(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2020-0106711
(43) 공개일자 2020년09월15일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 1/20 (2006.01) *A23K 10/16* (2017.01)
A23K 10/37 (2016.01) *A23L 33/105* (2016.01)
A23L 7/104 (2017.01) *C12R 1/07* (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 1/20 (2013.01)
A23K 10/16 (2016.05)
(21) 출원번호 10-2019-0025277
(22) 출원일자 2019년03월05일
심사청구일자 2019년03월05일

(71) 출원인
계명대학교 산학협력단
대구광역시 달서구 달구벌대로 1095, 계명대학교 산학협력관 201호(신당동)
(72) 발명자
이삼빈
대구광역시 달서구 선원로 171, 102동 306호 (이곡동, 성서무지개타운)
최지연
대구광역시 중구 달구벌대로 1937, 2동 103호 (대신동, 동서타운)
(74) 대리인
특허법인태백

전체 청구항 수 : 총 7 항

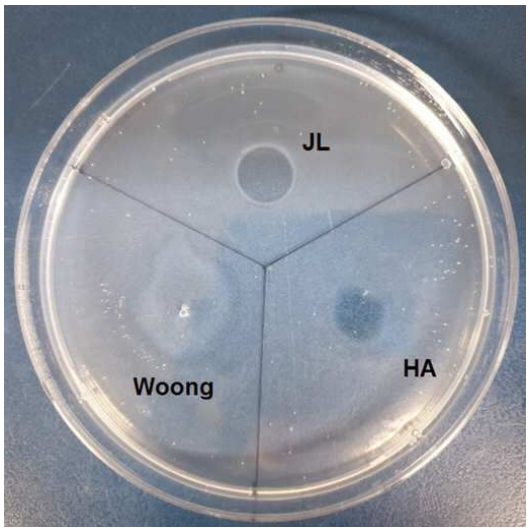
(54) 발명의 명칭 **혈전 용해능이 우수한 바실러스 메틸로트로피커스 JL 균주**

(57) 요 약

본 발명은 혈전 용해능이 우수한 바실러스 메틸로트로피커스 JL(*Bacillus methylotrophicus* JL) 균주를 제공하고, 혈전 용해능이 증진된 밀기울 발효물 제조 방법을 제공한다. 또한, 본 발명은 상기 제조 방법에 따라 제조된 밀기울 발효물을 유효성분으로 포함하는 혈전 용해능이 증진된 식품 조성물 및 사료 첨가제 조성물을 제공한다.

상기 바실러스 메틸로트로피커스 JL(*Bacillus methylotrophicus* JL) 균주는 우수한 혈전 용해능을 가지고, 상기 제조 방법을 통해 혈전 용해능이 증진된 밀기울 발효물을 제조할 수 있으며, 상기 밀기울 발효물이 식품 조성물 또는 사료 첨가제 조성물의 유효성분으로 포함되어, 혈전 용해능이 증진된 식품 또는 사료 첨가제로 활용될 수 있다.

대 표 도 - 도16



(52) CPC특허분류
A23K 10/37 (2016.05)
A23L 33/105 (2016.08)
A23L 7/104 (2016.08)
A23V 2002/00 (2013.01)
C12R 1/07 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1415159572
부처명 산업통상자원부
과제관리(전문)기관명 한국산업기술평가관리원
연구사업명 지역특화산업육성(산업부)
연구과제명 사회적 경제 활성화를 위한 고부가 지역특화식품 개발 및 기업맞춤형 상품화
기 여 율 1/1
과제수행기관명 계명대학교 산학협력단
연구기간 2018.07.01 ~ 2018.12.31

명 세 서

청구범위

청구항 1

KCCM12408P로 수탁되고, 혈전 용해능이 우수한 바실러스 메틸로트로피커스 JL(*Bacillus methylotrophicus* JL) 균주.

청구항 2

제 1 항에 있어서,

상기 균주는,

간장으로부터 분리된 것을 특징으로 하는 바실러스 메틸로트로피커스 JL(*Bacillus methylotrophicus* JL) 균주.

청구항 3

밀기울(wheat bran)에 물을 첨가하여 혼합하는 단계; 및

상기 혼합물에 KCCM12408P로 수탁된 바실러스 메틸로트로피커스 JL(*Bacillus methylotrophicus* JL) 스타터를 접종하고 배양하여 발효하는 단계;를 포함하는 혈전 용해능이 증진된 밀기울 발효물 제조 방법.

청구항 4

제 3 항에 있어서,

상기 발효 단계는,

35 내지 45℃에서 12 내지 48시간 동안 수행되는 것을 특징으로 하는 혈전 용해능이 증진된 밀기울 발효물 제조 방법.

청구항 5

제 3 항에 있어서,

상기 혼합 단계는,

상기 혼합물 100 중량부에 대하여, 모노소듐 L-글루타메이트(monosodium L-glutamate, MSG)를 1 내지 10 중량부 더 포함하여 수행되는 것을 특징으로 하는 혈전 용해능이 증진된 밀기울 발효물 제조 방법.

청구항 6

제 3 항 내지 제 5 항 중 어느 한 항에 따라 제조된 밀기울 발효물을 유효성분으로 포함하는 혈전 용해능이 증진된 식품 조성물.

청구항 7

제 3 항 내지 제 5 항 중 어느 한 항에 따라 제조된 밀기울 발효물을 유효성분으로 포함하는 혈전 용해능이 증진된 사료 첨가제 조성물.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 혈전 용해능이 우수한 바실러스 메틸로트로피커스 JL(*Bacillus methylotrophicus* JL) 균주에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 혈전은 혈관 속이나 심장 속에서 혈액 성분이 국소적으로 응고해서 생기는 응어리로, 혈관 내피의 손상이나 염증, 또는 동맥경화 등에 의한 이상, 혈액의 정체, 응고성이 높아진 경우에 그 국소에서 혈전이 생길 수 있다. 우리 신체는 혈관을 통해 각 조직에 영양 물질과 산소를 공급하여 신진대사를 유지하므로 원활한 순환계에서 이러한 혈전은 혈류를 방해하는 요인이 된다.

[0003] 혈전의 생성 원인은 아직까지 정확하게 밝혀진 바 없으나, 선천적 유전 질환, 신체의 노화에 따른 생리적 기능의 변화, 스트레스 등이 그 원인으로 지목되고 있고, 특히 현대인의 과다한 업무로 인한 스트레스는 혈액응고기전에 관여하는 인자의 양에 변화를 일으켜 비정상적인 혈전을 일으키는 원인 중의 하나로 지목되고 있다.

[0004] 혈전은 혈관 벽이 손상을 입었을 때 혈전 유출 방지를 위한 정상적인 기능을 하고 있지만, 평소에 생성된 혈전은 혈관을 좁게 만들어 혈압을 상승시키기도 하고, 뇌혈관에 생성되었을 경우, 뇌혈전증을 일으켜 뇌출혈을 유발하여 생명에 지장을 줄 수 있다.

[0005] 이러한 질환의 원인이 되는 혈전을 제거하기 위하여 많은 연구가 진행되어 왔으며, 그 결과 혈전의 생성을 억제하거나 생성된 혈전을 용해시키는 작용을 하는 여러 약물들이 개발되었다. 하지만, 이러한 약물들에 대한 전신출혈 등의 부작용 역시 보고되어 있다. 그리하여 기존의 혈전 용해제들의 단점을 극복하는 새로운 혈전 용해제를 개발하기 위한 많은 노력이 시도되고 있고, 새로운 혈전 용해제를 개발하기 위한 방법 중 하나로 자연계로부터 우수한 혈전 용해능을 가지는 동식물 자원에 대한 연구가 진행되고 있다.

[0006] 특히, 미생물 유래의 혈전 용해 물질이 특이성이 높고 산업화가 용이하며 발효나 유전자 조작 등을 통하여 대량생산이 가능하기 때문에 이와 관련된 연구가 활발히 이루어지고 있는 실정이다.

선행기술문헌

특허문헌

[0007] (특허문헌 0001) 한국등록특허 제10-0831420호 (2008년05월15일 등록)

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 상기와 같은 문제점을 해결하기 위하여, 본 발명은 바실러스 메틸로트로피커스 JL(*Bacillus methylotrophicus* JL) 균주를 제공한다.

[0009] 본 발명은 상기 바실러스 메틸로트로피커스 JL(*Bacillus methylotrophicus* JL) 균주를 이용하여 혈전 용해능이 증진된 밀기울 발효물 제조 방법을 제공한다.

[0010] 본 발명은 상기 밀기울 발효물을 포함하는 혈전 용해능이 증진된 식품 조성물 및 사료 첨가제 조성물을 제공한다.

과제의 해결 수단

[0011] 본 발명은 KCCM12408P로 수탁되고, 혈전 용해능이 우수한 바실러스 메틸로트로피커스 JL(*Bacillus methylotrophicus* JL) 균주를 제공한다.

[0012] 본 발명은 밀기울(wheat bran)에 물을 첨가하여 혼합하는 단계; 및 상기 혼합물에 KCCM12408P로 수탁된 바실러스 메틸로트로피커스 JL(Bacillus methylotrophicus JL) 스타터를 접종하고 배양하여 발효하는 단계;를 포함하는 혈전 용해능이 증진된 밀기울 발효물 제조 방법을 제공한다.

[0013] 본 발명은 상기 제조 방법에 따라 제조된 밀기울 발효물을 유효성분으로 포함하는 혈전 용해능이 증진된 식품 조성물을 제공한다.

[0014] 본 발명은 상기 제조 방법에 따라 제조된 밀기울 발효물을 유효성분으로 포함하는 혈전 용해능이 증진된 사료 첨가제 조성물을 제공한다.

발명의 효과

[0015] 본 발명에 따른 바실러스 메틸로트로피커스 JL(*Bacillus methylotrophicus* JL) 균주는 우수한 혈전 용해능을 가진다.

[0016] 본 발명에 따른 밀기울 발효물 제조 방법을 통해 혈전 용해능이 증진된 밀기울 발효물을 제조할 수 있고, 상기 방법에 따라 제조된 밀기울 발효물은 식품 조성물 또는 사료 첨가제 조성물의 유효성분으로 함유되어, 혈전 용해능이 증진된 식품 또는 사료 첨가제로 활용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0017] 도 1은 본 발명의 실험예 1의 실험 방법을 나타낸 흐름도이다.

도 2는 본 발명의 일 실험예에 사용되는 간장에서 분리된 A, B, C의 3가지 균주이다.

도 3은 본 발명의 실험예 1에 따른 발효된 조직대두단백(TVP)의 pH 변화를 나타낸 그래프이다.

도 4는 본 발명의 실험예 1에 따른 발효된 조직대두단백(TVP)의 생균수 변화를 나타낸 그래프이다.

도 5는 본 발명의 실험예 1에 따른 발효된 조직대두단백(TVP)의 점질물 및 점조도 변화를 나타낸 그래프이다.

도 6은 본 발명의 실험예 1에 따른 발효된 조직대두단백(TVP)의 혈전 용해능을 나타낸다.

도 7은 본 발명의 실험예 2의 실험 방법을 나타낸 흐름도이다.

도 8은 본 발명의 실험예 2에 따른 발효된 조직대두단백(TVP)의 점질물 및 점조도 변화를 나타낸 그래프이다.

도 9는 본 발명의 실험예 2에 따른 발효된 조직대두단백(TVP)의 혈전 용해능을 나타낸다.

도 10은 본 발명의 실험예 3의 실험 방법을 나타낸 흐름도이다.

도 11은 본 발명의 실험예 3에 따른 발효된 밀기울(wheat bran)의 점질물 및 점조도 변화를 나타낸 그래프이다.

도 12는 본 발명의 실험예 3에 따른 발효된 밀기울(wheat bran)의 혈전 용해능을 나타낸다.

도 13은 본 발명의 일 실험예에 따른 균주 C의 DNA 시퀀싱의 결과이다.

도 14는 본 발명의 일 실험예에 따른 균주 C의 계통수(Phylogenetic tree) 결과이다.

도 15는 본 발명의 실험예 4의 실험 방법을 나타낸 흐름도이다.

도 16은 본 발명의 실험예 4에 따른 혈전 용해능 결과를 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0018] 이하, 본 발명에 대하여 상세히 설명한다.

[0019] 본 발명의 발명자들은 간장으로부터 바실러스 메틸로트로피커스 JL(*Bacillus methylotrophicus* JL) 균주를 분리하였고, 상기 균주가 발효 과정에서 발효물 내 점질물, 혈전 용해능 등을 증진시키는 것을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

[0021] 본 발명은 바실러스 메틸로트로피커스 JL(*Bacillus methylotrophicus* JL) 균주를 제공한다.

[0022] 상기 균주는 KCCM12408P로 수탁된 균주로, 간장으로부터 분리될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 그 외에, 예를 들어, 된장, 청국장, 고추장 등 전통 발효에 의한 장류에서 분리될 수 있다.

[0023] 상기 균주는 혈전 용해능이 우수한 특징을 가질 수 있다. 본 발명의 일 실험예에 따르면, 상기 균주는 바실러스 서브틸리스 HA(*Bacillus subtilis* HA) 균주 및 바실러스 메틸로트로피커스 웅(*Bacillus methylotrophicus* Woong) 균주와의 혈전 용해능을 비교하였을 때, 가장 우수한 혈전 용해능을 나타내었다.

[0025] 본 발명은 혈전 용해능이 증진된 밀기울 발효물 제조 방법을 제공한다.

[0026] 본 발명에 따른 혈전 용해능이 증진된 밀기울 발효물 제조 방법은 밀기울(wheat bran)에 물을 첨가하여 혼합하는 단계; 및 상기 혼합물에 KCCM12408P로 수탁된 바실러스 메틸로트로피커스 JL(*Bacillus methylotrophicus*

JL) 스타터를 접종하고 배양하여 발효하는 단계;를 포함할 수 있다.

[0027] 본 발명에 따른 제조 방법에 있어서, 상기 밀기울은 밀에서 가루를 빼고 남은 찌꺼기로, 상기 혼합 단계에서 물을 첨가하여 함께 혼합될 수 있다.

[0028] 본 발명에 따른 제조 방법에 있어서, 상기 혼합 단계는 상기 혼합물 100 중량부에 대하여, 폴리감마글루탐산(poly-ɣ-glutamic acid, 이하, ɣ-PGA)의 전구물질인 모노소듐 L-글루타메이트(monosodium L-glutamate, MSG)를 1 내지 10 중량부 더 포함하여 수행될 수 있다. 본 발명의 일 실험예에 따르면, 상기 모노소듐 L-글루타메이트를 더 첨가한 경우, 상기 균주에 의해 점질물 및 점조도의 값이 증가하는 등의 변화가 관찰되었다.

[0029] 또한, 상기 혼합물의 발효 효율을 높이기 위해, 미생물 발효에서 통상적으로 첨가될 수 있는 영양소 성분, 예를 들어, 포도당, 효모 추출액, 비타민, 무기질 등이 더 첨가될 수 있다.

[0030] 본 발명에 따른 제조 방법에 있어서, 상기 밀기울의 형태는 발효 과정이 일어날 수 있는 형태라면 제한 없이 가능하고, 예를 들어, 비건조물, 건조물, 절단물, 분쇄물 및 추출물로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상일 수 있다. 본 발명의 일 실험예에 따르면, 상기 밀기울에 물을 첨가해 혼합하여 사용하였다. 상기 물은 상기 밀기울에서 발효가 잘 진행될 수 있도록 적당량이 첨가되어 혼합될 수 있으며, 예를 들어, 상기 밀기울의 중량 대비 0.1 내지 100배 부피의 물이 가해질 수 있다.

[0031] 본 발명에 따른 제조 방법에 있어서, 상기 발효 단계는 35 내지 45℃, 바람직하게는 37 내지 43℃의 온도에서, 12 내지 48시간, 바람직하게는 20 내지 24시간 동안 수행될 수 있다. 발효 온도가 상기의 온도 범위보다 낮은 경우, 상기 바실러스 메틸로트로피커스 JL(*Bacillus methylotrophicus* JL)의 생육이 느려져서 발효 시간이 길어질 수 있고, 이로 인해 바실러스 균 특유의 발효취가 증가할 수 있다. 또한, 발효 온도가 상기의 온도 범위보다 높은 경우, 상기 균이 과도하게 많이 증식되어 발효 시간은 단축될 수 있으나, 상기 균의 정상적인 생육이 불가능할 수 있으므로, 상기 범위 내의 온도와 시간에서 발효를 진행하는 것이 보다 바람직할 것이다.

[0032] 본 발명에 따른 제조 방법에 있어서, 상기 발효 단계에서 수행되는 발효 방법은 통상의 기술자가 사용할 수 있는 발효 방법이면 제한 없이 적용될 수 있고, 예를 들어, 발효 대상에 따라 고체발효, 액체발효 등이 적용될 수 있다. 본 발명의 일 실험예에 따르면, 대두 또는 밀기울에 대해 고체발효가 진행되었고, 이러한 발효 방법에 따라 제조된 밀기울 발효물은 혈전 용해능이 보다 증진된 특징을 가질 수 있다.

[0033] 이 외에도, 식용 가능하고 상기 바실러스 메틸로트로피커스 JL(*Bacillus methylotrophicus* JL) 균주에 의해 발효될 수 있는 곡류, 두류, 채소류, 과일류 등 예를 들어, 보리, 찹쌀, 현미, 율무, 강낭콩, 대두 등에서도 상기의 제조 방법으로 발효물이 제조될 수 있다.

[0035] 본 발명은 상기 제조 방법에 따라 제조된 밀기울 발효물을 유효성분으로 포함하는 혈전 용해능이 증진된 식품 조성물을 제공한다.

[0036] 본 발명의 제조 방법에 따라 제조된 밀기울 발효물은 혈전 용해능이 증진된 특징을 가져, 이를 포함하는 식품 조성물 또한 혈전 용해능이 증진된 특징을 가질 수 있다.

[0037] 본 발명에 따른 식품 조성물에 있어서, 상기 밀기울 발효물은 원칙적으로 식품 조성물에 사용될 수 있는 제형이면 제한되지 않고, 예를 들어, 액체 또는 고체이거나, 여과액, 추출액, 현탁액, 농축액, 건조분말, 동결건조분말, 분무건조분말 등의 형태가 될 수 있다.

[0038] 본 발명에 따른 식품 조성물에 있어서, 상기 밀기울 발효물은 본 발명에서 목적하는 혈전 용해능이 효과적으로 나타낼 수 있는 적절한 양의 범위 내에서 식품에 포함될 수 있고, 상기 발효물의 제형에 따라 적정 농도 범위 또한 달라질 수 있다.

[0039] 본 발명에 따른 식품 조성물에 있어서, 상기 식품의 제형은 분말, 과립, 정제, 캡슐, 시럽 또는 음료 등으로 제조될 수 있고, 상기 식품이 취할 수 있는 형태에는 제한이 없으며, 통상적인 의미의 식품을 모두 포함할 수 있다. 예를 들어, 음료 및 각종 드링크, 과실 및 그의 가공식품(과일통조림, 잼 등), 어류, 육류 및 그 가공식품(햄, 베이컨 등), 빵류 및 면류, 쿠키 및 스낵류, 유제품(버터, 치즈 등) 등이 가능하며, 통상적인 의미에서의 기능성 식품도 모두 포함할 수 있다.

[0040] 본 발명에 따른 식품 조성물은 당업계에서 통상적으로 사용되는 식품학적으로 허용 가능한 식품 첨가제 및 적절한 기타 보조 성분을 더 포함하여 제조될 수 있다. 예를 들어, 향미제, 천연 탄수화물, 감미제, 비타민,

전해질, 착색제, 펙트산, 알긴산, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알콜, 탄산화제 등을 추가로 함유할 수 있다. 특히, 상기 천연 탄수화물로는 포도당, 과당과 같은 모노사카라이드, 말토스, 수크로오스와 같은 디사카라이드, 및 덱스트린, 사이클로덱스트린과 같은 폴리사카라이드, 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알콜을 사용할 수 있으며, 감미제로서는 타우마틴, 스테비아 추출물과 같은 천연 감미제나 사카린, 아스파르탐과 같은 합성 감미제 등을 사용할 수 있다.

[0041] 본 발명에 따른 식품 조성물은 일반 약품과는 달리, 식품을 원료로 하여 약품의 장기 복용 시 발생할 수 있는 부작용 등이 없는 장점이 있고, 휴대성이 뛰어나며, 혈전 용해능이 증진된 특징을 이용하여, 예를 들어, 혈전증 예방 또는 개선을 위한 보조제로 섭취될 수 있다.

[0043] 본 발명은 상기 제조 방법에 따라 제조된 밀기울 발효물을 유효성분으로 포함하는 혈전 용해능이 증진된 사료 첨가제 조성물을 제공한다.

[0044] 상기 밀기울은 밀의 속껍질이 많이 섞인 것으로, 밀에서 차지하는 용적이 크고, 기호성이 높으며 소화가 잘 되어 가축의 사료로 사용될 수 있고, 상기 밀기울 발효물은 사료 첨가제 조성물로 사용될 수 있다. 본 발명의 제조 방법에 따라 제조된 밀기울 발효물은 혈전 용해능이 증진된 특징을 가져, 이를 포함하는 사료 첨가제 또한 혈전 용해능이 증진된 특징을 가질 수 있다.

[0045] 본 발명에 따른 사료 첨가제 조성물에서, 상기 사료는 일반적으로 가축 사육에 사용되는 공지된 구성의 사료로, 시판되고 있는 일반 사료를 모두 포함할 수 있다. 상기 사료는 곡물, 식물성 단백질 사료, 동물성 단백질 사료, 당분 및 유제품을 포함할 수 있다. 예를 들어, 미강, 옥수수, 대두박, 콩, 수수, 쌀, 보리, 밀, 귀리, 호밀, 좁쌀, 메밀, 티리티게일, 고구마, 타피오카, 밀기울, 맥강, 대두피, 옥수수겨, 맥아근, 전분박, 커피박, 잠분, 잠사, 해조분, 면실박, 채종박, 캐놀라밀, 임자박, 호마박, 아마박, 해바라기씨박, 낙화생박, 야자박, 옥수수 글루텐, 주정박, 옥수수 배아박, 고추씨박, 루핀종실, 어분, 우모분 및 육분을 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0046] 본 발명에 따른 사료 첨가제 조성물에서, 상기 사료 첨가제는 일반적인 사료 첨가제, 예를 들면, 소금, 골분, 인산 칼슘제, 무기물 혼합제, 비타민제, 아미노산제, 항생물질, 호르몬제 등의 특수 목적을 위한 사료 첨가제를 포함할 수 있다.

[0047] 본 발명에 따른 사료 첨가제 조성물은 돼지, 소, 닭, 염소, 양, 말, 어류, 개 및 고양이로 이루어진 군에서 선택되는 동물의 사료에 첨가될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 상기 조성물의 투여량은 투여대상이 되는 동물의 종류, 동물의 나이, 동물의 체중, 동물의 예방 또는 개선하고자 하는 질병, 원하는 효과 등에 따라 당해 분야의 전문가가 적절히 조절할 수 있다.

[0049] 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.

[0051] **<실험예 1> 간장으로부터 분리한 3 가지 균주와 *Bacillus subtilis* HA 비교 실험**

[0052] **1. 실험 방법**

[0053] 도 1은 본 발명의 실험예 1의 실험 방법을 나타낸 흐름도이다.

[0054] 도 1을 참조하면, 조직대두단백(Texturized Vegetable Protein, 이하, TVP)을 원료로 사용하여 고체발효를 수행하였다. TVP 25g에 증류수 37.5mL을 첨가하여 121℃에서 15분간 멸균하였다.

[0055] 도 2는 본 발명의 일 실험예에 사용되는 간장에서 분리된 A, B, C의 3가지 균주로, 상기 분리된 3가지 균주와 대조군으로 이용되는 바실러스 서브틸리스 HA(*Bacillus subtilis* HA, 이하 *B. subtilis* HA) 균주 배양액을 상기 멸균시킨 TVP에 1%씩 접종하였다. 이때, 바실러스 서브틸리스(고초균) 스타터 배양액은 5% 소이 밀크(soy milk) 배지를 사용하였다. 이후 42℃에서 2일간 고체 발효한 후 발효물을 분석하였다.

[0057] **2. 실험 결과**

[0058] 1) pH 및 생균수(Viable cell count)

[0059] 도 3은 본 발명의 실험예 1에 따른 발효된 조직대두단백(TVP)의 pH 변화를 나타낸 그래프이다. 도 3을 참조하면, 발효 0일차에는 pH 6.51로, 발효가 진행되는 동안 균주 A, B, C, 및 *B. subtilis* HA 모두에서 전반적으로 큰 변화가 나타나지 않았으나, 발효 2일차에는 상기 *B. subtilis* HA 균주의 경우 pH가 7.84로 소폭 증가하였다.

[0060] 도 4는 본 발명의 실험예 1에 따른 발효된 조직대두단백(TVP)의 생균수 변화를 나타낸 그래프이다. 도 4를 참조하면, 균주 A, B, C 및 *B. subtilis* HA 모두의 경우에서 생균수의 경향이 전반적으로 큰 차이가 나지 않았다. A 균주와 C 균주는 발효 0일차 2.0×10^{7} CFU/mL에서 발효 1일차 2.0×10^{9} CFU/mL으로 증가한 후 유지되었고, B 균주와 *B. subtilis* HA 균주는 발효 0일차 2.0×10^{6} CFU/mL에서 발효 1일차 4.0×10^{8} CFU/mL으로 증가한 후, B 균주는 발효 2일차까지 소폭 증가하는 경향을 나타내었고, *B. subtilis* HA 균주는 유지되었다.

[0062] 2) 점질물(Mucilage) 및 점조도(Consistency)

[0063] 도 5는 본 발명의 실험예 1에 따른 발효된 조직대두단백(TVP)의 점질물 및 점조도 변화를 나타낸 그래프이다. 도 5를 참조하면, A, B 균주의 점질물이 발효 2일차에 증가하였고, C 및 *B. subtilis* HA 균주의 점질물은 소폭 감소하는 것으로 나타났으나, C 균주의 점질물 값이 가장 높았다. 점조도의 경우, 발효된 시료를 10배 희석하여 측정하였는데, A, B 및 *B. subtilis* HA 균주에서는 거의 변화가 없었으나 C 균주의 경우 증가하는 것으로 나타났다 즉, 점질물과 점조도 모두 C 균주가 값이 높게 측정되었다. 점질물의 경우 발효 1일차에 13.63%, 발효 2일차에 12.87%로 나타났고, 점조도의 경우 발효 1일차 0.05 $Pa\cdot s^{n}$에서 발효 2일차에 0.11 $Pa\cdot s^{n}$로 증가하였다.

[0065] 3) 혈전 용해능(Fibrinolytic activity)

[0066] 도 6은 본 발명의 실험예 1에 따른 발효된 조직대두단백(TVP)의 혈전 용해능을 나타낸다. 도 6을 참조하면, 왼쪽의 D1은 발효 1일차의 발효물로 반응시킨 혈전 플레이트이고, 오른쪽 D2는 발효 2일차의 발효물로 반응시킨 혈전 플레이트로, 상기 발효물을 각각 10배로 희석시킨 후 혈전 플레이트에 떨어뜨려 2시간 동안 반응시켰다. 그 결과, 발효 1일차의 발효물에서 C 균주의 혈전 용해능이 가장 우수한 것으로 나타났고, 발효 2일차의 발효물에서는 C 균주를 제외한 나머지 A, B 및 *B. subtilis* HA 균주의 혈전 용해능이 높아졌으나 여전히 C 균주가 우수한 것으로 나타났다.

[0068] **<실험예 2> 조직대두단백(TVP)에서의 C 균주와 *Bacillus subtilis* HA 비교 실험**

[0069] **1. 실험 방법**

[0070] 상기 실험예 1에서 혈전 용해능이 가장 우수했던 C 균주와 대조군 *B. subtilis* HA 균주의 비교 실험을 조직대두단백(TVP)에서 진행하였다.

[0071] 도 7은 본 발명의 실험예 2의 실험 방법을 나타낸 흐름도이다.

[0072] 도 7을 참조하면, 원료로는 상기 실험예 1과 같이 TVP를 사용하였으며, 이 때 고초균이 생성하는 폴리감마글루탐산(poly-ɣ-glutamic acid, 이하, ɣ-PGA)의 전구물질인 모노소듐 L-글루타메이트(monosodium L-glutamate; 이하, MSG) 5%를 첨가한 조건을 추가적으로 진행하였다. TVP 25g에 증류수 37.5mL을 첨가하고 121℃에서 15분간 멸균하여 C 균주와 대조군으로 이용되는 *B. subtilis* HA 균주 배양액을 1% 접종하였다. 이때 배양액은 5% 소이밀크(soy milk) 배지를 사용하였다. 이후 42℃에서 1일간 고체 배양한 후 분석하였다.

[0074] **2. 실험 결과**

[0075] 1) 점질물(Mucilage) 및 점조도(Consistency)

[0076] 도 8은 본 발명의 실험예 2에 따른 발효된 조직대두단백(TVP)의 점질물 및 점조도 변화를 나타낸 그래프이다.

도 8을 참조하면, 점질물과 점조도 모두 C 균주가 높게 나타났다. 또한 *B. subtilis* HA와 C 균주 모두 MSG를 첨가한 조건에서 눈에 띄게 높은 값을 나타내어, C 균주의 점질물은 17.28%, *B. subtilis* HA 균주의 점질물은 14.38%로 나타났다.

[0077] 점조도의 경우, 각 발효물을 10배 희석하여 측정하였다. 발효 1일차에 MSG를 첨가하지 않은 조건에서 C 균주는 0.10 Pa·s^n, *B. subtilis* HA 균주는 0.04 Pa·s^n로 측정되었고, MSG를 첨가한 조건에서는 C 균주가 0.33 Pa·s^n, *B. subtilis* HA 균주가 0.57 Pa·s^n 로 측정되었다.

[0079] 2) 혈전 용해능(Fibrinolytic activity)

[0080] 도 9는 본 발명의 실험예 2에 따른 발효된 조직대두단백(TVP)의 혈전 용해능을 나타낸다. 도 9를 참조하면, 각 발효물을 10배 희석하여 혈전 플레이트에서 혈전 용해능을 비교해 본 결과, MSG를 첨가하지 않은 조건과 첨가한 조건 모두 C 균주의 혈전 용해능이 더 우수한 것으로 나타났으며, MSG를 첨가한 조건에서는 두 균주 모두 혈전 용해능이 증가하였다.

[0082] **<실험예 3> 밀기울(wheat bran)에서의 C 균주와 *Bacillus subtilis* HA 비교 실험**

[0083] **1. 실험 방법**

[0084] 상기 실험예 1에서 혈전 용해능이 가장 우수했던 C 균주와 대조군 *B. subtilis* HA 균주의 비교 실험을 밀기울(wheat bran)에서 진행하였다.

[0085] 도 10은 본 발명의 실험예 3의 실험 방법을 나타낸 흐름도이다.

[0086] 도 10을 참조하면, 원료로는 밀기울(wheat bran)을 사용하였으며, 이 때 고초균이 생성하는 γ-PGA의 전구물질인 MSG 5%를 첨가한 조건을 추가적으로 진행하였다. 밀기울 25g에 증류수 37.5mL을 첨가하고 121℃에서 15분간 멸균하여 C 균주와 대조군으로 이용되는 *B. subtilis* HA 균주 배양액을 1% 접종하였다. 이때 배양액은 5% 소이밀크(soy milk) 배지를 사용하였다. 이후 42℃에서 1일간 고체 배양한 후, 발효물을 분석하였다.

[0088] **2. 실험 결과**

[0089] 1) 점질물(Mucilage) 및 점조도(Consistency)

[0090] 도 11은 본 발명의 실험예 3에 따른 발효된 밀기울(wheat bran)의 점질물 및 점조도 변화를 나타낸 그래프이다. 도 11을 참조하면, 점질물과 점조도 모두 *B. subtilis* HA 균주가 높게 나타났다. 또한 *B. subtilis* HA와 C 균주 모두 MSG를 첨가한 조건에서 눈에 띄게 높은 값을 나타내어, *B. subtilis* HA 균주의 점질물는 8.59%, C 균주의 점질물은 7.87%로 나타났다.

[0091] 점조도의 경우, 각 발효물을 10배 희석하여 점조도를 측정하였을 때, MSG를 첨가하지 않은 조건에서는 값이 거의 측정되지 않았고, MSG를 첨가한 조건의 경우에는 *B. subtilis* HA 균주는 0.37 Pa·s^n, C 균주는 0.07 Pa·s^n로 나타났다.

[0093] 2) 혈전 용해능(Fibrinolytic activity)

[0094] 도 12는 본 발명의 실험예 3에 따른 발효된 밀기울(wheat bran)의 혈전 용해능을 나타낸다. 도 12를 참조하면, 각 발효물을 10배 희석하여 혈전 플레이트에서 혈전 용해능을 비교해 본 결과, MSG를 첨가하지 않은 조건에서는 *B. subtilis* HA보다 C 균주의 혈전 용해능이 더 우수한 것으로 나타났으며, MSG를 첨가한 조건에서는 두 균주간의 큰 차이를 확인할 수 없었다.

[0096] **<실시예 1> 균주의 DNA 시퀀싱 확인**

[0097] 도 13은 본 발명의 일 실험예에 따른 균주 C의 DNA 시퀀싱의 결과이고, 도 14는 본 발명의 일 실험예에 따른 균

주 C의 계통수(Phylogenetic tree) 결과이다.

[0098] 도 13 및 도 14를 참고하면, 상기 균주 C는 바실러스 메틸로트로피커스(*Bacillus methylotrophicus*)로 확인되었고, 이를 바실러스 메틸로트로피커스 JL(*Bacillus methylotrophicus* JL, 이하, *B. methylotrophicus* JL)로 명명하였다.

[0100] **<실험예 4> *Bacillus methylotrophicus* JL, *Bacillus methylotrophicus* Woong 및 *Bacillus subtilis* HA의 혈전 용해능 비교 실험**

[0101] **1. 실험 방법**

[0102] 상기 실험예에서 혈전 용해능이 우수한 C 균주인 *B. methylotrophicus* JL와 바실러스 메틸로트로피커스 웅(*Bacillus methylotrophicus* Woong, 이하, *B. methylotrophicus* Woong) 및 *B. subtilis* HA의 혈전 용해능 비교 실험을 진행하였다.

[0103] 도 15는 본 발명의 실험예 4의 실험 방법을 나타낸 흐름도이다.

[0104] 도 15를 참조하면, 원료로는 TVP를 사용하였고, TVP 25g에 증류수 37.5mL을 첨가하여 121℃에서 15분간 멸균하여 *B. methylotrophicus* JL 균주와 *B. methylotrophicus* Woong, *B. subtilis* HA 균주 배양액을 1% 접종하였다. 이때 배양액은 5% 소이 밀크(soy milk) 배지를 사용하였다. 이후 42℃에서 1일간 고체 배양한 후, 발효물을 분석하였다.

[0106] **2. 실험 결과**

[0107] 도 16은 본 발명의 실험예 4에 따른 혈전 용해능 결과를 나타낸다.

[0108] 도 16을 참조하면, 각각의 TVP 발효물을 5배 희석하여 혈전 플레이트에서 혈전 용해능을 비교한 결과, *B. methylotrophicus* Woong 균주의 경우 혈전 플레이트가 거의 녹지 않았고, *B. methylotrophicus* JL 균주의 경우 혈전 플레이트가 가장 깊게 녹은 것을 확인하였다. 또한, *B. subtilis* HA 균주는 혈전을 용해시키지만 *B. methylotrophicus* JL 균주에 비해 투명하지 못한 용해물을 보였다.

[0109] 따라서, 청국장 및 나또 발효에 우수한 균주로 사용되고 있는 *B. subtilis* HA 균주에 비해서 *B. methylotrophicus* JL 균주가 보다 우수한 혈전 용해능을 보였고, 혈전 용해능이 있는 *B. methylotrophicus* Woong과 비교에서도 혈전 용해능이 매우 우수한 것으로 나타났다. 발효 균주로서 3가지 고초균 중에서 *B. methylotrophicus* JL 균주가 혈전 용해능이 가장 우수하였다.

[0111] 이제까지 본 발명에 대한 구체적인 실시예들을 살펴보았다. 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자는 본 발명이 본 발명의 본질적인 특성에서 벗어나지 않는 범위에서 변형된 형태로 구현될 수 있음을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 개시된 실시예들은 한정적인 관점이 아니라 설명적인 관점에서 고려되어야 한다. 본 발명의 범위는 전술한 설명이 아니라 특허청구범위에 나타나 있으며, 그와 동등한 범위 내에 있는 모든 차이점은 본 발명에 포함된 것으로 해석되어야 할 것이다.

수탁번호

[0112]

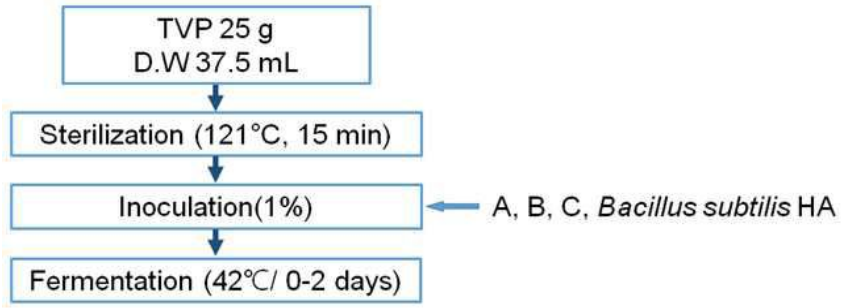
기탁기관명 : 한국미생물보존센터(국외)

수탁번호 : KCCM12408P

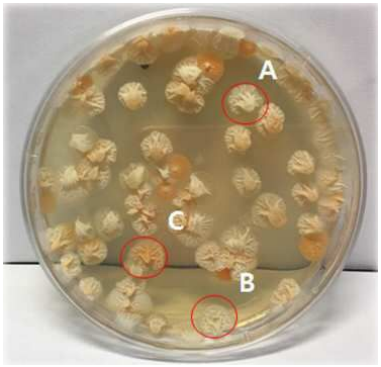
수탁일자 : 20181115

도면

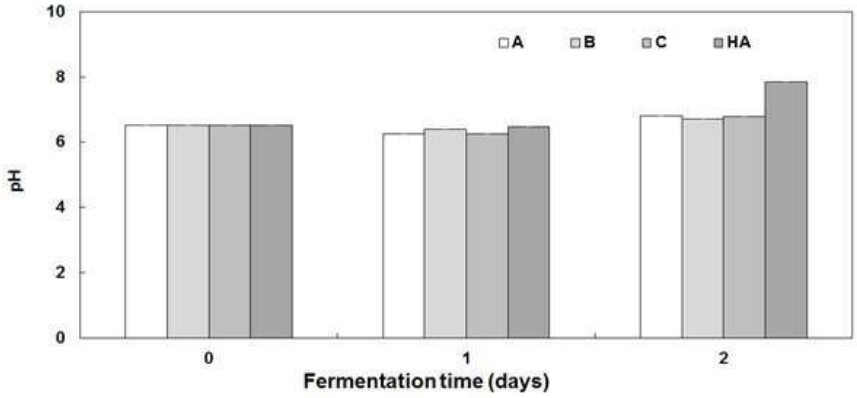
도면1



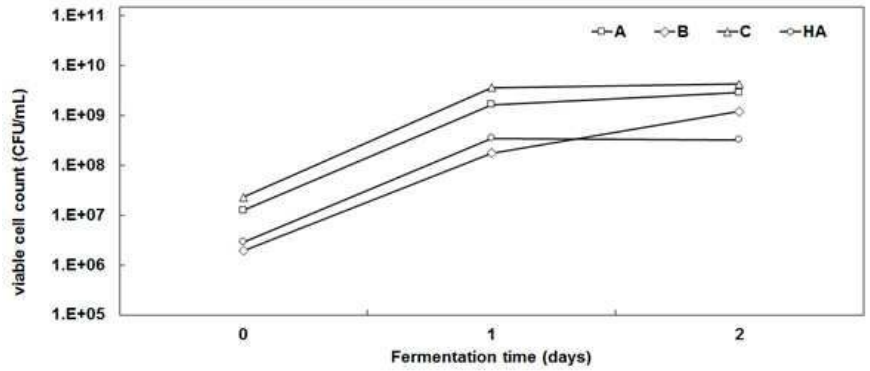
도면2



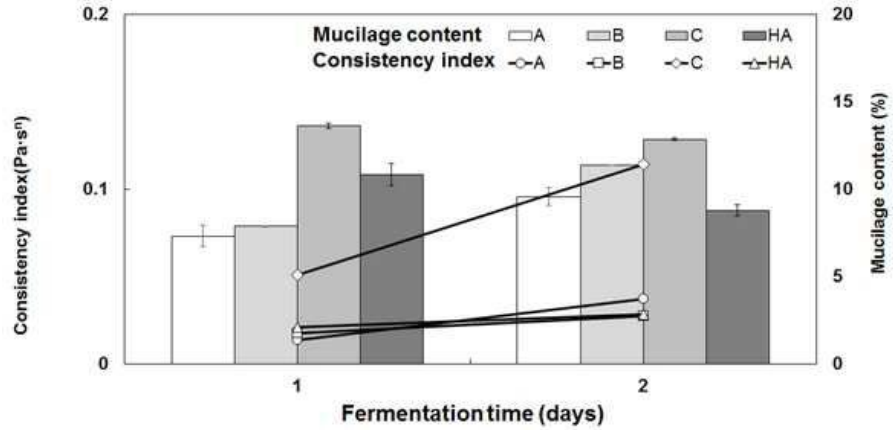
도면3



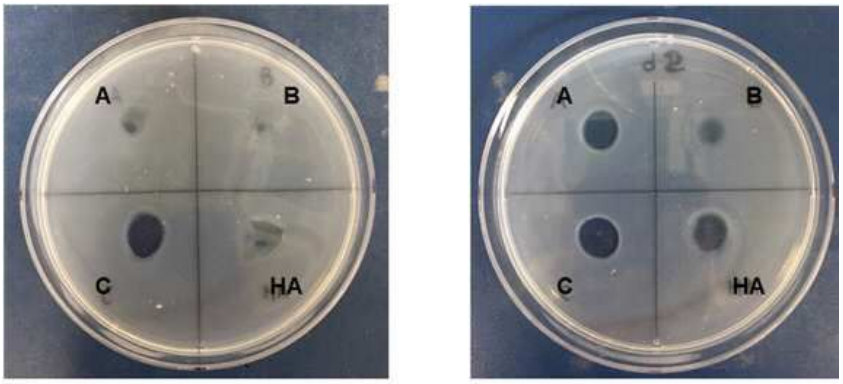
도면4


1.E+11
1.E+10
1.E+09
1.E+08
1.E+07
1.E+06
1.E+05
viable cell count (CFU/mL)
A
B
C
HA
0
1
2
Fermentation time (days)

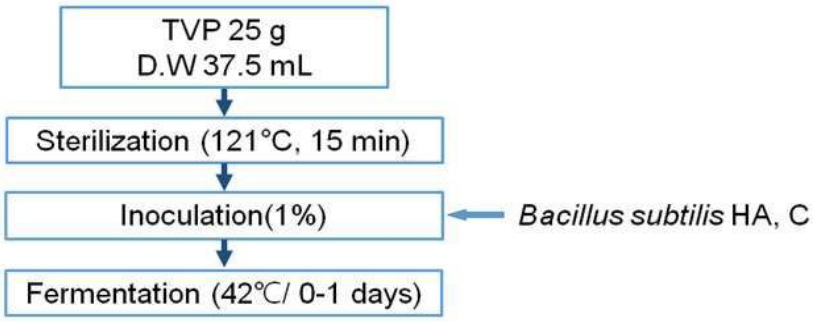
도면5


Mucilage content
Consistency index
A
B
C
HA
0.2
0.1
0
Consistency index(Pa·sⁿ)
20
15
10
5
0
Mucilage content (%)
1
2
Fermentation time (days)

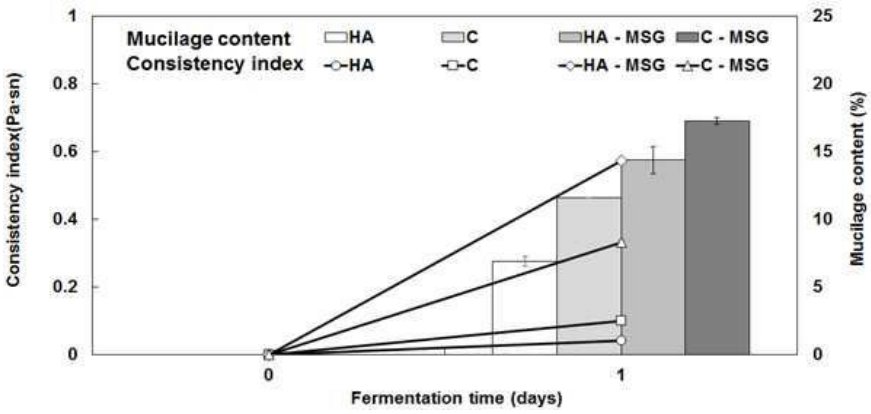
도면6


A
B
C
HA
D 1
A
B
C
HA
D 2

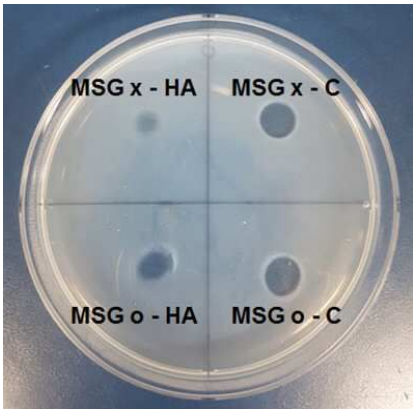
도면7



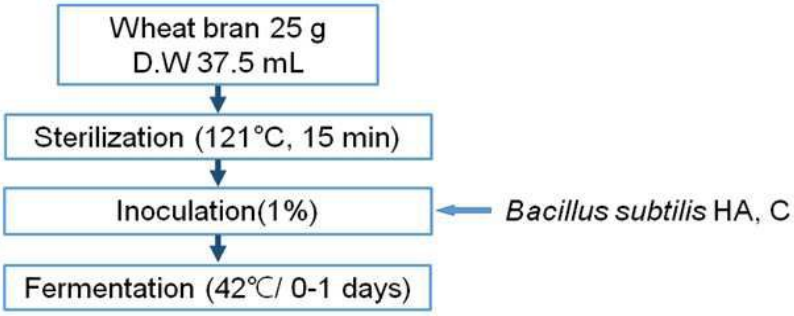
도면8



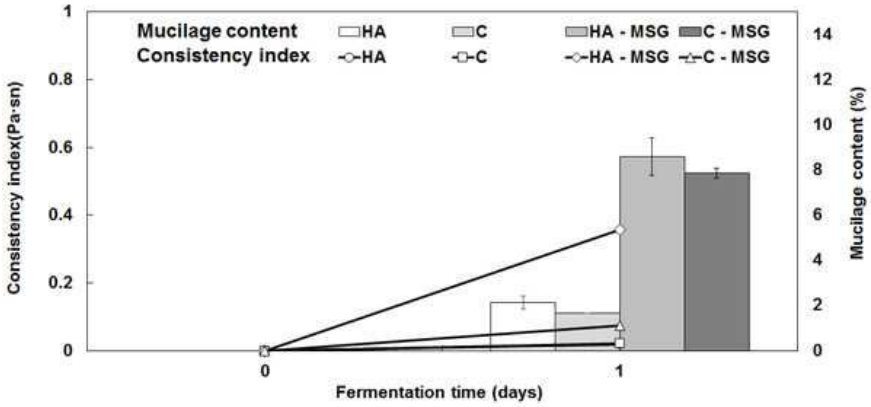
도면9



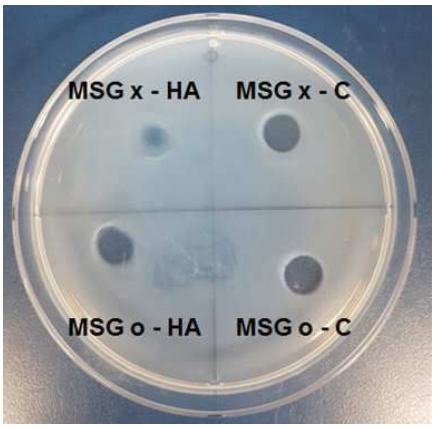
도면10



도면11



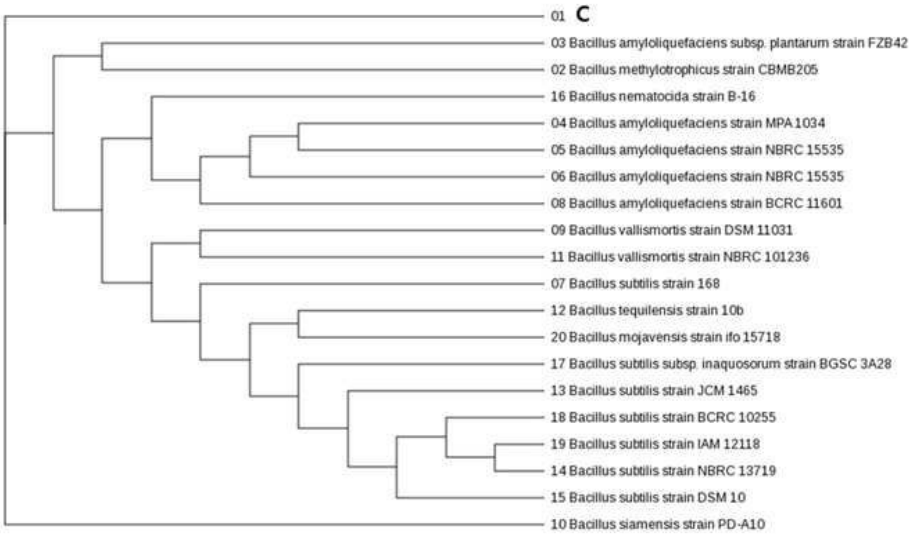
도면12



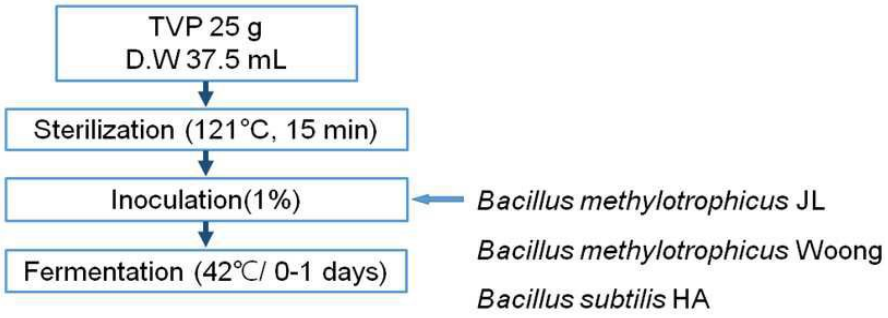
도면13

Sample Name	Length	Sequence
C	1404	TGCAGTCGAGCGGACAGATGGGAGCTTGCTCCCTGATGTTAGCGGCGGACGGGTGAGTAACACGT GGGTAACCTGCCTGTAAGACTGGGATAACTCCGGGAAACCGGGGCTAATACCGGATGGTTGTTTG AACCGCATGGTTCAGACATAAAAGGTGGCTTCGGCTACCACTTACAGATGGACCCGCGGCGCATT AGCTAGTTGGTGAGGTAACGGCTCACCAAGGCGACGATGCGTAGCCGACCTGAGAGGGTGATCGG CCACACTGGGACTGAGACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAAT GGACGAAAGTCTGACGGAGCAACGCCGCGTGAGTGATGAAGGTTTTCGGATCGTAAAGCTCTGTT GTTAGGGAAGAACAAGTGCCGTTCAAATAGGGCGGCACCTTGACGGTACCTAACCAGAAAGCCAC GGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGC GTAAAGGGCTCGCAGGCGGTTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCCGGCTCAACCGGGGAGGGTC ATTGGAAACTGGGGAACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGC GTAGAGATGTGGAGGAACACCAGTGGCGAAGGCGACTCTCTGGTCTGTAACTGACGCTGAGGAGC GAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGAGTGCTAA GTGTTAGGGGGTTTCCGCCCCTTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACG GTCGCAAGACTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAA TTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCCTCTGACAATCCTAGAGATAGGACGT CCCCTTCGGGGGCAGAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGT TAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTGATCTTAGTTGCCAGCATTCAGTTGGGCACTCTAAGGTG ACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCCTTATGACCTGG GCTACACACGTGCTACAATGGACAGAACAAAGGGCAGCGAAACCGCGAGGTTAAGCCAATCCCAC AAATCTGTTCTCAGTTCGGATCGCAGTCTGCAACTCGACTGCGTGAAGCTGGAATCGCTAGTAAT CGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCACGA GAGTTTGTAACACCCGAAGTCGGTGAGGTAACCTTTA

도면14



도면15



도면16

