



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0055130
(43) 공개일자 2022년05월03일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 1/16 (2006.01) A23L 11/00 (2021.01)
A23L 33/135 (2016.01) C12R 1/645 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
C12N 1/16 (2013.01)
A23L 11/01 (2021.01)
- (21) 출원번호 10-2020-0139283
- (22) 출원일자 2020년10월26일
심사청구일자 2020년10월26일

- (71) 출원인
중앙대학교 산학협력단
서울특별시 동작구 흑석로 84 (흑석동)
- (72) 발명자
전체욱
서울특별시 동작구 현충로 52, 아크로이버하임
105-1604
강현아
서울특별시 서초구 서초중앙로24길 33, 105동
1403호
(뒷면에 계속)
- (74) 대리인
특허법인 피씨알

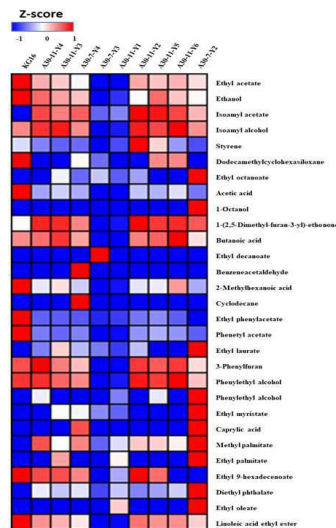
전체 청구항 수 : 총 11 항

(54) 발명의 명칭 위커하모마이세스(Wickerhamomyces) 속 균주 KG16 및 이의 용도

(57) 요약

KACC 93336P로 수탁된 위커하모마이세스 아노말러스(Wickerhamomyces anomalus) KG16 균주 및 이를 이용한 식품 조성물에 관한 것이다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A23L 33/135 (2016.08)
A23V 2002/00 (2013.01)
A23V 2200/324 (2013.01)
C12R 2001/645 (2021.05)

정다민

서울특별시 서초구 서초중앙로24길 43, 101동 205호

(72) 발명자

천병희

서울특별시 동작구 흑석로6길 31-1, 202호

한동민

서울특별시 종로구 지봉로5길 7, 102동 1602호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711103974
과제번호	2017M3C1B5019291
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	STEAM연구(R&D)
연구과제명	다중 메타오믹스 기반 전통장류 발효특성 및 발효 핵심 미생물 규명
기여율	70/100
과제수행기관명	중앙대학교
연구기간	2020.01.01 ~ 2020.12.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711104460
과제번호	2017M3C1B5019295
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	STEAM연구(R&D)
연구과제명	전통 발효장류 핵심 효모/곰팡이 발굴 및 복합종균 개발
기여율	30/100
과제수행기관명	중앙대학교
연구기간	2020.01.01 ~ 2020.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

수탁번호 KACC 93336P로 기탁된 위커하모마이세스 아노말러스 (*Wickerhamomyces anomalus*) KG16 균주.

청구항 2

제 1 항에 있어서, 상기 균주는 염화나트륨 5% 내지 15% 조건에 대해 내염성이 있는 것을 특징으로 하는 위커하모마이세스 아노말러스(*Wickerhamomyces anomalus*) KG16 균주.

청구항 3

제 1 항에 있어서, 상기 균주는 솔비톨(sorbitol) 1M 내지 2.5M 조건에 대해 내삼투압성을 가지는 것인 위커하모마이세스 아노말러스(*Wickerhamomyces anomalus*) KG16 균주.

청구항 4

제1항의 위커하모마이세스 아노말러스(*Wickerhamomyces anomalus*) KG16 균주 또는 이의 배양액을 포함하는 식품 조성물.

청구항 5

제4항에 있어서, 상기 조성물은 에틸아세테이트(ethyl acetate) 향미 성분이 강화된 것을 특징으로 하는 것인 식품 조성물.

청구항 6

제4항에 있어서, 상기 조성물은 초산(acetic acid) 향미 성분이 강화된 것을 특징으로 하는 것인 식품 조성물.

청구항 7

제4항에 있어서, 상기 조성물은 3-메틸뷰타노익에시드(3-methylbutanoic acid) 향미 성분이 강화된 것을 특징으로 하는 것인 식품 조성물.

청구항 8

제4항에 있어서, 상기 조성물은 면역 증진 활성을 갖는 것을 특징으로 하는 식품 조성물.

청구항 9

제1항의 위커하모마이세스 아노말러스(*Wickerhamomyces anomalus*) KG16 균주 또는 이의 배양액을 포함하는 장류 식품 제조용 미생물 제제.

청구항 10

제1항의 균주, 이의 배양액, 상기 배양액의 농축액 또는 그의 건조물을 유효성분으로 포함하는 프로바이오틱스 제제.

청구항 11

식물성 단백질원을 포함하는 곡물 원료 또는 이를 국균으로 발효한 발효물을 준비하는 단계; 및
 상기 곡물 원료 또는 이의 발효물에 위커하모마이세스 아노말러스 KG16을 접종하는 단계를 포함하는 장류 제조 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 위커하모마이세스 속 균주 KG16 및 이의 용도에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 콩을 원재료로 사용하는 장류는 우리나라 전통 발효 식품으로 국, 조림, 소스 등 음식의 조미료로 사용된다. 장류를 제조하는 방법은 콩을 물에 불린 후 삶아 사각형의 메주로 성형하고, 자연 발효를 하여 전통 메주를 제조한다. 그 후, 제조된 메주를 천일염수에 담가 추가 발효를 진행하여 된장과 간장을 완성한다. 장류의 발효과정 중 원재료 및 외부로부터 유래한 세균, 효모, 곰팡이와 같은 다양한 미생물들이 발효 과정에 관여하여 장류의 맛과 향미에 관련된 대사산물을 생성한다. 따라서, 우리나라 전통장류는 다양한 미생물이 발효 과정에 참여하기 때문에 지역과 제조 시기에 따라 다양한 맛과 향미를 지니고 있는 특성이 있다. 장류의 발효 과정에 관여하는 핵심 미생물은 세균, 효모, 곰팡이이다. 그 중 효모는 단백질, 탄수화물, 지방 등 고분자 대사 물질을 아미노산, 포도당, 지방산 등의 다양한 저분자 대사 산물로 대사하여 장류의 맛과 향미를 증진시킨다.

[0003] 현재 산업체에서 대량으로 제조되어 시판되고 있는 장류의 경우, 단조로운 향미를 지니고 있어 전통 장이 지닌 다양한 향미 특성을 구현할 수 있는 장류를 개발 할 필요가 있다.

선행기술문헌

특허문헌

[0004] (특허문헌 0001) 대한민국 공개공보 제10-2014-0055615호(2014.05.09)

발명의 내용

해결하려는 과제

[0005] 일 양상은 수탁번호 KACC 93336P로 기탁된 위커하모마이세스 아노말러스 (*Wickerhamomyces anomalus*) KG16 균주를 제공하는 것이다.

[0006] 다른 양상은 위커하모마이세스 아노말러스(*W. anomalus*) KG16 균주 또는 이의 배양액을 포함하는 식품 조성물을 제공하는 것이다.

[0007] 또 다른 양상은 위커하모마이세스 아노말러스(*W. anomalus*) KG16 균주 또는 이의 배양액을 포함하는 장류 식품 제조용 미생물 제제를 제공하는 것이다.

[0008] 다른 양상은 위커하모마이세스 아노말러스(*W. anomalus*) KG16 균주, 이의 배양액, 상기 배양액의 농축액 또는 그의 건조물을 유효성분으로 포함하는 프로바이오틱스 제제를 제공하는 것이다.

[0009] 또 다른 양상은 식물성 단백질을 포함하는 곡물 원료 또는 이를 국균으로 발효한 발효물을 준비하는 단계 및 상기 곡물 원료 또는 이의 발효물에 위커하모마이세스 아노말러스(*W. anomalus*) KG16을 접종하는 단계를 포함하는 장류 제조 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0011] 일 양상은 수탁번호 KACC 93336P로 기탁된 위커하모마이세스 아노말러스(*W. anomalus*) KG16 균주를 제공하는 것이다.
- [0012] 일 구체예에 따르면, 상기 위커하모마이세스 아노말러스(*W. anomalus*) KG16 균주는 내염성, 내삼투압성 특징을 가지는 것 일 수 있다.
- [0013] 본 발명에서 사용된 용어 '내염성'이란, 염(salt) 조건이 있는 환경에서 잘 견디어 내는 성질을 의미한다.
- [0014] 본 발명에서 사용된 용어 '내삼투압성'이란, 미생물이 삼투압에 견디는 성질을 의미한다.
- [0015] 상기 위커하모마이세스 아노말러스(*W. anomalus*) KG16 균주는 3% 내지 30% 염화나트륨(NaCl)의 농도에서 균주 수가 증식되거나 유지되는 것 일 수 있다. 예를 들면, 5% 내지 15% NaCl에서 균주 수가 증식되거나 유지되는 것 일 수 있다.
- [0016] 일 구체예에 따르면, 상기 위커하모마이세스 아노말러스(*W. anomalus*) KG16 균주는 5% 내지 15% 염(NaCl)조건에 대해 내염성이 있는 것일 수 있다.
- [0017] 상기 위커하모마이세스 아노말러스(*W. anomalus*) KG16 균주는 5% 내지 20% 염화칼륨(KCl)의 농도에서 균주 수가 증식되거나 유지되는 것일 수 있다. 더 구체적으로는 5% 내지 15% KCl에서 균주 수가 증식되거나 유지되는 것 일 수 있다.
- [0018] 상기 위커하모마이세스는 1 M 내지 3 M의 솔비톨(sorbitol)에서 균주 수가 증식되거나 유지되는 것을 볼 수 있다. 예를 들면, 1.5 M 내지 2.5 M의 솔비톨에서 균주 수가 증식되거나 유지되는 것을 볼 수 있다.
- [0019] 일 구체예에 따르면, 상기 위커하모마이세스 아노말러스(*W. anomalus*) KG16 균주는 솔비톨(sorbitol) 1M 내지 2.5M 조건에 대해 내삼투압성을 가지는 것일 수 있다.
- [0020] 일 구체예에 따르면, 상기 위커하모마이세스 아노말러스(*W. anomalus*)는 저염된장을 제조하는데 이용될 수 있다.
- [0021] 상기 저염된장이란, 나트륨의 과잉섭취를 예방하고 칼륨의 섭취를 높이기 위해 염화칼륨을 사용한 된장일 수 있다.
- [0022] 일 구체예에 따르면, 상기 위커하모마이세스 아노말러스(*W. anomalus*)는 향미물질을 생성하는 균주일 수 있다.
- [0023] 상기 향미물질은 에탄올, 초산 에틸(ethyl acetate), 2-메틸헥사노익 산(2-methylhexanoic acid), 에틸 페닐아세테이트(ethyl phenylacetate), 페네틸 아세테이트(phenetyl acetate), 3-페닐퓨란(3-phenylfuran), 페닐에틸알코올(phenylethyl alcohol), 에틸 9-헥사데세노에이트(ethyl 9-hexadecenoate) 일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0024] 다른 양상은 위커하모마이세스 아노말러스 (*Wickerhamomyces anomalus*) KG16 균주 또는 이의 배양액을 포함하는 식품 조성물을 제공한다.
- [0025] 상기 배양액은 균주를 포함하는 것일 수 있으며, 균주로 발효한 배지 또는 균주가 생성한 물질을 포함하는 것일 수 있다.
- [0026] 일 구체예에 따르면, 상기 식품 조성물은 에탄올(Ethanol)성분이 강화된 것일 수 있다.
- [0027] 상기 에탄올은 300ppm 이상 검출되는 것일 수 있으며, 예를 들면 500ppm 이상 검출되는 것일 수 있다.
- [0028] 일 구체예에 따르면, 상기 식품 조성물은 향미성분인 초산에틸(ethyl acetate)이 강화된 것일 수 있다.
- [0029] 상기 에틸아세테이트는 120ppm 이상 검출되는 것 일 수 있으며, 예를 들면 180ppm 이상 검출되는 것 일 수 있다.

- [0030] 일 구체예에 따르면, 상기 식품 조성물은 향미성분인 초산(Acetic acid)이 강화된 것일 수 있다.
- [0031] 상기 초산은 600ppm 이상 검출 되는 것 일 수 있으며, 예를 들면 730ppm 이상 검출되는 것 일 수 있다.
- [0032] 일 구체예에 따르면, 상기 식품 조성물은 향미 성분인 3-메틸 부탄 산(3-Methylbutanoic acid)이 강화된 것일 수 있다.
- [0033] 상기 3-메틸부타노익에시드는 150ppm 이상 검출되는 것 일 수 있으며, 예를 들면 220ppm 이상 검출되는 것일 수 있다.
- [0034] 일 구체예에 따르면, 상기 식품 조성물은 향미성을 가지는 것일 수 있다. 상기 향미성은 신선하고 달콤한 향, 레몬향, 바닐라향, 그 외 과일향을 나타내는 것일 수 있다. 상기 향미성은 3-메틸부타노익에시드(3-Methylbutanoic acid) 에틸 아세테이트 (Ethyl acetate), 에탄올(Ethanol) 및 아세트익에시드(Acetic acid)로 인한 것 일 수 있다.
- [0035] 일 구체예에 따르면, 상기 식품 조성물은 면역증진 활성을 갖는 것 일 수 있다.
- [0036] 상기 면역증진 활성은 상기 균주로 인하여 CD86을 발현한 수지상세포가 증가하거나, 사이토카인이 증가하는 것을 의미할 수 있다. 상기 CD86을 발현한 수지상 세포의 증가는 T cell을 활성화 시키는 것이 증가되는 것을 의미할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 상기 사이토카인의 증가는 IL-6, IL-8 및 TNF- α 가 증가되는 것일 수 있고, 상기 사이토카인 IL-6, IL-8 및 TNF- α 가 증가된다는 것은 면역 반응을 활성화하는 것일 수 있다. 또한, 상기 사이토카인 증가는 IL-10이 증가되는 것일 수 있다. 상기 사이토카인 IL-10은 항염증 사이토카인으로써 본 발명에서 면역 활성이 과도하게 일어나지 않도록 염증반응을 억제하는 작용을 의미하는 것일 수 있다.
- [0037] 본 발명의 조성물이 식품 조성물로 제조되는 경우, 유효성분으로써 위커하모마이세스 아노말러스(*W. anomalous*) KG16 균주 또는 이의 배양액 외에, 식품 제조 시에 통상적으로 첨가되는 성분을 포함할 수 있으며, 예를 들어, 단백질, 탄수화물, 지방, 영양소, 조미제 및 향미제를 포함할 수 있다. 탄수화물의 예는 단당류, 이당류, 다당류 등과 같은 통상적인 당 및 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알콜일 수 있다. 또한 향미제로서 천연 향미제[타우마틴, 스테비아 추출물(예를 들어, 레바우디오시드 A, 글리시르히진 등)] 및 합성 향미제(사카린, 아스파르탐 등)를 사용할 수 있다.
- [0038] 예를 들어, 본 발명의 식품 조성물이 드링크제로 제조되는 경우에는 본 발명의 위커하모마이세스 아노말러스(*W. anomalous*) KG16 균주 또는 이의 배양액 외에 구연산, 액상과당, 설탕, 포도당, 초산, 사과산, 과즙, 두층 추출액, 대추 추출액 및/또는 감초 추출액 등이 추가로 포함될 수 있다.
- [0039] 또한, 본 발명의 식품 조성물은 여러 가지 영양제, 비타민, 광물(전해질), 합성 풍미제 및 천연 풍미제 등의 풍미제, 착색제 및 증진제(치즈, 초콜릿 등), 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알콜, 탄산음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다.
- [0040] 이러한 성분은 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있으며, 이러한 첨가제의 비율은 본 발명의 식품 조성물 100 중량부 당 0 내지 약 20 중량부의 범위에서 선택될 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0041] 상기 식품 조성물은 건강기능식품, 기능성 음료, 장류 식품 제조용 미생물 제제 및 프로바이오틱스 제제를 포함할 수 있으나 이에 제한되지 않는다.
- [0042] 또 다른 양상은 위커하모마이세스 아노말러스 (*Wickerhamomyces anomalous*) KG16 균주 또는 이의 배양액을 포함하는 장류 식품 제조용 미생물 제제를 제공하는 것이다.
- [0043] 상기 장류 식품 제조용 미생물 제제는 향미성을 가질 수 있다. 상기 향미성은 상기 식품 조성물에 관한 설명에 기재되어 있는 것과 동일하다.
- [0044] 상기 장류 식품 제조용 미생물 제제는 면역증진 활성을 가질 수 있다. 상기 면역증진 활성에 관한 설명은 상기 식품 조성물에 관한 설명에 기재되어 있는 것과 동일하다.
- [0045] 상기 장류 식품 제조용 미생물 제제란 발효에 관여하는 유산균 또는 세균 등을 포함하는 미생물, 이의 배양물, 상기 배양물의 농축물 및 상기 배양물의 건조물로 이루어진 균 중에서 선택된 어느 하나를 포함하는 제제 또는 조성물을 의미하며, 장류 식품 제조용 미생물 제제는 장류 식품 등의 생산시 첨가하여 장류 식품에서 성장할 수 있는 미생물 또는 우점종으로 성장할 수 있는 미생물을 제공하기 위하여 사용된다. 상기 장류 식품 제조용 미생물 제제를 사용하여 장류 식품을 제조하는 경우, 상기 장류 식품 제조용 미생물 제제에 포함된 미생물에 의하여

장류 식품의 품질을 일정하게 조절하거나, 발효의 속도 또는 단계를 조절할 수 있으며, 특정한 목적을 달성한 장류 식품을 제조할 수 있다. 또한, 상기 장류 식품 제조용 미생물 제제에는 통상적으로 사용되는 첨가제를 더욱 포함할 수 있다.

- [0046] 다른 양상은 위커하모마이세스 아노말러스 (*Wickerhamomyces anomalus*) KG16 균주, 이의 배양액, 상기 배양액의 농축액 또는 그의 건조물을 유효성분으로 포함하는 프로바이오틱스 제제를 제공하는 것이다.
- [0047] 본 발명에서 사용된 용어 '프로바이오틱스 제제'란 체내에 들어가서 건강에 좋은 효과를 주는 균을 의미하는 것으로, 상기 균은 살아있는 균뿐만 아니라 사균까지 포함하는 의미이다.
- [0048] 상기 프로바이오틱스 제제는 향미성을 가질 수 있다. 상기 향미성은 상기 식품조성물에 관한 설명에 기재되어 있는 것과 동일하다.
- [0049] 상기 프로바이오틱스 제제는 면역증진 활성을 가질 수 있다. 상기 면역증진 활성에 관한 설명은 상기 식품조성물에 관한 설명에 기재되어 있는 것과 동일하다.
- [0050] 상기 프로바이오틱스 제제는 당업계에 공지된 방법에 따라 다양한 제형과 방법으로 제조 및 투여될 수 있다. 예를 들어, 본 발명의 위커하모마이세스 아노말러스 (*Wickerhamomyces anomalus*) KG16 균주, 이의 배양액, 상기 배양액의 농축액 또는 그의 건조물은 약제학적 분야에서 통상적으로 사용되는 담체와 혼합하여 산제(powder), 액제(liquids and solutions), 정제(tablet), 캡슐(capsule), 시럽(syrup), 현탁제(suspension) 또는 과립제(granule) 등의 형태로 제조되어 투여될 수 있다. 상기 담체로는 예를 들어, 결합제, 활탁제, 붕해제, 부형제, 가용화제, 분산제, 안정화제, 현탁화제, 색소 및 향료 등일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 또한, 투여 용량은 체내에서의 활성성분의 흡수도, 불활성률, 배설속도, 피투여자의 연령, 성별, 상태 및 질병의 중증 정도 등에 따라 적절히 선택할 수 있다.
- [0051] 또 다른 양상은 식물성 단백질원을 포함하는 곡물 원료 또는 이를 국균으로 발효한 발효물을 준비하는 단계; 및 상기 곡물원료 또는 이의 발효물에 위커하모마이세스 아노말러스 (*W. anomalus*) KG16을 접종하는 단계;를 포함하는 장류 제조 방법을 제공한다.
- [0052] 상기 곡물원료는 대두, 콩, 보리, 쌀, 소맥분, 기타 곡물 일 수 있다.
- [0053] 상기 국균은 누룩으로 분리된 유용한 곰팡이를 총칭하는 것으로, 예를 들면 아스파질루스 소야(*Aspergillus soyae*) 또는 아스파질루스 오리제(*Aspergillus oryzae*)일 수 있다.
- [0054] 상기 발효물은 곡물 원료에 여러가지 미생물이 자연적으로 들어가 발효된 것이며, 예를 들면 메주일 수 있다.
- [0055] 상기 접종하는 단계는 위커하모마이세스 아노말러스 농도 1×10^5 내지 1×10^7 cell/ml일 수 있으며, 예를 들면 1×10^6 cell/ml일 수 있다.
- [0056] 상기 접종하는 단계는 나트륨 농도 10 내지 15% 수용액에 침지시켜 수행하는 것일 수 있으며, 예를 들면 11 내지 12% 수용액에 침지시켜 수행하는 것일 수 있다.

발명의 효과

- [0057] 전통 장류에서 분리된 신규한 위커하모마이세스 아노말러스(*W. anomalus*) KG16 균주를 된장 제조에 사용함으로써, 면역활성을 증진시키고 우수한 향미를 나타내는 된장을 제조할 수 있는 효과가 있다.

도면의 간단한 설명

- [0058] 도 1은 위커하모마이세스 아노말러스(*W. anomalus*) 균주가 생산하는 향미물질을 비교한 데이터이다.
- 도 2는 위커하모마이세스 아노말러스(*W. anomalus*) KG 16과 A30-11-Y4의 계통수를 나타낸 도면이다.
- 도 3은 위커하모마이세스 아노말러스(*W. anomalus*) KG 16의 배수체를 분석한 데이터이다.
- 도 4의 A는 위커하모마이세스 아노말러스(*W. anomalus*) KG 16 유전체의 *de novo* assembly 및 주석화(annotation) 분석 결과 데이터이고, B는 위커하모마이세스 아노말러스(*W. anomalus*) KG 16 유전체 주석화를 위해 전사체(transcriptome) 분석을 수행한 결과 데이터이다.
- 도 5은 사카로마이세스 불라디(*S. boulardii*) 사멸체와 위커하모마이세스 아노말러스(*W. anomalus*) KG 16 사멸

체 및 위커하모마이세스 아노말러스(*W. anomalus*) A30-11-Y4 사멸체와 반응하여 CD86을 발현한 수지상 세포 수를 비교한 데이터이다.

도 6는 수지상세포에서 사카로마이세스 불라디(*S. boulardii*) 사멸체와 위커하모마이세스 아노말러스(*W. anomalus*) KG 16 사멸체 및 위커하모마이세스 아노말러스(*W. anomalus*) A30-11-Y4 사멸체와 반응했을 때 분비한 사이토카인양을 비교한 결과로, A는 IL-6, B는 TNF- α , C는 IL-10, D는 IL-8을 비교한 데이터이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0059] 이하 하나 이상의 구체예를 실시예를 통해 보다 상세하게 설명한다. 그러나, 이들 실시예는 하나 이상의 구체예를 예시적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0061] **실시예 1. 위커하모마이세스(*Wickerhamomyces*) 속 균주 발굴 및 동정**

[0062] 간장 및 된장 시료 1 ml(g)을 PBS (phosphate buffered saline) 완충액에 10^{-1} 배부터 10^{-3} 배까지 희석한 후, 테트라사이클린(tetracycline) 10 mg/L와 클로람페니콜(chloramphenicol) 50mg/L가 포함된 YPD (yeast extract peptone dextrose) 배지에 도말하여 30°C에서 3일간 정치배양하였다. 정치배양하여 생성된 곰팡이/효모의 집락(colony)은 하기 표 1의 서열번호 1 및 서열번호 2 프라이머를 이용하여 곰팡이/효모의 5.8S rRNA 및 ITS2 유전자를 PCR (polymerase chain reaction)로 증폭하여 서열 분석을 실시하였다. 서열 분석된 결과를 유전체 서열 데이터베이스인 NCBI에서 blast search하여 위커하모마이세스(*Wickerhamomyces*) 속에 속하는 균주 10점을 분리하였다.

표 1

서열번호	primer 이름	서열(5' > 3')
서열번호 1	ITS1	5' -CTTGGTCATTTAGAGGAAGTAA-3'
서열번호 2	NL4	5' -GGTCCGTGTTCAAGACGG-3'

[0066] **실시예 2. 위커하모마이세스(*Wickerhamomyces*) 속 균주의 향미 물질 분석**

[0067] 상기 실시예 1에서 분리한 위커하모마이세스 속 균주 10점을 각각 YPD 배지에서 배양한 후 생성하는 향미 물질을 분석하였다. 10점의 균주를 YPD 배지에서 전배양한 후, 25 ml YPD 배지에 초기 OD (optical density, 600 nm) 0.3으로 접종하였다. 0, 12 시간 배양 후 각 배양액 5 ml을 가스크로마토그래피 바이얼(vial)에 옮기고 SPME (solid phase microextraction) fiber를 이용하여 바이얼 headspace로부터 향미 성분을 흡착시킨 후 가스크로마토그래피 질량분석기로 분석을 실시하였다. 표준 물질로 초산에틸(ethyl acetate), 초산이소아밀(isoamyl acetate)과 3 가지 중간 크기(medium chain) 지방산(fatty acids; ethyl butyrate, ethyl hexanoate, ethyl octanoate)를 사용하였다. 가스크로마토그래피 질량분석기에 의한 SPME에 흡착된 향미 성분의 분석 조건은 다음과 같다. 향기성분의 효과적인 휘발을 위하여 시료를 50°C에서 5분간 교반시켰다. SPME 장치(a 50/30 μ m divinylbenzene/carboxen/ polydimethylsiloxane (DVB/CAR/PDMS) fiber)를 이용하여 휘발성 화합물을 30분간 흡착시킨 후, 250°C에서 2분간 탈착시켰다. 탈착된 향미 성분은 250°C로 설정된 이동선을 따라 가스크로마토그래피 질량분석기(7820A series gas chromatograph-5977E quadrupole mass selective detector, Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA)에 주입하였다. HP-INNOWax 컬럼(30m length \times 250 μ m i.d. \times 0.25 μ m film thickness)(19091N-133, Agilent Technologies)을 이용하여 분리를 진행하였고, 가스크로마토그래피 분석 조건은 다음과 같다: 오븐 온도 40°C로 시작, 5분 유지, 5°C/min의 속도로 150°C까지 온도 증가 후 10분 유지, 10°C/min의 속도로 220°C까지 온도 증가 후 5분 유지; 운반 기체(He) 유속 1.0 mL/min; 이온화 에너지 70 eV; 스캔 범위 33-200 m/z. 보존 지수(retention indices)와 mass spectrum data를 이용하여 각 화합물을 동정하였고, mass spectrum data는 NIST (National Institute of Standards and Technology, USA)에서 제공하는 mass spectral libraries를 이용하여 비교하였다.

[0068] 그 결과, 도 1과 같이 에탄올(ethanol)과 초산에틸(ethyl acetate)을 많이 생성하며 그 외에도 다양한 향미 물

질을 생성하는 두 개의 균주 KG16과 A30-11-Y4를 선정 한 후, 도 2와 같이 두 균주의 계통수(phylogenetic tree)를 분석하였다.

실시예 3. 위커하모마이세스(*Wickerhamomyces*) 속 균주의 성장 특성 분석

균주의 성장 특성을 분석하기 위하여, 상기 실시예 2에서 확보한 위커하모마이세스 KG16과 A30-11-Y4, 대조균으로 위커하모마이세스 속 공시 균주인 위커하모마이세스 아노말러스 CBS 605 및 양성대조균으로는 발효 균주로 사용되고 있는 사카로마이세스 세레비시아(*Saccharomyces cerevisiae*)를 사용하여 내염능을 비교실험을 하였다.

구체적으로 5% NaCl, 10% NaCl, 15% NaCl, 10% KCl, 15%KCl, 2M sorbitol, 2.5M sorbitol이 첨가된 YPD 배지에 각 균주 들을 OD₆₀₀ = 0.1 로 접종하여 16, 20 시간 동안 28℃진탕배양기에서 배양한 후 OD₆₀₀을 측정하였다.

그 결과로 하기 표 2 내지 3과 같은 결과를 얻을 수 있었다.

표 2

	hrs	YPD	YPD+5% NaCl	YPD+10% NaCl	YPD+15% NaCl
		Cell OD	Cell OD	Cell OD	Cell OD
<i>S. cerevisiae</i>	16	18.1	4.78	0.464	0.42
	20	19.85	9.75	0.444	0.396
<i>W. anomalus</i> KG16	16	36.3	27.5	0.895	0.342
	20	40.9	29.3	3.235	0.314
<i>W. anomalus</i> A30-11-Y4	16	43.85	29.9	0.63	0.284
	20	50.6	32.4	0.85	0.19
<i>W. anomalus</i> CBS605	16	34.4	1.175	0.18	0.34
	20	39.4	3.4	0	0

표 3

	hrs	YPD+10% KCl	YPD+15% KCl	YPD+2M Sorbitol	YPD+2.5M Sorbitol
		Cell OD	Cell OD	Cell OD	Cell OD
<i>S. cerevisiae</i>	16	0.995	0.38	0.776	0.302
	20	2.15	0.36	2.385	0.294
<i>W. anomalus</i> KG16	16	5.95	0.41	14.2	2.255
	20	17	0.535	16.9	5.17
<i>W. anomalus</i> A30-11-Y4	16	10.4	0.324	12.75	0.662
	20	26.4	0.485	18.95	2.67
<i>W. anomalus</i> CBS605	16	0.158	0.144	0.268	0.142
	20	0	0	0.34	0

YPD 기본배지에서는 실험에 사용한 균주 4종이 모두 성장하는 것을 확인하였다. 위커하모마이세스 아노말러스 (*W. anomalus*) CBS605는 5% NaCl과 2 M Sorbitol이 함유된 배지에서 성장하는 것을 확인하였다. 그러나 10% NaCl과 15% NaCl, 10% KCl, 15% KCl 및 2.5 M 솔비톨이 함유된 배지에서는 성장이 확인되지 못하였다.

10%, 15% NaCl 배지에서는 위커하모마이세스 아노말러스(*W. anomalus*) KG16이 다른 위커하모마이세스 아노말러스 균주들에 비해 높은 성장을 보여주었다.

10%, 15% KCl 배지에서는 위커하모마이세스 공시균주인 CBS605는 성장하지 못하였으나, KG16과 A30-11-Y4에서는 성장이 확인하였다.

2 M, 2.5 M 솔비톨 배지에서는 위커하모마이세스 아노말러스 KG16과 A30-11-Y4만 다른 균주들에 비해 더 빠르게 성장하는 것을 관찰할 수 있었고, 그 중 KG16의 경우에는 고농도 솔비톨에서 A30-11-Y4에 비해 더 현저히 빠르게 성장한 것을 확인할 수 있었다.

따라서 위커하모마이세스 아노말러스 KG16이 고농도의 NaCl, KCl, Sorbitol에서 다른 균주들에 비해 잘 성장하는 것을 확인할 수 있었다. 즉, 이 실험을 통해 위커하모마이세스 아노말러스 KG16이 내염성 및 내삼투압성 능

력이 다른 균주들에 비해 더 두드러진다는 것을 확인하였다.

[0082] 실시예 4. 위커하모마이세스(*Wickerhamomyces*) 속 균주의 유전체 특성

[0083] 유전체 조립 및 주석화에 필요한 사전 정보를 확보하기 위해, 장류 유래 위커하모마이세스(*Wickerhamomyces*) 속 균주 KG16의 배수체(ploidy)를 유세포분석기(FACS)를 이용하여 분석하였다. 배수체 분석 결과, 도 3과 같이, 위커하모마이세스 아노말러스 KG16은 위커하모마이세스 아노말러스 KCTC 27761의 유전체가 14.1 Mb로 보고되었음을 고려할 때 일배체(haploid, H)에 가까운 유전체를 지녔을 것으로 분석되었다.

[0084] 유전체 서열을 PacBio Sequel system으로 분석하여 얻은 결과를 조립(assembly)하여 조립 유전체 정보를 획득하였고 Illumina HiSeq 시퀀싱 정보를 사용하여 오류 정정(error correction)을 실시하였다. 먼저 PacBio SMRT(Single Molecule, Real-Time) sequencing을 위한 양질의 유전체를 확보하기 위해 위커하모마이세스 아노말러스 KG16 에 lyticase 처리 후 페놀 추출법(phenol extraction)으로 유전체를 얻었다. HGAP assembly (v4.0)와 Pilon (v1.21)을 통한 *de novo* assembly 결과, 도 4A를 보면 알 수 있듯이, 위커하모마이세스 아노말러스 KG16의 유전체는 76개의 콘티그(contig)로 조립되었고 크기는 약 22 Mb인 것을 확인하였다.

[0085] 도 4B에 나타난 결과와 같이, 위커하모마이세스 아노말러스 KG16의 유전체 주석화를 위한 첫 단계로 전사체(transcriptome) 분석을 수행하였다. 이를 기반으로 MAKER (v2.31.8)와 BLAST+ (v2.6.0)를 이용하여 대략적인 유전체 전체의 형태를 확인하였다. 위커하모마이세스 아노말러스 KG16 균주는 22 Mb의 유전체에서 9,608개의 단백질 암호화 유전자를 가지고 있으며, 이중 9,532개의 유전자가 NCBI에 알려진 단백질 암호화 유전자와 높은 상동성을 가지는 것을 확인하였다. 9,608개의 유전자를 확인해본 결과, 5,848개 유전자는 한 쌍이나 그 이상 존재하였으나 3,684개 유전자는 한 개씩만 존재하여 부분적 이배체(partial diploid)임을 확인하였다.

[0087] 실시예 5. 위커하모마이세스 아노말러스 KG16의 면역활성 조절능

[0088] 위커하모마이세스 아노말러스 KG16의 면역활성 조절능을 평가하기 위해 미성숙 수지상 세포와 효모 균주 사멸체들을 반응시켜 성숙한 수지상 세포(mature DCs)의 표면 분화 마커의 발현 정도와 사이토카인 분비량을 측정하였다.

[0089] 미성숙 수지상 세포를 얻기 위해서, 건강한 인체 유래의 혈액에서 생성된 말초 혈액 단핵구 세포(peripheral blood mononuclear cells, PBMCs)들 중 plate에 부착된 단핵 세포(mononuclear cells)를 분리하고 RPMI 배지에서 배양하였다. 단핵 세포의 수를 세어 1×10^6 cells/ml이 되도록 튜브에 IL-4 (2 μ g/ml)와 GM-CSF (5 μ g/ml) 처리한 RPMI 배지 첨가 후 6-well plate에 2 ml씩 분주하고 37°C 5% CO₂ 인큐베이터에서 배양하였다. 이틀에 한 번씩 배지를 교체해주며 6일동안 배양하여 미성숙 수지상 세포(immature dendritic cells, iDCs)로 분화시켰다.

[0090] 효모 균주는 위커하모마이세스 아노말러스 KG16, A30-11-Y4 균주와 양성 대조군으로 프로바이오틱스 효모인 사카로마이세스 불라디(*Saccharomyces boulardii*) 균주를 사용하였다. 효모 균주들을 2 ml YPD 배지에서 16시간 배양한 후 세포를 모아 PBS로 세척하였다. 그 후, 10%FBS를 첨가한 RPMI 1640 배지에 효모세포 1×10^7 cells/ml를 분주하고 80 °C에서 5분 간 배양하여 각 효모균주들의 사멸체를 준비하였다.

[0091] 96-well plate에 iDC를 1×10^6 cells/ml의 농도로 100 μ l씩 분주한 뒤, 하기 그룹에 표 4에 나타난 그룹에 따라 시료를 100 μ l씩 분주하여 iDC와 효모 균주를 37°C 5% CO₂ 인큐베이터에서 20 시간 반응시켰다. 각 대조군과 실험군은 5번씩 반복 실험 후, 평균값을 도출하였다.

표 4

iDC(immature DC)	10% FBS를 첨가한 RPMI 배지
Sb	1×10^7 cells/ml 농도의 사카로마이세스 불라디(<i>S. boulardii</i>) 사멸체
KG16	1×10^7 cells/ml 농도의 위커하모마이세스 아노말러스(<i>W. anomalus</i>) K16 사멸체
A30-11-Y4	1×10^7 cells/ml 농도의 위커하모마이세스 아노말러스(<i>W. anomalus</i>) A30-11-Y4 사멸체

- [0093] 20 시간 반응 후, 효모 균주들과 반응시킨 미성숙 수지상 세포가 성숙한 수지상 세포로 분화된 것을 현미경으로 관찰할 수 있었다.
- [0094] 성숙한 수지상 세포(mature DCs) 표면의 마커 발현 정도를 확인하기 위하여, 효모-수지상 세포 반응액에서 원심 분리를 통해 세포 펠렛과 상층액을 분리하였다. 분리한 세포 펠렛은 마커 발현 분석에, 상층액은 사이토카인 측정에 이용하였다. 분화 마커 분석을 위하여, 세포 펠렛을 FACS 완충액(2 mM EDTA, 1% BSA, 0.1% sodium azide)으로 세척 후 MHC class II(anti-human HLA-A, B, C) 항체, MHC class I (anti-human HLA-DR) 항체, anti-human CD86 항체 solution을 첨가하여 4°C 암실에서 40분간 반응시켰다. 항체-염색된 세포를 200 µl의 FACS 완충액에 현탁시킨 후 microtube로 옮겨 FACS 분석하였다.
- [0095] 수지상 세포만을 분석하기 위해, 수지상 세포의 마커인 MHC class I과 MHC class II로 수지상 세포들만을 선별하여 샘플 분석을 수행하였다. 측정값은 MFI(mean fluorescence intensity, 평균형광강도)로 나타내었다.
- [0096] 그 결과로 도 5와 같이, 장류에서 분리된 위커하모마이세스(*Wickerhamomyces*) 속 KG16, A30-11-Y4 및 *S. boulardii*(Sb) 균주가 미성숙 수지상 세포 (iDC)와 비교하여 CD86 의 발현이 증가한 것을 확인하였다.
- [0097] 수지상 세포에서 T 세포에 항원을 제시할 때, 특이적으로 높게 발현된다고 알려진 CD86에서 위커하모마이세스(*Wickerhamomyces*) 속 KG16 균주에서 발현을 확인하였으므로 다음으로 사이토카인 측정을 수행하였다.
- [0098] 효모와 반응시킨 수지상 세포가 분비한 사이토카인의 양을 측정하기 위해 Human Cytokines cytometric bead array (CBA) 키트를 사용하였다. IL-6, TNF- α , IL-8, IL-10에 대한 항체가 접합된, 크기와 내부 형광강도가 각기 다른 beads를 각 사이토카인의 standards 또는 효모-수지상세포 배양 상층액이 들어있는 96-well V-bottom plate에 첨가하고 상온에서 2시간 동안 반응시켰다. 원심분리하여 상층액 제거 후 바이오틴 표지된 검출 항체(detection antibody)를 첨가하였다. 상온에서 1시간 반응 후, 바로 PE 표지된 스트렙타비딘(streptavidin)을 첨가하여 상온에서 30분간 반응시켰다. 원심분리하여 상층액 제거 후, wash buffer 첨가 후 beads를 파이펫팅으로 잘 풀어주고 microtube로 옮겨주었다. 이후 FACS 분석을 수행하였다. 각 bead를 분리하기 위해 FSC, SSC, 그리고 두 개의 laser(red, blue)로 조건을 잡았고, flow rate 25 µl/min, 1800 events (300 events/bead)로 설정하여 분석하였다. 각 사이토카인의 양(0 pg/ml ~ 10,000 pg/ml)에 대한 표준 곡선(standard curve)을 얻었고, 이를 이용하여 효모와 반응시킨 수지상 세포가 분비한 사이토카인의 정량값을 얻었다. 5번의 반복실험을 통해 평균값으로 결과를 나타내었다.
- [0099] 하기 도6과 같이, 미성숙 수지상 세포(iDC) 대비 KG16과 A30-11-Y4 균주는 *S. boulardii* (Sb)와 유사한 수준으로 미성숙 T 세포를 작동 T 세포로 분화하는데 관여하는 염증 유발 사이토카인인 IL-8을 유도하는 것을 확인하였다. 또한, IL-6와 TNF- α 의 분비량은 KG16이 *S. boulardii* (Sb) 및 A30-11-Y4 보다 높은 수준으로 유도한 것을 확인하였다.
- [0100] KG16 균주는 *S. boulardii* (Sb)와 A30-11-Y4 에 비해 염증 억제 사이토카인인 IL-10 분비 또한 높은 수준으로 유도하는 것을 확인하였다. 이를 통해, KG16 균주가 인체 면역 관용에 작용할 것으로 예상할 수 있다.
- [0102] **실시예 6. 위커하모마이세스 아노말리스 KG16을 사용한 전통장류 제조**
- [0103] 대두(6 kg)를 물(20 L)에 14시간 침지한 후 2시간 동안 탈수시키고 100°C에서 4시간 동안 증자하였다. 100°C에서 4시간 동안 증자한 콩을 메주 4덩이로 성형하였다. 성형한 메주는 15°C에서 90일 동안 발효시킨 후 11% 염 농도의 소금물 20L 에 담근 후 위커하모마이세스 아노말리스 KG16을 1×10^6 cell/ml 농도로 접종하여 25°C에서 3개월 동안 숙성시킨 후, 간장과 된장을 분리하였다. 그 후, 간장은 추가적으로 3개월 더 숙성시켰으며, 된장은 9개월을 더 숙성시켜 완성하였다.
- [0105] **실시예 7. 위커하모마이세스 아노말리스 KG16을 사용한 전통장류의 향미성 프로파일링**
- [0106] 상기 실시예 6에서 제조한 된장의 향미성을 확인하고자, 위커하모마이세스(*Wickerhamomyces*) 속 KG16을 접종하여 제조한 된장 제품과 접종하지 않고 제조한 된장 제품을 360일간 발효하여 향미 성분을 분석하였다. 구체적으로 된장 시료 1 g을 GC 바이얼 (20 ml)에 옮기고 1 N NaOH를 사용하여 된장 시료의 pH를 6.5로 보정한 후 시료의 향미성분을 SPME fiber에 흡착 시킨 후 가스 크로마토그래프 질량분석계 (gas chromatograph-mass spectrometer; GC/MS)로 분석을 수행하였다. 내부표준물질(internal standard)로 메피산메틸(methyl

cinnamate) 100 ppm을 사용하여 시료간 성분의 양을 정량 하였다. SPME-GC/MS 조건은 다음과 같다. 향기성분의 효과적인 휘발을 위하여 시료를 50℃에서 5분간 교반시켰다. SPME 장치(50/30 μm divinylbenzene/carboxen/polydimethylsiloxane (DVB/CAR/PDMS) fiber)를 이용하여 휘발성 화합물을 30분간 흡착시킨 후, 250℃에서 2분간 용출시켰다. 용출된 화합물은 250℃로 설정된 이동선을 따라 GC-MS 기기(7820A series gas chromatograph-5977E quadrupole mass selective detector, Agilent Technologies, Palo Alto, CA, USA)로 주입되었다. HP-INNOWax GC column (30m length × 250 μm i.d. × 0.25 μm film thickness) (19091N-133, Agilent Technologies)을 이용하여 분리를 진행하였고, GC 조건은 다음과 같다: 오븐 온도 40℃로 시작, 5분 유지, 5℃/min의 속도로 150℃까지 온도 증가 후 10분 유지, 10℃/min의 속도로 220℃까지 온도 증가 후 5분 유지; 운반 기체(He) 유속 1.0 mL/min; 이온화 에너지 70 eV; 스캔 범위 33-200 m/z. 보존 지수(retention indices)와 mass spectrum data를 이용하여 각 화합물을 동정하였고, mass spectrum data는 NIST에서 제공하는 mass spectral libraries를 이용하여 비교하였다.

[0107] SPME-GC/MS를 이용하여 상기 실시예 6의 된장을 분석한 결과, 하기 표 5와 같이 위커하모마이세스 아노말러스 KG16을 접종한 된장과 접종하지 않은 된장의 향미분석을 GC/MS로 분석한 결과로 나타내었다. 접종한 된장이 하기 표 5와 같이, 향미 물질인 ethyl acetate를 2배, ethanol을 3배, 아세트산과 3-methylbutanoic acid를 6배 이상 많이 생성한다는 결과가 나왔다.

표 5

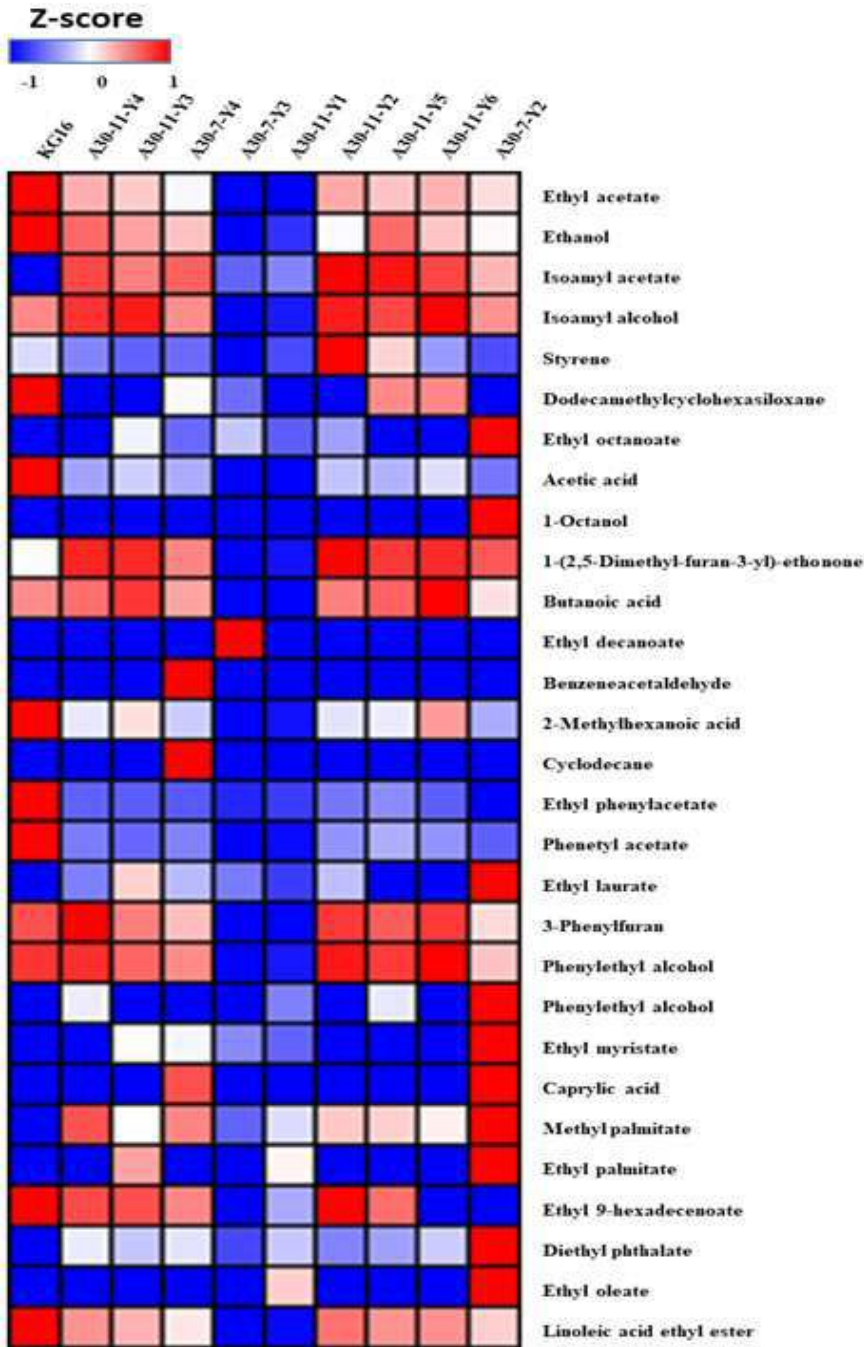
	Ethyl acetate	Ethanol	Acetic acid	3-Methylbutanoic acid
Control	102.53	190.70	82.68	43.27
KG16 접종	184.47	610.76	742.70	261.95

수탁번호

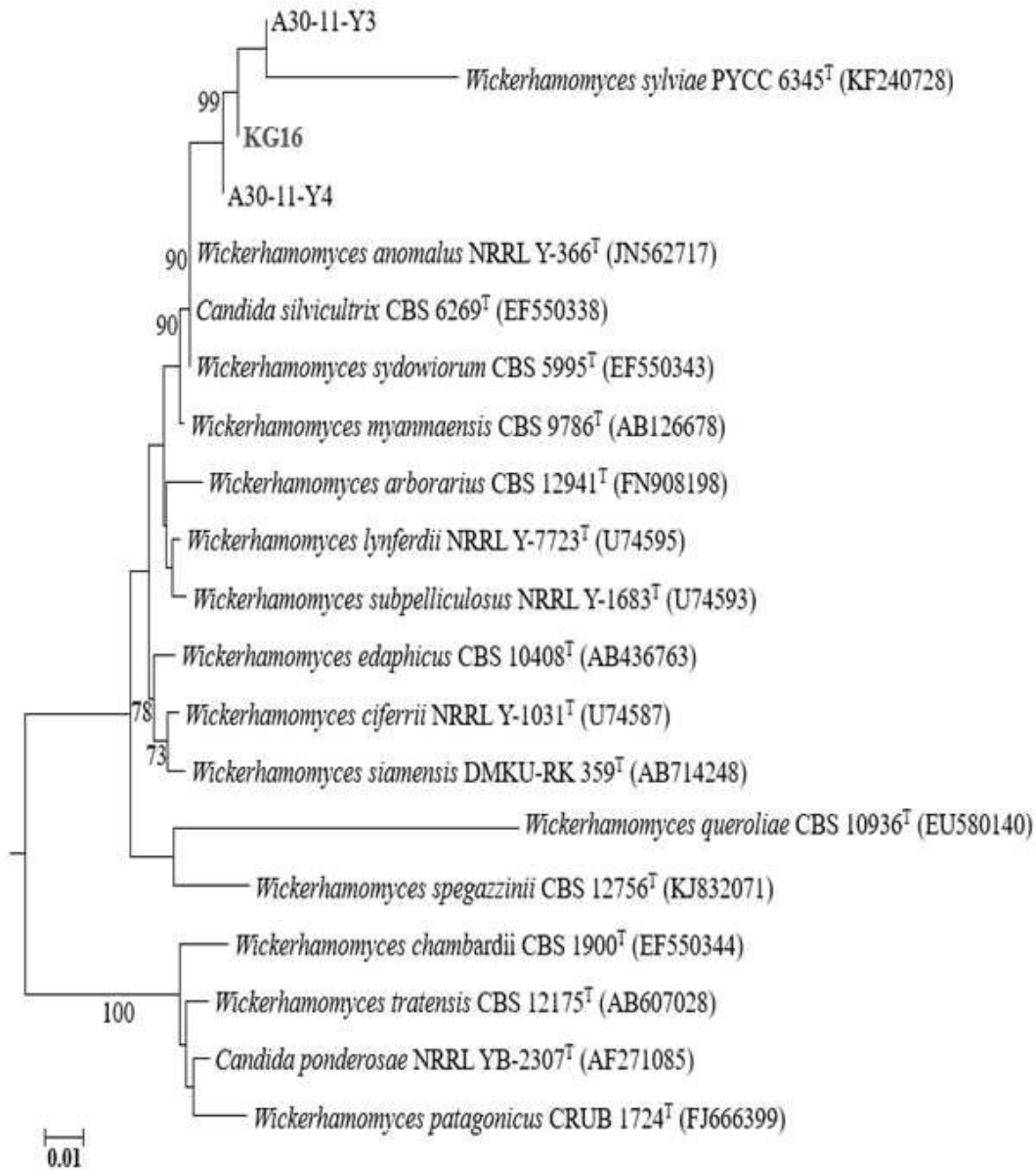
[0110] 기탁기관명 : 농업생명공학연구원
 수탁번호 : KACC93336
 수탁일자 : 20200311

도면

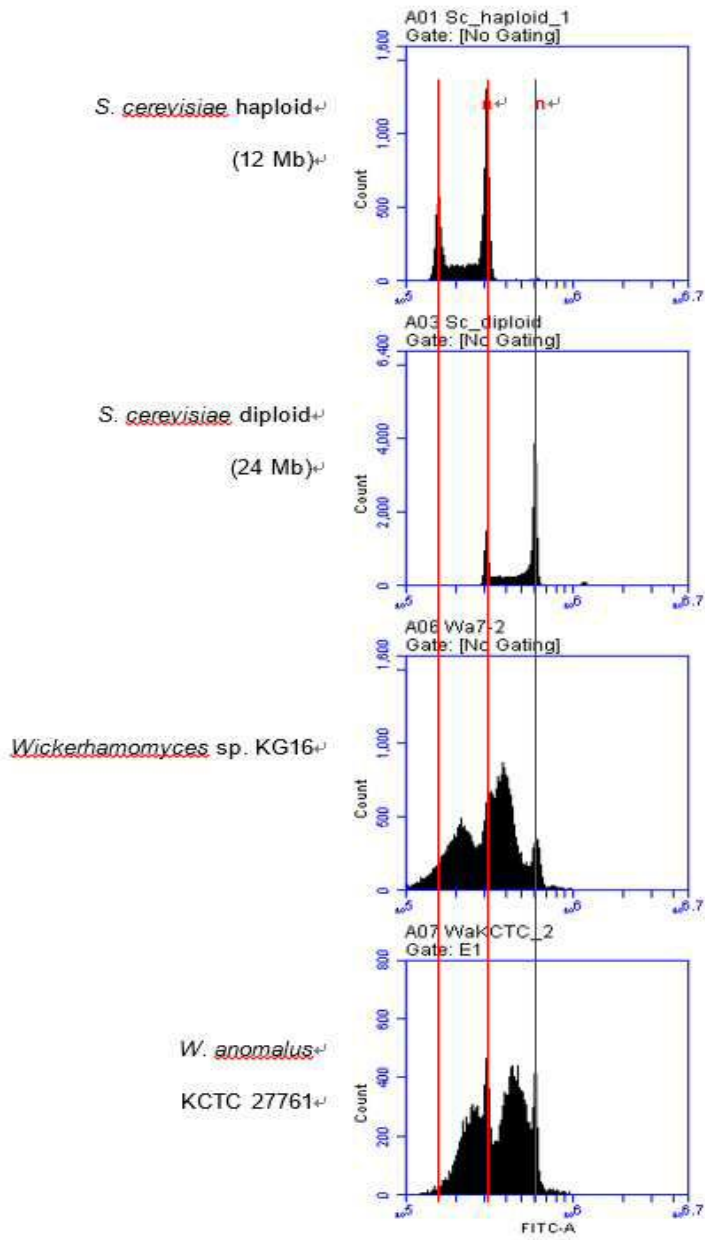
도면1



도면2



도면3



도면4

A

1) *De novo* assembly

Contigs	TotalLength	N50	MaxLength	MinLength	AvgLength
76	22,173,775	1,404,861	2,481,437	9,307	291,760

2) Result of annotation

	Number of Genes	Total Length
Predicted Transcripts	9,608	11,429,965 bp
Predicted Proteins	9,608	3,638,023 aa

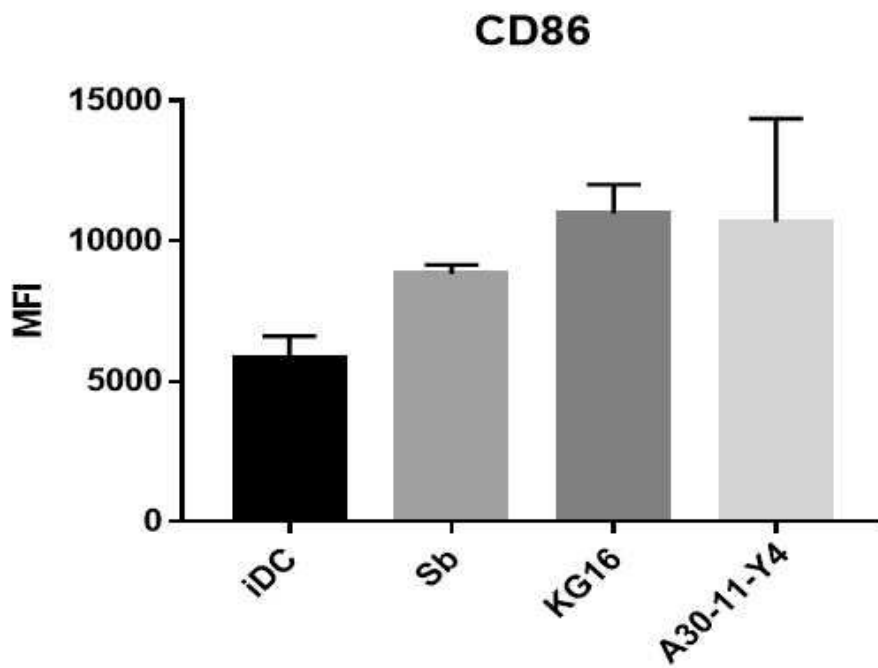
B

Hit	NoHit	Total Query
9532	76	9608

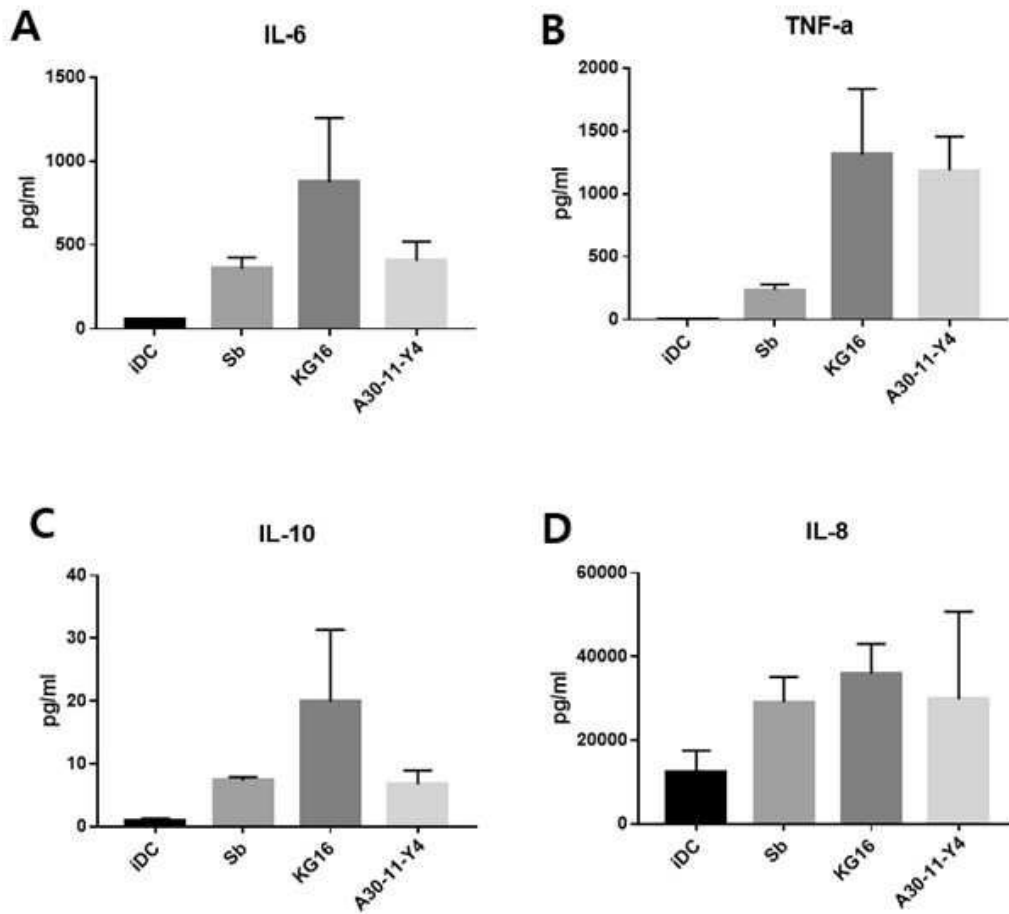


■ Hit ■ NoHit

도면5



도면6



서열목록

<110> CHUNG ANG University industry Academic Cooperation Foundation

<120> The Yeast Wickerhamomyces sp. KG16 Strains and Use Thereof

<130> PN200095

<160> 2

<170> KoPatentIn 3.0

<210> 1

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 1

cttggtcatt tagaggaagt aa

22

<210> 2

<211> 19

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer

<400> 2

ggtccgtgtt tcaagacgg

19