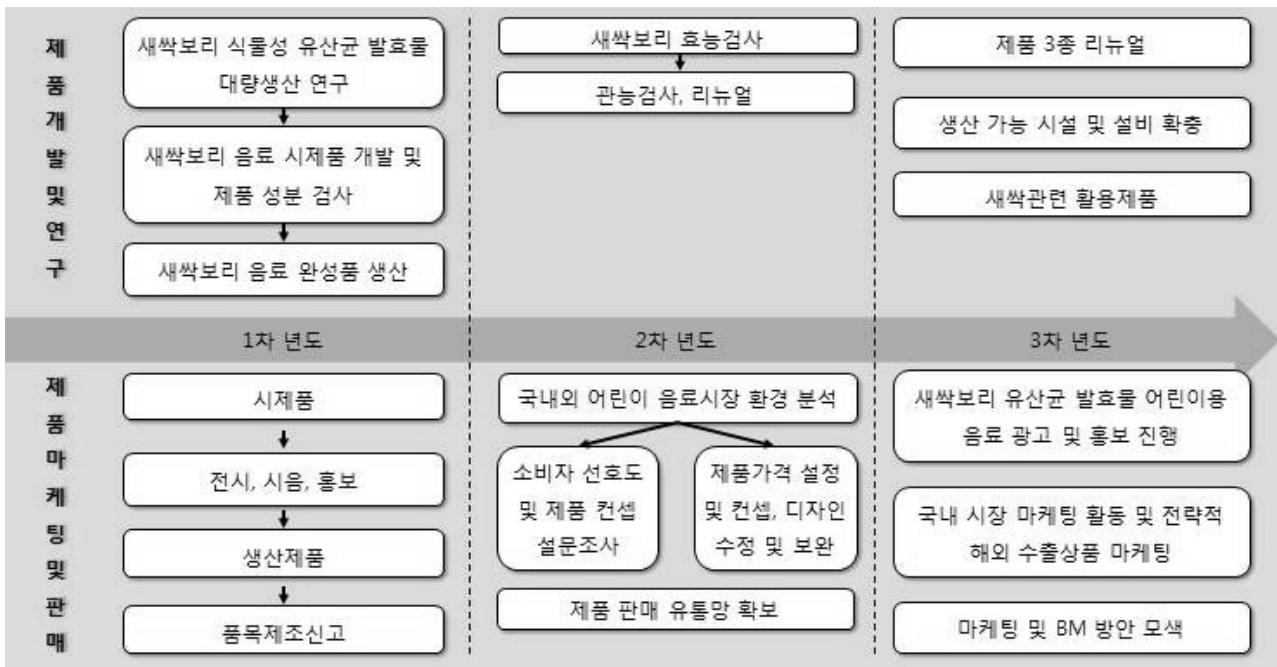
(가) 어린이의 비만 및 배변 기능 개선을 위한 식물성 유산균음료로 어린이를 위한 건강 보조식품으로 활용 가능

(나) 추가개발을 통한 어린이의 면역활성, 항 스트레스 및 뇌기능 활성 기능 개선을 위한 유산균음료를 개발함으로써 어린이의 건강기능 증진에 활용 가능

**(5) 주요성과**

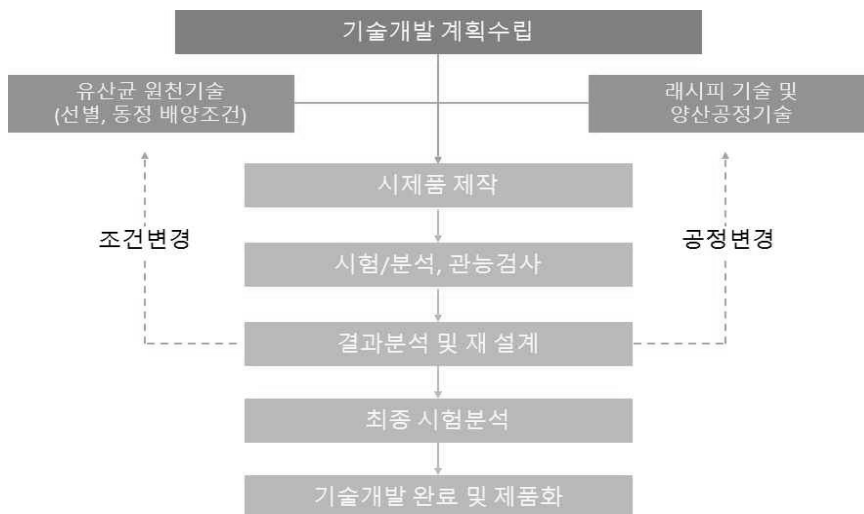
- (가) 발효용 식물성 유산균 1종 이상 특허기탁
- (나) 소아비만 및 배변기능 개선 어린이 음료 개발 : 품목제조 신고 3종 이상
- (다) 어린이 비만 및 배변 개선 기능성 검토 : 성인용 항비만 및 배변 건강기능 음료 대비 120% 이상의 기능 효과(특허 출원 및 등록 1건이상)
- (라) 제품개발 및 대량생산 공정 확립 : 생산공정도
- (마) 관련제품 패키지 디자인 개발 : 상표 등록 3종 이상

**2. 연차별 개발 목표 및 내용**



[그림] 3년 개발목표 및 내용

**가. 1차 년도**



[그림] 1차년도 시스템 구성도

**(1) 개발 목표**

**(가) 주관연구기관(프레쉬벨)**

- ① 새싹보리의 식물성 유산균 발효물을 활용한 소아비만 및 배변기능 개선 어린이용 음료 시제품 개발 및 제품 성분 검사
- ② 새싹보리의 식물성 유산균 발효물을 활용한 소아비만 및 배변기능 개선 어린이용 음료 완성품 생산(“새싹보리 식물성 유산균 음료” 출시)

**(나) 협동연구기관(대구대학교 산학협력단)**

- ① 새싹보리 유산균 최적발효조건 실현을 통한 scale up 조건 충족 및 대량생산기술 확립
- ② 새싹보리 유산균 발효물의 소아비만 및 배변기능 개선의 지표물질 함량 검토
- ③ 마케팅용 data 및 자료 확보
- ④ 식물성 유산균을 활용(요소기술 활용)한 변비개선 음료 IP 출원

**(2) 개발 내용 및 범위**

1차년도	주관연구기관	협동연구기관
<b>개발 목표</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 새싹보리의 식물성 유산균 발효물을 활용한 소아비만 및 배변기능 개선 어린이용 음료 시제품 개발 및 제품 성분 검사 → 완성품 생산(새싹보리 식물성 유산균 음료)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 최적발효조건 실현을 통한 Scale Up 조건 충족 및 대량생산기술 확립</li> <li>• 소아비만 및 배변 기능 개선 지표물질 함량 검토</li> <li>• 마케팅용 Data 및 자료 확보</li> <li>• 변비 개선 음료 IP 출원</li> </ul>
<b>개발 내용 및 범위</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 시제품 제작 및 성분 검사를 통한 시제품 성능 시험</li> <li>• 생산 업체 선정 및 제품 대량 생산</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 최적발효 유산균주의 동정과 균주의 기탁</li> <li>• Lab Scale 발효 조건의 최적화</li> <li>• Pilot 및 Plant Scale 적용</li> </ul>
<b>계획</b>	새싹보리 기술 개발 및 제품 개발	

[그림] 1차년도 개발

**(가) 주관연구기관(프레쉬벨)**

- ① 새싹보리의 식물성 유산균 발효물을 활용한 소아비만 및 배변기능 개선 어린이용 음료 시제품 개발
  - ㉠ 시제품 제작: 업체선정 및 시제품 제작
  - ㉡ 제품의 성분 검사 및 성능 시험
  - ㉢ 개발 기술의 특허 출원 및 등록
  - ㉣ 제품 디자인 개발
- ② 새싹보리의 식물성 유산균 발효물을 활용한 소아비만 및 배변기능 개선 어린이용 음료 대량생산 완료



- ㉓ 생산 업체 선정
- ㉔ 제품 대량 생산

**(나) 협동연구기관(대구대학교 산학협력단)**

- ① 최적발효 유산균주의 동정과 균주의 기탁
  - ㉓ 분리 유산균주의 인체 안전성 시험 (in vitro)
  - ㉔ 16s rRNA 추출에 의한 sequencing후 gene bank의 authentic strain과의 상동성 비교
- ② Lab scale 발효조건의 최적화
  - ㉓ 예비시험 조건을 통한 중심합성계획법에 의한 발효조건 제시 (발효시간 및 발효온도 등)
  - ㉔ RSM 기법에 의한 발효조건 최적화
  - ㉕ 반응변수로서 발효물의 특성 조사
  - ㉖ 반응변수로서 지표성분 조사
  - ㉗ 새싹보리의 지표성분의 분석 - 식이섬유, luteolin, lutunarin, saponarin 및  $\beta$ -glucan 등의 함량검사
- ③ 분광광도 및 HPLC에 의한 분석
  - ㉓ 새싹보리 발효전의 지표성분 및 발효물의 지표성분 변화량 측정
  - ㉔ 유산균의 bioconversion에 의한 물질변화
- ④ 배당체와 비배당체 함량 검사
- ⑤ 최적 효소 활성조건 검사
- ⑥ Pilot 및 plant scale 적용
  - ㉓ Pilot 시설에 의한 lab scale 조건의 보정
  - ㉔ 대용량 발효시 변수 check
  - ㉕ 최적 발효조건 검토

**나. 2차 년도**

**(1) 개발 목표**

**(가) 주관연구기관(프레쉬벨)**

- ① 새싹보리 발효물 리뉴얼 제품 출시
- ② 국·내외 어린이 음료시장 환경분석
- ③ 소비자 선호도 및 제품 컨셉 설문조사
- ④ 제품가격 설정 및 제품 컨셉, 제품 디자인 수정 및 보완
- ⑤ 제품 판매를 위한 유통망 확보
- ⑥ “새싹 브로콜리 식물성 유산균 음료”, “새싹 땅콩 식물성 유산균 음료” 시제품 생산

**(나) 협동연구기관(대구대학교 산학협력단)**

- ① 새싹보리 유산균 발효물 활용 어린이용 음료의 기능(비만개선, 배변효능) 검증(동물시험)

- ② 새싹보리의 유산균 발효물을 활용한 어린이용 음료 관능평가와 음료 formulation 확립
- ③ 새싹채소(땅콩, 브로콜리 등 활용)관련 발효능 및 지표검사

**(2) 개발 내용 및 범위**

2차년도	주관연구기관	협동연구기관
<b>개발 목표</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 관련제품 2종 출시</li> <li>• 소비자 선호도 및 제품 반응도 조사</li> <li>• 제품가격 설정 및 제품 컨셉, 제품 디자인 수정 및 보완</li> <li>• 제품 판매를 위한 유통망 확보</li> <li>• “새싹 브로콜리, 땅콩 유산균” 시제품 출시</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 소비자 관능평가와 음료의 Formation 확립</li> <li>• 개발 음료의 기능 개선 관련 동물 시험 확인</li> <li>• 동물실험을 통한 새싹보리 유산균 발효물 활용 어린이용 음료의 기능 검증</li> </ul>
<b>개발 내용 및 범위</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 국내외 어린이 음료시장 현황 및 트렌드 분석</li> <li>• 소비자 성향 파악 및 확인</li> <li>• 제품 판매 유통망 확보</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 개발 음료 맛 예비 test</li> <li>• 소비자 관능 평가</li> <li>• 항 비만 시험 및 세포 특성 검사</li> </ul>
<b>계획</b>	제품 성능 평가 및 디자인 개발	

**[그림] 2차 년도 개발**

**(가) 주관연구기관(프레쉬벨)**

- ① 새싹보리 관련 리뉴얼 제품 생산
  - ㉠ 어린이 맛 취향 관련한 관련 제품 출시
- ② 새싹채소(땅콩 및 브로콜리) 관련 시제품 생산
- ③ 국·내외 어린이 음료시장 환경분석
  - ㉠ 국내 어린이 음료시장 환경 분석: 시장현황, 트렌드, 경쟁업체 및 경쟁제품 강점, 약점 분석
  - ㉡ 해외 어린이 음료시장 환경 분석: 시장현황, 트렌드, 타겟 소비자 소비 행태 분석 및 경쟁제품 현황 분석
  - ㉢ 환경 분석 내용을 바탕으로 SWOT분석 및 국내 시장 진출 전략 수립
- ④ 소비자 선호도 및 제품 컨셉 설문조사
  - ㉠ 국내 타겟 소비자 분석: 음료의 사용자인 어린이와 구매자인 부모를 대상으로 한 제품의 이미지와 컨셉에 대한 설문조사 실시
  - ㉡ 설문조사 내용을 바탕으로 제품의 컨셉 수정 및 보완, 홍보·광고 전략 수립
  - ㉢ 해외 타겟 소비자 분석: 베트남 시장의 타겟 소비자 분석(대형마트를 선정하여 어린이와 부모의 어린이 음료 구매 현황 관찰조사, 이는 언어의 문제로 인한 설문조사의 한계점을 보완한 소비자 조사 방법임)
- ⑤ 국내·외 소비자 분석 내용을 바탕으로 제품의 가격을 설정하고 기존의 제품 컨셉 및 디자인의 수정이 필요할 시 수정할 것임. 뿐만 아니라 소비자 분석내용을 바탕으로 제품의 컨셉 및 디자인 보완

⑥ 제품 판매를 위한 유통망 확보

- ㉔ 국내 유통 업체 선정 및 계약 진행: 자사는 현재 파파주스를 롯데마트에 PB상품으로 판매 중에 있으므로 롯데마트를 포함한 국내 대형 마트의 유통망 확보를 진행할 것임
- ㉕ 해외 유통 업체 분석 및 유통업체 담당자와의 협상 진행: 현지 유통구조를 분석하고 특징을 파악하여 유통망 확보 전략 수립
- ㉖ 통관 및 검역 절차 조사, 제출서류 파악: 통관 및 검역 절차에 대한 조사를 바탕으로 유통 방법 결정, 수출시 필요한 제출서류를 파악하여 서류 준비

(나) 협동연구기관(대구대학교 산학협력단)

- ① 새싹채소(땅콩 및 브로콜리) 관련 발효능 및 지표물질검사
- ② 맛의 예비 test(9점 척도법)
- ③ 소비자 관능평가 - 자체 test 후 신뢰성 확보 차원에서 공인기관 의뢰
- ④ 새싹채소(땅콩 및 브로콜리)발효물 활용한 음료formulation
- ⑤ 발효물 및 음료의 항비만 동물 시험 :어린 mouse를 대상으로 한 비만 유도 후 시험

## 다. 3차 년도

### (1) 개발 목표

(가) 주관연구기관(프레쉬벨)

- ① 새싹채소(땅콩 및 브로콜리) 유산균 발효물 활용 어린이용 음료의 광고 및 홍보 진행
- ② 국내 시장 마케팅 활동 및 전략적 해외 수출상품 마케팅
- ③ 검증결과를 활용한 2년차에 출시한 제품 3종 리뉴얼 출시
- ④ 새싹채소(땅콩 및 브로콜리) 음료제품 패키지 디자인 개발
- ⑤ 새싹채소(땅콩 및 브로콜리) 음료제품 생산과 마케팅 및 BM 방안 모색
- ⑥ 새싹채소(땅콩 및 브로콜리) 음료생산 가능 시설 및 설비 확충

(나) 협동연구기관(대구대학교 산학협력단)

- ① 새싹채소(땅콩 및 브로콜리) 유산균 발효물 활용 음료 추가개발 및 제품 확장
- ② 새싹채소(땅콩 및 브로콜리) 발효물 및 음료 효능 및 안정성 검사
- ③ 새싹채소(땅콩 및 브로콜리) 관련 bioconversion 효소 활성 증가 핵심 기술 개발

(2) 개발 내용 및 범위

3차년도	주관연구기관	협동연구기관
개발 목표	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 검증결과 활용한 음료 국내 시장 마케팅 활동 및 전략적 해외 수출상품 마케팅</li> <li>• 2년 차 출시 제품 3종 리뉴얼</li> <li>• 시 제품 생산과 마케팅 및 BM 방안 모색</li> <li>• 생산 가능 시설 및 설비 확충</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 새싹채소(땅콩, 브로콜리) 음료 추가 개발 및 확장</li> <li>• 새싹채소(땅콩, 브로콜리) 발효물 및 음료효능 안전성 검사</li> <li>• 새싹보리 관련 핵심기술 개발</li> </ul>
개발 내용 및 범위	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 국내외 소비자 대상 광고 제작 및 마케팅 활동 진행</li> <li>• 추가 마케팅 및 BM 개발</li> <li>• 천연재료의 성분 증대 가능 기술개발형 공장 및 시설, 설비 확보</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 신규 제품 개발 연구</li> <li>• 천연재료의 성분 증대 가능 핵심기술 개발</li> </ul>
계획	판매 시장 확대와 마케팅 전략 개발	

[그림] 3차 년도 개발

(가) 주관연구기관(프레쉬벨 )

- ① 새싹보리 유산균 발효물 활용 어린이용 음료의 광고 및 홍보 진행
  - ㉠ 국내·외 시장의 소비자를 대상으로 한 시식행사 및 광고 진행
- ② 해외시장에 현지화 된 제품개발 및 마케팅 활동 진행
  - ㉠ 베트남 시장과 중국시장의 분석을 바탕으로 한 현지화 마케팅 활동 진행
- ③ 핵심기술의 개발과 생산이 가능한 시설 및 설비 확보
  - ㉠ 발효를 통한 다양한 천연재료의 특정유효성분을 높일 수 있는 연구개발의 필요성에 의해 핵심기술을 생산하고 연구할 수 있는 기술 개발형 공장 및 시설, 설비 확보
  - ㉡ 공장부지 선정 및 시설, 설비 설계 및 확보
  - ㉢ 새싹채소 유산균 발효물 활용 리뉴얼 음료의 생산 및 출시
- ④ 국내외 마케팅 방안 및 BM방안 모색
  - ㉠ 판매시장 확대를 위한 마케팅 전략 추가 개발 및 BM방안 추가 개발 진행

(나) 협동연구기관(대구대학교 산학협력단)

- ① 새싹채소(땅콩, 브로콜리) 발효물 및 음료의 효능 및 안정성 검사
- ② 새싹채소(땅콩, 브로콜리) 유산균 발효물 활용 음료 추가개발 및 제품 확장
- ③ 기 개발된 새싹채소 유산균 발효음료 개선점 보안 개발
- ④ 새싹보리 관련 핵심기술 개발
  - ㉠ 발효를 통한 다양한 천연재료의 특정유효성분을 높일 수 있는 연구개발의 필요성에 의해 (bioconversion)핵심기술 개발

## 제 2 장. 연구수행 내용 및 결과

### 제 1 절. 연구개발의 추진전략•방법 및 추진체계

#### 1. 연구개발 추진전략 및 방법

##### 가. 연구개발 추진전략

기술 이전하여 기 보유한 특허(새싹보리추출물을 포함하는 비만 억제용 조성물) 및 확보된 식물성 유산균의 분리공정기술, 음료제조기술, 저온효소처리기술과 같이, 원천 기술력을 바탕으로 대구대학교 제품화 및 사업화 추진

[표] 특허 이전내용

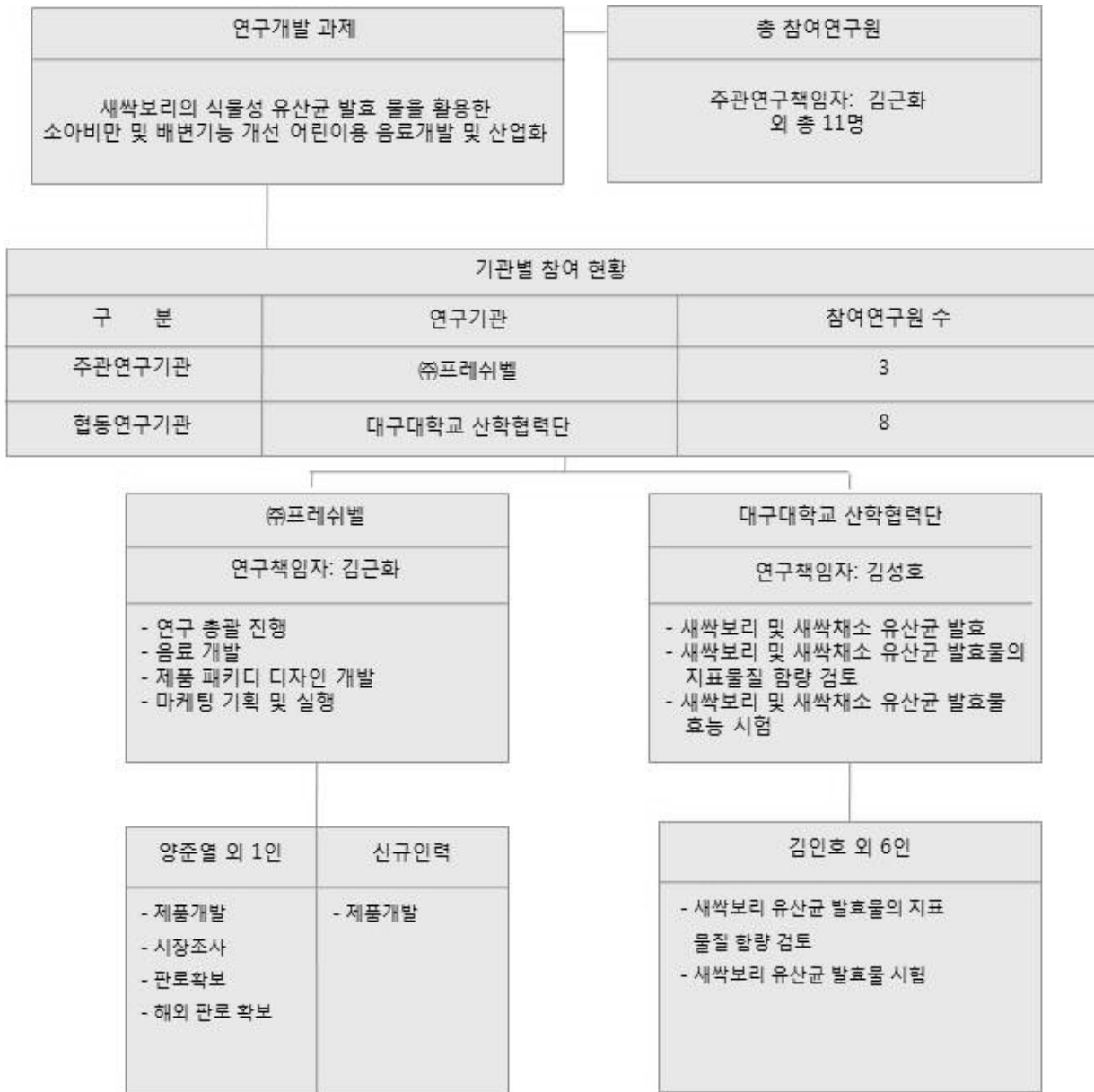
특허번호 및 발명의 명칭	특허권자	실시권자	실시기간	실시지역
제10-1645464호 새싹보리 추출물을 포함하는 비만 억제용 조성물	대한민국 (농촌진흥청)	(주)프레쉬벨	2017.3.15.~ 2020.3.14	대한민국 전역

- (1) 프레쉬벨은 정보 수집 및 제품 홍보, 국내외 판로 확보, 생산공정, 판매전략, 국내외 마케팅 등과 같은 사업화 추진 진행을 전담.
- (2) 대구대학교 산학협력단(김성호 교수)은 기존 보유하고 있는 발효 및 bioconversion 기술력을 바탕으로, 새싹보리 유산균 음료 기술을 공식화하고 추후 기술개발 및 기능성 검증(효능검사 : 비만 및 배변효능)을 진행함. 즉, IP출원과 같이 기술력 확보하여 제품화 진행을 전담
- (3) 이와 같은 기술역량의 강화를 통한, 문제점 개선을 진행 및 총 5종의 제품을 개발 진행 예정
  - (가) 자체적인 음료제조 기술과 대구대학교 김성호 교수 Lab과 협력시스템을 통해 지속적으로 제품 포트폴리오 구축
  - (나) 컨설팅 등을 통한 전문가 확보를 통해 기업의 기존 비즈니스 모델 추가 보안 및 마케팅 자문 진행 계획

##### 나. 사업화 추진

- (1) 시음회, 박람회 등을 통한 바이어와의 네트워크 구축 및 기업홍보 추진
- (2) 기술역량강화와 영업 인프라를 확충하여, 사업화추진 진행
- (3) 국내외 소비자 대상 광고 및 홍보 방안 탐색 및 실행

## 2. 연구개발 추진체계



[그림] 연구 추진체계

### 3. 추진일정

1차 년도																
일련 번호	연구내용	월별 추진 일정												연구 개발비 (단위: 천원)	책임자 (소속 기관)	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12			
1	최적발효 유산균주의 동정과 균주의 기탁					■	■								5,000	김성호 (대구대)
2	Lab scale 발효조건의 최적화					■	■	■	■						20,000	김성호 (대구대)
3	pilot 및 plant scale 적용시험						■	■	■	■	■				40,000	김성호 (대구대)
4	시제품 제작									■	■	■	■		50,000	김근화 (프레쉬벨)
5	제품의 성분 검사 및 성능 시험							■	■	■	■	■	■		15,000	김성호 (대구대)
6	제품 디자인 개발							■	■	■	■	■	■		20,000	김근화 (프레쉬벨)
7	음료 대량 시생산										■	■	■		50,000	김근화 (프레쉬벨)
2차 년도																
1	1년차 소비자 관능평가	■	■	■	■	■	■								20,000	김성호 (대구대)
2	1년차 및 신제품음료 formulation	■	■	■	■	■	■								20,000	김성호 (대구대)
3	발효물 및 음료의 항비만 동물 시험							■	■	■	■	■	■		60,000	김성호 (대구대)
4	국내외 어린이 음료 시장 환경분석	■	■	■	■	■									45,000	김근화 (프레쉬벨)
5	2년차 개발제품 소비자 선호도 및 제품 컨셉 조사 기획 및 실행					■	■	■	■	■	■				40,000	김근화 (프레쉬벨)
6	1,2년차 시제품 생산 및 소비자 조사 결과 분석	■	■	■	■	■	■	■	■						45,000	김근화 (프레쉬벨)
7	유통망 확보 및 해외시장 개척								■	■	■	■	■		70,000	김근화 (프레쉬벨)

3차 년도																
일련 번호	연구내용	월별 추진 일정												연구 개발비 (단위: 천원)	책임자 (소속 기관)	
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12			
1	새싹채소 발효물 및 음료(2종) 효능 및 안정성 검사														80,000	김성호 (대구대)
2	리뉴얼 제품 반응조사 및 마케팅														50,000	김근화 (프레쉬벨)
3	제품 보완 및 리뉴얼 제품 개발														20,000	김성호 (대구대)
4	리뉴얼제품 개발 및 출시														50,000	김성호 (대구대), 김근화 (프레쉬벨)
5	해외시장 현지화 제품 개발														50,000	김근화 (프레쉬벨)
6	시설 및 설비 확보														100,000	김근화 (프레쉬벨)



## 제 2 절. 1차 년도 연구수행 내용 및 결과

### 1. 최적 발효 유산균주의 동정

#### 가. 연구 수행 방법

##### (1) 실험재료

본 연구에서 사용된 새싹보리는 2017년에 9월에 수확된 것을 에코아이엠(경산)에서 구입하여 실험에 사용하였으며, 과채농축액(65 ° Brix)은 (주)엘림씨아이(Elimci Co., Inc, Yongin, Korea)에서 구입한 것으로 4℃ 냉장보관하면서 사용하였다.

##### (2) 유산균 분리

유산균 분리에 사용한 발효식품은 재래시장에서 구입하거나 가정에서 수집하여 사용하였으며, 각 10 g을 90 mL의 생리멸균식염수로 현탁하여  $10^{-4}$ 까지 희석한 후 0.004% Bromophenol blue(BPB)가 첨가된 MRS agar 배지에 100  $\mu$ L 씩 도말하고, 37℃에서 24시간 배양 후 나타난 독립된 colony 중 특징적인 colony를 순수 분리하였다. 순수 분리한 유산균은 MRS agar plate에 접종하여 37℃에서 24시간 배양한 후 4℃ 냉장보관하면서 사용하였다.

##### (3) $\beta$ -Glucosidase 활성 균주 선발

$\beta$ -Glucosidase 활성을 갖는 균주의 선발을 위해 esculin agar(esculin 0.1%, peptones 1.8%, ferric citrate 0.1%, agar 2%)법을 이용하여 esculin이 함유된 esculin agar 배지에 균주를 접종하여 배지 내에서의 색깔 변화를 관찰하였다. Esculin은  $\beta$ -glucosidas에 의하여 glucose 와 esculin으로 분리 되며 esculin은 ferric ammonium citrate와 반응하여 colony 주위에 black complex를 형성하게 된다(Fig. 1-1). 따라서 colony 주위에 black complex를 형성하는 균주를  $\beta$ -glucosidase 활성을 가지는 균주로 판단하였다.

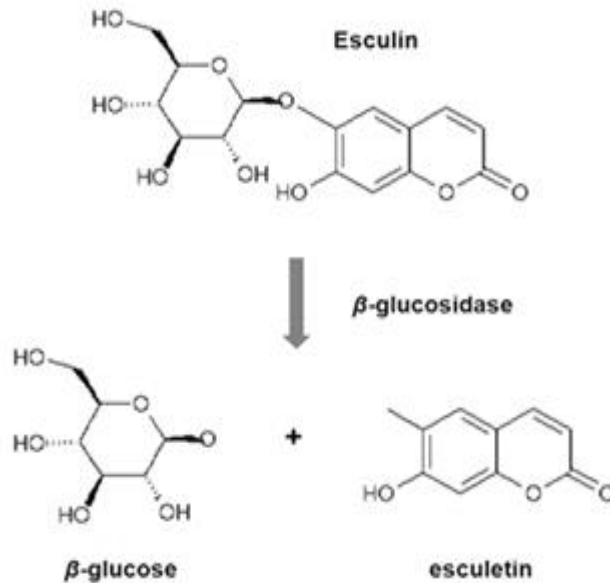


Fig 1-1. Decomposition of esculin into  $\beta$ -glucose and esculetin by  $\beta$ -glucosidase.

#### (4). $\beta$ -Glucosidase 활성능 측정

$\beta$ -Glucosidase 활성 측정은 1% CMC(carboxymethyl cellulose)가 첨가된 MRS 배지에 12시간 전배양한 균주를 접종하여 37°C에서 24시간 배양 후, 배양액을 4°C에서 3000 rpm으로 15분간 원심분리하여 세포를 제거하고, 상층액을 0.5mL 취하여 1 mL의 5 mM  $\rho$ -NPG 용액과 혼합한 후 37°C에서 30분간 반응시켰다. 반응액은 1 mL의 1M  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  용액을 첨가하여 반응을 중지시키고, 생성된  $\rho$ -NP(p-nitrophenol) 405 nm에서 흡광도를 측정 한 후  $\rho$ -NP의 검량곡선을 이용하여 농도를 환산하였다.

#### (5) 선발균주의 염기서열분석과 계통분류

선발균주의 16S rRNA gene은 sequencing을 통하여 분석하였으며, NCBI data base를 이용하여 분리된 균주와 type strain의 similarity(%)를 확인하였다.

#### (6) 내담즙성 시험

내담즙성은 MRS 액체배지에 0.3% bile extract을 첨가하고, 분리된 균주들을 2%씩 접종하여 37°C에서 24시간 배양하였으며, 배양종료 후 BCP 한천배지에서 생균수를 측정하였다.

#### (7) 내산성 시험

1N HCl을 증류수에 희석하여 MRS 산성 broth (pH 2.5)를 준비하고 37°C MRS broth에서 24시간 배양된 균주를  $10^7$  cfu/mL 수준으로 접종하여 37°C에서 3시간 동안 배양하고, BCP 한천배지에서 생균수를 측정하였다.

## 나. 연구 수행 결과

### (1) 새싹보리 발효를 위한 유산균 선발

여러 발효식품 시료를 생리멸균식염수를 이용하여  $10^{-1} \sim 10^{-4}$ 으로 희석하여 MRS agar plate에 도말하여 37°C에서 배양한 후, 균주의 크기, 색, 모양, 투명도 등을 관찰하여, 4종의 유산균을 분리하였다. 일부 발효식품에서는 숙성에 따라 유산균이 거의 검출되지 않는 시료도 있었으며, 발효식품의 종류와 숙성도에 따른 colony의 분포는 달랐으며 희석배수가  $10^{-3} \sim 10^{-5}$ 일때 균주의 분리가 가장 용이하였다. 발효식품으로부터 분리한 균주는 DU. La. EIJ-30 ~ DU. La. EIJ-33으로 명명하였으며 분리한 균주는 계대배양을 실시하여 단독 colony를 순수분리 하였다. 최종 분리된 유산균은 MRS 배지상 BCP를 환원하여 전형적인 노란색으로 변화시켰고 전형적인 유산균종의 형태를 보였다(Fig. 1-2).

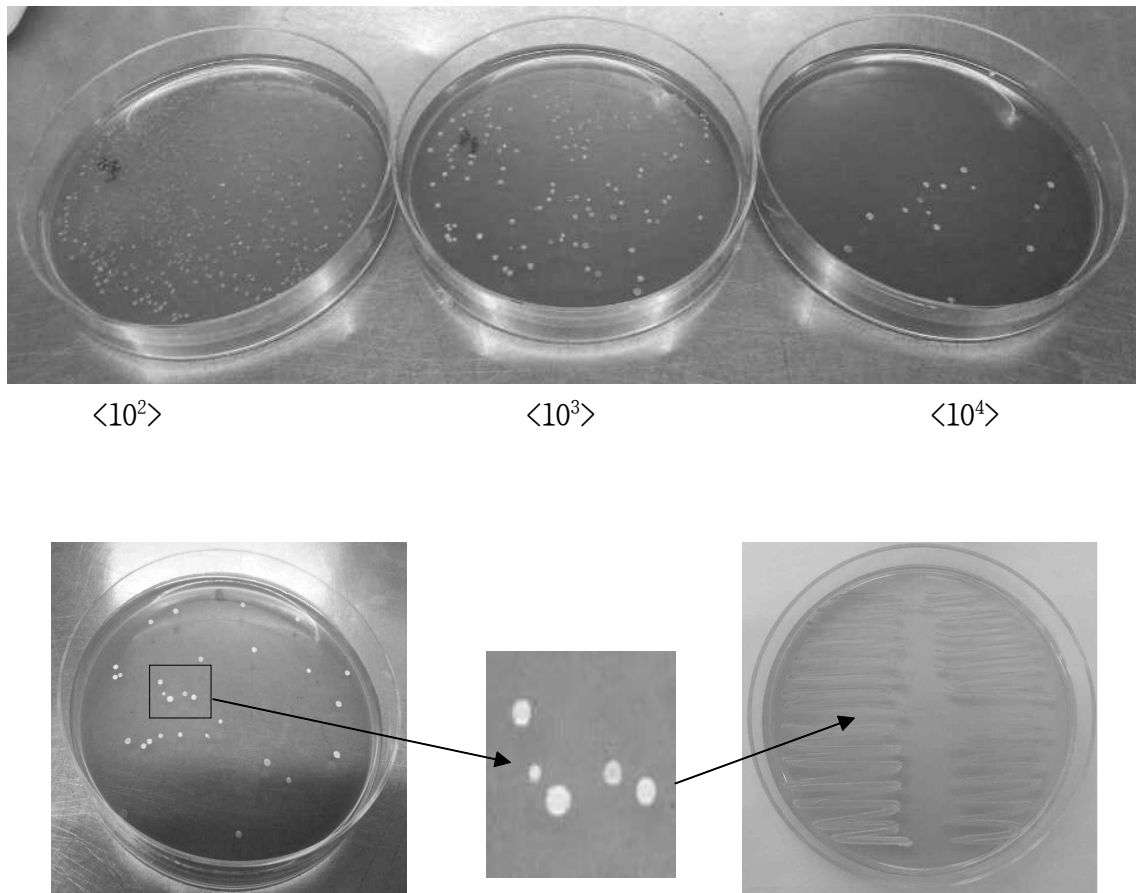


Fig. 1-2. Screening of lactic acid bacteria on MRS medium from fermentation food

### (2) $\beta$ -Glucosidase 활성 균주 Screening

$\beta$ -Glucosidase는 esculin의 beta-glucose를 절단하고 이때 생성된 esculetin이 배지 내에 있던 ferric ammonium citrate와 반응하여 plate 상의 colony 주위에 black complex를 형성

하게 된다. 발효식품에서 분리한 유산균주들을 esculin agar를 이용하여 배양을 실시한 후 colony 주변에 black complex를 형성한 균주를  $\beta$ -glucosidase 활성 균주로 간주하였다. 분리한 균주 4주 중, 3주에서 colony 주변에 black circle을 형성하여  $\beta$ -glucosidase 활성이 있는 것으로 나타났다(Fig. 1-3).

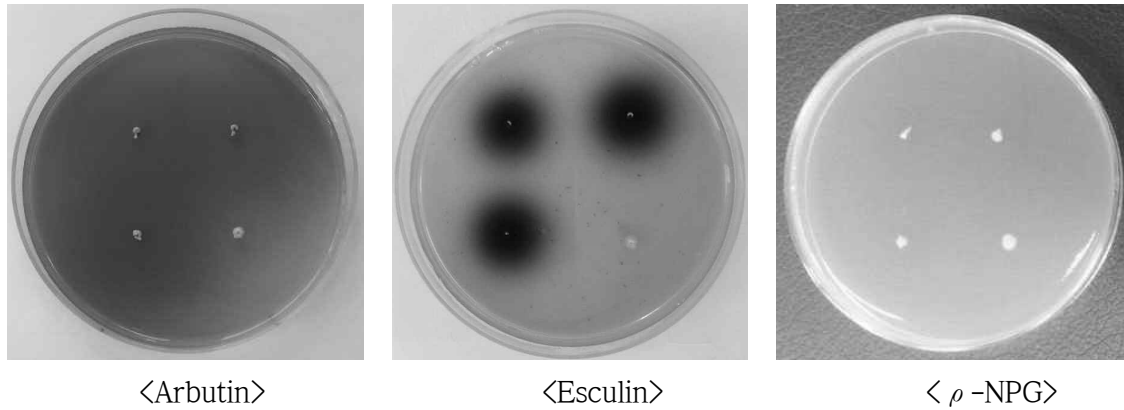


Fig. 1-3. Esculin agar to screening lactic acid bacteria producing  $\beta$ -glucosidase activity.

### (3) $\beta$ -Glucosidase 활성 균주의 in vitro에 의한 $\beta$ -glucosidase 활성능 측정

Esculin agar를 이용하여 colony 주변에 black complex를 형성 여부에 따라  $\beta$ -glucosidase 활성을 확인한 균주를 in vitro 법에 따라 정확한 효소활성을 다시 측정하였다. 그 결과 DU. La. EIJ-30  $10.21 \pm 0.80$  U/mL, DU. La. EIJ-31  $11.35 \pm 1.33$  U/mL, DU. La. EIJ-32  $9.97 \pm 1.19$  U/mL, DU. La. EIJ-33  $0.94 \pm 0.23$  U/mL으로 균주별로 차이를 보였으며, 그 중 LAB DU. LAB. IH02이 가장 높은 활성을 나타냈으며, DU. La. EIJ-33은  $\beta$ -glucosidase 활성이 거의 없는 것으로 나타났다(Table 1-1). 따라서 새싹보리 발효를 위해서는  $\beta$ -glucosidase 활성이 가장 좋은 DU. La. EIJ-31로 선정하였다.

Table 1-1.  $\beta$ -Glucosidase activity of screening lactic acid bacteria

Sample	Activity(U/mL)
DU. La. EIJ-30	$10.21 \pm 0.80$
DU. La. EIJ-31	$11.35 \pm 1.33$
DU. La. EIJ-32	$9.97 \pm 1.19$
DU. La. EIJ-33	$0.94 \pm 0.23$

#### (4) $\beta$ -glucosidase 활성균주의 염기서열분석과 계통분류

최종 분리된 균주 중  $\beta$ -glucosidase 활성능이 가장 높은 1균주를 16S rRNA gene의 전 염기서열을 분석하여 NCBI blast DB와 비교한 결과(Table 1-2) *Lactobacillus* 속에 속하는 *Lactobacillus fermentum*와 99%로 상등성을 보였다. DU. La. EIJ-31균주를 *Lactobacillus fermentum* DU. La. EIJ-31으로 명명하였다. NCBI Blast search를 통해 *Lactobacillus* genus 내에 DU. La. EIJ-31균주와 유연관계가 가까운 species들을 찾고 nucleotide sequence search를 통하여 type strain들의 염기서열을 조사하였다. Bioedit program과 Clustal X program을 이용하여 염기서열을 alignment 한 후 similarity를 조사해 본 결과 Fig. 1-4와 같으며 *Lactobacillus fermentum* strain NBRC 15885와 *Lactobacillus fermentum* strain CIP 102980가 99% 상등성을 보였다.

Table 1-2. Result of 16s rRNA partial sequencing

Standard strain	Identities	Similarity
<i>Lactobacillus fermentum</i> strain NBRC 15885	1/1438	99%
<i>Lactobacillus fermentum</i> strain CIP 102980	1/1438	99%
<i>Lactobacillus gorillae</i> strain KZ01	27/1438	98%
<i>Lactobacillus gastricus</i> strain Kx156A7	61/1440	96%
<i>Lactobacillus equigenerosi</i> strain NRIC 0697	62/1442	96%

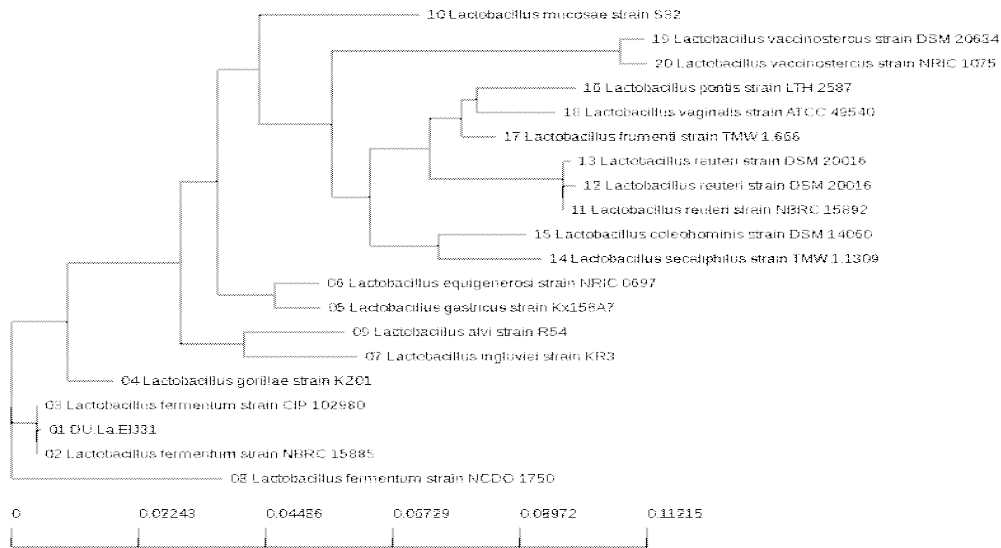


Fig 1-4. Phylogenetic tree based on 16S rRNA gene sequence showing the phylogenetic relationships among strain DU. La. EIJ-31 isolated and related species.

### (5) 내담즙성 및 내산성

발효식품으로부터 분리한 *Lactobacillus fermentum* DU. La. EIJ-31의 내담즙성과 내산성 측정은 bile extract 0.3%와 pH 2.5의 조건에서 성장상태를 bile extract 무첨가구(control)와 pH 5.7(control)에서의 성장과 비교하였으며, 37°C에서 24시간 동안 실험하여 실험한 결과는 Fig. 1-5와 같다.

Bile extract 첨가구에서는 무첨가구와 비교할 때 생장율이 다소 억제되기는 하였으나, 내성이 강한 성장상태를 보였다. 분리균의 내산성은 위산과 유사한 pH에서 유산균주의 생존여부를 관찰한 결과 pH 2.5에서 어느 정도 생존력을 보였다.

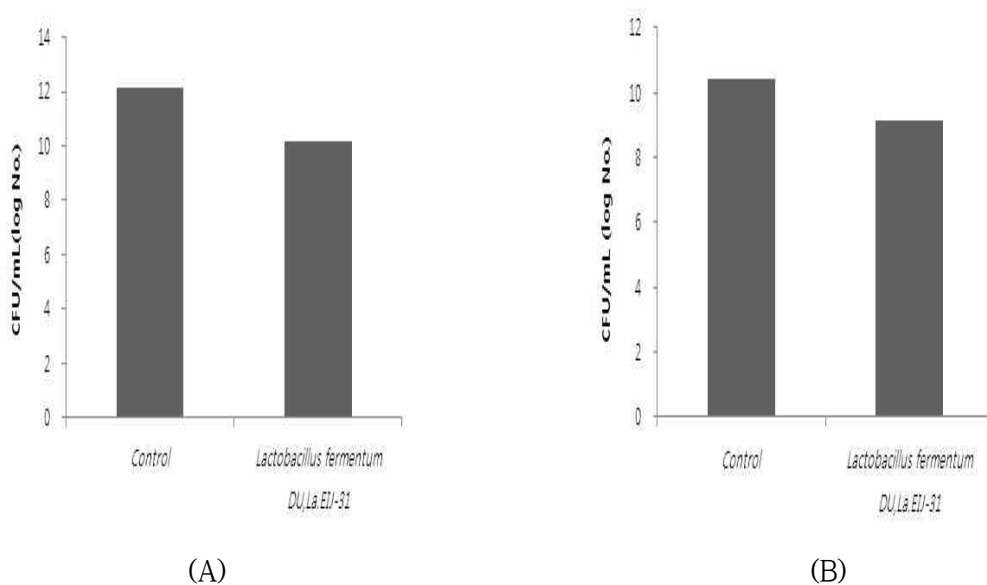


Fig. 1-5. Bile(A) and acid(B)-resistance of *Lactobacillus fermentum* DU. La. EIJ-31

## 2. 새싹보리 효소처리 조건 설정

### 가. 연구 수행 방법

#### (1) 가수분해 효소

실험에 사용한 분해효소로는 상업적으로 판매되어 사용하고 있는 당 분해효소 Celluclast 1.5L(Novo Nordisk Co., Denmark), Viscozyme L(Novo Nordisk Co., Denmark), Pectinex Ultra SL-L(Novo Nordisk Co., Denmark), Pectinex XXL(Novo Nordisk Co., Denmark)를 사용하였으며, 단백질 분해 효소로는 Alcalase 2.4 L(Novo Nordisk Co., Denmark), Flavourzyme 500 MG(Novo Nordisk Co., Denmark), Neutrase 0.8 L(Novo Nordisk Co., Denmark), Protamex(Novo Nordisk Co., Denmark)를 사용하였다.

#### (2) 효소 처리

효소처리는 시료 10 g에 90 mL의 증류수를 가하여 충분히 혼합한 후 각각의 효소를 2% 첨가하여 50°C 에서 24시간동안 처리하였다. 처리가 끝난 즉시 효소처리균은 85°C 에서 15분간 열처리 하여 효소를 불활성화하고 원심분리를 이용하여 원심분리 한 후 상등액을 취하여 환원당 함량과 saponarin 함량을 측정하였다.

#### (3) 환원당 함량 측정

환원당 함량은 dinitrosalicylic acid (DNS)법에 따라 측정하였다. 시료용액 0.5 mL에 DNS 액 0.5 mL를 혼합한 뒤 100°C 에서 5분간 반응시킨 후 냉각하고 증류수 4 mL를 첨가하여 분광광도계를 이용하여 550 nm에서 흡광도를 측정하였다.

#### (4) Saponarin 함량 분석

Saponarin 함량은 시료용액을 시료 용액을 0.45 µm membrane filter로 여과한 후, Alliance e2695 HPLC System (Waters Co., Milford, MA, USA)로 분석하였다. 분석조건은 Table 1-3에 나타내었다. 표준품은 saponarin (Sigma Chemical Co.)를 이용하여 표준 검량 선을 작성한 후 각각의 함량을 계산하였다.

Table 1-3. Operating conditions of HPLC for the analysis of sialic acid

Instrument	Conditions
Column	Xbridge C18 (150 × 4.6 mm I.d., particle size 5 µm)
Mobile phase	5% acetic acid : Methanol : 80 : 20 (v/v)
Flow rate	1.0 mL/min
Injection volume	10 µl
Oven temperature	35°C
Detector	PDA 270 nm

### (5) 효소분해 조건 최적화를 위한 실험계획

새싹보리의 효소처리조건을 최적화하기 위하여 반응표면분석법(response surface methodology, RSM)을 이용하였다. 효소처리조건은 중심합성계획법(Central Composite Design, CCD)을 이용하여 독립변수로서 효소농도(5~15%), 반응온도(40~60°C) 및 반응시간(2~10 hr)의 범위를 설정하였다. 종속변수는 효소분해 후 생성된 환원당 함량 ( $Y_{RSC}$ , mg/100 g)과 saponarin 함량( $Y_{SC}$ , mg/100 g)로 지정하여 실험을 설계하였으며 Table 1-4와 1-5에 나타냈다. 또한 효소분해 조건이 새싹보리 효소분해물의 환원당과 saponarin 함량에 미치는 영향을 예측된 모델식을 바탕으로 Mathematica program을 이용하여 4차원 반응표면 분석으로 해석하였다.

Table 1-4. Experimental design of enzyme hydrolysis condition for barley sprouts

Parameter	-2	-1	0	1	2
$X_1$ E/S (%)	5	7.5	10	12.5	15
$X_2$ Temp.(°C)	40	45	50	55	60
$X_3$ Time (hour)	2	4	6	8	10

Table 1-5. Central composite design for the optimization of hydrolysis condition for barley sprouts

Experiment number <sup>1)</sup>	Hydrolysis condition		
	E/S (%)	Temp.(°C)	Time (hour)
1	12.5	55	8
2	12.5	55	4
3	12.5	45	8
4	12.5	45	4
5	7.5	55	8
6	7.5	55	4
7	7.5	45	8
8	7.5	45	4
9	10	50	6
10	10	50	6
11	10	50	6
12	10	50	6
13	10	50	6
14	10	50	6
15	15	50	6
16	5	50	6
17	10	60	6
18	10	40	6
19	10	50	10
20	10	50	2

<sup>1)</sup>The number of experimental condition by central composite design.



## (6) 최적 효소처리 조건 예측

효소처리 조건별 새싹보리 효소분해물의 최적 조건 예측은 환원당 함량과 saponarin 함량에 대한 반응표면을 superimposing 했을 때 중복되는 부분의 범위에서 최적 효소처리 조건을 설정하였고, 예측된 범위에서 임의의 중심점을 최적 조건으로 예측한 뒤 각 회귀식에 대입하여 예측 값을 설정하였다. 또한 예측된 값들에 대하여 동일조건에서 실제 실험을 통하여 얻은 실험치를 비교하였다.

## (7) 통계 처리

최적 효소처리 조건 설정을 위한 중심합성계획법은 statistical analysis system(SAS, version 9.4 SAS institute) 프로그램을 이용하여 회귀분석하였다.

## 나. 연구 수행 결과

### (1) 새싹보리 효소처리를 위한 예비실험 결과

#### (가) 효소 종류의 영향

새싹보리의 효소적 가수분해를 위한 효소 선택을 위해 5종의 cellulase와 4종의 protease에 대한 영향을 조사한 결과는 Table 1-6과 Fig. 1-6과 같다. 효소를 처리하여 얻은 새싹보리 가수분해물의 경우는 환원당 함량이 Viscozyme L의 처리구에서 6.82 %으로 가장 높은 함량을 나타내었으며, Pectinex Ultra SP-L 처리구가 가장 낮은 함량 1.77%를 나타내어 효소 간에 유의적인 차이를 보였다. Saponarin 함량은 Pectinex Ultra SP-L의 처리구에서 다른 효소처리구에 비해 유의적인 차이를 보이며 높은 함량(35.08 mg/100mL)을 나타내었다. 이상의 결과로 발효에 도움이 될 수 있는 환원당 함량을 높이기 위해 Viscozyme L과 새싹보리의 유효성분 중 하나인 saponarin 함량을 증가시키기 위해 Pectinex Ultra SP-L을 최적조건 효소제로 선별하여 다음 단계의 실험에 사용하였다.

Table 1-6. Effect of enzyme kind on the hydrolysis of barley sprouts

Enzyme	Reducing sugar content (%)	Saponarin content (mg/100 mL)
Control	0.72	24.18
Alcalase 2.4 L	6.38	28.5
Flavourzyme 500 MG	4.42	31.68
Nertrase 0.8 L	2.78	27.73
Protamex	2.19	31.76
AMG 300L	6.26	28.41
Celluclast 1.5L	3.55	29.25
Ultrafol Max	1.94	30.47
Pectinex Ultra SP-L	1.77	35.08
Viscozyme L	6.82	29.36

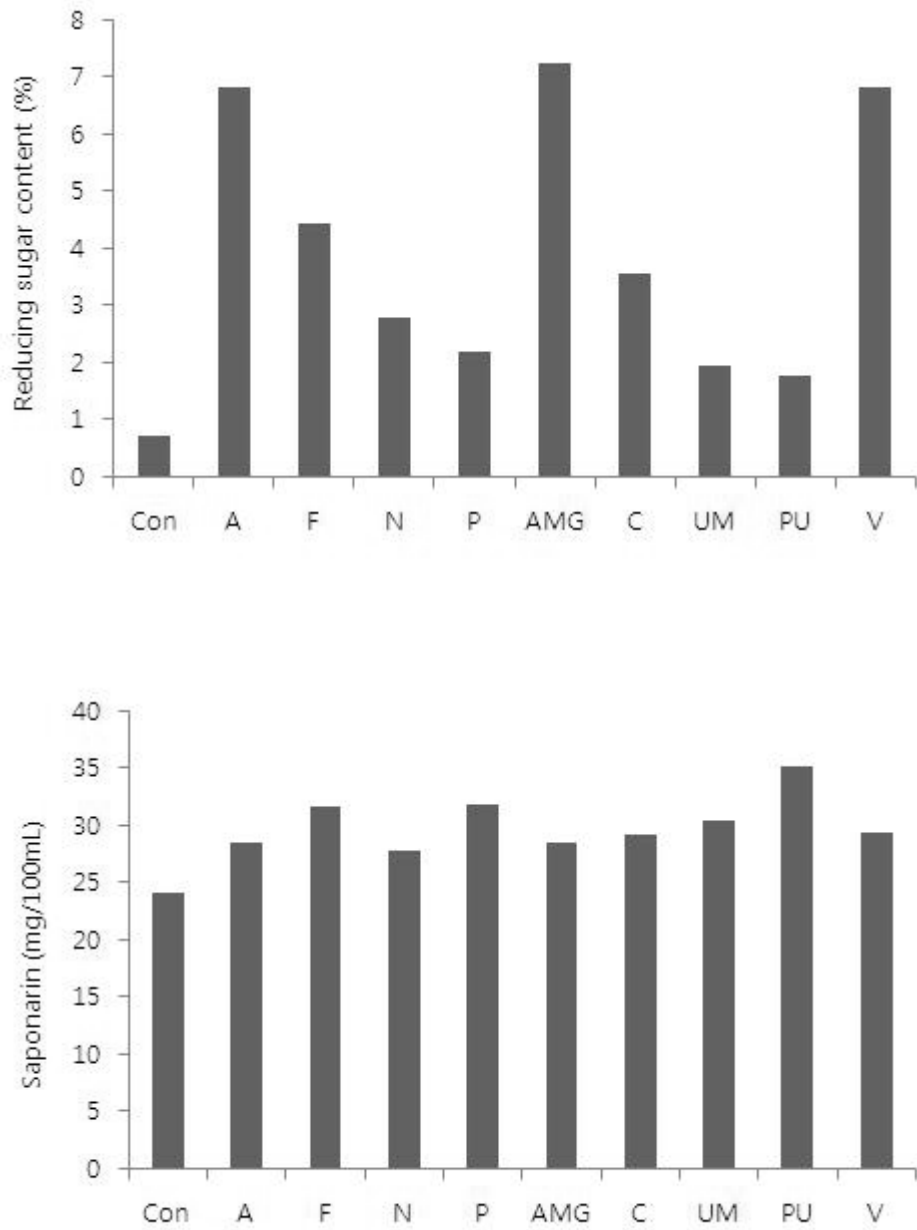


Fig. 1-6. Effect of enzyme kind on the hydrolysis of barley sprouts

### (나) 기질 농도의 영향

기질 농도가 새싹보리 가수분해에 미치는 영향을 알아보기 위하여 기질의 농도를 2.5%에서 20%로 조절하여 효소가수분해 반응을 진행하여 비교하였다(Table 1-7 or Fig. 1-7). 10%까지는 기질의 농도가 증가할수록 환원당 함량과 saponarin 함량이 증가하였으나, 10% 이상에서는 큰 변화를 나타내지 않았다. 10%의 기질 농도에서는 환원당 함량이 7.72%, saponarin 함량이 37.26 mg/100 mL로 최대의 값을 나타내었다. 기질농도 10% 이상에서는 환원당과 saponarin 함량이 증가하지 않는 이유로는 기질의 농도가 증가함에 따라 기질과 효소의 혼합이 상대적으로 원활하지 않아서 발생하는 것으로 생각된다.

Table 1-7. Effect of substrate concentration on the hydrolysis of barley sprouts

Substrate conc. (%)	Reducing sugar content (%)	Saponarin content (mg/100 mL)
2.5	7.94	26.82
5.0	8.04	29.04
7.5	7.79	32.64
10.0	7.72	37.26
12.5	7.48	32.57
15.0	7.24	31.97
17.5	7.28	30.69
20.0	6.91	31.66

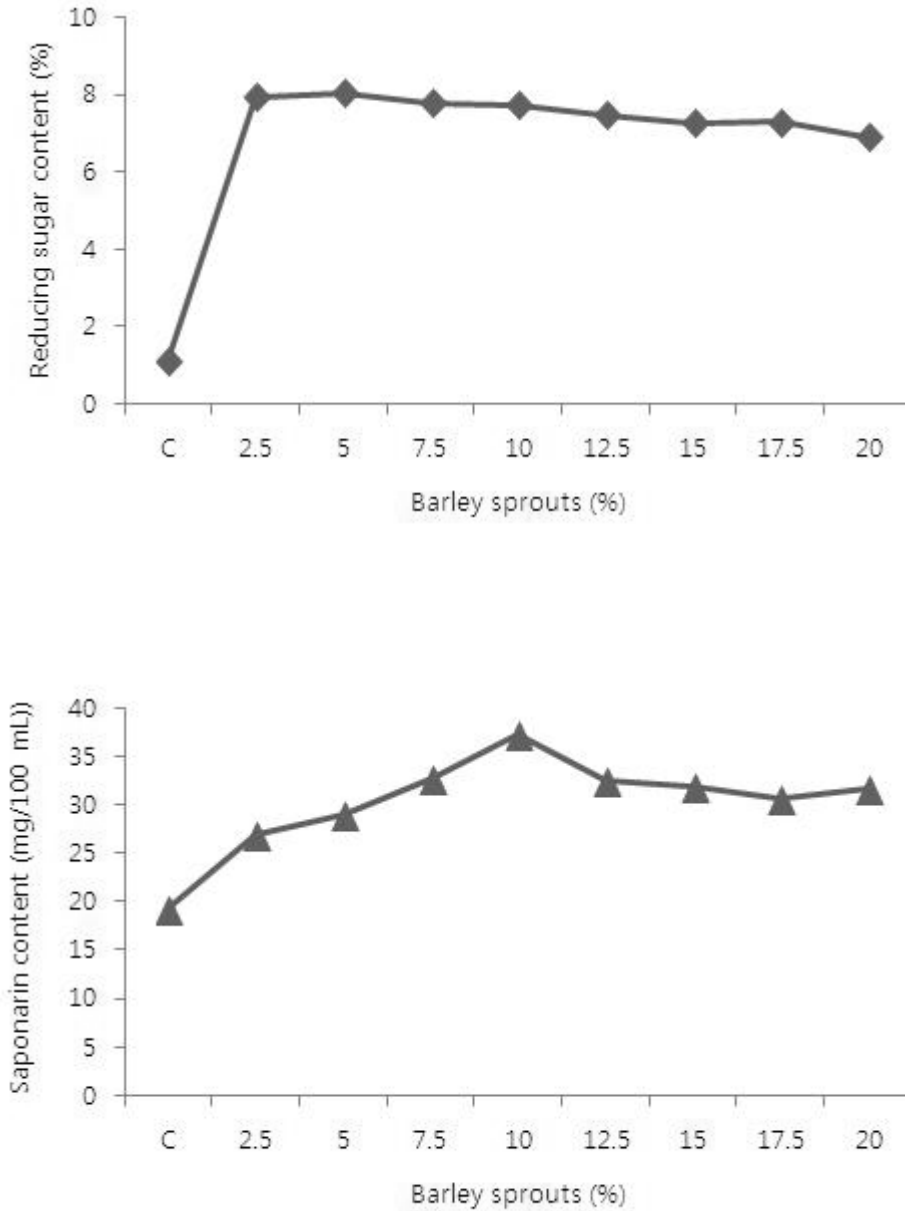


Fig. 1-7. Effect of substrate concentration on the hydrolysis of barley sprouts

## (2) 반응표면분석법을 이용한 새싹보리 효소분해 최적화

새싹보리로부터 최적 효소처리 조건을 설정하기 위해 효소농도, 반응온도 및 반응시간을 독립변수로 하여 중심합성계획에 의해 설계된 20구의 효소처리조건에서 얻어진 환원당 함량과 saponarin 함량은 Table 1-8과 같다.

각각의 결과를 이용하여 반응표면분석을 실시하고, 각 종속변수 즉, 환원당 함량과 saponarin 함량에 대한 회귀식을 얻었다(Table 1-9). 또한 변수별 최적 효소처리조건과 각 효소분해물의 특성값을 예측하여 Table 1-10에 나타내었으며, 이들의 4차원 반응표면을 효소농도, 반응온도 및 반응시간을 독립변수로 하여 Fig. 1-8과 1-9에 나타내었다.

Table 1-8. Experimental data on reducing sugar and saponarin content of barley sprouts under different hydrolysis condition based on central composite design by response surface analysis

Exp. No <sup>1)</sup>	Hydrolysis conditions			Reducing sugar content (%)	Saponarin content (mg/100 g)
	E/S (%)	Temp.(°C)	Time (hour)		
1	12.5	55	8	6.84	45.03
2	12.5	55	4	5.77	31.66
3	12.5	45	8	7.79	49.26
4	12.5	45	4	5.24	32.57
5	7.5	55	8	5.91	36.97
6	7.5	55	4	5.28	30.69
7	7.5	45	8	7.24	35.13
8	7.5	45	4	6.09	31.76
9	10	50	6	8.15	51.79
10	10	50	6	8.37	52.79
11	10	50	6	8.49	49.93
12	10	50	6	7.99	50.26
13	10	50	6	8.46	48.34
14	10	50	6	7.98	51.46
15	15	50	6	6.61	38.33
16	5	50	6	4.16	31.90
17	10	60	6	6.22	34.16
18	10	40	6	7.62	36.00
19	10	50	10	6.86	38.81
20	10	50	2	3.96	28.56

<sup>1)</sup>The number of experimental condition by central composite design.

Table 1-9. Polynomial equations calculated by RSM program for hydrolysis conditions of barley sprouts

Response	Second order polynomials	R <sup>2</sup>	Significance
Reducing sugar content	$Y = -40.992500 + 1.176000X_1 + 1.331000X_2 + 3.337500X_3 - 0.109200X_1^2 + 0.01720 X_1X_2 - 0.014200X_2^2 + 0.046000X_1X_3 - 0.025000X_2X_3 - 0.183125X_3^2$	0.9644	<.0001
Saponarin content	$Y = -481.626080 + 13.921159X_1 + 16.939761X_2 + 10.395540X_3 - 0.655345X_1^2 - 0.059100 X_1X_2 - 0.164186X_2^2 + 0.510250X_1X_3 - 0.005125X_2X_3 - 1.113352X_3^2$	0.9521	<.0001

중심합성계획법에 따라 Table 1-4와 같은 각 독립변수의 범위를 설정한 후, Design Expert를 이용하여 Table 1-5과 같이 20가지의 효소처리 조건을 설정하고 새싹보리를 효소분해하였다. 효소처리 조건에 따른 새싹보리 효소분해물의 환원당 함량은 3.96~8.49%의 범위로 나타났으며(Table 1-8), 이를 바탕으로 한 회귀식은 Table 1-9와 같다. 환원당 함량에 대한 R<sup>2</sup>값은 0.9644으로 높은 신뢰도를 보였으며, P-value는 1% 이내 유의수준을 보였다. 효소처리 조건에 대한 영향에서 환원당 함량의 경우 효소처리 온도 > 효소농도 > 효소처리시간 순으로 세 가지 조건 모두에서 영향을 크게 받는 것으로 나타났다(Table 1-10). 한편 lack of fit(적합결여검정) 값은 model의 적합도를 검정하는 통계량으로 P값이 0.05보다 작을 때 model의 적합성에 문제가 있으며, 이보다 클 때 model이 적합하다고 판단하는 통계값이다. 환원당 함량 값의 model에 대한 lack of fit의 P-value는 0.0898로 나타나 model이 적합한 것으로 나타났다(Table 1-11). 효소처리에 따라 반응표면모델로 예측된 회귀분석 결과 정상점은 최대점으로 나타났으며, 최적점을 산출한 결과 환원당 함량의 최댓값은 8.54%이고 이때의 효소처리조건은 효소농도 10.62 %, 반응온도 46.49℃ 및 반응시간 7.33 hr로 나타났다(Table 1-12). 실험조건에 따라 얻은 효소분해물의 환원당 함량에 대한 4차원 반응표면은 Fig. 1-8과 같이 최대점의 형태를 나타내었으며, 효소 농도가 높고, 반응시간이 길수록 증가하는 것으로 나타났다.

Table 1-10. Regression analysis for hydrolysis conditions of barley sprouts

Response	F-Ratio		
	E/S (%)	Temp.(°C)	Time (hour)
Reducing sugar content	28.44***	11.73***	44.75***
Saponarin content	21.31***	16.35***	29.42***

\*Significant at 10% level; \*\*significant at 5% level; \*\*\*significant at 1% level.

Table 1-11. Analysis of variance for response of dependent variables

Responses	Sources	Degree of freedom	Sum of squares	Means squares	F-value	p-value
Reducing sugar content	Model	9	33.637480	-	30.06	<.0001
	Linear	3	11.274000	-	30.23	<.0001
	Quadratic	3	21.070480	-	56.50	<.0001
	Cross-product	3	1.293000	-	3.47	0.0588
	Residual	10	1.243200	0.124320	-	-
	Lack of fit	5	0.9777200	0.195440	3.67	0.0898
	Pure error	5	0.266000	0.053200	-	-
	Total	19	-	-	-	-
Saponarin content	Model	9	1313.914532	-	22.10	<.0001
	Linear	3	315.405969	-	15.92	0.0004
	Quadratic	3	942.050526	-	47.54	<.0001
	Cross-product	3	56.458038	-	2.85	0.0913
	Residual	10	66.050068	6.605007	-	-
	Lack of fit	5	53.582984	10.716597	4.30	0.0677
	Pure error	5	12.467083	2.493417	-	-
	Total	19	-	-	-	-



효소처리 조건에 따른 새싹보리 효소분해물의 saponarin 함량은 28.56~52.79 mg/100 mL의 범위로 나타났으며(Table 1-8), 이를 바탕으로 한 회귀식은 Table 1-9와 같으며, 이 모델에 대한 회귀식의 R<sup>2</sup> 값은 0.9521로 1% 이내의 유의성이 인정되었다. ANOVA 결과는 Table 1-10과 같다. Saponarin 함량은 효소농도, 반응시간, 반응온도의 효소처리조건 모두에서 영향을 받고 있는 것으로 나타났으며, 효소농도와 반응온도가 높고, 효소처리 시간이 길어질수록 saponarin함량이 증가하는 것으로 나타났다(Table 1-10). Saponarin함량 함량을 위한 효소처리조건 model에 대한 lack of fit의 P-value는 0.0677로 나타나 model이 적합한 것으로 나타났다(Table 1-11). Table 1-12와 같이 saponarin 함량의 예측된 정상점은 최대점으로 최댓값이 51.98 mg/100 mL이었고, 이때 효소농도 11.27%, 반응온도 49.40℃ 및 반응시간 7.20 hr이었다. 효소분해물의 saponarin 함량은 효소처리 조건에 따른 4차원 반응표면에서 볼때 효소농도 8~12%, 반응온도 48~52℃ 및 반응시간 6~8 hr에서 가장 함량이 높은 것으로 나타났다 (Fig. 1-10).

Table 1-12. Predicted levels of optimum hydrolysis conditions for the maximum responses of barley sprouts by the ridge analysis

Response	Predicted response					Morphology
	Response	E/S (%)	Temp. (°C)	Time (hour)	Result	
Reducing sugar content	Min	10.83	49.03	2.07	3.81	Maximum
	Max	10.62	46.49	7.33	8.54	
Saponarin content	Min	11.76	51.25	2.29	23.85	Maximum
	Max	11.27	49.40	7.20	51.98	

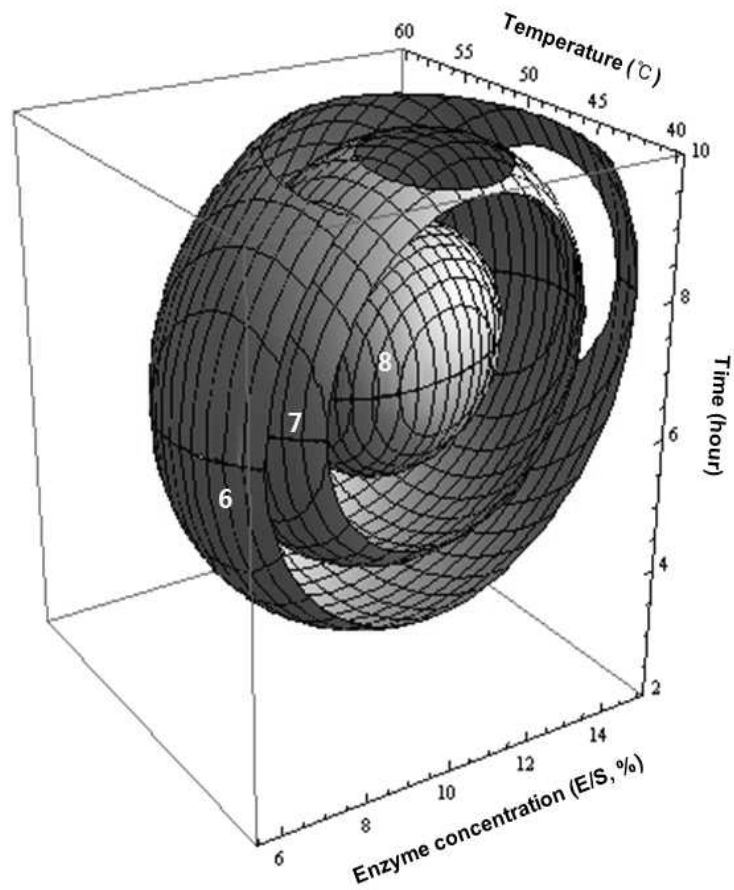


Fig. 1-8. Response surface for reducing sugar content in barley sprouts hydrolysis at constant values (reducing sugar content : 6-7-8%) according to enzyme concentration, temperature and time

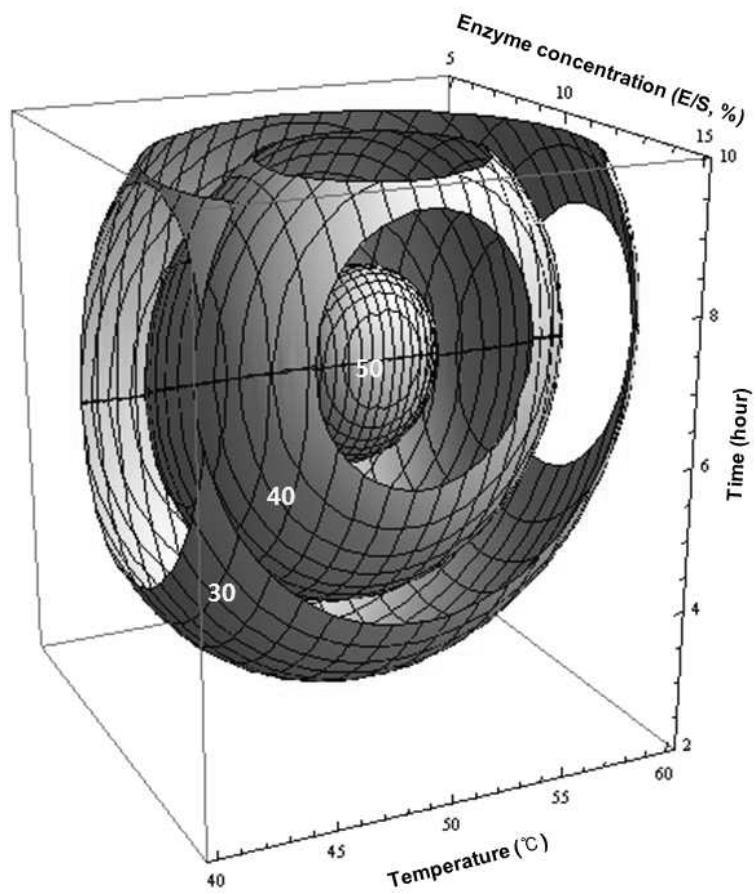


Fig. 1-9. Response surface for saponarin content in barley sprouts hydrolysis at constant values (saponarin content : 30-40-50 mg/100g) according to enzyme concentration, temperature and time

### (3) 최적 효소처리조건의 예측

새싹보리의 최적 효소처리조건을 설정하기 위하여 환원당과 saponarin 함량을 모두 만족시켜주는 최적 효소처리 조건을 얻고자 각 반응표면을 superimposing하여 Fig. 1-10의 겹쳐진 부분으로써 Table 1-13에 최적 조건을 나타내었다. 새싹보리 효소처리 최적 조건 범위는 효소농도 8~12%, 반응온도 45~55℃ 및 반응시간 5~7 hr으로 나타났다.

따라서 이와 같은 예측 결과에 대한 모델식의 신뢰성을 확인하기 위하여 예측된 최적 조건 범위 내에서 임의의 조건 즉, 효소농도 10%, 반응온도 50℃ 및 반응시간 6 hr을 대입하여 실제 효소처리를 실시하고, 효소분해물의 환원당 함량과 saponarin 함량을 측정된 결과 예측된 값들과 유사한 수준으로 비교되었다(Table 1-14).

Table 1-13. The range of optimum hydrolysis condition for maximum response variables by superimposing response surface of reducing sugar and saponarin content in barley sprouts

Hydrolysis condition	Range of predicted condition (optional point)
Enzyme concentration (%)	8 ~ 12 (10)
Temperature (°C)	45 ~ 55 (50)
Time (hr)	5 ~ 7 (6)

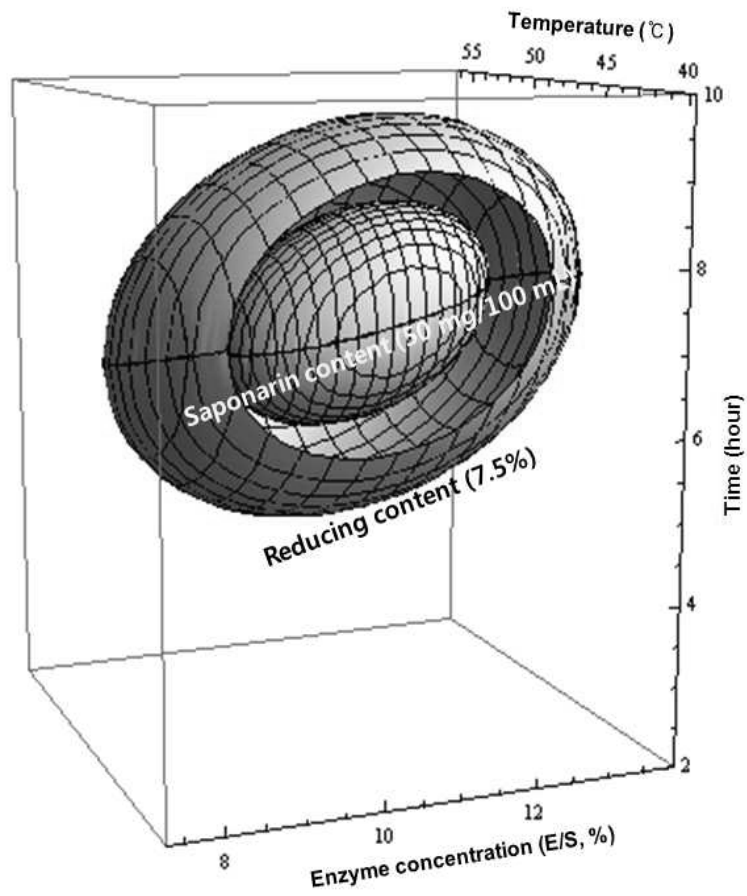


Fig. 1-10. Superimposed response surface for optimization of reducing sugar and saponarin content as function of enzyme concentration, temperature and time of barley sprouts

Table 1-14. Comparison between predicted and observed condition for physicochemical qualities of their hydrolyzate

Physicochemical qualities	Predicted condition(A) <sup>1)</sup>	Observed condition(B) <sup>2)</sup>	B/A × 100(%)
Reducing sugar content (%)	687.66	720.67 ± 6.30	104.80
Saponarin content (mg/100 g)	176.78	184.01 ± 3.55	104.08

<sup>1)</sup> Calculated using the predicted equations for response variables.

Given optimal condition of independent variables : enzyme concentration 10%, temperature 50°C, time 6 hr

<sup>2)</sup> Mean values of triplicates determinations.

### 3. 새싹보리 유산발효 조건 설정

#### 가. 연구 수행 방법

##### (1) 새싹보리 유산발효조건 최적화

새싹보리의 유산발효조건을 최적화하기 위하여 중심합성계획법(central composite design)에 따라 Table 1-15 같은 발효시간( $X_1$ )과 부원료 첨가 농도( $X_2$ )를 독립변수로 설정하고, 반응표면분석(response surface methodology, RSM)에 의하여 설정한 13가지 발효조건으로 새싹보리를 발효하였다(Table 1-16). 각 종속변수에 대한 회귀 방정식을 얻어 발효조건에서 독립변수의 상호영향 및 최적 발효조건을 구하였다. 발효조건의 회귀식에 의한 예측은 SAS(Statistical Analysis System) program을 사용하였다. 중심합성계획에서 독립변수( $X_n$ )은 발효시간(12~60시간,  $X_1$ ) 및 부원료 첨가 농도(0~20%,  $X_2$ )이며 실험계획은 -2, -1, 0, 1, 2 다섯 단계로 부화하여 실험값을 나타내었다. 최적 발효조건과 관련된 종속변수( $Y_n$ )으로는 생육도, pH, 산도, 유효성분 함량 및 유기산 함량으로 각각 나타내었다.

Table 1-15. Experimental design of fermentation conditions for barley sprouts hydrolysate

Parameter	-2	-1	0	1	2
$X_1$ Time (hour)	12	24	36	48	60
$X_2$ Sub material concentration (%)	0	5	10	15	20

Table 1-16. Central composite design for the optimization of lactic acid bacteria fermentation condition for barley sprouts hydrolysate

Exp. No <sup>1)</sup>	Fermentation conditions	
	Time (hour)	Sub material concentration (%)
1	48	15
2	48	5
3	24	15
4	24	5
5	36	10
6	36	10
7	36	10
8	36	10
9	36	10
10	60	10
11	12	10
12	36	20
13	36	0

<sup>1)</sup>The number of experimental condition by central composite design.

### (가) 발효

새싹보리 가수분해물을 기본 배지로 하여 실험계획에 따라 부원료인 바나나 농축액(62 ° brix) 첨가량을 달리하여, MRS broth 배지에 12시간 전배양된 *Lactobacillus fermentum* DU. La. EIJ-31를 종균으로 하여 3% 접종 후 발효시간을 달리하여 발효하였다.

### (나) 생육도, pH 및 산도 측정

유산균의 생육도는 Spectrophotometer(Optizen 2120UV, Mecasys co., Ltd., Korea)로 660 nm에서 흡광도를 측정하였다. pH는 pH meter(Metter Toledo Group, Switzerland)를 사용하여, 적정 산도는 0.1 N NaOH용액으로 pH 8.3으로 중화 적정하여 소비된 0.1 N NaOH용액을 lactic acid 함량(%)으로 환산하였다.

### (다) 유기산 분석 함량 측정

유기산 분석을 위해 시료를 0.45 µm membrane filter로 여과하여 HPLC로 분석하였다. 유기산 분석조건은 Aminex<sup>®</sup>HPX-87H(7.5×300 mm, 9 µm, BIO-RAD Laboratories, USA)를 사용하여 5 mM sulfuric acid를 유속 0.6 mL/min의 조건으로 PDA 214 nm에서 분석하였다. 모든 표준물질은 Sigma-Aldrich Co.(St, Louis, MO, USA) 제품으로 사용하였다.

### (라) 유효성분 함량 측정

진세노사이드 함량은 시료 용액을 0.45 µm membrane filter로 여과한 후, Alliance 2695 HPLC System (Waters Co., Milford, MA, USA)로 분석하였다. 분석조건은 Table 1-17에 나타내었다. 표준품은 saponarin, vitexin, isovitexin, luteolin(ChromaDex Co.)을 이용하여 표준 검량선을 작성한 후 각각의 함량을 계산하였다.

Table 1-17. Operating conditions of HPLC for the analysis

Instrument	Conditions		
Column	Jupiter 4u proteo 90A (Phenomenex) (250 × 4.6 mm I.d., particle size 4 µm)		
Mobile phase A	5% Acetic acid		
Mobile phase B	Acetonitrile : Methanol = 1 : 1 (v/v)		
Flow rate	1.0 mL/min		
Gradient(%)	Time (min)	Profile	
		A	B
	0	95	5
	7	85	15
	25	80	20
	35	75	25
	45	65	35
55	55	45	
60	95	5	
Injection volume	20 µl		
Oven temperature	35°C		
Detection	PDA 338 nm		



#### (마) 총 페놀성 화합물 함량 측정

시료의 총 페놀성 화합물 함량은 Folin-Denis 법에 의해 비색정량하였다. 시료 1 mL에 phenol reagent 1 mL를 가하여 3분간 정치한 후 10% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 1 mL를 혼합하고 1시간 실온에서 방치하여 700 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준곡선은 gallic acid 용액으로 작성하였다.

#### (바) DPPH 라디칼 소거능

시료의 전자공여능은  $\alpha, \alpha'$ -diphenyl- $\beta$ -picrylhydrazyl (DPPH)을 사용한 방법으로 측정하였다. 즉, DPPH 시약 12 mg을 absolute ethanol 100 mL에 용해한 후 50% ethanol 용액을 첨가하여 DPPH 용액의 흡광도를 517 nm에서 약 1.0으로 조정한 후, 추출액 0.5 mL에 DPPH 용액 5 mL를 혼합하여 흡광도를 측정하였다.

### (2) 최적 유산발효 조건 예측

유산발효 조건별 새싹보리 발효물의 최적 조건 예측은 발효적 특성, 유기산 함량 및 유용성분 함량에 대한 반응표면을 superimposing 했을 때 중복되는 부분의 범위에서 최적 효소처리 조건을 설정하였고, 예측된 범위에서 임의의 중심점을 최적 조건으로 예측한 뒤 각 회귀식에 대입하여 예측 값을 설정하였다. 또한 예측된 값들에 대하여 동일조건에서 실제 실험을 통하여 얻은 실험치를 비교하였다.

### (3) 통계 처리

최적 발효 조건 설정을 위한 중심합성계획법은 statistical analysis system(SAS, version 9.4 SAS institute) 프로그램을 이용하여 회귀분석하였다.

## 나. 연구 수행 결과

### (1) 반응표면분석법을 이용한 새싹보리 유산발효조건 최적화

새싹보리 가수분해물의 최적 발효조건을 설정하기 위해 발효시간과 부원료인 바나나 농축액 첨가 농도를 독립변수로 하여 중심합성계획에 의해 설계된 13구의 발효조건에서 얻어진 발효적 특성 즉, 생육도, pH 및 산도는 Table 1-18과 같다.

각각의 결과를 이용하여 반응표면분석을 실시하고, 각 종속변수 즉, 생육도, pH, 산도에 대한 회귀식을 얻었다(Table 1-19). 또한 변수별 최적 발효조건과 각 발효액의 특성값을 예측하여 Table 1-20에 나타내었다.

Table 1-18. Experimental data cell growth, pH and acidity of barley sprouts hydrolysate under different fermentation conditions based on central composite design by response surface analysis

Exp. No <sup>1)</sup>	Cell growth (O.D. 600 nm)	pH	Acidity (%)
1	1.785	3.39	1.13
2	1.654	3.49	0.60
3	1.745	3.40	1.10
4	1.418	3.27	0.81
5	1.618	3.32	0.95
6	1.647	3.32	0.96
7	1.632	3.36	0.90
8	1.624	3.40	0.80
9	1.635	3.48	0.77
10	1.611	3.34	1.04
11	1.204	3.98	0.43
12	1.546	3.55	1.12
13	1.314	3.16	0.48

<sup>1)</sup>The number of experimental condition by central composite design.

중심합성계획법에 따라 Table 1-15와 같은 각 독립변수의 범위를 설정한 후, Design Expert를 이용하여 Table 1-16과 같이 13가지의 발효조건을 설정하고 새싹보리를 유산발효 하였다. 발효조건에 따른 새싹보리 발효물의 생육도는 1.204~1.785 O.D. 600 nm의 범

위로 나타났으며(Table 1-18), 이를 바탕으로 한 생육도의 회귀식은 Table 1-19와 같고 R<sup>2</sup> 값은 0.9977로 1% 이내의 수준에서 유의성이 확인되었다. ANOVA 분석을 통한 모형에 대한 적합성을 검증하기 위해서는 Lack of fit의 *P*-value가 0.5051로 나타나 모형의 적합성이 인정되었다(Table 1-19). 발효조건에 대한 영향은 Table 1-20에서와 같이 발효시간과 부원료 농도 모두에 큰 영향을 받는 것으로 나타났다. 발효조건에 따라 반응표면모델로 예측된 회귀분석결과 임계점이 최대점으로 나타났으며, 최적점을 산출한 결과 최적값은 1.762 O.D. 600 nm이며, 이때의 발효 조건은 발효시간 54.25 시간 및 부원료 농도 12.47%로 나타났다(Table 1-21).

Table 1-19. Regression coefficient and *t*-value of the predicted quadratic polynomial models on cell growth, pH and acidity of fermented barley sprouts hydrolysate

Term	Cell growth		pH		Acidity	
	Coefficient	<i>t</i> -value	Coefficient	<i>t</i> -value	Coefficient	<i>t</i> -value
Intercept						
$\beta_0$	0.389479	9.54	4.595208	15.96	-0.380208	-3.68
Linear						
$\beta_1$	0.035321	23.86	-0.049345	-4.73	0.036773	9.82
$\beta_2$	0.064325	16.94	-0.029730	-1.11	0.058282	6.07
Quadratic						
$\beta_{11}$	-0.000266	-16.79	0.000559	5.01	-0.000355	-8.89
$\beta_{22}$	-0.001505	-16.52	0.001170	1.82	-0.001397	-6.06
Cross product						
$\beta_{12}$	-0.000488	-5.37	-0.000125	-0.20	-0.000041667	0.18
R <sup>2</sup>	0.9977		0.8994		0.9913	
Lack of fit	0.5051		0.0014		0.0619	

발효조건별로 처리된 새싹보리 발효물의 pH는 3.16~3.49의 범위로 나타났으며(Table 1-18) 이를 바탕으로 한 회귀식은 Table 1-19와 같다. pH에 대한 R<sup>2</sup>값은 0.0.8994로 높은 신뢰도를 보였으며, *P*-value는 1% 이내 유의수준을 보였다. 한편 pH의 model에 대한 lack of fit의 *P*-value는 0.0014로 나타나 model이 적합하지 않은 것으로 나타났다(Table 1-19). 발효조건에 대한 영향에서 pH의 경우 부원료 농도 > 발효시간 순으로 영향을 크게 받는 것으로 나타났다(Table 1-20). 발효조건에 따라 반응표면모델로 예측된 회귀분석 결과 정상점이 최저점으로 나타났으며, 최적점을 산출한 결과 pH의 최저값은 3.23이고 이때의 발효조건은 발효시간 46.14 시간 및 부원료 농도 15.57%로 나타났다(Table 1-21). 실험조건에 따라 얻은 새싹보리 발효물의 pH에 대한 반응표면은 Fig. 1-12에 나타내었으며, 발효시간이 길수록 pH가 감소하는 것으로 나타났다.

Table 1-20. Regression analysis for fermentation conditions of barley sprouts hydrolysate

Response	F-Ratio	
	Time (hour)	Sub materials conc. (%)
Cell growth	725.34***	334.73***
pH	128.22***	145.56***
Acidity	128.22***	145.56***

\*Significant at 10% level; \*\*significant at 5% level; \*\*\*significant at 1% level.

Table 1-21. Predicted levels of optimum fermentation conditions for the maximum responses of barley sprouts hydrolysate by the ridge analysis

Response	Predicted response				Morphology
	Response	Time (hour)	Sub materials conc. (%)	Result	
Cell growth	Min	16.81	3.98	1.108	Maximum
	Max	54.25	12.47	1.762	
pH	Min	46.14	15.57	3.23	Minimum
	Max	12.17	8.80	3.89	
Acidity	Min	17.58	3.58	0.35 (%)	Maximum
	Max	49.26	18.33	1.20 (%)	

발효조건에 따른 새싹보리 발효물의 산도 변화는 0.48~1.13%의 범위로 나타났으며 (Table 18), 이를 바탕으로 한 회귀식은 Table 1-19와 같으며, 이 모델에 대한 회귀식의  $R^2$  값은 0.9913로 1% 이내의 유의성이 인정되었다. 산도를 위한 발효조건 model에 대한 lack of fit의  $P$ -value는 0.0691로 나타나 model이 적합한 것으로 나타났다. 산도는 발효온도와 부원료 농도의 발효조건 모두에서 영향을 받고 있는 것으로 나타났으며 (Table 1-20), 부원료 농도가 높고 발효시간이 길수록 산도가 증가하는 것으로 나타났다 (Fig. 1-13). Table 1-21과 같이 산도의 예측된 정상점은 최댓점으로 최댓값이 1.20%이었고, 이때 발효시간 49.26 시간 및 부원료 농도 18.33%이었다.

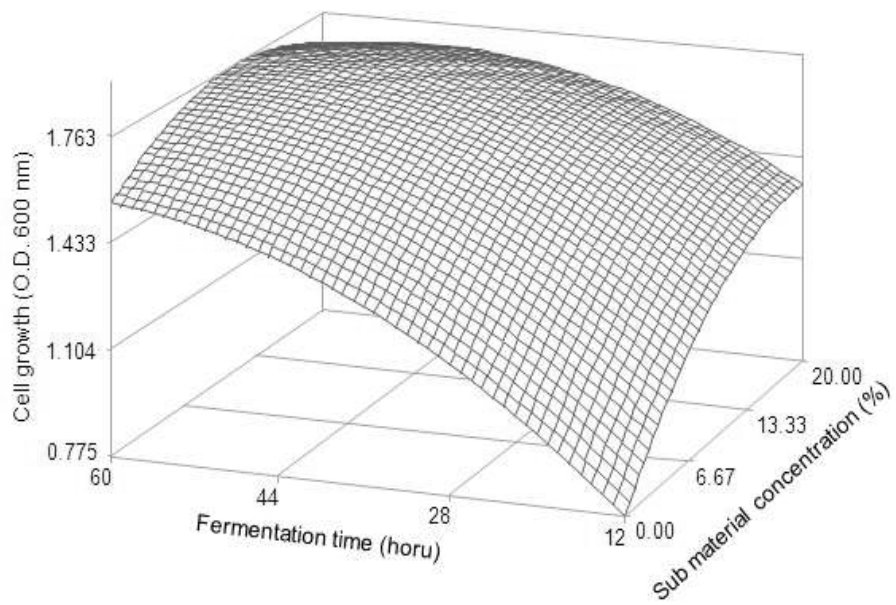
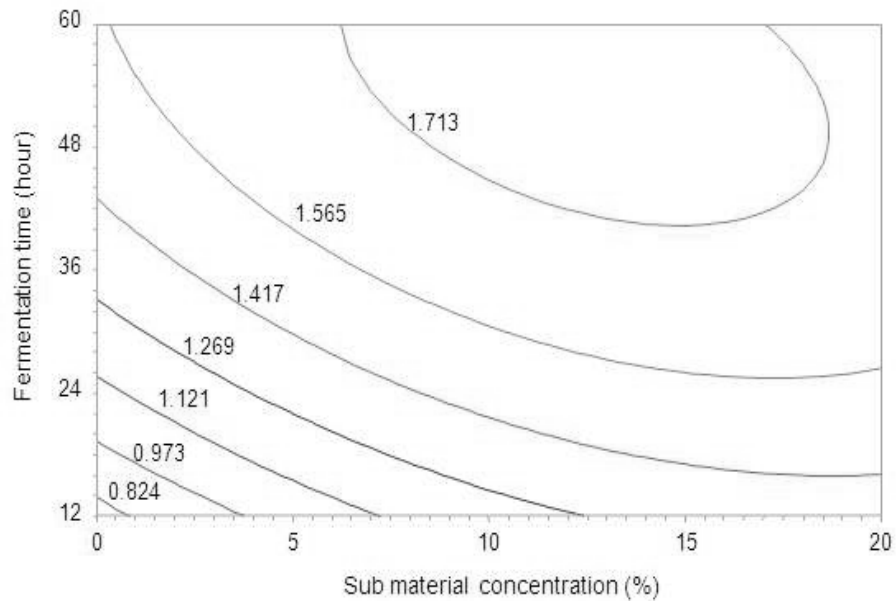


Fig. 1-11. Contour map(top) and response surface(bottom) for cell growth of fermented barley sprouts hydrolysate as a fermentation condition of time and sub material concentration.

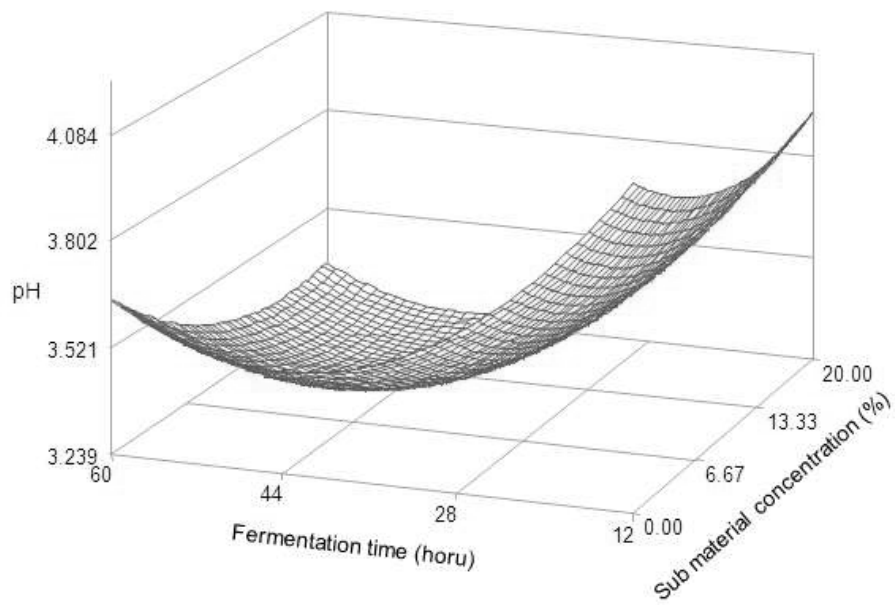
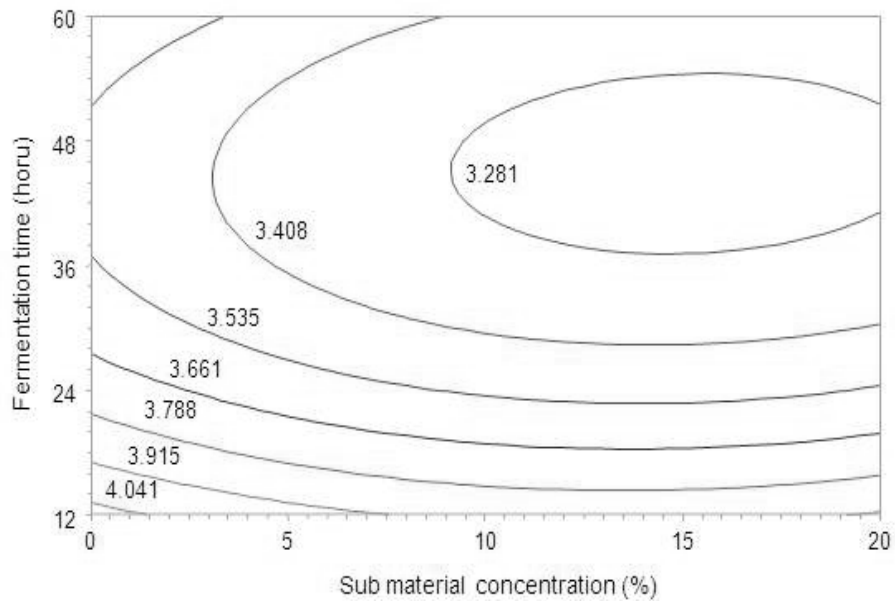


Fig. 1-12. Contour map(top) and response surface(bottom) for pH of fermented barley sprouts hydrolysate as a fermentation condition of time and sub material concentration.

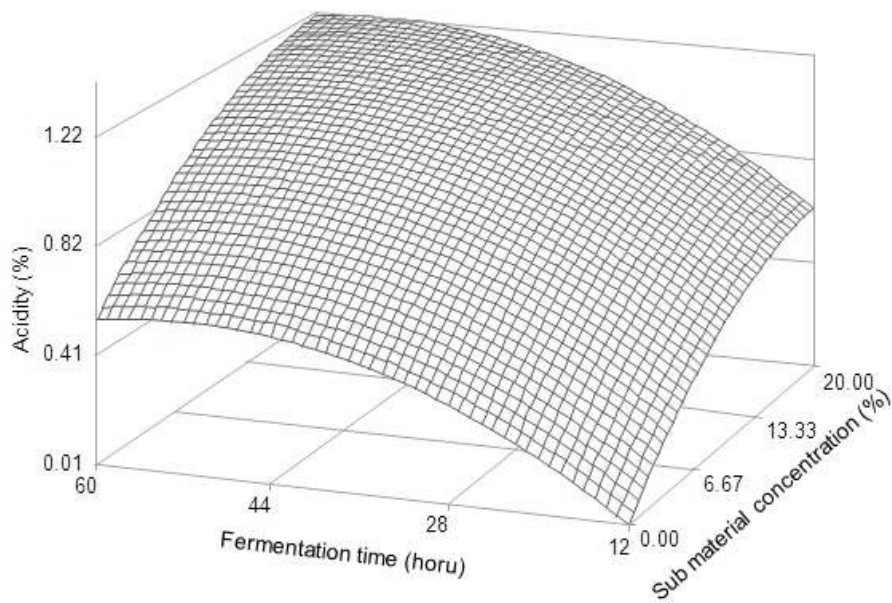
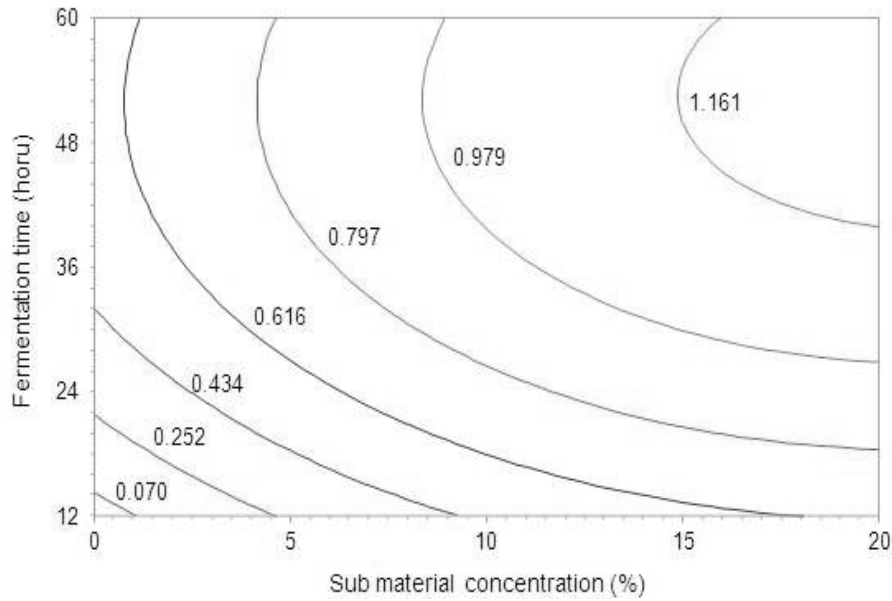


Fig. 1-13. Contour map(top) and response surface(bottom) for acidity fermented barley sprouts hydrolysate as a fermentation condition of time and sub material concentration.

새싹보리의 최적 유산발효 조건을 설정하기 위해 발효시간과 부원료 농도를 독립변수로 하여 중심합성계획에 의해 설계된 13구의 유산발효조건에서 얻어진 유기산 함량은 Table 1-22와 같다.

각각의 결과를 이용하여 반응표면분석을 실시하고, 각 종속변수 즉, 유기산 함량에 대한 회귀식을 얻었다(Table 1-23). 또한 변수별 최적 유산발효조건과 각 발효물의 유기산 함량을 예측하여 Table 1-25에 나타내었으며, 이들의 반응표면을 발효시간 및 부원료 농도를 독립변수로 하여 Fig. 1-14~1-18에 나타내었다.

Table 1-22. Experimental data organic acid content of barley sprouts hydrolysate under different fermentation conditions based on central composite design by response surface analysis

Exp. No <sup>1)</sup>	Organic acid content (mg/100 mL)				
	Oxalic acid	Citric acid	Malic acid	Lactic acid	Acetic acid
1	20.63	103.95	22.46	972.50	58.81
2	17.91	63.87	9.64	742.50	28.31
3	20.23	120.17	20.81	828.69	55.33
4	17.66	49.02	9.56	447.53	36.92
5	18.34	78.06	15.85	843.58	43.14
6	17.50	79.08	16.37	857.07	48.82
7	18.22	74.25	15.13	545.45	48.28
8	18.25	87.16	15.15	824.33	47.72
9	17.89	82.16	17.79	808.91	42.88
10	18.84	80.97	19.25	903.33	43.39
11	18.32	106.16	24.98	327.73	27.95
12	19.09	148.77	28.35	854.87	60.87
13	15.51	-	5.00	369.71	33.79

<sup>1)</sup>The number of experimental condition by central composite design.

중심합성계획법에 따라 Table 1-15와 같은 각 독립변수의 범위를 설정한 후, Design Expert를 이용하여 Table 1-16과 같이 13가지의 발효조건을 설정하고 새싹보리를 유산발효 하였다. 발효조건에 따른 새싹보리 발효물의 oxalic acid 함량은 15.51~20.63 mg/100 mL의 범위로 나타났으며(Table 1-22), 이를 바탕으로 한 oxalic acid 함량의 회귀식은 Table 1-23과 같고 R<sup>2</sup>값은 0.7702로 5% 이내의 수준에서 유의성이 확인되었다. ANOVA 분석을 통한 모형에 대한 적합성을 검증하기 위해서는 Lack of fit의 P-value가 0.0214로 나타나 모형의 적합성이 인정되지 않았다(Table 1-23). 발효조건에 대한 영향은 Table 1-24에 서와 같이 부원료 농도에 영향을 받는 것으로 나타났으나, 발효시간의 경우는 설정된 범위 내에서는 영향을 받지 않는 것으로 나타났다. 발효조건에 따라 반응표면모델로 예측된 회귀분석결과 oxalic acid 함량의 임계점은 안장점으로 나타났으며, 최적점을 산출한 결과 최댓값은 20.06 mg/100 mL이며, 이때의 발효 조건은 발효시간 53.07시간 및 부원료 농도 17.02%로 나타났다(Table 1-25).



발효조건에 따른 새싹보리 발효물의 citric acid 함량의 0.00~148.77 mg/100 mL의 범위로 나타났으며(Table 1-22), 이를 바탕으로 한 회귀식은 Table 1-23과 같으며, 이 모델에 대한 회귀식의  $R^2$  값은 0.9714로 1% 이내의 유의성이 인정되었다. Citric acid 함량을 위한 발효조건 model에 대한 lack of fit의  $P$ -value는 0.0797로 나타나 model이 적합한 것으로 나타났다(Table 1-23). Citric acid 함량은 부원료 농도에서 큰 영향을 받고 있는 것으로 나타났으며, 다음으로 발효시간에는 영향을 받는 것으로 나타났다(Table 1-24). Table 1-25와 같이 citric acid 함량의 예측된 정상점은 안장점으로 능선분석을 한 결과 최댓값이 156.85 mg/100 mL이었고, 이때 발효시간 22.87시간, 부원료 농도 18.37%이었다. 새싹보리 발효물의 citric acid 함량의 발효조건에 따른 반응표면에서 볼 때 부원료 농도가 높아질수록 함량이 증가하는 것으로 나타났다(Fig. 1-15).

발효조건별로 처리된 새싹보리 발효물의 malic acid 함량은 5.00~28.35 mg/100 mL의 범위로 나타났으며(Table 1-22), 이를 바탕으로 한 회귀식은 Table 1-23과 같다. Malic acid 함량에 대한  $R^2$ 값은 0.9487로 높은 신뢰도를 보였으며,  $P$ -value는 1% 이내 유의수준을 보였다. Malic acid 함량의 model에 대한 lack of fit의  $P$ -value는 0.0607로 나타나 model이 적합한 것으로 나타났다(Table 1-23). 발효조건에 대한 영향에서 malic acid 함량의 경우 부원료 농도>발효시간 순으로 영향을 받는 것으로 나타났다(Table 1-24). 발효조건에 따라 반응표면모델로 예측된 회귀분석 결과 정상점이 최저점으로 나타났으며, 최적점을 산출한 결과 malic acid 함량의 최댓값은 27.78 mg/100 mL이고 이때의 발효조건은 발효시간 30.52시간 및 부원료 농도 19.73%로 나타났다(Table 1-25). 실험조건에 따라 얻은 새싹보리 발효물의 malic acid 함량에 대한 반응표면은 Fig. 1-16에 나타내었으며, 부원료의 농도가 높을수록 malic acid 함량이 증가하는 것으로 나타났다.

발효조건에 따른 새싹보리 발효물의 lactic acid 함량을 측정된 결과는 Table 1-22와 같으며, 327.73~972.50 mg/100 mL의 범위로 측정되었다. 조건에 따른 값을 이용한 lactic acid 함량의 회귀식은 Table 1-23과 같으며, 이 모델에 대한 회귀식의  $R^2$  값은 0.9840으로 회귀방정식에 대한 적합도가 높았으며,  $P$ -value는 1% 이내 유의 수준을 보였다. ANOVA 분석을 통한 Lack of fit의  $P$ -value는 0.00506로 분석되어 반응표면 모형에 대한 적합성이 인정되었다(Table 1-23). 발효조건의 영향은 Table 1-24에서와 같이 발효시간과 부원료 농도 모두에서 큰 영향을 받는 것으로 나타났다. 발효조건에 따라 반응표면모델로 예측된 정상점은 최대점으로 구하였고, lactic acid의 최대 함량은 920.12 mg/100 mL이었고, 이때의 발효조건은 발효시간 53.93시간, 부원료 농도 16.64%로 나타났다(Table 1-25). Lactic acid 함량의 발효조건에 따른 반응표면에서 볼 때 부원료 농도가 높고, 발효시간이 길수록 함량이 증가하는 것으로 나타났다(Fig. 1-17).

발효조건별 acetic acid 함량은 Table 1-22에 나타내었고, 이를 회귀분석하여 본 결과 회귀식의  $R^2$ 는 0.9029으로 1% 이내의 수준에서 유의성이 인정되었고, 회귀식은 Table 1-23과 같다. Lack of fit의  $P$ -value가 0.01417이므로 모형에 대한 적합성이 인정되었다(Table 1-23). 부원료 농도의 영향이 가장 크며, 다음으로 발효시간에 영향을 받는 것으로 나타났다(Table 1-24). 예측된 정상점이 안장점으로 acetic acid 함량의 최댓값은 397.18 mg/100 mL이었고, 이때의 발효조건은 발효시간 40.85시간, 부원료 농도 19.79%이었다(Table 1-25). 반응표면을 통한 새싹보리 발효물의 acetic acid 함량 변화는또한 발효시간과 부원료 농도의 발효조건에 따른 acetic acid 함량의 반응표면분석은 Fig. 1-18과 같다.

Table 1-23. Regression coefficient and *t*-value of the predicted quadratic polynomial models on organic acid content of fermented barley sprouts hydrolysate

Term	Oxalic acid		Citric acid		Malic acid		Lactic acid		Acetic acid	
	Coefficient	<i>t</i> -value	Coefficient	<i>t</i> -value	Coefficient	<i>t</i> -value	Coefficient	<i>t</i> -value	Coefficient	<i>t</i> -value
Intercept										
$\beta_0$	16.801250	5.65	3.887917	0.13	22.112083	3.07	-759.727500	-5.76	4.399583	0.30
Linear										
$\beta_1$	-0.071648	-0.66	-0.761580	-0.71	-0.868673	-3.32	44.679387	9.34	1.430254	2.68
$\beta_2$	0.317586	1.15	12.594471	4.58	0.866011	1.29	93.423241	7.61	0.936184	0.68
Quadratic										
$\beta_{11}$	0.001071	0.93	0.0235697	2.06	0.010266	3.68	-0.379716	-7.43	-0.017626	-3.09
$\beta_{22}$	-0.006629	-1.00	-0.056057	-0.85	0.004733	0.29	-2.219562	-7.54	0.015074	0.46
Cross product										
$\beta_{12}$	0.000625	0.09	-0.129458	-1.97	0.006125	0.38	-0.629833	-2.15	0.008708	0.27
R <sup>2</sup>	0.7702		0.9714		0.9487		0.9840		0.9029	
Lack of fit	0.0214		0.0797		0.0607		0.0506		0.1417	

Table 1-24. Regression analysis for fermentation conditions of barley sprouts hydrolysate

Response	F-Ratio	
	Time (hour)	Sub materials conc. (%)
Oxalic acid content	0.42	7.16**
Citric acid content	3.90*	76.01***
Malic acid content	5.28**	37.72***
Lactic acid content	76.51***	76.45***
Acetic acid content	5.50**	15.64***

\*Significant at 10% level; \*\*significant at 5% level; \*\*\*significant at 1% level.

Table 1-25. Predicted levels of optimum fermentation conditions for the maximum responses of fermented barley sprouts hydrolysate by the ridge analysis

Response	Predicted response				Morphology
	Response	Time (hour)	Sub materials conc. (%)	Result (mg/100mL)	
Oxalic acid content	Min	35.31	0.00	15.61	Saddle
	Max	53.07	17.02	20.06	
Citric acid content	Min	31.39	0.18	4.78	Saddle
	Max	22.87	18.37	156.85	
Malic acid content	Min	39.22	0.09	3.93	Minimum
	Max	30.52	19.73	27.78	
Lactic acid content	Min	19.08	2.90	172.47	Maximum
	Max	53.93	16.64	920.12	
Acetic acid content	Min	14.84	5.27	27.79	Saddle
	Max	40.85	19.79	64.89	

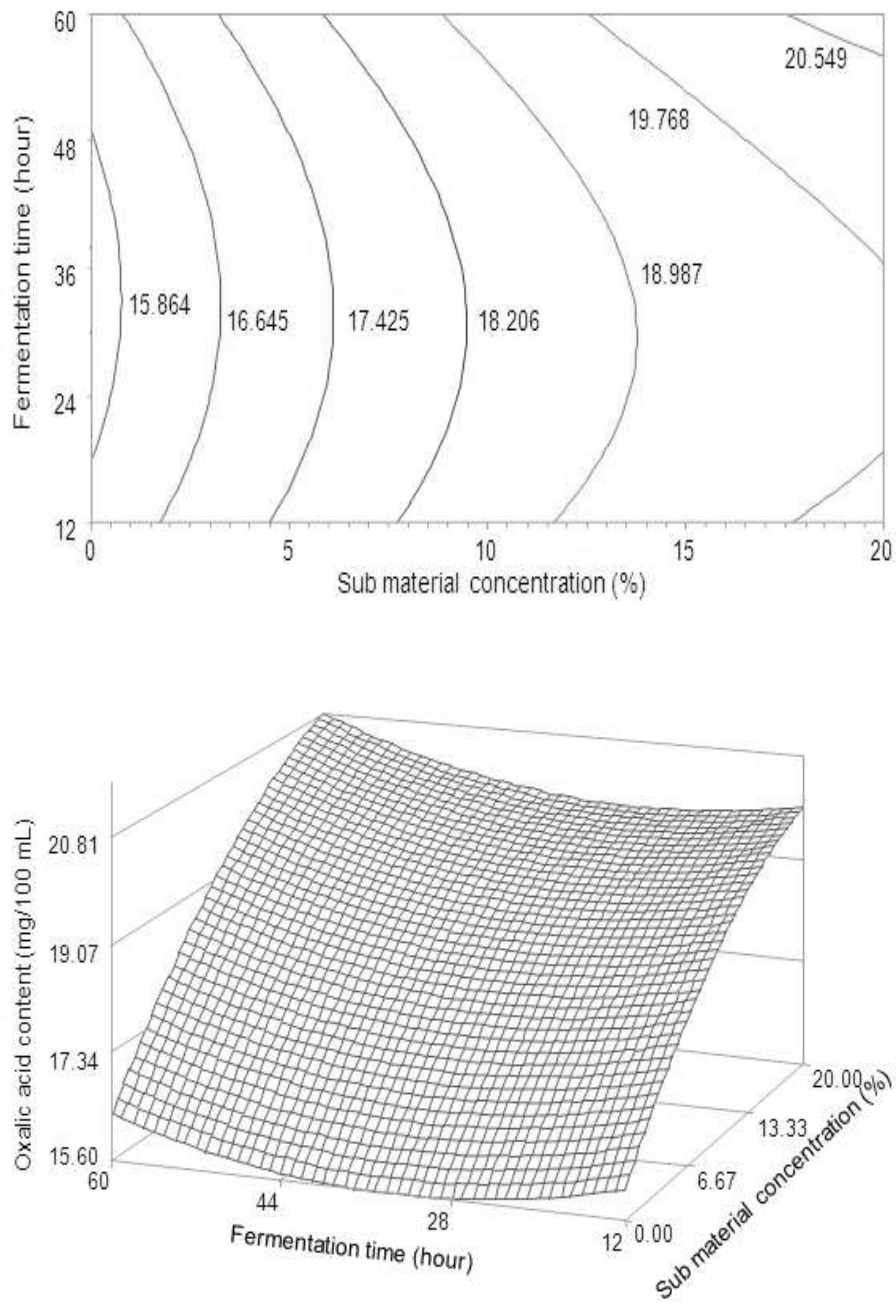


Fig. 1-14. Contour map(top) and response surface(bottom) for oxalic acid content of fermented barley sprouts hydrolysate as a fermentation condition of time and sub material concentration.

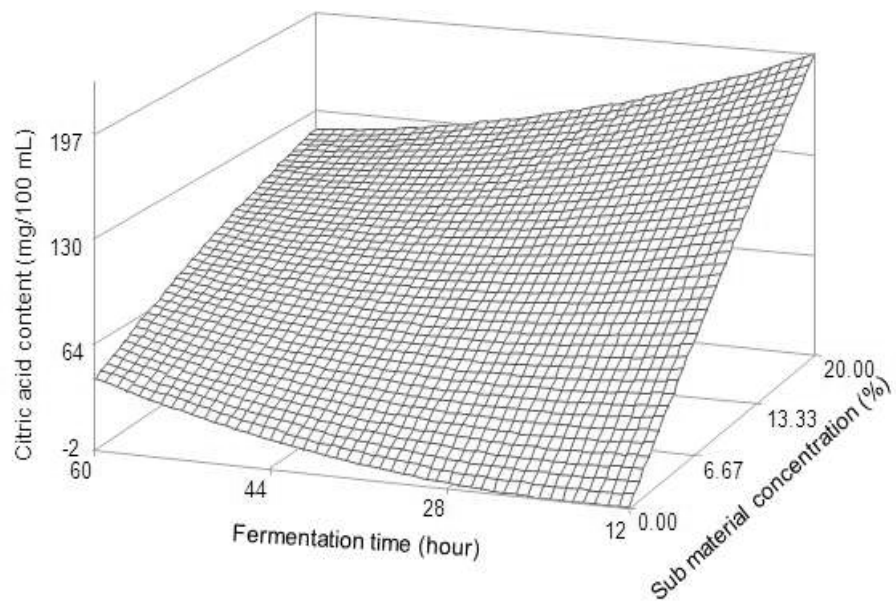
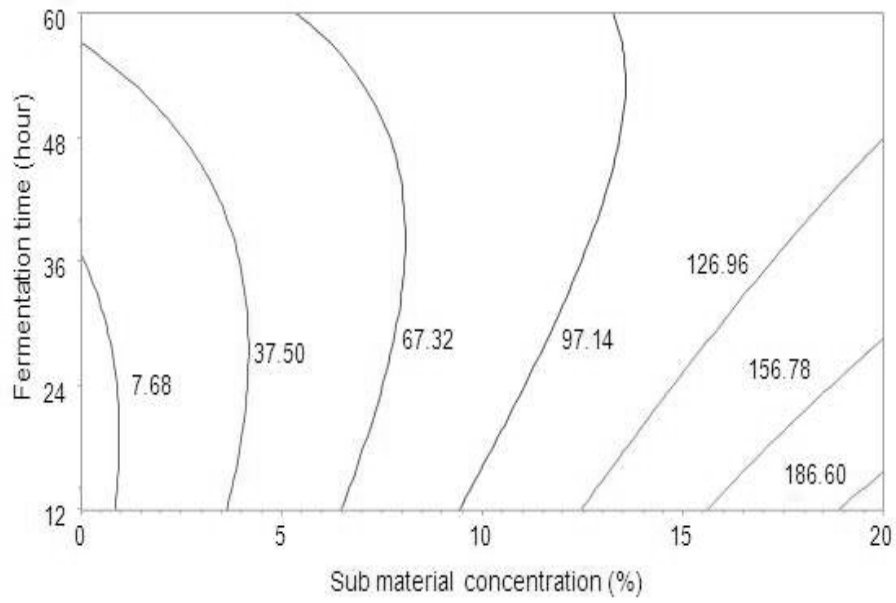


Fig. 1-15. Contour map(top) and response surface(bottom) for citric acid content of fermented barley sprouts hydrolysate as a fermentation condition of time and sub material concentration.

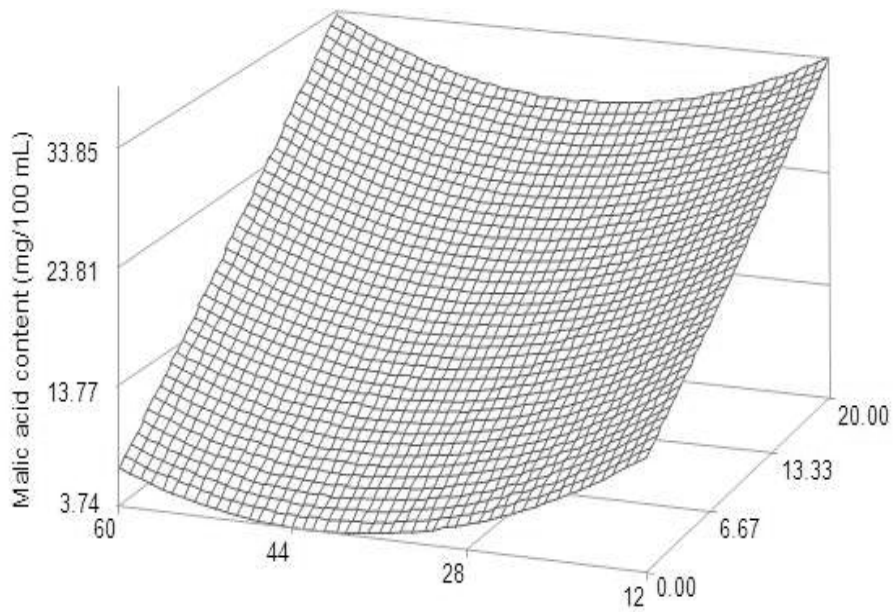
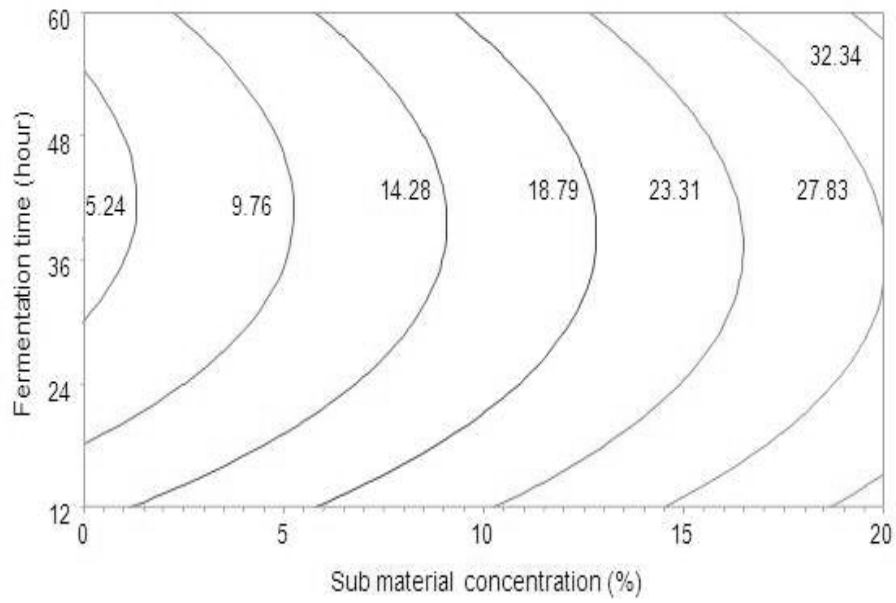


Fig. 1-16. Contour map(top) and response surface(bottom) for malic acid content of fermented barley sprouts hydrolysate as a fermentation condition of time and sub material concentration.

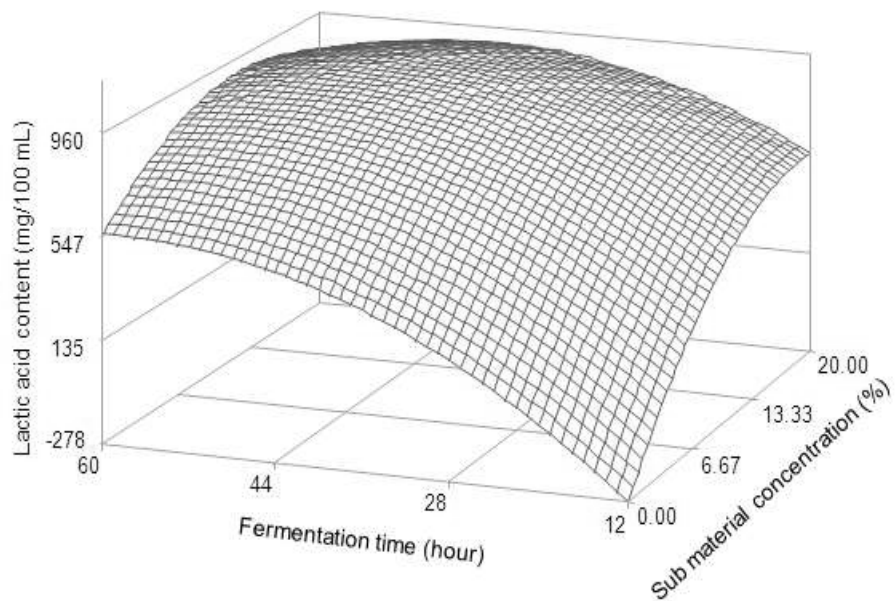
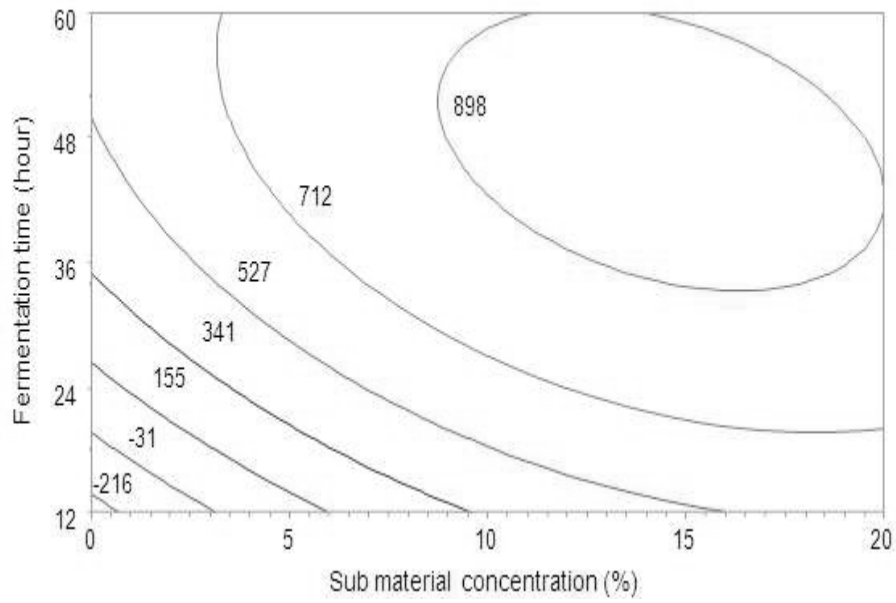


Fig. 1-17. Contour map(top) and response surface(bottom) for lactic acid content of fermented barley sprouts hydrolysate as a fermentation condition of time and sub material concentration.

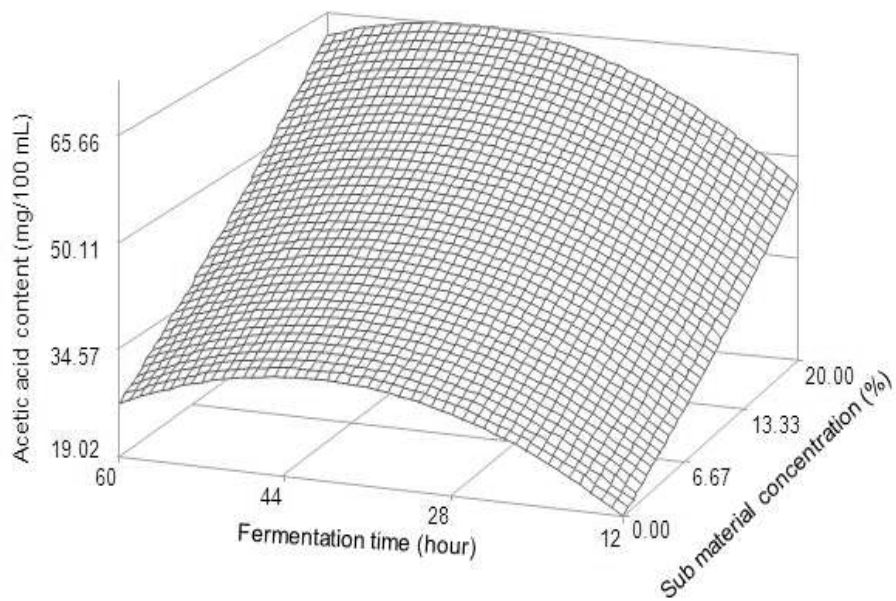
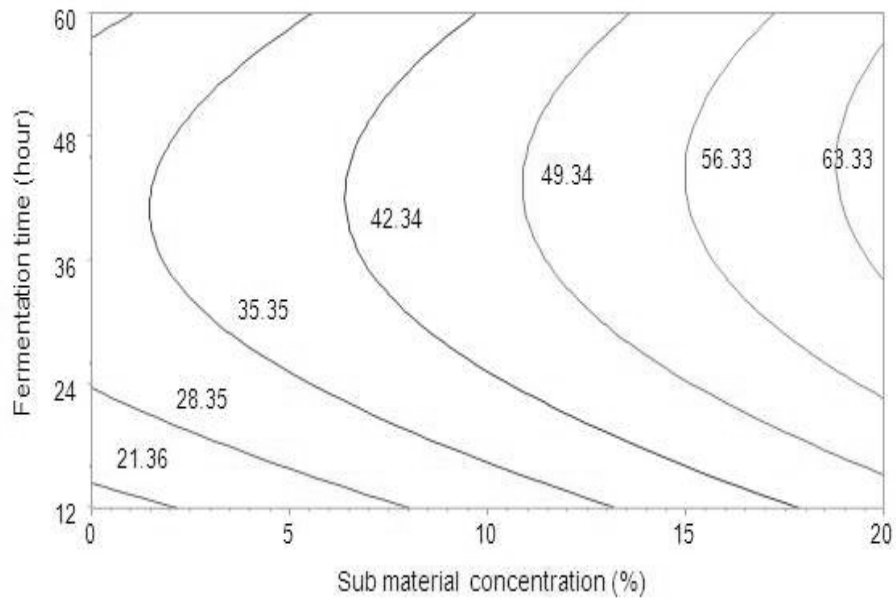


Fig. 1-18. Contour map(top) and response surface(bottom) for acetic acid content of fermented barley sprouts hydrolysate as a fermentation condition of time and sub material concentration.



새싹보리로부터 최적 발효조건을 설정하기 위해 발효시간과 부원료 농도를 독립변수로 하여 중심합성계획에 의해 설계된 13구의 발효조건에서 얻어진 유용성분 함량은 Table 1-26과 같다. 각각의 결과를 이용하여 반응표면분석을 실시하고, 각 종속변수 즉, saponarin, isovitexin, 총페놀성 화합물 함량 및 전자공여능에 대한 회귀식을 얻었다(Table 1-27). 또한 변수별 최적 발효조건과 각 발효물의 측정값을 예측하여 Table 28에 나타내었 으며, 이들의 3차원 반응표면을 발효시간 및 부원료 농도를 독립변수로 하여 Fig. 1-19~ 1-22에 나타내었다.

Table 1-26. Experimental data saponarin, isovitexin, totoal phenolics compound content and DPPH radical scavenging ability of barley sprouts hydrolysate under different fermentation conditions based on central composite design by response surface analysis

Exp. No <sup>1)</sup>	Saponarin content (µg/mL)	Isovitexin content (µg/mL)	Total phenolics compound content (mg/100 mL)	DPPH radical scavenging ability (%)
1	34.54	2.84	5.70	41.81
2	29.97	2.65	4.67	33.76
3	30.83	2.47	5.30	35.77
4	26.52	2.57	4.74	31.50
5	30.58	2.53	4.63	34.19
6	30.34	2.73	4.94	34.36
7	30.87	2.41	5.34	38.75
8	30.17	2.74	4.63	35.98
9	31.26	2.47	4.98	36.06
10	32.02	2.50	5.04	40.88
11	23.94	1.65	5.00	36.70
12	32.26	2.67	5.97	38.93
13	25.30	1.58	4.50	30.18

<sup>1)</sup>The number of experimental condition by central composite design.

Table 1-27. Regression coefficient and  $t$ -value of the predicted quadratic polynomial models on functional components content of fermented barley sprouts hydrolyzate

Term	Saponarin		Isovitexin		Total phenolics compound content		DPPH radical scavenging ability	
	Coefficient	$t$ -value	Coefficient	$t$ -value	Coefficient	$t$ -value	Coefficient	$t$ -value
Intercept								
$\beta_0$	14.022500	4.94	0.664167	0.65	5.386875	6.13	37.384375	6.01
Linear								
$\beta_1$	0.475896	4.63	0.062933	1.69	-0.031984	-1.01	-0.402226	-1.79
$\beta_2$	0.700655	2.66	0.080471	0.84	-0.062397	-0.76	0.200328	0.35
Quadratic								
$\beta_{11}$	-0.004511	-4.11	-0.000835	-2.10	0.000212	0.62	0.005006	2.08
$\beta_{22}$	-0.017983	-2.84	-0.004307	-1.88	0.001958	1.72	-0.013516	-0.98
Cross product								
$\beta_{12}$	0.001083	0.17	0.001208	0.53	0.003370	1.00	0.015750	1.14
$R^2$	0.9615		0.7129		0.8348		0.8617	
Lack of fit	0.0615		0.0537		0.9292		0.6602	

Table 1-28. Regression analysis for fermentation conditions of barley sprouts hydrolysate

Response	F-Ratio	
	Time (hour)	Sub materials conc. (%)
Saponarin	31.98***	27.89***
Isovitexin	3.28*	3.19*
Total phenolics compound content	0.55	11.70***
DPPH radical scavenging ability	4.68**	9.73***

\*Significant at 10% level; \*\*significant at 5% level; \*\*\*significant at 1% level.

Table 1-29. Predicted levels of optimum fermentation conditions for the maximum responses of fermented barley sprouts hydrolysate by the ridge analysis

Response	Predicted response				Morphology
	Response	Time (hour)	Sub materials conc. (%)	Result ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	
Saponarin	Min	16.44	4.19	23.33	Maximum
	Max	50.80	17.87	34.31	
Isovitexin	Min	12.73	7.54	1.80	Maximum
	Max	48.84	15.95	2.87	
Total phenolics compound content	Min	47.73	1.27	4.38	Saddle
	Max	44.58	19.33	6.12	
DPPH radical scavenging ability	Min	37.73	0.02	29.35 (%)	Saddle
	Max	55.84	15.62	44.10 (%)	

발효조건에 따른 새싹보리 발효물의 saponarin 함량을 측정한 결과는 Table 1-26과 같으며, 23.94~34.54  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 범위로 측정되었다. 조건에 따른 값을 이용한 saponarin 함량의 회귀식은 Table 1-27과 같으며, 이 모델에 대한 회귀식의  $R^2$  값은 0.9615으로 회귀방정식에 대한 적합도가 높았으며,  $P$ -value는 1% 이내 유의 수준을 보였다. ANOVA 분석을 통한 Lack of fit의  $P$ -value는 0.0615로 분석되어 반응표면 모형에 대한 적합성이 인정되었다 (Table 1-27). 발효시간과 부원료 농도 모두에서 큰 영향을 받는 것으로 나타났다(Table

1-28). 발효조건에 따라 반응표면모델로 예측된 정상점은 최대점으로 구하였고, saponarin 함량의 최대함량은 34.31  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 이었고, 이때의 발효조건은 발효시간 50.80시간, 부원료 농도 17.87%로 나타났다(Table 1-29). 반응표면을 통한 새싹보리 발효물의 saponarin 함량 변화는 Fig. 1-19와 같다.

발효조건별로 처리된 새싹보리 발효물의 isovitexin 함량은 124.11~169.42  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 범위로 나타났으며(Table 1-26), 이를 바탕으로 한 회귀식은 Table 1-27과 같다. Isovitexin 함량 값의 model에 대한 lack of fit의  $P$ -value는 0.0537로 나타나 model이 적합한 것으로 나타났다(Table 27). Isovitexin 함량에 대한  $R^2$ 값은 0.7129으로 낮은 신뢰도를 보였으며,  $P$ -value는 10% 이내 유의수준을 보였다. 발효조건에 대한 영향에서 isovitexin 함량의 경우 발효시간>부원료 농도 순으로 두 조건 모두에서 적은 영향을 받고 있는 것으로 나타났다(Table 1-28). 발효조건에 따라 반응표면모델로 예측된 회귀분석결과 정상점이 최대점으로 나타났으며, 최적점을 산출한 결과 isovitexin 함량의 최댓값은 2.87  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 이고 이때의 발효조건은 발효시간 48.84시간, 부원료 농도 15.95%로 나타났다(Table 1-29). 실험조건에 따라 얻은 새싹보리 발효물의 isovitexin 함량에 대한 반응표면은 Fig. 1-20에 나타내었다.

발효조건에 따른 새싹보리 발효물의 총 페놀성 화합물 함량을 측정한 결과는 4.50 ~ 5.97 mg/100 mL의 범위로 나타났으며(Table 1-26), 이를 이용한 회귀식은 Table 1-27에 나타내었다. 반응표면 모델의 회귀식의  $R^2$  값은 0.8348로 확인되었으며, ANOVA 분석을 통한 Lack of fit의  $P$ -value가 0.9292이므로 반응표면 모형에 대한 적합성이 인정되었다(Table 1-27). 부원료 농도의 큰 영향을 받는 것으로 나타났으며, 설정된 범위 내에서 발효시간에는 영향을 받지 않는 것으로 나타났다.(Table 1-28). 발효조건에 따라 반응표면모델로 예측된 정상점은 안장점으로 나타났으며, 능선분석을 하여 최적점을 산출한 결과, 총 페놀성 화합물 함량의 최댓값은 6.12 mg/100 mL였으며, 이때의 발효조건은 발효시간 44.58시간, 부원료 농도 19.33%로 나타났다(Table 1-29). 반응표면을 통한 발효조건에 따른 새싹보리 발효물의 총 페놀성 화합물 함량 변화는 Fig. 1-21과 같다.

발효조건에 따른 새싹보리 발효물의 DPPH 라디칼 소거능은 30.18~41.81%의 범위로 나타났으며(Table 1-26), 이를 바탕으로 한 DPPH 라디칼 소거능의 회귀식은 Table 1-27와 같고  $R^2$  값은 0.8617으로 1% 이내의 수준에서 유의성이 확인되었다. ANOVA 분석을 통한 모형에 대한 적합성을 검증하기 위해서는 Lack of fit의  $P$ -value가 0.6602로 나타나 모형의 적합성이 인정되었다(Table 1-27). 발효조건에 대한 영향은 Table 1-28에서와 같이 부원료 농도에 큰 영향을 받고 있는 것으로 나타났으며, 다음으로 발효시간에 영향을 받고 있는 것으로 나타났다. 발효조건에 따라 반응표면모델로 예측된 회귀분석결과 임계점이 안장점으로 나타났으며, 최적점을 산출한 결과 최댓값은 44.10%이며, 이때의 발효조건은 발효시간 55.84시간, 부원료 농도 15.62%으로 나타났다(Table 1-29). 반응표면을 통한 발효 조건에 따른 새싹보리 발효물의 DPPH 라디칼 소거능의 변화는 Fig. 1-22와 같이 부원료 농도가 높고 발효시간이 길어질수록 활성이 증가하는 경향을 나타내었다.

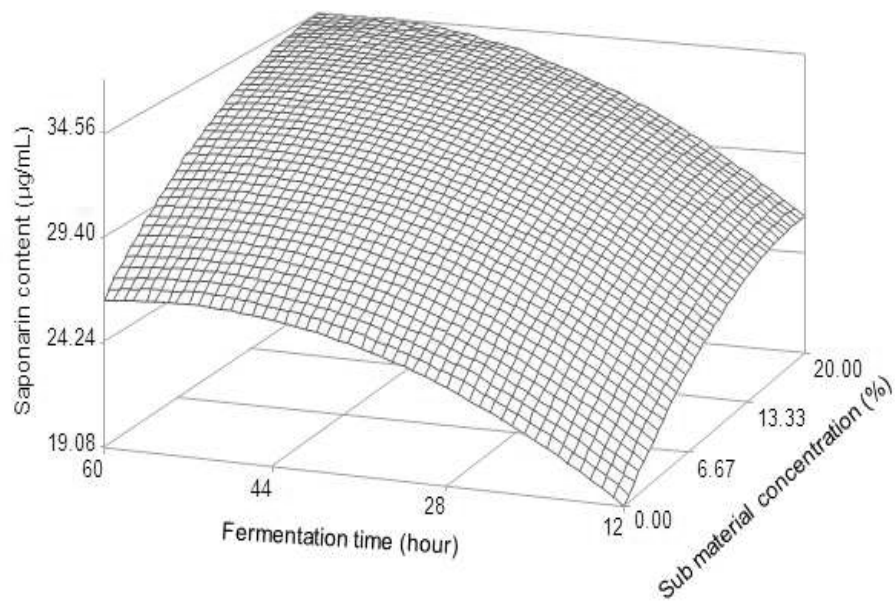
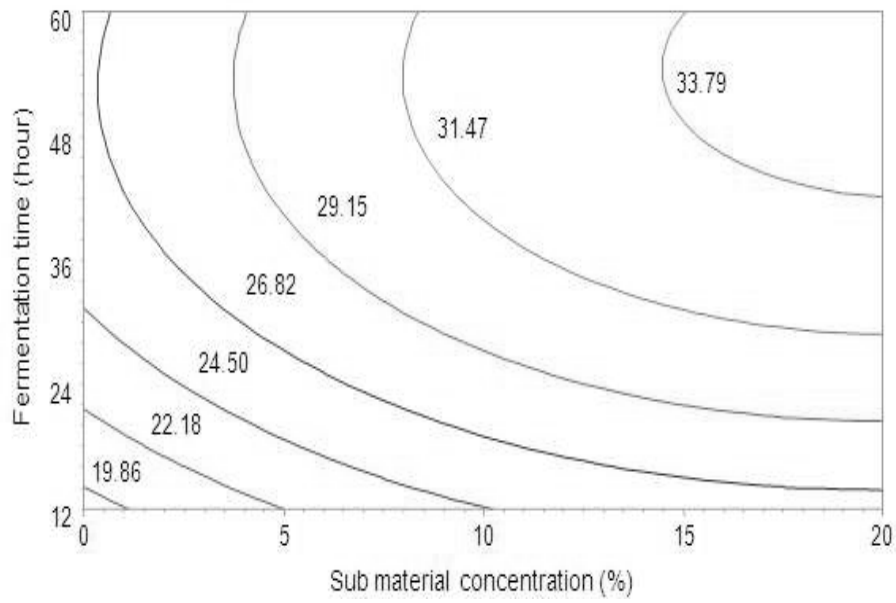


Fig. 1-19. Contour map(top) and response surface(bottom) for saponarin content of fermented barley sprouts hydrolysate as a fermentation condition of time and sub material concentration.

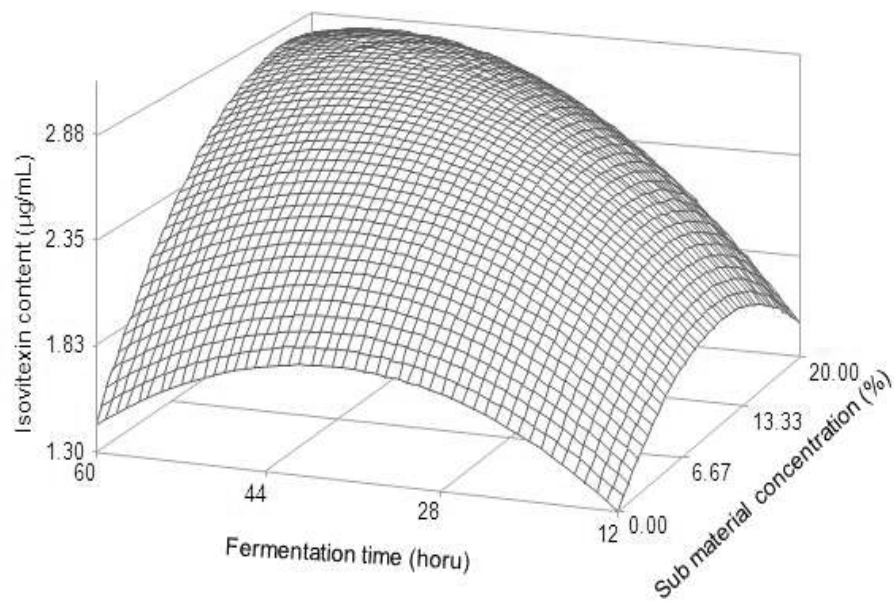
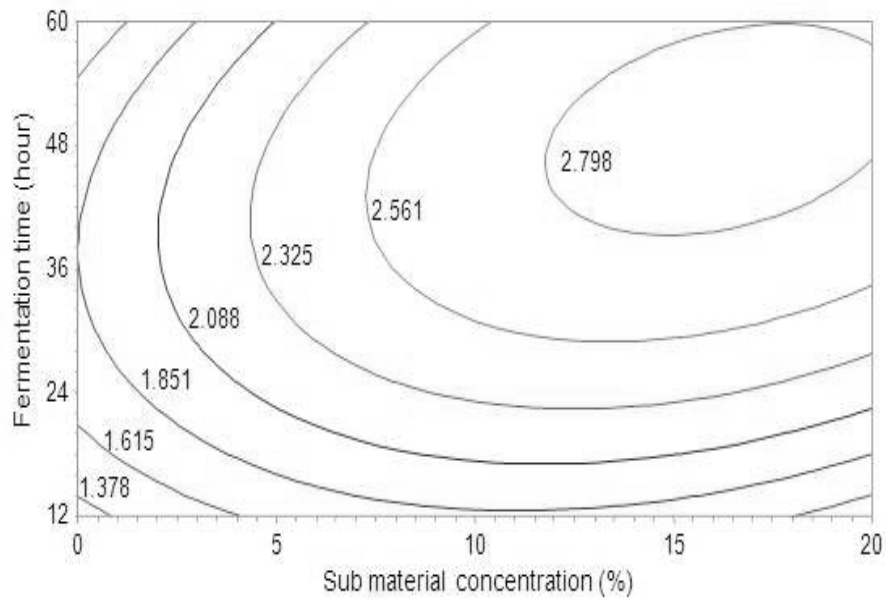


Fig. 1-20. Contour map(top) and response surface(bottom) for isovetexin content of fermented barley sprouts hydrolysate as a fermentation condition of time and sub material concentration.

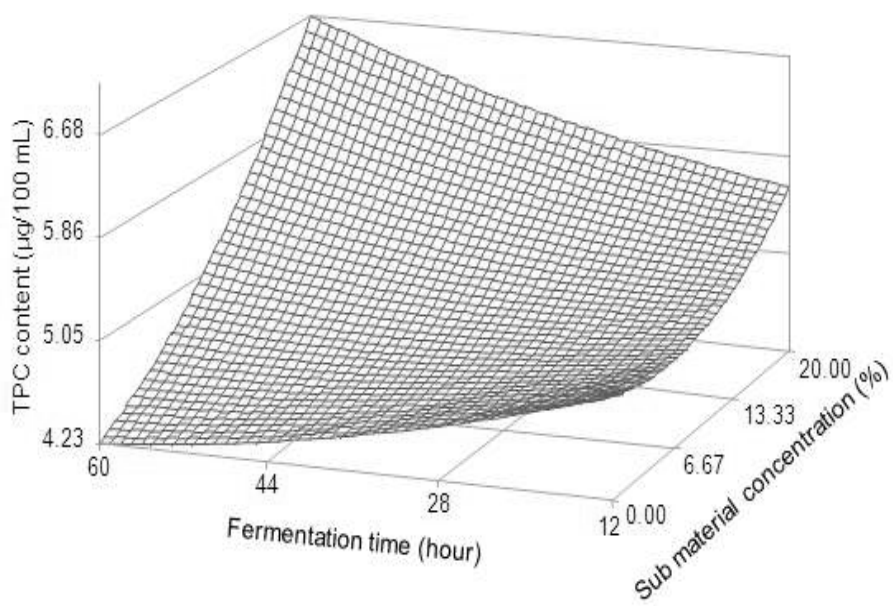
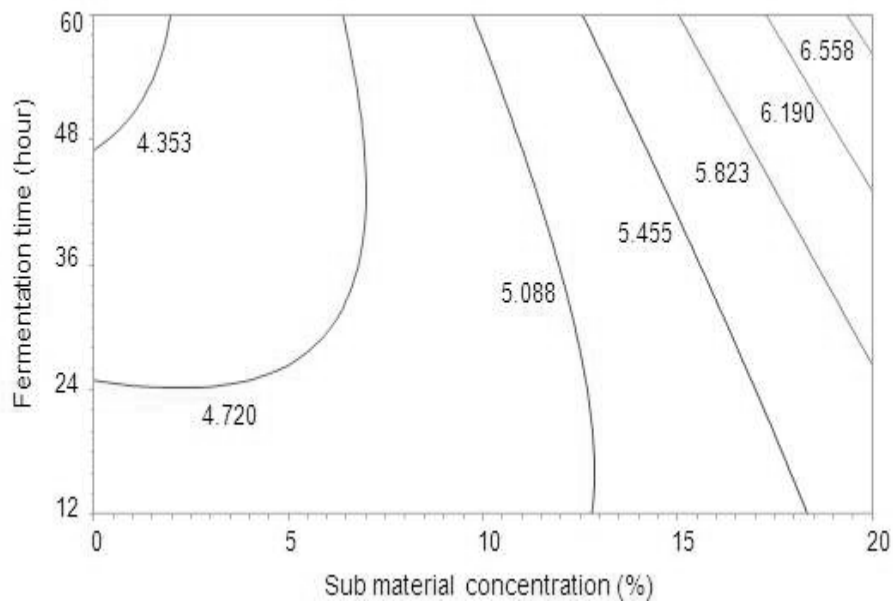


Fig. 1-21. Contour map(top) and response surface(bottom) for total phenolics compound content of fermented barley sprouts hydrolysate as a fermentation condition of time and sub material concentration.

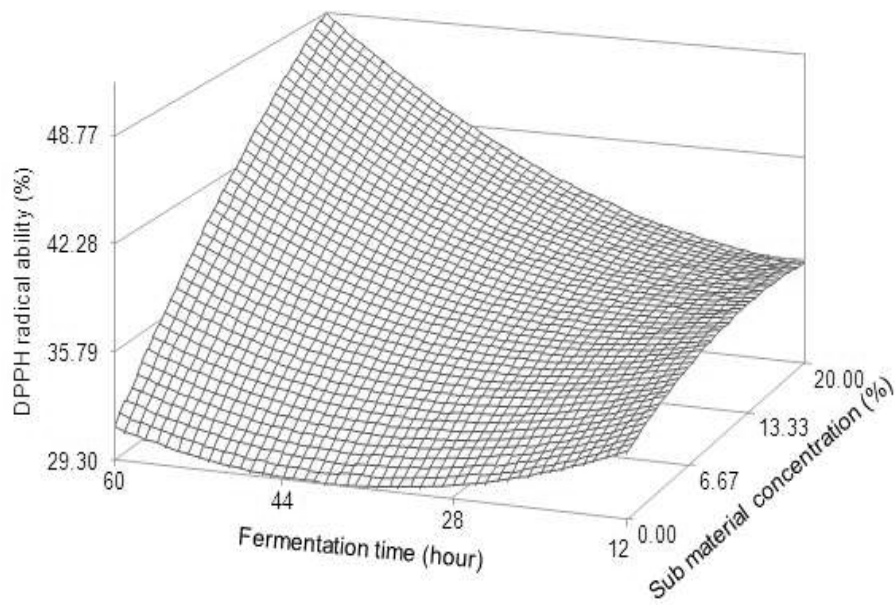
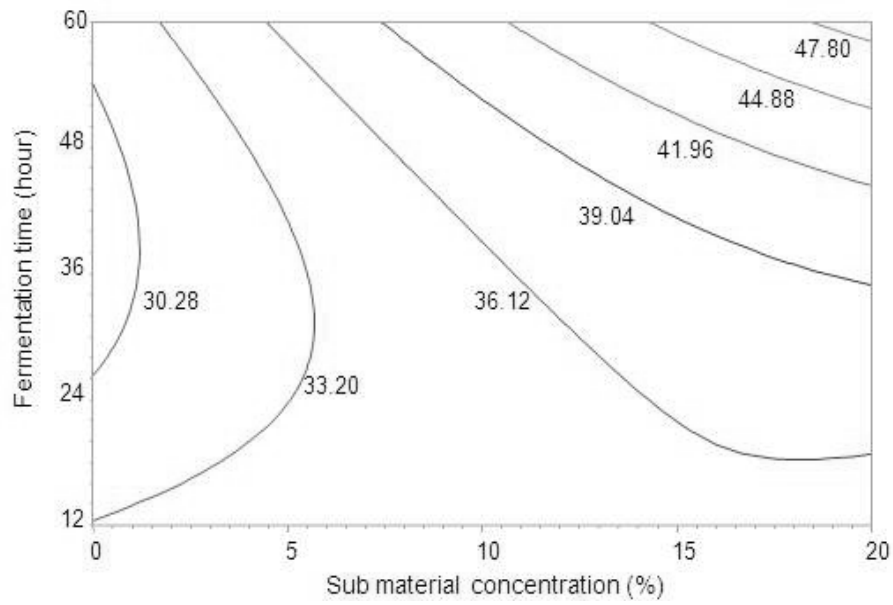


Fig. 1-22. Contour map(top) and response surface(bottom) for DPPH radical scavenging ability of fermented barley sprouts hydrolysate as a fermentation condition of time and sub material concentration.



## (2) 최적 발효조건 예측

새싹보리의 최적 발효조건을 설정하기 위하여 발효적 특성, 유기산 함량 및 유용성분 함량을 모두 만족시켜주는 최적 발효조건을 얻고자 각 반응표면을 superimposing하여 Fig. 1-23의 겹쳐진 부분으로써 Table 1-30에 최적 발효조건을 나타내었다. 새싹보리의 최적 발효조건 범위는 발효시간 44 ~ 52시간 및 부원료 농도 11 ~ 18%로 나타났다.

따라서 이와 같은 예측 결과에 대한 모델식의 신뢰성을 확인하기 위하여 예측된 최적 조건 범위 내에서 임의의 조건 즉, 발효시간 44시간 및 부원료 농도 15%을 대입하여 실제 유산발효를 실시하고, 새싹보리 발효물의 발효적 특성, 유기산 함량 및 유용성분 함량을 측정하여 예측된 값들과 유사한 수준으로 비교되었다(Table 1-31).

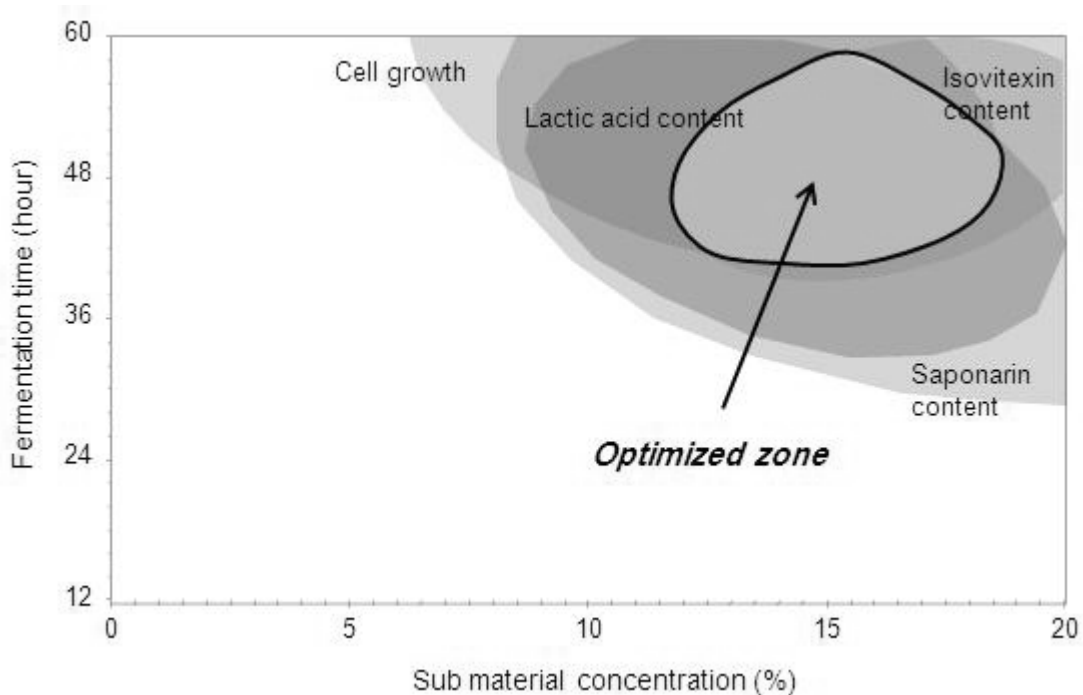


Fig 1-23. Superimposed contour map for the optimization of cell growth, saponarin, isovitexin and lactic acid content as function of fermentation time and sub material concentration of fermented barley sprouts hydrolysate

Table 1-30. The optimum fermentation condition of fermented barley sprouts hydrolysate by superimposed response surface

Fermentation conditions	Range of predicted condition
Fermentation time (hour)	44 ~ 52
Sub material concentration (%)	11 ~ 18

Table 1-31. Comparison between predicted and observed condition for physicochemical qualities of fermented barley sprouts hydrolysate

Physicochemical qualities		Predicted condition(A) <sup>1)</sup>	Observed condition(B) <sup>2)</sup>	B/A × 100(%)
Cell growth (O.D. 600 nm)		1.733	1.758	101.44
pH		3.24	3.36	103.70
Acidity (%)		1.08	1.11	102.77
Functional components content (µg/mL)	Saponarin	33.72	32.38	96.03
	Isovitexin	2.87	2.35	82.45
	Oxalic acid	22.59	21.29	94.24
	Citric acid	106.87	49.58	42.64
	Malic acid	21.86	18.34	83.89
Organic acid content (mg/100 mL)	Lactic acid	957.29	929.58	97.12
	Acetic acid	56.15	42.44	75.26
Total phenolics compound content		6.96	6.27	90.08
DPPH radical scavenging ability (%)		40.92	59.42	145.21

<sup>1)</sup>Calculated using the predicted equations for response variables.

<sup>2)</sup>Given optimal condition of independent variables : fermentation time 48 hour and sub material concentration 15%

#### 4. 발효 전 새싹보리와 새싹보리 가수분해물의 이화학적 특성 비교

Table 1-32. Comparison between pre-fermented barley sprouts and barley sprouts hydrolyzate for physicochemical qualities

		Barley sprouts	Barley sprouts hydrolyzate
pH		5.48	5.05
Acidity (%)		0.08	0.15
Functional components content ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	Saponarin	24.95	35.99
	Homoorientin	0.71	0.328
	vitexin	-	2.115
	Isovitexin	1.46	2.496
	Luteolin	-	0.119
Organic acid content (mg/100 mL)	Oxalic acid	38.451	21.40
	Citric acid	10.95	64.31
	Malic acid	-	51.58
	Lactic acid	-	16.75
	Acetic acid	21.92	47.96
Dietary fiber	TDF	0.162	0.174
	SDF	0.101	0.114
	IDF	0.048	0.055
$\beta$ -Glucan (mg/100 mL)		5.5	6.7

## 5. 발효 후 새싹보리와 새싹보리 가수분해물의 이화학적 특성 비교

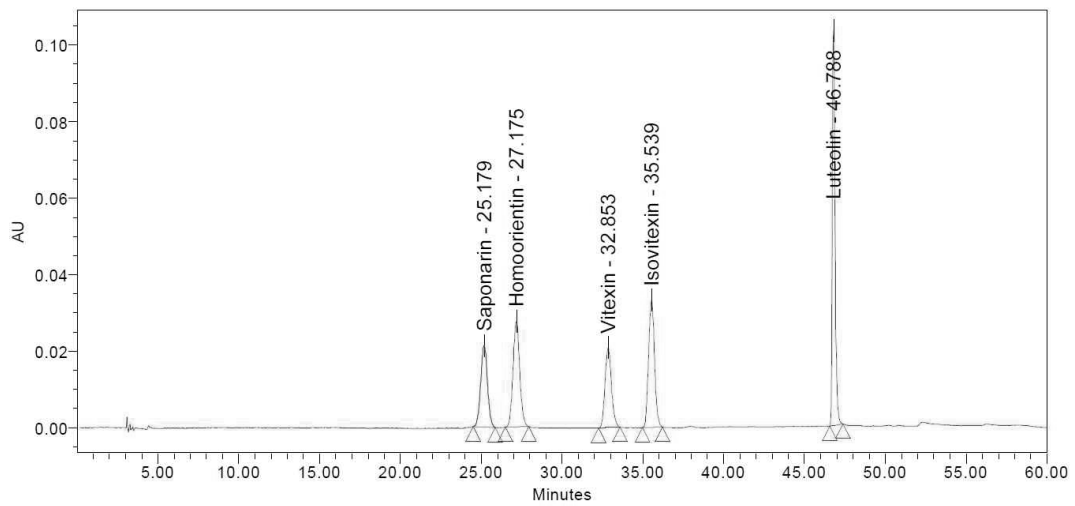
Table 1-33. Comparison between fermented barley sprouts and barley sprouts hydrolyzate and sub material mixture for physicochemical qualities

		Fermented Barley sprouts	Fermented barley sprouts hydrolysate and sub material mixture
pH		3.56	3.36
Acidity (%)		0.23	1.11
Functional components content ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	Saponarin	22.504	38.09
	Homoorientin	0.83	0.38
	vitexin	-	0.17
	Isovitexin	2.19	3.31
	Luteolin	-	0.18
Organic acid content ( $\text{mg}/100 \text{ mL}$ )	Oxalic acid	17.392	21.29
	Citric acid	4.527	49.57
	Malic acid	-	18.33
	Lactic acid	127.198	929.57
	Acetic acid	6.652	42.43
Dietary fiber (%)	TDF	0.188	0.244
	SDF	0.111	0.164
	IDF	0.043	0.074
$\beta$ -Glucan ( $\text{mg}/100 \text{ mL}$ )		6.2	8.7

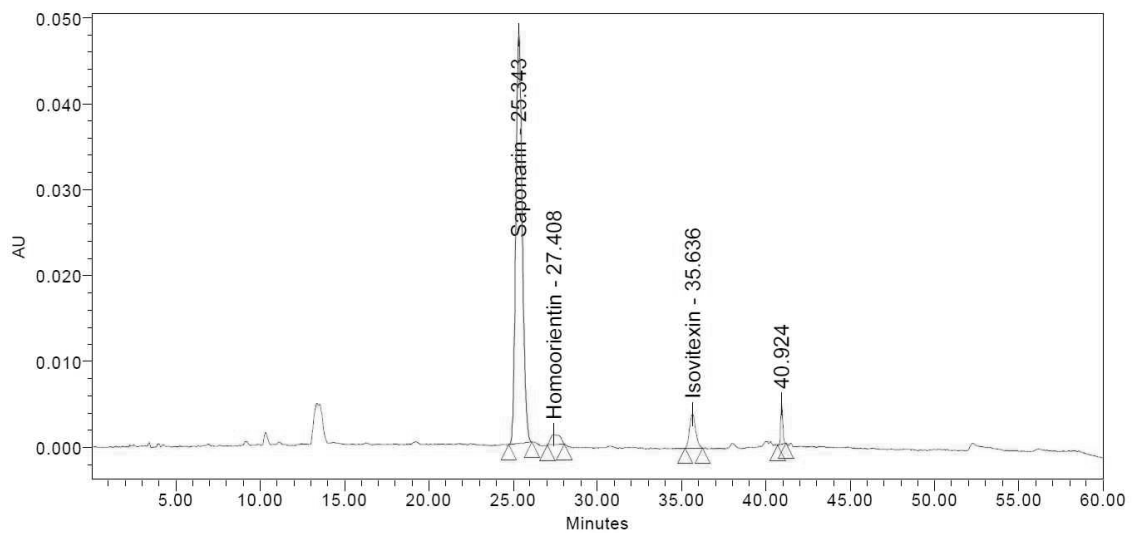
## 6. 새싹보리, 새싹보리 가수분해물, 새싹보리 유산발효물 중 유효성분 분석 크로마토그램

### 가. Standard

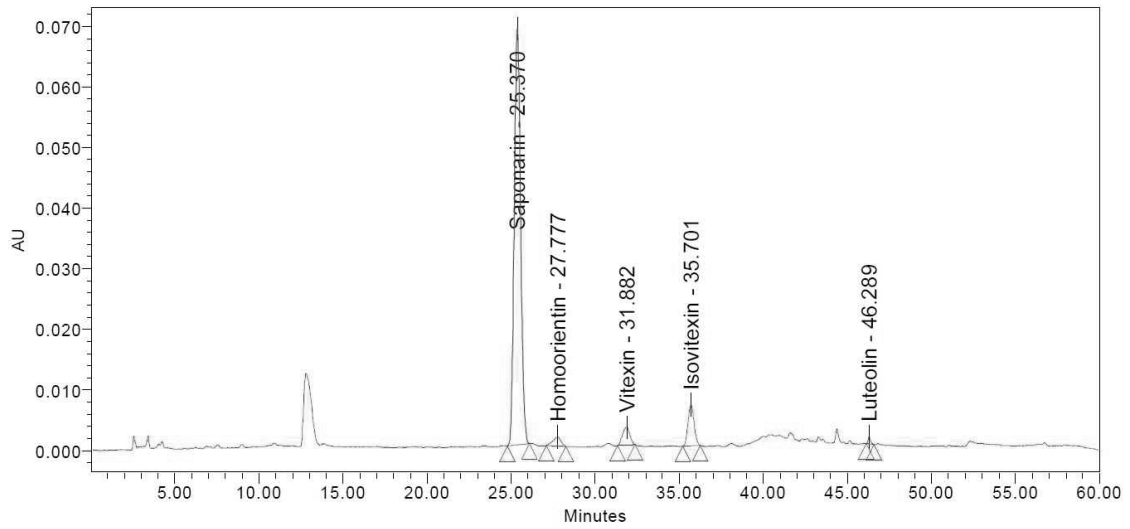
#### (1) Saponarin, Homoorientin, Vitexin, Isovitexin, Luteolin 5종



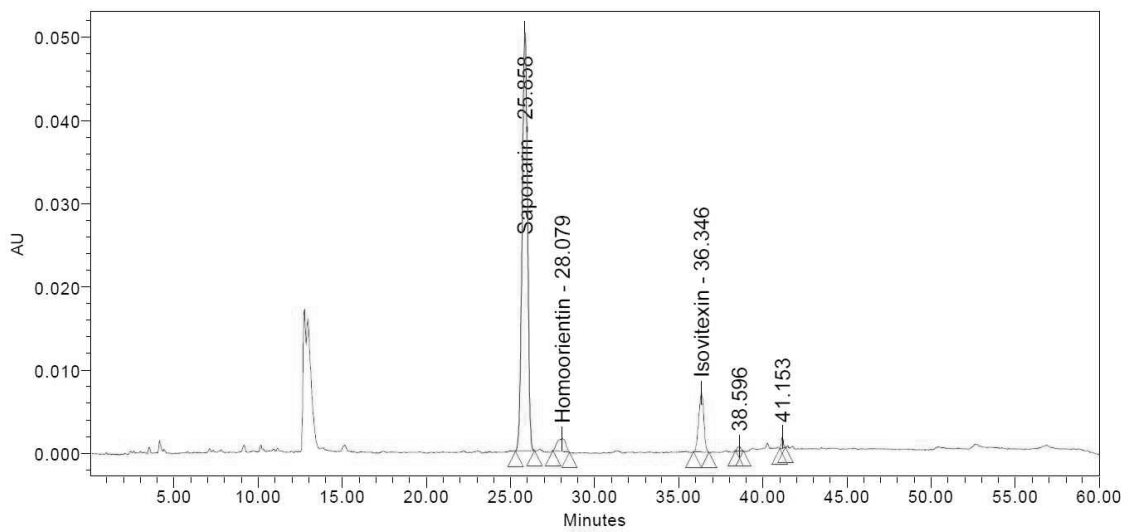
#### (2) 발효 전 새싹보리



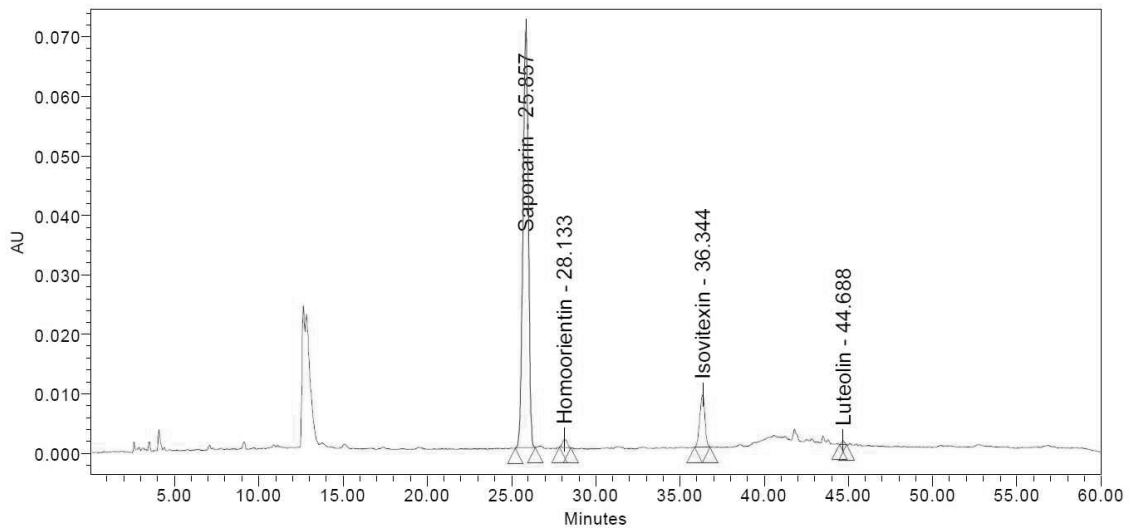
### (3) 발효 전 새싹보리 가수분해물



### (4) 발효 새싹보리



(5) 발효 새싹보리 가수분해물



(6) 최적발효조건 발효물

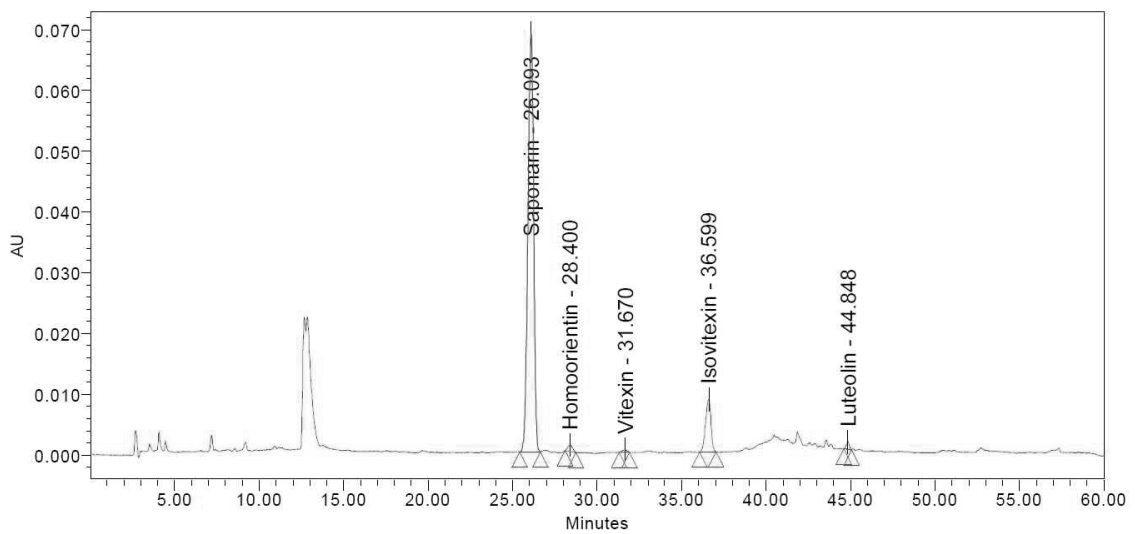
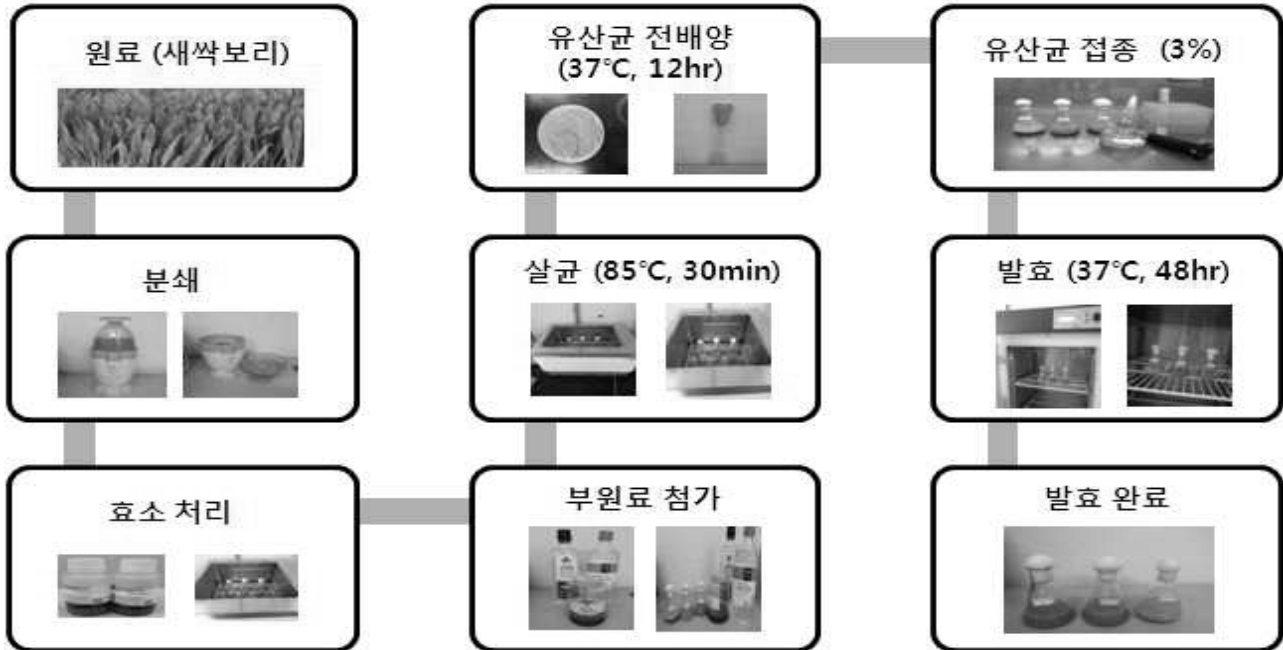


Fig 1-24. Chromatogram for saponarin, homoorientin, vitexin, isovitexin, luteolin content as effective Ingredient of barley sprouts hydrolysate and fermented barley sprouts hydrolysate

## 7. 새싹보리 발효물을 활용한 음료 제조

### 가. 음료 소재화를 위한 처리 공정도





## 나. 음료 배합비 결정

새싹보리 식물성 유산발효물을 이용한 음료의 배합비율은 Table 1-34와 같다.

Table 1-34. Formula for preparation of beverage added lactic acid fermented barley sprouts hydrolysate

### 1) Beverage A

Ingredients	Mixing ratio (% v/v)
Fermented barley sprouts hydrolysate	25
Oligosaccharide	5
Citrus fruits concentration	10
Persimmon concentrate	5
Refined water	55
Total	100

### 2) Beverage B

Ingredients	Mixing ratio (% v/v)
Fermented barley sprouts hydrolysate	30
Oligosaccharide	5
Citrus fruits concentration	5
Persimmon concentrate	2
Dietary fiber	1
Citric acid	0.1
Vitamin C	0.05
Refined water	56.85
Total	100

## 다. 제조공정도

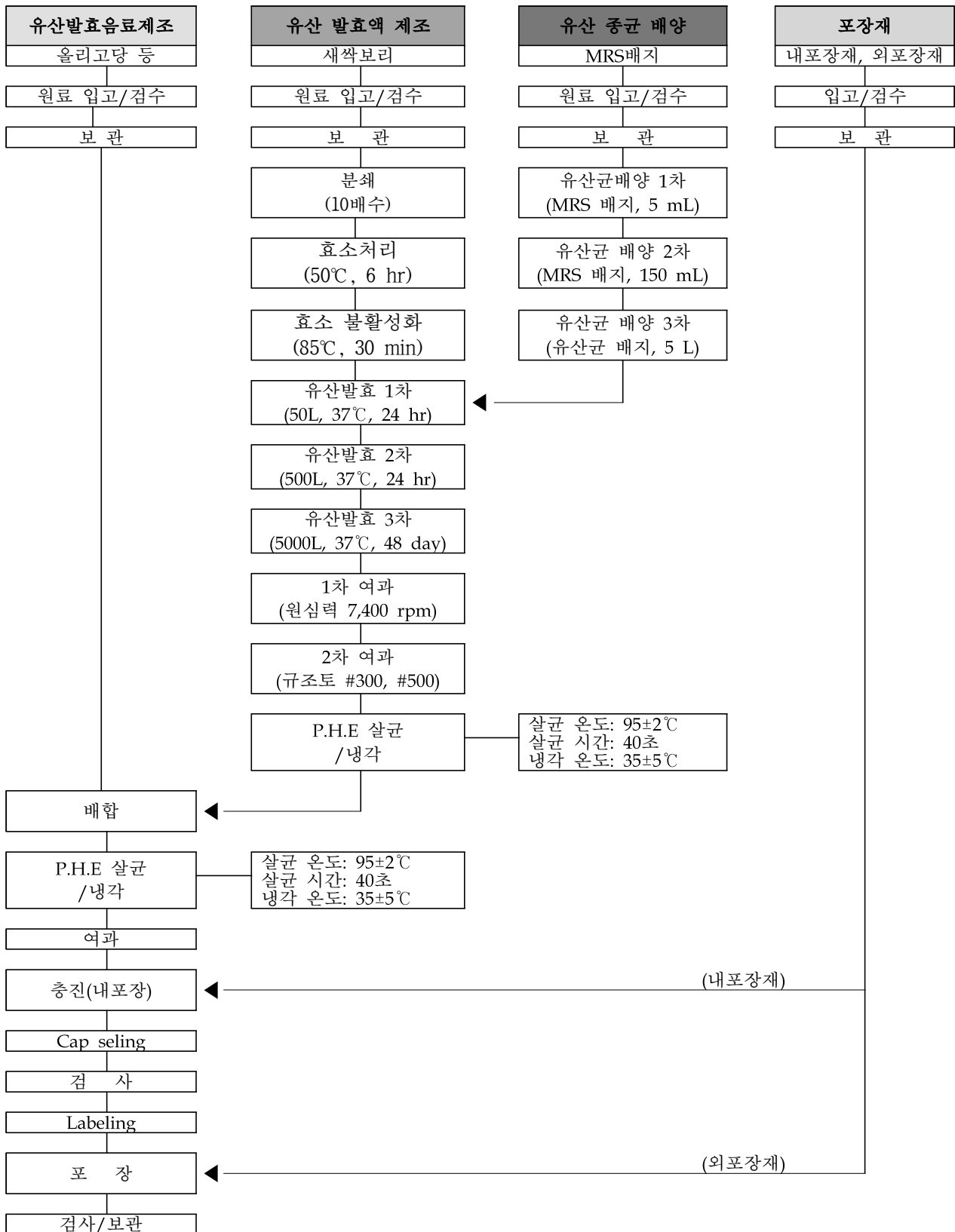
새싹보리 유산발효물을 이용한 음료제조 공정도는 Fig. 1-25와 같다. 그림과 같은 9단계의 공정도를 거친 음료는 pH, 당도, 산도 등의 여러 가지 검수 후 적합한 제품에 한하여 완제품으로 출하될 수 있다.



1. 원료 검사 : 모든 원료는 식품 및 식품첨가물공전 규격에 적합한 원료만을 검수하여 사용
2. 배합 : 원료를 정제수와 같이 비율에 따라 배합
3. 교반 : 원료를 60℃에서 20분 교반 및 용해 후 산도, 당도 등 검사
4. HTST 살균 : 배합된 액을 90℃에서 30초간 순간 살균
5. 여과 : 부직포 여과 및 0.5 마이크론 여과기 통과
6. 주입 : 살균 및 여과된 액을 100 mL / 550 mL 용기에 충전
7. 봉인 : 용기에 캡을 덮고 자동실링기로 봉인
8. 살균/냉각 : 90℃에서 15분간 살균 후 40℃가 되도록 냉각
9. 포장 : 상표 부착 및 상자 포장

Fig. 1-25. Flowchart of beverages using lactic acid fermented barley sprouts hydrolysate

## 라. 음료 제조공정도



## 8. 시제품 제조

새싹보리 식물성 유산발효물을 이용한 음료의 배합비율 및 제조공정도에 준하여 음료 시제품을 생산하였으며 Fig. 1-26와 같다.



시제품

Fig. 1-26. Photograph of beverages using lactic acid fermented barley sprouts hydrolysate

## 가. 음료의 품질 특성

음료의 품질 특성은 Table 1-35에 나타내었다.

Table 1-35. Physicochemical properties of beverages

Physicochemical property	Beverage A	Beverage B	
pH	3.38	3.17	
Sugar content (°Brix)	12.4	9.8	
Acidity (%)	0.56	0.61	
Hunter' s color	L(lightness)	11.30	28.20
	a(redness)	7.42	7.94
	b(yellowness)	19.31	41.95
Saponarin content ( $\mu\text{g/mL}$ )	8.93	10.05	
Organic acid content (mg/100 mL)	Oxalic acid	5.13	6.10
	Citric acid	225.37	207.30
	Succinic acid	80.77	36.20
	Lactic acid	250.77	289.16
	Acetic acid	17.26	13.95

## 9. Pilot 및 plant scale 적용시험





### 제 3 절. 2차 년도 연구수행 내용 및 결과

#### 1. 자체 소비자 관능검사

(협동연구기관 : 대구대학교 산학협력단)

##### 가. 연구 수행 방법

###### (1) 실험재료

새싹보리 발효물과 천연원료(과즙 농축액)을 활용하여 어린이가 선호하며, 부모가 안전을 인정하는 제품으로 3有(맛, 영양, 기능)와 5無(무농약, 무설탕, 무첨가물, 무색소, 무방부제)의 concept으로 새싹보리발효음료 4종을 제조하여 소비자 관능검사를 실시하였다. 새싹보리 발효액 단독으로 제조한 음료의 경우 맛과 향 측면에서 음용하기 어려운 점이 있어 이를 개선하기 위해 맛을 상승시키며, 냄새에 대한 masking을 위해 새싹보리 발효물의 농도를 달리하고, 천연물질을 부재료로 첨가하여 음료를 제조하였다. 각 시료는 Table 2-1과 같이 레시피와 3자리 난수표로 샘플표시를 부여하였다.

Table 2-1. Formula for preparation of beverage added lactic acid fermented barley sprout

527		974		425		840	
재료	배합비 (%)	재료	배합비 (%)	재료	배합비 (%)	재료	배합비 (%)
새싹보리 발효물	25	새싹보리 발효물	50	새싹보리 발효물	25	새싹보리 발효물	25
프락토 올리고당	2.5	프락토 올리고당	3	프락토 올리고당	5.0	프락토 올리고당	5.0
과인애플 농축액	5	혼합과일 농축액	3	당근 농축액	7.0	당근 농축액	7.0
배농축액	5	배 농축액	2	사과 농축액	5.0	사과 농축액	5.0
혼합과일 농축액	2.5	정제수	42	단호박 농축액	3.0	감귤 농축액	3.0
정제수	60			망고 농축액	3.0	망고 농축액	3.0
				정제수	52	정제수	52
합계	100	합계	100	합계	100	합계	100



(2) 새싹보리발효음료 제조공정

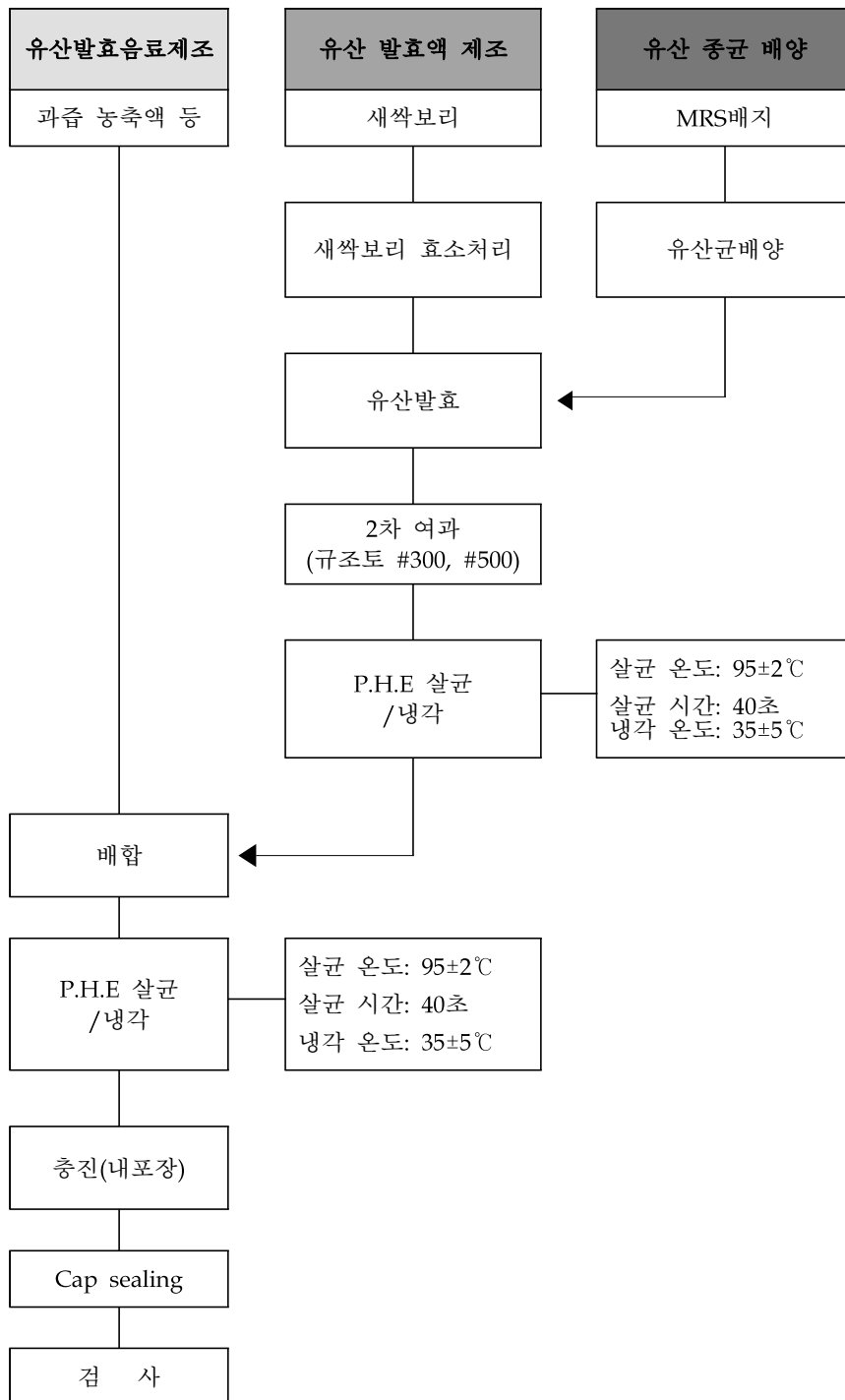


Fig. 2-1. Manufacturing method

### (3) 관능검사 패널 선정

관능검사원은 대구대학교 식품공학과 학부생과 대학원생 23명을 선정하였다. 실험자의 연령대는 20대로 남성 8명(34.78%), 여성 15명(65.22%)으로 구성하여 진행하였다. 관능검사 요원은 관능검사의 경험이 있고 색, 향, 맛 등을 평가하는데 지장이 없으며, 언어의 이해에 제한이 없는 참가자를 대상으로 하였다.

### (4) 시료 준비 및 제시

각각의 음료의 시료는 코드화 시킨 3자리 난수표로 평가를 진행하였으며, 투명하여 시료의 색을 잘 관찰할 수 있는 플라스틱 컵에 50 mL의 음료시료를 담아 관능검사 요원에게 즉시 제시하였다. 각각의 시료 평가 시 입안을 헹구기 위하여 생수를 제공하여, 시료는 왼쪽에서 오른쪽 순서로 평가하도록 하였다. 관능검사 패널들은 실험을 검사를 실시하기 1시간 전부터 자극적인 음식물의 섭취와 화장품의 사용 및 흡연을 자제하도록 하였다.

### (5) 관능검사 방법

새싹보리발효음료의 관능적 품질 평가는 기호도 검사로 진행하였다. 식품공학을 전공하는 패널 요원 23명을 대상으로 시험의 목적과 평가 방법을 주지시킨 뒤 실시하였다. 색(color), 향(flavor), 전체적인 맛(taste), 기호도(overall quality) 항목에 대하여 9점 척도(1:extremely dislike, 5:dislike & like, 9:extremely like)를 이용하여 평가하였다.

### (6) 통계처리

연구결과 얻어진 자료를 SPSS (statistical package for social science, version 17.0) 통계 프로그램을 사용하여 하위그룹 각각의 기술 통계치(mean, SD)를 산출하였다. 집단간의 차이를 알아보기 위해 일원변량분석(one-way ANOVA)를 이용하여 분석하였고, 사후검증은 Duncan's multiple range test로  $P < 0.05$  수준에서 검증하였다.

## 나. 연구수행 결과

### (1) 새싹보리발효음료의 시료별 기호도 조사

새싹보리발효물을 바탕으로 4종의 새싹보리발효음료를 제조하였다. 새싹보리 발효음료는 변비개선을 위한 어린이용 음료로 관능성과 기호도를 향상시키기 위해 새싹보리발효물의 농도와 천연물을 부원료로 사용하여 음료를 제작 후 관능 평가를 실시하였다. 각 시료별 기호도 조사는 Table 2-2에 나타내었다. 시료별 관능적 특성은 9점 척도로 1점(대단히 싫다)에서 5점(좋지도 싫지도 않다)으로, 9점(대단히 좋다)까지 선택할 수 있도록 제시하였다. 4종의 새싹보리발효음료에서 향, 맛, 전반적인 기호도는 유의적인 차이를 나타내었으나, 색에 있어서는 유의적인 차이가 없는 것으로 나타났다. 색(Color)에서 4종의 시료가 5.55 ~ 6.06으로 시료 간에 유의적인 차이가 없이 유사한 값을 보였다. 그 중에서 527 시료의 기호도가 5.48로 가장 낮았고, 974 시료의 기호도가 6.00으로 가장 높았다. 향(Flavor)의 항목에서는 425>527>840>974 순으로 기호도가 높았으며, 425 시료의 기호도가 6.22로 나머지 3종의 시료보다 유의적으로 가장 높은 값을 나타내었다. 관능 패널 응답에서 427 시료의 경우 달콤한 향과 새콤한 향이 좋고 향의 조화가 적당하다는 패널의 의견이 나타났다. 맛(Taste)에서 4종의 시료가 4.17 ~ 6.39로 시료간의 차이를 보였다. 그 중에 425 시료의 기호도가 6.39로 가장 높았고, 974 시료의 기호도가 4.17로 가장 낮았다. 974 시료의 경우 신맛과 쓴맛 강하다는 부정적인 의견이 나타났고, 425 시료의 경우 부드러운 맛과 부드러운 목넘김 등의 긍정적인 의견이 나타났다. 전반적인 기호도(Overall quality) 항목에서는 시료간의 유의적인 차이를 보였는데( $P<0.01$ ) 425 시료에서 가장 높은 기호도를 보였으며, 527 > 840 > 974 순으로 나타났다. 4종의 새싹보리발효음료 중 425 시료가 관능적으로 가장 우수한 결과를 나타내었다. 이상의 관능평가 결과를 볼 때, 새싹보리발효음료의 경우 새싹보리발효물의 농도를 25%로 하여 신맛과 쓴맛을 줄이고, 변비에 도움을 주는 과즙 및 야채농축액을 첨가하여 달콤하고 새콤한 음료 개발이 필요할 것으로 생각된다.

Table 2-2. Sensory preference scores<sup>1)</sup> for the beverage added lactic acid fermented barley sprout

	527	974	425	840	F -value
<b>Color</b>	5.48 ± 1.81 <sup>2)a3)</sup>	6.00 ± 1.93 <sup>a</sup>	5.57 ± 2.06 <sup>a</sup>	5.52 ± 2.06 <sup>a</sup>	0.20 <sup>NS4)</sup>
<b>Flavor</b>	5.70 ± 1.87 <sup>a</sup>	4.91 ± 1.56 <sup>b</sup>	6.22 ± 1.59 <sup>a</sup>	5.13 ± 1.39 <sup>a</sup>	2.53 <sup>*</sup>
<b>Taste</b>	5.33 ± 1.85 <sup>ba</sup>	4.17 ± 1.64 <sup>b</sup>	6.39 ± 1.62 <sup>a</sup>	4.70 ± 1.58 <sup>a</sup>	3.18 <sup>**</sup>
<b>Overall quality</b>	6.09 ± 2.02 <sup>ba</sup>	4.70 ± 1.79 <sup>b</sup>	7.04 ± 1.52 <sup>a</sup>	5.17 ± 1.44 <sup>b</sup>	4.56 <sup>**</sup>

<sup>1)</sup>9-point facial hedonic scale (1:extremely dislike, 5:dislike & like, 9:extremely like)

<sup>2)</sup>Mean ± S.D.

<sup>3)</sup>Means within a column not sharing a superscript letter are significantly different ( $P < 0.05$ , Duncan's multiple range test)

<sup>4)</sup>\*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$ , <sup>NS</sup>:Not Significant

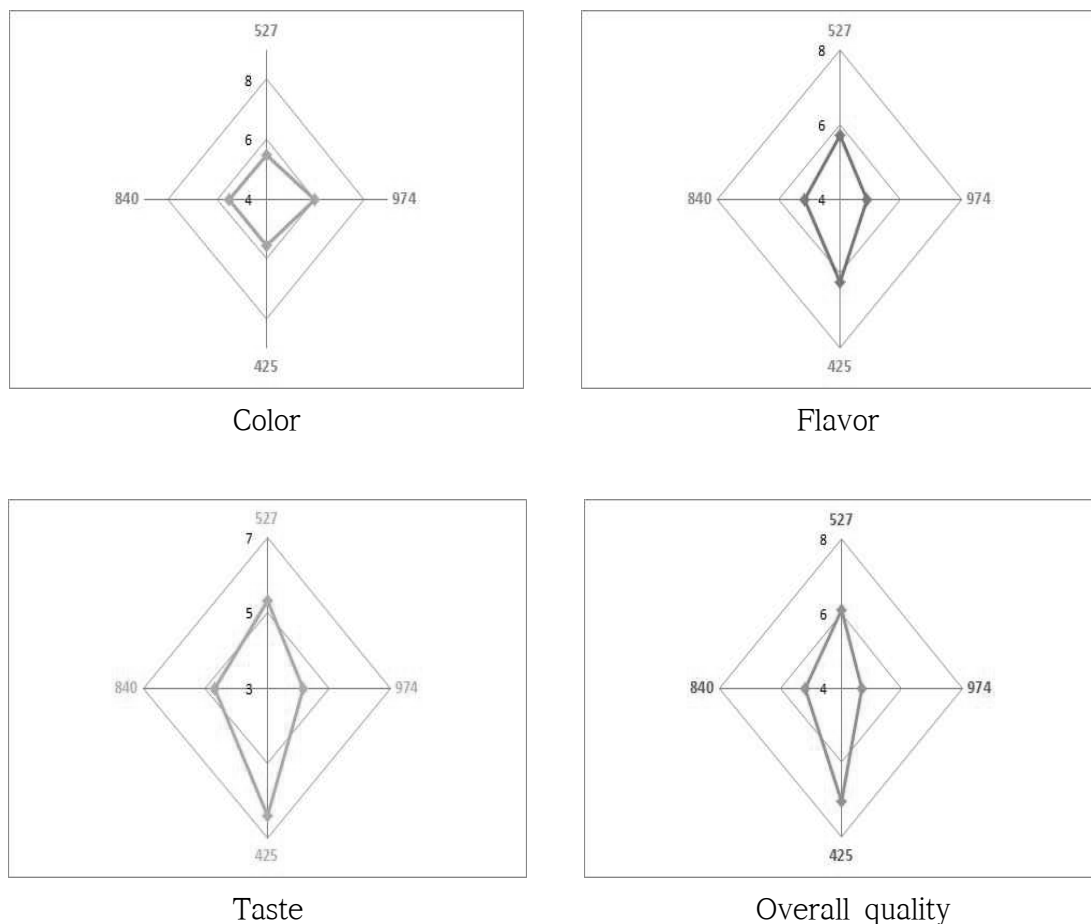


Fig. 2-2. Sensory preference scores for the beverage added lactic acid fermented barley sprout

## 2. 신뢰성 확보를 위한 공인기관을 통한 소비자 기호도 조사

(협동연구기관 : 대구대학교 산학협력단)

### 가. 실험결과보고서

Lab. of Industry  
식품환경연구센터  
www.industry-lab.co.kr

귀사의 실험실이 되어 드리겠습니다. (We will be your laboratory)

## 시험결과 보고서

### Test Report

1. 시험의뢰 번호(Document No.)	FERC-2018-717	
2. 의뢰자	업체명(Client)	(주)프레쉬벨
	업체주소 (Client address)	경상북도 경산시 진량읍 대구대로 201 CTL 1203B
	의뢰일자 (Request date)	2018년 08월 27일
	검사기간(Test period)	2018년 08월 27일 ~ 2018년 09월 4일
	결과서 발급일 (Report Date)	2018년 09월 11일
3. 시험검사결과서 용도 (Purpose)	결과보고	
4. 시료명(Sample)	영유아용 새싹보리음료의 소비자 기호도검사	
5. 시험방법(Test Method)	9점 척도법	
6. 패널수(Number of panels)	50명	
7. 패널의 연령대(Panel age)	영유아, 유년기 자녀를 둔 20~40대 여성	

### 8. 실험 목적(Purpose of experiment)

본 검사는 (주)프레쉬벨에서 개발한 새싹보리를 이용한 음료제품 5종을 비교하여 소비자 기호도를 알아보기 위하여 실시하였다.

### 9. 시료 및 검사지(Sample & Questionnaire)

#### 1) 실험재료

본 검사에 사용된 샘플은 (주)프레쉬벨에서 개발한 새싹보리를 이용한 음료 5종을 사용하였다.

## 2) 실험방법

본 검사에 참여한 20~40대 여성패널 50명은 주식회사 식품환경연구센터에서 모집하였으며, 관능검사 이전에 평가 방법에 대하여 교육한 후 10명 씩 관능검사 부스에서 평가를 실시하였다.

관능검사에 사용한 제품은 아래의 [그림 1]과 같으며, 검사 제품은 [그림 2]와 같이 제공하였다. 모든 제품은 세 자리 난수표를 이용하여 표기하였으며, 검사지는 [그림 3], [그림 4]와 같다.

## 8. 실험 목적(Purpose of experiment)

본 검사는 (주)프레쉬벨에서 개발한 새싹보리를 이용한 음료제품 5종을 비교하여 소비자 기호도를 알아보기 위하여 실시하였다.

## 9. 시료 및 검사지(Sample & Questionnaire)

### 1) 실험재료

본 검사에 사용된 샘플은 (주)프레쉬벨에서 개발한 새싹보리를 이용한 음료 5종을 사용하였다.

### 2) 실험방법

본 검사에 참여한 20~40대 여성패널 50명은 주식회사 식품환경연구센터에서 모집하였으며, 관능검사 이전에 평가 방법에 대하여 교육한 후 10명 씩 관능검사 부스에서 평가를 실시하였다.

관능검사에 사용한 제품은 아래의 [그림 1]과 같으며, 검사 제품은 [그림 2]와 같이 제공하였다. 모든 제품은 세 자리 난수표를 이용하여 표기하였으며, 검사지는 [그림 3], [그림 4]와 같다.



개발제품 A (974번)



개발제품 B (536번)



개발제품 C (729번)



개발제품 D (286번)



개발제품 E (385번)

[그림 1] 관능검사 시료



[그림 2] 관능검사 시료 제공

관능검사는 9점 척도법을 사용하여 진행하였다.

9점 평점법의 기호도는 1점 ‘대단히 싫다’, 2점 ‘매우 싫다’, 3점 ‘보통으로 싫다’, 4점 ‘약간 싫다’, 5점 ‘좋지도 싫지도 않다’, 6점 ‘약간 좋다’, 7점 ‘보통으로 좋다’, 8점 ‘매우 좋다’, 9점 ‘대단히 좋다’로 평가하였다.

음료 5종의 기호도 평가 속성은 ‘색감’, ‘향’, ‘단맛’, ‘신맛’, ‘맛’, ‘목넘김’, ‘전체적인 기호도’에 대하여 검사하였다.

정도는 1점 ‘대단히 연하(약하/부드럽)다’, 2점 ‘매우 연하(약하/부드럽)다’, 3점 ‘보통으로 연하(약하/부드럽)다’, 4점 ‘약간 연하(약하/부드럽)다’, 5점 ‘연하(약하/부드럽)지도 진하(강하/거칠)지도 않다’, 6점 ‘약간 진하(강하/거칠)다’, 7점 ‘보통으로 진하(강하/거칠)다’, 8점 ‘매우 진하(강하/거칠)다’, 9점 ‘대단히 진하(강하/거칠)다’로 평가하였다.

음료 5종의 정도 평가속성은 ‘색감’, ‘향’, ‘단맛’, ‘신맛’, ‘맛’, ‘목넘김’에 대하여 검사하였다.

검사 중 패널간의 소통을 금하게 하여 객관적인 평가를 할 수 있도록 하였으며, 충분한 시간 동안 시료를 평가할 수 있게 하였다.



## 관능검사 검사지

본 검사는 **유아용 음료의** 관능검사 입니다.  
다음의 검사 방법을 숙지 하신 후 검사에 임하여 주십시오.  
**5가지** 제품이며, 각 속성을 성의 있게 검사하여 주시기 바랍니다.

### 1. 제품소개

본 제품은 유아 및 어린이를 대상으로 개발한 음료제품입니다.

### 2. 검사목적

본 검사는 5가지 음료제품을 9점 척도법으로 각 속성별 소비자의 기호도, 정도와 전체적인 기호도를 알아보기 위함입니다.

### 3. 검사 항목

기호도 : 색감, 향, 단맛, 신맛, 맛, 목넘김

정 도 : 색감, 향, 단맛, 신맛, 맛, 목넘김

전체적인 기호도

### Q1. 응답자 분류 질문

이름 : \_\_\_\_\_

성별		연령		
1) 남 ( )	2) 여 ( )	20대 ( )	30대 ( )	40대 ( )

[그림 3] 영유아용 새싹보리음료 5종의 관능검사 검사지 - 1

## Q2. 관능검사

점 수 (기호도)								
1점	2점	3점	4점	5점	6점	7점	8점	9점
대단히 싫다	매우 싫다	보통으로 싫다	약간 싫다	좋지도 싫지도 않다	약간 좋다	보통으로 좋다	매우 좋다	대단히 좋다

기호도 항목	설명	시료번호				
		974	536	729	286	385
색감	제품에서 느껴지는 색감의 기호도는 어떤가요?					
향	제품에서 느껴지는 향의 기호도는 어떤가요?					
단맛	제품에서 느껴지는 단맛의 기호도는 어떤가요?					
신맛	제품에서 느껴지는 신맛의 기호도는 어떤가요?					
맛	제품에서 느껴지는 맛의 기호도는 어떤가요?					
목넘김	제품에서 느껴지는 목넘김의 기호도는 어떤가요?					
전체적인 기호도	제품의 전체적인 기호도를 평가해 주세요.					

번호	점 수 (정도)								
	1점	2점	3점	4점	5점	6점	7점	8점	9점
1	대단히 연하다	매우 연하다	보통으로 연하다	약간 연하다	연하지도 진하지도 않다	약간 진하다	보통으로 진하다	매우 진하다	대단히 진하다
2	대단히 약하다	매우 약하다	보통으로 약하다	약간 약하다	약하지도 강하지도 않다	약간 강하다	보통으로 강하다	매우 강하다	대단히 강하다
3	대단히 부드럽다	매우 부드럽다	보통으로 부드럽다	약간 부드럽다	부드럽지도 거칠지도 않다	약간 거칠다	보통으로 거칠다	매우 거칠다	대단히 거칠다

척도 적용번호	정도 항목	설명	시료번호				
			974	536	729	286	385
1번	색감	제품에서 느껴지는 색감은 어느 정도인가요?					
2번	향	제품에서 느껴지는 향은 어느 정도인가요?					
2번	단맛	제품에서 느껴지는 단맛은 어느 정도인가요?					
2번	신맛	제품에서 느껴지는 신맛은 어느 정도인가요?					
2번	맛	제품에서 느껴지는 맛은 어느 정도 인가요?					
3번	목넘김	제품에서 느껴지는 목넘김은 어느 정도인가요?					

[그림 4] 영유아용 새싹보리음료 5종의 관능검사 검사지 - 2

10. 결과 및 해석(Results and interpretation)

1) 영유아용 새싹보리음료 5종의 관능검사 유의차 분석

[표 1] 영유아용 새싹보리음료 5종의 기호도 유의차 분석

특성		샘플번호 <sup>1)</sup>				
		974	536	729	286	385
기 호 도	색감	6.06±1.35 <sup>a</sup>	5.88±1.30 <sup>a</sup>	6.30±1.49 <sup>a</sup>	6.28±1.53 <sup>a</sup>	3.74±1.55 <sup>b</sup>
	향	5.88±1.32 <sup>a</sup>	5.04±1.50 <sup>b</sup>	6.00±1.41 <sup>a</sup>	5.82±1.34 <sup>a</sup>	3.72±1.31 <sup>c</sup>
	단맛	5.40±1.44 <sup>b</sup>	3.66±1.33 <sup>c</sup>	6.24±1.38 <sup>a</sup>	6.20±1.34 <sup>a</sup>	4.04±1.44 <sup>c</sup>
	신맛	5.14±1.47 <sup>b</sup>	3.24±1.32 <sup>d</sup>	5.74±1.10 <sup>a</sup>	6.14±1.40 <sup>a</sup>	4.10±1.79 <sup>c</sup>
	맛	5.16±1.50 <sup>b</sup>	3.58±1.31 <sup>c</sup>	6.16±1.57 <sup>a</sup>	6.24±1.38 <sup>a</sup>	3.50±1.74 <sup>c</sup>
	목넘김	5.66±1.72 <sup>a</sup>	4.36±1.74 <sup>b</sup>	6.16±1.45 <sup>a</sup>	6.28±1.46 <sup>a</sup>	3.36±1.54 <sup>c</sup>
전체적인 기호도		5.38±1.44 <sup>b</sup>	3.66±1.10 <sup>c</sup>	6.24±1.29 <sup>a</sup>	6.46±1.45 <sup>a</sup>	3.28±1.51 <sup>c</sup>

샘플번호<sup>1)</sup>

974 : 개발제품 A, 536 : 개발제품 B, 729 : 개발제품 C, 286 : 개발제품 D, 385 : 개발제품 E

\* 값 : 평균±표준편차, n=50

● 유의적 확률 : 확률값 p가 0.05보다 작을 때 유의적 차이가 있음.

● PASWStatistics18 program을 이용하여 일원배치 분산분석 후 Duncan의 사후검정을 실시하였으며, 신뢰수준 95%로 나타냄. (p<0.05)

[표 1]은 영유아, 유년기 자녀를 둔 20~40대 여성패널 50명을 대상으로 새싹보리를 이용한 음료 5종의 기호도를 나타낸 결과이다.

다섯 가지 제품의 유의차 검증은 PASW Statistics18 program을 이용하여 일원배치 분산분석 후 Duncan의 사후검정을 실시하였으며, 모든 속성은 95%의 신뢰수준(p<0.05)으로 검증하였다.

색감의 기호도는 974번(개발제품 A), 729번(개발제품 C), 286번(개발제품 D)가 6.06점, 6.30점, 6.28점으로 ‘약간 좋다’ 로 평가 되었으며, 536번(개발제품 B)이 5.88점으로 ‘좋지도 싫지도 않다’, 385번(개발제품 E)이 3.74점으로 ‘보통으로 싫다’ 로 평가되었다. 유의적 확률은 974번, 536번, 729번, 286번이 385번보다 유의적 차이가 있게 좋은 것으로 나타났다.

향의 기호도는 729번이 6.00점으로 ‘약간 좋다’로 평가되었으며, 974번, 536번, 286번이 5.88점, 5.04점, 5.82점으로 ‘좋지도 싫지도 않다’, 385번이 3.72점으로 ‘보통으로 싫다’로 평가되었다. 유의적 확률은 974번, 729번, 286번이 536번, 385번보다 유의적 차이가 있게 좋은 것으로 나타났으며, 536번이 385번보다 유의적 차이가 있게 좋은 것으로 나타났다.

단맛의 기호도는 729번, 286번이 6.24점, 6.20점으로 ‘약간 좋다’로 평가되었으며, 974번이 5.40점으로 ‘좋지도 싫지도 않다’, 385번이 4.04점으로 ‘약간 싫다’, 536번이 3.66점으로 ‘보통으로 싫다’로 평가되었다. 유의적 확률은 729번, 286번이 974번, 536번, 385번보다, 974번이 536번, 385번보다 유의적 차이가 있게 좋은 것으로 나타났으며, 536번, 385번 제품간에는 차이가 없는 것으로 나타났다.

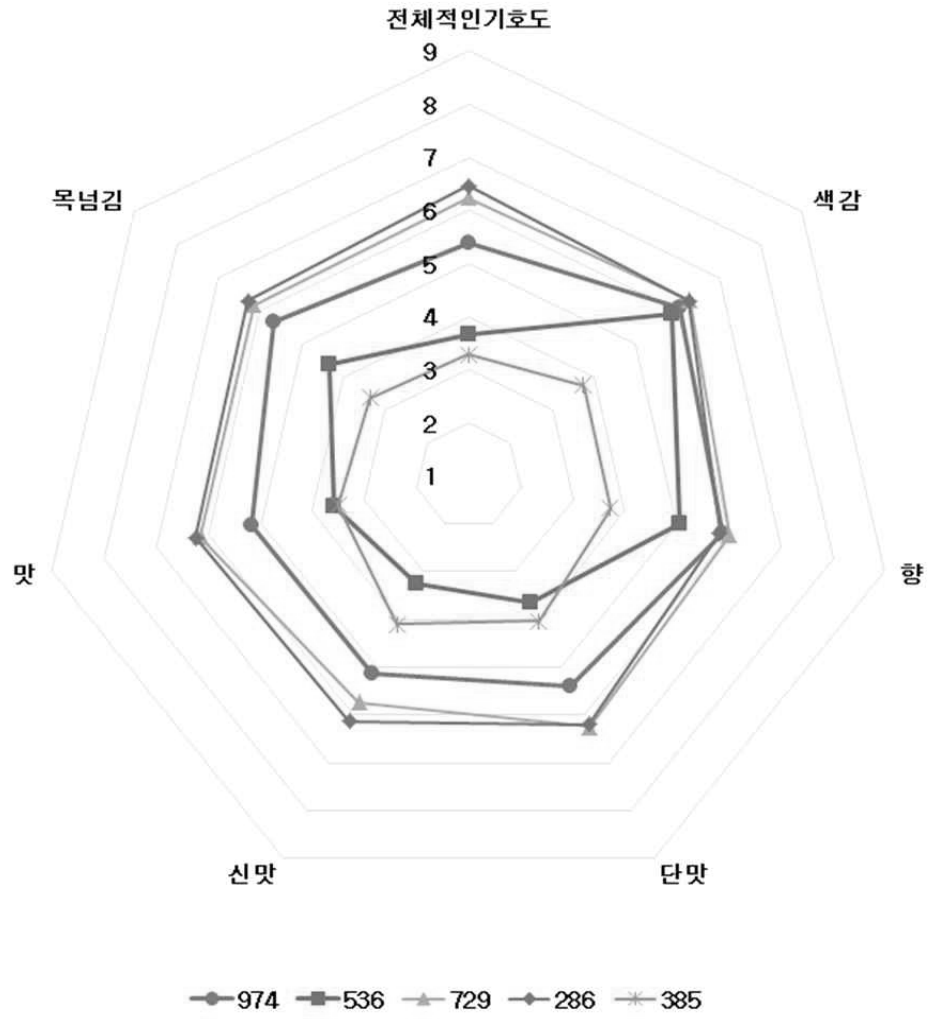
신맛의 기호도는 286번이 6.14점으로 ‘약간 좋다’로 평가되었으며, 974번, 729번이 5.14점, 5.74점으로 ‘좋지도 싫지도 않다’, 385번이 4.10점으로 ‘약간 싫다’, 536번이 3.24점으로 ‘보통으로 싫다’로 평가되었다. 유의적 확률은 729번, 286번이 974번, 536번, 385번보다, 974번이 536번, 385번보다, 385번이 536번보다 유의적 차이가 있게 좋은 것으로 나타났다.

맛의 기호도는 729번, 286번이 6.16점, 6.24점으로 ‘약간 좋다’로 평가되었으며, 974번이 5.16점으로 ‘좋지도 싫지도 않다’, 536번, 385번이 3.58점, 3.50점으로 ‘보통으로 싫다’로 평가되었다. 유의적 확률은 729번, 286번이 974번, 536번, 385번보다 유의적 차이가 있게 좋은 것으로 나타났으며, 974번이 536번, 385번보다 유의적 차이가 있게 좋은 것으로 나타났다. 536번, 385번 제품간에는 차이가 없는 것으로 나타났다.

목넘김의 기호도는 729번, 286번이 6.16점, 6.28점으로 ‘약간 좋다’로 평가되었으며, 974번이 5.66점으로 ‘좋지도 싫지도 않다’, 536번이 4.36점으로 ‘약간 싫다’, 385번이 3.36점으로 ‘보통으로 싫다’로 평가되었다. 유의적 확률은 974번, 729번, 286번이 536번, 385번보다, 536번이 385번보다 유의적 차이가 있게 좋은 것으로 나타났다.

전체적인 기호도는 729번(개발제품 C), 286번(개발제품 D)이 6.24점, 6.46점으로 ‘약간 좋다’로 평가되었으며, 974번(개발제품 A)이 5.38점으로 ‘좋지도 싫지도 않다’, 536번(개발제품 B), 385번(개발제품 E)이 3.66점, 3.28점으로 ‘보통으로 싫다’로 평가되었다. 유의적 확률은 729번, 286번이 974번, 536번, 385번 제품보다, 974번이 536번, 385번 제품보다 유의적 차이가 있게 좋은 것으로 나타났으며, 536번, 385번 제품간에는 차이가 없는 것으로 나타났다.

아래의 [그림 5]는 20~40대 여성 50명을 대상으로 진행한 새싹보리음료 5종의 관능검사 결과 중 각 속성별 기호도를 나타낸 결과 그래프이다.



[그림 5] 영유아용 새싹보리음료 5종의 속성별 기호도 검사 결과

[표 2] 영유아용 새싹보리음료 5종의 정도 유의차 분석

특 성		샘플번호 <sup>1)</sup>				
		974	536	729	286	385
정 도	색감	4.44±1.45 <sup>b</sup>	4.68±1.63 <sup>b</sup>	6.82±1.16 <sup>a</sup>	6.62±1.09 <sup>a</sup>	6.34±1.73 <sup>a</sup>
	향	4.80±1.41 <sup>b</sup>	5.12±1.08 <sup>ab</sup>	5.58±1.42 <sup>a</sup>	5.40±1.50 <sup>ab</sup>	5.24±1.77 <sup>ab</sup>
	단맛	4.94±1.20 <sup>b</sup>	3.26±1.58 <sup>c</sup>	5.94±1.33 <sup>a</sup>	6.28±1.13 <sup>a</sup>	5.16±1.66 <sup>b</sup>
	신맛	5.20±1.25 <sup>b</sup>	6.78±1.47 <sup>a</sup>	4.58±1.57 <sup>b</sup>	4.72±1.71 <sup>b</sup>	4.86±1.54 <sup>b</sup>
	맛	5.28±1.26 <sup>b</sup>	5.56±1.77 <sup>ab</sup>	6.14±1.16 <sup>a</sup>	6.16±1.17 <sup>a</sup>	5.86±1.76 <sup>ab</sup>
	목넘김	4.16±1.33 <sup>b</sup>	4.80±1.68 <sup>b</sup>	4.32±1.80 <sup>b</sup>	4.20±1.63 <sup>b</sup>	6.52±1.63 <sup>a</sup>

샘플번호<sup>1)</sup>

974 : 개발제품 A, 536 : 개발제품 B, 729 : 개발제품 C, 286 : 개발제품 D, 385 : 개발제품 E

\* 값 : 평균±표준편차, n=50

● 유의적 확률 : 확률값 p가 0.05보다 작을 때 유의적 차이가 있음.

● PASWStatistics18 program을 이용하여 일원배치 분산분석 후 Duncan의 사후검정을 실시하였으며, 신뢰수준 95%로 나타냄. (p<0.05)

[표 2]는 영유아, 유년기 자녀를 둔 20~40대 여성패널 50명을 대상으로 새싹보리를 이용한 음료 5종의 정도를 나타낸 결과이다.

다섯 가지 제품의 유의차 검증은 PASW Statistics18 program을 이용하여 일원배치 분산분석 후 Duncan의 사후검정을 실시하였으며, 모든 속성은 95%의 신뢰수준(p<0.05)으로 검증하였다.

색감의 정도는 729번, 286번, 385번이 6.82점, 6.62점, 6.34점으로 ‘약간 진하다’로 평가되었으며, 974번, 536번이 4.44점, 4.68점으로 ‘약간 연하다’로 평가되었다. 유의적 확률은 729번, 286번, 385번이 974번, 536번보다 유의적 차이가 있게 진한 것으로 나타났다.

향의 정도는 536번, 729번, 286번, 385번이 5.12점, 5.58점, 5.40점, 5.24점으로 ‘약하지도 강하지도 않다’로 평가되었으며, 974번이 4.80점으로 ‘약간 약하다’로 평가되었다. 유의적 확률은 729번이 974번 제품보다 유의적 차이가 있게 강한 것으로 나타났다.

단맛의 정도는 286번이 6.28점으로 ‘약간 강하다’로 평가되었으며, 729번, 385번이 5.94점, 5.16점으로 ‘약하지도 강하지도 않다’, 974번이 4.94점을 ‘약간 약하다’, 536번이 3.26점으로 ‘보통으로 약하다’로 평가되었다. 유의적 확률은 729번, 286번이 974번, 536번, 385번 제품보다, 974번, 385번이 536번보다 유의적 차이가 있게 강한 것으로 나타났다.

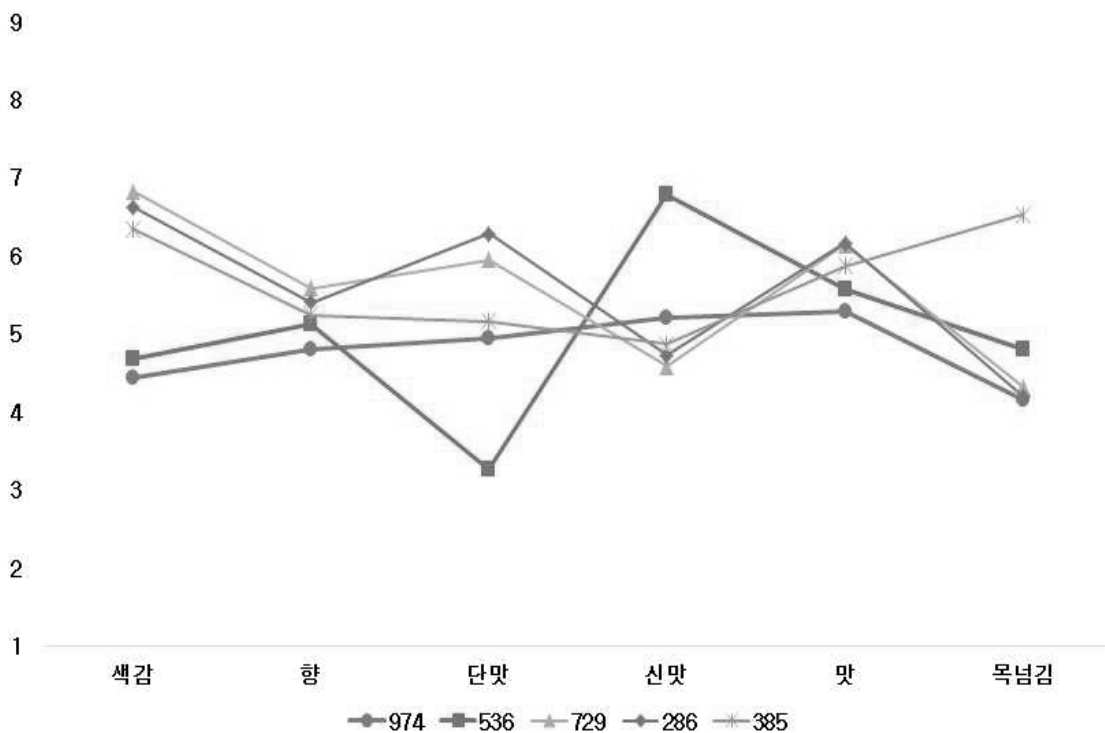
신맛의 정도는 536번이 6.78점으로 ‘약간 강하다’로 평가되었으며, 974번이 5.20점으로

‘약하지도 강하지도 않다’, 729번, 286번, 385번이 4.58점, 4.72점, 4.86점으로 ‘약간 약하다’로 평가되었다. 유의적 확률은 536번이 다른 네 제품보다 유의적 차이가 있게 강한 것으로 나타났으며, 974번, 729번, 286번, 385번 제품간에는 차이가 없는 것으로 나타났다.

맛의 정도는 729번, 286번이 6.14점, 6.16점으로 ‘약간 강하다’로 평가되었으며, 974번, 536번, 385번이 5.28점, 5.56점, 5.86점으로 ‘약하지도 강하지도 않다’로 평가되었다. 유의적 확률은 729번, 286번이 974번 제품보다 유의적 차이가 있게 강한 것으로 나타났다.

목넘김의 정도는 385번 제품이 6.52점으로 ‘약간 거칠다’로 평가되었으며, 974번, 536번, 729번, 286번이 4.16점, 4.80점, 4.32점, 4.20점으로 ‘약간 부드럽다’로 평가되었다. 유의적 확률은 385번이 다른 네 가지 제품보다 유의적 차이가 있게 거친 것으로 나타났으며, 다른 네 제품간에는 차이가 없는 것으로 나타났다.

아래의 [그림 6]은 20~40대 여성 50명을 대상으로 진행한 새싹보리음료 5종의 관능검사 결과 중 각 속성별 정도를 나타낸 결과 그래프이다.



[그림 6] 영유아용 새싹보리음료 5종의 속성별 정도 검사 결과

## 11. 결론 및 제언(Conclusion and suggestion)

본 검사는 (주)프레쉬벨에서 새싹보리를 이용하여 개발한 영유아용 음료제품 5종의 소비자 기호도를 알아보기 위하여 실시하였다.

영유아, 유년기 자녀를 둔 20~40대 주부패널 50명으로 관능검사를 진행한 결과 286번(개발제품 D)이 6.46점, 729번(개발제품 C)이 6.24점으로 ‘약간 좋다’ 로 평가되었으며, 다른 세 제품보다 유의적 차이가 있게 좋은 것으로 나타났다. 974번(개발제품 A)은 5.38점으로 ‘좋지도 싫지도 않다’ 로 평가되었으며, 536번, 385번 제품보다 유의적 차이가 있게 좋은 것으로 나타났다.

974번(개발제품 A)은 색감, 향의 정도는 기호도에 영향을 주지 않는 것으로 판단되나, 단맛, 신맛의 정도는 기호도에 영향을 주는 것으로 판단된다. 729번, 286번 제품보다 단맛이 약하고 신맛이 강한 것으로 평가되어 단맛과 신맛을 개선하면 기호도에 긍정적인 것으로 판단된다.

536번(개발제품 B)은 색감, 향의 기호도는 5.00점 이상으로 평가되었으나, 단맛, 신맛, 맛, 목넘김은 4.00점 이하로 평가되었다. 이는 신맛의 정도가 6.78점으로 ‘약간 강하다’ 로 평가되어 단맛, 맛, 목넘김의 정도에도 영향을 주어 기호도가 낮은 것으로 판단된다.

9점 척도법으로 관능검사를 진행할 시 6.00점 이상을 ‘약간 좋다’ 로 평가한다. 이번에 진행한 영유아용 새싹보리 음료의 경우 729번(개발제품 C), 286번(개발제품 D)이 6.24점, 6.46점으로 평가되어 소비자에게 긍정적인 것으로 판단된다.

<b>확인</b>	<b>(주)식품환경연구센터</b> Director of Food · Enviroment Research Center
<p>1. 이 검사서는 의뢰자가 제시한 시료 및 시료명으로 시험한 결과로서 전체 제품에 대한 품질을 보증하지는 않습니다.</p> <p>2. 이 검사서는 (주)식품환경연구센터의 사전 서면동의 없이 홍보, 선전, 광고 및 소송용으로 사용될 수 없으며, 용도 이외의 사용을 금합니다.</p> <p>3. 시험검사보고서 재발행 요청 시 발급수수료가 부과됩니다.</p>	



### 3. 새싹보리 발효물을 활용한 어린이용 음료의 기능개선

#### - 변비개선 동물실험

(협동연구기관 : 대구대학교 산학협력단)

#### 가. 연구 수행 방법

##### (1) 실험동물의 사육 및 식이

실험동물은 Sprague Dawley계 4주령 수컷 흰쥐 70마리를 효창사이언스(Daegu, Korea)에서 구입하였으며, 일주일 간 일반사료와 물을 자유롭게 섭취할 수 있도록 하여 적응시켰다. 이때 실험실 환경은 온도  $22\pm 1^{\circ}\text{C}$ , 상대습도  $63\pm 5\%$ , 명암은 12시간 주기로 조절하였다. 1주일 간 적응시킨 다음 2주째에 난괴법(randomized block design)에 따라 각 군의 체중이 비슷하도록 각 처리군당 10마리씩 7군으로 나누어 스테인리스 케이지에 3마리씩 분리하여 4주동안 사육하였다.

실험군은 일반식이를 급여하는 정상군(normal)과 일반식이를 급여하고 loperamide로 변비를 유도하는 대조군(control), 상업용 시판음료(kkeung-a)를 투여하면서 loperamide로 변비를 유발하는 양성대조군(PC), 새싹보리추출액을 투여하면서 loperamide로 변비를 유발하는 시험군(S1), 새싹보리가수분해액을 투여하면서 loperamide로 변비를 유발하는 시험군(S2), 새싹보리유산발효액을 투여하면서 loperamide로 변비를 유발하는 시험군(S3), 새싹보리발효음료를 투여하면서 loperamide로 변비를 유발하는 시험군(S4)으로 구성하였다. 본 동물 실험은 대구대학교 동물실험윤리위원회의 승인을 받고 그 규정에 따라 실행하였다.

동물실험 기간은 총 5주로 1주 동안 환경에 적응시킨 뒤 4주 동안 실험을 진행했다. 흰쥐 식이로 공급한 pellet형 고형 사료는 AIN-76A 일반 식이를 사용했다. 정상군과, 대조군은 일반 식이만을 급여했고, S1군 새싹보리추출액을, S2군은 새싹보리가수분해액을, S3군은 새싹보리유산발효액을, S4 시험군은 새싹보리발효음료를 각각 동결건조하여 500 mg/kg을 하루에 한번씩 일정시간에 경구투여하였다. 7개군 중 정상군을 제외한 대조군과 양성대조군, S1, S2, S3, S4 시험군은 loperamide로 변비를 유도시켰다. 실험에 사용한 loperamide는 Sigma(St. Louis, MO, USA) 제품을 사용했다

##### (2) 실험동물 처치

4주(28일) 간 식이섭취 기간이 끝나고, 29일차부터 31일차 까지 3일 동안 변비를 유도시키지 않는 음성대조군은 0.9% 생리식염수만 경구투여(p.o, per oral)했고, 변비를 유도시킬 대조군과 양성대조군, S1, S2, S3, S4 시험군은 loperamide(5 mg/kg)를 0.9 % 생리식염수에 녹인 뒤 하루에 2회씩(오전 9시와 오후 9시) 3일간 경구투여했다(Fig. 2-3). Loperamide는 설사를 치료하는 지사제로 일정 기간 연속해서 투여하면 대장 내 점 액질 분비와 장 운동이 감소해 통과시간이 길어지는 증상이 나타나, 설사를 멈추게 하는 약품이지만, 설사 증상이 없는 정상일 경우에는 변비를 유발한다. 실험 31일차에 장 통과시간을 측정된 뒤 32일차에 모든 군의 실험동물을 ether로 흡입 마취해서 희생했다.

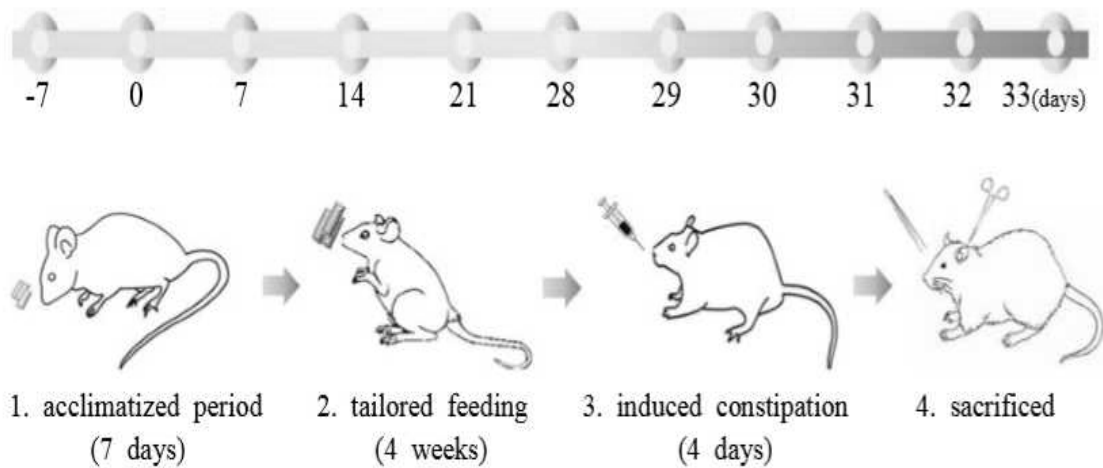


Fig. 2-3. *In vivo* experiment flow

### (3) 체중 및 식이효율 측정

실험식이 첫 급여일을 시작으로 1 주마다 체중을 측정하였고, 변비 유도기간에는 매일 체중을 측정하였다. 실험식은 하루에 한 번 100 g씩 일정 시간에 공급하고 24시간 후 남은 양을 측정하여 식이섭취량을 측정하여 그 차이로 섭취한 식이량을 계산하였다.

### (4) 변 개수, 변 중량, 변 수분함량 측정

변의 개수, 중량 및 수분함량의 측정값은 변비유발 전과 변비유발 기간 두 기간으로 나누어 측정하였다. 각 실험동물의 케이지에 절식판을 설치한 후, 실험시작 당일과 이후 1주마다 총 4회 수거하였으며, 변비기간 중에는 매일 수거하여 변 개수를 세고 무게를 측정하였다. 변의 수분함량은 변을 70°C 드라이오븐에서 24시간 동안 건조시켜 중량을 측정하여 변 중량과 건조 후의 변 중량차를 이용해 수분함량을 구하였다.

### (5) 장관 내 잔류 변 개수 측정과 형태 관찰

장관 내 변 개수는 loperamide 투여한 뒤 3일째 되는 날 맹장부터 직장까지 전체 부위를 취해 10% formaldehyde 인산 염 완충액(phosphate buffered saline, PBS, pH 7.4)으로 고정해서 대장 안에 남아있는 변 개수를 측정했다. 대장 내에 남아 있는 변의 크기와 형태는 눈으로 확인했다.

### (6) 혈청 지질 함량 측정

혈청 분석을 위해 실험 종료일에 흰쥐를 마취시켜 회복한 뒤 하대정맥에서 혈액을 채취

한 후 헤파린으로 처리한 멸균튜브에 모아 실험에 이용하였다. 채취된 혈액은 3,000 rpm, 4°C에서 15분간 원심분리 한 후 혈청을 분리하여 분석 전까지 -70°C에 보관하였다.

혈중 중성지질의 함량은 중성지질 측정용 kit 시약(AM 157S-K, Asan Pharm. Co., Seoul, Korea), 총 콜레스테롤의 함량은 총 콜레스테롤 측정용 kit 시약(AM 202-K, Asan Pharm. Co., Seoul, Korea), HDL-콜레스테롤 함량은 HDL 콜레스테롤 측정용 kit 시약(AM 203-K, Asan Pharm. Co., Seoul, Korea)으로 측정하였다. 혈중 LDL-콜레스테롤 농도는 Friedewald의 계산식으로 구하였다. 계산식은 LDL 콜레스테롤 = ((총 콜레스테롤 - HDL 콜레스테롤) - (중성지질/5))이다.

## (7) 간기능 효소 측정

혈중 Glutamic oxaloacetic transaminase (GOT), Glutamic pyruvic transaminase (GPT)의 측정은 Reitman-Frankel의 효소법을 응용한 GOT, GPT 측정용 kit 시약(Asan Pharm. Co., Seoul, Korea)을 사용하여 측정하였다.

## (8) 통계처리

모든 실험결과는 평균값과 표준편차로 표시하였으며, 통계처리는 Statistical Analysis System (SAS version 9.2, SAS Institute Inc., USA)을 one-way ANOVA 분석을 실시한 후  $p < 0.05$  수준에서 Duncan's multiple range test에 의해 유의성을 검증하였다.

# 나. 연구수행결과

## (1) 체중 변화 및 식이섭취량

실험기간 동안 변비 유발 rat에 대한 각 군의 체중변화량과 식이섭취량은 Table 2-3 및 Fig. 2-3과 같다. 체중변화는 실험 종료 시 모든 시험군에서 대조군(control)에 비해 체중이 감소하는 경향을 보였지만 유의적인 차이는 없었다. 또한 새싹보리가수분해물시험군(S2), 새싹보리발효물 시험군(S3) 및 새싹보리음료 시험군(S4)은 정상군(normal) 보다도 체중이 감소하는 경향이 보이나 유의하진 않았다. 식이섭취량은 loperamide로 변비 유발시킨 모든 시험군이 정상군보다 식이섭취량이 감소하는 경향을 보였지만 유의성은 없었다. 이는 기존 변비개선 관련 연구들과 마찬가지로 loperamide에 의해 감소되는 몸무게 및 식이섭취량은 유의적인 차이가 없다고 보고된 것과 유사하였다. Shimotoyodomo A 등(2000)에 따르면 loperamide를 투여 시 복부가 팽만해지고 식욕이 떨어지는 증상이 나타나, 실험동물이 식이섭취량이 감소하는 것으로 밝혀진 바 있다. 또한 연속해서 loperamide를 투여하면 수축과 이완을 반복하는 대장의 연동 운동이 저하되면서 변의 이동 속도가 느려지며 자연스럽게 배변 기간이 길어지고 대장 점액질 두께가 얇아져서 변비에 걸린다(Cepinkas 등 1993).

Table 2-3. Effect of barley sprouts on body weight and food intake in experimental rats

Groups <sup>1)</sup>	Initial weight (g)	Final weight (g)	Weight increase (g)	Food intake (g/day)
Normal	109.6±4.20 <sup>2)ba3)</sup>	351.4±22.38 <sup>a</sup>	241.8±19.31 <sup>ba</sup>	25.88±2.09 <sup>a</sup>
Control	104.3±7.18 <sup>b</sup>	360.7±14.70 <sup>a</sup>	256.4±14.25 <sup>a</sup>	22.12±2.43 <sup>b</sup>
PC	115.0±8.41 <sup>2)a</sup>	358.9±25.34 <sup>a</sup>	245.5±19.39 <sup>ba</sup>	24.33±2.33 <sup>ba</sup>
S1	110.5±9.24 <sup>ba</sup>	354.8±34.86 <sup>a</sup>	244.3±30.97 <sup>ba</sup>	23.38±2.61 <sup>ba</sup>
S2	110.0±2.42 <sup>ba</sup>	335.0±25.15 <sup>a</sup>	225.9±26.12 <sup>b</sup>	23.42±1.98 <sup>ba</sup>
S3	107.8±3.61 <sup>ba</sup>	340.2±21.04 <sup>a</sup>	232.4±21.66 <sup>ba</sup>	24.54±2.48 <sup>ba</sup>
S4	106.8±6.05 <sup>ba</sup>	340.4±22.99 <sup>a</sup>	233.6±17.81 <sup>ba</sup>	23.71±2.03 <sup>ba</sup>

<sup>1)</sup>Normal : normal diet group

Control : normal diet and loperamide group

PC : commercial beverages(kkeung-a) and loperamide group

S1 : barley sprouts extract and loperamide group

S2 : barley sprouts hydrolysate and loperamide group

S3 : fermented barley sprouts hydrolysate and loperamide group

S4 : barley sprouts beverages and loperamide group

<sup>2)</sup>Values are Mean±S.D.(n=10)

<sup>3)</sup>Mean with the different superscripts are significantly different at p<0.05 by one-way ANOVA with Duncan' s multiple range test.

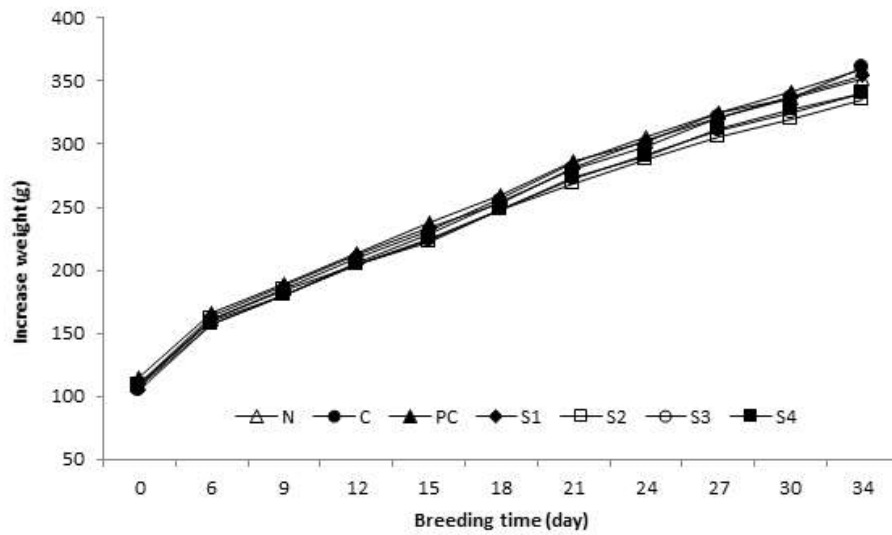


Fig. 2-3. Change body weight of experimental rat

<sup>1)</sup>Normal : normal diet group

Control : normal diet and loperamide group

PC : commercial beverages(kkeung-a) and loperamide group

S1 : barley sprouts extract and loperamide group

S2 : barley sprouts hydrolysate and loperamide group

S3 : fermented barley sprouts hydrolysate and loperamide group

S4 : barley sprouts beverages and loperamide group

## (2) 간 무게

실험동물의 간 무게 및 체중 100 g당 간 무게를 Table 2-4에 나타내었다. 간 무게는 대조군에서 가장 높게 나타났으며, 새싹보리가수분해물 시험군(S2)이 정상군과 대조군에 비해 유의적으로 낮게 나타났다. 이를 실험동물의 체중 100 g당 간 무게로 환산하였을 경우 대조군이 3.11 g으로 다른 시험군에 비해 약간 높았으나 유의적인 차이는 없었다.

Table 2-4. Liver weight in experimental rat

Groups <sup>1)</sup>	Liver weight (g)	Liver weight (g/100g body wt.)
Normal	10.55 ± 1.10 <sup>2)ba3)</sup>	3.00 ± 0.19 <sup>a</sup>
Control	11.31 ± 1.17 <sup>a</sup>	3.11 ± 0.86 <sup>a</sup>
PC	10.57 ± 1.33 <sup>ba</sup>	2.94 ± 0.25 <sup>a</sup>
S1	10.22 ± 1.31 <sup>ba</sup>	2.88 ± 0.19 <sup>a</sup>
S2	9.53 ± 1.23 <sup>b</sup>	2.84 ± 0.29 <sup>a</sup>
S3	9.77 ± 1.18 <sup>ba</sup>	2.87 ± 0.25 <sup>a</sup>
S4	9.66 ± 0.93 <sup>ba</sup>	2.84 ± 0.17 <sup>a</sup>

<sup>1)</sup>Normal : normal diet group

Control : normal diet and loperamide group

PC : commercial beverages(kkeung-a) and loperamide group

S1 : barley sprouts extract and loperamide group

S2 : barley sprouts hydrolysate and loperamide group

S3 : fermented barley sprouts hydrolysate and loperamide group

S4 : barley sprouts beverages and loperamide group

<sup>2)</sup>Values are Mean ± S.D.(n=10)

<sup>3)</sup>Mean with the different superscripts are significantly different at p<0.05 by one-way ANOVA with Duncan's multiple range test.

### (3) 변 개수, 변 중량, 변 수분함량

변비 유도 전과 후로 나눠 실험동물 개체 당 변의 개수와 변의 중량, 변의 수분함량은 Table 2-5과 같다. 변비를 유도하기 전 4주 동안 각 군에서 배설한 변 개수는 정상군과 대조군이 각각  $42.50 \pm 4.45$ 개,  $39.54 \pm 5.00$ 개로 유의적인 차이가 없었으며, 양성대조군과 새싹보리추출물 시험군, 새싹보리가수분해물 시험군, 새싹보리발효물 시험군, 새싹보리발효음료 시험군은 대조군보다 변의 개수가 많은 것으로 나타났으며, 특히 새싹보리발효물 시험군은 정상군과 대조군보다 변 개수가 유의적으로 많은 것으로 나타났다. 변비를 유도한 후 대조군의 변 개수가 감소했고, 변비를 유도하지 않은 정상군과 비교했을 때 유의적인 감소를 하였다. 변 개수가 감소한 대조군과 동일하게 변비를 유발한 새싹보리 시험군 모두가 변비를 유도하기 전보다 감소했다. 그러나 대조군에 비해서는 변의 개수가 유의적으로 많았으며, 새싹보리발효물 시험군(S3)에서  $37.74 \pm 3.96$ 개로 가장 많은 변의 개수를 나타내었다(Fig. 2-4). 변 중량은 변 개수와 함께 비례적으로 증감 관계가 나타나는 수치였다(Fig. 2-5).

변의 수분함량의 경우, 변비 유발 전, 정상군과 대조군보다 새싹보리 시험군(S1, S2, S3, S4)에서 증가한 경향이 있었지만, 유의적인 차이는 없었으며, 새싹보리가수분해물 시험군의 변 수분함량이  $43.04 \pm 3.22\%$ 로 가장 높았다. 변비를 유도한 후, 정상군과 일반식이에 loperamide를 단독으로 투여한 대조군에서도 수분함량이 증가하는 경향이 나타났다. 또한 새싹보리 시험군 모두에서도 변비 유발 전보다 수분함량이 증가하는 것으로 나타났지만 시험군 간에 유의적인 차이는 없었다. 변비 유발 후에도 대조군에 비해 새싹보리 시험군에서 변의 수분함량이 유의적인 차이 없이 증가함을 알 수 있었다(Fig. 2-6).

Table 2-5. Number of fecal pellet, wet weight of fecal pellets and fecal water content in experimental rat

Groups <sup>1)</sup>	Before inducing constipation (BIC)		
	No. of fecal pellet (count/day)	Wet weight of fecal pellets (g)	Fecal water content (%)
Normal	42.50 ± 4.45 <sup>2)bc3)</sup>	9.88 ± 2.03 <sup>a</sup>	38.96 ± 6.36 <sup>a</sup>
Control	39.54 ± 5.00 <sup>c</sup>	9.39 ± 1.03 <sup>a</sup>	36.90 ± 4.52 <sup>a</sup>
PC	44.39 ± 3.20 <sup>bac</sup>	10.04 ± 1.49 <sup>a</sup>	41.75 ± 6.13 <sup>a</sup>
S1	42.36 ± 4.97 <sup>bc</sup>	9.52 ± 0.97 <sup>a</sup>	39.17 ± 4.42 <sup>a</sup>
S2	46.03 ± 4.66 <sup>ba</sup>	10.18 ± 1.50 <sup>a</sup>	43.04 ± 3.22 <sup>a</sup>
S3	48.35 ± 7.01 <sup>a</sup>	11.10 ± 1.90 <sup>a</sup>	39.73 ± 4.89 <sup>a</sup>
S4	43.97 ± 5.96 <sup>bac</sup>	9.71 ± 1.45 <sup>a</sup>	39.37 ± 6.02 <sup>a</sup>

Groups <sup>1)</sup>	After inducing constipation (BIC)		
	No. of fecal pellet (count/day)	Wet weight of fecal pellets (g)	Fecal water content (%)
Normal	40.13 ± 5.30 <sup>2)a3)</sup>	9.30 ± 1.22 <sup>a</sup>	45.65 ± 3.11 <sup>a</sup>
Control	28.94 ± 3.99 <sup>c</sup>	6.84 ± 1.73 <sup>b</sup>	43.53 ± 4.38 <sup>a</sup>
PC	34.11 ± 4.92 <sup>b</sup>	7.96 ± 1.56 <sup>ba</sup>	45.31 ± 3.09 <sup>a</sup>
S1	34.01 ± 3.00 <sup>b</sup>	7.60 ± 1.83 <sup>ba</sup>	45.33 ± 5.50 <sup>a</sup>
S2	33.22 ± 3.64 <sup>b</sup>	8.13 ± 2.72 <sup>a</sup>	47.97 ± 3.35 <sup>a</sup>
S3	37.74 ± 3.96 <sup>ba</sup>	8.61 ± 1.61 <sup>a</sup>	46.89 ± 4.67 <sup>a</sup>
S4	34.63 ± 4.56 <sup>b</sup>	7.63 ± 1.51 <sup>ba</sup>	44.27 ± 4.26 <sup>a</sup>

<sup>1)</sup>Normal : normal diet group

Control : normal diet and loperamide group

PC : commercial beverages(kkeung-a) and loperamide group

S1 : barley sprouts extract and loperamide group

S2 : barley sprouts hydrolysate and loperamide group

S3 : fermented barley sprouts hydrolysate and loperamide group

S4 : barley sprouts beverages and loperamide group

<sup>2)</sup>Values are Mean ± S.D.(n=10)

<sup>3)</sup>Mean with the different superscripts are significantly different at p<0.05 by one-way ANOVA with Duncan's multiple range test.



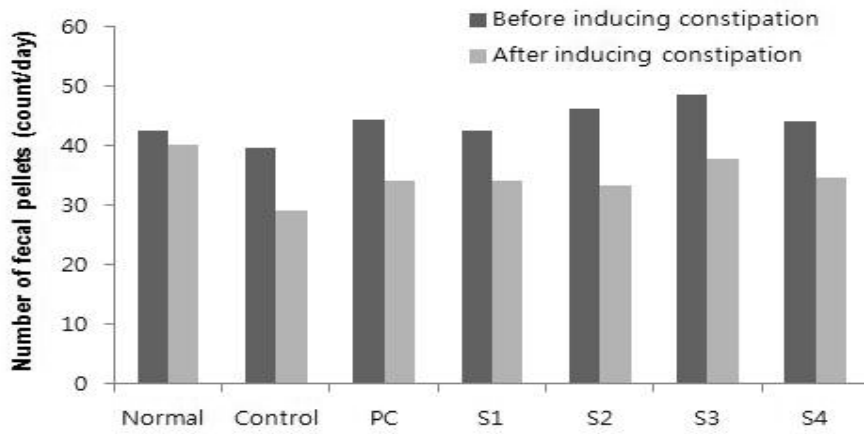


Fig. 2-5. Number of fecal pellets in experimental rat

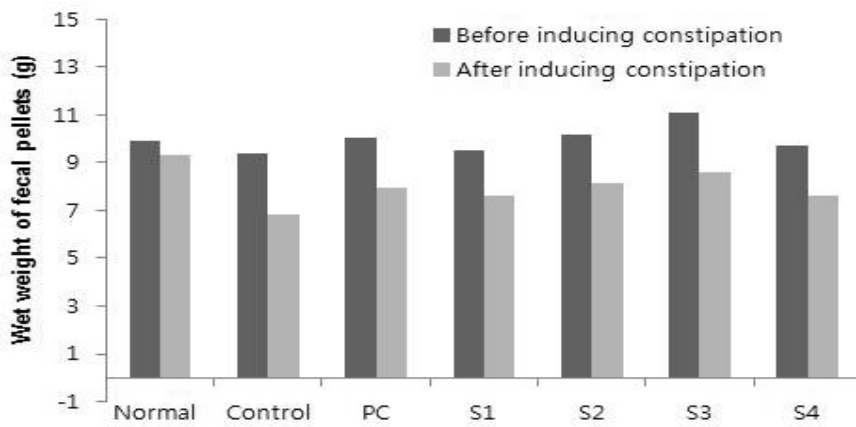


Fig. 2-6. Wet weight of fecal pellets in experimental rat

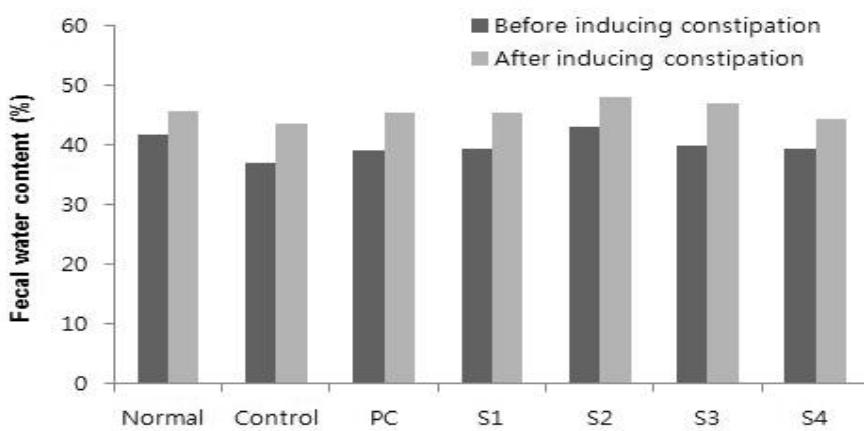


Fig. 2-7. fecal water content in experimental rat

#### (4) 장관 내 잔류 변 개수

실험 마지막 날 모든 실험동물을 희생시켜, 결장 부위에 잔류하고 있는 변의 개수를 측정한 결과는 Table 2-6 및 Fig. 2-8과 같다. 변비를 유도하지 않은 정상군(normal)에서  $0.70 \pm 0.95$ 개의 가장 적은 잔류 변 개수를 확인하였고, loperamide로 변비를 유도한 대조군(control)이  $4.10 \pm 2.42$ 개로 그 수가 유의적으로 증가함을 확인하였다. 그리고 대조군에 비해 양성대조군이  $2.20 \pm 1.14$ 개로 유의적으로 감소하여 변비를 유발한 시험군에서 가장 적은 변의 개수를 나타내었으며, 새싹보리 시험군인 S1은  $3.30 \pm 1.16$ 개, S2는  $2.70 \pm 1.83$ , S3은  $2.40 \pm 1.71$ , S4는  $3.40 \pm 1.51$ 로 대조군보다는 유의적으로 감소하였으며, 새싹보리 시험군 간에 유의적 차이는 없는 것으로 나타났다.

Table 2-6. Number of fecal pellets in the colon of experimental rat

Groups <sup>1)</sup>	No. of fecal pellet (count/day)
Normal	$0.70 \pm 0.95^{2)c3}$
Control	$4.10 \pm 2.42^a$
PC	$2.20 \pm 1.14^{bc}$
S1	$3.30 \pm 1.16^{ba}$
S2	$2.70 \pm 1.83^{bac}$
S3	$2.40 \pm 1.71^{bac}$
S4	$3.40 \pm 1.51^{ba}$

<sup>1)</sup>Normal : normal diet group

Control : normal diet and loperamide group

PC : commercial beverages(kkeung-a) and loperamide group

S1 : barley sprouts extract and loperamide group

S2 : barley sprouts hydrolysate and loperamide group

S3 : fermented barley sprouts hydrolysate and loperamide group

S4 : barley sprouts beverages and loperamide group

<sup>2)</sup>Values are  $\text{Mean} \pm \text{S.D.}(n=10)$

<sup>3)</sup>Mean with the different superscripts are significantly different at  $p < 0.05$  by one-way ANOVA with Duncan's multiple range test.

## (5) 혈청 지질함량 측정

새싹보리가 혈중 지질함량에 미치는 영향을 관찰하기 위해 혈액을 채취하여 실험동물의 혈청 중 중성지방과 콜레스테롤의 변화를 측정한 결과는 Table 2-7과 같다. 중성지질(TG)의 경우는 정상군에서 가장 높은  $57.68 \pm 9.31$  mg/dL로 나타났다. Loperamide를 투여한 대조군에서는  $35.13 \pm 8.74$  mg/dL로 유의적으로 감소하였다. 양성대조군과 새싹보리 시험군 모두는 대조군보다 증가했으나 정상군보다는 낮은 값을 나타내었다. 그리고 총 콜레스테롤의 경우 변비를 유발하지 않은 정상군과 변비를 유발한 대조군 보다 새싹보리 시험군들에서 감소하는 경향이 나타났지만 유의적인 차이는 없었다. HDL-콜레스테롤 함량에서는 새싹보리 시험군 S1, S2, S3, S4 시험군 모두가 대조군(control)에 비해 유의적으로 증가하는 결과를 보였으며, S1, S2, S3 시험군의 경우는 정상군(normal)보다도 높은 함량을 나타내었다. LDL-콜레스테롤의 측정값은 대조군에서  $36.30 \pm 11.23$  mg/dL로 가장 높은 함량을 나타내었으며, 새싹보리발효물 시험군에서  $19.08 \pm 8.51$  mg/dL로 가장 낮은 함량을 보였으며, 새싹보리 시험군 모두가 정상군과 대조군에 비해 감소한 것으로 나타났다.

Table 2-7. Triglyceride, total cholesterol, HDL-cholesterol and LDL-cholesterol in serum of experimental rats

(unit : mg/dL)

Groups <sup>1)</sup>	Triglyceride	Total cholesterol	HDL-cholesterol	LDL-cholesterol
Normal	$57.68 \pm 9.31^{2)a3)$	$64.26 \pm 8.41^a$	$25.37 \pm 4.11^{ba}$	$27.38 \pm 6.47^{bac}$
Control	$35.13 \pm 8.74^b$	$65.32 \pm 10.01^a$	$22.00 \pm 3.32^c$	$36.30 \pm 11.23^a$
PC	$47.23 \pm 9.70^{ba}$	$56.90 \pm 14.16^a$	$24.67 \pm 4.42^{bac}$	$22.79 \pm 11.38^{bc}$
S1	$43.84 \pm 12.08^b$	$61.16 \pm 6.58^a$	$27.60 \pm 2.63^a$	$24.79 \pm 8.81^{bc}$
S2	$43.26 \pm 9.26^b$	$60.77 \pm 7.08^a$	$27.67 \pm 3.78^a$	$24.46 \pm 9.22^{bc}$
S3	$57.58 \pm 6.32^a$	$57.58 \pm 6.65^a$	$26.97 \pm 3.80^{ba}$	$19.08 \pm 8.51^c$
S4	$43.16 \pm 6.22^b$	$63.10 \pm 5.64^a$	$24.13 \pm 2.71^{bc}$	$30.33 \pm 6.40^{ba}$

<sup>1)</sup>Normal : normal diet group, Control : normal diet and loperamide group

PC : commercial beverages(kkeung-a) and loperamide group

S1 : barley sprouts extract and loperamide group

S2 : barley sprouts hydrolysate and loperamide group

S3 : fermented barley sprouts hydrolysate and loperamide group

S4 : barley sprouts beverages and loperamide group

<sup>2)</sup>Values are Mean  $\pm$  S.D.(n=10)

<sup>3)</sup>Mean with the different superscripts are significantly different at  $p < 0.05$  by one-way ANOVA with Duncan's multiple range test.

## (6) 간기능 효소 측정

GOT와 GPT 효소는 간세포 내에 존재하는 효소로 세포가 파괴되거나 사멸하면 혈액 속으로 분비되어 혈액 내에서도 일정량이 검출 될 수 있다. 지방간이나 알코올의 섭취, 과체중 등의 이유로 간에 염증이거나 세포의 파괴가 일어나면 정상적인 양 보다 더 많은 GOT와 GPT가 혈액 속으로 분비된다. 따라서 간 기능관련 효소활성도를 측정한 결과는 Table 2-8에 나타내었다.

혈청 중 GOT와 GPT 활성을 측정한 결과 새싹보리발효물 시험군(S3)에서 각각  $42.16 \pm 2.47$  Kramen/mL,  $10.45 \pm 1.83$  Kramen/mL로 시험군들 중 가장 낮은 값을 나타내었으며, 대조군에서  $48.30 \pm 5.78$  Kramen/mL,  $13.43 \pm 2.04$  Kramen/mL로 가장 높은 값을 나타내었으며, GOT와 GPT 활성이 대조군보다 새싹보리 시험군들에서 유의적으로 감소하는 경향을 나타내었다.

Table 2-8. Serum GOT and GPT in experimental rat

Groups <sup>1)</sup>	GOT <sup>2)</sup> activity (Kramen/mL)	GPT activity (Kramen/mL)
Normal	$42.78 \pm 3.72^{3)4)}$	$10.51 \pm 1.51^b$
Control	$48.30 \pm 5.78^a$	$13.43 \pm 2.04^a$
PC	$44.57 \pm 3.47^{ba}$	$12.11 \pm 1.82^{ba}$
S1	$44.46 \pm 4.56^{ba}$	$11.09 \pm 1.33^b$
S2	$42.89 \pm 4.43^b$	$10.97 \pm 1.91^b$
S3	$42.16 \pm 2.47^b$	$10.45 \pm 1.83^b$
S4	$44.54 \pm 3.19^{ba}$	$11.60 \pm 2.28^b$

<sup>1)</sup>Normal : normal diet group, Control : normal diet and loperamide group

PC : commercial beverages(kkeung-a) and loperamide group

S1 : barley sprouts extract and loperamide group

S2 : barley sprouts hydrolysate and loperamide group

S3 : fermented barley sprouts hydrolysate and loperamide group

S4 : barley sprouts beverages and loperamide group

<sup>2)</sup>GOT : glutamic oxaloacetic transaminase

GPT : glutamic pyruvic transaminase

<sup>3)</sup>Values are Mean  $\pm$  S.D.(n=10)

<sup>4)</sup>Mean with the different superscripts are significantly different at  $p < 0.05$  by one-way ANOVA with Duncan's multiple range test.

## 5. 새싹채소(땅콩 및 브로콜리) 관련 발효능 검사

(협동연구기관 : 대구대학교 산학협력단)

### 가. 새싹채소(브로콜리&땅콩) 발효를 위한 전처리(추출) 조건 최적화

#### (1) 연구 수행 방법

##### ① 실험재료

본 연구에서 사용된 새싹채소(땅콩 및 브로콜리)는 2018년에 수확된 것을 나눔공동체(안동)와 주식회사 광야(양평)에서 새싹땅콩과 새싹브로콜리를 각각 구입하여 실험에 사용하였다. 이들 새싹채소는 일정한 크기로 잘라 10배수의 물을 가하여 추출조건 실험에 사용하였다.

##### ② 추출조건 최적화를 위한 실험계획

새싹채소(브로콜리&땅콩) 발효를 위하여 중심합성계획법(central composite design)에 따라 Table 2-9와 같은 추출온도( $X_1$ )과 추출시간( $X_2$ )를 독립변수로 설정하고, 반응표면분석(response surface methodology, RSM)에 의하여 설정한 Table 2-10의 13가지의 추출조건으로 새싹채소(브로콜리&땅콩)를 추출하였다. 각 종속변수에 대한 회귀방정식을 얻어 추출조건에서 독립변수의 상호영향 및 최적 추출조건을 구하였다.

Table 2-9. Experimental design of extraction conditions

Extraction conditions	-2	-1	0	1	2
$X_1$ Temperature (°C)	50	60	70	80	90
$X_2$ Time (hour)	2	4	6	8	10

Table 2-10. Central composite design for the optimization of extraction condition

Exp. No <sup>1)</sup>	Extraction conditions	
	Temperature (°C)	Time (hour)
1	80(1)	8(1)
2	80(1)	4(-1)
3	60(-1)	8(1)
4	60(-1)	4(-1)
5	70(0)	6(0)
6	70(0)	6(0)
7	70(0)	6(0)
8	70(0)	6(0)
9	70(0)	6(0)
10	90(2)	6(0)
11	50(-2)	6(0)
12	70(0)	10(2)
13	70(0)	2(-2)

<sup>1)</sup>The number of experimental condition by central composite design.

### ③ 분석방법

#### ㉞ 추출수율

추출수율은 항량을 구한 수기에 추출물을 취하여 105°C에 건조시킨 후 그 무게를 측정하여 추출물 조제에 사용된 건물량에 대한 백분율로써 추출수율을 나타내었다.

#### ㉟ 총 페놀화합물 함량

총페놀화합물 함량은 Folin-Ciocalteu 방법에 따라 측정하였다. 즉, 시료 1 mL에 2 N Folin-Ciocalteu(Junsei Chemical Co, Ltd, Japan) 시약 1 mL를 첨가 하고 3분 후, 10% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 1 mL를 가하여 1시간 방치하였다. 반응물의 흡광도는 700 nm에서 spectrophotometer를 사용하여 측정하였고, gallic acid(Sigma-Aldrich, Co, St Louis, MO, USA)를 이용한 표준곡선으로 양을 환산하였다.

#### ㊱ 총플라보노이드 함량

추출조건별 새싹채소 추출물의 총플라보노이드의 함량은 Davis 방법을 일부 변형하여 분석하였다. 추출물 1 mL에 diethylene glycol(Sigma-Aldrich) 10 mL와 1 N NaOH 1 mL를 혼합하여 37° C 항온수조에서 1시간 동안 반응시켰다. 흡광도의 변화는 420 nm에

서 측정하였으며, 총플라보노이드의 정량을 위하여 quercetin(Sigma-Aldrich)을 이용하여 작성한 표준 곡선으로부터 총플라보노이드 함량을 구하였다.

#### ㉔ Rutin & quercetin 함량 분석

새싹브로콜리 추출물 및 발효액의 rutin 함량 분석을 위하여 시료를 0.45  $\mu$ m membrane filter로 여과하여 HPLC (2695 Alliance HPLC, Waters, USA)로 분석하였다. 칼럼은 X-bridge C18 column (250 $\times$ 4.6 mm, 3.5  $\mu$ m Waters, USA)를 사용하였으며, 이동상으로는 0.5% acetic acid in water(A)과 methanol(B)를 사용하였다.

#### ㉕ Sulforaphane 함량 분석

새싹브로콜리 추출물 및 발효액의 rutin 함량 분석을 위하여 시료를 0.45  $\mu$ m membrane filter로 여과하여 HPLC (2695 Alliance HPLC, Waters, USA)로 분석하였다. 칼럼은 X-bridge C18 column (250 $\times$ 4.6 mm, 3.5  $\mu$ m Waters, USA)를 사용하였으며, 이동상으로는 Water (A)과 Acetonitrile (B)를 사용하였다.

#### ㉖ Resveratrol 함량 분석

새싹땅콩 추출물 및 발효액의 rutin 함량 분석을 위하여 시료를 0.45  $\mu$ m membrane filter로 여과하여 HPLC (2695 Alliance HPLC, Waters, USA)로 분석하였다. 칼럼은 X-bridge C18 column (250 $\times$ 4.6 mm, 3.5  $\mu$ m Waters, USA)를 사용하였으며, 이동상으로는 0.1% formic acid in water(A)과 Acetonitrile(B)를 사용하였다. 이동상의 비율(A:B)은 80:20(5 min)에서 70:30(12 min), 40:60(25 min), 20:80(35 min), 80:20(40 min)으로 순차적으로 변화시켜 측정하였고, 유속은 0.6 mL/min, injvol 은 20  $\mu$ L, 파장은 338 nm, 40분 동안 측정하였다.

### ④ 최적추출조건 예측 및 실증시험

새싹채소(브로콜리&땅콩)의 추출조건 최적화를 위하여 추출물의 중요한 품질인자로 고려되는 추출수율, 총 페놀화합물 함량, 총플라보노이드 함량 및 지표성분 함량을 최대로 설정하여 반응표면을 superimposing 하여 최적 추출조건 범위를 예측하였다. 또한 예측된 범위에서 임의의 점을 설정하여 회귀식에 대입한 후 그 예측된 값들에 대하여 동일조건에서 실제 실험을 통하여 얻은 실험치를 비교하였다.

### ⑤ 통계 처리

최적 효소처리 조건 설정을 위한 중심합성계획법은 statistical analysis system(SAS, version 9.4 SAS institute) 프로그램을 이용하여 회귀분석하였다.

## (2) 연구 수행 결과

### (가) 추출조건에 따른 새싹브로콜리 추출물의 이화학적 특성

추출조건에 따른 새싹브로콜리 추출물의 추출수율은 3.35~4.00%의 범위로 나타났으며 (Table 2-11), 이를 바탕으로 한 회귀식은 Table 2-12와 같다. 한편 lack of fit(적합 결여검정) 값은 model의 적합도를 검정하는 통계량으로  $P$ 값이 0.05보다 작을 때 model의 적합성에 문제가 있으며, 이보다 클 때 model이 적합하다고 판단하는 통계 값이다. 추출수율 값에 대한 lack of fit의  $P$ -value는 0.3091로 나타나 model 적합성이 인정되었다(Table 2-12). 추출수율에 대한  $R^2$ 값은 0.8120의 신뢰도를 보였으며,  $F$ value는 5% 이내 유의수준을 보였다. 추출조건에 대한 영향은 추출시간보다 추출온도에 큰 영향을 미치는 것으로 확인되었다 (Table 2-13). 추출조건에 따라 반응표면모델로 예측된 회귀분석 결과 정상점이 최대점으로 나타났으며, 최적점을 산출한 결과 추출수율의 최댓값은 3.93%이며, 이때의 추출조건은 추출온도 71.42°C, 추출시간 7.57 hr로 나타났다(Table 2-14). 새싹브로콜리 추출물에 대한 추출 조건별 반응표면의 변화는 Fig. 2-9와 같다.

추출조건에 따른 새싹브로콜리 추출물의 총 페놀화합물 함량은 1.99~2.46 mg/mL의 범위로 나타났으며(Table 2-11), 이를 바탕으로 한 회귀식은 Table 2-12와 같다. 총 페놀화합물 함량에 대한  $R^2$ 값은 0.9613의 높은 신뢰도를 보였으며,  $F$ value는 1% 이내 유의적인 결과를 나타냈다. 새싹브로콜리 추출물의 총 페놀화합물 함량 값에 대한 lack of fit의  $p$ -value는 0.2031로 나타나 model 적합성이 인정되었다(Table 2-12). 추출조건에 대한 영향은 추출온도와 추출시간 모두에 큰 영향을 받고 있는 것으로 나타났다(Table 2-13). 추출조건에 따라 새싹브로콜리 추출물의 반응표면모델로 예측된 회귀분석 결과 정상점이 최대점으로 나타났으며, 최적점을 산출한 결과 추출수율의 최댓값은 2.40 mg/mL이며, 이때의 추출조건은 추출온도 60.42°C, 추출시간 8.04 hr로 나타났다(Table 2-14). 새싹브로콜리 추출물에 대한 추출조건별 반응표면의 변화는 Fig. 2-10과 같다.

추출조건에 따른 새싹브로콜리 추출물의 총플라보노이드 함량의 범위는 1.42~1.87 mg/mL였으며(Table 2-11), 이를 바탕으로 한 회귀식은 Table 2-12와 같다.  $R^2$ 값은 0.9761로 회귀방정식에 대한 설명력이 높았으며,  $F$ value는 1%이내의 유의수준을 보였다. 새싹브로콜리 추출물의 총플라보노이드 함량 값의 lack of fit의  $P$ -value는 0.2012로 나타나 적합성이 인정되었다(Table 2-12). 추출조건에 대한 영향은 Table 2-13과 같이 추출온도와 추출시간 두 조건 모두에서 큰 영향을 받고 있는 것을 알 수 있었으며, 추출온도 보다 추출시간에 더 큰 영향을 받고 있는 것으로 나타났다. 추출조건에 따라 반응표면 모델로 예측된 회귀분석 결과 정상점이 최대점으로 나타났으며, 총플라보노이드 함량은 1.87 mg/mL이었으며, 이때의 추출조건은 75.43°C, 7.17 hr로 나타났다(Table 2-14). 새싹브로콜리 추출물의 총플라보노이드 함량값에 대한 추출조건별 반응표면의 변화는 Fig. 2-11과 같다.

추출조건에 따른 새싹브로콜리 추출물의 rutin 함량은 15.52~24.53  $\mu$ g/mL의 범위로 나타났으며(Table 2-11), 이를 바탕으로 한 회귀식은 Table 2-12와 같다. Rutin 함량에 대한  $R^2$ 값은 0.8948의 높은 신뢰도를 보였으며,  $F$ value는 1% 이내 유의적인 결과를 나타냈다. 새싹브로콜리 추출물의 rutin 함량 값에 대한 lack of fit의  $p$ -value는 0.2117로 나타나 model 적합성이 인정되었다(Table 2-12). 추출조건에 대한 영향은 추출온도와 추출시간 모두에 큰



영향을 받고 있는 것으로 나타났다(Table 2-13). 추출조건에 따른 새싹브로콜리 추출물의 반응표면모델로 예측된 회귀분석 결과 정상점이 최대점으로 나타났으며, 최적점을 산출한 결과 rutin 함량의 최댓값은 23.37  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 이며, 이때의 추출조건은 추출온도 63.13 $^{\circ}\text{C}$ , 추출시간 6.82 hr로 나타났다(Table 2-14). 새싹브로콜리 추출물에 대한 추출조건별 rutin 함량에 대한 반응표면의 변화는 Fig. 2-12와 같다.

추출조건에 따른 새싹브로콜리 추출물의 quercetin 함량의 범위는 0.67~1.23  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 였으며(Table 2-11), 이를 바탕으로 한 회귀식은 Table 2-12와 같다.  $R^2$ 값은 0.8088로 회귀방정식에 대한 설명력이 높았으며,  $F$ value는 5%이내의 유의수준을 보였다. 새싹브로콜리 추출물의 quercetin 함량 값의 lack of fit의 p-value는 0.1472로 나타나 적합성이 인정되었다(Table 2-12). 추출조건에 대한 영향은 Table 2-13과 같이 추출온도와 추출시간 두 조건 모두에서 영향을 받고 있으며, 추출온도 보다 추출시간에 더 큰 영향을 받고 있는 것으로 나타났다. 추출조건에 따라 반응표면 모델로 예측된 회귀분석 결과 정상점이 최대점으로 나타났으며, quercetin 함량은 1.16  $\text{mg}/\text{mL}$ 이었으며, 이때의 추출조건은 68.17 $^{\circ}\text{C}$ , 6.71 hr로 나타났다(Table 2-14). 새싹브로콜리 추출물의 quercetin 함량값에 대한 추출조건별 반응표면의 변화는 Fig. 2-13과 같다.

추출조건에 따른 새싹브로콜리 추출물의 sulforaphane 함량은 4.88~1.73  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 범위로 나타났으며(Table 2-11), 이를 바탕으로 한 회귀식은 Table 2-12와 같다. Sulforaphane 함량에 대한  $R^2$ 값은 0.8672의 높은 신뢰도를 보였으며,  $F$ value는 1% 이내 유의적인 결과를 나타냈다(Table 2-12). 새싹브로콜리 추출물의 sulforaphane 함량 값에 대한 lack of fit의 p-value는 0.1400으로 나타나 model 적합성이 인정되었다(Table 2-12). 추출조건에 대한 영향은 추출온도와 추출시간 모두에 큰 영향을 받고 있는 것으로 나타났다(Table 2-13). 추출조건에 따른 새싹브로콜리 추출물의 반응표면모델로 예측된 회귀분석 결과 정상점이 최대점으로 나타났으며, 최적점을 산출한 결과 sulforaphane 함량의 최댓값은 6.84  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 이며, 이때의 추출조건은 추출온도 58.26 $^{\circ}\text{C}$ , 추출시간 7.52 hr로 나타났다(Table 2-14). 새싹브로콜리 추출물에 대한 추출조건별 sulforaphane 함량에 대한 반응표면의 변화는 Fig. 2-14와 같다.

Table 2-11. Experimental data physicochemical characteristics of broccoli sprouts extract under different extraction conditions based on central composite design by response surface analysis

Exp. No <sup>1)</sup>	Physicochemical characteristics					
	Total yield (%)	Total phenol content (mg/mL)	Total flavonoid content (mg/mL)	Rutin content (µg/mL)	Quercetin content (µg/mL)	Sulforaphane content (µg/mL)
1	3.86	2.16	1.83	19.48	1.03	5.87
2	3.75	2.14	1.68	21.05	1.13	6.26
3	3.96	2.46	1.74	24.53	1.03	7.13
4	3.68	2.20	1.54	20.89	0.96	6.22
5	4.00	2.31	1.87	21.35	1.09	6.33
6	3.78	2.36	1.84	22.91	1.17	6.72
7	3.86	2.37	1.85	23.31	1.14	6.82
8	3.83	2.33	1.81	23.26	1.23	6.81
9	3.94	2.38	1.83	23.10	1.08	6.77
10	3.72	1.99	1.78	15.52	0.84	6.19
11	3.35	2.18	1.56	20.19	0.96	6.04
12	3.85	2.22	1.75	18.41	0.97	5.60
13	3.57	2.01	1.42	20.76	0.67	4.88

<sup>1)</sup>The number of experimental condition by central composite design.

Table 2-12. Regression coefficient and  $t$ -value of the predicted quadratic polynomial models on physicochemical characteristics of broccoli sprouts extract

Term	Total yield (%)		Total phenol content (mg/mL)		Total flavonoid content (mg/mL)		Rutin content ( $\mu\text{g/mL}$ )		Quercetin content ( $\mu\text{g/mL}$ )		Sulforaphane content ( $\mu\text{g/mL}$ )	
	Coefficient	$t$ -value	Coefficient	$t$ -value	Coefficient	$t$ -value	Coefficient	$t$ -value	Coefficient	$t$ -value	Coefficient	$t$ -value
Intercept												
$\beta_0$	-2.223046	-1.48	-2.409195	-4.29	-1.768333	-4.10	-62.278046	-4.00	-3.494598	-2.71	-10.156954	-2.33
Linear												
$\beta_1$	0.138662	4.22	0.104221	8.51	0.069708	7.40	1.980287	5.83	0.095986	3.41	0.286588	3.01
$\beta_2$	0.314217	1.69	0.414641	5.99	0.278958	5.24	6.811925	3.55	0.412112	2.59	2.297033	4.27
Quadratic												
$\beta_{11}$	-0.000857	-4.12	-0.000660	-8.51	-0.000431	-7.23	-0.012201	-5.67	-0.000599	-3.36	-0.001405	-2.33
$\beta_{22}$	-0.010490	-2.01	-0.014623	-7.54	-0.016094	-10.79	-0.196897	-3.66	-0.019968	-4.48	-0.016250	-5.96
Cross product												
$\beta_{12}$	-0.002125	-0.85	-0.003000	-3.23	-0.000625	-0.88	-0.065125	-2.53	-0.002125	-1.00	-0.089822	-2.25
$R^2$	0.8120		0.9613		0.9761		0.8948		0.8088		0.8672	
$\text{Pr}>F$	0.0176		<.0001		<.0001		0.0026		0.0187		0.0056	
Lack of fit $\text{Pr}>F$	0.3091		0.2031		0.2012		0.2117		0.1472		0.1400	

Table 2-13. Regression analysis for extraction conditions of broccoli sprouts extract

Response	F-Ratio	
	Temperature (°C)	Time (hour)
Total yield	7.30 <sup>**</sup>	4.12 <sup>*</sup>
Total phenol content	38.63 <sup>***</sup>	32.30 <sup>***</sup>
Total flavonoid content	32.97 <sup>***</sup>	73.82 <sup>***</sup>
Rutin content	18.15 <sup>***</sup>	6.78 <sup>**</sup>
Quercetin content	4.11 <sup>*</sup>	8.27 <sup>**</sup>
Sulforaphane content	3.78 <sup>*</sup>	14.80 <sup>***</sup>

\*Significant at 10% level; \*\*significant at 5% level; \*\*\*significant at 1% level.

Table 2-14. Predicted levels of optimum extraction conditions for the maximum responses of broccoli sprouts extract by the ridge analysis

Response	Predicted response				Morphology
	Response	Temp. (°C)	Time (hour)	Result	
Total yield (%)	Min	52.85	3.93	3.34	Maximum
	Max	71.42	7.57	3.93	
Total phenol content (mg/mL)	Min	88.58	7.47	1.94	Maximum
	Max	60.42	8.04	2.40	
Total flavonoid content (mg/mL)	Min	61.68	2.36	1.38	Maximum
	Max	75.43	7.17	1.87	
Rutin content (µg/mL)	Min	87.08	8.07	14.00	Maximum
	Max	63.13	6.82	23.37	
Quercetin content (µg/mL)	Min	61.65	2.36	0.70	Maximum
	Max	68.17	6.71	1.16	
Sulforaphane content (µg/mL)	Min	62.15	2.32	4.72	Maximum
	Max	58.26	7.52	6.84	

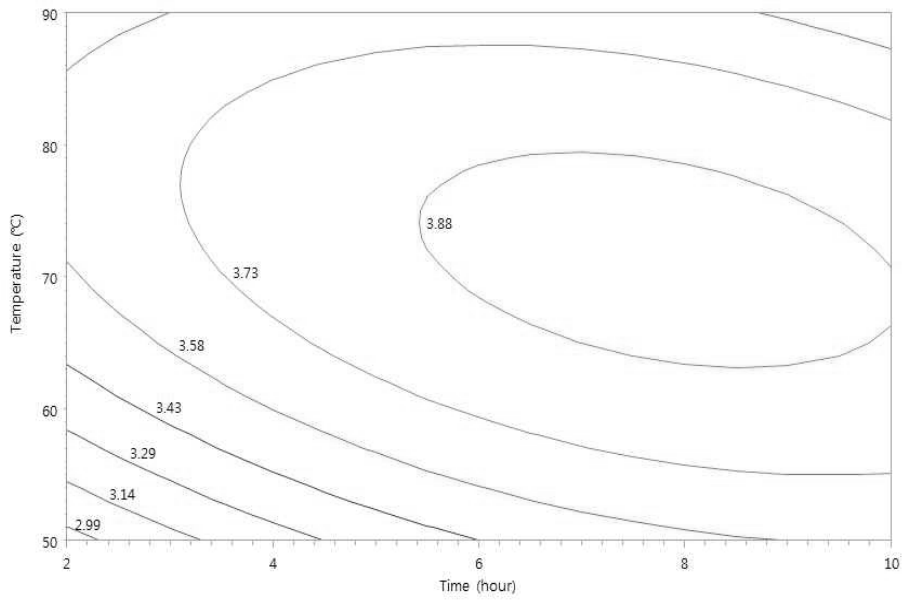
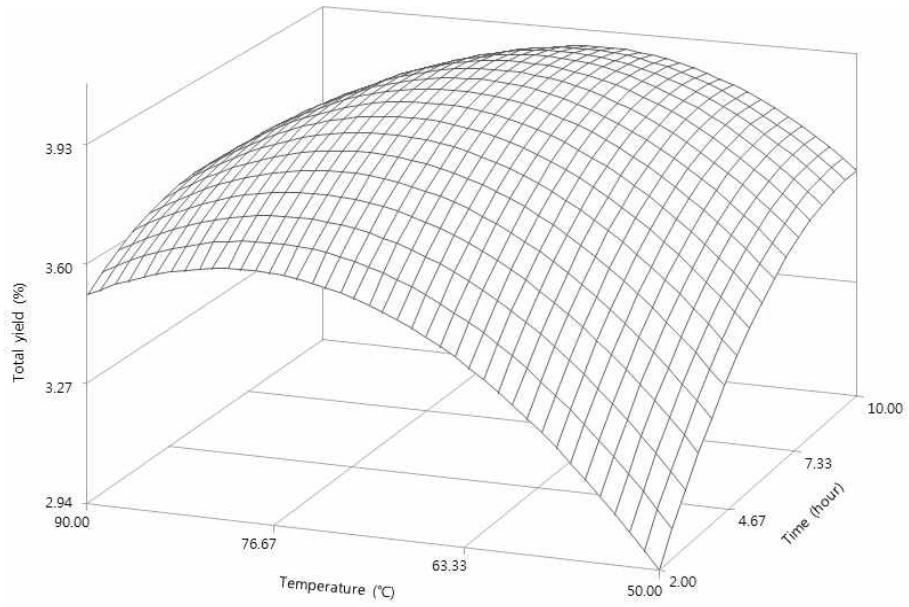


Fig. 2-9. Contour map(top) and response surface(bottom) for total yield of broccoli sprouts extract as a extraction condition of temperature and time.

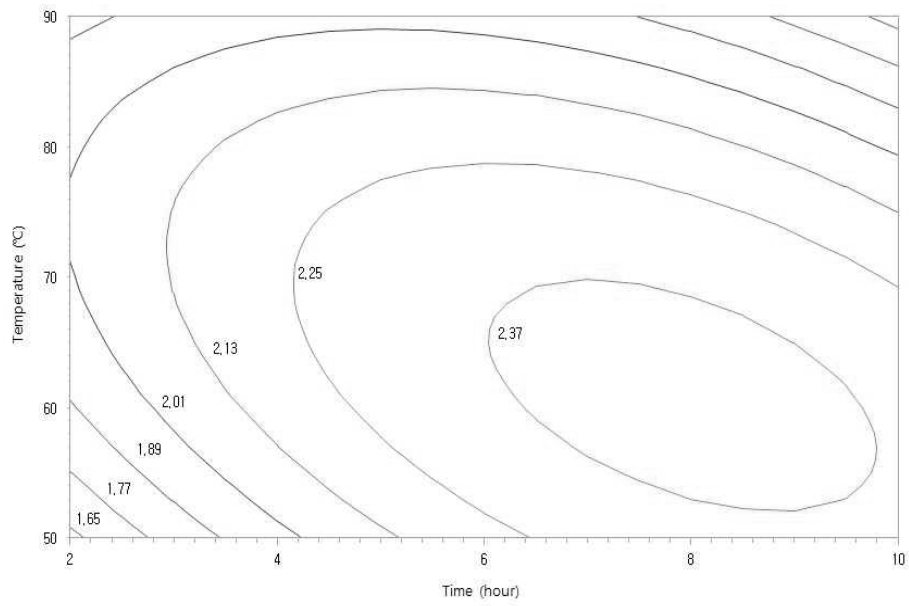
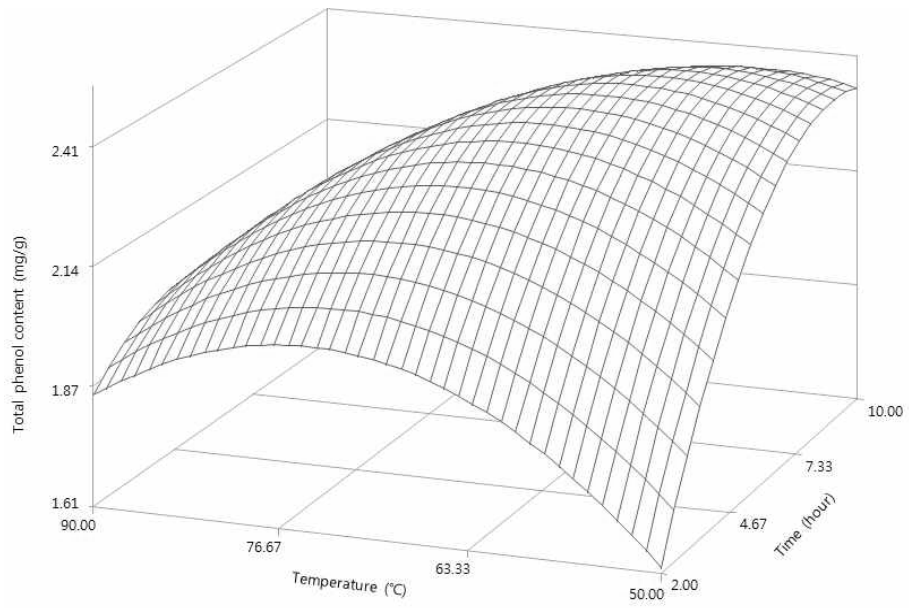


Fig. 2-10. Contour map(top) and response surface(bottom) for total phenol content of broccoli sprouts extract as a extraction condition of temperature and time.

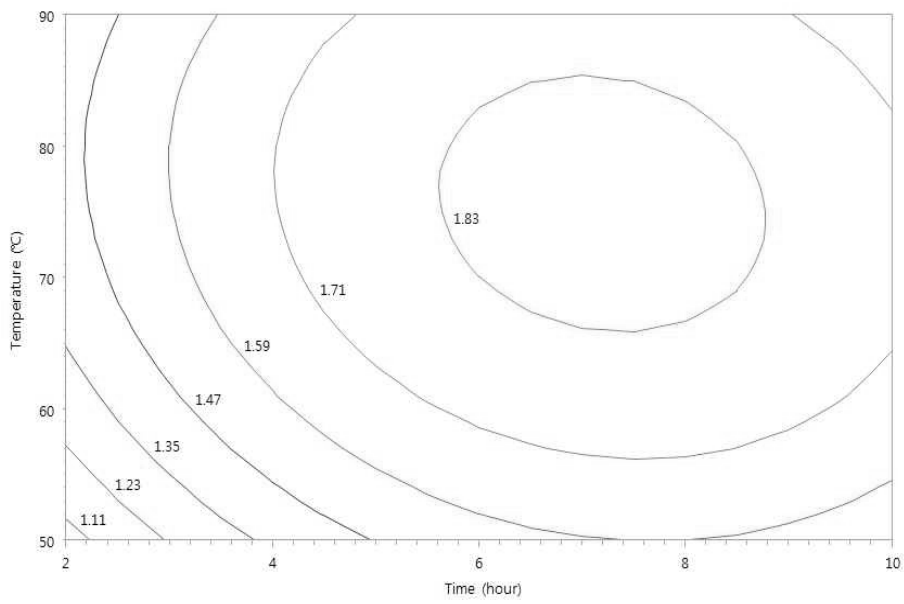
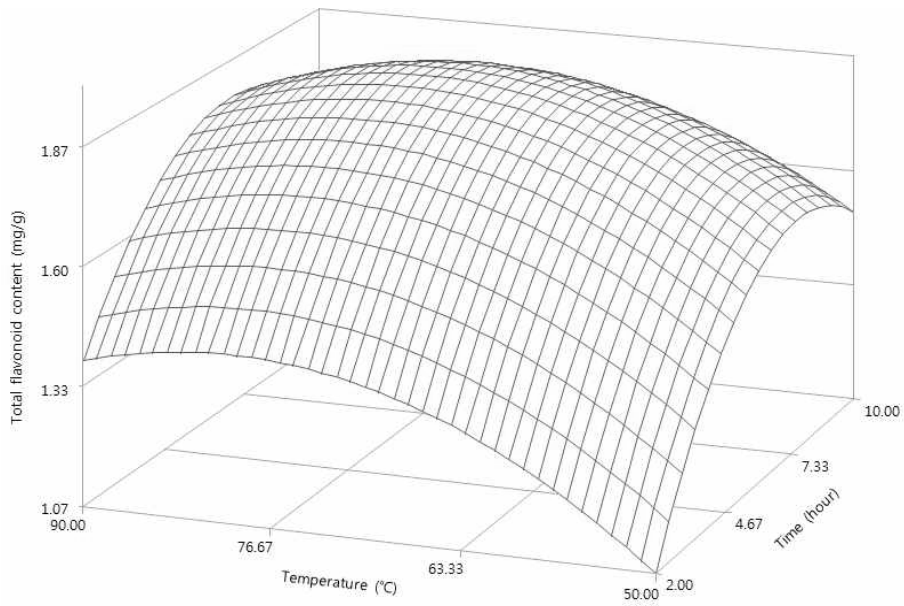


Fig. 2-11. Contour map(top) and response surface(bottom) for total flavonoid content of broccoli sprouts extract as a extraction condition of temperature and time.

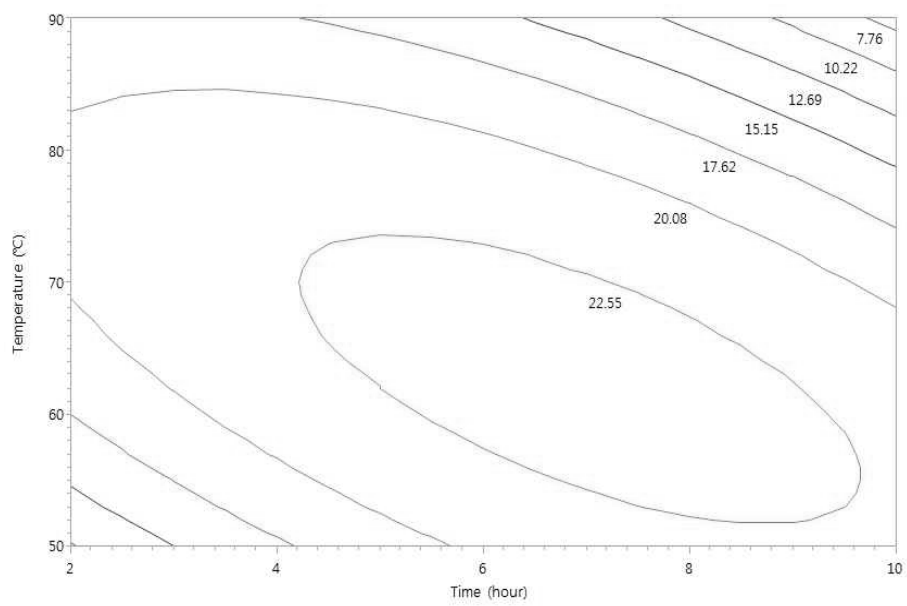
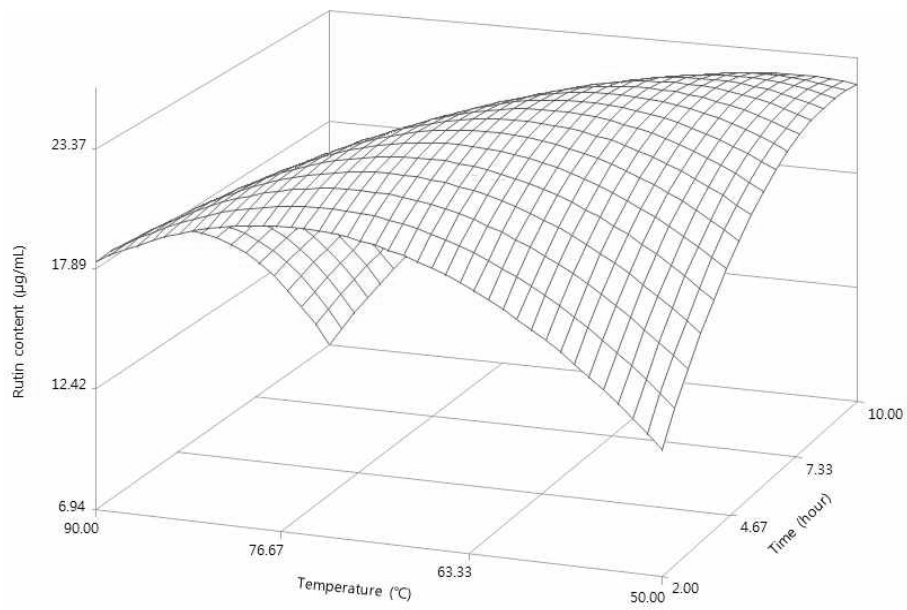


Fig. 2-12. Contour map(top) and response surface(bottom) for rutin content of broccoli sprouts extract as a extraction condition of temperature and time.



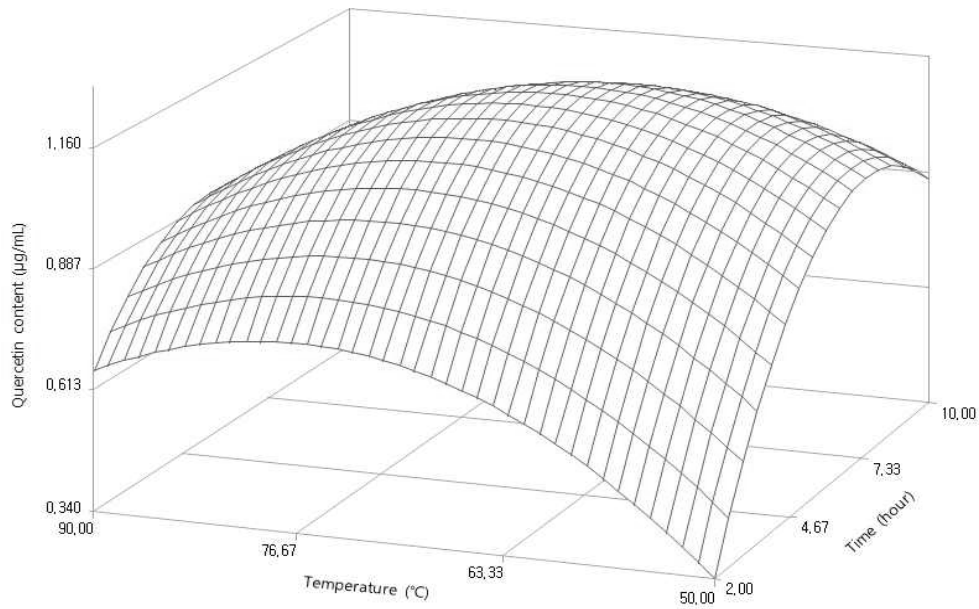
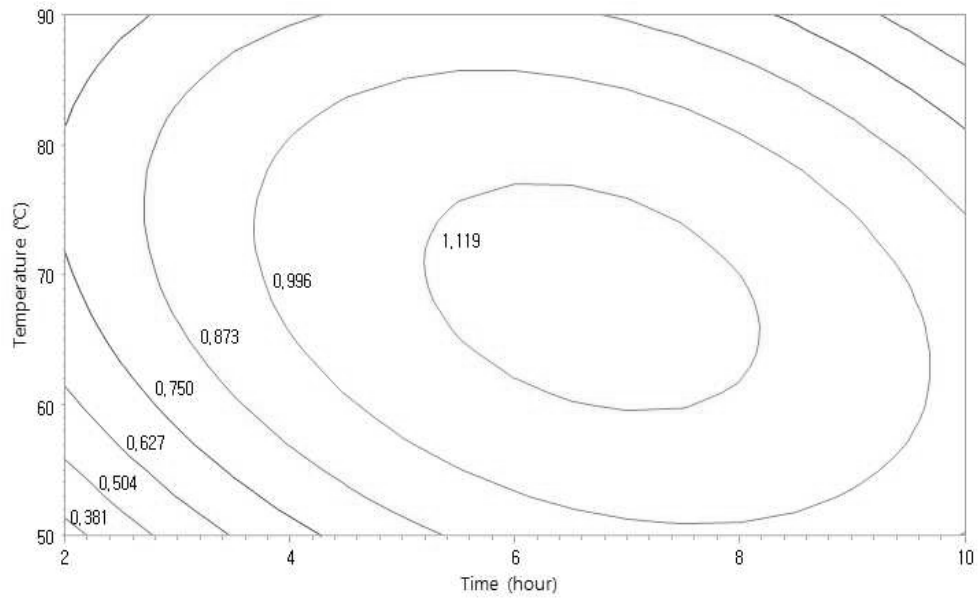


Fig. 2-13. Contour map(top) and response surface(bottom) for quercetin content of broccoli sprouts extract as a extraction condition of temperature and time.

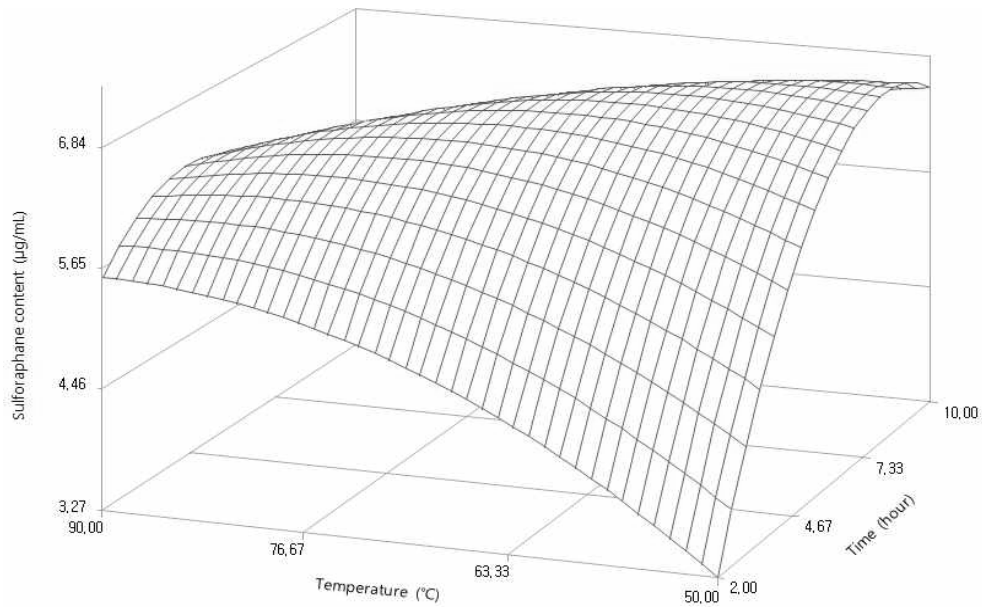
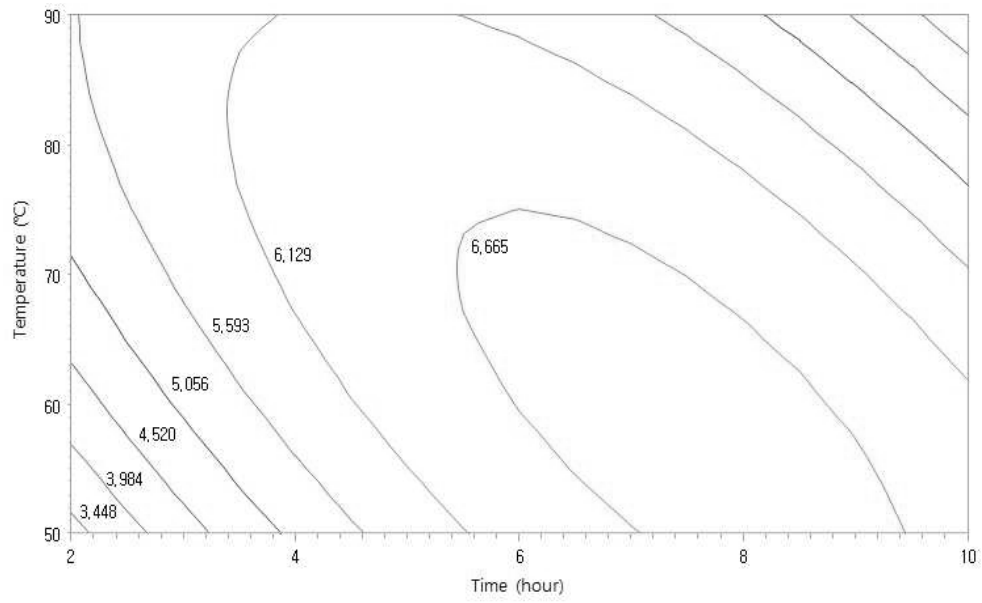


Fig. 2-14. Contour map(top) and response surface(bottom) for sulforaphane content of broccoli sprouts extract as a extraction condition of temperature and time.

### (나) 새싹브로콜리의 최적 추출조건의 예측 및 실증 시험

새싹브로콜리의 발효를 위한 전처리 조건으로 최적 추출조건을 설정하기 위하여 각 특성값의 반응표면을 superimposing하여 Fig. 2-15에 나타내었다. 각 항목의 최적 추출조건으로 도출된 최대값의 반응표면을 한 도면에 합한 결과 추출수율, 총 페놀화합물 함량, 총플라보노이드 함량 rutin, quercetin 및 sulforaphane 함량의 반응표면의 그림이 완전 또는 부분적으로 적합하였고, 그 일치하는 부분을 각 독립변수의 범위를 읽어 최적 추출조건의 범위로 설정하였다. 이 반응표면으로부터 설정될 수 있는 최적 조건 범위는 Fig. 2-15의 짙은 부분으로 새싹브로콜리 추출물의 최적 추출조건은 추출온도 67°C, 추출시간 7.3 시간을 최적 추출조건으로 예측되었다(Table 2-15).

각 성분의 반응표면을 superimposing 하여 예측된 최적추출조건(추출온도 67°C, 추출시간 7.3 시간)에서 실제 추출을 한 새싹브로콜리 추출물은 예측치와 실제 실험치의 비교를 통하여 모델의 정확도를 검증하였다(Table 2-16). 그 결과, 최적 추출조건에서의 총플라보노이드 함량은 예측된 조건에서의 값보다 실측된 값에서 그 함량이 높게 나타났고, 추출수율, 총 페놀화합물 함량, 루틴 함량, 퀘세틴 함량 및 설폴라판 함량 값은 실측값이 예측값보다 다소 낮은 값을 나타내었다.

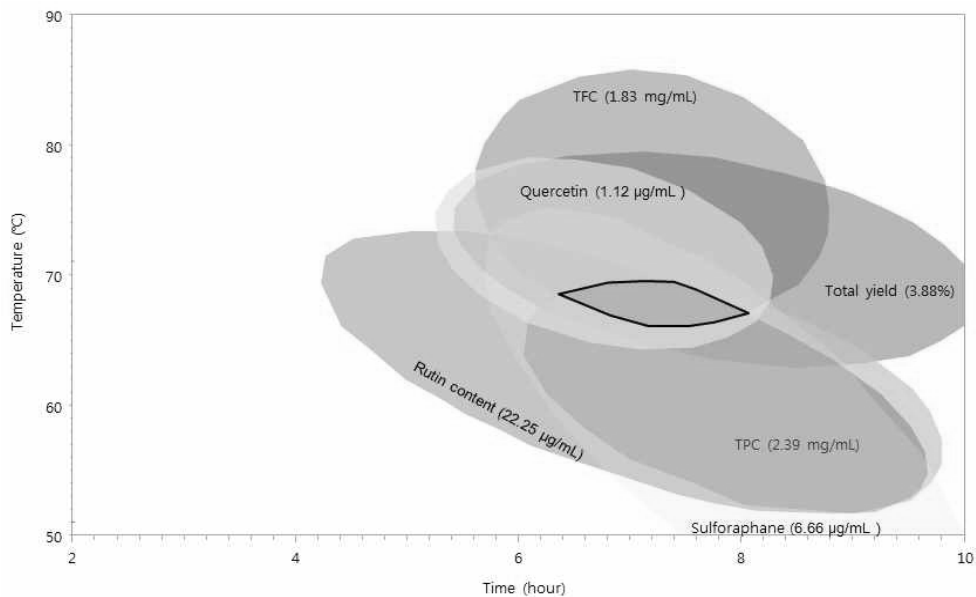


Fig. 2-15. Superimposed contour map for the optimization of total yield, total phenol, total flavonoid, rutin, quercetin and sulforaphane content as function of extraction temperature and time of broccoli sprouts extract

Table 2-15. The optimum extraction condition of broccoli sprouts extract by superimposed response surface

Extraction conditions	Range of predicted condition
Temperature (°C)	65 ~ 69 (67)
Time (hour)	6.4 ~ 8.2 (7.3)

Table 2-16. Comparison between predicted and observed condition for physicochemical qualities of broccoli sprouts extract

Physicochemical qualities	Predicted condition(A) <sup>1)</sup>	Observed condition(B) <sup>2)</sup>	B/A × 100(%)
Total yield (%)	4.55	4.39 ± 0.06	96.48
Total phenol content (mg/mL)	2.39	1.96 ± 0.11	82.00
Total flavonoid content (mg/mL)	1.84	1.98 ± 0.05	107.60
Rutin content (µg/mL)	23.02	22.56 ± 0.71	98.00
Quercetin content (µg/mL)	1.15	1.08 ± 0.10	94.91
Sulforaphane content (µg/mL)	6.77	6.52 ± 0.59	96.30

<sup>1)</sup> Calculated using the predicted equations for response variables.

<sup>2)</sup> Given optimal condition of independent variables : extraction temperature 67°C and time 7.3 hour

#### (다) 추출조건에 따른 새싹땅콩 추출물의 이화학적 특성

추출조건에 따른 새싹땅콩 추출물의 추출수율은 3.14~4.29%의 범위로 나타났으며(Table 2-17), 이를 바탕으로 한 회귀식은 Table 2-18과 같다. 추출수율에 대한  $R^2$ 값은 0.8837의 신뢰도를 보였으며,  $F$ value는 1% 이내 유의수준을 보였다. 추출수율 값에 대한 lack of fit의  $p$ -value는 0.0768로 나타나 model 적합성이 인정되었다(Table 2-18). 추출조건에 대한 영향은 추출온도보다 추출시간에 큰 영향을 미치는 것으로 확인되었다(Table 2-19). 추출조건에 따라 반응표면모델로 예측된 회귀분석 결과 정상점이 최대점으로 나타났으며, 최적점을 산출한 결과 추출수율의 최댓값은 4.26%이며, 이때의 추출조건은 추출온도 67.70°C, 추출시간 8.35 hr로 나타났다(Table 2-20) 새싹땅콩 추출물에 대한 추출조건별 반응표면의 변화는 Fig. 2-16과 같다.

추출조건에 따른 새싹땅콩 추출물의 총 페놀화합물 함량은 1.35~1.74 mg/mL의 범위로 나타났으며(Table 2-17), 이를 바탕으로 한 회귀식은 Table 2-18과 같다. 총 페놀화합물 함량에 대한  $R^2$ 값은 0.9826의 높은 신뢰도를 보였으며,  $F$ value는 1% 이내 유의적인 결과를 나타냈다. 새싹땅콩 추출물의 총 페놀화합물 함량 값에 대한 lack of fit의  $p$ -value는 0.0665로 나타나 model 적합성이 인정되었다(Table 2-18). 추출조건에 대한 영향은 추출온도와 추출시간 모두에 큰 영향을 받고 있는 것으로 나타났다(Table 2-19). 추출조건에 따른 새싹땅콩 추출물의 반응표면모델로 예측된 회귀분석 결과 정상점이 최대점으로 나타났으며, 최적점을 산출한 결과 총 페놀화합물 함량의 최댓값은 1.76 mg/mL이며, 이때의 추출조건은 추출온도 71.59°C, 추출시간 7.56 hr로 나타났다(Table 2-20). 새싹땅콩 추출물에 대한 추출조건별 반응표면의 변화는 Fig. 2-17과 같다.

추출조건에 따른 새싹땅콩 추출물의 총플라보노이드 함량의 범위는 0.18~0.36 mg/mL였으며(Table 2-17), 이를 바탕으로 한 회귀식은 Table 2-18과 같다.  $R^2$ 값은 0.7856로 회귀방정식에 대한 신뢰도를 보였으며,  $F$ value는 5%이내의 유의수준을 보였다. 새싹땅콩 추출물의 총플라보노이드 함량 값의 lack of fit의  $p$ -value는 0.3353으로 나타나 적합성이 인정되었다(Table 2-18). 추출조건에 대한 영향은 Table 2-19와 같이 추출시간 큰 영향을 받고 있는 것을 알 수 있었으며, 추출온도에서는 영향을 받지 않는 것으로 나타났다. 추출조건에 따라 반응표면 모델로 예측된 회귀분석 결과 정상점이 최대점으로 나타났으며, 총플라보노이드 함량은 0.31 mg/mL이었으며, 이때의 추출조건은 73.41°C, 6.41 hr로 나타났다(Table 2-20). 새싹땅콩 추출물의 총플라보노이드 함량값에 대한 추출조건별 반응표면의 변화는 Fig. 2-18과 같다.

추출조건에 따른 새싹땅콩 추출물의 resveratrol 함량은 0.11~0.19  $\mu$ g/mL의 범위로 나타났으며(Table 2-17), 이를 바탕으로 한 회귀식은 Table 2-18과 같다. Resveratrol 함량에 대한  $R^2$ 값은 0.9155의 높은 신뢰도를 보였으며,  $F$ value는 1% 이내 유의적인 결과를 나타냈다. 새싹땅콩 추출물의 Resveratrol 함량 값에 대한 lack of fit의  $p$ -value는 0.0640으로 나타나 model 적합성이 인정되었다(Table 2-18). 추출조건에 대한 영향은 추출온도와 추출시간 모두에 큰 영향을 받고 있는 것으로 나타났다(Table 2-19). 추출조건에 따른 새싹땅콩 추출물의 반응표면모델로 예측된 회귀분석 결과 정상점이 최대점으로 나타났으며, 최적점을 산출한 결과 Resveratrol 함량의 최댓값은 0.19  $\mu$ g/mL이며, 이때의 추출조건은 추출온도 76.25°C, 추출시간 9.79 hr로 나타났다(Table 2-20). 새싹땅콩 추출물에 대한 추출조건별 반응표면의 변화는 Fig. 2-19와 같다.

Table 2-17. Experimental data physicochemical characteristics of peanut sprouts extract under different extraction conditions based on central composite design by response surface analysis

Exp. No <sup>1)</sup>	Physicochemical characteristics			
	Total yield (%)	Total phenol content (mg/mL)	Total flavonoid content (mg/mL)	Resveratrol (µg/mL)
1	3.85	1.74	0.29	0.18
2	3.58	1.59	0.26	0.16
3	4.10	1.69	0.25	0.14
4	3.67	1.53	0.20	0.13
5	4.21	1.73	0.30	0.17
6	4.15	1.74	0.34	0.17
7	4.24	1.71	0.36	0.18
8	4.01	1.71	0.33	0.17
9	4.21	1.72	0.29	0.18
10	3.79	1.51	0.28	0.14
11	3.65	1.44	0.26	0.11
12	4.29	1.67	0.23	0.19
13	3.14	1.35	0.18	0.13

<sup>1)</sup>The number of experimental condition by central composite design.

Table 2-18. Regression coefficient and *t*-value of the predicted quadratic polynomial models on physicochemical characteristics of peanut sprouts extract

Term	Total yield (%)		Total phenol content (mg/mL)		Total flavonoid content (mg/mL)		Resveratrol content (µg/mL)	
	Coefficient	<i>t</i> -value	Coefficient	<i>t</i> -value	Coefficient	<i>t</i> -value	Coefficient	<i>t</i> -value
Intercept								
$\beta_0$	-4.091149	-1.78	-2.177989	-6.45	-0.876149	-1.81	-0.525920	-3.67
Linear								
$\beta_1$	0.172184	3.44	0.088553	12.02	0.022309	2.12	0.017622	5.64
$\beta_2$	0.608966	2.15	0.205769	4.94	0.115841	1.94	0.008297	0.47
Quadratic								
$\beta_{11}$	-0.001147	-3.61	-0.000612	-13.13	-0.000140	-2.10	-0.000123	-6.24
$\beta_{22}$	-0.028664	-3.61	-0.013120	-11.25	-0.007570	-4.54	-0.000900	-1.82
Cross product								
$\beta_{12}$	-0.002000	-0.53	-0.000125	-0.22	-0.000250	-0.31	0.000125	0.53
R <sup>2</sup>	0.8837		0.9826		0.7856		0.9155	
Pr>F	0.0036		<.0001		0.0270		0.0012	
Lack of fit	0.0768		0.0665		0.3353		0.0640	

Table 2-19. Regression analysis for extraction conditions of peanut sprouts extract

Response	F-Ratio	
	Temperature (°C)	Time (hour)
Total yield	4.45**	15.29***
Total phenol content	60.97***	92.55***
Total flavonoid content	2.04	7.78**
Resveratrol content	18.31***	8.16**

\*Significant at 10% level; \*\*significant at 5% level; \*\*\*significant at 1% level.

Table 2-20. Predicted levels of optimum extraction conditions for the maximum responses of peanut sprouts extract by the ridge analysis

Response	Predicted response				Morphology
	Response	Temp. (°C)	Time (hour)	Result	
Total yield (%)	Min	64.74	2.14	3.14	Maximum
	Max	67.70	8.35	4.26	
Total phenol content (mg/mL)	Min	60.99	2.42	1.34	Maximum
	Max	71.59	7.56	1.76	
Total flavonoid content (mg/mL)	Min	64.87	2.13	0.15	Maximum
	Max	73.41	6.41	0.31	
Resveratrol content (µg/mL)	Min	50.28	5.32	1.00	Maximum
	Max	76.25	9.79	0.19	



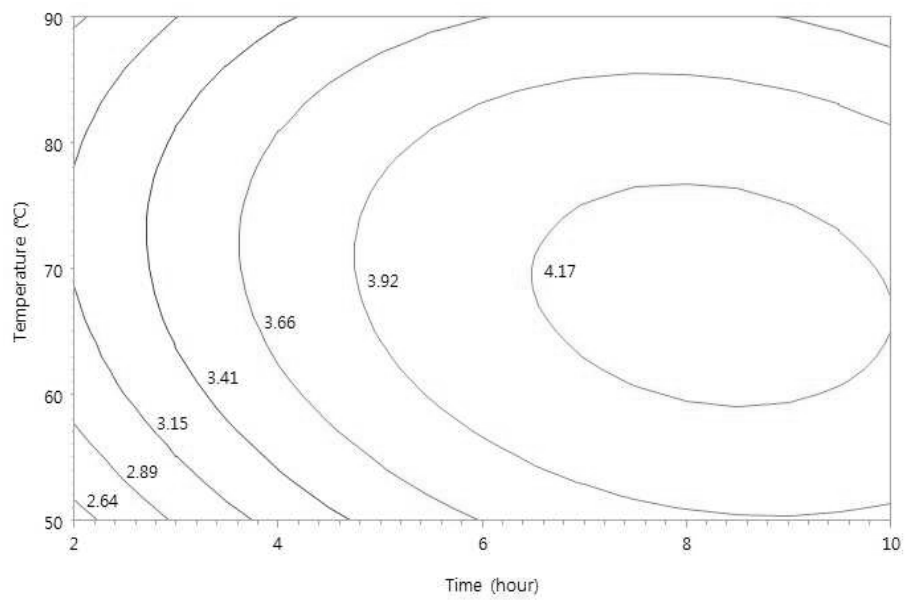
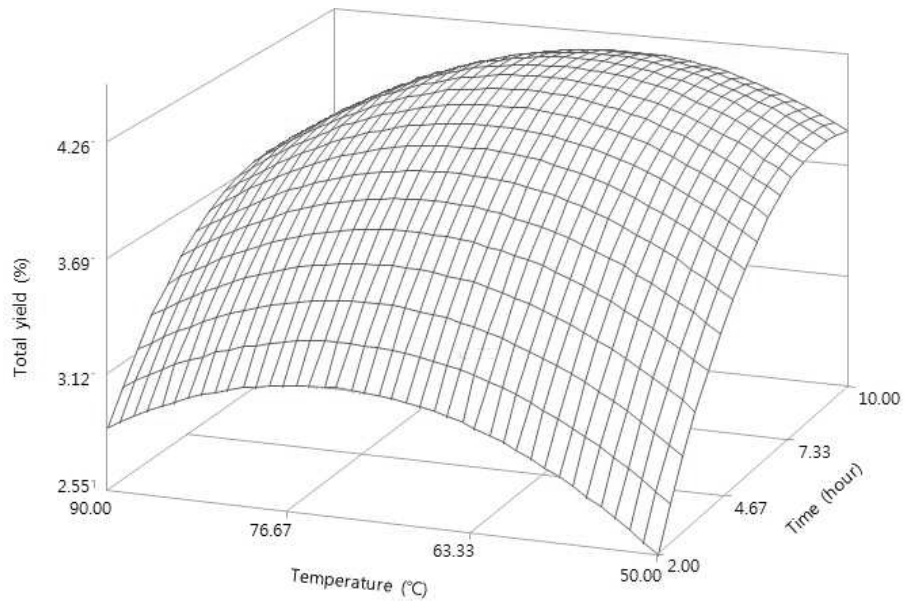


Fig. 2-16. Contour map(top) and response surface(bottom) for total yield of peanut sprouts extract as a extraction condition of temperature and time.

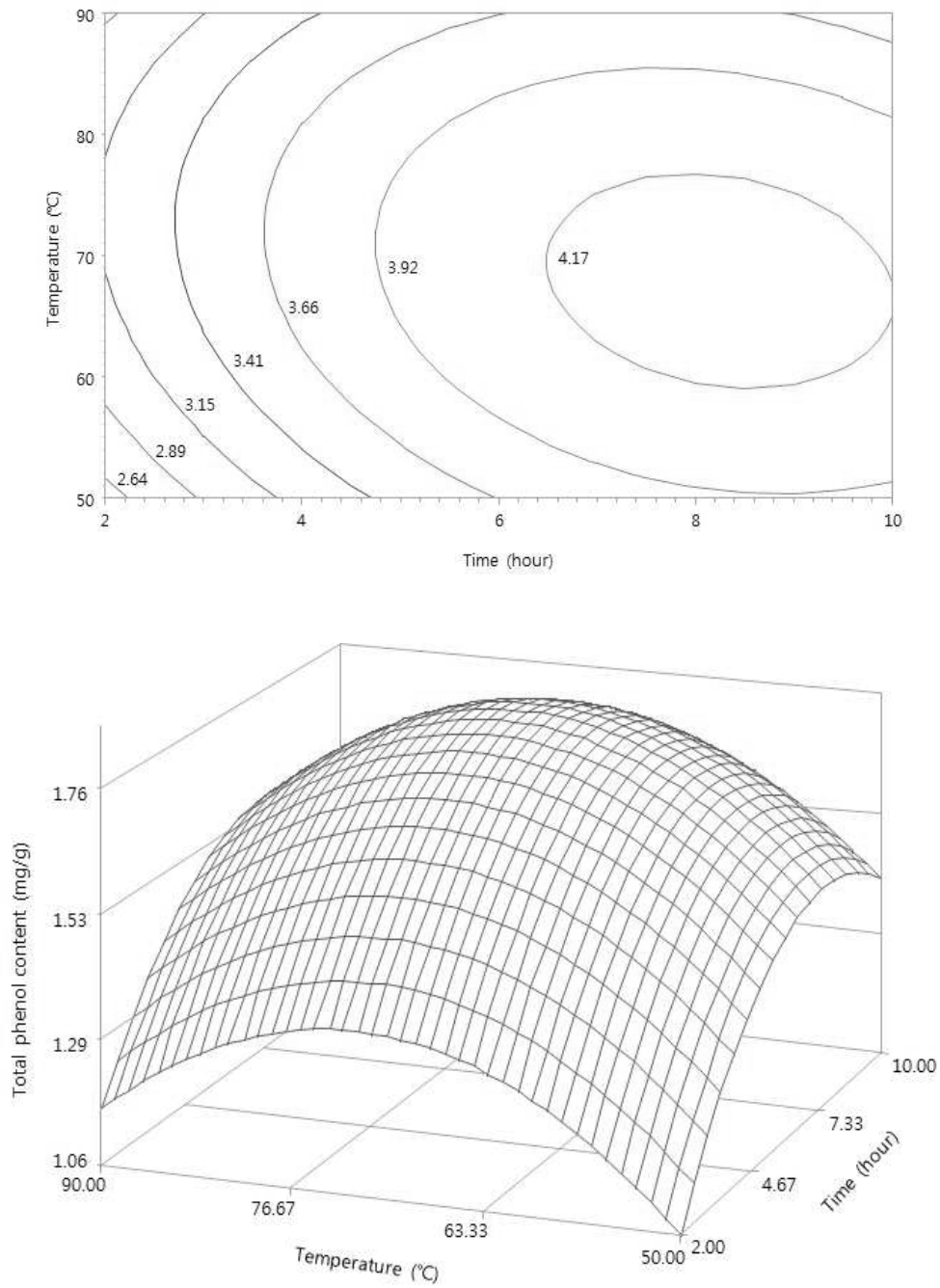


Fig. 2-17. Contour map(top) and response surface(bottom) for total phenol content of peanut sprouts extract as a extraction condition of temperature and time.

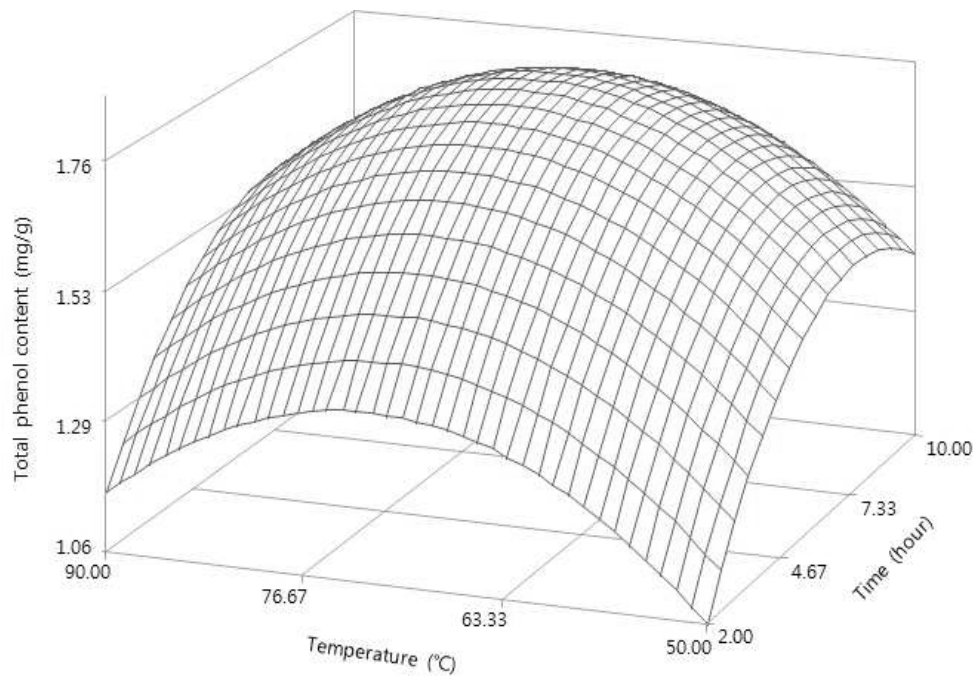
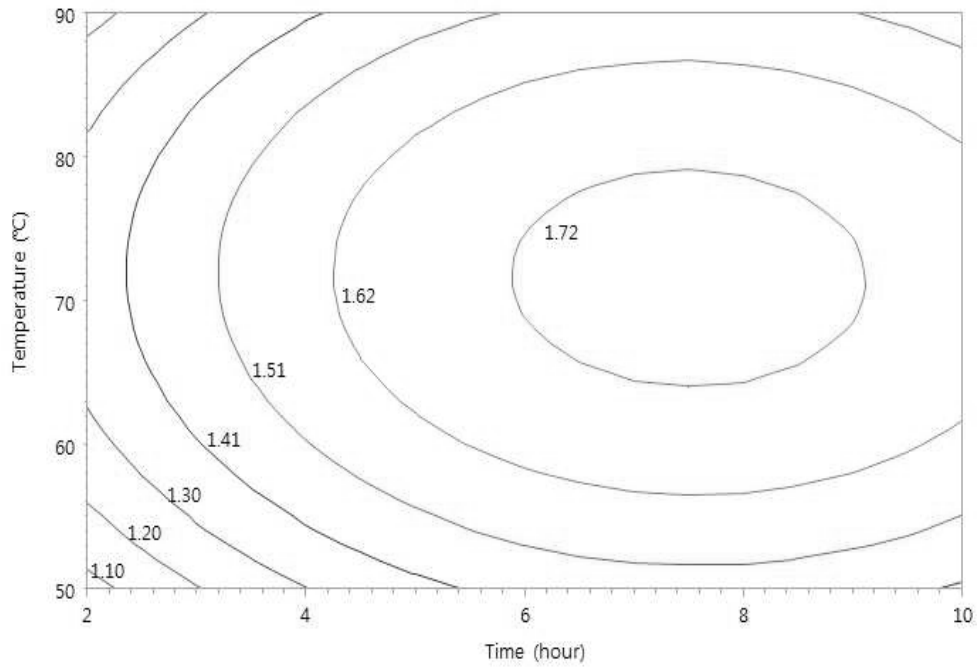


Fig. 2-18. Contour map(top) and response surface(bottom) for total flavonoid content of peanut sprouts extract as a extraction condition of temperature and time.

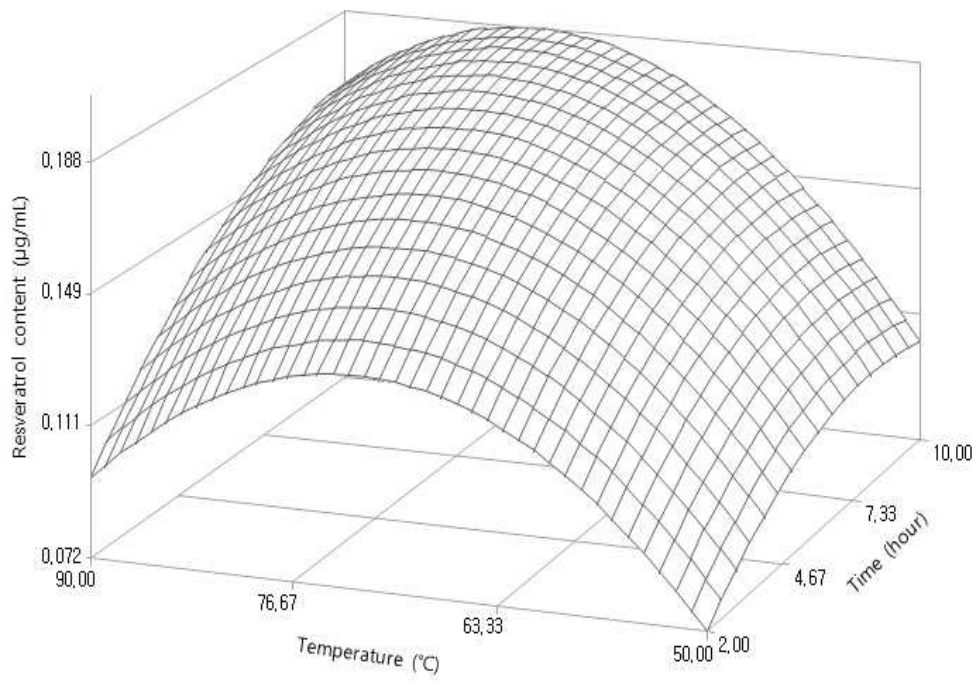
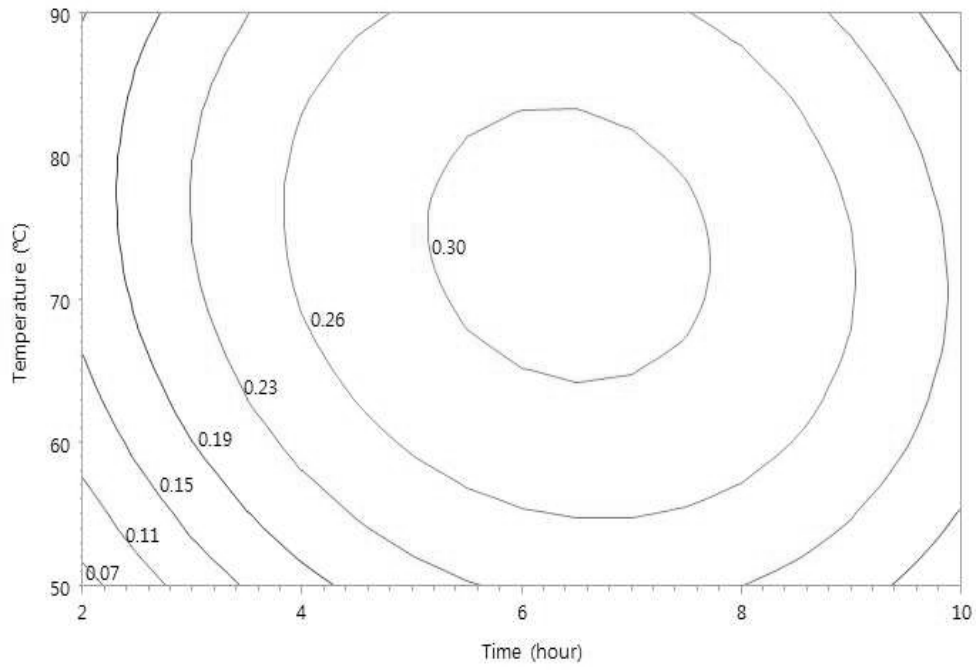


Fig. 2-19. Contour map(top) and response surface(bottom) for resveratrol content of peanut sprouts extract as a extraction condition of temperature and time.

### (라) 새싹땅콩의 최적 추출조건의 예측 및 실증 시험

새싹땅콩의 발효를 위한 전처리 조건으로 최적 추출조건을 설정하기 위하여 각 특성 값의 반응표면을 superimposing하여 Fig. 2-20에 나타내었다. 각 항목의 최적 추출조건으로 도출된 최대값의 반응표면을 한 도면에 합한 결과 추출수율, 총 페놀화합물 함량 및 총플라보노이드 함량에 대한 반응표면의 그림이 완전 또는 부분적으로 적합하였고, 그 일치하는 부분을 각 독립변수의 범위를 읽어 최적 추출조건의 범위로 설정하였다. 이 반응표면으로부터 설정될 수 있는 최적 조건 범위는 Fig. 8의 짙은 부분으로 새싹땅콩 추출물의 최적 추출조건은 추출온도 68℃, 추출시간 7.0 시간을 최적 추출조건으로 예측되었다(Table 2-21).

각 성분의 반응표면을 superimposing 하여 예측된 최적추출조건(추출온도 68℃, 추출시간 7.0 시간)에서 실제 추출을 한 새싹땅콩 추출물은 예측치와 실제 실험치의 비교를 통하여 모델의 정확도를 검증하였다(Table 2-22). 그 결과, 최적 추출조건에서의 추출수율과 총 플라보노이드 함량은 예측된 조건에서의 값보다 실측된 값에서 그 함량이 높게 나타났고, 총 페놀화합물 함량 값은 실측값이 예측값보다 다소 낮은 값을 나타내었다.

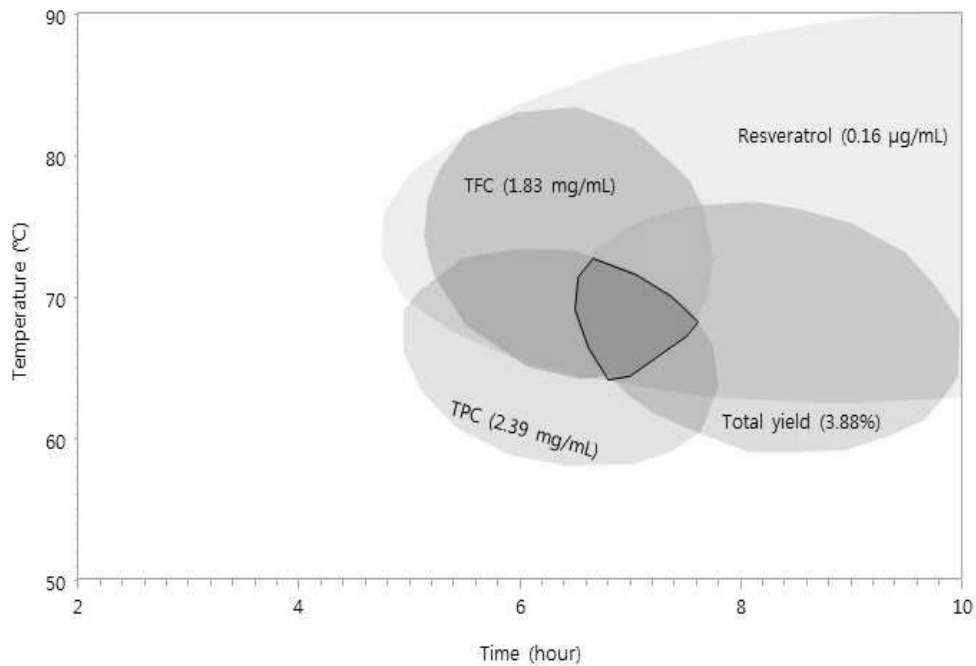


Fig. 2-20. Superimposed contour map for the optimization of total yield, total phenol, total flavonoid and resveratrol content as function of extraction temperature and time of peanut sprouts extract

Table 2-21. The optimum extraction condition of peanut sprouts extract by superimposed response surface

Extraction conditions	Range of predicted condition
Temperature (°C)	64 ~ 72 (68)
Time (hour)	6.5 ~ 7.6 (7.0)

Table 2-22. Comparison between predicted and observed condition for physicochemical qualities of peanut sprouts extract

Physicochemical qualities	Predicted condition(A) <sup>1)</sup>	Observed condition(B) <sup>2)</sup>	B/A × 100(%)
Total yield (%)	4.23	4.80 ± 0.06	113.47
Total phenol content (mg/mL)	1.76	1.25 ± 0.08	71.02
Total flavonoid content (mg/mL)	0.31	0.34 ± 0.02	109.67
Resveratrol content (µg/mL)	0.17	0.16 ± 0.02	94.11

<sup>1)</sup> Calculated using the predicted equations for response variables.

<sup>2)</sup> Given optimal condition of independent variables : extraction temperature 68°C and time 7.0 hour

## 나. 새싹채소(새싹브로콜리&새싹땅콩) 발효 균주 분리

### (1) 연구 수행 방법

#### (가) 실험재료

본 연구에서 사용된 새싹채소(땅콩 및 브로콜리)는 2018년에 수확된 것을 나눔공동체(안동)와 주식회사 광야(양평)에서 새싹땅콩과 새싹브로콜리를 각각 구입하여 실험에 사용하였다. 이들 새싹채소는 일정한 크기로 잘라 10배수의 물을 가하여 추출조건 실험에 사용하였다.

#### (나) 유산균 분리

유산균 분리에 사용한 발효식품은 재래시장에서 구입하거나 가정에서 수집하여 사용하였으며, 각 10 g을 90 mL의 생리멸균식염수로 현탁하여  $10^{-4}$ 까지 희석한 후 0.004% Bromophenol blue(BPB)가 첨가된 MRS agar 배지에 100  $\mu$ L 씩 도말하고, 37°C 에서 24시간 배양 후 나타난 독립된 colony 중 특징적인 colony를 순수 분리하였다. 순수 분리한 유산균은 MRS agar plate에 접종하여 37°C 에서 24시간 배양한 후 4°C 냉장보관하면서 사용하였다.

#### (다) $\beta$ -Glucosidase 활성 균주 선발

$\beta$ -Glucosidase 활성을 갖는 균주의 선발을 위해 esculin agar(esculin 0.1%, peptones 1.8%, ferric citrate 0.1%, agar 2%)법을 이용하여 esculin이 함유된 esculin agar 배지에 균주를 접종하여 배지 내에서의 색깔 변화를 관찰하였다. Esculin은  $\beta$ -glucosidase에 의하여 glucose 와 esculin으로 분리 되며 esculin은 ferric ammonium citrate와 반응하여 colony 주위에 black complex를 형성하게 된다(Fig. 2-21). 따라서 colony 주위에 black complex를 형성하는 균주를  $\beta$ -glucosidase 활성을 가지는 균주로 판단하였다.

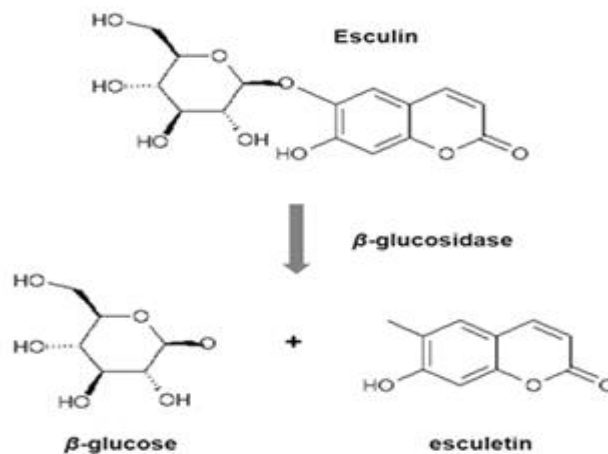


Fig 2-21. Decomposition of esculin into  $\beta$ -glucose and esculetin by  $\beta$ -glucosidase.

#### (라) $\beta$ -Glucosidase 활성능 측정

$\beta$ -Glucosidase 활성 측정은 1% CMC(carboxymethyl cellulose)가 첨가된 MRS 배지에 12시간 전배양한 균주를 접종하여 37°C에서 24시간 배양 후, 배양액을 4°C에서 3000 rpm으로 15분간 원심분리하여 세포를 제거하고, 상층액을 0.5mL 취하여 1 mL의 5 mM  $\rho$ -NPG 용액과 혼합한 후 37°C에서 30분간 반응시켰다. 반응액은 1 mL의 1M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 용액을 첨가하여 반응을 중지시키고, 생성된  $\rho$ -NP(p-nitrophenol) 405 nm에서 흡광도를 측정한 후  $\rho$ -NP의 검량곡선을 이용하여 농도를 환산하였다.

#### (마) 분리유산균주의 성장조건 확립

새싹땅콩과 새싹브로콜리 추출액을 농도별로 (5, 10, 15, 20, 50 및 100%) 첨가한 MRS agar에 분리균주를 희석도말하여 37°C에서 24시간 배양 후 균의 성장정도를 관찰하였다.

#### (바) 새싹채소 추출액의 유산발효 검토

- ① 균주 선별 : 분리균주의 새싹채소에 대한 발효능을 조사하기 위해 새싹채소 10%를 첨가하여 추출한 추출물을 기본 배지로 하여 위에서 선별된 유산균 3종을 MRS broth 배지에 12시간 전배양 후 2% 접종 후 발효시간을 달리하여 발효하였다.
- ② 부원료 과즙 농축액 첨가 : 새싹채소 추출물에 부원료(과채농축액 65 ° Brix)를 0, 5, 10, 15% 첨가하여 85°C에서 30분 살균 후 12시간 전 배양된 균주를 2% 접종 후 37°C에서 0, 1, 2, 3일 동안 발효하였다.
- ③ 생균수, pH 및 산도 측정: 유산균수(lactic acid bacteria) 측정은 발효액 1 mL를 취하여 10배수로 희석한 희석액을 MRS agar에 접종하여 37°C에서 24시간 배양 후 노란색 colony 집락을 계수하였다. pH는 pH meter (AG 8603, Mettler-Torledo, Schwerzenbach, Switzerland)로 측정하였으며, 적정산도는 0.1N NaOH로 pH 8.3이될 때까지 적정하고 이때 소비된 0.1N NaOH 양으로부터 lactic acid 함량(%)으로 나타내었다.

#### (사) 선발균주의 염기서열 분석과 계통분류

유산균 선발균주의 16S rRNA gene은 sequencing을 통하여 분석하였으며, NCBI data base(National Center for Biotechnology Information, Martland, USA)를 이용하여 분리된 균주와 type strain의 similarity(%)를 확인하였다.



## (2) 연구 수행 결과

### (가) 새싹브로콜리 발효를 위한 유산균 분리

#### ① 균주 분리

발효식품(김치) 시료로부터 11종의 유산균을 분리하였다(Fig. 2-22.). 일부 발효식품에서는 숙성에 따라 유산균이 거의 검출되지 않는 시료도 있었다. 발효식품으로부터 분리한 균주는 DU. La. B-1~7과 DU. LAB. K-1~3로 명명하였으며, 분리한 균주는 계대배양을 실시하여 단독 colony를 순수분리 하였다. 발효식품의 종류와 숙성도에 따른 colony의 분포는 달랐으며 희석배수가  $10^{-3}$ ~ $10^{-5}$  일 때 균주의 분리가 가장 용이하였다(Table 2-23).

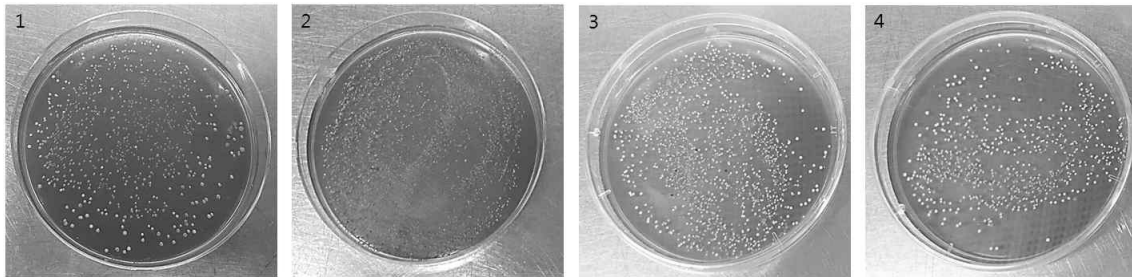


Fig. 2-22. Formation of colony on the MRS-BPB agar containing broccoli sprout by lactic acid bacteria. 1 : Watery kimchi, 2 : Fresh kimchi, 3 : Kimchi, 4 : Radish kimchi

Table 2-23. List of isolated lactic acid bacteria of broccoli sprouts

Strain	Sample	Colony color
DU. La. B-1	Watery kimchi	Sky blue
DU. La. B-2	Fresh kimchi	Sky blue
DU. La. B-3	Fresh kimchi	Blue
DU. La. B-4	Fresh kimchi	Blue
DU. La. B-5	Kimchi	Sky blue
DU. La. B-6	Kimchi	Sky blue
DU. La. B-7	Kimchi	Blue
DU. La. B-8	Kimchi	Blue
DU. LAB. K-1	Radish kimchi	Sky blue
DU. LAB. K-2	Radish kimchi	Sky blue
DU. LAB. K-3	Radish kimchi	Blue

## ② 분리유산균의 $\beta$ -glucosidase 활성균주 선발

$\beta$ -glucosidase 활성 균주를 선발하고자 esculin agar법을 사용하였다. 새싹브로콜리의 분리유산균들이 esculin에 의해 black complex의 생성 여부에 따른 결과는 Fig. 2-23과 같으며, black complex 길이는 Table 16과 같다. Esculin agar에서 black complex 생성은 DU. La. B-1균주를 제외한 모든 분리유산균에서 colony 주변에 black circle을 형성하여  $\beta$ -glucosidase 활성이 있는 것으로 나타났으며, DU. LAB. K-3 균주가 black complex 길이가 가장 크게 나타났다.

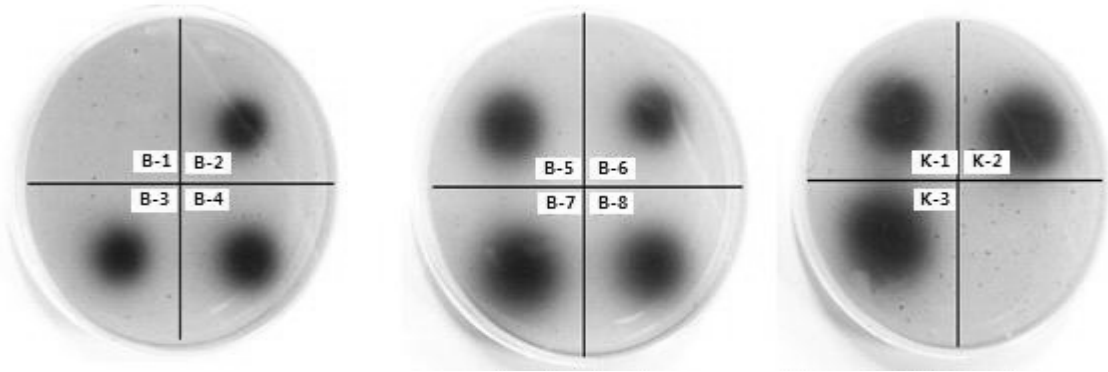


Fig. 2-23. Screening on esculin agar of isolated shoot broccoli lactic acid bacteria producing  $\beta$ -glucosidase activity

## ③ 선발된 균주들의 $\beta$ -glucosidase 활성능 측정

새싹브로콜리에서 분리된 11종의 유산균에 대한  $\beta$ -glucosidase 활성을 측정한 결과는 Table 2-24와 같이 esculin agar에서 black complex 생성하지 않은 DU. La. B-1균주가  $\beta$ -glucosidase 활성이 2.74 mU/mL로 가장 낮게 나타났으며, DU. La. B-7균주가  $\beta$ -glucosidase 활성이 5.85 mU/mL로 가장 높은 활성을 나타내었다.

Table 2-24. The length of black complex on the esculin agar plate and  $\beta$ -glucosidase activity for isolation broccoli sprout lactic acid bacteria

Strain	Length of black complex (mm)	$\beta$ -glucosidase activity (unit : mU/ml)
DU. La. B-1	0.00±0.00	2.74±0.06
DU. La. B-2	14.33±1.15	4.68±0.03
DU. La. B-3	15.00±2.65	4.79±0.04
DU. La. B-4	18.00±1.73	4.94±0.06
DU. La. B-5	18.67±0.58	4.92±0.08
DU. La. B-6	16.00±1.00	4.85±0.04
DU. La. B-7	21.67±0.58	5.85±0.01
DU. La. B-8	20.67±0.58	5.69±0.07
DU. LAB. K-1	21.67±0.58	5.09±0.04
DU. LAB. K-2	22.33±0.58	4.64±0.11
DU. LAB. K-3	23.00±1.00	4.75±0.03

#### ④ 분리유산균주의 성장조건 확립

새싹브로콜리 추출액을 5, 10, 15, 20, 50, 100% 함유한 배지에서 분리유산균주의 생육능을 검토 한 결과는 Table 2-25와 같다. DU. La. B-1과 DU. LAB. K-7균주를 제외한 모든 분리유산균들은 새싹브로콜리 추출액이 함유된 배지에서 colony가 뚜렷하게 생성된 것을 알 수 있었다.

Table 2-25. Studies on the growth ability of a agar containing broccoli sprout extract

Strain	Broccoli sprout extraction(%)					
	5	10	15	20	50	100
DU. La. B-1	+	+	+	+	+	+
DU. La. B-2	+++	+++	+++	+++	+++	+++
DU. La. B-3	+++	+++	+++	+++	+++	+++
DU. La. B-4	+++	+++	+++	+++	+++	+++
DU. La. B-5	+++	+++	+++	+++	+++	+++
DU. La. B-6	+++	+++	+++	+++	+++	+++
DU. La. B-7	+++	+++	+++	+++	+++	+++
DU. La. B-8	+++	+++	+++	+++	+++	+++
DU. LAB. K-1	+++	+++	+++	+++	+++	+++
DU. LAB. K-2	+++	+++	+++	+++	+++	+++
DU. LAB. K-3	+++	++	++	++	++	++

⑤ 새싹브로콜리의 유산발효 검토

㉞ 균주 선별 : 발효식품으로부터 분리한 유산 균주에 대한 새싹브로콜리 발효 여부를 검토하기 위하여 새싹브로콜리에  $\beta$ -glucosidase 활성능이 좋은 3종의 균주(DU. La. Broccoli-7, 8, DU. LAB. K-1)를 배양하여 37°C incubator에서 48시간 배양하여 생균수, pH, 산도를 측정하여 균주의 성장 및 발효능을 확인하였다(Table 2-26). 그 결과 3종의 균주 모두가 새싹브로콜리에서 성장이 가능한 것으로 나타났으며, 세 균주 모두가 24시간 내에 왕성하게 증식하는 것으로 보였으며, 발효 종류 후 DU. LAB. K-1에서 가장 많은 균수 증가량을 보였다. pH의 경우는 모든 균주에서 발효시간이 경과할수록 감소하는 것으로 나타났으며, DU. LAB. K-1 균주에서 가장 낮은 pH 값이 측정되었다. 산도의 경우는 균주 간에 큰 차이가 없는 것으로 나타났으며, 발효 24시간 동안 산도가 크게 증가하는 경향을 보였으며, 24시간 후 48시간까지는 산도의 변화가 거의 없는 것으로 나타났다. 따라서 새싹브로콜리의 발효를 위해서는 유산균수 증가량과 pH 감소폭이 가장 큰 DU. LAB. K-1 균주를 발효균주로 선정하였다.

Table 2-26. pH, acidity and viable cell count change with broccoli sprout fermentation time and different LAB

		Fermentation time (day)	DU. La. B-7	DU. La. B-8	DU. LAB. K-1
pH		0	5.64±0.01	5.45±0.00	5.20±0.00
		1	4.04±0.00	3.99±0.00	3.75±0.00
		2	4.07±0.00	3.99±0.00	3.80±0.00
Acidity(%)		0	0.08±0.01	0.09±0.00	0.08±0.00
		1	0.19±0.00	0.20±0.00	0.21±0.00
		2	0.18±0.00	0.18±0.00	0.22±0.00
Viable cell count (Log10 CFU/ml)		0	11.09±0.00	11.08±0.01	11.13±0.02
		1	17.65±0.00	17.47±0.02	17.70±0.00
		2	19.07±0.01	18.80±0.00	19.45±0.01

㉟ 부원료 과co 농축액 첨가 : 새싹브로콜리의 유산발효에 부원료 첨가가 새싹브로콜리의 발효에 미치는 영향을 조사하기 위해 부원료(과채 농축액, 65 ° Bx)의 농도를 0, 5, 10, 15% 첨가하여 DU, LAB. K-1 균주를 접종하여 37°C에서 하루간격으로 3일간 발효하여 pH, 산도 및 생균수를 측정한 결과는 Table 2-27과 Fig. 2-24에 나타내었다. pH의 경우 부원료 무첨가군과 농도별 첨가군간의 큰 차이가 없이 모두 유사한 pH 변화를 나타내었으며, 그중 부원료를 5% 첨가하였을 때 가장 크게 감소하는 것으로 나타났다. 산도의 경우는 발효 완료 후 부원료 무첨가군의 산도 증가량이 0.15%였으나, 부원료를 첨가하여 발효 한 경우 산도의 증가량이 0.62~0.75%로 부원료 첨가한 경우 산도증가량이 월등히 높은 것으로 나타났으며, 부원료 첨가 농도가 많을수록 산도 증가량이 큰 것으로 나타났다. 생균수의 경우는 무첨가군과 농도별 첨가군 간에 큰 차이가 없이 모든 시험군에 있어 유사한 균수 성장과 증가량을 보였다, 따라서 새싹브로콜리의 발효를 위해 부원료의 무첨가보다는 최저 농도인 5%의 첨가가 발효에

좋은 것으로 생각된다.

Table 2-27. pH, acidity and viable cell count change with broccoli sprout different sub. material concentration

	Time (day)	Sub. material concentration (%)			
		0	5	10	15
pH	0	5.29±0.01	5.25±0.00	5.20±0.01	5.18±0.01
	1	3.74±0.00	3.60±0.00	3.71±0.01	3.81±0.01
	2	3.79±0.01	3.45±0.01	3.55±0.00	3.65±0.00
	3	3.78±0.00	3.37±0.00	3.47±0.00	3.57±0.00
Acidity(%)	0	0.08±0.00	0.13±0.00	0.17±0.00	0.21±0.00
	1	0.23±0.01	0.54±0.00	0.64±0.01	0.71±0.00
	2	0.23±0.01	0.65±0.00	0.84±0.01	0.92±0.00
	3	0.23±0.00	0.75±0.01	0.89±0.00	0.96±0.00
Viable cell count (Log10 CFU/ml)	0	11.09±0.00	11.09±0.00	11.10±0.00	11.10±0.00
	1	19.90±0.00	20.17±0.01	20.13±0.01	19.74±0.01
	2	22.39±0.01	23.14±0.01	22.97±0.00	22.12±0.03
	3	23.34±0.02	22.76±0.03	23.26±0.02	23.25±0.03

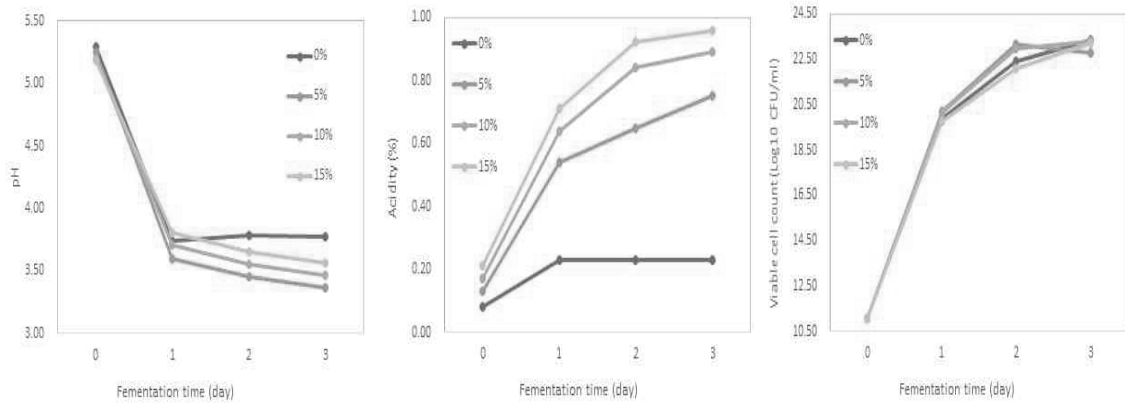


Fig. 2-24. pH, acidity and viable cell count change with broccoli sprout different sub. material concentration

⑥ 선발 균주의 염기서열 분석과 계통분류

분리 균주 중  $\beta$ -glucosidase 활성능이 높고, 새싹브로콜리에서 발효가 가장 우수한 DU. LAB. K-1 균주를 16 rRNA gene의 염기서열을 분석한 결과 Table 2-28과 같다. NCBI Blast search를 통해 DU. LAB. K-1를 분석한 결과 *Pediococcus acidilactici* 종들과 99%의 유사성을 보였으며 표준균주와의 유연관계를 나타낸 phylogenetic 과정의 결과는 Fig. 2-25와 같다. 본 실험에서 분리된 균주를 *Pediococcus acidilactici*로 동정하고 *Pediococcus acidilactici* DU. LAB. K-1로 명명하였다.

Table 2-28. Result of 16R rRNA partial sequencing of DU. LAB. K-1

Standard strain	Difference/compared	Similarity
<i>Pediococcus acidilactici</i> DSM 20284	3/1433	99%
<i>Pediococcus acidilactici</i> NGRI 0510Q	17/1440	98%
<i>Pediococcus pentosaceus</i> strain DSM 20336	3/1433	98%
<i>Pediococcus stilesii</i> strain FAIR-E 180	1/1432	98%
<i>Pediococcus claussenii</i> strain ATCC BAA-344	5/1431	97%

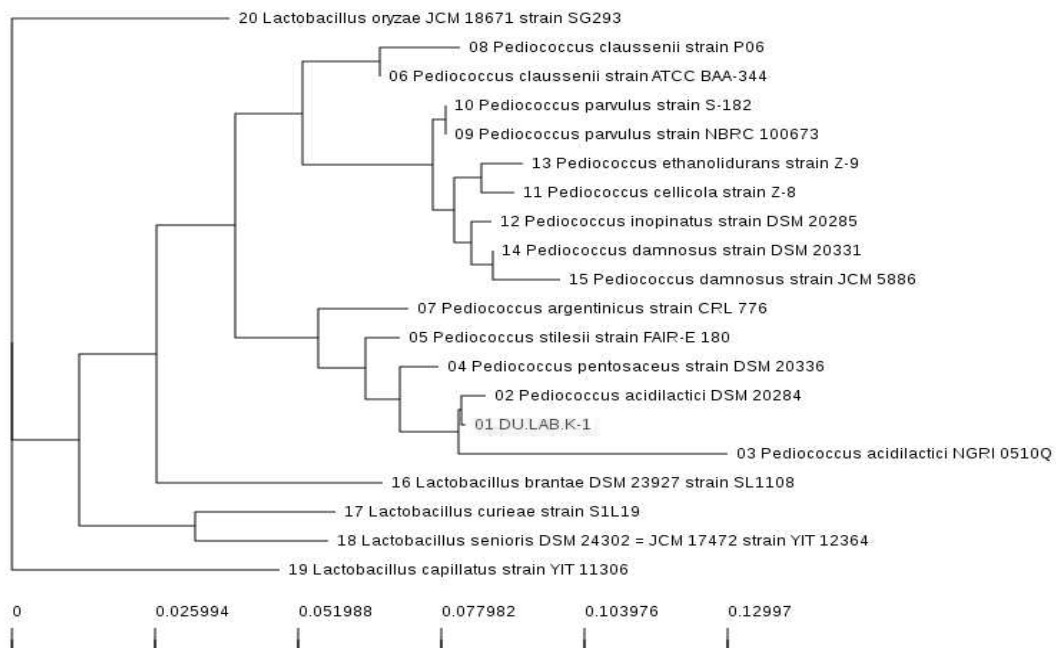


Fig. 2-25. Phylogenetic tree based on 16S rRNA gene sequence, showing the phylogenetic relationships among strain DU. LAB. K-1 isolated and related species.

## (나) 새싹땅콩 발효를 위한 유산균 분리

### ① 균주분리

발효식품으로부터 유산균을 분리하기 위하여 BPB를 첨가한 MRS agar을 사용하였다. 여러 발효식품 시료를 생리멸균식염수를 이용하여  $10^{-1} \sim 10^{-4}$ 으로 희석하여 MRS agar plate에 도말하여 37°C 에서 배양한 후, 균주의 크기, 색, 모양, 투명도 등을 관찰하여 총 11균주를 순수분리하여 DU. La. P로 명명하였다(Table 2-29). MRS-BPB agar는 맹 등의 연구를 참고하면 *Lactobacillus*들은 균락이 크고 진한 청색을 띠며 *Streptococcus* 속 균들은 작고 흰색의 균이고, *Leuconostoc*들은 균락이 크고 주변이 하늘색 colony를 띤다고 보고하였다. 새싹땅콩과 4개의 분리원을 MRS broth에서 하루정도 배양하여 MRS-BPB agar에서 도말하였으며(Fig. 2-26),

Table 2-29. List of isolated lactic acid bacteria of peanut sprouts

Strain	Sample	Colony color
DU. La. P-1	Watery kimchi	Sky blue
DU. La. Ps-2	Fresh kimchi	Sky blue
DU .La. P-3	Fresh kimchi	Blue
DU. La. P-4	Kimchi	Sky blue
DU. La. P-5	Kimchi	Sky blue
DU. La. P-6	Kimchi	Blue
DU. La. P-7	Kimchi	Blue
DU. La. P-8	Watery kimchi 2	Sky blue
DU. La. P-9	Watery kimchi 2	Sky blue
DU. La. P-10	Watery kimchi 2	White
DU. La. P-11	Watery kimchi 2	Blue

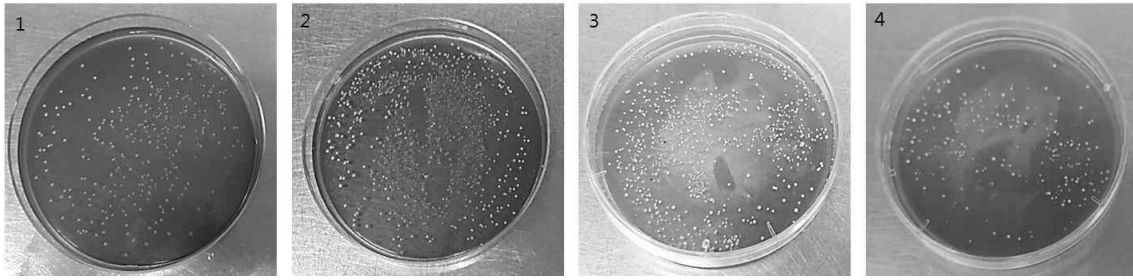


Fig. 2-26. Formation of colony on the MRS-BPB agar containing peanut sprout by lactic acid bacteria. 1 : Watery kimchi, 2 : Fresh kimchi, 3 : Kimchi, 4 : Watery kimchi 2

## ② 분리유산균의 $\beta$ -glucosidase 활성균주 선발

$\beta$ -glucosidase 활성 균주를 선발하고자 esculin agar법을 사용하였다. 새싹땅콩에서 분리한 유산균들의 esculin에 의해 black complex의 생성 여부에 따른 결과는 Fig. 2-27과 같으며, black complex 길이는 Table 2-30와 같다. Esculin agar에서 black complex 생성은 DU.La..P-1균주를 제외한 모든 분리유산균에서 colony 주변에 black circle을 형성하여  $\beta$ -glucosidase 활성이 있는 것으로 나타났으며, DU. La. P-9균주가 black complex 길이가 가장 크게 나타났다.

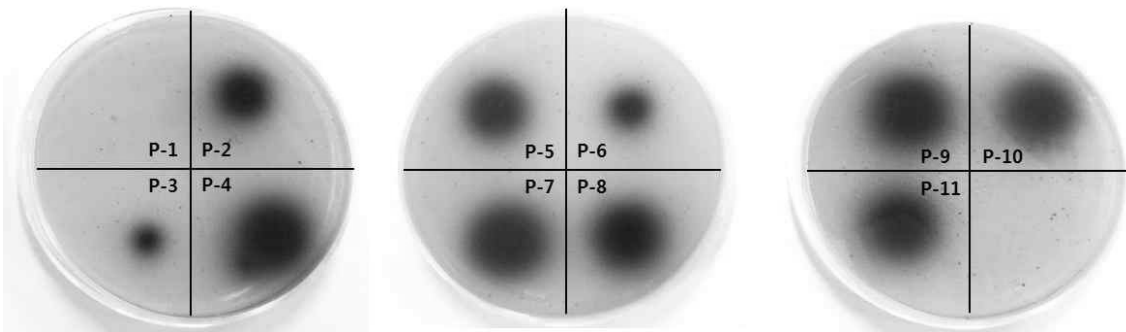


Fig. 2-27. Screening on esculin agar of isolated peanut sprout lactic acid bacteria producing  $\beta$ -glucosidase activity



Table 2-30. The length of black complex on the esculin agar plate and  $\beta$ -glucosidase activity for isolation peanut sprout lactic acid bacteria

Strain	Length of black complex (mm)	$\beta$ -glucosidase activity (unit : mU/mL)
DU. La. P-1	0.00±0.00	2.59±0.06
DU. La. P-2	16.00±1.00	4.70±0.10
DU. La. P-3	11.67±1.53	4.52±0.16
DU. La. P-4	19.33±1.53	4.61±0.04
DU. La. P-5	17.67±0.58	4.77±0.13
DU. La. P-6	13.67±0.58	4.88±0.03
DU. La. P-7	20.33±0.58	5.08±0.09
DU. La. P-8	20.00±2.00	4.87±0.15
DU. La. P-9	22.33±1.53	4.60±0.04
DU. La. P-10	19.33±1.15	4.65±0.05
DU. La. P-11	21.00±1.00	5.30±0.03

### ③ 선발된 균주들의 $\beta$ -glucosidase 활성능 측정

새싹땅콩에서 분리된 11종의 유산균에 대한  $\beta$ -glucosidase 활성을 측정한 결과는 Table 2-30과 같이 esculin agar에서 black complex 생성하지 않은 DU. La. P-1균주가  $\beta$ -glucosidase 활성이 2.59 mU/mL로 가장 낮게 나타났으며, DU. La. P-11균주가  $\beta$ -glucosidase 활성이 5.30 mU/mL으로 가장 높은 활성을 나타내었다.

### ④ 분리유산균주의 성장조건 확립

새싹땅콩 추출액을 5, 10, 15, 20, 50, 100% 함유한 배지에서 분리유산균주의 생육능을 검토한 결과는 Table 2-31과 같다. DU. La. P-1, 3균주를 제외한 모든 분리유산균들은 새싹땅콩 추출액이 함유된 배지에서 colony가 뚜렷하게 생성된 것을 알 수 있었다.

Table 2-31. Studies on the growth ability of a agar containing peanut sprout extract

Strain	Peanut sprouts extract (%)					
	5	10	15	20	50	100
DU. La. P-1	++	++	+	+	+	+
DU. La. P-2	+++	+++	+++	+++	+++	+++
DU. La. P-3	++	++	++	++	++	++
DU. La. P-4	+++	+++	+++	+++	+++	+++
DU. La. P-5	+++	+++	+++	+++	+++	+++
DU. La. P-6	+++	+++	+++	+++	+++	+++
DU. La. P-7	+++	+++	+++	+++	+++	+++
DU. La. P-8	+++	+++	+++	+++	+++	+++
DU. La. P-9	+++	+++	+++	+++	+++	+++
DU. La. P-10	+++	+++	+++	+++	+++	+++
DU. La. P-11	+++	+++	+++	+++	+++	+++

⑤ 새싹땅콩의 유산발효 검토

㉠ 균주 선별 : 발효식품으로부터 분리한 유산 균주에 대한 새싹땅콩 발효 여부를 검토 하기 위하여 새싹땅콩에  $\beta$ -glucosidase 활성능이 좋은 3종의 균주를 배양하여 37°C incubator에서 48시간 배양하여 생균수, pH, 산도를 측정하여 균주의 성장 및 발효 능을 확인하였다(Table 2-32). 그 결과 3종의 균주 모두가 새싹땅콩에서 생장이 가능한 것으로 나타났으며, DU. La. P-7과 11 균주는 24시간 내에 균주가 왕성하게 증식하는 것으로 보였으며, 발효 종료 후 DU. La. P-11에서 가장 많은 균수 증가량을 보였다. pH의 경우는 모든 균주에서 발효시간이 경과할수록 감소하는 것으로 나타났으며, 균주 간에 차이는 없는 것으로 나타났다. 산도의 경우 또한 균주 간에 큰 차이가 없는 것으로 나타났으며, 발효 24시간 동안 산도가 크게 증가하는 경향을 보였으며, 24시간 후 48시간 까지는 산도의 변화가 거의 없는 것으로 나타났다. 따라서 새싹땅콩의 발효를 위해서는 유산균수 증가량이 가장 큰 DU, La. P-11균주를 발효균주로 선정하였다.

Table 2-32. pH, acidity and viable cell count change with peanut sprouts fermentation time and different LAB

	Fermentation time (day)	DU. La. P-7	DU. La. P-8	DU. La. P-11
pH	0	5.44±0.00	5.37±0.00	5.32±0.00
	1	3.70±0.01	3.68±0.00	3.70±0.00
	2	3.67±0.01	3.67±0.00	3.65±0.00
Acidity(%)	0	0.05±0.00	0.05±0.00	0.05±0.01
	1	0.22±0.01	0.25±0.01	0.24±0.01
	2	0.24±0.00	0.26±0.00	0.25±0.00
Viable cell count (Log10 CFU/mL)	0	10.87±0.01	11.08±0.02	11.12±0.03
	1	17.47±0.03	13.54±0.34	17.49±0.01
	2	18.12±0.03	17.29±0.01	18.43±0.01

㉔ 부원료 과채 농축액 첨가 : 새싹땅콩의 유산발효를 위해 부원료 첨가가 새싹땅콩의 발효에 미치는 영향을 조사하기 위해 부원료(과채 농축액, 65 ° Bx)를 0, 5, 10, 15% 첨가하여 DU, La. P-11균주를 접종하여 37°C에서 하루 간격으로 3일간 발효하여 pH, 산도 및 생균수를 측정된 결과는 Table 2-33에 나타내었다. pH의 경우 부원료 무첨가군과 농도별 첨가군 간에 큰 차이가 없이 모두 유사한 pH 변화를 나타내었으며, 그 중 부원료를 5% 첨가하였을 때 가장 크게 감소하는 것으로 나타났다. 산도의 경우는 발효 완료 후 부원료 무첨가군의 산도 증가량이 0.16%였으나, 부원료를 첨가하여 발효 한 경우 산도의 증가량이 0.48 ~ 0.52%로 부원료 첨가한 경우 산도증가량이 월등히 높은 것으로 나타났다. 반면 부원료 농도별 첨가군 간에는 차이를 보이지 않는 것으로 나타났으며, 발효 1일째에 산도가 급격히 증가하였다. 생균수의 경우는 부원료 무첨가군과 농도별 첨가군 간에 큰 차이가 없이 모든 시험군에 있어 유사한 균수 성장과 증가량을 보였다, 따라서 새싹땅콩의 발효를 위해 부원료의 무첨가보다는 최저 농도인 5%의 첨가가 발효에 좋은 것으로 사료된다.

Table 2-33. pH, acidity and viable cell count change with peanut sprout different sub. material concentration

	Time (day)	Sub. material concentration (%)			
		0	5	10	15
pH	0	5.10±0.01	5.21±0.00	5.19±0.00	5.18±0.00
	1	3.69±0.01	3.59±0.00	3.76±0.01	3.91±0.00
	2	3.71±0.00	3.49±0.01	3.64±0.01	3.77±0.00
	3	3.65±0.00	3.47±0.01	3.60±0.00	3.71±0.00
Acidity(%)	0	0.06±0.00	0.12±0.00	0.17±0.01	0.22±0.02
	1	0.22±0.00	0.55±0.00	0.56±0.00	0.58±0.01
	2	0.20±0.00	0.69±0.00	0.69±0.00	0.73±0.00
	3	0.22±0.00	0.62±0.03	0.65±0.01	0.74±0.00
Viable cell count (Log10 CFU/ml)	0	11.01±0.00	11.10±0.00	11.11±0.00	11.12±0.00
	1	19.79±0.01	20.17±0.02	19.69±0.01	19.14±0.03
	2	21.61±0.04	23.29±0.00	22.90±0.00	19.15±0.21
	3	22.95±0.01	22.45±0.21	24.74±0.03	23.61±0.00

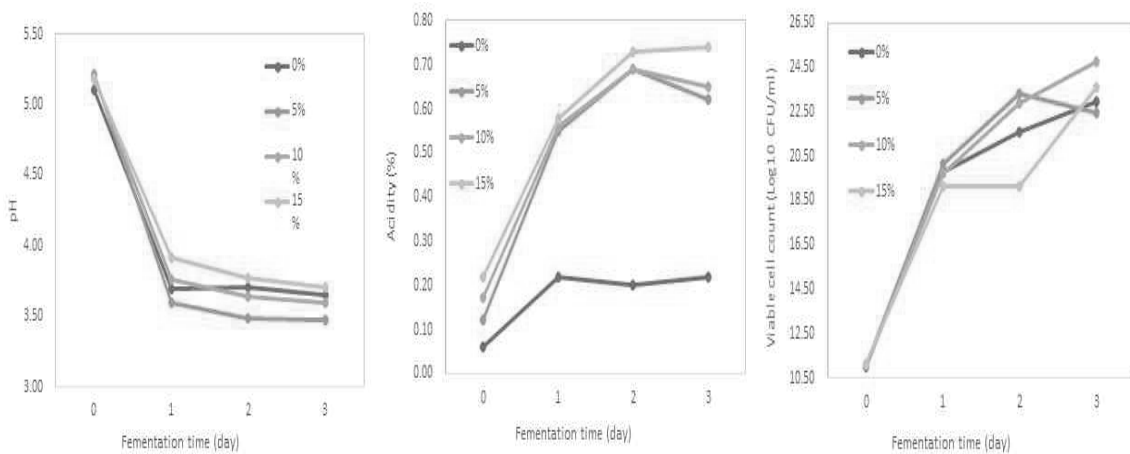


Fig. 2-28. pH, acidity and viable cell count change with peanut sprout different sub. material concentration

⑥ 선발 균주의 염기서열 분석과 계통분류

분리 균주 중  $\beta$ -glucosidase 활성능이 높고, 새싹브로콜리에서 발효가 가장 우수한 DU. La. P-11 균주를 16 rRNA gene의 염기서열을 분석한 결과 Table 2-34와 같다. NCBI Blast search를 통해 DU. LAB. K-1를 분석한 결과 *Pediococcus pentosaceus* 종과 99%의 유사성을 보였으며 표준균주와의 유연관계를 나타낸 phylogenetic 과정의 결과는 Fig. 2-29와 같다. 본 실험에서 분리된 균주를 *Pediococcus pentosaceus*로 동정하고 *Pediococcus pentosaceus* DU. La. P-11로 명명하였다.

Table 2-34. Result of 16R rRNA partial sequencing of DU. La. P-11

Standard strain	Identities	Gaps
<i>Pediococcus pentosaceus</i> strain DSM 20336	1446/1449 (99%)	2/1449 (0%)
<i>Pediococcus stilesii</i> strain FAIR-E 180	1424/1448 (99%)	0/1448 (0%)
<i>Pediococcus acidilactici</i> strain DSM 20284	1421/1449 (98%)	2/1449 (0%)
<i>Pediococcus claussenii</i> strain ATCC BAA-344	1409/1451 (97%)	4/1451 (0%)
<i>Pediococcus argentinicus</i> strain CRL 776	1408/1450 (97%)	4/1450 (0%)
<i>Pediococcus acidilactici</i> strain NGRI 0510Q	1411/1455 (97%)	16/1455 (1%)
<i>Pediococcus claussenii</i> strain P06	1406/1451 (97%)	3/1451 (0%)

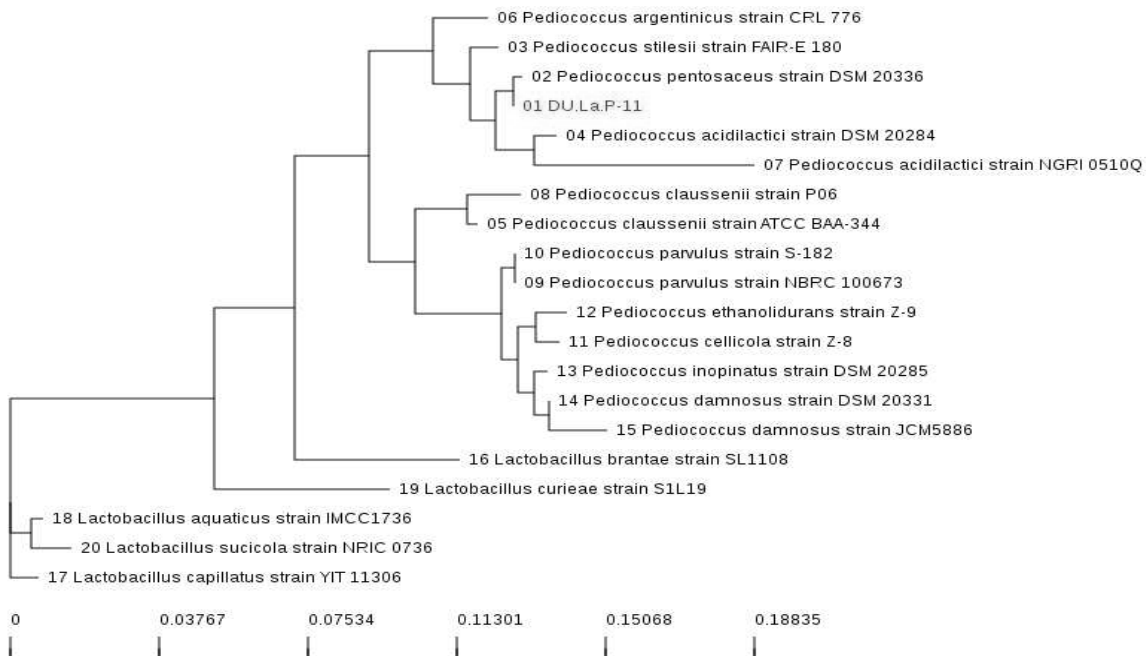


Fig. 2-29. Phylogenetic tree based on 16S rRNA gene sequence, showing the phylogenetic relationships among strain DU. La. P-11 isolated and related species.

## 다. 새싹채소(새싹브로콜리&새싹땅콩) 추출물의 발효조건 설정

### (1) 연구 수행 방법

#### (가) 새싹채소(새싹브로콜리&새싹땅콩) 추출물 제조

새싹채소(새싹브로콜리&새싹땅콩) 발효를 위한 전처리로 최적의 추출조건을 설정한 결과에 따라 새싹브로콜리의 경우는 추출온도 67°C, 추출시간 7.3시간, 새싹땅콩의 경우 추출온도 68°C, 추출시간 7.0시간으로 추출 후 감압농축하여 최종 농도를 15 ° Brix하여 유산발효를 위한 원료로 사용하였다.

#### (나) 새싹채소의 유산발효조건 설정

새싹채소(브로콜리&땅콩)의 발효조건을 최적화하기 위하여 반응표면분석법(response surface methodology, RSM)을 이용하였다. 발효조건은 중심합성계획법(Central Composite Design, CCD)을 이용하였다. 새싹채소의 발효조건은 Table 2-35, 2-36와 같이 세 개의 독립변수를 5수준으로 발효시간( $X_1$  : 24, 36, 48, 60, 72 hr) 및 새싹채소추출물의 농도( $X_2$  : 4, 6, 8, 10, 12 ° Brix), 부원료(과채농축액, 65 ° Brix)농도( $X_3$  : 2, 4, 6, 8, 10 ° Brix)로 하였고, 종속변수는 유산발효 후 유산균수(Log10 CFU/mL), pH 감소량, 산도증가량, lactic acid 함량, 유효성분 함량을 측정하였다. 또한 유산발효 조건이 새싹땅콩과 새싹브로콜리 추출물의 종속변수(발효특성 및 유효성분 함량 변화)에 미치는 영향을 예측된 모델식을 바탕으로 Mathematica program을 이용하여 4차원 반응표면분석으로 해석하였다.

Table 2-35. Experimental design of lactic acid fermentation conditions for broccoli and peanut sprouts extract

Fermentation conditions	-2	-1	0	1	2
$X_1$ Time (hour)	24	36	48	60	72
$X_2$ Sprouts conc. (° Brix)	4	6	8	10	12
$X_3$ Sub. material conc. (° Brix)	2	4	6	8	10

Table 2-36. Central composite design for the optimization of lactic acid fermentation condition for broccoli and peanut sprouts extract

Exp. No <sup>1)</sup>	Fermentation conditions		
	Time (hour)	Sprouts concentration (° Brix)	Sub. material concentration (° Brix)
1	60(1)	10(1)	8(1)
2	60(1)	10(1)	4(-1)
3	60(1)	6(-1)	8(1)
4	60(1)	6(-1)	4(-1)
5	36(-1)	10(1)	8(1)
6	36(-1)	10(1)	4(-1)
7	36(-1)	6(-1)	8(1)
8	36(-1)	6(-1)	4(-1)
9	48(0)	8(0)	6(0)
10	48(0)	8(0)	6(0)
11	48(0)	8(0)	6(0)
12	48(0)	8(0)	6(0)
13	48(0)	8(0)	6(0)
14	72(2)	8(0)	6(0)
15	24(-2)	8(0)	6(0)
16	48(0)	12(2)	6(0)
17	48(0)	4(-2)	6(0)
18	48(0)	8(0)	10(2)
19	48(0)	8(0)	2(-2)

<sup>1)</sup>The number of experimental condition by central composite design

#### (다) 분석방법

##### ① 생육도, pH 및 산도 측정

유산균수는 MRS 배지를 사용하여 표준한천배양법으로 생균수를 측정하였다. pH는 pH meter(Metter Toledo Group, Switzerland)를 사용하여, 적정 산도는 0.1 N NaOH용액으로 pH 8.3으로 중화 적정하여 소비된 0.1 N NaOH용액을 lactic acid 함량(%)으로 환산하였다.

##### ② Lactic acid 함량 분석

유기산 분석을 위해 시료를 0.45 µm membrane filter로 여과하여 HPLC로 분석하였다. 유기산 분석조건은 Aminex<sup>®</sup>HPX-87H(7.5×300 mm, 9 µm, BIO-RAD Laboratories, USA)를 사용하여 5 mM sulfuric acid를 유속 0.6 mL/min의 조건으로 PDA 214 nm에서 분석하였다. 모든 표준물질은 Sigma-Aldrich Co.(St, Louis, MO, USA) 제품으로 사용하였다.

### ③ 유효성분 함량 측정

지표성분 함량은 시료 용액을 0.45  $\mu\text{m}$  membrane filter로 여과한 후, Alliance e2695 HPLC System (Waters Co., Milford, MA, USA)로 분석하였다. 표준품은 rutin, quercetin, resveratrol을 이용하여 표준 검량선을 작성한 후 각각의 함량을 계산하였다.

#### (라) 최적 유산발효조건 예측 및 실증실험

새싹채소(브로콜리&땅콩) 추출물의 유산 발효 최적화를 위한 유산 발효액의 중요한 품질인자로 고려되는 유산균 수, 산도 증가량, lactic acid 함량 및 유효성분 함량을 최대로 설정하여 반응표면을 superimposing 했을 때 중복되는 부분의 범위에서 최적조건을 설정하였고, 예측된 범위에서 임의의 중심점을 최적 조건으로 예측한 뒤 각 회귀식에 대입하여 예측값을 설정하였다. 또한 예측된 값에 대하여 동일조건에서 실제 실험을 통하여 얻은 실험치를 비교하였다.

#### (마) 통계 처리

최적 효소처리 조건 설정을 위한 중심합성계획법은 statistical analysis system(SAS, version 9.4 SAS institute) 프로그램을 이용하여 회귀분석하였다.



## (2) 연구 수행 결과

### (가) 새싹브로콜리 추출물의 유산발효조건 최적화

#### ① 유산발효조건에 따른 발효적 특성

새싹브로콜리 추출물의 최적 유산발효 조건을 설정하기 위해 발효시간, 새싹브로콜리 추출물 농도 및 부원료 농도를 독립변수로 하여 중심합성계획에 의해 설계된 19구의 발효조건에서 얻어진 발효물의 특성은 Table 2-37과 같다. 각각의 결과를 이용하여 반응표면분석을 실시하고, 유산균수, pH 감소량, 산도 증가량, 젖산 함량 값에 대한 회귀식을 얻었다(Table 2-38). 또한 변수별 최적발효조건과 발효 특성값을 예측하여 Table 2-39에 나타냈으며, 이들의 4차원 반응표면을 발효시간, 새싹브로콜리 추출물농도, 및 부원료 농도를 독립변수로 하여 Fig. 2-30 ~Fig. 2-33에 나타내었다.

Table 2-37. Experimental data on physicochemical characteristics of broccoli sprouts extract under different fermentation condition based on central composite design by response surface analysis

Exp. No <sup>1)</sup>	Physicochemical characteristics			
	Lactic acid bacteria count (CFU/mL)	pH	Acidity (%)	Lactic acid content (mg/mL)
1	14.26	1.87	1.44	13.56
2	13.81	1.83	1.38	12.49
3	14.06	2.00	1.39	12.27
4	13.09	2.07	1.37	11.44
5	11.83	1.73	1.41	12.72
6	11.90	1.82	1.35	12.23
7	12.40	1.94	1.23	12.04
8	11.94	2.02	1.20	10.76
9	13.50	1.97	1.43	12.89
10	13.40	1.99	1.42	12.70
11	13.42	1.97	1.42	13.34
12	13.24	1.95	1.45	13.04
13	13.31	1.97	1.42	12.91
14	14.55	1.91	1.45	13.53
15	11.41	1.76	1.13	10.93
16	12.02	1.78	1.41	14.05
17	11.98	2.03	1.26	11.27
18	12.79	1.85	1.40	12.78
19	11.85	1.93	1.34	11.88

<sup>1)</sup>The number of experimental condition by central composite design.

Table 2-38. Polynomial equations calculated by RSM program for fermentation conditions of broccoli sprouts extract

Term	Coefficient			
	Lactic acid bacteria count (CFU/mL)	pH	Acidity (%)	Lactic acid content (mg/mL)
Intercept( $\beta_0$ )				
Linear	3.673091	1.660557	-0.594510	0.408395
$\beta_1$	0.026555	0.020663	0.040441	0.169379
$\beta_2$	1.121833	-0.005397	0.172019	0.802525
$\beta_3$	0.851765	-0.013657	0.039873	0.848066
Quadratic				
$\beta_{11}$	-0.000547	-0.000227	-0.000245	-0.001498
$\beta_{22}$	0.007969	-0.003784	-0.006005	-0.027052
$\beta_{33}$	-0.080954	-0.004721	-0.003818	-0.047677
Cross product				
$\beta_{12}$	0.007969	0.000052083	-0.001406	0.000990
$\beta_{13}$	0.005365	0.000573	-0.000052083	0.000677
$\beta_{23}$	-0.032813	0.004062	0.002187	-0.017188
Lack of fit $P$ -value	0.0535	0.0529	0.0559	0.2174
$R^2$	0.9786	0.9575	0.9628	0.8762
Significance	<.0001	<.0001	<.0001	0.0038

중심합성계획법에 따라 Table 2-35과 같은 각 독립변수의 범위를 설정한 후, Design Expert를 이용하여 Table 2-36와 같이 19가지의 발효 조건을 설정하고 새싹브로콜리 추출물을 유산발효 하였다. 발효조건에 따른 새싹브로콜리 발효물의 유산균 수는 11.41 ~ 14.55 Log 10 CFU/mL의 범위로 나타났으며(Table 2-37), 이를 바탕으로 한 회귀식은 Table 2-38과 같다. 유산균수에 대한  $R^2$ 값은 0.9786으로 높은 신뢰도를 보였으며,  $P$ -value는 1% 이내 유의수준을 보였다. 유산균수 값의 model에 대한 lack of fit의  $P$ -value는 0.0535로 나타나 model이 적합한 것으로 나타났다(Table 2-38). 효소처리 조건에 대한 영향에서 환원당 함량의 경우 발효시간 > 새싹브로콜리 추출물 농도 > 부원료 농도 순으로 세 가지 조건 모두에서 영향을 크게 받는 것으로 나타났다(Table 2-39). 발효조건에 따라 반응표면모델로 예측된 회귀분석 결과 정상점은 최대점으로 나타났다으며, 최적점을 산출한 결과 유산균수의 최댓값은 14.99 Log 10 CFU/mL이고 이때의 발효조건은 발효시간 70.85 hr, 새싹브로콜리 추출물 농도 8.64 ° Brix 및 부원료 농도 7.03 ° Brix로 나타났다(Table 2-40). 실험조건에 따라 얻은 발효물의 유산균수에 대한 4차원 반응표면은 Fig. 2-30과 같이 최대점의 형태를 나타내었으며, 새싹브로콜리

추출물 농도가 높고, 발효시간이 길수록 증가하는 것으로 나타났다.

발효조건에 따른 새싹브로콜리 발효물의 pH 감소량은 1.73~2.07의 범위로 나타났으며(Table 2-37), 이를 바탕으로 한 회귀식은 Table 2-38과 같으며, 이 모델에 대한 회귀식의  $R^2$ 값은 0.9575로 1% 이내의 유의성이 인정되었다. ANOVA 결과 pH 감소량을 위한 발효조건 model에 대한 lack of fit의  $P$ -value는 0.0529로 나타나 model이 적합한 것으로 나타났다(Table 2-38). pH 감소량은 발효시간, 새싹브로콜리 추출물농도, 부원료 농도 모두에서 영향을 받고 있는 것으로 나타났다(Table 2-39). Table 2-40과 같이 pH 감소량의 예측된 정상점은 최대점으로 최댓값이 2.09이었고, 이때 발효시간 50.77 시간, 새싹브로콜리 추출물 농도 4.37 ° Brix 및 부원료 농도 4.37 ° Brix이었다. 새싹브로콜리 발효물의 pH 감소량은 발효조건에 따른 4차원 반응표면에서 볼 때 발효시간이 길어질수록 감소량이 증가하는 것으로 나타났다 (Fig. 2-31).

발효조건에 따른 새싹브로콜리 발효물에 대한 산도 증가량의 범위는 1.13~1.45%의 범위로 나타났으며(Table 2-37), 이를 바탕으로 한 회귀식은 Table 2-38과 같다. 이 모델에 대한 회귀식의  $R^2$  값은 0.9628로 1% 이내의 유의성이 인정되었으며, 산도 증가량의 model에 대한 lack of fit의  $p$ -value는 0.0559로 나타나 model이 적합한 것으로 나타났다(Table 2-38). 발효시간, 새싹브로콜리농도, 부원료 농도 순으로 모두에서 영향을 크게 받는 것으로 나타났다(Table 2-39). 유산발효조건에 따라 반응표면모델로 예측된 정상점이 최대점으로 나타났으며, 최적점을 산출한 결과 산도 증가량의 최대값은 1.46% 이었고, 이때 발효 시간은 55.28 hr, 새싹브로콜리 농도 9.29 ° Brix 및 부원료농도 9.61 ° Brix이었다(Table 2-40). 4차원 반응표면을 통한 유산발효조건에 따른 산도증가량의 변화는 Fig. 2-32과 같이 새싹브로콜리 발효물의 산도 증가량은 발효조건에 따른 4차원 반응표면에서 볼 때 발효시간 50~60 hr, 새싹브로콜리 농도 8~10 ° Brix, 부원료 농도 6~10 ° Brix의 범위에서 가장 높은 산도 증가량은 보이는 것으로 나타났다.

유산발효조건에 따른 새싹브로콜리 발효물에 대한 lactic acid 함량은 1093~14.05 mg/mL의 범위로 나타났으며(Table 2-37), 이를 바탕으로 한 lactic acid 함량의 회귀식은 Table 2-38과 같고  $R^2$ 값은 0.8762로 1% 이내의 수준에서 유의성이 확인되었다. Lactic acid 함량의 lack of fit의  $p$ -value는 0.2174로 나타나 model이 적합한 것으로 나타났다(Table 2-38). 유산발효조건에 대한 영향은 Table 2-39에서와 같이 새싹브로콜리 추출물 농도에 영향이 가장 크며, 다음으로 발효시간, 부원료 농도 순으로 영향을 받는 것으로 나타났다. 유산발효조건에 따라 반응표면모델로 예측된 정상점은 최대점으로 최댓값이 13.99 mg/mL이었고, 이때 발효 시간은 58.51 hr, 새싹브로콜리농도 11.47° Brix 및 부원료 농도 6.90 ° Brix이었다(Table 2-40). 4차원 반응표면을 통한 유산발효조건에 따른 lactic acid 함량의 변화는 Fig. 2-33과 같이 새싹브로콜리 추출물 농도가 높을수록 lactic acid 함량이 증가하는 것으로 나타났다.

Table 2-39. Regression analysis of lactic acid fermentation conditions of broccoli sprouts extract

Response	F-Ratio		
	Fermentation time (hour)	Broccoli sprouts concentration (%)	Sub. material concentration (%)
Lactic acid bacteria count (Log <sub>10</sub> CFU/ml)	76.92***	18.98***	16.42***
pH decrement	14.55***	34.56***	6.20**
Acidity increment	41.76***	21.16***	4.54**
Lactic acid content	5.32**	8.09***	3.38*

\*Significant at 10% level; \*\*significant at 5% level; \*\*\*significant at 1% level.

Table 2-40. Predicted levels of optimum lactic acid fermentation conditions for the maximum responses of broccoli sprouts extract by the ridge analysis

Response	Predicted response					Morphology
	Resp- onse	Time (hr)	Broccoli sprout conc. (° Brix)	Sub. material conc.(° Brix)	Result	
Lactic acid bacteria count (Log <sub>10</sub> CFU/ml)	Min	29.72	10.51	6.64	11.05	Maximum
	Max	70.85	8.64	7.03	14.99	
pH decrement	Min	29.45	10.39	6.83	1.71	Maximum
	Max	50.77	4.37	4.37	2.09	
Acidity increment (%)	Min	28.33	5.71	5.80	1.08	Maximum
	Max	55.28	9.29	9.61	1.46	
Lactic acid content (mg/mL)	Min	33.63	5.57	3.90	10.52	Maximum
	Max	58.51	11.47	6.90	13.99	

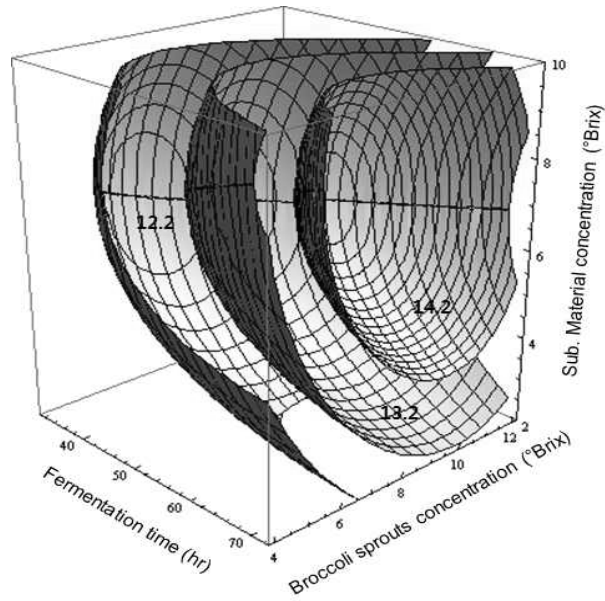


Fig. 2-30. Response surface for lactic acid bacteria count in broccoli sprouts extract at constant values (lactic acid bacteria content : 12.2-13.2-14.2 Log<sub>10</sub> CFU/mL) according to fermentation time, broccoli sprouts extract concentration and sub. material concentration.

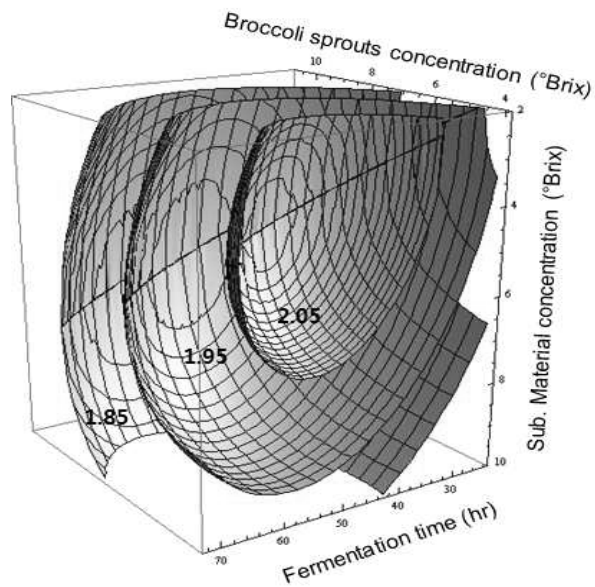


Fig. 2-31. Response surface for pH decrement in broccoli sprouts extract at constant values (pH decrement : 1.85-1.95-2.05) according to fermentation time, broccoli sprouts extract concentration and sub. material concentration.

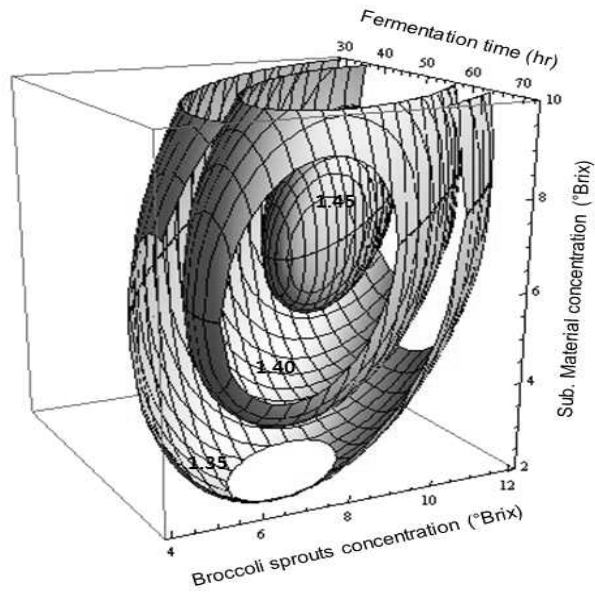


Fig. 2-32. Response surface for acidity increment in broccoli sprouts extract at constant values (acidity increment : 1.35-1.40-1.45%) according to fermentation time, broccoli sprouts extract concentration and sub. material concentration.

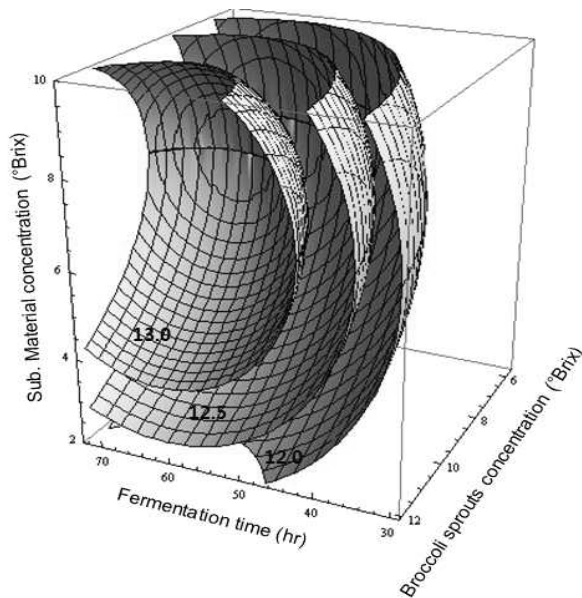


Fig. 2-33. Response surface for lactic acid content in broccoli sprouts extract at constant values (lactic acid content : 12.0-12.5-13.0 mg/mL) according to fermentation time, broccoli sprouts extract concentration and sub. material concentration.

## ② 발효조건에 따른 새싹브로콜리 발효물의 지표성분 함량 모니터링

새싹브로콜리 추출물의 최적 유산발효조건을 설정하기 위해 발효시간, 새싹브로콜리 추출물 농도 및 부원료 농도를 독립변수로 하여 중심합성계획에 의해 설계된 19구의 발효조건에서 얻어진 지표성분 함량 변화는 Table 2-41과 같다.

중심합성계획법에 따라 Table 2-35과 같은 각 독립변수의 범위를 설정한 후, Design Expert를 이용하여 Table 2-36와 같이 19가지의 발효 조건을 설정하고 새싹브로콜리 추출물을 유산발효 하였다. 발효조건에 따른 새싹브로콜리 발효물의 sulforaphane 함량은 18.97~12.34  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 범위로 나타났으며(Table 2-41), 이를 바탕으로 한 회귀식은 Table 2-42과 같다. Sulforaphane 함량에 대한  $R^2$ 값은 0.8471로 높은 신뢰도를 보였으며,  $P$ -value는 1% 이내 유의수준을 보였다. Sulforaphane 함량의 model에 대한 lack of fit의  $P$ -value는 0.2147로 나타나 model이 적합한 것으로 나타났다(Table 2-42). 발효조건에 대한 영향에서 sulforaphane 함량의 경우 새싹브로콜리 추출물 농도>발효시간 순으로 영향을 크게 받는 것으로 나타났으며, 부원료 농도에서는 영향을 받지 않는 것을 알 수 있었다(Table 2-43). 발효조건에 따라 반응표면모델로 예측된 회귀분석 결과 정상점은 안장점으로 나타났으며, 능선분석을 하여 최적점을 산출한 결과 sulforaphane 함량의 최댓값은 13.41  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 이고 이때의 발효조건은 발효시간 56.79hr, 새싹브로콜리 추출물 농도 4.48 ° Brix 및 부원료 농도 7.20 ° Brix로 나타났다(Table 2-44). 실험조건에 따라 얻은 발효물의 sulforaphane 함량에 대한 4차원 반응표면은 Fig. 2-34과 같이 안장점의 형태를 나타내었으며, 새싹브로콜리 추출물 농도가 낮고, 발효시간이 길수록 증가하는 것으로 나타났다.

발효조건에 따른 새싹브로콜리 발효물의 rutin 함량은 2.89~12.64  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 범위로 나타났으며(Table 2-41), 이를 바탕으로 한 회귀식은 Table 2-42와 같으며, 이 모델에 대한 회귀식의  $R^2$  값은 0.9767로 1% 이내의 유의성이 인정되었다. ANOVA 결과는 Table 2-42와 같다. Rutin 함량을 위한 발효조건 model에 대한 lack of fit의  $P$ -value는 0.0506으로 나타나 model이 적합한 것으로 나타났다. Rutin 함량은 새싹브로콜리 추출물 농도와 발효시간영향을 크게 받는 것으로 나타났(Table 2-43). Table 2-44와 같이 Rutin 함량의 예측된 정상점은 안장점으로 나타났으며, 능선분석을 하여 최대값을 산출한 결과 rutin 함량의 최댓값이 12.765  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 이었고, 이때 발효시간 53.50 시간, 새싹브로콜리 추출물 농도 11.76 ° Brix 및 부원료 농도 6.98 ° Brix이었다. 새싹브로콜리 발효물의 rutin 함량은 발효조건에 따른 4차원 반응표면에서 볼 때 새싹브로콜리 추출물 농도가 높을수록 rutin 함량이 증가하는 것으로 나타났다 (Fig. 2-35).

발효조건에 따른 새싹브로콜리 발효물의 quercetin 함량 범위는 0.85~1.62  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 범위로 나타났으며(Table 2-41), 이를 바탕으로 한 회귀식은 Table 2-42와 같다. 이 모델에 대한 회귀식의  $R^2$  값은 0.9120로 1% 이내의 유의성이 인정되었으며, quercetin 함량의 model에 대한 lack of fit의  $p$ -value는 0.0843으로 나타나 model이 적합한 것으로 나타났다(Table 2-42). 새싹브로콜리농도, 부원료 농도, 발효시간 순으로 모두에서 영향을 받는 것으로 나타났(Table 2-43). 유산발효조건에 따라 반응표면모델로 예측된 정상점이 안장점으로 나타났으며, 최적점을 산출한 결과 quercetin 함량의 최대값은 1.65  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 이었고, 이때 발효 시간은 37.05 hr, 새싹브로콜리 농도 4.51 ° Brix 및 부원료농도 5.25 ° Brix이었다(Table 2-44). 4차원 반응표면을 통한 유산발효조건에 따른

quercetin 함량의 변화는 Fig. 2-36에 나타내었다.

Table 2-41. Experimental data on active components of broccoli sprouts extract under different fermentation condition based on central composite design by response surface analysis

Exp. No <sup>1)</sup>	Active components		
	Sulforaphane increment content ( $\mu\text{g/mL}$ )	Rutin decrement content ( $\mu\text{g/mL}$ )	Quercetin increment content ( $\mu\text{g/mL}$ )
1	9.13	10.70	1.10
2	8.97	9.82	1.10
3	11.98	5.51	1.25
4	11.70	5.34	1.34
5	10.02	10.31	0.85
6	12.17	8.10	1.29
7	11.44	4.84	1.37
8	10.93	4.62	1.49
9	11.02	8.09	1.19
10	10.19	7.74	1.12
11	10.11	8.36	1.16
12	10.14	7.83	1.18
13	9.95	7.80	1.23
14	9.38	9.07	1.25
15	10.21	6.28	1.32
16	9.99	12.64	1.08
17	12.34	2.89	1.62
18	10.34	7.39	1.16
19	9.94	7.72	1.28

<sup>1)</sup>The number of experimental condition by central composite design.



Table 2-42. Polynomial equations calculated by RSM program for fermentation conditions of broccoli sprouts extract

Term	Coefficient		
	Sulforaphane increment content ( $\mu\text{g/mL}$ )	Rutin decrement content ( $\mu\text{g/mL}$ )	Quercetin increment content ( $\mu\text{g/mL}$ )
Intercept( $\beta_0$ )			
Linear	5.079122	-5.002196	4.108497
$\beta_1$	0.193880	0.126678	-0.046589
$\beta_2$	0.516402	0.812568	-0.270785
$\beta_3$	0.160270	0.146301	-0.112542
Quadratic			
$\beta_{11}$	-0.000594	-0.000690	0.000170
$\beta_{22}$	0.064248	-0.019223	0.01086
$\beta_{33}$	-0.086875	-0.032348	0.002061
Cross product			
$\beta_{12}$	-0.028125	0.003750	0.001719
$\beta_{13}$	0.010833	-0.007188	0.002448
$\beta_{23}$	-0.086875	0.084375	-0.007188
Lack of fit $p$ -value	0.2147	0.0526	0.0843
R2	0.8471	0.9767	0.9120
Significance	0.0089	<.0001	0.0009

Table 2-43. Regression analysis of lactic acid fermentation conditions of broccoli sprouts extract

Response	F-Ratio		
	Fermentation time (hour)	Broccoli sprouts concentration (%)	Sub. material concentration (%)
Sulforaphane increment content	4.52**	10.52***	1.23
Rutin decrement content	5.45**	88.13***	1.96
Quercetin increment content	3.27*	18.63***	4.42**

\*Significant at 10% level; \*\*significant at 5% level; \*\*\*significant at 1% level.

Table 2-44. Predicted levels of optimum lactic acid fermentation conditions for the maximum responses of broccoli sprouts extract by the ridge analysis

Response	Predicted response					Morphology
	Response	Time (hr)	Broccoli sprout conc. (° Brix)	Sub. material conc. (° Brix)	Result	
Sulforaphane increment content (µg/mL)	Min	66.77	10.48	6.11	8.00	Saddle
	Max	56.79	4.48	7.20	13.41	
Rutin decrement content (µg/mL)	Min	44.80	4.10	6.74	2.67	Saddle
	Max	53.50	11.76	6.98	12.75	
Quercetin increment content (µg/mL)	Min	38.38	10.48	8.69	0.88	Saddle
	Max	37.05	4.51	5.25	1.65	

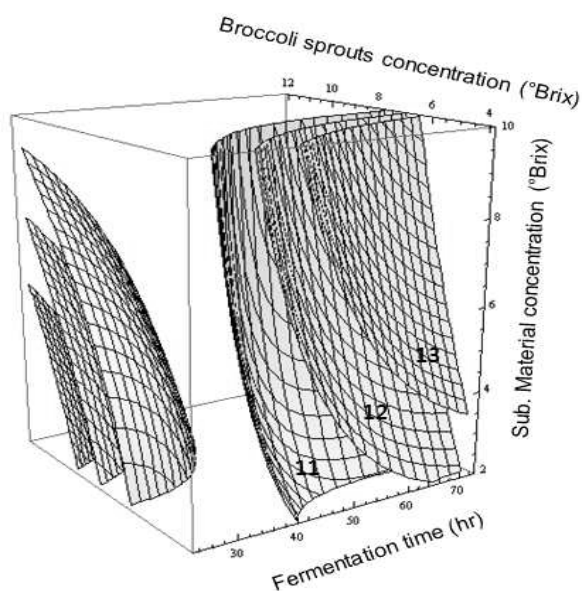


Fig. 2-34. Response surface for sulforaphane increment content in broccoli sprouts extract at constant values (sulforaphane content : 11-12-13 µg/mL) according to fermentation time, broccoli sprouts extract concentration and sub. material concentration.

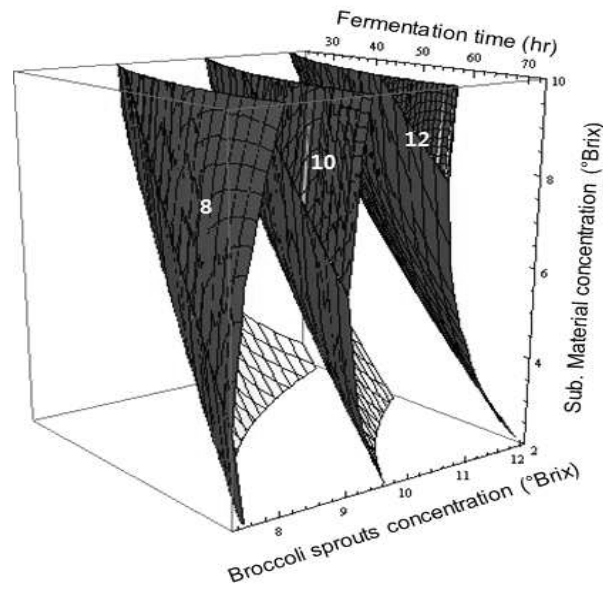


Fig. 2-35. Response surface for rutin decrement content in broccoli sprouts extract at constant values (rutin content : 8-10-12  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) according to fermentation time, broccoli sprouts extract concentration and sub. material concentration.

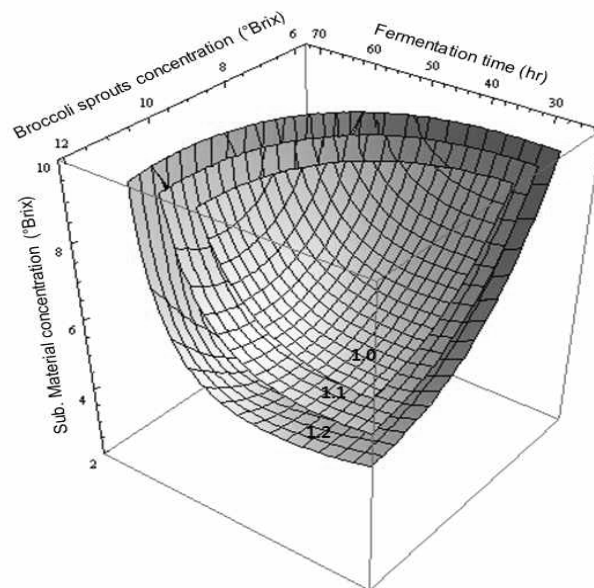


Fig. 2-36. Response surface for quercetin increment content in broccoli sprouts extract at constant values (quercetin content : 1.0-1.1-1.2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) according to fermentation time, broccoli sprouts extract concentration and sub. material concentration.

③ 새싹브로콜리 추출물의 최적 유산발효조건 예측 및 실증실험

새싹브로콜리 추출물의 발효조건을 설정하기 위하여 유산균 수, 산도증가량, 젖산 함량 및 sulforaphane 함량 결과에 대하여 4차원 반응표면을 superimposing 하여 Fig. 2-37의 겹쳐진 부분으로써 Table 2-45에 최적 발효조건을 나타내었다. 즉, 새싹브로콜리 추출물의 최적 발효조건 범위는 발효시간 50~60 시간, 새싹브로콜리 추출물 농도 8~12 ° Brix 및 부원료 농도 4~7 ° Brix로 나타났다. 따라서 이와 같은 예측결과에 대한 모델식의 신뢰성을 확인하기 위하여 예측된 최적 조건의 범위 내에서 임의의 조건 즉, 발효시간 55 시간, 새싹브로콜리 추출물 농도 10 ° Brix 및 부원료 농도 5.5 ° Brix 을 대입하여 실제 유산발효를 실시하여 발효 특성을 분석하였다(Table 2-46).

Table 2-45. The range of optimum lactic acid fermentation condition for maximum response variables by superimposing response surface of broccoli sprouts extract

Fermentation condition	Range of predicted condition (optional point)
Fermentation time (hour)	50~60 (55)
Broccoli sprout concentration (° Brix)	8~10 (9)
Sub. material concentration (° Brix)	4~8 (6)

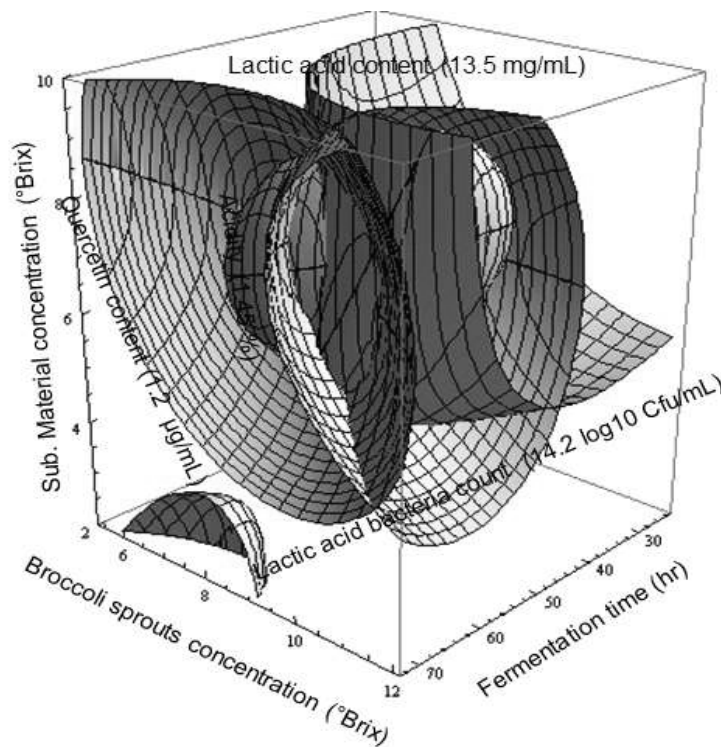


Fig. 2-37. Superimposed response surface for optimization of lactic acid bacteria count, acidity increment, lactic acid content and quercetin increment content for broccoli sprouts ferments

Table 2-46. Comparison between predicted and observed condition for physicochemical qualities of their ferments

Physicochemical qualities	Predicted condition(A) <sup>1)</sup>	Observed condition(B) <sup>2)</sup>	B/A × 100(%)
Lactic acid bacteria count (Log10 CFU/ml)	13.88	13.81 ± 0.73	99.49
pH decrement	1.94	1.91 ± 0.02	98.45
Acidity increment (%)	1.46	1.45 ± 0.10	99.31
Lactic acid content (mg/mL)	13.38	13.56 ± 0.81	101.34
Sulforaphane increment content (µg/mL)	9.73	9.99 ± 1.02	102.67
Rutin decrement content (µg/mL)	9.39	10.31 ± 1.25	109.79
Quercetin increment content (µg/mL)	1.17	1.12 ± 0.09	95.72

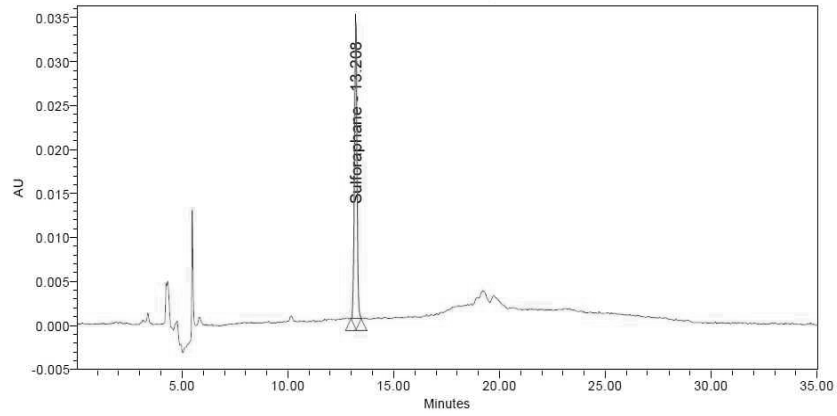
<sup>1)</sup> Calculated using the predicted equations for response variables.

Given optimal condition of independent variables : fermentation time 55 hr, Broccoli sprouts extract concentration 9 ° Brix, Sub. material concentration 6 ° Brix

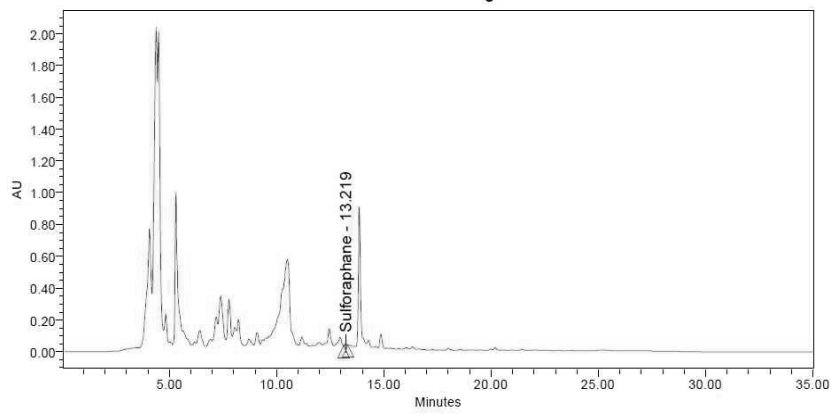
<sup>2)</sup> Mean values of triplicates determinations.

④ Sulforaphane 분석 크로마토그램

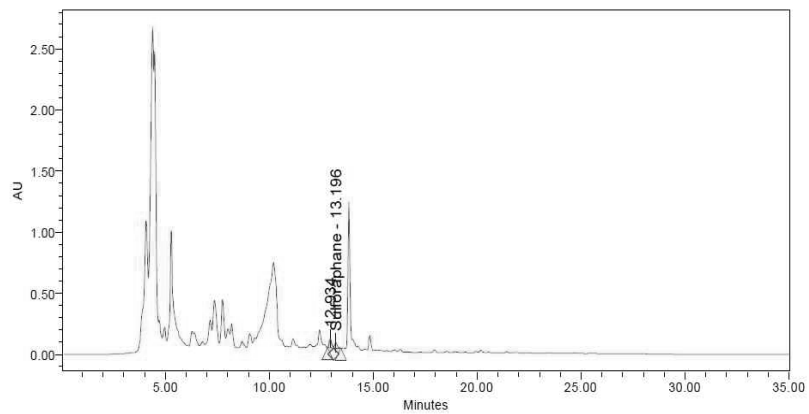
㉞ Standard chromatogram



㉞ 발효 전 새싹브로콜리 추출물

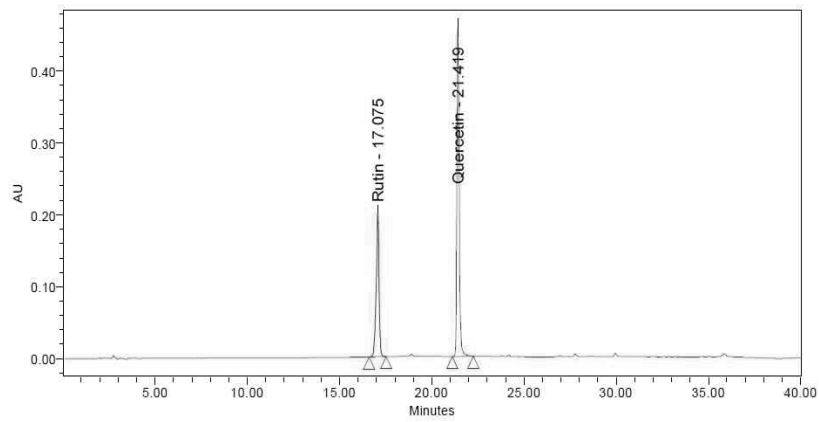


㉞ 발효 후 새싹브로콜리 추출물

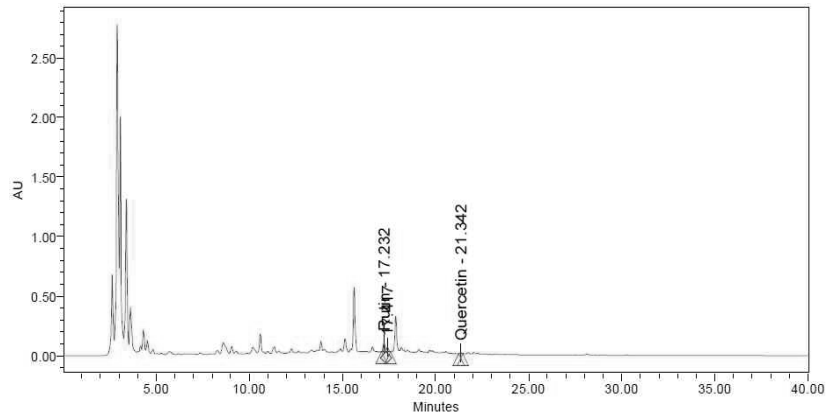


⑤ Rutin & quercetin 분석 크로마토그램

㉗ Standard chromatogram



㉘ 발효 전 새싹브로콜리 추출물



㉙ 발효 후 새싹브로콜리 추출물

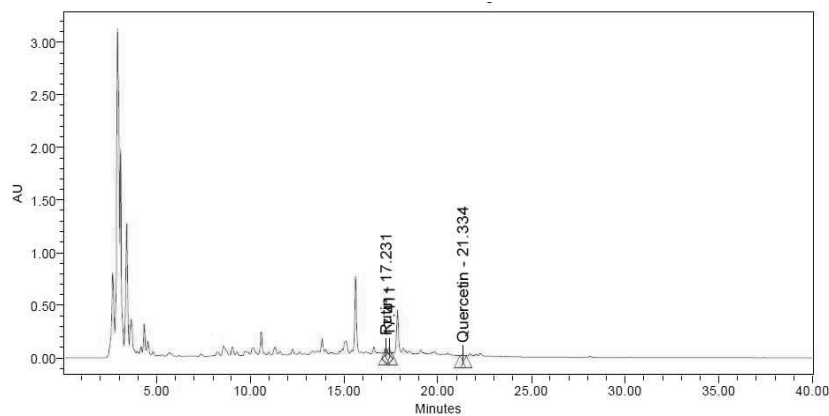


Fig 2-38. Chromatogram for sulforaphane, rutin and quercetin content as effective Ingredient of broccoli sprouts extracts and fermented broccoli sprouts

## (나) 새싹땅콩 추출물의 유산발효조건 최적화

### ① 유산발효조건에 따른 발효적 특성

새싹땅콩 추출물의 최적 유산발효 조건을 설정하기 위해 발효시간, 새싹땅콩 추출물 농도 및 부원료 농도를 독립변수로 하여 중심합성계획에 의해 설계된 19구의 발효조건에서 얻어진 발효물의 특성은 Table 2-47과 같다. 각각의 결과를 이용하여 반응표면분석을 실시하고, 유산균수, pH 감소량, 산도 증가량, 젖산 함량 및 resveratrol 함량 값에 대한 회귀식을 얻었다(Table 2-48). 또한 변수별 최적발효조건과 발효 특성값을 예측하여 Table 2-49와 2-50에 나타냈으며, 이들의 4차원 반응표면을 발효시간, 새싹땅콩 추출물농도, 및 부원료 농도를 독립변수로 하여 Fig. 2-39 ~ Fig. 2-43에 나타내었다.

발효조건에 따른 새싹땅콩 발효물의 유산균 수는 11.75~14.86 Log 10 CFU/mL의 범위로 나타났으며(Table 2-47), 이를 바탕으로 한 회귀식은 Table 2-48와 같다. 유산균수에 대한 R<sup>2</sup>값은 0.8574으로 높은 신뢰도를 보였으며, P-value는 1% 이내 유의수준을 보였다. 유산균수 값의 model에 대한 lack of fit의 P-value는 0.0981로 나타나 model이 적합한 것으로 나타났다(Table 2-48). 발효조건에 대한 영향에서 유산균수의 경우 새싹땅콩 추출물 농도와 발효시간에 영향을 받고 있는 것으로 나타났으며, 부원료 농도에는 영향을 받지 않는 것으로 나타났다(Table 2-49). 발효조건에 따라 반응표면모델로 예측된 회귀분석 결과 정상점은 최대점으로 나타났으며, 최적점을 산출한 결과 유산균수의 최댓값은 15.20 Log 10 CFU/mL이고 이때의 발효조건은 발효시간 61.02 hr, 새싹땅콩 추출물 농도 10.86 ° Brix 및 부원료 농도 5.81 ° Brix로 나타났다(Table 2-50). 실험조건에 따라 얻은 발효물의 유산균수에 대한 4차원 반응표면은 Fig. 2-39와 같이 최대점의 형태를 나타내었으며, 새싹땅콩 추출물 농도가 높고, 발효시간이 길수록 증가하는 것으로 나타났다.

발효조건에 따른 새싹땅콩 발효물의 pH 감소량은 1.64~2.07의 범위로 나타났으며(Table 2-47), 이를 바탕으로 한 회귀식은 Table 2-48과 같으며, 이 모델에 대한 회귀식의 R<sup>2</sup> 값은 0.9789로 1% 이내의 유의성이 인정되었다. ANOVA 결과 pH 감소량을 위한 발효조건 model에 대한 lack of fit의 P-value는 0.1387로 나타나 model이 적합한 것으로 나타났다(Table 2-48). pH 감소량은 발효시간, 새싹땅콩 추출물 농도 및 부원료 농도 모두에서 큰 영향을 받고 있는 것으로 나타났으며, 새싹땅콩 추출물 농도와 부원료 농도가 높고, 발효 시간이 길어질수록 pH 감소량이 증가하는 것으로 나타났다(Table 2-49). pH 감소량의 예측된 정상점은 최대점으로 최댓값이 2.06이었고, 이때 발효시간 57.29 시간, 새싹땅콩 추출물 농도 5.42 ° Brix 및 부원료 농도 4.06 ° Brix이었다(Table 2-50). 새싹땅콩 발효물의 pH 감소량은 발효조건에 따른 4차원 반응표면에서 볼 때 발효시간 40~50 hr, 새싹땅콩 추출물 농도 8~10 ° Brix 및 부원료 농도 4~6 ° Brix의 범위에서 가장 높은 pH 감소량을 보이는 것으로 나타났다 (Fig. 2-40).

발효조건에 따른 새싹땅콩 추출물에 대한 산도 증가량의 범위는 0.91~1.42%의 범위로 나타났으며(Table 2-47), 이를 바탕으로 한 회귀식은 Table 2-48과 같다. 이 모델에 대한 회귀식의 R<sup>2</sup> 값은 0.9549로 1% 이내의 유의성이 인정되었으며, 산도 증가량의



model에 대한 lack of fit의  $p$ -value는 0.0502로 나타나 model이 적합한 것으로 나타났다(Table 2-48). 발효시간, 새싹땅콩 추출물 농도 및 부원료 농도 세 가지 조건 모두에서 영향을 받는 것으로 나타났다(Table 2-49). 유산발효조건에 따라 반응표면모델로 예측된 정상점이 안장점으로 나타났으며, 최적점을 산출한 결과 산도 증가량의 최대값은 1.55%이었고, 이때 발효시간은 65.06 hr, 새싹땅콩 추출물 농도 9.71 ° Brix 및 부원료 농도 3.77 ° Brix이었다. (Table 2-50). 4차원 반응표면을 통한 유산발효조건에 따른 산도증가량의 변화는 Fig. 2-41과 같이 새싹땅콩 추출물 농도가 높을수록 증가하는 것으로 나타났다.

유산발효조건에 따른 lactic acid 함량은 8.87~12.89 mg/mL의 범위로 나타났으며 (Table 2-47), 이를 바탕으로 한 lactic acid 함량의 회귀식은 Table 2-48과 같고  $R^2$ 값은 0.9604로 1% 이내의 수준에서 유의성이 확인되었다. Lactic acid 함량의 lack of fit의  $p$ -value는 0.1694로 나타나 model이 적합한 것으로 나타났다(Table 2-48). 유산발효조건에 대한 영향은 Table 2-49에서와 같이 발효시간과 새싹땅콩 추출물 농도의 영향이 가장 크며, 그 다음으로 부원료 농도의 영향을 받는 것으로 나타났다. 유산발효조건에 따라 반응표면모델로 예측된 정상점은 최대점으로 최대값이 17.49 %이었고, 이때 발효시간은 62.63 hr, 새싹땅콩 추출물 농도 11.08 ° Brix 및 부원료 농도 5.26 ° Brix이었다.(Table 2-50). 4차원 반응표면을 통한 유산발효조건에 따른 lactic acid 함량의 변화는 Fig. 2-42와 같다.

유산발효 조건에 따른 새싹땅콩 발효물의 resveratrol 함량은 0.31~0.87 µg/mL의 범위로 나타났으며(Table 2-47), 이를 바탕으로 한 회귀식은 Table 2-48과 같으며, 이 모델에 대한 회귀식의  $R^2$  값은 0.8730로 1% 이내의 유의성이 인정되었다. ANOVA 결과, resveratrol 함량을 위한 발효조건 model에 대한 lack of fit의  $P$ -value는 0.2047로 나타나 model이 적합한 것으로 나타났다(Table 2-48). Resveratrol 함량은 새싹땅콩 추출물 농도에서 가장 큰 영향을 받고 그 다음으로 부원료 농도에 영향을 받고 있는 것으로 나타났으며, 발효시간에서는 영향을 받지 않는 것으로 나타났다(Table 2-49). Resveratrol 함량의 예측된 정상점은 최대점으로 최대값이 0.85 µg/mL이었고, 이때 발효시간은 52.19 hr, 새싹땅콩 추출물 농도 10.71 ° Brix 및 부원료 농도 3.14 ° Brix이었다(Table 2-50). 발효물의 resveratrol 함량은 발효조건에 따른 4차원 반응표면에서 볼 때 새싹땅콩 추출물 농도와 부원료 농도가 높을수록 resveratrol 함량이 증가하는 것으로 나타났다(Fig. 2-43).

Table 2-47. Experimental data on physicochemical characteristics of peanut sprouts extract under different hydrolysis condition based on central composite design by response surface analysis

Exp. No <sup>1)</sup>	Physicochemical characteristics				
	Lactic acid bacteria count (Log 10 CFU/mL)	pH decrement	Acidity increment (%)	Lactic acid content (mg/mL)	Resveratrol increment content (µg/mL)
1	14.80	1.84	1.39	12.89	0.66
2	14.85	1.92	1.56	13.16	0.80
3	12.12	1.93	1.26	9.59	0.37
4	12.08	2.07	1.33	10.43	0.41
5	13.98	1.73	1.33	11.15	0.62
6	13.84	1.80	1.24	10.80	0.87
7	12.96	1.84	1.08	9.53	0.47
8	12.57	1.93	1.02	8.96	0.46
9	14.03	1.98	1.33	11.07	0.65
10	14.44	1.97	1.34	11.20	0.74
11	14.86	1.96	1.37	11.39	0.73
12	14.74	1.99	1.35	11.73	0.66
13	14.57	1.95	1.39	11.33	0.79
14	14.04	1.93	1.42	11.67	0.75
15	11.75	1.64	0.91	8.87	0.63
16	13.84	1.73	1.37	12.19	0.66
17	12.04	1.98	1.00	9.05	0.31
18	13.41	1.71	1.12	10.21	0.54
19	13.08	1.93	1.29	10.89	0.70

<sup>1)</sup>The number of experimental condition by central composite design.

Table 2-48. Polynomial equations calculated by RSM program for fermentation conditions of peanut sprouts extract

Term	Coefficient				
	Lactic acid bacteria count (CFU/mL)	pH decrement	Acidity increment(%)	Lactic acid content (mg/mL)	Resveratrol increment content ( $\mu\text{g/mL}$ )
Intercept( $\beta_0$ )					
Linear	-0.576081	0.689764	-1.954409	-1.056976	-1.239189
$\beta_1$	0.183941	0.036774	0.055826	0.187479	-0.000144
$\beta_2$	1.216774	0.061267	0.244958	0.470498	0.341639
$\beta_3$	1.219611	0.075794	0.203015	0.938421	0.133260
Quadratic					
$\beta_{11}$	-0.002836	-0.000307	-0.000304	-0.001798	-0.000066864
$\beta_{22}$	-0.099291	-0.006681	-0.009704	-0.042863	-0.015220
$\beta_{33}$	-0.080228	-0.008868	-0.008454	-0.047238	-0.006782
Cross product					
$\beta_{12}$	0.016458	0	-0.000573	0.013385	0.000625
$\beta_{13}$	-0.002813	-0.000312	-0.002031	-0.010573	0.000313
$\beta_{23}$	-0.010625	0.002500	-0.002188	0.010938	-0.011250
Lack of fit					
$p$ -value	0.0981	0.1387	0.0502	0.1694	0.2047
R2	0.8754	0.9789	0.9594	0.9604	0.8730
Significance	0.0039	<.0001	<.0001	<.0001	0.0042

Table 2-49. Regression analysis of lactic acid fermentation conditions of peanut sprouts extract

Response	F-Ratio		
	Fermentation time (hour)	Peanut sprouts concentration (%)	Sub. material concentration (%)
Lactic acid bacteria count	6.09**	11.60***	2.29
pH decrement	50.93***	34.62***	32.54***
Acidity increment	31.87***	21.14***	6.42***
Lactic acid content	21.82***	34.48***	3.08*
Resveratrol content	0.19	13.84***	2.77*

\*Significant at 10% level; \*\*significant at 5% level; \*\*\*significant at 1% level.

Table 2-50. Predicted levels of optimum lactic acid fermentation conditions for the maximum responses of peanut sprouts extract by the ridge analysis

Response	Predicted response					Morphology
	Response	Time (hr)	Peanut sprout conc. (° Brix)	Sub. material conc. (° Brix)	Result	
Lactic acid bacteria count (Log10 CFU/ml)	Min	57.12	4.31	5.71	11.29	Maximum
	Max	61.02	10.86	5.81	15.20	
pH decrement	Min	27.09	9.58	7.15	1.63	Maximum
	Max	57.29	5.42	4.06	2.06	
Acidity increment (%)	Min	29.09	5.74	5.00	0.84	Maximum
	Max	65.06	9.71	3.77	1.55	
Lactic acid content (mg/mL)	Min	27.07	6.50	4.73	8.67	Maximum
	Max	62.63	11.08	5.26	13.65	
Resveratrol content (µg/mL)	Min	49.95	4.06	5.36	0.20	Maximum
	Max	52.19	10.71	3.14	0.85	

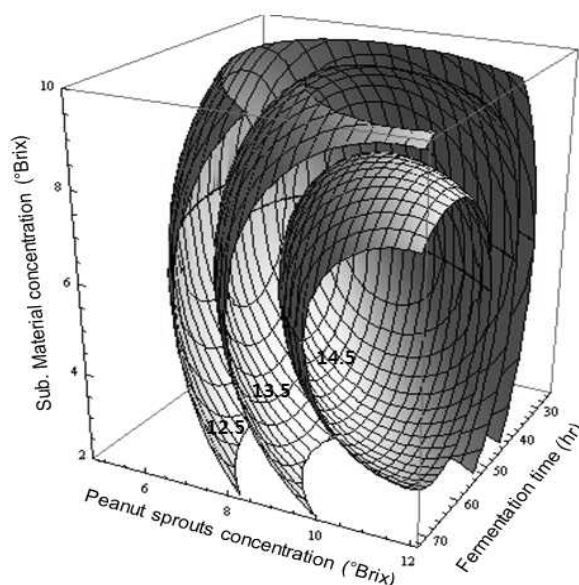


Fig. 2-39. Response surface for lactic acid bacteria count in peanut sprouts extract at constant values (lactic acid bacteria content : 12.5-13.5-14.5 Log10 CFU/mL) according to

fermentation time, peanut sprouts extract concentration and sub. material concentration.

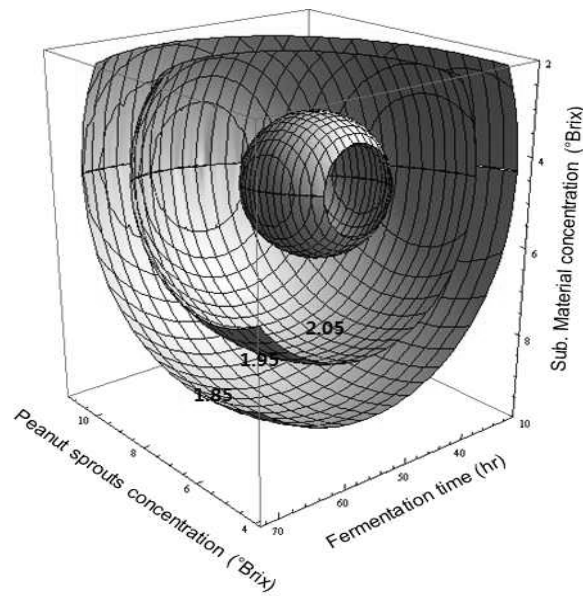


Fig. 2-40. Response surface for pH decrement in peanut sprouts extract at constant values (pH decrement : 1.85-1.95-2.05) according to fermentation time, peanut sprouts extract concentration and sub. material concentration.

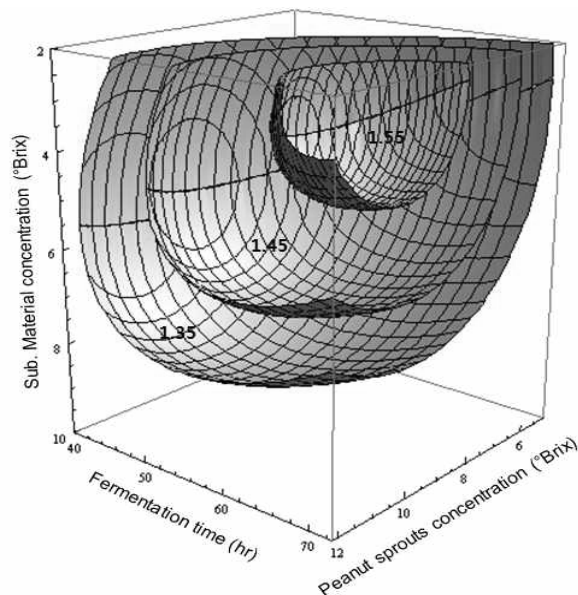


Fig. 2-41. Response surface for acidity increment in peanut sprouts extract at constant values (acidity increment : 1.35-1.45-1.55%) according to fermentation time, peanut sprouts extract concentration and sub. material concentration.

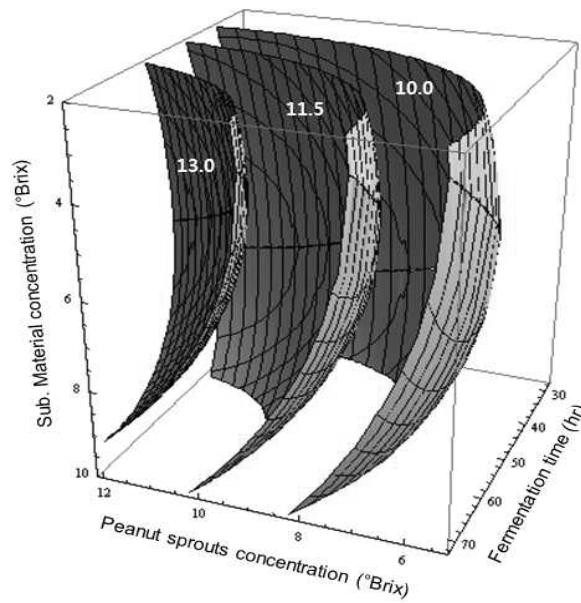


Fig. 2-42. Response surface for lactic acid content in peanut sprouts extract at constant values (lactic acid content : 10.0-11.5-13.0 mg/mL) according to fermentation time, peanut sprouts extract concentration and sub. material concentration.

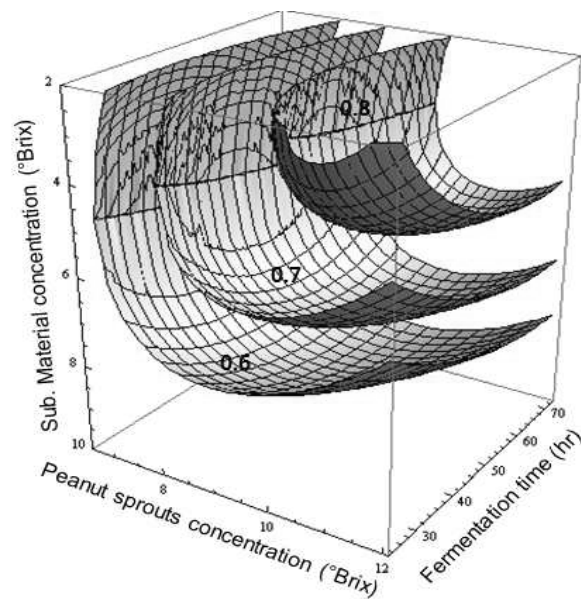


Fig. 2-43. Response surface for resveratrol increment content in peanut sprouts extract at constant values (resveratrol content : 0.6-0.7-0.8 µg/mL) according to fermentation time, peanut sprouts extract concentration and sub. material concentration.

## ② 최적 발효조건 예측

새싹땅콩 추출물의 발효조건을 설정하기 위하여 유산균수, 산도 증가량, 젖산 함량 및 resveratrol 함량을 모두 만족시켜주는 최적 발효조건을 얻고자 각 반응표면을 superimposing하여 Fig. 2-44의 겹쳐진 부분으로써 Table 2-51에 최적 조건을 나타내었다. 새싹땅콩 추출물의 최적 발효조건 범위는 발효시간 50~60 시간, 새싹땅콩 추출물 농도 8~12 ° Brix 및 부원료 농도 4~7 ° Brix로 나타났다(Table 2-51).

따라서 이와 같은 예측 결과에 대한 모델식의 신뢰성을 확인하기 위하여 예측된 최적 조건 범위 내에서 임의의 조건 즉, 발효시간 55 hr, 새싹땅콩 추출물 농도 10 ° Brix 및 부원료 농도 5.5 ° Brix를 대입하여 실제 유산발효를 실시하고, 발효물의 유산균수, pH 감소량, 산도 증가량, 젖산 함량 및 resveratrol 함량을 측정하여 예측된 값들과 유사한 수준으로 비교되었다(Table 2-52).

Table 2-51. The range of optimum lactic acid fermentation condition for maximum response variables by superimposing response surface of peanut sprouts

Fermentation condition	Range of predicted condition (optional point)
Fermentation time (hour)	50~60 (55)
Peanut sprouts extract conc. (° Brix)	8~12 (10)
Sub. material conc. (° Brix)	4~6 (5)

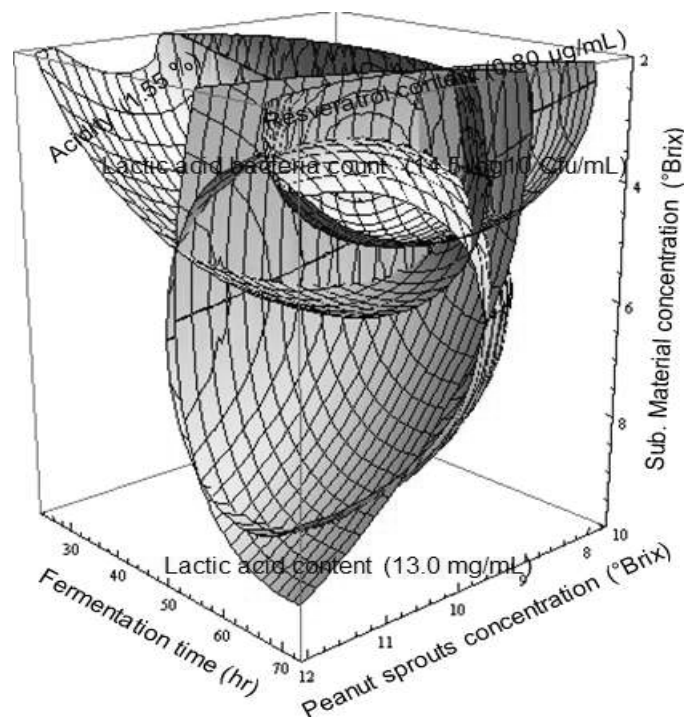


Fig. 2-44. Superimposed response surface for optimization of lactic acid bacteria count, acidity increment, lactic acid content and resveratrol increment content as function of fermentation time, peanut sprouts extract concentration and sub, material concentration of peanut sprouts

Table 2-52. Comparison between predicted and observed condition for physicochemical qualities of ferments

Physicochemical qualities	Predicted condition(A) <sup>1)</sup>	Observed condition(B) <sup>2)</sup>	B/A × 100(%)
Lactic acid bacteria count(Log10 CFU/ml)	15.04	14.85 ± 1.05	98.73
pH decrement	1.92	1.87 ± 0.02	97.39
Acidity increment (%)	1.50	1.52 ± 0.07	101.33
Lactic acid content (mg/mL)	12.75	12.16 ± 0.98	95.37
Resveratrol increment content (µg/mL)	0.81	0.75 ± 0.0698.73	88.23

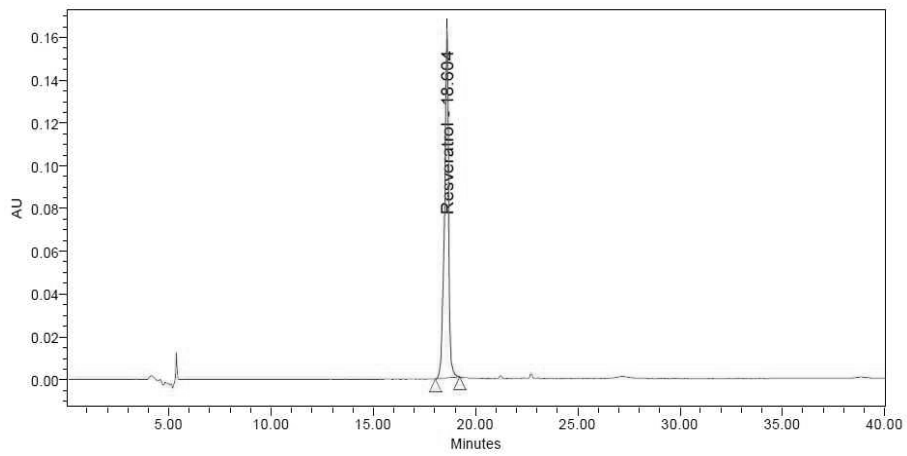
<sup>1)</sup> Calculated using the predicted equations for response variables.

<sup>2)</sup> Given optimal condition of independent variables : fermentation time 55 hr, peanut sprouts extract concentration 10 ° Brix, Sub. material concentration 5 ° Brix  
Mean values of triplicates determinations.

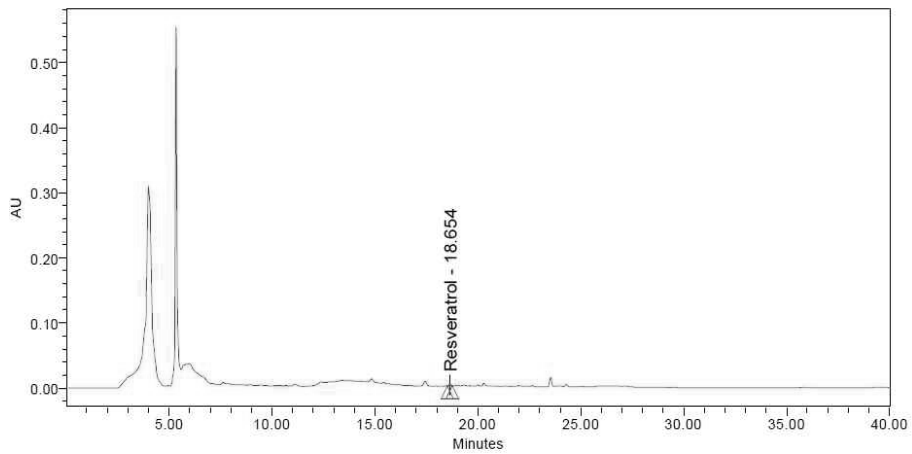


③ Resveratrol 분석 크로마토그램

㉞ Standard chromatogram



㉟ 발효 전 새싹땅콩 추출물



㊱ 발효 후 새싹땅콩 발효물

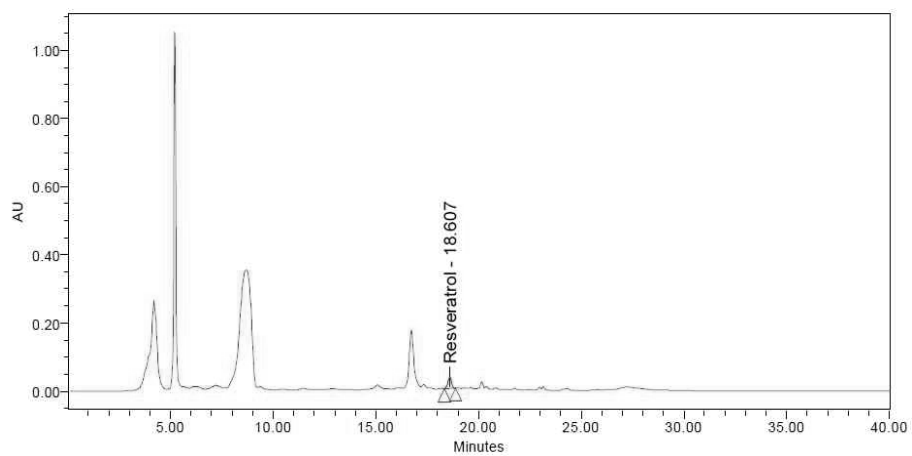


Fig 2-45. Chromatogram for sulforaphane, rutin and quercetin content as effective Ingredient of peanut sprouts extracts and fermented peanut sprouts

## 제 4절. 3차 년도 연구수행 내용 및 결과

### 1. 새싹채소(땅콩 및 브로콜리)유산균 발효물 활용 음료 추가개발 및 제품 확장

(협동연구기관 : 대구대학교 산학협력단)

#### 가. 연구 수행 결과

##### (1) 음료 소재화를 위한 처리 공정도

새싹채소(새싹브로콜리&새싹땅콩) 유산발효음료 제조를 위한 새싹채소의 추출조건은 다음과 같다.

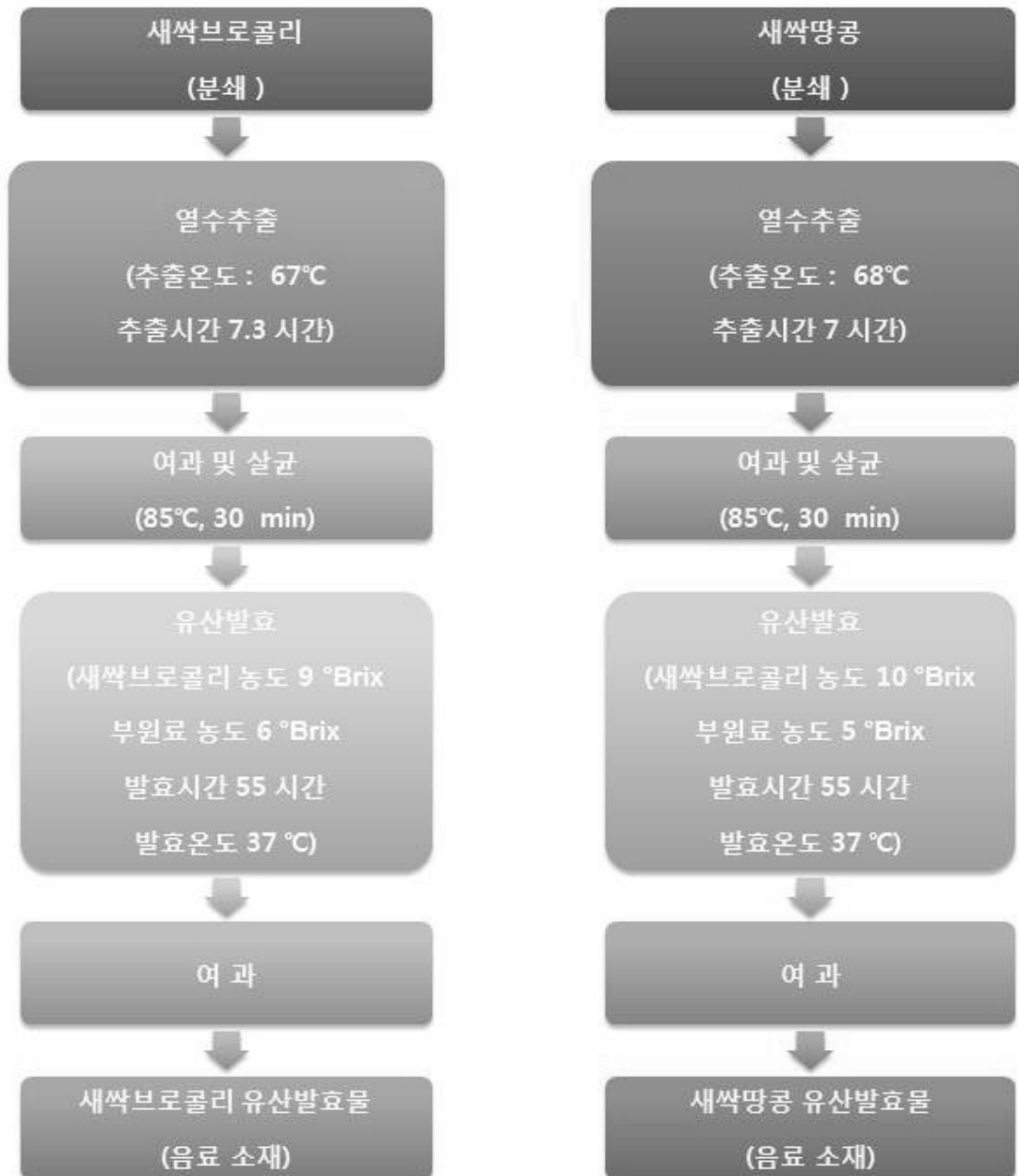
##### (가) 새싹채소 추출조건

Extraction conditions	Broccoli sprouts	Peanut sprouts
Temperature (°C)	67	68
Time (hour)	7.3	7.0

##### (나) 새싹채소 발효조건

Fermentation condition	Broccoli sprouts	Peanut sprouts
Fermentation time (hour)	55	55
Extracts concentration (° Brix)	9	10
Sub. material concentration (° Brix)	6	5

(다) 전처리 공정도



## (2) 음료 formulation

### (가) 음료 배합비율 설정

새싹채소(새싹브로콜리&새싹땅콩) 유산발효가 종료된 새싹채소 유산발효물에 기호성 증진을 위하여 여러 가지 부원료를 첨가하여 여러 가지 비율의 Table 3-1의 음료배합비를 설정하였다.

Table 3-1. Composition of sprouts lactic acid fermentation beverage

Broccoli sprouts beverage		Peanut sprouts beverage	
Ingredients	Mixing ratio (%, v/v)	Ingredients	Mixing ratio (%, v/v)
Broccoli sprouts ferments	40-60	Peanut sprouts ferments	40-60
Fructooligosaccharide	2-4	Fructooligosaccharide	2-4
Polydextrose	2-5	Polydextrose	2-5
Citric acid	0.01-0.06	Citric acid	0.01-0.06
Vitamin C	0.01-0.06	Vitamin C	0.01-0.06
Enzymatically Modified Stevia	0.01-0.03	Enzymatically Modified Stevia	0.01-0.03
Concentrate	5-10	Concentrate	5-10
Purified Water	30-40	Purified Water	30-40
<b>Total</b>	<b>100</b>	<b>Total</b>	<b>100</b>

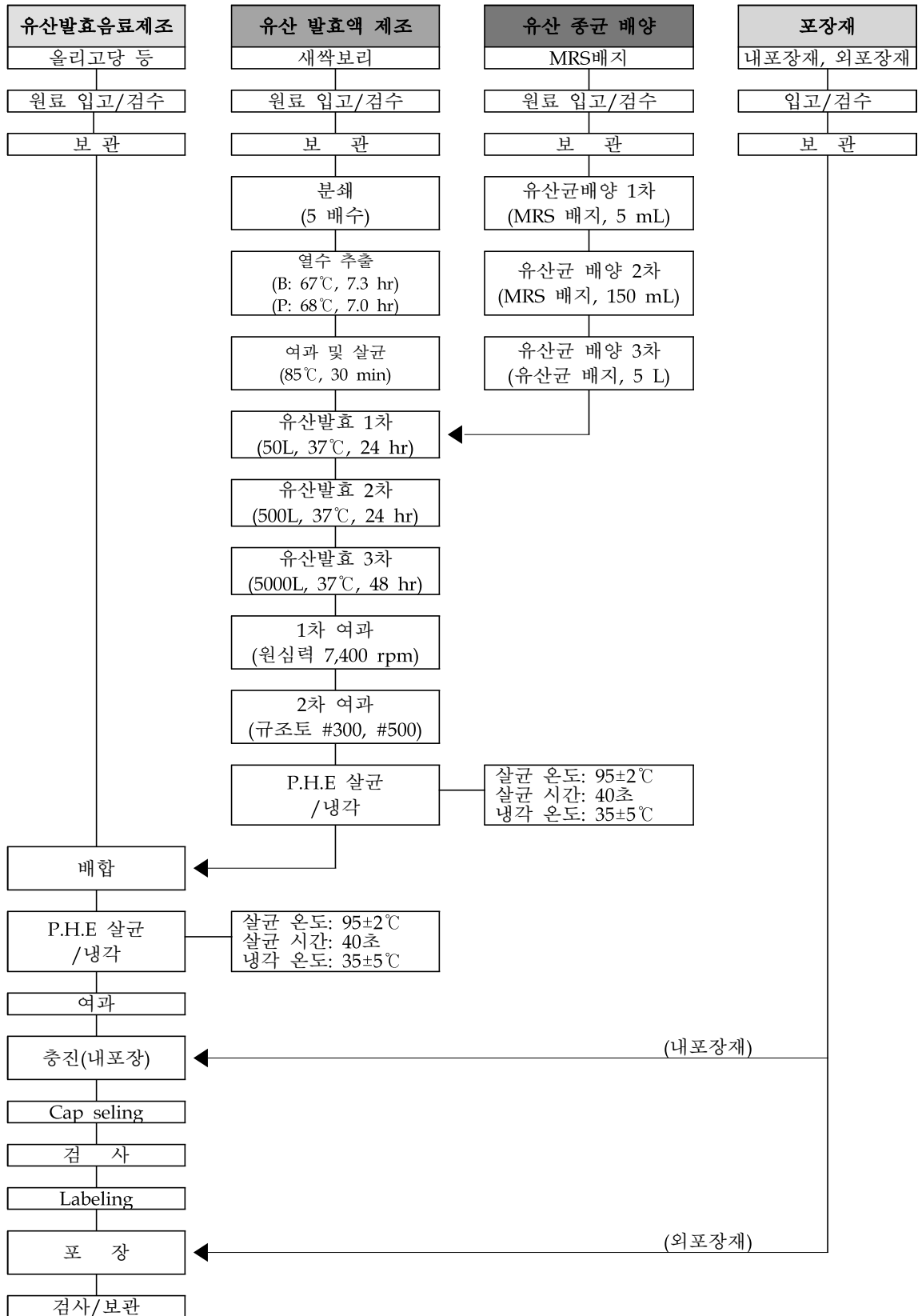
(나) 음료 배합비 결정

위의 전처리 공정에 따라 제조된 새싹채소(새싹브로콜리&새싹땅콩) 발효물을 이용한 새싹채소 유산발효 음료의 배합비율은 Table 3-2와 같다. 제품의 이화학적 및 관능적 특성을 측정한 후 부드럽고 자연스런 맛의 기호도가 가장 높은 비율을 선택하여 음료의 최적 배합 조건으로 설정하였다.

Table 3-2. Formula for preparation of beverage added lactic acid fermented broccoli & peanut sprouts

Broccoli sprouts beverage		Peanut sprouts beverage	
Ingredients	Mixing ratio (%, v/v)	Ingredients	Mixing ratio (%, v/v)
Broccoli sprouts ferments	50	Peanut sprouts ferments	50
Fructooligosaccharide	3.0	Fructooligosaccharide	3.0
Apple concentrate	5.0	Brown rice concentrate	2.0
Sweet potato concentrate	2.0	Grape concentrate	5.0
Polydextrose	3.0	Polydextrose	3.0
Citric acid	0.05	Citric acid	0.05
Vitamin C	0.05	Vitamin C	0.05
Enzymatically Modified Stevia	0.02	Enzymatically Modified Stevia	0.02
Purified Water	36.88	Purified Water	36.88
<b>Total</b>	<b>100</b>	<b>Total</b>	<b>100</b>

### (3) 음료 제조공정도



#### (4) 시제품 제조

새싹채소(새싹브로콜리&새싹땅콩) 식물성 유산발효물을 이용한 음료의 배합비율 및 제조공정도에 준하여 음료 시제품을 생산하였으며 Fig. 3-1과 같다.



새싹브로콜리유산발효음료 시제품



새싹땅콩유산발효음료 시제품

Fig. 3-1. Prototype of beverages using lactic acid ferments of broccoli and peanut sprouts

(5) 최종 새싹채소 유산발효음료의 품질 특성 및 관능검사

(가) 이화학적 특성

음료의 품질 특성은 Table 3-3에 나타내었다.

Table 3-3. Physicochemical properties of beverages

Physicochemical property	Broccoli sprout beverage	Peanut sprout beverage
pH	3.63	3.92
Sugar content (°Brix)	0.58	0.34
Acidity (%)	11.7	11.0
Sulforaphane content (µg/mL)	2.07	-
Rutin content (µg/mL)	7.25	-
Quercetin content (µg/mL)	0.33	-
Resveratrol content (µg/mL)	-	0.24

(나) 관능검사

Table 3-4. 음료의 관능적 특성 강도

	색의 진한 정도	새콤한 향의 정도	새콤한 맛의 정도	단맛의 정도
Broccoli sprout beverage	5.23±1.07 <sup>a</sup>	4.67±1.02 <sup>a</sup>	4.77±1.04 <sup>a</sup>	4.40±1.16 <sup>b</sup>
Peanut sprout beverage	5.42±1.10 <sup>a</sup>	3.79±1.37 <sup>b</sup>	3.19±1.18 <sup>b</sup>	5.28±1.30 <sup>a</sup>

<sup>a-d</sup>Means within the same column with different letters are significant different at  $p<0.05$

Table 3-5. 관능적 기호도

	색	향	맛	전체적 기호도
Broccoli sprout beverage	5.65±1.00 <sup>a</sup>	5.35±0.97 <sup>a</sup>	5.26±1.03 <sup>a</sup>	5.53±0.98 <sup>a</sup>
Peanut sprout beverage	5.60±0.98 <sup>a</sup>	4.44±0.96 <sup>b</sup>	4.16±1.00 <sup>b</sup>	4.30±1.04 <sup>b</sup>

<sup>a-d</sup>Means within the same column with different letters are significant different at  $p<0.05$



관능검사 (평점법)

이름:

성별:

나이:

날짜:

- 시료번호를 아래의 표에 기입하시오.
- 평점법으로 실시 - 7점 척도법 사용

강도 척도		기호도 척도	
1점	매우 약하다	1점	매우 싫어 한다
2점	약하다	2점	싫어 한다
3점	조금 약하다	3점	조금 싫어 한다
4점	보통이다 (약하지도 강하지도 않다)	4점	보통이다 (좋아하지도 싫어하지도 않는다)
5점	조금 강하다	5점	조금 좋아 한다
6점	강하다	6점	좋아 한다
7점	매우 강하다	7점	매우 좋아 한다

I. 각 시료의 관능적 특성에 대한 강한 정도를 7점 척도법으로 평가하시오

- 특성강도 검사

관능적 특성	시료번호	
색의 진한 정도		
새콤한 향의 정도		
새콤한 맛의 정도		
단맛의 정도		

II. 각 시료의 관능적 특성에 대한 기호도를 7점 척도법으로 평가하시오

- 기호도 검사

관능적 특성	시료번호	
색		
향		
맛		
전체적인 기호도		

## 2. 새싹채소(브로콜리&땅콩)발효물 및 음료 효능 및 안정성 검사

: (협동연구기관 : 대구대학교 산학협력단)

### 가. 새싹브로콜리와 새싹땅콩 발효물을 활용한 어린이용 음료의 기능개선

- 변비개선 동물실험

#### (1) 연구 수행 방법

##### (가) 실험동물의 사육 및 식이

실험동물은 Sprague Dawley계 4주령 수컷 흰쥐 70마리를 효창사이언스(Daegu, Korea)에서 구입하였으며, 일주일 간 일반사료와 물을 자유롭게 섭취할 수 있도록 하여 적응시켰다. 이때 실험실 환경은 온도  $22\pm 1^{\circ}\text{C}$ , 상대습도  $63\pm 5\%$ , 명암은 12시간 주기로 조절하였다. 1주일 간 적응시킨 다음 2주째에 난괴법(randomized block design)에 따라 각 군의 체중이 비슷하도록 각 처리군당 10마리씩 7군으로 나누어 스테인리스 케이지에 3마리씩 분리하여 4주동안 사육하였다.

실험군은 일반식이를 급여하는 정상군(normal)과 일반식이를 급여하면서 loperamide로 변비를 유도하는 대조군(control), 상업용 음료(kkeung-a)를 식이하면서 loperamide로 변비를 유발하는 양성대조군(PC), 새싹브로콜리유산발효액을 식이하면서 loperamide로 변비를 유발하는 시험군(S1), 새싹땅콩유산발효액을 식이하면서 loperamide로 변비를 유발하는 시험군(S2), 새싹브로콜리발효음료를 식이하면서 loperamide로 변비를 유발하는 시험군(S3), 새싹땅콩발효음료를 식이하면서 loperamide로 변비를 유발하는 시험군(S4)으로 구성하였다. 본 동물 실험은 대구대학교 동물실험윤리위원회의 승인을 받고 그 규정에 따라 실행하였다.

동물실험 기간은 총 5주로 1주 동안 환경에 적응시킨 뒤 4주 동안 실험을 진행했다. 흰쥐 식이로 공급한 pellet형 고형 사료는 AIN-76A 일반 식이를 사용했다. 정상군과, 대조군은 일반 식이만을 급여했고, S1군 새싹브로콜리유산발효액을, S2군은 새싹땅콩유산발효액을, S3군은 새싹브로콜리발효음료를, S4 시험군은 새싹땅콩발효음료를 각각 동결건조하여 500 mg/kg을 하루에 한번 씩 일정시간에 경구 투여하였다. 일곱 군 중 정상군을 제외한 대조군과 양성대조군, S1, S2, S3, S4 시험군은 loperamide로 변비를 유도시켰다. 실험에 사용한 loperamide는 Sigma(St. Louise, MO, USA) 제품을 사용했다

##### (나) 실험동물 처치

4주(28일) 간 식이섭취 기간이 끝나고, 29일차부터 33일차 까지 5일 동안 변비를 유도시키지 않는 음성대조군은 0.9% 생리식염수만 경구투여(p.o, per oral)했고, 변비를 유도시킬 대조군과 양성대조군, S1, S2, S3, S4 시험군은 loperamide(5 mg/kg)를 0.9 % 생리식염수에 녹인 뒤 하루에 2회씩(오전 9시와 오후 9시) 5일간 경구투여했다. 실험 33일차에 장 통과시간을 측정된 뒤 34일차에 모든 군의 실험동물을 ether로 흡입 마취해서 희생하였다.

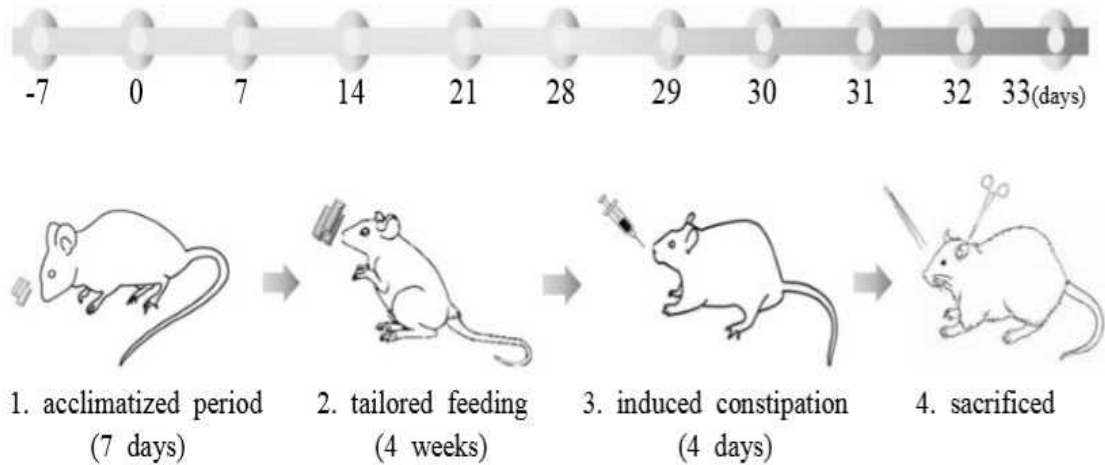


Fig. 3-2. *In vivo* experiment flow

#### (다) 체중 및 식이효율 측정

실험식이 첫 급여일을 시작으로 1 주마다 체중을 측정하였고, 변비 유도기간에는 매일 체중을 측정하였다. 실험식은 하루에 한 번 100 g씩 일정 시간에 공급하고 24시간 후 남은 양을 측정하여 식이섭취량을 측정하여 그 차이로 섭취한 식이량을 계산하였다.

#### (라) 변 개수, 변 중량, 변 수분함량 측정

변의 개수, 중량 및 수분함량의 측정값은 변비유발 전과 변비유발 기간 두 기간으로 나누어 측정하였다. 각 실험동물의 케이지에 절식판을 설치한 후, 실험시작 당일과 이 후 1주마다 총 4회 수거하였으며, 변비기간 중에는 매일 수거하여 변 개수를 세고 무게를 측정하였다. 변의 수분함량은 변을 70℃ 드라이오븐에서 24시간 동안 건조시켜 중량을 측정하여 변 중량과 건조 후의 변 중량차를 이용해 수분함량을 구하였다.

#### (마) 장관 내 잔류 변 개수 측정과 형태 관찰

장관 내 변 개수는 loperamide 투여한 뒤 3일째 되는 날 맹장부터 직장까지 전체 부위를 취해 10% formaldehyde 인산 염 완충액(phosphate buffered saline, PBS, pH 7.4)으로 고정 해서 대장 안에 남아있는 변 개수를 측정하고, 대장 내에 남아 있는 변의 크기와 형태는 눈으로 확인하였다.

#### (바) 혈청 지질 함량 측정

혈청 분석을 위해 실험 종료일에 흰쥐를 마취시켜 회복한 뒤 하대정맥에서 혈액을 채취한 후 헤파린으로 처리한 멸균튜브에 모아 실험에 이용하였다. 채취된 혈액은 3,000 rpm,

4℃에서 15분간 원심분리 한 후 혈청을 분리하여 분석 전까지 -70℃에 보관하였다. 혈중 중성지질의 함량은 중성지질 측정용 kit 시약(AM 157S-K, Asan Pharm. Co., Seoul, Korea), 총 콜레스테롤의 함량은 총 콜레스테롤 측정용 kit 시약(AM 202-K, Asan Pharm. Co., Seoul, Korea), HDL-콜레스테롤 함량은 HDL 콜레스테롤 측정용 kit 시약(AM 203-K, Asan Pharm. Co., Seoul, Korea)으로 측정하였다. 혈중 LDL-콜레스테롤 농도는 Friedewald의 계산식으로 구하였다. 계산식은 LDL 콜레스테롤 = ((총 콜레스테롤 - HDL 콜레스테롤) - (중성지질/5))이다.

#### (사) 간기능 효소 측정

혈중 Glutamic oxaloacetic transaminase (GOT), Glutamic pyruvic transaminase (GPTT)의 측정은 Reitman-Frankel의 효소법을 응용한 GOT, GPT 측정용 kit 시약(Asan Pharm. Co., Seoul, Korea)을 사용하여 측정하였다.

#### (아) 통계처리

모든 실험결과는 평균값과 표준편차로 표시하였으며, 통계처리는 Statistical Analysis System (SAS version 9.2, SAS Institute Inc., USA)을 one-way ANOVA 분석을 실시한 후  $p < 0.05$  수준에서 Duncan's multiple range test에 의해 유의성을 검증하였다.

## (2) 연구 수행 결과

### (가) 체중 변화 및 식이섭취량

실험기간 동안 변비 유발 rat에 대한 각 군의 체중변화량과 식이섭취량 변화는 Table 3-6과 같다. 체중변화는 실험 종료 시 새싹브로콜리와 새싹땅콩 발효물 및 음료를 경구 투여한 군이 정상군에 비해 체중이 감소하는 경향을 보였으며, 특히 새싹땅콩 발효물에서는 정상군보다 유의적으로 체중이 감소하는 것으로 나타났다. 반면 대조군은 정상군에 비해 체중이 증가됨을 알 수 있었다. 식이섭취량은 loperamide로 변비 유발시킨 모든 실험군이 정상군보다 식이섭취량이 감소하는 경향을 보였으며, 새싹브로콜리 발효물 투여 실험군(S1)을 제외한 나머지 실험군에서는 유의적인 차이를 보이며 감소하는 것으로 나타났다. 또한 loperamide로 변비를 유발시킨 대조군(control)과 loperamide로 변비를 유발시킨 실험군을 비교한 결과, 모든 실험군에서 대조군에 비해 식이섭취량이 많은 것으로 나타났으며, 특히 새싹땅콩발효음료 실험군(S4)에서 유의적으로 섭취량이 많은 것을 알 수 있었다. 식이효율은 정상식이군(normal)과 loperamide로 변비를 유발시킨 대조군(control) 사이에 유의적인 차이를 보이며 대조군의 식이효율이 감소하였으며, 대조군(control)에 비해서 loperamide로 변비를 유발시킨 실험군의 식이효율은  $P < 0.05$  수준에서 유의적으로 낮았다. 기존 변비개선 관련 연구들에서 loperamide에 의해 감소되는 몸무게 및 식이섭취량은 유의적인 차이가 없다고 보고된 것과는 차이가 있는 결과를 보였다. Shimotoyodomo A 등(2000)에 따르면 loperamide를 투여 시 복부가 팽만해지고 식욕이 떨어지는 증상이 나타나, 실험동물이 식이섭취량이 감소하는 것으로 밝혀진 바 있다. 또한 연속해서 loperamide를 투여하면 수축과 이완을 반복하는 대장의 연동 운동이 저하되면서 변의 이동 속도가 느려진다. 따라서 자연스럽게 배변 기간이 길어지고 대장 점액질 두께가 얇아져서 변비에 걸린다(Cepinskas 등 1993).

Table 3-6. Initial body weight, final body weight and body weight gain of rats fed experimental diets for 5 weeks

Groups <sup>1)</sup>	Initial weight (g)	Final weight (g)	Weight increase (g)	Food intake (g/day)	Food efficiency ratio (%)
Normal	152.2±2.74 <sup>2)bc3)</sup>	325.5±10.07 <sup>a</sup>	173.3±10.31 <sup>ba</sup>	24.74±1.72 <sup>a</sup>	0.22±0.01 <sup>cb</sup>
Control	147.9±8.50 <sup>c</sup>	329.2±16.82 <sup>a</sup>	181.3±16.20 <sup>a</sup>	23.34±2.21 <sup>c</sup>	0.27±0.02 <sup>a</sup>
PC	159.8±5.07 <sup>ba</sup>	312.5±23.79 <sup>a</sup>	152.7±24.26 <sup>c</sup>	21.51±1.64 <sup>c</sup>	0.22±0.04 <sup>cb</sup>
S1	153.8±10.26 <sup>bc</sup>	316.7±19.70 <sup>a</sup>	162.9±16.04 <sup>bc</sup>	23.82±2.00 <sup>ba</sup>	0.21±0.02 <sup>c</sup>
S2	159.5±7.25 <sup>ba</sup>	312.0±15.87 <sup>a</sup>	152.5±19.88 <sup>c</sup>	21.51±1.67 <sup>c</sup>	0.22±0.03 <sup>cb</sup>
S3	153.1±7.65 <sup>bc</sup>	324.4±16.36 <sup>a</sup>	171.3±14.80 <sup>ba</sup>	22.03±1.89 <sup>bc</sup>	0.24±0.02 <sup>b</sup>
S4	162.5±10.10 <sup>a</sup>	321.8±23.88 <sup>a</sup>	160.9±18.62 <sup>bc</sup>	21.18±1.88 <sup>b</sup>	0.21±0.03 <sup>c</sup>

<sup>1)</sup>Normal : normal diet group

Control : normal diet and loperamide group

PC : commercial beverages(kkeung-a) and loperamide group

S1 : fermented broccoli sprouts extract and loperamide group

S2 : fermented peanut sprouts extract and loperamide group

S3 : broccoli sprouts beverages and loperamide group

S4 : peanut sprouts beverages and loperamide group

<sup>2)</sup>Values are Mean±S.D.(n=10)

<sup>3)</sup>Mean with the different superscripts are significantly different at p<0.05 by one-way ANOVA with Duncan's multiple range test.

#### (나) 장기 무게

실험동물의 간, 신장 및 비장 무게를 Table 3-7과 같다. 간의 무게는 loperamide로 변비를 유발시킨 대조군(control)에서 가장 높게 나타났으며, loperamide로 변비를 유발시킨 시험군의 경우 대조군에 비해 간의 무게가 낮았으나 유의적인 차이는 보이지 않는 것으로 나타으며, 정상군(normal)에 비해서는 높은 경향을 보였으며 이 또한 유의적인 차이가 없는 것으로 나타났다. 실험동물의 체중 100 g당 간 무게로 환산하였을 경우 대조군이 3.11 g으로 다른 시험군에 비해 약간 높았으나 유의적인 차이는 없었다. 신장 무게의 경우는 loperamide로 변비를 유발시킨 시험군이 정상군(normal)과 대조군(control)에 비해 낮은 경향을 보였으며, 특히 새싹땅콩발효물 실험군(S2)과 새싹브로콜리음료 실험군(S3)에서는 유의적으로 낮게 나타나는 것을 알 수 있었다. 비장의 무게는 간의 무게와 같은 경향으로 대조군(control)보다는 낮았으며, 정상군(normal)보다는 높은 것으로 나타났으며, 실험군 간에 유의적인 차이는 없는 것으로 나타났다.

Table 3-7. Liver, kidney and spleen weight in experimental rat

Groups <sup>1)</sup>	Liver weight (g)	Kidney weight (g)	Spleen weight (g)
Normal	15.75±1.63 <sup>2)a3)</sup>	2.52±0.24 <sup>ba</sup>	0.72±0.12 <sup>a</sup>
Control	17.50±2.06 <sup>a</sup>	2.64±0.24 <sup>a</sup>	0.78±0.09 <sup>a</sup>
PC	16.92±2.18 <sup>a</sup>	2.46±0.25 <sup>ba</sup>	0.74±0.12 <sup>a</sup>
S1	16.76±2.23 <sup>a</sup>	2.56±0.22 <sup>ba</sup>	0.74±0.08 <sup>a</sup>
S2	16.82±2.63 <sup>a</sup>	2.39±0.27 <sup>b</sup>	0.72±0.09 <sup>a</sup>
S3	16.88±1.56 <sup>a</sup>	2.40±0.19 <sup>b</sup>	0.77±0.09 <sup>a</sup>
S4	16.91±1.55 <sup>a</sup>	2.43±0.18 <sup>ba</sup>	0.76±0.10 <sup>a</sup>

<sup>1)</sup>Normal : normal diet group, Control : normal diet and loperamide group

PC : commercial beverages(kkeung-a) and loperamide group

S1 : fermented broccoli sprouts extract and loperamide group

S2 : fermented peanut sprouts extract and loperamide group

S3 : broccoli sprouts beverages and loperamide group

S4 : peanut sprouts beverages and loperamide group

<sup>2)</sup>Values are Mean±S.D.(n=10)

<sup>3)</sup>Mean with the different superscripts are significantly different at  $P<0.05$  by one-way ANOVA with Duncan's multiple range test.

#### (다) 지방 무게

변비를 유발시키면서 새싹브로콜리와 새싹땅콩 발효물과 새싹브로콜리와 새싹땅콩 유산발효음료를 경구 투여한 흰쥐의 복부, 신장 및 부고환지방의 무게는 Table 3-8과 같다. 복부지방 무게는 loperamide로 변비를 유발시킨 실험군(S1, S2, S3, S4)이 정상군(normal)과 대조군(control)에 비해 낮은 경향을 보였으며, S1, S2, S4 실험군에서는  $P<0.05$  수준에서 유의성이 인정되었다. 신장지방 무게의 경우도 복부지방 무게와 같은 경향을 보여 정상군과 대조군에 비해 무게가 낮은 것으로 나타났으며, 새싹브로콜리발효물 실험군(S1)에서 신장지방의 무게가  $1.16\pm0.23$  g으로 가장 낮은 값을 보였다. 부고환지방 무게의 경우는 대조군(control)에 비해 변비를 유발시킨 실험군 모두에서 유의적으로 낮은 것으로 나타났으며, 변비를 유발시키지 않은 정상군(normal)군과 비교할 경우 새싹브로콜리 발효물(S1) 실험군이 정상군에 비해 낮게 나타났으나, 유의적인 차이는 보이지 않았으며, 나머지 실험군(S2, S3, S4)은 유의적인 차이 없이 다소 높은 것으로 나타났다.

Table 3-8. Fat weight in experimental rat

Groups <sup>1)</sup>	Abdominal fat weight (g)	Kidney fat weight (g)	Epididymal fat weight (g)
Normal	3.42±0.68 <sup>2)ba3)</sup>	1.62±0.29 <sup>a</sup>	0.18±0.04 <sup>cb</sup>
Control	3.62±0.70 <sup>a</sup>	1.65±0.38 <sup>a</sup>	0.32±0.07 <sup>a</sup>
PC	2.61±0.68 <sup>c</sup>	1.15±0.0.23 <sup>c</sup>	0.20±0.02 <sup>b</sup>
S1	2.60±0.60 <sup>c</sup>	1.16±0.23 <sup>c</sup>	0.15±0.02 <sup>b</sup>
S2	2.65±0.54 <sup>c</sup>	1.43±0.30 <sup>ba</sup>	0.20±0.03 <sup>b</sup>
S3	3.20±0.65b <sup>ac</sup>	1.41±0.28 <sup>bac</sup>	0.21±0.05 <sup>b</sup>
S4	2.95±0.44 <sup>c</sup>	1.34±0.13 <sup>bc</sup>	0.22±0.03 <sup>b</sup>

<sup>1)</sup>Normal : normal diet group

Control : normal diet and loperamide group

PC : commercial beverages(kkeung-a) and loperamide group

S1 : fermented broccoli sprouts extract and loperamide group

S2 : fermented peanut sprouts extract and loperamide group

S3 : broccoli sprouts beverages and loperamide group

S4 : peanut sprouts beverages and loperamide group

<sup>2)</sup>Values are Mean±S.D.(n=10)

<sup>3)</sup>Mean with the different superscripts are significantly different at p<0.05 by one-way ANOVA with Duncan's multiple range test.

#### (라) 변 개수, 변 중량, 변 수분함량

변비 유도 전과 후로 나눠 실험동물 개체 당 변의 개수와 변의 중량, 변의 수분함량은 Table 3-9와 같다. 변비를 유도하기 전 4주 동안 각 군에서 배설한 변 개수는 정상군(normal)과 대조군(control)이 각각 41.21±4.56개, 39.86±2.73개로 유의적인 차이가 없었으며, 양성대조군(PC)과 새싹땅콩발효물 실험군(S2), 새싹브로콜리발효음료 실험군(S3), 새싹땅콩발효음료 실험군(S4)은 대조군보다 변의 개수가 많은 것으로 나타났으며, 특히 새싹브로콜리발효물 실험군은 정상군과 대조군보다 변의 개수가 많았으나, 유의적인 차이는 없는 것으로 나타났다. 그리고 변비 유발을 위하여 loperamide 투여 후 실험동물의 변의 개수와 변의 중량, 변의 수분함량을 측정한 결과, 변의 개수는 변비를 유도한 후 대조군의 변의 개수가 감소했고, 변비를 유도하지 않은 정상군과 비교했을 때 유의적인 감소가 나타났다. 따라서 변비가 제대로 유발됐음을 확인할 수 있었다. 변의 개수가 감소한 대조군과 동일하게 변비를 유발한 새싹브로콜리와 새싹땅콩 실험군 모두가 변비를 유도하기 전보다 감소했다. 그러나 대조군에 비해서는 변의 개수가 유의적으로 많았으며, 새싹브로콜리발효물 실험군(S1)에서 33.8±8.15개로 가장 많은 변의 개수를 보였다(Fig. 3-3). 변 중량 또한 변 개수와 유사한 경향의 결과가 나타났다(Fig. 3-4). 변의 수분함량의 경우, 변비 유발 전, 정상군과 대조군보다 새싹브로콜리와 새싹땅콩 발효물 실험군(S1, S2)에서 높은 경향이 있었지만, 유의적인 차이는 없었으며, 새



썩브로콜리발효물물 실험군의 변 수분함량이  $33.23 \pm 9.16\%$ 로 가장 높았다. 또한 변비를 유도한 후, 변의 수분함량은 정상군에 비해서는 낮았으나. 대조군과 비교하여서는 모든 실험군에서 높게 나타났으나, 유의적인 차이가 없었다.(Fig. 3-5).

Table 3-9. Number of fecal pellet, wet weight of fecal pellets and fecal water content in rat

Groups <sup>1)</sup>	Before inducing constipation (BIC)		
	No. of fecal pellet (count/day)	Wet weight of fecal pellets (g)	Fecal water content (%)
Normal	$41.21 \pm 4.56^{2)a3}$	$6.72 \pm 1.91^a$	$30.10 \pm 8.78^a$
Control	$39.86 \pm 2.73^a$	$6.23 \pm 1.04^a$	$29.55 \pm 3.39^a$
PC	$40.24 \pm 3.50^a$	$6.31 \pm 1.32^a$	$30.00 \pm 5.42^a$
S1	$43.27 \pm 4.53^a$	$7.07 \pm 1.22^a$	$33.23 \pm 9.16^a$
S2	$40.71 \pm 4.28^a$	$6.47 \pm 1.21^a$	$30.95 \pm 5.81^a$
S3	$40.56 \pm 4.80^a$	$6.60 \pm 1.38^a$	$30.00 \pm 5.42^a$
S4	$40.63 \pm 6.01^a$	$6.32 \pm 1.47^a$	$29.60 \pm 6.45^a$

Groups <sup>1)</sup>	After inducing constipation (BIC)		
	No. of fecal pellet (count/day)	Wet weight of fecal pellets (g)	Fecal water content (%)
Normal	$43.47 \pm 7.09^{2)a3}$	$7.08 \pm 1.36^a$	$33.35 \pm 6.84^a$
Control	$25.64 \pm 6.48^c$	$5.34 \pm 1.18^c$	$26.18 \pm 5.21^b$
PC	$30.25 \pm 5.13^b$	$5.64 \pm 1.24^{bc}$	$30.89 \pm 7.99^{ba}$
S1	$33.8 \pm 8.15^b$	$6.48 \pm 1.38^{ba}$	$32.22 \pm 8.22^{ba}$
S2	$29.54 \pm 7.84^{cb}$	$5.81 \pm 1.30^{bc}$	$30.57 \pm 6.90^{ba}$
S3	$31.13 \pm 7.38^b$	$5.89 \pm 1.26^{bc}$	$28.02 \pm 6.89^{ba}$
S4	$31.10 \pm 7.99^b$	$5.39 \pm 1.01^{bc}$	$28.47 \pm 5.34^{ba}$

<sup>1)</sup>Normal : normal diet group

Control : normal diet and loperamide group

PC : commercial beverages(kkeung-a) and loperamide group

S1 : fermented broccoli sprouts extract and loperamide group

S2 : fermented peanut sprouts extract and loperamide group

S3 : broccoli sprouts beverages and loperamide group

S4 : peanut sprouts beverages and loperamide group

<sup>2)</sup>Values are  $\text{Mean} \pm \text{S.D.} (n=10)$

<sup>3)</sup>Mean with the different superscripts are significantly different at  $p < 0.05$  by one-way ANOVA with Duncan's multiple range test.

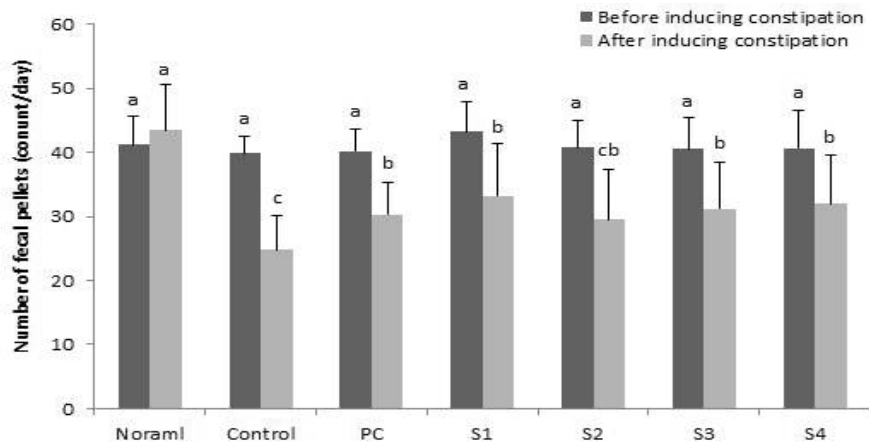


Fig. 3-3. Number of fecal pellets in rat

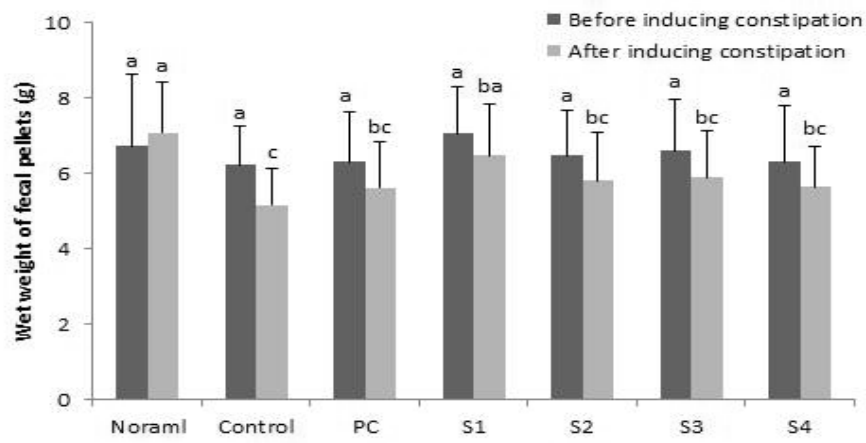


Fig. 3-4. Wet weight of fecal pellets in rat

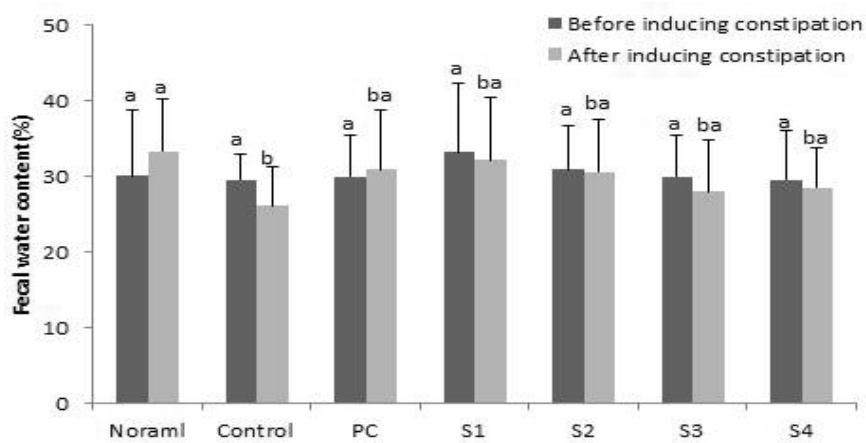


Fig. 3-5. Fecal water content in rat

### (마) 장관 내 잔류 변 개수

실험 마지막 날 모든 실험동물을 희생시켜, 결장 부위에 잔류하고 있는 변의 개수를 측정 한 결과는 Table 3-10 및 Fig. 3-6과 같다. 변비를 유도하지 않은 정상군(normal)에서  $0.90 \pm 0.57$ 개로 가장 적은 잔류 변 개수를 확인하였고, loperamide로 변비를 유도한 대조군(control)이  $5.00 \pm 1.25$ 개로 그 수가 유의적으로 많은 것을 확인하였다. 그리고 대조군에 비해 변비를 유도한 실험군에서는 새싹브로콜리 발효물 실험군인 S1이  $2.40 \pm 1.71$ 개, 새싹땅콩 발효물 실험군인 S2는  $3.20 \pm 1.14$ 개, 새싹브로콜리발효음료 실험군인 S3은  $3.00 \pm 1.94$ , 새싹땅콩 발효음료 실험군인 S4가  $3.56 \pm 1.51$ 개로 대조군보다는 장관 내 잔류 변 개수가 유의적으로 낮은 것을 확인하였으며, 실험군 간에는 유의적 차이는 없는 것으로 나타났다. 정상군(normal)과 대조군(control)군의 장관 내 잔류 변개수의 유의적인 차이는 loperamide에 의한 변비 유발을 다시 한 번 확인시켜 주었고, 새싹브로콜리발효물과 새싹땅콩발효물 실험군 역시 변비가 유발되었음에도 대조군에 비해 잔류 변 개수가 감소함을 확인하여 새싹브로콜리발효물과 새싹땅콩발효물이 배변활동 원화에 효과를 보이는 것을 알 수 있었다.

Table 3-10. Number of fecal pellets in distal colon

Groups <sup>1)</sup>	No. of fecal pellet (count/day)
Normal	$0.90 \pm 0.57^c$
Control	$5.00 \pm 1.25^a$
PC	$2.70 \pm 1.42^b$
S1	$2.40 \pm 1.71^b$
S2	$3.20 \pm 1.14^b$
S3	$3.00 \pm 1.94^b$
S4	$3.56 \pm 1.51^b$

<sup>1)</sup>Normal : normal diet group

Control : normal diet and loperamide group

PC : commercial beverages(kkeung-a) and loperamide group

S1 : fermented broccoli sprouts extract and loperamide group

S2 : fermented peanut sprouts extract and loperamide group

S3 : broccoli sprouts beverages and loperamide group

S4 : peanut sprouts beverages and loperamide group

<sup>2)</sup>Values are  $\text{Mean} \pm \text{S.D.} (n=10)$

<sup>3)</sup>Mean with the different superscripts are significantly different at  $p < 0.05$  by one-way ANOVA with Duncan's multiple range test.

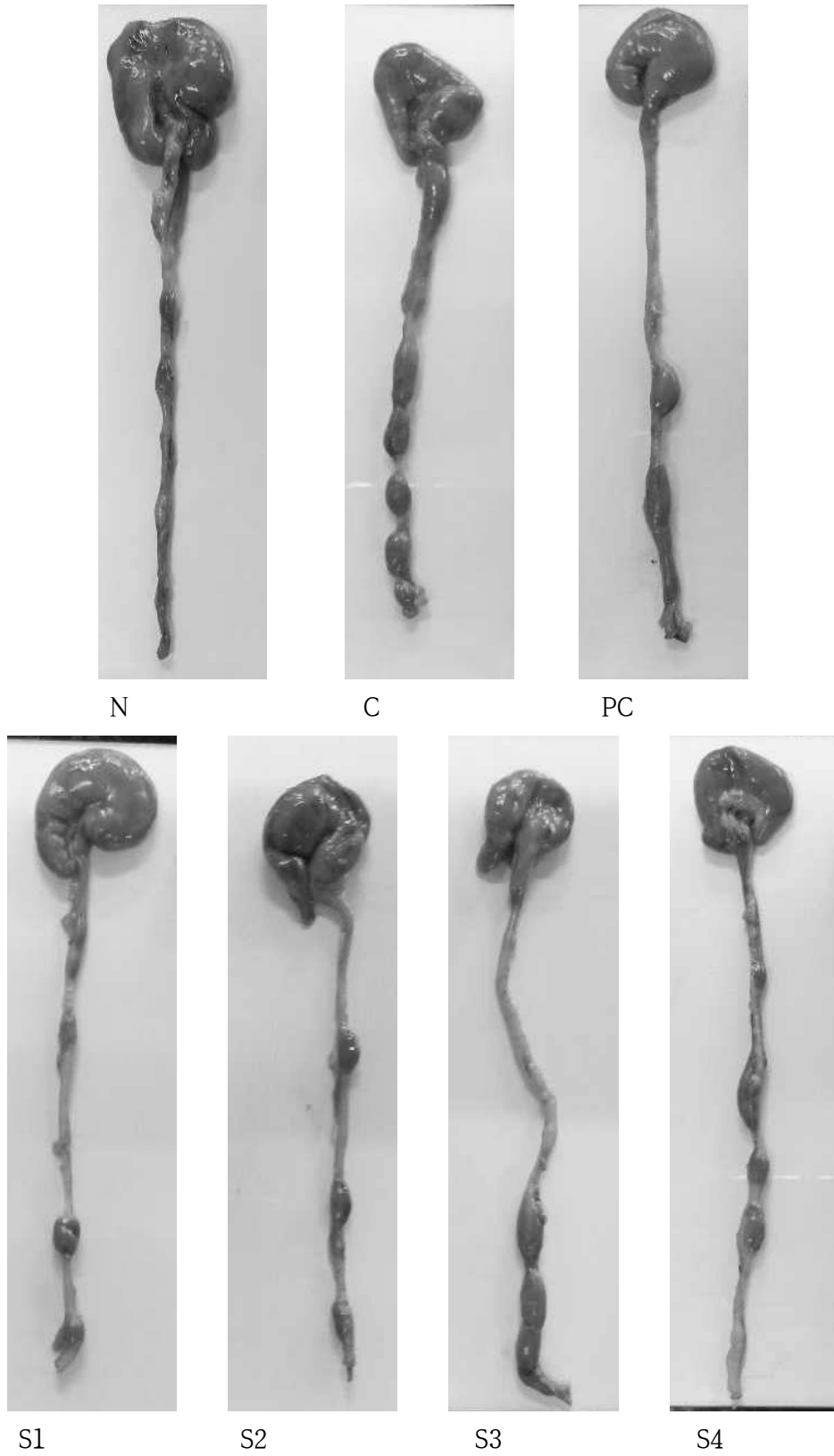


Fig. 3-6. Number of fecal pellets in th colon

## (바) 혈청 지질함량 측정

새싹브로콜리 발효물과 새싹땅콩 발효물 식이가 흰쥐의 혈중 지질 함량에 미치는 영향을 관찰하기 위해 혈액을 채취하여 실험동물의 혈청 중 중성지방과 콜레스테롤의 변화를 측정된 결과는 Table 3-11과 같다. 중성지방(TG)의 경우는 loperamide로 변비를 유도한 대조군에서 가장 높은  $59.52 \pm 17.38$  mg/dL로 나타났으며, loperamide로 변비를 유도한 새싹브로콜리와 새싹땅콩 처리 실험군(S1, S2, S3, S4) 모두에서 대조군에 비해 그 함량이 유의적으로 낮은 경향을 보였으며, 변비를 유도하지 않은 정상군에 비해서도 그 함량이 낮은 경향을 보였지만 새싹브로콜리발효음료 실험군(S3)을 제외하고는 유의한 차이를 보이지는 않았다. 그리고 총 콜레스테롤 함량의 경우 새싹브로콜리발효음료 실험군(S3)과 새싹땅콩발효음료 실험군(S4)은 변비를 유발한 대조군에 비해 유의적으로 낮은 값을 나타내었으며, S1 실험군과 S2 실험군 또한 대조군에 비해 낮은 값을 보였지만 유의적인 차이는 없었다. HDL-콜레스테롤 함량에서는 변비를 유도하지 않은 정상군에서 가장 높은 함량( $18.83 \pm 3.80$  mg/dL)을 loperamide로 변비를 유도한 대조군에서 가장 낮은  $12.90 \pm 3.91$  mg/dL의 함량을 보였다. 변비를 유도함과 동시에 새싹브로콜리와 새싹땅콩을 처리한 시험군의 경우는 정상군에 비해서는 그 함량이 낮은 경향을 보였으나, 대조군에 비해 함량이 높은 결과를 보였으며, 특히 S3 실험군이 실험군 유의적으로 가장 높은 함량을 나타내었다. LDL-콜레스테롤의 함량을 측정값은 대조군에서  $37.42 \pm 9.40$  mg/dL로 가장 높은 함량을 나타내었으며, 새싹브로콜리발효음료 실험군(S3)에서  $20.51 \pm 7.23$  mg/dL로 유의적으로 가장 낮은 함량을 보였으며, 실험군 모두가 대조군에 비해 낮은 것으로 나타났다.

## (사) 혈중 GOT, GPT 활성

Aspartic acid transaminase(AST, GOT)는 간, 심장, 근육 및 신장조직에 aspartate transaminase(ALT, GPT)는 간, 신장, 골격근 등에 존재하면서 아미노산을 합성하는 효소이며, 혈중에는 미량 존재한다. 특히 간에 많이 존재하여 간손상의 지표로 사용된다. GOT와 GPT 효소는 세포가 파괴되거나 사멸하면 혈액 속으로 분비되어 혈액 내에서도 일정량이 검출될 수 있다. 지방간이나 알코올의 섭취, 비만 등의 이유로 세포 내의 에너지 공급이 감소됨으로 인해  $K^+$ 이 세포 밖으로 유출되고,  $Na^+$ ,  $Ca^{2+}$  및 수분이 세포 내로 유입되면서 세포가 팽창되고 세포막이 늘어나 혈 중 GOT, GPT 효소는 세포질 내에서 외부로 유출 되므로 간독성으로 인해 간세포의 괴사와 조직의 파괴가 진행되면 그 함량이 증가하게 된다. 따라서 본 실험에서 간 기능관련 효소활성도를 측정된 결과는 Table 3-12와 같다. 혈청 중 GOT 변비를 유발한 활성을 측정된 결과, loperamide로 변비를 유도한 대조군이  $38.48 \pm 6.49$  Kramen/mL로 정상군에 비해 유의적으로 높았으며, 변비를 유도함과 동시에 새싹브로콜리와 새싹땅콩을 처리한 시험군의 경우는 정상군에 비해서는 그 함량이 낮게 나타났으나, 대조군에 비해서는 높은 결과를 보였으며, 특히 새싹브로콜리발효음료 실험군 S3에서는 실험군 중 유의적으로 가장 낮은 함량을 나타내었다. GPT 활성의 결과, 대조군에서  $15.64 \pm 2.28$  Kramen/mL로 가장 높았고, loperamide로 변비를 유도한 새싹브로콜리와 새싹땅콩 처리 실험군(S1, S2, S3, S4) 모두에서 대조군에 비해 그 함량이 유의적으로 낮았으며, 변비를 유도하지 않은 정상군에 비해서도 그 함량이 낮게 나타났다.

Table 3-11. Triglyceride, total cholesterol, HDL-cholesterol and LDL-cholesterol in serum of rats

(unit : mg/dL)

Groups <sup>1)</sup>	Triglyceride	Total cholesterol	HDL-cholesterol	LDL-cholesterol
Normal	50.90 ± 15.22 <sup>ba</sup>	53.71 ± 7.93 <sup>bac</sup>	18.83 ± 3.80 <sup>a</sup>	24.70 ± 11.82 <sup>bdc</sup>
Control	59.52 ± 17.38 <sup>a</sup>	62.23 ± 6.24 <sup>a</sup>	12.90 ± 3.91 <sup>b</sup>	37.42 ± 9.40 <sup>a</sup>
PC	43.55 ± 11.61 <sup>bc</sup>	45.87 ± 8.95 <sup>c</sup>	15.17 ± 2.89 <sup>ba</sup>	21.99 ± 9.49 <sup>dc</sup>
S1	45.48 ± 14.01 <sup>bc</sup>	57.29 ± 13.65 <sup>ba</sup>	15.90 ± 5.47 <sup>ba</sup>	32.29 ± 8.03 <sup>ba</sup>
S2	40.74 ± 7.85 <sup>bc</sup>	53.61 ± 8.16 <sup>bac</sup>	15.23 ± 1.60 <sup>ba</sup>	30.23 ± 7.20 <sup>bac</sup>
S3	34.94 ± 7.73 <sup>c</sup>	45.00 ± 5.67 <sup>c</sup>	17.50 ± 2.29 <sup>a</sup>	20.51 ± 7.23 <sup>d</sup>
S4	39.68 ± 11.76 <sup>bc</sup>	51.68 ± 9.44 <sup>bc</sup>	16.40 ± 4.08 <sup>ba</sup>	27.34 ± 10.13 <sup>bdc</sup>

<sup>1)</sup>Normal : normal diet group

Control : normal diet and loperamide group

PC : commercial beverages(kkeung-a) and loperamide group

S1 : fermented broccoli sprouts extract and loperamide group

S2 : fermented peanut sprouts extract and loperamide group

S3 : broccoli sprouts beverages and loperamide group

S4 : peanut sprouts beverages and loperamide group

<sup>2)</sup>Values are Mean ± S.D.(n=10)

<sup>3)</sup>Mean with the different superscripts are significantly different at p<0.05 by one-way ANOVA with Duncan's multiple range test.

Table 3-12. Serum GOT and GPT in rat

Groups <sup>1)</sup>	GOT <sup>2)</sup> activity (Kramen/mL)	GPT activity (Kramen/mL)
Normal	32.61 ± 4.17 <sup>b</sup>	12.91 ± 1.30 <sup>b</sup>
Control	38.48 ± 6.49 <sup>a</sup>	15.64 ± 2.28 <sup>a</sup>
PC	34.61 ± 3.89 <sup>ba</sup>	11.81 ± 1.64 <sup>b</sup>
S1	34.48 ± 5.15 <sup>ba</sup>	12.43 ± 2.46 <sup>b</sup>
S2	34.58 ± 3.58 <sup>ba</sup>	11.87 ± 1.65 <sup>b</sup>
S3	31.91 ± 2.77 <sup>b</sup>	9.57 ± 1.44 <sup>c</sup>
S4	32.73 ± 4.97 <sup>b</sup>	8.81 ± 1.10 <sup>c</sup>

<sup>1)</sup>Normal : normal diet group

Control : normal diet and loperamide group

PC : commercial beverages(kkeung-a) and loperamide group

S1 : fermented broccoli sprouts extract and loperamide group

S2 : fermented peanut sprouts extract and loperamide group

S3 : broccoli sprouts beverages and loperamide group

S4 : peanut sprouts beverages and loperamide group

<sup>2)</sup>Values are Mean ± S.D.(n=10)

<sup>3)</sup>Mean with the different superscripts are significantly different at p<0.05 by one-way ANOVA with Duncan's multiple range test.

## 나. 3T3-L1 지방 전구세포 분화억제 효과

### (1) 연구 수행 방법

#### (가) 새싹채소 발효물의 제조

본 연구에 사용된 새싹채소(새싹보리, 새싹브로콜리, 새싹땅콩) 추출물과 발효물은 1차년도(새싹보리)와 2차년도(새싹브로콜리와 새싹땅콩)의 전처리 조건 및 발효조건 최적화에 따라 설정된 조건으로 추출하고, 발효하였다. 각 새싹채소의 추출물과 발효물은 여과 후 동결건조한 분말을 실험시료로 사용하였다.

#### (나) 3T3-L1 세포 배양 및 분화

3T3-L1 세포는 American Type Culture Collection(ATCC, CL-173, Manassas, VA, USA)으로부터 분양받아 사용하였다. 3T3-L1 전지방세포는 실험목적에 따라 100  $\phi$ , 24-well 및 96-well plate에 각각  $1 \times 10^6$  cells/well을 seeding한 후, BS(10%) 및 P/S(1%)를 함유한 고농도 포도당 DMEM(89%)에서 100% confluence 될 때까지 배양하였다. 이로부터 2일 후에, 지방세포 분화유도 물질(10  $\mu$ g/mL insulin, 1  $\mu$ M DEX, 0.5 mM IBMX)과 FBS(10%) 및 P/S(10%)를 함유한 DMEM으로 전지방세포를 지방세포로 분화유도 하였다. 지방세포 분화(day 0)시 DMEM에 시료를 각각 400  $\mu$ g/mL로 처리하였다. 지방세포의 분화는 분화유도 물질을 처리한 후, 2일마다 지속적으로 10  $\mu$ g/mL insulin, 1% P/S, 10% FBS가 함유된 배지에 각각의 시료를 처리한 후, 8일 동안 분화시키면서 지방축적량 및 ROS의 생성량을 관찰하였다.

#### (다) 세포독성 실험(MTS assay)

본 실험에서 사용한 발효 전후의 새싹채소 시료가 지방세포에 독성을 나타내는지를 측정하기 위하여 MTS assay를 수행하였다. 3T3-L1 preadipocyte를 96 well plate에  $5 \times 10^3$  cell/well로 분주하였으며, 발효 전후 새싹채소를 농도별로 (500, 1,000  $\mu$ g/mL) 처리하여 48 시간 동안 배양하였다. 그 후에 각각 MTS 용해액을 첨가한 후 37°C에서 2시간 배양한 후 ELISA microplate reader를 이용하여 490 nm에서 흡광도를 측정하여 control에 대한 백분율로 세포독성을 평가하였다.

#### (라) Oil red O staining을 이용한 지방축적량 관찰

분화 과정에 따른 3T3-L1 세포 내 지방축적량을 측정하고자 각각의 시료를 처리하여 24-well에서 8일 동안 분화된 3T3-L1 세포의 배양액을 제거한 후, 10% formalin 용액 500  $\mu$ L를 첨가하여 5분간 실온에서 방치한 뒤 제거하였다. 그 후 동량의 formalin 용액으로 분화된 3T3-L1 세포 1시간 이상 실온에서 방치한 후, formalin을 제거하고 60% isopropyl alcohol 용액 500  $\mu$ L로 세척하여 세포를 완전히 건조시켰다. 완전히 건조된 세포들은 미리

제조해 둔 Oil red O working solution(Oil red O : DDW = 6 : 4)으로 세포 내 축적된 지방 성분들을 충분히 염색 한 후, 증류수를 이용하여 세포를 3~4회 세척하고 완전히 건조시켰다. 세포 내 축적된 지방 성분과 결합한 Oil red O는 100% isopropyl alcohol을 이용하여 모두 용출 시킨 후, microplate reader를 이용하여 490 nm에서 흡광도를 측정하였다.

#### (마) NBT assay를 이용한 ROS 함량 측정

분화 과정에 따른 지방세포의 ROS 생성량을 측정하기 위하여 먼저 24-well에 배양 및 분화된 3T3-L1 세포의 배양액을 제거한 후, 멸균된 PBS(pH 7.4)를 이용하여 2회 세척, 0.2% NBT 용액 0.2 mL를 첨가하여 CO<sub>2</sub> incubator안에서 90분간 반응시킨 뒤 DMSO와 1 N KOH 를 7:3 혼합한 용액을 이용하여 이들 dark blue formazan을 모두 용출시켜 microplate reader를 이용하여 620 nm에서 흡광도를 측정하였다.

#### (바) 통계처리

실험에서 얻어진 모든 측정치는 평균±표준편차로 나타내었고, 통계처리는 SAS version 9.2(SAS institute Inc., Cary, NC, USA)를 이용하여 분석하였다. 유의성 분석은 Duncan's multiple range test로 유의성은 p<0.05 수준에서 검증하였다.



## (2) 연구 수행 결과

### (가) 새싹보리 발효물

#### ① 세포독성평가

새싹보리 발효물의 안전성과 지방생성억제 효능이 세포 독성에 의한 것인지를 확인하기 위하여 3T3-L1 전구지방세포에 분화를 유도하는 인슐린과 함께 새싹보리 발효물을 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 와 1,000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  농도로 처리한 결과(Fig. 3-7), 새싹보리 발효물을 처리한 군에서는 대조군과 비교하여 세포 생존율이 유의성 있는 변화를 보이지 않아 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 와 1,000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도에서 세포 독성이 나타나지 않는 것으로 나타났다. 반면, 발효전 새싹보리를 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 와 1,000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도로 처리하였을 때는  $67.77 \pm 4.14\%$ 와  $62.69 \pm 7.66\%$ 로 세포생존율이 유의적으로 감소하였다.

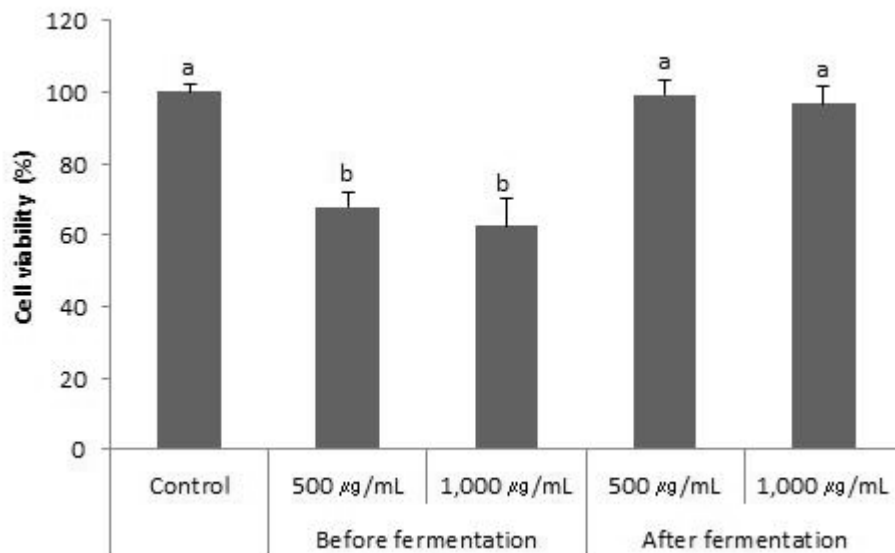
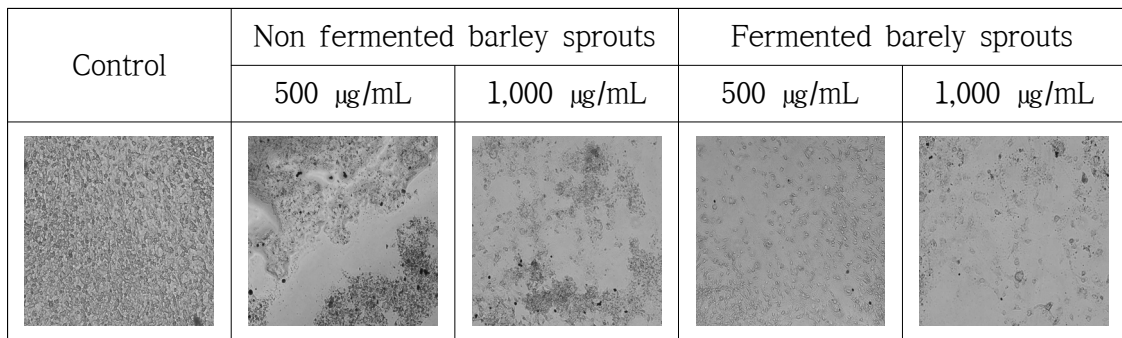


Fig. 3-7. Effects of non fermented barley sprouts and fermented barley sprouts on cell viability from 3T3-L1 adipocytes. Each values are the means $\pm$ SD of samples. Bars with different letters indicate statistically significant differences among groups at  $p < 0.05$  by one-way ANOVA.

## ② 3T3-L1 전구지방세포의 lipid droplet 생성에 미치는 새싹보리 발효물의 영향

Lipid droplet은 phospholipid monolayer에 의하여 둘러싸인 중성지방으로 구성된 비활성 소낭으로서 precursor fibroblast에서부터 지방세포로의 분화과정에서 나타나는 것으로 알려져 있다. 3T3-L1 전구지방세포가 지방세포로의 분화과정에 나타나는 lipid droplet 생성에 새싹보리 발효물이 어떠한 영향을 미치는지를 확인하기 위해 Oil-red O염색법을 통해 3T3-L1 지방세포 내 축적된 지방의 양을 측정하였다. Oil-red O 염색시약은 세포 내 지질과 결합하며, 염색된 세포의 붉은 색이 강할수록 세포 내 중성지질 축적이 많이 이루어졌음을 의미한다. 위상차 현미경을 통해 염색된 지방세포의 수를 이미지로 확인한 결과(Fig. 3-8), lipid droplet의 형성이 새싹보리 발효물 처리에 의해 억제되는 것을 확인하였다. 또한, 지방 축적량을 통계 처리한 결과 대조군보다 발효후 새싹보리 500 µg/mL와 1,000 µg/mL의 농도로 처리한 군에서 각각 61.90%와 56.06%로, 발효전 새싹보리의 경우는 62.70%와 59.95%의 유의적인 지방축적률의 감소가 나타났고, 발효전 새싹보리와 발효후 새싹보리의 농도별 처리는 지방축적률이 유의적인 차이가 없는 것으로 나타났다. 이 결과를 통해 새싹보리 발효물의 처리가 3T3-L1 전구지방세포에서 지방축적 억제 효과를 가지는 것으로 확인되었다. 과도한 지방구는 비만을 유도할 뿐만 아니라 대사성 질환 유발에 관련성이 크기 때문에, 지방구 형성의 억제는 비만을 치료하고 억제하는 것이 중요하다.

(A)



(B)

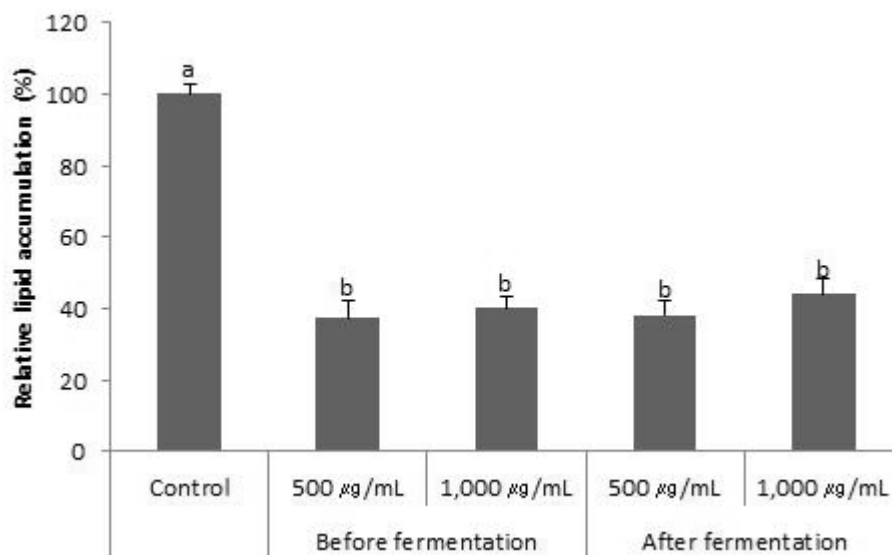


Fig. 3-8. Effects of non fermented barley sprouts and fermented barley sprouts on relative lipid accumulation from 3T3-L1 adipocytes. Each values are the means $\pm$ SD of samples. (A) Morphology of Oil-red O stained adipocytes. Magnification, 100 $\times$ . (B) OD values of extracted Oil-red O dye (n=5). Bars with different letters indicate statistically significant differences among groups at  $p < 0.05$  by one-way ANOVA.

### ③ 3T3-L1 분화 과정 중 새싹보리 발효물에 의한 ROS 생성 억제 효과

NBT assay는 NBT용액이 지방세포 내 축적된 ROS와 반응하여 dark blue formazan을 생성하게 되며, 이를 용출하여 세포 내 ROS의 생성량을 알 수 있는 실험방법이다. 3T3-L1 전구지방세포에 분화유도 물질을 처리하여 세포 분화 동안 생성된 ROS를 측정하기 위하여 NBT assay를 측정한 결과는 Fig. 3-9와 같다. 새싹보리 발효물을 처리하지 않은 대조군에 비하여 새싹보리 발효물을 500 및 1,000  $\mu\text{g/mL}$  처리한 군에서 ROS 생성량이 각각 28.47%와 42.35%로 유의적으로 감소하는 것으로 나타났으며, 발효전 새싹보리의 경우도 대조군에 비해 각각 9.88%와 30.12% 감소한 결과를 보여, 발효전 새싹보리보다 발효한 새싹보리에서 ROS 생성량이 더 감소하는 것으로 나타났다. 위의 결과를 통하여 새싹보리 발효물은 ROS 생성을 억제하여 비만에 효과를 갖는 원료임을 알 수 있었다.

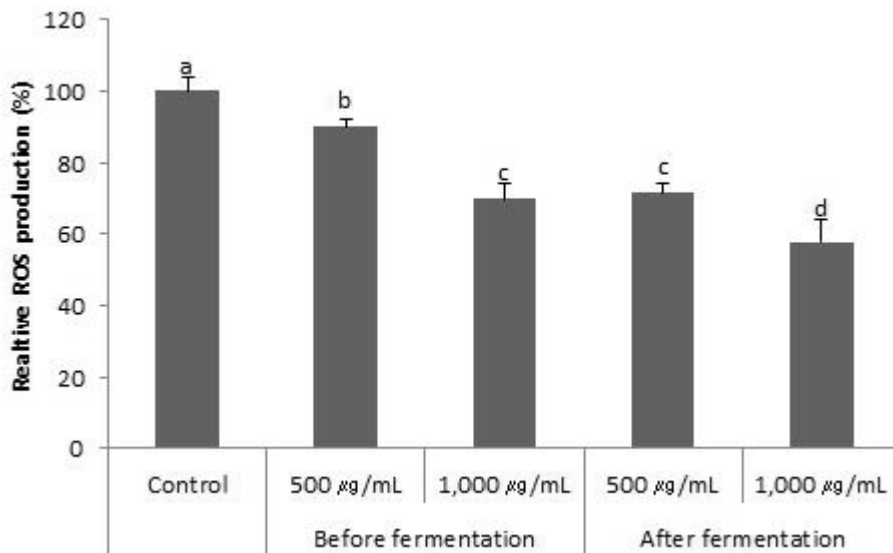


Fig. 3-9. Effects of non fermented barley sprouts and fermented barley sprouts on relative ROS production from 3T3-L1 adipocytes. Each values are the means $\pm$ SD of samples. Bars with different letters indicate statistically significant differences among groups at  $p < 0.05$  by one-way ANOVA.

## (나) 새싹브로콜리

### ① 세포독성평가

새싹브로콜리 발효물의 지방 생성 억제능을 평가하기 위해 새싹브로콜리 발효물이 3T3-L1 전구지방세포의 세포 생존율에 미치는 영향을 WTS assay를 이용하여 분석하였다. 그 결과, Fig. 3-10과 같이 500 µg/mL와 1,000 µg/mL의 농도로 처리한 새싹브로콜리 발효물은 세포독성을 유발하지 않는 것으로 나타났다. 그러나 발효전 새싹브로콜리를 500 µg/mL와 1,000 µg/mL의 농도로 처리하였을 때는 대조군에 비해  $83.84 \pm 3.54\%$ 와  $90.55 \pm 9.10\%$ 로 세포생존율이 유의적으로 감소하였다.

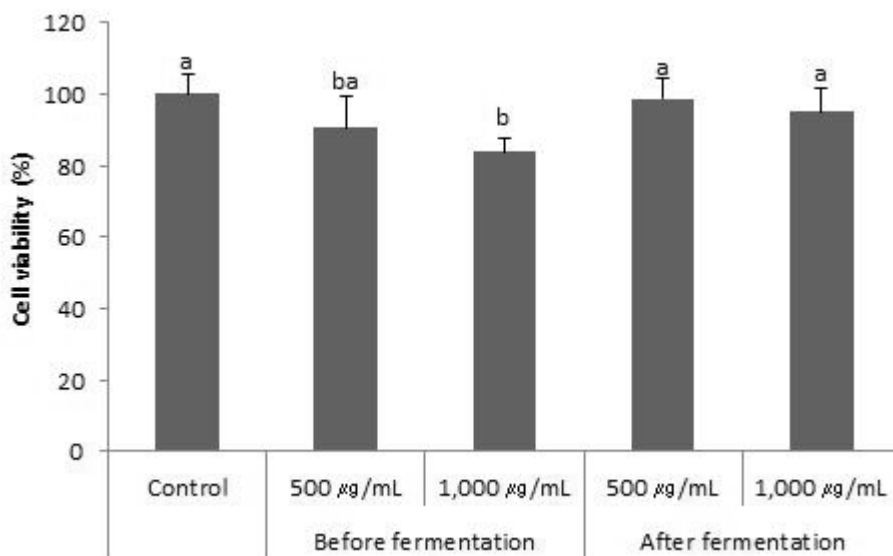


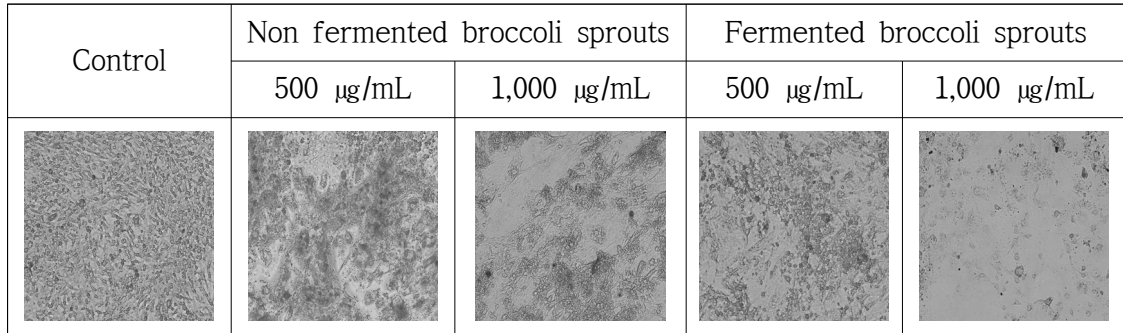
Fig. 3-10. Effects of non fermented broccoli sprouts and fermented broccoli sprouts on cell viability from 3T3-L1 adipocytes. Each values are the means $\pm$ SD of samples. Bars with different letters indicate statistically significant differences among groups at  $p < 0.05$  by one-way ANOVA.

### ② 3T3-L1 분화과정 중 새싹브로콜리 발효물에 의한 지방축적 억제 효과

3T3-L1 세포 분화 억제 효과를 확인하기 위하여 중성지방만을 붉은색으로 염색하는 Oil red O 염색법을 통해 3T3-L1 전구지방세포 내 생성된 중성지방의 양을 측정된 결과는 Fig. 3-11(A)와 같다. 농도별 새싹브로콜리 발효물을 처리하여 위상차 현미경을 통해 염색된 지방세포의 수를 이미지로 확인한 결과, lipid droplet의 형성이 발효전 새싹브로콜리와 발효 후 새싹브로콜리 모두에서 억제되는 것을 확인할 수 있었다. 새싹브로콜리를 처리하지 않은 대조군에 비하여 발효전 새싹브로콜리와 발효 후 새싹브로콜리를 500 µg/mL와 1,000 µg/mL 처리한 군에서 지방축적량은 각각 57.32%, 51.95%, 59.04%, 53.89%으로 유의적인 감소

치를 나타내었으나, 시험군 간에는 유의적인 차이가 나타나지 않았다(Fig. 3-11(B)). 따라서 새싹브로콜리 발효물이 3T3-L1 전구지방세포에서 지방축적 억제 효과를 가지는 것이 확인되었다.

(A)



(B)

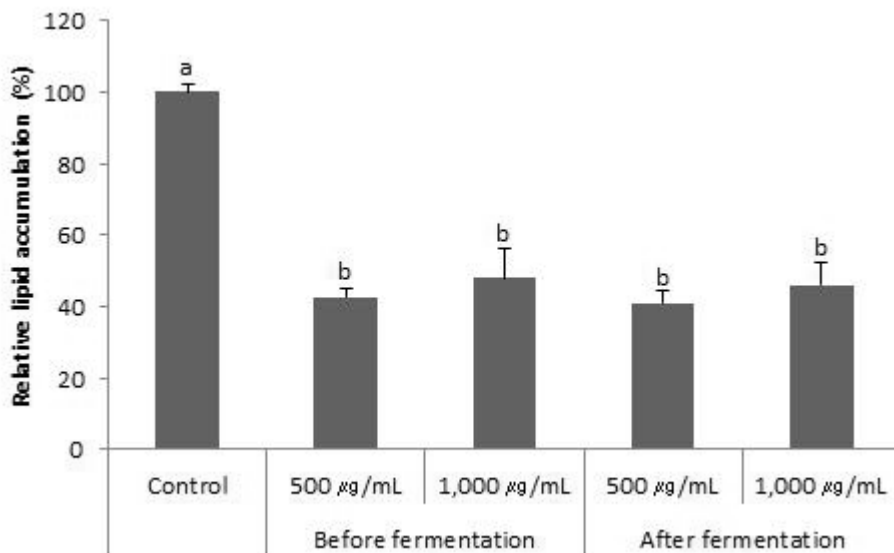


Fig. 3-11. Effects of non fermented broccoli sprouts and fermented broccoli sprouts on relative lipid accumulation from 3T3-L1 adipocytes. Each values are the means $\pm$ SD of samples. (A) Morphology of Oil-red O stained adipocytes. Magnification, 100 $\times$ . (B) OD values of extracted Oil-red O dye (n=5). Bars with different letters indicate statistically significant differences among groups at  $p < 0.05$  by one-way ANOVA.

### ③ 3T3-L1 분화 과정 중 새싹브로콜리 발효물에 의한 ROS 생성 억제 효과

3T3-L1 전구지방세포에 분화유도 물질을 처리하여 세포 분화 동안 생성된 ROS를 측정하기 위하여 NBT assay를 측정한 결과는 Fig. 3-12와 같다. 새싹브로콜리를 처리하지 않은 대조군에 비하여 발효후 새싹브로콜리를 500 및 1,000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  처리한 군에서 ROS 생성량이 각각 21.88%와 24.94%로 유의적으로 감소하는 것으로 나타났으며, 발효전 새싹브로콜리의 경우도 대조군에 비해 각각 13.18%와 22.35% 감소하였으며, 발효전 새싹브로콜리보다 발효 후 새싹브로콜리에서 ROS 생성량이 더 감소하였으나, 발효전 새싹브로콜리 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$  처리한 군을 제외하고는 유의적인 차이는 거의 없는 것으로 나타났다. 이 결과를 통해 새싹브로콜리 발효물이 3T3-L1 지방세포에서 지방축적 억제 효과를 가지는 것이 확인되었다.

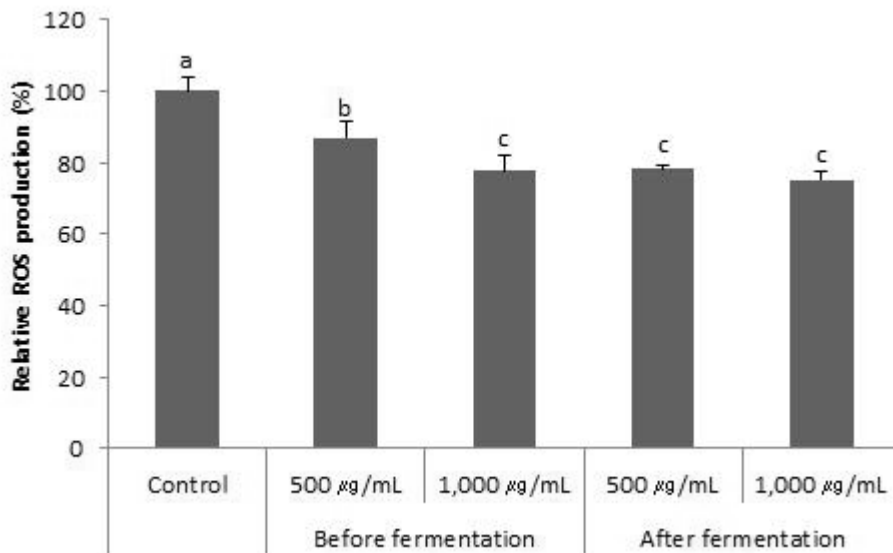


Fig. 3-12. Effects of non fermented broccoli sprouts and fermented broccoli sprouts on relative ROS production from 3T3-L1 adipocytes. Each values are the means $\pm$ SD of samples. Bars with different letters indicate statistically significant differences among groups at  $p < 0.05$  by one-way ANOVA.

## (다) 새싹땅콩

### ① 세포독성평가

3T3-L1 전구지방세포에 대한 새싹땅콩 발효물의 세포독성은 Fig. 3-13과 같다. 3T3-L1 지방전구세포에 분화를 유도하는 인슐린과 함께 발효전 새싹땅콩과 발효후 새싹땅콩을 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 와 1,000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  농도로 처리한 결과, 발효후 새싹땅콩을 처리한 군에서는 대조군과 비교하여 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 와 1,000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도 처리군에서 세포 생존율이 유의성 있는 변화를 보이지 않아 세포독성을 나타내지 않는 것으로 나타났다. 반면, 발효전 새싹땅콩을 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 와 1,000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도로 처리하였을 때는  $61.66 \pm 5.69\%$ 와  $43.45 \pm 2.66\%$ 로 세포생존율이 유의적으로 감소하였다.

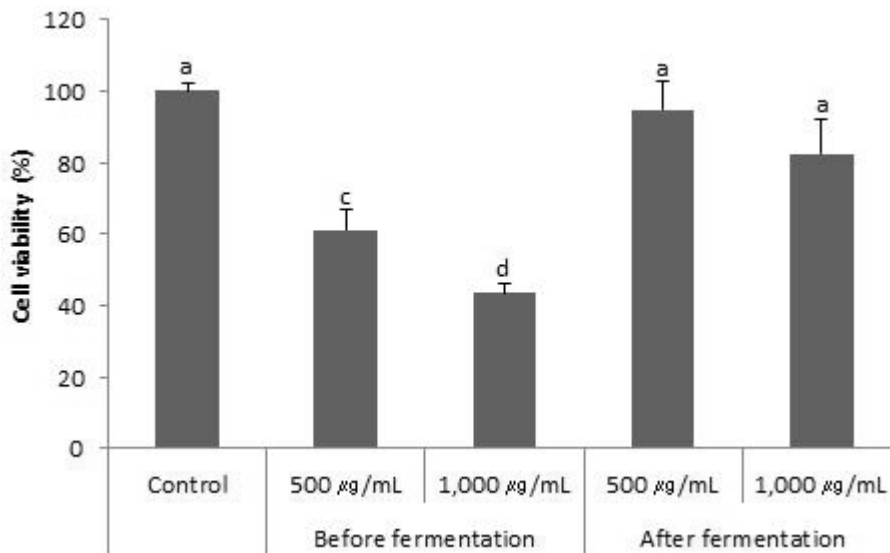


Fig. 3-13. Effects of non fermented peanut sprouts and fermented broccoli sprouts on cell viability from 3T3-L1 adipocytes. Each values are the means $\pm$ SD of samples. Bars with different letters indicate statistically significant differences among groups at  $p < 0.05$  by one-way ANOVA.

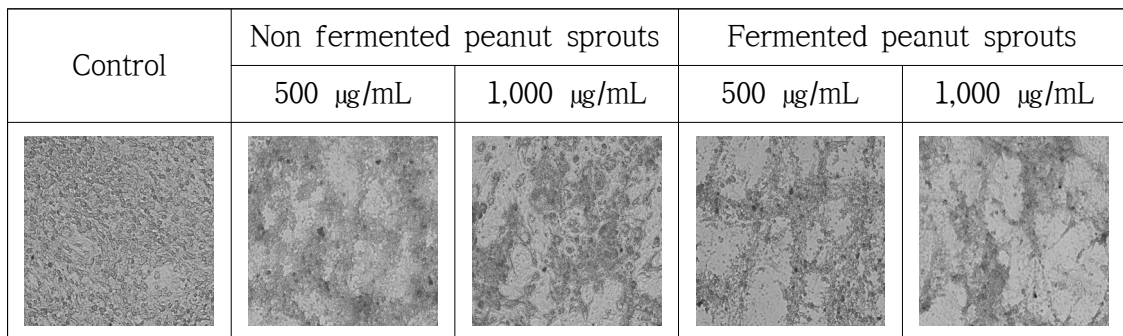
### ② 3T3-L1 분화과정 중 새싹땅콩 발효물에 의한 지방축적 억제 효과

3T3-L1 세포 분화 억제 효과를 확인하기 위하여 중성지방만을 붉은 색으로 염색하는 Oil red O 염색법을 통해 3T3-L1 전구지방세포 내 생성된 중성지방의 양을 측정한 결과는 Fig. 3-14와 같다. Fig. 3-14(A)는 농도별 새싹땅콩 발효물을 처리하여 위상차 현미경을 통해 염색된 지방구를 관찰한 것으로 대조군을 제외한 모든 군에서 지방구의 크기가 감소하



였다. 또한 지방 축적량을 통계 처리한 결과(Fig. 3-14(B)), 대조군보다 발효한 새싹땅콩을 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 와 1,000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 의 농도로 처리한 군에서 각각 59.50%와 55.61%로, 발효전 새싹땅콩의 경우는 53.55%와 51.49%의 유의적인 지방축적률의 감소를 나타내었으나. 농도별로 발효전 새싹땅콩과 발효한 새싹땅콩에 있어서 지방축적률은 유의적인 차이가 없는 것으로 나타났다. 이 결과를 통해 새싹땅콩 발효물이 3T3-L1 전구지방세포에서 지방축적을 유의적으로 감소시키고 지방 생성 억제효과를 가진다는 사실을 알 수 있었다.

(A)



(B)

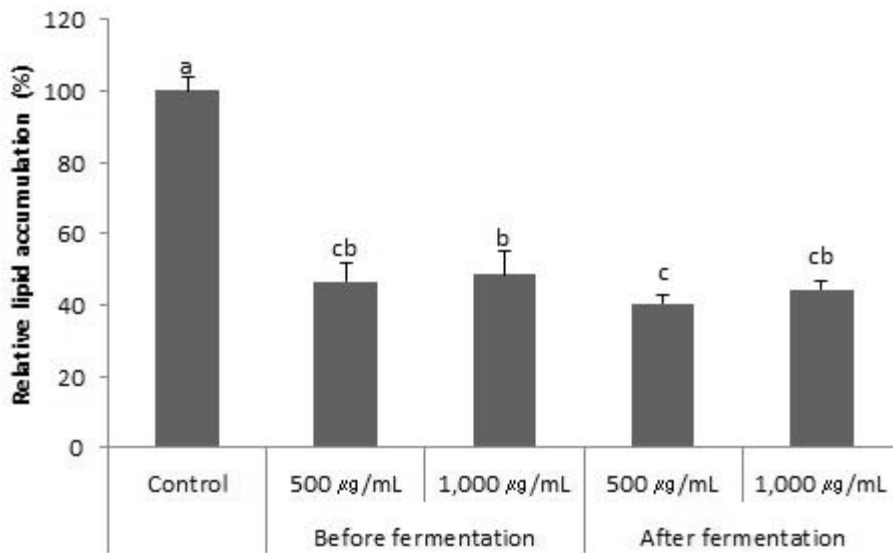


Fig. 3-14. Effects of non fermented peanut sprouts and fermented broccoli sprouts on relative lipid accumulation from 3T3-L1 adipocytes. Each values are the means $\pm$ SD of samples. (A) Morphology of Oil-red O strained adipocytes. Magnification, 100 $\times$ . (B) OD values of extracted Oil-red O dye (n=5). Bars with different letters indicate statistically significant differences among groups at  $p < 0.05$  by one-way ANOVA.

### ③ 3T3-L1 분화 과정 중 새싹땅콩 발효물에 의한 ROS 생성 억제 효과

3T3-L1 전구지방세포에 분화유도 물질을 처리하여 지방세포로 분화를 시킨 뒤 생성된 ROS를 측정하기 위하여 NBT assay를 이용하여 측정한 결과는 Fig. 3-15와 같다. 새싹땅콩을 처리하지 않은 대조군에 비하여 발효한 새싹땅콩을 500 및 1,000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  처리한 군에서 ROS 생성량이 각각 35.06%와 42.82% 정도 유의적으로 감소하는 것으로 나타났으며, 발효전 새싹땅콩의 경우 또한 대조군에 비해 각각 25.41%와 36.47% 유의적으로 감소하였으며, 발효전 새싹브로콜리보다 발효한 새싹브로콜리에서 ROS 생성량이 더 감소하였으나 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$  처리군을 제외하고는 유의적인 차이는 거의 없는 것으로 나타났다. 이 결과를 통해 새싹땅콩 발효물이 3T3-L1 지방세포에서 지방축적 억제 효과를 가지는 것이 확인되었다.

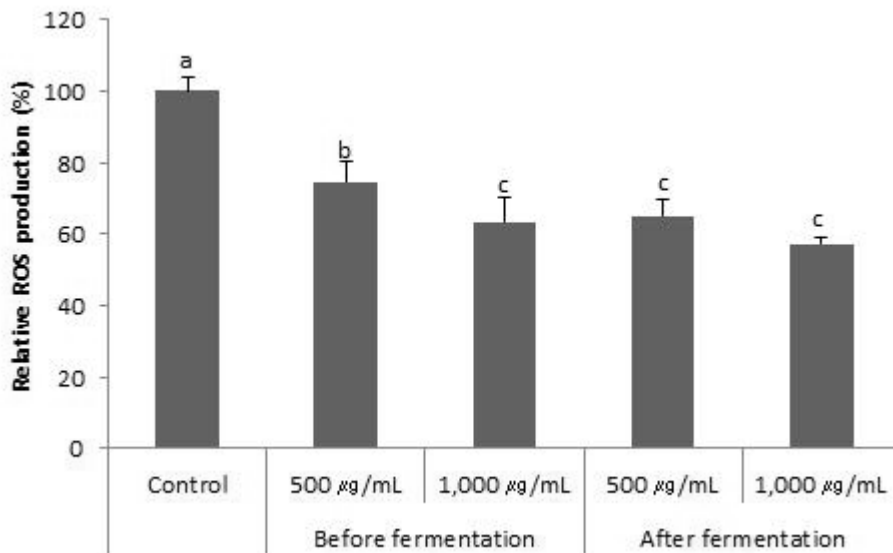


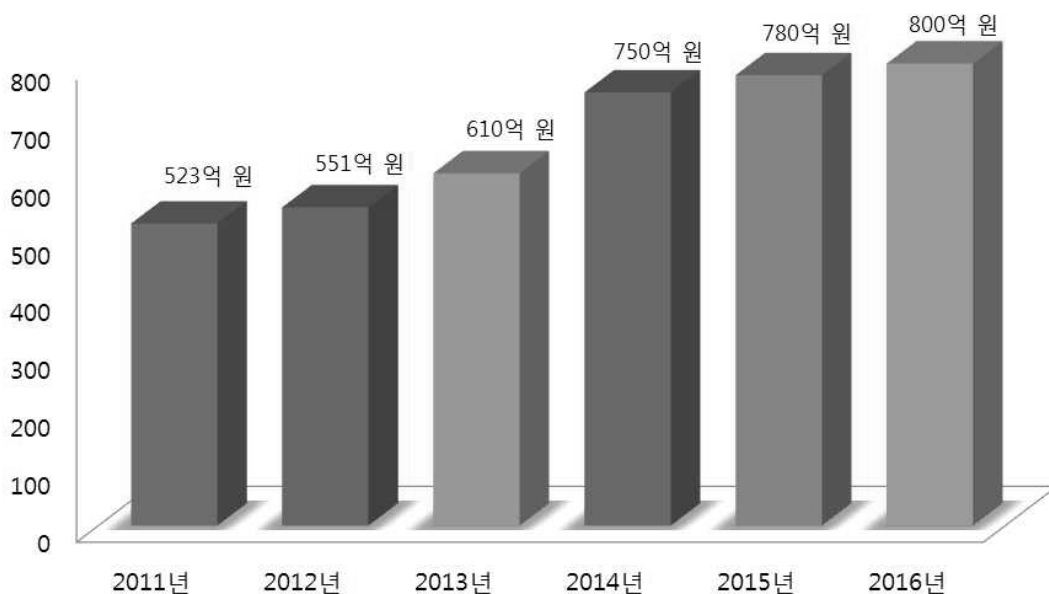
Fig. 3-15. Effects of non fermented broccoli sprouts and fermented broccoli sprouts on relative ROS production from 3T3-L1 adipocytes. Each values are the means $\pm$ SD of samples. Bars with different letters indicate statistically significant differences among groups at  $p < 0.05$  by one-way ANOVA.

## 제 5절. 주관기관 연구 수행 결과

### 1. 국내외 어린이 음료시장 환경 분석

#### 가. 어린이 음료 시장현황

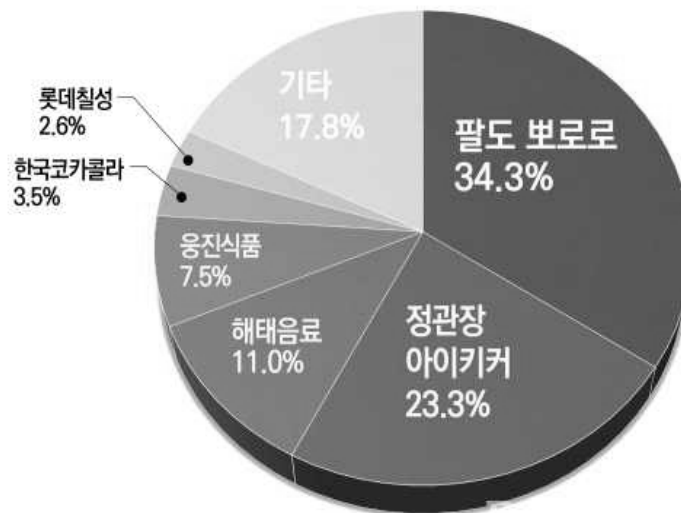
- (1) 기능성 식품시장의 꾸준한 성장이 지속되며, 2016년 기준 국내 건강기능식품 시장규모는 1조 4천억원의 거대시장을 형성하고 있으며, 평균 28.2 %씩 성장하고 있음. 또한, 연평균 10%이상의 성장잠재력을 가지고 있음
- (2) 2016년 건강 트렌드 1위는 면역력 증진으로, 특히 아이들 건강과 성장 관리가 최대 관심사( '16 한국건강기능식품협회)
  - (가) 국내 어린이 음료시장은 2011년 523억원에서 2015년 780억원, 2016년 800억원으로 5년 만에 60% 가까이 빠르게 성장하고 있으며 향후 4~5년 내 1,000억원 규모로 성장할 것으로 전망됨
  - (나) 어린이 음료 시장은 현재 과즙음료와 홍삼음료가 주를 이루고 있으며 매년 시장 규모가 20% 이상 성장하고 있음
  - (다) 어린이 음료 시장의 성장 원인은 저출산, 맞벌이 증가로 구매에 대한 자녀의 영향력이 커졌으며 건강에 대한 관심증대로 어른이 먹는 음료와 차별화 된 음료를 먹이고자 하는 부모의 구매율 증가와 유치원, 학원 등 단체 활동의 증가로 인한 어린이 음료에 대한 수요 증가와 등으로 분석 됨
  - (라) 어린이 음료 시장의 성장과 함께 식음료 업계에서는 건강과 맛을 생각한 다양한 기능성 제품들과 어린이들이 좋아하는 캐릭터를 사용한 제품들을 출시하고 있음



[그림] 국내 어린이 음료시장 규모

(3) 어린이 음료시장 업체별 점유율

(가) 어린이 음료 시장에서 업체별 점유율은 팔도(34.3%), 정관장(23.3%), 해태음료(11.0%), 웅진식품(7.5%)의 순으로 나타남



[그림] 어린이 음료시장 업체별 점유율(출처: 링크아즈텍)

(4) 어린이 음료시장 소비 트렌드

(가) 자녀의 건강에 대한 부모의 관심과 투자의 증가: 자녀의 면역력 강화와 발육에 대한 부모의 관심이 증대되었으며 이는 어린이 홍삼음료 시장의 성장에 영향을 미침. 어린이 홍삼음료 시장은 2014년 기준 1,500억원 규모로 성장했음

(나) 어린이를 대상으로 하는 건강기능 식품 시장의 성장: 2016년 기준 건강기능식품 주요 소비자층으로 중년여성(20.4%)의 뒤를 이어 어린이(13%)가 선정됨(2016년 한국건강기능식품 협회 시장전망 보고서). 이는 건강기능식품의 구매 평균연령대가 점점 낮아지고 있음을 의미함

(다) 어린이의 입맛과 부모들의 간간한 기준을 모두 만족시킬 수 있는 제품의 소비: 어린이를 대상으로 하는 음료의 경우 제품구매자와 사용자가 구분되어있음. 따라서 음료를 구매하는 부모의 기준(성분, 자녀의 건강에 도움이 되는 제품 등)과 어린이들의 기호(맛, 아이들의 눈높이에 맞는 캐릭터 사용 등)를 모두 충족시켜 줄 수 있는 제품을 소비함

(라) 천연원료를 활용한 무첨가 제품의 선호: 부모들이 자녀의 건강을 위해 탄산음료의 구매는 기피하고 합성감미료를 첨가하지 않고 천연원료를 활용한 무첨가 제품을 구매함

(마) 기존의 어린이 음료관련 기업들은 단순히 제품 종류를 늘리는 차원이 아니라 기존의 자사 제품, 이미지와 다른 유형의 상품을 통해 새로운 어린이 음료 시장을 개척하고 있음

(바) 과거 어린이 대상 음료가 화려한 색깔과 당분으로 어린이들의 이목을 집중시켰다면, 최근에는 어린이들의 발육에 유익하다고 알려진 각종 영양성분이 들어있는 기능성제품이 개발되어 판매량이 증가하는 추세

## 나. 경쟁기관현황

- 어린이 음료 시장점유율은 팔도 뽀로로 음료, 정관장 아이키커, 한국코카콜라 쿠우, 이롭 앵그리버드, 한국야쿠르트 하루야채, 웅진식품 코코몽 순으로 나타남
- 현재 어린이 음료는 크게 과.채주스, 과.채음료, 유산균 음료, 혼합음료, 건강기능식품 등의 형태로 다양한 제품이 출시되고 있음
- 어린이 음료는 과.채주스, 과.채음료, 유산균음료, 혼합음료의 네 가지로 구분 할 수 있음 (식품의약품안전처 어린이 기호식품 유형 기준)

### (1) 팔도

(가) 팔도는 어린이음료 시장에서 총 120억원의 매출을 올리며, 점유율 34.3%로 시장 1위를 지키고 있음.

(나) ‘뽀로로’ 4종(밀크/딸기/사과/블루베리)이 어린이 혼합음료로 식품의약품안전처에서 인증하는 어린이 기호식품 품질인증을 획득, 또한 지난 뽀로로 샘물, 뽀로로 스포츠를 출시 하며 라인업을 강화함

### (2) 정관장

(가) KGC인삼공사의 ‘정관장 아이키커’ 가 23.3%의 점유율로 어린이음료 시장에서 2위 자리를 지키고 있음

### (3) 기타기관

(가) ‘뽀로로 홍삼썩썩’ (팔도), ‘발삼 키플러스 코코몽’ (웅진식품), ‘착한 홍삼 키즈엔’ (농협), ‘홍삼 키즈 튼튼’ (이롭) 등이 지속적으로 출시되고 있음

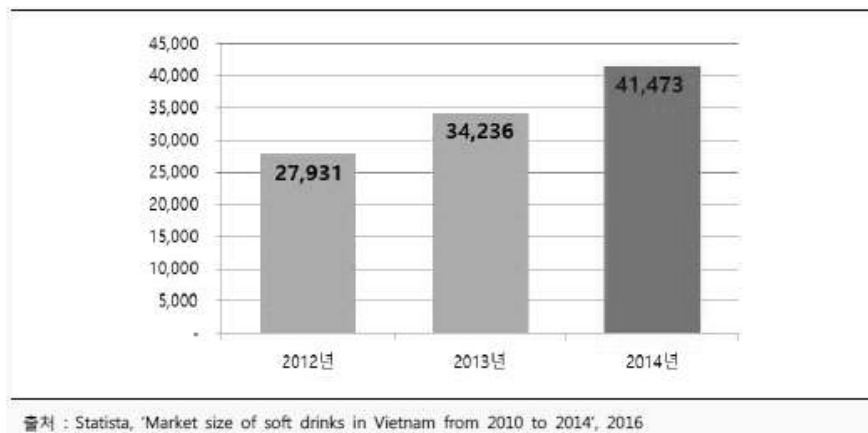
(나) ‘식물성 유산균 제품으로는 (주)웰빙엘에스에서 유산균 핸드제품 (다른 과즙이나 우유/두유에 타서 마시는 제품)을 생산하여 판매하고 있음. 경쟁제품으로 볼 수 있으나 음료제품은 출시하지 않고 있음. 당사는 창업이후 식물성 유산균 과즙음료를 개발하여 1개 품목에 대하여 상용화하고 있음.

## 다. 베트남 음료 시장 현황

### (1) 베트남 음료시장 규모

- (가) 2012년부터 2014년까지 베트남의 소프트 음료 시장은 꾸준한 성장세를 보임. 2012년부터 2014년까지 순차적으로 27조 9,310억 동(1,000동= 50.10원), 34조 2,360억 동, 41조 4,730억 동의 시장 규모가 확인되었으며, 3개년 연평균은 21.85% 성장률을 기록함
- (나) 베트남 식품 및 음료 시장의 연간 성장률이 7~8%로 집계되어 발전가능성이 높은 시장으로 떠오름. 베트남인들의 지출에 있어 음식이 차지하는 비중이 매우 큼.

(단위 : 십억 동)



[그림] 베트남 음료 시장 규모

- (가) 어린이 음료의 주요 소비층인 0~9세 인구 비중의 경우, 베트남 전체 인구의 16%인 약 1,512만 5,004명으로 집계됨. 한국의 0~9세의 총 인구수가 460만 1,688명임을 감안하면, 베트남의 동 연령층의 규모가 3.29배 더 큰 것으로 나타남

### (2) 베트남 음료시장 소비 트렌드

- (가) 베트남 어린이 음료, 바이어 선호 스펙: 보편적으로 전 연령층이 음용할 수 있는 음료를 수입하며, 원산지, 브랜드, 테트라 팩에 담긴 포장 용기를 선호함
- (나) 과거 베트남인들은 설탕을 많이 먹으면 머리가 좋아진다고 생각하여 설탕 섭취에 대한 거부 반응이 적었다고 함. 그러나 최근 당뇨병 등 성인병 환자가 증가하면서 설탕이 건강에 해롭다는 인식이 증가하고 있음
- (다) '건강'이 트렌드로 부상하면서 저당, 탄산을 무첨가한 음료가 각광 받고 있음
- (라) 베트남 사람들이 좋아하는 한국 상품으로는 건강 및 웰빙을 마케팅 키워드로 한 홍삼, 김, 미역 제품이 있음

### (3) 베트남 시장 내 경쟁기관 현황

- (가) 베트남 시장에서는 Vina milk와 FrieslandCampina가 베트남 내에서 어린이에게 인기가 높은 것으로 나타남
- (나) 한국기업의 경우 팔도사의 뽀로로 제품이 현지 매장에 가장 많이 진열된 것으로 나타났으며 조아제약의 스마트 디노와 룡디노는 2016년 7월 베트남 어린이 음료 시장에 진출한 것으로 나타남

## 2. 소비자 선호도 및 제품 컨셉 설문조사

**Intuitive Perception and Understanding for New Paradigm Shift.**

Integrated Marketing Decision Making Service.  
 Innovated Research and Development.  
 Pioneer in Developing and Applying Korean Model.  
 Accurate and Efficient Operating System.  
 Optimum Systematic Service applied by IT Technology.

**『부천산업진흥재단』 소비자반응조사 결과보고서  
 기업명(대표자명)/아이템명 : (주)프래쉬벨유아 및 어린이 음료 '곰곰이네'**

**INSIGHT**  
 RESEARCH & CONSULTING

**조사 배경 및 목적**

부천산업진흥재단 주관 소비자반응조사 프로그램 지원 아이템에 대해 Target 고객을 대상으로 아이템에 대한 수용도를 조사하여, 마케팅 전략 및 사업 모델을 보완할 수 있도록 방향성 수립하고 상품력 강화를 위한 기초자료 제공을 목적으로 기획됨

아이템에 대한 현 수요 파악 및 개선필요점

- 대상 고객의 전반적인 반응
- 상품 특성별 수용도 파악
- 상품력 강화요소를 개선 및 보완할 과제

01. 조사실계를 위한 사전주요조사  
 02. 조사진행 및 자료처리  
 03. 결과보고서 작성 및 제안  
 04. 엔터칭 지원

창업 아이템 수용도 파악을 통한 시장가능성 및 경쟁력 진단

INSIGHT -2- Copyright © 2016 Insight Korea

**조사 프로세스**

Step 1. 기획 및 준비 → Step 2. 조사진행 → Step 3. 데이터 처리 및 분석 → Step 4. 결과보고서 제공 / FEED-BACK

기업 안내를 발송  
 소비자반응조사 실시 관련 안내메일 발송

조사 Setting  
 조사기업과 기업 Needs 고려 조사 진행

회수 및 데이터 코팅  
 회수된 설문지 용인 데이터 취급 및 코팅

결과보고서 작성/제공  
 용기내용 기업 정보 / 영상 결과보고서 작성

공통 지표구성  
 지표 산출의 정량분석과 질적응답 제안을 위한 질적 분석 포함 구성

데이터 분석  
 기업별 FEED-BACK

기업 Data 기반 분석  
 창업기업별 결과보고서 작성 분석 및 사용지원

수요파악  
 기업 Needs 파악 및 맞춤형 조사설계

INSIGHT -3- Copyright © 2016 Insight Korea

**조사 내용**

정량지표: 제품/서비스 수용도 진단  
 정성지표: 제품/서비스에 대한 소비자 의견

제품/서비스 평가 (7점 척도)

수용도	호감도	가능성	개선 필요성
편의성	편의성	다자인	다자인
전문성	전문성	경제성	경제성
신뢰성	신뢰성	안전성	안전성
신뢰성	신뢰성	신뢰성	신뢰성

개선 필요 의견

- 기능 보완요소
- 편의성 보완요소
- 다자인 보완요소
- 전문성 보완요소

INSIGHT -4- Copyright © 2016 Insight Korea

## 조사 설계



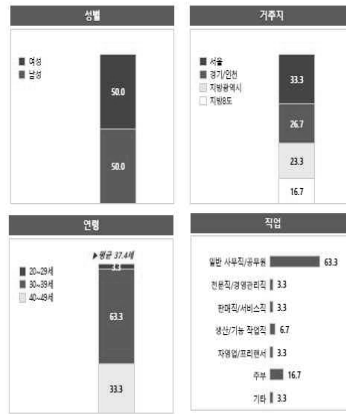
INSIGHT

- 5 -

Copyright © 2018 Insight Korea

## 응답자 특성

[Base: 전체 응답자 (n=50), Unit: %]



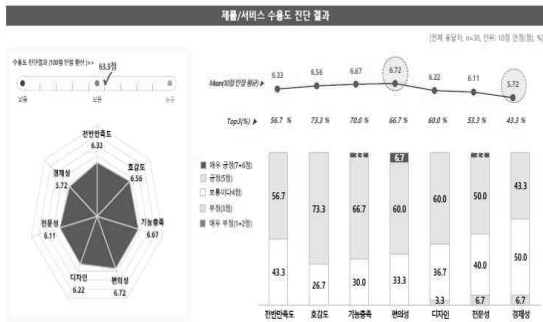
INSIGHT

- 6 -

Copyright © 2018 Insight Korea

## 전반 수용도 진단 결과

- 전체 응답자 중 56.7%가 본 제품에 대해 전반적으로 만족한 것으로 나타남 (만족 응답율: 7점 만점, 5~6+7점 응답자)
- 전반 수용도를 살펴보기 위한 저점 속성 중 편의성 측면에서 타 업체 대비 높은 수용도를 보임
- 다만, 강적성 측면에서 상대적으로 낮은 수용도를 보인 것으로 나타나 이에 본 결과보고서에서는 잠재고객이 느끼는 개선 필요도 진단 결과를 통해 가격 저감점 확보를 위한 소비자 접근 전략을 제시하고자 함



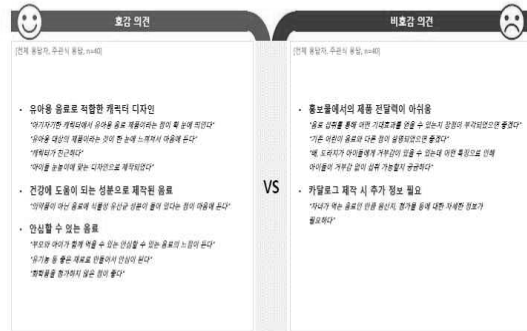
INSIGHT

- 8 -

Copyright © 2018 Insight Korea

## 전반 수용도 진단 결과 (VOC - Voice Of Customer)

- 이가지엄 계획과 스티어링 식의 실용성 유익함 음미하는 점을 한 눈에 확인한다는 점이 주된 호감 요인으로 언급됨
- 또한, 유아용 승차로 제작된 안방 자락과 부조와 함께 안심하고 운용할 수 있다는 측면에서 긍정적인 반응을 보임
- 반면, 저점 실용성 상에서 음료 섭취를 통해 얻을 수 있는 기대효과와, 도라지와 같은 원료의 음료를 어떤 특징으로 인해 거부감 없이 섭취할 수 있는지 추가적인 설명이 보완되길 희망한다는 의견이 다수 언급됨



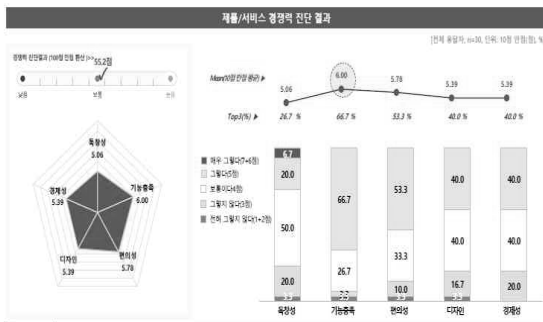
INSIGHT

- 9 -

Copyright © 2018 Insight Korea

## 제품/서비스 경쟁력 진단 결과

- 기본 유자 제품 대비 독점성 측면에서 중도적 반응이 높게 나타나 인지, 연상되는 있는 유자 제품이 다수 있는 것으로 해석됨
- 인지, 연상되고 있는 제품 대비 기능성 측면에서의 경쟁력에 대한 수용도가 높게 나타남



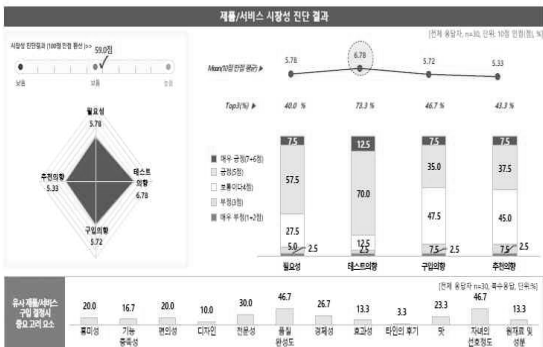
INSIGHT

- 10 -

Copyright © 2018 Insight Korea

## 제품/서비스 시장성 진단 결과

- 전체 응답자(n=30) 7세 이하의 자녀를 부모 중 73.3%가 해당 제품에 대한 태스트의향을 보여 높은 시장 잠재력을 보임으로 해석됨
- 다만, 제품 실용성 본 후 실제 구입의향을 보인 응답자는 46.7% 중도적인 반응 응답자 47.5%로 나타나 실제 구입으로 유인하기 위한 접근 전략이 강화되어야 할 것으로 사해됨
- 기본 유자 제품 구입 결정 시 중요요인(Key Buying Factor)은 품질원소도, 자녀의 선호도(46.7%) > 편의성(30.0%)으로 나타나 해당 요소는 소비자 구매 유인을 위한 기본중요요인(Basic Factor)로 고려할 필요가 있음



INSIGHT

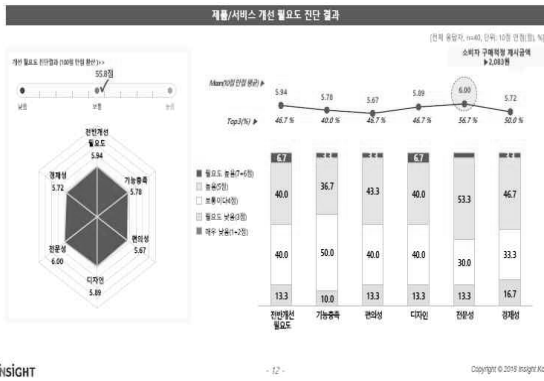
- 11 -

Copyright © 2018 Insight Korea



## 제품/서비스 속성별 개선 필요도 진단 결과

- 전체 응답자 중 46.7%가 본 제품의 전반 개선 필요도가 필요하다는 응답을 보임
- 제품 속성별로 살펴본 결과, 전문성(6.00점) > 디자인(5.89점) > 기능성(5.78점) 순의 개선 필요도가 높으며, 향후 제품 정교화에 있어서 보다 전문성을 갖춘 제품의 시장 디자인 측면에서의 고도화를 우선순위로 고려할 것을 권장함
- 응답자들이 제시한 소비자 구매목적 제시금액은 1개 기준 평균 2,083원으로 응답됨



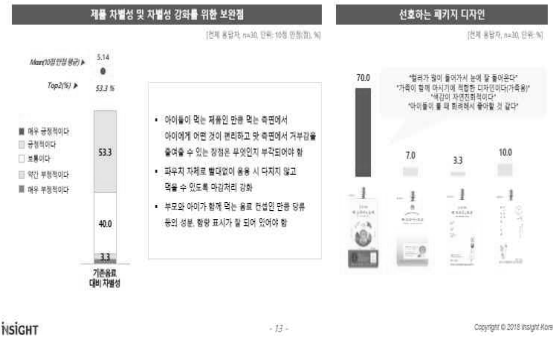
INSIGHT

- 12 -

Copyright © 2018 insight Korea

## 제품/서비스 차별성 및 선호 디자인

- 전체 응답자 중 53.3%가 부모와 아이가 함께 먹는 건강 음료수 컨셉에 대해 차별성을 느낀 것으로 조사됨
- 기존 음료 대비 가격, 음료로서 차별성을 강화하기 위해 아이들이 먹는 음료로서 첫 측면에서 거부감을 줄여줄 수 있는 본 제품만의 장점이 부각되었으면 좋겠다는 의견이 제시됨
- 선호하는 패키지 디자인은 (1)번 시안으로, 자연친화적 색상 표현으로 가격이 함께 마시기에 적합해 보인다는 의견도 보임



INSIGHT

- 13 -

Copyright © 2018 insight Korea

## [종합수용도] 요약 및 결론

- 부모와 아이가 함께 먹는 건강 음료수 '유공이네'에 대한 수용도, 경쟁력, 차별성 진단에 대한 종합 수용도 결과는 다음과 같음



INSIGHT

- 15 -

Copyright © 2018 insight Korea

## [개선점 도출] 제품/서비스 속성별 개선사항

제품/서비스 속성별 개선 필요도	상호적 강화를 위한 방향
<ul style="list-style-type: none"> <li>[제품/서비스 속성별 개선 필요 우선순위]</li> <li>전반성 &gt; 디자인 &gt; 기능성</li> <li>향후 제품 정교화에 있어서 보다 어린이 음료로서의 필요 정보들 반영한 홍보물과 제품 디자인 측면에서의 고도화를 우선순위로 고려할 것을 권장</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>본 제품은 아이와 함께 먹는 건강 음료로서 차별화된 시의 실용성으로 유아를 유혹하는 힘이 한 단계 높아진다는 점에서 최강력 고객 (7세 이하) 자제를 둔 부모에게 수용을 보임</li> <li>반면, 일반인의 상용 식품을 보다는 어린이 음료로서의 기능성 발휘하기 위해, 도라지 성분과 거부감 없이 맛있게 하기 위해 어떤 방식을 사용 했는지 등 해당 제품군으로서의 필요 정보에 대해 보다 전문적으로 보강할 것으로 권장함</li> <li>또한, 과유지 자체로 유용 시 있으나, 순물 디자인이 있도록 디자인된 것</li> <li>디자인의 경우 시안(1)에 대한 선호도가 높게 나타났으며, 자연친화적 색상 표현을 하는 색상과 함께, 디자인 전체에 대한 호응도가 높으므로 향후 제품 과유지 디자인 시 해당 내용을 기초자료로 활용될 것을 권장</li> </ul>
<b>속성별 보완요소</b>	
<b>기능적 측면</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>도라지에 대해 거부감 없이 활용할 수 있는 비프러미탈 양의 확정이 투과되지 않을 것</li> <li>유용성을 높여 얻을 수 있는 기대효과 제시</li> </ul>	
<b>편의성 보완요소</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>소용량, 구매 채널의 다양화</li> <li>자녀가 쉽게 개봉할 수 있는, 과유지, 과유지 마킹에 의해 일과 용이 디자인 필요로 디자인력</li> </ul>	
<b>디자인 보완요소</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>공공이 채택된 정교화</li> <li>브랜딩 효과 정교화</li> </ul>	
<b>가격정책</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>소비자 최우선 가격대 낮게 1개 및 2,083원</li> </ul>	

INSIGHT

- 16 -

Copyright © 2018 insight Korea

### 3. 제품 가격 설정 및 제품 컨셉

#### 가. 제품 가격 설정

##### (1) 원가 구성내역

- 가) 원재료비
- 나) 부재료비(포장재)
- 다) 생산비(OEM 가공비)
- 라) 인건비
- 마) 전력비, 수도비, 감가상각비
- 바) 관관비
- 사) 택배비

2018년 10월 31일		원가계산서								출처: 세관	
제품명		제품1팩 포장단위		1일 생산량(CAPA)		생산수율					
공공(세척보리쌀음료)		100ml		한팩당 1팩 기준		120,000팩		97%			
구분	원재료비	유동비	생산비	인건비	관관비	수도비	감가상각비	전력비	택배비	제조원가	
비	105.00										
도안기	2.30										
수세기	1.10										
당곡분쇄기	0.30										
세척보리쌀분쇄기	30.00										
정유수	0.00										
계	138.70	20,800,022.00	25,200,000.00	1,770.57	67.35	4.61	9.95	479.04	2,900.00	46,005,393.10	
1팩	138.70	179.33	210.00							529.03	
10팩	1,387.00	1,793.34	2,100.00	1,770.57	67.35	4.61	9.95	479.04	2,900.00	10,492.66	
30팩	4,161.00	5,379.01	6,300.00	1,770.57	67.35	4.61	9.95	479.04	2,900.00	30,493.33	

#### 나. 판매처 및 예상 매출

- (1) 지마켓, 카카오, 마켓컬리 특가구성(수수료 10%이하)
- (2) 소셜몰 특가구성(수수료 10%이하)
- (3) 자사몰 세트구성
- (4) 국내예상매출(MAX): 12백만원(日) X 22 = 264백만원 / 일 평균 400~500set 판매 (1set/30포)
- (5) 해외예상매출: 42백만원(20FT DRY CONTAINER) / 60,000팩
- (6) 중국 / 베트남 / 러시아 외 수출상담 및 계약 진행 中

- 예상 매출액

단위: 백만원

	2019년	2020년	2021년
국내	1,820	2,150	2,400
	판매가: 1,500원 月매출: 264백만원 / 하루평균 400~500건 판매		
국외	200	400	600
	수출확정 및 예상국가 : 중국, 베트남, 러시아 외		
합계	2,020	2,550	3,000

- 상세 예상매출액

단위: 백만원

	2019년	2020년	2021년	2022년	2023년
오프라인	120	150	200	250	300
	1. 롯데마트/롯데슈퍼/빅마트 2. 현대백화점 3. 신세계백화점 4. 고메이494 ※ 메인 오프라인시장에 입점을 통해 온라인에서 입지강화. ※ 수출 상담 시에도 상당한 플러스 요인으로 작용 함.				
온라인	1,700	2,000	2,200	2,500	3,000
	1. 지마켓, 카카오,마켓컬리 2. 소셜 외 3. 자체몰 ※ 일 평균 200건 / 1달 22일 발송기준				
수출	200	400	600	800	1,000
	1. 중국, 베트남, 인도네시아 외 ※ 20pt(60,000팩) / 예상수출가: 750원				
합계	2,020	2,550	3,000	3,550	4,300

다. 판매가격 설정

- (1) 1차 메인 오프라인 시장 경쟁음료 가격조사
- (2) 평균가격에서 15% 높여서 리테일 가격 설정(1,500원)

라. 제품 컨셉 설정



## 4. 제품 판매를 위한 유통망 확보

### 가. 국내

진행사항 및 성과

# LOTTE Mart

자사제품 홍보

롯데마트가 선보인  
특수 디자인 수채화 오묘  
+  
자랑의 맛과  
달콤한 시대

롯데마트  
프리미엄  
품질 확정  
100% 표시

롯데마트 온라인  
롯데마트 주점  
롯데마트 오프라인

▶▶ 프레쉬벨 직코드 부여

진행사항 및 성과

## 현대그린푸드 OEM 계약체결

10종  
제품 라인업 구축

현대백화점  
현대TV홈쇼핑  
현대이산영점  
현대그림계명서

2019년 1월  
현대백화점 전점 런칭

2019년 1월  
현대백화점  
신제품 3종 런칭 중

진행사항 및 성과

## 신세계백화점 (대구점, 의정부점)

▶▶ 프레쉬벨 매장 확보

진행사항 및 성과

## COSTCO WHOLESALE (대구혁신도시점)

▶▶ 제품 홍보

국내판매 전략

지사 온라인업 구축  
www.1stfoodbest.com  
www.1stfoodbest.co.kr

대형마트  
편의점 / 슈퍼마켓 / 홈플러스

미국 식품  
어린이전문병원  
도매 업체와 협업

도매업체 납품  
이마트 / 홈플러스 / 롯데마트 / 신세계

유통채널별 세분화된 마케팅 전략 수립

편의점 브랜드키재  
세분화된 유통채널 마케팅 전략

유치원  
어린이집  
키즈카페


유아박물관  
참가

온라인입점  
편의점 / 대형마트 / 슈퍼마켓 / 홈플러스 / 이마트 / 신세계 / 롯데마트 / 신세계


## 나. 해외

성과 - 해외수출

**홍콩**



2018.08  
HK푸드페어 참가  
Busy bee社 미팅



2018.09  
Busy bee社 한국방문  
> 수출 조율 중

성과 - 해외수출

**러시아**



2018.05.28  
블라디보스톡 수출상담



2018.05.30  
Stimul社 방문



2018.11.08  
수출거래 합의서 체결(USD2,000,000)

진행사항 및 성과

**베트남**



주프레쉬벨 & MET FOODS 구매약식  
PURCHASE AGREEMENT  
CEREMONY  
Daegu, Vietnam, November 19th, 2017

>> 베트남 수출 확정

**수출 거래 합의서**

한국 ㈜프레쉬벨과 러시아 Stimul LLC는 상호이해 및 신의성실의 원칙에 의거하여 대한민국 화장품관련 거래 합의서를 아래와 같이 체결한다.

1. 수출품목 : 음료 등
2. 수출금액 : USD2,000,000
3. 기타사항 : 수출 거래와 관련된 기타 자세한 사항은 별도로 상세히 작성한다.

본 합의서는 한국어와 영어로 작성하여 서명 후 각각 1부씩 보관한다.

2018. 11. 8.

FRESHBELL CO.,LTD.  
*[Signature]*
Stimul LLC  
*[Signature]*

해외 사절단 참가 및 수출 진행 국

중국	베트남	대만
2018.05.23-27 2017.11.18-20	2017.11.16-18 2017.09.01-02	2018.05.18-19
		
		
		

아시아하이웨이 마케팅  
지원 선정 1억(베트남/싱가폴)



- 글로벌 경쟁력 제고
- 거래처 다변화
- 국내시장 모회로 인한 매출 정체
- 해외 진출 목적으로 시장진출 기반 확보
- 해외 진출 및 시장내용을 기반으로 해당국 언어로 자영업 제작
- 외국어 홈페이지, 모바일 앱, 동영상 제작으로 바이어 유치 확대 및 프랜차이즈 인지도 상승
- 현지 경영사, 제품 등 분석을 통한 경쟁력 확보

## 5. 다양한 어린이 입맛 취향 관련 제품 출시

### 가. 새싹보리 발효물을 활용한 어린이 음료개발

#### 제품화-시제품



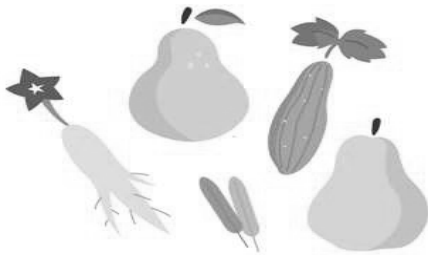
#### 시제품 성분 검사

제 17-2-04195 호		발급번호 : 제 R20171229-023 호	
시험성적서			
검 체 명	총합품료		
제 품 유 형	유방성분유사		
외관인 주수 및 설명	(주)은래위발	대 표 자	김근화, 임준봉
	경상북도 경산시 진량읍 대구대로 201, 12038호(장보동신동)		
접 수 년 월 일	2017년 12월 19일	검사완료일	2017년 12월 28일
시 청 의뢰 목적	참고용		
귀하가 사용 의뢰한 결과 및 단점은 의뢰된 시험항목에 한하며 다음과 같습니다.			
결과 :			
시 청 항 목	규 격 기 준	결 과	
지방	-	96.234g/100mL	
단백질	-	16.404g/100mL	
탄수화물	-	13.596g/100mL	
당류	-	9.481g/100mL	
지방산	-	0.078g/100mL	
단백질지방	-	불검출	
포화지방	-	0.019g/100mL	
총지방산	-	불검출	
당백질	-	0.287g/100mL	
<p>식품위생검사기준지침기준 제4호의 2 규정에 의하여 위와같이 검사성적서를 발급합니다.</p> <p>2017년 12월 29일</p> <p><b>계명대학교 전통미생물자원개발 및 산업화연구센터장</b></p> <p>대구지방식품약물관련전문시험실 시험실서기관서기관 제112호 대구지방식품약물관련전문시험실 시험실서기관서기관 제13호</p> <p>이 검사결과는 제출된 견본에 한하며, 위법목적 이외의 상업적인 광고 및 법적인 해결수단으로 사용할 수 없습니다.</p>			

나. 새싹보리 발효물을 활용한 리뉴얼 어린이 음료 2종 개발



식물성 유산균 + 천연재료



새싹보리유산발효  
배 도라지 수세미 모과



식물성유산균  
양배추 사과



(1) 새싹보리 발효물이 함유된 곰곰이네 주스 I

(가) 레시피

	원재료	배합비 (%)
1	배착즙액	79.97
2	도라지 · 수세미 혼합추출액	10
3	Vit. C	0.03
4	모과농축액	5
5	새싹보리 발효액	5
6	합 계	100



(나) 음료의 이화학적 특성

pH	당도	산도	일반세균	대장균군
4.24	13.9	0.23	불검출	불검출

(2) 새싹보리 발효물이 함유된 곰곰이네 주스 II

(가) 레시피

	원재료	배합비 (%)
1	사과 70 : 양배추 30 착즙유산발효액	50
2	새싹보리 유산발효액	5
3	폴리덱스트로스	1
4	프락토올리고당	3
5	배 농축액	3
6	모과 농축액	2
7	당근 농축액	1
8	정제수	35
9	Total	100



(나) 음료의 이화학적 특성

pH	당도	산도	일반세균	대장균군
3.80	12.7	0.26	불검출	불검출



## (2) 새싹땅콩 유산발효음료



프레쉬벨

### 새싹땅콩 유산발효음료



프레쉬벨

### 새싹땅콩 유산발효음료

<b>제품명</b> 새싹땅콩 유산발효음료	<b>보관방법</b> 직사광선을 피해 실온에 보관하고 개봉 후에는 양분 손실과 고장 위험이 있으므로 개봉 후 24시간 이내에 섭취하십시오.
<b>식품유형</b> 유산발효음료	<b>유통기한</b> (주)프레쉬벨 / 경북 경주시 진동면 두리길 101-101 02.03.26
<b>내용량</b> 100ml	<b>제조원</b> (주)프레쉬벨 / 경북 경주시 진동면 두리길 101-101 02.03.26
<b>외장 포장재</b> PET(내면 무장)	<b>주요 성분</b> 콩(생콩) 100%, 유산균(유산균, 락토바실러스, 비피도박테리움, 스트렙토코커스, 유산균 복합체) 2%, 구연산, 천연 C, 향소제(신맛제)
<b>원재료명 및 함량</b> 새싹땅콩 3%, (생콩) 3%, (생콩) 20%, 유산균 복합체 2%, 구연산, 천연 C, 향소제(신맛제)	<b>영양정보</b> 총 내용량 100ml : 41kcal 니트릴 30mg 1%   탄수화물 10g 3%   당류 7g 7%   지방 0g 0% 트립토판 0g   포화지방 0g 0%   콜레스테롤 0mg 0%   단백질 0g 0% 1일 섭취량 기준에 대한 에너지 2,000kcal 기준에 대한 영양소 함량에 대한 수치입니다.
<b>품질보증번호</b> 2019066449026	<b>유통기한</b> 별도 표기일까지

41kcal  
100ml

02-2000-0000



새싹땅콩 함유액 50% (새싹땅콩 추출액 90%, 바나나 농축액 10%)





### 제일분석센터

http://www.cheillab.com

☎ 08389 서울시 구로구 디지털로 272번지 한신(TH)빌딩 913호 전화)02-862-8666 팩스)02-869-4610

영수담당자 : 박한울

RQHR-KQFT-YHQT-SLZLF

### 검사 성적서

<b>의뢰인</b>	성명 / 상호 (주)프레쉬벨	사업자등록번호 130-87-07926	
	주소 경북 경주시 진동면 대구대로 201.1111호	전화번호 070-8670-9249	
<b>시료명</b>	새싹땅콩유산발효음료		
<b>접수년월일</b>	2019. 12. 21	<b>검사완료일</b>	2019. 12. 26
<b>접수번호</b>	19-12-FD0682	<b>검사목적</b>	참고용

검사 결과			
검사항목	검사기준	결과	비고
지방(g/100g)	-	0.889	
당류(g/100g)	-	6.56	
콜레스테롤(mg/100g)	-	0	
열량(kcal)	-	41.27	
탄수화물(g/100g)	-	9.88	
트립토판(g/100g)	-	0.0	
포화지방(g/100g)	-	0.00	
당백분율(g/100g)	-	0.24	
나트륨(mg/100g)	-	25.28	

시험책임자: 오재환      시험항: 김유진, 박영호, 신원섭, 오혜진, 이아람

주) 상기 검사결과는 의뢰인이 당사에 제공한 시료에 대한 분석결과입니다.

2019년 12월 30일

제일분석센터 대표이사 이은미



발급번호 : 2019-084-1-043-084A-094H

### 식품(식품첨가물) 품목제조보고서

<b>보고인</b>	생명(법인명) 생년월일(법인번호) 법인명 1988년 08월 19일 주소 진화번호 07986709249 영수번호 010 31526956	영수번호 084시 094호 0941(094호)094호 대구광역시북구 1111호 영수번호 010 31526956
<b>영입소</b>	영입번호 20190564480 소주자 경상북도 경산시 신항읍 대구대로 201(경북테크노파크 대구대우화센터 1111호)	
<b>제품정보</b>	식품의 유형 유산발효음료 제품명 새싹땅콩유산발효음료 유통기한 제조일로부터 12개월 용량(단위) 100ml, 100ml X 10ea, 100ml X 30ea 포장방법 및 포장단위 100mL, 100mL X 10ea, 100mL X 30ea 포장재의 특성 양상	
<b>기타</b>	식품의 특성 ■ 고열량 식품 여부 [ ]에 [ ] O H O [ ] O H O ■ 알칼리성 식품 여부 [ ]에 [ ] O H O ■ 영·유아용 식품(대상연령 표시) 여부 [ ]에 [ ] O H O	

\* 식품위생법 제87조제5항 및 같은 법 시행규칙 제45조제1항에 따라 식품(식품첨가물) 품목제조 시험을 보고합니다. 2019년 12월 30일

경상북도 경산시장 귀하

품목보고번호	20190564480-26
제출 부서	보건소 식품위생과
처리자명	윤남진
처리일자	2020년 01월 03일

본 증명서는 컴퓨터로 발급되었으며 서명(한정명도함) http://www.foodsafetykorea.go.kr/ 홈페이지에서 확인할 수 있습니다.

\* 본 검사결과는 의뢰인의 의뢰 및 제공한 시료에 대한 분석결과입니다.

### (3) 곰곰 새싹한 사과·양배추



**제일분석센터**  
http://www.cheillab.com

주소: 08389 서울시 구로구 디지털로 272번지 한신타워 913호 전화: 02-862-8666 팩스: 02-868-4610 접수담당: 이윤기

검사 성적서

의뢰인	성명 / 상호	(주)프레쉬벨	사업자등록번호	130-87-07926
	주소	경북 경산시 진량읍 대구대로 201,111호	전화번호	070-8670-9249
시료명	곰곰이주스			
접수년월일	2019. 11. 12	검사완료일	2019. 11. 18	
접수번호	19-11-FD0179	검사목적	참고용	

검사 결과

검사항목	검사기준	결과	비고
지방(g/100g)	-	0.00	
당류(g/100g)	-	9.44	
총아세트산(mg/100g)	-	0	
열량(kcal)	-	55.52	
탄수화물(g/100g)	-	13.51	
트랜스지방(g/100g)	-	0.0	
포화지방(g/100g)	-	0.00	
단백질(g/100g)	-	0.37	
나트륨(mg/100g)	-	5.60	

시험용량: 100ml  
시료명: 곰곰이주스  
시험원: 김유진, 박영호, 신다음, 신원갑, 이아람

주) 상기 검사 결과는 의뢰인이 당사에 제공한 시료에 대한 분석결과입니다.

2019년 11월 18일

제일분석센터 대표이사 이은미



\*본 검사 결과는 의뢰자가 이외에 영고 및 소송 등 타 목적으로 사용하실 수 없으며, 그에 따른 책임은 당사자는 부담할 수 없습니다.

발급번호: 12JF-06ML-U28A-ESVA-08J4

식품(식품첨가물) 품목제조보고서

영양(법인명)	최년월일(법인번호)
김근희	1988년 08월 16일
주소	전화번호
경상북도 경산시 진량읍 대구대로 201(경북테크노파크 대구대학캠퍼스 1111호)	07086709249
	유대번호
	010 31526658
영양(상호)	영양등록번호
농업용 사료(주)프레쉬벨	20190564480
소재지	경상북도 경산시 진량읍 대구대로 201(경북테크노파크 대구대학캠퍼스 1111호)
식품의 유형	유산균음료
제품명	곰곰 새싹한 사과양배추
유통기한	제조일로부터 24개월
용량유지기간	
중요기능	맛장애 기재
용도 용법	맛장애 기재
보관방법 및 주의사항	맛장애 기재
용량명칭 및 포장단위	100mL, 100mL X 10ea, 100mL X 30ea
형상	연말재의 고유해 색채를 지니며, 이미 이허가 없어야 함
품질의 특성	
■ 고열량·저지방 식품 해당 여부	[ ]예 [ ]아니오 [O]확인 없음
■ 알러지 유발 식품 해당 여부	[ ]예 [O]아니오
■ 유전자 변형(대량으로 표시 판매하는 식품 해당 여부)	[ ]예 [O]아니오

기타

\*식품위생법 제37조제5항 및 같은 법 시행규칙 제45조제1항에 따라 식품(식품첨가물) 품목제조 보고서를 보고합니다.

2019년 11월 27일 보고인 김근희

경상북도 검사시정 주하

품목보고번호	20190564480-14
처리부서	보건소 식품의약과
처리과장명	김남진
처리일자	2019년 11월 27일

본 증명서는 인터넷으로 발급되었으며 식품안전정보포털(http://www.foodsafe.go.kr/) 홈페이지에서 확인할 수 있습니다.

(4) 곰곰 새싹한 브로콜리와 감귤·당근



(5) 곰곰 새싹한 땅콩과 하루견과



## 6. 패키지 디자인 개발

### 가. 새싹발효음료 브랜딩 개발

**Company Overview**  
About Freshbell

**기업현황**  
About Freshbell  
건강에 좋은 아미, 단백질을 포함한 유아 ~ 성인 식품용 제조기업  
아이들이 많이 좋아하는 음료는 브랜드를 아이를 생각해 맛으로 개발, 맛과 영양을  
고루 갖춘 유아 식품으로 제품 개발, 중국, 베트남, 싱가포르 등 해외 수출국 확대

**개발배경**  
Project Background  
시장환경: 유통시장, 매년 9%이상 성장, 유제품 2만억 원, 500억 원의 52조 원  
주요제품: 유아, 어린이, 성인 건강음료, 과채음료, 수유용 제비집 음료 등  
기업니즈: 프리미엄, 주스트로피아 등 제품보편으로 주로 소구하여 기업 브랜드 비동일성을  
기대효과: 기업 브랜드 체계를 견고히 하여, 기업 브랜드 경쟁력 확보

**브랜드 개발**  
Brand Development

- 타겟: 유아부터 성인까지 다양한 연령층
- 브랜드: 건강한 자연주의
- 이미지: 건강, 자연, 자연의 맛

차별화: 유아, 어린이, 성인 기능분서 및 이질 테스트를 통해 맛과 영양을 검증  
유아와 아이 모두 만족하는 브랜드 이미지 기대

**브랜드 개발 방향**  
Branding Direction

- 프레스벨의 하위 브랜드들을 포함할 수 있는 브랜드
- 기업의 철학과 제품(제조)을 대표하는 이미지의 브랜드
- 프레스벨의 의미와 브랜드네임을 잘 표현하는 브랜드
- 메인 패키지 포맷 개발

**Company Overview**  
About Freshbell

검증된 기술력을 가진 기업

차근차근 탄탄하게 자리를 잡아가는 기업

원칙과 철학을 지키는 기업

소비자에게 품질을 인정받은 기업

[ 과제를 중심으로 특화된 상품개발을 통해, 차별화된 천연과채음료를 제조하는 기업 ]

**Project Overview**  
Project Background

브랜드의 본질을 담은 가치

기업 현황 분석

경쟁사 분석

브랜드가 지니는 에센스 도출

브랜드 현황 및 확장 가능성 여부를 검토하여 반영

경쟁사 및 타겟 특성을 분석하여 시장성 있고 차별화되는 키워드 도출

**Packaging Concept**  
내부환경, 외부환경을 분석하여 차별화된 패키지 컨셉 도출

**Project Overview**  
Project Direction

브랜드: 건강한 자연주의

타겟: 어린이 ~ 성인, 은가족

이미지: 건강, 자연, 자연의 맛



## Brand Concept

### Market Analysis



**Design Development**

Line up

- Line up 1 : 새싹보리 (새싹한 사과-양배추 유산균발효음료)
- Line up 2 : 새싹브로콜리 (새싹브로콜리와 감귤-당근 유산균발효음료)
- Line up 3 : 새싹망고 (새싹망고과 하루견과 유산균발효음료)

**Design Development**

B-I Sampling

제품의 전면에 들어갈 브랜드명과 제품명은 핸드레이팅 사체를 활용함으로써 자연에서 갓 나온 과실들 따온 듯 한 분위기를 전달합니다.

Line up 1 : 새싹한 사과-양배추 유산균발효음료

Line up 2 : 새싹브로콜리와 감귤-당근 유산균발효음료

Line up 3 : 새싹망고과 하루견과 유산균발효음료

**Design Development**

B-I Sampling

제품의 메인 컬러는 자연의 분화기 전달을 위해 톤다운 컬러를 사용하여 안정성을 전하고자 하였습니다. 또한, 각 라인업의 특성을 반영하여 컬러를 패키지에 적극적으로 활용합니다.

Line up 1 - 새싹보리 : 새싹한 사과-양배추 (Deep Green)

Line up 2 - 새싹브로콜리 : 새싹브로콜리와 감귤-당근 (Deep Orange)

Line up 3 - 새싹망고 : 새싹망고과 하루견과 (Brown)

## 나. 새싹브로콜리 유산발효음료

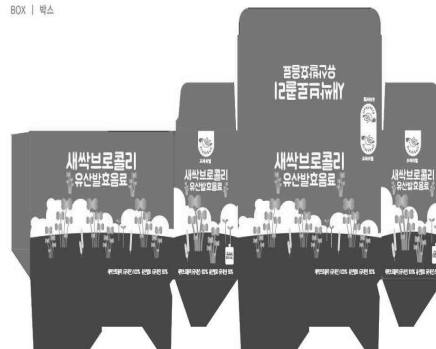
### 패키지 개발

POUCH | 파우치



### 패키지 개발

BOX | 박스





## BI 개발

Logotype | 로고타입

세척당콩 유산발효음료  
 대표를 특징으로, 모든 아이덴티티  
 요소를 구성하며, 브랜드의 상징적인  
 색을 사용하여 브랜드의 유산 발효음료  
 제품 사용을 강화하고, 모든 아이덴티티  
 요소를 사용할 수 있는 모든 요소에  
 관련된 사용의 유연성을 제공한다.  
 또한, 모든 시그니처 요소를  
 사용하여 모든 아이덴티티 요소를  
 사용할 수 있도록 한다.

로고타입  
**새싹브로콜리  
 유산발효음료**



## BI 개발

Logo Emblem type | 로고 엠블렘 타입

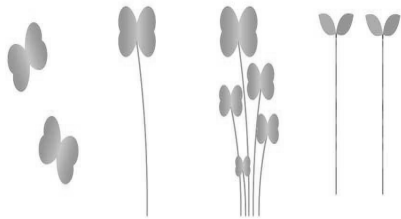
엠블렘은 세척당콩 유산발효음료의  
 모든 시그니처 요소를 사용하여 모든  
 요소를 활용하여 모든 아이덴티티  
 요소를 활용할 수 있는 모든 요소에  
 관련된 사용의 유연성을 제공한다.  
 또한, 모든 시그니처 요소를  
 사용하여 모든 아이덴티티 요소를  
 사용할 수 있도록 한다.

**새싹브로콜리  
 유산발효음료**



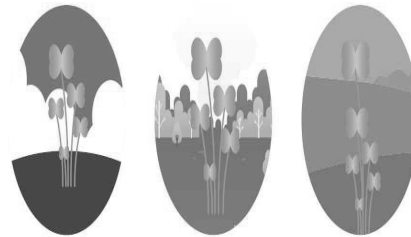
## 디자인 개발

icon | 아이콘



## 디자인 개발

icon | 아이콘 응용



# 다. 새싹당콩 유산발효음료

## 패키지 개발

POUCH | 파우치



## 패키지 개발

BOX | 박스



## BI 개발

### Logotype | 로고타입

로고타입은 세련됨과 친근함을 동시에 지니는 획일적으로 통일된 디자인을 지니는 것이 중요하다. 로고타입은 디자인을 통해 브랜드의 이미지를 효과적으로 전달할 수 있도록 도와주는 중요한 역할을 하며, 브랜드의 정체성을 확립하는 데 크게 기여한다. 로고타입은 브랜드의 이미지를 효과적으로 전달할 수 있도록 도와주는 중요한 역할을 하며, 브랜드의 정체성을 확립하는 데 크게 기여한다.

로고 타입은 브랜드의 정체성을 효과적으로 전달할 수 있도록 도와주는 중요한 역할을 하며, 브랜드의 정체성을 확립하는 데 크게 기여한다. 로고타입은 디자인을 통해 브랜드의 이미지를 효과적으로 전달할 수 있도록 도와주는 중요한 역할을 하며, 브랜드의 정체성을 확립하는 데 크게 기여한다.



## BI 개발

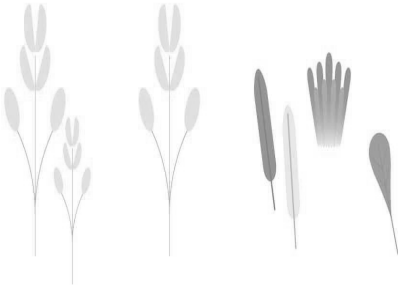
### Logo Emblem type | 로고 엠블럼 타입

엠블럼은 상징적이고 시각적으로 선명하며, 시선 내로 유인할 수 있는 특징을 지니고 있으며, 브랜드의 정체성을 효과적으로 전달할 수 있도록 도와주는 중요한 역할을 하며, 브랜드의 정체성을 확립하는 데 크게 기여한다.



## 디자인 개발

### icon | 아이콘



## 디자인 개발

### icon | 아이콘 응용



## 라. 곰곰 새싹한 사과 · 양배추

**Design Develop-ment**  
Line up #1  
곰곰 새싹한 사과 양배추 Character

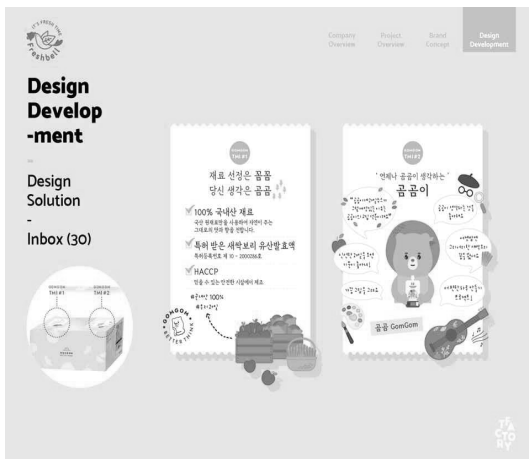
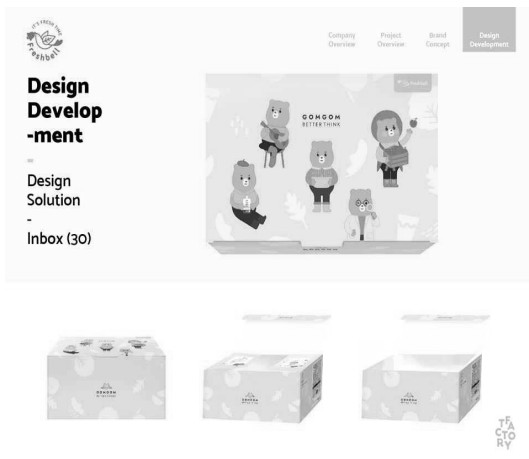
**Design Develop-ment**  
Design Solution

Company Overview

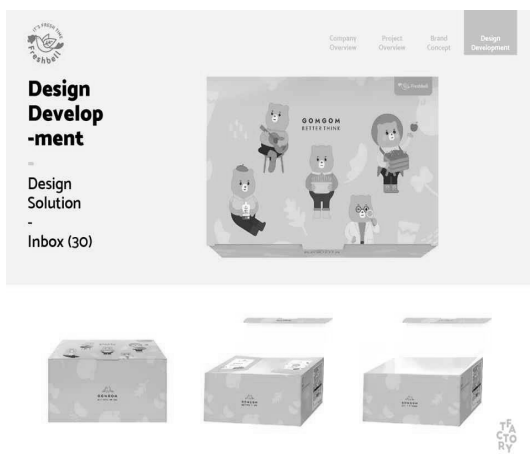
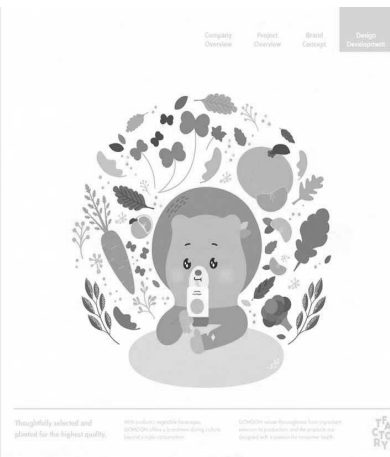
Project Overview

Brand Concept

Design Development



# 마. 곰곰 새싹브로콜리와 감귤 당근





# Design Develop-ment

Design Solution - Carton box



Small

Large



# Design Develop-ment

Design Solution - Carton box

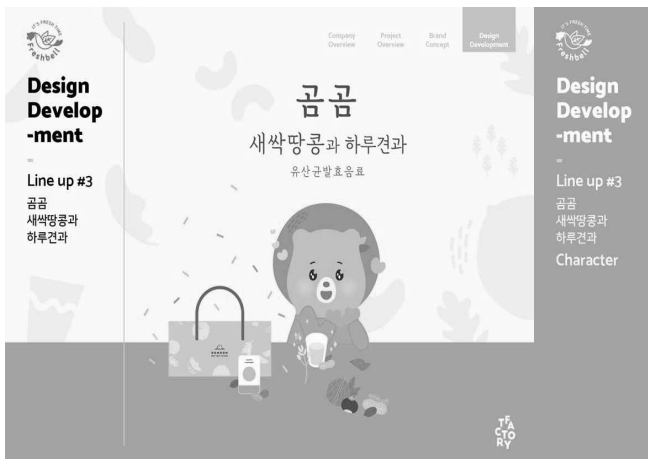


Small

Large



## 바. 곱곶 새싹망콩과 하루 견과



# Design Develop-ment

Design Solution

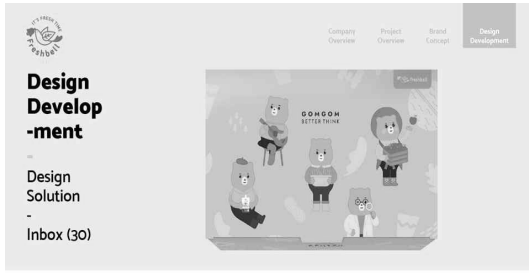


# Design Develop-ment

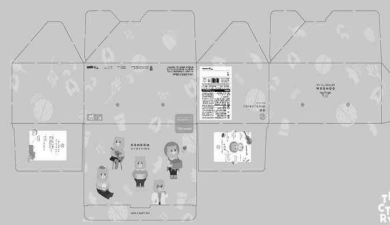
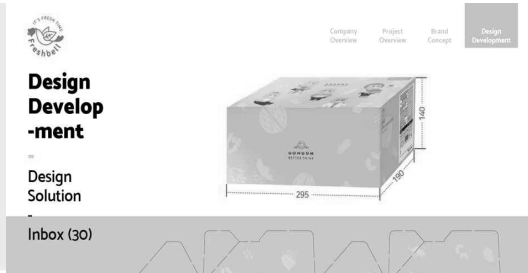
Design Solution - Pouch

Line up 3 - 새싹망콩

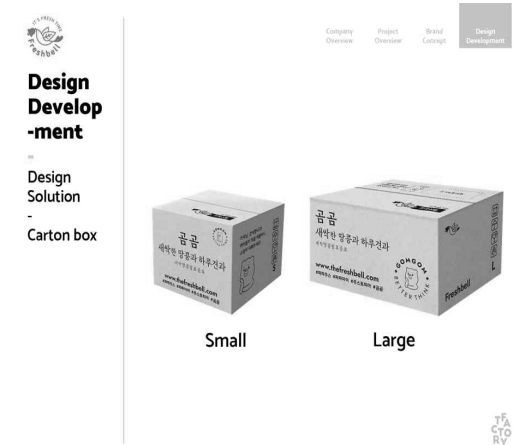
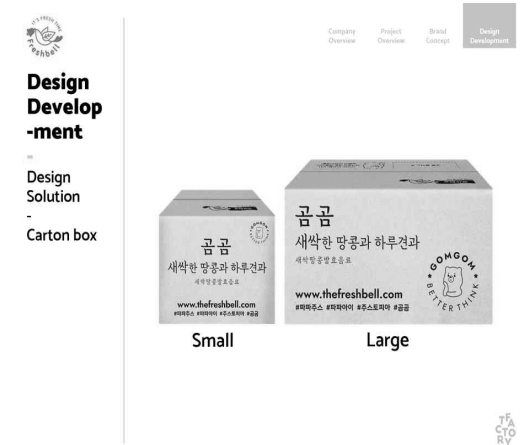




TACTORY



TACTORY



## 7. 시생산 업체 선정

### 1) 시생산업체 정보

생산업체1 현황	업체명	농업회사법인(주)동서 웰빙	사업자등록번호	505-81-63945
	주소	경상북도 영천시 하이브리드로 678(본촌동)		
	유형	중소기업		
	주 생산품	과채음료, 과채주스, 건강보조식품 등		
	대표자	최 경 자	전화	054-336-1212
	E-mail	dsp1213@hanmail.net	팩스	054-336-1214

생산업체2 현황	업체명	에코네츄럴	사업자등록번호	515-07-47923
	주소	경상북도 경산시 남산면 하남로 336		
	유형	중소기업		
	주 생산품	과채음료, 과채주스 등		
	대표자	조 준 구	전화	053-852-8400
	E-mail	cjg0912@hanmail.net	팩스	-

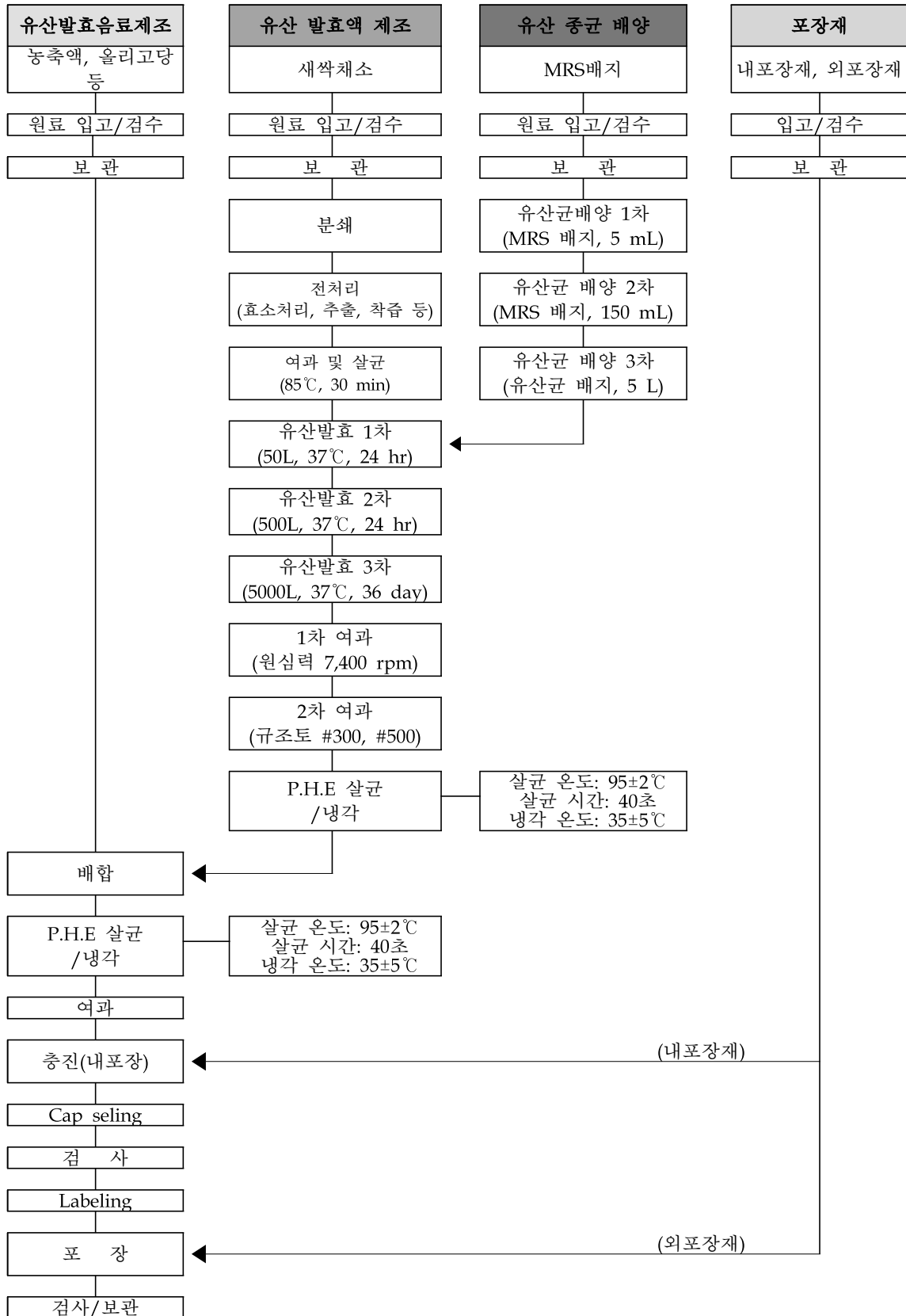
### 2) 시생산 내용

- 1차 시생산 : 새싹보리 유산 발효 및 시제품 제작
- 2차 시생산 : 새싹보리 유산 발효 및 리뉴얼 시제품 제작
- 3차 시생산 : 새싹보리와 사과양배추 유산 발효 및 리뉴얼 시제품 제작
- 4차 시생산 : 새싹브로콜리 유산 발효 및 제품 생산
- 5차 시생산 : 새싹땅콩 유산 발효 및 제품 생산
- 6차 시생산 : 새싹보리사과양배추 유산 발효 및 제품 생산

### 3) 생산 시설



#### 4) 시생산 제조공정도





5) 시생산 결과물



<1차 시생산 시제품>



<2차 시생산 시제품 2종>



<3차 시생산 시제품 2종>



<4차 시생산 시제품>



<5차 시생산 시제품>



<6차 생산 제품>

## 8. 마케팅 및 NB 방안 모색

- 1) 아래 유통경로를 통하여 동시다발적으로 마케팅 및 유통 실시.  
(온·오프라인 동시에 출시 및 마케팅 진행하여 인지도 확보 및 매출 증대)
- 2) 기존 온·오프라인 유통망을 활용.
- 3) 특히 국내 주요 대형 유통사를 통하여 1차 고급 시장에 출시 함으로써,  
신뢰를 줄 수 있는 제품 이미지 확보.
- 4) 전국 유명 카페체인을 통하여 유통 판매 및 제품이미지 확보.
- 5) 약국유통은 성분 및 포장패키지를 다르게 제작하여 판매.  
(건강기능식품은 아니지만 건강한 이미지의 음료로 이미지 마케팅)
- 6) 학교급식을 통하여 학생들에게 친숙하고 편안한 음료 이미지 확보.  
(추가로 과다 생산에 대한 전략 및 음료 생산 주기를 빠르게 가져갈 수 있음.)
- 7) 면세점 유통라인을 통하여 국내외 잠재고객 발굴 및 확보.

오프라인  
유통망

대형 유통사  
직코드 보유  
(1차 벤더)



카페체인  
납품



약국



학교  
급식



인천공항  
면세점  
(제2터미널)



- 8) 인스타그램, 페이스북 등 활용하여 모델 선발
- 9) 아래 온라인 유통망의 통시다발적 광고마케팅을 통하여 제품 인지도 확보
- 10) 주기적으로 다가오는 1년간 명절 및 기념일 패키지 출시로 소비자와의 친밀도 상승.
- 11) 자체 종합 쇼핑몰 운영을 통한 홍보마케팅 진행



(1) 세부실행계획

- 구매인증, 구매사은행사 (예시 사진)



- 보도자료



- 블로그 상위 노출 및 리뷰 홍보

- 포털사이트 유사 키워드의 노출 빈도를 조사하여, 뉴스 카테고리 상위 노출



- SNS 홍보

- 인스타, 페이스북 유사제품키워드 검색시 노출되는 빈도로 제품 홍보전달



- 타켓별 커뮤니티 홍보

- 행사특가, 1+1 기획전을 각 커뮤니티 사이트에 기재하여 제품 홍보



- 키워드 광고

- 제품에 관련된 연관검색어를 바탕으로 키워드를 도출하여 상위에 노출 함



- 오픈마켓 입점 및 세팅

- 개별 제품 세팅 완료 및 메인 광고 상품 묶음 등록(네이버쇼핑, 11번가, 옥션, G마켓)



- 그 외 언론 지면광고 및 잡지광고 진행

- 다양한 매체를 이용한 기획기사, 인터뷰, 칼럼 등 적극적인 제품 기사 활동
- 새싹발효음료에 대한 전략 수립과 언론 매체 대응
- 언론매체와의 밀접한 관계유지하고 새싹발효음료에 관한 적극적인 홍보유도
- 추가 제품 개발을 위한 분기별 홍보 진행

〈서울/경기 관련신문〉 ● 서울신문 ● 중앙일보 ● 한겨레신문 ● 조선일보 ● 동아일보 ● 문화일보 ● 머니투데이  
 〈부산 관련 신문〉 ● 부산일보 ● 국제신문 ● 부경뉴스 ● 국제신문 ● 기장뉴스 ● 중앙일보 ● 조선일보  
 〈인터넷 일간지〉 ● 뉴시스 ● 아시아뉴스통신 ● 메디파나뉴스 ● 국제뉴스

MBC 생활과 건강, KTX 소개광고, 지하철 지면광고, 남성잡지, 여성잡지 등  
 소비자들이 즐겨보는 잡지와 협업하여, 지면광고 실행

12) 현재 보유하고 있는 바이어를 통하여 수출 진행

**바이어 보유 현황 |**



13) 현재 수출 국가에서 진행중인 행사를 적극 활용하여 국내 뿐만아니라 해외 고객확보

**| 중국 1성급 도시 영유아 프리미엄 매장 입점**

- 상해, 베이징, 칭다오 등 105개 매장
- 2019.04.26~05.01 북경 유아용품 박람회
- 2019.05.14~16 상해 국제식품 박람회
- 2019.06.16~22 중국 무역사절단(대련, 장저우, 칭따오)



**| 싱가포르 타카시마야 백화점, 왓슨즈 행사**

singapore yummy fair / singapore food fair 판촉행사 진행



**| 베트남 롯데마트 판촉행사 참가**

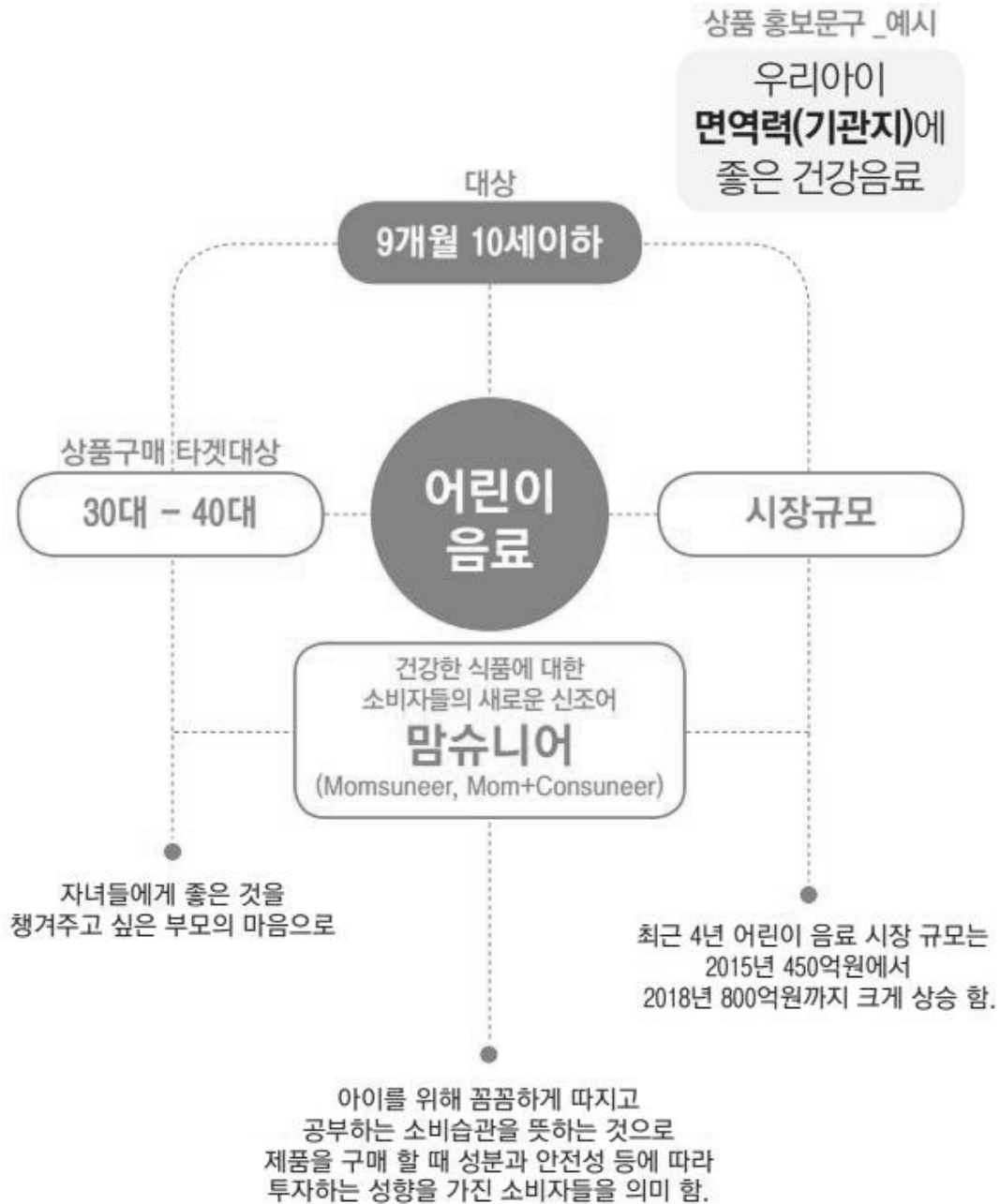
- 2018.11 베트남 판촉전(푸미흥 알파문구) >> 완판
- 2019.02 롯데마트 베트남 고밥점 판촉전 >> 완판
- 2019.05 롯데마트 남사이공 지점 입점 확정



14) 고객 확보 후 기존 스파우트 형태의 제품에서 변형 된 패키지와 성분으로 추가 고객확보 (ex. 스틱형태의 제품 출시로 전 연령층이 간편하게 섭취가능한 제품 출시)

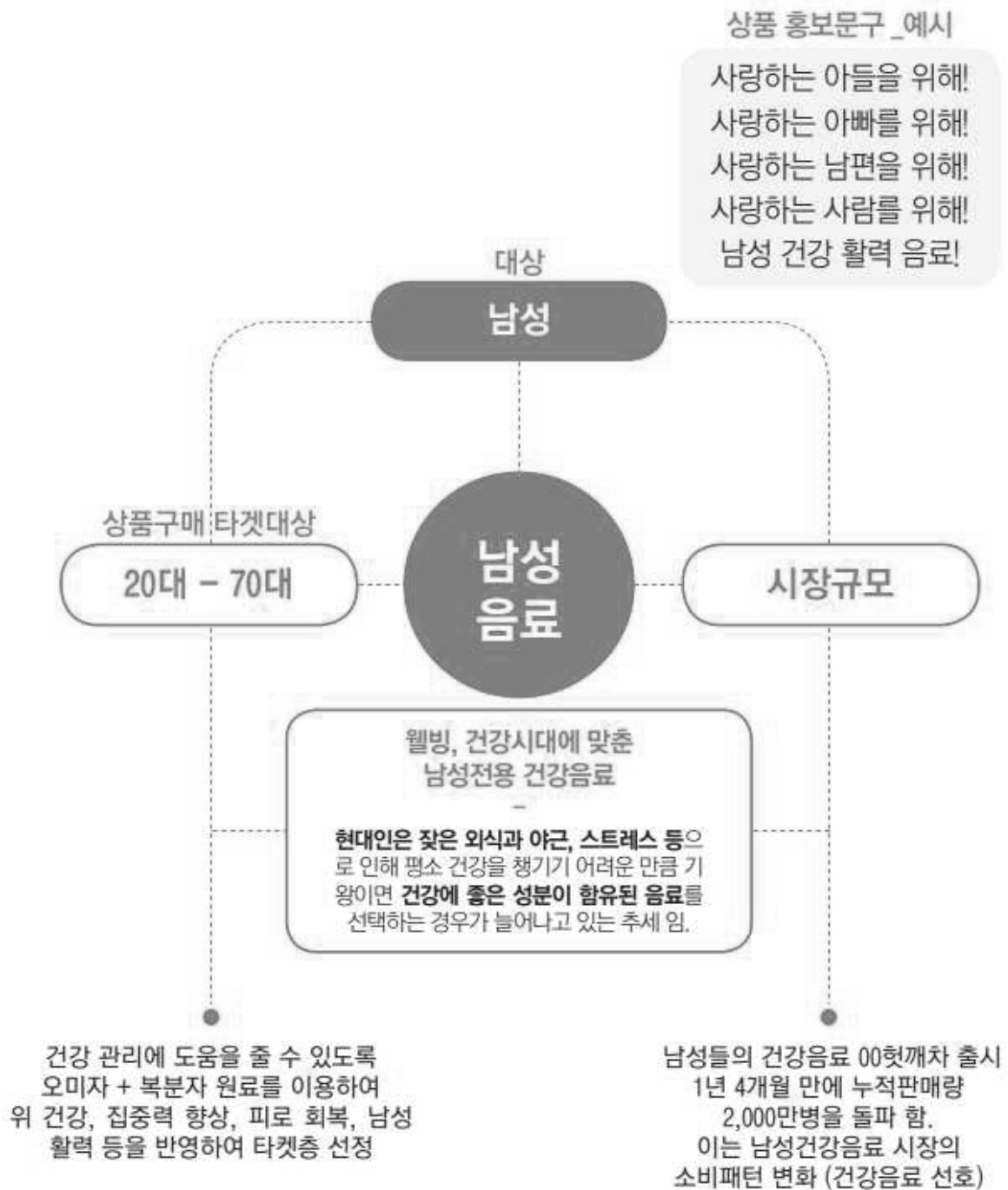
15) 새싹음료 홍보마케팅 전략 수립

(1) 어린이 음료 타켓분석

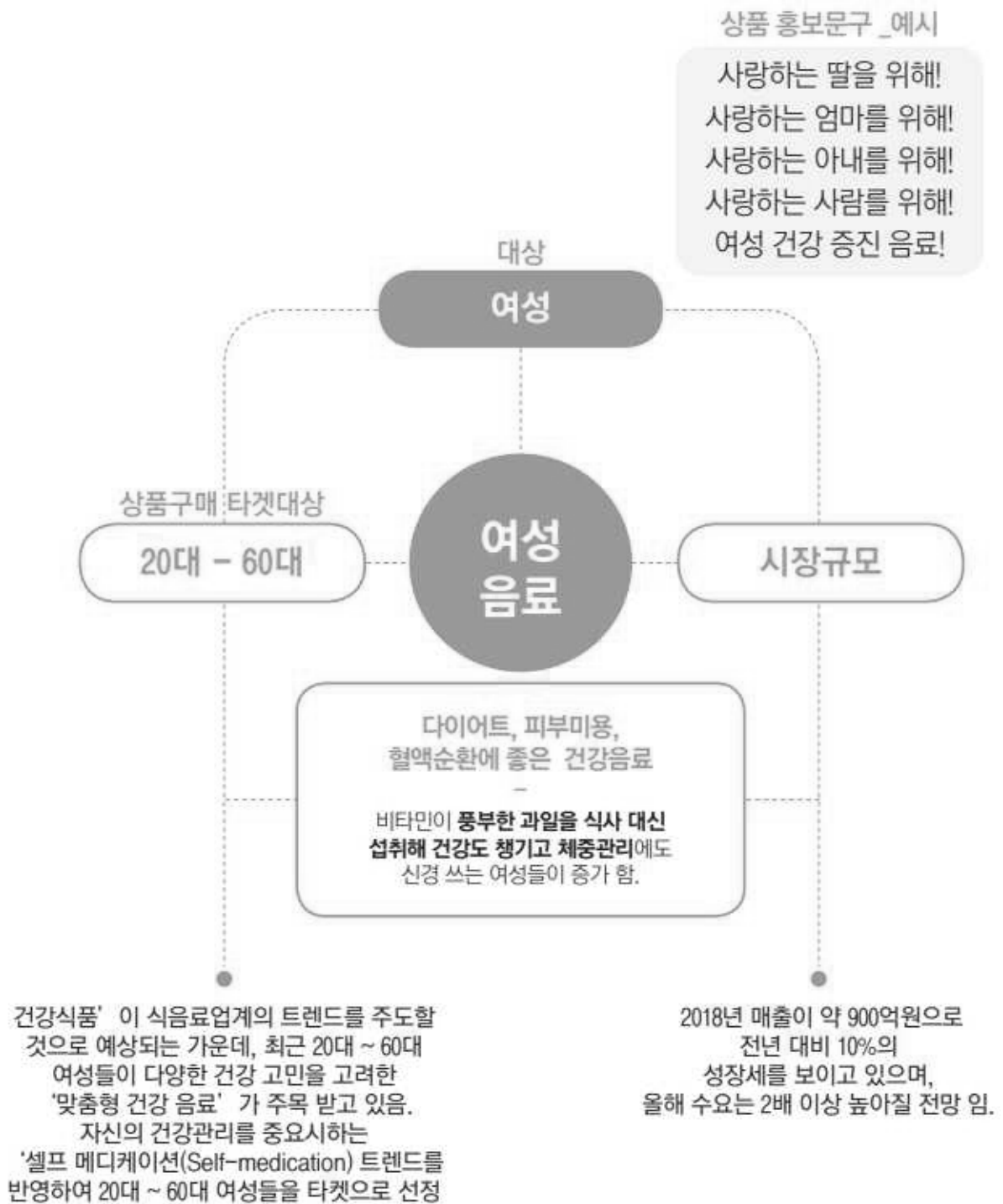




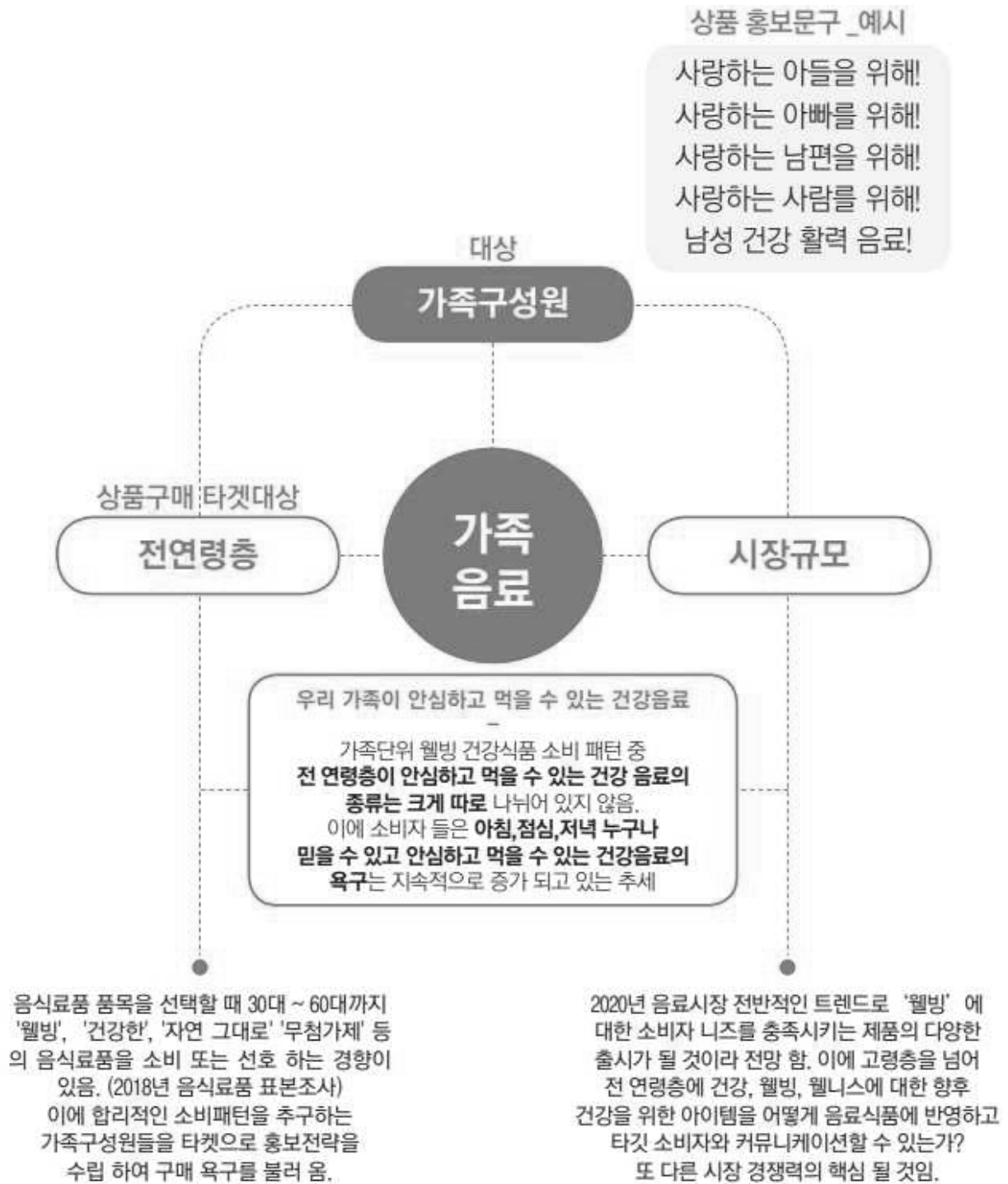
(2) 성인음료(남성) 타겟분석



(3) 성인음료(여성) 타겟분석



(4) 온가족용 음료 타겟분석



16) 성공적인 제품개발을 위한 표본조사 실시

### 표본조사표 (5세 - 10세 이하)

구분	제품 디자인 선호도	디자인에 따른 음료제품 선택	평균 섭취량
어린이음료	<ul style="list-style-type: none"> <li>· 귀여운 내 친구 뽀로로 사과맛</li> <li>· 마시는 오비타</li> <li>· 미닛에이드 쿠우 젤리 포도</li> <li>· 선키스트 로보카 폴리 사과맛</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>· 어린이음료제품에 따른 디자인 선호도 조사</li> <li>· 디자인에 따른 소비 선택 조사</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>· 어린이음료 평균 구매율</li> <li>· 섭취기준에 따른 영양성분 조사</li> </ul>

### 표본조사 현장



## 표본조사표 (남성/여성 10 - 70대), 구성비율(5:5)

구분	건강음료에 대한 인식	맛, 색상 대한 선호도 조사	성분에 따른 선택기준
성인음료	<ul style="list-style-type: none"> <li>· 건강음료를 선택하는 조건</li> <li>· 건강음료의 효과</li> <li>· 건강음료의 신뢰성</li> <li>· 원료에 따른 선호도</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>· 원료 사용에 따른 선택성</li> <li>· 단맛, 쓴맛, 상큼한 맛 등에 대한 선택 선호도 조사</li> <li>· 색상에 대한 선호도 조사</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>· 비타민 음료/피로회복제</li> <li>· 영양성분 함량, 안전성 조사</li> <li>· 면역력 증진 / 건강음료</li> </ul>

### 표본조사 현장









- 17) 클라우드 펀딩 진행(와디즈) 성공
  - 목표액 대비 1800% 달성(목표액: 100만원)

**[9억 새싹보리 특허의 비밀] 엑소리나는 음료에 양배추가 들어간 이유는?**

- 와디즈 메인 노출

## 9. 생산 가능 시설 및 설비 확충

생산 공장 전경	생산설비 전경(현물자산 포함)
 <p data-bbox="295 806 542 862">공장 외부 전경</p>	 <p data-bbox="837 784 949 828">세척기</p> <p data-bbox="1165 784 1276 828">착즙기</p>
 <p data-bbox="279 1187 566 1232">공장 내부 전경 1</p>	 <p data-bbox="821 1164 965 1209">배합탱크</p> <p data-bbox="1181 1164 1292 1209">여과기</p>
 <p data-bbox="279 1568 566 1612">공장 내부 전경 2</p>	 <p data-bbox="790 1534 893 1579">충진기</p> <p data-bbox="1181 1534 1332 1579">후살균조</p>

## 제 6절. 연구 개발 성과

### 1. 연구개발 성과목표 및 대비 실적표

성과 목표	사업화지표										연구기반지표								
	지식 재산권			기술 실시 (이전)		사업화					기술 인증	학술성과			교 육 지 도	인 력 양 성	정책 활용 홍보		기 타 (타 연 구 활 용 등)
	특 허 출 원	특 허 등 록	품 종 등 록	권 수	기 술 료	제 품 화	매 출 액	수 출 액	고 용 창 출	투 자 유 치		논문		학 술 발 표			정 책 활 용	홍 보 전 시	
												SCI	비 SCI						
단위	건	건	건	건	백 만	건	억 원	억 원	명	건	건	건	건	건	명	건	건		
가중치																			
최종목표	3	3				6	23	6.5	8	1				3				3	
1 차 연 도	목 표	1				1			1	1				1				1	
	실 적	3		1		1			1	1				1				1	
2 차 연 도	목 표	1	1			1	2		2					1				1	
	실 적	1	3			1	2	0.5	4					2				3	
3 차 연 도	목 표	1	1			1	3	0.5	2					1				1	
	실 적	3	1	2		1	7	0.6	3					3					
합 계	목 표	3	2			3	5	0.5	5	1				3				3	
	실 적	7	4	3		3	9	1.1	8	1				6				4	



## 2. 생명자원(생물자원) 기탁

No.	생명자원(생물자원)/화합물명	등록/기탁번호	등록/기탁기관	발행년도
1	<i>Lactobacillus fermentum</i> DU.LA.EIJ-31	KCTC 13419BP	Korean Collection for Type Cultures(KCTC)	2017
2	<i>Pedococcus pentosaceus</i> DU.La.P-11	KCTC 13781BP	Korean Collection for Type Cultures(KCTC)	2018
3	<i>Pedococcus acidilactici</i> DU.LAB.K-1	KCTC 13963BP	Korean Collection for Type Cultures(KCTC)	2019

## 3. 국내 및 국제학술회의 발표

No.	회의명칭	발표자	발표일시	장소	국명
1	2017 KFN International Symposium and Annual Meeting	Kim, In-Ho, Kim, Yi-Seul, Eom, In-Ju, Kim, Seong-Ho	2017.11.09	HICO Gyeongju	Korea
2	2018 KFN International Symposium and Annual Meeting	Kim, In-Ho, Kim, Yi-Seul, Eom, In-Ju, Kim, Seong-Ho	2018.10.31	BEXCO Busan	Korea
3	2018 KFN International Symposium and Annual Meeting	Kim, In-Ho, Kim, Yi-Seul, Eom, In-Ju, Kim, Seong-Ho	2018.10.31	BEXCO Busan	Korea
4	2019 KFN International Symposium and Annual Meeting	Kim, In-Ho, Kim, Seong-Ho	2019.10.23	ICC JEJU Jeju	Korea
5	2019 KFN International Symposium and Annual Meeting	Kim, In-Ho, Kim, Seong-Ho	2019.10.23	ICC JEJU Jeju	Korea
6	2019 KFN International Symposium and Annual Meeting	Kim, In-Ho, Kim, Seong-Ho	2019.10.24	ICC JEJU Jeju	Korea

#### 4. 지식재산권(특허, 실용신안, 의장, 디자인, 상표, 규격, 신품중, 프로그램)

No.	지식재산권 등 명칭 (건별 각각 기재)	국 명	출원			등록			기여율
			출원인	출원일	출원번호	등록인	등록일	등록번호	
1	신규 락토바실러스 퍼멘텀 균주를 이용한 사포나린, 이소비티신 및 루테올린 함량이 증진된 새싹보리 발효물의 제조방법	한국	(주)프레쉬벨	2017.12.28	10-2017-0181837	(주)프레쉬벨	2019.07.09	10-2000286	100
2	신규한 유산균 <i>Pediococcus acidilactici</i> DU. LAB. K-1(KCTC 13963BP)를 이용하여 설포라판 및 퀴세틴이 증강된 새싹브로콜리 유산균 발효물 및 이의 제조방법	한국	(주)프레쉬벨 대구대학교 산학협력단	2019.12.27	10-2019-0176836				100
3	신규 페디오코쿠스 펜토사세우스 균주를 이용한 새싹땅콩 발효물의 제조방법 및 상기 방법에 의해 제조된 새싹땅콩 발효물을 포함하는 변비 개선용 조성물	한국	(주)프레쉬벨 대구대학교 산학협력단	2019.12.31	10-2019-0179947				100
4	곰곰	한국	(주)프레쉬벨	2017.12.15	4020170161713	(주)프레쉬벨	2018.09.21	4013999240000	100
5	슈퍼파파	한국	(주)프레쉬벨	2017.12.29	4020170168395	(주)프레쉬벨	2018.10.23	4014094910000	100
6	새싹바라보리	한국	(주)프레쉬벨	2017.09.22	4020170120973	(주)프레쉬벨	2018.12.21	4014296890000	100
7	파파아이	한국	(주)프레쉬벨	2019.11.07	4020190171568	(주)프레쉬벨			100

#### 5. 인력양성

No.	분류	기준년도	인력양성현황										
			학위별			성별		지역별					
			박사	석사	학사	남	여	수도권	충청권	영남권	호남권	기타	
1	인력양성	2017-2019		2			2				2		

## 6. 포상 및 수상실적

No.	포상명	포상내용	대상	포상일자	포상기관
1	농식품분야 오픈크라운드 투자 경진대회 1등	식물성 유산균 제품의 상품화	(주)프레쉬벨		오픈크라운드

## 7. 홍보 전시

No.	유형	행사명	전시품목	장소	활용년도
1	상품전시회	코스트코 상품전시회	곰곰이네 외	코스트코 (대구혁신도시 시범)	2018
2	유아교육전	부산 유아교육전	곰곰이네 외	부산 벡스코	2019
3	베이비페어	대구 베이비페어	곰곰이네 외	대구 엑스코	2019
4	국제유아교육전	서울 국제유아교육전	곰곰이네 외	서울 엑스코	2019
5	맘앤베이비엑스포	일산 맘앤베이비엑스포	곰곰이네 외	일산 킨텍스	2019
6	베이비페어	일산 베이비페어	곰곰이네 외	일산 킨텍스	2019
7	베이비페어	부산 드림베이비페어	곰곰이네 외	부산 벡스코	2019
8	브랜드엑스포	대한민국 브랜드엑스포 in LA	곰곰이네 외	LA	2019

## 8. 시제품 성과

No.	제품명	제품사진	제품출시일	매출액 (백만원)	원산지	품질 인증여부
1	곰곰이네 배·도라지엔모과		2018.		국산	
2	곰곰이네 사과·양배추		2018.		국산	
3	곰곰 새싹한 사과양배추		2020. 01		국산	HACCP 인증

## 9. 사업화 성과 및 매출실적

### 가. 사업화 성과

항목	세부항목			성 과
사업화 성과	매출액	개발제품	개발후 현재까지	0.5억원
			향후 3년간 매출	20억원
		관련제품	개발후 현재까지	8억원
			향후 3년간 매출	50억원
	시장 점유율	개발제품	개발후 현재까지	-
			향후 3년간 매출	국내 : 10% 국외 : 2%
		관련제품	개발후 현재까지	-
			향후 3년간 매출	국내 : 20% 국외 : 5%
	세계시장 경쟁력 순위	현재 제품 세계시장 경쟁력 순위		-
		3년 후 제품 세계 시장경쟁력 순위		-

## 10. 연구 성과 결과 및 고찰

### 가. 기술적 성과

(1) 목적성 어린이용 음료 제품 생산 및 출시

(가) 어린이용 항비만 및 배변 기능 개선 음료 조성 및 formulation

(나) 3有(맛, 영양, 기능 有), 5無(무농약, 무설탕, 무첨가물, 무색소, 무방부제) 컨셉

(다) 어린이 취향 관련 3종이상의 관련 제품 개발

(2) 목적성 식물성 유산균 3종 특허기탁

(가) 새싹보리, 새싹브로콜리, 새싹땅콩 발효 최적화 유산균 동정 및 특허기탁

(공인기탁기관).

(3) 공정도 및 제조 매뉴얼 개발 및 제공

(가) 본 연구결과를 바탕으로 음료제작에 필요한 새싹채소(보리, 브로콜리, 땅콩)

전처리 조건기술

(나) 새싹채소를 이용한 발효생산기술 및 발효물을 활용한 음료 조성 및 배합비 등 생산

기술에 필요한 매뉴얼을 제작.

(4) 최종시제품 관련한 생산을 위한 품목제조신고 3건 이상

(5) 특허 출원 및 등록 3건 이상 및 상표등록 3건 이상

## 나. 경제적 성과

(1) 관련 제품의 판매 상담 미팅

(가) 새싹채소음료 해외진출 개척을 위한 제너럴네이처(주), 중국 한진무역 구매 담당자 미팅, 베트남 내 편의점, 마트 수입 유통업체 바이어 미팅, 중국키즈박람회 참가

(나) 국내 유통사 판로개척을 위한 롯데슈퍼, 롯데마트 입점 미팅, 현대그린푸드, 신세계 백화점 미팅, 윙잇 온라인 유통업체 미팅, 티앤비 코리아 공동구매 업체 미팅, 국내 박람회 참가(유아박람회 외)

(2) 제품개발에 따른 새싹채소의 원활한 가공처리로 농가 소득증대와 새싹채소 가격의 안정화, 고부가가치 창출

(3) 동 사업에서 지원한 개발 인력 고용

(4) 새싹채소를 이용한 기능성 제품화는 지역발전과 고용창출 등에 기여

### 제 3 장. 목표 달성도 및 관련 분야 기여도

#### 제 1 절. 목표달성도

##### 1. 연차별 연구개발 목표 달성도 및 수행내용

###### 가. 1차 년도

구분 (연도)	세부 과제명	세부연구목표	연구개발수행내용	달성도 (%)
1차 년도 (2017)	(주관, 연구과제)	새싹보리의 식물성 유산균 발효물을 활용한 소아비만 및 배변기능 개선 어린이용 음료 시제품 개발 및 제품 성분 검사	- 시제품 업체 선정 및 시제품 제작 - 영양성분 검사 - 특허 출원 - 제품 디자인 개발	100
		새싹보리의 식물성 유산균 발효물을 활용한 소아비만 및 배변기능 개선 어린이용 음료 완성품 생산	- 생산업체 선정	100
	(협동 연구과제)	새싹보리 유산균 최적발효조건 실현을 통한 scale up 조건 충족 및 대량생산기술 확립	- 최적 발효 유산균주의 기탁 - Lab scale 발효 조건 최적화	100
	새싹보리의 식물성 유산균 발효공정 최적화 및 발효물의 기능 검증	새싹보리 유산균 발효물의 소아비만 및 배변기능 개선의 지표물질 함량 검토	- 분광광도계 및 HPLC법에 의한 지표물질 분석	100
	마케팅용 data 및 자료 확보	- Pilot 및 plant scale 적용	100	
	식물성 유산균을 활용(요소 기술 활용)한 변비개선 음료 IP 출원	- 관련 특허 출원	100	

나. 2차 년도

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	연구개발수행내용	달성도 (%)
2차 년도 (2018)	주관, 연구과제	새싹보리 발효물 리뉴얼 제품 출시	- 새싹보리 발효물이 함유된 곰곰이네 주스 2종 출시	100
		국내외 어린이 음료시장 환경 분석	- 자료 조사	100
		소비자 선호도 및 제품 컨셉 설문조사	- 설문 조사	100
		제품가격 설정 및 제품 컨셉 제품 디자인 수정 및 보완	- 제품가격 설정 - 제품 컨셉 결정 - 제품 디자인 개발	100
		제품 판매를 위한 유통망 확보	- 마케팅 및 유통망 확보	100
		새싹브로콜리&새싹땅콩 식물성 유산균 음료 시제품 생산	- 새싹브로콜리 식물성 유산균음료 & 새싹땅콩 식물성 유산균 음료 시제품 생산	100
	협동 연구과제	새싹보리의 유산균 발효물을 활용한 어린이용 음료 관능 평가와 음료 formulation 확립	- 음료 배합비 결정 - 관능검사 (자체관능검사, 신뢰성 확보를 위한 전문기관 소비자 관능평가)	100
		새싹보리 유산균 발효물 활용 어린이용 음료의 기능 (배변효능) 검증(동물시험)	- 동물실험을 통한 변비 개선 검증 ( <i>in vivo</i> test)	100
		새싹채소(땅콩, 브로콜리 등) 관련 발효능 및 지표검사	- 최적 발효 유산균주의 기탁 - Lab scale 발효 조건 최적화 - 지표 성분 검사	100

### 다. 3차 년도

구분 (연도)	세부과제명	세부연구목표	연구개발수행내용	달성도 (%)
3차 년도 (2019)	주관, 연구과제	새싹채소 유산균발효음료 광고 및 홍보 진행	- 국내외 박람회 참가 홍보	100
		리뉴얼 제품 반응조사 및 마케팅	- 현장 관능검사 및 전문기관 기호도 분석 - 시음회 진행	100
		제품 보완 및 리뉴얼 제품 개발	- 새싹땅콩과 새싹브로콜리 유산균발효음료 리뉴얼 개발 - 디자인 보완 및 수정	100
		리뉴얼제품 개발 및 출시	- 크라우드 펀딩 진행 및 성공 (새싹한 사과양배추)	100
		해외시장 현지화 제품 개발	- 중국 바이어 상담(박람회)	100
		시설 및 설비 확보	- 공장 설립(HACCP인증)	100
	협동 연구과제	새싹채소 유산균 발효물 활용 음료 추가개발 및 제품 확장	- 새싹채소(브로콜리&땅콩) 유산발효음료 개발	100
		새싹채소 발효물 및 음료(2종) 효능 및 안정성 검사	- 동물실험을 통한 변비 개선 검증 - 세포실험을 통한 항비만 효과 검증	100
		새싹채소(브로콜리&땅콩) 관 련 bioconversion 효소 활성 증 가 핵심 기술 개발	- 특허 2건 출원	100



## 제 4 장. 연구결과의 활용 계획

- 새싹보리 활용 어린이용 발효음료 개발 후 국내 대기업 납품 및 PB제품 런칭 기대
- 베트남 공기업인 ITPC와의 MOU를 통해 나노기술을 공유 등 기술 사업화
- 베트남 중심의 동남아 수출상품화 추구 및 전략(해외수출)
- 다양한 새싹원료를 어린이용 음료 기술 고도화 및 다양한 제품개발
- 당사의 음료 제조 노하우를 적극 활용하여 제품화를 진행
- 시제품 제작을 통한 본격적인 생산체제를 구축하고, 디자인 마케팅 전략을 확립하여 사업화를 진행
- 음료제품의 기존 확보되어 있는 거래처 적극 활용하여 국내 판로 확보
- 천연자원을 활용한 기능성 부여 제품개발을 통해, 차후 신제품 개발 시 기존의 레시피를 활용한 다양한 음료 개발이 가능

## 제 5 장. 참고문헌

1. Pyo YH, Lee TC, Lee YC. 2005. Enrichment of bioactive isoflavones in soymild fermented with  $\beta$ -glucosidase-producing lactic acid bacteria. *Food Res Int.* 38: 551-559.
2. Ko Ja, Park JY, Kwon HJ, Ryu YB, Jeung HJ, Park SJ, Kim CY, Oh HM, Park CS, Lim YH, et al. 2014. Purification and functional characterization of the first stilbene glucoside-specific  $\beta$ -glucosidase isolated from *Lactobacillus* kimchi. *Enzyme Microb Technol.* 67: 59-66.
3. Byres E, Paton AW, Paton JC, Lofling, J. C., Smith, D. F., Wilce, M. C. J., et al, 2008. Incorporation of a non-human glycan mediates human susceptibility to a bacterial toxin. *Nature*, 456: 648-.652.
4. Son MI, Kim TO, 1997. Optimum Conditions of Cellulose-Hydrolysis Reaction with Mixed Enzymes of Cellulase and  $\beta$ -Glucosidase. *Korean J. Biotechnol. Bioeng.* 13: 20-25.
5. Weisburg WG, Barns SM, Pelletier DA, Lane DJ, 1991. 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J Bacteriol* 173: 697-703.
6. Bas D, Boyacı IH, 2007. Modeling and optimization I: Usability of response surface methodology. *J. Food Eng.* 78: 836-845.
7. Myers RH, 1971. Response surface methodology. pp. 127-139, Allyn and Bacon Inc. Boston.
8. Wamasimbara, P. K. J. P. D. and F. Shahi. 1996. Optimization of hexameta-phosphate-assisted extraction of flaxseed proteins using response surface methodology. *Kor. J. Food Sci.* 61: 604-607.
9. Koon, L. C. 2000. Features -. Bird's nest soup -Market demand for this expensive gastronomic delicacy threatens the aptly named edible-nest SwiXets with extinction in the east. *Wildlife Conservation*, 103: 30-5.
10. Jung TD, Shin GH, Kim JM, Choi SI, Lee JH, Lee SJ, Heo IY, Park SJ, Ph SK, Uoo KS, Lim JK, Lee OH. 2016. Isoflavone,  $\beta$ -glucan content and antioxidant activity of defatted soybean powder by bioconversion with *Lentinula edodes*. *J. Food Hyg. Saf.* 31: 386-392.
11. Kim IB, Shin S, Lim BL, Seong GS, Lee YE. 2010. Bioconversion of soybean isoflavone by *Lactobacillus plantarum* and *Bifidobacterium longum*. *Korean K Food Cookery Sci.* 26: 214-219.
12. McCleary BV, Glennie-Holmes M. 1985. Enzymic quantification of (1-3)(1-4)- $\beta$ -D-glucan in barley and malt. *J Inst Brew.* 91: 285-295.
13. Lee MJ, Park SY, Kim YK, Kim HS, Park HH, Lee YJ, Jeong HS. 2017. Physicochemical properties and  $\beta$ -glucan contents of Korean naked oat (*Avena sativa* L.) cultivars. *Koran J Food Sci Techenol*, 49: 91-103.
14. Woo KW, Sim MO, Kim AH, Kang BM, Jung HK, An BK, Cho JH, Cho HW. 2016. Quantitative analysis of luteolin 5-glucoside in *Ajuga spectabilis* and their neuroprotective effects. *Kor. J. Pharmacogn.* 47: 211-216.

15. Choe JS, Uoun JY. 2005. The chemical composition of barley and wheat varieties. *J Korean Soc Food Sci Nutr.* 34: 223-229.
16. Prosky L, Asp, NS, Schweizer TF, Devries JW, Furda I. 1988. Determination of insoluble, soluble and total dietary fiber in foods and food products: interlaboratory study. *J Assoc Off Anal Chem.* 71: 1017-1023.
17. Ryu JE, Cha SH, Lee JY, Kim YK, Kim DH, Jang GI. 2017. Determination of total dietary fiber content in Muchim, Bokkeum, and Guk (Tang) of eat-out Korean foods. *Korean J Food Nutr.* 30: 405-412.
18. Son HK, Lee YM, Lee JJ. 2016. Nutrient composition and antioxidative effects of young barley leaf. *Korean J Community Living Sci.* 27: 851-862.
19. Hooper L, Kroon PA, Rimm EB, Cohn JS, Harvey I, Le Cornu KA, et al. 2008. Flavonoids, flavonoid-rich foods, and cardiovascular risk: a meta-analysis of randomized controlled trials. *American Journal of Clinical Nutrition.* 88: 38-50.
20. Benedet JA, Umeda H, Shibamoto T. 2007. Antioxidant activity of flavonoids isolated from young green barley leaves toward biological lipid samples. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 55: 5499-5504.
21. Kim KT, Kim SS, Lee SH, Kim DM. 2003. "The functionality of barley leaves and its application on functional foods" , *Food Sci. Ind.* 36: 45-49.
22. Ryu EH, Yoon HH, Jung JH, 2015. Characteristics of lactic acid fermentation of black raspberry juice using the *Lactobacillus Plantarum* GBL17 strain. *Korean J Food Cood Sci.* 31: 773-780.
23. Park JH, Moon HJ, Ph JH, Lee JH, Jung HK, Choi KM, Cha JD, Lim JY, Han SB, Lee TB, Lee MJ, Choi HR. 2014. Changes in the functional components of *Lactobacillus acidophilus*-fermented red ginseng extract and its application to fresh cheese production. *Koran J. Dairy Sci, Technol.* 32: 47-53.
24. Ryu IH, Kwon TO. 2013. Functional quality characteristics of extracts by sugar-leaching and lactic acid fermentation of mulberry leaves (*Morus alba* L.). *J Seric Entomol Sci.* 51: 164-172.
25. Lee DH, Hong JH. 2017. Biological activities and physicochemical properties of polysaccharides from *Gloiopeltis furcata* prepared by using various enzymes. *Korean J, Food Preserv.* 24: 455-463.
26. Im JH, Choi JK, Lee MH, Ahn YT, Lee JH, Huh CS, Kim GB. 2011. Effect of functional yogurt (R&B Rhythm®) on the improvement of constipation in animal models. *Korean J Food Sci Ani Resour* 31: 442-450.
27. Kim DG, Jin YG, Jin JY, Kim SC, Kim SC, Han CH, Lee YJ. 2011. Effects of the *Actindia chinensis* on loperamide-induced constipation in rat. *Korean J Pant Res.* 24: 61-68.
28. Lee JJ, Lee YM, Jung SK, Kim KY, Lee MY 2008. Effects of dietary mulberry leaf on loperamide-induced constipation in rats. *Korean J Food Preserv.* 15: 280-287.
29. Park CS, Park KS, Kim ML, Kong HJ, Yang KM. 2013. Effects of medicinal enzyme powder on intestinal mobility, lipid level, and blood parameters of loperamide-induced

- constipation in rats. *J of Life Sci* 23: 228-236.
30. Park MK, Jin YG, Kim DG, Jin JY, Lee YJ. 2007. Effects of *Lentinus edodes* extract on the loperamide-induced constipation in rats. *Korean J Food Sci Technol* 39: 88-93.
  31. Shimotoyodomo A, Meguro S, Hase T, Tokimitsu I, Sakata T. 2000. Decreased colonic mucus in rats with loperamide-induced constipation. *Comparative Biochemistry and Physiology - Part A: Mol and Integr Physiol* 126: 203-212.
  32. Kim EY, Jo KA, Ahn SH, Park SS, Son HS, Han SH. 2015. Effect of lactic acid bacteria powder on loperamide-induced constipation in rat. *Korean J. Food Nutr* 28: 956-964.
  33. Shin S, Park SS, Lee HM, Hur JM. 2014. Effects of fermented chicory fiber on the improvement of intestinal function and constipation. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 43: 55-59.
  34. Lawrence RS, Carol A, Stephen G, John S. 1984. Mechanism of the antidiarrheal effect of loperamide. *Gastroenterology* 86: 1475-1480.
  35. Yang JL, Suh MJ, Song YS. 1996. Effects of dietary fibers on cholesterol metabolism in cholesterol-fed rats. *J Korean Soc Food Nutr* 25: 392-398.
  36. Friedewald WT, Levy RI, Fredrickson DS. 1972. Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clin. Chem* 18: 499-502.
  37. Haglund O, Luostarinen R, Wibell L, Saldeen T. 1991. The effects of fish oil on triglyceride, cholesterol, fibrinogen and malondialdehyde in humans supplemented with vitamin E. *J. Nutr* 121 : 165-169.
  38. Rosenfeld L. 1989. Lipoprotein analysis. *Arch. Pathol. Lab. Med* 113: 1101-1110.
  39. Reitman S. A. 1957. Colorimetric method for the determination of serum glutamic oxaloacetic acid glutamic pyruvic transaminase. *Am. J. Clin. Pathol* 2: 56-63.
  40. Johnson-Delaney CA. Exotic Animal Companion Medicine Handbook for Veterinarians. Florida: *Zoological Education Network*; 2008, p. 19.
  41. Park YK, Kang YH. 2004. Effects of single cells of carrot and radish on the fecal extraction properties, mineral absorption rate and structure of small intestine and colon in rats. *J Korean Soc Food Sic Nutr* 33: 505-511.
  42. Maeng KJ, Kim JS, Ji GE, Kim TH. 1997. Isolation of bacteriocin-producing lactic acid bacteria from human intestines and the characteristics of their bacteriocins. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 26: 1228-1236.
  43. Kim GH, Bae EK. 1999. Lactic acid bacteria for the preservation of fruit and vegetable. *J Korean Postharvest Sci Technol*, 6: 245-254.
  44. Auh MS, Kim YS, Ahn SJ, Ahn JB, Kim KY. 2012. Comparison of property changes of black jujube and zizyphus jujube extracts during lactic acid fermentation. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 41: 1346-1355.
  45. Choi YJ. 2009. Development of fermented onion juice using functional lactic acid bacteria. Ewha womans Unicersity, Seoul, Korea.
  46. Wanasundara PKJPD, Shahidi F. 1996. Optimization of hexametaphosphate-assisted

- extraction of flaxseed proteins using response surface methodology. *J Food Sci* 6: 604-607.
47. Abell ML, Braselton JP. 1992. The mathematica handbook: [compatible with mathematica version 2.0]. Academic press Inc., Boston, MA, USA. p 15-511.
  48. Lee SJ. 2015. Quality Characteristics and Antioxidant Effects of Breads added with Peanut Sprout Extract and Powder. *Korean Soc Food Sci Nutr* 28(4), 558-570.
  49. Goldin BR. 1998. Health benefits of probiotics. *J Nutr* 80: S203-207.
  50. Fuller R. 1989. Probiotics in man and animals. *J Bacteriol* 66: 365-378.
  51. Park SJ, Kim DH, Paek NS, Kim SS. 2006. Preparation and quality characteristics of the fermentation product of Ginseng by lactic acid bacteria. *J Ginseng* 30: 88-94.
  52. Park CS, Park KS, Kim ML, Kong HJ, Yang KM. 2013. Effects of medicinal enzyme powder on intestinal mobility, lipid level and blood parameters of loperamide-induced constipation in rats. *Journal of life science* 23: 228-236.
  53. Shin S, Park SS, Lee HM, Hur JM. 2014. Effects of fermented chicory fiber on the improvement of intestinal function and constipation. *J korean Soc Food Sci Nutr* 43: 55-59.
  54. Lee CH, Jang HW, Kim Y, Lee YE. 2017. Effect of pine inner bark(*Song-gi*) powder on relief from constipation in loperamide-induced rats. *J East Asian Soc Diet Life* 27: 548-557.
  55. Park MH, Kwon CJ, Lim SH, Kim KH, H대 NK, Jang HK, Park IJ, Lee KJ. 2011. Effects of dietary fiber isolated from *Synurus deltoides* on constipation in loperamide-induced rats. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 40: 1715-1719.
  56. Cho YS, Kim SI, Han YS. 2008. Effects of slander glasswort (*Salicornia herbacea* L.) extract on improvements in bowel function and constipation relier. *Korean J Food Sci Technol* 40: 326-331.
  57. Kim EY, Cho KA, Ahn SH, Park SS, Son HS, Han SH. 2015. Effect of lactic acid bacteria powder on loperamide-induced constipation in rat. *Korean J Food Nutr* 28: 956-964.
  58. Im JH, Choi JK, Lee MH, Ahn YT, Lee JH, Huh CS, Kim GB. 2011. Effect of function yogurt (R&B Rhythm<sup>®</sup>) on the improvement of constipation in animal models. *Korean J Food Sci Ani Resour* 31: 442-450.
  59. Kim DG, Jin YG, Jin JY, Kim SC, Han CH, Lee YJ. 2011. Effects of the *Antindia chinensis* on loperamide-induced constipation in rat. *Korean J Plant Res* 24: 61-68.
  60. Shin HJ, Kim KO, Kim YA, Lee HS. 2010. Effect of resistant starch on body weight and defecation in loperamide-induced constipated rats. *Korean J Food Sci Technol* 42: 743-749.
  61. Kim JH, Oh HG, Kang YR, Park JW, Moon DI, Seo MY, Park SH, Kang YG, Choe CH, Park IS, Kim J, Yu KY, Kim JK, Kim OJ, Hwang HY, Ryu DG, Lee YR, Lee HY. 2012. Improving effects of *Stichopus Japonicus* on TNBS-induced colitis and loperamide-induced constipation in animal disease models. *Korean J Oriental physiology & pathology* 26: 672-678.
  62. Kim DG, Kang MJ, Seo HJ, Kwon OO, Shin JH. 2016. Effect of *Acacia catechu* extract on 3T3-L1 preadipocyte differentiation. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 45: 1107-1113.

63. Jin KS, Lee SH, Kwon HJ, Kim BW. 2017. Anti-obesity effect of *Salsola collina* ethanol extract. *Journal of life science* 27: 888-895.
64. Oh JW, Lee JH, Lee OH, Kim KH, Kim HR, Lee HK. 2015. Effect of hot water and ethanol extracts from *Nelumbo nucifera* gaertner flower on lipid accumulation and reactive oxygen species(ROS) production in adipogenesis of 3T3-L1 cells. *Korean J Food Preserv* 22: 744-750.
65. Kim JY, Jeong JE, Moon SH, Park KY. 2010. Antiobesity effect of the *Bacillus subtilis* KC-3 fermented soymilk in 3T3-L1 adipocytes. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 39: 1126-1131.
66. Lee YJ, Yoon BR, Choi HS, Lee BY, Lee OH, 2012. Effect of *Sargassum micracanthum* extract on lipid accumulation and reactive oxygen species(ROS) production during differentiation of 3T3-L1 preadipocytes. *Korean J Food Preserv* 19: 455-461.
67. Lee CW, Park YI, Kim SH, Lim HK, Chung MJ. 2016. Antioxidant and anti-adipogenic activities of bread containing corn silk, job' s tears, *Lentinus edodes*, and apple peel in 3T3-L1 preadipocytes. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 45: 651-663.
68. Kang BM, Shim MO, Kim MS, Yoo SJ, Yeo JH, Jung WS. 2017. Anti-obesity effects of barley sprout young leaf on 3T3-L1 cells and high-fat diet-induced obese mice. *Korean J Medicinal Crop Sci* 25: 367-374.
69. Kim DH, Kwon BR, Kim SJ, Kim HJ, Jeong SI, Yu KY, Kim SY. 2017. Anti-obese effects and signaling mechanisms of *Chaenomeles sinensis* extracts in 3T3-L1 preadipocytes and obese mice fed a high-fat diet. *Herbal Formula Science* 25: 457-469.
70. Lim Y, Shin JY, Kim H, Baek GH, Yu KW, Jeong HS, Lee J. 2014. Anti-adipogenic effect of fermented coffee with *Monascus ruber* mycelium by solid-state culture of green coffee beans. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 43: 624-629.
71. Hwang CR, Kang MJ, Shim HJ, Suh HJ, Kwon OO, Shin JH. 2015. Antioxidant and antiobesity activity of various color resources extracted from natural plants. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 44: 165-172.

#### 주 의

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







## 주 의

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