



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2020년11월10일
(11) 등록번호 10-2177262
(24) 등록일자 2020년11월04일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 1/16 (2006.01) A21D 8/04 (2017.01)
C12R 1/645 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 1/16 (2013.01)
A21D 8/047 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2019-0037201
(22) 출원일자 2019년03월29일
심사청구일자 2019년03월29일
(65) 공개번호 10-2020-0114829
(43) 공개일자 2020년10월07일
(56) 선행기술조사문헌
KR101453837 B1*
KR1020190014344 A*
KR1020180134621 A
KR1020170120976 A
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
단국대학교 천안캠퍼스 산학협력단
충청남도 천안시 동남구 단대로 119, 단국대학교천안캠퍼스내(안서동)
(72) 발명자
노재영
충청남도 천안시 서북구 불당25로 8, 301동 201호(불당동, 불당호반써밋플레이스 센터시티)
(74) 대리인
특허법인아이엠

전체 청구항 수 : 총 6 항

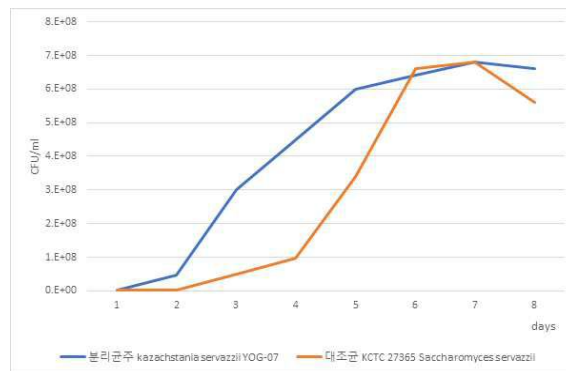
심사관 : 문동현

(54) 발명의 명칭 **저온 내성을 갖는 카자흐스타니아 세르바찌 YOG-07 균주 및 이의 용도**

(57) 요약

본 발명은 효모계 미생물에 대한 것으로, 보다 구체적으로는 저온에서도 생장성이 우수하고, 알콜류 생산능이 저온에서도 유지되는 저온 내성을 갖는 카자흐스타니아 세르바찌(*kazachstania servazzii*)YOG-07 균주 및 이를 포함하는 발효빵반죽재료에 혼합시켜 발효하는 발효반죽의 제조방법에 관한 것이다.

대표도 - 도3



(52) CPC특허분류
A23V 2002/00 (2013.01)
C12R 1/645 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	C0564805
부처명	중소벤처기업부
과제관리(전문)기관명	중소기업기술정보진흥원
연구사업명	첫걸음 협력
연구과제명	고효율 생물전환 효모 및 유산균 개발
기 여 율	1/1
과제수행기관명	엠피엘
연구기간	2017.12.01 ~ 2018.11.30

명세서

청구범위

청구항 1

15℃ 미만의 저온 생장에 내성이 있어, 10℃에서 배양시 2일 이내에 증식을 시작하여 배양 4일에는 최초 균수의 200배 이상 증식되면서 이산화탄소를 발생시키는 것을 특징으로 하는 카자흐스탄리아 세르바찌(*kazachstania servazzii*) YOG-07 균주(KACC 93312P).

청구항 2

삭제

청구항 3

삭제

청구항 4

제 1 항의 카자흐스탄리아 세르바찌(*kazachstania servazzii*) YOG-07 균주(KACC 93312P) 및 상기 카자흐스탄리아 세르바찌(*kazachstania servazzii*)YOG-07 균주(KACC 93312P)의 배양액 중 하나 이상을 포함하는 생균제조성물.

청구항 5

제 1 항의 카자흐스탄리아 세르바찌(*kazachstania servazzii*) YOG-07 균주(KACC 93312P)를 반죽재료에 혼합시켜 15℃ 미만의 온도조건에서 발효하는 단계를 포함하는 발효반죽의 제조방법.

청구항 6

제 5 항의 제조방법으로 제조된 천연효모발효반죽.

청구항 7

제 6 항에 있어서,

상기 발효반죽은 15℃의 미만의 온도조건에서 보관되는 것을 특징으로 하는 발효반죽.

청구항 8

제 6 항 또는 제 7항의 발효반죽을 성형하여 오븐에 구워서 얻어지는 천연효모발효빵.

발명의 설명

기술분야

[0001] 본 발명은 효모계 미생물에 대한 것으로, 보다 구체적으로는 저온에서도 성장성이 우수하고, 우수한 팽창능 물론 알콜류 생산능이 저온에서도 유지되는 카자흐스탄리아 세르바찌(*kazachstania servazzii*)YOG-07 균주 및 이

를 포함하는 발효빵반죽재료에 혼합시켜 발효하는 발효반죽의 제조방법에 관한 것이다.

배경 기술

- [0002] 효모는 진핵세포로 주조, 식품, 의약, 사료, 화장품 등의 분야에 사용되는 발효 미생물이다. 효모는 기원전부터 이미 술이나 빵의 발효에 이용되어 왔는데, 사카로미세스 세레비지에(Saccharomyces cerevisiae)는 자낭균류에 속하는 대표적인 효모로 빵효모(baker's yeast)나 맥주효모(brewery yeast)등 양조에 사용하는 효모는 대부분 이 사카로미세스 세레비지에(Saccharomyces cerevisiae)이다. 효모는 당으로부터 알코올과 탄산가스를 생성시키고 깊은 풍미를 내게 하는 중요한 역할을 하며 균주에 따라 생리활성이 다르기 때문에 균주마다 서로 다른 고유한 풍미를 나타낸다.
- [0003] 발효 균주에 의한 고유의 풍미가 가장 대표적으로 발현되는 것은 술과 빵이다. 발효주의 발효능과 발효에 따른 향미성분은 품질에 영향을 주는 요소로서 발효 효모에 의해서 대부분 결정된다. 최근 소비자의 기호가 다양해지면서, 소비자의 취향이 다변화되고 있을 뿐만 아니라 웰빙에 대한 관심이 높아지면서 발효식품에 대한 관심도 증가하고 있다. 이와 같은 추세에 부응하기 위해서 다양한 효모가 개발되고 있는데, 효모의 개발은 크게 2가지 방법이 있다, 그 중 하나는 유전공학적인 방법에 의한 새로운 균주의 개발이고, 다른 하나는 자연계로부터 새로운 효모를 분리하는 방법이 있다.
- [0004] 전자의 경우에는 이미 알려져 있는 효모를 이용하는 방법이지만, 후자의 경우에는 야생효모이기 때문에 우리가 예측할 수 없는 우수한 능력을 갖추고 있는 효모가 존재할 수도 있고 실제로 주류를 포함한 식품에 많이 이용되고 있다. 주류에 대한 일례로 한국등록특허 제1284263호는 키위 껍질에서 분리된 사카로미세스 세레비지에의 신균주를 이용해 포도주를 제조하는 방법에 대해 개시되어 있으며, 한국등록특허 제1199544호, 제1199545호, 및 제1166489호는 전통누룩에서 분리된 사카로미세스 세레비지에의 신균주를 이용한 발효주에 대해 개시하고 있다. 또한 제빵용 효모에 대한 일례로 한국등록특허 제1074340호는 유기농 거봉에서 분리하고 유기농 거봉 함유 배지에서 배양한 사카로미세스 세레비지에의 신균주를 이용한 빵 반죽 및 빵의 제조방법에 대해 개시하고 있으며, 한국등록특허 제1410244호는 유기농 굴에서 분리된 사카로미세스 세레비지에의 신균주를 함유하거나 신균주 및 신균주를 과쇄하여 얻은 세포벽 분획물을 함유하는 제빵용 반죽에 대해 개시하고 있다.
- [0005] 자연환경에 따라 서로 다른 맛과 풍미를 지닌 효모가 존재하는데, 대부분의 선행특허는 상기한 선행특허들과 마찬가지로 식품 적용에 있어 한 가지의 활용성을 갖는 사카로미세스 세레비지에(Saccharomyces cerevisiae) 신균주에 대해 개시하고 있다. 더욱이, 요즘 국내에서 사용되는 효모종은 대부분 외국의 상업효모에 의존하고 있어 맛과 풍미에 있어 다양성이 부족하고 수입에 따른 경제적인 부담이 있다. 그리고 사용 효모 종이 대부분 사카로미세스 세레비지에(Saccharomyces cerevisiae)로 신규 제빵효모의 개발이 필요하다
- [0006] 따라서 세계 몇몇 회사들이 독점적으로 공급하고 있는 상업효모 의존하지 않고 보다 다변화된 소비자의 기호를 충족시킬 수 있으면서 하나의 효모로 다양한 식품에 적용할 수 있어 경제성이 뛰어난 토종효모 개발이 요구된다.

선행기술문헌

특허문헌

- [0007] (특허문헌 0001) 대한민국 등록특허번호 제10-1284263호
(특허문헌 0002) 대한민국 등록특허번호 제10-1199545호

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0008] 본 발명자들은 15℃ 미만의 저온에서 성장성, 발효 팽창능 및 에탄올 발효능이 우수한 특성을 나타내는 신균주 효모를 분리함으로써 본 발명을 완성하였다.
- [0009] 따라서, 본 발명의 목적은 상온에서는 물론 저온 내성을 통해 15℃ 미만의 저온에서도 우수한 성장성, 발효 팽창능 및 에탄올 발효능을 나타내는 토종 신균주인 카자흐스타니아 세르바찌 YOG-07 균주를 제공하는 것이다.

[0010] 본 발명의 다른 목적은 카자흐스탄리아 세르바찌 YOG-07 균주를 포함함으로써 저온발효가 가능하여 저온에서 대부분의 병원성 미생물의 증식을 억제하고 저온 성장 유익균인 효모균 즉 카자흐스탄리아 세르바찌 YOG-07 균주만 선택적으로 자라게 할 수 있어, 상온은 물론 저온에서도 기존 균주보다 발효 팽창능 및 에탄올 발효능이 우수한 특성을 이용하여 생균제조성물, 천연발효반죽 및 천연발효빵 등의 다양한 응용제품을 제공하는 것이다.

[0011] 본 발명의 목적들은 이상에서 언급한 목적들로 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 목적들은 아래의 기재로부터 당업자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

과제의 해결 수단

[0012] 상술된 본 발명의 목적을 달성하기 위해, 본 발명은 15℃ 미만의 저온 생장에 내성이 있는 카자흐스탄리아 세르바찌(*kazachstania servazzii*) YOG-07 균주(KACC 93312P)를 제공한다.

[0013] 바람직한 실시예에 있어서, 상기 균주는 10℃에서 5일 생장시 3%의 에틸알코올 생산능을 갖고, 30℃에서 5일 생장시 6%의 에틸알코올 생산능을 갖는다.

[0014] 바람직한 실시예에 있어서, 상기 균주는 10℃에서 4일 생장시 이산화탄소를 발생시키고, 30℃에서 생장시 접촉 6시간부터 이산화탄소를 발생시킨다.

[0015] 또한, 본 발명은 상술된 어느 하나의 카자흐스탄리아 세르바찌(*kazachstania servazzii*) YOG-07 균주(KACC 93312P) 및 상기 카자흐스탄리아 세르바찌(*kazachstania servazzii*) YOG-07 균주(KACC 93312P)의 배양액 중 하나 이상을 포함하는 생균제조성물을 제공한다.

[0016] 또한, 본 발명은 카자흐스탄리아 세르바찌(*kazachstania servazzii*) YOG-07 균주(KACC 93312P)를 반죽재료에 혼합시켜 15℃ 미만의 온도조건에서 발효하는 단계를 포함하는 발효반죽의 제조방법을 제공한다.

[0017] 또한, 본 발명은 상술된 제조방법으로 제조된 천연효모발효반죽을 제공한다.

[0018] 바람직한 실시예에 있어서, 상기 발효반죽은 15℃의 미만의 온도조건에서 보관된다.

[0019] 또한, 본 발명은 상술된 어느 하나의 발효반죽을 성형하여 오븐에 구워서 얻어지는 천연효모발효빵을 제공한다.

발명의 효과

[0020] 본 발명의 카자흐스탄리아 세르바찌 YOG-07 균주는 토종으로서 상온에서는 물론 저온 내성을 통해 15℃ 미만의 저온에서도 우수한 성장성, 발효 팽창능 및 에탄올 발효능을 나타내므로 기존 상온 성장성 균주를 대체할 수 있다.

[0021] 또한, 본 발명의 응용제품은 카자흐스탄리아 세르바찌 YOG-07 균주를 포함함으로써 저온발효가 가능하여 대부분의 병원성 미생물의 증식을 억제하고 저온 성장 유익균인 효모균 즉 카자흐스탄리아 세르바찌 YOG-07 균주만 선택적으로 자라게 할 수 있으므로, 상온은 물론 저온에서도 기존 균주보다 발효 팽창능 및 에탄올 발효능이 우수한 특성을 이용할 수 있다.

[0022] 본 발명의 효과는 이상에서 언급한 효과로 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 효과들은 아래의 기재로부터 당업자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

도면의 간단한 설명

[0023] 도 1은 카자흐스탄리아 세르바찌(*kazachstania servazzii*)YOG-07 균주의 콜로니모양과 효모의 현미경사진이다.

도 2a는 카자흐스탄리아 세르바찌 YOG-07 균주에서 분석된 18S rDNA 염기서열을 바탕으로 작성된 계통발생수이고, 도 2b는 카자흐스탄리아 세르바찌 YGT-10 균주에서 분석된 18S rDNA 유전자 염기서열의 상동성을 나타낸 것이다.

도 3은 카자흐스탄리아 세르바찌 YOG-07 균주의 저온에서의 성장성을 보여주는 결과그래프이다.

도 4는 카자흐스탄리아 세르바찌 YOG-07 균주의 CO₂생성능력을 보여주는 결과사진이다.

도 5a 내지 도 5c는 카자흐스탄리아 세르바찌 YOG-07 균주가 포함된 빵 반죽의 팽창정도를 실험한 결과를 보여주는 사진 및 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0024] 본 발명에서 사용되는 용어는 본 발명에서의 기능을 고려하면서 가능한 현재 널리 사용되는 일반적인 용어들을 선택하였으나, 이는 당 분야에 종사하는 기술자의 의도 또는 판례, 새로운 기술의 출현 등에 따라 달라질 수 있다. 또한, 특정한 경우는 출원인이 임의로 선정한 용어도 있으며, 이 경우 해당되는 발명의 설명 부분에서 상세히 그 의미를 기재할 것이다.
- [0025] 본 발명에서 언급한 '포함한다', '갖는다', '이루어진다' 등이 사용되는 경우 '~만'이 사용되지 않는 이상 다른 부분이 추가될 수 있다. 구성 요소를 단수로 표현한 경우에 특별히 명시적인 기재 사항이 없는 한 복수를 포함하는 경우를 포함한다.
- [0026] 구성 요소를 해석함에 있어서, 별도의 명시적 기재가 없더라도 오차 범위를 포함하는 것으로 해석한다.
- [0027] 본 발명의 여러 구현예들 각각의 특징적인 부분들은 부분적으로 또는 전체적으로 서로 결합 또는 조합가능하고, 기술적으로 다양한 연동 및 구동이 가능하며, 각 구현예들은 서로에 대하여 독립적으로 실시 가능할 수도 있고 연관 관계로 함께 실시할 수도 있다.
- [0028] 이하, 첨부한 도면 및 바람직한 실시예들을 참조하여 본 발명의 기술적 구성을 상세하게 설명한다.
- [0029] 그러나, 본 발명은 여기서 설명되는 실시예에 한정되지 않고 다른 형태로 구체화 될 수도 있다. 명세서 전체에 걸쳐 본 발명을 설명하기 위해 사용되는 동일한 참조번호는 동일한 구성요소를 나타낸다.
- [0030] 본 발명의 기술적 특징은 상온에서는 물론 15℃ 미만 특히 10℃이하의 저온에서도 성장성, 발효 팽창능 및 에탄올 발효능이 우수한 특성을 나타내므로, 기존 상온 성장성 균주를 대체하고 저온으로 인한 발효력 감소를 최소화할 수 있는 카자흐스타니아 세르바찌(*kazachstania servazzii*)YOG-07 균주 및 이의 용도에 있다.
- [0031] 일반적으로 효모는 진핵세포로 주조, 식품, 의약, 사료, 화장품 등의 분야에 사용되는 발효 미생물인데, 이들의 생육적온은 30℃이다. 따라서 그동안 다수의 저온 내성을 갖는 효모 변이체 균주가 개발되었고, 실제로 15℃에서 배양된 결과는 보여 주었으나 아직까지 그 미만의 온도에서 배양된 결과를 보여준 바 없기 때문이다.
- [0032] 따라서, 본 발명은 15℃ 미만의 저온 생장에 내성이 있는 카자흐스타니아 세르바찌(*kazachstania servazzii*)YOG-07 균주(KACC 93312P)를 제공한다.
- [0033] 여기서, 카자흐스타니아 세르바찌 YOG-07 균주(KACC 93312P)는 전통 누룩에서 분리된 균으로서 우리나라 고유의 생물자원이며, 15℃ 미만, 특히 10℃이하의 온도에서도 배양이 이루어지는 특성을 갖는다.
- [0034] 특히, 카자흐스타니아 세르바찌 YOG-07 균주(KACC 93312P)는 10℃에서 5일 생장시 3%의 에틸알코올 생산능을 갖고, 30℃에서 5일 생장시 6%의 에틸알코올 생산능을 갖는 특성을 나타낸다. 또한, 10℃에서 4일 생장시 이산화탄소를 발생시키고, 30℃에서 생장시 집중 6시간부터 이산화탄소를 발생시키는 특성을 나타낸다.
- [0035] 이러한 본 발명의 카자흐스타니아 세르바찌 YOG-07 균주(KACC 93312P)의 특성을 이용하면 저온발효가 필요한 식품이나 발효주는 물론 발효반죽 및 발효빵 등을 효과적으로 제조할 수 있다.
- [0036] 그 결과, 본 발명의 생균제조성물은 카자흐스타니아 세르바찌 YOG-07 균주(KACC 93312P) 및 상기 카자흐스타니아 세르바찌 YOG-07 균주(KACC 93312P)의 배양액 중 하나 이상을 유효성분으로 포함할 수 있다.
- [0037] 필요한 경우 본 발명의 카자흐스타니아 세르바찌 YOG-07 균주(KACC 93312P) 또는 생균제조성물은 운반이나 보관 등의 편의를 위하여 다양한 형태로 제제화 될 수 있다. 예를 들면, 동결보호제와 함께 동결건조하여 분말의 형태로 사용될 수 있고, 보존 담체와 혼합하여 흡착시킨 후 건조시켜 고체화하여 사용할 수도 있다. 상기 동결보호제 및 보존 담체는 당 분야에서 통상적으로 사용되는 것이면 그에 따른 특별한 제한은 없고, 예를 들면 동결보호제로는 글리세롤, 탈지유, 꿀 등이 사용될 수 있다.
- [0038] 또한, 본 발명의 발효반죽제조방법은 카자흐스타니아 세르바찌(*kazachstania servazzii*)YOG-07 균주(KACC 93312P)를 반죽재료에 혼합시켜 발효하는 단계를 포함할 수 있다. 이와 같이 본 발명의 카자흐스타니아 세르바찌 YOG-07 균주를 이용하여 반죽재료를 발효시키게 되면 저온에서도 발효 팽창능이 어느 정도 우수하므로 저온 발효가 필요한 경우 매우 유용하며, 상온에서는 발효 팽창능이 매우 우수하므로 빠른 발효 팽창능이 필요할 때 유효할 수 있다.
- [0039] 또한, 본 발명의 천연효모발효반죽은 15℃의 미만의 온도조건에서 보관되어도 적절하게 팽창된 상태를 유지할

수 있으며, 적절하게 성형하여 오븐에서 구우면 천연효모발효빵을 얻을 수 있다.

[0040]

실시에

[0041]

카자흐스탄리아 세르바찌(*kazachstania servazzii*)YOG-07 균주를 다음과 같이 분리하여 동정하였다.

[0042]

1. 균주의 분리

[0043]

증류수 10ml에 전동누룩 1g을 첨가하여 연속 10배 희석한 다음 potato-dextrose agar(PDA)에 도말하여 효모 집락(colony)을 분리하였다. (배양조건은 10℃에서 5일간 배양) 분리된 효모 후보균은 다시 durham tube(듀럼 튜브)가 넣어진 Yeast extract 1%, Peptone, 2%, Dextrose,5%(YPD)broth 배지에 접종 균의 증식에 따라 이산화탄소의 발생 유무로 발효 효모균을 선별하였다.

[0044]

2. 18s-rDNA primer 서열분석을 통한 균주의 동정

[0045]

선발된 효모균은 동정을 위한 단계로 ITS 18s rDNA 염기서열 상동성을 비교 분석하였다. 분리 효모 집락으로부터 Wizard genomic DNA purification kit (Promega, WI, USA)를 이용하여 genomic DNA를 정제한 후 18s rDNA primer를 이용하여 PCR 증폭하였다. 증폭된 sequence의 염기서열을 분석하고, 염기서열은 NCBI의 BLAST search (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)를 수행한 후 bioedit 프로그램과 Cluster W 프로그램을 효모의 동정에 이용하였다. Align된 염기서열은 Neighbor-Joining 방법으로 Neighbor-joining tree를 작성하였다.

[0046]

도 1에 도시된 바와 같이 선발된 효모균의 콜로니 모양과 효모의 현미경사진을 비교하여 전형적인 효모 형태임을 알 수 있는데, 상술된 염기서열분석결과 얻어진 계통도는 도 2a에 나타내었고, 도 2b에 카자흐스탄리아 세르바찌(*kazachstania servazzii*)YOG-07 균주의 18s rDNA 염기서열의 상동성을 나타내었다. 상기 염기서열분석결과 선발된 균주는 카자흐스탄리아 세르바찌(*kazachstania servazzii*)YOG-07 균주로 동정되었다. 도 2a에 도시된 바와 같이 카자흐스탄리아 세르바찌 YOG-07균주는 *kazachstania servazzii* culture CBS:12661 효모와 가장 가까운 근연관계를 나타내었다. 또한, 동정된 카자흐스탄리아 세르바찌(*kazachstania servazzii*)YOG-07 균주는 국립농업과학원 농업미생물은행에 2018년 8월 10일자로 기탁하여 KACC 93312P 수탁번호를 부여받았다.

[0047]

3. 실험용 균주 준비

[0048]

순수 분리 동정된 카자흐스탄리아 세르바찌(*kazachstania servazzii*)YOG-07균주를 YPD 액체배지에 대량 배양 후 글리세롤 20% 함유하도록 첨가해 -20℃에서 보관하였다.

[0049]

실험예 1. 카자흐스탄리아 세르바찌(*kazachstania servazzii*)YOG-07 균주의 저온성장성 확인

[0050]

카자흐스탄리아 세르바찌(*kazachstania servazzii*)YOG-07균주(기탁번호: KACC 93312P)의 저온성장성을 확인하기 위해 다음과 같이 실험하였다. 냉동 보관된 카자흐스탄리아 세르바찌 YOG-07 균주를 east extract 1%, Peptone, 2%, Dextrose,5%(YPD)broth 20ml에 접종 활성화 시켜, 같은 배지 50ml에 접종량 1×10^6 /ml를 접종한 다음 10℃로 조절된 냉장배양실에 배양하면서 24시간 간격으로 8일 동안 균수를 평판 계수법을 사용하여 측정하였고, 그 결과를 도 3 및 표 1에 나타내었다.

표 1

[0051]

배양일수 (days)/ CFU/ml	1	2	3	4	5	6	7	8
분리균주 (YOG-07)	2×10^6	4.8×10^7	3.0×10^8	6.0×10^8	6.4×10^8	6.6×10^8	6.8×10^8	6.6×10^8
표준균주 (KCTC27365)	2×10^6	3.6×10^6	5.1×10^7	9.8×10^7	3.4×10^8	6.6×10^8	6.8×10^8	5.6×10^8

[0052]

표 1 및 도 3으로부터, 카자흐스탄리아 세르바찌 YOG-07 균주(분리균주)는 2일부터 증식을 하였으며 3일째부터 대조균에 비교하여 높은 증식력을 나타내었다. 반면 표준균주는 3일째부터 증식 하였으며 7일째에 최대 증식력을 보였다. 이러한 결과는 본 발명의 카자흐스탄리아 세르바찌 YOG-07 균주가 표준균주로 사용된 사카로마이세스 세레비지에 KCTC 27365 균주보다 5일 이내의 기간에는 저온에서 2배 이상 더 빨리 증식할 뿐만 아니라 증식량도 우수함을 보여준다.

[0053] 실험예 2. 카자흐스탄리아 세르바찌 YOG-07 균주의 에탄올 발효조건 확인

[0054] 저온(10℃) 및 상온(30℃)에서 카자흐스탄리아 세르바찌(*kazachstania servazzii*)YOG-07 균주의 에탄올 생산능을 다음과 같이 조사하고 그 결과를 표 2에 나타내었다. 여기서, 대조균으로 사카로마이세스 세레비지에 KCTC 27365(표준균주)를 사용하였다.

[0055] 1. 저온 발효조건

[0056] 10℃의 저온발효는 배지조성이 Yeast extract 1%, Peptone, 2%, Dextrose,5%(YPD)broth 50ml에 dextrose를 첨가하여 농도가 5%되게 하였다. 에틸 알콜 농도는 5일 배양 후 측정 하였다

[0057] 2. 상온 발효조건

[0058] 상온발효는 Yeast extract 1%, Peptone, 2%, Dextrose,5%(YPD)broth 와 실제 막걸리 발효 조성과 유사하게 쌀가루(rice powder) 누룩으로 조성하여 발효시켰다 배지조건은 도정 쌀을 세척한 후 121℃로 15분 멸균한 다음 건조기로 건조한 다음 분쇄기를 사용하여 분쇄한 건조 쌀가루 300(Dry Weight)을 증류수에 넣고 서서히 저어 주면서 포화시킨다. 물은 최종 증류수 1000L로 하였다 이렇게 만들어진 발효 배양액은 상온으로 식힌 후 여기에 누룩 10g(Dry Weight)을 넣고, 충분히 풀어준 다음 효모를 투입한다. 투입효모는 다음과 같은 준비를 하였다. 즉 카자흐스탄리아 세르바찌 YOG-07 균주와 표준균주는 Yeast extract 1%, Peptone, 2%, Dextrose,5%(YPD)broth 배지 300ml에 30℃ 24시간 진탕 배양으로 활성화 시켜 활성화된 균배양액을 원심분리 후 침전시킨 균체10g(Wet weight)을 접종한 다음 30℃ 배양기에서 배양하면서 12시간 간격으로 저어주면서 5일 배양 후 에틸 알코올 농도를 측정하였다.

[0059] 3. 에틸알코올 함량 측정

[0060] 알코올 함량은 국제청의 주류분석규정(NTS 2010)에 의거하여 다음과 같이 시행하였다. 균질화한 발효 상등액을 100 mL 메스실린더의 눈금 까지 취하고 이것을 500 mL 플라스크에 옮긴 다음 이 메스실린더를 약 50 mL의 증류수로 2회 씻은 용액을 플라스크에 합치고 냉각기에 연결한 다음 메스실린더를 받는 용기로 하여 증류 한다. 증류용액이 80 mL가 되면 증류를 중지하고 증류수 를 20 mL 가하여 15℃에서 주정계를 사용하여 Gay-Lussac 주정도수환산표에 따라 최종 알코올 함량을 %로 나타내었다.

표 2

균주 / 배양온도	10℃		30℃	
	YOG-07(분리균주)	YPD	YPD	쌀가루, 누룩
	3%	6%	7%	
KCTC 27365 (표준균주:대조균)	YPD	YPD	쌀가루, 누룩	
	2%	4%	5%	

[0062] 표 2에 나타난 바와 같이, 분리 균주인 카자흐스탄리아 세르바찌 YOG-07 균주는 저온(10℃)에서 5일 발효시킨 결과 3%의 에틸알코올 생산능을 보였으며 대조균은 2%의 생산능을 나타내어 분리 균주가 30% 이상 에틸알코올 생산능이 우수함을 알 수 있다. 또한, 상온(30℃)에서 5일 발효시에도 YPD배지에서는 분리균주인YOG-07은 6%, 대조균인 표준균주 KCTC 27365는 에틸알코올 농도 4%를 보여 분리균주가 30% 이상 높은 발효력을 보여주었음을 알 수 있다. 쌀가루로 만든 배지에서도 분리균주가 대조균인 표준균주 KCTC 27365보다 우수한 에틸알코올의 생산능을 나타내는 것을 알 수 있다.

[0063] 실험예 3. 카자흐스탄리아 세르바찌 YOG-07 균주의 CO₂ 생성능 확인

[0064] 카자흐스탄리아 세르바찌(*kazachstania servazzii*)YOG-07 균주가 실험예2의 저온발효조건 및 상온발효조건에서 배양시 CO₂ 생성능을 갖는지 듀람 튜브를 포화시켜 확인하고 그 결과를 도 4에 나타내었다.

[0065] 도 4에 도시된 바와 같이, 카자흐스탄리아 세르바찌 YOG-07 균주는 저온일 경우 4일에 CO₂를 발생시키고 5일에 CO₂를 듀람 튜브를 포화시켰고, 30℃의 경우 접종 6시간부터 CO₂ 발생시키는 것으로 나타났으며 18시간에 이미 듀람 튜브를 포화 시켰음을 알 수 있다.

[0066] 실험예 4. 카자흐스탄리아 세르바찌 YOG-07 균주의 빵반죽 팽창 특성 확인

- [0067] 카자흐스탄리아 세르바찌 YOG-07 균주의 발효 팽창능을 측정하기 위해, Lee J.Y등의 방법을 변형하여 증류수 30ml 및 효모배양액 30ml을 밀가루(강력분)100g의 비율로 혼합 10분간 치대어 반죽을 제조하였다(도 5a참조). 여기서, 효모배양액에 사용된 균주는 카자흐스탄리아 세르바찌 YOG-07 균주와 표준균주로 각각 사카로마이세스 세레비지에 KCTC 7924 및 KCTC 27365를 사용하였다.
- [0068] 도 5a와 같이 제조된 빵 반죽을 코니칼 튜브(내구경2.7cm)에 20g을 넣고 입구를 밀봉하였다. 30℃에서 정치 숙성하며 빵반죽의 부풀려진 시간당 단위 부피를(ml/hr)를 측정하여 팽창력을 결정하고(Lee J.Y등 2003 J Korean Soc Food Sci Nutr 32,1245-1252), 그 결과 사진 및 그래프를 각각 도 5b 및 도 5c에 나타내었다.
- [0069] 도 5b 및 도 5c로부터 알 수 있듯이, 본 발명의 카자흐스탄리아 세르바찌 YOG-07(분리균주:KACC93312P)의 빵반죽 팽창능력은 5,4ml로 *Saccharomyces servazzii* KCTC 27365(표준균주)의 3.2ml와 비교하면 3.5ml 더 높은 빵반죽 팽창능을 보였으며, *Saccharomyces servazzii* KCTC 7924(표준균주)의 3.5ml와 비교해도 3.3ml 더 높은 빵반죽 팽창능을 보여주는 것을 확인할 수 있다. 특히, 일반적으로 빵반죽 팽창효모로 쓰이는 KCTC 7924 *Saccharomyces cerevisiae*(표준균주)와 비교하여 보다 거의 100% 이상 우수한 빵 반죽 팽창 능력을 보여 빵반죽 시간을 단축할 수 있으므로, 빵반죽 효모로 사용하기에 적합할 것으로 예측된다.
- [0070] 이상의 실험결과로부터 본 발명의 카자흐스탄리아 세르바찌(*kazachstania servazzii*)YOG-07 균주는 전통 누룩에서 분리된 것으로, 온도 10℃에서 2일째부터 증식을 시작하여 저온성장성을 나타내며, 저온에서도 우수한 에틸알코올 발효능 및 CO₂생성능을 나타내는 것을 알 수 있다. 또한, 카자흐스탄리아 세르바찌(*kazachstania servazzii*)YOG-07 균주를 혼합하여 발효하는 천연효모발효반죽 제조시 우수한 발효 팽창능을 나타내는 것을 알 수 있다.
- [0071] 본 발명은 이상에서 살펴본 바와 같이 바람직한 실시 예를 들어 도시하고 설명하였으나, 상기한 실시 예에 한정되지 아니하며 본 발명의 정신을 벗어나지 않는 범위 내에서 당해 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자에 의해 다양한 변경과 수정이 가능할 것이다.

수탁번호

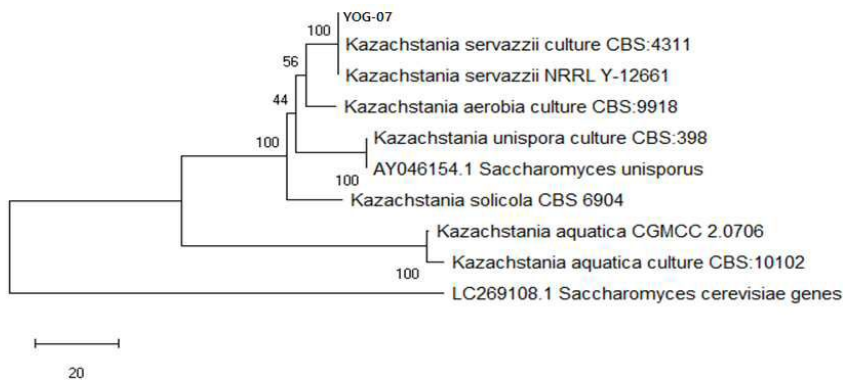
- [0072] 기탁기관명 : 국립농업과학원 농업미생물은행(국내)
- 수탁번호 : KACC93312P
- 수탁일자 : 20180810

도면

도면1



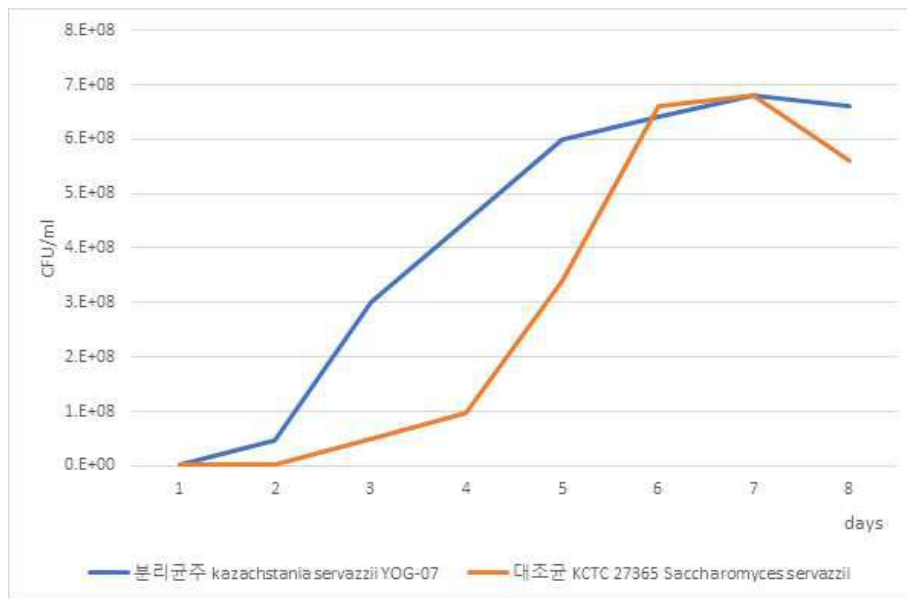
도면2a



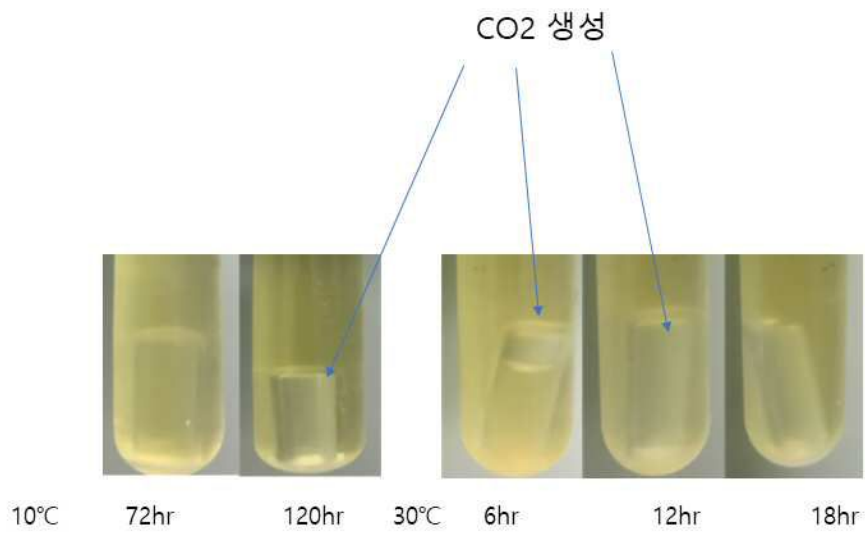
도면2b

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
Kazachstania servazzii strain GY2 internal transcribed spacer 1, partial sequence, 5.8S ribosom	1327	1327	95%	0.0	99%	JQ808010.1
Saccharomyces servazzii genes for 18S rRNA, ITS1, 5.8S rRNA, ITS2, 28S rRNA, partial and	1325	1325	93%	0.0	100%	D89895.1
Kazachstania servazzii culture CBS:6965 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	1319	1319	92%	0.0	100%	KY103867.1
Kazachstania servazzii strain MY7 18S ribosomal RNA gene, partial sequence, internal transcr	1319	1319	93%	0.0	99%	JX101632.1
Kazachstania servazzii strain THK-A118 internal transcribed spacer 1, partial sequence, 5.8S r	1315	1315	92%	0.0	100%	JX981992.1
Kazachstania servazzii culture CBS:4311 internal transcribed spacer 1, partial sequence, 5.8S	1306	1306	91%	0.0	100%	KY103668.1
Kazachstania servazzii culture CBS:8958 small subunit ribosomal RNA gene, partial sequence	1306	1306	93%	0.0	99%	KY103666.1

도면3



도면4



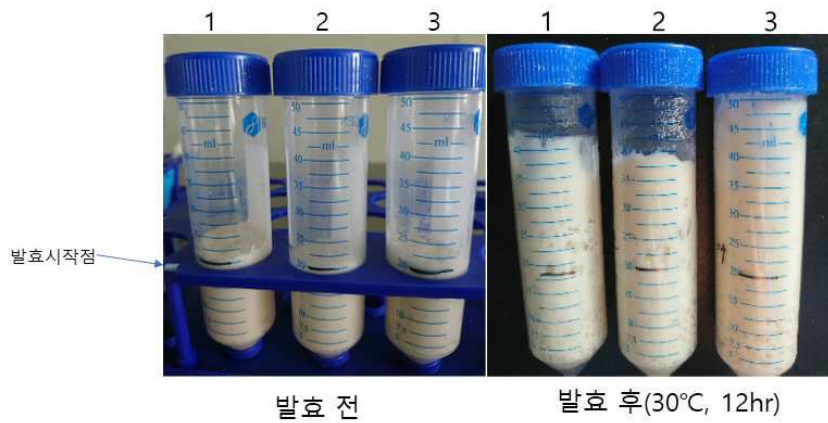
도면5a



빵반죽

- 1:KCTC 7924 *Saccharomyces cerevisiae*(표준균주)
- 2:KCTC 27365 *Saccharomyces servazzii*(표준균주)
- 3.*Kazachstania servazzii* YOG-07(분리균주:KACC93312P)

도면5b



- 1:KCTC 7924 *Saccharomyces cerevisiae*(표준균주)
- 2:KCTC 27365 *Saccharomyces servazzii*(표준균주)
- 3.*Kazachstania servazzii* YOG-07(분리균주:KACC93312P)

도면5c

