



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2019년02월26일
 (11) 등록번호 10-1926183
 (24) 등록일자 2018년11월30일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 1/14 (2018.01) *A23L 11/00* (2016.01)
C12N 1/20 (2006.01) *C12R 1/125* (2006.01)
C12R 1/69 (2006.01)

(52) CPC특허분류
C12N 1/14 (2013.01)
A23L 11/09 (2016.08)

(21) 출원번호 10-2017-0051870
 (22) 출원일자 2017년04월21일
 심사청구일자 2017년04월21일
 (65) 공개번호 10-2018-0118477
 (43) 공개일자 2018년10월31일

(56) 선행기술조사문헌
 KR1020160051454 A*
 (뒷면에 계속)

전체 청구항 수 : 총 5 항

(73) 특허권자
 서울대학교 산학협력단
 서울특별시 관악구 관악로 1 (신림동)

(72) 발명자
최상호
 경기도 양평군 양서면 옛재길 59-11
유상렬
 서울특별시 강남구 언주로30길 13, A동 1001호 (도곡동, 대림아크로빌)

이인형
 서울특별시 성북구 보국문로 116, 정릉힐스테이트3차아파트 313동 602호

(74) 대리인
 특허법인태동

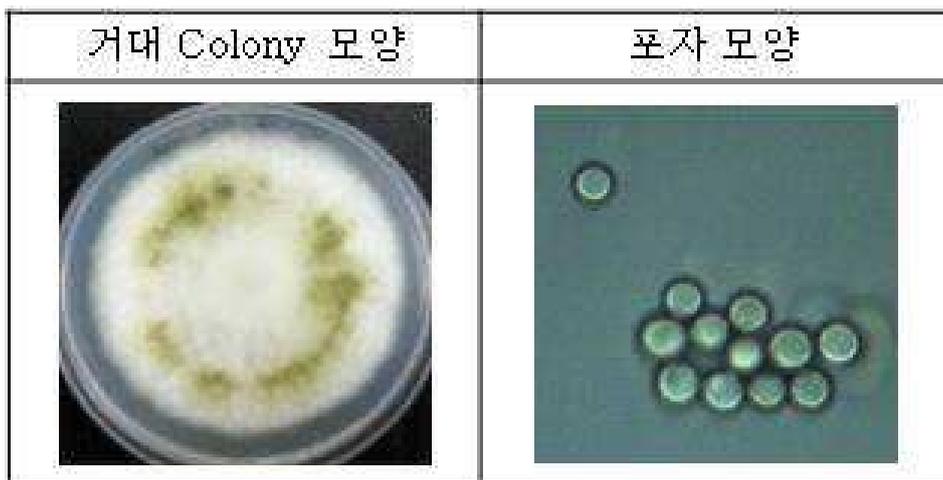
심사관 : 문동현

(54) 발명의 명칭 **안전성이 검증된 장류 발효 균주 및 이를 이용하여 제조된 장**

(57) 요약

본 발명은 장류의 생산에 사용되는 곰팡이 균주로서, 곰팡이 독소인 아플라톡신과 CPA(cyclopiazonic acid)를 생산하지 않는 아스퍼질러스 오리재(*Aspergillus oryzae*) MJS14 (기탁번호: KCTC18552P) 균주 및 장류의 생산에 사용되는 세균 균주로서, 바이오제닉아민을 생성하지 않는 바실러스 서브틸리스 (*Bacillus subtilis*) D119C (기탁번호: KCTC18551P) 균주를 제공한다. 본 발명에서는 본 발명에서 선발한 곰팡이 균주와 세균 균주를 동시에 접종함으로써, 복합적인 미생물학적 작용이 나타나, 단일 접종으로 발효시킨 된장과는 다른 풍미를 나타낼 수 있고, 자연 접종으로 인한 혼합발효가 나타나는 재래식 메주 및 된장과 비교하였을 때, 접종하는 균주와 발효 기간을 일정하게 유지할 수 있어, 품질의 획일화와 안전성의 확보가 가능하다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

C12N 1/20 (2013.01)
 C12R 1/125 (2013.01)
 C12R 1/69 (2013.01)

(56) 선행기술조사문헌

KR1020140056442 A
 KR1020140057436 A
 KR1020150019435 A
 KR1020150123439 A
 KR1020160126691 A

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 0635-20160004
 부처명 농림축산식품부
 연구관리전문기관 농림수산식품기술평가원(농림축산식품부)

연구사업명 농림축산식품연구센터지원사업

연구과제명 유전체 기반 패혈증 비브리오팀 독성인자의 포괄적 동정, 특성 규명 및 제어기술 연구
 (7-7년차)- 식중독미생물 독성인자 특성 규명 및 제어기술 개발(제1핵심총괄과제명)

기여율 40/100
 주관기관 서울대학교
 연구기간 2016.09.01 ~ 2017.08.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 0635-20160011
 부처명 농림축산식품부
 연구관리전문기관 농림수산식품기술평가원(농림축산식품부)

연구사업명 농림축산식품연구센터지원사업

연구과제명 파아지에 대한 저항성 원리 규명 및 endolysin 연구를 통한 식중독균 제어 신기술 개발

기여율 30/100
 주관기관 서울대학교
 연구기간 2016.09.01 ~ 2017.08.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 0635-20160009
 부처명 농림축산식품부
 연구관리전문기관 농림수산식품기술평가원(농림축산식품부)

연구사업명 농림축산식품연구센터지원사업

연구과제명 전통발효식품의 생물학적 위해인자 생성기작 규명 및 제어시스템 개발

기여율 30/100
 주관기관 서울대학교
 연구기간 2016.09.01 ~ 2017.08.31

명세서

청구범위

청구항 1

아스퍼질러스 오리재(*Aspergillus oryzae*) MJS14 (기탁번호: KCTC18552P) 균주 및 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*) D119C (기탁번호: KCTC18551P) 균주로 이루어진 장(醬) 제조용 발효균주 혼합물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 아스퍼질러스 오리재 (*Aspergillus oryzae*) MJS14 (기탁번호: KCTC18552P) 균주는,

곰팡이 독소인 아플라톡신과 CPA (cyclopiazonic acid)를 생산하지 않고,

상기 바실러스 서브틸리스 (*Bacillus subtilis*) D119C (기탁번호: KCTC18551P) 균주는,

바이오테너아민을 생성하지 않는 것을 특징으로 하는 장(醬) 제조용 발효균주 혼합물.

청구항 3

삭제

청구항 4

삭제

청구항 5

삶은 콩에 발효균주를 접종하여 발효시킴으로써 제조되는 장(醬)의 제조에 있어서,

상기 발효균주로 아스퍼질러스 오리재(*Aspergillus oryzae*) MJS14 (기탁번호: KCTC18552P) 균주와 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*) D119C (기탁번호: KCTC18551P) 균주를 동시에 접종하는 것을 특징으로 하는 장(醬)의 제조방법.

청구항 6

제5항에 있어서,

상기 아스퍼질러스 오리재 (*Aspergillus oryzae*) MJS14 (기탁번호: KCTC18552P) 균주는,

곰팡이 독소인 아플라톡신과 CPA (cyclopiazonic acid)를 생산하지 않고,

상기 바실러스 서브틸리스 (*Bacillus subtilis*) D119C (기탁번호: KCTC18551P) 균주는,

바이오테너아민을 생성하지 않는 것을 특징으로 하는 장(醬)의 제조방법.

청구항 7

제5항에 있어서,

상기 장은,

된장 또는 간장인 것을 특징으로 하는 장(醬)의 제조방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 장류 발효를 위해 사용될 수 있는 안전하고 우수한 종균 및 이를 이용하여 제조한 장류에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 안전성 측면에서 곰팡이 독소를 생산하지 않는 아스퍼질러스 오리재 (*Aspergillus oryzae*) MJS14 (기탁번호: KCTC18552P) 균주와 바이오제닉아민을 생산하지 않는 바실러스 서브틸리스 (*Bacillus subtilis*) D119C (기탁번호: KCTC18551P) 균주 및 이를 이용하여 제조한 장류에 관한 것이다.

[0002]

배경 기술

[0003] 우리나라 전통 장류는 주원료인 콩을 찹지 및 증자 후 사각 메주 형태로 성형한 것을 쪄서로 매달아 자연접종에 의한 발효가 일어나도록 하는 방법을 이용한다. 이런 방법으로 발효된 메주 및 장류는 제조가 간단한 장점이 있으나, 자연적으로 접종되는 미생물을 제어할 수 없기 때문에, 일정한 품질을 유지할 수 없고, 유해균의 오염에 의해 독소가 생성될 가능성이 높다.

[0004] 자연 접종에 의한 경우, 메주 발효 곰팡이인 아스퍼질러스 오리재 (*Aspergillus oryzae*)와 외형적으로 매우 비슷한 아스퍼질러스 플라버스 (*Aspergillus flavus*) 균주가 메주에 오염될 수 있는데, 이 균주는 강력한 발암물질인 아플라톡신을 생성하게 된다. 또한, 자연적으로 접종되는 메주 발효 세균들은 최근 유해물질로 이슈가 되고 있는 바이오제닉아민을 생산할 가능성이 매우 높다.

[0005] 따라서, 자연접종에 의한 발효를 진행할 경우, 메주 및 장류의 안전성을 확보하기는 매우 어렵다 할 것이다. 이에, 안정성이 검증된 종균을 새롭게 개발하여 장류의 생산에 적극 사용할 필요가 있는 것이다.

선행기술문헌

특허문헌

[0007] (특허문헌 0001) 대한민국 특허공개번호 제10-2014-0057436호 (공개일자 2014. 05. 13)에는, 신규한 균주 바실러스 아밀로리퀴페이션스 CJ3-27 및 아스퍼질러스 오리재 CJ KG를 이용한 한식 메주된장의 제조방법에 대한 내용이 기재되어 있다.

(특허문헌 0002) 대한민국 특허공개번호 제10-2014-0012411호 (공개일자 2014. 02. 03)에는, 장류의 유해 미생물에 대한 항균 활성 및 바이오제닉아민 분해 활성이 있는 바실러스 리케니포미스 SCKB11균주 및 이의 용도에 대한 내용이 기재되어 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 현재 산업계에서는 장류 발효를 위해 장류 우점종인 아스퍼질러스 오리재 (*A. oryzae*) 균주를 주로 사용하고 있다. 하지만, 산업계에서 이미 사용하고 있는 이들 균주는 주로 효소 활성 등의 기능성에만 초점을 맞춘 균주로서, 안전성에 대한 검증은 미미한 실정이다. 또한, 발효 후 장류의 안전성에 대한 검증도 추가적으로 이루어지지 않는 실정이다.

[0009] 한편, 종균을 이용한 장류의 발효가 보고되긴 했으나, 단일 종균을 이용하거나 각각의 종균으로 발효 후 혼합하는 제조방법이 주를 이루고 있을 뿐, 복합 균주를 동시 접종하여 장류를 생산하는 기술에 대한 보고는 거의 전무한 실정이다.

[0010] 본 발명은 이와 같은 문제점을 해결하기 위해 진행되었으며, 산업적 코지(koji)와 전통메주 및 장류로부터 안정성이 확보되고 우수한 관능적 특성을 부여할 수 있는 종균 후보를 분리하여 제공하고자 한다.

[0011] 또한, 본 발명은 안전성이 확보된 균주를 이용하여 안정성이 확보되고, 관능적 특성이 우수한 장류를 제조하여 제공하고자 한다.

[0012]

과제의 해결 수단

[0013]

본 발명은 아스퍼질러스 오리재(*Aspergillus oryzae*) MJS14 (기탁번호: KCTC18552P) 균주를 제공한다.

[0014]

상기 본 발명의 아스퍼질러스 오리재(*Aspergillus oryzae*) MJS14 (기탁번호: KCTC18552P)는, 바람직하게 곰팡이 독소인 아플라톡신과 CPA(cyclopiazonic acid)를 생산하지 않는 균주이다.

[0015]

본 발명은 바실러스 서브틸리스 (*Bacillus subtilis*) D119C (기탁번호: KCTC18551P) 균주를 제공한다.

[0016]

상기 본 발명의 바실러스 서브틸리스 (*Bacillus subtilis*) D119C (기탁번호: KCTC18551P)는, 바람직하게 바이오제닉아민을 생성하지 않는 균주이다.

[0017]

본 발명은 삶은 콩에 발효균주를 접종하여 발효시킴으로써 제조되는 장(醬)의 제조에 있어서, 상기 발효균주로 아스퍼질러스 오리재(*Aspergillus oryzae*) MJS14 (기탁번호: KCTC18552P) 균주와 바실러스 서브틸리스 (*Bacillus subtilis*) D119C (기탁번호: KCTC18551P) 균주 중 선택되는 어느 하나 이상을 사용하는 것을 특징으로 하는 장(醬)의 제조방법을 제공한다.

[0018]

상기 본 발명 장(醬)의 제조방법에 있어서, 상기 아스퍼질러스 오리재(*Aspergillus oryzae*) MJS14 (기탁번호: KCTC18552P) 균주와 바실러스 서브틸리스 (*Bacillus subtilis*) D119C (기탁번호: KCTC18551P) 균주는, 바람직하게 두 균주를 동시에 접종하는 것이 좋다.

[0019]

상기 본 발명 장(醬)의 제조방법에 있어서, 상기 장(醬)은, 일 예로, 된장 또는 간장일 수 있다.

발명의 효과

[0021]

본 발명은 장류의 생산에 사용되는 곰팡이 균주로서, 곰팡이 독소인 아플라톡신과 CPA(cyclopiazonic acid)를 생산하지 않는 아스퍼질러스 오리재(*Aspergillus oryzae*) MJS14 (기탁번호: KCTC18552P) 균주를 제공한다.

[0022]

또한, 본 발명은 장류의 생산에 사용되는 세균 균주로서, 바이오제닉아민을 생성하지 않는 바실러스 서브틸리스 (*Bacillus subtilis*) D119C (기탁번호: KCTC18551P) 균주를 제공한다.

[0023]

본 발명에서는 본 발명에서 선발한 곰팡이 균주와 세균 균주를 동시에 접종함으로써, 복합적인 미생물학적 작용이 나타나, 단일 접종으로 발효시킨 된장과는 다른 풍미를 나타낼 수 있다.

[0024]

또한, 본 발명은 자연 접종으로 인한 혼합발효가 나타나는 재래식 메주 및 된장과 비교하였을 때, 접종하는 균주와 발효 기간을 일정하게 유지할 수 있어, 품질의 획일화와 안전성의 확보가 가능하다.

도면의 간단한 설명

[0026]

도 1은 본 발명 아스퍼질러스 오리재(*Aspergillus oryzae*) MJS14 (기탁번호: KCTC18552P) 균주의 거대 콜로니 모양과 포자 모양을 관찰한 것이다.

도 2는 *Sma*I 제한효소 절단법을 통한 본 발명 아스퍼질러스 오리재(*Aspergillus oryzae*) MJS14 (기탁번호: KCTC18552P) 균주의 분해 패턴 비교 결과이다.

도 3은 PCR을 이용하여 본 발명 아스퍼질러스 오리재(*Aspergillus oryzae*) MJS14 (기탁번호: KCTC18552P)의 아플라톡신 생합성 유전자 클러스터(cluster)를 확인한 것이다.

도 4는 PCR을 이용하여 본 발명 아스퍼질러스 오리재(*Aspergillus oryzae*) MJS14 (기탁번호: KCTC18552P)의 CPA 생합성 유전자 클러스터를 확인한 것이다.

도 5는 본 발명의 선발균주 아스퍼질러스 오리재(*Aspergillus oryzae*) MJS14 (기탁번호: KCTC18552P), 바실러스 서브틸리스 (*Bacillus subtilis*) D119C (기탁번호: KCTC18551P)를 이용하여 콩알메주를 혼합발효(복발효)한 사진이다.

도 6은 본 발명의 곰팡이 균주 아스퍼질러스 오리재(*Aspergillus oryzae*) MJS14 (기탁번호: KCTC18552P)의 단독발효, 본 발명의 세균 균주 바실러스 서브틸리스 (*Bacillus subtilis*) D119C (기탁번호: KCTC18551P)의 단독발효 및 이들을 혼합발효(복발효) 한 콩알메주의 단백질분해효소 활성과 전분분해효소 활성을 나타낸 것이다.

도 7은 본 발명의 두 균주를 동시 접종하여 제조한 된장 시료의 맛 성분 분석을 통한 PCA 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0027] 본 발명은 아스퍼질러스 오리재(*Aspergillus oryzae*) MJS14 (기탁번호: KCTC18552P) 균주를 제공한다. 본 발명을 통해 개발된 곰팡이 종균 *A. oryzae* MJS14 (기탁번호: KCTC18552P)는 *Aspergillus* 속 곰팡이가 생산할 수 있는 곰팡이 독소인 아플라톡신과 CPA를 생산하지 않는 것으로 정량적 생산 측정과 분자유전학적 수준에서 검증되었다.
- [0028] 한편, 본 발명은 바실러스 서브틸리스 (*Bacillus subtilis*) D119C (기탁번호: KCTC18551P) 균주를 제공한다. 본 발명을 통해 개발된 세균 *B. subtilis* D119C (기탁번호: KCTC18551P)는, 세균이 생산할 수 있는 독성 물질인 바이오제닉아민을 생산하지 않는 것으로 확인되었고, 프로테아제(protease), 아밀라아제(amyase), 셀룰라아제(cellulase)의 활성이 높은 것으로 확인되었다.
- [0029] 한편, 본 발명은 삶은 콩에 발효균주를 접종하여 발효시킴으로써 제조되는 장(醬)의 제조에 있어서, 상기 발효균주로 아스퍼질러스 오리재(*Aspergillus oryzae*) MJS14 (기탁번호: KCTC18552P) 균주와 바실러스 서브틸리스 (*Bacillus subtilis*) D119C (기탁번호: KCTC18551P) 균주 중 선택되는 어느 하나 이상을 사용하는 것을 특징으로 하는 장(醬)의 제조방법을 제공한다.
- [0030] 본 발명의 장 제조방법은, 발효균주로 아스퍼질러스 오리재(*Aspergillus oryzae*) MJS14 (기탁번호: KCTC18552P) 균주와 바실러스 서브틸리스 (*Bacillus subtilis*) D119C (기탁번호: KCTC18551P) 균주 중 선택되는 어느 하나 이상을 사용하는데 특징이 있기 때문에, 이 균주들의 사용 외에 장류의 제조에 필요한 다른 기술적 사상, 즉 메주를 띄우는 것이나, 된장 또는 간장으로 발효 및 숙성하는 기술들은 공지된 기술을 사용할 수 있다. 따라서, 이에 대한 구체적인 서술은 공지기술로 대체하기로 한다.
- [0031] 한편, 본 발명의 장 제조방법은 아스퍼질러스 오리재(*Aspergillus oryzae*) MJS14 (기탁번호: KCTC18552P) 균주와 바실러스 서브틸리스 (*Bacillus subtilis*) D119C (기탁번호: KCTC18551P) 균주를 단독으로 사용할 수 있거나, 이들 모두를 사용할 수도 있다. 다만, 바람직하게는 두 균주를 동시에 접종하여 사용하는 것이 좋은데, 본 발명에서 선발한 두 종균을 콩알메주 형태로 혼합발효해 본 결과, 각각 균주의 단일발효에 비해 높은 효소 활성이 나타나는 것을 확인할 수 있었다.
- [0032] 이와 같은 결과로부터 본 발명에서 선발한 곰팡이 균주 및 세균 균주를 각각 사용하여 콩알메주 형태로 발효하는 것보다, 혼합하여 혼합발효를 하는 것이 발효에 더 효과적임을 알 수 있었으며, 두 미생물이 서로 성장에 큰 영향을 미치지 않으면서도, 미생물적 상호작용에 의해 더 높은 수준의 효소 활성을 나타내는 것을 확인할 수 있었다.
- [0033] 또한, 혼합발효 콩알메주를 이용하여 된장 발효를 진행하였을 때, 자연접종에 의한 발효로 생산된 전통된장에 비해 높은 숙성도를 나타내는 것을 알 수 있었다. 이와 같은 결과로부터 본 발명의 혼합종균을 이용한 된장에서 비교적 짧은 시간 안에 더 효율적인 발효가 이루어짐을 알 수 있었다.
- [0034] 또한, 관능평가에 의한 맛 성분 분석에서 전통된장에 비해 불쾌취는 낮게 나타났으며, 상대적으로 높은 감칠맛과 단맛을 나타내는 것을 알 수 있었고, 이를 통해 품질면에서도 더 우수한 장류를 생산할 수 있음을 알 수 있었다.
- [0035] 또한, 안전성 측면에서 본 발명 완성된 된장의 바이오제닉아민을 분석했을 때, 매우 낮은 수준의 바이오제닉아민이 검출되는 것을 확인할 수 있었으며, 이는 전통된장과 비교하였을 때, 안전성이 매우 높은 수준으로 확보되었음을 의미하는 것이다.
- [0036] 종합하자면, 안전성을 확보한 본 발명의 두 종균을 혼합발효하여 메주를 발효하고 장류를 생산하였을 때, 품질 개선뿐만 아니라 안전성 측면에서도 전통된장에 비해 매우 개선된 결과를 보여주는 것을 알 수 있었다. 따라서, 본 발명에서 발굴한 두 종균 및 혼합발효는 안전하고 풍미가 우수한 장류의 산업적 생산에 적용될 수 있을 것이다.
- [0038] 이하, 하기 실시예를 통해 본 발명을 보다 상세하게 설명한다. 다만, 이러한 실시예에 의해 본 발명이 한정되는 것은 아니다.
- [0040] [실시예 1: 아스퍼질러스 오리재(*Aspergillus oryzae*) MJS14 (기탁번호: KCTC18552P) 균주 및 바실러스 서브틸리스 (*Bacillus subtilis*) D119C (기탁번호: KCTC18551P) 균주의 분리 및 동정]

[0041] 한국 전통 메주로부터 곰팡이 균주들을 분리하였다. 곰팡이 균주의 동정을 위해, 형태학적 동정을 진행하였다. 곰팡이의 동정에 흔히 사용되는 거대 콜로니 모양과 포자 모양을 관찰하였을 때, MJS14 (기탁번호: KCTC18552P)는 콜로니 형태가 *A. oryzae/A. flavus*의 것과 유사하며 공중균사가 매우 보송보송한 모양을 띄며 포자색도 연두색에서 올리브색을 나타내었다. 또한, 포자가 매끈한 동그란 모양으로, 역시 *A. oryzae/A. flavus*의 포자 특징과 일치하였다(도 1). 다만, *A. oryzae*와 *A. flavus*는 형태적 특징에 상동성이 매우 커서 이 결과로는 종을 구분하기 어려웠다. 따라서 MJS14 (기탁번호: KCTC18552P)는 이 외의 추가적인 분자유전학적 PCR 방법을 통해 동정하였다.

[0042] *Aspergillus* 속 미생물의 분자유전학적 동정을 위해서는 아플라톡신 유전자 클러스터(aflatoxin gene cluster)의 유전자를 증폭하는 방법을 이용한다. 곰팡이의 분자유전학적 동정 시, 같은 속에 속하는 종들 사이에도 공통된 특징을 가지고 있는 종들이 서로 분류되어 section 으로 한 차례 더 동정된다. *A. oryzae* 와 *A. flavus*는 위의 분류 체계에서 section *flavi*에 속하는 종이며, 아플라톡신 유전자 클러스터의 유전자인 *afIT* 유전자의 PCR 분석 결과 증폭 산물이 존재하는 것으로 나타나 MJS14 균주는 *Aspergillus* section *flavi*로 확인되었다. 좀 더 세분된 동정을 위해 *afIT* 유전자 내의 *afafIT* 부분을 real-time PCR로 증폭한 결과, 잘 증폭되어 MJS14 균주는 *Aspergillus* section *flavi* 중에서도 *A. oryzae/A. flavus* group으로 분류되었다.

[0043] 다만, MJS14 균주를 *A. flavus*로부터 구분하여 확실히 동정하기 위해 추가적으로 *Sma*I 제한효소 절단법을 이용하였다. *A. flavus*는 통상적으로 1.7kb 밴드 이외에 3.8kb의 밴드를 추가로 보이는 반면, *A. oryzae*는 통상적으로 1.7kb와 1.0kb, 2.7kb의 밴드를 보인다. 메주로부터 분리한 본 발명의 MJS14 균주는 희미하지만 1.0kb의 밴드까지 포함하여 *A. oryzae*의 밴드 특성을 보였다. 따라서, 해당 균주를 *A. oryzae* 균주로 동정하였다.

[0044] 한편, 한국 전통 된장으로부터 세균 균주 D119C를 분리하여 API 50E kit를 이용한 생리학적 동정과 16S rRNA 유전자를 이용한 분자유전학적 동정을 진행하였다. 동정 결과 분리 균주 D119C (기탁번호: KCTC18551P)는 *B. subtilis* 균주로 동정되었다.

[0045] 상기의 MJS14 및 D119C 균주의 동정 결과를 아래 표 1에 정리하였다.

표 1

MJS14	형태학적 동정	<i>Aspergillus oryzae / flavus</i>
	ITS 서열 분석	<i>Aspergillus oryzae / flavus</i>
	<i>Sma</i> I 제한효소 절단법	<i>Aspergillus oryzae</i>
	AVM test	<i>Aspergillus oryzae</i>
D119C	API50E kit	<i>Bacillus subtilis</i>
	16S rRNA 서열 분석	<i>Bacillus subtilis</i>

[실시예 2: 선발 균주의 안전성 및 종균 적합성 평가]

[0049] 1. MJS14 (기탁번호: KCTC18552P) 균주에 대한 평가

[0050] 상기 실시예 1에서 선발된 곰팡이 종균 후보 균주의 곰팡이 독소 생합성 능력을 분자유전학적 수준에서 확인하기 위해 PCR을 이용한 유전자 검사를 진행하였다.

[0051] *A. oryzae*가 속하는 *Aspergillus* section *Flavi* 종들이 생산할 가능성이 있는 아플라톡신 독소에 대한 생합성 유전자들은 도 3과 같이 알려져 있다. 이를 바탕으로 분리·동정된 *A. oryzae* MJS14 (기탁번호: KCTC18552P) 균주의 아플라톡신 생합성 유전자를 PCR법을 통해 확인하였다.

[0052] 도 3에서 MJS14 (기탁번호: KCTC18552P)의 아플라톡신 생합성 유전자 중 *norB/cypA* 유전자의 일부가 결실된 것을 확인할 수 있었다 (*A. oryzae*에 대한 분석 결과와 동일하게 나타남). 즉, *A. oryzae* MJS14 균주는 아플라톡신 생합성 유전자 클러스터(cluster) 중 한 가지 유전자가 결실된 것을 확인할 수 있었으며, 이를 바탕으로 아플라톡신을 생합성 하지 않을 것으로 예상할 수 있었다.

[0053] 한편, *A. oryzae*는 CPA(cyclopiazonic acid)도 생산할 가능성이 있다. CPA를 생산하는 균주와 생산하지 않는 균주의 CPA 생합성 유전자 클러스터(cluster)는 도 4와 같다. 도 4에서 검은색으로 표시한 화살표가 CPA 생합성 유전자를 의미한다. 실험 결과, 도 4에서 보는 바와 같이 본 발명의 MJS14 균주(기탁번호: KCTC18552P)는 CPA를 생합성 하는 균주와 밴드가 일치하며, 모든 CPA 생합성 유전자를 가지는 것으로 나타났다. 그러나 HPLC 측정에

의한 정량적 분석 결과, CPA가 전혀 검출되지 않았고, 이에 따라 MJS14 균주는 CPA 생합성 유전자는 가지지만, 실제로는 CPA를 생산하지는 않는 것으로 확인되었다.

[0054] 하기 표 2는 이상의 실험 결과를 정리한 것이다.

표 2

[0055]

Strain	Aflatoxin gene cluster					CPA gene cluster			Biosynthesis of Aflatoxin			Biosynthesis of CPA	
	<i>norB/cypA</i> ^a	<i>nor-1</i>	<i>aflR</i>	<i>ver-1</i>	<i>omtA</i>	<i>maoA</i>	<i>dmaT</i>	<i>pks/nrps</i>	AVM	TLC	HPLC	TLC	HPLC
<i>A. flavus</i> NRRL3357	II	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>A. oryzae</i> SRRC266	I	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
<i>A. oryzae</i> NBRC4177	ND	ND	ND	ND	ND	+	+	+	ND	ND	ND	+	+
<i>A. oryzae</i> RIB40	ND	ND	ND	ND	ND	+	+	-	ND	ND	ND	-	-
MJS14	I	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-

[0056] ND, No data.

[0057] ^a I, 400 bp; II, 800 bp

[0059] 2. D119C (기탁번호: KCTC18551P) 균주에 대한 평가

[0060] 상기 실시예 1에서 선발한 D119C (기탁번호: KCTC18551P) 세균 균주의 종균 적합성을 확인하기 위해, 안전성 측면에서 바이오제닉아민 생성능과 식중독균인 바실러스 세레우스 (*Bacillus cereus*) 균주에 대한 길항작용을 배지 상에서 확인하고자 하였다.

[0061] 우선, D119C (기탁번호: KCTC18551P) 균주가 아미노산으로부터 바이오제닉 아민을 생성하는 효소인 아미노산 데카르복실라아제 (amino acid decarboxylase) 활성을 가지고 있는지 확인하고자 하였다. 배지 상에서 아미노산을 영양원으로 첨가해 준 후, 브로모크레솔 퍼플 (bromocresol purple)을 pH 지시약으로 첨가하여 바이오제닉 아민 생성 여부를 확인하였다. 만약, 해당 균주가 바이오제닉 아민을 생성하면, 배지 상의 pH가 증가하고, 이를 색 변화로 관찰할 수 있는데, 이 방법을 통해 아미노산 데카르복실라아제 활성이 낮은 균주들을 선별할 수 있는 것이다. 실험 결과, 본 발명의 *B. subtilis* D119C (기탁번호: KCTC18551P)는 아미노산 데카르복실라아제 활성(DC activity)이 없는 것으로 나타났다 (하기 표 3)

[0062] 한편, 또 다른 안전성 측면에서, 식중독균인 *B. cereus*에 대한 길항작용을 배지 상에서 투명환(clear zone)의 생성 유무로 확인하고자 하였다. top agar를 이용하여 *B. cereus* 균주를 접종하고, 그 위에 페이퍼 디스크를 올려 본 발명 D119C (기탁번호: KCTC18551P) 세균 균주를 접종한 후, 투명환의 크기를 확인하였다. 실험 결과, 본 발명 *B. subtilis* D119C (기탁번호: KCTC18551P) 균주에서 가장 넓은 투명환이 나타남을 확인하였으며 (하기 표 3), *B. subtilis* D119C (기탁번호: KCTC18551P)균주를 안전성 측면에서 가장 이점이 있는 균주일 것으로 판단할 수 있었다.

[0063] 한편, 된장 발효를 위해 필요한 가장 기본적인 효소들의 활성을 확인하기 위해 배지 상에서 프로테아제 (protease), 아밀라아제(amylase), 셀룰라아제(cellulase)이 활성을 측정하였다. 각각의 균주들을 기질이 첨가된 배지 상에서 배양한 후, 투명환 혹은 발색시약으로 확인하였다. 실험 결과, 안전성 측면에서 가장 이점이 있는 *B. subtilis* D119C (기탁번호: KCTC18551P) 균주에서 상기 효소들에 대한 기본적 수준의 활성이 나타나는 것으로 확인할 수 있었다.

[0064] 선발 균주 및 다른 균주들의 안전성 검사, 효소 활성 결과는 하기 표 3에 나타내었으며, 종균으로 선정된 균주

인 *B. subtilis* D119C (기탁번호: KCTC18551P) 균주의 HPLC를 이용한 바이오제닉아민의 정량적 평가 결과는 표 4에 나타내었다.

표 3

strain	Strain No.	origin	DC activity	<i>B. cereus</i> 길항작용	protease	amylase	cellulase
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	zip6	rice straw, Korea	+	+	+	+	++
<i>Bacillus subtilis</i>	KCCM 11316		-	-	+	-	-
<i>Brevibacillus non reactive</i>	D065B	doenjang, Korea	-	-	+	-	+
<i>B. subtilis/amyloliquefaciens</i>	D077A	doenjang, Korea	+	+	+	-	-
<i>B. subtilis/amyloliquefaciens</i>	D108C	doenjang, Korea	+	-	+	-	++
<i>B. subtilis</i>	D119C	doenjang, Korea	-	++	+	+	++
<i>B. subtilis/amyloliquefaciens</i>	D125D	doenjang, Korea	-	-	+	-	+
<i>B. subtilis/amyloliquefaciens</i>	D131B	doenjang, Korea	+	-	+	-	-
<i>Geobacillus thermoglucosidasius</i>	D135A1	doenjang, Korea	-	-	+	-	++
<i>B. licheniformis</i>	D136C	doenjang, Korea	--	-	-	-	+
<i>B. subtilis/amyloliquefaciens</i>	D140D	doenjang, Korea	+	++	+	-	+
<i>B. subtilis/amyloliquefaciens</i>	D162C	doenjang, Korea	--	-	-	-	+
<i>B. subtilis/amyloliquefaciens</i>	D170C	doenjang, Korea	-	-	+	-	-

표 4

	Strain	Strain No.	PUT	CAD	HIS	TYR
F	<i>B. subtilis</i>	D119C	ND*	ND	ND	1.78±0.17

ND*: Not detected, PUT; Putrescine, CAD; Cadaverine, HIS; Histamine, TYR; Tyramine

[실시예 3: 선발 균주를 이용한 콩알메주의 발효]

[0067] 선발 균주(곰팡이 1종 MJS14 (기탁번호: KCTC18552P), 세균 1종 *B. subtilis* D119C (기탁번호: KCTC18551P))를 이용하여 콩알메주 상에서 혼합발효를 진행하였을 때, 변화하는 여러 영향을 알아보려고 하였다. 이를 위해, 선발된 각각의 균주를 콩 중량의 10⁶ 수준으로 콩알메주에 접종하여 메주 발효를 진행하였다 (도 5).

[0071] 발효 결과, 곰팡이 단독발효 및 세균 단독발효에 비해 혼합발효 콩알메주에서 단백질 분해효소 활성 및 전분 분해효소 활성이 높게 나타나는 것을 확인할 수 있다 (도 6). 곰팡이 단독발효 시료에서는 세균 단독발효 시료에 비해 상대적으로 전분 분해효소 활성이 높고, 세균 단독발효 시료는 반대로 단백질 분해효소 활성이 높았다. 하지만, 혼합발효 시료에서는 두 효소 활성이 모두 높게 나타날 뿐 아니라 각각의 단독발효에 비해서도 높은 효소 활성을 나타내었다. 이는 두 미생물이 한 배치 안에서 배양될 때 두 균주가 성공적으로 함께 자라고 있음을 시사하며, 두 균주가 서로 상호작용함으로써 서로에 이점을 제공한다는 점을 의미하는 것이다.

[0072] 상기의 실험 결과는 곰팡이를 단독배양하는 경우보다 세균과 함께 배양한 경우, 더 높은 효소 활성을 나타내며, 이를 통해 맛과 풍미에 영향을 미치는 당과 아미노산 성분이 증가할 것을 의미한다. 이와 같은 결과는 완성된 메주에 본 발명의 두 미생물을 한꺼번에 접종하여 된장을 담근다면, 두 균주가 서로 길항작용을 일으키지 않을 뿐만 아니라, 서로 상호작용을 함으로써, 기존의 산업 된장과는 또 다른 양상의 된장을 생산할 수 있음을 의미한다.

[실시예 4: 선발 균주의 혼합발효에 의한 콩알메주를 이용한 된장의 제조]

[0075] 본 발명의 선별 균주를 혼합발효하여 만든 콩알메주로 된장을 제조하였다. 또한, 제조한 된장을 이용하여 이화학적 분석과 안전성 분석 및 관능평가를 진행하였다.

표 5

sample	포르말데질소 (mg%)	NaCl (%)	수분함량 (%)	pH	산도	색도		
						L	a	b
시료	1126	12.0	53.1	6.23	25.3	37.62	10.79	23.55
Reference	890	11.0	56.6	5.04	34.4	41.34	8.52	18.95

시료; 본 발명의 혼합 종균을 사용하여 혼합발효한 콩알메주를 이용하여 만든 된장, Reference; 전통 방식으로 제조한 된장

[0078] 기본적인 장류의 이화학적 특성을 비교해 본 결과, 상기 표 5에서 보는 바와 같이, 본 발명의 혼합 종균을 사용하여 만든 된장에서, 숙성도의 지표인 포르말데질소의 함량이 대조구인 전통된장에 비해 높은 것을 확인할 수 있었다. 이를 통해 본 발명의 된장이 전통된장에 비해 비교적 짧은 시간 동안 발효된 개량식 장류이지만, 숙성이 더 많이 진행된 것을 알 수 있었고, 전통 된장에 비해 감칠맛에 영향을 주는 성분들이 많이 포함되어 있을 것으로 판단할 수 있었다.

[0079] 한편, 산미에 영향을 미치는 pH와 산도는 혼합 종균을 사용한 본 발명의 된장에 비해 전통된장에서 높은 것을 알 수 있었으며, 이에 따라 전통된장의 산미가 더 높을 것으로 판단할 수 있었다.

[0080] 한편, 전문 패널들의 맛 성분 분석 데이터를 이용하여, 전통된장과 함께 본 발명 된장의 PCA 분석을 진행하였다 (도 7). 전통된장의 경우, 맛 성분에서 불쾌함을 느끼게 하는 맛 성분들이 다량 포함되어 있었으나, 혼합 종균을 사용한 본 발명 된장은 해당 맛들이 비교적 느껴지지 않았다. 또한, PCA 분석 결과에서, 전통된장과 본 발명 혼합 종균 사용 된장의 맛 분포가 매우 다르게 나타나는 것을 알 수 있었으며, 본 발명 혼합 종균 된장에서 전통된장에 비해 상대적으로 감칠맛과 단맛이 많이 나타나는 것을 확인할 수 있었다. 이는 본 발명 혼합 종균 메주 및 된장의 높은 단백질 분해효소와 전분 분해효소에 의한 아미노산과 당 성분 때문인 것으로 판단되었다. 이에 따라, 본 발명의 혼합 종균을 사용하여 제조한 된장은, 맛과 풍미는 우수하면서도 전통된장에서 나타나는 불쾌취를 감소시킬 수 있었기 때문에, 상품성 측면에서 더 우수한 것을 알 수 있었다.

[0081] 한편, 본 발명의 혼합 종균을 사용한 된장의 안전성을 측정하기 위해 된장에서 바이오제닉아민을 추출하여 측정하였다 (표 6). 대조구로는 전통된장을 사용하였다.

표 6

sample	바이오제닉아민 (µg/g)								Total BA
	TRP	PHE	PUT	CAD	HIS	TYR	SPD	SPM	
Sample	ND	ND	ND	ND	ND	6.91 ±0.00	ND	5.31 ±0.00	12.22 ±0.00
Reference	ND	486.97 ±19.00	ND	ND	4.87 ±1.31	916.20 ±41.00	ND	0.06 ±0.00	1408.10 ±61.31

TRP; Tryptamine, PHE, 2-Phenylethylamine, PUT; Putrescine, CAD; Cadaverine, HIS; Histamine, TYR; Tyramine, SPD; Spermidine, SPM; Spermine

[0084] 실험 결과, 혼합 종균을 사용한 본 발명 된장에서 전통된장에 비해 매우 낮은 수준의 바이오제닉아민이 검출된 것을 알 수 있었다. 하지만, 전통된장에서는 8종의 바이오제닉 아민 중 2-페닐에틸아민(2-phenylethylamine)과 티라민(tyramine)의 함량이 특히 높게 나타난 것을 알 수 있었다. 이를 통해 본 발명의 혼합 종균을 이용하여 된장을 제조할 경우, 자연접종으로 인해 발효된 된장에 비해, 안전성이 매우 높은 수준으로 확보되는 것을 알 수 있었다.

[0086] 기탁기관명 : 한국생명공학연구원

[0087] 수탁번호 : KCTC18551

[0088] 수탁일자 : 20170228

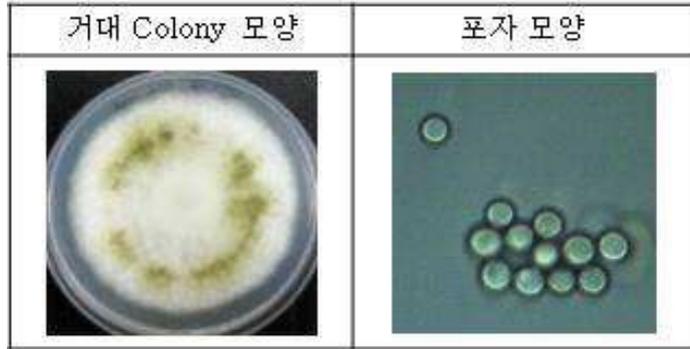
[0090] 기탁기관명 : 한국생명공학연구원

[0091] 수탁번호 : KCTC18552

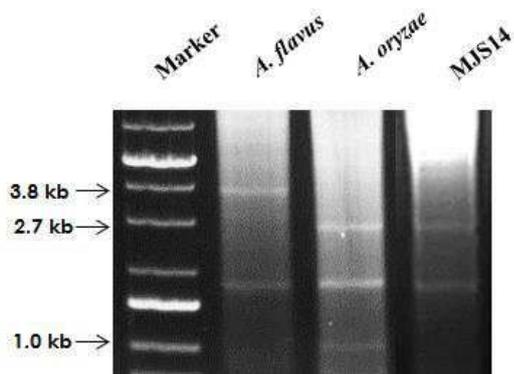
[0092] 수탁일자 : 20170228

도면

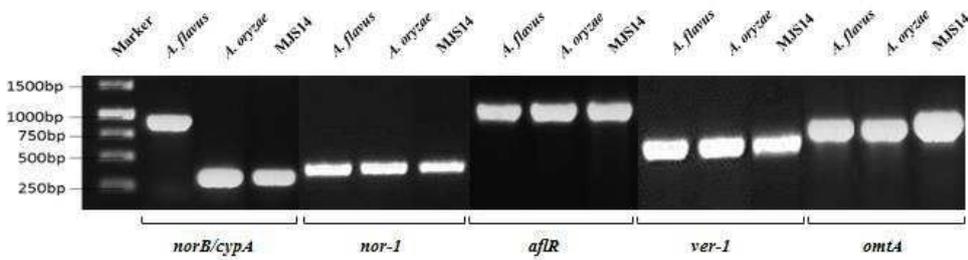
도면1



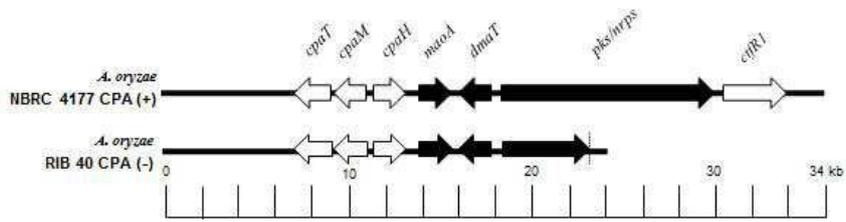
도면2



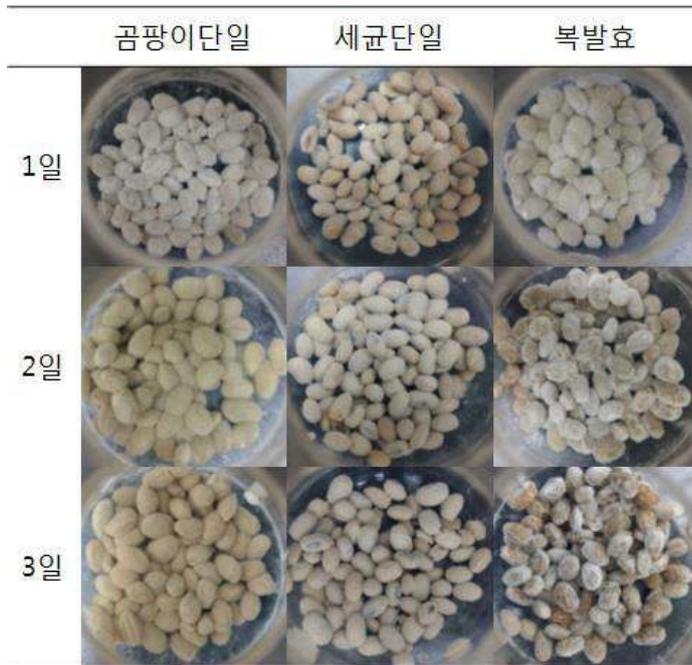
도면3



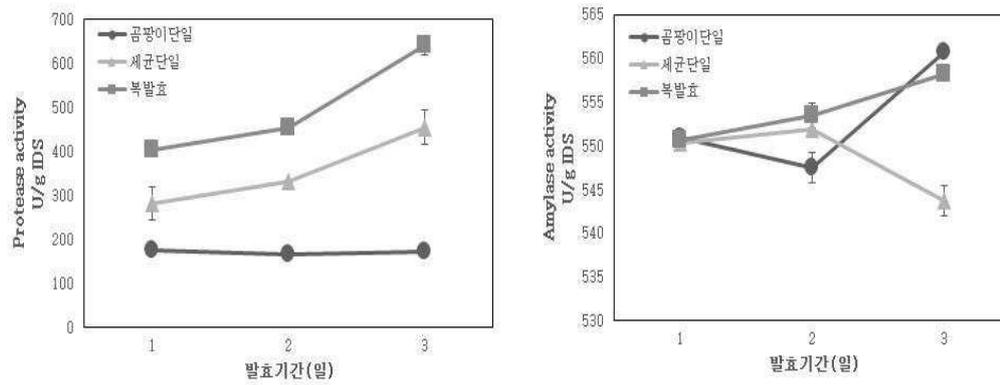
도면4



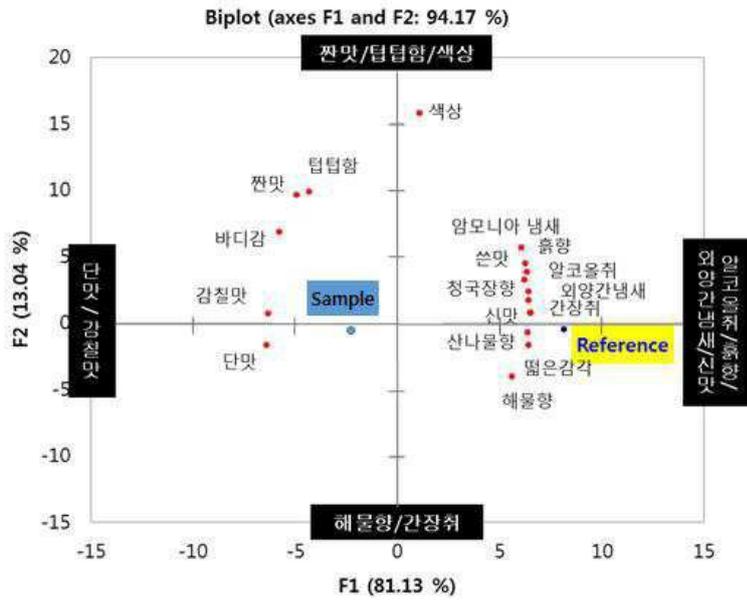
도면5



도면6



도면7



【심사관 직권보정사항】

【직권보정 1】

【보정항목】 청구범위

【보정세부항목】 청구항 6의 제2행

【변경전】

Aspergillus aryzae

【변경후】

Aspergillus oryzae

【직권보정 2】

【보정항목】 청구범위

【보정세부항목】 청구항 2의 제2행

【변경전】

Aspergillus aryzae

【변경후】

Aspergillus oryzae