



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2014년03월17일
(11) 등록번호 10-1374586
(24) 등록일자 2014년03월10일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 1/20 (2006.01) A23L 1/202 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2012-0016591
(22) 출원일자 2012년02월17일
심사청구일자 2012년02월17일
(65) 공개번호 10-2013-0095127
(43) 공개일자 2013년08월27일
(56) 선행기술조사문헌
KR1020110137182 A*
한국식품과학회지, Vol.38, pp.82-87(2006.)
Kor. J. Microbiol. Biotechnol., Vol.31,
pp.271-276(2003.)
양주희, 공주대학교 대학원,
석사학위논문(2011.02.)*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
연세대학교 원주산학협력단
강원도 원주시 흥업면 연세대길 1
(72) 발명자
정건섭
서울 송파구 중대로 24, 213동 705호 (문정동, 올
림픽훼밀리타운)
홍성욱
서울 서대문구 홍제천로2길 90, B동 401호 (연희
동, 임탑빌라)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인다나

전체 청구항 수 : 총 5 항

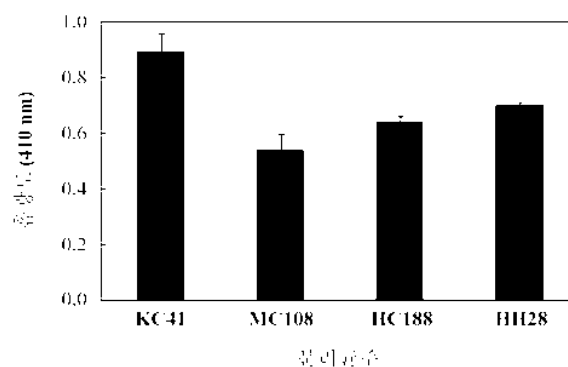
심사관 : 김지연

(54) 발명의 명칭 감마 글루타미트랜스펩티데이스 및 피브리린 분해효소의 활성이 높은 바실러스 아밀로리큐파시엔스 KC41 및 이를 이용하여 제조한 청국장

(57) 요약

본 발명은 감마 글루타미트랜스펩티데이스 및 피브리린 분해효소의 활성이 높은 바실러스 아밀로리큐파시엔스 KC41 (*Bacillus amyloliquefaciens* KC41, 기탁번호 KCCM 11249P) 및 이를 이용하여 제조한 청국장을 제공한다. 본 발명에 따른 바실러스 아밀로리큐파시엔스 KC41은 청국장 점질물의 주 성분인 감마 글루타메이트 (γ -glutamate) 생성에 관여하는 감마 글루타미트랜스펩티데이스 (γ -glutamyltranspeptidase)의 활성 및 뇌혈전증이나 심장마비를 유발하는 혈전을 용해하는 피브리린 분해효소 (fibrinolytic enzyme)의 활성이 매우 높아 기능성과 기호성이 우수한 청국장 개발을 위한 종균으로서 활용가치가 뛰어나다.

대표도 - 도1



(72) 발명자

신소희

충북 제천시 의병대로29길 18-8, (동현동)

임인규

충북 제천시 내제로29길 13, (청전동)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 109150-3

부처명 농수산식품부

연구사업명 농림기술개발사업

연구과제명 DGGE 방법을 이용한 청국장 발효용 기능성 종균 개발

기 여 율 1/1

주관기관 연세대학교 산학협력단

연구기간 2009.04.10 ~ 2012.04.09

특허청구의 범위

청구항 1

16S rDNA 유전자 서열로서 서열번호 1의 핵산서열로 표시되고, 바실러스 아밀로리큐파시엔스(*Bacillus amyloliquefaciens*) KC41 KCCM 11249P.

청구항 2

삭제

청구항 3

제1항의 바실러스 아밀로리큐파시엔스(*Bacillus amyloliquefaciens*) KC41 KCCM 11249P를 종균으로 이용하여 대두를 발효시키는 것을 포함하는 청국장 제조방법.

청구항 4

제3항의 방법에 따라 제조된 청국장.

청구항 5

제4항의 청국장을 포함하는 식품 조성물.

청구항 6

제4항의 청국장을 포함하는 혈전성 질환 개선용 건강기능식품.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 감마 글루타밀트랜스캡티데이스 및 피브린 분해효소의 활성이 높은 바실러스 아밀로리큐파시엔스 KC41 (*Bacillus amyloliquefaciens* KC41) 및 이를 이용하여 제조한 청국장에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 쌀을 주식으로 하는 우리나라에서 청국장은 단백질의 중요한 공급원이며 된장, 고추장, 간장 등과 더불어 한국 음식 맛의 기본이 되는 것으로 매우 중요한 발효식품으로 사용되어 왔다. 특히 청국장은 된장과 비교하여 속성으로 발효시켜 제조할 수 있기 때문에 널리 이용해 왔다. 자가 방법으로 제조되는 우리나라의 청국장은 지방마다 맛과 풍미가 일정하지 못한다. 이것은 청국장 발효미생물의 종류에 따라 청국장의 맛과 풍미도 변화되는 것으로 보고되어 있다.

[0003] 청국장의 품질은 발효에 관여하는 미생물의 종류에 따라 차이가 있으며 청국장에 존재하는 주요 미생물로는 *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus pumilus*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus amyloliquefaciens* 등이 알려져 있다. 청국장의 발효과정 중에 생성되는 각종 생리활성 물질은 혈압상승 억제효과, 면역증강, 항돌연변이, 항산화효과 및 혈전용해능 등과 같은 기능성을 나타내는 것으로 보고되어 있으며, 특히 청국장의 점질물은 항암효과와 항균효과가 있는 것으로 보고되어 있다. 또한 우리 나라의 청국장과 유사한 일본의 *Natto*에서 nattokinase라는 혈전 용해효소가 발견되어 그 효능의 우수성이 보고되었다.

[0004] 청국장의 점성 및 풍미성분은 D,L-glutamic acid가 중합된 poly- γ -glutamic acid, 즉 γ -polyglutamate (γ -PGA)와 fructose의 중합체인 levan으로 청국장 점질물에는 생리활성이 있는 것으로 연구보고 되어있다. γ -Glutamyltranspeptidase (γ -GTP)는 γ -glutamylpeptide를 가수분해하여 γ -glutamyl을 다른 amino acid 또는 peptide로 전이시키는 효소로서 청국장 점질물 생성에 관여하는 것으로 알려져 있다. γ -PGA 산성에서 α -helix 구조가 되며 중성에서는 분자가 길게 늘어진 불규칙적인 코일(random coil) 구조로 변화되어 점성이 높아진다. 일종의 polypeptide이지만 글루탐산의 γ -카르복실기와 글루탐산의 α -아미노기가 아마이드 결합으로 이루어진 단일 아미노산의 중합체로 구별된다. 고도의 수용성 및 생분해성을 가진 음이온성 아미노산 고분자소재로 고부가가치의 의약품, 화장품, 기능성 식품, 환경용, 공업용 등의 적용 범위가 매우 다양하다. 청국장은 미확인된 많은 종류의 미생물들에 의해서 발효가 되기 때문에 다양한 미생물 효소에 의해 분해된 대두의 각종 성분들과 미생물의 대사산물에 의한 생체반응 조절 기능성에 대한 연구가 더 필요한 실정이다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0005] 본 발명에서는 감마 글루타미트랜스펩티데이스 및 피브린 분해효소의 활성이 높은 신규 미생물을 발굴하여, 이를 종균으로 이용하여 제조한 우수한 효능과 풍미를 지닌 청국장을 제공하고자 한다.

과제의 해결 수단

[0006] 상기 과제를 해결하기 위한 수단으로서, 본 발명은 청국장으로부터 분리해 낸 신규 미생물인 바실러스 아밀로리큐파시엔스 KC41 (*Bacillus amyloliquefaciens* KC41)를 제공한다.

[0007] 본 발명에 따른 바실러스 아밀로리큐파시엔스 KC41 (*Bacillus amyloliquefaciens* KC41)은 16S rDNA 유전자 서열로서 서열번호 1의 핵산서열을 갖는다.

[0008] 한 구체예에서, 상기 바실러스 아밀로리큐파시엔스 KC41은 기탁번호 KCCM 11249P로 기탁된 것일 수 있다.

[0009] 하기 실시예에서 확인할 수 있는 바와 같이, 본 발명에 따른 바실러스 아밀로리큐파시엔스 KC41 은 청국장 점질물의 주성분인 감마 글루타메이트 (γ -glutamate) 생성에 관여하는 감마 글루타미트랜스펩티데이스 (γ -glutamyltranspeptidase)의 활성 및 뇌혈전증이나 심장마비를 유발하는 혈전을 용해하는 피브린 분해효소 (fibrinolytic enzyme)의 활성이 매우 높다. 뿐만 아니라 바실러스 아밀로리큐파시엔스 KC41를 이용하여 제조한 청국장의 경우 다른 종균을 이용하여 제조한 청국장들에 비해 맛, 향기 등에 대한 기호성도 매우 높은 것으로 나타나, 청국장 제조를 위한 종균으로서의 활용 가치가 매우 높은 것으로 나타났다.

[0010] 따라서, 본 발명은 또한 바실러스 아밀로리큐파시엔스 KC41를 종균으로 이용하여 대두를 발효시키는 것을 포함하는 청국장의 제조방법 및 이에 따라 제조된 청국장을 제공한다.

[0011] 본 발명에 따른 청국장은 바실러스 아밀로리큐파시엔스 KC41를 종균으로 이용하여 통상의 청국장 제조방법에 따라 제조될 수 있다. 예를 들어, 메주콩을 10~20시간동안 물에 침지한 후, 4~5시간 동안 끓이고 삶은 대두를 옮겨 담아 50~60℃까지 식힌 다음, 바실러스 아밀로리큐파시엔스 KC41를 종균으로 접종한 후 42~45℃에서 36~48시간 동안 발효시켜 제조할 수 있다.

[0012] 본 발명은 또한 상기 방법에 따라 제조된 청국장을 포함하는 식품 조성물을 제공한다. 본 발명에 따른 식품 조성물은 통상의 방식으로 제제화되어 기능성 식품으로 이용하거나, 각종 식품에 첨가할 수 있다.

[0013] 본 발명은 또한 상기 방법에 따라 제조된 청국장을 포함하는 혈전성 질환 개선용 건강기능식품을 제공한다. 건강기능식품이란, 유효성분을 음료, 차류, 향신료, 껌, 과자류 등의 식품소재에 첨가하거나, 캡슐화, 분말화, 현탁액 등으로 제조한 식품으로, 이를 섭취할 경우 건강상 특정한 효과를 가져오는 것을 의미하나, 일반 약품과는 달리 식품을 원료로 하여 약품의 장기 복용시 발생할 수 있는 부작용 등이 없는 장점이 있다. 이와 같이 하여 얻어지는 본 발명의 건강기능식품은, 일상적으로 섭취하는 것이 가능하기 때문에 매우 유용하다.

[0014] 현재까지 혈전성 질환의 예방과 치료에 다양한 항응고제, 항혈소판제, 혈전 용해제 등이 사용되고 있으나, 가격이 매우 높으며, 출혈성 부작용과 위장 장애 및 과민반응 등의 부작용의 위험이 크다는 문제점이 있다. 반면,

본 발명에 따른 청국장을 식품으로써 섭취하게 되면 혈전증, 동맥경화증, 색전, 허혈성 심질환, 뇌졸중, 협심증, 뇌경색, 두개 내 출혈, 동맥류, 죽상혈전증, 신경화증, 심근경색 등의 혈전성 질환을 미연에 방지하거나 개선 시킬 수 있는 기능성을 제공하게 된다.

[0015] 이와 같은 건강식품에 있어서의 본 발명에 따른 청국장의 첨가량은, 대상인 건강식품의 종류에 따라 달라 일률적으로 규정할 수 없지만, 식품 본래의 맛을 손상시키지 않는 범위에서 첨가하면 되며, 대상 식품에 대하여 통상 0.01 내지 50 중량%, 바람직하기로는 0.1 내지 20 중량%의 범위이다. 또한, 과립, 정제 또는 캡슐형태의 식품의 경우에는 통상 0.1 내지 100 중량%, 바람직하기로는 0.5 내지 80 중량%의 범위에서 첨가하면 된다. 한 구체에서, 본 발명의 건강기능식품은 청국장 환의 형태일 수 있다.

발명의 효과

[0016] 본 발명에 따른 바실러스 아밀로리큐파시엔스 KC41(*Bacillus amyloliquefaciens* KC41, 기탁번호 KCCM 11249P)은 청국장 점질물의 주 성분인 감마 글루타메이트 (γ -glutamate) 생성에 관여하는 감마 글루타밀트랜스펩티데이스 (γ -glutamyltranspeptidase)의 활성 및 뇌혈전증이나 심장마비를 유발하는 혈전을 용해하는 피브린 분해 효소 (fibrinolytic enzyme)의 활성이 매우 높아 기능성과 기호성이 우수한 청국장 개발을 위한 종균으로서 활용가치가 뛰어나다.

도면의 간단한 설명

[0017] 도 1은 청국장으로부터 분리한 미생물의 γ -GTP 합성효소 활성을 측정한 결과를 나타낸 그래프이다.
 도 2는 분리균주 KC41의 피브린 플레이트 상에서의 혈전분해 활성을 나타낸 사진이다.
 도 3은 KC41 분리균주의 형태학적 조사 결과를 보여주는 사진이다.
 도 4는 동정된 KC41 균주의 염기서열을 BLASTN의 데이터와 비교하여 분자 생물학적 연관성을 나타낸 계통도를 보여준다.
 도 5는 선발 미생물을 종균으로 사용하여 제조한 청국장의 미생물 생균수를 측정한 결과를 보여주는 그래프이다.
 도 6은 선발미생물을 종균으로 사용하여 제조한 청국장의 점질물 물성을 측정한 결과를 보여주는 그래프이다.
 도 7은 선발미생물을 종균으로 사용한 청국장의 기호성 조사 결과를 나타낸 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0018] 본 발명의 이점 및 특징, 그리고 그것들을 달성하는 방법은 상세하게 후술되어 있는 실시예들을 참조하면 명확해질 것이다. 그러나 본 발명은 이하에서 개시되는 실시예들에 한정되는 것이 아니라 서로 다른 다양한 형태로 구현될 것이며, 단지 본 실시예들은 본 발명의 개시가 완전하도록 하고, 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 발명의 범주를 완전하게 알려주기 위해 제공되는 것이며, 본 발명은 청구항의 범주에 의해 정의될 뿐이다.

[실시예]

[0020] 실시예 1: 청국장 발효용 미생물의 탐색

[0021] 본 연구에 사용된 미생물 분리용 청국장은 경기도 여주군, 강원도 원주시, 전라북도 순창군, 경기도 안성시에서 시판되고 있는 전통 청국장을 각각 구입하여 사용하였다. 청국장으로부터의 미생물의 분리는 다음과 같은 방법으로 수행되었다. 청국장 시료를 각각 취하여 멸균 생리식염수에 1 : 9 비율로 혼합한 후, homogenizer (Stomacher 400, Seward, England)를 사용하여 10분 동안 균질화 한 후, 현탁액을 제조하였다. 이 현탁액을 멸균 생리식염수로 십진희석한 후 tryptic soy agar (TSA; Difco, Detroit, MI, USA) plate에 100 μ l씩 도말하여 37 $^{\circ}$ C에서 24시간 동안 배양한 후에 미생물 집락의 형태에 따라 서로 다른 미생물을 분리하였다.

[0022] (1) Gamma-glutamyltranspeptidase (γ -GTP)의 활성측정

[0023] 청국장으로부터 분리한 미생물 1,399주 중에서 γ -polyglutamate 생성량이 높은 미생물을 선발하기 위해 γ -glutamyl-p-nitroanilide를 기질로 사용하여 γ -glutamyl transpeptidase (γ -GTP)를 측정하였다.

[0024] 분리미생물은 soy medium에서 37℃에서 24시간 동안 배양하고 원심분리 (10,000×g / 10 min)한 후, 상등액을 조효소액으로 사용하였다. 분리미생물이 효소를 생산하기 위한 soy medium 제조는 대두 (충북 괴산군 2010산)와 증류수 (1:4)를 121℃에서 15분 동안 열처리한 후, 여과망을 이용하여 대두를 제거하고 그 여과액은 1N HCl을 사용하여 pH를 3.5로 조절한 다음, 4℃에서 6시간 정치하여 침전된 단백질을 filter paper (Whatman, England)로 제거하였다. 1N NaOH를 사용하여 pH를 6.5로 재조정하여 제조하였다. γ -GTP 효소활성 측정은 기질용액 (1.0 mM γ -glutamyl-p-nitroanilide, 50mM Tris·HCl buffer, pH 8.0) 0.5 mL에 조효소액 0.25 mL과 20mM glycylglycine 0.25 mL을 첨가하여 37℃에서 10분 동안 반응시킨 후, 3.5 M acetic acid 0.5 mL을 첨가하여 효소활성 반응을 억제한 후, 410 nm에서 흡광도를 측정하였다. 대조군은 20mM glycylglycine을 첨가하지 않은 기질효소 반응액을 사용하였다.

[0025] γ -GTP 효소활성 후, 410 nm에서 흡광도(O.D.)를 측정하여 γ -GTP 합성효소의 활성이 가장 높은 미생물 50주를 1차 선발하였고 (데이터 미제시), 동일한 방법으로 γ -GTP 합성효소의 활성을 측정한 결과, 총 4주를 2차 선발하였다 (도 1). 2차 선발된 총 4주의 미생물을 각각 HC188, HH28, MC108, KC41이라 명명하였으며, 이 중 γ -GTP 효소활성이 가장 높은 KC41 분리군주를 최종 선발하였다.

[0026] (2) 혈전분해 효소의 활성측정

[0027] 최종 선발한 KC41 분리군주의 혈전분해 활성을 조사하였다. 분리미생물의 혈전분해 효소의 활성측정은 0.1 M 소듐 포스페이트 버퍼 (pH 7.8) 10 mL에 피브리노겐을 0.8 %가 되도록 용해시키고 트롬빈(100 NIH/ml) 100 μ L를 첨가하였다. 위와 동일한 완충용액에 녹인 1% 아가로스 용액 10 mL을 첨가하여 충분히 혼합한 후, 즉시 square dish에 붓고 실온에서 5-10 min 동안 방치, 고형화시켜 fibrin plate를 제조하였다. 분리미생물을 soy medium에 37℃에서 24시간 동안 배양하고 원심분리 (10,000×g / 10 min)한 후, 제조한 피브린 플레이트에 페이퍼 디스크(8mm, Toyo Roshi, Japan)를 올려놓고, 배양 상등액 10 μ L를 적가하여 37℃에서 24시간동안 반응시킨 후, 생성된 투명한 분해환의 크기를 대조군인 플라스민 (plasmin, 1unit/ml)과 비교하였다.

[0028] 실험 결과, 대조군인 플라스민 1 unit/ml 농도 (100%)와 비교하였을 때, KC41 분리군주는 86% 정도의 혈전분해 활성을 나타내었다 (도 2).

[0029] 실시예 2: KC41 분리군주의 동정

[0030] (1) 형태학적 특성 조사

[0031] 분리 선발한 미생물의 동정은 Gram 염색과 아포염색을 하여 현미경 관찰을 통해 형태학적 특성을 조사하였다. γ -GTP 효소활성이 가장 높은 KC41군주를 형태학적으로 관찰한 결과, TSA고체배지 상에서 미생물 콜로니는 불규칙한 모양 (irregular)의 주름 (wrinkled)이 있는 형태로 관찰되었고, 그람염색과 아포염색하여 현미경 관찰한 결과, 내열성 포자를 형성하는 그람양성의 간균으로 전형적인 바실러스 군주의 특성을 나타내었다 (도 3).

[0032] (2) 탄소원에 대한 이용성 조사

[0033] API 50 CHB kit (bioMerieux Co., France)으로 KC41 군주의 49개의 탄소원에 대한 이용성을 조사하고 이 결과를 API 50 CHB database V3.0 (<http://apiweb.biomerieux.com>)을 이용하여 잠정적으로 동정하였다. 그 결과, KC41군주는 *Bacillus amyloliquefaciens*와 87 % 상동성을 나타내었는데 *B. amyloliquefaciens* KCCM12090 표준 균주와는 glycerol, D-xylose, lactose, Trehalose, β Gentiobiose 와 같은 5개의 당 이용성에서 차이가 있는 것으로 확인되었다 (표 1).

표 1

[0034]

Carbohydrate	Result		Carbohydrate	Result	
	KC41	바실러스 아밀로리큐파시엔스 KCCM12090		KC41	바실러스 아밀로리큐파시엔스 KCCM12090
Control	-	-	Esculine	+	+
Glycerol	-	+	Salicine	+	+
Erythritol	-	-	Cellobiose	+	+
D-Arabinose	-	-	Maltose	+	+
L-Arabinose	+	+	Lactose	+	-
Ribose	+	+	Melibiose	-	-
D-Xylose	+	-	Saccharose	+	+
L-Xylose	-	-	Trehalose	+	-
Adonitol	-	-	Inulin	-	-
β Methyl-xyloside	-	-	Melezitose	-	-
Galactose	-	--	D-Raffinose	+	+
D-Glucose	+	+	Amidon	+	+
D-Fructose	+	+	Glycogen	+	+
D-Mannose	+	+	Xylitol	-	-
L-Sorbose	-	-	β Gentiobiose	-	+
Rhamnose	-	-	D-Turanose	-	-
Dulcitol	-	-	D-Lyxose	-	-
Inositol	-	-	D-Tagatose	-	-
Mannitol	+	+	D-Fucose	-	-
Sorbitol	+	+	L-Fucose	-	-
α Methyl-D-mannoside	-	-	D-Arabitol	-	-
α Methyl-D-glucosamine	+	+	L-Arabitol	-	-
N Acetyl glucosamine	+	+	Gluconate	-	-
Amygdaline	+	+	2 ceto-gluconate	-	-
Arbutine	+	+	5ceto-gluconate	-	-

[0035]

* +, positive or slow positive ; -, negative or weakly positive

[0036]

(3) 16S ribosomal DNA gene sequencing 분석

[0037]

보다 더 정확한 동정을 위하여 KC41균주를 16S ribosomal DNA gene sequencing 분석을 통하여 동정하였다. 분리미생물의 균체를 취하고 멸균된 생리식염수에 균체를 2회 세척한 후, DNeasy tissue kit (Qiagen, Valencia, CA, USA)를 사용하여 DNA를 추출하였다.

[0038]

추출된 DNA의 16S ribosomal DNA gene 증폭을 위하여 universal primer; 27F (5'-AGAGTTTGATCATGGCTCAG-3')와 1492R (5'-GGATACCTTGTTACGACTT-3') primer를 사용하였다. PCR 반응시 Takara Perfect Premix (0.4mM dNTP, 0.5units Taq polymerase, 4mM Mg²⁺이 함유된 PCR buffer) 10μl에 DNA template (20μg/ml) 1μl, forward와 reverse primer (1.0 μM)를 각각 1μl씩 넣고 나머지는 증류수를 첨가하여 총 부피가 20μl가 되도록 제조하였다. PCR 증폭은 Mastercycler gradient (Eppendorf, Hamburg, Germany)으로 수행하였다. PCR 반응은 95℃에서 5분 (initial denaturation), 94℃에서 45초 (denaturation), 52℃에서 45초 (annealing), 72℃에서 1분 (extension)을 30 cycles 실시하였고, 72℃에서 5분간 최종 extension을 수행하였다. 증폭된 약 1400 bp의 fragment를 T vector (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)에 결합시킨 후 형질전환하였다. T vector sequencing primer를 이용하여 염기서열 결정을 수행하였다. KC41균주의 16S rDNA gene sequence는 서열번호 1의 핵산 서열로 나타났다.

[0039]

서열번호 1의 핵산 서열을 BLAST search (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) program을 이용하여 GenBank (NCBI,

Bethesda, MD, USA)의 ribosomal DNA gene sequencing과 비교하여 동정하였다. 동정 결과 얻은 분자 생물학적 연관성을 나타내는 계통도를 나타내었다(도 4). 이 결과에 따르면 KC41균주는 *Bacillus amyloliquefaciens*와 가장 가까운 유연 관계로 보였다. 따라서 KC41균주를 *Bacillus amyloliquefaciens*로 동정하고 *Bacillus amyloliquefaciens* KC41이라 명명하였으며, 이를 2012.01.11에 한국미생물보존센터에 기탁하고 기탁번호 KCCM 11249P 를 부여받았다.

[0040] 그 외 2차 선발된 미생물 HC188, HH28, MC108에 대해서도 KC41 균주와 마찬가지로의 방법으로 동정 한 결과, 각각 *Bacillus amyloliquefaciens* subsp.plantarum, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus subtilis*로 동정되었다.

[0041] **실험예: 본 발명에 따른 미생물을 이용하여 제조된 청국장의 특성**

[0042] **(1) 청국장의 제조**

[0043] γ -GTP 효소활성이 가장 높은 *B. amyloliquefaciens* KC41 선발균주와 MC108, HC188, HH28 분리균주를 청국장 발효용 종균으로 사용하여 2010년에 수확된 충북 괴산군 백태를 이용하여 청국장을 제조하였다. 선발미생물은 soy medium 액체배지에서 37℃에서 24시간동안 배양 (10^7 CFU/mL)하여 청국장 발효용 종균으로 사용하였다. 원료 대두를 10℃에서 24시간 동안 침지한 후 물빼기를 하여 121℃에서 60분 동안 증자하였다. 증자한 후 50℃로 냉각시키고 soy medium 액체배지에서 배양(37℃, 24hr)한 미생물 배양액을 종균으로 대두량의 1% (v/w)를 접종하였다. 청국장 발효조건은 45℃에서 48시간 동안 발효하였고 이때 항온기 내부의 습도는 70%를 유지하였다.

[0044] **(2) 이화학적 특성조사**

[0045] 상기 방법에 의해 제조된 청국장 시제품의 이화학적 특성을 비교하였다.

[0046] 미생물 검사는 청국장 시료를 멸균증류수로 10배씩 연속 희석하여 tryptic soy agar (TSA; Difco, Detroit, MI, USA) plate에 도말한 후 37℃에서 14시간 배양하여 생성된 colony의 수를 계수하였다. 삶은 콩에 종균을 접종한 생균수는 4.60~4.95 Log CFU/g 에서 48시간 동안 발효한 후, 8.81~9.68 Log CFU/g으로 청국장 시제품 간의 생균수는 유의적 차이가 없었다 (도 5).

[0047] 청국장의 수분함량은 상압가열 건조법을 이용하여 측정하였다. pH는 청국장 5 g에 증류수 5 mL를 넣어 현탁한 후, pH meter로 측정하였다. 아미노태 질소함량은 Formol 적정법으로 측정하였고 조단백질 함량은 Kjeldahl법으로 측정하였다. 암모니아태 질소는 아미노태 질소함량과 동일한 시료액 0.1 mL을 취한 후 phenol 10 g, sodium nitroprusside dihydrate 0.05 g, 1 L 증류수를 혼합한 용액과 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 0.9 g, NaOH 6g, NaOCl 10mL, 1 L 증류수를 혼합한 용액을 각각 2 mL씩 넣어 37℃에서 20분간 반응시킨 후, 630nm에서 spectrophotometer를 이용하여 흡광도를 측정하였다. 검량곡선은 ammonia sulfate을 사용하여 작성하여 암모니아태 질소량을 계산하였다. 청국장 점질물의 측정은 청국장에 증류수를 가하고 현탁 (180 rpm, 15 min)한 후 여과망을 이용하여 여과액을 분리하였다. 여과분리액을 원심분리 ($10,000 \times g$ / 30 min)하여 pellet을 취하였다. 증류수로 3회 세척을 한 후, 증류수 50 mL에 현탁시켜 3배 용량의 cold ethanol을 첨가하여 서서히 교반하고 원심분리 ($14,000 \times g$ / 15 min)한 후 침전물의 무게와 청국장 점질물의 최대길이를 측정하였다. 대조군(control)은 종균을 접종하지 않은 삶은 콩을 사용하여 이화화학적 특성을 비교하였다.

[0048] 제조한 청국장 시제품의 이화학적 특성은 표 2와 같다.

표 2

청국장 시제품	수분함량 (%)	pH	아미노태질소함량 (mg%)	암모니아태질소함량 (mM)	조단백질함량 (%)
KC41	49.2	7.4	450.0	25.6	57.5
MC108	53.2	7.5	411.7	34.0	55.6
HC188	49.1	7.4	305.8	28.7	55.8
HH28	51.6	7.2	291.6	20.5	57.5
Control*	61.0	6.3	26.1	2.0	53.1

- [0050] 표 2에서 볼 수 있는 바와 같이, 수분함량은 모든 청국장이 49.1~53.2%를 유지하였으며, pH는 7.2~7.5 정도를 나타내었다.
- [0051] 청국장 발효과정에서 pH가 높아지는 이유는 생성되는 암모니아 등에 인한 것으로 사료된다. 청국장의 구수한 맛의 척도인 아미노태 질소함량은 청국장의 발효중 단백질이 분해되어 생성되는 물질로서 청국장 제품의 품질지표로서 식품공전에도 그 규격기준을 280 mg% 이상으로 규정하고 있다. 제조한 청국장 모두 식품공전에서 규정하는 기준이상의 아미노태 질소를 함유 (291.6~450.0 mg%) 하고 있으며, 아미노태 질소함량은 주로 프로테아제 활성에 영향을 받는 것으로 알려져 있다. 청국장의 암모니아태 질소함량은 20.5~34.0 mM 수준이었다. 암모니아태 질소는 대두 단백질이 아미노태 질소형태로 가수분해와 동시에 발효가 계속 진행되면서 암모니아태 질소를 형성하는 것으로 알려져 있다. 청국장에서 암모니아태 질소함량이 높은 경우, 그 품질이 좋지 않은 결과로 해석될 수 있다.
- [0052] 청국장 특유의 점질물의 길이와 점질물의 침전량을 측정한 결과 (도 6), γ -GTP 효소활성이 높은 *B. amyloliquefaciens* KC41을 종균으로 제조한 청국장의 점질물 길이가 95cm 로 나타내었고, 침전물의 무게는 1.7 g/100g로 가장 높은 결과를 나타내었다. 이는 청국장의 점질물과 γ -GTP 효소활성 사이에 상관관계가 있는 것으로 판단되었다.
- [0053] 대조구(control)인 삶은 콩은 아미노태 질소와 암모니아태질소 함량이 가장 낮게 측정되었고, 점질물 생성은 확인되지 않아 청국장 특유의 점질물 생성은 미생물에 의해 발효시 생성되는 것으로 확인할 수 있었다.
- [0054] 청국장 발효용 종균 중에서 *B. amyloliquefaciens* KC41 균주가 비교적 많은 점질물을 생산하고 청국장의 맛을 좌우하는 아미노태질소의 생산량이 가장 많을 뿐만 아니라, 불쾌취 성분의 일종인 암모니아태질소의 생산량이 적어 KC41를 이용하여 발효할 경우, 우수한 청국장을 제조할 수 있을 것이라 사료되었다.
- [0055] (3) 기호성 설문조사
- [0056] 청국장 시제품(A, B, C, D시료)에 대해 설문지를 통한 기호성을 조사하여 다수층의 소비자 취향을 알아보고 이를 품질개선에 활용하였다. 기호성 조사는 청국장의 외관, 맛, 향기, 및 종합성 기호성을 총 5단계(매우 미흡, 미흡, 보통, 좋음, 매우 좋음)로 평가하도록 하였다. 기호성 설문에 참여한 응답자는 20대에서 60대까지의 남녀를 대상으로 하였으며, 응답자의 성별은 남성과 여성이 각각 54%와 46%이었으며, 연령은 20대가 43%, 30대가 9%, 40대가 15%, 50대가 22%, 60대가 11% 이었다.
- [0057] 그 결과, 청국장 시제품 KC41에서 전체적으로 외관, 맛, 향기, 종합적 기호성에서 월등하게 우수하다는 응답을 얻었다 (도 7), 청국장 시제품 KC41은 외관에서 점성이 많아 보이며, 구수한 향기, 담백한 맛이 있으며 종합적 기호성에서 우수한 평가를 얻었으나 청국장 시제품 MC108은 냄새가 너무 강하며, 쓴맛으로 평가되었다. 기존에 청국장에 비해 점질물의 생성이 많고 구수한 향과 담백한 맛을 소비자들이 선호하는 것으로 판단되며, γ -GTP 효소활성이 우수한 청국장 발효용 종균을 사용하여 청국장 제조시 우수한 평가를 받을 수 있을 것으로 사료된다.

수탁번호

[0058]

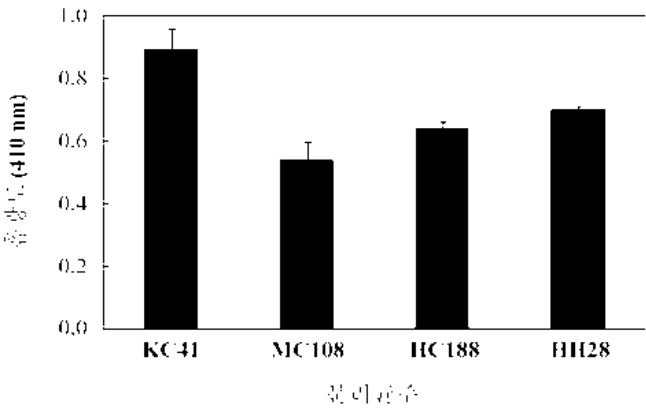
기탁기관명 : 한국미생물보존센터(국외)

수탁번호 : KCCM11249P

수탁일자 : 20120111

도면

도면1



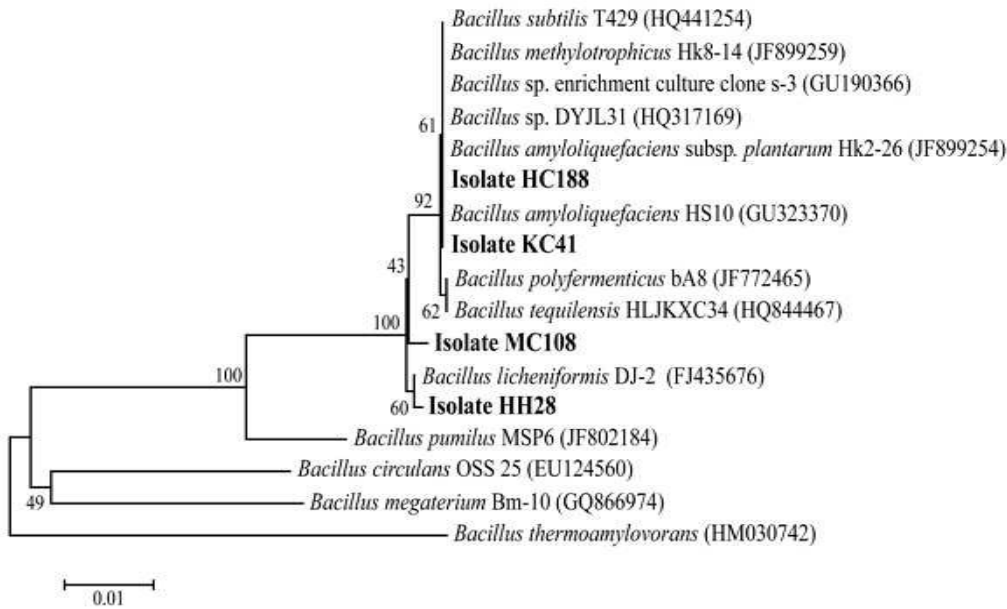
도면2



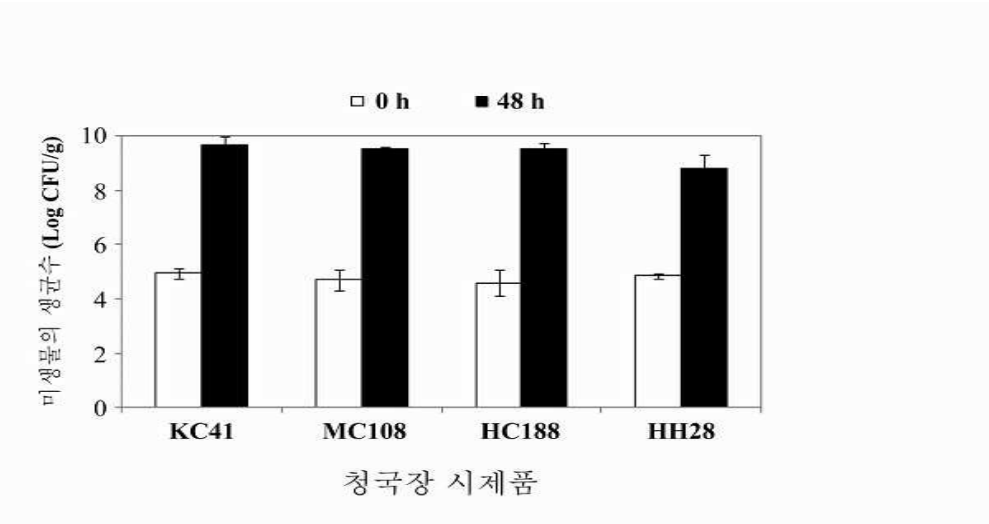
도면3



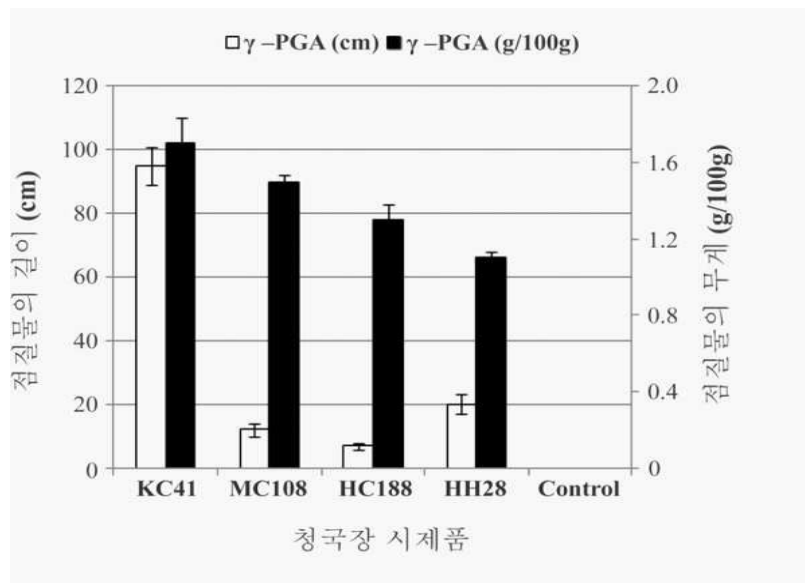
도면4



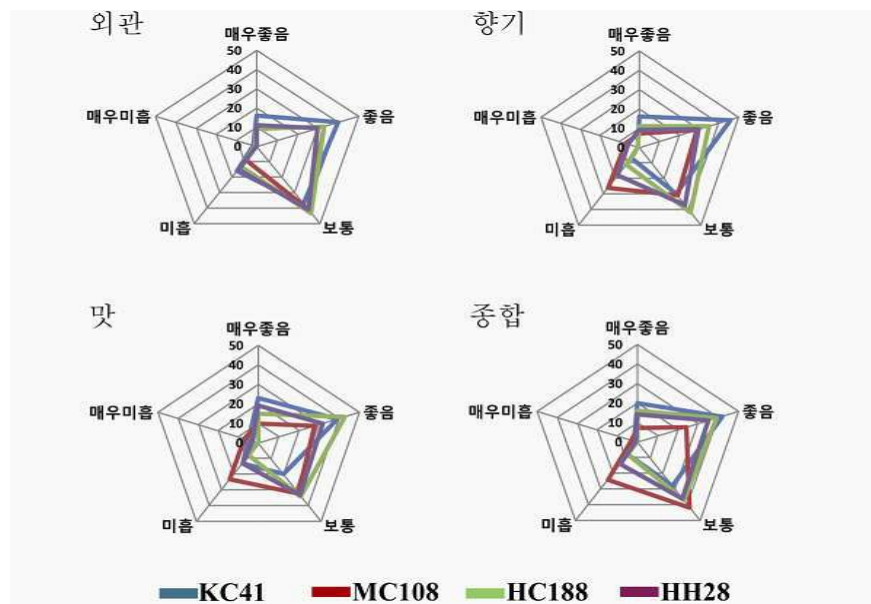
도면5



도면6



도면7



서열 목록

[서열목록 전자파일 첨부](#)