



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2016년10월13일
 (11) 등록번호 10-1665888
 (24) 등록일자 2016년10월06일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
 A23L 7/10 (2016.01) A23L 29/00 (2016.01)
 (52) CPC특허분류
 A23L 7/10 (2016.08)
 A23L 29/065 (2016.08)
 (21) 출원번호 10-2015-0148670(분할)
 (22) 출원일자 2015년10월26일
 심사청구일자 2015년10월26일
 (65) 공개번호 10-2015-0125918
 (43) 공개일자 2015년11월10일
 (62) 원출원 특허 10-2013-0087981
 원출원일자 2013년07월25일
 심사청구일자 2013년07월25일
 (56) 선행기술조사문헌
 JP09289890 A*
 KR100519083 B1*
 *는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
 한국식품연구원
 경기도 성남시 분당구 안양관교로1201번길 62 (백현동)
 (72) 발명자
 박해웅
 광주광역시 광산구 수동로123번길 21 110동 1101호 (신가동, 수완지구호반베르디움1차아파트)
 김태운
 광주광역시 남구 효사랑길 14 포스코아파트 103동 1608호
 (뒷면에 계속)
 (74) 대리인
 특허법인다나

전체 청구항 수 : 총 3 항

심사관 : 김태산

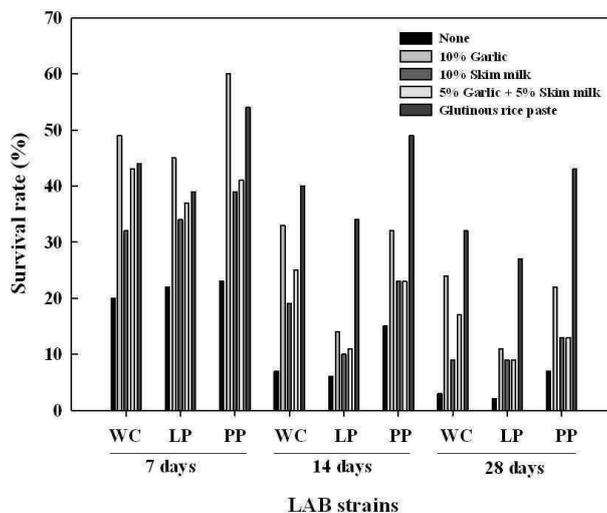
(54) 발명의 명칭 동결보호제로서 찹쌀풀을 이용하는 생존율이 증진된 식품 발효용 미생물 첨가제 조성물 및 이의 제조방법

(57) 요약

본 발명은 유산균 및 동결보호제로서 찹쌀풀을 포함하는 식품 발효용 미생물 첨가제 조성물 및 이의 제조방법을 제공한다.

본 발명에서 신규 동결보호제로 사용하는 찹쌀풀은 식품 발효용 미생물 첨가제 조성물을 제조회법에 있어서 균체의 보호 효과가 종래의 동결보호제에 비해 매우 뛰어날 뿐만 아니라, 식품등급의 재료로서 안정성을 제공해 준다. 따라서, 본 발명에 따른 식품 발효용 미생물 첨가제 조성물은 미생물의 생존율을 극대화시켜 고품질의 식품 생산을 가능하게 하며, 식품의 품질 균일화 및 품질 유지를 위한 수단으로서 유산균을 낮은 단가로 공급할 수 있게 한다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A23V 2002/00 (2013.01)

A23V 2200/206 (2013.01)

(72) 발명자

이중희

광주광역시 북구 일곡마을로 10 402동 110호 (일곡동, 청솔4차아파트)

최학종

광주광역시 서구 풍암순환로 183 101동 1506호 (풍암동, 우미아파트)

박성희

서울특별시 관악구 봉천로 308-22 (봉천동)

장자영

광주광역시 광산구 장덕로95번길 45 105동 1401호 (장덕동, 수원GS자이아파트)

곽현정

대전광역시 서구 월평중로24번길 18 401호 (월평동, 대정하우스)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 311041-3

부처명 농림수산식품부

연구관리전문기관 농림수산식품기술기획평가원

연구사업명 고부가가치식품기술개발사업

연구과제명 전통발효식품(무발효제)의 개선을 위한 미생물 첨가제 개발 및 보금시스템 구축

기여율 1/1

주관기관 한국식품연구원 부설 세계김치연구소

연구기간 2011.09.29 ~ 2014.09.28

명세서

청구범위

청구항 1

Weissella cibaria, *Lactobacillus plantarum* 및 *Pediococcus pentosaceus*로 이루어진 균으로부터 선택되는 1종 이상의 유산균 및 유산균의 동결보호제로서의 찹쌀풀을 혼합하여 동결하는 것을 포함하는 유산균의 동결 보호 방법으로서,

상기 혼합은 멸균수에 1×10^9 내지 1×10^{11} CFU/ml의 농도로 현탁되어 있는 유산균에 대해, 찹쌀과 멸균수를 1:6 내지 1:10의 비로 혼합하여 제조된 찹쌀풀을 150 내지 250%(v/v)로 첨가함으로써 수행되는, 유산균의 동결 보호 방법.

청구항 2

제1항에 있어서,

당류, 아미노산, 펩타이드, 젤라틴, 글리세롤, 당알콜, 유청, 알긴산, 아스코르빈산, 효모 추출물, 탈지유, 트레할로스 및 마늘 파쇄물로부터 선택되는 하나 이상의 추가의 동결보호제를 추가로 첨가하는 것을 포함하는 유산균의 동결 보호 방법.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 유산균은 김치 유래의 유산균인 유산균의 동결 보호 방법.

청구항 4

삭제

청구항 5

삭제

청구항 6

삭제

청구항 7

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 동결보호제로서 찹쌀풀을 이용하는 생존율이 증진된 식품 발효용 미생물 첨가제 조성물 및 이의 제조 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 식품의 발효에는 여러가지 다양한 유산균들이 관여한다. 발효 식품의 제조시, 식품의 품질 균일화 및 품질 유

지를 위해 우수한 유산균 균주를 분리 선발하여 식품 제조시 첨가할 수 있는 식품 발효용 미생물 첨가제에 대한 연구가 진행 중에 있다. 식품 발효용 미생물 첨가제를 보급하기 위해서는 미생물의 보존을 위한 제제화가 필요한데, 동결/동결건조는 대부분의 미생물을 효과적으로 장기 보존할 수 있는 방법이다. 오염방지, 저장, 수송, 경제성 등에서 동결/동결건조는 탁월한 장점을 찾을 수 있지만, 동결/동결건조 과정에서 균체의 활성과 생존율이 급격하게 감소하게 되므로 미생물 균체의 생존율을 극대화 할 수 있는 방법이 요구된다.

[0003] 기존의 유산균 동결건조 분말의 제조공정은 수용성 배지 등을 사용하여 혐기적 발효장치 내에서 이루어지는 유산균 발효 생산, 원심분리 및 한외여과를 사용한 균체 회수, 그리고 급속동결 및 동결건조의 순서로 이어진다. 이러한 과정은 동결시 얼음입자가 만들어지면서 세포의 막 구조를 손상시키고 유산균 분말이 공기, 수분, 온도 조건에 민감하게 반응하기 때문에 저장 및 유통안정성과 가공안정성을 확보하기에 어려움이 있다. 이를 개선하기 위하여 유산균이 사멸하지 않고 유지될 수 있는 수단으로 당류 및 아미노산, 탈지유, 젤라틴, 구연산 등의 동결보호제를 단독 또는 조합하여 첨가한다. 동결보호제는 유산균 분말에 물리화학적 안정성을 부여함으로써 단순 동결건조된 유산균 분말에 비하여 높은 생존율을 나타낸다.

[0004] 그러나, 주요 유산균에 대한 중균화 사업으로 동결건조 후 미생물 제제화가 실행되고 있지만, 아직까지는 실제 동결건조 후 생존율이 60-70%에 머물러 있어 생산비용의 증가라는 문제점이 나타나고 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 본 발명은 동결 또는 동결건조 후 미생물의 생존율을 향상시킨 식품 발효용 미생물 첨가제 조성물 및 이의 제조 방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

[0008] 본 발명은 유산균 및 동결보호제로서 찹쌀풀을 포함하는 식품 발효용 미생물 첨가제 조성물 및 이의 제조방법을 제공한다.

[0009] 본 발명의 식품 발효용 미생물 첨가제 조성물은 종래에 식품 발효용 미생물 첨가제에 포함될 수 있는 것으로 알려져 있는 유산균을 포함하며, 이들의 생존율을 향상시킬 수 있는 동결보호제로서 찹쌀풀을 포함하는 것을 특징으로 한다.

[0010] 하기 실시예에서 확인할 수 있는 바와 같이, 유산균의 동결보호제로서 기존에 사용되고 있는 탈지유나 마늘에 비해 찹쌀풀을 동결보호제로서 사용하였을 때 유산균의 동결건조 후 생존율이 월등히 향상됨을 확인하였다.

[0011] 본 발명에서 동결보호제로서 사용되는 찹쌀풀은 직접 제조하거나 통상 시판되고 있는 제품을 구입하여 이용할 수 있으며, 특별히 그 종류에 제한이 없다. 찹쌀풀은 식품등급의 재료로서 여러가지 식품에 사용되고 있는 안정성 높은 물질이므로 본 발명에 따른 미생물 첨가제 조성물의 제조에도 유용하게 사용될 수 있다. 특히, 단기 보존 및 유통을 위한 동결 형태의 미생물 첨가제로 사용할 경우 동결건조 분말 형태의 미생물 첨가제에 비해 생산 단가를 크게 낮출 수 있는 장점이 있다.

[0012] 본 발명에 따른 식품 발효용 미생물 첨가제 조성물은 동결보호제로서 찹쌀풀 외에도, 종래에 동결보호제로서 알려져 있던 성분들을 추가로 포함할 수 있다.

[0013] 본 발명의 한 구체예에서, 상기 조성물은 당류, 아미노산, 펩타이드, 젤라틴, 글리세롤, 당알콜, 유청, 알긴산, 아스코르빈산, 효모 추출물, 탈지유, 트레할로스 및 마늘 파쇄물로부터 선택되는 하나 이상의 추가의 동결보호제를 더 포함할 수 있다. 하기 실시예로부터 확인한 결과, 상기 추가의 동결보호제를 찹쌀풀과 조합사용하는 것이 미생물의 생존율을 보다 향상시켜주는 것은 아닌 것으로 나타났으나, 본 발명에 따른 미생물 첨가제 조성물의 사용에 따른 식품의 맛, 향, 식감 등의 변화나 제품 생산 비용 등을 고려할 때 추가의 동결보호제를 적절히 조합하여 사용하는 것이 가능하다.

[0014] 한편, 본 발명의 식품 발효용 미생물 첨가제 조성물에서 포함할 수 있는 유산균의 종류는 특별히 제한되지 않으며, 구체적인 유산균의 종류는 발효시키고자 하는 식품의 종류에 따라 해당 식품 발효를 위해 적합한 것으로 종래에 연구되어 왔거나 사용되어 온 것이면 어떠한 것이든 이용가능하다. 본 발명에 있어서 유산균은 단독으로 또는 1종 이상을 혼합하여 사용될 수 있다.

[0015] 본 발명의 한 구체예에서, 상기 유산균은 김치 유래의 유산균이고, 상기 식품은 김치일 수 있다. 본 발명의 하

기 실시예에서는 김치 발효를 위해 사용되는 미생물 첨가제 조성물을 제조하고, 찹쌀풀의 김치 유래 유산균에 대한 동결보호 효능을 평가하였다.

[0016] 본 발명의 한 구체예에서, 상기 유산균은 *Weissella* 속, *Lactobacillus* 속, *Streptococcus* 속, *Enterococcus*속, *Bifidobacterium* 속, *Lactococcus*속 및 *Pediococcus* 속으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 1종 이상의 유산균일 수 있다. 본 발명의 바람직한 구체예에서, 상기 유산균은 *Weissella cibaria*, *Lactobacillus plantarum* 및 *Pediococcus pentosaceus*로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상의 유산균일 수 있다.

[0017] 본 발명에 따른 식품 발효용 미생물 첨가제 조성물은 동결된 형태 또는 동결건조된 분말의 형태로 제제화될 수 있다. 식품 제조를 위해 액상의 종균을 배양하여 사용하기 보다는 동결된 형태 또는 동결건조된 분말의 형태의 미생물 첨가제로 제조하여 보급하는 것이 식품의 품질 향상 및 품질의 안정성 향상을 위해 유리하다. 특히, 찹쌀풀을 동결보호제로 사용하여 동결 형태의 미생물 첨가제로 제조할 경우 동결건조 분말 형태의 미생물 첨가제에 비해 생산 단가를 크게 낮출 수 있는 장점이 있다.

[0018] 본 발명은 또한 유산균 및 동결보호제로서의 찹쌀풀을 혼합하고, 상기 혼합물을 동결 또는 동결건조하는 것을 포함하는 상기 식품 발효용 미생물 첨가제 조성물의 제조방법을 제공한다.

[0019] 예를 들어, 유산균은 김치 등의 식품으로부터 순수 분리하여 얻을 수 있으며, 이들은 유산균 배양에 적합한 시판용 배지 또는 배추 등의 식품 재료로부터 제조한 식물성 배지 등을 활용하여 배양할 수 있다. 이렇게 배양된 유산균을 찹쌀풀 또는 추가의 동결보호제와 함께 적절한 농도로 혼합하고 -30 내지 -10 °C의 저온에서 동결하거나, -50 내지 -90 °C의 저온에서 54 내지 90시간 동안 동결건조하여 본 발명에 따른 식품 발효용 미생물 첨가제 조성물을 제조할 수 있다.

[0020] 상기 유산균의 농도는 제조하고자 하는 식품의 종류, 사용되는 유산균의 종류, 발효의 정도 등에 따라 적절히 조절될 수 있으며, 찹쌀풀의 농도는 함께 사용되는 추가의 동결보호제의 유무 등에 따라 조절될 수 있다.

[0021] 본 발명의 한 구체예에서, 상기 혼합은 멸균수에 1×10^9 내지 1×10^{11} CFU/ml의 농도로 현탁되어 있는 유산균에 대해 찹쌀과 멸균수를 1:6 내지 1:10의 비로 혼합하여 제조된 찹쌀풀을 상기 현탁액의 부피를 기준으로 150 내지 250%(v/v), 예를 들어, 180 내지 220 %(v/v)의 농도로 첨가하는 것을 포함한다. 찹쌀풀을 상기 범위 내에서 동결보호제로 사용할 경우 탈지유나 마늘에 비해 장기 냉동보존시 월등하게 우수한 미생물 생존율을 나타낸다.

[0022] 본 발명은 또한 동결 형태의 유산균 제제 또는 동결건조 유산균 분말 제제의 제조에 있어서, 멸균수 내에 현탁된 유산균에 대해 동결보호제로서 찹쌀풀을 첨가하여 동결 또는 동결건조하는 것을 포함하는 유산균의 동결 보호 방법, 즉, 동결 형태의 유산균 제제 또는 동결건조 유산균 분말 제제의 제조에 있어서 유산균의 동결보호를 위한 찹쌀풀의 용도를 제공한다. 상기 용도를 구현하기 위한 구성은 앞서 설명한 바와 같다.

발명의 효과

[0024] 본 발명에서 신규 동결보호제로 사용하는 찹쌀풀은 식품 발효용 미생물 첨가제 조성물을 제조함에 있어서 균체의 보호 효과가 종래의 동결보호제에 비해 매우 뛰어날 뿐만 아니라, 식품등급의 재료로서 안정성을 제공해 준다. 따라서, 본 발명에 따른 식품 발효용 미생물 첨가제 조성물은 미생물의 생존율을 극대화시켜 고품질의 식품 생산을 가능하게 하며, 식품의 품질 균일화 및 품질 유지를 위한 종균으로서 유산균을 낮은 단가로 공급할 수 있게 한다.

도면의 간단한 설명

[0026] 도 1 및 2는 동결보호제 종류 및 동결보존 시간에 따른 유산균의 생존율을 비교한 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0027] 본 발명의 이점 및 특징, 그리고 그것들을 달성하는 방법은 상세하게 후술되어 있는 실시예들을 참조하면 명확해질 것이다. 그러나 본 발명은 이하에서 개시되는 실시예들에 한정되는 것이 아니라 서로 다른 다양한 형태로 구현될 것이며, 단지 본 실시예들은 본 발명의 개시가 완전하도록 하고, 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 발명의 범주를 완전하게 알려주기 위해 제공되는 것이며, 본 발명은 청구항의 범주에 의

해 정의될 뿐이다.

[0029] **[실시예]**

[0030] 하기 실시예에서는 김치 발효를 위해 사용되는 미생물 첨가제 조성물을 제조하고, 찹쌀풀의 김치 유래 유산균에 대한 동결보호 효능을 평가하였다.

[0032] **실시예 1. 김치 유래 유산균의 분리 및 보존**

[0033] (1) 김치 유래 유산균의 분리

[0034] 광주광역시 세계김치연구소에서 직접 제조한 김치로부터 유산균을 분리하여 각각 *Weissella cibaria*, *Lactobacillus plantarum*, *Pediococcus pentosaceus*로 명명하였다.

[0036] (2) 김치 유래 유산균의 배양과 보존

[0037] 김치로부터 순수 분리한 유산균을 이들의 배양에 적합한 MRS broth(표 1)에 접종하여 30℃에서 24시간 배양하여 유산균이 잘 자라게 한 다음, 4주 간격으로 계대 배양하면서 보관하였다. 순수 분리한 미생물의 장기보관은 글리세롤 최종농도 20%로 미생물 현탁액을 제조하여 -75℃에서 보존하였다.

표 1

MRS 배지조성

[0038]

성분	농도 (g/L)
프로테오스 펩톤	10
우육추출물	10
효모추출물	10
포도당	20
트윈 80	1
구연산암모니움	2
초산나트륨	5
황산마그네슘	0.1
황산망간	0.05
인산나트륨	2
증류수	1 L

[0040] **실시예 2. 동결보호제에 따른 김치 유래 유산균의 생존율 검정**

[0041] (1) 동결보호제 종류에 따른 김치 유래 유산균의 생존율 비교

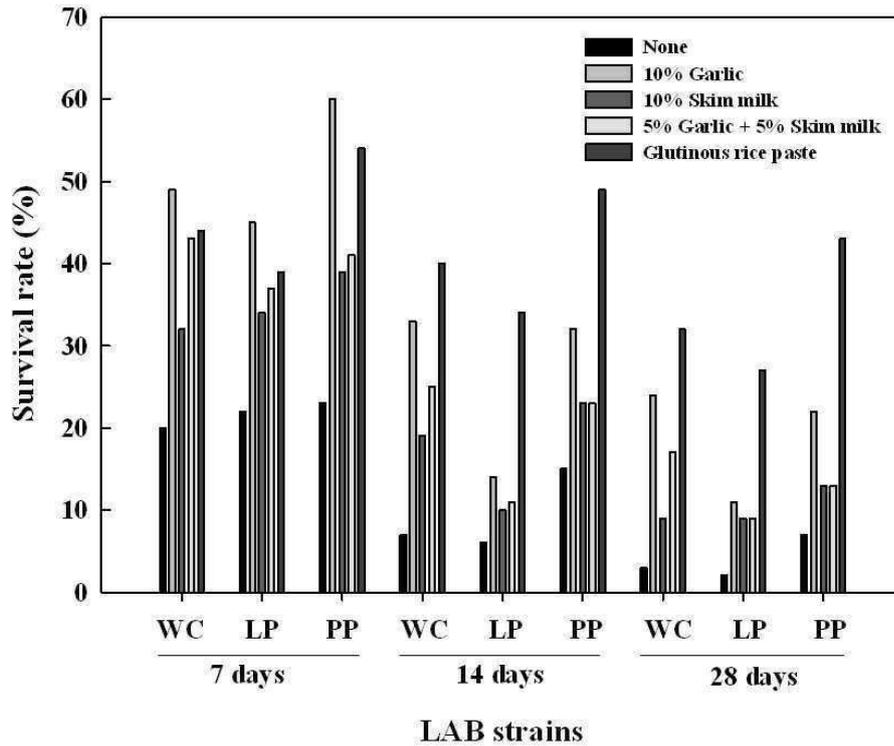
[0042] 상기 세 종류의 김치 유래 유산균을 MRS broth에 접종한 후 30℃에서 24시간 동안 정치 배양하여 김치 미생물의 농도가 $10^9 \sim 10^{10}$ CFU/ml가 되도록 하였다. 8,000 rpm으로 10분간 원심분리하여 김치 유래 유산균을 회수한 후, 0.9% 생리식염수를 사용하여 3번 세척하였다. 김치 유래 유산균의 농도를 1×10^{10} CFU/ml로 고정하고 상기 유산균 현탁액의 부피를 기준으로 동결보호제(탈지유, 마늘 파쇄물)를 최종 농도 10%(w/v)로 첨가한 후, 10분간 균일하게 교반하였다. 찹쌀풀을 동결보호제로 사용한 경우 찹쌀 중량 대비 8배의 증류수로 찹쌀풀을 제조하고, 1×10^{10} CFU/ml의 농도로 고정된 김치 미생물 현탁액 부피 대비 200%(v/v)로 첨가하여 10분간 균일하게 교반하였다. 이후, -20℃ 저온장치에서 동결보존하였다. 동결 후 해동하여 김치 미생물제제를 MRS 고체배지에 도말하고 생존수를 조사하였다.

[0043] 동결전 생존수에 대한 동결후 생존수의 비율을 백분율로 계산하여 생존율을 구하고, 동결보호제의 종류 및 동결 보존 시간에 따른 생존율을 도 1 및 2의 그래프로 나타내었다. *Weissella cibaria*(WC), *Lactobacillus plantarum*(LP), 및 *Pediococcus pentosaceus*(PP) 모두 찹쌀풀을 동결보호제로 사용하였을 경우 동결보존 14일 이후부터는 가장 높은 생존율을 보였다. 특히, *P. pentosaceus*의 경우 -20℃ 저온장치에서 보존 7일째 54%의 높은 생존율을 나타내었으며, 28일이 지나서도 43% 이상의 생존율을 기록하여 찹쌀풀에 의한 보호효과가 높은 것으로 관찰되었다. 마늘 10%를 동결보호제로 사용하였을 때, 7일후 생존율은 60% 이상으로 가장 좋은 결과를 나타냈으나, 이후 28일에는 22%를 기록하여 찹쌀풀에 비하여 급격히 감소하는 경향을 나타내었다. 동결보호제를

사용하지 않은 대조구의 경우 저장기간 14-28일 사이에 대부분의 김치 미생물이 사멸하여 10% 이하의 생존율을 나타내었다. *Weissella cibaria* 역시 동결보존 7일 후 마늘을 보호제로 첨가한 경우에서 가장 높은 생존율(49%)을 나타냈으나, 보존기간이 지남에 따라 생존율이 급격히 감소하여 28일 후 24%를 기록하여 32%를 기록한 참쌀풀 처리구보다 낮은 효율을 나타내었다. *Lb. plantarum* 역시 참쌀풀을 동결보호제로 사용하였을 때 가장 높은 생존율을 기록하였으며, 세 가지 균주 모두에서 마늘과 탈지유를 함께 동결보호제로 사용하였을 경우 김치 미생물 생존율에 관한 상승효과는 관찰되지 않았다.

도면

도면1



도면2

