



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2020년03월13일
(11) 등록번호 10-2088696
(24) 등록일자 2020년03월09일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 1/16 (2006.01) A23L 29/00 (2016.01)
C12G 1/00 (2019.01) C12G 3/02 (2019.01)
C12R 1/865 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 1/16 (2013.01)
A23L 29/065 (2016.08)
(21) 출원번호 10-2018-0054661
(22) 출원일자 2018년05월14일
심사청구일자 2018년05월14일
(65) 공개번호 10-2019-0130247
(43) 공개일자 2019년11월22일
(56) 선행기술조사문헌
KR1020150096559 A*
KR1020150096561 A
KR1020150096560 A
KR101904164 B1
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
재단법인 발효미생물산업진흥원
전라북도 순창군 순창읍 민속마을길 61-27
(72) 발명자
정수지
전라북도 순창군 동계면 서호길 21-12
양희중
대전광역시 서구 가장로 107, 205동 402호(가장동, 삼성래미안아파트)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
최규환

전체 청구항 수 : 총 2 항

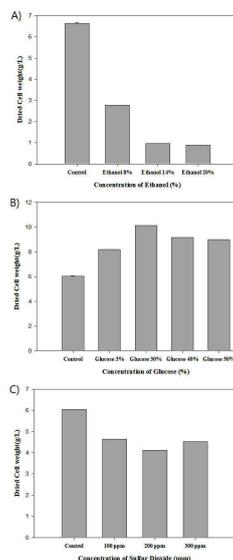
심사관 : 문동현

(54) 발명의 명칭 베리류 와인 제조를 위한 바이오제닉 아민 비생성 사카로마이세스 세레비지에 BA34 균주 및 이의 용도

(57) 요약

본 발명은 베리류 와인 제조를 위한 바이오제닉 아민 비생성 사카로마이세스 세레비지에 BA34 균주 및 이의 용도에 관한 것으로, 본 발명에서는 베리류 과실로부터 분리된 사카로마이세스 세레비지에(*Saccharomyces cerevisiae*) BA34 균주가 알코올, 당 및 아황산에 대한 내성이 있고, 알코올 생성능 및 β -글루코시다제(β -glucosidase) 분비능이 있으며, 바이오제닉 아민 및 우레아제를 생성하지 않는 것을 확인하였다. 따라서, 본 발명의 사카로마이세스 세레비지에 BA34 균주를 이용하여 바이오제닉 아민이 없는 안전한 와인을 제공할 수 있으므로, 산업적으로 유용하게 이용될 수 있을 것으로 기대된다.

대표도 - 도2



(52) CPC특허분류

C12G 1/00 (2019.02)
C12G 3/02 (2019.02)
A23V 2002/00 (2013.01)
A23V 2250/762 (2013.01)
C12G 2200/11 (2013.01)
C12R 1/865 (2013.01)

정도연

전라북도 순창군 순창읍 남계로 98, 101동 1001호
(해태타운)

(72) 발명자

류명선

전라북도 완산구 중인4길 26-27

서지원

광주광역시 북구 양일로 55, 104동 1308호(연제동,
현대아파트)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	MIFI1201601
부처명	전라북도
연구관리전문기관	(재)발효미생물산업진흥원
연구사업명	향토건강식품명품화사업
연구과제명	블루베리를 활용한 건강기능성 제품의 개발
기여율	1/1
주관기관	(재)발효미생물산업진흥원
연구기간	2017.09.01 ~ 2018.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

삭제

청구항 2

삭제

청구항 3

알코올, 당 및 아황산에 대한 내성이 있고, 알코올 생성능 및 β-글루코시다제(β-glucosidase) 분비능이 있으며, 히스타민(histamine), 티라민(tyramine), 푸트레신(putrescine) 및 카다베린(cadaverine)의 바이오제닉 아민 및 우레아제를 생성하지 않는 사카로마이세스 세레비지애(*Saccharomyces cerevisiae*) BA34 균주(KCCM12243P), 이의 배양액, 상기 배양액의 농축액 또는 그의 건조물을 유효성분으로 포함하는 40~50%의 당 농도에서 알코올을 생산하기 위한 조성물.

청구항 4

제3항에 있어서, 상기 알코올은 베리류 와인인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 5

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 베리류 와인 제조를 위한 바이오제닉 아민 비생성 사카로마이세스 세레비지애 BA34 균주 및 이의 농도에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 우리나라는 고대로부터 식품의 제조에 사용되는 발효기술과 숙성기술이 발달해 왔고, 이에 따라 발효기술을 이용한 전통주도 지속적으로 개발되고 있다. 전통주는 제조방법에 따라 크게 전통 증류주와 전통 발효주로 나누어지며, 특히 전통 발효주는 첨가된 재료에 따라 맛과 향이 독특하고 각기 개성적인 기능성을 함유하고 있다.

[0003] 전통주의 발효에는 사카로마이세스(*Saccharomyces*) 속, 아스퍼질러스(*Aspergillus*) 속, 바실러스(*Bacillus*) 속, 락토바실러스(*Lactobacillus*) 속 등의 균주들이 사용되고 있는데, 최근에는 발효 재료와 더불어 이와 같은 발효 균주들이 발효과정 중에 생산하는 부산물의 효능 및 특성을 강조한 건강 기능성 발효주가 생산되고 있다.

[0004] 발효과정에서 발효 미생물들에 의해 생산되는 것 중 하나인 감마-아미노뷰티르산(γ-amino butyric acid, GABA)은 자연계에 분포하는 비단백질성 아미노산의 일종으로 뇌나 척수와 같은 중추신경계의 주된 억제성 신경전달물질(inhibitory neurotransmitter)로 알려져 있다. 뇌의 혈류를 활발하게 하고 뇌에 산소 공급량을 증가시켜 뇌세포의 대사기능을 촉진시키며, 혈액 내의 중성지방을 줄이고 간기능을 개선시키는 등의 여러 약리 활성으로 인해, 뇌동맥 휴유증에 의한 두통, 귀 울림, 의욕저하 등의 치료제에 응용되어 왔다. 또한, 고혈압과 같은 성인병 등의 예방 및 개선에 효과적인 것으로 밝혀져, 기능성 식품소재로서의 관심이 고조되고 있고 최근에는 감마-아미노뷰티르산을 다량 함유하는 음료가 출시되기도 했다.

[0005] 한편, 바이오제닉 아민(biogenic amine, BA)은 인체에서 성장조절 및 염증조절, 신경전달 등의 생리적 기능을 담당하지만, 인체의 분해 한도를 넘어서는 바이오제닉 아민을 식품을 통해서 섭취하는 경우에는 유해한 증상이 나타난다. 따라서 발효에 있어서, 발효과정 동안 바이오제닉 아민을 생산하지 않는 발효 균주의 선발이 매우 중요하다.

[0006] 와인과 같은 베리류의 알코올 발효에는 다양한 미생물들이 관여하고 있으며 복잡한 화학적 단계를 반복하면서 미생물들 간 다양한 작용을 통해 이루어진다. 많은 해외 국가에서는 와인의 제조를 위하여 사카로마이세스 세레비지에를 스타터 균주로 사용하여 와인의 품질 향상을 도모하고 있으며, 알코올 발효능이 우수하고 와인 제조 시 품질 향상에 도움이 되는 효모의 선별에 많은 노력을 기울이고 있다.

[0007] 한편, 한국등록특허 제1599271호에서는 '베리류 과실로부터 분리된 알코올을 생산하고 바이오제닉 아민을 생산하지 않는 사카로마이세스 세레비지에 BA42 균주 및 이의 용도'가 개시되어 있고, 한국등록특허 제1599270호에서는 '오디로부터 분리된 알코올을 생산하고 바이오제닉 아민을 생산하지 않는 사카로마이세스 세레비지에 BA33 균주 및 이의 용도'가 개시되어 있으나, 본 발명에서와 같이, '베리류 와인 제조를 위한 바이오제닉 아민 비생성 사카로마이세스 세레비지에 BA34 균주 및 이의 용도'에 대해서는 밝혀진 바가 전혀 없다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명은 상기와 같은 요구에 의해 도출된 것으로서, 본 발명에서는 베리류 과실로부터 알코올, 당 및 아황산에 대한 내성이 있고, 알코올 생성능 및 β-글루코시다제(β-glucosidase) 분비능이 있으며, 바이오제닉 아민 및 우레아제를 생성하지 않는 사카로마이세스 세레비지에(*Saccharomyces cerevisiae*) BA34 균주를 분리하였다.

[0009] 따라서, 본 발명의 사카로마이세스 세레비지에 BA34 균주는 와인 제조를 위한 스타터 균주 등 발효식품 관련 산업에 다양하게 사용이 가능함을 확인함으로써, 본 발명을 완성하였다.

과제의 해결 수단

[0010] 상기 과제를 해결하기 위해, 본 발명은 알코올, 당 및 아황산에 대한 내성이 있고, 알코올 생성능 및 β-글루코시다제(β-glucosidase) 분비능이 있으며, 바이오제닉 아민 및 우레아제를 생성하지 않는 사카로마이세스 세레비지에(*Saccharomyces cerevisiae*) BA34 균주(KCCM12243P)를 제공한다.

[0011] 또한, 본 발명은 상기 균주, 이의 배양액, 상기 배양액의 농축액 또는 그의 건조물을 유효성분으로 포함하는 알코올 생산용 조성물을 제공한다.

[0012] 또한, 본 발명은 상기 균주, 이의 배양액, 상기 배양액의 농축액 또는 그의 건조물을 유효성분으로 포함하는 발효식품 제조용 스타터(starter) 조성물을 제공한다.

발명의 효과

[0013] 본 발명에서는 베리류 과실로부터 분리된 사카로마이세스 세레비지에(*Saccharomyces cerevisiae*) BA34 균주가 알코올, 당 및 아황산에 대한 내성이 있고, 알코올 생성능 및 β-글루코시다제(β-glucosidase) 분비능이 있으며, 바이오제닉 아민 및 우레아제를 생성하지 않는 것을 확인하였다. 따라서, 본 발명의 사카로마이세스 세레비지에 BA34 균주를 이용하여 바이오제닉 아민이 없는 안전한 와인을 제공할 수 있으므로, 산업적으로 유용하게 이용될 수 있을 것으로 기대된다.

도면의 간단한 설명

[0014] 도 1은 본 발명에서 분리한 사카로마이세스 세레비지에(*Saccharomyces cerevisiae*) BA34 균주(KCCM12243P)의 18S rRNA 유전자 기초의 계통도를 나타낸다.

도 2는 본 발명에서 분리한 사카로마이세스 세레비지에(*Saccharomyces cerevisiae*) BA34 균주(KCCM12243P)의 에탄올, 당 및 아황산의 상이한 농도에 대한 내성을 분석한 결과이다. 상이한 농도의 에탄올, 당 및 아황산을 포함하는 YPD 배지에서 30℃, 200 rpm, 35hr 배양 후 건조 세포 중량(g/ℓ)으로 사카로마이세스 세레비지에의 저항성을 나타내었다. (A) 상이한 에탄올 농도(0%, 8%, 14%, 및 20%)에 대한 사카로마이세스 세레비지에 저항성, (B) 상이한 글루코스 농도(3%, 30%, 40%, 및 50%)에 대한 사카로마이세스 세레비지에 저항성, (C) 상이한 아황산 농도(0 ppm, 100 ppm, 200 ppm, 및 300 ppm)에 대한 사카로마이세스 세레비지에 저항성. 실험을 3 반복구로 수행한 평균값이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0015] 본 발명의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 알코올, 당 및 아황산에 대한 내성이 있고, 알코올 생성능 및 β

-글루코시다제(β -glucosidase) 분비능이 있으며, 바이오제닉 아민 및 우레아제를 생성하지 않는 사카로마이세스 세레비지에(*Saccharomyces cerevisiae*) BA34 균주(KCCM12243P)를 제공한다.

- [0016] 본 발명에 따른 사카로마이세스 세레비지에 BA34 균주는 전라북도 순창군에서 재배 및 수확한 오디, 머루, 복분자, 블루베리와 같은 각종 베리류 과실 및 엑기스로부터 분리된 균주들 중에서 알코올을 생산하고 오디 와인, 복분자 와인 및 블루베리 와인을 제조하였을 때 바이오제닉 아민을 생산하지 않으며, 알코올, 당 및 아황산에 대한 내성이 있으므로 베리류 와인 제조용 발효 균주로서 가장 적합한 균주로 선발된 것이다.
- [0017] 상기 선발된 본 발명의 BA34 균주는 18S rRNA 영역의 염기서열 분석을 실시한 결과, 사카로마이세스 세레비지에(*Saccharomyces cerevisiae*)로 동정되었다.
- [0018] 본 발명의 균주 사카로마이세스 세레비지에 BA34 균주를 한국미생물보존센터에 2018년 3월 28일자로 기탁하였다(기탁번호: KCCM12243P).
- [0019] 본 발명의 일 구현 예에 따른 균주에서, 상기 바이오제닉 아민은 히스타민(histamine), 푸트레신(putrescine), 카다베린(cadaverine), 스퍼미딘(spermidine), 스퍼민(spermine), 트립타민(tryptamine), 히세아민(hiseamine), 2-페닐에틸아민(2-phenylethylamine), 티라민(tyramine), 세로토닌(serotonin), L-노르에피네프린(L-norepinephrine) 또는 도파민(dopamine)일 수 있고, 바람직하게는 히스타민, 티라민, 푸트레신 또는 카다베린일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0020] 또한, 본 발명은 상기 균주 또는 이의 배양액을 유효성분으로 포함하는 알코올 생산용 조성물을 제공한다.
- [0021] 본 발명의 일 구현 예에 따른 조성물에서, 상기 알코올은 곡류 또는 과실류를 발효시킨 알코올일 수 있으며, 가장 바람직하게는 베리류를 발효시킨 와인일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0022] 본 발명의 균주를 배양하는 방법은 당업계에 통상적으로 이용되는 방법에 따라 배양할 수 있으며, 특별한 방법에 한정되는 것은 아니다.
- [0023] 본 발명의 균주를 배양하는 단계에서 얻어지는 상기 균주 또는 상기 균주의 배양물 또는 상기 균주의 배양액의 농축액을 첨가제로 사용할 경우, 상기 균주 또는 상기 균주의 배양물 또는 상기 균주의 배양액의 농축액을 그대로 첨가하거나 다른 첨가제를 함께 사용할 수 있으며, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다 유효 성분의 혼합량은 그의 사용 목적에 따라 적절하게 결정될 수 있다.
- [0024] 또한, 본 발명은 상기 균주, 이의 배양액, 상기 배양액의 농축액 또는 그의 건조물을 유효성분으로 포함하는 발효식품 제조용 스타터(starter) 조성물을 제공한다.
- [0025] 본 발명에 있어서, 발효식품 제조용 스타터(starter)란 발효식품 제조를 위해 발효에 관여하는 미생물을 포함하는 제제 또는 조성물을 의미한다. 발효식품 제조 시에 첨가함으로써 발효된 식품에서 성장할 수 있는 미생물 또는 우점종으로 성장할 수 있는 미생물을 제공하기 위하여 사용된다. 상기 식품 발효용 스타터를 사용하여 식품을 제조하는 경우, 상기 식품 발효용 스타터에 포함된 미생물에 의하여, 식품의 품질을 일정하게 조절하거나, 특정한 목적, 일 예로 식품에서 이취를 발생시키지 않거나, 감소시키는 목적을 달성할 수 있다. 본 발명에서는 사카로마이세스 세레비지에 BA34 균주 또는 이의 배양액을 스타터 균주로 이용함으로써, 알코올 및 β -글루코시다제(β -glucosidase)가 생성되고, 바이오제닉 아민 및 우레아제를 생성되지 않는 발효 식품을 제조할 수 있다.
- [0026] 본 발명의 일 구현 예에 따른 발효식품 제조용 스타터 조성물에서, 상기 발효식품은 곡류 또는 과실류를 발효시킨 발효주, 베리류를 발효시킨 와인, 김치, 장류 또는 발효유 등일 수 있고, 바람직하게는 베리류를 발효시킨 와인일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0028] 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.
- [0030] **재료 및 방법**
- [0031] **효모 분리 및 배양조건**
- [0032] 다양한 효모를 분리하기 위해 전라북도 순창군에서 재배 및 수확한 오디, 머루, 복분자, 블루베리와 같은 각종 베리류 과실 및 엑기스를 구매 사용하였다. 10g의 베리류 과실 및 엑기스를 균질화시킨 다음 100ml의 멸균생리 식염수에 넣어 십진법으로 희석하였고, 박테리아 성장을 억제하기 위해 100 μ g/ml의 클로람페니콜을 함유한 YPD(효모추출물 1%, 펩톤 2%, 포도당 3%) 고체배지에 도말하여 30 $^{\circ}$ C에서 2일간 배양하였다. 순수한 효모 콜로니

를 분리하기 위해, 단일 콜로니를 분리하였고, YPD 액체배지에서 30℃에서 2일간 배양하였다. 효모 균주 중 베리류 와인 발효에 적합한 바이오제닉 아민 비생성 효모를 선별하였고, 20%의 글리세롤을 포함한 YPD 액체배지에 혼합하여 4℃에서 보관하였다. 세포의 활성화는 YPD 액체배지에서 30℃, 2일간 배양하여 활성화하여 사용하였다.

[0034] **알코올 발효성 효모의 분리**

[0035] 가스 생성능은 듀람 시험을 통하여 확인하였다. 선별된 균주의 배양을 위해 효모는 YPD 액체배지에서 30℃, 24시간 동안 교반하여 배양하였다. 배양액의 2%는 20%의 포도당을 함유한 5ml의 YPD 액체배지를 함유한 듀람관에 접종하였다. 이후 교반 없이 30℃에서 모든 듀람 시험관은 48시간 동안 배양하고, 48시간 후 가스 생성여부를 확인하여 1차 선별하였고 1차 선별 효모들을 20% 포도당이 함유된 YPD에 접종하여 48시간 배양후 배양액을 원심 분리하여 배양 상등액을 취해 0.45 μm 시린지 필터를 이용하여 필터한 뒤 표 1에 따른 조건에 따라 HPLC를 이용해 알코올 생성능을 분석하였다.

표 1

[0036] 바이오제닉 아민, 글루코스 및 에탄올 검출에 사용된 HPLC 분석 조건

바이오제닉 아민 검출에 사용된 HPLC 분석 조건	
Instrument	Agilent 1200 series (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA)
Column	CapcellPak C18 Column
Detector	DAD detector (254 nm)
Mobile phase	A: 0.1% formic acid in H ₂ O B: 0.1% formic acid in ACN
Gradient condition	A:B = 45:55, 0~10 min
	A:B = 35:65, 10~15 min
	A:B = 20:80, 15~20 min
	A:B = 10:90, 20~30 min
	A:B = 10:90, 40 min over
Flow rate	1.0 mL/min
Temperature	40℃
Injection volume	20 μL
글루코스 및 에탄올 검출에 사용된 HPLC 분석 조건	
Instrument	Agilent 1200 series (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA)
Column	Aminex HPX 87H column, 300 X 7.8 mm (Bio-Rad, Hercules, CA, USA)
Detector	RID detector
Eluant	5 mM Sulfuric acid in H ₂ O
Flow rate	0.6 mL/min
Temperature	65℃
Injection volume	10 μL

[0038] **바이오제닉 아민 생성 여부 확인**

[0039] 선별 분리주의 바이오제닉 아민 생성 여부 조사는 YPD 액체배지에 각 분리주를 접종한 후 30℃ 웨이킹 인큐베이터 150 rpm에서 24시간 전배양 후 배양액 1 ml을 티라민, 히스타민, 퓨트레이신, 카다베린의 전구체 아미노산인 티로신, 히스티딘, 아르기닌, 리신이 0.1% 포함된 YPD 액체배지 9ml에 접종하고 30℃ 웨이킹 인큐베이터 150rpm에서 48시간 동안 본배양하였다. 본배양액은 13,000rpm에서 30분간 원심분리하여 균체를 제거하고, 균체가 제거된 배양 상등액과 베리류를 이용해 제조한 와인을 바이오제닉 아민 분석을 위한 시료로 사용하였다. 시료 용액과 표준 용액을 각각 0.5 ml 취한 후 0.25 ml 1,7-디아미노헵탄(Sigma-aldrich) 및 0.25 ml 포화 Na₂CO₃ 용액(Sigma-aldrich), 1% 아세톤 (Sigma-aldrich), 0.4 ml 단실 클로라이드(Sigma-aldrich)을 혼합한 후 45℃에서 1시간 동안 유도체화하였다. 유도체화 한 시료에 0.25 ml의 10% 프롤린(Sigma-aldrich)을 가한 후 잔량의 단실 클로라이드를 제거한 뒤 2.5 ml의 에틸에테르 (Samchun, Seoul, Korea)를 가하여 3분간 진탕한 후, 분리된 상등액을 취하여 증발시키고 남은 잔사를 0.5 ml 아세트니트릴에 정용하여 0.45 μm 시린지 필터 (Sartorius)로 여과

하여 분석에 사용하였다. 바이오제닉 아민 분석을 위한 기기 분석 조건은 표 1과 같다.

[0041] **우레아제 생성여부확인**

[0042] 유해효소인 우레아제(urease)의 생성여부는 우레아 신속 테스트 키트(MB cell, Korea)를 이용하여 확인하였다. 우레아 신속 테스트 키트에 선별 균주를 접종하고 바세린 오일(vaseline oil)을 첨가하여 산소가 차단된 상태로 37°C에서 24시간동안 배양하였고 4시간 간격으로 색변화를 관찰하여 우레아제 생성여부를 확인하였다.

[0044] **β-글루코시다제 효소활성**

[0045] β-글루코시다제(β-glucosidase) 효소활성을 분석하기 위해 1.0% 에스쿨린(esculin)과 0.5% 페릭 암모늄 시트레이트(ferric ammonium citrate)를 첨가하여 제조한 락토바실리 MRS 아가 플레이트에 분리주를 접종하여 37°C에서 24시간 배양한 후 콜로니 주변에 생기는 검정색 투명환의 유무에 따라 β-글루코시다제 효소활성을 조사하였다.

[0047] **효모의 동정 및 계통수 작성**

[0048] 최종적으로 선별 균주 중에서 베리류 와인 발효에 적합한 효모 BA34를 선별하였으며, 선별 균주를 동정하기 위해 DNA를 추출하여 18S rRNA 유전자를 분석하여 Cosmogene tech.에 의뢰하여 동정하였다. 염기서열은 ExTaxone-e 서버(<http://www.eztaxon.org>)를 통해 표준 균주의 염기서열을 확보하여 MEGA 6.0 프로그램을 사용하여 염기서열간 상호 비교 후 계통도를 작성하였다. 계통도는 Neighbor-joining 알고리즘을 사용하였으며, 1,000회 반복으로 부트스트랩(bootstrapping)하여 작성한 계통도의 견고성을 확인하였다.

[0050] **알코올 내성, 당내성, 아황산 내성 조사**

[0051] 사카로마이세스 세레비지에 BA34의 알코올 내성을 조사하기 위하여 0, 8, 14, 20%의 무수에탄올을 YPD 액체배지에 효모를 접종한 후 바로 첨가하였다. 건조 균체량은 30°C에서 72시간동안 배양하여 조사하였다. 당내성은 3, 30, 40, 50%의 포도당을 함유한 YPD 액체배지에 30°C에서 48시간 동안 효모를 배양한 후 건조 균체량을 측정하여 조사하였다. 아황산 내성은 100, 200, 300 ppm의 메타중아황산칼륨을 첨가한 YPD 액체배지에서 30°C에서 48시간동안 배양하여 건조 균체량을 측정하였다.

[0053] **베리류를 이용한 와인 제조**

[0054] 베리를 와인을 제조하기 위해 YPD 액체배지에 선별한 효모를 접종하여 30°C 웨이킹 인큐베이터에서 150rpm, 24시간 배양하였고, 배양액은 13,000rpm에서 20분간 원심분리 하였다. 분리된 균체를 멸균 증류수에 3회 세척하여 베리류 와인 제조를 위한 스타터로 사용하였다. 베리류 발효액은 오디, 복분자, 블루베리 과실을 각각 분쇄하여 여과지로 여과한 원액에 백설탕을 첨가하여 당도를 12° Brix가 되도록 조정한 후 살균한 것을 사용하였다. 이에 앞서 배양한 효모 2%(v/v)를 접종하고 30°C 웨이킹 인큐베이터에서 150rpm으로 48시간 동안 진탕 배양한 발효액을 주모로 사용하였다. 베리류 와인의 제조는 백설탕을 첨가하여 22° Brix로 조정한 후 멸균한 과실액에 주모를 2%(v/v) 접종한 다음 25~30°C에서 5일간 발효하고, 7일간 숙성기간을 거쳐 제조하였다.

[0056] **실시예 1. 베리류 과실로부터 효모의 분리**

[0057] 본 발명에서는 효모 균주의 분리를 위하여 베리류 과실 및 액기스로부터 효모 분리주를 선별하였고, 선별 분리주는 다음 연구의 진행을 위해 -20°C에 보관한 뒤 다음 연구에 이용하였다.

[0059] **실시예 2. 가스 및 알코올 생성능을 갖는 효모의 선별**

[0060] 선별 분리주를 대상으로 실험을 진행하였으며, 듀람 시험관에서의 가스 형성은 30°C 정치 배양기에서 48시간 동안 배양한 후 관찰하였다. 모든 배양 상등액을 이용하여 가스 형성 여부를 조사하였고, 가스를 형성하는 균주를 1차로 선별하였다. 그러나 보고에 따르면 대부분의 효모들은 식별 가능한 가스 형성능 없이도 알코올을 생성하는 역할을 수행하기 때문에 추가적으로 HPLC 분석을 통하여 알코올 생성 여부를 조사하였고, 그 결과 최종적으로 5% 이상의 알코올 생성능을 갖는 7개의 효모를 2차 선별하였다(표 2).

표 2

[0061] 24% 글루코스를 포함하는 YPD 액체 배지에서 선발된 균주의 에탄올 함량

균주	에탄올 함량(%)
시판효모(과실주)	10.28 ± 0.01
시판효모(곡주)	10.52 ± 0.05

BBA 03	8.78 ± 0.01
BBA 19	5.87 ± 0.01
BBA 23	9.65 ± 0.03
BA34	12.63 ± 0.05
BBA 46	8.63 ± 0.03
BBA 88	5.06 ± 0.01
BBA 91	6.06 ± 0.03

[0063] 실시예 3. 바이오제닉 아민 비생성 효모의 선별

[0064] 앞서 1차로 선별한 효모를 대상으로 바이오제닉 아민 전구체가 포함된 액체배지에서 바이오제닉 아민 생성여부를 조사하였고, 2차로 베리류를 이용해 와인을 제조한 후 히스타민, 티라민, 푸트레신과 카다베린 함량을 조사하였다. 대조구로는 앞서 알려진 바와 같이 베리류 과실 자체에 존재하는 바이오제닉 아민의 검출 가능성을 고려하여 베리류의 착즙액을 사용하였고, 베리류 와인을 제조하여 선별 효모에 의한 바이오제닉 아민의 생성여부를 확인하였다. 결과는 Vasantha Rupasinghe와 Clegg의 결과와 동일하게 과실 자체에도 히스타민이 존재하고 있음을 확인하였고, 결과는 표 3과 같으며, 베리류 착즙액 자체에서 뿐만 아니라 일부 균주에 의해 바이오제닉 아민이 검출되었으나 대부분 정량되지 않거나 미비한 수치를 나타내었고, BA34의 경우 베리류를 이용해 제조한 와인에서 4종의 바이오제닉 아민이 모두 검출되지 않았으므로 베리류를 이용한 와인 제조에 적합한 균주로 선정하였다.

표 3

선발 균주를 이용한 다양한 베리로 제조된 와인에서 바이오제닉 아민 함량

바이오제닉 아민		균주 번호								
		Control ^a	BBA 03	BBA 19	BBA 23	BA 34	BBA 46	BBA 88	BBA 91	
YPD 배지에서 0.1% 전구체	티라민	N.D. ^b	5.3±0.05	N.Q. ^c	N.D.	N.D.	7.8±0.03	N.Q.	N.Q.	
	히스타민	0.2±0.01	N.Q.	N.Q.	5.9±0.03	N.D.	N.D.	12.6±0.02	N.Q.	
	푸트레신	N.D.	N.D.	3.0±0.06	22.2±0.01	N.D.	N.Q.	N.D.	31.8±0.01	
	카다베린	N.Q.	N.D.	N.Q.	N.D.	N.D.	N.Q.	4.9±0.04	N.Q.	
와인	오디 (Mulberry)	티라민	N.D. ^b	1.6±0.03	3.6±0.03	N.D.	N.D.	5.5±0.05	N.Q.	N.Q.
		히스타민	2.8±0.01	3.2±0.05	N.Q.	7.9±0.02	N.D.	N.D.	N.Q.	4.6±0.07
		푸트레신	N.D.	N.D.	N.Q.	1.8±0.03	N.D.	2.1±0.05	N.D.	31.8±0.01
		카다베린	1.5±0.01	N.D.	N.Q.	N.D.	N.D.	N.Q.	2.1±0.05	N.Q.
	블루베리 (Blueberry)	티라민	N.D.	N.Q.	N.Q.	N.D.	N.D.	1.5±0.04	N.Q.	N.Q.
		히스타민	N.Q.	5.8±0.02	N.Q.	0.3±0.01	N.D.	N.D.	N.Q.	N.Q.
		푸트레신	N.D.	N.D.	N.Q.	N.Q.	N.D.	9.2±0.02	N.D.	N.Q.
		카다베린	N.Q.	N.D.	N.Q.	N.D.	N.D.	N.Q.	3.8±0.01	N.Q.
	복분자 (Black raspberry)	티라민	N.D.	N.Q.	N.Q.	N.D.	N.D.	N.Q.	N.Q.	N.Q.
		히스타민	4.2±0.01	6.8±0.06	N.Q.	N.D.	N.D.	N.D.	4.1±0.01	N.Q.
		푸트레신	N.D.	N.D.	N.Q.	N.Q.	N.D.	N.Q.	N.D.	N.Q.
		카다베린	2.7±0.02	N.D.	N.Q.	N.D.	N.D.	N.Q.	N.Q.	N.Q.

[0065]

[0066] 결과는 3번 측정하였으며 표준편차로 표기하였음

[0067] ^a 대조구로써 착즙액 자체 또는 전구체만 들어있는 YPD 액체배지

[0068] ^b N.D. - 검출되지 않음

[0069] ^c N.Q. - 정량되지 않음

[0071] **실시예 4. 베리류 와인의 알코올 함량 분석**

[0072] 사카로마이세스 세레비지에로 동정된 BBA03, BBA19, BBA23, BA34, BBA46, BBA88, BBA91의 7개의 균주를 이용하여 베리류 와인을 제조해 알코올 함량을 분석한 결과는 표 4와 같다. 오디 및 블루베리, 복분자 원액에 균주를 접종하지 않은 대조구에서는 에탄올 검출이 되지 않았으며, 오디 와인의 경우 대조구로 접종한 시판효모(곡주)가 18.82%로 가장 높게 나타났고, 선별 균주 중에서는 BBA23 균주를 접종하여 제조한 와인에서 알코올 함량 17.01%로 가장 높게 나타났다. 블루베리 와인에서는 대조구로 접종한 시판효모 2종보다 선별한 BBA03을 제외한 6종의 균주가 더 높게 나타났다. 복분자 와인의 경우 BA34이 18.68%로 대조구를 포함한 선별균주 중 가장 높은 함량을 나타냈다. 블루베리 와인의 경우 오디 및 복분자와 달리 모두 5% 이상의 알코올 함량을 나타내긴 하였으나 원 재료인 블루베리의 높은 산도로 인하여 효모 균주 자체가 생육을 하는 데는 어려움을 갖고 있으며, 이로 인하여 선별 효모의 당 소비에 의한 알코올의 생성이 저조한 것으로 사료된다.

표 4

[0073] 선별 균주를 이용한 다양한 베리로 제조된 와인에서 에탄올 함량

균주	에탄올 함량(%)		
	오디	블루베리	복분자
대조구	N.D.	N.D.	N.D.
시판효모(과실주)	18.33 ± 0.05	5.68 ± 0.03	17.54 ± 0.02
시판효모(곡주)	18.82 ± 0.03	5.39 ± 0.01	15.55 ± 0.01
BBA 03	15.55 ± 0.01	4.79 ± 0.01	15.01 ± 0.02
BBA 19	16.37 ± 0.01	6.96 ± 0.05	13.82 ± 0.05
BBA 23	17.01 ± 0.03	7.43 ± 0.05	17.49 ± 0.01
BA 34	16.59 ± 0.01	7.94 ± 0.05	18.68 ± 0.01
BBA 46	16.79 ± 0.01	8.62 ± 0.01	15.27 ± 0.02
BBA 88	15.25 ± 0.01	7.08 ± 0.01	13.03 ± 0.05
BBA 91	15.48 ± 0.05	7.21 ± 0.03	13.72 ± 0.05

[0075] **실시예 5. 우레아제(Urease) 생성여부 확인**

[0076] 세포손상을 주는 기전으로 헬리코박터 파일로리(*Helicobacter pylori*) 감염 시 우레아제에 의해 생성되는 암모니아(ammonia)에 의해 세포 손상이 생기고, Vac A에 의해 상피세포의 공포화가 발생하는데 호중구에서 분비된 염증매개물질과 활성 산소화물에 의해서도 세포가 손상된다. 상피세포의 손상은 세포의 위축성 변화를 일으키고 세포손상에 대한 보상기전으로 세포증식이 증가하며 활발하게 증식하는 세포는 발암물에 의하여 유전자가 손상을 받을 기회가 많아진다. 따라서 우레아제 생성 여부를 확인하기 위한 실험을 진행하였고, 측정결과 BBA19, BA34, BBA46, BBA91 균주에서 우레아제가 생성되지 않음을 확인하였다(표 5).

표 5

[0077] 선발된 효모 균주에 대한 우레아제 활성 비교

균주	우레아제 활성
BBA 03	+
BBA 19	-
BBA 23	+
BA34	-
BBA 46	-
BBA 88	+
BBA 91	-

[0079] **실시예 6. β-글루코시다제 효소활성**

[0080] β-글루코시다제(β-glucosidase)는 비배당체의 형성과 이소플라본 배당체의 가수분해에 필요한 촉매작용을 한다고 알려져 있다. β-글루코시다제를 생산하는 미생물로는 아스퍼질러스 나이거(*Aspergillus niger*), 트라이코더마 레제이(*Trichoderma reesei*), 푸사리움 옥시스포룸(*Fusarium oxysporum*) 등의 곰팡이와 사카로마이세스 세레비지애(*Saccharomyces cerevisiae*), 스키흐사카로마이세스 폼베(*Schizosaccharomyces pombe*) 등의 효모 그리고 토양세균으로 스트렙토마이세스 레티쿨리(*Streptomyces reticuli*), 바실러스 서틸리스(*Bacillus subtilis*), 바실러스 폴리믹사(*Bacillus polymyxa*), 바실러스 서큘란스(*Bacillus circulans*), 아그로박테리움 튜머파시엔스(*Agrobacterium tumefaciens*), 셀룰로모나스 종(*Cellulomonas* sp.) CS1-1 및 초고온성 고세균인 피로코커스 푸리오수스(*Pyrococcus furiosus*) 등 다양한 계통군에 속하는 균주들이 알려져 있고, 이들이 생산하는 β-글루코시다제에 대한 효소학적 특성과 유전자도 다수 밝혀졌다. 진통발효식품에 주로 존재하는 대두 이소플라본 배당체인 제니스틴과 다이드진의 체내 흡수를 위해 비배당체 형태로 전환하는 생물전환 공정에 활용가능성을 갖는 β-글루코시다제 활성 확인 결과 BA34 균주의 경우 β-글루코시다제의 활성이 우수한 것으로 확인되었다(표 6).

표 6

[0081] 선발된 효모 균주에 대한 β-글루코시다제 활성 비교

균주	β-글루코시다제 활성
BBA 03	++
BBA 19	-
BBA 23	+
BA34	+++
BBA 46	+
BBA 88	++
BBA 91	+

[0083] 실시예 7. 효모의 동정 및 계통수 작성

[0084] 선별 균주 BA34의 동정을 위해 ITS1과 ITS4 프라이머를 이용해 유전자를 증폭하여 18S rRNA 유전자 염기서열을 분석하였다. 분석한 결과를 GenBank에서 BLAST 결과 사카로마이세스 세레비지애(*S. cerevisiae*)로 판명되었으며, 염기서열은 서열번호 1과 같다. 염기서열을 이용하여 SeqMatch program에서 상동성 높은 표준균주와 상호비교를 실시하였다. 18S rRNA 유전자 염기서열을 토대로 하여 계통수를 작성하여 계통수를 분석하였고(도 1), 최종적으로 사카로마이세스 세레비지애 BA34로 명명하였다. 최종 선별균주인 BA34는 한국미생물보존센터(KCCM, Korean Culture Center of Microorganisms)에 사카로마이세스 세레비지애 KCCM12243P로 기탁하였다.

[0086] 실시예 8. 선별 균주의 알코올 내성, 당 내성 및 아황산 내성

[0087] 사카로마이세스 세레비지애 균주의 종균 배양은 아로마틱 향기 성분의 생산과 아황산 및 알코올 내성의 증가로 인해 일반적으로 사용된다. 따라서, 알코올, 당, 아황산 저항성은 포도 와인의 제조시 고농도의 포도당과 알코올, 아황산이 첨가됨으로 와인 제조를 위한 효모로써는 필수적인 요소이다. 따라서, 알코올, 당, 아황산 내성은 베리류를 이용한 와인 제조를 위한 효모로써의 가능성을 확인하기 위하여 선별한 균주의 내성을 조사하였다.

[0088] BA34의 알코올 내성의 조사를 위하여 무수 에탄올을 0, 8, 14, 20%를 일반 효모 배양 배지인 YPD 액체배지에 첨가하여 건조 균체량을 조사하여 내성여부를 확인하였다. 건조 균체량은 도 2A와 같으며 8%를 첨가한 실험구에서는 대조구(6.63 g/l)에 비하여 2.78 g/l로 감소하였으며, 고농도 첨가구에서는 거의 성장하지 못하였다. 이는 초기 포도당과 알코올의 농도가 높을 경우 최종 바이오매스 농도는 낮다는 선행 연구 결과와 유사한 결과를 확인하였다. 하지만 알코올 내성에 대한 다른 문헌들과 비교하여 보아도 8% 이상의 농도에서는 잘 성장하지 못하므로 다른 연구 결과들과는 큰 차이를 보이지는 않았다.

[0089] 당 내성은 도 2B와 같으며, 일반 효모 배양 배지인 YPD의 균체량(6.04 g/L)과 비교하여 30%의 포도당을 첨가한 실험구에서 10.13 g/l로 크게 증가하였다. 앞선 Calado 등(2003)과 Kim 등이 제시한 4% 이상의 당이 첨가되었을 경우 균체량 및 알코올 생성능이 낮다는 결과와 다른 결과를 보였다. 반면, 40%와 50%의 포도당이 첨가된 실험구에서는 9.16 g/l와 8.99 g/l로 감소하였으나 고농도의 포도당이 첨가된 실험구의 경우에서도 성장에는 많은 영향을 받지 않는다는 것을 확인하였다. 하지만 포도당의 첨가 비율이 증가할수록 균체 성장률이 감소한 것은 바이오매스 생산량 감소와 당의 고농도 첨가에 따른 배양 배지에서의 물 순환에 어려움으로 인한 결

과 건조 균체량 또한 감소한 것으로 분석되었다.

[0090]

아황산은 식품 및 음료와 약품의 보존의 용도로 첨가되는 물질로써, 산화 방지 및 항균효과와 갈변효과 방지 등의 효과로 인해 이용되는 물질이다. 따라서, 와인 제조시 산화 방지와 선택적 유해 미생물 억제능을 위하여 사용이 된다. 따라서 효모는 와인제조를 위해서는 아황산 내성을 가질 필요성이 있다. 현재 국내 식품 규격상 350 mg/l의 첨가 허용 규격에 맞추어 100, 200, 300 ppm의 아황산을 첨가하여 내성을 조사한 결과는 도 2C와 같으며, 아황산 첨가에 따라 BA34는 대조구인 6.04 g/l에 비교하여 4.64 g/l, 4.11 g/l, 4.52 g/l로 약간의 감소의 경향을 보이긴 하였으나, 큰 영향을 받지 않아 베리류 와인제조를 위한 효모로 사용이 가능함을 확인할 수 있었다.

수탁번호

[0091]

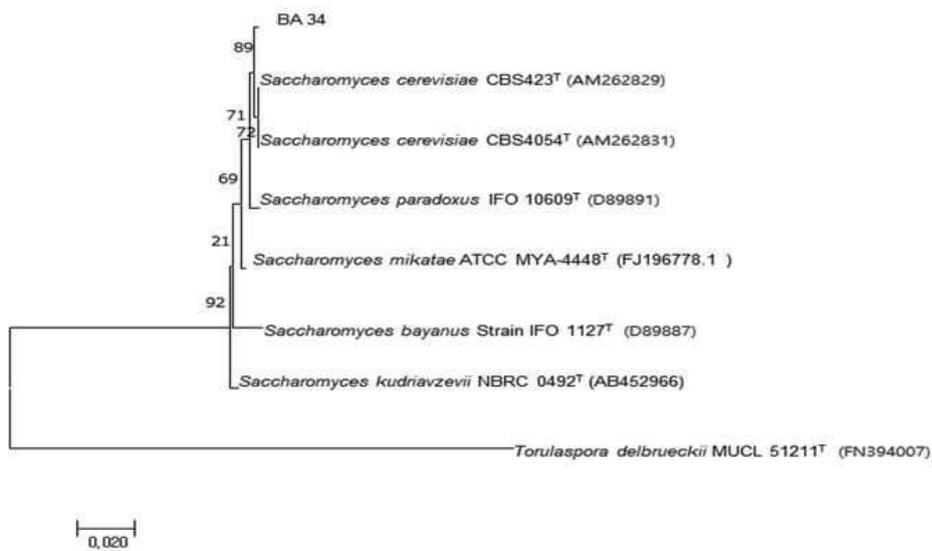
기탁기관명 : 한국미생물보존센터(국외)

수탁번호 : KCCM12243P

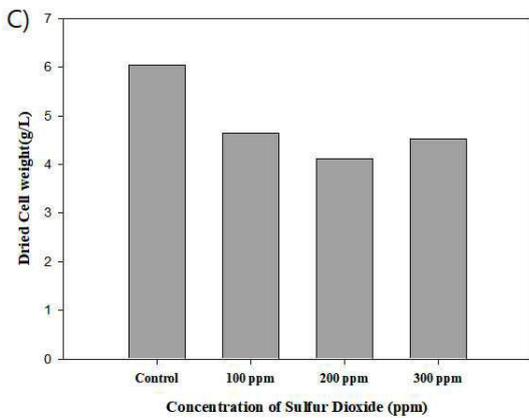
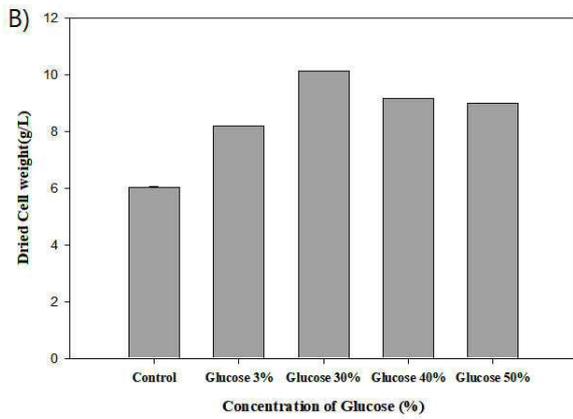
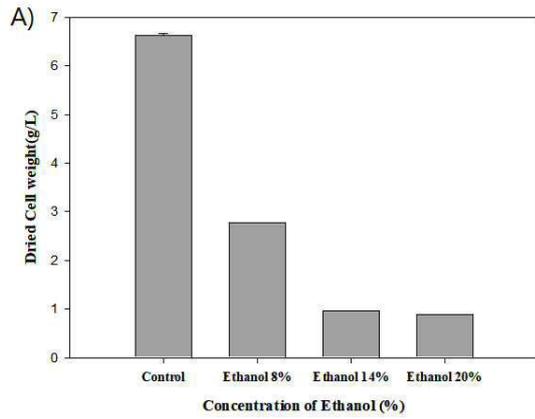
수탁일자 : 20180328

도면

도면1



도면2



서열목록

- <110> Microbial Institute for Fermentation Industry
- <120> Saccharomyces cerevisiae BA34 strain for manufacturing the wine using various berries and not producing biogenic amine and uses thereof
- <130> PN18147
- <160> 1
- <170> KopatentIn 2.0

<210> 1
 <211> 813
 <212> DNA
 <213> Saccharomyces cerevisiae
 <400> 1

ggaagatca ttaagaaat ttaataattt tgaatgga tttttttgt tttggcaaga 60
 gcatgagagc tttactggg caagaagaca agagatggag agtccagccg gcctgcgct 120

taagtgcgcg gtcttgctag gcttgtaagt ttctttcttg ctattccaaa cggtagagaga 180
 tttctgtgct ttgttatag gacaattaa accgtttcaa tacaacacac tgtggagttt 240
 tcatatcttt gcaacttttt ctttgggcat tcgagcaatc ggggccaga gtaacaaac 300
 acaacaatt ttattttatc attaaatttt tgcacaaaac aagaattttc gtaactggaa 360
 attttaaat attaaaaact ttcaacaacg gatctcttgg ttctcgcatc gatgaagaac 420
 gcagcgaat gcgatacgtg atgtgaattg cagaattccg tgaatcatcg aatctttgaa 480
 cgcacattgc gcccttggg attccagggg gcatgcctgt ttgagcgtca tttccttctc 540

aaacattctg ttggtagtg agtgatactc ttggagtta acttgaaatt gctggccttt 600
 tcattggatg ttttttttc caaagagagg ttctctgctg tgcttgaggt ataagcaag 660
 tacggtcggt ttaggtttta ccaactgcgg ctaatctttt ttatctgag cgtattggaa 720
 cgttatcgat aagaagagag cgtctaggcg aacaatgttc ttaaagtttg acctcaaatc 780
 aggtaggagt acccctgaa cttaagcata tca 813