

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국



(43) 국제공개일
2011년 8월 25일 (25.08.2011)

PCT

(10) 국제공개번호
WO 2011/102568 A1

- (51) 국제특허분류:
C12Q 1/04 (2006.01) G01N 21/80 (2006.01)
G01N 33/84 (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2010/001476
- (22) 국제출원일: 2010년 3월 9일 (09.03.2010)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보:
10-2010-0015836 2010년 2월 22일 (22.02.2010) KR
- (71) 출원인 (US을(를) 제외한 모든 지정국에 대하여): **조선대학교 산학협력단 (INDUSTRY-ACADEMIC CO-OPERATION FOUNDATION CHOSUN UNIVERSITY)** [KR/KR]; 광주광역시 동구 서석동 375 조선대학교 내, 501-759 Gwangju (KR).
- (72) 발명자: **김**
- (71) 출원인: **장해춘 (CHANG, Hae Choon)** [KR/KR]; 광주광역시 남구 진월동 514-22 번지 한국아텔리움아파트 101 동 1002 호, 503-789 Gwangju (KR).
- (72) 발명자: **김**
- (75) 발명자/출원인 (US에 한하여): **장미 (CHANG, Mi)** [KR/KR]; 광주광역시 동구 지산 2 동 225-1 번지덕정빌라 201 호, 501-835 Gwangju (KR).
- (74) 대리인: **특허법인 천지 (CHEONJEE INTERNATIONAL PATENT & LAW FIRM)**; 서울특별시 서초

구 서초3 동 1570-1 허브원빌딩 502 호, 137-874 Seoul (KR).

- (81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RS, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

- (84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), 유럽 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

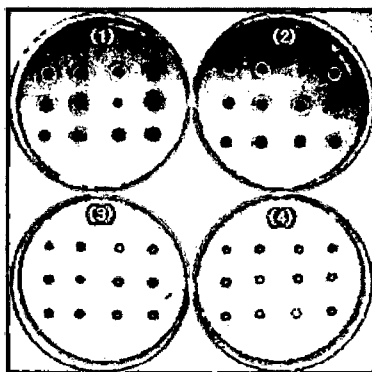
공개:

— 국제조사보고서와 함께 (조약 제 21 조(3))

(54) Title: COMPOSITION FOR SCREENING BIOGENIC AMINE-PRODUCING MICROORGANISMS

(54) 발명의 명칭: 생체아민 생성 미생물 선별용 조성물

[Fig. 4]



(57) Abstract: The present invention relates to a composition for detecting biogenic amine-producing microorganisms, and more particularly, the composition for detecting biogenic amine-producing microorganisms relates to a culture medium composition for detecting biogenic amine-producing microorganisms. Also, the present invention relates to a culture medium produced by using the composition for detecting biogenic amine-producing microorganisms, and to a kit including the culture medium for detecting biogenic amine-producing microorganisms. When the composition of the present invention for detecting biogenic amine-producing microorganisms is used, the production of biogenic amine of target strains can be qualitatively and quantitatively determined in a simple manner. In particular, for strains such as the *Bacillus* sp. strain, which is widely used to make fermented foods in Asian countries including Korea, it is difficult to confirm biogenic amine production through conventional methods applied to lactobacillus, whereas the composition of the present invention can easily detect biogenic amine production qualitatively and quantitatively for such strains by producing alkaline components during the growing or culturing of the strains. The present invention, when compared to conventional technologies that use precision equipment such as the existing HPLC, is advantageous in being able to economically and quickly detect bio-

genic amine-producing strains, and can be widely used in assorted industries related to fermented foods and various other foods.

(57) 요약서: 본 발명은 생체아민 생성 미생물 검출용 조성물로, 보다 구체적으로 생체아민 생성 미생물 검출용 조성물은 생체아민 생성 미생물 검출용 배지 조성물에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 생체아민 생성 미생물 검출용 조성물을 이용하여 제조된 배지 및 상기 배지를 포함하는 생체아민

[다음 쪽 계속]



생성 미생물 검출용 키트에 관한 것이다. 본 발명의 생체아민 생성 미생물 검출용 조성물을 이용하면, 대상 균주의 생체아민 생성 여부를 정성 및 정량적으로 간단하게 확인할 수 있으며, 특히 균주의 생육 또는 배양 과정에서 알칼리성 성분을 생성하여, 기존 유산균에 적용하던 방법으로는 생체아민 생성여부를 확인하기 어려운 균주, 일 예로 한국을 포함한 아시아권 국가의 발효식품 제조에 널리 사용되는 바실러스속(*Bacillus* sp.) 균주에 대해서도 용이하게 생체아민 생성 여부를 정성 및 정량적으로 사용할 수 있으므로, 본 발명은 기존 HPLC 등과 같은 정밀기기를 사용하여던 종래 기술에 비하여, 경제적이고 신속하게 생체아민 생성 균주를 검출할 수 있다는 점에서, 발효식품을 비롯한 다양한 식품과 관련된 여러 산업분야에서 널리 사용될 수 있다.

명세서

발명의 명칭: 생체아민 생성 미생물 선별용 조성물

기술분야

- [1] 본 발명은 생체아민 생성 미생물을 효과적으로 선별할 수 있는 조성물에 관한 것이다.

배경기술

- [2] 생체아민(Biogenic amine, BA)은 식품의 저장 및 발효과정 중에 존재하는 미생물에 의한 유리아미노산의 탈탄산 반응을 통해 생성되는 생물학적 활성을 지니는 저분자 물질로서, putrescine(PUT), cadaverine(CAD), tryptamine(TRY), phenylethylamine(PHE), spermidine (SPD), spermine(SPM), histamine(HIS), tyramine(TYR), agmatine(AGM), serotonin (SER) 등이 있다. 상기 생체아민은 구조상 지방족 화합물(PUT, CAD, SPD, SPM), 방향족 화합물(TYR, PHE) 및 헤테로고리 화합물(HIS, TRY)로 분류된다.
- [3] 생체아민은 체내에서 성장조절, 신경전달, 염증조절 등의 중요한 생리적 기능을 수행하지만, 과량의 생체아민이 함유된 식품을 섭취하거나 신체 이상으로 정상적인 생체아민 대사가 이루어지지 않는 경우 치명적인 독성을 일으킬 수 있다. 식품을 통해 상기 과량의 생체아민을 경구섭취 후 발생하는 대표적인 증상으로는 구토, 호흡곤란, 안면홍조, 발한 및 심계항진(sweating heart palpitation), 두통, 발진 및 구강 작열통(bright red rash oral burning), 고혈압 및 저혈압 등이 있다. 또한, 생체아민은 발암물질(carcinogenic nitroso compound)의 전구체로 알려져 있고, 이 중 타이라민은 주요 돌연변이원의 전구체로 알려져 있다.
- [4] 생체아민은 유리아미노산의 탈탄산 반응을 통해 생성되는 물질이므로, 단백질 또는 유리아미노산이 함유된 거의 모든 식품에서 미생물학적 활성 또는 생화학적 활성에 의해 생성될 수 있으며, 식품 내 생체아민의 존재 여부 및 함량은 식품 원재료 특성과 미생물의 특성에 의존한다. 따라서, 단백질이 풍부한 식품, 즉 발효 유제품, 발효 육제품뿐만 아니라 와인, 맥주, 견과류 등에서도 생체아민이 검출되고, 우리나라의 발효 콩제품(장류)에서도 경우에 따라 높은 함량의 생체아민이 검출되기도 한다. 이미 유럽 등 서구에서는 히스타민(histamine)과 타이라민(tyramine)의 다량 검출로 문제시 되는 치즈, 소세지 및 수산식품(Fish products)을 중심으로 각 식품에 함유된 생체아민 함량을 조사하고, 생체아민 생성에 영향을 미치는 요인 등을 분석하여 식품에 적용함으로써 생체아민 저감화를 위한 수많은 연구가 진행되었다. 또한, 서구에서는 상기 생체아민 저감화에 대한 연구와 함께 서양의 발효식품(발효유제품, 육제품, 와인 등)에서 강력한 decarboxylase 활성을 지니는 생체아민 생성 균주를 검출하는 연구가 진행되어 왔다. 상기 생체아민 생성

균주를 검출하는 연구는 서양의 발효식품과 관련되어 있는 유산균(lactic acid bacteria)과 엔테로박터균(Enterobaceteiaceae) 균주에 대한 연구가 주를 이루면서, 원인 식품으로부터 생체아민 생성 균주를 손쉽게 스크리닝할 수 있는 여러 방법들도 생체아민 생성 유산균을 검출하는 방법에 대한 연구에 초점이 맞추어져 있다.

- [5] 식품에 존재하는 미생물이 생체아민을 형성하기 위해서는 미생물의 유리아미노산 이용능, 미생물의 amino acid decarboxylase 활성 및 균주의 생육환경 등의 요건이 만족되어야 한다. 일반적으로 식품에 존재하는 amino acid decarboxylase 활성을 나타내는 미생물로는 엔테로박터균(Enterobacteriaceae), 바실러스속(*Bacillus*), 사이트로박터속(*Citrobacter*), 클로스트리디움속(*Clostridium*), 크렙시엘라속(*Klebsiella*), 에셰리키아속(*Escherichia*), 포로테우스속(*Proteus*), 슈도모나스속(*Pseudomonas*), 살모넬라속(*Salmonella*), 쉬겔라속(*Shigella*), 포토박테리움속(*Photobacterium*) 그리고 유산균(lactic acid bacteria, *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*) 등이 보고되어 있고, 이외에도 많은 균주들이 관여하고 있으며, 이에 대한 연구는 끊임없이 이루어지고 있다.
- [6] 상기와 같이 식품 내에 일정 함량 이상이 포함되는 경우 다양한 문제점을 유발할 수 있는 생체아민 자체의 함량을 분석하거나 상기 생체아민을 생성하는 생체아민 생성 균주를 선별할 수 있는 다양한 방법들이 연구되어 왔다. 일 예로, decarboxylase plate를 이용한 생체아민 생성 균주 검출법, histamine 정량법(leucocrystal violet(LCV) detection method) 및 생체아민 분석법 등이 있다.
- [7] 상기 decarboxylase plate를 이용한 생체아민 생성 균주 검출법은 생체아민은 균주가 생산하는 amino acid decarboxylase에 의해 유리아미노산의 탈탄산 반응으로 생성된다는 점을 이용한 방법으로, 배양 배지 내에 생체아민 생성을 유도하는 전구체 아미노산(histidine, tyrosine, ornithine, lysine)과 pH indicator(bromocresol purple 또는 cresol red)를 첨가한 decarboxylase plate를 제조하여 대상 균주를 배양하는 방법이다. 일반적인 유산균이나 엔테로박터와 같은 균주는 대사 과정 중, 산성의 대사산물을 형성하므로 배양 후 배지의 pH가 산성으로 변하나, 대상 균주가 생체아민을 생성하는 균주이면 상기 균주에 의해 생성된 생체아민으로 인해 균주 주변의 배지가 알칼리화 되면서 함유된 pH indicator에 의해 발색되므로, 대상 균주가 생체아민 생성 균주인지 산알칼리 indicator에 의해 쉽게 검출할 수 있다. 이와 같이, 상기 생체아민 생성 균주를 검출하기 위한 decarboxylase plate의 선별력을 높이기 위한 배지조성에 관한 많은 연구들이 이루어졌으며, 상기 연구는 주로 유산균(lactic acid bacteria)과 엔테로박테리아(*Enterobacteria*)를 중심으로 진행되어왔다. 일 예로, 복잡한 영양요구성을 지니는 유산균의 생육 효과를 높이고 생체아민 생성을 최대한 유도함으로써, 균주가 생체아민을 생성하지 않지만 생체아민 생성균주로 검출되는 경우(false-positive)와 생체아민을 생성하지만 검출되지 않는 경우(false-negative)를 최소화하기 위한 배지조성에 관한 연구들을 중심으로

진행되어 왔다.

- [8] 그러나, 이러한 연구에도 불구하고 검출배지에서서의 실험결과와 HPLC 분석결과가 정확히 일치하지 않아 그 효용성에 대한 문제가 제기되고 있다. 또한, 상기 연구들은 주로 유산균이나 엔테로박테리아속 균주에 대한 연구를 위주로 진행되어 그 적용의 한계가 있다는 문제점이 제기되고 있다. 구체적으로 우리나라 전통 장류의 주 발효 균주인 바실러스속(*Bacillus* sp.) 균주의 경우에는 생체아민 외에도 다른 알칼라인 화합물(alkaline compounds)을 생성하여, 생육 후 배지의 pH가 약알칼리로 변하므로, 유산균에서 적용되는 산알칼리 적정법에 의한 생체아민 생성 균주 검출방법은 비유산균인 바실러스속(*Bacillus* sp.) 발효균주 등에 대해서 적용하기에 부적합하다는 문제점이 있다.
- [9] 상기 histamine 정량법은 간단한 enzyme test를 통해 식품이나 균주 배양 상징액에 함유된 histamine 함량을 측정하는 방법으로서 histamine은 diamine oxidase(DAO)에 의해 ammonia, imidazole acetaldehyde와 hydrogen peroxide로 분해되며, 생성된 hydrogen peroxide가 peroxidase 첨가에 의해 분해되면서 leucocrystal violet이 산화되어 발색을 일으키게 되는 원리를 이용한 것이다. 상기 Histamine 정량법은 enzyme 첨가농도나 반응시간 등의 enzyme 반응을 위한 최적조건 설정 등에 대한 연구 등 여러 연구를 통해 정성적인 방법으로 histamine 생성균주를 검출하는 것이 가능한 수준에 이르렀다. 그러나, 균주 배양상징액을 사용하는 검출방법이므로 배양배지에 의한 간접현상이 일어나 생성된 histamine을 정확히 정량할 수 없다는 한계점을 지닌다. 또한, 균주를 배양한 배양액 자체를 사용하는 것이 아니라, 배양액에서 균체를 제거한 배양 상징액을 조효소액으로 얻어 사용하는 것이므로 불편하고, histamine을 제외한 다른 생체아민의 경우에는 검출할 수 없다는 단점을 갖는다.
- [10] 상기 생체아민 분석법은 생체아민을 분석하는 방법으로, 생체아민은 흡광을 나타내지 않기 때문에 유도체화하여 HPLC(high performance liquid chromatography)로 분석하는 것이 일반적이다. 최근에는 reverse-phase HPLC를 이용하여 multi-channel UV detection(diode-array)으로 검출하는 방법이 주로 사용되고 있다. 이외에도 TLC(thin layer chromatography), GC(gas chromatography) 및 LC(liquid chromatography) 등의 다수의 크로마토그래피(chromatography) 방법이 시행되어 왔으며, HPLC와 같은 고가의 장비 없이 빠르게 검출하고자 enzyme-linked immunosorbent assay system(ELISA)를 응용한 방법도 시도되었다.
- [11] 상기 생체아민 분석법은 decarboxylase plate법과 달리 유산균이 아닌 다양한 균주에서 생체아민의 생성여부를 정확하게 확인할 수 있다는 장점이 있으나, 고가의 장비와 시약 사용이 요구되고, 추출, 유도체화와 분석에 장시간이 요구되는 등, 고비용 및 장시간 소요란 문제점이 지적되고 있으며, 아민(amine)을 분석하고 동정할 수 있는 고기술력(장비사용기술 및 아민 검지율)이 요구된다는 점에서 일반적으로 쉽게 사용할 수 없다는 단점을 지니고 있다.
- [12] 따라서, 이러한 문제점을 해결하기 위하여 고가의 장비 등이 요구되지 않고,

간단하게 검색할 수 있으면서도, 유산균을 제외한 다양한 균주 특히, 최근 건강 식품으로 각광을 받고 있는 장류의 발효균주인 바실러스속 균주에 대해서도 높은 정확도로 생체아민 생성 균주를 검색할 수 있는 방법에 대한 연구의 필요성이 증가되고 있다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [13] 상기와 같은 요구에 부응하기 위하여, 본 발명은 고가의 장비나 오랜 검색기간이 요구되지 않고, 간단한 방법으로 검색할 수 있으면서도, 유산균이 아닌 다른 균주에서도 높은 정확도로 생체아민 생성 미생물을 검색할 수 있는 방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제 해결 수단

- [14] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 생체아민 생성 미생물 검출용 조성물을 제공한다.
- [15] 또한, 본 발명은 생체아민 생성 미생물 검색용 배지 조성물을 제공한다. 또한, 본 발명은 상기 배지 조성물에 의해 제조된 생체아민 생성 미생물 검출용 배지를 제공한다.
- [16] 또한, 본 발명은 상기 생체아민 생성 미생물 검출용 배지를 포함하는 생체아민 생성 미생물 검출용 키트를 제공한다.
- [17] 또한, 본 발명은 상기 생체아민 생성 미생물 검출용 배지를 이용하여 생체아민 생성 미생물을 검출하는 방법을 제공한다.
- [18] 최근 다양한 생리활성 및 항바이러스 효능 등과 관련하여 건강음식으로 관심을 받고 있는 우리나라의 된장을 비롯한 장류의 발효는 고초균(*Bacillus subtilis*)과 같은 바실러스속(*Bacillus* sp.) 균주가 관여한다. 발효식품을 통하여 유산균을 섭취하는 경우는 동서양이 모두 공통되나, 바실러스속 균주를 식이를 통해 섭취하는 경우는 우리나라의 청국장과 일본의 나또(natto)를 비롯한 동아시아나 일부 아프리카 지역의 전통음료나 알칼리 발효식품에 국한되어 있다.
- [19] 생체아민이 과량 포함되어 있는 식품을 섭취하는 경우의 위험성과 관련하여, 생체아민 생성 미생물에 대한 검출방법은 이미 상당한 연구가 진행되어 있으나, 현재까지 개발된 생체아민 생성 미생물에 대한 검출방법은 서양에서 주로 개발된 것으로, 유산균을 대상으로 한 검출방법이 대부분이다. 상기 유산균을 대상으로 한 검출방법은 다음과 같은 원리에 기반한다. 유산균은 균의 생리특성상 생육 시 젖산(lactic acid)을 생성하여 pH가 저하되는 한편, 생체아민은 알칼리성을 나타내므로, 생체아민 생성 유산균과 생체아민을 생성하지 않는 유산균은 산알칼리 적정법으로 판별이 가능하다. 그러나, 된장이나 간장과 같은 우리나라 전통 장류의 주 발효균주인 바실러스속(*Bacillus* sp.) 균주의 경우에는 생체아민 외에도 다른 알칼라인 화합물(alkaline compounds)을 생성하여, 생육 후 배지의 pH가 약알칼리로 변하므로, 유산균에서

적용되는 산알칼리 적정법에 의한 생체아민 생성 균주 검출방법을 사용할 수 없다.

- [20] 본 발명자들은 이러한 문제점을 인지하여 바실러스속을 포함한 생육과정에서 생육 배지의 pH가 올라가는 다른 미생물에 대해서도 적용이 가능한 생체아민 생성 미생물 검출방법에 대해 연구하던 중, 기존 배지에서는 바실러스속의 생육과정에서 생성되는 아민류에 의해 생체아민의 생성 여부가 검출되지 아니하였으나, 글리세롤(glycerol)이 포함된 배지에서 바실러스속 균주를 배양하는 경우 pH 지시약의 발색여부를 통해 생체아민을 생성하는 바실러스속 균주를 검출할 수 있다는 것을 확인하였으며, 상기 글리세롤의 첨가량 및 생체아민 전구체의 첨가여부 등에 따라 검출 정확성을 개선할 수 있고, 정량적 검출도 가능하다는 것을 추가적으로 확인하여 본 발명을 완성하였다.
- [21] 이하, 본 발명을 보다 상세하게 설명한다.
- [22] 본 발명은 글리세롤을 유효성분으로 포함하는 생체아민 생성 미생물 검출용 조성물에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 글리세롤을 유효성분으로 포함하는 생체아민 생성 미생물을 검출용 배지 조성물에 관한 것이다.
- [23] 본 발명에 있어서, 생체아민이란 유리아미노산의 탈탄산 반응을 통해 생성되는 물질로, 단백질 또는 유리아미노산이 함유된 거의 모든 식품에서 미생물학적 활성 또는 생화학적 활성에 의해 생성될 수 있는 물질이다. 상기 생체아민은 구조상 지방족 화합물, 방향족 화합물 및 헤테로고리 화합물로 분류될 수 있고, 상기 생체아민의 예로는 히스타민(histamine, HIS), 푸트레신(putrescine, PUT), 스퍼민(spermine, SPM), 타이라민(tyramine, TYR), 카데버린(cadaverine, CAD), 트립타민(tryptamine, TRY), 페닐에틸아민(phenylethylamine, PHE), 스퍼미딘(spermidine, SPD), 아그마틴(agmatine, AGM), 세로토닌(serotonin, SER) 등이 있다.
- [24] 본 발명에 있어서, 미생물이란 육안의 가시한계를 넘어선 0.1 mm 이하의 크기인 미세한 생물로 주로 단일세포 또는 군사로써 몸을 이루며, 생물로서 최소 생활단위를 영위하는 것을 의미하고, 조류(algae), 세균류(bacteria), 원생동물류(protozoa), 사상균류(fungi) 및 효모류(yeast)를 포함한다.
- [25] 상기 생체아민 생성 미생물이란 생체아민을 생성할 수 있는 미생물보다 구체적으로, 아미노산 탈탄산효소(amino acid decarboxylase) 활성이나 생체아민 생성능을 갖는 미생물, 일 예로 아미노산 탈탄산효소 활성이나 생체아민 생성능을 갖는 세균일 수 있고, 바람직하게는 아미노산 탈탄산효소 활성과 생체아민 생성능을 가지고, 배양과정에서 배양배지의 pH를 알칼리성으로 만들 수 있는 즉, 배양배지의 pH를 배양 전 pH 보다 높은 pH로 높일 수 있는 미생물 또는 배양과정에서 산성 물질보다 생체아민 외에 다른 알칼리 화합물을 더욱 생성할 수 있는 미생물일 수 있다.
- [26] 상기 생체아민 생성 미생물은 일 예로 바실러스속(*Bacillus* sp.) 균주, 사이트로박터속(*Citrobacter* sp.) 균주, 엔테로박터균(*Enterobacteriaceae*) 균주,

클로스트리디움속(*Clostridium* sp.) 균주, 크렙시엘라속(*Klebsiella* sp.) 균주, 에셰리키아속(*Escherichia* sp.) 균주, 포로테우스속(*Proteus* sp.) 균주, 슈도모나스속(*Pseudomonas* sp.) 균주, 살모넬라속(*Salmonella* sp.) 균주, 쉬겔라속(*Shigella* sp.) 균주, 포토박테리움속(*Photobacterium* sp.) 균주 및 유산균(lactic acid bacteria, *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Streptococcus* 등) 등 일 수 있고, 바람직하게는 바실러스속 균주일 수 있다.

[27] 본 발명에 있어서, 검출이란 대상 시료에서 특정 화합물이나 특정 원소를 포함하는 특정 물질 또는 특정 미생물의 유무를 알아내는 일을 의미하며, 상기와 같은 의미에서 검색, 검사 또는 분석 등으로 대체될 수 있다.

[28] 본 발명에 있어서, 배지란 미생물이나 동식물의 조직을 배양하기 위하여 배양체 즉, 미생물 등이 필요로 하는 영양물질을 주성분으로 하고, 다시 특수한 목적을 위한 물질을 넣어 혼합한 것을 의미하며, 배양기 또는 배양액이라고도 한다.

[29] 본 발명은 생체아민 생성 미생물 검출용 조성물일 수 있다.

[30] 상기 생체아민 생성 미생물 검출용 조성물은 글리세롤을 유효성분으로 포함하는 것일 수 있다.

[31] 상기 생체아민 생성 미생물 검출용 조성물은 추가로 pH 지시약을 더욱 포함하는 것일 수 있다.

[32] 상기 글리세롤은 $C_3H_5(OH)_3$ 의 분자식을 가진 지방족 3가 알코올의 하나로 글리세린, 리세린, 프로페인-1,2,3-트라이올, 글리세리톨 또는 글리실알코올이라고도 한다. 상기 글리세롤은 무색, 무취이며, 단맛이 나고, 주로 건조방지제, 용제, 감미료, 음식물의 보존제로 사용되기도 한다. 상기 글리세롤의 함량은 배양대상 미생물 및 배양배지의 종류에 따라 적절하게 조절될 수 있으며, 일 예로 상기 생체아민 생성 미생물 검출용 조성물 전체를 기준으로 0.1 중량% 내지 0.5 중량% 또는 0.15 중량% 내지 0.35 중량%일 수 있다.

[33] 상기 pH 지시약은 용액의 pH를 검출하는 데 쓰이는 약품으로, 산염기 지시약이라고도 한다. 상기 pH 지시약은 pH(수소이온지수)에 따라 색깔이 변하는 지시약일 수 있다.

[34] 상기 pH 지시약은 미생물의 배양 결과 배지의 pH의 변화를 확인할 수 있거나 미생물의 배지에 포함되어 미생물의 생육을 제한하지 않으면서 미생물의 배양에 따른 배양 배지의 pH 변화를 확인할 수 있는 물질이면 그 종류가 제한되지 아니한다.

[35] 일 예로, 상기 pH 지시약은 브로모크레솔 퍼플(bromocresol purple), 브로모크레솔 블루(bromocresol blue), 페놀 레드(phenol red), 뉴트랄 레드(netral red), 크레졸 레드(cresol red), 아조리트민(azolitmin) 및 브로모크레솔 그린(bromocresol green)로 이루어진 군 중에서 선택된 1종 이상 또는 브로모크레솔 퍼플(bromocresol purple), 브로모크레솔 블루(bromocresol blue), 페놀 레드(phenol red), 뉴트랄 레드(netral red) 및 크레졸 레드(cresol red)로

이루어진 군 중에서 선택된 1종 이상일 수 있다. 또한, 상기 pH 지시약은 pH 4 내지 pH 8의 범위에서 pH가 변화되는 경우 발색되어 pH의 변화를 확인할 수 있는 물질일 수 있다.

[36] 또한, 상기 미생물 검출용 조성물은 생체아민 전구체를 더욱 포함하는 것일 수 있다. 상기 생체아민 전구체는 일 예로 히스티딘, 오르니틴, 글루타민, 라이신, 알지닌, 트립토판, 페닐알라닌 및 타이로신으로 이루어진 군 중에서 선택된 1종 이상일 수 있다.

[37] 상기 생체아민 전구체는 대상 균주의 종류 및 확인하고자 하는 생체아민 생성능에 따라 선택하여 사용될 수 있고, 일 예로 바실러스 속 균주로부터 히스타민의 생성여부를 확인하기 원하는 경우에는 히스티딘을 첨가할 수 있다. 상기 히스티딘이 상기 조성물에 첨가되는 경우 상기 히스티딘의 함량은 상기 생체아민 생성 미생물 검출용 조성물 전체를 기준으로 0.01 중량% 내지 0.25 중량%, 바람직하게는 0.05 중량% 내지 0.2 중량%, 더욱 바람직하게는 0.75 중량% 내지 0.125 중량%일 수 있다.

[38] 본 발명의 생체아민 생성 미생물 검출용 조성물은 기존 조성물에 비하여, 생육 또는 배양 과정에서 알칼리 물질을 생성하여 주변의 성질을 알칼리로 만들거나, 배지 또는 생육하는 대상 물질의 pH를 높일 수 있는 미생물에서도 생체아민 생성 여부를 확인할 수 있으므로, 상기 생체아민 생성 미생물은 바람직하게는 상기와 같이 생육 또는 배양 과정에서 주로 알칼리 물질을 생성할 수 있는 미생물일 수 있다. 일 예로, 상기 미생물은 생체아민을 생성하는 바실러스속(*Bacillus* sp.) 균주일 수 있다.

[39] 또한, 본 발명은 생체아민 생성 미생물 검출용 배지 조성물일 수 있다.

[40] 상기 생체아민 생성 미생물 검출용 배지 조성물은 생체아민 생성 미생물 후보균주를 배양하여 생체아민 생성여부를 검출하기 위한 배지를 제조하기 위해 조성물 즉, 생체아민 생성 미생물을 검출하기 위한 배지 조성물일 수 있다.

[41] 상기 생체아민 생성 미생물 검출용 배지 조성물은 글리세롤을 유효성분으로 포함하는 것일 수 있다.

[42] 상기 배지(medium 또는 culture medium)는 미생물 등을 배양하기 위하여, 상기 미생물 등 배양체의 생육에 요구되는 물질을 주성분으로 제조된 것을 의미한다. 상기 배지에는 미생물 등의 생존 및 발육 즉, 생육에 필요한 물 및 영양물질을 공급할 수 있는 물질이 포함될 수 있다. 또한, 상기 배지에는 특정 목적을 위해 요구되는 물질이 더욱 포함될 수 있다.

[43] 상기 영양물질이란 탄소원, 질소원, 무기염류 및 발육인자(비타민류) 등일 수 있다. 상기 탄소원의 종류로는 Glucose, Fructose, Mannose, Ribose, Xylose 등의 단당류, Sucrose, Melobiose, Cellobios, Lactose 등의 이당류 Amylose, Starch, Raffinose 등의 다당류 및 Sorbitol, Mannitol, Glycerol 등의 당알콜류(Suga-alcohol) 등일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 상기 질소원으로는 암모늄염이나 질산염등의 무기태 질소 또는 아미노산이나 peptone과 같은 유기태 질소 등이

- 사용될 수 있다. 상기 무기영양분으로는 주된 무기염인, P, Na, Cl, K, Mg, S, Ca, Fe, Mn, Zn 및 Cu를 제공할 수 있는 인산나트륨, 인산 칼륨, 황산 마그네슘이나 염화마그네슘 또는 감자 육즙, yeast extract, pepton 등이 사용될 수 있다.
- [44] 본 발명에서 배지는 미생물이 배양될 수 있는 모든 물질이 포함될 수 있으므로, 상기 미생물 검출용 배지 조성물은 유효성분인 글리세롤을 포함하는 것을 제외하고는 그 성분이 제한되지 아니하고, 성상도 제한되지 아니한다.
- [45] 따라서, 본 발명의 배지는 생물체에서 추출한 성분 또는 식물의 씨앗이나 열매 등과 같은 천연물질이 주된 구성인 천연배지나 화학조성이 알려져 있는 성분만으로 만들어진 합성배지 또는 상기 합성배지 성분의 일부를 peptone이나 yeast extract와 같이 화학조성이 밝혀지지 않은 천연물로 대체한 반합성배지 등이 있다. 상기 천연배지의 예로는 감자한천, 오토밀 배지(Oat meal medium), 벧쥘 배지, Nutrient broth 배지, Nutreien agar 배지, yeast extract, beef extract, Peptone, 맥아 추출물, 맥주, 양파 추출물 등이 있고, 합성 배지로는 Czapek-Dox 배지 등이 있다. 또한, 본 발명의 배지는 영양성분의 종류 및 첨가유무에 따른 제한배지(minimal media) 또는 완전배지(rich media 또는 complete media) 모두를 포함할 수 있고, 식용 또는 사료로 제공될 수 있는 식용가능한 배지일 수 있다. 또한, 본 발명의 배지는 액체배지(liquid medium) 또는 액체배지에 한천, 젤라틴 혹은 실리카겔 등의 교질재료가 첨가되어 굳혀진 또는 반고체 상태가 된 고체배지(solid medium) 모두를 포함할 수 있다.
- [46] 따라서, 상기 배지 조성물에는 상기 유효성분인 글리세롤 이외에 추가로 미생물의 배양에 필요한 영양성분이 포함될 수 있다.
- [47] 본 발명의 발명자는 배지에 글리세롤이 포함되는 경우, 생체아민 생성 미생물 검출용 배지 조성물은 생체아민 생성 미생물 후보균주 특히, 배양 과정에서 배지의 pH를 상승시키는 알칼리성 물질을 생성하는 미생물에 해당하는 생체아민 생성 미생물 후보균주가 생성하는 알칼리성 물질에 의한 배지의 pH 변화를 완충시킬 수 있어, 결과적으로 상기 후보균주의 생체아민 생성여부를 배지의 pH 변화를 통해 결정할 수 있다는 것을 실험을 통하여 확인하였다.
- [48] 따라서, 상기 생체아민 생성 미생물을 검출하기 위한 배지 조성물은 유효성분으로 글리세롤을 포함하고, 추가 성분 특히, 영양물질을 공급하는 성분 또는 추가 조성의 경우에는 제한되지 아니한다.
- [49] 일 예로, 상기 영양성분은 제한배지(minimal media)에 포함된 성분 또는 각 검출 대상 미생물의 배양에 요구되는 성분일 수 있다. 상기 검출 대상 미생물이 바실러스 속인 경우에는 상기 배지 조성물에 포함되는 성분은 NaCl과 bacto-tryptone 및/또는 yeast extract일 수 있다.
- [50] 또한, 상기 생체아민 생성 미생물 검출용 배지 조성물은 배양 과정에서 배지의 pH 변화를 배지의 발색정도 또는 색깔의 변화 정도를 통하여 확인할 수 있도록 pH 지시약을 더욱 포함할 수 있다.
- [51] 또한, 특정 생체아민의 생성여부를 확인하거나, 생체아민의 생성을 촉진하여

생체아민 생성여부를 좀 더 용이하게 명확하게 확인하기 위하여, 상기 생체아민 전구체를 더욱 포함할 수 있다.

[52] 또한, 본 발명은 상기 생체아민 생성 미생물 검출용 배지 조성물에 의해 제조된 생체아민 생성 미생물 검출용 배지일 수 있다.

[53] 상기 배지는 배지 내에 글리세롤이 포함된 것을 제외하고는 다른 조성은 한정되지 아니하고, 성상도 한정되지 아니한다. 따라서, 상기 배지는 고체배지 또는 액체배지일 수 있고, 상기 배지가 고체배지인 경우 상기 생체아민 생성 미생물 검출용 배지 조성물에 아가(Agar), 한천, 노블아가, 젤리트(Gelite)를 더욱 첨가하여 제조된 것일 수 있다.

[54] 상기 배지에 포함되는 영양성분은 한정되지 않으며, 상기 영양성분은 그 조성이 특정되어 있는 물질이거나 그 조성이 특정되어 있지 아니한 물질일 수 있다.

[55] 또한, 상기 배지에는 상기 pH 지시약이 포함되어 있을 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 또한, 상기 배지에는 상기 생체아민 전구체를 더욱 포함되어 있을 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[56] 또한, 본 발명은 상기 생체아민 생성 미생물 검출용 배지를 포함하는 생체아민 생성 미생물 검출용 키트일 수 있다.

[57] 상기 배지에 상기 pH 지시약이 포함되어 있지 않은 경우에는 상기 생체아민 생성 미생물 검출용 키트는 상기 pH 지시약을 더욱 포함할 수 있다.

[58] 상기 생체아민 생성 미생물 검출용 키트는 상기 배지가 포함되어 있는 플레이트 또는 상기 배지가 구분되어 있는 공간에 각각 넣어진 공간이 구분되어 있는 본체 또는 몸체를 포함하는 것일 수 있다.

[59] 상기 생체아민 생성 미생물 검출용 키트를 이용하여 생체아민 생성 여부를 정성적으로 측정하기 원하는 경우에는 특별한 추가 장치가 필요하지 아니하나, 상기 생체아민 생성 여부를 정량적으로 비교하기 원하는 경우에는 상기 pH 지시약에 의한 발색정도를 확인할 수 있는 장치가 추가로 포함될 수 있다.

[60] 상기 발색정도를 추가로 포함될 수 있는 장치는 일 예로, 분광계 또는 형광정도를 확인할 수 있는 장치일 수 있다.

[61] 상기 분광계(spectrometer)는 분광기(monochromator) 또는 분광광도계일 수 있다. 상기 분광광도계는 광전분광광도계(photoelectric spectrophotometer)라고도 불리우며, 물질이 방출 또는 흡수하는 빛의 스펙트럼을 측정하는 장치로, 전자기파를 포함한 전자선 등 입자선의 에너지를 분석하는 장치를 모두 포함하는 개념이다.

[62] 상기 분광기는 특정 물질이 방출 또는 흡수하는 빛의 스펙트럼을 측정할 수 있으므로, 상기 생체아민 생성 미생물 검출용 배지의 pH 지시약이 생체아민 생성에 따라 색이 변화되는 경우 그 변화 정도를 정량적으로 측정해 낼 수 있으며, 이는 생체아민 생성 정도의 정량적 측정 결과로 이용될 수 있다.

[63] 또한, 상기 형광정도를 확인할 수 있는 장치의 경우, ELISA(Ezyme-linked

immunosorbent assay)법 등으로 응용하는 경우에 사용될 수 있으며, 이러한 경우 상기 키트에는 상기 생체아민에 대한 항체 및 상기 생체아민에 대한 항체에 대한 항체로써 효소가 결합된 항체가 더욱 포함될 수 있다.

- [64] 또한, 본 발명은 상기 생체아민 생성 미생물 검출용 배지를 이용하여 생체아민 생성 미생물을 검출하는 방법에 관한 것이다.
- [65] 본 발명의 생체아민 생성 미생물을 검출하는 방법은 상기 생체아민 생성 미생물 검출용 배지에 대상균주를 배양하는 단계를 포함할 수 있다.
- [66] 상기 대상균주란 생체아민 생성 여부를 확인하기 원하는 미생물을 의미한다.
- [67] 상기 생체아민 생성 미생물 검출용 배지에 상기 pH 지시약이 포함된 경우에는 상기 배지의 발색여부를 확인하는 단계를 더욱 포함할 수 있다.
- [68] 또한, 상기 생체아민 생성 미생물 검출용 배지에 상기 pH 지시약이 포함되지 않은 경우에는 상기 대상 균주를 배양한 배지에 pH 지시약을 첨가하는 단계 및 상기 배지의 발색여부를 확인하는 단계를 더욱 포함할 수 있다.
- [69] 상기 배지의 발색여부를 확인하는 단계는 상기 배지의 발색여부를 육안으로 관찰하는 방법, 상기 배지의 발색여부를 분광계를 이용하여 발색정도를 확인하는 방법, 상기 배지의 배양 전 pH와 배양 후 pH를 비교하는 방법, 상기 배지를 이용하여 HPLC를 수행하는 방법 또는 상기 배지의 발색여부를 형광정도를 이용하여 확인하는 방법으로 수행할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [70] 상기 형광정도를 확인하는 경우에는 확인하기 원하는 생체아민에 대한 항체를 상기 대상 균주를 배양한 배지에 첨가하는 단계 및 상기 생체아민에 대한 항체에 대한 항체로 효소가 결합된 항체를 첨가하는 단계가 더욱 포함될 수 있다.
- [71] 또한, 상기 생체아민 생성 미생물을 검출하는 방법은 상기 생체아민 생성 미생물 검출용 배지의 상징액을 얻는 단계 및 상기 상징액을 이용하여 생체아민 생성 여부를 확인하는 단계를 더욱 포함할 수 있다.
- [72] 상기 배지의 상징액이란 미생물 배양 배지에서 배양된 미생물 균체를 제거한 것을 의미한다. 상기 배지의 상징액은 원심분리기 등을 이용하여 미생물 균체와 배양상징액을 분리시킨 후, 배양상징액만을 수득하는 방법과 상기 배지를 여과하여 균체를 제거하는 방법 등으로 제조될 수 있다.
- [73] 미생물 배지를 직접적으로 이용하는 경우, 미생물 자체에 의한 간섭현상 등으로 인하여 생체아민 생성여부에 대한 확인 결과에 오차가 발생될 가능성이 높으므로, 본 발명의 방법은 상기 미생물 배양 배지에서 상기 미생물 균체를 제거한 배지 상징액을 이용하여 생체아민 생성여부를 확인할 수 있다.
- [74] 상기 배양 상징액을 이용하는 경우 상기 pH 지시약의 유무에 따라 상기 대상 균주를 배양한 배지에 pH 지시약을 첨가하는 단계가 더욱 추가될 수 있다.
- [75] 또한, 상기 배양 상징액을 이용하는 경우, 생산된 특정 생체아민의 종류 및 함량을 측정하기 위하여, 상기 배양 상징액으로 HPLC를 수행하는 단계를 더욱 포함할 수 있다.

발명의 효과

- [76] 본 발명의 방법에 의하면, 대상 균주의 생체아민 생성 여부를 정성 및 정량적으로 간단하게 확인할 수 있으므로, 본 발명은 식품의 제조에 사용되거나 식품에 포함된 다양한 균주의 생체아민 생성여부를 용이하게 스크리닝(screening)할 수 있을 것으로 평가된다.
- [77] 특히, 균주의 생육 또는 배양 과정에서 알칼리성 성분을 생성하여, 기존 유산균에 적용하던 방법으로는 생체아민 생성여부를 확인하기 어려운 균주, 일 예로 한국을 포함한 아시아권 국가의 발효식품 제조에 널리 사용되는 바실러스 속(*Bacillus* sp.) 균주에 대해서도 용이하게 생체아민 생성여부를 정성 및 정량적으로 사용할 수 있으므로, 기존 HPLC 등과 같은 정밀기기를 사용하였던 방법에 비하여, 경제적이고 신속하게 생체아민 생성 균주를 검출할 수 있어 발효식품을 비롯한 다양한 식품과 관련된 여러 산업분야에서 생체아민 생성 균주의 포함 여부를 확인할 수 있을 것으로 예상된다.

도면의 간단한 설명

- [78] 도 1은 본 발명의 일 실시예에 따른, 배지 내의 접종된 위치에 따라 배지에 접종된 균주를 구분하기 위한 번호가 기재된 도면이다.
- [79] 도 2는 본 발명의 일 실시예에 따른, 종래 유산균의 생체아민 생성 여부를 확인하기 위해 고안된 배지를 이용하여 decarboxylase plate법으로 바실러스 속(*Bacillus* sp.) 균주의 생체아민 생성 여부를 확인한 사진으로, 구체적으로 종래 유산균의 생체아민 생성 여부를 확인하기 위해 고안된 배지에 12종의 바실러스 속 균주를 배양한 결과를 나타낸 사진이고, 도 2의 1번 및 4번 배지는 균주를 배양하기 전의 배지를 촬영한 사진이고, 도 2의 2번 및 5번은 바실러스 속 균주를 배양한 후 촬영한 사진이며, 도 2의 3번은 오르니틴(ornithine)이 첨가된 배지에서 바실러스 속 균주를 배양한 결과를 나타낸 사진이고, 도 2의 6번은 히스티딘(histidine)이 첨가된 배지에서 바실러스 속 균주를 배양한 결과를 나타낸 사진이다.
- [80] 도 3은 본 발명의 일 실시예에 따른, 변형 LB 배지에서 히스티딘의 함량에 따른 바실러스 속(*Bacillus* sp.) 균주의 생체아민 생성 여부 정도를 확인하기 위해 균주를 접종한 후 2시간이 경과된 사진으로, 상기 도 3의 (1)은 히스티딘을 첨가하지 않은 배지이고, 상기 도 3의 (2)는 히스티딘을 0.1% 첨가한 배지이고, 상기 도 3의 (3)은 히스티딘을 0.5% 첨가한 배지이며, 상기 도 3의 (4)는 히스티딘을 1% 첨가한 배지이다.
- [81] 도 4는 본 발명의 일 실시예에 따른, 변형 LB 배지에서 히스티딘의 함량에 따른 바실러스 속(*Bacillus* sp.) 균주의 생체아민 생성 여부 정도를 확인하기 위해 균주를 접종한 후 12시간이 경과된 사진으로, 상기 도 4의 (1)은 히스티딘을 첨가하지 않은 배지이고, 상기 도 4의 (2)는 히스티딘을 0.1% 첨가한 배지이고, 상기 도 4의 (3)은 히스티딘을 0.5% 첨가한 배지이며, 상기 도 4의 (4)는

히스티딘을 1% 첨가한 배지이다.

- [82] 도 5는 본 발명의 일 실시예에 따른, 변형 LB 배지에서 히스티딘의 함량에 따른 바실러스 속(*Bacillus* sp.) 균주의 생체아민 생성 여부 정도를 확인하기 위해 균주를 접종한 후 24시간이 경과된 사진으로, 상기 도 5의 (1)은 히스티딘을 첨가하지 않은 배지이고, 상기 도 5의 (2)는 히스티딘을 0.1% 첨가한 배지이고, 상기 도 5의 (3)은 히스티딘을 0.5% 첨가한 배지이며, 상기 도 5의 (4)는 히스티딘을 1% 첨가한 배지이다.
- [83] 도 6은 본 발명의 일 실시예에 따른, 배지 내의 접종된 위치에 따라 배지에 접종된 균주를 구분하기 위한 번호가 기재된 도면이다.
- [84] 도 7은 본 발명의 일 실시예에 따른, 본 발명의 배지 중 생체아민의 전구체를 첨가하지 않은 배지(A)와 생체아민의 전구체 중 오르니틴을 첨가한 배지(B)를 이용하여 12종의 바실러스 속(*Bacillus* sp.) 균주의 생체아민 생성 여부를 확인한 사진이다.
- [85] 도 8은 본 발명의 일 실시예에 따른, 본 발명의 배지 중 생체아민의 전구체를 첨가하지 않은 배지(A)와 생체아민의 전구체 중 히스티딘을 첨가한 배지(B)를 이용하여 12종의 바실러스 속(*Bacillus* sp.) 균주의 생체아민 생성 여부를 확인한 사진이다.
- [86] 도 9는 본 발명의 액체 배지를 이용하여 바실러스 속(*Bacillus* sp.) 균주의 생체아민 생성 여부를 확인한 사진으로, 도 9에 기재된 각 번호는 배지에 접종된 균주의 번호를 나타낸 것으로, 1은 *B. subtilis* DJI를 접종한 것을 의미하고, 2는 *B. subtilis* cx1을 접종한 것을 의미하며, 3은 *B. licheniformis* cy2를 접종한 것을 의미하고, 4는 *B. subtilis* ATCC6633을 접종한 것을 의미하며, 5는 *B. polyfermenticus* CJ9을 접종한 것을 의미하고, 6은 *B. licheniformis* KCTC1918을 접종한 것을 의미하며, 7은 *B. subtilis* KCTC1022을 접종한 것을 의미하고, 8은 *B. subtilis* subsp. *subtilis* KCTC3135을 접종한 것을 의미하며, 9는 *B. subtilis* KCTC3014을 접종한 것을 의미하고, 10은 *B. atrophaeus* KCTC3701을 접종한 것을 의미하며, 11은 *B. subtilis* subsp. *spizizenii* KCTC 3705을 접종한 것을 의미하고, 12는 *B. subtilis* KCTC1028을 접종한 것을 의미하며, 각 번호에 따른 배지를 왼쪽으로부터 구분하여, 첫 번째 배지는 균주를 접종하지 않은 배지이고, 두 번째 배지부터 다섯 번째 배지는 균주를 접종한 후, 24시간이 경과한 시점에 확인된 배지로, 두 번째 배지는 변형된 LB 배지이고(MLB), 세 번째 배지는 본 발명의 배지(BA)이며, 네 번째 배지는 오르니틴이 첨가된 본 발명의 배지이고(BAO), 다섯 번째 배지는 히스티딘이 첨가된 본 발명의 배지(BAH)이다.
- [87] 도 10은 본 발명의 일 실시예에 따른, 9종의 생체아민 표준 물질의 크로마토그램 결과를 나타낸 그래프이다.
- [88] 도 11은 본 발명의 일 실시예에 따른, Dansylation을 수행한 후 히스티딘 표준물질과 내부표준물질(IS)에 대해 HPLC를 수행한 크로마토그램 결과를

나타낸 그래프이다.

발명의 실시를 위한 형태

- [89] 이하, 본 발명을 더욱 구체적으로 설명하기 위하여 제조에 및 실시예를 제시한다. 그러나, 하기 제조에 및 실시예는 본 발명의 이해를 돕기 위하여 예시한 것을 뿐, 여러 가지 형태로 변형될 수 있으며, 본 발명의 범위가 하기 예들에 한정되는 것은 아니다.
- [90] [실시예]
- [91] 실시예 1. 생체아민 생성 균주 검출용 배지의 제조
- [92] 생체아민 생성 균주 검출용 배지 및 본 발명의 생체아민 생성 균주 검출용 배지의 효과를 확인하기 위해 대조구로 사용된 배지는 다음과 같다.
- [93] 보다 구체적으로, 본 발명의 생체아민 생성 균주 검출용 배지는 pH를 pH 5로 조정하였으며, 배지 조성은 고체배지(BA plate)의 경우 표 1과 같고 액체배지(BA broth)의 경우 표 2와 같으며, 고체배지 중 첨가된 생체아민 전구체 중, histidine의 경우 전체 배지 조성물 중량을 기준으로 0.1 중량%(w/w) 내지 1 중량%(w/w)의 농도로 첨가하여 최적농도를 결정하였다. 하기 표 1 및 표 2에서 생체아민 전구체의 첨가여부 및 함량은 각 실험에 따라 선택하여 결정하였다. 또한, 대조군의 경우 상기 배지 조성에서 본 발명의 배지의 유효성분인 글리세롤이나 생체아민 전구체인 아미노산을 첨가하지 아니하였다.

- [94] 표 1

조성(Components)		함량(content, 중량%)
Bacto-tryptone		1
Yeast extract		0.5
NaCl		1
pH 지시약(pH indicator, Bromocresol purple)		0.006
글리세롤(Glycerol)		0.15 ~ 0.35
아가(agar)		1.5
생체아민 전구체	histidine	0.1 ~ 1
	ornithine	1
pH		pH 5.0

- [95] 표 2

조성(Components)		함량(content, 중량%)
Bacto-tryptone		1
Yeast extract		0.5
NaCl		1
pH 지시약(pH indicator, Bromocresol purple)		0.006
글리세롤(Glycerol)		0.15 ~ 0.35
생체아민 전구체	histidine	0.1 ~ 1
	ornithine	1
pH		pH 5.0

[96] 실시예 2. 고체배지(plate)를 이용한 생체아민 생성 균주의 검출

[97] 본 발명의 고체배지를 이용하여 생체아민 생성 여부를 확인하기 위한 바실러스 속(*Bacillus* sp.) 균주는 하기 표 3에 기재된 실험실에서 보유하고 있는 장류로부터 분리한 균주 및 기탁기관에서 분양받은 균주인 12종의 바실러스 속 균주를 사용하였다.

[98] 표 3

No.	균주명	배양가능한 배지	적정 배양온도(°C)
1	<i>B. subtilis</i> DJI	LB	37
2	<i>B. subtilis</i> cx1	LB	30
3	<i>B. licheniformis</i> cy2	LB	30
4	<i>B. subtilis</i> ATCC6633	LB	37
5	<i>B. polyfermenticus</i> CJ9	LB, TSB	37
6	<i>B. licheniformis</i> KCTC1918	LB, NB	37
7	<i>B. subtilis</i> KCTC1022	LB, NB	37
8	<i>B. subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i> KCTC3135	LB, NB	37
9	<i>B. subtilis</i> KCTC3014	LB, NB	37
10	<i>B. atrophaeus</i> KCTC3701	LB, NB	37
11	<i>B. subtilis</i> subsp. <i>subtilis</i> KCTC3705	LB, NB	30
12	<i>B. subtilis</i> KCTC1028	LB, NB	30

[99] 상기 표 3에 기재된 바실러스 속 균주의 생체아민 생성여부를 확인하고자 상기 실시예 1의 표 1에 기재된 조성으로 제조된 배지에 상기 표 3의 균주를 배양하여

생체아민 생성 여부를 확인하였고, 본 발명의 배지의 유효성을 확인하기 위한 대조군으로는 변형 LB(Luria-Bertani) 배지 즉, 하기 표 4와 같이 pH가 조절되고, pH 지시약으로 Bromocresol purple이 전체 조성물 중량 대비 0.006 중량% 포함된 LB 배지(1% bacto-tryptone, 0.5% yeast extract, 1% NaCl, pH 5.0)를 사용하였다.

[100] 표 4

조성(Components)	함량(content, 중량%)
Bacto-tryptone	1
Yeast extract	0.5
NaCl	1
pH 지시약(pH indicator, Bromocresol purple)	0.006
아가(agar)	1.5
pH	pH 5.0

[101] 보다 구체적으로, 상기 표 3에 기재된 균주를 LB broth(Luria-Bertani, 1% bacto-tryptone, 0.5% yeast extract, 1% NaCl, pH 7.0) 배지를 이용하여 37°C에서 24시간 동안 전배양한 후, 상기 전배양한 각각의 균주 배양액 1 mL를 전구체 아미노산인 오르니틴(ornithine) 및 히스티딘(histidine)이 0.1% 함유된 LB broth(Luria-Bertani, 1% bacto-tryptone, 0.5% yeast extract, 1% NaCl, pH 7.0) 9 mL에 접종하고, 37°C에서 24시간 동안 배양하였다. 상기 배양한 균주를 상기 대조군에 해당되는 표 4에 기재된 조성으로 제조된 변형 LB 배지, 상기 표 4에 기재된 조성에서 생체아민 전구체인 히스티딘을 1%의 함량으로 추가한 배지, 상기 표 4에 기재된 조성에서 생체아민 전구체인 오르니틴의 함량을 1%의 함량으로 추가한 배지 및 상기 표 4에 기재된 조성에서 생체아민 전구체인 히스티딘 및 오르니틴 함량을 1%씩 추가한 배지에 접종하고, 37°C에서 배양하였다. 상기 실험 배지의 접종은 균을 배양한 후, 배양액의 농도를 600 nm에서 O.D.값(주로 O.D. 값이 3.0 내지 4.5)의 형태로 측정하고, 각각의 배양액으로부터 원심분리로 균주를 펠렛으로 얻어, 상기 균주 펠렛을 증류수로 녹이면서, 첨가된 증류수를 상기 측정된 측정된 O.D.값을 기초로 동일한 농도가 되도록 조절한 후에, 상기 증류수를 첨가하고 균주 펠렛을 녹여 제조한 균액을 해당 위치에 10 µl씩 떨어트리는 방법으로 수행하였다.

[102] 또한, 히스티딘의 함량에 따른 발색 정도를 확인하기 위하여, 상기 표 4에 기재된 조성에서 생체아민 전구체인 히스티딘의 함량을 히스티딘의 함량을 0.1% 내지 1%의 범위에서 조정하여 추가한 배지에서 상기 균주를 접종하여 배양하였다.

[103] 상기 방법으로 배양 후, 발색 정도에 따라 생체아민을 생성 여부를 확인한 결과는 도 1 내지 도 8에 나타내었다.

- [104] 상기 도 1 및 도 2에 나타낸 바와 같이, 본 발명의 배지의 유효성분인 글리세롤을 첨가하지 않은 대조군인 변형 LB(Luria-Bertani) 배지에서 바실러스 속 균주를 배양한 결과 모든 균주 배양 후 배지가 보라색으로 변하는 결과를 나타내었다. 상기 접종된 균주는 도 1에 기재된 바와 같이 접종하였고, 상기 도 1의 번호는 균주에 관한 상기 표 3에 기재된 균주의 번호를 의미한다.
- [105] 보다 구체적으로, 상기 도 2에 나타낸 바와 같이, 배양 결과 아미노산 전구체를 첨가하지 않은 경우에도 배양 배지는 배지 전체가 보라색으로 변하였고, 오르니틴을 1% 첨가한 경우에도 배지 전체가 보라색으로 변하였다. 한편, 히스티딘 1% 첨가한 경우에는 발색이 잘 이루어지지 않는 것으로 확인되었으나, 균주 특이적으로 발색여부를 확인할 수는 없었다(도 2의 6번 사진). 상기 결과로부터, 기존 유산균에 주로 적용하였던 decarboxylase plate법에 사용된 배지와 유사한 대조군 즉, 본 발명의 유효성분인 글리세롤을 첨가하지 않은 배지의 경우 바실러스속 균주에는 적합하지 않은 것으로 확인되었다.
- [106] 이는 바실러스속의 경우 균주 특성상 배양 후 배지의 pH가 중성에서 약알칼리에 이르므로, 산알칼리 지시법에 의한 알칼리 지시결과가 생체아민 생성에 의한 결과인지, 다른 알칼리 생성물(alkaline compound) 생성 결과인지 확인할 수 없기 때문인 것으로 검토되었다.
- [107] 한편, 상기한 바와 같이, 히스티딘 1% 첨가한 경우에는 발색이 잘 이루어지지 않는 것으로 확인되어, 균주 특이적으로 발색 여부를 확인할 수는 없었다(도 2의 6번 사진). 이로부터, 히스티딘의 첨가농도에 따른 발색 여부를 확인하기 위하여, 히스티딘의 함량을 변화시키면서 발색여부를 관찰하였다(도 3 내지 도 5).
- [108] 상기 히스티딘을 첨가하지 않은 배지(도 3 내지 도 5의 (1)), 히스티딘을 0.1% 첨가한 배지(도 3 내지 도 5의 (2)), 히스티딘을 0.5% 첨가한 배지(도 3 내지 도 5의 (3)) 및 히스티딘을 1% 첨가한 배지(도 3 내지 도 5의 (4))에 균주를 접종한 후, 배양하면서 접종 후 2시간(도 3), 12시간(도 4) 및 24시간(도 5) 경과한 시점에서 발색여부를 관찰하였다.
- [109] 상기 도 3 내지 도 5에 나타낸 바와 같이, 상기 표 4의 조성을 갖는 pH를 조절한 변형 LB 배지에서 배양한 결과, 히스티딘을 0.5% 첨가한 배지(도 3 내지 도 5의 (3)) 및 히스티딘을 1% 첨가한 배지(도 3 내지 도 5의 (4))에서는 균주에 의한 정상적인 발색현상이 일어나지 않았다. 특히, 24시간(도 5) 경과한 시점에서 히스티딘을 첨가하지 않은 배지(도 5의 (1)) 및 히스티딘을 0.1% 첨가한 배지(도 5의 (2))의 경우 배지 전체에서 발색현상이 일어났음에도 불구하고, 히스티딘을 0.5% 첨가한 배지(도 5의 (3)) 및 히스티딘을 1% 첨가한 배지(도 5의 (4))의 경우 일정 수준의 발색현상이 균주 비특이적으로 나타났다. 상기한 결과로부터, 히스티딘의 첨가량은 0.1% 농도가 바람직한 것으로 확인되었다.
- [110] 한편, 상기 도 6 내지 도 8에 나타낸 바와 같이, 상기 표 1의 조성에 의해 제조된 본 발명의 배지를 이용하여 상기 표 3에 기재된 12종의 바실러스 속 균주를 배양한 결과 특정 균주에서만 배양 후 배지가 보라색으로 변하는 결과를

나타내었다. 상기 접종된 균주는 도 6에 기재된 바와 같이 접종하였고, 상기 도 6의 번호는 균주에 관한 상기 표 3에 기재된 균주의 번호를 의미한다.

[111] 보다 구체적으로, 상기 도 7에 나타낸 바와 같이, 특정 균주가 접종된 부분에서만 발색현상이 나타났고, 생체아민의 전구체인 오르니틴을 첨가한 경우에 그 발색 정도가 더욱 진한 것으로 확인되었다. 또한, 상기 도 8에서도 특정 균주가 접종된 부분에서만 발색현상이 나타나는 것이 확인되었고, 생체아민의 전구체인 히스티딘을 첨가한 경우에 그 발색 정도가 더욱 진한 것이 확인되었다.

[112] 상기 결과로부터, 본 발명의 배지는 기존 유산균 검출용 배지와 달리 생체아민을 생성하는 바실러스 속 균주를 검출할 수 있는 것으로 확인되었다. 상기 생체아민 전구체를 첨가하지 않은 배지(A)에서도 발색현상이 나타난 것은 바실러스 속 균주가 배지에 사용된 영양성분으로부터 아민(amine)을 생성하였기 때문인 것으로 예상된다.

[113] 보다 구체적으로, 본 발명의 배지에 포함된 영양성분은 제한배지(minimal media)가 아닌 완전배지(rich media 또는 complete media)에 해당하는 LB 배지(1% bacto-tryptone, 0.5% yeast extract, 1% NaCl)이고, 상기 LB 배지에는 생체아민의 전구체가 될 수 있는 단백질이나 폴리펩타이드가 일정량 첨가되어 있기 때문에, 바실러스 속 균주가 생성하는 많은 분해 효소에 의해 상기 배지에 포함된 성분이 분해되고, 상기 분해의 산물로부터 생체아민을 포함한 아민이 형성되어 발색현상이 일어난 것으로 판단된다.

[114] 상기 도 7 및 도 8에 나타낸 바와 같이, 균주의 발색반응을 분석한 결과 5번 및 6번 균주의 경우 오르니틴 및 히스티딘을 첨가한 두 배지 모두에서 진한 보라색의 발색현상이 확인되어 생체아민 생성균주로 추정되었다. 또한, 3번 및 12번 균주의 경우 오르니틴을 첨가한 배지에서 더욱 발색현상이 강화되는 것으로 확인되었다.

[115] 실시예 3. 액체배지(broth)를 이용한 생체아민 생성 균주의 검출

[116] 상기 실시예 2의 본 발명의 고체배지를 통하여 생체아민 생성능을 가진 균주를 확인할 수 있었다. 그러나, 이는 정성적인 분석으로 생체아민 생성 정도를 정량적으로 확인하여, 해당 균주의 생체아민 생성능을 보다 구체적으로 확인하기 위한 방법의 개발이 요구된다. 따라서, 이를 위하여 본 발명의 액체배지를 이용한 분석방법을 실시하였다. 본 발명의 액체배지를 이용하여 생체아민 생성 여부를 확인하기 위한 바실러스속(*Bacillus* sp.) 균주는 상기 실시예 2의 표 3에 기재된 12종의 바실러스속 균주를 사용하였다.

[117] 상기 표 3에 기재된 바실러스속 균주의 생체아민 생성여부를 액체배지(broth)에서 확인하고자 상기 실시예 1의 표 2에 기재된 조성으로 제조된 배지에 상기 표 3의 균주를 배양하여 생체아민 생성 여부를 확인하였다.

[118] 보다 구체적으로, 본 발명의 효과를 확인하기 위한 배지는 상기 실시예 1의 표 2에 기재된 조성을 기초로, 상기 표 2의 조성에서 생체아민의 전구체를 전혀

첨가하지 않은 배지(BA broth, BA), 상기 표 2의 조성에서 생체아민의 전구체인 오르니틴을 0.1% 첨가한 배지(BAO) 및 상기 표 2의 조성에서 생체아민의 전구체인 히스티딘을 0.1% 첨가한 배지(BAH)로 구분하여 사용하였고, 본 발명의 유효성 및 효과를 확인하기 위한 대조군으로는 LB 배지를 변형시킨 배지(modified LB broth, MLB)를 사용하였다. 상기 LB 배지를 변형시킨 배지는 상기 표 4의 조성에서 아가를 제외한 조성으로 작성한 배지이다.

- [119] 보다 구체적으로, 상기 표 3에 기재된 12종의 균주를 LB broth(Luria-Bertani, 1% bacto-tryptone, 0.5% yeast extract, 1% NaCl, pH 7.0) 배지에 각각 접종하고 37°C에서 24시간 동안 전배양한 후, 상기 전배양한 각각의 균주 배양액 1 mL를 상기 4종류의 배지 각 9 mL에 접종하고, 37°C에서 24시간 동안 배양하였다. 상기 배양 후, 각 배지에서 생체아민 생성에 따라 보라색으로 발색된 정도를 590 nm에서 흡광도를 측정함으로써 정량화하였다. 이와 함께, 배양액의 pH를 함께 측정하였다. 상기 흡광도와 pH의 측정을 통하여 생체아민 생성 여부를 확인한 결과를 도 9 및 표 5에 나타내었다. 하기 표 5의 균주 종류는 상기 표 3의 균주 번호에 의한 균주를 의미하고, 하기 표 5의 배지의 종류는 상기 4종의 배지의 약자를 의미한다. 또한, 하기 표 5의 pH는 균주를 접종하기 전의 배지의 pH와 균주를 접종한 후 24시간 동안 배양하고 난 후의 배지의 pH를 나타낸 것이다. 상기 도 9에 기재된 번호도 하기 표 5에 기재된 균 종류와 같이, 상기 표 3의 균주 번호에 의한 균주를 의미하고, 각 균주 별로 첫 번째 배지는 균주를 접종하지 않은 배지를 나타내고, 두 번째 배지는 변형된 LB 배지(MLB)에 균주를 접종한 후 24시간 배양한 결과를 나타내며, 세 번째 배지는 생체아민 전구체를 첨가하지 않은 본 발명의 배지(BA)에 균주를 접종한 후 24시간 배양한 결과를 나타내고, 네 번째 배지는 오르니틴이 첨가된 본 발명의 배지(BAO)에 균주를 접종한 후 24시간 배양한 결과를 나타내며, 다섯 번째 배지는 히스티딘이 첨가된 본 발명의 배지(BAH)에 균주를 접종한 후 24시간 배양한 결과를 나타낸다.

- [120] 표 5

균 종류	배지종류	pH		A ₅₉₀	균 종류	배지종류	pH		A ₅₉₀
		0h	24h				0h	24h	
1	MLB	5.87	6.98	7.38	7	MLB	5.76	7.59	8.08
	BA	5.92	5.07	0.55		BA	5.79	7.57	7.85
	BAO	5.93	4.92	0.46		BAO	5.80	6.85	6.38
	BAH	5.67	5.12	0.69		BAH	5.58	7.48	7.71
2	MLB	5.68	6.84	6.43	8	MLB	5.87	8.01	7.66
	BA	5.71	4.90	0.35		BA	5.91	4.91	0.38
	BAO	5.72	4.89	0.36		BAO	5.92	4.83	0.30
	BAH	5.57	4.88	0.33		BAH	5.67	5.14	0.60
3	MLB	5.91	7.24	7.40	9	MLB	5.63	7.93	7.53
	BA	5.95	6.39	5.27		BA	5.67	4.95	0.22
	BAO	5.99	6.83	6.58		BAO	5.68	4.91	0.24
	BAH	5.75	6.40	4.84		BAH	5.49	4.78	0.22
4	MLB	5.67	6.98	6.16	10	MLB	5.88	7.50	8.01
	BA	5.68	5.00	0.49		BA	5.93	4.28	0.13
	BAO	5.69	4.99	0.43		BAO	5.94	4.24	0.12
	BAH	5.49	5.01	0.52		BAH	5.70	4.23	0.11
5	MLB	5.60	7.91	7.55	11	MLB	5.92	8.13	6.53
	BA	5.63	5.88	2.53		BA	5.96	5.16	0.57
	BAO	5.63	7.80	7.31		BAO	5.98	5.10	0.54
	BAH	5.45	6.97	6.46		BAH	5.71	4.97	0.32
6	MLB	5.97	7.00	6.79	12	MLB	5.86	8.14	7.43
	BA	6.03	6.45	5.08		BA	5.90	6.25	3.38
	BAO	6.04	7.86	7.32		BAO	5.92	7.64	7.19
	BAH	5.78	7.06	6.55		BAH	5.67	7.00	6.27

[121] 각각의 배지에서 각각의 균주를 24시간 동안 배양한 결과를 나타낸 상기 도 9에서 확인된 바와 같이, LB 배지를 변형시킨 배지(MLB)인 대조군인 두 번째 배지는 12종의 모든 균주에서 진한 보라색으로 발색되어 생체아민 생성 여부를 확인할 수 없었다. 이러한 결과는 상기 실시예 2와 일치하는 것으로, 기존 LB배지에 알칼리화에 의해 발색이 되는 pH지시약인 bromocresol purple을

첨가한 배지 즉, 기존 decarboxylase plate법에 사용되던 개념의 배지를 응용하여 제조된 배지를 사용한 방법으로는 바실러스 속 균주를 대상으로 생체아민 생성 여부를 확인할 수 없다는 것이 다시 확인되었다.

- [122] 한편, 본 발명의 배지인 상기 표 2의 조성에서 생체아민의 전구체를 전혀 첨가하지 않은 배지(BA)인 세 번째 배지에서는 균주에 따라 전혀 발색이 되지 않는 경우와 발색이 되는 경우가 명확히 구분되었고, 발색이 되는 경우에도 발색 정도가 시각적으로도 구분될 수 있을 정도로 변별력이 있게 발색이 됨이 확인되었다. 상기 결과로부터 본 발명의 배지는 바실러스 속 균주를 대상으로 생체아민 생성 여부를 확인할 수 있는 것으로 확인되었다. 또한, 본 발명의 배지에 생체아민 전구체를 첨가한 배지, 구체적으로 상기 표 2의 조성에서 생체아민의 전구체인 오르니틴을 0.1% 첨가한 배지(BAO)인 네 번째 배지 및 상기 표 2의 조성에서 생체아민의 전구체인 히스티딘을 0.1% 첨가한 배지(BAH)인 다섯 번째 배지의 경우에는 특정 균주에서 생체아민의 전구체를 첨가하지 않은 세 번째 배지에 비하여 보다 확연한 발색의 차이를 나타내는 것으로 확인되었다.
- [123] 상기 결과로부터 본 발명의 배지는 바실러스속 균주를 대상으로 생체아민 생성 여부를 확인할 수 있을 뿐만 아니라, 생체아민 전구체의 첨가를 통하여 특정 생체아민의 생성능도 확인할 수 있을 것으로 예상되었다.
- [124] 또한, 상기 액체 배지에서 배양한 결과 즉, 배양 배지의 pH 및 발색 정도를 흡광도로 측정한 결과를 나타낸 표 5를 통하여, 상기 실시예 2에서 생체아민을 생성할 것으로 예상되었던 균주에 대해 나타낸 바와 같이, 3번 균주(*B. licheniformis* cy2), 5번 균주(*B. polyfermenticus* CJ9), 6번 균주(*B. licheniformis* KCTC1918) 및 12번 균주(*B. subtilis* KCTC1028)에서 발색을 나타내었고, 추가로 7번 균주(*B. subtilis* KCTC1022)에서도 발색을 나타내었다.
- [125] 상기 5번 균주의 경우 생체아민 전구체를 첨가하지 않은 본 발명의 배지(BA)에서 pH가 pH 5.88이고, 흡광도(A_{590})의 경우 2.53이었으며, 생체아민 전구체로 오르니틴을 첨가한 배지(BAO)에서 pH가 pH 7.80이고, 흡광도(A_{590})의 경우 7.31이었으며, 생체아민 전구체로 히스티딘을 첨가한 배지(BAH)에서 pH가 pH 6.97이고, 흡광도(A_{590})의 경우 6.46이었다. 또한, 6번 균주의 경우 생체아민 전구체를 첨가하지 않은 본 발명의 배지(BA)에서 pH가 pH 6.45이고, 흡광도(A_{590})의 경우 5.08이었으며, 생체아민 전구체로 오르니틴을 첨가한 배지(BAO)에서 pH가 pH 7.86이고, 흡광도(A_{590})의 경우 7.32이었으며, 생체아민 전구체로 히스티딘을 첨가한 배지(BAH)에서 pH가 pH 7.06이고, 흡광도(A_{590})의 경우 6.55이었다. 또한, 12번 균주의 경우 생체아민 전구체를 첨가하지 않은 본 발명의 배지(BA)에서 pH가 pH 6.25이고, 흡광도(A_{590})의 경우 3.38이었으며, 생체아민 전구체로 오르니틴을 첨가한 배지(BAO)에서 pH가 pH 7.64이고, 흡광도(A_{590})의 경우 7.19이었으며, 생체아민 전구체로 히스티딘을 첨가한 배지(BAH)에서 pH가 pH 7.00이고, 흡광도(A_{590})의 경우 6.27이었다.

- [126] 상기 결과로부터, 전구체를 첨가하지 않은 본 발명의 배지(BA)에서보다 생체아민 전구체를 첨가한 배지(BAO 및 BAH)에서 상기 5번, 6번 및 12번의 균주는 각각의 pH와 흡광도(A_{590})가 높게 측정되어, 상기 5번, 6번 및 12번 균주는 생체아민 생성균주임이 확인되었다. 특히, 5번 균주 및 6번 균주는 본 발명의 고체 배지를 이용한 방법(BA plate 법)으로 실시한 상기 실시예 2에서 확인된 결과와 본 발명의 액체 배지를 이용한 방법(BA broth 법)에서 모두 동일한 결과가 확인되었다.
- [127] 또한, 고체 배지를 이용한 방법으로 실시한 상기 실시예 2에서 오르니틴을 첨가한 배지에서만 생체아민을 생성하는 것으로 확인된 균주인 3번 균주의 경우, 액체 배지를 이용한 상기 실험에서도 오르니틴을 첨가한 배지(BAO)에서 pH와 흡광도가 상승한 반면, 히스티딘을 첨가한 배지(BAH)에서는 pH와 흡광도가 모두 감소하여, 3번 균주에서도 고체 배지를 이용한 방법으로 실시한 상기 실시예 2의 결과와 상기 본 발명의 액체 배지를 이용한 방법에서 모두 결과가 일치하는 것으로 확인되었다.
- [128] 한편, 7번 균주의 경우, 본 발명의 배지(BA)에서 pH가 pH 7.57이고, 흡광도(A_{590})의 경우 7.85인 반면, 생체아민 전구체로 오르니틴을 첨가한 배지(BAO)에서 pH가 pH 6.85이고, 흡광도(A_{590})의 경우 6.38이었으며, 생체아민 전구체로 히스티딘을 첨가한 배지(BAH)에서 pH가 pH 7.48이고, 흡광도(A_{590})의 경우 7.71로, 생체아민 전구체를 첨가하였을 때, 더 낮은 pH와 더 낮은 발색 정도를 나타내었다. 다른 균주 배양 결과, 균주의 생육에 영향을 미치지 않으면서도, 생체아민의 전구체로 생체아민 생성을 유도하여 높은 흡광도를 유도한 오르니틴을 포함한 본 발명의 배지에서 대조구보다 오히려 낮은 pH 및 흡광도를 나타낸 결과로부터, 상기 7번 균주는 생체아민 생성보다는 다른 종류의 알칼라인 화합물(alkaline compound)을 주로 생성하는 것으로 예상되었다.
- [129] 실시예 4. HPLC를 이용한 생체아민 분석
- [130] 상기 실시예 2 및 실시예 3에서 확인된 생체아민 생성 균주에 대한 보다 정밀한 검증을 위하여, HPLC를 이용한 분석을 수행하였다. 특히, 상기 실시예 3의 결과로부터 상기 7번 균주가 생체아민 생성균주는 아닌 것으로 잠정 추정되었으나, 이에 대한 보다 정밀한 확인이 요구되므로, 최종적으로 HPLC를 이용한 검증을 수행하였다. 상기 HPLC를 이용한 검증은 하기와 같은 방법으로 수행하였다.
- [131] 우선, HPLC를 이용한 생체아민 생성여부를 검증하기 위해, 생체아민 표준용액(BA standard solution)을 조제하였다. 상기 생체아민 표준용액은 총 9종의 생체아민과 내부표준물질(internal standard, IS)을 이용하여 조제하였다.
- [132] 우선, 총 9종의 생체아민, 구체적으로 트립타민(tryptamine hydrochloride, TRY, 49.12 mg), 푸트레신(putrescine dihydrochloride, PUT, 73.2 mg), 카다베린(cadaverine dihydrochloride, CAD, 68.56 mg), 스퍼미다인(spermidine trihydrochloride, SPD, 70.16 mg), 페닐에틸아민(2-phenylethylamine hydrochloride,

PHE, 52.08 mg), 스퍼민(spermine tetrahydrochloride, SPM, 68.8 mg), 히스타민(histamine dihydrochloride, HIS, 66.24 mg), 티라민(tyramine hydrochloride, TYR, 50.72 mg) 및 아그마틴(agmatine sulfate, AGM, 70.16 mg)과 내부표준물질(1,7-diaminoheptane, IS, 40 mg)을 각각 0.1 N HCl 40 mL에 녹여 최종 1 mg/mL 농도로 조제하였다.

[133] 상기 유도체화를 위한 생체아민 표준용액(BA standard solution)은 상기 생체아민과 내부표준물질(IS)을 각각 0.1 mg/mL 농도로 혼합하여 제조하였다.

[134] 또한, 상기 HPLC를 수행하기 위한 생체아민 생성 미생물 후보 균주의 배양액으로부터 생체아민을 추출하는 방법은 Hwang 등의 방법(Journal of Chromatography B, Vol 693, pp. 23-30(1997))을 변형하여 사용하였다. 보다 구체적으로, 상기 표 3에 기재된 12종의 바실러스 속 미생물의 배양액으로부터 상기 각각의 미생물이 생성한 생체아민을 추출하기 위해, 상기 12종의 균주를 각각 37°C에서 24시간 전배양한 후, LB broth(Luria-Bertani, 1% bacto-tryptone, 0.5% yeast extract, 1% NaCl, pH 7.0)와 LBO broth(상기 LB broth에 0.1% ornithine(전구체)를 첨가한 배지)에 각각 전배양한 균주를 10%씩 접종하여 24시간 동안 배양하였다. 배양 후, 4°C 및 9,950×g의 조건으로 15분간 원심분리한 후, 상등액만을 분리하여 균체를 제거하고 배양 상정액을 회수하였다. 상기 회수한 배양 상정액을 0.2 µm membrane filter로 제균한 후, 동결 건조하여 10배 농축하였다. 상기 10배 농축한 농축 배양 상정액 2 mL에 5% trichloroacetic acid(TCA)-0.4 M perchloric acid(HClO₄) 10 mL을 가하고, 상기 내부표준물질(IS, 1,7-diaminoheptane)를 0.2 mg/2 mL첨가하여 추출하였다.

[135] 상기 생체아민 및 내부표준물질이 포함된 생체아민 표준용액과 상기 추출된 배양 상정 추출액에 대해 우선 유도체화를 수행한 후, HPLC를 수행하였다. 상기 HPLC를 수행하기 전에 수행된 유도체화 과정 및 상기 추출된 농축 배양 상정 추출액의 유도체화 과정은 다음과 같은 방법으로 수행하였다.

[136] 상기 생체아민 표준 물질 혼합용액과 상기 추출된 농축 배양 상정 추출액에 각각 2 M NaOH 1 mL와 benzoyl chloride 10 µL를 가하고 30°C에서 40분간 반응시켰다(benzoylation). 상기 각각의 반응액에 포화된 NaCl 용액(saturated NaCl) 2 mL를 가하여 반응을 정지시키고, 디에틸 에테르(diethyl ether) 3 mL를 첨가하여 추출한 다음, 상정액 1.5 mL을 분취하여 질소 가스로 농축하였다. 상기 질소가스로 농축한 상정액을 50% 메탄올 수용액(이동상) 500 µL에 용해하여 HPLC 분석 시료로 사용하였다.

[137] 또한, 상기 생체아민 및 내부표준물질을 이용하여 정확한 생체아민 분석을 위해 HPLC 분석 조건을 설정하였다. 보다 정확한 생체아민 분석을 수행하기 위한 HPLC 분석 조건을 설정하기 위해, 다양한 용매 구배(gradient) 조건에서 생체아민 표준용액(BA standard solution)를 이용하여 HPLC를 수행하여 최종 분석조건을 구하였다. 상기 HPLC를 수행한 기계에 관한 사항 및 수행조건과 최종 분석조건으로 결정된 HPLC의 분석조건을 하기 표 6 및 표 7에 나타내었다.

[138] 표 6

Instrument	YOUNGLIN instrument
Detector	UV-730D(254 nm)
Column	SunFire C ₁₈ (4.6x150 mm, 3.5 μ m, Waters)
Solvent	A; water:methanol(50:50) / B; water:methanol(10:90)
Oven temperature	40°C
Injection vol	20 μ l

[139] 표 7

Time(min)	Flow rate(mL/min)	A(%)	B(%)
0	0.4	100	0
15	0.4	0	100
25	0.4	0	100
30	0.4	100	0
55	0.4	100	0

[140] 상기 최적 분석 조건에서 9종의 생체아민과 내부표준물질(IS)의 혼합용액인 생체아민 표준용액(BA standard solution)의 크로마토그램(chromatogram) 결과로도 10에 나타내었다.

[141] 상기 도 10에 나타낸 바와 같이, 최적 분석 조건에서 상기 9종의 생체아민 표준물질과 상기 내부표준물질은 동일한 농도(0.1 mg/mL)로 혼합하여 측정하였으나, 생체아민의 종류에 따라 다른 검출감도를 나타내었다. 이 중, 아그마틴(agmatine, AGM), 스퍼민(spermine, SPM), 히스타민(histamine, HIS) 및 티라민(tyramine, TYR)의 경우 다른 종류의 생체아민에 비해 낮은 감도를 나타내었고, 특히 히스타민은 가장 낮은 검출감도를 나타내는 것으로 확인되었다.

[142] 또한, 상기 배양액으로부터 추출된 생체아민의 정량을 위하여, 상기 표 6 및 표 7의 조건에서 수행하여 측정된 HPLC 수행결과를 배양상징액 추출 시 내부표준물질로 첨가된 1,7-diaminoheptane(IS)의 peak area 값과 각각의 생체아민의 peak area 값을 비교하여 배양 상징액 1 L에 함유된 생체아민을 상대적으로 정량하였고, 그 결과를 하기 표 8에 나타내었다. 하기 표 8의 단위는 mg/L이다. 하기 표 8의 균주번호는 상기 표 3의 각각의 균주의 균주번호(No.)에 대응하는 번호를 의미하고, 하기 표 8의 배지 중, LB는 상기 균주를 배양한 LB broth를 의미하고, LBO broth는 상기 LB broth에 0.1% ornithine(전구체)를 첨가한 배지를 의미하고, 하기 표 8에 기재된 약자는 각각 푸트레신(putrescine, PUT), 카다베린(cadaverine, CAD), 트립타민(tryptamine, TRY), 스퍼미다인(spermidine, SPD), 페닐에틸아민(2-phenylethylamine, PHE) 및 스퍼민(spermine, SPM, 68.8

mg)의 생체아민을 의미한다. 하기 표 8에서 ‘-’는 생체아민이 검출되지 않았음을 의미한다.

[143] 표 8

군주 번호	배지 종류	PUT		CAD	TRY	SPD+PH E	SPM	전체아민(Total)	
		합량	증감					합량	증감
1	LB	0.86	+0.14	0.71	-	6.99	0.69	9.26	-0.21
	LBO	1.00		0.72	-	6.52	0.80	9.05	
2	LB	2.22	+0.22	1.01	-	7.87	0.98	12.08	+8.26
	LBO	2.44		1.33	-	15.04	1.52	20.34	
3	LB	45.14	+14.75	-	23.13	2.78	7.98	79.02	+13.42
	LBO	59.89		-	21.76	3.16	7.64	92.44	
4	LB	1.55	+1.57	1.10	-	7.44	1.05	11.13	+9.29
	LBO	3.12		2.04	-	13.42	1.84	20.42	
5	LB	2.00	+3.89	1.11	-	11.40	1.53	16.04	+30.06
	LBO	5.89		3.32	-	32.67	4.23	46.10	
6	LB	117.32	+53.52	-	88.98	16.86	-	223.16	+66.68
	LBO	170.84		-	102.94	16.06	-	289.84	
7	LB	-	-	-	33.31	5.50	-	38.81	+4.01
	LBO	-		-	36.02	5.80	-	41.82	
8	LB	0.69	-0.03	1.01	-	8.63	1.48	11.82	-0.01
	LBO	0.66		0.98	-	8.72	1.45	11.81	
9	LB	1.59	+0.51	0.93	-	5.55	0.53	8.60	+4.34
	LBO	2.10		1.30	-	8.04	1.50	12.94	
10	LB	-	-	-	14.81	4.82	-	19.62	+1.21
	LBO	-		-	16.43	4.40	-	20.83	
11	LB	1.05	+0.27	0.68	-	6.28	0.85	8.86	+0.55
	LBO	1.32		0.66	-	5.35	0.98	8.31	
12	LB	1.42	+3.00	1.07	-	8.14	1.41	12.04	+14.20
	LBO	4.42		2.46	-	16.93	2.43	26.24	

- [144] 상기 표 8에 나타낸 바와 같이, 총 9종의 생체아민 생성 여부를 분석한 결과, 6종의 생체아민이 검출되었으며, 상기 12종의 균주 배양 상징액 모두에서 히스타민(histamine)은 검출되지 않았다.
- [145] 또한, 상기 표 8에 나타낸 바와 같이, 상기 실시예 3의 액체배지를 이용한 실험에서, 배지 내 오르니틴을 첨가한 경우 진한 보라색으로 발색되었던, 3번, 5번, 6번 및 12번 균주의 경우 오르니틴을 첨가하지 않았을 때 총 생체아민 생성량(각 균주별로 79.02 mg/L, 16.04 mg/L, 223.16 mg/L 및 12.04 mg/L)에 비하여 오르니틴을 첨가하였을 때 총 생체아민 생성량(92.44 mg/L, 46.10 mg/L, 289.84 mg/L 및 26.24 mg/L)이 현저하게 증가하였고, 다른 균주에 비해 절대적인 검출량 뿐만 아니라 오르니틴 첨가에 의한 증가량도 현저한 것으로 확인되었다.
- [146] 또한, 오르니틴을 전구체로 하여 생성된 푸트레신(putrescine)의 함량변화를 살펴본 결과, 다른 균주에 비하여 오르니틴을 첨가하지 않았을 때(45.14 mg/L, 2.00 mg/L, 117.32 mg/L 및 1.42 mg/L)와 오르니틴을 첨가한 때(59.89 mg/L, 5.89 mg/L, 170.84 mg/L 및 4.42 mg/L)의 증가 정도가 현저하게 높은 것으로 확인되었다.
- [147] 상기 표 8에 나타난 결과는 상기 실시예 3의 액체 배지를 이용한 측정 결과 오르니틴을 첨가한 배지(BAO)의 발색정도를 A₅₉₀에서 측정한 결과(6.58, 7.31, 7.32 및 7.19)와 일치하는 것으로, 상기 결과들에 의해 상기 3번 균주, 5번 균주, 6번 균주 및 12번 균주는 다른 균주들에 비하여 현저하게 많은 생체아민을 생성하는 것 즉, 생체아민 생성 균주로 확인되었다.
- [148] 또한, 상기 실시예 3의 액체 배지를 이용한 측정 결과에서, 생체아민 생성여부를 명확히 구분할 수 없었던 7번 균주의 경우, HPLC 분석결과 균주 배양 시 전구체로 오르니틴을 첨가하여도 푸트레신이 전혀 생성되지 않으며 총 생체아민 생성량도 거의 증가 되지 않는 것으로 확인되어, 생체아민 생성 균주가 아닌 것으로 판명되었다. 상기 실시예 3에서 대조구(MLB)와 본 발명의 배지에서 비슷한 발색이 나타난 원인은 생체아민 생성 때문이 아닌 다른 알칼라인 화합물(alkaline compound) 생성에 의한 것으로 확인되었다.
- [149] 상기 HPLC 결과, 히스타민이 검색되지 않은 것이 도 10에 나타낸 바와 같이 상기 생체아민 표준 물질을 이용한 HPLC 수행방법은 히스타민에 대한 낮은 검출감도를 나타냈기 때문인 것인지 여부를 확인하기 위해 추가실험을 수행하였다.
- [150] 우선, 상기 HPLC를 수행하기 전에 수행된 유도체화 과정 및 상기 추출된 농축 배양 상징 추출액의 유도체화 과정과 관련하여, Dansylation 법(KOREAN J.FOOD SCI. TECHNOL, Vol 38, No6, pp 730-737(2006))으로 유도체화를 제조하였다. 상기 Dansylation 법을 이용한 방법은 다음과 같다.
- [151] 상기 생체아민 표준물질 혼합용액과 상기 추출된 농축 배양 상징 추출액에 각각 포화탄산나트륨 용액 0.5 mL와 1% dansylchloride 아세톤 용액 1 mL를 가하고 45°C에서 1시간 반응시켰다. 상기 각각의 반응액에 10% proline 용액 0.5

mL를 가하여 반응을 정지시키고, 디에틸 에테르(diethyl ether) 3 mL를 첨가하여 추출한 다음, 상정액 1.5 mL을 분취하여 질소 가스로 농축하였다. 상기 질소가스로 농축한 상정액을 50% 메탄올 수용액(이동상) 500 μ L에 용해하여 HPLC 분석 시료로 사용하였다.

[152] 상기 생체아민 표준물질 및 내부표준물질을 이용하여 정확한 생체아민 분석을 위해 상기 표 6의 기계로 수행한 HPLC 분석 조건은 하기 표 9에 나타내었다.

[153] 표 9

Time(min)	Flow rate(mL/min)	A(%)	B(%)
0	0.4	100	0
10	0.4	20	80
15	0.4	17	83
20	0.4	0	100
25	0.4	0	100
30	0.4	100	0
55	0.4	100	0

[154] 상기 표 9의 조건으로 수행한 히스타민딘 표준물질(HIS standard)과 내부표준물질(IS)의 혼합용액인 생체아민 표준물질 혼합용액의 크로마토그램(chromatogram) 결과를 도 11에 나타내었다.

[155] 상기 도 11에 나타낸 바와 같이, Dansylation 법으로 유도체화를 제조한 후, 상기 표 9의 조건에서 HPLC를 수행한 경우, 히스타민(histamine, HIS)에 대해서도 높은 감도를 나타내는 것이 확인되었다.

[156] 상기 Dansylation 법으로 유도체화를 제조한 후, 상기 표 9의 조건으로 HPLC를 수행한 결과, 상기 LB 및 LBO에서 상기 표 3의 각각의 균주를 배양한 배양액의 상정액 모두에서 히스타민이 검출되지 않는 것으로 확인되었다.

[157] 히스타민의 검출 정도를 좀 더 명확히 확인하기 위하여, 상기 히스트민의 전구체인 히스티딘을 첨가한 배지인 LBH(상기 LB broth에 0.1% histidine(전구체)를 첨가한 배지)에 상기 표 3의 각각의 균주를 상기와 같은 방법으로 배양하여 배양액을 얻고, 상기 Hwang 등의 방법을 변형한 방법으로 농축 배양 상정 추출액을 제조한 후, 상기 Dansylation 법으로 유도체화를 제조하였다.

[158] 상기 Dansylation 법으로 유도체화된 농축 배양 상정 추출액에 대해 상기 표 9의 조건으로 HPLC를 수행한 결과, 상기 LBH에서도 상기 표 3의 각각의 균주를 배양한 배양액의 상정액 모두에서 히스타민이 검출되지 않는 것으로 확인되었다.

[159] 상기 결과로부터, 상기 표 8에서 히스타민이 검출되지 않는 것은 유도체화 과정

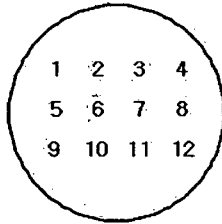
및 HPLC 조건에 의한 것이 아닌 상기 표 3의 균주가 생체아민 중 히스타민을 생성하지 않거나 검출에 의해 검출되지 아니할 정도의 극소량만 생성하기 때문인 것으로 확인되었다.

- [160] 상기 HPLC를 통한 정밀한 분석결과와 상기 실시예 2의 고체배지를 통한 측정법(BA plate 법) 및 상기 실시예 3의 고체배지를 통한 측정법(BA broth 법)에 의한 결과가 일치되어, 본 발명의 배지를 이용한 생체아민 생성 균주의 검색법의 정확성이 검증될 수 있었다.
- [161] 상기한 실시예 2 및 실시예 3의 결과로부터 본 발명의 생체아민 생성 균주 검출용 배지는 균주의 생육과정 또는 배양과정에서 알칼리성 성분을 생성하는 균주, 일 예로 바실러스 속 균주에서 생체아민 생성 여부를 positive selection 방법으로 검출할 수 있는 것임이 확인되었으며, 또한 상기 실시예 3의 결과로부터 본 발명의 액체 배지(BA broth)를 사용하는 경우, 발색 정도를 측정하여, 대상 균주의 생체아민 생성여부를 정량적으로 측정할 수 있음이 확인되었다.
- [162] 본 발명의 방법에 의하면, 대상 균주의 생체아민 생성 여부를 정성 및 정량적으로 간단하게 확인할 수 있으므로, 본 발명은 식품의 제조에 사용되거나 식품에 포함된 다양한 균주의 생체아민 생성여부를 용이하게 스크리닝(screening)할 수 있을 것으로 평가된다.
- [163] 따라서, 본 발명에 의해 생체아민 생성여부를 스크리닝한 후, 스크리닝된 대상 균주에 대해 생체아민의 생성여부, 생성된 생체아민의 종류 및 그 함량을 HPLC 등의 정밀한 기기를 활용하여 최종적으로 정량할 경우, 많은 인력, 시간 및 비용이 소요된 기존 방법에 비하여 현저하게 경제적이고, 신속하게 생체아민 생성여부를 검토할 수 있을 것으로 예상된다.

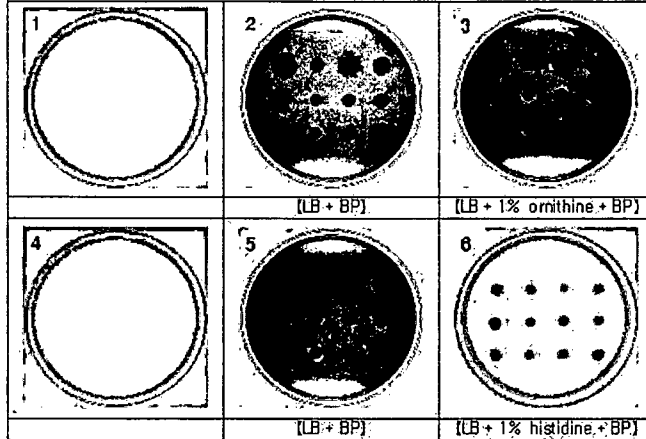
청구범위

- [청구항 1] 글리세롤을 유효성분으로 포함하는 생체아민 생성 미생물 검출용 조성물.
- [청구항 2] 제1항에 있어서,
상기 생체아민 생성 미생물 검출용 조성물은 pH 지시약을 더욱 포함하는 생체아민 생성 미생물 검출용 조성물.
- [청구항 3] 글리세롤을 유효성분으로 포함하는 생체아민 생성 미생물 검출용 배지조성물.
- [청구항 4] 제3항에 있어서,
상기 생체아민 생성 미생물 검출용 배지조성물은 pH 지시약을 더욱 포함하는 생체아민 생성 미생물 검출용 배지조성물.
- [청구항 5] 제4항에 있어서,
상기 pH 지시약은 브로모크레솔 퍼플, 브로모크레솔 그린, 아조리트민, 브로모크레솔 블루, 페놀 레드, 뉴트랄 레드 및 크레졸 레드로 이루어진 군 중에서 1종 이상 선택된 것인 생체아민 생성 미생물 검출용 배지조성물.
- [청구항 6] 제3항에 있어서,
상기 생체아민 생성 미생물 검출용 배지 조성물은 히스티딘, 오르니틴, 글루타민, 라이신, 알지닌, 트립토판, 페닐알라닌 및 타이로신으로 이루어진 군 중에서 선택된 1종 이상을 더욱 포함하는 것을 특징으로 하는 생체아민 생성 미생물 검출용 배지조성물.
- [청구항 7] 제6항에 있어서,
상기 히스티딘의 함량은 상기 생체아민 생성 미생물 검출용 조성물 전체를 기준으로 0.01 중량% 내지 0.25 중량%인 생체아민 생성 미생물 검출용 배지조성물.
- [청구항 8] 제3항에 있어서,
상기 생체아민 생성 미생물 검출용 배지 조성물은 생체아민을 생성하는 바실러스속 균주를 검출하기 위한 것인 생체아민 생성 미생물 검출용 배지조성물.
- [청구항 9] 제3항의 조성물로 제조된 생체아민 생성 미생물 검출용 배지.
- [청구항 10] 제3항의 조성물로 제조된 생체아민 생성 미생물 검출용 배지를 포함하는 생체아민 생성 미생물 검출용 키트.
- [청구항 11] 제3항의 조성물로 제조된 생체아민 생성 미생물 검출용 배지에 대상 균주를 배양하는 단계를 포함하는 생체아민 생성 미생물 검출방법.

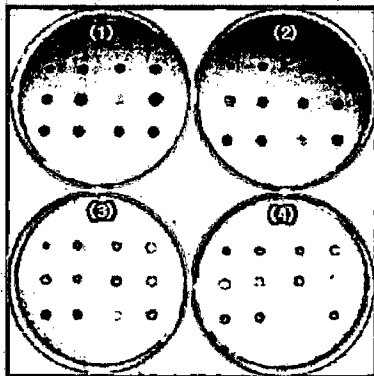
[Fig. 1]



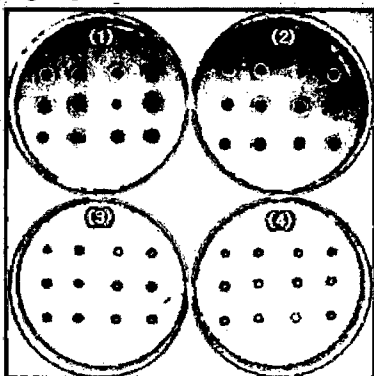
[Fig. 2]



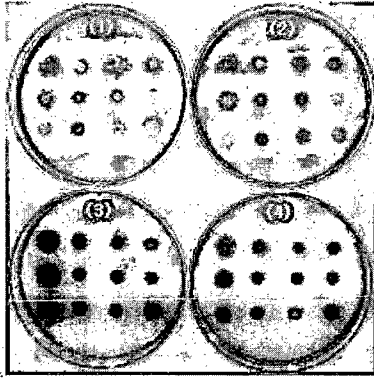
[Fig. 3]



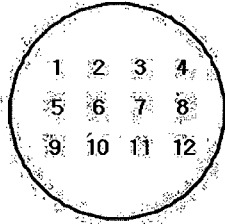
[Fig. 4]



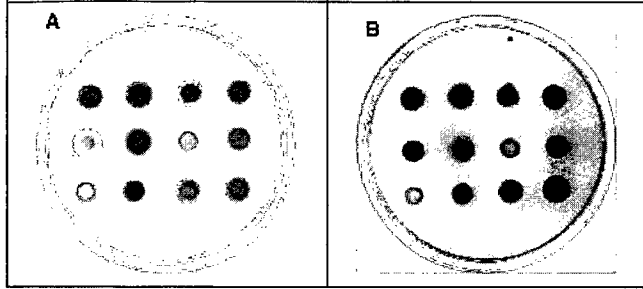
[Fig. 5]



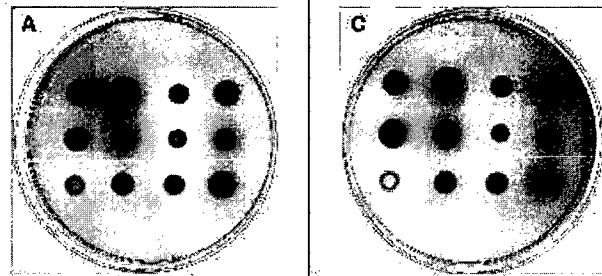
[Fig. 6]



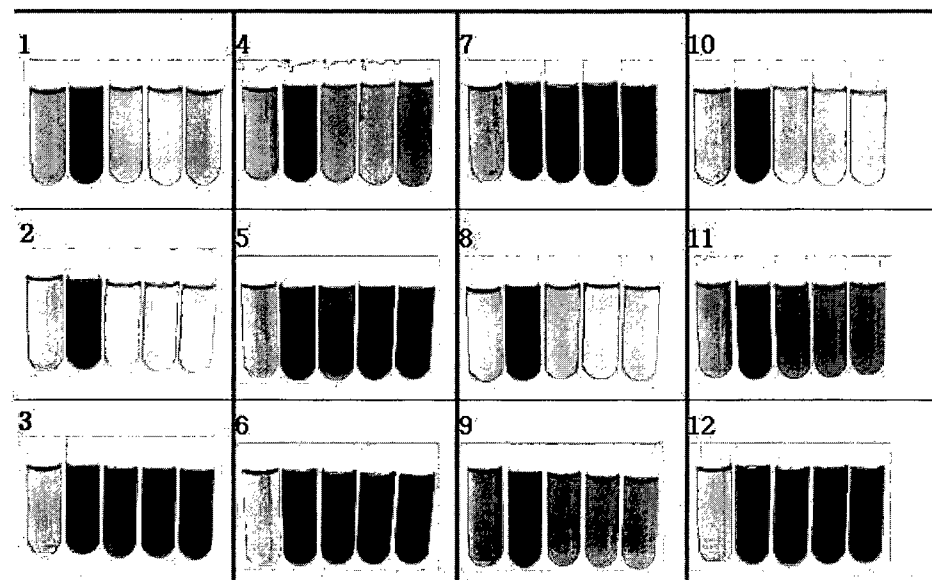
[Fig. 7]



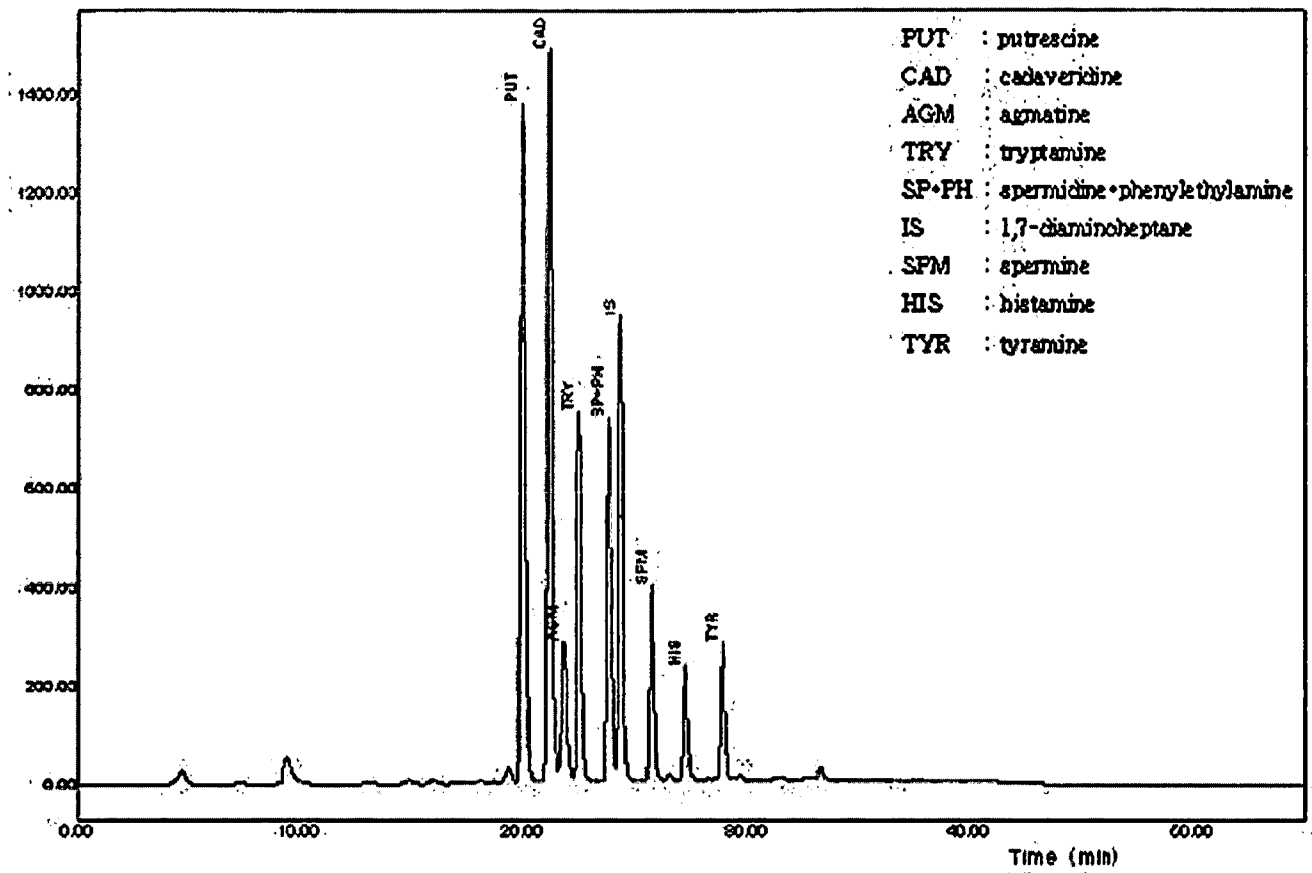
[Fig. 8]



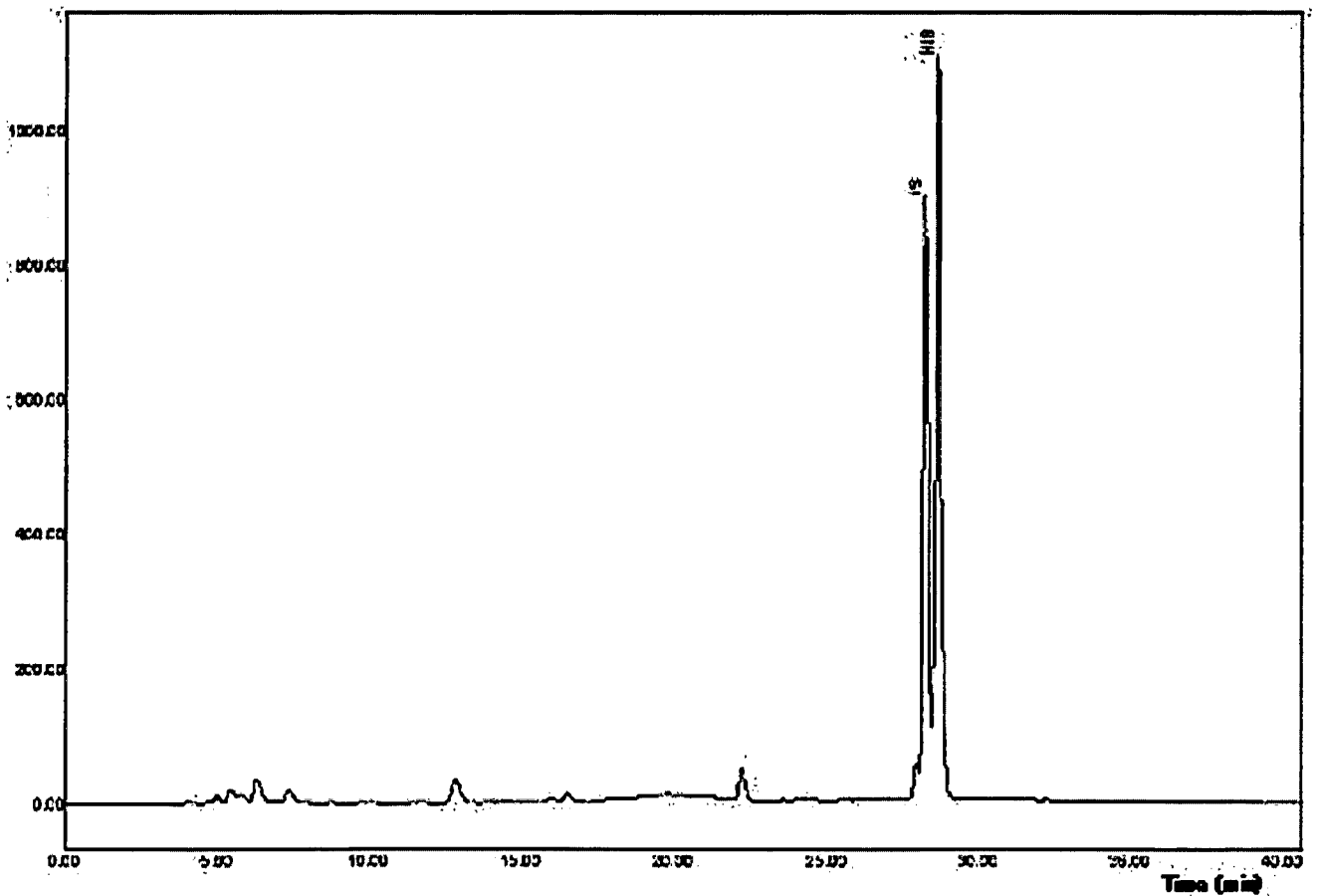
[Fig. 9]



[Fig. 10]



[Fig. 11]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2010/001476**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER*****C12Q 1/04(2006.01)i, G01N 33/84(2006.01)i, G01N 21/80(2006.01)i***

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C12Q 1/04; C12N 1/00; C12N 1/20

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Korean Utility models and applications for Utility models: IPC as above

Japanese Utility models and applications for Utility models: IPC as above

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

eKOMPASS (KIPO internal) & Keywords: glycerol, biogenic amine-producing microorganism, pH indicator

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 5,573,947 A (MADEC, M-N. et al.) 12 November 1996 Column 3, lines 27-33 and claims 1, 7, 8	1-11
A	KR 10-2003-0049983 A (KOREA CHUNGANG EDUCATIONAL FOUNDATION) 25 June 2003 Page 2 and claim 1	1-11
A	BOVER-CID, S. et al. Improved screening procedure for biogenic amine production by lactic acid bacteria. Int. J. Food Microbiol., 1999, vol. 53, no. 1, pages 33-41. Page 34, table 1	1-11
A	NIVEN, C. F. et al. Differential plating medium for quantitative detection of histamine-producing bacteria. Appl. Environ. Microbiol., 1981, vol. 41, no. 1, pages 321-322. Page 321	1-11
A	MAVROMATIS, P. et al. Modification of Niven's medium for the enumeration of histamine-forming bacteria and discussion of the parameters associated with its use. J. Food Prot., 2002, vol. 65, no. 3, pages 546-551. Abstract	1-11



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T"

later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X"

document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y"

document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&"

document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

21 APRIL 2011 (21.04.2011)

Date of mailing of the international search report

21 APRIL 2011 (21.04.2011)

Name and mailing address of the ISA/KR



Korean Intellectual Property Office
Government Complex-Daejeon, 139 Seonsa-ro, Daejeon 302-701,
Republic of Korea

Facsimile No. 82-42-472-7140

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2010/001476

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
US 5573947 A1	12.11.1996	EP 0632838 A1	11.01.1995
		EP 0632838 A1	18.03.1998
		EP 0632838 B1	12.12.2001
		WO 94-17201 A1	04.08.1994
KR 10-2003-0049983 A	25.06.2003	NONE	

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC)) <i>C12Q 1/04(2006.01)i, G01N 33/84(2006.01)i, G01N 21/80(2006.01)i</i>		
B. 조사된 분야 조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재) C12Q 1/04; C12N 1/00; C12N 1/20 조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌 한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC 일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC 국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우)) eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: 글리세롤, 생체아민 생성 미생물, pH지시약		
C. 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	US 5,573,947 A(MADEC, M-N. et al.) 1996년11월12일 컬럼 3, 라인 27-33 및 청구항 1, 7, 8	1-11
A	KR 10-2003-0049983 A(학교법인고려중앙학원) 2003년06월25일 페이지 2 및 청구항 1	1-11
A	BOVER-CID, S. et al. Improved screening procedure for biogenic amine production by lactic acid bacteria. Int. J. Food Microbiol., 1999년, 제53권, 제1호, 제33-41면. 페이지 34, 표 1	1-11
A	NIVEN, C. F. et al. Differential plating medium for quantitative detection of histamine-producing bacteria. Appl. Environ. Microbiol., 1981년, 제41권, 제1호, 제321-322면. 페이지 321	1-11
A	MAVROMATIS, P. et al. Modification of Niven's medium for the enumeration of histamine-forming bacteria and discussion of the parameters associated with its use. J. Food Prot., 2002년, 제65권, 제3호, 제546-551면. 요약	1-11
☐ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다. ☒ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.		
* 인용된 문헌의 특별 카테고리: “A” 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌 “E” 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌 “L” 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌 “O” 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌 “P” 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌 “T” 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌 “X” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신구성 또는 진보성이 없는 것으로 본다. “Y” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다. “&” 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌		
국제조사의 실제 완료일 2011년 04월 21일 (21.04.2011)	국제조사보고서 발송일 2011년 04월 21일 (21.04.2011)	
ISA/KR의 명칭 및 우편주소  대한민국 특허청 (302-701) 대전광역시 서구 청사로 189, 정부대전청사 팩스 번호 82-42-472-7140	심사관 김윤경 전화번호 82-42-481-5605 	

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
US 5573947 A1	1996.11.12	EP 0632838 A1 EP 0632838 A1 EP 0632838 B1 WO 94-17201 A1	1995.01.11 1998.03.18 2001.12.12 1994.08.04
KR 10-2003-0049983 A	2003.06.25	없음	