



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2018년02월13일
 (11) 등록번호 10-1828494
 (24) 등록일자 2018년02월06일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A23L 2/38 (2006.01) *A23L 29/00* (2016.01)
A23L 33/00 (2016.01)
 (52) CPC특허분류
A23L 2/382 (2013.01)
A23L 29/065 (2016.08)
 (21) 출원번호 10-2016-0156190
 (22) 출원일자 2016년11월23일
 심사청구일자 2016년11월23일
 (56) 선행기술조사문헌
 KR1020150099630 A*
 KR1020160120875 A*
 KR1020090111920 A
 KR1020090041887 A
 *는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
주식회사 발효에스
 전라북도 익산시 왕궁면 동촌제길 110 ,식품벤처
 에프243호
 (72) 발명자
박종혁
 전라북도 전주시 덕진구 추탄로 61, 101동 304호
 (덕진동2가, 하가더루벤스아파트)
 (74) 대리인
노형식

전체 청구항 수 : 총 1 항

심사관 : 도현미

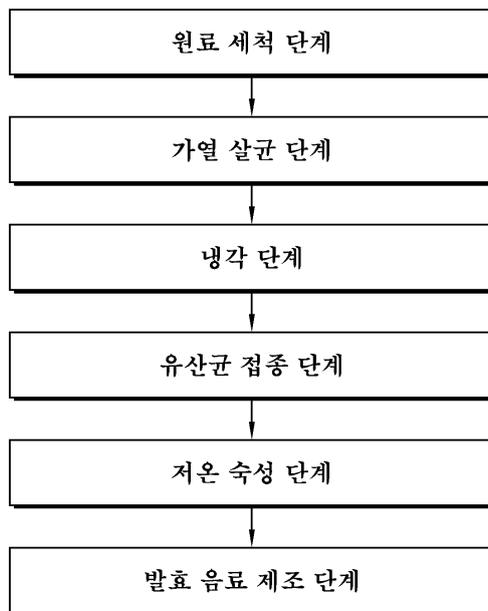
(54) 발명의 명칭 **유산균을 이용한 발효음료의 제조방법**

(57) 요약

본 발명은 유산균을 이용한 발효음료의 제조방법에 관한 것이다.

본 발명에 따른 유산균을 이용한 발효음료의 제조방법은 과일 및 채소의 원료를 준비한 후 세척하는 원료 세척 단계; 상기 세척된 원료를 가열하여 살균하는 가열 살균 단계; 상기 가열 살균된 원료를 냉각하는 냉각 단계; 상

(뒷면에 계속)
대표도 - 도2



기 냉각된 원료에 유산균주를 접종하는 유산균 접종 단계; 상기 유산균이 접종된 원료를 일정한 온도에서 숙성하는 저온 숙성 단계; 및 상기 숙성된 원료를 이용하여 발효음료를 제조하는 발효음료 제조 단계를 포함하되, 상기 가열 살균 단계는 90~100℃에서 20~60초 동안 가열하여 살균하고, 상기 냉각 단계는 상기 가열 살균된 과일 및 채소를 20 내지 30℃로 냉각하되, 상기 과일 및 채소는 가열 살균 단계를 거친 후 착즙하여 사용되며, 상기 저온 숙성 단계는 상기 유산균주가 접종된 과일 및 채소를 24 내지 26℃에서 3 내지 6일 동안 보관하여 숙성시킨다.

상기한 구성에 의해 본 발명은 전통 발효식품인 김치로부터 분리된 유산균을 이용하여 제조됨으로써 섭취시 내산성 및 내담즙성을 향상시켜 인체 면역 활성을 증진시키고 웰빙 식품에 대한 소비자의 기호도를 충족시킬 수 있다.

(52) CPC특허분류

- A23L 33/00* (2016.08)
- A23V 2002/00* (2013.01)
- A23Y 2220/03* (2013.01)
- A23Y 2220/67* (2013.01)
- A23Y 2260/00* (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

과일 및 채소의 원료를 준비한 후 세척하는 원료 세척 단계;
 상기 세척된 원료를 가열하여 살균하는 가열 살균 단계;
 상기 가열 살균된 원료를 냉각하는 냉각 단계;
 상기 냉각된 원료에 유산 균주를 접종하는 유산균 접종 단계;
 상기 유산균이 접종된 원료를 일정한 온도에서 숙성하는 저온 숙성 단계; 및
 상기 숙성된 원료를 이용하여 발효음료를 제조하는 발효음료 제조 단계를 포함하되,
 상기 가열 살균 단계는 90~100℃에서 20~60초 동안 가열하여 살균하고,
 상기 냉각 단계는 상기 가열 살균된 과일 및 채소를 20 내지 30℃로 냉각하되, 상기 과일 및 채소는 가열 살균 단계를 거친 후 착즙하여 사용되며,
 상기 저온 숙성 단계는 상기 유산 균주가 접종된 과일 및 채소를 24 내지 26℃에서 3 내지 6일 동안 보관하여 숙성시키고,
 상기 유산균 접종 단계는 발효음료 전체 함량 중에서 상기 유산 균주는 5~10중량% 포함되고, 상기 과일은 10~15 중량% 포함되며, 상기 채소는 5~10중량% 포함되고, 레몬액이 0.5~1중량% 포함되며,
 상기 유산 균주로는 락토바실러스 플란타럼(*Lactobacillus plantarum*), 류코노스톡 락티스(*Leuconostoc lactis*) 및 락토바실러스 아시도필루스(*Lactobacillus acidophilus*)로 이루어진 균에서 선택된 어느 하나 이상의 유산 균주가 사용되고,
 상기 유산균은 1N HCl을 이용하여 배지의 pH를 2.5~3.0으로 조정된 다음 김치로부터 유산 균주를 분리하고, MRS broth를 이용하여 37℃에서 24시간 동안 배양하여 활성화시킨 후 사용하되,
 상기 유산 균주를 MRS broth에 접종하여 37℃에서 24시간 배양시킨 후 1×1.0^8 CFU/mL이 되도록 희석시킨 후 10,000rpm에서 10분간 원심분리하여 상청액(supernatant)과 펠릿(pellet)으로 분리하고, 상기 상청액(Supernatant)은 0.45 μ m 시린지 필터(syringe filter)로 여과 후 멸균한 증류수를 이용하여 희석하여 사용하며,
 상기 펠릿(Pellet)은 멸균 증류수로 2회 세척한 후 증류수 1mL에 현탁하고, 100℃에서 30분 동안 열처리한 후 10,000rpm에서 10분간 원심분리하고, 상등액을 0.45 μ m 시린지 필터(syringe filter)로 여과 후 -80℃에서 보관하여 사용하는 것을 특징으로 하는 유산균을 이용한 발효음료의 제조방법.

청구항 2

삭제

청구항 3

삭제

청구항 4

삭제

발명의 설명

기술 분야

본 발명은 유산균을 이용한 발효음료의 제조방법에 관한 것으로서, 더욱 상세하게는 전통 발효식품인 김치로부터

[0001]

터 분리된 유산균을 이용하여 발효음료를 제조함으로써 섭취시 내산성 및 내담즙성을 향상시켜 인체 면역 활성을 증진시키고 웰빙 식품에 대한 소비자의 기호도를 충족시킬 수 있는 유산균을 이용한 발효음료의 제조방법에 관한 것이다.

배경 기술

- [0003] 일반적으로, 유산균은 오래전부터 요거트, 버터, 치즈와 같은 유가공 식품에서 중요한 역할을 담당하고 있으며, 유산균을 이용한 발효 식품은 특유의 풍미와 생성된 유산에 의한 우수한 보존성, 단백질의 부분 분해에 의한 소화 흡수성 향상 등 기호적, 영양적인 우수성을 나타내며 전 세계를 통하여 엄청난 시장 규모를 형성하고 있다.
- [0004] 특히, 장내 정상 세균총의 유지, 장내 이상 발효의 개선, 장내 부패균에 의해 생성되는 독성물질의 무독화 작용, 칼슘의 흡수 촉진 등 유산균의 다양한 기능적 작용과 변비, 고혈압, 피부염, 위장염 등의 증상에 효과가 밝혀짐으로써, 다양한 제품이 개발되고 있으며, 근래에는 다양한 유산균을 이용한 음료의 개발이 활발하게 진행되고 있다.
- [0005] 한편, 근래의 식생활은 생활수준의 급속한 향상으로 인해 고지방과 고단백질이 함유된 육류와 인스턴트 식품 등의 고칼로리를 가지는 식품의 섭취가 증가한 반면에, 채소나 섬유질을 함유하는 식품의 섭취가 감소함으로써 성인병과 비만 환자가 날로 증가하고 있다.
- [0006] 이러한 식습관에 기인하는 만성질환의 증가, 고령화 사회로의 진입, 식품의 유효성분에 의한 건강증진 효과 및 질병예방의 효과 등이 연구로 증명되면서 소비자들은 과거 식품이 갖는 영양소 공급을 위한 1차적 기능을 넘어 식품의 생리활성 측면에 대한 관심이 증대되고 있다.
- [0007] 최근 국내외적으로 비만 인구가 증가함에 따라 건강에 대한 관심이 증가하면서 일상적으로 섭취하는 식품에 함유되어 있는 생리활성 물질의 건강증진 및 만성질환의 예방효과에 대한 관심이 높아지면서 그에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다.
- [0008] 특히, 식품 섭취와 밀접하게 관련되어 있는 것으로 알려진 성인병(비만, 심장병 등)은 올바른 식품섭취에 의해서 예방할 수 있음이 밝혀지고 있으며, 치료제 개발보다는 심혈관계 발병을 억제, 예방하는 활성물질 및 식품소재 개발이 오히려 효과적인 것으로 인식되는 단계로, 이들에 대한 관심이 높아지고 있으며, 이와 함께 소비자들이 식품을 선택하는데 있어서도 다양한 변화가 나타나고 있다.
- [0009] 예를 들어, 최근 소득 및 생활수준의 향상으로 식생활이 변하고 있으며, 변화된 식생활에 따라 음식의 맛, 향, 색에 대해 관심이 고조될 뿐만 아니라 건강에 대한 관심이 고조되고 있는데, 이러한 변화된 식생활에 따라, 과일이나 채소를 이용한 다양한 가공식품들이 개발되고 시판되고 있다.
- [0010] 그러나 과일이나 채소에 들어있는 파이토케미컬(phytochemical)은 수확되는 순간부터 손실되기 시작하며, 특히 가열에 의한 가공처리시 대부분이 파괴되어 손실될 수 있다.
- [0011] 따라서 소비자가 수확된 과일이나 채소를 섭취할 때에는 영양가가 거의 없거나 효과가 반감된 상태로 섭취될 수 있고, 더욱이 특정한 색깔의 과일이나 채소만을 즐겨 먹는 소비자는 많은 양의 과일이나 채소를 섭취하여도 여전히 결핍되는 영양소가 있을 수밖에 없으므로, 과일이나 채소의 영양소 파괴를 최소화하기 위한 기능성 강화 발효 기술이 필요한 실정이다.
- [0012] 일 예로, 기호성, 저장성, 편리성 및 간편성을 향상시키고 동시에 유산균과 같은 인체에 유익한 균주를 이용하여 웰빙 식품, 예를 들어, 과일이나 야채에 이차 대사 과정을 통해 항균 물질 및 항산화 물질과 같은 기능성 물질을 생산하는 유산균을 접종하여 기능성 발효 음료를 개발하려는 노력이 있어 왔다.
- [0013] 그러나 이와 같이 기능성 물질을 생산하는 유산균을 이용한 발효음료는 특성상 멸균하여 유통할 수밖에 없으므로, 유통기간이 짧아 경제적인 측면에서 바람직하지 못한 실정이다.
- [0014] 따라서 기질 발효시 유산균의 생장을 촉진하고, 유산균의 발효 기능성을 향상시켜 유산균이 생산하는 이차 대사 과정을 통한 항균 물질이나 항산화 물질과 같은 기능성 물질의 생산을 극대화하며, 유통기간을 연장하고, 생산 효율을 향상시킬 수 있는 기능성 발효음료의 개발이 절실히 요구되고 있다.

선행기술문헌

특허문헌

- [0016] (특허문헌 0001) 국내등록특허 제10-0780030호(2007년 11월 21일 등록)
- (특허문헌 0002) 국내등록특허 제10-0435168호(2004년 05월 31일 등록)
- (특허문헌 0003) 국내등록특허 제10-1187227호(2012년 09월 25일 등록)

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0017] 본 발명은 전통 발효식품인 김치로부터 분리된 유산균을 이용하여 발효음료를 제조함으로써 섭취시 내산성 및 내담즙성을 향상시켜 인체 면역 활성을 증진시키고 웰빙 식품에 대한 소비자의 기호도를 충족시킬 수 있는 유산균을 이용한 발효음료의 제조방법을 제공하는데 있다.
- [0018] 또한, 본 발명은 유산균의 성장을 촉진하고, 유산균의 발효 기능성을 향상시켜 유산균이 생산하는 이차 대사 과정을 통한 항균 물질이나 항산화 물질과 같은 기능성 물질의 생산을 극대화하며, 유통기간을 연장하고, 생산 효율을 향상시킬 수 있는 유산균을 이용한 발효음료의 제조방법을 제공하는데 있다.
- [0019] 본 발명이 해결하고자 하는 다양한 과제들은 이상에서 언급한 과제들에 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 당업자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

과제의 해결 수단

- [0021] 본 발명에 따른 유산균을 이용한 발효음료의 제조방법은 과일 및 채소의 원료를 준비한 후 세척하는 원료 세척 단계; 상기 세척된 원료를 가열하여 살균하는 가열 살균 단계; 상기 가열 살균된 원료를 냉각하는 냉각 단계; 상기 냉각된 원료에 유산 균주를 접종하는 유산균 접종 단계; 상기 유산균이 접종된 원료를 일정한 온도에서 숙성하는 저온 숙성 단계; 및 상기 숙성된 원료를 이용하여 발효음료를 제조하는 발효음료 제조 단계를 포함하되, 상기 가열 살균 단계는 90~100℃에서 20~60초 동안 가열하여 살균하고, 상기 냉각 단계는 상기 가열 살균된 과일 및 채소를 20 내지 30℃로 냉각하되, 상기 과일 및 채소는 가열 살균 단계를 거친 후 착즙하여 사용되며, 상기 저온 숙성 단계는 상기 유산 균주가 접종된 과일 및 채소를 24 내지 26℃에서 3 내지 6일 동안 보관하여 숙성시킨다.
- [0022] 상기 유산균 접종 단계는 발효음료 전체 함량 중에서 상기 유산 균주는 5~10중량% 포함되고, 상기 과일은 10~15중량% 포함되며, 상기 채소는 5~10중량% 포함되고, 레몬액이 0.5~1중량% 포함될 수 있다.
- [0023] 상기 유산 균주로는 락토바실러스 플란타럼(*Lactobacillus plantarum*), 류코노스톡 락티스(*Leuconostoc lactis*) 및 락토바실러스 아시도필루스(*Lactobacillus acidophilus*)로 이루어진 균에서 선택된 어느 하나 이상의 유산 균주가 사용될 수 있다.
- [0024] 상기 유산균은 1N HCl을 이용하여 배지의 pH를 2.5~3.0으로 조정된 다음 김치로부터 유산 균주를 분리하고, MRS broth를 이용하여 37℃에서 24시간 동안 배양하여 활성화시킨 후 사용하되, 상기 유산 균주를 MRS broth에 접종하여 37℃에서 24시간 배양시킨 후 1×1.0^8 CFU/mL이 되도록 희석시킨 후 10,000rpm에서 10분간 원심분리하여 상청액(supernatant)과 펠릿(pellet)으로 분리하고, 상기 상청액(Supernatant)은 0.45μm 시린지 필터(syringe filter)로 여과 후 멸균한 증류수를 이용하여 희석하여 사용하며, 상기 펠릿(Pellet)은 멸균 증류수로 2회 세척한 후 증류수 1mL에 현탁하고, 100℃에서 30분 동안 열처리한 후 10,000rpm에서 10분간 원심분리하고, 상등액을 0.45μm 시린지 필터(syringe filter)로 여과 후 -80℃에서 보관하여 사용할 수 있다.
- [0025] 기타 실시 예들의 구체적인 사항들은 상세한 설명에 포함되어 있다.

발명의 효과

- [0027] 본 발명에 따른 유산균을 이용한 발효음료는 전통 발효식품인 김치로부터 분리된 유산균을 이용하여 제조됨으로써 섭취시 내산성 및 내담즙성을 향상시켜 인체 면역 활성을 증진시키고 웰빙 식품에 대한 소비자의 기호도를 충족시킬 수 있다.
- [0028] 또한, 본 발명에 따른 유산균을 이용한 발효음료는 유산균의 성장을 촉진하고, 유산균의 발효 기능성을 향상시켜 유산균이 생산하는 이차 대사 과정을 통한 항균 물질이나 항산화 물질과 같은 기능성 물질의 생산을 극대화

하며, 유통기간을 연장하고, 생산 효율을 향상시킬 수 있다.

[0029] 본 발명의 기술적 사상의 실시예는, 구체적으로 언급되지 않은 다양한 효과를 제공할 수 있다는 것이 충분히 이해될 수 있을 것이다.

도면의 간단한 설명

[0031] 도 1a 내지 도 1d는 본 발명에서 선택된 유산 균주의 Raw 264.7 세포 성장 억제 효과를 보여주는 그래프이다.
 도 2는 본 발명에 따른 유산균을 이용하여 발효음료를 제조하는 방법을 설명하기 위한 순서도이다.
 도 3은 본 발명에 따른 유산 균주 첨가량에 따른 pH의 변화를 나타내는 그래프이다.
 도 4는 본 발명에 따른 유산 균주 첨가량에 따른 산도의 변화를 나타내는 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0032] 본 발명의 이점 및 특징, 그리고 그것들을 달성하는 방법은 상세하게 후술되어 있는 실시예를 참조하면 명확해질 것이다. 그러나 본 발명은 여기서 설명되는 실시예들에 한정되지 않고 다른 형태로 구체화될 수도 있다. 오히려, 여기서 소개되는 실시예들은 개시된 내용이 철저하고 완전해질 수 있도록 그리고 당업자에게 본 발명의 사상이 충분히 전달될 수 있도록 하기 위해 제공되는 것이다.

[0033] 본 출원에서 사용한 용어는 단지 특정한 실시예를 설명하기 위해 사용된 것으로, 본 발명을 한정하려는 의도가 아니다. 단수의 표현은 문맥상 명백하게 다르게 뜻하지 않는 한, 복수의 표현을 포함한다.

[0034] 다르게 정의되지 않는 한, 기술적이거나 과학적인 용어를 포함해서 여기서 사용되는 모든 용어들은 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자에 의해 일반적으로 이해되는 것과 동일한 의미가 있다. 일반적으로 사용되는 사전에 정의되어 있는 것과 같은 용어들은 관련 기술의 문맥상 가지는 의미와 일치하는 의미가 있는 것으로 해석되어야 하며, 본 출원에서 명백하게 정의하지 않는 한, 이상적이거나 과도하게 형식적인 의미로 해석되지 않는다.

[0036] 이하, 본 발명에 따른 유산균을 이용한 발효음료의 제조방법에 대하여 상세하게 설명하기로 한다.

[0038] 본 발명에 따른 유산균을 이용한 발효음료는 전통 발효식품인 김치로부터 분리된 유산균을 이용하여 제조됨으로써 섭취시 내산성 및 내담즙성을 향상시켜 인체 면역 활성을 증진시키고 웰빙 식품에 대한 소비자의 기호도를 충족시킬 수 있다.

[0040] 1. 시료 및 측정 방법

[0041] (1) 유산 균주의 분리 및 전처리

[0042] 1) 유산 균주의 분리

[0043] 국내 전통 발효식품인 김치로부터 유산 균주를 분리하기 위하여 1N HCl을 이용하여 배지의 pH를 2.5~3.0으로 조정된 다음 김치로부터 유산 균주를 분리하였다.

[0044] 상기 분리된 유산 균주의 면역증진에 미치는 영향을 알아보기 위하여 마우스의 대식세포인 RAW 264.7 cell를 한국세포은행(Korea)에서 분양받아 이용하였고, 10% fetal bovine serum(FBS, Gibco, USA)과 100U/mL의 streptomycin/penicillin(Gibco, USA)을 첨가한 Dulbecco's Modified Eagle Medium(DMEM, Gibco, USA)을 이용하여 5% CO₂ incubator에서 37℃로 2~3일마다 계대배양 하면서 실험에 사용하였다. 유산균은 MRS broth(Oxoid, England)를 이용하여 37℃에서 24시간 동안 배양하여 활성화시킨 후 실험에 사용하였다.

[0046] 2) 유산 균주의 전처리

[0047] 유산 균주를 MRS broth에 접종하여 37℃에서 24시간 배양시킨 후 1 × 1.0⁸ CFU/mL이 되도록 희석시킨 후 10,000rpm에서 10분간 원심분리하여 상청액(supernatant)과 펠릿(pellet)으로 분리하였다. 상기 상청액(Supernatant)은 0.45μm 시린지 필터(syringe filter)로 여과 후 멸균한 증류수를 이용하여 희석하여 시료로 사용하였다.

[0048] 펠릿(Pellet)은 멸균 증류수로 2회 세척한 후 증류수 1mL에 현탁하고, 100℃에서 30분 동안 열처리한 후 10,000rpm에서 10분간 원심분리하였고, 상등액을 0.45μm 시린지 필터(syringe filter)로 여과 후 -80℃에서 보

관하면서 시료로 사용하였다.

[0050] (2) 세포 생존능 측정

[0051] 유산균주의 배양액과 균체 파쇄액이 Raw 264.7 cell의 성장에 미치는 영향을 측정하였다. 96 well plate에 4×10^4 cells/well의 수로 계대배양 하여 24시간 동안 안정화시킨 후 각각의 시료를 처리하여 24시간 동안 반응시켰다. 그 후 PrestoBlue™ 시약(Invitrogen, USA)을 10 μ l씩 첨가하여 37 $^{\circ}$ C에서 20분 동안 반응시킨 후 ELISA reader(DYEX, USA)를 이용하여 570nm(reference 600nm)에서 흡광도를 측정하였다. 시료를 처리하지 않은 대조군의 흡광도를 100%로 하여 세포 증식정도를 나타내었다.

[0053] (3) NO 생성 억제능 측정

[0054] LPS(sigma, USA) 자극으로 활성화된 Raw 264.7 cell에서 유산균주의 배양액과 균체 파쇄액이 NO 생성에 미치는 영향을 측정하였다. 96 well plate에 4×10^4 cells/well의 수로 계대배양 하여 24시간 동안 안정화시켰다. 각각의 시료를 처리하고 2시간 후 LPS를 1 μ g/ml의 농도로 처리하여 24시간 동안 배양하였다.

[0055] 24시간 후 상등액 100 μ l에 동량의 그리스 시약(Griess reagent)(Promega, USA)을 첨가하여 실온에서 20분 동안 방치한 후 ELISA reader로 530nm에서 흡광도를 측정하였다. NO의 농도는 질산나트륨(Sodium nitrate)을 이용하여 표준곡선을 작성하여 계산하였다.

[0057] (4) 분리된 유산균주의 내산성 및 내담즙성 측정

[0058] 1N HCl를 사용하여 pH 2.5로 조정된 MRS 액체배지를 사용하였다. 김치에서 분리된 유산균을 37 $^{\circ}$ C MRS 액체배지에서 24시간 배양시킨 후 15ml 튜브(tube)에 넣고 4000rpm에서 15분간 원심분리 후 상등액을 버리고 균을 회수하였다. pH를 조정된 MRS 액체배지 10ml에 회수한 균 1%를 접종하여, 37 $^{\circ}$ C에서 2시간 배양한 후 생균수를 측정하였다.

[0059] 내담즙성 시험은 Bacto oxgall(Difco)의 농도를 0.3%가 되도록 MRS 액체배지에 가하여 상기와 같은 방법으로 37 $^{\circ}$ C에서 4시간 배양한 후 생균수를 측정하였다.

[0061] 2. 측정 결과

[0062] (1) 김치로부터 발효 유산균의 분리 결과

[0063] 국내 전통 발효식품인 김치로부터 유산균주를 분리하기 위하여 1N HCl을 이용하여 배지의 pH를 2.5~3.0으로 조정된 다음 김치로부터 유산균주를 분리하였다.

[0064] 상기 김치에서 분리된 유산균주는 총 5종이었으며, 균주명은 락토바실러스 쿠르바투스(*Lactobacillus curvatus*), 바이셀라 비리데센스(*Weissella viridescens*), 락토바실러스 플란타럼(*Lactobacillus plantarum*), 류코노스톡 락티스(*Leuconostoc lactis*), 락토바실러스 아시도필루스(*Lactobacillus acidophilus*)와 같이 공지된 균주가 분리된 것으로 판명되었다.

표 1

김치로부터 분리된 유산균주의 동정 결과

Strain	16S rRNA sequence	
	Homology(%)	Scientific name
1	99	락토바실러스 쿠르바투스(<i>Lactobacillus curvatus</i>)
2	99	바이셀라 비리데센스(<i>Weissella viridescens</i>)
3	99	락토바실러스 플란타럼(<i>Lactobacillus plantarum</i>)
4	99	류코노스톡 락티스(<i>Leuconostoc lactis</i>)
5	99	락토바실러스 아시도필루스(<i>Lactobacillus acidophilus</i>)

Strain		Contig summary												
1	Query		Subject				Score				Identities			
	Start	End	Description	AC	Length	Start	End	Bit	Raw	EV	Match	Total	Pct.(%)	Strand
	5	1495	Lactobacillus casei gene for 16S rRNA, partial sequence, strain JCM2086	AB000090.1	1534	17	1506	27.0	1462	0.0	1490	1490	96	Plus/Plus
2	Query		Subject				Score				Identities			
	Start	End	Description	AC	Length	Start	End	Bit	Raw	EV	Match	Total	Pct.(%)	Strand
	8	1512	Wigglesella vitibrevia gene for 16S rRNA, partial sequence, strain JCM2949	AB00106.1	1503	1	1495	26.7	1415	0.0	1494	1505	96	Plus/Plus
3	Query		Subject				Score				Identities			
	Start	End	Description	AC	Length	Start	End	Bit	Raw	EV	Match	Total	Pct.(%)	Strand
	1	1499	Lactobacillus plantarum subsp. plantarum gene for 16S rRNA, partial sequence, strain JCM2279	AB004179.1	1525	19	1504	27.0	1476	0.0	1496	1490	96	Plus/Plus
4	Query		Subject				Score				Identities			
	Start	End	Description	AC	Length	Start	End	Bit	Raw	EV	Match	Total	Pct.(%)	Strand
	1	1499	Leuconostoc gelidum strain DAAL70003 16S ribosomal RNA, gene, partial sequence	JCM07111.1	1547	49	1525	25.6	1464	0.0	1476	1480	96	Plus/Plus
5	Query		Subject				Score				Identities			
	Start	End	Description	AC	Length	Start	End	Bit	Raw	EV	Match	Total	Pct.(%)	Strand
	8	1477	Lactobacillus acidophilus gene for 16S rRNA, partial sequence, strain JCM2114	AB000049.1	1507	6	1497	26.2	1414	0.0	1499	1492	96	Plus/Plus

[0068]

[0069] (2) 분리 유산 균주의 *in vitro* 면역 활성 결과

[0070] 분리된 유산 균주의 면역활성은 유산 균주 배양액 및 균체에 의한 Raw 264.7 세포 생존능력과 NO 생성 억제능을 확인하였다.

[0071] 유산균은 1차적으로 MRS broth에서 배양하였고, 실험원료는 배양액과 유산균체를 분리하여 사용하였다.

[0072] 도 1a 내지 도 1d는 본 발명에서 선택된 유산 균주의 Raw 264.7 세포 성장 억제 효과를 보여주는 그래프이다.

[0073] 도 1a 내지 도 1d를 참조하면, 배양액은 모든 실험구에서 10배 희석시 Raw 264.7 세포의 성장을 억제하는 것으로 나타난 반면, 1000배 이상 희석한 배양액에서는 Raw 세포의 성장을 억제하지 않는 것으로 나타났다. 따라서 Raw 264.7 세포에 독성이 나타나지 않는 1000배 희석한 배양액을 이용하여 NO 생성억제에 미치는 영향을 측정하기로 결정하였다.

[0074] 유산균체에 대한 면역활성을 확인하기 위하여 열처리한 균체 추출액을 Raw 세포에 처리하여 세포 생존능을 측정하였다. 모든 실험구에서 Raw 264.7 세포의 성장을 억제하지 않는 것으로 나타났으며, 락토바실러스 플란타럼 (*Lactobacillus plantarum*), 류코노스톡 락티스(*Leuconostoc lactis*)와 락토바실러스 아시도필루스 (*Lactobacillus acidophilus*)는 대조구 대비 약 13%, 11% 및 14% 정도 Raw 264.7 세포의 성장을 촉진하는 경향을 보였다.

[0075] 락토바실러스 플란타럼(*Lactobacillus plantarum*), 류코노스톡 락티스(*Leuconostoc lactis*)와 락토바실러스 아시도필루스(*Lactobacillus acidophilus*)의 배양액 및 균체에 의한 Raw 264.7 세포의 NO 생성 억제능을 측정하였으며, 대식세포인 Raw 264.7 세포에 LPS를 처리하여 NO 생성을 유도한 후 락토바실러스 플란타럼 (*Lactobacillus plantarum*), 류코노스톡 락티스(*Leuconostoc lactis*)와 락토바실러스 아시도필루스 (*Lactobacillus acidophilus*)의 배양액과 균체가 NO 생성을 20, 15 및 30% 억제함을 확인하였다.

[0077] (3) 분리된 유산균의 내산성 및 내담즙성 결과

[0078] 유산균은 유산이 생성된 산성환경의 배양액에서 사멸률이 증가하며, 사람이 섭취하였을 때 인체의 위에서 머무는 동안 염산(HCl)이 0.4~0.5%(0.1N HCl 정도) 함유되어 있고, 총 산도가 0.45~0.6%에 달하는 위액과 접촉하게 된다. 위액의 pH는 시간에 따라 변하는데 공복 시에는 1.8에서 식후 5로 상승한다.

[0079] 따라서 유산균을 섭취한 후 장까지 도달하기 위해서는 위산에 대한 내성이 있어야 하므로, 선택된 3종, 즉 락토바실러스 플란타럼(*Lactobacillus plantarum*), 류코노스톡 락티스(*Leuconostoc lactis*)와 락토바실러스 아시도필루스(*Lactobacillus acidophilus*) 유산균의 내담즙성 및 내산성 분석하였다.

[0080] 하기의 [표 2] 및 [표 3]을 참조하면, 선택된 유산 균주의 분석 결과, 상기 락토바실러스 플란타럼

(*Lactobacillus plantarum*), 류코노스톡 락티스(*Leuconostoc lactis*)와 락토바실러스 아시도필루스(*Lactobacillus acidophilus*)의 내산성은 각각 82, 78 및 77%이었고, 내담즙성은 각각 78, 77 및 82%인 것으로 나타났다.

표 2

분리된 유산 균주의 내산성 결과(log/mL)

구분	락토바실러스 플란타럼 (<i>Lactobacillus plantarum</i>)	류코노스톡 락티스 (<i>Leuconostoc lactis</i>)	락토바실러스 아시도필루스 (<i>Lactobacillus acidophilus</i>)
배양 전	8.0	6.7	7.3
배양 후	6.56	5.23	5.6
생존율(%)	82	78	77

표 3

분리된 유산 균주의 내담즙성 결과(log/mL)

구분	락토바실러스 플란타럼 (<i>Lactobacillus plantarum</i>)	류코노스톡 락티스 (<i>Leuconostoc lactis</i>)	락토바실러스 아시도필루스 (<i>Lactobacillus acidophilus</i>)
배양 전	8.0	6.7	7.3
배양 후	4.99	5.16	5.99
생존율(%)	78	77	82

3. 발효음료 제조 및 실험 평가

(1) 분리된 유산 균주를 이용한 과일 및 채소 발효음료 제조

상기 분리된 유산 균주를 이용한 과일 및 채소 발효음료는 도 2에 도시된 바와 같은 제조공정으로 제조하였다. 도 2는 본 발명에 따른 유산균을 이용하여 발효음료를 제조하는 방법을 설명하기 위한 순서도이다.

도 2를 참조하면, 본 발명에 따른 유산균을 이용한 발효음료의 제조방법은 (1) 과일 및 채소의 원료를 준비한 후 세척하는 원료 세척 단계, (2) 상기 세척된 원료를 가열하여 살균하는 가열 살균 단계, (3) 상기 가열 살균된 원료를 냉각하는 냉각 단계, (4) 상기 냉각된 원료에 유산 균주를 접종하는 유산균 접종 단계, (5) 상기 유산균이 접종된 원료를 일정한 온도에서 숙성하는 저온 숙성 단계, 및 (6) 상기 숙성된 원료를 이용하여 발효음료를 제조하는 발효음료 제조 단계를 거쳐 제조된다.

상기 원료 세척 단계에서 준비되는 과일 및 채소로는 예를 들어, 사과 및 비트가 사용될 수 있다.

상기 가열 살균 단계는 상기 준비된 과일 및 채소를 가열하여 살균할 수 있는데, 예를 들어, 상기 사과 및 비트는 90~100℃에서 20~60초 동안 가열하여 살균할 수 있다.

상기 냉각 단계는 상기 가열 살균된 과일 및 채소를 20 내지 30℃로 냉각하는 단계인데, 예를 들어, 상기 사과 및 비트는 가열 살균 단계를 거친 후 착즙하여 사용될 수 있다.

상기 유산균 접종 단계는 상기 과일 및 채소에 유산 균주를 접종하는 단계인데, 발효음료 전체 함량 중에서 상기 유산 균주는 5~10중량% 포함되고, 상기 과일은 10~15중량% 포함되며, 상기 채소는 5~10중량% 포함되고, 레몬액이 0.5~1중량% 포함되도록 할 수 있다. 상기 유산균 접종 단계에서 상기 유산 균주로는 락토바실러스 플란타럼(*Lactobacillus plantarum*), 류코노스톡 락티스(*Leuconostoc lactis*) 및 락토바실러스 아시도필루스(*Lactobacillus acidophilus*)로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상의 유산 균주가 사용될 수 있다.

상기 저온 숙성 단계는 상기 유산 균주가 접종된 과일 및 채소를 24 내지 26℃에서 3 내지 6일 동안 보관하여 숙성시키는 단계이다. 상기 저온 숙성 단계는 유산 균주로 과일 및 채소를 발효시킴으로써, 유산균의 성장을 촉진하고, 유산균의 발효 기능성을 향상시켜 유산균이 생산하는 이차 대사 과정을 통한 향균 물질이나 향산화 물질과 같은 기능성 물질의 생산을 극대화할 수 있다.

한편, 본 발명의 기술적 사상의 일 실시예에서는 과일과 채소로 사과와 비트를 일 예로 들어 설명하였는데, 본 발명의 기술적 사상은 상기 사과와 비트에 한정되는 것은 아니고 다양한 종류의 과일 및 채소에 락토바실러스

플란타럼(*Lactobacillus plantarum*), 류코노스톡 락티스(*Leuconostoc lactis*) 및 락토바실러스 아시도필루스(*Lactobacillus acidophilus*)로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상의 유산 균주를 상기한 방법으로 접종하여 발효음료를 제조하는 것을 포함한다.

[0099] (2) 분리된 유산 균주를 이용한 과일 및 채소 발효음료 실험 평가

[0100] 분리된 3종의 유산 균주, 즉 락토바실러스 플란타럼(*Lactobacillus plantarum*), 류코노스톡 락티스(*Leuconostoc lactis*)와 락토바실러스 아시도필루스(*Lactobacillus acidophilus*)와 과일 및 채소의 발효 특성을 확인하기 위하여 분리된 3종의 유산 균주 첨가량에 따른 총 유산균 수를 측정하였으며, 하기의 [표 4]를 참조하면, 첨가 농도는 5~10중량%로 결정하였다.

표 4

[0102] 분리된 유산 균주 첨가 농도에 따른 과일 및 채소 발효음료의 유산균 수

첨가 농도(중량%)	유산균 수(CFU/mL)	비고
5	9.15×10^8	72시간 배양 후 측정 결과
7.5	6.10×10^9	
10	5.40×10^9	

[0104] (3) 유산 균주 첨가량에 따른 pH의 변화 평가

[0105] 도 3은 본 발명에 따른 유산 균주 첨가량에 따른 pH의 변화를 나타내는 그래프이고, 도 4는 본 발명에 따른 유산 균주 첨가량에 따른 산도의 변화를 나타내는 그래프이다.

[0106] 도 3 및 도 4를 참조하면, 분리된 유산 균주 첨가 농도에 따른 발효음료의 pH 및 산도의 변화는 모든 실험구에서 발효시간이 증가할수록 pH가 감소하였으며, 유산균의 증식, 발효시간에 따른 pH 및 산도의 변화는 일정하게 감소하였으며, 이에 따라 본 발명에 따라 분리된 유산 균주를 발효음료에 적용 가능한 것으로 판단된다.

[0108] (4) 관능 평가

[0109] 상기와 같이 유산 균주를 이용하여 제조된 발효음료에서 분리된 유산 균주 첨가 농도에 따른 발효음료의 향, 색, 맛, 전체적인 기호도 등에 대하여 관능 평가를 실시하였으며, 그 결과를 아래 [표 6]에 나타내었다.

[0110] 관능시험은 식품관련 전문가 및 일반 소비자 25명을 대상으로 하여 실시하였고, 점수 및 평가 기준은 5점 채점법을 이용하였으며, 아래 [표 5]에 나타내었다.

표 5

[0112] 점수 및 평가 기준

점수	평가 기준
5	매우 좋음
4	좋음
3	보통
2	나쁨
1	매우 나쁨

표 6

[0114] 결과

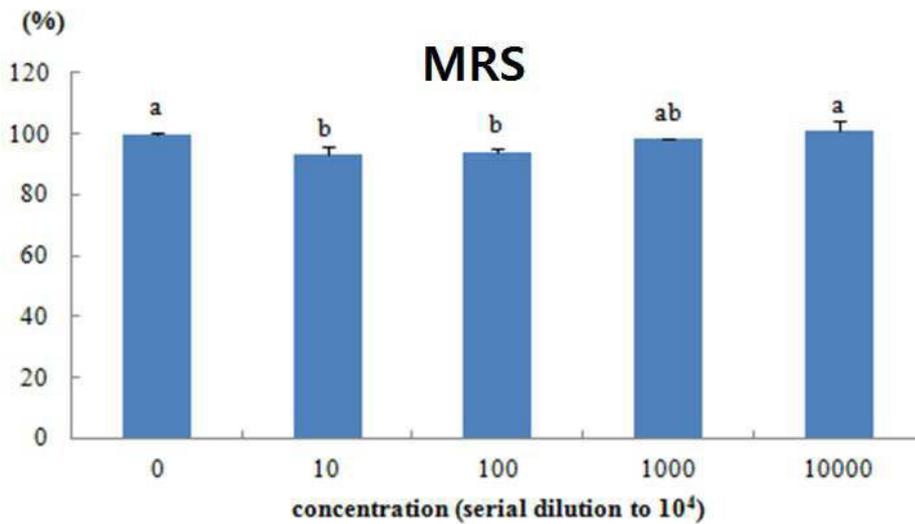
첨가 농도(중량%)	향	색	맛	전체적인 기호도
0	3.8 ± 0.38	3.3 ± 0.92	3.7 ± 0.77	3.8 ± 0.46
5	3.8 ± 0.65	3.6 ± 0.33	3.9 ± 0.25	4.0 ± 0.61
7.5	3.7 ± 0.51	4.1 ± 0.17	4.2 ± 0.64	4.3 ± 0.51
10	3.3 ± 0.94	4.5 ± 0.37	4.1 ± 0.18	4.2 ± 0.22

[0116] 상기 [표 6]을 참조하면, 유산균이 5~10중량% 포함된 발효음료가 유산균이 포함되지 않은 발효음료에 비하여 향, 색, 맛뿐만 아니라 전체적인 기호도도 우수함을 확인할 수 있었다.

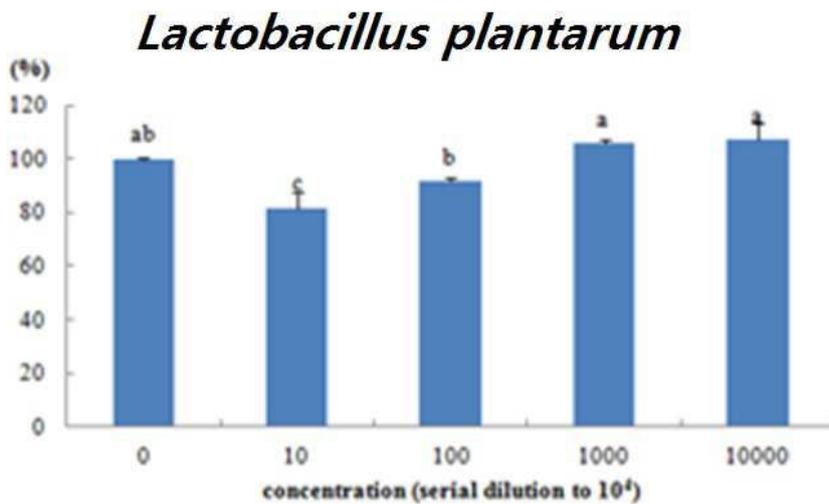
[0118] 이상, 본 발명의 바람직한 일 실시예를 설명하였지만, 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자라면 본 발명이 그 기술적 사상이나 필수적인 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 실시될 수 있다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 이상에서 기술한 일 실시예는 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적이 아닌 것으로 이해해야만 한다.

도면

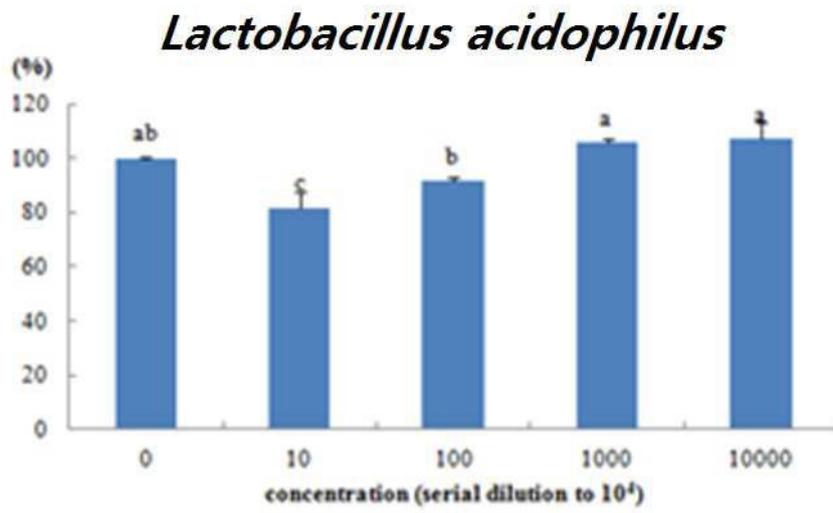
도면1a



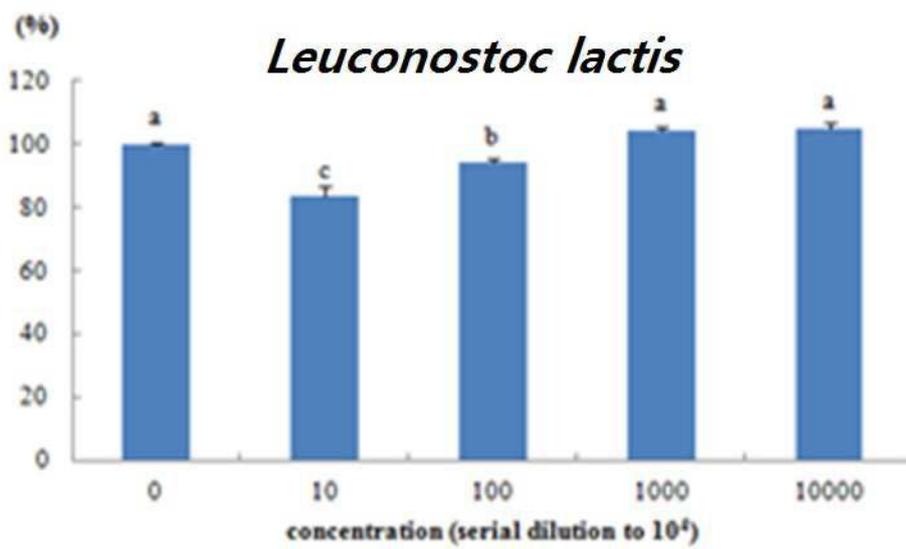
도면1b



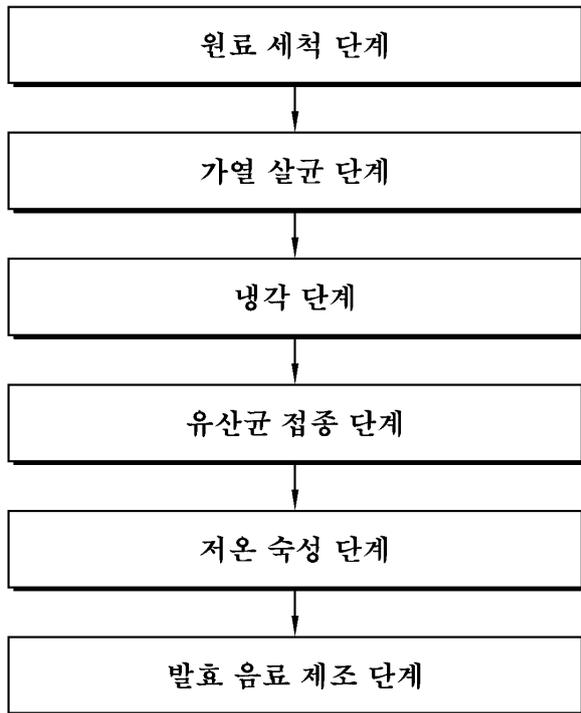
도면1c



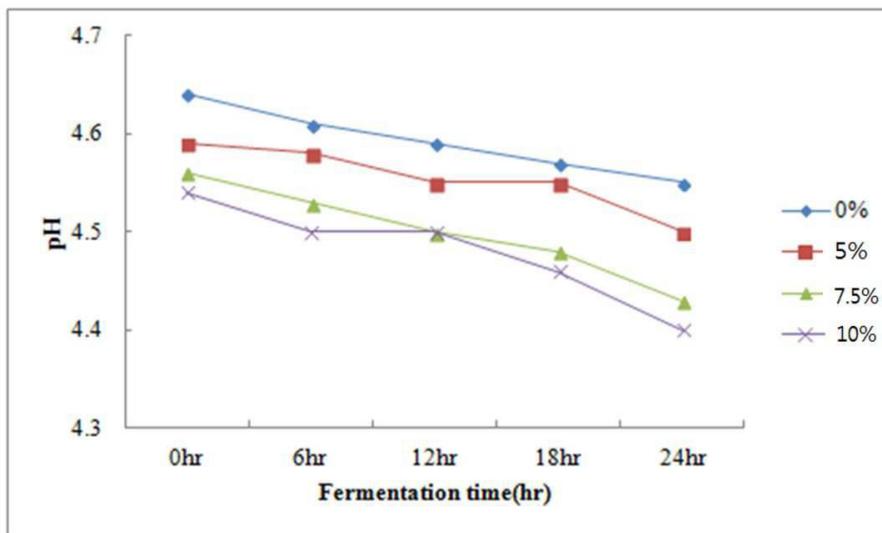
도면1d



도면2



도면3



도면4

