



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2021년10월07일

(11) 등록번호 10-2310936

(24) 등록일자 2021년10월01일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12N 1/20 (2006.01) A23B 4/22 (2017.01)

A23K 10/16 (2017.01) A23L 29/00 (2016.01)

C12R 1/01 (2006.01)

(52) CPC특허분류

C12N 1/20 (2021.05)

A23B 4/22 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2020-0045331

(22) 출원일자 2020년04월14일

심사청구일자 2020년04월14일

(56) 선행기술조사문헌

Franz, C. et. al., Int J Syst Evol Microbiol.
2006 Feb, 56(Pt 2):329-333Sudalayandi, K. et al., African Journal of
Biotechnology 2011 January, 10(1):42-47Holland, R. & Curry, CB. Encyclopedia of
Dairy Science (2nd Edition), 2011, pp.149-152
JP2017018009 A

(73) 특허권자

부경대학교 산학협력단

부산광역시 남구 용소로 45, 부경대학교내 (대연
동)

(72) 발명자

김영목

부산광역시 남구 분포로 111, 109동 1103호(용호
동, 엘지메트로시티)

박슬기

부산광역시 부산진구 당감로 79, 16동 1901호(부
암동, 화승삼성아파트)

조두민

경상남도 창원시 의창구 반계로 104-9, 206동
1805호(팔용동, 팔용벽산블루밍A단지)

(74) 대리인

김순웅

전체 청구항 수 : 총 10 항

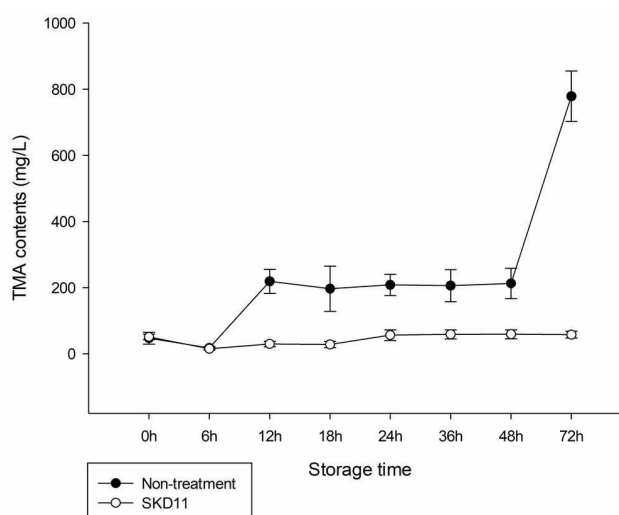
심사관 : 이효진

(54) 발명의 명칭 페디오코쿠스 스틸레시 신규 분리주 및 이의 용도

(57) 요약

본 발명은 신규한 페디오코쿠스 스틸레시 분리주 및 이의 신규한 용도에 관한 것으로, 보다 구체적으로, 본 발명의 수탁번호 KCTC13940BP로 수탁된, 수산물의 이취 저감 및 저장성 연장 효과를 갖는 페디오코쿠스 스틸레시 (*Pediococcus stilesii*, *P. stilesii*) 균주 또는 이의 배양액을 제공한다. 본 발명에 따르면, 상기 균주 또는 이의 배양액은 수산물로부터 비린내를 근본적으로 제거하여 소비자의 기호성을 향상시키고, 대중화시킬 수 있으며, 저장성이 연장되어 이로부터 생산성을 향상시킬 수 있을 뿐만 아니라, 온도(계절)에 관계없이 연중 균일하게 생 산품질을 유지할 수 있어 경제성이 우수하며, 맛, 영양, 및 조직감이 유지된 고영양가의 수산물을 제공할 수 있다.

대표도 - 도1a



(52) CPC특허분류

A23K 10/16 (2016.05)

A23L 29/065 (2016.08)

C12R 2001/01 (2021.05)

공지예외적용 : 있음

명세서

청구범위

청구항 1

수탁번호 KCTC13940BP로 수탁된, 수산물의 이취 저감 및 저장성 연장 효과를 갖는 페디오코쿠스 스틸레시 (*Pediococcus stilesii*, *P.stilesii*) 균주.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 이취는 아민계 화합물에 의해 발생하는 비린내인 것을 특징으로 하는,

수탁번호 KCTC13940BP로 수탁된, 수산물의 이취 저감 및 저장성 연장 효과를 갖는 페디오코쿠스 스틸레시 (*Pediococcus stilesii*, *P.stilesii*) 균주.

청구항 3

제2항에 있어서,

상기 아민계 화합물은 트리메틸아민(TMA), 피페리딘(Piperidine), N-메틸아지리딘, 디메틸에틸아민 (DMEA), N-메틸아제티딘, N-에틸아지리딘, 디에틸메틸아민 (DEMA), 디메틸이소프로필아민 (DMIPA), 디메틸(n-프로필)아민 (DMPA), N-(n-프로필)아지리딘, N-이소프로필아지리딘, N-에틸아제티딘, N-메틸피롤리딘, N,N,N',N'-테트라메틸디아미노메탄, 트리에틸아민(TEA), 메틸에틸(n-프로필)아민, 메틸에틸이소프로필아민, 디메틸(n-부틸)아민, 디메틸(sec-부틸)아민, 디메틸이소부틸아민, 디메틸(tert-부틸)아민, N-에틸피롤리딘, N-메틸피페리딘, 헥사메틸렌테트라민, 디메틸피페라진, N,N,N',N'-테트라메틸디아미노메탄, 디메틸펜틸아민, 메틸에틸부틸아민, 디에틸아민, 디프로필메틸아민, N-프로필피롤리딘, N-에틸피페리딘, 디메틸헥실아민, 메틸에틸펜틸아민, 디에틸부틸아민, 디프로필에틸아민, N-부틸피롤리딘, N-프로필피페리딘, 디에틸피페라진, 디메틸헵틸아민, 메틸에틸헥실아민, 디에틸펜틸아민, 트리프로필아민, N-펜틸피롤리딘, N-부틸피페리딘, 디메틸옥틸아민, 메틸에틸헵틸아민, 디에틸헥실아민, 에틸프로필펜틸아민, 디프로필부틸아민, N-펜틸피페리딘 및 에틸디이소프로필아민으로 이루어진 군으로부터 선택된 1 종 이상인 것을 특징으로 하는,

수탁번호 KCTC13940BP로 수탁된, 수산물의 이취 저감 및 저장성 연장 효과를 갖는 페디오코쿠스 스틸레시 (*Pediococcus stilesii*, *P.stilesii*) 균주.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 균주는 트리메틸아민(TMA)의 함량을 감소시키거나 트리메틸아민(TMA)의 생성을 억제하는 것을 특징으로 하는,

수탁번호 KCTC13940BP로 수탁된, 수산물의 이취 저감 및 저장성 연장 효과를 갖는 페디오코쿠스 스틸레시 (*Pediococcus stilesii*, *P.stilesii*) 균주.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 수산물은 수산 식물, 어류 및 수산 동물로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나인 것을 특징으로 하는,

수산물의 이취 저감 및 저장성 연장 효과를 갖는 페디오코쿠스 스틸레시(*Pediococcus stilesii*, *P.stilesii*) 균주.

청구항 6

제1항에 있어서,

상기 페디오코쿠스 스틸레시 균주는 서열번호 1의 염기서열을 포함하는 16S rDNA를 갖는 것을 특징으로 하는,

수탁번호 KCTC13940BP로 수탁된, 수산물의 이취 저감 및 저장성 연장 효과를 갖는 페디오코쿠스 스틸레시(*Pediococcus stilesii*, *P.stilesii*) 균주.

청구항 7

수탁번호 KCTC13940BP로 수탁된, 수산물의 이취 저감 및 저장성 연장 효과를 갖는 페디오코쿠스 스틸레시(*Pediococcus stilesii*, *P.stilesii*) 균주; 상기 균주의 파쇄물; 상기 균주의 발효물; 상기 균주의 배양액; 상기 배양액의 농축물; 상기 배양액의 건조물 및 상기 배양액의 분획물로 이루어지는 균으로부터 선택되는 1 종 이상을 유효성분으로 포함하는, 수산물의 이취 저감 및 저장성 연장용 조성물.

청구항 8

수탁번호 KCTC13940BP로 수탁된, 수산물의 이취 저감 및 저장성 연장 효과를 갖는 페디오코쿠스 스틸레시(*Pediococcus stilesii*, *P.stilesii*) 균주; 상기 균주의 파쇄물; 상기 균주의 발효물; 상기 균주의 배양액; 상기 배양액의 농축물; 상기 배양액의 건조물 및 상기 배양액의 분획물로 이루어지는 균으로부터 선택되는 1 종 이상을 유효성분으로 포함하는, 식품 첨가제 조성물.

청구항 9

제7항의 수산물의 이취 저감 및 저장성 연장용 조성물을 수산물에 처리하는 단계를 포함하는, 수산물의 이취 저감 및 저장성 연장 방법.

청구항 10

제7항의 수산물의 이취 저감 및 저장성 연장용 조성물을 유효성분으로 포함하는, 수산물 사료 첨가제.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 페디오코쿠스 스틸레시(*Pediococcus stilesii*) 신규 분리주 및 이의 용도에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 어류는 축육과 달리 지방산 조성이 우수하여 성인병에 시달리는 현대인에게는 우수한 보건 기능성 식품이나 특유의 이취인 비린내로 인하여 다양한 소비자의 기능성을 만족시키지 못하고 이로부터 소비가 저하되고 있는 실정이다.

[0004] 특히, TMA(trimethylamine)는 어류의 비린내 성분으로서, 신선한 어류의 체액 중의 TMAO(trimethylamine oxide)가 어류의 사후 선도 저하와 함께 세균의 환원작용에 의해 생성된다.

[0005] 일반적으로 알려져 있는 어류 비린내 제거 방법은 식초를 첨가하는 방법인데 이는 약한 비린내를 없앨 수 있을 뿐, 그 효과가 지속적이지 못하고, 식초 특유의 냄새로 인해 사용량이 제한적이라는 단점이 있다.

- [0006] 즉, 적은 양의 트리메틸아민(TMA)의 제거에는 효과적이거나, 많은 양의 트리메틸아민(TMA)의 제거에는 그다지 효과적이지 못하며, 유통기간이 장기간 지속되는 어류의 저장시에는 더욱 효과를 기대하기 어려운 단점이 있다.
- [0007] 최근 상기와 같은 문제를 해결하기 위하여, 다양한 시도가 있었으나, 종래의 생선 및 육류의 냄새 제거용 조성물들은 장기 저장시에는 그 효과가 떨어지고, 조성물의 냄새가 어류 및 육류에 베어 있다는 문제점이 있었다.
- [0008] 또한, 종래 기술은 많은 처리 과정을 포함하고 있고 복잡하며 많은 재료가 첨가되면서 원가를 상승시켜서 실제 공정에서 적용될 가능성이 크지 않다는 문제점을 내포하고 있다.
- [0009] 또한, 기존의 연구들은 활성탄(activated charcoal), 제올라이트(zeolite), 셀룰로오스(cellulose) 등 다공성 물질들에 시료를 통과시키거나 반응시킨 후 TMA 감소 효과에 대하여 보고하였으나, 고체성 시료에 대해서는 효과적이지 못했다.
- [0010] 즉, 비린내 제거에 효과적인 물질을 찾기 위해 다양한 방법들에 대한 연구도 보고되고 있으나, 실제 효과를 얻기에는 한계가 있음이 확인되었다.
- [0011] 더욱이, 인체에 독성 또는 위험성 없이 사용할 수 있는 천연물 내지 천연 소재를 이용한 비린내 제거용 친환경 제제에 대해서는 개발된 바가 없다.
- [0012] 따라서, 어류가 갖는 비린내를 효과적으로 제거하면서도 어류의 고유한 맛 및 영양소를 파괴하지 않도록 하는 처리 및 제조 공정의 개발이 요구되고 있는 실정이다.
- [0013] 한편, 유산균은 글루코스 1분자당 생산해내는 유기산이 50%가 넘는 균주를 통칭하며, 흔히 장내에 유익한 효과를 가져오는 프로바이오틱스(probiotics)로써 활용되어왔다. 또한, 다양한 발효식품으로부터 분리되고 연구되어 왔으며, 다양한 유기산 생성으로 인해 유해균 성장 저해, 장내 환경의 개선, 풍미 증진 등 다양한 역할을 하고 있다.
- [0014] 유산균이 생성하는 유기산은 종류도 매우 다양하며 배양 종료 시 배양액의 pH가 약 4.0 수준으로 많은 양을 생성한다.
- [0015] 따라서, 이러한 유산균이 생성한 유기산 외 대사물질을 이용하는 경우, 수산물의 이취, 특히, 비린내 발생의 주요물질인 TMA를 제어할 수 있을 것으로 예상된다.

선행기술문헌

특허문헌

- [0017] (특허문헌 0001) 한국등록특허공보 제0291089호
(특허문헌 0002) 한국공개특허공보 제2001-0099234호

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0018] 이러한 상황 하에서, 본 발명자들은 현재 사용되고 있는 비린내 제거 방법의 문제점을 극복하면서, 어류로부터 비린내의 원인물질을 근본적으로 제거하여, 소비자의 기호성을 향상시키고, 대중화시킬 수 있는 안전한 친환경적인 방법을 개발하고자 노력하였다. 그 결과, 본 발명자들은 국내 전통 발효 식품으로부터 신규한 유산균주인 *P. stilesii* SKD11를 분리 및 동정하였고, 이의 배양액이, 다량의 유기산을 생성하여 수산물 비린내 발생의 주요물질인 TMA의 함량을 감소시켜 비린내 제거에 매우 효과적일 뿐만 아니라, 수산물 중 특히 어류의 저장성을 개선하여 유통 기한을 연장시키는 효과가 있음을 규명함으로써, 본 발명을 완성하였다.
- [0019] 따라서, 본 발명의 일 목적은 수탁번호 KCTC13940BP로 수탁된, 수산물의 이취 저감 및 저장성 연장 효과를 갖는 신규한 페디오코쿠스 스틸레시(*Pediococcus stilesii*, *P. stilesii*) 균주 또는 이의 배양액을 제공하는 데 있다.
- [0020] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 균주; 상기 균주의 파쇄물; 상기 균주의 발효물; 상기 균주의 배양액; 상기 배양액의 농축물; 상기 배양액의 건조물 및 상기 배양액의 분획물로 이루어지는 군으로부터 선택되는 1 종 이상을 유효성분으로 포함하는, 수산물의 이취 저감 및 저장성 연장용 조성물을 제공하는 데 있다.

- [0021] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 균주; 상기 균주의 파쇄물; 상기 균주의 발효물; 상기 균주의 배양액; 상기 배양액의 농축물; 상기 배양액의 건조물 및 상기 배양액의 분획물로 이루어지는 군으로부터 선택되는 1 종 이상을 유효성분으로 포함하는, 식품 첨가제 조성물을 제공하는 데 있다.
- [0022] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 수산물의 이취 저감 및 저장성 연장용 조성물을 수산물에 처리하는 단계를 포함하는, 수산물의 이취 저감 및 저장성 연장 방법을 제공하는 데 있다.
- [0023] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 수산물의 이취 저감 및 저장성 연장용 조성물을 유효성분으로 포함하는, 수산물 사료 첨가제를 제공하는 데 있다.
- [0025] 본 발명의 다른 목적 및 이점은 하기의 발명의 상세한 설명 및 청구범위에 의해 보다 명확하게 된다.

과제의 해결 수단

- [0027] 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.
- [0028] 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.
- [0030] 이하, 본 발명을 상세하게 설명한다.
- [0031] 본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명은 수탁번호 KCTC 13940BP로 수탁된, 수산물의 이취 저감 및 저장성 연장 효과를 갖는 페디오코쿠스 스틸레시(*Pediococcus stilesii*, *P. stilesii*) 균주 또는 이의 배양액을 제공한다.
- [0032] 본 발명의 페디오코쿠스 스틸레시(*Pediococcus stilesii*, *P. stilesii*) 균주는, 국내 발효 수산 식품에서 분리해 낸 유산균주로서 신규한 페디오코쿠스 스틸레시 균주인 것으로 본 발명자에 의해 규명된 바, SKD11로 명명하고 KCTC에 2019년 09월 05일자로 기탁하여, 수탁번호 KCTC13940BP를 부여받았다.
- [0033] 또한, 상기 페디오코쿠스 스틸레시 균주는 서열번호 1의 염기서열을 포함하는 16S rDNA를 갖는다.
- [0034] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 상기 이취는 아민계 화합물에 의해 발생하는 비린내이다.
- [0035] 상기 아민계 화합물은 아민기(NH₂)를 포함하는 화합물을 의미하며, 트리메틸아민(TMA), 피페리딘(Piperidine), N-메틸아지리딘, 디메틸에틸아민 (DMEA), N-메틸아제티딘, N-에틸아지리딘, 디에틸메틸아민 (DEMA), 디메틸이소프로필아민 (DMIPA), 디메틸(n-프로필)아민(DMPA), N-(n-프로필)아지리딘, N-이소프로필아지리딘, N-에틸아제티딘, N-메틸피롤리딘, N,N,N',N'-테트라메틸디아미노메탄, 트리에틸아민(TEA), 메틸에틸(n-프로필)아민, 메틸에틸이소프로필아민, 디메틸(n-부틸)아민, 디메틸(sec-부틸)아민, 디메틸이소부틸아민, 디메틸(tert-부틸)아민, N-에틸피롤리딘, N-메틸피페리딘, 헥사메틸렌테트라민, 디메틸피페라진, N,N,N',N'-테트라메틸디아미노에탄, 디메틸펜틸아민, 메틸에틸부틸아민, 디에틸아민, 디프로필메틸아민, N-프로필피롤리딘, N-에틸피페리딘, 디메틸헥실아민, 메틸에틸펜틸아민, 디에틸부틸아민, 디프로필에틸아민, N-부틸피롤리딘, N-프로필피페리딘, 디에틸피페라진, 디메틸헵틸아민, 메틸에틸헥실아민, 디에틸펜틸아민, 트리프로필아민, N-펜틸피롤리딘, N-부틸피페리딘, 디메틸옥틸아민, 메틸에틸헵틸아민, 디에틸헥실아민, 에틸프로필펜틸아민, 디프로필부틸아민, N-펜틸피페리딘 및 에틸디이소프로필아민으로 이루어진 군으로부터 선택된 1 종 이상일 수 있으나, 본 발명의 페디오코쿠스 스틸레시(*Pediococcus stilesii*, *P. stilesii*) 균주 또는 이의 배양액이 이취 저감 및 저장성 연장 효과를 달성하는 한, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0036] 본 발명에서는, 바람직하게는 트리메틸아민(TMA) 또는 피페리딘(Piperidine)이고, 가장 바람직하게는 트리메틸아민(TMA)이다.
- [0037] 일 실시예에서, 본 발명의 균주 또는 이의 배양액은 트리메틸아민(TMA)의 함량을 감소시키거나 트리메틸아민(TMA)의 생성을 억제시킨다.

- [0038] 본 발명의 목적 대상은 수산물로서, 상기 수산물은 수산 식물, 어류 및 수산 동물로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나이나, 본 발명의 페디오코쿠스 스틸레시(*Pediococcus stilesii*, *P.stilesii*) 균주 또는 이의 배양액이 이취 저감 및 저장성 연장 효과를 달성하는 한, 어떠한 종류의 수산물에도 적용할 수 있으며, 본 발명에서는, 바람직하게는 어류이다.
- [0039] 상기 수산 식물은 예컨대, 김, 파래, 다시마 및 미역 등을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0040] 상기 어류는 예컨대, 갈치, 붕어, 고등어 및 연어 등을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0041] 상기 수산 동물은 예컨대, 조개, 게 및 고래 등을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0042] 본 발명의 신규 유산균주인 페디오코쿠스 스틸레시(*Pediococcus stilesii*, *P.stilesii*) 균주는 높은 유기산 생성 능력을 가지면서 TMA 억제능이 높은 균학적 특징을 나타낸다.
- [0043] 즉, 본 발명은 본 발명의 신규 유산균주인 페디오코쿠스 스틸레시(*Pediococcus stilesii*, *P.stilesii*) 균주 또는 이의 배양액을 목적 대상인 수산물에 처리하는 경우, 상술한 균학적 특징에 의해 수산물의 소비자 기호를 해치는 요인 중 가장 높은 비율을 차지하는 비린내의 주요 발생 물질인 TMA의 함량을 탁월하게 감소시켜 비린내를 효과적으로 제거할 뿐만 아니라, TMA의 생성을 억제시켜 저장성을 개선시킴으로써, 유통 기한을 연장시키는 우수한 효과를 발휘하는 것을 최초로 규명하였다.
- [0044] 또한, 이러한 본 발명의 유산균주인 페디오코쿠스 스틸레시(*Pediococcus stilesii*, *P.stilesii*) 균주 또는 이의 배양액은 기존의 액체 시료에만 해당되던 비린내 제거 기술들의 단점을 보완하였으므로, 고체 시료(생선, 어패류 등 대부분의 수산물)에도 적용 가능하다.
- [0045] 또한, 본 발명은 열처리 단계를 거치지 않기 때문에 수산물 원형 그대로 처리가 가능하며 대부분의 수산물에 적용 가능한 액상으로 액상-액상(liquid-liquid) 및 액상-고상(liquid-solid)으로도 반응이 가능한 장점을 가진다.
- [0047] 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 상층액을 물리적 방법으로 여과한 것도 포함할 수 있다.
- [0048] 본 발명의 일 구현예에서, 상기 배양 배지는 MRS 배지이며, 상기 MRS 배지는 유산균의 배양을 위해 개발된 배지로서, 예컨대 배지 조성물 총 중량에 대해 Glucose 2%, Peptone 2%, Yeast extract 0.5%, Sodium Acetate 0.5%, Potassium Phosphate dibasic 0.2%, Ammonium Sulfate 0.2%, Magnesium Sulfate 0.1%, Manganese Sulfate 0.005% 및 Tween80 0.1%를 포함하는 것일 수 있다.
- [0049] 예시적인 일 구현예에서, 상기 배양은 16 내지 72 시간 동안 실시하는 것일 수 있다. 다른 측면에서, 상기 배양은 16 시간 이상, 20 시간 이상, 25 시간 이상, 30 시간 이상, 35 시간 이상, 40 시간 이상, 45 시간 이상, 50시간 이상, 55 시간 이상, 60 시간 이상 또는 65 시간 이상이면서 72 시간 이하, 70 시간 이하, 65 시간 이하, 60 시간 이하, 55 시간 이하, 50 시간 이하, 45 시간 이하, 40 시간 이하, 35 시간 이하, 30 시간 이하, 25 시간 이하 또는 20 시간 이하 동안 실시하는 것일 수 있다.
- [0051] 또한, 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은, 수탁번호 KCTC13940BP로 수탁된, 수산물의 이취 저감 및 저장성 연장 효과를 갖는 페디오코쿠스 스틸레시(*Pediococcus stilesii*, *P.stilesii*) 균주; 상기 균주의 파쇄물; 상기 균주의 발효물; 상기 균주의 배양액; 상기 배양액의 농축물; 상기 배양액의 건조물 및 상기 배양액의 분획물로 이루어지는 군으로부터 선택되는 1 종 이상을 유효성분으로 포함하는, 수산물의 이취 저감 및 저장성 연장용 조성물; 및 이를 수산물에 처리하는 단계를 포함하는 수산물의 이취 저감 및 저장성 연장 방법을 제공한다.
- [0052] 바람직하게는 상기 조성물은 유효성분으로 페디오코쿠스 스틸레시(*Pediococcus stilesii*, *P.stilesii*) 균주; 상기 균주의 파쇄물; 상기 균주의 발효물; 상기 균주의 배양액; 상기 배양액의 농축물; 상기 배양액의 건조물 및 상기 배양액의 분획물로 이루어지는 군으로부터 선택되는 1 종 이상을 포함하나, 보다 바람직하게는 상기 균주의 배양액, 상기 배양액의 농축물 및 상기 배양액의 건조물로 이루어지는 군으로부터 선택되는 1 종 이상이며, 가장 바람직하게는 상기 균주의 배양액이다.
- [0053] 상기 배양액의 분획물은 헥산, 에틸아세테이트, 부탄올 및 물로 구성되는 군에서 선택된 어느 하나 이상을 용매로 사용하여 분획된 또는 흡착제를 사용한 컬럼을 사용하여 분획된 것이다.

- [0054] 상기 컬럼에 이용될 수 있는 흡착제는 스티렌-디비닐벤젠, 실리카겔, 세파텍스, RP-18, 폴리아미드, 도요펄(Toyopearl) 및 XAD 수지를 포함하는 그룹으로부터 선택될 수 있다.
- [0055] 본 명세서에서 사용되는 용어 "유효성분으로 포함하는"이란, 본 발명의 균주; 상기 균주의 파쇄물; 상기 균주의 발효물; 상기 균주의 배양액; 상기 배양액의 농축물; 상기 배양액의 건조물 및 상기 배양액의 분획물로 이루어지는 군으로부터 선택되는 1 종 이상이 그 효능 또는 활성을 달성하는 데 충분한 양으로 포함되는 것을 의미한다.
- [0056] 본 발명의 조성물의 유효성분은 천연 발효 식품으로부터 분리한 유산균 균주 또는 이의 파쇄물; 이의 발효물; 이의 배양액; 상기 배양액의 농축물; 상기 배양액의 건조물 및 상기 배양액의 분획물인바, 과량 투여하여도 대상에 부작용이 없으므로 본 발명의 조성물에 포함된 양적 상한은 당업자가 적절한 범위 내에서 선택하여 실시할 수 있다.
- [0057] 또한, 상기 처리는 조성물을 대상인 수산물에 직접 도포하거나, 수산물이 자라고 있는 주거지에 도포하거나 수산물의 배양용 매개체에 도포하는 간접 살포일 수 있다.
- [0058] 처리량은 처리할 대상 수산물의 종류, 수산물의 가공 제형 형태, 처리 기간, 기후 조건 등에 따라 변화할 수 있다.
- [0060] 또한, 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 수탁번호 KCTC13940BP로 수탁된, 수산물의 이취 저감 및 저장성 연장 효과를 갖는 페디오코쿠스 스티레스시(*Pediococcus stilesii*, *P.stilesii*) 균주; 상기 균주의 파쇄물; 상기 균주의 발효물; 상기 균주의 배양액; 상기 배양액의 농축물; 상기 배양액의 건조물 및 상기 배양액의 분획물로 이루어지는 군으로부터 선택되는 1 종 이상을 유효성분으로 포함하는 식품 첨가제 조성물을 제공한다.
- [0061] 상기 식품 첨가제 조성물은 용액, 분말, 현탁액, 분산액, 에멀전, 유성 분산액, 페이스트, 과립제 또는 정제 형태로 제조할 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다.
- [0062] 예컨대, 상기 식품은 식물성 발효유, 유제품, 발효 음료 또는 발효 식품일 수 있다.
- [0064] 또한, 본 발명의 또 다른 양태에 따르면, 본 발명은 수탁번호 KCTC13940BP로 수탁된, 수산물의 이취 저감 및 저장성 연장 효과를 갖는 페디오코쿠스 스티레스시(*Pediococcus stilesii*, *P.stilesii*) 균주; 상기 균주의 파쇄물; 상기 균주의 발효물; 상기 균주의 배양액; 상기 배양액의 농축물; 상기 배양액의 건조물 및 상기 배양액의 분획물로 이루어지는 군으로부터 선택되는 1 종 이상을 유효성분으로 포함하는, 수산물의 이취 저감 및 저장성 연장용 조성물을 유효성분으로 포함하는 수산물 사료 첨가제를 제공한다.
- [0065] 본 발명의 상기 사료 첨가제는 상술한 본 발명의 균주; 상기 균주의 파쇄물; 상기 균주의 발효물; 상기 균주의 배양액; 상기 배양액의 농축물; 상기 배양액의 건조물 또는 상기 배양액의 분획물을 유효성분으로 포함하여, 비린내 제거 및 저장성 개선 효과 뿐만 아니라, 안전하므로 이를 사료 첨가제로 사용할 경우 수산물 품질 증상에 기여할 수 있다.
- [0066] 본 발명의 상기 사료 첨가제는 상술한 본 발명의 균주; 상기 균주의 파쇄물; 상기 균주의 발효물; 상기 균주의 배양액; 상기 배양액의 농축물; 상기 배양액의 건조물 또는 상기 배양액의 분획물을 원형 그대로 사용하거나 또는 추가적으로 수산물에 허용되는 곡류 및 그 부산물 등의 공지된 담체, 안정제 등을 가할 수 있으며, 필요에 따라 구연산, 후발산, 아디픽산, 젖산, 사과산 등의 유기산이나 인산나트륨, 인산칼륨, 산성 피로인산염, 폴리인산염(중합인산염) 등의 인산염이나, 폴리페놀, 카테킨, 알파-토코페롤, 로즈마리 추출물, 비타민 C, 녹차 추출물, 감초 추출물, 키토산, 탄닌산, 피틴산 등의 천연 항산화제, 향생물질, 향균제 및 기타의 첨가제 등을 가할 수도 있으며, 그 형상으로는 분체, 과립, 펠릿, 현탁액 등의 적당한 상태일 수 있으며, 상기 사료첨가제를 공급하는 경우는 수산물에 대하여 단독으로 또는 사료에 혼합하여 공급할 수 있다.
- [0067] 본 발명의 사료 첨가제는 상술한 본 발명의 균주; 상기 균주의 파쇄물; 상기 균주의 발효물; 상기 균주의 배양액; 상기 배양액의 농축물; 상기 배양액의 건조물 또는 상기 배양액의 분획물을 포함하므로, 중복된 내용은 본 명세서의 과도한 복잡성을 피하기 위하여 그 기재를 생략한다.

발명의 효과

- [0069] 본 발명의 수탁번호 KCTC13940BP로 수탁된, 수산물의 이취 저감 및 저장성 연장 효과를 갖는 페디오코쿠스 스티레스시(*Pediococcus stilesii*, *P.stilesii*) 균주 또는 이의 배양액은, 수산물로부터 비린내를 근본적으로 제거하여 소비자의 기호성을 향상시키고, 대중화시킬 수 있으며, 저장성이 연장되어 이로부터 생산성을 향상시킬 수

있을 뿐만 아니라, 온도(계절)에 관계없이 연중 균일하게 생산품질을 유지할 수 있어 경제성이 우수하며, 맛, 영양, 및 조직감이 유지된 고영양가의 수산물을 제공할 수 있다.

도면의 간단한 설명

도 1은 갈치 육 부분을 포를 뜬 후 본 발명의 유산균주 SKD11 배양액에 침지한 후 25℃(도 1a) 및 4℃(도 1b)에서 저장하는 동안의 TMA 수준을 정량한 결과를 보여준다.

(●: 갈치 육 부분을 아무 처리 없이 저장한 무 처리군; 및 ○ SKD11 균주 배양액 처리를 한 실험군)

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

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.

실시예 1. 본 발명의 신규한 유산균주(*Pediococcus stilesii* SKD11)의 분리 및 선별

본 발명자들은 신규한 유산균주인 페디오코쿠스 스틸레시 분리주(*Pediococcus stilesii* SKD11)를 획득하기 위하여, 다음과 같이 국내 전통 발효 식품(메주, 막걸리, 누룩 및 김치)으로부터 분리하였다:

다양한 발효식품을 회식한 후 Bromo cresol purple agar (plate count agar with 0.006% bromo cresol purple)에 접종하여 30℃에서 48시간까지 배양한 후 노란색으로 변한 집락을 선별하였다. 총 15 개의 집락을 분리하였으며 이들 배양액을 TMA 0.3% 용액과 반응하여 TMA를 감소시키는 활성이 높은 3 개의 균주를 1차로 선별하였으며, 상기 선별된 3 개 균주를 각각 SKD 1, 11, 및 15번으로 번호를 부여하였다.

또한, 이들 분리균주들이 유기산을 다량 생성한다는 것을 확인하기 위하여, 상기 균주들을 배양한 후 배양액 내 pH를 측정하였다. 이때, 대조군으로 MRS 배지를 이용하였다.

그 결과, 하기 표 1에 나타난 바와 같이, 상기 균주들은 대조군에 비해 pH가 현저히 감소된 것을 확인하였으며, 이는 상기 균주들이 유산균주로서 유기산을 생성한다는 것을 입증한다.

표 1

시료	pH
Control	6.5
SKD 1	4.0
SKD 11	3.9
SKD 15	4.1

상기와 같이 분리된 유산균 중 탁월한 TMA 제거능을 보유한 유산균을 선별하기 위해, TMA 제거능을 확인할 수 있는 있도록, 인위적으로 부패시킨 갈치시료 1g과 각 분리된 유산균주 배양액 4mL를 반응시킨 후 TMA 수준을 정량하였다.

이때, 대조군으로 부패시킨 갈치 시료를 사용하였다.

표 2

시료	TMA (mg/L)	감소 효율(Reduction efficiency)(%)	Gene Bank accession No.
Control	384 [±] 33 ^{a*}	100	-
SKD 1	212 [±] 6 ^b	45	MK785052
SKD 11	152 [±] 16 ^d	60	MK758076
SKD 15	185 [±] 9 ^c	52	MK758083

* 값은 세 번 반복한 평균 ± SD로 표시된다. 다른 문자로 표시된 데이터는 P < 0.05에서 유의한 차이를

나타낸다.

- [0088] 그 결과, 상기 표 2에 나타난 바와 같이, 이들 중 가장 높은 TMA 제거율을 나타낸 SKD 11을 최종적으로 선정하였다.
- [0090] 또한, 상기 최종적으로 선별한 균주는, 16S rRNA를 코딩하는 DNA 염기서열(16S rDNA; 서열번호 1)을 기반으로 하여 동정하였으며, 프라이머 27F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG -3'), 1492R (5'-TACGGYTACCT TGTACGTACTT-3')를 이용하여 PCR로 증폭한 후 시퀀싱을 실시하여 NCBI GenBank와 Basic local alignment search tool(Blast, NCBI)을 통해 본 발명의 선별된 분리 균주가 페디오코쿠스 스틸레시(*Pediococcus stilesii*)에 속하는 유산균주임을 확인하였다.
- [0091] 상기 결과들에 의해, 본 명세서에 따른 유산균은 페디오코쿠스 스틸레시 (Gene Bank accession No. MK758076)와 근접한 균주로 동정이 되나, 상기 균주와는 서열 상 차이가 존재하는 상이한 균주임을 확인하였다.
- [0092] 이에, 본 발명자들은 상기 분리한 페디오코쿠스 스틸레시(*Pediococcus stilesii*) 균주를 SKD11로 명명하고 KCTC에 2019년 09월 05일자로 기탁하여, 수탁번호 KCTC13940BP를 부여받았다.
- [0093] 따라서, 본 발명의 균주인 페디오코쿠스 스틸레시(*Pediococcus stilesii*) SKD11는, 공시균주와 비교하였을 때 염기서열 상 차이가 존재하는 것으로 밝혀진 신규 균주이며, 상기 균주는 탁월하게 유기산을 생성하고 TMA 제거능을 나타내는 균학적 특징이 발휘되므로, 균주 자체뿐만 아니라 이의 배양 대사물으로써 수산식품의 비린내를 제거할 수 있다.
- [0095] **실시예 2. 본 발명의 신규한 유산균주(*Pediococcus stilesii* SKD11) 배양액의 효능 확인**
- [0096] **2-1. *P. stilesii* SKD11 배양액의 TMA 제거능**
- [0097] 본 발명자들은 상기 실시예 1에서 분리된 본 발명의 신규한 균주인 페디오코쿠스 스틸레시(*Pediococcus stilesii*, *P. stilesii*) SKD11의 균학적 특징으로서 TMA 제거능을 입증하고자, 상기 *P. stilesii* SKD11를 배양하여, 상기 배양액(SKD11)과 TMA 시약을 지정 시간 동안 반응시킨 후 GC-FID-SPME를 사용하여 잔여 TMA를 정량함으로써, 본 발명의 균주 배양액에 의한 TMA 감소 수준을 분석하였다.
- [0098] 구체적으로, 먼저, 상기 실시예 1에서 동정된 *P. stilesii* SKD11를 MRS 배지(de Man Rogosa and Sharpe agar)에 접종하여 37℃ 인큐베이터에서 약 10^9 CFU/mL로 배양하였다. 이후 *P. stilesii* SKD11 세포와 상기 세포가 생산한 유기산을 포함하고 있는 배양액을 0.2 μ m 멤브레인 필터를 이용하여 정제한 후 TMA와 반응시켰다.
- [0099] 반응은 상기 배양액 배지 4mL에 TMA 최종농도 0.3%를 첨가한 후 GC-SPME 분석을 실시하여 TMA를 정량하였다. 본 반응은 22mL 투명 유리 바이얼(clear glass vial, polytetrafluoroethylene(PTFE)-silicon septa and open top phenolic caps) 내에서 수행되었다.
- [0100] 이때, 본 정량 분석에 사용된 TMA는 표준시약으로써 JUNSEI CO.의 30% TMA solution (dissolved in water)을 사용하였다. TMA 시약을 이용한 모든 실험은 TMA 최종 농도 0.3%(v/v)를 사용하였다.
- [0101] 또한, 정량분석에 사용한 장비는 GC(Gas chromatography)-FID(Flame ionization detector, Agilent technologies 6890N)를 사용하였으며 TMA 추출을 위하여 SPME(solid phase micro extraction)(assemblies and fiber holder 포함, needle size는 24ga, Supelco CO.)를 사용하였다. GC 컬럼은 HP-5 column (30m*0.320mm id, 0.25 μ m)를 사용하였고, 디텍터(detector) 및 인젝터(injector) 온도는 250℃에 split less mode를 이용하였다.
- [0102] carrier gas로 nitrogen을 30mL/min, hydrogen gas 25mL/min, air 300mL/min으로 설정하였다. oven 온도는 5분간 50℃에서 홀딩 후, 150℃까지 10℃/min으로 상승시켰으며 마지막 스텝으로 15분간 150℃에서 홀딩하였다. post run condition은 5분간 250℃로 진행하여 컬럼 세척에 사용하였다.
- [0103] 또한, TMA 정량을 위하여 70℃에서 20분간 200rpm으로 교반하며 SPME fiber에 TMA를 최대 수율로 흡착시켰으며 최대한 흡착 후 인젝터에 직접 주입하였다.
- [0104] 그 결과, 하기 표 3에 나타난 바와 같이, SKD11 배양액과 TMA 시약(JUNSEI CO., JAPAN) 0.3%(final conc.)를 반응시킨 후 GC-FID-SPME를 사용하여 TMA를 정량했을 때, 5시간 이후부터 비린내의 원인 물질로 알려진 TMA가 현저하게 감소되는 것을 확인할 수 있었다.
- [0105] 따라서, 본 발명의 유산균주인 페디오코쿠스 스틸레시(*Pediococcus stilesii*, *P. stilesii*) SKD11 배양액

(*P.stilesii* SKD11 Cell-free culture)이 TMA를 탁월하게 제거할 수 있다는 것을 다시 한번 입증하였다.

표 3

시료	TMA 제거 효율 (mg/L)		TMA 제거 비율(%)	
	5h 반응	24h 반응	5h 반응	24h 반응
대조군	1621.86±23.43	1469.04±23.73	-	-
SKD11	152.06±3.00	151.33±3.63	90.62	89.86

2-2. 실제 부패된 생선 시료에서의 *P.stilesii* SKD11 배양액에 의한 비린내 감소 효과

또한, 본 발명자들은 상기 배양액(*P.stilesii* SKD11 Cell-free culture)에 갈치를 침지한 후 지정된 저장 기간 동안의 갈치 내 TMA 수준을 측정함으로써, 본 발명의 배양액에 의한 TMA 감소 효과를 확인하였다.

보다 구체적으로, 정제된 TMA 시약이 아닌 실질적으로 수산식품에서 발생하는 TMA과 반응을 확인하기 위하여 부패한 생선 시료를 제조하였다. 상기 생선 시료로서 갈치를 인위적으로 부패시키기 위하여 균질화(homogenizer)하여 페이스트(paste) 형태로 25℃ 인큐베이터에서 48시간 이상 배양하여 제조하였다.

상기 제조한 부패된 갈치(spoiled ribbon fish) 시료 1g과 본 발명의 유산균 배양액(*P.stilesii* SKD11 Cell-free culture) 4 mL를 혼합한 후 상기 실시예 2-1에 기재된 방법을 이용하여 TMA를 정량하였다.

이때, 부패한 갈치 시료의 TMA를 측정한 결과값을 대조군으로 표시하였고, 부패한 갈치 시료와 SKD11 균주 배양액을 혼합 후 TMA를 정량한 결과값을 SKD11 결과값으로 표시하였다.

그 결과, 하기 표 4에 나타낸 바와 같이, 대조군에 비해 TMA가 현저하게 감소되는 것을 확인할 수 있었다.

따라서, 본 발명의 유산균주인 페디오코쿠스 스틸레시(*Pediococcus stilesii*, *P.stilesii*) SKD11의 배양액(*P.stilesii* SKD11 Cell-free culture)이 실제 부패된 어류로부터 발생된 TMA를 탁월하게 제거할 수 있다는 것을 입증하였다.

표 4

시료	TMA 함량 (mg/L)	제거 비율(%)
대조군	384±33	-
SKD11	152±16	60

2-3. 실제 생선 필렛에서의 *P.stilesii* SKD11 배양액에 의한 저장성 연장 효과

또한, 본 발명자들은 생선 필렛에 상기 유산균주 SKD11 배양액(*P.stilesii* SKD11 Cell-free culture)에 처리시 저장성 연장 효과를 확인하였다.

보다 구체적으로, 저장성 연장 연구를 위하여 갈치의 내장, 머리, 뼈를 제거한 육 필렛을 준비한 후 유산균주 SKD11 배양액(*P.stilesii* SKD11 Cell-free culture)과 1:3(w/w)으로 혼합한 후 20 분간 침지하였다. 침지 후 10 분간 체에 받쳐 배양액을 제거하여 각각 4℃ 및 25℃에 저장하여 시간별로 TMA를 분석하였다.

그 결과, 도 1a(25℃) 및 도 1b(4℃)에 나타낸 바와 같이, 정상대조군인 무처리군에 비해 25℃ 및 4℃ 모두에서 TMA 함량에 변화없이 TMA가 생성되지 않는 것을 확인할 수 있었다.

따라서, 본 발명의 유산균주인 페디오코쿠스 스틸레시(*Pediococcus stilesii*, *P.stilesii*) SKD11의 배양액(*P.stilesii* SKD11 Cell-free culture)이 온도에 상관없이 실제 어류의 저장성을 탁월하게 연장시킨다는 것을 입증하였다.

현재, 균 배양액의 특성 상 냄새 제거와 관련한 연구는 매우 미미하며 발효를 통하여 풍미증진에 대한 연구가 대부분이다. 본 발명의 신규 유산균이 생성하는 유기산은 종류도 매우 다양하며, 배양 종료 시 배양액의 pH 범위는 약 4.0 수준으로 많은 양의 유기산이 생성되어 있다. 따라서, 이러한 본 발명의 신규 유산균주에 의해 생성된 배양액 내 유기산을 비롯한 대사물질이 TMA의 함량을 감소시킴으로써, 이취 중 특히 어류 비린내 제거 및 산패 감소를 통한 유통기한 연장에 매우 효과적임을 입증하였다.

종합적으로, 본 발명의 유산균주 및/또는 이의 배양액을 수산물 처리에 이용하는 경우, 비린내와 같은 이취를

제거함으로써, 수산 품질 및 위생을 향상시켜, 수산 가공 업계 및 환경산업에서 높은 시장성을 가질 수 있음을 확인하였다.

[0129] 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

[0130]

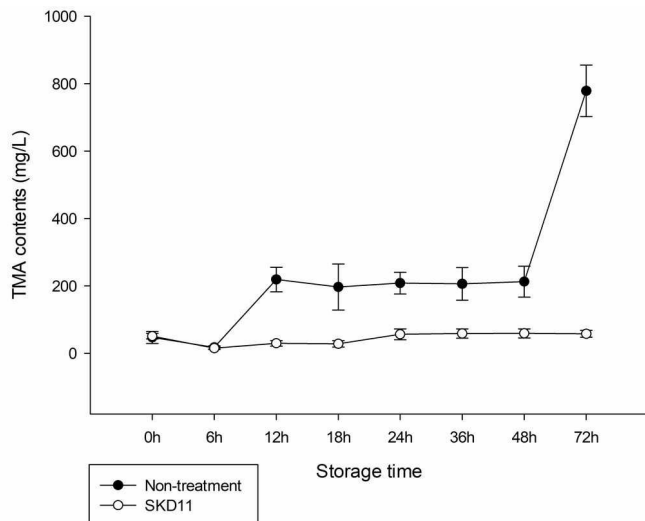
기탁기관명 : 한국생명공학연구원

수탁번호 : KCTC13940BP

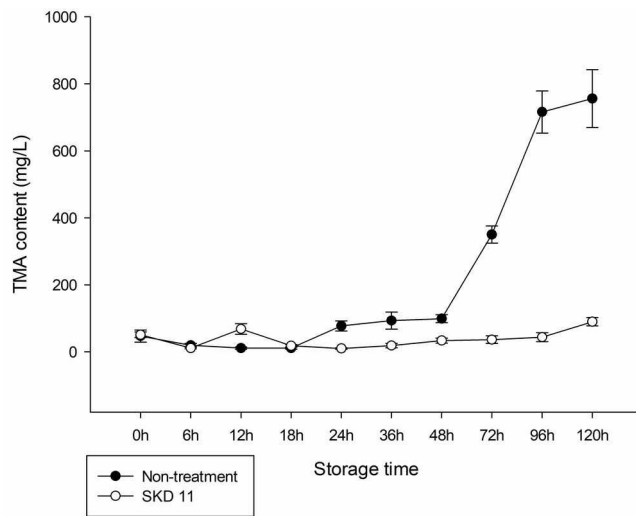
수탁일자 : 20190905

도면

도면1a



도면1b



서열 목록

- <110> Pukyong National University Industry-University Cooperation Foundation
- <120> Novel *Pediococcus stilesii* strain and Uses Thereof
- <130> PKU1-58
- <160> 1
- <170> KoPatentIn 3.0
- <210> 1
- <211> 413
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence
- <220><223> *Pediococcus stilesii*
- <400> 1

aatcttccac aatggacgca agtctgatgg agcaacgccg cgtgagtga gaagggtttc	60
ggctcgtaaa gctctgttgt taaagaagaa cgtgggtgag agtaactgtt caccagtg	120
cggtatttaa ccagaaagcc acggctaact acgtgccagc agccgcggtata acgtaggt	180
ggcaagcgtt atccgattt attgggcgta aagcgagcgc aggcggtctt ttaagtctaa	240
tgtgaaagcc ttccgctcaa ccgaagaagt gcattggaaa ctgggagact tgagtgcaga	300
agaggacagt ggaactccat gtgtagcggg gaaatgcgta gatatatgga agaaccag	360
tggcgaaggc ggctgtctgg tctgtaactg acgtgagggc tcgaaagcat ggg	413