



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2018년06월08일
(11) 등록번호 10-1865713
(24) 등록일자 2018년06월01일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A01N 1/02 (2006.01) C12N 1/04 (2017.01)
(52) CPC특허분류
A01N 1/0221 (2013.01)
A01N 1/0205 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2017-0129141(분할)
(22) 출원일자 2017년10월10일
심사청구일자 2017년10월10일
(65) 공개번호 10-2017-0121726
(43) 공개일자 2017년11월02일
(62) 원출원 특허 10-2015-0046709
원출원일자 2015년04월02일
심사청구일자 2015년04월02일
(56) 선행기술조사문헌
JP4588598 B2*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
세종대학교산학협력단
서울특별시 광진구 능동로 209 (군자동, 세종대학교)
(72) 발명자
유상호
서울특별시 송파구 올림픽로 435, 219동 1401호
이수용
서울특별시 송파구 양재대로 1218, 103동 603호
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인태동

전체 청구항 수 : 총 2 항

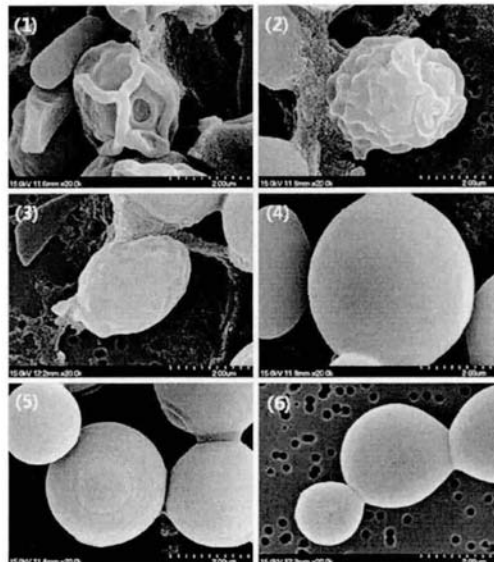
심사관 : 유진오

(54) 발명의 명칭 투라노즈를 함유하는 동결보존제

(57) 요약

본 발명은 냉·해동시 미생물의 사멸을 최대한 억제할 수 있는 투라노즈 함유 동결보존제에 관한 것으로, 기존의 냉·해동 안정제로 활용되는 트레할로즈보다 적은 양으로도 동일한 안정효과를 줄 수 있으며, 탈지유와 같은 보조 첨가제와의 혼합 사용에 의해 상승효과를 도모할 수 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류
C12N 1/04 (2013.01)

최성원

경기도 김포시 사우중로74번길 12, 101동 1305호

(72) 발명자

정창환

서울특별시 동작구 여의대방로10길 100, 101동 50
1호

한동주

경기도 용인시 처인구 양지면 식송로 101-3

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1545008788

부처명 농림축산식품부

연구관리전문기관 농림수산식품기술기획평가원

연구사업명 고부가가치식품기술개발

연구과제명 냉장, 냉동 곡류 가공식품의 품질 연장 기술 개발

기 여 율 1/1

주관기관 세종대학교 산학협력단

연구기간 2014.08.08 ~ 2015.08.07

명세서

청구범위

청구항 1

삭제

청구항 2

삭제

청구항 3

삭제

청구항 4

투라노즈(turanose) 4중량%;

스킵밀크 6중량%; 및

아스코르브산 또는 그 염 4중량% 함유하며,

냉동과 해동시 락토바실러스 파라카세이(*Lactobacillus paracasei*)의 사멸을 방지하는 것을 특징으로 하는 냉동 생지.

청구항 5

제4항에 있어서,

냉동과 해동시 사카로마이세스 세레비지애(*Saccharomyces cerevisiae*)의 사멸을 더욱 방지하는 것을 특징으로 하는 냉동 생지.

청구항 6

삭제

발명의 설명

기술분야

[0001] 본 발명은 투라노즈를 함유하는 동결보존제에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 냉·해동시 미생물의 사멸을 억제할 수 있는 투라노즈 함유 동결보존제에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 미생물을 보존하기 위한 가장 우수한 저장 상태는 동결이나 동결건조인데, 동결과 해동과정에서도 미생물의 사멸이 어느 정도 발생한다. 현미경 분석 결과, 사멸 원인은 용해, 과열 등에 의한 세포막 손상이 주원인인데, 이는 동결 시 전해질의 농도 변화와 빙결정의 형성으로부터 기인한다.

[0003] 동결 및 해동시 발생하는 미생물의 사멸을 방지하기 위해서는 동해방지제의 사용이 필요한데, 동해방지제는 동결저장시, 수분과 결합하고, 세포 내·외의 빙결정 형성을 억제시킴으로써 미생물의 생존율을 높이게 된다. 미생물의 동결저장에는 동해방지제로 솔비톨, 글리콜, 글리세롤, 만니톨 등의 당알콜이 많이 이용되고 있다.

[0004] 한편, 밀가루 반죽을 냉동시키면, 발효시간이 길어지고, 생지가 약하게 되어, 큰 빵으로 형성되지 않는다. 또한, 풍미에 있어서도 이스트 냄새가 강하여 상품 가치가 떨어지게 되는데, 이는 냉동에 의하여 이스트가 죽고, 이로 인해 글루타치온이 용출되어 글루텐이 약하게 되는 것이 주요인이다.

[0005] 따라서, 냉동 생지로 만들어진 빵의 품질에 미치는 주요인은 이스트의 활성과 가스 보유력이 가장 크다 할 수 있다. 생지의 품질 저하를 막고, 냉·해동 안정성에 기여한다고 알려져 있는 물질은 트레할로즈 등의 이당류가 대표적이다. 트레할로즈와 같은 이당류는 독성이 없어 천연 동결보존제로 널리 사용되고 있는데, 냉동시 탈수 현상이 일어날 때 세포막의 안정제로 작용한다. 동결보존제로서 트레할로즈의 유용성은 지질막과의 상호 보호작용, 냉동-해동 과정에서 불안정한 단백질의 안정 등으로부터 기인한다.

[0006] 그런데 트레할로즈 외에 동결보존제로 활용되는 당류는 현재 전무한 상황이다. 다양한 사용자들의 소재 선택 욕구를 충족시키기 위해서는, 사용가능한 동결보존제의 스펙트럼을 넓히는 것이 필요하다. 따라서, 새로운 동결보존제의 개발을 위한 연구가 절실히 요구되는 것이다.

선행기술문헌

특허문헌

[0007] (특허문헌 0001) 대한민국 공개특허 제10-2012-0022868호 (공개일자 2012.03.12)에는 "전분 가수분해물과 글루탐산염 및/또는 폴리 알코올을 포함하는 냉동건조유산균의 생존율 및 안정성을 향상시키기 위한 안정화 화합물의 배합물"이 기재되어 있다.

(특허문헌 0002) 일본등록특허 05592049 (등록일자 2014.08.08)에는 "구아노신-5'-일인산(GMP), 이노신-5'-일인산(IMP) 및 이노신으로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상의 동결보호제를 포함하는 동결 또는 동결건조 재배양액"이 기재되어 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명은 미생물의 냉동과 해동시, 미생물 사멸을 방지할 수 있는 당류 유래의 새로운 소재를 동결보존제로 개발하여 제공하고자 한다.

과제의 해결 수단

[0009] 본 발명은 투라노즈를 유효성분으로 함유하는 것을 특징으로 하는 미생물 동결보존제를 제공한다. 이때, 상기 미생물은 일 예로, 효모 또는 유산균일 수 있다.

[0010] 투라노즈(turanose)는 자연적으로 벌에서 생기는 환원성 이당류로서, 수크로즈의 절반 정도에 해당하는 단맛을 나타낸다. 투라노즈는 수크로즈의 유사체이며, 3-O-a-D-글루코피라노실-D-프락토스의 화학적 구조를 지닌다. 본 발명에서는 상기와 같은 특성이 있는 투라노즈가 트레할로즈와 같은 냉·해동 안정제의 특성이 있음을 새롭게 확인한 것이다.

[0011] 한편, 본 발명의 투라노즈는 트레할로즈와 같은 냉·해동 안정제로 쓰일 수 있는 다른 성분들과 조합되어 사용됨으로써, 더 큰 상승효과를 발생시킬 수 있다. 일 예로, 본 발명의 미생물 동결보존제는 스킴밀크(skim milk)를 더 포함할 수 있다. 또한, 아스코르브산(ascorbate) 또는 그 염을 더욱더 포함할 수도 있다. 아스코르브산 또는 그 염은 유산균에 적용시 더욱 효과적이다.

[0012] 한편, 본 발명은 투라노즈를 미생물을 함유하는 배지에 첨가한 후, 냉동시키는 것을 포함하는 것을 특징으로 하는 미생물 동결방법을 제공한다. 이때, 상기 미생물 동결방법은, 냉동 후, 동결건조하는 것을 더 포함할 수 있다. 투라노즈를 첨가하여 냉동시킬 경우, 냉동 및 해동시 발생하는 미생물의 사멸을 효과적으로 방지할 수 있음이 본 발명을 통해 확인되었다.

[0013] 한편, 상기 본 발명의 미생물 동결방법에 있어서, 투라노즈는 바람직하게 배지 중 4~12%(w/v) 첨가되는 것이 좋다.

발명의 효과

[0014] 본 발명은 기존의 냉·해동 안정제로 활용되는 트레할로즈보다 적은 양으로도 동일한 안정효과를 줄 수 있으며, 스킴밀크(skim milk)와 같은 보조 첨가제와의 혼합 사용에 의해 상승효과를 도모할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0015] 도 1은 투라노즈 농도별 효모 표면의 FE-SEM 사진을 보여준다. (1)은 투라노즈 0%, (2)는 투라노즈 2%, (3)은 투라노즈 4%, (4)는 투라노즈 8%, (5)는 투라노즈 12%, (6)는 트레할로즈 8%를 첨가했을 때, 효모의 사진이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0016] 이하, 본 발명의 내용을 하기 실시예 및 실험예를 통해 더욱 상세히 설명하고자 한다. 다만, 본 발명의 권리범위가 하기 실시예 및 실험예에만 한정되는 것은 아니고, 그와 등가의 기술적 사상의 변형까지를 포함한다.

[실시예 1: 효모의 생균수 확인을 통한 냉·해동 안정성 평가 - 투라노즈 첨가군]

[0018] 1. 효모의 배양

[0019] 생효모인 사카로마이세스 세레비지에 (*Saccharomyces cerevisiae*) 0.025g을 YPD broth 1mL에 용해한 후, 적정 배수로 희석하였다 (10⁵~10⁷배 희석). 희석된 생효모액 100 μL를 플레이트에 스프레딩하고, 30℃에서 72시간 배양하였다. 단일 콜로니를 채취하여 5mL YPD broth에 30℃ 48시간 정치 배양하였다. 배양이 끝난 균체는 원심분리를 통해 회수하고, 멸균된 증류수로 2회의 수세과정을 거쳤다.

[0020] 2. 효모의 동결건조

[0021] 냉·해동 안정성 평가를 위한 배지를 제조하기 위해, 투라노즈의 양을 0~12%(w/v) 5개 군으로 나누어 준비하였다. 대조군은 트레할로즈 8%(w/v)로 실험을 진행하였다. 회수한 균체는 각각 냉·해동 안정제인 투라노즈 혹은 트레할로즈가 첨가된 배지에 재용해한 후 -80℃에서 냉동시키고, 72시간 동결건조시켰다. 건조된 균체는 막자사발에 갈아 100메쉬 체에 걸러 균질화시켰다.

[0022] 3. 생균수의 확인을 통한 냉·해동 안정성 평가

[0023] 동결건조 전 시료와 동결건조 후 시료의 생균수를 확인하여 비교하였다. 시료를 YPD 플레이트에 스프레딩하고, 30℃에서 72시간 배양한 후, 콜로니 개수를 확인하였다. 실험 결과의 균수는 CFU/mL로 표기하였으며, 이를 CFU/g으로 단위 변환을 위해 수분함량 측정기를 이용하여 건조중량을 측정하였다. 그 결과는 하기 표 1과 같다.

표 1

냉·해동 안정제 첨가량	동결건조 전	동결건조 후	생존율 %
	CFU/g		
투라노즈 0%	(5.87±0.01) × 10 ⁷	(6.00±0.14) × 10 ⁵	1.02±0.04
투라노즈 2%	(4.03±0.01) × 10 ⁷	(4.30±0.42) × 10 ⁵	1.07±0.12
투라노즈 4%	(2.31±0.01) × 10 ⁷	(1.14±0.42) × 10 ⁶	4.94±0.04
투라노즈 8%	(1.96±0.00) × 10 ⁷	(2.16±0.50) × 10 ⁶	10.97±0.13
투라노즈 12%	(1.64±0.01) × 10 ⁷	(2.34±0.15) × 10 ⁶	14.29±1.44
트레할로즈 8%	(2.38±0.02) × 10 ⁷	(1.29±0.50) × 10 ⁶	5.41±0.30

[0024]

[0025] 표 1과 같이, 투라노즈를 첨가하지 않은 경우의 생존율은 1.02%이었고, 투라노즈를 2% 첨가한 경우의 생존율은 약 1.07%으로 나타나, 두 군의 생존율은 거의 차이가 나지 않음을 알 수 있었다. 다만, 투라노즈의 첨가량이 증가할수록 생존율도 비례해서 증가함을 알 수 있었다. 또한, 트레할로즈 8%의 경우는 생존율이 5.41%으로 나타났으나, 투라노즈 8%의 경우는 생존율이 10%로 나타나, 투라노즈의 경우가 거의 두 배 가량 높은 것을 알 수 있었다.

[실시예 2: 효모의 생균수 확인을 통한 냉·해동 안정성 평가 - 투라노즈 + 스킵밀크 첨가군]

[0027] 1. 효모의 배양

[0028] 생효모인 사카로마이세스 세레비지에 (*Saccharomyces cerevisiae*) 0.025g을 YPD broth 1mL에 용해한 후, 적정 배수로 희석하였다 (10⁵~10⁷배 희석). 희석된 생효모액 100 μL를 플레이트에 스프레딩하고, 30℃에서 72시간 배

양하였다. 단일 콜로니를 채취하여 5mL YPD broth에 30℃, 48시간 정치 배양하였다. 배양이 끝난 균체는 원심분리를 통해 회수하고, 멸균된 증류수로 2회의 수세과정을 거쳤다.

[0029] 2. 효모의 동결건조

[0030] 냉·해동 안정성 평가를 위한 배지를 제조하기 위해, 투라노즈의 양을 0~12%(w/v) 5개 군으로 나누어 준비하였다. 대조군은 트레할로즈 8%(w/v)로 실험을 진행하였다. 그 외에 안정제로써 각 배지에 5%(w/v)의 스킵밀크 (skim milk)를 첨가하였다. 회수한 균체는 각각 냉·해동 안정제인 투라노즈 혹은 트레할로즈가 첨가된 배지에 재용해한 후, -80℃에서 냉동시키고, 72시간 동결건조시켰다. 건조된 균체는 막자사발에 갈아 100메쉬 체에 걸러 균질화시켰다.

[0031] 3. 생균수의 확인을 통한 냉·해동 안정성 평가

[0032] 동결건조 전 시료와 동결건조 후 시료의 생균수를 확인하여 비교하였다. 시료를 YPD 플레이트에 스프레딩하고, 30℃에서 72시간 배양한 후, 콜로니 개수를 확인하였다. 실험 결과의 균수는 CFU/mL로 표기되었으며, 이를 CFU/g으로 단위 변환을 위해 수분함량 측정기를 이용하여 건조중량을 측정하였다. 그 결과는 하기 표 2와 같다.

표 2

냉·해동 안정제 첨가량	동결건조 전		생존율 %
	CFU/g		
투라노즈 0% + 스 킵밀크 5%	$(2.34 \pm 0.02) \times 10^7$	$(4.17 \pm 0.49) \times 10^6$	17.29 ± 1.42
투라노즈 2% + 스 킵밀크 5%	$(2.16 \pm 0.17) \times 10^7$	$(5.93 \pm 0.40) \times 10^6$	27.53 ± 2.78
투라노즈 4% + 스 킵밀크 5%	$(1.55 \pm 0.01) \times 10^7$	$(6.63 \pm 0.40) \times 10^6$	42.94 ± 3.77
투라노즈 8% + 스 킵밀크 5%	$(1.57 \pm 0.02) \times 10^7$	$(7.40 \pm 0.96) \times 10^6$	47.25 ± 5.66
투라노즈 12% + 스 킵밀크 5%	$(1.08 \pm 0.01) \times 10^7$	$(6.80 \pm 0.26) \times 10^6$	62.97 ± 5.50
트레할로즈 8% + 스킵밀크 5%	$(1.40 \pm 0.00) \times 10^7$	$(6.07 \pm 0.42) \times 10^6$	43.42 ± 2.03

[0033]

[0034] 표 2와 같이, '투라노즈를 첨가하지 않고 스킵밀크만 5%' 첨가한 군의 생존율은 17.29%이었고, '투라노즈 2% 및 스킵밀크 5%'를 첨가한 군의 생존율은 약 27.53%로 나타나, 투라노즈 첨가 시 생존율이 10% 가량 증가한 것을 알 수 있었다. 또한, 투라노즈의 첨가량이 증가할수록 생존율도 증가함을 알 수 있었다.

[0035] 한편, 트레할로즈 8%의 경우, 생존율이 43.42%로 나타났는데, 투라노즈 4%의 경우와 생존율이 거의 비슷하게 나타났다. 이는 트레할로즈 대비 1/2 첨가량만큼의 투라노즈가 트레할로즈와 동일한 정도의 생존율을 보이는 것을 의미한다.

[0036] [실시예 3: 유산균의 생균수 확인을 통한 냉·해동 안정성 평가 - 투라노즈 + 스킵밀크 + 소듐 아스코르베이트 첨가군]

[0037] 1. 유산균의 배양

[0038] 유산균인 락토바실러스 파라카세이 (*Lactobacillus paracasei*)를 5 mL MRS broth에 37℃, 48시간 정치 배양하였다. 배양이 끝난 균체는 원심분리를 통해 회수하고, 멸균된 증류수로 2회의 수세과정을 거쳤다.

[0039] 2. 유산균의 동결건조

[0040] 냉·해동 안정성 평가를 위한 배지를 제조하기 위해, 투라노즈의 양을 0~12%(w/v) 4개 군으로 나누어 준비하였다. 대조군은 트레할로즈 8%(w/v)로 실험을 진행하였다. 그 외에 안정제로써 각 배지에 6%(w/v)의 스킵밀크 및 4%(w/v)의 소듐 아스코르베이트 (sodium ascorbate)를 첨가하였다. 회수한 균체는 각각의 냉·해동 안정제 첨가 배지에 재용해한 후, -80℃에서 2주간 냉동시키고, 그 후 48시간 동안 동결건조시켰다. 건조된 균체는 막자사발에 갈아 100메쉬 체에 걸러 균질화시켰다.

[0041] 3. 생균수의 확인을 통한 냉·해동 안정성 평가

[0042] 동결건조 전의 시료와 동결건조 후의 시료의 생균수를 확인하여 비교하였다. 시료를 MRS 액체 배지에서 37℃로 48시간 배양시킨 후, 플레이트에 옮겨 배양함으로써 콜로니 개수를 확인하였다. 실험 결과의 균수는 CFU/mL로 표기하였으며, 이를 CFU/g으로 단위 변환을 위해 수분함량 측정기를 이용하여 건조중량을 측정하였다. 그 결과는 하기 표 3과 같았다.

표 3

냉·해동 안정제 첨가량	동결건조 전	동결건조 후	생존율
	CFU/g		%
투라노즈 0% + 스 킴밀크 6% + 소디 움 아스코르베이트 4%	$3.08 \pm 0.70 \times 10^{11}$	$6.17 \pm 0.25 \times 10^{10}$	20.02 ± 0.82
투라노즈 4% + 스 킴밀크 6% + 소디 움 아스코르베이트 4%	$7.41 \pm 0.18 \times 10^{10}$	$5.03 \pm 0.24 \times 10^{10}$	67.86 ± 2.80
투라노즈 8% + 스 킴밀크 6% + 소디 움 아스코르베이트 4%	$6.60 \pm 0.27 \times 10^{10}$	$3.73 \pm 0.41 \times 10^{10}$	56.40 ± 4.08
투라노즈 12% + 스 킴밀크 6% + 소디 움 아스코르베이트 4%	$5.15 \pm 0.65 \times 10^{10}$	$2.83 \pm 0.60 \times 10^{10}$	54.40 ± 5.49
트레할로즈 8% + 스킴밀크 6% + 소 디움 아스코르베이 트 4%	$6.50 \pm 0.37 \times 10^{10}$	$4.27 \pm 0.54 \times 10^{10}$	65.50 ± 6.76

[0043]

[0044] 표 3과 같이, 투라노즈를 첨가하지 않고 스킴밀크와 소디움 아스코르베이트만 첨가된 경우 생존율은 20.02%이었다. 그런데 투라노즈 또는 트레할로즈 첨가균은 전반적으로 생존율이 2배 이상 증가함을 알 수 있었다. 특히, 투라노즈 4% 첨가균의 생존율은 67.86%로 첨가균 중 생존율이 가장 높음을 알 수 있었다.

[0045] 또한, 투라노즈 4%의 생존율은 트레할로즈 8%의 생존율과 유사하게 나타났는데, 이는 트레할로즈 첨가 농도의 절반 수준으로도 투라노즈가 트레할로즈와 유사한 정도의 보존능을 발휘할 수 있음을 의미한다.

[0046] [실시예 4: 효모 균체 복원력 확인을 통한 냉·해동 안정성 평가 - 투라노즈 첨가균]

[0047] 1. 효모의 배양

[0048] 생효모인 사카로마이세스 세레비지에 (*Saccharomyces cerevisiae*) 0.025g을 YPD broth 1mL에 용해한 후, 적정 배수로 희석하였다 ($10^5 \sim 10^7$ 배 희석). 희석된 생효모액 100 μ L를 플레이트에 스프레딩하고, 30℃에서 72시간 배양하였다. 단일 콜로니를 채취하여 5mL YPD broth에 30℃, 48시간 정치 배양하였다. 배양이 끝난 균체는 원심분리를 통해 회수하고, 멸균된 증류수로 2회의 수세과정을 거쳤다.

[0049] 2. 효모의 동결건조

[0050] 냉·해동 안정성 평가를 위한 배지를 제조하기 위해, 투라노즈의 양을 0~12%(w/v) 5개 균으로 나누어 준비하였다. 대조균은 트레할로즈 8%(w/v)로 실험을 진행하였다. 회수한 균체는 각각 냉·해동 안정제인 투라노즈 혹은 트레할로즈가 첨가된 배지에 재용해한 후, -80℃에서 냉동시키고, 72시간 동결건조시켰다. 건조된 균체는 막자사발에 갈아 100메쉬 체에 걸러 균질화시켰다.

[0051] 3. 균체 복원력 확인을 통한 냉·해동 안정성 평가

[0052] 균체의 복원 여부는 주사전자현미경을 이용한 표면 관찰을 통해 진행하였으며, 그 방법은 하기와 같았다. 균체의 주사전자현미경 촬영을 위해 0.2 μ m 폴리카르보네이트 필터 (polycarbonate filter)를 이용하여 여과시킨 후, 전처리를 진행하였다.

[0053] 실험을 위해, 동결 건조된 균체를 멸균된 증류수를 이용하여 1%로 희석시켰다. 균체를 0.2 μ m 폴리카르보네이트

필터를 이용하여 여과하였다. 2% 글루타르알데히드(glutaraldehyde)에 넣고, 4℃에서 2시간 1차 고정을 진행하였다. 100 mM 인산완충용액으로 4℃에서 10분간 3번 수세한 후, 1% 사산화오스뮴(osmium tetroxide)로 4℃에서 2시간 2차 고정을 진행하였다. 이후, 멸균된 증류수로 상온에서 2번 수세하고, 30~100% 에탄올로 탈수를 진행하였다. 전처리가 끝난 시료는 백금을 이용하여 18nm 두께로 표면 코팅한 후, 주사전자현미경을 이용하여 표면을 관찰하였다.

[0054] 실험 결과는 도 1과 같았다. 도 1은 투라노즈 농도별 효모 표면의 FE-SEM 사진을 보여준다. (1)은 투라노즈 0%, (2)는 투라노즈 2%, (3)은 투라노즈 4%, (4)는 투라노즈 8%, (5)는 투라노즈 12%, (6)는 트레할로즈 8%를 첨가했을 때의 효모의 사진이다.

[0055] 도 1에서 보는 바와 같이, 투라노즈를 첨가하지 않은 경우, 균체 복원력이 낮아, 균체가 많이 수축된 것을 알 수 있었다. 그런데 투라노즈 첨가량이 증가할수록 균체 복원력이 증가하여 균체의 수축 정도가 낮아지는 것을 알 수 있었다.

도면

도면1

