

 (19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)	(11) 공개번호 10-2011-0038739 (43) 공개일자 2011년04월14일
(51) Int. Cl. <i>A21D 2/08</i> (2006.01) <i>A23G 3/34</i> (2006.01) <i>A23D 9/007</i> (2006.01) <i>C12P 19/04</i> (2006.01) (21) 출원번호 10-2011-7006921(분할) (22) 출원일자(국제출원일자) 2003년06월18일 심사청구일자 2011년03월25일 (62) 원출원 특허 10-2004-7020606 원출원일자(국제출원일자) 2003년06월18일 심사청구일자 2008년05월29일 (85) 번역문제출일자 2011년03월25일 (86) 국제출원번호 PCT/JP2003/007739 (87) 국제공개번호 WO 2004/001053 국제공개일자 2003년12월31일 (30) 우선권주장 JP-P-2002-185261 2002년06월25일 일본(JP) JP-P-2002-206994 2002년07월16일 일본(JP)	(71) 출원인 가부시킴가이샤 아데카 일본국 도쿄도 아라카와구 히가시오구 7초메 2반 35고 (72) 발명자 츠바키 카즈후미 일본국 도쿄도 아라카와구 히가시오구 7초메 2반 35고 아사히 덴카 고교 가부시킴가이샤 내 스기야마 히로무 일본국 도쿄도 아라카와구 히가시오구 7초메 2반 35고 아사히 덴카 고교 가부시킴가이샤 내 쇼지 요시카즈 일본국 도쿄도 아라카와구 히가시오구 7초메 2반 35고 아사히 덴카 고교 가부시킴가이샤 내 (74) 대리인 윤동열

전체 청구항 수 : 총 7 항

(54) β글루칸 함유 유지 조성물 및 β글루칸을 생산하는 신규 미생물

(57) 요약

본 발명의 β글루칸 함유 유지 조성물은, 미생물류 유래 또는 담자균류 유래의 β글루칸을 함유하는 것이다. 본 발명의 β글루칸 함유 유지 조성물에 따르면, β글루칸을 식품에 균일하게 분산할 수 있으며, 또한 그 식품의 식미(食味), 식감 등을 저하시키는 일이 없다. 또한, 본 발명의 신규 미생물은, 상기의 미생물류 유래의 β글루칸으로서, 수크로오스 등의 저렴한 당류로부터, 고효율성이며 고품질의 β글루칸을, 효율적으로 높은 생산속도로 제조할 수 있다.

특허청구의 범위

청구항 1

유지에 미생물류 또는 담자균류 유래의 β 글루칸을 유지와 혼합해서 50℃ 이상으로 5분 이상, 6시간 이하 유지 함으로써, β 글루칸이 균일하게 분산하며, 또한 유지와 상화한 β 글루칸 함유 유지 조성물을 이용해서 조제한 생지를 소성해서 이루어지는 베이커리 제품으로서, 상기 베이커리 제품은 빵, 파이, 카스테라, 스펀지케이크, 버터케이크, 슈파자(puff pastries), 와플 또는 발효과자인 제품.

청구항 2

제 1 항에 있어서, 상기 β 글루칸이 미생물류 또는 담자균류를 배양함으로써 균체 밖에 분비된 β 글루칸인 베이커리 제품.

청구항 3

제 1 항에 있어서, 상기 β 글루칸이 미생물류 또는 담자균류를 배양함으로써 얻은 배양세포의 세포벽에 포함되는 β 글루칸인 베이커리 제품.

청구항 4

제 1 항에 있어서, 상기 미생물류가 효모균, 유산균, 클로렐라, 조류(藻類), 또는 아우레오바시디움(*Aureobasidium*)속에 속하는 미생물인 베이커리 제품.

청구항 5

제 1 항에 있어서, 상기 미생물류가 18S rRNA 유전자의 1,732 염기의 배열이 배열표의 배열번호 1에 나타내는 염기배열을 포함하고, 또 항생물질인 시클로헥시미드(cycloheximide)에 대한 저항성을 가지며, 또한, β 글루칸을 균체 밖에 분비 생산하는 능력을 갖는 아우레오바시디움 풀루란스(*Aureobasidium pullulans*) ADK-34(FERM BP-8391) 균주인 베이커리 제품.

청구항 6

제 1 항에 있어서, 상기 미생물류가 ITS-5.8S rRNA 유전자의 563 염기의 배열이 배열표의 배열번호 2에 나타내는 염기배열을 포함하고, 또한, β 글루칸을 균체 밖에 분비 생산하는 능력을 갖는 아우레오바시디움 풀루란스(*Aureobasidium pullulans*) ADK-34(FERM BP-8391) 균주인 베이커리 제품.

청구항 7

제 1 항에 있어서, 상기 β 글루칸 함유 유지 조성물 중의 β 글루칸 함유량이 이 β 글루칸 함유 유지 조성물 중의 β 글루칸 이외의 전 조성물 100 중량부에 대하여 0.01~500 중량부인 베이커리 제품.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 미생물류 유래 또는 담자균류 유래의 β 글루칸을 함유하는 유지 조성물에 관한 것으로서, 본 발명의 유지 조성물은 β 글루칸이 유지중에 균일하게 분산하고 있고, 식품 등에 사용함으로써, 생체 조절 기능을 갖는 β 글루칸을 식품 등에 균일하게 분산할 수 있으며, 또한 그 식품 등의 식미(食味), 식감, 풍미 등을 향상시키는 효과를 갖는 것이다.

[0002] 또한, 본 발명은 상기 β 글루칸을 얻는 데 유용한 신규 미생물 및 그 미생물을 사용한 β 글루칸의 제조방법에 관한 것이다.

배경기술

[0003] β 글루칸은, 최근 그 우수한 생체 조절 기능성, 예를 들면, 지질대사 개선작용, 정장작용, 혈당치 상승 억제 등, 또는, 항종양 효과나 면역 증강작용이 해석되어, 그 이용이 주목되고 있는 소재이다. 이러한 소재를 가공식품에서 널리 이용하는 것은, 가공식품의 기능성 증강(고부가가치화)에 기여할 뿐만 아니라, 널리 국민의 건강

유지예의 공헌이 기대되며, 매우 유용한 일이다. β 글루칸은 대부분의 생물체, 예를 들면, 미생물류, 담자균류, 식물에 포함되어 있으며, 주로 이들 생물체의 골격을 이루는 것으로, β 글루칸의 대부분은 세포벽을 구성하는 성분으로서 존재하고 있다. 그 구조는 β -1-2, 1-3, 1-4, 1-6-D-글루코피라노스(glucopyranose) 결합의 적어도 2종류 이상을 갖는 글루코오스의 중합체를 주성분으로 한다.

[0004] 일본국 특허공개 2001-501996호 공보에서는, 곡류나 벼과 식물 유래의 β 글루칸에 대하여 검토되어 있으나, 곡류나 벼과 식물 유래의 β 글루칸은 폴리페놀을 포함하는 경우가 있어, 착색이라고 하는 문제가 발생하는 일이 있었다. 또한, 함유량이 적어서 고가라는 문제도 있어, 식품에의 응용은 한계가 있었다.

[0005] 한편, 미생물류나 담자균류 중에는 배양조건에 따라 세포벽 성분과 동일한 상기 β 글루칸을 균체 밖에 분비하는 균주가 존재하고 있다. 미생물류나 담자균류의 세포벽에는 다량의 β 글루칸이 포함되어 있다.

[0006] 이러한, 미생물류나 담자균류의 균체 밖에 분비된 β 글루칸, 미생물류나 담자균류로부터 분리, 추출, 정제 등의 조작에 의해 채취된 β 글루칸, 미생물류나 담자균류의 세포벽 성분, 또한 균체 자신 등의, 미생물류나 담자균류 유래의 β 글루칸을, 가공식품에 첨가하는 방법으로서, 예를 들면, 1)미생물류나 담자균류의 배양 균체를 가공식품 원료에 직접 첨가하는 방법, 2)배양에 의해 얻은 미생물류나 담자균류의 세포벽 성분을 분리·정제하여 가공식품 원료에 첨가하는 방법, 3)균체나 분리된 세포벽 성분으로부터 β 글루칸을 추출하고, 추출 β 글루칸을 가공식품 원료에 첨가하는 방법, 4)미생물류나 담자균류를 배양한 배양 상청(上清; supernatant liquid)이나 배양 상청으로부터 분리·정제한 β 글루칸을 가공식품 원료에 첨가하는 방법이 고려된다.

[0007] 그러나, 상기의 1)이나 2)의 방법의 경우, β 글루칸의 대부분은 분자량 1만 이상의 고분자량체이며, 물에 난용성을 나타내는 β 글루칸도 존재하여, 가공식품 소재에 균일하게 혼합시키는 것이 매우 곤란하며, 결과로서, β 글루칸을 첨가한 가공식품에 있어서 식감의 저하나, 탄 얼룩 등의 제품 가치의 저하 등의 결점이 발생하고 있다.

[0008] 이에 비하여, 상기의 3)이나 4)의 방법의 경우는, β 글루칸을 비교적 균일하게 가공식품에 첨가할 수 있으며, β 글루칸의 함유량을 임의로 조절할 수 있는 이점이 있어 유용하다. 그러나, 추출·정제한 β 글루칸은 흡수성이 커서, 예를 들면, 소맥분을 주성분으로 하는 생지(生地; dough) 원료에 그대로 첨가하고, 물을 더하여 혼합 반죽하면, β 글루칸이 덩어리(lumps)가 되어, 생지 전체 중에서 불균일화를 일으키며, 식미·식감의 저하, 품질의 저하로 이어진다고 하는 문제가 발생한다. 또한, 미리 물에 용해하고 나서 생지 원료(주로 분체)에 첨가함으로써 비교적 균일하게 분산한 β 글루칸 함유 식품을 얻을 수 있으나, 물에 용해시키는 데 시간이 걸림과 동시에 수용액은 점성을 나타내고, 균일한 수용액을 얻는 것이 용이하지 않으며, 제조현장에서는 작업성을 손상시켜 실 제적이지 않다고 하는 결점이 있었다.

[0009] 그래서, 미생물류나 담자균류 유래의 β 글루칸을 함유하는 가공식품을 제조할 때에, β 글루칸을 균일하게 분산할 수 있으며, 또한 간편하게 동(同) 가공식품을 제조하는 방법 혹은, 그러한 β 글루칸 재료의 개발이 기다려지고 있었다.

[0010] 한편, 면역계를 활성화하는 β 글루칸류로서는, 식물 세포벽 성분(일본국 특허공개 소62-6692호 공보, 일본국 특허공개 2001-323001호 공보), 담자균(버섯)의 자실체나 균사체에 함유되어 있는 것(K.Sasaki et al., Carbohydrate Res., Vol.47, 99-104(1976), 일본국 특허공개 평05-345725호 공보), 미생물 균체의 세포벽 성분이나 균체 밖에 분비 생산되는 β 글루칸 등이 알려져 있다.

[0011] 미생물 균체의 세포벽 성분은, 어떠한 것에 있어서도 β 글루칸을 포함하여 면역 활성을 증강하는 작용이 있는 것은 일반적으로 잘 알려져 있으나, 특히 안전성이 높아 식품으로서도 이용가치가 높은 것으로서는, 효모 균체(일본국 특허공개 소54-138115호 공보, 일본국 특허공개 평09-103266호 공보), 유산균 균체(일본국 특허공개 평03-229702호 공보, 일본국 특허공개 평10-167972호 공보), 아우레오바시디움(Aureobasidium) 균체(일본국 특허공개 평06-92441호 공보) 등이 알려져 있다.

[0012] 또한, 면역 활성을 증강하는 기능을 갖는 β 글루칸을 균체 밖에 분비 생산하는 미생물로서는, 일본국 특허공개 평03-2202호 공보에 기재되어 있는 바와 같이, 매크로포모프시스(Macrophomopsis)속, 혹은, 알칼리게네스(Alcaligenes)속이 생산하는 커드란(curdlan)(식물섬유의 과학, p108, 아사쿠라 쇼텐(Asakura Shoten), 1997년), 아우레오바시디움 풀루란스(Aureobasidium pullulans)(Agaric. Biol. Chem. 47(6), 1167-1172(1983), 일본국 특허공개 평6-340701호 공보)가 알려져 있다.

[0013] 담자균(버섯)의 자실체나 균사체에 함유되어 있는 β 글루칸은, 면역 증강 활성이 높고, 표고버섯 자실체로부터 추출되는 렌티난(lentinan)과 같이, 의약품으로서 이용되고 있는 것도 있다. 그러나, 일반적으로 담자균(버섯)의 자실체나 균사체에 함유되어 있는 β 글루칸은, 그 생육·재배 조건에 따라 포함되는 β 글루칸량이 크게 변동

하여, 추출 조작으로 β 글루칸을 분리할 필요가 있으며, 결과로서 얻어지는 β 글루칸이 복잡 다기(多岐)의 분자중에 걸쳐서, 고분자체와 저분자체가 혼재하는 등, 품질이 불안정한 것이 되고 있다.

[0014] 이와 같이 담자균(버섯)에서는, 고활성을 가진 일정한 β 글루칸을 안정적으로 제조하는 것이 현시점에서의 과제가 되고 있다. 한편, 미생물 균체의 세포벽은 다량의 β 글루칸을 포함하고 있으며, β 글루칸의 공급원으로서 흥미 깊다. 그러나, 미생물 균체의 세포벽 자체는, β 글루칸 이외의 성분도 포함하며, 또한 물에 불용성이기 때문에, 효과가 높은 수용성의 β 글루칸을 얻기 위해서는, 담자균과 마찬가지로 추출 조작이 필요하므로, 일정한 품질의 β 글루칸을 안정적으로 추출하는 방법의 확립이 과제라고 할 수 있다.

[0015] 이에 비하여, 균체 밖에 면역 증강 활성이 높은 수용성 β 글루칸을 분비 생산하는 미생물을 사용한 β 글루칸의 발효 생산은, 균일하며 수용성의 고활성의 β 글루칸을 얻는 것이 가능하며, 매우 유효한 방법이다. 이러한 생각에 기초하여, 고활성의 β 글루칸을 균체 밖에 분비 생산하는 것이 알려져 있는 아우레오바시디움속의 미생물을 사용한 β 글루칸의 제조방법이 제안되어 왔었다.

[0016] 그러나, 아우레오바시디움속의 미생물은, 수크로오스(sucrose)와 같은 일반적인 미생물 배양에 사용하는 탄소원을 사용해서 배양하면, α 글루칸인 풀루란을 균체 밖에 분비 생산하는 것이 알려져 있어(일본국 특허공고 소51-36360호 공보, 일본국 특허공고 소51-42199호 공보), β 글루칸을 순도 좋게 제조하는 것이 곤란하였다(일본국 특허공개 평06-340701호 공보). 또한, 아우레오바시디움속의 미생물은, 속명으로 흑효모라고 불리며, 균체에 따라서 생산되는 멜라닌 색소에 의해 균체 혹은 배양액이 흑색으로 착색하여, 얻어지는 β 글루칸도 착색하므로, 제조되는 β 글루칸은 품질이 현저하게 손상된 것이 되고 있다. 이 점을 개량하기 위해서, 변이원 처리에 의해 착색을 보이지 않는 돌연변이체를 취득하여, 이 돌연변이체를 사용한 풀루란 등의 다당체의 제조방법이 제안되어 있다(일본국 특허공고 평4-18835호 공보). 그러나, 멜라닌 색소를 완전히 생산하지 않고, 효율적으로 고순도의 β 글루칸을 균체 밖에 분비 생산하는(풀루란을 균체 밖에 분비 생산하지 않음) 균주는 아직 알려져 있지 않다.

[0017] 또한, β 글루칸 제조과정, 즉 배양공정에 있어서, 불순물로서 들 수 있는 풀루란의 생산을 억제하는 배양방법이 다양하게 검토되어, 일본국 특허공개 평06-340701호 공보 및 일본국 특허공개 평07-51080호 공보에는, pH 조정 혹은 탄소원으로서 특수한 당류를 사용함으로써, 풀루란의 생산을 억제하여, 순도가 높은 β 글루칸을 생산할 수 있는 방법이 제안되어 있다. 이 경우, 특수한 배양조건을 설정하기 때문에 조작이 번잡한 것, 특수한 탄소원을 이용하기 때문에 배양에 사용하는 배지(培地)의 비용이 높아지는 것 등이, β 글루칸을 제조하는 데 문제가 되고 있다.

[0018] 이상과 같이, 아우레오바시디움속의 미생물을 사용해서 β 글루칸을 생산하기 위해서는, 일반적으로 미생물 배양에 사용되는 저렴한 당류를 탄소원으로서 배양하더라도, 풀루란 등의 불순물의 생산이 없거나 혹은 억제되고 있고, 또한, β 글루칸의 제조과정에서 실질적으로 멜라닌 색소의 생산이 없거나 혹은 억제되고 있어, 생산된 β 글루칸이 착색하지 않는, 고활성이며 고품질의 β 글루칸을 효율적으로 균체 밖에 분비 생산하는 균주가 필요하게 되고 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0019] 본 발명의 목적은, 우수한 생체 조절 기능성을 갖는 β 글루칸을 식품에 균일하게 분산할 수 있으며, 또한, 그 식품의 식미, 식감 등을 저하시키는 일이 없는 β 글루칸 재료를 제공하는 데 있다. 또한, 수크로오스 등의 저렴한 당류로부터 고활성이며 고품질의 β 글루칸을 효율적으로 높은 생산속도로 제조하는 데 유용한 신규의 미생물, 이 미생물을 사용한 β 글루칸의 제조방법, 및 이 미생물이 균체 밖에 분비 생산하는 β 글루칸을 제공하는 데 있다.

[0020] 본 발명자들은, 심도깊게 연구를 거듭한 결과, 미생물류나 담자균류 유래의 β 글루칸을 사용하여, 이것을 유지 또는 유지 조성물 중에 분산, 혼합시킴으로써, 상기 목적을 달성하는 β 글루칸 재료가 얻어지는 것을 발견하고, 본 발명을 완성시키기에 이르렀다.

[0021] 또한, 본 발명자들은, 상기 목적을 달성하기 위하여, 수크로오스로부터, 순도가 높은 β 글루칸을 효율적으로 균체 밖에 분비 생산하는 능력을 갖는 미생물의 탐색을 행하였다. 그 결과, 고품질의 β 글루칸을 고효율로 균체 밖에 분비 생산하는 신규의 미생물을 발견하였다. 또한, 더욱 검토한 결과, 항생물질 시클로헥시미드에 내성을 갖는 아우레오바시디움속에 속하는 균주가, 순도가 높은 β 글루칸을 효율적으로 균체 밖에 분비 생산하는 것을

발견하였다.

- [0022] 즉, 본 발명은, 미생물류 유래 또는 담자균류 유래의 β 글루칸을 함유하는 것을 특징으로 하는 β 글루칸 함유 유지 조성물을 제공하는 것이다.
- [0023] 또한, 본 발명은, 18S rRNA 유전자의 1732염기의 배열이 배열표의 배열번호 1에 나타내는 염기배열, 또는 이 염기배열과 18S rRNA 유전자의 염기배열에 기초하는 분자 계통학상 동등한 염기배열을 포함하고, 또한 항생물질인 시클로헥시미드(cycloheximide)에 대한 저항성을 가지며, 또한, β 글루칸을 균체 밖에 분비 생산하는 능력을 갖는 미생물을 제공하는 것이다.
- [0024] 또한, 본 발명은, ITS-5.8S rRNA 유전자의 563염기의 배열이 배열표의 배열번호 2에 나타내는 염기배열, 또는 이 염기배열과 ITS-5.8S rRNA 유전자의 염기배열에 기초하는 분자 계통학상 동등한 염기배열을 포함하고, 또한, β 글루칸을 균체 밖에 분비 생산하는 능력을 가지며, 바람직하게는 또한 항생물질인 시클로헥시미드(cycloheximide)에 대한 저항성을 갖는 미생물을 제공하는 것이다.
- [0025] 또한, 본 발명은, 그 구조에 적어도 β -1,3-D-글루코피라노스(glucopyranose) 결합을 갖는 β 글루칸을 균체 밖에 분비 생산하는 능력을 갖는 상기 미생물을 제공하는 것이다.
- [0026] 또한, 본 발명은, 아우레오바시디움(Aureobasidium)속에 속하는 상기 미생물을 제공하는 것이다.
- [0027] 또한, 본 발명은, 아우레오바시디움 풀루란스(Aureobasidium pullulans) ADK-34(FERM BP-8391) 균주인 상기 미생물을 제공하는 것이다.
- [0028] 또한, 본 발명은, 상기 미생물을 배양(바람직하게는 탄소원으로서 당류를 함유하는 배양액에서 배양)하여, β 글루칸을 균체 밖에 분비 생산시키는 것을 특징으로 하는 β 글루칸의 제조방법을 제공하는 것이다.
- [0029] 또한, 본 발명은, ITS-5.8S rRNA 유전자의 배열이 배열표의 배열번호 2에 나타내는 염기배열과 98%이상의 상동성(相同性)을 나타내는 미생물을 배양(바람직하게는 탄소원으로서 당류를 함유하는 배양액에서 배양)하여, β 글루칸을 균체 밖에 분비 생산시키는 것을 특징으로 하는 β 글루칸의 제조방법을 제공하는 것이다.
- [0030] 또한, 본 발명은, 아우레오바시디움 풀루란스(Aureobasidium pullulans) ADK-34(FERM BP-8391) 균주를 배양함으로써 균체 밖에 분비 생산되며, 그 구조에 적어도 β -1,3-D-글루코피라노스 결합을 갖는 β 글루칸 및 이 β 글루칸을 함유하는 유지 조성물을 제공하는 것이다.
- [0031] 또한, 본 발명은, 상기의 본 발명의 β 글루칸 함유 유지 조성물을 함유하는 식품이나, 상기의 본 발명의 β 글루칸 함유 유지 조성물을 함유하는 생활습관병 예방 작용을 갖는 의약품을 제공하는 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0032] 이하, 본 발명을 상세하게 설명한다.
- [0033] 본 발명의 유지 조성물에 사용되는 β 글루칸은, 미생물류 또는 담자균류에서 얻어지는, 미생물류 유래의 β 글루칸 또는 담자균류 유래의 β 글루칸이다.
- [0034] 우선, 본 발명에서 사용되는 상기 미생물류 유래의 β 글루칸에 대해서 설명한다.
- [0035] 미생물류는, 세포 자신이 그 세포벽에 다량의 β 글루칸을 함유하고 있기 때문에, 상기 미생물류 유래의 β 글루칸으로서는, 미생물류를 각각의 증식 배지에 접종해서 균체를 증식시킴으로써 얻어지는 배양세포를 그대로, 또한 이 배양세포를 파쇄(破碎)해서 내용물을 제거하여 얻어진 배양 세포벽 잔사를 사용할 수 있다. 또한, 상기 배양세포 또는 상기 배양 세포벽 잔사로부터 추출된 β 글루칸을 그대로, 혹은 이 추출 β 글루칸을 정제한 것의 어떠한 것도 사용할 수 있다. 또한, 미생물류를 배양함으로써 균체 밖에 분비 생산된 β 글루칸을 이용하는 것도 가능하며, 그 경우는, 배양 종료 후의 배양액을 그대로, 혹은 배양액으로부터 단리·정제된 β 글루칸을 사용할 수 있다.
- [0036] 이들 중, 미생물류를 각각의 증식 배지에 접종해서 균체를 증식시킴으로써 얻어지는 배양세포를 그대로 사용한 경우, 세포 내용물이, 첨가 대상물의 가공식품의 식미·식감의 저하 혹은 물성의 저하를 일으킬 우려가 있으므로, 이 배양세포를 파쇄해서 내용물을 제거하여 얻어진 배양 세포벽 잔사를 사용하는 것이 바람직하고, 또한, 상기 배양세포 또는 상기 배양 세포벽 잔사로부터 추출된 β 글루칸을 그대로, 혹은 정제해서 사용하는 것이 더욱 바람직하며, 또한, 균체 밖에 분비 생산된 β 글루칸을 배양액과 함께, 혹은 배양액으로부터 정제한 것을 사

용하는 것이 가장 바람직하다.

- [0037] 상기 β 글루칸을 얻기에 적합한 미생물류는, 종래부터 식용으로 이용되고 있는 미생물류가 안전성이 높아서 적합하다. 즉, 효모균, 유산균, 납두균, 초산균, 국균(麴菌), 클로렐라나 스피루리나(spirulina) 등의 조류(藻類), 아우레오바시디움(Aureobasidium)속에 속하는 미생물 등이다. 이들은, 환경중(예를 들면 식품, 토양, 실내 등)으로부터 분리된 당해 미생물을 사용할 수 있다. 또한, 단균 분리된 보존주(保存株) 혹은 분리주(分離株), 또는 그들을 통상적인 방법에 따라서 변이 조작을 실시한 변이주를 사용할 수 있다. 변이 조작의 예로서는, 예를 들면 UV조사, 혹은 니트로소구아니딘(nitrosoguanidine), 에티디움 브로마이드(ethidium bromide), 메탄술폰산에틸(ethane methane sulfonate), 아질산나트륨(sodium nitrite) 등에 의한 화학처리 등을 들 수 있다.
- [0038] 상기 효모균으로서는, 맥주, 발포주, 소주, 일본주, 와인, 위스키 등의 알코올 양조나 제빵 공정에서 사용되는 사카로마이세스(Saccharomyces)속으로 분류되는 효모류나, 압착 빵효모, 간장 양조에서 사용되는 효모류, 미생물 단백질 생산에 사용되는 캔디다(candida)속의 효모균 등을 들 수 있다.
- [0039] 상기 유산균으로서는, 간균(桿菌)의 락토바실러스(Lactobacillus)속이나 비피도박테리움(Bifidobacterium)속, 구균의 류코노스톡(Leuconostoc)속, 페디오코커스(Pediococcus)속, 스트렙토코커스(Streptococcus)속, 락토코커스(Lactococcus)속의 유산균이 통상 사용되지만, 그 외에, 엔테로코커스(Enterococcus)속, 바고코커스(Vagococcus)속, 카노박테리움(Carnobacterium)속, 아에로코커스(Aerococcus)속, 테트라게노코커스(Tetragenococcus)속의 유산균을 이용할 수 있다. 구체적인 유산균주로서는, 락토바실러스 불가리쿠스(Lactobacillus bulgaricus), 락토바실러스 헬베티쿠스(L. helveticus), 락토바실러스 아시도필루스(L. acidophilus), 락토바실러스 락티스(L. lactis), 락토바실러스 카제이(L. casei), 락토바실러스 브레비스(L. brevis), 락토바실러스 플란타룸(L. plantarum), 락토바실러스 사케(L. sake), 스트렙토코커스 써모필루스(Streptococcus thermophilus), 스트렙토코커스 락티스(S. lactis), 스트렙토코커스 크레모리스(S. cremoris), 비피도박테리움 롱검(Bifidobacterium longum), 비피도박테리움 비피덤(B. bifidum), 비피도박테리움 브레브(B. breve), 비피도박테리움 인판티스(B. infantis), 류코노스톡 크레모리스(Leuconostoc cremoris), 류코노스톡 메센테로이데스(Ln. mesenteroides), 류코노스톡 옥노스(Ln. ocnos), 페디오코커스 아시디락티시(Pediococcus acidilactici), 페디오코커스 세레비시에(P. cerevisiae), 페디오코커스 펜토사세우스(P. pentosaceus) 등의 종래 사용되고 있는 유산균의 1종류 또는 2종류 이상을 사용할 수 있다. 이들은 단독 또는 2 이상이 함께 사용될 수 있다. 또한, 비피도박테리움(Bifidobacterium)속의 유산균의 배양과 그 외의 유산균의 배양을 따로따로 행하고, 이들을 혼합해도 좋다.
- [0040] 상기 아우레오바시디움(Aureobasidium)속에 속하는 미생물로서는, 당해 미생물을 배양함으로써 균체 밖에 β 결합을 갖는 글루코오스 중합체를 생산하는 균주라면 어떠한 것이어도 좋고, 그 예로서는 아우레오바시디움 풀루란스(Aureobasidium pullulans) 균주이며, 구체적으로는 IF04464, IF04466, IF06353, IF07757, ATCC9348, ATCC3092, ATCC42023, ATCC433023 등을 사용할 수 있다. 그 외에, 환경중(예를 들면 식품, 토양, 실내 등)에 의해 분리된 당해 미생물을 사용할 수 있다. 또한, 단균 분리된 보존주 혹은 분리주, 또는 그들을 통상적인 방법에 따라 변이 조작을 실시한 변이주를 사용할 수 있다. 변이 조작의 예로서는, 예를 들면 UV조사, 혹은 니트로소구아니딘, 에티디움 브로마이드, 메탄술폰산에틸, 아질산나트륨 등에 의한 화학처리 등을 들 수 있다.
- [0041] 그 외, 납두균인 바실러스(Bacillus)속의 균주, 초산균인 아세트박터(Acetobactor)속의 균주, 국균류인 아스페르길루스(Aspergillus)속이나 페니실리움(Penicillium)속의 균주, 클로렐라나 스피루리나 등의 조류, 건조 클로렐라 분말, 풀루란을 균체 밖에 분비 생산하는 것이 알려져 있는 아우레오바시디움(Aureobasidium)속의 균주, 그 외 식품 첨가물로서 사용되는 증점 다당류를 생산하는 것이 알려져 있는 크산토모나스(Xanthomonas)속, 아에로모나스(Aeromonas)속, 아조토박터(Azotobactor)속, 알칼리게네스(Alcaligenes)속, 에르위니아(Erwinia)속, 엔테로박터(Enterobactor)속, 스크레로티움(Sclerotium)속, 슈도모나스(Pseudomonas)속, 아그로박테리움(Agrobacterium)속, 매크로포모프시스(Macrophomopsis)속의 균주를 사용할 수 있다.
- [0042] 또한, 상기 미생물류로서는, 본 발명의 신규 미생물인, "18S rRNA 유전자의 1732염기의 배열이 배열표의 배열번호 1에 나타내는 염기배열, 또는 이 염기배열과 18S rRNA 유전자의 염기배열에 기초하는 분자 계통학상 동등한 염기배열을 포함하고, 또한 항생물질인 시클로헥시미드(cycloheximide)에 대한 저항성을 가지며, 또한, β 글루칸을 균체 밖에 분비 생산하는 능력을 갖는 미생물", 및, "ITS-5.8S rRNA 유전자의 563염기의 배열이 배열표의 배열번호 2에 나타내는 염기배열, 또는 이 염기배열과 ITS-5.8S rRNA 유전자의 염기배열에 기초하는 분자 계통학상 동등한 염기배열을 포함하고, 또한, β 글루칸을 균체 밖에 분비 생산하는 능력을 갖는 미생물"을 바람직하게 사용할 수 있다. 이들의 본 발명의 신규 미생물의 상세한 것에 대해서는 후술한다.

- [0043] 다음으로, 본 발명에서 사용되는 상기 담자균류 유래의 β 글루칸에 대하여 설명한다.
- [0044] 담자균류는, 자실체나 균사가 덩어리형상으로 집합한 균핵에 다량의 β 글루칸을 함유하고 있기 때문에, 자실체나 균핵을 미분쇄한 것, 혹은 분쇄물로부터 추출된 추출물, 혹은 추출물로부터 β 글루칸을 정제한 것 등, 어떠한 것도 담자균류 유래의 β 글루칸으로서 사용할 수 있다. 또한, 담자균류의 포자를 받아시키고, 균사체를 각각의 증식 배지에 접종해서 균체를 증식시킴으로써 얻어지는 배양세포를 그대로, 또한 이 배양세포를 파쇄해서 내용물을 제거하여 얻어진 배양 세포벽 잔사를 사용할 수 있다. 또한, 상기 배양세포 또는 상기 배양 세포벽 잔사로부터 추출된 β 글루칸을 그대로, 혹은 이 추출 β 글루칸을 정제한 것의 어떠한 것도 담자균류 유래의 β 글루칸으로서 사용할 수 있다. 또한, 담자균류를 배양함으로써 균체 밖에 분비 생산된 β 글루칸을 이용하는 것도 가능하며, 그 경우는, 배양 종료 후의 배양액을 그대로, 혹은 배양액으로부터 분리·정제된 β 글루칸을 담자균 유래의 β 글루칸으로서 사용할 수 있다.
- [0045] 이들 중, 자실체나 균핵을 미분쇄한 β 글루칸이나, 그들로부터 추출된 β 글루칸, 포자나 균사체를 각각의 증식 배지에 접종해서 균체를 증식시킴으로써 얻어지는 배양세포를 그대로 사용한 경우는, 세포 내용물이, 첨가 대상물의 가공식품의 식미·식감의 저하 혹은 물성의 저하를 일으킬 우려가 있으므로, 이 배양세포를 파쇄해서 내용물을 제거하여 얻어진 배양 세포벽 잔사를 사용하는 것이 바람직하고, 또한, 상기 배양세포 또는 상기 배양 세포벽 잔사로부터 추출된 β 글루칸을 그대로, 혹은 정제해서 사용하는 것이 더욱 바람직하며, 또한, 균체 밖에 분비 생산된 β 글루칸을 배양액과 함께, 혹은 배양액으로부터 정제한 것을 사용하는 것이 가장 바람직하다.
- [0046] 담자균류로서는 재배 품종이 가장 바람직하지만, 상업 생산에 제공되고 있지 않은 담자균류로부터의 β 글루칸도 본 발명에 이용할 수 있다. 예로서는, 신령버섯(*Agaricus blazei*), 샷갓버섯, 그물버섯(*Suillus bovinus*), 수염바늘버섯(*Climacodon septentrionalis*), 팽나무버섯(*Flammulina velutipes*), 소혀버섯(*Fistulina hepatica*), 목이(*Auricularia auricula*), 망태버섯(*Dictyophora indusiata*), 개암버섯(*Naematoloma sublateralitium*), 독청버섯아재비(*Stropharia rugosoannulata*), 먹물버섯(*Coprinus comatus*), 수실노루궁뎅이(*Hericium ramosum*), 표고버섯(*Lentinus edodes*), 알버섯(*Rhizopogon rubescens*), 흰목이(*Tremella fuciformis*), 만가닥버섯(*Lyophyllum ulmarium*), 넓은옆버섯(*Pleurocybella porrigens*), 노랑느타리버섯(*Pleurotus cornucopiae*), 저령(*Dendropolyporus umbellatus*), 플레우로토스 드라이너스(*Pleurotus dryinus*), 동충하초(*Cordyceps*), 나도팽나무버섯(*Pholiota nameko*), 팽나무버섯(*Armillaria mellea*), 팽나무버섯부치(*Armillaria tabescens*), 왕송이(*Tricholoma giganteum*), 글로에오스테레움 인카나툼(*Gloeostereum incarnatum*), 헛바늘목이(*Pseudohydnum gelatinosum*), 검은비늘버섯(*Pholiota adiposa*), 금빛비늘버섯(*Pholiota aurivella*), 젓버섯아재비(*Lactarius hatsudake*), 느타리(*Pleurotus ostreatus*), 복령(*Wolfiporia cocos*), 풀버섯(*Volvariella volvacea*), 느티만가닥버섯(*Hypsizygus marmoreus*), 마이셀렙토도노이데스 에이치소니(*Myceleptodonoides aitchisonii*), 땅찌만가닥버섯(*Lyophyllum shimeji*), 잎새버섯(*Grifola frondosa*), 덕다리버섯(*Laetiporus sulphureus*), 잣버섯(*Lentinus lepideus*), 양송이(*Agaricus bisporus*), 송이(*Tricholoma matsutake*), 영지버섯(*Ganoderma lucidum*), 참부채버섯(*Panellus serotinus*), 민자주방망이버섯(*Lepista nuda*), 그물버섯(*Boletus edulis*), 노루궁뎅이버섯(*Hericium erinaceum*), 버들송이버섯(*Agrocybe cylindracea*) 등을 들 수 있다.
- [0047] 상기의 미생물류나 담자균류의 배양 세포벽 잔사를 β 글루칸으로서 단리하는 방법으로서, 배양한 미생물류나 배양한 균사체 혹은 재배한 균핵이나 자실체에 적당량의 용매를 첨가하고, 자기소화 혹은 가수분해 효소의 첨가에 의해 세포벽의 일부를 파괴해서 내용물을 유거(流去)시키고, 잔사 성분을 회수함으로써 배양 세포벽 잔사를 β 글루칸으로서 단리하는 방법을 들 수 있다. 또한, 프렌치 프레스(French press)나 초음파 파쇄기 등의 물리적 힘에 의해 미생물류나 담자균류의 세포에 손상을 주어 일부를 파괴하여, 내용물을 제거하고, 잔사를 회수함으로써 β 글루칸으로서 얻는 방법도 있다.
- [0048] β 글루칸의 추출방법은, 특별히 제한은 없으며, 추출원료가 되는 미생물류 또는 담자균류에, 추출 용매를 첨가해서 추출하면 된다. 추출 용매는, 물, 염용액, 산수용액, 알칼리 수용액, 유기성 용매 등의 1종 또는 2종 이상의 혼합 용매 등을 사용할 수 있다. 또한, 세포벽을 분해하는 효소를 병용함으로써 추출 효율을 높일 수 있다. 추출물은 고액(固液) 분리된 경우의 추출액 그 자체, 혹은 추출액으로부터 공지의 방법에 의해 추출된 β 글루칸을 농축한 액체나 고체형상의 것, 혹은 추출액으로부터 공지의 방법에 의해 정제해서 순도를 높인 액체나 고체형상의 것 등, 어떠한 제조방법에 의해 얻은 것이라도, 어떠한 형태의 것이라도, 어떠한 순도의 것이라도 사용 가능하다. 물론 β 글루칸 이외의 추출된 성분이 혼합되어 있어도 전혀 문제는 없다. 본 발명에서는, 이들을 모두 미생물류 또는 담자균류로부터 추출된 β 글루칸이라고 말한다.

- [0049] 또한, β 글루칸의 미생물류 또는 담자균류로부터의 추출방법을 설명하면, 본 발명에서 사용되는 β 글루칸은, 수용성 고분자로서 물 등의 용매에 용해시킬 수 있으며, 예를 들면 담자균인 일반적으로 시판되고 있는 버섯을 건조시키고, 분쇄한 분말에, 물, 온수, 열수 혹은 염용액, 또는 산, 알칼리성의 수용액, 유기용매 등을 사용해서, 분말에 대하여 2~100배량의 용매에 의해 임의의 시간, 임의의 온도에서 추출할 수 있다. 또한 추출액을 고액 분리해서 β 글루칸을 얻을 수 있다. 이들 중에서도, 물, 온수 또는 열수로 추출된 β 글루칸이 바람직하며, 온도 80℃이하 4℃이상의 물로 추출된 β 글루칸이 보다 바람직하다. 또한 추출시에 효소 용액 등의 추출 촉진제 등을 첨가해도 좋다.
- [0050] 본 발명에 사용되는 β 글루칸은 β -1,2-D-글루코피라노스 결합, β -1,3-D-글루코피라노스 결합, β -1,4-D-글루코피라노스 결합, β -1,6-D-글루코피라노스 결합을 적어도 2종류이상 갖는 β 글루칸이 바람직하며, 특히 β -1,3-D-글루코피라노스 결합 및 β -1,4-D-글루코피라노스 결합으로 이루어지는 β 글루칸, β -1,3-D-글루코피라노스 결합 및 β -1,6-D-글루코피라노스 결합으로 이루어지는 β 글루칸, β -1,3-D-글루코피라노스 결합, β -1,4-D-글루코피라노스 결합 및 β -1,6-D-글루코피라노스 결합으로 이루어지는 β 글루칸을 함유하는 것이 바람직하다. 단, β -1,3-D-글루코피라노스 결합으로 이루어지는, 이른바 커드란은 본 발명에서는 β 글루칸에 포함시키지 않는다.
- [0051] 또한, 본 발명에 사용되는 β 글루칸은 고분자체이며, 어떠한 중량 평균 분자량을 갖는 β 글루칸도 사용 가능하지만, 분자량의 저하와 함께 유지와의 상화성(相和性)이 좋아지므로, 분자량 300만이하, 바람직하게는 50만이하, 더욱 바람직하게는 10만이하의 것이 좋다. 추출된 β 글루칸은, 유지와의 상화성이 좋아지도록, 공지의 방법으로 저분자화해도 좋고, 직접 저분자량의 β 글루칸을 추출해도 좋다.
- [0052] 상기의 미생물류 유래, 담자균류 유래 또는 본 발명의 신규의 미생물 유래의 β 글루칸을 혼합, 분산시키는 유지 또는 유지 조성물은, 식용에 이용할 수 있으면 특별히 제한되지 않는다. 예를 들면, 쌀기름, 채종유, 대두유, 면실유, 팜유, 팜핵유, 야자유, 올리브유, 어유(魚油), 쇠기름, 돼지기름, 카카오 기름, 혹은 그들을 필요에 따라서 가공한 경화유, 미수첨유(slightly hydrogenated oils), 이성화 수첨유(hydrogenation isomerized oils), 에스테르 교환유, 분별유(分別油;fractionated oils) 또는 이들의 2종이상의 가공을 행한 기름, 및 이들의 유지의 2종이상을 혼합한 유지 등의 어떠한 것도 사용 가능하다. 또한, 이들의 식용 유지의 유화물(W/O 유화물 혹은 O/W 유화물, 또는 O/W/O 유화물, W/O/W의 2중 유화물, 또는 그 이상의 고차 유화 구조의 에멀전을 포함함)이나 현탁물 등, 유지를 분산매(分散媒) 또는 분산질(分散質)로 하는 분산계를 사용할 수 있다(이하, 본 명세서중에서는 이 분산계도 유지로 함).
- [0053] 본 발명의 β 글루칸 함유 유지 조성물은, 상기 유지에 상기 β 글루칸을 첨가 후, 혼합시켜서 얻을 수 있다.
- [0054] 상기 β 글루칸의 상기 유지에의 첨가방법은, β 글루칸의 형태에는 특별히 제한은 없으며, β 글루칸을 그대로, 혹은 β 글루칸을 물이나 그 외의 수용성의 용매에 용해시켜서, 유지에 첨가할 수 있다.
- [0055] 상기 유지가 유화물인 경우, 이미 유화하고 있는 유지에 β 글루칸을 첨가시킬 수도, 유화시에 β 글루칸을 첨가시킬 수도 있다. 또한, 이 때, β 글루칸을 유상(油相;oil phase), 수상(水相;aqueous phase)의 어느 것에 첨가하는 것도 가능하지만, 우선 β 글루칸을 유상에 첨가, 분산시킨 후, 수상과 혼합하는 편이, β 글루칸이 유지와 양호하게 상화(相和)하며, 또한 균질한 유지 조성물이 되어, β 글루칸 함유 유지 조성물이 단시간에 얻어지므로 바람직하다.
- [0056] 또한, 상기 유지가 유중수형(油中水型;water-in-oil) 에멀전 또는 이것을 가소화한 것 등의 경우는, 상술과 같이 유지에 β 글루칸을 첨가하고 나서 유화시킬 수 있는 것 외에, 유화시에 β 글루칸을 첨가하는 것도, 유화 후에 β 글루칸을 첨가하는 것도, 가소화 후에 β 글루칸을 첨가하는 것도 가능하다. 또한, 상기 유지가 고체 기름인 경우는, 필요에 따라서 적절한 방법에 의해 연화 혹은 액상화시켜서 β 글루칸을 혼합할 수 있다. 또한, 고도로 균일한 상태로 β 글루칸을 분산시키기 위해서는, 분체형상의 β 글루칸 100중량부에 대하여 10~50중량부의 유지를 첨가해서 혼합시킨 후, 롤링(rolling) 혹은 롤링에 더하여 콘칭(conching)을 행하는 것이 바람직하다. 이 때, 다른 원료의 첨가나 기름 추가 등에 의해, 얻고자 하는 β 글루칸 함유 유지 조성물 중의 상기 β 글루칸 성분 함유량을 조정할 수도 있다.
- [0057] 상기 유지에 상기 β 글루칸을 첨가한 후의 혼합방법은 특별히 한정되지 않으나, β 글루칸을 유지와 혼합해서 50℃이상으로 일정 시간, 바람직하게는 5분이상, 6시간이하, 더욱 바람직하게는 10분이상 2시간이하 유지함으로써, β 글루칸이 균일하게 분산하며, 또한 충분히 유지와 상화한 β 글루칸 함유 유지 조성물을 얻을 수 있으므로 바람직하고, 이 β 글루칸 함유 유지 조성물을 사용해서 제조된 식품은, β 글루칸을 직접 첨가하는

경우와 비교해서 β 글루칸이 식품 전체에 균일하게 분산하여, 결과적으로, 식미·식감을 느끼지 않고, 의외로도 유화제의 사용에 기인한 풍미 억제를 완화하는 작용이 있는 것이나 식품의 풍미 발현의 향상 효과 등의 효과가 현저하다.

[0058] 상기 유지와 상기 β 글루칸과의 혼합 수단은 특별히 한정되지 않으며, 각종의 혼합·혼합반죽, 교반기를 사용할 수 있다. 예를 들면, 프로펠라형 교반기, 왕복회전형 교반기, 오리피스 혼합기(orifice mixers), 패들형 교반기(paddle agitators), 교반형 유화기(호모믹서), 커터 믹서, 코니더(cokneaders), 콘체기(conches), 사일런트 커터(silent cutters), 제트 믹서, 진공교반기, 스크류형 혼합기, 스태틱 믹서(static mixers), 커팅 믹서, 초음파 유화기, 니더, 롤, 하이드로써(hydrossure), 파이프라인 믹서, 유니버설 믹서, 핀 머신(pin machines), 호모지나이저(homogenizers)(고압균질기), 볼 커터(ball cutters), 리본 믹서(ribbon mixers) 등을 들 수 있다. 바람직하게는 품온(品溫) 40℃ 이상 80℃ 이하에서 교반형 유화기(호모믹서) 및/또는 호모지나이저(고압균질기)를 사용하는 것이 바람직하다.

[0059] 본 발명의 β 글루칸 함유 유지 조성물은, 상기 β 글루칸과 상기 유지를 상기 방법에 의해 혼합 교반 후, 그대로 보존 혹은 유화물로 해도 좋고, 또는 급랭(急冷) 가소화시켜도 좋다. 이 경우, 보테이터(votator), 컴비네이터(combinator), 퍼펙터(perfecter), 컴플렉터(complector), 온레이터(Onreitor) 등을 사용할 수 있으나, 품온 10℃ 이하에서 핀 머신을 사용하는 것이 바람직하다. 또한, 상기 유지를 유화하고, 보테이터, 컴비네이터, 퍼펙터, 컴플렉터, 온레이터 등의 급랭 가소화 장치를 사용한 후, 상기 β 글루칸을 첨가하고, 상기 어느 하나의 방법에 의해 β 글루칸 함유 유지 조성물을 조제해도 좋다.

[0060] 상기 β 글루칸의 함유량은, 본 발명의 조성물중, 이 β 글루칸 이외의 전 조성물 100중량부에 대하여, 바람직하게는 0.01~500중량부, 보다 바람직하게는 0.1~150중량부, 특히 바람직하게는 1~100중량부이다. β 글루칸의 함유량이 0.01중량부 미만이면, 최종 제품에서의 상기 β 글루칸의 기능성 효과가 얻어지지 않을 우려가 있고, 500중량부를 넘으면, 그 외의 성분의 종류에 상관없이 분말형상 내지 덩어리형상(lumpy)이 되어, 균일하게 β 글루칸이 혼합, 분산한 식용 유지 조성물이 되지 않고, 최종 제품으로 했을 때에 멍울이 남아서 β 글루칸의 분포가 불균일하게 되어 버리는 경향이 강하다.

[0061] 한편, 미생물류 또는 담자균류로부터의 추출액을 정제를 행하지 않고 그대로, 혹은 상기 추출액을 분체화, 고체화 처리만을 행한 것을 그대로 사용하는 경우, 상기 성분중의 β 글루칸의 순도는 1~100%, 바람직하게는 10~100%, 더욱 바람직하게는 20~100%이면 되고, 고순도일수록 좋다.

[0062] 본 발명의 β 글루칸 함유 유지 조성물에는, 상기 조성물중에서 β 글루칸이 멍울이나 덩어리가 되는 등의 불균일화를 보다 한층 억제하기 위해서, 유화제, 겔화제, 증점제, 안정제 등의 식품 첨가물을 첨가하는 것도 가능하다. 이들은 식용이면 특별히 한정되지 않으며, 유화제로서는, 예를 들면, 레시틴, 지방산 모노글리세라이드, 소르비탄 지방산 에스테르, 프로필렌글리콜 지방산 에스테르, 슈가에스테르 등을 들 수 있고, 증점제, 안정제로서는, 예를 들면, 플루란, 실리움(psyllium), 아라비아검, 젤란검(gellan gum), 글루코만난(glucomannan), 구아검, 크산탄검, 타마린드검(tamarind gum), 카라기난, 아르긴산염, 파셀란(farceran), 로커스트빈검(locust bean gum), 펙틴, 커드란 및 그들의 저분자화물, 전분, 화공전분, 각종 α 화 전분, 결정 셀룰로오스, 젤라틴, 텍스트린, 한천, 텍스트란 등을 들 수 있다. 그 외에, 포도당, 과당, 자당, 맥아당, 효소당화물엿, 젓당, 환원 전분당화물, 이성화액당, 자당 결합 물엿, 올리고당, 환원당 폴리텍스트로오스, 소르비톨, 환원 젓당, 트레할로오스, 크실로스(xylose), 크실리톨(xylitor), 말티톨(maltitol), 에리스리톨(erythritol), 만니톨, 플라토올리고당, 대두올리고당, 갈락토올리고당, 유과올리고당, 라피노스(raffinose), 락투로스(lactulose), 팔라티노스올리고당, 스테비아(stevia), 아스파라템 등의 당류, 인산염(헥사메타인산, 제2인산(secondary phosphates), 제1인산(primary phosphates), 구연산의 알칼리 금속염(칼륨, 나트륨 등) 등의 안정제, α -락토알부민이나 β -락토글로불린(lactoglobulin), 혈청 알부민 등의 유장 단백질(whey proteins), 카세인, 그 외의 유단백질, 저밀도 리포단백질(low density lipoprotein), 고밀도 리포단백질, 포스비틴(phosvitin), 리베틴(livetin), 인당단백질, 오브알부민(ovalbumin), 콘알부민(Conalbumin), 오보무코이드(ovomucoid) 등의 난단백질(卵蛋白質), 글리아딘, 글루테닌, 플로라민, 글루테린 등의 소맥단백질, 그 외 동물성 및 식물성 단백질 등의 단백질, 식염, 암염, 해염, 염화칼륨 등의 무기염류, 초산, 젓산, 글루콘산 등의 산미료, β -칼로틴, 카라멜(caramel), 홍국색소 등의 착색료, 토코페롤, 차 추출물 등의 산화방지제, 전란(全卵), 난황, 난백, 효소처리 계란 등의 계란류, 강력분, 중력분, 박력분 등의 곡류, 대두분말 등의 두류(豆類), 물, 착향료, 유제품, 조미료, pH조정제, 효소, 식품 보존일 유지 향상제, 과실, 과즙, 커피, 너트 페이스트(nut pastes), 향신료, 카카오 매스(cacao mass), 코코아 파우더를 함유시켜도 좋다. 이들 상기에 든 첨가물의 2종이상의 병용도 가능하다. 이들의 첨가물의 첨가량은 특별히 한정되지 않으며, 일반적인 양일 수 있고, 본 발명의 조성물 중, 예를 들면, 0.01

~15중량%이다.

[0063] 다음으로, 본 발명의 식품에 대해서 상세히 설명한다. 본 발명의 식품은, 상술한 본 발명의 β 글루칸 함유 유지 조성물을 함유하고 있는 것으로, 상기 유지 조성물로, 식품중의 종래의 유지의 일부 또는 전부를 치환한 것이다. 그 양태로서는, 마가린, 쇼트닝 등의 유지 식품은 물론, 베이커리 제품, 제과류, 쌀가공품, 소맥가공품, 옥수수가공품, 대두가공품, 건강식품, 약용식품 외에, 유지를 포함하는 모든 식품을 들 수 있다. 또한, 본 발명의 식품은, 예를 들면, 샐러드 오일, 프라이닝 오일(frying oil), 휘핑크림 등의 액상물(液狀物), 유동 쇼트닝 등의 유동상물(流動狀物), 혹은 기포성 유화기름이나 드레싱, 팻 스프레드(fat spreads), 카스타드 크림, 디핑크림 등의 페이스트형상물 또는 에멀전, 혹은 쇼트닝, 마가린, 캔디, 초콜릿, 카레루 등의 고체형상물의 어떠한 것이라도, 이들의 식품중의 유지의 일부 또는 전부를 본 발명의 β 글루칸 함유 유지 조성물로 치환하여, 종래와 동일한 사용 양태로 사용되는 것이다.

[0064] 다음으로, 본 발명의 베이커리 제품에 대해서 상세히 설명한다. 본 발명의 베이커리 제품은, 상술한 본 발명의 β 글루칸 함유 유지 조성물을 함유하고 있으며, 이 유지 조성물로, 베이커리 제품중의 종래의 유지의 일부 또는 전부를 치환하여 생지(生地;dough)를 조제하고, 이 생지를 소성한 것이다. 그 양태로서는, 예를 들면, 빵, 파이, 카스테라, 스펀지케이크, 버터케이크, 슈과자(puff pastries), 와플, 발효과자 등을 들 수 있다. 상기 생지를 조제하는 방법은 특별히 한정되지 않으며, 종래 공지의 방법에서 사용되고 있는 유지의 일부 또는 전부를, 본 발명의 β 글루칸 함유 유지 조성물로 치환함으로써 행할 수 있다. 예를 들면, 본 발명의 베이커리 제품이 빵인 경우, 빵 생지의 조제에 있어서는, 소맥분, 물, 이스트, 설탕, 식염 등의 일반적 제빵 원료와, 본 발명의 β 글루칸 함유 식용 유지 조성물을 공지의 조작과 동일한 조작을 실시함으로써 빵 생지를 얻을 수 있다. 예를 들면, 혼합 반죽 후, 본 발명의 β 글루칸 함유 유지 조성물을 롤인(roll-in)하고, 일반적 방법에 따라, 발효, 성형, 배로(焙爐) 등을 행하여 소성할 수 있다. 마찬가지로 예를 들면, 본 발명의 베이커리 제품이 겹파이(folded pies)라면, 롤인 유지(roll-in fat and oil) 또는 이겨서 넣은 유지의 일부 또는 전부를, 파이 크러스트(pie crust)라면, 침형상 또는 스트로(straw)형상 등의 소편(小片) 유지의 일부 또는 전부를, 스펀지 케이크라면, 기포성 유화기름 또는 케이크용 액상기름의 일부 또는 전부를, 본 발명의 β 글루칸 함유 유지 조성물로 치환해서 사용할 수 있다.

[0065] 베이커리 제품이 소성 공정을 수반하는 것인 경우, 미생물류나 담자균류를 β 글루칸의 공급원으로서 그대로 첨가, 사용하거나, 생지 작성 후에 β 글루칸을 그대로 첨가하거나, 분체 등에 β 글루칸을 그대로 혼합 후 생지 작성을 행하면, 생지중에서 멍울이 되기 쉽고, 멍울이나 덩어리가 된 경우는, 식품에 까슬까슬한 느낌이나 도톨도톨한 느낌, 수분의 불균일함, 경도의 차이에 기인한 위화감이 발생한다. 한편, 본 발명의 β 글루칸 함유 유지 조성물을 이용함으로써, β 글루칸이 균일하게 분산한, 멍울이나 덩어리가 극히 적은 생지를 얻을 수 있으며, 소성한 최종 제품은 이미(異味)를 느끼지 않을 뿐만 아니라, 부드러움이 대폭으로 증가한 식감이 좋은 베이커리 제품이 된다.

[0066] 다음으로, 본 발명의 제과류에 대해서 상세히 설명한다. 본 발명의 제과류는, 상술한 본 발명의 β 글루칸 함유 유지 조성물을 함유하고 있으며, 이 β 글루칸 함유 유지 조성물로, 제과류중의 종래의 유지의 일부 또는 전부를 치환해서 생지를 조제하고, 이 생지를 가공한 것이다. 그 양태로서는, 예를 들면, 생지를 프라이한 스낵, 도넛류, 찐케이크, 만두 등의 찌서 만든 과자류를 들 수 있다. 또한, 다른 양태로서, 상술한 본 발명의 β 글루칸 함유 유지 조성물과, 설탕, 향료 등을 혼합하고, 필요에 따라서 고화(固化) 성형한 캔디, 껌, 초콜릿, 틀에 넣어 굳힌 마른 과자 등 외에, 락토아이스 등의 빙과도 들 수 있다.

[0067] 제과류로서, 풍미뿐만 아니라, 식미, 특히 단맛을 소중히 하는 제과류를 얻고자 하는 경우에는, 멍울이 없는 것이 더욱 중요하며, 아주 약간의 멍울이라도, 즉시 위화감을 발생시켜 버려서, 상품가치가 저하된다. 본 발명의 β 글루칸 함유 유지 조성물에서는, 이미 β 글루칸이 균일하게 분산한 형태로 존재하고 있기 때문에, 제과류에 후첨가, 혼합하는 경우라도, 최종 제품인 본 발명의 제과류는, 함유하는 β 글루칸이 균일하게 분산하여, 멍울이 없으며, 또한 이미(異味)를 느끼는 일이 없는 양호한 풍미의 것이 된다.

[0068] 본 발명의 β 글루칸 함유 유지 조성물은, 생활습관병 예방 작용을 갖는 식품 성분을 포함한 식품 또는 의약품에 첨가해서, 그 작용을 증강하기 위하여 사용 가능하다. 예를 들면, 혈중 지질 농도를 적정화하는 고(高)불포화지방산(EPA, DHA), 혈청 콜레스테롤을 조절하는 식물스테롤, 및 그 에스테르화물, 디아실글리세롤(diacylglycerol), γ 리노렌산(linolenic acid), α 리노렌산, 비트화이버(beet fiber), 콘화이버(corn fiber), 실리움 종피(psyllium seed coat), 차폴리페놀(tea polyphenol), 레시틴, 혈압강화에 유효한 가다랭이포 펩티드(dried bonito peptide), 정어리 펩티드, 카세인 도데카펩티드(casein dodecapeptide), 대두 분리 단백질

등, 장내 환경을 개선해서 정장작용에 효험을 나타내는 유산균, 글루콘산, 올리고당, 각종 식물섬유 등을 포함하는 식품이나 의약품이다. 그 외에, 건강 기능성을 갖는 것이 알려져 있는, 클로렐라, 스피루리나, 봉랍(propolis), 키틴(chitin), 키토산, 핵산, 영지, 주름버섯(agaricus), 은행잎 엑기스, 나한과(羅漢果), 심황(turmeric), 가르시니아(garcinia), 애플화이버(apple fiber), 짐네마(gymnema), 콜라겐, 블루베리, 알로에, 톱 팔메토(saw palmetto), 식물 발효 효소, 대두 이소플라본(soybean isoflavon), 엽녹소, 로얄제리, 고려인삼, 프룬(prune), 카밀레(chamomile), 사향초(thyme), 셀비어(sage), 페퍼민트, 레몬 밤(lemon balm), 당아욱(mallow), 오레가노(oregano), 캐트닙 티(cat nip tea), 서양가새풀(yarrow), 히비스커스(hibiscus) 등의 허브류에, 본 발명의 β 글루칸 함유 유지 조성물을 첨가해서 생체 조절 기능성을 증강한 식품 또는 의약품을 얻을 수 있다.

[0069] 또한, 본 발명의 β 글루칸 함유 유지 조성물은, 쌀가공품, 소맥가공품, 옥수수가공품, 대두가공품에 첨가해서, 기능성을 부여, 증강하는 것이 가능하다. 예를 들면, 쌀밥류(냉동 쌀밥·무균 쌀밥); 라이스 누들(rice noodles), 아라레(주사위같이 잘게 썰어 말린 찰떡), 센베이 등의 쌀가공품; 상기에 들었던 베이커리 제품, 제과류 외에, 파스타, 메밀국수, 우동, 호우도우(houtou noodles), 중화면 등의 면류; 그 외 소맥가공품; 조식(朝食) 시리얼, 콘플레이크와 같은 옥수수가공품; 두부나 두유, 두유음료, 두부겉질, 유부(얇게 썰어서 기름에 튀긴 두부), 두껍게 썰어서 살짝 튀긴 두부, 간모도키(유부의 한가지, 으갠 두부에 잘게 썬 야채나 다시마 등을 넣고 기름에 튀긴 것), 팔소, 된장 등의 대두가공식품을 들 수 있다. 또한, 그 외에, 우유가공품, 요구르트, 유청음료, 유산균 음료; 버터, 치즈 등의 유제품; 양갱, 모나카(참쌀가루 반죽을 얇게 밀고, 이것을 둥글게 잘라서 구운 것 두 조각 사이에 팔소를 채운 일본 과자), 소(sweet bean jam)와 같은 일본식 과자류; 보타주 수프, 스튜, 카레 등의 수프류; 간장, 소스, 타레(조미한 진한 국물), 잼, 토마토케첩 등의 조미료류; 소세지와 같은 가축 고기 가공품; 어묵, 사쓰마아게(어육(魚肉)을 갈아서 소금·설탕·녹말을 넣고, 다시 잘게 썬 당근·우엉 등을 섞어 기름에 튀긴 식품) 등의 수산 반죽 제품을 비롯한 모든 식품에 첨가할 수 있다.

[0070] β 글루칸을 얻기에 적합한 미생물류로서, 전술한 종래의 미생물 중에서는, 아우레오바시디움속의 미생물을 들 수 있으나, 본 발명은 β 글루칸의 생산에 우수한 신규의 미생물을 제공하는 것이다. 이하에 그 미생물의 상세한 것에 대하여 서술한다.

[0071] 본 발명의 미생물은, 18S rRNA 유전자의 1732염기의 배열이 배열표의 배열번호 1에 나타내는 염기배열, 또는 이 염기배열과 18S rRNA 유전자의 염기배열에 기초하는 분자 계통학상 동등한 염기배열을 포함하고, 또한 스트렙토미세스 그리세우스(*Streptomyces griseus*) 등에 의해 생산되는 항생물질인 시클로헥시미드(cycloheximide)에 대한 저항성을 가지며, 또한, β 글루칸을 균체 밖에 분비 생산하는 능력을 갖는 미생물, 및, ITS-5.8S rRNA 유전자의 563염기의 배열이 배열표의 배열번호 2에 나타내는 염기배열, 또는 이 염기배열과 ITS-5.8S rRNA 유전자의 염기배열에 기초하는 분자 계통학상 동등한 염기배열을 포함하고, 또한, β 글루칸을 균체 밖에 분비 생산하는 능력을 가지며, 바람직하게는 또한 스트렙토미세스 그리세우스(*Streptomyces griseus*) 등에 의해 생산되는 항생물질인 시클로헥시미드(cycloheximide)에 대한 저항성을 갖는 미생물이다.

[0072] 이들의 본 발명의 미생물은, 상기와 같은 특징을 갖는 미생물이면, 야생주, 보존주, 기탁기관에 기탁되어 있는 균주, 변이주 [UV 조사나, 예를 들면, N-메틸-N'-니트로소구아니딘(nitrosoguanidine)(NTG), 아크리딘(acridine), 에탄메탄술포네이트(EMS), 아질산 등의 화학물질에 의한 화학처리에 의해 돌연변이를 유발시킨 변이주], 혹은, 세포융합 혹은 유전자 재편성주(株) 등의 생물공학·유전자 공학적 방법에 의해 유도된 개량균주 등, 어떠한 균주여도 좋다.

[0073] 본 발명의 미생물은, 환경, 예를 들면, 식품·야채·과일·실내외의 공기중(낙하균)·마루·벽·천장·지붕·모르타르(mortar)·콘크리트·타일의 메지·샤워커텐, 비닐 클로스(cloth)·냉장고·세탁기·배스터브(bathtubs)·실내 먼지, 식물체 표면·토양·하천·호소(湖沼)·해수 등으로부터도 얻을 수 있다.

[0074] 본 발명자들은, 실시예에 상세한 것을 나타내는 바와 같이, 환경중에서 본 발명의 미생물을 분리하였다. 분리한 본 발명의 미생물 중에는, 아우레오바시디움(*Aureobasidium*)속에 속하는 미생물이 보여졌다. 그 중에서도, 순도가 높으며, 비착색성의 β 글루칸을 효율적으로 균체 밖에 분비 생산할 수 있는 1균주를 ADK-34 균주라고 명명하였다. 이 균주는 독립행정법인 산업기술 종합연구소 특허 생물기탁 센터(주소 성명: 일본국 이바라키켄 츠쿠바시 히가시 1초메 1반치 1 중앙 제6(우편번호 305-8566)에, 미생물의 표시(기탁자가 부여한 식별을 위한 표시)「*Aureobasidium pullulans* ADK-34」, 수탁번호 「FERM BP-8391」로서 2003년 6월 2일에 기탁되어 있다.

[0075] 또한, 약제 내성에 대해서는, 그 균주의 컨디션, 배지(培地)의 종류, 배양기간에 따라 내성을 나타내는 농도가

다른 경우가 있으므로, 본 발명에 있어서 「시클로헥시미드에 대한 저항성을 갖는다」는 것은, IFO-4466주, IFO-6353주 및 IFO-7757주를 기준으로 해서, 이들의 균주와 비교하여, 시클로헥시미드에 대한 저항성을 갖는 것을 말한다. 즉, 시클로헥시미드를 함유하는 고형 배지(한천(寒天) 플레이트)에 균주를 접종하고, 26℃에서 10일간 배양했을 때, 이들의 IFO 균주의 생육이 보이지 않는 시클로헥시미드 농도를 갖는 고형 배지에서, 직경 0.1mm이상, 바람직하게는 0.3mm이상, 더욱 바람직하게는 0.5mm이상의 균체 증식에 의한 콜로니 형성이 관찰되는 경우를 말한다. 통상, 이들의 IFO 균주는 고형 배지중의 시클로헥시미드 농도가 20 μ g/ml 이상이면 생육이 보이지 않는다.

[0076] 또한, 본 발명에 있어서, 비착색성 혹은 착색이 억제된, 균주 혹은 배양액 또는 β 글루칸이란, 배양액을 적당히 희석하고, 균체를 원심분리(10000xg, 10min.)에 의해 제거한 배양 희석액의 흡광도를 490nm에서 측정하고, 동일하게 배양하여 얻은 IFO-6353주의 배양 희석액의 490nm에 있어서의 흡광도가 0.1이상을 나타내는 조건에 있어서, 본 발명의 미생물의 균주의 경우, 0.099이하, 바람직하게는 0.060이하, 더욱 바람직하게는 0.050이하인 경우를 말한다.

[0077] 또한, 본 발명에 있어서, 고순도란, 후기하는 분석예 3에 나타내는 생성 다당의 폴루란에 대한 순도 측정에 있어서, 폴루라나아제(pullulanase) 효소처리를 행했을 때, 효소처리 후의 페놀 황산값(phenol-sulfuric acid value)의 효소처리 전의 페놀 황산값에 대한 비가 75%이상, 바람직하게는 85%이상, 더욱 바람직하게는 90%이상인 것을 말한다.

[0078] 본 발명의 미생물은 β 글루칸을 고순도로 고효율로 균체 밖에 생산시키는 데 유용하다. 본 발명의 미생물이 생산하는 상기 β 글루칸은, 그 구조에 적어도 β -1,3-D-글루코피라노스 결합을 갖는 β 글루칸인 것이 바람직하다.

[0079] 본 발명의 미생물을 사용한 β 글루칸의 제조방법의 바람직한 실시형태에 대해서, 이하에 설명한다.

[0080] 본 발명의 미생물을 사용한 β 글루칸의 제조방법에 있어서는, 본 발명의 미생물의 균주를 상기 미생물이 생육 가능한 배지에 작용시켜서, 균체 밖의 배지 중에 β 글루칸을 생산시키면 된다. 또한, 본 발명의 미생물의 균주를 배양해서 얻어진 배양균체를 분리하고, 이 배양균체를 β 글루칸의 기질(基質)인 당류를 포함한 용액 혹은 배지에 작용시켜서, 균체 밖에 β 글루칸을 생산시켜도 좋다. 단, 균체 밖의 분비가 준비된 분비형의 β 글루칸을 균체 내에 내포하고 있는 경우도 있으므로, 이와 같이 균체 내에 분비를 위해서 준비 축적되어 있는 β 글루칸도, 본 발명에 있어서는 균체 밖에 분비되는 β 글루칸으로 한다.

[0081] 본 발명의 미생물을 사용한 β 글루칸의 제조방법에 있어서, 본 발명의 미생물의 균주를 배양하는 배지로서는, 아우레오바시디움(Aureobasidium)속에 속하는 미생물이 통상 이용할 수 있는 영양원(탄소원, 질소원, 무기염류)을 포함하고, 또한 필요에 따라서 유기 영양원을 포함하는 통상의 배지를 사용할 수 있으나, 탄소원으로서 당류를 함유하는 배양액이 바람직하다. 이들의 배지로서는, 각종의 합성 배지, 반합성 배지, 천연 배지 등 어떠한 것도 이용 가능하다.

[0082] 상기 탄소원으로서, 당류가 바람직하며, 이 당류로서는, 글루코오스(glucose), 프락토오스(fructose), 만노오스, 갈락토오스(galactose), 크실로오스(xylose), 아라비노오스(arabinose) 등의 단당류, 수크로오스(sucrose), 말토오스(maltose), 락토오스, 트레할로오스 등의 2당류, 락토올리고당, 자일로올리고당 등의 올리고당류, 텍스트린이나 전분 등의 다당류를 들 수 있으며, 이들을 단독 또는 조합해서 사용할 수 있다. 이들 중에서도, 주(主) 탄소원으로서, 글루코오스, 프락토오스 등의 6탄당, 수크로오스, 락토오스 등의 2당류, 전분이나 텍스트린, 혹은 이들 탄수화물의 가수분해물 등의 다당류를 사용하는 것이 바람직하다. 또한, 비트주스(beet juice), 사탕수수 주스(sugarcane juice), 감귤류를 비롯한 과일주스, 혹은 이들의 주스에 당을 첨가한 것 등을 사용할 수도 있다. 이 외에, 글리세롤, 에틸렌글리콜 등의 알코올류, 만니톨, 소르비톨, 에리스리톨 등의 당알코올류, 유기산 등의 그 외의 탄소원을 적절히 사용할 수 있다. 이들의 탄소원은, 배양 도중에 수시로 첨가해도 좋고, 예를 들면, 수크로오스 등의 당류를 배지중에 바람직하게는 3~500g/l, 더욱 바람직하게는 5~300g/l, 가장 바람직하게는 10~200g/l의 농도범위가 되도록 적절히 공급하면, β 글루칸의 생산속도·생성량을 상대적으로 증대시킬 수 있다.

[0083] 상기 질소원으로서, 펩톤, 고기 엑기스, 대두분(大豆粉), 카세인, 아미노산, 맥아 엑기스, 옥수수 침지수(corn steep liquor), 카세인 분해물, 효모 엑기스, 요소 등의 유기 질소원, 질산나트륨, 황산암모늄, 암모니아가스, 암모니아수 등의 무기질소원을 단독 또는 조합해서 사용할 수 있다.

[0084] 상기 무기염류로서는, 예를 들면, 염화나트륨, 염화칼륨, 탄산칼슘, 황산마그네슘, 인산나트륨, 인산칼륨, 염화

코발트 등의 염류, 중금속류 염 등을 사용할 수 있으며, 필요에 따라서 비타민류도 첨가 사용할 수 있다. 한편, 배양 중에 발포가 발생하는 경우에는, 공지의 각종 소포제를 적절히 배지중에 첨가할 수도 있다.

[0085] 본 발명의 미생물의 균주의 배양조건에는, 각별한 제한은 없으며, 그 균주가 양호하게 생육할 수 있는 범위내에서 적절히 선택할 수 있다. 통상, pH5.0~8.5, 20℃~35℃에서 2~8일간 정도 배양하면 되지만, 이들의 배양조건은 사용 미생물 균주의 종류나 특성, 외부조건 등에 따라서 적절히 변경할 수 있으며, 최적 조건을 선택할 수 있다. 또한, 배지에의 균주의 접종량은, 플라스크 배양의 경우는 1백금이(白金耳), 스케일 업의 경우는 종배양액을 본배양액의 1~10%(v/v) 첨가하는 것이 바람직하지만, 실질적으로 배양 가능하다면 이에 한정되는 것은 아니다.

[0086] 본 발명의 미생물의 균주의 배양은, 통기교반, 진탕(shaking) 등에 의한 호기적 조건하에서 행한다. 배양시간은 목적으로 하는 β글루칸의 생성 농도에 도달할 때까지 행해지는 것이 바람직하며, 통상 2~5일간 행해진다. 또한, 연속적으로 β글루칸의 기질인 당류나 배지 성분을 연속 첨가해서, β글루칸을 연속적으로 생산해도 좋다. β글루칸의 기질인 수크로오스 등의 당류는 분말 그대로거나, 혹은 고농도로 물에 용해시킨 액당으로서 배양액에 첨가할 수 있으며, 그 첨가량은 배양액 11당 0.1~500g이 바람직하다. 첨가량을 500g/1보다 많게 하면, 생산속도가 현저하게 늦어져서 바람직하지 않다. 기질 첨가 후는, 바람직하게는 25~35℃에서 1~7일간, 특히 약 2~5일간, 진탕 혹은 통기교반 등의 조작을 행하여, 호기적 조건하에서 반응을 진행시킴으로써, 기질인 수크로오스 등의 당류로부터 β글루칸을 제조할 수 있다.

[0087] 또한, 본 발명의 미생물의 균주를 배양함으로써 얻어진 배양균체를 분리해서, 상기 배양균체 혹은 상기 배양균체의 추출액을 촉매로 하여 β글루칸을 제조할 수도 있다. 이 경우는, 배양균체, 배양균체 조제물 또는 배양균체 처리물의 현탁액에, 기질인 당류 용액 혹은 배지를 첨가하면 된다. 상기 배양균체 조제물로서는, 상기 배양균체를 예를 들면 균질화(homogenizing)한 세포 파쇄액 등을 들 수 있으며, 또한, 상기 배양균체 처리물로서는, 배양균체 혹은 세포 파쇄액을 알긴산겔(alginate gel)중, 이온교환 수지, 세라믹, 키토산 등에 고정화한 고정화 균체 등을 들 수 있다. 이들의 배양균체, 배양균체 조제물 또는 배양균체 처리물의 현탁액의 조제에 사용할 수 있는 용액으로서, 상기한 배지, 혹은 트리스-초산(tris-acetic acid), 트리스-염산(tris-hydrochloric acid), 호박산 나트륨(sodium succinate), 구연산 나트륨(sodium citrate), 인산 나트륨(sodium phosphate), 인산 칼륨(potassium phosphate) 등의 완충액을 단독 또는 혼합한 것을 들 수 있다. 상기 완충액의 pH는 바람직하게는 3.5~9.0, 더욱 바람직하게는 5.0~8.0, 가장 바람직하게는 5.2~7.8이다. 상기 현탁액중의 배양균체의 양은 특별히 한정되는 것은 아니지만, 바람직하게는 현탁액 내의 부피비(wet volume basis)로 0.1~10%정도가 좋다.

[0088] 상기 현탁액에의 기질인 당류나 배지의 첨가는, 어떠한 농도, 어떠한 용량이라도 실시할 수 있으나, 1회당의 기질의 첨가량은, 균체의 활성을 유지할 수 있는 범위가 바람직하다. 예를 들면, 현탁액 11당 0.1~500g을 1회 또는 수회로 나눠서 첨가해도 좋고, 0.5~500g/day 정도로 연속적으로 첨가해도 좋다. 균체와 기질을 작용시킨 용액을, 임의의 시간과 온도에서 인큐베이션(incubation)함으로써, β글루칸을 생산시킬 수 있으나, 상기 인큐베이션은, 상술한 본 발명의 미생물의 균주의 배양과 동일한 조건에서 실시하는 것이 바람직하다.

[0089] 상기와 같이 배양한 후, 균체 밖에 분비 생산된 β글루칸은, 통상적인 방법에 따라서, 배양액으로부터 분리, 채취된다. 구체적으로는, 배양액으로부터 원심분리, 여과 등에 의해 균체 등의 고형물을 분리 제거하거나, 활성탄, 이온교환 수지 등에 의해 불순물이나 염류를 제거하는 등, 다양한 기지(既知)의 정제 수단을 선택, 조합해서 행할 수 있다. 또한, 예를 들면, 소수성 수지에의 흡착·용출, 에탄올, 메탄올, 초산에틸, n-부탄올 등을 사용한 용매 침강, 실리카겔 등에 의한 칼럼법 혹은 박층크로마토그래피, 역상칼럼(reverse phase column)을 사용한 분취용 고속액체크로마토그래피 등, 단독 혹은 적절히 조합, 경우에 따라 반복 사용함으로써, 분리 정제할 수 있다.

[0090] 또한, 균체 밖에 분비 생산된 β글루칸을 상기의 방법으로 분리하기 전후에 있어서, 균체의 살균을 실시해도 좋다. 살균 온도는, 균체가 사멸하는 온도이면 특별히 한정되는 것은 아니지만, 바람직하게는 50℃이상, 더욱 바람직하게는 60℃, 가장 바람직하게는 80℃이상이다. 또한, 더욱 온도를 올려서, 예를 들면, 90℃이상, 혹은 가압하 121℃에서, 균체 내에 준비되어 있는 분비형의 β글루칸을 열수 추출할 수 있다. 살균 시간 및 열수 추출 시간은, 임의의 시간을 설정할 수 있으나, 바람직하게는 10분이상, 8시간이하, 더욱 바람직하게는 15분이상 6시간이하, 가장 바람직하게는 30분이상 2시간이하로 하면, 불순물의 혼입이 억제되어, β글루칸이 열화하지 않으므로 바람직하다.

[0091] 또한, 본 발명의 미생물을 대신해서, ITS-5.8S rRNA 유전자의 배열이 배열표의 배열번호 2에 나타내는 염기배

열과 98%이상의 상동성(相同性)을 나타내는 미생물을 사용해서, 상술과 동일하게 하여 β 글루칸을 제조할 수도 있다.

- [0092] 또한, 아우레오바시디움 풀루란스(Aureobasidium pullulans) ADK-34(FERM BP-8391) 균주를 사용해서 β 글루칸을 제조하면, 그 구조에 적어도 β -1,3-D-글루코피라노스 결합을 갖는 β 글루칸을 얻을 수 있기 때문에 바람직하다.
- [0093] 본 발명의 미생물을 사용한 β 글루칸의 제조방법은, 지금까지 알려져 있는 아우레오바시디움 풀루란스의 균주, 혹은 아우레오바시디움속에 속하는 미생물을 사용한 배양과 비교하면, 풀루란의 생산이 현저하게 억제되어 있기 때문에, 배양물로부터의 β 글루칸의 분리가 용이하고, 또한 고순도의 β 글루칸을 얻기 위한 정제 조작을 간략화할 수 있다는 이점이 있다. 또한, 아우레오바시디움속에 속하는 미생물, 효모, 유산균 등의 균체의 세포벽이나 담자균류나 식물로부터의 추출 β 글루칸과 비교하여 불순물이 적으며, 단리·정제 조작을 간략화할 수 있음과 동시에, β 글루칸의 착색이 현저하게 억제되어 있으므로, 고품질이며 일정한 품질을 유지한 β 글루칸을 안정적으로 얻는 것이 용이하다.
- [0094] 본 발명에서 얻어지는 β 글루칸은 착색이 없으며, 고품질이고, 그대로, 혹은 다른 제품에 첨가함으로써, 다양한 용도에 사용할 수 있다.
- [0095] 본 발명에서 얻어지는 β 글루칸의 용도로서는, 식품, 식품 첨가제, 화장품(cosmetics), 화장품류 제품(toiletries), 화성품, 의약품 등을 들 수 있다.
- [0096] 식품의 구체예를 이하에 든다.
- [0097] 유지 식품으로서, 마가린, 쇼트닝, 마요네즈, 크림, 샐러드 오일, 프라이닝 오일(frying oil), 휘핑크림, 기포성 유화기름, 드레싱, 팻 스프레드(fat spreads), 카스타드 크림, 디핑크림 등을 들 수 있다. 본 발명에서 얻어진 β 글루칸은, 유지와의 상용성이 우수하며, 상술한 바와 같이, 유지에 첨가해서, β 글루칸을 함유하는 유지 조성물(본 발명의 β 글루칸 함유 유지 조성물)로 하고 나서, 다른 원료와 함께 사용하는 것이 바람직하다.
- [0098] 또한 곡류 관련 제품으로서, 소맥분을 주성분으로 한 식품, 쌀류를 주성분으로 한 식품, 쌀가공품, 소맥가공품, 옥수수가공품, 대두가공품 등을 들 수 있으며, 예를 들면, 식빵, 과자빵, 파이·테니스 등의 베이커리 제품, 핫케이크, 도넛, 피자, 튀김 등, 또한 그들의 프리믹스(premixes), 비스킷, 쿠키, 스낵 등의 과자류, 생면, 건면, 즉석면, 컵면, 우동, 메밀국수, 중화면, 라이스 누들(rice noodles), 파스타류 등의 면류, 취반미(炊飯米;boiled rice), 떡, 무궁쌀밥, 레토르트 취반미(retort pouch boiled rice), 상신분, 찹쌀분(glutinous rice flour), 경단, 설탕, 아라레(주사위같이 잘게 썰어 말린 찰떡) 등의 쌀제품을 들 수 있다.
- [0099] 또한, 과자류로서는, 초콜릿, 캔디·드롭(drops), 엿, 츄잉껌, 구워서 만든 과자, 케이크, 만두 등의 양과자 또는 일본식 과자 등을 들 수 있다.
- [0100] 또한 가축 고기 가공품으로서, 햄·소세지, 햄버그 스테이크 등을 들 수 있으며, 수산 가공품으로서, 치쿠와(으깬 생선살을 가는 대나 낚시 등 금속의 막대에 감듯이 발라서 굽거나 찢 식품), 어묵, 사쯔마아게(어육(魚肉)을 갈아서 소금·설탕·녹말을 넣고, 다시 잘게 찢 당근·우엉 등을 섞어 기름에 튀긴 식품), 어육 소세지 등을 들 수 있다.
- [0101] 또한 유제품으로서, 버터, 치즈, 아이스크림, 요구르트 등을 들 수 있다.
- [0102] 또한, 음료로서는, 맥주, 술, 일본술, 위스키, 브랜디, 양주, 소주, 증류주, 발포주, 와인, 과일주 등의 알코올 음료, 커피, 홍차, 일본차, 우롱차, 중국차, 코코아, 탄산음료, 영양드링크, 스포츠드링크, 커피드링크, 탄산음료, 유산균 음료, 과즙·과실 음료 등의 음료를 들 수 있다.
- [0103] 또한 조미료, 소스류로서는, 스파이스(spices), 타레(조미한 진한 국물), 불고기 양념(dressings for meat), 드레싱 소스, 된장, 간장, 카레, 해시(hashed beef sauce mixes) 등의 루(roux)를 들 수 있다. 또한 수프로서는, 옥수수수프, 감자수프, 호박수프 등의 수프를 들 수 있다. 그 외, 잼, 땅콩버터, 후리카케(밥에 뿌려서 먹는, 어육·김 따위를 가루로 만든 식품) 등을 들 수 있다.
- [0104] 또한 장기보존 식품으로서, 수산물, 가축 고기, 과일, 야채, 버섯, 콘비프, 잼, 토마토 등의 통조림 또는 병조림, 냉동식품 등을 들 수 있으며, 또한, 카레, 스튜, 미트소스, 마파두부, 식육 야채 혼합 스튜(stew of meat with vegetables), 수프, 쌀밥 등의 레토르트 식품을 들 수 있다. 또한, 분말식품으로서, 음료, 수프, 된장국 등의 분말 인스턴트 식품 등을 들 수 있다.

- [0105] 또한, 건강식품, 약용식품, 이유식 등의 육아용 식품, 유동식 등의 병인식, 노인식, 다이어트식, 보조식품(supplementary foods) 등을 들 수 있다.
- [0106] 또한, 전자레인지 가열식품, 전자레인지 조리식품 등을 들 수 있다.
- [0107] 식품 첨가제로서는, 유화제, 증점제, 증점안정제, 품질개량제, 산화방지제, 안정제, 보존료, 향료, 감미료, 착색료, 표백제, 산미료, 껌베이스(gum bases), 조미료, 고미료(苦味料;bittering agents), 영양강화제, 향신료, 제조용제 등을 들 수 있다.
- [0108] 화장품, 화장품류 제품(toiletries)으로서는, 피부 화장품, 두발용 화장품, 약용 화장품, 구강용제 등을 들 수 있으며, 구체적으로는, 화장수, 유액, 스킨밀크, 크림, 연고, 로션, 칼라민 로션(calamine lotions), 선스크린제(sun screens), 썬텐제, 애프터셰이브 로션(after-shave lotions), 프리셰이브 로션(pre-shave lotions), 메이크업 베이스(makeup bases), 팩료(beauty masks), 클렌징료, 세안료, 여드름 대책 화장료(antiacne cosmetics), 에센스 등의 기초 화장료; 파운데이션, 백분, 아이섀도, 아이라이너, 아이브로우, 치크컬러(cheek colors), 립스틱, 네일컬러 등의 메이크업 화장료; 샴푸, 린스, 컨디셔너, 헤어컬러, 헤어토닉, 세트제, 정발료, 욱모료, 양모제, 보디 파우더, 데오드란트, 탈모제, 비누, 보디샴푸, 핸드소프, 향수, 치약, 구강 케어 제품, 입욕제 등을 들 수 있다.
- [0109] 화성품으로서는, 계면활성제, 유화제, 증점제, 점도조정제 등을 들 수 있다.
- [0110] 의약품으로서는, 콜레스테롤 저하작용, 정장작용, 혈당치 상승을 억제하는 작용 등을 가지며, 생활습관병을 예방하는 의약품, 면역 증강작용을 갖는 의약품 등을 들 수 있다.
- [0111] 이하, 실시예에 의해 본 발명을 더욱 구체적으로 설명하지만, 이들은 본 발명을 한정하는 것은 아니다. 한편, "부" 및 "%"는 특별히 기재하지 않는 한 중량 기준이다.
- [0112] [분석예] (β 글루칸의 확인방법과 함유량의 측정방법)
- [0113] 다당중의 β 글루칸의 분석은, 알코올에 의해 침전하는 전 다당량을 페놀 황산법(phenol-sulfuric acid method)으로 측정하고, 이어서, 침전시킨 다당중의 β 글루칸의 확인·정량을 세이 가가쿠 고교(주)의 β -1,3-D-글루코피라노스 결합을 포함하는 β 글루칸의 검출·측정용 키트(kit)를 사용해서 행하였다. 이하에 그 순서를 설명한다.
- [0114] 우선, 측정 샘플중의 전 다당량을 페놀 황산법으로 측정하였다. 즉, 샘플용액 30 μ l에 증류수 30 μ l를 첨가하고, 여기에 300mM의 NaCl을 포함하는 인산 완충액(pH6.9)을 120 μ l 첨가하며, 또한 에탄올 540 μ l(3배량)를 첨가하고, -15℃에 10분간 방치해서 다당을 침전시켰다. 상청(上清; supernatant liquid)을 제거한 후, 100 μ l의 증류수를 첨가해서 침전을 용해시켰다. 여기에 5중량% 페놀 수용액 100 μ l 및 황산 500 μ l를 첨가해서 반응시킨 후, 이 용액의 490nm에 있어서의 흡광도를 측정하였다. 또한, 샘플을 첨가하지 않고 증류수 100 μ l에 5중량% 페놀 수용액 100 μ l 및 황산 500 μ l를 첨가한 것을 블랭크(blank)로 하고, 이 블랭크의 490nm에 있어서의 흡광도를 측정하였다. 플루란의 10mg/ml로부터 2배 희석계열을 작성한 것을 표준 샘플로 하고, 이 표준 샘플을 사용해서 검량선을 작성하며, 이 검량선과 상기 흡광도로부터, 샘플중의 전 다당량의 정량을 실시하였다.
- [0115] 다음으로, 전 다당량이 0.1~1mg/ml 전후의 용액을, 우선, 1.0M의 NaOH로 10배 희석하고, 이어서 β 글루칸 프리(β -glucan-free)의 증류수로 희석해서, 10¹⁰ 배까지 희석하여, β 글루칸 희석액을 조제하였다. β 글루칸 희석액 50 μ l를 튜브에 넣고, 주반응 시약(main reaction reagent) 50 μ l를 첨가하여, 37℃에서 30분간 인큐베이트하였다. 계속해서, 아질산나트륨 용액 50 μ l, 술폰아민산암모늄 50 μ l, N메틸-2-피롤리돈 용액(N-methyl-2-pyrrolidone solution) 50 μ l를 첨가하고, 반응시킨 후, 용액의 545nm(대상 파장 630nm)에 있어서의 흡광도를 측정하였다. 또한, 첨부의 β 글루칸 표준품을 사용해서 7.5~60pg/ml의 β 글루칸 용액을 조제하고, 검량선을 얻었다. 이 검량선과 상기 흡광도로부터, 각 β 글루칸 희석액의 농도를 산출하고, 샘플중의 β 글루칸량을 구하였다.
- [0116] [분석예 2] (β 글루칸의 분자량 측정방법)
- [0117] β 글루칸의 분자량 측정은 이하와 같이 하였다. 샘플에 3배량의 알코올을 첨가하고, -20℃로 냉각해서 10분간 방치하여, 침전을 얻었다. 침전시킨 β 글루칸 5mg을 튜브에 넣고, 1ml의 증류수를 첨가해서, 비등수(沸騰水)중에서 용해시켰다. 이 용액을 0.22 μ m의 필터를 통과시켜 HPLC용의 샘플로 하였다. 분리에는 HPLC 겔 여과 칼럼(gel-filtration column)인 Shodex의 팩드 칼럼(Shodex-packed column) KS-805(쇼와 덴코사(Showa Denko K.

K.)제)를 사용해서, 유속 0.6ml/min., 온도 50℃로 하고, 검출에는 RI검출기를 사용하며, 물을 분리 용매로서 사용해서 실시하였다. 분자량 마커(marker)로서는 Shodex 폴루란 표준액 P-82(쇼와 덴코사제)를 사용해서 측정하였다.

[0118] [분석예 3] (배양액중에 존재하는 다당의 폴루란에 대한 순도의 측정방법)

[0119] 폴루란을 특이적으로 분해하는 효소인 폴루라나아제(pullulanase)(와코 준야쿠 고교사(Wako Pure Chemical Industries, Ltd.)제)를 사용해서, 배양액중에 생산된 다당의 폴루란에 대한 순도를 측정하였다. 즉, 폴루라나아제에 의한 효소 소화 반응의 전후에서 다당량을 측정하고, 효소처리 후의 다당량(폴루라나아제에 의해 소화되지 않은 다당량)과 효소처리 전의 다당량으로부터 생성 다당의 폴루란에 대한 순도를 산출하였다. 이하에 다당량의 측정방법을 상세히 서술한다.

[0120] 우선, 폴루라나아제 효소 희석액 50 μ L에 구연산 완충용액(10mmol/L 구연산-20mmol/L 인산 완충용액(pH6.0)) 2mL를 첨가한 것을 효소 용액으로 하였다. 양성 대조군(positive control)으로서, 폴루란(도쿄 가세이 고교사(Tokyo Kasei Kogyo Co., Ltd.)제)을 10mg/mL에 희석한 용액을 표준 샘플 용액으로서 사용하였다. 배양액 혹은 표준 샘플을 30 μ L씩, 2개의 샘플 튜브(1.5mL용량)에 넣고, 한쪽에 효소 용액 30 μ L를 첨가하며, 한쪽에 PBS 30 μ L를 첨가하고, 37℃에서 1시간 반응시켰다. 반응 종료 후, 각 샘플에 3배량의 에탄올을 첨가하였다. 잘 교반하고, -15℃에서 10분간 인큐베이트(incubate)한 후, 4℃, 15000rpm으로 10분간 원심분리를 행하며, 상청을 버리고, 튜브를 건조시켜서 침전을 얻었다. 침전에 증류수 100 μ L를 첨가하고, 교반하며, 5중량% 페놀 수용액 100 μ L를 첨가하고, 신속하게 황산 500 μ L를 첨가하여 발색시켰다. 냉각 후, 96웰 마이크로플레이트(96-well microplate)에 100 μ L씩 나누어 주입하고, 증류수에 5중량% 페놀 수용액 및 황산을 첨가한 경우를 블랭크로 하여, 490nm의 흡광도를 측정하였다. 또한, 폴루란을 10mg/ml~1 μ g/ml로 희석한 용액으로 검량선을 작성하였다. 이 검량선과 상기 흡광도로부터, 효소 소화 반응 전후의 배양액중의 다당량을 각각 정량하고, 배양액중에 존재하는 다당의 폴루란에 대한 순도를 산출하였다. 한편, 표준 샘플인 폴루란 용액을 효소 소화한 경우, 10mg/ml 용액에서는 90%이상의 소화율이, 1mg/ml의 농도의 용액에서는 95%이상, 0.1mg/ml이하에서는 98%이상의 소화율이 얻어졌다. 이상과 같이, 폴루란이 생성하고 있는 경우는, 폴루라나아제의 작용에 의해, 효소처리 후의 페놀 황산값(흡광값)은 저값이 되며, 예를 들면 흡광값이 50% 감소하고 있는 경우는, 다당의 폴루란에 대한 순도는 50%라고 산출하였다.

[0121] [제조예 1] (버섯 유래 β 글루칸의 조제)

[0122] 1)버섯 추출액의 조제

[0123] 신령버섯(Agaricus blazei)의 자실체를 파쇄하여, 분쇄하고, 그 분쇄물 10kg에 열수(熱水) 50리터를 첨가하며, 자비(煮沸) 조건하에서 부드럽게 교반하면서 3시간, 열수 추출 처리하였다. 열수 추출 처리한 후, 원심분리해서, 그 분리액을 얻었다.

[0124] 2)버섯 추출액의 정제물의 조제

[0125] 상기 1)에서 얻은 분리액에 3배량의 99% 에틸알코올을 첨가하고, 침전물을 얻으며, 냉결건조해서, 조정제물(粗精製物; crude product) 1200g(버섯 유래 β 글루칸 조정제물:샘플 A)을 얻었다. 샘플 A의 1g중에 포함되는 β 글루칸량은 860mg으로 산출되었다. 또한, 최대 피크(peak)의 분자량은 100만을 나타내었다.

[0126] 3)버섯 효소 처리 추출물의 조제

[0127] 신령버섯의 자실체 1kg에 2리터의 물을 첨가하고, 믹서로 파쇄하였다. 이것에 2g의 판셀라아제(Funcelase)(야쿠르트사(Yakult Pharmaceutical Ind. Co., Ltd.)제)를 첨가해서 혼합하고, 55℃에서 3시간, 효소 반응을 실시하였다. 이어서, 85℃로 승온하고, 10분간 유지하여 효과 활성을 실활(失活; deactivate)시켰다. 3리터의 증류수를 첨가해서 잘 혼합한 후, 잔사를 제거하여 추출액 4.5리터(버섯 효소 처리 β 글루칸 추출액:샘플 B)를 얻었다. 샘플 B의 1ml중에 포함되는 β 글루칸량은 93mg으로 산출되었다. 또한, 분자량은 1만~80만으로 분포하고, 최대 피크는 12만이었다.

[0128] 4)버섯 균사체 배양물의 조제

[0129] 4개의 500mL용의 삼각 플라스크에 글루코오스 감자 추출물 배지(glucose-potato extract medium)(글루코오스 2%, 감자 200g/l)를 120ml 주입하고, 120℃, 30분간 멸균을 행하며, 별도로 사면배양 보존하고 있는 팽나무버섯의 균사(Flammulina velutipes) IF0-30602를 접종하여, 25℃에서 회전식 배양장치에서 200rpm으로 10일간의 배양을 행하였다. 이 삼각 플라스크 4개분을 합치고, 생리식염수로 배지를 세정하며, 동결건조시켜서, 건조 균

사체 8g을 얻었다. 얻어진 균사체 1g에 10ml의 0.2M 수산화나트륨 용액을 첨가하고, 15℃에서 하루, 교반 추출을 행하였다. 추출물은 그대로 염산으로 pH3.0으로 하고, 120℃에서 30분간 오토클레이브 처리하였다. 원심분리에 의해 상청을 얻고 나서, 인산2나트륨(disodium phosphate)으로 pH7.0으로 하고, 3배량의 에틸알코올을 첨가해서 침전을 얻었다. 침전에 10ml의 증류수를 첨가하여 샘플 C를 얻었다. 샘플 C의 1ml중에 포함되는 β글루칸량은 40mg으로 산출되었다. 또한, 최대 피크의 분자량은 20만이었다.

[0130] [제조예 2] (미생물 유래 β글루칸의 조제)

[0131] 1)균체 세포벽의 조제

[0132] 리조레시틴을 0.5%가 되도록 용해시킨 물에, 균체를 1g/ml의 농도가 되도록 현탁하고, 초음파 파쇄기로 10분간 처리하며, 원심분리에 의해 상청을 제거하고, 침전을 동결건조해서, 세포벽 성분으로 하였다. 유산균 균체로서는, 시판의 모리나가 유산균말(모리나가 뉴교사(Morinaga Milk Industry Co., Ltd.)제)을 사용해서 얻어진 것을 유산균체 세포벽(샘플 D)으로 하고, 효모균체로서 시판의 압착 빵효모(다이아 이스트(Dia Yeast):교와 핫코우사(Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd.)제)를 사용해서 얻어진 것을 효모균체 세포벽(샘플 E)으로 하며, 클로렐라 균체로서 시판의 건조 클로렐라인, 클로렐라 마이크로 파우더(닛폰 클로렐라 고교사제)를 사용해서 얻어진 것을 클로렐라 균체 세포벽(샘플 F)으로 하였다. 각 샘플의 10mg에 1M 수산화나트륨 용액 1ml를 첨가하고, 50℃에서 하루 동안 추출 조작을 실시하였다. 원심분리 후의 상청을 증류수로 100배로부터 10배 희석계열을 작성하고, β글루칸의 측정을 실시한 바, 각 샘플 10mg중의 β글루칸량은, 샘플 D는 2.8mg, 샘플 E는 4.9mg, 샘플 F는 3.5mg으로 산출되었다. 다음으로 분자량 측정을 실시하였다. 각 샘플의 10mg에 1M 수산화나트륨 용액 1ml를 첨가하고, 50℃에서 하루동안 추출 조작을 실시하며, 원심분리한 상청에 3배량의 에탄올을 첨가하고, 침전물을 1ml의 증류수에 용해시켰다. 각 샘플의 평균 중량 분자량은 샘플 D가 120만, 샘플 E는 200만, 샘플 F는 180만이었다.

[0133] [제조예 3] (세포벽으로부터의 알칼리 추출물의 조제)

[0134] 1)버섯 세포벽으로부터의 알칼리 추출물의 조제

[0135] 꽃송이버섯(*Sparassis crispa*) 시료 100g에 1% 수산화나트륨의 1리터를 첨가하고, 65℃에서 2시간 교반 추출을 행하였다. 추출 잔사를 원심분리에 의해 제거한 후, 추출액은 HCl로 중화하고 나서, 등량의 에탄올을 첨가하여 침전물 20g(버섯 세포벽 추출 β글루칸:샘플 G)을 얻었다. 샘플 G의 1g중에 포함되는 β글루칸량은, 500mg으로 산출되었다. 또한, 최대 피크의 분자량은 120만이었다.

[0136] 2)미생물 세포벽으로부터의 알칼리 추출물의 조제

[0137] 시판의 압착(壓搾) 빵효모로부터 조제된 세포벽(효모균체 세포벽 E)의 100g에 2% 수산화나트륨의 1리터를 첨가하고, 4℃에서 24시간 교반 추출하였다. 원심분리한 추출액을 HCl로 중화하고, 2배량의 에탄올로 침전시켜서, 20g의 추출물(효모균체 세포벽 추출 β글루칸:샘플 H)을 얻었다. 샘플 H의 10mg중에 포함되는 β글루칸량은 4.2mg으로 산출되었다. 또한, 최대 피크의 분자량은 160만이었다.

[0138] [제조예 4] (미생물 배양액의 조제)

[0139] 1)유산균 배양액의 조제

[0140] 페디오코커스 담노수스(*Pediococcus damnosus*) 균주(오사카 발효 연구소에 보존된 IF0-3896주)를, 폴리펩톤(Polypepton) 5g, 이스트 엑기스(Yeast extract) 5g, 글루코오스(Glucose) 5g, MgSO₄ · 7H₂O 1g, 증류수 1리터의 비율로 혼합 용해하고, pH5.5로 조정된 배지 5리터에 식균하여, 5일간, 30℃에서 통기(通氣)하지 않고 교반(50rpm) 배양하였다. 배양을 2회 실시해서 10리터의 배양액을 얻었다. 이 배양액을 원심분리해서 얻은 상청을 감압 농축하여, 2리터의 배양 농축액을 얻었다. 얻어진 농축액의 2배량의 에탄올을 첨가해서 침전을 회수하고, 동결건조해서 분말 15g(유산균 배양물:샘플 I)을 얻었다. 샘플 I의 1g중에 포함되는 β글루칸량은 600mg으로 산출되었다. 또한, 최대 피크의 분자량은 190만이었다.

[0141] 2)아우레오바시디움(*Aureobasidium*) 배양물의 조제

[0142] 아우레오바시디움(*Aureobasidium*)속에 속하는 미생물로서, 유전적·형태학적으로 동정(同定)되며, 배양함으로써 균체 밖에 β결합을 갖는 글루코오스 중합체를 생산하는 아우레오바시디움 풀루란스(*Aureobasidium pullulans*)의 균주인 IF07757주를, 포테이토 덱스트로오스 한천(potato-dextrose-agar) 사면배지에서 배양하여 보존균주로 하고, YM 액체 배지(디프코(Difco)사제) 100ml를 넣은 500ml용 삼각 플라스크에 접종해서, 28℃에서 3일간 전배양(pre-cultured)하였다. 본배양은, 풀루존(FULLZONE) 날개를 탑재한 5리터용 발효조(fermentation tank)에,

차펙(Czapek's) 배지(디프코사제) 3리터, 얻어진 전배양물을 첨가하여 28℃에서 5일간 배양하였다. 한편 배양 중, pH는 5.0이 되도록 조정하고, 통기는 1vvm이 되도록 통기량과 회전수를 시퀀스 제어(sequentially controlling)하였다. 배양액 3리터를 90℃에서 30분간 가열 살균한 후, 원심분리에 의해 균체를 제거하고, 그 중의 1리터를 그대로 동결건조해서 27g의 동결건조물을 얻었다(Aureobasidium 배양물:샘플 J). 샘플 J의 1g중에 포함되는 β글루칸량은 440mg으로 산출되었다. 또한, 샘플 J의 10mg/ml 증류수용액에 폴루라나아제 효소의 현탁액(와코 준야쿠사제)을 0.05%가 되도록 첨가하고, 2시간 반응시킨 후, 2배량의 에탄올을 첨가하며, 얻어진 침전에, 다시 1ml의 증류수를 첨가해서 용해시키고, 분자량의 측정을 실시하였다. 또한, 대조로서 폴루란 10mg/ml 증류수용액을 동일하게 조작한 것도 분자량 측정을 행하였다. 그 결과, 샘플 J의 최대 피크의 분자량은 20만이 었다. 폴루란 용액에서는 피크는 보이지지 않았다.

[0143] 나머지 배양액 2리터에 2배량의 에탄올을 첨가해서 침전물을 회수하였다. 침전물을 동결건조해서, 분말로서 26g을 얻었다(Aureobasidium 배양 정제물:샘플 K). 샘플 K의 10mg중에 포함되는 β글루칸량은 6mg으로 산출되었다. 또한, 샘플 K의 10mg/ml 증류수용액에 폴루라나아제 효소의 현탁액(와코 준야쿠사제)을 0.05%가 되도록 첨가해서, 2시간 반응시킨 후, 2배량의 에탄올을 첨가하고, 얻어진 침전에, 다시 1ml의 증류수를 첨가해서 용해시키고, 분자량의 측정을 실시하였다. 한편, 대조로서 폴루란 10mg/ml 증류수용액을 동일하게 조작한 것도 분자량 측정을 행하였다. 그 결과, 샘플 K의 최대 피크의 분자량은 20만이 었다. 폴루란 용액에서는 피크는 보이지지 않았다.

[0144] [실시에 1] (β글루칸 함유 유지 조성물)

[0145] 상기 샘플 A의 100부와 대두유 100부를 니더(kneader)로 잘 혼합하고, 60℃에서 10분간 방치 후, 실온으로 냉각하여 크림형상이 된 본 발명의 β글루칸 함유 유지 조성물-1(β글루칸 함유량 43%)을 얻었다. β글루칸은 균일하게 분산하고 있었다.

[0146] [실시에 2] (β글루칸 함유 유지 조성물)

[0147] 상기 샘플 B의 80부와 대두유 120부를 니더로 잘 혼합하고, 60℃에서 10분간 방치 후, 실온으로 냉각하여 크림형상이 된 본 발명의 β글루칸 함유 유지 조성물-2(β글루칸 함유량 3.7%)를 얻었다. β글루칸은 균일하게 분산하고 있었다.

[0148] [실시에 3] (β글루칸 함유 유지 조성물)

[0149] 상기 샘플 H의 100부와 대두유 100부를 니더로 잘 혼합하고, 60℃에서 10분간 방치 후, 실온으로 냉각하여 크림형상이 된 본 발명의 β글루칸 함유 유지 조성물-3(β글루칸 함유량 21%)을 얻었다. β글루칸은 균일하게 분산하고 있었다.

[0150] [실시에 4] (β글루칸 함유 유지 조성물)

[0151] 상기 샘플 K의 300부에 70℃로 가온하여 용해시킨 팜유 100부 및 레시틴 1부를 첨가하고, 고속 호모믹서로 혼합하며, 50℃에서 20분간 방치 후, 실온으로 냉각해서 덩어리형상(lumpy)이 된 본 발명의 β글루칸 함유 유지 조성물-4(β글루칸 함유량 44.9%)를 얻었다. β글루칸은 균일하게 분산하고 있었다.

[0152] [실시에 5] (β글루칸 함유 유지 조성물)

[0153] 상기 샘플 E의 300부에 70℃로 가온하여 용해시킨 팜유 100부 및 레시틴 1부를 첨가하고, 고속 호모믹서로 혼합하며, 50℃에서 20분간 방치 후, 실온으로 냉각해서 덩어리형상이 된 본 발명의 β글루칸 함유 유지 조성물-5(β글루칸 함유량 36.6%)를 얻었다. β글루칸은 균일하게 분산하고 있었다.

[0154] [실시에 6] (β글루칸 함유 유지 조성물)

[0155] 상기 샘플 F의 300부에 70℃로 가온하여 용해시킨 팜유 100부 및 레시틴 1부를 첨가하고, 고속 호모믹서로 혼합하며, 50℃에서 20분간 방치 후, 실온으로 냉각해서 덩어리형상이 된 본 발명의 β글루칸 함유 유지 조성물-6(β글루칸 함유량 26%)을 얻었다. β글루칸은 균일하게 분산하고 있었다.

[0156] [실시에 7] (β글루칸 함유 유지 조성물)

[0157] 상기 샘플 G의 50부에 팜올레인유(palm olein oil) 30부, 채종유 70부, 프로테아제에 의해 가수분해 처리한 난황 0.2부를 첨가해서, 믹서로 혼합하고, 65℃에서 15분간 방치 후, 실온으로 냉각해서 크림형상이 된 본 발명의 β글루칸 함유 유지 조성물-7(β글루칸 함유량 16.6%)을 얻었다. β글루칸은 균일하게 분산하고 있었다.

- [0158] [실시에 8] (β 글루칸 함유 유지 조성물)
- [0159] 상기 샘플 I의 50부에 팜올레인유 30부, 채종유 70부, 프로테아제에 의해 가수분해 처리한 난황 0.2부를 첨가해서, 믹서로 혼합하고, 65℃에서 15분간 방치 후, 실온으로 냉각해서 크림형상이 된 본 발명의 β 글루칸 함유 유지 조성물-8(β 글루칸 함유량 20%)을 얻었다. β 글루칸은 균일하게 분산하고 있었다.
- [0160] [실시에 9] (β 글루칸 함유 유지 조성물)
- [0161] 상기 샘플 K의 50부에 팜올레인유 30부, 채종유 70부, 프로테아제에 의해 가수분해 처리한 난황 0.2부를 첨가해서, 믹서로 혼합하고, 65℃에서 15분간 방치 후, 실온으로 냉각해서 크림형상이 된 본 발명의 β 글루칸 함유 유지 조성물-9(β 글루칸 함유량 20%)를 얻었다. β 글루칸은 균일하게 분산하고 있었다.
- [0162] [실시에 10] (β 글루칸 함유 유지 조성물)
- [0163] 상기 샘플 A의 5부에 쌀기름(rice oil) 40부, 올리브유 20부 및 홍화유 35부를 첨가하고, 고속 호모믹서로 혼합하며, 50℃에서 30분간 방치 후, 실온으로 냉각해서 점도는 거의 원료유(原料油)와 다르지 않으나 약간 탁함을 발생시킨 본 발명의 β 글루칸 함유 유지 조성물-10(β 글루칸 함유량 4.3%)을 얻었다. β 글루칸은 균일하게 분산하고 있었다.
- [0164] [실시에 11] (β 글루칸 함유 유지 조성물)
- [0165] 상기 샘플 I의 5부에 쌀기름 40부, 올리브유 20부 및 홍화유 35부를 첨가하고, 고속 호모믹서로 혼합하며, 50℃에서 30분간 방치 후, 실온으로 냉각해서 점도는 거의 원료유와 다르지 않으나 약간 탁함을 발생시킨 본 발명의 β 글루칸 함유 유지 조성물-11(β 글루칸 함유량 3%)을 얻었다. β 글루칸은 균일하게 분산하고 있었다.
- [0166] [실시에 12] (β 글루칸 함유 유지 조성물)
- [0167] 상기 샘플 J의 5부에 쌀기름 40부, 올리브유 20부 및 홍화유 35부를 첨가하고, 고속 호모믹서로 혼합하며, 50℃에서 30분간 방치 후, 실온으로 냉각해서 점도는 거의 원료유와 다르지 않으나 약간 탁함을 발생시킨 본 발명의 β 글루칸 함유 유지 조성물-12(β 글루칸 함유량 2.2%)를 얻었다. β 글루칸은 균일하게 분산하고 있었다.
- [0168] [실시에 13] (β 글루칸 함유 유지 조성물)
- [0169] 상기 샘플 G의 13부에 경화 대두유 20부(융점 45℃), 팜유 35부, 면실유 30부 및 대두 리조레시틴(soybean lysolecithin) 0.2부를 첨가해서 70℃에서 10분간 방치 후, 고속 믹서로 유화 후, 급랭 가소화에 의해 마가린과 같은 물성을 나타내는 본 발명의 β 글루칸 함유 유지 조성물-13(β 글루칸 함유량 6.6%)을 얻었다. β 글루칸은 균일하게 분산하고 있었다.
- [0170] [실시에 14] (β 글루칸 함유 유지 조성물)
- [0171] 상기 샘플 H의 13부에 경화 대두유 20부(융점 45℃), 팜유 35부, 면실유 30부 및 대두 리조레시틴 0.2부를 첨가해서 70℃에서 10분간 방치 후, 고속 믹서로 유화 후, 급랭 가소화에 의해 마가린과 같은 물성을 나타내는 본 발명의 β 글루칸 함유 유지 조성물-14(β 글루칸 함유량 5.6%)를 얻었다. β 글루칸은 균일하게 분산하고 있었다.
- [0172] [실시에 15] (β 글루칸 함유 유지 조성물)
- [0173] 상기 샘플 K의 13부에 경화 대두유 20부(융점 45℃), 팜유 35부, 면실유 30부 및 대두 리조레시틴 0.2부를 첨가해서 70℃에서 10분간 방치 후, 고속 믹서로 유화 후, 급랭 가소화에 의해 마가린과 같은 물성을 나타내는 본 발명의 β 글루칸 함유 유지 조성물-15(β 글루칸 함유량 8%)를 얻었다. β 글루칸은 균일하게 분산하고 있었다.
- [0174] [실시에 16] (β 글루칸 함유 유지 조성물)
- [0175] 상기 샘플 B의 50부에 어경화유(hardened fish oil) 27.6부(융점 36℃), 콘샐러드유(corn salad oil) 18부 및 주석산모노글리세라이드(glycerol monotartrate) 0.4부를 첨가해서 50℃에서 30분간 교반 혼합 후, 고속 믹서로 유화 후, 급랭 가소화에 의해 팻 스프레드(fat spread)와 같은 물성을 나타내는 본 발명의 β 글루칸 함유 유지 조성물-16(β 글루칸 함유량 4.8%)을 얻었다. β 글루칸은 균일하게 분산하고 있었다.
- [0176] [실시에 17] (β 글루칸 함유 유지 조성물)
- [0177] 상기 샘플 H의 50부에 어경화유 27.6부(융점 36℃), 콘샐러드유 18부 및 주석산모노글리세라이드 0.4부를 첨가해서 50℃에서 30분간 교반 혼합 후, 고속 믹서로 유화 후, 급랭 가소화에 의해 팻 스프레드와 같은 물성을 나타내는 본 발명의 β 글루칸 함유 유지 조성물-17(β 글루칸 함유량 22%)을 얻었다. β 글루칸은 균일하게 분산하고

고 있었다.

[0178] [실시예 18] (β글루칸 함유 유지 조성물)

[0179] 상기 샘플 I의 50부에 어경화유 27.6부(용점 36℃), 콘셀러드유 18부 및 주석산모노글리세라이드 0.4부를 첨가해서 50℃에서 30분간 교반 혼합 후, 고속 믹서로 유화 후, 급랭 가소화에 의해 팻 스프레드와 같은 물성을 나타내는 β글루칸 함유 유지 조성물-18(β글루칸 함유량 31%)을 얻었다. β글루칸은 균일하게 분산하고 있었다.

[0180] [실시예 19] (β글루칸 함유 유지 조성물)

[0181] 상기 샘플 G의 20부에 올리브유 0.3부(용점 36℃) 및 카세인 나트륨(sodium casein) 0.1부를 첨가해서 55℃에서 15분간 방치 후, 고속 믹서로 유화 후, 스프레이 드라이어로 건조시켜서, 분말화한 본 발명의 β글루칸 함유 유지 조성물-19(β글루칸 함유량 49%)를 얻었다. β글루칸은 균일하게 분산하고 있었다.

[0182] [실시예 20] (β글루칸 함유 유지 조성물)

[0183] 상기 샘플 H의 20부에 올리브유 0.3부(용점 36℃) 및 카세인 나트륨 0.1부를 첨가해서 55℃에서 15분간 방치 후, 고속 믹서로 유화 후, 스프레이 드라이어로 건조시켜서, 분말화한 본 발명의 β글루칸 함유 유지 조성물-20(β글루칸 함유량 41%)을 얻었다. β글루칸은 균일하게 분산하고 있었다.

[0184] [실시예 21] (β글루칸 함유 유지 조성물)

[0185] 상기 샘플 K의 20부에 올리브유 0.3부(용점 36℃) 및 카세인 나트륨 0.1부를 첨가해서 55℃에서 15분간 방치 후, 고속 믹서로 유화 후, 스프레이 드라이어로 건조시켜서, 분말화한 본 발명의 β글루칸 함유 유지 조성물-21(β글루칸 함유량 59%)을 얻었다. β글루칸은 균일하게 분산하고 있었다.

[0186] [실시예 22] (쇼트닝의 제조예)

[0187] 팜유 30부, 팜경화유 50부, 유채기름 20부 및 레시틴 0.3부로 이루어지는 유상(油相; oil phase)을 70℃에서 용해하고, 이 유상 100부에 대해서, 상기 샘플 G의 5.0부를 첨가하며, 70℃에서 그대로 30분간 방치하였다. 다음으로 호모믹서에 의해 고속회전으로 2분간 교반 혼합하여, 본 발명의 β글루칸 함유 유지 조성물-22를 얻었다. 눈으로 보아, β글루칸은 충분히 유지에 분산되어 있었다. 그 후, 급랭 가소화를 행한 후, 5℃까지 냉각하였다. 이렇게 해서, 본 발명의 쇼트닝(β글루칸 함유량 2.4%)을 얻었다. 얻어진 쇼트닝에 대하여, 매끄러움, 풍미를 평가하였다. 그 결과를 하기 표 1에 나타낸다. 얻어진 쇼트닝은 하기 비교예 1의 쇼트닝에 비하여, 매끄러움과 풍미가 우수한 것을 알 수 있다. 얻어진 쇼트닝은 결정의 숙성공정, 즉 에이징(aging)을 생략하더라도 식감이 우수한 적당한 결정의 생성을 형성, 촉진하는 효과, 유화제에 의한 풍미 억제 효과를 방지하는 효과를 갖고 있다고 말할 수 있다.

[0188] [실시예 23] (쇼트닝의 제조예)

[0189] 팜유 30부, 팜경화유 50부, 유채기름 20부 및 레시틴 0.3부로 이루어지는 유상을 70℃에서 용해하고, 이 유상 100부에 대해서, 상기 샘플 K의 5.0부를 첨가하며, 70℃에서 그대로 30분간 방치하였다. 다음으로 호모믹서에 의해 고속회전으로 2분간 교반 혼합하여, 본 발명의 β글루칸 함유 유지 조성물-23을 얻었다. 눈으로 보아, β글루칸은 충분히 유지에 분산되어 있었다. 그 후, 급랭 가소화를 행한 후, 5℃까지 냉각하였다. 이렇게 해서, 본 발명의 쇼트닝(β글루칸 함유량 2.9%)을 얻었다. 얻어진 쇼트닝에 대하여, 매끄러움, 풍미를 평가하였다. 그 결과를 하기 표 1에 나타낸다. 얻어진 쇼트닝은, 하기 비교예 1의 쇼트닝에 비하여, 매끄러움과 풍미가 우수한 것을 알 수 있다. 얻어진 쇼트닝은, 결정의 숙성공정, 즉 에이징을 생략하더라도 식감이 우수한 적당한 결정의 생성을 형성, 촉진하는 효과, 유화제에 의한 풍미 억제 효과를 방지하는 효과를 갖고 있다고 말할 수 있다.

[0190] [비교예 1] (쇼트닝의 비교 제조예)

[0191] 팜유 30부, 팜경화유 50부, 유채기름 20부 및 레시틴 0.3부로 이루어지는 유상을 70℃에서 용해하고, 호모믹서에 의해 고속회전으로 2분간 교반 혼합하며, 그 후, 급랭 가소화를 행한 후, 5℃까지 냉각하여 쇼트닝을 얻었다. 얻어진 쇼트닝에 대하여, 매끄러움, 풍미를 평가하였다. 그 결과를 하기 표 2에 나타낸다. 얻어진 쇼트닝은 풍미가 매우 떨어진 것을 알 수 있다.

[0192] [실시예 24] (마가린의 제조예)

[0193] 팜유:팜경화유:채종유:소르비탄 지방산 에스테르(sorbitan fatty acid ester)를, 30:50:20:0.3의 비율(중량비)로 함유하는 식용 유지 100부를 70℃에서 용해하고, 이것에 상기 샘플 G의 8부를 첨가하며, 65℃에서 30분간

방치한 후, 호모믹서로 교반하면서, 70℃로 가온한 물 16부에 탈지분유 0.5부 및 식염 1부를 용해시킨 용액을 서서히 첨가, 혼합한 후, 급랭 가소화를 행하고, 25℃에서 하룻밤 유지한 후, 5℃까지 냉각하였다. 이렇게 해서, 본 발명의 마가린(β 글루칸 함유량 3.2%)을 얻었다. β 글루칸은 균일하게 분산하고 있었다. 얻어진 마가린에 대하여, 안정성, 매끄러움, 풍미를 평가하였다. 그 결과를 하기 표 1에 나타낸다. 얻어진 마가린은 결이 고운 매끄러운 식감이 좋은 것이었다. 또한 하기 비교예 2의 마가린에 비하여, 풍미도 좋고, 유화제의 풍미 저감을 억제하는 효과가 있다고 말할 수 있다.

[0194] [실시예 25] (마가린의 제조예)

[0195] 팜유:팜경화유:채종유:소르비탄 지방산 에스테르를, 30:50:20:0.3의 비율(중량비)로 함유하는 식용 유지 100부를 70℃에서 용해하고, 이것에 상기 샘플 H의 8부를 첨가하며, 65℃에서 30분간 방치한 후, 호모믹서로 교반하면서, 70℃로 가온한 물 16부에 탈지분유 0.5부 및 식염 1부를 용해시킨 용액을 서서히 첨가, 혼합한 후, 급랭 가소화를 행하고, 25℃에서 하룻밤 유지한 후, 5℃까지 냉각하였다. 이렇게 해서, 본 발명의 마가린(β 글루칸 함유량 2.7%)을 얻었다. β 글루칸은 균일하게 분산하고 있었다. 얻어진 마가린에 대하여, 안정성, 매끄러움, 풍미를 평가하였다. 그 결과를 하기 표 1에 나타낸다. 얻어진 마가린은 결이 고운 매끄러운 식감이 좋은 것이었다. 또한 하기 비교예 2의 마가린에 비하여, 풍미도 좋고, 유화제의 풍미 저감을 억제하는 효과가 있다고 말할 수 있다.

[0196] [실시예 26] (마가린의 제조예)

[0197] 팜유:팜경화유:채종유:소르비탄 지방산 에스테르를, 30:50:20:0.3의 비율(중량비)로 함유하는 식용 유지 100부를 70℃에서 용해하고, 이것에 상기 샘플 K의 8부를 첨가하며, 65℃에서 30분간 방치한 후, 호모믹서로 교반하면서, 70℃로 가온한 물 16부에 탈지분유 0.5부 및 식염 1부를 용해시킨 용액을 서서히 첨가, 혼합한 후, 급랭 가소화를 행하고, 25℃에서 하룻밤 유지한 후, 5℃까지 냉각하였다. 이렇게 해서, 본 발명의 마가린(β 글루칸 함유량 3.8%)을 얻었다. β 글루칸은 균일하게 분산하고 있었다. 얻어진 마가린에 대하여, 안정성, 매끄러움, 풍미를 평가하였다. 그 결과를 하기 표 1에 나타낸다. 얻어진 마가린은 결이 고운 매끄러운 식감이 좋은 것이었다. 또한 하기 비교예 2의 마가린에 비하여, 풍미도 좋고, 유화제의 풍미 저감을 억제하는 효과가 있다고 말할 수 있다.

[0198] [비교예 2] (마가린의 비교 제조예)

[0199] 팜유:팜경화유:채종유:소르비탄 지방산 에스테르를, 30:50:20:0.3의 비율(중량비)로 함유하는 식용 유지 100부를 70℃에서 용해하고, 호모믹서로 교반하면서, 70℃로 가온한 물 16부에 탈지분유 0.5부 및 식염 1부를 용해시킨 용액을 서서히 첨가, 혼합한 후, 급랭 가소화를 행하고, 25℃에서 하룻밤 유지한 후, 5℃까지 냉각해서 마가린을 얻었다. 얻어진 마가린에 대하여, 안정성, 매끄러움, 풍미를 평가하였다. 그 결과를 하기 표 2에 나타낸다.

[0200] [실시예 27] (드레싱의 제조예)

[0201] 상기 샘플 G의 10부, 난황 10부, 식염 1.5부, 식초 11부, 백설탕 2.5부, 머스터드 파우더 0.05부 및 양파 파우더 0.05부를, 믹서에 의해 고속으로 5분간 교반, 혼합하여, 수상(水相;aqueous phase)으로 하였다. 이 수상을, 또한 호모믹서로 고속 교반하면서, 이것에 대두 쉼머드유 75부를 70℃로 가온한 것을, 서서히 첨가, 혼합하고, 50℃에 10분간 방치 후, 유화시키며, 24시간, 5℃로 냉각하여, 본 발명의 드레싱(β 글루칸 함유량 4.5%)을 얻었다. β 글루칸은 균일하게 분산하고 있었다. 얻어진 드레싱에 대하여, 안정성과 풍미를 평가하였다. 그 결과를 하기 표 1에 나타낸다. 얻어진 드레싱은 안정성과 풍미가 우수한 것을 알 수 있다.

[0202] [비교예 3] (드레싱의 비교 제조예)

[0203] 난황 10부, 식염 1.5부, 식초 11부, 백설탕 2.5부, 머스터드 파우더 0.05부 및 양파 파우더 0.05부를, 믹서에 의해 고속으로 5분간 교반, 혼합하여, 수상으로 하였다. 이후는 실시예 27과 동일하게 조작하여, 드레싱을 얻었다. 얻어진 드레싱에 대하여, 안정성과 풍미를 평가하였다. 그 결과를 하기 표 2에 나타낸다.

[0204] [실시예 28] (드레싱의 제조예)

[0205] 난황 10부, 식염 1.5부, 식초 11부, 백설탕 2.5부, 머스터드 파우더 0.05부 및 양파 파우더 0.05부를, 믹서에 의해 고속으로 5분간 교반, 혼합하여, 수상으로 하였다. 이 수상을, 또한 호모믹서로 고속 교반하면서, 이것에 실시예 12의 β 글루칸 함유 유지 조성물-12의 75부를, 서서히 첨가, 혼합하고, 유화시키며, 24시간, 5℃로 냉각하여, 본 발명의 드레싱(β 글루칸 함유량 1.65%)을 얻었다. β 글루칸은 균일하게 분산하고 있었다. 얻어진 드레

상에 대하여, 안정성과 풍미를 평가하였다. 그 결과를 하기 표 1에 나타낸다. 얻어진 드레싱은 안정성과 풍미가 우수한 것을 알 수 있다.

[0206] [비교예 4] (드레싱의 비교 제조예)

[0207] 난황 10부, 식염 1.5부, 식초 11부, 백설탕 2.5부, 머스터드 파우더 0.05부 및 양파 파우더 0.05부를, 믹서에 의해 고속으로 5분간 교반, 혼합하여, 수상으로 하였다. 이 수상을, 또한 호모믹서로 고속 교반하면서, 이것에 유지(쌀기름 40부, 올리브유 20부 및 홍화유 35부를 혼합한 것) 75부를, 서서히 첨가, 혼합하고, 유화시키며, 24시간, 5℃로 냉각하여, 드레싱을 얻었다. 얻어진 드레싱에 대하여 안정성과 풍미를 평가하였다. 그 결과를 하기 표 2에 나타낸다.

[0208] [실시에 29] (마요네즈의 제조예)

[0209] 상기 샘플 H의 30부에 대두 샐러드유 30부를 첨가하고, 교반해서 예비 유화 후, 본 발명의 β글루칸 함유 유지 조성물을 얻었다. 이것에, 난황 9부, 전분 5.2부, 설탕 8.2부, 식염 2.8부, 식초 8부, 조미 향신료 1부 및 물 6부를 잘 혼합한 것을 첨가하고, 콜로이드 밀(colloid mill)에 의해 마무리 유화를 행하여, 본 발명의 마요네즈(β글루칸 함유량 12.6%)를 얻었다. β글루칸은 균일하게 분산하고 있었다. 얻어진 마요네즈에 대하여, 안정성, 매끄러움, 풍미를 평가하였다. 그 결과를 하기 표 1에 나타낸다. 얻어진 마요네즈는 1개월의 보존기간중에 물의 분리가 없으며, 또한, 매끄럽고 풍미도 매우 양호하였다.

[0210] [비교예 5] (마요네즈의 비교 제조예)

[0211] 물 30부에 대두 샐러드유 30부를 첨가하고, 교반해서 예비 유화 후, 유지 조성물을 얻었다. 이것에, 난황 9부, 전분 5.2부, 설탕 8.2부, 식염 2.8부, 식초 8부, 조미 향신료 1부 및 물 6부를 잘 혼합한 것을 첨가하고, 콜로이드 밀에 의해 마무리 유화를 행하여, 마요네즈를 얻었다. 얻어진 마요네즈에 대하여, 안정성, 매끄러움, 풍미를 평가하였다. 그 결과를 하기 표 2에 나타낸다.

[0212] [실시에 30] (마요네즈의 제조예)

[0213] 난황 9부, 설탕 8.2부, 식염 2.8부, 식초 8부, 조미 향신료 1부 및 샘플 B의 36부를 혼합하여, 수상을 조제하였다. 이것에 채종유 25부, 실시예 3의 β글루칸 함유 유지 조성물-3의 10부를 첨가하고, 교반하여 예비 유화 후, 콜로이드 밀에 의해 마무리 유화를 행하여, 본 발명의 마요네즈(β글루칸 함유량 5.5%)를 얻었다. β글루칸은 균일하게 분산하고 있었다. 얻어진 마요네즈에 대하여, 안정성, 매끄러움, 풍미를 평가하였다. 그 결과를 하기 표 1에 나타낸다. 얻어진 마요네즈는 1개월의 보존기간중에 물의 분리가 없으며, 또한, 매끄럽고 풍미도 매우 양호하였다.

[0214] [비교예 6] (마요네즈의 비교 제조예)

[0215] 난황 9부, 설탕 8.2부, 식염 2.8부, 식초 8부, 조미 향신료 1부 및 36부의 물을 혼합하여, 수상을 조제하였다. 이것에 채종유 25부, 팜유 10부를 첨가하고, 교반해서 예비 유화 후, 콜로이드 밀에 의해 마무리 유화를 행하여, 마요네즈를 얻었다. 얻어진 마요네즈에 대하여, 안정성, 매끄러움, 풍미를 평가하였다. 그 결과를 하기 표 2에 나타낸다.

[0216] [실시에 31] (팻 스프레드(fat spread)의 제조예)

[0217] 어경화유(魚硬化油)(융점 36℃) 27.6부, 면실유 18.4부, 상기 샘플 K의 40부, 물 12.3부, 식염 1부, 탈지분유 0.5부, 조미료(flavor) 0.2부 및 레시틴 0.3부를 유화, 급랭 가소화에 의해 본 발명의 팻 스프레드(β글루칸의 함유량 24%)를 조제하였다. β글루칸은 균일하게 분산하고 있었다. 얻어진 팻 스프레드에 대하여, 안정성, 매끄러움, 풍미를 평가하였다. 그 결과를 하기 표 1에 나타낸다. 얻어진 팻 스프레드는 1개월의 보존기간중에 물의 분리가 없으며, 또한, 매끄럽고 풍미도 양호하였다.

[0218] [비교예 7] (팻 스프레드의 비교 제조예)

[0219] 어경화유(융점 36℃) 27.6부, 면실유 18.4부, 물 52.3부, 식염 1부, 탈지분유 0.5부, 조미료 0.2부 및 레시틴 0.3부를 유화, 급랭 가소화에 의해 팻 스프레드를 조제하였다. 얻어진 팻 스프레드에 대하여, 안정성, 매끄러움, 풍미를 평가하였다. 그 결과를 하기 표 2에 나타낸다.

[0220] [실시에 32] (카레루의 제조예)

[0221] 소맥분(박력분) 44부 및 실시예 22에서 얻어진 쇼트닝 34부를 얇은 갈색이 될 때까지 볶고, 또한 시판의 카레분

말 8부를 첨가하여, 본 발명의 카레루(β 글루칸 함유량 0.95%)를 얻었다. β 글루칸은 균일하게 분산하고 있었다.

[0222] [실시예 33] (쿠키의 제조예)

[0223] 실시예 9에서 얻어진 β 글루칸 함유 유지 조성물-9의 50부와 백설탕 50부를 호바트 믹서(hobart mixer)로 고속 6분 크리밍하고, 이것에 전란(全卵)(외피(外皮)를 제외한 알맹이) 15부, 식염 1부 및 탄산수소암모늄(ammonium hydrogencarbonate) 0.5부를 합친 것을 첨가하고, 중속으로 30초간 혼합하였다. 또한, 체에 거른 소맥분 100부를 첨가 혼합하고, 저속으로 30초간 혼합하여, 생지(生地;dough)를 얻었다. 이 생지를 직경 6cm의 통에 넣고, 생지를 두께 1cm씩 짜낸 곳에서 커트하며, 200℃, 13분간 소성하여, 본 발명의 쿠키(β 글루칸 함유량 4.6%)를 얻었다. β 글루칸은 균일하게 분산하고 있었다. 얻어진 쿠키에 대하여, 경도(firmness), 풍미를 평가하였다. 그 결과를 하기 표 1에 나타낸다.

[0224] [비교예 8] (쿠키의 비교 제조예)

[0225] 유지(팜올레인유 30부, 채종유 70부, 프로테아제에 의해 가수분해한 난황 0.2부를 혼합한 것) 50부와 백설탕 50부를 호바트 믹서로 고속 6분 크리밍하고, 이것에 전란(외피를 제외한 알맹이) 15부, 식염 1부 및 탄산수소암모늄 0.5부를 합친 것을 첨가하고, 중속으로 30초간 혼합하였다. 이후는 실시예 33과 동일하게 조작하여, 쿠키를 얻었다. 얻어진 쿠키에 대하여, 경도, 풍미를 평가하였다. 그 결과를 하기 표 2에 나타낸다.

[0226] [실시예 34] (쿠키의 제조예)

[0227] 실시예 14에서 얻어진 β 글루칸 함유 유지 조성물-14의 50부와 사탕무로 만든 백설탕 40부를 호바트 믹서로 고속 6분 크리밍하고, 이것에 건포도 페이스트(raisin paste) 20부를 첨가하여, 중속으로 30초간 혼합하였다. 또한, 체에 거른 밤분말을 첨가 혼합하고, 저속으로 30초간 혼합하여, 생지를 얻었다. 이 생지를 직경 6cm의 통에 넣고, 생지를 두께 1cm씩 짜낸 곳에서 커트하며, 160℃, 15분간 소성하여, 본 발명의 쿠키(β 글루칸 함유량 2.5%)를 얻었다. β 글루칸은 균일하게 분산하고 있었다. 얻어진 쿠키에 대하여, 경도, 풍미를 평가하였다. 그 결과를 하기 표 1에 나타낸다. 얻어진 쿠키는 계란, 유제품을 사용하지 않음에도 불구하고 식감이 좋은 것이 얻어졌다.

[0228] [비교예 9] (쿠키의 비교 제조예)

[0229] 경화 대두유 20부(용점 45℃), 팜유 35부, 면실유 30부 및 대두 리조레스틴 0.2부를 첨가하여 70℃에서 10분간 방치 후, 고속믹서로 유화 후, 급랭 가소화에 의해 얻어진 마가린과 같은 물성을 나타내는 식용 유지 조성물 50부와 함께 사탕무로 만든 백설탕 40부를 호바트 믹서로 고속 6분 크리밍하고, 이것에 건포도 페이스트 20부를 첨가하여, 중속으로 30초간 혼합하였다. 이후는 실시예 34와 동일하게 조작하여, 쿠키를 얻었다. 얻어진 쿠키에 대하여, 경도와 풍미를 평가하였다. 그 결과를 하기 표 2에 나타낸다.

[0230] [실시예 35] (초콜릿의 제조예)

[0231] 카카오 매스(cacao mass) 12부, 분당(粉糖;powdered sugar) 45부, 전분유(全粉乳;whole milk powder) 20부, 카카오 버터 23부 및 상기 샘플 G의 2부의 배합 중에서, 카카오 버터 10부를 남기고, 다른 원료를 호바트 믹서에 투입해서, 비터(beater)를 사용하여 중속으로 3분간 혼합하고, 또한, 롤링(rolling)하고, 콘칭(conching)하여, 본 발명의 β 글루칸 함유 유지 조성물을 얻었다(β 글루칸 함량 1%), 눈으로 보아, β 글루칸은 균일하게 분산하고 있었다. 이 본 발명의 β 글루칸 함유 유지 조성물에, 나머지 카카오 버터를 투입, 혼합해서 초콜릿의 원액을 얻고, 이것을 템퍼링(tempering) 처리 후, 몰드(mold)에 흘려 넣고, 냉각하여, 본 발명의 초콜릿을 얻었다. 얻어진 초콜릿에 대하여, 매끄러움, 경도, 풍미를 평가하였다. 그 결과를 하기 표 1에 나타낸다. 얻어진 초콜릿은 입에서 녹는 느낌이 좋은 풍미가 양호한 것이었다.

[0232] [비교예 10] (초콜릿의 비교 제조예)

[0233] 카카오 매스 12부, 분당 45부, 전분유 20부, 카카오 버터 23부 및 유지(팜올레인유 30부, 채종유 70부 및 프로테아제 처리 난황 0.2부를 혼합한 것) 2부의 배합 중에서, 카카오 버터 10부를 남기고, 다른 원료를 호바트 믹서에 투입해서, 비터를 사용하여 중속으로 3분간 혼합하고, 또한, 롤링하고, 콘칭하여, 유지 조성물을 얻었다. 이 유지 조성물에, 나머지 카카오 버터를 투입, 혼합하고, 이후는 실시예 35와 동일하게 조작하여, 초콜릿을 얻었다. 얻어진 초콜릿에 대하여, 매끄러움, 경도, 풍미를 평가하였다. 그 결과를 하기 표 2에 나타낸다.

[0234] [실시예 36] (초콜릿의 제조예)

- [0235] 카카오 매스 12부, 분당 45부, 전분유 20부, 카카오 버터 23부 및 실시예 4에서 얻은 β 글루칸 함유 유지 조성물-4의 20부를 호바트 믹서에 투입해서, 비터를 사용하여 중속으로 3분간 혼합하고, 또한, 롤링하고, 콘칭하며, 이것을 템퍼링 처리 후, 몰드에 흘려 넣고, 냉각하여, 본 발명의 초콜릿을 얻었다(β 글루칸 함량 15%). β 글루칸은 균일하게 분산하고 있었다. 얻어진 초콜릿에 대하여, 매끄러움, 경도, 풍미를 평가하였다. 그 결과를 하기 표 1에 나타낸다. 얻어진 초콜릿은 입에서 녹는 느낌이 좋은 풍미가 양호한 것이었다.
- [0236] [비교예 11] (초콜릿의 비교 제조예)
- [0237] 카카오 매스 12부, 분당 45부, 전분유 20부, 카카오 버터 23부 및 팜유 20부를 호바트 믹서에 투입하고, 이후는 실시예 36과 동일하게 조작하여, 초콜릿을 얻었다. 얻어진 초콜릿에 대하여, 매끄러움, 경도, 풍미를 평가하였다. 그 결과를 하기 표 2에 나타낸다.
- [0238] [실시예 37] (식빵의 제조예)
- [0239] 실시예 26에서 얻어진 β 글루칸 함유 마가린을 사용해서 식빵을 제조하였다. 소맥분 100부, 이스트 3부, 설탕 4부, 식염 2부, 실시예 26에서 얻어진 마가린 6부 및 물 60부를 첨가하고, 반죽 온도 28℃에서, 호퍼 믹서(hopper mixer)로 저속 2분, 고속 4분, 믹싱하여 빵 생지(bread dough)를 조제하였다. 28℃에서 60분간 발효시키고, 450g으로 분할, 둥글게 뭉치고, 부풀리며(prove)(28℃, 20분), 시터(sheetter)에 3회 통과시켜서 정형(整形) 후, 원로프(one-loaf) 타입의 틀에 삽입하였다. 최종 발효는 38℃에서 상대습도 90%의 조건하, 틀 상부가장자리 위로 2cm 올라올 때까지 실시하며, 42분을 필요로 하였다. 소성은, 220℃에서 23분간 행하여, 본 발명의 식빵(β 글루칸 함유량 0.16%)을 얻었다. β 글루칸은 균일하게 분산하고 있었다. 얻어진 식빵에 대하여, 경도, 풍미를 평가하였다. 그 결과를 하기 표 1에 나타낸다. 얻어진 식빵은 부드럽고 볼륨이 있는 품질이며 식감도 양호하였다.
- [0240] [비교예 12] (식빵의 비교 제조예)
- [0241] 실시예 26에서 얻어진 마가린 대신에, β 글루칸(샘플 K)을 배합하지 않은 것 이외는 실시예 26과 동일하게 해서 얻어진 마가린을 사용하고, 이후는 실시예 37과 동일하게 조작하여 식빵을 제조하였다. 얻어진 식빵에 대하여, 경도, 풍미를 평가하였다. 그 결과를 하기 표 2에 나타낸다.
- [0242] [실시예 38] (식빵의 제조예)
- [0243] 소맥분 100부, 이스트 3부, 설탕 4부, 식염 2부, 실시예 19에서 얻어진 분말화한 β 글루칸 함유 유지 조성물-19의 2부, 쇼트닝 4부, 샘플 B의 30부 및 물 33부를 첨가하고, 반죽 온도 28℃에서, 호퍼 믹서로 저속 2분, 고속 4분, 믹싱하여, 빵 생지를 조제하였다. 28℃에서 60분간 발효시키고, 450g으로 분할, 둥글게 뭉치고, 부풀리며(28℃, 20분), 시터에 3회 통과시켜서 정형 후, 원로프 타입의 틀에 삽입하였다. 최종 발효는 38℃에서 상대습도 90%의 조건하, 틀 상부가장자리 위로 2cm 올라올 때까지 실시하며, 46분을 필요로 하였다. 소성은, 210℃에서 30분간 행하여, 본 발명의 식빵(β 글루칸 함유량 2.5%)을 얻었다. 식빵중에 β 글루칸은 균일하게 분산하고 있었다. 얻어진 식빵에 대하여, 경도, 풍미를 평가하였다. 그 결과를 하기 표 1에 나타낸다. 얻어진 식빵은 부드럽고 볼륨이 있는 품질이며 식감도 양호하였다.
- [0244] [비교예 13] (식빵의 비교 제조예)
- [0245] 소맥분 100부, 이스트 3부, 설탕 4부, 식염 2부, β 글루칸(샘플 G)을 배합하지 않은 것 이외는 실시예 19와 동일하게 해서 얻어진 분말 함유 조성물 2부, 쇼트닝 4부 및 물 63부를 첨가하고, 반죽 온도 28℃에서, 호퍼 믹서로 저속 2분, 고속 4분, 믹싱하여, 빵 생지를 조제하였다. 이후는 실시예 38과 동일하게 조작하여, 식빵을 얻었다. 얻어진 식빵에 대하여, 경도, 풍미를 평가하였다. 그 결과를 하기 표 2에 나타낸다.
- [0246] [실시예 39] (쌀밥의 제조예)
- [0247] 니이가타(Niigata)산 코시히카리(Koshihikari)를 물에 잘 씻고, 그 100부에 물 60부, 실시예 3에서 얻어진 β 글루칸 함유 유지 조성물-3을 4부 첨가하여, 전기밥솥으로 밥을 지어, 본 발명의 쌀밥(β 글루칸 함유량 0.51%)을 얻었다. β 글루칸은 균일하게 분산하고 있었다. 얻어진 쌀밥에 대하여, 경도를 평가하였다. 그 결과를 하기 표 1에 나타낸다. 얻어진 쌀밥은 부드럽게 부푼 식감이 좋은 것이었다.
- [0248] [비교예 14] (쌀밥의 비교 제조예)
- [0249] 니이가타산 코시히카리를 물에 잘 씻고, 그 100부에 물 60부, 대두유를 4부 첨가하여, 전기밥솥으로 밥을 지어,

쌀밥을 얻었다. 얻어진 쌀밥에 대하여, 경도를 평가하였다. 그 결과를 하기 표 2에 나타낸다.

[0250] [실시예 40] (팍콘의 제조예)

[0251] 냄비에 옥수수 100부, 식염 2부, 실시예 10에서 얻어진 β 글루칸 함유 유지 조성물-10의 10부를 넣고, 뚜껑을 덮어 불에 직접 쪄어서 가열하여, 본 발명의 팍콘(β 글루칸 함유량 0.38%)을 얻었다. β 글루칸은 균일하게 분산하고 있었다. 얻어진 팍콘에 대하여, 매끄러움을 평가하였다. 그 결과를 하기 표 1에 나타낸다. 얻어진 팍콘은 촉감이 가볍고 매끈하며 식감은 매끄럽고 양호하였다.

[0252] [실시예 41] (두부의 제조예)

[0253] 실시예 22에서 제조한 쇼트닝을 사용하여 두부를 제조하였다. 물에서 침지(浸漬) 처리한 대두 100부에 물 140부를 첨가해서 갈고(ground), 100℃에서 5분간 비등(沸騰)시켰다. 삶은 국물은 목면 주머니(cotton bag)에 넣고, 압착 여과하여, 두유를 얻었다. 여기에 응고제(황산칼슘) 3부, 실시예 22에서 제조한 쇼트닝을 10부 첨가하여, 차분히 교반하고 나서, 75℃에서 응고시키고, 목면포를 깐 소쿠리에 흘려 넣어서 30분간 방치하여 본 발명의 두부(β 글루칸 함유량 0.095%)를 얻었다. β 글루칸은 균일하게 분산하고 있었다. 얻어진 두부에 대하여, 매끄러움, 풍미를 평가하였다. 그 결과를 하기 표 1에 나타낸다. 얻어진 두부는 양호한 식감이었다.

[0254] [비교예 15] (두부의 비교 제조예)

[0255] 물에서 침지 처리한 대두 100부에 물 140부를 첨가해서 갈고, 100℃에서 5분간 비등시켰다. 삶은 국물은 목면 주머니에 넣고, 압착 여과하여, 두유를 얻었다. 여기에 응고제(황산칼슘) 3부, β 글루칸(샘플 G)을 배합하지 않은 것 이외는 실시예 22와 동일하게 해서 제조한 쇼트닝을 10부 첨가하여, 차분히 교반하고 나서, 75℃에서 응고시키고, 목면포를 깐 소쿠리에 흘려 넣어서 30분간 방치하여 두부를 얻었다. 얻어진 두부에 대하여, 매끄러움, 풍미를 평가하였다. 그 결과를 하기 표 2에 나타낸다.

[0256] [실시예 42] (소프트 초콜릿의 제조예)

[0257] 설탕 50부, 카카오 매스 5부, 전지분유 15부, 실시예 4에서 얻어진 β 글루칸 함유 유지 조성물-4를 30부, 레시틴 0.3부 및 바닐린(vanillin) 0.04부로 이루어지는 배합으로, 통상적인 방법에 따라서 롤링(rolling), 콘칭 처리하여, 본 발명의 소프트 초콜릿(β 글루칸 함유량 13.5%)을 얻었다. β 글루칸은 균일하게 분산하고 있었다. 얻어진 소프트 초콜릿에 대하여, 매끄러움, 경도, 풍미를 평가하였다. 그 결과를 하기 표 1에 나타낸다. 얻어진 소프트 초콜릿은 브룸(bloom)이 발생하지 않고, 풍미도 양호하였다.

[0258] [비교예 16] (소프트 초콜릿의 비교 제조예)

[0259] 설탕 50부, 카카오 매스 5부, 전지분유 15부, 팜유 30부, 레시틴 0.3부 및 바닐린 0.04부로 이루어지는 배합으로, 통상적인 방법에 따라서 롤링, 콘칭 처리하여, 소프트 초콜릿을 얻었다. 얻어진 소프트 초콜릿에 대하여, 매끄러움, 경도, 풍미를 평가하였다. 그 결과를 하기 표 2에 나타낸다.

[0260] [실시예 43] (무수 크림의 제조예)

[0261] 실시예 23에서 제조한 쇼트닝 35부, 설탕 45부, 테이스티 파우더(tasty powder) 10부 및 분유 10부를 혼합하여, 본 발명의 무수 크림(β 글루칸 함유량 1%)을 얻었다. β 글루칸은 균일하게 분산하고 있었다. 얻어진 무수 크림에 대하여, 매끄러움과 풍미를 평가하였다. 그 결과를 하기 표 1에 나타낸다. 얻어진 무수 크림은 입에서 녹는 느낌이 좋고, 풍미가 매우 양호하였다.

[0262] [비교예 17] (무수 크림의 비교 제조예)

[0263] β 글루칸(샘플 K)을 배합하지 않은 것 이외는 실시예 23과 동일하게 해서 제조한 쇼트닝 35부, 설탕 45부, 테이스티 파우더 10부 및 분유 10부를 혼합하여, 무수 크림을 얻었다. 얻어진 무수 크림에 대하여, 매끄러움, 풍미를 평가하였다. 그 결과를 하기 표 2에 나타낸다.

[0264] [실시예 44] (샌드크림의 제조예)

[0265] 실시예 23에서 제조한 쇼트닝 100부 및 모노글리세라이드 0.1부를 혼합하고, 휘저어 거품을 일게 하여, 비중을 0.3으로 하였다. 그리고 시럽 100부를 첨가하고, 또한 휘저어서 거품을 일게 하여, 비중 0.65의 본 발명의 샌드크림(β 글루칸 함유량 1.45%)을 얻었다. β 글루칸은 균일하게 분산하고 있었다. 얻어진 샌드크림에 대하여, 매끄러움과 풍미를 평가하였다. 그 결과를 하기 표 1에 나타낸다. 얻어진 샌드크림은 풍미가 매우 양호하였다.

- [0266] [비교예 18] (샌드크림의 비교 제조예)
- [0267] β 글루칸(샘플 K)을 배합하지 않은 것 이외는 실시예 23과 동일하게 해서 제조한 쇼트닝 100부를 사용한 것 이외는 실시예 44와 동일하게 조작하여, 샌드크림을 얻었다. 얻어진 샌드크림에 대하여, 매끄러움, 풍미를 평가하였다. 그 결과를 하기 표 2에 나타낸다.
- [0268] [실시예 45] (하드 캔디(hard candy)의 제조예)
- [0269] 실시예 1의 β 글루칸 함유 유지 조성물-1을 100부, 실시예 6의 β 글루칸 함유 유지 조성물-6을 100부, 폴리글리세린지방산에스테르 23부, 글리세린지방산에스테르 14부 및 자당지방산에스테르(sucrose fatty acid ester) 4부를 첨가 혼합한 유지 조성물의 35부, 설탕 35부, 물엿 8.5부, 탈지분유 1.5부 및 물 40부를 혼합해서, 수중유형(水中油型) 유화물로 하고, 이것을 140℃가 될 때까지 줄여서, 수분 함량이 1.9%가 될 때까지 물을 줄이고, 냉각, 성형하여, 본 발명의 하드 캔디(β 글루칸 함유량 12.5%)를 얻었다. β 글루칸은 균일하게 분산하고 있었다. 얻어진 하드 캔디에 대하여, 안정성, 매끄러움, 풍미를 평가하였다. 그 결과를 하기 표 1에 나타낸다. 얻어진 하드 캔디는 보존중의 기름의 배어나움이 없고, 풍미도 양호하였다.
- [0270] [비교예 19] (하드 캔디의 비교 제조예)
- [0271] 대두유 100부, 팜유 100부, 폴리글리세린지방산에스테르 23부, 글리세린지방산에스테르 14부 및 자당지방산에스테르 4부를 첨가 혼합한 유지 조성물의 35부, 설탕 35부, 물엿 8.5부, 탈지분유 1.5부 및 물 40부를 혼합해서, 수중유형 유화물로 하고, 이것을 140℃가 될 때까지 줄여서, 수분 함량이 1.9%가 될 때까지 물을 줄이고, 냉각, 성형하여, 하드 캔디를 얻었다. 얻어진 하드 캔디에 대하여, 안정성, 매끄러움, 풍미를 평가하였다. 그 결과를 하기 표 2에 나타내었다.
- [0272] [실시예 46] (웍크림(whipped cream)의 제조예)
- [0273] 물 50부를 60℃로 승온하고, 교반하면서, 탈지분유 5부 및 트리폴리인산나트륨 0.1부를 용해한 수상(水相;aqueous phase)을 조제하였다. 별도로 실시예 3의 β 글루칸 함유 유지 조성물-3을 10부, 실시예 4의 β 글루칸 함유 유지 조성물-4를 20부 및 실시예 7의 β 글루칸 함유 유지 조성물-7을 15부를 혼합한 유상(油相;oil phase)을 준비해서, 상기의 수상에 이 유상을 혼합 교반하여, 예비 유화물을 조제하였다. 예비 유화 후 5Mpa의 압력으로 균질화한 후, VTIS 살균기에서 142℃, 4초간 살균하고, 다시 5Mpa의 압력으로 균질화 후 5℃까지 냉각하였다. 그 후, 냉장고에서 24시간 에이징(aging)을 행하여, 본 발명의 웍크림(β 글루칸 함유량 13.6%)을 얻었다. β 글루칸은 균일하게 분산하고 있었다. 얻어진 웍크림에 대하여, 안정성, 매끄러움, 풍미를 평가하였다. 그 결과를 하기 표 1에 나타낸다. 얻어진 웍크림은 오버런(overrun), 유화안정성, 내열보형(耐熱保形;heat resistant shape retention), 풍미, 입안에서의 녹음, 조화성 모두가 양호하였다.
- [0274] [비교예 20] (웍크림의 비교 제조예)
- [0275] 물 50부를 60℃로 승온하고, 교반하면서, 탈지분유 5부 및 트리폴리인산나트륨 0.1부를 용해한 수상을 조제하였다. 별도로 대두유 10부, 팜유 20부 및 채종유 15부를 혼합한 유상을 준비해서, 상기의 수상에 이 유상을 혼합 교반하여, 예비 유화물을 조제하였다. 이후는 실시예 46과 동일하게 조작하여, 웍크림을 얻었다. 얻어진 웍크림에 대하여, 안정성, 풍미를 평가하였다. 그 결과를 하기 표 2에 나타낸다.
- [0276] [실시예 47] (젓 대체 조성물의 제조예)
- [0277] 물 64부를 60℃로 승온하고, 교반하면서, 탈지분유 25부, 헥사메타인산나트륨(sodium hexametaphosphate) 0.2부, 구연산나트륨 0.2부 및 자당지방산에스테르 0.3부를 용해한 수상에, 실시예 17의 β 글루칸 함유 유지 조성물-17을 10부, 글리세린지방산에스테르 0.3부를 첨가, 혼합 교반하여, 예비 유화물을 조제하였다. 예비 유화 후 5Mpa의 압력으로 균질화한 후, VTIS 살균기에서 142℃, 4초간 살균하고, 다시 15Mpa의 압력으로 균질화 후 5℃까지 냉각하여, 본 발명의 젓 대체 조성물(β 글루칸 함유량 2.2%)을 얻었다. β 글루칸은 균일하게 분산하고 있었다. 얻어진 젓 대체 조성물에 대하여, 안정성, 풍미를 평가하였다. 그 결과를 하기 표 1에 나타낸다. 얻어진 젓 대체 조성물은 풍미, 유화안정성 모두 양호하였다.
- [0278] [비교예 21] (젓 대체 조성물의 비교 제조예)
- [0279] 물 64부를 60℃로 승온하고, 교반하면서, 탈지분유 25부, 헥사메타인산나트륨 0.2부, 구연산나트륨 0.2부 및 자당지방산에스테르 0.3부를 용해한 수상에, β 글루칸(샘플 H)을 배합하지 않은 것 이외는 실시예 17과 동일하게 제조한 유지 조성물 10부 및 글리세린지방산에스테르 0.3부를 첨가, 혼합 교반하여, 예비 유화물을 조제하였다.

이후는 실시예 47과 동일하게 조작하여, 젓 대체 조성물을 얻었다. 얻어진 젓 대체 조성물에 대하여, 안정성과 풍미를 평가하였다. 그 결과를 하기 표 2에 나타낸다.

[0280] [실시예 48] (생활습관병 예방 작용을 갖는 식품(마가린)의 제조예)

[0281] 경화 대두유(용점 45℃) 10부, 팜유 35부, 실시예 3의 β 글루칸 함유 유지 조성물-3의 10부, 식물스테롤 혹은 식물스테롤지방산에스테르(plant sterol fatty acid esters)를 10%이상 함유하는 에스테르 교환유 30부, 상기 샘플 K의 13.3부, 식염 1부, 탈지분유 0.5부 및 조미료(flavor) 0.2부를 유화, 급랭 가소화에 의해 본 발명의 콜레스테롤 저하 작용을 갖는 마가린(β 글루칸 함유량 10%)을 얻었다. β 글루칸은 균일하게 분산하고 있었다. 얻어진 콜레스테롤 저하 작용을 갖는 마가린에 대하여, 매끄러움, 풍미를 평가하였다. 그 결과를 하기 표 1에 나타낸다. 얻어진 마가린은 입에서 녹는 느낌이 좋은, 풍미가 양호한 마가린이었다.

[0282] [비교예 22] (생활습관병 예방 작용을 갖는 식품(마가린)의 비교 제조예)

[0283] 경화 대두유(용점 45℃) 10부, 팜유 35부, 대두유의 10부, 식물스테롤 혹은 식물스테롤지방산에스테르를 10%이상 함유하는 에스테르 교환유 30부, 물 13.3부, 식염 1부, 탈지분유 0.5부 및 조미료 0.2부를 유화, 급랭 가소화에 의해 콜레스테롤 저하 작용을 갖는 마가린을 얻었다. 얻어진 콜레스테롤 저하 작용을 갖는 마가린에 대하여, 매끄러움, 풍미를 평가하였다. 그 결과를 하기 표 2에 나타낸다.

[0284] [실시예 49] (생활습관병 예방 작용을 갖는 의약품의 제조예)

[0285] 고순도 DHA(순도 98%, POV 1.0meq/kg이하)에 4000ppm이 되도록 α 토코페롤을 첨가한 것 3부, 상기 샘플 K의 20부 및 카세인 나트륨 10부를 첨가하여 질소하, 고속믹서로 유화 후, 스프레이 드라이어로 건조시켜서, 분말화한 본 발명의 생활습관병 예방 작용을 갖는 의약품(β 글루칸 함유량 36.4%)을 얻었다. β 글루칸은 균일하게 분산하고 있었다. 얻어진 생활습관병 예방 작용을 갖는 의약품에 대하여, 안정성을 평가하였다. 그 결과를 하기 표 1에 나타낸다. 얻어진 의약품은 POV가 0.8meq/kg으로 산화안정성이 우수한 것이었다.

[0286] [비교예 23] (생활습관병 예방 작용을 갖는 의약품의 비교 제조예)

[0287] 고순도 DHA(순도 98%, POV 1.0meq/kg이하)에 4000ppm이 되도록 α 토코페롤을 첨가한 것 3부, 물 20부 및 카세인 나트륨 10부를 첨가하여 질소하, 고속믹서로 유화 후, 스프레이 드라이어로 건조시켜서, 분말화한 생활습관병 예방 작용을 갖는 의약품을 얻었다. 얻어진 생활습관병 예방 작용을 갖는 의약품에 대하여, 안정성을 평가하였다. 그 결과를 하기 표 2에 나타낸다. 얻어진 의약품은 POV가 1.4meq/kg으로 산화안정성이 떨어지는 것이었다.

[0288] 상기의 실시예 및 비교예에 있어서의 안정성, 식감(매끄러움, 경도, 풍미)은 다음과 같이 해서 평가하였다. 한편, 하기의 표 1 및 2중의 -는, 평가를 하고 있지 않은 것을 나타낸다.

[0289] · 안정성의 평가방법

[0290] 안정성은 5℃에서 1개월 보존 후의 상태 변화를 눈으로 확인하고, 하기 3단계의 평가기준으로 평가하였다.

[0291] <평가기준>

[0292] ○ : 안정성이 우수하다.

[0293] △ : 약간 분리 등, 외관에 변화가 보여진다.

[0294] × : 분리가 보여진다.

[0295] · 식감(매끄러움, 경도, 풍미)의 평가방법

[0296] 식감에 대해서는, 패널리스트 10명에 의해, 각각 하기 3단계의 평가기준으로 평가를 행하고, 가장 사람수가 많은 평가를 평가결과로 하였다.

[0297] <평가기준>

[0298] (매끄러움)

[0299] ○ : 매우 매끄럽다.

[0300] △ : 매끄럽다.

- [0301] × : 매끄럽지 않다
- [0302] (경도)
- [0303] ○ : 매우 부드럽다.
- [0304] △ : 부드럽다
- [0305] × : 부드럽지 않다
- [0306] (풍미)
- [0307] ○ : 우수하다.
- [0308] △ : 약간 떨어진다
- [0309] × : 떨어진다.

표 1

[0310]

실시예	안정성	식감		
		매끄러움	경도	풍미
실시예 22	-	○	-	○
실시예 23	-	○	-	○
실시예 24	○	○	-	○
실시예 25	○	○	-	○
실시예 26	○	○	-	○
실시예 27	○	-	-	○
실시예 28	○	-	-	○
실시예 29	○	○	-	○
실시예 30	○	○	-	○
실시예 31	○	○	-	○
실시예 33	-	-	○	○
실시예 34	-	-	○	○
실시예 35	-	○	○	○
실시예 36	-	○	○	○
실시예 37	-	-	○	○
실시예 38	-	-	○	○
실시예 39	-	-	○	-
실시예 40	-	○	-	-
실시예 41	-	○	-	○
실시예 42	-	○	○	○
실시예 43	-	○	-	○
실시예 44	-	○	-	○
실시예 45	○	○	-	○
실시예 46	○	○	-	○
실시예 47	○	-	-	○
실시예 48	-	○	-	○
실시예 49	○	-	-	-

표 2

[0311]

비교예	안정성	식감		
		매끄러움	경도	풍미
비교예 1	-	△	-	×
비교예 2	○	○	-	△
비교예 3	△	-	-	△
비교예 4	△	-	-	○
비교예 5	×	○	-	△
비교예 6	×	△	-	△

비교예 7	△	○	-	△
비교예 8	-	-	△	△
비교예 9	-	-	△	△
비교예 10	-	○	△	△
비교예 11	-	○	△	△
비교예 12	-	-	△	○
비교예 13	-	-	△	○
비교예 14	-	-	△	-
비교예 15	-	○	-	△
비교예 16	-	○	△	×
비교예 17	-	○	-	×
비교예 18	-	○	-	×
비교예 19	△	○	-	△
비교예 20	△	-	-	×
비교예 21	△	-	-	△
비교예 22	-	△	-	×
비교예 23	×	-	-	-

[0312] 다음으로 본 발명의 신규의 미생물에 대하여 실시예를 들어 구체적으로 설명한다. 시험예 1~2에 있어서는, 본 발명의 미생물의 균주의 스크리닝(screening) 방법을 나타내고, 시험예 3~7에 있어서는, ADK-34 균주의 균학적 성질을 나타낸다. 또한, 실시예 50~52는 ADK-34 균주를 사용한 본 발명의 β글루칸의 제조방법의 실시예를 나타낸다. 분석에 관해서는, 상기 분석예 1~3과 동일하게 행하였다.

[0313] [시험예 1] 균주의 스크리닝 방법 1

[0314] 일본에 있어서 전통적인 보존식을 중심으로, 통상, 가열조리하지 않고 섭취하는 시판의 식품의 표면에 부착·생육하고 있는 미생물을 넓게 분리하고, β글루칸을 생산하는 균주를 스크리닝하였다. 스크리닝 방법을 이하에 상세히 서술한다.

[0315] 우선, 대상 샘플인 식품을 멸균 페트리 접시(petri dish)에 넣고, 이것에 멸균한 PBS 10ml를 첨가하며, 멸균이 끝난 스포이트를 사용해서 샘플 표면을 PBS로 반복 세정하여, 샘플의 표면을 세정한 세정액을 얻었다. 얻어진 세정액을 멸균한 PBS로 10~100배 희석하고, 이 200μl를 플레이트에 첨가하여, 스프레더(spreeder)로 펴고, 2주간, 실온에서 배양하였다. 플레이트는 YM 배지(디프코(Difco)사제)에, 클로람페니콜(chloramphenicol)을 100μg/ml, 한천을 1.5중량%가 되도록 각각 첨가한 배지를 20ml 넣고, 고화(固化)시킨 것을 사용하였다. 생육한 콜로니(colonies) 약 2만 중, 생육 초기에 유백색이고, 점차 콜로니 전체에 광택이 나게 되며 습윤한 콜로니를 형성한 것, 콜로니 전체에 광택이 나고, 중심부가 약간 황색·갈색, 혹은 황색·갈색의 윤곽이 생기며, 습윤한 콜로니를 형성한 것, 전체가 유백색~핑크색을 나타내는 콜로니를 형성한 것, 점차 노흑색이 되어 보풀이 인 특징을 갖는 콜로니가 형성된 것, 이상의 4형질을 나타내는 콜로니로부터 조균(釣菌)하였다. 한편, 콜로니 전체가 핑크색이 되지만, 상부로 부풀어 올라 외주부위의 확산이 보여지지 않는, 광택이 없는 콜로니는 제외하였다. 조균한 균주는, 단균 분리 조작을 실시하고, 다시 7일간 배양한 후, 현미경 관찰에 의해 출아형(出芽型) 분생자가 관찰되는 것, 및 효모양 생육(yeast-like growth)이 보여지는 것을 남겨 두고, 분생자병(conidiophores)이 관찰된 것에 대해서는 제외하여, 제 1 스크리닝 결과로 하였다.

[0316] 다음으로, 제 1 스크리닝에 의해 얻어진 균주를 액체 배양하였다. 즉, YM 배지에 5중량%가 되도록 수크로오스를 첨가한 배지를 조제하고, 24웰 마이크로플레이트(24-well microplate)를 사용해서, 26℃, 4일간의 배양을 행하여, 배양액을 얻었다. 생육한 균주가 배양액 전체에 균일하게 분산하고, 또한 점성을 나타내는 배양액을 제공하는 균주를 남겨 두고, 제 2 스크리닝 결과로 하였다.

[0317] 다음으로, 제 2 스크리닝 결과에 의해 얻어진 균주를 단균 분리하고, YM 액체 배지에 식균하여, 26℃에서 96시간 배양을 실시하였다. 얻어진 배양액에 등량의 증류수를 첨가하고, 121℃에서 20분간의 멸균 후, 배양액을 원심분리(8,000rpm)하여 배양 상청을 얻었다. 배양 상청 30μl에 2배량의 에탄올을 첨가하고, 원심분리(1000rpm, 10min)로 침전을 얻으며, 100μl의 증류수를 첨가하고, 전 다당량을 페놀 황산법(phenol-sulfuric acid method)으로 측정하며, 배지에 대하여 동일한 조작을 해서 얻어진 값보다 고가가 된 것을 양성으로 판정하였다. 양성인 것을 제 3 스크리닝 결과로 하였다.

[0318] 대상 샘플로부터 분리·배양하여 생육한 약 2만 콜로니로부터, 제 1 스크리닝으로 180균주, 제 2 스크리닝으로

50균주, 제 3 스크리닝으로 14균주를 얻었다. 제 3 스크리닝에 의해 얻어진 균주 및 재단법인 오사카 발효 연구소로부터 얻은 3균주, 즉 IFO-4466주, IFO-6353주 및 IFO-7757주에 대하여, 배양 상청중의 β 글루칸량을 상기 분석에 1에 나타내는 측정방법에 의해 측정함과 아울러, 상기 분석에 3에 나타내는 측정방법에 의해 배양액 중의 생성 다당의 폴루란에 대한 순도를 측정하였다. 그 결과를 표 3에 나타낸다. ADK-34 균주가 생성하는 다당은, 폴루라나아제에 의해 소화되지 않으며, 그 다당량은 β 글루칸 정량값에 거의 일치하는 것으로, β 글루칸이 순도 좋게 생성되어 있다고 결론되었다.

표 3

[0319]

균주명	페놀 황산값(490nm)		순도(%)	β 글루칸량 (mg/ml)
	효소 처리전	효소 처리후		
ADK-1	1.067	0.389	36.5	0.12
ADK-4	1.183	0.504	42.6	0.23
ADK-5	1.655	1.042	63	1.34
ADK-6	1.364	0.764	56	0.649
ADK-8	1.344	0.914	68	0.674
ADK-10	1.469	0.646	44	0.357
ADK-17	1.224	0.759	62	0.411
ADK-20	1.003	0.552	55	0.264
ADK-24	1.141	0.776	68	0.888
ADK-27	1.225	0.882	72	0.954
ADK-28	1.377	0.565	41	0.5
ADK-31	1.419	0.426	30	0.311
ADK-34	1.366	1.369	100	1.89
ADK-42	1.154	0.427	37	0.44
IFO-6353	1.455	0.757	52	0.743
IFO-7757	0.975	0.722	74	0.684
IFO-4466	0.736	0.521	71	0.701
폴루란 1mg/ml	0.755	0.016	3.9	0
폴루란 0.5mg/ml	0.411	0.009	2.2	0

[0320]

[시험예 2] 균주의 스크리닝 방법 2

[0321]

항생물질 시클로헥시미드(cycloheximide)를 10 μ g/ml의 농도로 첨가한 배지를 사용한 것 이외는, 시험예 1과 동일하게 하여, 균주의 스크리닝을 실시하였다. 그 결과, 대상 샘플로부터 분리·배양하여 생육한 4000 콜로니로부터, 제 1 스크리닝으로 30균주, 제 2 스크리닝으로 10균주, 제 3 스크리닝으로 3균주(ADK-71 균주, ADK-77 균주, ADK-82 균주)가 얻어졌다. 제 3 스크리닝에 의해 얻어진 균주에 대해서, 시험예 1과 동일하게 하여, β 글루칸량 및 생성 다당의 폴루란에 대한 순도를 측정하였다. 그 결과를 표 4에 나타낸다.

[0322]

다음으로, 제 3 스크리닝의 결과 얻어진 3균주에 대하여 형태학적인 관찰로부터 균주 동정을 각각 시도하였다. YM 한천 배지에 식균 후, 26℃, 7일간 배양한 바, 3균주의 콜로니는 모두, 전체적으로 광택이 나고, 중심부에 황색의 윤곽을 가지며, 습윤한 콜로니를 형성하였다. 이들 플레이트를 4℃로 이관(移管)해서 7일간 보존함으로써, 중심부의 황색은 흑색으로 변화하였다. ADK-71 균주 및 ADK-77 균주 각각의 콜로니 전체는 변화하지 않고, 백색~핑크색이었다. ADK-82 균주는 콜로니 전체가 흑색화하였다. 또한, 이들의 3균주 각각을 YM 액체 배지에서 26℃에서 3일간 배양한 균체의 현미경 관찰에서는, 3균주 어느 것에 있어서도 출아형의 분생자가 보여졌으며, 효모양(yeast-like)의 생육이었다. 또한, 이들의 3균주 각각을 YM 한천 배지에서 26℃에서 7일간 배양한 콜로니의 균체는, 3균주 어느 것에 있어서도, 분생자가 연결된 쇠상(鎖狀)으로 생육한 균체가 관찰되었으나, 분생자병(conidiophores)은 보이지 않았다. 이상으로부터, 3균주는 아우레오바시디움 폴루란스(Aureobasidium pullulans)로 판정하였다.

표 4

[0323]

균주명	페놀 황산값(490nm)		순도(%)	β 글루칸량 (mg/ml)
	효소 처리전	효소 처리후		
ADK-71	0.882	0.893	101	1.22

ADK-77	0.741	0.842	114	0.936
ADK-82	0.633	0.655	103	0.854
플루란 1mg/ml	0.768	0.015	2	0
플루란 0.5mg/ml	0.393	0.005	1.3	0

[0324] [시험예 3] 형태적·배양적 성질

[0325] 시험예 1에서 얻어진 균주 중에서, ADK-34 균주에 대하여, YM 배지(1중량% 글루코오스, 0.5중량% 펩톤, 0.3중량% 효모 엑기스, 0.3중량% 맥아 엑스트랙트(malt extract), pH6.0)에서 26℃, 3일간 배양한 후, 현미경으로 관찰한 소견을 나타내면, 세포의 크기는 짧은지름 2~2.5 μ m, 긴지름 5~10 μ m, 형상은 계란형, 표면은 평활하고 무색, 운동성은 없었다. 또한, 군사는 극히 조금이고, 폭은 2.5 μ m였다. 불균일하고 표면은 평활 무색이었다. 효모양의 출아 분생자가 형성되었다.

[0326] [시험예 4] 한천 평판 배양

[0327] 시험예 1에서 얻어진 균주 중에서, ADK-34 균주에 대하여, 포테이토 텍스트로오스 한천(potato-dextrose-agar) 배지(에이켄(Eiken))에서 26℃에서 7일간 배양하였다. 그 때의 소견을 이하에 나타낸다. 3일간의 배양에서, 생육은 양호하고, 형태는 원형이며, 전체 가장자리가 갈쪽갈쪽하고, 콜로니 전체에 광택이 있으며, 표면의 상태는 평활, 색조는 백색이었다. 또한, Colony(콜로니)는, 5일간의 배양에서 표면이 평활하고 담회백색(淡灰白色)이 되며, 효모양으로 발육하고, 7일간의 배양에서 Colony 표면은 핑크색이 되었다. 26℃에서 7일간 배양한 플레이트를, 4℃에서 7일간 냉장한 바, 약간 핑크색이 진해졌으나, 콜로니 전체에 변화는 없었다.

[0328] [시험예 5] 액체 배양

[0329] 시험예 1에서 얻어진 균주 중에서, ADK-34 균주에 대하여, YM 배지에서 배양하였다. 그 때의 최적 생육 온도 및 최적 생육 pH를 나타내면, 최적 생육 온도는 26℃이고, 최적 생육 pH는 5.0~7.0이며, 생육 개시시의 pH는 6.2이고, 배양 종료 후의 pH는 7.5였다. 바람직한 발육 온도는 20~30℃이고, 최적 온도는 26℃, 발육 가능 온도는 5~40℃였다. 글루코오스, 프락토오스(fructose), 만노오스(mannose) 등의 헥소스(hexoses), 수크로오스 등의 이당류 및 전분(starch)을 분해하고, 어떠한 탄소원에서도, 배양액은 점조(粘稠)하게 되며, 특유의 방향(芳香)을 가졌다.

[0330] 시험예 3~5의 결과, 본 발명의 미생물 중, ADK-34 균주는 균학적 특징으로부터 아우레오바시디움속의 균주로 동정되었다.

[0331] [시험예 6] 시클로헥시미드 내성 시험

[0332] 시험예 1 및 2의 스크리닝으로 얻어진 균주, 및 재단법인 오사카 발효 연구소에 보존되어 있는, IF0-4466주, IF0-6353주, 및 IF0-7757주에 대해서, 각 균주의 시클로헥시미드 내성 시험을 실시하였다. 즉, 각 균주를 YM 한천 배지(디프코사제)에서 26℃에서 5일간 생육시켰다. YM 한천 배지(디프코사제)에 시클로헥시미드를 5, 10, 20, 40, 80 μ g/ml의 농도가 되도록 첨가한 배지를 각각 조제하고, 상기의 생육시켜 둔 균주를 멸균한 이쑤시개로 이들의 시클로헥시미드 함유 배지에 식균하며, 26℃에서 10일간의 배양 후, 생육한 콜로니의 유무를 관찰하고, 생육한 경우는 콜로니의 직경을 측정하였다. 그 결과를 표 5에 나타낸다.

표 5

[0333]

균주명	시클로헥시미드 농도(μ g/ml)					
	0	5	10	20	40	80
ADK-1	16.5	0	0	0	0	0
ADK-4	17.3	8.5	0	0	0	0
ADK-5	15.6	6.3	0	0	0	0
ADK-6	14.4	7.1	0	0	0	0
ADK-8	16.8	7.7	1.1	0	0	0
ADK-10	14.9	8.5	0	0	0	0
ADK-17	12.7	6.7	0	0	0	0
ADK-20	13.3	6.2	0	0	0	0
ADK-24	15.6	9.1	2.5	0	0	0
ADK-27	17.4	10.3	0	0	0	0

ADK-28	15.4	7.1	0	0	0	0
ADK-31	16.8	6.3	1.7	0	0	0
ADK-34	15.5	13.6	6.7	5.1	3.7	0.5
ADK-42	12.7	2.4	0	0	0	0
ADK-71	13.7	7.6	4.1	1.8	1.2	0
ADK-77	15.4	9.5	4.1	0.8	0	0
ADK-82	16.8	10.4	2.9	1.5	1.2	0
IFO-7757	17.5	0	0	0	0	0
IFO-6353	15.6	7.3	2.3	0	0	0
IFO-4466	14.8	4.4	0	0	0	0

[0334] 표 3 및 표 5로부터 명백하듯이, IFO-4466주, IFO-6353주, 및 IFO-7757주는, 시클로헥시미드에 내성을 갖지 않으며, 생산되는 β 글루칸의 풀루란에 대한 순도는 낮은 것이었다. 한편, 표 3~5로부터 명백하듯이, 식품으로부터의 분리 균주 중에서, 시클로헥시미드에 내성을 갖는 균주(ADK-34 균주, ADK-71 균주, ADK-77 균주, ADK-82 균주)는 β 글루칸을 풀루란에 대하여 순도 좋게 생산하며, 시클로헥시미드에 내성이 없는 균주의 대부분은, 생산된 β 글루칸의 풀루란에 대한 순도가 낮은 결과가 되었다.

[0335] [시험예 7] 18S rRNA 유전자의 유전자 해석

[0336] 스크리닝의 결과 얻어진 ADK-34 균주에 대하여, 18S rRNA 유전자의 1732bp의 염기배열을 이하와 같이 해서 결정하였다. ADK-34 균주를 포테이토 텍스트로오스 배지(디프코사)에서 진탕배양(shake-culture)하고, 원심분리, 증류수에 의한 세정을 3회 행하여, DNA 추출용 균체를 얻었다. 이 균체로부터 FastPrep FP120(Qbiogene)과 FastDNA-kit(Qbiogene)를 사용해서 세포 파쇄(破碎)하고, DNeasy Plant Mini Kit(QIAGEN)에 의해 게놈 DNA 분리를 행하였다. 이 게놈 DNA를 주형(鑄型)으로 하고, Ready-To-Go PCR Beads(Amersham-Pharmacia Biotech)와 프라이머(primers) NS1 및 NS8을 사용해서 PCR 증폭을 행하였다.

[0337] 프라이머 NS1과 NS8의 염기배열은 NS1:(5'→3') GTAGTCATATGCTTGTCTC, NS8:(5'→3') TCCGCAGGTTACCTACGGA를 사용하였다. 서머 사이클러(thermal cycler)는 geneAmp PCR System 9600(Applied Biosystems)을 사용하였다. 반응 종료 후, PCR 산물을 QIAquickPCR purification Kit(QIAGEN)를 사용해서 정제하였다. 이 DNA 단편(fragment)을 직접 시퀀싱 반응(sequencing reaction)에 제공하고, 염기배열 해석은 ABI Prism377 DNA Sequencer(Applied Biosystems)를 사용해서 실시하였다. 유사한 염기배열은 DNA 데이터 베이스(DDBJ, DNA Data Bank of Japan)에서 BLAST를 이용해서 검색하였다.

[0338] 그 결과를 배열표의 배열번호 1에 나타낸다. 또한, 얻어진 염기배열에 기초하여 데이터 베이스 검색을 행하고, 동(同) 균주와 유연균(類緣菌; homologous strains)과의 상동성(相同性)을 조사한 결과를 표 6~8에 나타낸다. 결정된 염기배열(배열번호 1), 상동성 검색 결과(표 6~8)로부터, ADK-34 균주는 아우레오바시디움 풀루란스(Aureobasidium pullulans)와의 상동성이 100%로, 완전히 일치하였다. 이 결과로부터, 본 균주는 아우레오바시디움 풀루란스라고 판정되었다.

표 6

Sequences producing significant alignments:			(bits)	Value
AY030322 AY030322.1	Aureobasidium pullulans 18S ribosomal RNA g...	3433	0.0	1732/1732 (100%)
M55639 M55639.1	Aureobasidium pullulans 16S-like ribosomal RNA ...	3429	0.0	1731/1732 (99%)
U42474 U42474.1	Dothidea inculpta 18S small subunit ribosomal ...	3237	0.0	1699/1721 (98%)
U42475 U42475.1	Dothidea hippophaeos 18S small subunit ribosoma...	3221	0.0	1691/1713 (98%)
U77668 U77668.1	Coccodinium bartschii 18S ribosomal RNA gene, p...	3178	0.0	1690/1719 (98%)
AF258607 AF258607.1	Scytalidium hyalinum strain IP252699 18S ri...	3158	0.0	1699/1733 (98%),
AF258606 AF258606.1	Scytalidium hyalinum strain IP151783 18S ri...	3158	0.0	1699/1733 (98%),
AB041250 AB041250.1	Phyllosticta pyrolae gene for 18S rRNA, par...	3158	0.0	1699/1733 (98%),
AB041249 AB041249.1	Guignardia endophyllicola gene for 18S rRNA...	3150	0.0	1698/1733 (97%),
AB041248 AB041248.1	Guignardia endophyllicola gene for 18S rRNA...	3150	0.0	1698/1733 (97%),
AB041247 AB041247.1	Guignardia endophyllicola gene for 18S rRNA...	3150	0.0	1698/1733 (97%)
Y11716 Y11716.1	P.dematoides 18S rRNA gene.	3148	0.0	1697/1732 (97%),
U42477 U42477.1	Botryosphaeria ribis 18S small subunit ribosoma...	3144	0.0	1689/1722 (98%),
Y18702 Y18702.1	Sarcinomyces petricola 18S rRNA gene, strain CB...	3108	0.0	1693/1733 (97%),
D49656 D49656.1	Lasioderma serricorne yeast-like symbiote DNA f...	3102	0.0	1692/1733 (97%),
AJ224362 AJ224362.1	Bulgaria inquinans 18S rDNA.	3094	0.0	1691/1733 (97%),
AF088239 AF088239.1	Lecidea fuscoatra 18S ribosomal RNA, partia...	3033	0.0	1666/1710 (97%),
Y18693 Y18693.1	Hortaea werneckii 18S rRNA gene, strain CBS 107...	3027	0.0	1679/1731 (96%)
AF088253 AF088253.1	Umbilicaria subglabra 18S ribosomal RNA, pa...	3015	0.0	1648/1689 (97%),
Y11355 Y11355.1	S.crustaceus 18S rRNA gene.	3001	0.0	1674/1731 (96%),
U42478 U42478.1	Sporormia lignicola 18S small subunit ribosomal...	2991	0.0	1665/1717 (96%)
AF184755 AF184755.1	Metus conglomeratus small subunit ribosomal...	2991	0.0	1678/1733 (96%),
AB016175 AB016175.1	Euascomycetes sp. K89 gene for 18S rRNA, pa...	2985	0.0	1680/1733 (96%),
AF184753 AF184753.1	Cladonia rangiferina small subunit ribosoma...	2976	0.0	1676/1733 (96%),
AF140236 AF140236.1	Stereocaulon paschale small subunit ribosom...	2976	0.0	1676/1733 (96%),
AB015778 AB015778.1	Pseudogymnoascus roseus 18S rRNA gene, part...	2972	0.0	1640/1687 (97%)
AF184756 AF184756.1	Pilophorus cereolus small subunit ribosomal...	2968	0.0	1675/1733 (96%),
AF184761 AF184761.1	Stereocaulon vesuvianum small subunit ribos...	2960	0.0	1674/1733 (96%),
AF184754 AF184754.1	Heterodea muelleri small subunit ribosomal ...	2960	0.0	1674/1733 (96%),
AF168167 AF168167.1	Dark septate endophyte DS16b 18S ribosomal ...	2960	0.0	1661/1713 (96%),
AF184757 AF184757.1	Pilophorus robustus small subunit ribosomal...	2952	0.0	1673/1733 (96%),
AF117984 AF117984.1	Hypogymnia physodes nuclear small subunit r...	2952	0.0	1665/1720 (96%),
AF088246 AF088246.1	Rhizocarpon geographicum 18S ribosomal RNA,...	2946	0.0	1643/1693 (97%),
AF241544 AF241544.1	Cladonia sulphurina small subunit ribosomal...	2944	0.0	1672/1733 (96%),
AB015776 AB015776.1	Byssosascus striatosporus 18S rRNA gene, par...	2940	0.0	1636/1687 (96%)

[0339]

표 7

Sequences producing significant alignments:			(bits) Value
AF140233 AF140233.1 Alecortia sarmentosa small subunit ribosoma...	2938	0.0	1671/1733 (96%),
U70960 U70960.1 Pilophorus acicularis 18S small subunit ribosom...	2936	0.0	1671/1733 (96%),
AF085471 AF085471.1 Baecomyces rufus 18S small subunit ribosomal...	2932	0.0	1638/1691 (96%)
U70961 U70961.1 Stereocaulon ramulosum 18S small subunit riboso...	2928	0.0	1670/1733 (96%),
AF088238 AF088238.1 Lasallia rossica 18S ribosomal RNA, partial...	2926	0.0	1654/1708 (96%),
Y14210 Y14210.1 Monilinia laxa 18S rRNA gene, exon 1, partial.	2916	0.0	1636/1691 (96%)
U42476 U42476.1 Botryosphaeria rhodina 18S small subunit riboso...	2914	0.0	1619/1671 (96%),
U86692 U86692.1 Stenocybe pullatula 18S SSU ribosomal RNA, part...	2910	0.0	1640/1696 (96%),
AF117992 AF117992.1 Xanthoparmelia conspersa nuclear small subu...	2910	0.0	1664/1728 (96%),
AF085475 AF085475.1 Cladonia subcervicomicis 18S small subunit r...	2910	0.0	1637/1692 (96%),
AF085465 AF085465.1 Stereocaulon taeniarum 18S small subunit ri...	2910	0.0	1634/1688 (96%),
AB015787 AB015787.1 Oidiodendron tenuissimum 18S rRNA gene, iso...	2910	0.0	1634/1688 (96%),
AF140235 AF140235.1 Cornicularia normoerica small subunit ribos...	2908	0.0	1663/1727 (96%),
AB015777 AB015777.1 Myxotrichum deflexum 18S rRNA gene, isolate...	2908	0.0	1632/1687 (96%)
AF184759 AF184759.1 Psora decipiens small subunit ribosomal RNA...	2904	0.0	1667/1733 (96%),
AF117981 AF117981.1 Neophyllis melacarpa nuclear small subunit ...	2904	0.0	1667/1733 (96%),
AF088251 AF088251.1 Stereocaulon ramulosum 18S ribosomal RNA, p...	2904	0.0	1652/1713 (96%),
AF088245 AF088245.1 Pseudevernia cladoniae 18S ribosomal RNA, p...	2902	0.0	1638/1696 (96%)
AF201452 AF201452.1 Rhytidhysterion rufulum 18S ribosomal RNA ge...	2900	0.0	1578/1615 (97%),
AF274110 AF274110.1 Lepolichen coccophorus 18S ribosomal RNA ge...	2898	0.0	1660/1725 (96%),
AF117991 AF117991.1 Pleurosticta acetabulum nuclear small subun...	2898	0.0	1664/1730 (96%),
U43463 U43463.1 Mycosphaerella mycopappi small subunit nuclear ...	2894	0.0	1664/1732 (96%)
AF085466 AF085466.1 Stereocaulon vesuvianum 18S small subunit r...	2894	0.0	1632/1688 (96%),
AB033475 AB033475.1 Blumeria graminis f. sp. bromi gene for 18S...	2894	0.0	1660/1724 (96%),
U42485 U42485.1 Lophiostoma crenatum 18S small subunit ribosoma...	2892	0.0	1655/1719 (96%),
AF053726 AF053726.1 Kirschsteiniotelia maritima small subunit ...	2890	0.0	1659/1726 (96%)
AF201455 AF201455.1 Tubeufia helicoma 18S ribosomal RNA gene, p...	2886	0.0	1586/1628 (97%),
AF241541 AF241541.1 Xanthoria parietina small subunit ribosomal...	2884	0.0	1653/1719 (96%)
U70959 U70959.1 Leifidium tenerum 18S small subunit ribosomal R...	2880	0.0	1664/1733 (96%),
AF282910 AF282910.1 Lichinella cribellifera 18S small subunit r...	2880	0.0	1667/1733 (96%),
AF117986 AF117986.1 Cetraria islandica nuclear small subunit ri...	2880	0.0	1646/1709 (96%),
L37540 L37540.1 Porpidia crustulata (Ach.) Hertel and Knoph nuc...	2878	0.0	1570/1608 (97%),
AF184751 AF184751.1 Cladia retipora small subunit ribosomal RNA...	2874	0.0	1636/1697 (96%),

[0340]

표 8

Sequences producing significant alignments:	(bits) Value
AF282913 AF282913.1 <i>Peltula obscurans</i> 18S small subunit ribosom... 2872 0.0	1663/1732 (96%),
AF085474 AF085474.1 <i>Pycnothelia papillaria</i> 18S small subunit ri... 2872 0.0	1618/1673 (96%),
AB033479 AB033479.1 <i>Leveillula taurica</i> gene for 18S ribosomal RNA. 2865 0.0	1654/1720 (96%),
AF117985 AF117985.1 <i>Parmelia saxatilis</i> nuclear small subunit ri... 2859 0.0	1653/1722 (95%),
AF088254 AF088254.1 <i>Xanthoria elegans</i> 18S ribosomal RNA, partia... 2855 0.0	1655/1724 (95%),
AF117988 AF117988.1 <i>Usnea florida</i> nuclear small subunit ribosom... 2853 0.0	1635/1699 (96%),
U42483 U42483.1 <i>Herpotrichia juniperi</i> 18S small subunit ribosom... 2847 0.0	1649/1720 (95%),
AF140234 AF140234.1 <i>Alectoria ochroleuca</i> small subunit ribosoma... 2847 0.0	1598/1652 (96%),
AF091587 AF091587.1 <i>Sclerocarpus umbrinum</i> 18S ribosomal RNA g... 2847 0.0	1625/1688 (96%),
AF085469 AF085469.1 <i>Pilophorus acicularis</i> 18S small subunit rib... 2845 0.0	1613/1671 (96%),
AF010590 AF010590.1 <i>Ascozonus woolhopensis</i> SSU ribosomal RNA ge... 2841 0.0	1654/1727 (95%),
AF117990 AF117990.1 <i>Vulpicida juniperina</i> nuclear small subunit ... 2831 0.0	1624/1688 (96%),
Z30239 Z30239.1 <i>S.flavida</i> gene for 18S ribosomal RNA. 2819 0.0	1638/1711 (95%),
AB016174 AB016174.1 <i>Geomyces pannorum</i> gene for 18S rRNA, partia... 2809 0.0	1544/1588 (97%),
AB016173 AB016173.1 <i>Geomyces asperulatus</i> gene for 18S rRNA, par... 2809 0.0	1544/1588 (97%),
AF117987 AF117987.1 <i>Evernia prunastri</i> nuclear small subunit rib... 2807 0.0	1621/1688 (96%),
AF184749 AF184749.1 <i>Bunodophoron australe</i> small subunit ribosom... 2805 0.0	1619/1687 (95%),
AF241540 AF241540.1 <i>Caloplaca flavorubescens</i> small subunit ribo... 2795 0.0	1624/1694 (95%),
AF091583 AF091583.1 <i>Lecidella meiococca</i> 18S ribosomal RNA gene,... 2795 0.0	1626/1697 (95%),
AF282914 AF282914.1 <i>Pterygiopsis guyanensis</i> 18S small subunit r... 2771 0.0	1654/1734 (95%),
U72713 U72713.1 <i>Cladia aggregata</i> 18S small subunit ribosomal RN... 2755 0.0	1597/1665 (95%),
AF091589 AF091589.1 <i>Lecania cyrtella</i> 18S ribosomal RNA gene, pa... 2753 0.0	1635/1713 (95%),
AF085468 AF085468.1 <i>Alloctetaria madreporiformis</i> 18S small subu... 2732 0.0	1536/1592 (96%),
AF088250 AF088250.1 <i>Squamaria lentigera</i> 18S ribosomal RNA, par... 2692 0.0	1623/1710 (94%),
AF201453 AF201453.1 <i>Aliquandostipite khaoyaiensis</i> 18S ribosomal... 2684 0.0	1603/1684 (95%),
AF258605 AF258605.1 <i>Scytalidium dimidiatum</i> strain IP252899 18S ... 2615 0.0	1374/1391 (98%),
AF258604 AF258604.1 <i>Scytalidium dimidiatum</i> strain IP252799 18S ... 2615 0.0	1374/1391 (98%),
AF258603 AF258603.1 <i>Scytalidium dimidiatum</i> strain IP127881 18S ... 2615 0.0	1374/1391 (98%),
AB033477 AB033477.1 <i>Arthrocladia mougeotii</i> gene for 18S ribo... 2613 0.0	1418/1450 (97%),
U45438 U45438.1 <i>Amylocarpus encephaloides</i> small subunit rRNA gene. 2605 0.0	1441/1481 (97%),
AF274113 AF274113.1 <i>Coccotrema pocillarium</i> 18S ribosomal RNA ge... 2375 0.0	1351/1401 (96%),
AF184752 AF184752.1 <i>Cladonia gracilis</i> subsp. <i>turbinata</i> small su... 2226 0.0	1239/1277 (97%),

[0341]

[0342]

[시험예 8] ITS-5.8S rRNA 유전자

[0343]

스크리닝에 의해 얻어진 ADK-34 균주 및 IFO-6353주 및 IFO-7757주에 대하여, ITS-5.8S rRNA 유전자의 563 염기배열 혹은 564염기배열을 결정하였다. 각 균주는 포테이토 텍스트로오스 배지(디프코사)에서 진탕배양하고, 원심분리, 증류수에 의한 세정을 3회 행하여, DNA 추출용 균체를 얻었다. 이 균체로부터 FastPrep FP120(Qbiogene)과 FastDNA-kit(Qbiogene)를 사용해서 세포 파쇄(破碎)하고, DNeasy Plant Mini Kit(QIAGEN)에 의해 게놈 DNA 분리를 행하였다. 이 게놈 DNA를 주형(鑄型)으로 하고, Ready-To-Go PCR Beads(Amersham-Pharmacia Biotech)와 프라이머 ITS5 및 ITS4를 사용해서 PCR 증폭을 행하였다. 프라이머 ITS4와 ITS5의 염기배열은 ITS4:(5'→3') TCCTCCGCTTATTGATATGC, ITS5:(5'→3') GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG이다. 서머 사이클러(thermal cycler)는 geneAmp PCR System 9600(Applied Biosystems)을 사용하였다. 반응 종료 후, PCR 산물을 QIAquickPCR purification Kit(QIAGEN)를 사용해서 정제하였다. 이 DNA 단편(fragment)을 직접 시퀀싱 반응(sequencing reaction)에 제공하고, 염기배열 해석은 ABI Prism377 DNA Sequencer(Applied Biosystems)를 사용해서 실시하였다. 유사한 염기배열은 DNA 데이터 베이스(DDBJ, DNA Data Bank of Japan)에서 BLAST를 이용해서 검색하였다.

[0344]

ADK-34 균주의 결과를 배열표의 배열번호 2에, IFO-6353주의 결과를 배열번호 3에, IFO-7757주의 결과를 배열번호 4에 각각 나타낸다. 또한, 얻어진 염기배열에 기초해서 데이터 베이스 검색을 행하고, 동(同) 균주와 유연균과의 상동성을 조사한 결과를 표 9 및 10에 나타낸다. 결정된 염기배열을 비교한 바, ADK-34 균주와 IFO-6353주 및 IFO-7757주는 다르며, 완전히 일치하지 않았다. ADK-34 균주와 IFO-6353주와의 상동성은 98%, ADK-34 균주와 IFO-7757주와의 상동성은 98%였다. 또한, 상동성 검색 결과(표 9 및 10)로부터, ADK-34 균주의

ITS-5.8S 영역의 563염기쌍이 완전히 일치하는 균주는 보고되어 있지 않았다. IF0-6353주는 보고되어 있는 아우레오바시디움 풀루란스 균주인 등록번호 "AJ276062"와 100%(표 11), 즉 완전히 일치하고, IF0-7757주는 보고되어 있는 아우레오바시디움 풀루란스 균주인 등록번호 "AJ276062"와 99%로 일치하였다(표 12). ADK-34 균주는 등록번호 "AJ276062"와 98%의 일치율이었다.

[0345]

이상으로부터, ADK-34 균주는 지금까지 보고되어 있는 아우레오바시디움 풀루란스 균주와는 ITS-5.8S영역의 염기배열의 일부가 다르며, 신균주라고 판정되었다.

표 9

Sequences producing significant alignments:	(bits) Value
AF013229 AF013229.1 Aureobasidium pullulans 18S ribosomal RNA g... 997 0.0	555/567 (97%),
AY029406 AY029406.1 Astasia longa internal transcribed spacer 1... 989 0.0	538/546 (98%),
AJ276062 AJ276062.1 Aureobasidium pullulans 5.8S rRNA gene and ... 971 0.0	517/526 (98%),
AF121287 AF121287.1 Aureobasidium pullulans var. melanigenum st... 971 0.0	507/510 (99%),
AJ244265 AJ244265.1 Trimmatostroma abietina 5.8S rRNA gene and ... 965 0.0	503/507 (99%),
AJ244231 AJ244231.1 Aureobasidium pullulans 5.8S rRNA gene and ... 965 0.0	503/507 (99%),
AJ244235 AJ244235.1 Aureobasidium pullulans 5.8S rRNA gene and ... 963 0.0	501/506 (99%),
AJ244234 AJ244234.1 Aureobasidium pullulans 5.8S rRNA gene and ... 963 0.0	501/506 (99%),
AF121285 AF121285.1 Aureobasidium pullulans strain ATCC48433 in... 952 0.0	501/508 (98%),
AF121281 AF121281.1 Aureobasidium pullulans strain ATCC11942 in... 952 0.0	501/508 (98%),
AJ244232 AJ244232.1 Aureobasidium pullulans 5.8S rRNA gene and ... 948 0.0	499/506 (98%),
AF182377 AF182377.1 Hormonema sp. F-054,764 internal transcribe... 940 0.0	501/510 (98%),
AF121284 AF121284.1 Aureobasidium pullulans strain ATCC42457 in... 936 0.0	499/508 (98%),
AJ244233 AJ244233.1 Aureobasidium pullulans 5.8S rRNA gene and ... 934 0.0	492/499 (98%),
AJ244269 AJ244269.1 Aureobasidium pullulans 5.8S rRNA gene and ... 932 0.0	497/506 (98%),
AJ244236 AJ244236.1 Aureobasidium pullulans 5.8S rRNA gene and ... 932 0.0	497/506 (98%),
AF121286 AF121286.1 Aureobasidium pullulans var. melanigenum st... 920 0.0	497/508 (97%),
AJ276061 AJ276061.1 Aureobasidium pullulans 5.8S rRNA gene and ... 914 0.0	497/505 (98%),
AJ244252 AJ244252.1 Kabatiella lini 5.8S rRNA gene and internal... 906 0.0	496/508 (97%),
AJ244251 AJ244251.1 Kabatiella caulivora 5.8S rRNA gene and int... 825 0.0	487/508 (95%),
AF013225 AF013225.1 Phaeocryptopus gaeumannii 18S ribosomal RNA... 446 e-124	361/398 (90%),
AJ244257 AJ244257.1 Pringsheimia smilacis 5.8S rRNA gene and in... 428 e-118	255/264 (96%),
AJ244248 AJ244248.1 Hormonema prunorum 5.8S rRNA gene and inter... 420 e-116	253/264 (95%),
AJ244245 AJ244245.1 Dothiora rhamni-alpinae 5.8S rRNA gene and ... 420 e-116	252/264 (95%),
AJ244242 AJ244242.1 Dothichiza pityophila 5.8S rRNA gene and in... 418 e-115	246/255 (96%),
AF182376 AF182376.1 Kabatina juniperi internal transcribed spac... 416 e-115	251/262 (95%),
AF182375 AF182375.1 Hormonema sp. ATCC74360 internal transcribe... 416 e-115	251/262 (95%),
AJ244243 AJ244243.1 Dothiora cannabinae 5.8S rRNA gene and inte... 412 e-113	252/264 (95%),
AF027764 AF027764.1 Dothidea insculpta CBS 189.58 18S ribosomal... 412 e-113	252/264 (95%),
AF013226 AF013226.1 Kabatina thujae 18S ribosomal RNA gene, par... 412 e-113	251/264 (95%),
AF027763 AF027763.1 Dothidea hippophaeos CBS 186.58 18S ribosom... 404 e-111	251/264 (95%),
AJ278930 AJ278930.1 Hormonema dematioides 5.8S rRNA gene, 26S r... 402 e-110	244/255 (95%),
AJ278929 AJ278929.1 Hormonema dematioides 5.8S rRNA gene, 26S r... 402 e-110	244/255 (95%),
AJ278928 AJ278928.1 Hormonema dematioides 18S rRNA gene (partia... 402 e-110	244/255 (95%),
AJ278927 AJ278927.1 Hormonema dematioides 5.8S rRNA gene, 26S r... 402 e-110	244/255 (95%),

[0346]

표 10

Sequences producing significant alignments:	(bits) Value
AJ278926 AJ278926.1 Hormonema dematioides 5.8S rRNA gene, 26S r...	402 e-110 244/255 (95%),
AJ278925 AJ278925.1 Hormonema dematioides 5.8S rRNA gene, 26S r...	402 e-110 244/255 (95%),
AJ244262 AJ244262.1 Sydowia polyspora 5.8S rRNA gene and intern...	402 e-110 244/255 (95%),
AJ244247 AJ244247.1 Hormonema macrosporum 5.8S rRNA gene and in...	402 e-110 244/255 (95%),
AJ244244 AJ244244.1 Dothiora europaea 5.8S rRNA gene and intern...	402 e-110 252/263 (95%),
AF182378 AF182378.1 Hormonema sp. F-054,258 internal transcribe...	402 e-110 240/251 (95%),
AF013232 AF013232.1 Rhizosphaera kalkhoffii 18S ribosomal RNA g...	402 e-110 244/255 (95%),
AF013228 AF013228.1 Hormonema dematioides 18S ribosomal RNA gen...	402 e-110 244/255 (95%),
AF260224 AF260224.1 Kabatina juniperi 18S ribosomal RNA, partia...	396 e-109 250/264 (94%),
AF013231 AF013231.1 Rhizosphaera kalkhoffii 18S ribosomal RNA g...	389 e-106 244/256 (95%),
AF121283 AF121283.1 Aureobasidium pullulans strain ATCC16629 in...	379 e-103 238/251 (94%),
AF121282 AF121282.1 Aureobasidium pullulans strain ATCC16628 in...	379 e-103 238/251 (94%),
AF013230 AF013230.1 Rhizosphaera pini 18S ribosomal RNA gene, p...	375 e-102 244/257 (94%),
AF246930 AF246930.1 Botryosphaeria mamane isolate 97-59 18S rib...	359 2e-97 214/225 (95%),
AF246929 AF246929.1 Botryosphaeria mamane isolate 97-58 18S rib...	359 2e-97 214/225 (95%),
AF243410 AF243410.1 Sphaeropsis sapinea isolate 215 18S ribosom...	345 2e-93 214/226 (94%),
AF243409 AF243409.1 Sphaeropsis sapinea isolate 411 18S ribosom...	345 2e-93 214/226 (94%),
U28059 U28059.1 Sphaceloma fawcettii 18S ribosomal RNA and 26S ...	339 1e-91 189/195 (96%),
U28058 U28058.1 Elsinoe fawcettii 18S ribosomal RNA and 26S rib...	339 1e-91 189/195 (96%),
AF297232 AF297232.1 Cercospora sorghi f. maydis Kenya 1 18S rib...	335 2e-90 187/193 (96%),
AF297230 AF297230.1 Cercospora nicotianae 18S ribosomal RNA gen...	335 2e-90 187/193 (96%),
AF297229 AF297229.1 Cercospora asparagi 18S ribosomal RNA gene,...	335 2e-90 187/193 (96%),
AF243394 AF243394.1 Botryosphaeria ribis isolate 96-8 18S ribos...	335 2e-90 212/225 (94%),
AF243393 AF243393.1 Botryosphaeria ribis isolate 94-128 18S rib...	335 2e-90 212/225 (94%),
AF079776 AF079776.1 Phomopsis amaranthicola 18S ribosomal RNA g...	335 2e-90 187/193 (96%),
AB041245 AB041245.1 Guignardia loricata genes for 18S rRNA, ITS...	333 9e-90 189/196 (96%),
AF297667 AF297667.1 Umbilicaria muehlenbergii isolate sml1004 1...	331 4e-89 182/187 (97%),
AF297666 AF297666.1 Umbilicaria muehlenbergii isolate sml1003 1...	331 4e-89 182/187 (97%),
AF141190 AF141190.1 Neofabraea alba 18S ribosomal RNA gene, par...	331 4e-89 182/187 (97%),
AF141189 AF141189.1 Neofabraea malicorticis 18S ribosomal RNA g...	331 4e-89 182/187 (97%),
AF141181 AF141181.1 Pezicula ocellata strain CBS267.39 18S ribo...	331 4e-89 182/187 (97%),
AF096204 AF096204.1 Umbilicaria muehlenbergii 18S ribosomal RNA...	331 4e-89 182/187 (97%),
AF083199 AF083199.1 Phialophora sp. p3901 18S ribosomal RNA, pa...	331 4e-89 182/187 (97%),
AF383949 AF383949.1 Botryosphaeria quercuum 18S ribosomal RNA g...	327 6e-88 190/197 (96%),

[0347]

표 11

Sequences producing significant alignments:		(bits) Value
AJ276062 AJ276062.1 Aureobasidium pullulans 5.8S rRNA gene and ...	1043 0.0	526/526 (100%)
AF182377 AF182377.1 Hormonema sp. F-054,764 internal transcribe...	1011 0.0	510/510 (100%)
AF121284 AF121284.1 Aureobasidium pullulans strain ATCC42457 in...	1007 0.0	508/508 (100%)
AF013229 AF013229.1 Aureobasidium pullulans 18S ribosomal RNA g...	1005 0.0	556/567 (98%),
AJ244269 AJ244269.1 Aureobasidium pullulans 5.8S rRNA gene and ...	1003 0.0	506/506 (100%)
AJ244236 AJ244236.1 Aureobasidium pullulans 5.8S rRNA gene and ...	1003 0.0	506/506 (100%)
AF121286 AF121286.1 Aureobasidium pullulans var. melanigenum st...	991 0.0	506/508 (99%)
AF121285 AF121285.1 Aureobasidium pullulans strain ATCC48433 in...	959 0.0	502/508 (98%)
AF121281 AF121281.1 Aureobasidium pullulans strain ATCC11942 in...	959 0.0	502/508 (98%)
AJ244232 AJ244232.1 Aureobasidium pullulans 5.8S rRNA gene and ...	955 0.0	500/506 (98%)
AJ276061 AJ276061.1 Aureobasidium pullulans 5.8S rRNA gene and ...	954 0.0	502/505 (99%),
AJ244265 AJ244265.1 Trimmatostroma abietina 5.8S rRNA gene and ...	942 0.0	500/507 (98%),
AJ244233 AJ244233.1 Aureobasidium pullulans 5.8S rRNA gene and ...	942 0.0	493/499 (98%)
AJ244231 AJ244231.1 Aureobasidium pullulans 5.8S rRNA gene and ...	942 0.0	500/507 (98%),
AJ244235 AJ244235.1 Aureobasidium pullulans 5.8S rRNA gene and ...	932 0.0	497/506 (98%)
AJ244234 AJ244234.1 Aureobasidium pullulans 5.8S rRNA gene and ...	932 0.0	497/506 (98%)
AF121287 AF121287.1 Aureobasidium pullulans var. melanigenum st...	924	501/510 (98%),

[0348]

표 12

Sequences producing significant alignments:		(bits) Value
AJ276062 AJ276062.1 Aureobasidium pullulans 5.8S rRNA gene and ...	1021 0.0	525/527 (99%),
AF013229 AF013229.1 Aureobasidium pullulans 18S ribosomal RNA g...	997 0.0	554/567 (97%),
AF182377 AF182377.1 Hormonema sp. F-054,764 internal transcribe...	989 0.0	509/511 (99%),
AF121284 AF121284.1 Aureobasidium pullulans strain ATCC42457 in...	985 0.0	507/509 (99%),
AJ244269 AJ244269.1 Aureobasidium pullulans 5.8S rRNA gene and ...	981 0.0	505/507 (99%),
AJ244236 AJ244236.1 Aureobasidium pullulans 5.8S rRNA gene and ...	981 0.0	505/507 (99%),
AF121286 AF121286.1 Aureobasidium pullulans var. melanigenum st...	969 0.0	505/509 (99%),
AJ244265 AJ244265.1 Trimmatostroma abietina 5.8S rRNA gene and ...	965 0.0	502/507 (99%),
AJ244231 AJ244231.1 Aureobasidium pullulans 5.8S rRNA gene and ...	965 0.0	502/507 (99%),
AJ276061 AJ276061.1 Aureobasidium pullulans 5.8S rRNA gene and ...	940 0.0	502/506 (99%),
AF121287 AF121287.1 Aureobasidium pullulans var. melanigenum st...	940 0.0	502/510 (98%),
AF121285 AF121285.1 Aureobasidium pullulans strain ATCC48433 in...	938 0.0	501/509 (98%),
AF121281 AF121281.1 Aureobasidium pullulans strain ATCC11942 in...	938 0.0	501/509 (98%),
AJ244232 AJ244232.1 Aureobasidium pullulans 5.8S rRNA gene and ...	934 0.0	499/507 (98%),
AY029406 AY029406.1 Astasia longa internal transcribed spacer 1...	932 0.0	531/546 (97%),
AJ244235 AJ244235.1 Aureobasidium pullulans 5.8S rRNA gene and ...	926 0.0	498/507 (98%),
AJ244234 AJ244234.1 Aureobasidium pullulans 5.8S rRNA gene and ...	926 0.0	498/507 (98%),
AJ244233 AJ244233.1 Aureobasidium pullulans 5.8S rRNA gene and ...	920 0.0	492/500 (98%),
AJ244252 AJ244252.1 Kabatiella lini 5.8S rRNA gene and internal...	912 0.0	497/508 (97%),
AJ244251 AJ244251.1 Kabatiella caulivora 5.8S rRNA gene and int...	872 0.0	492/508 (96%),
AF013225 AF013225.1 Phaeocryptopus gaemannii 18S ribosomal RNA...	454 e-126	362/398 (90%),
AJ244257 AJ244257.1 Pringsheimia smilacis 5.8S rRNA gene and in...	436 e-121	256/264 (96%),

[0349]

[0350]

[실시에 50]

[0351]

30ml용량의 시험관에 YM 배지(디프코사) 5.5ml를 넣고, 멸균 후(121℃, 20분간), 냉각하고 나서, YPD 한천 배지(디프코사)의 사면(slant)에서 보존하고 있는 ADK-34 균주를 1백금이(白金耳), 식균하고, 300rpm의 진탕배양기에서 26℃에서 4일간 배양하여, 종배양액을 얻었다. 다른 시험관에 차폐 배지(디프코사, 수크로오스 농도 3중량%) 5.5ml를 넣고 멸균 후, ADK-34 균주의 종배양액 500μl를 첨가(5% 식균)하고, 300rpm의 진탕배양기에서 26℃에서 4일간 배양하였다. 배양액은 백색이며 현저한 점성을 갖고 있었다. 배양 후, 배양액에 등량의 증류수를 첨가하고, 15분간, 고압 증기 살균하고 나서, 10000rpm으로 15분간 원심분리하여 다당을 함유하는 배양상청(上淸)을 얻었다. 배양 상청중의 β글루칸량 및 다당의 폴루란에 대한 순도를 상기 분석에 1 및 상기 분석에 3의 측정방법에 의해 각각 측정하였다. 그 결과, 다당의 폴루란에 대한 순도는 100%이며, β글루칸량으로부터 산출한 β글루칸의 당(糖)에 대한 수율은 44%였다. 한편, 배양 상청의 490nm에 따른 흡광값은 0.030이며, 착색이 억제되어 있었다. 또한, 상기 분석에 2의 측정방법에 의해 β글루칸의 분자량을 측정한 바, 분자량은 15만~200만을 나타내었다. 또한, 배양 상청의 동결 건조물을 샘플 L로 하였다.

[0352]

동일한 방법으로 IF0-6353주를 배양하고, β글루칸량 및 다당의 폴루란에 대한 순도를 측정한 바, 다당의 폴루란에 대한 순도는 40%, β글루칸의 당에 대한 수율은 11%로 산출되었다. 한편, 배양 상청의 490nm에 따른 흡광값은 0.190이며, 착색이 보여졌다.

[0353]

[실시에 51]

[0354]

이스트 질소원 기초 배지 분말(Yeast Nitrogen Base w/o Amino Acids and Ammonium Sulfate:디프코사) 1.7g을 100ml의 증류수에 용해시키고, 필터 멸균하였다. 질산나트륨 5g을 500ml의 증류수에 용해하여, 2배 농도의 질산

나트륨 용액을 조제하였다. 탄소원으로서, 수크로오스, 글루코오스, 프락토오스, 가용성 전분 또는 말토오스(와코 준야쿠 고교)를 사용해서, 12중량% 탄소원 수용액을 각각 조제하였다. 질산나트륨, 탄소원 수용액 및 증류수를 오토클레이브 멸균(121℃, 20min.)하고, 멸균이 끝난 시험관에, 이스트 질소원 기초 배지 1ml, 질산나트륨 용액 5ml, 탄소원 수용액 2.5ml 및 증류수 1.5ml 첨가하여, 전량을 10ml로 하고, 각 탄소원을 첨가한 탄소원 체크 배지를 조제하였다.

[0355] 30ml용량의 시험관에, YM 배지(디프코사) 5.5ml를 넣고, 멸균 후(121℃, 20분간), 냉각하고 나서, YPD 한천 배지(디프코사)의 사면(slant)에서 보존하고 있는 ADK-34 균주를 1백금이, 식균하고, 300rpm의 진탕배양기에서 26℃에서 4일간 배양하여, 종배양액을 얻었다. 얻어진 종배양액을 상기 탄소원 체크 배지에 식균하고, 300rpm의 진탕배양기에서 26℃에서 5일간 배양하였다. 배양액은 백색이며 현저한 점성을 갖고 있었다. 배양 후, 배양액에 등량의 증류수를 첨가하고, 15분간, 고압 증기 살균하고 나서, 10000rpm으로 15분간 원심분리하여 다당을 함유하는 배양 상청(上淸)을 얻었다. 배양 상청중의 β글루칸량 및 다당의 폴루란에 대한 순도를 상기 분석에 1 및 상기 분석에 3의 측정방법에 의해 각각 측정하였다. 측정결과를 표 13에 나타낸다. 표 13으로부터 명백하듯이, 어떠한 탄소원에 있어서도, 다당의 폴루란에 대한 순도는 90%이상이며, β글루칸의 당에 대한 수율은 20~46%로 산출되었다. 한편, 배양 상청의 490nm에 따른 흡광도는 0.026~0.041이며, 착색이 억제되어 있었다. 또한, 상기 분석에 2의 측정방법에 의해 β글루칸의 분자량을 측정 한 바, 분자량은 15만~200만이었다.

표 13

탄소원	순도(%)	β글루칸의 당에 대한 수율(%)	배양액의 흡광도(490nm)
수크로오스	100	46	0.031
글루코오스	110	44	0.033
프락토오스	104	20	0.031
가용성 전분	96	34	0.041
말토오스	94	29	0.026

[0357] [실시예 52]

[0358] ADK-34주를 YM 배지에 식균하고, 26℃에서 3일간 배양하여, 300ml의 종배양액을 얻었다. 폴루존(FULLZONE) 날개를 탑재한 5L 자퍼멘터(jar fermentor)(마루비시 바이오엔지사)에, 차팩 배지 3L 및 수크로오스 300g을 넣고, 멸균·냉각 후, 100ml의 종배양액을 식균하고, 26℃에서 72시간의 배양을 실시하여, 배양액 3L를 얻었다. 배양액을 80℃에서 30분간 가열하여, 살균한 후, 등량의 증류수를 첨가하고, 잘 혼합하고 나서, 8000rpm으로 15분간 원심분리하여, 배양 회석액을 얻었다. 배양 회석액을 또한 증류수로 5배 회석하고, 흡광도를 측정한 바, 490nm에 있어서 0.023이었다. 배양 회석액 100ml에 등량의 에탄올을 첨가하고, 얻어진 침전을 분리하며, 에탄올로 세정하고, 그대로 50ml의 증류수에 용해시켰다. 이 조작을 다시 반복해서, 투석막(분자량 3000커트)에 넣어 10배량의 증류수로 투석을 실시하였다. 최종적으로 100ml의 다당 용액을 얻었다. 이 때의 β글루칸량은 25mg/ml, 다당의 폴루란에 대한 순도는 95%, β글루칸의 분자량은 15만~200만으로 산출되었다.

[0359] [실시예 53] (β글루칸 함유 유지 조성물)

[0360] 상기 샘플 L의 100부와 대두유 100부를 니더(kneader)로 잘 혼합하고, 60℃에서 10분간 방치 후, 실온으로 냉각하여 크림형상이 된 본 발명의 β글루칸 함유 유지 조성물을 얻었다. β글루칸은 유지중에 균일하게 분산하였다.

산업상 이용가능성

[0361] 본 발명의 β글루칸 함유 유지 조성물은, 우수한 생체 조절 기능성을 갖는 β글루칸이 유지중에 균일하게 분산하고 있으며, 식품 등에 사용함으로써, 상기 β글루칸을 식품 등에 균일하게 분산할 수 있고, 또한 그 식품 등의 식미(食味), 식감, 안정성 등을 향상시킬 수 있다. 또한, 본 발명의 미생물을 사용함으로써, 수크로오스 등의 저렴한 당류로부터 고효율성이며 고품질의 β글루칸을, 효율적으로 높은 생산속도로 제조할 수 있다.

서열 목록

<110> ASAHI DENKA Co., Ltd.
 <120> Beta-glucan-containing fat compositions and novel microorganism
 producing beta-glucan
 <130> FP-0411010
 <160> 4
 <170> Kopatent In 1.71
 <210> 1
 <211> 1732
 <212> DNA
 <213> Aureobasidium pullulans ADK-34
 <400> 1

```

aaagattaag ccatgcatgt ctaagtataa gcaactatac ggtgaaactg cgaatggctc      60
attaaatcag ttatcgttta tttgatagta ccttactact tggataaccg tggtaattct      120
agagctaata catgctaaaa accccaactt cggaaggggt gtatttatta gataaaaaac      180

caacgccctt cggggctcct tgggtattca taataactaa acgaatcgca tggccttgcg      240
ccggcgatgg ttattcaaaa tttctgccct atcaactttc gatgtagga tagtgcccta      300
ccatggtatc aacgggtaac ggggaattag ggttctattc cggagaggga gcctgagaaa      360
cggctaccac atccaaggaa ggcagcaggc gcgcaaatta cccaatcccg acacggggag      420
gtagtacaa taaatactga tacagggtc ttttgggtct tgtaattgga atgagtacaa      480
tttaaatccc ttaacgagga acaattggag ggcaagtctg gtgccagcag ccgcggtaat      540
tccagctcca atagcgtata ttaaagttgt tgcagttaaa aagctcgtag ttgaaccttg      600

ggcctggctg gccggtcgc ctcaccgct gtactggtcc ggccgggcct ttccttctgg      660
ggagccgcat gcccttact gggcgtgtcg gggaaccagg acttttactt tgaaaaaatt      720
agagtgttca aagcaggcct ttgctcgaat acattagcat ggaataatag aataggacgt      780
gcggttctat tttgttggtt tctaggaccg ccgtaatgat taatagggat agtcgggggc      840
atcagtattc aattgtcaga ggtgaaattc ttggatttat tgaagactaa ctactgcgaa      900
agcatttgcc aaggatgttt tcattaatca gtgaacgaaa gttaggggat cgaagacgat      960
cagataccgt cgtagtctta accataaact atgccgacta gggatcgggc gatgttatca     1020

ttttgactcg ctcggcacct tacgagaaat caaagtcttt gggttctggg gggagtatgg     1080
tcgcaaggct gaaacttaaa gaaattgacg gaagggcacc accaggcgtg gaggctgcgg     1140
cttaatttga ctcaacacgg ggaaactcac caggtccaga cacaataagg attgacagat     1200
tgagagctct ttcttgattt tgtgggtggt ggtgcatggc cgttcttagt tgggtggagt     1260
    
```

atttgtctgc ttaattgcga taacgaacga gaccttaacc tgctaaatag cccggcccgc 1320
 ttggcggtt cgccggcttc ttagaggac tatcggtca agccgatgga agtttgaggc 1380
 aataacaggt ctgtgatgcc cttagatgtt ctgggccgca cgcgcgtac actgacagag 1440

ccaacgagtt catttccttg cccggaaggg ttgggtaatc ttgttaaact ctgtcgtgct 1500
 ggggatagag cattgcaatt attgctcttc aacgaggaat gcctagtaag cgtacgtcat 1560
 cagcgtgctg tgattacgtc cctgcccttt gtacacaccg cccgtcgcta ctaccgattg 1620
 aatggctgag tgaggccttc ggactggccc agggaggtcg gcaacgacca cccagggccg 1680
 gaaagtgggt caaactccgt catttagagg aagtaaaagt cgtaacaagg tt 1732

<210> 2

<211> 563

<212> DNA

<213> Aureobasidium pullulans ADK-34

<400> 2

tttccgtagg tgaacctgcg gaaggatcat taaagagtaa ggggtgctcag cgccccacct 60

ccaacccttt gttgttaaaa ctaccttgtt gctttggcgg gaccgctcgg ttcgagccg 120
 ctggggattc gtcccaggcg agtgcccgcc agagttaaac caaactcttg ttattaaacc 180
 ggtcgtctga gttaaaattt tgaataaatc aaaactttca acaacggatc tcttggttct 240
 cgcacgtatg aagaacgcag cgaaatgcga taagtaatgt gaattgcaga attcagttaa 300
 tcatcgaatc ttgtaacgca cattgcgcc cttgggtatt cgaggggcat gcctgttcga 360
 gcgtcattac accactcaag ctatgcttgg tattgggtgc cgtccttagt tgggcgcgcc 420
 ttaaagacct cggcgaggcc actccggctt taggcgtagt agaatttatt cgaacgtctg 480

tcaaaggaga ggaactctgc cgattgaaac ctttatTTTT ctaggttgac ctcgatcag 540
 gtagggatac ccgtgaact taa 563

<210> 3

<211> 563

<212> DNA

<213> Aureobasidium pullulans IFO-6353

<400> 3

tttccgtagg tgaacctgcg gaaggatcat taaagagtaa ggggtgctcag cgccccacct 60
 ccaacccttt gttgttaaaa ctaccttgtt gctttggcgg gaccgctcgg tctcgagccg 120
 ctggggattc gtcccaggcg agcgcccgcc agagttaaac caaactcttg ttatttaacc 180

ggtcgtctga gttaaaattt tgaataaatc aaaactttca acaacggatc tcttggttct	240
cgcatcgatg aagaacgcag cgaaatgcga taagtaatgt gaattgcaga attcagtga	300
tcatcgaatc ttigaacgca cattgcgcc cttggtattc cgaggggcat gcctgttcga	360
gcgtcattac accactcaag ctatgcttgg tatitgggtgc cgtccttagt tgggcgcgcc	420
ttaaagacct cggcgaggcc tcaccggcct taggcgtagt agaatttatt cgaacgtctg	480
tcaaaggaga ggacttctgc cgactgaaac cttttatctt ctaggttgac ctcggatcag	540
gtagggatac ccgctgaact taa	563
<210> 4	
<211> 564	
<212> DNA	
<213> Aureobasidium pullulans IF0-7757	
<400> 4	
tttccgtagg tgaacctgcg gaaggatcat taaagagtaa gggtagtcag cgcggacat	60
ccaacccttt gttgttaaaa ctacctgttt gctttggcgg gaccgctcgg tctcgagcgg	120
ctggggattc gtcccaggcg agcgccgcc agagttaaac caaactcttg ttattaaacc	180
ggtcgtctga gttaaaattt tgaataaatc aaaactttca acaacggatc tcttggttct	240
cgcatcgatg aagaacgcag cgaaatgcga taagtaatgt gaattgcaga attcagtga	300
tcatcgaatc ttigaacgca cattgcgcc cttggtattc cgaggggcat gcctgttcga	360
gcgtcattac accactcaag ctatgcttgg tatitgggtgc cgtccttagt tgggcgcgcc	420
ttaaagacct cggcgaggcc tcaccggcct taggcgtagt agaatttatt cgaacgtctg	480
tcaaaggaga ggacttctgc cgactgaaac cttttatctt tctaggttga ctcggatca	540
gtagggata cccgctgaac ttaa	564