(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2016-0034016
(43) 공개일자 2016년03월29일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 1/20 (2006.01) *A23L 33/00* (2016.01)
A61K 8/99 (2006.01) *A61P 21/00* (2006.01)
C12P 7/52 (2006.01) *C12R 1/24* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2014-0125008
(22) 출원일자 2014년09월19일
심사청구일자 2014년09월19일

(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

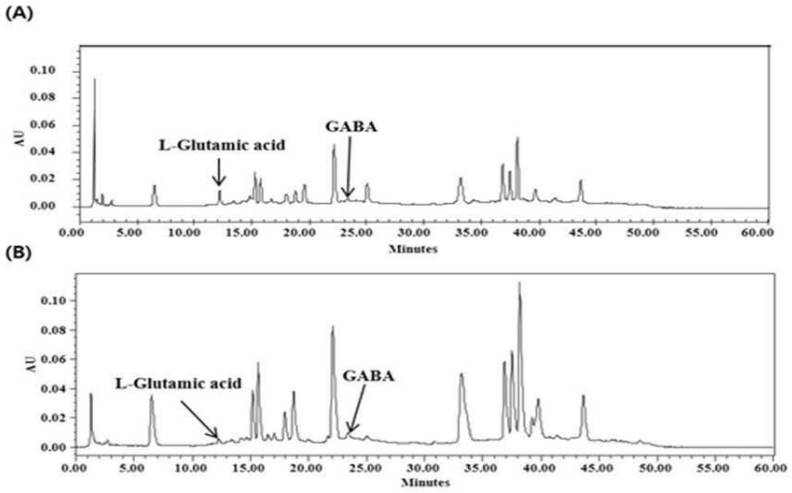
전체 청구항 수 : 총 8 항

(54) 발명의 명칭 **신종균 락토바실러스 브레비스 ＴＨＫ-ａＤ110 및 이를 이용한 ＧＡＢＡ 생산 방법**

(57) 요 약

본 발명은 신종균 락토바실러스 브레비스 THK-aD110(*Lactobacillus brevis* THK-aD110) 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 화장료 조성물로 유용하게 사용될 수 있다.

대 표 도 - 도3



(72) 발명자

양정은

경기도 용인시 기흥구 흥덕4로30번길 28-14 (영덕동)

손홍민

경기도 하남시 대성로 271 (덕풍동)

송현근

인천광역시 남구 수봉북로12번길 24 (도화동)

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

명 세 서

청구범위

청구항 1

락토바실러스 브레비스 THK-aD110(*Lactobacillus brevis* THK-aD110)(수탁번호 KCTC 12638BP).

청구항 2

락토바실러스 브레비스 THK-aD110(수탁번호 KCTC 12638BP) 균주를 이용하여 글루탐산으로부터 GABA를 생산하는 방법.

청구항 3

제2항에 있어서, 상기 균주는 수크로스(sucrose), 효모 추출물(yeast extract), 및 망간 설페이트(manganese sulfate)를 포함하는 MRS 배지에서 배양되는 방법.

청구항 4

제2항에 있어서, 상기 배지에 상기 수크로스는 1 내지 3 %, 상기 효모 추출물은 0.1 내지 3 %, 상기 망간 설페이트는 0.0001 내지 0.1 % (w/v) 포함되는 방법.

청구항 5

제2항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 균주는 28 내지 34 ℃에서 배양되는 방법.

청구항 6

락토바실러스 브레비스 THK-aD110(수탁번호 KCTC 12638BP) 균주의 배양물을 포함하는 식품 조성물.

청구항 7

락토바실러스 브레비스 THK-aD110(수탁번호 KCTC 12638BP) 균주의 배양물을 포함하는 화장료 조성물.

청구항 8

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

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 신종균 락토바실러스 브레비스 THK-aD110(*Lactobacillus brevis* THK-aD110) 및 이를 이용하여 GABA를 생산하는 방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] γ-아미노부티르산(γ-aminobutyric acid, 이하 GABA)은 비-단백질 아미노산의 일종이다. GABA는 포유류의 중추신경계에서 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 개발되어 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-aD110 및 이를 이용하여 글루탐산으로부터 GABA를 생산하는 방법을 제공하고자 한다.

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

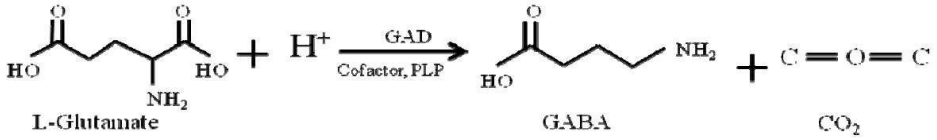
과제의 해결 수단

[0006] 상기 과제를 달성하기 위하여, 본 발명은 신종균인 락토바실러스 브레비스 THK-aD110(수탁번호 KCTC 12638BP)를 제공한다.

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

[0011] 본 발명의 락토바실러스 브레비스 THK-aD110은 우수한 효율로 글루탐산을 저분자화하여 GABA를 생산할 수 있다.

[0012] 본 발명의 일 구현예로서, 상기 방법은 상기 균주를 수크로스(sucrose), 효모 추출물(yeast extract), 및 망간 설페이트(manganese sulfate)를 포함하는 MRS 배지에서 배양하여 수행될 수 있다.

[0013] 본 발명자들은 상기 락토바실러스 브레비스 THK-aD110의 최적 배양 배지를 연구한 결과 수크로스, 효모 추출물 및 망간 설페이트를 포함하는 배지에서 세포 성장 및 GABA 생산이 모두 우수하게 나타남을 확인하였으며, 바람직하게는 수크로스 1 내지 3 %, 효모 추출물 0.1 내지 3 %, 망간 설페이트 0.0001 내지 0.1 %, 보다 바람직하게는 수크로스 2%, 효모 추출물 1%, 망간 설페이트 0.005%를 포함하는 경우에 균주의 성장 및 GABA 생산이 모두 가장 우수하게 나타나는 것을 확인하였다. 그러나 배양 배지는 이에 제한되지 않는다.

[0014] 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.

[0015] 본 발명의 또 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.

[0016] 또한 본 발명은 락토바실러스 브레비스 THK-aD110의 배양물을 포함하는 식품 조성물을 제공한다.

[0017] 또한 본 발명은 락토바실러스 브레비스 THK-aD110의 배양물을 포함하는 화장료 조성물을 제공한다.

[0018] 상기 락토바실러스 브레비스 THK-aD110의 배양물은 락토바실러스 브레비스 THK-aD110과 함께 배양한 물질을 의미한다.

[0019] 본 발명의 일 구현예로서, 상기 락토바실러스 브레비스 THK-aD110의 배양물은 곽향(*Agastache*) 추출물, 즉 배초향속 식물의 추출물을 포함하는 배지에 락토바실러스 브레비스 THK-aD110를 배양한 것으로서, 곽향 추출물 및 GABA를 함유하는 것을 의미한다. 상기 곽향은 꿀풀과(*Lamiaceae*)에 속하는 배초향속(genus *Agastache*)의 식물을 의미한다. 배초향속은 *Agastache aurantiaca*, *Agastache breviflora*, *Agastache cana*, *Agastache cusickii*, *Agastache foeniculum*, *Agastache mexicana*, *Agastache nepetoides*, *Agastache pallida*, *Agastache pallidiflora*, *Agastache pringlei*, *Agastache parvifolia*, *Agastache parvifolia*, *Agastache rugosa*, *Agastache rupestris*, *Agastache scrophulariifola*, *Agastache wrightii*, *Agastache urticifolia* 등을 포함한다. 상기 곽향 추출물은 상기 배초향속 식물들의 지상부를 사용하여 제조할 수 있다. 본 발명에 있어서, 추출

방법은 열수 추출, 침지 추출, 환류 냉각 추출 및 초음파 추출 등의 추출 방법을 사용할 수 있다. 추출 횟수는 1 내지 5회인 것이 바람직하며, 3회 반복 추출하는 것이 더욱 바람직하나 이에 한정되는 것은 아니다. 감압농축은 진공감압농축기 또는 진공회전증발기를 이용하는 것이 바람직하나 이에 한정하지 않는다. 이러한 농축에 의해 액상 또는 분말 형태로 곽향 추출물을 추출한다. 곽향 추출물은 물, 탄소수 1~4의 알코올, 탄소수 1~4의 알코올 수용액으로 이루어진 군으로부터 선택된 추출용매로 추출하여 얻어질 수 있으며, 이렇게 얻어진 추출물, 그 추출물의 반건조물 또는 건조 분말이 될 수 있다. 바람직하게는 상기 추출용매는 에탄올 수용액을 사용할 수 있으며, 보다 바람직하게 40 ~ 90% 에탄올 수용액을 사용할 수 있다. 상기 에탄올 수용액을 이용한 추출은 실온에서 1일 내지 7일 동안, 바람직하게는 3일 동안 수행될 수 있다. 또한, 필요에 따라 차광 및/또는 가온(예를 들어, 온침) 조건 하에서 수행될 수도 있다. 상기 추출 용매의 양은 곽향 건조 중량의 2 내지 15 배로 한다. 바람직하게는 상기 곽향을 분쇄하여 물로 열수 추출한 것일 수 있다. 그러나 추출 방법은 이에 제한되지 않는다. 곽향 추출물을 본 발명의 락토바실러스 브레비스 THK-aD110과 함께 배양한 배양물은 여러 유리한 효과를 가지며 특히 항염증 효과가 뛰어나다.

[0020] 상기 배양물은 곽향 추출물 외에 다른 재료를 포함하는 경우도 포함하며, 상기 기재에 의해 제한되지 않는다.

[0021] 본 발명의 일 구현예로서, 상기 배양물은 배지에 상기 락토바실러스 브레비스 THK-aD110 1%(w/v)를 접종하고 28 내지 34 ℃에서, 바람직하게는 29 내지 32 ℃에서, 가장 바람직하게는 30 ℃에서 배양하여 얻은 배양물일 수 있다. 그러나 배양 기간은 이에 제한되지 않는다.

[0022] 본 발명의 일 구현예로서, 상기 배양물은 배지에 상기 락토바실러스 브레비스 THK-aD110 1%(w/v)를 접종하고 1일 내지 30일, 바람직하게는 1일 내지 10일, 더욱 바람직하게는 5일간 배양하여 얻은 배양물일 수 있다. 그러나 배양 기간은 이에 제한되지 않는다.

[0023] 상기 락토바실러스 브레비스 THK-aD110의 배양물에는 GABA가 다량 함유되어 있다. 그러나 GABA의 함량은 이에 제한되지 않는다.

[0024] 본 발명의 락토바실러스 브레비스 THK-aD110의 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.

[0025] <u>식품 조성물</u>

[0026] 본 발명의 식품 조성물은 THK-aD110의 배양물을 유효성분으로 포함한다.

[0027] 유효성분의 함량은 사용 목적(예방, 또는 치료적 처치)에 따라 적합하게 결정될 수 있다. 본 발명의 조성물 중 THK-aD110의 배양물은, 조성물 총 중량에 대하여 0.1 내지 60 중량%로, 바람직하게는 10 중량%로 함유될 수 있다. 그러나 함량은 이에 제한되지 않는다.

[0028] 또한, 상기 식품의 종류에는 특별한 제한이 없다. 본 발명의 식품 조성물을 첨가할 수 있는 식품의 예로는 정제, 캅셀, 분말, 과립, 액상, 환, 드링크제 등이 있으며, 통상적인 의미에서의 건강기능식품을 모두 포함한다.

[0029] 본 발명의 식품 조성물을 정제로 제조하는 경우, THK-aD110의 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.

[0030] 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 덱스트린, 시클로덱스트린 등과 같은 통상적인 당, 및 자일리톨, 소르비톨, 에리트릴톨 등의 당알콜이다. 또한, 상술한 것 이외의 향미제(사카린, 아스파르탐 등)을 사용할 수 있다.

[0031] 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.

[0032] 본 발명의 식품 조성물은 염증의 예방, 개선 또는 치료를 위하여 단독으로, 또는 수술, 호르몬 치료, 화학 치료 및 생물학적 반응 조절제를 사용하는 방법들과 병용하여 사용할 수 있다.

[0033] <u>화장료 조성물</u>

[0034] 본 발명은 THK-aD110의 배양물을 유효성분으로 포함하는 화장료 조성물을 제공한다.

[0035] 본 명세서에서 '화장료' 란 화장품 또는 의약외품이 될 수 있는 물질을 말한다.

[0036] 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.

[0037] 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.

[0038] 유효성분의 함량은 사용 목적(예방, 또는 치료적 처치)에 따라 적합하게 결정될 수 있다. 본 발명의 조성물 중 THK-aD110의 배양물은, 조성물 총 중량에 대하여 0.1 내지 60 중량%로, 바람직하게는 10 중량%로 함유될 수 있다. 그러나 함량은 이에 제한되지 않는다.

[0039] 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.

[0040] 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.

[0041] 이들 제형의 제조방법은 통상의 화장료 제형의 제조방법에 따라 제조될 수 있다.

[0042] <u>개선 또는 치료방법</u>

[0043] 본 발명은 또한 사람 또는 그 외 동물에게 치료학적으로 유효한 양의 THK-aD110의 배양물을 투여하여 염증을 예방, 개선 또는 치료하는 방법을 제공한다.

[0044] 여기에서 사용된 "치료학적으로 유효한 양"은 연구자, 수의사, 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 성분에 대한 치료상 유효 투여량 및 투여횟수는 원하는 효과에 따라 변화될 것임은 당업자에게 자명하다.

발명의 효과

[0045] 본 발명의 신종균 락토바실러스 브레비스 THK-aD110은 글루탐산을 효과적으로 저분자화하여 GABA를 생산할 수 있다. 상기 균주의 배양물은 우수한 항염증 효과를 가지며 세포 독성이 낮아 안전하므로 식품 조성물 및 화장료 조성물로서 유용하게 이용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0046] 도 1은 락토바실러스 브레비스 THK-aD110의 16s rRNA 서열이다.

도 2는 온도를 변화시켜 가며 THK-aD110의 세포 성장 및 일산화질소 농도를 관찰한 도이다.

도 3은 THK-aD110에 의하여 글루탐산이 저분자화되어 GABA가 생산됨을 RP-HPLC로 확인한 도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0047] 이하, 본 발명을 실시예를 통하여 더욱 상세히 설명한다. 그러나 이들 실시예는 본 발명을 예시하기 위한 것으

로, 본 발명의 범위가 이들에 한정되는 것은 아니다.

[0048] **실시예 1. 신종균의 분리 및 동정**

[0049] 김치를 분쇄한 후 식염수에 희석하고, 이로부터 신종균을 분리하고 GABA 생산성이 현저히 우수한 균주를 선발하였다. 상기 균주를 락토바실러스 브레비스 THK-aD110(Lactobacillus brevis THK-aD110, 이하 THK-aD110)으로 명명하였다. 상기 THK-aD110을 한국 생명공학연구원에 기탁하였다(수탁번호 KCTC 12638BP). 한편 THK-aD110의 16s rRNA 서열은 서열번호 1로 표시하였고, 도 1에 나타내었다. THK-aD110은 그람 양성의 간균이다.

[0050] 또한 API kit (50CH, Biomrieux Co., France)를 이용하여 생화학적 특성을 관찰하였다. 관찰된 특성에 대해서는 하기 표 1에 정리하였다.

[0051] [표 1]

Acid production (API 50CHL)					
L-Arabinose	+	5-ketogluconate	+	D-Melobiose	+
D-Xylose	−	N-acetyl-glucosamine	+	D-xylose	+
Methyl-β-D-Xylopyranside	+	Mannitol	+	D-Trehalose	−
D-Glucose	+	Gluconate	+	Inulin	−
D-Fructose	+	Glycerol	−	D-Melezitose	−
D-Mannose	+	Grythritol	−	D-Raffinose	−
Inositol	−	D-arabinose	−	Glycogen	−
Amygdalin	−	Sorbitol	−	Gentiobiose	−
Arbutin	−	Esculin	−	D-rilycobose	+
Salicin	−	Methyl-α-D-mannopyranoside	−	Mehtyl-α-D-glucopyranoside	+
D-Cellobiose	−	Starch	−	D-galactose	+
D-Maltose	+	D-tagatose	−	2-ketogluconate	+
D-Lactose	−	D-fucose	−	L-fucose	−
D-arabitol	−	Dulcitol	−	L-arabitol	−
D-adonitol	−	D-lyxose	−	D-turanose	−
L-sorbose	−	Sucrose	−		
Rhamnose	−	Xylitol	−		

[0052]

[0053] **실시예 2. THK-aD110의 최적 배양 배지의 확인**

[0054] MRS 배지는 락토바실러스 속의 세균의 배양을 위한 선택배지로서 사용된다.

[0055] 시판되는 MRS 배지(MRS 상용배지)에는 1% 프로테오스 펩톤(proteose peptone), 1% 우육 추출물(beef extract), 0.5% 효모 추출물(yeast extract), 2% 덱스트로스(dextrose), 0.1% 폴리소르베이트 80(polysorbate 80), 0.2% 암모늄 시트레이트(ammonium citrate), 0.5% 소디움 아세테이트(sodium acetate), 0.01% 마그네슘 설페이트(magnesium sulfate), 0.005% 망간 설페이트(manganese sulfate), 0.2% 디포타슘 포스페이트(dipotassium phosphate)(w/v)가 포함되어 있다. 상기 MRS 배지의 구성요소 중 본 발명의 THK-aD110의 배양을 위한 최적의 구성 성분들을 확인하기 위하여 MRS 배지의 구성 성분을 하나씩 제외해 가면서 균주의 성장을 비교하였다. 그 결과 수크로스(sucrose), 효모 추출물(yeast extract), 및 망간 설페이트(manganese sulfate)가 본 발명의 THK-aD110의 성장을 극대화시키는 것을 확인하였다.

[0056] 그 후 상기 각 성분들의 농도를 변화시켜 가며 THK-aD110의 성장을 확인하였다. 그 결과 수크로스 2%, 효모 추출물 1%, 망간 설페이트 0.005%(w/v)를 포함하는 경우에 THK-aD110의 성장이 최대로 나타남을 확인하였다.

[0057] **실시예 3. THK-aD110의 최적 배양 온도 확인**

[0058] THK-aD110의 최적 배양 온도를 확인하고자, 온도를 변화시켜 가며 세포 성장 정도 및 일산화질소(nitric oxide, NO) 농도를 관찰하였다.

[0059] 상기 실시예 2에서의 조성을 나타내는 배지에서, 각각 20 ℃, 25 ℃, 30 ℃, 37 ℃, 42 ℃의 온도에서 각각 1%의 THK-aD110을 분주하여 성장시키고, 600 nm에서 흡광도를 측정하여 세포 성장을 관찰하였다.

[0060] 일산화질소(nitric oxide, NO)는 염증반응을 유발하는 물질이다. 따라서 NO 어세이를 이용하여 일산화질소 농도를 관찰하였다.

[0061] 결과는 도 2에 나타내었다. 도 2에서 검은 막대는 세포 성장을 의미하며, 빗금 막대는 일산화질소 농도를 의미한다. 도 2에서 30 ℃의 온도에서 일산화질소 농도는 가장 낮고 세포 성장 정도는 가장 큰 것을 확인할 수 있다. 따라서 본 발명의 THK-aD110의 최적 배양 온도는 30 ℃인 것을 알 수 있다.

[0062] **실시예 4. THK-aD110을 이용한 글루탐산으로부터의 GABA 생산**

[0063] 수크로스 2%, 효모 추출물 1%, 망간 설페이트 0.005%(w/v)를 포함하는 배지를 하기 조건에서 RP-HPLC (Reversed Phase HPLC, 역상 HPLC)를 이용하여 배지에 포함된 성분들을 분석하였다.

[0064] <RP-HPLC 조건>

[0065] 검출기: waters 996 photodiode array(PDA) detector (Waters, USA) 338 nm

[0066] 칼럼: XTerra (Waters: RP18 5um, 4.6 mm x 150 mm)

[0067] 이동상: pH 7.2, 0.05M sodium acetate(Solvent A), Acetonitrile(solvent B), Methanol(solvent C), pH 7.2, 0.1 M sodium acetate-Acetonitrile-Methanol(solvent D)의 혼합액 (46:44:10).

[0068] 유속: 1.3-1.7 ml/min

[0069] 주입량: 50 μl

[0070] 결과는 도 3의 상단에 나타내었고, 하기 표 2에서 대조군으로서 표시하였다.

[0071] 그 후 상기와 동일한 배지에 THK-aD110을 1 %(w/v) 접종하고, 30 ℃에서 5일간 배양하였다. 그 후 상기와 동일한 조건으로 RP-HPLC (Reversed Phase HPLC, 역상 HPLC)를 이용하여 배지에 포함된 성분들을 분석하였다. 결과는 도 3의 하단에 나타내었다.

[0072] 도 3에서 상단의 도와 비교하여 하단의 도에서 L-글루탐산의 농도는 감소한 반면 GABA의 농도는 증가한 것을 확인할 수 있다. 구체적인 수치 변화는 하기 표 2에 나타내었다.

[0073] **[표 2]**

Standard substance	L-글루탐산 및 GABA 농도 (mM)	
	대조군	THK-aD110 배양물
L-글루탐산	5.3 ± 0.9	2.1 ± 0.2
GABA	1.9 ± 0.3	5.1 ± 0.5

[0074]

[0075] 각 값은 mean ± SD (n = 3)을 의미한다.

[0076] 이로부터 THK-aD110은 글루탐산을 저분자화하여 GABA를 생산함을 알 수 있다.

수탁번호

[0077]

기탁기관명 : 한국생명공학연구원

수탁번호 : KCTC12638BP

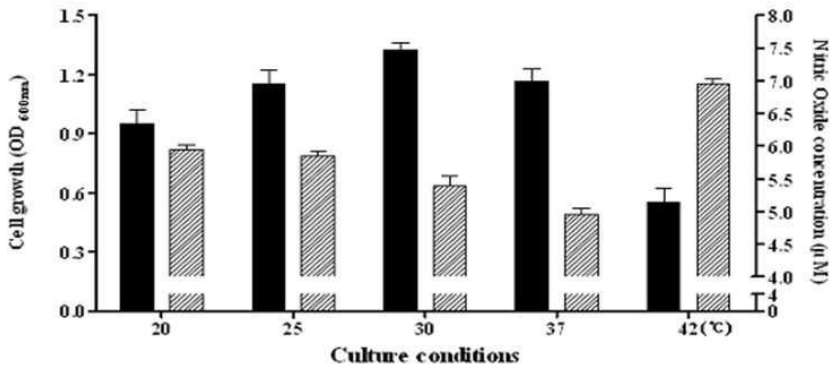
수탁일자 : 20140729

도면

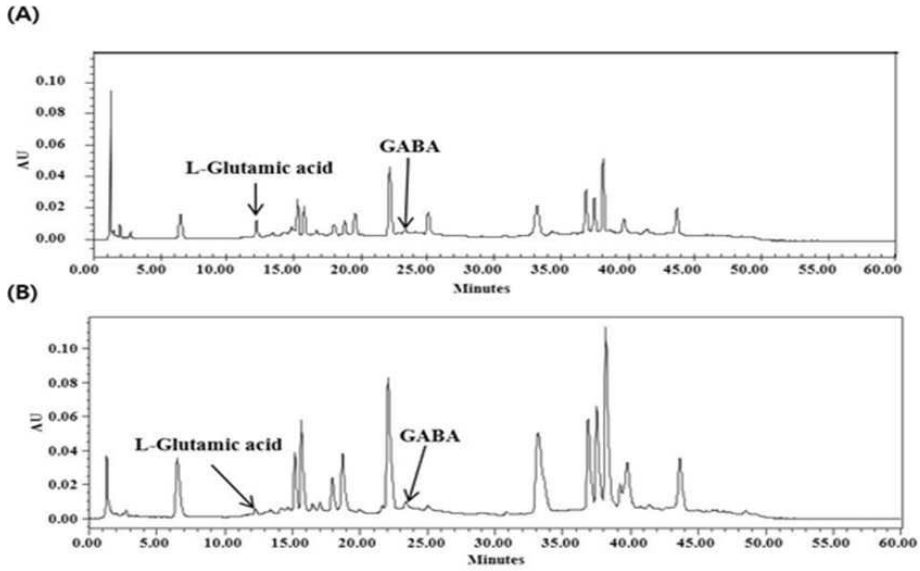
도면1

GCGTGNANTGCAGTCGAACGAGCTTCCGTTGATGACGTGCTTGCACTGATTTCAACA
ATGAAGCGAGTGGCGAACTGGTGAGTAACACGTGGGRAATCTGCCCAGAAGCAGGGG
ATAACACTTGGAAACAGGTGCTAATACCGTATAACAACAAAATCCGCATGGATTTTG
TTTGAAAGGTGGCTTCGGCTATCACTTCTGGATGATCCCGCGGCGTATTAGTTAGTT
GGTGAGGTAAAGGCCCACCAAGACGATGATACGTAGCCGACCTGAGAGGGTAATCGG
CCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAAACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAGGGAATCTT
CCACAATGGACGAAAGTCTGATGGAGCAATGCCGCGTGAGTGAAGAAGGGTTTCGGC
TCGTAAAACTCTGTTGTTAAAGAAGAACACCTTTGAGAGTAACTGTTCAAGGGTTGA
CGGTATTTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGTAG
GTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTTTTAAG
TCTGATGTGAAAGCCTTCGGCTTAACCGGAGAAGTGCATCGGAAACTGGGAGACTTG
AGTGCAGAAGAGGACAGTGGAACTCCATGTGTAGCGGTGGAATGCGTAGATATATGG
AAGAACACCAGTGGCGAAGGCGGCTGTCTAGTCTGTAACTGACGCTGAGGCTCGAAA
GCATGGGTAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCATGCCGTAAACGATGAGTG
CTAAGTGTTGGAGGGTTTCCGCCCTTCAGTGCTGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGC
CTGGGGAGTACGACCGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCACAAGC
GGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGAAGCTACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACAT
CTTCTGCCAATCTTAGAGATAAGACGTTCCCTTCGGGGACAGAATGACAGGTGGTGC
ATGGTTGTCGTCAGCTCGTGTCGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAA
CCCTTATTATCAGTTGCCAGCATTCAGTTGGGCACTCTGGTGAGACTGCCGGTGACA
AACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCCTTATGACCTGGGCTAC
ACACGTGCTACAATGGACGGTACAACGAGTCGCGAAGTCGTGAGGCTAAGCTAATCT
CTTAAAGCCGTTCTCAGTTCGGATTGTAGGCTGCAACTCGCCTACATGAAGTTGGAA
TCGCTAGTAATCGCGGATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACA
CCGCCCGTCACACCATGAGAGTTTGTAACACCCAAAGCCGGTGAGATAACCTTCGGGA
GTCAGCCGTCT

도면2



도면3



서 열 목 록

<110> University-Industry Cooperation Group of Kyung Hee University

<120> A novel bacterium Lactobacillus brevis THK-aD110, and a method

<130> P14-065-KHU

<160> 1

<170> KopatentIn 2.0

<210> 1

<211> 1442

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> Lactobacillus brevis THK-aD110 16s rRNA

<400> 1

gcgtgnantg cagtcgaacg agcttccgtt gatgacgtgc ttgcactgat ttcaacaatg 60

aagcgagtgg cgaactggtg agtaacacgt gggraatctg cccagaagca ggggataaca 120

cttggaaaca ggtgctaata ccgtataaca acaaaatccg catggatttt gtttgaaagg 180

tggcttcggc tatcacttct ggatgatccc gcggcgtatt agttagttgg tgaggtaaag 240

gcccaccaag acgatgatac gtagccgacc tgagagggta atcggccaca ttgggactga 300

gacacggccc aaactcctac gggaggcagc agtagggaat cttccacaat ggacgaaagt 360

ctgatggagc aatgccgcgt gagtgaagaa gggtttcggc tcgtaaaact ctgttgttaa 420

agaagaacac ctttgagagt aactgttcaa gggttgacgg tatttaacca gaaagccacg 480

gctaactacg tgccagcagc cgcggtaata cgtaggtggc aagcgttgtc cggatttatt 540

gggcgtaaag cgagcgcagg cggtttttta agtctgatgt gaaagccttc ggcttaaccg 600

gagaagtgca tcggaaactg ggagacttga gtgcagaaga ggacagtgga actccatgtg 660

tagcggtgga atgcgtagat atatggaaga acaccagtgg cgaaggcggc tgtctagtct 720

gtaactgacg ctgaggctcg aaagcatggg tagcgaacag gattagatac cctggtagtc 780

catgccgtaa acgatgagtg ctaagtgttg gagggtttcc gcccttcagt gctgcagcta 840

acgcattaag cactccgcct ggggagtacg accgcaaggt tgaaactcaa aggaattgac 900

gggggcccgc acaagcggtg gagcatgtgg tttaattcga agctacgcga agaaccttac 960

caggtcttga catcttctgc caatcttaga gataagacgt tcccttcggg gacagaatga 1020

caggtggtgc atggttgtcg tcagctcgtg tcgtgagatg ttgggttaag tcccgcaacg 1080

agcgcaaccc ttattatcag ttgccagcat tcagttgggc actctggtga gactgccggt 1140

gacaaaccgg aggaaggtgg ggatgacgtc aaatcatcat gccccttatg acctgggcta 1200

cacacgtgct acaatggacg gtacaacgag tcgcgaagtc gtgaggctaa gctaatctct 1260

taaagccgtt ctcagttcgg attgtaggct gcaactcgcc tacatgaagt tggaatcgct 1320

agtaatcgcg gatcagcatg ccgcggtgaa tacgttcccg ggccttgtac acaccgcccg 1380

tcacaccatg agagtttgta acacccaaag ccggtgagat aaccttcggg agtcagccgt 1440

ct 1442