



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2025년04월01일

(11) 등록번호 10-2789394

(24) 등록일자 2025년03월27일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12N 1/20 (2006.01) *A23B 2/783* (2025.01)

A23L 17/00 (2016.01) *C12R 1/01* (2006.01)

(52) CPC특허분류

C12N 1/205 (2021.05)

A23B 2/783 (2025.01)

(21) 출원번호 10-2023-0181840

(22) 출원일자 2023년12월14일

심사청구일자 2023년12월14일

(56) 선행기술조사문헌

KR1020080092090 A*

KR101946777 B1

KR1020130070274 A

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자

국립부경대학교 산학협력단

부산광역시 남구 용소로 45, 부경대학교내 (대연동)

(72) 발명자

김영목

부산광역시 남구 분포로 111, LG 메트로시티 109동 1103호

조두민

경상남도 창원시 의창구 중동로 78, 409동 3703호
(뒷면에 계속)

(74) 대리인

특허법인정진

전체 청구항 수 : 총 5 항

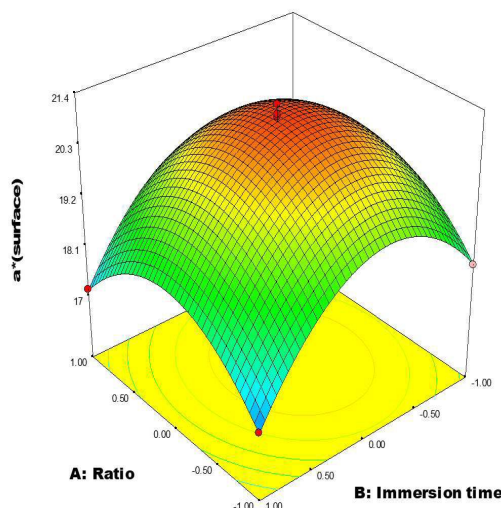
심사관 : 전명숙

(54) 발명의 명칭 류코노스톡 시트리움 신규 분리주 및 이의 용도

(57) 요약

본 발명은 류코노스톡 시트리움 신규 분리주 및 이의 용도에 관한 것으로, 본 발명에 따르면, 본 발명은 적색육 어류의 변색을 방지하는 데 최적의 조건을 도출하기 위해, 반응표면분석법(RSM, response surface methodology)을 이용하여, 본 발명의 신규 류코노스톡 시트리움 균주 또는 이의 배양액의 최적 처리 조건을 확립하였고, 이에 의해, 기호도 및 신선도가 유지되어 생산성을 향상시킬 수 있을 뿐만 아니라, 맛, 영양, 및 조직감이 유지된 고영양가의 수산물을 제공할 수 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A23L 17/00 (2016.08)
A23V 2002/00 (2023.08)
A23V 2200/048 (2013.01)
A23V 2400/315 (2023.08)
C12R 2001/01 (2021.05)

최지선

부산광역시 해운대구 대천로 103번길 47, 113동
1701호

(72) 발명자

송미루

울산광역시 남구 신정로 160번길 27, 하니와루 3층

최지환

경상북도 구미시 박정희로 616, 303동 302호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	2520000026
과제번호	20220319
부처명	해양수산부
과제관리(전문)기관명	해양수산과학기술진흥원
연구사업명	수산식품산업맞춤형기술개발사업
연구과제명	횃감용 적색 어육의 유통 중 변색 및 이취 문제 해결을 위한 현장 맞춤형 유통 품질

향상 기술

과제수행기관명	창원대학교산학협력단
연구기간	2022.04.01 ~ 2024.12.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	2520000235
과제번호	RS-2024-00404977
부처명	해양수산부
과제관리(전문)기관명	해양수산과학기술진흥원
연구사업명	대체해조육 및 수산배양육 기술개발사업
연구과제명	미세조류 기반 대체해조육 상용화 기술개발
과제수행기관명	국립부경대학교 산학협력단
연구기간	2024.01.01 ~ 2028.12.31

공지예외적용 : 있음

명세서

청구범위

청구항 1

수탁번호 KCTC15454BP로 수탁된, 참치의 변색 방지 효과를 갖는 류코노스톡 시트리움(*Leuconostoc citreum*) 균주.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 류코노스톡 시트리움 균주는 서열번호 1의 염기서열을 포함하는 16S rDNA를 갖는 것을 특징으로 하는,

수탁번호 KCTC15454BP로 수탁된, 참치의 변색 방지 효과를 갖는 류코노스톡 시트리움(*Leuconostoc citreum*) 균주.

청구항 3

수탁번호 KCTC15454BP로 수탁된, 참치의 변색 방지 효과를 갖는 류코노스톡 시트리움(*Leuconostoc citreum*) 균주의 배양 여액을 유효성분으로 포함하는, 참치의 변색 방지용 조성물로서,

상기 참치와 상기 배양 여액의 침지시간은 14.1초이고;

상기 참치와 상기 배양 여액의 침지비율은 1:2.98 (w/w)이고;

상기 배양 여액은, 증류수(distilled water)로 상기 류코노스톡 시트리움 균주의 배양액을 1:2.36(v/v)의 비율로 희석하여 여과한 것을 특징으로 하는, 조성물.

청구항 4

수탁번호 KCTC15454BP로 수탁된, 참치의 변색 방지 효과를 갖는 류코노스톡 시트리움(*Leuconostoc citreum*) 균주의 배양 여액을 유효성분으로 포함하는, 식품 보존제 조성물로서,

상기 참치와 상기 배양 여액의 침지시간은 14.1초이고;

상기 참치와 상기 배양 여액의 침지비율은 1:2.98 (w/w)이고;

상기 배양 여액은, 증류수(distilled water)로 상기 류코노스톡 시트리움 균주의 배양액을 1:2.36(v/v)의 비율로 희석하여 여과한 것을 특징으로 하는, 조성물.

청구항 5

다음 단계를 포함하는 참치의 변색 방지 방법:

(a) 참치의 내장을 제거하고 세척한 후 물기를 제거하는 단계; 및

(b) 상기 참치를, 수탁번호 KCTC15454BP로 수탁된, 참치의 변색 방지 효과를 갖는 류코노스톡 시트리움(*Leuconostoc citreum*, *L. citreum*) 균주의 배양 여액을 포함하는 참치의 변색 방지용 조성물에 침지시키는 단계로서,

상기 참치와 상기 배양 여액의 침지시간은 14.1초이고;

상기 참치와 상기 배양 여액의 침지비율은 1:2.98 (w/w)이고;

상기 배양 여액은 증류수(distilled water)로 상기 류코노스톡 시트리움 균주의 배양액을 1:2.36(v/v)의 비율로 희석하여 여과한 것을 특징으로 하는, 방법.

청구항 6

삭제

청구항 7

삭제

청구항 8

삭제

청구항 9

삭제

청구항 10

삭제

청구항 11

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 류코노스톡 시트리움(*Leuconostoc citreum*) 신규 분리주 및 이의 용도에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 적색육 어류는, 색원체의 변이 및 변성이 일어나, 신선도의 지표가 아님에도 불구하고, 소비자에게 부정적인 영향을 미치는 색조로 변색되고, 변색된 유액이 흘러나와 결과적으로 외형 및 풍미를 저하시켜 상업적 가치를 크게 손상시킨다.

[0004] 이러한 적색 어육의 색을 결정하는 것은 미오글로빈(myoglobin)으로, 미오글로빈은 산화 및 환원의 영향을 크게 받는다. 미오글로빈은 산소와 결합 시 옥시미오글로빈(oxy-myoglobin)으로 변하여 육표면을 밝고 붉게 나타내며, 산화할 경우 메트미오글로빈(met-myoglobin)으로 변화하여 육표면을 어둡고 갈색으로 나타낸다.

[0005] 현재, 적색 어육의 변색 방지와 관련된 선행 연구로 숙성을 통해 맛과 식감을 향상하는 연구, 포장 방법을 이용하는 연구 및 합성 항산화제를 이용한 연구가 진행된 바가 있다. 숙성을 이용한 기술은 숙성 시 오랜 시간이 걸리며, 선어에 적용하기 어려운 기술로 기술의 적용 범위가 제한적이다. 포장 방법을 이용한 기술은 변색 방지에 대한 근본적인 원인에 대한 해결책을 제시하지 못한다. 합성 항산화제의 경우, 식품첨가물로 적용 가능한 제품이 제한적이며, 안전성의 문제 및 소비자의 인식으로 인해 제품 적용에 제한적이다.

[0006] 따라서, 이러한 문제점들을 극복하고 유통 중 발생하는 변색을 방지 또는 억제할 수 있는 효과적인 천연 소재를 활용한 방안 마련이 필요하다.

[0007] 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.

[0008] 따라서, 적색 어육의 변색을 방지할 수 있는 천연 소재로서 이러한 유산균 및/또는 이의 배양액을 이용하는 경

우, 적색 어육의 가공 및 유통 중의 질을 높이고, 판매 기간을 연장시켜 높은 시장성을 가질 수 있을 것으로 기대된다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0010] 이러한 상황 하에서, 본 발명자들은 적색육 어류의 유통 중 발생하는 변색을 억제할 수 있는 방법을 개발하고자 노력하였다. 그 결과, 수산식품으로부터 우수한 항산화 활성을 갖는 신규한 유산균주인 류코노스톡 시트리움(*Leuconostoc citreum*) M8을 분리 및 동정하였고, RSM 분석을 통해 상기 균주 배양액에 의한 적색어육의 변색 방지에 대한 최적 조건을 도출하였다. 또한, 이의 통계학적인 유의성을 통해 소비자의 관능 및 기호를 만족시킬 뿐만 아니라, 신선도를 유지할 수 있음을 규명함으로써, 본 발명을 완성하였다.
- [0011] 따라서, 본 발명의 일 목적은 수탁번호 KCTC15454BP로 수탁된, 적색육 어류의 변색 방지 효과를 갖는 신규한 류코노스톡 시트리움(*Leuconostoc citreum*) 균주 또는 이의 배양액을 제공하는 데 있다.
- [0012] 또한, 본 발명의 또 다른 목적은 상기 균주 또는 이의 배양액을 유효성분으로 포함하는, 적색육 어류의 변색 방지용 조성물을 제공하는 데 있다.
- [0013] 또한, 본 발명의 또 다른 목적은 상기 균주 또는 이의 배양액을 유효성분으로 포함하는, 식품 보존제 조성물을 제공하는 데 있다.
- [0014] 또한, 본 발명의 또 다른 목적은 적색육 어류의 변색 방지 방법을 제공하는 데 있다.
- [0016] 본 발명의 다른 목적 및 이점은 하기의 발명의 상세한 설명 및 청구범위에 의해 보다 명확하게 된다.

과제의 해결 수단

- [0018] 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.
- [0019] 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.
- [0021] 이하, 본 발명을 상세하게 설명한다.
- [0023] 본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명은 수탁번호 KCTC15454BP로 수탁된, 적색육 어류의 변색 방지 효과를 갖는 류코노스톡 시트리움(*Leuconostoc citreum*, *L. citreum*) 균주 또는 이의 배양액을 제공한다.
- [0024] 본 발명의 류코노스톡 시트리움(*Leuconostoc citreum*, *L. citreum*) 균주는, 갈치속젓에서 분리해 낸 유산균주로서 신규한 류코노스톡 시트리움 균주인 것으로 본 발명자에 의해 규명된 바, M8로 명명하고 한국생명공학연구원 생물자원센터(Korean Collection for Type Cultures, KCTC)에 2023년 05월 25일자로 기탁하여, 수탁번호 KCTC15454BP를 부여받았다.
- [0025] 상기 류코노스톡 시트리움 균주의 분리 및 배양은 당업계에 공지된 임의의 방법으로 수행할 수 있다.
- [0026] 또한, 상기 류코노스톡 시트리움 균주는 서열번호 1의 염기서열을 포함하는 16S rDNA를 갖는다.
- [0027] 본 발명의 신규 유산균주인 류코노스톡 시트리움(*Leuconostoc citreum*, *L. citreum*) 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 배양여액인 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 제공한 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 류코노스톡 시트리움 M8 균주의 배양액은 유통 중 발생하는 적색육 어류의 변색을 효과적으로 방지 또는 억제할 뿐만 아니라 신선도 유지에 기여하므로, 영양적 가치, 관능, 소비자 기호성 및 식품의 저장성을 향상시킬 수 있는 효과가 있다. 또한, 상기 류코노스톡 시트리움 M8 균주의 배양액은 식품 변색 예방이 요구되는 다양한 용도에 응용될 수 있다.
- [0033] 또한, 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 수탁번호 KCTC15454BP로 수탁된, 적색육 어류의 변색 방지 효과를 갖는 류코노스톡 시트리움(*Leuconostoc citreum*, *L. citreum*) 균주 또는 이의 배양액을 유효성분으로 포함하는, 적색육 어류의 변색 방지용 조성물을 제공한다.
- [0034] 상기 조성물은 유효성분으로 류코노스톡 시트리움(*Leuconostoc citreum*, *L. citreum*) 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 핵산, 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, 세파텍스, RP-18, 폴리아미드, 도요펄(Toyoparl) 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 갈치속젓으로부터 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 KCTC15454BP로 수탁된, 적색육 어류의 변색 방지 효과를 갖는 류코노스톡 시트리움(*Leuconostoc citreum*, *L. citreum*) 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 물질을 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, 영양적 가치, 조직감 및 맛을 향상시킬 수 있는 효과가 있다. 또한, 상기 보존제 조성물은 다양한 병원성균이나 식품오염의 주원인이 되는 곰팡이 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 적색육 어류의 변색 방지 방법을 제공한다:
- [0048] (a) 적색육 어류의 내장을 제거하고 세척한 후 물기를 제거하는 단계; 및
- [0049] (b) 상기 적색육 어류를, 수탁번호 KCTC15454BP로 수탁된, 적색육 어류의 변색 방지 효과를 갖는 류코노스톡 시트리움(*Leuconostoc citreum*, *L. citreum*) 균주 또는 이의 배양액을 포함하는 적색육 어류의 변색 방지용 조성물에 침지시키는 단계.
- [0050] 본 발명은 변색 방지를 위한 조성의 최적 조건을 탐색하는 데 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 적색육 어류의 변색을 방지하는 방법에 있어서, 본 발명의 목적을 달성할 수 있는 한, 상기 적색육 어류는 통상적으로 당업계에 공지된 적색육 어류라면 어떤 것이라도 사용 가능하다.
- [0052] 본 명세서에서 적색육 어류는 적색어육 또는 붉은살 생선과 혼용된다.
- [0053] 바람직하게는, 상기 적색육 어류는 참치, 가다랑어, 고등어, 방어, 정어리 및 콩치로 이루어진 군으로부터 선택되는 생선이고, 본 발명의 일 실시예에서는 참치를 이용하였으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0054] 상기 적색육 어류는 세척 후 바로 침지하여 건조하는 과정을 수행할 수 있으나, 변색 방지용 조성물이 생선 내로 잘 흡수되기 위해서는 생선의 물기를 잘 제거하는 것이 바람직하며, 이를 위해 세척된 생선을 2~4시간 예비 건조하는 방법을 이용할 수 있다. 예비건조 단계는 실온에서 수행할 수 있다. 이 때 실온은 4~35℃의 통상적인 생선 가공 온도 조건일 수 있다.
- [0055] 상기 건조는, 당업계에 공지된 임의의 건조 방법을 이용하여 당업자가 적절히 조정할 수 있다.
- [0056] 바람직하게는, 상기 (b) 단계에서 상기 침지 시간은 1초 내지 100초, 보다 바람직하게는 1초 내지 60초, 더욱 바람직하게는 5초 내지 30초이며, 상기 조성물에 적색육 어류를 침지할 때부터 마칠 때까지 3~10시간 간격으로 1~10회 반복할 수 있다. 또한 1초 이내로 침지하거나 100초 이상 침지할 경우 변색 방지가 잘 되지 않을 수 있다.
- [0057] 상기 (b) 단계에서 상기 적색육 어류와 변색 방지용 조성물은 1:10 내지 10:1(w/w)의 비율로 침지한다.
- [0058] 손질된 재료인 적색육 어류를 변색 방지용 조성물에 1:10 내지 10:1(w/w) 비율로 침지시킬 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.
- [0059] 본 발명의 일 실시예에서는 변색 방지 효과를 극대화시키기 위하여, 상기 적색육 어류와 변색 방지용 조성물의 혼합비를 탐색한 결과, 적색육 어류와 변색 방지용 조성물을 1:2.98 (w/w)로 혼합함이 바람직함을 알 수 있었다.
- [0060] 만일, 적색육 어류와 변색 방지용 조성물의 혼합비율이 1:10 (w/w) 미만이거나, 10:1(w/w)를 초과하는 경우에는 변색이 효과적으로 방지되지 않는다.
- [0061] 상기 (b) 단계에서 상기 적색육 어류의 변색 방지용 조성물은 류코노스톡 시트리움 균주의 배양액을 1:10 내지 10:1(v/v)의 비율로 증류수(distilled water)로 희석한 것일 수 있다.
- [0062] 또한, 상기 (b) 단계에서 상기 류코노스톡 시트리움 균주 또는 이의 배양액은, 조성물 총 중량에 대하여 0.01 내지 100 중량%로 포함될 수 있다. 즉, 상기 조성물은 본 발명의 류코노스톡 시트리움 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.
- [0063] 일 구현예에 있어서, 상기 류코노스톡 시트리움 균주의 배양액은 미생물 배양 배지에 상기 균주를 접종하고, 당업계에 공지된 미생물 배양방법(예를 들어, 정지 배양)에 따라 제조될 수 있다.
- [0064] 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.

- [0065] 상기 배양액은 류코노스톡 시트리움 균주를 9 log CFU/mL로 포함한다.
- [0066] ml당 CFU는 생 박테리아의 양을 평가하는 시험관내 역가 분석의 표준에 의해 평가될 수 있다. 용어 "ml당"은 바람직하게는 유체 1ml를 지칭한다.
- [0067] 본 발명의 일 실시예에서, 본 발명은 본 발명의 신규 유산균주인 류코노스톡 시트리움(*Leuconostoc citreum*, *L. citreum*) 균주 또는 이의 배양액을 목적 대상인 적색육 어류에 처리하는 경우, 변색을 방지하고 신선도를 유지하는 우수한 효과를 발휘하는 최적 조건을 최초로 확립하였다.
- [0068] 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.
- [0069] 본 발명의 방법은 상술한 본 발명의 적색육 어류의 변색 방지용 조성물을 이용하므로, 이 둘 사이에 공통된 내용은 본 명세서의 과도한 복잡성을 피하기 위하여, 그 기재를 생략한다.
- [0071] 결론적으로, 본 발명은 적색육 어류의 변색을 효과적으로 억제하면서 신선도를 유지할 수 있는 bio-treatment 기술을 최적화함으로써, 수산물의 다양한 적색어류의 변색 방지 및 유산균의 수산식품산업 적용에 대한 새로운 방안을 제시할 수 있을 것으로 기대된다.

발명의 효과

- [0073] 본 발명은 적색육 어류의 변색을 방지하는 데 최적의 조건을 도출하기 위해, 반응표면분석법(RSM, response surface methodology)을 이용하여, 본 발명의 신규 류코노스톡 시트리움(*Leuconostoc citreum*, *L. citreum*) 균주 또는 이의 배양액의 최적 처리 조건을 확립하였고, 이에 의해, 기호도 및 신선도가 유지되어 생산성을 향상시킬 수 있을 뿐만 아니라, 맛, 영양, 및 조직감이 유지된 고영양가의 수산물을 제공할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0075] 도 1은 본 발명의 방법의 침지 비율 및 침지 시간에 따른 육 표면의 redness의 3D 반응 표면 모델을 보여준다.
- 도 2는 본 발명의 방법의 침지 비율 및 회석 비율에 따른 육 표면의 redness의 3D 반응 표면 모델을 보여준다.
- 도 3은 본 발명의 방법의 침지 시간 및 회석 비율에 따른 육 표면의 redness의 3D 반응 표면 모델을 보여준다.
- 도 4는 본 발명의 방법의 침지 비율 및 침지 시간에 따른 조추출물(crude extract)의 redness의 3D 반응 표면 모델을 보여준다.
- 도 5는 본 발명의 방법의 침지 비율 및 회석 비율에 따른 조추출물(crude extract)의 redness의 3D 반응 표면 모델을 보여준다.
- 도 6은 본 발명의 방법의 침지 시간 및 회석 비율에 따른 crude extract의 redness의 3D 반응 표면 모델을 보여준다.
- 도 7은 본 발명의 방법의 침지 비율 및 침지 시간에 따른 oxy-myoglobin 함량의 3D 반응 표면 모델을 보여준다.
- 도 8은 본 발명의 방법의 침지 비율 및 회석 비율에 따른 oxy-myoglobin 함량의 3D 반응 표면 모델을 보여준다.
- 도 9는 본 발명의 방법의 침지 시간 및 회석 비율에 따른 oxy-myoglobin 함량의 3D 반응 표면 모델을 보여준다.
- 도 10은 본 발명의 방법의 침지 비율 및 침지 시간에 따른 met-myoglobin 함량의 3D 반응 표면 모델을 보여준다.
- 도 11은 본 발명의 방법의 침지 비율 및 회석 비율에 따른 met-myoglobin 함량의 3D 반응 표면 모델을 보여준다.
- 도 12는 본 발명의 방법의 침지 시간 및 회석 비율에 따른 met-myoglobin 함량의 3D 반응 표면 모델을 보여준다.
- 도 13은 본 발명의 방법의 침지 비율 및 침지 시간에 따른 붉은색 정도의 3D 반응 표면 모델을 보여준다.

도 14는 본 발명의 방법의 침지 비율 및 희석 비율 따른 붉은색 정도의 3D 반응 표면 모델을 보여준다.

도 15는 본 발명의 방법의 침지 시간 및 희석 비율에 따른 붉은색 정도의 3D 반응 표면 모델을 보여준다.

도 16은 본 발명의 방법의 침지 비율 및 침지 시간에 따른 전반적 선평도의 3D 반응 표면 모델을 보여준다.

도 17은 본 발명의 방법의 침지 비율 및 희석 비율에 따른 전반적 선평도의 3D 반응 표면 모델을 보여준다.

도 18은 본 발명의 방법의 침지 시간 및 희석 비율에 따른 전반적 선평도의 3D 반응 표면 모델을 보여준다.

도 19a 및 19b는 본 발명에서 도출된 최적 조건으로 처리한 참치육의 10℃ 저장 기간 중 일반세균수(도 19a) 및 VBN(도 19b) 수준을 보여준다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

실시예 1. 본 발명의 신규한 유산균주(*Leuconostoc citreum* M8)의 분리 및 선별

본 발명자들은 신규한 유산균주인 류코노스톡 시트리움 분리주(*Leuconostoc citreum* M8)를 획득하기 위하여, 다음과 같이 국내 전통 수산 발효 식품(갈치숙젓)으로부터 분리하였다:

갈치숙젓을 희석하여 Bromo cresol purple agar (plate count agar with 0.006% bromo cresol purple)에 접종하여 30℃에서 48시간까지 배양 후 노란색으로 변한 집락을 선별하였다. 총 12개의 집락을 분리하였으며 그 중 향산화 활성이 가장 높은 균주를 선별하였다.

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

유산균주의 16S rRNA 시퀀싱은 분리 균주의 chromosomal DNA를 분리한 후에 프라이머 27F (서열번호 2; 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG -3'), 1492R (서열번호 3; 5'-TACGGYTACCTGTGTACGTACTT-3')를 사용하여 PCR로 증폭하였다.

상기 균주의 16S rRNA를 코딩하는 DNA 염기서열(16S rDNA; 서열번호 1)을 Basic local alignment search tool(Blast, NCBI)을 통해 진뱅크(GeneBank) 데이터베이스에 등록된 균주들의 16S rRNA 염기서열과 상동성을 조사하여 계통학적 유연 관계를 분석한 결과, 본 발명의 선별된 분리 균주가, 류코노스톡 시트리움(*Leuconostoc citreum*)에 속하는 유산균주임을 확인하였다.

또한, 본 명세서에 따른 유산균은 공시균주인 류코노스톡 시트리움(Genbank accession No. LC09622.1)과 근접한 균주로 동정이 되나, 상기 균주와는 서열 상 차이가 존재하는 상이한 균주임을 확인하였다.

이에, 본 발명자들은 상기 분리한 류코노스톡 시트리움(*Leuconostoc citreum*) 균주를 M8로 명명하고 한국생명공학연구원 생물자원센터(KCTC)에 2023년 05월 25일자로 기탁하여, 수탁번호 KCTC15454BP를 부여받았다.

따라서, 본 발명의 균주인 류코노스톡 시트리움(*Leuconostoc citreum*) M8은, 공시균주와 비교하였을 때 염기서열 상 차이가 존재하는 것으로 밝혀진 신규 균주이며, 상기 균주는 탁월하게 유기산을 생성하고 높은 향산화능을 나타내는 균학적 특징이 발휘되므로, 균주 자체뿐만 아니라 이의 배양 대사물로서 효과를 달성할 수 있다.

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

본 발명자들은, 상기 실시예 1에서 분리된 본 발명의 신규한 균주인 류코노스톡 시트리움(*Leuconostoc citreum*, *L. citreum*) M8 배양액에 의한 적색 어육에 대한 변색 방지능을 분석하고 침지 조건의 최적화를 도출하고자 통계적 실험법으로서 RSM(Response surface methodology)을 적용하였다.

또한, 대표적인 적색육 어류로서 참치를 대상으로 이용하였고, 변색 방지 효과는 참치 육표면의 redness 값, crude extract의 redness 값, oxy-myoglobin 함량, met-myoglobin 함량, 관능평가에서 붉은색 정도 및 전반적 선평도를 통해 측정하였다.

이때, RSM을 이용하여 적색 어육의 변색을 방지 또는 억제할 수 있는 최적화 모델을 도출하기 위해, 유산균 상등액 침지 비율(tuna : cell-free 배양액)(w/w) 침지시간(sec) 및 유산균 상등액 희석 비율(immersion solution : distilled water)(v/v) 조건에 대한 single factor experiment를 수행하였으며, 유산균 처리를 통한 변색 억제 최적 조건을 분석하기 위해 RSM 중 Box-Behnken Design (BBD)를 이용하였다.

보다 구체적으로, *Leuconostoc citreum* M8은 glucose 10%로 조절한 MRS broth에 접종하여 30℃에서 24시간 동

안 9 log CFU/mL 세포수 조건으로 배양하였으며 이를 원심분리(10,000 Xg, 20 min, 4℃)하여 상등액만 수거후 0.22 μm membrane filter를 이용하여 여과하여 cell-free 배양액을 제조하여 실험에 사용하였다. 참치는 냉동 참치를 해동하여 각 실험조건에 따라 침지 처리 후 추가 1분 탈수를 진행하여 10℃에서 한시간 동안 보관하여 redness 및 myoglobin 함량의 변화를 확인하고 관능평가를 진행하였다.

[0090] 그 결과, 참치에 LAB cell-free 배양액을 처리하여 참치의 변색을 효과적으로 방지할 수 있는 최적 처리 조건을 도출하고자 RSM 중 BBD에 따라 실험을 설계하여 독립변수(X_1)인 침지 비율(X_1), 침지시간(X_2) 및 희석 비율(X_3)에 따른 종속변수(Y_i)인 육 표면의 redness(Y_1), crude extract의 redness (Y_2), oxy-myoglobin 함량 (Y_3), met-myoglobin 함량(Y_4), 관능평가 항목인 붉은색 정도 (Y_5) 및 전반적 선호도 (Y_6) 결과를 분석하였다.

[0091] 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.

[0092] 표 1에서는, 참치의 침지 조건을 최적화하기 위해 -1, 0, +1의 3단계로 부호화하였으며, 독립변수의 범위로 침지 비율(참치: 희석된 cell-free 상등액)은 1:2, 1:3, 1:4(w/w), 침지시간은 10, 15, 20초 및 희석 비율(distilled water: cell-free 상등액)은 1:4, 1:3, 1:2 (v/v)으로 설정하였다.

[0093] [표 1]

변수	수준		
	-1.00	0	+1.00
침지 비율 (tuna : 희석된 cell-free 배양액)	1:2	1:3	1:4
침지시간 (sec)	10	15	20
희석 비율 (distilled water : cell-free 배양액)	1:4	1:3	1:2

[0094]

[0096] RSM에서 제시된 조건들에 따른 실험 결과를 각 종속변수 별로 2차 방정식을 도출한 결과는 표 2와 같다.

[0098] [표 2]

요인	다항식
육 표면의 redness	$Y=20.99+0.00625X_1-0.524X_2+0.471X_3+0.0425X_1X_2-0.0572X_1X_3+0.0569X_2X_3-1.468X_1^2-1.931X_2^2-1.533X_3^2$
Crude extract의 redness	$Y=19.40-0.179X_1-0.832X_2+0.52X_3-0.0172X_1X_2-0.289X_1X_3+0.217X_2X_3-1.225X_1^2-1.784X_2^2-0.962X_3^2$
Oxy-myoglobin 함량	$Y=40.65-0.2916X_1-0.2080X_2+1.2644X_3+0.7503X_1X_2-1.1045X_1X_3+0.2619X_2X_3-2.9050X_1^2-6.5960X_2^2-2.8394X_3^2$
Met-myoglobin 함량	$Y=41.83-0.4625X_1+0.4791X_2-1.0962X_3-1.9177X_1X_2+0.1042X_2X_3-0.3196X_3X_3+1.9123X_1^2+5.8927X_2^2+2.7731X_3^2$
관능평가 붉은색 정도	$Y=4.84+0.075X_1-0.65X_2+0.275X_3+0.000X_1X_2-0.05X_2X_3+0.2X_3X_3-0.495X_1^2-0.545X_2^2-0.595X_3^2$
관능평가 전반적 선호도	$Y=4.92+0.05X_1-0.475X_2+0.125X_3+0.1X_1X_2+0.000X_1X_3-0.435X_1^2-0.385X_2^2-0.485X_3^2$

[0099]

[0101] 본 발명에서 제시한 모델의 유의성 검증을 위해 ANOVA 분석을 실시하였으며 이에 대한 결과는 표 3과 같다. 본 연구에서 개발된 모든 종속 변수의 모델이 유의한 것으로 나타났다.

[0103] [표 3]

Sources	F-value						p-value					
	Y1	Y2	Y3	Y4	Y5	Y6	Y1	Y2	Y3	Y4	Y5	Y6
Model	96.35	52.28	16.17	11.91	29.48	31.45	< 0.0001 significant	< 0.0001 significant	0.0007 significant	0.0018 significant	< 0.0001 significant	< 0.0001 significant
X ₁	0.01	3.49	0.33	1.21	1.42	1.19	0.9387	0.1040	0.5818	0.3069	0.2724	0.3121
X ₂	44.61	75.18	0.17	3.56	106.58	107.08	0.0003	< 0.0001	0.6929	0.1013	< 0.0001	< 0.0001
X ₃	36.05	29.39	6.27	0.10	19.08	7.42	0.0005	0.0010	0.0408	0.7565	0.0033	0.0296
X ₁ X ₂	0.15	0.02	1.10	0.08	0.00	2.37	0.7130	0.9025	0.3285	0.7805	1.0000	0.1674
X ₁ X ₃	0.27	4.55	2.39	7.99	0.32	0.00	0.6218	0.0703	0.1660	0.0255	0.5920	1.0000
X ₂ X ₃	0.26	2.56	0.13	0.17	5.05	5.34	0.6235	0.1533	0.7248	0.6915	0.0595	0.0541
X ₁ ²	184.53	85.90	17.41	6.12	32.53	47.26	< 0.0001	< 0.0001	0.0042	0.0425	0.0007	0.0002
X ₂ ²	319.05	182.12	89.74	60.61	39.43	37.02	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001	0.0001	0.0004	0.0005
X ₃ ²	201.08	52.94	16.63	19.62	47.00	58.75	< 0.0001	0.0002	0.0047	0.0030	0.0002	0.0001
Residual												
Lack of fit	0.03	2.62	3.39	0.87	1.31	1.94	0.9921 not significant	0.1878 not significant	0.1343 not significant	0.5285 not significant	0.3873 not significant	0.2643 not significant

[0104]

[0106] RSM을 이용한 M8(cell-free) 배양액(상등액) 처리를 위한 최적 조건은 하기 표 4에 나타내었다.

[0108] [표 4]

종속변수	최적 조건
침지 비율 (tuna : 희석된 cell-free 배양액) (w/w)	1 : 2.98
침지시간 (sec)	14.10
희석 비율 (distilled water : cell-free 배양액) (v/v)	1 : 2.36

[0109]

[0111] 또한, RSM을 이용한 모델링을 통해 예측된 최적 조건의 검증을 위해, 제시된 최적 조건에 따라 유산균 cell-free 배양액에 침지한 참치 변색 방지의 검증 시험 결과는 하기 표 5에 나타내었다.

[0112] 이는, 모든 변수에서 실제 값과 예측 값의 편차가 5% 미만($p < 0.05$)으로 나타나 RSM을 이용하여 최적화한 모형이 적합함을 나타낸다.

[0114] [표 5]

독립변수	예측값	실제값
육 표면의 redness	21.05	20.92 ± 0.31
Crude extract의 redness	19.64	18.29 ± 1.50
Oxy-myoglobin 함량	40.62	39.985 ± 0.702
Met-myoglobin 함량	41.83	41.138 ± 1.415
관능평가 붉은색 정도	4.96	5.00 ± 0.00
관능평가 전반적 선호도	4.99	5.00 ± 0.00

[0115]

[0117] 결과적으로, 본 발명에 따라 모델링한 최적 조건은 침지시간 14.1초, 침지비율 1:2.98(참치:cell-free 배양액)(w/w) 및 희석 비율 1:2.36(distilled water:cell-free 배양액)(v/v)로 도출되었으며, 통계학적으로 유의적

인 모델임을 확인하였다.

- [0118] 따라서, 이는, 본 발명의 RSM 분석을 기반으로 도출된 본 발명의 류코노스톡 시트리움(*Leuconostoc citreum*, *L. citreum*) M8 배양액(*L. citreum* M8 Cell-free culture)의 최적 처리 조건이 적색육 어류의 변색을 탁월하게 방지할 수 있음을 입증한다.
- [0120] **실시예 3. 본 발명의 최적 조건을 이용한 참치육의 저장 기간 중 품질 변화 확인**
- [0121] 본 발명자들은 본 발명에서 도출된 유산균주 처리 최적 조건에 따라 참치육에 처리했을 때 품질에 영향을 미치는 지 확인하고자 10℃ 저장 기간 중 일반 세균수 및 휘발성 염기 질소(VBN) 변화를 측정하였다.
- [0122] 그 결과, 도 19에 나타낸 바와 같이, 대조군인 무처리군에 비해, 본 발명의 *Leuconostoc citreum* M8 최적 조건 처리군은 저장기간 중 일반 세균수 및 VBN 함량의 증가폭이 현저하게 낮았다. 이는 본 발명의 유산균주가 적색 어육의 품질에 영향을 미치지 않고, 항균활성을 나타낼 뿐만 아니라 신선도를 유지시킬 수 있음을 의미한다.
- [0123] 종합적으로, 본 발명에서는, 본 발명의 유산균주인 류코노스톡 시트리움(*Leuconostoc citreum*, *L. citreum*) M8 배양액을 적색육 어류에 최적 조건으로 처리하는 경우, 소비자의 기호도에 큰 영향을 미치는 색차 분석 및 관능 평가를 통해 전반적인 기호도가 높고, 선도판정법을 통해 어육의 신선도를 유지시킬 수 있음을 규명하였다. 따라서, 본 발명의 유산균주 배양액을 이용한 변색 방지 방법은, 적색육 어류의 붉은 살 품질이 유지되어 소비자의 기호 및 관능을 만족시킬 뿐만 아니라 유통 기간 및 가식 기간을 연장시킬 수 있으므로, 수산 가공 업계 및 환경 산업에서 높은 시장성을 가질 수 있다.
- [0125] 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]

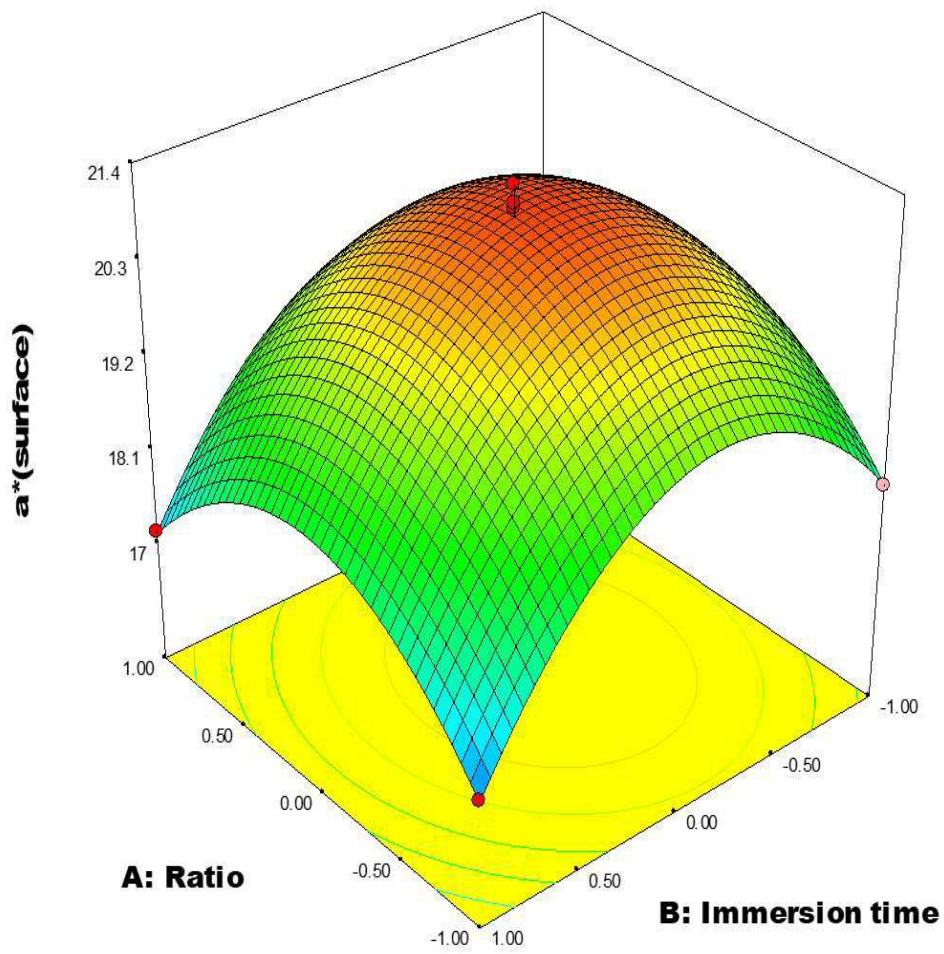
기탁기관명 : 한국생명공학연구원 생물자원센터(KCTC)

수탁번호 : KCTC15454BP

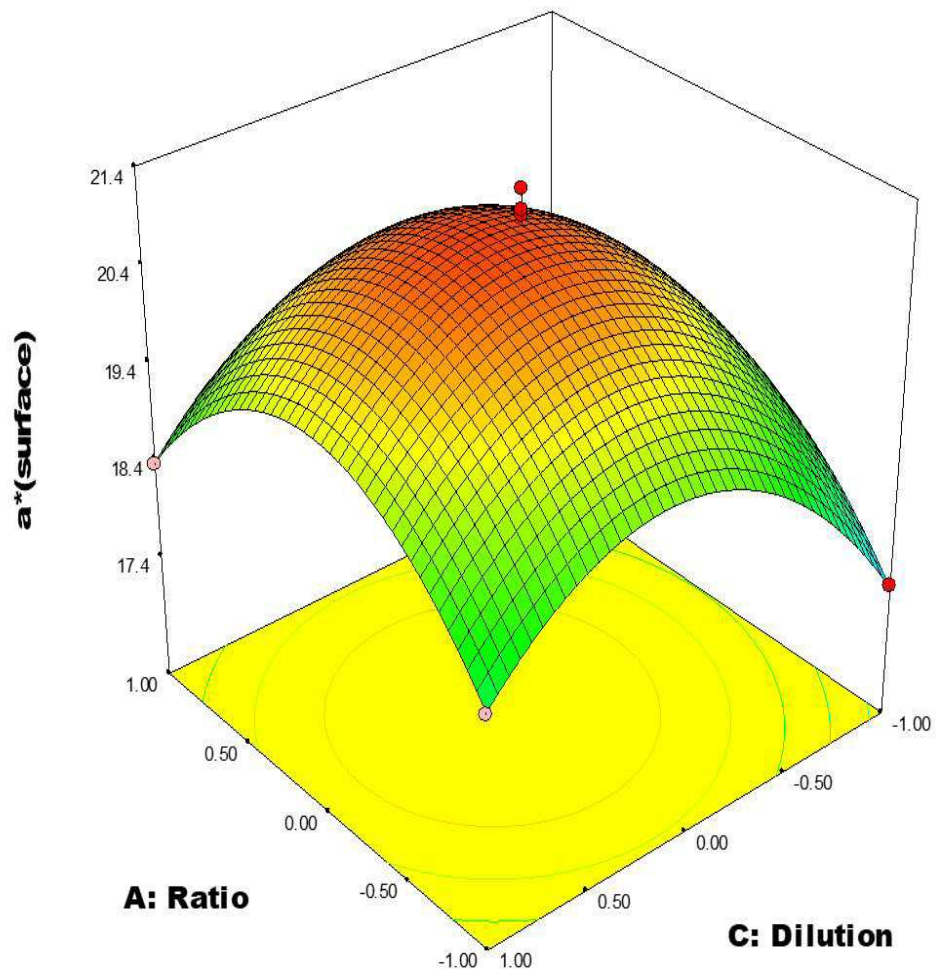
수탁일자 : 20230525

도면

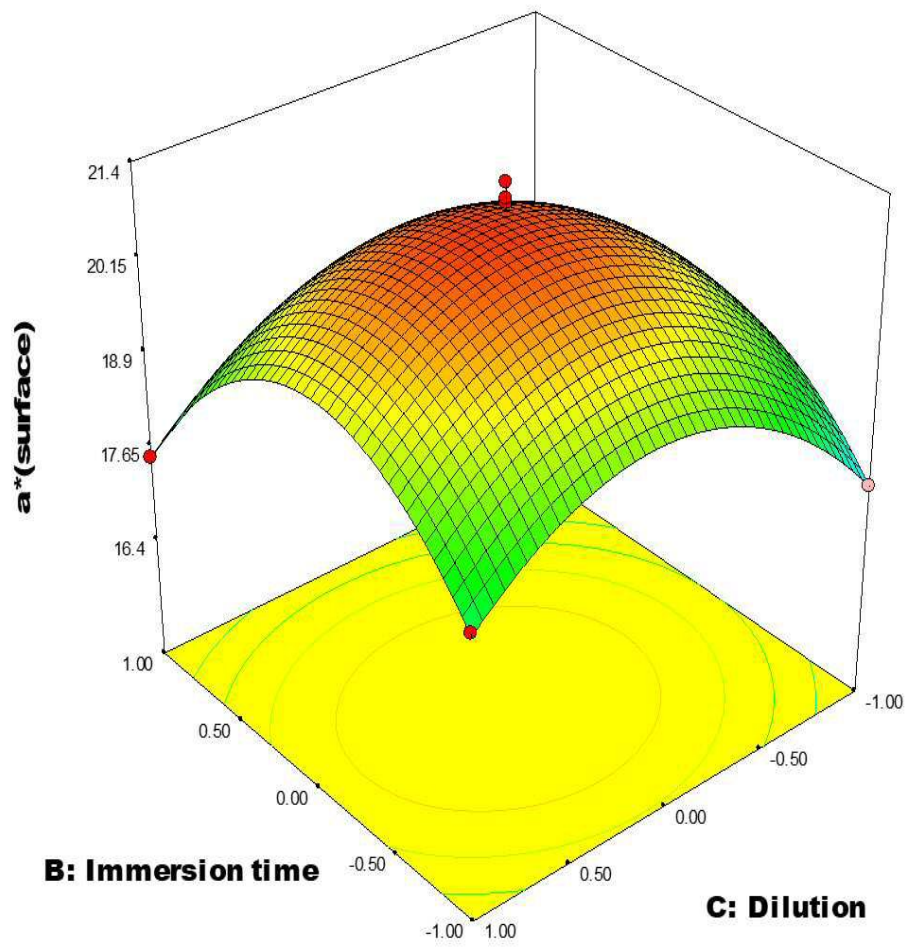
도면1



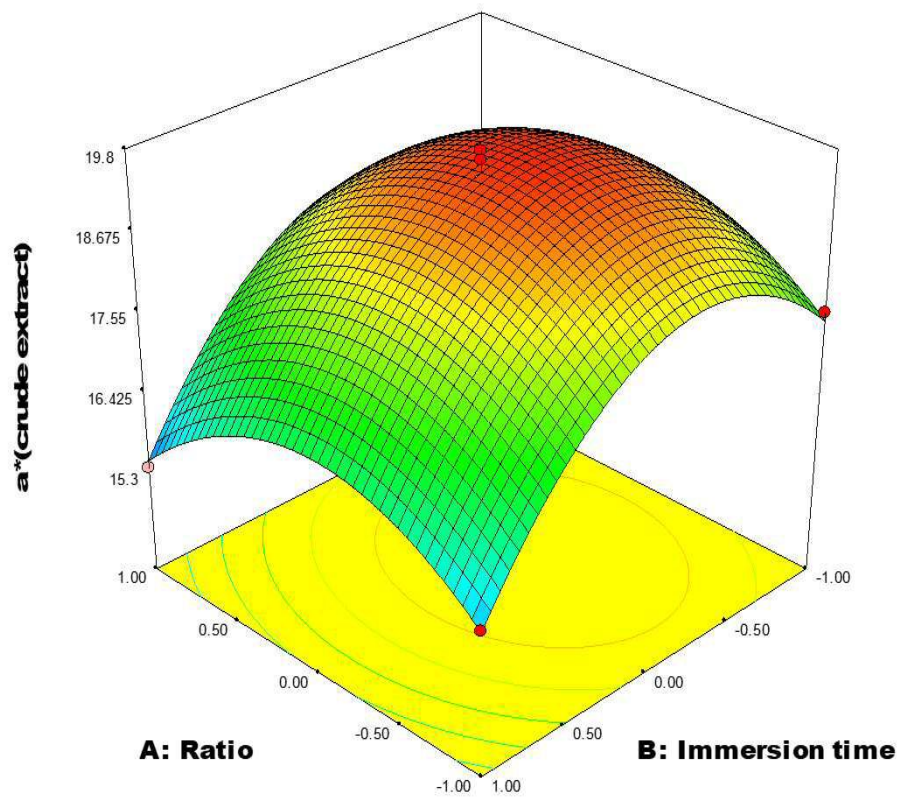
도면2



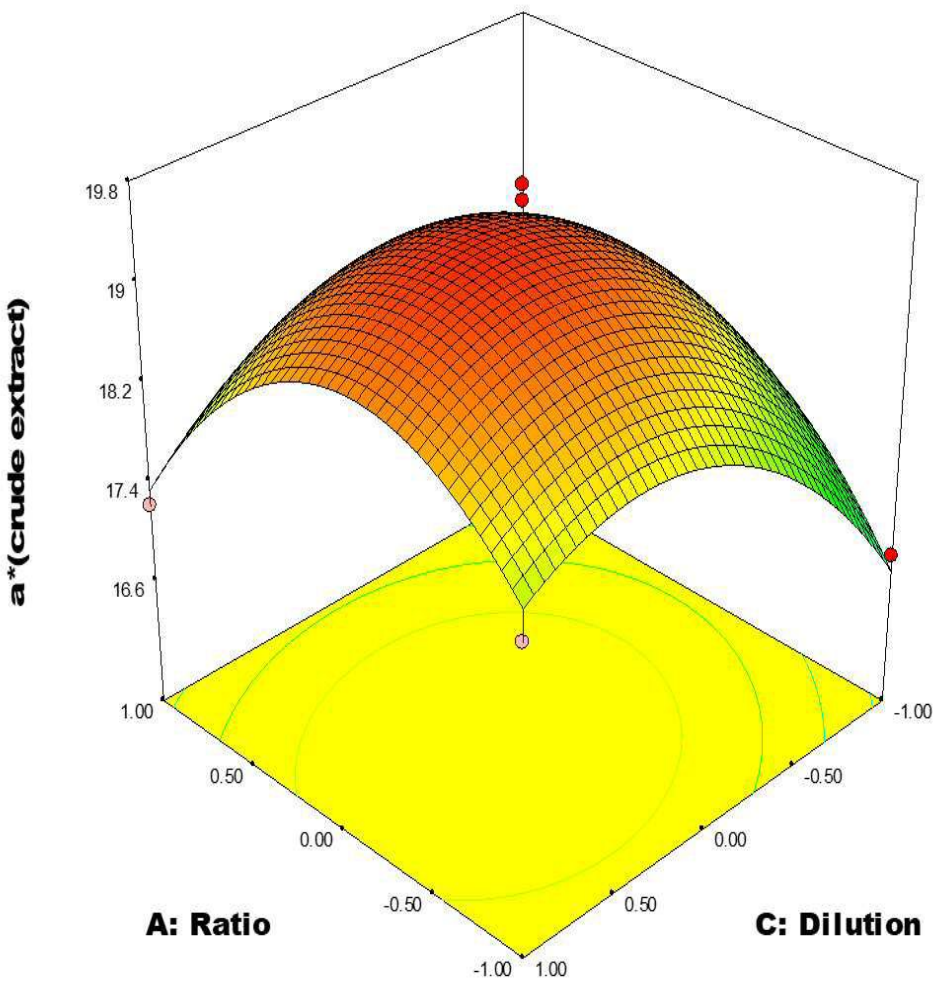
도면3



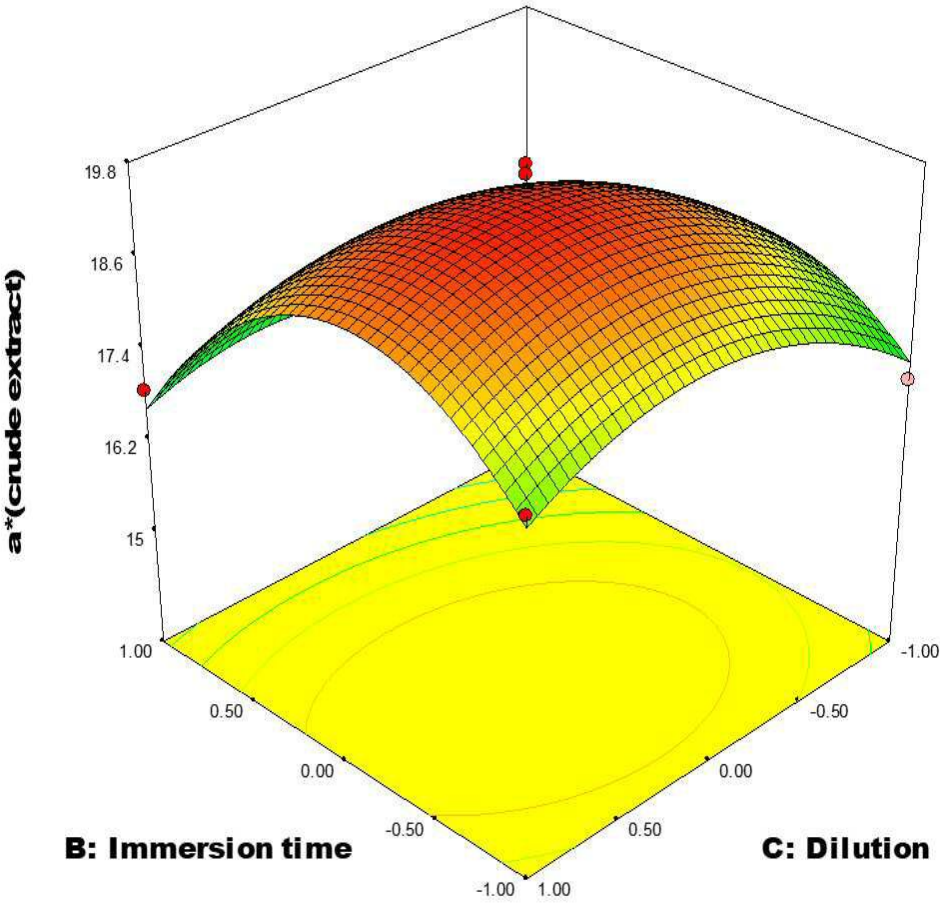
도면4



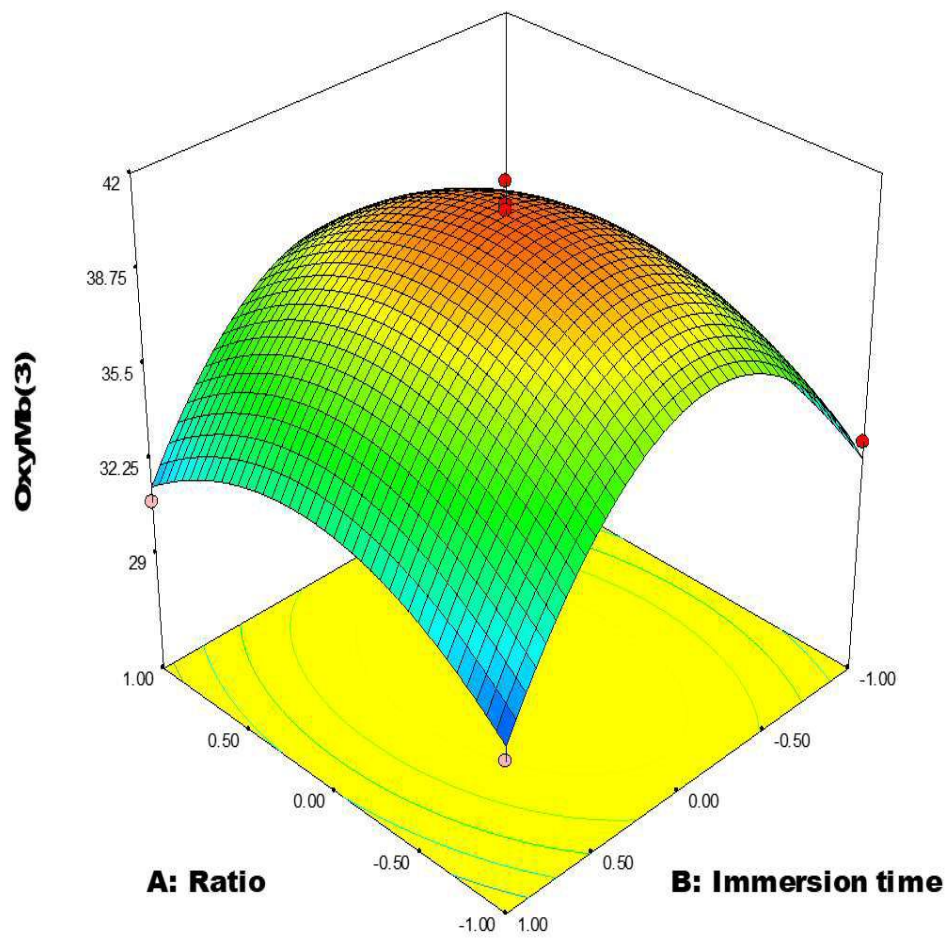
도면5



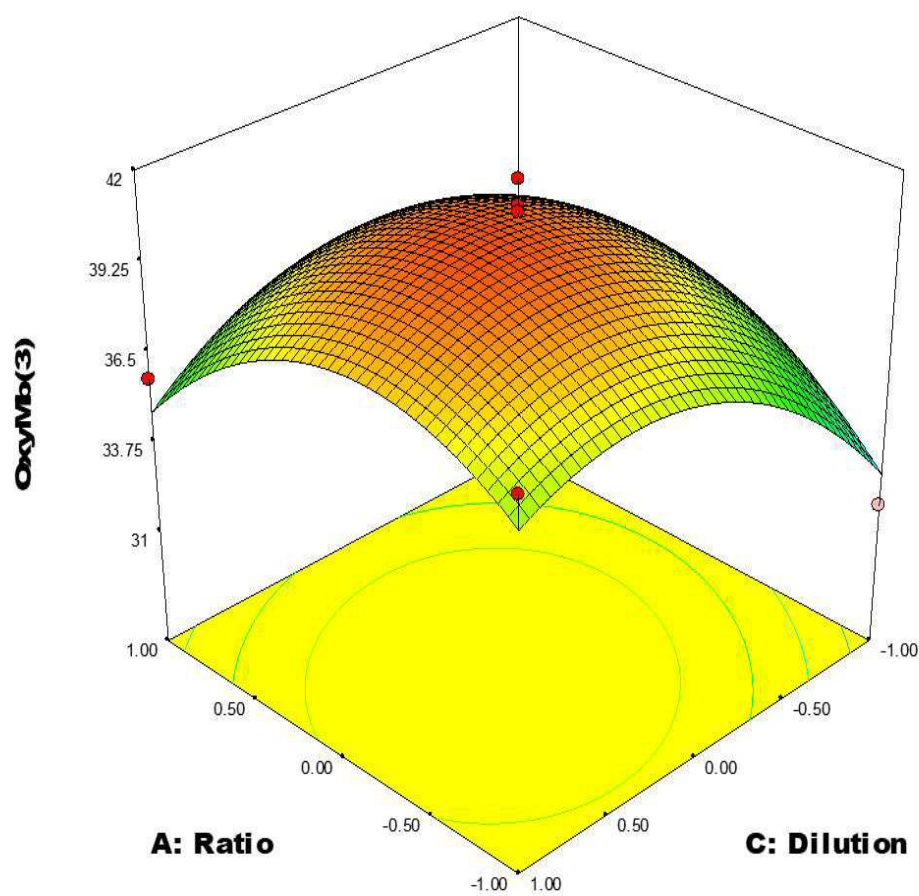
도면6



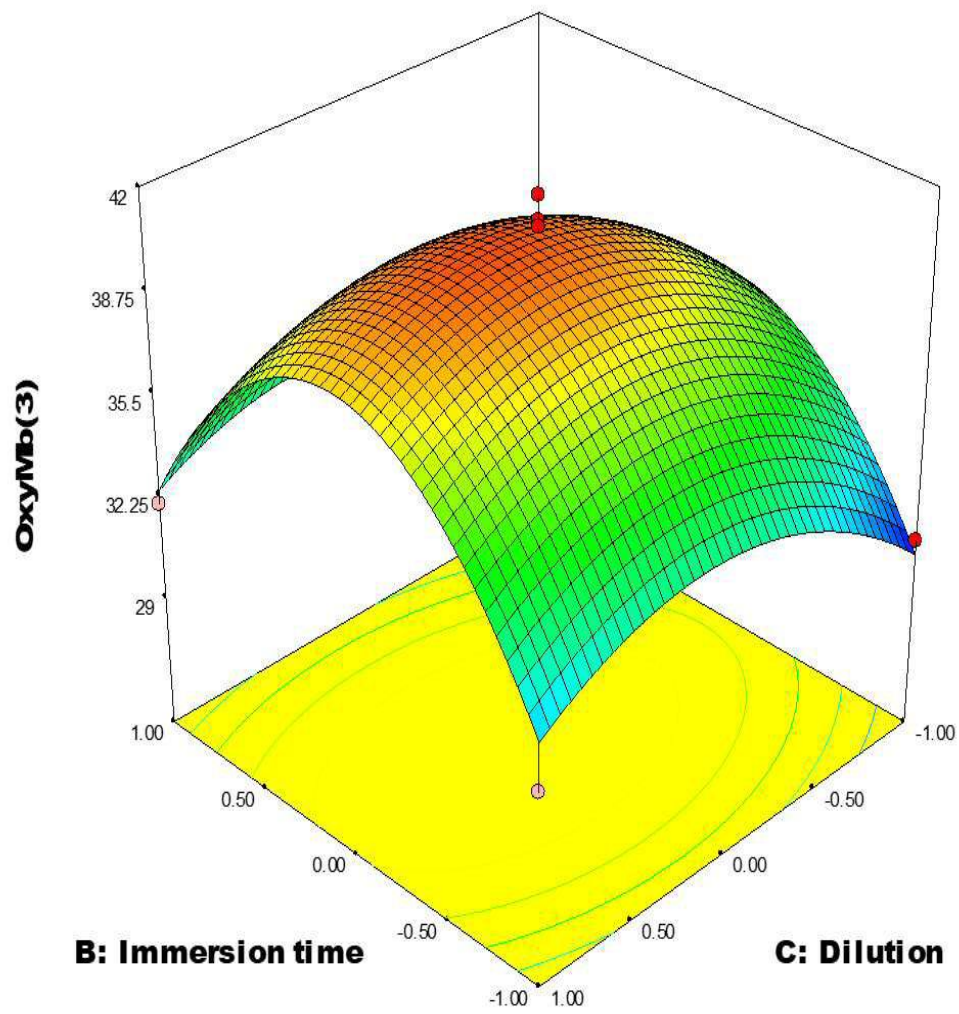
도면7



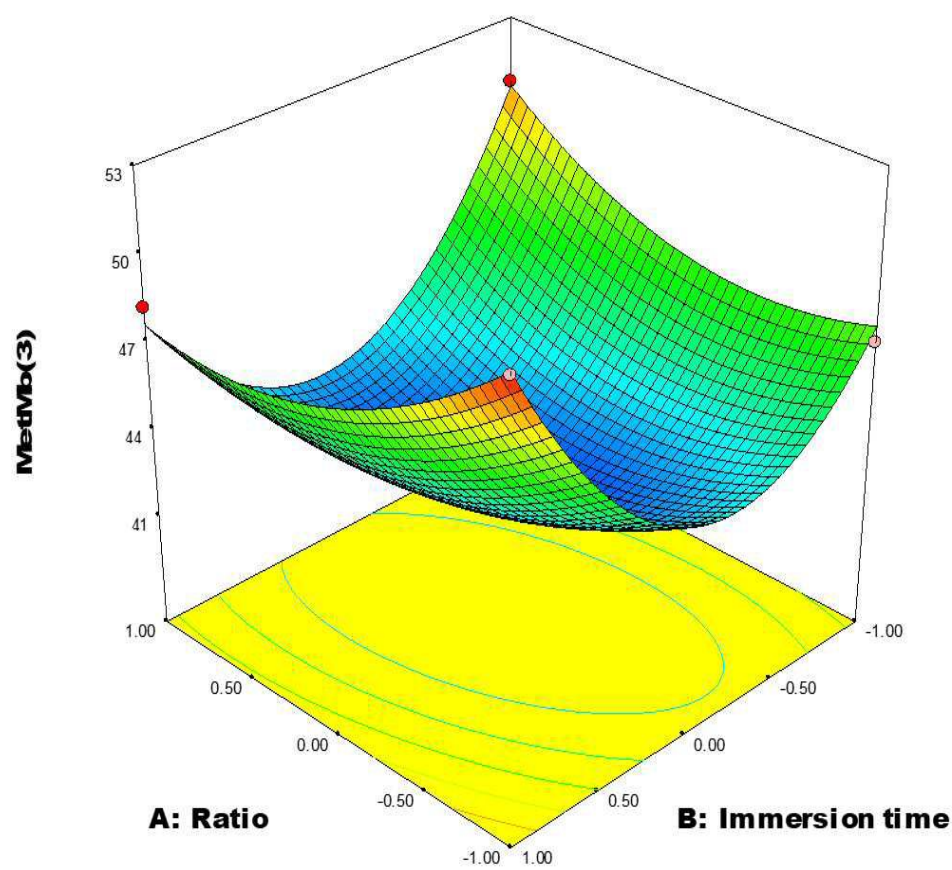
도면8



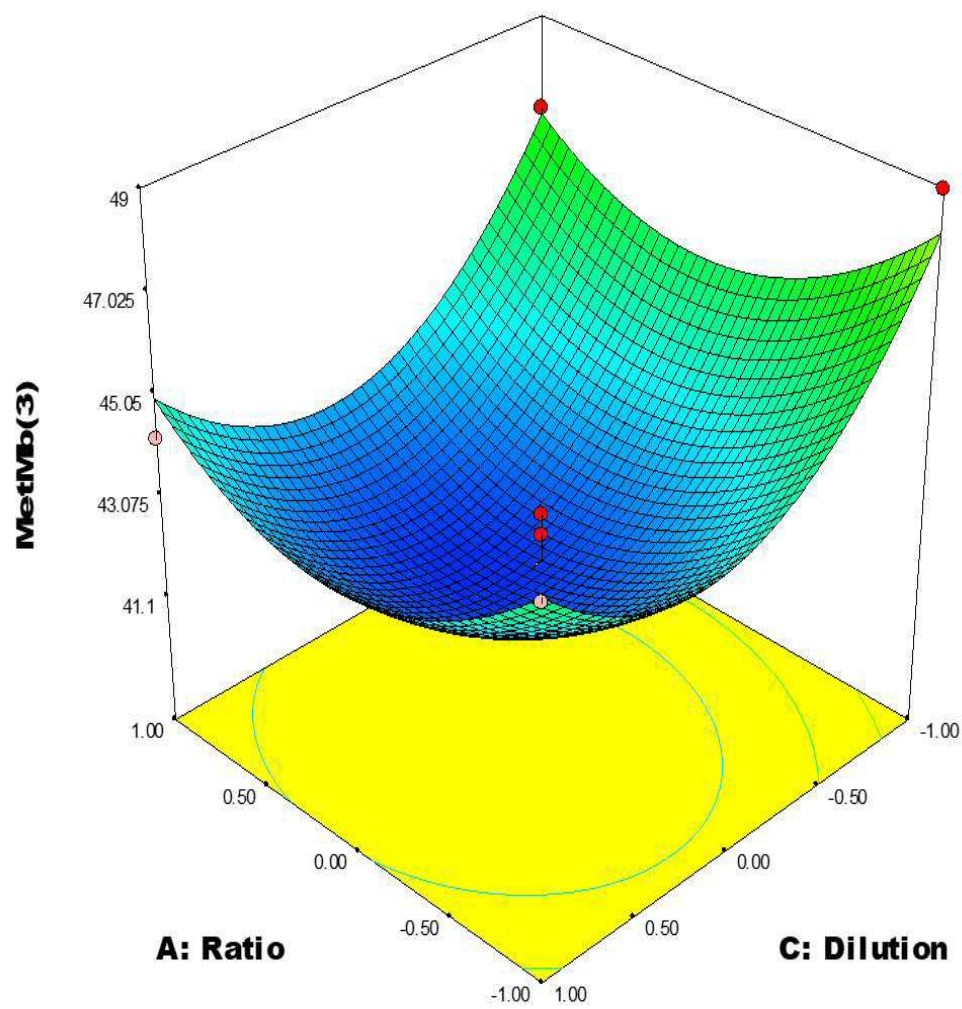
도면9



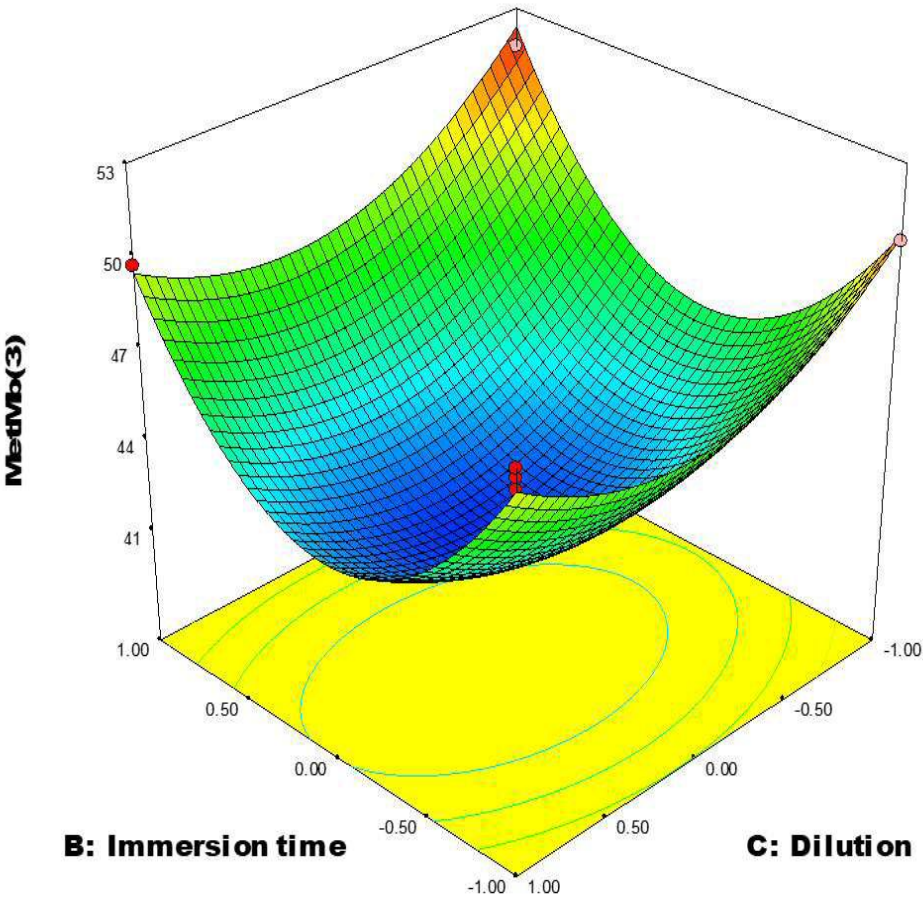
도면10



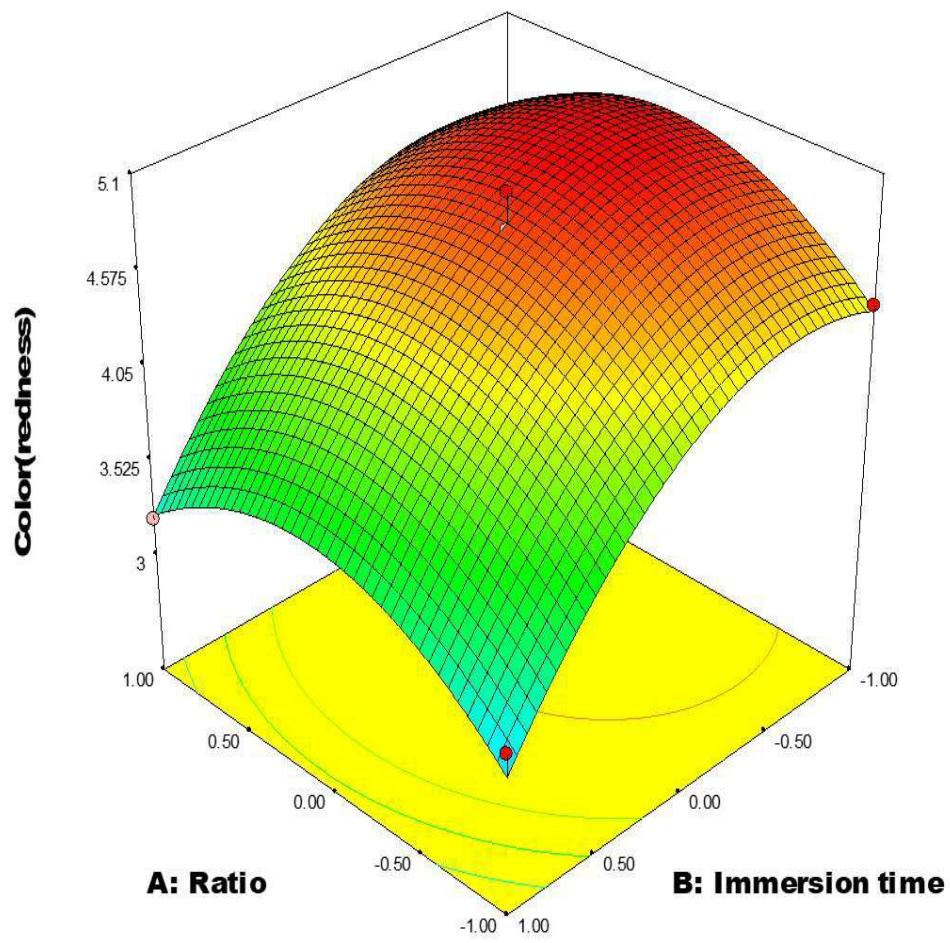
도면11



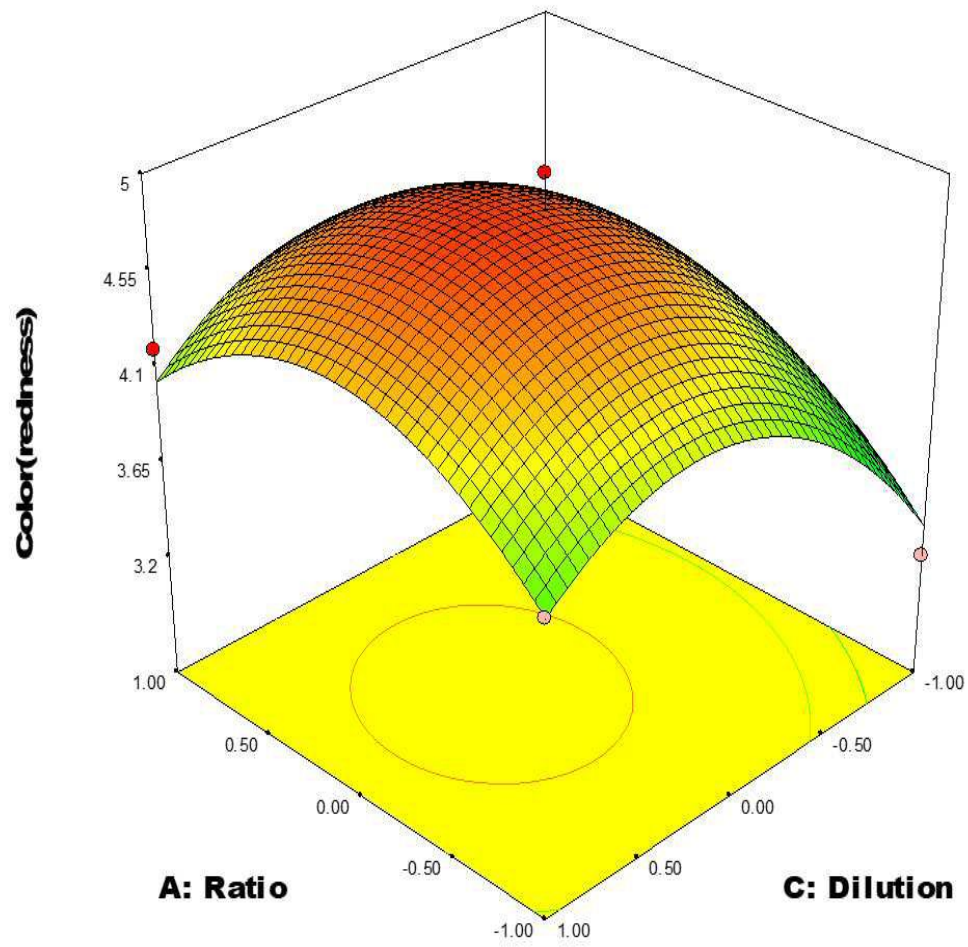
도면12



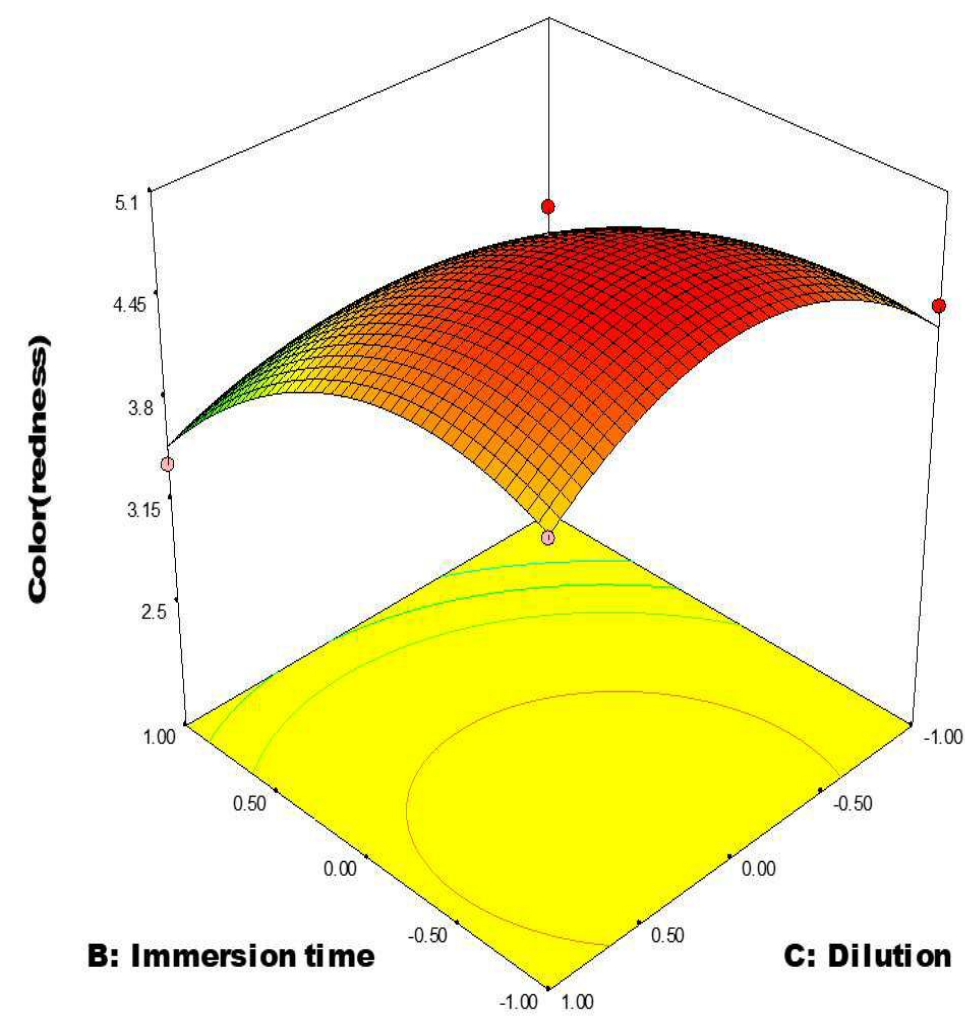
도면13



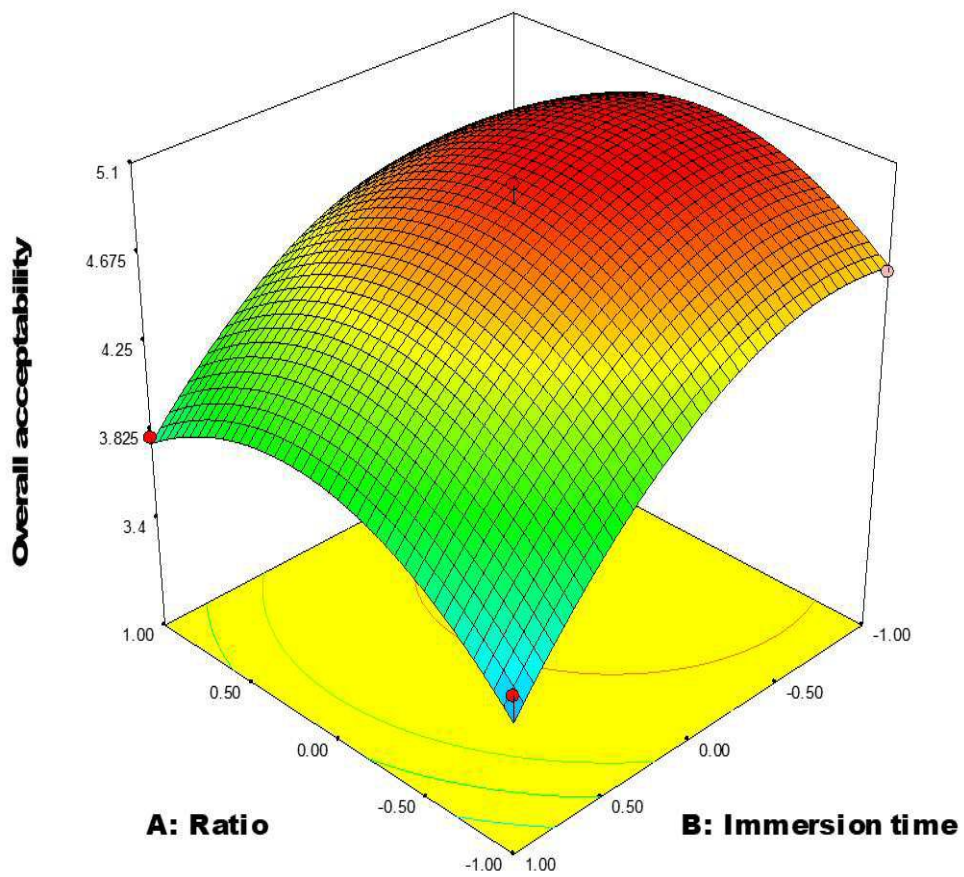
도면14



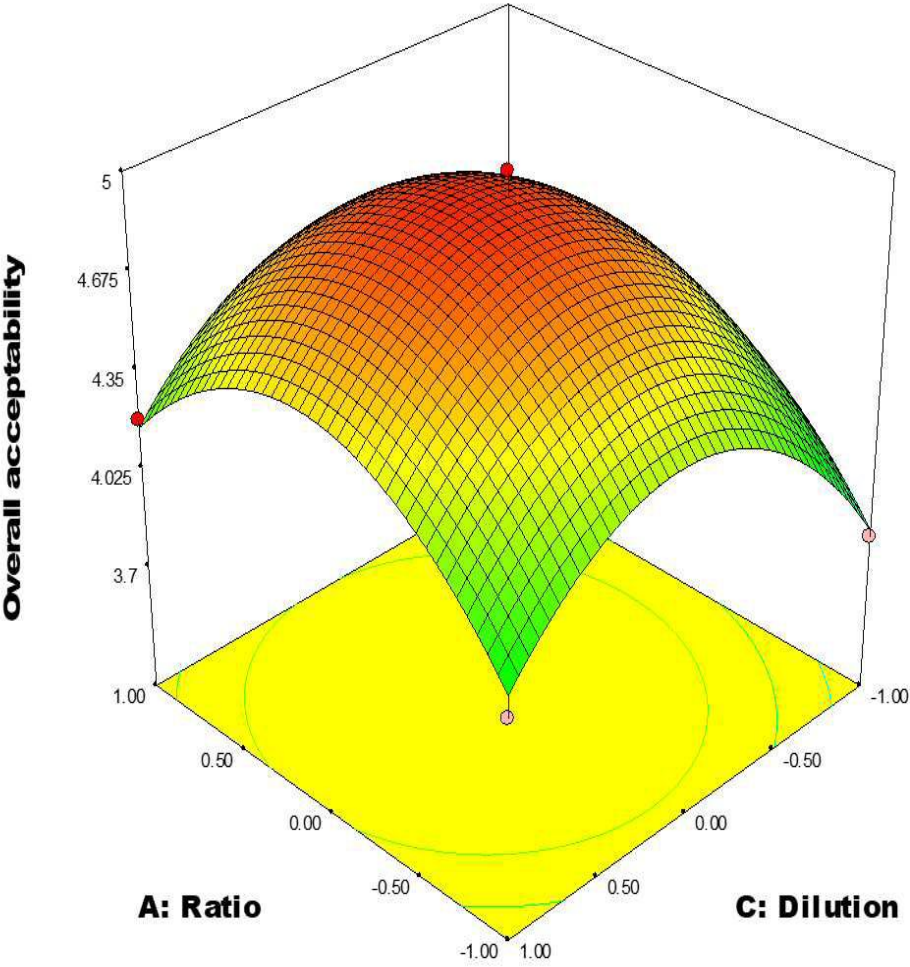
도면15



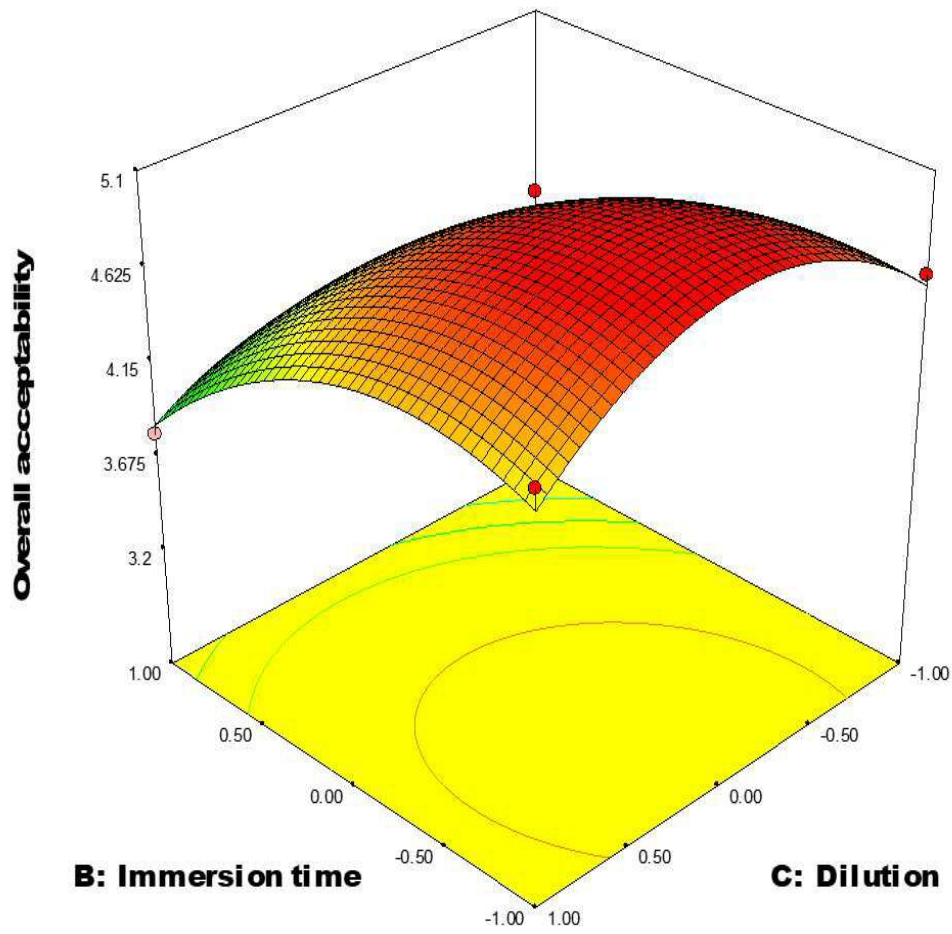
도면16



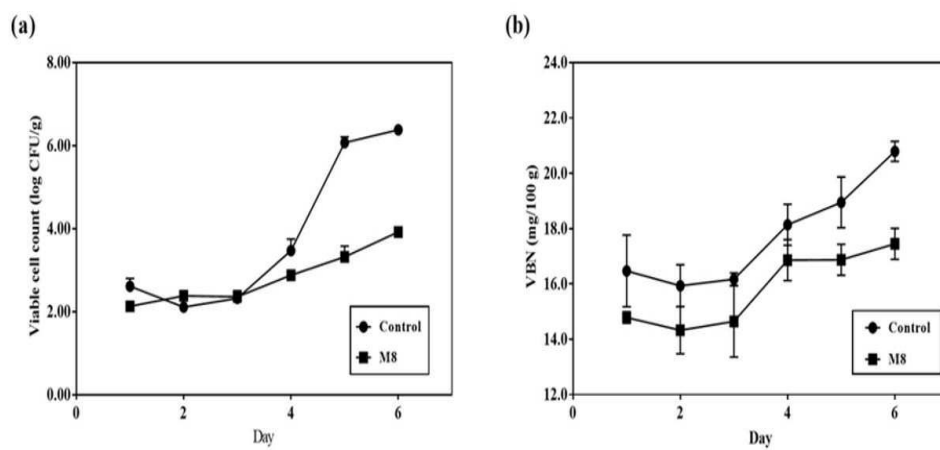
도면17



도면18



도면19



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.