



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2007-0111182
(43) 공개일자 2007년11월21일

(51) Int. Cl.

C12N 1/20 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2006-0044232

(22) 출원일자 2006년05월17일

심사청구일자 2006년05월17일

(71) 출원인

인하대학교 산학협력단

인천 남구 용현동 253 인하대학교

(72) 발명자

김은기

서울 강남구 대치동 은마아파트 8-201

김영범

인천 계양구 작전동 도두리마을 동남A 518-2003

김동준

서울 강서구 화곡7동 353-18번지 진행빌라 나동 102호

(74) 대리인

이원희

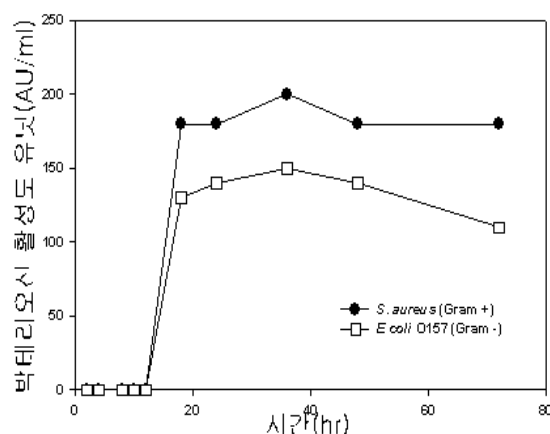
전체 청구항 수 : 총 10 항

(54) 폐감귤박 배지에서 성장하는 신규 바실러스 속 L S 1-2 균주 및 이를 이용한 향균 프로바이오틱스 제조방법

(57) 요약

본 발명은 폐감귤박 배지에서 성장하는 신규 바실러스 속(*Bacillus* sp.) LS 1-2 균주 및 이를 이용한 향균 프로바이오틱스(probiotics) 제조 방법에 관한 것으로서, 보다 구체적으로 폐감귤박(Citrus waste)의 주성분인 펙틴(pectin)을 동일하게 가지고 있는 콩과 발효식품에 존재하는 균주에서 폐감귤박에서만 성장하는 바실러스 균주를 선별하였다. 선별된 바실러스 속 LS 1-2 균주는 동물과 사람에게 무독하며, 폐감귤박 배지에서 성장하며, 효소 및 향균물질을 생산하고, 병원균에 향균 능력을 보이며, 담즙산에 대한 내성을 보유하고 있다. 또한, 대량 배양이 가능하며 통상적으로 사용되는 항생제와 유사한 향균 능력을 가지고 있으므로, 폐감귤박 배지를 이용한 독성 없고 안전한 향균물질 생산 및 향균 사료 생산에 유용하게 사용될 수 있다.

대표도 - 도10



특허청구의 범위

청구항 1

하기의 균학적 특징으로 갖는 신규한 바실러스 속(*Bacillus* sp.) LS 1-2 균주:

- i) 그람 역색시 양성을 나타내는 간균;
- ii) 호기성으로 포자를 형성;
- iii) 글리세롤(Glycerol), D-아라비노스(D-Arabinose), 리보스(Ribose), D-글루코오스(D-glucose), D-만노스(D-Mannose), 이노시톨(Inositol), 만니톨(Mannitol), 소비톨(Sorbitol), α -메틸-D-글루코사이드(α -Methyl-D-glucoside), 에스쿨린(esculine), 살리신(Salicine), 셀로바이오스(Cellobiose), 말토스(Maltose), 락토스(Lactose), 멜리바이오스(Melibiose), 사카로오스(Saccharose), 트레할로스(trehalose), D-라피노오스(D-Raffinose), 아미돈(Amidon), 글라이코젠(Glycogene)을 탄소원으로 이용; 및
- v) 폐감귤박 배지에서 성장시 향균 활성을 보임.

청구항 2

제 1항에 있어서, 폐감귤박 배지는 폐감귤박 가공폐수를 사용하는 것을 특징으로 하는 바실러스 속(*Bacillus* sp.) LS 1-2 균주.

청구항 3

제 1항에 있어서, 수탁번호 KCTC 18109P로 기재되는 바실러스 속(*Bacillus* sp.) LS 1-2 균주.

청구항 4

제 1항에 있어서, 서열번호 1로 기재되는 16s rRNA 염기서열을 갖는 것을 특징으로 하는 바실러스 속(*Bacillus* sp.) LS 1-2 균주.

청구항 5

제 1항의 LS 1-2 균주 또는 배양상등액을 포함하는 프로바이오틱스(probiotics).

청구항 6

제 1항의 LS 1-2 균주 또는 배양상등액을 유효성분으로 포함하는 사료첨가제.

청구항 7

제 1항의 LS 1-2 균주로부터 프로바이오틱스를 생산하는 방법.

청구항 8

제 7항에 있어서,

- 1) 바실러스 속 LS 1-2 균주를 복합 배지에서 배양하는 단계;
- 2) 단계 1)에서 배양한 바실러스 속 LS 1-2 균주를 폐감귤박 배지에서 배양하는 단계; 및
- 3) 단계 2)에서 생산한 프로바이오틱스를 수득하는 단계를 포함하는 프로바이오틱스 생산 방법.

청구항 9

제 8항에 있어서, 단계 1)의 복합 배지는 LB, LBS, TBS 및 MRS로 이루어진 균으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 프로바이오틱스 생산 방법.

청구항 10

제 8항에 있어서, 단계 3)의 프로바이오틱스를 수득하는 방법은 원심분리법, 탄젠셀프로우 마이크로 필터를 이용한 농축 회수법, 흡착제를 사용한 회수법인 것을 특징으로 하는 프로바이오틱스 생산 방법.

명세서

발명의 상세한 설명

발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

- <45> 본 발명은 폐감귤박 배지에서 성장하는 신규한 바실러스 속(*Bacillus* sp.) LS 1-2 균주 및 이를 이용한 항균 프로바이오틱스(probiotics) 제조 방법에 관한 것이다.
- <46> 국내에서 생산되는 대부분의 감귤(*Citrus retiula*)은 연간 10 만톤이 제주도에서 생산되며 생과용으로 80%, 가공용으로 20% 소비되고 있는데 최근 감귤의 과잉생산체제로 인하여 소득성이 낮아지면서 부가가치를 높일 수 있는 가공식품 개발이나 기능성식품으로서의 가치를 개발하는데 관심이 높아지고 있다. 그 예로써 균 발효를 이용한 감귤식초, 감귤요구르트, 혼합 과실음료 등을 들 수 있고, 그중에서는 90%가 주스용으로 이용되고 있다(농림통계연보, 농림부, p.86, 1993).
- <47> 상기 주스 제조 공정 중 50%의 감귤주스 가공폐기물이 얻어지고 있는데, 연간 5만 톤의 양이다. 이들 부산물은 극히 일부만이 사료 또는 한약재로 사용될 뿐 대부분이 해양투기 되어 토양, 수질오염의 원인이 되고 있는 실정이다. 따라서 감귤주스 가공폐기물을 처리하기 위한 방안으로써 감귤박이 가지고 있는 많은 유효성분들에 대해 활발히 연구되고 있다(Park YK. *et al.*, *J. Korean Soc. Food Sci. Uutr.* 25, 4, 659-664, 1996). 그 중 큰 부분을 차지하는 것이 펙틴(pectin)과 바이오플라보노이드(bioflavonoid)이다.
- <48> 펙틴(Pectin)은 잼, 젤리 등의 제조에 이용되어 왔고, 겔화, 증점, 유화안정 등의 목적으로 사용될 뿐 아니라, 의학적 효능으로써 대장운동 속도를 높이고, 포만감을 주기 때문에 다이어트 식품으로써 가치가 크며, 체내에 있는 중금속 성분을 해독하고, 혈중 콜레스테롤 함량을 저하하며, 면역력을 높여주는 효능을 나타내므로 그 중요성이 강조되고 있다(Braddock, R. J. *Food Tech.* 12:85, 1963; Swisher H.E and Pritchett, D. E., *The Backers Digest*, 43:53, 1969; BelshawF, *Food Prod. Develop.* 12:36, 1978).
- <49> 또한, 바이오플라보노이드(bioflavonoid), 에센스 오일(essential oil) 성분에는 생리활성, 항산화 활성을 보이는 d-limonene, 항균, 항암 작용을 하는 hesperidin, 지방 대사 개선, 항균, 항암 작용을 하는 naringin 등이 보고되고 있어 다양한 기능성을 보여주고 있다(Formica, J.V.J. *Fd. Chem. Toxic.* 33(12):1061-1080, 1995).
- <50> 그러나 이러한 유효성에도 불구하고, 하루 400톤이라는 엄청난 양을 처리하기 위한 방안으로 다량의 공급과 수요를 가지는 사료 개발이 활발히 이루어지고 있다. 감귤 가공부산물의 90%가 수분으로 장기간 저장이 힘들고, 페니실리움 카렘베르티(*Penicillium camemberti*), 페니실리움 로크웨티(*Penicillium roqueforti*) 등에 감염되어 부패되기 쉽기 때문에(Secrra, V. *Aniaml Feed Science and Technology* 78:169-176, 1998) 현재 대부분이 펠렛(pellet) 형태의 건조 사료로써 사용이 되고 있다(Kang T.H. *et al.*, *J. Agri. Sci.* 36(1):512-516, 1994). 그러나 펠렛 생산공정은 압출식 탈수과정 중에 고농도 유기물 액상(BOD 50,000 ppm)이 발생하는데, 이는 수질 환경에 문제가 될 수 있는 폐수이며 또한 펙틴(pectin) 및 기능성 물질이 다량 함유되어 있기 때문에 이를 재활용 하려는 노력이 요구된다.
- <51> 이런 문제의 해결책으로써 균 발효를 통해 고부가가치의 프로바이오틱스(probiotics) 사료 생산이 제시되고 있다. 기존의 사료시장은 축산업에서 성장 촉진, 사료 전환(feed conversion) 효율성 증대, 및 장내 감염 방지 등을 목적으로 항생제를 광범위하게 사용하여 유익한 장내 미생물 생태계의 불균형과 항생제 내성 균주의 출현을 초래하였다. 최근 유럽 위원회(European commission)는 동물의 성장 촉진제로 사료에 첨가되는 항생제의 사용을 금지하였으며, 특히 양계에서는 병원균 차단을 위해 항균력을 갖는 정장제를 적극 권장하고 있는 실정이다. 이런 문제점에 대한 해결책으로 항생제 대체제로써 항균성 물질을 생산하는 프로바이오틱스가 대두되고 있다.
- <52> 프로바이오틱스(probiotics)는 장내 미생물 균형에 도움을 주는 미생물, 항균 활성과 효소 활성을 가진 미생물, 및 그들이 내는 생산물을 말한다(Fuller, R. *J Appl Bacteriol.* 66(5):365-378, 1989). 아울러 프로바이오틱스는 사람이나 동물에 건조된 세포형태나 발효 산물 형태로 공급되어 사람이나 동물 숙주의 장내 균총을 개선함으로써 좋은 영향을 주는 단일 또는 복합 균주 형태의 생균으로 정의되고 있다. 프로바이오틱스가 갖추어야 할 특성은 인간의 장내를 서식지로 하고, 비병원성, 무독성, 장으로 가는 동안 살아 남아야한다. 더 나아가서 전 달 식품 안에서 소비되기 전에 생존율과 활성을 유지 및 감염 예방으로 사용되는 항생제에 대해 민감해야하며,

항생제 내성을 갖는 플라스미드를 보유하지 않아야 한다. 또한 장내 환경에서 산, 효소, 담즙에 대한 내성을 갖추어야 한다(Mishra, C. et al., *Asia Pacific J Clin Nutr.* 5:20-24, 1996).

<53> 이러한 프로바이오틱스들로는 소화효소(amylase, protease, lipase, cellulase, phosphatase) 생성능력이 우수한 바실러스 종(*Bacillus* sp.), 유기산을 생성하여 저분자 탄수화물을 분해하는 락토바실러스 종(*Lactobacillus* sp.), 젖산으로 전환시켜 장내 흡수를 용이하게 하고 비타민(Vitamin) B 합성, 비타민(Vitamin) E 흡수를 촉진하는 사카로마이세스 종(*Saccharomyces* sp.), 가축의 분변에 남아있는 악취 유발물질(암모니아, 황화수소, 아민류 등)을 대사과정에 이용하여 악취유발을 막는 광합성 박테리아(Photosynthetic bacteria) 등이 이용되고 있다.

<54> 특히 바실러스 종(*Bacillus* sp.)과 락토바실러스 종(*Lactobacillus* sp.)은 유산균(lactic acid bacteria : LAB) 이라 칭하고, 식품으로부터 분리되는데 상기 종들에는 식품 부패를 방지를 위해 부패균에 대한 항균물질을 생산하는 균주들이 존재하기 때문이다(Tag, G. U. et al., *Bacteriol. Rev.* 40:772-756, 1976). 이들 유산균들은 항생제 내성 기작과 관련이 없는 항균 기작을 가지는 박테리오신(Bacteriocin)이라는 항균펩타이드를 생산한다. 박테리오신은 전통적인 항생제와는 다르기 때문에 정확하게 정의 내릴 수 없다. 박테리오신은 분자량, 생화학적 성질, 숙주에 대한 항균 범위나 기작이 상당히 다른 다형적 특징을 가지고 있다. Klaenhammer는 박테리오신을 생산하는 박테리아와 근접한 종들에 대한 직접적인 항균 활성을 가진 단백질 또는 단백질복합체라고 정의하고 있다(Klaenhammer, TR. *Biochimie* 70:337-379, 1998). 또한 이런 전형적인 정의와 맞지 않지만 항균 능력을 가진 물질들을 "박테리오신 유사 물질(Bacteriocin-like substance)로 제시한다(Tag, G. U. et al., *Bacteriol. Rev.* 40:772-756, 1976). 항생제(Antibiotics), 박테리오신, 마이크로신(Microcins)을 나누는 뚜렷한 경계는 없지만, 박테리오신은 좁은, 광범위 활성 차이로 정균제(bacteriostatic), 살균제(bacteriocidal)로 나누고, 펩티드 항생제(peptide antibiotics) 그룹에 포함된다. 항생제는 여러 단계의 효소 기작에 의한 비-리보솜(non-ribosomal) 합성이다. 반면, 박테리오신은 리보솜 합성에 의해 이루어지고, 내성 발생이 드물지만 내성 가능성은 제시되고 있다(Hurst A. *Adv Appl Microbiol* 27:85-123, 1981; Harvis, B., Farr, J. *Biochim Biophys Acta* 227:232-340, 1971; Harris, LJ. et al., *J Food Prot* 52:384-387, 1989). 많은 항생제들은 화학적 합성이 가능하지만, 박테리오신은 아직까지 화학적 합성에 대한 보고는 없다. 그러나 유전공학 기술에 의한 박테리오신의 유사체들이 재구성, 재조합되고 있는데, 지질(Lipid)나 탄수화물(carbohydrate) 부분이 박테리오신 복합체의 부분을 이루고 관련되어 있다. 상기 박테리오신은 세포에 부착되어 있거나 외부로 방출될 수 있고, 성장 주기(growth cycle) 전, 후에 생성될 수 있으며, 단백질 분해 효소(protease) 같은 효소에 저항력을 가지며, pH, 온도에서도 안정적이다. 상기 박테리오신의 항균 기작은 거의 알려져 있지 않으며, 세포막 채널(cell membrane channel)에 박혀 세포 용해(cell lysis)를 유도한다는 점이 보고되었다. 세포 용해는 곧 세포 죽음(cell death)과 관련되어 있고, 비특이적 수용체 자리(receptor site)와 특이적 수용체 자리를 가진 민감한 박테리아에 의존하는 편이다(Bhunja, AK. et al., *J Appl Bacteriol* 57:492-498, 1991). 이러한 특징을 가지는 박테리오신은 항생제 대체제로써 부각되고 있으며, 식품의 부패방지제로 사용되는 항균물질이기 때문에 더욱 안정한 항균제라 할 수 있다.

<55> 바실러스(*Bacillus*)는 많은 펩티드 항생제를 생산하고, 다양한 산업에 중요한 종으로써 식품과 산업용으로 안정성을 가지고 있어 항균 활성에 관한 흥미로운 종이다(Paik, H.D. et al., *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 19:294-298, 1997). 바실러스 세레우스(*Bacillus cereus*), 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*) 및 바실러스 슈린지엔시스(*Bacillus thuringiensis*) 등 이미 많은 바실러스 종들이 박테리오신(bacteriocins)과 박테리오신 유사 물질(bacteriocin-like substances)을 생산하는 것으로 알려져 있다(Paik, H.D. et al., *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 19:294-298, 1997; Zheng, G. et al., *J. Bacteriol.* 181:7346-7355, 1999; Bizani, D., Brandelli, A. *J. Appl. Microbiol.* 93:512-519, 2002).

<56> 본 발명자들은 폐감귤박(Citrus waste)에서 성장하는 신규한 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*) LS 1-2 균주를 선별하여 병원균에 대한 항균 능력을 보유하고 있으며, 항균물질을 생산하고, 대량 생산이 가능하며, 일반 항생제와 비슷한 항균 능력을 보유하고 있음을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

발명이 이루고자 하는 기술적 과제

<57> 본 발명의 목적은 폐감귤박(Citrus waste)에서 성장하면서 항균물질을 생산하는 신규한 바실러스(*Bacillus*) 균주 및 상기 균주에서 프로바이오틱스(probiotics)를 생산하는 방법을 제공하는 것이다.

발명의 구성 및 작용

- <58> 상기 목적을 달성하기 위하여 본 발명은 폐감귤박(citrus waste)에서 분리한 신규한 바실러스 속(*Bacillus* sp.) LS 1-2 균주를 제공한다.
- <59> 또한, 본 발명은 상기 신규한 바실러스 속 LS 1-2 균주가 생산하는 프로바이오틱스(probiotics)를 제공한다.
- <60> 또한, 본 발명은 상기 프로바이오틱스를 유효성분으로 포함하는 사료첨가제를 제공한다.
- <61> 아울러, 본 발명은 상기 신규한 바실러스 속 LS 1-2 균주로부터 프로바이오틱스를 생산하는 방법을 제공한다.
- <62> 이하, 본 발명에서 사용한 용어를 설명한다.
- <63> 배양 상등액은 배지에 균주를 배양한 후 원심 분리를 통하여 배양액의 고체 부분(균주, 세포 찌꺼기)과 액체 부분으로 분리한 후 고체 부분을 제하고 남은 액체 부분을 의미한다. 배양 상등액에는 균주가 생산한 효소 및 항균물질이 포함되어 있다.
- <64> 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.
- <65> 본 발명은 폐감귤박(citrus waste)에서 분리한 신규한 바실러스 속(*Bacillus* sp.) LS 1-2 균주를 제공한다.
- <66> 대부분의 바실러스 종(*Bacillus* sp.)은 폐감귤박의 주성분인 펙틴(pectin)을 분해하는 펙티나아제(pectinase)를 분비하고(Mahmood, A.U. *et al.*, *Enzyme and Microbiol Technology* 22:130-137, 1998; Matsumoto, T. *et al.*, *Biochemical Engineering Journal* 6:81-86, 2000), 유리된 당을 성장하기 위한 탄소원(carbon source)으로 사용한다(Stabnikova, O. *et al.*, *Bioresource Technology* 96(6):747-751, 2005). 이에 본 발명자들은 폐감귤박을 분해할 수 있는 균을 바실러스 종에서 선별하려 하였다. 본 발명자들은 폐감귤박(폐감귤박 가공폐수)으로 제조된 아가 플레이트(agar plate) 위에 바실러스 8종을 접종하여 배양하였으나, 바실러스 종이 성장하지 않았다. 이는 폐감귤박의 pH는 3.3이지만, 바실러스 종이 성장하기 위해서는 적어도 pH가 5 이상은 되어야하기 때문이다. 이에 본 발명자들은 폐감귤박을 포함하는 아가 플레이트 제조시 약염기성인 K_2HPO_4 를 첨가하여 아가 플레이트의 pH를 5.6으로 증가시켰을 때 바실러스 종이 성장하는 것을 확인하였다(도 1 참조). 이를 통하여 본 발명자들은 폐감귤박 배지에서 바실러스 종이 성장할 수 있는 주요 인자가 pH임을 알 수 있었다. 이 후 폐감귤박의 압출 건조 공정(도 2 참조)에서 폐감귤박의 섬유질을 경화시켜 압출시 섬유질과 물이 분리할 수 있도록 도와주는 $Ca(OH)_2$ 0.5% 처리시 pH가 8 이상으로 증가함을 확인하였고, 결과적으로 압출 건조 공정에서 발생한 폐감귤박 침출수는 바실러스 종이 성장할 수 있는 배지가 될 수 있다.
- <67> 본 발명자들은 프로바이오틱스(probiotics)로 사용할 있는 바실러스(*Bacillus*) 균주를 얻기 위해서 식품으로부터 균주 분리를 시도하였고, 폐감귤박의 주성분인 펙틴 성분을 가지고 있는 콩과 발효 식품을 선택하였다. 우리나라 재래된장과 고추장은 과거부터 그 제조방법상 특이점으로 아스파질러스 니가(*Aspergillus niger*)와 바실러스 균주가 주를 이룬다. 특히 고추장의 발효 초기에는 바실러스 리케니포미스(*Bacillus lichniformis*)가 우점종을 이루며, 발효 말기에는 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*)가 우점종을 이룬다. 이러한 사실을 통해 본 발명자들은 재래된장 또는 재래고추장으로부터 폐감귤박 배지에서 성장하는 29종의 균주를 선발하였고, 선발된 29종의 균주에 대하여 프로바이오틱스로서의 가치 요소(factor)로 항균 활성, 생균수 그리고 효소 활성에 50 : 25 : 25의 가중치를 두어 통계학적인 방법인 RPI(Relative Performance Induce) 법으로 계산하였다. 이 때 기존의 프로바이오틱스인 바실러스 서브틸리스(*B. subtilis*), 바실러스 코아굴란스(*B. coagulans*), 바실러스 리케니포미스(*B. lichniformis*)와 활성 비교를 하였다. 전체적으로 선별 균주들은 스태필로코쿠스 아우레우스(*Staphylococcus aureus*)에 대해 15 ~ 30 mm의 높은 항균 활성을 나타냈고(도 3a 참조), 단백질 분해 효소(protease) 활성은 바실러스 코아굴란스(*B. coagulans*)를 100으로 하여 상대활성을 측정하였다(도 3c 참조). 균 성장 또한 10^9 CFU/ml 이상의 생균수로 보이는 것으로 보아(도 3b 참조) 많은 균주들이 폐감귤박 배지에서 성장하는 것을 알 수 있다. 본 발명자들은 최종적으로 LS 1-2 균주(#2)를 선발하였다(도 3d 참조).
- <68>
- <69> 프로바이오틱스(probiotics)는 사료 첨가용, 식품 첨가용으로 사용되기 때문에 동물과 사람에 무독해야 하므로, 균주의 동정을 통해 비독성 균주임을 확인하는 것이 필요하다. 이에 본 발명자들은 선별 균주의 생화학적, 분자적 동정 방법을 통하여 동정하였다.
- <70> 최종 선별 균주인 LS 1-2는 그람(Gram) 양성 간균으로서, 호기성이며 포자를 형성하고 카탈라아제(catalase) 시험에서는 양성으로 나타나 바실러스(*Bacillus*) 속 세균임을 알 수 있었다. 이후 미생물 대사와 생화학적 반응을 이용한 색깔 판정 방법으로 균주의 생화학적 표현 형질을 알 수 있는 API 50CHB 키트를 통한 동정을 한국미

생물 보존센터(KCCM)에 의뢰하였다. 이 결과 49개의 탄소원에 대한 이용성을 조사 98%의 유사율로 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*)로 간이 동정하였다(표 1 참조). 또한 LS 1-2 균주의 16S rRNA 유전자 염기 서열 분석을 통한 균주 동정 결과 GeneBank에 AY112743으로 등록된 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*) M05의 16S rRNA의 유전자 염기서열이 98% 일치하였다(도 4 참조). 이에 본 발명자들은 최종 선별된 LS 1-2 균주를 바실러스 속(*Bacillus* sp.) LS 1-2로 명명하였고, 대한민국 대전시 유성구에 위치한 한국생명공학연구원 내 유전자 은행에 2005년 4월 25일자로 기탁하였다(기탁번호 : KCTC 18109P).

<71> 본 발명자들은 최종 선별된 바실러스 속(*Bacillus* sp.) LS 1-2 균주의 항균 활성을 시험하였다. 이때, 선별 균주 중 항균 활성이 높은 균주에 대하여 피검균, 스태필로코쿠스 아우레우스(*Staphylococcus aureus*) 또는 대장균(*E. coli* 0-157)에 대한 항균 활성을 아가 웰 확산 방법(Agar well diffusion test)로 확인하였다. 그 결과 대장균에 대해서는 5개 균주가 20 ~ 22 mm로 비슷한 저해환을 보였고, 스태필로코쿠스 아우레우스(*Staphylococcus aureus*)에 대해서는 LS 1-2 균주가 28 mm에 해당하는 가장 큰 저해환을 보였다(도 5 참조). 이를 통해 최종 선별된 LS 1-2 균주가 항균 활성도가 가장 높은 것을 확인할 수 있었다.

<72> 본 발명자들은 선별 균주인 LS 1-2의 복합 배지(LB 배지)에서의 성장을 알아보기 위하여 시간대별로 시료를 채취하여 생균수와 항균 활성을 측정하였다. 그 결과 바실러스(*Bacillus*) 종의 상업용 복합 배지인 LB 배지에서 선별 균주의 성장은 6 ~ 8 시간에서 지수 성장기를 거쳐 기존의 바실러스 종과 비슷한 빠른 성장을 보이고, 12 시간 이후에 사멸기로 접어들다. 이에 비해 폐감귤박 배지에서의 2시간 늦은 8 시간 이후에 지수 성장기로 접어들었고 12시간 이후 2일 동안 생균수를 유지하였다(도 6 참조). 이를 통해 본 발명자들은 LS 1-2 균주가 100% 포자(spore)로 전환되었을 것이라고 예측하고, 포자수를 측정하기 위해 80℃, 15분 동안 열처리 후 생균수를 측정하였다. 그 결과 포자수와 생균수는 비슷하였고 24 시간 이후 100% 포자로 전환됐음을 알 수 있다(도 7 참조). 이같이 선별된 LS 1-2 균주의 빠른 포자 전환은 프로바이오틱스(probiotics) 생산에 문제가 되고 있는 포자로의 전환을 해결할 수 있는 유리한 이점으로 작용할 수 있다. 포자 형성을 프로바이오틱스의 제형과 과정에서 발생하는 100℃ 이상의 고온에서도 균수를 유지할 수 있게 한다. 또한 동물과 인간의 프로바이오틱스 섭취, 소화 과정에서 발생하는 산과 효소에서 견딜 수 있도록 보호막 역할을 한다(Hyronimus, B. *et al.*, *International Journal of Food Microbiology* 61:193-197, 2000). 항균 활성 측정시 LB 배지에서는 항균물질을 생산하지 않았고, 폐감귤박 배지에서만 항균물질을 생산하였다(도 6 참조). 바실러스 종을 산업부산물물을 이용하여 박테리오킨(bacteriocin)을 생산한다는 보고가 있는데, 이 경우 복합배지인 LB 배지에서도 박테리오킨을 생산한다. 이를 통하여 선별 균주 LS 1-2가 생산하는 항균물질이 폐감귤박 배지에서 유래한 항균물질임을 알 수 있었다.

<73> 본 발명자들은 선별된 LS 1-2 균주의 성장에 따른 전체 단백질 양을 측정하여 효소 생산 시기와 항균물질 생산 시기를 비교하였다. 전체 단백질 양은 12 시간 때 균 성장이 최고점에 달했을 때부터 증가하기 시작하여 2일, 3일째 최고치를 나타냈다(도 8 참조). 이는 2차 대사산물을 내고 있다는 결과이며 SDS-PAGE를 통해 18 ~ 72 시간까지 여러 세포의 요소들이 생산된다는 것을 밴드로 확인할 수 있었다. 또한 프로바이오틱스(probiotics)로서 필요한 단백질 분해 효소(protease)와 아밀라아제(α-amylase)의 생산되는 시기가 동일하였다(도 9 참조). 단백질 분해 효소와 아밀라아제는 프로바이오틱스가 장내에서 활동할 때 정상 작용을 돕는 효소이므로 프로바이오틱스가 갖추어야 할 조건이므로, 선별 균주인 LS 1-2가 프로바이오틱스의 조건을 만족시킴을 확인하였다.

<74> 본 발명자들은 선별된 LS 1-2 균주의 성장 후 항균물질이 생산되는지를 조사하였다. 스태필로코쿠스 아우레우스(*Staphylococcus aureus*)와 대장균(*E. coli* 0-157)을 대상으로 항균력을 갖는 항균물질 또한 2차 대사산물로써 생산된다는 것을 실험을 통해 확인하였다(도 10 참조).

<75> 프로바이오틱스(probiotics)의 시장 확대는 항생제(antibiotics) 금지로 인해 항생제 대체제의 요구에 의해 생겨난 현상이다. 현재 기존의 프로바이오틱스는 항균 능력을 가지고 있는 균주 개발로 연구가 진행되고 있다(Mishra, C. and Lambert, J. *Asia Pacific J Clin Nutr* 5:20-24, 1996). 그러나 대부분의 프로바이오틱스들은 소화 작용에서 위의 강한 산성 조건에서 다수 사멸하고, 간에서 분비되는 담즙산에 의해 타격을 입게 되어 장까지 살아왔다 하더라도 장 내에 존재하는 더 강력한 형태의 담즙산과 소화 효소들에 의해 살아남기 힘들다. 장내에 상주하고 있는 미생물군과의 상호 작용과 장에 부착하는 성질을 가지고 있어야만 비로소 프로바이오틱스의 목적을 달성할 수 있다(Spinosa, M. R. *et al.*, *Res. Microbiol.* 151:361-368, 2000). 하루 사람으로부터 분비되는 담즙의 양은 3 ~ 45 mM로 알려져 있다(Floch, M. H. *Digest Liver Dis* 34:554-557, 2002). 이에 본 발명자들은 선별 균주인 LS 1-2의 담즙산에 대한 내성을 조사하였다. 그 결과 상업용 프로바이오틱스인 바실러스(*Bacillus*) 종과 흙으로부터 분리한 바실러스 종과 비교하여 담즙에 대해 비교적 좋거나 비슷한 내성을 보였다(표 2 참조). 간 내에서 분비되는 담즙 형태인 TDOC의 경우 MIC 1.0 mM 이상으로 높은 편이었고, 보다 강력

한 장내에서 분비되는 담즙 형태인 DOC의 경우 아주 낮은 MIC 0.2 mM을 보였다.

- <76> 본 발명자들은 신규한 LS 1-2 균주의 대량 배양 가능성을 알아보기 위하여 5L 배양기를 통하여 배양하였다. 5L 배양시 균의 성장은 별 차이가 없으나 대장균에 대한 항균 활성이 플라스크 배양시 165 ± 5.5 AU/ml에서 255 ± 5.8 AU/ml로 약 1.6배 증가되었다(도 11 참조). 바실러스(*Bacillus*) 종의 특성상 산소 공급의 영향이 크다. 5L 배양기는 플라스크 환경과 달리 교반기를 통해 직접 산소의 전달을 돕는다. 따라서 이러한 효과가 항균 활성의 증가에 영향을 준 것이라 사료된다.
- <77> 본 발명자들은 LS 1-2 균주의 여러 성장배지에서의 항균물질 생산을 조사하였다. 그 결과 상업용 복합 배지인 LB/LBS/TSB/MRS에서는 항균물질을 생산하지 않았고, 폐감귤박 배지에서만 항균물질을 생산하였다(표 3 참조). 이는 LS 1-2 균주가 폐감귤박의 어떠한 물질에서 유래된 생합성된 항균물질을 생산함을 알 수 있다. 폐감귤박 배지의 주성분은 펙틴(petin)이므로 펙틴을 추가적으로 상업용 복합 배지에 첨가, 제조하여 LS 1-2 균주를 배양하였지만 항균물질은 생산되지 않았다. 또한, 본 발명자들은 일반 항생제와 LS 1-2 균주의 항균 능력을 비교하였다. 그 결과 일반적인 항생제와 유사한 항균 효능을 가지고 있음을 확인하였다(도 12 참조).
- <78>
- <79> 본 발명은 상기 신규한 바실러스 속(*Bacillus* sp.) LS 1-2 균주를 포함하는 프로바이오틱스를 제공한다.
- <80> 본 발명의 신규 바실러스 속 LS 1-2 균주는 병원균을 대상으로 항균 능력을 보유하고 있고(도 5 참조), 프로바이오틱스(probiotics)가 장내에서 활동할 때 정균 작용을 돕는 효소인 단백질 분해 효소와 아밀라아제가 생산되며(도 9 참조), 담즙산에 대한 내성을 보유하고 있으므로(표 2 참조) 프로바이오틱스로서 유용하게 이용할 수 있다. 또한 다른 항생제와 비슷한 항균 능력을 보임으로 안전하고 독성없는 프로바이오틱스로서 유용하다. 본 발명의 프로바이오틱스는 가축을 비롯한 동물을 대상으로 사용될 수 있으며 식품 또는 동물 사료에 첨가할 수 있다. 또한 동물 의약품 및 의약품에 사용할 수 있다.
- <81> 본 발명은 상기 프로바이오틱스(probiotics)를 유효성분으로 포함하는 사료첨가제를 제공한다.
- <82> 본 발명의 사료첨가제는 폐감귤박과 함께 동물 사료에 첨가할 수 있다. 상기 사료첨가제는 신규한 바실러스 속(*Bacillus* sp.) LS 1-2 균주의 종균 배양액을 폐감귤박 배지 100 중량부에 대하여 1 ~ 20 중량부로 첨가하는 것이 바람직하며, 10 ~ 20 중량부로 첨가하는 것이 보다 바람직하다. 본 발명의 사료 첨가제는 스태필로코쿠스 아우레우스(*Staphylococcus aureus*)와 대장균(*E.coli* 0-157)에 항균 효과를 가짐을 기대할 수 있다(도 5 및 도 10 참조).
- <83> 본 발명은 상기 신규한 바실러스 속(*Bacillus* sp.) LS 1-2 균주로부터 프로바이오틱스(probiotics)를 생산하는 방법을 제공한다.
- <84> 본 발명은 하기의 생산 단계를 제공한다: 1) 바실러스 속 LS 1-2 균주를 복합 배지에서 배양하는 단계; 2) 단계 1)에서 배양한 바실러스 속 LS 1-2 균주를 폐감귤박 배지에서 배양하는 단계; 및 3) 단계 2)에서 생산한 프로바이오틱스를 수득하는 단계.
- <85> 상기 단계 1)의 복합 배지는 LB, LBS, TBS 및 MRS로 이루어진 군에서 선택되는 것이 바람직하며, 본 단계를 통하여 선발 균주 LS 1-2를 지수성장기까지 성장시켜 균수를 증가시킬 수 있다. 상기 단계 2)의 폐감귤박 배지는 도 2의 폐감귤박 가공폐기물 사료화 공정에 따라 발생하는 폐감귤박 가공폐수를 사용하는 것이 바람직하다. 상기 단계 3)의 프로바이오틱스를 수득하는 방법은 당업자에게 알려진 모든 방법을 사용하여도 무방하며 하기의 방법으로 수득하는 것이 바람직하다: 1) 배양액을 원심분리하여 고액을 분리하고 침전물을 회수하는 원심 분리 방법; 2) 탄젤셀플로우 마이크로 필터를 이용하여 배양액을 농축시킨 후 회수하는 방법; 및 3) 흡착제를 첨가하여 sedimentation된 펠렛(pellet)을 회수하는 방법. 이 중 원심분리 방법을 사용하는 것이 가장 바람직하다.
- <86> 이하 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다.
- <87> 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.
- <88> <실시예 1> 감귤가공 부산물에서의 바실러스 속(*Bacillus* sp.) 성장 조사
- <89> TSB(Tryptic soy broth: 1.5% Tryptone, 0.5% Yeast extract, 0.5% NaCl) 배지 5 ml(W/V)을 튜브에 담아 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*) ATCC 21332, 바실러스 코아굴란스(*Bacillus coagulans*), 바실러스 리케니포미스(*Bacillus licheniformis*), 바실러스 세레우스(*Bacillus cereus*), 바실러스 메가테리움(*Bacillus megaterium*), 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*), 바실러스 종(*Bacillus* sp. 65#) 및 바실러스 종

(*Bacillus* sp. 55#)을 접종하여 배양하여 250 rpm, 30℃로 진탕 배양기에서 전배양하였다. 이 후 폐감귤박 배지(폐감귤박 가공폐수) 50 ml(W/V)에 상기 전배양한 바실러스 종(*Bacillus* sp)을 1% 접종하여 250 rpm, 30℃로 진탕 배양기에서 1일 동안 배양하였다. 이후 폐감귤박으로 제조된 아가 플레이트(폐감귤박 가공폐수 95%, 아가 2%)에 도말하여 1일 동안 배양하였다. 그 결과, 처음에는 폐감귤박만으로 아가 플레이트를 제조하였을 때에는 바실러스 종들이 성장하지 않았다. 이에 본 발명자들은 아가 플레이트 제조시 감귤박과 함께 K_2HPO_4 1 g/l를 첨가하여 상기 바실러스 종들을 접종하였다. 그 결과 바실러스 종들이 정상적으로 성장함을 확인하였다(도 1). 바실러스 종의 경우 pH 5 이상이 되어야 성장하는데, 폐감귤박은 pH 3.3이되므로 성장할 수 없었던 것으로 보인다. 이에 본 발명자들은 폐감귤박의 압출 건조 과정에서 폐감귤박의 섬유질을 정화시켜 압출 시 섬유질과 물이 분리하게 도와주는 $Ca(OH)_2$ 0.5%를 화학 처리시 pH 8 이상으로 올라가는 것을 확인하였고, 결과적으로 압출 건조 공정에서 발생한 침출수를 이용하여 바실러스 종이 성장할 수 있는 배지를 조성하였다. 제주도 감귤주스 공장에서 나오는 가공폐기물인 폐감귤박(제주도, 감귤가공복합처리단지; 90% 수분함량)을 1차, 2차에 걸친 분쇄 및 압출 공정과 $Ca(OH)_2$ 의 처리를 통해 고상부분 27%(55% 수분함량)와 액상부분 73%(95% 수분함량)로 분리하였다. 고상은 열풍건조와 펠렛(pellet) 성형을 통하여 수분함량 5%의 CPP(citrus pulp pellet)을 생산하고, 액상(폐감귤박 가공폐수; Citrus waste water)은 균 배양배지로 이용하여 본 실험을 수행하였다(도 2). 이에 상기 바실러스 종을 전배양한 후, 폐감귤박 배지를 고형분 5%가 되도록 제조한 후 5 N $Ca(OH)_2$ 로 pH를 6.5 ~ 7.5로 보정하여 배양하였다.

<90> <실시예 2> 균주 분리 및 RPI 분석 방법을 이용한 균주 선별

<91> 재래된장, 재래고추장 등의 콩과 발효식품의 25% 희석액을 폐감귤박(수분함량 95%, 100 ml(w.v)/500 ml) 배지에 1% 접종하여 37℃, 250 rpm, 2일 동안 배양하고, TSB(Tryptic soy broth: 1.5% Tryptone, 0.5% Soytone, 0.5% NaCl), LBS(Luria-Bertani w/Stach: 1% Tryptone, 0.5% Yeast extract, 0.5% NaCl, 1% Starch), ROGOSA(1% Pancreatic digest of Csein, 0.5% yeast extract, 1% Dextrose, 0.5% Arabinose, 0.5% Saccharose, 1.5% Sodium acetate, 0.2% Ammonium citrate, 0.6% K_2HP_4 , 0.057% $MgSO_4 \cdot H_2O$, 0.012% $MnSO_4 \cdot H_2O$, 0.003% $FeSO_4$, 0.1% Tween 80), MRS(1% Casein peptone, 1% tryptic digest, 1% Meat extract, 0.5% Yeast extract, 2% Glucose, 0.1% Tween 80, 0.2% K_2HPO_4 , 0.5% Na-acetate, 0.2% $(NH_4)_2$ citrate, 0.02% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.005% $MnSO_4 \cdot H_2O$) 배지에 도말하였다. 12 시간 동안 37℃ 배양기에서 배양한 후 성장한 콜로니(colony)들을 단일 콜로니로 분리하였다. 이후 폐감귤박(수분함량 95%)과 아가(agar) 2.0%를 이용하여 폐감귤박 아가 플레이트(Citrus agar plate)를 제조하여 분리한 균을 접종함으로써 폐감귤박을 분해, 성장할 수 있는 균을 29종 선별하였다. 최종적으로 고활성 균주를 선별하기 위해 통계학적 선별방법인 RPI(Relative Performance Indies) 방법을 이용하였다(Kim, HA. et al., *Journal of Resource Development* 20(1):65-69, 2001).

<92> 상기 방법으로 선별된 분해 균주 29종과 프로바이오틱스 대표 균주 3종에 대하여 스태필로코쿠스 아우레우스(*Staphylococcus aureus*)에 대한 항균 활성을 50%(도 3A), 생균수를 25%(도 3B) 그리고 효소 활성능(proteases)을 25%(도 3C)로 균의 활성에 대한 가중치를 두었다. 상기 가중치는 Schisler 등의 방법을 이용하여 계산하였고, 최종적으로 고활성 균을 선별하였다(Schisler, D.A. and Slininer, P. J. J. *Onl. Microbiol. Biotechnol.* 19:172-179, 1997).(도 3). 항균 활성의 검증은 아가 디스크 확산 테스트(Agar disk diffusion test: Kirby-Bauer 법) 방법을 기초로 하여 수행하였다. 병원성균 스태필로코쿠스 아우레우스(*Staphylococcus aureus*) 또는 대장균(*E.coli* 0-157)은 TSB 배지에서 접종하여 pH 7.0, 30℃, 250 rpm으로 진탕 배양기에서 12 시간 배양하였다. TSB 아가(1.5%) 플레이트 위에 병원성균(10^6 - 10^7 CFU/ml) 스태필로코쿠스 아우레우스(*Staphylococcus aureus*), 대장균(*E.coli* 0-157)을 소프트 아가(soft agar: 0.8%, 100 ml)에 1.0 ml를 희석하여 배양된 플레이트 위에 평평하게 도말하였다. 30분 정도 실온에서 건조한 후 스틸 웰(steel well)을 소프트 아가(soft agar) 위에 4 ~ 5개를 올려놓고, 멸균된 선별 균주의 배양액을 농도별로 나누어 스틸 웰에 100 μ l씩 떨어뜨린다. 이후 37℃, 12시간 동안 배양하고, 저해환을 관찰하였고, 환 크기(mm)에 10을 곱하여 ml 당 박테리옌 활성도 유닛(Bacteriocin Activity Unit)(AU/ml)을 계산하였다. 전체적으로 스태필로코쿠스 아우레우스(*Staphylococcus aureus*)에 대해 15 ~ 30 mm의 높은 항균 활성을 나타냈다(도 3A). 효소 활성은 바실러스 코아굴란스(*Bacillus coagulans*)를 100으로 하여 상대 활성을 측정하였다(도 3C). 측정 방법은 하기와 같다. 효소 활성도(Enzyme activity) 1 U은 pH11, 60℃에서 Proteaserk casein(Sigma, USA)을 가수분해하여 1분 동안 타이로신(tyrosine) 1 M이 생성되는 것으로 정의하였다. casein은 0.1 M glycine-NaOH(pH11) 버퍼에 0.5% 농도로 녹인 후 사용하였고, 효소 용액(Enzyme solution)은 배양액을 15,000 rpm으로 10분간 원심분리 후, 0.1 M

glycine-NaOH(pH11)에 10배 희석하여 사용하였다. 반응을 멈추는 정지 용액(stop solution)은 1.888% 아세트산(acetic acid), 2.992% 소듐 아세테이트(sodium acetate), 1.8% TCA를 혼합하였다. 어세이(assay) 과정은 0.5 ml 기질(substrate)을 각각 1.8 ml 튜브에 넣고 60℃, 10분 동안 전 반응시킨 후 효소 용액(enzyme solution) 0.01 ml을 넣고 10분간 반응시켰다. 이후 정지 용액 0.5 ml 첨가 후 4℃에서 10분간 방치하였다. 이후 15,000 rpm에서 10분간 원심분리 후 275 nm 흡광도로 측정하였다. 균의 성장 또한 10^9 CFU/ml 이상의 생균수를 보이는 것으로 보아 많은 균주들이 폐감귤박에서 성장하는 것으로 판단된다(도 3B) 생균수 측정 방법은 하기와 같다. 순차적 희석(serial dilution)을 10배씩 하여 LB 아가 또는 TS아가 평판배지에 도말하여 생성되는 콜로니(colony)를 개수하였다. 유효범위는 1 플레이트 위에 콜로니 수가 50 ~ 300개 사이인 것을 활용하였다. 최종적으로 선별된 균주는 LS 1-2이다(도 3D의 #2).

<93>

<실시예 3> 선별 균주 동정

<94>

<실시예3-1> 형태학적, 생화학적 및 탄소원에 대한 이용성을 이용한 균주 동정

<95>

최종 선별된 LS 1-2 균주를 그람 염색법(Gram staining)을 사용하여 염색하였다. 그 결과 LS 1-2 균주는 그람(Gram) 양성의 간균으로서, 호기성으로 포자(spore)를 형성하며 카탈라이즈 시험(catalase test)에서는 양성으로 나타나 바실러스(*Bacillus*) 속의 세균임을 추정하였다. 카탈라이즈 시험은 하기와 같다. API test kit(BioMereux Co. 프랑스)를 이용하여 과산화수소 용액을 콜로니 위에 점적하여 기포가 발생하는 것을 카탈라아제 양성균으로 판단하였다.

<96>

또한, 미생물 대사와 생화학적 반응을 이용하여 색깔 판정 방법으로 균주의 생화학적 표현 형질을 알 수 있는 API 50CHB kit(bioMerieux Co., France)를 이용하여 49개의 탄소원에 대한 이용성을 조사하여 간이 동정하였다. 그 결과는 표 1과 같다. 49개의 탄소원에 대한 이용성을 조사한 결과 98%의 유사율로 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*)로 간이 동정되었다.

표 1

<97>

API kit 분석 결과

		Bnatto			Bnatto
		API CHB			API CHR
0	Control	-	25	Esculine	+
1	Glycerol	+	26	Salicine	+
2	Ertlythritol	-	27	Cellobiose	+
3	D-Arabinose	-	28	Maltose	+
4	L-Arabinose	+	29	Lactose	+
5	Ribose	+	30	Melibiose	+
6	D-Xylose	-	31	Saccharose	+
7	L-Xylose	-	32	Trehalose	+
8	Adonitol	-	33	Inuline	-
9	β Methyl-xyloside	-	34	Melezitose	-
10	Galactose	-	35	D-Raffinose	+
11	D-Glucose	+	36	Amidon	+
12	D-Fructose	+	37	Glycogene	+
13	D-Mannose	+	38	Xylitol	-
14	L-Sorbose	-	39	βGentiobiose	-
15	Rhamnose	-	40	D-Turanose	-
16	Dulcitol	-	41	D-Lyxose	-
17	Inositol	+	42	D-Tagatose	-
18	Mannitol	+	43	D-Fucose	-
19	Sorbitol	+	44	L-Fucose	-
20	α Methyl-D-mannoside	-	45	D-Arabitol	-

21	α Methyl-D-glucoside	+	46	L-Arabitol	-
22	N Acetyl glucosamine	-	47	Glyconate	-
23	Amygdaline	-	48	2 Keto-gluconate	-
24	Arbutine	-	49	5 Keto-gluconate	-

<실시예 3-2> 분자적 균주 동정(16S rDNA sequence)

최종 선별된 바실러스 속(*Bacillus* sp.) LS 1-2 균주는 16S rRNA 유전자 염기서열 분석을 통하여 균주를 동정하였다. 최종 LS 1-2 균주의 16S rRNA는 서열번호 1로 기재되는 서열을 가지고 있으며(도 4), 동정 결과 GeneBank에 AY112743으로 등록된 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*)의 16S ribosomal RNA 유전자의 부분 염기 서열과 98% 일치하였다.

이를 통해 최종 선별된 LS 1-2 균주를 바실러스 속(*Bacillus* sp.) LS 1-2로 명명하였고, 대한민국 대전시 유성구에 위치한 한국생명공학연구원 내 유전자 은행에 2005년 4월 25일자로 기탁하였다(기탁번호: KCTC 18109P).

<실시예 4> 선별된 균주의 항균 활성

본 실험에 사용된 항균물질은 다음의 방법에 의하여 조항균물질 상태로 준비하였다. 24시간 동안 전배양된 균(TS 4, TS 7, LS 1-1, LS 1-2, LS 10)을 50 ml/250 ml(w/v) 폐감귤박 배지에 2% 접종하고, 다시 30℃에서 24시간 동안 본배양 한 후 회수하여 배양액을 원심분리(13,000 rpm, 5분, 4℃)하여 균체를 제거하고, 회수한 상등액을 시린지 필터(syringe filter: 0.2 μ m pore size, Sartorius, USA)로 제균하였다. 항균 활성의 검증은 실시예 2의 방법으로 수행하였다.

그 결과, 항균 활성이 높은 선별 5개 균주가 대장균(*E.coli* 0-157)에 대해서는 20 ~ 22 mm로 비슷한 저해환을 보였고, 스탕필로코쿠스 아우레우스(*Staphylococcus aureus*)에 대해서는 선별 균주인 바실러스 속(*Bacillus* sp.) LS 1-2가 28 mm에 해당하는 가장 큰 저해환을 보였다(도 5).

<실시예 5> LB 배지와 폐감귤박 배지에서의 균의 성장 및 항균 활성 비교

선별 균주 바실러스 속(*Bacillus* sp.) LS 1-2의 LB 배지 또는 폐감귤박 배지에서의 성장을 알아보기 위하여 0, 2, 4, 8, 10, 12, 18, 24, 36, 48 시간대마다 시료를 채취하여 생균수와 항균 활성을 측정하였다. 항균 측정은 실시예 2와 같은 방법으로 측정하였다.

그 결과 LB 배지에서의 선별균주 LS 1-2 균주는 6 ~ 8 시간에서 지수 성장기를 거쳐 기존의 바실러스 종(*Bacillus* sp.)과 비슷한 빠른 성장을 보이며 12 시간이후 사멸기로 접어들다. 그러나 폐감귤박 배지에서는 2시간 늦은 8시간 후에 지수 성장기로 접어들고 12시간 후에 2일동안 생균수를 유지하였다(도 6 참조). 이에 본 발명자들은 LS 1-2 균주가 100% 포자로 전환되었을 것이라 예측하였고, 포자수를 측정하기 위하여 80℃, 15분 동안 열처리 후 생균수를 측정하였다. 그 결과 포자수와 생균주는 비슷하였고, 24시간 이후 100% 포자로 전환되었음을 알 수 있었다(도 7).

항균 활성 측정시 LB 배지에서는 항균물질을 생산하지 않았고, 폐감귤박 배지에서만 항균물질을 생산하였다(도 6). 이를 통해 바실러스 속(*Bacillus* sp.) LS 1-2 균주에서 생산하는 항균물질이 폐감귤박 유래 항균물질임을 예측할 수 있었다.

<실시예 6> 성장에 따른 효소 생산

선별균주인 바실러스 속(*Bacillus* sp.) LS 1-2를 배양하면서 성장에 따른 전체 단백질 양을 측정하여 효소 생산시기와 항균물질 생산시기를 비교하였다.

전체 단백질 양은 Bradford 단백질 정량법(Bio-rad protein assay kit; Bio-rad, USA)을 이용하여 측정하였으며, 웨스턴 블롯을 함께 수행하였다(Sambrook, J. et al., *Molecular Cloning*, 2nd ed, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989). 또한 단백질 분해 효소(Protease)와 α -아밀라아제(Amylase)의 활성 측정 방법은 Kang 등의 방법을 사용하였다(Kang, T.H. et al., *J. Agri. Sci.* 36(1):512-516, 1994).

그 결과, 전체 단백질 양은 12시간 때 균 성장이 최고점에 달했을 때부터 증가하기 시작해 2일, 3일째 최고치를 나타냈다(도 8A). 이는 2차 대사산물을 내고 있다는 증거이며, SDS-PAGE를 통하여 18 ~ 72 시간까지 여러 가지 세포의 효소들이 생산됨을 확인할 수 있었다(도 8B).

<112> 단백질 분해 효소(Protease)와 아밀라아제(Amylase)의 활성 또한 LS 1-2 균주에서 시간이 흐를수록 증가함을 확인하였다(도 9). 단백질 분해 효소와 아밀라아제는 프로바이오틱스(probiotics)가 장내에서 활동할 때 정상 작용을 돕은 효사이므로 선별균주인 LS 1-2 균주가 프로바이오틱스로서의 조건을 만족함을 알 수 있었다.

<113> <실시예 7> 성장에 따른 항균물질 생산 조사

<114> 폐감귤박 배지에 TSB 배지(5 ml 튜브)로 전배양한 선별 균주 LS 1-2를 2% 접종 후 진탕 배양기에서 250 rpm, 30℃에서 24시간 동안 배양하였다. 이후 실시예 4의 방법으로 조항균물질 제조하여 스태필로코쿠스 아우레우스(*Staphylococcus aureus*)와 대장균(*E. coli* O-157)에 대한 항균 활성을 실시예 2의 방법으로 측정하였다.

<115> 그 결과 균의 성장이 끝난 후에 역시 항균물질이 생산되었다(도 10). 이를 통해 스트렙토코쿠스 아우레우스(*Staphylococcus aureus*)와 대장균(*E. coli* O-157)에 항균력을 갖는 항균물질 또한 2차 대사산물로써 생산이 된다는 것을 확인하였다.

<116> <실시예 8> 담즙산에 대한 내성 조사

<117> 담즙산에 대한 내성 조사를 MIC(Minimum inhibitory concentration: 최소 저해 농도) 측정방법을 사용하여 측정하였다(Lambert, R. J. W. Journal of Applied Microbiology 91:453-462, 2001). 본 발명자들은 상업용 프로바이오틱스(probiotics)로 사용되는 바실러스 종(*Bacillus* sp.)과 흙으로부터 분리된 바실러스 종과 선별 균주 LS 1-2 균주의 담즙 내성 조사를 수행하였다.

<118> 그 결과, 선별 균주 LS 1-2는 상업용 프로바이오틱스인 바실러스 종과 흙으로부터 분리된 바실러스 종과 비교하여 담즙에 대해 비교적 좋거나 비슷한 내성을 보였다(표 2). 간 내에서 분비되는 담즙형태인 TDOC의 경우 MIC 1.0 mM 이상으로 높은 편이고, 보다 강력한 장내에서 분비되는 담즙형태인 DOC의 경우 아주 낮은 MIC 0.2 mM를 보였다.

표 2

종명	TDOC*의 MIC(mM)	DOC ^{&} 의 MIC(mM)
바실러스 서브틸리스(<i>Bacillus subtilis</i>) LS 1-2	≥ 1.0	0.27
바실러스 서브틸리스(<i>Bacillus subtilis</i>) ATCC 21332	≥ 1.0	0.20
바실러스 리케니포미스(<i>Bacillus licheniformis</i>)	≥ 1.0	0.15
바실러스 코아굴란스(<i>Bacillus coagulans</i>)	≥ 1.0	0.1
바실러스 세레우스(<i>Bacillus cereus</i>)(Bactisubtil)	0.2	0.2
바실러스 클라우시(<i>Bacillus clausii</i>)(Enterogermina)	0.05	0.2

<120> * TDOC : 간 내에 존재하는 담즙산

<121> & DOC : 장 내에 존재하는 담즙산

<122> <실시예 9> 대량 배양

<123> 본 발명자들은 5L 배양기를 통하여 대량생산 가능성을 알아보기 위해 선별균주의 성장과 항균 활성을 측정하였다. 폐감귤박 배지(50 ml/250 ml(w/v) Erlenmeyer flask)에서 24시간 동안 전배양된 선별균주 LS 1-2는 5L 발효 시스템(fermentor system: Kobiotech, Korea)에 5% 접종하였다. 5L 발효기의 배양은 2 ℓ 부피(working volume), 600 rpm, 1 vvm의 산소공급 조건에서 24시간 동안 배양하였다. 배양 중에 발생하는 거품 발생을 제거하기 위해 Antiform 204(Sigma, USA)를 100배 희석하고 필터링하여 배양기에 주입하였다.

<124> 그 결과 5L 배양 시 균의 성장은 별 차이가 없었으나, 대장균(*E. coli* O-157)에 대한 항균 활성이 플라스크(flask) 배양 시 165± 5.5 AU/ml에서 255± 5.8 AU/ml로 약 1.6배 증가 되었다(도 11).

<125> <실시예 10> 여러 성장 배지에서의 항균물질 생산

<126> 폐감귤박 배지(접종 세포 없음; 대조군), 폐감귤박 배지(세포 접종), 폐감귤박 배지 + Ca(OH)₂, LB, LBS, TSB, LB/LBS/TSB + 펙틴(pectin) 그리고 펙틴 배지를 제조(50 ml/250 ml(w/v) Erlenmeyer flask)하여 TSB 배지(5 ml 튜브)에 전 배양된 선별 균주 LS 1-2를 2% 접종 후 진탕 배양기에서 250 rpm, 30℃에서 24시간 동안 배양하여

항균물질 생산을 조사하였다.

<127> 그 결과 상업용 복합배지인 LB, LBS, TSB 및 MRS에서는 항균물질을 생산하지 않았고, 폐감귤박 배지에서만 항균물질을 생산하였다(표 3). 상기 결과는 폐감귤박의 어떤 물질에서 유래되어 바실러스(*Bacillus*)에 의해 생합성된 항균물질로 추측할 수 있다. 폐감귤박의 주성분은 펙틴이므로 이 물질이 항균물질 생산의 주요성분이라고 추측하여 복합배지에 펙틴을 첨가 또는 펙틴만으로 배지를 제조하여 LS 1-2 균주를 배양하였다. 그 결과 항균물질이 생산되지 않았다.

표 3

배지	항미생물 활성
폐감귤박 배지(세포 접종 안함)	-
폐감귤박 배지	+
폐감귤박 배지 + Ca(OH) ₂	+
LB	-
LBS	-
TSB	-
MRS	-
펙틴(pectin)	-
LB/LBS/TSB/MRS + 펙틴(pectin)	-

<129> * + : 항미생물 활성 있음

<130> * - : 항미생물 활성 없음

<131> <실시예 1> 일반 항생제와의 항균효능 비교

<132> 선별균주인 LS 1-2 균주의 항균 능력을 일반 항생제인 암피실린(ampicillin), 반코마이신(vancomycin), 스펙티노마이신(spectinomycin), 노보바이오신(novobiocin), 스트렙토마이신(streptomycin), 테트라사이클린(tetracycline), 카나마이신(kanamycin)과 비교하였다. 상기 비교 방법은 실시예 2와 같이 항균 활성을 조사하여 수행하였다.

<133> 그 결과 선별균주 LS 1-2 균주가 일반 항생제와 유사한 항균 효능을 보임을 확인하였다(도 12).

발명의 효과

<134> 신규한 바실러스 속(*Bacillus* sp.) LS 1-2 균주와 그로부터 프로바이오틱스를 제조하는 방법에 관한 것으로서, 보다 구체적으로 선별된 바실러스 서브틸리스 LS 1-2는 동물과 사람에게 무독하며, 폐감귤박 배지에서 성장하며, 효소 및 항균물질을 생산하고, 병원균에 항생 능력을 보이며, 담즙산에 대한 내성을 보유하고 있다. 또한, 대량 배양이 가능하며 통상적으로 사용되는 항생제와 유사한 항균 능력을 가지고 있으므로, 폐감귤박 배지를 이용한 독성 없고 안전한 항균물질 생산 및 항균 사료 생산에 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

<1> 도 1은 폐감귤 가공폐기물 사료화 공정을 나타낸 공정도이다.

<2> 도 2는 폐감귤박 아가 플레이트에서의 바실러스 종의 성장을 확인한 플레이트(plate) 도안이다:

<3> A : 바실러스 세레우스(*Bacillus cereus*);

<4> B : 바실러스 리케니포미스(*Bacillus licheniformis*);

<5> C : 바실러스 종(*Bacillus* 55#);

<6> D : 바실러스 종(*Bacillus* 65#);

<7> E : 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*) ACTC 21332;

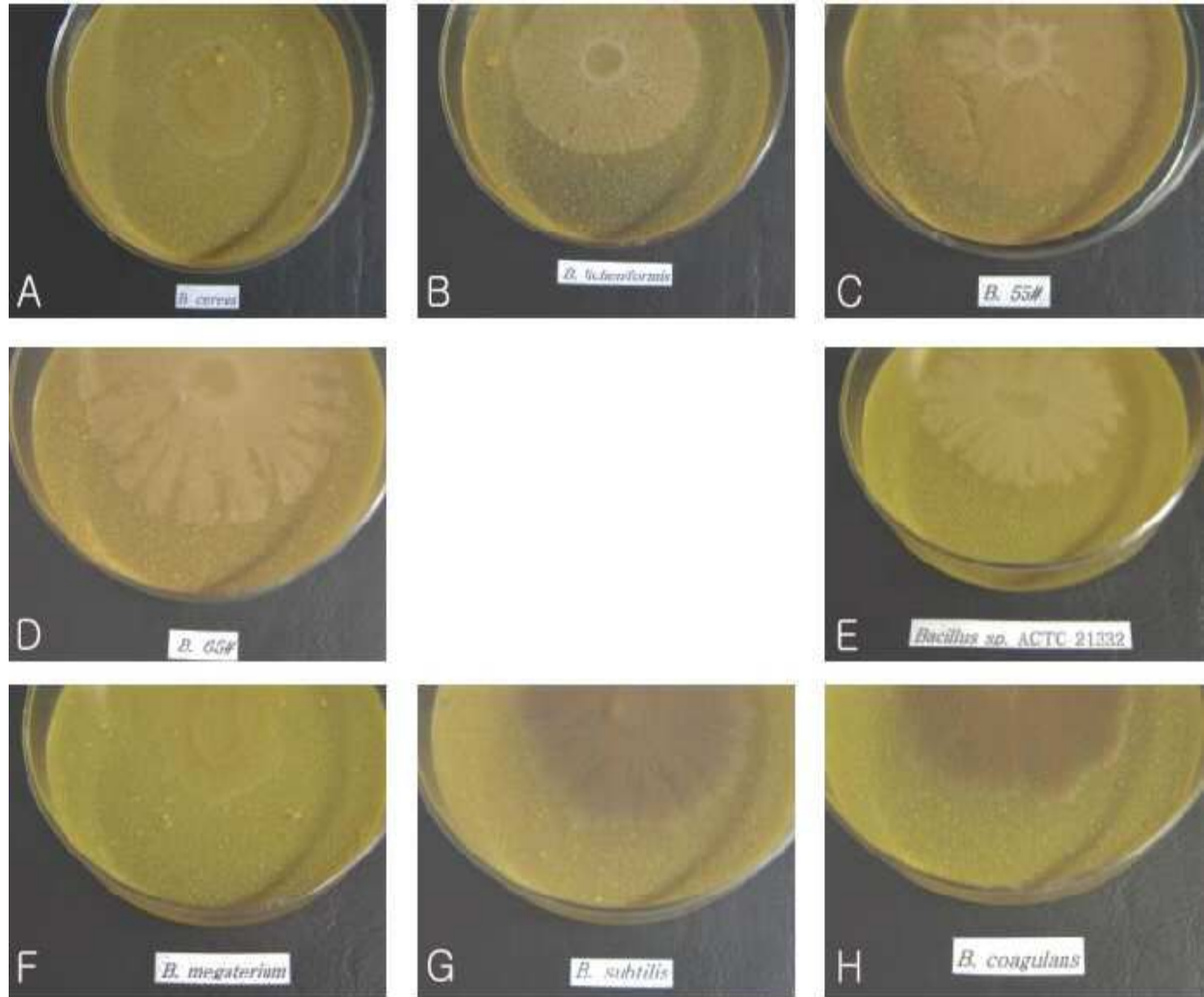
<8> F : 바실러스 메카테리움(*Bacillus megaterium*);

- <9> G : 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*); 및
- <10> H : 바실러스 코아굴란스(*Bacillus coagulans*).
- <11> 도 3은 균주 분리 및 RPI(Relative Performance Index) 분석 방법을 이용한 균주 선별 과정을 나타낸 그래프이다:
- <12> 도 3a : 스태필로코쿠스 아우레우스(*Staphylococcus aureus*)를 대상으로 한 선별 균종의 항균 활성 측정;
- <13> 도 3b : 선별 균종의 생균수 측정;
- <14> 도 3c : 바실러스 코아굴란스(*Bacillus coagulans*)를 대조균으로 한 연관 단백질 분해 효소(protease) 생산비; 및
- <15> 도 3d : 선별 균종의 RPI 분석 결과.
- <16> 도 4는 선별 균주 LS 1-2의 16S rRNA 서열 및 Genebank를 이용한 동정 결과를 나타낸 그림이다.
- <17> 도 5는 스태필로코쿠스 아우레우스(*Staphylococcus aureus*) 또는 대장균(*E.coli* 0-157)에 대한 선별 균주의 박테리오파지 활성도 유닛 측정을 나타낸 도안이다.
- <18> 도 6은 LB 배지 또는 폐감귤박 배지에서 배양한 LS 1-2 균주의 생균수 및 항균 활성을 나타낸 그래프이다:
- <19> ◆ : 폐감귤박 배지를 이용하여 배양했을 때 생성된 항균 활성도;
- <20> □ : LB 배지를 이용하여 배양했을 때 생성된 항균 활성도;
- <21> ● : 폐감귤박 배지를 이용하여 배양하였을 때의 생균수의 변화; 및
- <22> ▲ : LB 배지를 이용하여 배양했을 때의 생균수의 변화.
- <23> 도 7은 폐감귤박 배지에서 배양한 LS 1-2 균주의 생균수 및 포자수를 나타낸 그래프이다:
- <24> ● : 생균; 및
- <25> □ : 포자.
- <26> 도 8은 LS 1-2 균주의 생균수 및 전체 단백질 양을 나타낸 그래프이다:
- <27> ● : 성장도;
- <28> □ : 전체 단백질;
- <29> 1 : 18 시간 ;
- <30> 2 : 24 시간 ;
- <31> 3 : 48 시간 ;
- <32> 4 : 36 시간 ; 및
- <33> 5 : 72 시간 .
- <34> 도 9는 LS 1-2 균주의 단백질 분해효소(protease) 활성도 및 아밀라아제(α-amylase) 활성도를 나타낸 그래프이다:
- <35> ● : 단백질 분해효소 활성도; 및
- <36> □ : 아밀라아제 활성도.
- <37> 도 10은 스태필로코쿠스 아우레우스(*Staphylococcus aureus*) 또는 대장균(*E.coli* 0-157)에 대한 LS 1-2 균주의 항균 활성을 나타낸 그래프이다:
- <38> ● : 스태필로코쿠스 아우레우스(*Staphylococcus aureus*) 대상; 및
- <39> □ : 대장균(*E.coli* 0-157) 대상.
- <40> 도 11은 LS 1-2 균주의 생균수, 항균 활성을 나타낸 그래프이다:
- <41> ● : 생균수;

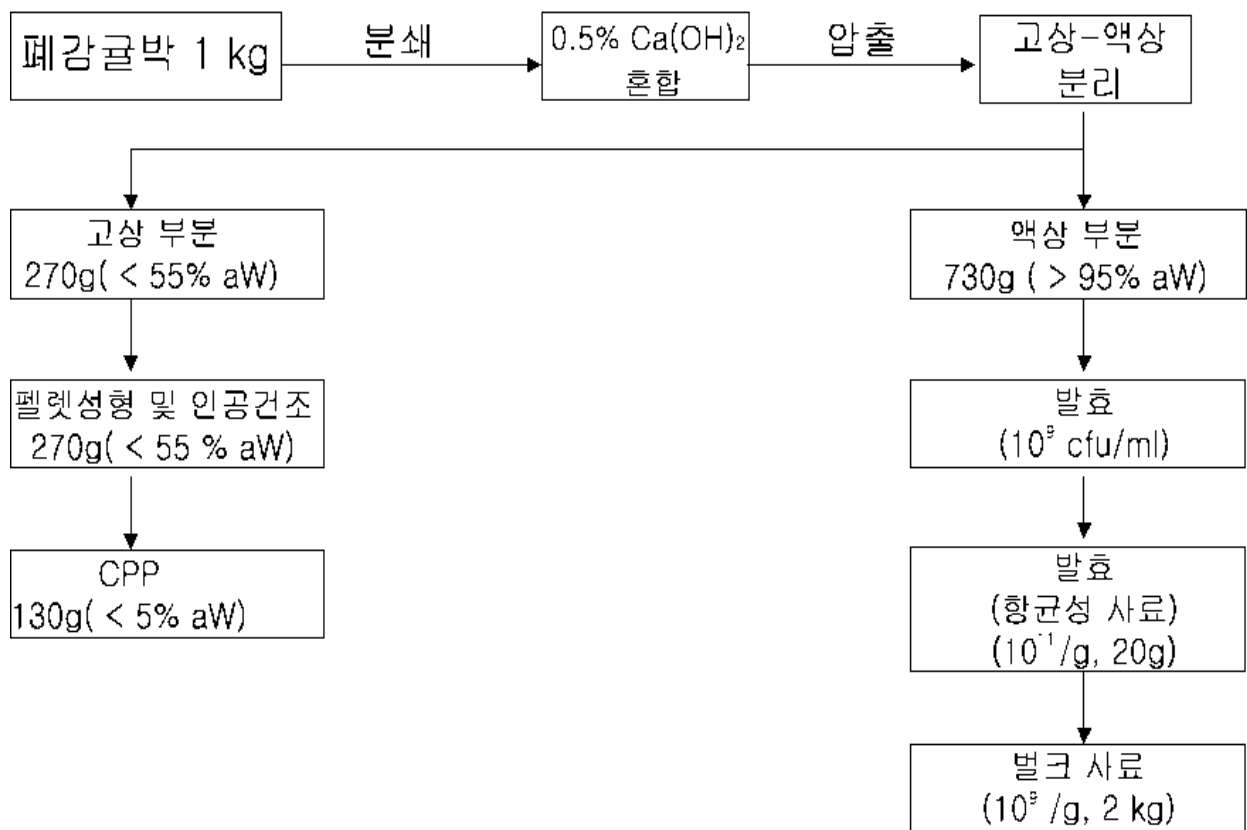
- <42> ▲ : DO(용존산소량); 및
- <43> ■ : 박테리옌 활성도 유닛.
- <44> 도 12는 LS 1-2와 여러 종류의 항생제 간의 항균 활성을 측정한 그래프이다.

도면

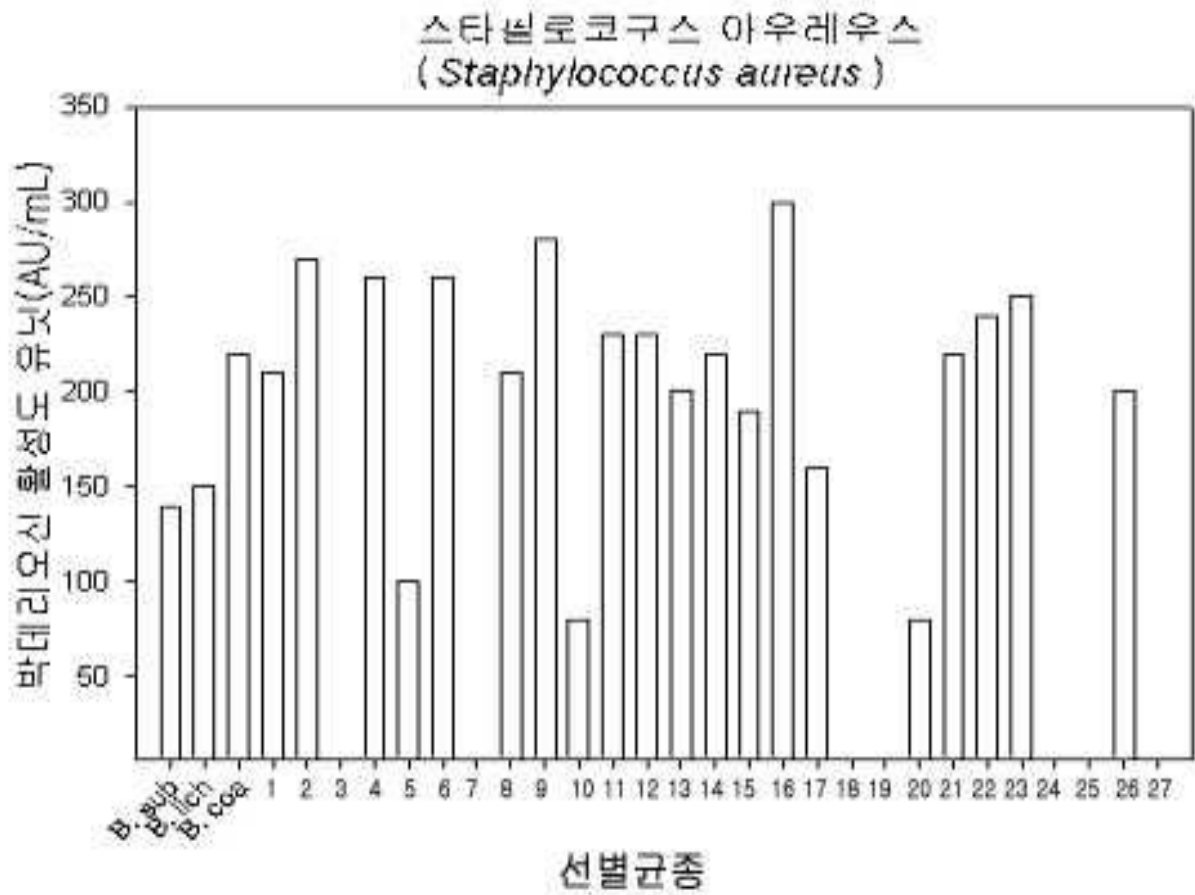
도면1



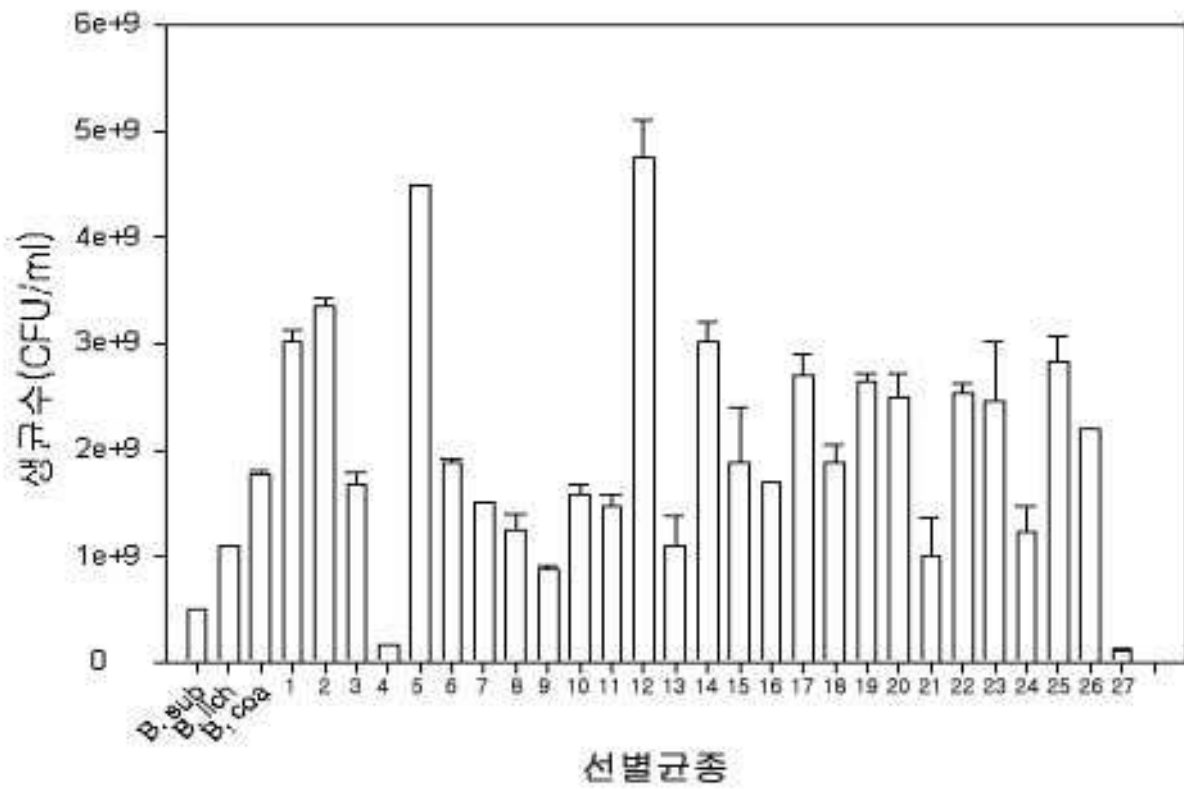
도면2



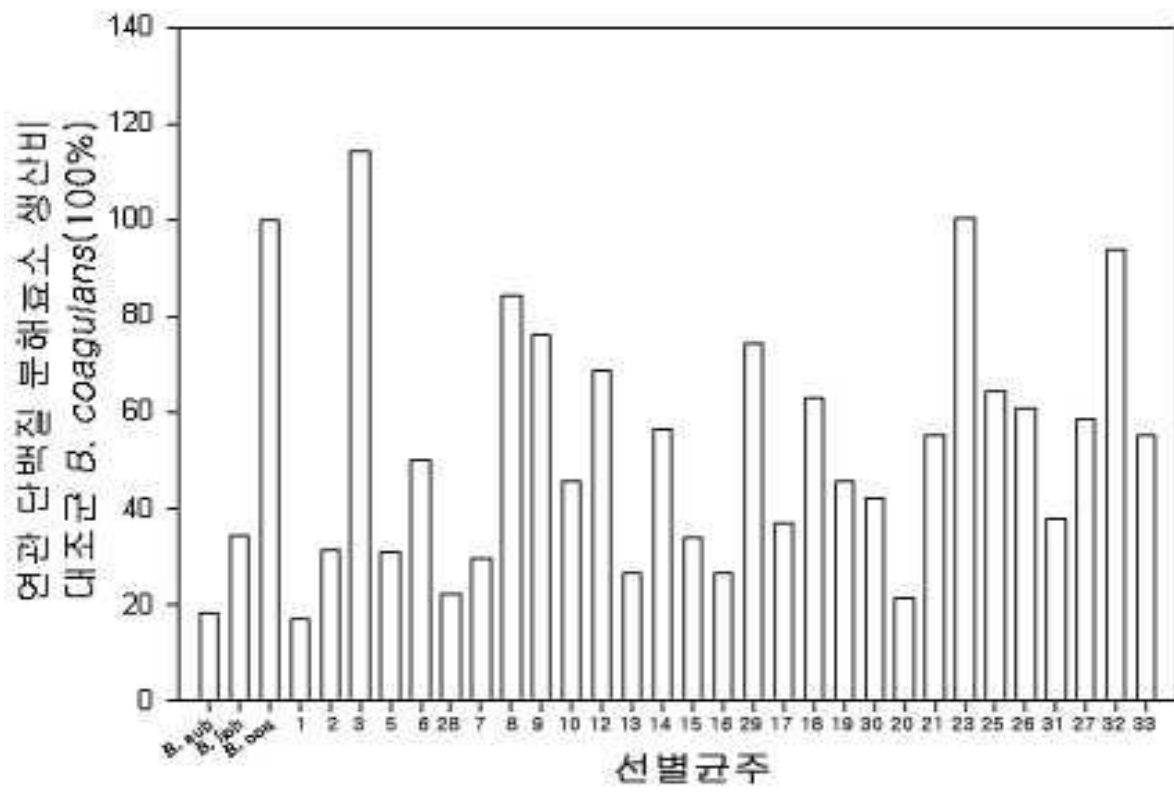
도면3a



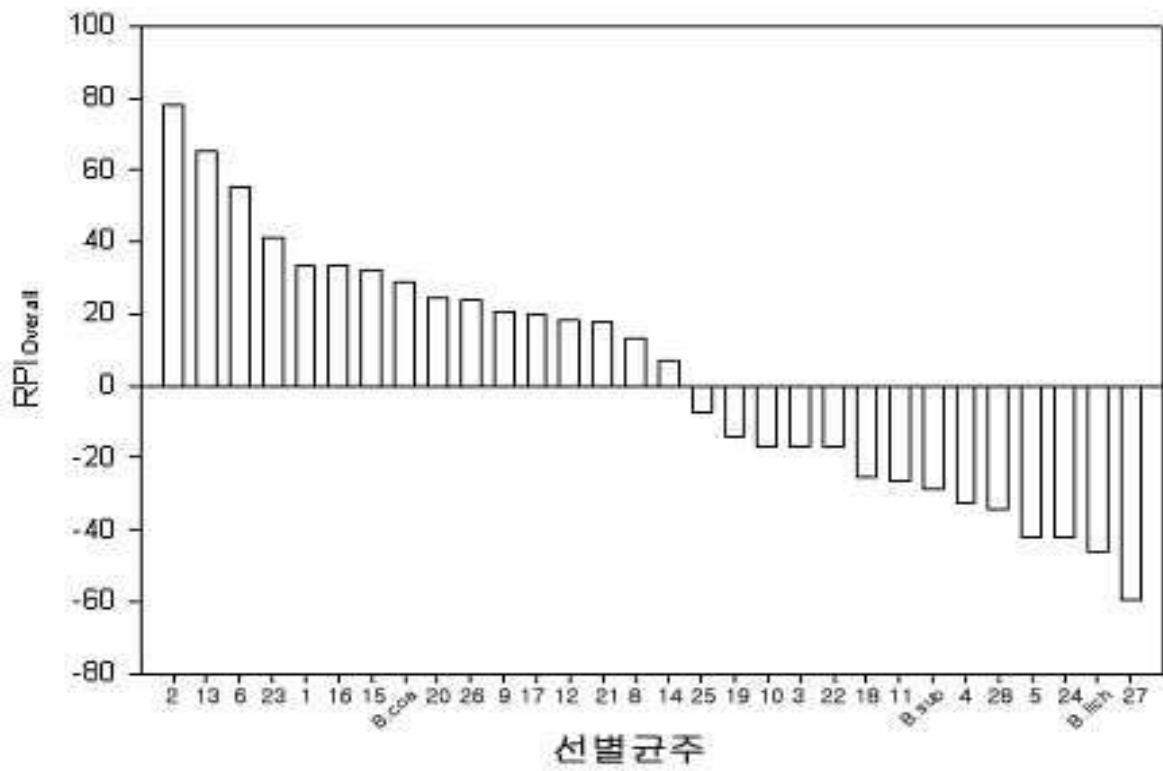
도면3b



도면3c



도면3d



도면4

LS1-2 16s 서열 데이터

5'-

AAGCGTTGTCCCGGAATTATTGGGCGCTAAAGGGGCTCGCAGGCCGGTTTCTTAAGT
CTGAATTTGAAAGCCCCCGGCTCAACCCCCAGGGTCATTGGAAACTGGGGAACTT
GAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAATTCCACGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGAGATG
TGAAACCCAGTGGCGAAGGCGACTCTCTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGAGCGA
AAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATAACCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATG
AGTGCTAAGTGTTAGGGGGTTCGCCCCCTTAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCA
CTCCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGACTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCC
CGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCA
GGTCTTGACATCCTCTGACAATCCTAGAGATAGGACGNTCCCTTCGGGGGCAGAGT
GACAGGTGGTGCATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTAAAGCCCC
GCAACGAGCGCAACCCCTTGATCTTAGTTGCCAGCATTGAGTTGGGCACCTTAAGGT
GACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCC
TTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGACAGAACAAAGGGCAGCGAAACC
GCGAGGTAAAGCCAATCCACAAATCTGTTCTCAGTTCGGATCGCAGTCTGCAACT
CGACTGCGTGAAGCTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAAT
ACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCACGAGAGTTTGTAACACCCG
AAGTCGGTGAGGTAACCTTTATGGAGCCAGCCGCCGAAGGTGGGACAGGTATTGG
GGTGAAGTCGTAACAAGGTAGCCGTATCGGAAGGTGC-3'

Blast results (LS1-2)

☐ [gi|161744005|gb|AY952473.1|](#) Bacillus subtilis strain P40 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
Length = 1535

Score = 1727 bits (871), Expect = 0.0
Identities = 965/965 (97%), Gaps = 10/965 (1%)
Strand = Plus / Plus

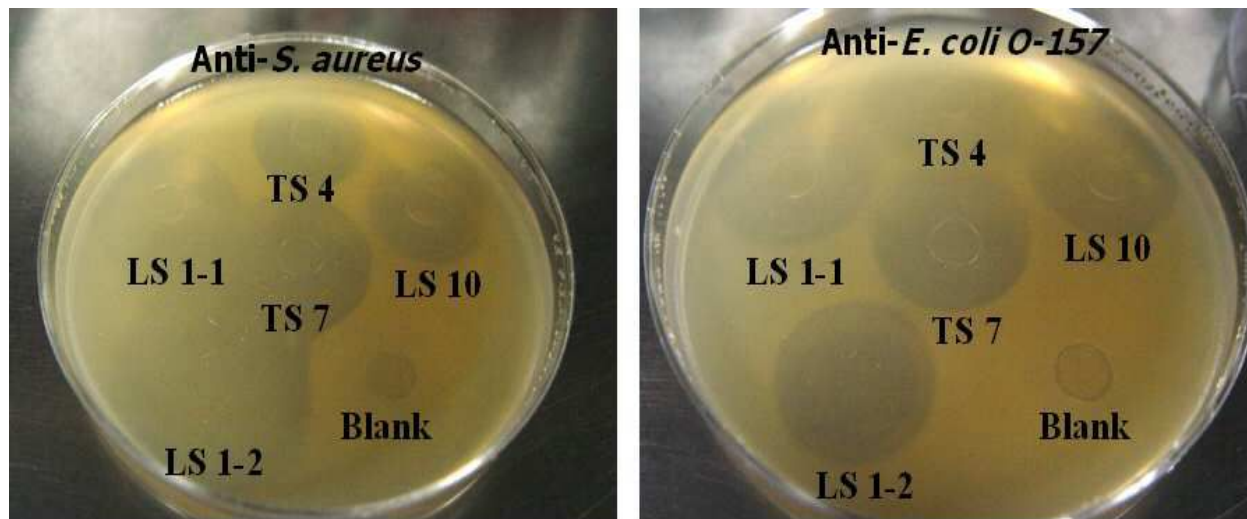
☐ [gi|47834652|gb|AY553098.1|](#) Bacillus subtilis strain M05 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
Length = 1506

Score = 1741 bits (878), Expect = 0.0
Identities = 966/984 (98%), Gaps = 10/984 (1%)
Strand = Plus / Plus

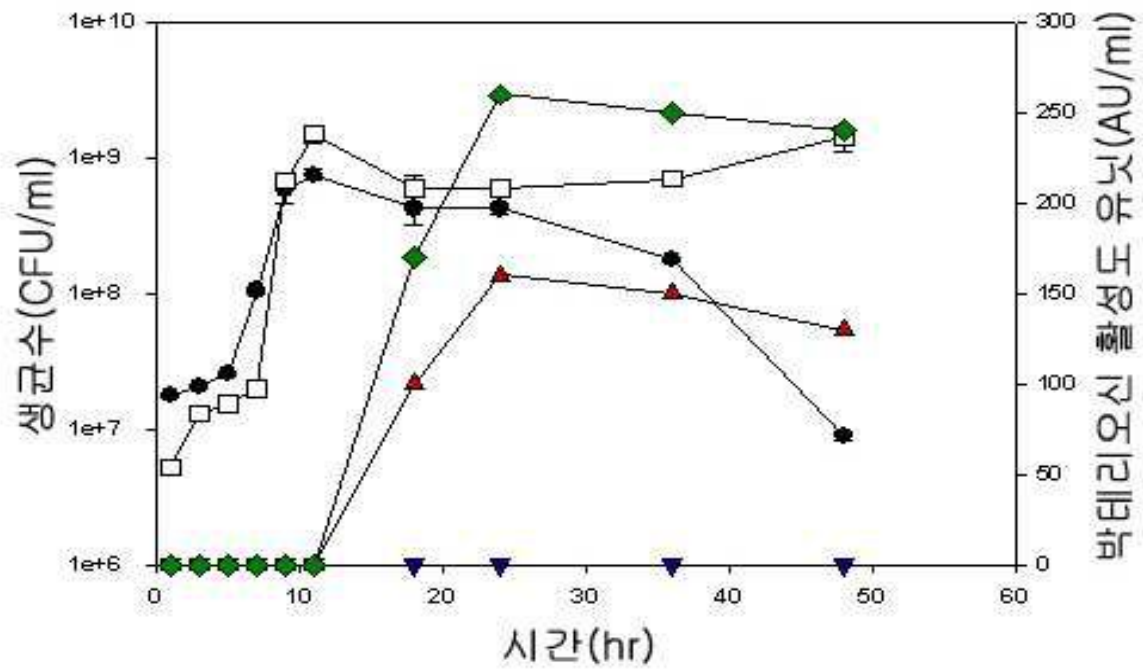
☐ [gi|47834651|gb|AY553097.1|](#) Bacillus subtilis strain M04 16S ribosomal RNA gene, partial sequence
Length = 1504

Score = 1739 bits (877), Expect = 0.0
Identities = 965/983 (98%), Gaps = 10/983 (1%)
Strand = Plus / Plus

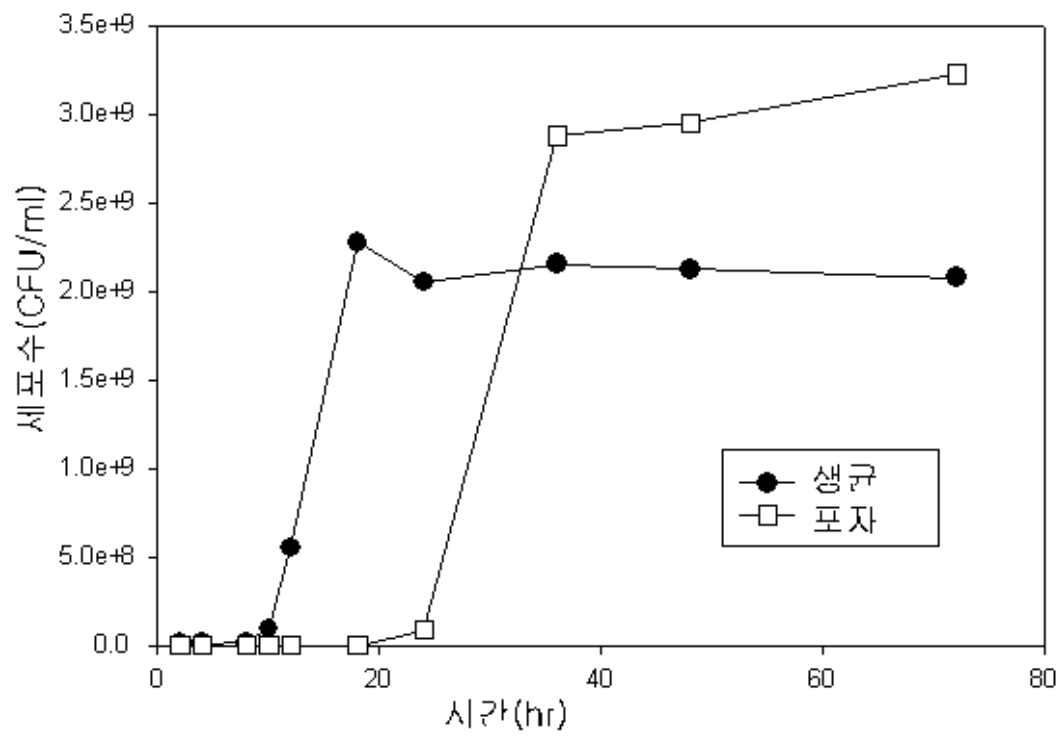
도면5



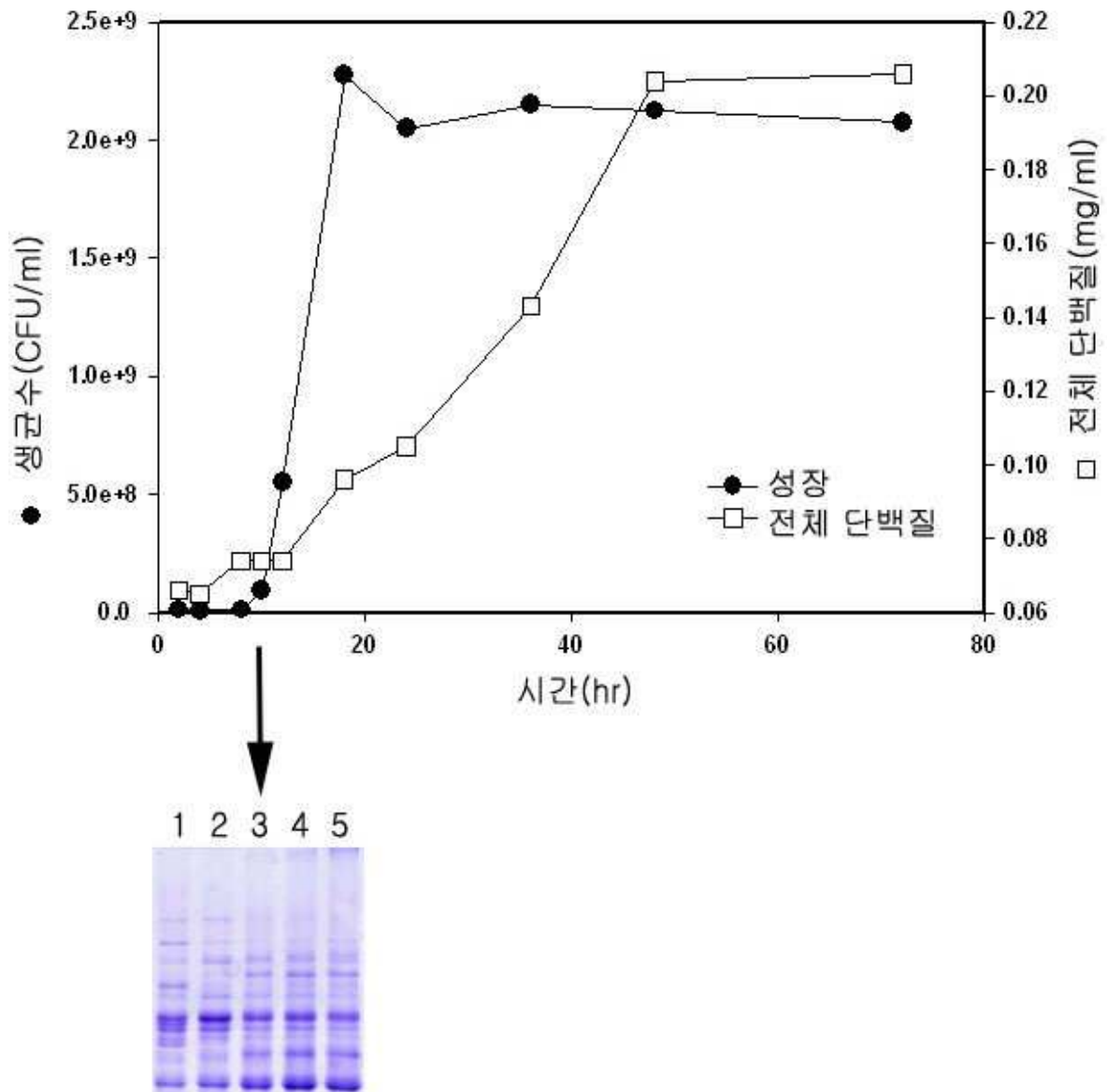
도면6



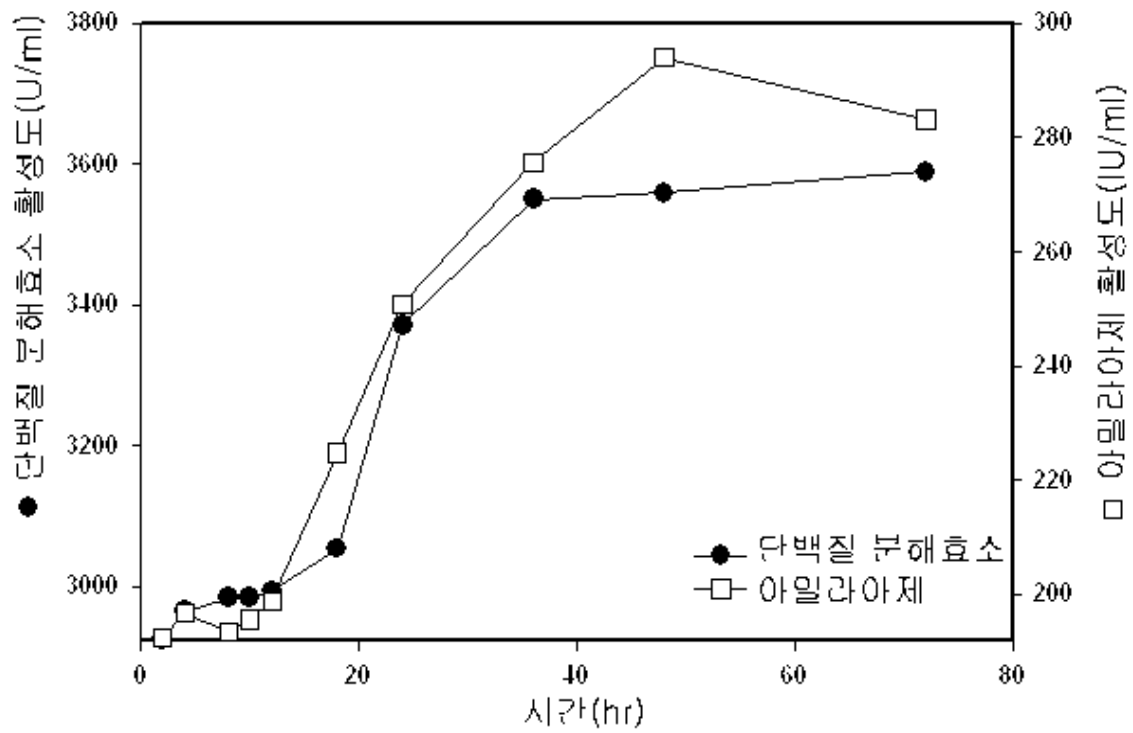
도면7



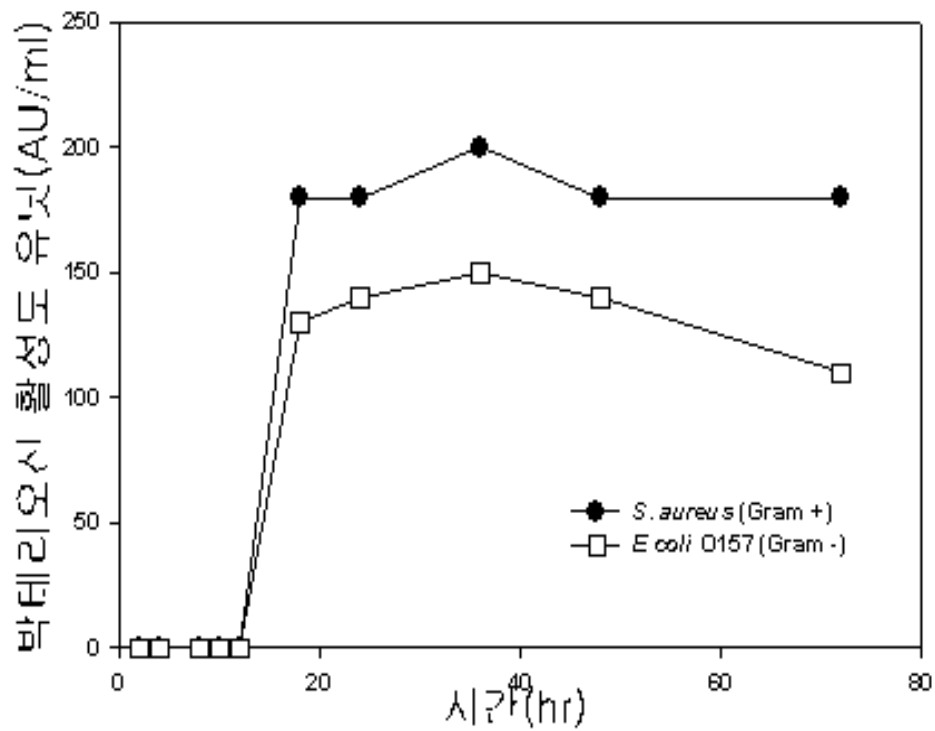
도면8



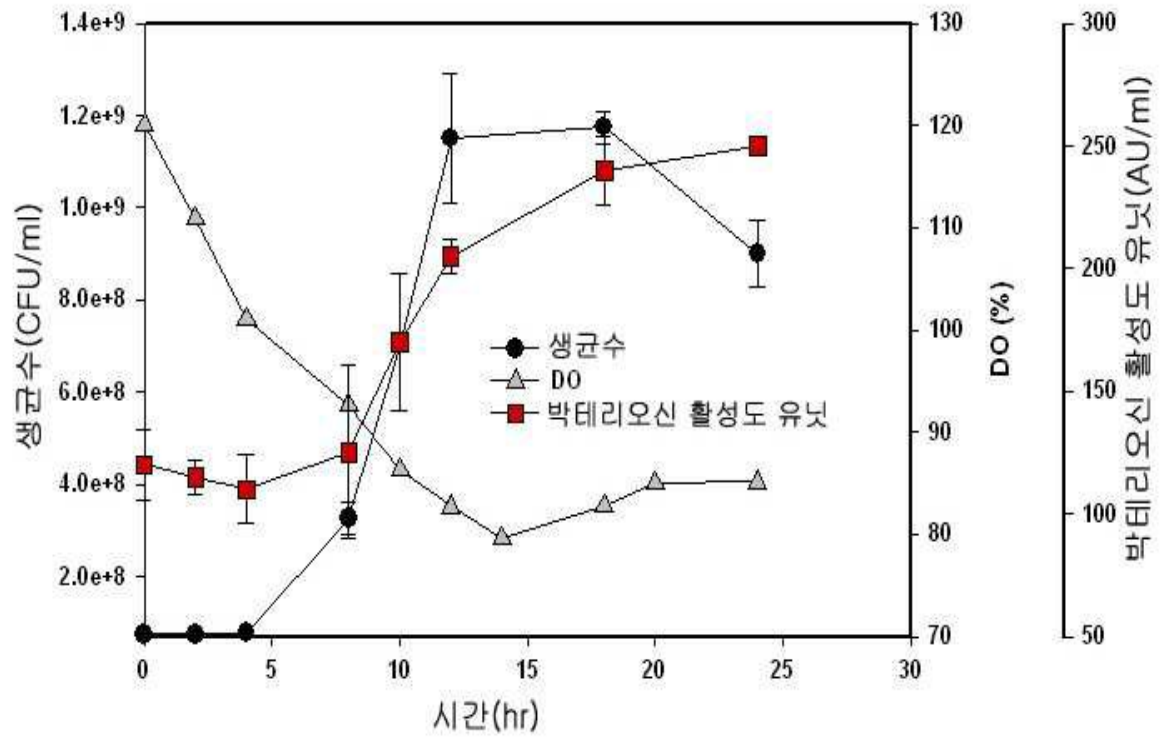
도면9



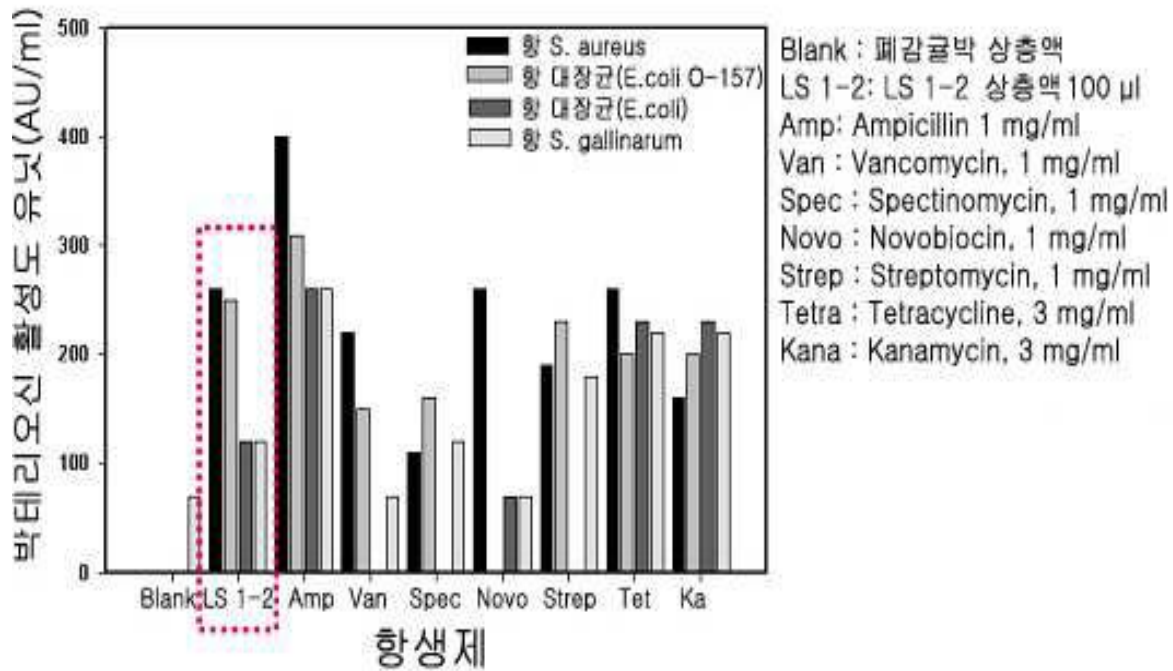
도면10



도면11



도면12



서열목록

- <110> Inha University Industry Foundation
- <120> A novel strain of Bacillus sp. LS 1-2 that growing in citrus waste and the production method of antibiotic probiotics using the same
- <130> 6p-03-02
- <160> 1
- <170> Kopatent In 1.71
- <210> 1
- <211> 980
- <212> DNA
- <213> 16S rRNA of LS 1-2
- <400> 1
 aagcgttgtc ccggaattat tgggccgtaa agggctcgca ggccggtttc ttaagtctga

atttgaaagc cccccggtc aacccccagg gtcattggaa actggggaac ttgagtgcag	120
aagaggagag tggaattcca cgtgtagcgg tgaatgcgt agagatgtgg aaaccagtg	180
gcgaaggcga ctctctggtc tgtaactgac gctgaggagc gaaagcgtgg ggagcgaaca	240
ggattagata ccctggtagt ccacgccgia aacgatgagt gctaagtgtt agggggtttc	300
cggcccttag tgctgcagct aacgcattaa gcactccgcc tggggagtac ggtcgcaaga	360
ctgaaactca aaggaattga cgggggcccc cacaagcggg ggagcatgtg gtttaattcg	420
aagcaacgcg aagaacctta ccaggtcttg acatcctctg acaatcctag agataggacg	480
ntcccttcgg gggcagagtg acaggtggtg catggttctg gtcagctcgt gtcgtgagat	540
gttgggttaa gccccgaac gagcgcaacc ctgatctta gttgccagca ttcagttggg	600
cactctaagg tgactgccgg tgacaaaccg gaggaagggt gggatgacgt caaatcatca	660
tgcccttat gacctgggt acacacgtgc tacaatggac agaacaaagg gcagcgaac	720
cgcgaggtta agccaatccc acaaactctg tctcagttcg gatcgagtc tgcaactcga	780
ctgcgtgaag ctggaatcgc tagtaatcgc ggatcagcat gccgcggtga atacgttccc	840
gggccttgta cacaccgccc gtcacaccac gagagtttgt aacaccgaa gtcggtgagg	900
taacctttat ggagccagcc gccgaagggt ggacaggtat tggggtgaag tcgtaacaag	960
gtagccgtat cggaagggtc	980