(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2020 년 6 월 4 일 (04.06.2020)

WIPO | PCT

(10) 국제공개번호
WO 2020/111724 A1

(51) 국제특허분류:
A23L 33/105 (2016.01)

(21) 국제출원번호: PCT/KR2019/016360

(22) 국제출원일: 2019 년 11 월 26 일 (26.11.2019)

(25) 출원언어: 한국어

(26) 공개언어: 한국어

(30) 우선권정보:
10-2018-0152025 2018 년 11 월 30 일 (30.11.2018) KR

(71) 출원인: 계명대학교 산학협력단 (**INDUSTRY ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION KEIMYUNG UNIVERSITY**) [KR/KR]; 42601 대구시 달서구 달구벌대로 1095, Daegu (KR).

(72) 발명자: 이삼빈 (**LEE, Sam Pin**); 42605 대구시 달서구 선원로 171, 102동 306호, Daegu (KR). 최지연 (**CHOE, Ji-Yeon**); 41930 대구시 중구 달구벌대로 1937, 2동 103호, Daegu (KR). 황정인 (**HWANG, Jeong In**); 41475 대구시 북구 서변로 120, 102동 907호, Daegu (KR). 문예진 (**MOON, Ye Jin**); 42832 대구시 달서구 한실로 49, 511동 306호, Daegu (KR). 김수현 (**KIM, Su Hyeon**); 42773 대구시 달서구 진천로 41, 102동 701호, Daegu (KR).

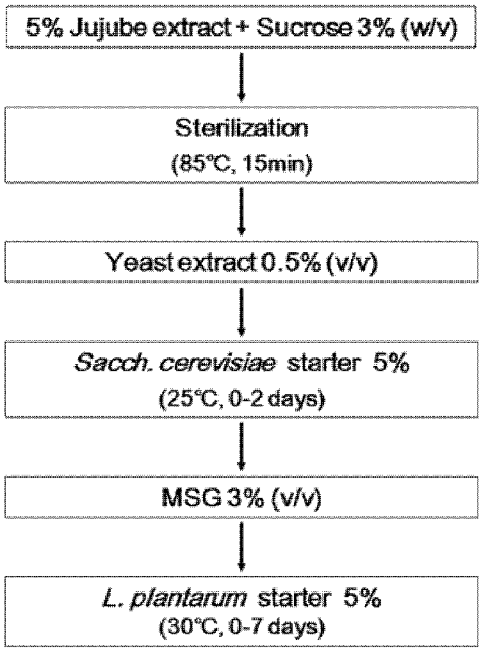
(74) 대리인: 특허법인 태백 (**TAEBAEK INTELLECTUAL PROPERTY LAW FIRM**); 08506 서울시 금천구 가산디지털1로151 이노플렉스1차 601호, Seoul (KR).

(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK,

WO 2020/111724 A1

(54) Title: FERMENTED JUJUBE HAVING INCREASED CONTENT OF GABA BY USING COMPLEX FERMENTATION AND PREPARATION METHOD THEREFOR

(54) 발명의 명칭: 복합 발효를 이용한 GABA 증진된 대추 발효물 및 그 제조 방법



(57) Abstract: The present invention provides a fermented jujube having an increased content of γ-aminobutyric acid (hereinafter referred to as GABA) by using complex fermentation and a preparation method therefor. More particularly, a method for preparation of fermented jujube having an increased content of GABA according to the present invention comprises the steps of: preparing a jujube extract; adding and mixing the jujube extract with fermentative sugars and a yeast extract; inoculating a first starter into the mixture to conduct primary fermentation; and adding monosodium glutamate (MSG) to the primarily fermented product and inoculating a second starter to the primarily fermented product to conduct secondary fermentation. The preparation method utilizes the complex fermentation of lactic acid bacteria and lactic acid bacteria, or yeast and lactic acid bacteria to effectively prepare fermented jujube having an increased content of GABA. The fermented jujube prepared according to the method has an increased content of GABA and as such, can be used in health functional foods or functional beverages.

(57) 요약서: 본 발명은 복합 발효를 이용한 감마 아미노뷰티르산(γ-Aminobutyric acid; 이하, GABA) 증진된 대추 발효물 및 그 제조 방법을 제공한다. 보다 상세하게는, 본 발명에 따른 GABA 증진된 대추 발효물 제조 방법은 대추 추출물을 제조하는 단계; 상기 대추 추출물에 발효성 당류 및 효모 추출물을 첨가하여 혼합하는 단계; 상기 혼합물에 제1 스타터(starter)를 접종하여 제1 차 발효하는 단계; 및 상기 제1 차 발효물에 모노소듐글루타메이트(monosodium glutamate, MSG)를 첨가하고 제2 스타터(starter)를 접종하여 제2 차 발효하는 단계;를 포함할 수 있다. 상기 제조 방법은 젖산균과 젖산균 또는 효모와 젖산균의 복합 발효를 이용하여 효과적으로 GABA 함량이 증진된 대추 발효물을 제조할 수 있고, 이에 따라 제조된 대추 발효물은 GABA 함량이 증진되어 건강기능식품 또는 기능성 음료 등으로 이용할 수 있다.

[다음 쪽 계속]

MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

공개:

— 국제조사보고서와 함께 (조약 제21조(3))

명세서

발명의 명칭: 복합 발효를 이용한 GABA 증진된 대추 발효물 및 그 제조 방법

기술분야

[1] 본 발명은 복합 발효를 이용한 GABA 증진된 대추 발효물 및 그 제조 방법에 관한 것이다.

배경기술

[2] 최근 소비자들의 생활수준 향상과 더불어 고령화 시대에 성인병 발병률이 증가함에 따라 건강기능식품의 수요도 점차 늘어가는 추세이다. 고혈압, 당뇨병 등의 성인병의 예방 및 개선의 일환으로 천연물 소재를 활용한 건강기능식품 개발 또한 점차 늘어가고 있다.

[3] 갈매나무과(Rhamnaceae) 대추나무속의 낙엽활엽교목 과일인 대추는 수확기간이 약 10일 정도로 아주 짧고 생대추 상태로의 저장성이 좋지 못하여 수확 후 바로 건조시킨 상태로 저장, 유통되고 있다. 건조된 대추는 당분과 비타민C가 풍부하고 독특한 맛과 향을 가진다. 대추의 약용 성분으로는 스테롤(sterol), 알칼로이드(alkaloid), 사포닌(saponin), 비타민류, 유기산류, 아미노산류 등이 존재한다. 약리 효과로는 뇌출혈과 고혈압의 예방 등 순환기계통의 건강 유지에 유익하며 자양강장, 이뇨제, 완화제, 만성 기관지염, 거담제, 결핵, 위의 허한증을 치료하는 등의 한방 약재로서 또는 과실의 한 종류로 널리 사용되어 왔다.

[4] 근래에는 대추의 약리적 효과가 널리 알려지면서 현재까지 대추 활용 및 이용에 관한 연구, 대추 분말 형태의 가공에 관한 연구, 대추 추출액의 암세포 증식 억제 효과에 관한 연구, 대추 성분에 관한 연구, 대추를 이용하여 제조한 떡, 술, 소스에 관한 연구, 제조 과정에 따른 대추 페이스트의 이화학적 특성에 관한 연구 등이 보고되고 있다. 이처럼 점차 다양한 제품이 개발되고 있어 대추를 주원료로 한 대추 가공식품의 소비는 계속 증가할 전망이다.

[5] 감마 아미노뷰티르산(γ-Aminobutyric acid; 이하, GABA)은 뇌나 척수에 존재하는 비단백질성 아미노산 신경전달물질로, 혈류를 개선하고 뇌의 산소 공급을 증가시켜 뇌의 대사 촉진 및 뇌 기억력을 증진시킨다. 이러한 기능은 신경세포의 기능과 정보 처리에 지대한 영향을 미치게 되는데, 특히 감각 뇌에서 방향 민감성, 각도 민감성 반응 등을 결정하며 정교한 운동 기능도 조율하는 것으로 알려져 있다. 최근 GABA가 흥분성 신경전달 물질을 감소시켜 진정 효과를 주어 자연스럽게 잠을 유도하는 데 도움이 된다는 연구도 진행되고 있다.

[6] GABA의 다양한 기능성이 알려지면서 의약품으로서 뿐만 아니라 기능성 식품 소재로 이용하고자 하는 연구가 많이 시도되고 있고, 이들 연구들은 현미, 녹차, 맥아, 배추 등에 자연적으로 약간 함유되어 있는 GABA의 함량을 증대시키는 데

집중되어 있으나, 자연계의 식물을 원재료로 한 GABA의 생산에는 한계가 있다. 특히, 국내에서 GABA는 혈압강하에 도움을 주는 것으로 식약처 건강기능식품원료로 등재되어있다.

[7] 효모와 젖산균은 대표적인 발효 미생물이자, 섭취가 가능한 GRAS (generally recognized as safe; 미국 FDA에서 지정한 일반적으로 안전한 물질)로서 기능성 물질인 GABA 생산에 관여한다는 연구 보고가 있다. GABA의 대량 생산을 위해서는 미생물을 이용한 연구로서 효모 또는 젖산균을 이용한 발효물과 이를 이용한 제품 개발이 활발해지고 있지만, 효모와 젖산균의 단계적인 복합 발효에 관한 연구는 전무한 실정이다. 따라서 효모와 젖산균의 복합발효 최적화를 통해서 대량으로 GABA를 생산함으로서 고농도 GABA함유 기능성 발효소재를 개발하는 것은 상업적 소재로 경쟁력이 있다고 판단하였다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

[8] 상기와 같은 문제점을 해결하기 위해서, 본 발명은 감마 아미노뷰티르산(γ-Aminobutyric acid; 이하, GABA) 증진된 대추 발효물 및 그 제조 방법을 제공한다.

[9] 또한, 본 발명은 GABA 증진된 건강기능식품 조성물 및 기능성 음료를 제공한다.

과제 해결 수단

[10] 본 발명에 따른 감마 아미노뷰티르산(γ-Aminobutyric acid; 이하, GABA) 증진된 대추 발효물 제조 방법은 대추 추출물을 제조하는 단계; 상기 대추 추출물에 발효성 당류 및 효모 추출물을 첨가하여 혼합하는 단계; 상기 혼합물에 제1 스타터(starter)를 접종하여 제1 차 발효하는 단계; 및 상기 제1 차 발효물에 모노소듐글루타메이트(monosodium glutamate, MSG)를 첨가하고 제2 스타터(starter)를 접종하여 제2 차 발효하는 단계;를 포함할 수 있다.

[11] 본 발명에 따른 GABA 증진된 대추 발효물은 상기 제조 방법에 따라 제조될 수 있다.

[12] 본 발명에 따른 GABA 증진된 건강기능식품 조성물은 상기 대추 발효물을 유효성분으로 함유할 수 있다.

[13] 본 발명에 따른 GABA 증진된 기능성 음료는 기능성 음료 전체 100 중량부에 대하여, 상기 대추 발효물 3 내지 10 중량부; 대추 추출액 40 내지 60 중량부; 및곤약 분말 0.5 내지 2 중량부;를 포함할 수 있다.

발명의 효과

[14] 본 발명에 따른 대추 발효물 제조 방법은 젖산균과 젖산균 또는 효모와 젖산균의 복합 발효를 이용하여 감마 아미노뷰티르산(γ-Aminobutyric acid; 이하, GABA) 함량이 증진된 대추 발효물을 효과적으로 제조할 수 있다.

[15] 상기 제조 방법에 따라 제조된 대추 발효물은 GABA 함량이 증진되어

건강기능식품 또는 기능성 음료 등으로 이용할 수 있다. 또한, 상기 GABA 증진된 대추 발효물은 대추 고유의 맛과 향까지 함유하여 상기 식품 또는 상기 음료 등으로 간편하고 효율적으로 섭취할 수 있고, 이를 통해 불면증 개선, 스트레스 해소, 우울증 조절, 혈압 강하 등의 효과를 가질 수 있다.

도면의 간단한 설명

[16] 도 1은 본 발명에 따른 대추 발효물의 감마 아미노뷰티르산(γ-Aminobutyric acid, GABA)이 전구체로부터 전환되는 과정을 나타낸다.

[17] 도 2는 본 발명의 일 실시예에 사용된 건대추 및 대추 추출물이다.

[18] 도 3은 본 발명의 일 실시예에 사용된 균주, 락토바실러스 플란타럼(*Lactobacillus plantarum*)의 형태와 MRS 한천 플레이트에 계대 배양된 모습이다.

[19] 도 4는 본 발명의 일 실시예에 사용된 균주, 류코노스톡 시트리움(*Leuconostoc citreum*)의 형태와 A 한천 플레이트에 계대 배양된 모습이다.

[20] 도 5는 본 발명의 일 실시예에 사용된 균주, 사카로미세스 세레비시아(*Saccharomyces cerevisiae*)의 형태와 MRS 한천 플레이트에 계대 배양된 모습이다.

[21] 도 6은 본 발명의 일 실시예에 사용된 균주, 브레타노미세스 아노말루스(*Brettanomyces anomalus*)의 형태와 MRS 한천 플레이트에 계대 배양된 모습이다.

[22] 도 7은 본 발명의 일 실험예에 따른 대추에 대한 농촌진흥청의 식품성분표(제8차 개정, RDA, 2011)이다.

[23] 도 8은 본 발명의 일 실시예에 따른 *Leuc.* 시트리움(*Leuc. citreum*) 및 *L.* 플란타럼(*L. plantarum*)의 복합 발효에 의한 대추 발효물의 제조 방법을 나타낸 흐름도이다.

[24] 도 9는 본 발명의 실시예 1에 따른 대추 발효물의 pH와 적정산도를 측정한 결과 그래프이다.

[25] 도 10은 본 발명의 실시예 1에 따른 대추 발효물의 당도를 측정한 결과 그래프이다.

[26] 도 11은 본 발명의 실시예 1에 따른 대추 발효물의 환원당를 측정한 결과 그래프이다.

[27] 도 12는 본 발명의 실시예 1에 따른 대추 발효물의 생균수를 측정한 결과 그래프이다.

[28] 도 13은 본 발명의 실시예 1에 따른 대추 발효물의 GABA 생성 변화에 대한 TLC 분석결과이다.

[29] 도 14는 본 발명의 일 실시예에 따른 *S.* 세레비시아(*S. cerevisiae*) 및 *L.* 플란타럼(*L. plantarum*)의 복합 발효에 의한 대추 발효물의 제조 방법을 나타낸 흐름도이다.

[30] 도 15는 본 발명의 실시예 2-1에 따른 대추 발효물의 pH와 적정산도를 측정한 결과 그래프이다.

[31] 도 16은 본 발명의 실시예 2-1에 따른 대추 발효물의 환원당을 측정한 결과

그래프이다.

[32] 도 17은 본 발명의 실시예 2-1에 따른 대추 발효물의 생균수를 측정한 결과 그래프이다.

[33] 도 18은 본 발명의 실시예 2-1에 따른 대추 발효물의 GABA 생성 변화에 대한 TLC 분석결과이다.

[34] 도 19는 본 발명의 실시예 2-2에 따른 대추 발효물의 pH와 적정산도를 측정한 결과 그래프이다.

[35] 도 20은 본 발명의 실시예 2-2에 따른 대추 발효물의 당도를 측정한 결과 그래프이다.

[36] 도 21은 본 발명의 실시예 2-2에 따른 대추 발효물의 환원당을 측정한 결과 그래프이다.

[37] 도 22는 본 발명의 실시예 2-2에 따른 대추 발효물의 생균수를 측정한 결과 그래프이다.

[38] 도 23은 본 발명의 실시예 2-2에 따른 대추 발효물의 GABA 생성 변화에 대한 TLC 분석결과이다.

[39] 도 24는 본 발명의 일 실시예에 따른 대추 발효물을 포함하여 제조된 파우치형 음료이다.

발명의 실시를 위한 최선의 형태

[40] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

[41]

[42] 본 발명자는 효모 및 젖산균을 이용한 복합 발효를 통하여 기능성 발효물을 만들었고, 이러한 발효 방법을 약리효과가 우수한 건대추 추출물에 적용하여 기능이 증진된 대추 발효물 및 그의 고유의 맛과 향을 살린 기능성 발효 음료를 개발함으로써 본 발명을 완성하였다.

[43]

[44] 본 발명에서, "복합 발효"는 하나 또는 둘 이상의 스타터 미생물에 의해 발효가 순차적으로 진행되거나 일정한 시간 간격을 두고 진행되거나, 또는 동시에 진행되는 것을 포함할 수 있다. 상기 스타터 미생물은 동일한 종류일 수 있고, 또는 서로 다른 종류일 수 있다. 혼합 발효, 이중 발효 등의 용어는 상기 복합 발효와 동일한 의미로 사용될 수 있다.

[45] 본 발명에서, "스타터 (starter)"는 발효물을 제조하는 경우에 사용하는 미생물 배양액으로, 스타터 미생물의 종류에 따라 그 발효물의 특성이 결정되고 그 품질에도 영향을 미칠 수 있다. 미생물 중에서 스타터로 사용되고 있는 것은 박테리아, 곰팡이, 효모 등을 들 수 있으며, 이것은 단독 혹은 혼합하여 사용할 수 있다.

[46] 본 발명에서 "건강기능식품"은 인체에 유용한 기능성을 가진 원료나 성분을 사용하여 제조 및 가공한 식품을 의미한다. 여기서 '기능성'이라 함은 인체의

구조 및 기능에 대하여 영양소를 조절하거나 생리학적 작용 등과 같은 보건 용도에 유용한 효과를 얻는 것을 의미한다.

[47]

[48] 본 발명은 감마 아미노뷰티르산(γ-Aminobutyric acid; 이하, GABA) 증진된 대추 발효물 제조 방법을 제공한다.

[49] 본 발명에 따른 대추 발효물 제조 방법은, 대추 추출물을 제조하는 단계; 상기 대추 추출물에 발효성 당류 및 효모 추출물을 첨가하여 혼합하는 단계; 상기 혼합물에 제1 스타터(starter)를 접종하여 제1 차 발효하는 단계; 및 상기 제1 차 발효물에 모노소듐글루타메이트(monosodium glutamate, MSG)를 첨가하고 제2 스타터(starter)를 접종하여 제2 차 발효하는 단계;를 포함할 수 있다.

[50]

[51] 본 발명에 따른 대추 발효물 제조 방법에 있어서, 상기 대추 추출물을 제조하는 단계는 상기 대추를 균질화하기 위해 수행될 수 있다. 상기 대추는 마른 상태의 건대추일 수 있고, 상기 대추 추출물은 상기 대추를 침지시켜 제1 차 분쇄하고, 상기 제1 차 분쇄물에서 상기 대추의 씨를 제거한 뒤 제2 차 분쇄하고 여과시켜 제조될 수 있다.

[52] 상기 제1 차 분쇄는 핸드 믹서 등을 이용하여 상기 침지시킨 건대추를 크고 거친, 불균일한 입자 상태로 분쇄할 수 있고, 상기 제2 차 분쇄는 상기 1차 분쇄물을 고속으로 분쇄하여 상기 입자를 보다 가늘고 균일하게 만들 수 있다. 상기 제2 차 분쇄물은 여과 체 등을 통해 여과될 수 있고, 상기 여과액은 열처리하여 상기 대추 추출물로 제조될 수 있다. 상기 열처리는 80 내지 90℃, 바람직하게는 85℃의 항온 수조에서 10 내지 20분간, 바람직하게는 15분간 중탕으로 수행될 수 있다. 제조된 상기 대추 추출물은 냉동 보관될 수 있다.

[53]

[54] 본 발명에 따른 대추 발효물 제조 방법에 있어서, 상기 혼합 단계는 상기 제조된 대추 추출물에 발효성 당류 및 효모 추출물을 첨가하여 혼합물을 제조함으로써 수행될 수 있다.

[55] 상기 발효성 당류(fermentable sugar)는 발효시 스타터 미생물의 주된 탄소원으로, 미생물의 작용에 의해 분해되어 유기산 등 다른 물질로 전환될 수 있는 수크로오스(sucrose), 포도당(glucose), 프룩토오스(fructose), 락토오스(lactose), 만노오스(mannose) 등이 포함될 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[56] 상기 스타터의 종류에 따라 상기 혼합물에 첨가되는 발효성 당류의 함량이 달라질 수 있고, 상기 발효성 당류의 함량에 따라 제조된 대추 발효물의 GABA 함량, 맛 또는 향 등이 달라질 수 있다. 상기 발효성 당류는 상기 혼합물 전체 100 중량부에 대하여 0.1 내지 10 중량부로 포함될 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[57] 상기 효모 추출물(yeast extract) 또한 미생물의 영양성분으로, 상기 혼합

단계에서 상기 효모 추출물은 상기 혼합물 전체 100 중량부에 대하여, 0.1 내지 5 중량부 포함될 수 있다.

[58]

[59] 본 발명에 따른 대추 발효물 제조 방법에 있어서, 상기 제1 차 발효 단계는 상기 혼합 단계에서 제조된 혼합물에 제1 스타터(starter)를 접종함으로써 수행될 수 있다.

[60] 상기 혼합물은 제1 차 발효를 위한 배양물이 될 수 있다.

[61] 상기 제1 스타터는 젖산균을 포함할 수 있고, 바람직하게는 상기 젖산균은 류코노스톡 시트리움(*Leuconostoc citreum*)일 수 있다. 젖산균은 대표적인 프로바이오틱스(probiotics)로서 당류를 발효해서 젖산을 생성하는 세균으로 발효유, 간장, 된장, 치즈, 김치 및 육제품 등 전통적인 발효 식품의 제조에 관여한다. 또한 젖산균에 의한 젖산 발효, 단백질 및 지방분해 작용으로 발효 식품의 저장성을 높이며 풍미를 향상시킬 수 있다. 상기 류코노스톡 시트리움(*Leuconostoc citreum*)은 김치의 숙성 및 발효에 관여하는 젖산균으로, 상기 혼합물 전체 100 중량부에 대하여 0.5 내지 5 중량부로 접종될 수 있다. 상기 수치 범위 내에서 가장 효과적으로 제1 차 발효가 진행될 수 있다.

[62] 상기 제1 차 발효 단계는 20 내지 40℃에서, 바람직하게는 20 내지 30℃에서, 보다 바람직하게는 25℃에서 0.5일 내지 3일간, 바람직하게는 1일간 수행될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[63]

[64] 본 발명에 따른 대추 발효물 제조 방법에 있어서, 상기 제2 차 발효 단계는 상기 제1 차 발효물에 모노소듐글루타메이트(monosodium glutamate; 이하, MSG)를 첨가하고 제2 스타터(starter)를 접종함으로써 수행될 수 있다.

[65] 상기 MSG는 L-글루타메이트(L-glutamate)에 나트륨을 치환시킨 중추신경계의 신경전달물질로 신경세포 활성을 유도하고, 글루탐산탈탄산효소(glutamate decarboxylase, GAD, EC 4.1.1.15)에 의해 감마-아미노뷰티르산(γ-aminobutyric acid; 이하, GABA)으로 전환되는 GABA 전구물질이다. 상기 MSG는 상기 제2 차 발효 배양물 전체 100 중량부에 대하여 1 내지 5 중량부 포함될 수 있다.

[66] 상기 제1 차 발효물 및 그에 첨가된 MSG는 상기 제2 차 발효를 위한 배양물이 될 수 있다.

[67] 상기 제2 스타터 역시 젖산균을 포함할 수 있고, 바람직하게는 상기 젖산균은 락토바실러스 플란타럼(*Lactobacillus plantarum*)일 수 있다. 락토바실러스 플란타럼(*Lactobacillus plantarum*) 또한 김치 유래 유산균으로, 인체에 유익한 활성을 나타낼 수 있다. 상기 제2 스타터는 상기 혼합물 전체 100 중량부에 대하여 0.5 내지 10 중량부로 접종될 수 있다. 상기 수치 범위 내에서 가장 효과적으로 제2 차 발효가 진행될 수 있다.

[68] 상기 제2 차 발효 단계는 25 내지 35℃에서, 바람직하게는 30℃에서, 5 내지 10일간, 바람직하게는 7일간 수행될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[69]

[70] 본 발명에 따른 대추 발효물 제조 방법에 있어서, 상기 제1 차 발효 스타터로 젖산균, 바람직하게는 류코노스톡 시트리움(*Leuconostoc citreum*)을 사용하고, 제2 차 발효 스타터로도 젖산균, 바람직하게는 락토바실러스 플란타럼(*Lactobacillus plantarum*)을 사용하는 경우, 즉 젖산균과 젖산균의 복합 발효의 경우, 상기 혼합물에 첨가되는 발효성 당류는 상기 혼합물 전체 100 중량부에 대하여 0.1 내지 10 중량부, 바람직하게는 3 내지 7 중량부, 보다 바람직하게는 4 내지 6 중량부일 수 있다. 상기 발효성 당류의 함량이 증가하는 경우 상기 젖산균의 생육이 증가하고 그에 따라 GABA의 생산량도 높아지나, 그에 비례하여 상기 젖산균의 발효에 의한 산미도, 불쾌취도 등이 강해질 수 있다. 그러므로 상기 범위 함량의 발효성 당류를 이용할 때 산미 및 향미도 좋은, GABA 증진된 대추 발효물이 제조될 수 있다.

[71]

[72] 한편, 본 발명에 따른 대추 발효물 제조 방법에 있어서, 상기 제1 차 발효 단계의 제1 스타터는 효모를 포함할 수 있고, 바람직하게는 상기 효모는 사카로미세스 세레비시아(*Saccharomyces cerevisiae*)일 수 있다. 사카로미세스 세레비시아(*Saccharomyces cerevisiae*)는 자낭균류에 속하는 대표적인 효모로 알코올 발효력이 강한 배양 효모이다. 상기 효모는 상기 혼합물 전체 100 중량부에 대하여 1 내지 10 중량부로 접종될 수 있다. 상기 수치 범위 내에서 가장 효과적으로 제1 차 발효가 진행될 수 있다.

[73] 상기 제1 차 발효 단계는 20 내지 40℃에서, 바람직하게는 25 내지 35℃에서, 보다 바람직하게는 30℃에서 0.5일 내지 3일간, 바람직하게는 2일간 수행될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[74] 이 때, 상기 제2 차 발효 단계의 제2 스타터는 젖산균을 포함할 수 있고, 바람직하게는 상기 젖산균은 락토바실러스 플란타럼(*Lactobacillus plantarum*)일 수 있다. 상기 제2 차 발효 단계는 25 내지 35℃에서, 바람직하게는 30℃에서, 5 내지 10일간, 바람직하게는 7일간 수행될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[75]

[76] 본 발명에 따른 대추 발효물 제조 방법에 있어서, 상기 제1 차 발효 스타터로 효모, 바람직하게는 사카로미세스 세레비시아(*Saccharomyces cerevisiae*)를 사용하고, 제2 차 발효 스타터로 젖산균, 바람직하게는 락토바실러스 플란타럼(*Lactobacillus plantarum*)을 사용하는 경우, 즉 효모와 젖산균의 복합 발효의 경우, 상기 혼합물에 첨가되는 발효성 당류는 상기 혼합물 전체 100 중량부에 대하여 0.1 내지 7 중량부, 바람직하게는 1 내지 5 중량부, 보다 바람직하게는 2 내지 4 중량부일 수 있다. 상기 발효성 당류의 함량이 증가하는 경우 상기 젖산균의 생육이 증가하지만, GABA의 생산능이 감소할 수 있고, GABA 생산능이 가장 빠른 발효성 당류의 함량에서는 불쾌취, 발효취 등이 증가하였다. 그러므로 상기 범위 함량의 발효성 당류를 이용할 때 가장 적절하게 GABA 증진된 대추

발효물이 제조될 수 있다.

[77]

[78] 본 발명은 감마 아미노뷰티르산(γ-Aminobutyric acid; 이하, GABA) 증진된 대추 발효물을 제공한다.

[79] 본 발명에 따른 대추 발효물은 상기 제조 방법들에 의해 제조될 수 있다.

[80] 본 발명에 따른 대추 발효물은 젖산균 및 젖산균, 또는 효모 및 젖산균 등의 복합 발효를 이용하여 GABA 증진된 기능성 발효물로 제조될 수 있다.

[81]

[82] 도 1은 본 발명에 따른 대추 발효물의 감마 아미노뷰티르산(γ-Aminobutyric acid, GABA)이 전구체로부터 전환되는 과정을 나타낸다. 도 1을 참조하면, 전구물질인 L-글루타메이트(L-glutamate)가 미생물의 글루탐산탈탄산효소(glutamate decarboxylase; GAD)의 작용에 의해서 탈탄산반응이 일어나 GABA로 전환된다. GABA는 신경 전달물질로써, 불면증 개선, 스트레스 해소, 우울증 조절, 혈압강하 등의 다양한 효능을 가지고 있다.

[83]

[84] 또한, 본 발명은 감마 아미노뷰티르산(γ-Aminobutyric acid; 이하, GABA) 증진된 건강기능식품 조성물을 제공한다.

[85] 본 발명에 따른 건강기능식품 조성물은 상기 제조 방법에 의해 제조된 대추 발효물을 유효성분으로 함유할 수 있다.

[86] 본 발명에 따른 건강기능식품 조성물에서, 상기 건강기능식품은 분말, 과립, 정제, 캡슐, 시럽, 잼 또는 음료 등으로 제조될 수 있고, 본 발명에 따른 대추 발효물 이외에 다른 식품 또는 식품 첨가물과 함께 제조될 수 있다. 즉, 상기 건강기능식품은 당 업계에서 통상적으로 사용되는 방법에 의하여 제조가능하고, 건강기능식품으로 인정되는 제형이면 제한 없이 제조될 수 있다. 또한, 상기 건강기능식품 제조시에는 당 업계에서 통상적으로 첨가하는 원료 및 성분을 첨가하여 제조할 수 있으며 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다.

[87] 본 발명에 따른 건강기능식품 조성물에서, 상기 건강기능식품은 일반 약품과는 달리 식품을 원료로 하여 약품의 장기 복용 시 발생할 수 있는 부작용 등이 없는 장점이 있고, 휴대성이 뛰어나, 불면증 개선, 스트레스 해소, 우울증 조절, 혈압강하 등의 다양한 효과를 증진시키기 위한 보조제로 섭취될 수 있다.

[88] 본 발명에 따른 건강기능식품 조성물에서, 상기 대추 발효물 유효성분의 혼합량은 그의 사용 목적, 예를 들어, 예방, 건강 또는 치료적 처치에 따라 적합하게 결정될 수 있다.

[89] 본 발명에 따른 건강기능식품 조성물에서, 상기 건강기능식품이 취할 수 있는 형태에는 제한이 없으며, 통상적인 의미의 식품을 모두 포함할 수 있고, 기능성 식품 등 당업계에 알려진 용어와 혼용 가능하다. 아울러 본 발명에 따른 대추 발효물을 유효성분으로 포함하는 건강기능식품은 당업자의 선택에 따라 식품에

함유될 수 있는 적절한 기타 보조성분과 공지의 첨가제를 혼합하여 제조할 수 있다. 첨가할 수 있는 식품의 예로는 육류, 소세지, 빵, 쵸코렛, 캔디류, 스낵류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류를 포함한 낙농제품, 각종 스프, 음료수, 차, 드링크제, 알콜 음료 및 비타민 복합제 등이 있으며, 본 발명에 따른 대추 발효물을 주성분으로 하여 제조한 즙, 차, 젤리 및 주스 등에 첨가하여 제조할 수 있다. 또한 동물을 위한 사료로 이용되는 식품도 포함할 수 있다.

[90]

[91] 본 발명은 감마 아미노뷰티르산(γ-Aminobutyric acid; 이하, GABA) 증진된 기능성 음료를 제공한다.

[92] 본 발명에 따른 기능성 음료는 기능성 음료 전체 100 중량부에 대하여, 상기 제조 방법에 따라 제조된 대추 발효물 3 내지 10 중량부, 대추 추출액 40 내지 60 중량부 및 곤약 분말 0.5 내지 2 중량부를 포함할 수 있다. 바람직하게는 상기 대추 발효물 5 중량부, 대추 추출액 50 중량부 및 곤약 분말 1 중량부를 포함할 수 있다.

[93] 본 발명에 따른 기능성 음료는 기능성 음료 전체 100 중량부에 대하여, 설탕 5 내지 15 중량부, 구연산 0.1 내지 1 중량부, 올리고당 5 내지 15 중량부, 자일리톨 10 내지 20 중량부 및 사과즙 10 내지 20 중량부로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상을 더 포함할 수 있다. 바람직하게는 상기 설탕 10 중량부, 구연산 0.3 중량부, 올리고당 10 중량부, 자일리톨 15 중량부 및 사과즙 15 중량부로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상일 수 있다.

발명의 실시를 위한 형태

[94] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 실시예를 들어 상세하게 설명하기로 한다. 다만 하기의 실시예는 본 발명의 내용을 예시하는 것일 뿐 본 발명의 범위가 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 실시예는 당업계에서 평균적인 지식을 가진 자에게 본 발명을 보다 완전하게 설명하기 위해 제공되는 것이다.

[95]

[96] **<실험 준비>**

[97] **1. 재료**

[98] 본 발명의 일 실시예에 사용된 건대추는 2017년 예천(Yecheon, Korea)에서 생산된 원료를 제공받아 상온에 보관하여 사용하였다. 주된 탄소원으로 사용된 설탕(수크로오스)은 대한제당 (KS H-2003, Incheon, Korea)으로부터 구입하여 사용하였다. 생육 촉진제로서 효모 추출물(yeast extract, YE)은 ㈜조홍 (Ansan, Korea)으로부터 제품을 구입하여 사용하였다. 건대추의 젖산 발효 시, GABA 생성을 위한 부 원료로 사용된 소듐 L-글루타메이트(sodium L-glutamate, 이하 MSG)는 야쿠리 퓨어 캠사(Yakuri pure Chem., Kyoto, Japan)에서 구입하였고, 분석에 사용된 시약은 특급 이상을 구입하여 사용하였다.

[99]

[100] **2. 건대추 전처리**

[101] 건대추의 균질화를 위해서 50g 대추를 1L 생수에서 24시간 동안 4℃에서 침지시킨 후, ㈜필립스코리아 (HR1673, Seoul, Korea)에서 제조된 핸드믹서를 이용하여 거칠게 분쇄 후 씨를 제거하였다. 씨를 제거한 여과액과 침지액의 혼합물을 신일산업 주식회사 (SMX-3610WS, Chungnam, Korea)에서 제조된 균질기(homogeniger)를 이용하여 고속으로 분쇄하여 균질화하였다. 최종 씨가 제거된 여과액은 225 mesh의 여과 체를 이용하여 분쇄액을 걸러서 제조하였다. 발효용 배지로 이용하기 위해 85℃ 항온 수조에 15분간 중탕 열처리한 후 사용하였다. 실험에 사용한 대추 추출물은 냉동 보관하여 사용하였다.

[102] 도 2는 본 발명의 일 실시예에 사용된 건대추 및 대추 추출물이다. 도 2를 참조하면, (A)는 2017년 예천에서 생산된 원료를 제공받아 상온에 보관한 건대추이고, (B)는 상기 건대추를 이용하여 제조한 대추 추출물이다.

[103]

[104] **3. 사용균주**

[105] 도 3은 본 발명의 일 실시예에 사용된 균주, 락토바실러스 플란타럼(*Lactobacillus plantarum*)의 형태와 MRS 한천 플레이트에 계대 배양된 모습이다. 상기 락토바실러스 플란타럼(이하, *L.* 플란타럼, *L. plantarum*)은 미강 (울진, 정미소)으로부터의 시료 2g을 멸균 증류수 18mL에 혼합한 후 103배까지 희석한 뒤, 디프코 락토바실리 MRS 브로스 한천 (Difco™ Lactobacilli MRS broth agar, Becton, Dickinson and Company, Sparks, MD., USA, 이하 동일)에 도말하고 30℃ 항온 배양기 (IS-971R, Jeio tech., Kimpo, Korea, 이하 동일)에서 24시간 배양하여 균주를 순수 분리하였다. 균주의 단일 콜로니를 취하여 2회 계대 배양한 후, 121℃에서 15분간 멸균한 MRS 브로스(broth)에 순수 분리하였다.

[106] 도 4는 본 발명의 일 실시예에 사용된 균주, 류코노스톡 시트리움(*Leuconostoc citreum*)의 형태와 A 한천 플레이트에 계대 배양된 모습이다. 상기 류코노스톡 시트리움(이하, *Leuc.* 시트리움, *Leuc. citreum*)은 동치미로부터의 시료 2g을 멸균 증류수 18mL에 혼합한 후 103배까지 희석한 뒤, 디프코 락토바실리 MRS 브로스 한천에 도말하고 25℃ 항온 배양기에서 24시간 배양하여 균주를 순수 분리하였다. 균주의 단일 콜로니를 취하여 2회 계대 배양한 후, 121℃에서 15분간 멸균한 MRS 브로스에 순수 분리하였다.

[107]

[108] 도 5는 본 발명의 일 실시예에 사용된 균주, 사카로미세스 세레비시아(*Saccharomyces cerevisiae*)의 형태와 MRS 한천 플레이트에 계대 배양된 모습이다. 상기 사카로미세스 세레비시아(이하, *S.* 세레비시아, *S. cerevisiae*)는 빵 효모로부터의 시료 2g을 멸균 증류수 18mL에 혼합한 후 103배까지 희석한 뒤, 디프코 YM 브로스 한천 (Difco™ YM broth agar, Becton, Dickinson and Company, Sparks, MD., USA, 이하 동일)에 도말하고 30℃ 항온 배양기에서 48시간 배양하여 균주를 순수 분리하였다. 균주의 단일 콜로니를 취하여 2회 계대

배양한 후, 121℃에서 15분간 멸균한 YM 브로스에 순수 분리하였다.

[109] 도 6은 본 발명의 일 실시예에 사용된 균주, 브레타노미세스 아노말루스(*Brettanomyces anomalus*)의 형태와 MRS 한천 플레이트에 계대 배양된 모습이다. 상기 브레타노미세스 아노말루스(이하, *Brett.* 아노말루스, *Brett. anomalus*)는 콤부차로부터의 시료 2g을 멸균 증류수 18mL에 혼합한 후 103배까지 희석한 뒤, 디프코 YM 브로스 한천에 도말하고 30℃ 항온 배양기에서 48시간 배양하여 균주를 순수 분리하였다. 균주의 단일 콜로니를 취하여 2회 계대 배양한 후, 121℃에서 15분간 멸균한 YM 브로스에 순수 분리 하였다. 분리된 효모는 유전자 분석을 통해서 동정하였다.

[110]

[111] **4. 스타터 (Starter) 배양액 제조**

[112] MRS 브로스에 순수 분리된 각각의 *L.* 플란타럼(*L. plantarum*), *Leuc.* 시트리움(*Leuc. citreum*), *S.* 세레비시아(*S. cerevisiae*), *Brett.* 아노말루스(*Brett. anomalus*)를 디프코 락토바실리 MRS 브로스 (Difco™ Lactobacilli MRS broth, Becton, Dickinson and Company, Sparks, MD., USA)에 한 백금이 접종하고, *L.* 플란타럼, *S.* 세레비시아, *Brett.* 아노말루스는 30℃ 항온 배양기에서 24시간 정치 배양되었고, *Leuc.* 시트리움은 25℃ 항온 배양기에서 24시간 정치 배양되어 스타터로 사용되었다.

[113]

[114] **<실험 방법>**

[115] **1. pH 및 적정산도 측정**

[116] pH는 10배 희석한 건대추 발효물을 10mL 취하여 pH 미터 (pH meter, Digital pH meter 420A+, Thermo Orion. Beverly, MA, USA)를 이용하여 측정하였다. 적정산도는 pH 미터를 이용하여 배양액의 pH가 8.3에 도달할 때까지 0.1 N-NaOH로 적정하고, 그 소비량을 타르타르산(tartaric acid) 및 락트산(lactic acid) 함량(%, v/v)으로 환산하여 나타내었다.

[117]

[118] **2. 생균수 측정**

[119] 생균수는 젖산 발효한 배양액을 104, 105, 106배로 단계별 희석하여 121℃에서 15분간 멸균한 MRS 브로스 한천 배지에 20μL 도말한 후, 30℃ 항온 배양기에서 24시간 배양한 젖산균의 생균수를 log CFU (colony forming unit)/mL로 나타내었다.

[120]

[121] **3. 당도 및 환원당 함량 측정**

[122] 당도는 전자굴절당도계 (0-93 Brix, Refractometer, ATAGO, Tokyo, Japan)를 이용하였고, 환원당 함량은 DNS (dinitrosalicylic acid)법에 의해 측정하였다. 건대추 복합 발효물을 원심분리 (1,500g, 20min) 하여 얻은 상등액을 희석한 시료 1mL에 DNS 시약 3mL을 가하고, 100℃에서 5분간 발색시켰다. 실온의 암소에서

40분간 냉각 후 550nm에서 흡광도를 측정하였다.

[123]

[124] **4. TLC를 이용한 GABA 함량 측정**

[125] MSG 및 GABA의 정성분석을 위해 실리카겔 얇은 막 크로마토그래피(silica gel thin layer chromatography, TLC) 플레이트 (TLC plate)는 10×20cm로 잘라서 사용하였고, TLC 용매 전개는 사각 챔버 (30×25×10 cm) 에서 수행하였다. MSG 잔존량과 GABA 함량 비교를 위한 표준(standard)으로 MSG 1%, GABA 1%를 사용하였다. 전개 용매는 n-부틸 알코올(n-butyl alcohol) : 빙초산(acetic acid glacial) : 증류수(distilled water)를 6 : 2 : 2 (v/v)의 비율로 혼합하여 실온에서 4시간 이상 포화시켜 사용하였다. 발효물 시료와 표준 용액을 TLC 플레이트의 아래에서 10mm 되는 위치에서 10-15mm 간격을 유지하여 2μL을 점적하였다. 그 다음, TLC 플레이트의 샘플을 건조시켜 전개하였고, 전개가 끝난 TLC 플레이트는 상온에서 건조시켰다. 건조된 TLC 플레이트에 발색 시약인 0.2% 닌하이드린(ninhydrin) 용액을 뿌리고 100℃ 건조기에서 약 5분 동안 발색시킨 다음 발효물의 MSG와 GABA 스판(spot)을 확인하였다.

[126]

[127] **<비교예 1> 건대추 추출물의 발효 전 이화학적 특성 분석**

[128] 대추는 과실의 숙성 정도에 따라 성분의 변화가 크며, 일반적으로 완숙 생과와 건조 대추로 구분하고 있다.

[129] 도 7은 본 발명의 일 실험예에 따른 대추에 대한 농촌진흥청의 식품성분표 (제8차 개정, RDA, 2011)이다. 도 7을 참조하면, 수분이 73.6%인 완숙 생과는 단백질 2.2%, 지질 0.1%, 회분 1.3%, 탄수화물 22.8%, 섬유소 3.7%를 포함하고 있고, 수분 17.2%인 건조 대추는 단백질 5.0%, 지질 2.0%, 회분 2.1%, 탄수화물 73.7%, 섬유소 9.8%를 포함하고 있다.(TDF: 총 식이섬유(total dietary fiber), SDF: 수용성 식이섬유(soulble dietary fiber), IDF: 불용성 식이섬유(insoluble dietary fiber))

[130] [표1]

특성	값
당도(Soluble solid content)	4.5 °Brix
pH	5.58
총 산도(total acidity)	0.14 %
환원당(Reducing sugar)	0.82 %

[131] 상기 표 1은 건대추의 이화학적 특성을 분석한 결과이다. 상기 표 1을 참조하면, 건대추 추출액의 당도는 4.5 °Brix, pH와 총 산도(total acidity)는 각각 5.58, 0.14%이었으며 환원당이 0.82%로 나타났다.

[132]

[133] **<실시예 1>** *Leuc.* 시트리움(*Leuc. citreum*) 및 *L.* 플란타럼(*L. plantarum*)의 복합 발효 최적화를 이용한 기능성 강화 건대추 발효물

[134] 도 8은 본 발명의 일 실시예에 따른 *Leuc.* 시트리움(*Leuc. citreum*) 및 *L.* 플란타럼(*L. plantarum*)의 복합 발효에 의한 대추 발효물의 제조 방법을 나타낸 흐름도이다.

[135] 도 8을 참조하면, 먼저 -20℃에서 냉동 보관되어 있던 대추 추출액을 해동시켜 수크로오스(sucrose)를 농도별로 첨가하였다. 미생물을 사멸시키기 위해 85℃ 항온 수조기에서 15분간 열처리한 후, 영양성분인 효모 추출물(YE) 0.5%를 첨가하였다. 1차 젖산균 발효를 위해서 *Leuc.* 시트리움(*Leuc. citreum*) 스타터 1%를 접종하여 항온 배양기에서 25℃로 1일간 정치 배양하였다. 연속적으로 2차 젖산균 발효를 위해서 GABA의 전구물질인 MSG를 3% 넣은 후, *L.* 플란타럼(*L. plantarum*) 스타터를 1% 접종하여 항온 배양기에서 30℃로 7일간 정치 배양하였다.

[136]

[137] **<실험예 1-1> pH 및 적정산도 측정**

[138] 건대추 젖산 복합 발효를 통한 GABA 생산을 최적화하기 위하여 *Leuc.* 시트리움(*Leuc. citreum*)의 탄소원 영양 성분인 수크로오스의 첨가 비율을 0%, 5%, 10%로 달리하여 pH와 적정산도 측정 실험을 진행하였다.

[139] 도 9는 본 발명의 실시예 1에 따른 대추 발효물의 pH와 적정산도를 측정한 결과 그래프이다. 도 9를 참조하면, 그래프 (A)는 발효 기간에 따른 pH 변화를 나타낸 것으로, 발효 전의 pH는 5.24에서 1차 *Leuc.* 시트리움(*Leuc. citreum*) 발효 1일차 수크로오스 0% 발효물의 pH는 5.05, 수크로오스 5%, 10% 각 발효물은 3.89까지 감소하였다. 2차 *L.* 플란타럼(*L. plantarum*) 발효 진행 시, 처음에는 MSG 첨가에 의해 5.32, 4.68, 4.9로 증가하였다가 7일 후에는 4.95, 4.38, 4.08로 큰 변화를 보이지 않았다.

[140] 그래프 (B)는 발효 기간에 따른 적정산도의 변화를 나타낸 것으로, 적정산도는 초기 0.17%, 0.19%, 0.18%에서 *Leuc.* 시트리움(*Leuc. citreum*) 발효가 진행될수록 증가하여 수크로오스 0% 발효물은 1일 후 0.9%, 수크로오스 5%, 10% 발효물은 각각 1.26%, 1.31%까지 상승하였다. 이후 2차 *L.* 플란타럼(*L. plantarum*) 발효 진행 시, 수크로오스 0% 발효물은 증가하였다가 3일 차에 다시 0.54%로 감소하여 7일 후까지 산도 값을 유지하였고, 수크로오스 5%, 10% 발효물은 각각 1.33%, 2.16%까지 증가하는 것으로 나타났다. 따라서 *L.* 플란타럼(*L. plantarum*) 발효가 진행됨에 따라 pH는 감소하고 적정산도는 증가하는 것을 확인하였다.

[141]

[142] **<실험예 1-2> 당도 및 환원당 측정**

[143] 도 10은 본 발명의 실시예 1에 따른 대추 발효물의 당도를 측정한 결과 그래프이다. 도 10을 참조하면, 수크로오스 비율을 0%, 5%, 10%로 달리한 발효물의 당도는 1차 *Leuc.* 시트리움(*Leuc. citreum*) 발효 시 4.5, 9, 12.8 Brix에서,

1일 후 GABA 생산의 전구물질인 MSG를 첨가한 후 7.3, 10.6, 14.1 Brix까지 증가하였고, 젖산균에 의한 복합 발효 7일차에 5.7, 9.4, 12.7 Brix로 감소하며 미미한 변화를 나타내었다.

[144] 도 11은 본 발명의 실시예 1에 따른 대추 발효물의 환원당를 측정한 결과 그래프이다. 도 11을 참조하면, 1차 *Leuc.* 시트리움(*Leuc. citreum*) 발효 시 수크로오스 0%, 5%, 10%의 발효물의 환원당이 각각 0.82%, 1.90%, 1.73%에서 발효 1일 후 1.30%, 2.12%, 2.41%까지 증가하였다. 2차 *L.* 플란타럼(*L. plantarum*) 발효 1일 후 수크로오스 0%, 5% 발효물의 환원당 값이 감소하기 시작하여 0% 발효물은 0.15%로, 5% 발효물은 1.31%, 3일차에 0.28%로 급감하였다. 수크로오스 10% 발효물은 3일차에 환원당 값이 감소하기 시작하여 7일차에 0.63%까지 감소하였다. 이는 젖산균에 의한 발효로 당을 소모하였기 때문이라고 판단하였다.

[145]

[146] **<실험예 1-3> 생균수 및 GABA 함량 측정**

[147] 도 12는 본 발명의 실시예 1에 따른 대추 발효물의 생균수를 측정한 결과 그래프이다. 도 12를 참조하면, 1차 *Leuc.* 시트리움(*Leuc. citreum*) 발효 스타터의 생균수는 7.89 log CFU/mL이며, 1일 발효 후 수크로오스 0% 발효물의 경우 7.90 log CFU/mL로 성장이 미미했으나, 수크로오스 5%, 10% 발효물의 경우 각각 9.02 log CFU/mL, 9.05 log CFU/mL까지 증가하였다. 2차 발효균주인 *L.* 플란타럼(*L. plantarum*) 스타터의 생균수는 7.47 log CFU/mL이며, 2차 *L.* 플란타럼(*L. plantarum*) 발효 진행 시 수크로오스 5% 발효물은 3일차에 9.18 log CFU/mL까지, 수크로오스 10% 발효물은 5일차에 9.47 log CFU/mL까지 대폭 증가하였다. 이로 인해 수크로오스의 함량이 높을수록 *Leuc.* 시트리움(*Leuc. citreum*) 및 *L.* 플란타럼(*L. plantarum*) 젖산균의 생균수 또한 높은 균수로 증가하는 것을 확인하였다.

[148] 도 13은 본 발명의 실시예 1에 따른 대추 발효물의 GABA 생성 변화에 대한 TLC 분석결과이다. 도 13을 참조하면, 수크로오스 0% 발효물의 경우 MSG는 모두 소진되었지만 GABA 스팟이 형성되지 않았고, 수크로오스 5%, 10% 발효물의 경우 2차 젖산 발효 3일차부터 GABA 스팟이 형성되었지만 수크로오스 5% 발효물은 2차 젖산 발효 5일차에 MSG를 모두 소진하였으며, 표준시료 GABA 스팟과 비교하였을 때 1.0%정도의 GABA 함량을 나타내었다. 수크로오스 10% 발효물은 2차 젖산 발효 7일차까지 MSG가 남아있는 것으로 보아 수크로오스 5% 첨가 조건이 최적조건이라고 판단하였다.

[149]

[150] **<실시예 2>** *S.* 세레비시아(*S. cerevisiae*) 및 *L.* 플란타럼(*L. plantarum*)의 복합 발효 최적화를 이용한 기능성 강화 건대추 발효물

[151] 도 14는 본 발명의 일 실시예에 따른 *S.* 세레비시아(*S. cerevisiae*) 및 *L.* 플란타럼(*L. plantarum*)의 복합 발효에 의한 대추 발효물의 제조 방법을 나타낸

흐름도이다.

[152]

[153] **<실시예 2-1> 효모 종류에 따른 제조**

[154] 도 14의 흐름도를 따라, 먼저 -20℃에서 냉동보관 되어있던 대추 추출액을 해동시켜 수크로오스 3%를 첨가하였다. 미생물을 사멸시키기 위해 85℃ 항온 수조기에서 15분간 열처리한 후, 영양성분인 효모 추출물(YE) 0.5%를 첨가하였다. 1차 효모 발효 균주를 *S.* 세레비시아(*S. cerevisiae*)와 *Brett.* 아노말루스(*Brett. anomalus*)로 달리하여 각각 5%씩 접종하고 30℃ 항온 배양기에서 2일간 정치 배양하였다. 연속적으로 2차 젖산균 발효를 위해서 GABA의 전구물질인 MSG를 3% 넣은 후 *L.* 플란타럼(*L. plantarum*)을 접종하여 항온 배양기에서 30℃로 7일간 정치 배양하였다.

[155]

[156] **<실시예 2-2> 향미 증진을 위한 수크로오스 농도에 따른 제조**

[157] -20℃에서 냉동보관 되어있던 대추 추출액을 해동시켜 수크로오스를 농도별로 첨가하였다. 미생물을 사멸시키기 위해 85℃ 항온 수조기에서 15분간 열처리한 후, 영양성분인 효모 추출물(YE) 0.5%를 첨가하였다. 1차 효모 발효를 위해서 *S.* 세레비시아(*S. cerevisiae*) 스타터 5%를 접종하여 항온 배양기에서 30℃로 2일간 정치 배양하였다. 연속적으로 2차 젖산균 발효를 위해서 GABA의 전구물질인 MSG를 3% 넣은 후, *L.* 플란타럼(*L. plantarum*)을 접종하여 항온 배양기에서 30℃로 7일간 정치 배양하였다.

[158]

[159] **<실험예 2-1> 실시예 2-1의 대추 발효물**

[160] **<u><실험예 2-1-1> pH 및 적정산도 측정</u>**

[161] 건대추 효모-젖산 복합 발효를 통한 GABA 생산 최적화하기 위하여 1차 효모 발효의 균주를 달리하여 제조한 다음, pH와 적정산도를 측정하였다.

[162] 도 15는 본 발명의 실시예 2-1에 따른 대추 발효물의 pH와 적정산도를 측정한 결과 그래프이다. 도 15를 참조하면, 그래프 (A)는 발효 기간에 따른 pH 변화를 나타낸 것으로, A는 1차 효모 발효에 *S.* 세레비시아(*S. cerevisiae*)를, B는 *Brett.* 아노말루스(*Brett. anomalus*)를 이용하여 발효물을 제조한 경우이다. A의 pH는 5.4에서 2차 *L.* 플란타럼(*L. plantarum*) 발효 시 4.38로 감소하고 7일차에 4.20로 감소하였다. 반면에 B의 pH는 1차 발효 후 2차 *L.* 플란타럼(*L. plantarum*) 발효 시 4.95에서 5.87로 값이 증가하여 다른 양상을 보였다.

[163] 그래프 (B)는 발효 기간에 따른 적정산도 변화를 나타낸 것으로, A는 1차 효모 발효에 *S.* 세레비시아(*S. cerevisiae*)를, B는 *Brett.* 아노말루스(*Brett. anomalus*)를 이용하여 발효물을 제조한 경우이다. A의 적정산도는 1차 *S.* 세레비시아(*S. cerevisiae*) 효모 발효 0일차에 0.17%에서 2차 *L.* 플란타럼(*L. plantarum*) 발효 1일차에 1.05%로 급증하였고, 7일차에 1.63%까지 증가하였다. 반면, B의 적정산도는 2차 *L.* 플란타럼(*L. plantarum*) 발효 0일차에 0.46%에서 감소하기

시작하여 5일차에 0.18까지 감소하였다. 상기 두 균주는 2차 *L.* 플란타럼(*L. plantarum*) 발효 후 산도가 1.63%와 0.18%로 1차 발효 균주로 *S.* 세레비시아(*S. cerevisiae*)를 이용하였을 때 9배 정도 높게 나타났다. 따라서 A 경우가 젖산균의 산 생성에 비교적 많은 영향을 준다고 판단되었다.

[164]

[165] **<실험예 2-1-2> 환원당 측정**

[166] 도 16은 본 발명의 실시예 2-1에 따른 대추 발효물의 환원당을 측정한 결과 그래프이다. 도 16을 참조하면, A는 1차 효모 발효에 *S.* 세레비시아(*S. cerevisiae*)를, B는 *Brett.* 아노말루스(*Brett. anomalus*)를 이용하여 발효물을 제조한 경우이다. A는 1차 발효 1일차에 0.88%에서 0.14%로, B는 1.44%에서 0.48%로 큰 폭으로 감소하였고, 2일차에 각각 0.15%, 0.12%로 환원당이 거의 모두 소진된 것을 확인하였다. 따라서 대추 추출액의 초기 환원당 값은 높았으며, 효모 발효를 통해서 대부분이 소진되는 경향을 보였다. 동시에 2차 젖산균 발효를 통한 GABA 생산에서 매우 낮은 발효성 당이 존재하면서 전구물질인 MSG를 이용한 발효가 진행되는 것으로 판단되었다.

[167]

[168] **<실험예 2-1-3> 생균수 및 GABA 함량 측정**

[169] 도 17은 본 발명의 실시예 2-1에 따른 대추 발효물의 생균수를 측정한 결과 그래프이다. 도 17을 참조하면, 그래프 (A)는 1차 효모 발효에 *S.* 세레비시아(*S. cerevisiae*)를, 그래프 (B)는 1차 효모 발효에 *Brett.* 아노말루스(*Brett. anomalus*)를 이용하여 발효물을 제조한 경우의 생균수이다.

[170] 먼저 그래프 (A)의 효모균 수는 6.25 log CFU/mL에서 효모 발효 1일차에 8.12 log CFU/mL까지 증가하였고 이후 점차 감소하였으며, 젖산 발효 1일차 8.54 log CFU/mL에서 3일차에 9.88 log CFU/mL까지 증가하며 유지되는 형태를 보였다. 그래프 (B)의 효모균 수는 6.94 log CFU/mL에서 효모 발효 2일차에 8.87 log CFU/mL까지 증가하였다가 감소하는 양상을 나타냈으며, 젖산 발효 시 8.30 log CFU/mL에서 1일차 8.53 log CFU/mL까지 증가하였다가 감소하였다. B의 경우보다 A 경우에서 젖산 발효 시 생균수가 1.35 log CFU/mL 높은 것으로 보아 *Brett.* 아노말루스(*Brett. anomalus*)균보다 *S.* 세레비시아(*S. cerevisiae*)균이 젖산균의 생균수 증가에 영향을 주는 것으로 판단되었다.

[171] 도 18은 본 발명의 실시예 2-1에 따른 대추 발효물의 GABA 생성 변화에 대한 TLC 분석결과이다. 도 18을 참조하면, A는 1차 효모 발효에 *S.* 세레비시아(*S. cerevisiae*)를, B는 1차 효모 발효에 *Brett.* 아노말루스(*Brett. anomalus*)를 이용하여 발효물을 제조한 경우로, A는 2차 발효 1일차부터 GABA 스팟이 형성되며 5일차에 완전히 전환된 모습을 보였지만, B는 2차 발효 3일차부터에 GABA 스팟이 형성되기 시작하지만 7일차까지 MSG가 잔존하며 완전히 소진되지 않는 것을 확인하였다.

[172] 따라서 대추 추출액의 효모 및 젖산균에 의한 복합 발효에서 1차 효모 발효에

사용되는 균주의 종류에 따라 2차 젖산균 발효에 의한 GABA 생성에 차이를 나타내었다. 이는 1차 효모 발효에 의해 생산된 대사산물들이 2차 젖산 발효에서 GABA 생산에 도움을 주는 환경 및 영양적 조건을 제공하는 것으로 판단되었다.

[173]

[174] **<실험예 2-2> 실시예 2-2의 대추 발효물**

[175] **<실험예 2-2-1> pH 및 적정산도 측정**

[176] 건대추 효모-젖산 복합 발효를 통한 GABA 생산 최적화하기 위하여 *S.* 세레비시아(*S. cerevisiae*)의 영양성분인 수크로오스 첨가 비율을 달리하여 pH와 적정산도를 측정하였다.

[177] 도 19는 본 발명의 실시예 2-2에 따른 대추 발효물의 pH와 적정산도를 측정한 결과 그래프이다. 도 19를 참조하면, 그래프 (A)는 발효 기간에 따른 pH 변화를 나타낸 것으로, 수크로오스 비율을 0%, 3%, 5%로 달리한 발효물의 1차 효모 발효 0일차 pH는 각각 5.58, 5.52, 5.63이었고, 1차 효모 발효 2일째 pH가 각각 5.42, 5.28, 5.36으로 소폭 감소하는 비슷한 경향을 보였다. 2차 젖산 발효 1일차에서 세 조건 모두 4.43, 4.34, 4.33로 대폭 감소하였다. 그 후 수크로오스 0% 발효물에서는 2차 젖산 발효 3일차에 pH가 대폭 상승하였고, 수크로오스 3%, 5% 발효물에서는 발효가 진행되는 동안 꾸준히 감소하는 경향을 보였다.

[178] 그래프 (B)는 발효 기간에 따른 적정산도의 변화를 나타낸 것으로, 적정산도는 1차 효모 발효 0일째 0.14%로 세 조건 모두 동일하였고, 1차 효모 발효 2일째 까지 0.11%, 0.18%, 0.18%로 꾸준히 감소하는 경향을 보였다. 2차 젖산 발효 1일차에 0.95%, 1.19%, 1.15%로 대폭 상승하였고, 수크로오스 0% 조건에서는 2차 젖산 발효 3일차에 대폭 감소 후 유지하였으나, 수크로오스 3%, 5% 발효물은 꾸준히 감소하는 경향을 보였다.

[179]

[180] **<실험예 2-2-2> 당도 및 환원당 측정**

[181] 건대추 효모-젖산 복합 발효를 통한 GABA 생산 최적화하기 위하여 *S.* 세레비시아(*S. cerevisiae*)의 영양성분인 수크로오스 첨가 비율을 달리하여 당도 및 환원당 변화를 측정하였다.

[182] 도 20은 본 발명의 실시예 2-2에 따른 대추 발효물의 당도를 측정한 결과 그래프이다. 도 20을 참조하면, 수크로오스 비율을 0%, 3%, 5%로 달리한 발효물의 당도는 1차 효모 발효 0일차 3.7, 7.9, 9.4 Brix로, 효모 발효가 진행되는 동안 설탕 비율에 관계없이 비슷한 소진정도를 보였다. 2차 *L.* 플란타럼(*L. plantarum*) 발효 0일차에는 GABA 전환의 전구물질인 MSG를 첨가한 후 6.6, 9.2, 10.4Brix로 증가하였으나 *L.* 플란타럼(*L. plantarum*) 발효가 진행되는 동안 세 조건 모두 설탕 비율과는 관계없이 소폭 감소하였다.

[183] 도 21은 본 발명의 실시예 2-2에 따른 대추 발효물의 환원당을 측정한 결과 그래프이다. 도 21을 참조하면, 환원당은 1차 효모 발효 0일차에 0.85%로 설탕비율과 관계없이 세 조건 모두 환원당 값이 같았고, 1차 효모 발효 1일차에

0.14%, 0.12%, 0.12%로 대폭 감소하는 것으로 보아 효모의 생육이 1일차에 가장 좋다고 판단하였다.

[184]

[185] **<실험예 2-2-3> 생균수 및 GABA 함량 측정**

[186] 건대추 효모-젖산 복합 발효를 통한 GABA 생산 최적화하기 위하여 *S.* 세레비시아(*S. cerevisiae*)의 영양성분인 수크로오스 첨가 비율을 달리하여 생균수 및 GABA 함량 변화를 측정하였다.

[187] 도 22는 본 발명의 실시예 2-2에 따른 대추 발효물의 생균수를 측정한 결과 그래프이다. 도 22를 참조하면, 상단 그래프는 *S.* 세레비시아(*S. cerevisiae*)로 1차 발효한 경우의 생균수 변화이고, 하단 그래프는 *L.* 플란타럼(*L. plantarum*)으로 2차 발효한 경우의 생균수 변화이다. 수크로오스 비율을 0%, 3%, 5%로 달리한 발효물의 1차 효모 발효 0일차 발효물의 생균수는 6.95 log CFU/mL이며, 1일 발효 후 세 조건 모두 10^8 정도로 세 조건 모두 동일하게 유지하였지만, 2차 젖산 발효가 진행되면서 수크로오스 첨가 비율이 높아질수록 젖산균의 생육은 증가하고 효모의 생육은 줄어든다는 것을 확인하였다. 이는 수크로오스 첨가로 인한 젖산균의 생육 증가로 사료되었고, 젖산균의 생육 증가에 따른 젖산 생성이 효모의 생육환경에 영향을 미치는 것으로 판단하였다.

[188] 도 23은 본 발명의 실시예 2-2에 따른 대추 발효물의 GABA 생성 변화에 대한 TLC 분석결과이다. 도 23을 참조하면, 수크로오스 첨가 비율이 높을수록 GABA 전환 속도와 MSG 소진 정도가 적게 나타났으며, 수크로오스 0%의 경우 세 조건 중 GABA전환 속도와 MSG 소진 정도가 가장 빨랐다. 하지만 발효 후 효모에 의한 이취(발효취)가 품질을 저하시킴으로, 효모 발효시 초기에 수크로오스 3%를 이용하는 것이 GABA를 1.0% 이상 생산하면서 발효물의 기호성도 양호하여 발효의 최적조건으로 판단하였다.

[189]

[190] **<제조예 1> 건대추 발효물을 이용한 기능성 곤약 음료 제조**

[191] 건대추로 젖산균-젖산균 복합 발효를 진행하여 만들어진 발효물과 효모-젖산균 복합 발효를 통해서 제조된 발효물을 이용하여 기능성 곤약 음료 시제품을 제조하였다. 발효물의 종류를 젖산 복합 발효물과 효모 복합 발효물로 달리하여 제품을 제조하였으며, 각각의 발효물과 대추 추출액, 설탕, 구연산, 자일리톨, 사과즙, 곤약을 첨가하였다. 그리고 85℃ 항온수조에 10분간 저온 살균하여 기능성이 함유된 곤약 음료를 제조하였다.

[192]

[193] **1. 제조방법**

[194] *S.* 세레비시아(*S. cerevisiae*)와 *L.* 플란타럼(*L. plantarum*) 복합 발효물 (효모 복합 발효)과 *Leuc.* 시트리움(*Leuc. citreum*)과 *L.* 플란타럼(*L. plantarum*) 복합 발효물 (젖산 복합 발효)을 이용하여 기능성 곤약 음료를 제조하였다.

[195]

[196] 표 2는 본 발명의 일 제조예에 따른 기능성 음료 제조 성분이다.

[197] 하기 표 2를 참조하면, 수크로오스의 최적조건에 따라 효모 복합 발효물은 수크로오스 3%가 첨가된 발효물을 이용하였고, 젖산 복합 발효물은 수크로오스 5%가 첨가된 발효물을 이용하였다. 각각의 복합 발효물을 5%씩 첨가하여 대추 추출액 50%, 설탕 10%, 구연산 0.3%, 자일리톨 15.2%, 사과즙 18.5%를 첨가한 후 식감 개선을 위해 곤약 분말 첨가비율을 달리하여 음료를 제조하였다.

[198] [표2]

재료(%)	젖산복합발효음료	효모복합발효음료
발효물	5	5
건대추 추출물	50	50
설탕	10	10
구연산	0.3	0.3
자일리톨	15.2	15.2
사과즙	18.5	18.2
곤약	1	1

[199]

[200] 도 24는 본 발명의 일 실시예에 따른 대추 발효물을 포함하여 제조된 파우치형 음료이다. 곤약 분말을 추가로 첨가하는 경우에 음료 혼합물의 열처리에 따른 높은 점성에 의해서 스파우트 파우치(spout pouch)에 충진하는데 어려움이 있었다. 따라서 이를 극복하기 위해서 곤약 분말이 균일하게 혼합된 최종 음료를 용기에 충진한 후 열처리하여 음료의 살균 효과와 높은 점성을 갖도록 하였다.

[201] 파우치 형 음료제조에 적합한 물성평가를 위해 곤약을 농도별로 음료제조를 해본 결과, 곤약 분말 1% 첨가한 비율에서 파우치 형태로 제조하였을 때 짜먹기 알맞은 물성이라고 평가하였다. 반면에 2% 곤약 분말을 첨가한 경우 파우치에서 짜내기 어려울 정도로 곤약 덩어리들이 뭉쳐지기 때문에 제품화시키기 힘들다고 판단하였다.

[202]

[203] **2. 관능평가**

[204] 건대추를 이용한 효모, 젖산균 발효물이 첨가된 기능성 음료의 관능검사는 신뢰성과 실험에 대한 관심도 등을 고려하여 계명대학교 식품 연구원 10명을 관능검사 요원으로 선정하였으며, 이들에게 실험의 목적과 평가방법을 인지시킨 후 실시하였다. 평가 항목으로는 색(color), 향(flavor), 맛(taste), 발효취 강도(fermented smell intensity), 물성(texture), 전반적인 기호도(overall preference)로 하였으며, 5점법을 사용하여 5점으로 갈수록 특성의 기호도가 좋아지는 것으로 하였다. 시료는 흰 종이컵을 이용하여 관능평가를 실시하였다.

[205]

[206] 하기 표 3은 본 발명의 일 제조예에 대한 관능평가 결과이다.

[207] [표3]

	Sample	
	Leuc. 시트리움(*Leuc. citreum*)복합 발효물	*S.* 세레비시아(*S. cerevisiae*)복합 발효물
색	3.59±0.95	3.57±1.18
맛	2.56±0.36	3.85±0.69
향	2.55±1.46	3.05±1.38
발효취 강도	4.49±1.21	4.08±0.75
물성	3.42±1.27	3.85±0.81
전반적인 기호도	2.58±1.13	4.05±1.24

[208] 표 3을 참조하면, *S.* 세레비시아(*S. cerevisiae*) 복합 발효물이 첨가된 음료와 *Leuc.* 시트리움(*Leuc. citreum*) 복합 발효물이 첨가된 음료의 색은 두 조건 모두 비슷한 수치를 보였고, 향은 각각 2.55±1.46, 3.05±1.38로 *S.* 세레비시아(*S. cerevisiae*) 복합 발효물이 첨가된 음료의 향이 더 좋다고 평가하였다. 이는 효모 발효에 의해 발효물의 냄새가 개선되는 것으로 사료된다. 발효취는 각각 4.49±1.21, 4.08±0.75로 *Leuc.* 시트리움(*Leuc. citreum*) 복합 발효물이 상대적으로 높은 발효취의 강도가 높았다. 전반적인 기호도는 *S.* 세레비시아(*S. cerevisiae*) 복합 발효물이 첨가된 음료가 높게 나타났다.

[209] 이상의 관능평가 결과를 색, 맛, 향, 발효취 강도, 물성, 전반적인 기호도를 통해 종합적으로 고려하면 *S.* 세레비시아(*S. cerevisiae*) 복합 발효물을 첨가하면서 전반적인 향미와 기호도가 높았을 뿐만 아니라 GABA의 기능성과 관능을 증대시킨 발효 음료를 만들 수 있었다

[210]

[211] 하기 표 4는 *S.* 세레비시아(*S. cerevisiae*)와 *L.* 플란타럼(*L. plantarum*) 복합 발효물을 이용하여 만든 기능성 음료의 특성을 분석한 것이다.

[212] [표4]

	Jujube extract
Soluble solid content (°Brix)	15
pH	3.51
Total acidity (%)	1.12
Reducing sugar (%)	1.43
Consistency index ($Pa \cdot s^n$)	104.2

[213] 상기 표 4를 참조하면, 상기 *S.* 세레비시아(*S. cerevisiae*)와 *L.* 플란타럼(*L. plantarum*) 복합 발효물을 이용하여 만든 기능성 음료의 당도는 15 °Brix, pH는 3.51, 총 산도(total acidity)는 1.12%, 환원당은 1.43%, 컨시스턴시 지수(Consistency index)는 104.2 $Pa \cdot s^n$로 분석되었다.

[214]

[215] 이제까지 본 발명에 대한 구체적인 실시예들을 살펴보았다. 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자는 본 발명이 본 발명의 본질적인 특성에서 벗어나지 않는 범위에서 변형된 형태로 구현될 수 있음을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 개시된 실시예들은 한정적인 관점이 아니라 설명적인 관점에서 고려되어야 한다. 본 발명의 범위는 전술한 설명이 아니라 특허청구범위에 나타나 있으며, 그와 동등한 범위 내에 있는 모든 차이점은 본 발명에 포함된 것으로 해석되어야 할 것이다.

청구범위

[청구항 1] 대추 추출물을 제조하는 단계;
상기 대추 추출물에 발효성 당류 및 효모 추출물을 첨가하여 혼합하는 단계;
상기 혼합물에 제1 스타터(starter)를 접종하여 제1 차 발효하는 단계; 및
상기 제1 차 발효물에 모노소듐글루타메이트(monosodium glutamate; 이하, MSG)를 첨가하고 제2 스타터(starter)를 접종하여 제2 차 발효하는 단계;를 포함하는, 감마 아미노뷰티르산(γ-Aminobutyric acid; 이하, GABA) 증진된 대추 발효물 제조 방법.

[청구항 2] 제 1 항에 있어서,
상기 대추 추출물은,
상기 대추를 침지시켜 제1 차 분쇄하고,
상기 제1 차 분쇄물에서 상기 대추의 씨를 제거한 뒤 제2 차 분쇄하고 여과하여 제조되는 것을 특징으로 하는, GABA 증진된 대추 발효물 제조 방법.

[청구항 3] 제 1 항에 있어서,
상기 발효성 당류는,
수크로오스(sucrose), 포도당(glucose), 프룩토오스(fructose),
락토오스(lactose) 및 만노오스(mannose)로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상인 것을 특징으로 하는, GABA 증진된 대추 발효물 제조 방법.

[청구항 4] 제 1 항에 있어서,
상기 제1 스타터는 젖산균을 포함하고,
상기 젖산균은 류코노스톡 시트리움(*Leuconostoc citreum*)인 것을 특징으로 하는, GABA 증진된 대추 발효물 제조 방법.

[청구항 5] 제 4 항에 있어서,
상기 발효성 당류는,
상기 혼합물 전체 100 중량부에 대하여 0.1 내지 10 중량부인 것을 특징으로 하는, GABA 증진된 대추 발효물 제조 방법.

[청구항 6] 제 1 항에 있어서,
상기 제1 스타터는 효모를 포함하고,
상기 효모는 사카로미세스 세레비시아(*Saccharomyces cerevisiae*)인 것을 특징으로 하는, GABA 증진된 대추 발효물 제조 방법.

[청구항 7] 제 6 항에 있어서,
상기 발효성 당류는,
상기 혼합물 전체 100 중량부에 대하여 0.1 내지 7 중량부인 것을 특징으로 하는, GABA 증진된 대추 발효물 제조 방법.

[청구항 8] 제 1 항에 있어서,

상기 제1 차 발효 단계는,
20 내지 40℃에서 0.5일 내지 3일간 수행되는 것을 특징으로 하는, GABA 증진된 대추 발효물 제조 방법.

[청구항 9] 제 1 항에 있어서,
상기 제2 스타터는 젖산균을 포함하고,
상기 젖산균은 락토바실러스 플란타럼(*Lactobacillus plantarum*)인 것을 특징으로 하는, GABA 증진된 대추 발효물 제조 방법.

[청구항 10] 제 1 항에 있어서,
상기 MSG는,
상기 제2 차 발효 배양물 전체 100 중량부에 대하여 1 내지 5 중량부인 것을 특징으로 하는, GABA 증진된 대추 발효물 제조 방법.

[청구항 11] 제 1 항에 있어서,
상기 제2 차 발효 단계는,
25 내지 35℃에서 5 내지 10일간 수행되는 것을 특징으로 하는, GABA 증진된 대추 발효물 제조 방법.

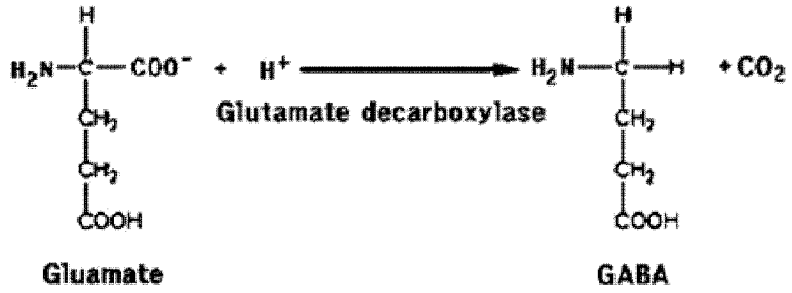
[청구항 12] 제 1 항 내지 제 11 항 중 어느 한 항의 방법에 의해 제조된 GABA 증진된 대추 발효물.

[청구항 13] 제 12 항에 따른 대추 발효물을 유효성분으로 함유하는 GABA 증진된 건강기능식품 조성물.

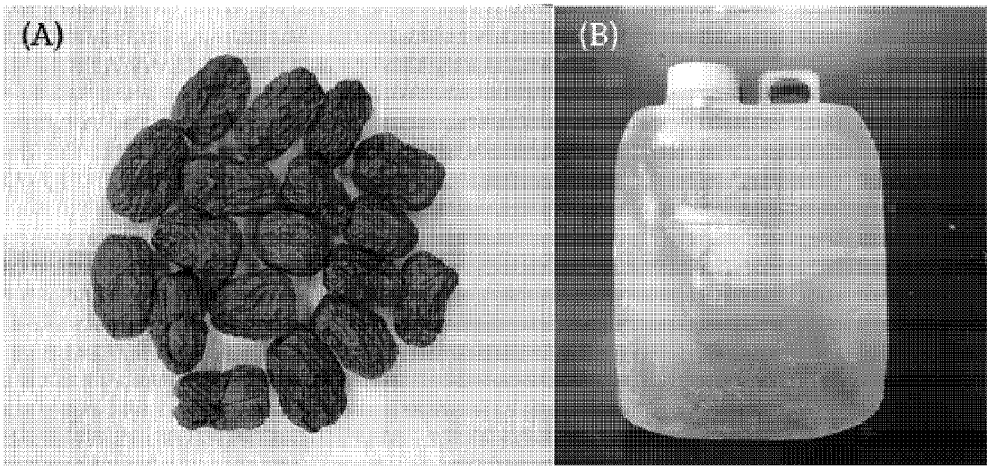
[청구항 14] 기능성 음료 전체 100 중량부에 대하여,
제 12 항에 따른 대추 발효물 3 내지 10 중량부;
대추 추출액 40 내지 60 중량부; 및
곤약 분말 0.5 내지 2 중량부;를 포함하는, GABA 증진된 기능성 음료.

[청구항 15] 제 14 항에 있어서,
상기 기능성 음료는,
기능성 음료 전체 100 중량부에 대하여,
설탕 5 내지 15 중량부, 구연산 0.1 내지 1 중량부, 올리고당 5 내지 15 중량부, 자일리톨 10 내지 20 중량부 및 사과즙 10 내지 20 중량부로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상을 더 포함하는 것을 특징으로 하는, GABA 증진된 기능성 음료.

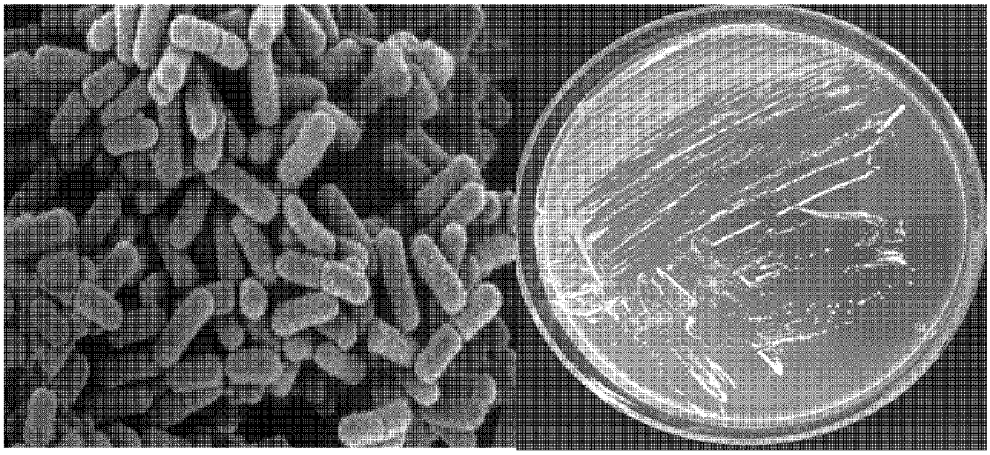
[도1]



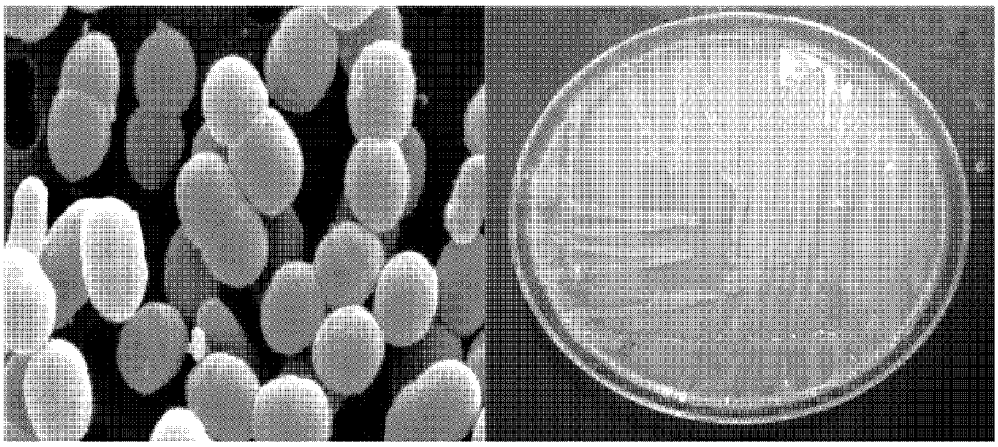
[도2]



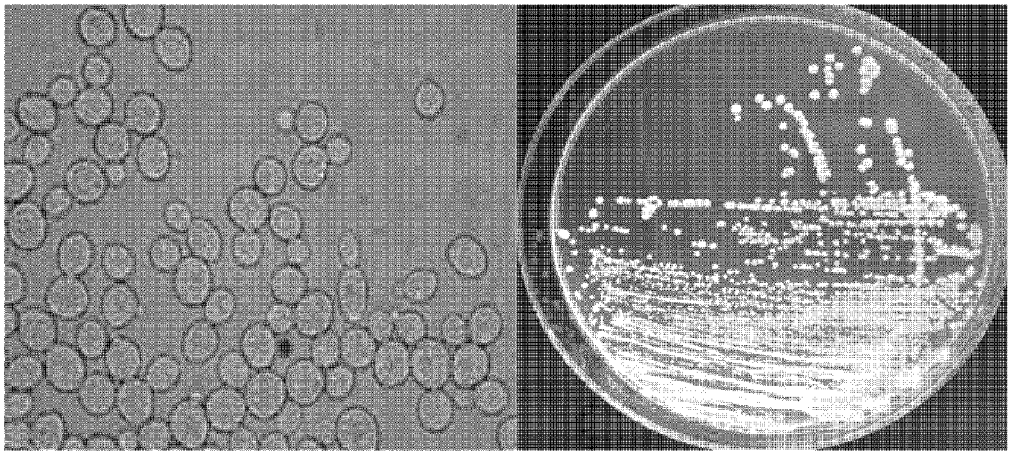
[도3]



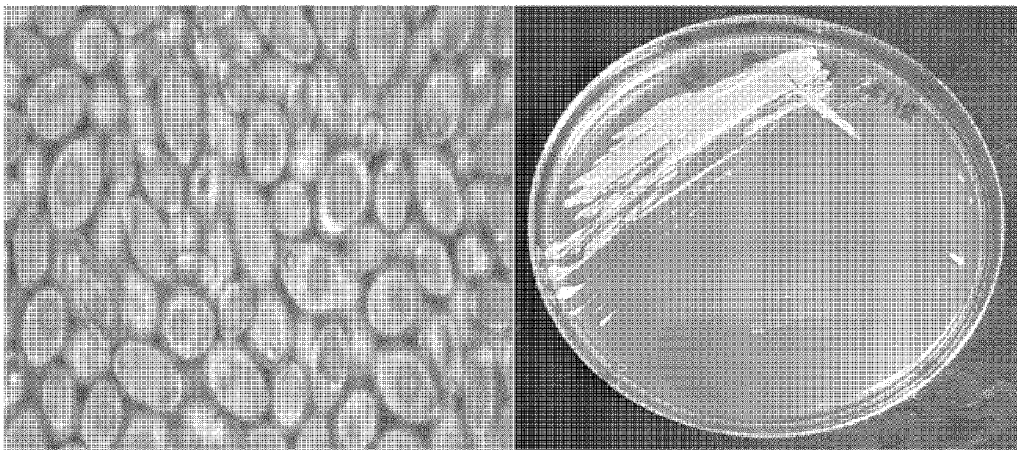
[도4]



[도5]



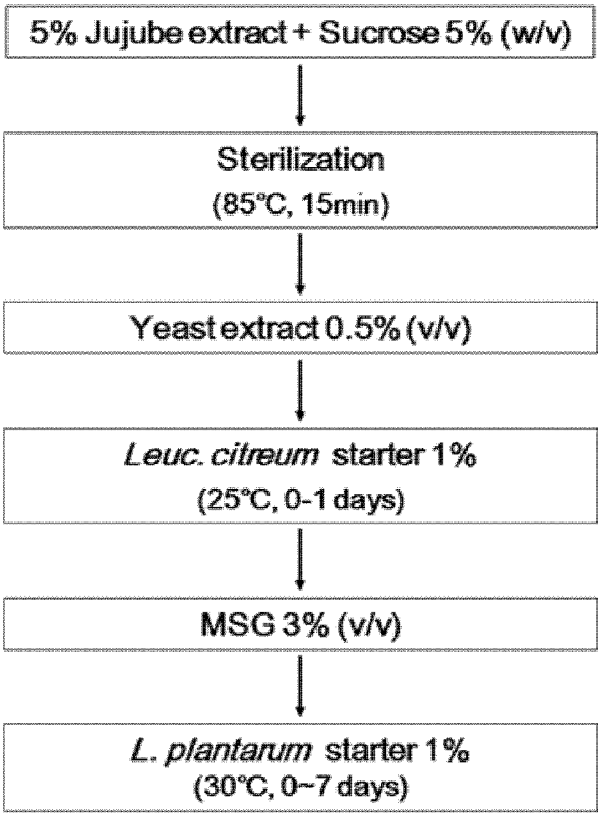
[도6]



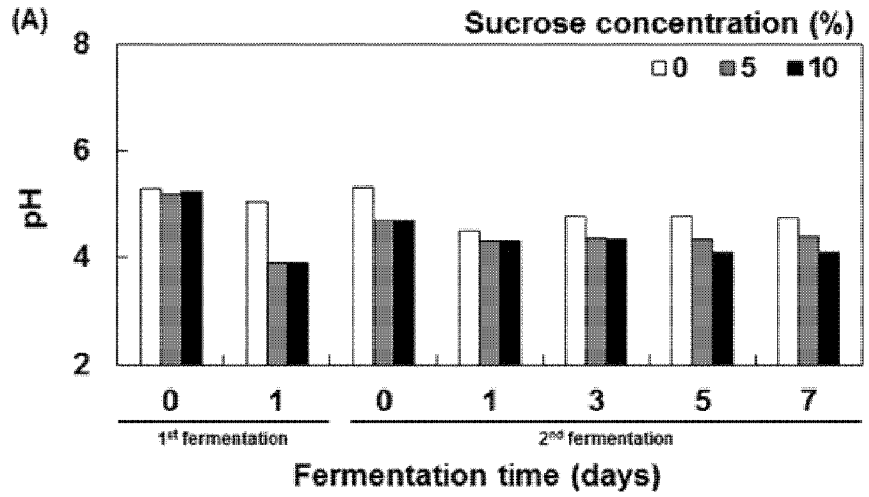
[도7]

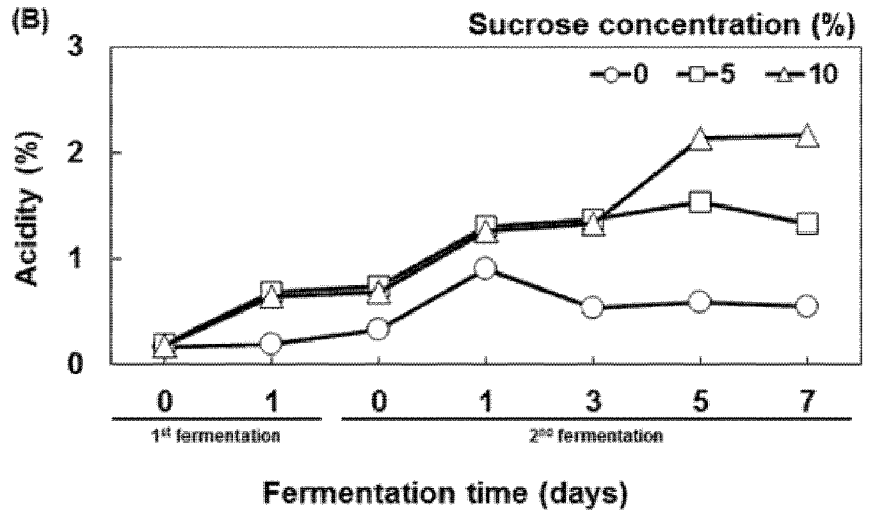
Food and description				Jujube, raw	Jujube, dried
Proximate composition		Energy	Kcal	90	299
		Water	g	73.6	17.2
		Protein	g	2.2	5.0
		Fat	g	0.1	2.0
		Ash	g	1.3	2.1
		Carbohydrate	g	22.8	73.7
Dietary fiber		TDF[1]	g	3.7	9.8
		SDF[2]	g	0.3	0.4
		IDF[3]	g	3.4	9.4
Minerals		Calcium	mg	28	18
		Phosphorus	mg	45	116
		Iron	mg	1.2	1.8
		Potassium	mg	357	952
		Sodium	mg	1	8
Vitamin	A	Retinol equivalent	RE	2	1
		Retinol	μg	0	0
		β-Carotene	μg	13	5
	B	B^1 Thiamin	mg	0.04	0.13
		B^2 Riboflavin	mg	0.05	0.06
		B^3 Niacin	mg	0.6	1.1
	C	Ascorbic acid	mg	6.2	8
Sodium chloride equivalent			g	0	0
Refuse			g	6	13

[도8]

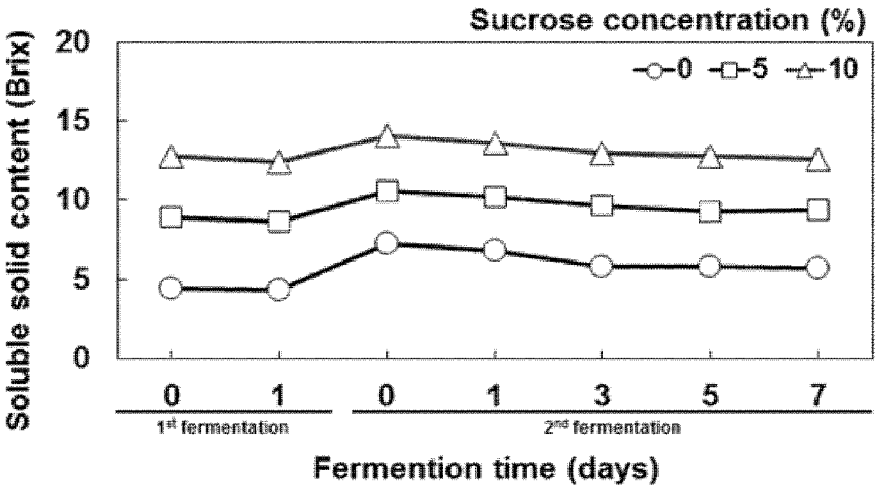

5% Jujube extract + Sucrose 5% (w/v)
Sterilization
(85℃, 15min)
Yeast extract 0.5% (v/v)
Leuc. citreum starter 1%
(25℃, 0-1 days)
MSG 3% (v/v)
L. plantarum starter 1%
(30℃, 0~7 days)

[도9]

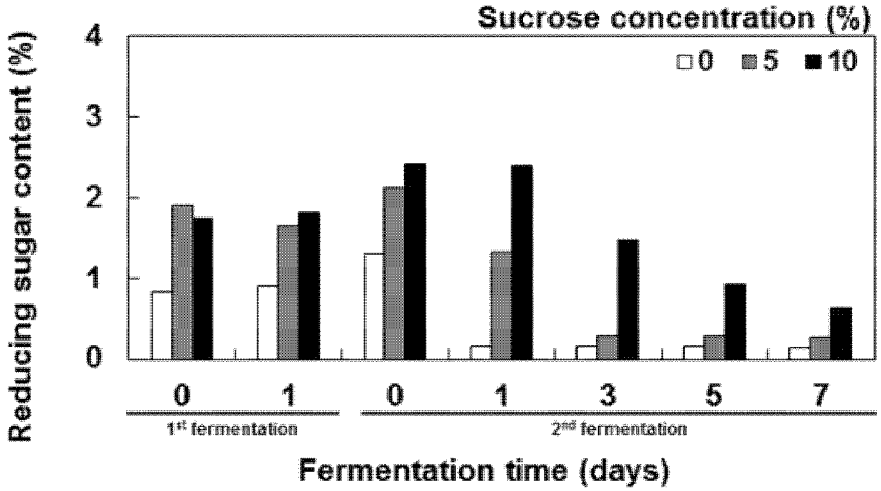

(A)
Sucrose concentration (%)
0
5
10
pH
8
6
4
2
0
1
0
1
3
5
7
1st fermentation
2nd fermentation
Fermentation time (days)


(B)
Sucrose concentration (%)
0
5
10
Acidity (%)
3
2
1
0
0
1
0
1
3
5
7
1st fermentation
2nd fermentation
Fermentation time (days)

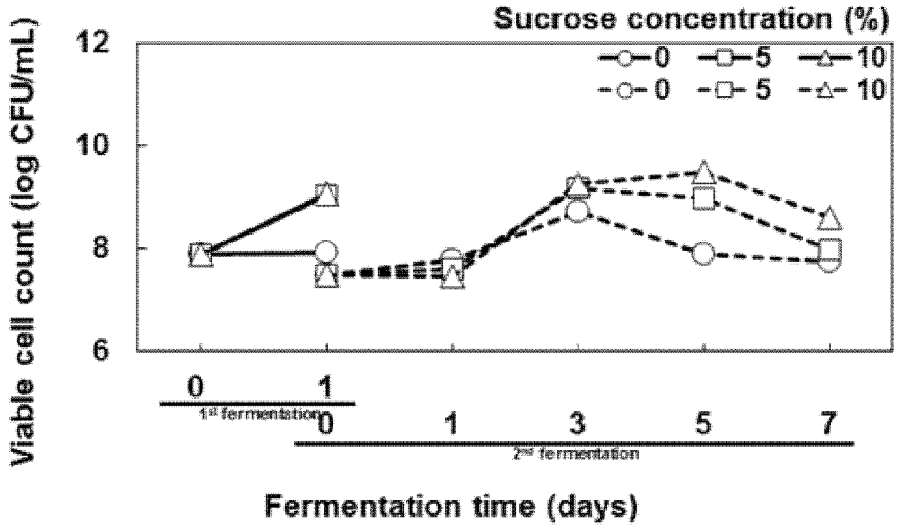
[도10]


Sucrose concentration (%)
0
5
10
Soluble solid content (Brix)
20
15
10
5
0
0
1
0
1
3
5
7
1st fermentation
2nd fermentation
Fermention time (days)

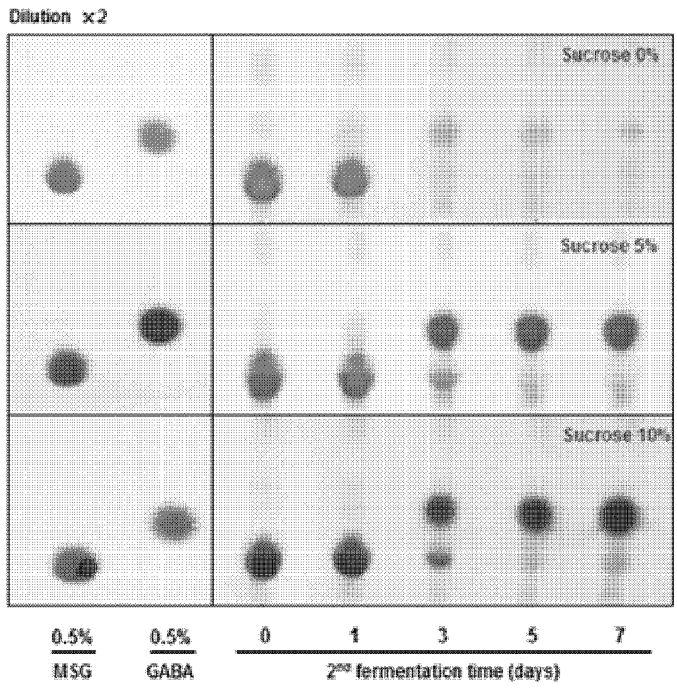
[도11]


Sucrose concentration (%)
0
5
10
Reducing sugar content (%)
4
3
2
1
0
0
1
0
1
3
5
7
1st fermentation
2nd fermentation
Fermentation time (days)

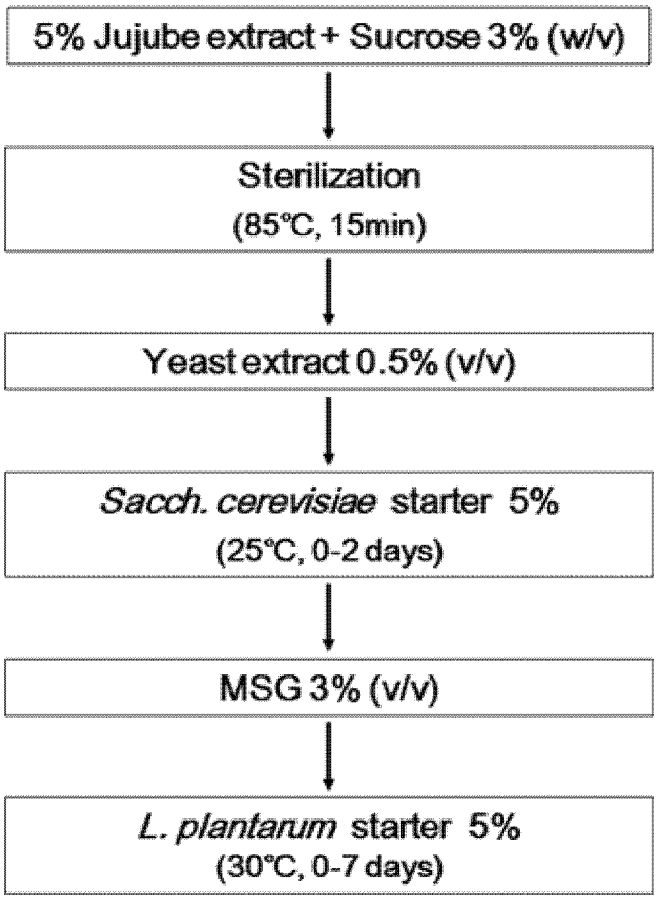
[도12]


Sucrose concentration (%)
0
5
10
0
5
10
Viable cell count (log CFU/mL)
12
10
8
6
0
1
1st fermentation
0
1
3
5
7
2nd fermentation
Fermentation time (days)

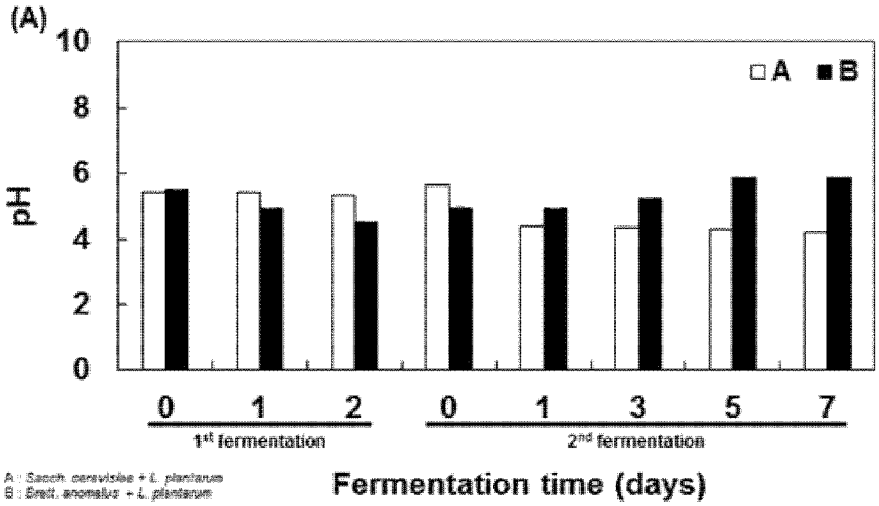
[도13]

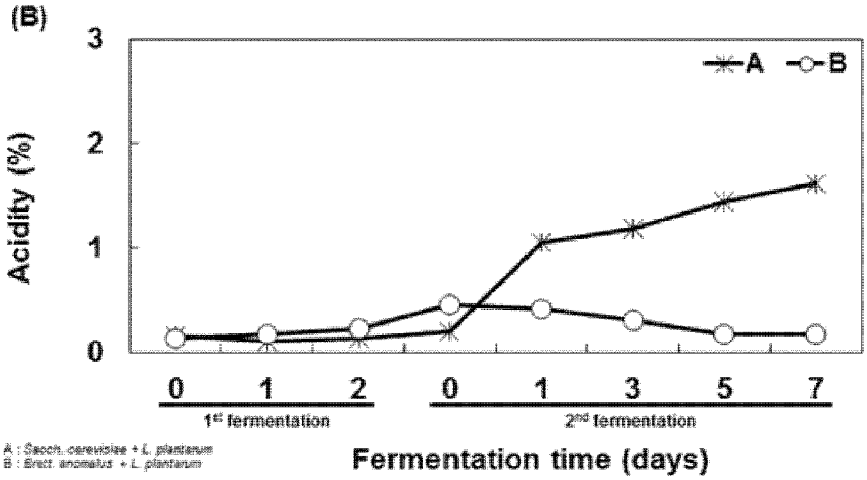

Dilution ×2
Sucrose 0%
Sucrose 5%
Sucrose 10%
0.5%
MSG
0.5%
GABA
0
1
3
5
7
2nd fermentation time (days)

[도14]

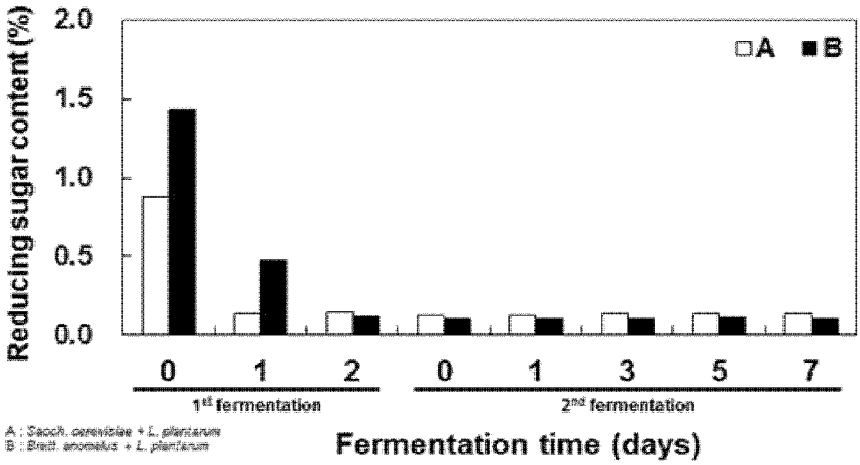

5% Jujube extract + Sucrose 3% (w/v)
Sterilization
(85℃, 15min)
Yeast extract 0.5% (v/v)
Sacch. cerevisiae starter 5%
(25℃, 0-2 days)
MSG 3% (v/v)
L. plantarum starter 5%
(30℃, 0-7 days)

[도15]

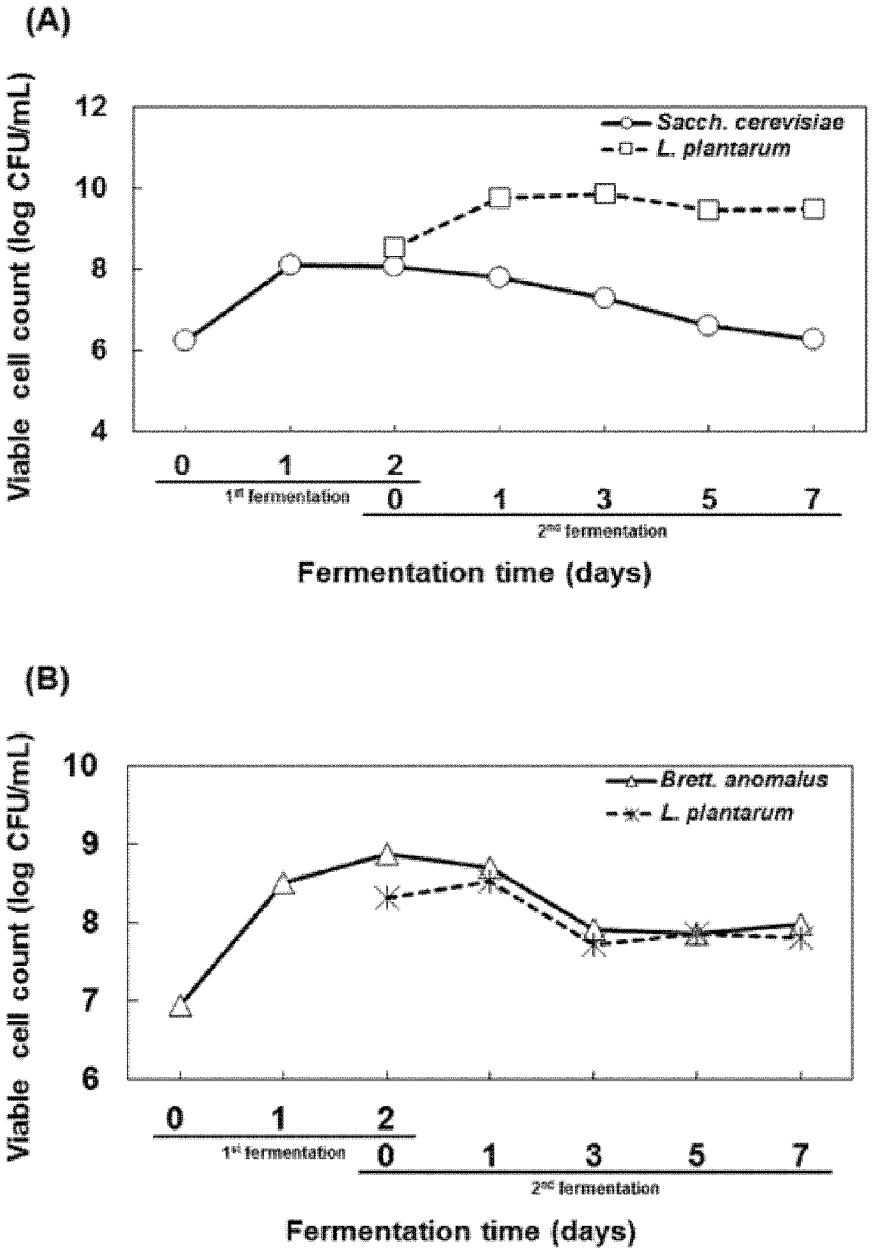

(A)
pH
10
8
6
4
2
0
A
B
0 1 2 0 1 3 5 7
1st fermentation
2nd fermentation
A : Sacch. cerevisiae + L. plantarum
B : Brett. anomalus + L. plantarum
Fermentation time (days)


(B)
Acidity (%)
3
2
1
0
A
B
0 1 2 0 1 3 5 7
1st fermentation
2nd fermentation
A : Sacch. cerevisiae + L. plantarum
B : Brett. anomalus + L. plantarum
Fermentation time (days)

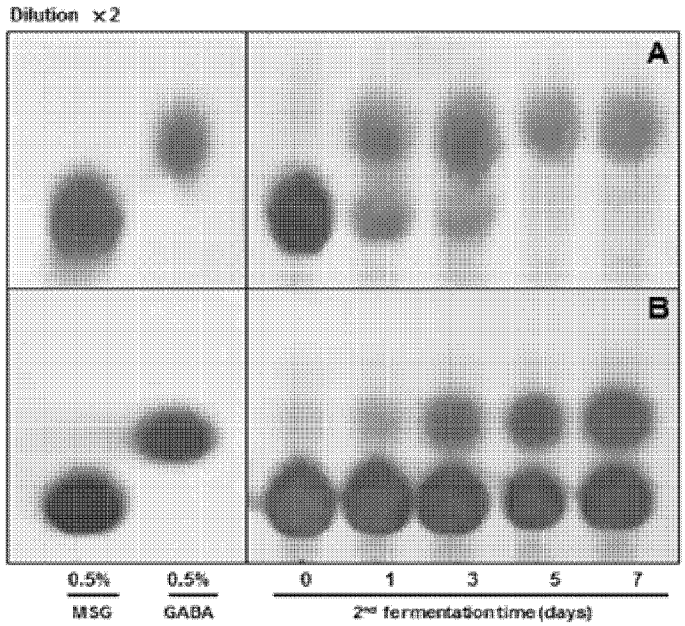
[도16]


Reducing sugar content (%)
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
A
B
0 1 2 0 1 3 5 7
1st fermentation
2nd fermentation
A : Sacch. cerevisiae + L. plantarum
B : Brett. anomalus + L. plantarum
Fermentation time (days)

[도17]

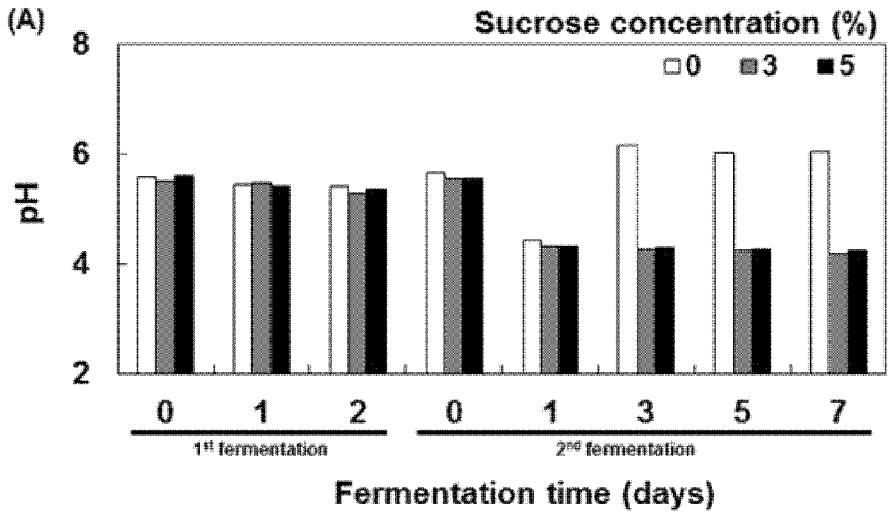

(A)
Viable cell count (log CFU/mL)
12
10
8
6
4
Sacch. cerevisiae
L. plantarum
0
1
2
1st fermentation
0
1
3
5
7
2nd fermentation
Fermentation time (days)
(B)
Viable cell count (log CFU/mL)
10
9
8
7
6
Brett. anomalus
L. plantarum
0
1
2
1st fermentation
0
1
3
5
7
2nd fermentation
Fermentation time (days)

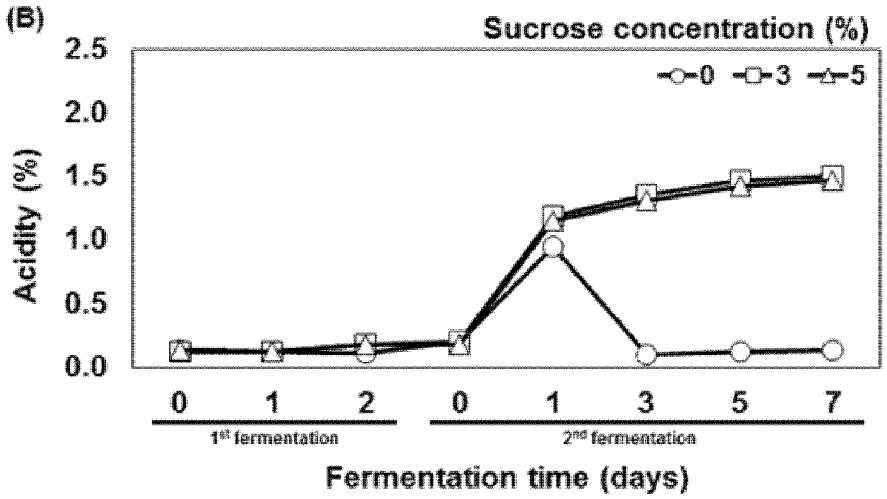
[도18]



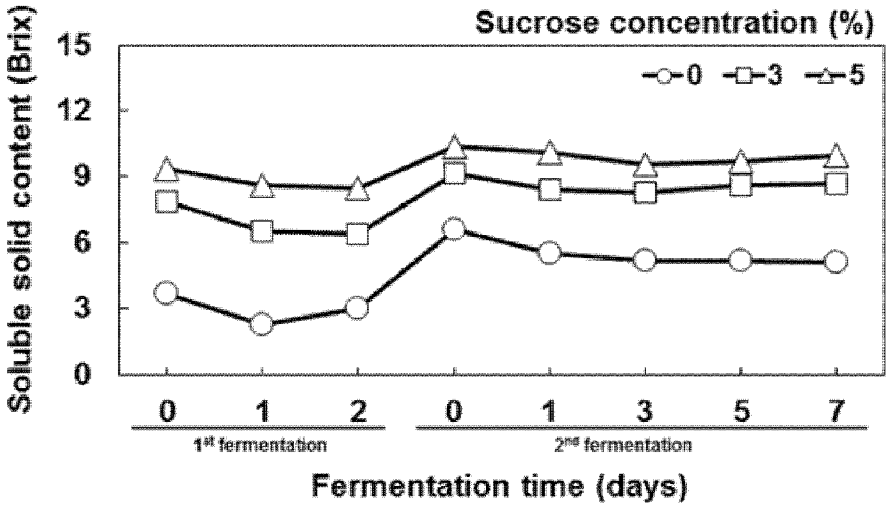
A : *Sacch. cerevisiae* + *L. plantarum*
B : *Brett. anomalus* + *L. plantarum*

[도19]

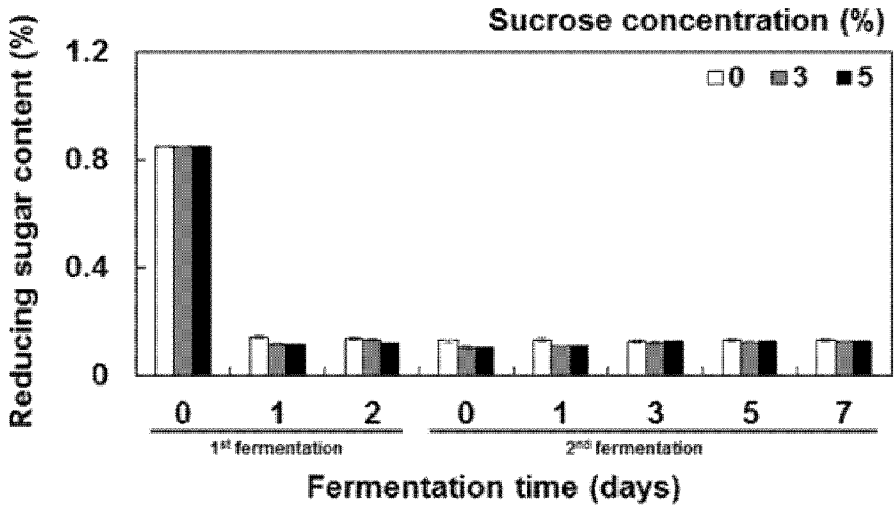




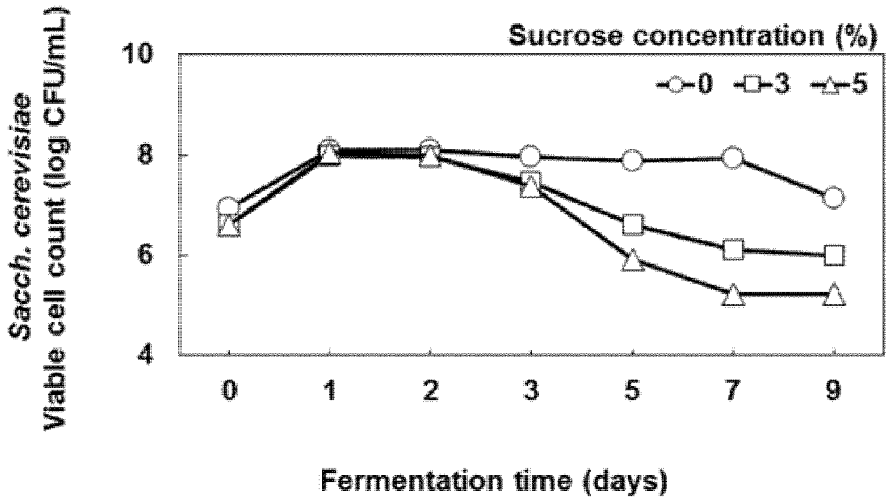
[도20]

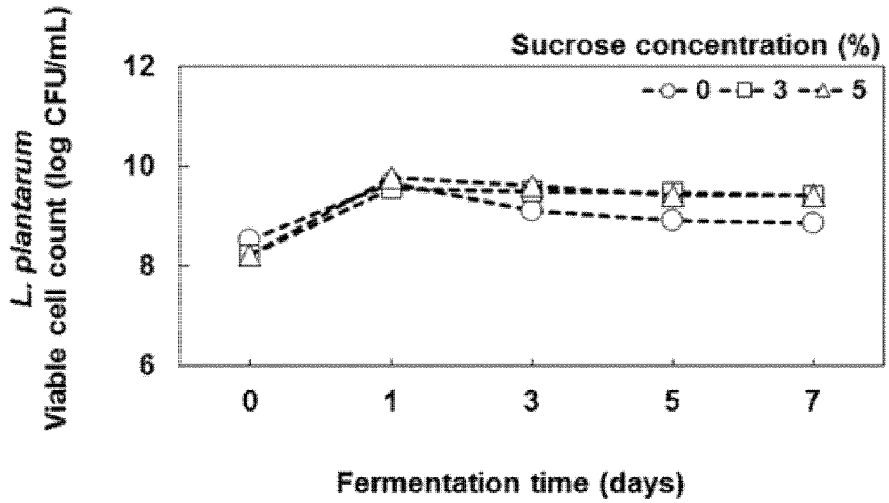

Sucrose concentration (%)
0
3
5
Soluble solid content (Brix)
15
12
9
6
3
0
0
1
2
0
1
3
5
7
1st fermentation
2nd fermentation
Fermentation time (days)

[도21]

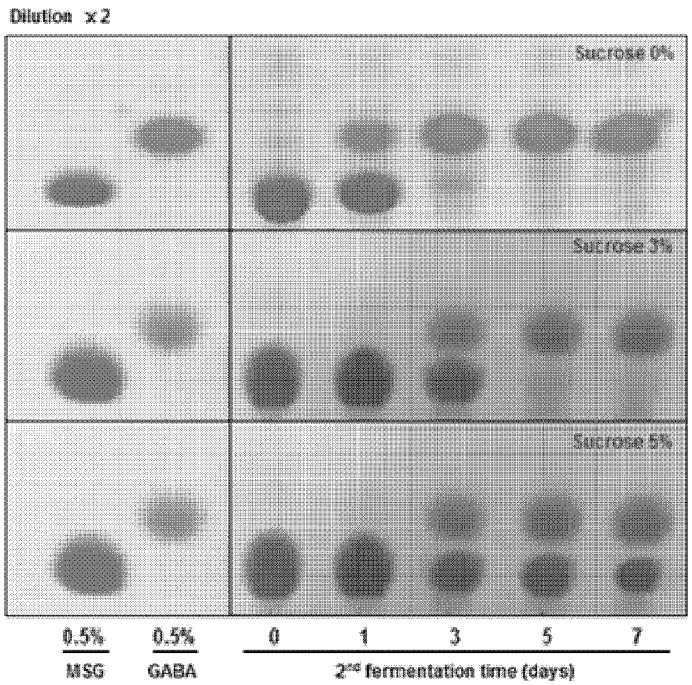

Sucrose concentration (%)
0
3
5
Reducing sugar content (%)
1.2
0.8
0.4
0
0
1
2
0
1
3
5
7
1st fermentation
2nd fermentation
Fermentation time (days)

[도22]


Sucrose concentration (%)
0
3
5
Sacch. cerevisiae
Viable cell count (log CFU/mL)
10
8
6
4
0
1
2
3
5
7
9
Fermentation time (days)


Sucrose concentration (%)
0
3
5
L. plantarum
Viable cell count (log CFU/mL)
12
10
8
6
0
1
3
5
7
Fermentation time (days)

[도23]


Dilution x2
Sucrose 0%
Sucrose 3%
Sucrose 5%
0.5%
MSG
0.5%
GABA
0
1
3
5
7
2nd fermentation time (days)

[도24]

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/KR2019/016360

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A23L 33/105(2016.01)i, A23L 2/38(2006.01)i, A23L 2/60(2006.01)i, A23L 33/135(2016.01)i, A23L 33/14(2016.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A23L 33/105; A23L 19/00; A23L 2/00; A23L 2/08; A23L 2/38; A23L 2/52; A23L 29/00; A23L 33/00; A23L 33/10; C12P 13/04; C12P 19/04; A23L 2/60; A23L 33/135; A23L 33/14

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched
Korean utility models and applications for utility models: IPC as above
Japanese utility models and applications for utility models: IPC as above

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

eKOMPASS (KIPO internal) & Keywords: jujube extracts, fermentation, monosodium glutamate

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	KR 10-2016-0013408 A (INDUSTRY ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION KEIMYUNG UNIVERSITY) 04 February 2016 See claims 1, 5; paragraphs [0005], [0023].	1-15
Y	KR 10-2018-0085578 A (INDUSTRY ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION KEIMYUNG UNIVERSITY et al.) 27 July 2018 See abstract; claim 1.	1-15
Y	KR 10-2012-0041033 A (POUN-GUN CHUNG BUK) 30 April 2012 See claim 1; paragraphs [0021] to [0023], [0032]; figure 1.	1-15
Y	KR 10-2011-0077882 A (MARINE BIOPROCESS CO., LTD.) 07 July 2011 See claims 4, 7.	6-7
Y	KR 10-2015-0081921 A (POUN-GUN CHUNG BUK) 15 July 2015 See abstract; claims 1, 2.	1-15

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
10 MARCH 2020 (10.03.2020)	**10 MARCH 2020 (10.03.2020)**
Name and mailing address of the ISA/KR Korean Intellectual Property Office Government Complex Daejeon Building 4, 189, Cheongsa-ro, Seo-gu, Daejeon, 35208, Republic of Korea Facsimile No. +82-42-481-8578	Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/KR2019/016360

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
KR 10-2016-0013408 A	04/02/2016	None	
KR 10-2018-0085578 A	27/07/2018	KR 10-1900667 B1	21/09/2018
KR 10-2012-0041033 A	30/04/2012	KR 10-1248171 B1	27/03/2013
KR 10-2011-0077882 A	07/07/2011	KR 10-1158448 B1	20/06/2012
KR 10-2015-0081921 A	15/07/2015	KR 10-1560331 B1	19/10/2015

국 제 조 사 보 고 서

국제출원번호
PCT/KR2019/016360

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

A23L 33/105(2016.01)i, A23L 2/38(2006.01)i, A23L 2/60(2006.01)i, A23L 33/135(2016.01)i, A23L 33/14(2016.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)
A23L 33/105; A23L 19/00; A23L 2/00; A23L 2/08; A23L 2/38; A23L 2/52; A23L 29/00; A23L 33/00; A23L 33/10; C12P 13/04; C12P 19/04; A23L 2/60; A23L 33/135; A23L 33/14

조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌
한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC
일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우))
eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: 대추 추출물 (jujube extracts), 발효 (fermentation), 모노소듐 글루타메이트 (monosodium glutanate)

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
Y	KR 10-2016-0013408 A (계명대학교 산학협력단) 2016.02.04 청구항 1, 5; 단락 [0005], [0023]	1-15
Y	KR 10-2018-0085578 A (계명대학교 산학협력단 등) 2018.07.27 요약; 청구항 1	1-15
Y	KR 10-2012-0041033 A (보은군) 2012.04.30 청구항 1; 단락 [0021] 내지 [0023], [0032]; 도면 1	1-15
Y	KR 10-2011-0077882 A ((주)마린바이오프로세스) 2011.07.07 청구항 4, 7	6-7
Y	KR 10-2015-0081921 A (충청북도 보은군) 2015.07.15 요약; 청구항 1, 2	1-15

☐ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다.

☒ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.

* 인용된 문헌의 특별 카테고리:

"A" 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌

"D" 본 국제출원에서 출원인이 인용한 문헌

"E" 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌

"L" 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌

"O" 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌

"P" 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌

"T" 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌

"X" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다.

"Y" 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다.

"&" 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

국제조사의 실제 완료일	국제조사보고서 발송일
2020년 03월 10일 (10.03.2020)	2020년 03월 10일 (10.03.2020)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소
대한민국 특허청
(35208) 대전광역시 서구 청사로 189, 4동 (둔산동, 정부대전청사)
팩스 번호 +82-42-481-8578

심사관
허주형
전화번호 +82-42-481-8150

국제조사보고서
대응특허에 관한 정보

국제출원번호
PCT/KR2019/016360

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
KR 10-2016-0013408 A	2016/02/04	없음	
KR 10-2018-0085578 A	2018/07/27	KR 10-1900667 B1	2018/09/21
KR 10-2012-0041033 A	2012/04/30	KR 10-1248171 B1	2013/03/27
KR 10-2011-0077882 A	2011/07/07	KR 10-1158448 B1	2012/06/20
KR 10-2015-0081921 A	2015/07/15	KR 10-1560331 B1	2015/10/19