(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0110191
(43) 공개일자 2024년07월15일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 1/20 (2006.01) *A23L 17/00* (2016.01)
A23L 29/00 (2016.01) *A23P 20/17* (2016.01)
C12R 1/25 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 1/205 (2021.05)
A23L 17/75 (2016.08)
(21) 출원번호 10-2023-0001968
(22) 출원일자 2023년01월05일
심사청구일자 2023년01월05일

(71) 출원인
국립부경대학교 산학협력단
부산광역시 남구 용소로 45, 부경대학교내 (대연동)
(72) 발명자
김영목
부산광역시 남구 분포로 111, 109동 1103호 (용호동, 엘지메트로시티)
손은익
충청북도 청주시 흥덕구 오송읍 연제길 3-14, 202호
조두민
경상남도 창원시 의창구 중동로 78, 409동 3703호 (중동, 창원 중동 유니시티4단지)
(74) 대리인
특허법인정진

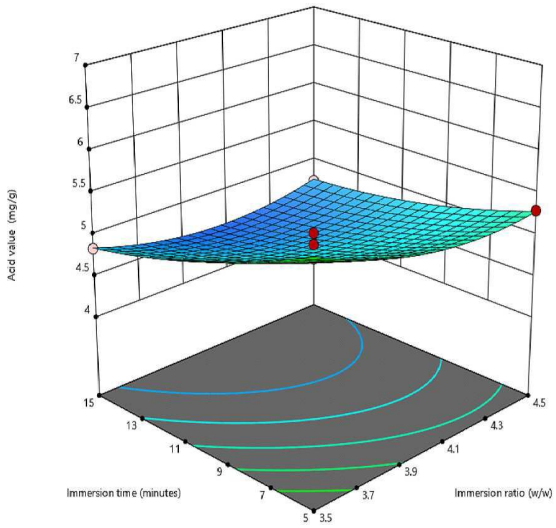
전체 청구항 수 : 총 12 항

(54) 발명의 명칭 **락토바실러스 플란타룸 신규 분리주 및 이의 용도**

(57) 요 약

본 발명은 신규한 락토바실러스 플란타룸 분리주 및 이의 신규한 용도에 관한 것으로, 본 발명에 따르면, 본 발명은 어류의 산패를 억제시키는 데 최적의 조건을 도출하기 위해, 반응표면분석법(RSM, response surface methodology)을 이용하여, 본 발명의 신규 락토바실러스 플란타룸 균주 또는 이의 배양액의 최적 처리 조건을 확립하였고, 이에 의해, 신선도 및 저장성이 연장되어 생산성을 향상시킬 수 있을 뿐만 아니라, 맛, 영양, 및 조직감이 유지된 고영양가의 수산물을 제공할 수 있다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류
A23L 29/065 (2016.08)
A23P 20/17 (2016.08)
A23V 2400/169 (2023.08)
C12R 2001/25 (2021.05)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1525013176
과제번호 202203192
부처명 해양수산부
과제관리(전문)기관명 해양수산과학기술진흥원
연구사업명 수산식품산업 맞춤형 기술개발
연구과제명 횟감용 적색 어육의 유통 중 변색 및 이취 문제 해결을 위한 현장 맞춤형 유통 품질 향상 기술
기 여 율 1/2
과제수행기관명 창원대학교 산학협력단
연구기간 2022.04.01 ~ 2024.12.31
이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1345350472
과제번호 2021R1A6A1A03039211
부처명 교육부
과제관리(전문)기관명 한국연구재단
연구사업명 이공학학술연구기반구축
연구과제명 해양바이오닉스융합기술센터
기 여 율 1/2
과제수행기관명 부경대학교
연구기간 2021.06.01 ~ 2030.05.31

명 세 서

청구범위

청구항 1

수탁번호 KCTC15204BP로 수탁된, 어류의 산패 억제 효과를 갖는 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) 균주 또는 이의 배양액.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 락토바실러스 플란타룸 균주는 서열번호 1의 염기서열을 포함하는 16S rDNA를 갖는 것을 특징으로 하는,

수탁번호 KCTC15204BP로 수탁된, 어류의 산패 억제 효과를 갖는 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*, *L. plantarum*) 균주 또는 이의 배양액.

청구항 3

수탁번호 KCTC15204BP로 수탁된, 어류의 산패 억제 효과를 갖는 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*, *L. plantarum*) 균주 또는 이의 배양액을 유효성분으로 포함하는, 어류의 산패 억제용 조성물.

청구항 4

수탁번호 KCTC15204BP로 수탁된, 어류의 산패 억제 효과를 갖는 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*, *L. plantarum*) 균주 또는 이의 배양액을 유효성분으로 포함하는, 식품 보존제 조성물.

청구항 5

다음 단계를 포함하는 과메기의 산패 억제 방법:

(a) 어류의 내장을 제거하고 세척한 후 물기를 제거하는 단계; 및

(b) 상기 어류를, 수탁번호 KCTC15204BP로 수탁된, 어류의 산패 억제 효과를 갖는 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*, *L. plantarum*) 균주 또는 이의 배양액을 포함하는 어류의 산패 억제용 조성물에 침지한 후 저온건조시키는 단계.

청구항 6

제5항에 있어서,

상기 어류는 꽁치, 학꽁치, 고등어, 양미리, 정어리 및 청어로 이루어진 군으로부터 선택되는 생선인 것을 특징으로 하는,

과메기의 산패 억제 방법.

청구항 7

제5항에 있어서,

상기 (b) 단계에서 상기 락토바실러스 플란타룸 균주 또는 이의 배양액은 조성물 총 중량에 대하여 0.01 내지 100 중량%로 포함되는 것을 특징으로 하는,

과메기의 산패 억제 방법.

청구항 8

제5항에 있어서,

상기 배양액은 락토바실러스 플란타룸 균주를 1.0 내지 10.0 log cfu/mL로 포함하는 것을 특징으로 하는,

과메기의 산패 억제 방법.

청구항 9

제5항에 있어서,

상기 (b) 단계에서 상기 침지 시간은 1분 내지 100분인 것을 특징으로 하는,

과메기의 산패 억제 방법.

청구항 10

제5항에 있어서,

상기 (b) 단계에서 상기 어류와 산패 억제용 조성물을 1:10 내지 10:1(w/w)의 비율로 침지하는 것을 특징으로 하는,

과메기의 산패 억제 방법.

청구항 11

다음 단계를 포함하는 신선도 유지 및 저장 안전성이 증대된 과메기 제조 방법:

(a) 어류의 내장을 제거하고 세척한 후 물기를 제거하는 단계; 및

(b) 상기 어류를, 수탁번호 KCTC15204BP로 수탁된, 어류의 산패 억제 효과를 갖는 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*, *L. plantarum*) 균주 또는 이의 배양액을 포함하는 어류의 산패 억제용 조성물에 침지한 후 저온건조시키는 단계.

청구항 12

제11항의 방법에 따라 제조된, 신선도 유지 및 저장 안전성이 증대된 과메기.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) 신규 분리주 및 이의 용도에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0003] 과메기는 등푸른 생선을 동절기에 수분함량이 약 40% 정도로 자연건조시킨 반건조식품으로 경북 동해안 일대의

전통식품이다. 원재료로는 다양한 등푸른 어류를 사용할 수 있는데 값이 저렴한 꽁치를 이용한 과메기가 가장 많으며, 생물보다 건조에 의해 수분이 증발된 과메기가 영양적으로 우수하다(Shin, K. O. et at., Quality characteristics of chitosan-ascorbate treated Kwamagi prepared by vaccuum drying, and lowering effect of serum lipids in rats fed high fat diets, Korean J. Food Preserv., 14, 669-675, 2007).

[0004] 꽁치(*Pacific saury*)는, eicosapentaenoic acid (EPA) 및 docosahexaenoic acid (DHA) 등의 고도화 불포화지방산 함량이 높은 반면, 가공 및 건조 조건에 따라 지질 산화가 일어나기 쉬운 단점이 있다. 어류의 지질 산화 반응은 불쾌한 맛, 변색, 독성 성분, 영양 손실 및 저장기간의 감소를 초래한다.

[0005] 최근 꽁치 과메기의 맛과 기능성이 알려지면서 전국적으로 꽁치 과메기의 소비량이 점차 증가하고 있으나, 해풍에 의해 냉동 및 해동을 거듭하면서 수분함량이 30% 전후가 되도록 말린 재래식 건조방법은 건조시간이 길어 병원성 미생물에 노출되어 겨울철 식중독의 위험을 초래할 수 있어서, 꽁치 과메기 제조시 산패를 억제하여 저장기간을 증대시킬 수 있도록 하는 방법이 필요한 실정이다.

[0006] 한편, 과메기의 지질 산패와 관련된 선행연구로 천연 산화 방지제, 합성 방부제 및 화학 방부제 등을 이용하는 연구가 진행되었으나, 실제 천연 산화 방지제를 식품에 실제로 적용했을 때의 효과는 용해성, 제제균일성, 특히, 항균 스펙트럼에 의해 제한되는 경우가 많다. 이에, 일반적으로 식품에 천연 산화 방지제를 단일로 사용할 때 효과적인 보존 효과를 얻기 위해서는 고농축이 필요하며, 이는 식품에서 좋지 않은 맛과 냄새를 유발할 수 있다. 이와 유사하게, 일부 합성 방부제, 화학 방부제 등이 수산물의 변질을 억제하여 유통기한 연장에도 사용되어왔으나, 수산물과 관련된 독성 및 건강상의 문제 때문에 엄격하게 금지되어 있다. 또한, 합성 방부제의 불안정과 미생물의 교차저항성 때문에 합성 방부제를 대체할 새로운 방법이 필요하다.

[0007] 따라서, 이러한 문제점들을 극복하고 과메기의 공정 중 발생하는 지질 산화를 억제할 수 있는 효과적인 천연 소재를 활용한 방안 마련이 필요하다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009] 이러한 상황 하에서, 본 발명자들은 저장성이 극히 제한적인 과메기의 품질 향상 및 장기적으로 안전하게 저장 유통을 위해 과메기 제조시 건조 과정 중 발생하는 산패를 억제할 수 있는 방법을 개발하고자 노력하였다. 그 결과, 수산식품으로부터 우수한 항산화 활성을 갖는 신규한 유산균주인 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacilus plantarum*) D9를 분리 및 동정하였고, RSM 분석을 통해 상기 균주 배양액에 의한 꽁치 과메기 산패 억제에 대한 최적 조건을 도출하고, 이의 통계학적인 유의성을 규명함으로써, 본 발명을 완성하였다.

[0010] 따라서, 본 발명의 일 목적은 수탁번호 KCTC15204BP로 수탁된, 어류의 산패 억제 효과를 갖는 신규한 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*, *L. plantarum*) 균주 또는 이의 배양액을 제공하는 데 있다.

[0011] 또한, 본 발명의 또 다른 목적은 상기 균주 또는 이의 배양액을 유효성분으로 포함하는, 어류의 산패 억제용 조성물을 제공하는 데 있다.

[0012] 또한, 본 발명의 또 다른 목적은 상기 균주 또는 이의 배양액을 유효성분으로 포함하는, 식품 보존제 조성물을 제공하는 데 있다.

[0013] 또한, 본 발명의 또 다른 목적은 과메기의 산패 억제 방법을 제공하는 데 있다.

[0014] 또한, 본 발명의 또 다른 목적은 신선도 유지 및 저장 안전성이 증대된 과메기 제조 방법을 제공하는 데 있다.

[0015] 또한, 본 발명의 또 다른 목적은 상기 방법에 따라 제조된, 신선도 유지 및 저장 안전성이 증대된 과메기를 제공하는 데 있다.

[0017] 본 발명의 다른 목적 및 이점은 하기의 발명의 상세한 설명 및 청구범위에 의해 보다 명확하게 된다.

과제의 해결 수단

[0019] 본 명세서에서 사용한 용어는 단지 설명을 목적으로 사용된 것으로, 한정하려는 의도로 해석되어서는 안된다. 단수의 표현은 문맥상 명백하게 다르게 뜻하지 않는 한, 복수의 표현을 포함한다. 본 명세서에서, "포함하다" 또는 "가지다" 등의 용어는 명세서 상에 기재된 특징, 숫자, 단계, 동작, 구성요소, 부품 또는 이들을 조합한 것이 존재함을 지정하려는 것이지, 하나 또는 그 이상의 다른 특징들이나 숫자, 단계, 동작, 구성요소, 부품 또는 이들을 조합한 것들의 존재 또는 부가 가능성을 미리 배제하지 않는 것으로 이해되어야 한다.

[0020] 다르게 정의되지 않는 한, 기술적이거나 과학적인 용어를 포함해서 여기서 사용되는 모든 용어들은 실시예가 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자에 의해 일반적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 가지고 있다. 일반적으로 사용되는 사전에 정의되어 있는 것과 같은 용어들은 관련 기술의 문맥 상 가지는 의미와 일치하는 의미를 가지는 것으로 해석되어야 하며, 본 출원에서 명백하게 정의하지 않는 한, 이상적이거나 과도하게 형식적인 의미로 해석되지 않는다.

[0022] 이하, 본 발명을 상세하게 설명한다.

[0023] 본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명은 수탁번호 KCTC15204BP로 수탁된, 어류의 산패 억제 효과를 갖는 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*, *L. plantarum*) 균주 또는 이의 배양액을 제공한다.

[0024] 본 발명의 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*, *L. plantarum*) 균주는, 국내 발효 수산 식품에서 분리해 낸 유산균주로서 신규한 락토바실러스 플란타룸 균주인 것으로 본 발명자에 의해 규명된 바, D9로 명명하고 한국생명공학연구원 생물자원센터(Korean Collection for Type Cultures, KCTC)에 2022년 11월 21일자로 기탁하여, 수탁번호 KCTC15204BP를 부여받았다.

[0025] 상기 락토바실러스 플란타룸 균주의 분리 및 배양은 당업계에 공지된 임의의 방법으로 수행할 수 있다.

[0026] 또한, 상기 락토바실러스 플란타룸 균주는 서열번호 1의 염기서열을 포함하는 16S rDNA를 갖는다.

[0027] 본 발명의 신규 유산균주인 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*, *L. plantarum*) 균주는 유기산 생성 능력을 가지면서 항산화능이 높은 균학적 특징을 나타낸다.

[0028] 본 발명에 이용되는 배양액은 본 발명의 균주를 배양한 배양물 자체 뿐만 아니라, 원심분리 등으로 본 발명의 균주(세포)가 어느 정도 제거되고 본 발명의 균주가 배양시 생산한 유기산을 포함하고 있는 상등액을 물리적 방법으로 여과한 것도 포함할 수 있다.

[0029] 본 명세서에서 특별한 언급이 없는 한, 배양물이란 특정 미생물을 배양배지 또는 배양액에서 배양한 것을 의미하며, 상기 배양물은 상기 특정 미생물을 포함하는 배양물 또는 상기 미생물을 제균한 제균 배양물을 포함하는 것일 수 있다. 상기 배양물 또는 배양물의 농축물은 그 제형이 한정되지 아니하고, 일 예로 상기 제형은 액체 또는 고체일 수 있다.

[0030] 상기 배지는 특정 미생물을 배양하기 위하여, 배양대상 즉, 배양체가 되는 미생물이 필요로 하는 영양물질을 포함하는 것으로 특수한 목적을 위한 물질이 추가로 첨가되어 혼합된 것일 수 있다. 상기 배지는 배양기 또는 배양액이라고도 하며, 천연배지, 합성배지 또는 선택배지를 모두 포함하는 개념이다.

[0031] 상기 락토바실러스 플란타룸 D9 균주의 배양액은 어류의 산패를 효과적으로 억제할 수 있으므로, 과메기 제작시에 발생되는 어류의 변패나 부패를 방지함으로써, 식품을 장기간 동안 신선하게 보관할 수 있게 해준다.

[0033] 또한, 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 수탁번호 KCTC15204BP로 수탁된, 어류의 산패 억제 효과를 갖는 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*, *L. plantarum*) 균주 또는 이의 배양액; 및 이를 유효성분으로 포함하는 어류의 산패 억제용 조성물을 제공한다.

[0034] 상기 조성물은 유효성분으로 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*, *L. plantarum*) 균주의 배양액을 포함하나, 당업자가 본 발명의 목적을 달성할 수 있는 한, 추가적으로 상기 균주의 파쇄물; 상기 균주의 발효물; 상기 균주 배양액의 농축물; 상기 배양액의 건조물 및 상기 배양액의 분획물로 이루어지는 군으로부터 선택되는 1 종 이상을 적절히 채택하여 이용할 수 있다.

[0035] 상기 배양액의 분획물은 헥산, 에틸아세테이트, 부탄올 및 물로 구성되는 군에서 선택된 어느 하나 이상을 용매로 사용하여 분획된 또는 흡착제를 사용한 컬럼을 사용하여 분획된 것이다.

[0036] 상기 컬럼에 이용될 수 있는 흡착제는 스티렌-디비닐벤젠, 실리카겔, 세파덱스, RP-18, 폴리아미드, 도요펄(Toyopearl) 및 XAD 수지를 포함하는 그룹으로부터 선택될 수 있다.

[0037] 본 명세서에서 사용되는 용어 "유효성분으로 포함하는"이란, 본 발명의 균주 또는 이의 배양액이 그 효능 또는 활성을 달성하는 데 충분한 양으로 포함되는 것을 의미한다.

[0038] 본 발명의 조성물의 유효성분은 천연 발효 식품으로부터 분리한 유산균 균주 또는 이의 배양액인바, 과량 투여하여도 대상에 부작용이 없으므로 본 발명의 조성물에 포함된 양적 상한은 당업자가 적절한 범위 내에서 선택하여 실시할 수 있다.

[0040] 또한, 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 수탁번호 KCTC15204BP로 수탁된, 어류의 산패 억제 효과를 갖는 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*, *L. plantarum*) 균주 또는 이의 배양액을 유효성분으로 포함하는 식품 보존제 조성물을 제공한다.

[0041] 상기 보존제 조성물은 세균, 곰팡이 및 효모 등의 위해 미생물 또는 부패 미생물의 증식을 억제하거나 살균하여, 위해 미생물 또는 부패 미생물에 의해 감염되거나 부패될 수 있는 보존대상의 변질, 산패 또는 부패를 방지하고 보존대상의 상태를 유지하기 위하여 사용되는 물질을 의미하며, 바람직하게는 식품, 사료, 화장품 및 의약품으로 이루어진 군중에서 선택된 1종 이상, 더욱 바람직하게는 식품에 사용될 수 있는 것을 의미한다.

[0042] 상기 식품은 통조림식품 등을 포함하는 식품가공품, 어육제품, 두부류, 묵류, 건강보조식품, 조미식품, 제빵 및 제과류, 유제품을 포함하는 유가공품, 절임식품, 발효유 및 발효알콜음료를 포함하는 발효식품 또는 음료 등을 포함하며, 상기 사료는 일 예로 가축 사료일 수 있고, 그 용도에 제한되지 아니하고, 고체 또는 액체일 수 있다.

[0043] 상기 보존제 조성물은 상기 유효성분을 포함하는 것을 제외하고는 보존제에 포함되는 통상의 물질을 추가로 포함할 수 있다. 상기 보존제 조성물은 전체 조성물 100 중량부에 대하여 상기 항균 조성물을 0.1 내지 50 중량부 또는 0.5 내지 10 중량부 포함하는 것일 수 있다.

[0044] 상기 보존제 조성물은 보존제가 사용되는 식품 또는 사료 등의 저장성을 향상시킬 수 있을 뿐만 아니라, 열처리량 감소에 의한 영양적가치, 조직감 및 맛을 향상시킬 수 있는 효과가 있다. 또한, 상기 보존제 조성물은 다양한 병원성균이나 식품오염의 주원인이 되는 곰팜이 또는 부패의 원인이 되는 미생물 등의 제어가 요구되는 다양한 용도에 응용될 수 있다.

[0045] 상기 보존제 조성물에는 본 발명의 효과를 유지하는 범위 내에서 필요에 따라, 천연보존제, 합성 보존제 또는 유기산 혼합물을 함께 사용할 수 있다.

[0047] 또한, 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 다음 단계를 포함하는 과메기의 산패 억제 방법을 제공한다:

[0048] (a) 어류의 내장을 제거하고 세척한 후 물기를 제거하는 단계; 및

[0049] (b) 상기 어류를, 수탁번호 KCTC15204BP로 수탁된, 어류의 산패 억제 효과를 갖는 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*, *L. plantarum*) 균주 또는 이의 배양액을 포함하는 어류의 산패 억제용 조성물에 침지한 후 저온건조시키는 단계.

[0050] 본 발명은 산패 억제를 위한 조성의 최적 조건을 탐색하기 위한 가장 효과적인 방법으로 반응표면분석법(response surface methodology, RSM)을 이용하여 최적 조건을 도출했다는 데 특징이 있으며, 이는 실험 경비의 절약, 각 요인들의 상호작용을 통한 결과의 최소치와 최대치의 결과를 동시에 예측할 수 있는 장점을 가지고 있다.

[0051] 본 발명의 과메기를 제조하는 방법에 있어서, 상기 과메기 제조용 어류는 통상적으로 과메기의 제조에 이용되는 것이라면 어떤 것이라도 사용 가능하며, 바람직하게는 꽁치, 학꽁치, 고등어, 양미리, 정어리 및 청어로 이루어진 군으로부터 선택되는 생선이고, 본 발명의 일 실시예에서는 꽁치를 이용하였으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0052] 상기 어류는 세척 후 바로 침지하여 건조하는 과정을 수행할 수 있으나, 산패 억제용 조성물이 생선 내로 잘 흡

수되기 위해서는 생선의 물기를 잘 제거하는 것이 바람직하며, 이를 위해 세척된 생선을 2~4시간 예비건조하는 방법을 이용할 수 있다. 예비건조 단계는 실온에서 수행할 수 있다. 이 때 실온은 4~35℃의 통상적인 생선 가공 온도 조건일 수 있다.

[0053] 상기 건조는, 통상적인 과메기 제조 방법인 실외에서 얼렸다 녹이는 과정을 반복하는 방법으로 생선을 건조할 수도 있으나, 최종 제조된 과메기의 상태를 일정하게 유지하기 위해, 당업계에 공지된 임의의 건조 방법을 이용하여 당업자가 적절히 조정할 수 있다.

[0054] 바람직하게는, 상기 (b) 단계에서 상기 침지 시간은 1분 내지 100분, 바람직하게는 1분 내지 60분, 더욱 바람직하게는 5분 내지 30분이며, 상기 조성물에 어류를 침지할 때부터 마칠 때까지 3~10시간 간격으로 2~10회 반복할 수 있다. 또한 1분 이내로 침지하거나 100분 이상 침지할 경우 산패 억제가 잘 되지 않을 수 있다.

[0055] 상기 (b) 단계에서 상기 어류와 산패 억제용 조성물은 1:10 내지 10:1(w/w)의 비율로 침지한다.

[0056] 손질된 재료인 어류를 산패 억제용 조성물에 1:10 내지 10:1(w/w) 비율로 침지시킬 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.

[0057] 과메기 제조시 산패 억제 효과를 극대화시키기 위하여, 상기 어류와 조성물의 혼합비를 탐색한 결과, 어류와 조성물을 1:4.03(w/w)로 혼합함이 바람직함을 알 수 있었다.

[0058] 만일, 어류와 조성물의 혼합비율이 1:10 (w/w) 미만이거나, 10:1(w/w)를 초과하는 경우에는 산패가 효과적으로 억제되지 않는다.

[0059] 상기 (b) 단계에서 상기 락토바실러스 플란타룸 균주 또는 이의 배양액은, 조성물 총 중량에 대하여 0.01 내지 100 중량%로 포함될 수 있다. 즉, 상기 조성물은 본 발명의 락토바실러스 플란타룸 균주 또는 이의 배양액 자체이거나, 상기 균주 또는 이의 배양액을 다른 부재료 및/또는 첨가물과 혼합하여 제조된 것, 또는 다른 부재료 및/또는 첨가물과 혼합한 후 발효하여 제조된 것일 수 있다.

[0060] 일 구현예에 있어서, 상기 락토바실러스 플란타룸 균주의 배양액은 미생물 배양 배지에 상기 균주를 접종하고, 당업계에 공지된 미생물 배양방법 (예를 들어, 정치 배양)에 따라 제조될 수 있다.

[0061] 상기 배양액의 제조를 위해, 상기 배양은 24 내지 38℃, 바람직하게는 30 내지 38℃, 더욱 바람직하게는 32 내지 38℃에서 6 내지 36 시간, 바람직하게는 12 내지 24 시간 동안 혐기 조건에서 액체배양하는 것일 수 있다.

[0062] 상기 배양액은 락토바실러스 플란타룸 균주를 1.0 내지 10.0 log cfu/mL, 바람직하게는 4.0 내지 8.0 log cfu/mL, 더욱 바람직하게는 7.0 내지 8.0 log cfu/mL로 포함한다.

[0063] ml당 CFU는 생 박테리아의 양을 평가하는 시험관내 역가 분석의 표준에 의해 평가될 수 있다. 용어 "ml당"은 바람직하게는 유체 1ml를 지칭한다.

[0064] 본 발명의 일 실시예에서, 본 발명은 본 발명의 신규 유산균주인 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum, L. plantarum*) 균주 또는 이의 배양액을 목적 대상인 어류에 처리하는 경우, 지질 산폐를 억제하는 우수한 효과를 발휘하는 최적 조건을 최초로 확립하였다.

[0065] 또한, 본 발명은 열처리 단계를 거치지 않기 때문에 수산물 어류 원형 그대로 처리가 가능하며 대부분의 수산물에 적용 가능한 액상으로 액상-액상(liquid-liquid) 및 액상-고상(liquid-solid)으로도 반응이 가능한 장점을 가진다.

[0067] 또한, 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 다음 단계를 포함하는 신선도 유지 및 저장 안전성이 증대된 과메기 제조 방법 및 이에 따라 제조된, 신선도 유지 및 저장 안전성이 증대된 과메기를 제공한다:

[0068] (a) 어류의 내장을 제거하고 세척한 후 물기를 제거하는 단계; 및

[0069] (b) 상기 어류를, 수탁번호 KCTC15204BP로 수탁된, 어류의 산패 억제 효과를 갖는 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum, L. plantarum*) 균주 또는 이의 배양액을 포함하는 어류의 산패 억제용 조성물에 침지한 후 저온건조시키는 단계.

[0070] 본 발명의 방법은 상술한 본 발명의 어류의 산패 억제용 조성물을 이용하므로, 이 둘 사이에 공통된 내용은 본 명세서의 과도한 복잡성을 피하기 위하여, 그 기재를 생략한다.

[0072] 결론적으로, 본 발명은 과메기의 산패를 효과적으로 억제할 수 있는 bio-treatment 기술을 최적화함으로써, 수산물의 다양한 어육의 산패 억제 및 유산균의 수산식품산업 적용에 대한 새로운 방안을 제시할 수 있을 것으로 기대된다.

발명의 효과

[0074] 본 발명은 어류의 산패를 억제시키는 데 최적의 조건을 도출하기 위해, 반응표면분석법(RSM, response surface methodology)을 이용하여, 본 발명의 신규 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*, *L. plantarum*) 균주 또는 이의 배양액의 최적 처리 조건을 확립하였고, 이에 의해, 신선도 및 저장성이 연장되어 생산성을 향상시킬 수 있을 뿐만 아니라, 맛, 영양, 및 조직감이 유지된 고영양가의 수산물을 제공할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0076] 도 1은 본 발명의 방법의 침지시간 및 침지비율에 따른 산가의 3D 반응 표면 모델을 보여준다.

도 2는 본 발명의 방법의 침지시간 및 cell population에 따른 산가의 3D 반응 표면 모델을 보여준다.

도 3은 본 발명의 방법의 침지비율 및 cell population에 따른 산가의 3D 반응 표면 모델을 보여준다.

도 4는 본 발명의 방법의 침지시간 및 침지비율에 따른 과산화물가의 3D 반응 표면 모델을 보여준다.

도 5는 본 발명의 방법의 침지시간 및 cell population에 따른 과산화물가의 3D 반응 표면 모델을 보여준다.

도 6은 본 발명의 방법의 침지비율 및 cell population에 따른 과산화물가의 3D 반응 표면 모델을 보여준다.

도 7은 본 발명의 방법의 침지시간 및 침지비율에 따른 색차값의 3D 반응 표면 모델을 보여준다.

도 8은 본 발명의 방법의 침지시간 및 cell population에 따른 색차의 3D 반응 표면 모델을 보여준다.

도 9는 본 발명의 방법의 침지비율 및 cell population에 따른 색차값의 3D 반응 표면 모델을 보여준다.

도 10은 본 발명의 방법의 침지시간 및 침지비율에 따른 전반적인 기호도의 3D 반응 표면 모델을 보여준다.

도 11은 본 발명의 방법의 침지시간 및 cell population에 따른 전반적인 기호도의 3D 반응 표면 모델을 보여준다.

도 12은 본 발명의 방법의 침지비율 및 cell population에 따른 전반적인 기호도의 3D 반응 표면 모델을 보여준다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0077] 이하, 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로서, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

[0079] **실시예 1. 본 발명의 신규한 유산균주(*Lactobacillus plantarum* D9)의 분리 및 선별**

[0080] 본 발명자들은 신규한 유산균주인 락토바실러스 플란타룸 분리주(*Lactobacillus plantarum* D9)를 획득하기 위하여, 다음과 같이 국내 전통 발효 식품(다시마 김치)으로부터 분리하였다:

[0081] 다시마 김치를 희석하여 Bromo cresol purple agar (plate count agar with 0.006% bromo cresol purple)에 접종하여 35℃에서 48시간까지 배양 후 노란색으로 변한 집락을 선별하였다. 총 15개의 집락을 분리하였으며 그 중 항산화 활성이 가장 높은 균주를 선별하였다.

[0082] 또한, 상기 최종적으로 선별한 균주의 동정을 위하여, 분리 균주의 16S rRNA 염기서열을 결정하여 알려진 균주들과 비교하였다.

[0083] 유산 균주의 16S rRNA 시퀀싱은 분리 균주의 chromosomal DNA를 분리한 후에 프라이머 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG -3'; 서열번호 2), 1492R (5'-TACGGYTACCT TGTTACGTACTT-3'; 서열번호 3)의 프라이머를 사용하여 PCR로 증폭하였다.

[0084] 상기 균주의 16S rRNA를 코딩하는 DNA 염기서열(16S rDNA; 서열번호 1)을 Basic local alignment search tool(Blast, NCBI)을 통해 진뱅크(GeneBank) 데이타베이스에 등록된 균주들의 16S rRNA 염기서열과 상동성을 조사하여 계통학적 유연 관계를 분석한 결과, 본 발명의 선별된 분리 균주가, 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*)에 속하는 유산균주임을 확인하였다.

[0085] 또한, 본 명세서에 따른 유산균은 공시균주인 락토바실러스 플란타룸(Genbank accession No.KT025937)과 근접한 균주로 동정이 되나, 상기 균주와는 서열 상 차이가 존재하는 상이한 균주임을 확인하였다.

[0086] 이에, 본 발명자들은 상기 분리한 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) 균주를 D9로 명명하고 한국생명공학연구원 생물자원센터(KCTC)에 2022년 11월 21일자로 기탁하여, 수탁번호 KCTC15204BP를 부여받았다.

[0087] 따라서, 본 발명의 균주인 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) D9는, 공시균주와 비교하였을 때 염기서열 상 차이가 존재하는 것으로 밝혀진 신규 균주이며, 상기 균주는 탁월하게 유기산을 생성하고 높은 항산화능을 나타내는 균학적 특징이 발휘되므로, 균주 자체뿐만 아니라 이의 배양 대사물로써 효과를 달성할 수 있다.

[0089] **실시예 2. RSM을 이용한 유산균 배양액(cell-free 상등액)의 최적 처리 조건 도출**

[0090] 본 발명자들은 상기 실시예 1에서 분리된 본 발명의 신규한 균주인 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*, *L. plantarum*) D9 배양액에 의한 과메기 제조 중의 산패 억제능을 분석하고 침지 조건의 최적화를 도출하고자 통계적 실험법으로서 RSM(Response surface methodology)을 적용하였다.

[0091] 이때, RSM을 이용하여 과메기 제조 시 산패를 억제할 수 있는 최적화 모델을 도출하기 위해, 유산균(D9) 배양 시 세포수(cell population)(log CFU/mL), 배양액 침지 시 침지시간 (분) 및 침지비율 (w/w) 조건에 대한 single factor experiment를 수행하였으며, 유산균 처리를 통한 과메기 산패 억제 최적 조건을 분석하기 위해 RSM 중 Box-Behnken Design (BBD)를 이용하였다.

[0092] 보다 구체적으로, *Lactobacillus plantarum* D9는 MRS broth에 접종하여 37℃에서 24시간 동안 6, 7 및 8 log CFU/mL 세포수 조건으로 배양하였으며, 이를 원심 분리(10,000 Xg, 20 min, 4℃)하여 상등액만 수거 후 0.22 um membrane filter를 이용하여 여과하여 cell-free 배양액을 제조하여 실험에 사용하였다. 과메기 제조를 위해 냉동 꽁치를 해동하여 비가식 부위를 제거한 후 건조대에서 10분간 탈수하였으며 이후 각 실험 조건(침지시간 및 침지비율)에 따라 침지 처리 후 건조대에서 추가 10분 탈수를 진행하였다. 처리한 꽁치는 저온 인큐베이터에서 36시간동안 건조하여 과메기를 제조하였다.

[0093] 그 결과, 꽁치에 LAB cell-free 배양액을 처리하여 과메기의 산패를 효과적으로 억제할 수 있는 bio-treatment 기술을 최적화하고 최적 처리 조건을 도출하고자 RSM 중 BBD에 따라 실험을 설계하여 독립변수(X_i)인 침지시간(X_1), 침지비율(X_2) 및 cell population(X_3)에 따른 종속변수(Y_i), 산가(Y_1), 과산화물가(Y_2), 색차(Y_3) 및 관능평가 항목 중 전반적인 기호도(Y_4) 결과를 얻을 수 있었다.

[0094] 보다 구체적으로, 모델 최적화를 위해 설계된 독립변수의 실험 수준 및 범위는 표 1, 2차 다항식 모델 방정식은 표 2, 2차 모델의 분산 및 적정성 분석을 위한 ANOVA는 표 3에 나타내었다.

[0095] 표 1에서는, 과메기의 제조 조건을 최적화하기 위해 -1, 0, +1의 3단계로 부호화하였으며, 독립변수의 범위로 침지시간은 5, 10, 15분, 침지비율(꽁치 대비 배양액)은 3.5, 4.0, 4.5 (w/w) 및 cell population은 6, 7, 8 log CFU/mL으로 설정하였다.

[0097] [표 1]

변수	수준		
	-1.00	0	+1.00
침지시간 (분)	5.0	10.0	15.0
침지비율 (w/w)	3.5	4.0	4.5
Cell population (log CFU/mL)	6.0	7.0	8.0

[0098]

[0100] RSM에서 제시된 조건들에 따른 실험 결과를 각 종속변수 별로 2차 방정식을 도출한 결과는 표 2와 같다.

[0102] [표 2]

요인	다항식
산가	$Y = 62.43 - 0.60X_1 - 9.14X_2 - 9.16X_3 + 0.04X_1X_2 + 0.04X_1X_3 + 0.18X_2X_3 + 0.004\ X_1^2 + 0.90X_2^2 + 0.51X_3^2$
과산화물가	$Y = 81.82 - 5.70X_1 - 0.88X_2 - 14.41X_3 - 0.009X_1X_2 - 2.18X_1X_3 - 0.70X_2X_3 - 3.42X_1^2 - 1.57X_2^2 - 4.45X_3^2$
색차	$Y = 8.69 + 0.164X_1 + 1.43X_2 - 4.19X_3 - 0.03X_1X_2 + 0.02X_1X_3 - 0.14X_2X_3 - 0.007X_1^2 + 0.01X_2^2 + 0.40X_3^2$
전반적인 기호도	$Y = 2.42 + 0.044X_1 + 4.09X_2 - 2.65X_3 - 0.06X_1X_2 + 0.04X_1X_3 + 0.13X_2X_3 - 0.00007X_1^2 - 0.51X_2^2 + 0.15X_3^2$

[0103]

[0105] 본 발명에서 제시한 모델의 유의성 검증을 위해 ANOVA 분석을 실시하였고 이에 대한 결과는 표 3과 같다. 본 연구에서 개발된 모든 종속 변수의 모델이 유의한 것으로 나타났다.

[0107] [표 3]

Sources	*F*-value				*p*-value			
	Y_1	Y_2	Y_3	Y_4	Y_1	Y_2	Y_3	Y_4
Model	108.04	49.17	58.25	38.14	< 0.0001 Signific-ant	< 0.0001 Signific-ant	< 0.0001 Signific-ant	< 0.0001 Signific-ant
X_1	109.10	55.12	50.25	86.42	< 0.0001	0.0001	0.0002	< 0.0001
X_2	18.64	1.30	6.10	24.52	0.0035	0.2912	0.0429	0.0017
X_3	681.89	352.43	426.63	169.83	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001
X_1X_2	4.08	0.0065	1.00	14.98	0.0833	0.9380	0.3495	0.0061
X_1X_3	14.37	4.05	2.64	21.23	0.0068	0.0840	0.1482	0.0025
X_2X_3	2.97	0.4099	0.9369	2.36	0.1285	0.5424	0.3653	0.1685
X_1^2	4.92	10.47	6.13	0.0019	0.0621	0.0144	0.0425	0.9660
X_2^2	20.63	2.21	0.0018	10.21	0.0027	0.1809	0.9672	0.0152
X_3^2	106.10	17.69	31.88	14.93	< 0.0001	0.0040	0.0008	0.0062
Residual								
Lack of Fit	0.0929	3.11	1.52	4.03	0.9601 Not significa nt	0.1509 Not significa nt	0.3377 Not significa nt	0.1056 Not significa nt
Pure Error								
Cor. Total								

[0108]

[0110] RSM을 이용한 D9(cell-free) 배양액(상등액) 처리를 위한 최적 조건은 하기 표 4에 나타내었다. Design Expert Software (ver.13.0.5)를 이용하여 제조된 과메기의 산가, 과산화물가, 색차의 값을 최소화하고 전반적인 기호도 점수를 최대화할 수 있는 최적조건을 예측하였다.

[0112] [표 4]

종속변수	최적 조건
침지시간	15 (min)
침지 비율	4.03 (w/w)
cell population	7.36 (log CFU/mL)

[0113]

[0115] 또한, RSM을 이용한 모델링을 통해 예측된 최적 조건의 검증을 위해 제시된 최적 조건에 따라 제조한 과메기의 검증 시험 결과는 하기 표 5에 나타내었다.

[0116] 이는, 모든 변수에서 실제 값과 예측 값의 편차가 5% 미만($p < 0.05$)으로 나타나 RSM을 이용하여 최적화한 모형이 적합함을 나타낸다.

[0118] [표 5]

[0119]

독립변수	예측값	실제값	Standard deviation (%)
산가	4.37	4.49	2.75
과산화물가	72.95	73.85	1.23
색차	2.92	2.99	2.40
전반적인 기호도	4.21	4.25	0.95

[0121] 결과적으로, R value로 산가, 과산화물가, 색차 및 기호도를 설정하여 모델링한 최적 조건은 침지시간 15분, 침지비율 4.03(w/w) 및 cell population 7.36 log CFU/mL로 도출되었으며, 통계학적으로 유의적인 모델임을 확인하였다.

[0122] 따라서, 이는, 본 발명의 RSM 분석을 기반으로 도출된 본 발명의 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum, L. plantarum*) D9 배양액(*L. plantarum* D9 Cell-free culture)의 최적 조건이 과메기의 산패를 탁월하게 억제할 수 있음을 입증한다.

[0124] 종합적으로, 본 발명에서는, 본 발명의 유산균주인 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum, L. plantarum*) D9 배양액을 과메기 제조에 이용하는 경우, 유지의 산패의 평가지표로 활용되는 산가, 과산화물가 분석과 소비자의 기호도에 큰 영향을 미치는 색차 분석 및 관능평가를 통해 전반적인 기호도를 확인하고 최적화 및 통계적 검증을 통해서, 부패나 산패를 효과적으로 억제함을 규명하였다. 따라서, 본 발명의 유산균주 배양액을 이용한 산패 방지 방법에 따라, 과메기의 신선도가 장기간 유지되어 저장기간을 증가시킬 수 있을 뿐만 아니라, 지질의 산화 또는 단백질의 변성을 방지하여 장기간 저장시에도 육질이 단단하고 쫄깃하여 씹는 식감이 뛰어나 수산물 본연의 풍미 및 영양을 그대로 유지하면서, 과메기의 품질 및 위생을 향상시킬 수 있으므로, 수산가공 업계 및 환경산업에서 높은 시장성을 가질 수 있다.

[0126] 비록 본 발명이 상기에 언급된 바람직한 실시예로서 설명되었으나, 발명의 요지와 범위로부터 벗어남이 없이 다양한 수정이나 변형을 하는 것이 가능하다. 또한 첨부된 청구 범위는 본 발명의 요지에 속하는 이러한 수정이나 변형을 포함한다.

수탁번호

[0127]

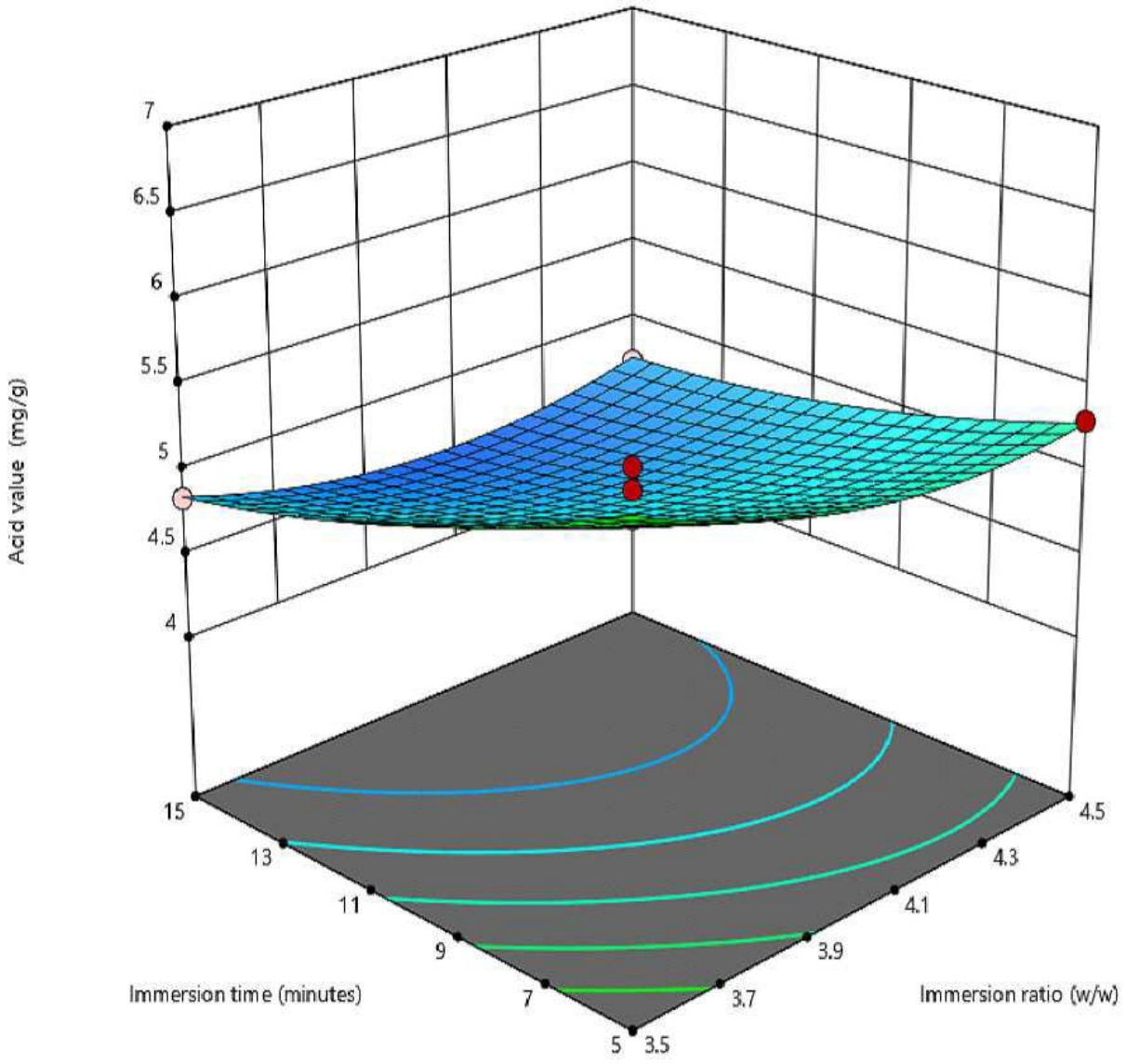
기탁기관명 : 생물자원센터

수탁번호 : KCTC15204BP

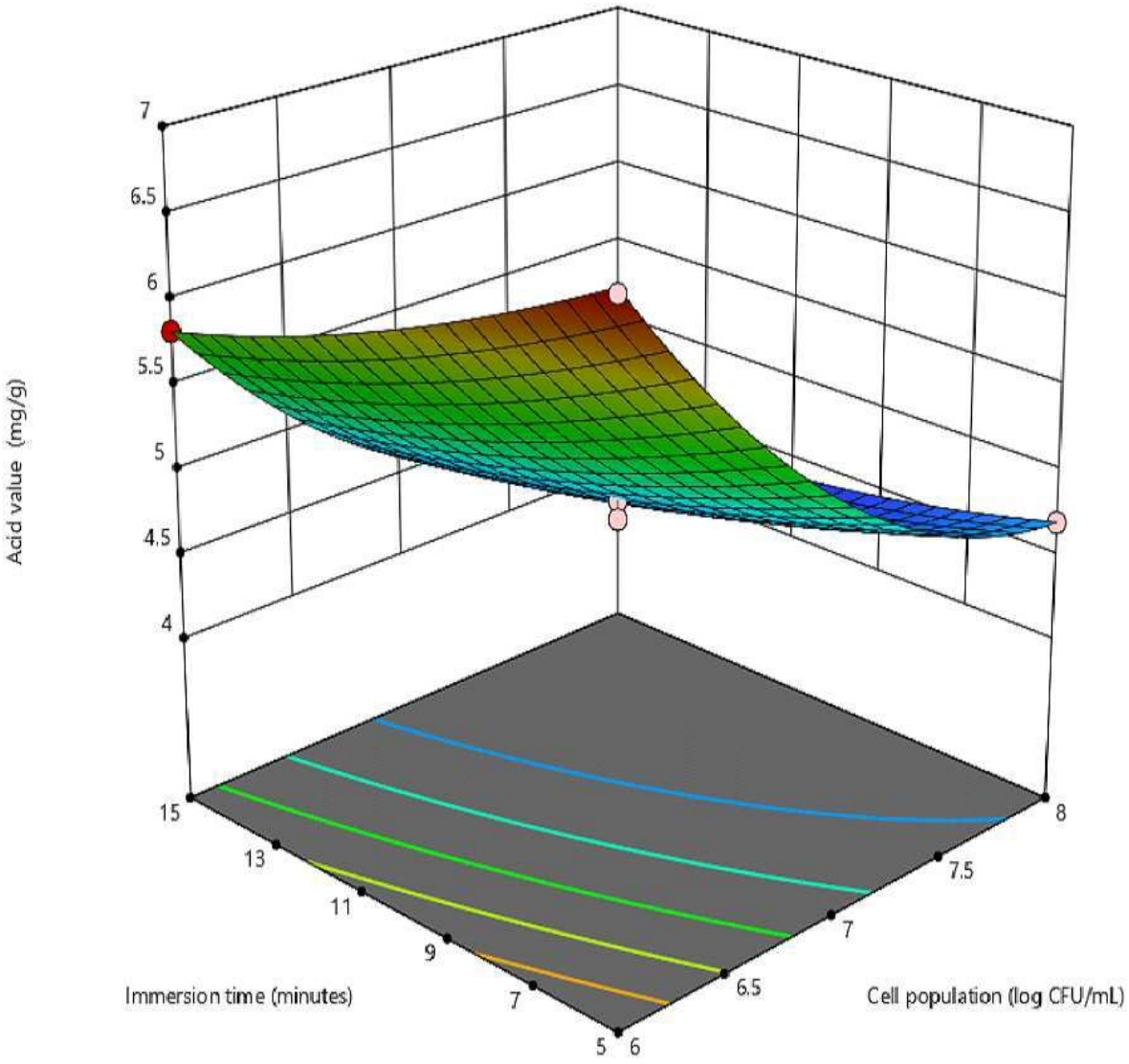
수탁일자 : 20221121

도면

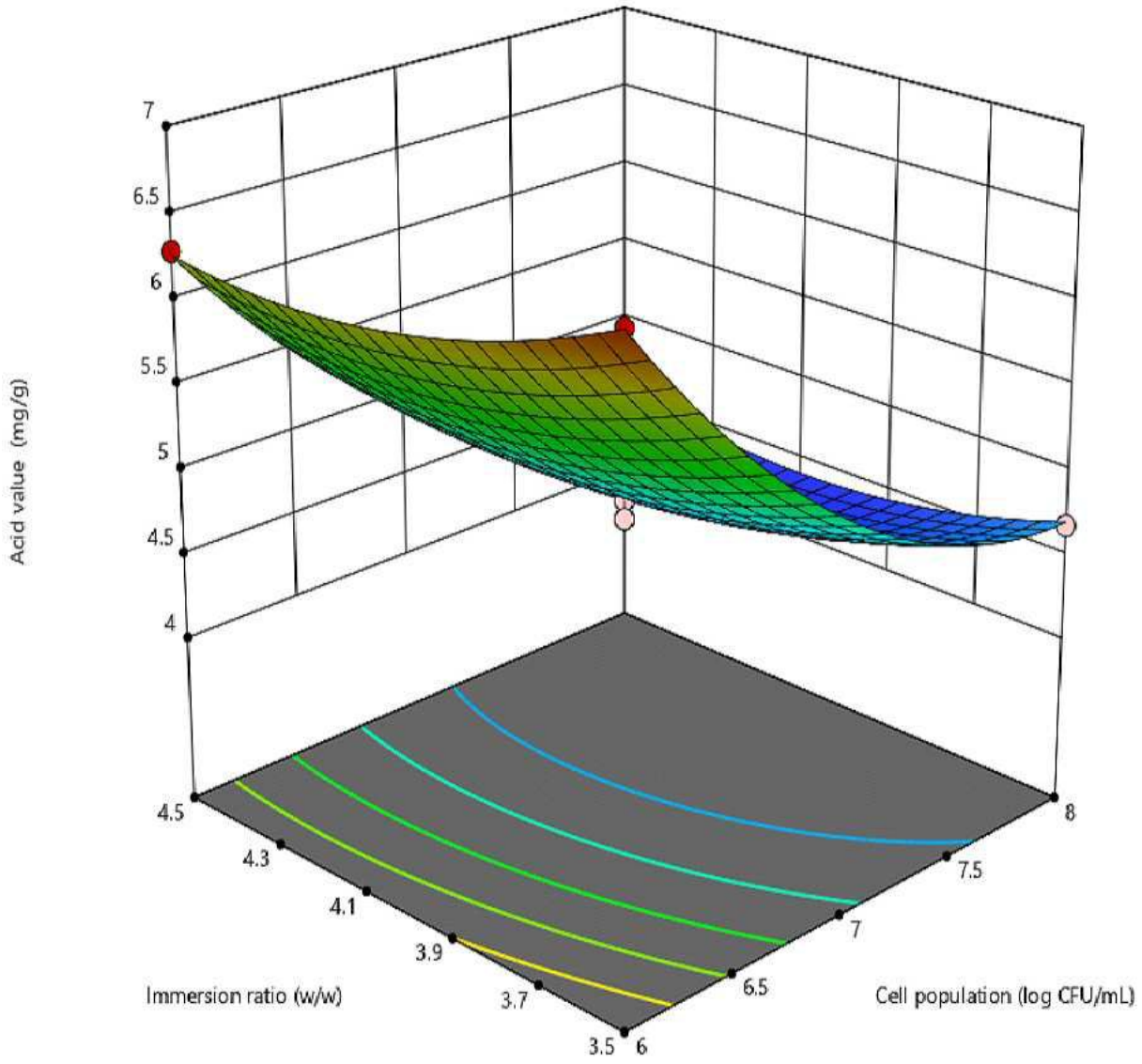
도면1


Acid value (mg/g)
7
6.5
6
5.5
5
4.5
4
15
13
11
9
7
5
Immersion time (minutes)
3.5
3.7
3.9
4.1
4.3
4.5
Immersion ratio (w/w)

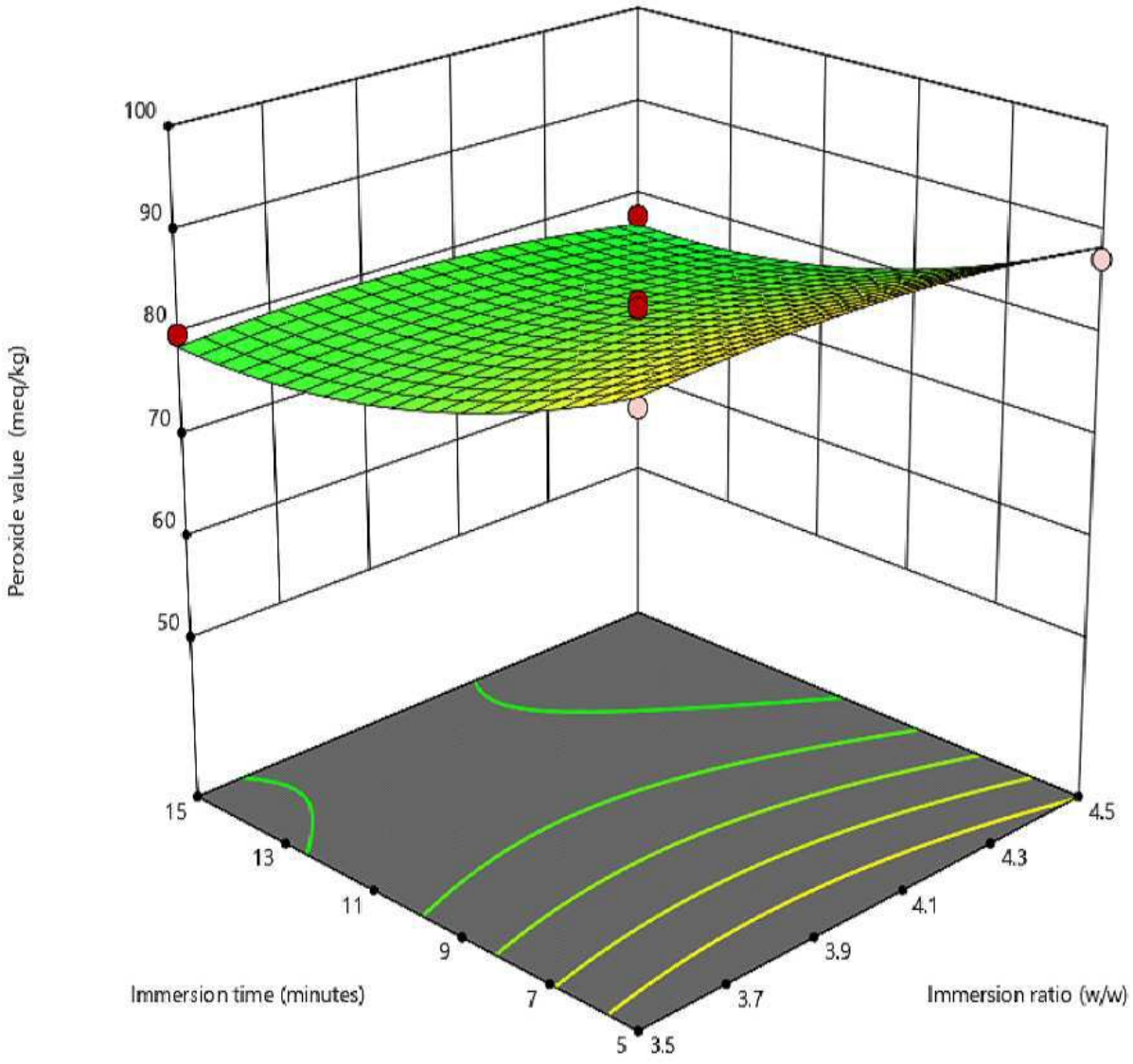
도면2


Acid value (mg/g)
7
6.5
6
5.5
5
4.5
4
15
13
11
9
7
5
Immersion time (minutes)
6
6.5
7
7.5
8
Cell population (log CFU/mL)

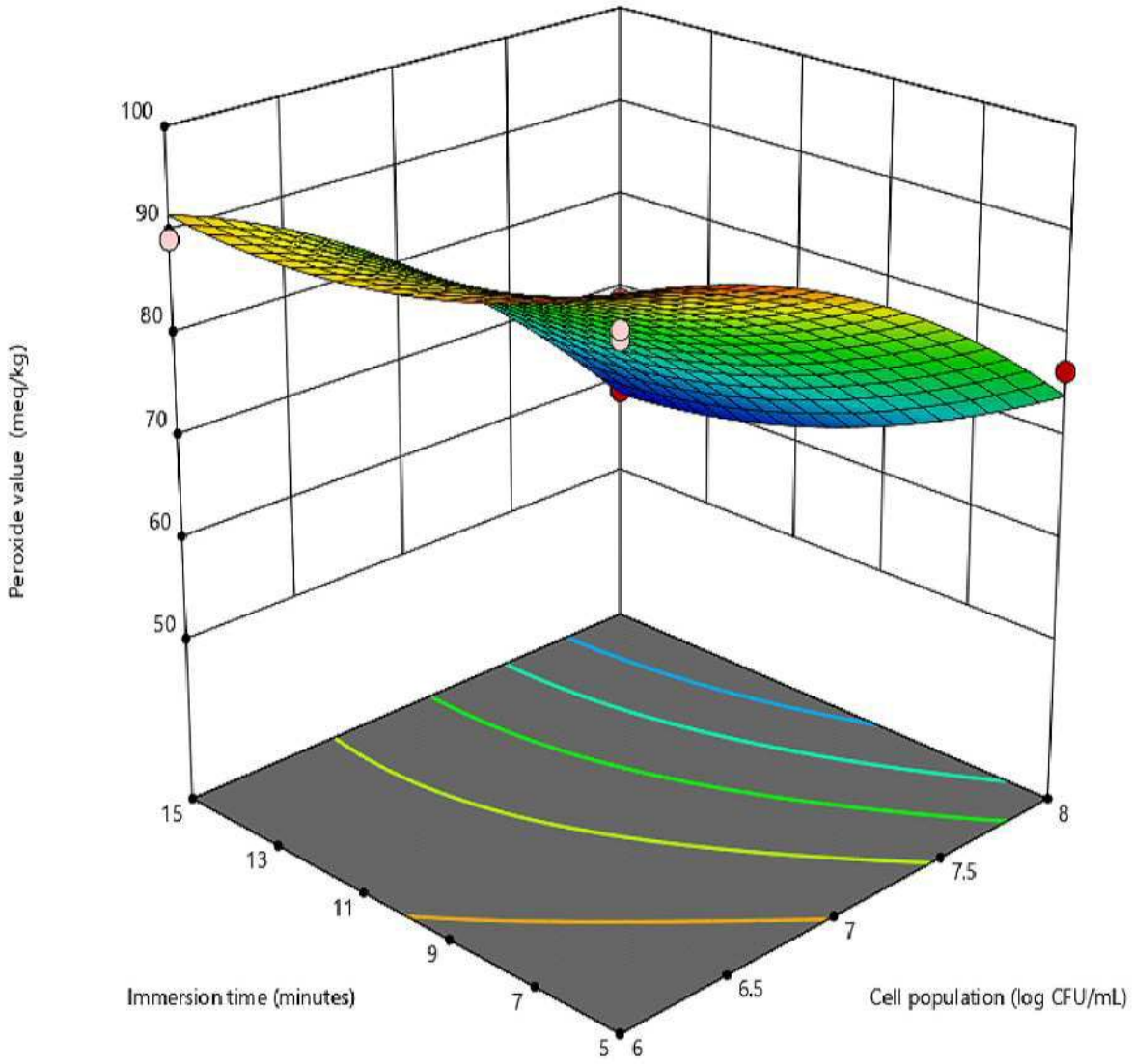
도면3


Acid value (mg/g)
7
6.5
6
5.5
5
4.5
4
4.5
4.3
4.1
3.9
3.7
3.5
Immersion ratio (w/w)
6
6.5
7
7.5
8
Cell population (log CFU/mL)

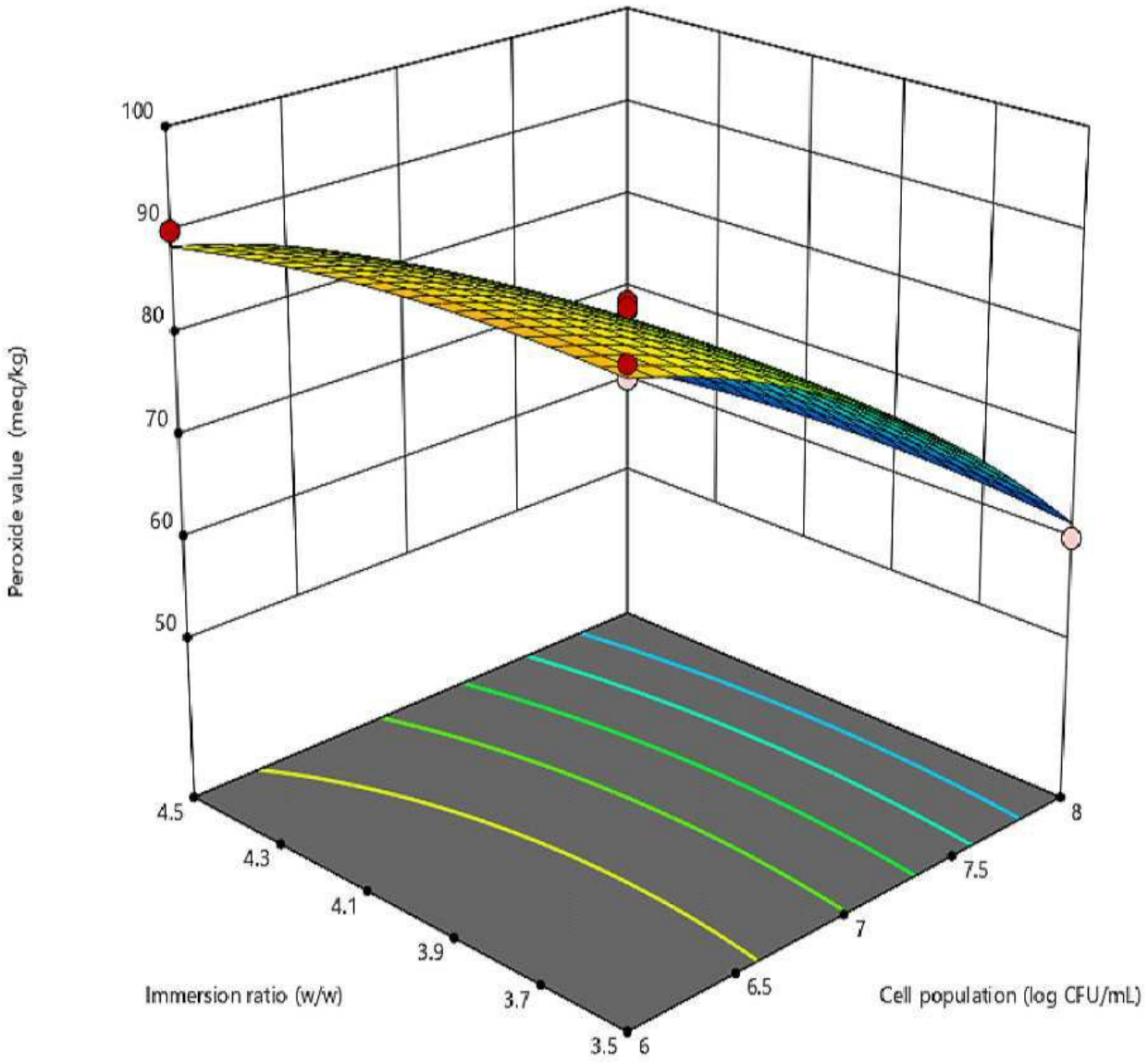
도면4


Peroxide value (meq/kg)
100
90
80
70
60
50
15
13
11
9
7
5
Immersion time (minutes)
3.5
3.7
3.9
4.1
4.3
4.5
Immersion ratio (w/w)

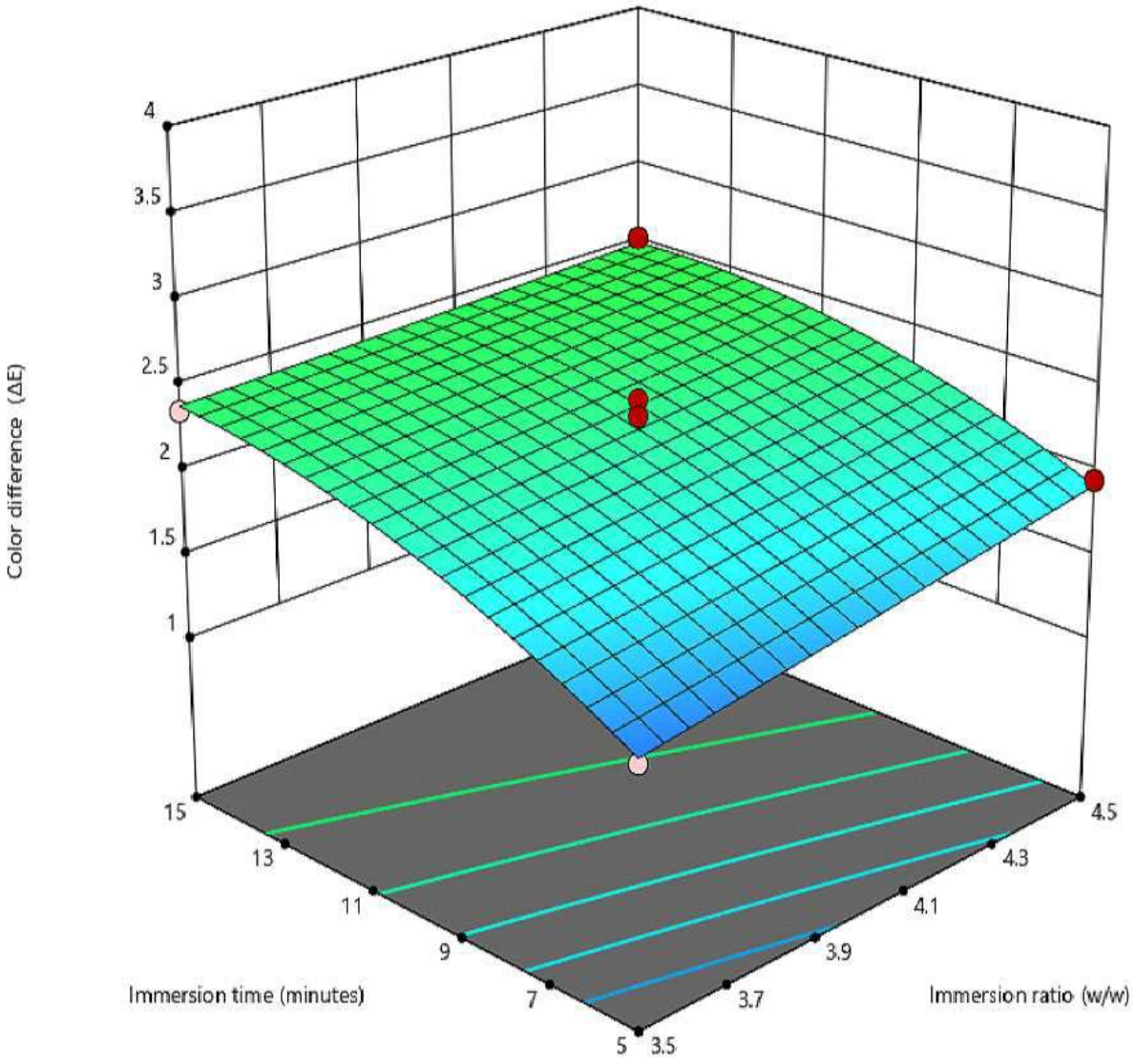
도면5


Peroxide value (meq/kg)
100
90
80
70
60
50
15
13
11
9
7
5
Immersion time (minutes)
6
6.5
7
7.5
8
Cell population (log CFU/mL)

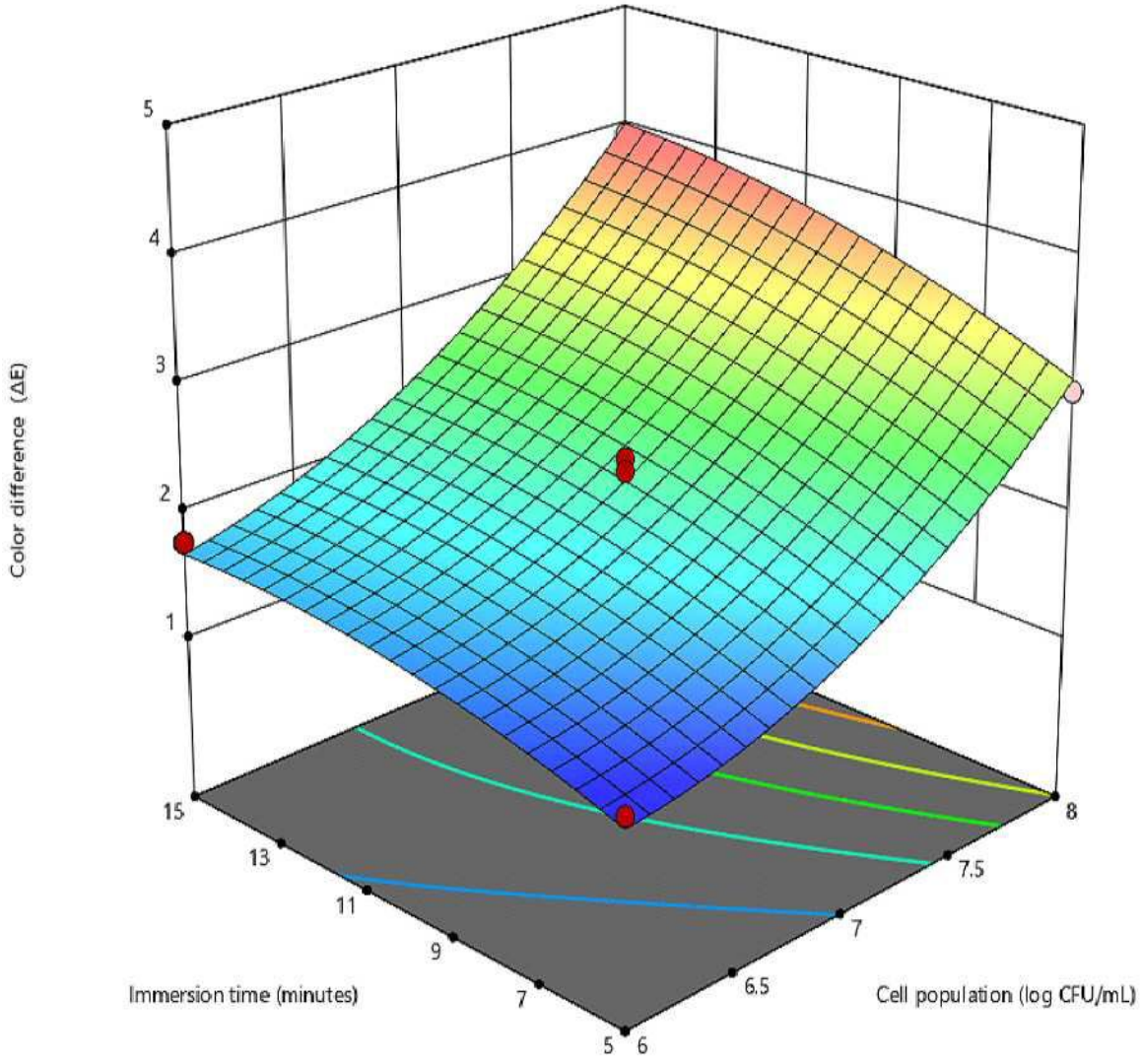
도면6


Peroxide value (meq/kg)
100
90
80
70
60
50
4.5
4.3
4.1
3.9
3.7
3.5
Immersion ratio (w/w)
6
6.5
7
7.5
8
Cell population (log CFU/mL)

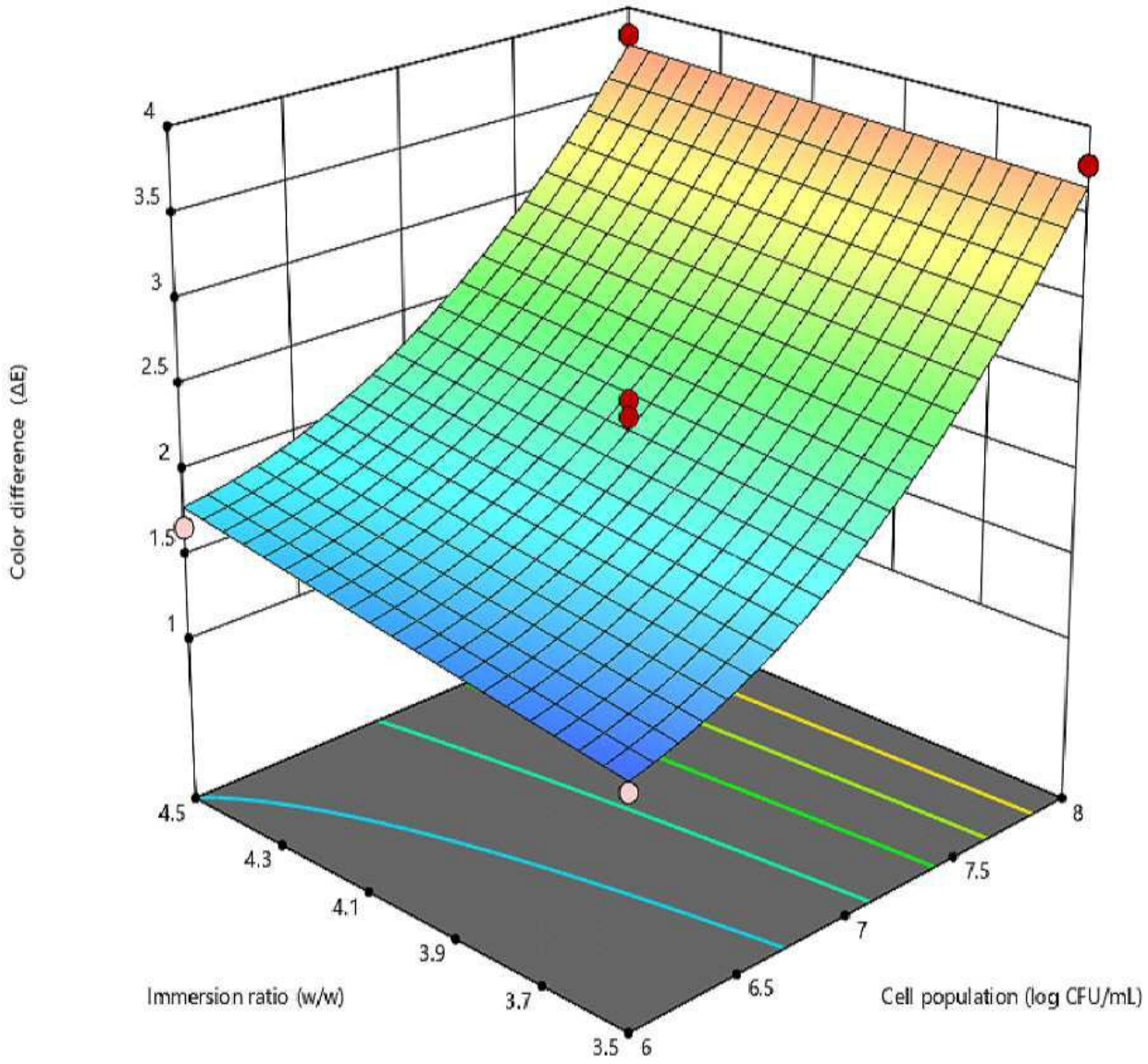
도면7


Color difference (ΔE)
4
3.5
3
2.5
2
1.5
1
15
13
11
9
7
5
Immersion time (minutes)
3.5
3.7
3.9
4.1
4.3
4.5
Immersion ratio (w/w)

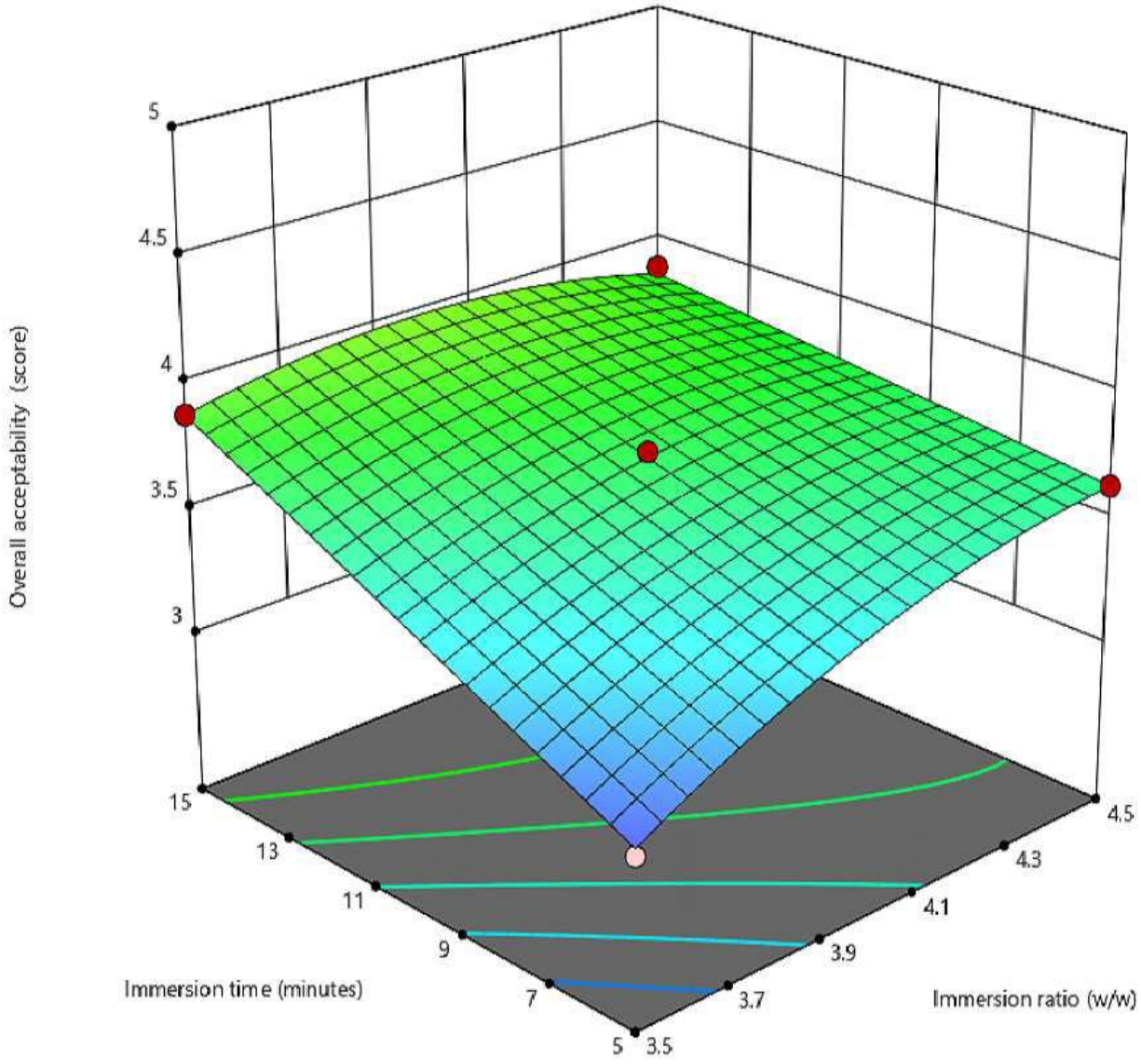
도면8


Color difference (ΔE)
5
4
3
2
1
15
13
11
9
7
5
Immersion time (minutes)
6
6.5
7
7.5
8
Cell population (log CFU/mL)

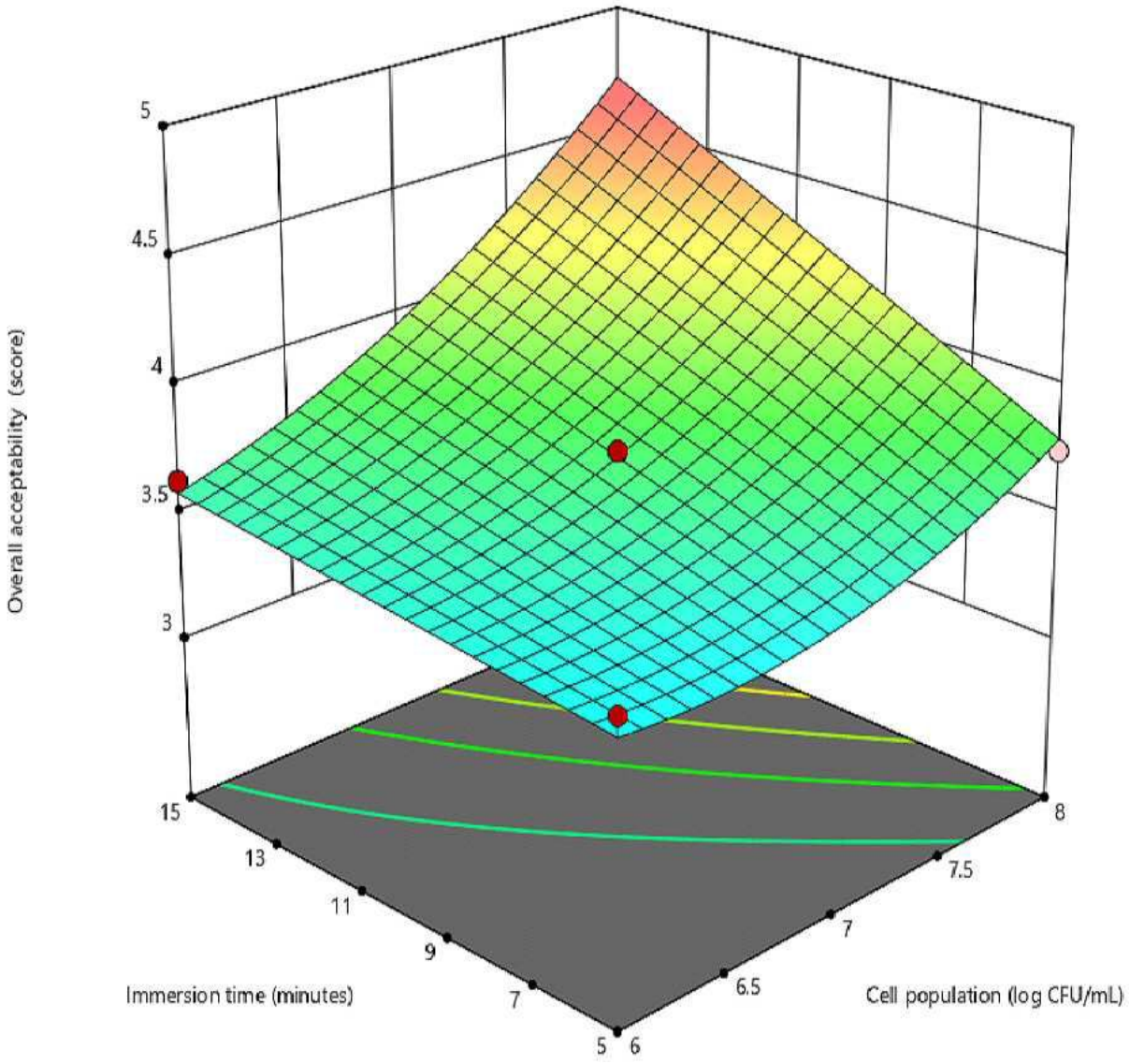
도면9


Color difference (ΔE)
4
3.5
3
2.5
2
1.5
1
4.5
4.3
4.1
3.9
3.7
3.5
Immersion ratio (w/w)
6
6.5
7
7.5
8
Cell population (log CFU/mL)

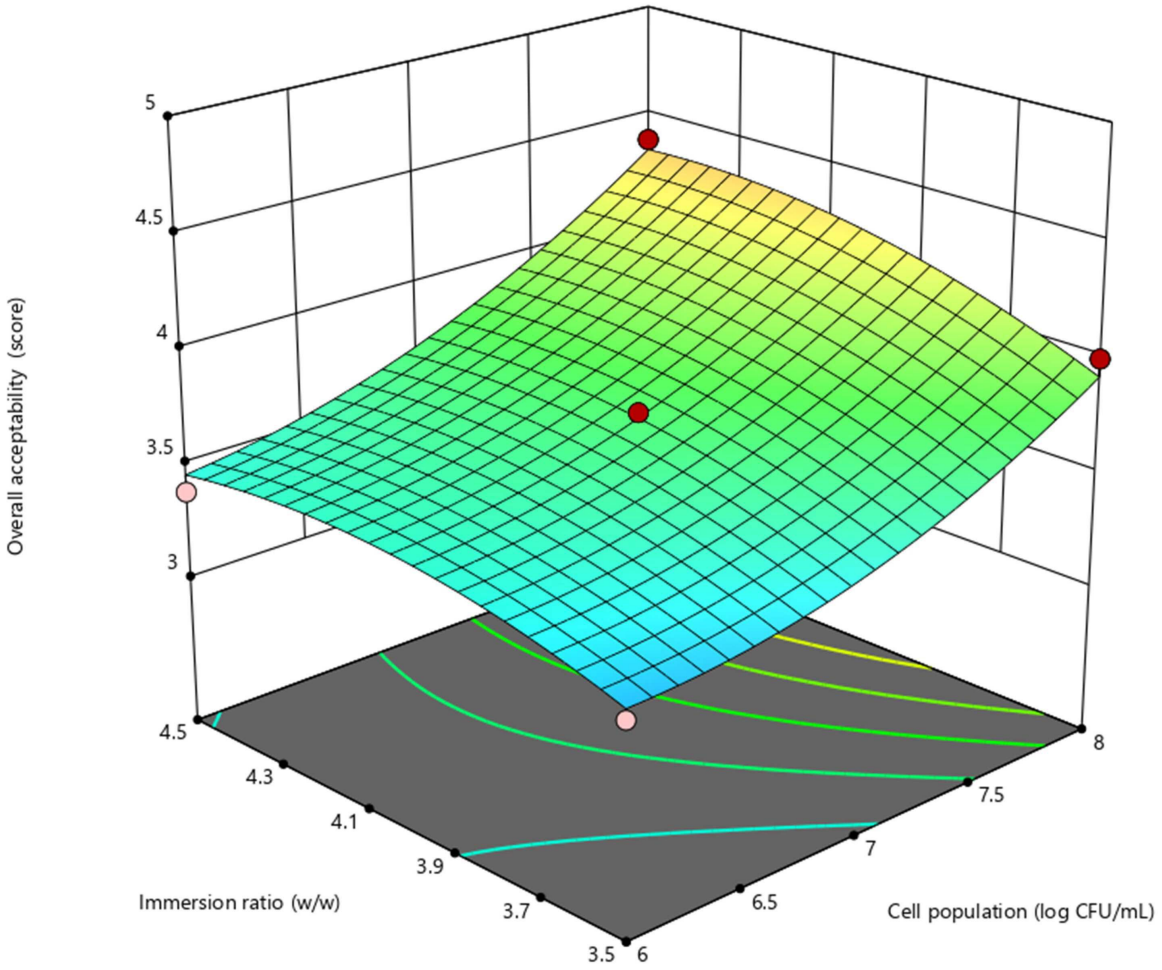
도면10


Overall acceptability (score)
5
4.5
4
3.5
3
15
13
11
9
7
5
Immersion time (minutes)
3.5
3.7
3.9
4.1
4.3
4.5
Immersion ratio (w/w)

도면11


Overall acceptability (score)
5
4.5
4
3.5
3
15
13
11
9
7
Immersion time (minutes)
5
6
6.5
7
7.5
8
Cell population (log CFU/mL)

도면12


Overall acceptability (score)
5
4.5
4
3.5
3
4.5
4.3
4.1
3.9
3.7
3.5
Immersion ratio (w/w)
6
6.5
7
7.5
8
Cell population (log CFU/mL)

서 열 목 록 (첨부)



아이콘을 클릭하시면 서열목록 파일이 열립니다.

본 공보 PDF는 첨부파일을 가지고 있습니다. Acrobat Reader PDF뷰어를 제공하지 않는 브라우저(크롬, 파이어폭스, 사파리 등)의 경우 첨부파일 열기가 제한되어 있으므로 Acrobat Reader PDF뷰어 설치 후 공보 PDF를 다운로드 받아 해당 뷰어에서 조회해주시기 바랍니다.