



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2018-0072455
(43) 공개일자 2018년06월29일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 1/20 (2006.01) A23L 29/00 (2016.01)
C12R 1/44 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 1/20 (2013.01)
A23L 29/065 (2016.08)
(21) 출원번호 10-2016-0176039
(22) 출원일자 2016년12월21일
심사청구일자 2016년12월21일

(71) 출원인
창원대학교 산학협력단
경상남도 창원시 의창구 창원대로 20(퇴촌동)
(72) 발명자
주우홍
경상남도 창원시 의창구 도계로 69, 세영빌딩 1층(도계동)
임보람
경상남도 산청군 신안면 원지강변로61번길 24, 101동 1009호(대동강변타운아파트)
최혜정
경상남도 창원시 의창구 동읍 죽동길45번길 11
(74) 대리인
김순웅

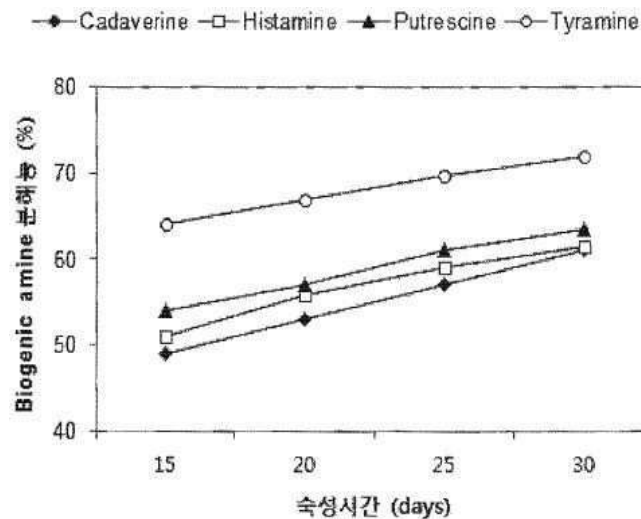
전체 청구항 수 : 총 13 항

(54) 발명의 명칭 신규한 스태필로코쿠스 에퀴오룸 BCNU 3002 균주

(57) 요약

본 발명은 신규한 스태필로코쿠스 에퀴오룸(*Staphylococcus equorum*) BCNU 3002(KACC 81031BP) 균주 및 이를 포함하는 바이오제닉 아민 분해용 또는 저감화용 조성물에 관한 것이다. 본 발명의 신규한 스태필로코쿠스 에퀴오룸 BCNU 3002(KACC 81031BP) 균주를 이용 시, 식품의 발효 과정 동안 바이오제닉 아민을 생산하지 않고 바이오제닉 아민의 높은 분해 및 저감화 활성을 가지며, 독성이 없고 안전한 발효식품을 생산할 수 있는 효과가 있어 산업적으로 유용하게 이용될 수 있다.

대표도 - 도6



(52) CPC특허분류
C12R 1/44 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

신규한 스태필로코쿠스 에퀴오룸(*Staphylococcus equorum*) BCNU 3002(KACC 81031BP) 균주.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 스태필로코쿠스 에퀴오룸 BCNU 3002(KACC 81031BP) 균주는 서열번호 1로 표시되는 16S rDNA를 포함하는 것을 특징으로 하는, 스태필로코쿠스 에퀴오룸 BCNU 3002(KACC 81031BP) 균주.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 스태필로코쿠스 에퀴오룸 BCNU 3002(KACC 81031BP) 균주는 바이오제닉 아민(biogenic amine) 분해능을 갖는 것을 특징으로 하는, 스태필로코쿠스 에퀴오룸 BCNU 3002(KACC 81031BP) 균주.

청구항 4

제3항에 있어서,

상기 바이오제닉 아민은 히스타민(histamine), 티라민(tryamine), 푸트레신(putreacine), 카다베린(cadaverine), 아그마틴(agmatine), 스페르민(spermine), 스페르미딘(spermidine), 2-페닐아틸아민(2-phenylethylamine) 및 트립타민(tryptamine)으로 이루어진 군 중에서 선택된 1종 이상인 것을 특징으로 하는, 스태필로코쿠스 에퀴오룸 BCNU 3002(KACC 81031BP) 균주.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 스태필로코쿠스 에퀴오룸 BCNU 3002(KACC 81031BP) 균주는 pH 4 내지 7, 20 내지 45도의 온도에서 바이오제닉 아민 분해 활성을 나타내는 것을 특징으로 하는, 스태필로코쿠스 에퀴오룸 BCNU 3002(KACC 81031BP) 균주.

청구항 6

스타필로코쿠스 에퀴오룸 BCNU 3002(KACC 81031BP) 균주 또는 이의 배양액을 포함하는 바이오제닉 아민 분해용 또는 저감화용 조성물.

청구항 7

제6항의 조성물을 포함하는 바이오제닉 아민 분해용 또는 저감화용 미생물 제제.

청구항 8

제6항의 조성물을 포함하는 바이오제닉 아민 분해용 또는 저감화용 미생물 스타터.

청구항 9

스타필로코쿠스 에퀴오룸 BCNU 3002(KACC 81031BP) 균주를 배양하는 단계;를 포함하는 바이오제닉 아민 분해용 또는 저감화용 미생물 제제의 제조방법.

청구항 10

스타필로코쿠스 에퀴오룸 BCNU 3002(KACC 81031BP) 균주를 배양하는 단계;를 포함하는 바이오제닉 아민 분해용 또는 저감화용 미생물 스타터의 제조방법.

청구항 11

스타필로코쿠스 에퀴로룸 BCNU 3002(KACC 81031BP) 균주 또는 이의 배양액을 포함하는 바이오제닉 아민이 저감화된 식품 조성물.

청구항 12

제11항에 있어서,

상기 식품은 발효식품인 것을 특징으로 하는 바이오제닉 아민이 저감화된 식품 조성물.

청구항 13

스타필로코쿠스 에퀴로룸 BCNU 3002(KACC 81031BP) 균주 또는 이의 배양액을 발효식품에 처리하는 단계;를 포함하는 발효식품 내 바이오 제닉 아민의 저감화 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 신규한 스타필로코쿠스 에퀴로룸 BCNU 3002(KACC 81031BP) 균주 및 이를 포함하는 바이오제닉 아민 분해용 또는 저감화용 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 바이오제닉 아민(biogenic amine)은 단백질을 함유한 식품이 부패하거나, 발효·숙성 과정에서 유리아미노산이 미생물의 탈탄산작용, 아미노기 전이작용 등의 화학적 작용에 의해 주로 생성되는 질소화합물이다. 바이오제닉 아민은 발효식품, 어류제품, 육류제품, 낙농제품, 포도주, 맥주, 채소, 과일, 견과류 등 다양한 식품에 함유되어 있다. 이러한 바이오제닉 아민은 인체 및 동물 체내에서 신경전달물질로서 직·간접적으로 작용하고, 혈압조절, 혈류 등의 심혈관계에도 영향을 미치므로 바이오제닉 아민이 함유된 식품의 섭취로 여러 약리적인 현상이 나타날 수 있다.

[0003] 식품에서 주로 발견되는 바이오제닉 아민은 히스타민, 티라민, 푸트레신, 카다베린 등이 있으며, 구조상 지방족 화합물(putrescine, cadaverine 등), 방향족화합물(tyramine, 2-phenylethylamine), 헤테로고리화합물(histamine, tryptamine)로 나눌 수 있는데, 지방족 화합물은 부패의 지표물질로서 흔히 이용되고 있으며, 최근에는 이들 폴리아민(polyamine)류는 세포의 성장과 증식에 관여하는 인자로 알려져 연구가 진행되고 있으며, N-니트로사민(N-nitrosamine)과 같은 발암물질로 전환될 수 있는 잠재성을 갖고 있는 것으로 알려져 있다.

[0004] 바이오제닉 아민 중 가장 널리 알려진 물질은 히스타민으로, 고등어, 꽂치, 정어리, 참치 등의 어종이 비위생적 처리로 인해 부패가 발생하게 되면 발진, 국소적 피부염증, 구토 등을 증상으로 하는 'scombrototoxicosis'를 유발하게 된다. 하지만 히스타민에 의한 식중독은 식품섭취를 통한 알레르기와 증상이 비슷해 그 발생빈도가 잘 알려져 있지 않다. 바이오제닉 아민의 독성 증세로는 오심, 호흡곤란, 발열홍조, 발한, 두통, 구강작열통, 설사, 경련, 홍반, 혈압상승, 두드러기 등이 발생할 수 있는데, 특히 티라민은 혈관수축 및 혈압상승작용에 관여하는 가장 강한 혈압증진 아민으로 고혈압을 유발할 수 있으며, 편두통을 유발하기도 한다.

[0005] 현재 외국에서의 바이오제닉 아민에 대한 규정과 관련하여 히스타민에 대해 국제식품규격위원회(Codex)를 비롯한 유럽연합(EU) 등 일부 국가에서는 어육 및 가공 어육제품에 대해 100~200ppm 이하를 권장하고 있으며, 미국은 가다랑어 및 참치 통조림에 대해 500ppm 이하로 규정하고 있다. 한편 우리나라 발효식품인 김치, 된장, 젓갈 등은 조미를 위해 꾸준히 섭취가 된다는 점을 고려할 때 우리나라에서도 발효식품 특성에 맞는 기준 규격이 필요하다.

[0006] 따라서, 바이오제닉 아민 분해능이 우수한 스타터 균주를 탐색하여 발효식품뿐만 아니라 맥주, 소시지, 와인 등 다양한 식품에 적용하여 식품의 안전성을 높일 필요가 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0007] 이에 본 발명자들은 바이오제닉 아민 분해능을 갖는 균주를 탐색하던 중, 신규한 스태필로코쿠스 에퀴오룸(*Staphylococcus equorum*) BCNU 3002 균주를 발굴하고, 상기 균주는 바이오제닉 아민 분해 또는 저감화에 우수함을 확인하여 본 발명을 완성하였다.
- [0008] 따라서, 본 발명의 목적은 신규한 스태필로코쿠스 에퀴오룸(*Staphylococcus equorum*) BCNU 3002(KACC 81031BP) 균주를 제공하는 것이다.
- [0009] 또한, 본 발명의 목적은 상기 스태필로코쿠스 에퀴오룸 BCNU 3002(KACC 81031BP) 균주 또는 이의 배양액을 포함하는 바이오제닉 아민 분해용 또는 저감화용 조성물을 제공하는 것이다.
- [0010] 또한, 본 발명의 목적은 상기 조성물을 포함하는 바이오제닉 아민 분해용 또는 저감화용 미생물 제제를 제공하는 것이다.
- [0011] 또한, 본 발명의 목적은 조성물을 포함하는 바이오제닉 아민 분해용 또는 저감화용 미생물 스타터를 제공하는 것이다.
- [0012] 또한, 본 발명의 목적은 상기 스태필로코쿠스 에퀴오룸 BCNU 3002(KACC 81031BP) 균주를 배양하는 단계;를 포함하는 바이오제닉 아민 분해용 또는 저감화용 미생물 제제의 제조방법을 제공하는 것이다.
- [0013] 또한, 본 발명의 목적은 상기 스태필로코쿠스 에퀴오룸 BCNU 3002(KACC 81031BP) 균주를 배양하는 단계;를 포함하는 바이오제닉 아민 분해용 또는 저감화용 미생물 스타터의 제조방법을 제공하는 것이다.
- [0014] 또한, 본 발명의 목적은 상기 스태필로코쿠스 에퀴오룸 BCNU 3002(KACC 81031BP) 균주 또는 이의 배양액을 포함하는 바이오제닉 아민이 저감화된 식품 조성물을 제공하는 것이다.
- [0015] 또한, 본 발명의 목적은 상기 스태필로코쿠스 에퀴오룸 BCNU 3002(KACC 81031BP) 균주 또는 이의 배양액을 발효 식품에 처리하는 단계;를 포함하는 발효식품 내 바이오제닉 아민의 저감화 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0016] 상기와 같은 과제를 해결하기 위해, 본 발명은 신규한 스태필로코쿠스 에퀴오룸(*Staphylococcus equorum*) BCNU 3002(KACC 81031BP) 균주를 제공한다.
- [0017] 또한, 본 발명은 상기 스태필로코쿠스 에퀴오룸 BCNU 3002(KACC 81031BP) 균주 또는 이의 배양액을 포함하는 바이오제닉 아민 분해용 또는 저감화용 조성물을 제공한다.
- [0018] 또한, 본 발명은 상기 조성물을 포함하는 바이오제닉 아민 분해용 또는 저감화용 미생물 제제를 제공한다.
- [0019] 또한, 본 발명은 조성물을 포함하는 바이오제닉 아민 분해용 또는 저감화용 미생물 스타터를 제공한다.
- [0020] 또한, 본 발명은 상기 스태필로코쿠스 에퀴오룸 BCNU 3002(KACC 81031BP) 균주를 배양하는 단계;를 포함하는 바이오제닉 아민 분해용 또는 저감화용 미생물 제제의 제조방법을 제공한다.
- [0021] 또한, 본 발명은 상기 스태필로코쿠스 에퀴오룸 BCNU 3002(KACC 81031BP) 균주를 배양하는 단계;를 포함하는 바이오제닉 아민 분해용 또는 저감화용 미생물 스타터의 제조방법을 제공한다.
- [0022] 또한, 본 발명은 상기 스태필로코쿠스 에퀴오룸 BCNU 3002(KACC 81031BP) 균주 또는 이의 배양액을 포함하는 바이오제닉 아민이 저감화된 식품 조성물을 제공한다.
- [0023] 또한, 본 발명은 상기 스태필로코쿠스 에퀴오룸 BCNU 3002(KACC 81031BP) 균주 또는 이의 배양액을 발효식품에 처리하는 단계;를 포함하는 발효식품 내 바이오제닉 아민의 저감화 방법을 제공한다.

발명의 효과

- [0024] 본 발명의 신규한 스태필로코쿠스 에퀴오룸(*Staphylococcus equorum*) BCNU 3002(KACC 81031BP) 균주를 이용시, 식품의 발효 과정 동안 바이오제닉 아민을 생산하지 않고 바이오제닉 아민의 높은 분해 및 저감화 활성을 가지며, 독성이 없고 안전한 발효식품을 생산할 수 있는 효과가 있어 산업적으로 유용하게 이용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0025] 도 1은 16s rDNA를 이용하여 본 발명의 신규한 스태필로코쿠스 에퀴오룸(*Staphylococcus equorum*) BCNU 3002(KACC 81031BP) 균주의 계통도를 나타낸 도이다.
- 도 2는 pH 조건에 따른 스태필로코쿠스 에퀴오룸 BCNU 3002 균주(KACC 81031BP)의 바이오제닉 아민 분해능을 확인한 결과를 나타낸 도이다.
- 도 3은 온도 조건에 따른 스태필로코쿠스 에퀴오룸 BCNU 3002 균주(KACC 81031BP)의 바이오제닉 아민 분해능을 확인한 결과를 나타낸 도이다.
- 도 4는 본 발명의 스태필로코쿠스 에퀴오룸 BCNU 3002 균주(KACC 81031BP)의 바이오제닉 아민 분해능을 확인한 결과를 나타낸 도이다(H는 히스타민, C는 카다베린, P는 푸트레신 및 T는 티라민을 의미함).
- 도 5는 본 발명의 스태필로코쿠스 에퀴오룸 BCNU 3002 균주(KACC 81031BP) 처리균과 대조균을 비교하여 본 발명 균주의 바이오제닉 아민 분해능을 확인한 결과를 나타낸 도이다(H는 히스타민, P는 푸트레신 및 T는 티라민을 의미함).
- 도 6은 일반 제조 새우 젓갈에 스타터 균주로서 본 발명의 스태필로코쿠스 에퀴오룸 BCNU 3002 균주(KACC 81031BP)를 접종 시 바이오제닉 아민 분해능을 확인한 결과를 나타낸 도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0026] 본 발명은 신규한 스태필로코쿠스 에퀴오룸(*Staphylococcus equorum*) BCNU 3002(KACC 81031BP) 균주를 제공한다.
- [0027] 본 발명에 있어서, 상기 "스타필로코쿠스(*Staphylococcus*)"는 포도상구균이라고도 하며, 미크로코쿠스과(*Micrococcaceae*)에 속하며 그람 양성이고 지름 0.8~1.0 μm 의 구균이다. 포도당을 혐기적으로 분해하여 산(acid)을 생성하고, 여러가지 용혈소를 생산한다.
- [0028] 상기 스태필로코쿠스 에퀴오룸 BCNU 3002(KACC 81031BP) 균주는 서열번호 1로 표시되는 16S rDNA를 포함하고, 이에 제한되지 않는다.
- [0029] 상기 스태필로코쿠스 에퀴오룸 BCNU 3002(KACC 81031BP) 균주는 바이오제닉 아민(biogenic amine) 분해능을 갖으며, 상기 바이오제닉 아민은 히스타민(histamine), 티라민(tryamine), 푸트레신(putreacine), 카다베린(cadaverine), 아그마틴(agmatine), 스페르민(spermine), 스페르미딘(spermidine), 2-페닐에틸아민(2-phenylethylamine) 및 트립타민(tryptamine)으로 이루어진 군 중에서 선택된 1종 이상이고, 바람직하게는 히스타민, 타리만, 푸트레신 및 카다베린이나 이에 제한되지 않는다.
- [0030] 상기 스태필로코쿠스 에퀴오룸 BCNU 3002(KACC 81031BP) 균주는 pH 4 내지 7, 20 내지 45의 온도에서 바이오제닉 아민 분해 활성을 나타내고, 바람직하게는 pH 4 내지 6, 25 내지 35의 온도에서 더욱 활성화되나, 이에 제한되지 않는다.
- [0031] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 본 발명의 균주를 분자학적으로 분석한 결과, 스태필로코쿠스 에퀴오룸임을 확인하고 신규한 균주임을 확인하여, 이를 스태필로코쿠스 에퀴오룸(*Staphylococcus equorum*) BCNU 3002로 명명하였다. 또한, 상기 균주를 2016년 10월 20일자로 대한민국 특허기관인 국립농업과학원 농업유전자원센터에 기탁하여 기탁번호 KACC 81031BP를 부여 받았다. 본 발명의 스태필로코쿠스 에퀴오룸 BCNU 3002(KACC 81031BP) 균주는 요소분해효소(urease), 젤라티나아제(gelatinase) 암모니아 및 인돌(indole)을 생성하지 않아 장내 안전성이 존재한다. 또한, 본 발명의 스태필로코쿠스 에퀴오룸 BCNU 3002 균주 처리균과 시중 판매 식품균을 비교하면 본 발명 균주가 처리된 식품에서 바이오제닉 아민의 함량이 낮아지므로, 본 발명의 균주가 바이오제닉 아민에 대한 분해능이 우수함을 확인하였다. 또한, 스타터 균주로서 젓갈에 접종 시 비접종균보다 젓갈 숙성 시간이 지날수록 바이오제닉 아민 분해능이 우수함을 확인하여, 관련 산업에 유용하게 이용될 수 있다.
- [0033] 또한, 본 발명은 상기 스태필로코쿠스 에퀴오룸 BCNU 3002(KACC 81031BP) 균주 또는 이의 배양액을 포함하는 바이오제닉 아민 분해용 또는 저감화용 조성물을 제공한다.
- [0034] 또한, 본 발명은 상기 조성물을 포함하는 바이오제닉 아민 분해용 또는 저감화용 미생물 제제를 제공한다.
- [0035] 본 발명에 의한 상기 미생물 제제는 그 제형에 있어 특별히 한정되지 않으나, 액상 형태로 제조할 수 있으며,

이에 증량제를 첨가하여 가루분말 형태로 제조할 수도 있고, 이를 제형화하여 과립화 형태로 제조할 수도 있다.

- [0037] 또한, 본 발명은 조성물을 포함하는 바이오제닉 아민 분해용 또는 저감화용 미생물 스타터를 제공한다.
- [0038] 본 발명에 있어서, 상기 "스타터"는 식품의 발효에 관여하는 미생물을 포함하는 제제로, 발효식품 제조 시 첨가함으로써 숙성된 식품에서 지배적으로 성장하는 미생물을 말하며, 본 발명의 목적상 스타터란, 바이오제닉 아민 분해 또는 저감화 효과가 우수하도록 제공하는 미생물, 즉, 본 발명의 스타필로코쿠스 에퀴오룸 BCNU 3002(KACC 81031BP) 균주를 필수적으로 포함함을 의미한다.
- [0040] 또한, 본 발명은 상기 스타필로코쿠스 에퀴오룸 BCNU 3002(KACC 81031BP) 균주를 배양하는 단계;를 포함하는 바이오제닉 아민 분해용 또는 저감화용 미생물 제제의 제조방법을 제공한다.
- [0041] 또한, 본 발명은 상기 스타필로코쿠스 에퀴오룸 BCNU 3002(KACC 81031BP) 균주를 배양하는 단계;를 포함하는 바이오제닉 아민 분해용 또는 저감화용 미생물 스타터의 제조방법을 제공한다.
- [0042] 본 발명에서 용어 "배양"은 미생물을 적당히 인공적으로 조절한 환경조건에서 생육시키는 것을 의미한다.
- [0043] 상기 스타필로코쿠스 에퀴오룸 BCNU 3002(KACC 81031BP) 균주는 통상의 배지에서 생육 가능하다. 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. 스타필로코쿠스 에퀴오룸 BCNU 3002(KACC 81031BP) 균주는 통상의 배양방법에 따라 배양할 수 있다.
- [0044] 배양에 사용되는 배지는 적당한 탄소원, 질소원, 아미노산, 비타민 등을 함유한 통상의 배지 내에서 온도, pH 등을 조절하면서 적절한 방식으로 본 발명의 균주의 요건을 충족해야 한다. 사용될 수 있는 탄소원으로는 글루코즈 및 자일로즈의 혼합당을 주 탄소원으로 사용하며 이외에 수크로즈, 락토즈, 프락토즈, 말토즈, 전분, 셀룰로즈와 같은 당 및 탄수화물, 대두유, 해바라기유, 피마자유, 코코넛유 등과 같은 오일 및 지방, 팔미트산, 스테아린산, 리놀레산과 같은 지방산, 글리세롤, 에탄올과 같은 알코올, 아세트산과 같은 유기산이 포함된다. 이들 물질은 개별적으로 또는 혼합물로서 사용될 수 있다. 사용될 수 있는 질소원으로는 암모니아, 황산암모늄, 염화암모늄, 초산암모늄, 인산암모늄, 탄산암모늄, 및 질산암모늄과 같은 무기질소원; 글루탐산, 메티오닌, 글루타민과 같은 아미노산 및 펩톤, NZ-아민, 육류 추출물, 효모 추출물, 맥아 추출물, 옥수수 침지액, 카세인 가수분해물, 어류 또는 그의 분해생성물, 탈지 대두 케이크 또는 그의 분해생성물 등 유기질소원이 사용될 수 있다. 이들 질소원은 단독 또는 조합되어 사용될 수 있다. 상기 배지에는 인원으로서는 인산 제1칼륨, 인산 제2칼륨 및 대응되는 소듐-함유 염이 포함될 수 있다. 사용될 수 있는 인원으로는 인산이수소칼륨 또는 인산수소이칼륨 또는 상응하는 나트륨-함유 염이 포함된다. 또한, 무기화합물로는 염화나트륨, 염화칼슘, 염화철, 황산마그네슘, 황산철, 황산망간 및 탄산칼슘 등이 사용될 수 있다. 마지막으로, 상기 물질에 더하여 아미노산 및 비타민과 같은 필수 성장 물질이 사용될 수 있다.
- [0045] 또한, 배양 배지에 적절한 전구체들이 사용될 수 있다. 상기된 원료들은 배양과정에서 배양물에 적절한 방식에 의해 회분식, 유가식 또는 연속식으로 첨가될 수 있으나, 특별히 이에 제한되지는 않는다. 수산화나트륨, 수산화칼륨, 암모니아와 같은 기초 화합물 또는 인산 또는 황산과 같은 산 화합물을 적절한 방식으로 사용하여 배양물의 pH를 조절할 수 있다.
- [0047] 또한, 본 발명은 상기 스타필로코쿠스 에퀴오룸 BCNU 3002(KACC 81031BP) 균주 또는 이의 배양액을 포함하는 바이오제닉 아민이 저감화된 식품 조성물을 제공한다.
- [0048] 본 발명의 스타필로코쿠스 에퀴오룸 BCNU 3002(KACC 81031BP) 균주를 식품에 첨가하는 경우, 상기 균주가 식품 내 바이오 제닉 아민을 효과적으로 분해시켜 식품 내 유해인자인 바이오 제닉 아민을 효과적으로 저감시킬 수 있다.
- [0049] 상기 식품은 발효 식품인 것이 바람직하고, 보다 바람직하게는 김치류, 장류, 젓갈류, 주류 및 발효 육가공류로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 발효식품이나, 이에 제한되지 않는다.

- [0050] 상기 김치류는 배추김치, 물김치, 깍두기, 열무김치, 총각김치, 오이김치, 파김치, 갓김치 등일 수 있고, 상기 장류는 메주, 한식된장, 된장, 조미된장, 고추장, 조미고추장, 춘장, 청국장, 혼합장, 한식간장, 양조간장, 혼합간장 등일 수 있고, 상기 젓갈류는 새우젓, 창난젓, 전복젓, 어간장, 연어알젓, 오징어젓, 은어젓, 젓갈, 양념젓갈, 액젓 등일 수 있고, 주류로는 맥주, 청주, 약주, 노주, 탁주, 과일주, 와인 등일 수 있으며, 발효 육가공류는 소시지, 햄, 건조육, 베이컨, 프레스햄 등일 수 있다. 그러나, 이에 제한되지 않는다.
- [0051] 본 발명의 상기 스태필로코쿠스 에퀴오룸 BCNU 3002(KACC 81031BP) 균주를 식품첨가물로 사용하는 경우, 상기 균주를 그대로 첨가하거나 다른 식품 또는 식품 성분과 함께 사용될 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다. 유효 성분의 혼합량은 그의 사용 목적(예방, 건강 또는 치료적 처치)에 따라 적합하게 결정될 수 있다. 일반적으로, 식품 또는 음료의 제조시에 본 발명의 균주는 원료에 대하여 15중량부 이하, 바람직하게는 10중량부 이하의 양으로 첨가된다. 그러나, 건강 및 위생을 목적으로 하거나 또는 건강 조절을 목적으로 하는 장기간의 섭취의 경우에는 상기 양은 상기 범위 이하일 수 있으며, 안전성 면에서 아무런 문제가 없기 때문에 유효성분은 상기 범위 이상의 양으로도 사용될 수 있다.
- [0052] 상기 식품의 종류에는 특별한 제한은 없으나, 스태필로코쿠스 에퀴오룸 BCNU 3002(KACC 81031BP) 균주를 함유하는 형태일 수 있으며, 또한 다른 식품의 첨가물로서도 이용될 수 있고, 바람직하게는 발효 식품이다.
- [0054] 또한, 본 발명은 상기 스태필로코쿠스 에퀴오룸 BCNU 3002(KACC 81031BP) 균주 또는 이의 배양액을 발효식품에 처리하는 단계;를 포함하는 발효식품 내 바이오제닉 아민의 저감화 방법을 제공한다.
- [0055] 본 발명의 목적 상, 본 발명의 상기 스태필로코쿠스 에퀴오룸 BCNU 3002(KACC 81031BP) 균주 또는 이의 배양액을 처리 시, 발효식품의 바이오 제닉 아민의 함량이 낮아지므로 본 발명의 균주는 바이오 제닉 아민에 대한 분해능이 뛰어나, 발효식품 제조 및 가공 단계에서 효과적으로 바이오 제닉 아민을 제어할 수 있다.
- [0057] 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.
- [0059] **실시예 1. 균주의 분리 및 16S rDNA 확인**
- [0060] 균주를 분리하고 이의 16S rDNA를 확인하여 종래의 스태필로코쿠스 에퀴오룸(*Staphylococcus equorum*)와 상동성을 비교하여 신규한 균주임을 확인하였다.
- [0061] 구체적으로, 일반 가정 및 시중에서 판매되는 새우 젓갈에서 분리한 균주 중에서, 바이오제닉 아민 분해능을 갖는 균주를 선발하였다. 상기 선발된 균주의 genomic DNA를 분리한 후, 16S rDNA를 분석하였다. 그 결과를 도 1에 나타내었다.
- [0062] 도 1에 나타낸 바와 같이, 본 발명의 균주를 분자학적으로 분석한 결과, 스태필로코쿠스 에퀴오룸임을 확인하고 신규한 균주임을 확인하여, 스태필로코쿠스 에퀴오룸(*Staphylococcus equorum*) BCNU 3002로 명명하였다. 또한, 상기 균주를 2016년 10월 20일자로 대한민국 특허균주 기탁기관인 국립농업과학원 농업유전자원센터에 기탁하여 기탁번호 KACC 81031BP를 부여 받았다. 또한, 상기 스태필로코쿠스 에퀴오룸 BCNU 3002의 16S rDNA의 염기서열을 서열번호 1로 나타내었다.
- [0064] **실시예 2. 스태필로코쿠스 에퀴오룸 BCNU 3002의 장내 안전성 조사**
- [0065] 상기 실시예 1에서 선발한 스태필로코쿠스 에퀴오룸 BCNU 3002을 스타터 균주로서 이용하기 위하여, 식품에 적용하게 되면 섭취를 통해 인체 내로 들어오게 되므로 장내에서 유해성을 나타내는지 확인하였다.
- [0066] 구체적으로, 본 발명의 스태필로코쿠스 에퀴오룸 BCNU 3002에서 장내 세균이 생산하는 유해 효소 중 요소분해효소(urease) 및 젤라티나아제(gelatinase) 분비 여부를 *E. coli* ATCC10798과 비교하여 확인하였다. 또한, 유해 대사산물인 암모니아 및 인돌(indole) 분비 여부 또한 확인하였다. 그 결과를 하기 표 1에 나타내었다.

[0067] 표 1에 나타난 바와 같이, E. coli ATCC10798과 비교하여, 본 발명의 스태필로코쿠스 에퀴오룸 BCNU 3002 균주는 요소분해효소, 젤라티나아제, 암모니아 및 인돌을 분비하지 않아, 장내 안정성이 존재하여 스타터 균주로서 이용에 적합함을 확인하였다.

표 1

	E. c ¹⁾	BCNU 3002
Ammonia	- ²⁾	-
indole	+	-
Gelatinase	-	-
urease	-	-

¹⁾ E. c : *Escherichia coli* ATCC 10798

²⁾ +: positive, -: negative

[0068]

[0070] 실시예 3. 스태필로코쿠스 에퀴오룸 BCNU 3002의 최적의 바이오제닉 아민 분해능 조건 확인

[0071] 3-1. 시료 추출

[0072] 본 발명의 스태필로코쿠스 에퀴오룸 BCNU 3002 균주를 Lactobacilli MRS broth에서 18시간 배양한 뒤 원심분리하여(8,000×g, 10분, 4도) 배양액을 이용하였다. 하기 일련의 실험을 위하여, 실험에 사용한 식품은 시장에서 구입한 새우젓갈을 이용하였다. 상기 각각의 식품과 배양액을 각각 1:1의 비율로 혼합한 후 20도에서 18시간 동안 반응시켰으며, 비교를 위해 조추출물을 대신하여 MRS broth를 동량 넣은 식품을 대조군으로 사용하였다. 반응 후 각각의 혼합물에 0.4M perchloride acid 10mL을 각각 첨가하여 초음파 수조(HAN-400A, 한샘인테리어, Korea)에서 30분 동안 처리하고, 5,000×g에서 5분간 원심 분리하여 얻은 상층액을 시료로 사용하였다.

[0074] 3-2. 유도체화

[0075] 상기 3-1의 각각의 시료 1mL에 2M 수산화나트륨 200 μL와 탄산수소나트륨 300 μL를 혼합한 후, 1% 댄실클로라이드(dansyl chloride)가 첨가된 2mL의 아세톤 용액에 첨가하고 40도에서 45분 동안 유도체화시켰다. 유도체화시킨 각각의 시료에 25% 수산화암모늄 100 μL을 넣고 25에서 30분 동안 반응시켜 여분의 댄실클로라이드를 제거한 뒤 아세토니트릴을 이용하여 총 부피를 5mL로 조정하였다. 각각의 혼합물은 원심분리(3,000×g, 5분, 4도)한 후 0.2μm의 필터로 여과한 다음 HPLC 분석을 위한 시료로 사용하였다.

[0077] 3-3. 액체 크로마토그래피를 이용한 스태필로코쿠스 에퀴오룸 BCNU 3002 균주의 바이오제닉 아민 분해능 분석 조건

[0078] 본 발명의 스태필로코쿠스 에퀴오룸 BCNU 3002 균주를 바이오제닉 아민 분해 능력을 정량적으로 분석하기 위하여, 액체 크로마토그래피(LC-20AD series, SHIMADZU, Japan)를 이용하여 수행하였다. 칼럼은 ODS C18(250×4.6 mm, 5μm)으로 40으로 사용하였고, 전개용매는 아세토니트릴: 0.1M 아세트산암모늄을 단계적으로 50:50의 비율로 시작하여 19분에 10:90의 비율로 1mL/분의 속도로 전개하였으며, 각각의 시료는 15 μL씩 주입하였다. 다이오드 어레이 검출기를 이용하여 254nm에서 모니터링을 수행하였다.

- [0080] 3-4. pH-온도에 따른 스태필로코쿠스 에퀴오룸 BCNU 3002 균주의 바이오제닉 아민 분해능 분석
- [0081] pH 및 온도에 따른 스태필로코쿠스 에퀴오룸 BCNU 3002 균주의 바이오제닉 아민 분해능 분석하기 위하여, 다양한 pH 범위의 버퍼 및 온도에서 상기 3-3의 방법에 따라, 바이오 제닉 아민의 분해능을 확인하였다.
- [0082] 구체적으로, pH 4~5는 0.05M 아세테이트 버퍼(acetate buffer), pH 6~7은 0.05M 포스페이트 버퍼(phosphate buffer), pH 8~10은 트리스 버퍼(Tris buffer)를 각각 사용하였다. 온도는 20 내지 45도 조건으로 반응시켰으며, 각 버퍼에는 0.01%의 바이오제닉 아민을 첨가하였다. 본 발명의 스태필로코쿠스 에퀴오룸 BCNU 3002 균주를 Lactobacill MRS broth에서 18시간 배양한 후 배양액 1mL를 멸균된 상기 각 조건의 버퍼 9mL와 혼합하였다. 그 후, 20 내지 45도에서, pH 4 내지 8의 조건으로 24시간 동안 배양하였다. 배양한 시료는 원심분리(8000×g, 10분, 4도)하고, 얻어진 상등액 1mL을 채취하여 유도체 과정을 거친 후, 상기 3-3의 액체 크로마토그래피 방법을 이용하여 바이오 제닉 분해능을 측정하였다. 그 결과를 도 2 내지 4에 나타내었다.
- [0083] 도 2에 나타난 바와 같이, pH 6 조건이었을 때 스태필로코쿠스 에퀴오룸 BCNU 3002 균주의 히스타민(H), 카다베린(C), 푸트레신(P) 및 티라민(T)의 분해능이 가장 높음을 확인하여, pH 최적의 조건은 pH 5임을 확인하였다.
- [0084] 또한, 도 3에 나타난 바와 같이, 온도 조건이 30도일 때, 스태필로코쿠스 에퀴오룸 BCNU 3002는 히스타민(H), 카다베린(C), 푸트레신(P) 및 티라민(T)의 분해능이 가장 높음을 확인하여, 최적의 온도 조건은 30도임을 확인하였다.
- [0085] 또한, 도 4에 나타난 바와 같이, 본 발명의 스태필로코쿠스 에퀴오룸 BCNU 3002 균주는 pH 6 및 30도의 조건에서 24시간 배양하였을 때, 히스타민(H)은 45%, 카다베린(C)은 42%, 푸트레신(P)은 38.8% 및 티라민(T)은 42% 순으로 분해능이 나타남을 확인하였다.
- [0087] **실시예 4. 스태필로코쿠스 에퀴오룸 BCNU 3002의 배양액(조추출물)을 이용한 바이오제닉 아민 분해능 확인**
- [0088] 스태필로코쿠스 에퀴오룸 BCNU 3002의 배양액(조추출물)을 이용한 바이오제닉 아민(히스타민, 카다베린, 푸트레신 및 티라민) 분해능을 확인하기 위하여, 시중에 판매되는 식품에 스태필로코쿠스 에퀴오룸 BCNU 3002의 배양액(조추출물)을 혼합하여 바이오제닉 아민 분해능을 확인하였다.
- [0089] 구체적으로, 본 발명의 스태필로코쿠스 에퀴오룸 BCNU 3002 균주를 Lactobacill MRS broth에서 18시간 배양한 뒤 원심분리하여(8,000×g, 10분, 4도) 배양 상등액을 조추출물로 사용하였다. 실험에 사용한 식품은 시장에서 구입한 새우젓갈을 이용하였다. 대조군으로는 본 발명 균주의 배양액(조추출물) 대신 MRS broth를 혼합하였다. 실험군으로 본 발명 균주의 배양액(조추출물)과 배추 젓갈을 각각 1:1 중량비로 혼합하였다. 각 군을 20, 130rpm으로 반응시켰으며, 반응 후 각각의 혼합물에 0.4M perchloride acid 10mL을 각각 첨가하여 초음파 수조(HAN-400A, 한샘인테리어, Korea)에서 30분 동안 처리하고, 5,000×g에서 5분간 원심분리하여 얻은 상층액을 시료로 사용하였다. 그 결과를 도 5에 나타내었다.
- [0090] 도 5에 나타난 바와 같이, 젓갈에 본 발명의 스태필로코쿠스 에퀴오룸 BCNU 3002 균주를 혼합한 군에서는 티라민(T)은 55%, 푸트레신(P)은 50.3% 및 히스타민(H)은 48% 순으로 분해함을 확인하였다.
- [0091] 따라서, 본 발명의 스태필로코쿠스 에퀴오룸 BCNU 3002 균주의 배양액(조추출물) 또한 바이오제닉 아민 분해능이 우수함을 확인하였다.
- [0093] **실시예 5. 스타터 균주로서 스태필로코쿠스 에퀴오룸 BCNU 3002 균주의 바이오제닉 아민 분해능 확인**
- [0094] 스타터 균주로서 본 발명의 스태필로코쿠스 에퀴오룸 BCNU 3002 균주를 일반적인 방법으로 제조한 것갈에 처리한 군 및 비처리군과 비교하여, 시간이 지남에 따라 젓갈이 숙성되는 동안의 바이오제닉 아민(히스타민, 카다베린, 푸트레신 및 티라민) 분해능을 확인하였다.
- [0095] 구체적으로, 젓갈은 새우 젓갈로 제조하였었으며, 100g의 새우를 소금물에 담갔다가 물기를 제거한 후 소금 50g과 혼합하여 깨끗한 밀폐용기를 담고 남은 소금을 위에 덮어 밀봉한 뒤 하루 동안 숙성한 것을 사용하였다. 바이오제닉 아민 측정을 위해 시료는 밀폐 용기에 담아 10도의 항온기 내에서 30일 동안 발효시키면서 15일째에 1%(w/w)의 본 발명의 스태필로코쿠스 에퀴오룸 BCNU 3002 균주 배양액을 스타터로 접종하였다. 대조군으로 배양

액을 접종하지 않은 젓갈을 이용하였으며, 바이오제닉 아민 분해능을 5일 간격으로 30일까지 시료를 채취하여 확인하였다. 그 결과를 도 6에 나타내었다.

[0096] 도 6에 나타난 바와 같이, 본 발명의 스태필로코쿠스 에퀴오룸 BCNU 3002 균주 배양액을 스타터 균주로서 젓갈에 접종 시, 바이오제닉 아민(히스타민, 카다베린, 푸트레신 및 티라민)의 분해능이 30% 이상으로 나타남을 확인하였으며, 시간이 지날수록 약 60% 이상의 분해능이 나타남을 확인하였다. 반면, 본 발명의 스태필로코쿠스 에퀴오룸 BCNU 3002 균주를 접종하지 않은 대조군에서는 바이오제닉 아민(히스타민, 카다베린, 푸트레신 및 티라민)의 분해능이 미미함을 확인하였다.

[0097] 따라서, 본 발명의 스태필로코쿠스 에퀴오룸 BCNU 3002 균주는 스타터 균주로서 시간이 지남에 따라 바이오제닉 아민 분해능이 우수함을 확인하였다.

수탁번호

[0098]

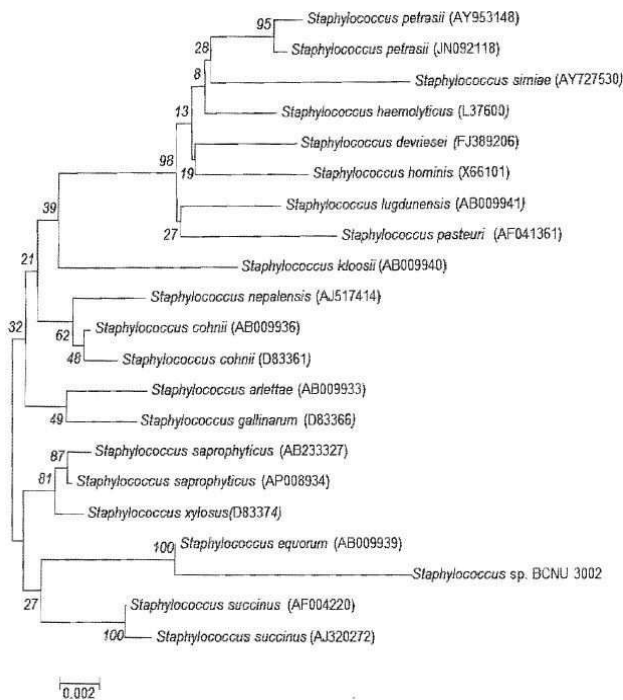
기탁기관명 : 국립농업과학원농업유전자원센터

수탁번호 : KACC81031BP

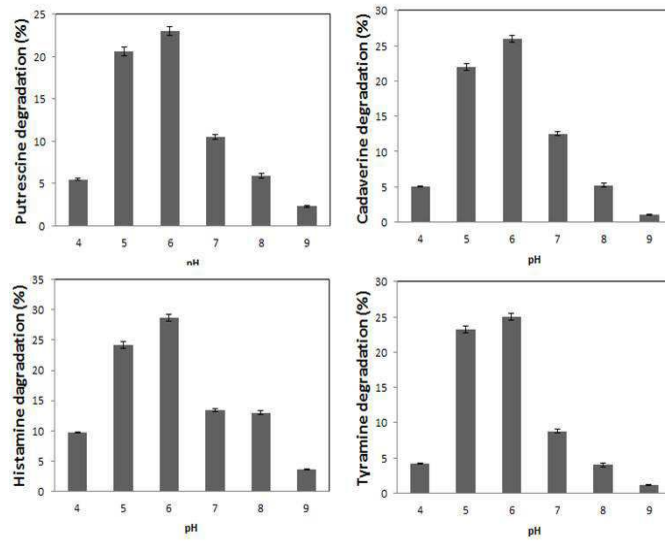
수탁일자 : 20161020

도면

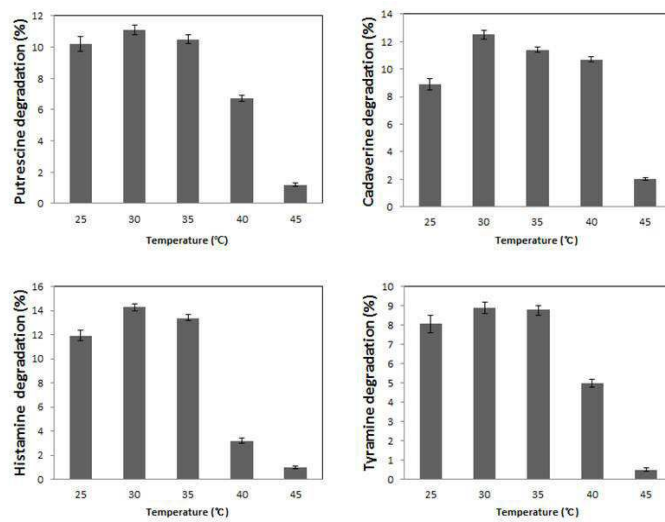
도면1



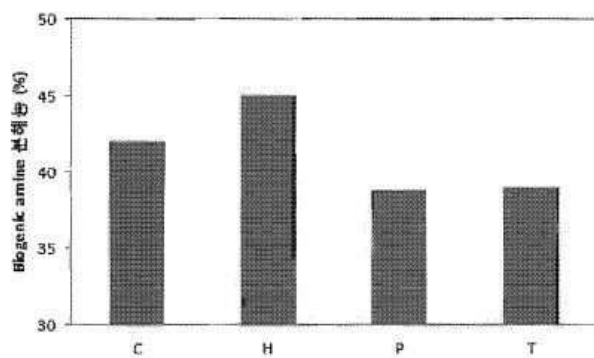
도면2



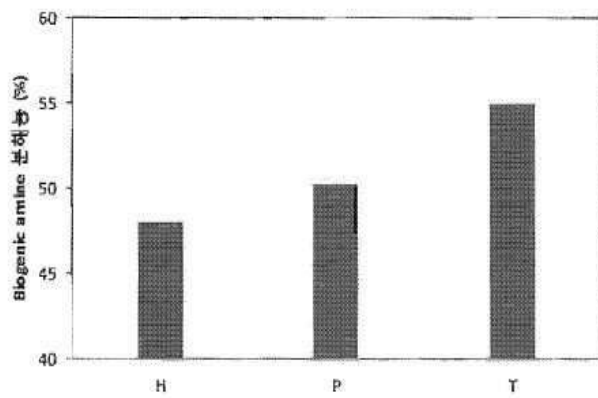
도면3



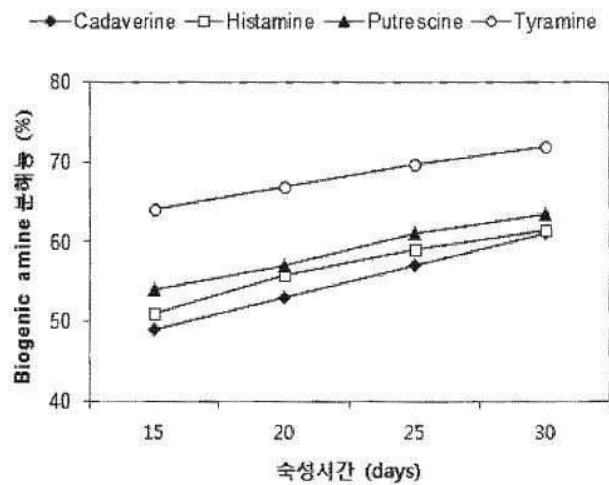
도면4



도면5



도면6



서열 목록

- <110> CHANGWON NATIONAL UNIVERSITY Industry Academy Cooperation Corps
- <120> Novel *Staphylococcus equorum* BCNU 3002 strain
- <130> 1-71
- <160> 1
- <170> KoPatent In 3.0
- <210> 1
- <211> 1136
- <212> DNA
- <213> Unknown
- <220><223> 16S rDNA of *Staphylococcus equorum* BCNU 3002 strain
- <400> 1

ggagcttgct cctttgaagt tagcggcgga cgggtgagta acacgtgggt aacctaccta

60

taagactgga ataacttcgg gaaaccggag ctaatgccgg ataacatttg gaaccgcatg	120
gttctaaagt aaaagatggt ttgtctatca cttatagatg gacccgcgcc gtattagcta	180
gttggtaagg taacggctta ccaaggcaac gatacgtagc cgacctgaga gggatgatcgg	240
ccacctgga actgagacac ggtccagact cctacgggag gcagcagtag ggaatcttcc	300
gcaatggacg aaagtctgac ggagcaacgc cgcgtgagtg atgaaggttt tcggatcgta	360
aaactctgtt attaggggag aacaaatgtg taagtaactg tgcacatctt gacggtaacct	420
aatcagaaag ccacggctaa ctacgtgcca gcagccgcgg taatacgtag gtggcaagcg	480
ttatccggaa ttattgggag taaagcgcgc gtaggcgggt tcttaagtct gatgtgaaag	540
cccacggctc aaccgtggag ggtcattgga aactgggaaa cttgagtaca gaagaggaaa	600
gtggaattcc atgtgtagcg gtgaaatgcg cagagatatg gaggaacacc agtggcgaag	660
gcgactttct ggictgtaac tgacgtgat gtgcgaaagc gtggggatca aacaggatta	720
gataccctgg tagtccacgc cgtaaacgat gagtgctaag tgttaggggg tttccgcccc	780
ttagtgctgc agctaacgca ttaagcactc cgctgggga gtacgaccgc aaggttgaaa	840
ctcaaaggaa ttgacgggga cccgcacaag cgtggagca tgtggtttta ttcgaagcaa	900
cgcaagaac cttaccaaat cttgacatcc ttgaaaact ctagagatag agccttcccc	960
ttcgggggac aaagtgacag gtggatcatg gttgtcgtca gtcgtgtcg tgagatgttg	1020
ggttaagtcc cgcaacgagc gcaaccctta aacttagttg ccagcattta gttgggcact	1080
ctaggttgac tgccggtgac aaaccggagg aagtgggga tgacgtcaaa tcatca	1136