(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2021년06월28일
(11) 등록번호 10-2269477
(24) 등록일자 2021년06월21일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 1/20 (2006.01) *A23C 9/12* (2017.01)
C12R 1/07 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 1/20 (2021.05)
A23C 9/1203 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2020-0003214
(22) 출원일자 2020년01월09일
심사청구일자 2020년01월09일
(56) 선행기술조사문헌
KR101921529 B1*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
계명대학교 산학협력단
대구광역시 달서구 달구벌대로 1095, 계명대학교 산학협력관 201호(신당동)
(72) 발명자
윤웅규
대구광역시 달서구 월배로5길 76, 211동 1903호 (유천동, 대구월배2차 아이파크)
김지은
대구광역시 달서구 계대동문로 99, 206동 1002호 (이곡동, 성서보성화성타운)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인태백

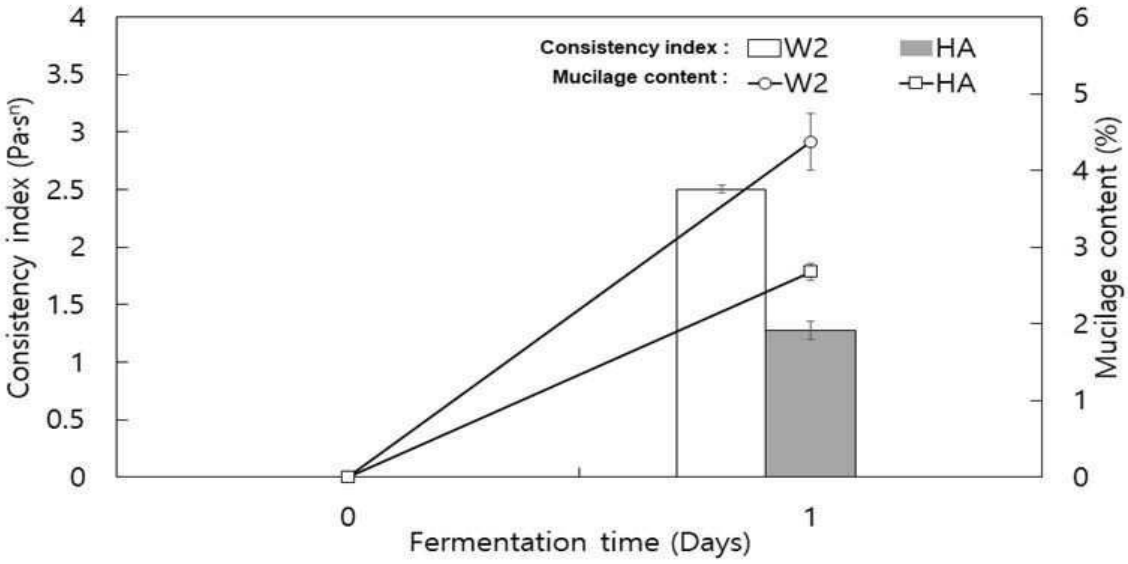
전체 청구항 수 : 총 5 항 심사관 : 이효진

(54) 발명의 명칭 **신규한 바실러스 벨레젠시스 WK2019 균주 및 이를 이용한 우유발효물 제조방법**

(57) 요 약

본 발명은 신규한 바실러스 벨레젠시스 (Bacillus velezensis) WK2019 균주 및 이를 이용한 우유발효물에 관한 기술으로, 보다 상세하게는 김치로부터 분리된 고초균 바실러스 벨레젠시스 (Bacillus velezensis) WK2019는 종래의 고초균으로 발효된 우유발효물보다 우수한 풍미를 나타내며, GABA 함량 증가 및 항혈전 효과를 나타내는 우유발효물을 제공하는 것으로 확인됨에 따라, 상기 균주를 이용한 우유발효물은 기능성 식품으로 제공될 수 있다.

대 표 도 - 도9



(52) CPC특허분류
C12R 2001/075 (2021.05)
(72) 발명자
임종순
대구광역시 달서구 계대동문로3길 64 (신당동)
이삼빈
대구광역시 달서구 선원로 171, 102동 306호 (이곡동, 성서무지개타운)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	P0004334
부처명	산업통상자원부
과제관리(전문)기관명	한국산업기술진흥원
연구사업명	커뮤니티비즈니스 활성화사업
연구과제명	사회적경제 활성화를 위한 고부가 지역특화식품 개발 및 기업맞춤형 상품화
기 여 율	1/1
과제수행기관명	계명대학교 산학협력단
연구기간	2019.01.01 ~ 2019.12.31

명 세 서

청구범위

청구항 1

유당 분해능 및 점질물 생산능력이 우수하며, 우유발효물의 풍미를 향상시키는 바실러스 벨레젠시스 (Bacillus velezensis) WK2019 (KCCM12589P) 균주.

청구항 2

삭제

청구항 3

삭제

청구항 4

유당 분해능 및 점질물 생산능력이 우수한 바실러스 벨레젠시스 (Bacillus velezensis) WK2019 (KCCM12589P) 균주로 발효되며, 점질물 함량 및 풍미가 향상된 우유발효물.

청구항 5

유당 분해능 및 점질물 생산능력이 우수한 바실러스 벨레젠시스 (Bacillus velezensis) WK2019 (KCCM12589P) 균주를 배양하여 스타터(starter)를 준비하는 단계;

상기 바실러스 벨레젠시스 WK2019 스타터를 2 내지 6 중량% MSG가 포함된 우유배지에 접종하는 단계; 및

상기 바실러스 벨레젠시스 WK2019 스타터가 접종된 우유배지를 발효시키는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 점질물 함량 및 풍미가 향상된 우유발효물 제조방법.

청구항 6

삭제

청구항 7

청구항 5에 있어서, 상기 접종하는 단계는 바실러스 벨레젠시스 WK2019 스타터를 1 내지 5%(v/v)로 접종하는 것을 특징으로 하는 점질물 함량 및 풍미가 향상된 우유발효물 제조방법.

청구항 8

청구항 5에 있어서, 상기 발효시키는 단계는 25 내지 45℃에서 160rpm으로 1 내지 3일간 배양하는 것을 특징으로 하는 점질물 함량 및 풍미가 향상된 우유발효물 제조방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 신규한 바실러스 벨레젠시스 (Bacillus velezensis) WK2019 균주 (KCCM12589P) 및 이를 이용한 우유발효물에 관한 기술이다.

배 경 기 술

[0002] 고초균은 전통적인 발효식품에서 유용하게 이용되는 프로바이오틱스 (probiotics)이며 주로 청국장, 낫또 등의 대두 발효식품에 관여하며 혈전용해효소, 면역기능 강화 및 항산화 효과 등의 기능성 물질을 생산하여 건강식품으로 알려져 있다. 특히 고초균에서 생산하는 점질물은 γ-PGA와 당의 중합체 프룩탄 (fructan) 형태의 레반 (levan)으로 구성되어 있다. γ-PGA는 글루타민산 (glutamic acid)의 γ-카르복실기와 α-아미노기 사이의 아미

드 연결 (amide linkage)에 의해 결합된 동종 중합체 (homopolymer)이다. 식품의약품안전처에서 인증하는 면역증진 등의 기능성 식품 원료로 등재되어 있으며 생분해성을 가질 뿐만 아니라 기호성, 물성 개선 및 다양한 생리활성효과를 갖는 수용성 고분자로서 바이오 신소재, 보습제, 화장품, 약물 전달체 등 다양한 식품, 환경, 의약 등 다양한 분야에서 이용되고 있다. 김치로부터 분리된 유용 고초균을 이용하여 점질물, 펩타이드, 활성효소 등이 함유된 다기능성 발효원료를 개발하며, 탈지대두 및 우유를 원료로 하여 유용 고초균을 이용한 발효를 통해서 기능성물질이 강화되며, 물성 및 풍미가 개선된 발효물을 생성한다.

[0003] 그러나 고초균에 의해 발효된 우유의 경우, 고유한 냄새가 생성되어 품질에 문제가 있으며, 고초균의 포자는 내열성을 지니고 대부분 유당 분해능이 없어 우유 발효 제품 제조공정에 문제점을 나타내어 스타터로서의 사용이 전무한 실정이다. 일반적으로 유가공 및 발효업체에서는 젖산균이 대표적인 스타터 균주로 이용되지만 내열성 포자형성균인 고초균은 유해균으로 인식되고 있어, 고초균 발효를 통한 우유의 기능성 강화와 관련된 연구는 미비한 실정이다.

선행기술문헌

특허문헌

[0004] (특허문헌 0001) 대한민국 공개특허 제10-2009-0020744호 (2009.02.27. 공개)

발명의 내용

해결하려는 과제

[0005] 본 발명은 고초균에 의한 우유 발효 시 나타나는 고유의 냄새를 완화시키면서 고초균 발효에 의해 생성되는 기능성물질이 함유된 기능성 우유발효물 제조를 위한 신규한 바실러스 벨레젠시스 WK2019 균주 및 이를 이용한 우유발효물 제조방법을 제공하고자 한다.

과제의 해결 수단

[0006] 본 발명은 당 분해능 및 항혈전 효과가 우수하며, 감마-아미노뷰티르산 (gamma-aminobutyric acid; GABA)이 생산능력이 우수한 바실러스 벨레젠시스 (Bacillus velezensis) WK2019 (KCCM12589P) 균주를 제공한다.

[0007] 본 발명은 바실러스 벨레젠시스 (Bacillus velezensis) WK2019 (KCCM12589P) 균주로 발효되며, 감마-아미노뷰티르산 (gamma-aminobutyric acid; GABA) 함량 및 항혈전효과가 증가된 우유발효물을 제공한다.

[0008] 또한, 본 발명은 바실러스 벨레젠시스 (Bacillus velezensis) WK2019 (KCCM12589P) 균주를 배양하여 스타터 (starter)를 준비하는 단계; 상기 바실러스 벨레젠시스 WK2019 스타터를 2 내지 4 중량% MSG가 포함된 우유배지에 접종하는 단계; 및 상기 바실러스 벨레젠시스 WK2019 스타터가 접종된 우유배지를 발효시키는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 감마-아미노뷰티르산 (GABA) 함량 및 항혈전효과가 증가된 우유발효물 제조방법을 제공한다.

발명의 효과

[0009] 본 발명에 따르면, 김치로부터 분리된 고초균 바실러스 벨레젠시스 (Bacillus velezensis) WK2019 (KCCM12589P)는 종래의 고초균으로 발효된 우유발효물보다 우수한 풍미를 나타내며, GABA 함량 증가 및 항혈전 효과를 나타내는 우유발효물을 제공하는 것으로 확인됨에 따라, 상기 균주를 이용한 우유발효물은 기능성 식품으로 제공될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0010] 도 1은 바실러스 벨레젠시스 WK2019의 콜로니를 확인한 결과이다.

도 2는 MRA 배지에서 바실러스 벨레젠시스 (Bacillus velezensis) WK2019 및 바실러스 서브스틸스 HA (B. subtilis HA)의 성장 형태를 확인한 결과이다.

도 3은 바실러스 벨레젠시스 WK2019 및 바실러스 서브스틸스 HA로 발효된 TVP 발효물을 확인한 결과이다.

도 4는 바실러스 벨레젠시스 WK2019 및 바실러스 서브스틸스 HA로 발효된 TVP 발효물에서 생균수를 확인한 결과이다.

도 5는 바실러스 벨레젠시스 WK2019 및 바실러스 서브스틸스 HA로 발효된 TVP 발효물의 pH를 확인한 결과이다.

도 6은 바실러스 벨레젠시스 WK2019 및 바실러스 서브스틸스 HA로 발효된 TVP 발효물의 점조도 (Consistency index) 및 점질물 함량 (mucilage content)을 확인한 결과이다.

도 7은 바실러스 벨레젠시스 WK2019 및 바실러스 서브스틸스 HA로 발효된 우유 발효물의 생균수를 확인한 결과이다.

도 8은 바실러스 벨레젠시스 WK2019 및 바실러스 서브스틸스 HA로 발효된 우유 발효물의 pH 및 산성도를 확인한 결과이다.

도 9는 바실러스 벨레젠시스 WK2019 및 바실러스 서브스틸스 HA로 발효된 우유 발효물의 점조도 (Consistency index) 및 점질물 함량 (mucilage content)을 확인한 결과이다.

도 10은 바실러스 벨레젠시스 WK2019 및 바실러스 서브스틸스 HA로 발효된 우유 발효물의 항혈전 (Thrombolysis) 효과를 확인한 결과이다.

도 11은 바실러스 벨레젠시스 WK2019 및 바실러스 서브스틸스 HA의 접종 후 2일 후 탄소공급원 (carbon source) 소비능을 확인한 API 50 CHB Kit 결과이다.

도 12는 락토스 (lactose)의 표준곡선을 나타낸 그래프이다.

도 13은 바실러스 벨레젠시스 WK2019 및 바실러스 서브스틸스 HA에 의한 우유발효에 따른 당 감소 수준을 확인한 결과이다.

도 14는 바실러스 벨레젠시스 WK2019 및 바실러스 서브스틸스 HA에 의한 우유발효물 내 생균수를 확인한 결과이다.

도 15는 바실러스 벨레젠시스 WK2019 및 바실러스 서브스틸스 HA에 의한 우유발효물의 pH 및 산성도를 확인한 결과이다.

도 16은 바실러스 벨레젠시스 WK2019 및 바실러스 서브스틸스 HA에 의한 우유발효물의 점조도 (Consistency index) 및 점질물 함량 (mucilage content)을 확인한 결과이다.

도 17은 바실러스 균주와 젖산균 L. plantarum로 혼합발효된 우유발효물 내 생균수를 확인한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0011] 이하, 본 발명을 보다 상세하게 설명한다.

[0012] 본 발명은 당 분해능 및 항혈전 효과가 우수하며, 감마-아미노뷰티르산 (gamma-aminobutyric acid; GABA)이 생산능력이 우수한 바실러스 벨레젠시스 (Bacillus velezensis) WK2019 (KCCM12589P) 균주를 제공할 수 있다.

[0013] 보다 상세하게 상기 균주는 김치로부터 분리되는 고초균일 수 있다.

[0014] 상기 당은 유당일 수 있으며, 보다 바람직하게는 락토오스 (lactose) 또는 글루코스 (glucose)일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0015] 본 발명은 바실러스 벨레젠시스 (Bacillus velezensis) WK2019 (KCCM12589P) 균주로 발효되며, 감마-아미노뷰티르산 (gamma-aminobutyric acid; GABA) 함량 및 항혈전효과가 증가된 우유발효물을 제공할 수 있다.

[0016] 본 발명의 실시예에 따르면, B. velezensis WK2019 (KCCM12589P)와 B. subtilis HA를 글루코스 2.5% 및 MSG 3% 첨가된 우유배지에 각각 접종하고 발효 1일 후 우유발효물의 점조도 및 점질물 함량의 변화를 확인한 결과, 도 9와 같이 B. velezensis WK2019로 발효된 우유의 점질물 함량은 2.51 $Pa \cdot S^n$으로 확인되었으며, B. subtilis HA로 발효된 우유의 점질물 함량은 1.27 $Pa \cdot S^n$으로 점질물 함량이 각각 4.38% 및 2.69% 증가된 것으로 확인되었으며, 고초균 B. velezensis WK2019와 B. subtilis HA로 발효된 우유를 이용하여 혈전분해정도를 측정하기 위하여 트롬빈효소와 피브리노겐을 혼합하여 피브린배지를 만들어 비교한 결과, 도 10과 같이 B. subtilis HA보다 B. velezensis WK2019이 점적된 자리의 혈전이 더 많이 분해된 것을 확인할 수 있었다.

[0017] 또한 본 발명의 다른 실시예에 따르면, 우유의 기능성을 강화하기 위하여 B. subtils HA를 이용하여 발효하였으나 발효취가 나타남에 따라, B. velezensis WK2019를 이용한 우유 발효를 진행한 후 계명대학교 대학원생을 대상으로 관능평가를 수행한 결과, 표 4와 같이 B. velezensis WK2019 또는 B. subtilis HA로 발효된 우유발효물 모두 치즈향과 같은 향미가 부드럽게 나는 것을 확인하였으나 B. subtils HA로 발효한 우유는 고초균 특유의 꿉꿉한 발효취와 같이 났으며, B. velezensis WK2019로 발효된 우유발효물의 풍미가 B. subtils HA 보다 우수한 것으로 나타났으며, 전체적인 기호도 역시 개선된 것을 확인할 수 있었다.

[0018] 상기 결과로부터 B. velezensis WK2019로 발효된 우유의 점조도 값 및 점질물 함량이 B. subtilis HA로 발효된 우유보다 높은 것으로 확인됨에 따라, B. velezensis WK2019균이 기능성 물질인 γ-PGA를 더 많이 생성하는 것이 확인되었으며, 종래의 고초균에의한 우유발효에 있어 문제가 되었던 특유의 발효향이 개선됨에 따라 본 발명의 B. velezensis WK2019로 발효된 우유발효물은 우수한 기능성 우유발효 식품으로 제공될 수 있다.

[0019] 또한, 본 발명은 바실러스 벨레젠시스 (Bacillus velezensis) WK2019 (KCCM12589P) 균주를 배양하여 스타터(starter)를 준비하는 단계; 상기 바실러스 벨레젠시스 WK2019 스타터를 2 내지 6 중량% MSG가 포함된 우유배지에 접종하는 단계; 및 상기 바실러스 벨레젠시스 WK2019 스타터가 접종된 우유배지를 발효시키는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 감마-아미노뷰티르산 (GABA) 함량 및 항혈전효과가 증가된 우유발효물 제조방법을 제공할 수 있다.

[0020] 보다 상세하게는 상기 우유배지는 1 내지 3 중량% 글루코스를 추가로 더 포함하는 것일 수 있다.

[0021] 상기 접종하는 단계는 바실러스 벨레젠시스 WK2019 스타터를 1 내지 5 %(v/v)로 접종하는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0022] 상기 발효시키는 단계는 25 내지 45℃에서 160rpm으로 1 내지 3일간 배양하는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0024] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 실시예를 들어 상세하게 설명하기로 한다. 다만 하기의 실시예는 본 발명의 내용을 예시하는 것일 뿐 본 발명의 범위가 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 실시예는 당업계에서 평균적인 지식을 가진 자에게 본 발명을 보다 완전하게 설명하기 위해 제공되는 것이다.

[0026] **<실시예 1> 김치로부터 유용 고초균 분리**

[0027] 일반 가정집 김치 10 g을 멸균된 증류수 100 mL에 현탁 시킨 후, 순차적으로 희석하여 MRS 고체배지(MRS agar)에 도말하고, 42℃ 배양기에서 24시간 동안 배양하였다. 육안으로 관찰하여 점질물을 생성하고 가장 점성을 나타내는 한콜로니를 분리하여 영양액체배지 (nutrient broth)에 접종하고 42℃에서 24시간 동안 배양하였다. 이후 배양액을 MRS고체 배지에 도말한 후 배양하여 순수분리 된 종균으로 사용하였다.

[0028] 도 1과 같이 바실러스 서브틸리스 HA (Bacillus subtilis HA)는 MRS 고체배지에 도말하고, 42℃ 배양기에서 24시간 동안 배양하여 단일 콜로니를 획득한 후 스타터 종균으로 사용하였다.

[0029] 그 결과, 도 2와 같이 MRS 고체배지의 왼쪽은 B. velezensis WK2019 (KCCM12589P) 오른쪽은 B. subtilis HA로 비교하였을 때 B. velezensis WK2019는 B. subtilis HA보다 돌출된 모양을 가지며 점성이 더 강하며 점질물을 생성하는 것을 확인할 수 있었다.

[0031] **<실시예 2> 콩 단백질을 이용한 고기 대용품 (Textured vegetable protein; TVP)를 이용한 고초균 발효물 비교**

[0032] 1. TVP를 이용한 고초균 발효물의 생균수 및 pH 확인

[0033] 도 3과 같이 콩 가공소재인 TVP(Textured vegetable protein, 조직화된 콩 단백질)를 이용하여 42℃에서 24시간 동안 고체배지에서 발효한 후, 생성된 발효물로부터 생균수를 측정하였다.

[0034] 그 결과, 도 4와 같이 TVP 발효원료의 초기 생균수는 B. velezensis WK2019 (KCCM12589P) 및 B. subtilis HA 각각 5.33 및 5.84 log CFU/mL에서 9.54 및 8.66 log CFU/mL로 발효 1일 동안 모두 생육이 왕성히 증가하는 것을 확인하였으나 B. velezensis WK2019가 B. subtilis HA보다 더 높은 생균수를 보였다.

[0035] 또한 도 5를 참고하면, TVP 발효 원료의 초기 pH는 6.76 이였으나 발효 1일 후 B. velezensis WK2019로 발효된 TVP의 pH는 7.54 이었으며, B. subtilis HA로 발효된 TVP의 pH는 8.32로 두 고초균으로 발효된 TVP의 pH모두 증가하였으나 B. subtilis HA로 발효된 TVP pH가 더 높은 것으로 확인되었다.

[0037] 2. TVP를 이용한 고초균 발효물의 점조도 및 점질물 확인

[0038] TVP를 이용하여 42℃에서 24시간 동안 고체배지에서 발효한 후, 생성된 발효물로부터 점질물 함량 및 점조도를 측정하였다.

[0039] 그 결과, 도 6과 같이 B. velezensis WK2019와 B. subtilis HA로 발효된 TVP의 점질물 함량은 각각 14.16% 및 9.22%로 B. velezensis WK2019로 발효된 TVP의 점질물 함량이 더 높게 나타났다. 또한, 점조도 값은 B. velezensis WK2019로 발효된 TVP는 2.11 $Pa \cdot S^n$으로 확인되었으며, B. subtilis HA로 발효된 TVP는 4.24 $Pa \cdot S^n$로 확인됨에 따라, B. subtilis HA로 발효된 TVP가 더 높은 점조도 값을 나타내었다.

[0041] 3. TVP를 이용한 고초균 발효물의 관능평가

[0042] TVP를 이용한 고초균 발효물의 관능평가는 계명대학교 대학원생을 대상으로 수행하였다. 단백질이 풍부한 원료인 TVP가 고초균 발효될 경우, 된장과 같은 발효취가 생성되어 젊은 사람들 사이에서 기피되는 경향이 있다. 그러나 표 1과 같이 B. velezensis WK2019 (KCCM12589P)로 발효된 TVP 발효물은 B. subtilis HA로 발효된 TVP 발효물과 비교하여 발효취가 미미한 것을 확인할 수 있었다.

[0043] 상기 결과로부터 신균주인 B. velezensis WK2019를 이용하여 고초균, 펩타이드, 기능성 물질인 γ-PGA가 포함된 점질물을 생성하는 고초균발효물을 식품, 기능성식품 및 화장품의 소재로 활용이 가능하다.

표 1

[0044]

분석 항목	*B. velezensis* WK2019	*B. subtilis* HA
풍미(Flavor)	+++	+
맛(Taste)	+	+
전체적인 기호도 (Overall preference)	++	+

[0046] **<실시예 3> 우유 발효를 통한 고초균 특징 확인**

[0047] 1. 우유배지 제조

[0048] 우유를 ㈜매일유업(Seoul, Korea)에서 구입하여 사용하였다. 고초균 비교 실험시 첨가한 부 원료인 mono sodium L-glutamate (MSG)와 glucose는 각각 CJ Cheiljedang (Seoul, Korea), Samyang Genex Corporation (Incheon, Korea)에서 구입하였다.

[0049] 우유 100 mL를 85℃, 30 분간 항온수조(B-490, BUCHI Corporation, Korea)에서 가열 후 glucose 2.5%와 MSG 3%를 첨가하였다.

[0050] 고초균을 NB 배지에서 42℃, 160 rpm에서 1일 동안 배양한 후 원심분리하여 상등액을 제거하고 균체를 멸균된 증류수로 분산시켜 10배 농축된 B. velezensis WK2019 (KCCM12589P)와 B. subtilis HA 스타터를 제조한 후 표 2와 같은 구성의 우유 배지에 농축스타터를 3% 접종하여 42℃, 160 rpm에서 1일 동안 진탕배양 한후 분석하였다.

표 2

[0051]

	Volume(mL)
Milk	157
40% Glucose (W/V)	12.5
50% MSG (W/V)	12
Distilled water	12.5
Starter	6
Total	200

[0053] 2. 고초균을 이용한 우유발효물의 생균수 비교

[0054] Glucose 2.5% 및 MSG 3%가 첨가된 우유배지에 고초균 B. velezensis WK2019와 B. subtilis HA를 각각 접종하고 42℃, 160 rpm에서 1일 동안 진탕배양한 후 고초균의 생균수를 측정하였다.

[0055] 그 결과, 도 7과 같이 발효 0일 B. velezensis WK2019와 B. subtilis HA는 발효 0일째 각각 7.42 및 6.52 log

CFU/mL로 생균수 차이를 나타내었으나, 발효 1일째에는 8.23 및 8.24 log CFU/mL로 생균수 차이가 미미하였다.

[0056] 상기 결과로부터 B. velezensis WK2019와 B. subtilis HA 모두 우유배지에서 8.00 log CFU/mL이상의 높은 생균수를 보이며 생육이 왕성한 것이 확인되었다.

[0058] 3. 고초균을 이용한 우유발효물의 pH 및 산도 비교

[0059] B. velezensis WK2019와 B. subtilis HA를 우유배지에 각각 접종하고 발효 1일 후 각 발효 우유의 pH 및 산도의 변화를 측정하였다.

[0060] 그 결과, 도 8과 같이 B. velezensis WK2019는 발효 0일 pH 7.09에서 발효1일 pH 7.04로 변화가 미미한 반면 B. subtilis HA는 발효 0일 pH 7.09에서 발효 1일 pH 6.63로 감소된 것을 확인할 수 있었다.

[0061] 산도(Acidity) 역시 B. velezensis WK2019는 발효 0일 0.12%에서 발효1일 0.16%로 변화가 미미한 반면 B. subtilis HA는 발효 0일 0.12%에서 발효 1일 0.31%로 증가하는 것이 확인되었다.

[0063] 4. 고초균을 이용한 우유발효물의 점조도 및 점질물함량 비교

[0064] B. velezensis WK2019와 B. subtilis HA를 글루코스 2.5% 및 MSG 3% 첨가된 우유배지에 각각 접종하고 발효 1일 후 우유발효물의 점조도 및 점질물 함량의 변화를 확인하였다.

[0065] 그 결과, 도 9와 같이 B. velezensis WK2019로 발효된 우유의 점질물 함량은 2.51 $Pa \cdot S^n$으로 확인되었으며, B. subtilis HA로 발효된 우유의 점질물 함량은 1.27 $Pa \cdot S^n$으로 점질물 함량이 각각 4.38% 및 2.69% 증가된 것으로 확인되었다.

[0066] 상기 결과로부터 B. velezensis WK2019로 발효된 우유의 점조도 값 및 점질물 함량이 B. subtilis HA로 발효된 우유보다 높은 것으로 확인됨에 따라, B. velezensis WK2019균이 기능성 물질인 γ-PGA를 더 많이 생성하는 것이 확인되었다.

[0068] 5. 고초균을 이용한 우유발효물의 혈전분해 수준 비교

[0069] 고초균 B. velezensis WK2019와 B. subtilis HA로 발효된 우유를 이용하여 혈전분해정도를 측정하기 위하여 트롬빈효소와 피브리노겐을 혼합하여 피브린배지를 만들어 비교하였다.

[0070] 그 결과, 도 10과 같이 B. subtilis HA보다 B. velezensis WK2019이 점적된 자리의 혈전이 더 많이 분해된 것을 확인할 수 있었다.

[0072] 6. 고초균의 carbon source 소비율 비교

[0073] 도 11과 같이 API kit 50CH B medium을 이용하여 B. velezensis WK2019와 B. subtilis HA의 탄소공급원(carbon source) 이용능을 비교하였다.

[0074] 그 결과, 표 3과 같이 대표적인 발효성 당류 중 B. velezensis WK2019는 락토스 (lactose)에 대해 양성반응을 나타내었으나 B. subtilis HA는 음성반응을 나타냈다. 또한, 글루코스 (glucose)로 만들어진 동질다당인 글리코겐 (glycogen)의 반응에서도 B. velezensis WK2019는 양성을 나타낸 반면, B. subtilis HA는 음성반응을 나타내었다.

표 3

[0075]

Tube	Test	Active ingredients	*B. velezensis* WK2019	*B. subtilis* HA
0		CONTROL	-	-
1	GLY	Glycerol	+	+
2	ERY	Erythritol	-	-
3	DARA	D-arabinose.	-	-
4	LARA	L-arabinose	+	+
5	RIB	D-ribose	+	+
6	DXYL	D-xylose	+	+
7	LXYL	L-xylose	-	-
8	ADO	D-xylose	-	-
9	MDX	Methyl-beta-D-xylopyranoside	-	-

10	GAL	D-galactose	-	-
11	GLU	D-glucose	+	+
12	FRU	D-fructose	+	+
13	MNE	D-mannose	+	+
14	SBE	L-sorbose	-	-
15	RHA	L-rhamnose	-	-
16	DUL	Dulcitol	-	-
17	INO	Inositol	-	+
18	MAN	D-mannitol	+	+
19	SOR	D-sorbitol	+	+
20	MDM	Methyl-alpha-D-mannopyranoside	+	-
21	MDG	Methyl-alpha-D-glucopyranoside	+	+
22	NAG	N-acetylglucosamine	+	+
23	AMY	Amygdalin	+	-
24	ARB	Arbutin	+	-
25	ESC	Esculin ferric citrate	+	+
26	SAL	Salicin	+	-
27	CEL	D-cellobiose	+	-
28	MAL	D-maltose	+	+
29	LAC	D-lactose (bovine origin)	+	-
30	MEL	D-melibiose	-	-
31	SAC	D-saccharose (sucrose)	+	+
32	TRE	D-trehalose	+	+
33	INU	Inulin	-	+
34	MLZ	D-melezitose	-	-
35	RAF	D-raffinose	+	+
36	AMD	Amidon (starch)	+	+
37	GLYG	Glycogen	+	-
38	XLT	Xylitol	-	-
39	GEN	Gentiobiose	+	-
40	TUR	D-turanose	-	+
41	LYX	D-lyxose	-	-
42	TAG	D-tagatose	-	+
43	DFUC	D-fucose	-	-
44	LFUC	L-fucose	-	-
45	DARL	D-arabitol	-	-
46	LARL	L-arabitol	-	-
47	GNT	Potassium gluconate	-	+
48	2KG	Potassium 2-ketogluconate	-	-
49	5KG	Potassium 5-ketogluconate	-	-

[0077] 7. 글루코스를 첨가하지 않은 우유배지 발효물을 이용한 고초균의 유당소비 비교

[0078] 앞서 확인된 6의 결과를 기반으로 유당소비 차이를 비교하기 위해 글루코스 0%, MSG 3% 첨가된 우유배지를 B. velezensis WK2019 및 B. subtilis HA로 발효시켰다. 환원당 함량은 DNS(Dinitrisalicylic acid)법에 따라 측정하였으며 락토스를 표준물질로 하여 도 12와 같이 표준 곡선을 작성한 후 유당소비율을 산출하였다.

[0079] 그 결과, 도 13과 같이 발효 0일 3.49%의 유당이 B. velezensis WK2019와 B. subtilis HA 발효 2일 후 각각 0.9% 및 1.71%로 감소하였다.

[0080] 상기 결과로부터 B. velezensis WK2019와 B. subtilis HA 모두 유당을 소모하였으나 B. velezensis WK2019의 유당 소모량이 약 두배 더 많은 것으로 확인되었다.

[0082] 8. 글루코스를 첨가하지 않은 우유배지 발효물에서 고초균의 생균수 함량 비교

[0083] 글루코스를 첨가하지 않은 우유배지에 MSG 3%를 첨가한 후 고초균 발효를 진행하여 생균수를 확인하였다.

[0084] 그 결과, 도 14와 같이 B. subtils HA는 발효 0일 7.09 log CFU/mL에서 발효 2일 8.45 log CFU/mL 증가하였다.

또한, B. velezensis WK2019는 발효 0일째에 6.73 log CFU/mL이였으나 발효 2일 후 8.6 log CFU/mL로 증가하였다.

[0085] 상기 결과로부터 B. velezensis WK2019를 이용한 우유발효물에서는 B. subtils HA 발효물과 유사한 수준의 생균수를 나타내는 것이 확인되었다.

[0087] 9. 글루코스를 첨가하지 않은 우유배지를 이용한 고초균 발효물의 pH 및 산도 비교

[0088] 글루코스를 첨가하지 않은 우유배지를 고초균 발효하여 pH 와 산도를 비교하였다. 그 결과, 도 15와 같이 B. velezensis WK2019로 발효된 우유는 발효 0일 pH 7.14에서 발효 2일 후 pH 7.99로 증가하였으며, B. subtilis HA로 발효된 우유 역시 발효 0일 pH 7.14에서 발효 2일 후 pH 7.44로 증가하였다. 두 고초균으로 발효된 우유 모두 pH가 증가하였으나 증가의 정도는 차이가 있다.

[0089] 산도는 B. velezensis WK2019 및 B. subtils HA로 발효된 우유발효물 각각 발효 0일 0.15%에서 발효 2일 후 0.11 및 0.23%로 확인됨에 따라, B. velezensis WK2019로 발효된 우유의 산도가 감소한 반면, B. subtilis HA로 발효된 우유는 0.23%로 증가된 것을 확인할 수 있었다.

[0091] 10. 글루코스를 첨가하지 않은 우유배지를 이용한 고초균 발효물의 점조도 및 점질물 비교

[0092] 글루코스 0% 및 MSG 3% 가 첨가된 우유배지를 고초균 B. velezensis WK2019와 B. subtilis HA로 발효하여 점조도 및 점질물 차이를 비교하였다.

[0093] 그 결과, 도 16과 같이 B. velezensis WK2019와 B. subtils HA로 발효된 우유의 점조도는 발효 2일후 각각 0.26 $Pa \cdot S^n$ 및 0.06 $Pa \cdot S^n$이며 점질물은 2.24% 및 1.68%로 차이가 났으며, B. velezensis WK2019로 발효된 우유가 더 높은 점조도와 점질물값을 확인하였다.

[0095] 11. 고초균 젖산균 혼합발효 중 고초균 활성 비교

[0096] 글루코스 2.5% 및 MSG 3% 첨가된 우유배지에 고초균 B. velezensis WK2019와 B. subtilis HA를 접종하여 42℃, 160 rpm에서 1일간 발효를 진행한 후 30℃에서 젖산균인 L. plantarum을 접종하여 5일동안 고초균 및 젖산균을 정치배양한 후 고초균의 활성을 확인하였다.

[0097] 그 결과, 도 17과 같이 고초균 단일 발효 1일 동안은 B. velezensis WK2019와 B. subtilis HA 모두 증가하는 양상을 보였으나 혼합 발효가 진행된 이후 3일차부터 B. velezensis WK2019는 혼합발효 5일까지 7.98 log CFU/mL로 적응하여 계속 생육을 유지한 반면, B. subtilis HA는 4.30 log CFU/mL까지 급격하게 감소되는 것을 확인할 수 있었다.

[0099] 12. 고초균을 이용한 우유 발효물의 관능평가

[0100] 우유의 기능성을 강화하기 위하여 B. subtils HA를 이용하여 발효하였으나 발효취가 나타남에 따라, 앞선 TVP 발효실험에서 B. subtils HA 보다 발효취가 감소된 것으로 확인된 B. velezensis WK2019를 이용하여 발효를 진행한 후 계명대학교 대학원생을 대상으로 관능평가를 수행하였다.

[0101] 그 결과, B. velezensis WK2019 또는 B. subtilis HA로 발효된 우유발효물 모두 치즈향과 같은 향미가 부드럽게 나는 것을 확인하였으나 B. subtils HA로 발효한 우유는 고초균 특유의 꿉꿉한 발효취와 같이 났으며, 관능평가 결과에서도 B. velezensis WK2019로 발효된 우유발효물의 풍미가 B. subtils HA 보다 우수한 것으로 나타났으며, 전체적인 기호도 역시 개선된 것을 확인할 수 있었다.

표 4

[0102]

분석항목	B. velezensis WK2019	B. subtilis HA
풍미(Flavor)	++++	++
맛(Taste)	+	+
전체적인 기호도 (Overall preference)	+++	++

[0104] 이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시양태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할

것이다.

[0106] 기탁기관명 : 한국미생물보존센터(국외)

[0107] 수탁번호 : KCCM12589P

[0108] 수탁일자 : 20190906

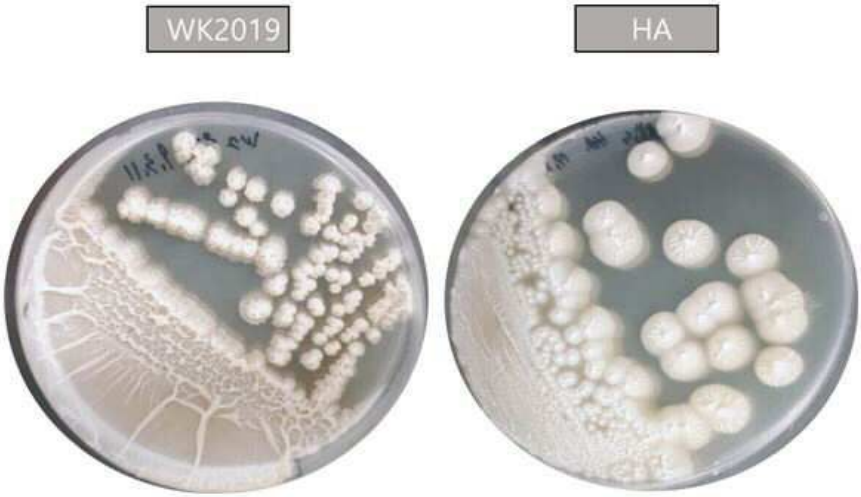
도면

도면1





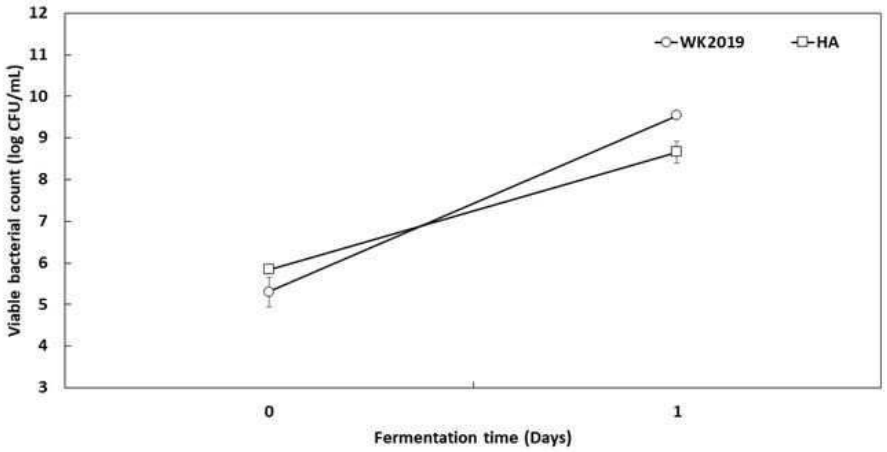
도면2



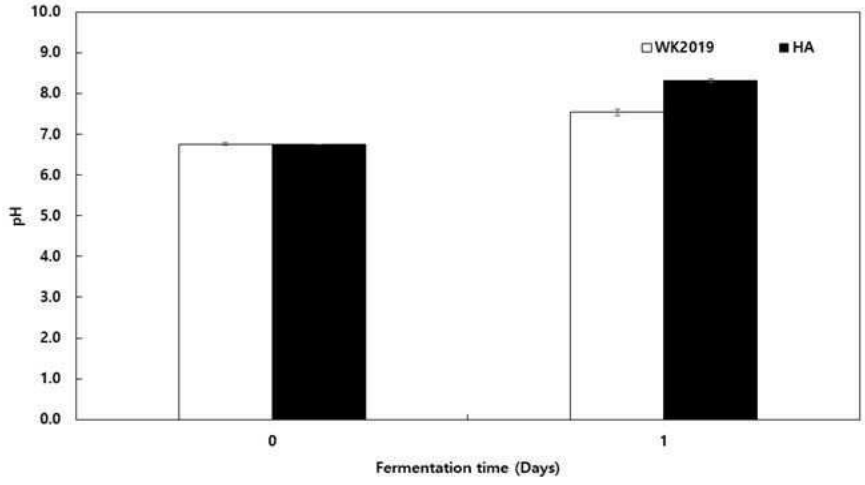
도면3


WK2019
HA

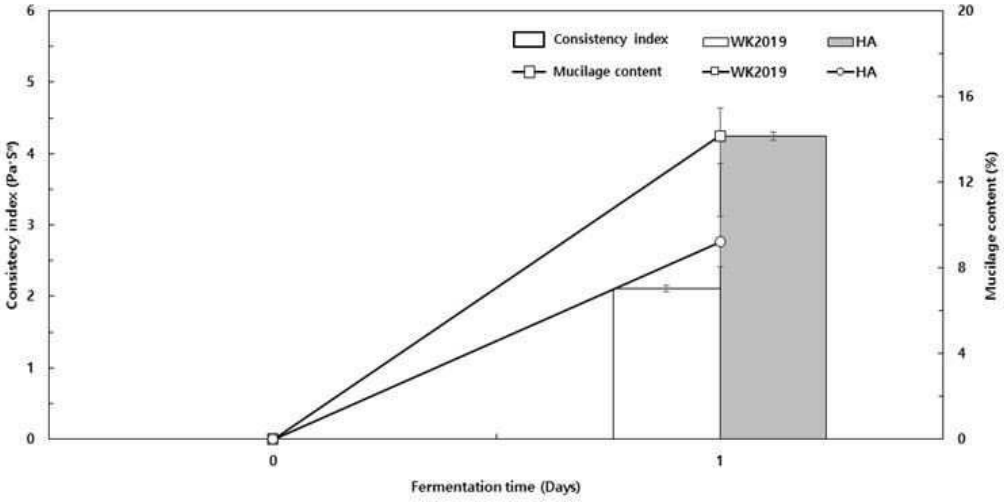
도면4


WK2019
HA
Viable bacterial count (log CFU/mL)
12
11
10
9
8
7
6
5
4
3
0
1
Fermentation time (Days)

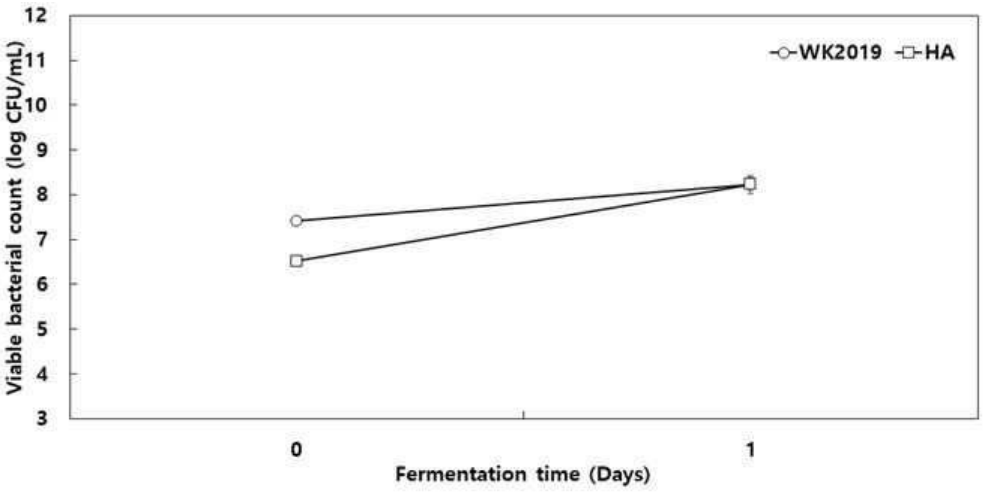
도면5


WK2019
HA
pH
10.0
9.0
8.0
7.0
6.0
5.0
4.0
3.0
2.0
1.0
0.0
0
1
Fermentation time (Days)

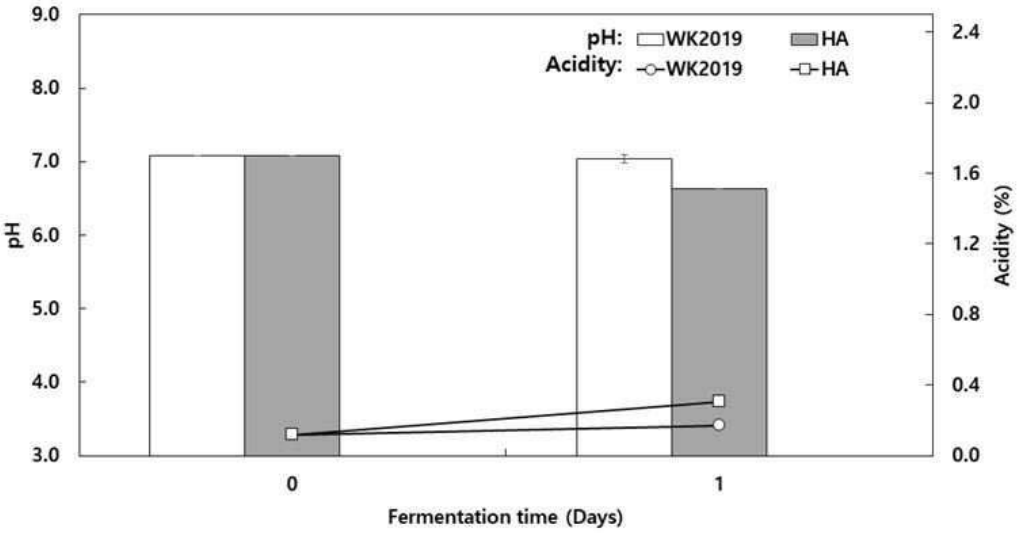
도면6


Consistency index
WK2019
HA
Mucilage content
WK2019
HA
Consistecy index (Pa·Sⁿ)
Mucilage content (%)
Fermentation time (Days)

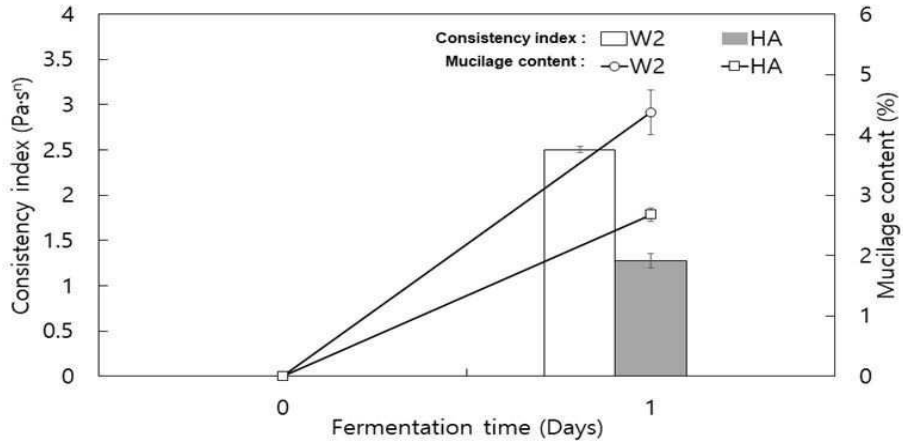
도면7


WK2019
HA
Viable bacterial count (log CFU/mL)
Fermentation time (Days)

도면8


pH: WK2019
HA
Acidity: WK2019
HA
pH
Acidity (%)
Fermentation time (Days)

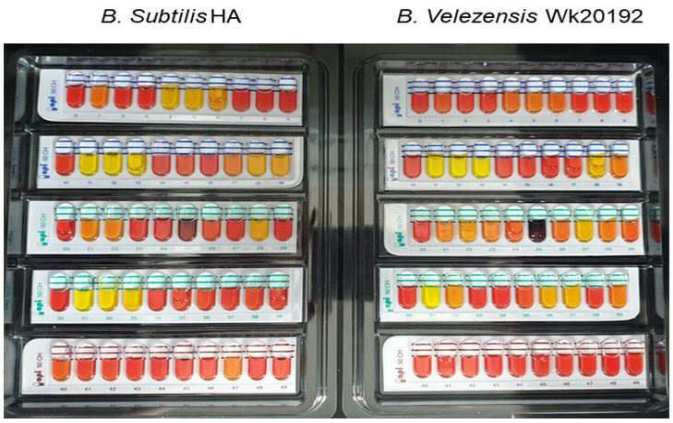
도면9



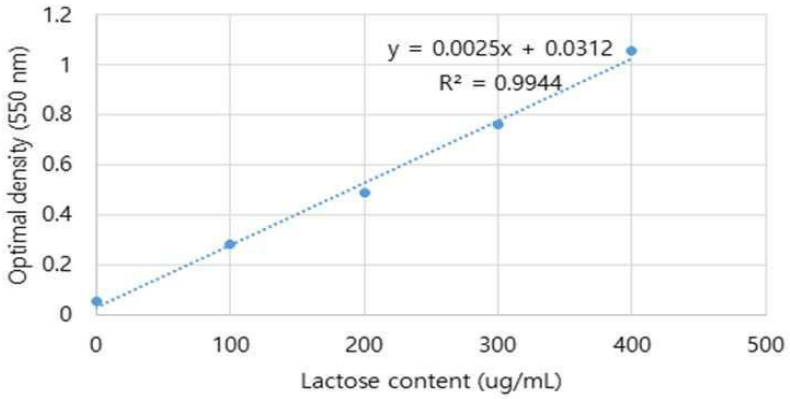
도면10



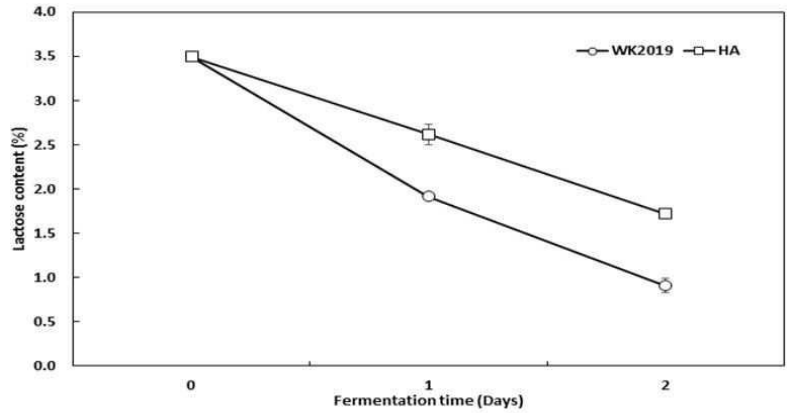
도면11



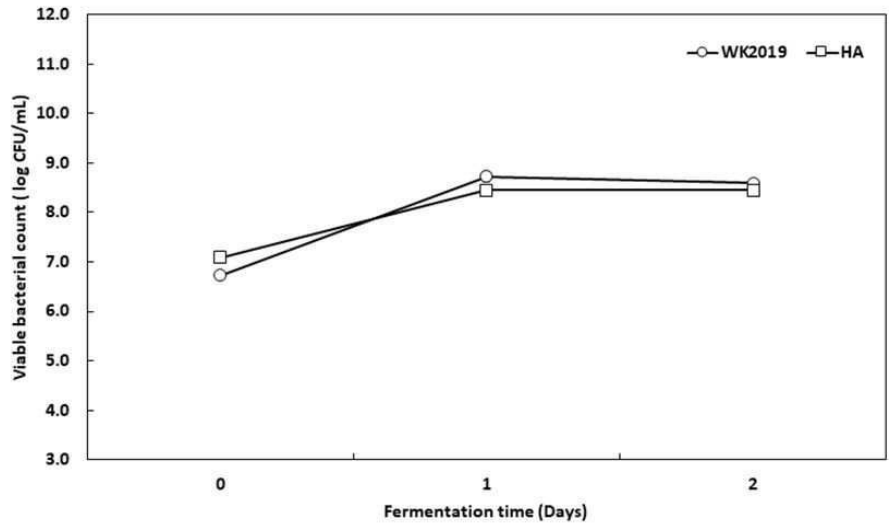
도면12



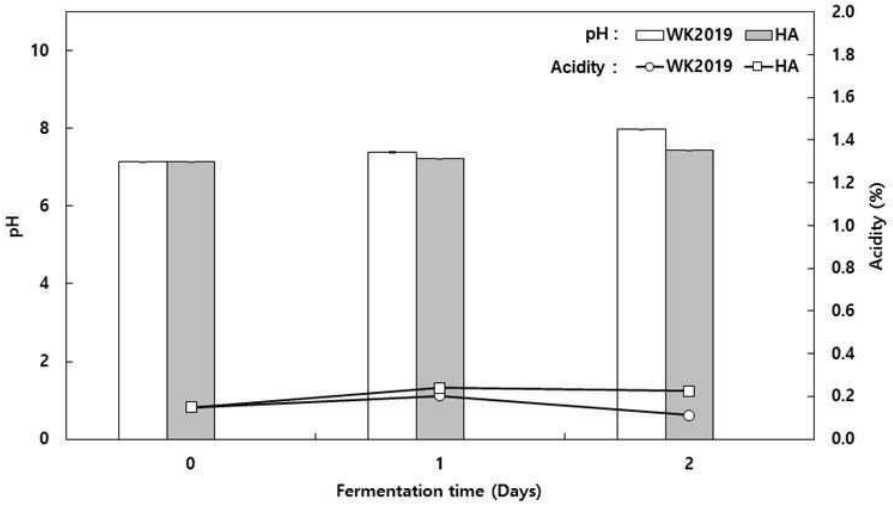
도면13



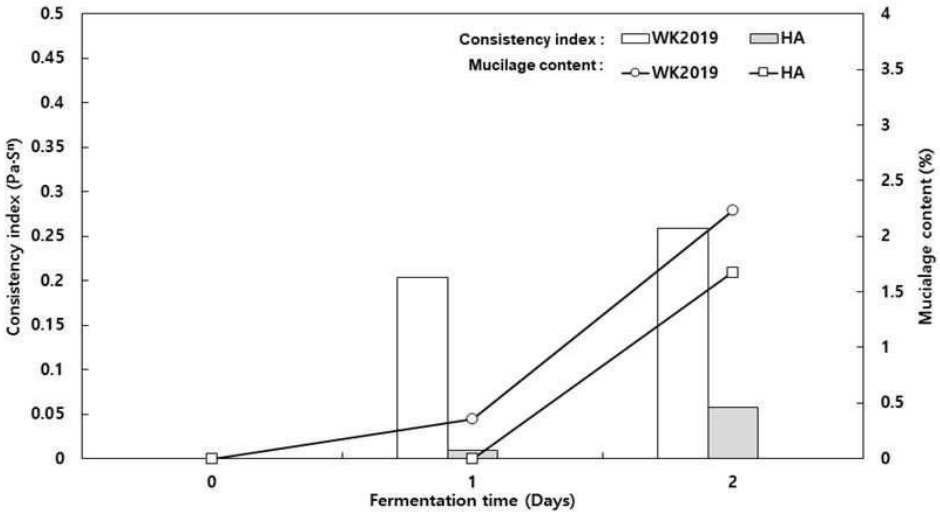
도면14



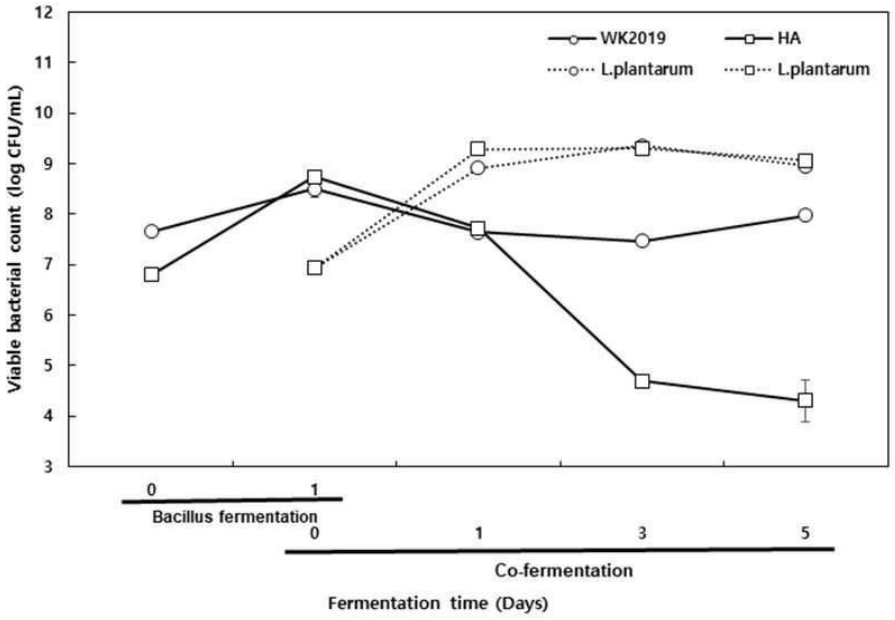
도면15


pH : WK2019 HA
Acidity : WK2019 HA
pH
Acidity (%)
Fermentation time (Days)

도면16


Consistency index : WK2019 HA
Mucilage content : WK2019 HA
Consistency index (Pa·Sⁿ)
Mucialage content (%)
Fermentation time (Days)

도면17


WK2019
HA
L.plantarum
L.plantarum
Viable bacterial count (log CFU/mL)
12
11
10
9
8
7
6
5
4
3
0
1
Bacillus fermentation
0
1
3
5
Co-fermentation
Fermentation time (Days)