



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2018년11월23일
(11) 등록번호 10-1921529
(24) 등록일자 2018년11월19일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 1/20 (2006.01) A23L 29/00 (2016.01)
A23L 33/135 (2016.01) C12R 1/07 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 1/20 (2013.01)
A23L 29/065 (2016.08)
(21) 출원번호 10-2017-0118620
(22) 출원일자 2017년09월15일
심사청구일자 2017년09월15일
(56) 선행기술조사문헌
KR1020160144639 A
J. Microbiol. Biotechnol., Vol.26,
pp.666-674(Epub.2015.12.31.)*
US20020192333 A1
KR1020150057583 A
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
계명대학교 산학협력단
대구광역시 달서구 달구벌대로 1095, 계명대학교
산학협력관 201호(신당동)
(72) 발명자
이삼빈
대구광역시 달서구 선원로 171, 102동 306호(이곡
동, 성서무지개타운)
윤용규
대구광역시 달서구 장산남로 33, 109동 1906호(용
산동, 용산롯데캐슬그랜드)
(74) 대리인
(뒷면에 계속)
특허법인태백

전체 청구항 수 : 총 2 항

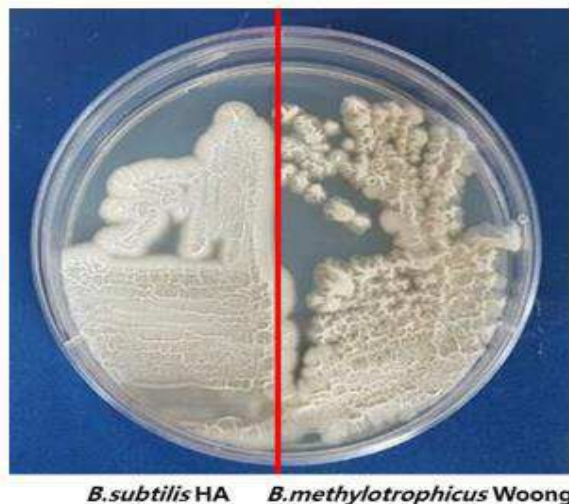
심사관 : 김지연

(54) 발명의 명칭 신규한 바실러스 메틸로트로피커스 Woong 균주

(57) 요약

본 발명은 신규한 바실러스 메틸로트로피커스 Woong 균주에 관한 것으로, 본 발명에서는 전통 발효식품인 김치로부터 신규한 바실러스 메틸로트로피커스 Woong(*Bacillus methylotrophicus* Woong) 균주를 동정하였으며, 상기 바실러스메틸로트로피커스 Woong 균주가 유청 또는 식물성 조직 단백질을 이용한 발효 과정에서 발효물 내 점질물, 펩타이드(티로신), 가수분해효소, 혈전분해효소 등의 다양한 기능성 물질을 증진시키고, 물성 및 풍미가 개선된 발효물을 생산하는 것을 확인하였다. 따라서, 상기와 같은 효과를 가지는 바실러스 메틸로트로피커스 Woong 균주는 다양한 식품 제조에 유용하게 활용될 수 있다.

대표도 - 도1



B. subtilis HA *B. methylotrophicus* Woong

(52) CPC특허분류

A23L 33/135 (2016.08)

C12R 1/07 (2013.01)

(72) 발명자

김지은

대구광역시 달서구 대명천로12안길 40, 1동 302호
(성당동, 대영하이츠)

임종순

대구광역시 달서구 달서대로109안길 54(호산동)

김근영

대구광역시 수성구 지범로39길 56, 103동 811호(범
물동, 범물직장주택조합아파트)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 B0010792

부처명 산업통상자원부 및 부산광역시

연구관리전문기관 한국산업기술진흥원

연구사업명 지역혁신센터사업

연구과제명 천연물과 한방소재를 이용한 다기능성 바이오소재 개발 및 상품화

기 여 율 1/1

주관기관 동의대학교 블루바이오 소재개발 및 실용화 지원센터

연구기간 2017.03.01 ~ 2018.02.28

공지예외적용 : 있음

명세서

청구범위

청구항 1

KCCM11957P로 수탁되고, 유청 발효시 티로신 생산, 점질물 생산 및 혈전분해능을 증진시키며 요구르트 풍미를 향상시키는, 김치로부터 분리된 유청 발효능이 우수한 바실러스 메틸로트로피커스 Woong(*Bacillus methylotrophicus* Woong) 균주.

청구항 2

삭제

청구항 3

삭제

청구항 4

제1항에 따른 균주를 유청이 함유된 배지에 접종하고, 1일 내지 3일 동안 42℃에서 배양하여 발효시키는 단계를 포함하는 티로신, 점질물 및 혈전분해능이 증진되고 요구르트 풍미가 향상된 유청 발효물 제조방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 유청 또는 식물성 조직 단백질(texture vegetable protein; TVP)을 이용한 발효를 통해 발효물 내 다양한 기능성 물질을 증진시키는 바실러스 메틸로트로피커스 Woong 균주에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 고초균은 전통적인 콩 발효식품에서 발견되는 유용 발효 미생물로서 단백질, 탄수화물, 혈전 등을 분해시키는 다양한 효소뿐만 아니라 점질물인 γ -글루탐산(γ -glutamic acid; γ -PGA), 펩타이드 등을 생산하는 특징을 가진다. γ -글루탐산은 글루탐산이 중합된 고분자 중합체로 면역증진 또는 칼슘 흡수를 도와 식약처로부터 인정된 건강기능성 식품 소재이다. 따라서 콩을 포함한 다양한 원료로부터 가수분해 효소를 포함한 점질물을 다량 생산하기 위해서는 점질물 생산능이 우수한 고초균의 분리 및 활용이 요구된다. 특히, 고초균을 이용한 전통 발효제품의 고유한 풍미는 소비자들의 기호성에 부정적으로 영향을 미치기 때문에 고초균 발효물을 식품소재 등으로 활용하기 위해서는 유용 고초균의 선발 및 발효 환경의 조건을 최적화하여 최종 발효제품의 기호성을 개선시키는 것이 필요하다. 또한, 전통 발효제품에 있어서 원료 성분 외에 미생물로부터 생산되는 다양한 기능성 물질의 강화는 제품의 부가가치를 높이는 수단이 될 수 있다.

[0003] 치즈 제조 시, 우유의 응고 및 압착 과정에서 생산되는 부산물인 유청(whey)은 우유의 주된 단백질인 카세인(casein)이 제거되고, 유청 단백질과 유당, 유지방, 무기질, 비타민 등이 풍부한 식품소재이다. 유청은 단백질 및 지방의 주된 원료이지만, 높은 농도의 유당(lactose)을 포함하고 있어 유당분해효소 결핍으로 유당의 분해 및 흡수가 어려운 일부 유당 불내증(lactose intolerance) 사람들에게 설사 등을 유발하여 식품소재로 부적합하다. 유청의 유당을 제거하는 방법으로 젖산균에 의한 젖산 발효가 주로 이용되고 있으며, 고초균을 이용한 발효는 좋지 않은 발효취가 생성되어 기호성이 낮은 단점이 있다.

[0004] 요구르트는 포유류의 우유를 원료로 하여 다양한 젖산균에 의해서 생산되는 대표적인 우유 발효제품이다. 젖산균은 정장작용 및 면역증진 등 다양한 생리활성기능을 가지며, 장 건강을 포함한 종합적인 건강증진에 도움을 주는 프로바이오틱스(probiotics)이다. 대부분의 유발효 제품은 젖산균 또는 젖산균과 효모에 의한 복합발효를 통해서 제조된다. 젖산균은 젖산의 생성을 통하여 고유한 요구르트의 풍미, 맛 및 커드(curd; 응고물) 형성에 따른 조직감을 제공하지만, 젖산균 발효과정에서 발효물의 점도 증가에 의한 물성 개량을 위한 생고분자 생산이

매우 어렵다는 단점이 있다. 우유의 젖산균 발효 시, 고분자 다당류 생산을 통한 물성 개발에 대한 연구는 현재 까지 미흡한 실정이다. 따라서 우유 발효물 제조 시, 유용 발효 미생물에 의한 고분자 점질물 생산을 통해서 제품의 물성과 기능성을 강화시키는 발효기술의 개발은 유발효 제품의 고부가가치 부여 및 기능적 차별화를 가능 하게 할 것이다.

선행기술문헌

특허문헌

[0005] (특허문헌 0001) 미국 공개특허 제 2002/0192333호(2002.12.19 공개)

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 본 발명의 목적은 다양한 기능성 물질의 생성능이 우수한 신규한 균주를 제공하는 데에 있다.

과제의 해결 수단

[0007] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 발효물 내 점질물, 펩타이드, 가수분해효소 및 혈전분해효소의 생산을 증진시키는 바실러스 메틸로트로피커스 Woong(*Bacillus methylotrophicus* Woong) 균주를 제공한다.

발명의 효과

[0008] 본 발명에서는 전통 발효식품인 김치로부터 신규한 바실러스 메틸로트로피커스 Woong(*Bacillus methylotrophicus* Woong) 균주를 동정하였으며, 상기 바실러스메틸로트로피커스 Woong 균주가 유청 또는 식물성 조직 단백질을 이용한 발효 과정에서 발효물 내 점질물, 펩타이드(티로신), 가수분해효소, 혈전분해효소 등의 다양한 기능성 물질을 증진시키고, 물성 및 풍미가 개선된 발효물을 생산하는 것을 확인하였다. 따라서, 상기과 같은 효과를 가지는 바실러스 메틸로트로피커스 Woong 균주는 다양한 식품 제조에 유용하게 활용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0009] 도 1은 MRS 고체배지에서 배양된 고초균 HA(*B. subtilis* HA, 왼쪽) 및 고초균 Woong(*B. methylotrophicus* Woong, 오른쪽)의 균체 모습을 나타낸 것이다.

도 2는 바실러스 메틸로트로피커스 Woong의 계통수를 나타낸 것이다.

도 3은 바실러스 메틸로트로피커스 Woong의 16S rRNA 염기서열을 NCBI BLAST 프로그램으로 분석하여 바실러스 메틸로트로피커스 균과의 상동성을 비교하여 나타낸 것이다.

도 4는 고초균 HA와 고초균 Woong의 현미경 이미지를 나타낸 것이다.

도 5는 발효 시간 및 발효 온도에 따른 고초균 HA 및 고초균 Woong의 생육곡선을 측정한 결과이다.

도 6은 콩 가공 소재인 식물성 조직 단백질(textured vegetable protein; TVP)를 이용하여 고초균 HA와 고초균 Woong으로 발효한 후, 생성된 발효물의 pH를 측정한 결과이다.

도 7은 콩 가공 소재인 TVP를 이용하여 고초균 HA와 고초균 Woong으로 발효한 후, 생성된 발효물의 생균수를 측정한 결과이다.

도 8은 콩 가공 소재인 TVP를 이용하여 고초균 HA와 고초균 Woong으로 발효한 후, 생성된 발효물의 점질물 및 점조도를 측정한 결과이다.

도 9는 콩 가공 소재인 TVP를 이용하여 고초균 HA와 고초균 Woong으로 발효한 후, 생성된 발효물의 점질물 생성 능을 확인한 결과이다.

도 10은 유청 농축액 및 모노 소듐 글루타메이트(mono sodium glutamate; MSG)를 이용한 유청 배지 제조, 및 고 초균의 발효 공정을 나타낸 것이다.

도 11은 유청 배지 및 고초균 종류에 따라 생성된 발효물의 펩타이드(티로신) 함량을 측정한 결과이다.

도 12는 유청 배지 및 고초균 종류에 따라 생성된 발효물의 점질물 및 점조도를 측정한 결과이다.

도 13은 유청 배지 및 고초균 종류에 따라 생성된 발효물의 생균수를 측정한 결과이다.

도 14는 유청 배지 및 고초균 종류에 따라 생성된 발효물의 혈전분해효소 활성을 측정한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0010] 본 발명의 발명자들은 김치로부터 신규한 바실러스 메틸로트로피커스 *Woong* 균주를 동정하였으며, 상기 균주가 발효 과정에서 발효물 내 점질물, 펩타이드(티로신), 가수분해효소, 혈전분해효소 등의 기능성 물질을 증진시키고, 물성 및 풍미를 개선시키는 것을 확인하며 본 발명을 완성하였다.
- [0012] 본 발명은 바실러스 메틸로트로피커스 *Woong*(*Bacillus methylotrophicus* *Woong*) 균주를 제공한다.
- [0013] 상기 균주는 KCCM11957P로 수탁된 것이 바람직하다.
- [0014] 바람직하게는, 상기 균주는 발효물 내 점질물, 펩타이드, 가수분해효소 및 혈전분해효소의 생산을 증진시킬 수 있다.
- [0015] 바람직하게는, 상기 균주는 김치로부터 분리될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아님을 명시한다.
- [0017] 이하에서는 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.
- [0019] **실시예 1 : 김치로부터 유용 고초균 분리**
- [0020] 전통 김치 10 g을 증류수 100 mL에 분산시킨 후, 단계적으로 희석하여 MRS 고체배지(MRS agar)에 도말하고, 42℃ 배양기에서 24시간 동안 배양하였다. 미생물 중에서 점질물을 생성하는 균주를 분리하여 MRS 액체배지(MRS broth)에 접종하고 24시간 동안 배양하였다. 그 후, 단계적으로 희석한 배양액을 MRS 고체 배지에 도말한 후 배양하여 단일 콜로니(colony)를 획득하였다. 단일 콜로니는 MRS 고체배지에 접종하고 배양하여 스타터 종균으로 사용하였다.
- [0021] 청국장에서 분리한 고초균인 바실러스 서브틸리스 HA(*Bacillus subtilis* HA)는 MRS 고체배지에 도말하고, 42℃ 배양기에서 24시간 동안 배양하여 단일 콜로니를 획득한 후 스타터 종균으로 사용하였다.
- [0022] 그 결과, 도 1을 참조하여 보면, MRS 고체배지의 왼쪽은 청국장으로부터 분리한 고초균 HA, 오른쪽은 김치로부터 분리한 고초균 *Woong*으로, 고초균 HA와 비교하였을 때, 고초균 *Woong*이 우수한 점질물 생성능을 나타내며, 동시에 표면이 거칠게 돌출된 형상의 균체 모양을 가지는 것을 확인할 수 있었다.
- [0023] 또한, 도 2는 고초균 *Woong*의 계통수를 나타낸 것이며, 도 3은 고초균 *Woong*의 16S rRNA 염기서열을 이용하여 NCBI BLAST 프로그램으로 바실러스 메틸로트로피커스(*Bacillus methylotrophicus*)와의 상동성을 비교한 결과로, 고초균 *Woong*이 99% 신뢰도로 바실러스 메틸로트로피커스에 속하는 것을 확인하였다.
- [0024] 또한, 도 4는 고초균 HA와 고초균 *Woong*을 현미경으로 관찰한 이미지를 나타낸 것이다.
- [0026] **실시예 2 : 김치로부터 분리된 고초균의 발효 특성 비교**
- [0027] 2-1. 발효 온도에 따른 생육곡선 비교
- [0028] 고초균 HA 및 고초균 *Woong*을 NB(nutrient broth) 액체배지에 접종한 후, 30℃ 또는 42℃에서 진탕 배양(160 rpm)하여 균의 생육을 비교하였다.
- [0029] 그 결과, 도 5를 참조하여 보면, 고초균 HA 및 고초균 *Woong* 모두 비교적 낮은 온도인 30℃에서 배양한 경우, 발효 12시간 동안 균의 생육이 완만하게 증가하는 경향을 보였으며, 42℃에서 배양한 경우, 발효 3시간 후부터 균의 생육이 활발하게 진행되고, 발효 시간이 증가할수록 급격하게 균체량이 증가하는 경향을 보였다. 기준 균주인 고초균 HA와 비교 균주인 김치에서 분리된 고초균 *Woong*의 생육곡선은 유사한 양상을 보이는 것을 확인하였다.
- [0031] 2-2. TVP를 이용한 고초균 발효물의 pH 및 생균수 비교

- [0032] 콩 가공소재인 식물성 조직 단백질(textured vegetable protein; TVP)을 이용하여 42℃에서 24시간 동안 고체 배지에서 발효한 후, 생성된 발효물로부터 pH를 측정하였다.
- [0033] 그 결과, 도 6을 참조하여 보면, TVP 발효 원료의 초기 pH는 약 6.6 정도로 약산성을 보였으며, 24시간 발효 후, 김치에서 분리된 고초균 Woong을 이용한 TVP 발효물의 pH는 고초균 HA를 이용한 TVP 발효물의 pH 보다 낮았으며, 고초균 Woong과 고초균 HA의 최종 발효물의 pH는 각각 7.4 및 8.4를 나타내었다.
- [0034] 또한, 도 7을 참조하여 보면, TVP 발효 원료의 초기 생균수는 초기 생균수는 고초균 Woong이 2.0×10^6 CFU/ml, 고초균 HA가 1.8×10^7 CFU/mL이었으며, 24시간 발효 후, 고초균 Woong과 고초균 HA에 의한 최종 생균수는 각각 1.3×10^9 CFU/ml 및 1.1×10^9 CFU/ml로 비교적 높은 값을 나타내었다.
- [0036] 2-3. TVP를 이용한 고초균 발효물의 점질물 및 점조도 비교
- [0037] TVP를 이용하여 42℃에서 24시간 동안 고체배지에서 발효한 후, 생성된 발효물로부터 점질물 함량 및 점조도를 측정하였다.
- [0038] 그 결과, 도 8 및 도 9를 참조하여 보면, TVP 발효 원료를 24시간 발효 후, 고초균 Woong과 고초균 HA에 의한 점질물 함량은 각각 4.5% 및 2.4%로 고초균 Woong이 더 높은 점질물 함량을 가지는 것을 확인하였다. 반면, 추출한 발효물의 점조도 값은 고초균 HA가 $8.6 \text{ Pa} \cdot \text{s}^n$ 이었으며 고초균 Woong이 $5.13 \text{ Pa} \cdot \text{s}^n$ 으로 고초균 Woong이 약간 낮은 점조도 값을 가지는 것을 확인하였다.
- [0039] 따라서, 김치에서 분리된 고초균 Woong이 고초균 HA 보다 높은 점질물을 생산하는 균주임을 확인하였다.
- [0041] **실시예 3 : 유청의 고초균 발효를 통한 기능성 발효물 개발**
- [0042] 3-1. 유청 배지 제조
- [0043] 치즈 제조 과정에서 생산되는 부산물인 유청을 농축시킨 유청 농축액(milk whey concentrate, 고형분 26% w/v, 매일유업)을 증류수로 2배 또는 4배 희석시킨 후, 121℃에서 15분 동안 멸균하여 배지로 사용하였다. 멸균된 30% MSG(monosodium glutamate) 용액 및 20% 포도당 용액을 각각 3%, 2% 수준으로 첨가하여 고초균을 위한 유청 배지를 제조하였으며, 상기 공정 과정은 도 10에 나타내었다.
- [0044] 고초균 HA와 고초균 Woong을 NB 배지에 접종하고 42℃에서 24시간 동안 배양한 후, 원심분리하여 상등액을 제거하고 균체를 증류수로 분산시켜 10배 농축된 고초균 스타터를 제조하였다. 농축 스타터(고초균 HA, 고초균 Woong, 및 복합 균주)를 3% 수준으로 유청 배지에 접종하고 42℃에서 3일 동안 진탕 배양시키면서 유청 발효물을 분석하였다.
- [0046] * 유청 배지 조성(희석된 유청 농축액 최종 부피: 100 mL)
- [0047] 1) W3: 유청 농축액(2배 희석)
- [0048] - 유청 농축액 50% + 30% MSG(10 mL) + 20% 포도당 10 mL
- [0049] 2) W4: 유청 농축액(2배 희석)
- [0050] - 유청 농축액 50% + 30% MSG(10 mL)
- [0051] 3) W5: 유청 농축액(4배 희석)
- [0052] - 유청 농축액 25% + 30% MSG(10 mL)
- [0054] 3-2. 유청을 이용한 고초균 발효물의 티로신(tyrosine) 함량 비교
- [0055] 김치에서 분리된 고초균 Woong과 청국장에서 분리된 고초균 HA를 유청 배지에 접종하고, 42℃에서 1일 또는 3일 동안 배양한 후, 생산된 발효물로부터 티로신 함량을 측정하였다.
- [0056] 그 결과, 도 11을 참조하여 보면, 2배 희석된 유청 농축액 배지(W4) 또는 2배 희석된 유청 농축액에 포도당이 첨가된 배지(W3)에서 1일 동안 배양시킨 발효물은 고초균 Woong이 고초균 HA 보다 더 높은 티로신 함량을 나타내었다. 또한, 4배 희석된 유청 농축액 배지(W5)에서 1일 동안 배양시킨 발효물은 고초균 Woong이 근소하게 낮은 티로신 함량을 나타내었으나 발효 3일에는 유사한 티로신 함량을 나타내었다.

- [0057] 2배 희석된 유청 농축액에 포도당이 첨가된 배지(W3)에서 3일 동안 배양시킨 발효물은 고초균 Woong이 59 mg%로 가장 높은 티로신 함량을 나타내었다. 또한, W3 배지에서 1일 동안 배양시킨 발효물은 고초균 Woong이 고초균 HA 보다 높은 티로신 함량을 나타내었다. 2배 희석된 유청 농축액 배지(W4)에 발효시킨 발효물은 고초균 Woong이 고초균 HA 보다 발효 1일 및 발효 3일에 모두 높은 티로신 함량을 나타내었다. 이는 고초균 Woong을 이용한 유청 발효 과정에서 단백질 가수분해물인 펩타이드(peptide)가 효과적으로 생산됨을 확인할 수 있었다.
- [0059] 3-3. 유청을 이용한 고초균 발효물의 점조도 비교
- [0060] 고초균 Woong과 고초균 HA를 유청 배지에 접종하고, 42℃에서 1일 또는 3일 동안 배양한 후, 생산된 발효물로부터 점조도를 측정하였다.
- [0061] 그 결과, 도 12를 참조하여 보면, 2배 희석된 유청 농축액에 포도당이 첨가된 배지(W3)에서 1일 동안 발효시킨 발효물은 고초균 Woong이 고초균 HA에 비하여 낮은 점조도 값을 보였다. 반면, 4배 희석된 유청 농축액 배지(W5)에서 1일 동안 발효시킨 발효물은 고초균 Woong의 점조도 값이 0.193 Pa.sⁿ으로 높았으며, 고초균 HA의 점조도 값은 0.036 Pa.sⁿ으로 낮은 값을 나타내었다.
- [0062] 전체적으로 고초균 Woong은 고초균 HA 보다 2배 희석된 유청 농축액 배지(W4) 또는 4배 희석된 유청 농축액 배지(W5)를 이용하여 진탕 배양 시, 발효물의 점조성이 고초균 HA 보다 높은 것으로 나타났다. 발효 3일에는 2배 희석된 유청 농축액에 포도당이 첨가된 배지(W3)에서 고초균 HA가 고초균 Woong 보다 높은 점조도 값을 보였으며, 대부분 점조성이 감소하는 경향을 나타내었다.
- [0064] 3-4. 유청을 이용한 고초균 발효물의 생균수 비교
- [0065] 유청 농축액을 2배 또는 4배 희석한 후 MSG를 3% 수준으로 첨가한 유청 배지에 고초균을 접종하고, 42℃에서 1일 또는 3일 동안 배양한 후, 고초균의 생균수를 측정하였다.
- [0066] 그 결과, 도 13을 참조하여 보면, 발효 1일에 고초균 HA는 2배 희석된 유청 농축액에 포도당이 첨가된 배지(W3)에서 생육이 활발하여 5.3×10^9 cfu/ml로 높은 생균수를 나타내었으며, 반면, 고초균 Woong은 2.0×10^7 cfu/ml 정도로 낮은 생균수를 나타내었다. 반면, 2배 희석된 유청 농축액 배지(W4) 또는 4배 희석된 유청 농축액 배지(W5)의 경우, 발효 1일 고초균 Woong의 생균수는 모두 1.0×10^9 cfu/ml 이상으로 높은 값을 보였으며, 고초균 HA는 이보다 낮은 생균수 값을 나타내었다.
- [0068] 3-5. 유청을 이용한 고초균 발효물의 혈전분해능 비교
- [0069] 고초균 Woong과 고초균 HA를 유청 배지에 접종하고, 42℃에서 1일 또는 3일 동안 배양한 후, 생산된 발효물을 증류수로 2배 희석하여 혈전분해능 비교 실험을 수행하였다.
- [0070] 생산된 발효물의 혈전분해효소의 활성을 측정하기 위해 기질인 피브리노겐(fibrinogen) 단백질과 트롬빈(thrombin) 효소를 반응시켜 인위적으로 제조한 젤 형태의 혈전 플레이트를 이용하여 혈전 분해 정도를 측정하였다.
- [0071] 그 결과, 도 14를 참조하여 보면, 발효 1일차에 W3-W(W3 배지+고초균 Woong), W3-HA(W3 배지+고초균 HA) 및 W4-HA(W4 배지+고초균 HA) 발효물은 고체화된 피브린 플레이트(fibrin plate)를 분해하지 못하였고, W5-HA(W5 배지+고초균 HA) 발효물의 경우, 일부 혈전분해효소가 존재하지만 활성이 약하여 혈전 플레이트를 바닥까지 분해하지는 못하는 것을 확인하였다.
- [0072] 반면, 발효 3일차에 고초균 Woong에 의해서 발효된 유청 발효물인 W4-W(W4 배지+고초균 Woong) 및 W5-W(W5 배지+고초균 Woong)는 높은 혈전분해효소 활성을 나타내었다. 반면, 고초균 HA에 의해서 발효된 유청 발효물인 W5-HA(W5 배지+고초균 HA)는 매우 미비한 혈전분해효소 활성을 나타내었다. 혈전 플레이트에서 용해된 환의 직경을 측정한 결과, W4-W(W4 배지+고초균 Woong)의 직경은 0.7 cm, W5-W(W5 배지+고초균 Woong)의 직경은 0.6 cm으로 W4의 혈전분해능이 가장 우수한 것을 확인할 수 있었다.
- [0073] 발효 3일차에 W3-HA(W3 배지+고초균 HA) 및 W4-HA(W4 배지+고초균 HA) 발효물은 피브린을 분해하지 못하였고, W5-HA(W5 배지+고초균 HA) 발효물은 넓게 퍼지면서 혈전을 조금 분해하였으나 플레이트 아래까지 분해하지 못하는 것을 확인하였다. 반면, 고초균 Woong에 의해서 발효된 유청 발효물인 W3-W(W3 배지+고초균 Woong), W4-W(W4 배지+고초균 Woong) 및 W5-W(W5 배지+고초균 Woong)의 각각 혈전 플레이트의 용해된 환의 직경은 1.1 cm, 1.2

cm 및 1.1 cm로 혈전분해능이 양호하며, W4-W가 용해된 환의 직경이 가장 큰 것으로 나타났다.

[0074] 따라서 고초균 Woong의 발효물 W4가 발효 1일차 및 3일차에서 혈전분해능이 가장 우수하며, 높은 혈전분해효소를 갖는 것으로 확인하였다.

[0076] 3-6. 유청을 이용한 고초균 발효물의 관능평가

[0077] 유청을 이용한 고초균 발효물에 대한 관능평가는 계명대학교 대학원생을 대상으로 수행하였다. 일반적으로 단백질이 풍부한 식물성 원료를 이용하여 고초균 발효를 수행하는 경우, 독특한 발효취가 생성되어 기호성이 낮은 경향이 있다. 반면, 유청 단백질과 유당을 함유한 유청에 점질물 생성을 위한 전구물질로 MSG를 첨가한 후 젖산균이 아닌 고초균으로 발효시킨 경우, 유청 발효물의 점조도 증가하며, 요구르트의 풍미를 생성하는 것을 확인할 수 있었다.

[0078] 하기 표 1을 참조하여 보면, 유청 배지(W3, W4 및 W5)를 이용하여 고초균 Woong에 의한 발효 1일에 얻어진 발효물은 단맛과 요구르트의 고유한 향이 풍부하였으며, 유청 배지 W3의 발효물에서는 약간의 구수한 풍미를 나타내었으며, 고초균 1일 동안 진탕 배양에서 얻어진 모든 유청 발효물은 기호성이 높은 풍미를 나타내었다. 또한, 점질물을 함유하고 있어서 유청 발효물의 물성이 개선되며 안정성을 부여하였다. 반면, 발효 3일에 얻어진 발효물은 요구르트 향이 감소하였고 고초균 특유의 풍미를 나타내어 기호도가 감소하였다.

[0079] 관능평가 결과, 유청 배지에서 1일 동안 발효시킨 발효물에서 고초균 Woong이 고초균 HA에 비하여 요구르트의 고유한 향을 나타내면서 좋은 기호성을 보였다. 반면, 3일 동안 발효시킨 발효물은 약간의 고초균 특유의 냄새를 나타내었다. 또한, 콩 단백질 및 우유 단백질의 경우, 고초균 발효를 통해 과도하게 생성된 펩타이드에 의해서 발효물이 쓴맛을 나타내는 것과 대조적으로 유청 발효물은 생성된 점질물에 의해서 쓴맛이 상쇄되어 구수한 맛을 나타내면서 전체적인 기호도가 양호하게 평가되었다.

[0080] 결론적으로 유청을 이용한 고초균 Woong의 발효를 통해 청국장 특유의 냄새가 아닌 요구르트 풍미를 생성할 수 있으며, 특히 고초균에 의한 단기간의 발효 과정 중에 고분자 점질물을 생성시킴으로써 물성이 개량된 유청 발효물을 생산할 수 있었다. 이와 같은 발효물은 고초균, 펩타이드, 혈전분해효소 등을 포함하며, 기능성 물질인 점질물을 함유함으로써 복합적으로 기능성 물질이 강화된 발효 소재로 개발할 수 있었으며, 이는 요구르트 유사 제품 등의 소재로도 활용이 가능하다.

표 1

분석 항목	발효 1일		발효 3일	
	고초균 HA	고초균 Woong	고초균 HA	고초균 Woong
풍미(flavor)	+	+++	+	+
맛(taste)	++	++	+	+
전체적인 기호도 (overall preference)	++	+++	+	+

[0084] 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술한 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현 예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

[0085] 본 발명의 범위는 후술하는 특허청구범위에 의하여 나타내어지며, 특허청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 균등 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

수탁번호

[0086]

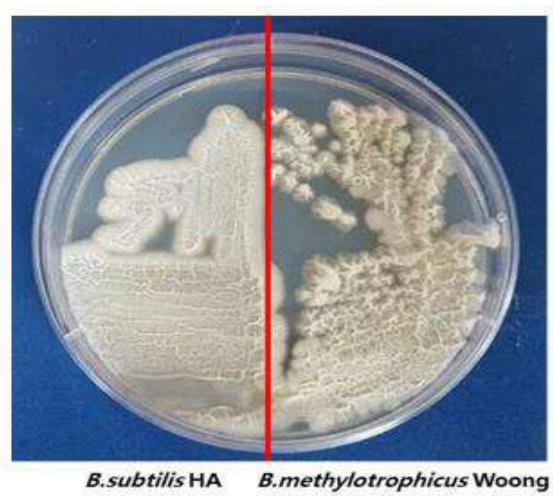
기탁기관명 : 한국미생물보존센터(국외)

수탁번호 : KCCM11957P

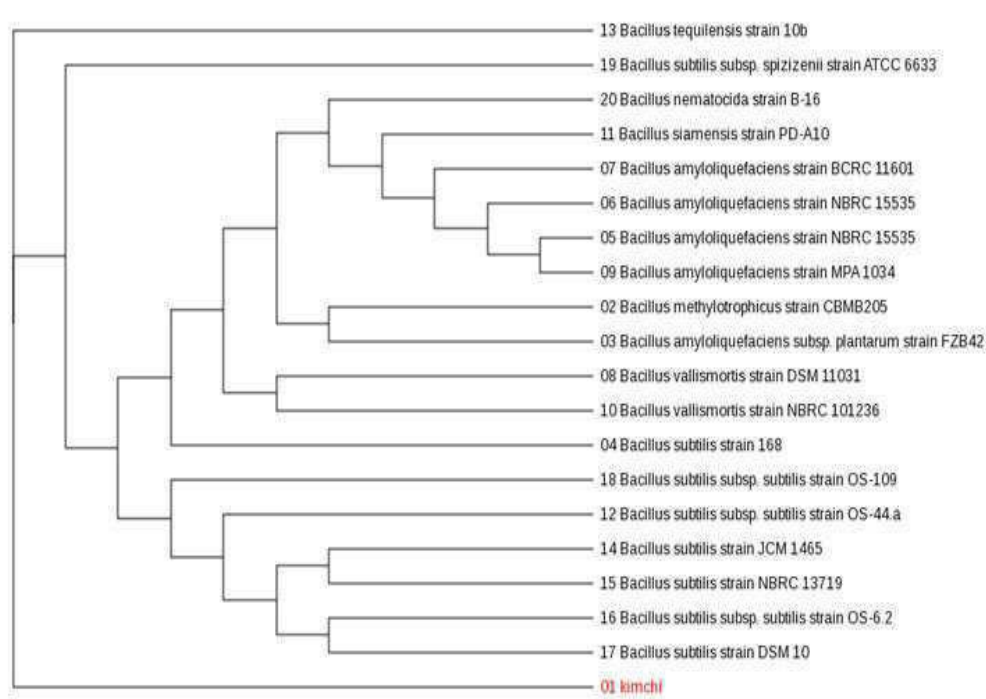
수탁일자 : 20161213

도면

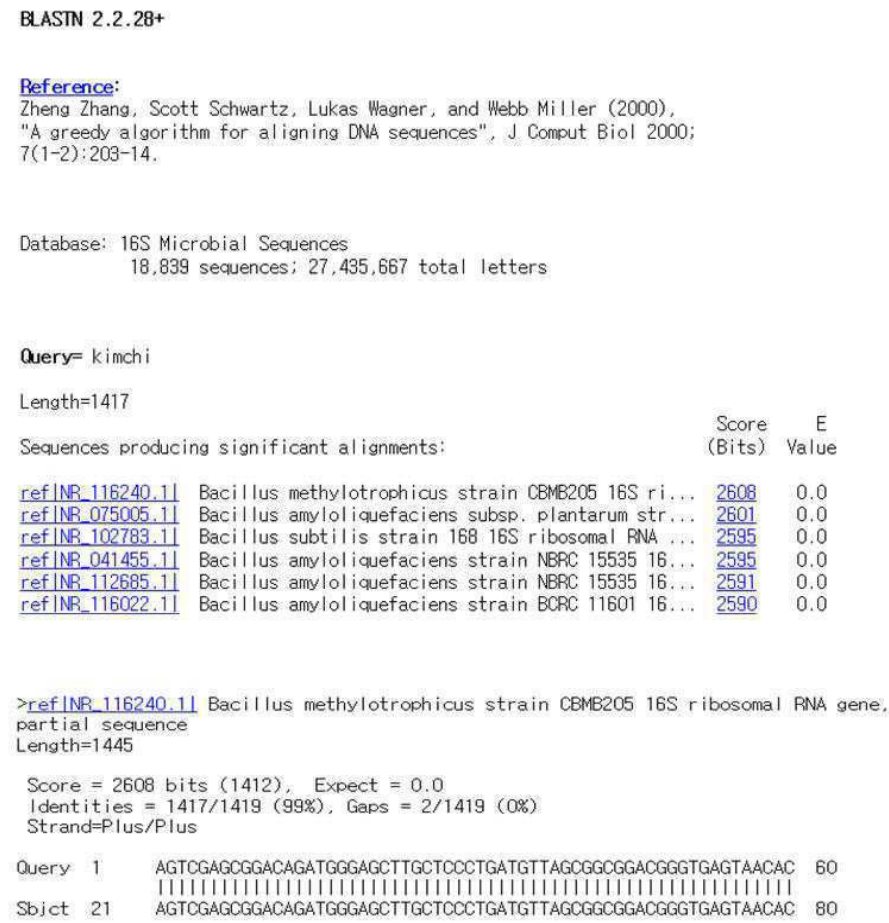
도면1



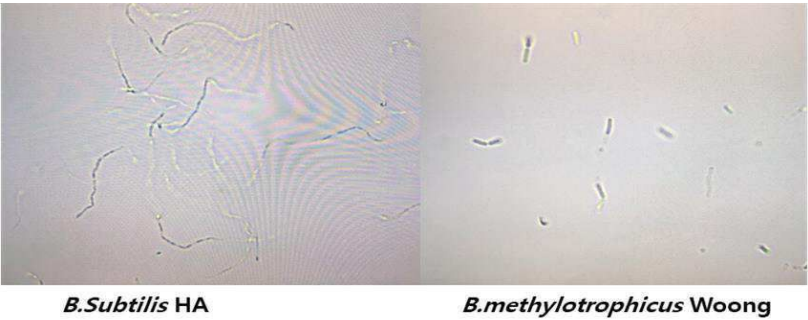
도면2



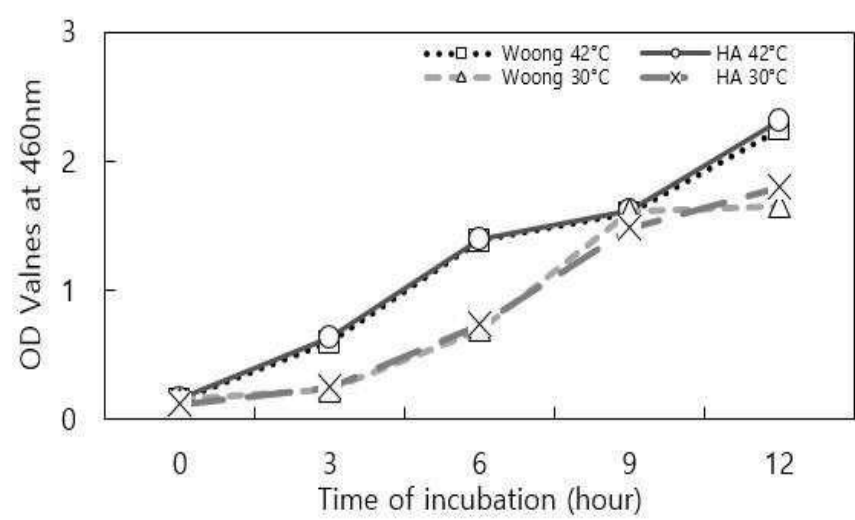
도면3



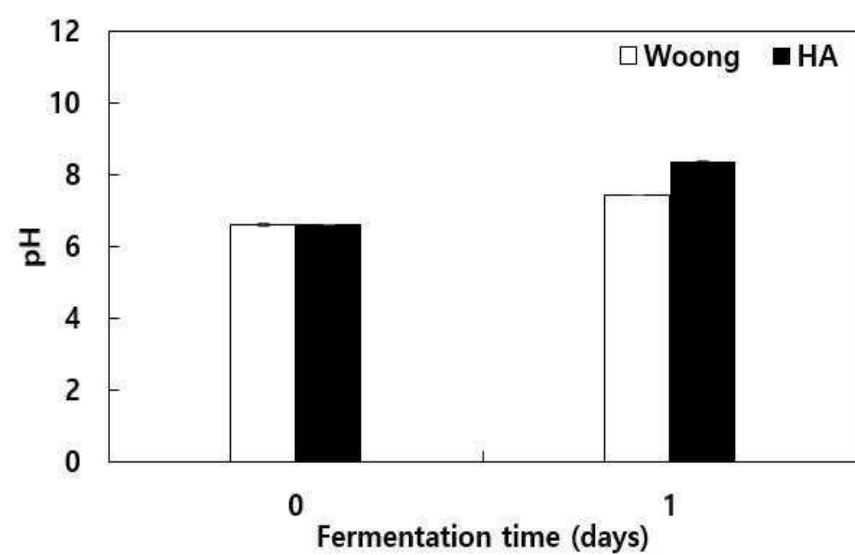
도면4



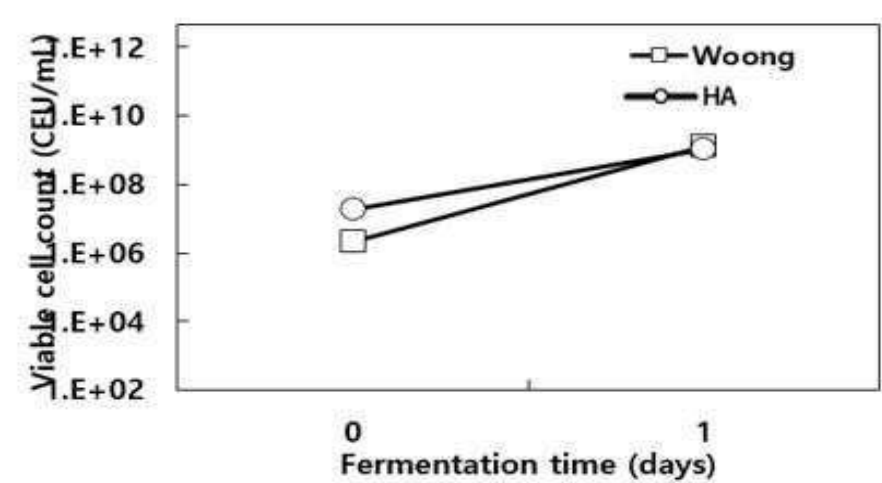
도면5



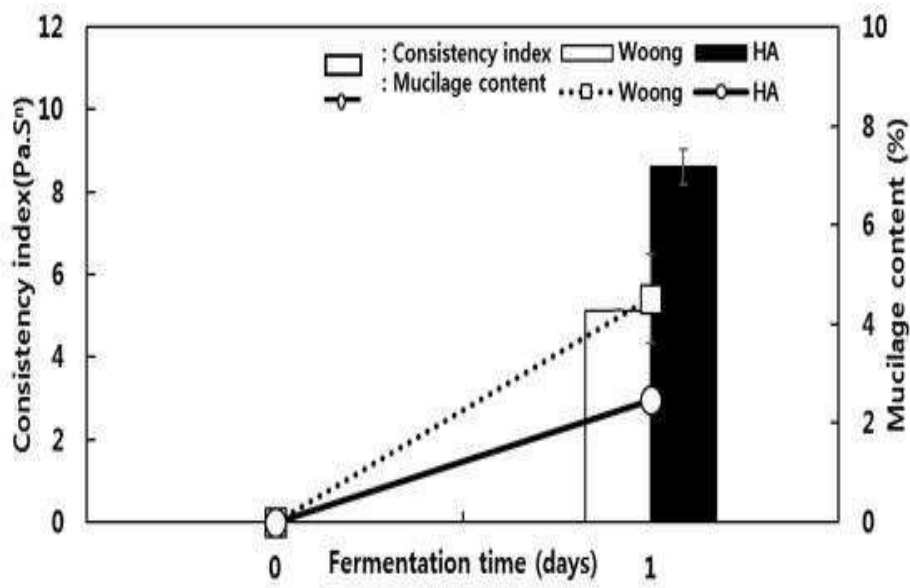
도면6



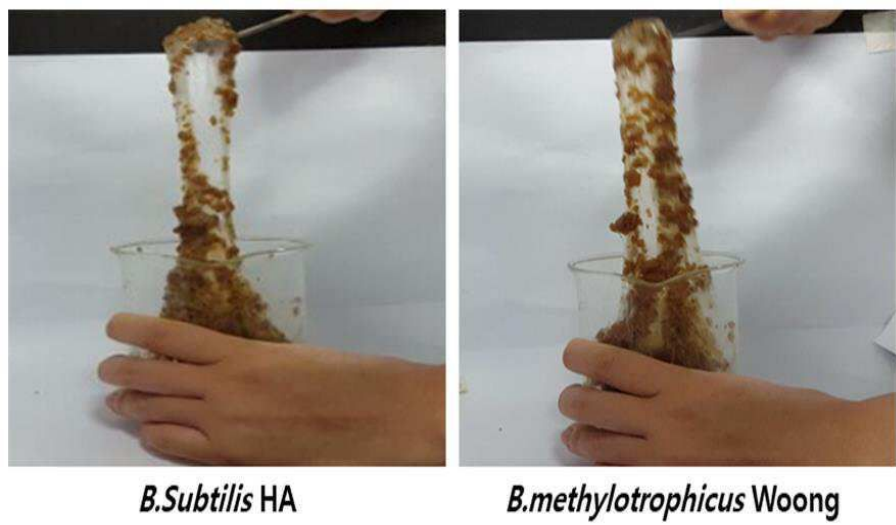
도면7



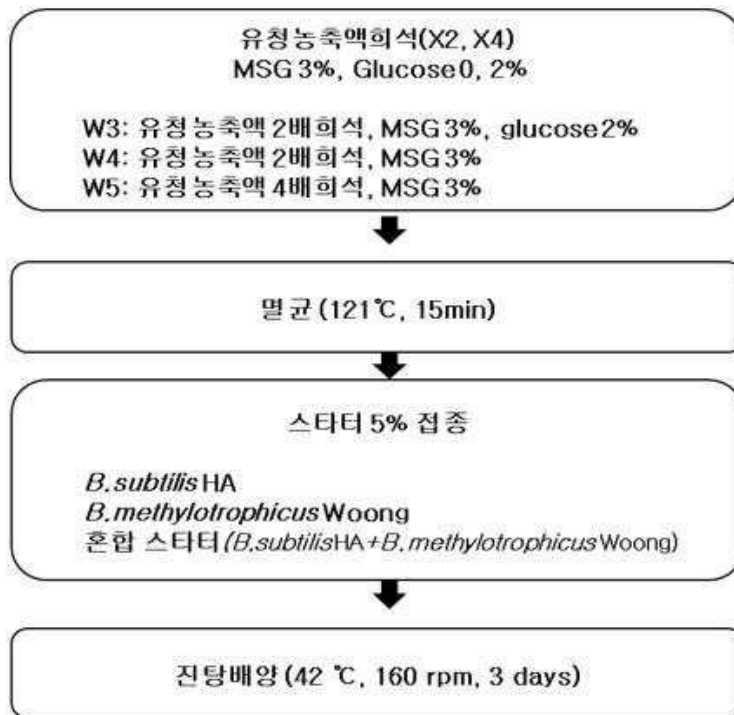
도면8



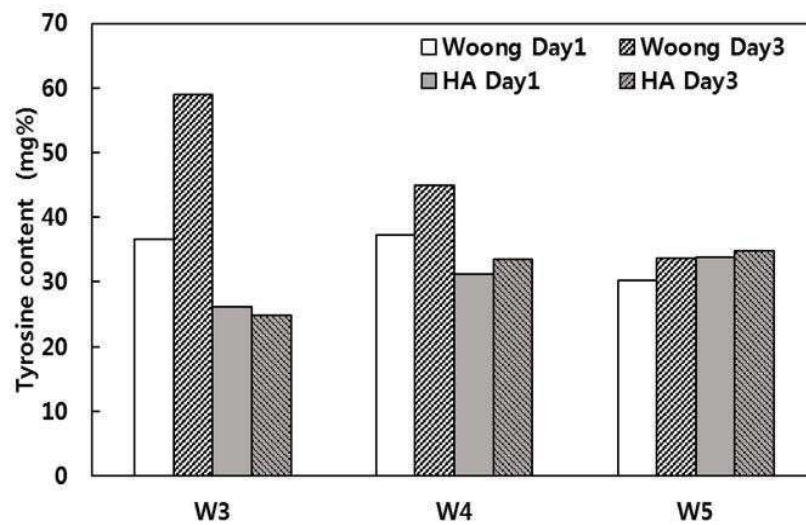
도면9



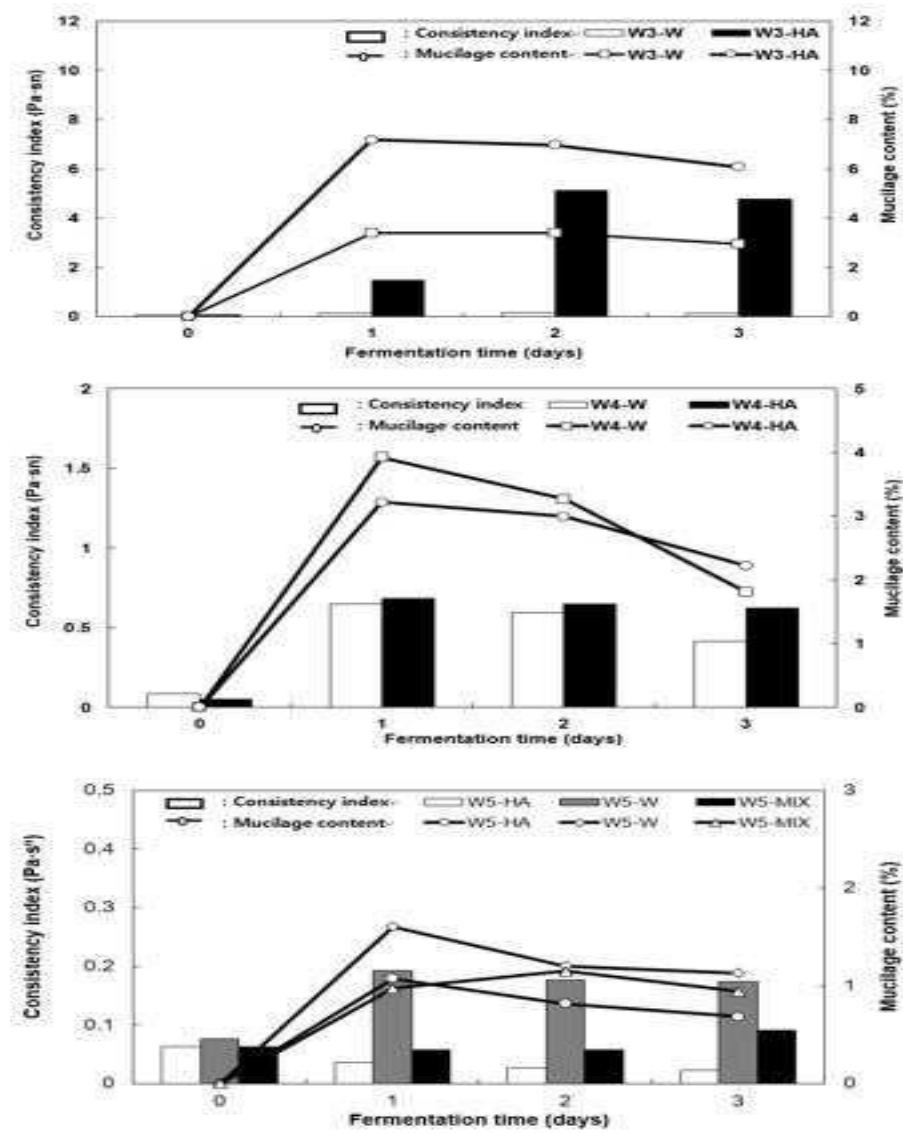
도면10



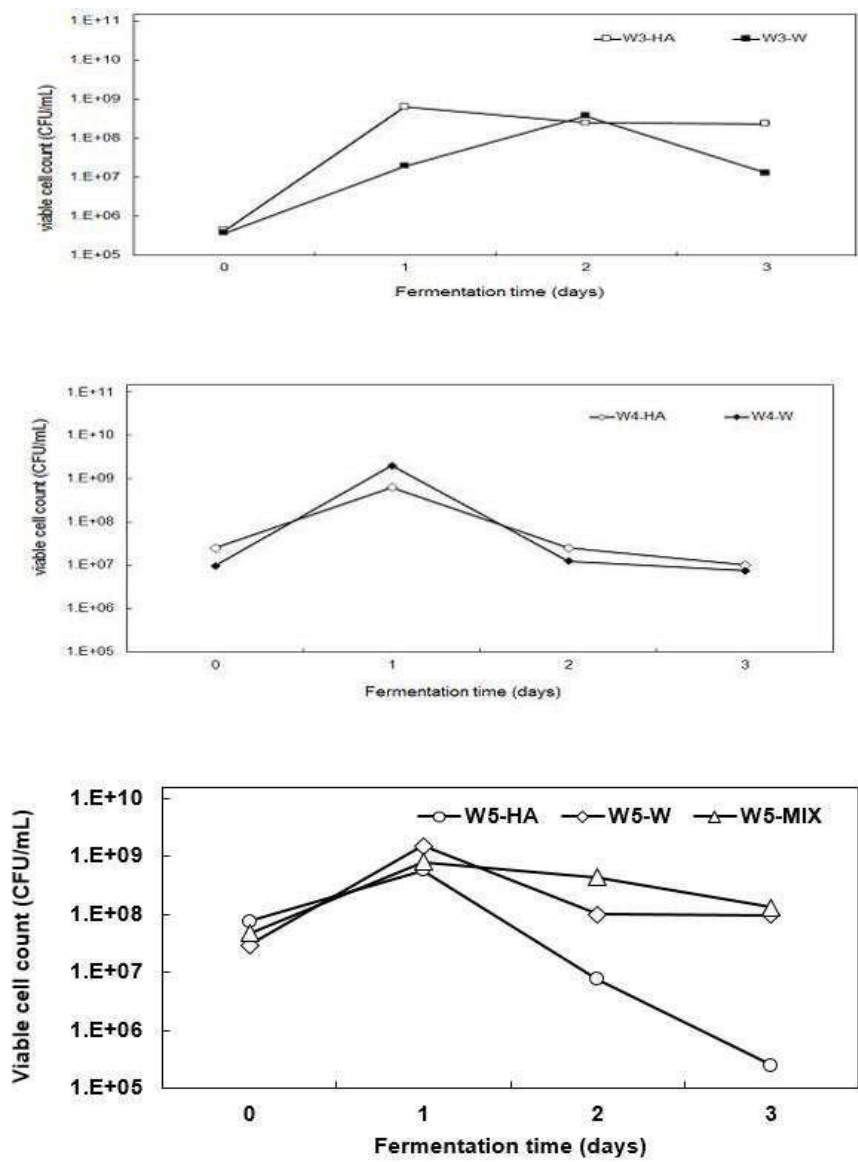
도면11



도면12



도면13



도면14

