(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2019-0057916
(43) 공개일자 2019년05월29일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A23L 33/00 (2016.01) *A23L 33/105* (2016.01)
A23L 7/104 (2017.01)
(52) CPC특허분류
A23L 33/00 (2016.08)
A23L 33/105 (2016.08)
(21) 출원번호 10-2017-0155394
(22) 출원일자 2017년11월21일
심사청구일자 2017년11월21일

(71) 출원인
계명대학교 산학협력단
대구광역시 달서구 달구벌대로 1095, 계명대학교 산학협력관 201호(신당동)
(72) 발명자
이삼빈
대구광역시 달서구 선원로 171, 102동 306호 (이곡동, 성서무지개타운)
최지연
대구광역시 중구 달구벌대로 1937, 2동 103호 (대신동, 동서타운아파트)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인태백

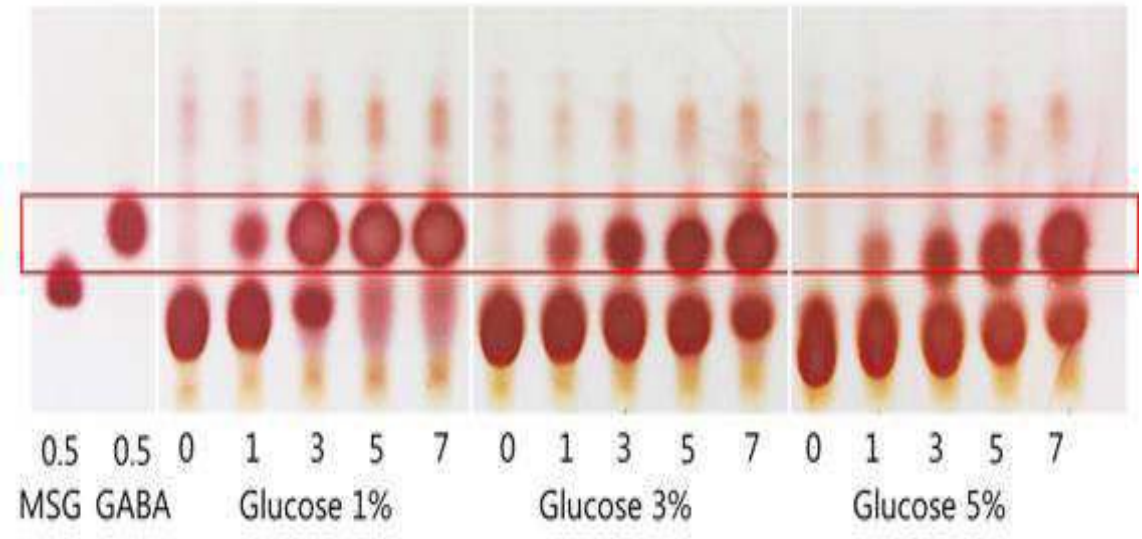
전체 청구항 수 : 총 9 항

(54) 발명의 명칭 **젖산 발효를 통한 기능성 쌀 발효물의 제조방법, 이로 제조된 쌀 발효물 및 식품 조성물**

(57) 요 약

본 발명은 (1) 막걸리를 50℃ 내지 95℃에서 농축하는 단계; (2) 상기 단계 (1)에서 얻은 농축물에, 1 중량% 내지 5 중량%의 포도당(glucose) 용액 및 3 중량% 내지 5 중량%의 모노소듐 글루타메이트(monosodium glutamate; MSG) 용액을 혼합하는 단계; (3) 상기 단계 (2)에서 얻은 혼합물에 젖산균(Lactobacillus) 스타터를 접종하고 배양하여 젖산 발효시키는 단계를 포함하는, 감마-아미노뷰티르산(gamma-aminobutyric acid; GABA) 함량이 증진된 쌀 발효물의 제조방법, 이로 제조된 쌀 발효물 및 이를 포함하는 식품 조성물에 관한 것으로, 상기 쌀 발효물은 GABA의 함량이 극대화되어 있으므로, 종래 막걸리에 GABA 생성이 어려웠다는 한계를 극복하고 보다 우수한 기능성을 나타낼 수 있는 바, 다양한 생리 활성을 나타내는 식품 조성물로 활용될 수 있다.

대 표 도 - 도20



(52) CPC특허분류
A23L 7/104 (2016.08)
A23V 2002/00 (2013.01)
A23V 2250/038 (2013.01)
A23Y 2220/67 (2013.01)
(72) 발명자
김지은
대구광역시 달서구 계대동문로 99, 206동 1002호
(이곡동, 성서보성화성타운)
임종순
대구광역시 달서구 달서대로109안길 54 (호산동)

황보미향
대구광역시 동구 입석로3길 6(검사동)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 314082033SB010
부처명 농림축산식품부
연구관리전문기관 농림수산식품기술기획평가원
연구사업명 기술사업화지원
연구과제명 농산물 소재를 활용한 고부가가치 제품 개발 지원을 위한 CRO 구축
기 여 율 1/1
주관기관 계명대학교 산학협력단
연구기간 2016.12.19 ~ 2017.12.18

명 세 서

청구범위

청구항 1

(1) 막걸리를 50℃ 내지 95℃에서 농축하는 단계;

(2) 상기 단계 (1)에서 얻은 농축물에, 1 중량% 내지 5 중량%의 포도당(glucose) 용액 및 3 중량% 내지 5 중량%의 모노소듐 글루타메이트(monosodium glutamate; MSG) 용액을 혼합하는 단계;

(3) 상기 단계 (2)에서 얻은 혼합물에 젖산균(Lactobacillus) 스타터를 접종하고 배양하여 젖산 발효시키는 단계를 포함하는, 감마-아미노뷰티르산(gamma-aminobutyric acid; GABA) 함량이 증진된 쌀 발효물의 제조방법.

청구항 2

제 1 항에 있어서, 상기 단계 (1)의 농축은 75℃ 내지 95℃에서, 20분 내지 60분 동안 수행되는 것을 특징으로 하는 GABA 함량이 증진된 쌀 발효물의 제조방법.

청구항 3

제 1 항에 있어서, 상기 단계 (2)는 1 중량%의 포도당 용액 및 3 중량%의 모노소듐 글루타메이트 용액을 혼합하는 단계인 것을 특징으로 하는, GABA 함량이 증진된 쌀 발효물의 제조방법.

청구항 4

제 1 항에 있어서, 상기 젖산균(Lactobacillus)은 락토바실러스 플란타륨(*Lactobacillus plantarum*) EJ2014 (KCCM11545P) 균주인 것을 특징으로 하는, GABA 함량이 증진된 쌀 발효물의 제조방법.

청구항 5

제 1 항에 있어서, 상기 단계 (3)의 젖산 발효는 25℃ 내지 35℃에서, 1일 내지 5일 동안 수행되는 것을 특징으로 하는, GABA 함량이 증진된 쌀 발효물의 제조방법.

청구항 6

제 1 항에 있어서, 상기 단계 (3)의 발효 시에, 젖산균이 혼합물에 존재하는 MSG를 GABA로 전환하는 것을 특징으로 하는, GABA 함량이 증진된 쌀 발효물의 제조방법.

청구항 7

제 1 항 내지 제 6 항 중 어느 한 항의 제조방법에 의해 제조된, GABA 함량이 증진된 쌀 발효물.

청구항 8

제 7 항에 따른 쌀 발효물을 유효성분으로 포함하는 GABA 증진용 식품 조성물.

청구항 9

제 8 항에 있어서, 상기 식품은 음료, 육류, 소세지, 빵, 초콜릿, 캔디, 스넥, 과자, 피자, 라면, 껌, 아이스크림, 스프, 차, 기능수, 드링크제, 막걸리, 알코올 및 비타민 복합제로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나인 것을 특징으로 하는 GABA 증진용 식품 조성물.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 감마-아미노뷰티르산(gamma-aminobutyric acid; GABA) 함량이 증진된 쌀 발효물의 제조방법, 이로 제조된 쌀 발효물 및 이를 포함하는 식품 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 종래부터 막걸리는 우리나라 고유의 대표적인 전통 발효주로서 애주가들로부터 많은 사랑을 받고 있으며, 현재에도 꾸준히 애용되고 있는 전통술 중 하나이다.

[0003] 일반적으로 막걸리는 쌀을 원료로 하여 제조되는데, 일반적인 막걸리 제조 방법은 다음과 같다. 즉, 먼저 쌀을 씻은 후, 물기를 걸러 준비해 둔다. 그 후, 찜통에 물을 적당량 넣고 준비된 쌀을 넣어 쌀을 찐다. 찐 밥을 상온까지 식힌 후, 쌀, 누룩, 효모, 물을 넣고 섞어 발효시킨다. 일정 시간이 지나면 막걸리가 제조된다.

[0004] 이와 같이 발효되어 생성된 막걸리는 여러 가지 실험을 통하여 알려진 바와 같이, 암 예방 효과와, 손상된 간조직의 회복 효과, 갱년기 장애 해소 효과가 있으며, 또한 생효모가 많아 간경화, 지방간의 예방에 효과가 있는 물론이고, 효모 발효를 통해서 유효 성분으로서 각종 영양분을 풍부하게 함유하고 있다.

[0005] 또한, 최근에는 이러한 막걸리의 영양뿐만 아니라 냄새 및 맛을 개선하기 위하여 다양한 성분이 막걸리에 첨가되고 있다. 예를 들어, 상황버섯, 솔, 인삼 등을 포함하는 막걸리가 제조되어 시중에 판매되고 있다.

[0006] 그러나 이러한 막걸리는 소비성향이 다양한 현대인들의 욕구를 충족시키기에는 그 맛과 향이 여전히 고전적이며, 특히 건강에 대한 관심이 높아짐에 따라 다양한 생리활성을 나타낼 수 있는 기능성 막걸리 개발에 대한 요구가 높은 실정이다. 또한, 우리의 주식으로 쌀 소비가 감소하는 시점에서 쌀의 소비를 촉진하며, 고령화 100세 시대에 건강장수에 기여하는 기능성 음료의 수요가 증가하고 있고, 이에 대한 방안으로 간편하면서 기능성을 갖는 건강 쌀 음료의 개발이 요구되고 있다.

[0007] 따라서, 풍부한 영양성분과 기능성 성분을 함유한 막걸리를 이용하여 젖산발효를 통한 기능성 성분인 가바(gamma-aminobutyric acid, GABA)가 강화된 기능성 소재를 개발하고, 이를 활용한 기능성 음료 또는 기능성 막걸리를 개발하는 것이 본 발명의 목적이다.

선행기술문헌

특허문헌

[0008] (특허문헌 0001) 한국등록특허 제10-1169219호(2012.07.23 등록).

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009] 본 발명의 목적은 GABA 함량이 증진된 기능성 쌀 발효물의 제조방법을 제공하는 것이다.

[0010] 본 발명의 다른 목적은 GABA 함량이 증진된 기능성 쌀 발효물 내지 막걸리를 제공하는 것이다.

[0011] 본 발명의 또 다른 목적은 GABA 증진용 기능성 식품 조성물을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0012] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 (1) 막걸리를 50℃ 내지 95℃에서 농축하는 단계; (2) 상기 단계 (1)에서 얻은 농축물에, 1 중량% 내지 5 중량%의 포도당(glucose) 용액 및 3 중량% 내지 5 중량%의 모노소듐 글루타메이트(monosodium glutamate; MSG) 용액을 혼합하는 단계; (3) 상기 단계 (2)에서 얻은 혼합물에 젖산균(Lactobacillus) 스타터를 접종하고 배양하여 젖산 발효시키는 단계를 포함하는, 감마-아미노뷰티르산(gamma-aminobutyric acid; GABA) 함량이 증진된 쌀 발효물의 제조방법을 제공한다.

[0013] 상기 다른 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 상기 제조방법에 의해 제조된, GABA 함량이 증진된 쌀 발효물을 제공한다.

[0014] 상기 또 다른 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 상기 쌀 발효물을 유효성분으로 포함하는 GABA 증진용 식품 조성물을 제공한다.

발명의 효과

[0015] 본 발명은 젖산 발효를 통한 기능성 쌀 발효물 제조방법, 이로 제조된 쌀 발효물 및 이를 포함하는 식품 조성물에 관한 것으로, 특정한 함량의 포도당과 MSG가 존재하는 조건에서, 락토바실러스 플란타륨(*Lactobacillus plantarum*) EJ2014(KCCM11545P)를 이용한 젖산 발효를 수행하는 경우, 막걸리 발효물 내의 GABA의 함량이 증진되어 기능성이 강화된 쌀 발효물을 제조할 수 있는 바, GABA 함량을 극대화할 수 있는 최적화 조건을 규명하였으며, 이렇게 기능성이 강화된 쌀 발효 소재는 기능성 식품 및 건강식품의 소재로서도 유용하게 활용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0016] 도 1은 본 발명의 일 실시예에서, 막걸리 비열 처리 후 젖산 발효시키기 위한 각 조건 내지 발효액 제조공정을 모식적으로 나타낸 것이다.

도 2는 도 1의 실시예에 따른 발효액의 pH 및 산도를 확인한 결과이다.

도 3은 도 1의 실시예에 따른 발효액의 효모 생균수를 확인한 결과이다.

도 4는 도 1의 실시예에 따른 발효액의 젖산균 생균수를 확인한 결과이다.

도 5는 본 발명의 일 실시예에서, 저온에서 진공 농축된 막걸리를 젖산 발효시키기 위한 각 조건 내지 발효액 제조공정을 모식적으로 나타낸 것이다.

도 6은 도 5의 실시예에 따른 발효액의 pH 및 산도를 확인한 결과이다.

도 7은 도 5의 실시예에 따른 발효액의 효모 생균수를 확인한 결과이다.

도 8은 도 5의 실시예에 따른 발효액의 젖산균 생균수를 확인한 결과이다.

도 9는 본 발명의 일 실시예에서, 고온에서 진공 농축된 막걸리를 젖산 발효시키기 위한 각 조건 내지 발효액 제조공정을 모식적으로 나타낸 것이다.

도 10은 도 9의 실시예에 따른 발효액의 pH 및 산도를 확인한 결과이다.

도 11은 도 9의 실시예에 따른 발효액의 생균수를 확인한 결과이다.

도 12는 도 9의 실시예에 따른 발효액의 GABA 함량을 확인한 결과이다.

도 13은 본 발명의 일 실시예에서, 진공 농축된 막걸리 젖산 발효 시에 포도당 및 MSG의 함유 여부에 따른 효과를 분석하기 위한 각 조건 내지 발효액 제조공정을 모식적으로 나타낸 것이다.

도 14는 도 13의 실시예에 따른 발효액의 pH 및 산도를 확인한 결과이다.

도 15는 도 13의 실시예에 따른 발효액의 생균수를 확인한 결과이다.

도 16은 도 13의 실시예에 따른 발효액의 GABA 함량을 확인한 결과이다.

도 17은 본 발명의 일 실시예에서, 진공 농축된 막걸리 젖산 발효 시에 포도당의 농도에 따른 효과를 분석하기 위한 각 조건 내지 발효액 제조 공정을 모식적으로 나타낸 것이다.

도 18은 도 17의 실시예에 따른 발효액의 pH 및 산도를 확인한 결과이다.

도 19는 도 17의 실시예에 따른 발효액의 생균수를 확인한 결과이다.

도 20은 도 17의 실시예에 따른 발효액의 GABA 함량을 확인한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0017] 이하, 본 발명을 보다 상세히 설명한다.

[0018] 본 발명의 발명자들은 생막걸리를 농축시킨 후, 특정한 성분을 특정 함량 범위로 첨가한 뒤 젖산 발효를 시킬 경우에, 종래 효모와 같은 기존 성분 때문에 GABA 함량을 늘리기 어려웠던 막걸리에서 GABA의 함량을 증진시킴으로써 기능성을 향상시킬 수 있음을 확인하여 본 발명을 완성하였다.

[0019] 따라서, 본 발명은 (1) 막걸리를 50℃ 내지 95℃에서 농축하는 단계; (2) 상기 단계 (1)에서 얻은 농축물에, 1 중량% 내지 5 중량%의 포도당(glucose) 용액 및 3 중량% 내지 5 중량%의 모노소듐 글루타메이트(monosodium

glutamate; MSG) 용액을 혼합하는 단계; (3) 상기 단계 (2)에서 얻은 혼합물에 젖산균(Lactobacillus) 스타터를 접종하고 배양하여 젖산 발효시키는 단계를 포함하는, 감마-아미노뷰티르산(gamma-aminobutyric acid; GABA) 함량이 증진된 쌀 발효물의 제조방법을 제공한다.

[0020] 바람직하게는, 상기 단계 (1)의 농축은 75℃ 내지 95℃에서, 20분 내지 60분 동안 수행될 수 있는 바, 이러한 온도 범위에서 알코올의 휘발 및 효모의 살균이 가장 최적으로 이루어지므로 바람직하다.

[0021] 또한, 보다 바람직하게는 상기 단계 (2)는 1 중량%의 포도당 용액 및 3 중량%의 모노소듐 글루타메이트 용액을 혼합하는 단계일 수 있는 바, 본 발명의 일 실시예에서 상기 함량의 포도당 및 모노소듐 글루타메이트 용액이 포함되었을 때 GABA의 생성량이 가장 증가하였으므로, GABA 함량이 극대화된 쌀 발효물을 제조할 수 있다.

[0022] 본 발명의 일 실시예에서, 상기 젖산균(Lactobacillus)은 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) EJ2014 (KCCM11545P) 균주일 수 있다.

[0023] 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. 일반적으로 미생물 중에서 스타터로 사용되고 있는 것은 박테리아, 곰팡이, 효모 등이 있으며, 이것을 단독 혹은 혼합하여 사용할 수 있다.

[0024] 바람직하게는, 상기 단계 (3)의 젖산 발효는 25℃ 내지 35℃에서, 1일 내지 5일 동안 수행될 수 있는 바, 이러한 조건으로 젖산 발효될 때, 젖산균에 의한 GABA 생성량이 극대화될 수 있으므로 바람직하다.

[0025] 즉, 상기 단계 (3)의 발효 시에, 젖산균이 혼합물에 존재하는 MSG를 GABA로 100% 전환할 수 있는 바, 최종적으로 얻어지는 쌀 발효물에는 고농도의 GABA가 함유되어 있으므로, 다양한 생리 활성 기능을 나타낼 수 있다.

[0026] 본 발명에 있어서, "감마-아미노뷰티르산(gamma-aminobutyric acid; GABA)"은 4-아미노부틸산으로서 L-글루타메이트(L-glutamate) 기질이 탈탄산 반응에 의해 생성되며, 이에 관여하는 효소로는 글루타메이트 디카르복실라제(glutamate decarboxylase; GAD)가 있으며 피리독시드-5'-포스페이트(pyridoxid-5'-phosphate) 의존성 경로로 합성된다. GABA는 단백질에서는 발견이 되지 않는 비단백질성 아미노산으로 뇌나 척수에 존재하는 신경전달물질로 혈류를 개선하며 뇌의 산소공급을 증가시켜 뇌의 대사촉진 및 뇌 기억을 증진시키는 뇌의 영양제로 알려져 있다. 글루타메이트(glutamate)가 신경을 활성화시키는 것과는 달리 GABA는 신경활성을 억제하며, 이러한 기능은 신경세포의 기능과 정보처리에 지대한 영향을 미치게 되는데 특히 감각 뇌에서 방향 민감성, 각도 민감성 반응 등을 결정하며 정교한 운동기능도 조율하는 것으로 알려져 있다. GABA의 뇌 혈류 촉진 효과와 산소공급 증가 효과는 뇌세포의 대사를 촉진함으로써 뇌졸중의 후유증 및 뇌동맥경화증 등에 개선 효과가 나타나 의약품으로 사용되고 있다.

[0028] 더불어, 본 발명은 상기 제조방법에 의해 제조된, GABA 함량이 증진된 쌀 발효물을 제공한다.

[0029] 또한, 본 발명은 상기 쌀 발효물을 유효성분으로 포함하는 GABA 증진용 식품 조성물을 제공한다.

[0030] 상기 식품 조성물은 음료, 육류, 소세지, 빵, 초콜릿, 캔디, 스넥, 과자, 피자, 라면, 껌, 아이스크림, 스프, 차, 기능수, 드링크제, 막걸리, 알코올 및 비타민 복합제로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나의 형태일 수 있고, 가장 바람직하게는 음료 또는 막걸리일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0031] 상기 식품 조성물은 여러 가지 영양제, 비타민, 광물(전해질), 합성 풍미제 및 천연 풍미제 등의 풍미제, 착색제 및 중진제(치즈, 초콜릿 등), 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알코올, 탄산음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다. 그 밖에 천연 과일 주스, 합성 과일 주스 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다. 이러한 성분은 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있다.

[0032] 이때, 식품 조성물을 제조하는 과정에서 첨가되는 상기 쌀 발효물은 필요에 따라 그 함량을 적절히 가감할 수 있으며, 바람직하게는 식품 100 중량부에 대하여 1 중량부 내지 90 중량부로 포함될 수 있다.

[0033] 또한, 상기 식품 조성물은 통상적으로 사용되는 식품 첨가제를 더 포함할 수 있다. 상기 식품 첨가제로서의 적합 여부는 다른 규정이 없는 한 식품의약품 안정청에 승인된 식품첨가물공전의 총칙 및 일반 시험법 등에 따라 해당 품목에 관한 규격 및 기준에 의하여 판정한다.

[0034] 상기 "식품첨가물공전"에 수재된 품목으로 예를 들어, 케톤류, 글리신, 구연산 칼륨, 니코틴산, 계피산 등의 화학적 합성품, 감색소, 감초추출물, 결정셀룰로오스, 고랭색소, 구아검 등의 천연첨가물, L-글루타민산나트륨 제제, 면류 첨가 알칼리제, 보존료제제, 타르색소 제제 등의 혼합 제제류 등을 들 수 있다.

[0036] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 실시예를 들어 상세하게 설명하기로 한다. 다만 하기의 실시예는 당업계에서 평균적인 지식을 가진 자에게 본 발명을 보다 완전하게 설명하기 위해 제공되는 것이며 본 발명의 내용을 예시하는 것일 뿐이므로 본 발명의 범위가 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0038] **<실시예 1> 막걸리 비열처리 후 젖산 발효 조건의 분석**

[0039] **1. 실험 방법**

[0040] 원료로는 대구 지역 양조장에서 생산되는 탁주(막걸리)를 사용하였다. 막걸리 100 mL에 4가지 조건으로 MSG, 이스트 추출물(yeast extract), 포도당(glucose)을 분말 형태로 첨가하였다. MSG 3 g, 이스트 추출물 0.2 g, 포도당 2 g 넣은 것을 조건 A, MSG 3 g, 포도당 2 g 넣은 것을 조건 B, 이스트 추출물 0.2 g, 포도당 2 g 넣은 것을 조건 C, 포도당 2 g 넣은 것을 조건 D로 표시하였다. 각각의 조건은 별도의 멸균 과정을 거치지 않고 MRS 육즙 배지(1% 펩톤, 1% 비프 추출물, 0.4% 이스트엑기스, 2% 포도당, 0.5% 소듐아세테이드, 0.1% 폴리솔베이드 80, 0.2% 디포타슘 포스페이트, 0.2% 암모늄시트레이드, 0.02% 마그네슘 설페이트, 0.005% 망간 설페이트; Difco)에 배양한 락토바실러스 플란타럼 EJ2014(*Lactobacillus plantarum* EJ2014; KCCM11545P)를 1% 접종하고 30℃에서 5일간 정치 배양하였다. 이때 각 조건에 따른 모식도를 도 1에 나타내었다.

[0041] 이후, pH 및 산도를 측정하기 위하여, 정치배양이 완료된 발효액 1 g에 증류수 9 mL을 혼합한 후, pH 미터(420A+, Thermo Orion, USA)를 이용하여 측정하였다. 적정 산도는 발효액 1 g에 증류수 9 mL를 첨가하여 pH 미터로 pH가 8.3에 도달할 때까지 적정 시에 사용된 0.1 N 수산화나트륨(NaOH) 소비량을 주석산(lactic acid) 함량(%, v/w)으로 환산하였다.

[0042] 또한, 생균수를 측정하기 위하여, 발효액 1 mL에 멸균수 9 mL를 첨가하여 10배씩 단계별로 희석하여 MRS 육즙 아가(broth agar) 배지에 20 ㎕ 도말하고, 30℃ 항온배양기에서 24시간 배양한 후의 효모 및 *L. plantarum* EJ2014의 생균수를 CFU(colony forming unit)/mL으로 나타내었다.

[0043] **2. 실험 결과**

[0044] **(1) pH 및 산도 측정**

[0045] 상기와 같은 방법으로 제조한 음료의 pH 및 산도를 측정한 결과, 도 2에 나타난 바와 같이, A, B 조건의 경우 발효 0일차부터 마지막 날까지 pH 5 정도에서, C, D 조건의 경우 pH 4 정도에서 머무르며 큰 변화의 폭은 보이지 않았다. 발효 0일차 산도 0.4%에서 C, D 조건의 경우 발효 1일차까지 산도 0.4%로 비슷한 수치를 나타내었고 발효 5일차까지 0.6%로 증가하였다. A, B 조건의 경우 발효 3일차까지 0.75%로 지속적으로 증가하다가 발효 5일차에 미미하게 감소하거나 증가하였다.

[0046] **(2) 생균수 측정**

[0047] 생균수를 측정한 결과, 도 3에 나타난 바와 같이, *L. plantarum* EJ2014의 경우 접종한 스타터가 10^8 CFU/mL으로 측정이 되었다. 이후 발효 3일차까지 생균수가 유지되었던 A 조건을 제외하고, 나머지 조건에서는 10^7 CFU/mL으로 감소하였고, 발효 5일차에 10^6 CFU/mL으로 감소한 D 조건을 제외하고, 나머지 조건에서는 미미하게 증가되는 수치를 보였다.

[0048] 또한, 도 4에 나타난 바와 같이, 원료인 쌀 막걸리에 존재하던 효모의 경우 원물에서 10^7 CFU/mL으로 측정이 되었다. 이후 발효 3일차에 B, C 조건이 10^8 CFU/mL까지 증가하였고, A, D 조건은 미미하게 증가하긴 하였으나 여전히 10^7 CFU/mL에서 머무른 수치를 보였다. 이후 발효 5일차에 4가지 조건 모두 조금 감소하거나 유지되는 경향을 보였다.

[0049] 즉, 원래부터 막걸리에 존재하던 효모와 알코올 함량 때문에, 조건들 전체적으로 젖산균 EJ2014가 잘 자라지 않

았다. 특히 그 중에서도 상대적으로 균이 섭취할 영양분이 부족했던 D 조건에서 균 활성이 제일 좋지 않음을 확인하였다.

[0051] **<실시예 2> 저온에서 진공 농축된 막걸리 젖산 발효 조건의 분석**

[0052] **1. 실험 방법**

[0053] 먼저, 쌀 막걸리 750 mL을 50℃에서 농축하여 전체량의 40%인 300 mL을 증류하였다. 이후 각각 MSG 용액, 포도당 용액과 멸균 증류수를 조건에 맞게 배합하여 전체 부피를 100 mL로 맞춰 준 후, *L. plantarum* EJ2014를 1% 접종, 30℃에서 7일간 발효를 할 예정이었으나, 젖산균과 효모 이외에 의도하지 않은 균이 많이 자라서 발효 1일차 이후로 진행을 중단하였다. 이때 각 조건에 따른 모식도를 도 5에 나타내었다.

[0054] 이후, pH, 산도 및 생균수는 상기 실시예 1과 동일한 방법으로 측정하였다.

[0055] **2. 실험 결과**

[0056] **(1) pH 및 산도 측정**

[0057] pH 및 산도를 측정한 결과, 도 6에 나타난 바와 같이, 발효 0일차에 pH 4에서 발효 1일차에 MSG 3% 조건은 pH 6, 포도당 2% 조건은 pH 4, 두 가지 모두 들어간 조건은 pH 5로 측정되었다. 산도의 경우, 발효 0일차 0.3%에서 발효 1일차에 각각 미미하게 증가하거나 유지되는 값을 나타내었다.

[0058] **(2) 생균수 측정**

[0059] 생균수를 측정한 결과, 도 7 및 도 8에 나타난 바와 같이, 젖산균인 *L. plantarum* EJ2014와 막걸리에 있던 효모, 두 균주 모두 발효 0일차부터 비슷한 경향을 나타내었다. 두 균주 모두 발효 0일차에 10^7 CFU/mL으로 측정이 되었다. 이후 발효 1일차에 MSG와 포도당을 모두 넣은 조건과 MSG 3%만 넣은 조건이 10^8 CFU/mL으로 증가하였고, 포도당 2%만 넣은 조건은 여전히 10^7 CFU/mL으로 비슷한 값을 나타내었다. 그러나 발효 1일차에 의도치 않은 균이 많이 자라나서 실험을 중단하였다. 다만 발효 1일차까지의 실험 결과를 토대로, MSG의 유무가 균 생육에 영향을 준다는 것을 확인하였다.

[0061] **<실시예 3> 고온에서 진공 농축된 막걸리 젖산발효 시의 조건 분석 - 포도당 및 MSG 효과 분석**

[0062] **1. 실험 방법**

[0063] 쌀 막걸리 750 mL을 85℃에서 30분간 농축하여 전체량의 55%인 410 mL을 증류하였다. 이후 각각 MSG 용액, 포도당 용액과 멸균 증류수를 조건에 맞게 배합하여 전체 부피를 100 mL로 맞춰 준 후 *L. plantarum* EJ2014를 1% 접종, 30℃에서 7일간 정치 배양하였다. 이때 각 조건에 따른 모식도를 도 9에 나타내었다.

[0064] 이후, 상기 실시예 1과 동일한 방법으로 pH, 산도 및 생균수를 측정하였다.

[0065] 또한, GABA를 측정하기 위하여, TLC 실리카 겔 60 F_{254} (25 알루미늄 시트 20 x 20 cm)를 이용하여 2배 희석한 발효액의 GABA 함량을 측정하였다. 즉, 상기 발효액 1 mL를 2 mL E-튜브에 넣은 후, 원심분리기(effendorf centrifuge 5415R)를 이용하여 13,200 rpm로 10분간 원심분리하였고, 상등액과 GABA(sigma) 및 MSG(junsei)의 가루 용액을 섞어 만든 농도별 GABA 표준용액 0.5 1% 와 MSG 1% 또는 2%를 각각 실리카겔에 찍어서 확인하였다.

[0066] **2. 실험 결과**

[0067] **(1) pH 및 산도 측정**

[0068] pH 및 산도를 측정한 결과, 도 10에 개시된 바와 같이, 발효 0일차에 pH 4-5에서 MSG 3% 조건은 발효 3일차에 pH 8까지 증가하고 이후 감소되었다. 포도당 2% 조건은 이후로도 pH 4를 유지하였고, 두 가지 모두 들어간 조건은 발효 1일 차에 pH 4로 감소하고 이후 유지되다가 발효 7일차에 6으로 증가하였다.

[0069] 산도의 경우, 발효 0일차 0.5%에서 MSG 3% 조건은 0.2%로 감소하고 이후 비슷한 값을 나타내었다. 포도당 2% 조건은 값이 지속적으로 증가하여 마지막 날에는 2.4%로 나타났다. 포도당과 MSG 두 가지 모두 들어간 조건은 발효 1일차에 1.5%로 증가하고 발효 5일차까지 유지되다가 발효 7일차에 다시 0.5%로 감소하였다.

[0070] (2) 생균수 측정

[0071] 생균수를 측정한 결과, 도 11에 나타난 바와 같이, 효모를 비롯하여 젖산균 이외의 균이 자라지 않아서 *L. plantarum* EJ2014만 측정하였다. 접종한 *L. plantarum* EJ2014 스타터는 10^8 CFU/mL인 것으로 나타났고, 이후 발효 1일차에 MSG 3%만 넣은 조건과 MSG와 포도당 두 가지 모두 넣은 조건이 10^9 CFU/mL으로 증가하다 이후 유지되는 경향을 보였다. 포도당 2%만 넣은 조건은 발효 5일차까지 지속적으로 증가하고 7일차에도 그 값을 유지하였다.

[0072] (3) GABA 함량 측정

[0073] GABA(gamma-aminobutyric acid)의 함량 변화를 비교하기 위해 TLC를 이용하여 정성분석한 결과, 도 12에 나타난 바와 같이, MSG가 들어간 두 조건은 발효 1일차부터 GABA 스팟(spot)이 보이기 시작하였다. 이 두 조건의 7일차 샘플을 비교해 보아 MSG와 포도당 두 가지 모두 들어간 조건에서 MSG 소진 정도가 더 많음을 확인할 수 있었다. 그리고 MSG만 들어간 조건의 시료에서는 이취가 나는 것을 확인하였다.

[0075] **<실시예 4> 진공농축된 막걸리 젖산 발효시 조건 분석 - 포도당 및 MSG 효과 분석**

[0076] **1. 실험 방법**

[0077] 상기 실시예 4의 반복 실험으로, 쌀 막걸리 750 mL을 85℃에서 30분간 농축하여 전체량의 51.4%인 385 mL을 증류하였다. 이후 각각 MSG 용액, 포도당 용액과 멸균 증류수를 조건에 맞게 배합하여 전체 부피를 100 mL로 맞춰준 후 *L. plantarum* EJ2014를 1% 접종, 30℃에서 7일간 정치 배양하였다. 이때 각 조건에 따른 모식도를 도 13에 나타내었다.

[0078] 이후, 상기 실시예 1과 동일한 방법으로 pH, 산도 및 생균수를 측정하였고, 상기 실시예 3과 동일한 방법으로 GABA를 측정하였다.

[0079] **2. 실험 방법**

[0080] (1) pH 및 산도 측정

[0081] pH 및 산도를 측정한 결과, 도 14에 나타난 바와 같이, 발효 0일차에 pH 4-5에서 MSG 3% 조건은 발효 3일차에 pH 7까지 증가하고 이후 유지되었다. 포도당 3% 조건은 이후로도 pH 3-4를 유지하였고, 두 가지 모두 들어간 조건은 발효 1일차에 pH 4로 감소하고 이후 유지되었다.

[0082] 산도의 경우, 발효 0일차 0.4%에서 MSG 3% 조건은 발효 3일차에 0.2%로 감소하고 이후 비슷한 값을 나타내었다. 포도당 3% 조건은 값이 지속적으로 증가하여 마지막 날에는 1.6%로 나타났다. 두 가지 모두 들어간 조건은 발효 3일차까지 1.8%로 증가하여 이후 완만하게 감소하였다.

[0083] (2) 생균수 측정

[0084] 생균수를 측정한 결과, 도 15에 나타난 바와 같이, 효모를 비롯하여 젖산균 이외의 균이 자라지 않아 *L. plantarum* EJ2014만 측정하였다. 접종한 *L. plantarum* EJ2014 스타터는 10^7 CFU/mL으로 측정이 되었고, 이후 발효 1일차에 MSG 3%만 넣은 조건과 MSG와 포도당 두 가지 모두 넣은 조건이 10^9 CFU/mL으로 증가하였으며, 이후 두 가지 모두 넣은 조건이 생균수가 유지되는 경향을 나타낸 반면, MSG만 넣은 조건은 지속적으로 감소하였다. 포도당 3%만 넣은 조건은 서서히 증가하여 발효 3일차에 지속적으로 증가하여 10^8 CFU/mL로 값이 나왔다가 이후 감소하였다.

[0085] (3) GABA 함량 측정

[0086] GABA(gamma-aminobutyric acid)의 함량 변화를 비교하기 위해 TLC를 이용하여 정성분석 한 결과, 도 16에 나타난 바와 같이, 상기 실시예 3과 마찬가지로 MSG가 들어간 두 조건은 발효 1일차부터 GABA 스팟이 보이기 시작하였다. 이 두 조건의 7일차 샘플을 비교해 보았을 때 3% MSG와 3% 포도당 두 가지 모두 들어간 조건에서 MSG 소진 정도가 더 많음을 확인할 수 있었다. 그리고 이번에도 역시 MSG만 들어간 조건에서 이취가 나는 것을 확인하였다.

[0087] 또한, 상기 실시예 4와 마찬가지로 GABA의 전구물질인 MSG가 들어가지 않은 포도당 3% 조건에서는 GABA 스팟이

전혀 보이지 않았고, MSG만 들어간 조건과 MSG와 포도당 모두 들어간 조건에서는 발효 1일차 이후로 GABA 스팟이 생성됨을 알 수 있었다. 더욱이 포도당이 들어가지 않은 조건보다 3% 포도당이 첨가된 조건에서 MSG 소진율이 더 우수하였다.

[0089] **<실시예 5> 진공 농축된 막걸리 젖산 발효 시의 조건 분석 - MSG 및 글루코오스 농도 효과 확인**

[0090] **1. 실험 방법**

[0091] 쌀 막걸리 750 mL를 85℃에서 30분간 농축하여 전체량의 51.4%인 385 mL를 증류하였다. 이후 각각 MSG 용액, 포도당 용액과 멸균 증류수를 조건에 맞게 배합하여 전체 볼륨을 100 mL로 맞춰 준 후 *L. plantarum* EJ2014를 1% 접종, 30℃에서 7일간 정치 배양하였다. 이때 각 조건에 따른 모식도를 도 17에 나타내었다.

[0092] 이후, pH 및 산도를 실시예 1에 개시된 방법으로, GABA 함량을 실시예 3에 개시된 방법으로 측정하였다.

[0093] **2. 실험 결과**

[0094] **(1) pH 및 산도 측정**

[0095] pH 및 산도를 측정한 결과, 도 18에 개시된 바와 같이, 발효 0일차에 pH 5에서 포도당 1% 발효 1일차에 pH 4로 감소한 이후 증가하여 다시 pH 5로 나타났고, 포도당 3%와 5% 조건은 발효 1일차에 pH 4로 감소한 이후 유지되는 값을 나타내었다.

[0096] 산도의 경우, 발효 0일차 0.4%에서 세 가지 시료 모두 1.4-5%로 증가하였고 포도당 1% 조건이 이후 지속적으로 감소한 반면, 나머지 두 조건은 발효 3일차에 1.7%로 증가한 이후 유지되는 경향을 나타내었다.

[0097] **(2) 생균수 측정**

[0098] 생균수를 측정한 결과, 도 19에 개시된 바와 같이, 접종한 *L. plantarum* EJ2014 스타터가 10^7 CFU/mL으로, 이후 발효 1일차에 10^9 CFU/mL로 증가하였고 이후 세 가지 조건 모두 시료 간 큰 차이 없이 생균수가 감소되는 것을 확인하였다.

[0099] **(3) GABA 함량 측정**

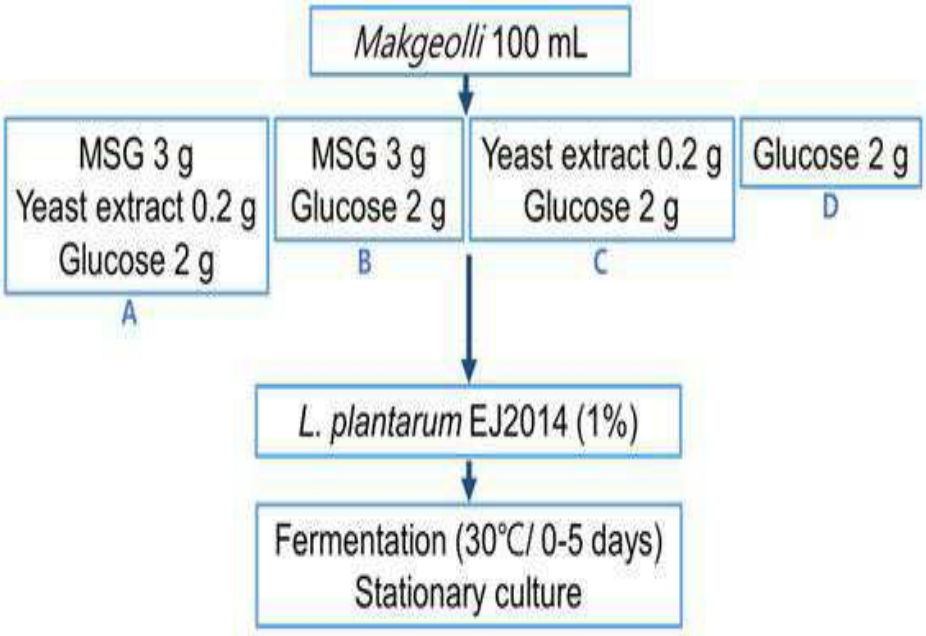
[0100] GABA의 함량을 측정한 결과, 도 20에 나타난 바와 같이, 포도당 3%와 5% 시료 사이에 큰 차이가 보이지 않으나, 두 시료는 포도당 1% 조건과는 큰 차이를 보였다. 포도당 1% 시료가 발효 5일차에 MSG가 거의 소진된 반면, 나머지 두 시료는 발효 7일차가 되어도 MSG가 1/3 정도 남아 있음을 확인하였다.

[0101] 즉, 세 조건은 생균수에서는 큰 차이를 보이지 않았으나, 산도에서 포도당 1% 조건이 다른 두 조건에 비해 빠르게 발효 1일차 이후로 감소하는 경향을 보인 것과 TLC 상에서 MSG가 가장 빨리 소진된 것으로, 나머지 두 시료와는 차이를 보였다. 따라서 포도당 농도별 조건 중 1%가 최적 조건이라고 판단하였다.

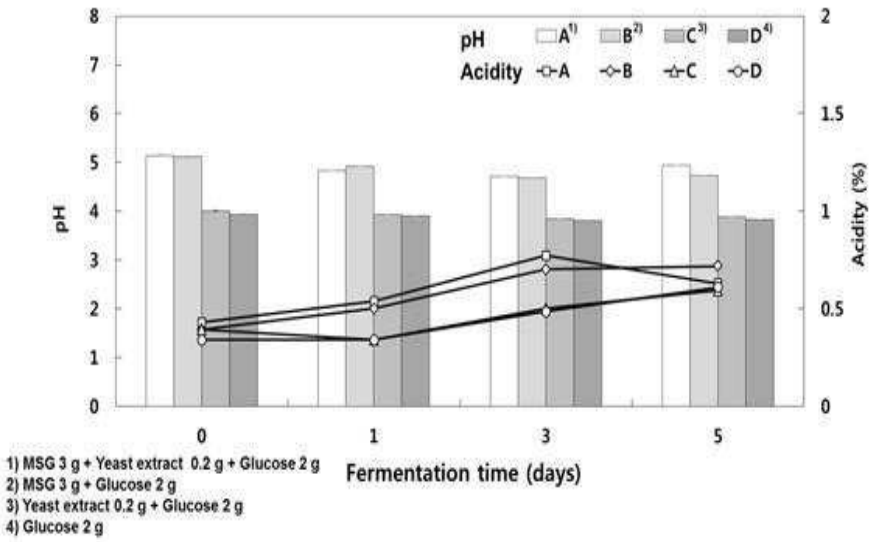
[0103] 이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시양태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 즉, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다.

도면

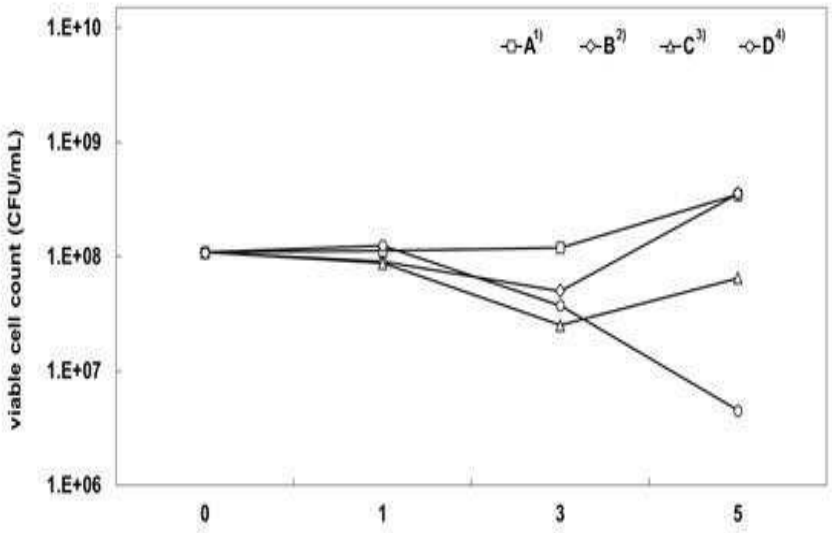
도면1


Makgeolli 100 mL
MSG 3 g
Yeast extract 0.2 g
Glucose 2 g
A
MSG 3 g
Glucose 2 g
B
Yeast extract 0.2 g
Glucose 2 g
C
Glucose 2 g
D
L. plantarum EJ2014 (1%)
Fermentation (30℃/ 0-5 days)
Stationary culture

도면2

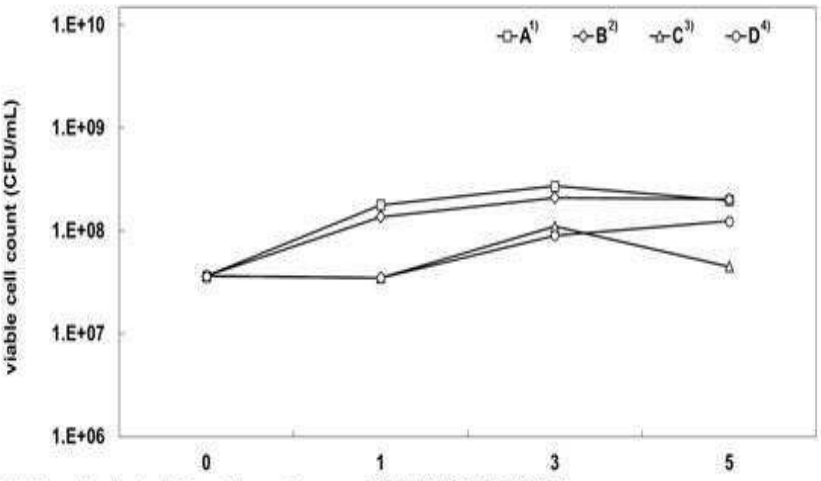

pH
Acidity
A1)
B2)
C3)
D4)
A
B
C
D
pH
Acidity (%)
Fermentation time (days)
1) MSG 3 g + Yeast extract 0.2 g + Glucose 2 g
2) MSG 3 g + Glucose 2 g
3) Yeast extract 0.2 g + Glucose 2 g
4) Glucose 2 g

도면3



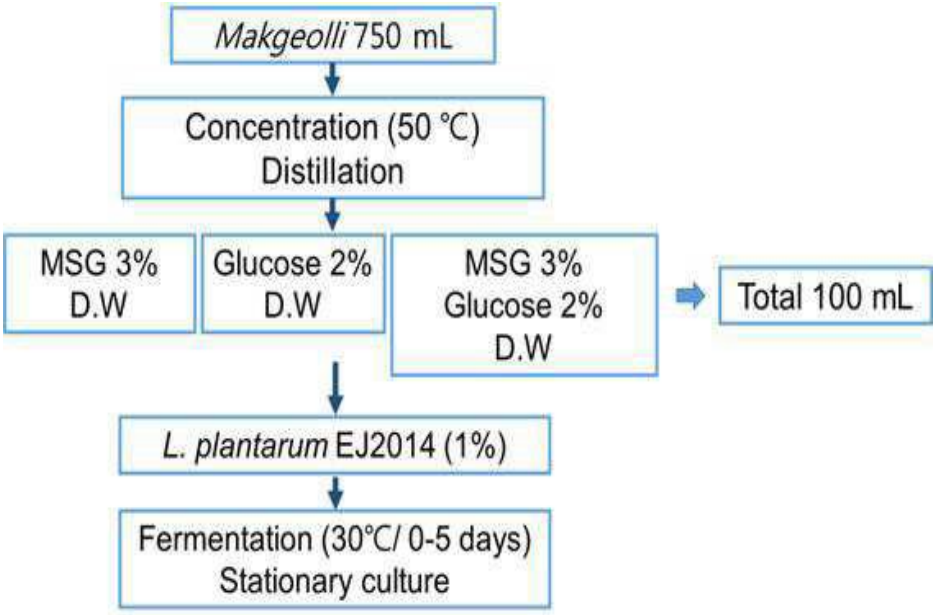
1) MSG 3 g + Yeast extract 0.2 g + Glucose 2 g
2) MSG 3 g + Glucose 2 g
3) Yeast extract 0.2 g + Glucose 2 g
4) Glucose 2 g

도면4

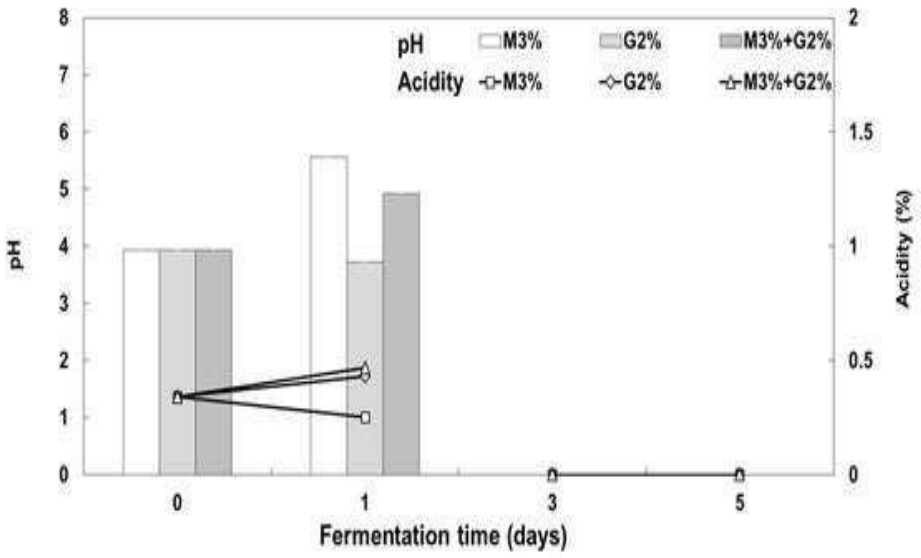


1) MSG 3 g + Yeast extract 0.2 g + Glucose 2 g
2) MSG 3 g + Glucose 2 g
3) Yeast extract 0.2 g + Glucose 2 g
4) Glucose 2 g

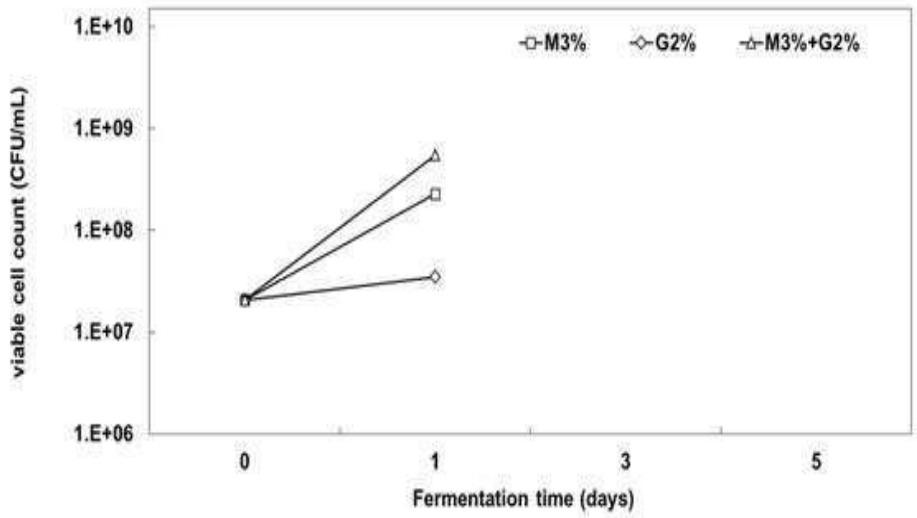
도면5


Makgeolli 750 mL
Concentration (50 ℃)
Distillation
MSG 3%
D.W
Glucose 2%
D.W
MSG 3%
Glucose 2%
D.W
Total 100 mL
L. plantarum EJ2014 (1%)
Fermentation (30℃/ 0-5 days)
Stationary culture

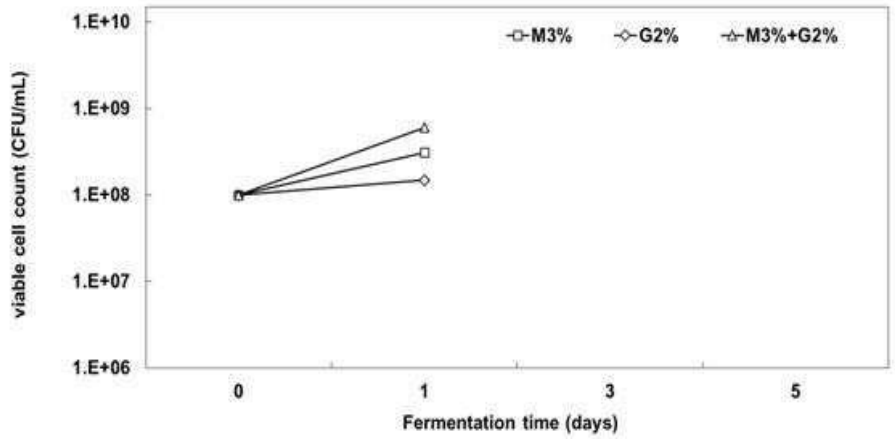
도면6


pH
Acidity
M3%
G2%
M3%+G2%
pH
Acidity (%)
Fermentation time (days)
0
1
3
5

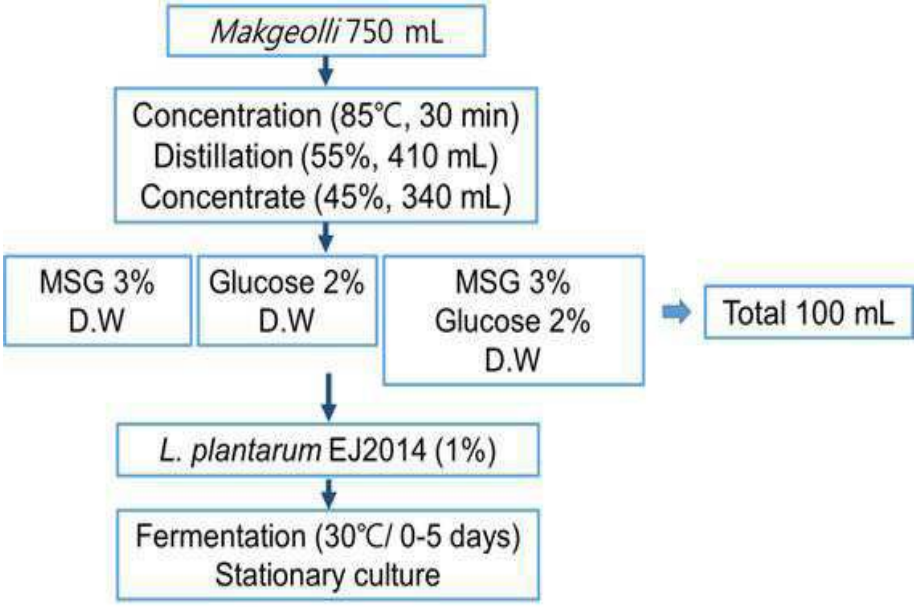
도면7


1.E+10
1.E+09
1.E+08
1.E+07
1.E+06
viable cell count (CFU/mL)
M3%
G2%
M3%+G2%
0
1
3
5
Fermentation time (days)

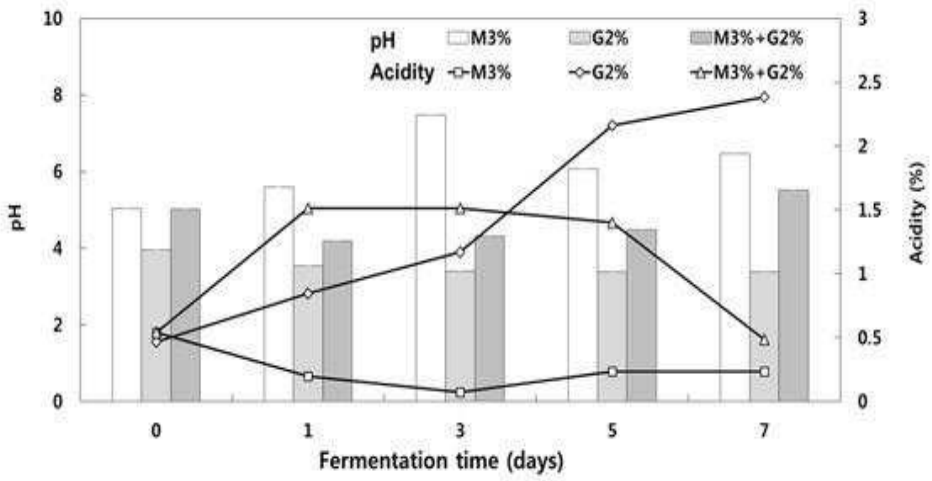
도면8


1.E+10
1.E+09
1.E+08
1.E+07
1.E+06
viable cell count (CFU/mL)
M3%
G2%
M3%+G2%
0
1
3
5
Fermentation time (days)

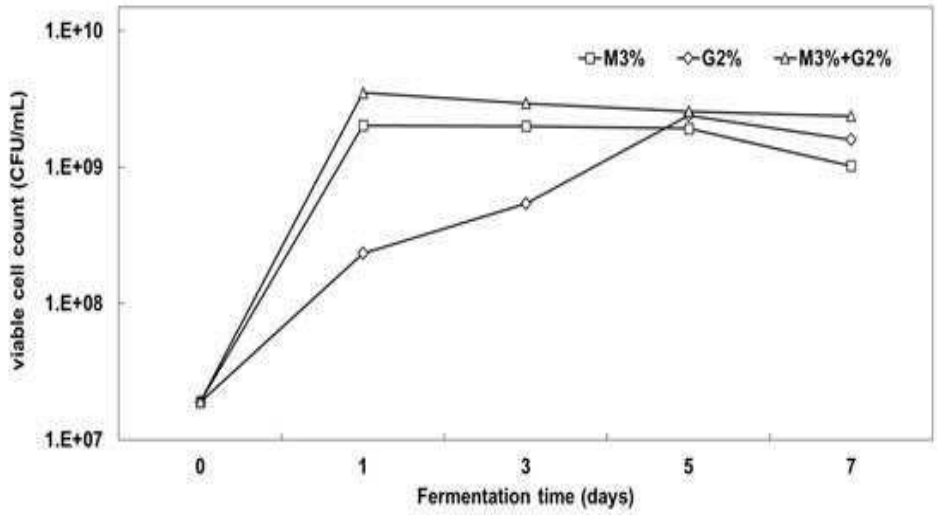
도면9


Makgeolli 750 mL
Concentration (85℃, 30 min)
Distillation (55%, 410 mL)
Concentrate (45%, 340 mL)
MSG 3% D.W
Glucose 2% D.W
MSG 3% Glucose 2% D.W
Total 100 mL
L. plantarum EJ2014 (1%)
Fermentation (30℃/ 0-5 days)
Stationary culture

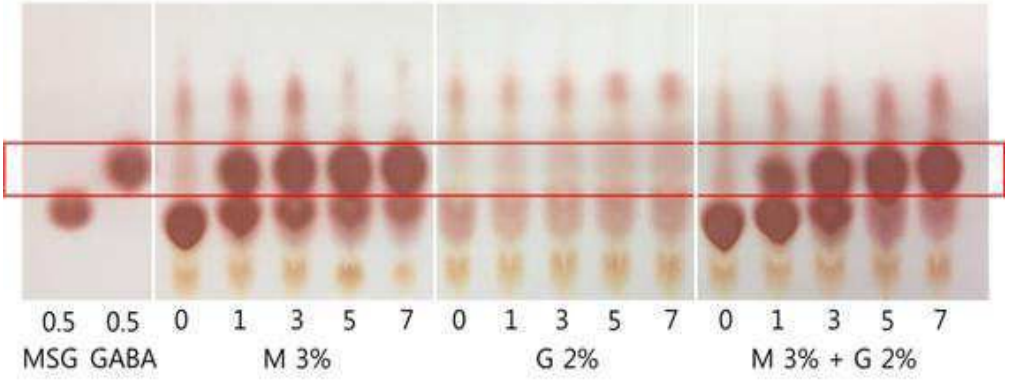
도면10


pH
Acidity
M3%
G2%
M3%+G2%
pH
Acidity (%)
Fermentation time (days)
0
1
3
5
7
0
2
4
6
8
10
0
0.5
1
1.5
2
2.5
3

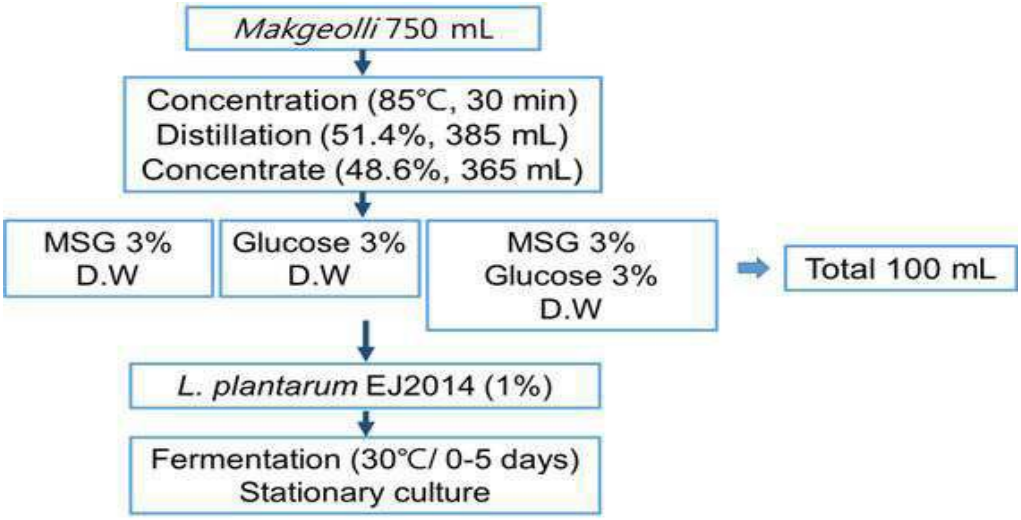
도면11



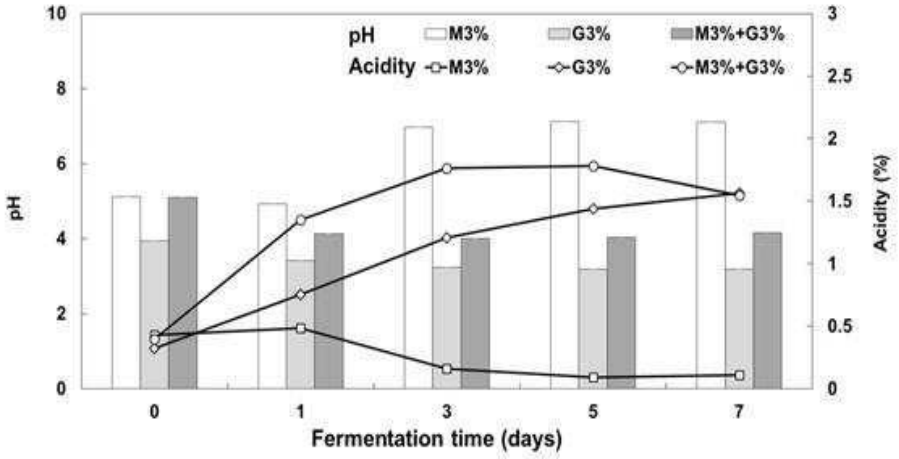
도면12



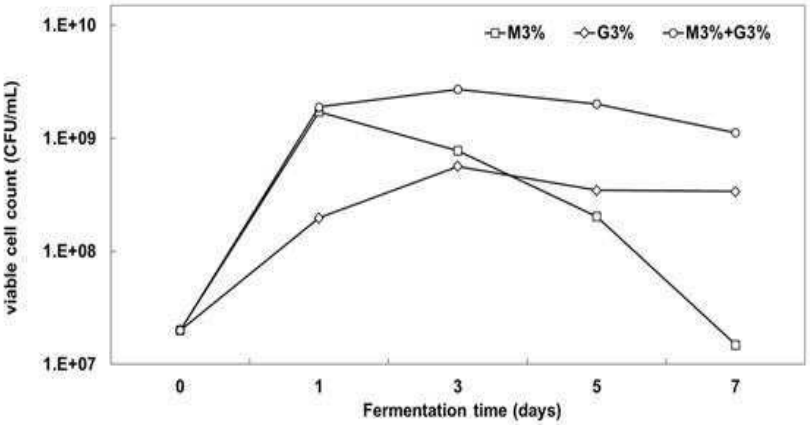
도면13



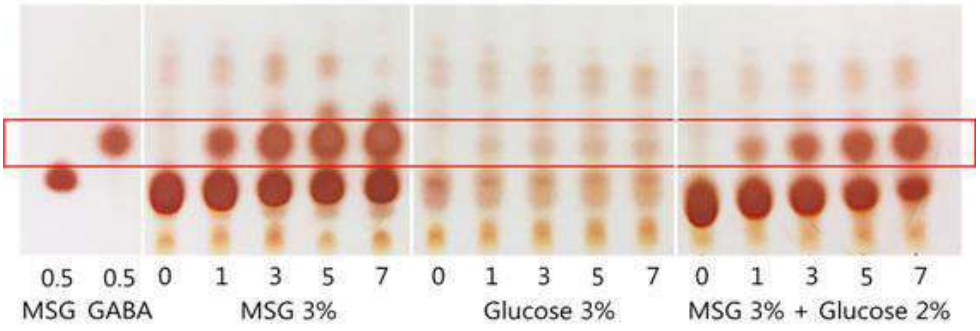
도면14



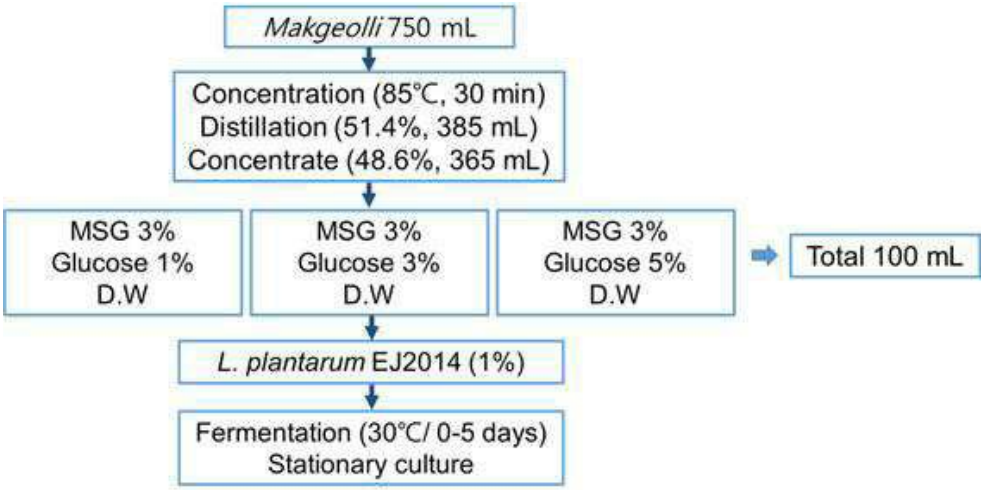
도면15



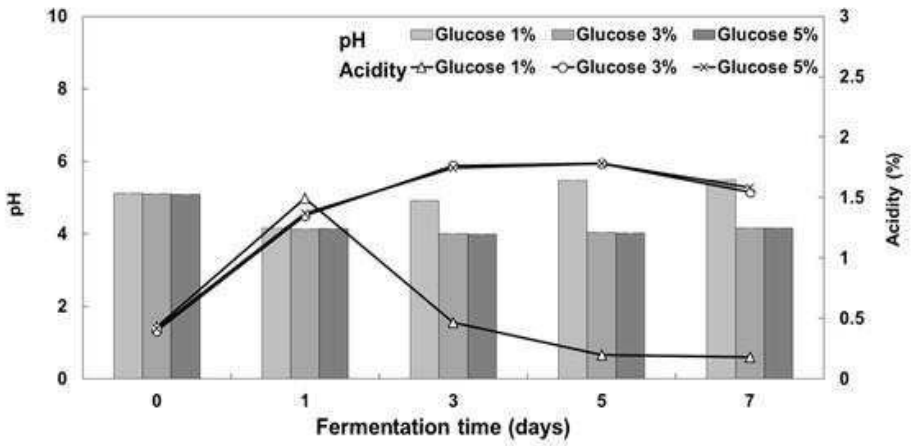
도면16



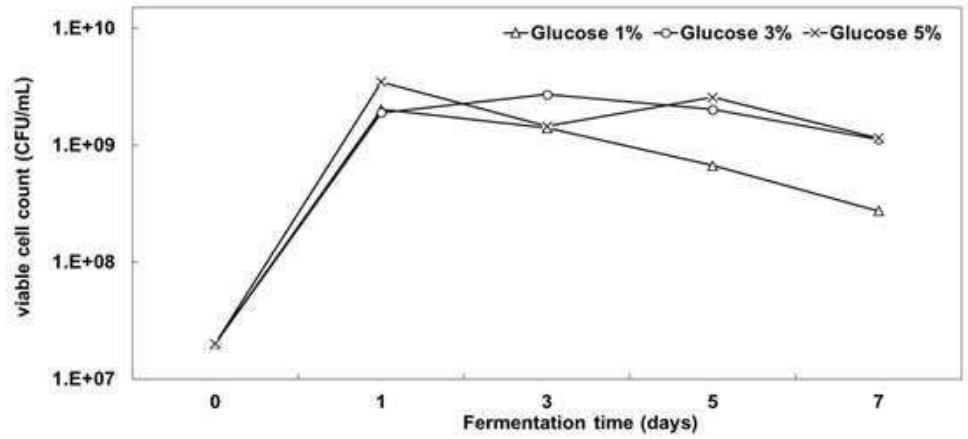
도면17



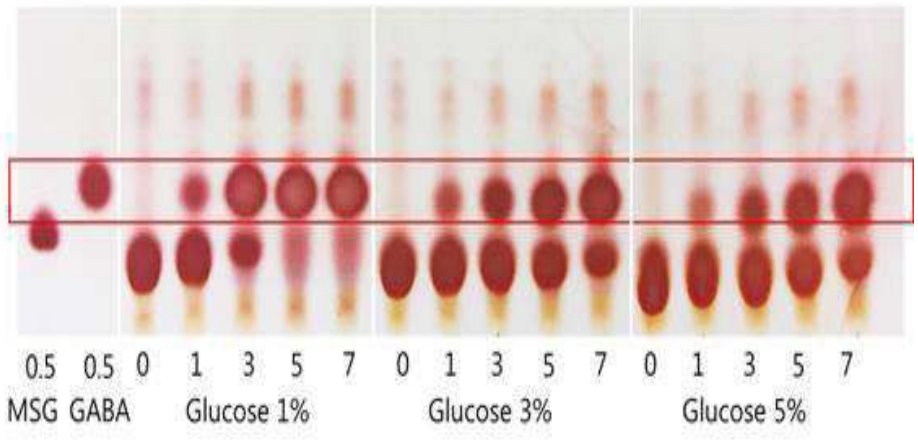
도면18



도면19



도면20


0.5 0.5 0 1 3 5 7 0 1 3 5 7 0 1 3 5 7
MSG GABA
Glucose 1%
Glucose 3%
Glucose 5%