



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2018-0092178
(43) 공개일자 2018년08월17일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 1/20 (2006.01) A23K 10/16 (2017.01)
A23K 20/195 (2016.01) A23L 33/135 (2016.01)
C12R 1/25 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 1/20 (2013.01)
A23K 10/16 (2016.05)
(21) 출원번호 10-2017-0017616
(22) 출원일자 2017년02월08일
심사청구일자 2017년02월08일

(71) 출원인
부경대학교 산학협력단
부산광역시 남구 신선로 365 (용당동,
부경대학교)
(주)부경푸드바이오센터
부산광역시 남구 신선로 365, 용당캠퍼스창업보
육센터10호관102AB호(용당동)
(72) 발명자
김영목
부산시 남구 분포로 111, 109동 1103호(엘지메트
로시티)
박홍엽
부산시 진구 중앙대로 786, 102동 701호(전포동,
에메랄드홈)
(74) 대리인
위병갑

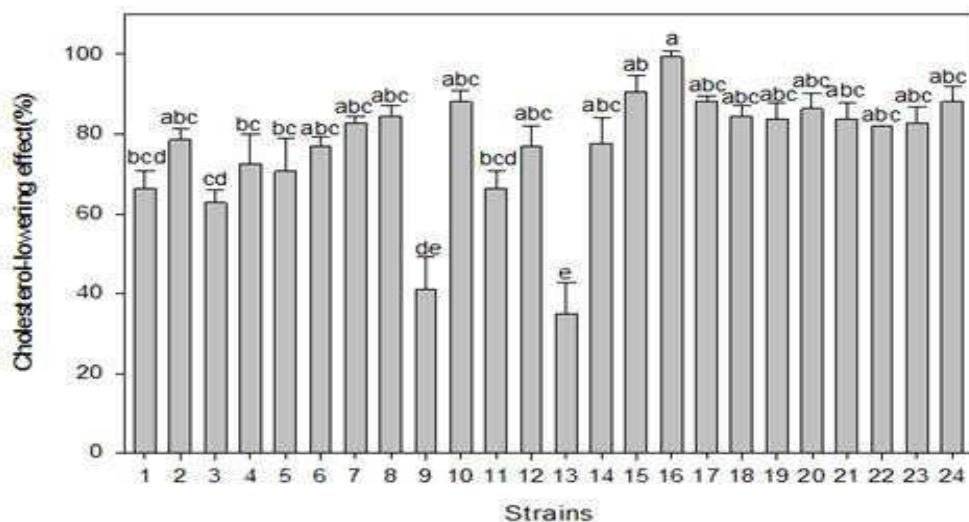
전체 청구항 수 : 총 6 항

(54) 발명의 명칭 항콜레스테롤 활성이 우수한 신규 락토바실러스 플란타륨 F.M.B #31 균주 및 이의 용도

(57) 요약

본 발명은 항콜레스테롤 활성이 우수한 신규 락토바실러스 플란타륨 F.M.B #31 균주 및 이의 용도에 관한 것이다. 본 발명의 균주는 항콜레스테롤 활성, 항산화 활성, 장 정착능, 내산성, 내담즙성 또는 내염성이 우수한 효과가 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A23K 20/195 (2016.05)

A23L 33/135 (2016.08)

A23V 2002/00 (2013.01)

A23V 2200/3204 (2013.01)

A23Y 2220/67 (2013.01)

C12R 1/25 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 15BSI105411

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 (재)연구개발 특구진흥재단

연구사업명 기술이전사업화사업

연구과제명 유산균 발효법을 이용한 수해양 자원유래 고부가가치 장류제조기술개발 및 사업화

기 여 율 1/1

주관기관 부경대학교 산학협력단

연구기간 2015.11.06 ~ 2016.11.05

명세서

청구범위

청구항 1

서열번호 1로 표시되는 염기서열을 갖는 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) F.M.B #31 KCTC 18498P 균주.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 균주는 항콜레스테롤 활성, 항산화 활성, 장 정착능, 내산성, 내담즙성 또는 내염성이 우수한 것을 특징으로 하는, 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) F.M.B #31 KCTC 18498P 균주.

청구항 3

제1항의 균주, 상기 균주의 배양물, 상기 배양물의 농축액 및 건조물로 이루어지는 군에서 선택된 1종 이상을 유효성분으로 함유하는 프로바이오틱스 제제.

청구항 4

제1항의 균주, 상기 균주의 배양물, 상기 배양물의 농축액 및 건조물로 이루어지는 군에서 선택된 1종 이상을 유효성분으로 함유하는 항산화용 조성물.

청구항 5

제1항의 균주, 상기 균주의 배양물, 상기 배양물의 농축액 및 건조물로 이루어지는 군에서 선택된 1종 이상을 유효성분으로 함유하는 건강기능성 식품.

청구항 6

제1항의 균주, 상기 균주의 배양물, 상기 배양물의 농축액 및 건조물로 이루어지는 군에서 선택된 1종 이상을 유효성분으로 함유하는 사료첨가제.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 항콜레스테롤 활성이 우수한 신규 락토바실러스 플란타룸 F.M.B #31 균주 및 이의 용도에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 경제수준 향상에 의한 영양과잉, 환경오염, 운동부족, 스트레스 증가 등에 따른 각종 생활습관병 및 만성퇴행성 질환의 만연이 우리 사회의 큰 문제로 대두되고 있다. 이 중, 최근에 관심이 집중되고 있는 질병이 대사성질환이다. 상기 대사성질환은 현대인들의 고지방 및 고당질 가공식품 및 동물성 식품 소비 증가로 대표되는 영양과잉과 운동부족 등의 생활습관이 원인이 되는 질환군으로, 고혈압, 당뇨병, 비만, 고지혈증, 동맥경화증 등이 그 예이다. 특히, 과량의 지방과 콜레스테롤의 섭취는 과량 섭취된 콜레스테롤의 혈관 침착을 유도하고, 이에 따라 동맥이 막히거나, 혈액공급에 문제가 발생되어, 심혈관계 질환 등을 포함한 순환계 질환을 일으키는 주요원인으로 알려져 있다.

[0003] 일 예로, 세계보건기구(WHO)의 보고에 의하면, 2008년에 약 1,700 만명의 인구가 심혈관 질환으로 사망하였고, 이러한 추세는 계속 증가하여 2030년에는 약 2,300 만명 이상의 인구가 심혈관 질환에 의해 사망할 것으로 예상되고 있다.

[0004] 이와 관련하여, 혈중 콜레스테롤 수치가 1 mg/dL이 상승할 때 마다, 심장병 발병률이 2 내지 3% 증가되는 것으

로 보고되고 있다. 이러한 연관관계에 따라, 심혈관질환의 발병률을 억제하기 위한 차원에서 혈중 콜레스테롤과 관련된 관리 기준들이 제시되고 있다.

- [0005] 일 예로, 한국인을 위한 바람직한(desirable) 혈중 콜레스테롤 수치는 200 mg/dL 미만으로 정의되고, 혈중 콜레스테롤 수치가 200 내지 239 mg/dL의 경우, 경계수준(borderline-high), 그리고 240 mg/dL이상의 경우, 고 콜레스테롤 혈증(high)으로 정의되고 있다. 또한, 미국 NCEP(National Cholesterol Education Program)가 설정한 관상동맥 질환(coronary heart disease) 발병률을 고려한 혈중 콜레스테롤 수치의 경우, 저밀도 지질단백질 콜레스테롤(LDL 콜레스테롤)을 기준으로 100 mg/dL미만이면 적절한 수준(optimal)이고, 100 내지 129 mg/dL이면 적정수준에 근접하였거나 조금 상위하는 수준(near optimal/above optimal), 130 내지 159 mg/dL이면 경계위험 수준(borderline high), 160 내지 189 mg/dL이면 고위험수준(high), 그리고 190 mg/dL이상이면 매우 고위험 수준(very high)으로 규정하고 있다.
- [0006] 정상인의 1일 콜레스테롤의 섭취량을 약 400 내지 500 mg으로 가정할 경우, 일반적으로 식이 콜레스테롤의 흡수율은 약 60 내지 80%로 알려져 있으며, 제한된 콜레스테롤의 흡수율에 따라 흡수되지 않은 식이 콜레스테롤은 콜레스테롤 형태 내지 대장과 직장의 박테리아 효소반응에 의한 대사산물로 배설된다.
- [0007] 따라서, 심혈관계 질환을 지닌 환자들은 혈중 콜레스테롤 수치를 조절하기 위하여 약물들을 복용하기도 하는데, 이들 약물의 콜레스테롤 조절 작용 유형으로는 소장에서의 콜레스테롤 가수 분해 및 에스테르화를 억제하기 위하여 이와 관련된 효소활성을 억제함으로써 장내 콜레스테롤 흡수를 조절하거나, 장내 흡수 차단제(sequestrant)로 작용하여 콜레스테롤 배설 촉진을 이용한 콜레스테롤과 담즙산 배설 조절이나 지질대사 조절제 등이 있다.
- [0008] 그러나, 이러한 약물들을 장기 복용 시 심각한 간 손상 및 기능 저하, 관절 근육통, 변비 및 설사 등의 부작용을 초래한다. 일 예로, 지방분해효소의 활성을 억제하여 콜레스테롤(cholesterol) 및 중성지방(triglyceride)의 가수분해를 방해하며 산화되지 않은 지방을 변으로 배설시키도록 돕는 약물로 비만치료제로도 사용되는 올리스타트(orlistat, XenicalR)의 경우 소화기 장애, 지방변, 배변실금, 지용성 비타민 흡수 방해 등을 유도한다고 보고되고 있다.
- [0009] 따라서, 상대적으로 안전성에 대한 문제가 발생할 가능성을 최소화 할 수 있을 것으로 기대되는 천연물을 이용한 방법들에 대한 연구가 진행되고 있으며, 최근에는 각국의 연구진에 의하여, 식이요법과 함께 사용될 각종 기능성 식품 및 고지혈증 개선용 식이보충제에 대한 연구가 활발히 진행되고 있는 상황이다.
- [0010] 유산균은 당류를 발효해서 50% 이상 젖산을 생성하는 세균으로, 인간이 이용할 수 있는 가장 유익한 미생물이다. 음식물뿐만 아니라 포유동물의 구강과 소화관, 토양 등 자연계에 널리 분포하고 있으며, 식품의 보존과 관능적 특성과 관련된 중요한 역할 등을 수행하는 인간생활에 유익한 균주이다. 전 세계적으로 오랜 기간에 걸쳐 유산균 함유 발효 식품으로 널리 식품으로 사용된 유산균은 최근에 GRAS(Generally Recognized As Safe) 미생물로 안정성을 인정받고 있다.
- [0011] 이러한 유산균의 안정성 및 유산균이 건강에 좋다는 인식을 기초로 하여 유산균 함유 식품을 통하여 건강을 유지하고, 질병을 예방하려는 노력이 증대되었으며, 최근 유산균을 기능성 식품에 사용하기 위하여 잠재력을 평가하기 위한 프로바이오틱 유산균에 대한 연구가 전 세계적으로 광범위하게 진행되고 있다.
- [0012] 프로바이오틱 유산균은 유래 및 이용에 대한 안정성이 인정될 뿐만 아니라 위장관 상부의 산성 조건 및 담즙 존재 하에서도 존재하여야 하고, 대장에서 부착이 가능해야 하며, 균주 안정성이나 생존력이 뛰어나야 한다. 현재 상기 요구 조건을 만족하는 프로바이오틱 유산균은 락토바실러스 속 균주(*Lactobacillus* sp.)와 비피도박테리움 균주(*Bifidobacterium* strain)가 대부분이다. 이러한 프로바이오틱 유산균의 경우 대부분 치즈 등의 유제품 발효식품과 관련되어 주로 연구되고 있으며, 발효 유제품과 관련된 서구의 연구진들에 의해 주로 연구가 진행되고 있다.
- [0013] 따라서, 우리 고유의 전통 식품인 독자적인 생물자원의 보전 및 연구와 활용이란 차원에서 우리의 전통 발효음식인 김치발효과정과 관여하는 유산균 중에서 혈중 콜레스테롤을 조절할 수 있으면서도 장내 생존가능성 및 장내 부착능이 우수하여 생균활성제로 활용가능한 프로바이오틱 유산균에 대한 연구의 필요성이 대두되고 있다.

선행기술문헌

특허문헌

[0014] (특허문헌 0001) 한국등록특허 제1616530호

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0015] 이에 본 발명자들은 전통 발효음식인 김치발효과정에 관여하는 유산균 중에서 혈중 콜레스테롤을 조절할 수 있으면서도 장내 생존가능성 및 장내 부착능이 우수하여 생균활성제로 활용가능한 프로바이오틱 유산균을 찾기 위하여 노력하던 중 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) F.M.B #31 KCTC 18498P 균주에서 상기 효과가 있음을 확인하고 본 발명을 완성하였다.
- [0016] 따라서, 본 발명의 목적은 서열번호 1로 표시되는 염기서열을 갖는 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) F.M.B #31 KCTC 18498P 균주를 제공하는 것이다.
- [0017] 또한 본 발명의 다른 목적은 상기 균주, 상기 균주의 배양물, 상기 배양물의 농축액 및 건조물로 이루어지는 군에서 선택된 1종 이상을 유효성분으로 함유하는 프로바이오틱스 제제를 제공하는 것이다.
- [0018] 또한 본 발명의 다른 목적은 상기 균주, 상기 균주의 배양물, 상기 배양물의 농축액 및 건조물로 이루어지는 군에서 선택된 1종 이상을 유효성분으로 함유하는 항산화용 조성물을 제공하는 것이다.
- [0019] 또한 본 발명의 다른 목적은 상기 균주, 상기 균주의 배양물, 상기 배양물의 농축액 및 건조물로 이루어지는 군에서 선택된 1종 이상을 유효성분으로 함유하는 건강기능성 식품을 제공하는 것이다.
- [0020] 나아가 본 발명의 다른 목적은 상기 균주, 상기 균주의 배양물, 상기 배양물의 농축액 및 건조물로 이루어지는 군에서 선택된 1종 이상을 유효성분으로 함유하는 사료첨가제를 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0021] 상기와 같은 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 서열번호 1로 표시되는 염기서열을 갖는 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) F.M.B #31 KCTC 18498P 균주를 제공한다.
- [0022] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 균주는 항콜레스테롤 활성, 항산화 활성, 장 정착능, 내산성, 내담즙성 또는 내염성이 우수할 수 있다.
- [0023] 또한, 본 발명은 상기 균주, 상기 균주의 배양물, 상기 배양물의 농축액 및 건조물로 이루어지는 군에서 선택된 1종 이상을 유효성분으로 함유하는 프로바이오틱스 제제를 제공한다.
- [0024] 또한, 본 발명은 상기 균주, 상기 균주의 배양물, 상기 배양물의 농축액 및 건조물로 이루어지는 군에서 선택된 1종 이상을 유효성분으로 함유하는 항산화용 조성물을 제공한다.
- [0025] 또한, 본 발명은 상기 균주, 상기 균주의 배양물, 상기 배양물의 농축액 및 건조물로 이루어지는 군에서 선택된 1종 이상을 유효성분으로 함유하는 건강기능성 식품을 제공한다.
- [0026] 나아가 본 발명은 상기 균주, 상기 균주의 배양물, 상기 배양물의 농축액 및 건조물로 이루어지는 군에서 선택된 1종 이상을 유효성분으로 함유하는 사료첨가제를 제공한다.

발명의 효과

- [0027] 본 발명의 균주는 항콜레스테롤 활성, 항산화 활성, 장 정착능, 내산성, 내담즙성 또는 내염성이 우수한 효과가 있다.

도면의 간단한 설명

- [0028] 도 1은 본 발명의 실험균주들을 이용하여 콜레스테롤 저하 정도를 확인한 결과이다.
- 도 2는 본 발명의 실험균주들을 이용하여 내염성 정도를 확인한 결과이다.
- 도 3은 본 발명의 실험균주들을 이용하여 내산성 정도를 확인한 결과이다.
- 도 4는 본 발명의 실험균주들을 이용하여 내담즙성 정도를 확인한 결과이다.

도 5는 본 발명의 실험균주들을 이용하여 DPPH 라디칼 소거능 정도를 확인한 결과이다.

도 6은 본 발명의 실험균주들을 이용하여 Oxygen 라디칼 소거능 정도를 확인한 결과이다.

도 7은 계통발생분석에 따른 본 발명의 실험균주의 16S rRNA 아미노산 서열의 계통수(Phylogenetic tree)를 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0029] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 김치로부터 분리되고, 콜레스테롤 저하능이 우수하며, 항산화 활성을 가지고, 프로바이오틱 유산균이 되기 위하여 장내부착능이 우수한 신규한 락토바실러스 플란타룸 균주 (*Lactobacillus plantarum*)를 제공한다. 상기 락토바실러스 플란타룸 균주는 콜레스테롤을 35.0%에서 99.4%에 이르기까지 다양한 범위에서 감소시킬 수 있다.
- [0030] 또한, 본 발명은 상기 균주, 이의 배양물, 상기 배양물의 농축액 및 상기 배양물의 건조물로 이루어지는 군에서 선택된 1종 이상을 유효성분으로 함유하는 프로바이오틱스 제제를 제공한다.
- [0031] 또한, 본 발명은 상기 균주, 상기 균주의 배양물, 상기 배양물의 농축액 및 건조물로 이루어지는 군에서 선택된 1종 이상을 유효성분으로 함유하는 항산화용 조성물을 제공한다.
- [0032] 또한, 본 발명은 상기 균주, 상기 균주의 배양물, 상기 배양물의 농축액 및 건조물로 이루어지는 군에서 선택된 1종 이상을 유효성분으로 함유하는 건강기능성 식품을 제공한다.
- [0033] 나아가 본 발명은 상기 균주, 상기 균주의 배양물, 상기 배양물의 농축액 및 건조물로 이루어지는 군에서 선택된 1종 이상을 유효성분으로 함유하는 사료첨가제를 제공한다.
- [0034] 본 명세서에서 특별한 언급이 없는 한, 배양물이란 특정 미생물을 배양배지 또는 배양액에서 배양한 것을 의미하며, 상기 배양물은 상기 특정 미생물을 포함하는 것일 수 있다. 상기 배양물은 그 제형이 한정되지 아니하고, 일 예로 액체 또는 고체일 수 있다. 이러한 측면에서, 배양액이란 액체배지에 특정 미생물을 접종하여 배양한 것을 의미한다. 또한, 본 발명에 있어서, 배양액의 농축액이란 상기 배양액을 농축한 것을 말하고, 배양액의 건조물이란 상기 배양액의 물기를 없앤 것 또는 제거한 것을 의미한다.
- [0035] 상기 배양배지란 동물세포나 식물세포 또는 세균 따위를 기르는 데 필요한 영양소가 들어 있는 고체 또는 액체를 의미한다. 상기 배지는 배양대상 즉, 배양체가 되는 미생물이나 세포가 필요로 하는 영양물질을 포함하는 것으로, 특수한 목적을 위한 물질이 추가로 첨가되어 혼합된 것일 수 있다. 상기 배지는 배양기 또는 배양액이라고도 불리우며, 천연배지, 합성배지 또는 선택배지를 모두 포함하는 개념이다.
- [0036] 본 명세서에서 특별한 언급이 없는 한, 생균활성제 또는 프로바이오틱스(probiotics)이란 사람과 가축의 장내 미생물 군총의 개선으로 건강에 유익한 효능을 갖는 생균제제 또는 장내 미생물 균형을 증진시킴으로써 숙주동물에 유익한 효과를 주는 살아 있는 미생물 제제를 의미한다. 미생물이 생균활성제로 기능하기 위해서는, 위장을 통과하는 과정에도 일정 군수가 생존하여야 하므로, 내산성 및 내담즙성이 있어야 하고, 장내 생존력이 좋아 섭취 후 일정기간 그 활성이 유지될 수 있어야 한다. 본 발명의 프로바이오틱스는 가축을 비롯한 동물을 대상으로도 사용될 수 있으며 식품 또는 동물 사료에 첨가할 수 있다. 또한, 동물 의약품 및 의약품에 사용할 수 있다.
- [0037] 본 명세서에서 특별한 언급이 없는 한, 발효용 스타터(starter)란 발효에 관여하는 김치 유산균 등의 세균 등을 포함하는 미생물, 이의 배양물, 상기 배양물의 농축물 및 상기 배양물의 건조물로 이루어진 군 중에서 선택된 어느 하나를 포함하는 제제 또는 조성물을 의미한다. 상기 발효용 스타터는 발효식품 등의 생산 시 첨가하여 발효식품에서 성장할 수 있는 미생물 또는 우점종으로 성장할 수 있는 미생물을 제공하기 위하여 사용된다. 상기 발효용 스타터를 사용하여 발효식품을 제조하는 경우, 상기 발효용 스타터에 포함된 미생물에 의하여 발효식품의 품질을 일정하게 조절하거나, 발효의 속도 또는 단계를 조절할 수 있으며, 특정한 목적을 달성한 발효 식품을 제조할 수 있다.
- [0038] 본 명세서에서 특별한 언급이 없는 한, 종균이란 발효에 이용되는 미생물로서, 발효를 위하여 기질 또는 식품에 접종되는 미생물을 의미하고, 종균 조성물이란 발효를 개시하는데 필요한 하나 이상의 접종균체를 유효성분으로 포함하는 조성물을 의미한다.
- [0039] 본 명세서에서 특별한 언급이 없는 한, 식품이란 영양소를 한 가지 또는 그 이상 함유하고 있는 천연물 또는 가

공품을 의미하고, 바람직하게는 어느 정도의 가공 공정을 거쳐 직접 먹을 수 있는 상태가 된 것을 의미하며, 그 예로는 과일, 야채, 과일이나 야채의 건조제품이나 절단제품, 과일쥬스, 야채쥬스, 이들의 혼합쥬스이거나 칩류, 면류, 축산가공식품, 수산가공식품, 유가공식품, 발효식품, 두류식품, 곡류식품, 미생물발효식품, 제과제빵, 양념류, 육가공류, 산성음료수, 감초류, 허브류 등이 있으며 본 발명에서 발효식품, 기능성 식품 및 가공식품을 포함하는 것을 의미하나 이에 한정되는 것은 아니다.

[0040] 본 명세서에서 특별한 언급이 없는 한, 유효성분이란 조성물, 구체적으로, 식품조성물에 있어서 혈중 콜레스테롤 조절능, 항산화, 고지혈증 개선 또는 예방 효과를 제공하는 성분을 의미한다.

[0041] 본 명세서에서 특별한 언급이 없는 한, 약학적으로 허용되는이란 생리학적으로 허용되고 동물, 바람직하게는 인간에게 투여될 때, 통상적으로 위장 장애, 현기증과 같은 알레르기 반응 또는 이와 유사한 반응을 일으키지 않는 것을 의미한다.

[0043] 본 발명의 발명자는 기존 외국에서 동정된 유산균이 아닌 우리 유산균 특히, 우리나라의 대표적인 전통 발효식품인 김치로부터 콜레스테롤 저하능을 가진 생균활성제로 사용가능한 프로바이오틱 유산균을 동정하기 위하여 연구하던 중, 생균활성제로 활용하기 위한 실험결과, 항생제 내성 등의 위해성도 문제되지 않고, 내산성, 인공위액 및 인공담즙 저하성이 우수하고, 장내부착능도 뛰어날 뿐만 아니라, 콜레스테롤 저하능이 우수하고, 항산화 활성이 우수한 효과를 가진다는 것을 확인하였으며, 이러한 본 발명의 균주의 효과는 해당 제품을 반드시 생균으로 제공하여야 하는 것이 아니므로, 생균활성제 제제를 상품으로 유통하는 경우에도 보다 폭 넓은 유통 조건에서 유통이 가능하고, 이를 이용하여 발효시킨 발효식품의 경우 다양한 가공법에 의해 가공된 경우에도 콜레스테롤 저하효과를 유지시킬 수 있어서, 산업적으로 다양한 응용이 가능하다는 것을 확인하였다.

[0044] 또한 본 발명자들은 상기 동정한 균주의 염기서열을 분석하였고, 그 염기서열을 서열번호 1에 나타내었으며, 염기서열 분석 결과, 종래 존재하지 않은 새로운 염기서열을 갖는 신균주임을 확인하였으며, 2016년 8월 30일자로 한국생명공학연구원 생물자원센터에 기탁하여 기탁번호 KCTC 18498P를 부여받았다. 따라서, 본 발명에서 동정한 신균주는 “락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) F.M.B #31 KCTC 18498P” 이다.

[0046] 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명하기로 한다. 그러나 이들 실시예는 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로서, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0048] <실시예 1>

[0049] 본 발명의 실험균주

[0050] 국내에서 유통중인 김치를 구매하여 유산균을 분리하였다. 유산균은 소화기관을 통과한 후 담즙산에서 살아남아 소장까지 도달하여 장에서 증식하여야 한다. 담즙산에 강한 내성을 가지는 유산균을 분리하기 위하여 5% NaCl과 0.3% oxgall이 함유된 MRS broth에서 배양하였다. 이렇게 분리한 유산균 23종과 표준 균주인 *Lactobacillus rhamnosus* KCTC 5033으로 총 24종의 균주로 실험을 진행하였다.

[표 1] 본 발명의 실험균주

No.	Strains	No.	Strains
1	<i>Lactobacillus</i> sp, F.M.B #01	13	<i>Lactobacillus</i> sp, F.M.B #24
2	<i>Lactobacillus</i> sp, F.M.B #02	14	<i>Lactobacillus</i> sp, F.M.B #26
3	<i>Lactobacillus</i> sp, F.M.B #03	15	<i>Lactobacillus</i> sp, F.M.B #27
4	<i>Lactobacillus</i> sp, F.M.B #04	16	<i>Lactobacillus</i> sp, F.M.B #31
5	<i>Lactobacillus</i> sp, F.M.B #05	17	<i>Lactobacillus</i> sp, F.M.B #34
6	<i>Lactobacillus</i> sp, F.M.B #06	18	<i>Leuconostoc</i> sp, F.M.B #3
7	<i>Lactobacillus</i> sp, F.M.B #07	19	<i>Lactobacillus</i> sp, F.M.B #35
8	<i>Lactobacillus</i> sp, F.M.B #08	20	<i>Lactobacillus</i> sp, F.M.B #37
9	<i>Pediococcus</i> sp, F.M.B #01	21	<i>Lactobacillus</i> sp, F.M.B #53
10	<i>Pediococcus</i> sp, F.M.B #22	22	<i>Lactobacillus</i> sp, F.M.B #94
11	<i>Lactobacillus</i> sp, F.M.B #20	23	<i>Lactobacillus</i> sp, F.M.B #78
12	<i>Lactobacillus</i> sp, F.M.B #21	24	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> KCTC 5033

[0052]

[0054] <실시예 2>

[0055] 콜레스테롤 저하 효과(Cholesterol-lowering Activity)

[0056] 유산균을 0.1% 콜레스테롤(cholesterol)이 첨가된 MRS broth에 37℃에서 24 시간 배양한 후, 원심분리하여 얻어진 상등액 1 mL에 2 mL의 50%(w/v) KOH와 3 mL의 95% 에탄올(ethanol)을 첨가한 후 1분간 잘 혼합하고 60℃의 항온수조에서 10 분간 내버려 둔다. 그 후, 차가운 흐르는 물에 냉각시킨 후 5 mL의 헥산(hexane)을 첨가하여 잘 혼합하고 1 mL의 증류수를 첨가하여 재 현탁 시킨 후, 층 분리를 위해 상온에 10 분간 내버려 둔다. 분리된 상층의 hexane층 3 mL를 깨끗한 시험관에 옮긴 후 60℃의 항온수조 상에서 질소가스로 농축시킨다. 농축시킨 시료에 4 mL O-phthalaldehyde reagent를 첨가하여 잘 혼합한 후, 상온에서 10 분 간 내버려 둔 다음 2 mL의 진한 황산을 천천히 첨가하여 잘 섞어주고 10 분 후 흡광도를 550 nm에서 측정하였다.

[0057] 그 결과, 0.1 g/L water-soluble cholesterol이 첨가된 MRS 액체배지에서 균주 배양 최적온도인 37 ℃에서 24 시간 배양하였을 때, #16번 균주가 가장 높은 99.4%의 수치를 보였으며, 그 다음으로 #15번 균주가 90.1%, #13번 균주는 35.0%로 가장 낮은 수치를 나타내었다. 대조균주로 사용된 락토바실러스 람노서스(*Lactobacillus rhamnosus*) KCTC 5033은 88.1%로 전통식품에서 분리한 유산균 2종이 대조 균주에 비해 더욱 높은 감소율을 나타내는 것으로 확인되었다(도 1 참조).

[0059] <실시예 3>

[0060] 내염성(Salt Tolerance) 확인

[0061] 유산균을 3%, 6% 및 9% NaCl이 첨가된 MRS broth에 37℃에서 24 시간 배양한 후, 탁도를 확인하여 균주의 생장을 확인한 결과, 대부분의 유산균들은 생존하였지만, #6번, #9번, #10번, #14번, #17번, #19번, #22번 및 #23번 균주들은 생존하지 못하였다(도 2 참조).

[0063] <실시예 4>

[0064] 내산성(Acid Tolerance) 확인 실험

[0065] 유산균을 HCl을 이용하여 pH 2.0으로 조정된 PBS에 37℃에서 2 시간 배양한 후, 생균수를 측정하여 내산성을 확인하였다.

[0066] Probiotics의 기준으로 낮은 pH에 대한 저항성은 중요하며, 강한 산성 조건의 위장관에서 장까지 도달하여 생존하여야 한다. HCl을 이용하여 pH 2.0으로 조정된 MRS broth에 37℃에서 2 시간 배양 시, #16번 균주가 84.0%, #13번 균주가 78.0%, #7번 균주가 77.9%, #11번 균주가 77.9%, #8번 균주가 77.1%의 생존율을 나타내었다. 대

조 균주로 사용된 락토바실러스 람노서스(*Lactobacillus rhamnosus*) KCTC 5033은 72.3%의 생존율을 나타내었다(도 3 참조).

[0068] <실시예 5>

[0069] 내담즙성(Bile Tolerance) 확인 실험

[0070] 유산균을 0.3% oxgall이 첨가된 PBS에 37℃에서 6 시간 배양한 후, 생균수를 측정하여 담즙 내성을 확인하였다.

[0072] 그 결과, #13번 균주가 91.4%, #16번 균주가 85.3%, #12번 균주가 85.5%로 높은 생존율을 보였다. 대조 균주로 사용된 락토바실러스 람노서스(*Lactobacillus rhamnosus*) KCTC 5033은 83.8%의 생존율을 나타내었음을 알 수 있었다(도 4 참조).

[0074] <실시예 6>

[0075] 장 부착능 실험

[0076] 장내 상피 세포인 HT-29 세포를 이용하여 실험하였다. 유산균을 전처리된 마친 HT-29 세포에서 37℃에서 2 시간 배양한 후 부착되지 않은 HT-29 세포를 제거하고 trypsin-EDTA 용액으로 탈착시켜 PBS로 세척하고 MRS 고체배지를 이용하여 유산균수를 측정하였다.

[0077] 장 부착능을 확인 결과, HT-29 세포에 대하여 20.0%의 부착율을 보임을 알 수 있었다(표 2 참조).

[표 2] HT-29 세포에 대한 장 부착능 실험 결과

	균수(CFU/ML)
초기 균수	2.6×10^7
부착 균수	5.2×10^6

[0081] <실시예 7>

[0082] 항산화 활성 측정

[0084] <7-1> DPPH radical 소거활성

[0085] 균주를 37℃에서 24 시간 배양한 배양 상등액을 0.2 μm cellulose acetate hydrophilic filters를 이용하여 여과한 무균 용액을 시료로 사용하였다. 시료 100 μL에 150 μM의 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl 용액 100 μL를 혼합 후 반응액을 암실에서 30분간 방치 후 GENios® microplate reader를 통해 517 nm에서 흡광도를 측정하였다.

[0086] 그 결과, 양성 대조균로 사용된 0.2 mM 아스코르브산(ascorbic acid)이 91.0%의 활성을 나타내었다. 대조균로 사용된 *L. rhamnosus* KCTC 5033은 46.0%의 활성을 나타내었으며, 김치에서 분리한 유산균중에서 #21번 균주가 57.0%, #16번 균주가 56.8%, #15번 균주가 54.6%로 높은 활성을 나타내는 것으로 확인되었다(도 5 참조).

[0088] <7-2> Oxygen radical 소거활성

[0089] 무균 상등액은 DPPH radical 소거능 측정에 사용된 것과 같은 방법으로 준비하였다. 무균 상등액 50 μL와 78

nM의 fluorescein 용액 50 μ L를 혼합하여 37°C에서 15 분간 반응시킨 후, 25 μ L의 221 mM의 2,2'-azobis(2-methylpropionamidine) dihydrochloride와 반응시켰다. 형광분광광도계로 반응액에서의 형광물질의 감소정도를 37°C에서 60 분(5 분간 1회, 총 12회)동안 485 nm에서 전자가 여기되고, 535 nm에서 방출되게 조절하여 측정하였다. 표준물질로는 trolox의 농도를 0, 6.25, 12.5, 25, 50 및 100 μ M로 측정하여 표준곡선을 작성하였다.

[0091] 결과를 살펴보면 46.8 μ M trolox에서 63.3 μ M trolox의 황산화 활성을 나타내었다. 실험에 사용한 유산균 중에서 #16번 균주가 63.3 μ M trolox의 활성을 나타내었으며, #15번 균주가 62.7 μ M trolox의 활성을 나타내었다. 대조구로 사용된 *L. rhamnosus* KCTC 5033의 경우 62.0 μ M trolox를 나타내었다(도 6 참조).

[0093] <실시예 8>

[0094] 미생물 동정

[0095] 27F/1492R 프라이머(primer)를 사용하여, PCR을 진행하였다. 분리된 균의 16S DNA 염기서열은 미국 국립생물공학정보센터(National Center for Biotechnology Information)의 database 자료와 비교하여 동정하였다. 계통수 제작에는 ClustalX와 MEGA6 프로그램을 이용하였으며, Kimura-2-parameter distances에 기초하여 neighbor-joining tree를 만들었으며 1,000번의 re-sampling을 통해 bootstrap value를 결정하였다.

[0096] 본 발명에서는 콜레스테롤 감소율과 내염성, 내산성 및 담즙 내성에서 우수한 기록을 보인 #16번 균주를 DNA 염기서열과 계통수(phylogenetic tree)를 통하여 분석하였다. 계통수 분석을 진행한 결과 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) 속 균주인 것으로 밝혀졌다. 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*)은 대표적인 프로바이오틱스(probiotics)로 알려져 있다(도 7 참조).

[0098] 또한 본 발명자들은 상기 동정한 균주의 염기서열을 분석하였고, 그 염기서열을 서열번호 1에 나타내었으며, 염기서열 분석 결과, 종래 존재하지 않은 새로운 염기서열을 갖는 신규주임을 확인하였으며, 2016년 8월 30일자로 한국생명공학연구원 생물자원센터에 기탁하여 기탁번호 KCTC 18498P를 부여받았다. 이하 본 발명에서는 상기 동정한 신규주를 “락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) F.M.B #31 KCTC 18498P”로 명명하였다. 본 균주의 염기서열은 다음과 같다(도 8 참조).

[0100] 이제까지 본 발명에 대하여 그 바람직한 실시예들을 중심으로 살펴보았다. 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자는 본 발명이 본 발명의 본질적인 특성에서 벗어나지 않는 범위에서 변형된 형태로 구현될 수 있음을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 개시된 실시예들은 한정적인 관점이 아니라 설명적인 관점에서 고려되어야 한다. 본 발명의 범위는 전술한 설명이 아니라 특허청구범위에 나타나 있으며, 그와 동등한 범위 내에 있는 모든 차이점은 본 발명에 포함된 것으로 해석되어야 할 것이다.

수탁번호

[0101]

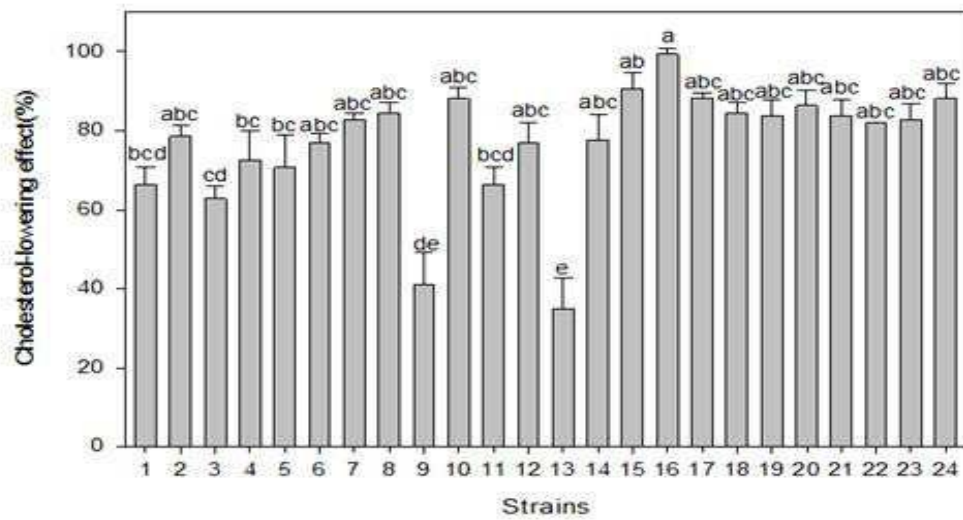
기탁기관명 : 한국생명공학연구원

수탁번호 : KCTC18498P

수탁일자 : 20160830

도면

도면1



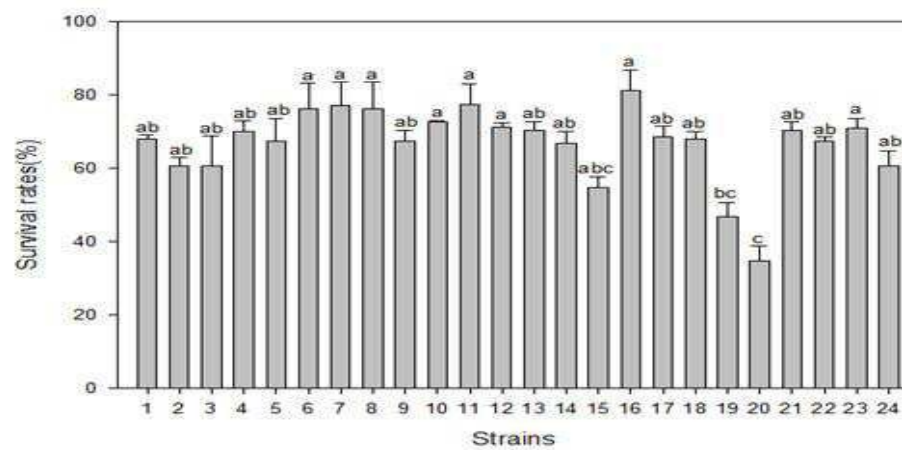
도면2

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
3% NaCl	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
6% NaCl	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
9% NaCl	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+	+

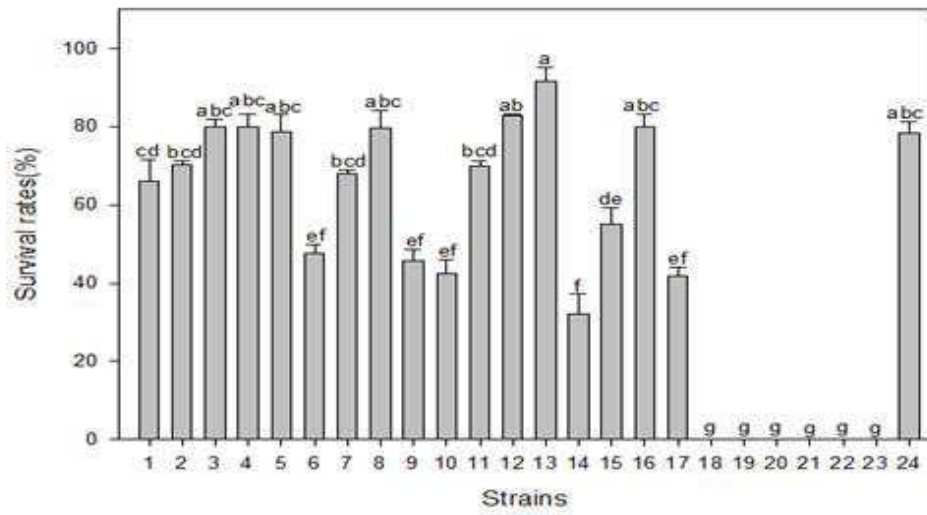
	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
3% NaCl	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
6% NaCl	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+
9% NaCl	+	-	+	+	-	+	-	+	+	-	-	+

a), tolerant; b) nontolerant.

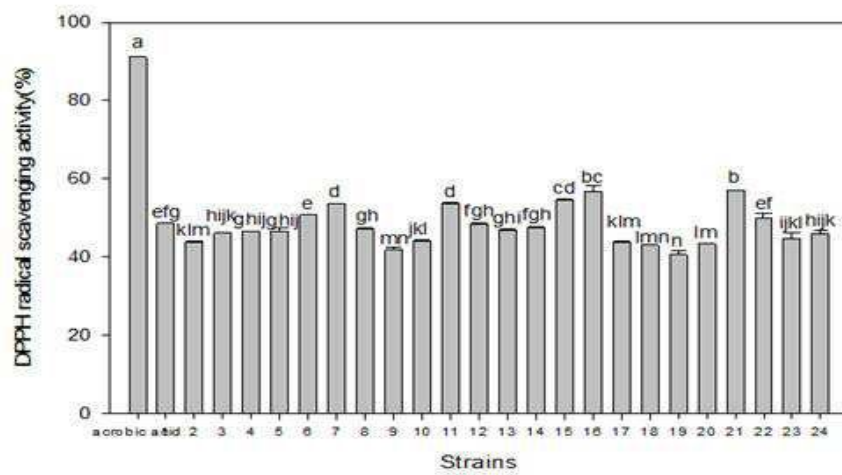
도면3



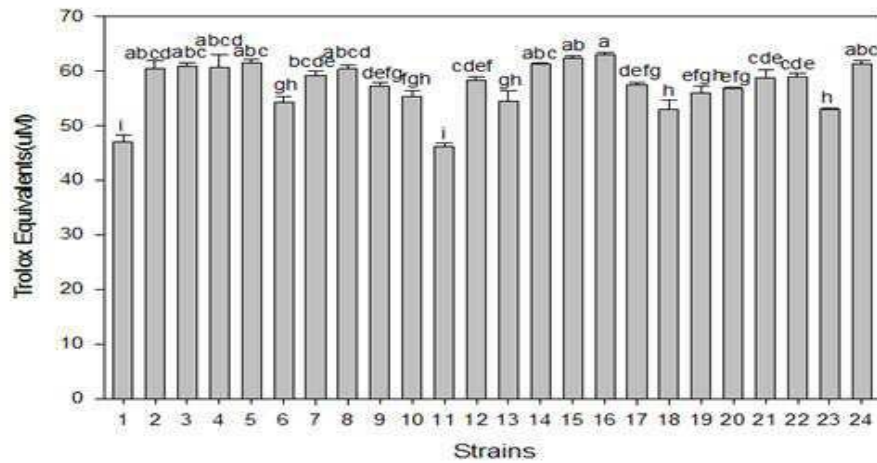
도면4



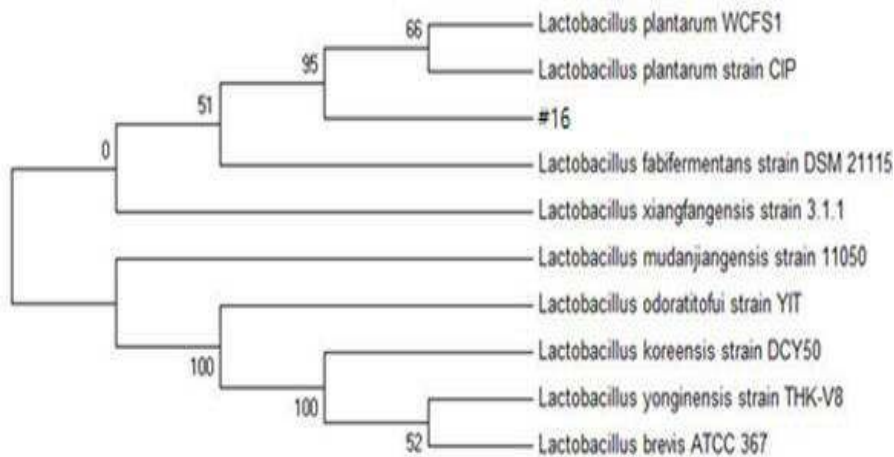
도면5



도면6



도면7



서열 목록

- <110> Pukyong National University Industry-University Cooperation Foundation
- <120> Lactobacillus plantarum F.M.B #31 as a novel strain with
anti-cholesterol activity and use thereof
- <130> PN1701-036
- <160> 1
- <170> KoPatent In 3.0
- <210> 1
- <211> 1417
- <212> DNA
- <213> Unknown
- <220><223> Lactobacillus plantarum F.M.B #31 KCTC 18498P's DNA sequence
- <400> 1

```

agtccaacga actctggtat tgattggtgc ttgcatcatg atttacattt gagtgagtgg      60
cgaactggtg agtaaacagt gggaaacctg cccagaagcg ggggataaca cctggaaaca      120

gatgctaata ccgcataaca acttggaccg catggtccga gtttgaaaga tggcttcggc      180
tatcactttt ggatgggtccc gcggcggtatt agctagatgg tggggtaacg gctcaccatg      240
gcaatgatac gtagccgacc tgagagggtat atcggccaca ttgggactga gacacggccc      300
aaactcctac gggaggcagc agtagggaat cttccacaat ggacgaaagt ctgatggagc      360
aacgcccggt gagtgaagaa gggtttcggc tcgtaaaact ctgttggtta agaagaacat      420
atctgagagt aactgttcag gtattgacgg tatttaacca gaaagccacg gctaactacg      480
    
```

tgccagcagc cgcggttaata cgtaggtggc aagcgttgtc cggatttatt gggcgtaaag	540
cgagcgcagg cggtttttta agtctgatgt gaaagccttc ggctcaaccg aagaagtgca	600
tcggaaactg ggaaacttga gtgcagaaga ggacagtgga actccatgtg tagcggtgaa	660
atgcgtagat atatggaaga acaccagtgg cgaaggcggc tgtctggtct gtaactgacg	720
ctgaggtctg aaagtatggg tagcaaacag gattagatac cctggtagtc cataccgtaa	780
acgatgaatg ctaagtgttg gagggtttcc gcccttcagt gctgcagcta acgcattaag	840
cattccgcct ggggagtacg gccgcaaggc tgaaactcaa aggaattgac gggggcccg	900
acaagcgggtg gagcatgtgg tttaattcga agctacgcga agaaccctac caggtcttga	960
catactatgc aaatctaaga gattagacgt tcccttcggg gacatggata caggtggtgc	1020
atggttgctg tcagctcgtg tcgtgagatg ttgggttaag tccgcaacg agcgcaaccc	1080
ttattatcag ttgccagcat taagttgggc actctggtga gactgccggt gacaaaccgg	1140
aggaagggtg ggatgacgtc aaatcatcat gcccttatg acctgggcta cacacgtgct	1200
acaatggatg gtacaacgag ttgcgaactc gcgagagtaa gctaattctt taaagccatt	1260
ctcagttcgg attgtaggct gcaactcgcc tacatgaagt cggaatcgct agtaatcgcg	1320
gatcagcatg ccgcggtgaa tacgttcccg ggccttgtag acaccgccg tcacaccatg	1380
agagtttgta acacccaaag tcggtggggt aaccttt	1417