

	(19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)	(11) 공개번호 (43) 공개일자	10-2016-0082147 2016년07월08일
(51) 국제특허분류(Int. Cl.) <i>A23L 7/104</i> (2016.01) <i>A23L 2/38</i> (2006.01) (21) 출원번호 (22) 출원일자 심사청구일자	(71) 출원인 조선대학교산학협력단 광주광역시 동구 필문대로 309 (서석동) (72) 발명자 정현숙 광주광역시 북구 설죽로 595 롯데아파트 107동 404호 최학준 광주광역시 동구 동계로15번길 1-23 (동명동) (74) 대리인 최규환	(71) 출원인 조선대학교산학협력단 광주광역시 동구 필문대로 309 (서석동) (72) 발명자 정현숙 광주광역시 북구 설죽로 595 롯데아파트 107동 404호 최학준 광주광역시 동구 동계로15번길 1-23 (동명동) (74) 대리인 최규환	

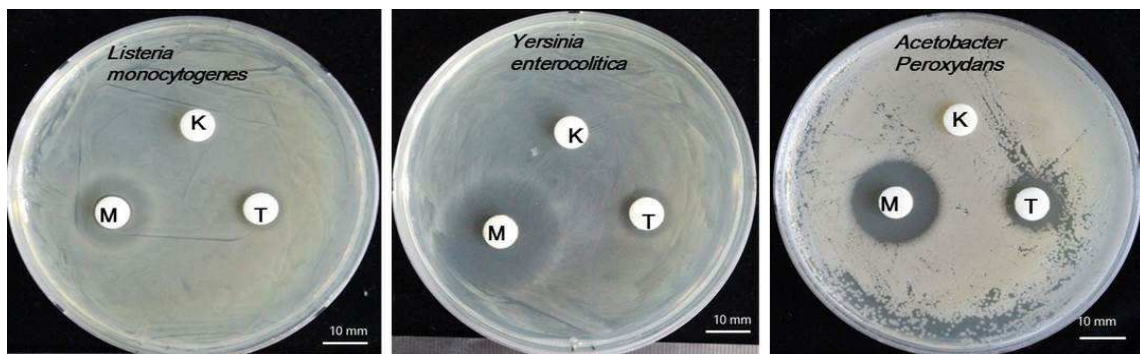
전체 청구항 수 : 총 9 항

(54) 발명의 명칭 발효현미 슬러리를 유효성분으로 포함하는 기능성 음료 및 이의 제조방법

(57) 요약

본 발명은 발효현미 슬러리를 유효성분으로 포함하는 기능성 음료 및 이의 제조방법에 관한 것이다. 상세하게는 현미와 누룩을 이용하여 3단계 발효과정을 수행하고, 상기 단계에서 생성된 침전물을 물로 희석하여 채로 거른 현미발효액을 농축하는 방법으로 제조하는 발효현미 슬러리의 제조방법에 관한 것이다. 본 발명의 제조방법에 의해 제조된 발효현미 슬러리는 소화불량의 원인인 장내 유해균에 대한 항균활성뿐만 아니라 항산화 활성이 우수하다. 따라서 장 활성화에 도움을 줄 수 있는 건강 기능성 음료 또는 식품으로 제공하는 것이 가능하다.

대표도 - 도3



(72) 발명자

박재영

광주광역시 남구 수박등로18번길 10-6, 201호(월산동, 광남빌라)

이범기

전라남도 광양시 공영로 39 호반리젠시빌아파트 102동 1105호

김웅

광주광역시 동구 지산로57번길 6, 207호(지산동)

최다빈

광주광역시 남구 수춘길 25-4 (양과동)

최지은

광주광역시 북구 문산로62번길 20 호반아파트 102동 1307호

곽정자

전라남도 담양군 창평면 용운길 35-27

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1545007357

부처명 농림수산식품부

연구관리전문기관 농림수산식품기술기획평가원

연구사업명 기술사업화지원사업

연구과제명 생활습관병 개선 기능성 가공제품 개발 및 산업화

기 여 율 1/1

주관기관 조선대학교산학협력단

연구기간 2011.11.03 ~ 2014.11.02

명세서

청구범위

청구항 1

- (1) 멥쌀을 이용하여 죽을 끓여 식힌 후, 누룩과 혼합하는 단계;
- (2) 상기 혼합물을 25 내지 32℃에서 2 내지 3일 동안 1차 발효하여 밀술을 제조하는 단계;
- (3) 상기 밀술에 현미, 누룩 및 물을 첨가하여 알코올 도수가 10~14도가 되도록 23 내지 27℃에서 2~3일간 2차 발효하는 단계;
- (4) 상기 2차 발효 후, 알코올 도수가 0이 될 때까지 20 내지 40일 동안 3차 발효하는 단계; 및
- (5) 상기 3차 발효에서 형성된 초막과 윗물을 제거하고, 침전물의 부피에 대하여, 4 내지 5배의 물을 첨가하고, 채로 걸러 90~110℃에서 5~15분 동안 끓이고, 12~48시간 숙성하는 단계;를 포함하는 것을 특징으로 하는 발효현미 슬러리의 제조방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 단계 (1)의 멥쌀 죽과 누룩의 혼합은 멥쌀 죽 100 중량부에 대하여, 누룩 15 내지 30 중량부를 혼합하는 것을 특징으로 하는 발효현미 슬러리의 제조방법.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 단계 (3)에서 현미는 현미백설기인 것을 특징으로 하는 발효현미 슬러리의 제조방법.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 단계 (3)에서 밀술 100 중량부에 대하여, 현미 90 내지 100 중량부, 누룩 10 내지 20 중량부 및 물 200 내지 250 중량부를 첨가하는 것을 특징으로 하는 발효현미 슬러리의 제조방법.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 발효현미 슬러리는 향산화 및 항균 활성을 갖는 것을 특징으로 하는 발효현미 슬러리의 제조방법.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항의 제조방법으로 제조된 발효현미 슬러리.

청구항 7

제6항에 있어서, 상기 발효현미 슬러리는 pH가 3 내지 3.6이고, 당도는 15 내지 17 Brix이며, 무 알코올인 것을 특징으로 하는 발효현미 슬러리.

청구항 8

제6항의 발효현미 슬러리를 유효성분으로 포함하는 기능성 음료.

청구항 9

제8항에 있어서, 향산화 및 항균활성을 갖는 것을 특징으로 하는 기능성 음료.

발명의 설명

기술분야

본 발명은 발효현미 슬러리를 유효성분으로 포함하는 기능성 음료 및 이의 제조방법에 관한 것이다. 상세하게는

[0001]

현미와 누룩을 이용하여 3단계 발효과정을 수행하고, 상기 단계에서 생성된 침전물을 물로 희석하여, 채로 거른 발효현미 슬러리를 농축하여 제조하는 기능성 음료 및 이의 제조방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 현미는 백미에 비해 단백질, 비타민, 무기질, 식이섬유 등의 영양성분 및 기능성이 높은 쌀이다. 특히, 현미는 식이섬유의 중요한 공급원으로 밀가루의 3~4배, 백미의 2배 정도 함유되어 혈압 상승을 억제하며, 분변 용적을 증가시켜 당뇨와 변비 및 대장암의 예방효과가 있는 것으로 밝혀져 있다. 또한, 현미에는 가바(GABA; γ -aminobutyric acid), 감마-오리자놀(γ -oryzanol), 옥타코사놀(octacosanol), 토코페놀(tocopherol) 및 토코트리엔놀(tocotrienol) 등의 유효한 성분들이 함유되어 있어, 콜레스테롤 저하작용, 혈압상승억제, 항암효과 및 혈청 지질개선 효과 등이 알려져 있으며, 현미를 발효하여 새로운 기능 또는 기능성을 향상시키고자 하는 노력은 계속되고 있다. 일례로, 한국공개특허 제2011-0085750호에서는 누룩 단독 사용에 의한 현미식초의 정치 발효 방법에 대해 개시되어 있고, 한국공개특허 제2014-0084593호에 발효현미를 이용한 쌀 가공식품 및 이의 제조방법에 관해 개시되어 있으며, 한국공개특허 제2014-0102395호에 항산화 물질이 풍부한 흑초의 제조법에 관하여 개시되어 있다.

[0003] 한편, 식중독은 식중독 균주의 직접적인 감염에 따른 위해성 외에도 식중독균과 부패 미생물들이 과일, 야채, 곡물과 그 가공 식품 내에 배출하는 위험한 독성대사 물질에 의해 질병을 유발하기도 한다. 대표적인 예로, 대장균(*Escherichia coli*), 황색포도상구균(*Staphylococcus aureus*), 살모넬라(*Salmonella*), 예시니아(*Yersinia*) 또는 클로스트리듐 속 균(*Clostridium* sp.) 등은 엔테로톡신(enterotoxin)을 배출하여 구토와 설사를 유발하는 위장장애를 일으키는 원인균으로 밝혀지고 있다. 미량의 식중독균은 건강한 사람에게는 건강상의 문제를 야기하지 않지만, 면역체계가 약한 어린이, 노인, 환자 또는 임산부의 경우에는 심각한 위험을 초래할 가능성이 있다. 그 예로서 리스테리아 속 균(*Listeria* sp.)의 감염으로 인한 리스테리아증(listeriosis)은 높은 치사율을 보인다. 상기한 바와 같은 장내 유해균으로부터 장을 보호하고, 장 활성화에 도움을 줄 수 있는 건강기능성 식품은 꾸준히 요구되고 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0004] 본 발명은 상기와 같은 요구에 의해 도출된 것으로서, 본 발명자들은 현미와 누룩만을 이용하여 무 알코올이고, 고 당도이며, 항산화 및 항균효과가 있는 발효현미 슬러리를 제조하는 방법을 제공함으로써, 본 발명을 완성하였다.

과제의 해결 수단

- [0005] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은
- [0006] (1) 뭍쌀을 이용하여 죽을 끓여 식힌 후, 누룩과 혼합하는 단계;
- [0007] (2) 상기 혼합물을 25 내지 32℃에서 2 내지 3일 동안 1차 발효하여 밑술을 제조하는 단계;
- [0008] (3) 상기 밑술에 현미, 누룩 및 물을 첨가하여 알코올 도수가 10~14도가 되도록 23 내지 27℃에서 2~3일간 2차 발효하는 단계;
- [0009] (4) 상기 2차 발효 후, 알코올 도수가 0이 될 때까지 20 내지 40일 동안 3차 발효하는 단계; 및
- [0010] (5) 상기 3차 발효에서 형성된 초막과 윗물을 제거하고, 침전물에 정제수를 첨가하고, 채로 걸러 90~110℃에서 5~15분 동안 끓이고, 12~48시간 숙성하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 발효현미 슬러리의 제조방법을 제공한다.
- [0011] 또한, 본 발명의 제조방법으로 제조하는 발효현미 슬러리를 제공한다.
- [0012] 또한, 본 발명의 발효현미 슬러리를 유효성분으로 포함하는 기능성 음료를 제공한다.

발명의 효과

[0013] 본 발명은 발효현미 슬러리를 유효성분으로 포함하는 기능성 음료 및 이의 제조방법에 관한 것이다. 상세하게는 현미와 누룩을 이용하여 3단계 발효과정을 수행하고, 3단계 발효과정에서 생성된 침전물을 물로 희석하여 채로

거른 현미발효액을 농축하는 방법으로 제조하는 발효현미 슬러리의 제조방법에 관한 것이다. 본 발명의 제조방법에 의해 제조된 발효현미 슬러리는 항산화 및 항균활성이 있을 뿐만 아니라, 무 알코올성이며, pH가 3 내지 3.6이고, 당도가 15 내지 17 Brix이므로 보당할 필요가 없으며, 새콤달콤한 식감으로, 기능성과 기호성을 갖춘 기능성 음료로 제공할 수 있다.

도면의 간단한 설명

도 1은 발효현미 슬러리에서 분리한 4종의 균주에 대한 계통도를 나타낸 도면이다.

도 2는 발효현미 슬러리의 항산화 활성을 분석한 결과를 나타낸 도면이다.

도 3은 발효현미 슬러리의 항균 활성을 분석한 결과를 나타낸 도면이다. K; KCl 완충용액(pH 3, 100mM), T; 테트라사이클린 (50 μ g/ml), M; 발효현미 슬러리

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

본 발명은

(1) 뽕쌀을 이용하여 죽을 끓여 식힌 후, 누룩과 혼합하는 단계;

(2) 상기 혼합물을 25 내지 32 $^{\circ}$ C에서 2 내지 3일 동안 1차 발효하여 밀술을 제조하는 단계;

(3) 상기 밀술에 현미, 누룩 및 물을 첨가하여 알코올 도수가 10~14도가 되도록 23 내지 27 $^{\circ}$ C에서 2~3일간 2차 발효하는 단계;

(4) 상기 2차 발효 후, 알코올 도수가 0이 될 때까지 20 내지 40일 동안 3차 발효하는 단계; 및

(5) 상기 3차 발효에서 형성된 초막과 윗물을 제거하고, 침전물의 부피에 대하여, 4 내지 5배의 물을 첨가하고, 채로 걸러 90~110 $^{\circ}$ C에서 5~15분 동안 끓이고, 12~48시간 숙성하는 단계;를 포함하는 것을 특징으로 하는 발효현미 슬러리의 제조방법에 관한 것이다.

상기 단계 (1)의 뽕쌀 죽과 누룩의 혼합은 뽕쌀 죽 100 중량부에 대하여, 누룩 15 내지 30 중량부를 혼합하는 것이 바람직하지만 이에 한정하지 않으며, 상기 단계 (3)에서 밀술 100 중량부에 대하여, 현미 90 내지 100 중량부, 누룩 10 내지 20 중량부 및 물 200 내지 250 중량부를 첨가하는 것이 바람직하지만 이에 제한하지 않는다.

상기 단계 (3)에서 현미는 원형 그대로인 것, 현미를 가루로 낸 것, 볶은 것, 밥을 지은 것, 또는 현미백설기를 만든 것 중에서 선택된 어느 하나인 것이 바람직하지만, 이에 한정하지 않는다. 가장 바람직한 현미의 상태는 현미 백설기로 만든 것이다.

상기 단계 (4)에서의 3차 발효는 아무것도 첨가하지 않고 2차 발효 상태를 그대로 20일 내지 40일을 유지하여 무 알코올이 될 때까지 발효하는 것이다.

또한, 본 발명은 본 발명의 제조방법으로 제조된 발효현미 슬러리에 관한 것이다. 상기 발효현미 슬러리는 항산화 및 항균 활성이 있는 것을 특징이며, pH가 3 내지 3.6이고, 당도는 15 내지 17 Brix이며, 무 알코올인 것이 바람직하지만 이에 제한하지 않는다.

본 발명의 발효현미 슬러리(slurry)는 고체와 액체의 현탁액으로, 액체와 고체의 중간상태를 의미한다. 즉, 죽 또는 스프와 같은 형상으로 농축의 정도에 따라 점성이나, 묽기 등이 달라질 수 있다.

또한, 본 발명은 본 발명의 발효현미 슬러리를 유효성분으로 포함하는 기능성 음료에 관한 것이다.

본 발명에서 정의되는 기능성 음료는 일상생활에서 섭취하는 음료 중에서 항균 활성에 의한 장 활성 관련 질병을 예방 또는 개선하거나, 항산화 효과에 의해 예방 또는 개선할 수 있는 것으로 알려진 다양한 질병, 예를 들어 암, 동맥경화, 심장질환, 면역질환, 피부노화를 포함한 노화, 연령 증가에 따른 성인병의 예방 또는 개선 기능이 있는 음료를 의미하며, 통상의 음료 제조방법에 따라 제조될 수 있다.

상기 기능성 음료는 기호성을 해치지 않는 범위 내에서 상기 성분 이외의 음료의 제조에 통상적으로 사용되는 다른 성분을 더 포함할 수 있으며, 예를 들어 다양한 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 더 함유할 수 있다. 상기 천연 탄수화물로는 단당류(예: 포도당, 과당 등), 이당류(예: 말토스, 수크로스 등), 다당류(예: 텍스트린, 시클로텍스트린 등)와 같은 통상적인 당 및 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알코올이 함유될 수 있다.

또한, 향미제로서 천연 향미제(예: 타우마틴, 스테비아 추출물 등) 및 합성 향미제(예: 사카린, 아스파탐 등)를 함유할 수 있다. 상기 천연 탄수화물의 비율은 음료 100ml당 일반적으로 약 1 내지 20g, 바람직하게는 약 5 내지 12g으로 함유되는 것이 바람직하지만 이에 제한하지 않는다.

[0029] 본 발명에서 정의되는 기능성 음료는 2008년 개정된 건강기능식품에 관한 법률을 통하여 새롭게 정의된 인체에 대한 기능성 및 안전성이 충분하게 확립되어 식품의약품안전청 식약청 고시 제2008-72호에 규정된 건강기능식품 기능성 원료 인정에 관한 규정에 수재된 건강기능식품에 포함되는 음료를 의미한다.

[0030] 이하, 실시예를 이용하여 본 발명을 더욱 상세하게 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들에 의해 제한되지 않는다는 것은 당해 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어 자명한 것이다.

[0031] 실시예 1. 발효현미 슬러리의 제조

[0032] 4kg의 땀쌀을 4시간 동안 물에 불린 후, 12ℓ의 물을 붓고 죽을 끓여 식힌 후, 1kg의 누룩과 잘 섞어 25℃ 발효실에서 2~3일간 보온담요로 덮어서 항아리 내부의 온도가 32℃가 넘지 않도록 조절하면서 1차 발효하여 밑술을 제조하였고, 20kg의 현미를 8시간 동안 불리고, 1시간 동안 물기를 뺀 후, 빵아 백설기를 제조하였다. 상기 밑술에 20kg의 현미백설기, 2kg의 누룩, 50ℓ의 물을 첨가하여 골고루 섞고, 약 3일 동안 25℃에서 2차 발효하여 알코올 도수가 12도가 되도록 하였다. 알코올 도수를 확인한 후, 다시 동일한 조건에서 한 달간 3차 발효하였다. 한 달 이후, 초막이 형성되면 윗물을 떠내고, 침전물에 90ℓ의 물을 붓고, 60mm 메쉬의 채로 3번 걸러 100℃에서 10분 동안 끓이고, 24시간 동안 숙성하여 발효현미 슬러리를 제조하였다.

[0033] 이하, 실시예에서는 본 실시예 1에서 획득한 발효현미 슬러리를 원심분리하여 걸쭉한 부분을 가라앉히고 상등액을 이용하였다.

[0034] 실시예 2. 발효현미 슬러리의 알코올 함량(%), pH, 당도(Brix), 일반성분 및 유리 아미노산 분석

[0035] 발효현미 슬러리의 알코올 함량 측정은 주정계를 이용하여 측정하였고, pH는 pH 측정기(Orion 420A pH meter, Thermo Electron Co)로 측정하였으며, 당도는 당도계(Brix Refractometer HI 96811, Hanna instrument Co)를 이용하여 분석하였다.

[0036] 분석결과, 발효현미 슬러리의 알코올 함량은 0%였으며, pH는 3~3.6, 당도는 16.5 Brix였다. 고당도 무 알코올의 약 산성을 띠고 있어 새콤 달콤한 식감을 나타냈다.

[0037] 일반성분 분석결과, 수분 함유량은 $95.54 \pm 0.08\%$ 이고, 회분 $0.04 \pm 0.01\%$ 이며, 조 단백질은 $1.36 \pm 0.03\%$ 로 분석되었으며, 당은 프룩토오스(Fructose) $0.515 \pm 0.103\text{mg}/\ell$, 글루코오스(Glucose) $0.556 \pm 0.124\text{mg}/\ell$, 수크로오스(Sucrose) $1.806 \pm 0.062\text{mg}/\ell$ 의 3종의 당이 분석되었다. 유기산의 경우에는 젖산(Lactic acid) $2.069 \pm 0.007\text{mg}/\ell$, 아세트산(Acetic acid) $4.050 \pm 0.043\text{mg}/\ell$, 프로피온산(Propionic acid) $0.405 \pm 0.025\text{mg}/\ell$ 의 3종의 유기산이 분석되었다(표 1).

표 1

[0038] 발효현미 슬러리의 알코올 함량(%), pH, 당도(Brix), 일반성분의 분석 결과

pH		3.20 ± 0.24
당도(Brix)		16.5
수분(%)		95.54 ± 0.08
회분(%)		0.04 ± 0.01
조단백질(%)		1.36 ± 0.03
당(mg/ℓ)	프룩토오스	0.515 ± 0.103
	글루코오스	0.556 ± 0.124
	수크로오스	1.806 ± 0.062

유기산(mg/ℓ)	젖산	2.069±0.007
	아세트산	4.050±0.043
	프로피온산	0.405±0.025

[0039] 유리 아미노산은 LC-MS/MS에서 (+)ESI 이온화 및 selected ion monitoring(SIM) mode로 분석하였다. 상기 발효 현미 슬러리의 성분 및 유리 아미노산 분석은 동신대학교 생물자원산업화지원센터(BIC) 연구분석팀에 의뢰하여 조사하였다.

[0040] 발효현미 슬러리에 포함된 유리 아미노산 17종을 분석하였다. 글리신(47.7±7.0mg/ℓ), 알라닌(153.5mg/ℓ), 세린(44.8±7.3mg/ℓ), 프롤린(63.9±6.0mg/ℓ), 발린(49.0±4.6mg/ℓ), 트레오닌(21.2±2.6mg/ℓ), 루신(60.8±5.4mg/ℓ), 이소루신(124.4mg/ℓ), 아스파르트산(37.0±4.7mg/ℓ), 리신(13.4±1.2mg/ℓ), 글루탐산(57.8±6.1mg/ℓ), 메티오닌(48.8±5.4mg/ℓ), 히스티딘(21.7±2.2mg/ℓ), 페닐알라닌(29.5±2.5mg/ℓ), 아르기닌(62.6±5.3mg/ℓ), 티로신(20.2±1.2mg/ℓ) 및 시스테인(9.9±1.5mg/ℓ)으로 분석되었다.

[0041] 실시예 3. 발효현미 슬러리에 포함된 균주의 스크리닝 및 동정

[0042] 본 실시예 3에서는 균주를 동정하기 위하여, 상기 실시예 1의 3차 발효 단계에서 일주일 간격으로 발효액을 20 μℓ씩 취하여, TSB(trypton soy broth) 고체배지와 YPD 고체배지에 도말하고, TSB 고체배지는 37℃, YPD 고체배지는 30℃에서 48시간 배양하였다. 배양된 미생물의 콜로니는 형태적 차이에 의해 반복 분리하였으며 다시 각각의 액체배지에서 배양하여 분리해내었다. 분리 선발한 미생물의 동정은 그람(Gram) 염색법과 현미경 관찰을 통해 형태학적 특성에 대하여 분류하였다.

[0043] 또한, 생화학적 동정을 위하여 BSM(basic salt media) 배지로 8개의 탄소원(말토오스(Maltose), 프룩토오스(Fructose), 락토오스(Lactose), 아라비노오스(Arabinose), 셀로비오스(Cellobiose), 만노오스(Mannose), 만니톨(Mannitol), 글루코오스(Glucose))에 대한 이용성을 조사하였다.

[0044] 더욱더 정확한 동정을 위하여 16S ribosomal DNA 유전자 서열 분석을 통하여 동정하였다. 균주의 chromosomal DNA는 ExgeneTM CellSV(Geneall)를 사용하여 DNA를 추출하였다. 16S rDNA gene 증폭을 위하여 일반적으로 사용하는 27F(5'-AGAGTTTGATCATGGCTCAG-3': 서열번호 1)와 1492R(5'-GATACCTTGTTACGACTT-3': 서열번호 2) 프라이머를 사용하였다. PCR 반응은 0.4mM dNTP, 0.5 unit의 Taq polymerase, 4mM Mg²⁺이 함유된 다카라 프리믹스(Takara, Japan) 10μℓ에, 1μℓ의 DNA 주형(20μg/ml), 1μℓ의 정방향 프라이머(1.0 μM) 및 1μℓ의 역방향 프라이머(1.0 μM)를 각각 넣고, 나머지는 증류수를 첨가하여 총 부피가 20μℓ가 되도록 제조된 반응액으로 수행하였다. PCR 증폭은 94℃에서 1분간 변성; 55℃에서 1분간 어닐링; 72℃에서 1분 30초 동안 신장을 30 사이클 실시하였고; 72℃에서 5분간 최종 신장을 실시하여 증폭하였다. 결과는 BLAST(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) 프로그램을 이용하여 진뱅크(NCBI, Bethesda, MD, USA)의 ribosomal DNA 유전자 서열과 비교하여 동정하였다. 분리된 미생물의 16S rDNA 염기서열을 CLUSTAL_X 프로그램으로 다중 서열 정렬을 실시하고, 계통수를 작성하였다. 계통수 분석은 neighborhood-joining 알고리즘을 바탕으로 수행하였다.

[0045] 상기 배지에서 배양된 미생물의 형태적 차이에 의해 분리하고, 다시 각각의 액체배지에 배양하여 발효 1주차에 2종, 발효 3주차에 2종의 균주를 분리하였고 각각 분리 순서대로 M-1, M-2, M-3, M-4로 명명을 하였다. 발효 1주차에 분리한 M-1은 그람음성균이며, 막대모양 또는 타원형이며 포자를 형성하지 않고, 운동성이 없었다. M-2는 그람양성균이며 막대모양이며 포자를 형성하지 않고, 운동성이 없었다. 발효 3주차에 분리한 M-3은 그람양성균이며 막대모양이며 포자를 형성하지 않고 운동성이 없었다. M-4는 그람음성균이며 막대모양이며, 포자를 형성하지 않고 운동성이 없었다(표 2).

표 2

[0046] 16S ribosomal DNA 유전자 서열을 통하여 균의 동정과 특성 분석

명칭	형태	그람 염색	운동성	포자형성	16s rDNA 서열 상동성	발효 기간
M-1	rod	음성	-	-	글루콘아세트박터 인터메디어스와 100% 일치	7일
M-2	rod	양성	-	-	락토바실러스 카제이와 100% 일치	7일

M-3	rod	양성	-	-	락토바실러스 플랜타럼과 100% 일치	21일
M-4	rod	음성	-	-	아세트박터 퍼옥시단스와 98% 일치	21일

[0047] 더욱 정확한 동정을 하기 위해, 16S ribosomal DNA 유전자 서열을 통하여 동정하였다. 16S ribosomal DNA 유전자 서열 분석 결과, M-1은 글루콘아세트박터 인터메디우스(*Gluconacetobacter intermedius*)와 100%의 상동성을 보였고, M-2는 락토바실러스 카제이(*Lactobacillus casei*)와 100%, M-3은 락토바실러스 플랜타럼(*Lactobacillus plantarum*)과 100%, M-4는 아세트박터 퍼옥시단스(*Acetobacter peroxydans*)와 98%의 유사성을 보였다(도 1).

[0048] 생화학적 동정을 위한 BSM(basic salt media)배지를 이용한 탄소원 실험에서, M-1은 프룩토오스(Fructose)만을 탄소원으로 사용하며, M-2, M-3, M-4는 8종의 탄소원 중에서 사용하는 탄소원이 없었다(표 3).

표 3

[0049] BSM(basic salt media) 배지를 이용한 생화학적 동정
(+: 균 번식함, -:균 번식 못함)

	말도 오스	프룩토 오스	락토 오스	아라비 노오스	셀로비 오스	만노 오스	만니톨	글루 코오스
글루콘아세트박터 인터메디우스(M-1)	-	+	-	-	-	-	-	-
락토바실러스 카제이(M-2)	-	-	-	-	-	-	-	-
락토바실러스 플랜타럼(M-3)	-	-	-	-	-	-	-	-
아세트박터 퍼옥시단스(M-4)	-	-	-	-	-	-	-	-

[0050] 실시예 4. 발효현미 슬러리의 항산화능 분석

[0051] 발효현미 슬러리의 항산화 활성을 분석하기 위하여 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) 라디칼 소거법을 이용한 전자공여능 측정을 수행하였다. 96웰 플레이트에 메탄올에 용해된 1.5×10^{-4} M의 DPPH 180 μ l와 각 발효현미 슬러리 시료 20 μ l를 분주한 혼합액을 실온에서 30분간 반응시킨 후, 마이크로 플레이트 리더(EON microplate spectrophotometer, Biotek, USA)를 이용하여, 517nm에서 흡광도를 측정하였다. 시료를 첨가하지 않은 음성 대조군과 비교하여 자유라디칼 소거활성을 백분율로 나타내었다. 양성 대조군으로는 대표적인 항산화제인 아스코르브산(1mg/ml)를 사용하였으며 측정값은 3회 반복 실험의 평균값으로 나타내었다.

[0052] DPPH 라디칼 소거법을 이용한 발효현미 슬러리의 항산화능 측정결과, 발효현미 슬러리는 $63.04 \pm 0.67\%$ 의 항산화 활성을 보였다. 이는 잘 알려져 있는 항산화제인 아스코르브산(Ascorbic acid; 1mg/ml)의 활성인 $71.26 \pm 1.20\%$ 와 유사하였다(도 2).

[0053] 실시예 5. 발효현미 슬러리의 항균활성 분석

[0054] 발효현미 슬러리의 항균 활성은 잘 알려진 페이퍼-디스크 어세이법으로 분석을 수행하였다. 항균활성 분석은 10종의 미생물 균주에서 실시하였다.

[0055] 상기 항균활성 분석을 실시한 균주는 그람 양성균인 황색포도상구균(*Staphylococcus aureus*), 리스테리아 모노사이토제니스(*Listeria monocytogenes*), 락토바실러스 카제이(*Lactobacillus casei*)와 그람 음성균인 대장균(*Escherichia coli*), 녹농균(*Pseudomonas aeruginosa*), 살모넬라 티피무리움(*Salmonella typhimurium*), 예시니아 엔테로콜리티카(*Yersinia enterocolitica*), 아세트박터 퍼옥시단스(*Acetobacter peroxydans*), 글루콘아세트박터 인터메디우스(*Gluconacetobacter intermedius*) 및 효모인 로테로마이세스 엘롱기스포르스(*Lodderomyces elongisporus*)이다.

[0056] 항균활성 분석은 LB 액체배지에 상기 균주를 접종하여 37°C에서 18시간 동안 배양한 후, 각 균주를 OD₆₀₀에서의 흡광도를 1.0으로 맞추고, LB 고체배지를 포함하는 멸균 펠트리디쉬에 100 μ l씩 도말하고, 발효현미 슬러리와 대조군인 50 μ g/ml의 카르페니실린(Carbenicillin), 50 μ g/ml의 테트라사이클린(Tetracycline), 100mM KCl 완충용액(pH 3)을 각각 50 μ l씩 멸균 디스크-페이퍼(지름 8mm, ADVANTEC paper disc)에 가하여, 37°C에서 18시간 동안

배양하여 실시하였다.

[0057] 결과로 나타나는 생육 저지환의 크기는 육안으로 생육이 나타나지 않는 부분의 지름을 mm 단위로 측정하였고, 3회 이상 분석하여 평균값으로 나타냈다(도 3 및 표 4)

[0058] 발효현미 슬러리와 pH를 동일하게 조절한 KCl 완충용액 pH 3의 음성대조군의 경우, 어떠한 항균활성이 없었다. 양성대조군인 50 μ g/ml의 테트라사이클린(Tetracycline)과 50 μ g/ml의 카르베니실린(Carbenicillin)은 전체적으로 11~18 mm 크기의 항균활성을 보였으나, 카르베니실린(Carbenicillin)의 경우, 역시니아 엔테로콜리티카(*Yersinia enterocolitica*)의 생장을 억제하지 못했다. 발효현미 슬러리는 락토바실러스 카제이(*Lactobacillus casei*), 글루콘아세트박터 인터메디우스(*Gluconacetobacter intermedius*), 로데로마이세스 엘롱기스포르스(*Lodderomyces elongisporus*)의 경우에 상대적으로 약한 항균활성을 보였고, 나머지 7종의 균주에 대해서는 항생제보다 강한 항균활성을 보였다.

[0059] 특히, 리스테리아 모노사이토제니스(*Listeria monocytogenes*), 역시니아 엔테로콜리티카(*Yersinia enterocolitica*), 아세트박터 퍼옥시단스(*Acetobacter peroxydans*)에서 항생제에 비해 1.5~2배의 활성을 보였으며, 이 중에서 역시니아 엔테로콜리티카(*Yersinia enterocolitica*)에서는 카르베니실린(Carbenicillin)이 생장을 억제하지 못한 것에 비교하면, 발효현미 슬러리는 매우 강한 항균활성을 보였다(표 4).

표 4

[0060] 발효현미 슬러리의 항균활성(mm)

균주	KCl 완충액 (pH3)	카베니실린 (50 μ g/ml)	테라싸이클린 (50 μ g/ml)	현미발효 슬러리
황색포도상 구균	-	15	12	18
대장균	-	12	11	13
리스테리아 모노사이토제니스	-	14	11	21
녹농균	-	17	16	18
살모넬라 티피무리움	-	13	11	15
역시니아 엔테로콜리티카	-	-	12	32
락토바실러스 카제이	-	14	16	10
아세트박터 퍼옥시단스	-	19	17	18
글루콘아세트박터 인터메디우스	-	11	18	12
로데로마이세스 엘로기스포르스	-	12	11	11

[0061] 실시예 6. 발효현미 슬러리에 포함된 유기산의 항균활성 분석

[0062] 발효현미 슬러리에 포함된 유기산인 젖산(Lactic acid), 옥살산(Oxalic acid), 아세트산(Acetic acid), 포름산(Formic acid) 및 프로피온산(Propionic acid)의 항균활성을 분석하였으며, 균주는 그람 양성균으로는 황색포도상구균(*Staphylococcus aureus*) 및 리스테리아 모노사이토제니스(*Listeria monocytogenes*)를 사용하였으며, 그람 음성균인 대장균(*Escherichia coli*), 녹농균(*Pseudomonas aeruginosa*), 살모넬라 티피무리움(*Salmonella typhimurium*), 역시니아 엔테로콜리티카(*Yersinia enterocolitica*)로 총 6 균주를 사용하였다. 항균활성 분석은 LB 액체배지에 상기 균주를 접종하여 37℃에서 18시간 동안 배양한 후, 각 균주를 OD₆₀₀에서의 흡광도를 1.0으로 맞추고, LB 고체배지를 포함하는 멸균 펠트리디쉬에 100 μ l씩 도말하고, 발효현미 슬러리와 대조군인 50 μ g/ml의 카르베니실린(Carbenicillin), 50 μ g/ml의 테트라사이클린(Tetracycline), 100mM KCl 완충용액(pH 3)을 각각 50 μ l씩 멸균 disc-paper(지름 8mm, ADVANTEC paper disc)에 가하여, 37℃에서 18시간 동안 배양하여 실시하였다. 결과로 나타나는 생육 저지환의 크기는 육안으로 생육이 나타나지 않는 부분의 지름을 mm 단위로 측정하였고, 3회 이상 분석하여 평균값으로 나타냈다.

[0063] 발효현미 슬러리에 포함된 유기산 중에서 젖산, 옥살산, 포름산, 아세트산에서는 항균활성이 나타나지 않았으며, 프로피온산에서 상기 실시예 5에서 실시한 발효현미 슬러리의 항균활성과 비슷한 정도로 활성이 나타났다(표 5).

표 5

[0064]

발효현미 슬러리에 포함된 유기산의 항균활성(mm)

	현미발효 슬러리	젖산	옥살산	포름산	아세트산	프로피온산
황색포도상 구균	16	-	-	-	-	15
대장균	20	-	-	-	-	17
리스테리아 모노사이토제니스	23	-	-	-	-	19
녹농균	20	-	-	-	-	17
살모넬라 티피무리움	26	-	-	-	-	22
여시니아 엔테로콜리티카	27	-	-	-	-	28

[0065]

실시예 7. pH에 따른 발효현미 슬러리의 항균활성 분석

[0066]

발효현미 슬러리의 pH 변화에 따른 항균활성을 측정하였다. 1N NaOH를 사용하여 pH 3인 발효현미 슬러리의 pH를 3~7까지 조정하고, pH에 따른 항균활성 효과를 분석하였다.

[0067]

상기 유기산 및 pH에 따른 항균 활성을 분석한 균주는 그람 양성균인 황색포도상구균(*Staphylococcus aureus*), 리스테리아 모노사이토제니스(*Listeria monocytogenes*)와 그람 음성균인 대장균(*Escherichia coli*), 녹농균(*Pseudomonas aeruginosa*), 살모넬라 티피무리움(*Salmonella typhimurium*), 여시니아 엔테로콜리티카(*Yersinia enterocolitica*)로 6종의 균주를 사용하였다. 항균활성 분석은 LB 액체배지에 상기 균주를 접종하여 37℃에서 18시간 동안 배양한 후, 각 균주를 OD₆₀₀에서의 흡광도를 1.0으로 맞추고, LB 고체배지를 포함하는 멸균 펠트리 디쉬에 100μl씩 도말하고, pH가 다른 발효현미 슬러리를 각각 50μl씩 멸균 페이퍼-디스크(지름 8mm, ADVANTEC paper disc)에 가하여, 37℃에서 18시간 동안 배양하여 실시하였다. 결과로 나타나는 생육 저지환의 크기는 육안으로 생육이 나타나지 않는 부분의 지름을 mm 단위로 측정하였고, 3회 이상 분석하여 평균값으로 나타냈다.

[0068]

발효현미 슬러리의 pH에 따른 항균활성을 6종의 균주에서 전체적으로 pH가 증가할수록 항균활성이 줄어드는 양상을 보였고, pH 6부터는 억제활성이 나타나지 않았다(표 6).

표 6

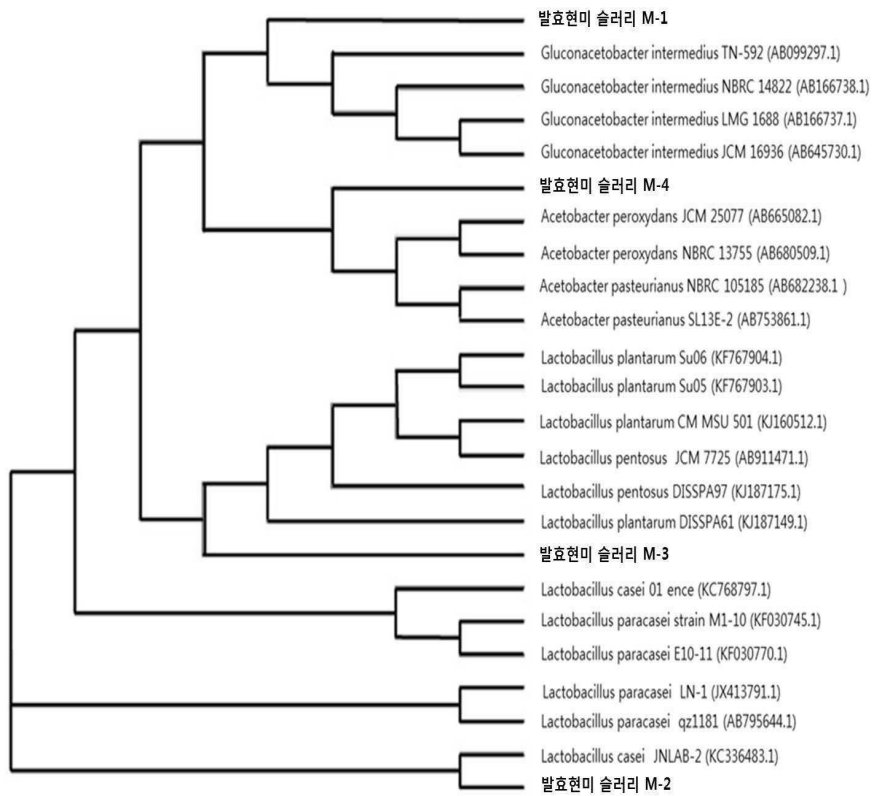
[0069]

발효현미 슬러리의 pH 변화에 따른 항균활성(mm)

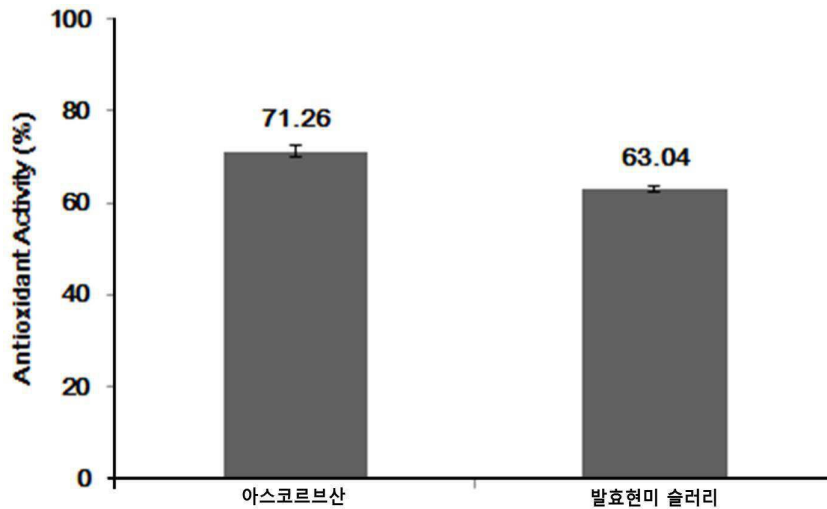
	pH3	pH4	pH5	pH6	pH7
황색포도상 구균	16	12	10	-	-
대장균	20	16	12	-	-
리스테리아 모노사이토제니스	23	16	11	-	-
녹농균	20	13	11	-	-
살모넬라 티피무리움	26	16	10	-	-
여시니아 엔테로콜리티카	27	16	13	-	-

도면

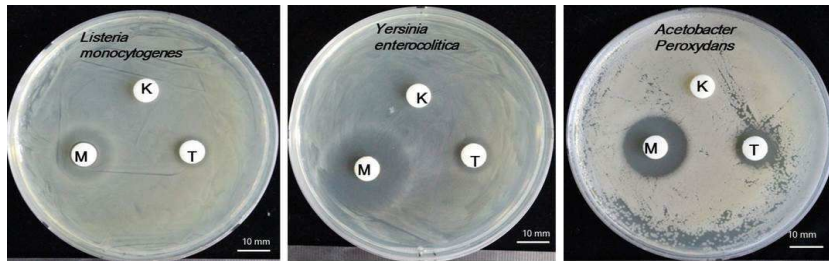
도면1



도면2



도면3



서열 목록

<110> Industry-Academic Cooperation Foundation Chosun University
 <120> Functional beverage comprising fermented brown rice slurry as
 effective component and preparation method thereof

<130> PN14275

<160> 2

<170> Kopatent In 2.0

<210> 1

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 1

agagtttgat catggctcag

20

<210> 2

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 2

gataccttgt tagactt

18