(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2025-0040860
(43) 공개일자 2025년03월25일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 1/20 (2006.01) *A23L 29/00* (2025.01)
A23L 33/135 (2016.01) *A61P 31/12* (2006.01)
C12N 9/22 (2006.01) *C12R 1/01* (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 1/205 (2021.05)
A23L 29/065 (2016.08)
(21) 출원번호 10-2024-0032038
(22) 출원일자 2024년03월06일
심사청구일자 2024년03월06일
(30) 우선권주장
1020230122867 2023년09월15일 대한민국(KR)

(71) 출원인
한국식품연구원
전북특별자치도 완주군 이서면 농생명로 245
조선대학교산학협력단
광주광역시 동구 조선대길 126(서석동, 산학협력단)
(72) 발명자
장해춘
광주광역시 남구 서문대로627번길 19(진월동, 한국아델리움), 101동 1002호
문소영
광주광역시 남구 서문대로622번길 7, 308동 1303호
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인다나

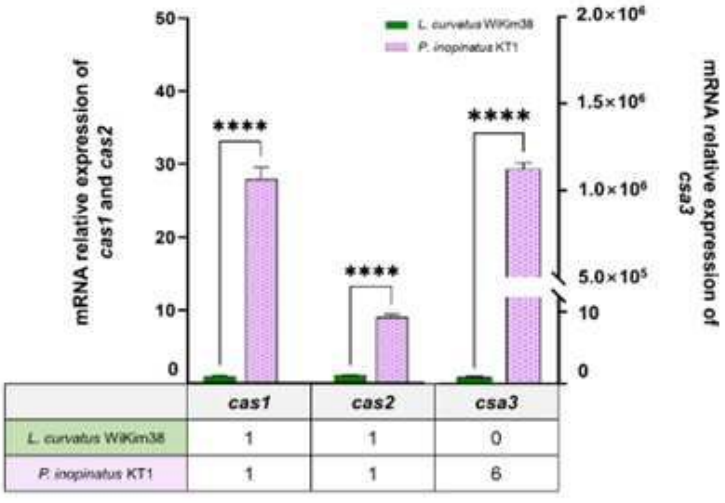
전체 청구항 수 : 총 8 항

(54) 발명의 명칭 **파지 저항성을 갖는 신규한 김치 유산균 페디오코커스 이노피나투스 KT1 균주 및 이의 용도**

(57) 요 약

본 발명에 따른 페디오코커스 이노피나투스 (*Pediococcus inopinatus*) KT1 균주는 김치로부터 분리된 유산균으로서, 파지에 우수한 저항성을 갖고 있으며, 상기 유산균 및 이를 포함하는 조성물은 발효식품 제조, 항바이러스 용도 등 다양하게 활용될 수 있다.

대 표 도 - 도7



(52) CPC특허분류
A23L 33/135 (2016.08)
A61K 35/744 (2013.01)
A61P 31/12 (2018.01)
C12N 9/22 (2013.01)
A23V 2002/00 (2023.08)
A23V 2400/423 (2023.08)
C12R 2001/01 (2021.05)
(72) 발명자
장지윤
광주광역시 남구 봉선2로 51-1, 101동 402호
이우제
광주광역시 남구 봉선2로 51-1, 104동 1002호
이수영
광주광역시 광산구 수등로 287 풍영리버빌아파트, 106동 304호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1711195841
과제번호 KE2301-1
부처명 과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명 세계김치연구소
연구사업명 세계김치연구소연구운영비지원(주요사업비)
연구과제명 김치 품질 차별화를 위한 종균기반 발효조절 기술 개발
과제수행기관명 세계김치연구소
연구기간 2023.01.01 ~ 2023.12.31
이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1711140580
과제번호 2019R1A2C1002643
부처명 과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명 한국연구재단
연구사업명 개인기초연구
연구과제명 유전체분석기술기반 저온 김치발효 우점유산균의 기능성 특성 규명
과제수행기관명 조선대학교 산학협력단
연구기간 2021.03.01 ~ 2021.08.29

명 세 서

청구범위

청구항 1

수탁번호 KCTC15326BP의 페디오코커스 이노피나투스 (*Pediococcus inopinatus*) KT1 균주.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 페디오코커스 이노피나투스 KT1 균주는 묵은지 유래인 것인, 균주.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 페디오코커스 이노피나투스 KT1 균주는 크리스퍼 카스 (CRISPR-Cas) 연관 단백질을 발현하는 것인, 균주.

청구항 4

제3항에 있어서, 상기 크리스퍼 카스 연관 단백질은 *cas1*, *cas2*, *cas9*, *csn2* 및 *csa3*으로 이루어진 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 것인, 균주.

청구항 5

수탁번호 KCTC15326BP의 페디오코커스 이노피나투스 (*Pediococcus inopinatus*) KT1 균주, 이의 배양물, 이의 파쇄물 또는 이의 추출물을 포함하는 발효식품 제조용 미생물 제제.

청구항 6

수탁번호 KCTC15326BP의 페디오코커스 이노피나투스 (*Pediococcus inopinatus*) KT1 균주, 이의 배양물, 이의 파쇄물 또는 이의 추출물을 포함하는 항바이러스용 식품 조성물.

청구항 7

수탁번호 KCTC15326BP의 페디오코커스 이노피나투스 (*Pediococcus inopinatus*) KT1 균주, 이의 배양물, 이의 파쇄물 또는 이의 추출물을 유효성분으로 포함하는 항바이러스용 약제학적 조성물.

청구항 8

수탁번호 KCTC15326BP의 페디오코커스 이노피나투스 (*Pediococcus inopinatus*) KT1 균주, 이의 배양물, 이의 파쇄물 또는 이의 추출물을 스타터(Starter) 균주로 이용하여 발효식품을 제조하는 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 특이적 크리스퍼 카스 (CRISPR-Cas) 시스템으로 강력한 파지 저항성을 갖는 신규한 김치 유산균 페디오코커스 이노피나투스 (*Pediococcus inopinatus*) KT1 균주 및 이의 용도에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 김치는 담근 직후부터 원부재료로부터 유산균 증식이 활발해지면서 발효가 되는 비살균 자연 발효 식품이다. 발효과정 동안 원부재료, 발효온도, 기간, 염도 등의 다양한 발효환경에 따라 김치 내 유산균 천이 현상이 나타나며, 발효에 관여하는 미생물이 생성하는 대사 산물에 따라 김치의 맛과 품질이 다르게 나타난다.

[0003] 미생물 천이는 다양한 발효환경에 의해 영향을 받으며, 특정 세균에 감염하여 사멸시키는 세균 특이적 바이러스인 파지는 이러한 미생물 천이를 유발하는 주요 원인 중 하나이다.

[0004] 유제품을 비롯한 다양한 발효제품은 종래의 자연 발효에서 스타터를 첨가한 인공 발효로 발전하고 있으나, 파지

감염에 의한 스타터의 사멸은 발효제품 (예를 들어, 유제품, 발효 채소제품, 김치 등)의 생산에 가장 큰 문제점이 되고 있다.

[0005] 우리나라의 대표적인 발효 식품인 김치의 대외 경쟁력을 확립하기 위해서는 김치의 맛과 품질을 균일하게 유지하는 것이 중요하다.

[0006] 따라서, 파지에 저항성이 있는 유산균 균주 발굴 및 이들의 유전적 특성을 파악하고, 이러한 유전적 특성을 기존의 발굴된 우수한 김치 종균에 적용하여 파지 저항성을 개량할 필요성이 요구되고 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 이에, 본 발명자들은 특이적 크리스퍼 카스 시스템으로 강력한 파지 저항성을 갖는 신규한 김치 유산균을 예의 연구한 결과, 묵은지 유래의 페디오코커스 이노피나투스 KT1 균주가 높은 파지 저항성을 나타냄으로서 우수한 항바이러스 효과가 있음을 확인하였다.

[0008] 본 발명의 목적은 수탁번호 KCTC15326BP의 페디오코커스 이노피나투스 (*Pediococcus inopinatus*) KT1 균주를 제공하기 위한 것이다.

[0009] 본 발명의 다른 목적은 수탁번호 KCTC15326BP의 페디오코커스 이노피나투스 (*Pediococcus inopinatus*) KT1 균주, 이의 배양물, 이의 파쇄물 또는 이의 추출물을 포함하는 발효식품 제조용 미생물 제제를 제공하기 위한 것이다.

[0010] 본 발명의 또 다른 목적은 수탁번호 KCTC15326BP의 페디오코커스 이노피나투스 (*Pediococcus inopinatus*) KT1 균주, 이의 배양물, 이의 파쇄물 또는 이의 추출물을 포함하는 항바이러스용 식품 조성물을 제공하기 위한 것이다.

[0011] 본 발명의 또 다른 목적은 수탁번호 KCTC15326BP의 페디오코커스 이노피나투스 (*Pediococcus inopinatus*) KT1 균주, 이의 배양물, 이의 파쇄물 또는 이의 추출물을 유효성분으로 포함하는 항바이러스용 약제학적 조성물을 제공하기 위한 것이다.

[0012] 본 발명의 또 다른 목적은 수탁번호 KCTC15326BP의 페디오코커스 이노피나투스 (*Pediococcus inopinatus*) KT1 균주, 이의 배양물, 이의 파쇄물 또는 이의 추출물을 스타터 (Starter) 균주로 이용하여 발효식품을 제조하는 방법을 제공하기 위한 것이다.

과제의 해결 수단

[0013] 이하, 본 발명을 자세히 설명하고자 한다.

[0014] 본 발명의 일 양태는 수탁번호 KCTC15326BP의 페디오코커스 이노피나투스 (*Pediococcus inopinatus*) KT1 균주이다.

[0015] 본 발명에 있어서 페디오코커스 이노피나투스 KT1 균주는 그람 양성균이고 구균 형태로 아이보리 (ivory)색이며 광택을 보인다.

[0016] 본 발명에 있어서 페디오코커스 이노피나투스 KT1 균주는 서열번호 3의 16S rRNA 염기서열을 갖는 것 일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0017] 본 발명에 있어서 페디오코커스 이노피나투스 KT1 균주는 생균체 또는 사균체로서 존재할 수 있으며, 또한 건조 또는 동결 건조된 형태로 존재할 수도 있다. 또한, 페디오코커스 이노피나투스 KT1 균주의 배양물이 유효성분일 수 있으며, 상기 배양물에는 생균 배양액 또는 사균 상등액이 포함될 수 있다. 다양한 조성물 내에 포함시키기 적합한 유산균의 형태 및 제제화 방법은 당업자에게 잘 알려져 있다. 예를 들어, 페디오코커스 이노피나투스 KT1 균주는 공지의 액체 배지 또는 고체 배지에서 배양시켜 수득한 배양물이거나, 상기 균주와 추가의 성분을 함께 배양하여 수득한 발효물이거나, 상기 균주를 유기용매로 추출한 추출물, 상기 균주의 세포막을 용해시키거나, 파쇄 또는 균질화 처리한 용해물(또는 파쇄물) 등의 형태로 제제화 할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0018] 본 발명에 있어서 페디오코커스 이노피나투스 KT1 균주는 묵은지에서 유래된 것일 수 있다.

[0019] 본 발명의 일 실시예에 있어서 묵은지는 저온 (-2 내지 10 ℃)에서 6개월 이상 발효시킨 김치인 것일 수 있다.

[0020] 본 발명의 일 실시예에 있어서 페디오코커스 이나피나투스 KT1 균주는 5 내지 30 ℃에서 생육이 가능하였으며, pH 4 내지 8에서 생육이 가능하였다.

[0021] 본 발명에 있어서 페디오코커스 이나피나투스 KT1 균주는 크리스퍼 카스 (CRISPR-Cas) 연관 단백질을 발현하는 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0022] 본 발명에 있어서 크리스퍼 카스 연관 단백질은 *cas1*, *cas2*, *cas9*, *csn2* 및 *csa3*으로 이루어진 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0023] 본 발명의 일 실시예에 있어서 페디오코커스 이노피나투스 KT1 균주는 일반적인 김치 발효 기간에서 분리한 유산균들에 비해서 방어 관련 유전자의 수가 더 많았다. 특히, *cas1*과 *cas2*의 발현을 유도하는 전사인자인 *csa3*가 6 copy 존재함을 확인하였다. 또한 페디오코커스 이노피나투스 KT1 균주는 크리스퍼 카스의 활동성을 측정할 수 있는 *cas1*과 *cas2*의 유전자 발현이 *csa3* 유전자를 가지지 않은 락티락토바실러스 쿠르바투스 WiKim38 균주보다 *cas1*은 27배, *cas2* 는 8배가 더 활발히 발현하는 것을 확인하였다.

[0024] 본 발명의 일 실시예에 있어서 페디오코커스 이노피나투스 KT1 균주는 크리스퍼 카스의 어레이 (array)에는 기존의 김치에서 분리된 유산균과 비교하여 유의미하게 많은 수의 스페이서를 가지고 있었다. 특히, 페디오코커스 이노피나투스 KT1 균주의 스페이서는 플라스미드, 박테리아를 숙주로 하는 바이러스 등의 외래유전자와 유사하거나 동일한 서열인 것으로 확인하였다. *csa3* 유전자의 개수와 크리스퍼 어레이의 스페이서 개수의 상관관계를 분석한 결과, 명확한 양의 상관관계가 관찰되었으며, 페디오코커스 이노피나투스 KT1의 *csa3* 유전자가 크리스퍼 카스 시스템의 활동성을 활발히 유도함을 확인하였다.

[0025] 본 발명의 일 실시예에 있어서 페디오코커스 이노피나투스 KT1 균주를 첨가한 플레이트에서는 김치 상등액에 플라크가 관찰되지 않았으며, 페디오코커스 이노피나투스 KT1 균주가 바이러스에 우수한 저항성이 있음을 확인하였다.

[0026] 본 발명의 다른 일 양태는 수탁번호 KCTC15326BP의 페디오코커스 이노피나투스 (*Pediococcus inopinatus*) KT1 균주, 이의 배양물, 이의 파쇄물 또는 이의 추출물을 포함하는 발효식품 제조용 미생물 제제이다.

[0027] 본 발명에 있어서 미생물 제제는 통상적인 미생물 제제 제조방법에 따라 제조될 수 있으며, 일반적으로, 배양현탁액이나 건조분말 형태일 수 있다. 또한, 주성분인 상기 페디오코커스 이노피나투스 KT1 균주, 또는 이의 배양액의 유효량에 1종 또는 2종 이상의 약제학적으로 허용 가능한 통상적인 담체 또는 1종 또는 2종 이상의 첨가제를 선택하여 통상적인 제형의 조성물로 제조할 수 있다.

[0028] 본 발명에 있어서 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.

[0029] 본 발명에 있어서 담체 및 첨가제는 약제학적으로 허용 가능한 것은 모두 사용이 가능하며, 구체적으로는 희석제로는 유당 (lactose monohydrate), 옥수수 전분 (cornstarch), 콩기름 (soybean oil), 미결정 셀룰로오스 (microcrystalline cellulose) 또는 만니톨 (D-mannitol)이 좋고, 활택제로는 스테아린산 마그네슘 (magnesiumstearate) 또는 탈크 (talc)가 바람직하며, 결합제로는 폴리비닐피롤리돈 (PVP: polyvinyipyrolidone) 또는 하이드록시프로필셀룰로오스 (HPC: hydroxypropylcellulose) 중에서 선택함이 바람직하다. 또한, 붕해제로는 카르복시메칠셀룰로오스칼슘 (Ca-CMC: carboxymethylcellulose calcium), 전분글리콜산나트륨 (sodium starchglycolate), 폴라크릴린칼륨 (polacrylin potassium) 또는 크로스포비돈 (cross-linked polyvinylpyrrolidone)중에서 선택함이 바람직하고, 감미제로는 백당, 과당, 소르비톨 (sorbitol) 또는 아스파탐 (aspartame) 중에서 선택되고, 안정제로는 카르복시메칠셀룰로오스나트륨 (Na-CMC: carboxymethylcellulose sodium), 베타-싸이크로덱스트린 (β-cyclodextrin), 백납 (white bee's wax) 또는 잔탄검 (xanthan gum) 중에서 선택되며, 방부제로는 파라옥시안식향산메칠 (methyl p-hydroxy benzoate, methlparaben), 파라옥시안식향산프로필 (propyl p-hydroxybenzoate, propylparaben), 또는 소르빈산칼륨 (potassium sorbate) 중에서 선택하는 것이 바람직하나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0030] 본 발명의 또 다른 일 양태는 수탁번호 KCTC15326BP의 페디오코커스 이노피나투스 (*Pediococcus inopinatus*) KT1 균주, 이의 배양물, 이의 파쇄물 또는 이의 추출물을 포함하는 항바이러스용 식품 조성물이다.

[0031] 본 발명에 있어서 항바이러스용 식품 조성물은 바이러스 중 박테리아를 숙주세포로 하는 바이러스인 박테리오파

지에 저항성을 가지는 가지는 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0032] 본 명세서 상 “식품 조성물”은 건강기능식품 조성물을 포함하는 것이다.

[0033] 본 발명에 있어서 "건강기능식품"은 건강기능식품에 관한 법률에 따라 인체에 유용한 기능성을 가진 원료나 성분을 사용하여 제조 및 가공한 식품을 의미(제3조 제1호)하며, "기능성"이라 함은 인체의 구조 및 기능에 대하여 영양소를 조절하거나 생리학적 작용 등과 같은 보건 용도에 유용한 효과를 얻는 것 (동조 제2호)을 의미한다.

[0034] 본 발명의 또 다른 일 양태는 수탁번호 KCTC15326BP의 페디오코커스 이노피나투스 (*Pediococcus inopinatus*) KT1 균주, 이의 배양물, 이의 파쇄물 또는 이의 추출물을 유효성분으로 포함하는 항바이러스용 약제학적 조성물이다.

[0035] 본 발명에 있어서 항바이러스용 약제학적 조성물은 바이러스 중 박테리아를 숙주세포로 하는 바이러스인 박테리오파지에 저항성을 가지는 가지는 것일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0036] 본 발명에 있어서 약제학적 조성물로 활용될 경우, 본 발명의 약제학적 조성물은 상기 페디오코커스 이노피나투스 KT1 균주 이외에 약제학적으로 적합하고 생리학적으로 허용되는 보조제를 사용하여 제조될 수 있으며, 상기 보조제로는 부형제, 붕해제, 감미제, 결합제, 피복제, 팽창제, 윤활제, 활택제 또는 향미제 등을 사용할 수 있다.

[0037] 상기 약제학적 조성물은 투여를 위해서 상기 기재한 유효성분 이외에 추가로 약제학적으로 허용가능한 담체를 1종 이상 포함하여 약제학적 조성물로 바람직하게 제제화 할 수 있다.

[0038] 예를 들어, 정제 또는 캡슐제의 형태로의 제제화를 위해, 유효성분은 에탄올, 글리세롤, 물 등과 같은 경구, 무독성의 약제학적으로 허용가능한 불활성 담체와 결합될 수 있다. 또한, 원하거나 필요한 경우, 적합한 결합제, 윤활제, 붕해제 및 발색제 또한 혼합물로 포함될 수 있다. 적합한 결합제는 이에 제한되는 것은 아니나, 녹말, 젤라틴, 글루코스 또는 베타-락토오스와 같은 천연당, 옥수수감미제, 아카시아, 트래커캔스 또는 소듐올레이트와 같은 천연 및 합성검, 소듐 스테아레이트, 마그네슘 스테아레이트, 소듐 벤조에이트, 소듐아세테이트, 소듐 클로라이드등을 포함한다. 붕해제는 이에 제한되는 것은 아니나, 녹말, 메틸셀룰로스, 아가, 벤토니트, 잔탄검 등을 포함한다. 액상 용액으로 제제화되는 조성물에 있어서 허용가능한 약제학적 담체로는, 멸균 및 생체에 적합한 것으로서, 식염수, 멸균수, 링거액, 완충식염수, 알부민 주사 용액, 덱스트로즈 용액, 말토덱스트린 용액, 글리세롤, 에탄올 및 이들 성분 중 1 성분이상을 혼합하여 사용할 수 있으며, 필요에 따라 항산화제, 완충액, 정균제 등 다른 통상의 첨가제를 첨가할 수 있다. 또한 희석제, 분산제, 계면활성제, 결합제 및 윤활제를 부가적으로 첨가하여 수용액, 현탁액, 유탁액 등과 같은 주사용 제형, 환약, 캡슐, 과립 또는 정제로 제제화할 수 있다.

[0039] 본 발명의 또 다른 일 양태는 수탁번호 KCTC15326BP의 페디오코커스 이노피나투스 (*Pediococcus inopinatus*) KT1 균주, 이의 배양물, 이의 파쇄물 또는 이의 추출물을 스타터 (Starter) 균주로 이용하여 발효식품을 제조하는 방법이다.

[0040] 본 명세서 상 용어 “스타터”란 식품의 발효에 관여하는 미생물을 포함하는 제제로, 발효식품 제조 시 첨가함으로써 숙성된 식품에서 지배적으로 생장하는 미생물을 말한다.

[0041] 본 발명의 유산균 스타터 조성물은 인간 및 동물의 건강증진을 위한 용도, 즉 정장용 조성물, 생균제 (프로바이오틱스) 조성물 또는 유산균 제제로 사용될 수 있으며, 상기 조성물 또는 제제는 본 발명의 유산균의 파쇄된 세포벽 분획, 생균, 사균, 건조균 또는 배양물을 유효성분으로 포함할 수 있으며, 부형제 또는 담체를 추가로 포함할 수 있다. 상기 배양물은 액체배지에서 배양한 배양액 자체, 상기 배양액을 여과 또는 원심분리하여 균주를 제거한 여액 (원심분리한 상등액)등을 포함한다. 조성물 내 유산균 스타터의 함량은 조성물의 용도 및 제형에 따라 달라질 수 있다. 본 발명에 따른 정장용 또는 생균제 조성물은 다양한 제형과 방법으로 제조 및 투여될 수 있다.

[0042] 본 발명의 이점 및 특징, 그리고 그것들을 달성하는 방법은 상세하게 후술되어있는 실시예들을 참조하면 명확해질 것이다. 그러나 본 발명은 이하에서 개시되는 실시예들에 한정되는 것이 아니라 서로 다른 다양한 형태로 구현될 것이며, 단지 본 실시예들은 본 발명의 개시가 완전하도록 하고, 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 발명의 범주를 완전하게 알려주기 위해 제공되는 것이며, 본 발명은 청구항의 범주에 의해 정의될 뿐이다.

발명의 효과

[0043] 본 발명에 따른 페디오코커스 이노피나투스 (*Pediococcus inopinatus*) KT1 균주는 김치로부터 분리된 유산균으로서, 파지에 우수한 저항성을 갖고 있으며, 상기 유산균 및 이를 포함하는 조성물은 발효식품 제조, 항바이러스 용도 등 다양하게 활용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0044] 도 1은 본 발명의 일 실시예에 따른 묵은지로부터 페디오코커스 이노피나투스 (*Pediococcus inopinatus*) KT1 균주를 분리하는 과정(A) 및 메타게놈 분석 결과(B)를 나타낸 도이다.

도 2는 본 발명의 일 실시예에 따른 페디오코커스 이노피나투스 KT1 균주의 그람 염색 결과를 나타낸 도이다.

도 3은 본 발명의 일 실시예에 따른 페디오코커스 이노피나투스 KT1 균주의 균학적 특징을 평가하여 나타낸 도이다.

도 4는 본 발명의 일 실시예에 따른 묵은지로부터 분리된 페디오코커스 이노피나투스 KT1 균주의 배양 온도에 따른 생육을 평가한 결과를 나타낸 그래프이다.

도 5는 본 발명의 일 실시예에 따른 묵은지로부터 분리된 페디오코커스 이노피나투스 KT1 균주의 배양 초기 pH에 따른 생육을 평가한 결과를 나타낸 그래프이다.

도 6은 본 발명의 일 실시예에 따른 김치로부터 분리한 유산균 29종의 크리스퍼 카스 관련 유전자 개수를 분석한 결과를 나타낸 히스토그램이다.

도 7은 본 발명의 일 실시예에 따른 페디오코커스 이노피나투스 KT1 균주의 *cas1*, *cas2* 및 *csa3*의 발현량을 분석한 결과를 나타낸 그래프이다.

도 8은 본 발명의 일 실시예에 따른 김치로부터 분리한 유산균 71종의 스페이서 개수를 분석한 결과를 나타낸 도이다.

도 9는 본 발명의 일 실시예에 따른 크리스퍼 카스 어레이 내 *csa3* 카피 수와 스페이서 개수와의 연관성을 분석한 결과를 나타낸 그래프이다.

도 10은 본 발명의 일 실시예에 따른 페디오코커스 이노피나투스 KT1, BB2, WiKim15, DSM 20285^{T}, BC1 균주의 크리스퍼 카스 어레이 내 스페이서 시퀀스 유사도를 비교한 결과를 나타낸 도이다.

도 11은 본 발명의 일 실시예에 따른 페디오코커스 이노피나투스 KT1, BB2, WiKim15, DSM 20285^{T}, BC1 균주의 크리스퍼 어레이 내 동일한 시퀀스 스페이서 개수를 분석한 결과를 나타낸 벤다이어 그램이다.

도 12는 본 발명의 일 실시예에 따른 락티플란티바실러스 플란타룸과 페디오코커스 이노피나투스 균주의 크리스퍼 어레이내 스페이서 타겟 유전자를 비교한 결과를 나타낸 도이다.

도 13은 본 발명의 일 실시예에 따른 박테리오파지가 포함된 김치 상등액에 대한 류코노스톡 메센테로이드 및 페디오코커스 이노피나투스 균주의 저항성을 분석한 결과를 나타낸 도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0045] 이하, 본 발명을 실시예를 통해 상세히 설명한다. 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐 본 발명의 범위가 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0047] **실시예 1. 페디오코커스 이노피나투스 KT1 균주의 분리 및 동정**

[0048] 저온 (-2 내지 10° C)에서 6개월 이상 발효시킨 34개의 묵은지 중 30개에서 공통적으로 우점하고 있는 유산균을 분리하였다 (도 1).

[0049] 구체적으로, 묵은지 샘플들을 핸드 블렌더 (HHM-600, 한일, 한국)로 블렌딩 한 다음 멸균된 얇은 천으로 걸러내었다. 준비된 묵은지 여과물은 0.1 % 펩톤수로 연속 희석하여 2.0 % $CaCO_3$를 첨가한 드만, 로고사, 샤프 (MRS, Difco, USA) 한천에 뿌렸다. 배지를 30 ℃에서 2 내지 3일 배양한 다음 배지의 콜로니를 분화시키고 콜로니 형

태와 색을 기준으로 계수하였다. 플레이트의 콜로니 주위에 명확한 영역을 보이는 균주를 잠정적 유산균으로 분리하였다.

[0050] 분리균주들은 16s rRNA 염기서열 분석을 통하여 동정하였다. 분리균주의 DNA는 Dneasy Blood & Tissue Kits (Qiagen, Germany)을 사용하여 추출하였으며, 마크로젠에 의뢰하여 하기 표 1의 유니버셜 프라이머를 사용하여 16s rRNA 염기서열 분석을 수행하였다.

표 1

[0051]

명칭	서열번호	서열 (5'à 3')
27F	1	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG
1492R	2	GGTTACCTTGTTACGACTT

[0053] 분석 결과, 100% 상동성을 가지는 서열번호 3의 페디오코커스 이노피나투스 (*Pediococcus inopinatus*) KT1 균주를 확인하였다.

[0054] 상기 페디오코커스 이노피나투스 KT1이 분리된 묵은지의 미생물 군집 분석을 위하여 DNeasyPowerSoil kit (Qiagen)을 사용하여 김치여액으로부터 genomic DNA를 추출하였다. Library는 Illumina 16S Metagenomic Sequencing Library의 프로토콜에 따라 제작되었으며 Paired-end sequencing은 Illumina MiSeq platform (Illumina)을 통해 마크로젠에서 진행되었다.

[0055] 분석 결과, 페디오코커스 이노피나투스의 우점률이 62.9%로 가장 우점하는 유산균인 것으로 확인되었다.

[0056] 상기 페디오코커스 이노피나투스 KT1 균주는 한국생명공학연구원 생물자원센터에 2023년 02월 15일자로 수탁번호 KCTC15326BP로 기탁하였다.

[0058] **실시예 2. 균학적 특징 평가**

[0059] 페디오코커스 이노피나투스 KT1 균주는 원형에 아이보리 (ivory)색이며 광택을 보인다. 그람 염색 결과 그람 양성에 구균 형태를 나타내었다 (도 2).

[0060] Biomerieux사의 유산균 동정용 API 50 CH kit를 이용한 실험으로 추가 특성을 관찰하였다. 대조군으로는 페디오코커스 이노피나투스 KACC 12308^{T}균주를 비교하였으며, 그 결과를 하기 표 2 및 도 3에 나타내었다.

표 2

[0061]

순번	당	KACC 12308^{T}	KT1
1	Glycerol	-	-
2	Erythritol	-	-
3	D-Arabinose	-	-
4	L-Arabinose	-	-
5	Ribose	-	-
6	D-Xylose	-	-
7	L-Xylose	-	-
8	Adonitol	-	-
9	Methyl-BD-xylopyranosicle	-	-
10	D-Galactose	+	+
11	D-Glucose	+	+
12	D-Fructose	+	+
13	D-Mannose	+	+
14	L-Sorbose	-	-
15	Rhamnose	-	-
16	Dulcitol	-	-
17	Inositol	-	-

18	Mannitol	-	-
19	Sorbitol	-	-
20	α-Methyl-D-mannoside	-	+
21	α-Methyl-D-Glucoside	-	-
22	N-Acetyl glucosamine	+	+
23	Amygdaline	+	+
24	Arbutin	+	w
25	Esculin	+	+
26	Salicine	+	+
27	Cellobiose	+	+
28	Maltose	-	+
29	Lactose	-	w
30	Melibiose	-	-
31	Sucrose	-	+
32	Trehalose	+	+
33	Inuline	-	-
34	Melezitose	-	-
35	Rafiinose	-	-
36	Starch	-	-
37	Glycogen	-	-
38	Xylitol	-	-
39	β-Gentiobiose	+	+
40	D-Turanose	-	+
41	D-Lyxose	-	-
42	D-Tagatose	-	-
43	D-Fucose	-	-
44	L-Fucose	-	-
45	D-Arabitol	-	-
46	L-Arabitol	-	-
47	Gluconate	-	-
48	2 Keto-gluconate	-	-
49	5 keto-gluconate	-	-

[0062] +: 양성 반응, -: 음성 반응, w: 약한 양성

[0063] 페디오코커스 이노피나투스 KT1 균주는 페디오코커스 이노피나투스 KACC 12308^{T}균주와 비교하였을 때 α-Methyl-D-mannoside, Maltose, Lactose, sucrose 및 D-Turanose 대사능에서 차이를 나타내었다.

[0065] **실시예 3. 배양온도 및 배지 초기 pH에 따른 균주의 생육평가**

[0066] **3-1. 배양온도에 따른 균주의 생육 평가**

[0067] 묵은지로부터 분리된 페디오코커스 이노피나투스 KT1 균주의 배양 온도에 따른 생육을 평가하였다. 대조군으로는 페디오코커스 이노피나투스 KACC 12308^{T}균주와 비교하였다.

[0068] 실험 결과, 페디오코커스 이노피나투스 KT1 균주는 5 내지 30 ℃에서 생육이 가능하며 30 ℃에서 최적 생육을 나타내었다 (도 4).

[0070] **2-2. pH에 따른 균주의 생육평가**

[0071] 묵은지로부터 분리된 페디오코커스 이노피나투스 KT1 균주의 배양 초기 pH에 따른 생육을 평가하였다. 대조군으로는 페디오코커스 이노피나투스 KACC 12308^{T}균주와 비교하였다.

[0072] 실험 결과, 페디오코커스 이노피나투스 KT1 균주는 pH 4 내지 8에서 생육이 가능하며 pH 6.0 내지 6.5에서 최적 생육을 나타내었다 (도 5).

[0074] **실시예 3. 크리스퍼 카스 관련 유전자 분석**

[0075] 김치로부터 분리한 유산균 29종의 크리스퍼 카스 관련 유전자 개수를 분석하였다.

[0076] 페디오코커스 이노피나투스 KT1의 전장 유전체 염기서열 분석을 하였다. 페디오코커스 이노피나투스 KT1의 DNA는 Dneasy Blood & Tissue Kits (Qiagen, Germany)을 사용하여 추출하였으며 PacBio RS Ⅱ (Pacific Biosciences, USA)와 Illumina HiseqXten platform (Illumina, USA)를 사용하여 유전자 서열을 분석하였다. 생산된 염기서열은 Unicycler Hybrid Assembly v. 0.4.6와 Pilon v. 1.21을 사용하여 조립하였다. 김치유산균 28종의 염기서열은 미국 국립생물공학정보센터 (NCBI)에서 다운로드하였다. 상기 김치유산균 29종의 염기서열은 Anvi'o v 7.0 workflow를 이용하여 Pan-genome 분석을 진행하였다.

[0077] 페디오코커스 이노피나투스 KT1는 일반적인 김치 발효 기간에서 분리한 유산균들에 비해서 방어 관련 유전자의 수가 더 많았다. 특히, *cas1*과 *cas2*의 발현을 유도하는 전사인자인 *csa3*가 6 copy 존재하였으며, 이는 다른 김치 유래 유산균에 비해 월등히 많은 개수를 나타내었다 (도 6).

[0078] 페디오코커스 이노피나투스 KT1의 카스 유전자 발현을 분석하였다. 비교 실험군으로는 김치 유산균 중 *cas1*, *cas2*는 보유하고 있으나 *csa3*는 보유하지 않은 락티락토바실러스 쿠르바투스 (*Latilactobacillus curvatus*) WiKim38 (RefSeq. GCF_001723545.1) 균주를 사용하였다.

[0079] 구체적으로, 세포를 수확 (9950 × g, 15분, 4 ° C)하고 1 mL의 Trizol 시약에 다시 현탁하였다. 현탁액을 2 mL 용해 매트릭스 E튜브(미국 MP 바이오메디컬스)로 옮긴 후 FastPrep-24 기기(MP 바이오메디컬스)를 사용하여 4.0 m/s에서 40초 동안 비드를 두 번 치는 방식으로 균질화하였다. 그런 다음 제조업체의 프로토콜에 따라 총 RNA를 추출하였다. 추출된 각 균주의 RNA는 Bio-Rad CFX96 실시간 PCR 검출 시스템에서 QuantiNova SYBR Green RT-PCR 키트(Qiagen, 208154)를 사용하여 원스텝 qRT-PCR에 사용하였다. 실시간 사이클러 조건은 역전사를 위해 50 ° C에서 10분 역전사를 위해 50 ° C에서 10분, 변성을 위해 95 ° C에서 2분, 95 ° C에서 5초, 60 ° C에서 10초씩 36주기를 수행하였다. 각 사이클이 끝날 때마다 형광 데이터를 수집하였다. *csa3*, *cas1*, *cas2*의 발현 수준 차이는 내인성 유전자인 16S rRNA의 발현을 기준으로 평가하였다. 상대적 발현은 ΔΔCt에 의해 결정되었고, T-테스트는 Prism 9.0을 사용하여 수행하였다.

[0080] 크리스퍼 카스의 활동성을 측정할 수 있는 *cas1*과 *cas2*의 유전자 발현은 페디오코커스 이노피나투스 KT1는 *csa3* 유전자를 가지지 않은 락티락토바실러스 쿠르바투스에 비해 *cas1*은 27배, *cas2* 8배가 더 활발히 발현하는 것을 확인할 수 있었다 (도 7).

[0082] **실시예 4. 스페이서 구성에 따른 균주의 서열 유사성 분석**

[0083] 크리스퍼 시스템은 감염으로부터 부분적인 염기 서열을 획득하는 적응 면역 시스템으로, 노출 환경에 따라 스페이서 (spacer)의 서열이 크게 달라진다. 이노피나투스에서 스페이서 서열의 다양성을 조사하기 위해 이노피나투스 균주에서 스페이서의 서열 유사성을 분석하였다. 김치유산균 68종의 염기서열은 미국 국립생물공학정보센터 (NCBI)에서 다운로드하였다.

[0084] 페디오코커스 이노피나투스 KT1의 크리스퍼 카스의 어레이 (array)에는 기존의 김치에서 분리된 유산균과 비교하여 유의미하게 많은 수의 스페이서를 가지고 있었다 (도 8). 추가적으로, *csa3* 유전자의 개수와 크리스퍼 어레이의 스페이서 개수의 상관관계를 분석한 결과, 명확한 양의 상관관계가 관찰되었다 (도 9). 결과적으로 페디오코커스 이노피나투스 KT1의 *csa3* 유전자가 크리스퍼 카스 시스템의 활동성을 활발히 유도함을 확인할 수 있었다.

[0085] 페디오코커스 이노피나투스는 생성된 환경에 따라 유사한 또는 이질적인 스페이서 시퀀스를 획득하였다 (도 10). 예를 들어, 페디오코커스 이노피나투스가 맥주에서 분리되었을 경우 (DSM 20285^{T}), 김치 유래 KT1, WiKim15 (RefSeq. GCF_001641385.1) 균주의 스페이서(spacer) 시퀀스와 일치하는 경우가 매우 제한적인 반면, 김치 유래 KT1, WiKim15 균주는 서로 매우 유사한 스페이서(spacer) 시퀀스를 가지고 있음을 확인할 수 있었다 (도 11). 이러한 분석 결과는 동일한 종이라 하더라도 크리스퍼 어레이에 포함되어 있는 스페이서는 매우 다양하다는 것을 의미한다.

[0086] 또한, 김치 주요 유산균주 중 하나인 락티플란티바실러스 플란타룸 균주 중 크리스퍼 카스 시스템을 보유한 8종

의 크리스퍼 카스 어레이(array)의 스페이서와 비교하여, 더 다양하고 많은 파지 및 플라스미드에 일치하는 유전자 서열을 가지고 있었다 (도 12). 이러한 데이터를 통해 페디오코커스 이노피나투스가 락티플란티바실러스 플란타룸보다 외부 유전자 침입에 더 강력한 저항성을 가지고 있음을 확인할 수 있었다.

[0088] **실시예 5. 플라크 분석**

[0089] 박테리오파지에 대한 페디오코커스 이노피나투스의 저항성을 시험하기 위해서, 플라크 분석 (Plaque assay)을 수행하였다.

[0090] 김치 파지 용액을 얻기 위해 4 ° C에서 90일 동안 발효시킨 김치 샘플을 여과하고 여과액을 3000 × g에서 15분간 원심분리를 하였다. 상층액은 고체 이물질의 이동이나 포함을 방지하기 위해 조심스럽게 수집하였다. 김치 상층액의 잔류 박테리아는 0.45 μm 멸균 주사기 필터(Satorius, 독일)를 통해 여과하여 제거하였다. 숙주 세포로는 페디오코커스 이노피나투스 KT1과 크리스퍼 카스 유전자가 없는 류코노스톡 메센테로이데스 (*Leuconostoc mesenteroides*) WiKim33을 준비하였다. 배양된 각 실험실 균주를 김치 상등액과 혼합하여 0.6% MRS 연성 한천 3 mL에 접종한 후 MRS 한천 플레이트에 겹쳐서 접종하였다. 음성 대조군으로 김치 상등액을 처리하지 않고 동일한 실험을 수행하였다. 30 ℃에서 24시간 배양한 후, 류코노스톡 메센테로이데스 WiKim33과 페디오코커스 이노피나투스 KT1의 배양 접시 간 플라크 형성을 비교하였다.

[0091] 김치 상등액을 처리한 플레이트 중 류코노스톡 메센테로이드스 WiKim33 플레이트에서는 고밀도의 플라크가 관찰되었지만 (박테리오파지에 의한 유산균 사멸), 페디오코커스 이노피나투스 KT1 플레이트에서는 플라크가 관찰되지 않았다 (도 13).

[0092] 이를 통해, 페디오코커스 이노피나투스 KT1은 바이러스에 우수한 저항성이 있음을 확인할 수 있었다. 또한, 김치 발효 중 김치 유산균의 연속성은 김치 내 박테리오파지에 의해 결정될 수 있음을 확인하였다.

수탁번호

[0094]

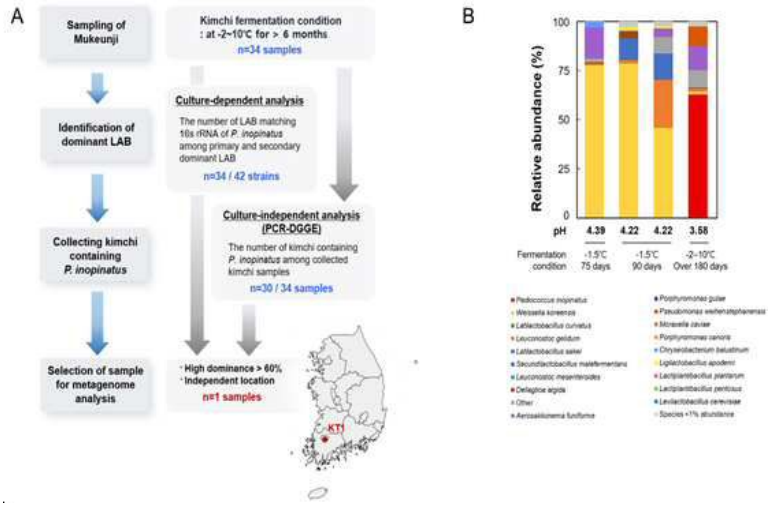
기탁기관명 : 한국생명공학연구원 생물자원센터(KCTC)

수탁번호 : KCTC15326BP

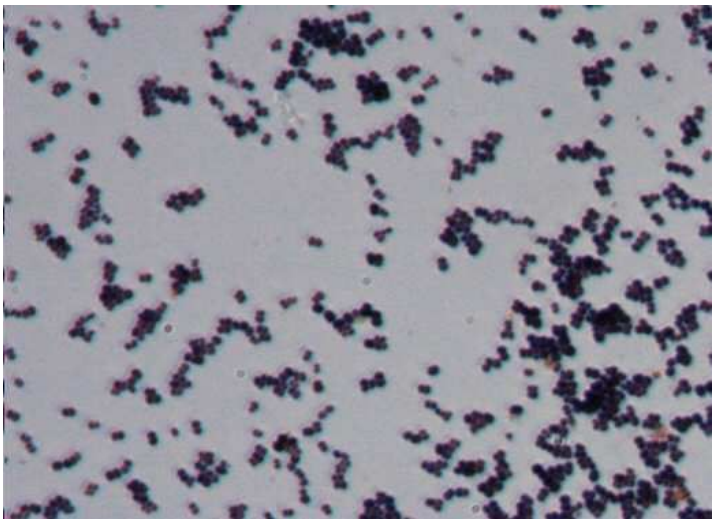
수탁일자 : 20230215

도면

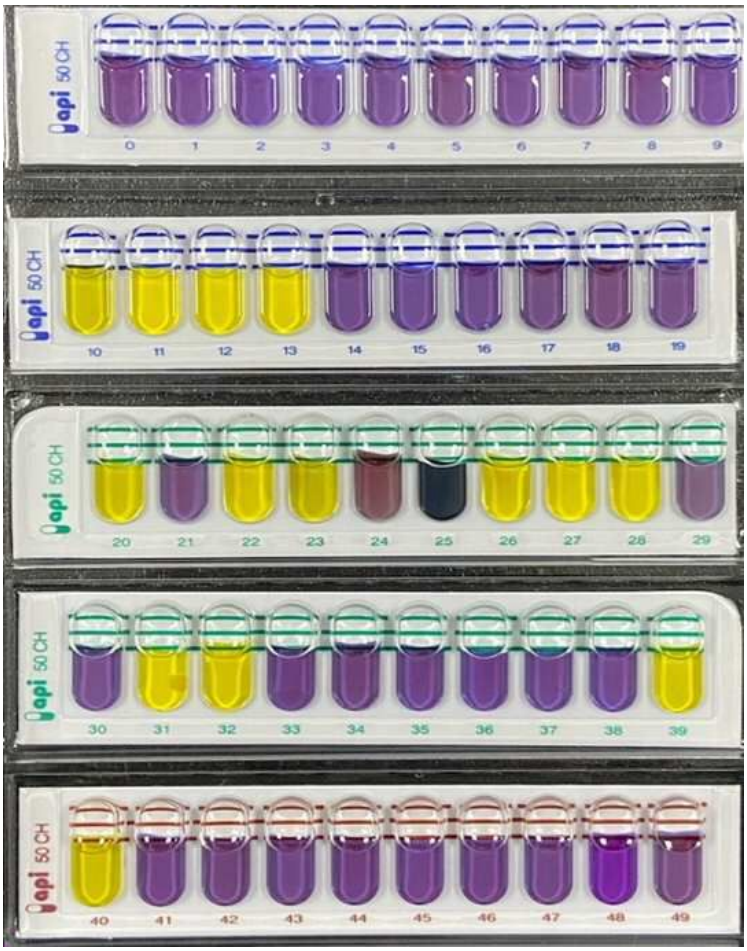
도면1



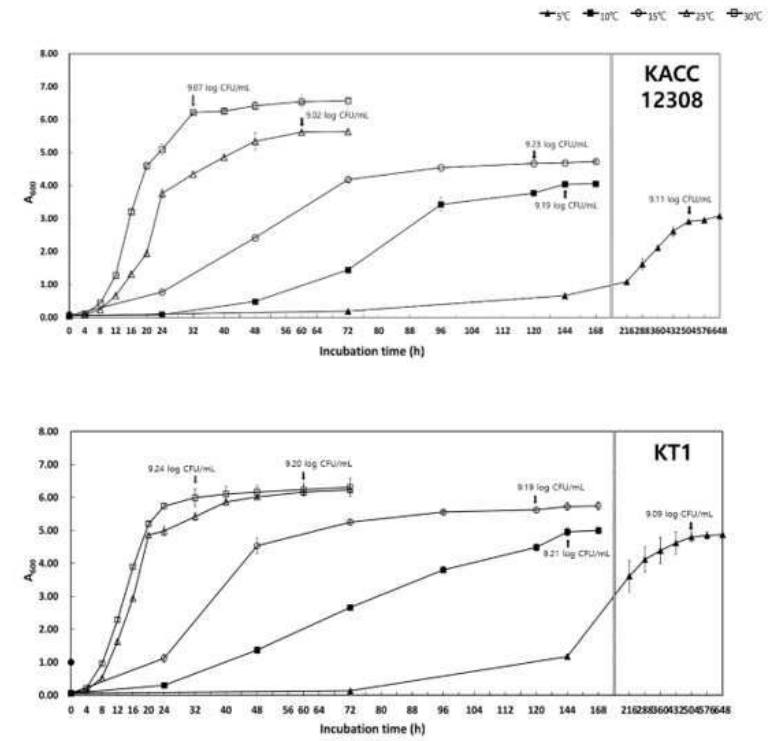
도면2



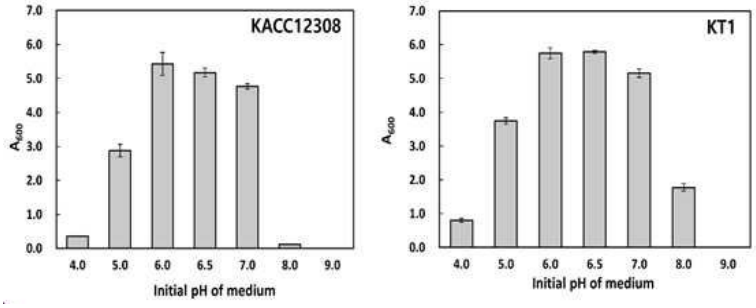
도면3


api 50 CH
0 1 2 3 4 5 6 7 8 9
api 50 CH
10 11 12 13 14 15 16 17 18 19
api 50 CH
20 21 22 23 24 25 26 27 28 29
api 50 CH
30 31 32 33 34 35 36 37 38 39
api 50 CH
40 41 42 43 44 45 46 47 48 49

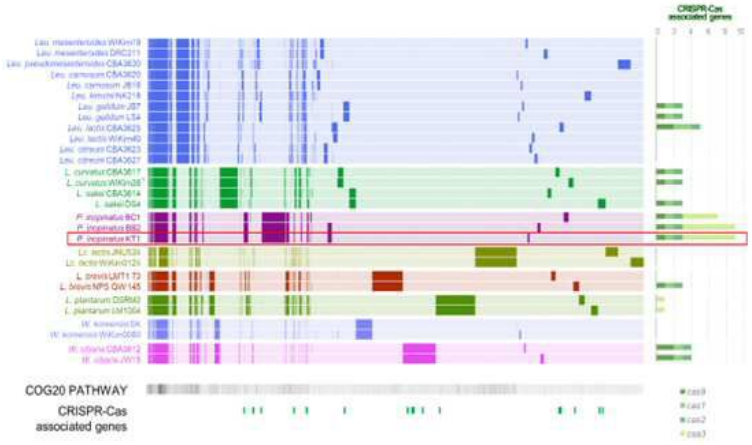
도면4


5℃
10℃
15℃
25℃
30℃
KACC 12308
9.07 log CFU/mL
9.02 log CFU/mL
9.23 log CFU/mL
9.19 log CFU/mL
9.11 log CFU/mL
Incubation time (h)
KT1
9.24 log CFU/mL
9.20 log CFU/mL
9.19 log CFU/mL
9.21 log CFU/mL
9.09 log CFU/mL
Incubation time (h)

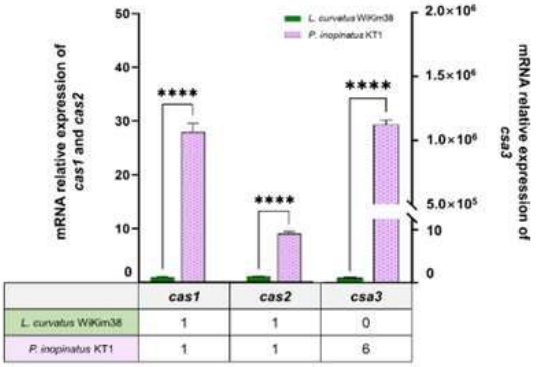
도면5


KACC12308
KT1
Initial pH of medium
Initial pH of medium

도면6

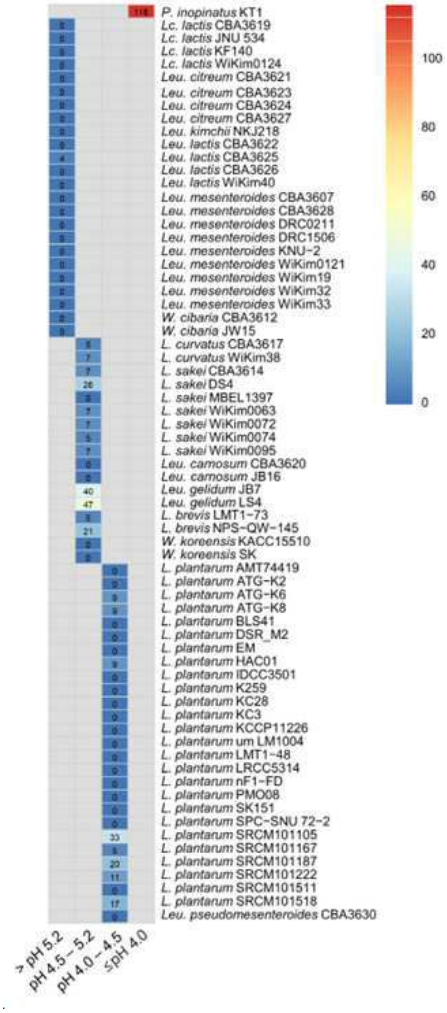

COG20 PATHWAY
CRISPR-Cas associated genes

도면7

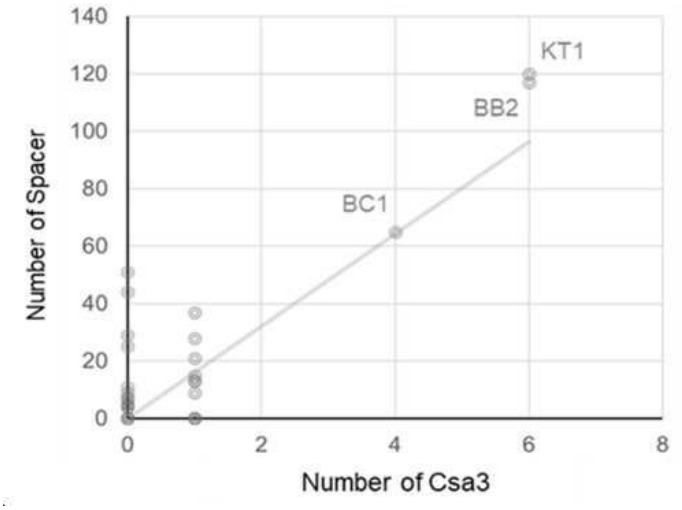


	cas1	cas2	csa3
L. curvatus WiKim38	1	1	0
P. inopinatus KT1	1	1	6

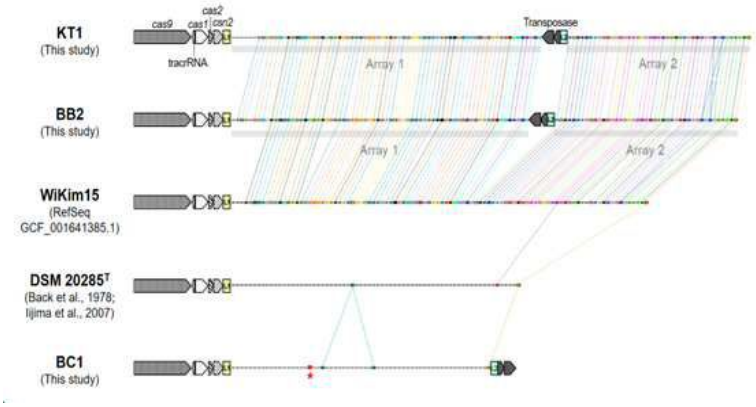
도면8



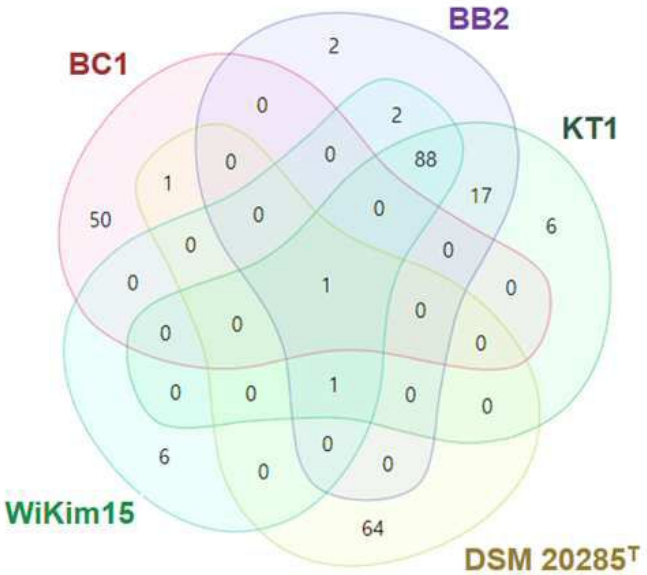
도면9


140
120
100
80
60
40
20
0
Number of Spacer
0
2
4
6
8
Number of Csa3
KT1
BB2
BC1

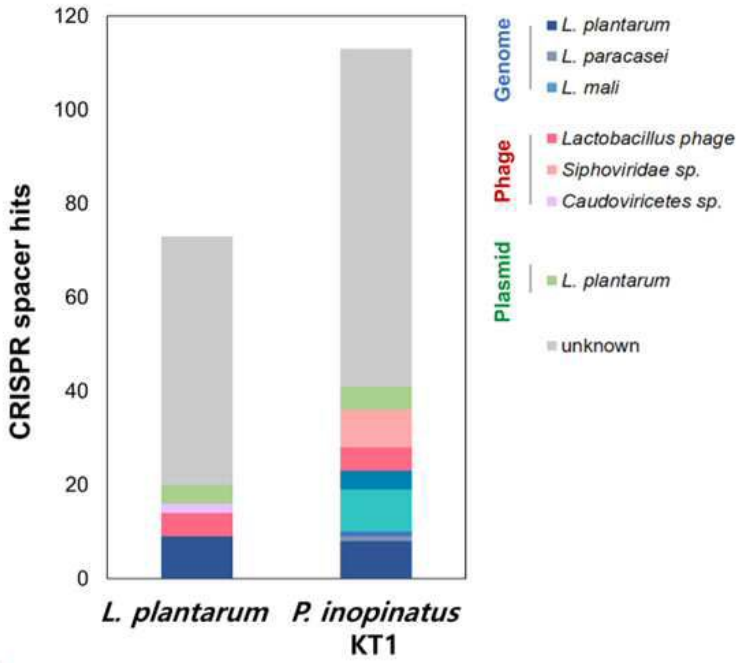
도면10


KT1
(This study)
cas9
cas2
cas1/csn2
tracrRNA
Transposase
Array 1
Array 2
BB2
(This study)
Array 1
Array 2
WiKim15
(RefSeq
GCF_001641385.1)
DSM 20285T
(Back et al., 1978;
Iijima et al., 2007)
BC1
(This study)

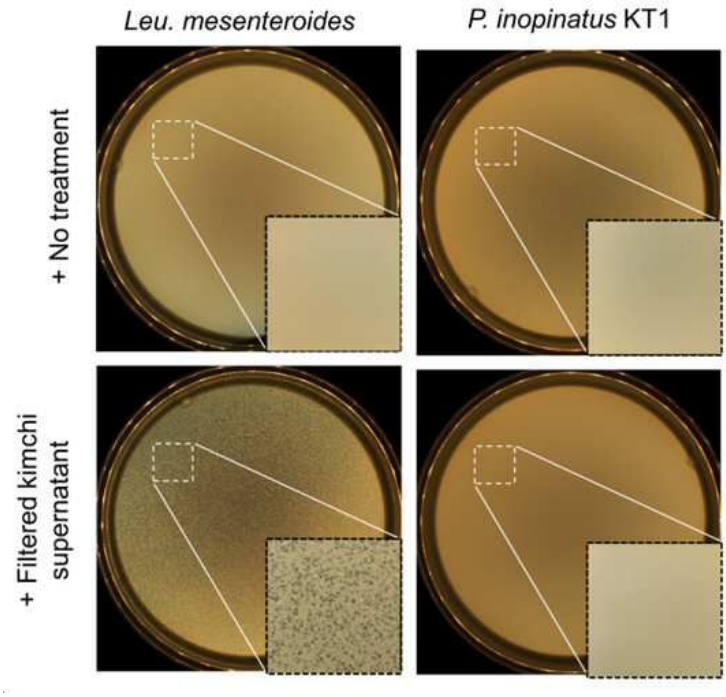
도면11


BB2
BC1
KT1
WiKim15
DSM 20285T
2
0
2
0
0
88
1
17
50
0
6
0
0
0
1
0
0
0
0
0
0
1
0
0
0
0
6
0
0
64

도면12


CRISPR spacer hits
120
100
80
60
40
20
0
L. plantarum
P. inopinatus
KT1
Genome
L. plantarum
L. paracasei
L. mali
Phage
Lactobacillus phage
Siphoviridae sp.
Caudoviricetes sp.
Plasmid
L. plantarum
unknown

도면13


Leu. mesenteroides
P. inopinatus KT1
+ No treatment
+ Filtered kimchi supernatant

서 열 목 록 (첨부)



아이콘을 클릭하시면 서열목록 파일이 열립니다.

본 공보 PDF는 첨부파일을 가지고 있습니다. Acrobat Reader PDF뷰어를 제공하지 않는 브라우저(크롬, 파이어폭스, 사파리 등)의 경우 첨부파일 열기가 제한되어 있으므로 Acrobat Reader PDF뷰어 설치 후 공보 PDF를 다운로드 받아 해당 뷰어에서 조회해주시기 바랍니다.