

발간등록번호

11-1543000-001284-01

# 잣나무 잎 정유 추출물 이용 구취 및 구강세균 억제 효능 식품소재개발에 관한 연구

(Development of food materials from  
Korean pine leaf essential oil for enhancing oral sanitation)

(주) 하 티

농림축산식품자료실



0006581

농림축산식품부

# 제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “잣나무 잎 정유 추출물 이용 구취 및 구강세균 억제 효능 식품소재개발에 관한 연구” 보고서로 제출합니다.

2016년 02월 02일

주관연구기관명 : (주)하 티

주관연구책임자 : 한 경 찬

세부연구책임자 : 김 선 영

연 구 원 : 정 낙 원

연 구 원 : 용 종 우

연 구 원 : 윤 정 로

연 구 원 : 허 성 일

# 요 약 문

## I. 제 목

잣나무 잎 정유 추출물 이용 구취 및 구강세균 억제 효능 식품소재개발

## II. 연구성과 목표 대비 실적

연구 목표	연구 실적
잣나무 잎 정유 최적추출조건 확립	추출조건확립 및 잣나무 잎 정유 scale-up
지표성분 선정 및 method validation	지표성분 선정(5개성분) 및 validaion
추출소재의 구취소거 효과 평가	잣나무 잎 정유 소취력 평가
추출소재의 유해구강세균 억제 효과 분석	잣나무 잎 정유 항균력 평가
개발 소재의 안정성 검사	중금속 및 잔류농약 검사 수행
잣나무 잎 정유 식품소재 개발	잣나무 잎 정유 함유 껌 개발 1건
소비자 제품 개발	품목제조신고 1건
지식재산권 확보	특허출원 1건

## III. 연구개발의 최종목표 및 주요내용

### 1) 연구개발의 최종목표

- 잣나무 잎으로부터 추출한 정유를 활용하여 구취 및 구강세균 억제효능의 식품첨가소재 및 제품개발

### 2) 주요내용

- 잣나무 잎 정유를 이용한 식품소재 개발을 위해 추출조건을 확립하고, 정유 추출 공정의 scale-up 및 대량생산공정 적용
- 대량생산공정을 통해 얻어진 잣나무 잎 정유의 기능성은 소취력과 항균력으로 평가하고 중금속 및 잔류농약분석을 통해 안전성 확보
- 소비자 기호도를 기반으로 한 천연컨셉의 껌류 개발

#### IV. 연구개발 내용 및 범위

##### 1) 잣나무잎 정유 최적 추출 공정 개발

- 홍천군 잣나무 간벌지역에서 잣나무 잎 원료 확보
- 추출방법(연속수증기증류추출, 초음파추출, 열수추출)에 따른 잣나무 잎 정유 추출수율 비교 및 소비자 기호도 평가 수행을 통해 최적의 추출방법 설정
- 최종 선택된 추출 조건을 Scale-up하여 산업화에 적용

##### 2) 잣나무잎 정유 소재로부터 지표성분 선정

- GC/MS를 이용하여 잣나무 잎 정유의 휘발성분 분석
- 주요 지표물질 선정

##### 3) 지표성분의 분석법 확립 및 Method validation

- 선정된 지표물질에 대한 특이성, 정확성, 정밀성, 직선성 검증.

##### 4) 개발소재의 구취 제거 효과 분석

- 시료를 ASTM D1988-06의 Standard test method (ASTM D1988-06., 2011)를 응용한 가스검지관법을 통해 소취력을 측정.

##### 5) 개발소재의 유해구강세균 억제 효과 분석

- 잣나무 잎 정유의 항균력은 구강 내 세균 3종과 충치균 2종에 대해 디스크 확산법 (disc diffusion method)으로 항균력 평가

##### 6) 개발소재의 안전성 검사

- 식품 미생물 검사
- 유해중금속(납, 비소, 수은, 카드뮴) 분석
- Zoxamide 외 244종의 잔류농약 분석

##### 7) 잣나무잎 정유 식품소재의 개발

- 잣나무 잎 정유 함유 껌 배합비 개발
- 관능평가를 통한 최종 배합비 설정
- 잣나무 잎 정유 함유 껌 제품 개발 및 품목제조신고

##### 8) 논문 및 특허

- 잣나무 잎 정유를 함유하는 구강 내 위생증진용 조성물에 관한 특허 출원

## V. 연구개발결과

- 잣나무 잎 정유 최적 추출조건 확립 및 생산 공정 scale-up
- 잣나무 잎 정유의 지표성분 선정 및 method validation 검증
- 추출소재의 기능성 및 안전성 평가
- 잣나무 잎 정유를 함유하는 껌 개발
- 개발상품 품목제조보고 및 특허 출원

## VI. 연구성과 및 성과활용 계획

- 전국최대 잣나무 조림지역인 강원도 홍천의 특성상 잣나무 간벌 시 경제적 가치가 없어 버려지는 잣나무 잎을 활용하게 되면 산림 경영자에게는 부가적인 수입을 획득.
- 식품소재 시장에 진입 또는 이를 활용한 다양한 식품 개발로 생산제품의 다각화
- 강원도 문화관광 특산물 확보를 통한 지역인지도 개선 및 부산물 활용을 통한 부가가치 제고와 판로개척과 대량생산을 통한 고용창출.

# CONTENTS

Chapter 1. Introduction .....	7
Chapter 2. The status of domestic and foreign technical development .....	12
Chapter 3. Contents and results of study .....	14
Chapter 4. Purpose achievement and contribution degree on field of the study .....	40
Chapter 5. Achievement of the study and application plan of the results .....	41
Chapter 6. Collected foreign scientific technology information for studying .....	42
Chapter 7. Current status of research installation .....	43
Chapter 8. Reference .....	44

# 목 차

제 1 장	연구개발과제의 개요 .....	7
제 2 장	국내외 기술개발 현황 .....	12
제 3 장	연구개발수행 내용 및 결과 .....	14
제 4 장	목표달성도 및 관련분야에의 기여도 .....	40
제 5 장	연구개발 성과 및 성과활용 계획.....	41
제 6 장	연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보.....	42
제 7 장	연구시설·장비 현황.....	43
제 8 장	참고문헌.....	44

<첨부> 특허, 품목제조신고서

# 제 1 장 연구개발과제의 개요

## 제 1 절 연구개발 필요성

### 1. 연구 배경

- 본사가 위치하고 있는 강원도 홍천지역은 1930년 이후로 잣나무 조림을 시작하여 전국 최대의 잣나무 조림 면적을 가지고 있음
- 매년 잣나무 간벌에 의해서 부산물로 생산되는 잣나무 잎을 활용하여 피톤치드 정유를 생산하고 있으나 시중에서 소비자들이 만날 수 있는 잣나무 정유를 활용하는 응용상품은 다양하지 못함
- 본사의 선행연구를 통하여 잣나무정유의 구강세균억제 및 악취제거 효과를 확인한 바 구강위생을 위한 응용제품의 사업성이 높을 것으로 판단됨
- 산업화에 따른 서구화된 생활습관, 특히 식생활의 서구화에 따른 다량의 당분 섭취로 인하여 우리나라 국민 중 약 10%가 매년 치아우식증(충치)으로 병원 진료를 받고 있으며 진료비 지출이 해마다 소폭 증가하는 것으로 알려져 있음
- 아동 및 청소년의 우식경험영구치지수(DMFT index)는 연도별 조금씩 감소하고는 있으나 2012년도의 조사 결과 8세는 0.67개, 12세는 1.84개, 15세의 경우는 3.26개로 연령이 높아짐에 따라 우식경험지수가 증가하는 것으로 나타났음
- 이는 과자, 빵, 음료수 등 당분이 많은 식품 섭취가 증가하여 발생된 것으로 보이며, 충치는 한번 발생하면 치아가 원상으로 회복되지 않으므로 발병 전 치아 관리가 매우 중요함

표 1. 치아우식증 환자수 및 진료비

년도	2011년	2012년	2013년
환자수 (명)	5,430,811	5,373,550	5,264,778
진료비 (천원)	246,995,133	252,061,852	262,180,000

(건강보험심사평가원 통계자료, 2014)



표 2. 아동 및 청소년의 우식경험영구치지수

	8세	12세	15세
2006년	0.67	2.17	3.59
2010년	0.57	2.08	3.57
2012년	0.67	1.84	3.26

(국민구강건강실태조사, 보건복지부, 2012년)

- 또한 구취는 인체의 구강 내 원인이 되어 발생하는 악취 뿐 만 아니라 위장, 간, 폐 등 구강 이외의 전신 장기로부터 나오는 악취 중 구강을 통해서 나오는 불쾌한 냄새를 말하며, 일시적 또는 지속적으로 구강을 통해 발산 되는 불쾌한 냄새로서 많은 사람이 느끼는 불만요인임
- 구강 내 원인이 대부분 구취 유발을 일으키며, 구강 내 원인으로 인한 구취는 치아나 타액의 성분 등과 같은 숙주요인과 음식 잔유물 등이 세균에 의해 부패된 결과로 나타나게 되며, 그 원인으로서는 타액분비감소, 구내염, 치주질환, 부적절한 보철물, 혀 부위에 과도한 미생물 침착 등을 들 수 있음
- 또한, 자극성 음식 섭취나 흡연, 음주 그밖에도 타액점조도의 증가, 수소이온농도 완충능력 감소, 구강 미생물의 양과 활동성 증가 및 혀의 배면에 부착된 설태와 치료되지 않은 치아우식증, 치은염 및 치주염 등과 같은 구강병, 구강암 등이 구취 발생을 유발하는 요인으로 작용됨
- 특히 치은염 및 치주질환 환자수와 진료비는 매년 증가하고 있는 것으로 나타나 구취에 의한 불편함을 느끼는 사람이 많을 것으로 예상되며, 구취가 심할 경우 대인관계나 사회활동에 상당한 장애요소가 되고 있음

표 3. 치은염 및 치주질환 환자수 및 진료비

년도	2011년	2012년	2013년
환자수 (명)	8,039,811	8,430,492	10,279,249
진료비 (천원)	441,945,440	493,637,954	663,697,000

(건강보험심사평가원 통계자료, 2014)

## 2. 기존 연구의 문제점

- 구강 내 질환은 정상 세균총 중 특정 미생물 군이 증식하면 발병되는 것으로, 대표적 구강감염성 질환인 치아우식증과 치주질환을 비롯해, 치수 및 치근단 감염, 구강안면 조직 또는 악골감염 등, 구강악안면 영역에서 일어나는 대부분의 질환이 입안에 항상 존재하는 미생물에 의한 감염인 것으로 알려져 있음
- 이 중 치주질환은 복합세균감염으로 치주조직의 파괴와 골 흡수를 일으켜, 치아를 잃게 만드는 주요인으로서, 넓은 연령층에 높은 빈도로 발생하여 구강보건을 위협하고 있을 뿐만 아니라, 심혈관질환 및 당뇨병과 같이 전신적 질환과도 밀접한 관계가 있는 것으로 알려져 있고, 치주질환이 있는 산모에서 저체중아 및 조산율이 증가하는 것으로 보고되고 있음
- 또한 구취는 설태, 단백질 대사과정에서 생성된 물질, 각종 치과질환, 구강 내 감염, 구강건조증, 비위생적 보철물에 의한 것으로 알려져 있으며, 이중 가장 높은 비중을 차지하는 것은 혀 표면에 세균, 음식물 찌꺼기, 죽은 구강상피세포 등에 의한 설태와 음식물, 입안 출혈, 입안의 상피세포가 떨어진 것 등 단백질 성분이 분해되는 과정에서 구강 내 세균으로 인한 휘발성 화합물에 의한 것이 대표적인 구취 유발 물질임
- 구강 내 세균 중 질환을 유발시키는 원인균은 *Streptococcus mutans*, *S. sanguis*, *S. mitior*, *S. salivarius*, *S. milleri* 등으로 알려져 있으며, 이 중 *S. mutans*은 치아에 만연하고 있으며 치석에서 발견되고, 특히 인간 치아의 탈회화된 부근에서 발견되고 있어 주요 원인균으로 알려져 있음
- 또한 *S. sanguis* 와 *S. mitior*는 치아에 주로 서식하고 있으나 구강 질환과 이들 균의 밀도와는 일정한 경향이 없어 *S. mutans*보다는 덜 위험한 충치균으로 간주되고 있는 실정이나 이들 균은 sucrose를 이용하여 치석의 원인이 되는 글루칸을 형성하는 것으로 알려져 있음
- *S. salivarius*는 sucrose로부터 레반(levan; fructan)을 만들어 치아의 탈회화 작용을 일으키는 산 형성에 도움을 주고 있으며, *S. milleri*는 sucrose로부터 세포외 다당체를 만들어 내지 못하고, 과산화물도 만들어 내지 못하지만 구강 질환과 연관 되어 있다고 알려져 있음
- 구강 질환의 대표적인 치석은 *S. mutans*는 세포외로 glucosyltransferase(GTF;

sucrose 6-glucosyltransferase, EC 2.4.1.5)라는 효소를 분비하는데 GTF는 sucrose를 이용하여 부착력을 갖는 세포의 다당류인 글루칸(glucan)을 합성하여 치석형성의 원인을 생성함

- 구강세균 증식 및 GTF, 구취억제 소재 연구는 크게 나누어 천연유래 소재와 화학적 합성에 의한 소재로 나누어져 있는데 먼저 천연 유래 소재에 대해 살펴보면, propolis, polyphenol, pro-anthocyanidin 등은 구강세균 증식억제와 GTF 활성억제를 나타내는 것으로 보고되어 있음

표 4. 주요 천연물의 구강질환 유발 세균의 생육억제 및 GTF 활성억제 효과

원료명 (식물명)	유효 추출물질	<i>S. mutans</i> 생육억제 (MIC, ug/ml)	GTF 활성 억제	출처
Bee glue	Propolis	O (8-64)	X	Uzel et al.(2005)
Green tee	Polyphenols	O (250-500)	O	An et al.(2004), Limsong et al.(2004)
Magnolia spp.	Magnolol	O (31.3)	O	이 등(1998), Huang et al.(2006)
Theobroma cacao	Polyphenols	X	O	Kim et al.(2004)
Allium sativum	Water extract	O	X	Bakri & Douglas(2005)
Red grape husk	Polyphenols	X	O	안 (2001)
Coptis chnensis Franch	Water extract	O (200)	O	장 등 (2000)
Larix spp.	Proanthocyanidin	X	O	Mitsunaga et al.(1997)

- 구취 억제 관련 천연소재는 유산균, 오미자, 키토산, 사과추출물, 해조류추출물, 생강추출물, propolis 등이 대표적인 구취억제 천연소재로 알려져 있음. 특히 유산균 중에서 휘발성 유황화합물을 생성하는 혐기성 세균과 잘 결합할 수 있고 유산을 적게 생성하는 *Weissella cibareia* 균주에 관한 연구는 일반식품(분말형 유산균 제품), 건강기능식품(구취억제용 껌), 의약외품(구강청정제 및 치약)으로 적용이 가능한 것으로 알려져 있으며, propolis는 대부분 치약 관련 제품에 첨가되어 있음
- 자일리톨은 천연의 당알콜계 감미료로 추잉껌, 제과, 의약품 및 구강위상제품 등 다양한 무설탕(무당질) 제품에 널리 사용되는데, 임상실험을 통하여 자일리톨을 함유한 추잉껌이나 사탕과 같은 제과류의 꾸준한 섭취가 충치발생률을 감소시킨다는 사실이 밝혀졌음

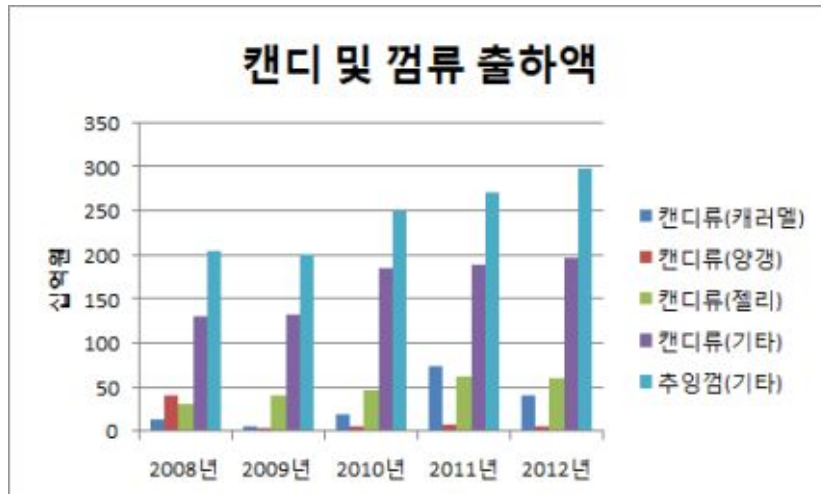
- 그러나 매일 5g씩 꾸준히 (1년 이상) 섭취해야 충치발생률을 감소시킬수 있다는 단점이 있으며, 껌이나 정과류의 경우 과당과 유당 등 발효성 당류는 포함되지 않아야 하며, 사용하는 감미료가 전부 비발효성 당류이어야 하며 그 중 자일리톨 함량이 50% 이상이어야 그 효과가 나타나는 것으로 알려져 있어 과자나 음료같은 제품에 사용은 제한적임.
- 화학적 합성 소재의 경우 불소류, 칼슘류, 항염제류, 금속이온봉쇄제 등이 널리 사용되고 있으며, 불소류는 ‘일불소인산나트륨이나 불화나트륨’이 대표물질이며, 칼슘류에는 ‘글리세로인산칼슘’, 항염제류는 ‘염화나트륨·초산토코페롤·염산피리독신·알란토인·트라넥사민산’, 금속이온봉쇄제는 ‘피로인산나트륨’등이 대표적으로 사용되고 있으나 대부분 치약에 포함되는 화합물로서 식품 첨가 소재로서 사용이 제한적이라는 단점을 가지고 있음

### 3. 개발의 필요성

- 구강질환 및 구취제거 관련 연구는 추출물 수준에서 널리 연구되어 왔고, 일부 효능이 확인된 천연유래 소재가 있지만, 사용량, 원재료 확보, 가격경쟁력 측면에서 볼 때 화학적 화합물에 비해 낮은 가능성을 보이고 있으며, 일부 효능이 뛰어난 소재 역시 가능성을 나타내는 용량이 너무 커 현재는 일부 첨가되는 수준에 머물러 있음
- 또한 화학적 화합물의 경우 높은 활성, 가격경쟁력 측면에서 일부 긍정적인 효과를 보이고 있지만, 앞서 기술한 대로 식품 첨가 소재로서 사용하기에는 관능적인 측면과, 소비자의 기대 심리에는 부합하지 않는 것으로 나타나 천연물 유래의 소재인 동시에 높은 활성, 적당한 가격경쟁력을 지닌 소재에 대한 연구의 필요성이 절실한 실정임
- 피톤치드(phytoncide)는 식물을 수증기 증류하거나 압축하여 얻는 추출액인 정유(essential oil)의 휘발성 방향성분을 말하며, 이들 휘발성분들은 식물 종류에 따라 수십종에서 많은 것은 200여 종에 달하며 phenolics, terpenoid, alkaloid, phenylpropane, acetogenin, steroid 등의 유기화합물로 구성되어 있음
- 피톤치드는 미생물 등의 외부 공격으로부터 수목 자신을 보호하는 역할을 하는 것으로 알려져 있고, 다양한 식물에서 추출된 피톤치드 또는 정유는 광범위한 미생물에 대해 항균효과가 있는 것으로 보고되고 있으며, 치아우식증이나 치주염, 기타 구강감염질환의 원인균들에 대한 정유의 항균효과를 관찰하는 연구가 활발히 이루어지면서 이들 질환을 예방하거나 진행을 억제하는 목적으로 사용할 수 있는 항균제 후보 물질들이 속속 보고되고 있음

## 제 2 장 국내외 기술개발 현황

- 캔디류와 껌류에서 큰 비중을 차지하는 캔디류(기타)의 경우 2008년도에 129십억 원에서 2012년도에 197십억 원으로 50% 가량 증가하였고, 추잉껌(기타)의 경우 2008년도에 205 십억 원에서 2012년도에 299십억 원 규모로 45% 가량 증가하는 등 국내 시장은 꾸준히 증가하는 추세를 나타내고 있음



- 올리고당류에서 기능성이 인정된 프락토 올리고당은 2008년도에 55억 원에서 2012년도에 182억 원으로 3.3배 가량 출하액이 증가함
- 충치예방 효과로 껌과 캔디류에 사용되고 있는 자일리톨의 국내 출고액은 2012년도에 4.9 억원으로 2008년도의 4.3억 원에 비해 소폭 상승한 것으로 나타났지만, 한국바이오산업협회의 자료(이메일 바이오 정보, 2008년)에 의하면 국내 자일리톨 시장규모는 2005년도에 약 200억 원에서 2015년에는 약 2,000억원 규모로 성장할 것으로 전망
- 자일리톨의 국내 생산규모가 크지 않은 것은 DaniscoCoulter사는 전세계 자일리톨 시장의 80%를 점유하고 있는 사실상의 독점기업이며 국내뿐만 아니라 해외 대부분의 기업에서도 동사의 자일리톨을 수입하여 제품에 활용하고 있는 실정임
- 과자류와 음료류의 시장성장으로 인하여 착향료의 사용량 또한 증가하고 있는데, 합성착향료의 경우 2008년도에 6.94억 원에서 2012년 50.9억 원으로 약 7배의 성장을 나타냈으며, 천연착향료의 경우 2008년도에 2억 원에서 2012년도에 144.6 억원으로 66배의 성장률을 나타내어 최근 건강에 관심이 많은 소비성향이 첨가제 시장에서도 그대로 나타나고 있음.

(출하액 : 천원)

품목	2008년	2009년	2010년	2011년	2012년
프락토올리고당	5,505,054	9,601,511	13,002,981	16,381,482	18,211,790
자일리톨	432,484	1,052,002	365,519	471,428	490,669
합성착향료	694,213	4,428,467	8,607,037	21,486,454	5,093,439
천연착향료	217,466	712,635	14,332,840	3,099,473	14,459,153

(식품 및 식품첨가물 생산실적, 식품의약품안전처, 2013)

## 제 3 장 연구개발 수행 내용 및 결과

### 제 1 절 연구개발 수행 내용

#### 1. 잣나무 잎 정유 최적 추출조건 확립

##### 가. 잣나무 잎 원료 확보

- 잣나무 잎은 홍천군 산림과와 홍천군산림조합의 협조를 얻어 잣나무 간벌지역인 홍천군 북방면 구만리, 서면 일대에서 잣나무 잎 약 50kg을 채취하였다.



그림 1. 잣나무 간벌지역 잣나무 잎 채취

##### 나. 잣나무 잎 정유 추출

- 잣나무 잎 정유의 최적추출조건을 확립하기 위해 채취된 잣나무 잎은 연속수증기증류추출, 초음파추출, 열수추출 후 수율 및 기호도 평가를 통해 최적추출조건을 확립하였다.

#### 1) 연속수증기증류추출(simultaneous steam distillation extraction, SDE)

- 연속수증기증류추출은 sample-flask에 잣나무 잎 200g과 증류수 200ml를 넣고, solvent-flask에는 diethyl ether 100ml를 넣은 후 10시간 가열하여 휘발성 정유와 증류수가 기화되어 나오는 것을 냉각시켜 수기에 받는다. 수기에 받아진 추출물은 수층과 ether층을 분리하기 위해 separated funnel에 넣고 약 1시간 방치 후 ether층만을 분리하였다. 분리된 ether층은 일정량의 sodium sulfate, anhydrous( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ )를 넣어 24시간 탈수시킨 다음 여과 후 농축시켜 정유성분만을 얻었다.

## 2) 초음파 추출(ultrasonic extraction, UE)

- 초음파 추출은 sample-flask에 잣나무 잎 200g과 증류수 200ml를 넣고, 70°C에서 10시간 추출하였다. 추출물은 여과 후 24시간 방치하여 층분리를 시킨 후 정유만을 분리하여 잣나무 잎 정유를 얻었다.

## 3) 열수 추출(water extraction, HE)

- 초음파 추출은 sample-flask에 잣나무 잎 200g과 증류수 200ml를 넣고, 80°C water bath에서 10시간 추출하였다. 추출물은 여과 후 24시간 방치하여 층분리를 시킨 후 정유만을 분리하여 잣나무 잎 정유를 얻었다.

### 다. 추출방법에 따른 잣나무 잎 정유 향취 평가

- 잣나무 잎 정유의 기호도 평가는 패널 15명을 대상으로 스멜링 스트립(smeling strip)에 잣나무 잎 정유 몇 방울 묻혀서 후각으로 향을 느끼게 한 후 5점 척도법(5 : 매우 좋다. 4 : 좋다 3 : 보통이다 2 : 안좋다 1 : 매우 안좋다)에 따라 향취의 신선함(fresh, 자극적이고 활기찬 느낌), 향취 강도, 종합적 기호도를 평가하였다.

### 라. 잣나무 잎 정유 대량생산

- 잣나무 잎 정유 추출을 scale-up하여 산업화가 가능할 수 있도록 산업용수증기추출기를 사용하여 추출하였다. 잣나무 잎 45kg/생체중을 산업용 수증기증류추출기에 원료를 투입한 후 추출기 내부 압력을 1~1.2기압까지 도달시키고, 10시간동안 추출을 진행하였다. 추출은 정제수를 가열시켜 증기발생을 유도하고 발생된 수증기는 냉각관을 통과하면서 액화되어 포집관에 모이고 층분리된 정유만을 분리하여 잣나무 잎 정유를 얻었다.

## 2. 잣나무 잎 정유 지표성분 분석 및 유효물질 선정

### 가. 잣나무 잎 정유 성분분석

- 대량생산된 잣나무 잎 정유의 성분은 GC-MS (Agilent 7890/5975 GC/MSD)를 이용하여 정성분석하였으며 분석조건은 아래의 표 1과 같다. Column은 HP-5MS(30m x 0.25mm x 0.25 $\mu$ m, Agilent)를 장착하였으며, 40°C에서 60분간 유지한 후 분당 2°C씩 승온하여 250°C까지 상승시키고 이 온도에서 20분간 유지하였다. 주입부의 온도는 250°C로 설정하였고 carrier gas는 He gas(1ml/min)을 이용하였다. 화합물의 동정은 GC-MS로 얻은 mass spectrum을 탑재된 라이브러리를 활용하여 성분을 확인하였다.



표 1. GC-MS 분석조건

구분		조건
Gas Chromatograph/ Mass Selective Detectors		Agilent 7890A/5975C inert XL GC/MSD (7693 Autosampler 부착)
Column		Agilent HP-5ms (30m x 0.25mm x 0.25 $\mu$ m)
Carrier gas	Helium	1.0ml/ min,
Injector temp.		250 $^{\circ}$ C
Interface temp.		280 $^{\circ}$ C
Oven temp.		40 $^{\circ}$ C(60min) $\rightarrow$ 2 $^{\circ}$ C/min 승온 $\rightarrow$ 250 $^{\circ}$ C(20min)
Injection volume		1

나. 지표성분 validation

- 잣나무 잎 정유 성분분석의 결과를 바탕으로 선정된 유효물질 5가지((+)- $\alpha$ -Pinene, (+)- $\beta$ -Pinene, Myrcene, 3-Carene, (R)-(+)-Limonene)에 대해 분석방법의 타당성을 검증하고자 분석법 밸리데이션을 진행하였다. Method validation은 성분분석과 동일하게 GC-MS로 진행하여 기기분석조건을 확립하여 지표물질 5종을 분석하기 위한 확립된 분석방법을 검증하고자 분석법 밸리데이션을 진행하였다.

1) 표준원액

- 표준물질 5종((+)- $\alpha$ -Pinene, (+)-Pinene, Myrcene, 3-Carene, (R)-(+)-Limonene)을 약 25 mg 칭량하여 최종 농도가 약 1000 ppm이 되도록 isooctane를 이용하여 용해시킨다.

ID	STD (mg)	Final volume with D.W (mL)	Final Conc. (ppm)
(+)- $\alpha$ -Pinene	25	25	1000
(+)- $\beta$ -Pinene	25	25	1000
Myrcene	25	25	1000
3-Carene	25	25	1000
(R)-(+)-Limonene	25	25	1000

2) 검량선용 표준용액

- 표준물질 5종에 대한 조제된 표준원액으로 검량범위의 검량선(L1~L5)을 아래와 같이

조제한다.

ID	Aliquot (mL)	Final volume with diluent (mL)
L5	1 ml from 표준원액	4
L4	2 ml from L5	4
L3	2 ml from L4	4
L2	2 ml from L3	4
L1	2 ml from L2	4

### 3) 정확성/정밀성

- 다섯 농도의 표준물질은 정밀성 시료로 사용한다. 정확성 및 정밀성 시료는 검량선용 표준용액과 동일하게 조제한다.

ID	Aliquot (mL)	Final volume with diluent (mL)
AP5-1	1 ml from 표준원액	4
AP4-1	2 ml from L5	4
AP3-1	2 ml from L4	4
AP2-1	2 ml from L3	4
AP1-1	2 ml from L2	4

### 4) 기기분석조건

구분	조건	
Gas Chromatograph/ Mass Selective Detectors	Agilent 7890A/5975C inert XL GC/MSD (7693 Autosampler 부착)	
Column	Agilent HP-5ms (30m x 0.25mm x 0.25 $\mu$ m)	
Carrier gas	Helium	1.0ml/ min,
Injector temp.	250 $^{\circ}$ C	
MS ion source temp.	230 $^{\circ}$ C	
Oven temp.	40 $^{\circ}$ C(60min) $\rightarrow$ 20 $^{\circ}$ C/min 승온 $\rightarrow$ 230 $^{\circ}$ C(0min)	
Injection mode	split, 20:1	
Data setting	Mass spectra	EI(Electron Impact) Mode 70eV.
	Scan range	50~550amu

## 5) 분석법 밸리데이션 항목

### ① 특이성(Specificity)

- 특이성은 시료에 다른 성분이 존재할 경우 분석성분이 분리되고 정량할 수 있는 분석법 인지에 대한 평가를 의미한다. 특이성은 공시료를 측정하고 시험물질인 잣나무 잎 정유 시료를 주입하여 평가된다. 분석물질의 용리되는 구간은 간섭피크에 영향을 받지 않아야 한다.

### ② 직선성(Linearity)

- 시험법의 직선성이란 검체 중 분석대상물질의 농도에 비례하여 일정 범위 내에 직선적인 측정값을 얻어낼 수 있는 능력을 말한다. GC-MS로 분석하여 얻은 결과로 검량선을 작성한 후, 상관계수(Coefficient of correlation, r)를 구한다.

적합기준: 작성된 검량선의 상관계수(coefficient of correlation, r)는 최소 0.99 이상이어야 한다.

### ③ 검출한계(Limit of detection, LOD) 및 정량한계(Limit of quantitation, LOQ)

- 표준물질 5종을 단계적으로 희석하여 각 농도별로 검출한계 및 정량한계를 확인한다.

### ④ 정확성 및 정밀성(Accuracy and Precision)

- 정확성은 시료의 이론 농도값에 대한 설정된 분석법에 따라 측정된 분석값의 근접도로 정의되며, 백분율(Recovery %)로 표현된다. 일내 정확성(Intra-accuracy)은 칭량되어 조제한 5가지 농도의 정확성 시료를 각 농도당 3번 반복 측정하여 평가된다.

- 정밀성은 반복 측정된 각 개개의 측정값의 근접도로 정의되며, 변동계수(Coefficient of variation, CV %)로 표현된다. 일내 정밀성(Intra-precision)은 칭량되어 조제한 5가지 농도의 정확성 시료를 각 농도당 3번 반복 측정하여 평가된다.

적합기준: 여러 개 성분에 대한 동시분석의 경우 각 농도에서 변동계수는  $\pm 20\%$ 이내이어야 한다.

## 6) 데이터 처리

- 분석장비의 운용프로그램을 이용해 크로마토그래피 데이터를 얻는다. 5가지((+)- $\alpha$ -Pinene, (+)- $\beta$ -Pinene, Myrcene, 3-Carene, (R)-(+)-Limonene) 지표성분의 피크면적비를 y축으로, 각각의 검량선용 표준물질의 농도를 x축으로 하여 회귀방정식을 사용해 검량선을 작성한다. 검량선 피팅으로부터, 상관계수(r), y절편, 기울기 및 역환산한 농도를 산출한다.

## 7) 데이터 저장

- 모든 시험물질 및 분석과 관련된 내용은 연구노트에 남기고, GC-MS 시스템으로부터 발생한 기초자료는 데이터 파일로 저장되어진다.

### 3. 잣나무 잎 정유 소취력 및 향균력 평가

#### 가. 잣나무 잎 정유 소취력 평가

##### 1) 악취물질 제조

- 잣나무 잎 정유의 소취력 평가에 사용된 악취물질은 총 4종으로, ammonia(25%, Wako, Japan), formaldehyde(40%, Duksan, Korea), trimethylamine(30%, Junsei, Japan)은 각각 3차 증류수로 희석하여 시험액을 제조하였으며 methylmercaptan(standard solution, Wako, Japan)은 원액을 사용하였다. 악취 잔류가스를 측정하는 검지관으로는 ammonia 검지관(No. 3La, Gastec, Japan, 측정범위 : 0~100 ppm, 측정시간 30 sec/pump stroke, 색 변화 : purple→yellow), formaldehyde 검지관(No. 91, Gastec, Japan, 측정범위 : 5~100 ppm, 측정시간 1 min/pump stroke, 색 변화 : white→brown), trimethylamine 검지관(No. 180, Gastec, Japan, 측정범위 : 5~100 ppm, 측정시간 : 1 min/pump stroke, 색 변화 : yellow→brown), methylmercaptan 검지관(No. 71, Gastec, Japan, 측정범위 : 2.5~70 ppm, 측정시간 : 2 min/pump stroke, 색 변화 : white→yellow)이 사용되었다.

##### 2) 소취력 평가

- Ammonia, formaldehyde, trimethylamine, methylmercaptan 등 4종의 대표적인 악취 물질을 대상으로 ASTM D1988-06의 Standard test method(ASTM D1988-06., 2011)를 응용한 가스검지관법 잣나무 잎 정유 소취력을 측정하였으며 대조구로는 녹차추출물을 사용하였다. 소취력 평가는 500 mL 삼각플라스크에 밀폐가 가능하도록 고무마개를 끼운 후 검지관의 출입이 가능하도록 구멍을 뚫고 희석된 악취 시험액을 플라스크 안으로 주입하여 악취를 유발시켰다. 악취 발생 30분 후 초기농도를 측정하여 최대 농도를 맞추고 동일한 양의 정유를 각각 주입하여 10분, 20분, 30분, 1시간 단위로 플라스크 내 악취 잔류가스를 가스검지기(GV-100S, Gastec, Japan)를 이용하여 비교·분석하였다. 모든 실험은 3회 반복하였다.

#### 나. 잣나무 잎 정유 향균력 평가

##### 1) 사용균주 및 배양조건

- 항균활성 실험에는 총 3종의 구강 내 세균과 2종의 충치균이 사용되었다. 구강 내 세균인 *Lactobacillus paracasei*(ATCC 25302), *Staphylococcus aureus*(ATCC 25923), *Enterococcus faecalis*(ATCC 29212)는 ATCC(American Type Culture Collection)에서 분양 받았으며, 충치균인 *Streptococcus mutans*(KCTC 3065), *Streptococcus sobrinus*(KCTC 3288)는 한국생명공학연구원 생물자원센터(BRC)에서 분양 받아 사용하였다. 먼저 *L. paracasei*(ATCC 25302)는 Lactobacilli MRS broth(MRS), *S. aureus*(ATCC 25923)는 Trypticase Soy Broth(TSB), *E. faecalis*(ATCC 29212)는 5% seep blood가 포함된 Trypticase Soy Broth(TSB), *S. mutans*(KCTC 3065)와 *S. sobrinus*(KCTC 3288)는 Luria bertani media Broth(LB) 배지를 이용하여 전배양하였다. 전배양된 균주는 다시 평판배지에 도말하였으며 *L. paracasei*(ATCC 25302)는 MRS, *S. aureus*(ATCC 25923)는 Trypticase Soy Agar(TSA), *E. faecalis*(ATCC 29212)는 5% seep blood가 포함된 Trypticase Soy Agar(TSA) 배지에서 37℃, 호기적 조건으로 배양되었다. *S. mutans*(KCTC 3065)와 *S. sobrinus*(KCTC 3288)는 Brain Heart Infusion(BHI) 배지를 사용하여 37℃, 혐기적 조건에서 배양하였다.

## 2) 항균력 평가

- 먼저 공시 균주를 사면배지에서 3회 계대배양하여 활성화시킨 후 각 균주용 액체배지에 무균적으로 1백금이 접종하여 진탕배양기(Shaking incubator WIS-10R wisecube)에서 24시간 배양한 후 분광광도계를 이용하여 흡광도가 0.1(600 nm)이 되도록 멸균증류수로 현탁시켜 시험균액으로 사용하였다. 항균 활성은 paper disc(직경 8 mm)를 이용한 디스크 확산법(disc diffusion method)으로 측정(Piddock., 1990)하였다. Petri dish에 배지를 15 mL씩 분주하여 응고시키고, 배양된 각 균주를 멸균한 도말봉을 이용하여 100 µL씩 도말하여 준비하였으며, 이 배지 위에 멸균된 paper disc를 올려놓고 밀착시킨 후 미리 0.45 µm membrane filter로 체균시킨 정유를 25 µL씩 흡수시키고 37℃에서 24시간 배양하여 디스크 주변에 형성된 저해환의 크기(clear zone, mm)를 측정하였다.

## 4. 잣나무 잎 정유 안전성 평가

### 가. 식품미생물 검사

- 일반세균 및 대장균군은 식품공정 시험법 중 건조필름법에 따라 수행하였다. 시험용액 1ml과 각 10배 단계 희석액 1ml을 세균수 및 대장균군 건조필름배지에 접종한 후 24~48시간 배양한 후 생성된 붉은 집락수를 확인하였다.

나. 잔류농약 분석

- 잣나무 잎 정유의 안전성 평가를 위해 Zoxamide 외 잔류농약 244종에 대해서 정량분석을 실시하였다. 정량분석은 농약품목등록시험연국기관(랩프런티어)에 의뢰하여 잣나무 잎 정유의 잔류농약 검사를 실시하였다.

다. 중금속 분석

- 잣나무 잎 정유의 중금속분석은 유해중금속 4종(납, 타드륨, 비소, 수은)에 대해 정량분석을 실시하였다. 납, 타드륨, 비소의 시험용액 제조는 습식분해법 중 마이크로웨이브법으로 전처리를 수행하였다. 검체를 일정량 취하여 질산 7ml 및 증류수 3ml로 처리하여 microwave로 분해하고 메스플라스크에 옮겨 일정량 정량 후 시험용액으로 사용하였으며 시험용액의 분석은 ICP-MS로 수행하였다. ICP-MS 분석 조건은 표 0와 같다. 수은 분석은 Mercury analyzer로 분석하였으며 분석 조건은 표 2,3와 같다

표 2. ICP-MS 분석 조건

분석조건	
ICP-MS	As 75(amu)
	Cd 111(amu)
	Pb 208(amu)
RF power	1550(W)

표 3. 수은분석기 분석 조건

분석조건				
Oxy flow	300ml/min			
Drying	Temp.	300℃	Time	300sec
Catalyst	Temp.	600℃	Time	120sec
Amalgamator	Temp.	600℃	Time	30sec
Decomposotion	Temp.	800℃	Time	300sec

## 5. 잣나무 잎 정유를 함유하는 가공식품 개발

### 가. 잣나무 잎 정유 함유 껌 배합비 개발

- 잣나무 잎 정유 함유 껌 배합비는 원재료 및 부재료 선정 후 배합비를 달리하여 3type의 껌 배합비를 설정하였으며, 관능평가를 통해 최종 배합비를 선정하였다.

### 나. 잣나무 잎 정유 함유 껌 제품개발

- 최종배합비 선정 후 시제품은 껌 및 캔디류 전문 제조업체인 (주)대영식품에 의뢰하여 시제품을 제조하였다. 제조된 시제품에 대해서는 품목제조신고를 진행하였고, 용기 디자인 개발 후 시제품 제조를 완료하였다.

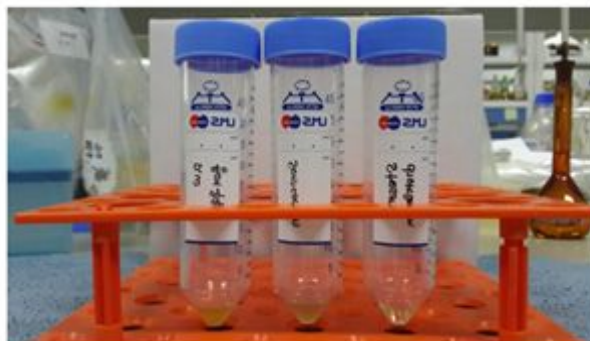
## 제 2 절 연구개발 결과

### 1. 추출방법에 따른 잣나무 잎 정유 추출 수율 비교

- 잣나무 잎 정유의 추출 수율은 추출 방법에 따라 차이를 보였다. 추출방법에 따라 0.303%~0.406%의 수율을 나타내었으며 초음파추출(ultrasonic extraction, E) 시 0.406%로 가장 높은 추출 수율을 보였고, 열수 추출, 연속식수증기증류추출 순으로 추출 수율을 나타내었다.

표 4. 추출방법별 잣나무 잎 정유 추출수율

추출 방법	추출수율(%)
연속식수증기증류추출(simultaneous steam distillation extraction)	0.303
초음파추출(ultrasonic extraction)	0.406
열수추출(water extraction)	0.346



### 2. 잣나무 잎 정유 향취평가

- 각각의 추출방법에 따라 얻어진 잣나무 잎 정유에 대해 패널 15명을 대상으로 향취 선호도, 향취 강도 및 종합적 기호도에 대한 향취 평가를 진행하였다. 향취 강도는 추출수율이 가장 높았던 초음파추출 잣나무 잎 정유가 높았던 반면, 연속식수증기증류추출로 얻어진 잣나무 잎 정유는 다른 정유에 비해 fresh한 느낌이 높아 향취 선호도 및 종합적 기호도에서 가장 우수하게 나타내었다.

표 5. 잣나무 잎 정유 향취평가

구 분	연속식수증기증류추출	초음파추출	열수추출
향취 선호도	4.5	4.1	4.0
향취 강도	4.3	4.5	4.2
종합적 기호도	4.5	4.1	4.0





그림 2. 추출방법에 따른 잣나무 잎 정유 향취평가

### 3. 잣나무 잎 scale-up 정유 추출

- 식품소재로 사용될 잣나무 잎 정유 대량추출은 추출수율, 기호도 평가, 식품산업에 적용가능성 등을 고려하여 수증기증류로 추출이 가능한 산업용스팀추출기를 이용하여 잣나무 잎 정유를 추출하였다. 잣나무 잎 45kg을 투입 후 10시간 수증기증류추출을 하여 260ml의 잣나무 잎 정유를 수득하였고 추출 수율은 0.57%로 나타났다.

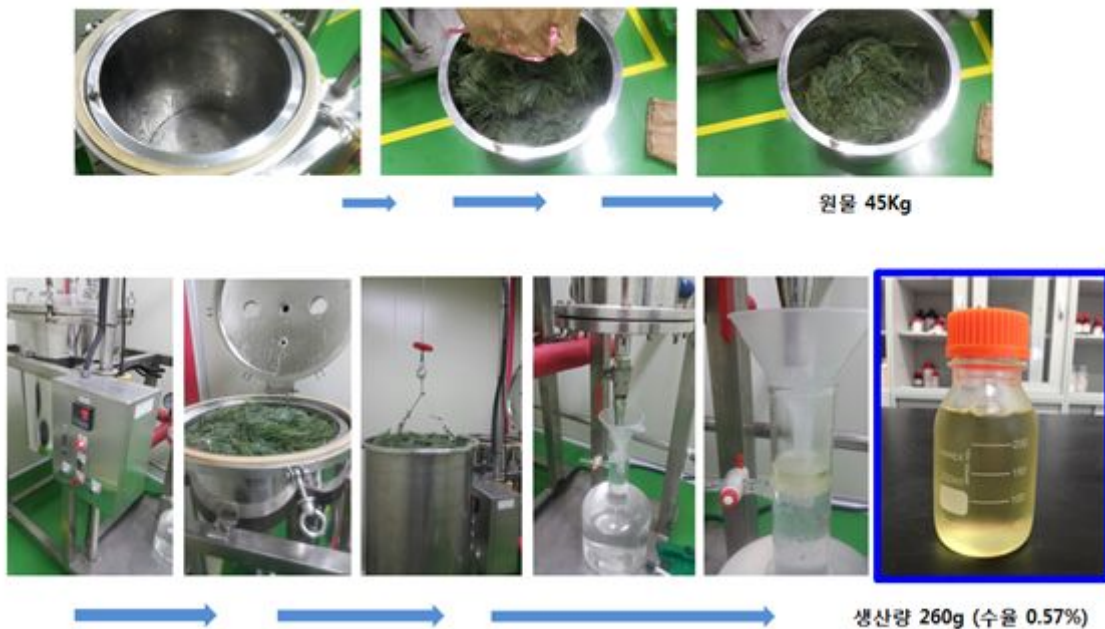


그림 3. 산업용스팀추출기를 활용한 잣나무 잎 정유 추출

- 산업용스팀추출기를 이용하여 잣나무 잎 정유 추출 시 연속식수증기증류추출에 비해 추출 수율이 높았으며 이는 고온고압의 증기로 인해 잣나무 잎 세포벽을 효율적으로 파괴시켜 추출수율이 높아진 것으로 사료된다.

#### 4. 잣나무 잎 정유 성분분석

- 잣나무 잎 정유를 GC-MS로 분석한 결과는 그림 4와 같으며 그 중 전체 함량의 1% 이상을 차지한 성분들은 Table 2에 나타내었다. 각 스펙트럼의 성분확인에는 분석장비에 탑재된 라이브러리를 활용하여 성분확인 하였다. 분석 결과 잣나무 잎 정유의 화학성분 중 Camphene이 20.85%로 가장 높은 비중을 차지하고 있는 것으로 보였으며, 다음으로는  $\beta$ -Myrcene(17.81%), 3-Carene(13.86%),  $\beta$ -Pinene(11.25%),  $\alpha$ -Pinene(10.51%) 등의 성분들이 높은 비중을 차지하고 있으며, terpene hydrocarbon류가 대부분을 구성하고 있었다.

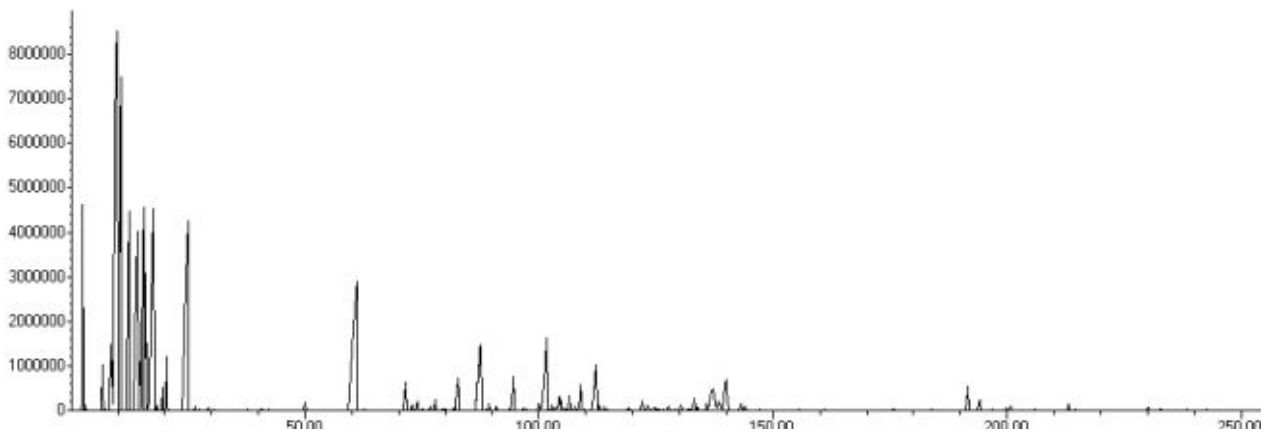


그림 4. GC-MS spectrum of essential oil from P. koraiensis.

- 잣나무 잎 정유의 화학성분 중  $\alpha$ -Pinene과  $\beta$ -Pinene은 소나무(coniferous)향, 박하(minty)향을 나타내는 것으로 알려져 있으며, 3-Carene은 D-Limonene과 유사한 coniferous, 오렌지(citrus)향, 달콤한(sweet)향, 허브(Herbal) 향취를 나타내어 전반적으로 이들 향취를 조합으로 인해 잣나무 잎 정유만의 상쾌하고 독특한 향취를 가지는 것으로 알려져 있다. (Evaluation on Deodorization Effect And Anti-oral Microbial Activity of Essential Oil from Pinus koraiensis, 2014. 27, 001-010)

표 6. 잣나무 잎 정유 성분분석 결과

No.	Compounds	R.T (min)	Content (%)
1	Camphene	10.58	20.85
2	$\beta$ -Myrcene	13.87	17.81
3	3-Carene	15.28	13.86
4	$\beta$ -Pinene	12.18	11.25
5	$\alpha$ -Pinene	9.77	10.51
6	Naphthalene	108.89	7.01
7	(+)-4-Carene	15.97	4.51
8	$\alpha$ -Caryophyllene	94.54	2.36
9	D-Limonene	17.62	2.10
10	$\alpha$ -Phellandrene	14.69	2.03
11	Bicyclo[4.1.0]heptane	213.31	1.84

12	Tricyclo[5.4.0.0(2,8)undec-9-ene	71.58	1.69
13	$\alpha$ -Cadinol	139.85	0.80
14	Bornyl acetate	61.23	0.57
15	1, 4-Methanoazulene	82.70	0.57
16	Ylangene	76.91	0.56
17	1,6-Cyclodecadiene	101.41	0.31
18	$\alpha$ -Cubebene	77.98	0.30
19	Copaene	138.35	0.29
20	1H-Naphtho[2,1-b]pyran	200.77	0.27
21	$\alpha$ -Cubebene	72.97	0.13
22	Cyclohexene	25.05	0.12
23	Caryophyllene	87.45	0.12
24	$\alpha$ -Cubebene	135.88	0.11

## 5. 지표성분 validation

### 1) 특이성(Specificity)

- 확립된 분석조건으로 표준물질과 시험물질인 잣나무 잎 정유 시료의 크로마토그램을 확보하고, 표준물질 5종의 peak가 분리되는지를 확인한 결과, 아래와 같이 다른 물질과 간섭 없이 성분이 분리되었으며 표준용액의 피크유지시간(RT)과 잣나무 잎 정유의 피크유지시간(RT)이 일치하여 특이성을 확인하였다.

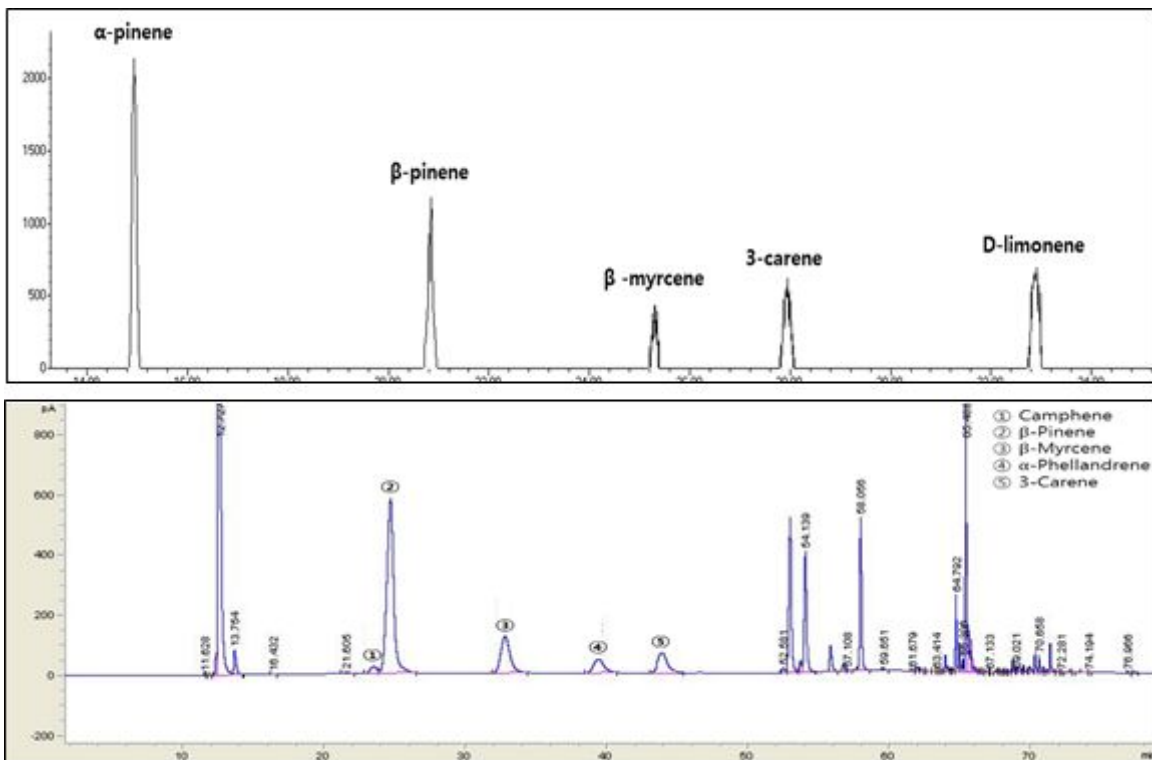


그림 5. Representative chromatogram of STD

((+)- $\alpha$ -Pinene, (+)- $\beta$ -Pinene, Myrcene, 3-Carene, (R)-(+)-Limonene)

2) 직선성(Linearity)

- 직선성(Linearity) 평가를 위해 단계적으로 희석한 검량선용 표준용액을 이용해 검량선을 작성하였으며 Figure 4와 같은 검량선을 나타내었다. 검량선 농도 약 2 ~ 1100 ppm의 농도 범위에서 측정된 상관계수( r ) 결과값은 0.9981~0.9997으로 허용범위 0.99 이상의 직선성을 나타내어 허용기준을 만족하였다.

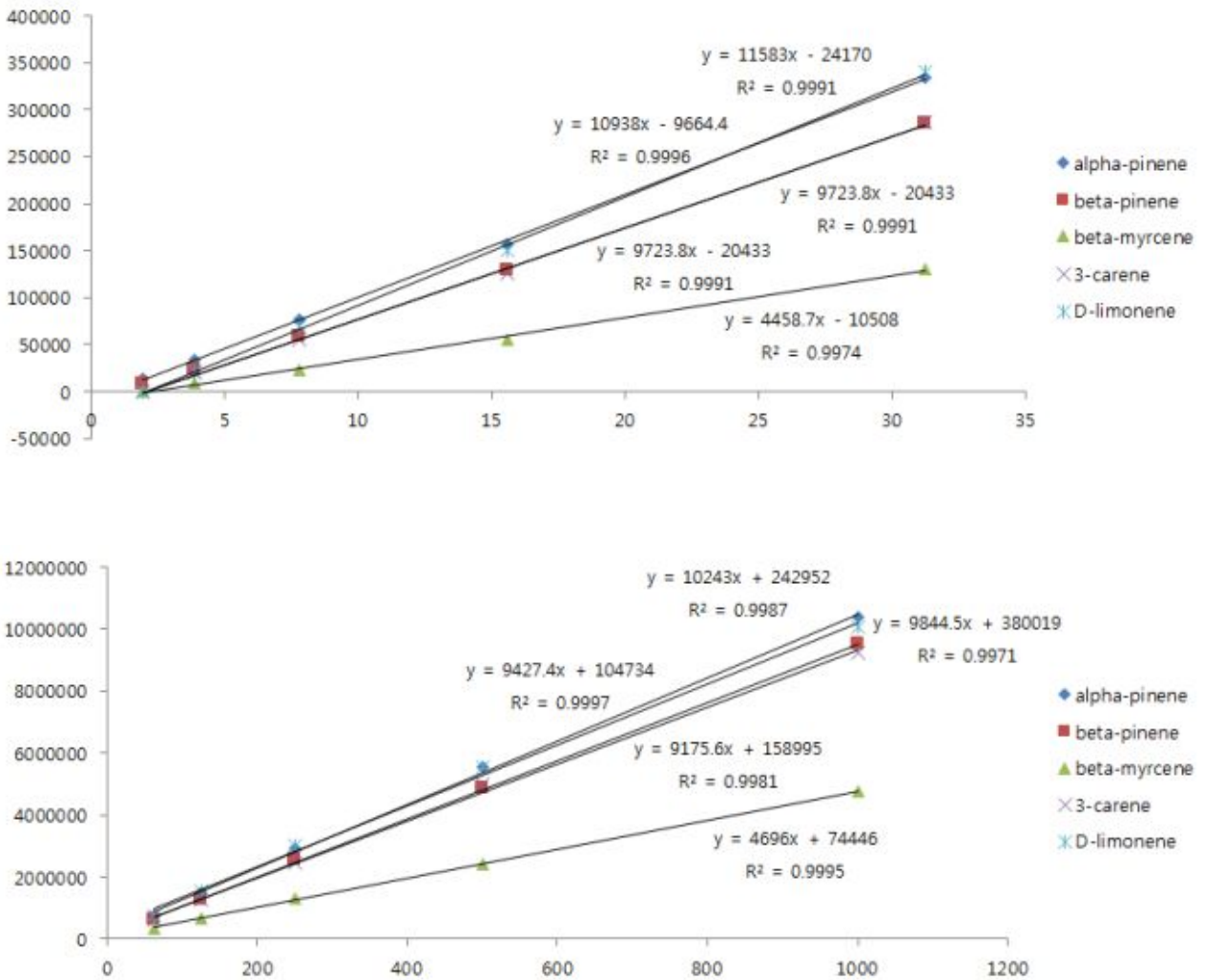


그림 6. Calibration curve

3) 검출한계(Limit of detection, LOD) 및 정량한계(Limit of quantitation, LOQ)

- 단계적으로 희석한 5가지((+)- $\alpha$ -Pinene, (+)- $\beta$ -Pinene, Myrcene, 3-Carene, (R)-(+)-Limonene) 표준용액을 GC-MS로 분석하여 검출한계 및 정량한계를 확인하고 아래와 같이 나타났다. 이는 시료에 적용할 경우 검출한계 수준까지 검출이 가능한 것을, 정량한계는 정량한계 수준까지 정량할 수 있는 분석물질의 최저 농도를 의미하게 된다.

ppm	(+)- $\alpha$ -Pinene	(+)- $\beta$ -Pinene	Myrcene	3-carene	Limonene
0.24	59(LOD)	-	-	-	
0.49	1219(LOQ)	439(LOD)	-	-	-
0.98	6284	2974(LOQ)	231(LOD)	1806(LOD)	108(LOD)
1.95	13097	7002	2479(LOQ)	5369(LOQ)	6980(LOQ)
3.91	33025	22867	8533	20092	21918
7.81	77057	58643	22961	54535	68293
15.63	156785	129268	54989	125853	149497
31.25	333979	284779	130936	286103	340778
63	737618	628817	322791	628033	779816
125	1471531	1262052	660267	1248429	1547173
250	2935982	2546893	1312882	2484820	3018527
500	5529084	4849476	2412499	4995426	5551176
1000	10385647	9501939	4762255	9216065	10077095

4) 정확성 및 정밀성(Accuracy and Precision)

- 5가지((+)- $\alpha$ -Pinene, (+)- $\beta$ -Pinene, Myrcene, 3-Carene, (R)-(+)-Limonene) 표준용액을 가지고 정밀성 실험을 각 물질마다 3회 반복하였다. 얻어진 면적을 이용하여 검량선의 의하여 정량한 농도별 검출농도의 표준편차를 검출농도로 나눈 비의 백분율로 계산하였다.  $\alpha$ -Pinene의 정밀도는 5가지 농도에서 5.03%, 0.9%, 1.75%, 2.7%, 2.62%로 나타났다,  $\beta$ -Pinene의 정밀도는 5가지 농도에서 6.49%, 1.69%, 1.51%, 2.76%, 2.53%로 나타났다.  $\beta$ -Myrcene의 정밀도는 5가지 농도에서 7.27%, 1.98%, 4.67%, 3.26%, 2.95%로 나타났다, 3-Carene의 정밀도는 5가지 농도에서 5.52%, 0.32%, 1.84%, 3.13%, 2.84%로 나타났다. (+)-Limonene의 정밀도는 5가지 농도에서 7.03%, 0.79%, 6.09%, 4.13%, 3.16%로 나타났다.

표 7. Validation of the analytical STD((+)- $\alpha$ -Pinene, (+)- $\beta$ -Pinene, Myrcene, 3-Carene, (R)-(+)-Limonene)

$\alpha$ -pinene	Nominal conc. (ppm)	Measured conc.(ppm)			Mean (ppm)	S.D	CV (%)
		No. 1	No. 2	No. 3			
n=3	15.6	11.13	10.68	10.06	10.62	0.53	5.03
	31.3	25.89	25.47	25.51	25.62	0.23	0.90
	62.5	37.81	37.49	36.55	37.28	0.65	1.75
	125	106.13	112.02	109.10	109.08	2.94	2.70
	250	250.88	260.65	263.88	258.47	6.77	2.62

$\beta$ -pinene	Nominal conc. (ppm)	Measured conc.(ppm)			Mean (ppm)	S.D	CV (%)
		No. 1	No. 2	No. 3			
n=3	15.6	9.15	8.80	8.05	8.67	0.56	6.49
	31.3	22.49	21.91	21.79	22.06	0.37	1.69
	62.5	42.47	41.93	41.21	41.87	0.63	1.51
	125	107.92	114.05	111.00	110.99	3.07	2.76
	250	252.06	260.79	264.93	259.26	6.57	2.53

$\beta$ -myrcene	Nominal conc. (ppm)	Measured conc.(ppm)			Mean (ppm)	S.D	CV (%)
		No. 1	No. 2	No. 3			
n=3	15.6	7.14	6.52	6.19	6.62	0.48	7.27
	31.3	18.63	18.11	17.93	18.22	0.36	1.98
	62.5	30.98	31.04	28.57	30.20	1.41	4.67
	125	98.44	104.96	100.83	101.41	3.30	3.26
	250	249.77	260.75	264.41	258.31	7.62	2.95

3-carene	Nominal conc. (ppm)	Measured conc.(ppm)			Mean (ppm)	S.D	CV (%)
		No. 1	No. 2	No. 3			
n=3	15.6	9.40	9.08	8.43	8.97	0.50	5.52
	31.3	24.05	23.90	24.02	23.99	0.08	0.32
	62.5	41.58	41.48	40.22	41.09	0.76	1.84
	125	112.34	119.60	116.16	116.04	3.63	3.13
	250	265.02	276.66	279.79	273.82	7.78	2.84

D-	Nominal conc.	Measured conc.(ppm)			Mean	S.D	CV
----	---------------	---------------------	--	--	------	-----	----

limonene	(ppm)	No. 1	No. 2	No. 3	(ppm)	(%)	
n=3	15.6	7.57	7.08	6.57	7.07	0.50	7.03
	31.3	20.18	19.87	20.08	20.04	0.16	0.79
	62.5	18.13	18.65	16.57	17.78	1.08	6.09
	125	90.25	98.00	93.75	94.00	3.88	4.13
	250	247.93	260.85	262.90	257.23	8.12	3.16

#### 5) 지표물질 5종 validation

- 본 시험은 GC-MS를 이용하여 잣나무 잎 정유 내 지표물질 5종( $\alpha$ -Pinene,  $\beta$ -Pinene,  $\beta$ -Myrcene, 3-Carene, (+)-Limonene)의 농도 분석법 검증을 위한 Validation을 실시하였다. 유효성 검증 결과, 본 시험법에서 표준용액의 피크유지시간과 잣나무 잎 정유의 지표물질 피크유지시간이 일치하여 특이성을 확인하였다. 검량선의 상관계수는 0.9981~0.9997으로 높은 직선성을 보여 분석에 적합함을 알 수 있었으며, 검출한계 및 정량한계도 각각 설정되었다. 지표물질 5에 대한 정밀도는  $\pm 20\%$ 로 이내로 잣나무 잎 정유 내 지표물질 5종에 대한 분석법은 적합한 시험법임이 검증되었다. 이상의 분석결과, 본 연구의 기기분석법 유효성 검증을 통해 잣나무 잎 정유성분의 표준화를 위해 존재하는 지표성분( $\alpha$ -Pinene,  $\beta$ -Pinene,  $\beta$ -Myrcene, 3-Carene, (+)-Limonene))의 분석이 가능함을 확인하였다.

#### 6. 잣나무 잎 정유 소취력 평가

- 잣나무 잎 정유의 소취력 평가는 가스검지법을 이용하여 악취물질 4종(ammonia, formaldehyde, trimethylamine, methylmercaptan)을 대상으로 소취력을 평가하였으며 대조구로는 녹차추출물을 사용하였다. 잣나무 잎 정유는 악취물질 4종 모두에 대해 소취효과를 나타내었으며 다른 악취물질에 비해 상대적으로 ammonia에 대해서 높은 소취력을 나타내었다. Ammonia에 대한 소취력은 잣나무 잎 정유를 주입한 후 10분 후부터 43.3%의 높은 소취력을 나타냈으며, 시간이 경과함에 따라 점차 증가하여 1시간 후에는 90.7%로 나타나 대조구인 녹차추출물에 비해 69.2% 높은 소취효과를 나타내었다. Trimethylamine에 대한 소취효과 역시 시간이 경과함에 따라 높은 소취력을 나타내었고 대조구에 비해 20.3% 높은 소취력을 보였다. Formaldehyde에 대한 소취력은 다른 악취물질에 비해 비교적 낮게 나타났으며 이는 선행연구결과에서도 유사한 결과를 보여 잣나무 잎 정유는 formaldehyde에 대한 소취효과는 낮은 것을 확인하였다. Methylmercaptan

에 대한 소취력은 초기 10분동안은 59.7%의 높은 소취력을 보였고 시간이 경과함에 따라 소취력은 증가하여 1시간 후 소취력은 88.9%의 소취력을 나타내었으며 이는 선행연구결과(70.56%)에 비해 다소 높은 소취력을 보였다.

표 8. 잣나무 잎 정유의 소취력 평가

시험물질	악취물질	소취력(%)			
		10min	20min	30min	60min
잣나무 잎 정유	Ammonia	43.3±4.5	73.7±4.9	79.5±5.1	90.7±5.2
	Trimethylamine	34.1±3.2	53.8±3.4	56.7±1.2	65.5±3.6
	Formaldehyde	20.0±1.4	31.6±1.6	36.8±1.8	39.5±1.1
	Methylmercaptan	59.7±1.1	75.0±1.5	79.3±1.4	88.9±1.3
녹차추출물	Ammonia	15.2±2.3	16.8±2.8	20.2±1.5	21.5±3.8
	Trimethylamine	25.8±1.6	36.4±2.5	40.1±4.8	45.2±5.2
	Formaldehyde	0.0±0.0	0.0±0.0	4.5±1.2	4.8±1.5
	Methylmercaptan	5.4±0.5	15.2±2.1	24.1±1.4	28.1±1.3

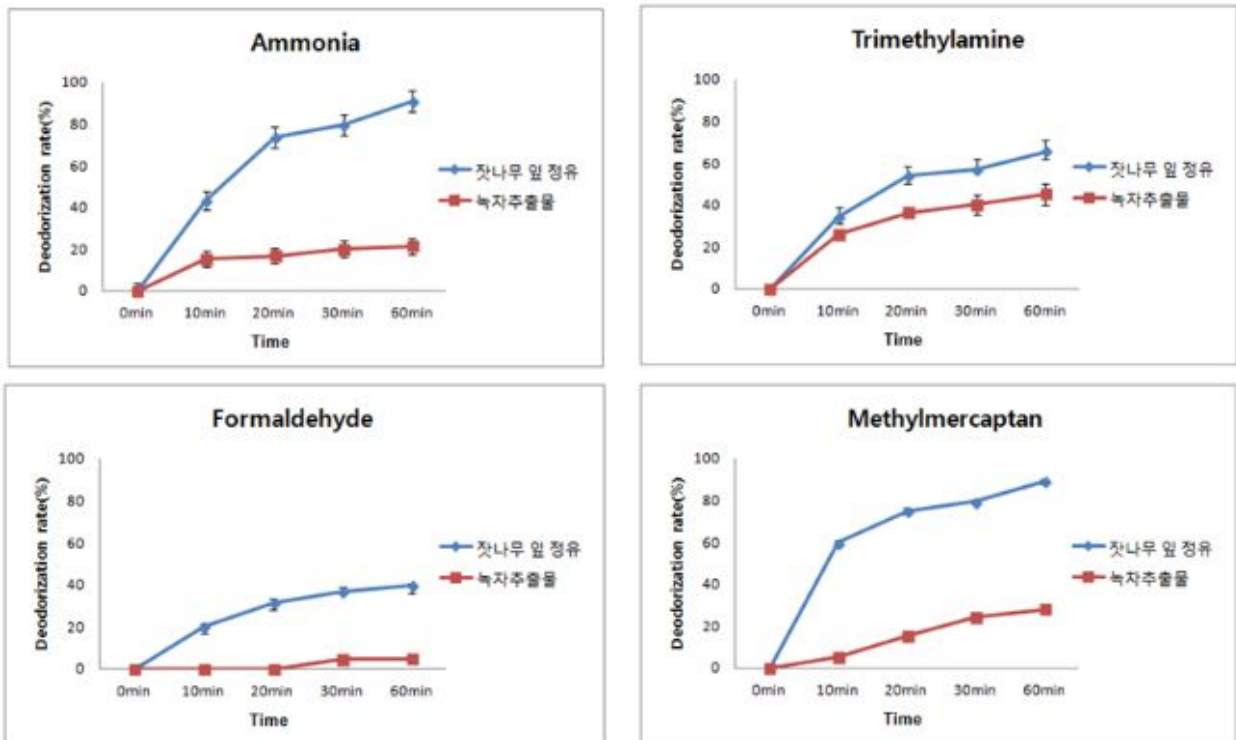


그림 7. 잣나무 잎 정유 소취력



### 7. 잣나무 잎 정유 항균력 평가

- 잣나무 잎 정유의 항균력은 구강 내 세균인 *L. paracasei*, *S. aureus*, *E. faecalis*, *S. mutans*, *S. sobrinus* 에 대해 평가하였으며 대조구로는 프로폴리스 추출물을 사용하였다. 각각의 시료 25  $\mu$ L을 paper disc에 흡수시켜 구강 내 세균에 대한 생육저해환을 측정 한 값은 II 와 같다. 측정 결과 잣나무 잎 정유는 *E. faecalis*을 제외한 모든 구강균에 대해 항균력을 나타내었다. 구강세균 중 *S. aureus* 균에 대한 항균력은 7.59mm로 가장 높은 항균력을 보였으며 대조구인 프로폴리스 추출물과 비교해서도 높은 항균력을 나타내었다. *L. paracasei*균에 대한 항균력은 또한 대조구에 비해 약 1.28mm 높은 항균력을 보인 반면 *S. aureus* 및 *S. sobrinus* 균에 대한 항균력은 대조구에 비해 다소 낮은 항균력을 나타내었다.

표 9. 잣나무 잎 정유 항균력

Sample(25 $\mu$ L)	Clear zone(mm)				
	<i>L. paracasei</i>	<i>S. aureus</i>	<i>E. faecalis</i>	<i>S. mutans</i>	<i>S. sobrinus</i>
잣나무 잎 정유	14.30 $\pm$ 0.18	14.54 $\pm$ 0.11	-	23.18 $\pm$ 0.19	12.16 $\pm$ 0.15
프로폴리스 추출물	11.74 $\pm$ 0.15	17.04 $\pm$ 0.21	10.50 $\pm$ 0.09	18.72 $\pm$ 0.17	13.16 $\pm$ 0.12

### 8. 잣나무 잎 정유 안전성 평가

#### 1) 잣나무 잎 정유 잔류농약 분석 결과

- 245종의 잔류농약 분석 결과 모든 검사항목에 잔류농약은 검출되지 않았으며, 식품가공소재 원료로 사용 가능한 것을 확인하였다.

표 10. 잣나무 잎 정유 잔류농약 분석결과

No.	Pesticide	result	No.	Pesticide	result
1	Acetamidrid	불검출	124	Oxaziclomefon	불검출
2	Alachlor	불검출	125	Paclobutrazol	불검출
3	Aldicarb	불검출	126	Penconazole	불검출
4	Amisulbrom	불검출	127	Pencycuron	불검출
5	Anilofos	불검출	128	Pendimethalin	불검출
6	Azinphos-methyl	불검출	129	Pentoxazone	불검출
7	Azoxystrobin	불검출	130	Phorate	불검출
8	Bendiocarb	불검출	131	Phosalone	불검출
9	Benomyl	불검출	132	Phosphamidon	불검출
10	Benthiavalicarb-isopropyl	불검출	133	Piperophos	불검출
11	Benzoximate	불검출	134	Pirimicarb	불검출
12	Bitertanol	불검출	135	Pirimiphos-ethyl	불검출
13	Boscalid	불검출	136	Pirimiphos-methyl	불검출

14	Bromobutide	불검출	137	Prochloraz	불검출
15	Buprofezin	불검출	138	Profenofos	불검출
16	Butachlor	불검출	139	Prometryn	불검출
17	Cadusafos	불검출	140	Propanil	불검출
18	Carbaryl	불검출	141	Propoxur	불검출
19	Carbendazim	불검출	142	Prothiofos	불검출
20	Carbofuran	불검출	143	Pyraclostrobin	불검출
21	Carbophenothion	불검출	144	Pyrazophos	불검출
22	Chinomethionate	불검출	145	Pyribenzoxim	불검출
23	Chlorantraniliprole	불검출	146	Pyributicarb	불검출
24	Chlorfenvinphos	불검출	147	Pyridaben	불검출
25	Chlorfluazuron	불검출	148	Pyridaphenthion	불검출
26	Chlorpropham	불검출	149	Pyrimethanil	불검출
27	Chlorpyrifos	불검출	150	Pyrimidifen	불검출
28	Chlorpyrifos-methyl	불검출	151	Pyriminobac-methyl	불검출
29	chromafenozide	불검출	152	Pyriproxyfen	불검출
30	Clofentezine	불검출	153	Pyroquilon	불검출
31	Clothianidin	불검출	154	Quinoclamine	불검출
32	Cyazofamid	불검출	155	Simazine	불검출
33	Cyflufenamid	불검출	156	Simeconazole	불검출
34	Cyhalofop-butyl	불검출	157	Simetryn	불검출
35	Cymoxanil	불검출	158	Spirodiclofen	불검출
36	Cyproconazole	불검출	159	Spiromesifen	불검출
37	Cyprodinil	불검출	160	Tebuconazole	불검출
38	Deltamethrin	불검출	161	Tebufenozide	불검출
39	Diazinon	불검출	162	Tebufenpyrad	불검출
40	Diethofencarb	불검출	163	Tebupirimfos	불검출
41	Difenoconazole	불검출	164	Teflubenzuron	불검출
42	Diflubenzuron	불검출	165	Terbuthylazine	불검출
43	Dimepiperate	불검출	166	Terbutryn	불검출
44	Dimethenamid	불검출	167	Tetraconazole	불검출
45	Dimethoate	불검출	168	Thiabendazole	불검출
46	Dimethomorph	불검출	169	Thiacloprid	불검출
47	Dimethylvinphos	불검출	170	Thiamethoxam	불검출
48	Diniconazole	불검출	171	Thiazopyr	불검출
49	Diphenamid	불검출	172	Thiobencarb	불검출
50	Dithiopyr	불검출	173	Thiodicarb	불검출
51	Diuron	불검출	174	Thiophanate-methyl	불검출
52	EPN	불검출	175	Tiadinil	불검출
53	Ethaboxam	불검출	176	Tolclofos-methyl	불검출
54	Ethiofencarb	불검출	177	Triadimefon	불검출
55	Ethion	불검출	178	Triadimenol	불검출
56	Ethoprophos	불검출	179	Triazophos	불검출
57	Etofenprox	불검출	180	Tricyclazole	불검출

58	Etoxazole	불검출	181	Trifloxystrobin	불검출
59	Etrimfos	불검출	182	Triflumizole	불검출
60	Fenamidone	불검출	183	Triflumuron	불검출
61	Fenamiphos	불검출	184	Zoxamide	불검출
62	Fenarimol	불검출	185	Acrinathrin	불검출
63	Fenazaquin	불검출	186	Aldrin & Dieldrin	불검출
64	Fenbuconazole	불검출	187	BHC	불검출
65	Fenitrothion	불검출	188	Bifenox	불검출
66	Fenobucarb	불검출	189	Bifenthrin	불검출
67	Fenothiocarb	불검출	190	Bromopropylate	불검출
68	Fenoxanil	불검출	191	Captan	불검출
69	Fenpropathrin	불검출	192	Chlordane	불검출
70	Fenpyroximate	불검출	193	Chlorfenapyr	불검출
71	Ferimzone	불검출	194	Chlorobenzilate	불검출
72	Fluacrypyrim	불검출	195	Chlorothalonil	불검출
73	Flubendiamide	불검출	196	Cyfluthrin	불검출
74	Fludioxonil	불검출	197	Cyhalothrin	불검출
75	Flumioxazine	불검출	198	Cypermethrin	불검출
76	Fluopicolide	불검출	199	DDT	불검출
77	Fluquinconazole	불검출	200	Dichlofluanid	불검출
78	Flusilazole	불검출	201	Dichlorvos	불검출
79	Flutolanil	불검출	202	Diclofop-methyl	불검출
80	Forchlorfenuron	불검출	203	Dicloran	불검출
81	Fosthiazate	불검출	204	Dicofol	불검출
82	Furathiocarb	불검출	205	Diphenylamine	불검출
83	Hexaconazole	불검출	206	Disulfoton	불검출
84	Hexaflumuron	불검출	207	Edifenphos	불검출
85	hexythiazox	불검출	208	Endosulfan	불검출
86	Imazalil	불검출	209	Endrin	불검출
87	Imibenconazole	불검출	210	Esprocarb	불검출
88	Imidacloprid	불검출	211	Ethalfuralin	불검출
89	Indanofan	불검출	212	Etridiazole	불검출
90	Indoxacarb	불검출	213	Fenthion	불검출
91	Iprobenfos	불검출	214	Fenvalerate	불검출
92	Iprodione	불검출	215	Fipronil	불검출
93	Iprovalicarb	불검출	216	Flucythrinate	불검출
94	Isoprocarb	불검출	217	Flufenoxuron	불검출
95	Isoprothiolane	불검출	218	Folpet	불검출
96	Kresoxim-methyl	불검출	219	Fthalide	불검출
97	Lufenuron	불검출	220	Halfenprox	불검출
98	Malathion	불검출	221	Heptachlor	불검출
99	Mandipropamid	불검출	222	Isofenphos	불검출
100	Mecarbam	불검출	223	Methoxychlor	불검출

101	Mefenacet	불검출	224	Methyl-pentachlorophenyl sulfide	불검출
102	Meipanipirim	불검출	225	Molinate	불검출
103	Mepronil	불검출	226	Oxyfluorfen	불검출
104	Metalaxyl	불검출	227	Parathion	불검출
105	Metamifop	불검출	228	Parathion-methyl	불검출
106	Metconazole	불검출	229	Permethrin	불검출
107	Methabenzthiazuron	불검출	230	Phenthoate	불검출
108	Methidathion	불검출	231	Probenazole	불검출
109	Methiocarb	불검출	232	Procymidone	불검출
110	Methomyl	불검출	233	Propiconazole	불검출
111	Methoxyfenozide	불검출	234	Pyraclofos	불검출
112	Metobromuron	불검출	235	Pyridalyl	불검출
113	Metolachlor	불검출	236	Quintozene	불검출
114	Metolcarb	불검출	237	Silafluofen	불검출
115	Metribuzin	불검출	238	Tefluthrin	불검출
116	Mevinphos	불검출	239	Terbufos	불검출
117	Myclobutanil	불검출	240	Tetradifon	불검출
118	Napropamide	불검출	241	Thifluzamide	불검출
119	Novaluron	불검출	242	Tolyfluanid	불검출
120	Nuarimol	불검출	243	Tralomethrin	불검출
121	Ofurace	불검출	244	Trifluralin	불검출
122	Oxadiazon	불검출	245	Vinclozolin	불검출
123	Oxamyl	불검출			

## 2) 잣나무 잎 정유 중금속 분석 결과

- 잣나무 잎 정유의 중금속 분석결과 카드뮴은 검출되지 않았으며 납, 비소 및 수은은 극미량 검출되었다. 국내외 농산물에 대한 중금속 기준을 살펴보면 납에 대한 기준관리는 우리나라 외 CODEX,EU, 호주, 중국에서는 곡류, 서류, 콩류, 과실류, 채소류에 대해서 0.1~0.3mg/kg 범위로 관리되고 있으며, 카드뮴은 품목별로 0.05~0.5mg/kg 이하로 관리되고 있다. 잣나무 잎 정유에서 검출된 중금속 함량은 극미량이며 식품소재로서의 안전에 는 문제가 없는 것으로 확인했다.

표 11. 잣나무 잎 정유 중금속 분석결과

중금속	분석결과
납(mg/kg)	0.0069mg/kg
카드뮴(mg/kg)	0.000mg/kg
비소(mg/kg)	0.0075mg/kg
수은(mg/kg)	0.008mg/kg

3) 잣나무 잎 정유 미생물 검사

- 잣나무 잎 정유의 식품소재로서의 안전성을 확인하기 위해 세균수 및 대장균군을 검사하였으며 세균수 및 대장균군 모두 검출되지 않았다.

표 12. 잣나무 잎 정유 미생물 검사

	세균수	대장균군
잣나무 잎 정유	0 CFU/g	음성

9. 잣나무 잎 정유 함유 가공상품 개발

1) 잣나무 잎 정유를 함유한 껌 배합비 개발

- 잣나무 잎 정유 함유 소비자 제품은 잣나무 잎 정유의 효능 및 컨셉을 고려하여 껌류로 결정하였다. 껌 원료는 잣나무 잎 정유 외 22가지의 껌베이스와 식품첨가물을 선정하였으며, 배합비는 껌의 착향에 관여하는 limemint flavor와 잣나무 잎 정유의 배합비를 달리하여 3가지 type의 배합비를 설정하여 관능평가를 통해 최적 배합비를 설정하였다.

표 13. 잣나무 잎 정유 함유 껌 배합비

No.	원료명(Ingredient)	배합비(%)		
		type-1	type-2	type-3
1	껌베이스(Gum Base) Vela-T Hard	19.1986	19.1986	19.1986
2	껌베이스(Gum Base) AK	2.5089	2.5089	2.5089
3	아세셀팜 K(Acesulfame K)	0.0509	0.0509	0.0509
4	자일리톨(Xylitol)	32.6375	32.6375	32.6375
5	이소말트(Isomalt)	5.7595	5.7595	5.7595
6	아스파탐(Aspartame)	0.5120	0.5120	0.5120
7	아세셀팜 K(Acesulfame K)	0.1728	0.1728	0.1728
8	말티톨시럽(Hydrogenated Glucose Syrup)	4.4738	4.4738	4.4738
9	L-멘톨(L-Menthol)	0.3840	0.3840	0.3840
10	Lime Flavor SKF-28424	0.9599	0.9599	0.9599
11	Lime Powder Flavor EL06212	0.5120	0.5120	0.5120
12	Menthol Powder Flavor SKF-25562	0.3840	0.3840	0.3840
13	Limemint Flavor SKF-23017	0.2050	0.1950	0.1850
14	Liquid Menthol SKF-22663	0.1300	0.1300	0.1300
15	말티톨(Maltitol) P-200	28.5236	28.5236	28.5236
16	아라비아검(Gum Arabic)	1.2772	1.2772	1.2772

17	D-소르비톨(D-Sorbitol)	0.4131	0.4131	0.4131
18	말티톨 파우더(Maltitol Powder) P-35	1.6061	1.6061	1.6061
19	잣나무과향	0.0157	0.0257	0.0357
20	치자청(Gardenia Blue) K-8897	0.0442	0.0442	0.0442
21	홍화황(Cathamus Yellow)	0.0812	0.0812	0.0812
22	카나우바왁스(Carnauba Wax)	0.0200	0.0200	0.0200
23	셀락(Shellac)	0.1300	0.1300	0.1300
Total		100	100	100

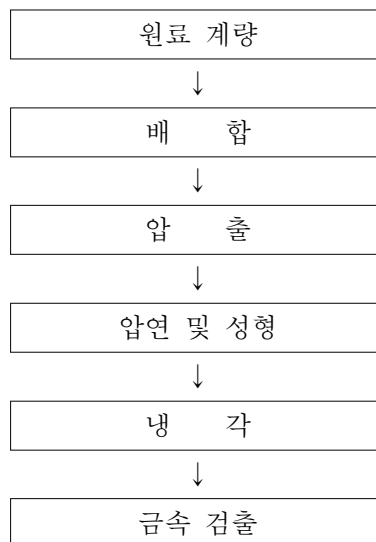
- 3가지 type의 시제품에 대한 관능평가는 전문패널 15명을 대상으로 맛, 향, 색, 식감, 종합적 기호도를 5점 척도법으로 평가하였다. 관능평가 결과 잣나무 잎 정유가 0.0257% 첨가된 type-2가 모든 항목에서 가장 우수한 평가를 받아 최종 배합비로 선정하였다.

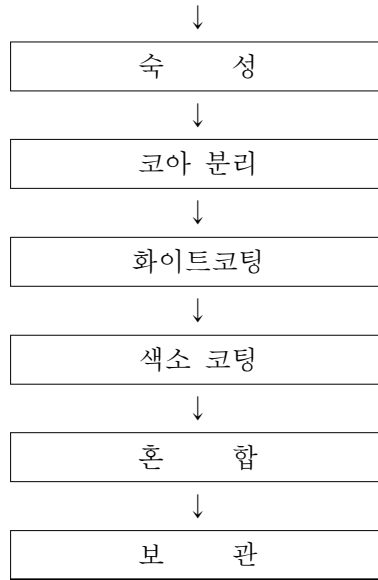
표 14. 잣나무 잎 정유 함유 껌 관능평가

중금속	맛	향	색	식감	종합적 기호도
type-1	4.1	4.1	4.0	4.1	4.2
type-2	4.5	4.3	4.0	4.1	4.4
type-3	4.2	4.2	3.9	4.0	4.1

## 2) 잣나무 잎 정유 함유 시제품 개발

- 최종 선정된 type-2 배합비에 따라 잣나무 잎 정유 함유 껌을 제조하였다. 제조 공정은 그림0와 같으며 공정동에 따라 HACCP 제조시설에서 제조하였다. 껌 색상은 잣나무 잎과 유사한 그린색으로 코팅하였으며, 개별 중량은 1.4g으로 제조하였다.





- 시제품 포장용기는 (주)동방플라스틱에 의뢰하여 주문제작 하였다. 용기 제질은 HDPE (고밀도 폴리에틸렌)이며 제품규격은 87.1mm(높이) × 43.8mm(지름)으로 1.4g씩 45개를 담을 수 있도록 제작하였다.



그림 8. 잣나무 잎 정유 함유 껌 용기

- 잣나무 잎 정유 함유 껌 전용용기에 부착될 스티커 디자인을 개발하였다. 디자인은 전체적으로 상쾌한 느낌을 표현하였고, 구취효과, 향균력, 상쾌함 문구를 삽입하여 잣나무 잎 정유의 구취 및 구강세균 억제 효능에 대한 간접적으로 표현하였다.



그림 9. 잣나무 잎 정유 함유 껌 용기 라벨(몸통(좌), 뚜껑(우))

- 개발된 전용용기와 라벨을 부착하여 최종제품 개발을 완료하였으며, 생산된 잣나무 잎 정유 함유 껌에 대해서 품목제조신고를 완료하였다.



식품(식품첨가물) 품목제조보고서

보고인	성명	생년월일		
	직종명	1961년 09월 24일		
주요	주소	전화번호		
	주요업무	통대전화		
영양(성조)	대상식품(주)			
	소재지			
영업소	총괄책임	보은군 보은읍 공공4길 821, 302-71		
제품정보	식품지 원형	추정품	식품신고번호	19930439002
	제품명	피톤치드 껌		
	원료기원	제조일로부터 18개월		
	유통유통기한			
	원재료 또는 성분명	원료명 기재		
	제품명	원료명 기재		
	보존방법 및 포장재질	직사광선과 고온다습한 곳을 피하여 서늘한 곳에 보관 용기(PE/PP), 캡(PE/PP), 포장지(PE/PP), AI-164, PVC		
	무중량당 당도 포장단위	11.3g, 26g, 56g, 70g, 135g, 10g, 100g, 150g, 8kg, 2kg, 10kg 등		
	용량	고체형의 직사각형 모양으로 조색제 개량 코팅용		
	고정분-지방질-식품첨가물 여부	[ ]에 [ ]아니오 [O] 해당 없음		

\* 식품위생법, 제37조제5항 및 같은 법 시행규칙 제45조제1항에 따른 식품(식품첨가물) 품목제조 사항별 보고합니다.

2015년 11월 30일  
보고인 조홍우

그림 10. 잣나무 잎 정유 함유 최종 제품(좌), 품목제조보고서(우)



## 제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

### 제 1 절 연구목표의 달성도

연구 목표	평가의 착안점	연구개발 수행내용	달성도 (%)
1. 잣나무 정유의 관능평가를 통한 추출조건 확립 1건	추출조건 확립 여부	• 잣나무 잎 정유 추출조건 확립 • 추출공정 scale-up 및 대량	100
2. 추출소재의 항균활성	잣나무 잎 정유의 항균력 평가	• 구강 내 세균 3종과 충치균 2종에 대한 항균력 평가	100
3. 추출소재의 구취소거 효과	잣나무 잎 정유의 소취력 평가	• 악취물질 4종에 대한 소취력 평가	100
4. 소재 제품	추출공정 scale-up을 통한 소재 확보	• 산업용스팀추출기 적용 및 대량생산	100
5. 소비자 제품	잣나무 잎 정유 함유 껌 및 캔디류 개발	• 잣나무 잎 정유 함유 껌개발 1건	100
6. 제품생산 공정 및 효능 관련 특허출원	특허출원 여부	• 특허출원 1건	100

### 제 2 절 관련분야에의 기여도

- 본 연구를 통해 개발되는 잣나무 잎 정유 식품 소재는 잣나무 잎에서 추출한 천연 물질로 구강세균 억제 및 구취제거 효과를 동시에 갖고 있어, 기존의 비슷한 기능을 갖는 껌 또는 캔디류의 첨가물을 대체하거나 같이 사용되어 이들의 상승효과를 기대
- 피톤치드(phytoncide)는 대부분 침엽수에서 정유의 형태로 추출되는데, 이러한 피톤치드는 각종 해충, 병원, 곰팡이, 박테리아 등에 킬러의 역할을 하지만 인간에게는 테르펜류가 주를 이루는 피톤치드 정유성분은 혈중 코르티솔을 농도를 현저하게 떨어뜨려 정신적 긴장을 해소하여 진정작용이나 스트레스 해소 작용을 하는 것으로 알려져 있어, 본 연구를 통해 개발할 잣나무 정유는 먹을 수 있는 아로마 오일로도 활용될 수 있을 것으로 기대
- 전국최대 잣나무 조림지역인 강원도 홍천의 특성상 잣나무 간벌 시 경제적 가치가 없어 버려지는 잣나무 잎을 활용하게 되면 산림 경영자에게는 부가적인 수입을 획득
- 강원도 문화관광 특산물 확보를 통한 지역인지도 개선 및 부산물 활용을 통한 부가가치 제고와 판로개척과 대량생산을 통한 고용창출 효과 기대

## 제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

### 제 1절 연구개발 성과

구분	특허		논문		제품화
	출원	등록	SCI	비 SCI	
목표	1	-	-	1	1
성과	1	-	-	0	1
달성도	100	-	-	0	100

#### 1. 특허

출원연도	특허명	출원인	출원국	출원번호
2016년	잣나무 추출물을 함유하는 구강 내 위생증진용 조성물 및 이의 제조방법	한경찬, 김선영, 용종우, 허성일, 유정식, 정상미	대한민국	10-2016-0009894

#### 2. 제품화(품목제조보고서)

보고연도	식품의 유형	제품명	유통기한
2015년	츄잉껌	피톤치드껌	제조일로부터 18개월

### 제 2절 연구 성과활용

구분	특허등록	제품화	매출창출	고용창출
성과창출 계획	1	1	1	1

- 본 연구를 통해 획득한 특허기술 적용 및 양산체계 구축
- 국내 및 해외 시장 분석결과 천연물 소재의 수요가 증가하고 있으며, 이러한 천연물 소재에 대한 기능성에 대한 기대 또한 증가하고 있어, 본 연구에서 단순한 추출물이 아닌 고부가가치 기능성 소재를 확보, 다양한 제형을 개발하여 국내 시장 진출
- 홍천 비발디파크 및 양양, 속초 등의 대규모 리조트에서 구매할 수 있는 강원 특산품 개발을 통하여 관광 콘텐츠 확보 및 산림자원의 부가가치 개선
- 연구과제에서는 식품으로 적용이 가능한 유효성분이 함유된 소재를 바탕으로 구강 세균 억제 및 구취 제거 활성과 관련된 논문 등을 국내 및 해외 학술지 등에 게재할 계획임

## 제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

해당사항 없음.

## 제 7 장 연구시설·장비 현황

해당사항 없음.

## 제 8 장 참고문헌

1. Kim JH, Lee HJ , J eong SJ , Lee MH, Kim SH Essential oil of Pinus koraiensis leaves exerts antihyperlipidemic effects via up-regulation of low-density lipoprotein receptor and inhibition of acyl-coenzyme A: cholesterol acyltransferase. *Phytother Res* 26: 1314-1319.
2. Joo HE, Lee HJ , Sohn EJ , Lee MH, Ko HS, et al. Anti-diabetic potential of the essential oil of Pinus koraiensis leaves toward streptozotocin-treated mice and HIT-T15 pancreatic beta cells. *Biosci Biotechnol Biochem* 77: 1997-2001.
3. Ko HS, Lee HJ , Sohn EJ , Yun M, Lee MH, et al. Essential Oil of Pinus koraiensis Exerts Antiobesic and Hypolipidemic Activity via Inhibition of Peroxisome Proliferator-Activated Receptors Gamma Signaling. *Evid Based Complement Alternat Med* 2013: 947037.
4. Cho SM, Lee EO, Kim SH, Lee HJ Essential oil of Pinus koraiensis inhibits cell proliferation and migration via inhibition of p21-activated kinase 1 pathway in HCT116 colorectal cancer cells. *BMC Complement Altern Med* 14: 275.
5. 서울대학교병원 의학정보
6. 건강기능식품과 기능성 식품 소재 시장현황 임팩트 편집부 2013
7. Vallianou I , Peroulis N, Pantazis P, Hadzopoulou-Cladaras M. “Camphene, a plant-derived monoterpene, reduces plasma cholesterol and triglycerides in hyperlipidemic rats independently of HMG-CoA reductase activity.” *PLoS One*. 20116(11):e20516
8. Victor Antony Santiago J , J ayachitra J , Shenbagam M, Nalini N. “Dietary d-limonene alleviates insulin resistance and oxidative stress-induced liver injury in high-fat diet and L-NAME-treated rats” .*Eur J Nutr*. 2012 Feb51(1):57-68.
7. Vallianou I , Peroulis N, Pantazis P, Hadzopoulou-Cladaras M. “Camphene, a plant-derived monoterpene, reduces plasma cholesterol and triglycerides in hyperlipidemic rats independently of HMG-CoA reductase activity.” *PLoS One*. 20116(11):e20516
8. Victor Antony Santiago J , J ayachitra J , Shenbagam M, Nalini N. “Dietary d-limonene alleviates insulin resistance and oxidative stress-induced liver injury in high-fat diet and L-NAME-treated rats” .*Eur J Nutr*. 2012 Feb51(1):57-68.
9. Korean National Statistical Office, 2012, The statistics of mortality and the cause. Available from <http://www.kostat.go.kr>
10. 고경화, 주요국 기능성식품 소재의 동향과 소비자 트렌드, 2012, 한국보건산업진흥원
11. 식품의약품안전처, 11년 건강기능식품 생산실적 분석결과 발표, 2012, 식품의약품안전처

## 주 의

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