



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2013-0000003
 (43) 공개일자 2013년01월02일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 1/20 (2006.01) *C12P 7/56* (2006.01)
C12R 1/25 (2006.01)
 (21) 출원번호 10-2011-0056468
 (22) 출원일자 2011년06월10일
 심사청구일자 없음

(71) 출원인
(주)아모레퍼시픽
 서울특별시 용산구 한강로2가 181
 (72) 발명자
곽일영
 경기도 용인시 기흥구 보라동 314-1 아모레퍼시픽
 기술연구원
유세진
 경기도 용인시 기흥구 보라동 314-1 아모레퍼시픽
 기술연구원
 (뒷면에 계속)
 (74) 대리인
임희택, 김영철, 김 순 영

전체 청구항 수 : 총 9 항

(54) 발명의 명칭 **차나무 잎에서 분리한 신규 락토바실러스 플란타룸**

(57) 요약

본 발명은 신규 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) APsulloc 331261(기탁번호: KCCM11179P)를 개시한다. 또한 본 발명은 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) APsulloc 331261 균주 또는 그 배양액을 포함하는 조성물을 개시한다.

(72) 발명자

박태훈

경기도 용인시 기흥구 보라동 314-1 아모레퍼시픽
기술연구원

이범진

경기도 용인시 기흥구 보라동 314-1 아모레퍼시픽
기술연구원

신계호

경기도 용인시 기흥구 보라동 314-1 아모레퍼시픽
기술연구원

정진오

경기도 용인시 기흥구 보라동 314-1 아모레퍼시픽
기술연구원

조준철

경기도 용인시 기흥구 보라동 314-1 아모레퍼시픽
기술연구원

특허청구의 범위

청구항 1

락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) APsulloc 331261(기탁번호: KCCM11179P).

청구항 2

제 1 항에 있어서,

락토바실러스 플란타룸 APsulloc 331261은 차나무(*Camellia sinensis*) 잎에서 분리된 것임을 특징으로 하는 락토바실러스 플란타룸 APsulloc 331261.

청구항 3

제 1 항에 있어서,

락토바실러스 플란타룸 APsulloc 331261은 내산성능을 가지는 것을 특징으로 하는 락토바실러스 플란타룸 APsulloc 331261.

청구항 4

제 3 항에 있어서,

락토바실러스 플란타룸 APsulloc 331261은 pH 2.5 내지 pH 4.0에서 0.5시간 내지 5시간 동안 내산성능을 가지는 것을 특징으로 하는 락토바실러스 플란타룸 APsulloc 331261.

청구항 5

제 1 항에 있어서,

락토바실러스 플란타룸 APsulloc 331261은 내담즙산능을 가지는 것을 특징으로 하는 락토바실러스 플란타룸 APsulloc 331261.

청구항 6

제 1 항에 있어서,

락토바실러스 플란타룸 APsulloc 331261은 락트산(lactic acid) 생성능을 가지는 것을 특징으로 하는 락토바실러스 플란타룸 APsulloc 331261.

청구항 7

제 6 항에 있어서,

락토바실러스 플란타룸 APsulloc 331261은 생성한 락트산 중 D-형이 70% 이하인 락트산 생성능을 가지는 것을 특징으로 하는 락토바실러스 플란타룸 APsulloc 331261.

청구항 8

제 1 항 내지 제 7 항 중 어느 한 항에 따른 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) APsulloc

331261 균주 또는 그 배양액을 포함하는 조성물.

청구항 9

제 8 항에 있어서,
조성물은 발효 식품 조성물인 것을 특징으로 하는 조성물.

명세서

기술 분야

[0001] 본 발명은 차나무 잎에서 분리한 신규 락토바실러스 플란타룸에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 마시는 용도의 차는 동백나무과의 카멜리아 시넨시스(*Camellia sinensis*)의 싹이나 잎 속에 존재하는 산화 효소를 불활성화하고 수분을 제거한 것이다. 이러한 차는 비타민을 비롯하여 카페인, 탄닌, 플라보노이드 및 정유 등을 함유하고, 식품 분야를 예로 들 수 있는 다양한 분야에서 널리 활용되고 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0003] 본 발명은 신규 락토바실러스 플란타룸 균주를 제공하고자 한다. 또한 상기 신규 락토바실러스 플란타룸 균주 또는 그 배양액을 포함하는 조성물을 제공하고자 한다.

과제의 해결 수단

[0004] 본 발명의 일측면은 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) APsulloc 331261을 제공한다.

[0005] 본 발명의 다른 일측면은 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) APsulloc 331261 균주 또는 그 배양액을 포함하는 조성물을 제공한다.

발명의 효과

[0006] 본 발명에 따른 신규 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) APsulloc 331261은 내산성이 우수하므로 이를 식품으로 섭취시 위(胃)에서도 생존 가능하며, 나아가 장내 도달률이 높을 수 있다. 락토바실러스 플란타룸 APsulloc 331261은 내담즙산능이 우수하므로, 장내 정착력이 뛰어나다. 또한 락토바실러스 플란타룸 APsulloc 331261은 항균력이 뛰어나므로 유해 세균 억제 효과가 우수하다. 락토바실러스 플란타룸 APsulloc 331261은 생성한 락트산 중 D-락트산의 비율이 기존 락토바실러스 플란타룸에 비해 낮으므로, 락트산에 취약한 성인 또는 영유아도 자유롭게 섭취 가능하다. 그리고 락토바실러스 플란타룸 APsulloc 331261은 기존 락토바실러스 플란타룸에 비해 적은 양의 락트산을 생성하므로, 이를 이용하여 식품을 발효시키는 경우 식품은 부드러운 맛을 가지게 된다. 따라서 본 발명에 따른 신규 락토바실러스 플란타룸 APsulloc 331261은 식품 분야를 예로 들 수 있는 다양한 분야에서 널리 활용될 수 있다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0007] 유산균은 글루코오스 등 당류를 분해하여 락트산(lactic acid)을 생성하는 세균을 가리키며, 젖산균이라고도 한다. 유산균의 락트산 발효에 의해 생성되는 락트산은 병원균과 유해 세균의 생육을 저지할 수 있으며, 이러한 성질은 유제품, 김치류, 양조 식품 등의 식품 제조에 이용되고 있다. 또한 유산균은 포유류의 장내에 서식하여

잡균에 의한 이상 발효를 방지하므로 정장제(整腸劑)로도 이용되는 중요한 세균이다.

- [0008] 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*)은 유산균에 속하는 균주로 주로 김치의 발효가 많이 진행되어 신맛이 날 때 성장한다고 알려져 있다. 생성하는 락트산의 광학이성체는 D형과 L형이다. 락토바실러스 플란타룸은 발효가 필요한 각종 식품에 널리 이용될 수 있으므로, 내산성능, 내담즙산능 및 항균력이 우수한 락토바실러스 플란타룸이 개발된다면, 유용하게 사용될 수 있을 것이다.
- [0009] 이하, 본 발명을 상세하게 설명한다.
- [0010] 본 발명의 일측면은 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) APsulloc 331261(기탁번호: KCCM11179 P)을 제공한다.
- [0011] 상기 APsulloc 331261은 차나무(*Camellia sinensis*) 잎에서 분리한 균주로 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*)에 속한다. 구체적으로, APsulloc 331261은 차나무 잎을 차나무 잎 중량 대비 5 내지 15 중량%의 식염으로 절이는 단계; 절인 차나무 잎을 0.1% 내지 3%의 프락토 올리고당을 예로 들 수 있는 당 용액과 혼합하여 25 내지 35℃에서 1 내지 5일간 배양하는 단계; 및 pH 5 미만으로 된 배양액을 취하여 25 내지 35℃ 혐기 조건에서 1 내지 5일간 배양하는 단계를 포함하는 방법으로 분리할 수 있다.
- [0012] 본 발명의 일측면에 따른 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) APsulloc 331261은 우수한 내산성능을 가진다. 락토바실러스 플란타룸을 예로 들 수 있는 유산균을 생균제로 섭취하는 경우, 유산균 특유의 효과를 발휘하기 위해서는 장(腸)내 도달률이 높은 것이 바람직하다. 장내 도달률이 높기 위해서는 먼저 위산 분비로 인해 pH가 낮은 위(胃)에서의 생존률이 높아야 한다. 위의 공복시 pH는 1.2~2.0 정도이나, 음식을 섭취한 경우 pH는 약 2~3 정도인 것으로 알려져 있다. 본 발명에 따른 락토바실러스 플란타룸 APsulloc 331261은 pH 2.5 내지 4.0에서, 구체적으로 pH 2.5 내지 3.5에서 우수한 내산성능을 가진다. 한편, 음식을 섭취하는 경우 음식물의 평균 위 체류 시간은 1 내지 3시간 정도로 알려져 있다. 본 발명에 따른 락토바실러스 플란타룸 APsulloc 331261은 0.5시간 내지 5시간, 구체적으로 1시간 내지 4시간 동안 pH 2.5 내지 4.0, 구체적으로 pH 2.5 내지 3.5에서 우수한 내산성능을 가진다. 따라서 본 발명에 따른 락토바실러스 플란타룸 APsulloc 331261은 위 체류 기간 동안 위의 낮은 pH에서도 생존 가능하므로 식품으로 섭취시 장내 도달률이 높다.
- [0013] 본 발명의 일측면에 따른 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) APsulloc 331261은 우수한 내담즙산성능을 가진다. 위를 통과한 음식물은 소장으로 전달되고, 이때 담즙산이 분비되어 음식물의 소화를 돕는다. 담즙산에 대한 내성이 높은 균주는 장내 정착력도 좋은 것으로 알려져 있다. 락토바실러스 플란타룸 APsulloc 331261은 내담즙산성이 우수하므로 장내 정착력이 뛰어나다.
- [0014] 본 발명의 일측면에 따른 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) APsulloc 331261은 락트산 생성능을 가진다. 일반적으로 유산균이 생성하는 락트산에는 L-형과 D-형이 있다. 이 중 D-락트산은 체내 대사 속도가 L-락트산에 비해 느리므로 혈중 D-락트산의 농도가 높아지면 락트산 중독증을 유발할 수 있다. 따라서, 락트산에 취약한 성인이나, 영유아는 가급적 D-락트산을 다량 생성하는 유산균을 섭취하지 않는 것이 바람직하다.
- [0015] 본 발명의 다른 일측면에 따른 락토바실러스 플란타룸 APsulloc 331261은 생성한 락트산 중 D-형이 70% 이하, 구체적으로 65% 이하인 락트산을 생성할 수 있다.
- [0016] 본 발명의 또 다른 일측면에 따른 락토바실러스 플란타룸 APsulloc 331261은 15.0 g/L 이하, 구체적으로 14.5 g/L 이하의 락트산을 생성할 수 있다.
- [0017] 이와 같이, 본 발명에 따른 락토바실러스 플란타룸 APsulloc 331261은 기존의 락토바실러스 플란타룸보다 D형의 비율이 낮은 락트산을 생성하므로 락트산에 취약한 성인이나 영유아도 자유롭게 섭취 가능하다. 또한 락트산 생성량도 기존의 락토바실러스 플란타룸보다 낮으므로 이를 이용하여 식품을 발효시키는 경우 식품이 좀 더 부드러운 맛을 가질 수 있다.
- [0018] 본 발명의 일측면은 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) APsulloc 331261의 추출물 또는 배양액을 제공한다. 본 발명의 다른 일측면은 락토바실러스 플란타룸 APsulloc 331261 균주, 그 추출물 또는 그 배양액을 포함하는 조성물을 제공한다.
- [0019] 본 발명의 일측면은 락토바실러스 플란타룸 APsulloc 331261 균주, 그 추출물 또는 그 배양액을 포함하는 식품

조성물을 제공한다.

- [0020] 상기 식품 조성물은 건강 식품 조성물일 수 있으며, 다(茶)류, 유제품류, 김치류, 양조 식품류를 예로 들 수 있는 발효가 필요한 발효 식품 조성물일 수 있다.
- [0021] 상기 식품 조성물의 제형은 특별히 한정되지 않으나, 예를 들어, 정제, 환제, 연질 및 경질 캡셀제, 과립제, 드링크제, 캐러멜, 다이어트바, 티백 등으로 제형화될 수 있다. 각 제형의 식품 조성물은 유효 성분 이외에 해당 분야에서 통상적으로 사용되는 성분들을 제형 또는 사용 목적에 따라 당업자가 어려움 없이 적의 선정하여 배합할 수 있으며, 다른 원료와 동시에 적용할 경우 상승 효과가 일어날 수 있다.
- [0022] 상기 유효 성분의 투여량 결정은 당업자의 수준 내에 있으며, 이의 1일 투여 용량은 예를 들어 락토바실러스 플란타룸 10^5 내지 10^{13} CFU/일, 보다 구체적으로는 10^6 내지 10^{10} CFU/일이 될 수 있으나, 이에 제한되지 않으며, 투여하고자 하는 대상의 연령, 건강 상태, 합병증 등의 다양한 요인에 따라 달라질 수 있다.
- [0023] 본 발명의 일측면은 락토바실러스 플란타룸 APsulloc 331261 균주, 그 추출물 또는 그 배양액을 포함하는 화장품 조성물을 제공한다. 상기 화장품 조성물은 국소 적용에 적합한 모든 제형으로 제공될 수 있다. 예를 들면, 용액, 수상에 유상을 분산시켜 얻은 에멀전, 유상에 수상을 분산시켜 얻은 에멀전, 현탁액, 고체, 젤, 분말, 페이스트, 포말(foam) 또는 에어로졸 조성물의 제형으로 제공될 수 있다. 이러한 제형의 조성물은 당해 분야의 통상적인 방법에 따라 제조될 수 있다.
- [0024] 상기 화장품 조성물은 상기한 물질 이외에 주 효과를 손상시키지 않는 범위 내에서, 바람직하게는 주 효과에 상승 효과를 줄 수 있는 다른 성분들을 함유할 수 있다. 본 발명에 따른 화장품 조성물은 비타민, 고분자 펩티드, 고분자 다당 및 스펅고 지질로 이루어진 군에서 선택된 물질을 포함할 수 있다. 또한 본 발명에 따른 화장품 조성물은 보습제, 에몰리언트제, 계면 활성제, 자외선 흡수제, 방부제, 살균제, 산화 방지제, pH 조정제, 유기 및 무기 안료, 향료, 냉감제 또는 제한(制汗)제를 포함할 수 있다. 상기 성분의 배합량은 본 발명의 목적 및 효과를 손상시키지 않는 범위 내에서 당업자가 용이하게 선정 가능하며, 그 배합량은 조성물 전체 중량을 기준으로 0.01~5 중량%, 구체적으로 0.01~3 중량%일 수 있다.
- [0025] 본 발명의 일측면은 락토바실러스 플란타룸 APsulloc 331261 균주, 그 추출물 또는 그 배양액을 포함하는 약학 조성물을 제공한다. 상기 약학 조성물은 과민성 장 증후군, 변비, 설사 등을 예로 들 수 있는 장 질환의 예방 또는 치료에 사용될 수 있다.
- [0026] 본 발명의 일측면에 따른 약학 조성물은 경구, 비경구, 직장, 국소, 경피, 정맥 내, 근육 내, 복강 내, 피하 등으로 투여될 수 있다. 경구 투여를 위한 제형은 정제(錠劑), 환제(丸劑), 연질 및 경질 캡셀제, 과립제(顆粒劑), 산제, 세립제, 액제, 유탁제(乳濁濟) 또는 펠렛제일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 비경구 투여를 위한 제형은 용액제, 현탁제, 유액제, 젤, 주사제, 점적제, 좌제(坐劑), 패취 또는 분무제일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 상기 제형은 당해 분야의 통상적인 방법에 따라 용이하게 제조될 수 있으며, 계면 활성제, 부형제, 수화제, 유화 촉진제, 현탁제, 삼투압 조절을 위한 염 또는 완충제, 착색제, 향신료, 안정화제, 방부제, 보존제 또는 기타 상용하는 보조제를 적당히 사용할 수 있다.
- [0027] 본 발명의 일측면에 따른 약학 조성물의 유효 성분은 투여 받을 대상의 연령, 성별, 체중, 병리 상태 및 그 심각도, 투여 경로 또는 처방자의 판단에 따라 달라질 것이다. 이러한 인자에 기초한 적용량 결정은 당업자의 수준 내에 있으며, 이의 1일 투여 용량은 예를 들어 0.1mg/kg/일 내지 5000mg/kg/일, 보다 구체적으로는 50 mg/kg/일 내지 500 mg/kg/일이 될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0028] 상기 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) APsulloc 331261은 2011년 3월 28일 한국미생물보존센터(Korean Culture Center of Microorganisms)에 미생물 기탁번호 KCCM11179P로 기탁하였다.
- [0029] 기탁기관명 : 한국미생물보존센터(국내)
- [0030] 수탁번호 : KCCM11179P

[0031] 수탁일자 : 20110328

[0032] 이하, 실시예 및 실험예를 들어 본 발명에 따른 신규 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) APsulloc 331261의 분리 방법, 동정 방법 및 특성을 상세하게 설명한다. 하지만 아래 실시예 및 실험예는 본 발명에 대한 이해를 돕기 위해 예시의 목적으로만 제공된 것일 뿐 본 발명의 범주 및 범위가 그에 의해 제한되는 것은 아니다.

[0033] [실시예 1] 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) APsulloc 331261의 분리

[0034] 차나무 잎 200g을 1차 증류수에 2회 세척하여 이물질을 제거한다. 세척한 차나무 잎의 물기를 털어내고 차나무 잎 중량의 8%에 해당하는 식염과 혼합한 후 3시간 동안 실온에 방치한다. 식염에 절여진 차나무 잎을 1% 프락토 올리고당 용액 1000 mL에 혼합한 후 3일간 32℃ 인큐베이터에서 배양한다. 3일 후 배양액의 pH가 5 미만으로 떨어졌는지 확인하고 pH 5 미만인 경우 이를 취해 디프코 락토바실리 MRS 아가²(Difco Lactobacilli MRS Agar²) 배지에 배양한다. 이때 배양은 32℃, 혐기 조건의 챔버에서 2일간 배양한 후 백색 집락을 보이는 콜로니를 취한다.

[0035] 위와 같은 방법으로 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) APsulloc 331261을 차나무 잎에서 분리하였다.

[0036] [실시예 2] 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) APsulloc 331261의 동정

[0037] (1) 균주의 배양

[0038] 실시예 1에서 분리한 APsulloc 331261을 MRS 아가 플레이트에 도말(streaking)하고 37℃에서 2일간 배양한다. 얻은 단일 콜로니(single colony)를 MRS 브로스(broth) 10mL에 접종하고 다시 37℃에서 밤새 배양하여 APsulloc 331261 배양액을 제조한다.

[0039] (2) APsulloc 331261의 당 발효 패턴 분석

[0040] 상기 (1)과 같이 제조한 APsulloc 331261 균주 배양액을 MRS 브로스 10mL에 0.5% 접종하여 37℃에서 밤새 배양하였다. 배양액을 8,000 rpm에서 5분간 원심 분리하고 상등액을 제거하여 균체만 모은 후, 0.85% 완충 식염수(saline buffer)를 2mL 첨가하여 현탁하였다. 이후 API 50CHL 키트(BioMerieux)를 사용하여 제조사 프로토콜에 따라 진행하였다. 그 구체적인 내용은 아래와 같다.

[0041] 먼저 API 현탁 미디움(medium) 5mL에 균주의 현탁액을 조금씩 넣으면서 맥파랜드 기준 2(McFarland Standard 2)(BioMerieux) 정도의 탁도가 되는데 필요한 현탁액 양을 측정하였다. 측정된 현탁액 양의 2배를 API 50CHL 미디움 10mL에 넣은 후 흔들어 섞어주었다. 각기 다른 기질이 들어있는 컵플(cupule)에 상기 혼합물을 넣은 후, 미네랄 오일을 한방울씩 떨어뜨리고 37℃에서 2일간 배양한 다음, 당 발효 패턴을 분석하였다.

[0042] 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) 균주(KCTC3108)를 표준 균주로 하여 비교한 APsulloc 331261의 당 발효 패턴 결과 및 그 결과를 이용한 APsulloc 331261의 동정 결과는 아래 표와 같다.

표 1

[0043]

기질	KCTC3108		APsulloc 331261		기질	KCTC3108		APsulloc 331261	
	24h	48h	24h	48h		24h	48h	24h	48h
대조균	-	-	-	-	에세쿨린	+	+	+	+
글리세롤	-	-	-	-	살리신	+	+	+	+
에리스리톨	-	-	-	-	셀로비오스	?	+	+	+
D-아라비노스	-	-	-	-	말토스	+	+	+	+
L-아라비노스	+	+	+	+	락토스	+	+	+	+

리보스	+	+	+	+	멜리비오스	+	+	+	+
D-자일로스	-	-	-	-	D-사카로스 (수크로스)	+	+	+	+
L-자일로스	-	-	-	-	트레할로스	+	+	+	+
아도니톨	-	-	-	-	이눌린	-	-	-	-
β-메틸-D-자일로스	-	-	-	-	멜레치토스	+	+	+	+
갈락토스	+	+	+	+	라피노스	-	-	+	+
글루코스	+	+	+	+	아미돈(진분)	-	-	-	-
프럭토스	+	+	+	+	글리코겐	-	-	-	-
만노스	+	+	+	+	자일리톨	-	-	-	-
소르보스	-	-	-	-	젬티오비오스	-	-	+	+
람노스	-	-	-	-	D-튜라노스	+	+	+	+
덜시톨	-	-	-	-	D-릭소스	-	-	-	-
이노시톨	-	-	-	-	D-타가토스	-	-	-	-
만니톨	+	+	+	+	D-퓨코스	-	-	-	-
소르비톨	+	+	+	+	L-퓨코스	-	-	-	-
α-메틸-D-만노사이드	?	+	-	-	D-아라비톨	?	-	?	-
α-메틸-D-글루코사이드	-	-	-	-	L-아라비톨	-	-	-	-
N-아세틸-글루코사민	+	+	+	+	글루콘산	?	+	?	+
아미그달린	+	+	+	+	2-케토글루코네이트	-	-	-	-
알부틴	+	+	+	+	5-케토글루코네이트	-	-	-	-

[0044] +: 기질 분해, -: 해당 기질을 분해하지 못 함, ?: 판정 불가

표 2

균주	종속명	% 인덱스	T 인덱스
KCTC	락토바실러스 플란타룸	99.9	0.8
3108	락토바실러스 펜토수스	0.1	0.29
APsulloc 331261	락토바실러스 플란타룸	99.4	0.99
	락토바실러스 펜토수스	0.4	0.71

[0046] 상기에서 볼 수 있듯이, APsulloc 331261은 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*)에 대한 일치도(% index)가 99% 이상으로 나타나 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*)에 속하는 것을 알 수 있다. 또한 APsulloc 331261은 표준 균주(KCTC3108)와 α-메틸-만노사이드(mannoside) 및 라피노스(raffinose) 이용 성질이 달라 서로 다른 균주임을 확인할 수 있다.

[0047] (3) APsulloc 331261의 효소 활성 패턴 분석

[0048] 상기 (1)과 같이 제조한 APsulloc 331261 균주 배양액을 MRS 브로스 10mL에 0.5% 접종하여 37°C에서 밤새 배양하였다. 배양액을 8,000 rpm에서 5분간 원심 분리하고 상등액을 제거하여 균체만 모은 후, 0.85% 완충 식염수(saline buffer)를 2mL 첨가하여 현탁하였다. 이후 API ZYM 키트(Biomérieux)를 사용하여 제조사 프로토콜에 따라 진행하였다. 그 구체적인 내용은 아래와 같다.

[0049] 먼저 API 현탁 미디움(medium) 5mL에 균주의 현탁액을 조금씩 넣으면서 맥파랜드 기준 2(McFarland Standard 2)(Biomérieux) 정도의 탁도가 되는데 필요한 현탁액 양을 측정하였다. 측정된 현탁액 양의 2배를 API 50CHL 미디움 10mL에 넣은 후 흔들어 섞어 주었다. 각 컵플(cupule)에 상기 혼합물 65μL씩 넣고 37°C에서 4시간 동안 배양하였다. ZYM A 시약과 ZYM B 시약을 각각의 컵플에 1방울씩 떨어뜨리고 5분 후 색의 강도에 따라 0-5까지 점수를 매긴 다음 3 이상이면 양성으로 판정하였다.

[0050] 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) 균주(KCTC3108)를 표준 균주로 하여 비교한 APsulloc 331261

의 효소 활성 패턴 결과는 아래와 같다.

표 3

효소	KCTC3108		APsulloc 331261	
	스코어	결과	스코어	결과
대조군	0	-	0	-
알칼라인 포스파타아제	0	-	1	-
에스터라아제	1	-	2	-
에스터라아제 리파아제	1	-	2	-
리파아제	0	-	2	-
류신 아릴아미다아제	5	+	4	+
발린 아릴아미다아제	4	+	4	+
크리스틴 아릴아미다아제	1	-	2	-
트립신	0	-	0	-
α- 키모트립신	0	-	1	-
산 포스파타아제	1	-	3	+
나프톨-AS-BI-포스포하이드로라아제	1	-	3	+
α- 갈락토시다아제	1	-	3	+
β- 갈락토시다아제	5	+	5	+
β- 글루쿠로니다아제	1	-	2	-
β- 글루코시다아제	3	+	5	+
N-아세틸-β-글루코사미니다아제	0	-	4	+
α- 만노시다아제	0	-	1	-
α- 푸코시다아제	0	-	1	-

[0052] 상기에서 볼 수 있듯이, APsulloc 331261은 표준 균주(KCTC3108)와 산 포스파타아제(Acid phosphatase), 나프톨-AS-BI-포스포하이드로라아제(Naphthol-AS-BI-phosphohydrolase), α-갈락토시다아제(α-galactosidase) 및 N-아세틸-β-글루코사미니다아제(N-acetyl-β-glucosaminidase)의 효소 활성 강도에 있어서 차이가 있음을 확인할 수 있다. 따라서 APsulloc 331261은 표준 균주와 다른 균주임을 알 수 있다.

[0053] 또한 APsulloc 331261은 장내에서 발암 전구 물질에 작용하여 발암 물질로 변화시킴으로써 암을 유도할 수 있는 대표적인 발암 효소 중 하나라고 알려져 있는 β-글루쿠로니다아제(β-glucuronidase) 활성에 대해 음성으로 판정되었다. 따라서 APsulloc 331261을 식품 조성에 활용하여도 무방함을 알 수 있다.

[0054] (4) APsulloc 331261의 항생제 내성 평가

[0055] 페트리 디쉬(직경 100mm)에 멸균한 MRS 아가를 20mL씩 넣고 클린벤치에서 식혀 배지를 제조하였다. MRS 브로쓰 10mL에 (1)에서 제조한 APsulloc 331261 배양액을 0.5% 접종하여 37°C에서 6시간 배양하였다. 625nm에서 흡광도가 0.08-0.13 정도 되도록 희석하였다. 희석액을 멸균한 면봉에 충분히 적신 후 미리 만들어둔 MRS 아가 플레이트에 전체적으로 고르게 도말하였다. 항생제 감수성 평가 디스크를 플레이트 위에 적당한 간격을 두고 떨어뜨렸다. 37°C에서 24시간 배양 후 클린 존(clear zone)의 지름을 측정하였다. 항생제 감수성 평가 디스크 농도 및 평가 기준과 그에 따른 평가 결과는 아래와 같다.

표 4

항생제		존(zone) 직경 해석		
성분명	농도	내성 있음(R)	중간(I)	예민함(S)
암피실린	10μg	≤13	14-16	≥17
세프타지딴	30μg	≤14	15-17	≥18
클로르암페니콜	30μg	≤12	13-17	≥18
시플로플록사신	5μg	≤15	16-20	≥21
클린다마이신	2μg	≤14	15-20	≥21
에리스로마이신	15μg	≤13	14-22	≥23
겐타마이신	120μg	≤6	7-9	≥10

이미페넴	10 μ g	≤ 13	14-15	≥ 16
스트렙토마이신	10 μ g	≤ 11	12-14	≥ 15
네오마이신	30 μ g	≤ 12	13-16	≥ 17
니트로푸란토인	300 μ g	≤ 14	15-16	≥ 17
페니실린	10U	≤ 14	-	≥ 15
폴리믹신 B	300U	≤ 8	9-11	≥ 12
테트라사이클린	30 μ g	≤ 14	15-18	≥ 19
트리메토프림	5 μ g	≤ 10	11-15	≥ 16
반코마이신	30 μ g	≤ 14	15-16	≥ 17

[0057] 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) 균주(KCTC3108)를 표준 균주로 하여 비교한 APsulloc 331261의 항생제 내성 평가 결과는 아래와 같다.

표 5

항생제	KCTC3108		APsulloc 331261	
	존(mm)	결과	존(mm)	결과
암피실린	29	S	27	S
세프타지딴	23	S	16	I
클로르암페닐콜	24	S	24	S
시플로플록사신	-	R	-	R
클린다마이신	12	R	29	S
에리스로마이신	26	S	25	S
겐타마이신	20	S	19	S
이미페넴	39	S	39	S
스트렙토마이신	-	R	-	R
네오마이신	11	R	9	R
니트로푸란토인	-	R	27	S
페니실린	24	S	18	S
폴리믹신 B	-	R	-	R
테트라사이클린	17	I	17	I
트리메토프림	-	R	-	R
반코마이신	-	R	-	R

[0059] R: 내성 있음(resistant), I: 중간(intermediate), S: 예민함 (susceptible)

[0060] 상기에서 볼 수 있듯이, APsulloc 331261은 표준 균주(KCTC3108)와 세프타지딴(ceftazidime), 클린다마이신(clindamycin), 니트로푸란토인(nitrofurantoin)의 항생제 내성 패턴에 있어 차이를 나타냈다. 따라서 APsulloc 331261은 표준 균주와 다른 균주임을 알 수 있다.

[0061] 당 발효 패턴, 효소 활성 패턴, 항생제 내성 패턴을 종합적으로 분석할 때 APsulloc 331261은 락토바실러스 플란타룸에 속하고 락토바실러스 플란타룸 표준 균주(KCTC3108)와 다른 새로운 균주임을 알 수 있다.

[0062] [실험예 1] 내산성능 평가

[0063] (1) pH 별 내산성능 평가

[0064] MRS 브로쓰 10mL에 APsulloc 331261 배양액을 0.5% 접종하여 37 $^{\circ}$ C에서 밤새 배양하였다. HCl로 pH를 각각 2.0, 2.5, 3.0, 3.5로 조정하여 멸균한 MRS 브로쓰 5mL에 상기 배양액 50 μ L를 접종한 후 37 $^{\circ}$ C에서 1시간 배양하였다. 1시간 후 펩톤 식염 완충액으로 희석하여 mL당 균수를 측정하였다. 상기 배양액의 균수를 측정 후 0.01을 곱해준 것을 대조군(Control)으로 하고, 대조군 균수를 100%로 하여 생존율을 계산하였다. 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) 균주(KCTC3108)를 표준 균주로 하여 비교한 결과를 아래 표에 나타내었다.

표 6

[0065]

pH	KCTC3108		APsulloc 331261	
	cfu/ml	생존율(%)	cfu/ml	생존율(%)
대조군	2.9×10^7	100	3.8×10^7	100
2.0	3.0×10^1	0	1.0×10^1	0
2.5	2.5×10^7	87.4	3.3×10^7	87.7
3.0	3.2×10^7	110.3	3.7×10^7	110.3
3.5	2.8×10^7	97.7	4.0×10^7	105.3

[0066]

상기에서 볼 수 있듯이, APsulloc 331261은 pH 2.5 내지 3.5에서 표준 균주보다 높은 생존율을 나타내었다. 즉, APsulloc 331261은 우수한 내산성을 가짐을 확인할 수 있다. 음식물 섭취시 위의 pH가 2.0 내지 3.0인 것을 고려할 때, APsulloc 331261이 식품 조성물에 포함되면 위에서의 생존율이 높을 것임을 알 수 있다.

[0067]

(2) 시간별 내산성능 평가

[0068]

MRS 브로쓰 10mL에 APsulloc 331261 배양액을 0.5% 접종하여 37°C에서 밤새 배양하였다. 멸균한 MRS 브로쓰 5mL에 HCl로 pH를 2.5로 조정된 배양액 50 μ l를 접종한 후 37°C에서 3시간 배양하였다. 1시간 및 3시간 후 펩톤 식염 완충액으로 희석한 다음 mL당 균수를 측정하였다. 상기 배양액의 균수를 측정 후 0.01을 곱해준 것을 대조군(control)으로 하고, 대조군 균수를 100%로 하여 생존율을 계산하였다. 락토바실러스 플란타룸 (*Lactobacillus plantarum*) 균주(KCTC3108)를 표준 균주로 하여 비교한 결과를 아래 표에 나타내었다.

표 7

[0069]

시간 (시)	KCTC3108		APsulloc 331261	
	cfu/ml	생존율(%)	cfu/ml	생존율(%)
0	3.3×10^7	100	6.8×10^7	100
1	2.9×10^7	86.9	6.6×10^7	98
3	2.2×10^7	67.3	6.4×10^7	94.6

[0070]

상기에서 볼 수 있듯이, APsulloc 331261은 pH 2.5에서 1시간 및 3시간 후에도 90% 이상 생존함을 확인할 수 있다. 즉, APsulloc 331261은 오랜 시간 우수한 내산성능을 가짐을 확인할 수 있다. 음식물 섭취시 평균 위 체류 시간이 1~3시간임을 고려할 때, APsulloc 331261이 식품 조성물에 포함되면 위 체류 중에도 생존율이 높을 것임을 알 수 있다.

[0071]

따라서 APsulloc 331261은 위 체류 기간 동안 위의 낮은 pH에서도 생존 가능하므로 식품으로 섭취시 위에서 생존 가능하며, 나아가 장내 도달률이 높다.

[0072]

[실험예 2] 내담즙산성능 평가

[0073]

MRS 브로쓰 10mL에 APsulloc 331261 배양액을 0.5% 접종하여 37°C에서 밤새 배양하였다. 황소의 담즙(ox gall)을 각각 0.3%, 0.5%씩 첨가하여 MRS 아가 플레이트를 제조하였다. 대조군(control)으로는 황소의 담즙을 첨가하지 않은 MRS 아가를 사용하였다. 상기의 균주 배양액을 희석하여 MRS 아가 배지에 도말 후 37°C에서 2일간 배양하였다. 각 콜로니를 계수한 후 대조군 균수를 100%로 하여 APsulloc 331261의 생존율(%)을 계산한 결과를 아래 표에 나타내었다.

표 8

[0074]

황소 담즙 농도(%)	APsulloc 331261	
	cfu/ml	생존율(%)
0	3.3×10^9	100
0.3	3.2×10^9	96.5
0.5	3.0×10^9	89

[0075]

상기에서 볼 수 있듯이, APsulloc 331261은 황소의 담즙 농도 0.3% 및 0.5%에서 생존율이 85% 이상으로 우수한 내담즙산성을 나타내었다. 내담즙산성이 뛰어난 균주는 장내 정착력도 우수한 것으로 알려져 있으므로, APsulloc 331261은 우수한 장내 정착력 및 장내 도달률을 가짐을 알 수 있다.

[0076]

[실험예 3] 락트산 생성능 평가

[0077]

MRS 브로쓰 10mL에 APsulloc 331261 배양액을 0.5% 접종하여 37°C에서 밤새 배양하였다. 배양액을 8000 rpm에서 15분간 원심 분리하여 상층액만 회수하였다. 회수한 상층액을 80°C에서 15분간 처리하여 효소 반응을 중지시켰다. 증류수로 열처리한 상층액을 100배 희석하였다. D-락트산/L-락트산 UV법 키트(UV method kit)(R-biopharm)를 사용하여 제조사 프로토콜에 따라 진행하였다. 그 구체적인 내용은 아래와 같다.

[0078]

큐벳(cuvette)에 키트 용액 1(kit solution 1)(글라이실글리신 버퍼/L-글루타메이트) 1mL, 용액 2(NAD 용액) 0.2mL, GPT 현탁 용액 3 0.02mL씩을 차례로 첨가하였다. 상기에서 준비한 상층액 0.1mL씩을 큐벳에 첨가하였다. 대조군에는 3차 증류수 1mL를, 시료에는 3차 증류수 0.9mL를 첨가하였다. 잘 섞어준 다음 5분 후에 340nm에서 흡광도(A1)를 측정하였다. D-LDH 용액 4를 0.02mL씩 첨가한 후 잘 섞어주고 30분간 반응시킨 후 340nm에서 흡광도(A2)를 측정하였다. L-LDH 용액 5를 0.02mL씩 첨가한 후 잘 섞어주고 30분간 반응시킨 다음 340nm에서 흡광도(A3)를 측정하였다. 계산법에 따라 시료 내 D-락트산 농도와 L-락트산 농도를 계산하였다. 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) 균주(KCTC3108)를 표준 균주로 하여 비교한 결과를 아래 표에 나타내었다.

표 9

[0079]

락트산	KCTC3108		APsulloc 331261	
	농도(g/L)	비율(%)	농도(g/L)	비율(%)
D 형	11.3	72	8.9	62
L 형	4.3	28	5.5	38
합계	15.6	100	14.4	100

[0080]

상기에서 볼 수 있듯이, APsulloc 331261은 D-락트산 및 L-락트산을 모두 생성하였다. 또한 표준 균주에 비해 총 락트산 생성량이 적었으며, 생성된 락트산 중 D-락트산의 비율이 적었다. 따라서 이를 포함한 식품은 락트산에 취약한 성인이나 영유아도 자유롭게 섭취할 수 있으며, 이를 이용하여 식품을 발효시키는 경우 식품이 좀 더 부드러운 맛을 가질 수 있다.

[0081]

[실험예 4] 항균력 평가

[0082]

MRS 브로쓰 10mL에 APsulloc 331261 배양액을 0.5% 접종하여 37°C에서 밤새 배양하였다. 멸균한 MRS 아가를 15mL씩 페트리 디쉬에 분주하여 배지 제조 후 상기 APsulloc 331261 배양액을 1μL씩 점적하여 37°C에서 24시간 배양하였다.

[0083]

한편, 시겔라 프렉스네리(*Shigella flexneri*)를 트립틱 소이 아가(Tryptic soy agar)에 도말하여 37°C에서 밤새 배양한 후 BHI 브로쓰에 콜로니를 접종하여 밤새 배양하였다. BHI 소프트 아가(아가 1%)를 멸균하여 45-50°C로 식힌 후 시겔라 프렉스네리(*Shigella flexneri*) 배양액 1%를 접종하였다.

[0084]

시겔라 프렉스네리(*Shigella flexneri*) 배양액을 10mL씩 APsulloc 331261 배양액 위에 증층하여 굳혔다. 37°C

에서 24시간 배양한 후 클리어 존(clear zone)의 크기를 측정하였다. 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) 균주(KCTC3108)를 표준 균주로 하여 비교한 결과를 아래 표에 나타내었다.

표 10

[0085]

시험 균주		클리어 존의 직경 (mm)	
KCTC no.	균주	KCTC3108	APsulloc 331261
2008	시겔라 프렉스네리	26	27

[0086]

상기에서 볼 수 있듯이, APsulloc 331261은 표준 균주보다 시겔라 프렉스네리(*Shigella flexneri*) 에 대한 항균 효과가 우수함을 확인할 수 있다.

수탁번호

[0087]

기탁기관명 : 한국미생물보존센터(국내)

수탁번호 : KCCM11179P

수탁일자 : 20110328