

어젠다코드	6 - 20 - 73		구 분	주관완결	
기술분야코드	V1	기술유형코드	H03	작목구분코드	FR-02-FR24
과제종류	공동연구		세세부사업	지역특화기술개발	
연구과제 및 세부과제			수행기간	과제책임자 및 세부책임자	
토착 미생물을 이용한 기능성 장류 및 가공 상품 개발			'11~'13	농식품연구소	이재형
1) 토착 미생물을 이용한 기능성 장류 개발 및 유용균주 조기 보급 연구			'11~'13	농식품연구소	이재형
2) 기능성 균주를 이용한 가공품 현장 접목 및 균주 코팅을 통한생체내 안정성 연구			'11~'13	태백시농업기술센터	이복식
책임용어	발효식품, 미생물, 토착균주, 코팅				

## ABSTRACT

Soybean fermented products were collected 120 companies in the Korea using traditional methods. We isolated microorganisms presenting high enzymatic activities for amylase, protease, lipase and fibrinolysis from Korean traditional soybean sauce and paste. And the physiological properties and 16S rRNA and ITS region sequences of isolated microorganisms were analyzed. A strain, D12Y1 showing strong fibrinolytic activity was isolated from doenjang, and then identified as *Saccaromyces* sp. based on biochemical characteristics. The optimal temperature and metal ion, carbon source were 30°C and 0.1 % K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.1% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.05% MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O and glucose, 1.5% respectively. By comparising with commercialized doenjang, it is prepared with *Saccaromyces* sp. D12Y1. The results evaluated with positive elements rised above the surface such as taste and flavor without ammonia. A gene encoding the major secreted fibrinolytic protein of *Bacillus* sp. C11Y16-4 was cloned from genomic DNAs. DNA sequencing showd that the gene, AprE8, introduced into *B. subtilis*. A mature 34 kDa protein was produced as expected. We have developed various products utilizing microbial. It is fermented sauces, cheongguk cookies, cheongguk bread and so on. In addition to, We have developed coating agent to enhance for the microbial stability. If properly utilized such microorganisms, it is strong market value in the food industry.

### 1. 연구목표

전통장류 중 된장에 대한 연구는 2000년대 이전까지 주로 된장 제조 및 숙성에 대한 연구로 된장에 서식하는 미생물이 재래식 된장의 독특한 향과 맛 성분인 아미노산과 유리당 생성 여부에 대한 연구와 발효숙성 중 생성되는 향기성분에 관한 것이 주로 연구되었다. 2000

년대 이후 혈압증가물질인 angiotensin전환효소를 저해하는 물질을 된장으로부터 추출한 연구가 발표되었고, 그 후 전통된장의 항돌연변이, 어육-된장 시스템에서의 항산화활성, fibrin 단백질 분해 효소의 분리 등 기능적 특성을 연구한 논문이 활발히 발표되고 있는 실정이다. 하지만 이러한 물질들의 가격이 비싸고 urokinase를 제외하고는 경구투여를 할 수 없어 부작용이 발생할 수 있다. 그러므로 기존 연구에서 선발한 혈전용해능이 우수한 균주를 이용하여 기능성 장류를 개발하고, 균주 코팅처리 등을 통해 체내에서 생존을 및 대사활성을 증가시킬 수 있는 연구가 필요하며 이를 지역 업체와 연계해 활용하는 방안을 강구하는 것이 시급한 실정이다.

## 2. 재료 및 방법

### (시험 1) 발효식품 자원 수집 및 유용 미생물 분리 및 동정

#### (1) 발효식품 자원수집

다양한 발효식품 자원을 수집하기 위해 도내의 경우 각 시·군 기술센터의 지원을 받아 수집하였고, 전국의 경우 발효식품 관련 축제 또는 행사장을 통해 참가한 업체의 제품을 수집하여 사용하였다. 발효식품 종류로는 장류, 젓갈류, 김치류 등을 주로 수집하였고 다양성 확보를 위해 발효액 및 생선 아가미를 수집하여 미생물을 분리하였다.

#### (2) 유용 미생물 분리 및 동정

##### 가. 미생물 분리

수집한 자원은 10 ml의 멸균수에 1 g의 시료를 첨가하여 균질화 한 후 유산균의 경우는 MRS배지(Casein peptone, tryptic digest 10 g, Meat extract 10 g, Yeast extract 5 g, Glucose 20 g, Tween 80 1 g,  $K_2 HPO_4$  2 g, Na-acetate 5 g,  $(NH_4)_2$  citrate 2 g,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0.2 g,  $MnSO_4 \cdot H_2O$  0.05 g, Agar 15 g, Distilled water 1 L, Adjust pH to 6.2-6.5), 고초균은 NA(beef extract 1 g, Yeast extract 2 g, Peptone 5 g, NaCl 5 g, Agar 15 g, Distilled water 1 L, Adjust pH to 7.4), 효모는 YPD(Yeast extract 10 g, Peptone 20 g, Dextrose 20 g, Agar 15 g, Distilled water 1 L)배지에 200  $\mu$ l씩 각각 분주하여 콜로니 생성 여부를 확인 한 후 Picking 방법을 이용해 각 선택배지로 옮겨 효소 활성 여부를 검정하였다.

##### 나. 단백질분해효소 측정

Protease 분비능은 2% skim milk를 첨가한 NA 및 YPD배지에 균주를 Picking하여 37°C에서 48시간 배양하고 colony주위의 투명환을 관찰하였다.

##### 다. 지방분해효소 측정

Lipase 분비능은 100mM  $CaCl_2$ , 2M NaCl, gum arabic이 혼합된 용액에 1% tributyrin을 첨가한 후 소니케이션을 한 후 NA배지 및 YPD배지에 혼합하여 멸균 후 사용하였다. 멸균된 배지에 균주를 Picking하고 같은 조건으로 배양한 후 투명환을 관찰하였다.

#### 라. 전분분해효소 측정

amylase 분비능은 2% soluble starch를 첨가한 NA 및 YPD배지에 Picking하여 배양한 후 iodine으로 염색한 후 starch 분해활성을 확인하였다.

#### 마. 혈전용해활성 측정

세포외로 분비되는 혈전분해효소 분비능 측정은 Astrup과 Mullertz의 방법을 변형하여 fibrinogen을 최종농도가 0.3%(w/v)가 되도록 PBS완충액(0.1 M, pH 7.4)에 용해시킨 후 평판에 부은 후 1.5%(w/v) agarose 용액을 동량 첨가하여 혼합하였다(백현 et al. 2005). 여기에 thrombin(Sigma-Aldrich, USA)을 100  $\mu$ l 첨가하여 상온에서 정치한 후 균 배양액 20  $\mu$ l를 분주하여 paper disk 방법으로 활성을 측정하였다. 양성 대조구로는 plasmin (1.0 U/mL, Sigma, USA)을 사용하였다. 각 균주가 나타내는 혈전용해활성은 아래식과 같이 plasmin이 나타내는 혈전용해활성의 상대활성으로 정의하였다.

$$\text{혈전용해활성(\%)} = \frac{\text{시료의 용해영역}}{\text{Plasmin의 용해영역}} \times 100$$

#### 바. 균주의 동정

선발 균주를 각각의 배지 200 ml에서 배양하여 원심분리(3,000 rpm, 5분)하여 균체를 회수하였다. 선발 균주의 염색체 DNA는 Miller *et al.*의 방법을 변형하여 분리하였다. 각각의 배지 400 ml에 30°C 에서 180 rpm 으로 교반과 함께 배양하였고, 배양된 균은 4°C 에서 10,000xg 로 15 분 간 원심 분리하여 사용하였다. 최종적으로 염색체 DNA는 CsCl/EtBr 평형밀도구배 원심분리 방법으로 분리하였다.

분리된 균주의 동정을 위하여 세균의 경우 16S rRNA를 증폭하기 위해 universal PCR primer fD1(5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG)과 rP2(5'-A CGGCTACCTTGTTACGACT)를 사용하였고, 효모의 경우 18S rRNA 유전자의 염기서열에 의한 균주 동정을 위해 universal primer로서 ITS1(5'-TCC GTAGGTGAACCTGCGG)과 ITS4 (5'-TCCTCCG CTTATTGATATGC)을 이용하였다. PCR 조건은 10 ng의 DNA를 주형으로 사용하고 1.25 U Taq polymerase (Bioneer, Korea), 10 pmol primers, 0.2 mM dNTPs와 10배 농축반응용액(10 mM Tris-HCl, 50 mM KCl, 105 mM MgCl<sub>2</sub>, pH 8.3)을 첨가하고 최종 부피를 50  $\mu$ l로 하여 94°C에서 3분 간 반응시키고 94°C에서 1분, 60°C에서 30초, 72°C에서 1분 반응을 28 회 수행한 후, 최종적으로 72°C에서 10 분간 반응시켰다. PCR 반응산물은 1.5% agarose gel을 사용하는 전기영동 장치를 이용하여 분석하였고, 약 400 bp의 증폭산물의 염기서열을 분석하였다. 확인된 염기서열은 NCBI(The National Center for Biotechnology Information)에서 제공하는 Blast Search 프로그램을 이용하여 염기서열을 비교하여 계통분류학적 유연관계를 분석하였다. 균주의 생리적 특성은 API 20C AUX kit (BioMerieux, France)으로 측정하였다.

## 사. 주사전자현미경(SEM)

분리된 균주의 형태학적 특성을 확인하기 위하여 균주배양액을 원심분리 (10,000 × g, 2분, 4℃) 한 후 상층액을 제거하고 생리식염수로 균체를 2회 세척하였다. 주사현미경 관찰을 위한 전처리는 0.1 M sodium phosphate 완충액 (pH 7.4)으로 제조한 2.5% glutaraldehyde (TAAB Laboratories Equipment Ltd., UK) 용액으로 세포를 3시간 고정시킨 후 같은 완충액으로 2회 세척한 후 1% osmium tetroxide (Sigma-Aldrich) 용액으로 30분간 고정하였다[28]. 농도구배 에탄올 (50~100%)로 각각 5분씩 탈수 후 100% hexamethyldisilazane (Sigma-Aldrich)으로 완전히 탈수한 후 건조시켰다. 준비된 시료는 주사전자현미경 (JSM-35CF, JEOL, Japan)으로 20,000배 확대하여 관찰하였다.

## (시험 2) 유용 미생물을 이용한 기능성 장류 제조

### 가. 혈전용해활성 강화 된장 제조

선발된 혈전용해활성이 우수한 균주 첨가 된장을 제조하기 위하여 무처리를 비롯해 처리 내역별로 8조합을 구성한 후 스타터를 제조하여 첨가하였다(金紅出 et al. 1998). 스타터 제조는 균주를 30℃에서 24시간 전 배양하여 YEPC 액체배지에 접종한 후 24시간 배양한 것을 이용하였다(박건영 et al. 2002). 준비된 균주 배양액을 원심분리(4,300xg, 15분)하여 균체를 회수하고 증류수로 2회 수세하였다. 정선한 콩 1kg은 세척한 후 상온에서 15시간 침지시킨 후 100℃에서 2시간 30분간 증자하였다. 이를 으깨어 냉각시키고 미리 준비해 둔 균주를 접종 하였으며 이를 30℃에서 2틀 동안 배양하여 이를 사용하였다. 제조된 스타터에 삶아서 으갠 콩 5kg을 섞고 소금을 함께 섞은 후 스타터와 마찬가지로 30℃에서 2틀 배양한 후 여기에 동량의 삶아 으갠 콩 5kg과 소금을 섞어 최종 10kg의 된장을 제조하였다. 소금의 농도는 최종 제조 된장의 소금농도가 15%가 되도록 첨가 하였다. 제조된 된장은 20℃에서 6개월간 숙성 시킨 후 사용하였다(尹榮 2005).

### 나. 항산화활성 강화 된장 제조

상기 혈전용해활성 된장 제조방법과 동일하게 제조하였고 첨가 균주만 항산화활성 균주로 첨가하였다.

## (시험 3) 청국장 제조 종균 선발 및 콩 품종별 청국장 특성 검정

### 가. 청국장 종균 선발

청국장 제조용 종균을 선발하기 위해 동정결과 바실러스로 동정된 균중에 청국장에 이용되는 균들을 골라 제조시 특성 변화를 조사하였다. 청국장 제조는 박의 방법을 응용하여 사용하였다(박주현 et al. 2011).

### 나. pH 및 아미노태 질소 측정

pH는 pH 측정기(720A, Orion, USA)를 이용하여 측정하였고 아미노태질소는 시료 100 g에 증류수를 넣어 200 mL로 정용한 후, 300 rpm, 20분 동안 진탕 추출하였고 8000 g에서

20분 동안 원심분리 하여 Adventec No. 2 로 여과 후 여액 일부를 20배 희석하였다(尹榮 2005). 시료 5 mL, 중성 formalin 용액 10 mL, 증류수 10 mL을 넣은 플라스크에 0.5% phenolphthalein 용액을 2~3방울 가한 후, 0.5N-NaOH로 미홍색이 될 때까지의 적정량과 시료 5 mL, 증류수 20 mL을 넣은 플라스크에 0.5% phenolphthalein 용액을 2~3방울 가한 후, 0.5N-NaOH로 미홍색이 될 때 까지 적정량을 이용하여 아미노태 질소 함량을 산출하였다.

#### 다. 유리 아미노산 측정

유리아미노산은 농업기술실용화재단 종합분석검정센터(수원, 한국)에 의뢰하여 조사하였다(정재홍 et al. 1998).

### (시험 4) 발효조를 이용한 유용 균주 배양조건 확립

#### 가. 배지 및 배양 조건

고활성 혈전용해 균주의 기본배지 조성 결정을 위해 5 L 발효조를 이용하여 탄소원, 질소원, 이온침가량의 영향을 검정하였고 400 L로 스케일-업을 통하여 대량 배양조건 확립하였다(김현진 et al. 2002, 신원철, 마호우 1996). 대상균주는 혈전용해 고활성 균주 2종(D12Y1, KA3Y1)으로 하였고 배지 조건은 기존 연구결과에 따라 3% Glucose, 1% yeast extract, 1% soy peptone, 1% casein peptone, 0.1%  $K_2HPO_4$ , 0.1%  $KH_2PO_4$ , 0.05%  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 로 설정하였다. 배양조건은 500 L 발효관(400L 배양), 0.5~1 vvm 통기, 80rpm 교반, 소포제(530F) 투입으로 하였다.

#### 나. 접종 및 균체 회수공정

접종시 접종원은 본 배양 전 3일간 배양하여 4% 접종비로 고농도 접종을 통해 전체 배양 시간을 1.5일 이내로 단축시켰다. 균체회수공정은 연속식 원심분리기, 30L 의료용 동결건조기를 사용하여 회수하였다(손봉수 et al. 1995).

### (시험 5) 유용 물질의 대량생산체계 구축

#### 가. Genomic DNA 추출

분리 균주를 NB 배지를 이용하여 30℃에서 배양한 후, 균체를 수거하고 동결건조하였다. 건조된 균체를 고운 가루로 분쇄하고 LETS buffer [20 mM EDTA (pH 8.0), 10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 0.1 M LiCl, 0.5% sodium dodecyl sulfate (SDS)]를 첨가하여 잘 섞는다. 이 suspension을 phenol-chloroform-isoamyl alcohol solution (25:24:1)에 두 번 추출하고 에탄올 침전시킨다. 침전된 DNA를 70% 에탄올에 washing한 후 실온에서 10분간 건조하고, 10 mM Tris buffer (pH 8.0)에 녹인 후 2ug의 RNase (10 mg/ml) 를 첨가하고 65℃에서 10분간 처리하였다(Bhattacharya, Ploplis &Castellino 2012).

## 나. 유전자 클로닝

혈전용해활성 유전자의 클로닝을 위해 yT&A vector(Yeastern Biotech., Taipei, Taiwan) 사용하였고, 호스트로는 *E.coli* DH-5a를 사용하였다. 형질전환 방법은 Yeastern Biotech사의 매뉴얼을 참고하여 수행하였다.

## (시험 6) 지역축제연계 한우구이용 발효소스 개발

### 가. Genomic DNA 추출

상기에 표기한 방법에 의해 단백질 및 지방분해효소 활성을 측정하여 선발하였다.

### 나. 근원섬유소편화 지수 및 정도 측정

근원섬유소편화지수(myofibrillar fragmentation index, MFI)는 Olson 등의 방법에 따라 근원섬유 분리액(100mM KCL, 20mM K-phosphate, pH7.0, 1mM  $\text{NaN}_3$ )으로 분리, 세척하여  $0.5 \pm 0.05 \text{ mg/ml}$ 의 농도로 희석한 다음 540nm에서 흡광도를 측정하고 200을 곱하여 근원섬유소편화지수로 하였다. 정도는 시료를 3 cm x 6 cm x 6 cm 크기로 절단하고 75°C에 달한 후 30분간 가열하여 샘플채취용 core를 이용하여 1 cm x 1.2 cm x 3 cm 크기로 만든 후 RHEO meter(Model CR-100, SUN Scientific Co. Japan)를 이용하여 측정하였다(정구민, 안희정 2012, 양용 et al. 1975).

### 다. 부위별 선호도 조사

형성축협 주부모니터링단을 상대로 연령에 따라 총 20명을 선발하여 수행하였다.

## (시험 7) 혼합 생균제 시제품 제조

### 가. 생균제 제조 조건 확립

혼합 생균제 시제품 제작에 사용할 미생물제로는 배양 조건 및 제제화 공정을 기 구축한 효모 균주 D12Y1, 고초균 C9Y16, 유산균 M9M1 3종의 미생물제를 사용하였다. 각 미생물제 3종의 생산은 각각 최적화된 배양 및 회수공정과 동결보호제 및 미세코팅 공정을 사용하였다. 혼합 생균제 시제품은 총 중량 10kg으로서 동일한 비율로  $1.5 \times 10^{10} / \text{g}$ 의 혼합 생균수를 보유하도록 각 미생물제를 건조 전분과 희석 혼합하여 제조하였다(최창용 et al. 2007).

### 나. 인공위액 조건에서 생균 안정성 관찰

3종 미생물의 혼합 생균제를 pH 1.2의 인공위액 조건에서 노출시킨 후 생균수의 변화를 측정하여 인공위액 조건 중에서의 생균의 안정성을 검토하다. 인공위액 조건은 식품 봉해도 시험 상의 인공위액 조건을 사용하였으며(염화나트륨 2.0 g, 묽은 염산 24.0 mL/L, pH 1.2), 위수축 운동을 고려하여 분당 100회의 왕복운동을 실시하였고, 노출시간은 위를 통과하는 시간을 고려하여 3시간으로 하였다. 모든 시료 액은 인공위액 조건 노출 후에 pH를 7.0으로 재 조정 후 생균수를 측정하였다. 생균수 측정은 YM-agar, PDA-agar, MRS-agar에서 배양시 생성되는 각 균종별 고유의 집락형태를 선별적으로 계수하여 합산하였다.

#### 다. 생균제 가속시험 안정성 관찰

혼합 미생물 생균제의 유통 및 보존시의 생균 활성의 안정성을 검토하기 위하여 가속시험 안정성을 평가하였다. 혼합 미생물 생균제는 100g 단위로 Al pouch 포장지에 소분 밀봉포장 하였으며 40℃, 상대습도 70% 조건에서 2주 간격으로 생균수를 측정하여 생균 활성의 안정성을 관찰하였다.

#### (시험 8) 기능성 균주를 이용한 가공품 현장접목

##### 가. 청국쿠키 제조

혈전용해 고활성 균주를 이용하여 청국장을 제조하고 이를 이용해 만든 청국가루를 이용하여 청국 쿠키를 제조하는 레시피를 제시하였다(이보배 2011).

##### 나. 청국빵 제조

혈전용해 고활성 균주를 이용하여 청국장을 제조하고 이를 이용해 만든 청국가루를 이용하여 청국 쿠키를 제조하는 레시피를 제시하고 연령에 따라 총 31명을 선발하여 기호도를 조사하였다(이용미, 류은순 2008).

#### (시험 9) 유용 균주 안정성 강화를 위한 코팅제 개발 및 거동 특성 분석

##### 가. 코팅제 개발

비코팅, 동결보호제(TH: Trehalose), 다당체(MD: maltodextrin), (SM: skim milk), (ISP: isolated soy protein)를 이용하여 총 5처리구로 수행하였다. 코팅제의 성장관찰은 이미 기술한 전자주사현미경으로 관찰하였다.

##### 나. 인공위액(pH 1.2) 조건에서의 생균 안정성 평가

인공위액 조건은 식품 봉해도 시험 상의 인공위액 조건을 사용하였으며(염화나트륨 2.0 g, 묽은 염산 24.0 mL/L, pH 1.2), 위수축 운동을 고려하여 분당 100회의 왕복운동을 실시하였고, 노출 시간은 위를 통과하는 시간을 고려하여 3시간으로 실시하였다. 시료 액은 인공위액 조건 노출 후에 pH를 7.0으로 재 조정 후 생균수를 측정하였다.

##### 다. 인공장액 (pH 6.8) 조건에서의 생균의 용출성 평가

인공장액 용액(pH 6.80, 2N 인산이수소칼륨시액 250 mL, 0.2N 수산화나트륨시액 118 mL/L)을 사용하여 관찰하였다. 조건별 마이크로 코팅 효소제를 10% 농도로 인공장액 용액에 투입한 후 장내 연동운동 조건을 고려하여 분당 100회 회전진탕 하였으며 20분 단위로 상층 액을 취하여 생균의 검출 정도를 관찰하였다.

## (시험 10) 생균제 가속시험 안정성 평가

### 가. 가속시험 안정성 평가

D12Y1 균주의 생균제의 장기간 유통 및 보존시의 생균 활성의 안정성을 검토하기 위하여 가속시험 안정성을 평가하였다. 각각의 생균제는 100g 단위로 Al pouch 포장지에 소분 밀봉 포장 하였으며 40℃, 상대습도 70% 조건에서 2주 간격으로 생균수를 측정하여 생균 활성의 안정성에 관련한 개선 효과를 관찰하였다.

## 3. 결과 및 고찰

### (시험 1) 발효식품 자원 수집 및 유용 미생물 분리 및 동정

#### 가. 발효식품 자원 수집 및 미생물 분리

발효식품 자원 총 120점을 수집하였고 세부내역별로는 장류 78점, 젓갈류 14점, 발효액 등 기타로 28점을 수집하였다. Fig. 1은 강원도내에서 수집한 자원을 품목별로 표시했으며, 된장을 비롯한 장류를 수집했고, 기타로는 청국장, 젓갈류 등을 수집하였다. 전국을 대상으로 수집한 자원은 주로 순창장류축제 및 전주발효엑스포장 등 축제에 전시되었던 품목 위주로 수집하였다. 미생물 분리 및 저장내역은 총 630점을 저장하였으며 주로 젓산균, 고초균, 효모를 분리하여 저장하였다.

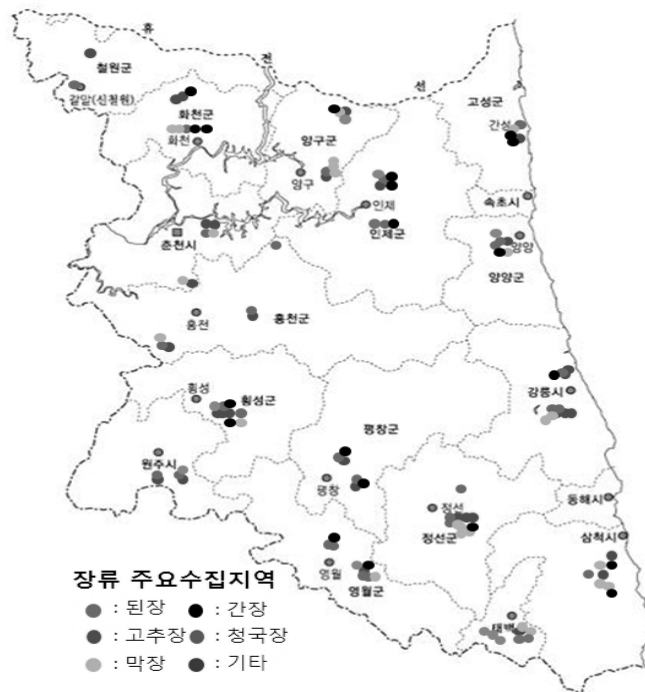


Fig. 1. The main gathering areas of fermented soybean paste.

#### 나. 단백질분해효소 측정

Protease 활성은 총 68점에서 확인했으며 주로 간장에서 분리한 젖산균과 효모에서 일부 확인되었으며 주로 고초균에서 활성이 확인되었다. 아마도 Protease 활성이 있는 균주가 Fibrinolytic 활성도 존재한다는 기존의 연구에 따른 결과로 예측된다.

표 1. Identification of protease activity

구 분	활성 균수(점)		
	LAB	Yeast	<i>Bacillus</i> sp.
고추장	-	-	-
된 장	-	4	-
간 장	6	12	-
청국장	-	1	48
김치류	-	0	-
젓갈류	-	-	16
기 타	-	4	4
<b>합 계</b>	<b>95</b>	<b>21</b>	<b>68</b>

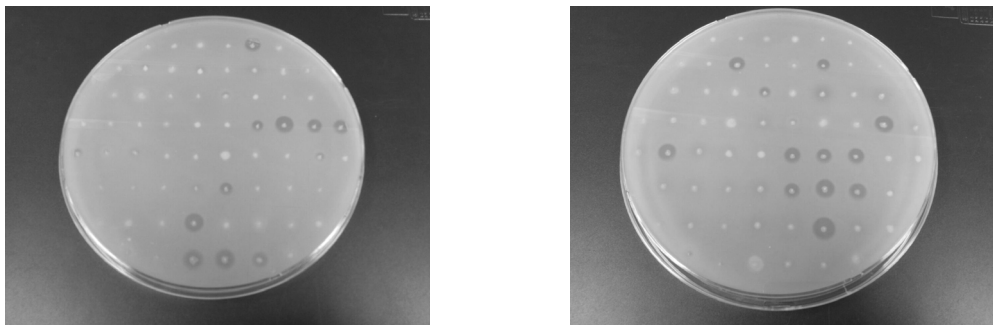


Fig. 2. Clear zone of Protease activity

#### 다. 지방분해효소 측정

Lipase 활성을 갖는 균주의 수는 총 104점으로 젖산균, 효모, 고초균에서 다양하게 활성을 나타내었으며 각 분리원의 특성에 따라 분리된 균주에서 광범위한 활성을 보여주었다.

표 2. Identification of lipase activity

구 분	활성 균수(점)		
	LAB	Yeast	<i>Bacillus</i> sp.
고추장	-	38	22
된 장	6	24	11
간 장	-	18	15
청국장	-	5	36
김치류	47	-	-
젓갈류	28	-	14
기 타	3	4	6
<b>합 계</b>	<b>277</b>	<b>89</b>	<b>104</b>

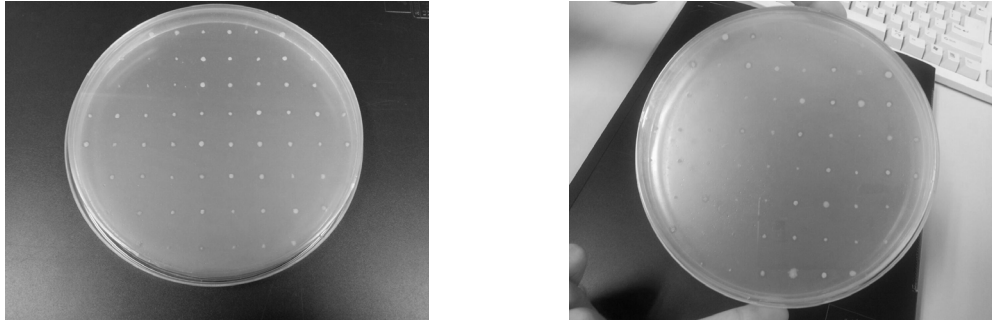


Fig. 3. Clear zone of Lipase activity

#### 라. 전분분해효소 측정

$\alpha$ -amylase 활성을 갖는 균주는 *Bacillus* sp. 속에서 53점으로 가장 많이 나왔으며 주로 청국장에서 분리한 균주에서 활성이 많이 나왔다. 다음으로 젓갈류에서 분리한 젓산균에서 활성이 많았으며 상대적으로 효모는 적은 수의  $\alpha$ -amylase 활성을 보여주었다.

표 3. Identification of amylase activity

구 분	활성 균수(점)		
	LAB	Yeast	<i>Bacillus</i> sp.
고추장	-	-	-
된 장	-	6	7
간 장	2	-	2
청국장	-	5	36
김치류	3	-	-
젓갈류	4	-	5
기 타	-	3	3
합 계	76	14	53

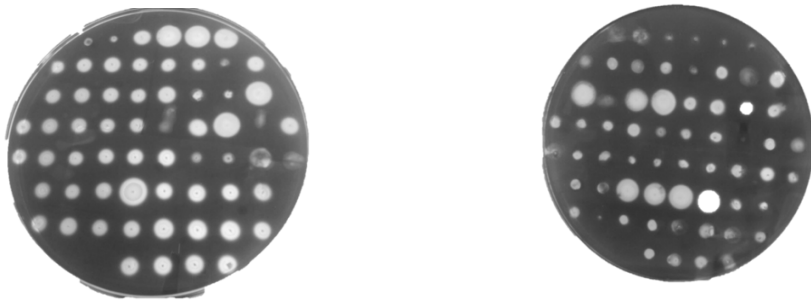


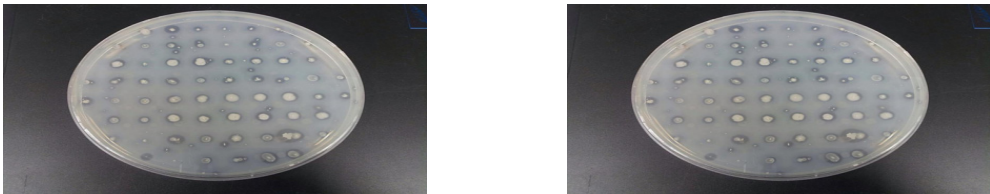
Fig. 4.  $\alpha$ -amylase activity staining

마. 혈전용해활성 측정

Fibrinolytic enzyme 활성은 총 126점에서 확인하였으며 청국장에서 분리한 균주에서 가장 많은 활성을 보여주었다. 앞서 언급했듯이 Protease 활성을 갖는 균주 중에 Fibrinolytic enzyme 활성도 갖는 균주가 많았으며 일부 된장에서 분리한 효모중에 특히 상대적 활성이 높은 균주가 스크리닝 되었다.

표 4. Identification of fibrinolytic enzyme activity

구 분	활성 균수(점)		
	LAB	Yeast	<i>Bacillus</i> sp.
고추장	-	3	-
된 장	-	29	15
간 장	-	6	8
청국장	-	11	86
김치류	-	-	-
젓갈류	-	-	17
기 타	-	-	-
합 계	175	49	126



< Fig. 5.. Clear zone of Fibrilytic activity >

바. 항산화활성 검정

항산화활성은 DPPH법을 이용하여 검정하였고, M9M1이 가장 유망하였다.

표 5. Identification of antioxidant activity

구분	균주명	DPPH radicals scavenging activity (%)	구분	균주명	DPPH radicals scavenging activity (%)
1	C1M8-2	66.85 ± 0.41	11	C9M6	39.27 ± 0.69
2	C6M8	61.03 ± 1.78	12	M8M1	66.44 ± 0.64
3	C7M4	63.14 ± 1.55	13	M9M1	69.64 ± 1.92
4	C8M4	40.90 ± 1.18	14	K6M1	66.13 ± 1.58
5	C8M6	38.70 ± 1.32	15	K6M2	76.31 ± 1.15
6	C8M7	39.88 ± 1.92	16	K6M3	75.87 ± 0.62
7	C9M1	40.62 ± 0.73	17	D3M1	59.88 ± 0.92
8	C9M3	40.90 ± 1.34	18	KA18M1	56.46 ± 0.34
9	C9M4	37.39 ± 0.82	19	C6M7-2	20.65 ± 2.07
10	C9M5	38.39 ± 2.04	20	C6M8	61.03 ± 1.78

※ Ascorbic acid : 20 µg/ml, 38.14 ± 0.90

### 사. 균주의 동정

유산균의 경우 주로 *Enterococcus* 속 또는 *Leuconostoc* 속으로 동정되었으며 특이하게도 유산균이 아닌 *Serratia* sp. 도 일부 확인되었다. 기존의 유산균과의 유사성은 대부분 98% 이상으로 확인되었으며 일부 균주의 경우 95%의 호모로지를 보여 추후 형태적 또는 생리학적 정밀 동정을 통해 추가 확인이 필요함을 보여주었다. 고초균의 경우 Fibrinolytic 활성이 높았던 DJN58Y16-1와 KAGB23Y16-1 균주는 *Bacillus amyloliquefaciens* 및 *Bacillus megaterium* 과 98%의 상동성을 보였으며, Protease 활성이 높았던 C11Y16-14 및 KAJN29Y16-1은 *Bacillus subtilis* 및 *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* 과 각각 98%의 상동성을 보여주었다. Protease와 Fibrinolytic 활성을 보였던 KAGB24Y16-1 균주는 청국장 종균으로 사용되는 *Bacillus megaterium* 과 98%의 상동성을 보여주었다. 효모의 경우 K29Y1균주가 *Zygosaccharomyces rouxii*와 유사도 91%로 가장 낮았으며, Query Coverage도 93%로 양호하여 새로운 genus일 확률이 높았다. Query Coverage는 낮지만 유사도가 높은 균주의 경우 추가 정밀 동정을 통해 새로운 종 여부를 확인 할 필요성이 있다. 일반적으로 유사도 97%이하의 균주는 신종으로 분류된다. 그 외 활성이 우수했던 KA3Y1과 D12Y1균주는 ITS gene의 Query coverage가 낮아 추가적인 동정이 필요하였다.

표 6. Identification of Lactic acid bacteria

No.	Strains	Species	Query Coverage(%)	Homology (%)
1	C5M1	<i>Enterococcus lactis</i>	97.0	98.0
2	C6M7-1	<i>Enterococcus faecium</i>	98.0	98.0
3	K25M5-2	<i>Enterococcus lactis</i>	97.0	98.0
4	O3M4	<i>Enterococcus faecium</i>	97.0	98.0
5	C4M3	<i>Enterococcus faecium</i>	97.0	99.0
6	C4M5	<i>Enterococcus faecium</i>	97.0	99.0
7	C5M4	<i>Enterococcus faecium</i>	98.0	99.0
8	C6M1	<i>Enterococcus faecium</i>	98.0	99.0
9	C6M9	<i>Enterococcus faecium</i>	97.0	99.0
10	C7M1	<i>Enterococcus faecium</i>	98.0	99.0
11	KCGW3M16-1	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	97.0	95.0
12	KCGW4M16-1	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	98.0	96.0
13	KCGW6M16-1	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	98.0	96.0
14	KCGW4Y16-2	<i>Serratia</i> sp.	97.0	95.0

㉟ 7. Identification of *Bacillus* sp.

No.	Strains	Species	Query Coverage(%)	Homology (%)
1	C8Y16-11	<i>Bacillus subtilis</i>	99.0	99.0
2	C9Y16-12	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	98.0	99.0
3	C11Y16-14	<i>Bacillus subtilis</i>	99.0	98.0
4	C12Y16-15	<i>Bacillus subtilis</i>	99.0	99.0
5	C13Y16-16	<i>Bacillus subtilis</i>	99.0	99.0
6	C14Y16-17	<i>Bacillus subtilis</i>	97.0	98.0
7	C17Y16-20	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	98.0	97.0
8	DGB52Y16-2	<i>Bacillus methylotrophicus</i>	98.0	98.0
9	DGN56Y16-1	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	99.0	95.0
10	DGN57Y16-1	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> subsp. <i>plantarum</i>	98.0	98.0
11	DJN58Y16-1	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	99.0	98.0
12	sKAY16-17	<i>Bacillus subtilis</i>	98.0	98.0
13	KAGB23Y16-1	<i>Bacillus megaterium</i>	98.0	98.0
14	KAJN29Y16-1	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> subsp. <i>plantarum</i>	99.0	98.0
15	sKAY16-9	<i>Bacillus licheniformis</i>	98.0	90.0
16	sKAY16-20	<i>Bacillus subtilis</i>	99.0	98.0
17	sKAY16-30	<i>Bacillus subtilis</i>	97.0	99.0
18	C11Y16-14	<i>Bacillus subtilis</i>	98.0	99.0
19	C17Y16-20	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	97.0	97.0
20	CCN25Y16_3	<i>Bacillus licheniformis</i>	98.0	95.0
21	KAGB24Y16-1	<i>Bacillus atrophaeus</i>	99.0	98.0

㉟ 8. Identification of Yeast

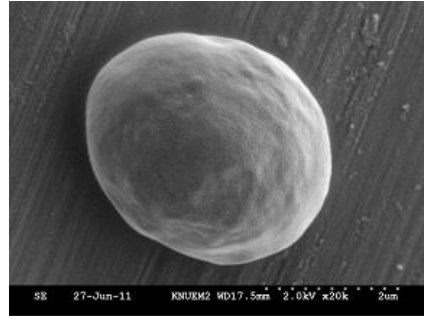
No.	Strains	Species	Query Coverage(%)	Homology (%)
1	K29Y1	<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>	93.0	91.0
2	C7Y2	<i>Debaryomyces</i> sp.	77.0	93.0
3	D13Y6	<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>	69.0	94.0
4	D12Y5	<i>Candida magnoliae</i> partial	47.0	94.0
5	M7Y9	<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>	90.0	95.0
6	K17Y1	<i>Debaryomyces subglobosus</i>	36.0	95.0
7	KA3Y1	<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>	59.0	97.0
8	D23Y1	<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>	85.0	95.0
9	D12Y1	<i>Saccharomycetales</i> sp.	42.0	98.0
10	M3Y1	<i>Zygosaccharomyces rouxii</i> strain	41.0	98.0
11	M6Y1	<i>Zygosaccharomyces rouxii</i> strain	41.0	98.0
12	M8M1	<i>Zygosaccharomyces rouxii</i> strain	41.0	98.0
13	K9Y3	<i>Pichia subpelliculosa</i>	78.0	98.0
14	K4Y3	<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>	98.0	99.0
15	K30Y1	<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>	41.0	99.0
16	M3Y2	<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>	40.0	99.0
17	K13Y2	<i>Rhodotorula glutinis</i>	37.0	99.0
18	C7M4	<i>Debaryomyces hansenii</i>	34.0	99.0
19	KA18Y7	<i>Candida psychrophila</i>	33.0	99.0
20	K6M3	<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>	39.0	100.0

사. 주사전자현미경(SEM)

혈전용해 활성 우수 균주인 D12Y1과 KA3Y1의 전자주사현미경 촬영결과는 다음과 같으며 추가적인 동정을 위하여 카본 소스에 대한 생리적 특성을 확인하여 최종적으로 *Saccharomyces sp.* 와 *Pichia sp.* 으로 동정하였다.



D12Y1



KA3Y1

Fig. 6. SEM

표 9. Biochemical property of D12Y1

Carbon source	<i>Saccharomyces sp.</i> D12Y1	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> FF-8
Control	<sup>2)</sup>	-
Glucose	+	+
Glycerol	-	-
2-Keto-gluconate	-	-
L-Arabinose	-	-
D-Xylose	-	-
Adonitol	-	-
Xylitol	-	-
Galactose	-	-
Inositol	-	+
D-Sorbitol	+	-
α-Methyl-D-glucoside	-	-
N-Acetyl-glucosamine	-	-
Cellobiose	-	-
Lactose	-	-
Maltose	-	+
Sucrose	+	+
Trehalose	-	-
Melezitose	-	-
Raffinose	+	+
Hyphae/Pseudohyphae	-	-

<sup>1)</sup> Used with API 20C AUX kit, <sup>2)</sup> + : Positive, - : Negative

표 10. Biochemical property of KA3Y1

Carbon source	<i>Pichia sp.</i> KA3Y1	<i>Pichia angusta</i>
Control	- <sup>2)</sup>	-
Glucose	+	+
Glycerol	-	+
2-Keto-gluconate	-	-
L-Arabinose	+	+
D-Xylose	+	+
Adonitol	+	+
Xylitol	+	+
Galactose	-	-
Inositol	-	-
D-Sorbitol	+	+
α-Methyl-D-glucoside	-	-
N-Acetyl-glucosamine	-	-
Cellobiose	-	+
Lactose	-	-
Maltose	+	+
Sucrose	+	+
Trehalose	-	+
Melezitose	+	+
Raffinose	+	-
Hyphae/Pseudohyphae	-	-

<sup>1)</sup> Used with API 20C AUX kit, <sup>2)</sup> + : Positive, - : Negative

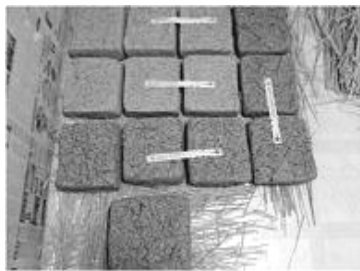
## (시험 2) 유용 미생물을 이용한 기능성 장류 제조

### 가. 혈전용해활성 강화 된장 제조

혈전용해활성 강화 된장에 사용된 균주는 표 11과 같다. 제조된 된장을 6개월간 숙성 후 혈전용해활성을 비교한 결과 3가지 균주를 모두 첨가한 처리구에서 가장 높은 활성을 보여 주었다. 하지만 1년 숙성과정 후 접종된 균주의 우점 여부는 확인 되지 않았다. 아마도 된장 숙성시 관여하는 균들의 길항작용으로 생육이 저해되었으리라 판단된다.

표 11. Study design of starter adding

구 분	처리내용
1	무처리
2	KA3Y1
3	K29Y1
4	D12Y1
5	KA3Y1 + K29Y1
6	KA3Y1 + D12Y1
7	K29Y1 + D12Y1
8	KA3Y1 + K29Y1 + D12Y1



[ 메주성형 ]



[ 메주수세 ]



[ 된장제조 ]

Fig. 7. Preparation of functional soybean paste



무처리



KA3Y1+D12Y1



KA3Y1+K29Y1+D12Y1

Fig. 8. Identification of fibrinolytic enzyme activity after 6 months

#### 나. 항산화활성 강화 된장 제조

상기 혈전용해활성 된장 제조방법과 동일하게 제조하였고 첨가 균주만 항산화활성 균주 2종으로 4처리하였다. 하지만 제조 후 숙성과정에서 부패되어 폐기처분 하였다.

#### 다. 혈전용해활성 강화 된장 특성 검정

단백질, 조회분, 조섬유, 염도는 시판된장보다 함량이 높았으며, 수분, 조지방, 인은 함량이 비슷하거나 뚜렷한 차이를 보이지 않았다. 유리 아미노산의 경우 감칠맛을 내는 아스파탐과 글루탐산의 함량이 시판된장보다 높음을 알 수 있었다.

표 12. Compared to the characteristics of enhanced fibrinolytic activity paste and commercial

구분	시료명	수분(g)	단백질(g)	조회분(g)	조섬유(g)	염도(%)	아스파탐 (%)	글루탐산 (%)
1	무처리	48.8	14.1	18.4	5.2	24.9	-	-
2	KA3Y1	46.7	17.4	16.5	6.6	24.5	1.526	2.390
3	K29Y1	48.4	16.3	18.7	5.2	24.6	-	-
4	D12Y1	51.3	15.3	16.2	4.1	23.2	-	-
5	KA3Y1 + K29Y1	48.6	15.3	17.2	4.9	24.7	-	-
6	KA3Y1 + D12Y1	50.5	13.2	18.8	5.8	26.7	-	-
7	K29Y1 + D12Y1	54.7	13.3	18.7	7.0	27.0	-	-
8	KA3Y1+K29Y1+D12Y1	54.5	13.4	17.7	6.7	26.0	-	-
9	J사	45.8	13.5	11.3	3.2	15.8	-	-
10	O사	42.6	11.4	13.9	3.5	18.3	-	-
11	S사	39.2	13.6	12.9	2.8	17.5	-	-
12	H사	43.7	14.0	11.5	5.2	15.7	-	-
13	HC사	46.6	13.8	12.2	3.3	17.5	1.169	2.178
14	D사	33.0	14.4	11.6	4.8	15.7	-	-
15	C사	33.6	13.4	11.2	3.0	15.4	-	-

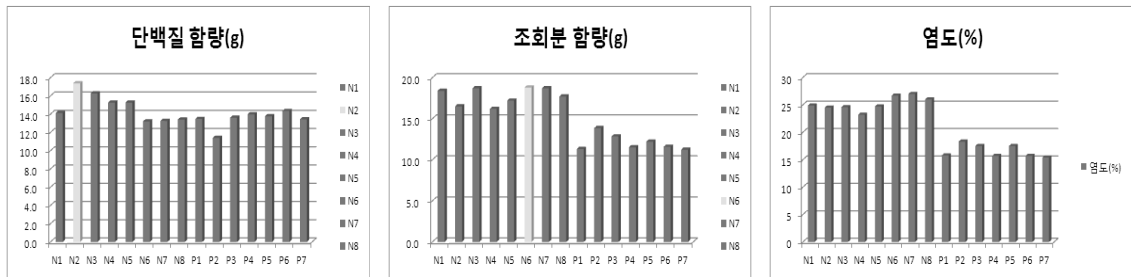


Fig. 9. Compared to the general component of soybean paste

※ 가식부 100g당, N1: 무처리, N2: KA3Y1, N3: K29Y1, N4: D12Y1, N5: KA3Y1 + K29Y1, N6 : KA3Y1 + D12Y1, N7: K29Y1 + D12Y1, N8: KA3Y1+K29Y1+D12Y1, P1: J사, P2: O사, P3: S사, P4: H사, P5: HC사, P6: D사, P7: C사

(시험 3) 청국장 제조 종균 선발 및 콩 품종별 청국장 특성 검정

가. 청국장 종균 선발

청국장 제조용 종균을 선발하기 위해 동정결과 바실러스로 동정된 균중에 청국장에 이용되는 균들을 골라 제조시 특성 변화를 조사하였다. 분석결과 C17Y16 균주가 아미노태 질소 함량 및 발효능에서 우수한 결과를 보여주었으나, Histamin 생성 유전자를 가지고 있어 종균에서 제외하고, 다음으로 우수했던 DJN58Y16 균주를 최종 선발하였다. 콩 품종별 청국장 특성 검정 결과 칼륨 함량은 햇살콩이 가장 높았으며 발효정도의 지표가 되는 pH 값은 청아콩이 가장 높았다. 칼륨 함량이 높은 햇살콩은 추후 저염화 장류 제조 소재로 사용 가능 하리라 판단된다.

표 13. Isolation and identification of Chenggukjang starter

구분	균주명	동정결과	Homology(%)
1	DJN58Y16-1	<i>Bacillus subtilis</i>	98
2	C11Y16-14	<i>Bacillus subtilis</i>	97
3	C12Y16-15	<i>Bacillus subtilis</i>	99
4	KAJN29Y16-1	<i>Bacillus subtilis</i>	97
5	KAGB24Y16-1	<i>Bacillus sp.</i>	99
6	DGB51Y16-1	<i>Bacillus sp.</i>	98
7	C17Y16-20	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	97
8	KAGB23Y16-1	<i>Bacillus megaterium</i>	98

표 14. Characteristic of Chenggukjang starter

(기준 : 48hr)

구분	균주명	아미노태질소(mg%)	$\gamma$ -PGA 생성능*
1	DJN58Y16-1	488.64	++
2	C11Y16-14	367.31	++
3	C12Y16-15	240.78	+
4	KAJN29Y16-1	384.40	+++
5	KAGB24Y16-1	347.87	++
6	DGB51Y16-1	198.81	+
7	C17Y16-20	418.53	+++
8	KAGB23Y16-1	268.26	+
9	시판 수입종균(T사)	570.91	+++

\* : +++(우수), ++(보통), +(저조)

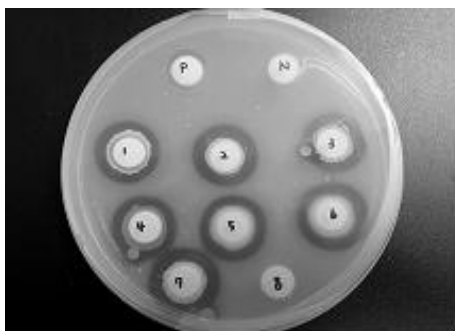


Fig. 10. Fibrinolytic activity of strains



Fig. 11. Preparation of Chenggukjang

표 15. General composition of soybean cultivars (100g당)

구분	품종명	수분(g)	단백질(g)	조지방(g)	조회분(g)	조섬유(g)	K(mg)	pH
1	청아	55.73	20.78	1.44	2.39	10.27	405.60	8.99
2	호반	58.34	20.95	0.96	2.97	10.10	468.27	8.02
3	대왕	52.27	22.28	0.06	2.87	10.37	612.46	7.35
4	대원	46.12	22.62	0.13	2.91	11.87	662.92	7.62
5	햇살	47.64	23.66	0.09	3.06	10.46	810.15	6.19
6	태광	43.50	22.42	0.05	3.55	13.96	702.43	6.14

나. 유리아미노산 및 아미노태 질소 측정

품종별 유리아미노산 함량은 단백질 함량이 높은 햇살콩이 높았으며, 상대적으로 단백질 함량이 낮은 호반콩이 낮은 경향을 보였다. 발효도와 청국장 맛의 지표성분인 아미노태 질소 함량은 pH 값이 높은 청아콩이 가장 높았다. 다른 품종들도 pH 값과 비례적으로 같은 패턴을 보였다. 특히 맛에 관여하는 아스파탐과 글루탐산의 경우 다른 품종에 비해 청아콩이 높은 패턴을 보여주어 장류 제조 시 유용할 것으로 판단된다.

표 16. Free amino acids and amino nitrogen of soybean cultivars

분석항목	품종명	청아	호반	대왕	대원	햇살	태광
아미노산(%)	CYS	0.259	0.232	0.233	0.312	0.343	0.283
	MET	0.230	0.235	0.199	0.280	0.284	0.245
	ASP	2.267	2.082	2.225	2.394	2.653	2.324
	THR	0.780	0.718	0.770	0.851	0.951	0.860
	SER	0.989	0.890	0.983	1.079	1.218	1.097
	GLU	3.332	3.248	3.471	3.641	4.234	3.667
	GLY	0.817	0.763	0.818	0.886	1.002	0.901
	ALA	0.867	0.850	0.947	0.957	1.035	0.936
	VAL	0.803	0.760	0.826	0.875	0.973	0.864
	I-LE	0.780	0.704	0.773	0.828	0.924	0.814
	LEU	1.576	1.462	1.578	1.655	1.836	1.606
	TYR	0.705	0.549	0.658	0.725	0.783	0.672
	PHE	1.098	1.071	1.084	1.146	1.221	1.037
	LYS	1.227	1.208	1.291	1.347	1.492	1.290
	HIS	0.508	0.464	0.545	0.567	0.638	0.557
	ARG	1.106	1.186	1.299	1.402	1.621	1.438
	PRO	1.021	0.960	1.148	1.080	1.189	1.180
아미노태 질소(mg%)	-	373.67	281.75	247.69	217.25	136.48	76.68

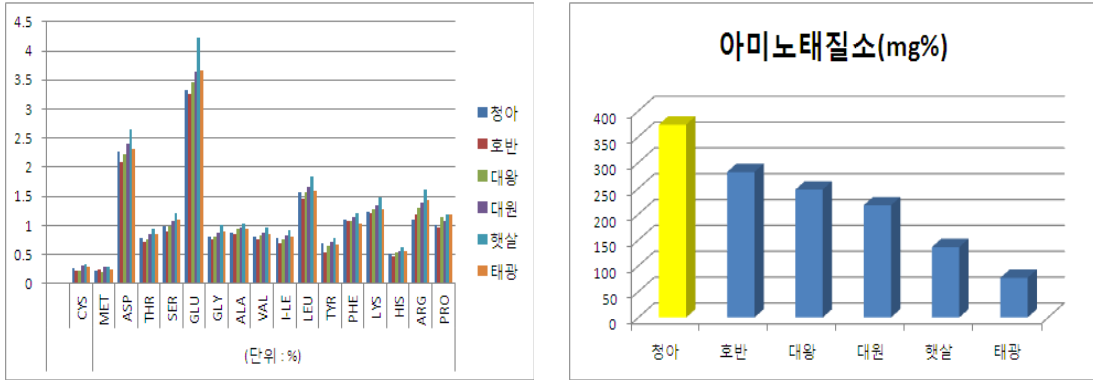


Fig. 12. Chenggukjang characteristic of soybean cultivars

#### (시험 4) 발효조를 이용한 유용균주 배양조건 확립

##### 가. 배지 및 배양 조건

고활성 혈전용해 균주의 기본배지 조성 결정을 위해 5 L 발효조를 이용하여 탄소원, 질소원, 이온첨가량의 영향을 검정하였고 400 L로 스케일-업을 통하여 대량 배양조건 확립하였다. 대상균주는 혈전용해 고활성 균주 2종(D12Y1, KA3Y1)으로 하였고 배지 조건은 기존 연구결과에 따라 3% Glucose, 1.5% yeast extract, 1.5% beef extract, 1.5% casein peptone, 1% soy peptone,, 0.1%  $K_2HPO_4$ , 0.1%  $KH_2PO_4$ , 0.05%  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 로 설정하였다. 배양조건은 500 L 발효관(400L 배양), 0.5~1 vvm 통기, 80rpm 교반, 소포제(530F) 투입으로 하였다. 최적 온도는 32℃ 이고, 산성에서 잘 자라 pH 조절은 불필요 하였다. 배양성이 상대적으로 우수한 D12Y1을 최종적으로 선발하여 다음 실험을 진행하였다. 항산화활성이 우수한 M9M1의 최적 배지 조건은 3% Glucose, 1.0% yeast extract, 1.0% beef extract, 0.5% casein peptone, 0.5% soy peptone,, 0.1%  $K_2HPO_4$ , 0.1%  $KH_2PO_4$ , 0.05%  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 로 설정하였고 최적 온도는 37℃ 최적 pH는 6.7 이었다.

표 17. The growth of strains with ion adding

균주명	이온첨가량 (W/V%)	생균수 (cfu/ml)				
		0	0.05	0.1	0.15	0.2
D12Y1	$K_2HPO_4$		$3.2 \times 10^9$	$4.9 \times 10^9$	$4.8 \times 10^9$	$5.3 \times 10^9$
	$KH_2PO_4$	$3.1 \times 10^9$	$3.3 \times 10^9$	$4.8 \times 10^9$	$4.9 \times 10^9$	$5.1 \times 10^9$
	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$		$3.9 \times 10^9$	$4.0 \times 10^9$	$4.4 \times 10^9$	$4.3 \times 10^9$
KA3Y1	$K_2HPO_4$		$1.2 \times 10^9$	$1.9 \times 10^9$	$1.9 \times 10^9$	$1.7 \times 10^9$
	$KH_2PO_4$	$1.2 \times 10^9$	$1.7 \times 10^9$	$2.1 \times 10^9$	$1.9 \times 10^9$	$2.0 \times 10^9$
	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$		$2.9 \times 10^9$	$2.8 \times 10^9$	$2.9 \times 10^9$	$2.5 \times 10^9$

표 18. The growth of strains with temperature

균주명	생균수 (cfu/ml)				
	24℃	28	32	36	40
D12Y1	$2.1 \times 10^9$	$3.2 \times 10^9$	$4.5 \times 10^9$	$2.9 \times 10^9$	$7.8 \times 10^9$
KA3Y1	$1.7 \times 10^9$	$2.6 \times 10^9$	$2.9 \times 10^9$	$1.3 \times 10^9$	$2.3 \times 10^9$

표 19. Optimum culture condition of D12Y1

(단위 : 500 L)

배지 조성	배양 조건	균주 선택
3% glucose 1.5% yeast extract 1.5% beef extract 1.5% casein peptone 1.5% soy peptone 0.1 % $K_2HPO_4$ 0.1% $KH_2PO_4$ 0.05% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$	배양부피 : 400 L 통기 : 0.5 ~ 1 vvm 교반 : 80 rpm 온도 : 32℃ PH : 조절 불필요	배양성이 상대적으로 우수한 D12Y1 균주 선발

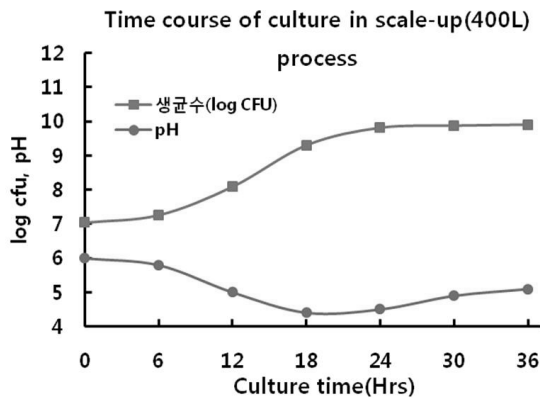


Fig. 13. Time course of culture of D12Y1

표 20. The growth of M9M1 according to beef extract concentration.

균주	생균수 (cfu/ml)				
	0	0.5	1.0	1.5	2.0
M9M1	$6.3 \times 10^8$	$2.2 \times 10^9$	$8.6 \times 10^9$	$8.3 \times 10^9$	$7.9 \times 10^9$

표 21. The growth of M9M1 according to casein peptone concentration.

균주	생균수 (cfu/ml)				
	0	0.5	1.0	1.5	2.0
M9M1	$8.5 \times 10^8$	$1.2 \times 10^9$	$3.5 \times 10^9$	$4.3 \times 10^9$	$5.1 \times 10^9$

표 22. The growth of M9M1 according to soy peptone concentration.

균주	생균수 (cfu/ml)				
	0	0.5	1.0	1.5	2.0
M9M1	$7.1 \times 10^8$	$2.4 \times 10^8$	$4.6 \times 10^8$	$5.1 \times 10^8$	$5.2 \times 10^9$

표 23. The growth of M9M1 with ion adding

균주명	이온첨가량 (W/V%)	생균수 (cfu/ml)				
		0	0.05	0.1	0.15	0.2
M9M1	$K_2HPO_4$	$3.9 \times 10^8$	$5.0 \times 10^8$	$5.7 \times 10^8$	$5.8 \times 10^8$	$5.9 \times 10^8$
	$KH_2PO_4$	$4.4 \times 10^8$	$4.2 \times 10^8$	$4.5 \times 10^8$	$4.3 \times 10^8$	$5.1 \times 10^8$
	$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	$4.2 \times 10^8$	$5.2 \times 10^8$	$5.6 \times 10^8$	$6.3 \times 10^8$	$9.1 \times 10^8$

표 24. The growth of M9M1 with temperature

균주명	생균수 (cfu/ml)				
	33℃	35	37	39	41
M9M1	$4.7 \times 10^9$	$6.5 \times 10^9$	$8.7 \times 10^9$	$7.8 \times 10^9$	$2.9 \times 10^9$

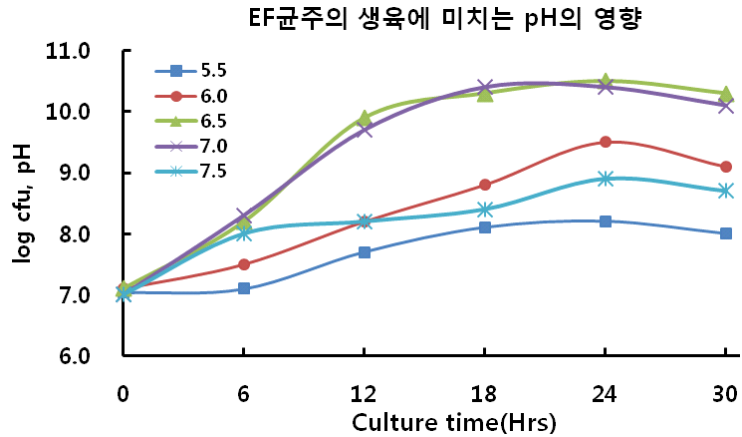


Fig. 14. Optimum pH of M9M1

표 25. Optimum culture condition of M9M1

(단위 : 250 mL)

배지 조성	배양 조건
3% glucose 1.0% yeast extract 1.0% beef extract 0.5% casein peptone 0.5% soy peptone 0.1 % K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 0.1% KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 0.05% MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	교반 : 30-60 rpm 배양온도 : 37℃ 최적 PH : 6.7

#### 나. 접종 및 균체 회수공정

D12Y1의 회수율은 총균수 대비 66.7%의 생존율 및 회수율을 나타내어 유산균 등 통상적인 생균제 회수율 보다 양호한 수준의 회수공정을 보여주었다.

표 26. Monitoring of mass-balance of fermentation process with D12Y1

구 분	접종액	배양액 (회수 전)	원심분리 회수액	동결건조분말	회수율 (생존율)
단위 생균수	4.5×10 <sup>9</sup> /ml	7.5×10 <sup>9</sup> /ml	2.5×10 <sup>11</sup> /ml	4×10 <sup>11</sup> /g	66.7%
총 생균수	3.6×10 <sup>13</sup> /8L	3×10 <sup>15</sup> /400L	2.5×10 <sup>15</sup> /10L	2×10 <sup>15</sup> /5KG	

(시험 5) 유용 물질의 대량생산체계 구축

가. 유전자 클로닝

형전용해활성 유전자의 클로닝을 통해 *ApeY1* gene이 *B. subtilis* *AprE8* gene과 96% 유사성이 있음을 확인하였고, 총 1570bp, CDS 1047bp로 이루어져 있으며, RBS(Ribosome Binding Site) 확인하였다. 아미노산의 수는 349개로 크기는 38kDa 정도로 예측되었다. *ApeY1* gene을 T-벡터 삽입 후 대장균(BL21)에 형질전환 시켰다.

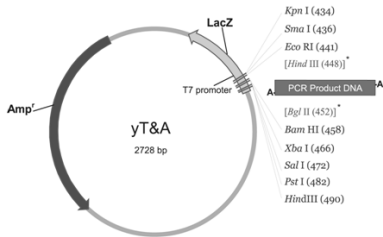


Fig. 15. Gene cloning vector

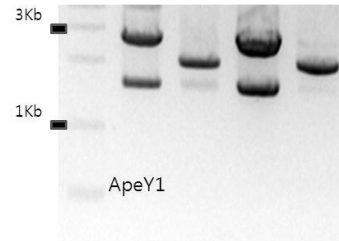


Fig. 16. C11Y16-4 *ApeY1* gene

```

1 CCAATTCGCG ATTTTGGCGT GACGGGGCTG AGCCAGTTG ATCCTCCGGT
51 GCTTGTGAAG ATTTTCAGAG GCAGCATCCG TTGATCATG GAACGGATTG
101 AACATCGCGA GAAAAGAGG AATCGCCGGC AACATCAGGA TGCTGACAAA
151 TAAAAAGAGG CAGGTATGGA GGAACCTGCT TCITTTTATC ATATTGTGCG
201 AGCTGCTGTG ACGTTGATTA ACCTCTTTCC ATAGTAGAAA GAGTITCCAA
251 GATATGTGCT AGTGTCTTTC AAACGATCAC GGACTTGGCC GTTGTCCAAA
301 GTCGGGTGCT TAGAAAGAA TACGCGCTCT CTGCCGGCAA CGTGAGGAGT
351 CGCCATGGAC GTGCCGTGTG AAGCACCGTA AGTGCCTCCA GGAAGTGTGC

401 TTTGGATGGA TAGCCAGGGA GCATCACAT GAAGCTCAGA ACCTGCGCTT
451 GAGAATGAAG CTCTTTGGTT GCTGCTGTTT ACCGCACTA CCGCAATAGT
501 AGAAGGATAT TTTGCAGGGT AGCCGACTGT GCTTGAAGCT CCGGACGAAC
551 CTTGCTTCCC GGCAACGGCA GCACAGCAGCA TACCCTGCGA AACGGCTTAA
601 TCAACGACTG TTTTCAGCGC TGTAAGACCA GAAGGTCCGC CAAGGCTCAT
651 GTAATAACCA TCCATATTGT TGGAAATGGC CCATCAATGT CCGTAAATAA
701 TCCAGCTATA TTGGCGCTTT CCGTITGAAT CAAGCTTACT TACTGCATAT
751 AATGATGGCG TTGGCGCTAC GGCACGAACA CCGATGAGT TATTAAGAGC
801 GGCAATCGTA CCGGCTACAT GCATCCCTGT AGAATCGCCG TCCTGTATG
851 GGTTTGTTC AGAAGTACG AGCTGTGCTC CCGCTGTGAC GTTTAAGTCA
901 AGGATGAGAA GAGTCAATC CGCTGTGAT AACAGCTACT TTTACTGTG
951 AGCCTGTGTA GCCTTTGAGA GTGAAGAGCC GCGCTTTTAA ATTTGAGAAA
1001 ATGCCATAAA GGAACAGATT GCGCATATTC ATGTGCAATA TGACTCTTCT
1051 CCACATAGCG AACGCTCGGA TCTTTTTTCA ATCTTTTACC AGCTTTTTCA
1101 TCCAATGTGG CTTCGGCCCG GGTAAACATA CTTAAATATG CTITTTGAAC
1151 CTTTCCCCC TTTTCAAAA TAACAACCTC TTTCTTTGGC GGAAATCATG
1201 GGAACCAATT GTTGGTITAT ATCCACAATA AGAATTCCT TCTTGAATG
1251 GCTTTTTCTT GCGSCCTGCC CCAACAAGT TGTTGAAMGC CACTCTAAAA
1301 AATTATCTTT TGACGGAAC AACAAAACGA AACACAATT TTTTGTCTC
1351 ATCTTACCC TCTCTCCCT TTAAAAAAT AAGAAAGAAC ATGCTTCAA
1401 AGAAAAATTT CGGGAATTTA TTTTGTTTA AGGGGGGAAGA AAATATATTT

1451 AGAAGAAAAA ACATCTTTGG TGAAGGATG TGTGTCCCT TTATCGGAAA
1501 AGAATCCCCC TCGCTCTCT CTTTGGCCCC CCGGACGAGA AAATATCTT
1551 CCTCATTTCA GAAAAAGGGA
    
```

Fig. 17. C11Y16-4 fibrinolytic enzyme *ApeY1* gene, complete cds

```

Majority      CCCCCTCTGATGCTTTTCCTGGCGAATGTCATCTTATTCTCTCCCTTCAATAATTTTTCCTTTTCCTGTTTT
10            20            30            40            50            60            70            80
C11M-aprE-14_aprEF -----
D0997813.1    CCCCCTCTGATGCTTTTCCTGGCGAATGTCATCTTATTCTCTCCCTTCAATAATTTTTCCTTTTCCTGTTTT
Majority      TGTGTGAGCTTTCTTTTCAAGTGTCTTTCTGGCTCATCTTTTAAAGATTTCAGGGTCACTATCTTTGTCATGGA
90            100           110           120           130           140           150           160
C11M-aprE-14_aprEF -----
D0997813.1    TGTGTGAGCTTTCTTTTCAAGTGTCTTTCTGGCTCATCTTTTAAAGATTTCAGGGTCACTATCTTTGTCATGGA
Majority      ACCGATTCACATCGGGGCTATTTGAGGATTTTTTGGACATCACTTCTGCTGGCCTCAGGACACTTGTGTGGAGG
170           180           190           200           210           220           230           240
C11M-aprE-14_aprEF -----
D0997813.1    ACCGATTCACATCGGGGCTATTTGAGGATTTTTTGGACATCACTTCTGCTGGCCTCAGGACACTTGTGTGGAGG
Majority      ACCCTGCTCTTTTAAAGTATATGTGCATTTCTGTGTGTGTTTTCTGCTTTCTAGTGGAAATAGTTTTTTTCGA
250           260           270           280           290           300           310           320
C11M-aprE-14_aprEF -----
D0997813.1    ACCCTGCTCTTTTAAAGTATATGTGCATTTCTGTGTGTGTTTTCTGCTTTCTAGTGGAAATAGTTTTTTTCGA
Majority      TTTTTTGGCGCTTTTACAGCATGATCACTTCCGCTTTGTTTCAAGTGTGTGCTTAAAGATGGGTTCTCAAGCTC
330           340           350           360           370           380           390           400
C11M-aprE-14_aprEF -----
D0997813.1    TTTTTTGGCGCTTTTACAGCATGATCACTTCCGCTTTGTTTCAAGTGTGTGCTTAAAGATGGGTTCTCAAGCTC
Majority      TGTTCGCTTATTGAGTATTTCCCGCATGCTTTTTTAAGTAAATCTCATCTGTGAGTTTTTTTAGAGGTTGTGGTTGG
410           420           430           440           450           460           470           480
C11M-aprE-14_aprEF -----
D0997813.1    TGTTCGCTTATTGAGTATTTCCCGCATGCTTTTTTAAGTAAATCTCATCTGTGAGTTTTTTTAGAGGTTGTGGTTGG
Majority      GTGTGATGACAGGAGTGTTCAGTCAAGTCTTGTGTTGTTGCTGCTTAACTTTTATAGATGGGCTTTTTCAGCATG
490           500           510           520           530           540           550           560
C11M-aprE-14_aprEF -----
D0997813.1    GTGTGATGACAGGAGTGTTCAGTCAAGTCTTGTGTTGTTGCTGCTTAACTTTTATAGATGGGCTTTTTCAGCATG
Majority      TGTGCTTCTTTTCCCGCACTAGTATAGAGGGATTTTTTTCGGTTTAAAGCGACTGTGAGTCTTCAAGTCTT
570           580           590           600           610           620           630           640
C11M-aprE-14_aprEF -----
D0997813.1    TGTGCTTCTTTTCCCGCACTAGTATAGAGGGATTTTTTTCGGTTTAAAGCGACTGTGAGTCTTCAAGTCTT
Majority      GGGACCAACAGGATTTTTTTCGGCGGGGGGAAAGTTCACCGGGATTTTCGGTDTTTCAGCGGGCTTTATCAAC
650           660           670           680           690           700           710           720
C11M-aprE-14_aprEF -----
D0997813.1    GGGACCAACAGGATTTTTTTCGGCGGGGGGAAAGTTCACCGGGATTTTCGGTDTTTCAGCGGGCTTTATCAAC
Majority      TTTTGTCTTTCAGCTCTTGAAGCATGTAAGAAAGCTCCCGCTGCTTATTTGATGACCTTATATATGATGAT
730           740           750           760           770           780           790           800
C11M-aprE-14_aprEF -----
D0997813.1    TTTTGTCTTTCAGCTCTTGAAGCATGTAAGAAAGCTCCCGCTGCTTATTTGATGACCTTATATATGATGATGAT
    
```

Fig. 18. Gene alignment of *ApeY1* and *ApeE8* gene

(시험 6) 지역축제연계 한우구이용 발효소스 개발

가. 발효소스용 균주 선발

단백질 및 지방분해효소 활성이 우수한 CCN25 균주를 최종적으로 선발하여 사용하였다.

표 27. Identification of strains for the manufacture of fermented source.

구 분	균주명	동정결과	유사도 (%)	비고
1	CCN25-5	<i>Bacillus licheniformis</i>	95	발효소스
2	CCN27-15	<i>Bacillus subtilis</i>	94	단백질, 지방분해
3	JGW3T16-1	<i>Lactobacillus sakei</i>	96	저온성, 길항작용
4	JGW6T16-1	<i>Leuconostoc citreum</i>	97	김치발효, 생균제
5	KCGW6M16-1	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	96	김치발효주균
6	J3B16-3	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	96	BAs 생성유전자 X

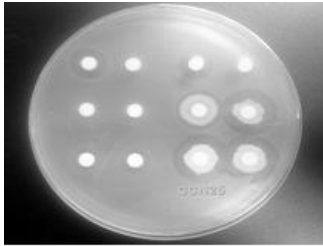


Fig. 19. Activity of CCN25 Fig. 20. Preparation of soybean source Fig. 21. Development of recipe

#### 나. 근원섬유소변화 지수 및 경도 측정

단백질과 지방분해활성이 가장 우수했던 CCN25균주를 첨가한 간장을 베이스로 양념을 제조 후 한우부위별로 적용 후 시판양념을 대조구로 연육도 시험을 한 결과 24시간 경과 후 설도 연육도가 시판양념에 비해 약 160% 증가하였다. 경도는 시판양념에 비해 감소하여 연육도가 증가함을 알 수 있었다. 채끝의 연육도와 기호도가 가장 좋았으나 가격을 고려하여 설도와 앞다리살로 최종 선정하였다.

표 28. Effect of aging on MFI

구 분	0시간		24시간		48시간	
	발효소스	시판양념	발효소스	시판양념	발효소스	시판양념
설도	72.5±3.4	76.8±2.1	183.3±3.4	116.9±2.8	205.5±3.5	145.8±2.9
앞다리살	67.9±1.8	65.8±2.7	157.9±1.2	104.9±1.2	187.5±2.6	168.5±3.1
채끝	81.8±3.9	88.7±3.2	202.4±2.5	164.9±2.6	278.7±3.8	202.5±3.6

표 29. Effect of aging on hardness

구 분	0시간		24시간		48시간	
	발효소스	시판양념	발효소스	시판양념	발효소스	시판양념
설도	24300±854	23700±487	14500±580	20450±745	8950±698	15260±581
앞다리살	27533±680	26900±847	15750±654	22415±610	9800±714	16524±625
채끝	21350±770	20580±668	12560±548	19570±647	7850±690	12240±665

다. 부위별 선호도 조사

횡성축협 주부모니터링단을 상대로 연령에 따라 총 20명을 선발하여 수행하였다.

- 전 체 : 20명(횡성축협 주부모니터링단 여18), 연령 : 20대(4), 30-45세(12), 45이상(4),
- 신뢰도 : 95±2.74%

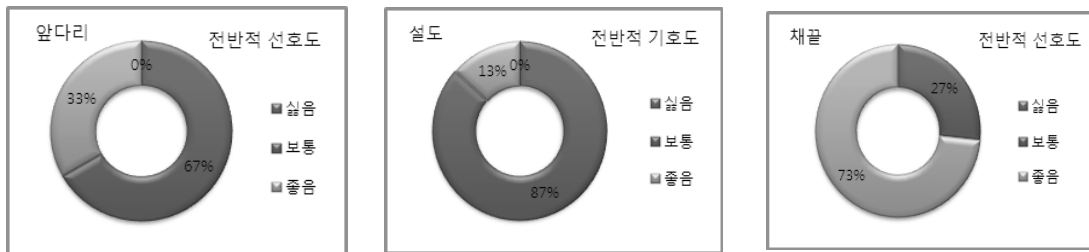


Fig. 22. Measurement of hardness



Fig. 23. Prototype of fermented source

(시험 7) 혼합 생균제 시제품 제조

가. 생균제 제조 조건 확립

혼합 생균제 시제품 제작에 사용할 미생물제로는 배양 조건 및 제제화 공정을 기 구축한 효모 균주 D12Y1, 고초균 C9Y16, 유산균 M9M1 3종의 미생물제를 사용하였다. 각 미생물제 3종의 생산은 각각 최적화된 배양 및 회수공정과 동결보호제 및 미세코팅 공정을 사용하였다. 혼합 생균제 시제품은 총 중량 10kg으로서 동일한 비율로  $1.5 \times 10^{10}/g$ 의 혼합 생균수를 보유하도록 각 미생물제를 건조 전분과 희석 혼합하여 제조하였다. 각 균주의 제조 조건 및 3종 혼합 생균제의 조성은 다음과 같다.

표 30. Manufacturing conditions of the probiotic strains D12Y1.

배양 배지 조성(w/v %)	배양 조건	동결보호제 및 코팅제 조성
3% glucose		Malto dextrin 0.4Kg
1% yeast extract	배양부피 : 400L	Skim milk 0.3Kg
1% casein peptone	통기 : 0.5~1 vvm	ISP 0.3Kg
1% soy peptone	교반 : 80rpm	Trehalose 2Kg
0.1% K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	온도 : 32℃	Tw 80 10ml
0.1% KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	pH : 조절 안함	Tap water 10L
0.05% MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O		

표 31. Manufacturing conditions of the probiotic strains C9Y16.

배양 배지 조성(w/v %)	배양 조건	동결보호제 및 코팅제 조성
3% glucose		
1% yeast extract	배양부피 400L	Malto dextrin 0.4Kg
1% casein peptone	통기 없음	Skim milk 0.3Kg
1% ISP	배양 온도 37℃	ISP 0.3Kg
0.5% Soluble starch	pH:조절 안함.	Trehalose 2Kg
0.1% K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	교반 30 RPM	Tw 80 10ml
0.1% KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	접종비 2%	Tap water 10L
0.05% MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O		

표 32. Manufacturing conditions of the probiotic strains M9M1.

배양 배지 조성(w/v %)	배양 조건	동결보호제 및 코팅제 조성
3% glucose		
1% yeast extract	배양부피 400L	Malto dextrin 0.4Kg
1% beef extract	통기 없음	Skim milk 0.3Kg
0.5% casein peptone	배양 온도 37℃	ISP 0.3Kg
0.5% soy peptone	pH 6.75	Trehalose 2Kg
0.1% K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	교반 30 RPM	Tw 80 10ml
0.1% KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	접종비 2%	Tap water 10L
0.05% MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O		

표33. Manufacturing conditions of the 3 probiotic strains(10 Kg, 1.5×10<sup>10</sup>/g).

균주 및 혼합제 성분	원말 생균수 (cfu/g)	첨가량 (g)	혼합 생균제 생균수 (cfu/g)
D12Y1	4.9 × 10 <sup>11</sup>	102	5 × 10 <sup>9</sup>
C9Y16-12	1.5 × 10 <sup>11</sup>	333	5 × 10 <sup>9</sup>
M9M1	5.5 × 10 <sup>11</sup>	91	5 × 10 <sup>9</sup>
Dried corn starch	-	9,474	
합계		10,000	1.5 × 10 <sup>10</sup> /g

#### 나. 인공위액 조건에서 생균 안정성 관찰

혼합 생균제는 인공위액에 3시간 노출시에도 48.6%의 양호한 생존율 특성을 보여주었는데 이는 3종의 원 균주의 생존특성이 양호한 점과 미세코팅된 각각의 미생물체의 개량된 내산성 특성이 함께 나타난 것으로서 실제 경구투여시 위액에 의한 생균의 사멸을 최소화하여 장에 도달 할 수 있을 것으로 기대할 수 있다. 3종 미생물의 혼합 생균제를 1% 농도로 멸균 펩톤 식염수에 현탁시킨 후 oxgall이 각각 0%, 0.05%, 0.1%, 0.3%, 0.5% 씩 첨가된 YM-agar, PDA-agar, MRS-agar 배지에 도달하고 48시간 동안 배양한 후 고유의 집락형태를 선별 계측하여 혼합 생균제의 내담즙성을 관찰하였다. 혼합 생균제는 담즙산이 첨가된 각 평판배지에 배양시 비교적 높은 생존 특성을 보여주었는데 이는 3종의 원 균주의 담즙산에서의 생존특성이 양호한 점과 미세코팅된 각각의 미생물체의 개량된 내담즙성 특성이 함께 나타난 것으로서 실제 경구투여시 담즙산에 의한 생균의 사멸을 최소화하는 것을 기대할 수 있다. 3종의 미생물체 혼합 생균제의 장내 조건에서의 생균체 용출성을 인공장액 용액(pH 6.80, 2N 인산이수소칼륨 시액 250 mL, 0.2N 수산화나트륨 시액 118 mL/L)을 사용하여 관찰하였다. 혼합 생균제를 10% 농도로 인공장액 용액에 투입한 후 장내 연동운동 조건을 고려하여 분당 100회 회전진탕하였으며 5분 또는 20분 단위로 상층 액을 취하여 YM-agar, PDA-agar, MRS-agar 배지에서 배양하여 균종별 고유의 집락을 선별 계수하여 생균의 용출 정도를 관찰하였다. 혼합 생균제의 용출성은 장액과 혼합한 직후에는 약 10% 수준이었으나 반응 20분 경과 시점부터는 100% 용출 특성을 나타내었다. 3종의 코팅 미생물체로 혼합 구성한 생균제의 pH 6.8의 장액 조건에서의 신속한 장용성 용출특성은 생체 내 경구 투여 시에도 위산 조건을 견뎌내고 장내에 도달하여 장내로 신속히 용출됨으로서 장내 정착성을 높이는 거동을 기대할 수 있는 것으로서 생체 내 기능성을 극대화할 수 있을 것으로 예측되었다.

표 34. Stability of strains at artificial gastric juice

구 분	생균수(CFU/G)		
	반응 전	반응 후	생균 안정성(%)
D12Y1	$5.0 \times 10^9$	$2.4 \times 10^9$	48
C9Y16	$5.0 \times 10^9$	$1.8 \times 10^9$	36
M9M1	$5.0 \times 10^9$	$3.1 \times 10^9$	62
Total	$1.5 \times 10^{10}$	$7.3 \times 10^9$	48.6

표 35. Stability of strains at artificial bile

구 분		Oxgall 첨가 농도			
		0.05	0.1	0.3	0.5
D12Y1	생균수(CFU/G)	$5.0 \times 10^9$	$4.8 \times 10^9$	$4.6 \times 10^9$	$4.3 \times 10^9$
	생존율(%)	100	96	92	86
C9Y16	생균수(CFU/G)	$4.5 \times 10^9$	$4.0 \times 10^9$	$2.1 \times 10^9$	$1.9 \times 10^9$
	생존율(%)	90	80	42	38
M9M1	생균수(CFU/G)	$5.0 \times 10^9$	$5.0 \times 10^9$	$5.0 \times 10^9$	$4.9 \times 10^9$
	생존율(%)	100	100	100	98
Total	생균수(CFU/G)	$1.45 \times 10^{10}$	$1.38 \times 10^{10}$	$1.17 \times 10^{10}$	$1.11 \times 10^{10}$
	생존율(%)	96.6	92.0	78.0	74.0

표 36. Stability of strains at artificial intestinal

구 분	반응 전 생균수 (cfu/ml)	검출시간대(min) 별 생균수(CFU/ml)				
		5	20	40	60	80
D12Y1	$5 \times 10^8$	$4.9 \times 10^7$	$5 \times 10^8$	$5 \times 10^8$	$5 \times 10^8$	$5 \times 10^8$
C9Y16	$5 \times 10^8$	$5.1 \times 10^7$	$5 \times 10^8$	$5 \times 10^8$	$5 \times 10^8$	$5 \times 10^8$
M9M1	$5 \times 10^8$	$4.5 \times 10^7$	$5 \times 10^8$	$5 \times 10^8$	$5 \times 10^8$	$5 \times 10^8$
Total	$1.5 \times 10^9$	$1.45 \times 10^8$	$1.5 \times 10^9$	$1.5 \times 10^9$	$1.5 \times 10^9$	$1.5 \times 10^9$
용출율(%)		9.7	100	100	100	100

#### 다. 생균제 가속시험 안정성 관찰

통상적으로 일반적인 생균제는 가속시험 조건에서 지수적 사멸경향을 나타내는데 반하여 당 분석에 사용한 혼합 미생물 생균제는 지수적 사멸 경향이 관찰되지 않았는데, 이는 장기 보존 및 유통시에 생균제의 매우 양호한 생균 안정성을 기대할 수 있게 하였다. 이는 선발된 효모균 *Saccharomyces sp.* D12Y1, 고초균 *Bacillus subtilis* C9Y16, 유산균 *Enterococcus faecium* M9M1 원 균주 자체의 생균 안정성이 특히 강한 특성을 지닌 것과 전 공정에서 사

용한 마이크로 코팅 생균제의 개선된 생균제 안정화 효과가 결합한 결과를 나타내고 있는 것으로 추정할 수 있다.

표 37. Stability of 3 strains at acceleration test.

구 분	검출기간대(Week) 별 생균수(CFU/g)				
	0	2	4	6	8
D12Y1	$5 \times 10^9$	$4.1 \times 10^9$	$3.5 \times 10^9$	$3.2 \times 10^9$	$2.9 \times 10^9$
C9Y16	$5 \times 10^9$	$3.3 \times 10^9$	$2.1 \times 10^9$	$1.7 \times 10^9$	$1.4 \times 10^9$
M9M1	$5 \times 10^9$	$4.9 \times 10^9$	$4.6 \times 10^9$	$4.5 \times 10^9$	$4.1 \times 10^9$
Total	$1.5 \times 10^{10}$	$1.23 \times 10^{10}$	$1.02 \times 10^{10}$	$9.4 \times 10^9$	$8.4 \times 10^9$
생존율		82.0	68.0	62.7	56.0

### (시험 8) 기능성 균주를 이용한 가공품 현장접목

#### 가. 청국쿠키 제조 레시피

혈전용해 고활성 균주를 이용하여 청국장을 제조하고 이를 이용해 만든 청국가루를 이용하여 청국 쿠키를 제조하는 레시피를 제시하였다.

#### (1) 청국쿠키 표준 레시피(30개 1박스 기준)

<재 료> 밀(가루)80g, 청국장가루 20g, 버터100g, 설탕100g, 계란100g

<만드는 방법>

- ① 녹인 버터에 설탕을 넣어 크림상태가 되도록 고루 섞는다.
- ② ①에 달걀을 넣어가며 고루 저어준다.
- ③ 체에 내린 분량의 밀가루와 청국장가루를 고루 섞은 후 ②에 넣고 섞어 반죽을 만든다.
- ④ ③의 반죽을 성형 후 180℃로 예열된 오븐에 넣고 5-10분 가량 굽는다.



Fig. 24. Processing of Chengguk cookies

## 나. 청국빵 제조 레시피

혈전용해 고활성 균주를 이용하여 청국장을 제조하고 이를 이용해 만든 청국가루를 이용하여 청국 쿠키를 제조하는 레시피를 제시하고 연령에 따라 총 31명을 선발하여 기호도를 조사하였고 결과는 다음과 같다.

### (1) 청국소보로빵 표준 레시피

<재 료>

- 빵 : 강력분1000g, 설탕150g, 이스트35g, 소금15g, 달걀4개, 우유459g, 버터150g, 물225g, 청국장분말 50g
- 소보루 : 중력분(또는 박력분)500g, 설탕300g, 버터250g, 달걀1개, 물엿50g, 베이킹파우더10g, 소금5g, 청국장 분말50g

<만드는 방법>

- ① 준비된 모든 재료를 넣고 반죽을 하다가 마지막에 버터를 넣고 반죽
- ② 1차 발효하기(1~2시간)
- ③ 성형후 둥글리기한후 2차발효(15~30분)
- ④ 물을 묻혀 만들어 놓은 소보루를 묻혀준 후 180℃로 예열한 오븐에서 약 20분간 굽기

소보루 만들기

- ① 가루(중력분+베이킹파우더+청국장분말) 체 내리기.
- ② 버터 풀고 설탕, 소금, 물엿 섞어줌
- ③ 계란넣고 잘 섞어줌
- ④ ①을 넣고 반죽하지말고 보슬보슬한 상태가 되도록 가볍게 섞어줌

### (2) 청국카스테라 표준 레시피

<재 료>

- 버터980g, 설탕980g, 물엿200g, 달걀980g, 우유600g, 박력분1500g, 베이킹파우더55g, 청국장 분말50g, 아몬드슬라이스, 호두칩, 건포도 약간

<만드는 방법>

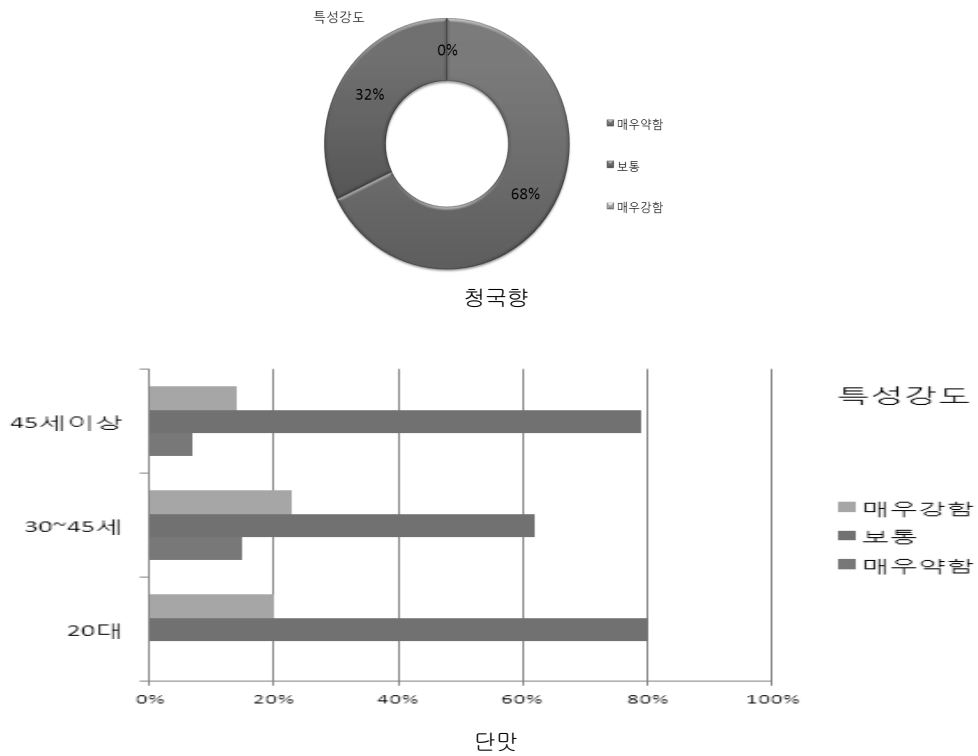
- ① 박력분+청국장분말+베이킹파우더를 체에 내림
- ② 달걀을 풀어 설탕, 물엿을 넣고 젓고 중탕으로 데운뒤 휘핑
- ③ 거품 자국이 선명해 질때까지 휘핑하고 ①을 넣고 거품이 꺼지지 않게 섞음
- ④ 우유와 녹인 버터를 섞어놓고 ③의 반죽을 조금 덜어 넣고 섞음
- ⑤ ④를 다시 ③에 부어 가볍게 섞은뒤 유산지를 깐 틀에 반죽을 붓기
- ⑥ 160~165℃로 예열된 오븐에 넣고 25분~30분 가량 굽기

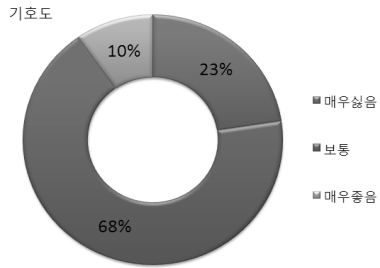


Fig. 25. Preparation of Chengguk bread

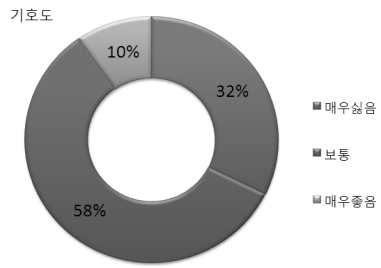
(3) 기호도 조사

○ 전체 : 31명(남13, 여18), 연령 : 20대(4), 30-45세(13), 45이상(14), 신뢰도 : 95±3.9%

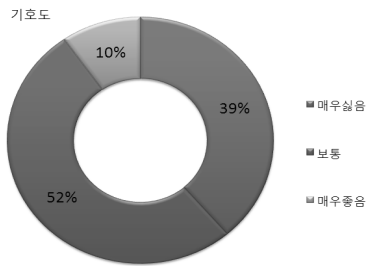




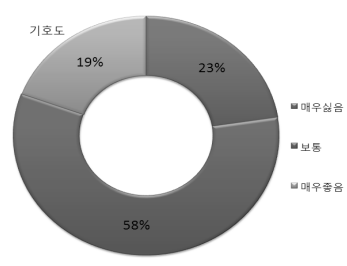
향



맛

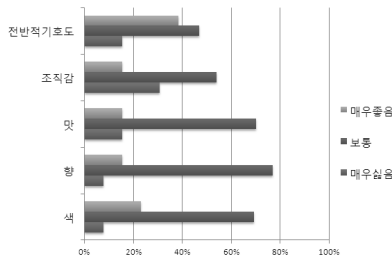


조직감

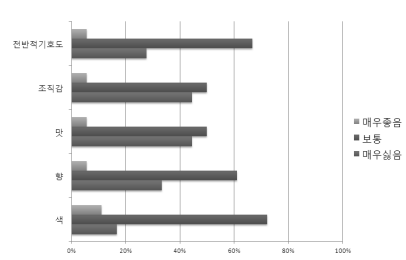


전반적 기호도

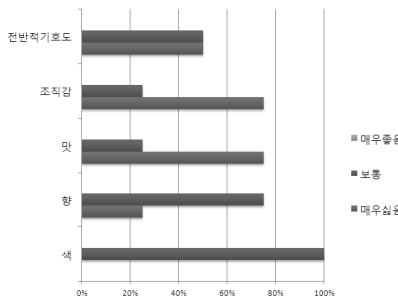
○ 성별 및 연령대별 기호도



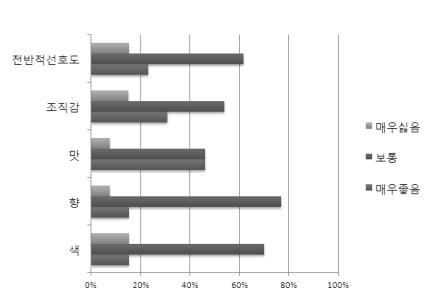
남자



여자



20대



30-45세

(시험 9) 유용 균주 안정성 강화를 위한 코팅제 개발 및 거동 특성 분석

가. 코팅제 개발

비코팅, 동결보호제(TH: Trehalose), 다당체(MD: maltodextrin), (SM: skim milk), (ISP: isolated soy protein)를 이용하여 총 5처리구로 수행하였다. 코팅제의 성상관찰은 이미 기술한 전자주사현미경으로 관찰하였다. 코팅제의 선발은 제타 포텐셜 값으로 결정하는데 고정층과 확산층 사이에 있는 미끄러지는 면의 전하를 측정하는 것이 zeta-potential인데 같은 전하로 하전된 입자사이의 인력 또는 척력의 척도가 되고 있다. 일반적으로 + 또는 - 전하와 관계없이 zeta-potential의 절대값이 클수록 입자간 반발력이 커지고 분산성이 좋아지는 반면에, zeta-potential의 절대값이 낮아질수록 입자간의 응집 및 침전현상이 발생할 수 있다. zeta-potential의 분석 결과는 마이크로캡슐화 된 미생물체의 경구투여 시에 장산성의 위액 조건에서는 효소제는 응집하여 낮은 용해도 특성을 나타내어 미생물 생균체의 방출을 억제하는 반면에 중성 pH의 장에 도달하면 입자간 분산성이 높아져 높은 용해도 특성을 나타내어 신속하게 용출되므로 장용성 제제로서의 이론적인 방출거동 특성을 정확하게 보유하고 있다고 판단된다. 비코팅 생균체의 경우보다 코팅 생균체에서의 장용성 거동이 우수하였으며 혼합코팅제에서의 장용성 거동이 약간 더 좋은 것으로 예측되었다.



표 38. The study design of coating of D12Y1

구분	코팅제 조성 실험구	코팅액 혼합비
1	비코팅	TH 단독
2	MD	MD:TH(1:1)
3	SM	SM:TH(1:1)
4	ISP	ISP:TH(1:1)
5	MD:SM:ISP	MD:SM:ISP:TH(4:3:3:1)

TH : Trehalose(동결보호제), MD : maltodextrin(다당체), SM : skim milk(단백질),  
ISP : isolated soy protein(단백질)

표 39. The SEM of coatings

구분	100 $\mu$ m	10 $\mu$ m
1. Control (비코팅)		
2. MD		
3. SM		
4. ISP		
5. MD:SM:ISP		

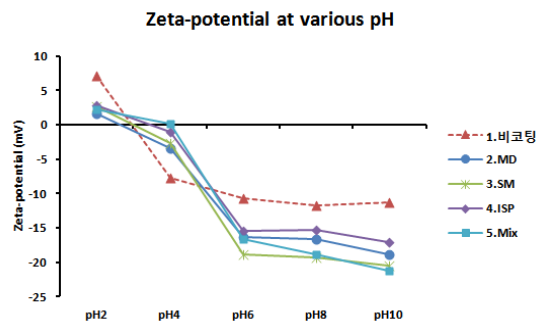


Fig. 26. Comparison of zeta-potential

나. 인공위액(pH 1.2) 조건에서의 생균 안정성 평가

비코팅 미생물제제의 경우 강산성의 인공위액 조건에 노출 시킨 후 생균수는 1/10 이하 수준으로 감소되었으며, 코팅제제의 경우 내산성 개선 효과를 나타내었다.

표 40. Stability of strains at artificial gastric juice

구분	시료	생균수(CFU/ml)		
		반응 전	반응 후	안정성(%)
1	비코팅	$4.5 \times 10^{11}$	$4.1 \times 10^{10}$	9.1
2	MD	$4.3 \times 10^{11}$	$9.3 \times 10^{10}$	21.6
3	SM	$4.7 \times 10^{11}$	$1.5 \times 10^{11}$	31.9
4	ISP	$4.9 \times 10^{11}$	$1.7 \times 10^{11}$	34.7
5	MIX	$4.9 \times 10^{11}$	$2.1 \times 10^{11}$	42.8

다. 인공장액 (pH 6.8) 조건에서의 생균의 용출성 평가

마이크로 코팅제의 용출성은 장액과 혼합한 직후에는 약 10% 수준이었으나 반응 20분 경과시부터는 100% 용출 특성을 나타내었다. pH 6.8의 장액 조건에서 비코팅제제와 동일한(신속한) 용출특성이 관찰됨으로서 마이크로 코팅 미생물제의 생체 내 경구 투여 시에 위액 조건을 견뎌내고 장내에 도달한 미생물제는 장내로 신속히 용출됨으로서 장용성 거동을 나타내어 생체 내 기능성을 극대화할 수 있을 것으로 예측된다.

표 41. Stability of strains at artificial gastric bile

구분	시료	검출시간대(min) 별 생균수(CFU/ml)					
		반응 전 생균수	0	20	40	60	80
1	비코팅	$4.5 \times 10^{10}$	$4.5 \times 10^{10}$	$4.5 \times 10^{10}$	$4.5 \times 10^{10}$	$4.5 \times 10^{10}$	$4.5 \times 10^{10}$
2	MD	$4.3 \times 10^{10}$	$5.4 \times 10^9$	$4.3 \times 10^{10}$	$4.3 \times 10^{10}$	$4.3 \times 10^{10}$	$4.3 \times 10^{10}$
3	SM	$4.7 \times 10^{10}$	$5.7 \times 10^9$	$4.7 \times 10^{10}$	$4.7 \times 10^{10}$	$4.7 \times 10^{10}$	$4.7 \times 10^{10}$
4	ISP	$4.9 \times 10^{10}$	$4.8 \times 10^9$	$4.9 \times 10^{10}$	$4.9 \times 10^{10}$	$4.9 \times 10^{10}$	$4.9 \times 10^{10}$
5	MIX	$4.9 \times 10^{10}$	$5.5 \times 10^9$	$4.9 \times 10^{10}$	$4.9 \times 10^{10}$	$4.9 \times 10^{10}$	$4.9 \times 10^{10}$

(시험 10) 생균제 가속시험 안정성 평가

가. 가속시험 안정성 평가

가속시험 조건에서 마이크로코팅된 미생물제는 비코팅 제제보다 약간 개선된 안정성을 발휘하였다. 당 개발에 사용된 미생물제는 코팅여부와 관계없이 가속시험 조건에서 흔히 관찰되는 지수적인 생균수 감소 현상은 없었는데 AFY-1 원 균주 자체의 생균 안정성이 특히 강한 특성을 지닌 것으로서 마이크로 코팅 생균제의 경우에는 이러한 D12Y1 원 균주 자체의

생균 안정성 특성을 그대로 유지하고 있거나 약간 개선된 결과를 나타내고 있음을 볼 수 있었다.

표 42. Stability of strains at acceleration test.

시료번호	시료	검출기간대(Week) 별 생균수(CFU/g)				
		0	2	4	6	8
1	비코팅	$4.5 \times 10^{11}$	$2.5 \times 10^{11}$	$2.2 \times 10^{11}$	$1.3 \times 10^{11}$	$5.1 \times 10^{10}$
2	MD	$4.3 \times 10^{11}$	$3.2 \times 10^{11}$	$2.3 \times 10^{11}$	$1.7 \times 10^{11}$	$8.3 \times 10^{10}$
3	SM	$4.7 \times 10^{11}$	$3.1 \times 10^{11}$	$2.8 \times 10^{11}$	$2.1 \times 10^{11}$	$9.7 \times 10^{10}$
4	ISP	$4.9 \times 10^{11}$	$2.9 \times 10^{11}$	$2.0 \times 10^{11}$	$1.9 \times 10^{11}$	$8.9 \times 10^{10}$
5	MIX	$4.9 \times 10^{11}$	$3.3 \times 10^{11}$	$2.4 \times 10^{11}$	$1.8 \times 10^{11}$	$1.0 \times 10^{11}$

#### 4. 적 요

- 1) 전국에서 발효식품 자원수집은 전체 120점을 수집하였고, 젓산균, 고초균, 효모를 포함하여 여러 균주를 분리하였다.
- 2) 혈전용해활성이 우수한 선발균주(D12Y1 등 3종)를 이용하여 기능성 된장을 제조하고 그 특성을 조사하였으며, 그 결과 3종을 모두 접종한 된장에서 활성이 가장 우수하였으나 기호도 평가에서는 D12Y1 균주만 첨가한 처리구가 가장 우수하였다.
- 3) 청국장 종균을 선발하기 위해 혈전용해활성이 우수한 고초균 8종을 대상으로 아미노태 질소 및  $\gamma$ -PGA 생성능을 조사하였다. 그 결과 DJN58Y16-1 균주의 결과가 가장 우수하였으며, 콩 품종에 따른 청국장 특성은 햇살콩이 가장 우수하였다.
- 4) D12Y1 등 혈전용해 고활성 균주 2종과 항산화활성이 우수한 균주 M9M1의 대량배양을 위한 탄소원, 질소원 배지 및 미량원소의 함량에 따른 균주의 생육 검토 결과 D12Y1의 경우 3% glucose, 1.5% yeast extract, 1.5% beef extract, 1.5% casein peptone, 1.5% soy peptone, 0.1 %  $K_2HPO_4$ , 0.1%  $KH_2PO_4$ , 0.05%  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 에서 최적의 생육을 보여주었으며 최적온도는 32°C이었다. M9M1은 3% glucose, 1.0% yeast extract, 1.0% beef extract, 0.5% casein peptone, 0.5% soy peptone, 0.1 %  $K_2HPO_4$ , 0.1%  $KH_2PO_4$ , 0.05%  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 에서 최적의 생육을 보여주었으며 최적온도는 37°C이었다.
- 5) 유용물질의 대량생산 체계를 확립하기 위해 선발 균주의 혈전용해활성 유전자를 클로닝하여 대장균내에 삽입하였고 관련 유전자의 시퀀스를 확인하여 다른 유전자와 비교한 결과 *B. subtilis* AprE8 gene과 96% 유사성 있었다.
- 6) 지역내 축제와 한우 비선호부위의 소비 촉진을 위하여 단백질 및 지방분해 활성이 우수한 균주를 선발하고 이 균주가 첨가된 간장을 제조하였다. 제조된 간장을 베이스로 구이용 소스를 개발하고 비선호 부위인 한우의 앞다리살 및 설도에 적용하여 연육도 및 경도를 측정된 결과 설도 부위의 연육도가 시판양념에 비해 약 160% 증가하였다.

경도는 시판양념에 비해 감소하여 연육도가 증가함을 알 수 있었다. 채끝의 연육도와 기호도가 가장 좋았으나 가격을 고려하여 설도와 앞다리살로 최종 선정하였다.

- 7) 혼합 생균제 시제품 제작에 사용할 미생물제로는 배양 조건 및 제제화 공정을 기 구축한 효모 균주 D12Y1, 고초균 C9Y16, 유산균 M9M1 3종의 미생물제를 사용하여 시제품을 개발하였다.
- 8) 기능성 균주를 이용한 가공품을 현장접목하기 위해서 혈전용해 균주가 첨가된 청국장 을 제조하고 이를 이용해 냄새가 안나는 청국쿠기의 레시피를 제공하였다.
- 9) 항산화 고활성 균주를 이용하여 제조한 청국가루를 이용해 전 연령층에서 섭취 가능한 청국빵 2종을 레시피를 제공하고 기호도를 조사결과 전연령대에서 우수한 평가를 받았다.
- 10) 유용 균주 자체의 안정성 강화를 위해 위산에서 보호되고 장내에서 용출성이 좋은 코팅제를 선별하고 코팅된 균주의 거동 특성을 분석한 결과 인공위액에서 안정성이 비코팅에 비해 5배 증가하였고, 장액에서의 용출성은 비코팅제와 동일한 용출성을 나타내었다
- 11) D12Y1 균주의 생균제를 개발하고 생균 활성의 안정성을 검토하기 위하여 가속시험 안정성 평가 결과 생균 안정성 특성을 그대로 유지하고 있거나 약간 개선된 결과를 나타내고 있음을 볼 수 있었다.

## 5. 인용문헌

- Bhattacharya, S., Ploplis, V.A. &Castellino, F.J. 2012, "Bacterial plasminogen receptors utilize host plasminogen system for effective invasion and dissemination", *Journal of biomedicine & biotechnology*, vol. 2012, pp. 482-496.
- Sun, Y., Wang, W. &Li, C. 2010, "Advancement on thrombolytic characteristic, function and clinical application of different fibrinolytic enzymes", *Zhongguo zhong yao za zhi = Zhongguo zhongyao zazhi = China journal of Chinese materia medica*, vol. 35, no. 6, pp. 794-798.
- Wegrzynowicz, Z., Ko, H.J., Pulverer, G. &Jeljaszewicz, J. 1978, "The nature of clotting and fibrinolytic activities of *Bacteroids melaninogenicus*", *Zentralblatt fur Bakteriologie, Parasitenkunde, Infektionskrankheiten und Hygiene.Erste Abteilung Originale.Reihe A: Medizinische Mikrobiologie und Parasitologie*, vol. 240, no. 1, pp. 106-111.
- 김경희, 송미영 &육홍선 2007, "청국장 가루를 첨가한 식빵의 품질 특성", *동아시아食生活學會誌*, vol. 17, no. 6, pp. 853-859.
- 김동현 1992, *된장 Koji 및 그 혼합에 따른 된장 숙성 과정중의 화학성분 변화*, 建國大學校 農畜開發大學院.
- 김동호, 송현과, 김기연, 김정옥 &변명우 2004, "된장의 혈전용해효소 활성과 미생물 분포와의 상관관계", *한국식품영양과학회지*, vol. 33, no. 1, pp. 41-46.
- 김현진, 여수환, 조성춘, 배동원, 윤정훈, 황용일 &이승철 2002, "항산화 물질을 생산하는 해양 미생물의 분리,동정 및 배양 특성 조사", *한국미생물·생명공학회지*, vol. 30, no. 3, pp. 223-229.

- 류병호 2003, "항산화와 혈전용해 활성을 갖는 기능성 된장의 개발", *생명과학회지*, vol. 13, no. 5, pp. 559-568.
- 박건영, 황경미, 정근옥 & 이규복 2002, "된장 제조방법의 표준화 연구 - 1. 문헌에 의한 된장 제조방법의 표준화", *한국식품영양과학회지*, vol. 31, no. 2, pp. 343-350.
- 박주현, 한찬규, 최숙현, 이복희, 이혜정 & 김성수 2011, "냄새저감형 울무청국장 제조에 관한 연구", *한국식품영양과학회지*, vol. 40, no. 2, pp. 259-266.
- 백현, 임학섭, 정경태, 최영현, 최병태, 서민정, 김지은, 류은주, 허만규, 주우홍 & 정영기 2005, "Bacillus subtilis BK-17 유래 혈전용해 효소의 특성", *생명과학회지*, vol. 15, no. 6, pp. 987-993.
- 서재구, 이과수, 김진웅 & 정명준 2010, "프로바이오틱 제품 개발 동향과 과제", *KSBB Journal*, vol. 25, no. 4, pp. 303-310.
- 손봉수, 박석규, 강신권, 이상원, 성치남 & 성낙계 1995, "다당류를 생산하는 미생물의 분리와 배양특성", *한국미생물·생명공학회지*, vol. 23, no. 3, pp. 263-268.
- 신원철 & 마호우 1996, "유산균 용균 효소를 생산하는 미생물의 분리, 동정 및 배양조건", *한국미생물·생명공학회지*, vol. 24, no. 3, pp. 299-303.
- 양용, 김건화, 이정희, 윤정희 & 유주현 1975, "Meat Tenderizer 제조에 관한 연구 제 1 보 ; 시판 meat tenderizer 의 연육효과", *한국식품과학회지*, vol. 7, no. 4, pp. 221-228.
- 이경희 & 조성환 2003, "황국균과 납두균의 혼합배양이 된장메주의 효소활성 및 숙성된장의 품질에 미치는 영향", *농업생명과학연구*, vol. 37, no. 1, pp. 9-21.
- 이보배 2011, *전통된장을 이용한 된장분말 건조공정의 최적화*, 세종대학교 대학원.
- 이용미 & 류은순 2008, "청국장 분말 첨가 패티의 이화학적 및 관능적 특성", *한국식품조리과학회지*, vol. 24, no. 6, pp. 742-747.
- 정구민 & 안희정 2012, "느타리버섯이 육류의 연육에 미치는 효과", *한국식품영양과학회지*, vol. 41, no. 6, pp. 829-833.
- 정재홍, 김종생, 이상덕, 최성현 & 오만진 1998, "시판된장의 유리아미노산, 유기산 및 Isoflavone의 함량에 관한 연구", *한국식품영양과학회지*, vol. 27, no. 1, pp. 10-15.
- 최창용, 강성구, 박석규, 장미경 & 나재운 2007, "유산균을 함유한 알긴산 미세입자의 제조와 특성", *생명과학회지*, vol. 17, no. 12, pp. 1754-1759.
- 尹榮 2005, *전통된장의 생리기능 특성*, 全北大學校 大學院.
- 金紅出, 趙鏞雲, 葛祥完 & 李相元 1998, "전통 양조된장의 조성 및 발효미생물의 특성", *산업과학기술연구소보*, vol. -, no. 5, pp. 169-175.
- 金炯洛 2011, *된장으로부터 분리된 세균의 Helicobacter pylori에 대한 성장 억제효과*, 順天大學校 大學院.

## 6. 연구결과 활용

연도(연차)	활용구분	제 목
2011(1년)	영농활용	기능성 균주 첨가 청국장 제조 방법
	영농활용	청국가루를 이용한 청국쿠키 레시피 제공
	기술이전	혈전용해활성 균주가 첨가된 기능성 청국장의 제조
	홍 보	지역신문 1건, 특산물판매장 1건, 세미나 1건
2012(2년)	영농활용	청국장 제조에 적합한 콩 품종 선발
	영농활용	청국장 제조용 종균 개발
	시책건의	유용 균주 자가배양시설 지원
	특허출원	혈전용해효소를 생산하는 미생물 및 이를 포함한 장류
	생명정보 등록	<i>Saccharomyces sp.</i> AGY1 18S ribosomal RNA gene
	생물자원 기탁	특허균주 KACC93155P
2013(3년)	홍 보	지역신문 2건, 불교방송 1건, 인터넷 2건
	특허출원	혈전분해효소 활성을 갖는 효모생균제 및 그의 제조방법
	기술이전	생균제 제조용 균주 제공
	기술협력 협정체결	한우구이용 발효소스 개발을 위한 양해각서 체결
	생명정보 등록	<i>Bacillus subtilis</i> AFY2 16S rRNA
	생물자원 기탁	<i>Bacillus subtilis</i> C17Y16
홍 보	한우구이용 발효소스 MOU 체결 및 시제품 개발	

## 7. 연구원 편성

구분	소속	직급	성명	수행업무	참여년도		
					'11	'12	'13
과제책임자	농식품연구소	농업연구사	이재형	과제 총괄	○	○	○
공동연구자	"	"	김시창	과제 지원	○	○	-
"	"	"	최병곤	"	○	○	○
"	"	농업연구관	김경희	"	○	○	-
"	"	"	허남기	과제 수행	-	○	○
"	"	농업연구사	이효영	과제 지원	-	○	-
"	"	"	박아름	"	-	○	○
"	"	연구원	김주영	과제 수행	-	-	○