

명세서

발명의 명칭: 이중 미생물 혼합 발효에 의한 조미소재의 제조방법

기술분야

- [1] 본 발명은 생산 물질의 종류가 서로 다른 2종 이상의 미생물들을 혼합하여 동시 발효하는 공정을 이용한 조미소재의 제조방법에 관한 것이다.

배경기술

- [2] L-글루탐산은 감칠맛을 내는 산성 아미노산으로, 다시마, 된장, 간장 등의 식물성 식품뿐만 아니라 유제품, 육류, 어류 등의 동물성 식품에도 천연으로 존재한다. 이러한 L-글루탐산은 전세계적으로 가장 많이 사용되고 있는 식품 조미소재이며, 특히 L-글루탐산의 정제 과정에서 염을 첨가하여 제조한 MSG(monosodium glutamate)는 식품 풍미 증진 효과가 우수하여 많은 가공식품에 식품첨가제로 사용되고 있다. 최근에는 건강에 대해 소비자의 인식이 높아지면서 효모엑기스, 천연 소재 추출물 등의 천연 조미소재 시장이 급격히 성장하는 추세이나, 여전히 MSG는 천연 조미소재에 비해 감칠맛이 뛰어나고 저렴한 가격으로 높은 경쟁력을 가진다. 따라서 MSG의 대체물을 개발하기 위해서는 많은 노력이 요구된다.
- [3] 한편, 감칠맛을 증진시킬 목적으로 L-글루탐산과 함께 L-라이신, L-발린, L-아르기닌 등 다양한 아미노산을 이용한 조미소재의 개발이 이루어지고 있다. 또한 이노신산, 구아닐산 등 핵산이나 숙신산, 젖산 등 유기산을 더 포함하는 조미소재도 개발되고 있다. 이러한 L-글루탐산을 기반으로 한 조미소재는 일반적으로 각각의 산물을 생산하는 미생물로부터 제조된 발효액을 혼합하거나, 또는 개별적으로 생산된 아미노산, 핵산 또는 유기산 분말을 혼합하여 제조하게 된다. 종래 제조방법은 L-글루탐산 등 최종 물질의 농도 또는 함량을 조절하기에 용이하지만 혼합 전까지 이중으로 생산 공정을 운영해야하기 때문에 높은 생산비용이 소요되며, 제조된 조미소재에 다량의 배지 성분, 발효 부산물 등이 잔존하여 이미.이취 문제를 해결하기 어렵고 여전히 풍부한 감칠맛을 내기 부족하다는 한계가 있다. 이에, 감칠맛이 향상된 조미소재를 개발하기 위한 많은 연구 및 개발이 필요한 실정이다.

[4] [선행기술문헌]

[5] [특허문헌]

[6] 대한민국 등록특허 제10-1758332호

[7] 대한민국 등록특허 제10-1328091호

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [8] 본 발명은 생산 물질의 종류가 서로 다른 2종 이상의 미생물을 혼합 발효하는 조미소재의 제조방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.

- [9] 또한, 본 발명은 글루탐산 생산 미생물과 라이신 생산 미생물을 혼합 발효하는 L-글루탐산 및 L-라이신 함유 조미소재의 제조방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.
- [10] 또한, 본 발명은 상기 방법으로 제조된 조미소재를 제공하는 것을 목적으로 한다.
- [11] 또한, 본 발명은 상기 조미소재를 포함하는 식품 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제 해결 수단

- [12] 본 발명의 일 양상은 발효 배지에 제1 미생물과 제2 미생물을 접종한 후 발효하여 아미노산, 핵산 및/또는 유기산을 함유하는 발효액을 제조하는 단계를 포함하며, 상기 제1 미생물 및 제2 미생물은 서로 다른 산물을 생산하고, 각각 아미노산, 핵산 및 유기산으로 이루어진 군에서 선택된 1종을 생산하는 것인 조미소재의 제조방법을 제공한다.
- [13] 본 발명에서 사용된 “조미소재”는 식품의 풍미를 증진시키기 위해 첨가되는 소재를 의미하며, 일반 식품 조리 과정에서 마지막에 소량 넣는 일반 조미료보다 더 넓은 개념으로 사용되며, 가정에서 요리할 때뿐만 아니라 햄, 소시지, 라면 등 가공식품을 제조하는 과정에 맛을 끌어올리기 위해 사용 가능하다. 본 발명에서의 조미소재는 정미성분으로 1종 이상의 아미노산, 핵산 및/또는 유기산을 포함하여 감칠맛을 더욱 풍부하게 내며 우수한 관능 특성을 가지는 물질을 말한다.
- [14] 본 발명의 일 구체예에 따르면, 상기 아미노산은 L-글루탐산, L-알라닌, L-발린, L-류신, L-이소류신, L-프롤린, L-페닐알라닌, L-트립토판, L-메티오닌, L-글리신, L-세린, L-트레오닌, L-시스테인, L-아스파라진, L-글루타민, L-아스파르트산, L-라이신, L-아르기닌 및 L-히스티딘으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상인 것일 수 있다.
- [15] 본 발명의 일 구체예에 따르면, 상기 핵산은 이노신산, 구아닐산, 잔틸산 및 이들의 염 형태로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상인 것일 수 있다.
- [16] 예를 들면, 상기 핵산은 이노신 일인산(inosine monophosphate, IMP), 구아노신 일인산(guanosine monophosphate, GMP), 잔토신 일인산(xanthosine monophosphate, XMP) 등일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [17] 본 발명의 일 구체예에 따르면, 상기 유기산은 숙신산(호박산), 사과산, 구연산, 초산, 젖산, 푸마르산, 주석산, 아스코르브산, 글루콘산 및 이들의 염 형태로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상인 것일 수 있다.
- [18] 본 발명에서 사용된 “발효”는 미생물에 의해 배지에 포함된 유기물이 분해되거나 또는 다른 물질로 변화되는 생물학적 현상으로, 접종된 미생물이 발효 배지 내 영양물질을 아미노산이나 핵산, 유기산 등으로 분해 또는 전환하는 것을 의미한다. 본 발명에서 사용된 “발효액”은 발효를 통해 미생물로부터

생산된 물질을 포함하는 것을 의미하며, 이러한 발효액은 서로 다른 종류의 산물을 생산하는 2종 이상의 미생물들을 혼합하여 발효함으로써 각 미생물이 생산한 아미노산, 핵산, 유기산 등의 유용물질뿐만 아니라 대사 과정에서 생산되는 부산물, 배지 성분 등을 포함한다.

- [19] 여기서 혼합 발효란, 미생물 발효 과정에서 서로 다른 산물, 즉 종류가 상이한 아미노산, 핵산 또는 유기산을 생산하는 이종(異種) 미생물을 하나의 배양기에서 동일한 조건으로 발효하는 공정을 의미한다.
- [20] 상기 혼합 발효에서는 아미노산, 핵산 또는 유기산의 종류가 상이한 미생물들이거나, 또는 아미노산 생산 미생물과 핵산 생산 미생물, 아미노산 생산 미생물과 유기산 생산 미생물, 또는 유기산 생산 미생물과 핵산 생산 미생물을 사용할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [21] 이러한 혼합 발효에 의해 제조된 발효액은 2종의 아미노산, 핵산, 또는 유기산을 포함하거나, 또는 1종의 아미노산과 1종의 핵산, 1종의 아미노산과 1종의 유기산, 또는 1종의 유기산과 1종의 핵산을 포함할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [22] 일례로는, 상기 제1 미생물이 글루탐산 생산 미생물인 경우, 상기 제2 미생물은 라이신 생산 미생물, 아르기닌 생산 미생물, 히스티딘 생산 미생물, 트립토판 생산 미생물, 글리신 생산 미생물, 알라닌 생산 미생물, 숙신산 생산 미생물, 젖산 생산 미생물, 구아닐산 생산 미생물 또는 이노신산 생산 미생물일 수 있다.
- [23] 또한, 상기 제1 미생물이 이노신산 생산 미생물인 경우, 상기 제2 미생물은 라이신 생산 미생물, 아르기닌 생산 미생물, 히스티딘 생산 미생물, 트립토판 생산 미생물, 글리신 생산 미생물, 알라닌 생산 미생물, 숙신산 생산 미생물, 젖산 생산 미생물 또는 구아닐산 생산 미생물일 수 있다.
- [24] 본 발명의 일 구체예에 따르면, 상기 단계는 제1 미생물 및 제2 미생물과 서로 다른 산물을 생산하며, 아미노산, 핵산 및 유기산으로 이루어진 군에서 선택된 1종을 생산하는 제3 미생물을 더 접종하는 것일 수 있다.
- [25] 보다 구체적으로, 제1 미생물, 제2 미생물 및 제3 미생물로부터 제조된 발효액은 3종의 아미노산, 핵산, 또는 유기산을 포함하거나, 또는 1종의 아미노산과 2종의 핵산, 2종의 아미노산과 1종의 핵산, 1종의 아미노산과 2종의 유기산, 2종의 아미노산과 1종의 유기산, 1종의 유기산과 2종의 핵산, 2종의 유기산과 1종의 핵산, 또는 1종의 아미노산, 1종의 핵산 및 1종의 유기산을 포함할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [26] 일례로는, 상기 제1 미생물이 글루탐산 생산 미생물이고, 상기 제2 미생물이 구아닐산 생산 미생물인 경우, 상기 제3 미생물은 이노신산 생산 미생물일 수 있다.
- [27] 이러한 조미소재의 제조에 사용되는 미생물은 아미노산, 핵산 및/또는 유기산을 생산하는 미생물로, 자연상태에서 수득된 야생형 미생물이거나, 또는 야생형 미생물의 생산능이 향상되도록 변형된 변이주일 수 있다. 상기 아미노산,

핵산 또는 유기산 생산 미생물로는 당업계에 공지된 미생물을 제한 없이 이용할 수 있으며, 일례로 코리네박테리움(*Corynebacterium*) 속, 브레비박테리움(*Brevibacterium*) 속, 락토바실러스(*Lactobacillus*) 속, 비피도박테리움(*Bifidobacterium*) 속, 바실러스(*Bacillus*) 속 등일 수 있다. 이러한 미생물은 서로 동일한 속(genus) 또는 종(species)이거나, 또는 서로 다른 속(genus) 또는 종(species)일 수 있으며, 사용자에 의해 선택될 수 있다.

- [28] 본 발명의 일 구체예에 따르면, 상기 제1 미생물, 제2 미생물 및 제3 미생물은 코리네박테리움 속 미생물인 것일 수 있다.
- [29] 보다 구체적으로, 상기 코리네박테리움 속 미생물은 코리네박테리움 글루타미쿰(*Corynebacterium glutamicum*), 코리네박테리움 크루디락티스(*Corynebacterium crudilactis*), 코리네박테리움 데저티(*Corynebacterium deserti*), 코리네박테리움 칼루나에(*Corynebacterium callunae*), 코리네박테리움 수라나레에(*Corynebacterium suranareeae*), 코리네박테리움 루브리칸티스(*Corynebacterium lubricantis*), 코리네박테리움 두사넨세(*Corynebacterium doosanense*), 코리네박테리움 이피시엔스(*Corynebacterium efficiens*), 코리네박테리움 우테레키(*Corynebacterium uterequi*), 코리네박테리움 스테이션리스(*Corynebacterium stationis*), 코리네박테리움 파켄세(*Corynebacterium pacaense*), 코리네박테리움 싱굴라레(*Corynebacterium singulare*), 코리네박테리움 휴미레듀센스(*Corynebacterium humireducens*), 코리네박테리움 마리눔(*Corynebacterium marinum*), 코리네박테리움 할로톨레란스(*Corynebacterium halotolerans*), 코리네박테리움 스페니스코룸(*Corynebacterium spheniscorum*), 코리네박테리움 프레이부르겐세(*Corynebacterium freiburgense*), 코리네박테리움 스트리아툼(*Corynebacterium striatum*), 코리네박테리움 카니스(*Corynebacterium canis*), 코리네박테리움 암모니아게네스(*Corynebacterium ammoniagenes*), 코리네박테리움 레날레(*Corynebacterium renale*), 코리네박테리움 폴루티솔리(*Corynebacterium pollutisoli*), 코리네박테리움 이미탄스(*Corynebacterium imitans*), 코리네박테리움 카스피움(*Corynebacterium caspium*), 코리네박테리움 테스투디노리스(*Corynebacterium testudinoris*), 코리네박테리움 슈도펠라지(*Corynebacterium pseudopelargi*) 또는 코리네박테리움 플라베스센스(*Corynebacterium flavescens*)일 수 있으며, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [30] 이러한 2종 이상의 미생물을 혼합 발효하기 위해서는 각각의 분리 및 선별된 미생물을 사용하거나, 또는 이들이 혼합된 미생물 혼합물을 사용할 수 있으며, 상황에 따라 분리 미생물과 미생물 혼합물을 적절히 혼합하여 사용할 수도 있다. 각 미생물은 생육 및 아미노산, 핵산 및/또는 유기산에 대한 생산능이 활성화된 상태에서 발효에 이용될 수 있으며, 미생물 활성화를 위해 종배양을 거치는 것이 바람직하다.
- [31] 본 발명의 일 구체예에 따르면, 상기 제1 미생물, 제2 미생물 및 제3 미생물은

- 개별적으로 배양되거나, 또는 혼합 배양된 종배양액 상태인 것일 수 있다.
- [32] 본 발명에서 사용된 “종배양(seed culture)”은 미생물을 대량 배양하기 전에 적은 용량의 배지에서 미생물을 배양하는 것을 의미하며, “종배양액”은 배지 성분과 종배양을 통해 증식된 미생물 및 이의 대사산물 등을 포함하는 것을 의미한다.
- [33] 상기 종배양은 각 미생물의 특성에 따라 당업계에 알려진 적절한 배지와 배양 조건에 따라 이루어질 수 있으며, 통상의 기술자라면 배지 및 배양 조건을 용이하게 조정하여 사용할 수 있다.
- [34] 보다 구체적으로, 상기 종배양에 사용된 배지는 미생물 성장 및 증식에 필요한 영양물질을 포함하며, 액체 배지일 수 있다.
- [35] 상기 종배양에서의 배양 온도는 통상 20 내지 45°C, 예를 들면 25 내지 40°C, 또는 27 내지 37°C일 수 있고, 배양 기간은 미생물이 활발히 성장 및 증식할 때까지 계속될 수 있으며, 예를 들면 10 내지 160시간, 18 내지 120시간, 또는 20 내지 80시간일 수 있다.
- [36] 또한, 배양 중에 수산화나트륨, 수산화암모늄, 수산화칼륨, 암모니아, 인산 및 황산과 같은 화합물을 배지 또는 배양액에 적절한 방식으로 첨가하여 배양액의 pH를 조정할 수 있다. 또한, 배양 중에 식품 첨가용 소포제를 사용하여 기포 생성을 억제할 수 있다. 추가적으로, 배지 또는 배양액의 호기 상태를 유지하기 위하여, 배양액 내로 산소 또는 산소-함유 기체 (예, 공기)를 주입할 수 있다.
- [37] 이러한 종배양은 사용자가 원하는 미생물 농도에 맞춰 배양할 수 있으며, 종배양액의 OD(optical density) 값을 측정하여 미생물 농도를 예상하고 배양 지속 여부를 결정하게 된다.
- [38] 본 발명의 일 구체예에 따르면, 상기 종배양액은 $OD_{610} = 10 \sim 80$ 인 것일 수 있다.
- [39] 이러한 2종 이상의 미생물의 발효에 의한 발효액을 제조하는 단계에서는 각 미생물 또는 이의 종배양액을 이용한 혼합 발효 (본발효)를 통해 서로 다른 종류의 산물을 포함하는 발효액을 제조할 수 있다.
- [40] 상기 혼합 발효는 종래 각 미생물을 개별적으로 배양하여 각 미생물의 산물을 함유한 발효액을 제조하는 개별 발효와 상반되는 개념이다. 본 발명에서는 혼합 발효를 통해 예를 들어, 글루탐산 생산 미생물에 의해 L-글루탐산을, 라이신 생산 미생물에 의해 L-라이신을, 아르기닌 생산 미생물에 의해 L-아르기닌을, 이노신산 생산 미생물에 의해 IMP를 생산하며, 이들 산물 간의 상호작용, 미생물 발효 과정에서 부가적으로 생성되는 이온, 핵산, 유기산, 기타 펩티드 등의 정미성분 등이 더해져 풍부한 감칠맛 및 우수한 관능 특성을 낼 수 있는 발효액을 제조할 수 있다.
- [41] 본 발명의 일 구체예에 따르면, 상기 단계는 발효액 내 각 미생물의 산물, 즉 아미노산, 핵산 및/또는 유기산의 비율을 조절하기 위해 각 미생물의 접종량을 조절하는 것이 바람직하다.

- [42] 보다 구체적으로, 2종의 미생물을 접종하는 경우, 제1 미생물과 제2 미생물의 접종 비율은 전체 접종량 중 제1 미생물 : 제2 미생물 = 0.05 ~ 99.95 : 99.95 ~ 0.05의 비율일 수 있다. 3종의 미생물을 접종하는 경우, 제1 미생물, 제2 미생물과 제3 미생물의 접종 비율은 전체 접종되는 접종량 중 제1 미생물 : 제2 미생물 : 제3 미생물 = 0.05 ~ 99.95 : 99.95 ~ 0.05 : 99.95 ~ 0.05의 비율일 수 있다.
- [43] 예를 들면, 글루탐산 생산 미생물과 라이신 생산 미생물의 접종량비가 50 ~ 99.95 : 50 ~ 0.05인 경우 두 미생물의 혼합 발효를 통해 조미소제로써의 적절한 맛을 낼 수 있도록 발효액 내 L-글루탐산과 L-라이신을 0.83 ~ 99 : 1의 비율로 생산할 수 있다. 글루탐산 생산 미생물과 아르기닌 생산 미생물의 접종량비가 30 ~ 99.95 : 70 ~ 0.05인 경우 두 미생물의 혼합 발효를 통해 발효액 내 L-글루탐산과 L-아르기닌을 1.04 ~ 99 : 1의 비율로 생산할 수 있다. 글루탐산 생산 미생물과 이노신산 생산 미생물의 접종량비가 0.05 ~ 99.95 : 99.95 ~ 0.05인 경우 두 미생물의 혼합 발효를 통해 발효액 내 L-글루탐산과 IMP를 0.02 ~ 99.8 : 1의 비율로 생산할 수 있다. 이노신산 생산 미생물과 라이신 생산 미생물의 접종량비가 0.05 ~ 99.95 : 99.95 ~ 0.05인 경우 두 미생물의 혼합 발효를 통한 발효액 내 IMP와 L-라이신을 0.01 ~ 92.3 : 1의 비율로 생산할 수 있다. 이노신산 생산 미생물과 아르기닌 생산의 접종량비가 65 ~ 99.95 : 35 ~ 0.05인 경우 두 미생물의 혼합 발효를 통한 발효액 내 IMP와 L-아르기닌을 1.04 ~ 95.1 : 1의 비율로 생산할 수 있다.
- [44] 상기 혼합 발효는 각 미생물의 특성을 고려하여 당업계에 알려진 적절한 배지와 발효 조건에 따라 이루어질 수 있으며, 통상의 기술자라면 배지 및 발효 조건을 용이하게 조정하여 사용할 수 있다.
- [45] 보다 구체적으로, 상기 혼합 발효에 사용되는 발효 배지는 미생물 성장 및 증식에 필요한 영양물질을 포함하며, 액체 배지일 수 있다.
- [46] 상기 발효 배지는 아미노산, 핵산 및/또는 유기산을 대량 생산하기 위한 본발효 시 사용되는 배지로, 각 미생물의 성장에 필요한 영양물질을 포함한다. 본 발명에서는 발효가 끝나면 발효 배지를 포함한 발효액을 별도의 정제 공정 없이 조미소제로 이용하므로, 상기 발효 배지는 식품소재로 이용 가능한 물질로 구성되며 미생물 배양에 필요한 최소한의 성분 및 양을 포함하는 것이 바람직하다.
- [47] 본 발명의 일 구체예에 따르면, 상기 발효 배지는 당밀을 기반으로 원당 및/또는 포도당을 포함하는 것일 수 있다.
- [48] 보다 구체적으로, 상기 발효 배지는 당밀, 원당 및 포도당을 미생물의 당원이자 영양원으로 포함하며, 전체 당량 중 당밀을 1 ~ 30 중량%를 포함할 수 있다. 여기서 사용된 당밀은 사탕수수 또는 사탕무에서 유래한 것일 수 있다.
- [49] 상기 발효 배지는 당원 외에 미생물의 영양 강화를 위한 영양물질을 더 포함할 수 있다.
- [50] 본 발명의 일 구체예에 따르면, 상기 발효 배지는 효모추출물, 인산 및

- 베타인으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상을 더 포함하는 것일 수 있다.
- [51] 상기 혼합 발효에서의 발효 온도는 통상 20 내지 45°C, 예를 들면 25 내지 40°C, 또는 30 내지 38°C일 수 있고, 발효 기간은 미생물이 활발히 성장 및 증식할 때까지 계속될 수 있으며, 예를 들면 10 내지 160시간, 18 내지 120시간, 또는 20 내지 100시간일 수 있다.
- [52] 또한, 배양 중에 수산화나트륨, 수산화암모늄, 수산화칼륨, 암모니아, 인산 및 황산과 같은 화합물을 배지 또는 배양액에 적절한 방식으로 첨가하여 배양액의 pH를 조절할 수 있다. 또한, 배양 중에 식품 첨가용 소포제를 사용하여 기포 생성을 억제할 수 있다. 추가적으로, 배지 또는 배양액의 호기 상태를 유지하기 위하여, 배양액 내로 산소 또는 산소-함유 기체 (예, 공기)를 주입할 수 있다.
- [53] 이러한 혼합 발효를 통해 제조된 발효액은 조미소재의 원물이 되며, 추가의 성분을 혼합하지 않고 그대로 사용하는 것을 특징으로 하며, 미생물로부터 생산된 아미노산, 핵산 및/또는 유기산을 다량 포함하고 있다.
- [54] 본 발명의 일 구체예에 따르면, 상기 발효액은 전체 고형분 중 전체 미생물의 산물을 3 내지 90 중량%로 포함하는 것일 수 있다.
- [55] 보다 구체적으로, 상기 발효액은 전체 고형분 함량을 기준으로 아미노산, 핵산 및/또는 유기산을 3 내지 90 중량%, 10 내지 90 중량%, 20 내지 90 중량%, 30 내지 90 중량%, 40 내지 90 중량%, 50 내지 90 중량%, 60 내지 90 중량%, 70 내지 90 중량%, 또는 80 내지 90 중량%로 포함할 수 있다. 이러한 발효액은 아미노산, 핵산 및/또는 유기산을 5 ~ 150 g/L을 포함할 수 있다.
- [56]
- [57] 또한, 본 발명의 일 양상은 발효 배지에 글루탐산 생산 미생물 및 라이신 생산 미생물을 접종한 후 발효하여 L-글루탐산 및 L-라이신 함유 발효액을 제조하는 단계를 포함하는 L-글루탐산 및 L-라이신 함유 조미소재의 제조방법을 제공한다.
- [58] 상기 글루탐산 생산 미생물 및 라이신 생산 미생물은 자연상태에서 수득된 야생형 미생물이거나, 또는 야생형 미생물의 아미노산 생산능이 향상되도록 변형된 변이주일 수 있다. 이러한 글루탐산 또는 라이신 생산 미생물로는 당업계에서 공지된 미생물을 제한 없이 이용할 수 있으며, 일례로 코리네박테리움(*Corynebacterium*) 속, 브레비박테리움(*Brevibacterium*) 속, 락토바실러스(*Lactobacillus*) 속, 비피도박테리움(*Bifidobacterium*) 속, 바실러스(*Bacillus*) 속 등일 수 있다. 본 발명에서의 미생물은 서로 동일한 속(genus) 또는 종(species)이거나, 또는 서로 다른 속(genus) 또는 종(species)일 수 있으며, 사용자에 의해 선택될 수 있다.
- [59] 본 발명의 일 구체예에 따르면, 상기 글루탐산 생산 미생물 및 라이신 생산 미생물은 코리네박테리움 속 미생물인 것일 수 있다.
- [60] 본 발명의 일 실시예에서는 글루탐산 생산 미생물 및 라이신 생산 균주로서 코리네박테리움 글루타미쿰을 사용하였다.

- [61] 상기 글루탐산 생산 미생물과 라이신 생산 미생물을 혼합 발효하기 위해서는 각각의 분리 및 선별된 미생물을 사용하거나, 또는 이들이 혼합된 미생물 혼합물을 사용할 수 있으며, 상황에 따라 분리 미생물과 미생물 혼합물을 적절히 혼합하여 사용할 수도 있다. 이러한 글루탐산 또는 라이신 생산 미생물은 미생물 생육 및 아미노산 생산능이 활성화된 상태에서 발효에 이용될 수 있으며, 미생물 활성화를 위해 종배양을 거치는 것이 바람직하다.
- [62] 본 발명의 일 구체예에 따르면, 상기 글루탐산 생산 미생물 및 라이신 생산 미생물은 개별적으로 배양되거나, 또는 혼합 배양된 종배양액 상태인 것일 수 있다.
- [63] 상기 종배양은 각 미생물의 특성에 따라 당업계에 알려진 적절한 배지와 배양 조건에 따라 이루어질 수 있으며, 통상의 기술자라면 배지 및 배양 조건을 용이하게 조정하여 사용할 수 있다.
- [64] 보다 구체적으로, 상기 종배양에 사용된 배지는 미생물 성장 및 증식에 필요한 영양물질을 포함하며, 액체 배지일 수 있다.
- [65] 본 발명의 일 구체예에 따르면, 상기 글루탐산 생산 미생물의 종배양 배지는 전체 중량을 기준으로 당밀 4.5 ~ 5.5 중량%, 포도당 3 중량%, 효모추출물 페이스트 0.85 중량%, 메티오닌 100 ppm, H_3PO_4 0.6 중량%, 숙신산나트륨 0.1 중량%, 비타민C 50 ppm, 티아민 HCl 12 ppm, 비타민 B12 20 ppb, 비오틴 10 ppm, $MgSO_4$ 0.4 중량% 및 식품용 소포제 0.01 중량%를 포함하는 것일 수 있다.
- [66] 또한, 본 발명의 일 구체예에 따르면, 상기 라이신 생산 미생물의 종배양 배지는 전체 중량을 기준으로 당밀 1.5 ~ 3 중량%, 원당 9 ~ 12 중량%, 효모추출물 페이스트 1 중량%, $(NH_4)_2SO_4$ 1.6 중량%, H_3PO_4 0.3 중량%, $MnSO_4 \cdot 5H_2O$ 7.3 ppm, 니코틴아미드 14 ppm, 티아민 HCl 2.5 ppm, $CuSO_4 \cdot H_2O$ 1.5 ppm, 비오틴 0.056 ppm, 베타인 0.045 중량% 및 식품용 소포제 0.01 중량%를 포함하는 것일 수 있다.
- [67] 상기 종배양에서의 배양 온도는 통상 20 내지 45°C, 예를 들면 25 내지 40°C, 또는 27 내지 37°C일 수 있고, 배양 기간은 미생물이 활발히 성장 및 증식할 때까지 계속될 수 있으며, 예를 들면 10 내지 160시간, 18 내지 120시간, 또는 20 내지 80시간일 수 있다.
- [68] 또한, 배양 중에 수산화나트륨, 수산화암모늄, 수산화칼륨, 암모니아, 인산 및 황산과 같은 화합물을 배지 또는 배양액에 적절한 방식으로 첨가하여 배양액의 pH를 조정할 수 있다. 또한, 배양 중에 식품 첨가용 소포제를 사용하여 기포 생성을 억제할 수 있다. 추가적으로, 배지 또는 배양액의 호기 상태를 유지하기 위하여, 배양액 내로 산소 또는 산소-함유 기체 (예, 공기)를 주입할 수 있다.
- [69] 이러한 종배양은 사용자가 원하는 미생물 농도에 맞춰 배양할 수 있으며, 종배양액의 OD(optical density) 값을 측정하여 미생물 농도를 예상하고 배양 지속 여부를 결정하게 된다.
- [70] 본 발명의 일 구체예에 따르면, 상기 종배양액은 $OD_{610} = 10 \sim 80$ 인 것일 수 있다.

- [71] 이러한 글루탐산 생산 미생물 및 라이신 생산 미생물의 발효에 의한 발효액을 제조하는 단계에서는 글루탐산 생산 미생물 또는 이의 종배양액과 라이신 생산 미생물 또는 이의 종배양액을 이용한 혼합 발효 (본발효)를 통해 L-글루탐산과 L-라이신을 모두 포함하는 발효액을 제조할 수 있다.
- [72] 상기 혼합 발효는 종래 아미노산 생산을 위해 각 미생물을 개별적으로 배양하여 각 미생물의 산물을 함유한 발효액을 제조하는 개별 발효와 상반대되는 개념이다. 본 발명에서는 혼합 발효를 통해 글루탐산 생산 미생물에 의해 L-글루탐산을, 라이신 생산 미생물에 의해 L-라이신을 생산하며, 이들 L-글루탐산과 L-라이신의 상호작용, 미생물 발효 과정에서 부가적으로 생성되는 이온, 핵산, 유기산, 기타 펩티드 등의 정미성분 등이 더해져 풍부한 감칠맛 및 우수한 관능 특성을 낼 수 있는 발효액을 제조할 수 있다.
- [73] 본 발명의 일 구체예에 따르면, 상기 단계는 발효액 내 L-글루탐산과 L-라이신의 비율을 조절하기 위해 글루탐산 생산 미생물과 라이신 생산 미생물의 접종량을 조절하는 것일 수 있다.
- [74] 보다 구체적으로, 상기 글루탐산 생산 미생물과 라이신 생산 미생물의 접종 비율은 전체 접종량 중 글루탐산 생산 미생물 : 라이신 생산 미생물 = 0.05 ~ 99.95 : 99.95 ~ 0.05의 비율일 수 있으며, 이러한 비율로 접종된 두 미생물의 혼합 발효를 통해 조미소재로서의 적절한 맛을 낼 수 있게 발효액 내 L-글루탐산과 L-라이신을 1 ~ 99 : 1의 비율로 생산할 수 있다.
- [75] 예를 들면, 상기 글루탐산 생산 미생물과 라이신 생산 미생물의 접종량비가 50 ~ 99.95 : 50 ~ 0.05인 경우 발효액 내 L-글루탐산과 L-라이신을 0.83 ~ 99 : 1의 비율로 생산할 수 있으며, 상기 글루탐산 생산 미생물과 라이신 생산 미생물을 65 : 35의 접종량비로 조절 시 발효액 내 L-글루탐산과 L-라이신을 약 1 : 1의 비율로 생산할 수 있다.
- [76] 상기 혼합 발효는 각 미생물의 특성을 고려하여 당업계에 알려진 적절한 배지와 발효 조건에 따라 이루어질 수 있으며, 통상의 기술자라면 배지 및 발효 조건을 용이하게 조정하여 사용할 수 있다.
- [77] 보다 구체적으로, 상기 혼합 발효에 사용된 발효 배지는 액체 배지일 수 있다.
- [78] 상기 발효 배지는 L-글루탐산 및 L-라이신을 대량 생산하기 위한 본발효 시 사용되는 배지로, 글루탐산 생산 미생물과 라이신 생산 미생물의 생장에 필요한 영양물질을 포함한다. 본 발명에서는 발효가 끝나면 발효 배지를 포함한 발효액을 별도의 정제 공정 없이 조미소재로 이용하므로, 상기 발효 배지는 식품소재로 이용 가능한 물질로 구성되며 미생물 배양에 필요한 최소한의 성분 및 양을 포함하는 것이 바람직하다.
- [79] 본 발명의 일 구체예에 따르면, 상기 발효 배지는 당밀을 기반으로 원당 및/또는 포도당을 포함하는 것일 수 있다.
- [80] 보다 구체적으로, 상기 발효 배지는 당밀, 원당 및 포도당을 미생물의 당원이자 영양원으로 포함하며, 전체 당량 중 당밀을 1 ~ 30 중량%를 포함할 수 있다.

- 여기서 사용된 당밀은 사탕수수 또는 사탕무에서 유래한 것일 수 있다.
- [81] 상기 발효 배지는 당원 외에 미생물의 영양 강화를 위한 영양물질을 더 포함할 수 있다.
- [82] 본 발명의 일 구체예에 따르면, 상기 발효 배지는 효모추출물, 인산 및 베타인으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상을 더 포함하는 것일 수 있다.
- [83] 본 발명의 일 구체예에 따르면, 상기 발효 배지는 전체 중량을 기준으로 당밀 1.5 ~ 3 중량%, 포도당 2.5 ~ 4 중량%, 효모추출물 페이스트 0.4 ~ 1 중량%, H_3PO_4 0.1 ~ 0.2 중량%, 베타인 0.05 ~ 0.12 중량% 및 식품용 소포제 0.001 ~ 0.01 중량%를 포함하는 것일 수 있다.
- [84] 상기 혼합 발효에서의 발효 온도는 통상 20 내지 45°C, 예를 들면 25 내지 40°C, 또는 30 내지 38°C일 수 있고, 발효 기간은 L-글루탐산 및 L-라이신을 원하는 함량 또는 농도로 수득할 때까지 계속될 수 있으며, 예를 들면 10 내지 160시간, 18 내지 120시간, 또는 20 내지 100시간일 수 있다.
- [85] 또한, 발효 중에 수산화나트륨, 수산화암모늄, 수산화칼륨, 암모니아, 인산 및 황산과 같은 화합물을 배지 또는 발효액에 적절한 방식으로 첨가하여 발효액의 pH를 조정할 수 있다. 또한, 발효 중에 식품 첨가용 소포제를 사용하여 기포 생성을 억제할 수 있다. 추가적으로, 배지 또는 발효액의 호기 상태를 유지하기 위하여, 발효액 내로 산소 또는 산소-함유 기체 (예, 공기)를 주입할 수 있다.
- [86] 본 발명의 일 구체예에 따르면, 상기 발효는 온도를 30 ~ 33°C에서 시작하여 36 ~ 39°C로 유지하고, pH 6.5 ~ 7.5 및 용존산소량 20 ~ 70%를 유지하는 상태에서 28 ~ 40시간 유가식 배양하는 것일 수 있다.
- [87] 이러한 L-글루탐산 및 L-라이신을 함유하는 발효액은 L-글루탐산 및 L-라이신 함유 조미소재의 원물이 되며, 추가의 성분을 혼합하지 않고 그대로 사용하는 것을 특징으로 하며, L-글루탐산 및 L-라이신을 다량 포함하고 있다.
- [88] 본 발명의 일 구체예에 따르면, 상기 발효액은 전체 고형분 중 L-글루탐산 및 L-라이신을 포함한 아미노산을 3 내지 90 중량%로 포함하는 것일 수 있다.
- [89] 보다 구체적으로, 상기 발효액 내 L-글루탐산 및 L-라이신을 포함한 아미노산 함량은 고형분 대비 3 내지 90 중량%, 10 내지 90 중량%, 20 내지 90 중량%, 30 내지 90 중량%, 40 내지 90 중량%, 50 내지 90 중량%, 60 내지 90 중량%, 70 내지 90 중량%, 또는 80 내지 90 중량%로 포함할 수 있다. 이러한 발효액은 L-글루탐산 및 L-라이신을 5 ~ 150 g/L을 포함할 수 있다.
- [90]
- [91] 한편, 본 발명에 따른 조미소재의 제조방법은 상기 발효액을 조미소재 또는 L-글루탐산 및 L-라이신 함유 조미소재로 이용하기 위한 추가 공정을 더 포함할 수 있다.
- [92] 보다 구체적으로, 상기 방법은 상기 발효액으로부터 균체 분리 (균체 제거) 및 탈색하는 단계를 더 포함할 수 있다.
- [93] 상기 균체 분리는 당업계에 공지된 균체 분리법 및 분리 조건을 적용하여 제한

- 없이 수행할 수 있다. 상기 균체 분리의 일례로는 막분리, 한외여과, 원심분리여과 등일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [94] 상기 탈색은 당업계에 공지된 탈색법 및 탈색 조건을 적용하여 제한 없이 수행할 수 있다. 상기 탈색의 일례로는 활성탄 등을 사용할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [95] 또한, 상기 탈색된 발효액을 여과하는 단계를 더 포함할 수 있다.
- [96] 상기 여과는 당업계에 공지된 여과법 및 여과 조건을 적용하여 제한 없이 수행할 수 있다. 상기 여과의 일례로는 여과지, 여과망, 막여과, 한외여과 등을 사용할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [97] 또한, 상기 여과된 발효액을 농축하는 단계를 더 포함할 수 있다.
- [98] 상기 농축은 당업계에 공지된 농축법 및 농축 조건을 적용하여 제한 없이 수행할 수 있다. 상기 농축의 일례로는 가열 농축, 감압 농축, 동결 농축, 증발 농축, 진공저온 농축 등이 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [99] 또한, 상기 농축된 발효액을 건조하여 분말화하는 단계를 더 포함할 수 있다.
- [100] 상기 건조는 당업계에 공지된 건조법 및 건조 조건을 적용하여 제한 없이 수행할 수 있다. 상기 건조의 일례로는 동결 건조, 진공 건조, 통기 건조, 송풍 건조, 열풍 건조, 유동 건조, 분무 건조, 적외선 건조, 고주파 건조 등이 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [101] 이와 같은 방법을 통해 발효액은 최종적으로 분말 상태로 수득될 수 있으며, 추가 화학적 정제 과정을 거치지 않은 천연 조미소제로서 식품으로 이용가능하다.
- [102]
- [103] 본 발명의 다른 일 양상은 전술한 2종 이상의 미생물을 이용한 조미소제의 제조방법으로 제조된 조미소제를 제공한다.
- [104] 본 발명의 일 구체예에 따르면, 상기 조미소제는 아미노산, 핵산 및 유기산 중 2종 또는 3종의 정미성분을 포함하는 천연 조미소제인 것일 수 있다.
- [105] 상기 아미노산은 L-글루탐산, L-알라닌, L-발린, L-류신, L-이소류신, L-프롤린, L-페닐알라닌, L-트립토판, L-메티오닌, L-글리신, L-세린, L-트레오닌, L-시스테인, L-아스파라진, L-글루타민, L-아스파르트산, L-라이신, L-아르기닌 및 L-히스티딘으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상인 것일 수 있다.
- [106] 상기 핵산은 이노신산, 구아닐산, 잔틸산 및 이들의 염 형태로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상인 것일 수 있다.
- [107] 예를 들면, 상기 핵산은 이노신 일인산(inosine monophosphate, IMP), 구아노신 일인산(guanosine monophosphate, GMP), 잔토신 일인산(xanthosine monophosphate, XMP) 등일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [108] 상기 유기산은 숙신산, 사과산, 구연산, 초산, 젖산, 푸마르산, 주석산, 아스코르브산, 글루콘산 및 이들의 염 형태로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상인 것일 수 있다.

- [109] 일례로는, 2종의 정미성분을 포함하는 경우, 상기 조미소재는 글루탐산; 및 라이신, 아르기닌, 히스티딘, 트립토판, 글리신, 알라닌, 숙신산, 젖산, 구아닐산, 또는 이노신산을 포함할 수 있다. 또한, 상기 조미소재는 이노신산; 및 라이신, 아르기닌, 히스티딘, 트립토판, 글리신, 알라닌, 숙신산, 젖산, 또는 구아닐산을 포함할 수 있다.
- [110] 다른 일례로는, 3종의 정미성분을 포함하는 경우, 상기 조미소재는 글루탐산; 구아닐산; 및 이노신산을 포함하는 것일 수 있다.
- [111] 본 발명의 일 구체예에 따르면, 상기 조미소재는 전체 고형분 함량을 기준으로 아미노산, 핵산 및/또는 유기산을 포함하는 정미성분을 3 내지 90 중량%로 포함하는 것일 수 있다.
- [112] 보다 구체적으로, 상기 조미소재는 전체 고형분 함량을 기준으로 아미노산, 핵산 및/또는 유기산을 포함하는 정미성분을 3 내지 90 중량%, 10 내지 90 중량%, 20 내지 90 중량%, 30 내지 90 중량%, 40 내지 90 중량%, 50 내지 90 중량%, 60 내지 90 중량%, 70 내지 중량%, 또는 80 내지 90 중량%로 포함할 수 있다.
- [113]
- [114] 또한, 본 발명의 다른 일 양상은 전술한 글루탐산 생산 미생물 및 라이신 생산 미생물을 이용한 L-글루탐산 및 L-라이신 함유 천연 조미소재의 제조방법으로 제조된 L-글루탐산 및 L-라이신 함유 조미소재를 제공한다.
- [115] 본 발명의 일 구체예에 따르면, 상기 L-글루탐산 및 L-라이신 함유 조미소재는 천연 조미소재인 것일 수 있다.
- [116] 본 발명의 일 구체예에 따르면, 상기 조미소재는 L-글루탐산 및 L-라이신 함량이 고형분 대비 3 내지 90 중량%이며, L-글루탐산과 L-라이신을 0.83 ~ 99 : 1의 비율로 포함하는 것일 수 있다.
- [117] 이러한 조미소재는 감칠맛을 내는 L-글루탐산과 함께 L-라이신을 포함함으로써 L-글루탐산의 용해도를 높이고 발효 과정 중 암모늄 글루탐산(ammonium glutamate)의 생성을 감소시켜 암모니아취 문제를 해결할 수 있으며, 발효 과정에서 생산된 유기산, 무기이온성분, 단백질 및 펩티드류, 비타민 등의 대사산물 또한 포함함으로써 풍부한 감칠맛과 강한 바디감을 가지며 우수한 관능 특성을 나타내어 다양한 식품에 첨가되어 식품의 맛을 극대화시킬 수 있다.
- [118]
- [119] 또한, 본 발명의 다른 일 양상은 전술한 조미소재 또는 L-글루탐산 및 L-라이신 함유 조미소재를 포함하는 식품 조성물을 제공한다.
- [120] 본 발명에서 사용된 “식품 조성물”은 영양소를 한 가지 또는 그 이상 함유하고 있는 천연물 또는 가공품을 의미하며, 바람직하게는 어느 정도의 공정을 거쳐 직접 먹을 수 있는 상태가 된 것을 의미하며, 통상적인 의미로서 건강기능식품, 기능성식품, 음료, 식품 첨가제 및 음료 첨가제를 모두 포함한다.
- [121] 본 발명의 일 구체예에 따르면, 상기 식품 조성물은 화학적 정제 과정 없이

제조된 조미소재 또는 천연 L-글루탐산 및 L-라이신 함유 조미소재, 즉 천연 조미소재를 포함하는 것으로, 전체 중량을 기준으로 상기 조미소재를 0.001 ~ 90 중량%, 보다 구체적으로는 0.01 ~ 50 중량%를 포함하는 것일 수 있다.

[122] 본 발명에서의 식품 조성물은 식품에 적합한 모든 제형으로 제공될 수 있으며, 일례로 용액, 유탁액, 점성형 혼합물, 분말, 과립, 정제, 캡슐 등일 수 있다. 이때, 본 발명이 목적으로 하는 주 효과를 손상시키지 않는 범위 내에서 제형의 제제화에 필요하고 적절한 각종 기재 및/또는 첨가물을 포함할 수 있으며, 그 효과를 떨어뜨리지 않는 범위 내에서 향료, 색소, 살균제, 산화방지제, 방부제, 보습제, 점증제, 무기염류, 유화제 등의 첨가제를 더 포함할 수 있다. 이러한 첨가제들의 배합량은 제형 또는 사용 목적에 따라 본 발명의 목적 및 효과를 손상시키지 않는 범위 내에서 선택될 수 있다. 예를 들면, 식품 조성물의 전체 중량을 기준으로, 첨가제 0.01 ~ 70 중량%, 보다 구체적으로는 0.1 ~ 50 중량%일 수 있다.

[123] 이러한 식품 조성물은 각종 식품의 첨가물로 이용될 수 있다. 이러한 식품 조성물을 첨가할 수 있는 식품으로는 당업계에 공지된 식품 종류라면 제한 없이 이용 가능하며, 일례로 육류, 소시지, 빵, 초콜릿, 캔디류, 스낵류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류를 포함한 낙농제품, 각종 스프, 음료수, 차, 드링크제, 알콜 음료 및 비타민 복합제 등일 수 있으나, 이에 제한되는 것이 아니다.

발명의 효과

[124] 본 발명에 따른 조미소재의 제조방법은 서로 다른 산물, 즉 종류가 상이한 아미노산, 핵산 및/또는 유기산을 생산하는 이종 미생물을 혼합하여 발효함으로써 아미노산, 핵산 및/또는 유기산을 함유하는 발효액을 통해 식품의 맛과 향을 향상시키고 전체적인 관능 특성을 개선시킬 수 있는 천연 조미소재를 제조할 수 있으며, 이러한 조미소재는 다양한 식품 분야에서 활용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[125] 도 1은 본 발명의 일 실시예에 따른 제조예 1 내지 3의 글루탐산 생산 미생물과 라이신 생산 미생물을 이용한 발효 공정의 흐름도이다.

[126] 도 2는 본 발명의 일 실시예에 따른 제조예 4 내지 6의 글루탐산 생산 미생물과 아르기닌 생산 미생물을 이용한 발효 공정의 흐름도이다.

[127] 도 3은 본 발명의 일 실시예에 따른 제조예 7 내지 9의 글루탐산 생산 미생물과 이노신산 생산 미생물을 이용한 발효 공정의 흐름도이다.

[128] 도 4는 본 발명의 일 실시예에 따른 제조예 10 내지 12의 이노신산 생산 미생물과 라이신 생산 미생물을 이용한 발효 공정의 흐름도이다.

[129] 도 5는 본 발명의 일 실시예에 따른 제조예 13 내지 15의 이노신산 생산 미생물과 아르기닌 생산 미생물을 이용한 발효 공정의 흐름도이다.

발명의 실시를 위한 형태

- [130] 이하, 첨부된 도면을 참조하며 본 발명을 보다 상세하게 설명한다. 그러나, 이러한 설명은 본 발명의 이해를 돕기 위하여 예시적으로 제시된 것일 뿐, 본 발명의 범위가 이러한 예시적인 설명에 의하여 제한되는 것은 아니다.
- [131]
- [132] 실시예 1. 글루탐산 및 라이신의 혼합 발효
- [133] 1-1. 종배양
- [134] 글루탐산 생산 미생물로서 L-글루탐산(GA)을 생산하는 코리네박테리움 글루타미쿰 NFG6 (KCCM13164P) 및 라이신 생산 미생물로서 L-라이신(LYS)을 생산하는 코리네박테리움 글루타미쿰 NFL21 (KCCM13163P)를 사용하였다.
- [135] 글루탐산 생산 미생물을 종배양하기 위해, 종배양 배지 0.2 L가 담긴 2 L 플라스크에 글루탐산 생산 미생물을 접종하여 30°C, 140 rpm에서 22 내지 24시간 동안 1차 배양하였다 (OD₆₁₀ = 10 ~ 15). 이후 5 L 배양기 (jar fermenter)에 1차 배양액 2 ~ 3%를 접종하고 종배양 배지 2 ~ 2.5 L를 첨가하여 32°C, pH 6.9, 600 rpm 및 통기량 1.0 vvm 조건에서 22 ~ 24시간 2차 배양하였고 (OD₆₁₀ = 20 ~ 60), 글루탐산 종배양액을 준비하였다.
- [136] 라이신 생산 미생물을 종배양하기 위해, 종배양 배지 0.2 L가 담긴 2 L 플라스크에 라이신 생산 미생물을 접종하여 30°C, 140 rpm에서 16 내지 18시간 동안 1차 배양하였다 (OD₆₁₀ = 11 ~ 12). 5 L 배양기 (jar fermenter)에 1차 배양액 5%를 접종하고 종배양 배지 2 ~ 2.5 L를 첨가하여 32°C, pH 7.0, 650 rpm 및 통기량 2.0 vvm 조건에서 21 내지 24시간 2차 배양하였고 (OD₆₁₀ = 20 ~ 60), 라이신 종배양액을 준비하였다.
- [137] 여기서 사용된 종배양 배지의 조성은 하기 표 1에 나타내었다.
- [138] [표1]

	조성
글루탐산 생산 미생물 종배양 배지	당밀 4.5 ~ 5.5%, 포도당 3%, 효모추출물 페이스트 0.85%, 메티오닌 100 ppm, H ₃ PO ₄ 0.6%, 숙신산나트륨 0.1%, 비타민C 50 ppm, 티아민 HCl 12 ppm, 비타민 B12 20 ppb, 비오틴 10 ppm, MgSO ₄ 0.4% 및 식품용 소포제 0.01%
라이신 생산 미생물 종배양 배지	당밀 1.5 ~ 3%, 원당 9 ~ 12%, 효모추출물 페이스트 1%, (NH ₄) ₂ SO ₄ 1.6%, H ₃ PO ₄ 0.3%, MnSO ₄ ·5H ₂ O 7.3 ppm, 니코틴아미드 14 ppm, 티아민 HCl 2.5 ppm, CuSO ₄ ·5H ₂ O 1.5 ppm, 비오틴 0.056 ppm, 베타인 0.045% 및 식품용 소포제 0.01%

[139]

[140] 1-2. 본발효

[141] 글루탐산 종배양액과 라이신 종배양액의 접종량에 따른 발효액 내 글루탐산과 라이신의 비율을 확인하기 위해 다양한 비율로 글루탐산 종배양액과 라이신 종배양액을 접종하여 발효하였다.

[142] 본발효에서는 50 L 발효조에 발효 배지 14 ~ 18 L를 첨가하고, 글루탐산 종배양액과 라이신 종배양액을 50 ~ 99.95 : 50 ~ 0.05의 접종량 비율로 총 종배양액 1.2 ~ 1.8 L를 접종하여 28 ~ 40시간 동안 유가식 배양으로 혼합 발효하였다. 여기서 사용된 발효 배지 조성 및 조건은 하기 표 2에 나타내었다.

[143] [표2]

발효 배지 조성	당밀 1.5 ~ 3%, 포도당 2.5 ~ 4%, 효모추출물 페이스트 0.4 ~ 1%, H ₃ PO ₄ 0.1 ~ 0.2%, 베타인 0.05 ~ 0.12% 및 식품용 소포제 0.005%
발효 조건	온도 32→38°C, pH 6.5 ~ 7.5, 통기 0.8 ~ 1.2 vvm, 내압 0.6 ~ 1.0 kg/cm ³ , 교반속도 320 ~ 350 rpm 및 용존산소량(DO) 20 ~ 70% 유지

[144]

[145] 이러한 혼합 발효를 총 3회 실시하여 평균 값을 계산하였고, 그 결과는 표 3에 나타내었다.

[146] [표3]

종배양액의 접종량 비율 GA : LYS	발효 시간	발효액 내 GA : LYS 비율
99.95 : 0.05	31시간	99 : 1
75 : 25	29시간	1.48 : 1
70 : 30	29시간	1.30 : 1
67 : 33	30시간	1.10 : 1
65 : 35	30시간	1.01 : 1
60 : 40	29시간	0.93 : 1
50 : 50	28시간	0.83 : 1

[147]

[148] 상기 표 3을 참조하면, 각 아미노산 미생물의 종배양액을 글루탐산 생산 미생물 : 라이신 생산 미생물 = 50 ~ 99.95 : 50 ~ 0.05의 비율로 접종 시 발효액 내 L-글루탐산과 L-라이신이 0.83 ~ 99 : 1의 비율로 생산됨을 확인하였다.

[149]

[150] 실시예 2. 발효 공정 차이에 따른 글루탐산-라이신 발효 분말 비교

[151] 2-1. 글루탐산-라이신 발효 분말의 제조

- [152] 종래에는 글루탐산 생산 미생물과 라이신 생산 미생물을 개별적으로 발효한 후 아미노산 함유 발효액 또는 이의 건조물을 적정 비율로 혼합하여 글루탐산과 라이신을 함유한 조미소재를 제조하였다. 이러한 종래 개별 발효 방법과 글루탐산 생산 미생물 및 라이신 생산 미생물을 혼합 발효하는 방법 간의 맛 차이를 비교하기 위해, 각 제조 방법에 의해 얻어진 글루탐산-라이신(GA-LYS) 발효 분말의 성분을 비교하였다 (도 1 참조).
- [153] 여기서 사용된 글루탐산 종배양액 및 라이신 종배양액은 실시예 1-1과 동일한 방법으로 준비하였다.
- [154]
- [155] ① 개별 발효 (제조예 1)
- [156] 종래 방법 중 개별 건조물을 혼합하는 방법에서는 글루탐산 종배양액 또는 라이신 종배양액을 각각 50 L 발효조로 옮긴 후 개별적으로 본발효를 실시하였다. 이후 각각의 발효액에서 균체를 분리한 후 탈색 및 여과 공정을 거쳤다. 여과물을 농축하고 건조하여 건조물을 수득하였다. 각각 수득된 글루탐산과 라이신 건조물을 각각 아미노산의 비율이 1 : 1이 되도록 혼합하여 글루탐산-라이신을 함유한 발효 분말을 제조하였다.
- [157]
- [158] ② 개별 발효 후 발효액 혼합 (제조예 2)
- [159] 종래 방법 중 개별 발효액을 혼합하는 방법에서는 글루탐산 종배양액 또는 라이신 종배양액을 각각 50 L 발효조로 옮긴 후 개별적으로 본발효를 실시하였다. 본발효에서 수득된 각각의 발효액을 각각 아미노산의 비율이 1 : 1이 되도록 혼합한 후 균체를 분리한 후 탈색 및 여과 공정을 거쳤다. 여과물을 농축하고 건조하여 글루탐산-라이신 발효 분말을 수득하였다.
- [160]
- [161] ③ 혼합 발효 (제조예 3)
- [162] 혼합 발효에서는 제조예 1 및 2와 동일하게 발효액 내 각 아미노산의 비율이 약 1 : 1이 되도록 실시예 1-2와 동일한 방법으로 글루탐산 종배양액과 라이신 종배양액을 접종량 기준 65 : 35의 비율로 접종하여 혼합 발효하였다. 이후 발효액에서 균체를 분리한 탈색 및 여과 공정을 거쳤다. 여과물을 농축하고 건조하여 글루탐산-라이신 발효 분말을 수득하였다.
- [163]
- [164] 2-2. 글루탐산-라이신 발효 분말의 성분 비교
- [165] 제조예 1 및 2의 개별 발효에서 수득된 글루탐산-라이신 발효 분말과 제조예 3의 혼합 발효에서 수득된 글루탐산-라이신 발효 분말에 대해 성분 분석을 실시하였다.
- [166] 아미노산 (L-글루탐산 및 L-라이신)은 HPLC 분석 (GA - 210 nm UV 검출기, 유속 0.9 ml/min; LYS - 214 nm, UV 검출기, 유속 0.8 ml/min)으로, 유기산 (시트르산, 숙신산, 젖산, 아세트산 등)은 HPLC 분석 (HPX-87H 컬럼, 214 nm, 25

min)으로 측정하였다. 이온류 (Na, Mg, K, PO₄, SO₄, Cl, NH₄ 등)에 대해서는 이온분석기 (Dionex IcS-1100, Thermo scientific)로 측정하였다. 그 결과는 하기 표 4에 나타내었다.

[167] [표4]

항목	제조예 1	제조예 2	제조예 3
GA	22%	35%	43%
LYS	22%	35%	43%
AA/TS*	47%	72%	88%
총 질소	9.0%	12.2%	11.8%
유기산	3.1%	2.6%	1.5%
이온	8.1%	10.2%	2%
암모늄	3.8%	2.5%	0.7%
*AA/TS: 총 고형분에 대한 아미노산(GA+LYS) 비율			

[168]

[169] 상기 표 4를 참조하면, 혼합 발효한 경우 (제조예 3)에는 개별 발효한 경우 (제조예 1 및 2)에 비해 높은 아미노산 비율을 나타내며, 유기산, 이온 및 암모늄 함량이 현저히 감소하였다.

[170]

[171] **2-3. 개별 발효와 혼합 발효의 관능 비교**

[172] 제조예 1 및 2의 개별 발효에서 수득된 글루탐산-라이신 발효 분말과 제조예 3의 혼합 발효에서 수득된 글루탐산-라이신 발효 분말에 대해 관능 평가를 진행하였다.

[173] 글루탐산-라이신 발효 분말에 대한 관능 평가는 10 ~ 15명의 관능평가 수행 전문패널을 대상으로 분말 그대로 또는 미온수에 1 ~ 5%로 희석하여 시료의 감칠맛, 감칠맛 지속성, 짭맛, 신맛, 쓴맛 및 단맛을 평가하였다. 그 결과를 하기 표 5에 나타내었다.

[174] [표5]

항목	제조예 1 (개별 발효)	제조예 2 (개별 발효)	제조예 3 (혼합 발효)
선미 감칠맛	+++	++++	++++
후미 지속성	++	+++	++++
짭맛	-	+	++
신맛	++	+	-
쓴맛	++	+	-
단맛	+	+	++

[175]

[176] 상기 표 5를 참조하면, 상기 표 4와 같은 글루탐산-라이신 발효 분말의 성분 차이로 인해 개별 발효 후 혼합하는 공정으로 제조된 샘플의 맛은 혼합 발효로 제조된 샘플에 비해 감칠맛이 약하고 쓴맛, 신맛이 높아졌다. 그리고 상기 표 4에서와 같이 유기산과 같은 부산물 증가 및 이온류 증가는 관능에도 영향을 주기 때문에 개별 발효 후 혼합하는 것보다는 혼합 발효 공정이 맛 측면이나 공정 간소화 부분에서 효과적이다.

[177]

[178] 실시예 3. 글루탐산 및 아르기닌의 혼합 발효

[179] 3-1. 종배양

[180] 글루탐산 생산 미생물로서 코리네박테리움 글루타미쿰 NFG6 (KCCM13164P) 및 아르기닌 생산 미생물로서 L-아르기닌(ARG)을 생산하는 코리네박테리움 글루타미쿰 NFA40 (KCCM13165P)을 사용하였다.

[181] 글루탐산 생산 미생물을 이용한 글루탐산 종배양액은 실시예 1-1과 동일한 방법으로 준비하였다.

[182] 아르기닌 생산 미생물을 종배양하기 위해, 종배양 배지 0.2 L가 담긴 2 L 플라스크에 아르기닌 생산 미생물을 접종하여 30°C, 140 rpm에서 16 내지 18시간 동안 1차 배양하였다 (OD₆₁₀ = 12 ~ 18). 5 L 배양기 (jar fermenter)에 1차 배양액 2 ~ 4%를 접종하고 종배양 배지 2 ~ 2.5 L를 첨가하여 32°C, pH 6.7, 600 rpm 및 통기량 1.0 vvm 조건에서 16 내지 24시간 2차 배양하였고 (OD₆₁₀ = 20 ~ 60), 아르기닌 종배양액을 준비하였다. 사용된 종배양 배지의 조성은 하기 표 6에 나타내었다.

[183] [표6]

	조성
아르기닌 생산 미생물 종배양 배지	포도당 1.5 ~ 4.5%, 원당 2 ~ 6%, 효모추출물 페이스트 2 ~ 3%, (NH ₄) ₂ SO ₄ 0.6%, KH ₂ PO ₄ 0.2%, K ₂ HPO ₄ 0.2%, MnSO ₄ ·5H ₂ O 15 ppm, MgSO ₄ ·7H ₂ O 0.2%, 티아민 HCl 1 ppm, ZnSO ₄ ·7H ₂ O 10 ppm, 비오틴 0.3 ppm, FeSO ₄ ·7H ₂ O 15ppm 및 식품용 소포제 0.01%

[184]

[185] **3-2. 본발효**

[186] 글루탐산 종배양액과 아르기닌 종배양액의 접종량에 따른 발효액 내 글루탐산과 아르기닌의 비율을 확인하기 위해 다양한 비율로 글루탐산 종배양액과 아르기닌 종배양액을 접종하여 발효하였다.

[187] 본발효에서는 50 L 발효조에 발효 배지 14 ~ 18 L를 첨가하고, 글루탐산 종배양액과 아르기닌 종배양액을 30 ~ 99.95 : 70 ~ 0.05의 접종량 비율로 총 종배양액 1.2 ~ 1.8 L를 접종하여 31 ~ 60시간 동안 유가식 배양으로 혼합 발효하였다. 여기서 사용된 발효 배지 조성 및 조건은 하기 표 7에 나타내었다.

[188] [표7]

발효 배지 조성	당밀 1.5 ~ 3%, 포도당 2.5 ~ 4%, 효모추출물 페이스트 0.4 ~ 1%, (NH ₄) ₂ SO ₄ 0.05 ~ 0.3%, H ₃ PO ₄ 0.1 ~ 0.2%, 베타인 0.05 ~ 0.12% 및 식품용 소포제 0.005%
발효 조건	온도 32 ~ 37°C, pH 6.5 ~ 7.5, 통기 0.8 ~ 1.2 vvm, 내압 0.5 ~ 1.0 kg/cm ³ , 교반속도 320 ~ 350 rpm 및 용존산소량(DO) 20 ~ 70% 유지

[189]

[190] 이러한 혼합 발효를 총 3회 실시하여 평균 값을 계산하였고, 그 결과는 표 8에 나타내었다.

[191] [표8]

종배양액의 접종량 비율 GA : ARG	발효 시간	발효액 내 GA : ARG 비율
99.95 : 0.05	31시간	99.0 : 1
90 : 10	31시간	12.2 : 1
80 : 20	34시간	4.36 : 1
70 : 30	36시간	2.41 : 1
60 : 40	38시간	1.96 : 1
50 : 50	40시간	1.57 : 1
40 : 60	44시간	1.21 : 1
30 : 70	45시간	1.04 : 1

[192]

[193] 상기 표 8을 참조하면, 각 아미노산 미생물의 종배양액을 글루탐산 생산 미생물 : 아르기닌 생산 미생물 = 30 ~ 99.95 : 70 ~ 0.05의 비율로 접종 시 발효액 내 L-글루탐산과 L-아르기닌이 1.04 ~ 99 : 1의 비율로 생산됨을 확인하였다.

[194]

[195] 실시예 4. 발효 공정 차이에 따른 글루탐산-아르기닌 발효 분말 비교

[196] 4-1. 글루탐산-아르기닌 발효 분말의 제조

[197] 종래에는 글루탐산 생산 미생물과 아르기닌 생산 미생물을 개별적으로 발효한 후 아미노산 함유 발효액 또는 이의 건조물을 적정 비율로 혼합하여 글루탐산과 아르기닌을 함유한 조미소재를 제조하였다. 이러한 종래 개별 발효 방법과 글루탐산 생산 미생물 및 아르기닌 생산 미생물을 혼합 발효하는 방법 간의 맛 차이를 비교하기 위해, 각 제조 방법에 의해 얻어진 글루탐산-아르기닌(GA-ARG) 발효 분말의 성분을 비교하였다 (도 2 참조).

[198] 여기서 사용된 글루탐산 종배양액 및 아르기닌 종배양액은 실시예 3-1과 동일한 방법으로 준비하였다.

[199]

[200] ① 개별 발효 (제조예 4)

[201] 종래 방법 중 개별 건조물을 혼합하는 방법에서는 글루탐산 종배양액 또는 아르기닌 종배양액을 각각 50 L 발효조로 옮긴 후 개별적으로 본발효를 실시하였다. 이후 각각의 발효액에서 균체를 분리한 후 탈색 및 여과 공정을 거쳤다. 여과물을 농축하고 건조하여 건조물을 수득하였다. 각각 수득된 글루탐산과 아르기닌 건조물을 각각 아미노산의 비율이 1 : 1이 되도록 혼합하여 글루탐산-아르기닌을 함유한 발효 분말을 제조하였다.

[202]

[203] ② 개별 발효 후 발효액 혼합 (제조예 5)

[204] 종래 방법 중 개별 발효액을 혼합하는 방법에서는 글루탐산 종배양액 또는 아르기닌 종배양액을 각각 50 L 발효조로 옮긴 후 개별적으로 본발효를 실시하였다. 본발효에서 수득된 각각의 발효액을 각각 아미노산의 비율이 1 : 1이 되도록 혼합한 후 균체를 분리한 후 탈색 및 여과 공정을 거쳤다. 여과물을 농축하고 건조하여 글루탐산-아르기닌 발효 분말을 수득하였다.

[205]

[206] ③ 혼합 발효 (제조예 6)

[207] 혼합 발효에서는 제조예 4 및 5와 동일하게 발효액 내 각 아미노산의 비율이 약 1 : 1이 되도록 실시예 3-2와 동일한 방법으로 글루탐산 종배양액과 아르기닌 종배양액을 접종량 기준 30 : 70의 비율로 접종하여 혼합 발효하였다. 이후 발효액에서 균체를 분리한 탈색 및 여과 공정을 거쳤다. 여과물을 농축하고 건조하여 글루탐산-아르기닌 발효 분말을 수득하였다.

[208]

[209] 4-2. 글루탐산-아르기닌 발효 분말의 성분 비교

[210] 제조예 4 및 5의 개별 발효에서 수득된 글루탐산-아르기닌 발효 분말과 제조예 6의 혼합 발효에서 수득된 글루탐산-아르기닌 발효 분말에 대해 성분 분석을 실시하였다.

[211] 아미노산 (L-글루탐산 및 L-아르기닌)은 HPLC 분석 (GA - 210 nm UV 검출기, 유속 0.9 ml/min; ARG - 195 nm, UV 검출기, 유속 1 ml/min)으로 측정하였다. 유기산 및 이온류는 실시예 2-2와 동일한 방법으로 측정하였다. 그 결과는 하기 표 9에 나타내었다.

[212] [표9]

항목	제조예 4	제조예 5	제조예 6
GA	22%	35%	42%
ARG	22%	34%	42%
AA/TS*	48%	71%	86%
총 질소	9.4%	12.0%	11.7%
유기산	3.6%	2.5%	1.8%
이온	8.3%	9.9%	2.1%
암모늄	4.0%	2.6%	0.9%
*AA/TS: 총 고형분에 대한 아미노산(GA+ARG) 비율			

[213]

[214] 상기 표 9를 참조하면, 혼합 발효한 경우 (제조예 6)에는 개별 발효한 경우 (제조예 4 및 5)에 비해 높은 아미노산 비율을 나타내며, 유기산, 이온 및 암모늄

함량이 현저히 감소하였다.

[215]

[216] **4-3. 개별 발효와 혼합 발효의 관능 비교**

[217] 제조예 4 및 5의 개별 발효에서 수득된 글루탐산-아르기닌 발효 분말과 제조예 6의 혼합 발효에서 수득된 글루탐산-아르기닌 발효 분말에 대해 관능 평가를 진행하였다.

[218] 관능 평가는 실시예 2-3과 동일한 방법으로 실시하였다. 그 결과를 하기 표 10에 나타내었다.

[219] [표10]

항목	제조예 4 (개별 발효)	제조예 5 (개별 발효)	제조예 6 (혼합 발효)
선미 감칠맛	++	+++	++++
후미 지속성	+	++	++++
짠맛	-	+	++
신맛	+	+	-
쓴맛	++	++	-
단맛	-	-	-

[220]

[221] 상기 표 10를 참조하면, 상기 표 9와 같은 글루탐산-아르기닌 발효 분말의 성분 차이로 인해 개별 발효 후 혼합하는 공정으로 제조된 샘플의 맛은 혼합 발효로 제조된 샘플에 비해 감칠맛이 약하고 쓴맛이 높아졌다. 그리고 상기 표 9에서와 같이 유기산과 같은 부산물 증가 및 이온류 증가는 관능에도 영향을 주기 때문에 개별 발효 후 혼합하는 것보다는 혼합 발효 공정이 맛 측면이나 공정 간소화 부분에서 효과적이다.

[222]

[223] **실시예 5. 글루탐산 및 이노신산의 혼합 발효**

[224] **5-1. 종배양**

[225] 글루탐산 생산 미생물로서 코리네박테리움 글루타미쿰 NFG6 (KCCM13164P) 및 이노신산 생산 미생물로서 IMP를 생산하는 코리네박테리움 암모니아게네스 NFI545 (KCCM13162P)를 사용하였다.

[226] 글루탐산 생산 미생물을 이용한 글루탐산 종배양액은 실시예 1-1과 동일한 방법으로 준비하였다.

[227] 이노신산 생산 미생물을 종배양하기 위해, 종배양 배지 0.3 L가 담긴 2 L 플라스크에 이노신산 생산 미생물을 접종하여 31°C, 150 rpm에서 20 내지 24시간 동안 1차 배양하였다 (OD₆₁₀ = 15 ~ 20). 5 L 배양기 (jar fermenter)에 1차 배양액

1%를 접종하고 종배양 배지 2 ~ 2.5 L를 첨가하여 31°C, pH 7.1, 600 rpm 및 통기량 1.0 vvm 조건에서 21 내지 24시간 2차 배양하였고 ($OD_{610} = 20 \sim 40$), 이노신산 종배양액을 준비하였다. 사용된 종배양 배지의 조성은 하기 표 11에 나타내었다.

[228] [표11]

	조성
이노신산 생산 미생물 종배양 배지	포도당 4 ~ 6%, 효모추출물 페이스트 2 ~ 4%, $(NH_4)_2SO_4$ 0.3%, KH_2PO_4 0.2%, K_2HPO_4 0.2%, 아데닌 200 ~ 300 ppm, 구아닌 200 ~ 300ppm, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.15%, 니코틴산 10 ppm, Ca-판토테네이트 100 ppm, 시스테인 15ppm, 티아민 HCl 1 ppm, $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 5 ppm, $MnSO_4 \cdot 5H_2O$ 10 ppm, 비오틴 0.1 ppm, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 15 ppm 및 식품용 소포제 0.01%

[229]

[230] **5-2. 본발효**

[231] 글루탐산 종배양액과 이노신산 종배양액의 접종량에 따른 발효액 내 글루탐산과 이노신산의 비율을 확인하기 위해 다양한 비율로 글루탐산 종배양액과 이노신산 종배양액을 접종하여 발효하였다.

[232] 본발효에서는 50 L 발효조에 발효 배지 14 ~ 18 L를 첨가하고, 글루탐산 종배양액과 이노신산 종배양액을 0.05 ~ 99.95 : 99.95 ~ 0.05의 접종량 비율로 총 종배양액 1.2 ~ 1.8 L를 접종하여 30 ~ 90시간 동안 유가식 배양으로 혼합 발효하였다. 여기서 사용된 발효 배지 조성 및 조건은 하기 표 12에 나타내었다.

[233] [표12]

발효 배지 조성	당밀 1 ~ 3%, 원당 5 ~ 7%, 효모추출물 페이스트 2 ~ 3%, H_3PO_4 0.6 ~ 1.2%, 베타인 0.05 ~ 0.1%, 아데닌 100 ~ 200 ppm, 구아닌 0 ~ 150 ppm, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.2 ~ 0.5%, Ca-판토테네이트 50 ~ 100 ppm, 비타민 B3 5 ~ 15ppm, 티아민 HCl 5 ~ 20 ppm, NaOH 0.4 ~ 0.8%, $FeSO_4$ 5 ~ 10 ppm, $MnSO_4$ 10 ~ 20 ppm, $ZnSO_4$ 10 ~ 20 ppm 및 식품용 소포제 0.005%
발효 조건	온도 31 ~ 32°C, pH 6.5 ~ 7.5, 통기 0.8 ~ 1.2 vvm, 내압 0.6 ~ 1.0 kg/cm ³ , 교반속도 320 ~ 350 rpm 및 용존산소량(DO) 20 ~ 70% 유지

[234]

[235] 이러한 혼합 발효를 총 3회 실시하여 평균 값을 계산하였고, 그 결과는 표 13에 나타내었다.

[236] [표13]

종배양액의 접종량 비율 GA : IMP	발효 시간	발효액 내 GA : IMP 비율
99.95 : 0.05	33시간	99.8 : 1
80 : 20	42시간	51.3 : 1
70 : 30	48시간	31.2 : 1
50 : 50	60시간	16.8 : 1
20 : 80	83시간	1.04 : 1
0.05 : 99.95	90시간	0.02 : 1

[237]

[238] 상기 표 13을 참조하면, 각 미생물의 종배양액을 글루탐산 생산 미생물 : 이노신산 생산 미생물 = 0.05 ~ 99.95 : 99.95 ~ 0.05의 비율로 접종 시 발효액 내 L-글루탐산과 IMP가 0.02 ~ 99.8 : 1의 비율로 생산됨을 확인하였다.

[239]

[240] 실시예 6. 발효 공정 차이에 따른 글루탐산-이노신산 발효 분말 비교

[241] 6-1. 글루탐산-이노신산 발효 분말의 제조

[242] 종래에는 글루탐산 생산 미생물과 이노신산 생산 미생물을 개별적으로 발효한 후 발효액 또는 이의 건조물을 적정 비율로 혼합하여 글루탐산과 이노신산을 함유한 조미소재를 제조하였다. 이러한 종래 개별 발효 방법과 글루탐산 생산 미생물 및 이노신산 생산 미생물을 혼합 발효하는 방법 간의 맛 차이를 비교하기 위해, 각 제조 방법에 의해 얻어진 글루탐산-이노신산(GA-IMP) 발효 분말의 성분을 비교하였다 (도 3 참조).

[243] 여기서 사용된 글루탐산 종배양액 및 이노신산 종배양액은 실시예 5-1과 동일한 방법으로 준비하였다.

[244]

[245] ① 개별 발효 (제조예 7)

[246] 종래 방법 중 개별 건조물을 혼합하는 방법에서는 글루탐산 종배양액 또는 이노신산 종배양액을 각각 50 L 발효조로 옮긴 후 개별적으로 본발효를 실시하였다. 이후 각각의 발효액에서 균체를 분리한 후 탈색 및 여과 공정을 거쳤다. 여과물을 농축하고 건조하여 건조물을 수득하였다. 각각 수득된 글루탐산과 이노신산 건조물을 각각 비율이 1 : 1이 되도록 혼합하여 글루탐산-이노신산을 함유한 발효 분말을 제조하였다.

[247]

[248] ② 개별 발효 후 발효액 혼합 (제조예 8)

[249] 종래 방법 중 개별 발효액을 혼합하는 방법에서는 글루탐산 종배양액 또는

이노신산 종배양액을 각각 50 L 발효조로 옮긴 후 개별적으로 본발효를 실시하였다. 본발효에서 수득된 각각의 발효액을 각각 비율이 1:1이 되도록 혼합한 후 균체를 분리한 후 탈색 및 여과 공정을 거쳤다. 여과물을 농축하고 건조하여 글루탐산-이노신산 발효 분말을 수득하였다.

[250]

[251] **③ 혼합 발효 (제조예 9)**

[252] 혼합 발효에서는 제조예 7 및 8과 동일하게 발효액 내 각 아미노산의 비율이 약 1:1이 되도록 실시예 5-2와 동일한 방법으로 글루탐산 종배양액과 이노신산 종배양액을 접종량 기준 20:80의 비율로 접종하여 혼합 발효하였다. 이후 발효액에서 균체를 분리한 탈색 및 여과 공정을 거쳤다. 여과물을 농축하고 건조하여 글루탐산-이노신산 발효 분말을 수득하였다.

[253]

[254] **6-2. 글루탐산-이노신산 발효 분말의 성분 비교**

[255] 제조예 7 및 8의 개별 발효에서 수득된 글루탐산-이노신산 발효 분말과 제조예 9의 혼합 발효에서 수득된 글루탐산-이노신산 발효 분말에 대해 성분 분석을 실시하였다.

[256] L-글루탐산 및 IMP는 HPLC 분석 (GA - 210 nm UV 검출기, 유속 0.9 ml/min; IMP - 254 nm UV 검출기, 유속 0.9 ml/min)로 측정하였다. 유기산 및 이온류는 실시예 2-2와 동일한 방법으로 측정하였다. 그 결과는 하기 표 14에 나타내었다.

[257] [표14]

항목	제조예 7	제조예 8	제조예 9
GA	22%	31%	37%
IMP	20%	31%	36%
(GA+IMP)/TS*	42%	62%	73%
총 질소	8.6%	9.7%	10.5%
유기산	4.0%	3.3%	3.1%
이온	10.4%	8.8%	4.2%
암모늄	4.0%	3.0%	1.7%
*(GA+IMP)/TS: 총 고형분에 대한 생산물의 비율			

[258]

[259] **6-3. 개별 발효와 혼합 발효의 관능 비교**

[260] 제조예 7 및 8의 개별 발효에서 수득된 글루탐산-이노신산 발효 분말과 제조예 9의 혼합 발효에서 수득된 글루탐산-이노신산 발효 분말에 대해 관능 평가를 진행하였다.

[261] 관능 평가는 실시예 2-3과 동일한 방법으로 실시하였다. 그 결과를 하기 표

15에 나타내었다.

[262] [표15]

항목	제조예 7 (개별 발효)	제조예 8 (개별 발효)	제조예 9 (혼합 발효)
선미 감칠맛	+++	++++	++++
후미 지속성	+	+++	++++
코쿠미	+	++	+++
짭맛	+	++	++
신맛	++	++	+
쓴맛	++	+	-
단맛	+	+	++

[263]

[264] 상기 표 15를 참조하면, 상기 표 14와 같은 글루탐산-이노신산 발효 분말의 성분 차이로 인해 개별 발효 후 혼합하는 공정으로 제조된 샘플의 맛은 혼합 발효로 제조된 샘플에 비해 감칠맛 및 후미 지속성이 약하고 쓴맛이 높아졌다. 그리고 상기 표 14에서와 같이 유기산과 같은 부산물 증가 및 이온류 증가는 관능에도 영향을 주기 때문에 개별 발효 후 혼합하는 것보다는 혼합 발효 공정이 맛 측면이나 공정 간소화 부분에서 효과적이다.

[265]

[266] 실시예 7. 이노신산 및 라이신의 혼합 발효

[267] 7-1. 종배양

[268] 이노신산 생산 미생물로서 코리네박테리움 암모니아게네스 NF1545 (KCCCM13162P) 및 라이신 생산 미생물로서 코리네박테리움 글루타미쿰 NFL21 (KCCCM13163P)를 사용하였다.

[269] 이노신산 생산 미생물을 이용한 이노신산 종배양액 및 라이신 생산 미생물을 이용한 라이신 종배양액은 각각 실시예 5-1 및 1-1과 동일한 방법으로 준비하였다.

[270]

[271] 7-2. 본발효

[272] 이노신산 종배양액과 라이신 종배양액의 접종 접종량에 따른 발효액 내 이노신산과 라이신의 비율을 확인하기 위해 다양한 비율로 이노신산 종배양액과 라이신 종배양액을 접종하여 발효하였다.

[273] 본발효에서는 50 L 발효조에 발효 배지 14 ~ 18 L를 첨가하고, 이노신산 종배양액과 라이신 종배양액을 0.05 ~ 99.95 : 99.95 ~ 0.05의 접종량 비율로 총 종배양액 1.2 ~ 1.8 L를 접종하여 45 ~ 90시간 동안 유가식 배양으로 혼합

발효하였다. 여기서 사용된 발효 배지 조성 및 조건은 하기 표 16에 나타내었다.

[274] [표16]

발효 배지 조성	당밀 1 ~ 3%, 원당 5 ~ 7%, 효모추출물 페이스트 2 ~ 3%, H_3PO_4 0.6 ~ 1.2%, 베타인 0.05 ~ 0.1%, 아데닌 100 ~ 200 ppm, 구아닌 50 ~ 150 ppm, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.2 ~ 0.5%, Ca-판토테네이트 50 ~ 100 ppm, 비타민 B3 5 ~ 15 ppm, 티아민 HCl 5 ~ 20 ppm, $(NH_4)_2SO_4$ 0.4%, NaOH 0.4 ~ 0.8%, $FeSO_4$ 5 ~ 10 ppm, $MnSO_4$ 10 ~ 20 ppm, $ZnSO_4$ 10 ~ 20 ppm 및 식품용 소포제 0.005%
발효 조건	온도 31 ~ 32°C, pH 6.5 ~ 7.5, 통기 0.8 ~ 1.2 vvm, 내압 0.6 ~ 1.0 kg/cm ³ , 교반속도 320 ~ 350 rpm 및 용존산소량(DO) 20 ~ 70% 유지

[275]

[276] 이러한 혼합 발효를 총 3회 실시하여 평균 값을 계산하였고, 그 결과는 표 17에 나타내었다.

[277] [표17]

종배양액의 접종량 비율 IMP : LYS	발효 시간	발효액 내 IMP : LYS 비율
99.95 : 0.05	90시간	92.3 : 1
80 : 20	73시간	1.01 : 1
50 : 50	61시간	0.05 : 1
20 : 80	48시간	0.02 : 1
0.05 : 99.95	45시간	0.01 : 1

[278]

[279] 상기 표 17을 참조하면, 각 미생물의 종배양액을 이노신산 생산 미생물 : 라이신 생산 미생물 = 0.05 ~ 99.95 : 99.5 ~ 0.05의 비율로 접종 시 발효액 내 IMP와 L-라이신이 0.01 ~ 92 : 1의 비율로 생산됨을 확인하였다

[280]

[281] 실시예 8. 발효 공정 차이에 따른 이노신산-라이신 발효 분말 비교

[282] 8-1. 이노신산-라이신 발효 분말의 제조

[283] 종래에는 이노신산 생산 미생물과 라이신 생산 미생물을 개별적으로 발효한 후 발효액 또는 이의 건조물을 적정 비율로 혼합하여 이노신산과 라이신을 함유한 조미소재를 제조하였다. 이러한 종래 개별 발효 방법과 이노신산 생산 미생물 및 라이신 생산 미생물을 혼합 발효하는 방법 간의 맛 차이를 비교하기 위해, 각 제조 방법에 의해 얻어진 이노신산-라이신(IMP-LYS) 발효 분말의 성분을

비교하였다 (도 4 참조).

[284] 여기서 사용된 이노신산 종배양액 및 라이신 종배양액은 실시예 7-1과 동일한 방법으로 준비하였다.

[285]

[286] **① 개별 발효 (제조예 10)**

[287] 종래 방법 중 개별 건조물을 혼합하는 방법에서는 이노신산 종배양액 또는 라이신 종배양액을 각각 50 L 발효조로 옮긴 후 개별적으로 본발효를 실시하였다. 이후 각각의 발효액에서 균체를 분리한 후 탈색 및 여과 공정을 거쳤다. 여과물을 농축하고 건조하여 건조물을 수득하였다. 각각 수득된 이노신산과 라이신 건조물을 각각 비율이 1 : 1이 되도록 혼합하여 이노신산-라이신을 함유한 발효 분말을 제조하였다.

[288]

[289] **② 개별 발효 후 발효액 혼합 (제조예 11)**

[290] 종래 방법 중 개별 발효액을 혼합하는 방법에서는 이노신산 종배양액 또는 라이신 종배양액을 각각 50 L 발효조로 옮긴 후 개별적으로 본발효를 실시하였다. 본발효에서 수득된 각각의 발효액을 각각 비율이 1 : 1이 되도록 혼합한 후 균체를 분리한 후 탈색 및 여과 공정을 거쳤다. 여과물을 농축하고 건조하여 이노신산-라이신 발효 분말을 수득하였다.

[291]

[292] **③ 혼합 발효 (제조예 12)**

[293] 혼합 발효에서는 제조예 10 및 11과 동일하게 발효액 내 이노신산 및 라이신의 비율이 약 1 : 1이 되도록 실시예 7-2와 동일한 방법으로 이노신산 종배양액과 라이신 종배양액을 접종량 기준 80 : 20의 비율로 접종하여 혼합 발효하였다. 이후 발효액에서 균체를 분리한 탈색 및 여과 공정을 거쳤다. 여과물을 농축하고 건조하여 이노신산-라이신 발효 분말을 수득하였다.

[294]

[295] **8-2. 라이신-이노신산 발효 분말의 성분 비교**

[296] 제조예 10 및 11의 개별 발효에서 수득된 이노신산-라이신 발효 분말과 제조예 12의 혼합 발효에서 수득된 이노신산-라이신 발효 분말에 대해 성분 분석을 실시하였다.

[297] IMP 및 L-라이신은 HPLC 분석 (IMP - 254 nm, UV 검출기, 유속 0.9 ml/min; LYS - 214 nm, UV 검출기, 유속 0.8 ml/min)으로 측정하였다. 유기산 및 이온류는 실시예 2-2와 동일한 방법으로 측정하였다. 그 결과는 하기 표 18에 나타내었다.

[298] [표18]

항목	제조예 10	제조예 11	제조예 12
LYS	26%	32%	38%
IMP	24%	30%	33%
(LYS+IMP)/TS*	45%	62%	71%
총 질소	9.7%	11.3%	12.5%
유기산	5.0%	4.1%	3.7%
이온	9.2%	8.2%	5.6%
암모늄	3.9%	3.5%	1.9%
*(LYS+IMP)/TS: 총 고형분에 대한 생산물의 비율			

[299]

[300] 상기 표 18을 참조하면, 혼합 발효한 경우 (제조예 12)에는 개별 발효한 경우 (제조예 10 및 11)에 비해 높은 LYS+IMP 비율을 나타내며, 유기산, 및 이온 및 함량, 암모늄니아 함량이 현저히 감소하였다.

[301]

[302] **8-3. 개별 발효와 혼합 발효의 관능 비교**

[303] 제조예 10 및 11 개별 발효에서 수득된 이노신산-라이신 발효 분말과 제조예 12의 혼합 발효에서 수득된 이노신산-라이신 발효 분말에 대해 관능 평가를 진행하였다.

[304] 관능 평가는 실시예 2-3과 동일한 방법으로 실시하였다. 그 결과를 하기 표 19에 나타내었다.

[305] [표19]

항목	제조예 10 (개별 발효)	제조예 12 (개별 발효)	제조예 13 (혼합 발효)
선미 감칠맛	+	++	++
후미 지속성	+	+++	++++
코쿠미	+	++	+++
짭맛	+	++	++
신맛	++	++	+
쓴맛	++	++	-
단맛	+	+	++

[306]

[307] 상기 표 19를 참조하면, 상기 표 18과 같은 이노신산-라이신 발효 분말의 성분

차이로 인해 개별 발효 후 혼합하는 공정으로 제조된 샘플의 맛은 혼합 발효로 제조된 샘플에 비해 후미 지속성이 약하고 쓴맛이 높아졌다. 그리고 상기 표 18에서와 같이 유기산과 같은 부산물 증가 및 이온류 증가는 관능에도 영향을 주기 때문에 개별 발효 후 혼합하는 것보다는 혼합 발효 공정이 맛 측면이나 공정 간소화 부분에서 효과적이다.

[308]

[309] 실시예 9. 이노신산 및 아르기닌의 혼합 발효

[310] 9-1. 종배양

[311] 이노신산 생산 미생물로서 코리네박테리움 암모니아게네스 NFI545 (KCCM13162P) 및 아르기닌 생산 미생물로서 코리네박테리움 글루타미쿰 NFA40 (KCCM13165P)을 사용하였다.

[312] 이노신산 생산 미생물을 이용한 이노신산 종배양액 및 아르기닌 생산 미생물을 이용한 아르기닌 종배양액은 각각 실시예 5-1 및 3-1과 동일한 방법으로 준비하였다.

[313]

[314] 9-2. 본발효

[315] 이노신산 종배양액과 아르기닌 종배양액의 접종량에 따른 발효액 내 이노신산과 아르기닌의 비율을 확인하기 위해 다양한 비율로 이노신산 종배양액과 아르기닌 종배양액을 접종하여 발효하였다.

[316] 본발효에서는 50 L 발효조에 발효 배지 14 ~ 18 L를 첨가하고, 이노신산 종배양액과 아르기닌 종배양액을 65 ~ 99.95 : 35 ~ 0.05의 접종량 비율로 총 종배양액 1.2 ~ 1.8 L를 접종하여 45 ~ 80시간 동안 유가식 배양으로 혼합 발효하였다. 여기서 사용된 발효 배지 조성 및 조건은 하기 표 20에 나타내었다.

[317] [표20]

발효 배지 조성	당밀 1 ~ 3%, 원당 5 ~ 7%, 효모추출물 페이스트 2 ~ 3%, H ₃ PO ₄ 0.6 ~ 1.2%, 베타인 0.05 ~ 0.1%, 아데닌 100 ~ 200ppm, 구아닌 50 ~ 150 ppm, MgSO ₄ ·7H ₂ O 0.2 ~ 0.5%, Ca-판토텐네이트 50 ~ 100 ppm, 비타민 B3 5 ~ 15 ppm, 티아민 HCl 5 ~ 20 ppm, (NH ₄) ₂ SO ₄ 0.4%, NaOH 0.4 ~ 0.8%, FeSO ₄ 5 ~ 10 ppm, MnSO ₄ 10 ~ 20 ppm, ZnSO ₄ 10 ~ 20 ppm 및 식품용 소포제 0.005%
발효 조건	온도 31 ~ 32°C, pH 6.5 ~ 7.5, 통기 0.8 ~ 1.2 vvm, 내압 0.6 ~ 1.0 kg/cm ³ , 교반속도 320 ~ 350 rpm 및 용존산소량(DO) 20 ~ 70% 유지

[318]

[319] 이러한 혼합 발효를 총 3회 실시하여 평균 값을 계산하였고, 그 결과는 표 21에 나타내었다.

[320] [표 21]

종배양액의 접종량 비율 IMP : ARG	발효 시간	발효액 내 IMP : ARG 비율
99.95 : 0.05	80시간	95.1 : 1
80 : 20	46시간	5.3 : 1
70 : 30	45시간	2.45 : 1
65 : 35	45시간	1.04 : 1

[321]

[322] 상기 표 21을 참조하면, 각 미생물의 종배양액을 이노신산 생산 미생물 : 아르기닌 생산 미생물 = 65 ~ 99.95 : 35 ~ 0.05의 비율로 접종 시 발효액 내 IMP와 L-아르기닌이 1.04 ~ 95.1 : 1의 비율로 생산됨을 확인하였다.

[323]

[324] 실시예 10. 발효 공정 차이에 따른 이노신산-아르기닌 발효 분말 비교

[325] 10-1. 이노신산-아르기닌 발효 분말의 제조

[326] 종래에는 이노신산 생산 미생물과 아르기닌 생산 미생물을 개별적으로 발효한 후 발효액 또는 이의 건조물을 적정 비율로 혼합하여 이노신산과 아르기닌을 함유한 조미소재를 제조하였다. 이러한 종래 개별 발효 방법과 이노신산 생산 미생물 및 아르기닌 생산 미생물을 혼합 발효하는 방법 간의 맛 차이를 비교하기 위해, 각 제조 방법에 의해 얻어진 이노신산-아르기닌(IMP-ARG) 발효 분말의 성분을 비교하였다 (도 5 참조).

[327] 여기서 사용된 이노신산 종배양액 및 아르기닌 종배양액은 실시예 9-1과 동일한 방법으로 준비하였다.

[328]

[329] ① 개별 발효 (제조예 13)

[330] 종래 방법 중 개별 건조물을 혼합하는 방법에서는 이노신산 종배양액 또는 아르기닌 종배양액을 각각 50 L 발효조로 옮긴 후 개별적으로 분발효를 실시하였다. 이후 각각의 발효액에서 균체를 분리한 후 탈색 및 여과 공정을 거쳤다. 여과물을 농축하고 건조하여 건조물을 수득하였다. 각각 수득된 이노신산과 아르기닌 건조물을 각각 비율이 1 : 1이 되도록 혼합하여 이노신산-아르기닌을 함유한 발효 분말을 제조하였다.

[331]

[332] ② 개별 발효 후 발효액 혼합 (제조예 14)

[333] 종래 방법 중 개별 발효액을 혼합하는 방법에서는 이노신산 종배양액 또는 라이신 종배양액을 각각 50 L 발효조로 옮긴 후 개별적으로 분발효를 실시하였다. 분발효에서 수득된 각각의 발효액을 각각 비율이 1 : 1이 되도록 혼합한 후 균체를 분리한 후 탈색 및 여과 공정을 거쳤다. 여과물을 농축하고

건조하여 이노신산-아르기닌 발효 분말을 수득하였다.

[334]

[335] ③ 혼합 발효 (제조예 15)

[336] 혼합 발효에서는 제조예 13 및 14와 동일하게 발효액 내 이노신산 및 아르기닌의 비율이 약 1 : 1이 되도록 실시예 9-2와 동일한 방법으로 이노신산 종배양액과 아르기닌 종배양액을 접종량 기준 65 : 35의 비율로 접종하여 혼합 발효하였다. 이후 발효액에서 균체를 분리한 탈색 및 여과 공정을 거쳤다. 여과물을 농축하고 건조하여 이노신산-아르기닌 발효 분말을 수득하였다.

[337]

[338] 10-2. 이노신산-아르기닌 발효 분말의 성분 비교

[339] 제조예 13 및 14의 개별 발효에서 수득된 이노신산-아르기닌 발효 분말과 제조예 15의 혼합 발효에서 수득된 이노신산-아르기닌 발효 분말에 대해 성분 분석을 실시하였다.

[340] L-아르기닌 및 IMP는 HPLC 분석 (ARG - 195 nm, UV 검출기, 유속 1 ml/min; IMP - 254 nm, UV 검출기, 유속 0.9 ml/min)으로 측정하였다. 유기산 및 이온류는 실시예 2-2와 동일한 방법으로 측정하였다. 그 결과는 하기 표 22에 나타내었다.

[341] [표22]

항목	제조예 13	제조예 14	제조예 15
ARG	24%	31%	34%
IMP	24%	31%	33%
(ARG+IMP)/TS*	48%	62%	76%
총 질소	9.7%	11.3%	14.1%
유기산	4.7%	3.8%	2.5%
이온	7.5%	6.2%	3.8%
암모늄	3.1%	2.5%	0.8%
*(ARG+IMP)/TS: 총 고형분에 대한 생산물의 비율			

[342]

[343] 10-3. 개별 발효와 혼합 발효의 관능 비교

[344] 제조예 13 및 14의 개별 발효에서 수득된 이노신산-아르기닌 발효 분말과 제조예 15의 혼합 발효에서 수득된 이노신산-아르기닌 발효 분말에 대해 관능 평가를 진행하였다.

[345] 관능 평가는 실시예 2-3과 동일한 방법으로 실시하였다. 그 결과를 하기 표 23에 나타내었다.

[346] [표23]

항목	제조예 13 (개별 발효)	제조예 14 (개별 발효)	제조예 15 (혼합 발효)
선미 감칠맛	+	++	++
후미 지속성	+	+++	++++
코쿠미	+	++	+++
짭맛	+	++	++
신맛	++	++	+
쓴맛	++	++	-
단맛	-	-	-

[347]

[348] 상기 표 23을 참조하면, 상기 표 22와 같은 이노신산-아르기닌 발효 분말의 성분 차이로 인해 개별 발효 후 혼합하는 공정으로 제조된 샘플의 맛은 혼합 발효로 제조된 샘플에 비해 후미 지속성이 약하고 쓴맛이 높아졌다. 그리고 상기 표 22에서와 같이 유기산과 같은 부산물 증가 및 이온류 증가는 관능에도 영향을 주기 때문에 개별 발효 후 혼합하는 것보다는 혼합 발효 공정이 맛 측면이나 공정 간소화 부분에서 효과적이다.

[349]

[350] 이제까지 본 발명에 대하여 그 바람직한 실시예들을 중심으로 살펴보았다. 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자는 본 발명이 본 발명의 본질적인 특성에서 벗어나지 않는 범위에서 변형된 형태로 구현될 수 있음을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 개시된 실시예들은 한정적인 관점이 아니라 설명적인 관점에서 고려되어야 한다. 본 발명의 범위는 전술한 설명이 아니라 특허청구범위에 나타나 있으며, 그와 동등한 범위 내에 있는 모든 차이점은 본 발명에 포함된 것으로 해석되어야 할 것이다.

[351] [수탁번호]

[352] 기탁기관명 : 한국미생물보존센터(KCCM)

[353] 수탁번호 : KCCM13162P

[354] 수탁일자 : 20220421

[355]

[356] 기탁기관명 : 한국미생물보존센터(KCCM)

[357] 수탁번호 : KCCM13163P

[358] 수탁일자 : 20220421

[359]

[360] 기탁기관명 : 한국미생물보존센터(KCCM)

- [361] 수탁번호 : KCCM13164P
- [362] 수탁일자 : 20220421
- [363]
- [364] 기탁기관명 : 한국미생물보존센터(KCCM)
- [365] 수탁번호 : KCCM13165P
- [366] 수탁일자 : 20220421

[367]

특허 출원을 위한 미생물 기탁의
국제적 승인에 대한 부다페스트 조약

국제적 양식

To: 대상

120, 창경궁로,
충로구,
서울, 03130,
대한민국

본 페이지의 하단에서 확인된
국제 기탁 기관에 의해
규칙 7.1에 의거 발행된 수탁증 원본

I. 미생물의 표시	
기탁자에 의해 주어진 참조 표시: <i>Corynebacterium ammoniagenes</i> NFI545	국제 기탁 기관에 의해 주어진 수탁번호: KCCM13162P
II. 과학적 설명 및/또는 제안된 분류학적 명명	
상기 I에 표시된 미생물에 다음이 첨부된다: ☐ 과학적 설명 ☐ 제안된 분류학적 명명 (해당되는 곳에 x 표시할 것)	
III. 수탁 및 수령	
본 국제 기탁 기관은 상기 I에 표시된 미생물을 수령하며, 그것은 2022. 04. 21. (최초 기탁일) 에 수탁되었다. ¹	
IV. 전환 요청의 수신	
상기 I에서 표시된 미생물이 본 국제 기탁 기관에 수탁되었고, 원 기탁을 부다페스트 조약에 의거한 기탁으로 전환하라는 요청이 본 국제 기탁 기관에 접수되었다.	
V. 국제 기탁 기관	
명칭: 한국미생물보존센터 주소: 유림빌딩 45, 홍제내2가길 서대문구 서울 03641 대한민국	국제 기탁 기관의 대표자의 사인  일자: 2022. 04. 21.

¹규칙 6.4(d)를 적용하여, 해당 날짜는 국제 기탁 기관의 지위를 취득한 날짜이다.

양식 BP/4 (단일 페이지)

상기 번역은 원문의 내용과 상위 없음을 증명함.

2022년 6월 14일

변리사 박혁



[368]

특허 출원을 위한 미생물 기탁의
국제적 승인에 대한 부다페스트 조약

국제적 양식

To: 대상

120, 창경궁로,
충로구,
서울, 03130,
대한민국

본 페이지의 하단에서 확인된
국제 기탁 기관에 의해
규칙 7.1에 의거 발행된 수탁증 원본

I. 미생물의 표시	
기탁자에 의해 주어진 참조 표시: <i>Corynebacterium glutamicum</i> NFL21	국제 기탁 기관에 의해 주어진 수탁번호: KCCM13163P
II. 과학적 설명 및/또는 제안된 분류학적 명명	
상기 I에 표시된 미생물에 다음이 첨부된다: ☐ 과학적 설명 ☐ 제안된 분류학적 명명 (해당되는 곳에 x 표시할 것)	
III. 수탁 및 수령	
본 국제 기탁 기관은 상기 I에 표시된 미생물을 수령하며, 그것은 2022. 04. 21. (최초 기탁일) 에 수탁되었다. ¹	
IV. 전환 요청의 수신	
상기 I에서 표시된 미생물이 본 국제 기탁 기관에 수탁되었고, 원 기탁을 부다페스트 조약에 의거한 기탁으로 전환하라는 요청이 본 국제 기탁 기관에 접수되었다.	
V. 국제 기탁 기관	
명칭: 한국미생물보존센터 주소: 유림빌딩 45, 홍제내2가길 서대문구 서울 03641 대한민국	국제 기탁 기관의 대표자의 사인  일자: 2022. 04. 21.

¹규칙 6.4(d)를 적용하여, 해당 날짜는 국제 기탁 기관의 지위를 취득한 날짜이다.
양식 BP/4 (단일 페이지)

상기 번역은 원문의 내용과 상위 없음을 증명함.

2022년 6월 14일

변리사 박혁



[369]

특허 출원을 위한 미생물 기탁의
국제적 승인에 대한 부다페스트 조약

국제적 양식

To: 대상

120, 창경궁로,
충로구,
서울, 03130,
대한민국

본 페이지의 하단에서 확인된
국제 기탁 기관에 의해
규칙 7.1에 의거 발행된 수탁증 원본

I. 미생물의 표시	
기탁자에 의해 주어진 참조 표시: <i>Corynebacterium glutamicum</i> NFG6	국제 기탁 기관에 의해 주어진 수탁번호: KCCM13164P
II. 과학적 설명 및/또는 제안된 분류학적 명명	
상기 I에 표시된 미생물에 다음이 첨부된다: ☐ 과학적 설명 ☐ 제안된 분류학적 명명 (해당되는 곳에 x 표시할 것)	
III. 수탁 및 수령	
본 국제 기탁 기관은 상기 I에 표시된 미생물을 수령하며, 그것은 2022. 04. 21. (최초 기탁일) 에 수탁되었다. ¹	
IV. 전환 요청의 수신	
상기 I에서 표시된 미생물이 본 국제 기탁 기관에 수탁되었고, 원 기탁을 부다페스트 조약에 의거한 기탁으로 전환하라는 요청이 본 국제 기탁 기관에 접수되었다.	
V. 국제 기탁 기관	
명칭: 한국미생물보존센터 주소: 유림빌딩 45, 홍제내2가길 서대문구 서울 03641 대한민국	국제 기탁 기관의 대표자의 사인  일자: 2022. 04. 21.

¹규칙 6.4(d)를 적용하여, 해당 날짜는 국제 기탁 기관의 지위를 취득한 날짜이다.
양식 BP/4 (단일 페이지)

상기 번역은 원문의 내용과 상위 없음을 증명함.

2022년 6월 14일

변리사 박혁



[370]

특허 출원을 위한 미생물 기탁의
국제적 승인에 대한 부다페스트 조약

국제적 양식

To: 대상

120, 창경궁로,
충로구,
서울, 03130,
대한민국

본 페이지의 하단에서 확인된
국제 기탁 기관에 의해
규칙 7.1에 의거 발행된 수탁증 원본

I. 미생물의 표시	
기탁자에 의해 주어진 참조 표시: <i>Corynebacterium glutamicum</i> NFA40	국제 기탁 기관에 의해 주어진 수탁번호: KCCM13165P
II. 과학적 설명 및/또는 제안된 분류학적 명명	
상기 I에 표시된 미생물에 다음이 첨부된다: ☐ 과학적 설명 ☐ 제안된 분류학적 명명 (해당되는 곳에 x 표시할 것)	
III. 수탁 및 수령	
본 국제 기탁 기관은 상기 I에 표시된 미생물을 수령하며, 그것은 2022. 04. 21. (최초 기탁일) 에 수탁되었다. ¹	
IV. 전환 요청의 수신	
상기 I에서 표시된 미생물이 본 국제 기탁 기관에 수탁되었고, 원 기탁을 부다페스트 조약에 의거한 기탁으로 전환하라는 요청이 본 국제 기탁 기관에 접수되었다.	
V. 국제 기탁 기관	
명칭: 한국미생물보존센터 주소: 유림빌딩 45, 홍제내2가길 서대문구 서울 03641 대한민국	국제 기탁 기관의 대표자의 사인  일자: 2022. 04. 21.

¹규칙 6.4(d)를 적용하여, 해당 날짜는 국제 기탁 기관의 지위를 취득한 날짜이다.
양식 BP/4 (단일 페이지)

상기 번역은 원문의 내용과 상위 없음을 증명함.

2022년 6월 14일

변리사 박혁



청구범위

- [청구항 1] 발효 배지에 제1 미생물과 제2 미생물을 접종한 후 발효하여 아미노산, 핵산 및/또는 유기산을 함유하는 발효액을 제조하는 단계를 포함하며, 상기 제1 미생물 및 제2 미생물은 서로 다른 산물을 생산하고, 각각 아미노산, 핵산 및 유기산으로 이루어진 군에서 선택된 1종을 생산하는 것인 조미소재의 제조방법.
- [청구항 2] 청구항 1에 있어서,
상기 아미노산은 L-글루탐산, L-알라닌, L-발린, L-류신, L-이소류신, L-프롤린, L-페닐알라닌, L-트립토판, L-메티오닌, L-글리신, L-세린, L-트레오닌, L-시스테인, L-아스파라진, L-글루타민, L-아스파트산, L-라이신, L-아르기닌 및 L-히스티딘으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상인 것인 방법.
- [청구항 3] 청구항 1에 있어서,
상기 핵산은 이노신산, 구아닐산, 잔틸산 및 이들의 염 형태로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상인 것인 방법.
- [청구항 4] 청구항 1에 있어서,
상기 유기산은 숙신산, 사과산, 구연산, 초산, 젖산, 푸마르산, 주석산, 아스코르브산, 글루콘산 및 이들의 염 형태로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상인 것인 방법.
- [청구항 5] 청구항 1에 있어서,
상기 제1 미생물은 글루탐산 생산 미생물이고,
상기 제2 미생물은 라이신 생산 미생물, 아르기닌 생산 미생물, 히스티딘 생산 미생물, 트립토판 생산 미생물, 글리신 생산 미생물, 알라닌 생산 미생물, 숙신산 생산 미생물, 젖산 생산 미생물, 구아닐산 생산 미생물 또는 이노신산 생산 미생물인 것인 방법.
- [청구항 6] 청구항 1에 있어서,
상기 제1 미생물은 이노신산 생산 미생물이고,
상기 제2 미생물은 라이신 생산 미생물, 아르기닌 생산 미생물, 히스티딘 생산 미생물, 트립토판 생산 미생물, 글리신 생산 미생물, 알라닌 생산 미생물, 숙신산 생산 미생물, 젖산 생산 미생물 또는 구아닐산 생산 미생물인 것인 방법.
- [청구항 7] 청구항 1에 있어서,
상기 단계는 제1 미생물 및 제2 미생물과 서로 다른 산물을 생산하며, 아미노산, 핵산 및 유기산으로 이루어진 군에서 선택된 1종을 생산하는 제3 미생물을 더 접종하는 것인 방법.
- [청구항 8] 청구항 1 또는 7에 있어서,
상기 제1 미생물은 글루탐산 생산 미생물이고,

- 상기 제2 미생물은 구아닐산 생산 미생물이고,
상기 제3 미생물은 이노신산 생산 미생물인 것인 방법.
- [청구항 9] 청구항 1 또는 7에 있어서,
상기 제1 미생물, 제2 미생물 및 제3 미생물은 코리네박테리움(*Corynebacterium*) 속 미생물인 것인 방법.
- [청구항 10] 청구항 1 또는 7에 있어서,
상기 제1 미생물, 제2 미생물 및 제3 미생물은 개별적으로 배양되거나,
또는 혼합 배양된 중배양액 상태인 것인 방법.
- [청구항 11] 청구항 1 또는 7에 있어서,
상기 단계는 발효액 내 각 미생물의 산물의 비율을 조절하기 위해 각
미생물의 접종량을 조절하는 것인 방법.
- [청구항 12] 청구항 1 또는 7에 있어서,
상기 발효액은 전체 고형분 중 전체 미생물의 산물을 3 내지 90 중량%로
포함하는 것인 방법.
- [청구항 13] 발효 배지에 글루탐산 생산 미생물 및 라이신 생산 미생물을 접종한 후
발효하여 L-글루탐산 및 L-라이신 함유 발효액을 제조하는 단계를
포함하는 L-글루탐산 및 L-라이신 함유 조미소재의 제조방법.
- [청구항 14] 청구항 13에 있어서,
상기 글루탐산 생산 미생물 및 라이신 생산 미생물은 코리네박테리움(*Corynebacterium*) 속 미생물인 것인 방법.
- [청구항 15] 청구항 13에 있어서,
상기 글루탐산 생산 미생물 및 라이신 생산 미생물은 개별적으로
배양되거나, 또는 혼합 배양된 중배양액 상태인 것인 방법.
- [청구항 16] 청구항 13에 있어서,
상기 단계는 발효액 내 L-글루탐산과 L-라이신의 비율을 조절하기 위해
글루탐산 생산 미생물과 라이신 생산 미생물의 접종량을 조절하는 것인
방법.
- [청구항 17] 청구항 13에 있어서,
상기 발효액은 전체 고형분 중 L-글루탐산 및 L-라이신을 포함한
아미노산을 3 내지 90 중량%로 포함하는 것인 방법.
- [청구항 18] 청구항 1 또는 7의 방법으로 제조된 조미소재.
- [청구항 19] 청구항 13의 방법으로 제조된 L-글루탐산 및 L-라이신 함유 조미소재.
- [청구항 20] 청구항 19에 있어서,
상기 조미소재는 L-글루탐산 및 L-라이신 함량이 고형분 대비 3 내지 90
중량%인 것인 L-글루탐산 및 L-라이신 함유 조미소재.
- [청구항 21] 청구항 18의 조미소재를 포함하는 식품 조성물.
- [청구항 22] 청구항 19의 L-글루탐산 및 L-라이신 함유 조미소재를 포함하는 식품
조성물.