



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2012-0076841
(43) 공개일자 2012년07월10일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A23L 1/22 (2006.01) C12N 1/16 (2006.01)
C12N 1/20 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2010-0138569
(22) 출원일자 2010년12월30일
심사청구일자 2010년12월30일

(71) 출원인
주식회사농심
서울특별시 동작구 여의대방로 112 (신대방동,
농심신대방동사옥)
(72) 발명자
김종훈
경기도 고양시 일산서구 고양대로 624, 태영데시
앙 101동 202호 (일산동)
이현준
인천광역시 부평구 부흥로 246, 26동 512호 (부
평동, 동아아파트)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인세립

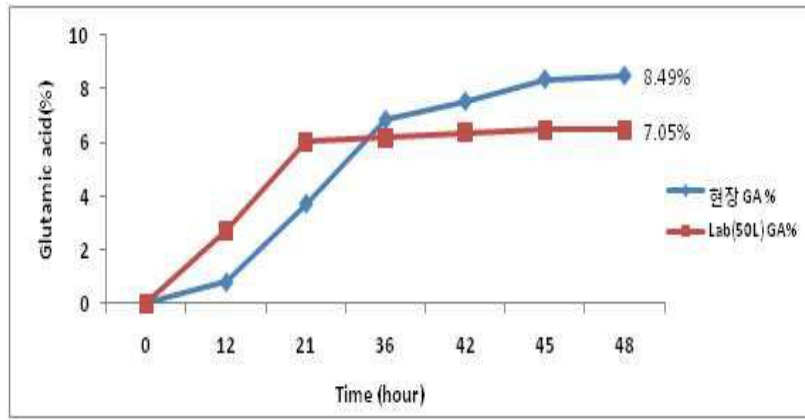
전체 청구항 수 : 총 12 항

(54) 발명의 명칭 식물성 단백질 가수분해물의 제조방법

(57) 요약

본 발명은 고 프로테아제 및 글루타미나아제 활성을 가진 균주를 선정하여 식물성 단백질을 잡균의 오염 없이 아스퍼질러스 오리제(*Aspergillus oryzae*)의 액상 배양액과 혼합하여 가수분해 공정을 실시함으로써 감칠맛이 우수한 식물성 단백질의 가수분해물을 제조하고자 한다.

대표도 - 도18



(72) 발명자

박선화

경기도 파주시 파주읍 향양말길 121

최호덕

경기도 과천시 별양로 111, 주공APT 501동 505호
(별양동)

김용휘

서울특별시 광진구 광나루로 346, 브라운스톤 50
8호 (화양동)

이창운

서울특별시 관악구 조원로 81-6, 103호 (신림동)

박수현

경기도 성남시 분당구 미금로 251, 701동 1201호
(금곡동, 청솔마을)

심선택

서울특별시 서초구 우면동 59번지(42/5) 동양고속
아파트 103동 504호

민병중

서울특별시 서초구 방배로37길 26-9, 102동 801호
(방배동, 쌍용예가클래식)

특허청구의 범위

청구항 1

아스퍼질러스 오리제의 프로테아제 및 글루타미나아제 활성을 향상시키는 단계;

식물성 단백질의 분산액을 형성하는 단계;

상기 아스퍼질러스 오리제를 상기 식물성 단백질의 분산액에 접종하여 상기 식물성 단백질을 발효시키는 단계; 및

상기 발효된 식물성 단백질을 정제하여 분말화하는 단계;를 포함하는 식물성 단백질 가수분해물의 제조방법.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 아스퍼질러스 오리제의 프로테아제 및 글루타미나아제의 활성을 향상시키는 단계는

아스퍼질러스 오리제를 0.5~3mm의 크기로 분쇄(grinding)하는 단계; 및

5~20g/L 유기질소원, 5~20g/L 멸균 포도당, 5~20g/L 효모추출물, 1~10g/L 인산칼륨, 0.1~2g/L 황산 마그네슘을 포함하는 배양액에 상기 아스퍼질러스를 배양하는 것을 포함하는 식물성 단백질 가수분해물의 제조방법.

청구항 3

제2항에 있어서,

상기 유기질소원은 탈지대두, 소맥 글루텐 및 분리대두단백으로 이루어진 그룹에서 적어도 하나 선택되는 식물성 단백질 가수분해물의 제조방법.

청구항 4

제1항 또는 제2항에 있어서,

상기 아스퍼질러스 오리제는 아스퍼질러스 오리제 KCCM 12042 또는 아스퍼질러스 오리제 KCCM 60166인 식물성 단백질 가수분해물의 제조방법.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 식물성 단백질은 소맥 글루텐, 콩 단백질, 옥수수 단백질 또는 쌀 단백질인 식물성 단백질 가수분해물의 제조방법.

청구항 6

제1항 또는 제5항에 있어서,

상기 식물성 단백질의 평균 입자 크기는 10~100 μ m인 식물성 단백질 가수분해물의 제조방법.

청구항 7

제1항에 있어서,

상기 식물성 단백질 분산액을 115~125 $^{\circ}$ C에서 15~25분간 멸균하는 단계를 더 포함하는 식물성 단백질 가수분해물의 제조방법.

청구항 8

제1항에 있어서,

상기 발효하는 단계는 28~36 $^{\circ}$ C에서 6시간 내지 5일간 1차 발효하는 단계 및 40~50 $^{\circ}$ C에서 3시간 내지 5일간 2

차 발효하는 단계를 포함하는 식물성 단백질 가수분해물의 제조방법.

청구항 9

제1항 또는 제8항에 있어서,

상기 발효하는 단계는 0~6%의 염 농도 하에서 교반하면서 이루어지는 식물성 단백질 가수분해물의 제조방법.

청구항 10

제1항 또는 제2항에 있어서,

발효 전의 상기 아스퍼질러스 오리제는 계대배양하면서 보관하거나 동결 건조상태로 보관하는 식물성 단백질 가수분해물의 제조방법.

청구항 11

제10항에 있어서,

상기 계대배양은 1회 또는 2회 진행되는 식물성 단백질 가수분해물의 제조방법.

청구항 12

제1항에 의해 제조된 식물성 단백질 가수분해물로서,

글루탐산 함량이 5~20%이고, 펩타이드의 함량이 총 건조 중량에 대하여 20~60%인 식물성 단백질 가수분해물.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 고 프로테아제 및 글루타미나아제를 지닌 미생물을 이용한 식물성 단백질 가수분해물의 제조방법에 관한 것이다. 더 구체적으로, 본 발명은 고체 상태의 식물성 단백질 및 아스퍼질러스 오리제(*Aspergillus oryzae*)의 액상 배양액을 혼합하여 무염 또는 저염, 무균 조건하에서 가수분해 반응을 통하여 생산된 단백 가수분해물을 분리, 정제 및 건조하여 발효 조미 소재를 제조하는 방법 및 이를 이용한 식품 조미료 및 가공식품 생산에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 식품의 맛은 단맛, 짠맛, 신맛, 쓴맛 4가지 맛을 기본으로, 감칠맛을 더하여 총 5가지로 구성되어있다. 감칠맛은 식품의 맛의 조화를 결정하는 주요 인자로, 글루탐산염(Mono Sodium Glutamate, MSG)이나 핵산계인 이노신산나트륨(IMP)과 구아닐산나트륨(GMP) 등이 대표적인 감칠맛을 내는 것으로 알려져 있다. 이중 글루탐산염(MSG)은 식품의 맛을 향상시키기 위해 보편적으로 사용되는 물질로, 초기에는 다시마에서 추출하여 제조하였으나, 경제성 확보를 위해 소맥 글루텐을 산가수분해하여 제조하였다.

[0003] 산가수분해 단백질(aHVP)은 공정 중 원료에 미량 존재하는 유지의 구성성분인 글리세린과 염산(염소)이 반응하여 생성되는 모노클로로프로판올(3-chloro-1,2-propanediol, MCPD)과 디클로로프로판올(1,3-dichloro-2-propanal, DCP)과 같은 클로로하이드린(chlorohydrin)의 유해성 논란이 일어나고 있어 식품으로 문제가 되고 있다. 따라서 대부분 콩 단백질, 옥수수 단백질과 소맥 글루텐 등과 같은 식물성 단백질을 이용한 효소 가수분해 단백질(enzyme Hydrolyzed Vegetable Protein; eHVP)이 생산되고 있으나, 상업적으로 구매가능한 단백질 분해효소를 이용한 eHVP의 생산은 단백질의 불완전 분해로 인한 쓴맛 물질의 생성 및 경제성이 떨어진다는 한계가 있다. 그럼에도, 최근 소비자의 "천연식품"에 대한 선호가 증가함에 따라 사용이 제한된 글루탐산염을 대체하기 위하여 식물 단백질 가수 분해물(HVP)을 일반적으로 사용하고 있다.

[0004] 발효를 통한 식물 단백질의 가수분해 단백질(Hydrolyzed Vegetable Protein; HVP)은 간장 및 된장 등의 전통 발효식품의 주된 맛의 근원으로, 이는 단백질의 가수분해산물인 유리 아미노산과 short/medium peptides를 기반으로 구성되어 있다. 이러한 아미노산 용액을 발효를 통하여 생산하기 위해 다양한 방법이 시도되고 있으며, 통상적으로 아스퍼질러스 오리제(*Aspergillus oryzae*)가 사용된다. 그러나 일반적으로 아스퍼질러스를 이용하여 단백질을 액상 발효할 경우, 아스퍼질러스의 pellet growth로 인해 균체의 증식이 억제되어 상업

적 액상 발효의 효율성 및 경제성이 떨어져 사용이 제한되고 있다.

[0005] 아스퍼질러스를 이용한 액상 발효를 통해 조미소재를 생산할 경우, 가장 큰 문제는 식물성 단백질(특히, 고글루타민 함량을 지닌 밀단백질의 경우)의 발효조 내에서의 분산에 한계를 지녀 경제적 미생물 발효 공정 개발에 제한을 가진다는 점이다. 또한, 식물 단백질 원료로부터 단백질 가수분해물을 제조하는 가수분해 공정에서 효소원으로 이용되는 미생물 이외의 잡균이 빈번하게 증식하여 가수분해물의 품질과 아미노산 수율이 저하되는 문제가 있다. 이를 해결하기 위해 다량의 염이나 알코올 등의 정균 물질을 첨가하는 것이 일반적이나, 이 첨가물들은 효소의 작용을 저해하여 분해시간이 길어지고 공정 종료 후 첨가물을 분리, 제거하는 부가공정이 필요하다. 특히, 식염을 사용하는 경우, 적당한 농도 이하로 식염을 제거하지 않으면 생산된 단백질 가수분해물의 이용 범위를 현저하게 제한하는 결과를 가져온다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 본 발명은 프로테아제 및 글루타미나아제 고활성을 가진 균주를 선정하여 식물성 단백질을 잡균의 오염 없이 아스퍼질러스 오리제(*Aspergillus oryzae*)의 액상 배양액과 혼합하여 가수분해 공정을 실시함으로써 감칠맛이 우수한 식물성 단백질의 가수분해물을 제조하고자 한다.

과제의 해결 수단

[0007] 본 발명의 일 측면은, 아스퍼질러스 오리제의 프로테아제 및 글루타미나아제 활성을 향상시키는 단계; 식물성 단백질의 분산액을 형성하는 단계; 상기 아스퍼질러스 오리제를 상기 식물성 단백질의 분산액에 접종하여 상기 식물성 단백질을 발효시키는 단계; 및 상기 발효된 식물성 단백질을 정제하여 분말화하는 단계;를 포함하는 식물성 단백질 가수분해물의 제조방법을 제공한다.

[0008] 상기 아스퍼질러스 오리제의 프로테아제 및 글루타미나아제의 활성을 향상시키는 단계는 아스퍼질러스 오리제를 0.5~3mm의 크기로 분쇄(grinding)하는 단계; 및 5~20g/L 유기질소원, 5~20g/L 멸균 포도당, 5~20g/L 효모 추출물, 1~10g/L 인산칼륨, 0.1~2g/L 황산 마그네슘을 포함하는 배양액에 상기 아스퍼질러스를 배양하는 것을 포함할 수 있다.

[0009] 이때, 유기질소원은 탈지대두, 소맥 글루텐 및 분리대두단백으로 이루어진 그룹에서 적어도 하나 선택될 수 있다.

[0010] 또한, 상기 아스퍼질러스 오리제는 아스퍼질러스 오리제 KCCM 12042 또는 아스퍼질러스 오리제 KCCM 60166일 수 있다.

[0011] 또한, 상기 식물성 단백질은 소맥 글루텐, 콩 단백질, 옥수수 단백질 또는 쌀 단백질일 수 있다.

[0012] 이때, 상기 식물성 단백질의 평균 입자 크기는 10~100 μ m일 수 있다.

[0013] 또한, 식물성 단백질 가수분해물의 제조방법은 상기 식물성 단백질 분산액을 115~125 $^{\circ}$ C에서 15~25분간 멸균하는 단계를 더 포함할 수 있다.

[0014] 또한, 상기 발효하는 단계는 상기 발효하는 단계는 28~36 $^{\circ}$ C에서 6시간 내지 5일간 1차 발효하는 단계 및 40~50 $^{\circ}$ C에서 3시간 내지 5일간 2차 발효하는 단계를 포함할 수 있다. 이때, 상기 발효하는 단계는 0~6%의 염 농도 하에서 교반하면서 이루어질 수 있다.

- [0015] 발효 전의 상기 아스퍼질러스 오리제는 계대배양하면서 보관하거나 동결 건조상태로 보관할 수 있다.
- [0016] 이때, 상기 계대배양은 1회 또는 2회 진행될 수 있다.
- [0017] 본 발명의 다른 측면은 상기 방법에 의해 제조된 식물성 단백질 가수분해물로서, 글루탐산 함량이 5~20%이고, 펩타이드의 함량이 총 건조 중량에 대하여 20~60%인 식물성 단백질 가수분해물을 제공한다.
- [0018] 즉, 본 발명은 상기와 같은 목적을 달성하기 위하여,
- [0019] (1) 식물 단백질 가수분해를 위한 고 활성 프로테아제 및 글루타미나아제 생산을 위한 균주를 선정하고,
- [0020] (2) 균주의 효율적 액상 발효를 통한 고 활성 프로테아제 및 글루타미나아제 생산을 위한 미생물 전처리 기술과 보관 기술을 제공하며,
- [0021] (3) 무염 및 저염, 무균의 식물성 단백질의 발효를 통한 가수분해 공정 개발을 위한 식물성 단백질의 처리 기술을 제공하고,
- [0022] (4) 선발된 미생물의 프로테아제 및 글루타미나아제 활성을 극대화하는 방법을 제공하며,
- [0023] (5) 선발된 미생물과 식물성 단백질을 이용한 발효 공정의 최적화 방법을 제공하고,
- [0024] (6) 이미 및 이취를 제거하기 위한 식물성 단백질 가수분해물의 분리 및 정제 기술 공정을 제공하며,
- [0025] (7) 식물성 단백질 가수분해물의 관능 평가 및 특성에 관련된 기술을 제공하고,
- [0026] (8) 생산된 조미소재를 이용하여 조미료 및 가공 식품을 생산하는 기술을 제공한다.

발명의 효과

- [0027] 전 세계의 향료 및 조미료 원료물질의 시장 구조는 유기합성에 의한 합성 향료가 전체의 70%를 차지하고 있으나, 세계적으로나 국내의 국민소득의 증가와 천연 식품 및 향미 소재의 요구, 소비자의 고급화 추세로 인한 천연 조미료가 식품 안정성과 기호도에서 선호되고 있다. 따라서 발효를 통한 식물성 단백질의 가수분해물은 고부가의 천연 발효 조미소재로 수입대체 효과와 더불어 국내 식품 업계의 국제화를 기대할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0028] 도 1은 아스퍼질러스 오리제의 액상 배양을 통한 식물 단백질 유래 발효 조미 소재 제조 공정을 나타내는 순서도이다.
- 도 2는 4종의 배지에 따른 수원 발효균(아스퍼질러스 오리제)의 프로테아제 활성의 변화를 나타낸 그래프이다.
- 도 3은 4종의 배지에 따른 층무 발효균(아스퍼질러스 오리제)의 프로테아제 활성의 변화를 나타낸 그래프이다.
- 도 4는 4종의 배지에 따른 아스퍼질러스 오리제 KCCM 12042의 프로테아제 활성의 변화를 나타낸 그래프이다.
- 도 5는 4종의 배지에 따른 아스퍼질러스 오리제 KCCM 60166의 프로테아제 활성의 변화를 나타낸 그래프이다.
- 도 6은 당 농도에 따른 아스퍼질러스 오리제 KCCM 60166의 프로테아제 활성의 변화를 나타낸 그래프이다.
- 도 7은 유기질소원 종류에 따른 아스퍼질러스 오리제 KCCM 60166의 프로테아제 활성의 변화를 나타낸 그래프이다.
- 도 8은 시간에 따른 아스퍼질러스 오리제 KCCM 60166의 프로테아제 활성을 나타낸 그래프이다.
- 도 9는 시간에 따른 아스퍼질러스 오리제 KCCM 60166의 글루타미나아제 활성을 나타낸 그래프이다.
- 도 10은 시간에 따른 아스퍼질러스 오리제 KCCM 60166의 pH의 변화를 나타낸 그래프이다.
- 도 11은 계대배양 시 아스퍼질러스 오리제 KCCM 60166의 프로테아제 활성의 변화를 나타낸 그래프이다.
- 도 12는 아스퍼질러스 오리제 KCCM 60166으로 식물성 단백질의 가수분해 도중의 포도당과 글루탐산 함량의 변

화를 나타낸 그래프이다.

도 13은 아스퍼질러스 오리제 KCCM 60166으로 소맥 글루텐을 가수분해한 시간에 대한 글루탐산 함량을 나타낸 그래프이다.

도 14은 아스퍼질러스 오리제 KCCM 60166으로 가수분해된 식물성 가수분해물의 아미노산 프로파일이다.

도 15는 아지노모토 코지아지의 펩타이드 분석 크로마토그램이다.

도 16는 아스퍼질러스 오리제 KCCM 60166로 가수분해된 소맥 글루텐 가수분해물의 펩타이드 분석 크로마토그램이다.

도 17은 아지노모토 코지아지와 아스퍼질러스 오리제 KCCM 60166로 가수분해된 소맥 글루텐 가수분해물의 공통 피크를 비교한 그래프이다.

도 18은 과일릿과 현장 생산 시 글루탐산의 함량변화 그래프이다.

도 19은 아스퍼질러스 오리제 KCCM 60166로 가수분해한 콩 단백질, 옥수수 단백질 및 쌀 단백질의 가수분해물의 글루탐산 함량을 나타낸 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0029] 이하, 첨부한 도면을 참조하여 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자가 용이하게 실시할 수 있도록 구현예 및 실시예를 상세히 설명한다.
- [0030] 그러나 본 발명은 여러 가지 상이한 형태로 구현될 수 있으며, 여기서 설명하는 구현예 및 실시예에 한정되지 않는다. 그리고 도면에서 본 발명과 직접적으로 명확히 관계없는 부분은 생략하였으며, 명세서 전체를 통하여 유사한 부분에 대해서는 유사한 도면 부호를 붙였다.
- [0031] 본 명세서 전체에서, 어떤 부분이 어떤 구성요소를 "포함"한다고 할 때, 이는 특별히 반대되는 기재가 없는 한 다른 구성요소를 제외하는 것이 아니라 다른 구성 요소를 더 포함할 수 있는 것을 의미한다.
- [0032] 본 명세서에서 사용되는 정도의 용어 "약", "실질적으로" 등은 언급된 의미에 고유한 제조 및 물질 허용오차가 제시될 때 그 수치에서 또는 그 수치에 근접한 의미로 사용되고, 본 발명의 이해를 돕기 위해 정확하거나 절대적인 수치가 언급된 내용은 비양심적인 침해자가 부당하게 이용하는 것을 방지하기 위하여 사용된다.
- [0033] 발효를 이용한 식물 단백질 가수분해 반응에 생산되는 미생물로는 다양한 균을 이용할 수 있지만, 목적하는 제품이 식품 용도임을 고려하여 종래부터 식품 또는 양조 분야에 이용되는 미생물 중에서 고 활성 프로테아제 생산 균주를 선택하여 사용하도록 한다.
- [0034] 일반적으로 아스퍼질러스는 액상 배양시 Pellet을 형성하며, 이는 균체량 감소를 비롯하여 프로테아제 및 글루타미나아제 활성 저하를 가져온다. 따라서 본 발명에서는 균주의 효율적 액상 발효를 위해 아스퍼질러스의 Pellet 크기를 최소화 또는 억제하기 위해, 사면 배지에 배양된 포자를 접종한 후 실험용 멸균 혼합기(Waring commercial laboratory blender)로 분쇄하여 고 활성 프로테아제 및 글루타미나아제 생산에 이용한다.
- [0035] 본 발명에서 가수분해 반응에 사용되는 단백질 가수분해 활성이 높은 균주는 액상 배양으로 제조되며, 이는 적절한 탄소원, 질소원, 무기염의 사용을 통해 프로테아제 및 글루타미나아제 활성을 증가시킬 수 있다. 본 발명에서 사용된 아스퍼질러스 오리제의 경우, 일정 농도의 당이 증가하면 균체량 및 효소 활성 또한 증가하였지만, 당의 농도가 높은 경우 효소 활성을 저해하는 carbohydrate repression이 일어난다. 따라서 균주의 효율적인 액상 발효 및 고효성 프로테아제 및 글루타미나아제 생산을 위해 당의 농도를 5~20g/L 이하의 수준으로 첨가한다. 또한 프로테아제 및 글루타미나아제의 활성을 증진시키기 위하여 탈지 대두, 밀 글루텐, 분리 대두 단백질과 같은 유기질소원을 첨가한다. 통상 탈지대부, 밀 글루텐, 분리대두단백, 효모 추출물은 미생물의 생육에 최적 범위의 5~20g/L로 첨가하여 사용할 수 있다.
- [0036] 일반적으로 진균류 배양시 균체의 성장에 따라 유기산이 분비되며 이에 따라 pH가 급격하게 감소한다. 이러한

급격한 pH의 변화로 인한 효소 활성의 저하가 일어나므로 이를 막기 위해 무기염을 균체의 성장에 영향을 미치지 않는 범위로 첨가하여 완충제 역할을 하도록 한다. 일반적으로, 무기염으로 1~10g/L의 인산칼륨 또는 0.1~2g/L의 황산 마그네슘을 사용할 수 있다.

[0037] 균체가 성장하여 pH가 낮아지는 동안에는 프로테아제 및 글루타미나아제 활성을 가지지 않으며, 첨가한 탄소원이 고갈되고 pH가 증가할 때 프로테아제 및 글루타미나아제 활성이 증가하였다. 따라서, 본 발명에서는 pH의 변화를 확인하여 프로타아제 및 글루타미나아제 활성 최고 시점을 예측한다.

[0038] 본 발명의 식물성 단백질 가수분해물 제조방법에서, 식물성 단백질로서 소맥 글루텐, 콩 단백질, 옥수수 단백질 및 쌀 단백질을 사용하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 특히 소맥 글루텐은 글루타민을 많이 함유하고 있어, 장류의 감칠맛을 부여하는 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 소맥 글루텐은 글리아딘(41 %)과 글루테닌(36 %)으로 이루어지며, 이들이 물과 결합하여 수화되면 3차원 그물구조(망상구조)의 글루텐 복합체를 형성하며, 이는 단백질 중 시스테인의 이황화기, 글루타민의 아마이드기 및 다양한 기능기가 글루텐 복합체를 형성할 때 분자 내 또는 분자간 결합을 형성하여 점탄성을 가지게 된다. 일반적으로 밀가루 반죽을 가열하면 글루텐의 점탄성을 급격히 감소하는 대신에 전분의 팽윤과 호화가 일어나 점성이나 부착성이 발생하며, 밀가루 반죽을 치대는 정도가 어느 한도를 넘으면 형성된 글루텐 섬유가 지나치게 늘어나 가늘어지고 반죽의 점성이 저하되어 물러지게 된다.

[0039] 이에 착안하여 본 발명에서는 90℃ 이상의 고온에서 반응기에 최대 교반속도로 원료 소맥 글루텐을 서서히 첨가하여 글루텐의 망상구조 형성을 억제한다. 또한, 평균 입자크기 10~100 μm 이하의 소맥 글루텐을 사용하여 분산액 중 단백질의 침강을 저하시켜 효과적으로 소맥 글루텐을 분산시킨다. 이때, 빠른 교반 속도로 인해 발생하는 거품을 제거하기 위해 소량의 소포제를 사용하며, 거품 형성의 억제로 인해 고온에서 발생하는 팽화나 겔(gel)화 또한 억제시킨다.

[0040] 발효를 통해 소맥 글루텐을 가수분해할 때, 1차적인 오염의 원인은 단백질 원료에 존재하는 잡균에서 유래된다. 가수분해 원료 및 배지로 이용되는 소맥 글루텐은 그 특성상 멸균 과정 중 팽화나 겔(gel)화가 일어나기 쉬어, 멸균 상태로 만들기 어려우며, 특히 단백질 농도가 증가할수록 완전 멸균 상태에 도달하기 힘들다. 따라서 원료 및 배지로 이용되는 단백질을 완벽히 살균할 수 있다면, 가수분해 공정을 잡균이 존재하지 않는 상태에서 실시할 수 있다. 이를 위해 소맥 글루텐의 분산 및 살균에 수반되는 공기 및 거품을 완전히 제거해야 완전히 멸균할 수 있으며, 실질적인 무균 상태의 소맥 글루텐을 고 활성 프로테아제 및 글루타미나아제를 가진 미생물 배양액과 혼합하여 소맥 글루텐의 가수분해물인 발효 조미소재를 생산할 수 있다. 분산액 중 공기가 혼입될 경우, 멸균시 열이 균일하게 분포하기 어려우며 기포에 포집된 잡균의 균체 또는 포자에 효과적으로 열을 작용할 수 없게 된다. 따라서 본 발명에서는 글루텐 제조 공정 중 2시간 이상의 숙성을 거친 평균 입자크기 10~100 μm 이하의 소맥 글루텐을 사용하여 효과적으로 소맥 글루텐을 분산시켰으며, 이를 통해 멸균 과정 중 분말 내로 열을 용이하게 전달하게 한다. 식물성 단백질의 크기가 10 μm 미만인 경우 분자간 인력이 커져 응집이 일어나며 100 μm 를 초과하는 경우 식물성 단백질 자체의 무게로 침전이 일어나 분산이 잘 안 되는 문제점이 있다. 또한 정치 살균시 단백질 덩어리가 생성되기 쉬우므로 교반 살균을 한다. 뿐만 아니라 0~6%의 무염 또는 저염 처리 조건에서 멸균을 함으로써 염농도에 따른 잡균 오염뿐만 아니라 분산성도 향상시켜주는 효과를 가질 수 있다. 염농도 5% 이상의 조건에서 일반 미생물의 생육은 저하되는 것으로 밝혀져 있으며, 본 발명에서 사용된 아스퍼질러스 오리제의 경우 내염성이 있어 발효공정에 더욱 적합하다.

[0041] 살균이 완료된 식물성 단백질을 무균 상태로 고 활성 프로테아제 및 글루타미나아제를 가진 미생물 배양액과 혼합하여 28~36℃에서 6시간 내지 5일간 1차 발효 반응 및 40~50℃에서 3시간 내지 5일간 2차 발효 반응을 수행하여 액체 상태의 식물성 단백질의 가수분해물을 생산한다. 분해 단계 후, 액체 상태의 분해물에 활성탄을 첨가하여 80℃ 내지 120℃에서 10분 내지 30분 동안 효소를 실활시키고, Celite bed Filtration을 통하여 균체 및 고형분을 제거한 소맥 글루텐 가수분해물의 정제 발효 조미 소재를 생산한다.

[0042] 본 발명의 구현예를 흐름도로 나타내면 도 1과 같다.

[0043] 본 발명에서는 아스퍼질러스 오리제(*Aspergillus oryzae*) 시판 2종(수원 발효균, 충무발효균)과 미생물 기탁 보존주 2종(KCCM 12042, KCCM 60166)을 사용한다. 즉, 본 발명에서 사용된 아스퍼질러스 오리제(*Aspergillus oryzae*)는 한국 미생물 보존센터(KCCM)와 수원발효식품연구소, (주)충무발효에서 분양받아 사용되었다.

[0044] 실시예에서 프로테아제 활성은 아래의 방법으로 측정된다.

[0045] 균사체 배양액을 원심분리하여 상등액을 효소액으로 이용하였으며, Azo-Casein(Megazyme ACS 2/99)을 기질 용액(100 mM Phosphate buffer, pH 7.0)으로 사용하였다. 활성 측정에 알맞은 농도로 희석된 효소액 1mL과 기질 1mL을 혼합하여 40℃에서 10 분간 반응시킨 후 5% Trichloroacetic acid(TCA) 6mL을 넣어 상온에서 5 분간 방치하여 반응을 종결시켰다. 반응이 종결된 후 3000rpm에서 10 분간 원심분리하여 분리된 상등액을 파장 440nm에서 흡광도를 측정하였으며, Protease activity의 계산은 아래의 식 1에 따랐다.

[0046] [식 1]

[0047] Fungal protease(*Aspergillus niger* from Sigma Chemical Co.) :

[0048] Protease(mUnit/mL) = 146 × Abs.(440nm) -4,

[0049] R = 0.99 (Linear absorbance range = 0.1 to 1.0)

[0050] 또한, 실시예에서 글루타미나아제 활성은 아래의 방법으로 측정된다.

[0051] 균사체 배양액을 원심분리하여 상등액을 효소액으로 이용하였으며, 100mM의 글루타민을 기질 용액(100 mM Phosphate buffer, pH 7.0)으로 사용하였다. 활성 측정에 알맞은 농도로 희석된 효소액 1mL과 기질 1mL을 혼합하여 40℃에서 10 분간 반응시킨 후 95℃에서 10분간 처리하여 반응을 종결시켰다. 반응이 종결된 후 3000 rpm에서 10 분간 원심분리하여 분리된 상등액에서 글루탐산의 함량을 YSI Biochemistry Analyzer로 측정하였다. 분당 1umole의 글루타민을 글루탐산으로 전환시키는 활성을 1unit로 결정하였다.

[0052] 그리고, 실시예에서 당 농도와 Glutamic acid 함량의 측정은 YSI Biochemistry Analyzer로 측정하였고, pH는 pH meter를 이용하여 측정하였다.

[0053] [실시예 1] 고 활성 프로테아제 생산을 위한 균주의 선정 및 활성 증가를 위한 배지의 조성

[0054] [실시예 1-1] 균주의 선정

[0055] 아스퍼질러스 오리제(*Aspergillus oryzae* KCCM 60166, KCCM 12042, 수원 발효균, 충무 발효균) 4종을 분양받아, PDB(Potato extract 4 g/L, Dextrose 20 g/L, pH 5.5)에 접종하여 26℃에서 200rpm으로 3 일간 진탕 배양한 균사체를 사면배지에 접종한 후 30℃에서 5 일간 배양하여 실험에 사용하였다. 균주의 선정을 위해 다음의 배지를 사용하여 실험하였다(표 1, 도 2 내지 5, 표 2).

표 1

배지의 조성물

[0056]

배지	조성물	배지	조성물
1	Potato Dextrose Broth	3	5 g/L Wheat gluten
	1g/L Malt extract		20 g/L Glucose
	1g/L Yeast extract		1 g/L Malt extract
	1 g/L Yeast extract		

2	5 g/L NaCO3	4	5 g/L Wheat gluten
	20 g/L Glucose		20 g/L Fructose
	1 g/L Malt extract		1 g/L Malt extract
	1 g/L Yeast extract		1 g/L Yeast extract

표 2

수원	배지 1			배지 2			배지 3			배지 4		
	0	24	48	0	24	48	0	24	48	0	24	48
발효균												
균체량 (g/mL)	0	0.064	0.107	0	0.031	0.171	0	0.037	0.061	0	0.031	0.171
pH	6.20	4.87	4.34	6.60	5.14	5.78	7.08	5.68	5.16	7.05	5.85	5.85
포도당 농도(g/L)		11.90	5.81		0.21	0		11.80	6.27		0.02	0
프로테아제 활성 (OD440)	0	0.018	0.026	0	0.060	0.058	0	0.218	0.424	0	0.214	0.632
충무발효균												
균체량 (g/mL)	0	0.031	0.097	0	0.031	0.087	0	0.037	0.054	0	0.007	0.067
pH	6.20	5.67	4.38	6.60	5.71	5.54	7.08	6.07	5.12	7.05	5.87	5.28
포도당 농도(g/L)		11.20	8.73		0.81	0.06		9.79	8.74		0.51	0
프로테아제 활성 (OD440)	0	0.023	0.058	0	0.061	0.072	0	0.028	0.14	0	0.034	0.088
KCCM 12042												
균체량 (g/mL)	0	0.034	0.061	0	0.041	0.094	0	0.041	0.057	0	0.041	0.057
pH	6.20		5.37	6.60	5.62	6.86	7.08	5.78	6.09	7.05	5.56	5.98
포도당 농도(g/L)		14.50	11.9		0.47	0.02		9.89	1.18		0.42	0.01
프로테아제 활성 (OD440)	0	0.024	0.031	0	0.046	0.05	0	0.022	0.361	0	0.016	0.181
KCCM 60166												
균체량 (g/mL)	0	0.144	0.094	0	0.074	0.131	0	0.074	0.091	0	0.087	0.104
pH	6.20	4.52	4.43	6.60	5.88	5.81	7.08	5.75	5.36	7.05	5.46	4.93
포도당 농도(g/L)		6.57	0.23		0	0		0	0		0	0
프로테아제 활성 (OD440)	0	0.017	0.043	0	0.056	0.087	0	0.494	1.034	0	0.839	1.05

[0057]

[0058]

도 2 내지 5 및 상기 표 2에서 알 수 있듯이, 4종의 아스퍼질러스 오리제(*Aspergillus oryzae*) 모두 유기질소 원인 소맥 글루텐을 첨가한 배지(배지 3 및 4)에서 배양한 것이 무기질소원을 첨가한 배지(배지 1 및 2)에서 배양한 것보다 프로테아제의 활성이 높음을 알 수 있었다. 따라서, 고 활성 프로테아제 및 글루타미나아제 생산을 위해 아스퍼질러스 오리제(*Aspergillus oryzae*)를 배양함에 있어, 유기 질소원의 첨가가 필수적임을 확인하였다. 도 2 내지 5 및 표 2의 결과를 바탕으로, 소맥 글루텐의 가수분해에 이용하기 위해 프로테아제의 활성이 가장 높은 *Aspergillus oryzae* KCCM 60166을 선정하였다.

[0059] [실시예 1-2] 선정된 균주의 보관

[0060] 고체 배지인 PDA(Potato extract 4 g/L, Dextrose 20 g/L, Agar 20 g/L, pH 5.6) 배지에서 배양한 상기 실시예 1-1에서 선정된 균주를 장기간 보존하기 위해, 액체 배지인 PDB(Potato extract 4 g/L, Dextrose 20 g/L, pH 5.5)에 아스퍼질러스 오리제(*Aspergillus oryzae*) KCCM 60166를 접종하여 26℃에서 200rpm으로 3일간 진탕 배양한 균사체에 20% 글리세린을 넣어 실험용 멸균 혼합기(Waring commercial laboratory blender)로 분쇄, 혼합하여 -80℃에 보관하였다.

[0061] 또한 액체 배지에서 배양한 균사체를 사면배지에 접종한 후 30℃에서 5일간 배양하여 4℃에서 보존하였으며, 2개월마다 계대배양하면서 실험에 사용하였다.

[0062] 또는 균체의 안정성과 장기 보존을 위하여 동결 건조한 상태로 보관할 수 있다. 동결건조 방법은 균체 현탁액으로부터 낮은 압력하에서 수분을 제거하는 방법으로 동결보호제인 15~25%의 Skim milk나 15~25%의 Sucrose 용액을 균 현탁액과 동량 혼합하여 시행할 수 있다. 동결건조된 미생물은 -20~-80℃에서 보관 시 10년 이상 장기보존 가능하다.

[0063] [실시예 1-3] 배지 조성에 따른 프로테아제의 생산성

[0064] 15g/L 탈지 대두 분말(DSB)을 기본 배지로 하여 다른 요소들을 추가 또는 변경하였을 경우, 아스퍼질러스 오리제(*Aspergillus oryzae*) KCCM 60166의 프로테아제 생산성의 변화를 실험하였다. 그 결과는 표 3과 같다.

표 3

배지 조성에 따른 프로테아제 활성

[0065]

	시간 (시)	프로테아제 활성 (Unit/mL)	균체량	pH	포도당 농도 (g/L)
PDB	0	0	-	5.10	20
	24	0	++	4.47	7.83
	48	0	++++	3.96	1.43
	72	0	+++	3.67	0.089
15g/L DSB	0	0	-	7.40	0
	24	0.346	++++	7.78	0.054
	48	0.453	+++	8.20	0.165
	72	0.185	++	8.59	0.113
15g/L DSB + 10 g/L Glucose	0	0	-	7.43	10
	24	0	++++	5.60	0.028
	48	0.031	+++++	8.19	0.227
	72	0.245	++++	8.20	0.303
15g/L DSB + 5g/L Yeast extract	0	0	-	7.27	0
	24	0.179	+++	7.87	0.039
	48	0.278	++	8.38	0.157
	72	0.089	++	8.64	0.113
15g/L DSB + 10 g/L Glucose + 5g/L Yeast extract	0	0	-	7.28	10
	24	0	++++	7.14	0.022
	48	0	+++++	7.99	0.084
	72	0.186	++++	7.91	0.401
15g/L DSB + 10 g/L Glucose + 5g/L Yeast extract + 5 g/L KH ₂ PO ₄ + 0.5 g/L MgSO ₄	0	0	-	6.43	10
	24	0	++++	5.78	0.027
	48	0	+++++	6.52	0.050
	72	0.800	+++++	7.38	0.114

[0066] 상기 표 3에서 보는 바와 같이, 포도당(glucose)을 첨가하였을 때 균체량은 상대적으로 증가하였으나, 프로테아제 활성은 넣어 준 포도당(glucose)의 농도가 0에 가까워질 때까지 나오지 않았다. 이는 탄수화물에 의해 프로테아제 생산이 저해되는 carbohydrate repression, 특히 포도당(glucose)에 의해 프로테아제 생산이 억제되는 glucose repression의 결과로 생각된다. 그러나, 첨가한 포도당이 고갈되었지만 당의 농도가 증가한 것은 탈지 대두 분말에 함유된 탄수화물이 균주가 가진 아밀라아제에 의해 분해되어 대사과정 중 사용된 것으로 보인다.

[0067] 또한 무기염을 첨가한 경우, 첨가하지 않은 배지에 비해 프로테아제의 활성이 약 4.3배 증가하였고, 균체량의 감소를 억제하였다. 이를 pH 변화와 비교하면, 진균류 배양시 균체 성장에 따른 유기산의 분비로 인하여 배양액 내에서 pH가 급격하게 감소 및 증가하는 것을 막아 효소 활성에 영향을 주므로, 인산염의 첨가는 프로테아제 활성을 증가시키는 중요 인자 중 하나임을 확인하였다.

[0068] [실시예 1-4] 당 농도와 프로테아제 및 글루타미나아제 활성의 관계

[0069] 균주의 생육이 가능한 최소배지를 이용하여 탄수화물의 농도와 프로테아제 생산과의 관계를 파악하기 위해 아스퍼질러스 오리제(*Aspergillus oryzae*) KCCM 60166를 접종할 때, 멸균시킨 glucose를 5g/L, 10g/L, 20g/L 첨가하였으며 26℃에서 200rpm으로 48시간 배양하였다. 최소배지는 NaNO₃ 5g/L, K₂HPO₄ 1g/L, KH₂PO₄ 2g/L, MgSO₄ 0.5g/L, Yeast extract 1g/L를 함유하며 pH는 6.5로 조절하여 121℃에서 15분간 멸균하여 사용하였다. 포도당 첨가량 및 시간에 따른 프로테아제의 활성을 조사한 결과를 하기 표 4 및 도 6에 나타내었다.

표 4

당의 농도에 따른 프로테아제 활성

[0070]

KCCM 60166	Glucose 5g/L			Glucose 10g/L			Glucose 20g/L		
	0	24시간	48시간	0	24시간	48시간	0	24시간	48시간
균체량 (g/mL)	0	0.084	0.064	0	0.131	0.067	0	0.061	0.104
pH	6.50	6.25	7.1	6.50	5.91	6.54	6.50	6.18	5.56
포도당 농도(g/L)	5.00	0.42	0.00	10.00	3.69	0.00	20.00	7.78	0.49
프로테아제 활성 (mUnits/mL, OD440)	0	25.2 (0.200)	40.238 (0.303)	0	32.646 (0.251)	50.896 (0.376)	0	0 (0.096)	20.382 (0.167)
글루타미나아제 활성 (mUnit/ml)	0	67.1	120.23	0	85.7	147.32	0	44.7	92.35

[0071] 상기 표 4 및 도 6에서 알 수 있듯이, 일정 농도의 당이 증가함에 따라 균체량 및 프로테아제 및 글루타미나아제 활성 또한 증가하였지만, 당의 농도가 높은 경우 프로테아제 및 글루타미나아제 활성을 저해하는 carbohydrate repression이 확인되었다.

[0072] [실시예 1-5] 프로테아제 유도 단백질에 따른 프로테아제 활성

[0073] 사면배지에 있는 포자를 PDB 100mL 멸균 배지가 담긴 500mL 삼각 플라스크에 접종하였으며, 접종된 평균 포자의 수는 5×10^4 spore/mL로 하였다. 이를 Rotary shaking incubator에서 200rpm으로 30℃에서 24시간 배양한 후, 이 균사체의 형태(morphology)를 조절하기 위하여 Warning Blander로 grinding하여 15g/L의 탈지대두(defatted soybean; DSB)를 포함하는 배지와 15 g/L 소맥 글루텐(wheat gluten; WG)을 포함하는 배지에 각각 1% 농도로 접종하여 프로테아제 활성을 확인하고, 그 결과를 도 7에 나타내었다.

[0074] 도 7에서 보는 바와 같이, 아스퍼질러스 오리제(*Aspergillus oryzae*) KCCM 60166를 소맥 글루텐(WG)이 첨가된 배지보다 탈지 대두(DSB)를 첨가한 배지에서 배양하였을 때, 더 큰 프로테아제 활성을 나타냈다. 이는 균주가

소맥 글루텐보다 탈지 대두에 대한 기질 특이성이 있는 것으로 보인다.

[0075] [실시예 1-6] pH 변화와 프로테아제 및 글루타미나아제 활성

[0076] 사면배지에 있는 포자를 PDB 100mL 멸균 배지가 담긴 500mL 삼각 플라스크에 접종하였으며, 접종된 평균 포자의 수는 5×10^4 spore/mL로 하였다. 이를 Rotary shaking incubator에서 200rpm으로 30°C에서 24시간 배양한 후, 이 균사체를 Warning Blander로 grinding하여 15 g/L의 탈지대두 배지가 들어있는 2.5L 소형 발효기에 1% 접종하였다. 시간에 따른 프로테아제 활성(도 8), 시간에 따른 글루타미나아제 활성(도 9) 및 시간에 따른 pH 변화(도 10)에 각각 나타내었다.

[0077] 도 8 내지 도 10을 비교하면, 균체가 성장하여 pH가 낮아지는 동안에 프로테아제 및 글루타미나아제는 그 활성을 가지지 않았으며, 배양 12시간 후 탄소원이 고갈되고 pH가 증가하였을 때 프로테아제 및 글루타미나아제의 활성이 증가하였다.

[0078] 따라서 이를 토대로 pH의 변화를 확인함으로써 손쉽게 아스퍼질러스 오리제(*Aspergillus oryzae*) 배양액의 프로테아제 및 글루타미나아제 활성의 최고 시점을 추측할 수 있을 것으로 예상된다.

[0079] [실시예 1-7] 대량 생산을 위한 계대 배양과 프로테아제 활성

[0080] 대량 생산을 위해 15 g/L 탈지대두 배지를 이용하여 아스퍼질러스 오리제(*Aspergillus oryzae*) 1%를 계대 배양하여, 프로테아제의 활성을 측정하고, 그 결과를 표 5 및 도 11에 나타내었다.

표 5

계대 배양 회수에 따른 프로테아제 활성

[0081]

	프로테아제 활성 (Unit/mL)	pH	균체량	포도당 농도 (g/L)
1st	0.128	7.66	+++	0.032
2nd	0.161	7.80	+++	0.027
3rd	0.053	7.76	++	0.007
4th	0.028	8.40	+	0

[0082] 상기 표 5 및 도 11에서 보는 바와 같이, 두 번째 계대배양까지 균체량의 차이가 없었으나 세 번째 계대배양을 하면서부터 균체량이 감소하고 pellet의 크기는 증가하였으며, 프로테아제의 활성은 급격히 감소하였다.

[0083] 이는 균체량의 증가가 아닌 pellet 크기의 증가로 너무 잦은 계대배양은 균체량의 감소 및 프로테아제 활성의 감소를 가져온다는 것을 확인할 수 있었다.

[0084] [실시예 2] 소맥 글루텐으로부터 분말 가수분해물의 파일럿 스케일 제조

[0085] [실시예 2-1] 소맥 글루텐의 분산과 멸균

[0086] 50L 발효조에 물 24L를 넣고 수온이 90°C에 도달하면 교반 속도를 최대로 하여 평균입자가 100 μ m인 소맥 글루텐 분말(신송산업㈜, 대한민국) 1200g을 서서히 투입하여 소맥 글루텐 분말을 물에 분산시켰다. 소맥 글루텐 분산액을 121°C에서 20분간 멸균하였다. 소맥 글루텐 분말을 첨가하기 전, 거품의 생성을 방지하기 위해 소포제를 첨가하였다.

[0087]

[0088] [실시예 2-2] 아스퍼질러스 오리제 배양액의 조제

[0089] 사면배지에 있는 포자를 15g/L 탈지 대두분말, 10g/L 포도당(멸균 후 첨가), 5g/L 효모추출물, 5g/L 인산칼륨, 0.5g/L 황산 마그네슘을 함유하는 100mL 멸균 배지가 담긴 500mL 삼각 플라스크에 접종하였으며,

접종된 평균 포자의 수는 5×10^4 spore/mL로 하였다. 이를 Rotary shaking incubator에서 200rpm으로 30℃에서 24시간 배양한 후, 이 균사체를 Warning Blander로 grinding하여 2.5L 소형 발효기에 접종하였다.

[0090] 15g/L 탈지 대두분말, 10g/L 포도당(멸균 후 첨가), 5g/L 효모추출물, 5g/L 인산칼륨, 0.5g/L 황산 마그네슘을 함유하는 배지 2L를 총 용적이 2.5 L인 소형발효기(jar-fermenter)에 첨가하고 121℃에서 20분 분간 멸균하였다. 아스퍼질러스 오리제 KCCM 60166를 균사체로 배지 양의 1%를 접종한 후, 30℃에서 1/2vvm의 통기속도 및 600rpm의 교반 속도로 초기 pH 5.8에서 pH 7.5가 될 때까지 배양하였다.

[0091] [실시예 2-3] 아스퍼질러스 오리제 액상 배양액의 프로테아제 활성 평가

[0092] 상기 실시예 2-2에서 취득한 액체 아스퍼질러스 오리제 KCCM 60166의 프로테아제 활성은 700mUnit/mL이며, 아스퍼질러스 오리제 이외의 미생물의 혼입 또는 증식을 확인할 수 없었다.

[0093] [실시예 2-4] 아스퍼질러스 오리제 액상 배양액의 글루타미나아제 활성 평가

[0094] 상기 실시예 2-2에서 취득한 액체 아스퍼질러스 오리제 KCCM 60166의 글루타미나아제 활성은 150mUnit/mL이며, 아스퍼질러스 오리제 이외의 미생물의 혼입 또는 증식을 확인할 수 없었다.

[0095] [실시예 2-5] 소맥 글루텐의 가수분해

[0096] 상기 실시예 2-1에서 취득한 소맥 글루텐 분산액을 120℃에서 20분간 살균 후, 분산액을 40℃까지 냉각시킨 후, 상기 실시예 2-2의 액체 아스퍼질러스 오리제 KCCM 60166 배양액을 25% 첨가하여 혼합한 후 반응을 시작하였다. 반응 개시 시점부터 12시간 동안 35℃에서 1/4vvm의 통기속도로 200rpm으로 교반하면서, 1차 가수분해 반응을 진행시켰으며, 12시간 경과 후 분산액의 온도를 상승시켜 45℃로 유지하여 추가로 36시간 동안 2차 가수분해반응을 진행시켰다. 이때, 외부 공기로 인한 오염을 방지하기 위하여 발효조의 내압을 0.5psi로 유지하였다. 분해과정 중 12시간 마다 시료를 채취하여 YSI Biochemistry Analyzer를 이용하여 글루탐산(Glutamic acid) 및 포도당의 농도를 측정하여, 도 12에 나타내었다.

[0097] 도 12에서 보는 바와 같이, 소맥 글루텐의 가수분해 과정이 진행됨에 따라, 글루탐산의 농도가 증가하였다. 특히 24시간 동안 급속히 글루탐산의 농도가 증가하다가 그 이후부터는 서서히 증가하였다. 또한, 포도당 농도가 배양 중 낮게 유지되어 당 농도에 따른 프로테아제 및 글루타미나아제 활성이 저하되지 않아, 시간이 지남에 따라 글루탐산의 생성이 증가함을 확인할 수 있었다.

[0098] 또한, 글루타민산의 함량을 높이기 위해 도 1과 같은 공정으로 아스퍼질러스 오리제(KCCM 60166)을 액체배양하여 반응 개시 시점부터 72시간 동안 30℃에서 1/4 vvm의 통기속도로 200 rpm으로 가수분해 반응을 하였으며, 72시간 경과 후 액온을 상승시켜 45℃로 유지하여 추가 72시간 반응을 하였다. 이때 외부 공기로 인한 오염을 방지하기 위하여 발효조의 내압을 0.5psi로 유지하여 3000 L 배양기에서 반응을 진행하였다. 소맥 글루텐의 가수분해 시간에 따른 글루탐산이 농도를 도 13에 도시하였다. 도 13에서 보는 바와 같이, 가수분해시간을 늘림에 따라 대량 생산된 소맥 글루텐 가수분해물은 글루탐산 농도를 20% 이상 함유한 우수한 발효조미 소재를 제조할 수 있었다.

[0099] [실시예 2-6]: 단백질 가수분해물의 회수 및 분말 제조

[0100] 상기 실시예 2-5에서 취득한 액체 상태의 소맥 글루텐의 가수분해물에 활성탄 0.1%를 첨가하여 121℃에서 15분간 살균 후, Celite bed Filtration을 통하여 균체 및 고형분이 제거된 정제 가수분해물을 취득하였다. 이를 동결 건조하여 분말화한 후, 분석 전까지 4℃에 보관하였다.

[0101] [실시예 2-7] 소맥 글루텐 가수분해물의 평가

[0102] 상기 실시예 2-6에서 제조된 단백질 가수분해물 분말의 건조 중량을 YSI Biochemistry Analyzer로 분석하였을

때, 글루탐산(Glutamic acid, GA)의 농도는 7.3%이었다. 원료 소맥 글루텐에 함유된 글루탐산의 농도 29% 기준으로 33.69%의 글루탐산 유리율(분해율)을 나타냈으며, 최종 분말의 수율은 65.8%로 나타났다.

[0103]

[실시에 2-8] 소맥 글루텐 가수분해물의 아미노산 분석

[0104]

실시에 2-6의 소맥 글루텐의 가수분해물의 아미노산 조성은 HPLC를 사용하여 "AccQ-Tag Method"를 이용하였다.

[0105]

분석 전에 아미노산의 유도체를 만들기 위하여 sample tube에 분석시료 10 μ l를 넣고 AccQ-Fluor Borate Buffer를 60ul 첨가한 후, 0.1 mM의 내부표준물질(α -aminobutyric acid를 20 mM HCl에 0.1 mM로 녹여 만듦) 10 μ l과 AccQ-Fluor reagent 20 μ l을 첨가하여 실온에서 1 분간 반응시켰다. Heating block을 이용하여 유도체화된 아미노산 시료를 10 분 동안 가열하였다. 유도체화가 끝난 시료 20 μ l을 Agilent 1200 series HPLC에 injection하여 정량분석을 하였다. 이때, 컬럼의 온도는 37 $^{\circ}$ C로 유지하였으며 UV 254 nm의 파장에서 하기 표 6과 같은 조건으로 아미노산을 분석하였고, 그 결과를 표 7 및 도 14에 나타내었다.

표 6

[0106]

기기	Agilent 1200 HPLC		
컬럼	AccQ-Tag™ 3.9 x 150 mm Column		
용리액(Eluent) A	Waters AccQ-Tag Eluent A (acetate-phosphate buffer)		
용리액(Eluent) B	Acetonitrile : Water = 60 : 40		
Gradient			
시간(분)	유속(ml/min)	% A	% B
Initial	1.0	100	0
0.5	1.0	98	2
15	1.0	93	7
19	1.0	90	10
32	1.0	67	33
34	1.0	0	100
38	1.0	100	0
55	1.0	100	0
유속	1.0 mL/min		
오븐 온도	37 $^{\circ}$ C		
검출	Agilent 1200 detector (254nm)		
주입 부피	20 μ l		

표 7

아미노산 분석결과

[0107]

아미노산	소맥 글루텐의 가수분해물	
	mg/g	고형분 대비 %
Asp	5.2777	0.53%
Ser	0.8054	0.08%
Glu	70.4677	7.05%
Gly	9.4190	0.94%
His	1.9844	0.20%
Arg	0.3596	0.04%
Thr	4.9261	0.49%
Ala	4.0432	0.40%
Pro	47.3959	4.74%
Cys	0.8062	0.08%
Tyr	161.3176	16.13%
Val	8.1202	0.81%

Met	3.1956	0.32%
Lys	0.5554	0.06%
Ile	8.6847	0.87%
Leu	17.5507	1.76%
Phe	20.7894	2.08%
Trp	2.9591	0.30%
total	368.6580	36.87%

[0108] 상기 표 7 및 도 14의 분석결과는 상기 실시예 2-7에서 YSI Biochemistry Analyzer으로 분석한 Glutamic acid 함량과 거의 유사한 7.05%이었으며, Arginine, Histidine, Tryptophan, Valine 등과 같이 쓴맛을 가진다고 알려진 아미노산의 함량은 0.04 ~ 0.8%의 낮은 함량을 보였다. 본 발명에 따른 소맥 글루텐의 가수분해물은 쓴맛이 적으며 감칠맛이 있는 우수한 고체형상의 조미료로 사용될 수 있다.

[0109] [실시예 3] 관능평가 및 기기분석을 통한 펩타이드 조성 평가

[0110] [실시예 3-1] 관능평가

[0111] 실시예 2에서 얻어진 소맥 글루텐의 가수분해물 분말을 0.03%의 글루탐산 농도로 제조하고, 이 시료를 순차적으로 희석한 후 기준시료인 0.03% 글루탐산나트륨 수용액을 패널에게 제시하여 동일한 감칠맛으로 느껴지는 농도를 제시하도록 하였으며, 그 결과는 표 8과 같다.

표 8

[0112]	희석배수	1	2	4	6	8	10	12
	패널 수	0	2	2	15	17	14	0

[0113] 감칠맛의 평균강도는 상기 표 8의 각 희석배수와 해당하는 패널 수를 곱한 후 총 패널 수로 나누어 구하였으며, 평균강도는 글루탐산나트륨 대비 7.56배였다.

[0114] [실시예 3-2] 소맥 글루텐 가수분해물의 펩타이드 분석

[0115] 상업적으로 발효법으로 생산, 판매되는 소맥 글루텐 가수분해물인 코지아지(kojiaji)(아지노모도社, 일본)와 상기 실시예 2의 소맥 글루텐 가수분해물을 각각 0.1g씩 10mL 증류수에 녹인 후, 1ml을 0.2µm syringe filter(Advantec, Toyo Roshi Kaisha Ltd., Japan)를 통과시켜 HPLC를 이용하여 아래의 표 9와 같은 조건으로 펩타이드를 분석하였다.

표 9

[0116]	기기	Dionex P680 HPLC		
	컬럼	Kinetex 2.6µm C ₁₈ 100Å 100 x 4.6 mm Column		
	용리액(Eluent) A	Water : TFA = 1000 : 0.37		
	용리액(Eluent) B	Acetonitrile : Water : TFA = 800 : 200 : 0.27		
	Gradient			
	시간(분)	유속(ml/min)	% A	% B
	Initial	0.2	100	0
	5.0	0.2	60	40
	65	0.2	30	70
	70	0.2	100	0
	유속	0.2 mL/min		
	오븐 온도	40 °C		

검출	Dionex P680 absorbance detector (UV 214nm)
주입 부피	3 μ l

[0117] 일반적으로, 단백질 가수분해물의 맛은 단백질의 형태와 분해를 위해 사용된 효소에 따라 많은 차이가 있다. 도 15 내지 17에서 보는 바와 같이, 밀단백을 가수분해하여 생산되며 풍미가 우수한 것으로 알려진 코지아지(아지노모토社, 일본)와 실시예 2의 아스퍼질러스 오리제 KCCM 60166로 발효시킨 소맥 글루텐 가수분해물은 유사한 peptide profile 보였다. 관능검사 및 기기분석 결과를 통해 이러한 peptide가 같은 농도의 Glutamic acid보다 Umami의 강도를 향상시키는 것으로 보인다.

[0118] [실시예 4] 아스퍼질러스 오리제 KCCM 60166의 액체 배양을 통한 식물 단백질 유래 발효 조미 소재의 대량 생산 제조

[0119] 도 1과 같은 공정으로 아스퍼질러스 오리제(KCCM 60166)을 액체배양하여 실시예 2의 방법으로 3000 L 배양기에서 반응을 진행하였다. 도 18에서 보는 바와 같이, 대량 생산된 소맥 글루텐 가수분해물은 과일렛 스케일과 유사한 글루탐산 농도를 가져서, 우수한 발효 조미 소재를 제조할 수 있었다.

[0120] [실시예 5] 다른 식물성 단백질의 가수분해

[0121] 소맥 글루텐의 가수분해물을 제조한 상기 실시예 2와 동일한 방법으로 50L 과일렛 스케일에서 콩 단백질, 옥수수 단백질 및 쌀 단백질을 실시예 1의 아스퍼질러스 오리제 KCCM 60166으로 가수분해하였다. 48시간 가수분해한 후 글루탐산 농도를 측정하여 결과를 도 19에 나타내었다.

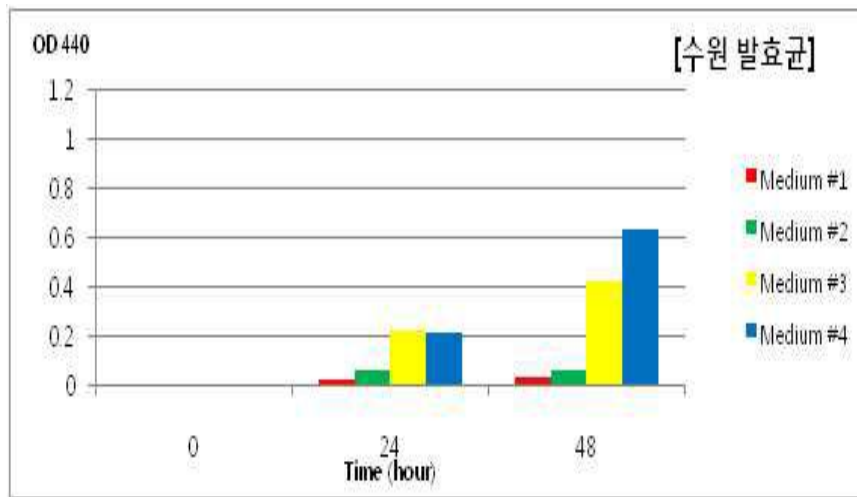
[0122] 도 19에서 보는 바와 같이, 콩 단백질 가수분해물, 옥수수 단백질 가수분해물, 쌀 단백질 가수분해물도 소맥 글루텐의 가수분해물과 유사한 양의 글루탐산 농도를 가짐을 알 수 있다. 그러나, 가수분해시간이 길어짐에 따라 글루탐산 함량이 더 증가할 수 있다(도 13 참조).

도면

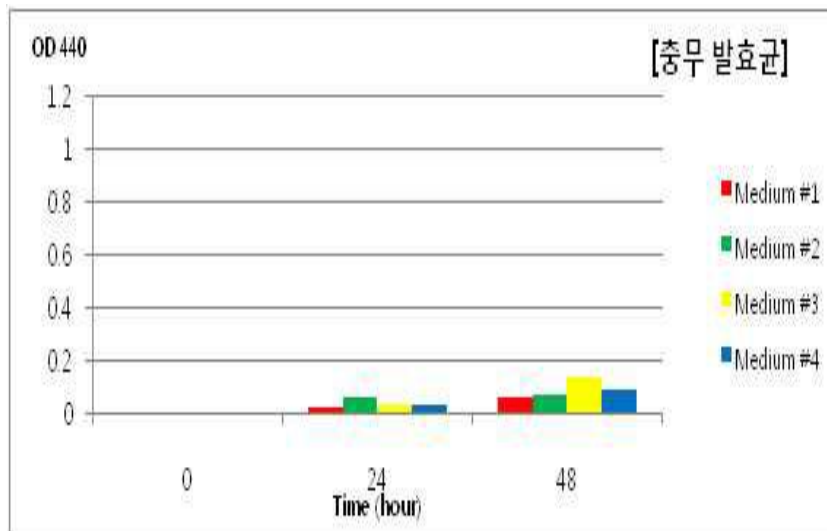
도면1



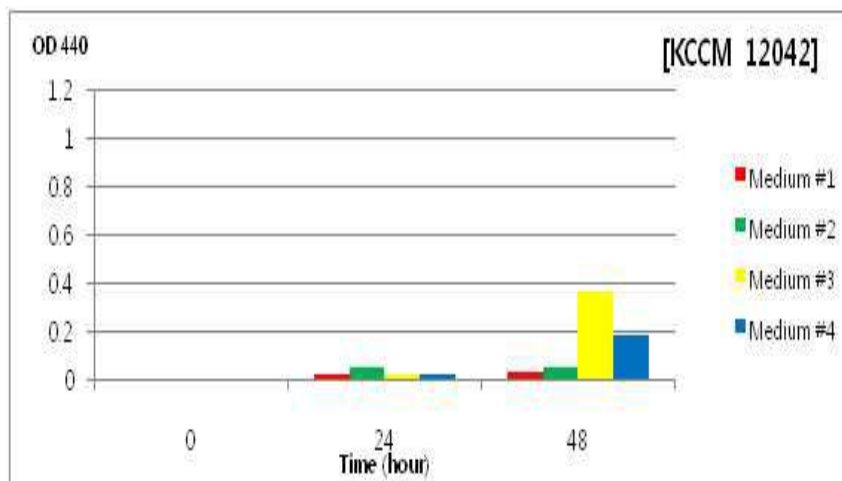
도면2



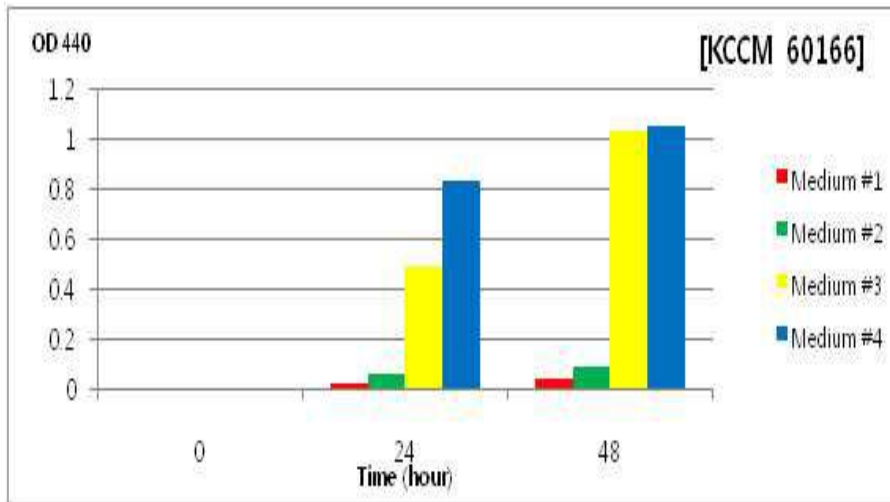
도면3



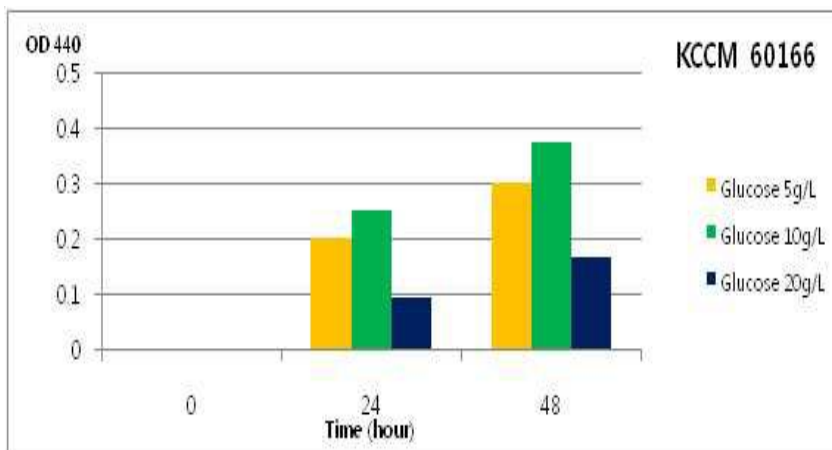
도면4



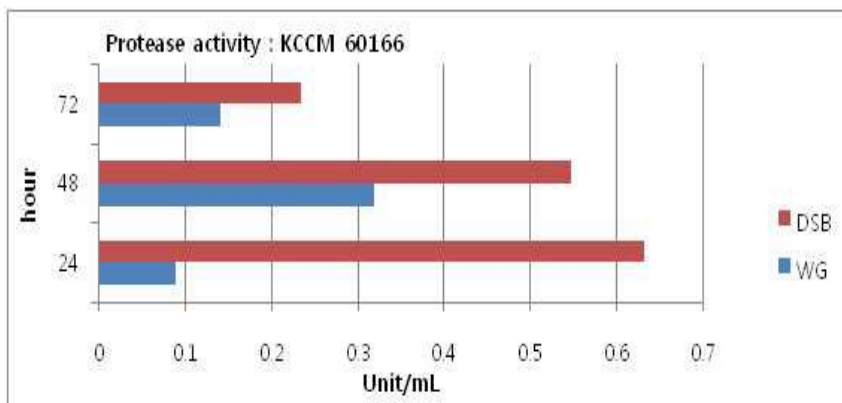
도면5



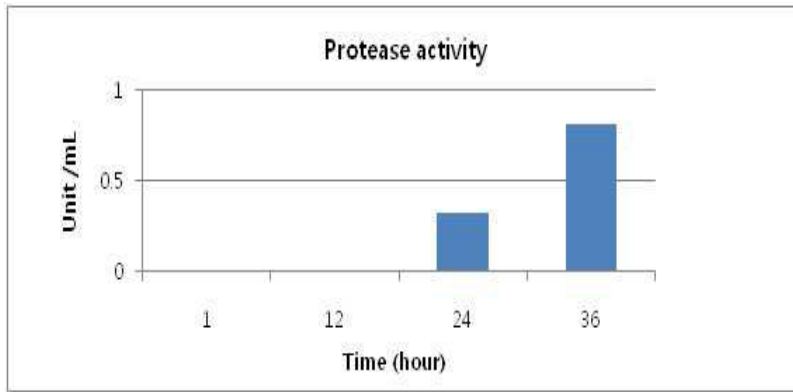
도면6



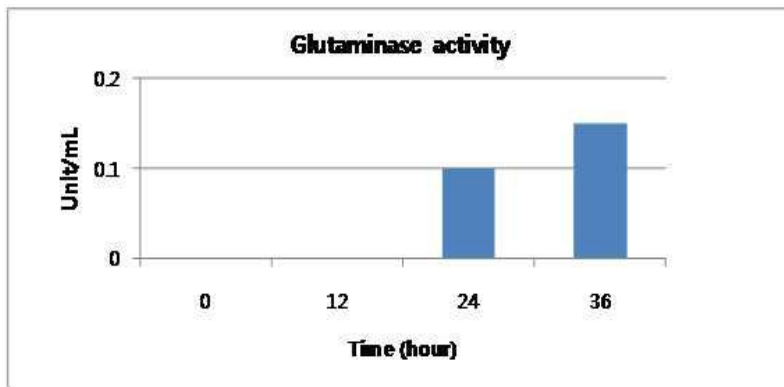
도면7



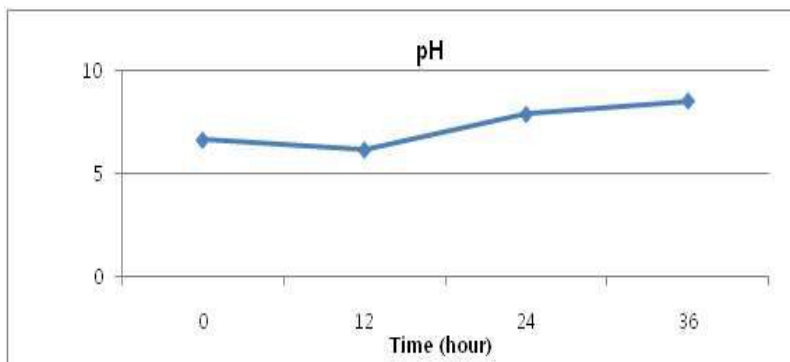
도면8



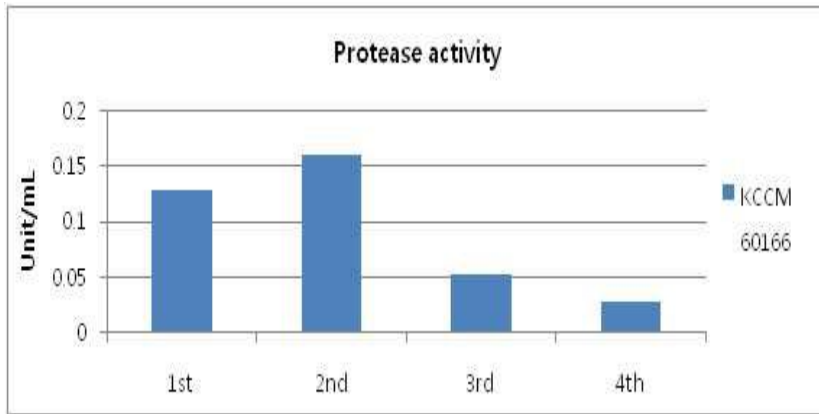
도면9



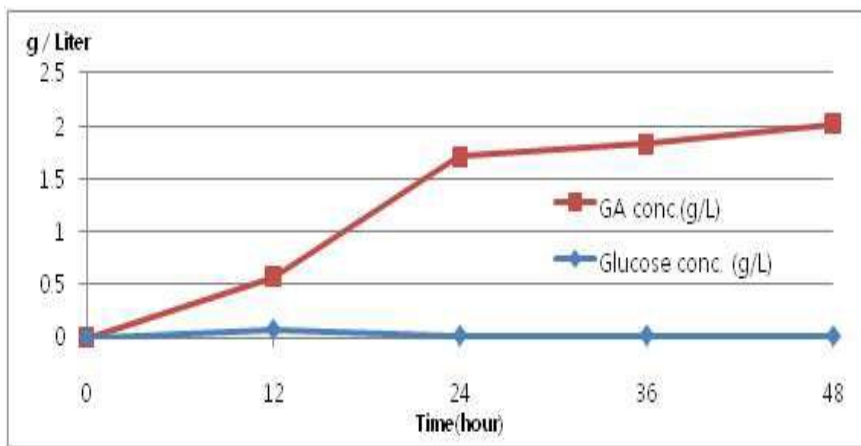
도면10



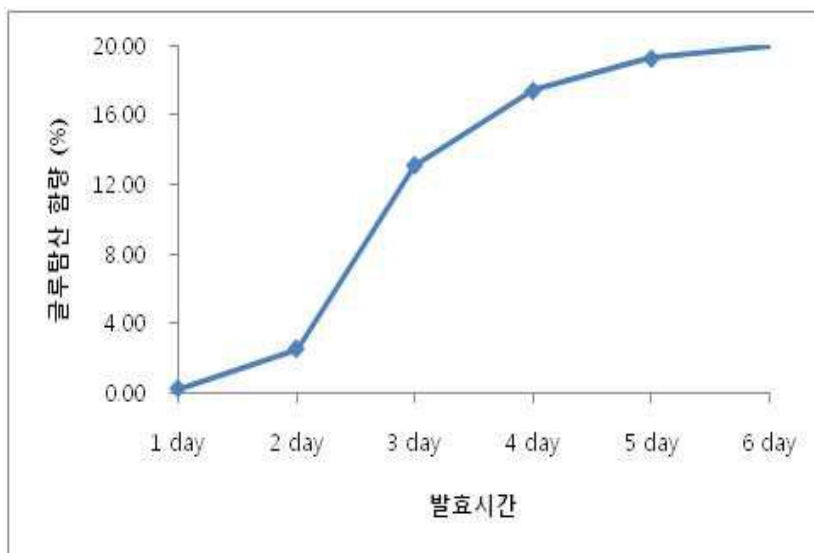
도면11



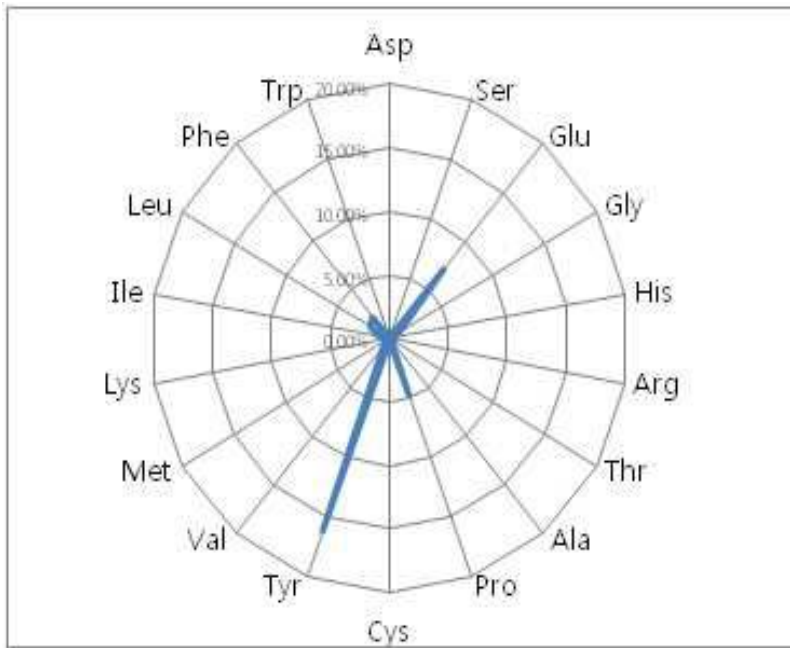
도면12



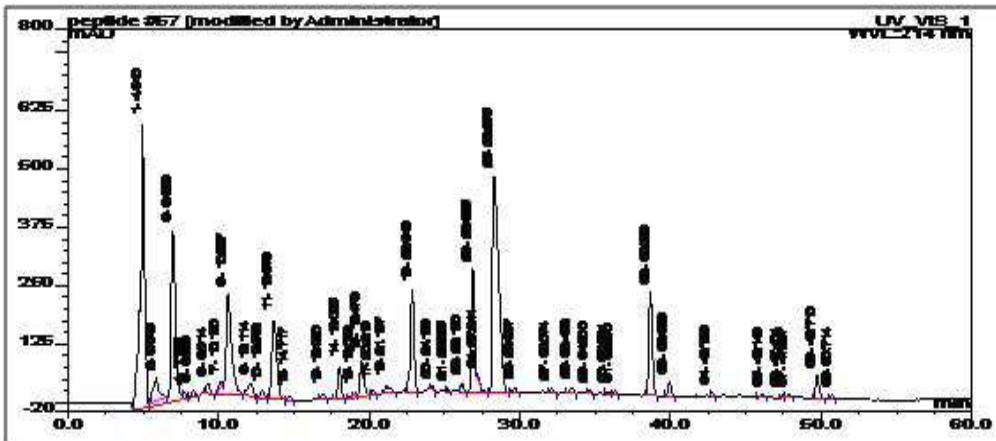
도면13



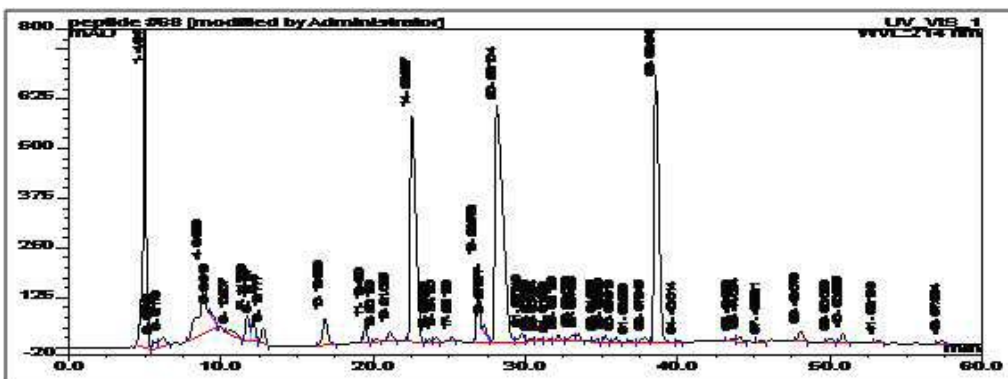
도면14



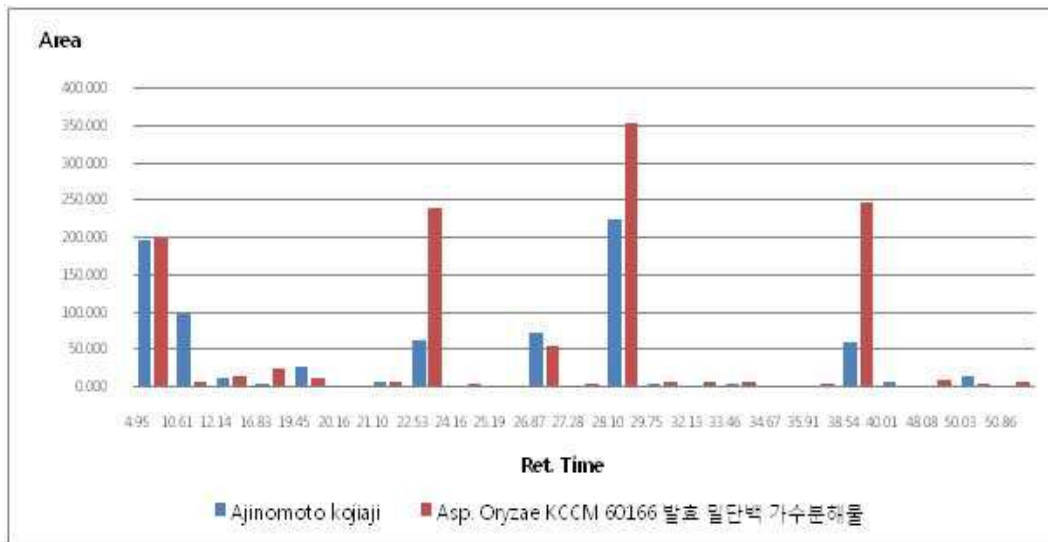
도면15



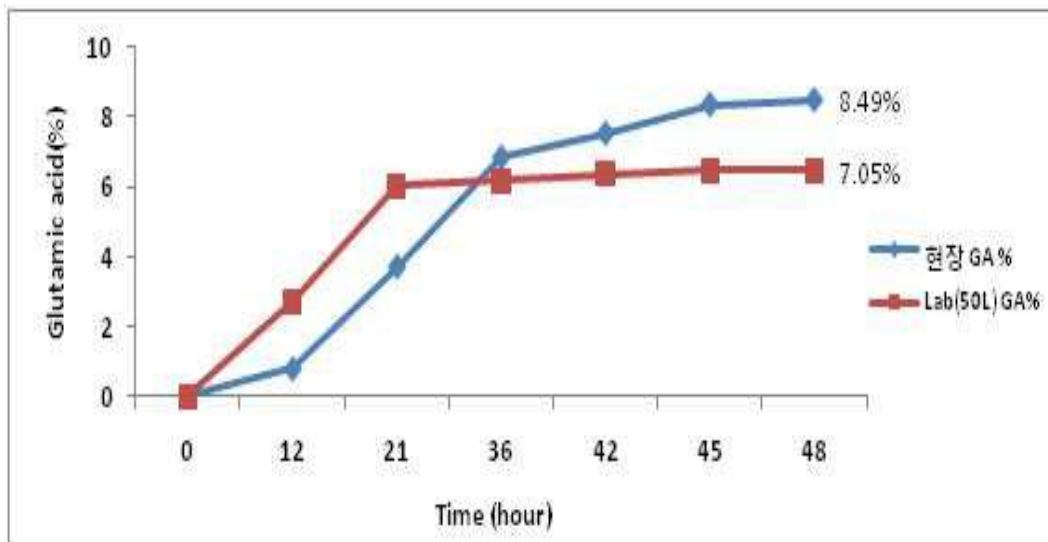
도면16



도면17



도면18



도면19

