



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2016-0035454
(43) 공개일자 2016년03월31일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12N 1/20 (2006.01) *A23L 33/00* (2016.01)

A61K 8/99 (2006.01) *A61P 29/00* (2006.01)

C12R 1/24 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2014-0127085

(22) 출원일자 2014년09월23일

심사청구일자 2014년09월23일

(71) 출원인

경희대학교 산학협력단

경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경희대학교 국제캠퍼스내)

(72) 발명자

이태후

서울특별시 강남구 논현로 807 (신사동)

원경화

경기도 수원시 팔달구 고화로52번길 19-4 (고등동)

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

안소영

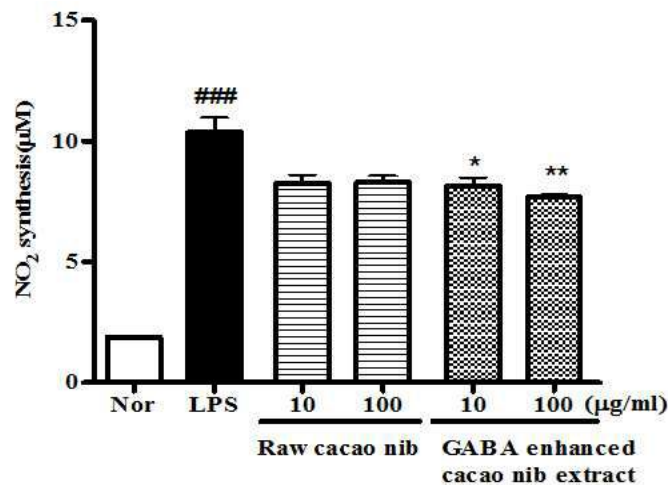
전체 청구항 수 : 총 9 항

(54) 발명의 명칭 신종균 락토바실러스 브레비스 THK-734 및 이를 이용한 GABA 생산 방법

(57) 요약

본 발명은 신종균 락토바실러스 브레비스 THK-734(*Lactobacillus brevis* THK-734) 및 이를 이용하여 GABA를 생산하는 방법에 관한 것이다. 본 발명의 균주를 이용하면 효율적으로 다량의 GABA를 함유하는 배양물을 얻을 수 있으며, 상기 배양물은 항염 효과가 우수하고 세포 독성이 낮아 안전하므로 식품 조성물 및 화장품 조성물로 유용하게 사용될 수 있다.

대표도 - 도6



(72) 발명자

양정은

경기도 용인시 기흥구 흥덕4로30번길 28-14 (영덕동)

송현근

인천광역시 남구 수봉북로12번길 24 (도화동)

박용진

경기도 화성시 영통로61번길 10, 108동 1601호 (반월동, 신영통현대1차아파트)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 N019400021

부처명 산업통상자원부

연구관리전문기관 한국산업기술진흥원(Kiat)

연구사업명 산업융합기반구축사업

연구과제명 천연물 의약·소재 개발 및 표준화 지원 사업

기 여 율 1/1

주관기관 경희대학교 산학협력단

연구기간 2013.11.01 ~ 2018.08.31

명세서

청구범위

청구항 1

락토바실러스 브레비스 THK-734(*Lactobacillus brevis* THK-734)(수탁번호 KCTC 12637BP).

청구항 2

락토바실러스 브레비스 THK-734(수탁번호 KCTC 12637BP) 균주를 이용하여 글루탐산으로부터 GABA를 생산하는 방법.

청구항 3

제2항에 있어서, 상기 균주는 덱스트로스(dextrose) 및 효모 추출물(yeast extract)을 포함하는 배지에서 배양되는 방법.

청구항 4

제2항에 있어서, 상기 배지에 상기 덱스트로스는 1 내지 3 %, 상기 효모 추출물은 0.1 내지 3 % (w/v) 포함되는 방법.

청구항 5

제2항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 균주는 28 내지 32 °C에서 배양되는 방법.

청구항 6

락토바실러스 브레비스 THK-734(수탁번호 KCTC 12637BP) 균주의 배양물을 포함하는 식품 조성물.

청구항 7

락토바실러스 브레비스 THK-734(수탁번호 KCTC 12637BP) 균주의 배양물을 포함하는 화장료 조성물.

청구항 8

제6항 또는 제7항에 있어서, 상기 조성물은 염증의 예방 또는 개선용인 조성물.

청구항 9

제6항 또는 제7항에 있어서, 상기 락토바실러스 브레비스 THK-734(수탁번호 KCTC 12637BP) 균주의 배양물은 카카오닙 추출물과 락토바실러스 브레비스 THK-734(수탁번호 KCTC 12637BP) 균주를 함께 배양하여 얻은 배양물인 조성물.

발명의 설명

기술분야

[0001]

본 발명은 신종균 락토바실러스 브레비스 THK-734(*Lactobacillus brevis* THK-734) 및 이를 이용하여 GABA를 생산하는 방법에 관한 것이다.

배경기술

[0002]

γ -아미노부티르산(γ -aminobutyric acid, 이하 GABA)은 비-단백질 아미노산의 일종이다. GABA는 포유류의 중추 신경계에서 주된 억제성 신경전달물질이다. GABA는 항우울 효과, 진정 효과, 이뇨 효과가 있는 것으로 보고된 바 있으며, 간질, 파킨슨병, 알츠하이머병, 헌팅턴병 등의 신경학적 질환에 효과가 있는 것으로 보고된 바 있다. 0.3 내지 300 mg/kg의 GABA를 장기적으로 섭취한 고혈압 동물 모델 랫트에서 수축기 혈압이 낮아졌다는 연구 결과도 있다. 이에 GABA 자체가 영양제로서 판매되고 있으며, GABA 함량을 증가시킨 쌀, 치즈 등이 개발되

어 판매되고 있다. 또한 GABA를 포함하고 있는 화장품은 기능성 화장품으로서 고가에 판매되고 있는 실정이다.

[0003] GABA는 화학적 또는 생화학적 방법으로 합성할 수 있다. 생화학적 방법은 반응이 간단하고 효소 효율이 높기 때문에 화학적 방법보다 유리하다. 따라서 다양한 생화학적 방법이 연구되어 왔다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0004] 본 발명은 신종균인 락토바실러스 브레비스 THK-734 및 이를 이용하여 글루탐산으로부터 GABA를 생산하는 방법을 제공하고자 한다.

[0005] 본 발명은 상기 균주의 배양물을 포함하는 약학적 조성물, 식품 조성물, 및 화장품 조성물을 제공하고자 한다.

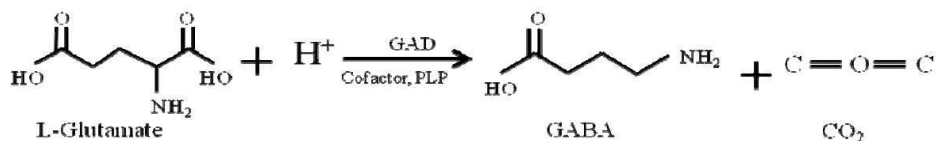
과제의 해결 수단

[0006] 상기 과제를 달성하기 위하여, 본 발명은 신종균인 락토바실러스 브레비스 THK-734(수탁번호 KCTC 12637BP)를 제공한다.

[0007] 락토바실러스 속은 당류를 발효하여 에너지를 획득하고 다량의 유산(lactic acid)을 생성하는 균으로서, 운동성이 없는 그람 양성균의 간균이다.

[0008] 본 발명은 상기 균주를 이용하여 글루탐산으로부터 GABA를 생산하는 방법을 제공한다.

[0009] GABA의 생화학적 합성은 하기와 같이 L-글루탐산이 글루타메이트 탈카복실화 효소(Glutamate Decarboxylase, GAD)에 의해 탈카복실화되는 한 단계의 반응으로 이루어진다.



[0010] 본 발명의 락토바실러스 브레비스 THK-734는 우수한 효율로 글루탐산을 저분자화하여 GABA를 생산할 수 있다.

[0012] 본 발명자들은 상기 락토바실러스 브레비스 THK-734의 최적 배양 배지를 연구한 결과 텍스트로스 및 효모 추출물을 포함하는 배지에서 세포 성장 및 GABA 생산이 모두 우수하게 나타남을 확인하였으며, 바람직하게는 텍스트로스 1 내지 3 %, 효모 추출물 0.1 내지 3 %, 보다 바람직하게는 텍스트로스 2 %, 효모 추출물 0.5 % (w/v)를 포함하는 배지에서 락토바실러스 브레비스 THK-734의 세포 성장 및 GABA 생산이 최대가 됨을 확인하였다. 그러나 본 발명의 락토바실러스 브레비스 THK-734가 배양될 수 있는 배지는 이에 제한되지 않는다.

[0013] 본 발명의 다른 구현예로서, 상기 방법은 상기 균주를 28 내지 34 ℃에서, 바람직하게는 29 내지 32 ℃에서, 가장 바람직하게는 30 ℃에서 배양하여 수행될 수 있다. 그러나 배양 온도는 이에 제한되지 않는다.

[0014] 본 발명의 다른 구현예로서, 상기 방법은 상기 균주를 1일 내지 20일 동안, 바람직하게는 5 내지 10일 동안, 더욱 바람직하게는 5일 동안 배양하여 수행될 수 있다. 그러나 배양 기간은 이에 제한되지 않는다.

[0015] 또한 본 발명은 락토바실러스 브레비스 THK-734의 배양물을 포함하는 식품 조성물을 제공한다.

[0016] 또한 본 발명은 락토바실러스 브레비스 THK-734의 배양물을 포함하는 화장품 조성물을 제공한다.

[0017] 상기 락토바실러스 브레비스 THK-734의 배양물은 락토바실러스 브레비스 THK-734와 함께 배양한 물질을 의미한다.

[0018] 본 발명의 일 구현예로서, 상기 락토바실러스 브레비스 THK-734의 배양물은 카카오닙 추출물을 포함하는 배지에서 락토바실러스 브레비스 THK-734를 배양한 것으로서, 카카오닙 추출물 및 GABA를 함유하는 것을 의미한다. 상기 카카오닙 추출물은 카카오 분말을 열수 추출한 후 여과하여 제조한 것일 수 있으나, 추출 방법은 이에 제한되지 않는다.

[0019] 상기 배양물은 이에 제한되지 않으며, 카카오닙 추출물 외에 다른 재료를 포함하는 경우도 이에 해당된다.

- [0020] 본 발명의 일 구현예로서, 상기 배양물은 상기 균주를 28 내지 34 ℃에서, 바람직하게는 29 내지 32 ℃에서, 가장 바람직하게는 30 ℃에서 배양하여 얻은 배양물일 수 있다. 그러나 배양 온도는 이에 제한되지 않는다.
- [0021] 본 발명의 다른 구현예로서, 상기 배양물은 상기 균주를 1일 내지 20일 동안, 바람직하게는 5 내지 10일 동안, 더욱 바람직하게는 5일 동안 배양하여 얻은 배양물일 수 있다. 그러나 배양 기간은 이에 제한되지 않는다.
- [0022] 상기 락토바실러스 브레비스 THK-734의 배양물에는 GABA가 다량 함유되어 있다. 그러나 GABA의 함량은 이에 제한되지 않는다.
- [0023] 본 발명의 락토바실러스 브레비스 THK-734의 배양물은 식품 조성물 및 화장료 조성물에 적용될 수 있다. 본 발명의 용도, 조성물, 방법에서 언급된 사항은 서로 모순되지 않는 한 동일하게 적용된다. 이하 본 발명을 상세히 설명한다.
- [0024] **식품 조성물**
- [0025] 본 발명의 식품 조성물은 THK-734의 배양물을 포함한다.
- [0026] 유효성분의 함량은 사용 목적(예방, 또는 치료적 처치)에 따라 적절하게 결정될 수 있다. 본 발명의 조성물 중 THK-734의 배양물은, 조성물 총 중량에 대하여 0.1 내지 60 중량%로 함유될 수 있으며, 바람직하게는 10 중량%로 함유될 수 있다. 그러나 함량은 이에 제한되지 않는다.
- [0027] 또한, 상기 식품의 종류에는 특별한 제한이 없다. 본 발명의 식품 조성물을 첨가할 수 있는 식품의 예로는 정제, 캡슐, 분말, 과립, 액상, 환, 드링크제 등이 있으며, 통상적인 의미에서의 건강기능식품을 모두 포함한다.
- [0028] 본 발명의 식품 조성물을 정제로 제조하는 경우, THK-734의 배양물과 부형제, 결합제, 붕해제, 및 다른 첨가제와의 혼합물을 통상의 방법으로 과립화한 다음, 활택제 등을 넣어 압축성형하거나, 상기 혼합물을 직접 압축성형할 수 있다. 또한, 상기 정제 형태의 건강기능식품은 필요에 따라 교미제 등을 함유할 수 있으며, 필요에 따라 적당한 제피제로 제피할 수도 있다.
- [0029] 본 발명의 식품 조성물을 음료 형태로 제조하는 경우, 통상의 음료와 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다. 상기 천연 탄수화물의 예로는 모노사카라이드, 예를 들어, 포도당, 과당 등; 디사카라이드, 예를 들어 말토스, 수크로스 등; 및 폴리사카라이드, 예를 들어 텍스트린, 시클로텍스트린 등과 같은 통상적인 당, 및 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알콜이다. 또한, 상술한 것 이외의 향미제(사카린, 아스파르탐 등)를 사용할 수 있다.
- [0030] 본 발명의 식품 조성물은 여러 가지 영양제, 비타민, 광물(전해질), 합성 풍미제 및 천연 풍미제 등의 풍미제, 착색제 및 증진제(치즈, 초콜릿 등), 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알코올, 탄산음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다.
- [0031] 본 발명의 식품 조성물은 염증을 개선 또는 치료하기 위하여 단독으로, 또는 수술, 호르몬 치료, 화학 치료 및 생물학적 반응 조절제를 사용하는 방법들과 병용하여 사용할 수 있다.
- [0032] **화장료 조성물**
- [0033] 본 발명은 THK-734의 배양물을 포함하는 화장료 조성물을 제공한다.
- [0034] 본 명세서에서 '화장료'란 화장품 또는 의약외품이 될 수 있는 물질을 말한다.
- [0035] 화장품이란 인체를 청결·미화하여 매력을 더하고 용모를 밝게 변화시키거나 피부·모발의 건강을 유지 또는 증진하기 위하여 인체에 사용되는 물품으로서 인체에 대한 작용이 경미한 것을 말한다. 또한 기능성화장품이란 피부의 미백에 도움을 주거나, 피부의 주름개선에 도움을 주거나, 자외선으로부터 피부를 보호하는데 도움을 주는 제품으로 보건복지가족부령이 정한 것을 포함하며, 피부를 개선시켜주는 모든 것을 통칭한다.
- [0036] 의약외품은 질병을 치료하거나 예방하기 위해 쓰는 의약품보다는 인체에 대한 작용이 경미한 물품에 대해 보건복지부가 따로 정한 분류 기준에 의한 약품을 지칭한다. 약사법에 따르면 의약품의 용도로 사용되는 물품을 제외한 것으로, 사람·동물의 질병 치료나 예방에 쓰이는 섬유·고무 제품, 인체에 대한 작용이 경미하거나 직접 작용하지 않으며, 기구 또는 기계가 아닌 것과 이와 유사한 것, 감염병을 막기 위한 살균·살충제 등이 포함된다. 의약외품의 대표적인 예로는 치약, 기능성 비누, 기능성 샴푸 등이 있다.

[0037] 유효성분의 함량은 사용 목적(예방, 또는 치료적 처치)에 따라 적합하게 결정될 수 있다. 본 발명의 조성물 중 THK-734의 배양물은, 조성물 총 중량에 대하여 0.1 내지 60 중량%, 바람직하게는 10 중량%로 함유될 수 있다. 그러나 함량은 이에 제한되지 않는다.

[0038] 본 발명의 화장료 조성물은 상기 성분과 더불어 필요에 따라 통상 화장료에 배합되는 다른 성분과 배합될 수 있다. 예를 들면, 안정화제, 용해화제, 비타민, 안료 및 향료와 같은 통상적인 보조제 및 담체를 포함할 수 있다.

[0039] 또한, 본 발명의 조성물은 본 발명의 화장료 조성물은 업계에서 통상적으로 제조되는 어떠한 제형으로도 제조될 수 있으며, 예를 들어, 유액, 현탁액, 크림, 화장수, 에센스, 팩, 젤, 파우더, 립스틱, 메이크업 베이스, 파운데이션, 로션, 연고, 패취, 미용액, 클렌징폼, 클렌징크림, 클렌징워터, 바디로션, 바디크림, 바디오일, 바디에센스, 샴푸, 린스, 바디세정제, 비누, 및 분무제에서 선택된 제형인 것일 수 있다.

[0040] 이들 제형의 제조방법은 통상의 화장료 제형의 제조방법에 따라 제조될 수 있다.

[0041] 개선 또는 치료방법

[0042] 본 발명은 또한 사람 또는 그 외 동물에게 치료학적으로 유효한 양의 THK-734의 배양물을 투여하여 염증을 예방, 개선 또는 치료하는 방법을 제공한다.

[0043] 여기에서 사용된 "치료학적으로 유효한 양"은 연구자, 의사, 의사 또는 기타 임상의에 의해 생각되는 동물 또는 인간에서 생물학적 또는 의학적 반응을 유도하는 활성 성분 또는 약학적 조성물의 양을 의미하는 것으로, 이는 치료되는 질환 또는 장애의 증상 완화를 유도하는 양을 포함한다. 본 발명의 유효 성분(들)에 대한 치료상 유효 투여량 및 투여횟수는 원하는 효과에 따라 변화될 것임은 당업자에게 자명하다.

발명의 효과

[0044] 본 발명의 신종균 락토바실러스 브레비스 THK-734는 글루탐산을 효과적으로 저분자화하여 GABA를 생산할 수 있다. 상기 균주의 배양물은 항염증 효과가 우수하고 세포독성이 낮아 안전성이 높으므로 식품 조성물 및 화장료 조성물로서 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0045] 도 1은 락토바실러스 브레비스 THK-734의 16s rRNA 서열이다.

도 2는 상기 THK-734의 배양에 적합한 탄소원을 선발하고, 그 중 텍스트로스의 최적의 농도를 확인한 도이다.

도 3은 상기 THK-734의 배양에 적합한 질소원을 선발하고, 그 중 효모 추출물의 최적의 농도를 확인한 도이다.

도 4는 온도를 변화시켜 가며 THK-734의 세포 성장 및 GABA 생산을 관찰한 도이다.

도 5는 시간 경과에 따라 THK-734의 세포 성장 및 GABA 생산을 관찰하고 pH의 변화를 확인한 도이다.

도 6은 THK-734과 함께 배양한 카카오닙 추출물의 항염증 효과를 확인한 도이다.

도 7은 THK-734과 함께 배양한 카카오닙 추출물의 세포독성을 확인한 도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0046] 이하, 본 발명을 실시예를 통하여 더욱 상세히 설명한다. 그러나 이들 실시예는 본 발명을 예시하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들에 한정되는 것은 아니다.

[0047] 실시예 1. 신종균의 분리 및 동정

[0048] 김치를 분쇄한 후 식염수에 희석하고, 이로부터 신종균을 분리하고 GABA 생산성이 현저히 우수한 균주를 선발하였다. 상기 균주를 락토바실러스 브레비스 THK-734(Lactobacillus brevis THK-734, 이하 THK-734)으로 명명하였다. 상기 THK-734를 한국 생명공학연구원에 기탁하였다(수탁번호 KCTC 12637BP). 한편 THK-734의 16s rRNA 서열은 서열번호 1로 표시하였고, 도 1에 나타내었다.

[0049] THK-734의 일반적인 특성에 대해서는 하기 표 1에 나타내었다.

[표 1]

Characteristics	<i>Lactobacillus brevis</i> THK-D437
Source	Kimchi
Gram	+
Catalase	—
Motility	—
Morphology	rod
Peptidoglycantype	A4α (L-Lys-D-Asp) type
Ratio of D- to L-lactic acid	4:6
Growth NaCl range (%)	0-7 (optimum 4-6)
Growth temperature (°C):	4-40 (optimum 30-35)
Growth pH	4.5-7.5 (optimum 5.0-6.5)

또한 API kit (50CHL 및 Zym, Biomrieux Co., France)를 이용하여 생화학적 특성을 관찰하였다. 관찰된 특성에 대해서는 하기 표 2에 정리하였다.

[표 2]

API 50CH					
Glycerol	Erythritol	D-Arabinose	L-Arabinose	D-Ribose	
—	—	—	+	+	
Methyl-β-D-Xylose	D-Galactose	D-Glucose	D-Fructose	D-Mannose	
+	w	w	w	—	
Inositol	Mannitol	Sorbitol	Esculin	Inulin	
—	w	—	—	—	
Methyl-α-D-Mannopyranoside	Salicin	Cellobiose	Maltose	Lactose	
—	—	—	w	—	
Methyl-α-D-Glucopyranoside	Melezitose	Raffinose	Starch	Glycogen	
+	—	—	—	—	
N-Acetyl-Glucosamine	D-Tagatose	D-Fucose	L-Fucose	D-Arabitol	
—	—	—	—	—	
5-Ketogluconate	D-Xylose	L-Xylose	D-Adonitol	L-Sorbose	
—	+	—	—	—	
Rhamnose	Dulcitol	D-Lyxose	Amygdalin	Arbutin	
—	—	—	—	—	
Melibiose	Sucrose	Trehalose	Xylitol	Gentiobiose	
w	—	—	—	—	
2-Ketogluconate	L-Arabitol	Gluconate	D-Turanose		
w	—	—	—		
API ZYM					
Alkaline phosphatase	Leucine arylamidase	Esterase (C8)	Lipase	Lipase (C14)	Esterase (C4)
—	+	+		+	+
Valine arylamidase	Crystine arylamidase	Trypsin		α-chymotrypsin	Acid phosphatase
+	+	w		w	+
Naphtol-AS-BI-phosphohydrolase	α-galactosidase	β-galactosidase		β-glucuronidase	α-glucosidase
—	+	+		+	+
N-acetyl glucosaminidase	β-glucosidase	α-mannosidase		α-fucosidase	
+	—	—		—	

실시에 2. THK-734의 최적 배양 배지의 확인

2-1. 탄소원에 따른 GABA 생산 확인

어떤 물질이 본 발명의 THK-734의 성장에 유리한 탄소원인지 확인하기 위하여 하기의 실험을 수행하였다.

덱스트로스, 말토스, 녹말, 수크로스를 각각 2%(w/v) 포함하는 배지를 준비하고, 각각의 배지에 THK-734를 접종하고 배양하였다. 그 후 600 nm에서 흡광도를 측정하여 세포 성장을 관찰하고 GABA 생산량을 측정하였다.

결과는 도 2A에 나타내었다. 도 2A에서 덱스트로스를 사용한 경우에 세포 성장 및 GABA 생산이 모두 높게 나타남을 알 수 있다(검은 막대는 세포 성장, 빗금 막대는 GABA 생산을 의미).

구체적으로 세포 성장 및 GABA 생산이 가장 우수한 덱스트로스 농도를 확인하기 위하여, 덱스트로스를 0, 0.5, 1, 1.5, 2, 3 %(w/v) 포함하고, 그 외에 우육 추출물(beef extract) 1%, 효모 추출물 0.5%, 망간 설페이트 0.005%, MSG 1%를 포함하는 배지를 준비하고, 각각의 배지에 THK-734를 접종하고 배양하였다. 그 후 600 nm에서 흡광도를 측정하여 세포 성장을 관찰하고 GABA 생산량을 측정하였다.

결과는 도 2B에 나타내었다. 도 2B에서 덱스트로스 농도가 2%일 때 세포 성장 및 GABA 생산이 가장 높게 나타남을 알 수 있다(검은 막대는 세포 성장, 빗금 막대는 GABA 생산을 의미).

2-2. 질소원에 따른 GABA 생산 확인

어떤 물질이 본 발명의 THK-734의 성장에 유리한 탄소원인지 확인하기 위하여 하기의 실험을 수행하였다.

펩톤, 우육 추출물, 트립톤, 소이톤, 효모 추출물을 각각 2.5%(w/v) 포함하는 배지를 준비하고, 각각의 배지에 THK-734를 접종하고 배양하였다. 그 후 600 nm에서 흡광도를 측정하여 세포 성장을 관찰하고 GABA 생산량을 측

정하였다.

[0065] 결과는 도 3A에 나타내었다. 도 3A에서 효모 추출물을 사용한 경우에 세포 성장 및 GABA 생산이 모두 현저히 높게 나타남을 알 수 있다(검은 막대는 세포 성장, 빗금 막대는 GABA 생산을 의미).

[0066] 구체적으로 세포 성장 및 GABA 생산이 가장 우수한 효모 추출물 농도를 확인하기 위하여, 효모 추출물을 각각 0, 0.5, 1, 1.5, 2, 3 %(w/v) 포함하고, 그 외에 우육 추출물(beef extract) 1%, 효모 추출물 0.5%, 망간 설페이트 0.005%, MSG 1%를 포함하는 배지를 준비하고, 각각의 배지에 THK-734를 접종하고 배양하였다. 그 후 600 nm에서 흡광도를 측정하여 세포 성장을 관찰하고 GABA 생산량을 측정하였다.

[0067] 결과는 도 3B에 나타내었다. 도 3B에서 효모 추출물 농도가 0.5%일 때 세포 성장 및 GABA 생산이 모두 높게 나타남을 알 수 있다(검은 막대는 세포 성장, 빗금 막대는 GABA 생산을 의미).

[0068] 실시예 3. THK-734의 최적 배양 온도 및 시간 확인

[0069] 3-1. 최적 배양 온도 확인

[0070] THK-734의 최적 배양 온도를 확인하고자, 온도를 변화시켜 가며 배양 시간에 따라 세포 성장 정도 및 GABA 생산량을 관찰하였다.

[0071] 텍스트로스 2% 및 효모 추출물 0.5%(w/v)을 포함하는 배지에 THK-734를 접종하고, 각각 20 °C, 30 °C, 37 °C의 온도에서 THK-734를 성장시키고, 600 nm에서 흡광도를 측정하여 세포 성장을 관찰하고 GABA 생산량을 측정하였다.

[0072] 결과는 도 4에 나타내었다. 도 4에서 30 °C에서 배양한 경우에 세포 성장 및 GABA 생산이 모두 높게 나타남을 알 수 있다.

[0073] 3-2. 최적 배양 시간 및 배양 시간에 따른 pH 변화 확인

[0074] THK-734의 최적 배양 시간을 확인하고자, 텍스트로스 2% 및 효모 추출물 0.5%(w/v)을 포함하는 배지에 THK-734를 접종하고, 배양 시간에 따라 세포 성장 정도 및 GABA 생산량을 관찰하고, 또한 시간 경과에 따른 pH의 변화를 관찰하였다.

[0075] 결과는 도 5에 나타내었다. 도 5에서 사각형은 균주의 성장을 나타내며, 삼각형은 pH, 원은 GABA 생산을 나타낸다.

[0076] 도 5에서 배양 후 24시간이 지난 후부터 GABA 생산이 활발하게 일어났으며, 72시간까지 GABA 생산이 급격하게 증가하였다. 그 후에는 GABA의 생산이 거의 일어나지 않았다.

[0077] 배양 배지의 pH는 초기에 약 pH 6.0에서 THK-734가 증식하는 기간에는 pH 4.2까지 감소하였다가 GABA 생산이 종료된 시점인 72시간 이후에는 pH 4.5로 소폭 상승하였다.

[0078] 세포 성장은 배양 초기 24시간까지 일어났으며, GABA가 활발히 생산되기 시작한 24시간 이후에는 추가적인 세포 성장이 거의 일어나지 않았다.

[0079] 실시예 4. THK-734에 의해 GABA 함량이 증가한 카카오닙 추출물의 효과 확인

[0080] 4-1. 카카오닙 THK-734 배양물 제조

[0081] 가나산(카카오 씨를 자연발효하여 로스팅한 후 껍질을 제거하여 분쇄한 카카오닙)을 구매하여 이를 액체질소로 급냉하여 막자사발로 분쇄하여 카카오 분말을 제조하였다. 카카오 분말에 10배 중량의 물을 넣고 121도에서 30분간 1차 열수추출한 후, 80도에서 24시간동안 2차 추출하였다. 추출 후 12000 rpm의 속도로 4도에서 10분간 원심분리하여 필터페이퍼를 이용하여 여과함으로써 카카오닙 추출물을 제조하였다.

[0082] 상기 카카오닙 추출물 각각 10, 100 μ g/ml를 텍스트로스 2% 및 효모 추출물 0.5%(w/v)을 포함하는 배지에 첨가하고, THK-734를 1%(w/v) 접종하고 5일 동안 동안 30 °C에서 배양하여 카카오닙 THK-734 배양물을 제조하였다. 한편 THK-734와 함께 배양하는 단계를 거치지 않은 카카오닙 추출물을 비교군으로서 준비하였다.

[0083] 4-2. 항염 활성 확인

[0084] 상기 4-1에서 준비한 카카오닙 THK-734 배양물과 카카오닙 추출물 각각 10, 100 μ g/ml를 염증 유발 물질인 LPS와 함께 Raw 254.7 세포에 처리하였다. 한편 LPS 만을 처리한 경우를 양성 대조군(LPS), 아무것도 처리하지 않

은 경우를 음성 대조군(Nor)으로 하였다. 그리고 염증반응을 유발하는 물질인 NO₂의 생산을 확인하였다.

[0085] 결과는 도 6에 나타내었다. 도 6에서 카카오닙 THK-734 배양물이 Raw 254.7 세포의 NO₂ 생산을 유의하게 감소시키는 것을 확인할 수 있다.

[0086] 4-3. 세포 독성 확인

[0087] 유산균 중에는 세포 독성이 있는 물질을 생산하는 것들이 있으므로, 이를 확인하기 위하여 하기의 실험을 수행하였다.

[0088] 상기 4-1에서 준비한 카카오닙 THK-734 배양물과 카카오닙 추출물 각각 0.01, 0.1, 1, 10, 100 µg/ml를 Raw 254.7 세포에 처리하였다. 한편 아무것도 처리하지 않은 경우를 음성 대조군(Nor)으로 하였다. 그리고 세포 생존을 측정하여 세포 독성을 확인하였다.

[0089] 결과는 도 7에 나타내었다. 도 7에서 카카오닙 THK-734 배양물이 음성 대조군 및 카카오닙 추출물의 경우와 세포 생존이 거의 유사하게 나타나는 것을 알 수 있다. 따라서 본 발명의 카카오닙 THK-734 배양물은 세포 독성이 매우 낮은 안전한 물질임을 알 수 있다.

수탁번호

[0090]

기탁기관명 : 한국생명공학연구원

수탁번호 : KCTC12637BP

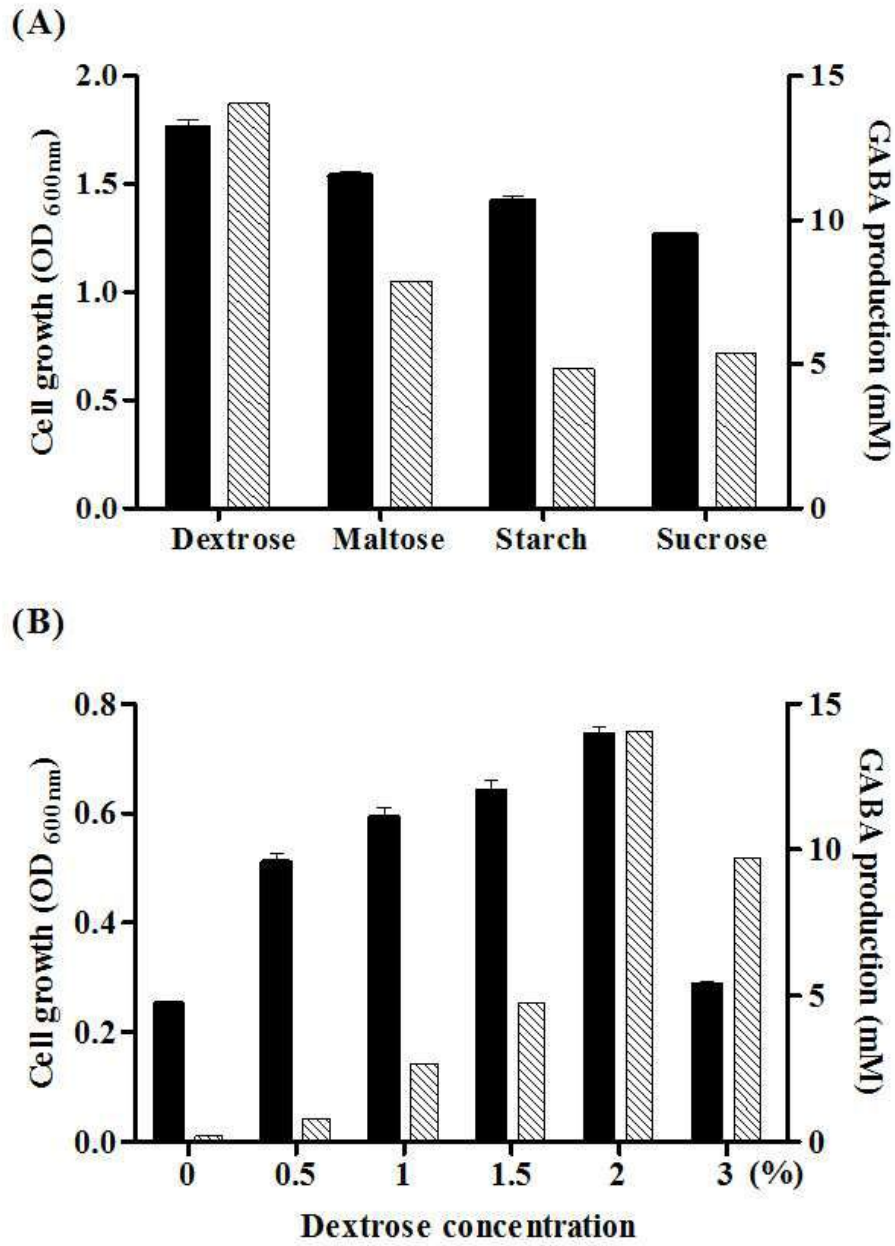
수탁일자 : 20140729

도면

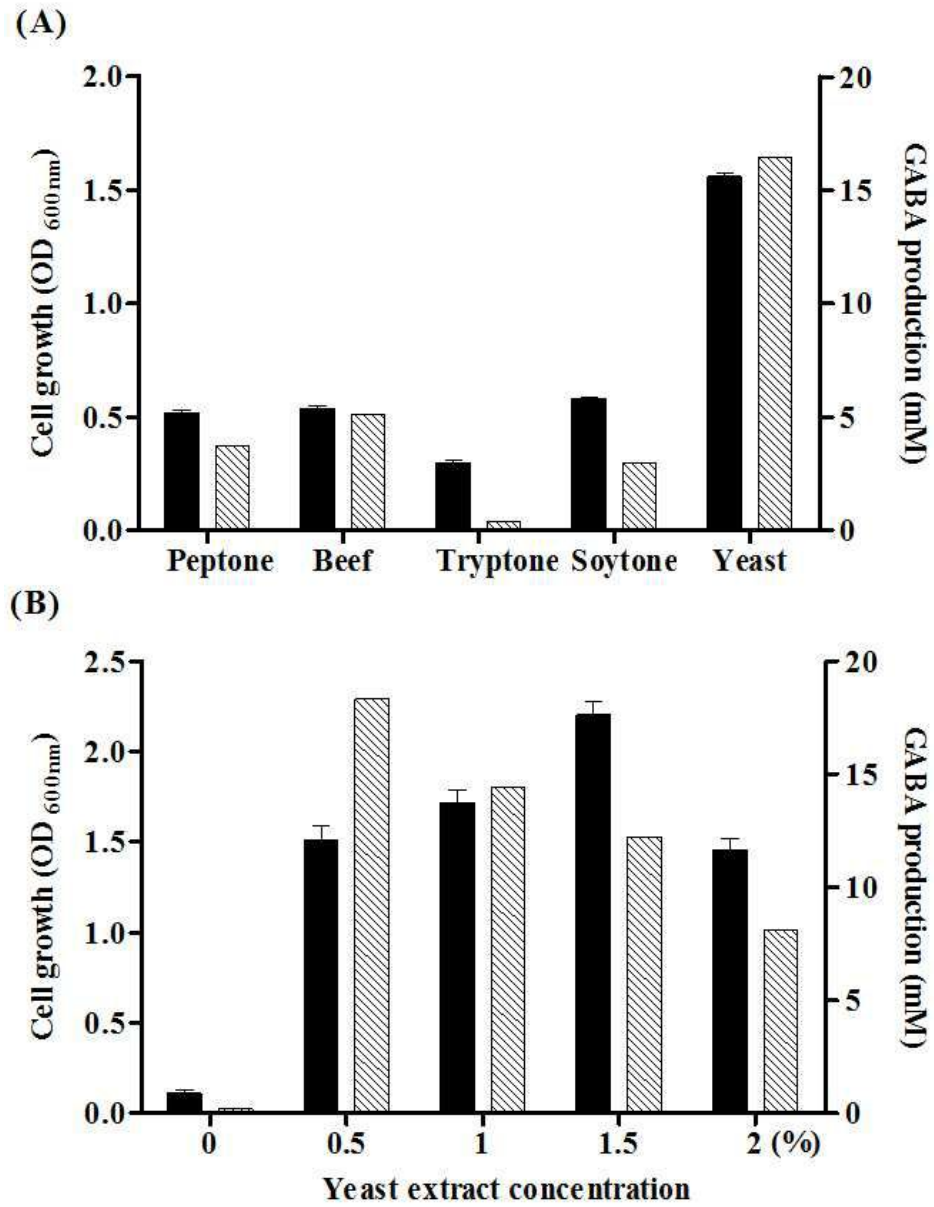
도면1

```
TGACGTGCTTGCACTGATTTCAACAATGAAGCGAGTGGCGAACTGGTGAGTAACACGTGGGAAATCTGCC
CAGAAGCAGGGGATAACACTTTGGAAACAGGTGCTAATACCGTATAACAACAAAATCTGCATGGATTTTGT
TTGAAAGGTGGCTTCGGCTATCACTTCTGGATGATCCCGCGGCGTATTAGTTAGTTGGTGAGGTAAAGGC
CCACCAAGACGATGATACGTAGCCGACCTGAGAGGGTAATCGGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCCAA
ACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAACTCTCCACAATGGACGAAAGTCTGATGGAGCAATGCCGCGTGA
GTGAAGAAGGGTTTCGGCTCGTAAAACTCTGTTGTTAAAGAAGAACACCTTTGAGAGTAACTGTTCAAGG
GTTGACGGTATTTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAGGTGGCAA
GCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTTTTAAGTCTGATGTGAAAGCCTTCGG
CTTAACCGGAGAAGTGCAATCGGAACTGGGAGACTTGAGTGACAGAAGAGGACAGTGGAACTCCATGTGTA
GCGGTGGAATGCGTAGATATATGGAAGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTGTCTAGTCTGTAAGTGAAGCT
GAGGCTCGAAAGCATGGGTAGCGAACAGGATTAGATACCCCTGGTAGTCCATGCCGTAAACGATGAGTGCT
AAGTGTGGAGGGTTTCGCCCTTCAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAAGCACTCCGCCTGGGGAGTACGAC
CGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTGGAAG
CTACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCTTCTGCCAATCTTAGAGATAAGACGTTCCCTTCGGGGA
CAGAATGACAGGTGGTGCAATGTTGTCTGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAG
CGCAACCTTTATTATCAGTTGCCAGCATTAGTTGGGCACCTCTGGTGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAG
GAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATGCCCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAATGGACGGT
ACAACGAGTCGCGAAGTCGTGAGGCTAAGCTAATCTCTTAAAGCCGTTCTCAGTTTCGGATTGTAGGCTGC
AACTCGCCTACATGAAGTTGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGG
CCTTGATACACACCGCCCGTACACCATGAGAGTTTG
```

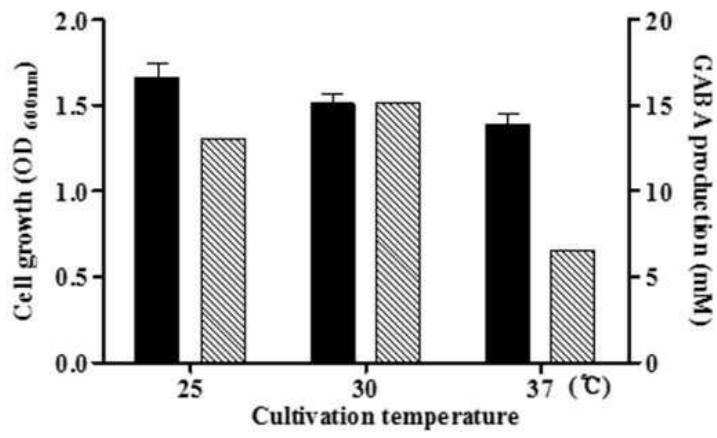
도면2



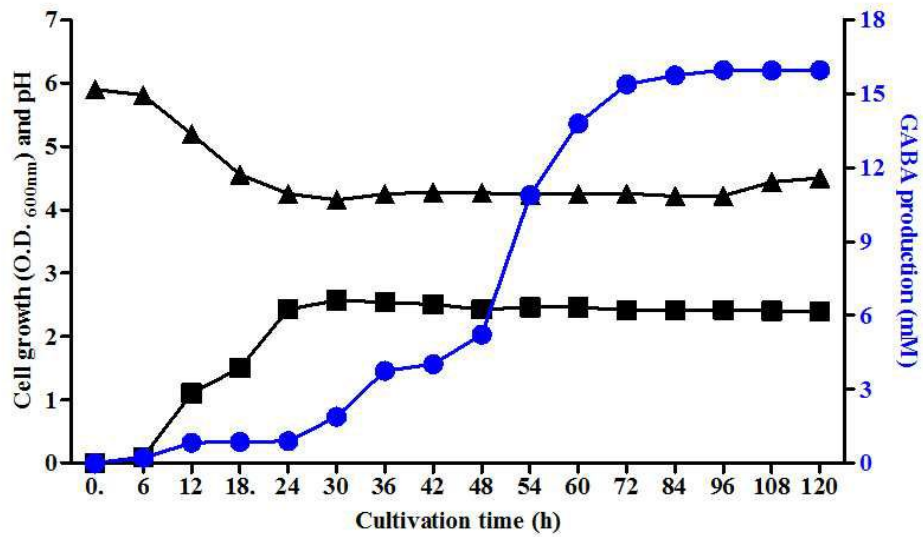
도면3



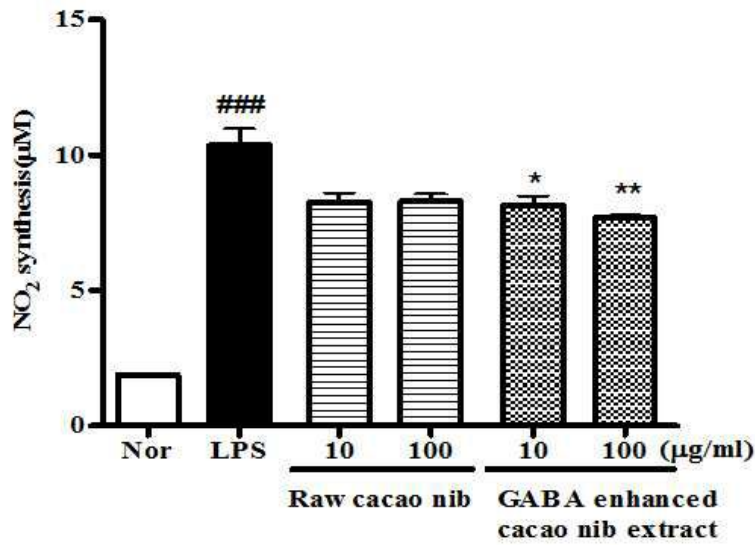
도면4



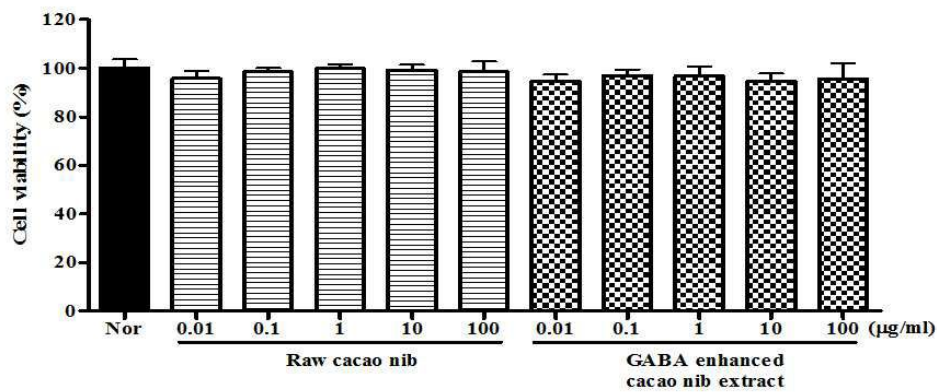
도면5



도면6



도면7



서열목록

- <110> University-Industry Cooperation Group of Kyung Hee University
- <120> A novel bacterium *Lactobacillus brevis* THK-734, and a method for producing GABA using the same
- <130> P14-066-KHU
- <160> 1
- <170> KopatentIn 2.0
- <210> 1
- <211> 1365
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence

<220><223> Lactobacillus brevis THK-734 16s rRNA

<400> 1

tgacgtgctt gcactgattt caacaatgaa gcgagtggcg aactggtgag taacacgtgg	60
gaaatctgcc cagaagcagg ggataaacact tggaaacagg tgctaatacc gtataacaac	120
aaaaatctgca tggatTTTTgt tgaaaggTgg cttcggttat cacttctgga tgatcccgcg	180
gcgtattagt tagttggtga ggtaaaggcc caccaagacg atgatacgta gccgacctga	240
gagggtaatc ggccacattg ggactgagac acggcccaaa ctctacggg aggcagcagt	300
agggaaatctt ccacaatgga cgaaagtctg atggagcaat gccgcgtgag tgaagaaggg	360
tttcggctcg taaaactctg ttgttaaaga agaacacctt tgagagtaac tgttcaaggg	420
ttgacggtat ttaaccagaa agccacggct aactacgtgc cagcagccgc ggtaatacgt	480
aggtggcaag cgttgtccgg atttattggg cgtaaagcga gcgcaggcgg tttttaagt	540
ctgatgtgaa agccttcggc ttaaccggag aagtgcacg gaaactggga gacttgagtg	600
cagaagagga cagtggaact ccatgtgtag cggTggaatg cgtagatata tggaagaaca	660
ccagtggcga aggcggctgt ctagtctgta actgacgtg aggcTcgaaa gcatgggtag	720
cgaacaggat tagataccct ggtagtccat gccgtaaacg atgagtgcta agtgttgag	780
ggtttccgcc cttcagtgt gcagctaacg cattaagcac tccgcctggg gagtacgacc	840
gcaaggttga aactcaaagg aattgacggg ggcccgcaca agcggTggag catgtggttt	900
aattcgaagc tacgcgaaga accttaccag gtcttgacat cttctgcaa tcttagagat	960
aagacgttcc cttcggggac agaatgacag gtggtgcatg gttgtcgtca gtcgtgtcg	1020
tgagatgttg ggTtaagtcc cgcaacgagc gcaaccctta ttatcagttg ccagcattca	1080
gttgggcact ctggtgagac tgccggtgac aaaccggagg aaggTgggga tgacgtcaaa	1140
tcatcatgcc ctttatgacc tgggctacac acgtgctaca atggacggtg caacgagtcg	1200
cgaagtcgtg aggcTaaagt aatctcttaa agccgttctc agttcggatt gtaggctgca	1260
actgcctac atgaagttgg aatcgctagt aatcgcgat cagcatgccg cggTgaatac	1320
gttcccgggc cttgtacaca ccgcccgtca cccatgaga gtttg	1365