



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2009-0129562
(43) 공개일자 2009년12월17일

(51) Int. Cl.

A23L 1/10 (2006.01) A23L 1/105 (2006.01)

A23G 3/48 (2006.01) A23G 3/36 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2008-0055539

(22) 출원일자 2008년06월13일

심사청구일자 2008년06월13일

(71) 출원인

조선대학교산학협력단

광주광역시 동구 서석동 375, 조선대학교 산학기
획팀

(주)산들촌

광주 북구 두암1동 동강대학 산학협력관 407

(72) 발명자

이숙영

광주 남구 봉선2동 148 무등파크 2차 202동 1107

김춘성

광주광역시 남구 진월동 대주아파트 101-1002

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

조광형

전체 청구항 수 : 총 1 항

(54) 발아 쥐눈이콩을 이용한 과자류 재료의 제조 방법

(57) 요약

본 발명은 발아 쥐눈이콩을 이용한 영유아용 기능성 건과류 및 그의 제조 방법에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 물침지, 키토산처리 또는 글루탐산 처리하여 발아시킨 쥐눈이콩 분말을 주성분으로 포함하는 건과류 제조용 재료 및 이러한 재료를 이용하여 제조된 건과류에 관한 것이다.

대표도 - 도1



(72) 발명자

전홍성

광주 북구 문흥1동 현대아파트 102-203

박상언

대전광역시 유성구 노은동 상록아파트 1010-1004

특허청구의 범위

청구항 1

쥐눈이콩에 물을 첨가하거나, 100 ~ 300 ppm의 글루탐산을 첨가하거나, 밋(또는) 키토산(M.W. 5000) 0.03 ~ 0.06%를 첨가하여 5 ~ 8시간 정도 침지한 후 상온 또는 25℃ 내외의 온도에서 발아 길이가 5 ~ 20 mm되게 발아시키는 공정,

상기 발아된 쥐눈이콩을 동결건조하여 분쇄기로 곱게 마쇄하는 공정, 및

필요에 따라서 상기 발아 쥐눈이콩 분말에 약 4 ~ 7 배량의 물을 첨가한 후 상온 또는 95 ~ 100℃의 온도에서 2 ~ 3회 추출한 후 감압 농축하여 동결건조시키는 공정

을 포함하는 것을 특징으로 하는 쥐눈이콩을 이용한 기능성 건과류 재료의 제조 방법.

명 세 서

발명의 상세한 설명

기술 분야

- <1> 본 발명은 발아 쥐눈이콩을 이용한 영유아용 기능성 건과류 및 그의 제조 방법에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 물침지, 키토산처리 또는 글루탐산 처리하여 발아시킨 쥐눈이콩 분말을 주성분으로 포함하는 건과류 제조용 재료 및 이러한 재료를 이용하여 제조한 건과류에 관한 것이다.

배경 기술

- <2> GABA(γ -Aminobutyric acid, 감마 아미노부티르산)는 자연계에 널리 분포하는 비단백태 아미노산의 일종으로 흥분 억제성 신경전달물질이다. 중추신경계 전체 신경전달물질 중 약 30%를 차지하며 다른 신경 전달물질에 비하여 약 200~1,000배의 고농도로 존재한다. 동물의 경우 뇌, 신장, 심장, 폐 등에서 발견되며 식물의 경우 발아현미를 비롯한 발아곡류, 녹차, 배추 뿌리 등에서 많이 검출되고 있다. GABA는 혈압상승억제, 혈중 콜레스테롤 및 중성지방 증가억제, 뇌의 혈류개선, 비만방지, 시력증진, 항불안, 항경련 등 인체의 많은 생리적인 메카니즘의 조절에 관여하는 것으로 알려져 있고, 성장 호르몬의 분비조절에도 관여함 통증완화에도 효과가 있는 것으로 알려져 있어 약리적으로 매우 주목받는 물질이다. 이러한 GABA의 역할로 인해 최근에는 기능성 식품 소재로서 GABA에 대한 관심이 고조되고 있다. GABA가 보강된 우유, 콩, 차, 홍국, 클로렐라 등은 본태성 고혈압 쥐의 혈압을 효과적으로 낮추는 것으로 보고 되었다.
- <3> 최근 여러 연구에서 종피의 안토시아닌 색소를 비롯한 기능성 성분으로 일반 대두에 비해 생리활성효과가 탁월함이 보고되었다. 한편 국내산 콩의 자급률은 해마다 저하되는 실정으로 경쟁력을 높이기 위해서는 이를 활용한 적극적인 식품 개발이 필요하다. 콩은 황, 백, 흑, 갈, 청, 얼룩 등 다양한 종피 색깔을 가지고 있다. 우리가 주로 즐겨 먹는 콩에는 노란콩과 검정콩이 있는데, 노란콩은 된장, 간장, 고추장 등의 발효 콩제품에 이용되거나 두부, 두유, 또는 콩기름 제조에 이용되어 대량 소비되는 반면에 검정콩은 밥밀콩으로 소량 소비되는 실정이다. 검정콩의 종실은 일반 노란콩과 영양 성분면에서 큰 차이가 없으나 종피에 안토시아닌 색소를 가지고 있는 특징이 있다. 콩에는 상당한 항산화 물질이 있으며 그 원인 물질로는 제니스테인(genistein)과 다이드제인(daidzein)을 포함하는 이소플라본(isoflavones), 페놀산(phenolic acids), 토코페롤류(tocopherols), 피틱산(phytic acids), 트립신 억제제(trypsin inhibitor)와 아미노산 및 펩타이드(peptide)들이 거론되고 있다. 그 중 특히 제니스테인은 유해한 활성 산소종을 제거하는데 탁월한 효과를 나타내며 검정콩의 색소인 안토시아닌 경우에도 항산화 효과에 크게 기여하는 것으로 보고되었다.
- <4> 쥐눈이콩은 검정콩 중 하나로 서리태보다 작고 윤기가 흐르는 콩이며, 약재상에서는 약콩이라고 하여 예로부터 신경통, 신장질환, 노인성 치매예방에 이용되었다. 쥐눈이콩은 이소플라본(isoflavone) 함량이 노란콩보다 높을 뿐만 아니라 종피에 항산화 효과가 탁월한 글리시테인(glycitein)과 안토시아닌(anthocyanin) 성분 중 시아니딘-3-글루코시드(cyanidin-3-glucoside)가 풍부하여 뇌혈관 및 심장질환의 예방과 치료에 효과가 있는 것으로 알려졌다.
- <5> 그러나 이러한 쥐눈이콩의 효율적인 이용에 관하여 유아기에 섭취하는 기준이나 그 영양소에 대한 표준이 없는 실정이다. 따라서, 특히 기능성이 유지되거나 또는 증대되면서도 소비자가 거부감 없이 용이하게 섭취할 수 있

는 쥐눈이콩을 이용한 식품을 종래의 것에 비하여 개선된 형태로 제공할 필요가 있다.

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

- <6> 본 발명자들은 식품 소재를 대상으로 기능성과 기호성 및 영양의 측면에서 양호한 기능성 식품을 개발하고자 예의 연구한 결과, 발아 쥐눈이콩 분말과 기타의 영양 성분을 배합하여 건과류 형태로 제조하는 것이 가능하며 이것이 영양이 풍부할 뿐만 아니라 식품의 기능성이 더욱 증진될 수 있음을 발견하고 본 발명을 완성하기에 이르렀다.

과제 해결수단

- <7> 따라서, 본 발명은 발아유도, 전구물질 첨가, 키토산처리 등의 기능성을 향상할 수 있는 기술들을 쥐눈이콩 종자에 적용하여 건강식품으로 잘 알려져 있고, 신경흥분 억제 및 진정효과, 항스트레스 효과, 혈압조절, 신장기능 개선, 뇌혈류개선, 갱년기장애 개선 등 다양한 생리활성효능이 있는 비단백테 아미노산인 GABA(Gamma Amino Butyric Acid)를 다량 함유한 쥐눈이콩 제품의 제조 조건을 확립하여 그 표준을 제공하는 것을 목적으로 한다.
- <8> 본 발명의 추가의 목적은 친환경적 기술(발아유도, 전구물질 첨가, 키토산처리 등)을 콩류를 포함하는 잡곡류에 적용함으로써 천연적으로 함유된 성분들의 생리적 효능이 상승되고, 고부가가치가 있는 기능성 식품 소재를 제공하는 데 있다.
- <9> 본 발명의 더욱 추가의 목적은 GABA 함량이 쥐눈이콩에서 최대로 증폭되도록 발아시킨 후, 이를 원료로 사용하여 제조된 8 ~12 개월의 영유아용 팥화형 건과류 및 그의 제조 방법을 제공하는데 있다.

효 과

- <10> 본 발명에 따른 건과류의 소재인 발아 쥐눈이콩은 기능성이 풍부할 뿐만 아니라 GABA 함량이 높도록 물침지 또는 키토산, 글루탐산 처리하여 발아시킨 것으로 영양이 풍부하므로 특히 영유아의 건과류 등 기능성 식품의 소재로서 적합하다. 본 발명의 건과류는 화학 첨가제나 합성 색소 등을 전혀 사용하지 않고, 오로지 영양소가 풍부한 성분만을 포함하도록 채택하였으므로 특히, 생식이나 자연식에 가까운 것으로서 영유아에 더욱 적합할 수 있다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

- <11> 본 발명은, 일면에 있어서, 쥐눈이콩을 여러 가지 조건에서 발아 처리하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 기능성 건과류 재료의 제조 방법을 제공한다.
- <12> 상기 본 발명의 건과류 재료의 제조 방법은
- <13> 쥐눈이콩에 물을 첨가하거나, 100 ~ 300 ppm의 글루탐산을 첨가하거나, 및(또는) 키토산(M.W. 5000) 0.03 ~ 0.06%를 첨가하여 5 ~ 8 시간 정도 침지한 후 상온 또는 25 ℃ 내외의 온도에서 발아 길이가 5 ~ 20 mm되게 발아시키는 공정,
- <14> 상기 발아된 쥐눈이콩을 동결건조하여 분쇄기로 곱게 마쇄하는 공정, 및
- <15> 필요에 따라서 상기 발아 쥐눈이콩 분말에 약 4 ~ 7 배량의 물을 첨가한 후 상온 또는 95 ~ 100℃의 온도에서 2 ~ 3 회 추출한 후 감압 농축하여 동결건조시키는 공정을 포함한다.
- <16> 을 포함한다.
- <17> 상기 방법에 있어서 글루탐산을 첨가하는 경우에는 약 200 ppm의 농도가 가장 적합할 수 있고 키토산은 0.05%의 농도로 첨가하여 7시간 정도 침지한 후 발아길이가 약 15 mm가 되도록 상온 또는 25℃ 내외의 온도에서 발아시키는 것이 가장 바람직할 수 있다.
- <18> 이어서, 상기 발아된 쥐눈이콩을 동결건조하여 분쇄기로 곱게 마쇄(40 ~ 100 메쉬)하여 곧 바로 건과류의 제조에 사용할 수 있으며, 추가로 필요에 따라 상기 발아 쥐눈이콩 분말에 바람직하게는 약 5 배량의 물을 첨가한 후 상온 또는 95 ~100 ℃의 온도에서 2 ~ 3회 정도 추출한 후 감압 농축하여 동결건조시킨 다음 이것을 건과류의 제조에 사용할 수도 있다.

- <19> 본 발명은, 추가의 일면에 있어서, 발아 쥐눈이콩을 이용한 기능성 건과류 및 그의 제조 방법을 제공한다.
- <20> 상기 방법은
- <21> (a) 상기 본 발명에 따른 발아 쥐눈이콩 분말 5 ~ 30 중량%, 찹쌀 분말 5 ~ 85 중량%, 흑미 분말 5 ~ 85 중량%, 옥수수 분말 0 ~ 15 중량%, 구기자 분말 1 ~ 10 중량%, 대두 분말 0 ~ 5 중량%, 고구마전분 0 ~ 10 중량%, 자일리톨 0 ~ 5 중량%의 함량비로 원료를 혼합하는 공정,
- <22> (b) 상기 혼합물에 35 ~ 50%의 습도에서 수분의 양이 16 ~ 20%가 되게 물을 혼합하는 공정,
- <23> (c) 상기 혼합물을 4 ~ 10 ℃에서 18 ~ 27 시간 동안 수분 평형시키는 공정,
- <24> (d) 상기 수분 평형물을 130 ~ 160 ℃에서 13 ~ 17 psi, 200 ~ 250 rpm으로 압출 성형 및 스낵화시키는 공정,
- <25> (e) 상기 압출 스낵을 50 ~ 70 ℃에서 5 ~ 8 시간 동안 건조시키는 공정, 및
- <26> (f) 포장 및 제품화 공정
- <27> 을 포함하는 것을 특징으로 한다.
- <28> 본 발명에 따른 제조 방법에 있어서, 먼저 원료로서 발아 쥐눈이콩 분말 5 ~ 30 중량%, 찹쌀 분말 5 ~ 85 중량%, 흑미 분말 5 ~ 85 중량%, 옥수수 분말 0 ~ 15 중량%, 구기자 분말 1 ~ 10 중량%, 대두 분말 0 ~ 5 중량%, 고구마전분 0 ~ 10 중량%, 자일리톨 0 ~ 5 중량%을 혼합한다.
- <29> 상기 혼합비율은 재료의 사용 목적, 최종 제품의 형태에 따라 변경이 가능하고, 이러한 변형은 특별한 기술을 부가하지 않고도 당업자에게 자명한 것이므로, 이러한 변형의 범위도 본 발명의 범주에 포함되는 것으로 이해하여야 한다.
- <30> 발아 쥐눈이콩 분말의 함량은 가급적 10 ~ 15 중량% 내외로 혼합하는 것이 더욱 경제적인 수 있다. 구형 팽화식 건과류의 제조를 위해서는 발아 쥐눈이콩 분말 15 중량%, 찹쌀 70 중량%, 옥수수분말 10 중량%, 구기자 4 중량%, 대두 1 중량%의 비율로 혼합하는 것이 더욱 적합할 수 있고, 바나나형 팽화식 건과류에는 발아쥐눈이콩 10 중량%, 찹쌀 70중량%, 흑미 13 중량%, 고구마전분 5 중량%, 자일리톨 2 중량%로 혼합하는 것이 보다 바람직할 수 있다.
- <31> 이어서, 상기 혼합물에 35 ~ 50%의 습도에서 수분의 양이 16 ~ 20%, 바람직하게는 18%가 되게 물을 혼합한 후, 4~10 ℃, 바람직하게는 6 ℃에서 18 ~ 27 시간, 바람직하게는 24 시간 동안 수분 평형시킨다. 이 과정에서 상대적으로 수분이 남는 재료는 수분을 방출하고, 수분이 부족한 재료는 수분을 더 흡수하여 균일한 팽창이 이루어지게 된다.
- <32> 충분한 수분 팽창이 이루어진 후, 수분 평형물을 130 ~ 160 ℃의 온도에서 13 ~ 17 psi, 바람직하게는 14 psi의 압력과 200 ~ 250 rpm, 바람직하게는 200 rpm으로 압출 성형시켜 과자를 스낵의 형태로 제조한다. 상기 압출 스낵은 50 ~ 70℃, 바람직하게는 60 ℃에서 5 ~ 8 시간 동안, 바람직하게는 6 시간 정도 건조시켜 팽화형 건과류를 제조할 수 있다. 건조가 완료되면 필요한 규격과 함량으로 포장하여 제품을 제조한다.
- <33> 본 발명에 따른 발아 쥐눈이콩을 이용한 건과류는 영유아가 섭취하기에 더욱 적합도록 조직이 부드러운 팽화형 인 것이 더욱 바람직할 수 있고, 영유아 뿐만 아니라 일반인도 섭취하기에 적합할 수 있다.
- <34> 세포는 그의 구성 성분을 보호하고 산화환원상태를 유지하기 위해 효소학적 및 비효소학적 방어시스템을 지니고 있다. 식물에서 비효소학적 방어시스템에는 천연 항산화제로 알려진 아스코르브산(ascorbic acid), 글루타치온(glutathione), 알파-토코페롤(α -tocopherol), 카로테노이드(carotenoids) 등이 있고, 효소적 방어시스템에는 수퍼옥시드 디스뮤타아제(superoxide dismutase), 카탈라아제(catalase), 아스코르베이트 퍼옥시다아제(ascorbate peroxidase), 글루타치온 리덕타아제(glutathione reductase) 등과 같은 효소들이 있다.
- <35> 본 발명에 따른 영유아용 건과류는 발아쥐눈이콩에 GABA 함량, 필수 아미노산 함량, 항산화 활성, 항암 활성에 있어서 유의할 만한 기능성을 지니는 것으로 확인되었다.
- <36> 이전까지 쥐눈이콩 자체의 기능성이나 약리 효과는 다수의 문헌을 통해 알려져 있으나, 쥐눈이콩을 이용하여 다른 생리 활성 물질의 기능성을 부가하는 시도는 거의 없었다. 본 발명에 의하여 발아 쥐눈이콩을 영유아의 건과용으로 만드는 등 식품 제조 조건을 확립하기에 이르렀으며 이에 의하여 GABA 함량이 높고 다양한 기능성을 제공하는 건과류를 제조하는 것이 가능하게 되었다.

- <37> 농산물의 가격이 갈수록 하락하고 있으며 저가의 고품질 외국 농산물의 수입이 증가되어 우리나라의 농업은 폐쇄될 수밖에 없는 입장에 놓여 있다. 이러한 상황 속에서 발아쥐눈이콩을 포함한 식품 개발은 저가의 외국 농산물이 난무하는 농산물 시장에서 충분한 가치를 나타낼 수 있으며 외국 농산물이 수입되더라도 충분한 경쟁력을 가질 수 있다.
- <38> <실시예>
- <39> 이하, 본 발명은 다음의 대표적인 실시예에 의하여 더욱 구체적으로 설명되나, 본 발명이 이들 실시예에 의해 어떤 식으로든 제한되는 것은 아니다.
- <40> **실시예 1: 쥐눈이콩의 발아 유도**
- <41> 쥐눈이콩을 광주광역시 소재 (주)산들촌으로부터 제공받아 각각의 쥐눈이콩 1kg에 대하여 물침지, 키토산 및 글루탐산을 처리하여 7 시간 동안 침지시킨 후 적정 수분과 25℃의 온도 조건의 챔버에서 발아시켰다. 대조구는 발아처리를 하지 않았다.
- <42> 먼저, 글루탐산 처리는 건조된 쥐눈이콩 1 kg을 깨끗이 세척한 후 증류수에 녹인 200 ppm 글루탐산(Sigma Co.) 용액으로 충분히 행군 후 2배 분량의 200 ppm 글루탐산 용액에 7시간 동안 침지하고 침지 후 실온에서 발아시켰다. 물침지 처리구에는 증류수를 사용하였다.
- <43> 마찬가지로 키토산 처리는 건조된 쥐눈이콩 1 kg을 깨끗이 세척한 후 0.05% 키토산 용액을 분자량별(1,000, 3,000, 5,000, 1,000)로 조제해서 7시간 동안 침지한 후 실온에서 발아시켰다. 발아에 사용한 각 용액들은 12시간마다 새로 조제한 각각의 용액으로 교환해 주면서 각각 2 mm, 5 mm, 10 mm, 15 mm까지 최대 일주일 동안 발아시켰다. 각 용액에서 발아된 각각의 쥐눈이콩 약 1 kg을 동결건조하여 마쇄하여 냉장보관하면서 실험에 사용하였다.
- <44> **시험예 1: 쥐눈이콩의 GABA-고함유 조건 분석**
- <45> 발아 단계별 길이와 침지방법을 달리하여 처리한 쥐눈이콩의 GABA 함량 변화를 측정하기 위하여 실시예 1에 따른 쥐눈이콩을 대상으로 GABA 함량변화를 분석하였다.
- <46> 각각의 시료의 GABA 분석을 위해 동결건조된 시료 1 kg을 40 메쉬로 분쇄하여 에탄올 추출하여 40℃ 이하에서 감압농축한 것을 증류수에 녹이고 동일 용적의 에틸 에테르를 넣어 에테르 층을 건어내고 다시 감압농축하였다. 이어서, 농축된 시료를 pH 2.2 리튬 시트레이트 희석 완충액으로 25 ml 메스플라스크에 정용한 후 설포살리실산(sulphosalicylic acid) 1 g을 넣고 잘 혼합한 후 1시간 동안 암실에 방치하였다. 15분간 원심분리기(MEGA 17R no. 17 rotor, Hanil, Korea)에서 12,000 rpm으로 원심분리 하여 얻어진 상층액을 0.45 μ m PVDF 멤브레인 필터(Millipore Co.)로 여과 후 희석하여 GABA 함량을 분석하였다. GABA 표준품은 SYKAM사의 GABA 표준품을 사용하며 분당 0.45 ml의 유속으로 흘려주었다.
- <47> 상기 물침지, 글루탐산 침지 및 키토산 침지의 세가지 조건으로 침지하여 발아 길이별(0, 2, 5, 10, 15mm)로 GABA함량을 측정한 결과는 다음의 표 1에 나타내었다.

표 1

- <48> 쥐눈이콩의 GABA(γ -aminobutyric acid)함량

시료	GABA 함량(mg/100g)
비발아	25
물침지 2mm	19
물침지 5mm	31
물침지 10mm	25
물침지 15mm	42
200ppm 글루탐산	25
0.05% 키토산 (MW:1,000)	28
0.05% 키토산 (MW:3,000)	29
0.05% 키토산 (MW:5,000)	30
0.05% 키토산 (MW:10,000)	24

- <49> 상기 결과로부터, 물침지 2mm를 제외한 나머지는 발아전에 비하여 GABA 함량이 증가하였으며 그 중에서도 15mm에서 GABA 함량이 42mg/100g으로 가장 높았고, 200ppm 글루탐산에서는 15mm에서는 발아전과 GABA 함량이 동일하게 25mg/100g로 나타났으며 분자량별 키토산침지에 따라서는 분자량 5000 일때 GABA 함량이 30mg/100g으로 높게 나타났다.
- <50> 이상의 결과는 GABA 함량에 관련해서는 쥐눈이콩을 물침지하여 15mm까지 발아시키거나 키토산 처리하여 발아시키는 것이 유리한 것을 나타낸다. 상기 결과를 토대로 후속 생리활성 실험을 실시하였다.
- <51> **시험예 2: 쥐눈이콩 추출물의 항산화활성 분석**
- <52> **2-1) DPPH 라디칼 소거능 분석**
- <53> 항산화활성 검색은 DPPH를 이용하여 시료의 라디칼 소거 효과를 측정하였다. 구체적으로, 1×10^{-4} M DPPH와 농도별 추출물을 각각 100 μ l씩 취하여 혼합한 30분간 암 상태에서 방치한 후 잔존 라디칼 농도를 ELISA Reader(Bio-Rad, USA)를 이용하여 517 nm에서 측정하였다. 시료의 환원력의 크기는 라디칼 소거 활성(scavenging activity)으로 표시하고, RC_{50} 은 DPPH 농도가 1/2로 감소하는데 필요한 시료의 양(μ g)으로 나타내었으며 항산화 물질로 잘 알려진 BHT(butylated hydroxytoluene)와 비타민 C(ascorbic acid)와 비교하였다. DPPH 라디칼 소거 활성(%)은 $(Ac-As)/Ac \times 100$ (여기서, Ac : 시료를 첨가하지 않은 대조구의 흡광도, As : 시료를 첨가한 반응구의 흡광도)로 나타내었다.
- <54> 쥐눈이콩의 비발아 추출물과 키토산, 글루탐산 및 물 침지하여 발아시킨 실시예 1의 각 추출물의 항산화 활성을 DPPH assay로 측정한 결과는 도 2에 나타내었다. 도 2는 쥐눈이콩의 처리 방법에 따른 항산화 활성을 나타내는 그래프도이다. 31.25 μ g/ml ~ 1mg/ml의 농도로 DPPH 라디칼 소거능에 대한 항산화 활성을 측정한 결과 1 mg/ml 농도에서 비발아>글루탐산 침지>물 침지>키토산 침지 순으로 항산화 활성을 보였으며 DPPH 라디칼 소거율은 14%~4% 수준으로 비교적 낮은 수준의 효과를 보였다(도 2참조).
- <55> **2-2) SOD (Superoxide dismutase) 활성측정**
- <56> 실시예 1의 각각의 시료를 추출 완충액(50 mM phosphate buffer, pH 7.0; 1% Triton X-100; 1% PVP-40)에 1:4의 비율로 혼합한 후 균질화시키고 12,000 rpm에서 20분 동안 원심분리한 후 상층액을 취하여 항산화 활성 측정에 사용하였다. 단백질 정량은 BSA를 표준물질로 사용하여 Bradford(1976) 방법(A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 72:248-254)에 따라 측정하였다. SOD 활성은 Beauchamp and Fridovich(1971)의 방법(Superoxide dismutase : Improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. Anal. Biochem. 44 : 276-287)을 응용하여 측정하였다. 50mM carbonic buffer (pH10.2), 0.1mM EDTA, 0.1mM Xanthine, 0.025mM nitroblue tetrazolium(NBT), 효소액이 포함된 용액을 25 $^{\circ}$ C에서 10분간 반응한 후 Xanthine oxidase(3.3 x 10 $^{-6}$ M)를 첨가하여 반응을 측정하였다. SOD 활성 측정은 550nm에 30초 단위로 5분간 흡광도를 측정하고 그 결과를 도 3에 나타내었다. 도 3은 쥐눈이콩의 처리 방법에 따른 SOD 활성을 나타내는 그래프도이다. 이 결과로부터 SOD활성의 경우 키토산 침지에서 14.75 U/mg protein로 가장 활성이 높았고, 글루탐산 침지 14.30 U/mg protein, 비발아 14.40 U/mg protein순으로, 물침지에서 14.25 U/mg protein로 가장 SOD 활성이 낮게 나타났다.
- <57> **2-3) Catalase activity 측정**
- <58> 카탈라아제(Catalase)는 생체내의 유해한 산소들을 신속히 처리하여 세포를 보호하는 항산화계 효소로 항산화효소 APX와 함께 H₂O₂를 분해 소거하는 대표적인 효소이다. 카탈라아제 활성은 Aebi 방법(참조문헌: Catalase : in methods of enzymatic analyses Bergmeyer, H. U. ed.). Verlag Chemie. Weinheim. 3:273-282(1983))에 의하여 측정하였다. 50mM 포타슘 포스페이트(pH 7.0)에 10mM H₂O₂와 반응 효소액을 가하여 240nm에서 2분간의 흡광도 변화를 관찰하고 1분 동안에 1uM의 H₂O₂를 분해하는 효소의 양을 1 unit으로 하였다. 도 4는 처리 방법에 따른 쥐눈이콩의 CAT 활성을 나타내는 그래프도이다.
- <59> 이 결과, CAT 활성 또한 역시 키토산 침지에서 6.95 U/mg protein로 가장 높은 활성을 보였고 물침지 5.0 U/mg protein, 글루탐산 침지 4.4 U/mg protein, 비발아에서 2.45 U/mg protein로 가장 활성이 낮게 나타났다.
- <60> 이상의 시험예의 결과를 정리하면, 쥐눈이콩의 항산화 활성 결과는 비발아> 글루탐산 침지> 물침지> 키토산 침지 순으로 항산화 활성을 보였으며 DPPH 라디칼 소거율은 14%~4% 수준으로 비교적 낮은 수준의 효과를 보였고,

SOD와 CAT의 항산화 효소 활성 능력을 측정하고자 침지 방법이 다른 쥐눈이콩의 추출물을 시료로 하여 그 활성을 측정한 결과 SOD활성의 경우 키토산 침지에서 14.75 U/mg protein로 가장 활성이 높았고 CAT 활성 또한 역시 키토산 침지에서 6.95U/mg protein로 가장 높은 활성을 보였다.

<61> 시험예 3: 총 페놀성 화합물 및 플라보노이드의 함량 분석

<62> 3-1) 총 페놀성 화합물의 함량 분석

<63> 총 페놀함량은 Folin-Denis(1985) 방법(AOAC Official method of analysis, 16th ed. Association of official Analytical Chemists, Washington D.C.)에 따라 약간 변형하여 측정하였다. 동결건조된 실시예 1의 추출물 0.05g에 메탄올 10 ml을 가하여 80℃에서 30분 동안 추출한 후 냉각하여 여과하였다. 이 여과한 추출액 50 μ l에 증류수 650 μ l를 넣은 후 Folin-Denis 시약을 50 μ l 가하여 3분 동안 실온에서 반응시켰다. 반응 후 10% Na₂CO₃ 포화용액을 100 μ l을 첨가하고, 최종 볼륨을 1 mL로 맞추기 위해 증류수 150 μ l을 넣어 잘 혼합시켰다. 37℃ 인큐베이터에서 1시간 반응시킨 후 UV-Vis spectrophotometer(UV-2401PC, SHIMADZU)를 사용하여 725 nm에서 흡광도를 측정하였다. 비교용 공시험은 시료 용액 대신 메탄올 용액을 동일하게 처리하였으며, 표준 곡선은 탄닌산(Sigma Co., USA)의 농도를 0~500 μ g/mL이 되도록 하고 이로부터 총 페놀 함량을 구하였다.

<64> 3-2) 총 플라보노이드류 함량 측정

<65> 총 플라보노이드류의 함량 측정은 Davis 변법(한국식품영양과학회 2000, 식품영양실험핸드북, 효일문화사, 서울 p.285-286)에 따라 측정하였다. 동결건조된 실시예 1의 추출물 0.05g에 메탄올 1ml을 가하여 60℃에서 1시간 추출한 후 냉각하여 여과하였다. 이 여과한 추출액 100 μ l에 1 mL의 디에틸렌 글리콜(diethylene glycol)을 첨가하고 다시 1N-NaOH 100 μ l을 넣어 잘 혼합시켜 37℃ 인큐베이터에서 1시간 반응시킨 후 UV-Vis spectrophotometer(UV-2401PC, SHIMADZU)를 사용하여 420 nm에서 흡광도를 측정하였다. 공시험은 시료 용액 대신 메탄올 용액을 동일하게 처리하였으며, 표준 곡선은 나린진(naringin) (Sigma Co., USA)의 농도를 0~200 μ g/mL 이 되도록 하여 작성하고 이로부터 총 플라보노이드 함량을 구하였다.

<66> 그 결과를 표 2 및 도 5 및 6에 각각 나타내었다. 도 5는 쥐눈이콩으로부터의 플라보노이드류의 함량을 나타내는 그래프도이고, 도 6은 쥐눈이콩으로부터의 페놀성 화합물의 함량을 나타내는 그래프도이다.

표 2

<67> 쥐눈이콩 추출물에서 총 페놀성 화합물 및 플라보노이드류의 함량

시료	총 페놀함량 (μ g/g)	총 플라보노이드류 함량 (μ g/g)
비발아	541.60 $\pm$ 16.37	155.67 $\pm$ 9.68
물침지(15mm)	575.09 $\pm$ 17.23	174.74 $\pm$ 9.77
200ppm 글루탐산(15mm)	460.70 $\pm$ 27.62	152.88 $\pm$ 7.06
0.05% 키토산 (MW:5,000/15mm)	460.09 $\pm$ 20.49	139.01 $\pm$ 9.25

<68> 페놀성 화합물은 식물계에 널리 분포되어 있는 2차 대사산물의 하나로서 다양한 구조와 분자량을 가진다. 이들은 페놀성 히드록시(OH)기를 가지기 때문에 단백질 및 기타 거대 분자들과 쉽게 결합하며, 항산화, 항암 등의 다양한 생리활성을 가진다.

<69> 본 시험예에서 쥐눈이콩의 침지 처리에 따른 총 페놀함량을 검토한 결과는 다음과 같다. 물 침지(15 mm)에서 575.09 $\pm$ 17.23 μ g/g로 가장 높은 함량을 보였고, 비발아시 541.60 $\pm$ 16.37 μ g/g을 나타내었으며, 200 ppm 글루탐산(발아길이 15 mm)에서 침지했을시 460.70 $\pm$ 27.62 μ g/g, 0.05% 키토산(MW:5,000, 발아길이 15 mm) 용액에서 침지시켰을시 460.09 $\pm$ 20.49 μ g/g의 순으로 나타났다.

<70> 플라보노이드 함량을 검토한 결과 물침지(15 mm)에서 174.74 $\pm$ 9.77 μ g/g로 가장 높은 함량을 보였고, 비발아 155.67 $\pm$ 9.68 μ g/g, 200 ppm 글루탐산(15 mm)에서 침지했을시 152.88 $\pm$ 7.06 μ g/g, 0.05% 키토산(MW:5,000/15mm) 용액에서 침지시켰을시 139.01 $\pm$ 9.25 μ g/g페놀함량이 높을수록 플라보노이드 함량도 증가함을 알 수 있었다. 본 실험에서는 폴리페놀의 함량이 플라보노이드보다 많았으며 폴리페놀의 함량이 많은 식물이 대부분 플라보노이드 함량도 많음을 알수 있었다.

<71> **시험예 4: 유리아미노산 조성 및 함량 분석**

<72> 실시예 1에서 얻은 시료 50 mg을 1ml의 증류수에 녹인 후 50 μ l를 분주하여 분석에 사용하였다. 물에 녹지 않아 시료를 각각 완전히 건조시키고 PITC(phenylisothiocyanate)로 유도체화시킨 후 시료를 다음의 표 3에 기재한 조건으로 분석하였다.

표 3

<73> 쥐눈이콩에서 유리아미노산을 분석하기 위한 HPLC 작동 조건

항목	조건
컬럼	Water Nova-Pak C18(3.9*300mm, 4 μ m)
컬럼 오븐 온도	46 °C
HPLC 펌프	HP 1100 Series, Binary Pump
HPLC 인젝터	HP 1100 Series, Autosampler
가변형 파장 검출기	HP 1100 시리즈, 254nm
용매	1.4mM NAHAc, 0.1% TEA, 6% CH ₃ CN (H 6.1)
용출	60% CH ₃ CN 용매의 선형 구배(0-100%)
유속	1.0 ml/분
전개 시간	50 분
Equil time	10 분
주입 용적	표준 4 μ l, 시료 20 μ l

<74> 분석 결과를 표 4에 나타내었다. 표에서 약어는 다음을 나타낸다. A; 비발아, B; 물침지(2mm), C; 물침지(5mm), D; 물침지(10mm), E; 물침지(15mm), F; 200ppm 글루탐산(2mm), G; 0.05% 키토산침지(MW:1,000), H; 0.05% 키토산침지(MW:3,000), I; 0.05% 키토산 침지(MW:5,000), J; 0.05% 키토산침지(MW:10,000).

<75> ¹⁾은 불검출, ²⁾TAA, 총아미노산, ³⁾EAA, 필수 아미노산 (Thr+Val+Met+Ile+Leu+Phe+His+Lys), ⁴⁾EAA/TAA(%), 필수 아미노산/총 아미노산.

표 4

<76> 쥐눈이콩의 유리아미노산 함량 (mg/100g)

유리 아미노산	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J
Cys	7	6	7	7	7	6	7	7	7	7
Asp	16	75	122	178	108	29	51	53	64	65
Glu	92	204	264	188	275	204	203	183	184	185
Asn	77	61	85	86	141	54	53	57	60	50
Ser	18	35	56	46	67	31	31	31	32	31
Gln	7	27	44	57	98	16	23	17	18	18
Gly	11	5	7	6	11	6	5	5	5	5
His	27	37	52	47	67	32	30	30	34	32
Arg	345	314	388	366	476	323	303	284	331	298
Thr	10	24	33	37	36	22	23	22	23	23
Ala	68	51	95	38	136	58	51	49	47	48
Pro	11	17	23	20	24	16	17	16	16	15
Tyr	10	15	22	22	24	17	17	16	19	18
Val	12	26	39	37	49	31	33	33	36	33
Met	6	8	11	10	13	30	33	34	34	30
Cys2	ND ¹⁾	ND	ND	ND	ND	ND ¹⁾	ND	ND	ND	ND
Ile	8	17	24	20	25	15	15	14	15	14
Leu	10	20	29	24	29	19	19	18	18	18

Phe	16	26	37	37	37	25	27	25	25	23
Trp	46	50	49	54	57	52	75	50	53	45
Lys	20	32	37	42	41	32	32	32	31	29
TAA ²⁾	843	1068	1456	1347	1762	1042	1050	1004	1084	1009
EAA ³⁾	109	190	262	254	297	206	212	208	216	202
EAA/TAA(%) 4)	12.9	17.8	18.0	18.9	13.5	19.8	20.8	20.7	19.9	20.0

<77> 쥐눈이콩의 침지 방법에 따른 10종의 시료에 대하여 유리 아미노산 함량을 측정한 결과 20종의 아미노산이 확인 되었으며 총 유리 아미노산이 A 시료구는 843 mg/100g, B 시료구는 1068 mg/100g, C 시료구는 1456 mg/100g, D 시료구는 843 mg/100g, E 시료구는 1762 mg/100g, F 시료구는 1042 mg/100g, G 시료구는 1050 mg/100g, H 시료 구는 1004 mg/100g, I 시료구는 1084 mg/100g, J 시료구는 1009 mg/100g 이 각각 함유되어 있으며 주요 유리 아미노산은 특히 글루탐산, 아르기닌으로 A 시료구는 각각 92 mg/100g, 345 mg/100g, B 시료구는 204 mg/100g, 314 mg/100g C 시료구는 264 mg/100g, 388 mg/100g D 시료구는 188 mg/100g, 366 mg/100g E 시료구는 275 mg/100g, 476 mg/100g F 시료구는 204 mg/100g, 323 mg/100g G 시료구는 203 mg/100g, 303 mg/100g H 시료구는 183 mg/100g, 284 mg/100g I 시료구는 18 4mg/100g, 331 mg/100g, J 시료구는 185 mg/100g, 298 mg/100g 함량 을 나타냈다.

<78> 또한 유리아미노산의 총합량에서 8종의 필수 아미노산이 고루 포함되어 있었으며 필수 아미노산이 차지하는 비 율은 A 시료구는 12.9%, B 시료구는 17.8%, C 시료구는 18.0%, D 시료구는 18.9%, E 시료구는 13.5%, F 시료구 는 19.8%, G 시료구는 20.8%, H 시료구는 20.7%, I 시료구는 19.9%, J 시료구는 20.0%로 G 시료구에서 20.8%로 가장 높은 필수아미노산 함량을 보였고 반면 A 시료구에서는 12.9로 가장 낮은 함량을 나타냈다. 유리 아미노산 함량을 측정한 결과 20 종의 아미노산이 확인되었다. 주요 유리 아미노산으로는 특히 글루탐산, 아르기닌으로 8 종의 필수 아미노산이 상기 처리한 시료 모두에 골고루 포함되어 있었다.

<79> 시험예 5: 쥐눈이콩 추출물의 인체암세포에 대한 항암 효과 분석

<80> 실시예 1의 쥐눈이콩 추출물을 사용하여 암세포에 대한 독성 시험을 수행하였다. 본 시험예에서 사용한 세포는 인간유래 암세포주로서 위암세포인 SNU-601 및 대장암 세포인 Caco-2를 사용하였다. Caco-2는 MEM 배지를 사용 하였고 그 외 세포는 RPMI 1640을 사용하였으며 10% 태아송아지혈청(fetal bovine serum)과 항생제 (antimycotic)을 첨가하여 37℃, 5% CO₂의 습윤화된 인큐베이터에서 적응시켜 배양하였다. 세포는 접시의 80% 정도 자랐을 때 PBS로 세척하여 Trypsin-EDTA (Gibco/BRL)을 처리하여 2~3일마다 계대배양하였다.

<81> 각 추출물에 의한 세포성장 억제 활성을 측정하기 위하여 MTT assay를 통한 세포독성능을 실험하였다. 96-웰 플 레이트의 각 웰에 로그기(logarithmic phase)에 도달한 인체암 세포를 2×10^5 cell/mL의 농도가 되도록 조절하 여 100 μ l씩 분주하여 37℃, 5% CO₂ 배양기에서 24 시간 동안 예비배양시킨 후 각 추출물을 농도별로 투여하였다. 세포주와 각 추출물이 처리된 플레이트를 CO₂ 배양기에서 2 일간 배양시킨 후 MTT 용액(5 mg/mL PBS) 10 μ l 씩 첨가하여 MTT가 생존 암세포의 효소작용에 의해 환원되도록 4 시간 더 배양하였다. 각 웰에 생성 된 포르마잔 결정을 DMSO 150 μ l로 잘 녹여서 마이크로플레이트 판독기(Bio-rad, USA)를 이용하여 540 nm에서 흡 광도를 측정하였고 암세포주를 50% 사멸하는데 필요한 세포 성장 저해농도(IC₅₀; 50% 억제 농도)를 산출하였다. 측정된 흡광도는 아래의 방법으로 생존한 세포의 비율을 구하였다. 생존세포율(%)=(세포독성 약물의 OD/세포독 성약물 부재의 OD) x 100.

<82> 그 결과를 도 7 및 도 8에 나타냈다. 도 7은 쥐눈이콩 추출물의 MTT 활성에 의한 인간암세포 Caco-2의 생존능 을 나타내는 그래프도이다. 도 8은 쥐눈이콩 추출물의 MTT 활성에 의한 인간암세포 SNU-601의 생존능을 나타내 는 그래프도이다. 인체 대장암 세포주인 Caco-2에 4종의 쥐눈이콩 추출물(비발아, 글루탐산, 키토산, 물 침 지)을 첨가하여 독성효과를 확인한 결과 1 mg/mL의 농도에서 물침지의 경우 20% 정도의 억제효과를 보였다. 또 한, 인체 위암 세포주인 SNU-601에 4종의 쥐눈이콩 추출물(비발아, 물침지, 글루탐산, 키토산)을 첨가하여 독성 효과를 확인한 결과 1mg/mL의 농도에서 키토산 침지>물 침지>글루탐산 침지>비발아 순으로 세포성장 저해율을 보였고 다른 비교 세포주와 비교하였을 때 위암에서 억제효과가 더 높게 나타났다. 따라서, 이러한 항암효과는

강력하지는 않으나 어느 정도 유의한 정도의 항암효과를 갖는 것으로 확인되어 기능성 식품으로서 이용가치가 충분히 기대된다.

<83> **실시예 2: GABA 고탍유 쥐눈이콩의 추출물 조제**

<84> 상기 시험예의 결과에 따라 GABA 함량 결과가 가장 높은 쥐눈이콩의 처리 방법에 따라 발아쥐눈이콩 1 kg을 실시예 1과 동일한 방식으로 처리하되, 쥐눈이콩을 7시간 동안 물침지한 경우에는 15mm가 되도록 발아시키고, 0.05% 키토산은 분자량이 5,000인 키토산을 동일하게 처리하였고, 글루탐산은 200ppm으로 처리하여 발아시켰다. 상기 각 시료를 발아시킨 후 동결 건조하여 분쇄기로 곱게 마쇄하여 후속 실시예에 사용하였다. 별법으로, 상기 마쇄물을 건조물량의 5 배에 해당하는 물을 첨가하여 상온에서 2회 추출한 후 감압 농축하여 동결 건조하여 후속 팽화형 건과류의 제조에 사용할 수 있다.

<85> **실시예 3: 구형 팽화식 건과 시제품 제조**

<86> 실시예 2에 따른 동결건조 후 분말상태의 발아쥐눈이콩 분말 150g, 찹쌀 700g, 옥수수분말 100g, 구기자 40g, 대두 10g을 혼합한 후, 수분을 전체 용적의 18%가 되게 혼합하였다. 이어서, 상기 혼합 재료를 4℃에서 24 시간 동안 수분을 평형시켰다. 수분 평형 후 상기 혼합물을 150 ℃, 15 psi에서 220 rpm으로 압출 성형하여 압출 스넵을 제조한 후, 상기 압출 스넵을 60 ℃에서 8 시간 동안 건조시킨 후 포장하여 건과 제품을 제조하였다.

<87> **실시예 4: 바나나형 팽화식 건과 시제품 제조**

<88> 실시예 2에 따른 동결건조 후 분말상태의 발아쥐눈이콩 100g, 찹쌀 700g, 흑미 130g, 고구마전분 50g, 자일리톨 20g을 사용한 것을 제외하고는 실시예 4의 방식과 동일하게 유아용 건과를 제조하였다.

산업이용 가능성

<89> 이상 설명한 바와 같이, 본 발명에 의하여 농산물시장 개방 확대에 따른 재배농가의 경제적 어려움을 해소하기 위하여 국산 잡곡류(콩류)를 이용하여 고기능성 가공 식품의 형태로 제공함으로써 소득을 증대시킬 수 있는 방안을 제시하고자 하였다. 또한, 콩류로 제조한 기능성이 다양한 제과류의 개발에 의하여 콩 가공식품의 수요를 창출하고, 더욱이 인체에 유익한 건강 기능성 식품을 개발할 수 있다는 측면에서 제과, 제빵 산업화에 기여할 것으로 사료된다. 또한, 기능성 소재를 이용한 영유아용 건과류 개발로 기존 단순 건과류에서 기능성 강화를 통한 고부가가치의 제품을 제공하는 것이 가능하게 되었다.

도면의 간단한 설명

<90> 도 1은 본 발명에 따른 쥐눈이콩 함유 건과류의 전반적인 제조 공정을 나타내는 도면.

<91> 도 2는 쥐눈이콩의 처리 방법에 따른 항산화 활성을 나타내는 그래프도.

<92> 도 3은 쥐눈이콩의 처리 방법에 따른 SOD 활성을 나타내는 그래프도.

<93> 도 4는 처리 방법에 따른 쥐눈이콩의 CAT 활성을 나타내는 그래프도.

<94> 도 5는 쥐눈이콩으로부터의 플라보노이드류의 함량을 나타내는 그래프도.

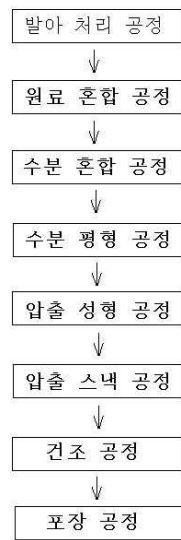
<95> 도 6은 쥐눈이콩으로부터의 페놀성 화합물의 함량을 나타내는 그래프도.

<96> 도 7은 쥐눈이콩 추출물의 MTT 활성에 의한 인간암세포 Caco-2.의 생존능을 나타내는 그래프도.

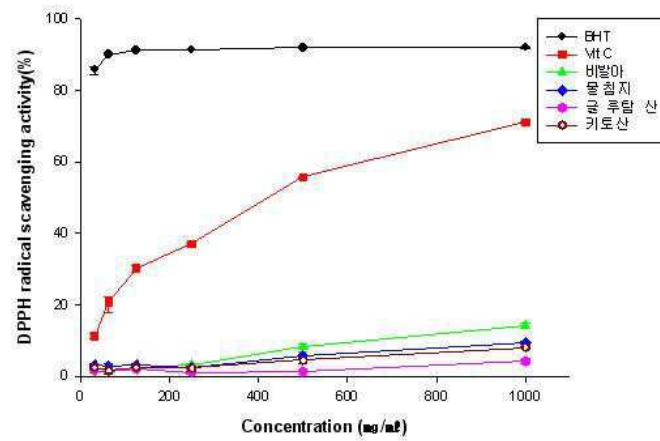
<97> 도 8은 쥐눈이콩 추출물의 MTT 활성에 의한 인간암세포 SNU-601의 생존능을 나타내는 그래프도.

도면

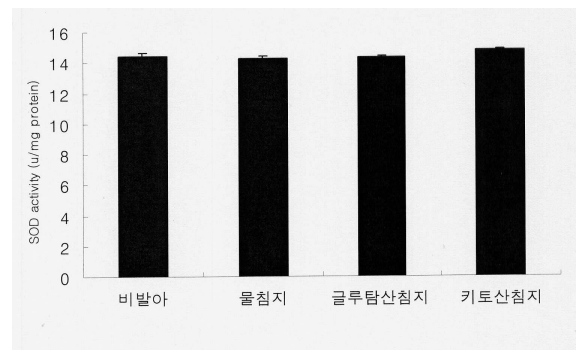
도면1



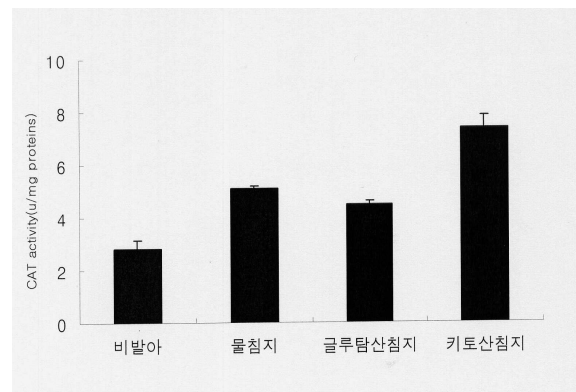
도면2



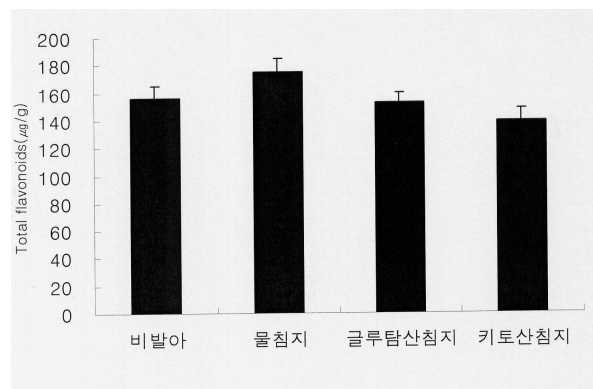
도면3



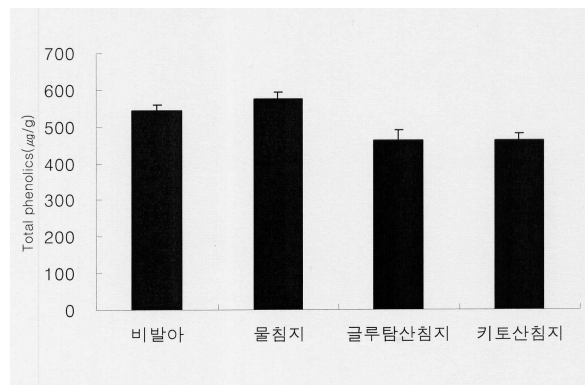
도면4



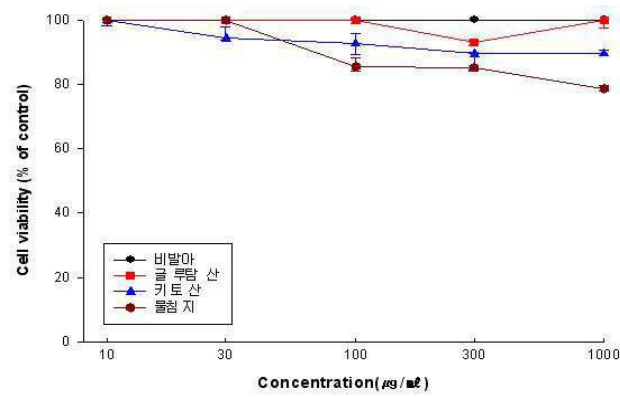
도면5



도면6



도면7



도면8

