



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2017-0114729
(43) 공개일자 2017년10월16일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A23L 7/109 (2016.01) A21D 2/36 (2006.01)
A21D 8/04 (2017.01) A23L 1/30 (2006.01)
A23L 7/152 (2016.01)
(52) CPC특허분류
A23L 7/109 (2016.08)
A21D 2/36 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2016-0042191
(22) 출원일자 2016년04월06일
심사청구일자 2016년04월06일

(71) 출원인
계명대학교 산학협력단
대구광역시 달서구 달구벌대로 1095 (신당동)
(72) 발명자
이삼빈
대구광역시 달서구 선원로 171, 102동 306호 (이곡동, 성서무지개타운)
장근민
대구광역시 달성군 다사읍 대실역남로 94, 청아람 2단지 202동 802호 (죽곡리)
(74) 대리인
특허법인태백

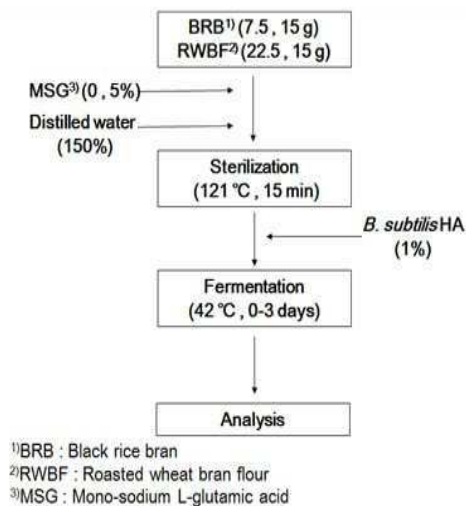
전체 청구항 수 : 총 6 항

(54) 발명의 명칭 붉은 밀기울 및 흑미강의 혼합 발효를 이용한 기능성 국수 제조방법

(57) 요약

본 발명은 붉은 밀기울 및 흑미강의 혼합 발효를 이용한 기능성 국수 제조방법에 관한 것으로, 상세하게는 바실러스 서브틸리스 (*Bacillus subtilis*) HA 균주를 이용한 고초균 발효를 통해 흑미강과 붉은 밀기울 혼합 발효물을 제조하여 이를 반죽에 이용하는 흑미강 및 붉은 밀기울 혼합 발효물이 함유된 반죽 제조방법 및 이를 이용한 기능성 국수를 제공한다. 상기 붉은 밀기울과 흑미강 혼합 발효물을 첨가한 국수 면은 기존 시판 중인 국수 면보다 부드러움 정도가 높아 중장년층이 섭취하기에도 용이한 물성으로 제조되었다. 또한, 고령화시대에 건강장수를 추구하는 현대인들에게도 식이섬유와 γ -PGA 등 기능성 성분이 강화하여 건강식품으로도 충분한 가능성이 있다고 판단된다.

대표도 - 도17



(52) CPC특허분류

A21D 8/047 (2013.01)

A23L 33/105 (2016.08)

A23L 7/152 (2016.08)

(72) 발명자

임종순

대구광역시 달서구 달서대로109안길 54 (호산동)

박용선

대구광역시 동구 신암남로28길 45, 302호 (신암동, 이스트캐슬)

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 2015.12.19 ~ 2016.12.18

명세서

청구범위

청구항 1

- (1) 흑미강과 볶은 밀기울을 1: 0.5 - 5의 중량비로 혼합하는 단계;
- (2) 상기 (1) 단계에서 혼합된 혼합물 100 중량부에 대하여 모노소듐 글루타메이트(mono sodium glutamate; MSG) 0.1 내지 10 중량부 및 물 100 내지 200 중량부를 첨가하여 혼합하는 단계;
- (3) 상기 (2) 단계에서 혼합된 혼합물에 고초균 스타터(starter)를 접종하고 발효시켜 혼합 발효물을 제조하는 단계; 및
- (4) 밀가루 100 중량부에 대하여 상기 (3) 단계에서 제조된 혼합 발효물을 5 내지 20 중량부 및 물 30 내지 50 중량부를 혼합하여 반죽하는 단계를 포함하는 흑미강 및 볶은 밀기울 혼합 발효물이 함유된 반죽 제조방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 고초균은 바실러스 서브틸리스 HA(*Bacillus subtilis* HA)(KCCM 10775P)인 것을 특징으로 하는 흑미강 및 볶은 밀기울 혼합 발효물이 함유된 반죽 제조방법.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 (3) 단계의 발효는 30 내지 50℃에서, 1 내지 3일 동안 발효하는 것을 특징으로 하는 흑미강 및 볶은 밀기울 혼합 발효물이 함유된 반죽 제조방법.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 흑미강 및 볶은 밀기울 혼합 발효물에는 점질물 및 타이로신(Tyrosine)이 증진된 것을 특징으로 하는 흑미강 및 볶은 밀기울 혼합 발효물이 함유된 반죽 제조방법.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항의 방법에 의해 제조된 흑미강 및 볶은 밀기울 혼합 발효물이 함유된 반죽.

청구항 6

제5항에 따른 반죽을 이용하여 제조된 국수.

발명의 설명

기술분야

[0001]

본 발명은 볶은 밀기울 및 흑미강의 혼합 발효를 이용한 기능성 국수 제조방법에 관한 것으로, 상세하게는 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*) HA 균주를 이용하여 1차 고초균 발효를 통해 기능성이 강화된 혼합 발효물을 생산하기 위해 모노-소듐 L-글루탐산(mono-sodium L-glutamic acid; MSG)을 첨가하였으며, 식이섬유가 풍부한 기능성 국수 면 제품 개발에 대한 것이다.

배경기술

[0002]

고초균(바실러스 서브틸리스; *Bacillus subtilis*)은 GRAS (Generally Recognized As Safe : 미국 FDA에서 지정한 일반적으로 안전한 물질) 균주로 대표적인 프로바이오틱스(probiotics; 젖산균과 비젖산균을 포함한 장내 건강에 이로운 살아 있는 모든 균) 미생물로 알려져 있다. 고초균 발효를 통해 생성되는 생리활성물질은 갈변물질로서 멜라노이딘(melanoidin), 단백질 및 탄수화물 가수분해 효소, 혈전분해효소, 기능성 펩타이드(peptide) 및 고분자 점질물 등을 포함한다.

[0003] 밀은 배유(85-80%), 배아(2.5-3.5%), 밀기울(5-6%)로 구성되며 제분과정 중 밀기울은 약 15-20% 정도 생성되어 부산물로 분류된다. 밀기울은 주로 밀의 종피(seed coat), 주심층(nuclear epidermis), 호분층(aleurone layer) 등으로 이루어져 있고, 제분 및 선별과정에서 일부 배유(endosperm) 성분이 포함된다. 밀기울에는 단백질 14-18%, 지방 4-6%, 탄수화물 50-70%, 회분 5-7%, 수분 9-14% 등이 있으며, 특히 약 40-50%의 식이섬유 성분이 포함되어 있는 것으로 알려져 있다. 그러나 밀기울 대부분은 산패 및 미생물 생육 등으로 쉽게 변질되는 이유로 식품소재로 이용되지 않고 폐기되거나 동물의 사료로 쓰이고 있다.

[0004] 미강은 쌀의 배아와 종피, 호분층으로 구성되어 있으며, 영양성분으로는 비타민B6와 판토텐산, 엽산, 비타민E, 비타민K, 식이섬유가 풍부하다. 그로 인해 노화방지(항산화), 장내세균 균형 유지, 뇌세포 에너지 대사기능 촉진, 콜레스테롤 감소효과가 있다고 알려져 있다. 현재 우리나라의 현미 도정과정에서 부산물인 미강의 생산량은 벼의 품종개량, 비료의 개발, 농업기법의 향상 등으로 인하여 꾸준히 증가하고 있는 반면, 그에 따른 미강의 식품 소재화는 미비한 실정이다. 또한 쌀 재고량이 증가하고 따라서, 미강의 제품화 향상과 더불어 소비를 촉진시키기 위한 적극적인 노력이 절실히 요구되어 진다.

[0005] 이러한 밀기울과 미강의 소비를 촉진하고 식품적 가치를 향상시키는 방법의 하나로, 밀기울 및 미강을 이용한 다양한 가공식품을 개발하여 기능성 식품으로의 전환이 필요한 실정이다.

선행기술문헌

특허문헌

[0006] (특허문헌 0001) 한국등록특허 제10-1526106호(2015.06.04 공개)

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명의 목적은 바실러스 서브틸리스 (*Bacillus subtilis*) HA 균주를 이용한 고초균 발효를 통해 흑미강과 볶은 밀기울 혼합 발효물을 제조하여 이를 반죽에 이용하는 흑미강 및 볶은 밀기울 혼합 발효물이 함유된 반죽 제조방법 및 이를 이용한 기능성 국수를 제공하는데 있다.

과제의 해결 수단

[0008] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 (1) 흑미강과 볶은 밀기울을 1: 0.5 - 5의 중량비로 혼합하는 단계; (2) 상기 (1) 단계에서 혼합된 혼합물 100 중량부에 대하여 모노소듐 글루타메이트(mono sodium glutamate; MSG) 0.1 내지 10 중량부 및 물 100 내지 200 중량부를 첨가하여 혼합하는 단계; (3) 상기 (2) 단계에서 혼합된 혼합물에 고초균 스타터(starter)를 접종하고 발효시켜 혼합 발효물을 제조하는 단계; 및 (4) 밀가루 100 중량부에 대하여 상기 (3) 단계에서 제조된 혼합 발효물을 5 내지 20 중량부 및 물 30 내지 50 중량부를 혼합하여 반죽하는 단계를 포함하는 흑미강 및 볶은 밀기울 혼합 발효물이 함유된 반죽 제조방법을 제공한다.

발명의 효과

[0009] 본 발명은 볶은 밀기울 및 흑미강의 혼합 발효를 이용한 기능성 국수 제조방법에 관한 것으로서, 상세하게는 볶은 밀기울과 흑미강을 혼합하여 만든 발효물을 활용하여 기능성 성분과 식이섬유가 풍부하고, 고초균 발효를 통해서 기능성 물질인 펩타이드(peptides)와 γ -PGA가 증가된 혼합 발효물을 이용한 기능성 국수 면 제조 방법에 대한 것이다. 상기 볶은 밀기울과 흑미강 혼합 발효물을 첨가한 국수 면은 기존 시판 중인 국수 면보다 부드러움 정도가 높아 중장년층이 섭취하기에도 용이한 물성으로 제조되었다. 또한, 고령화시대에 건강장수를 추구하는 현대인들에게도 식이섬유와 γ -PGA 등 기능성 성분이 강화하여 건강식품으로도 충분한 가능성이 있다고 판단된다.

도면의 간단한 설명

[0010] 도 1은 흑미강과 각각 재료에 따른 고초균 발효물 제조 방법을 나타낸 모식도이다.

도 2는 흑미강과 재료에 따른 pH, 산도를 나타낸다.

- 도 3은 흑미강과 재료에 따른 생균수를 나타낸다.
- 도 4는 흑미강과 재료에 따른 점질물 함량을 나타낸다.
- 도 5는 흑미강과 재료에 따른 타이로신 함량을 나타낸다.
- 도 6은 흑미강과 MSG 함량 및 증류수 함량에 따른 고초균 발효물 제조 방법을 나타낸 모식도이다.
- 도 7은 흑미강의 MSG 함량 및 증류수 함량에 따른 pH, 산도를 나타낸다.
- 도 8은 흑미강의 MSG 함량 및 증류수 함량에 따른 생균수를 나타낸다.
- 도 9는 흑미강의 MSG 함량 및 증류수 함량에 따른 점질물 함량을 나타낸다.
- 도 10은 흑미강의 MSG 함량 및 증류수 함량에 따른 타이로신 함량을 나타낸다.
- 도 11은 붉은 밀기울과 MSG 첨가에 따른 고초균 발효물 제조방법을 나타낸 모식도이다.
- 도 12는 붉은 밀기울의 MSG 첨가별 pH, 산도를 나타낸다.
- 도 13은 붉은 밀기울의 MSG 첨가별 생균수를 나타낸다.
- 도 14는 붉은 밀기울의 MSG 첨가별 점질물 및 점조도를 나타낸다.
- 도 15는 붉은 밀기울의 MSG 첨가별 타이로신 함량 및 단백질분해효소 활성을 나타낸다.
- 도 16은 붉은 밀기울의 MSG 첨가별 소진량 확인 결과를 나타낸다.
- 도 17은 붉은 밀기울과 흑미강을 혼합한 고초균 발효물 제조방법을 나타낸 모식도이다.
- 도 18은 흑미강과 붉은 밀기울 혼합 발효물의 pH, 산도를 나타낸다.
- 도 19는 흑미강과 붉은 밀기울 혼합 발효물의 생균수를 나타낸다.
- 도 20은 흑미강과 붉은 밀기울 혼합 발효물의 점질물 함량과 점조도를 나타낸다.
- 도 21은 흑미강과 붉은 밀기울 혼합 발효물의 타이로신 함량 및 단백질분해효소 활성을 나타낸다.
- 도 22는 흑미강과 붉은 밀기울 혼합 발효물의 MSG 첨가별 소진량 확인 결과를 나타낸다.
- 도 23은 흑미강과 붉은 밀기울 혼합 발효물을 이용한 기능성 국수 면 제조 공정을 나타낸다.
- 도 24는 흑미강과 붉은 밀기울 혼합 발효물 함량에 따라 국수를 제조한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0011] 본 발명자들은 붉은 밀기울과 흑미강을 혼합하여 발효한 발효물을 이용하여 식이섬유와 γ -PGA가 풍부한 기능성 물질을 첨가별에 따른 조성의 최적 조건을 선별하여 제품의 기호성과 기능성 국수 면을 제조하였고, 특히 국수 면 조성물 밀가루 대비 중에 붉은 밀기울과 흑미강의 혼합 발효물을 0-20 중량% 함유되게 반죽하여, 기능성 물질이 강화된 국수 면을 제조하고 본 발명을 완성하였다.
- [0012] 본 발명은 (1) 흑미강과 붉은 밀기울을 1: 0.5 - 5의 중량비로 혼합하는 단계; (2) 상기 (1) 단계에서 혼합된 혼합물 100 중량부에 대하여 모노소듐 글루타메이트(mono sodium glutamate; MSG) 0.1 내지 10 중량부 및 물 100 내지 200 중량부를 첨가하여 혼합하는 단계; (3) 상기 (2) 단계에서 혼합된 혼합물에 고초균 스타터(starter)를 접종하고 발효시켜 혼합 발효물을 제조하는 단계; 및 (4) 밀가루 100 중량부에 대하여 상기 (3) 단계에서 제조된 혼합 발효물을 5 내지 20 중량부 및 물 30 내지 50 중량부를 혼합하여 반죽하는 단계를 포함하는 흑미강 및 붉은 밀기울 혼합 발효물이 함유된 반죽 제조방법을 제공한다. 바람직하게는, 상기 흑미강 및 붉은 밀기울 혼합 발효물에는 점질물 및 타이로신(Tyrosine)이 증진되었다.
- [0013] 바람직하게는, 상기 고초균은 바실러스 서브틸리스 HA(*Bacillus subtilis* HA)(KCCM 10775P) 균주일 수 일 수 있다.
- [0014] 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.
- [0015] 바람직하게는, 상기 (3) 단계의 발효는 30 내지 50℃에서, 1 내지 3일 동안 발효할 수 있으나, 이에 제한되는

것은 아니다.

- [0016] 본 발명에서 흑미강 및 붉은 밀기울 혼합 발효물 첨가량은 전체 분말원료(밀가루) 100 중량부에 대하여 5 내지 20 중량부를 첨가하였는데, 30 중량부를 초과하면 맛의 기호성이 감소하였고, 가공적성이 부적합하였다.
- [0017] 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.
- [0018] 본 발명에 있어서, "점질물"에는 "감마-폴리글루탐산(gamma-poly glutamic acid; γ -PGA)"이 포함되어 있으며, 상기 γ -PGA는 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, 생체 적합성, 식용 등의 다양한 특성이 있기 때문에 다양한 분야에서 응용되고 있다.
- [0019] 본 발명에 있어서, "타이로신(Tyrosine)"은 단백질을 구성하는 20가지의 표준 아미노산 중 하나로서, 비필수아미노산인 동시에 방향족 아미노산이다. 뇌의 신경세포의 전달물질 중 중요한 도파민, 에피네프린, 노르에피네프린, 갑상선 호르몬, 피부의 멜라닌 성분의 생성에 필요한 성분으로 알려져 있다. 또한, 스트레스를 다스리고 집중력 향상에 효과가 있는 아미노산으로서, 우울증 및 치매 치료에 사용되기도 한다.
- [0020] 한편, 발효물의 펩타이드(peptide) 생성 정도를 측정하기 위하여 발효물 중에 존재하는 타이로신(tyrosine) 함량을 측정한 것이며, 상기 펩타이드가 타이로신으로 한정되는 것은 아니다.
- [0021] 또한, 본 발명은 상기의 방법에 의해 제조된 흑미강 및 붉은 밀기울 혼합 발효물이 함유된 반죽을 제공한다. 또한, 본 발명의 반죽에는 식품학적으로 허용되는 공지의 부재료, 첨가물, 천연 조미료 등이 함유될 수 있다.
- [0022] 한편, 본 발명의 반죽은 일정한 모양으로 성형한 후 굽거나 튀기거나 또는 증기로 쪄 빵, 스낵(과자), 떡, 면류 등을 제조할 수 있다. 본 발명의 실시예에서는 상기 반죽을 이용하여 제조된 국수에 대해 기재하고 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 빵 및 스낵(과자)은 카스테라, 머핀, 크루아상, 바케트, 도넛, 케이크류, 파이, 비스킷, 건빵, 호빵, 만주 등의 통상적인 빵 및 과자류를 포함하지만, 이에 제한되는 것은 아니다. 또한, 면류는 라면, 국수, 수제비, 짜장면, 칼국수, 우동, 냉면, 소면, 쫄면 등을 포함하지만 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0023] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.
- [0024] <실시예 1> 고초균 발효물 제조 최적화
- [0025] 1. 사용 균주 및 스타터(starter) 제조
- [0026] 바실러스 서브틸리스 (*Bacillus subtilis*) HA (KCCM 10775P) 균주는 재래식 청국장에서 분리하여 한국미생물보존센터에 등록한 후 분양받아 사용하였다. 스타터(Starter)용 액체배지는 탈지대두분말 5% 용액(w/v)을 균질기(homogenizer; TH220, Omni International, Waterbury, CT, USA)로 10,000 rpm에서 1분간 균질화한 다음 autoclave (MLS-3020, Sanyo Electric Co., Ltd., Osaka, Japan)를 이용하여 121℃에서 15분간 멸균한 후 사용하였다. 액체 배지 50 mL에 42℃에서 24시간 동안 160rpm인 진탕배양기(SI-900R, Jeio Tech. Co., Ltd., Daejeon, Korea)에서 배양한 후 스타터(srarter)로 사용하였다(2.95×10^9 CFU/mL).
- [0027] 2. pH 및 산도 측정
- [0028] pH는 pH meter(420A+, Thermo Orion, USA)를 이용하여 측정하였으며, 붉은 밀기울과 흑미강 혼합 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 주석산(lactic acid) 함량(% , v/w)으로 환산하였다.
- [0029] 3. 생균수 측정
- [0030] 생균수는 붉은 밀기울과 흑미강 혼합 발효물 1 mL에 멸균수 9 mL을 첨가하여 10배로 단계별 희석하여 MRS broth agar 배지에 20 μ L 도말하고, 42℃ 항온배양기에서 24시간 배양한 후의 바실러스 서브틸리스 HA 생균수를 CFU

(colony forming unit)/mL으로 나타내었다.

[0031] **4. 점질물 및 점조도 측정**

[0032] 점질물 함량은 볶은 밀기울과 흑미강 혼합 발효물을 10g씩 채취하여 증류수로 5배 희석한 다음, 8,000 rpm에서 20분 동안 원심분리한 상등액을 2-3배의 이소프로필알코올을 첨가한 후 생성된 점질물을 60℃, 24시간 dry oven에서 건조 시킨 후 무게를 측정하여 함량을 환산하였다.

[0033] 점조도 측정은 cone plate device(Plate PP35Ti, 3.5 cm diameter)를 장착한 물성측정기를 이용하여 측정하였다. 볶은 밀기울과 흑미강 혼합 발효물 10g씩 채취하여 증류수로 5배 희석한 다음, plate에 올려 구간 당 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⁻¹의 범위로 유동특성을 알아보고, 점조도 지수는 다음과 같은 식을 사용하여 나타냈다.

[0034] Power law model : $\sigma = K \cdot \dot{\gamma}^n$

[0035] σ 는 전단응력(shear stress, Pa), K는 점조도 지수(consistency index, Pa · sⁿ), $\dot{\gamma}$ 는 전단속도(shear rate, s⁻¹), n은 유동성 지수(flow behavior index, n)이다.

[0036] **5. 타이로신(Tyrosine) 함량 측정**

[0037] 발효물의 펩타이드(peptide) 생성정도를 측정하기 위하여 Folin phenol 시약을 이용하여 발효물 추출액 중에 존재하는 타이로신(tyrosine) 함량을 측정하였다. 발효물 5g에 증류수 45mL을 희석하여 균질화한 시료를 e-tube에 취하여 15,000 rpm에서 15분간 원심 분리하여 상등액을 2배 더 희석해준다. 상등액 0.7 mL과 0.44 M TCA(trichloroacetic acid) 0.7 mL을 첨가하고 37℃에서 30분간 반응시키고, 15,000 rpm에서 15분간 원심 분리하여 침전물을 제거하였다. 회수된 상등액 1 mL에 0.55 M Na₂CO₃ 2.5 mL와 3배 희석한 phenol reagent 0.5 mL를 차례로 넣고 혼합한 후 37℃ 항온수조에서 30분간 반응시켰다.

[0038] 상온에서 냉각시킨 후 반응액의 흡광도를 spectrophotometer(UVIKON 922, Kontron Instruments, Milan, Italy)로 660 nm에서 측정하였다.

[0039] **6. 단백질분해효소(Protease) 활성 측정**

[0040] 단백질분해효소(Protease) 활성은 발효물 5g에 0.02 M sodium phosphate buffer(pH 7.0) 45 mL을 첨가한 뒤 실온에서 진탕 후 원심분리(15,000 rpm, 15 min)하여 상등액으로부터 효소액을 조제한 다음 효소 활성을 측정하였다. 단백질분해효소(Protease) 활성은 Anson의 방법을 변형하여 측정하였다. 0.6% casein solution 0.35 mL을 기질로 하여 검액과 37℃에서 10분간 반응시킨 후 시험용과 공시험용 각각의 e-tube에 10배 희석한 효소액을 0.35 mL 넣은 후 37℃에서 10분간 반응시킨다. 0.44 M TCA 0.7 mL을 첨가하여 반응을 정지시키고, 단백질을 침전시킨 후 37℃에서 30분간 반응시킨 다음, 15,000 rpm에서 10분 동안 원심 분리하여 침전물을 제거하였다. 회수된 상등액 1 mL에 0.55 M Na₂CO₃ 2.5 mL과 3배 희석한 Folin reagent 0.5 mL을 혼합한 후 37℃ 항온수조에서 30분간 반응시켰다. 상온에서 냉각시킨 후 660 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이 반응 조건하에서 1분 동안 타이로신(tyrosine) 1 μg을 유리하는 효소량을 1 unit로 하였다. 공시험은 조효소액을 첨가하기 전에 0.44 M TCA를 넣은 후 동일하게 실시하였다.

[0041] **<실시에 2> 흑미강을 이용한 바실러스 서브틸리스 HA 균주 발효 최적화**

[0042] **1. 재료 및 방법**

[0043] 금중쌀에서 흑미강을 제공받아 실험을 진행하였다. 먼저 흑미강에 분순물을 제거하기 위해서 채를 친 다음 소분하여 냉장(5℃)에서 보관하여 사용하였다. 먼저 흑미강을 이용한 고초균 발효 제조 최적화를 하기 위하여 흑미강에 MSG 0, 3%, 울금 0, 2% 첨가하고, 수분을 미강 대비 100% (30 mL) 첨가하였다(도 1). Soymilk 배지에서 배양한 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*) HA균을 1% 접종 후, 42℃에서 1일간 정지배양 하여 흑미강 발효물을 제조하고 분석하였다.

[0044] **2. 결과 및 고찰**

[0045] (1) pH 및 산도 측정

- [0046] 흑미강의 발효 후 pH 및 산도는 도 2와 같다. 발효 전 흑미강의 pH는 초기 6.4였고, 발효 후 6.51로 pH 변화는 낮았다. 산도는 0일째에 0.38%에서 1일째에 최대 1.1%로 상승하는 경향을 보였다.
- [0047] (2) 생균수 측정
- [0048] 흑미강과 재료에 따른 발효 후 생균수는 도 3과 같다. 생균수는 초기 2.95×10^7 CFU/mL에서 발효 1일 째 BRB군에서 6.10×10^8 CFU/g으로 가장 높게 나타났다.
- [0049] (3) 점질물 함량 측정
- [0050] 흑미강과 재료에 따른 발효 후 점질물 함량은 도 4와 같다. 3가지 비교군 중 MSG 3% 첨가된 B+M이 11%로 가장 높았으며, BRB와 B+M+T는 점질물 함량이 각각 9.1%, 9.3%로 나타났다. B+M 시료군 에서 고초균의 생육으로 인한 생리활성물질인 점질물 함량과 단백질 가수분해 활성이 가장 높은 것으로 사료된다.
- [0051] (4) 타이로신(tyrosine) 함량 측정
- [0052] 흑미강과 재료에 따른 발효 후 타이로신 함량은 도 5와 같다. B+M 시료군에서 타이로신 함량이 355 mg%로 가장 높게 나타났으며, B+M+T 시료군에서는 329 mg%, BRB 시료군 에서는 298 mg%로 나타났다.
- [0053] <실시예 3> MSG 함량과 수분 함량에 따른 흑미강의 바실러스 서브틸리스 HA 균주 발효 제조 최적화
- [0054] 1. 재료 및 방법
- [0055] 흑미강 분말에 MSG를 0, 3% 첨가하고, 수분 함량을 흑미강 분말대비 100, 150, 200% 첨가한 후 121℃에서 15분 간 멸균하고 바실러스 서브틸리스(*B. subtilis*) HA 스타터(starter)를 고형분 대비 1% 접종하여 42℃에서 1일간 발효하였다(도 6).
- [0056] 2. 결과 및 고찰
- [0057] (1) pH 및 산도 측정
- [0058] 흑미강의 MSG 함량과 수분 함량에 따른 발효 후 pH 및 산도는 도 7과 같다. 발효 전 흑미강의 pH는 초기 6.4였고 발효 후 6.51로 pH 변화는 낮았다. 산도는 0일째에 0.38%에서 1일째에 최대 1.01%로 수분함량이 높아짐에 따라 산도가 감소하는 경향을 보였다.
- [0059] (2) 생균수 측정
- [0060] 흑미강의 MSG 함량과 수분 함량에 따른 발효 후 생균수는 도 8과 같다. 생균수는 초기 2.95×10^7 CFU/mL에서 발효 1일째 MSG 0% 수분 함량 150% 군에서 3.5×10^8 CFU/g으로 가장 높게 나타났다. 가장 낮은 군은 MSG 3% 수분 함량 100% 군에서 1.6×10^8 CFU/g으로 나타났다.
- [0061] (3) 점질물 함량 측정
- [0062] 흑미강의 MSG 함량과 수분 함량에 따른 발효 후 점질물 함량은 도 9와 같다. MSG 3%, 수분 함량 100% 조건이 11.2% 정도로 점질물 함량이 가장 높았으며, 반면에 MSG 0%, 수분 함량 200% 조건은 5.4% 정도로 가장 낮은 수치를 나타냈다. MSG 0, 3%군 모두에서 수분 함량이 높아짐에 따라 점질물 함량이 낮아지는 것을 확인하였다.
- [0063] (4) 타이로신(tyrosine) 함량 측정
- [0064] 흑미강의 MSG 함량과 수분 함량에 따른 발효 후 타이로신(tyrosine) 함량 측정은 도 10과 같다. 전체적으로 수분함량이 높아짐에 따라 타이로신(tyrosine) 함량이 낮아졌으며, 수분함량 100% 조건에서 MSG 0, 3%에서 모두 380 mg% 이상으로 가장 높게 나타났다. 수분 150% 조건은 각각 312 mg%와 303 mg%, 수분 200% 조건에서는 좀 낮은 수치인 283 mg%로 감소하는 경향이 나타났다.
- [0065] <실시예 4> 볶은 밀기울을 이용한 바실러스 서브틸리스 HA 균주 발효 최적화
- [0066] 1. 재료 및 방법
- [0067] 볶은 밀기울은 유스마일에서 구입하여 사용하였으며, 금종쌀의 흑미강과의 혼합발효를 하기 전, 볶은 밀기울에 단백질 성분인 MSG를 농도별로 첨가하여 실험하였다. 볶은 밀기울 30 g에 수분을 볶은 밀기울 대비 150%(45 mL)첨가하고, 전체 volume에서 MSG를 0-5% 첨가하고, soymilk 배지에서 배양한 바실러스 서브틸리스(*Bacillus*

subtilis) HA균을 1% 접종하여 42℃에서 3일간 정치 배양하여 붉은 밀기울 발효물을 비교분석 하였다(도 11).

2. 결과 및 고찰

(1) pH 및 산도 측정

MSG 농도에 따른 붉은 밀기울의 발효 후 pH, 산도는 도 12와 같다. 붉은 밀기울의 pH는 초기 6.2에서 발효 3일 8.4로 모든 MSG 구간에서 증가하였으며, 산도는 초기 0.6%에서 발효 2일 이후 크게 감소하여 MSG 1, 3, 5%는 약 0%로 나타났다.

(2) 생균수 측정

붉은 밀기울의 발효 후 생균수는 도 13과 같다. 생균수는 초기 2.95×10^7 CFU/mL에서 발효 1일째 MSG 5%에서 6.10×10^8 CFU/g으로 가장 높았으며, 발효 2일 이후 MSG 1-5% 첨가된 붉은 밀기울의 생균수가 2.45×10^7 - 3.6×10^8 CFU/g으로 감소하였다.

(3) 점질물 함량과 점조도 측정

붉은 밀기울의 점질물 함량은 모든 발효일수에서 MSG가 첨가될수록 점질물 함량이 높게 나타났으며, 발효 1일째에 모든 점질물 함량이 높게 나타났다. MSG 5% 첨가군에서 발효 1일째 11.5%로 점질물 함량이 가장 높게 나타났다(도 14). 점조도 또한 점질물과 유사하게 MSG 함량이 높아질수록 점조도가 높게 나타났으며, 발효 2일째 MSG 5% 첨가군에서 $5.82 \text{ Pa} \cdot \text{s}^n$ 으로 가장 높았다(도 14). 고초균의 붉은 밀기울 발효에서 MSG 함량이 증가함에 따라 글루탐산(Glutamic acid)을 이용하여 고분자 다당류의 생산이 높아짐을 확인하였다.

(4) 타이로신(Tyrosine) 함량과 단백질분해효소(Protease) 활성 측정

붉은 밀기울의 타이로신(Tyrosine) 함량과 단백질분해효소(Protease) 활성은 도 15와 같다. 타이로신 함량은 0일째 200 mg%에서 발효 3일째까지 계속해서 증가되었으며, 발효 3일째 MSG 0% 첨가군에서 722 mg%로 나타났다. 단백질분해효소 활성은 발효 1일째 MSG 모든 농도에서 가장 높은 활성을 보였으며, MSG 1% 첨가군에서 발효 1일째 86 unit/g으로 나타났다.

(5) 글루탐산(Glutamic acid) 소진율

붉은 밀기울의 발효시간에 따른 글루탐산(Glutamic acid) 소진량을 TLC를 이용하여 정성 분석하였다(도 16). 발효물은 10배 희석하여 분석하였으며, MSG 3% 이하의 발효 붉은 밀기울에서는 대부분의 글루탐산(Glutamic acid)이 소진되었다.

<실시예 5> 붉은 밀기울과 흑미강의 혼합 발효를 이용한 바실러스 서브틸리스 HA 균주 발효 최적화

1. 재료 및 방법

미강과 밀기울은 쌀과 밀의 식품 부산물로서, 이러한 식품 부산물은 동물의 사료, 퇴비 등에 많이 이용되어지고 있다. 이러한 식품 부산물로서 미강과 밀기울의 식품적 가치를 향상 시키기 위한 방법으로 고초균으로 발효를 통한 점질물, peptide 생성으로 영양 및 기능성이 강화된 고부가가치의 식품 소재를 얻고자 한다.

흑미강과 붉은 밀기울에 MSG 첨가 농도를 달리하여 실험을 하였을 때 MSG 5% 첨가군에서 기능성 다당류 및 단백질 가수분해가 높은 것으로 나왔지만 다시 한번 MSG 농도를 0%와 5%로 하고 붉은 밀기울에 금중쌀에서 제공받은 흑미강을 25, 50%첨가하여 실험을 진행하였다(흑미강: 붉은밀기울, 25:75, 50:50).

흑미강과 붉은밀기울 혼합물에 수분을 150% 첨가하고, 전체 volume에 MSG 0%, 5% 첨가하였다. 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*) HA 스타터(starter)를 1% 접종 후, 42℃에서 3일간 정치 배양하여 흑미강과 붉은 밀기울 혼합 발효물을 분석하였다(도 17).

2. 결과 및 고찰

(1) pH 및 산도 측정

흑미강과 붉은 밀기울 혼합 발효물의 pH, 산도는 도 18과 같다. 혼합 발효물의 pH는 MSG를 5% 첨가한 군과 첨가하지 않은 군에서 초기 6.2로 비슷한 경향을 보였다. 하지만 발효가 진행되면서 MSG를 5% 첨가한 군에서는 pH가 발효 3일차 까지 최대 8.3 까지 올라가는 경향을 보였고 MSG를 첨가하지 않은 군에서는 pH가 유지되는 경향을

보였다.

[0087] 산도는 발효 초기 모든 실험군에서 0.5% ~ 0.7% 까지 근소한 값을 나타냈고, MSG 5%를 첨가한 군은 산도가 급격하게 감소하는 경향을 보였고, MSG를 첨가하지 않은 군에서는 산도가 유지되는 것을 볼 수 있었다.

[0088] (2) 생균수 측정

[0089] 흑미강과 볶은 밀기울 혼합 발효물의 생균수는 도 19와 같다. MSG를 0% 첨가한 실험군에서는 발효 초기 2.95×10^7 CFU/g 에서 발효 1일차 2.00×10^8 CFU/g 과 8.50×10^7 CFU/g 으로 나타났고 발효 2일차에는 4.80×10^8 CFU/g 과 3.50×10^8 CFU/g 으로 나타났고, 발효 3일차에는 4.70×10^7 CFU/g 과 3.50×10^7 CFU/g 으로 발효가 3일차 까지 진행되면서 생균수가 증가하였다가 감소하는 경향을 보였다.

[0090] MSG를 5% 첨가한 실험군에서는 발효 초기 2.95×10^7 CFU/g에서 발효 1일차 3.80×10^8 CFU/g 과 1.70×10^8 CFU/g 으로 나타났고 발효 2일차에는 2.15×10^8 CFU/g 과 1.60×10^8 CFU/g 으로 나타났고 발효 3일차에는 5.15×10^7 CFU/g 과 5.05×10^7 CFU/g 으로 앞에 결과와 마찬가지로 발효가 3일차 까지 진행되면서 생균수가 증가 하였다가 감소하는 경향을 보였다.

[0091] (3) 점질물 함량 및 점조도 측정

[0092] 흑미강과 볶은 밀기울의 혼합 발효물의 점질물 함량과 점조도는 도 20과 같다. MSG를 첨가하지 않은 실험 군의 점질물 함량은 발효 1일차 6.8% 와 6.4% 로 가장 높게 나타났으며, 발효 2일차에서는 5.47% 와 5.73% 로 나타났고 발효 3일차에서는 2.87% 와 3.2% 로 나타났다 발효가 3일차까지 진행 되면서 점차 줄어드는 경향을 보였다. 또한 점조도는 초기에는 매우 낮은 0에 가까운 값을 나타내었고 발효가 3일차 까지 진행될 때까지 낮은 값을 계속 유지하는 경향을 보였다.

[0093] MSG를 5%를 첨가한 실험 군의 점질물 함량은 다음과 같다. 발효 1일차 6.87% 와 5.4% 로 가장 높게 나타났으며, 발효 2일차에서는 5.53%와 4.8%로 나타났고 발효 3일차에서는 4.93% 와 4.27% 로 나타났다. MSG를 첨가하지 않은 군과 비료를 해보았을 때 발효 1일차에서는 비슷한 값을 나타내는 경향이 보였고 발효가 진행될수록 떨어지는 경향을 보였다. 또한 점조도는 1일차에서 $2.41 \text{ Pa} \cdot \text{s}^n$ 과 $1.95 \text{ Pa} \cdot \text{s}^n$ 으로 나타났으며 2일차에서는 $3.34 \text{ Pa} \cdot \text{s}^n$ 과 $2.45 \text{ Pa} \cdot \text{s}^n$ 으로 나타났으며 발효 3일차에서는 $5.91 \text{ Pa} \cdot \text{s}^n$ 과 $3.19 \text{ Pa} \cdot \text{s}^n$ 으로 나타났다. 점조도는 점질물 함량의 경향과 반대로 발효 3일째 까지 계속하여 증가하는 경향을 보였다.

[0094] (4) 타이로신(Tyrosine) 함량과 단백질분해효소(Protease) 활성 측정

[0095] 흑미강과 볶은 밀기울의 타이로신(Tyrosine) 함량과 단백질분해효소(Protease) 효소활성은 도 21과 같다. MSG를 첨가하지 않은 실험 군에서의 타이로신 함량은 0일차에서 273 mg% 와 385 mg% 로 나타났고 발효가 진행되면서 점차 증가하는 경향을 보였다. 발효 3일차에서는 726 mg% 와 763 mg%으로 나타났다. 단백질분해효소 효소활성은 발효 1일차에서 39 unit/g 과 25 unit/g 으로 나타났고 발효 2일차에서는 56 unit/g 과 47 unit/g 으로 소폭 상승했다가 발효 3일차에서는 55 unit/g 과 45 unit/g 으로 하락하는 경향을 보였다.

[0096] MSG를 5% 첨가한 실험 군에서의 타이로신 함량은 0일차에서 308 mg% 와 412 mg% 로 나타났고 발효 1일차에서 372 mg% 와 496 mg% 로 나타났고 발효 2일차에서 594 mg% 와 645 mg% 로 나타났고 발효 3일차에서는 586 mg% 와 625 mg% 로 나타났다. MSG를 첨가하지 않은 군과 비교를 해보았을 때 비교적 높은 수치를 나타냈고 발효가 진행되면서 증가하는 경향을 보였다. 단백질분해효소 효소활성은 발효 1일차에서 19 unit/g 과 5 unit/g 으로 나타났고 발효 2일차에서는 22 unit/g 과 15 unit/g 으로 소폭 상승했다가 발효 3일차에서는 18 unit/g 과 11 unit/g 으로 하락하는 경향을 보였다. MSG를 첨가하지 않은 군과 비교를 해보았을 때 낮은 수치를 나타내는 경향을 보였다.

[0097] (5) 글루탐산(Glutamic acid) 소진율

[0098] 흑미강과 볶은 밀기울의 발효 시간에 따른 글루탐산(Glutamic acid) 소진량을 TLC를 이용하여 정성 분석 하였다 (도 22). 발효물은 20배 희석하여 분석하였으며, MSG를 첨가하지 않은 군에서는 소진율이 나타나지 않았고, MSG를 5% 첨가한 실험 군에서는 MSG가 미세하게 남아있지만 발효 2일차 까지는 대부분의 글루탐산(Glutamic acid) 이 소진되었다는 것을 알 수 있었다.

[0099] <실시예 6> 붉은 밀기울과 흑미강의 혼합 발효물을 이용한 국수 제조

[0100] 앞선 실험에서 흑미강과 붉은 밀기울을 비율(25:75 또는 50:50)에 따른 혼합 발효를 진행하였을 때 MSG 5%를 첨가한 군과 흑미강이 25%, 붉은 밀기울이 75% 들어간 조건이 가장 적당하다고 생각되어 발효 1일차까지의 발효물을 이용하여 국수를 제조하였다.

[0101] 제조 공정은 도 23과 같고, 제조 레시피는 표 1과 같다. 표 1에서 최종 선택된 발효물을 10% 와 20% 조건으로 나누어서 분석을 하였고, 비교군으로 일반적인 국수 반죽 레시피를 대조군으로 설정하여 실험을 진행하였다. 흑미강과 붉은 밀기울 혼합 발효물 첨가량은 전체 중력분 원료 대비 10%~20% 첨가하였는데, 20% 이상의 농도에서는 기호성이 감소하고, 가공적성이 부적합하였다.

표 1

	Control	10%	20%
Medium flour (g)	200	190	180
Fermentation product (g)	0	20	40
Water (mL)	90	80	70
Salt (g)	3	3	3

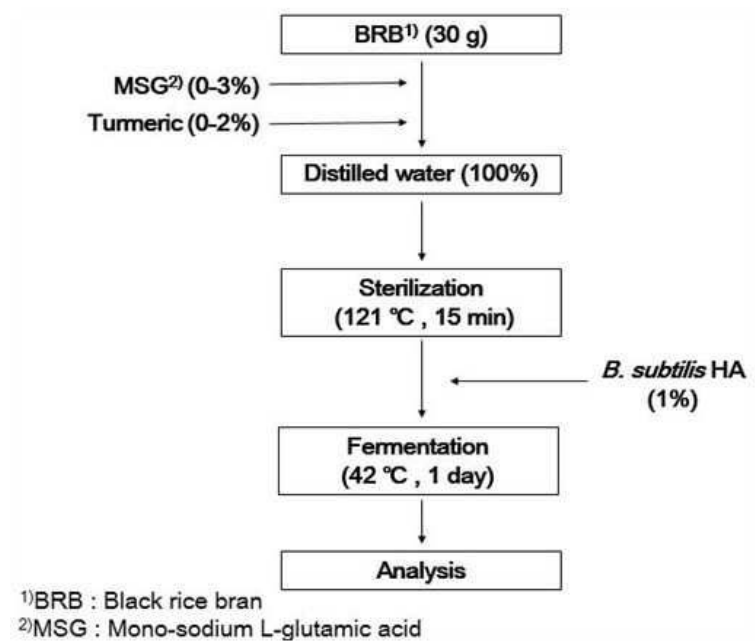
[0102]

[0103] 도 24에서 일반적인 국수와 발효물을 10% 와 20%를 첨가한 국수를 제조하여 삶기 전과 삶은 후로 나타내어 시각적인 효과를 알기 위해 사진으로 나타내었다. 삶기 전 보다 삶은 후가 색깔이 더 진해지고 어두워지는 것을 알 수 있었다.

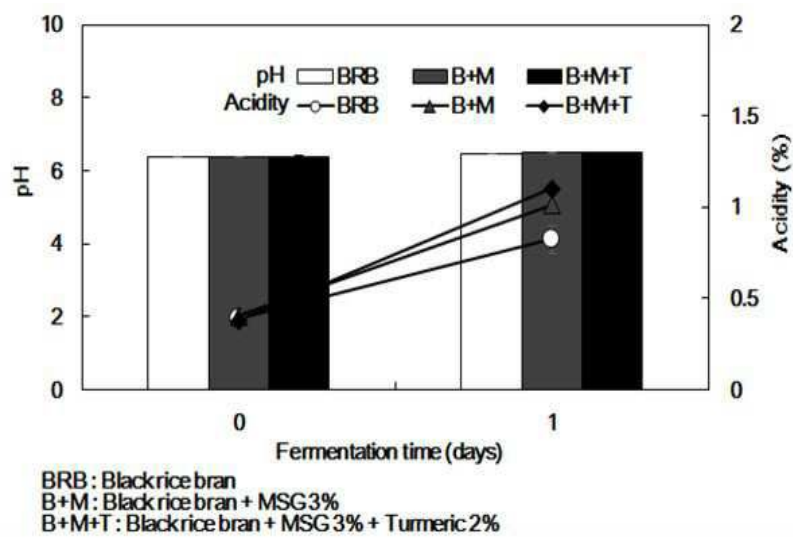
[0104] 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현 예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

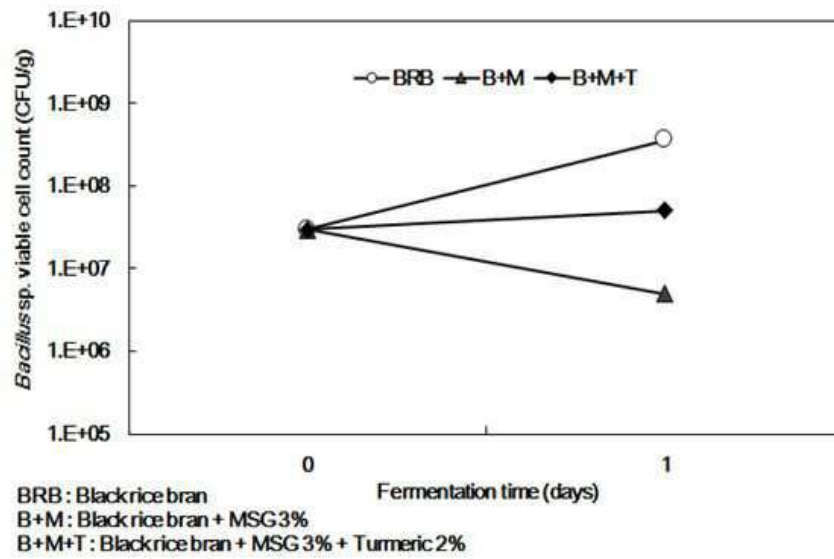
도면1



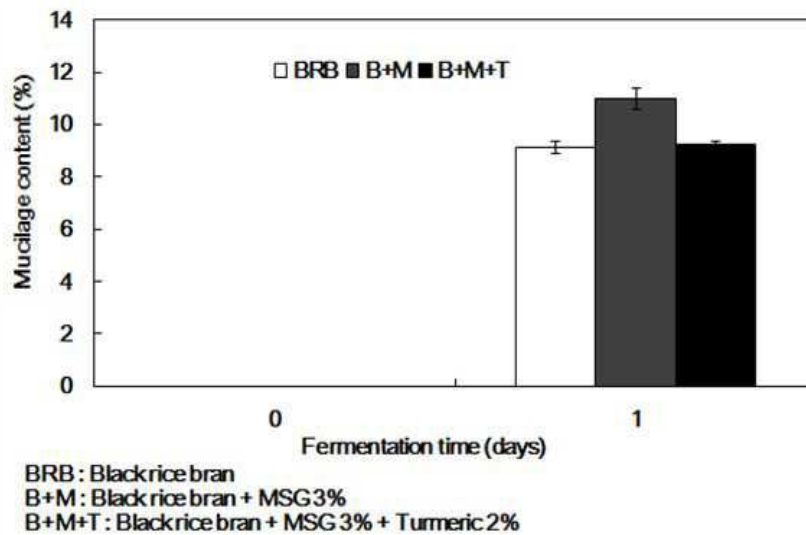
도면2



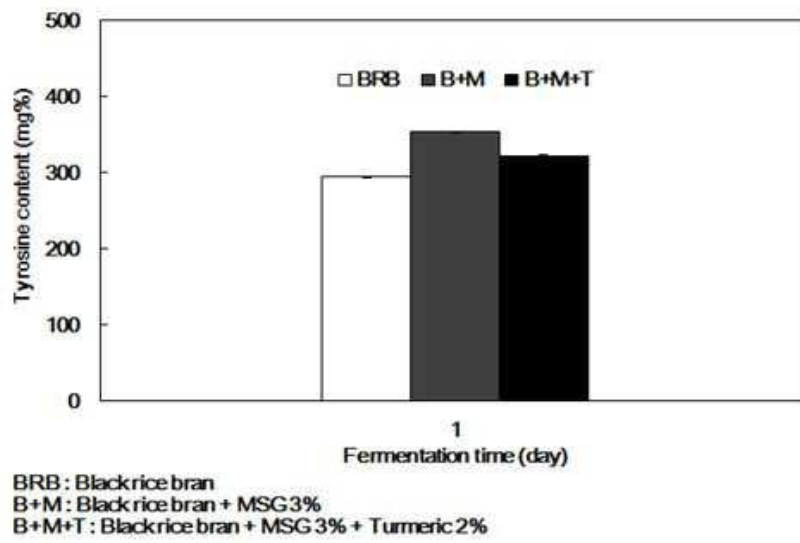
도면3



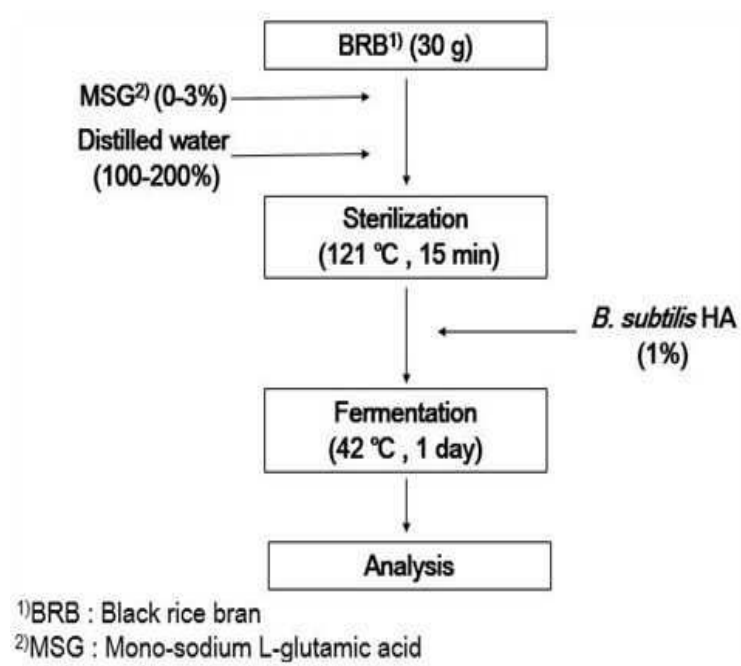
도면4



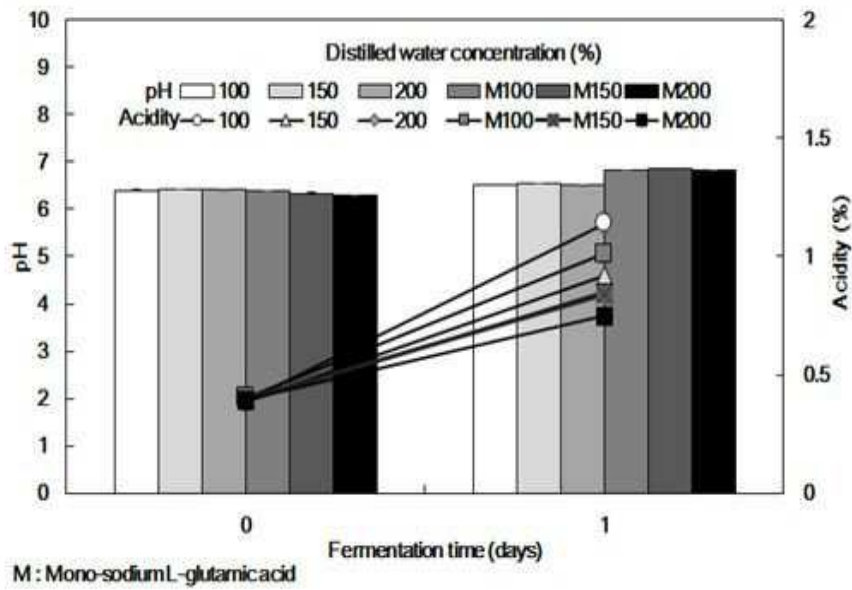
도면5



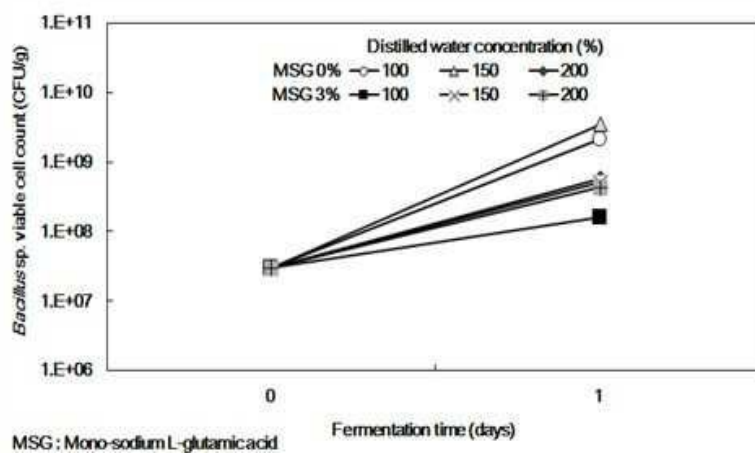
도면6



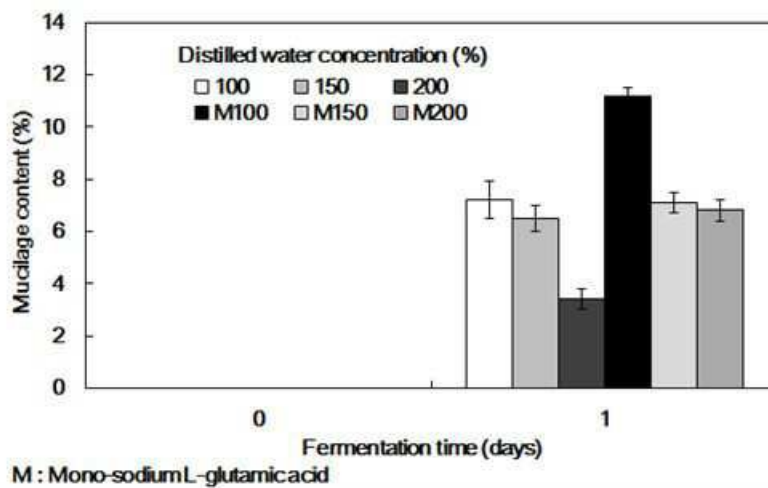
도면7



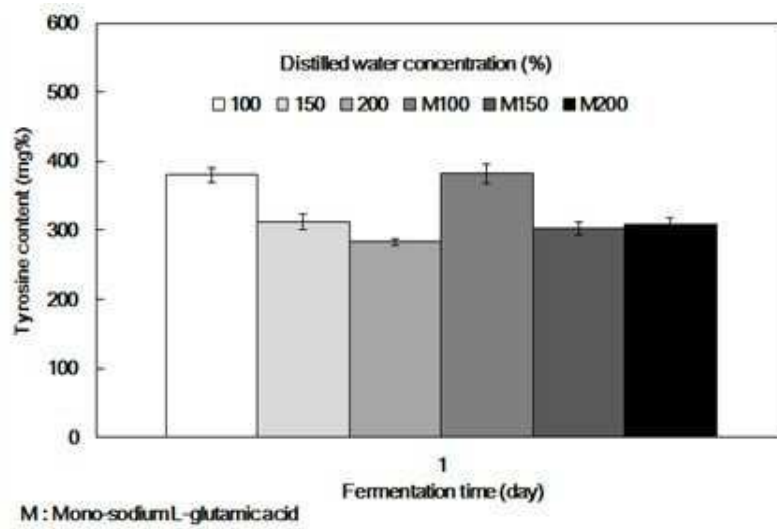
도면8



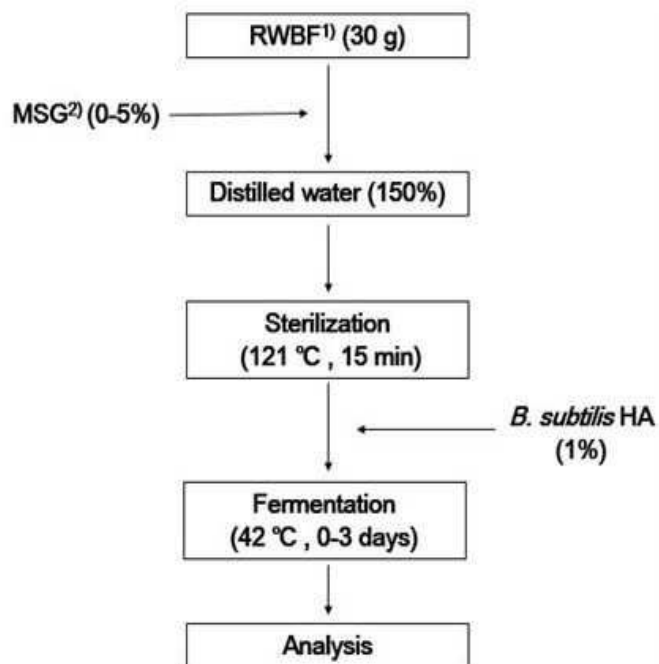
도면9



도면10



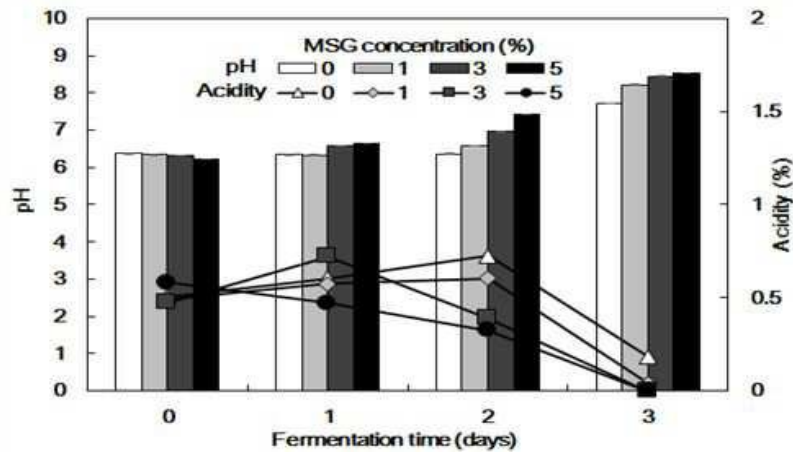
도면11



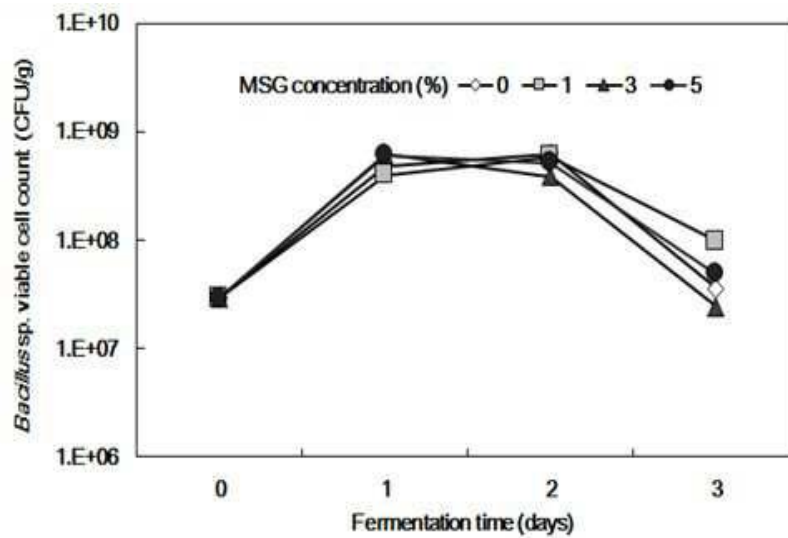
¹⁾RWBF : Roasted whet bran flour

²⁾MSG : Mono-sodium L-glutamic acid

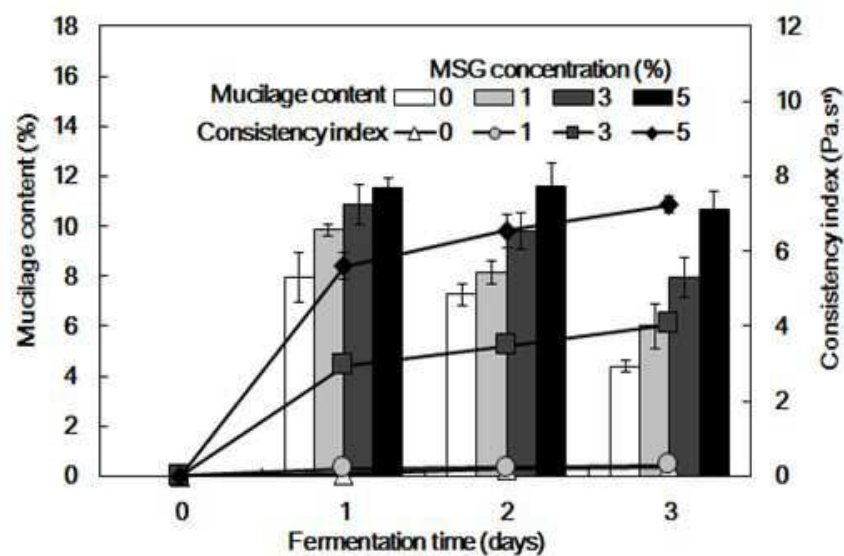
도면12



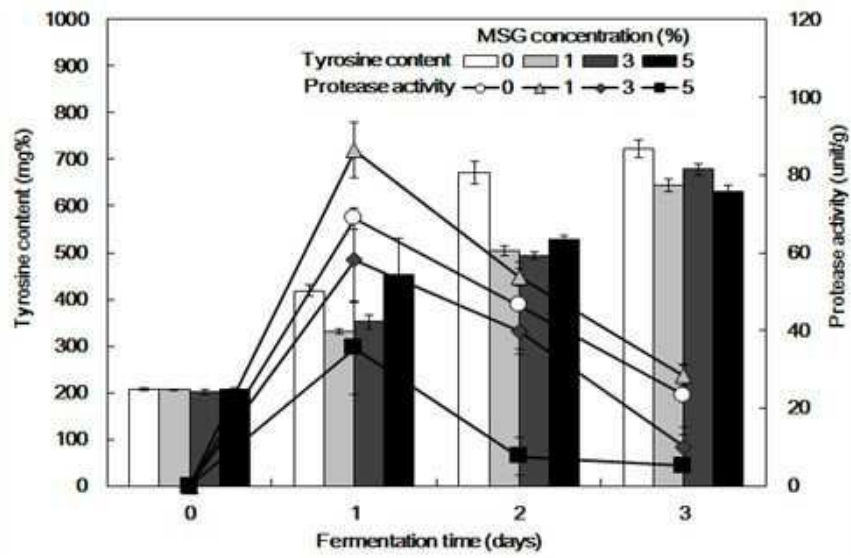
도면13



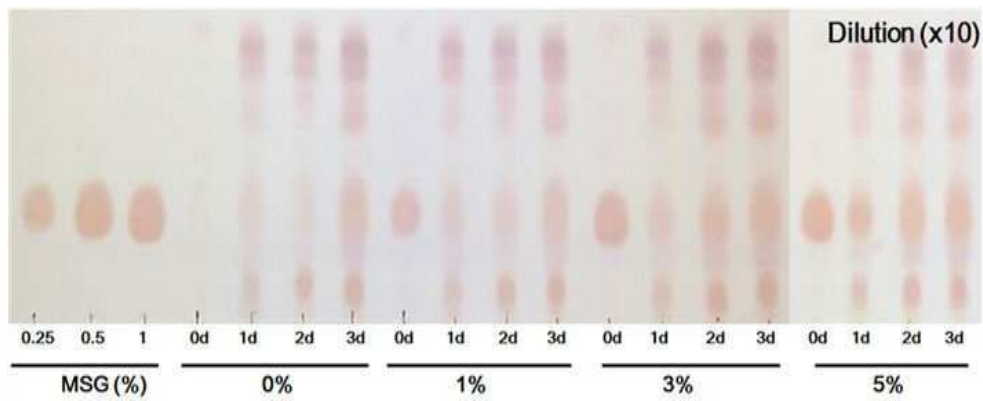
도면14



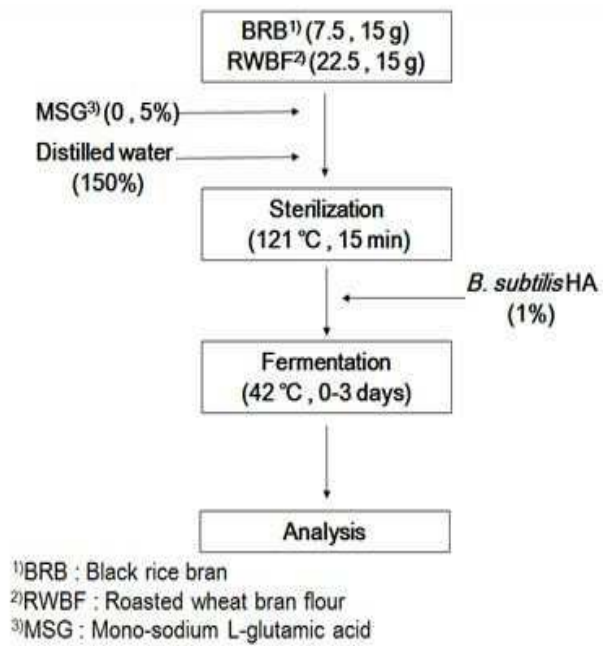
도면15



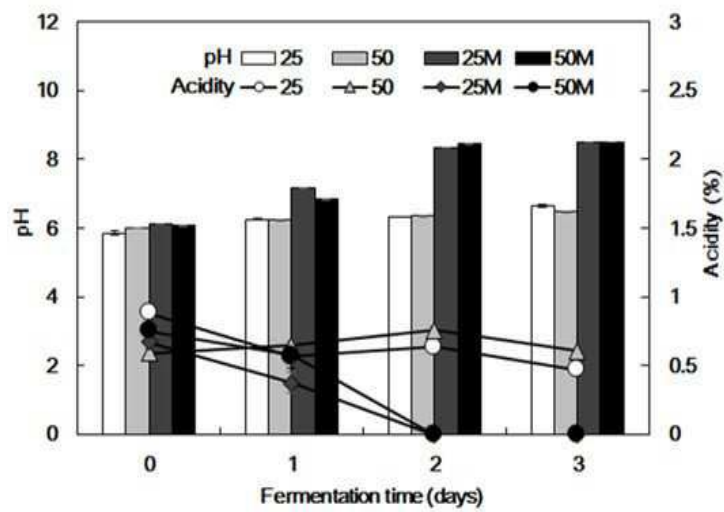
도면16



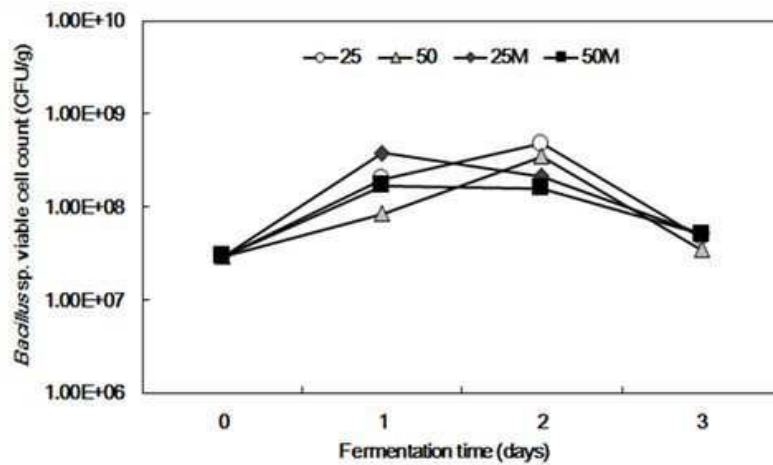
도면17



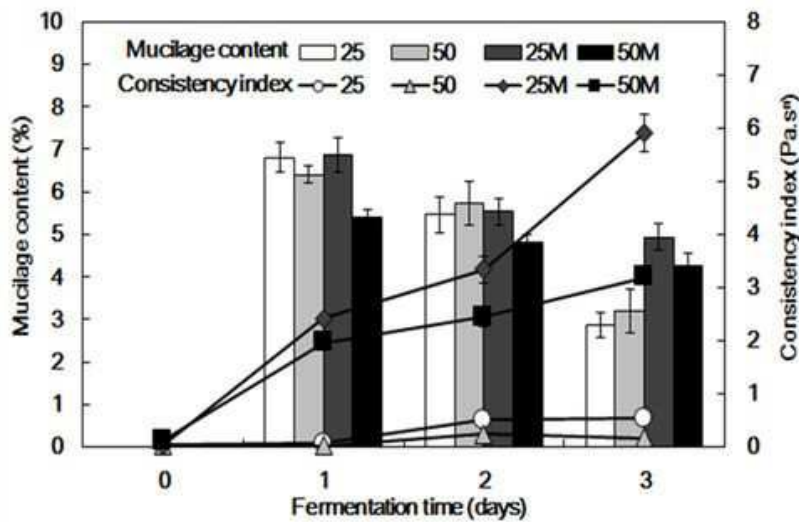
도면18



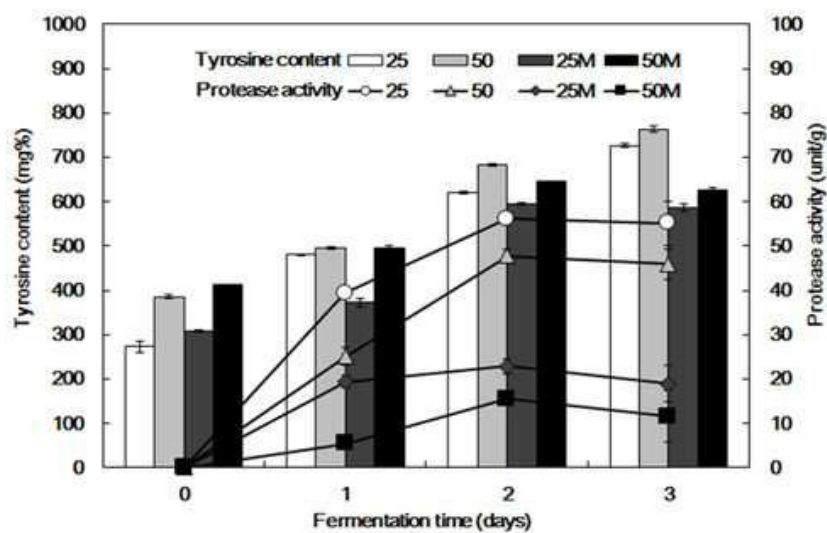
도면19



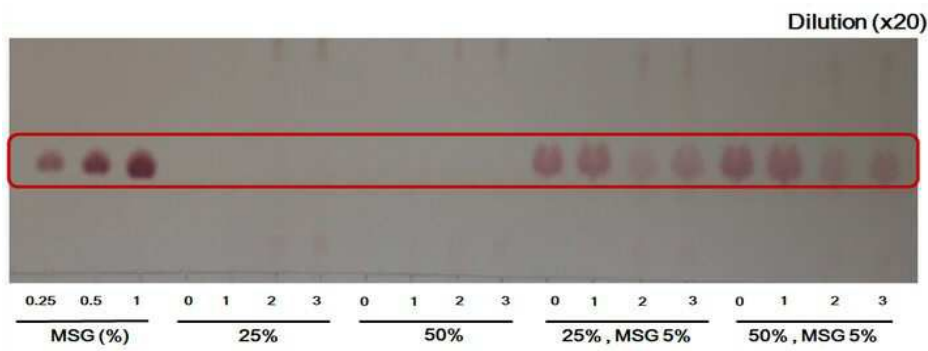
도면20



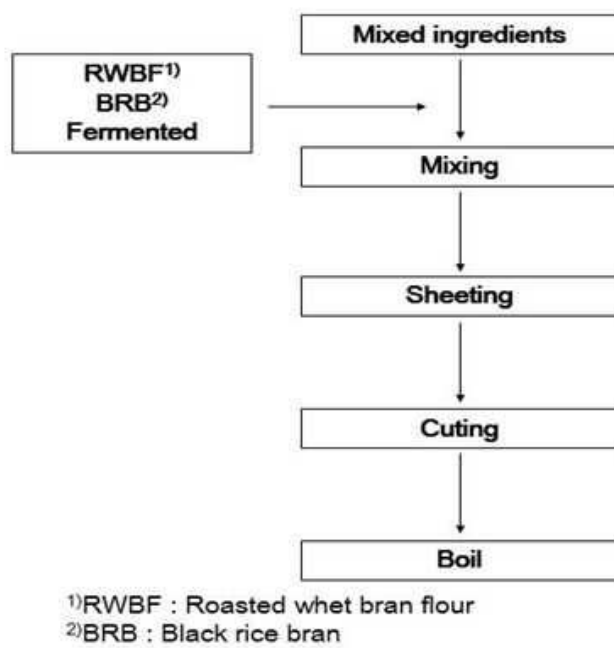
도면21



도면22



도면23



도면24

