



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2007-0121143
(43) 공개일자 2007년12월27일

(51) Int. Cl.

C12N 1/20 (2006.01) A23L 1/202 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2006-0055819

(22) 출원일자 2006년06월21일

심사청구일자 2006년06월21일

(71) 출원인

진주산업대학교 산학협력단

경남 진주시 칠암동 150

창원대학교 산학협력단

경남 창원시 사림동 9 창원대학교내

(72) 발명자

서원택

경남 진주시 칠암동 진주산업대학교 식품과학과

김용식

경남 창원군 대합면 용산리 1104-2번지 창녕식품

(74) 대리인

김일성

전체 청구항 수 : 총 4 항

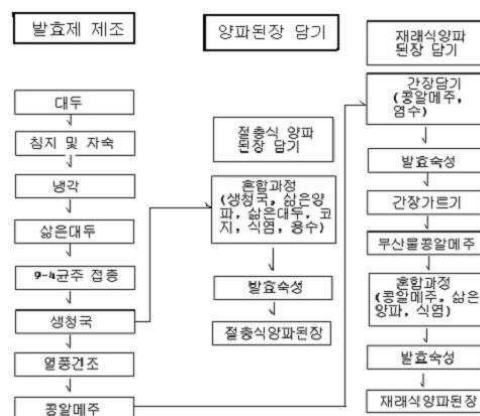
(54) 신규 바실러스 속 9-4 균주를 이용한 양파된장

(57) 요약

본 발명은 식품위생 미생물에 대한 항균활성 및 혈전용해 활성을 지닌 바실러스 속. 9-4(*Bacillus* sp.9-4)균주를 이용한 양파 된장에 관한 것으로, 이를 더욱 상세하게 설명하면, 전통장류로부터 분리한 혈전용해 활성과 식중독 미생물에 대해 항균활성을 나타내는 신규 기능성 바실러스 속. 9-4(*Bacillus* sp. 9-4 : 수탁번호 KCTC 18114P, 생명공학연구소 유전자은행 기탁일자 2006년 5월 30일)균주 및 발효제로 사용하는 발효미생물로서 신규 바실러스 균주를 삶은 대두에 접종하여 생청국장 및 콩알메주를 제조하는 1차 단계와,

1차 단계에서 신규 바실러스 균주를 접종하여 제조된 생청국장에 삶은 대두와 양파 및 기타 부 원료를 이용하여 발효시킨 절충식된장양파된장의 제조와, 생청국장을 건조시킨 콩알메주를 사용하여, 간장을 담근 후 간장 가르기 부산물로 얻어지는 콩알메주에 삶은 양파와 기타 부 원료를 첨가하여 발효시킨 재래식양파된장에 관한 것으로, 된장 발효에서 다양한 효능을 갖는 양파를 적당량 첨가하여, 발효시킴으로서 양파 특유의 맛과 향 및 기능성이 가미된 것을 특징으로 하는 항균활성 및 혈전용해 활성을 지닌 바실러스 속 9-4 (*Bacillus* sp.9-4)균주를 이용한 양파 된장에 관한 것이다.

대표도 - 도1



특허청구의 범위

청구항 1

전통장류에서 분리한 바실러스 균주(*Bacillus* colony)로부터, 혈전용해 활성과 식중독 미생물에 대해 항균활성을 가진 것을 특징으로 하는 바실러스 속. 9-4 *Bacillus* sp. 9-4 : 수탁번호 KCTC 18114P).

청구항 2

제1항에 기재된 바실러스 속. 9-4(*Bacillus* sp. 9-4 : 수탁번호 KCTC 18114P) 균주를 이용하여 생청국장과 콩알메주를 제조하게 됨을 특징으로 하는 양파된장.

청구항 3

제2항에 있어서, 생청국장을 이용하여 제조되어지는 것으로 삶은 양파가 10~30중량% 되도록 가하여 절충식양파된장으로 제조되어짐을 특징으로 하는 바실러스 9-4균주(*Bacillus* sp. 9-4)를 이용한 양파된장.

청구항 4

제 2항에 있어서, 콩알메주를 이용하여 제조되어지는 것으로 콩알메주를 사용하여 간장을 담근 후, 간장 가르기 공정에서 부산물로 얻어지는 콩알메주에 삶은 양파를 10~30중량% 되도록 가하여 재래식양파된장으로 제조되어짐을 특징으로 하는 바실러스 9-4균주(*Bacillus* sp. 9-4)를 이용한 양파된장.

명 세 서

발명의 상세한 설명

발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

- <2> 본 발명은 항균활성 및 혈전용해 활성을 지닌 바실러스 속 9-4(*Bacillus* sp.9-4.) 균주를 이용한 양파 된장에 관한 것으로, 이를 더욱 상세하게 설명하면, 전통장류로부터 분리한 혈전용해 활성과 식중독 미생물에 대해 항균활성을 나타내는 신규 기능성 바실러스 속 9-4(*Bacillus* sp.9-4 : 수탁번호 KCTC 18114P, 생명공학연구소 유전자은행 기탁일자 2006년 5월 30일)균주 및 발효제로 사용하는 발효미생물로서 신규 바실러스 균주를 삶은 대두에 접종하여 생청국장 및 콩알메주를 제조하는 1차 단계와,
- <3> 1차 단계에서 신규 바실러스 균주를 접종하여 제조된 생청국장에 삶은 대두와 양파 및 기타 부 원료를 이용하여 발효시킨 절충식양파된장의 제조와, 생청국장을 건조시킨 콩알메주를 사용하여, 간장을 담근 후 간장 가르기 부산물로 얻어지는 콩알메주에 삶은 양파와 기타 부 원료를 첨가하여 발효시킨 재래식 양파된장에 관한 것으로, 된장 발효에서 다양한 효능을 갖는 양파를 적당량 첨가하여, 발효시킴으로서 양파 특유의 맛과 향 및 기능성이 가미된 것을 특징으로 하는 항균활성 및 혈전용해 활성을 지닌 바실러스 속 9-4(*Bacillus* sp.9-4) 균주를 이용한 양파 된장에 관한 것이다.
- <4> 일반적으로, 된장이라 함은 대두, 쌀, 보리, 밀 또는 탈지대두 등을 주원료로 하여 식염, 종국을 섞어 제국하고 발효숙성시킨 것 또는 콩을 주원료로 하여 메주를 만들고 식염수에 담가 발효하고 여액을 분리하여 가공한 것을 말한다.
- <5> 우리나라 전통 발효식품의 하나인 된장은 크게 간장제조 부산물로 만든 막된장(재래식된장), 메주로 만든 토장, 기타 유사된장(막장, 찹장, 담복장)으로 나눌 수 있다(발효식품학, 신광출판사, 2005년). 된장은 단백질 함유량이 높은 대두를 주성분으로 하므로 탄수화물을 주식으로 하는 식단에서 단백질을 보강하여주는 부식으로서의 비중이 큰 식품이며, 또한 된장은 면역증강 작용, 항당뇨 작용, 항암 작용, 콜레스테롤 저하작용 등이 밝혀져 있는 (기능성 식품학, 조영수 차재영 공저, 동아대학교 출판부, 171 페이지, 2005년) 기능성이 뛰어난 식품으로 건강을 추구하는 현대인에게 점차 관심이 증가되고 있다.
- <6> 양파는 다량의 탄수화물 외에 퀘르세틴 등의 후라보노이드, 사이크로알린 등의 황 화합물과 같은 생리활성물질을 다량 함유하고 있어 항균활성 뿐만 아니라, 항암, 당뇨치료, 항혈전 효과, 고혈압예방효과 등의 생리활성이

보고되어 있어 건강을 위한 기능성 식품의 좋은 소재가 되어진다.

- <7> 또한, 양파는 남부지방에서 대량 재배되고 있으며 대량 재배에 따른 출하량 조절 실패 등으로 인한 가격의 폭락과 짧은 저장기간으로 출하량의 조절 등에 어려움이 발생하여 가격변동이 심한 작물의 하나로 큰 문제점을 가지고 있어, 양파의 저장기술개발에 의한 출하량 조절 및 양파 이용증대 방법 개발이 절실하다.
- <8> 한편 80년대에 들어서면서 급속한 경제 성장과 산업화 영향은 식품의 정보적 기능이 확대되고 식생활의 레저화, 국제화 시대에 따라 맛의 교류가 빠르게 이루어지고 다양한 식품이 가공 생산되고 있는 실정이다. 이에 건강 지향적 기능성식품으로서의 전통발효식품의 재인식된 된장제품의 수요가 급격히 증가되고 있는 실정이다.
- <9> 따라서 기업적인 측면에서는 기존 장류시장에서의 된장 제품이 경쟁력이 있고 활성화되기 위해서는 소비자가 선호하는 새로운 형태의 기술개발이 절대적으로 필요한 실정이다.
- <10> 한편, 웰빙 시대를 맞이하여 이러한 전통장류가 더욱더 발전하고 수요에 부응하기 위해서는 소비자의 취향과 기호에 맞게 변화된 제품이 개발되어야 할 것이며, 간편하고 즉석에서 조리할 수 있게 하여 젊은 세대에게 친숙하게 다가갈 수 있는 제품의 개발이 필요하다.
- <11> 이러한 실정으로 인하여, 신규 미생물을 이용하여 양파와 함께 제조되어진 된장과 같은 부가가치가 높은 제품을 제조하기 위한 연구기술의 개발이 시급한 실정이다.

발명이 이루고자 하는 기술적 과제

- <12> 본 발명은 상기 설명한 바와 같은 종래 기술의 문제점을 더욱 효율적으로 해결하기 위하여 제공된 것으로서, 전통장류로부터 분리한 혈전용해 활성과 식중독 미생물에 대해 항균활성을 나타내는 신규 기능성 바실러스 속(*Bacillus* sp. 9-4) 균주 및 그를 발효미생물로 사용하여 제조하는 양파된장에 관한 것으로, 삶은 양파를 발효 초기에 적당량 첨가하여 발효를 진행시킴으로서 양파 특유의 냄새를 자연스럽게 제거시켜, 된장 본래의 관능적 특성을 감소시키지 않는 동시에 양파와 된장의 영양과 향미가 부여된 새로운 형태의 된장을 제조하는 기술뿐만 아니라, 항균활성 및 혈전용해 활성을 지닌 바실러스 속(*Bacillus* sp.9-4) 균주를 이용한 기능성 장류를 제공하고자 하는 것이다.

발명의 구성 및 작용

- <13> 본 발명의 목적을 달성하기 위하여 전통장류로부터 분리한 혈전용해 활성과 식중독 미생물에 대해 항균활성을 나타내는 신규 기능성 바실러스 속(*Bacillus* sp.9-4 : 수탁번호 KCTC 18114P, 생명공학연구소 유전자은행 기탁일자 2006년 5월 30일)균주를 분리 동정하고, 된장 발효제로 사용하기 위하여, 분리 동정된 신규 바실러스 균주를 삶은 대두에 접종하여 생청국장 및 이를 건조시켜 콩알메주를 제조하는 1차 단계와, 1차 단계에서 신규 바실러스 균주를 접종하여 제조된 생청국장에 아스페르길루스 쌀 코지, 삶은 대두, 볶은 통밀가루, 볶은 쌀가루, 식염, 및 물을 사용하는 제조과정에 적당량의 삶은 양파를 가하고 치대어 발효시켜 절충식양파된장 제조와, 생청국장을 건조시킨 콩알메주를 사용하여, 간장을 담근 후 간장 가르기 공정의 부산물로 얻어지는 콩알메주에 삶은 양파와 기타 부 원료를 첨가하여 발효시킨 재래식양파된장의 제조에 관한 것으로, 항균활성 및 혈전용해 활성을 지닌 바실러스 속(*Bacillus* sp.9-4) 균주를 이용한 양파 된장에 관한 것이다.
- <14> 이하, 본 발명의 구성을 도 1에 나타낸 구체적인 방법과 실시예를 들어 상세히 설명하면,
- <15> 도 1은 본 발명인 신규 바실러스 속 9-4(*Bacillus* sp.9-4) 균주를 이용하여 양파된장을 제조하는 제조방법의 흐름도를 나타낸 것으로, 기능성 바실러스 속 9-4(*Bacillus* sp.9-4)의 분리동정과 양파된장 제조단계로 나누어 설명되어 지며 다음과 같다.
- <16> [실시예 1] 기능성 바실러스 분리 선별 및 동정
- <17> 전통장류로부터 분리한 혈전용해 활성과 식중독 미생물에 대해 항균활성을 나타내는 신규 기능성 바실러스 속(*Bacillus* sp. 9-4 : 수탁번호 KCTC 18114P, 생명공학연구소 기탁일자 2006년 5월 30일)균주를 분리 동정하고, 분리 동정된 신규 바실러스 균주를 된장 발효제로 사용하여 양파된장을 제조하게 되었으며, 기능성 바실러스 균주의 분리 선별 및 동정에 대하여는 다음과 같다.
- <18> 1. 균주 순수분리 및 선별
- <19> 기능성 장류발효 미생물을 분리하기 위하여 전국 각지로부터 수집한 전통장류를 멸균수로 적당한 배율로 10단 희석하여 와이피디 평판배지(yeast extract /L, peptone 5g/L, Dextrose 20 g/L 한천 1.5 g/L, pH 6.8)에 도말

하여 30℃에서 48시간 항온 배양하여 다양한 바실러스 균주(*Bacillus* colony)를 순수분리 하였다.

<20> 순수하게 분리된 바실러스 균주(*Bacillus* colony)를 삶은 대두에 접종하고 39℃에서 48시간 항온 배양하여 관능적으로 가능한 무취이면서 다량의 점성을 생성하는 바실러스 균주를 선별하였다. 최종적으로 다량의 점성을 형성하며, 대두 발효 시 악취발생이 거의 없는 9-4 균주를 선별하였다. 선별균주는 와이피디 한천배지에 접종하고 30℃에서 48시간 배양한 후 20% 글리세롤(glycerol) 함유 와이피디 액체배지에 현탁시켜 -40℃에 냉동 보관하면서 필요 시 와이피디 평판배지에서 활성화하여 사용하였다.

<21> 2. 9-4 균주 동정

<22> 선별된 균주는 통상의 방법에 따라 균의 형태학적, 생리화학적 분석을 통하여 동정을 시도하였으며, 와이피디 한천 평판배지에서 9-4 균주를 도말하고 30℃에서 3일간 배양한 후, 집락의 크기는 직경 3~5 밀리미터 정도였으며 형태는 가장자리가 불규칙하며 안쪽으로 원형의 주름을 형성하는 특징을 나타내고 있었으며, 배지로 수용성 색소는 생산하지 않았다.

<23> 9-4 균주는 그람 양성 무포자 간균이었으며, 9-4 균주의 배양학적 특성을 정리하면 표 1과 같았다. 생육온도 범위는 10~50℃ 이었고, 30~40℃에서 최적온도 범위를 나타내었다. 생육 pH 범위는 4.5~9.5이었으며, pH 6~8 범위에서 가장 잘 자랐다. 생육 식염 가능 농도는 17.5% 정도로 비교적 내염성이 강한 특성을 하고 있었다.

<24> 에피아이(API) 50 키트를 사용하여 선별균주 9-4의 생화학적 특성을 살펴본 결과 표 2에서 보는 바와 같이 글리세롤(glycerol)을 포함하는 23 종의 탄소원을 자화할 수 있었다. 탄소원 자화 패턴의 data base 분석을 통하여 9-4 균주는 바실러스 (*Bacillus amyloliquefaciens*)와 유사성이 68.8%로 가장 높았으며, 이 밖에 바실러스 (*Bacillus licheniformis*)와는 23.8%, 바실러스 섭티리스(*Bacillus subtilis*)와는 7.4% 순으로 유사성이 높았다.

<25> 세포의 지방산은 가스크로마토그래피로 지방산을 분리하고 미디(MIDI) 시스템으로 그 조성을 분석하여 표 3에 정리하였다.

<26> 표 3에서 보는 바와 같이, 9-4 균주의 세포 지방산은 분지 지방산인 안테이소(anteiso)-C_{15:0}이 38.66%로 가장 높았고 이소(iso)-C_{15:0}이 30.19% 이었다. 이밖에 선상의 포화지방산인 C_{16:0}과 분지 지방산인 이소(iso)-C_{16:0}, 과이소(iso)-C_{17:0}이 각각 8.78%, 8.07%, 및 6.70%로 그 함량이 낮은 수준에 있었다. 세포지방산 분석 data base로부터 9-4균주는 생화학적 분석결과와는 달리 *Paenibacillus marcerans*와 유사성이 가장 높았으며, 이밖에 *Bacillus lentimorbus*, *Bacillus pumilus*, 및 *Bacillus amyloliquefaciens* 순으로 유사성이 높은 결과가 얻어졌다.

<27> 표 1. 9-4 균주의 배양학적 특성

표 1. 9-4 균주의 배양학적 특성

증식 영향인자	생육특성
온도의 영향	10℃: 매우 약한 생육 30 - 40℃: 왕성한 생육 50℃: 약한 생육 55℃: 생육 중지
pH의 영향	4.0: 생육 중지 4.5 - 9.5: 생육 가능 (6 - 8: 왕성한 생육) 10.0: 생육 중지
식염농도의 영향	15.0%: 생육 양호 17.5%: 매우 약한 생육 20.0%: 생육 중지

<28>

<29> 표 2. 9-4 균주의 생화학적 특성(API 50 serials)

No.	Characteristics	API CHB	No.	Characteristics	API CHB
0	Control	-	25	Esculine	+
1	Glycerol	+	26	Salicine	+
2	Erythritol	-	27	Cellobiose	+
3	D-arabinose	-	28	Maltose	+
4	L-arabinose	+	29	Lactose	+
5	Ribose	+	30	Melibiose	-
6	D-xylose	+	31	Saccharose	+
7	L-xylose	-	32	Trehalose	+
8	Adonitol	-	33	Inuline	-
9	β methyl-xyloride	-	34	Melezitose	-
10	Galactose	-	35	D-Raffinose	+
11	D-glucose	+	36	Amidon	+
12	D-fructose	+	37	Glycogene	-
13	D-mannose	+	38	Xylitol	-
14	L-sorbose	-	39	B-Gentiobiose	+
15	Rhamnose	-	40	D-turanose	-
16	Dulcitol	-	41	D-lyxose	-
17	Inositol	+	42	D-tagatose	-
18	Mannitol	+	43	D-fucose	-
19	Sorbitol	+	44	L-fucose	-
20	α methyl-D-mannoside	-	45	D-arabitol	-
21	α methyl-D-glucoside	+	46	L-arabitol	-
22	N acetyl glucosamine	-	47	Gluconate	-
23	Amygdaline	+	48	2 ceto-gluconate	-
24	Arbutine	+	49	5 ceto-gluconate	-

<30>

<31> 표 3. 9-4 균주의 세포지방산 분석(MIDI)

Fatty acid	%
Saturated fatty acids:	
C _{14:0}	1.59
C _{15:0}	0.43
C _{16:0}	8.78
C _{18:0}	0.23
Unsaturated fatty acids:	
C _{16:1} ω 11c	1.34
Branched fatty acids:	
iso-C _{13:0}	0.36
iso-C _{14:0}	1.04
iso-C_{15:0}	30.19
anteiso-C_{15:0}	38.66
iso-C _{16:0}	1.48
	8.07
iso-C _{17:0}	6.70
anteiso-C _{17:0}	0.75
iso-C _{17:1} ω 10c	
Summed features:*	
4	0.38

<32>

<33> 생화학적 특성 및 세포지방산 분석 등의 기법으로 분석한 결과 상이한 결과를 나타내고 있었으므로 9-4 균주를 정확히 동정하는 것이 불가능하였다. 보다 정확한 동정을 위하여 계통발생학적인 분석을 하였으며,

<34> 조 등의 방법(Cho 등, *J. Microbiol. Biotechnol.* 16, 92-101. 2006)에 따라 16S rDNA 분리하여 염기서열(표 4)을 진뱅크 자료(GeneBank database)로부터 얻은 또 다른 세균의 16S rDNA와 비교 분석한 결과 표 5와 같았다.

표 4. 9-4 균주의 16S rDNA 염기서열

1	<u>OCTATCATGC</u>	<u>AAGTCGAGCG</u>	<u>GACAGATGGG</u>	<u>AGCTTGCTCC</u>	<u>CTGATGTTAG</u>	<u>CGGCGGACGG</u>
61	<u>GTGAGTAACA</u>	<u>CGTGGGTAAC</u>	<u>CTGCCTGTAA</u>	<u>GACTGGGATA</u>	<u>ACTCCGGGAA</u>	<u>ACCGGGGCTA</u>
121	<u>ATACCGGATG</u>	<u>GTTGTCTGAA</u>	<u>COGCATGGTT</u>	<u>CAGACATAAA</u>	<u>AGGTGGCTTC</u>	<u>GGCTACCACT</u>
181	<u>TACAGATGGA</u>	<u>CCCGCGGCGC</u>	<u>ATTAGCTAGT</u>	<u>TGGTGAGGTA</u>	<u>ACGGCTCACC</u>	<u>AAGGCGACGA</u>
241	<u>TGCGTAGCCG</u>	<u>ACCTGAGAGG</u>	<u>GTGATCGGCC</u>	<u>ACACTGGGAC</u>	<u>TGAGACACGG</u>	<u>CCCAGACTCC</u>
301	<u>TACGGGAGGC</u>	<u>AGCAGTAGGG</u>	<u>AATCTTCCGC</u>	<u>AATGGACGAA</u>	<u>AGTCTGACGG</u>	<u>AGCAACGCGG</u>
361	<u>CGTGAGTGAT</u>	<u>GAAGGTITTC</u>	<u>GGATCGTAAA</u>	<u>GCTCTGTTGT</u>	<u>TAGGGAAGAA</u>	<u>CAAGTGCCGT</u>
421	<u>TCAAATAGGG</u>	<u>CGGCACCTTG</u>	<u>ACGGTACCTA</u>	<u>ACCAGAAAGC</u>	<u>CACGGCTAAC</u>	<u>TACGTGCCAG</u>
481	<u>CAGCCGCGGT</u>	<u>AATACGTAGG</u>	<u>TGGCAAGCGT</u>	<u>TGTCCGGAAT</u>	<u>TATTGGGCGT</u>	<u>AAAGGGCTCG</u>
541	<u>CAGCGGCTTT</u>	<u>CTTAAGTCTG</u>	<u>ATGTGAAAGC</u>	<u>CCCCGGCTCA</u>	<u>ACCGGGGAGG</u>	<u>GTCATTGGAA</u>
601	<u>ACTGGGGAAC</u>	<u>TTGAGTGCAG</u>	<u>AAGAGGAGAG</u>	<u>TGGAATTCCA</u>	<u>CGTGTAGOGG</u>	<u>TGAAATGCGT</u>
661	<u>AGAGATGTGG</u>	<u>AGGAACACCA</u>	<u>GTGGCGAAGG</u>	<u>CGACTCTCTG</u>	<u>GTCTGTAACT</u>	<u>GACGCTGAGG</u>
721	<u>AGCGAAAGCG</u>	<u>TGGGGAGCGA</u>	<u>ACAGGATTAG</u>	<u>ATACCTTGGT</u>	<u>AGTCCACGCC</u>	<u>GTAAACGATG</u>
781	<u>AGTGCTAAGT</u>	<u>GTTAGGGGGT</u>	<u>TTCCGCCCCC</u>	<u>TAGTGCTGCA</u>	<u>GCTAACGCAT</u>	<u>TAAGCACTCC</u>
841	<u>GCCTGGGGAG</u>	<u>TACGGTCGCA</u>	<u>AGACTGAAAC</u>	<u>TCAAAGGAAT</u>	<u>TGACGGGGGC</u>	<u>CCGCACAAGC</u>
901	<u>GGTGGAGCAT</u>	<u>GTGGTTTAAT</u>	<u>TCGAAGCAAC</u>	<u>GCGAAGAAC</u>	<u>TTACCAGGTC</u>	<u>TTGACATCCT</u>
961	<u>CTGACAATCC</u>	<u>TAGAGATAGG</u>	<u>ACGTCCCTCT</u>	<u>CGGGGGCAGA</u>	<u>GTGACAGGTG</u>	<u>GTGCATGGTT</u>
1021	<u>GTGCTCAGCT</u>	<u>CGTGTGCTGA</u>	<u>GATGTTGGGT</u>	<u>TAAGTCCCGC</u>	<u>AACGAGCCGA</u>	<u>ACCTTTGATC</u>
1081	<u>TTAGTTGCCA</u>	<u>GCATTCAGTT</u>	<u>GGGCACTCTA</u>	<u>AGGTGACTGC</u>	<u>CGGTGACAAA</u>	<u>CCGGAGGAAG</u>
1141	<u>GTGGGGATGA</u>	<u>CGTCAAATCA</u>	<u>TCATGCCCCC</u>	<u>TATGACCTGG</u>	<u>GCTACACACG</u>	<u>TGCTACAATG</u>
1201	<u>GACAGAACAA</u>	<u>AGGGCAGCGA</u>	<u>AACCGCGAGG</u>	<u>TTAAGCCAAT</u>	<u>CCCACAAATC</u>	<u>TGTTCTCAGT</u>
1261	<u>TCGGATCGCA</u>	<u>GTCTGCAACT</u>	<u>CGACTGCGTG</u>	<u>AAGCTGGAAT</u>	<u>CGCTAGTAAT</u>	<u>CGCGGATCAG</u>
1321	<u>CATGCCCGCG</u>	<u>TGAATAOGTT</u>	<u>CCCGGGCCTT</u>	<u>GTACACACCG</u>	<u>CCCGTCACAC</u>	<u>CACGAGAGTT</u>
1381	<u>TGTAACCACC</u>	<u>CCGAAGTCGG</u>	<u>TGAGGTAAAC</u>	<u>TTTATGGAGC</u>	<u>CAGCCGCCGA</u>	<u>A</u>

<35>

<36>

표 5에서 보는 바와 같이, *Bacillus amyloliquefaciens*와 가장 유사하였으나 생리화학적 특성이 완전히 일치하지 않는 것을 확인 할 수 있어, 재래식된장으로부터 분리한 9-4는 바실러스 속, 9-4(*Bacillus* sp. 9-4)로 최종 동정하였다.

표 5. 기지 *Bacillus*와의 유사성 비교

비교균주	16S rDNA 유사성(%)								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
균주 SC 9-4	100								
<i>B. amyloliquefaciens</i>	99.9	100							
<i>B. azotoformans</i>	93.9	94.1	100						
<i>B. atrophaeus</i>	99.3	99.3	93.9	100					
<i>B. mojavensis</i>	99.2	99.3	94.3	99.2	100				
<i>B. pumilus</i>	97.2	97.2	93.9	97.5	96.9	100			
<i>B. anthracis</i>	93.6	93.8	93.9	94.2	93.8	93.9	100		
<i>B. subtilis</i>	99.9	100	94.1	99.3	99.3	97.2	93.8	100	
<i>B. thuringiensis</i>	93.5	93.6	93.7	94.0	93.7	93.7	99.9	93.6	100

* 본 균주는 한국생명공학연구원 유전자은행에 2006년 5월 30일자로 기탁하였다.
(수탁번호: KCTC 18114p)

<37>

<38>

3. 9-4 균주의 기능성 규명

<39>

선별된 균주의 기능성을 확인하기 위하여 혈전용해 활성과 대표적인 식품위생 미생물에 대한 항균활성을 검토하였다.

<40>

전용해 활성은 피브린(fibrin)을 기질로 사용하는 피브린플레이트(fibrin plate)법(Astrup and Mullertz, *ACTA Physiol. Scand.* **363**, 250, 1952)에 준하여 측정하였다. 즉, 피브리노겐[fibrinogen(from bovine plasma, Sigma Co., USA)]이 0.4% 되도록 완충용액(160 mM boric acid와 40 mM NaCl을 함유하는 10mM sodium borate 완충용액)]에 녹인 후 10 ml를 직경 87 mm 페트리디쉬(petri dish)에 분주하고 20 mM, 트리스 염산버퍼(Tris-HCl buffer, pH8.0)에 용해시킨 트롬빈(thrombin, 100 NIH unit/ml) 용액 40 μ l 첨가하여 실온에서 30분 방치시켜 응고시켜 응고된 피브린플레이트(fibrin plate)를 제작하였다. 피브린플레이트(fibrin plate)에 10 μ l의 바실

러스(*Bacillus*) 배양 여액을 적용시키고 37℃에서 6시간 반응시켜 용해된 면적을 측정하였다. 용해된 면적을 표준 혈전용해효소로 플라즈민[plasmin(Sigma Co., USA)] 1 unit를 사용하여 비교하였다. 혈전용해 조효소는 *Bacillus* 균주를 티에스비(Bacto™ Tryptic Soy Broth(USA)) 40 ml가 들어 있는 250 ml 얼렌미어(Erlenmeyer flask)에 접종하고 30℃에서 150 rpm으로 진탕하면서 15시간 배양한 배양여액을 사용하였다.

- <41> 9-4 균주의 혈전용해 활성을 실험실에서 보관 중인 바실러스 나토(*Bacillus natto*)와 비교한 결과 표 6와 같았다. 표 6에서 보는바와 같이 기존의 혈전용해 활성이 우수한 것으로 알려진 바실러스 나토(*Bacillus natto* (B. subtilis KCCM 12511))와 비교하여 약간 우수함을 알 수 있었다.

표 6. 된장으로부터 분리한 *Bacillus* 속 균주의 혈전용해 활성

균주	혈전용해 활성(unit)
<i>Bacillus natto</i>	2.9
9-4	3.1

<42>

- <43> 항균활성을 확인하기 위해 식품위생 미생물로 사용된 공시균주는 대장균(*Escherichia coli* KCCM 11234), 대장균(*Escherichia coli* KCTC 1682), 살모넬라 엔테리카(*Salmonella enterica* subsp. *enterica* KCTC 12456), 살모넬라 티피머리움(*Salmonella typhimurium* KCTC 1925), 시겔라 플렉시너리(*Shigella flexneri* KCTC 2008), 시겔라 손네이(*Shigella sonnei* KCTC 2518), 비브리오 볼니피쿠스(*Vibrio vulnificus* KCTC2959), 바실러스 세레우스(*Bacillus cereus* KCTC 1012), 리스테리아 모노사이토제네스(*Listeria monocytogenes* KCTC 3569), 리스테리아 이바노비(*Listeria ivanovii* subsp. *ivanovii* KCTC 3444), 스타필로코커스 오레우스(*Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* KCTC 1621) 및 스타필로코커스 에피더미스(*Staphylococcus epidermidis* KCTC 3958) 이었으며, 각각의 공시균주 배양용 평판배지 공시균주를 매립하여 항균활성 검토를 위한 평판배지를 조제하였다.

- <44> 선별된 9-4균주는 티에스비 배지에서 30℃의 온도로 48시간 배양한 후 배양액을 직경 8 mm 종이판(paper disk)에 40 µl씩 분주하여 항균활성 측정용 평판배지에 위치시키고 30℃에서 48 - 72시간 항온 시켜 투명한 생육저지 영역 확인으로부터 항균활성 유무를 판별하였다.

- <45> 표 7에서 보는바와 같이 9-4 균주는 다양한 식품위생 미생물에 대하여 항균활성을 나타내고 있었다.

표 7. 몇 가지 식품위생 미생물에 대한 9-4 균주의 항균활성

균주	항균활성	균주	항균활성
<i>E. coli</i> KCCM 11234	+	<i>V.parahaemolyticus</i> KCTC 33844	-
<i>E. coli</i> KCTC 1682	+	<i>V.vulnificus</i> KCTC 2959	+
<i>Ps.aeruginosa</i> KCTC 1750	-	<i>B. cereus</i> KCTC 1012	+
<i>S. enterica</i> KCTC 12456	+	<i>L. monocytogenes</i> KCTC 3569	+
<i>S. typhimurium</i> KCTC 1925	+	<i>L. ivanovii</i> KCTC 3444	+
<i>Sh. flexneri</i> KCTC 2008	+	<i>S. aureus</i> KCTC 1621	+
<i>Sh. sonnei</i> KCTC 2518	+	<i>S. epidermidis</i> KCTC 3958	+

<46>

- <47> 이상에서 보는바와 같이 저취 대두발효균주 9-4는 비교적 높은 혈전용해 활성과 다양한 식품위생 미생물에 대해 항균활성을 나타내는 등의 그 기능이 우수한 균주였다.

- <48> [실시 예 2] 생청국장 및 콩알메주 제조 방법

- <49> 대두 2Kg을 수세하고 실온에서 12시간 침지하여 30분간 절수하고 3시간 삶아 삶은 대두를 만들어 60℃ - 70℃ 냉각시키고 삶은 대두에서 미리 종배양한 9-4 균주 100 g을 접종하였다. 다시 39℃에서 36 - 48시간 발효하여 생 청국을 만들었다. 생 청국은 50℃의 열풍건조기에서 건조하여 콩알메주로 만들었다.

- <50> [실시 예 3] 절충식양파된장의 제조방법

- <51> 1. 절충식양파된장의 제조방법

- <52> 생청국 2 kg, 삶은 콩 4 kg, 아스페르질루스 쌀 코지 0.5 kg, 볶은 통밀가루 0.25 kg, 볶은 쌀가루 0.25 kg, 식염 1.2 kg, 및 물 1.8 kg의 절충식양파된장제조 기본조성에 대하여 12중량%의 식염을 포함하는 생 양파 또는 삶은 양파를 기본 조성에 대하여 10 - 30중량% 가하고 초퍼로 혼합하여 용기에 담아 20 - 30℃의 실온에서 60일

간 발효시켜 절충식양파된장을 제조하였다. 생 양파를 첨가하는 경우에는 약 30일 경과하면서 악취가 발생하는 등의 부패가 일어나 더 이상 발효를 진행시키지 않고 폐기하였으며, 삶은 양파를 첨가하는 경우에는 60일간 발효 후 장류의 일반분석법(しょうゆ試験法, 財団法人 日本醤油研究所, 昭和 60年)에 따라 생균 수, 환원당, 적정 산도, 총 질소, 및 가용성질소 함량을 분석한 결과 표 8과 같았다.

표 8. 60일 발효시킨 절충식양파된장의 특성

	양파첨가량(%)			양파첨가량(%)	
생균수 ($\times 10^7$ cells/g)	0	3.9	적정 산도*	0	107
	10	4.0		10	106
	20	4.3		20	110
	30	3.3		30	112
환원당 (g/Kg)	0	77	총 질소 (%)	0	1.51
	10	78		10	1.50
	20	78		20	1.54
	30	87		30	1.54
pH	0	6.0	수용성질소 (%)	0	0.67
	10	6.01		10	0.50
	20	6.09		20	0.95
	30	6.01		30	0.75

* 시료 10 g을 pH 8.3까지 중화시키는데 필요한 0.1N NaOH 소비량(ml)

<53>

<54>

2. 관능검사

<55>

삶은 양파를 첨가하여 60일간 숙성된 절충식양파된장을 시료로 사용하여 식품과학과 학생 10명을 패널로 하여 맛, 향, 색 및 전반적인 기호정도에 대하여 매우 좋다: 5점, 좋다: 4점, 보통이다: 3점, 나쁘다: 2점, 매우 나쁘다: 1점을 기준으로 하는 5점 만점의 기호도척도법을 이용한 관능검사 결과 표 9와 같았다.

<56>

생 양파를 사용한 절충식양파에서는 발효경과 30일이 지나면서 부패취가 발생하여 양파된장 가공적성이 부적격한 것으로 판단되어 관능검사에서 제외하였다. 전반적으로 색, 맛, 향이 대조실험에 비교하여 삶은 양파를 첨가하는 된장에서 높은 점수가 얻었으며, 삶은 양파를 20% 사용하는 경우에 가장 긍정적인 결과를 얻을 수 있었다.

표 9. 절충식 양파된장의 관능검사 결과

삶은 양파 첨가량(%)	맛	향	색	전반적인 식감
0	3.2	3.1	3.2	3.2
10	3.7	3.6	3.7	3.5
20	4.5	4.4	4.4	4.4
30	4.1	4.0	4.3	4.2

<57>

<58>

[실시 예 4] 재래식양파된장의 제조 방법

<59>

1. 재래식양파된장의 제조 방법

<60>

전통간장 제조 시 간장 가르기의 공정에서 발생하는 부산물인 메주덩이에 12중량%의 식염을 포함하는 삶은 양파를 10 - 30중량% 가하고 초퍼로 혼합하여 용기에 담아 20 - 30℃의 실온에서 60일간 발효시켜 재래식양파된장을 제조하였다. 실시 예 3에서와 같이 일반성분을 분석한 결과 표 10과 같았다.

표 10. 60일 발효시킨 재래식 양파된장의 특성

	양파첨가량(%)			양파첨가량(%)	
생균수 ($\times 10^7$ cells/g)	0	7.8	적정산도*	0	63
	10	7.3		10	76
	20	6.9		20	68
	30	8.9		30	48
환원당 (g/Kg)	0	1.7	총 질소 (%)	0	1.54
	10	7.2		10	1.52
	20	9.6		20	1.37
	30	14.9		30	1.16
pH	0	7.53	수용성질소 (%)	0	0.92
	10	7.09		10	0.90
	20	6.76		20	0.95
	30	6.79		30	1.04

* 시료 10 g을 pH 8.3까지 중화시키는데 필요한 0.1N NaOH 소비량(ml)

<61>

<62> 2. 관능검사

<63> 실 시 예 3에서와 같이 관능검사를 실시한 결과 표 11과 같았다.

<64> 일반적으로 색, 맛, 향이 대조실험에 비교하여 삶은 양파를 첨가하는 된장에서 높은 점수가 얻었으며, 삶은 양파를 20% 사용하는 경우에 가장 높은 점수를 얻을 수 있었다.

표 11. 재래식 양파된장의 관능검사 결과

삶은 양파 첨가량(%)	맛	향	색	전반적인 식감
0	2.9	2.7	3.1	2.8
10	3.1	3.0	3.1	3.4
20	4.0	3.8	4.1	3.9
30	3.8	3.5	3.9	3.7

<65>

<66> 이상의 실시 예에서 제조된 양파된장은 삶은 양파를 첨가하지 않은 경우에 비해 삶은 양파를 10 - 30중량% 첨가하여 발효한 경우 맛과 향이 우수하였으며, 특히 20%를 첨가하는 경우 가장 높은 점수를 얻을 수 있었다. 생 양파를 첨가하는 경우는 양파 특유의 냄새뿐만 아니라 발효 도중 부패가 일어나는 등 문제점이 있는 것으로 확인되었다.

<67> 따라서, 본 발명인 상기 방법에 의해 제조된 양파된장을 통한 생리적 기능성이 검증된 양파된장은 소비자가 요구하는 품질의 고급화 및 다양성을 갖춘 장류제품으로 유용할 것이라 사료된다.

<68> 이상에서 본 발명은 기재된 구체예에 대해서만 상세히 설명되었지만 본 발명의 기술사상 범위 내에서 다양한 변형 및 수정이 가능함은 당업자에게 있어서 명백한 것이며, 이러한 변형 및 수정이 첨부된 특허청구범위에 속함은 당연한 것이다.

발명의 효과

<69> 상기 실시예 및 실험예를 통해 살펴본 바와 같이, 본 발명의 신규 기능성 바실러스 속 9-4균주를 사용하고, 삶은 양파를 첨가하여 발효시킴으로서 양파가 가지고 있는 맛과 유용한 성분이 자연스럽게 된장에 함유되도록 하여 관능적 성질과 항균활성 및 혈전용해증에 대하여 우수한 효능을 가진 기능성이 향상되게 제조된 양파된장에 대하여 우수한 효능을 검증한 것으로, 농수산물의 퓨전화를 통한 고기능성을 갖춘 고급화된 장류제품으로서 이러한 제품의 생산을 통한 고부가가치의 창출 및 장류산업계에서의 산업경쟁력 우위를 확보 등의 효과를 제공한다.

도면의 간단한 설명

<1> 도 1은 본 발명인 신규 바실러스 속 9-4(*Bacillus* sp.9-4) 균주를 이용하여 양파된장을 제조하는 제조방법의 흐름도

도면

도면1

