(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2015-0129233
(43) 공개일자 2015년11월19일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 1/20 (2006.01) *C12R 1/10* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2014-0055583
(22) 출원일자 2014년05월09일
심사청구일자 2014년05월09일

(71) 출원인
창원대학교 산학협력단
경상남도 창원시 의창구 창원대학로 20(퇴촌동)
(72) 발명자
주우홍
경남 창원시 의창구 도계로 69, 1층 (도계동, 세영빌딩)
최혜정
경상남도 창원시 의창구 동읍 죽동45번길 521-14
하성민
경남 창원시 마산합포구 중앙동3길 22, 107동 2006호 (월포동, 경동메르빌)
(74) 대리인
김순웅

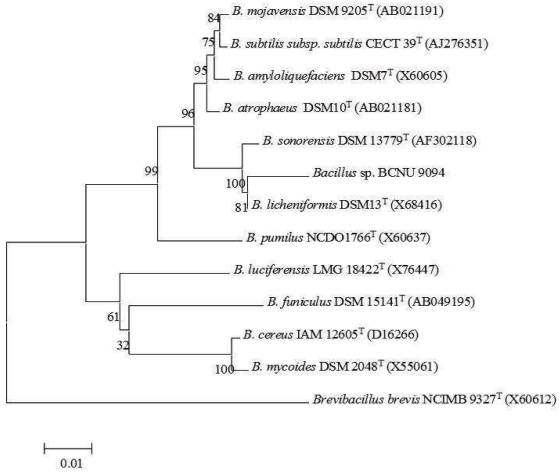
전체 청구항 수 : 총 11 항

(54) 발명의 명칭 **신규한 바실러스 라이체니포미스 균주 및 이의 용도**

(57) 요 약

본 발명은 신규한 바실러스 라이체니포미스(*Bacillus licheniformis*) 균주 및 이의 용도에 관한 것이다. 보다 상세하게는, 본 발명은 니코틴 또는 바이오제닉 아민 분해능을 갖는 바실러스 라이체니포미스 BCNU 9094 (*Bacillus licheniformis* BCNU 9094) 균주(수탁번호: KACC 91916P)를 제공한다. 또한, 상기 균주, 상기 균주의 배양물, 상기 배양물의 농축물, 상기 배양물의 건조물 및 이들의 조합으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나를 유효성분으로 포함하는 생균제 조성물, 환경 오염 정화용 미생물 제제, 니코틴 또는 바이오제닉 아민에 의해 발생되는 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물, 및 개선용 식품 조성물을 제공한다.

대 표 도 - 도1



명 세 서

청구범위

청구항 1

니코틴(nicotine) 또는 바이오제닉 아민(biogenic amine) 분해능을 갖는 바실러스 라이체니포미스 BCNU 9094 (*Bacillus licheniformis* BCNU 9094) 균주(수탁번호: KACC 91916P).

청구항 2

제 1 항에 있어서, 상기 균주는 된장으로부터 분리된 것을 특징으로 하는, 바실러스 라이체니포미스 BCNU 9094 균주(수탁번호: KACC 91916P).

청구항 3

제 1 항에 있어서, 상기 균주는 담즙에 대한 내성 및 장내 부착능을 갖는 것을 특징으로 하는, 바실러스 서브틸리스 BCNU 9094 균주(수탁번호: KACC 91916P).

청구항 4

제 1 항에 있어서, 상기 바이오제닉 아민은 히스타민(histamine), 티라민(tyramine), 퓨트레신(putrescine) 또는 카다베린(cadaverine)인 것을 특징으로 하는, 바실러스 서브틸리스 BCNU 9094 균주(수탁번호: KACC 91916P).

청구항 5

제 1 항의 바실러스 라이체니포미스 BCNU 9094 균주(수탁번호: KACC 91916P)의 배양물, 상기 배양물의 농축물, 상기 배양물의 건조물 및 이들의 조합으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나인 배양 산물.

청구항 6

제 1 항의 바실러스 라이체니포미스 BCNU 9094 균주(수탁번호: KACC 91916P), 상기 균주의 배양물, 상기 배양물의 농축물, 상기 배양물의 건조물 및 이들의 조합으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나를 유효성분으로 포함하는 생균제 조성물.

청구항 7

제 1 항의 바실러스 라이체니포미스 BCNU 9094 균주(수탁번호: KACC 91916P), 상기 균주의 배양물, 상기 배양물의 농축물, 상기 배양물의 건조물 및 이들의 조합으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나를 유효성분으로 포함하는, 니코틴 또는 바이오제닉 아민에 의해 발생되는 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 8

제 1 항의 바실러스 라이체니포미스 BCNU 9094 균주(수탁번호: KACC 91916P), 상기 균주의 배양물, 상기 배양물의 농축물, 상기 배양물의 건조물 및 이들의 조합으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나를 유효성분으로 포함하는, 니코틴 또는 바이오제닉 아민에 의해 발생되는 질환의 예방 또는 개선용 식품 조성물.

청구항 9

제 8 항에 있어서, 상기 식품 조성물은 식품, 음료 또는 발효유인 것을 특징으로 하는, 식품 조성물.

청구항 10

제 1 항의 바실러스 라이체니포미스 BCNU 9094 균주(수탁번호: KACC 91916P), 상기 균주의 배양물, 상기 배양물의 농축물, 상기 배양물의 건조물 및 이들의 조합으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나를 유효성분으로 포함하는 환경 오염 정화용 미생물 제제.

청구항 11

제 10 항에 있어서, 상기 환경 오염은 담배 제조 공정 또는 담배 폐기물로부터 발생한 것을 특징으로 하는 미생물 제제.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 신규한 바실러스 라이체니포미스(*Bacillus licheniformis*) 균주 및 이의 용도에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 생균제(Probiotics)는 숙주의 장내 미생물 균형을 유지시킴으로써 유익한 작용을 하는 미생물을 총괄하며, 인체 의약품인 정장제나 유산균 제제, 사료첨가제 및 건강식품 등으로 사용되고 있다. 일반적으로 생균제로 사용되는 미생물들은 안전하며, 섭취시 생체 내 저해환경 즉 위장의 위산, 담낭의 담즙 및 소장에서 분비되는 각종 소화효소에 저항력을 갖고, 대장과 직장에 도달해 증식하고 정착하는 능력을 갖는다[FAO/WHO, 2002; Homma 1998]. 또한, 생균제는 장내 균총의 정상화, 유해 세균의 정착을 억제함에 따른 부패 산물의 생성 감소, 질병예방, 항암작용, 면역의 활성화, 혈중 콜레스테롤 저하 및 항산화 효과 등 균체 성분 자체로 체내에서 유용한 기능을 전제로 한다.

[0003] 한국 전통 대두 발효식품(청국장, 메주)은 단백질 식품으로 기능성이 연구된 식품이다. 메주에 존재하는 미생물에 대해서는 오래 전부터 연구되어 왔으며, 바실러스(*Bacillus*) 속은 산업적으로 중요한 종으로 오랜 세월 동안 식품, 의약품 및 각종 발효 산업에서 사용되어, 안전성이 있다[Casula *et al.*, 2002; El-Naggar et al., 2004; Green *et al.*, 1999]. 또한 중요한 효소인 프로테아제, 아밀라제, 글루칸아제 및 셀룰라아제를 생성하며, 폴리펩타이드형의 바시트라신과 같은 항균 활성물질을 생성하며, 식중독균 외에도 위암의 원인인 헬리코박터 파이롤리(*Helicobacter pylori*)균에 대한 항균력을 가짐으로써, 생균제로 적합한 특성을 갖는다[Pinchuk *et al.*, 2001; Tagg *et al.*, 1995.]. 이미 1958년 이탈리아에서 일반 의약품으로서 *B. clausii*를 성분으로 한 Enterogermina의 상품화를 시작으로 바실러스 속을 이용한 생균제는 최소 50년 동안 사용되어 왔다. 또한, 미국의 nature's first Food, 일본의 bispan 및 중국의 medilac-vita 등 여러 나라에서 프로바이오틱 상품이 시판되고 있다. 생균제 정장제 중 바실러스 서브틸리스 2335 및 바실러스 리케니포르미스(*B.licheniformis*) 2336의 혼합 제제인 바이오스포린(Biosporin)의 바실러스 서브틸리스 2335가 위암의 원인인 헬리코박터 파이롤리균을 저해하는 항균물질인 Amicoumacin A를 분비한다는 연구결과가 있으며, 일본에서 분리된 Bispan 제품의 *Bacillus poyfermenticus* SCD는 polyfermenticin SCD라고 명명된 박테리오신을 생성한다고 보고 되었다[Cutting, 2010; Jun *et al.*, 2007;]. 이렇듯 식품 유래 생균제는 다양한 기능을 가지면서 안전한 것으로 간주되고 있다.

[0004] 담배 작물에 존재하는 니코틴은 흡연으로 체내에 흡수되는 강 독성 물질이다. 니코틴은 강한 독성을 가지며 신경마디의 세포막 상에 작용하여 혈압상승, 골격근섬유 경련초래, 흥분으로 인한 구강 내 마비 등을 일으키는 것으로 알려져 있다. 즉각적인 니코틴의 위해성은 동공축소, 시야혼탁, 구토, 복통, 설사, 소변조절 곤란, 후두화상초래, 호흡곤란, 타액과 호흡기관에 분비물 증가, 청색병, 심장박동수 감소 등이 있으며, 흡연 기간이 장기화되면 니코틴이 체내에 집적되어 장기적으로 암질환, 고혈압, 구강질환 초래, 위산과다분비 촉진에 따른 각종 위장질환과 동맥경화증을 비롯한 각종 순환계 질환을 일으킬 수 있다.

[0005] 또한 환경 분야에 있어서 니코틴은 담배제조과정에서 생성되는 폐기물로 유럽연합과 이탈리아에서는 폐기물의 니코틴 함량이 건조중량 kg당 500 mg을 초과할 때 독성 위험 폐기물로 지정하여 다양한 처리방안을 강구중이다. 탈니코틴화(Denicotinization)는 처음 물리 화학적 처리에 의해 행해졌으나 그 후 니코틴에 대한 미생물의 자화능을 이용하여 니코틴을 제거하는 생물학적 방법들이 고안되어 왔다. 따라서 니코틴 분해 균주는 수질과 토양에 존재하는 니트로소아민(nitrosoamine)류의 제거, 담배폐기물의 독성물질들을 제거할 수 있다는 점에서 경제적으로 매우 중요하다. 또한, 담배 제조과정에서 생기는 많은 폐기물을 니코틴 분해 미생물을 이용하여 제제로 개발하면 환경오염의 경감 및 친환경 제제로도 산업화가 용이할 것이다.

[0006] 바이오제닉 아민(biogenic amine)은 아미노산의 탈탄산 작용, 아미노기 전이작용 등의 화학적 작용에 의해 주로 생성되는 질소화합물로서, 단백질 함유 식품 내에서 미생물 또는 생화학적 활성에 의해 발생된다. 바이오제닉 아민은 미생물의 아미노산 디카복실라제(amino acid decarboxylase) 작용에 의해 형성되며, 체내에서 신경전달

물질로 직접 간접적으로 작용하고 혈압조절 및 혈류 등의 심혈관계 질환에도 영향을 미친다. 과량 섭취시 신경계 및 혈관계를 자극해 식중독 증상을 나타낼 수 있다. 또한, 일부 바이오제닉 아민은 N-nitrosamine과 같은 강력한 발암물질로 전환될 수 있는 잠재성을 가지고 있는 것으로 학계에 보고되고 있다.

[0007] 우리나라는 많은 흡연 인구를 보유하고 있을 뿐만 아니라 우리나라 음식 섭취 특성상 바이오제닉 아민 함유량이 많으므로, 니코틴 분해 및 바이오제닉 아아민 분해 능력이 있는 생균제를 이용하여 쉽게 접할 수 있는 정장제, 유산균 음료, 껌 및 기능성 식품 등에 다양하게 적용한다면 국민건강 증진에 이바지함과 동시에 고부가가치 기능성 제품으로 산업화가 용이할 것이다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명자들은 니코틴 및 바이오제닉 아민 분해 효과가 있는 안전한 생균제를 개발하기 위하여, 전통발효 식품인 된장에서 신규한 바실러스 서브틸리스 속 균주를 동정하였고, 상기 균주 및 이의 배양액의 탁월한 니코틴 분해능 및 바이오제닉 아민 분해능을 확인함으로써, 본 발명을 완성하였다.

[0009] 본 발명의 목적 및 이점은 하기의 첨부된 청구범위 및 도면으로부터 보다 명확하게 된다.

과제의 해결 수단

[0010] 상기와 같은 목적을 달성하기 위해서, 본 발명은 니코틴 또는 바이오제닉 아민 분해능을 갖는 바실러스 라이체니포미스 BCNU 9094 (*Bacillus licheniformis* BCNU 9094) 균주(수탁번호: KACC 91916P)를 제공한다.

[0011] 또한, 본 발명은 상기 균주의 배양물, 상기 배양물의 농축물, 상기 배양물의 건조물 및 이들의 조합으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나인 배양 산물을 제공한다.

[0012] 또한, 본 발명은 상기 균주, 상기 균주의 배양물, 상기 배양물의 농축물, 상기 배양물의 건조물 및 이들의 조합으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나를 유효성분으로 포함하는 생균제 조성물을 제공한다.

[0013] 또한, 본 발명은 상기 균주, 상기 균주의 배양물, 상기 배양물의 농축물, 상기 배양물의 건조물 및 이들의 조합으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나를 유효성분으로 포함하는, 니코틴 또는 바이오제닉 아민에 의해 발생되는 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.

[0014] 또한, 본 발명은 상기 균주, 상기 균주의 배양물, 상기 배양물의 농축물, 상기 배양물의 건조물 및 이들의 조합으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나를 유효성분으로 포함하는, 니코틴 또는 바이오제닉 아민에 의해 발생되는 질환의 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공한다.

[0015] 또한, 본 발명은 상기 균주, 상기 균주의 배양물, 상기 배양물의 농축물, 상기 배양물의 건조물 및 이들의 조합으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나를 유효성분으로 포함하는 환경 오염 정화용 미생물 제제를 제공한다.

[0016] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

[0017] 본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명은 니코틴 또는 바이오제닉 아민 분해능을 갖는 바실러스 라이체니포미스 BCNU 9094 (*Bacillus licheniformis* BCNU 9094) 균주(수탁번호: KACC 91916P)를 제공한다.

[0018] 상기 균주는 재래식 된장을 배양한 후, 배양액으로부터 니코틴 분해능이 우수한 균주를 분리하여 얻었다. 분리된 균주의 생리 화학적 특성을 Bergey`s Manual of Systematic Bacteriology에 기술된 방법으로 분석하였고, 분자생물학적 특성을 16S rDNA 유전자 염기서열로 분석하여 상기 분리된 균주가 바실러스 라이체니포미스와 높은 상동성을 보이는 신규한 균주로 동정하였다. 상기 균주를 바실러스 라이체니포미스 BCNU 9094 균주라고 명명하였으며, 농업유전자원정보센터에 2013년 12월 19일자로 기탁하여 수탁번호 KACC 91916P를 부여받았다.

[0019] 본 발명의 신규한 균주는 니코틴에 대하여 탁월한 분해능을 갖는다. 또한, 본 발명의 균주는 산성 및 담즙에 대한 내성을 갖고, 장내 부착능이 있어 소화기관 내 생존률이 우수하다. 또한, 항생제에 대하여 저항성이 존재하고, 바람직하게는 클로람페니콜에 대한 저항성이 있다. 따라서, 상기 균주를 이용하여 생균제 등을 제조하는 경우 체 내 니코틴을 분해하는 작용 및 장내 환경을 효과적으로 개선할 수 있는 생균제를 제조할 수 있는 효과가 있다.

[0020] 또한, 본 발명의 신규한 균주는 바이오제닉 아민에 대하여 분해능을 갖는다.

[0021] 본 명세서에서 사용되는 용어 "바이오제닉 아민(biogenic amine) "은 인체 및 동물 체내에서 중추신경의 신경전달물질 또는 직간접적 혈관계 조절에 관여하는 성분 중 하나를 의미한다. 간장, 치즈, 소시지, 맥주, 콩제품을 포함한 발효식품의 저장숙성 및 발효과정 중에 생성된다.

[0022] 본 발명의 바이오제닉 아민은 미생물의 아미노산 디카복실라제 작용에 의해 아미노산으로부터 형성되며, 바이오제닉 아민 함유 식품의 섭취로 여러 가지 약리적인 현상이 나타나 건강에 위해를 줄 수 있다.

[0023] 그 중 장류는, 단백질 함량이 높은 콩, 프로테아제(proteases) 활성이 높은 바실러스(Bacillus) 및 아스퍼질러스(Aspergillus) 속에 의한 발효, 미혐기적 환경 및 적당한 발효 온도를 고려할 때, 바이오제닉 아민 함량이 높다,

[0024] 따라서, 본 발명에서는 인체 안전성을 확보하기 위하여, 니코틴뿐 만 아니라, 바이오제닉 아민을 분해 가능한 균주를 선발하였고, 상기 균주는 바이오제닉 아민을 고효율로 분해하는 특성이 있기 때문에, 이러한 바이오제닉 아민에 대한 상기 균주의 자화능을 이용하여 식품에 존재 또는 발생하는 바이오제닉 아민(nitrosoamine)을 분해할 수 있다.

[0025] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 상기 바이오제닉 아민은 히스타민(histamine), 티라민(tyramine), 퓨트레신(putrescine) 또는 카다베린(cadaverine)이고, 가장 바람직하게는 히스타민 및 티라민이다.

[0026] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 바실러스 라이체니포미스 BCNU 9094 (*Bacillus licheniformis* BCNU 9094) 균주(수탁번호: KACC 91916P)의 배양물, 상기 배양물의 농축물, 상기 배양물의 건조물 및 이들의 조합으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나인 배양 산물을 제공한다.

[0027] 상기 배양 산물은 바실러스 라이체니포미스 BCNU 9094 (*Bacillus licheniformis* BCNU 9094) 균주(수탁번호: KACC 91916P)를 제거한 것 일수 있고, 또는 배양물을 원심 분리하여 수득한 상층액일 수 있다. 또한, 상기 배양 산물은 배양물의 농축물 및 상기 배양물의 건조물을 모두 포함할 수 있다.

[0028] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 바실러스 라이체니포미스 BCNU 9094 (Bacillus licheniformis BCNU 9094) 균주(수탁번호: KACC 91916P), 상기 균주의 배양물, 상기 배양물의 농축물, 상기 배양물의 건조물 및 이들의 조합으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나를 유효성분으로 포함하는 생균제 조성물을 제공한다.

[0029] 본 명세서에서 사용되는 용어 "생균제" 또는 "프로바이오틱스(probiotics)"는 인간을 포함한 동물의 위장관 내에서 유해 미생물에 대한 저항성 증진을 통한 숙주의 장내 미생물 환경을 개선하여 숙주의 건강에 유익한 영향을 주는 살아있는 미생물을 의미한다. 프로바이오틱스는 단일 또는 복합 균주 형태로 사람이나 동물에 건조된 세포 형태나 발효 산물 형태로 급여될 수 있다.

[0030] 본 발명에 따른 바실러스 라이체니포미스 BCNU 9094 (*Bacillus licheniformis* BCNU 9094) 균주(수탁번호: KACC 91916P), 이의 배양물, 상기 배양물의 농축물, 상기 배양물의 건조물 및 이들의 조합으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나인 배양 산물은 니코틴 분해 효과가 우수하고, 안전하며 독성 없는 프로바이오틱스로서 유용하게 이용될 수 있다. 따라서, 본 발명의 바실러스 라이체니포미스 BCNU 9094 (*Bacillus licheniformis* BCNU 9094) 균주(수탁번호: KACC 91916P), 이의 배양물, 상기 배양물의 농축물, 상기 배양물의 건조물 및 이들의 조합으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나인 배양 산물은 생균제, 특히 인체 의약품인 정장제나 유산균 제제, 사료첨가제 및 건강식품에 유용하게 사용될 수 있다.

[0031] 또한, 본 발명의 프로바이오틱스는 가축을 비롯한 동물을 대상으로 사용될 수 있으며 식품 또는 동물 사료에 첨가할 수 있다. 또한 동물 의약품에 사용할 수 있다.

[0032] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 바실러스 라이체니포미스 BCNU 9094 (*Bacillus licheniformis* BCNU 9094) 균주(수탁번호: KACC 91916P), 상기 균주의 배양물, 상기 배양물의 농축물, 상기 배양물의 건조물 및 이들의 조합으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나를 유효성분으로 포함하는, 니코틴 또는 바이오제닉 아민에 의해 발생되는 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.

[0033] 니코틴은 무색, 알카로이드의 강한 중독성 물질로, 매우 유독하여 일시에 60mg이 혈액에 흡수되면 대부분 사망한다. 니코틴은 모세 및 말초혈관수축, 혈압상승(한 개비: 20 - 30mmHg 증가), 심박동항진, 신경자극, 위산분비 증가, 혈청 지질의 변화(LDL 증가, HDL 감소), 혈소판 응집력 증가 및 혈관벽에 손상을 일으켜 동맥경화를 촉진시킨다. 이러한 니코틴에 의해 발생되는 질환은 다양하며, 예컨대, 니코틴이 체내에 집적되어 장기적으로 암 질환, 고혈압, 구강질환 초래, 위산과다분비 촉진에 따른 각종 위장질환과 동맥경화증을 비롯한 각종 순환계 질환을 일으킬 수 있다.

[0034] 바이오제닉 아민은 미생물의 아미노산 디카복실라제(amino acid decarboxylase) 작용에 의해 형성되며, 체내에서 신경전달 물질로 직접 간접적으로 작용하고 혈압조절 및 혈류 등의 심혈관계 질환에도 영향을 미친다. 이러한 바이오제닉 아민에 의해 발생되는 질환은 다양하며, 예컨대, 식중독, 오심, 호흡곤란, 안면 홍조, 발한, 심계 항진, 두통, 발진, 고혈압, 저혈압을 일으킬 수 있다.

[0035] 본 발명의 조성물은 임상 투여시 경구 도는 비경구로 투여가 가능하며, 주성분인 상기 바실러스 라이체니포미스 BCNU 9094 (*Bacillus licheniformis* BCNU 9094) 균주(수탁번호: KACC 91916P) 또는 이의 배양 산물의 유효량에 1종 또는 2종 이상의 약학적으로 허용가능한 통상적인 담체 또는 1종 또는 2종 이상의 첨가제를 선택하여 통상적인 약학적 제형의 조성물로 제조할 수 있다.

[0036] 담체는 희석제, 활택제, 결합제, 붕해제, 감미제, 안정제, 방부제 중에서 1종 또는 2종 이상을 선택하여 사용할 수 있으며, 첨가제로는 향료, 비타민류, 항산화제 중에서 1종 또는 2종 이상을 선택하여 사용할 수 있다.

[0037] 본 발명에 있어서, 담체 및 첨가제는 약학적으로 허용가능한 것은 모두 사용 가능하며, 구체적으로는 희석제로는 유당, 옥수수 전분, 콩기름, 미세결정 셀룰로오스 또는 만니톨이 좋고, 활택제로는 스테아린산 마그네슘 또는 탈크가 바람직하며, 결합제로는 폴리비닐피롤리돈(PVP) 또는 하이드록시프로필셀룰로오스(HPC) 중에서 선택되는 것이 바람직하다. 또한, 붕해제로는 카르복시메틸셀룰로오스칼슘(Ca-CMC), 전분글리콜산나트륨(sodium starch glycolate), 폴라크릴린칼륨(polacrylin potassium) 또는 크로스포비돈(cross-linked polyvinylpyrrolidone) 중에서 선택되는 것이 바람직하고, 감미제로는 백당, 과당, 소르비톨(sorbitol) 또는 아스파탐(aspartame) 중에서 선택되고, 안정제로는 카르복시 메틸셀룰로오스나트륨(Ma-CMC), 베타-시클로덱스트린, 백납(white bee's wax) 또는 잔탄검(xanthan gum)중에서 선택되며, 방부제로는 파라옥시안식향산메틸, 파라옥시안식향산프로필, 또는 소르빈산칼륨 중에서 선택하는 것이 바람직하다.

[0038] 본 발명의 조성물은 니코틴 또는 바이오제닉 아민으로 인해 발생하는 질환을 효율적으로 예방 또는 치료하는 목적으로 사용되는 것으로 그 제형에 있어서 특별히 한정되는 바 없으며, 음료, 분말, 캅셀, 연질캅셀, 정제, 껌, 점착 타입 액제 조성물로 사용될 수 있으며, 로션, 연고, 겔, 크림, 패치 또는 분무제와 같은 경피 투여형 제형으로 사용할 수 있고, 탕제, 환제, 정제, 산제, 과립제 등의 제제로 사용할 수 있다.

[0039] 본 발명의 조성물에는 상기 주요성분 이외에도 보조성분으로 비타민 B, C, E나 베타카로틴, Ca, Mg, Zn 등의 미네랄 함유 화합물이나 레시틴 등의 인지질 또는 말톨, 올리고당, 아미노산 등의 화합물을 사용할 수 있다.

[0040] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 바실러스 라이체니포미스 BCNU 9094 (*Bacillus licheniformis* BCNU 9094) 균주(수탁번호: KACC 91916P), 상기 균주의 배양물, 상기 배양물의 농축물, 상기 배양물의 건조물 및 이들의 조합으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나를 유효성분으로 포함하는, 니코틴 또는 바이오제닉 아민에 의해 발생되는 질환의 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공한다.

[0041] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 식품 조성물은 식품, 음료 또는 발효유이다.

[0042] 또한, 상술한 성분 이외에도 공지의 첨가제로서 미각을 돋구기 위하여 매실, 레몬향, 파인애플향 또는 허브향과 같은 천연향료나 천연과즙, 클로르필린, 플라보노이드 등의 천연색소 및 감미 성분인 과당, 벌꿀, 당알코올, 설탕 등과 구연산, 구연산나트륨 같은 산미제를 혼합하여 사용할 수 있다.

[0043] 또한 본 발명의 바실러스 라이체니포미스 BCNU 9094 (*Bacillus licheniformis* BCNU 9094) 균주(수탁번호: KACC 91916P) 또는 이의 배양산물을 포함하는 식품으로는 차, 젤리, 즙, 엑기스, 음료 등의 다양한 형태로 가공될 수 있으며, 본 발명의 식품은 인체에 부작용이 없으면서 복용이 용이하고 장기간 보관이 가능하다.

[0044] 본 발명의 바실러스 라이체니포미스 BCNU 9094 (*Bacillus licheniformis* BCNU 9094) 균주(수탁번호: KACC 91916P) 또는 이의 배양산물을 식품 첨가물로 사용할 경우, 상기 각각의 균주 또는 이의 배양 산물을 그대로 첨가하거나 다른 식품 또는 식품 성분과 함께 사용될 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다.

유효성분의 혼합양은 사용 목적(예방, 건강 또는 치료적 처치)에 따라 적합하게 결정될 수 있다. 일반적으로, 식품 또는 음료의 제조 시에는 본 발명의 바실러스 라이체니포미스 BCNU 9094 (*Bacillus licheniformis* BCNU 9094) 균주(수탁번호: KACC 91916P) 또는 이의 배양산물을 식품 전체 100 중량부에 대하여 15 중량부 이하, 바람직하게는 10 중량부 이하의 양으로 첨가된다. 그러나 건강 및 위생을 목적으로 하거나 또는 건강 조절을 목적으로 하는 장기간의 섭취의 경우에는 상기 양은 상기 범위 이하일 수 있으며, 안전성 면에서 아무런 문제가 없으므로 유효성분은 상기 범위 이상의 양으로도 사용될 수 있다.

[0045] 상기 식품의 종류에는 특별한 제한은 없다. 본 발명의 바실러스 라이체니포미스 BCNU 9094 (*Bacillus licheniformis* BCNU 9094) 균주(수탁번호: KACC 91916P) 또는 이의 배양산물을 첨가할 수 있는 식품의 예로는 육류, 소세지, 빵, 쵸컬릿, 캔디류, 스낵류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류를 포함하는 낙농제품, 각종 수프, 음료수, 차, 드링크제, 알코올 음료 및 비타민 복합제 등이 있으며, 통상적인 의미에서의 건강식품을 모두 포함한다.

[0046] 본 발명의 건강 음료 조성물은 통상의 음료와 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다. 상술한 천연 탄수화물은 포도당, 과당과 같은 모노사카라이드, 말토오스, 슈크로오스와 같은 디사카라이드, 및 덱스트린, 사이클로덱스트린과 같은 폴리사카라이드, 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알코올이다. 감미제로서는 타우마틴, 스테비아 추출물과 같은 천연 감미제나 사카린, 아스파르탐과 같은 합성 감미제 등을 사용할 수 있다. 상기 천연 탄수화물의 비율은 본 발명의 바실러스 라이체니포미스 BCNU 9094 또는 이의 배양액 100 ㎖당 일반적으로 0.01 내지 0.04 g, 바람직하게는 약 0.02 내지 0.03 g 이다.

[0047] 본 발명의 바실러스 라이체니포미스 BCNU 9094 (*Bacillus licheniformis* BCNU 9094) 균주(수탁번호: KACC 91916P) 또는 이의 배양산물은 여러 가지 영양제, 비타민, 전해질, 풍미제, 착색제, 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. 그 밖에 본 발명의 프로바이오틱스는 천연 과일 주스, 과일 주스 음료 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다. 이러한 성분은 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있다. 이러한 첨가제의 비율은 크게 중요하지 않지만 본 발명의 생균제는 100 중량부 당 0.01 내지 0.1 중량부의 범위에서 선택되는 것이 일반적이다.

[0048] 본 발명은 바실러스 라이체니포미스 BCNU 9094 (*Bacillus licheniformis* BCNU 9094) 균주(수탁번호: KACC 91916P), 상기 균주의 배양물, 상기 배양물의 농축물, 상기 배양물의 건조물 및 이들의 조합으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나를 유효성분으로 포함하는 발효유를 제공할 수 있다.

[0049] 본 발명의 바실러스 라이체니포미스 BCNU 9094 (*Bacillus licheniformis* BCNU 9094) 균주(수탁번호: KACC 91916P) 또는 이의 배양 산물은 발효유 100 중량부 당 0,01 내지 50 중량부인 것이 바람직하나 이에 한정되는 것은 아니며 당해업계의 당업자가 제조시 중량부를 조절할 수 있다.

[0050] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 바실러스 라이체니포미스 BCNU 9094 (*Bacillus licheniformis* BCNU 9094) 균주(수탁번호: KACC 91916P), 상기 균주의 배양물, 상기 배양물의 농축물, 상기 배양물의 건조물 및 이들의 조합으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나를 유효성분으로 포함하는 환경 오염 정화용 미생물 제제를 제공한다.

[0051] 본 발명의 바실러스 라이체니포미스 BCNU 9094 (*Bacillus licheniformis* BCNU 9094) 균주(수탁번호: KACC 91916P) 또는 이의 배양 산물은 미생물 제제 100 중량부 당 0,01 내지 100 중량부인 것이 바람직하나 이에 한정되는 것은 아니며 당해업계의 당업자가 제조시 중량부를 조절할 수 있다.

[0052] 바람직하게는, 상기 환경 오염은 담배 제조 공정 또는 담배 폐기물로부터 발생한 것이다.

[0053] 본 발명은 니코틴 분해활성이 있는 상기 균주를 처리함으로써 담배 제조 공정 또는 담배 폐기물로부터 발생한 고농도의 니코틴을 분해하는 환경 오염 정화용 미생물 제제를 제공할 수 있다.

[0054] 본 발명에 따른 니코틴 분해 활성이 있는 신규한 균주는 니코틴을 고효율로 분해하는 특성이 있기 때문에 담배 제조 공정시 발생하는 니코틴이 다량 제거할 수 있고, 균주를 배양하여 담배 또는 담배 폐기물에 바로 처리할 수 있기 때문에 처리 공정이 단순하여 경제적이며, 담배 가공 중 발생하는 니코틴 함량이 높은 다량의 고형 폐기물 처리에 이용할 경우 2차 폐기물을 생성하지 않아 안전하게 사용할 수 있어 환경 친화적이다

[0055] 담배 제조 공정시 발생하는 니코틴이 다량 제거할 수 있고, 균주를 배양하여 담배 또는 담배 폐기물에 바로 처

리할 수 있기 때문에 처리 공정이 단순하여 경제적이며, 담배 가공 중 발생하는 니코틴 함량이 높은 다량의 고형 폐기물 처리에 이용할 경우 2차 폐기물을 생성하지 않아 안전하게 사용할 수 있어 환경 친화적이다

[0056] 본 발명은 상술한 바실러스 라이체니포미스 BCNU 9094 (*Bacillus licheniformis* BCNU 9094) 균주(수탁번호: KACC 91916P)를 구성으로 하므로, 상술한 본 발명의 내용과 중복된 내용은 본 명세서의 과도한 복잡성을 피하기 위하여 그 기재를 생략한다.

발명의 효과

[0057] 본 발명에 따른 바실러스 라이체니포미스 BCNU 9094 균주 또는 이의 배양산물은 니코틴 또는 바이오제닉 아민 분해 효과가 탁월할 뿐만 아니라, 생체 내 안정성 및 소화기관 내 저해 환경에서의 생존률이 우수하므로 의약품, 건강식품, 생균제 및 환경 제제에 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0058] 도 1은 바실러스 라이체니포미스 BCNU 9094 균주의 계통도를 나타낸다.

도 2는 산성 pH에 대한 상기 분리 균주의 내성을 확인한 결과를 보여준다.

도 3은 담즙에 대한 상기 분리 균주의 내성을 확인한 결과를 보여준다.

도 4는 장내부착성을 확인하기 위한 세포표면 소수성을 측정한 결과를 보여준다.

도 5는 pH-시간에 따른 상기 분리 균주의 니코틴 분해능을 확인한 결과를 보여준다.

도 6은 온도-시간에 따른 상기 분리 균주의 니코틴 분해능을 확인한 결과를 보여준다.

도 7은 니코틴 농도-시간에 따른 상기 분리 균주의 분해능을 확인한 결과를 보여준다.

도 8은 히스타민 또는 티라민-시간에 따른 상기 분리 균주의 바이오제닉 아민 분해능을 확인한 결과를 보여준다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0059] 이하, 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로서, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

[0060] **<실시예 1> 미생물의 분리 및 동정**

[0061] **1-1. 균주의 분리 및 동정**

[0062] 일반 가정의 재래식 된장 1 g을 PBS(phosphate buffered saline, pH 2.5) 용액에 첨가하여 2 시간 정치 후, NA(nutrient agar)에 도말하고, 낮은 pH에 대하여 내성이 있는 집락을 1차 선발하였다. 그리고 0.1% 니코틴이 첨가된 최소배지(MSM: 0.2 g K_2HPO_4, 0.8 g KH_2PO_4, 0.2 g $MgSO_4$, 0.1 g $CaSO_4$, 0.3 g $(NH_4)_2SO_4$, 0.0033 g $NaMoO_4$, 0.005 g $FeSO_4$·H2O, 15 g agar per liter, pH 6.0)에서 니코틴을 이용하는 균주를 최종 선별하였다.

[0063] 상기 선별된 균주를 동정하기 위하여, 해당 프라이머(27F 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' 및 1492R 5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3')를 이용하여 16S rDNA 유전자의 염기서열을 분석하였고, 상기의 결과를 BLAST 프로그램을 이용하여 GeneBank의 데이타베이스에 등록된 다른 표준균주(type strain)의 16S rDNA 유전자들과 블라스트 서치(blastsearch)한 결과, 바실러스 라이체니포미스 BCNU 9094 균주는 바실러스 라이체니포미스와 높은 상동성을 보여, 상기 선별된 균주를 바실러스 라이체니포미스 BCNU 9094 균주로 명명하였다.

[0064] 또한, Clustal X 2.0(CLC bio, Denmark), 메가 4 프로그램을 이용하여 상동성을 분석하고, neighbor joining method를 기반으로 계통수를 구축하였다. 상기 결과는 도 1에 나타내었다. 도 1에 도시된 바와 같이, 본 발명에서 분리한 균주는 계통적으로 바실러스 라이체니포미스 종에 속해 있는 것을 확인하였다.

[0065] 따라서, 본 발명의 균주를 바실러스 라이체니포미스 BCNU 9094 균주를 농업유전자원정보센터에 2013년 12 월 19 일 자로 기탁하여, 수탁번호 KACC 91916P를 부여받았다.

[0066] **1-2. 균주의 특성 확인**

[0067] Bergey's Manual of Systematic Bacteriology 방법을 참고하여 바실러스 라이체니포미스(*Bacillus licheniformis*)의 생리생화학적 특성을 조사하였으며, 이를 표 1에 나타내었다. 하기 표 1에 기재된 +는 양성반응을 의미하고, -는 음성반응을 의미한다.

표 1

[0068] 바실러스 라이체니포미스 BCNU 9094의 생리생화학적 특징

내용	BCNU 9094
산소요구성	통성혐기성
그람 염색	+
운동성	-
포자형성	+
온도 성장범위(℃)	15-50
pH 성장범위	2.5-9.0
NaCl 내성(%)	3.0-10
Voges-Proskauer test	-
자화능	
아라비노스	+
프럭토오스	+
글루코오스	+
글라이신	-
락토오스	+
말토오스	+
만니톨	+
만노오스	+
수크로오스	+
라피토오스	+
자일로오스	+

[0069] **<실시예 2> 바실러스 서브틸리스 BCNU 9169 균주의 생균제로서의 이용 가능성**

[0070] **2.1 안전성 검사**

[0071] 본 발명의 바실러스 라이체니포미스 BCNU 9094 균주의 인체에 대한 안전성을 확인하기 위하여, 혈액 한천 배지(Sheep blood agar)에 분리 균주를 스트릭킹(streaking)한 후, 37℃에서 48시간 배양한 다음 균체 주위에 적혈구의 분해 현상인 용혈성 여부를 확인하였다. 또한, 인체 내 유해효소 생성확인 배지를 이용하여 인체 내 유해효소 생성을 확인하였다. 상기 결과는 표 2에 나타내었다.

표 2

[0072] 바실러스 라이체니포미스 BCNU 9094의 안전성

	BCNU 9094
용혈(Haemolysis)	γ-용혈성(Haemolysis)
β-글루코시다제(glucosidase)	-
β-글루쿠로니다아제 (glucuronidase)	-
트립토파나아제(Tryptophanase)	-
우레아제(Urease)	-
겔라티나아제(Gelatinase)	-
인돌(Indole)	-
페닐피루브산(Phenylpyruvic acid)	-

[0073] 표 2에 도시된 바와 같이, 본 발명의 바실러스 라이체니포미스 BCNU 9094 균주의 적혈구 분해현상을 검사한 결

과 γ-용혈성을 나타내었고, 인체 내 유해효소인 β-글루코시다제(glucosidase), β-글루쿠로니다아제(glucuronidase), 트립토파나아제(Tryptophanase), 우레아제(Urease), 겔라티나아제(Gelatinase), 인돌(Indole) 및 페닐피루브산(Phenylpyruvic acid)을 생성하지 않는 것을 확인하였다.

[0074] 따라서, 본 발명의 바실러스 라이체니포미스 BCNU 9094 균주는 인체에 안전한 것으로 판단하였다.

[0075] **2.2 산 및 인공 담즙에 대한 내성 확인**

[0076] 본 발명의 바실러스 라이체니포미스 BCNU 9094 균주의 생균제로서의 가능성을 확인하기 위하여, 산성 pH에 대한 분리 균주의 내성을 확인하였다.

[0077] 1 M의 염산을 이용하여 pH 2.5, pH 3 또는 pH 4로 조정한 PBS(phosphate buffered saline)에 배양액을 접종하였다. 이 후, 37℃에서 4 시간 동안 배양하였고, 시간별로 시료를 채취하여 총균수(CFU/ml)을 측정하여 생존률을 조사하였다. 상기 결과는 도 2에 나타내었다.

[0078] 도 2에 나타낸 바와 같이, 바실러스 라이체니포미스 BCNU 9094 균주는 pH 3.0에서 약 80%, pH 4.0에서 약 90%의 우수한 생존률을 나타냈다.

[0079] 또한, 본 발명의 바실러스 라이체니포미스 BCNU 9094 균주의 생균제로서의 가능성을 확인하기 위하여, 담즙에 대한 분리 균주의 내성을 확인하였다.

[0080] 0.3% 또는 0.6% Oxgall(Sigma Co., U.S.A)가 첨가된 NB에 바실러스 라이체니포미스 BCNU 9094 균주의 배양액을 접종하였다. 4 시간 배양 후의 총균수를 측정하여 생존률을 조사하였다. 상기 결과는 도 3에 나타내었다.

[0081] 도 3에 나타낸 바와 같이, 바실러스 라이체니포미스 BCNU 9094 균주는 0.3% 및 0.6% Oxgall에서 약 100%의 우수한 생존률을 나타냈다.

[0082] 따라서, 본 발명의 바실러스 라이체니포미스 BCNU 9094 균주는 pH 및 담즙에 대한 내성을 갖는다는 것을 확인하였다.

[0083] **2.3 세포표면 소수성**

[0084] 생균제 선발기준 중에서 안정성과 더불어 장관세포에 대한 부착성은 매우 중요하다. 미생물세포의 장내 부착성은 세포 표면의 구조와 조성에 많은 영향을 받는데, 특히 세포표면의 소수성이 주요한 요인으로 알려져 있으며 자가 결합 정도가 높을 시 부착능이 높다고 보고된바 있다. 생균제로서 활용을 확인하기 위하여 장관세포 부착능을 실험하였다. 구체적으로, Doyle과 Rosenberg의 방법을 응용하여 생물의 탄화수소에의 부착능(microbial adhesion to solvents, MATS)을 이용해 소수성 및 응집도를 측정하였다. 구체적으로는, 자일렌(xylene), 에틸아세테이트(ethylacetate), 클로로포름(chloroform) 및 헥사데칸(hexadecane) 4 종의 유기용매에 부착하는 정도를 흡광도로 측정함으로써 소수성을 측정하였다. 상기 결과는 도 4에 나타내었다.

[0085] 도 4에 나타낸 바와 같이, 본 발명의 바실러스 라이체니포미스 BCNU 9094 균주는 xylene에서 62%의 높은 소수성을 보였다. 미생물의 장내 부착성은 세포 표면의 구조와 조성에 많은 영향을 받는데 세포표면의 소수성이 주요한 요인으로서, 자가 결합 정도가 높을 경우 부착능이 높다고 보고되었다. 따라서, 본 발명의 바실러스 라이체니포미스 BCNU 9094 균주는 장내 부착능이 우수함을 알 수 있다.

[0086] **<실시예 3> 바실러스 라이체니포미스 BCNU 9094 균주의 항생제 감수성 확인**

[0087] 본 발명의 바실러스 라이체니포미스 BCNU 9094 균주의 인체에 대한 안전성을 확인하기 위하여, 항생제 감수성을 확인하였다. 항생제 감수성은 디스크 확산법(disk diffusion method)으로 측정하였다. 분리된 바실러스 라이체니포미스 BCNU 9094 균주를 MacFarland scale 0.5로 보정하였고, MRS 평판배지에 100㎕ 분주하여 도말하였다. 바실러스 라이체니포미스 BCNU 9094 균주가 도말된 배지에 농도별(5 내지 50 ㎍)로 접종된 항생제 페이퍼 디스크를 올려놓고, 37℃에서 24시간 배양한 뒤, 생육억제환을 확인함으로써 항생제의 최소 억제 범위를 조사하였다. 상기 결과는 하기의 표 3에 나타내었다.

표 3

[0088] 바실러스 라이체니포미스 BCNU 9094의 항생제 감수성

항생제	감수성
암피실린 10 ㎍	민감성
젠타마이신 10 ㎍	민감성
카나마이신 10 ㎍	민감성
클로람페니콜 30 ㎍	민감성
옥시마이신 10 ㎍	민감성
스트렙토마이신 10 ㎍	민감성
테트라사이클린 30 ㎍	민감성

[0089] 표 3에 나타낸 바와 같이, 본 발명의 바실러스 라이체니포미스 BCNU 9094 균주는 항생제 감수성 실험에서 암피실린, 젠타마이신, 카나마이신, 클로람페니콜, 옥시마이신, 스트렙토마이신 및 테트라사이클린 7 종의 항생제에 대한 감수성을 보임으로써 항생제내성유전자를 전달하지 않는 안전한 균으로 판단하였다.

[0090] **<실시예 4> 바실러스 라이체니포미스 BCNU 9094의 니코틴 분해능**

[0091] NB 배지에서 16 시간 전배양한 균주 1 ml을 원심분리(8000 rpm X 10분)하고 2번 세척한 후 0.05% 니코틴이 첨가된 최소배지에 접종하였고, 2 시간 간격으로 16 시간 동안 일정량을 채취하여 액체 크로마토그래피(LC-20AD series, SHIMADZU, Japan)를 이용하여 니코틴 분해능을 측정하였다. 컬럼은 ODS C18 (250 X 4.6 mm, 5 ㎛)으로 30℃에서 사용하였고, 전개용매는 메탄올: 1 mM 황산을 55:45 비율로 0.8 ml/min 속도로 전개하였으며, 다이오드 어레이 검출기를 이용하여 259 nm에서 모니터링하였다. 시간에 따른 다양한 조건, 즉, pH(pH 5, 6, 7 및 8, 도 5), 배양 온도(35℃및 28℃, 도 6) 및 니코틴 농도(0.05%, 0.10% 및 0.20%, 도 7)를 달리하여 측정하였고, 상기 결과는 도 5 내지 7에 나타내었다.

[0092] 도 5에 나타낸 바와 같이, 본 발명의 바실러스 라이체니포미스 BCNU 9094 균주는 pH 6.0일 때 농도 0.05%의 니코틴을 약 65%까지 분해하였다. 즉, 0.05% 니코틴 첨가하고 pH 별로 실험했을 때 pH 6.0에서 분해능이 좋았다.

[0093] 또한, 도 6에 나타낸 바와 같이, 본 발명의 바실러스 라이체니포미스 BCNU 9094 균주는 35℃로 배양 시 농도 0.05%의 니코틴을 약 65%까지 분해하였다. 즉, 0.05% 니코틴 첨가하고 온도별로 실험했을 때 35℃에서 분해능이 좋았다.

[0094] 또한, 도 7에 나타낸 바와 같이, 본 발명의 바실러스 라이체니포미스 BCNU 9094 균주는 0.05% 농도의 니코틴을 약 65%까지 분해하였다. 즉, pH 6.0, 35℃ 조건에서 농도별로 실험했을 때 0.05% 농도의 니코틴 분해능이 좋았다.

[0095] 요약하자면, 본 발명의 바실러스 라이체니포미스 BCNU 9094 균주는 0.05% 니코틴을 첨가했을 때, pH 6.0에서 35℃로 배양시 약 65%의 분해능이 있는 것을 확인하였다.

[0096] 따라서, 본 발명의 바실러스 라이체니포미스 BCNU 9094 균주는 니코틴 분해능이 탁월함을 알 수 있다.

[0097] **<실시예 5> 바실러스 라이체니포미스 BCNU 9094의 바이오제닉 아민 분해능**

[0098] NB 배지에서 16 시간 전배양한 균주 1 ml을 원심분리(8000 rpm X 10분)하고 2번 세척한 후 0.05%의 히스타민(histamine) 또는 티라민(tyramine)이 첨가된 최소배지에 접종하고, 35℃에서 배양하였다. 2 시간 간격으로 16 시간 동안 일정량을 채취하여 액체 크로마토그래피(LC-20AD series, SHIMADZU, Japan)를 이용하여 히스타민(histamine) 및 티라민(tyramine) 분해능을 측정하였다. 컬럼은 ODS C18 (250 X 4.6 mm, 5 ㎛)으로 30℃에서 사용하였고, 전개용매는 0.1 M 초산암모늄:아세토니트릴을 1 ml/min 속도로 50:50에서 10:90 비율까지 기울기용리를 사용하였으며, 254 nm에서 모니터링하였다. pH(pH 6), 배양 온도(35℃) 및 농도(0.05%)의 조건 하에서 시간에 따라 측정하였고, 상기 결과는 도 8에 나타내었다.

[0099] 도 8에 나타낸 바와 같이, 본 발명의 바실러스 라이체니포미스 BCNU 9094 균주는 0.05%의 히스타민(histamine) 및 티라민(tyramine)을 첨가했을 때, pH 6.0에서 35℃로 배양시 각각 37%와 45%까지 분해하였다.

[0100] 따라서, 본 발명의 바실러스 라이체니포미스 BCNU 9094 균주는 히스타민(histamine) 및 티라민(tyramine) 분해능이 있음을 알 수 있다.

[0101] **<제제예 1> 약학적 제제**

[0102] 본 발명의 바실러스 라이체니포미스 BCNU 9094 균주(수탁번호: KACC 91916P) 또는 이의 배양액을 포함하는 약학적 제제를 제조하였다.

[0103] **1. 산제의 제조**

[0104] 본 발명의 바실러스 라이체니포미스 BCNU 9094 균주(수탁번호: KACC 91916P) 및 이의 배양액 20mg

[0105] 유당 100mg

[0106] 탈크 10mg

[0107] 상기의 성분을 혼합하고 기밀포에 충진하여 산제를 제조하였다.

[0108] **2. 정제의 제조**

[0109] 본 발명의 바실러스 라이체니포미스 BCNU 9094 균주(수탁번호: KACC 91916P) 및 이의 배양액 10mg

[0110] 옥수수전분 100mg

[0111] 유당 100mg

[0112] 스테아린산 마그네슘 2mg

[0113] 상기의 성분들을 혼합한 후 통상의 정제의 제조방법에 따라서 타정하여 정제를 제조하였다.

[0114] **<제제예 2> 식품의 제조**

[0115] 본 발명의 바실러스 라이체니포미스 BCNU 9094 균주(수탁번호: KACC 91916P) 또는 이의 배양액을 포함하는 식품들을 다음과 같이 제조하였다.

[0116] **1. 조리용 양념의 제조**

[0117] 조리용 양념 100 중량부에 본 발명의 바실러스 라이체니포미스 BCNU 9094 균주(수탁번호: KACC 91916P) 또는 이의 배양액을 8 ~ 12 중량부로 혼합하여 장 기능 개선용 조리용 양념을 제조하였다.

[0118] **2. 스프 및 육즙의 제조**

[0119] 본 발명의 바실러스 라이체니포미스 BCNU 9094 균주(수탁번호: KACC 91916P) 또는 이의 배양액을 8 ~ 12 중량부, 인진호 추출물 0.1 ~ 4 중량부, 갈근 추출물 0.1 ~ 3 중량부, 진피 추출물 0.1 ~ 3 중량부, 창출 추출물 0.1 ~ 3 중량부, 감초 추출물 0.1 ~ 3 중량부, 홍삼 추출물 0.01 ~ 3.24 중량부를 스프 및 육즙 100 중량부에 첨가하여 장 기능 개선용 육가공 제품, 면류의 스프 및 육즙을 제조하였다.

[0120] **3. 유제품(dairy products)의 제조**

[0121] 본 발명의 바실러스 라이체니포미스 BCNU 9094 균주(수탁번호: KACC 91916P) 또는 이의 배양액을 8 ~ 12 중량부, 인진호 추출물 0.1 ~ 4 중량부, 갈근 추출물 0.1 ~ 3 중량부, 진피 추출물 0.1 ~ 3 중량부, 창출 추출물 0.1 ~ 3 중량부, 감초 추출물 0.1 ~ 3 중량부, 홍삼 추출물 0.1 ~ 3.24 중량부를 우유 100 중량부에 첨가하고, 상기 우유를 이용하여 버터 및 아이스크림과 같은 다양한 유제품을 제조하였다.

[0122] **4. 선식의 제조**

[0123] 현미, 보리, 찹쌀, 율무를 공지의 방법으로 알파화시켜 건조시킨 것을 배전한 후 분쇄기로 입도 60 메쉬의 분말로 제조하였다.

[0124] 검은콩, 검은깨, 들깨도 공지의 방법으로 쪄서 건조시킨 것을 배전한 후 분쇄기로 입도 60 메쉬의 분말로 제조하였다.

[0125] 본 발명의 바실러스 라이체니포미스 BCNU 9094 균주(수탁번호: KACC 91916P) 또는 이의 배양액을 진공 농축기에 감압, 농축하고 분무, 열풍 건조기로 건조하여 얻은 건조물을 분쇄기로 입도 60 메쉬로 분쇄하여 건조분말을 얻었다.

[0126] 상기에서 제조한 곡물류, 종실류, 및 본 발명의 추출물을 다음과 같은 비율로 배합하여 제조하였다.

[0127] 곡물류(현미 30 중량부, 율무 15 중량부, 보리 20 중량부),

[0128] 종실류(들깨 7 중량부, 검은콩 8 중량부, 검은깨 7 중량부),

[0129] 본 발명의 바실러스 라이체니포미스 BCNU 9094 균주(수탁번호: KACC 91916P) 또는 이의 배양액 건조분말(10 중량부),

[0130] 영지(0.5 중량부), 및

[0131] 지황(0.5 중량부).

[0132] **<제제예 3> 음료의 제조**

[0133] **1. 탄산음료의 제조**

[0134] 설탕 5 ~ 10 중량부, 구연산 0.05 ~ 0.3 중량부, 카라멜 0.005 ~ 0.02 중량부, 비타민 C 0.1 ~ 1 중량부, 본 발명의 바실러스 라이체니포미스 BCNU 9094 균주(수탁번호: KACC 91916P) 또는 이의 배양액 10 중량부의 첨가물을 혼합하고 여기에 79 ~ 94 중량부의 정제수를 섞어서 시럽을 만들고, 상기 시럽을 95 ~ 98℃에서 20 ~ 180초간 살균하여 냉각수와 1:4의 비율로 혼합한 다음 탄산가스를 0.5 ~ 0.82 중량부를 주입하여 탄산음료를 제조하였다.

[0135] **2. 기능성 음료의 제조**

[0136] 비타민 C 0.1 중량부, 과당 5.8 중량부, 백설탕 3.8 중량부, 구연산 0.12 중량부, 사과산 0.03 중량부, 구연산 타륨 0.04 중량부 및 치자청색소 0.02 중량부에 본 발명의 바실러스 라이체니포미스 BCNU 9094 균주(수탁번호: KACC 91916P) 또는 이의 배양액 10 중량부를 배합하여 계량된 물에 완전히 용해시켰다. 상기 용해된 음료를 총량이 1 중량부가 되도록 계량된 정제수로 조정하였다.

[0137] **3. 건강 음료의 제조**

[0138] 액상과당 0.5 중량부, 올리고당 2 중량부, 설탕 2 중량부, 식염 0.5 중량부, 물 75 중량부과 같은 부재료와 본 발명의 바실러스 라이체니포미스 BCNU 9094 균주(수탁번호: KACC 91916P) 또는 이의 배양액 10 중량부를 균질하게 배합하여 순간 살균을 한 후 이를 유리병, 패트병 등 소포장 용기에 포장하여 건강 음료를 제조하였다.

[0139] **4. 야채 주스의 제조**

[0140] 본 발명의 바실러스 라이체니포미스 BCNU 9094 균주(수탁번호: KACC 91916P) 또는 이의 배양액의 진공건조물 10 g을 토마토 또는 당근 주스 1 l에 가하여 건강 증진용 야채 주스를 제조하였다.

[0141] **5. 과일 주스의 제조**

[0142] 본 발명의 바실러스 라이체니포미스 BCNU 9094 균주(수탁번호: KACC 91916P) 또는 이의 배양액의 진공건조물 10 g, 을 사과 또는 포도 주스 1 l에 가하여 건강 증진용 과일 주스를 제조하였다.

[0143] **<제제예 4> 발효유의 제조**

[0144] 탈지분유를 이용하여 무지유 고형분 함량을 8 ~ 20 중량부로 조정한 원료유를 72 ~ 75℃에서 15초간 살균하였다. 살균된 원료유를 일정온도까지 냉각시킨 후 본 발명의 바실러스 라이체니포미스 BCNU 9094 균주(수탁번호: KACC 91916P)를 10^6 cfu/㎖의 농도로 접종하여 pH 4~5가 될 때까지 배양하였다. 배양원료 후 배양액을 냉각시켰다. 과즙농축액 0.1 ~ 50 중량부, 식이섬유 0.1 ~ 20 중량부, 포도당 0.5 ~ 30 중량부, 올리고당 0.1 ~

15 중량부, 칼슘 0.001 ~ 10 중량부, 비타민 0.0001 ~ 5 중량부 등을 녹여 시럽을 제조하였다. 이렇게 제조된 시럽을 살균한 후 냉각하여 사기 배양액과 일정비율로 혼합, 교반하여 균질화시킨 용기에 포장하여 발효유를 제조하였다.

[0145] **<제제예 5> 유산균 균말의 제조**

[0146] 본 발명의 바실러스 라이체니포미스 BCNU 9094 균주(수탁번호: KACC 91916P)를 MRS 브로스에 10^6 cfu/㎖의 농도로 접종하여 37℃에서 18 ~ 24 시간 동안 pH-조절발효(pH-control fermentation)를 실시하였다. 배양완료 후 4℃에서 10,000 xg로 원심분리하여 균체를 회수하였다. 회수된 균체는 5% 탈지 우유(skim milk)에 2.5% 유장(whey), 5% 수크로오스(sucrose)가 함유된 보호제와 동량으로 혼합된 후 동결건조기를 통해 분말화 하였다. 이렇게 제조한 본 발명의 바실러스 라이체니포미스 BCNU 9094 균주(수탁번호: KACC 91916P)의 건조분말은 모두 1 X 10^{11} cfu/g 이상의 생균수를 나타내었다.

[0147] **<제제예 6> 유산균 제제의 제조**

[0148] 제제예 5에서 제조한 유산균 균말을 이용하여 유산균 식품, 정장제 등의 유산균 제제를 제조하였다. 본 발명의 바실러스 라이체니포미스 BCNU 9094 균주(수탁번호: KACC 91916P)의 건조 분말 20 중량부에 올리고당 10 중량부, 무수포도당 20 중량부, 결정과당 5 중량부, 비타민 C 2 중량부, 과일분말향 5 중량부, 알로에 5 중량부, 식이섬유 15 중량부, 차전자피 18 중량부를 혼합하여 스틱 또는 병에 일정량 분주하여 포자하였다. 이렇게 제조된 유산균 제제는 5 X 10^8 cfu/g 이상의 생균수를 유지하였다.

[0149] **<제제예 7> 미생물 제제의 제조**

[0150] 제제예 5에서 제조한 균말을 이용하여 환경 오염 정화용 제제를 제조하였다. 본 발명의 바실러스 라이체니포미스 BCNU 9094 균주(수탁번호: KACC 91916P)의 건조 분말 55-67%, 인산이암모늄 18-30%, 염화나트륨 5% 및 수분 10%로 이루어진다. 방부제 역할을 하는 염화나트륨은 장기 보존시에도 활성이 떨어지지 않도록 하며, 비료로서 널리 사용되는 인산이암모늄은 실제 현장에 적용시 미생물의 분해 활성이 극대화될 수 있는 농도의 영양염과 pH 등의 조건을 제공한다.

수탁번호

[0151]

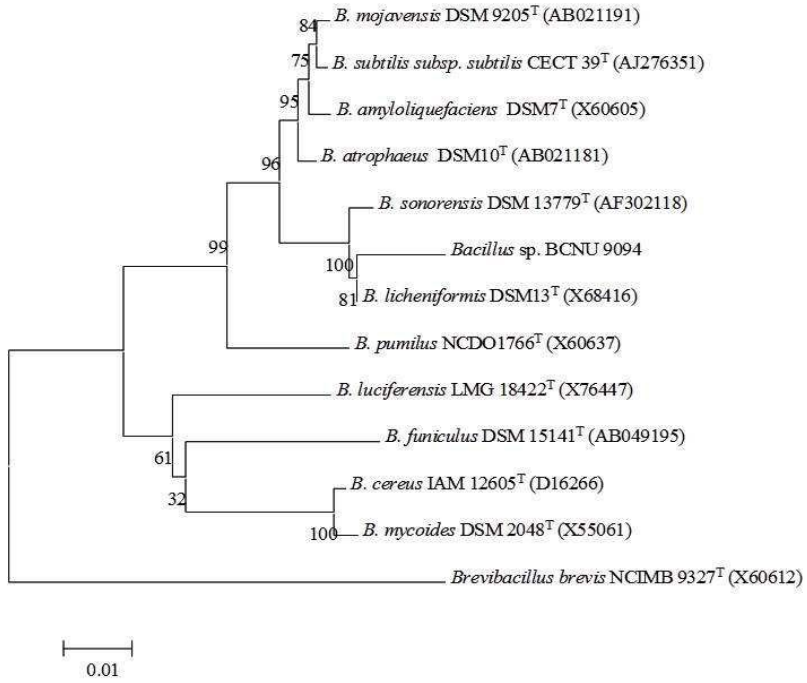
기탁기관명 : 농업생명공학연구원

수탁번호 : KACC91916P

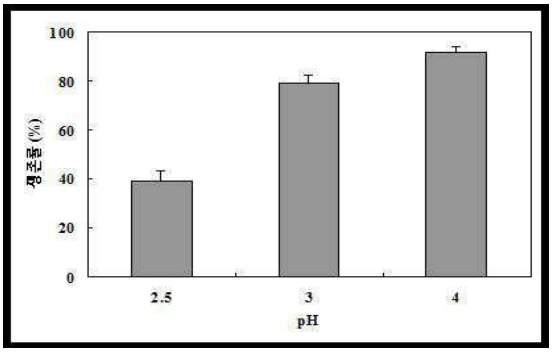
수탁일자 : 20131219

도면

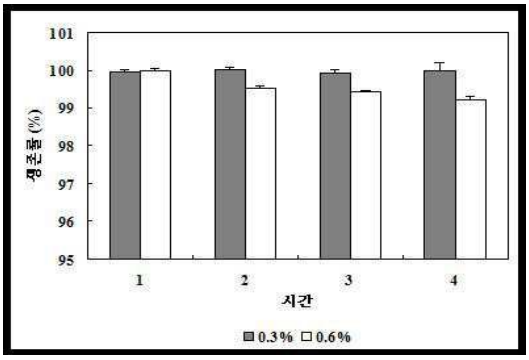
도면1


B. mojavensis DSM 9205T (AB021191)
B. subtilis subsp. subtilis CECT 39T (AJ276351)
B. amyloliquefaciens DSM7T (X60605)
B. atrophaeus DSM10T (AB021181)
B. sonorensis DSM 13779T (AF302118)
Bacillus sp. BCNU 9094
B. licheniformis DSM13T (X68416)
B. pumilus NCDO1766T (X60637)
B. luciferensis LMG 18422T (X76447)
B. funiculus DSM 15141T (AB049195)
B. cereus IAM 12605T (D16266)
B. mycoides DSM 2048T (X55061)
Brevibacillus brevis NCIMB 9327T (X60612)
84
75
95
96
99
100
81
61
32
100
0.01

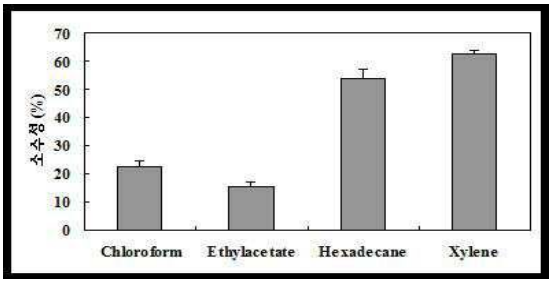
도면2


100
80
60
40
20
0
생존율 (%)
2.5
3
4
pH

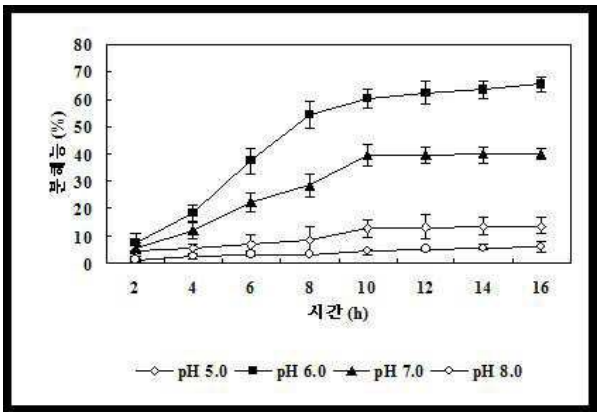
도면3



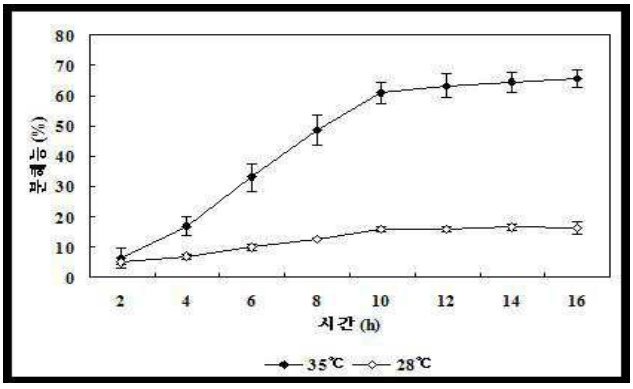
도면4



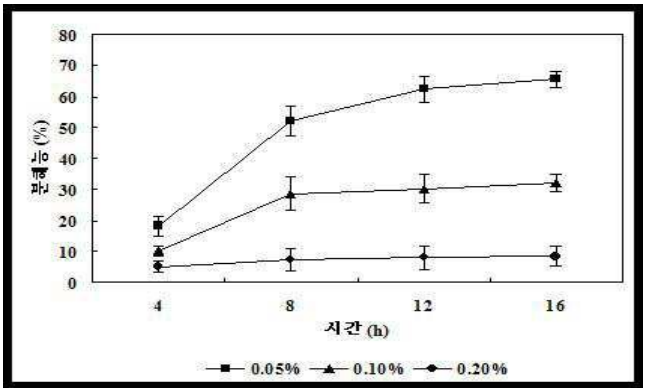
도면5



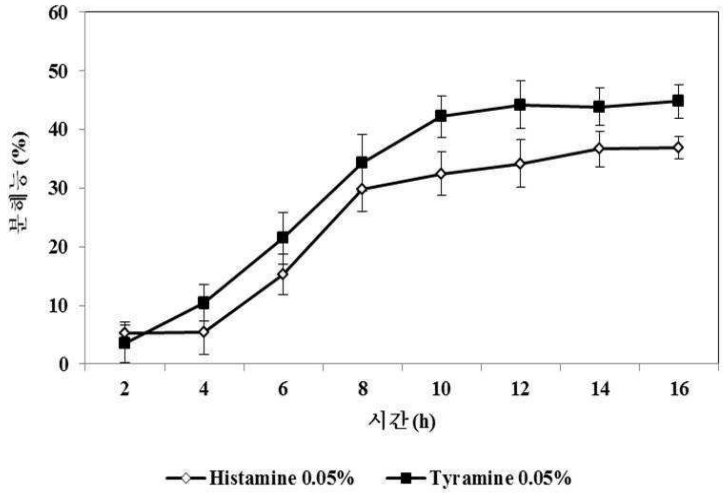
도면6



도면7


80
70
60
50
40
30
20
10
0
분해능 (%)
4
8
12
16
시간 (h)
0.05%
0.10%
0.20%

도면8


60
50
40
30
20
10
0
분해능 (%)
2
4
6
8
10
12
14
16
시간 (h)
Histamine 0.05%
Tyramine 0.05%