



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2016-0143915
(43) 공개일자 2016년12월15일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A23L 1/30 (2006.01) A23L 29/00 (2016.01)
A61K 36/725 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A23L 33/105 (2016.08)
A23L 29/065 (2016.08)
(21) 출원번호 10-2015-0079147
(22) 출원일자 2015년06월04일
심사청구일자 2015년06월04일

(71) 출원인
계명대학교 산학협력단
대구광역시 달서구 달구벌대로 1095 (신당동)
(72) 발명자
이삼빈
대구광역시 달서구 선원로 171 102동 306호 (이곡동, 성서무지개타운)
양선아
대구광역시 달성군 다사읍 대실역남로 93 203동 1402호 (죽곡리, 죽곡청아람푸르지오2단지아파트)
(74) 대리인
특허법인태백

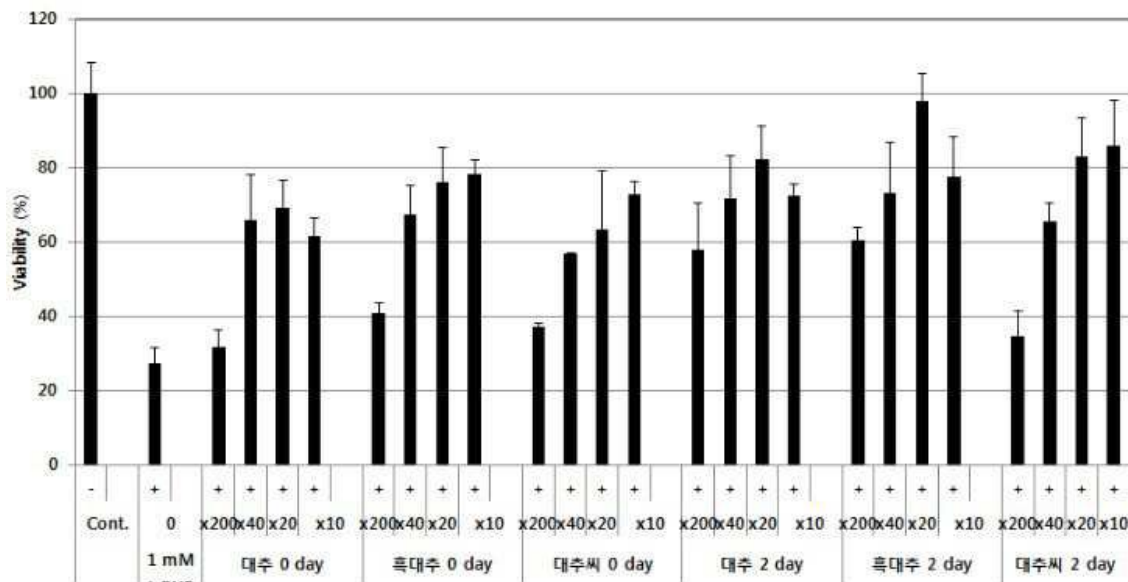
전체 청구항 수 : 총 9 항

(54) 발명의 명칭 고초균 발효를 통한 간기능 개선 또는 면역기능 증진된 대추류 발효액 제조방법

(57) 요약

본 발명은 고초균 발효를 통한 간기능 개선 또는 면역 증진된 대추류 발효액 제조방법에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*) HA균을 이용한 발효를 통해 대추, 흑대추 및 대추씨 추출물 발효액을 생산하고 감마 폴리글루탐산(γ -PGA) 등의 기능성이 강화된 발효액을 생산하는 방법에 대한 것이다. 본 발명에서는 대표적인 한방원료인 대추 추출액 이외에도, 흑대추 제조 공정의 최적화 및 비가식 부분인 대추씨 추출액을 이용하여 적정량의 γ -PGA 생산배지, 채소 주스, 민들레 당절임액과 모노-소듐 L-글루탐산(mono-sodium L-glutamic acid; MSG)을 혼합하여 고농도의 점질물(γ -PGA)과 물성 및 기호성이 개선되고, 간기능 개선 또는 면역 증진된 효과를 가지는 기능성 식품 소재를 개발하였다.

대표도 - 도13



(52) CPC특허분류

A61K 36/725 (2013.01)
A23V 2002/00 (2013.01)
A23V 2200/30 (2013.01)
A23V 2200/324 (2013.01)
A23V 2250/0618 (2013.01)
A23V 2250/21 (2013.01)
A61K 2236/19 (2013.01)

(72) 발명자

송영철

대구광역시 동구 큰고개로 23 1동 512호 (신암동,
 보성1차아파트)

김민주

대구광역시 달서구 계대동문로3안길 13-13 2층 (신
 당동)

박용선

대구광역시 동구 신암남로28길 45 302호 (신암동,
 이스트캐슬아파트)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	314082-3
부처명	농림축산식품부
연구관리전문기관	농림수산물기술기획평가원
연구사업명	농생명산업기술개발사업
연구과제명	농산물 소재를 활용한 고부가가치 제품 개발 지원을 위한 CRO 구축
기 여 율	1/1
주관기관	계명대학교 산학협력단
연구기간	2014.12.19 ~ 2017.12.18

명세서

청구범위

청구항 1

- (1) 대추류를 열수 추출하여 대추류 추출액을 제조하는 단계;
- (2) 상기 제조된 대추류 추출액에 모노소듐 글루타메이트(monosodium glutamate; MSG) 및 γ -PGA 생산배지를 첨가하여 혼합하는 단계; 및
- (3) 상기 혼합물에 바실러스 서브틸리스 HA (*Bacillus subtilis* HA; KCCM 10775P) 균주 스타터를 접종하고 배양하여 37 내지 42℃에서, 24 내지 72 시간 동안 발효시키는 단계를 포함하는 간기능 개선 또는 면역기능 증진된 대추류 발효액 제조방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 (2) 단계에서는 상기 전체 혼합물 100 중량부에 대해 5 내지 20 중량부의 당근주스 또는 민들레 당절임액을 추가로 첨가하여 혼합하는 것을 특징으로 하는 간기능 개선 또는 면역기능 증진된 대추류 발효액 제조방법.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 대추류 추출액은 상기 전체 혼합물 100 중량부에 대해 10 내지 75 중량부가 포함되는 것을 특징으로 하는 간기능 개선 또는 면역기능 증진된 대추류 발효액 제조방법.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 모노소듐 글루타메이트(monosodium glutamate; MSG)는 1 내지 5 중량%로 포함되는 것을 특징으로 하는 간기능 개선 또는 면역기능 증진된 대추류 발효액 제조방법.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 γ -PGA 생산배지는 KH_2PO_4 0.1 중량%, Na_2HPO_4 0.1 중량%, $(\text{NH}_4)_2 \cdot \text{SO}_4$ 0.5 중량%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05 중량%, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.04 중량%, 글루코오스(Glucose) 3 중량% 및 글루타메이트(Glutamate) 3 중량%로 이루어진 것을 특징으로 하는 간기능 개선 또는 면역기능 증진된 대추류 발효액 제조방법.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 대추류는 대추, 흑대추 또는 대추씨인 것을 특징으로 하는 간기능 개선 또는 면역기능 증진된 대추류 발효액 제조방법.

청구항 7

바실러스 서브틸리스 HA (*Bacillus subtilis* HA; KCCM 10775P) 균주로 발효시킨 대추류 발효액을 유효성분으로 함유하는 간기능 개선 또는 면역기능 증진용 식품조성물.

청구항 8

제7항에 있어서, 상기 대추류 발효액은 점질물 및 감마-폴리글루탐산(gamma-poly glutamic acid; γ -PGA)이 증진된 것을 특징으로 하는 간기능 개선 또는 면역기능 증진용 식품조성물.

청구항 9

제7항 또는 제8항에 있어서, 상기 대추류는 대추, 흑대추 또는 대추씨인 것을 특징으로 간기능 개선 또는 면역기능 증진용 식품조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 고초균 발효를 통한 간기능 개선 또는 면역 증진된 대추류 발효액 제조방법에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*) HA균을 이용한 발효를 통해 대추, 흑대추 및 대추씨 추출물 발효액을 생산하고 감마 폴리글루탐산(γ -PGA) 등의 기능성물질이 강화된 발효액을 생산하는 방법에 대한 것이다.

배경 기술

[0002] 대추나무는 갈매나무과에 속하는 활엽관목으로, 원산지는 인도이며 높이는 약 5m 정도이다. 꽃은 5-6월에 2~3개씩 모여서 달리며, 꽃잎이 다섯 장이고 노란빛이 도는 녹색을 띤다. 대추라고 부르는 열매는 씨가 단단한 핵에 싸여 있는 타원형 핵과로, 길이가 2.5-3.5cm이며 처음에는 초록색을 띠다가 9-10월에 적갈색이나 붉은 갈색으로 익는다. 대추는 날로 먹기도 하며, 말려서 저장하기도 한다. 특히 한방에서는 소화제, 진통제, 해열제, 이뇨제 등으로 많이 이용되며, 밤과 함께 제삿상에 반드시 올려지는 과일이기도 하다.

[0003] 단맛에 따뜻한 성질로 '대조'(大棗)라고 하는데, 심장을 도와 혈액순환을 원활하게 하고 신경을 안정시키는 효능이 있으며, 잠이 잘 오게 한다. 비, 위장을 건전하게 하며 배속이 차서 아프고 대변이 묽으며 설사할 때도 좋다. 한약에 대추를 많이 이용하는 이유는 기와 혈을 보하는 효능이 크고 여러 가지 약물을 조화시켜주는 작용이 있기 때문이다.

[0004] 한편, 상기와 같은 대추의 전통적인 음료제조방법은 대추를 달여 대추물을 추출한 후, 상기 대추를 바닥에 구멍이 굽은 채로 걸러 껍질과 씨를 제거하거나, 또는, 삼베 형겅에 물이 추출된 대추를 담아 즙을 짜내게 된다. 그러나, 상기와 같은 종래의 대추음료 제조방법은 제조공정이 번거로울 뿐만 아니라 추출된 액체만을 음용하여 액이 추출된 대추는 버리게 됨으로써 대추에서 나오는 영양소를 모두 섭취하지 못하게 되고, 보관이 어려워 먹을 때마다 제조해야 하는 문제점이 있었다.

[0005] 대표적인 발효미생물인 고초균은 그람 양성균이며, 호기성 포자 형성균으로서, 콩 원료로부터 점질물(감마 폴리글루탐산; γ -PGA)을 생산하는 특징을 갖는다. 최근 고초균을 이용한 감마 폴리글루탐산의 생산 및 정제에 관한 보고가 있으며, 감마 폴리글루탐산은 면역개선의 건강기능성식품의 원료로 식약처에 등재되었다. 앞으로 감마 폴리글루탐산의 식품 및 기능성식품의 원료로 활용 확대가 기대된다.

선행기술문헌

특허문헌

[0006] (특허문헌 0001) 한국공개특허 제10-2014-0044161호(2014.04.14 공개)

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명의 목적은 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*) HA균을 이용한 발효를 통해 대추, 흑대추 및 대추씨 추출물 발효액을 생산하고 감마 폴리글루탐산(γ -PGA) 등의 기능성 물질이 강화된 발효액을 생산하는 방법을 제공하는데 있다.

과제의 해결 수단

[0008] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 (1) 대추류를 열수 추출하여 대추류 추출액을 제조하는 단계; (2) 상기 제조된 대추류 추출액에 모노소듐 글루타메이트(monosodium glutamate; MSG) 및 γ -PGA 생산배지를 첨가하여 혼합하는 단계; 및 (3) 상기 혼합물에 바실러스 서브틸리스 HA (*Bacillus subtilis* HA; KCCM 10775P) 균주 스타터를 접종하고 배양하여 37 내지 42℃에서, 24 내지 72 시간 동안 발효시키는 단계를 포함하는 간기능 개선 또는 면역기능 증진된 대추류 발효액 제조방법을 제공한다.

[0009] 또한, 본 발명은 바실러스 서브틸리스 HA (*Bacillus subtilis* HA; KCCM 10775P) 균주로 발효시킨 대추류 발효

액을 유효성분으로 함유하는 간기능 개선 또는 면역기능 증진용 식품조성물을 제공한다.

발명의 효과

[0010] 본 발명은 고초균 발효를 통한 간기능 개선 또는 면역 증진된 대추류 발효액 제조방법에 관한 것으로서, 더욱 상세하게는 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*) HA균을 이용한 발효를 통해 대추, 흑대추 및 대추씨 추출물 발효액을 생산하고 감마 폴리글루탐산(γ -PGA) 등의 기능성이 강화된 발효액을 생산하였다. 본 발명에서는 대표적인 한방원료인 대추 추출액 이외에도, 흑대추 제조 공정의 최적화 및 비가식 부분인 대추씨 추출액을 이용하여 적정량의 γ -PGA 생산배지, 채소 주스와 모노-소듐 L-글루탐산(mono-sodium L-glutamic acid; MSG)을 혼합하여 고농도의 점질물(γ -PGA)과 물성이 개선되고, 간기능 개선 또는 면역 증진된 효과를 가지는 기능성 식품 소재를 개발하였다.

도면의 간단한 설명

[0011] 도 1은 대추씨 발효액의 γ -PGA 생산배지 첨가별 pH, 산도 변화를 나타낸다.
 도 2는 대추씨의 γ -PGA 생산배지 첨가별 점조도 변화를 나타낸다.
 도 3은 흑대추 발효액의 γ -PGA 생산배지 첨가별 pH, 산도 변화를 나타낸다.
 도 4는 흑대추 발효액의 농도별 pH, 산도 변화를 나타낸다.
 도 5는 대추 발효액, 흑대추 발효액, 대추씨 발효액 제조시, γ -PGA 생산배지 및 당근주스 첨가에 따른 시료별 색 변화를 나타낸다.
 도 6은 대추, 흑대추, 대추씨 추출물 액상 발효물의 pH와 산도 변화를 나타낸다.
 도 7은 대추, 흑대추, 대추씨 추출물 액상 발효물의 점조도 및 점질물 변화를 나타낸다.
 도 8은 대추, 흑대추, 대추씨 추출물 액상 발효물의 당도 변화를 나타낸다.
 도 9는 민들레 당절임액 첨가에 따른 흑대추 추출액 농도별 발효액의 pH와 산도 변화를 나타낸다.
 도 10은 민들레 당절임액 첨가에 따른 흑대추 추출액 농도별 발효액의 점조도 및 점질물 변화를 나타낸다.
 도 11은 민들레 당절임액 첨가에 따른 대추, 흑대추, 대추씨 추출물 액상 발효물의 pH와 산도 변화를 나타낸다.
 도 12는 민들레 당절임 첨가에 따른 대추, 흑대추, 대추씨 추출물 액상 발효물의 점조도 및 점질물 함량 변화를 나타낸다.
 도 13은 t-BHP 유도 독성에 노출된 HepG2 세포에 대한 대추, 흑대추, 대추씨 추출물 발효액의 독성 억제 효과를 나타낸다.
 도 14는 대추, 흑대추, 대추씨 추출물 발효액의 HepG2 세포독성 시험 결과를 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0012] 이에, 본 발명자들은 대추발효액, 흑대추 발효액, 대추씨 발효액을 이용하여 기능성 물질인 γ -PGA 증가를 위해 추출액 첨가별에 따른 조성의 최적조건과 γ -PGA 생산배지 첨가에 따른 발효 최적화하고 이를 이용해 다양한 식품에 적용하고자 하였다. 특히, 대추를 이용한 액상 발효액 제조에서 주원료인 대추와 흑대추 및 대추씨를 소재로 하여 대추의 가식부 및 비가식부 모두를 활용해 기능성 점질물을 증가시켜 기능성 음료 이외에도 다른 식품, 화장품 소재로써 활용하고자 하였다. 따라서, 본 발명자들은 고초균 발효물을 이용하여 기능성이 강화되고 물성이 개선된 대추, 흑대추, 대추씨 추출물의 액상 발효액을 제조하고 본 발명을 완성하였다.

[0013] 본 발명은 (1) 대추류를 열수 추출하여 대추류 추출액을 제조하는 단계; (2) 상기 제조된 대추류 추출액에 모노소듐 글루타메이트(monosodium glutamate; MSG) 및 γ -PGA 생산배지를 첨가하여 혼합하는 단계; 및 (3) 상기 혼합물에 바실러스 서브틸리스 HA (*Bacillus subtilis* HA; KCCM 10775P) 균주 스타터를 접종하고 배양하여 37 내지 42℃에서, 24 내지 72 시간 동안 발효시키는 단계를 포함하는 간기능 개선 또는 면역기능 증진된 대추류 발효액 제조방법을 제공한다.

- [0014] 상세하게는, 상기 (2) 단계에서는 당근주스 또는 민들레 당절임액을 추가로 첨가하여 혼합할 수 있으며, 상기 민들레 당절임액은 민들레를 민들레(뿌리, 줄기, 꽃)를 설탕과 1:1로 혼합하여 밀폐용기에 담아 3개월 내지 6개월간 추출하여 얻은 여액을 사용하여 제조할 수 있다. 보다 상세하게는, 상기 당근주스 또는 민들레 당절임액은 상기 전체 혼합물 100 중량부에 대해 5 내지 20 중량부가 포함될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0015] 상세하게는, 상기 대추류 추출액은 상기 전체 혼합물 100 중량부에 대해 10 내지 75 중량부가 포함될 수 있으며, 상기 모노소듐 글루타메이트(monosodium glutamate; MSG)는 1 내지 5 중량%로 포함될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0016] 상세하게는, 상기 γ -PGA 생산배지는 KH_2PO_4 0.1 중량%, Na_2HPO_4 0.1 중량%, $(\text{NH}_4)_2 \cdot \text{SO}_4$ 0.5 중량%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05 중량%, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.04 중량%, 글루코오스(Glucose) 3 중량% 및 글루타메이트(Glutamate) 3 중량%로 이루어질 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0017] 상세하게는, 상기 대추류는 대추, 흑대추 또는 대추씨일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 보다 상세하게는, 상기 흑대추는 대추를 80℃에서 3일간 밀폐하여 숙성시켜 제조할 수 있다.
- [0018] 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.
- [0019] 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.
- [0020] 또한, 본 발명은 바실러스 서브틸리스 HA (*Bacillus subtilis* HA; KCCM 10775P) 균주로 발효시킨 대추류 발효액을 유효성분으로 함유하는 간기능 개선 또는 면역기능 증진용 식품조성물을 제공한다.
- [0021] 상세하게는, 상기 대추류 발효액은 점질물 및 감마-폴리글루탐산(gamma-poly glutamic acid; γ -PGA)이 증진된 것일 수 있다.
- [0022] 상세하게는, 상기 대추류는 대추, 흑대추 또는 대추씨일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0023] 본 발명에 있어서, "감마-폴리글루탐산(gamma-poly glutamic acid; γ -PGA)"은 글루탐산 단량체(monomer glutamic acid)의 α -아미노기와 γ -카르복실기 사이의 아미드 결합(amide linkage)에 의해 결합된 동중중합체(homopolymer)이다. 일본의 전통발효식품인 낫토(natto)의 점액성 물질이 고초균(*Bacillus*)에 의해 생산되는 대표적인 γ -PGA로서 바실러스 낫토 사와무라(*Bacillus natto* Sawamura)에 의해 생산되었다는 보고가 있다. 일반적으로 γ -PGA는 수용성, 음이온성, 무독성, 생분해성, 생체적합성, 식용 등의 다양한 특성이 있기 때문에 다양한 분야에서 응용되고 있다.
- [0024] 본 발명의 식품 조성물인 경우, 상기 식품의 종류에는 특별한 제한은 없다. 상기 대추류 발효액을 첨가할 수 있는 식품의 예로는 육류, 소세지, 빵, 초코렛, 캔디류, 스낵류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류를 포함한 낙농제품, 각종 스프, 음료수, 차, 드링크제, 알콜 음료 및 비타민 복합제 등이 있다.
- [0025] 이하, 하기 실시예를 통해 본 발명을 보다 상세하게 설명한다. 다만, 이러한 실시예에 의해 본 발명이 한정되는 것은 아니다.

[0026] <실시예 1> 스타터 배양, 배양 배지 및 대추 추출액 제조

[0027] 1. 기본 배지

[0028] 기본 배지로 MRS broth와 NB broth를 이용하여 스타터 배양액을 제조하였으며, NB broth에서 42℃, 24시간 배양한 바실러스 서브틸리스 HA(*Bacillus subtilis* HA; KCCM 10775P)를 8,000 rpm에서 20분간 원심분리한 후 멸균 생리식염수를 이용하여 10배 농축한 스타터를 제조하여 사용하였다.

[0029]

[0030] 2. 사용 균주 및 농축 스타터 제조

[0031] 바실러스 서브틸리스 HA 균주는 NB(nutrient broth) 배지를 121℃에서 15분간 멸균한 배지 50 mL에 MRS agar plate를 이용해 42℃, 24 hr 배양한 바실러스 서브틸리스 HA를 1 백금이 접종한 뒤 진탕배양기(SI-900R, JEIO TECH Co., Ltd., Korea)에서 42℃, 160 rpm, 24시간 동안 배양한 후 8,000 rpm, 20분간 원심분리 하고 멸균 생리식염수를 이용해 10배 농축하여 스타터로 사용하였다.

[0032] 3. 대추, 흑대추 및 대추씨 추출액 제조

[0033] 대추 추출액 제조는 대추씨를 제거한 대추를 10 중량% 포함시켜 80℃에서 3일간 약탕기에서 열수추출하였다.

[0034] 흑대추는 밀폐 용기 내부에 대추를 넣어 밀폐 후 80℃에서 3일간 숙성 후 흑대추를 제조하였다. 그리고 흑대추 추출액 제조를 위해, 대추씨를 제거한 흑대추를 10 중량% 포함시켜 80℃에서 3일간 약탕기에서 열수추출하였다.

[0035] 대추씨 추출액 제조를 위해, 대추씨는 믹서기로 파쇄한 후 5 중량% 포함시켜 80℃에서 3일간 약탕기에서 열수추출하였다.

[0036] 발효를 위하여 10% MSG 용액을 3% 수준으로 첨가하여 *Bacillus subtilis* HA 1%를 접종한 후 42℃, 2일간 발효하면서 기능성 물질이 강화된 발효물을 제조하였다.

[0037] <실시예 2> 바실러스 서브틸리스 HA 균주를 이용한 1차 발효 최적화 및 효능평가

[0038] 1. pH 및 산도 측정

[0039] pH는 pH meter(420A+, Thermo Orion, USA)를 이용하여 측정하였으며, 발효물 1 g에 증류수 9 mL을 혼합한 후 측정하였다. 적정 산도는 시료 1 g에 증류수 9 mL을 첨가하여 pH meter로 pH가 8.3에 도달할 때까지 0.1 N NaOH로 적정한 소비량을 젖산(lactic acid) 함량(% , v/w)으로 환산하였다.

[0040] 2. 생균수 측정

[0041] 생균수는 발효물 1 mL에 멸균수 9 mL을 첨가하여 10배로 단계별 희석하여 MRS broth agar 배지에 20 μ L 도말한 후, 바실러스 서브틸리스 HA는 42℃ 항온배양기에서, 24시간 배양한 후의 생균수를 CFU (colony forming unit)/mL으로 나타내었다.

[0042] 3. 점질물 및 점도 측정

[0043] 점질물 함량은 대추, 흑대추 및 대추씨 액상 발효물을 각각 10 mL씩 취하여 15,000 rpm에서 15분 동안 원심분리한 상등액을 2-3배의 이소프로필알코올을 첨가한 후 생성된 점질물을 60℃, 24시간 dry oven에서 건조시킨 후 무게를 측정하여 함량을 환산하였다.

[0044] 점조도 측정은 cone plate device(Plate PP35Ti, 3.5 cm diameter)를 장착한 물성측정기를 이용하여 측정하였다. 발효물 1 mL을 plate에 올려 구간당 10초 동안의 평균값이 측정되어 얻은 값을 shear rate (1/s)와 shear

stress (Pa)로 나타내어 점조도를 측정하였다. 측정온도는 20℃에서 전단속도($\dot{\gamma}$)는 1-100 s^{-1} 의 범위로 유동특성을 알아보고, 점조도 지수는 다음과 같은 식을 사용하여 나타냈다.

[0045] Power law model : $\sigma = K \cdot \dot{\gamma}^n$

[0046] σ 는 전단응력(shear stress, Pa), K는 점조도 지수(consistency index, $Pa \cdot s^n$), $\dot{\gamma}$ 는 전단속도(shear rate, s^{-1}), n은 유동성 지수(flow behavior index, n)이다.

[0047] **4. 대추, 흑대추, 대추씨 발효 용액 관능검사**

[0048] 대추, 흑대추 및 대추씨 액상 발효물은 계명대학교 식품가공학 전공 학생 및 연구원에게 관능검사에 필요한 훈련과정을 거치게 한 후 신뢰성과 실험에 대한 관심도 등을 고려하여 10명을 관능요원으로 최종 선발하여 관능검사를 실시하였다. 용액은 냉장보관하여 종이컵에 담아 제공하여 평가항목은 향, 풍미, 색, 단맛, 쓴맛 및 전반적인 기호도에 대하여 각 항목별로 최저 1점, 최고 7점으로 7점 기호도 척도법으로 평가하였다.

[0049] **5. 세포 실험**

[0050] 5-1. 세포주

[0051] HepG2 세포주는 한국세포주은행에서 분양을 받아 사용하였다. 배양은 10% FBS(fetal bovine serum)와 1% antibiotics(penicillin/streptomycin)를 첨가한 DMEM(Dulbecco's Modified Eagle's Medium) 배지를 사용하여 37℃, CO₂ 5% 조건에서 배양, 사용하였다.

[0052] 5-2. 세포독성 시험

[0053] 세포독성 시험은 MTT assay를 사용하여 세포 생존율을 측정함으로써 수행하였다. MTT 시약은 세포내로 흡수된 후, 미토콘드리아 내 효소인 succinate dehydrogenase에 의해 formazan으로 변하여 세포의 성장을 멈추게 하며, 세포가 죽을수록 formazan의 생성이 줄어들게 되는 것을 이용한 것이다. 배양된 간암 세포주를 96 well plate에 5×10^4 cells/well이 되게 분주하여 5% CO₂ incubator에서 16-24시간 동안 예비 배양 한 후 시료를 농도별로 처리하여 24시간 배양한 세포에 PBS에 녹인 MTT(5 mg/mL) 용액 10 mL를 각 well에 넣고 incubator에서 4시간 동안 반응시킨다. 배양 종료 후 상등액을 제거하고, 각 well에 100 μ L의 dimethyl sulfoxide(DMSO)를 첨가하여 생성된 formazan crystal을 용해시켜 550 nm 파장에서 ELISA reader(SPECTRA max 340PC, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)로 흡광도를 측정하였다. 측정한 formazan 생성정도는 정상적인 세포의 값과 비교하여 백분율(%)로 표시하였다.

[0054] 5-3. t-BHP에 의한 간세포 독성 억제 시험

[0055] 5×10^4 cells/well의 HepG2 세포를 96 well plate에 분주한 후 24시간 동안 배양하였다. 세포가 plate에 부착되고 특징적인 형태를 나타내고 있음을 확인한 후 시료가 포함된 배양액 200 μ L를 넣고 24시간 동안 배양하였다. 상층액을 제거한 후 t-BHP(1 mM)가 포함된 배양액을 가하고 2시간 동안 배양하였다.

[0056] **6. γ -PGA 생산 배지 제조 방법**

[0057] 배지 조성은 표 1과 같은 조성으로 KH₂PO₄ 0.1%, Na₂HPO₄ 0.1%, (NH₄)₂SO₄ 0.5%, MgSO₄ · 7H₂O 0.05%, CaCl₂ · 2H₂O 0.04%, Glutamate 3%, Glucose 3%로 제조한 다음 이를 비율에 따라 혼합하여 γ -PGA 생산용 배지로 사용하였다. γ -PGA 생산 배지에 농축하여 제조된 바실러스 서브틸리스 HA 스타터 1% (v/v)를 접종한 후 42℃에서 3일간 160rpm에서 진탕발효하여 실험에 사용하였다.

표 1

고초균 액상 발효를 위한 γ -PGA 생산배지 조성

성분(Ingredients)	함량(Content) (mL, %)
KH_2PO_4 (10%)	(1, 0.1%)
Na_2HPO_4 (10%)	(1, 0.1%)
$(\text{NH}_4)_2 \cdot \text{SO}_4$ (25%)	(2, 0.5%)
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (1%)	(5, 0.05%)
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (1%)	(4, 0.04%)
Glucose (30%)	(10, 3%)
Glutamate (30%)	(10, 3%)
Distilled water	67 mL
Total	100 mL

<실시예 3> 대추씨의 γ -PGA 생산배지 첨가별에 따른 물성 변화

1. pH 및 산도 변화

대추씨 추출물을 이용하여 γ -PGA 생산배지 첨가에 따른 대추씨 액상 발효물의 pH 변화는 γ -PGA 생산배지를 10% 첨가하였을 때 발효 1-3일 기간 동안 각각 pH 4.99, pH 4.96, pH 5.04로 큰 차이를 보이지 않았다. γ -PGA 생산배지 25% 첨가하였을 때는 pH 6.61에서 pH 5.79로 감소하는 경향을 보였으며, 50% 첨가하였을 때는 pH 6.32, pH 7.30, pH 7.10로 나타났다. 그리고 γ -PGA 생산 배지로만 발효하였을 때는 pH 6.32, pH 7.29, pH 6.64로 나타났다(도 1).

산도 변화는 발효 1-3일 동안 각각 γ -PGA 생산배지 0% 첨가일 때 0.02%, 0.03%, 0.025%였고, 25% 첨가했을 때 0.02%, 0.035%, 0.025%, 50% 첨가했을 때 0.03%, 0.02%, 0.025%, 100%에서는 0.20%, 0.025%, 0.025%로 나타났다(도 1).

2. 생균수 변화

대추씨 추출물을 이용하여 γ -PGA 생산배지 첨가에 따른 대추씨 액상 발효물의 생균수 변화는 γ -PGA 생산배지를 0% 첨가하였을 때 1일 발효에 4.50×10^8 CFU/mL 이 나타난 후 발효 2일과 3일에는 생균수가 나타나지 않았다. γ -PGA 생산배지를 25% 첨가하였을 때 발효 1-3일 기간 동안 각각 2.95×10^8 , 1.90×10^8 , 1.40×10^8 CFU/mL로 큰 차이를 보이지 않았다. γ -PGA 생산배지를 50% 첨가하였을 때 발효 1-3일 기간 동안 각각 1.11×10^8 , 5.00×10^8 , 3.15×10^8 CFU/mL로 10^8 CFU/mL를 유지하였다. γ -PGA 생산배지를 100% 첨가하였을 때 발효 기간 동안 2.75×10^8 , 1.45×10^8 , 1.19×10^8 CFU/mL으로 10^8 CFU/mL 이상을 유지하였다(표 2).

표 2

대추씨의 γ -PGA 생산배지 첨가별 생균수 변화 (CFU/mL)

대추씨 γ -PGA 생산배지 첨가(%)	발효시간(Fermentation time) (days)		
	1	2	3
0	4.50×10^8	¹⁾ -	-
25	2.95×10^8	1.90×10^8	1.40×10^8
50	1.11×10^8	5.00×10^8	3.15×10^8
100	2.75×10^8	1.45×10^8	1.19×10^9

¹⁾ Not detected.

3. 점조도 변화

대추씨 추출물을 이용하여 γ -PGA 생산배지 첨가에 따른 대추씨 액상 발효물의 점조도 변화는 γ -PGA 생산배지를 0% 첨가하였을 때 발효 1-3일 동안 점조도가 나타나지 않았다. γ -PGA 생산배지 25% 첨가 하였을 때 발효 1-3일 동안 $0.029 \pm 0.002 \text{ Pa} \cdot \text{s}^n$, $0.012 \pm 0.002 \text{ Pa} \cdot \text{s}^n$, $0.094 \pm 0.003 \text{ Pa} \cdot \text{s}^n$ 로 서서히 증가하였다. γ -PGA 생산배지 50% 첨가 하였을 때 발효 1-3일 동안 $0.043 \pm 0.001 \text{ Pa} \cdot \text{s}^n$, $0.106 \pm 0.001 \text{ Pa} \cdot \text{s}^n$, $0.008 \pm 0.001 \text{ Pa} \cdot \text{s}^n$ 로 증가 후 발효 3일째 감소하였다. γ -PGA 생산배지 100% 첨가하였을 때 발효 1-3일 동안 $0.039 \pm 0.003 \text{ Pa} \cdot \text{s}^n$, $0.122 \pm 0.003 \text{ Pa} \cdot \text{s}^n$, $0.061 \pm 0.003 \text{ Pa} \cdot \text{s}^n$ 로 발효 2일에 크게 증가 후 감소하는 경향을 보였다(도 2).

<실시예 4> 흑대추의 γ -PGA 생산배지 첨가별에 따른 물성 변화

1. pH 및 산도 변화

흑대추 추출물을 이용하여 γ -PGA 생산배지 첨가에 따른 흑대추 액상 발효물의 pH 변화는 γ -PGA 생산배지를 10% 첨가하였을 때 발효 1-3일 기간 동안 각각 pH 4.89, pH 4.91, pH 4.89로 큰 차이를 보이지 않았다. γ -PGA 생산배지 25% 첨가하였을 때는 pH 6.10, pH 6.05, pH 5.77로 서서히 감소하는 경향을 보였으며, γ -PGA 생산배지 50% 첨가하였을 때는 pH 6.78, pH 7.40, pH 6.57로 나타났다. 50% 첨가한 경우는 pH가 증가하였다가 다시 감소하는 경향을 보였다. 산도는 발효 기간 동안 각각 γ -PGA 생산배지 첨가에 따라 전반적으로 감소하거나 일정한 수준으로 유지하는 것을 알 수 있었다(도 3).

2. 생균수 변화

흑대추 추출물을 이용하여 γ -PGA 생산배지 첨가에 따른 흑대추 액상 발효물의 생균수 변화는 γ -PGA 생산배지를 0% 첨가하였을 때 발효 1일째 생균수가 나타나지 않았다. γ -PGA 생산배지를 25% 첨가하였을 때 발효 1-3일 기간 동안 각각 1.20×10^8 , 2.30×10^8 , 2.90×10^8 CFU/mL로 생균수가 발효 2일째까지 증가하면서 발효 3일째에도 일정하게 유지되는 것을 알 수 있었다. γ -PGA 생산배지를 50% 첨가하였을 때 발효 1일째 3.15×10^8 CFU/mL로 높았으나 발효 3일에는 감소하여 1.50×10^8 CFU/mL로 감소하였다(표 3).

표 3

흑대추 추출물의 γ -PGA 생산배지 첨가별 생균수 변화 (CFU/mL)

γ -PGA 생산배지 농도 (%)	발효시간(Fermentation time) (days)		
	1	2	3
0	¹⁾ -	-	-
25	1.20×10^8	2.30×10^8	2.90×10^8
50	3.15×10^8	3.40×10^8	1.50×10^8

¹⁾ Not detected.

<실시예 5> 흑대추 추출물의 농도별 첨가에 따른 이화학적 변화

1. pH 및 산도 변화

γ -PGA 생산배지 첨가 농도를 25%로 고정한 후 흑대추 추출물을 0-75% 까지 첨가하여 흑대추의 농도별에 따른 액상 발효물의 pH 변화는 흑대추 추출물을 0% 첨가하였을 때 발효 1-3일 동안 각각 pH 6.69, pH 5.82, pH 5.80로 다소 감소하는 경향을 보였다. 흑대추 10% 첨가하였을 때는 pH 6.39, pH 6.19, pH 7.44로 감소하다가 증가하였고 pH 변화가 모든 조건 중에서 가장 큰 것으로 나타났다. 흑대추 농도를 30% 첨가하였을 때는 pH 6.08, pH 6.31, pH 6.58로 크게 변하지 않는 경향을 보였다. 흑대추 농도를 50% 첨가하였을 때는 pH 5.72, pH 5.67, pH 5.62로 크게 변하지 않는 경향을 보였다. 하지만 흑대추 추출물 75% 첨가된 조건에서는 pH 변화가 거의 없어 발효가 일어나지 않는 것으로 나타나, 흑대추 농도가 높아질수록 발효에 불리한 것으로 나타났다. 산도 변화는 발효 1-3일 동안 각각 흑대추 0% 첨가일 때 0.06%, 0.12%, 0.09%였고, 흑대추 10% 첨가일 때 0.09%, 0.08%, 0.08%, 흑대추 30% 첨가일 때 0.11%, 0.08%, 0.08%로 감소하였다. 흑대추 50, 75% 첨가에서는 산도 변화가 거의 없는 것을 알 수 있었다(도 4).

2. 생균수 변화

흑대추 추출물을 이용하여 γ -PGA 생산배지를 25%로 첨가하여 흑대추의 농도에 따른 액상 발효물의 pH 변화는 흑대추 추출물 농도를 10% 첨가하였을 때 발효 1-3일 기간 동안 각각 1.19×10^8 CFU/mL, 6.57×10^8 CFU/mL, 3.03×10^8 CFU/mL로 나타났으며, 흑대추 추출물 농도를 25% 첨가하였을 때 발효 후 2.14×10^8 CFU/mL에서 발효 3일째 3.03×10^8 CFU/mL로 흑대추 첨가 농도 중에서 가장 높은 생균수를 나타내었다. 하지만 흑대추 추출물 농도를 50% 첨가하였을 때 발효 1-3일 기간동안 각각 7.29×10^7 CFU/mL, 6.21×10^7 CFU/mL, 5.00×10^7 CFU/mL로 생균수는 점차 감소하여 10^7 CFU/mL로 나타났다. 그러나 흑대추 추출물 75% 첨가 농도에서는 생균수가 발효 1일째부터 나타나지 않았으며 흑대추의 농도가 높아질수록 항균작용에 의한 미생물 생육에 불리한 것으로 판단되어 발효가 진행되지 않는 것으로 나타났다. 따라서 미생물 생육을 하기 위해 흑대추 첨가 농도는 25%가 가장 좋은 것을 알 수 있었다(표 4).

표 4

흑대추 농도별 생균수 변화

생균수(Viable cell count) (CFU/mL)			
흑대추 농도 (%)	발효시간(Fermentation time) (days)		
	1	2	3
10	1.19×10^8	6.57×10^8	3.03×10^8
25	2.14×10^8	6.56×10^8	3.30×10^8
50	7.29×10^7	6.21×10^8	5.00×10^7
75	—	—	—

¹⁾ Not detected.

3. 점조도 변화

[0087] 흑대추 추출물 첨가 농도에 따른 점조도 변화를 표 5에 나타내었다. 그 결과, 흑대추 추출물 10, 75% 첨가된 조건에서는 점조도 변화가 매우 낮게 나타나는 것을 알 수 있었다. 흑대추 추출물 25% 첨가된 조건은 발효 2일째 $2.19 \text{ Pa} \cdot \text{s}^n$ 로 가장 높게 나타났다. 하지만 대부분의 조건에서는 발효 3일째 점조도는 감소하는 것으로 나타나 흑대추 추출물 25% 첨가하는 조건이 가장 좋다고 판단하였다.

표 5

[0088] 흑대추 농도별 점조도 변화

점조도(Consistency index) ($\text{Pa} \cdot \text{s}^n$)			
흑대추 농도 (%)	발효 시간(Fermentation time) (days)		
	1	2	3
10	0.01 ± 0.01	0.02 ± 0.02	0.01 ± 0.01
25	1.31 ± 0.02	2.19 ± 0.06	1.83 ± 0.02
50	1.01 ± 0.01	1.74 ± 0.03	1.53 ± 0.01
75	0.01 ± 0.01	0.01 ± 0.00	0.01 ± 0.02

[0089] 4. 점질물 변화

[0090] 흑대추 추출물 첨가 농도에 따른 점질물 변화를 표 6에 나타내었다. 그 결과, 10% 첨가한 조건에서는 발효 1-3일 동안 각각 0.53, 0.52, 0.31%로 나타났다. 25% 첨가한 조건은 발효 2일째 점질물 함량이 2.22%이었으며 발효 3일에는 조금 감소하여 1.98%로 나타났지만 다른 조건에 비하여 점질물 함량이 높은 것으로 나타났다. 하지만 흑대추 추출물 75%에서는 발효 후에 점질물이 나타나지 않는 것으로 보아 흑대추 추출물 농도가 높을수록 발효에 불리한 것을 알 수 있었다.

표 6

[0091] 흑대추 농도별 점질물 변화

생균수(Viable cell count) (CFU/mL)			
흑대추 농도 (%)	발효시간(Fermentation time) (days)		
	1	2	3
10	0.53 ± 0.01	0.52 ± 0.01	0.31 ± 0.02
25	1.31 ± 0.02	2.22 ± 0.03	1.98 ± 0.02
50	1.30 ± 0.01	1.74 ± 0.01	1.43 ± 0.01
75	-	-	-

[0092] <실시예 6> 대추 발효액, 흑대추 발효액, 대추씨 발효액 제조시, γ -PGA 생산배지 및 당근주스 첨가에 따른 물성 변화

[0093] 1. 배지 구성에 따른 대추, 흑대추 및 대추씨 액상 발효물 제조 방법

[0094] 대추, 흑대추, 대추씨 추출물을 25 mL과 MSG 10 mL, 증류수 15 mL, γ -PGA 생산배지 50mL을 첨가하고, 대조군으로 시료를 넣지 않고 증류수를 25 mL 추가로 넣고, 대조군으로 γ -PGA 생산배지 대신 증류수를 50 mL추가로 투입하고 또는 생당근을 착즙기를 이용하여 착즙박을 제거한 여액의 당근주스를 25 mL 투입하여 실험을 진행하였다(표 7).

표 7

1	대추 추출액 25 mL	MSG 10 mL	증류수 15 mL	γ -PGA 생산배지 50 mL
2	흑대추 추출액 25 mL	MSG 10 mL	증류수 15 mL	γ -PGA 생산배지 50 mL

3	대추씨 추출액 25 mL	MSG 10 mL	증류수 15 mL	γ -PGA 생산배지 50 mL
4	시료 ×	MSG 10 mL	증류수 40 mL	γ -PGA 생산배지 50 mL
5	대추 추출액 25 mL	MSG 10 mL	증류수 65 mL	×
6	대추 추출액 25 mL	MSG 10 mL	증류수 40 mL	당근주스 25 mL

2. 대추 발효액, 흑대추 발효액, 대추씨 발효액 제조시, γ -PGA 생산배지 및 당근주스 첨가에 따른 시료별 색 변화

1, 2, 3 번은 대추와 흑대추 대추씨를 희석한 색이므로 큰 차이를 보이지 않았다. 4 번은 시료가 들어가지 않고 γ -PGA 생산배지만 들어가 흰 불투명의 색으로 나타났으며, 5 번은 γ -PGA 생산배지가 들어가지 않아 1 번보다 조금 더 진한 색으로 나타났다. 6 번은 당근주스를 첨가하여 2 번 보다 붉은 계열의 색이 더 진하게 나타났다(도 5).

3. 대추 발효액, 흑대추 발효액, 대추씨 발효액 제조시, γ -PGA 생산배지 및 당근주스 첨가에 따른 시료별 pH 및 산도 변화

2일 발효 후 대추 발효액, 흑대추 발효액, 대추씨 발효액의 γ -PGA 생산배지 첨가별, γ -PGA 생산배지 대체용으로 당근주스 첨가시 변화는 표 8과 같이 대추와 흑대추, 대추씨는 각각 pH 7.65 ± 0.04 , pH 7.44 ± 0.02 , pH 7.68 ± 0.00 으로 큰 차이를 나타내지 않았다. 시료가 없었던 4번은 pH 6.42 ± 0.00 으로 낮았으며, γ -PGA 생산배지가 없었던 5번은 pH 8.18 ± 0.00 으로 높았다. 당근주스를 첨가한 6번은 pH 7.86 ± 0.00 였다. 산도는 1-6 시료 각각 $0.07 \pm 0.03\%$, $0.05 \pm 0.00\%$, $0.05 \pm 0.02\%$, $0.08 \pm 0.01\%$, $0.02 \pm 0.00\%$, $0.05 \pm 0.01\%$ 으로 γ -PGA 생산배지만 첨가한 시료가 가장 높았으며 다른 시료들은 큰 차이를 보이지 않았다.

표 8

	1	2	3	4	5	6
pH	7.65 ± 0.04	7.44 ± 0.02	7.68 ± 0.00	6.42 ± 0.00	8.18 ± 0.00	7.86 ± 0.00
Acidity	0.07 ± 0.03	0.05 ± 0.00	0.05 ± 0.02	0.08 ± 0.01	0.02 ± 0.00	0.05 ± 0.01

대추, 흑대추, 대추씨 추출물을 이용하여 γ -PGA 생산배지 첨가를 25%로 설정한 시료와 시료 대신 증류수를 넣은 시료, γ -PGA 생산배지를 넣지 않은 시료, γ -PGA 생산배지 대신에 당근주스를 첨가한 시료를 2일 발효 후, 생균수를 측정해 보았다. 각각 2.83×10^8 CFU/mL, 1.70×10^8 CFU/mL, 1.50×10^8 CFU/mL, 5.00×10^8 CFU/mL, 1.98×10^8 CFU/mL, 3.08×10^8 CFU/mL 로 10^8 CFU/mL로 유지하는 경향을 보였으며 시료를 첨가하지 않은 군에서 5.00×10^8 으로 가장 높은 경향을 보였다(표 9).

표 9

Viable cell count (CFU/mL)	1	2	3	4	5	6
	2.83×10^8	1.70×10^8	1.50×10^8	5.00×10^6	1.98×10^8	3.08×10^8

대추, 흑대추, 대추씨 추출물을 이용하여 γ -PGA 생산배지 첨가를 25%로 설정한 시료와 시료 대신 증류수를 넣은 시료, γ -PGA 생산배지를 넣지 않은 시료, γ -PGA 생산배지 대신에 당근주스를 첨가한 시료를 2일 발효 후, 점조도를 측정해 보았다. 각각 7.34 ± 0.30 Pa·sⁿ, 2.19 ± 0.05 Pa·sⁿ, 1.53 ± 0.01 Pa·sⁿ, 3.14 ± 0.11 Pa·sⁿ, 0.12 ± 0.16 Pa·sⁿ, 0.23 ± 0.01 Pa·sⁿ 으로 대추 추출물에서 가장 점조도가 높게 나타났으며, 이후 γ -PGA 생산배지만 첨가한 결과, 흑대추, 대추씨로 당근주스와 γ -PGA 생산배지를 첨가하지 않은 결과에서는 낮게 측정되었다(표 10).

표 10

[0104]

Consistency index (Pa · s ⁿ)	1	2	3	4	5	6
	7.34±0.30	2.19±0.05	1.53±0.01	3.14±0.11	0.12±0.16	0.23±0.01

[0105]

따라서 대추, 흑대추, 대추씨 추출물에 γ -PGA 생산배지를 25% 수준으로 첨가함으로써 효과적으로 기능성 점질물을 생산할 수 있었으며, 특히 γ -PGA 생산배지 대신에 당근주스를 25% 수준으로 첨가함으로써 점질물을 함유한 발효액을 생산할 수 있었다(표 11). 이는 γ -PGA 생산배지 대신에 다양한 채소 주스의 첨가를 통해서 효과적으로 점질물을 함유한 발효액을 생산할 수 있다. 결론적으로 대추, 흑대추, 대추씨 등의 대표적인 한방소재에 면역개선 소재로 인정을 받은 감마 폴리글로탄산 고분자 점질물을 강화시킴으로서 물성 및 면역증진 소재로 활용이 기대된다. 특히, 고분자 점질물(γ -PGA)을 포함한 발효물을 정제 단계 없이 전체로 식품 및 화장품 소재로 활용이 가능하여, 음료, 소스 등 기능성소재로서 다목적 활용이 가능하다.

표 11

[0106]

Mucilage content (%)	1	2	3	4	5	6
	2.48	2.22	2.39	1.83	0	1.79

[0107]

<실시예 7> 대추, 흑대추, 대추씨 시료별에 따른 액상 발효물의 특성 변화

[0108]

1. pH 및 산도 변화

[0109]

대추, 흑대추, 대추씨 추출물을 이용하여 γ -PGA 생산배지를 25% 첨가하여 대추, 흑대추, 대추씨 액상 발효물의 pH 변화 중 대추의 경우 발효 0-2일 기간동안 각각 pH 6.18, pH 5.79, pH 7.49로 2일 발효 시 크게 증가하였다. 흑대추의 경우 0-2일 기간동안 각각 pH는 6.18, pH 6.07, pH 7.32로 증가하는 경향을 보였으며, 대추씨의 경우 0-2일 기간동안 각각 pH 6.45, pH 5.79, pH 6.39로 큰 차이를 나타내지 않았다. 산도 변화는 발효 발효 0-2일 기간동안 각각 대추일때 0.10%, 0.11%, 0.08%였고, 흑대추 일때 0.09%, 0.14%, 0.05%, 대추씨 일때 0.08%, 0.11%, 0.08%, 로 나타났다. 각 시료들이 0.08%-0.14% 사이의 산도변화로 큰 차이를 보이지 않았다(도 6).

[0110]

2. 점조도 및 점질물 함량 변화

[0111]

대추, 흑대추, 대추씨 추출물을 이용하여 γ -PGA 생산배지를 25% 첨가하여 대추, 흑대추, 대추씨 액상 발효물의 점조도 변화와 점질물 변화를 측정해 보았다. 점질물에서 먼저 대추의 경우 발효 1-2일 동안 각각 점조도 1.80 Pa · sⁿ, 2.78 Pa · sⁿ 으로 증가하였고, 흑대추 추출물의 경우 발효 1-2일 동안 각각 점조도는 1.81 Pa · sⁿ, 1.73 Pa · sⁿ 으로 일정수준을 유지하는 것으로 나타났다. 대추씨의 경우 발효 1-2일 동안 각각 점조도는 0.54 Pa · sⁿ, 0.32 Pa · sⁿ 으로 대추와 흑대추에 비해 낮은 점조도 값을 보였다(도 7).

[0112]

점질물은 대추 추출물에서 발효 2일 동안 0.09%에서 0.13%로 조금 증가하였다. 흑대추 추출물의 경우 발효 2일 동안 점질물의 함량이 0.09%, 0.10%로 일정 수준으로 유지되었다. 대추씨 추출물은 발효 기간 동안 점질물이 0.09%에서 0.08%로 나타났다(도 7).

[0113]

3. 당도 변화

[0114]

대추, 흑대추, 대추씨 추출물을 이용하여 γ -PGA 생산배지를 25% 첨가하여 대추, 흑대추, 대추씨 액상 발효물의 당도 변화를 측정해 보았다. 대추의 당도는 발효 0-2일 동안 5.5±0.00 Brix°, 3.40±0.00 Brix°, 3.27±

0.06 Brix° 이다. 흑대추의 당도는 4.80 ± 0.00 Brix° , 3.00 ± 0.00 Brix° , 2.93 ± 0.06 Brix° 이다. 대추씨의 경우는 4.70 ± 0.00 Brix° , 3.07 ± 0.06 Brix° , 2.77 ± 0.06 Brix° 이다. 따라서 모든 조건에서 당도가 감소하면서 발효가 진행되는 것을 알 수 있었다(도 8).

4. 관능 평가

대추, 흑대추, 대추씨 추출물에 γ-PGA 생산배지를 첨가하여 고초균 발효를 한 관능적 특성의 결과는 표 12에 나타내었다. 발효액들은 전반적으로 1일 발효한 것보다 2일 발효한 시료들이 높은 점수를 나타내었다. BJ2가 대조구에 비해 향(aroma), 풍미(flavor), 색(color), 단맛(sweetness), 전반적인 기호도(overall acceptability)에서 높은 평가를 받았다. 고초균 발효를 진행함에 따라 특유의 쓴맛을 저하시켜, 풍미 등 전반적인 기호도에 서 우수한 것으로 나타나 향후 대추 발효 용액 제품의 활용이 가능하리라 생각된다.

표 12

	향 (aroma)	풍미 (flavor)	색 (color)	단맛 (sweetness)	쓴맛 (Bitterness)	전반적인 기호도 (overall acceptability)
C ¹⁾	2.70 ± 0.82	1.40 ± 0.70	2.90 ± 1.00	1.50 ± 0.53	2.20 ± 1.55	1.60 ± 0.52
J1 ²⁾	2.80 ± 0.79	2.10 ± 0.57	3.70 ± 0.67	3.50 ± 1.18	4.10 ± 0.88	2.40 ± 0.70
J2 ³⁾	3.60 ± 0.84	3.20 ± 1.14	4.10 ± 0.32	4.10 ± 0.74	3.10 ± 0.57	2.80 ± 0.79
BJ1 ⁴⁾	3.00 ± 0.94	3.80 ± 1.14	5.40 ± 0.70	4.70 ± 0.67	2.60 ± 0.70	3.70 ± 0.67
BJ2 ⁵⁾	4.90 ± 0.74	5.00 ± 0.82	5.70 ± 1.05	4.80 ± 1.48	2.30 ± 1.34	4.30 ± 0.95
JS1 ⁶⁾	1.70 ± 0.67	4.20 ± 0.92	3.50 ± 0.71	3.30 ± 0.67	3.10 ± 1.37	3.30 ± 0.67
JS2 ⁷⁾	2.80 ± 0.63	4.60 ± 0.70	3.70 ± 1.06	3.90 ± 0.88	2.20 ± 0.92	4.80 ± 0.79

C¹⁾ : 증류수 + γ-PGA 생산배지, J1²⁾ : 대추 추출액 + γ-PGA 생산배지(발효 1일), J2³⁾ : 대추 추출액 + γ-PGA 생산배지(발효 2일), BJ1⁴⁾ : 흑대추 추출액 + γ-PGA 생산배지(발효 1일), BJ2⁵⁾ : 흑대추 추출액 + γ-PGA 생산배지(발효 2일), JS1⁶⁾ : 대추씨 추출액 + γ-PGA 생산배지(발효 1일), JS2⁷⁾ : 대추씨 추출액 + γ-PGA 생산배지(발효 2일).

<실시예 8> 민들레 당절임액을 이용한 흑대추 추출액의 농도별 첨가에 따른 액상 발효물의 이화학적 특성 변화

민들레 당절임액은 설탕과 1:1로 혼합하여 밀폐용기에 담아 3개월 내지 6개월간 숙성시킨 후 추출하여 얻은 여액을 사용하였다.

표 13

1	흑대추 추출액 25 mL	MSG 10 mL	증류수 55 mL	민들레 당절임 10 mL
2	흑대추 추출액 50 mL	MSG 10 mL	증류수 30 mL	민들레 당절임 10 mL
3	흑대추 추출액 75 mL	MSG 10 mL	증류수 5 mL	민들레 당절임 10 mL

1. pH 및 산도 변화

[0124] 대추, 대추씨 추출물에 비해 점질물을 다량 생산하는 흑대추 추출물을 발효하고자 하였다. 그리고 γ -PGA 생산 배지를 대체하기 위한 천연발효 소재를 활용하기 위해 민들레 당절임을 10%를 첨가하였다. 흑대추 추출물의 첨가 비율을 25, 50, 75%로 달리하여 발효하였다. 그 결과, 흑대추 액상 발효물의 pH 변화는 흑대추 추출물 25% 첨가하였을 때 발효 2일 동안 pH 6.07 ± 0.00 에서 pH 5.81 ± 0.01 로 나타났다. 흑대추 추출액 50% 첨가하였을 때는 pH 5.53 ± 0.00 에서 pH 5.80 ± 0.01 로 증가하는 경향을 보였으며, 흑대추 추출액을 75% 첨가하였을 때는 pH 5.34 ± 0.01 , pH 5.45 ± 0.01 로 나타났다(도 9).

[0125] 산도 변화는 발효 1-2일 동안 각각 흑대추 발효액이 25% 첨가일 때 $0.08 \pm 0.00\%$, $0.16 \pm 0.01\%$ 였고, 흑대추 발효액이 50% 첨가일 때 $0.17 \pm 0.01\%$, $0.12 \pm 0.02\%$ 였다. 흑대추 발효액이 75% 첨가일 때 $0.19 \pm 0.02\%$, $0.18 \pm 0.02\%$ 로 나타났다(도 9).

[0126] 2. 점조도 및 점질물 함량 변화

[0127] 흑대추 추출물을 이용하여 민들레 당절임을 첨가하여 흑대추 농도별 첨가하여 흑대추 액상 발효물의 점조도 변화와 점질물 변화를 측정하였다. 흑대추 추출액이 25%인 경우 발효 1-2일 기간 동안 각각 점조도는 $0.01 \text{ Pa} \cdot \text{s}^n$, $0.005 \text{ Pa} \cdot \text{s}^n$ 으로 크게 낮았다. 흑대추 추출물이 50%인 경우, 발효 1-2일 기간 동안 각각 점조도는 $0.02 \text{ Pa} \cdot \text{s}^n$, $0.20 \text{ Pa} \cdot \text{s}^n$ 으로 2일째 증가한 모습을 보였다. 흑대추 농축액이 75%인 경우 발효 1-2일 기간동안 각각 점조도는 $0.01 \text{ Pa} \cdot \text{s}^n$, $0.01 \text{ Pa} \cdot \text{s}^n$ 으로 점조도 변화가 거의 나타나지 않았다(도 10).

[0128] 점질물 함량은 흑대추 추출물 25%인 경우 발효 2일 동안 1.38%에서 4.36%로 크게 증가하였다. 흑대추 추출물 50%는 발효 2일째 3.01%로 증가하였다. 하지만 흑대추 추출물 75%인 경우 발효 기간 동안 점질물이 형성되지 않아 흑대추 추출물 농도가 높아질수록 점질물 함량이 적게 만들어지는 것을 알 수 있었으며, 흑대추 추출물 25%가 첨가된 조건이 가장 높은 점질물을 나타내었다. 따라서 γ -PGA 생산배지에 비해 민들레 당절임액 첨가로 인해 점질물의 생산이 월등히 좋은 것으로 판단되었다(도 10).

[0129] <실시예 9> 대추, 흑대추, 대추씨 추출물의 민들레 당절임액 첨가에 따른 액상 발효물의 이화학적 특성 변화

[0130] 1. pH 및 산도 변화

[0131] 흑대추 추출물과 민들레 당절임액을 각각 25, 10%를 첨가한 액상 발효물이 발효 최적 조건으로 판단하여, 대추, 흑대추, 대추씨 추출물 각각을 25%로 하여 민들레 당절임액을 10% 첨가하여 액상발효후 비교 분석하였다.

[0132] 대추 추출물 25%에서 발효 3일 동안 pH 5.47 ± 0.02 에서 pH 6.95 ± 0.05 로 증가하는 것을 알 수 있었다. 발효 1일째는 변화가 없다가 2일째가 지나면서 pH 6.72 ± 0.02 로 급격하게 증가하였고, 3일째는 pH 변화가 거의 없었다. 흑대추 추출물 25%에서는 발효 3일 동안 점차적으로 pH가 증가하였으며 초기 pH 5.53 ± 0.02 에서 pH 7.00 ± 0.02 로 나타났다. 대추씨 추출물 25%도 흑대추 추출물과 유사하게 발효 3일 동안 pH가 점차적으로 증가하였고, 발효 3일째 pH 7.17 ± 0.01 로 나타났다(도 11).

[0133] 산도 변화는 모든 조건에서 발효 2일 동안 감소하는 경향을 나타내었고, 발효 3일째 일정하게 유지하거나, 약간 증가하는 것으로 나타났다(도 11).

[0134] 2. 생균수 변화

[0135] 생균수 변화는 대추 추출물의 경우 발효 2일째 3.50×10^7 CFU/mL로 가장 높게 나타났고 발효 3일째 감소하여 1.20×10^7 CFU/mL로 나타났다. 대추씨의 경우 발효 3일 동안의 7.00×10^7 CFU/mL에서 7.95×10^8 CFU/mL로 발효기간 동안 점차적으로 증가하는 경향을 보였다. 흑대추 추출물의 경우 발효 2일째까지 10^8 CFU/mL를 유지하다가 발효 3일째 급격히 증가하여 1.90×10^9 CFU/mL로 생균수가 다른 조건에 비하여 가장 높게 나타났다(표 14).

표 14

생균수(Viable cell count) (CFU/mL)			
성분	발효(Fermentation) (days)		
	1	2	3
대추 추출물	2.00×10^7	3.50×10^7	1.20×10^7
흑대추 추출물	1.45×10^8	1.05×10^8	1.90×10^9
대추씨 추출물	7.00×10^7	5.35×10^8	7.95×10^8

3. 점조도 및 점질물 함량 변화

점조도는 대추 추출물의 경우 발효 2일째까지 점조도는 거의 변화가 없다가 발효 3일째 급격히 증가하여 $0.68 \text{ Pa} \cdot \text{s}^n$ 으로 나타났다. 흑대추 추출물의 경우도 대추 추출물과 마찬가지로 발효 3일째 점조도 $1.69 \text{ Pa} \cdot \text{s}^n$ 으로 가장 높게 나타났다. 하지만 대추씨 추출물의 경우 발효 전후의 점조도 차이가 거의 나타나지 않았다(도 12).

점질물은 대추 추출물의 경우 발효 2일째 급격히 증가하여 2.73%로 나타났고 이후에는 2.70%로 큰 차이를 보이지 않았다. 흑대추 추출물의 경우 발효 1일째 점질물이 급격히 증가하여 3.01%로 나타났고, 발효 2일째 더 증가하여 4.12%까지 생성된 후 발효 3일째 감소하여 3.22%로 나타났다. 대추씨의 경우 발효 1일째 점질물이 3.69%로 높게 나타났다가 계속적으로 감소하여 발효 3일째 2.36%까지 감소하였다. 이를통해 대추, 흑대추, 대추씨 추출물에 민들레 당절임액을 혼합한 액상 발효물에서 추출물 시료 및 발효시간에 따른 점질물 생성의 다양한 패턴을 확인할 수 있었으며 전반적으로 흑대추 추출물 25%와 민들레 당절임액 10%를 이용한 액상 발효가 가장 좋은 것으로 판단되었다(도 12).

<실시에 10> 대추, 흑대추, 대추씨 추출물의 민들레 당절임액 첨가에 따른 액상 발효물의 간기능 개선 효능 평가

1. t-BHP 유도 독성에 노출된 HepG2 세포에 대한 대추, 흑대추, 대추씨 추출물 발효액의 독성 억제 효과

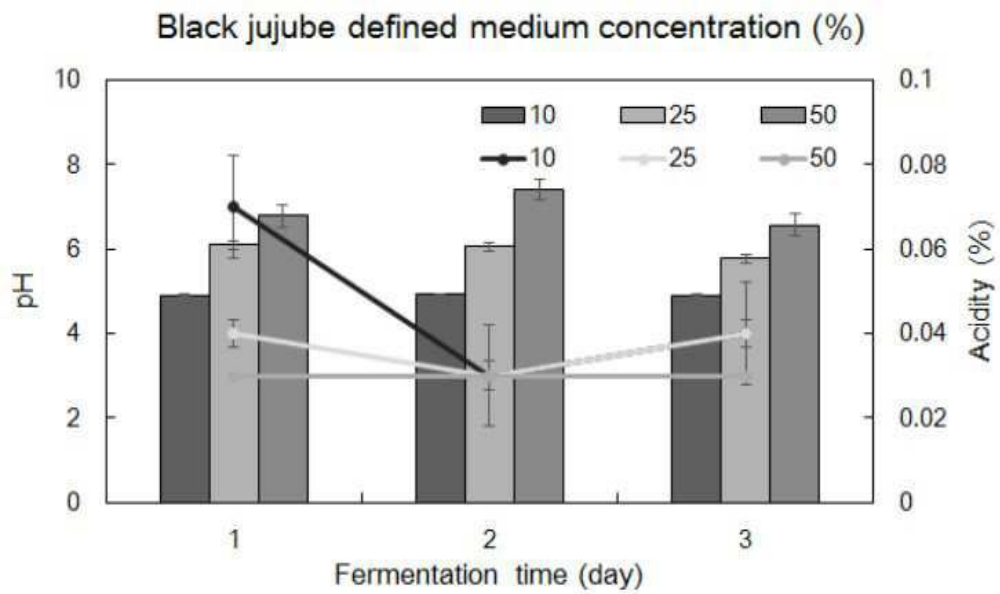
HepG2 세포를 t-BHP로 처리한 경우 아무것도 처리하지 않은 경우에 비해 세포 생존율이 27%로 감소하였다. 대추 발효액으로 세포를 전처리하면 모든 시료에서 발효 후 보호 효과가 농도 의존적으로 증가하는 것을 확인하였으며, 특히 200배 희석액으로 비교한 경우 흑대추 발효 후 세포 생존율이 40.8%에서 60.2%로 유의적으로 증가하여 보호 활성이 높아지는 것을 알 수 있었다(도 13).

2. 대추, 흑대추, 대추씨 추출물 발효액의 세포독성 시험

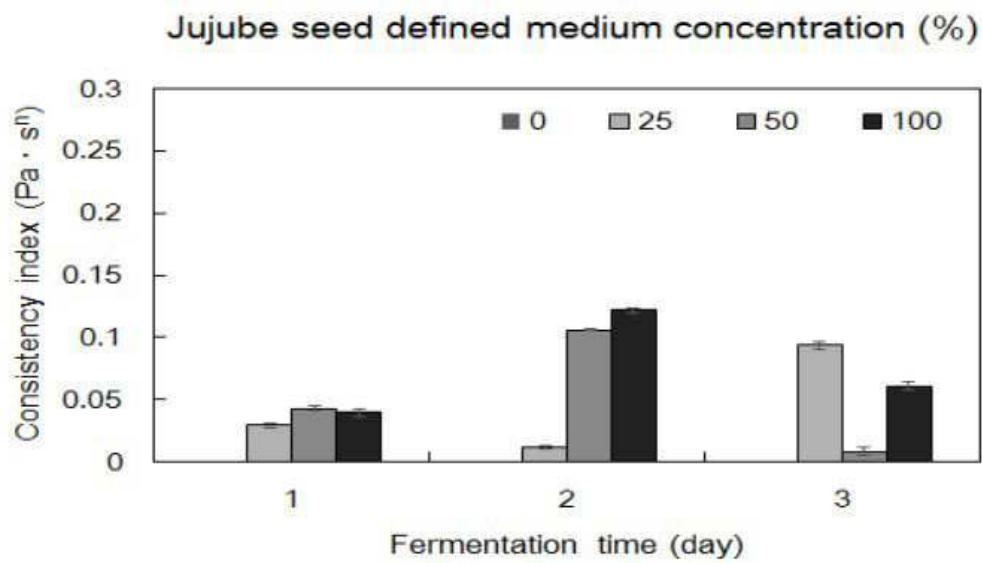
세포배양을 활용하여 대추발효액의 활성 효과를 측정하기 위해 시료 자체의 세포 독성이 최소화된 농도 조건을 확인하기 위하여 세포 배양액에 대추, 흑대추, 대추씨 추출물에 대한 발효 전후의 발효물을 시료로 가하고 24시간 동안 처리하여 얼마나 세포가 손상 받는지를 MTT assay를 통해 시험하였고 농도는 10~200배 희석 범위로 하였다. 그 결과, 시험한 농도 범위 내에서는 유의한 세포 독성은 나타나지 않는 것으로 나타났다(도 14).

도면

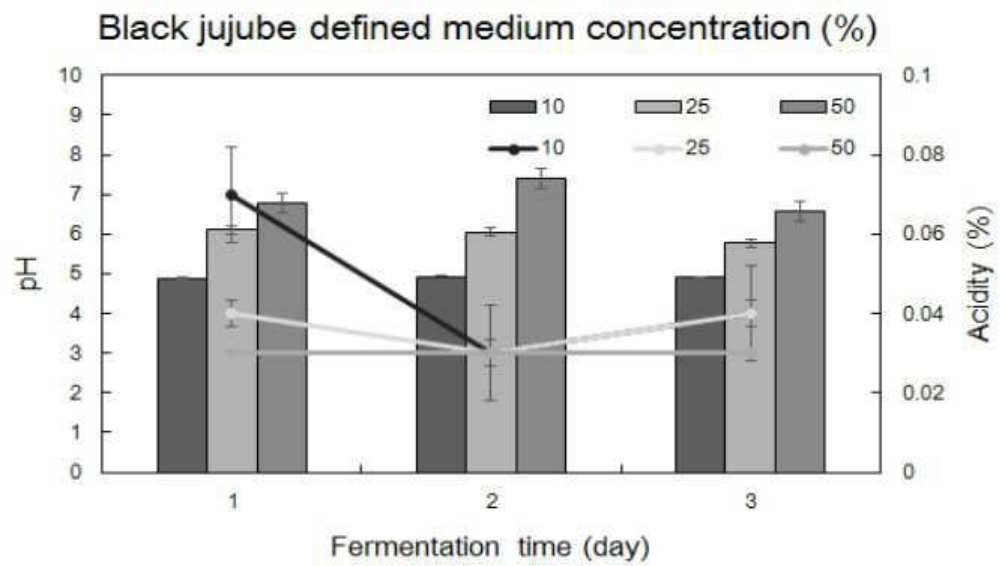
도면1



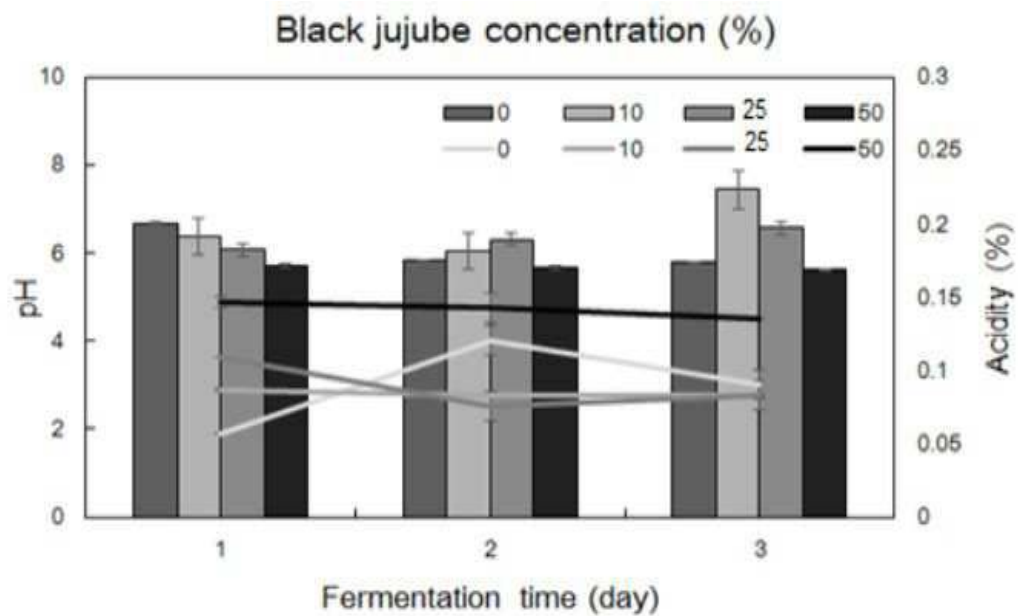
도면2



도면3



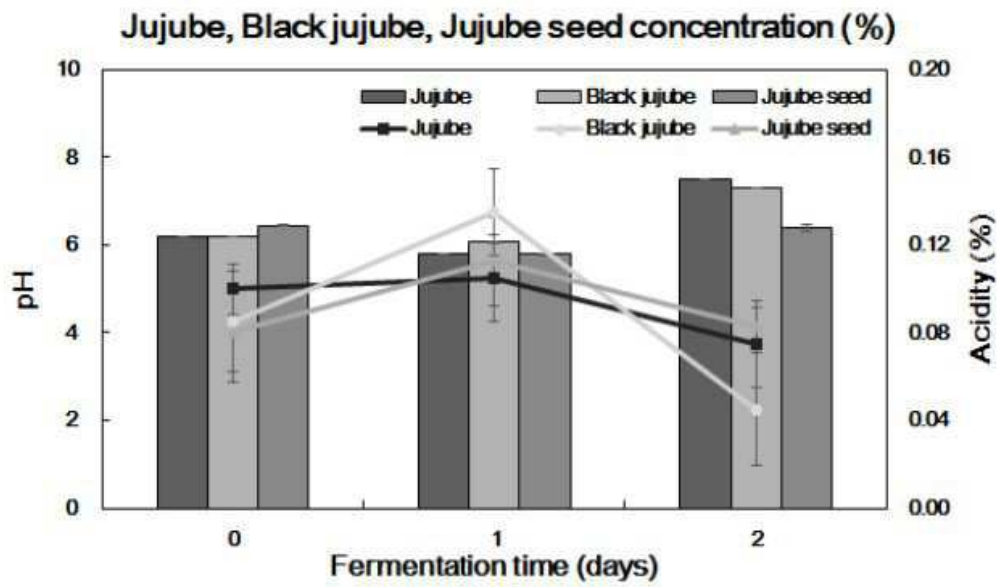
도면4



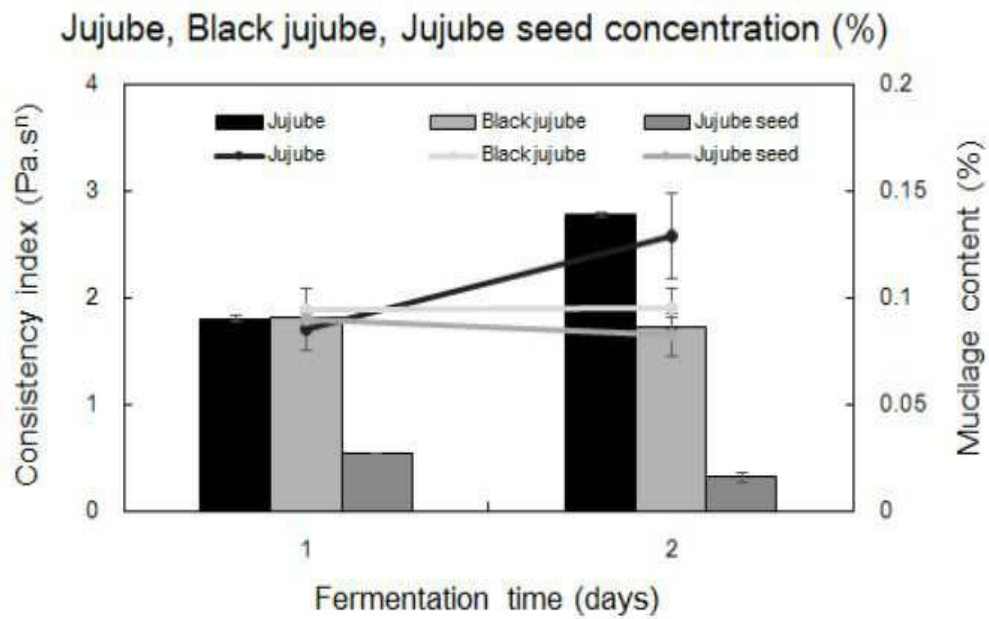
도면5



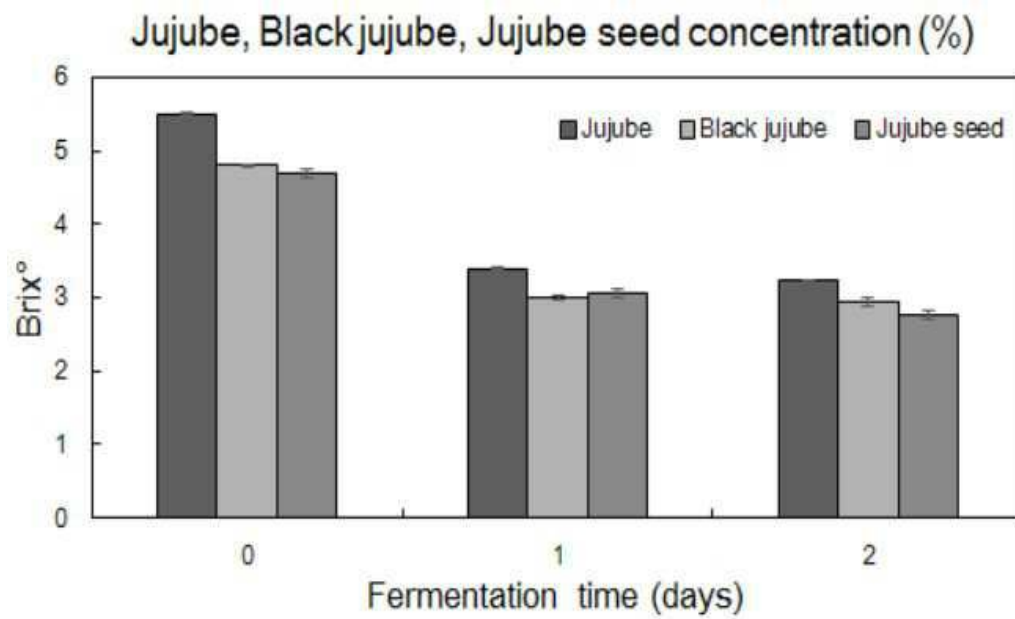
도면6



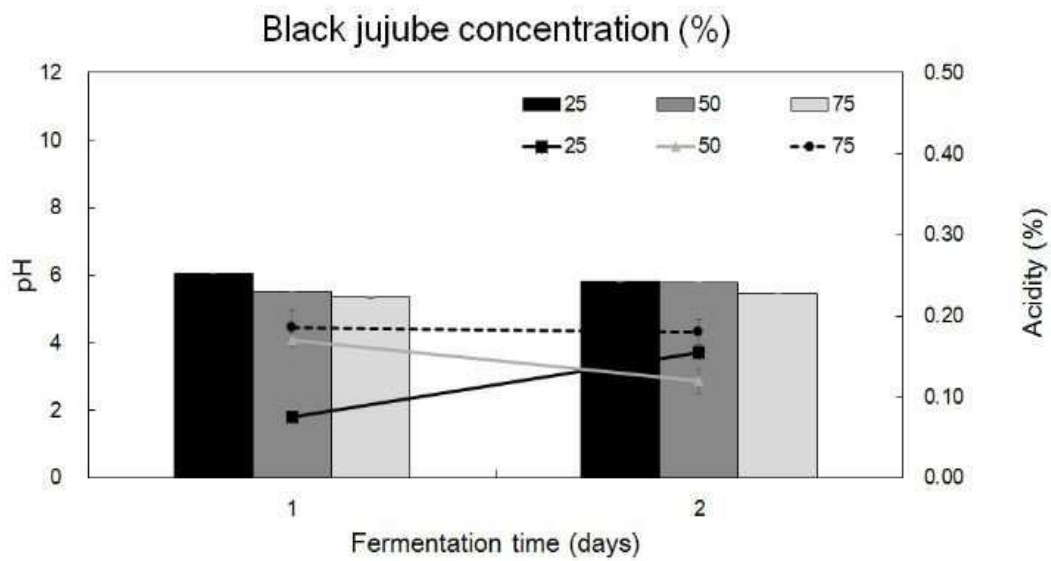
도면7



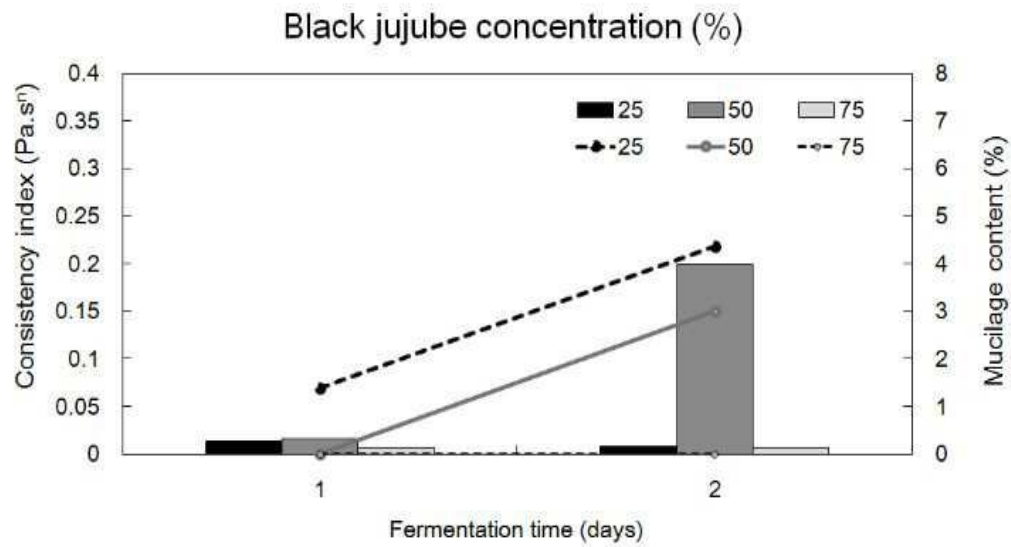
도면8



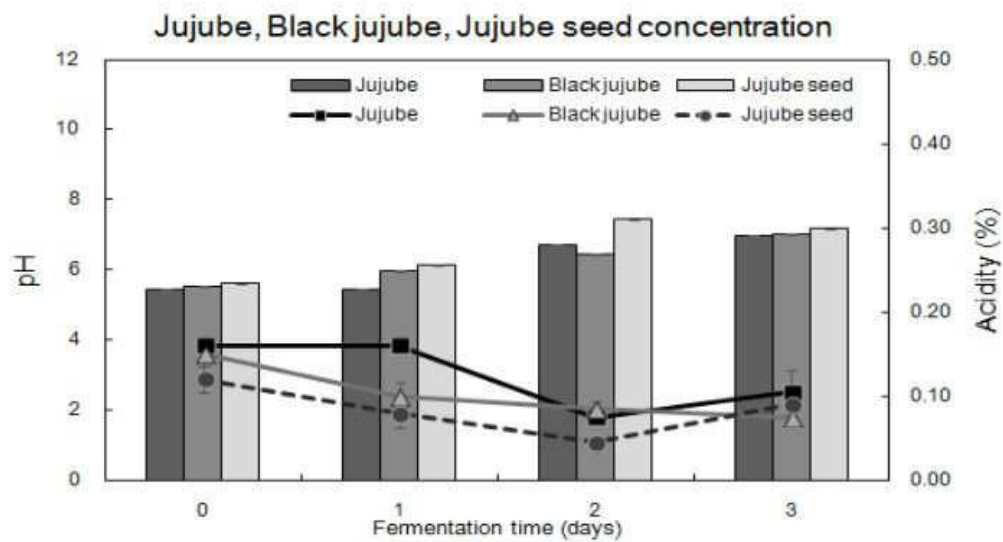
도면9



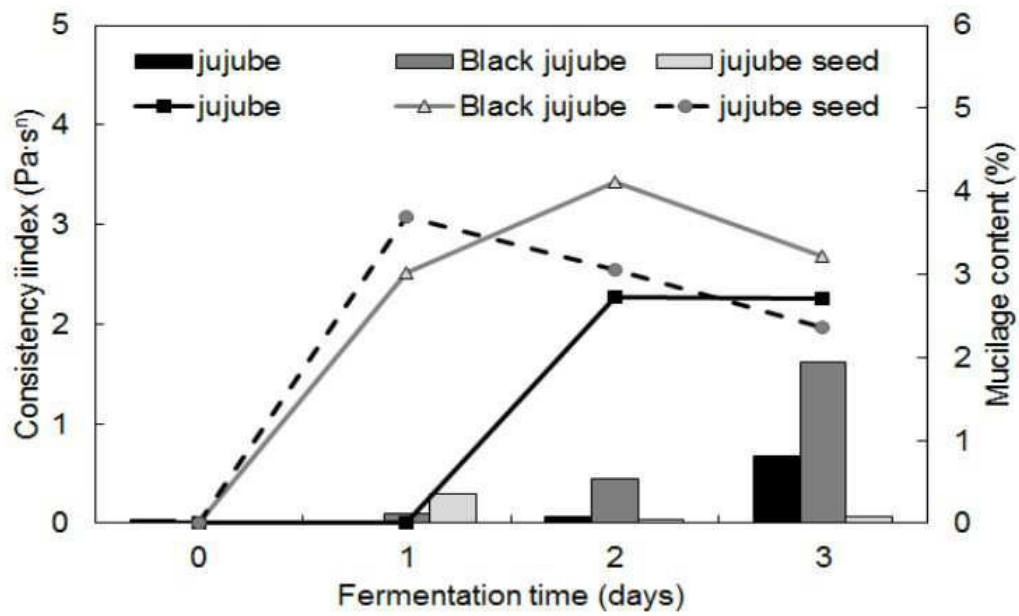
도면10



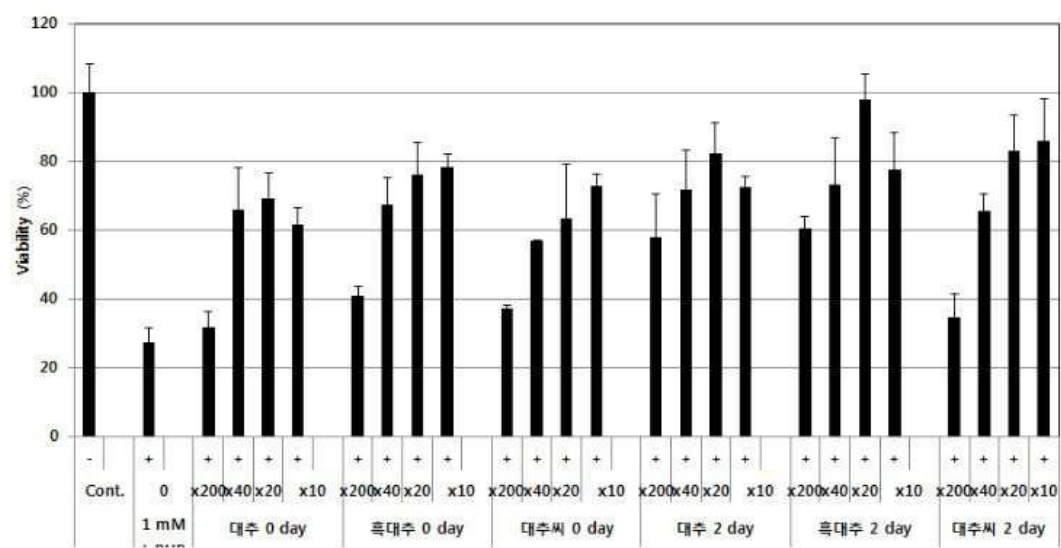
도면11



도면12



도면13



도면14

