



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2020년04월06일  
(11) 등록번호 10-2097458  
(24) 등록일자 2020년03월31일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
C12C 12/00 (2006.01) C12C 11/02 (2006.01)  
(52) CPC특허분류  
C12C 12/008 (2013.01)  
C12C 11/02 (2013.01)  
(21) 출원번호 10-2019-0096271  
(22) 출원일자 2019년08월07일  
심사청구일자 2019년08월07일  
(56) 선행기술조사문헌  
JP10215850 A\*  
(뒷면에 계속)

(73) 특허권자  
세종대학교 산학협력단  
서울특별시 광진구 능동로 209 (군자동, 세종대학교)  
(72) 발명자  
정장호  
경기도 성남시 분당구 서현로 181, 209동 408호(이매동, 이매촌한신아파트)  
김선영  
충청남도 천안시 동남구 신부8길 21, 104동 2104호(신부동, 도솔노블시티 동문굿모닝힐)  
강상훈  
서울특별시 중랑구 면목로35길 51, 403호 (면목동)  
(74) 대리인  
특허법인리체

전체 청구항 수 : 총 9 항

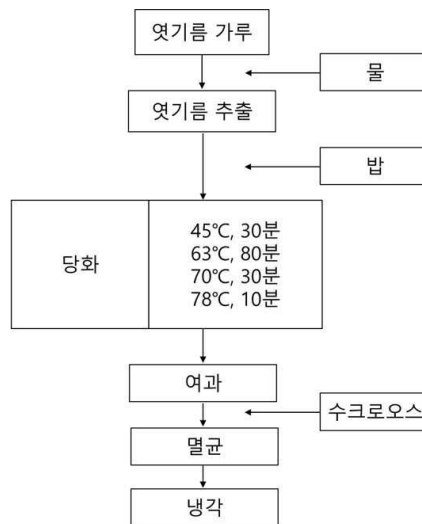
심사관 : 장은경

(54) 발명의 명칭 맥주 제조 방법

(57) 요약

본 발명은 젖산균을 이용해 제조된 발효액을 두 단계의 알코올 발효를 거쳐 맥주를 제조하는 방법으로, 이를 통해 기능성 올리고당을 포함하고, 청주취가 나타나지 않으며, 기호도가 높은 맥주를 제조할 수 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류  
C12C 11/11 (2019.02)

(56) 선행기술조사문헌  
KR1019980063223 A\*  
KR1020090054280 A\*  
KR1020170138805 A\*  
KR1020190053679 A\*  
\*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1545018102

부처명 농림축산식품부

연구관리전문기관 농림식품기술기획평가원

연구사업명 농축산물안전유통소비기술개발(R&D)

연구과제명 젓산균과 맥주 제조기술을 응용한 쌀가루 발효 알코올음료 개발

기여율 1/1

주관기관 세종대학교산학협력단

연구기간 2018.09.10 ~ 2019.09.09

공지예외적용 : 있음

---

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

밥을 엇기름과 혼합하고 당화시켜 당화액을 얻는 단계;

상기 당화액에 젖산 균주가 고정화된 알긴산염 칼슘 카보네이트 비드를 첨가하고, 상기 당화액을 발효시켜 1차 발효액을 얻는 젖산균을 이용한 올리고당 생성 발효 단계;

상기 1차 발효액에 적어도 한 종류의 홉을 넣어 가열시킨 후, 효모를 첨가하고 발효시켜 2차 발효액을 얻는 알코올 주발효 제1 단계; 및

상기 2차 발효액을 단힌계에서 발효시켜 3차 발효액을 얻는 알코올 주발효 제2 단계;를 포함하는 맥주 제조 방법.

#### 청구항 2

청구항 1에 있어서, 상기 젖산 균주는 바이셀라 시바리아(*Weissella cibaria*) 또는 류코노스톡 메센테로이데스(*Leuconostoc mesenteroides*)인 맥주 제조 방법.

#### 청구항 3

청구항 1에 있어서, 상기 1차 발효액의 가용성 고형분 함량은 15 내지 17 브릭스인 맥주 제조 방법.

#### 청구항 4

삭제

#### 청구항 5

청구항 1에 있어서, 상기 알코올 주발효 제1 단계는 발효에 의해 생성되는 이산화탄소 중 적어도 일부가 배출되는 조건에서 수행되는 맥주 제조 방법.

#### 청구항 6

청구항 1에 있어서, 상기 2차 발효액의 가용성 고형분 함량은 9 내지 11 브릭스인 맥주 제조 방법.

#### 청구항 7

청구항 1에 있어서, 상기 3차 발효액의 가용성 고형분 함량은 상기 2차 발효액의 가용성 고형분 함량 대비 0.5 내지 2 브릭스 감소된 것인 맥주 제조 방법.

#### 청구항 8

청구항 1에 있어서, 상기 효모는 상기 1차 발효액에 대하여 0.005 내지 0.05%(w/v) 첨가된 것인 맥주 제조 방법.

**청구항 9**

청구항 1에 있어서, 상기 3차 발효액을 냉장조건에서 발효시키는 알코올 부발효 단계;를 더 포함하는 맥주 제조 방법.

**청구항 10**

청구항 1 내지 3 및 5 내지 9 중 어느 한 항의 방법으로 제조된 맥주.

**발명의 설명**

**기술분야**

[0001] 본 발명은 맥주 제조 방법 및 이에 의해 제조된 맥주에 관한 것이다.

**배경기술**

[0003] 젖산균에 의한 발효는 식품에 다양한 풍미와 조직감을 부여하고 영양 및 기능성 성분의 생성으로 식품의 가치를 증대시킬 뿐만 아니라, 항균성 물질의 합성으로 식품의 저장성을 증대시키는 오래된 식품 가공법 중 하나이다. 따라서, 젖산균을 이용한 발효 음료 제조 시 제품의 상쾌한 신맛과 보존성을 향상시키며, 유단백질의 소화력 향상 및 칼슘, 철, 인 등의 이용성을 향상시키며, 기호성을 증진시킬 수 있을 것이다. 젖산균을 이용한 대표적인 발효식품 중 하나로 사우어 맥주(sour beer)가 있으며, 벨기에 람빅과 플랜더 레드 에일이 가장 오래된 사우어 맥주에 속한다. 이렇게 젖산균을 스타터로 이용한 사우어 맥주는 항산화 및 항균 활성이 높고 풍미를 향상시키며 프리바이오틱 효과를 가지고 있어 최근 재조명되고 있다.

[0004] 한편, 외국 맥주 수입이 증가하면서 프리미엄 맥주시장이 성장하기 시작하였고, 2008년 전체 맥주시장의 3.5%에 불과하던 프리미엄 맥주시장은 2010년을 기점으로 큰 폭으로 증가하여 2012년에는 5.4% 증가하였다. 2010년 이후 소규모 주류에 대한 주세법이 개정되면서 점진적으로 활성화되기 시작하였고, 수제맥주 양조상 수가 2017년 기준 95곳으로 집계되었으며, 2016년 200억원에서 2017년 400억 원대로 크게 증가하는 등 급격한 성장세를 보이고 있다. 주류 소비자들은 주류의 맛과 향을 중시하고, 저 도수 알코올 주류의 선호가 늘면서 맛있는 술을 찾는 사람들이 증가하고 있다. 이러한 고객의 요구에 맞추어 맥주 제조에 있어서 다양한 부재료를 첨가(예를 들어, 고구마 첨가, 쌀 첨가)한 연구 개발이 진행되고 있다. 특히, 쌀을 부재료로 이용한 맥주의 경우 알코올 함량에 영향을 미치는 당화 효율이 떨어질 수 있는 바, 재료들의 적합한 혼합 비율 등 제조 공정에 있어서 다양한 기술 개발이 요구된다.

**선행기술문헌**

**특허문헌**

[0006] (특허문헌 0001) 한국등록특허 제0440723호

**발명의 내용**

**해결하려는 과제**

[0007] 본 발명은 맥주 제조 방법을 제공함에 그 목적이 있다.

[0008] 본 발명의 다른 목적은 기능성 올리고당이 포함된 맥주를 제공함에 있다.

**과제의 해결 수단**

[0010] 1. 밥을 엿기름과 혼합하고 당화시켜 당화액을 얻는 단계; 및

[0011] 상기 당화액에 젖산 균주가 고정화된 알긴산염 칼슘 카보네이트 비드를 첨가하고, 상기 당화액을 발효시켜 1차 발효액을 얻는 젖산균을 이용한 올리고당 생성 발효 단계;를 포함하는 맥주 제조 방법.

- [0012] 2. 위 1에 있어서, 상기 젖산 균주는 바이셀라 시바리아(*Weissella cibaria*) 또는 류코노스톡 메센테로이데스(*Leuconostoc mesenteroides*)인 맥주 제조 방법.
- [0013] 3. 위 1에 있어서, 상기 1차 발효액의 가용성 고형분 함량은 15 내지 17 브릭스인 맥주 제조 방법.
- [0014] 4. 위 1에 있어서, 상기 1차 발효액에 적어도 한 종류의 홉을 넣어 가열시킨 후, 효모를 첨가하고 발효시켜 2차 발효액을 얻는 알코올 주발효 제1 단계; 및
- [0015] 상기 2차 발효액을 단히계에서 발효시켜 3차 발효액을 얻는 알코올 주발효 제2 단계;를 더 포함하는 맥주 제조 방법.
- [0016] 5. 위 4에 있어서, 상기 알코올 주발효 제1 단계는 발효에 의해 생성되는 이산화탄소 중 적어도 일부가 배출되는 조건에서 수행되는 맥주 제조 방법.
- [0017] 6. 위 4에 있어서, 상기 2차 발효액의 가용성 고형분 함량은 9 내지 11 브릭스인 맥주 제조 방법.
- [0018] 7. 위 4에 있어서, 상기 3차 발효액의 가용성 고형분 함량은 상기 2차 발효액의 가용성 고형분 함량 대비 0.5 내지 2 브릭스 감소된 것인 맥주 제조 방법.
- [0019] 8. 위 4에 있어서, 상기 효모는 상기 1차 발효액에 대하여 0.005 내지 0.05%(w/v) 첨가된 것인 맥주 제조 방법.
- [0020] 9. 위 4에 있어서, 상기 3차 발효액을 냉장조건에서 발효시키는 알코올 부발효 단계;를 더 포함하는 맥주 제조 방법.
- [0021] 10. 위 1 내지 9 중 어느 하나의 방법으로 제조된 맥주.

**발명의 효과**

- [0023] 본 발명은 맥주 제조 방법 및 이에 의해 제조된 맥주에 관한 것으로, 본 발명의 제조 방법에 따라 제조된 맥주는 기능성 올리고당 함유량이 높고, 청주취와 같은 이취가 낮다. 또한, 본 발명 맥주에는 만니톨 및 가지가 있는 올리고당(branched oligosaccharide)이 포함되어 있는 바, 만니톨은 청량한 맛을 내고 가지가 있는 올리고당은 가볍고 부드러운 단맛을 준다는 선행연구와 같이 본 발명 맥주의 기호도 역시 좋을 것이며, 소비자들로부터 수요도가 높을 것으로 기대된다.

**도면의 간단한 설명**

- [0025] 도 1은 당화액 제조 과정을 도식화한 것이다.
- 도 2는 알긴산 칼슘 카보네이트 비드(CaCO<sub>3</sub>-Alginate bead)의 제조 및 젖산균을 이용한 올리고당 생성 발효 과정을 도식화한 것이다.
- 도 3은 젖산균을 이용한 올리고당 생성 발효액을 이용한 맥주 제조 과정을 도식화한 것이다.
- 도 4는 젖산균 발효 과정 중 알긴산염 칼슘 카보네이트 비드 종류를 달리 한 시료들의 pH 변화를 나타낸다.
- 도 5는 알긴산염 칼슘 카보네이트 비드 종류를 달리한 시료의 젖산균 발효과정 중 총 균수 및 젖산균 수의 변화를 나타낸다.
- 도 6은 젖산균 발효 과정 중 알긴산염 칼슘 카보네이트 비드 종류를 달리 한 시료들의 가용성 고형분의 변화를 나타낸다.
- 도 7은 젖산균 발효 과정 중 알긴산염 칼슘 카보네이트 비드 종류를 달리 한 시료들의 환원당 변화를 나타낸다.
- 도 8은 젖산균 발효 과정 중 알긴산염 칼슘 카보네이트 비드 종류를 달리 한 시료들의 수크로오스의 양 변화를 나타낸다.
- 도 9는 젖산균 발효 과정 중 알긴산염 칼슘 카보네이트 비드 종류를 달리 한 시료들의 말토오스의 양 변화를 나타낸다.
- 도 10은 젖산균 발효 과정 중 알긴산염 칼슘 카보네이트 비드 종류를 달리 한 시료들의 프럭토오스의 양 변화를 나타낸다.
- 도 11은 젖산균 발효 과정 중 알긴산염 칼슘 카보네이트 비드 종류를 달리 한 시료들의 만니톨의 양 변화를 나타낸다.

타낸다.

도 12는 Control\_S의 발효 과정 중 D-panose와 말토실-이소말토올리고당(Maltosyl-Isomaltooligosaccharide; MIMO)의 양 변화를 나타낸다.

도 13은 E.W.C\_S의 발효 과정 중 D-panose와 말토실-이소말토올리고당(Maltosyl-Isomaltooligosaccharide; MIMO)의 양 변화를 나타낸다.

도 14는 E.L.M\_S의 발효 과정 중 D-panose와 말토실-이소말토올리고당(Maltosyl-Isomaltooligosaccharide; MIMO)의 양 변화를 나타낸다.

도 15는 E.W.L\_S의 발효 과정 중 D-panose와 말토실-이소말토올리고당(Maltosyl-Isomaltooligosaccharide; MIMO)의 양 변화를 나타낸다.

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0026] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.
- [0028] 본 발명은 당화액을 젖산 균주가 고정화된 비드와 혼합시켜 1차 발효액을 얻는 젖산균을 이용한 올리고당 생성 발효 단계;를 포함하는 맥주 제조 방법을 제공한다.
- [0029] 상기 당화액은 밥을 엇기름과 혼합하여 당 분야에 공지된 방법 및 조건으로 당화시켜 얻은 것 일 수 있다.
- [0030] 예를 들어, 상기 당화액은 일정 기간 동안 온도를 지속적으로 증가시키면서 당화시켜 얻은 것일 수 있다. 일 예로, 상기 당화액은 30분 동안 30℃에서 50℃로 온도를 증가시키면서 당화시켜 얻은 것 일 수 있다.
- [0031] 다른 예를 들어, 상기 당화액은 일정한 온도로 일정 기간 당화시킨 후, 온도를 상승시켜 상승된 일정한 온도로 일정 기간 추가 당화시켜 얻은 것 일 수 있다. 일 예로, 50℃의 온도로 30분 당화시킨 후, 60℃ 온도로 30분 당화시킨 후, 70℃ 온도로 1 시간 당화시키는 것 일 수 있다.
- [0032] 밥은 쌀 100 중량부 대비 물 100 내지 500 중량부를 혼합하여 지은 것일 수 있고, 바람직하게는 쌀 100 중량부 대비 물 100 내지 200 중량부를 혼합하여 지은 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0033] 엇기름은 엇기름 가루 1g 당 물 1 내지 30ml 비율로 혼합하여 추출된 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 예를 들어, 엇기름은 엇기름 가루 1g 당 물 1 내지 20, 2 내지 18, 4 내지 16, 6 내지 14 또는 8 내지 12 ml의 비율로 혼합하여 추출된 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0034] 예를 들어, 엇기름은 엇기름 가루 200g 당 물 1000 내지 3000ml를 혼합하여 추출된 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0035] 또한, 상기 당화 이후에 여과 과정을 거칠 수 있다.
- [0036] 상기 젖산 균주는 당질을 분해하여 대사산물로서 주로 젖산을 생산하는 세균으로, 예를 들어, 스트렙토코쿠스 (*Streptococcus*), 락토코쿠스 (*Lactococcus*), 락토바실러스 (*Lactobacillus*), 류코노스톡 (*Leuconostoc*), 페디오코쿠스 (*Pediococcus*) 및 비피도박테리움 (*Bifidobacterium*) 속, 바이셀라(*Weissella*) 속 중 하나 이상일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 구체적으로, 상기 젖산 균주는 류코노스톡 메센테로이데스(*Leuconostoc mesenteroides*), 바이셀라 시바리아(*Weissella cibaria*) 중 하나 이상일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0037] 상기 비드는 알긴산염 칼슘 카보네이트 비드(Alginate Calcium carbonate)일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0038] 비드의 직경은 0.1 내지 10 mm 일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 예를 들면, 비드의 직경은 0.1 내지 0.5, 0.5 내지 1, 1 내지 2, 2 내지 3, 3 내지 5, 5 내지 10 mm 일 수 있으며, 바람직하게는 1 내지 2 mm 일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0039] 젖산 균주가 고정화된 알긴산염 칼슘 카보네이트 비드는 쇼돔 알긴산(Sodium alginate), 칼슘 카보네이트(CaCO<sub>3</sub>), 젖산 균주를 혼합하여 콜로이드 액을 제조하는 단계; 및 상기 콜로이드 액을 칼슘 클로라이드(CaCl<sub>2</sub>)에 적하하는 단계;를 포함하여 제조된 것일 수 있다.
- [0040] 상기 당화액은 하나 이상의 젖산 균주가 고정화된 비드와 혼합될 수 있다. 예를 들어, 상기 당화액은 류코노스톡 메센테로이데스(*Leuconostoc mesenteroides*) 균주가 고정화된 제1 비드와 바이셀라 시바리아(*Weissella cibaria*) 균주가 고정화된 제2 비드와 함께 혼합될 수 있다.

- [0041] 상기 당화액은 상기 비드와 혼합되어 10 내지 55℃ 조건에서 발효될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 예를 들어, 상기 당화액은 상기 비드와 혼합되어 10 내지 50, 15 내지 45, 20 내지 40, 25 내지 35 조건에서 발효될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 다른 예를 들어, 상기 당화액은 상기 비드와 혼합되어 15 내지 25, 25 내지 35, 35 내지 45, 45 내지 55℃ 조건에서 발효될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0042] 상기 당화액은 상기 비드와 혼합되어 5 내지 60시간 동안 발효될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 예를 들어, 상기 당화액은 상기 비드와 혼합되어 5 내지 45, 10 내지 40, 15 내지 35, 20 내지 30시간 동안 발효될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 다른 예를 들어, 상기 당화액은 상기 비드와 혼합되어 6 내지 12, 12 내지 24, 24 내지 36, 36 내지 48, 48 내지 60시간 동안 발효될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0043] 상기 1차 발효액은 젖산균을 이용한 올리고당 생성 발효에 의해 얻어진 산물로, 올리고당 외에도 하나 이상의 당, 효소 등이 포함될 수 있다. 상기 당은 단당류, 이당류, 올리고당 또는 다당류 일 수 있고, 예를 들어, 프럭토오스(fructose), 글루코오스(glucose), 수크로오스(sucrose), 말토오스(maltose), 판노오스(panose), 이소말토올리고당(isomaltooligosaccharide) 또는 만니톨(mannitol)일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 상기 효소는 텍스트란수크라아제(dextranase) 일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0044] 상기 1차 발효액에 포함된 가용성 고형분 함량은 11 내지 20 브릭스(brix) 일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 예를 들어, 상기 1차 발효액에 포함된 가용성 고형분 함량은 11 내지 20, 12 내지 19, 13 내지 18, 14 내지 17 또는 15 내지 16 브릭스일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 다른 예를 들어, 상기 1차 발효액에 포함된 가용성 고형분 함량은 11 내지 12, 12 내지 14, 15 내지 17, 17 내지 18 또는 18 내지 20 브릭스일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0045] 고정화되지 않은 젖산균을 이용한 발효의 경우, 젖산균을 배양할 때 생성되는 부산물들에 의해 pH가 낮아져 젖산균의 성장 또는 활성 등이 저하되거나, 발효액 내에 포함된 효소의 적정 pH가 유지되기 어려워 효소 반응에 의한 기능성 물질들이 생산되기 어려운 단점이 있다. 반면, 젖산균이 고정화된 비드를 이용한 발효의 경우, 젖산균의 배양 효과가 높고, 발효액 내에서 효소 반응의 적정 pH가 유지될 수 있다는 장점이 있다. 즉, 젖산균이 고정화된 비드를 이용하면 발효 효율이 좋고, 발효액 내에 효소의 반응에 의해 생성된 기능성 물질이 포함될 수 있다.
- [0047] 또한, 본 발명은 전술한 단계에 의해 얻어진 1차 발효액에 적어도 한 종류의 홉을 넣어 가열시키고, 효모를 첨가하여 발효시켜 2차 발효액을 얻는 알코올 주발효 제1 단계; 및 상기 2차 발효액을 추가 발효시켜 3차 발효액을 얻는 알코올 주발효 제2 단계를 더 포함하는 맥주 제조 방법을 제공한다.
- [0048] 상기 홉은 삼(*Cannabaceae*) 과 식물로 맥주의 원료로 사용될 수 있다. 본 명세서에서 용어 "홉"은 상기 식물 전체를 의미할 수도 있고, 꽃만을 의미할 수도 있다.
- [0049] 예를 들어, 상기 홉은 미텔프뤼(Mittelfruh), 자츠(Saaz), 슈팔트(Spalt), 테트낭(Tettnang), 모자이크(Mosaic), 아마릴로(Amarillo), 아폴로(Apollo), 칼립소(Calypso), 캐스케이드(Cascade), 센티니얼(Centennial), 치누크(Chinook), 콜럼버스(Columbus), 갈레나(Galena), 리버티(Liberty), 뱅가드(Vanguard), 어드미럴(Admiral), 브루어스 골드(Brewer's Gold), 퍼글(Fuggie), 골드링(Golding), 이스트 켄트 골드링(East Kent Golding), 할러타우(Hallertau), 매그넘(Magnum), 폴라리스(Polaris), 갤럭시(Galaxy), 서던 크로스(Southern Cross), 그린 불릿(Green Bullet), 넬슨 소빈(Nelson Sauvin), 심코(Simcoe) 및 워리어(Warrior) 중 하나 이상일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0050] 상기 효모는 당 업계에 공지된 알코올 발효를 시킬 수 있는 효모일 수 있으며, 예를 들어 사카로미세스(*Saccharomyces*) 속 일 수 있다.
- [0051] 상기 효모는 상기 1차 발효액에 대하여 0.005 내지 0.05%(w/v) 첨가된 것일 수 있으며, 바람직하게는 0.005 내지 0.02%(w/v)로 첨가된 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0052] 알코올 주발효 제1 단계는 혐기 조건에서의 발효일 수 있다.
- [0053] 알코올 주발효 제1 단계에서는 발효에 의해 발생하는 가스 중 적어도 일부를 배출시킬 수 있다. 상기 가스는 이산화탄소(CO<sub>2</sub>)일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0054] 알코올 주발효 제1 단계에서 발생하는 가스가 외부로 배출되면, 발효 생성물인 가스 양이 일정 양까지 증가되지 못하는 바, 화학 평형이 될 때까지 발효가 더 일어날 수 있다.



- [0055] 상기 알코올 주발효 제1 단계는 공지된 온도 조건에서 수행될 수 있으나, 바람직하게는 상온 조건에서 수행될 수 있다. 본 명세서에서 용어 “상온”은 일반적인 실내의 온도로, 예를 들어, 1 내지 35℃ 일 수 있으나, 바람직하게는 15 내지 25℃ 범위 내의 온도를 의미한다. 예를 들어, 상기 1차 발효액은 5 내지 35, 10 내지 30, 15 내지 25℃ 조건에서 발효될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0056] 상기 주발효 제1 단계는 상기 1차 발효액의 가용성 고형분 함량 중 일부가 감소되면 발효를 중단하는 것 일 수 있다.
- [0057] 주발효 제1 단계는 상기 1차 발효액 대비 가용성 고형분 함량이 1 내지 10 브릭스 감소할 때까지 발효시키는 것 일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 예를 들어, 주발효 제1 단계는 상기 1차 발효액 대비 가용성 고형분 함량이 2 내지 9, 3 내지 8, 4 내지 7 또는 5 내지 6 브릭스 감소할 때까지 발효시키는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0058] 주발효 제1 단계는 상기 2차 발효액의 가용성 고형분 함량이 8 내지 12, 9 내지 11 또는 9 내지 10 브릭스인 2차 발효액을 얻을 수 있을 정도로 1차 발효액을 발효시키는 것일 수 있다.
- [0059] 또 다른 예를 들어, 주발효 제1 단계의 발효 기간은, 상기 1차 발효액의 가용성 고형분 함량이 거의 다 소모될 때까지 발효시키는 통상의 알코올 발효 기간보다 짧을 수 있다. 예를 들어, 주발효 제1 단계의 발효 기간은 1 내지 9일 일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 예를 들어, 주발효 제1 단계의 발효 기간은 1 내지 9, 2 내지 8, 3 내지 7 또는 4 내지 6일 일 수 있다. 다만, 구체적인 발효 기간은 1차 발효액의 성분, 1차 발효액의 양, 효모의 양, 효모의 양 등에 따라 달라질 수 있다.
- [0060] 상기 2차 발효액에는 주발효 제1 단계를 거친 후 1차 발효액 내 포함되어 있던 당 중 일부가 제거되고 남은 잔여 당 또는 효소가 포함될 수 있다. 상기 잔여 당은 단당류, 이당류 또는 다당류 일 수 있고, 예를 들어, 프럭토오스(fructose), 글루코오스(glucose), 수크로오스(sucrose), 말토오스(maltose), 판노오스(panose), 이소말tooligosaccharide) 또는 만니톨(mannitol)일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 상기 효소는 텍스트란수크라아제(dextranase) 일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0061] 상기 2차 발효액의 가용성 고형분 함량은 5 내지 18 브릭스일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 예를 들어, 상기 2차 발효액의 가용성 고형분 함량은 5 내지 15, 6 내지 14, 7 내지 13, 8 내지 12 또는 9 내지 11 브릭스 일 수 있으며, 바람직하게는 9 내지 11 브릭스 일 수 있으나 이에 제한되지 않는다.
- [0062] 알코올 주발효 제2 단계는 혐기 조건에서의 발효일 수 있다.
- [0063] 알코올 주발효 제2 단계는 단힌계에서의 발효일 수 있다. 본 명세서에서 "단힌계"는 외부와 물질을 교환하지 않는 계로, 구체적으로 반응에 의해 생성된 생성물 또는 반응물들이 외부로 배출되기 어려운 시스템을 의미할 수 있다.
- [0064] 즉, 알코올 주발효 제2 단계가 단힌계에서 발효인 경우, 발효에 의해 발생하는 가스가 외부로 배출되지 않을 수 있다. 상기 가스는 이산화탄소일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0065] 알코올 주발효 제2 단계에서 발생하는 가스가 외부로 배출되지 못하면, 발효가 진행 정도에 따라 발효 생성물인 가스의 양이 증가될 수 있기 때문에, 발효 시간이 경과할수록 발효가 점차적으로 느려지거나 발효 정도가 낮아질 수 있다.
- [0066] 한편, 알코올 주발효 제2 단계에서 발생하는 가스가 외부로 배출되지 못하면, 발생된 가스가 발효액 내에 포함될 수 있고, 이러한 발효액을 이용해 제조된 맥주는 탄산가스를 포함하는 부드러운 맛일 수 있다.
- [0067] 상기 알코올 주발효 제2 단계는 공지된 온도 조건에서 수행될 수 있으나, 바람직하게는 상온 조건에서 수행될 수 있다.
- [0068] 예를 들어, 상기 2차 발효액은 0 내지 45℃ 조건에서 발효될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 구체적으로, 상기 2차 발효액은 5 내지 35, 10 내지 30, 15 내지 25℃ 조건에서 발효될 수 있고, 바람직하게는 15 내지 25℃ 조건에서 발효될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0069] 상기 주발효 제2 단계는 상기 2차 발효액의 가용성 고형분 함량 중 일부가 감소되면 발효를 중단하는 것 일 수 있다.
- [0070] 주발효 제2 단계는 상기 2차 발효액 대비 가용성 고형분 함량이 0.1 내지 3 브릭스 감소할 때까지 발효시키는



것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 예를 들어, 주발효 제2 단계는 상기 2차 발효액 대비 가용성 고형분 함량이 0.1 내지 3, 0.25 내지 2.5, 0.5 내지 2 브릭스 감소할 때까지 발효시키는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

- [0071] 알코올 주발효 제2 단계에서 감소되는 가용성 고형분 함량은 알코올 주발효 제1 단계에서 감소되는 가용성 고형분 함량보다 더 적을 수 있다. 즉, 알코올 주발효 제1 단계에서 발효되는 정도가 알코올 주발효 제2 단계에서 발효되는 정도보다 더 클 수 있다.
- [0072] 주발효 제2 단계는 가용성 고형분 함량이 7 내지 11 브릭스인 3차 발효액을 얻을 수 있을 정도로 2차 발효액을 발효시키는 것일 수 있다. 이 때, 상기 7 내지 11 브릭스는 기능성 올리고당의 함량일 수 있다. 예를 들어, 주발효 제2 단계는 가용성 고형분 함량이 8 내지 11, 8.5 내지 10.5 또는 9 내지 10 브릭스인 3차 발효액을 얻을 수 있을 정도로 2차 발효액을 발효시키는 것일 수 있다.
- [0073] 주발효 제2 단계의 발효 기간은 1 내지 11일 일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 예를 들어, 주발효 제2 단계의 발효 기간은 기간은 3 내지 11, 4 내지 10, 5 내지 9 또는 6 내지 8일 일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 다만, 구체적인 발효 기간은 2차 발효액의 성분, 2차 발효액의 양, 홉의 양, 효모의 양 등에 따라 달라질 수 있다.
- [0074] 주발효 제2 단계를 거친 후 얻어진 상기 3차 발효액에는 2차 발효액 내의 기능성 올리고당 성분을 제외한 나머지 잔여 당을 적어도 일부가 소모된 것일 수 있다. 주발효 제2 단계를 통해 2차 발효액에서 소모된 잔여 당은 단당류, 이당류 또는 다당류 일 수 있고, 예를 들어, 프럭토오스(fructose), 글루코오스(glucose), 수크로오스(sucrose), 말토오스(maltose), 판노오스(panose) 또는 만니톨(mannitol)일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0075] 상기 3차 발효액의 가용성 고형분 함량은 1 내지 14 브릭스일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 예를 들어, 상기 3차 발효액의 가용성 고형분 함량은 6 내지 14, 7 내지 13, 8 내지 12, 9 내지 11 또는 8 내지 10 브릭스 일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 다른 예를 들어, 상기 3차 발효액의 가용성 고형분 함량은 1 내지 4, 5 내지 7, 8 내지 10, 또는 11 내지 14 브릭스일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 바람직하게는, 3차 발효액의 가용성 고형분 함량은 8 내지 10 브릭스일 수 있다.
- [0076] 전술한 바와 같이, 본 발명의 맥주 제조 방법에 따라 두 단계의 주발효 단계를 거쳐 제조된 맥주는 한 단계의 주발효를 거쳐 제조된 맥주에 비해 청주취와 같은 이취가 적고, 소비자의 기호도가 상대적으로 높다.
- [0078] 나아가, 본 발명은 상기 3차 발효액을 냉장조건에서 발효시키는 알코올 부발효 단계;를 더 포함하는 맥주 제조 방법을 제공한다.
- [0079] 본 명세서에서 용어 "냉장조건"은 상온보다 낮은 온도를 의미할 수 있다. 예를 들어, 상기 부발효는 3차 발효액을 0℃ 이상, 0 내지 5, 5 내지 10 또는 10 내지 15℃ 조건에서 숙성시키는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0080] 상기 부발효 단계를 거쳐 얻어진 산물에 포함된 가용성 고형분 함량은 2 내지 7일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 예를 들어, 상기 부발효 단계를 거쳐 얻어진 산물에 포함된 가용성 고형분 함량은 2 내지 3, 3 내지 4, 4 내지 5 또는 6 내지 7 브릭스 일 수 있으며, 바람직하게는 6 내지 7 브릭스 일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 상기 부발효 단계를 거쳐 얻어진 산물에 포함된 가용성 고형분 함량은 상기 산물에 포함된 기능성 올리고당의 함량일 수 있다.
- [0081] 본 발명 맥주 제조 방법은 전술한 상기 단계들 외에도, 통상의 맥주 제조 과정에 포함될 수 있는 단계들을 더 포함할 수 있다.
- [0083] 본 발명은 전술한 방법에 의해 제조된 맥주를 제공할 수 있다.
- [0084] 상기 맥주는 쌀 맥주, 보리 맥주 또는 밀 맥주일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0085] 상기 맥주는 기능성 올리고당을 포함할 수 있다. 올리고당은 2 내지 10개의 단당류의 중합도를 갖는 탄수화물로, 에너지원, 감미료, 안정화제 또는 팽창제로서 음식, 동물 사료, 제약 및 화장품 산업에서 사용될 수 있다. 또한, 올리고당은 장내에서 유익한 미생물들의 성장 및 활성을 도와 유익균이 정착하도록 도움을 주는 역할을 할 수 있다.
- [0086] 예를 들어, 상기 올리고당은 말토올리고당(maltooligosaccharide), 이소말토올리고당(Isomaltooligosaccharide), 갈락토올리고당(galactooligosaccharide), 프락토올리고당

(fructooligosaccharide) 일 수 있으며, 구체적으로, 말토실-이소말토올리고당(Maltosyl-Isomaltooligosaccharide; MIMO) 일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0088] 이하, 본 발명을 구체적으로 설명하기 위해 실시예를 들어 상세하게 설명하기로 한다. 그러나 하기의 실시예는 본 발명을 더욱 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐, 하기 실시예에 의하여 본 발명의 내용이 한정되는 것은 아니다.

[0090] **[실시예]**

[0091] **실험재료**

[0092] 본 실험에 사용된 시약은 유리당 표준품으로는 sucrose, glucose, D-mannitol, D-fructose(SAMCHUN Chemicals Co., Ltd, Gyeonggi-do, Korea), maltose(JUNSEI Chemical Co., Ltd, Tokyo, Japan), 및 ethyl alcohol(Sigma-Aldrich Co. LLC., MO, U.S.A)을 사용하였다. 유기산 표준품으로는 oxalic acid, tartaric acid, DL-malic acid, DL-lactic acid, acetic acid, citric acid, succinic acid(Sigma-Aldrich Co. LLC., MO, U.S.A)를 사용하였으며, 올리고당 표준품으로는 panose, isomaltotriose(Sigma-Aldrich Co. LLC., MO, U.S.A)와 isomaltotetraose(Tokyo Chemical Co. LTD., Tokyo, Japan)를 사용하였다. HPLC 유기용매 시약은 potassium sulfate와 potassium phosphate monobasic(SAMCHUN Chemicals Co., Ltd, Gyeonggi-do, Korea)를, pH 보정을 위해 phosphoric acid(Sigma-Aldrich Co. LLC., MO, U.S.A)를 사용하였다.

[0093] 또한, 총 균수 측정을 위한 배지 (microbial culture medium)는 PCA(plate count agar, Difco, U.S.A)를 이용하였으며, 총 젖산균은 Lactobacilli MRS(BD Difco, U.S.A)에 agar 2%(BD Difco, U.S.A)와 sodium azide 0.02%(Sigma-Aldrich Co. LLC., MO, U.S.A)를 첨가 한 배지를 사용하였다. 총 yeast의 측정은 YMPG(yeast 0.3%, malt extract 0.3%, peptone 0.5%, glucose 1%)에 agar 2%와 chloramphenicol 0.01%, chlortetracycline hydrochloride 0.01%(Sigma-Aldrich Co. LLC., MO, U.S.A)를 혼합 제조하여 제조하여 사용하였다.

[0095] **실험방법**

[0096] **1. 당화액 제조**

[0097] 당화액 제조를 위해 쌀 200 g을 3회 세척한 후, 2배의 물에 2시간 동안 불린 다음 물기를 빼고, 쌀 중량의 1.5 배 중량의 물을 부어 밥을 지었다. 엿기름 가루 200 g과 물을 1:10 비율로 혼합한 후 25℃에서 2시간 동안 100rpm으로 교반하여 엿기름을 추출하고 지은 밥과 함께 혼합하였다. 이를 45℃에서 30분, 63℃에서 80분, 70℃에서 30분간 순차적 승온방식으로 당화시킨 다음, 78℃에서 10분간 활성을 정지시켰다. 당화액은 8000 rpm에서 15분간 원심분리 (HMR-220IV, Hanil Inductiral Co., Korea)하여 여과시킨 후 6%(w/v)의 sucrose를 첨가하고, autoclave에서 121℃, 15분간 멸균시킨 다음 5℃까지 냉각하여 사용하였다. 전술한 바와 같은 당화액 제조 과정은 도 1에 도시하였다.

[0099] **2. 알긴산염 칼슘 카보네이트 비드(CaCO<sub>3</sub>-Alginate bead) 제조 및 젖산균을 이용한 올리고당 생성 발효**

[0100] Sodium alginate 2%(w/v)가 되도록 증류수에 넣고 교반기를 이용하여 충분히 녹인 후 CaCO<sub>3</sub> 20%와 *Weissella cibaria* 10% (w/v), *Leuconostoc mesenteroides* 10% (w/v) 균주를 각각 투입하여 섞일 때까지 200 rpm으로 균질화하였다. 충분히 섞인 혼합 콜로이드 액은 주사기를 이용하여 주사바늘(Gauge 18)을 통하여 혼합 콜로이드 액을 0.1M CaCl<sub>2</sub> 용액에 적하하여 1.0-2.0 mm정도의 직경을 가진 비드(bead)를 제조하였으며, 1 시간을 방치하여 비드를 강화시킨 다음 멸균수로 3회 세척한 후 사용하였다. *Weissella cibaria* 가 고정화된 알긴산염 칼슘 카보네이트 비드(이하, Encapsulated *Weissella cibaria*; E.W.C) 및 *Leuconostoc mesenteroides* 가 고정화된 알긴산염 칼슘 카보네이트 비드(이하, Encapsulated *Leuconostoc mesenteroides*; E.L.M)가 얻어졌다.

[0101] 당화액 400 mL에 E.W.C 접종(2%, w/v), E.L.M 접종(2%, w/v), E.W.C (1%, w/v) 및 E.L.M(1%, w/v)을 혼합 접종한 처리구(E.W.L)와 무처리구인 대조군을 30℃의 항온기에서 24시간 발효시켜 1차 발효액을 얻었다. 전술한 바와 같은 CaCO<sub>3</sub>-Alginate bead 제조 및 젖산균을 이용한 올리고당 생성 발효과정은 도 2에 도시하였다.

[0103] **3. 알코올 발효**

[0104] 상기 젖산균 발효액(1차 발효액)에 100℃ 온도에서 warrior hop(0.9%, w/v)를 넣고 15분간 가열하고, centennial hop(0.14%, w/v)를 넣어 30분간 더 가열하였다. 다시 centennial hop(0.14%, w/v)를 넣고 10분간 가열한 후, 불을 끄고 simcoe hop(0.14%, w/v)를 넣어 5℃로 냉각한 다음 French Sasion(mangrove jack's,

BGGi NZ Ltd, Newzealand), Safale S-04(Fermentis, Lesaffre, England) 또는 Safale US-05(Fermentis, Lesaffre, England) 의 효모 활성을 높이기 위해 1 mL당  $1 \times 10^7$ 의 조건으로 0.014%(w/v)첨가하였다. 20℃에서 5 일간 배양기(incubator)에서 생성되는 가스를 배출하면서 효모 발효(알코올 주발효 제1 단계)시켰고, 동일한 온도에서 7일간 생성되는 가스를 배출시키지 않고 발효(알코올 주발효 제2 단계) 시킨 다음, 4℃에서 4주간 저장 (알코올 부발효 단계)하였다. 진술한 바와 같은 맥주 제조 공정은 도 3에 도시하였다.

[0105] 맥주 제조시 알코올 수율을 위해 잔여 당을 모두 소모할 때까지 발효시키는 것이 일반적이며, 잔여 당을 모두 소모하기 위해서는 통상 10일 정도가 소요되는 바, 효모 발효 기간을 10일로 하여 제조된 맥주를 대조군으로 비교하였으며, 효모의 종류에 따라 맥주의 특성이 달라질 수 있는지 여부도 확인하기 위해서 3 종의 시판 효모를 사용하였다.

[0107] **실험 데이터 측정방법**

[0108] **1. 가용성 고형분 함량**

[0109] 가용성 고형분 함량 측정은 시료 1 mL를 micro tube에 넣고 10,000 rpm(xg-force)에서 10분 동안 원심분리기 (centrifuge 5415 B, Brinkmann instruments. inc., Germany)를 이용해 원심분리하여 사용하였다. 그 후 상등액을 당도계(refractometer, ATAGO, PR-101, Japan)를 사용하여 3 회 반복 측정하여 그 평균값을 구하고 ° Brix %로 표시하였다.

[0111] **2. pH 측정**

[0112] 발효 중 pH 변화는 15 mL 원액을 취하여 pH meter(TOA HM -7E, TOA Electrocin Ltd, Japan)를 이용하여 3회 반복 측정하여 평균 값으로 나타내었다.

[0114] **3. 환원당 정량**

[0115] 환원당은 dinitrosalicylic acid(DNS)법에 의해 측정하였다. 100배 희석하여 여과한 시료용액 1 mL에 DNS reagent 3 mL를 혼합한 뒤 끓는 물에서 5분 동안 반응시킨 후, 방랭한 것을 96 well마이크로플레이트를 이용하여 Ultra Microplate Reader(EL 808, BIO-Tek Instruments INC., U.S.A)에서 540 nm로 흡광도를 측정하였으며, Glucose(Sigma Chemical Co. U.S.A)를 표준물질로 사용하여 환산하였다.

[0117] **4. 유리당(Free sugar) 측정**

[0118] 시료의 유리당 및 알코올 분석을 위해 각각 초순수로 희석한 후 0.2 μm membrane filterpaper(Whatman, GE, Healthcare Bio-Sciences, Pittsburgh, PA., U.S.A)를 이용해 여과하고, 그 용액을 HPLC(2487, Waters Co., Milford, MA, U.S.A)를 이용하여 분석하였다. Detector는 Waters W410으로 분석하였고, column은 Aminex HPX-87c(300mm x 7.8mm, BIO-RAD, Hercules, CA., U.S.A)를 사용하였다. Column oven의 temperature는 85℃로 설정 하였으며, mobile phase는 0.01M potassium sulfate in water로 하여 flow rate는 0.6 mL/min으로 사용하고 시료는 20 μL를 injection하였다. 시료는 각각 3회 반복 측정하여 평균값을 사용하였으며, 표준용액의 제조는 특 급시약 제품(Sigma, St. Louis, MO., U.S.A)을 사용하였다. 시료들의 당 농도는 각각 성분의 HPLC 면적 값을 표준용액의 검량곡선을 이용하여 농도를 측정하였고, 유리당의 분석 조건은 표 1에 나타내었다.

**표 1**

[0120]

| 파라미터              | 조건   |
|-------------------|--|
| Column            | Aminex HPX-87c<br>(300 mm x 7.8 mm, BIO-RAD) |
| Detector          | Waters RI-2414                               |
| Flow rate         | 0.6 mL/min                                   |
| Mobile phase      | 0.01M potassium sulfate in water             |
| Column Oven temp. | 85℃  |
| Injection Vol.    | 20 μL  |

[0122] **5. 올리고당(Oligosaccharide) 측정**

[0123] 시료의 올리고당 분석을 위해 각각 초순수로 희석한 후 0.2 μm membrane filterpaper(Whatman, GE, Healthcare Bio-Sciences, Pittsburgh, PA., U.S.A)를 이용해 여과하고, 그 용액을 HPLC(2487, Waters Co.,

Milford, MA, U.S.A)를 이용하여 분석하였다. Detector는 Waters W410으로 분석하였고, column은 BP-200 Ag(300 mm x 7.8 mm, BIO-RAD, Hercules, CA., U.S.A)를 사용하였다. Column oven의 temperature는 90℃로 설정하였으며, mobile phase는 DI H2O로 하여 flow rate는 0.5 mL/min으로 사용하고 시료는 20 µL를 injection 하였다. 시료는 각각 3회 반복으로 측정하여 평균값을 사용하였으며, 표준용액의 제조는 특급시약 제품(Sigma, St. Louis, MO., U.S.A)을 사용하였다. 시료들의 당 농도는 각각 성분의 HPLC 면적 값을 표준용액의 검량곡선을 이용하여 농도를 측정하였으며, 올리고당의 분석 조건은 표 2와 같이 나타내었다.

표 2

| 파라미터              | 조건                                      |
|-------------------|---|
| Column            | BP-200 Ag<br>(300 mm x 7.8 mm, BIO-RAD) |
| Detector          | Waters RI-2414                          |
| Flow rate         | 0.5 mL/min                              |
| Mobile phase      | DI H2O                                  |
| Column Oven temp. | 85℃                                     |
| Injection Vol.    | 20 µL                                   |

[0125]

[0127]

**6. 칼슘(Ca) 함량 측정**

[0128]

칼슘 함량은 식품공전의 미량성분시험법의 습식분해 마이크로웨이브 방법에 준하여 전처리하였다. 시료 5 mL를 microwave digestion tube에 넣고 질산 8 mL와 과산화수소 2 mL를 가한 후 microwave Digestion System을 상온에서 90℃ 10분 분해, 150℃ 10분 분해, 190℃까지 온도를 올린 후 30분 동안 분해하였다. 서서히 온도를 낮추고 50℃가 되면 용액화된 시료를 50 mL 정용플라스크에 옮겨 증류수로 정용하고, filter paper(Whatman No.2)로 여과하여 ICP-ASE(Varian Inc., Mulgrave, Victoria, Australia)로 Ca를 정량하였다

[0130]

**7. 색도 측정**

[0131]

SRM(standard Reference Method) 색도는 주류분석규정과 ASBC 방법을 응용해 증류수로 영점을 조정한 분광광도계(X-ma 1200V, Human Co., Ltd., Seoul, Korea)를 이용해 430 nm에서 측정하여 그 값에 10을 곱한 값으로 색도를 계산하였다. 만일 700 nm의 흡광도가 430 nm의 흡광도에 0.039를 곱한 수치 이하라면 맥주는 투명한 것으로 하여 430 nm에서의 흡광도로 부터 맥주의 색도를 결정하였다.

[0132]

[수학식 1]

[0133]

$$SRM = 10 \times D \times \text{흡광도 (A)}$$

[0134]

D = 회석배수

[0136]

**8. 쓴맛 측정**

[0137]

쓴맛(Bitterness Unit, BU)의 측정은 주류분석규정에 따라 시료 100 mL를 삼각플라스크에 넣고 octyl alcohol 20 µL, 6N HCl 0.5 mL와 20 mL 2,2,4-trimethylpentane을 넣은 후 250 rpm의 일정한 속도를 유지하며 좌우로 움직이는 항온수조(ESV3025-W, Polyscience, IL, U.S.A)에 넣고 15분간 섞어주었다. 상층액을 취하여 자외선분광광도기(Du730, Beckman coulter, Inc, CA, U.S.A)를 이용하여 275 nm에서 흡광도 A를 측정하였다.

[0138]

[수학식 2]

[0139]

$$BU = \text{흡광도 (A)} \times 50$$

[0141]

**9. 알코올 함량**

[0142]

알코올 함량은 국제청 주류 분석 교본에 나와 있는 증류법을 사용하여 측정하였다. 15℃에서 100 mL 메스플라스크 눈금까지 각각의 검정한 시료 100 mL를 취하고 이것을 500 mL 삼각 플라스크에 옮긴 후 메스플라스크를 15 mL 증류수로 2회 씻은 액을 삼각 플라스크에 합하여 냉각기를 연결한 다음 70 mL의 증류액이 될 때까지 직화로 가열하고 이 증류액을 메스플라스크에 옮긴 후 증류수를 가하여 100 mL까지 채운 다음 주정계를 이용하여 알코올 함량을 측정하였다.

[0144]

**10. 적정 산도**

[0145] 적정 산도 측정은 시료 원액 15 mL를 채취한 후 0.1 N NaOH 용액을 pH 8.3이 될 때까지 중화 적정하였고, 소비된 0.1N NaOH 용액의 소비량을 lactic acid 계수로 정량하여 측정하였으며, 각각 3회 반복 측정하여 평균값을 산출하였다.

[0146] [수학식 3]

[0147] 적정산도(w/v%)= (MxVxF)/S x 100

[0148] M = 수산화 수산화 나트륨 나트륨 용액 1 mL에 해당하는 시료에 시료에 가장 높은 함량을 함량을 가진 lactic acid 량(계수): 0.009

[0149] V = 0.1N NaOH의 소비량

[0150] F = 0.1N NaOH의 factor

[0151] S = 시료량 mL

[0153] **11. 총 균수와 미생물 측정**

[0154] 각 시료를 무균적으로 무균적으로 1 mL 취하였고, 취한 시료 1 mL에 멸균수 9 mL를 분주해 심진 희석한 것을 단 계적으로 희석하여 PCA (Plate Count Agar) 배지와 MRSA 배지, YMPGA (Yeast Extract, Malt Extract, Peptone, Glucose, Agar) 배지에 0.1 mL 도말한 다음 30°C 항온기에서 48시간 배양한 후 그 집락수를 계수하여 log CFU (colony forming unit)/mL로 나타내었다.

[0156] **실험결과**

[0157] **1. 젖산균을 이용한 발효시 이용된 비드의 종류에 따른 맥주의 특성**

[0158] 본 발명자들은 E.W.C 및/또는 E.L.M 을 당화액에 첨가한 후 젖산균을 이용한 발효 과정에서의 시료를 분석하였다.

[0159] 이하에서는, E.W.C를 첨가한 시료를 E.W.C\_S, E.L.M를 첨가한 시료를 E.L.M\_S, E.W.C 및 E.L.M을 첨가한 시료를 E.W.L\_S, 무처리구를 첨가한 시료를 Control\_S로 표현한다.

[0161] **1-1. pH**

[0162] 도 4는 알긴산염 칼슘 카보네이트 비드를 달리한 시료의 젖산균 발효과정 중 pH 변화를 나타낸다. 모든 시료의 초기 pH는 5.98 내지 6.04에서 시작하였다. Control\_s를 제외한 나머지 시료들은 발효 6시간에 pH 6.27로 상승하는 경향을 보였는데, 이는 알긴산 칼슘 카보네이트 비드의 중화 작용에 기인한 완충 효과가 나타난 것으로 보인다.

[0163] 발효 시작 6시간 후 비드의 중화 작용에 의해 최적 pH가 되어, 젖산균의 활성이 높아졌고, 이에 생육하는 젖산균의 작용으로 발효시간이 경과함에 따라 유기산 생성량이 증가되어 pH가 저하된 것으로 보인다.

[0164] 도 5는 알긴산염 칼슘 카보네이트 비드를 달리한 시료의 젖산균 발효과정 중 총 균수(도 5의 (a) 참고) 및 젖산균 수(도 5의 (b) 참고)의 변화를 나타낸다.

[0166] **1-2. 환원당 및 유리당 함량**

[0167] 도 6은 젖산균을 이용한 올리고당 생성 발효를 통해 얻은 발효액의 가용성 고형분 함량을 나타내며, 도 6에 나타난 바와 같이, 발효 24 시간까지 가용성 고형분 함량은 15 내지 17 브릭스로 유의적인 변화는 없었다. 한편, 도 7에 나타난 바와 같이, 환원당은 발효 시작 후 12 시간까지는 그 값에 큰 변화가 없었고, 발효 시작 후 18 시간에 Control\_s를 제외한 모든 시료들은 9 내지 11로 증가하였다. 이는 발효 시간이 경과함에 따라 젖산균이 생성되고, 이에 당전이효소인 dextransucrase 효소의 활성도 증가되어, 수크로오스를 가수분해하여 프럭토오스(fructose)와 글루코오스(glucose)가 증가된 결과에 따른 것으로 보인다.

[0168] HPLC를 이용한 유리당 함량 분석한 결과, 발효 24 시간 내에 수크로오스는 모두 소비되었고, 말토오스(maltose)도 35 내지 40% 소비되었다. 이는 수크로오스가 가수분해되어 생성된 글루코오스가 말토오스와 반응하여 이소말토올리고당 과 같은 수용체 산물로 전환하게 됨으로써, 수크로오스와 말토오스의 함량 변화가 감소하는 경향을 보이는 것으로 판단된다. 또한, 대조군과 비교하여 나머지 시료들에서는 만니톨이 1 내지 1.24% 생성되었다. 만니톨은 당알코올에 비해 50%의 당도를 가지고 있어 혈당을 증가시키지 않아 대체 감미료로 사용되며, 청량한



단맛을 주어 식품 등에 널리 이용되고 있다.

[0169] 도 8은 젖산균을 이용한 올리고당 생성 발효 과정에서 수크로오스의 양 변화를 분석한 HPLC 결과를 나타낸다. 도 9는 젖산균을 이용한 올리고당 생성 발효 과정에서의 말토오스의 양 변화를 분석한 HPLC 결과를 나타낸다. 도 10은 젖산균을 이용한 올리고당 생성 발효 과정에서의 프럭토오스의 양 변화를 분석한 HPLC 결과를 나타낸다. 도 11은 젖산균을 이용한 올리고당 생성 발효 과정에서의 만니톨의 양 변화를 분석한 HPLC 결과를 나타낸다.

[0171] **1-3. 기능성 올리고당 함량**

[0172] 도 12 내지 15는 각 시료(Control\_S, E.W.C\_S, E.L.M\_S, E.W.L\_S)별 검출된 D-panose와 말토실-이소말토올리고당(Maltosyl-Isomaltooligosaccharide; MIMO)을 발효 시간별로 변화한 결과를 나타내었다. 상기 도 12 내지 15의 D-panose는 α-1,4 결합의 종말에 α-1,6 올리고당 사슬이 연결된 것이며, BDP 4 내지 7은 중합도가 4 내지 7인 환원성 말단에 말토오스 분자를 가지고 α-1,6 당결합된 말토실-이소말토올리고당을 의미한다.

[0173] HPLC 분석결과, 제시된 발효 방식을 통해 실험 균주들은 수크로오스와 말토오스를 이용하여 만니톨 생산과 더불어 기능성 올리고당인 D-panose, Branched maltosyl-isomaltooligosaccharides(D.P. 4-7)로 전환되는 것을 확인하였다. 젖산균을 첨가한 시료에서는 발효 12시간에 D-panose, BDP4 수치가 증가하기 시작하였고, E.W.C\_S, E.L.M\_S, E.W.L\_S는 각각 4.10%, 4.14%, 3.96%로 최대 수치를 나타내었다. BDP4는 발효 18시간에 0.60-1.18%, 24시간에 1.77-2.22%로 그 함량이 증가하였고, 중합도(DP)가 큰 BDP5 내지 BDP7 생성량이 증가하였다. 발효 24시간 후 최종 MIMO 함량은 control이 0.89%이고, E.W.C\_S, E.L.M\_S, E.W.L\_S는 5.89 내지 6.53% 함량을 나타내었다. 이런 특성에 따르면 알긴산 칼슘 카보네이트에 고정화된 젖산균을 이용하여 얻은 발효액은 건강 기능성 음료 제조에 사용될 수 있다.

[0175] 위 결과들에 따르면, 알긴산 칼슘 카보네이트에 고정화된 젖산균을 이용해 발효액을 만들면 젖산균이 최적화된 pH 조건에서 활성화되고, 이에 당전이효소의 활성도 증가하며, 기능성 만니톨, 기능성 올리고당 함량 등도 증가한다는 것을 확인하였다. 한편, 젖산균의 종류는 상기 특성들에 큰 영향을 미치지 않았다.

[0177] **2. 알긴산염 칼슘 카보네이트 비드의 종류에 따른 맥주의 특성**

[0178] 이하에서는, E.W.C를 첨가하여 제조된 발효액을 이용해 제조된 맥주 시료를 E.W.C\_B, E.L.M를 첨가하여 제조된 발효액을 이용해 제조된 맥주 시료를 E.L.M\_B, E.W.C, E.L.M을 첨가하여 제조된 발효액을 이용해 제조된 맥주 시료를 E.W.L\_B, 무처리구를 첨가하여 제조된 발효액을 이용해 제조된 맥주 시료를 Control\_B로 표현한다.

[0180] 하기 표 3은 전술한 4 종의 맥주 시료의 MIMO 함량, 칼슘 함량을 나타낸다.

**표 3**

| 시료        | MIMO 함량(% w/v) | 칼슘 함량 (mg/100 g) |
|-----------|----------------|------------------|
| Control_B | 0.89           | 5.09             |
| E.W.C_B   | 5.89           | 84.55            |
| E.L.M_B   | 6.52           | 71.38            |
| E.W.L_B   | 6.53           | 82.25            |

[0182] 상기 표 3에 나타난 바와 같이, Control\_B의 경우에 비해 젖산균을 이용한 올리고당 생성 발효를 한 맥주에서 높은 MIMO 함량과 칼슘 함량을 나타냈다. 우유의 칼슘함량이 105.0 mg/100 g인 것과 비교해, E.W.C\_B, E.L.M\_B 및 E.W.L\_B의 칼슘 함량이 적지 않다는 것을 알 수 있다.

[0184] 하기 표 4는 전술한 4 종의 맥주 시료의 색, 쓴맛, 알코올 함량을 나타낸다.

**표 4**

| 시료        | 맥주 특성       |            |               |
|-----------|-------------|------------|---------------|
|           | SRM (color) | 쓴맛 (BU)    | 알코올 함량(% v/v) |
| Control_B | 7.26±0.01   | 39.72±2.22 | 4.80          |
| E.W.C_B   | 5.39±0.01   | 29.18±3.87 | 2.80          |
| E.L.M_B   | 5.94±0.01   | 31.12±1.20 | 2.90          |
| E.W.L_B   | 5.18±0.01   | 32.40±0.77 | 2.70          |

[0186] 맥주의 SRM(색)은 주류분석 규정에 따른 것으로 control\_B가 유의적으로 높은 값을 나타냈다. 이는 젖산균을 이용한 올리고당 생성 발효를 한 시료들과의 차이로 젖산균을 이용한 올리고당 생성 발효가 맥주의 색상을 열게 하는 것으로 보인다. 맥주의 쓴맛은 Control\_B 와 비교해서 나머지 시료들이 낮은 BU값을 나타냈다. 이는 젖산균을 이용한 올리고당 생성 발효에 의한 효소 반응으로 생성된 당 성분의 함량이 높아 쓴맛이 상쇄되는 것으로 보인다. 알코올 함량은 Control\_B 와 비교해서 나머지 시료들이 낮은 값을 보인다.

[0188] 하기 표 5는 전술한 4 종의 맥주 시료의 관능 검사 결과를 나타낸다.

표 5

| 시료        | 감각적 특성    |               |               |               |               |               |               |               |
|-----------|-----------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|
|           | 색         | 맛             | 단맛            | 쓴맛            | 신맛            | 풍성함           | 뒷맛            | 전체적인 기호도      |
| Control_B | 6.58±1.72 | 5.53<br>±2.05 | 3.05<br>±1.48 | 3.85<br>±1.61 | 4.18<br>±1.75 | 4.08<br>±1.69 | 3.88<br>±2.00 | 3.73<br>±1.41 |
| E.W.C_B   | 4.97±1.80 | 6.08<br>±1.49 | 5.10<br>±1.69 | 4.48<br>±1.88 | 5.13<br>±1.76 | 5.55<br>±1.08 | 5.35<br>±1.59 | 5.98<br>±1.53 |
| E.L.M_B   | 5.68±1.10 | 6.20<br>±1.51 | 4.95<br>±1.57 | 4.60<br>±1.77 | 5.38<br>±1.43 | 5.55<br>±1.08 | 5.50<br>±1.65 | 5.90<br>±1.39 |
| E.W.L_B   | 4.95±1.89 | 5.63<br>±1.58 | 4.73<br>±1.68 | 5.28<br>±1.60 | 5.13<br>±1.56 | 5.33<br>±1.58 | 5.23<br>±1.78 | 5.65<br>±1.56 |
| G product | 5.85±1.10 | 5.98<br>±1.94 | 4.68<br>±1.58 | 5.18<br>±2.47 | 5.50<br>±1.59 | 5.63<br>±1.56 | 5.75<br>±1.56 | 6.03<br>±1.62 |
| F-value   | 7.496     | 1.138         | 10.707        | 3.731         | 4.131         | 7.994         | 7.240         | 16.848        |

[0190] (G product: 시판 맥주(Green blaze IPA)) 표 5에 나타난 바와 같이, Control\_B의 경우 젖산균을 이용한 다른 시료들 보다 단맛, 쓴맛, 신맛, 풍성함, 뒷맛 및 전체적 기호도에서 모두 낮은 기호도를 나타냈다.

[0192] 3. 알코올 발효 방법에 따른 맥주의 특성

[0193] 전술한 바와 같이, 본 발명자들은 *Leuconostoc mesenteroides* 가 고정화된 알긴산염 칼슘 카보네이트 비드, 즉 E.L.M을 이용한 올리고당 생성 발효로 얻은 1차 발효액을 상온의 혐기 조건에서 가스를 배출하며 5일간 알코올 발효(알코올 주발효 제1 단계)시켜 2차 발효액을 얻었고, 상기 2차 발효액을 상온의 혐기 조건에서 가스를 배출하지 않으면서 추가 발효(알코올 주발효 제2 단계)시켜 3차 발효액을 얻은 후, 4℃의 냉장조건에서 4주간 보관(알코올 부발효)하여 맥주를 생산하였다.

[0194] 또한, 본 발명자들은 비교를 위해 E.L.M을 이용한 올리고당 생성 발효 후 얻은 1차 발효액을 혐기 조건에서 가스를 배출하며 10일 발효시켜 발효액을 얻은 후, 4℃의 냉장조건에서 4주간 보관하여 맥주를 생산하였다.

[0195] 한편, 효모의 종류에 따라 맥주의 특성이 달라지는 것이 아닌지 확인하기 위해서 3 종의 시판 효모 French Saison(mangrove jack's, BGGi NZ Ltd, Newzealand), Safale S-04(Fermentis, Lesaffre, England), Safale US-05(Fermentis, Lesaffre, England)를 사용하여 맥주를 제조하여 각각의 특성을 분석하였다.

[0197] 하기 표 6은 3종의 효모를 이용해 알코올 주발효 제1 단계 후 얻은 2차 발효액의 가용성 고형분 함량, pH, 적정 산도, 환원당을 나타낸다. 또한, 알코올 주발효 제2 단계 후 얻은 3차 발효액의 가용성 고형분 함량을 나타낸다.

표 6

| 실험 방법           | 효모            | pH        | 적정 산도(%)  | 2차 발효액 가용성 고형분(Brix °) | 2차 발효액 환원당(%) | 3차 발효액 가용성 고형분(Brix °) |
|-----------------|---------------|-----------|-----------|------------------------|---------------|------------------------|
| 알코올 주발효 제1 단계 및 | French Saison | 3.93±0.01 | 0.40±0.01 | 9.8±0.0                | 2.86±0.06     | 8.5±0.0                |
|                 | Safale S-04   | 3.97±0.00 | 0.34±0.00 | 10.1±0.0               | 3.28±0.10     | 8.9±0.0                |
| 알코올 주발효 제2 단계   | Safale US-05  | 3.76±0.01 | 0.35±0.02 | 10.2±0.0               | 2.64±0.01     | 9.0±0.0                |



[0201] 하기 표 7은 3종의 효모를 이용해 혐기 조건에서 10일 알코올 발효 후 얻은 발효액의 가용성 고형분 함량, pH, 적정 산도, 환원당을 나타낸다.

표 7

[0203]

| 실험 방법  | 효모            | pH        | 적정 산도(%)  | 10일 발효 후 발효액의 가용성 고형분(Brix °) | 환원당(%)    |
|--------|---------------|-----------|-----------|-------------------------------|-----------|
| 10일 발효 | French Saison | 4.00±0.00 | 0.46±0.02 | 7.7±0.0                       | 1.00±0.00 |
|        | Safale S-04   | 4.03±0.02 | 0.36±0.02 | 9.1±0.0                       | 1.74±0.06 |
|        | Safale US-05  | 3.83±0.00 | 0.36±0.00 | 8.8±0.0                       | 1.57±0.01 |

[0204] 상기 표 6 및 7에 나타난 바와 같이, 알코올 주발효 제1 단계에서 얻어진 2차 발효액은, 10일 동안 혐기 조건에서 가스를 배출하며 발효시켜 얻어진 발효액 보다 가용성 고형분 함량이 높았다. 이는 알코올 주발효 제1 단계를 통해 얻은 각 시료들은 10일 발효 후 얻은 시료들에 비해 잔여 당을 남겨놓고 발효를 멈추었기 때문이다.

[0205] 한편, 3차 발효액의 가용성 고형분 함량은, 10일 동안 혐기 조건에서 가스를 배출하며 발효시켜 얻어진 발효액의 가용성 고형분 함량과 차이가 크지 않았으며, 이는 2차 발효액 내의 잔여 당을 알코올 주발효 제2 단계의 발효를 통해 소모한 것을 의미한다.

[0206] 한편, pH 및 적정산도에서는 차이가 나타나지 않았고, 3 종의 효모 간 발효 양상 차이는 크게 나타나지 않았다.

[0208] 하기 표 8은 전술한 알코올 주발효 제1 단계 및 알코올 주발효 제2 단계를 거쳐 얻어진 3차 발효액을 이용해 제조한 맥주와 혐기 조건에서 가스를 배출하며 10일간 발효 후 얻어진 발효액을 이용해 제조한 맥주의 기호도 조사를 통한 관능 검사 결과를 나타낸다.

표 8

[0209]

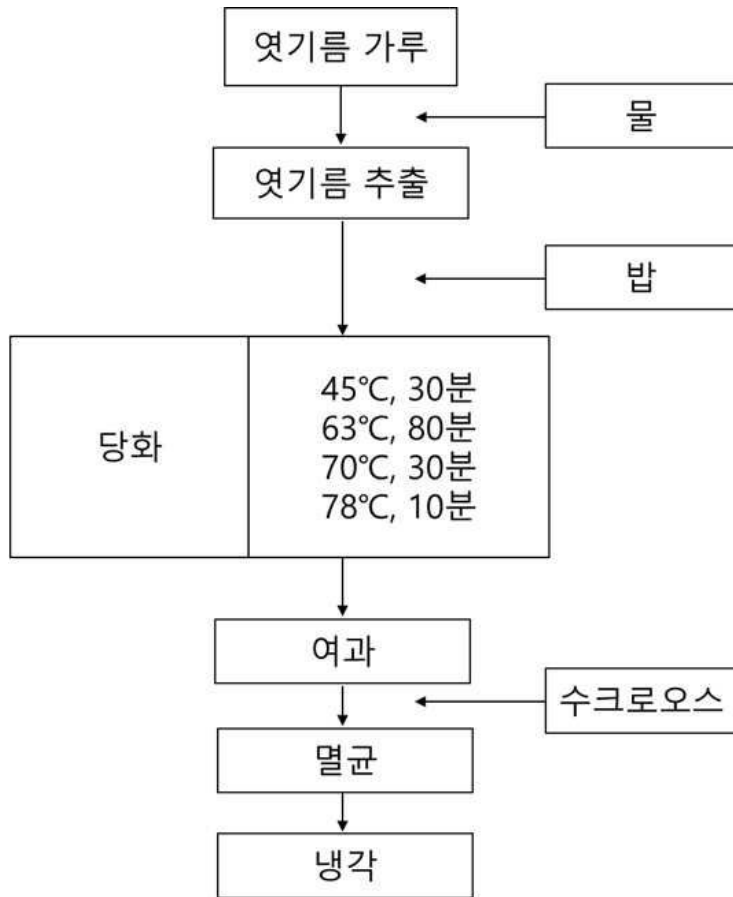
| 발효 방식           | 효모            | 맛                         | 전체적인 기호도                       |
|-----------------|---------------|---------------------------|--------------------------------|
| 알코올 주발효 제1 단계 및 | French Saison | 청주취가 없는 발효향               | 맛이 부드럽고, 탄산감이 좋음               |
|                 | Safale S-04   | 청주취가 미세하게 나타남             | 미세한 청주 맛이 느껴짐                  |
| 알코올 주발효 제2 단계   | Safale US-05  | 청주취가 나타나지 않고, 부드러운 향이 나타남 | 일반적인 맥주와 맛이 유사하고, 부드러운 단맛이 느껴짐 |
| 10일 발효          | French Saison | 청주취가 나타남                  | 청주 맛이 나고, 멍멍한 맛이 났으며, 발효취가 남   |
|                 | Safale S-04   | 강한 청주취가 나타남               | 강한 약주 맛이 나며, 쓴 맛이 강함           |
|                 | Safale US-05  | 청주취가 나타남                  | 청주 맛이 나고, 풋내가 남                |

[0210] 상기 표 8에 나타난 바와 같이, 10일 동안 효모 발효된 시료들은 청주취(청주 냄새) 등의 이취가 존재한다는 의견이 있었으나, 5일 동안 효모 발효(알코올 주발효 제1 단계) 후 추가 발효(알코올 주발효 제2 단계) 시켜 얻은 맥주는 전반적으로 청주취가 나타나지 않고 부드러운 단맛을 느낄 수 있으며, 기호도가 높은 경향성을 나타내었다. 한편, 관능 검사 결과에 있어서도 3 종류의 효모 간의 차이는 크게 나타나지 않았다.

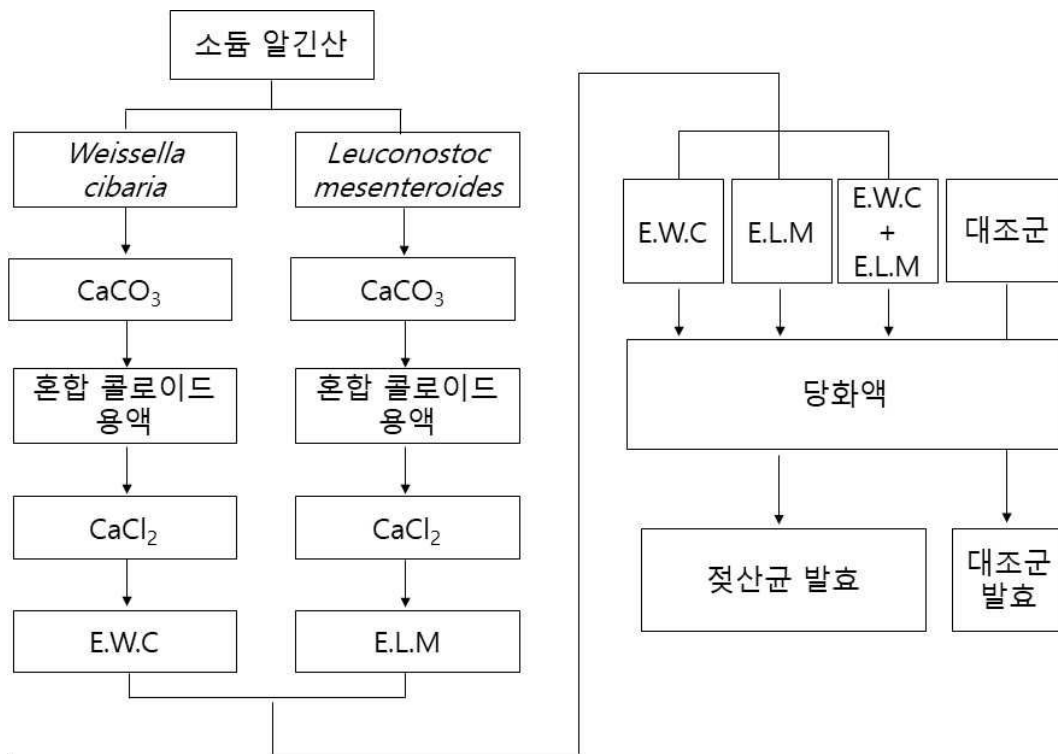
[0211] 즉, 두 단계의 효모 발효를 통해 당을 소모시켜 맥주를 제조하는 경우, 청주취와 같은 이취가 없고 보다 기호도가 높은 맥주가 생산될 수 있다는 것을 확인하였다.

도면

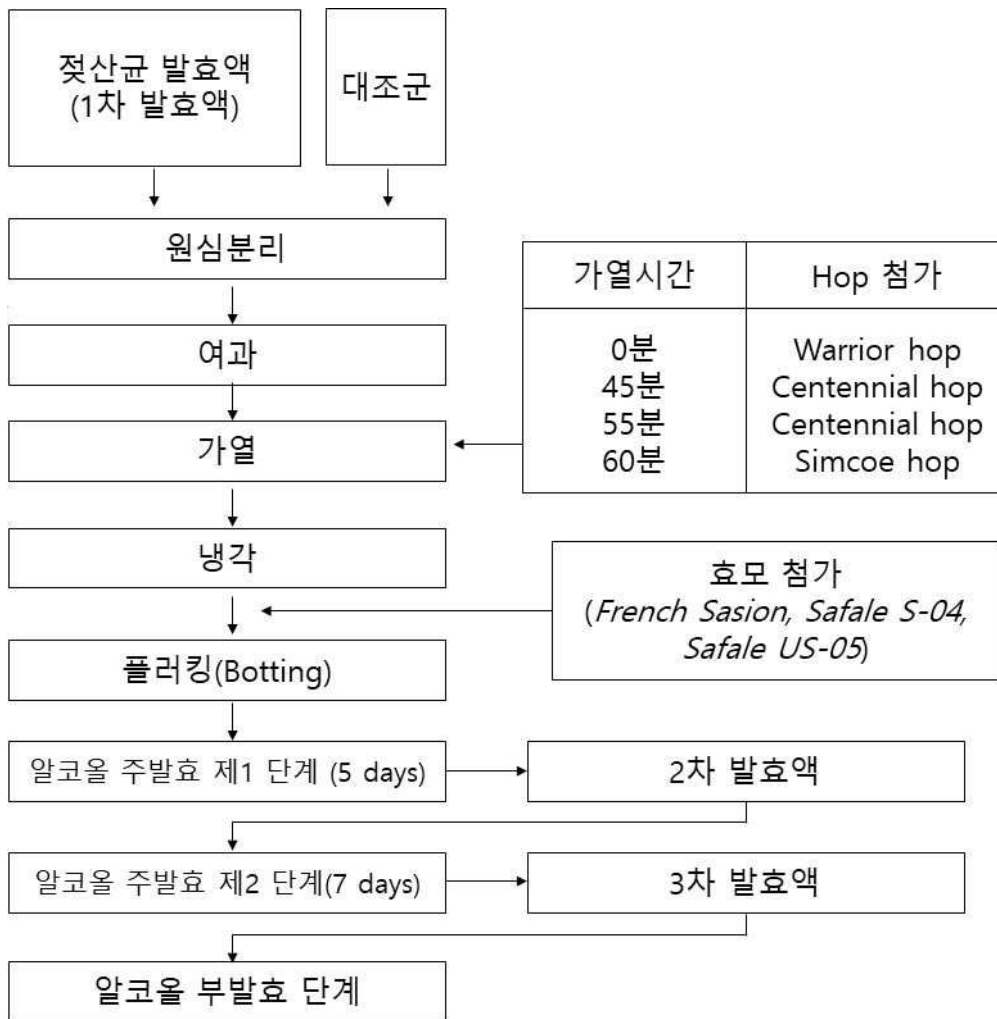
도면1



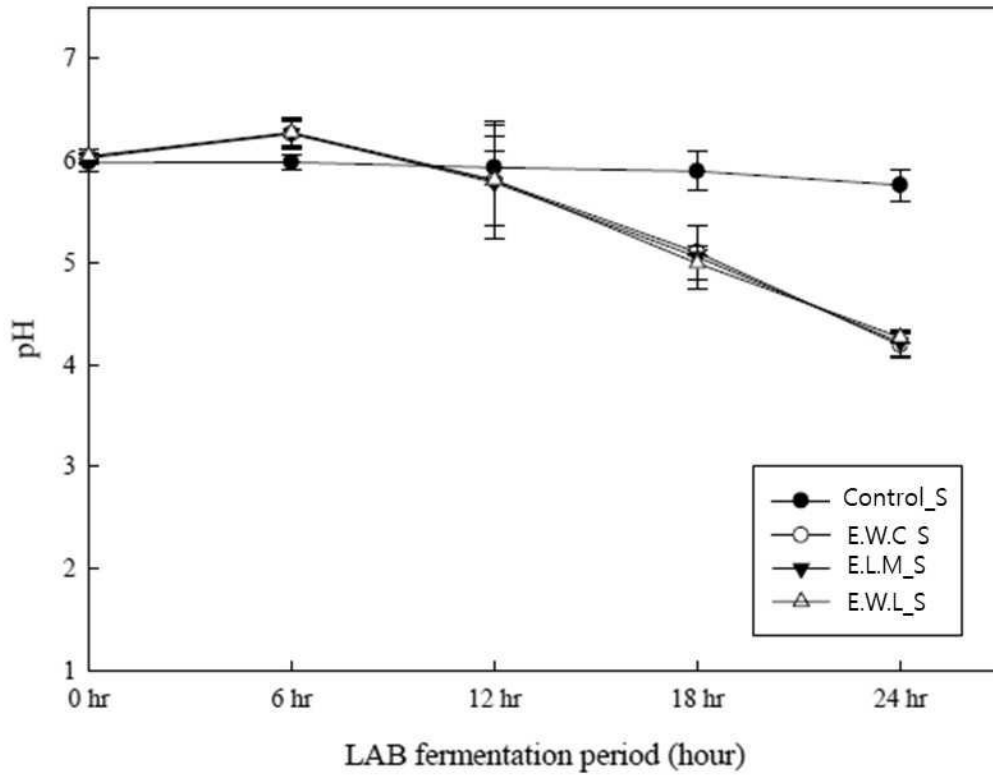
도면2



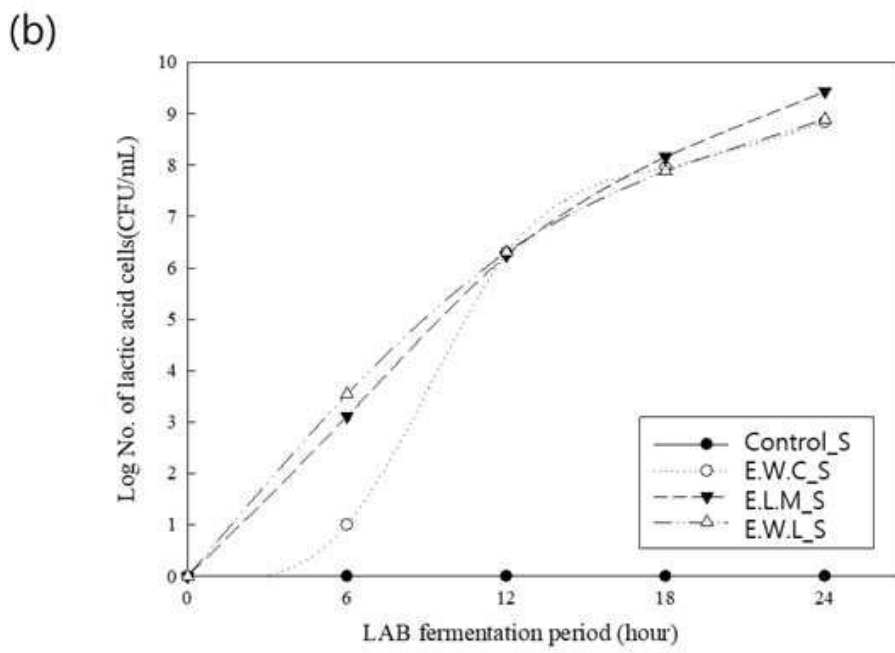
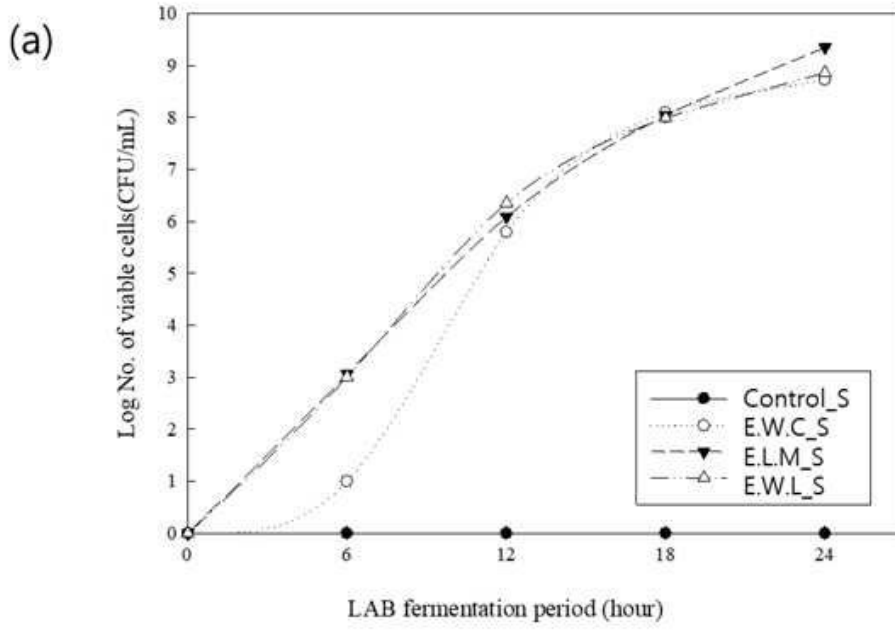
도면3



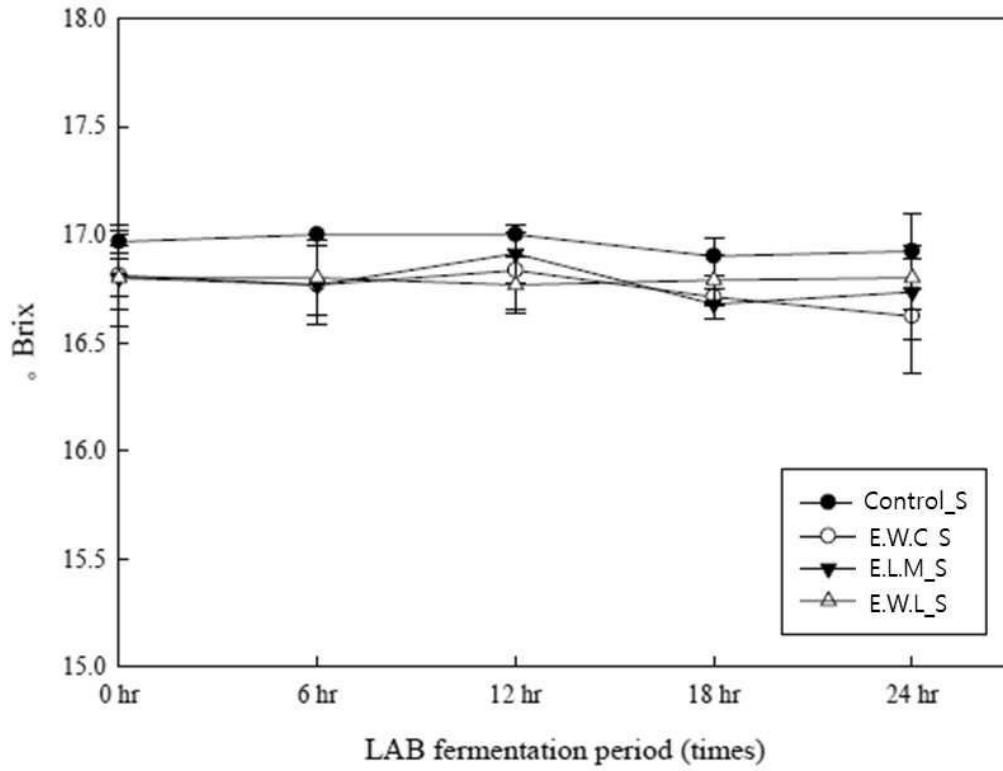
도면4



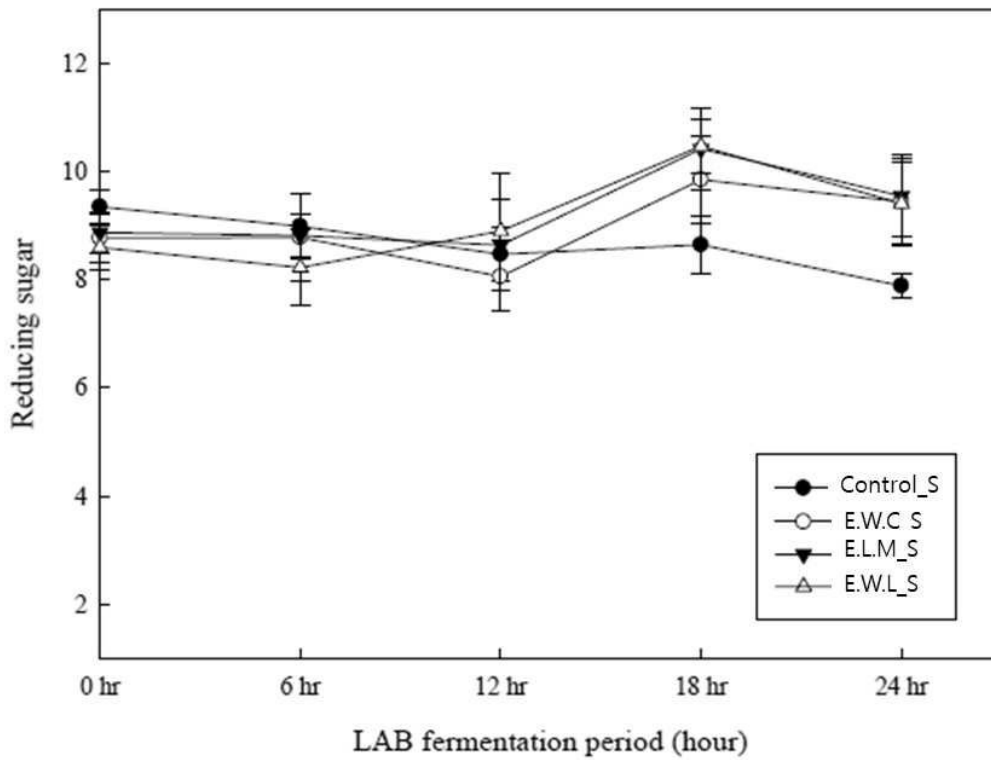
도면5



도면6

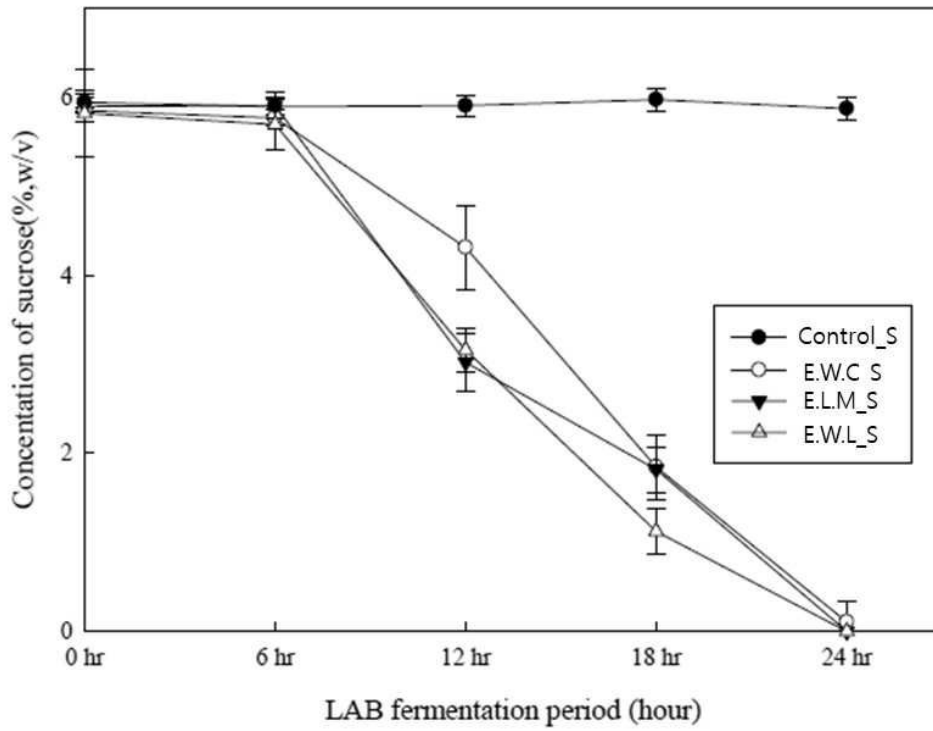


도면7

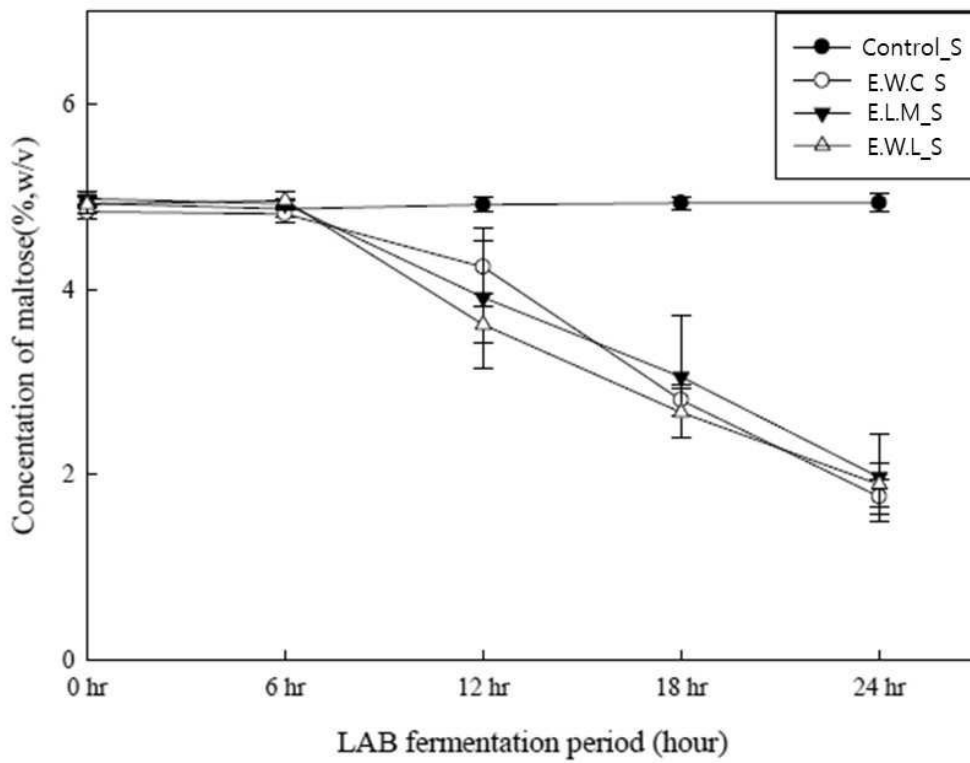




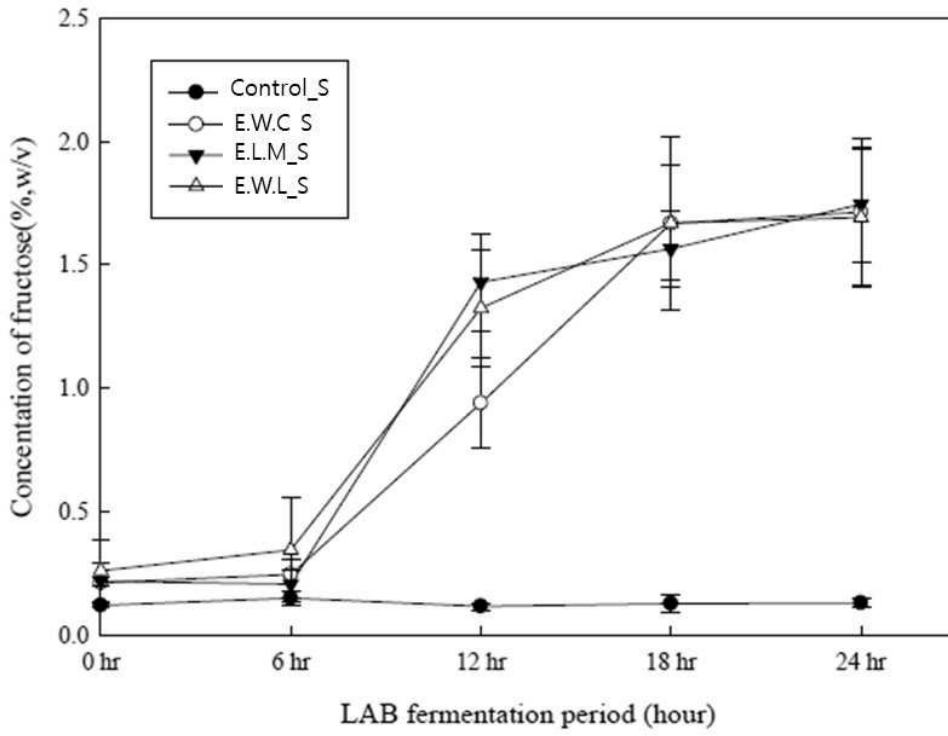
도면8



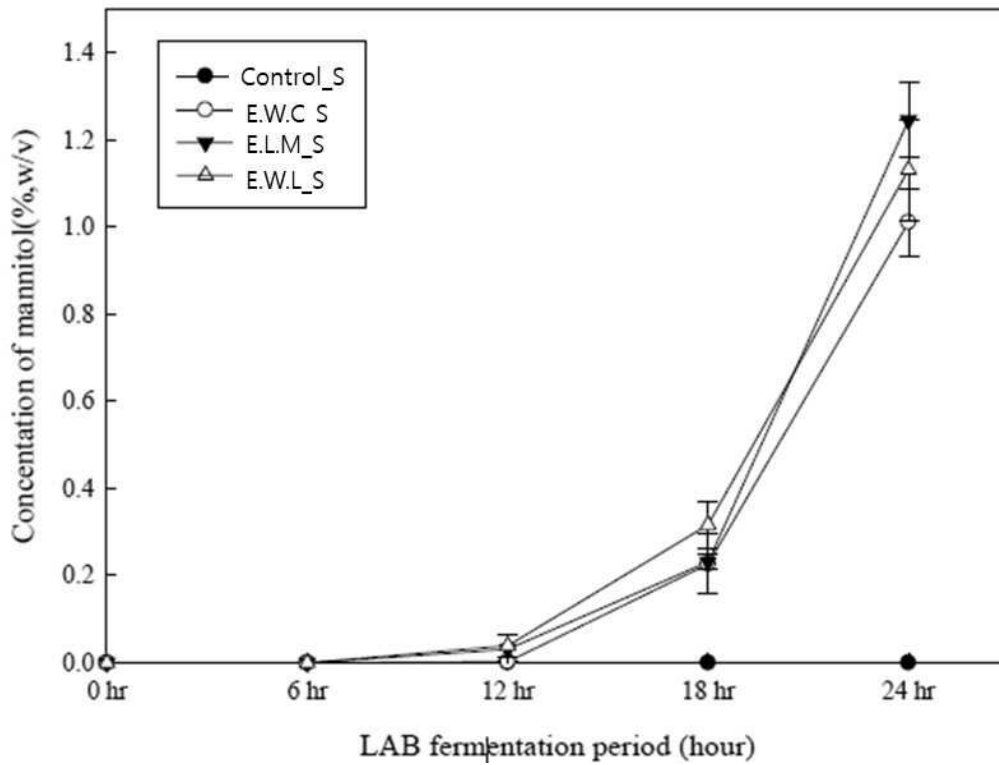
도면9



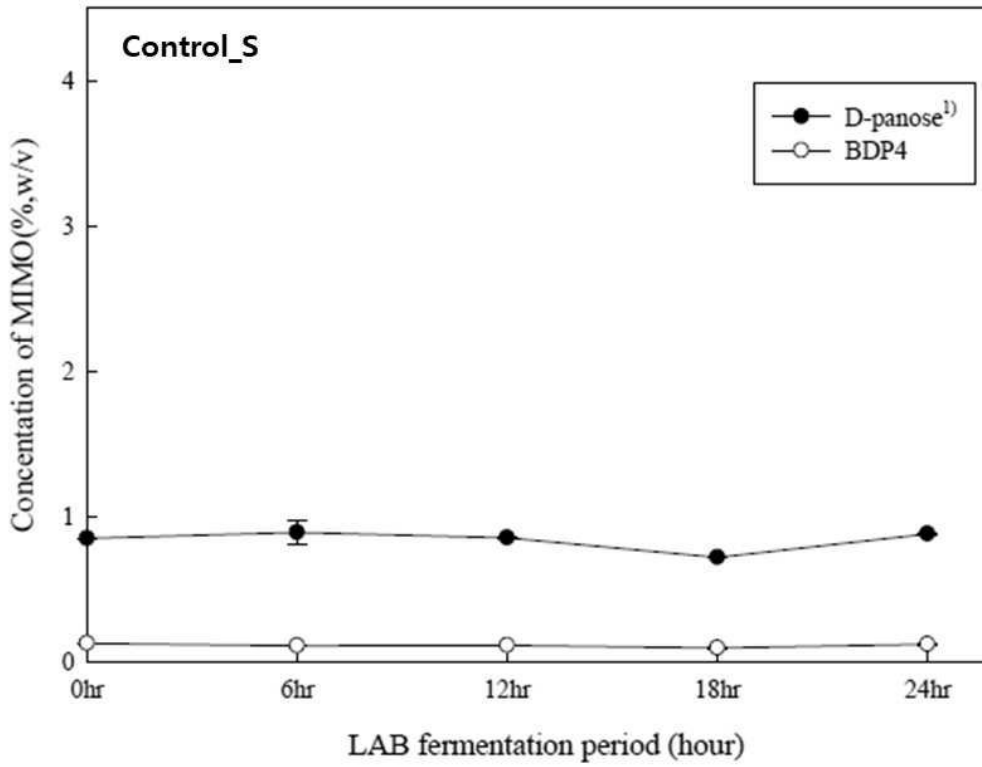
도면10



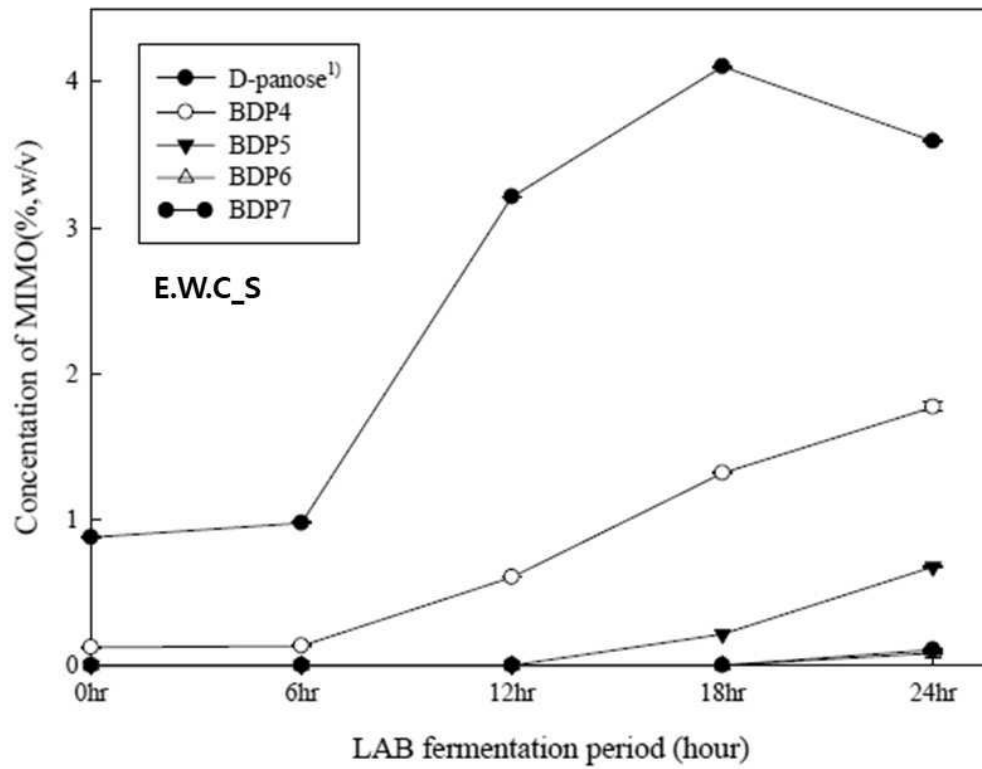
도면11



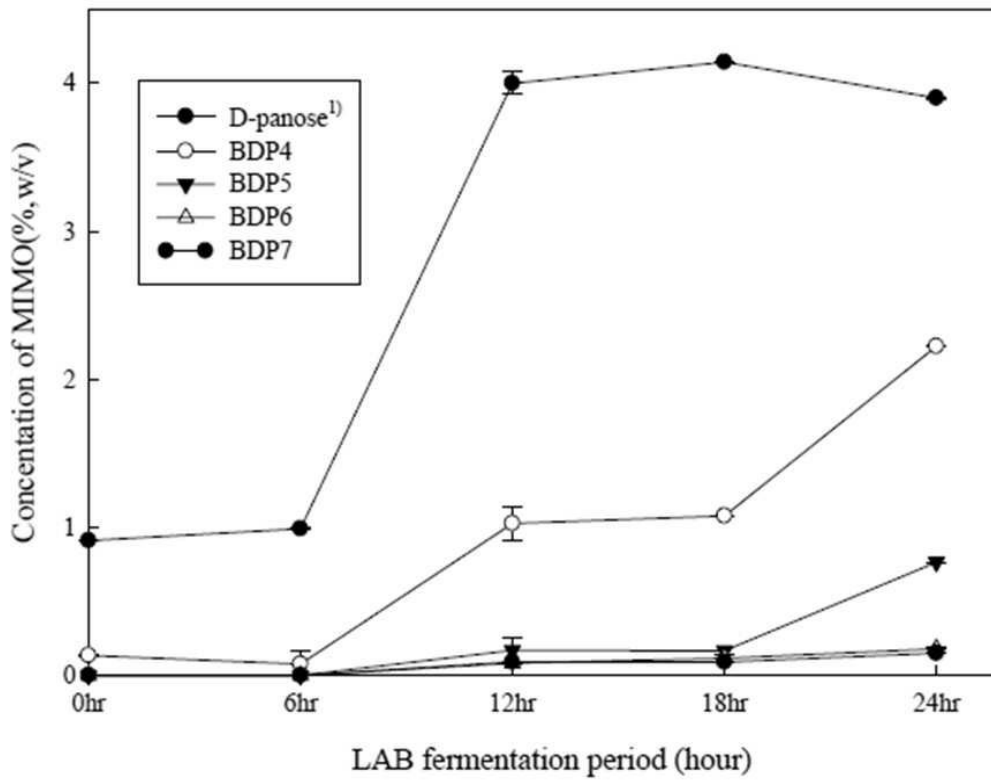
도면12



도면13



도면14



도면15

