



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2014-0137157
(43) 공개일자 2014년12월02일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A23L 1/23 (2006.01) A23L 1/212 (2006.01)
A23B 7/10 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2013-0057701
(22) 출원일자 2013년05월22일
심사청구일자 2013년05월22일

(71) 출원인
계명대학교 산학협력단
대구광역시 달서구 달구벌대로 1095 (신당동)
(72) 발명자
이삼빈
대구 달서구 선원로 171, 102동 306호 (이곡동, 성서무지개타운)
송영철
대구 동구 큰고개로 23, 1동 512호 (신암동, 보성아파트)
김지은
대구 달서구 대명천로12안길 40, 1동 302호 (성당동, 대영하이츠)
(74) 대리인
특허법인태백

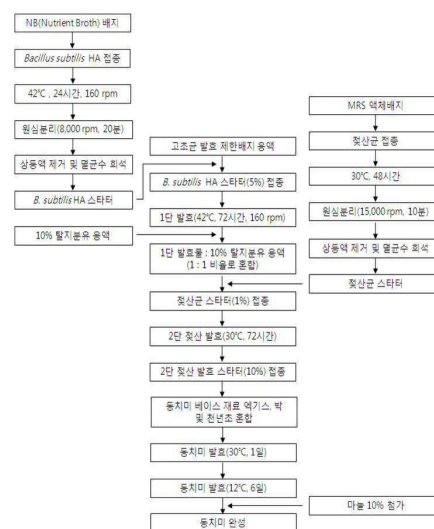
전체 청구항 수 : 총 9 항

(54) 발명의 명칭 GABA 생성 젖산균 및 천연초를 이용한 동치미 베이스 제조방법

(57) 요약

본 발명은 GABA 생성 젖산균 및 천연초를 이용한 동치미 베이스 제조방법에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 고초균 및 젖산균을 이용한 2단 발효를 통한 스타터를 접종하고, 동치미에 사용되는 각각의 재료를 모두 믹서로 갈아서 얻은 액과 박을 혼합하여 수분첨가 없이 페이스트 상태에서 천연초가 첨가된 동치미 베이스를 제조하는 방법을 제공한다. 상기의 방법에 의해 제조된 동치미 베이스는 천연초를 동치미 베이스에 접목시켜 색과 기능성을 부여하고자 하였다. 그리하여 물을 첨가하지 않은 동치미 베이스를 제조하여 산업적 발전에 기여할 수 있다.

대표도 - 도1



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 B0008871

부처명 지식경제부

연구관리전문기관 한국산업기술평가원

연구사업명 지역혁신센터사업(RIC 사업)

연구과제명 생물전환기술을 이용한 기능성 식품소재개발 및 상품화

기 여 율 1/1

주관기관 계명대학교 산학협력단

연구기간 2013.03.01 ~ 2014.02.28

특허청구의 범위

청구항 1

- (1) 1차 발효를 위한 고초균 스타터(starter)를 준비하여 접종하고 배양하는 1차 발효 단계;
- (2) 상기 1차 발효물과 10% 탈지분유를 혼합하는 단계;
- (3) 2차 발효를 위한 젖산균 스타터를 준비하여, (2)단계 혼합물에 접종하고 배양하는 2차 발효 단계;
- (4) 무, 배, 파, 사과, 생강, 마늘, 설탕 및 소금으로 이루어진 동치미 재료를 착즙하는 단계;
- (5) 상기 (4)단계에서 착즙된 착즙액 및 착즙박 혼합물에 상기 (3)단계의 2차 발효물을 접종하는 단계; 및
- (6) 상기 (5)단계 혼합물을 25 내지 30℃에서 1일 동안 발효시킨 후, 8 내지 12℃에서 4 내지 6일 동안 발효시키는 단계를 포함하는 동치미 베이스 제조방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 (4)단계 착즙 후에 전체 동치미 재료에 대해 천연초 1 내지 5 중량%를 더 추가하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 동치미 베이스 제조방법.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 (6)단계 발효 후에 전체 동치미 재료에 대해 마늘 1 내지 10 중량%를 더 추가하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 동치미 베이스 제조방법.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 (2)단계에서 1차 발효물과 10% 탈지분유는 1:1의 중량비율로 혼합하는 것을 특징으로 하는 동치미 베이스 제조방법.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 고초균은 바실러스 서브틸리스 HA(*Bacillus subtilis* HA)(KCCM 10775P)인 것을 특징으로 하는 동치미 베이스 제조방법.

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 젖산균은 락토바실러스 플랜타럼(*Lactobacillus plantarum*) K154(KACC91727P), 락토바실러스 브레비스(*Lactobacillus brevis*) YC10(KCCM43012), 락토바실러스 플랜타럼(*Lactobacillus plantarum*) YC11(KCCM43013), 락토바실러스 퍼멘텀(*Lactobacillus fermentum*) YC12(KCCM43014)으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 이상의 균주인 것을 특징으로 하는 동치미 베이스 제조방법.

청구항 7

제1항에 있어서, 상기 1차 발효 단계는 37 내지 42℃에서, 72시간 동안 발효하는 것을 특징으로 하는 동치미 베이스 제조방법.

청구항 8

제1항에 있어서, 상기 2차 발효 단계는 25 내지 30℃에서, 48 내지 72시간 동안 발효하는 것을 특징으로 하는 동치미 베이스 제조방법.

청구항 9

제1항 내지 제8항 중 어느 하나의 항의 방법에 의해 제조된 동치미 베이스.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 GABA 생성 젖산균 및 천연초를 이용한 동치미 베이스 제조방법에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 고초균 및 젖산균을 이용한 2단 발효를 통한 스타터를 접종하고, 동치미에 사용되는 각각의 재료를 모두 착즙한 엑기스와 박을 혼합하여 수분첨가 없이 페이스트 상태에서 천연초가 첨가된 동치미 베이스를 제조하는 방법에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 동치미는 한국 사람들의 오래된 주식인 김치의 한 종류로 통째 또는 크게 썬 무를 절이고, 국물에 담그어 먹는 음식으로 채소가 부족한 겨울에는 영양을 공급해주고 음료로서의 기능을 하였다. 특히 동치미는 적당한 농도의 소금물에 무와 약간의 부재료를 첨가하여 발효시킨 식품으로서 NaCl 및 무기질의 공급원이 되고, 체액의 산도평형을 조절함에 있어 알칼리성을 부여하기 때문에 건강식품으로서의 가치를 지니고 있다고 알려져 있다. 동치미는 양념류가 많이 들어가지 않고 물을 많이 사용하기 때문에 국물에 생성된 젖산을 비롯한 각종 유기산과 이산화탄소가 주는 독특한 맛과 상쾌한 탄산미, 그리고 무가 씹힐 때 느껴지는 아삭한 조직감 때문에 예부터 즐겨 찾던 국물김치이며 대표적인 젖산발효 식품이다.

[0003] 이러한 젖산발효 식품에서는 다양한 젖산균들이 생육하게 되며 젖산균의 대사산물로 생성되는 감마-아미노뷰티르산(γ -aminobutyric acid; GABA)은 자연계에 분포하는 비단백질 아미노산의 일종으로, 억제성 신경전달물질로서 혈압상승을 억제하고, 시력증진에 효과가 있으며 불안감, 초조감 등을 진정시키는 작용을 하는 것으로 알려진 물질이다. 동물의 경우 뇌, 심장, 폐, 신장 등에 분포되어 있으며, 식물의 경우 발아현미, 녹차 등에서 주로 발견되고 있다. 스트레스에 시달리는 현대인이나 수험생, 알코올 과다 섭취자의 경우 뇌와 혈중 GABA 농도가 낮은 것으로 보고되어 있으며, 체내 GABA 농도의 극심한 부족은 발작, 경련, 간질 증세를 일으키는 것으로 알려져 있다. GABA의 기능으로는 뇌의 혈류를 개선하여 뇌의 산소공급을 증가시켜 뇌의 대사 향상 및 의욕저하 등의 치료제로 사용되어 brain food 라고도 하며 이 외에도 연수의 혈관 중추에 작용하여 항이노호르몬인 바소프레신의 분비를 억제하고 혈관을 확장시켜 혈관을 낮추는 고혈압 저하효과(anti-hypertensive effect) 및 이뇨효과(diuretic effect) 등 여러 생리작용이 보고되고 있다.

[0004] 바실러스(*Bacillus*) 균주에 의한 발효된 대두 발효식품은 균주가 생산하는 효소의 작용에 의해 대두 단백질이 분해되고 끈끈한 점질물이 생성되어 그 특유의 맛과 향을 낸다. 대두 발효식품에서 생성되는 점질물(γ -PGA)은 글루탐산의 γ -카르복시기와 글루탐산의 α -아미노기가 아마이드 결합된 γ -폴리펩타이드로 미생물에 의해서 생산되는 아미노산계 폴리머이다. 감마-폴리글루탐산(γ -poly glutamic acid; γ -PGA)은 여러 균주가 생산하는 것으로 보고되고 있으나, 대두 발효 미생물인 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*)에 의해서 생성되는 γ -PGA가 가장 일반적이다. γ -PGA의 보고된 효능으로는 면역기능 증강, 세포 내 세균 및 바이러스 감염에 대한 억제 효능 및 암세포 사멸효과, 세포벽 보호 및 항산화 효과, 칼슘흡수 촉진 등이 있으며 보습성이 뛰어나 식품뿐만 아니라 화장품 소재로도 각광받고 있는 기능성 소재이다.

[0005] 그리고 천연초(*Opuntia humifusa*)는 손바닥 선인장과 속하는 한국 토종 선인장으로 영하 20℃의 혹한에서도 생존이 가능해 수년에서 수십 년생의 경작이 가능한 다년생 식물이다. 열매와 줄기에는 각각 163.8, 71 mg%의 비타민 C가 함유되어 있으며 총 폴리페놀 화합물이 많이 함유하고 있는 것으로 보고하고 있다. 또한 열매로부터 추출된 점질물 및 색소의 기능성 연구에서, 선인장 열매에서 분리된 추출액은 열에 안정하며, 산성조건에서도 적색 색소의 안정성 및 물성을 유지하는 다당류를 함유하고 있어 식품 가공, 발효에 의한 제품의 기호성 증진 및 식품학적 가치를 증진시키는데 이용될 수 있는 유용한 식품 소재라고 보고하였다.

[0006] 기존의 동치미들은 다양한 재료를 소금물에 침지하여 저온 숙성하는 방법을 이용하여 제조하였다. 하지만 물을 첨가하지 않고 재료를 모두 착즙한 엑기스와 박을 모두 혼합하여 젖산균 스타터를 접종하여 발효한 동치미 베이스에 대한 연구는 없었다.

[0007] 한편, 한국특허출원 제10-2010-0046387호는 동치미 국물 제조 방법에 관한 것으로서, 60℃ 이하 저온에서 농축한 무 농축물에 발효 균주 첨가 후 단기 숙성 발효법으로 동치미의 상업적 생산을 위한 방법에 관한 것이다. 하지만, 본 발명의 고초균 및 젖산균을 이용한 2단 발효 스타터를 접종하고, 물을 첨가하지 않고 재료를 모두 착

즙한 엑기스와 박을 모두 혼합하여 천연초를 첨가하는 동치미 베이스를 제조하는 방법에 대한 언급은 없다.

[0008] 따라서, 본 발명자들은 고초균 및 젖산균을 이용한 2단 발효를 통한 스타터를 접종하고, 동치미에 사용되는 각각의 재료를 모두 착즙한 엑기스와 박을 혼합하여 수분첨가 없이 페이스트 상태에서 천연초가 첨가된 동치미 베이스를 제조하고 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009] 본 발명의 목적은 고초균 및 젖산균을 이용하여 2단 발효를 하고, 이를 스타터로 접종하여 제조된 천연초 첨가 동치미 베이스를 제조하는 방법을 제공하는데 있다.

[0010] 본 발명의 다른 목적은 상기의 방법에 의해 제조된 동치미 베이스를 제공하는데 있다.

과제의 해결 수단

[0011] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명자들은 GABA 생산 젖산균 및 다양한 젖산균을 이용해 천연초가 첨가된 동치미 베이스 제조를 수행하였다. 먼저 NB(nutrient broth) 액체배지에 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*) HA를 42℃에서 24시간, 160 rpm의 조건에서 배양하여 8,000 rpm에서 20분간 원심분리하여 상등액을 제거한 균체를 멸균수에 회석하였다. 이를 고초균 제한 배지 용액에 5% 접종하여 42℃에서 72시간, 160 rpm의 조건에서 1단 발효를 하였다. 그리고 4 종류의 젖산균[락토바실러스 플랜타럼(*Lactobacillus plantarum*) K154(KACC91727P), 락토바실러스 브레비스(*Lactobacillus brevis*) YC10(KCCM43012), 락토바실러스 플랜타럼(*Lactobacillus plantarum*) YC11(KCCM43013), 락토바실러스 퍼멘텀(*Lactobacillus fermentum*) YC12(KCCM43014)]은 MRS 액체배지에서 각각 30℃에서 48시간 배양하여 15,000 rpm에서 10분간 원심분리 후 상등액을 제거한 균체를 멸균수에 회석하여 젖산균 스타터를 얻었다. 이를 2단 젖산 발효 스타터로 제조하기 위하여 먼저 1단 발효물과 10% 탈지분유 용액을 1:1의 비율로 혼합하고, 각각의 젖산균 스타터를 1% 접종하여 30℃에서 72시간 배양하여 2단 젖산 발효 스타터를 만들었다. 동치미 베이스를 제조하기 위해 먼저 씨를 제거한 천연초 과육부를 85℃에서 30분간 열처리하였다. 그리고 동치미 베이스 재료들을 모두 착즙한 엑기스와 박을 혼합한 페이스트에 열처리 한 천연초를 5% 혼합하였다. 여기에 2단 발효 스타터(각각 2.5%씩) 10%를 접종하여 30℃에서 1일 발효 후 12℃에서 6일 동안 저온 발효하여 동치미 베이스를 제조하였다.

[0012] 본 발명은 (1) 1차 발효를 위한 고초균 스타터(starter)를 준비하여 접종하고 배양하는 1차 발효 단계; (2) 상기 1차 발효물과 10% 탈지분유를 혼합하는 단계; (3) 2차 발효를 위한 젖산균 스타터를 준비하여, (2)단계 혼합물에 접종하고 배양하는 2차 발효 단계; (4) 무, 배, 파, 사과, 생강, 마늘, 설탕 및 소금으로 이루어진 동치미 재료를 착즙하는 단계; (5) 상기 (4)단계에서 착즙된 착즙액 및 착즙박 혼합물에 상기 (3)단계의 2차 발효물을 접종하는 단계; 및 (6) 상기 (5)단계 혼합물을 25 내지 30℃에서 1일 동안 발효시킨 후, 8 내지 12℃에서 4 내지 6일 동안 발효시키는 단계를 포함하는 동치미 베이스 제조방법을 제공한다.

[0013] 한편, 상기 (4)단계 착즙 후에 전체 동치미 재료에 대해 천연초 1 내지 5 중량%를 더 추가하는 단계를 포함하고, 상기 (6)단계 발효 후에 전체 동치미 재료에 대해 마늘 1 내지 10 중량%를 더 추가하는 단계를 포함하며, 상기 (2)단계에서 1차 발효물과 10% 탈지분유는 1:1의 중량비율로 혼합하는 것을 특징으로 한다.

[0014] 상세하게는, 상기 고초균은 바실러스 서브틸리스 HA(*Bacillus subtilis* HA)(KCCM 10775P)이고, 상기 젖산균은 락토바실러스 플랜타럼(*Lactobacillus plantarum*) K154(KACC91727P), 락토바실러스 브레비스(*Lactobacillus brevis*) YC10(KCCM43012), 락토바실러스 플랜타럼(*Lactobacillus plantarum*) YC11(KCCM43013), 락토바실러스 퍼멘텀(*Lactobacillus fermentum*) YC12(KCCM43014)으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 이상의 균주인 것을 특징으로 한다.

[0015] 본 발명에 사용된 바실러스 서브틸리스 HA(*Bacillus subtilis* HA)(KCCM 10775P) 균주는 전통 청국장에서 분리

및 동정한 균주로서, 한국등록특허 제 10-0864850호(등록일 2008.10.16)에 개시되어 있다. 또한, 본 발명에 사용된 락토바실러스 플랜타럼(*Lactobacillus plantarum*) K154(KACC91727P)는 한국식품과학연구원으로부터 분양받아 사용하였다.

[0016] 상세하게는, 상기 1차 발효 단계는 37 내지 42℃에서, 72시간 동안 발효하는 것을 특징으로 하고, 상기 2차 발효 단계는 25 내지 30℃에서, 48 내지 72시간 동안 발효하는 것을 특징으로 한다.

[0017] 본 발명에 있어서, "동치미 베이스(base)"란 동치미 재료의 착즙액 및 착즙박을 혼합한 것을 기본으로 발효한 엑기스로서, 동치미 제조시 원하는 농도로 정제수에 희석하여 사용할 수 있다.

[0018] 본 발명에 있어서, "스타터(starter)"란 발효물을 제조하는 경우에 사용하는 미생물 배양액을 말한다. 따라서 스타터 미생물의 종류는 그 제품의 특성을 결정하게 되며 제품의 품질에 중요한 영향을 미친다. 미생물 중에서 스타터로 사용되고 있는 것은 박테리아, 곰팡이, 효모 등을 들 수 있으며, 이것을 단독 혹은 혼합하여 사용할 수 있다.

[0019] 또한, 본 발명은 상기의 방법에 의해 제조된 동치미 베이스를 제공한다.

[0020]

발명의 효과

[0021] 본 발명은 GABA 생성 젖산균 및 천연초를 이용한 동치미 베이스 제조방법으로서, 동치미 제조에 사용되는 모든 재료를 착즙한 엑기스와 박을 혼합하고, 여기에 고초균을 이용하여 1단 발효 후 GABA 생성 젖산균으로 다시 2단 발효를 통하여 γ -PGA와 GABA가 함유된 스타터를 접종한다. 또한 천연초를 동치미 베이스에 접목시켜 색과 기능성을 부여하고자 하였다. 그리하여 물을 첨가하지 않은 동치미 베이스를 제조하여 산업적 발전에 기여할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0022] 도 1은 동치미 베이스의 제조 및 발효과정을 도식화한 것이다.

도 2는 분리된 미생물의 GABA 생성 변화를 TLC로 나타낸 그래프이다.

도 3은 2단 발효 젖산균 스타터의 pH 및 산도 변화를 나타낸 그래프이다.

도 4는 2단 발효 젖산균 스타터 GABA 생성 변화를 TLC로 나타낸 그래프이다.

도 5는 단일균주와 혼합균주를 이용한 동치미 베이스의 pH 및 산도 변화를 나타낸 그래프이다. 단일균주: 락토바실러스 플랜타럼(*Lactobacillus plantarum*) K154, 혼합균주: 락토바실러스 플랜타럼(*Lactobacillus plantarum*) K154 / 락토바실러스 브레비스(*Lactobacillus brevis*) YC10 / 락토바실러스 플랜타럼(*Lactobacillus plantarum*) YC11 / 락토바실러스 퍼멘텀(*Lactobacillus fermentum*) YC12

도 6은 단일균주와 혼합균주를 이용한 동치미 베이스의 GABA 생성 변화를 TLC로 나타낸 그래프이다.

도 7은 소금 첨가에 따른 동치미 베이스의 pH 및 산도 변화를 나타낸 그래프이다.

도 8은 소금 첨가에 따른 동치미 베이스의 GABA 생성 변화를 TLC로 나타낸 그래프이다.

도 9는 천연초 첨가에 따른 동치미 베이스의 pH 및 산도 변화를 나타낸 그래프이다.

도 10은 천연초 첨가에 따른 동치미 베이스의 GABA 생성 변화를 TLC로 나타낸 그래프이다.

도 11은 마늘 비율에 따른 천연초 첨가 동치미 베이스의 pH 및 산도 변화를 나타낸 그래프이다.

도 12는 마늘 비율에 따른 천연초 첨가 동치미 베이스의 GABA 생성 변화를 TLC로 나타낸 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0023] 이하, 하기 실시예를 통해 본 발명을 보다 상세하게 설명한다. 다만, 이러한 실시예에 의해 본 발명이 한정되는 것은 아니다.

< 실시예 1 > 미생물의 분리, 생육, 동정 및 GABA 시험

[0025] GABA 생성능이 우수한 락토바실러스 플랜타럼(*Lactobacillus plantarum*) K154 균주는 한국식품과학연구원으로부터 분양받아 사용하였다. 그리고 동치미에서 젖산균을 분리하기 위해 시료를 1,000배 희석하여 MRS agar 배지(표 1)에 20 μ l를 평면도말법으로 접종한 후 30℃에서 48시간 배양하였다. 그런 다음, 각각의 균락을 MRS agar 배지에서 순수분리하고 잠정적 젖산균으로 선발하였고, 분리된 젖산균은 16S rRNA 유전자 염기서열(Gene Sequence)을 이용하여 판명하였다. 그리고 나서 분양받고, 순수분리된 젖산균 모두를 동치미 발효에 사용하였다. 또한 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*) HA의 생육을 위해 NB 배지(표 2)를 이용하였다.

표 1

MRS 배지의 조성

성 분	성분비(그램/리터)
프로테오스 펩톤 #3	10.0
쇠고기 추출물	10.0
효모 추출물	5.0
텍스트로즈	20.0
폴리솔베이트 80	1.0
암모늄 시트레이트	2.0
소듐 아세테이트	5.0
마그네슘 설페이트	0.1
망간 설페이트	0.05
디포타시움 포스페이트	2.0

표 2

NB 배지의 조성

성 분	성분비(그램/리터)
펩톤	3.0
쇠고기 추출물	5.0

[0028] 동치미에서 순수 분리된 젖산균을 16S rRNA 유전자 염기서열(Gene Sequence)을 이용하여 판명한 결과 락토바실러스 브레비스(*Lactobacillus brevis*), 락토바실러스 플랜타럼(*Lactobacillus plantarum*), 락토바실러스 퍼멘텀(*Lactobacillus fermentum*)으로 판명되었다. 본 발명자들은 각각의 젖산균을 락토바실러스 브레비스(*Lactobacillus brevis*) YC10, 락토바실러스 플랜타럼(*Lactobacillus plantarum*) YC11, 락토바실러스 퍼멘텀(*Lactobacillus fermentum*) YC12로 명명하고, 2013년 02월 05일 한국미생물보존센터(KCCM)에 기탁번호 KCCM43012, KCCM43013, KCCM43014로 기탁하였다.

[0029] 젖산균의 GABA 생성능을 확인하기 위하여 MRS 배지와 MSG 0.5%를 포함한 MRS배지에 각각 순수분리된 젖산균을 한 백금이 접종하여 48시간 동안 배양하여 TLC(Thin Layer Chromatography)를 이용하여 GABA 생성 유무를 확인하였다. 동치미에서 분리한 3가지의 균주 중에서 GABA를 생산하는 것은 락토바실러스 브레비스(*Lactobacillus brevis*) YC10로 나타났다. 나머지 2종류의 젖산균은 MRS 배지에서는 GABA를 생산하지 않는 것을 알 수 있었다

(도 2).

[0030] < 실시예 2 > 고초균 1단 발효물 제조 및 함량 시험

[0031] 고초균 발효에 필요한 제한배지 조성은 표 3에 나타내었다. 제조방법은 성분들을 각각 용액으로 제조하고, 121℃에서 15분간 멸균하여 발효 직전에 혼합하여 사용하였다.

표 3

[0032]

성분	단위(%)
모노 소듐 글루타메이트	3
글루코즈	3
암모늄 설페이트	0.5
모노포타슘 포스페이트	0.1
소듐 포스페이트 다이베이직 12-워터	0.1
마그네슘 설페이트 7-워터	0.05
칼슘 클로라이드	0.04
비오틴	0.005

[0033] pH 시험은 pH meter를 이용하였고, 산도는 0.1N-NaOH를 적하하여 pH 8.3에서 적정종료점으로 하여 이때 소비된 0.1N-NaOH 양으로 산출하였다. 점질물 함량은 1단 발효물을 8,000 rpm에서 20분간 원심분리한 상등액을 3배 부피의 95% 에탄올과 혼합하고 진탕하여 가라앉은 고형분을 분리하여 50℃에서 48시간 건조하여 무게를 측정하고 함량비로 나타내었다.

표 4

[0034]

발효시간(일)	pH	생균수(CFU/mL)	점질물(%)
1	5.64±0.19	1.24X10 ⁹	0.49±0.27
2	5.94±0.27	9.20X10 ⁸	0.98±0.34
3	6.36±0.22	8.50X10 ⁸	1.94±0.28

[0035] 표 4에서 보는 바와 같이 pH는 점차적으로 하여 발효 3일째 6.36±0.22를 나타냈고, 생균수는 발효 1일째 1.24X10⁹ CFU/mL로 가장 높았지만 발효시간이 길어질수록 조금씩 감소하는 경향을 보였다. 점질물의 함량은 발효 1일째 0.49±0.27%에서 발효 3일 1.94±0.28%로 증가하였다.

[0036] < 실시예 3 > 2단 발효 젖산균 스타터의 pH, 산도, 생균수 및 GABA 생성 시험

[0037] 1단 발효물과 10% 탈지분유 용액을 1:1의 비율로 혼합하였다. 이에 MRS에서 24시간 배양한 각각의 젖산균주를 8,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 상등액을 제거한 균체를 증류수 1 mL과 혼합하여 점종하고 30℃, 3일 동안 발효하여 기간별로 시험하였다. pH 시험은 pH meter를 이용하였고, 산도는 0.1N-NaOH를 적하하여 pH 8.3에서 적정종료점으로 하여 이때 소비된 0.1N-NaOH 양으로 산출하였다.

[0038] 도 3 에서와 같이 2단 발효 젖산균 스타터는 발효 시간이 지날수록 pH가 감소하고, 산도는 증가하는 것을 나타내었다. 특히 발효가 가장 빠른 것은 락토바실러스 플랜타럼(*Lactobacillus plantarum*) K154 균주으로써 발효 3일째 pH 4.23, 산도 1.13%로 나타났다.

[0039] 생균수는 24시간 간격으로 72시간까지 배양한 각 시료를 MRS agar 평판배지에 10단계 희석법을 이용하였으며 표 5에 나타내었다.

표 5

[0040]

	생균수(CFU/mL)			
	0일	1일	2일	3일
<i>L. plantarum</i> K154	0	1.65×10^9	2.25×10^9	1.10×10^9
<i>L. brevis</i> YC10	0	7.75×10^8	9.75×10^8	6.00×10^8
<i>L. plantarum</i> YC11	0	1.17×10^9	1.84×10^9	9.75×10^8
<i>L. fermentum</i> YC12	0	6.25×10^8	9.25×10^8	6.90×10^8

[0041] 생균수는 표 5에서와 같이 락토바실러스 플랜타럼(*Lactobacillus plantarum*) K154 균주가 1.10×10^9 CFU/mL로 가장 높게 나타났다. 발효 3일 동안 생균수는 모든 조건에서 10^8 CFU/mL 이상을 유지하였고, 이를 동치미 스타터로 사용하였다.

[0042] 2단 발효 젖산균 스타터에서의 GABA 생성능을 확인하기 위하여 상기 방법으로 발효한 것을 24시간 간격으로 샘플을 채취해 TLC(Thin Layer Chromatography)를 이용하여 GABA 생성 유무를 확인하였다.

[0043] 도 4 에서 보는 바와 같이 모든 젖산균이 배양 기간 3일 동안 GABA를 생성하는 것으로 나타났다. 특히 GABA 생성이 가장 높은 것은 락토바실러스 플랜타럼(*Lactobacillus plantarum*) K154 균주였으며, 락토바실러스 브레비스(*Lactobacillus brevis*) YC10 균주도 배양 3일째 GABA의 함량이 급격히 증가하는 것으로 나타났다.

[0044] < 실시예 4 > 단일균주와 혼합균주를 이용한 동치미 베이스의 pH, 산도, 생균수 및 GABA 시험

[0045] 동치미 재료의 착즙액과 착즙박을 모두 혼합하였다. 여기에 실시예 3의 방법으로 제조한 2단 젖산 발효 스타터를 전체 무게의 10% 접종(각각 균주별 스타터 2.5%씩)하여 표 6의 재료비율로 동치미를 제조했다. 동치미는 30℃에서 1일 발효 후, 12℃에서 6일 동안 숙성하였다. pH 시험은 pH meter를 이용하였고, 산도는 0.1N-NaOH를 적하하여 pH 8.3에서 적정종료점으로 하여 이때 소비된 0.1N-NaOH양으로 산출하였다.

표 6

[0046]

재 료	단 위(그램)
무	150
배	6
과	5
사과	5
생강	2
마늘	20
설탕	10
소금	2
천년초(별도 첨가)	(10)
합계	200(천년초 첨가 시 210)

[0047] 천년초를 첨가하기 위하여 씨를 제거한 천년초 과육부를 85℃에서 30분간 열처리 하여 실온에서 냉각하여 사용하였다. 그리고 나서 천년초는 동치미 발효를 위해 2단 젖산 발효 스타터를 접종하기 전 동치미 무게 대비하여 5%를 첨가하였다.

[0048] 도 5에서 보는 바와 같이, 단일균주로 발효한 것보다 혼합균주를 이용하여 발효하였을 때 발효속도가 빠르게 진행되는 것을 알 수 있었다. 혼합균주로 7일 동안 발효한 결과 pH 4.05, 산도 1.03%로 나타났다.

[0049] 생균수는 발효한 동치미 시료를 기간별로 채취하여 MRS agar 평판배지에 10단계 희석법을 이용하여 측정하였으며 표 7에 나타내었다.

표 7

[0050]

	생균수(CFU/mL)				
	0일	1일	3일	5일	7일
단일균주	0	2.75×10^7	1.10×10^8	6.80×10^7	6.50×10^7
혼합균주	0	1.80×10^8	2.00×10^8	1.42×10^8	1.42×10^8

[0051] 단일균주: 락토바실러스 플랜타럼(*Lactobacillus plantarum*) K154,

[0052] 혼합균주: 락토바실러스 플랜타럼(*Lactobacillus plantarum*) K154 / 락토바실러스 브레비스(*Lactobacillus brevis*) YC10 / 락토바실러스 플랜타럼(*Lactobacillus plantarum*) YC11 / 락토바실러스 퍼멘텀(*Lactobacillus fermentum*) YC12

[0053] 표 7에서 보는 바와 같이 혼합균주를 활용한 동치미의 생균수가 발효기간에 관계없이 높은 것으로 나타났다. 생균수는 동치미 발효 7일째 혼합균주를 이용하였을 때 단일균주의 생균수 6.50×10^7 CFU/mL보다 1.42×10^8 CFU/mL로 더 많은 것으로 나타났다. 따라서 동치미 베이스 제조에 혼합균주를 사용하였다.

[0054] 동치미의 GABA 생성능을 확인하기 상기의 방법으로 발효한 동치미를 기간별로 샘플을 채취해 TLC(Thin Layer Chromatography)를 이용하여 GABA 생성 유무를 확인하였다.

[0055] 도 6에서와 같이 단일균주와 혼합균주를 이용한 동치미의 발효 기간에 따른 GABA의 변화는 뚜렷한 차이를 보이지 않는 것으로 나타났다. 30℃에서 24시간째 생성된 GABA의 함량은 발효 7일째의 GABA 함량과 큰 차이가 없었으나, 혼합균주를 이용한 동치미의 GABA 함량이 단일균주로 발효한 동치미보다 조금 더 많은 것을 알 수 있었다.

[0056] < 실시예 5 > 소금 첨가에 따른 동치미 베이스의 pH, 산도, 생균수 및 GABA 생성 시험

[0057] pH 시험은 pH meter를 이용하였고, 산도는 0.1N-NaOH를 적하하여 pH 8.3에서 적정종료점으로 하여 이때 소비된 0.1N-NaOH양으로 산출하였다.

[0058] 도 7에서와 같이 소금 첨가 비율이 높아질수록 동치미 발효가 저해되는 것으로 나타났다. 특히 소금 3% 이상에서는 발효가 거의 일어나지 않는 것으로 나타났다. pH와 산도의 변화가 거의 없었다. 하지만 소금 1%조건에서 pH 변화가 가장 컸으며 발효 7일째 pH 발효가 빠르게 진행된 조건은 소금1%에서 pH 3.93, 산도 1.26%로 나타났

다.

[0059] 생균수는 발효한 동치미 베이스 시료를 기간별로 채취하여 MRS agar 평판배지에 10단계 희석법을 이용하여 측정하였으며 표 8에 나타내었다.

표 8

[0060]

	생균수(CFU/mL)			
	1일	3일	5일	7일
소금1%	1.13×10^8	3.95×10^8	3.50×10^8	3.25×10^8
소금2%	5.00×10^7	3.50×10^8	1.58×10^8	1.00×10^8
소금3%	6.10×10^7	3.38×10^7	3.20×10^7	7.56×10^6
소금4%	2.90×10^7	6.00×10^6	1.05×10^4	3.80×10^3

[0061] 표 8에서 보는 바와 같이 소금 첨가 비율이 높을수록 생균수는 감소하는 것을 알 수 있었다. 특히 소금 4% 조건에서는 발효 5일이 지나면서 생균수는 급격히 감소하여 발효 7일째 3.80×10^3 CFU/mL로 나타났다. 소금 1% 조건에서는 발효 7일째 3.25×10^8 CFU/mL로 가장 높은 생균수를 나타내었다.

[0062] 동치미 베이스의 GABA 생성능을 확인하기 위하여 발효한 동치미를 기간별로 샘플을 취하고 95% 에탄올에 3배 희석하여 침전된 점질물을 15,000rpm에서 10분간 원심분리하여 제거한 상등액을 TLC(Thin Layer Chromatography)를 이용하여 GABA 생성 유무를 확인하였다.

[0063] 도 8에서 보는 바와 같이 GABA의 생성에 대해서는 소금 첨가 비율에 큰 영향 없이 비슷하게 생성되는 것을 알 수 있었다. 또한 발효 1일째 생성된 GABA의 함량이 발효가 길어지더라도 계속적으로 생성되는 경향은 보이지 않았다.

[0064] < 실시예 6 > 천년초 첨가에 따른 동치미 베이스의 pH, 산도, 생균수, 색도 및 GABA 시험

[0065] 천년초가 첨가된 동치미 베이스는 2단 젖산 발효 스타터를 접종하기 전에 씨를 제거한 천년초 과육부를 85℃에서 30분간 열처리 및 냉각시킨 것을 농도별로 첨가하였다. 그리고 나서 2단 젖산 발효 스타터(혼합균주)를 접종하여 동치미 발효를 하였다. pH 시험은 pH meter를 이용하였고, 산도는 0.1N-NaOH를 적하하여 pH 8.3에서 적정종료점으로 하여 이때 소비된 0.1N-NaOH양으로 산출하였다.

[0066] 도 9 에서와 같이 천년초의 첨가 비율이 높아지더라도 pH의 차이는 크게 차이나지 않았다. 산도는 천년초 5% 첨가한 조건이 발효 3일이 지나면서 가장 높게 유지되었으며 발효 7일째 1.06%로 나타났다.

[0067] 생균수는 발효한 동치미 베이스 시료를 기간별로 채취하여 MRS agar 평판배지에 10단계 희석법을 이용하여 측정하였으며 표 9에 나타내었다.

표 9

[0068]

	생균수(CFU/mL)			
	1일	3일	5일	7일
천년초0%	2.18×10^8	4.50×10^8	9.25×10^8	6.25×10^8

천년초1%	6.90X10 ⁸	6.88X10 ⁸	1.04X10 ⁹	8.78X10 ⁸
천년초5%	4.38X10 ⁸	7.63X10 ⁸	1.80X10 ⁹	9.25X10 ⁸

[0069] 표 9에서 보는 바와 같이 천년초의 첨가 비율이 높을수록 생균수는 증가하는 것을 알 수 있었다. 생균수는 발효 1일째 천년초 1% 조건이 높았으나 발효 3일이 지나면서 천년초 5% 조건에서 높게 나타났다. 발효 7일째 6.90X10⁸ CFU/mL로 천년초 5% 조건이 가장 높게 나타났다.

[0070] 동치미 베이스의 색도 시험은 색도계로 Hunter 색계의 L, a, b 값으로 측정하였다. L 값은 명도, a 값은 적색도 그리고 b 값은 황색도를 나타내며 표 10에 나타내었다.

표 10

[0071]

		0	1	3	5	7
L	천년초0%	30.67	33.23	36.59	37.22	37.84
	천년초1%	29.60	31.81	35.81	36.21	36.81
	천년초5%	28.40	28.56	29.72	29.94	30.22
a	천년초0%	-1.64	-1.69	-2.07	-1.87	-1.95
	천년초1%	-1.43	-1.39	-1.42	-1.24	-1.02
	천년초5%	2.06	2.36	3.37	5.67	6.32
b	천년초0%	4.60	4.82	5.16	5.25	5.27
	천년초1%	4.97	4.87	4.89	4.39	4.59
	천년초5%	4.88	4.81	4.37	4.14	4.18

[0072] 표 10에서 보는 것과 같이 명도는 발효 기간이 길어질수록 조금씩 증가하는 것으로 나타났으며 천년초 0%에서 발효 7일째 37.84로 가장 높게 나타났다. 적색도는 천년초 5%에서 발효 초기 2.06에서 발효 7일째 6.32로 적색도가 증가하는 경향을 나타냈지만 다른 조건에서는 변화가 거의 일어나지 않았다. 황색도의 경우 조건에 관계없이 거의 변화가 나타나지 않았다.

[0073] 동치미 베이스의 GABA 생성능을 확인하기 위하여 발효한 동치미 베이스를 기간별로 샘플을 취하고 95% 에탄올에 3배 희석하여 침전된 점질물을 15,000rpm에서 10분간 원심분리하여 제거한 상등액을 TLC(Thin Layer Chromatography)를 이용하여 GABA 생성 유무를 확인하였다.

[0074] 도 10에서 보는 바와 같이 천년초 첨가조건이 GABA의 생성에 영향을 크게 주지 않는 것을 알 수 있었다. 또한 발효 1일째 생성된 GABA의 함량이 발효가 길어지더라도 지속적으로 증가하는 경향은 보이지 않았다.

[0075] < 실시예 7 > 마늘 비율에 따른 천년초 첨가 동치미 베이스의 pH, 산도, 생균수, 색도 및 GABA 시험

[0076] 동치미 베이스는 마늘의 첨가 비율을 0~10%까지 조건을 달리하여 제조하였다. pH 시험은 pH meter를 이용하였고, 산도는 0.1N-NaOH를 적하하여 pH 8.3에서 적정종료점으로 하여 이때 소비된 0.1N-NaOH양으로 산출하였다.

[0077] 도 11에서 보는 바와 같이 pH는 마늘 첨가량에 비례적으로 높아지는 것을 알 수 있었다. 이는 마늘의 항균활성으로 인한 균의 생육을 억제하여 발효가 지연된다는 연구보고와 일치하는 것으로 나타났다. 발효 3일째까지는 마늘 7.5, 10% 조건에서 발효진행이 느렸으나 발효 7일째는 pH의 차이는 크게 나타나지 않았다. 산도는 마늘 무첨가군이 가장 높게 나타났다.

[0078] 생균수는 발효한 동치미 베이스 시료를 기간별로 채취하여 MRS agar 평판배지에 10단계 희석법을 이용하여 측정하였으며 표 11에 나타내었다.

표 11

[0079]

	생균수(CFU/mL)			
	1일	3일	5일	7일
마늘 0%	8.62×10^8	6.00×10^8	6.70×10^8	5.70×10^8
마늘 2.5%	4.20×10^8	4.50×10^8	6.00×10^8	5.80×10^8
마늘 5%	1.58×10^8	3.45×10^8	3.65×10^8	2.96×10^8
마늘 7.5%	1.18×10^8	8.80×10^7	3.25×10^8	3.35×10^8
마늘 10%	7.10×10^7	1.95×10^8	2.80×10^8	2.20×10^8

[0080] 표 11에서 보는 것과 같이 생균수는 마늘 첨가 비율이 높을수록 생균수는 감소하는 것으로 나타났다. 마늘 2.5% 조건까지는 마늘 무첨가군과 발효기간 동안 큰 차이를 나타내지 않았으나, 마늘 5% 이상의 조건에서는 생균수의 차이가 나는 것을 알 수 있었다.

[0081] 동치미 베이스의 GABA 생성능을 확인하기 위하여 발효한 동치미 베이스를 기간별로 샘플을 취하고 95% 에탄올에 3배 희석하여 침전된 점질물을 15,000rpm에서 10분간 원심분리하여 제거한 상등액을 TLC(Thin Layer Chromatography)를 이용하여 GABA 생성 유무를 확인하였다.

[0082] 도 12에서와 같이 마늘첨가에 따른 동치미 베이스의 GABA 생성은 마늘 0% 조건에서 발효기간이 지날수록 점차적으로 증가하는 것을 알 수 있었다. 하지만 마늘 2.5% 이상의 조건에서는 GABA의 생성이 발효 1일째와 변화가 없는 것으로 나타났다. 따라서 마늘을 첨가하지 않고 동치미 베이스를 제조하여 GABA의 함량을 증가시켜 발효 종료 후 마늘을 첨가하는 것이 적절한 것으로 나타났다.

수탁번호

[0083]

기탁기관명 : 한국미생물보존센터(국외)

수탁번호 : KCCM43012

수탁일자 : 20130205

기탁기관명 : 한국미생물보존센터(국외)

수탁번호 : KCCM43013

수탁일자 : 20130205

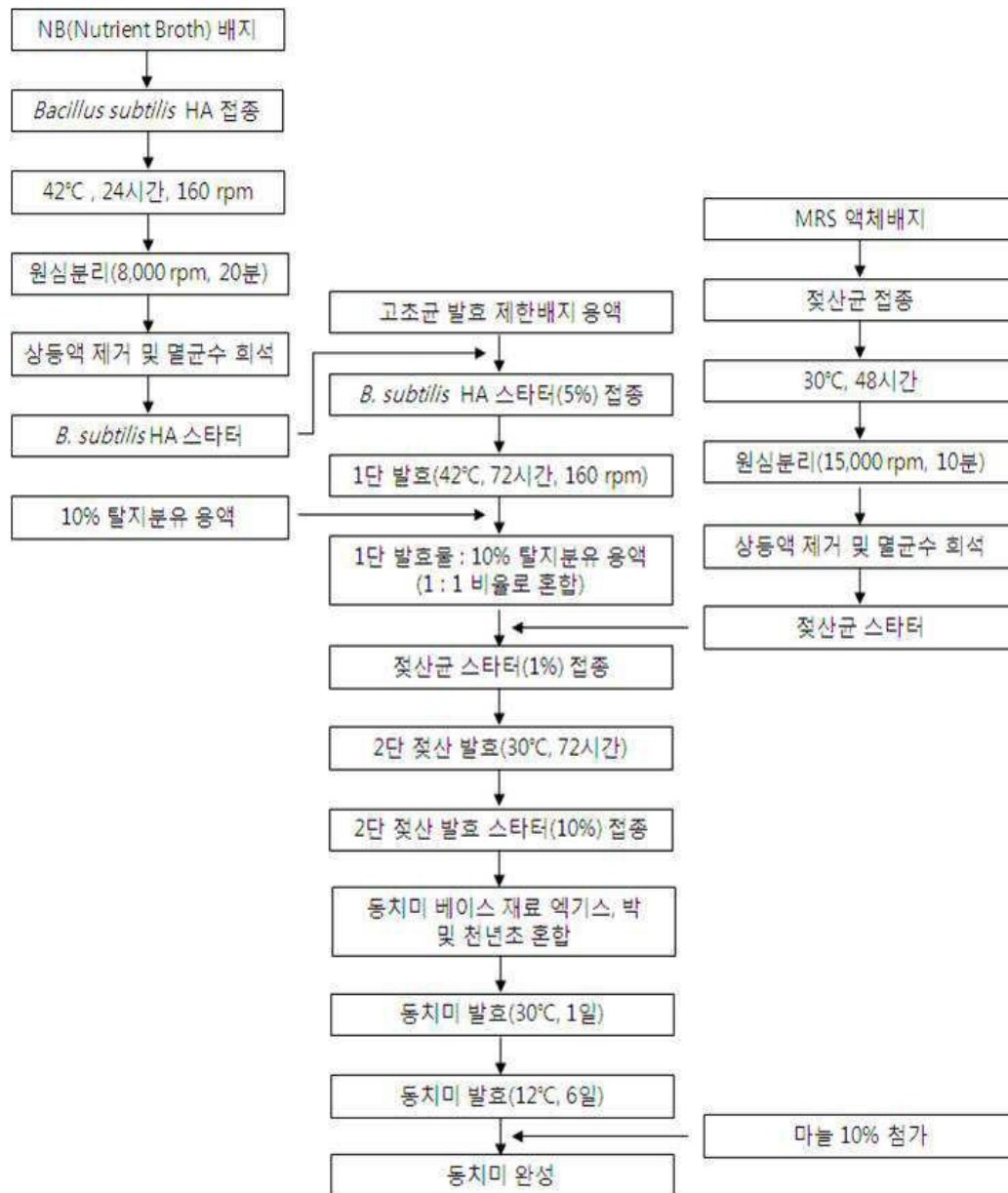
기탁기관명 : 한국미생물보존센터(국외)

수탁번호 : KCCM43014

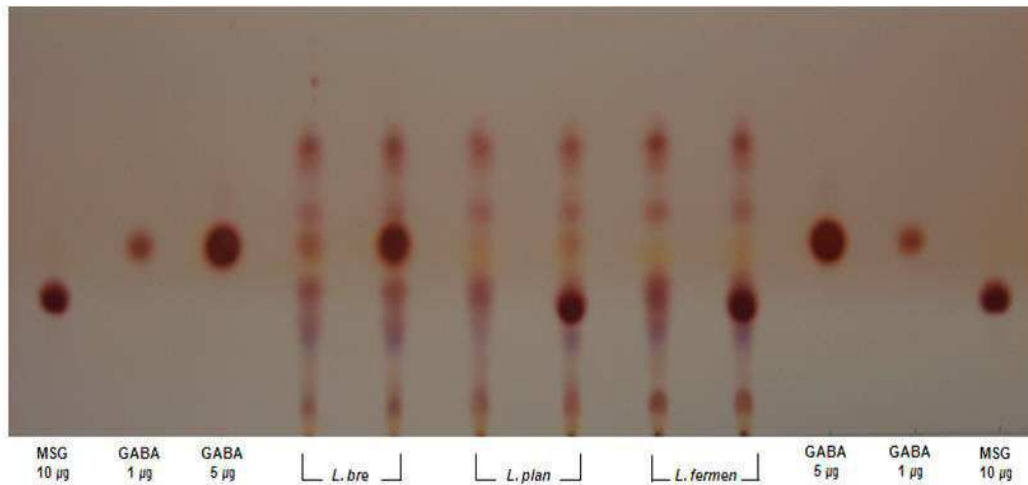
수탁일자 : 20130205

도면

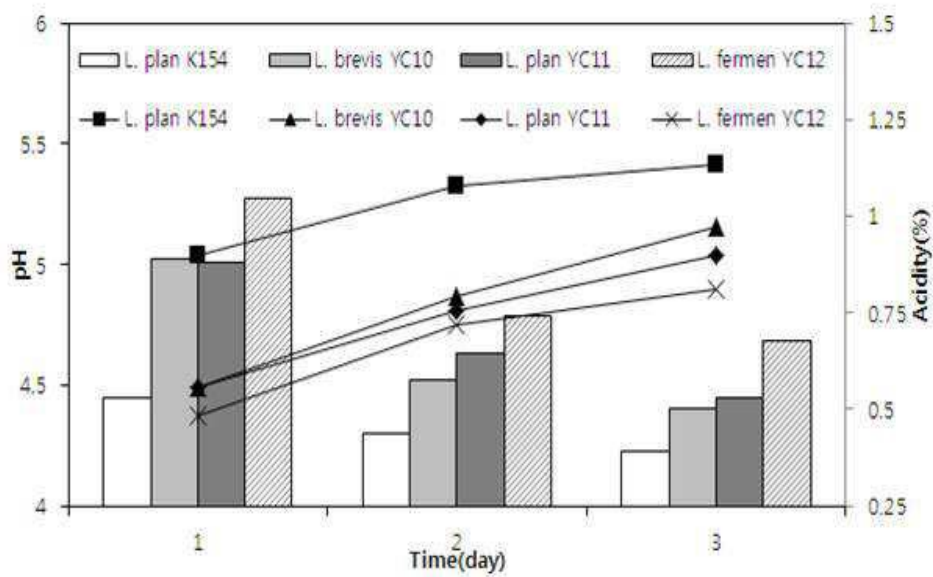
도면1



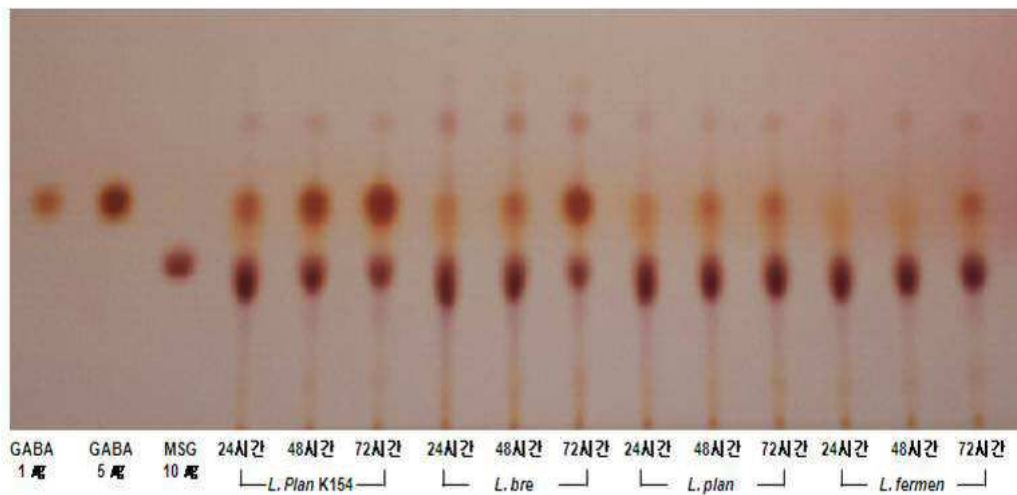
도면2



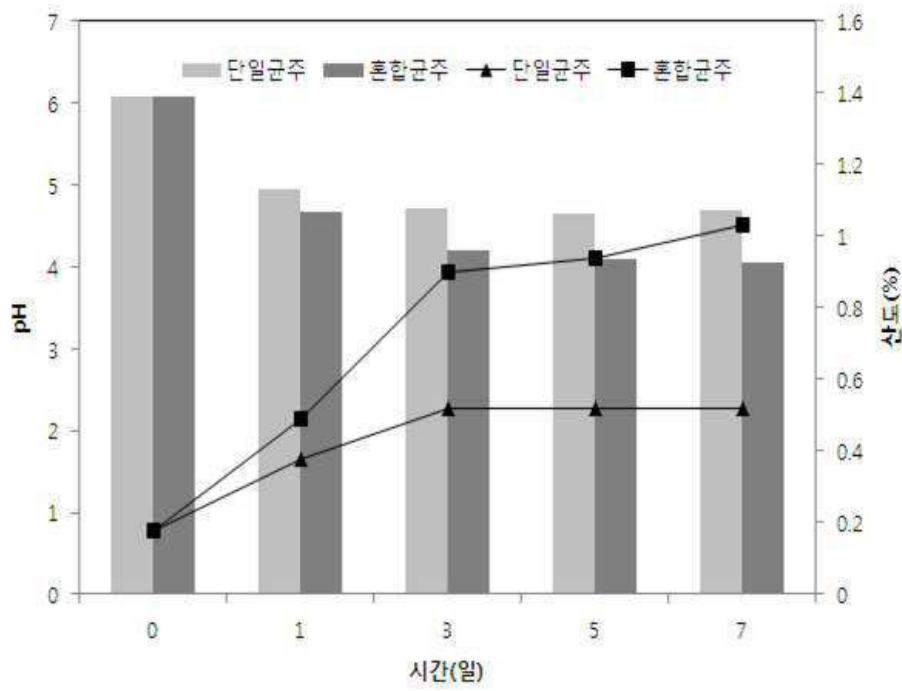
도면3



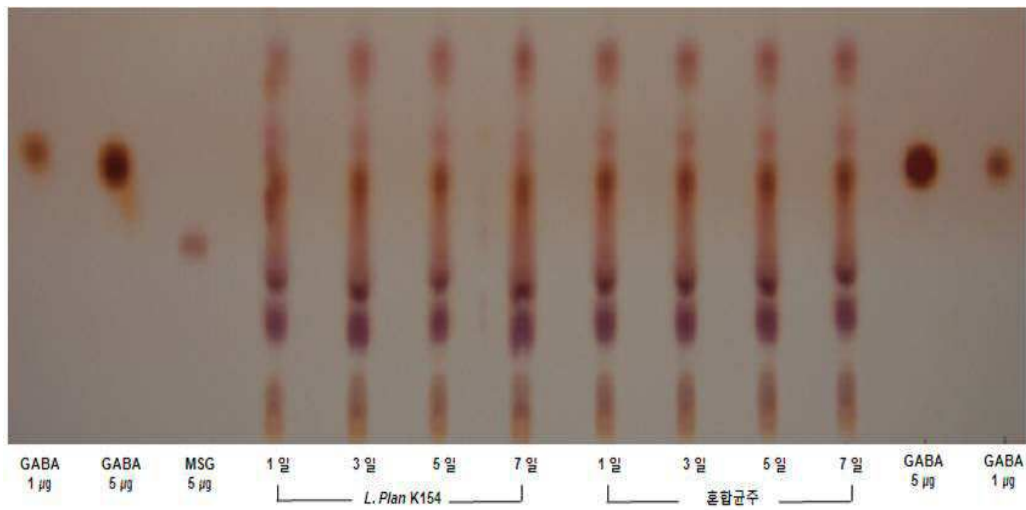
도면4



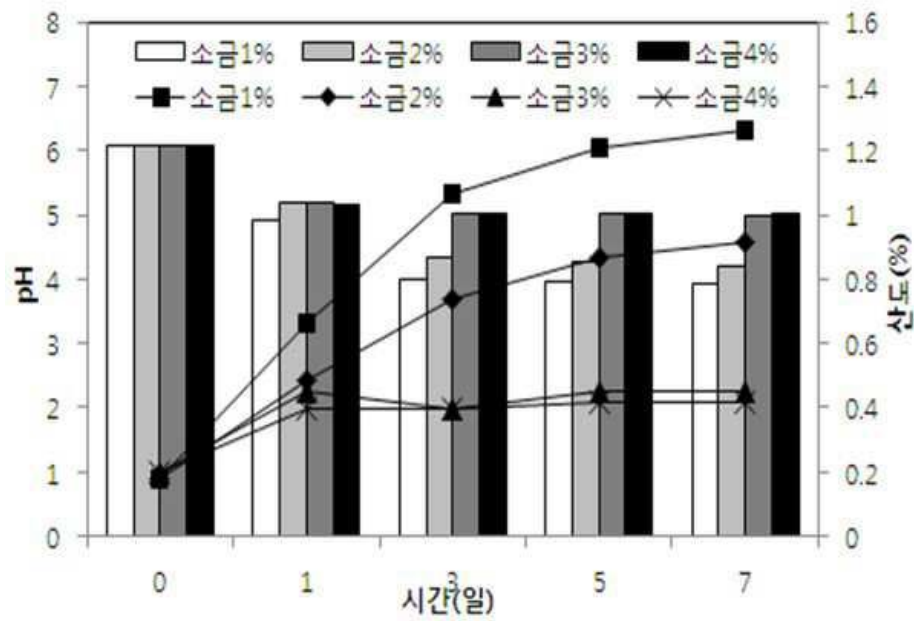
도면5



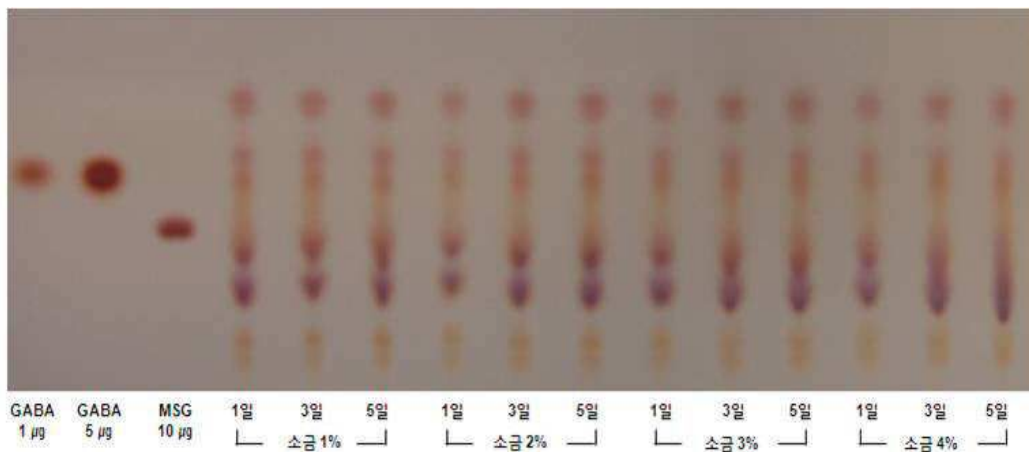
도면6



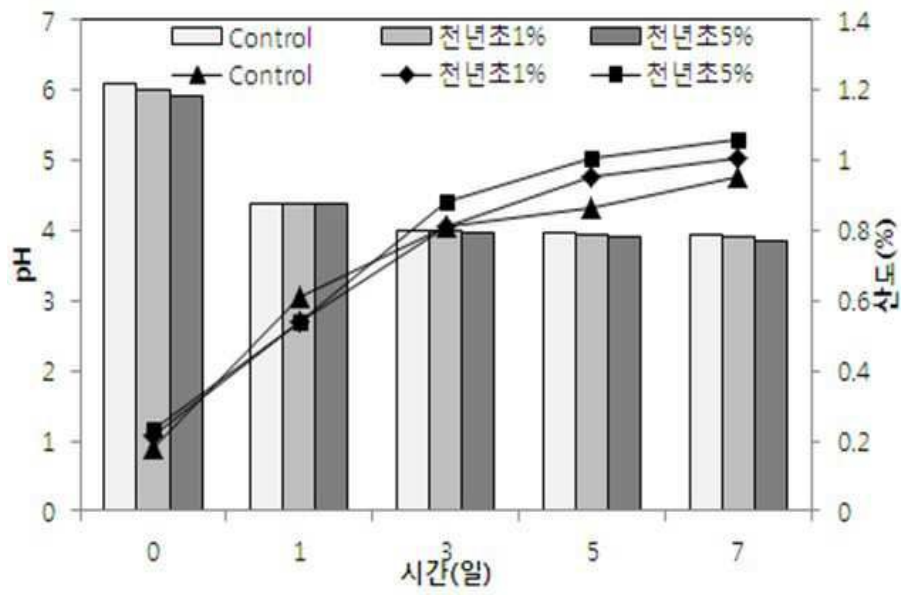
도면7



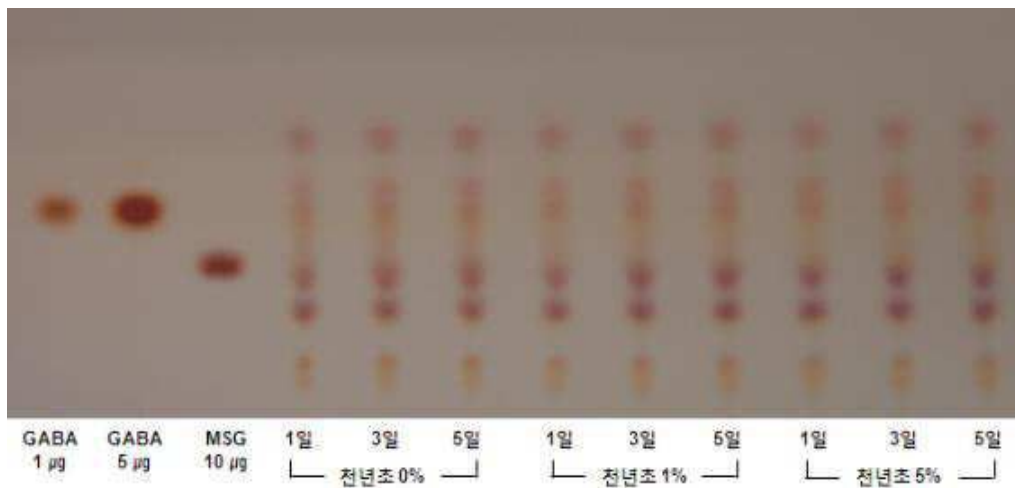
도면8



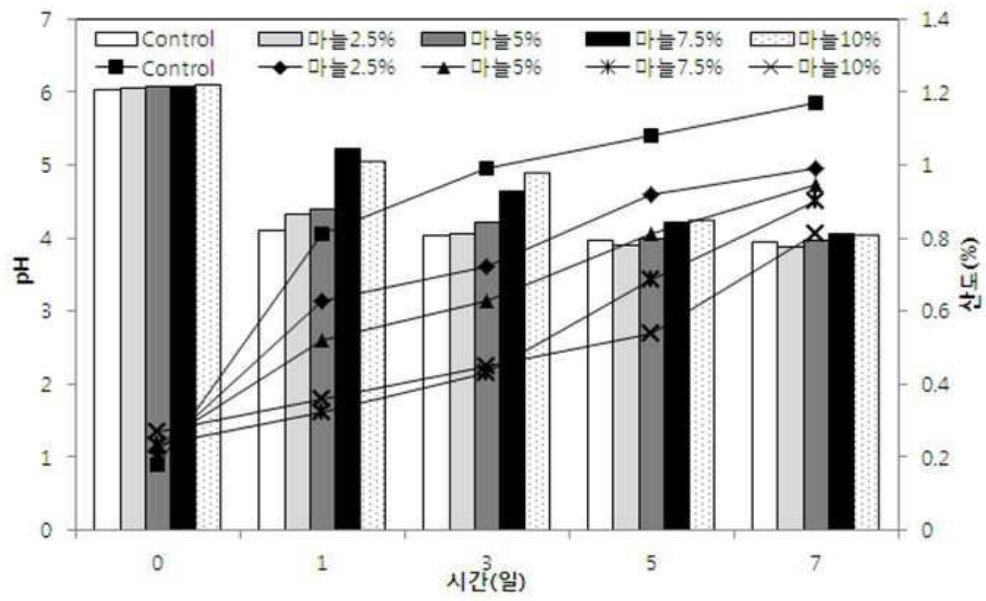
도면9



도면10



도면11



도면12

