

	(19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)	(11) 공개번호 10-2012-0021399 (43) 공개일자 2012년03월09일
(51) 국제특허분류(Int. Cl.) A23K 1/16 (2006.01) A23K 1/10 (2006.01) C12N 1/20 (2006.01) C12R 1/225 (2006.01) (21) 출원번호 10-2010-0073543 (22) 출원일자 2010년07월29일 심사청구일자 2010년07월29일		(71) 출원인 인하대학교 산학협력단 인천광역시 남구 인하로 100, 인하대학교 (용현동) (72) 발명자 김은기 인천광역시 남구 소성로 71, 생명화공학부 (용현동, 인하대학교) 윤선아 인천광역시 남구 도화1동 동원아파트 1동 805호 (74) 대리인 이원희

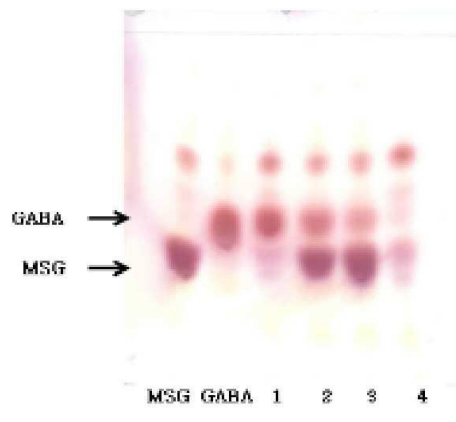
전체 청구항 수 : 총 10 항

(54) 발명의 명칭 감귤박을 이용한 사료 첨가용 조성물 및 그의 제조방법

(57) 요약

본 발명은 감귤박을 이용한 사료첨가제 및 그의 제조방법에 관한 것으로서, 보다 상세하게는 감귤박 또는 감귤박 추출액에 락토바실러스 속 박테리아를 접종하여 배양한 배양액을 함유하는 항균용 사료첨가제 및 그의 제조방법에 관한 것이다. 본 발명의 사료첨가제는 기존 배지에 비하여 우수한 항균활성을 보유하여 가축의 장내에 서식하는 유해세균의 증식을 저지하는 정장효과를 나타내며 항생제를 대체하는 생균제이며, 아울러 생리활성 물질인 GABA를 생산하여 경제적이고 고부가가치의 생균제 사료로서 사용될 수 있다.

대 표 도 - 도2



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 200901FHT010406240

부처명 농림부

연구사업명 바이오그린 21사업

연구과제명 감귤박을 이용한 향균미생물의 선발 및 향균물질 분리동정

주관기관 농촌진흥청

연구기간 2009.01.01 ~ 2011.12.31

특허청구의 범위

청구항 1

감귤박 또는 감귤박 추출액을 포함하는 배양 배지에 락토바실러스 속 박테리아를 접종하여 배양한 배양액을 함유하는 향균용 사료첨가제.

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 락토바실러스 속 박테리아는 락토바실러스 브레비스(*Lactobacillus brevis*), 락토바실러스 플란타럼(*L. plantarum*), 락토바실러스 엑시도필러스(*L. acidophilus*), 락토바실러스 카제이(*L. casei*), 락토바실러스 퍼멘텀(*L. fermentum*), 락토바실러스 람노서스(*L. rhamnosus*), 락토바실러스 루테리(*L. reuteri*)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나인 것을 특징으로 하는 향균용 사료첨가제.

청구항 3

제 1항에 있어서, 상기 배양 배지는 질소원, 또는 질소원 및 미량원소를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 향균용 사료첨가제.

청구항 4

제 1항에 있어서, 상기 사료첨가제는 락토바실러스 속 박테리아의 향균 활성을 갖는 것을 특징으로 하는 향균용 사료첨가제.

청구항 5

제 4항에 있어서, 상기 향균 활성은 병원균 살모넬라 엔테리티디스(*Salmonella enteritidis*), 대장균(*E. coli*) O-157 또는 대장균(*E. coli*) K88에 대한 향균 활성인 것을 특징으로 하는 향균용 사료첨가제.

청구항 6

제 1항에 있어서, 상기 사료첨가제는 락토바실러스 속 박테리아가 생산한 GABA(γ -Aminobutyric acid)를 포함하는 것을 특징으로 하는 향균용 사료첨가제.

청구항 7

- 1) 감귤을 착즙한 후 감귤박을 얻는 단계;
- 2) 상기 단계 1)의 감귤박과 수산화칼슘(Ca(OH)_2)을 혼합한 후 압출기를 사용하여 탈수함으로써 고상부분과 액상부분으로 분리하여 액상부분으로부터 감귤박 추출액을 수득하는 단계; 및
- 3) 상기 단계 1)의 감귤박 또는 단계 2)의 감귤박 추출액에 락토바실러스 속 박테리아 균주의 배양 배지를 첨가하여 배양한 후 배양액을 얻는 단계를 포함하는 제 1항의 향균용 사료첨가제의 제조방법.

청구항 8

제 7항에 있어서, 상기 단계 3) 이후에 수득한 배양액을 건조하여 분말을 제조하는 단계를 추가적으로

포함하는 것을 특징으로 하는 항균용 사료첨가제의 제조방법.

청구항 9

감귤박을 사일로에 저장하여 얻은 액체를 함유하는 항균용 사료첨가제.

청구항 10

제 9항에 있어서, 상기 감귤박을 사일로에 1년 내지 3년 동안 저장하는 것을 특징으로 하는 항균용 사료첨가제.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 감귤박을 이용한 사료 첨가용 조성물 및 그의 제조방법에 관한 것으로서, 보다 상세하게는 감귤박 또는 감귤박 추출액에 락토바실러스 속 균주를 접종하여 배양한 배양액을 함유하는 사료 첨가용 조성물 및 그의 제조방법에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 최근, 농업기술의 발전과 더불어 감귤 등의 과일의 생산량 또한 증가하고 있다. 이러한 생산량 증대로 인해 가격형성과 수요 공급의 불균형으로 인한 감귤의 이용성 증대가 산업적으로 필요하게 되었고, 그로 인해 감귤 주스, 감귤 술 등의 가공품의 생산이 증가하게 되었다. 그러나, 생산 증가에 수반하여 부산물 또는 폐기물로 감귤 과피와 찌꺼기 등의 발생도 증가 되었으며, 이러한 감귤 착즙 후의 나머지 감귤박은 잘 부패하지 않아 심각한 환경요인이 되고 있다.

[0003] 한편, 감귤박에는 펙틴, 플라보노이드, 알칼로이드, 헤스페리딘 및 비타민 등이 함유되어 있는 것으로 알려져 있다. 이들은 해독, 혈중 콜레스테롤 함량을 저하, 항균, 항염, 면역력을 높여주는 효능을 나타내므로 그 중요성이 강조되고 있다. 따라서, 최근에는 감귤박을 효과적으로 처리하는 방법들이 다각도로 연구되고 있으며, 감귤박을 분쇄하여 발효시키거나 건조시켜서 사료나 비료 또는 퇴비로 만드는 방법 및 감귤박 발효사료 생산장치 등이 연구되고 있다. 감귤박을 발효시키는 경우 감귤박의 발효로 인하여 pH가 낮아지고 항균성이 생길 수 있어 이를 사료첨가제로 사용하는 예가 있다(예, 제주축협 섬유질 사료).

[0004] 이런 문제의 방안으로써 균 발효를 통해 고부가가치의 생균제 사료를 생산하는데 많은 연구가 진행되고 있다. 기존의 사료시장은 축산업에서 성장 촉진, 사료 요구율(feed conversion ; 단위 체중 증가에 필요한 사료 섭취량) 효율성 증대, 그리고 장내 감염방지 등을 목적으로 항생제를 광범위하게 사용하여 유익한 장내 미생물 생태계의 불균형과 항생제 내성 균주의 출현을 초래하였다. 최근 유럽연합 집행기관(European commission)은 동물의 성장 촉진제로 사료에 첨가되는 항생제의 사용을 금지하여 특히 양계에서는 병원균 차단을 위해 항균력을 갖는 정장제를 적극 권장하고 있는 실정이다. 이런 문제점에 대한 방안으로 항생제 대체 물질로써 항균성 물질을 생산하는 생균제가 대두 되고 있다.

[0005] 생균제는 프로바이오틱스(probiotics)라 하고 균체를 포함하는 미생물의 배양물을 의미하는 것으로, 이들 미생물이 생균의 상태 혹은 사균의 상태로 가축에게 공급되어 유용한 효과를 내는 '미생물제제'라고 할 수 있다. 이러한 사료첨가용 생균제는 유해균이 장관 벽에 부착하는 것을 방지하고 유기산, 항균물질, 효소 등을 생산하여 면역능력을 증진시킨다. 현재 사용되는 생균제 균주로는 주로 그람양성균인 락토바실러스, 스트렙토코커스, 바실러스, 클로스트리디움 속과 곰팡이, 효모 등이 사용되고 있다.

[0006] 그 중 락토바실러스는 혐기성 또는 약간의 호기성 균으로서 호기성 바실러스 균(*Bacillus Sp.*)보다는 장내 세균의 주요한 유익한 균으로서 락토바실러스가 유익한 균이 많은 장내 세균총을 형성하기에 유리하다. 또한 락토바실러스 균이 젖산(Lactic acid)을 생산하여 장내 환경을 낮은 pH로 유지하게 하여 유해균 또는 병원성 균의 성장을 방해한다.

[0007] 상기 락토바실러스는 주요 생균제로서 이미 젖산, 항생물질을 생산한다고 알려져 있을 뿐만 아니라, 최근에는 락토바실러스를 이용한 GABA(γ -Aminobutyric acid) 생산에 대한 연구가 활발하게 진행되고 있다. GABA는 비단백질 아미노산으로서 동물의 경우 중추신경계의 주된 억제성 신경전달물질로서 잘 알려져 있다. GABA는 많은 생리학적 메카니즘에 관여하여 동물의 경우 뇌의 혈류를 활발하게 하고, 산소 공급량을 증가시켜 뇌세포의 대사기능을 항진시키는 것으로 알려져 있으며, 프로락틴의 분비와 성장호르몬의 분비 조절에도 관여하여 혈압강하 및 통증완화에도 효과가 있는 것으로 알려져 있어 약리적으로 매우 높은 물질이다. 이런 다양한 생리작용에 관여하는 GABA는 또한 진정작용 및 스트레스 억제 효과가 있어서 가축의 사료에 첨가하여 사용되기도 한다.

[0008] 그러나, 주요 생균제인 락토바실러스의 배양 배지인 MRS 배지는 가격이 20,000 ~ 30,000원/L로 고가의 배지이다. 대량 생산해야되는 축산업에서는 사료 첨가제의 가격이 중요하다. 이런 문제의 방안으로써 저렴한 폐감귤박을 이용하여 감귤박 또는 감귤박 추출액에 질소원과 미량원소를 첨가하여 락토바실러스 속 균주의 발효를 통해 고부가가치의 생균제 사료를 생산하는데 목적을 두었다.

[0009] 이에, 본 발명자들은 감귤박 또는 감귤박 추출액에 락토바실러스 속 박테리아를 접종하여 배양한 배양액을 함유하는 사료첨가제를 제조하고, 상기 배양액이 질소원과 미량원소의 함유에 따라 기존의 배지보다 우수한 항균활성을 나타내어 항생제를 대체할 수 있을 뿐 아니라 생리활성 물질인 GABA를 포함하는 고부가가치의 생균제 사료를 제조함으로써 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0010] 본 발명의 목적은 감귤박 또는 감귤박 추출액으로부터 항균활성이 높고 GABA를 포함하는 사료 첨가용 조성물 및 그의 제조방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0011] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 감귤박 또는 감귤박 추출액에 락토바실러스 속 박테리아를 접종하여 배양한 배양액을 함유하는 항균용 사료첨가제를 제공한다.

[0012] 또한, 본 발명은 1) 감귤을 착즙한 후 감귤박을 얻는 단계;

[0013] 2) 상기 단계 1)의 감귤박과 수산화칼슘(Ca(OH)_2)을 혼합한 후 압출기를 사용하여 탈수함으로써 고상부분과 액상부분으로 분리하여 액상부분으로부터 감귤박 추출액을 수득하는 단계; 및

[0014] 3) 상기 단계 1)의 감귤박 또는 단계 2)의 감귤박 추출액에 락토바실러스 속 박테리아 균주의 배양 배지를 첨가하여 배양한 후 배양액을 얻는 단계를 포함하는 사료첨가제의 제조방법을 제공한다.

[0015] 또한, 본 발명은 감귤박을 사일로(silo)에 저장하여 얻은 상등액을 함유하는 항균용 사료첨가제를 제공한다.

발명의 효과

[0016] 본 발명은 감귤박 또는 감귤박 추출액을 포함하는 배양 배지에 질소원과 미량원소를 첨가하여 락토바실러스 배양 시, 우수한 항균력을 나타내어 항생제를 대체할 수 있고 동시에 생리활성물질인 GABA를 생산하게 할 수 있으므로, 본 발명의 항균용 사료첨가제는 경제적이고 고부가가치의 생균제 사료로서 사용될 수 있다. 또한 본 발명은 감귤박을 사일로(silo)에 저장하여 얻은 상등액을 함유하는 항균용 사료첨가제도 생균제 사료로서 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0017] 도 1은 폐감귤박 가공폐기물 사료화 공정을 나타내는 공정도이다.

도 2는 폐감귤박 배지에서 발효된 락토바실러스 브레비스(*L. brevis*) IFO 12005의 배지 조성에 따른 GABA 생성능에 대한 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0018] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

[0019] 본 발명은 감귤박 또는 감귤박 추출액을 포함하는 배양 배지에 락토바실러스 속 박테리아를 접종하여 배양한 배양액을 함유하는 사료첨가제를 제공한다.

[0020] 본 발명에서 감귤박이라 함은 감귤 착즙 후의 나머지 찌꺼기 부분을 말하는 바, 본 발명에서는 감귤박의 액상 추출물 뿐만 아니라 감귤박도 유용하게 재활용할 수 있다.

[0021] 이때, 배양 배지는 펩톤(peptone), 쇠고기 추출물(Beef extract) 또는 효모 추출물(yeast extract)의 질소원 또는 상기 질소원 및 미량원소를 포함할 수 있다(표 1 참조).

[0022] 이때, 접종에 사용되는 락토바실러스 속 박테리아는 모든 종류의 락토바실러스 속 박테리아에 적용될 수 있으나, 바람직하게는 락토바실러스 브레비스(*Lactobacillus brevis*), 락토바실러스 플란타럼(*L. plantarum*), 락토바실러스 엑시도필러스(*L. acidophilus*), 락토바실러스 카제이(*L. casei*), 락토바실러스 퍼멘텀(*L. fermentum*), 락토바실러스 람노서스(*L. rhamnosus*) 및 락토바실러스 루테리(*L. reuteri*)로 구성된 군에서 선택되는 것이 바람직하다(표 2 참조). 상기 락토바실러스 속 박테리아는 프로바이오틱스(probiotics; 유효 생균제)로 사용이 가능한 균주이다. 더욱 바람직하게는 배지 조성에 따라 락토바실러스 퍼멘텀(*L. fermentum*), 락토바실러스 루테리(*L. reuteri*) 및 락토바실러스 플란타럼(*L. plantarum*)으로 구성된 군에서 선택되는 것이 바람직하다(표 2 참조).

[0023] 본 발명의 감귤박을 이용한 배양 배지에 따른 락토바실러스 배양액을 포함하는 사료첨가제의 항균 활성은 다양한 병원균에 대한 아가 디스크 확산 테스트(agar disk diffusion test) 방법으로 확인하였다. 양성 대조균인 암피실린(ampicillin) 1000 mg/ml의 저해환의 크기와 비교한 본 결과, 병원균들에 유의한 항균활성을 나타낸다. 감귤박을 사일로(silo)에 저장하여 얻은 액체의 항균 활성을 확인하였으나(표 3 참조), 락토바실러스 배양액을 포함하는 사료첨가제의 항균활성이 더 우수하다(표 4 내지 표 6 참조). 특히 락토바실러스 카제이(*L. casei*), 락토바실러스 퍼멘텀(*L. fermentum*), 락토바실러스 루테리(*L. reuteri*)를 포함하는 배양액으로부터 제조된 사료첨가제는 암피실린(ampicillin) 항생제와 비교하였을 때 뛰어난 항균 활성을 나타낸다(표 3 참조).

[0024] 상기 항균활성을 나타내는 사료첨가제는 감귤박을 사일로에 저장하여 얻은 상등액을 함유할 수 있고, 감귤박 또는 감귤박 추출액에 락토바실러스 배양액을 포함하는 것이 바람직하다.

[0025] 상기 배양 배지는 감귤박 또는 감귤박 추출액에 질소원을 첨가하는 것이 바람직하고, 질소원으로 펩톤(peptone), 쇠고기 추출물(Beef extract) 또는 효모 추출물(yeast extract)을 첨가하는 것이 더욱 바람직하다.

[0026] 상기 락토바실러스는 락토바실러스 카제이(*L. casei*), 락토바실러스 퍼멘텀(*L. fermentum*) 및 락토바실러스 루테리(*L. reuteri*)로 구성된 군에서 선택되는 것이 바람직하다(표 3 참조).

[0027] 상기 사료첨가제(feed additives)는 영양적 또는 특정 목적을 위하여 사료에 미량으로 첨가되는 물질을 총칭한다. 바람직하게는 상기 사료첨가제는 가축용 사료에 첨가되고, 가축의 범위는 포유류, 조류, 어류, 곤충류를 포함하며, 더욱 바람직하게는 한우, 육우, 젖소, 돼지, 가금류, 개 및 고양이용 사료에 첨가된다.

- [0028] 또한 본 발명의 배양 배지에 따라 락토바실러스 균주가 GABA를 생산하는 지 여부는 배양 상등액을 얇은 막 크로마토그래피(TLC) 방법으로 확인하였다. 음성대조균인 MSG와 양성 대조균인 GABA를 사용하여 락토바실러스 균주가 GABA를 생성하는 것을 확인하였다(도 2 참조).
- [0029] 상기 배양 배지는 감귤박 또는 감귤박 추출액에 질소원 및 미량원소를 첨가하는 것이 바람직하고, 질소원으로 펩톤(peptone), 쇠고기 추출물(Beef extract) 또는 효모 추출물(yeast extract)을 첨가하고, 미량원소로 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, $MnSO_4 \cdot 7H_2O$ 또는 K_2PO_4 를 첨가하는 것이 더욱 바람직하다(표 7 참조).
- [0030] 상기 락토바실러스 균주는 락토바실러스 브레비스(*L. brevis*)인 것이 바람직하다.
- [0031] 또한, 본 발명은
- [0032] 본 발명은 1) 감귤을 착즙한 후 감귤박을 얻는 단계;
- [0033] 2) 상기 단계 1)의 감귤박과 수산화칼슘($Ca(OH)_2$)을 혼합한 후 압출기를 사용하여 탈수함으로써 고상부분과 액상부분으로 분리하여 액상부분으로부터 감귤박 추출액을 수득하는 단계; 및
- [0034] 3) 상기 단계 1)의 감귤박 또는 단계 2)의 감귤박 추출액에 락토바실러스 속 박테리아 균주의 배양 배지를 첨가하여 배양한 후 배양액을 얻는 단계를 포함하는 사료첨가제의 제조방법을 제공한다.
- [0035] 본 발명의 단계 1)은 감귤박으로부터 감귤박 추출액을 수득하는 단계이다. 본 발명의 바람직한 실시예에서는 감귤박을 수산화칼슘과 혼합한 후, 탈수하여 감귤박 추출액을 수득하였다.
- [0036] 본 발명의 단계 2)는 감귤박 또는 상기 단계 1)에서 수득한 감귤박 추출액에 락토바실러스 속 박테리아를 접종하여 배양한 배양액을 수득하는 단계이다. 접종에 사용되는 락토바실러스 균주는 모든 종류의 락토바실러스 속 박테리아에 적용될 수 있으나, 바람직하게는 락토바실러스 브레비스(*Lactobacillus brevis*), 락토바실러스 플란타럼(*L. plantarum*), 락토바실러스 엑시도필러스(*L. acidophilus*), 락토바실러스 카제이(*L. casei*), 락토바실러스 퍼멘텀(*L. fermentum*), 락토바실러스 람노서스(*L. rhamnosus*) 및 락토바실러스 루테리(*L. reuteri*)로 구성된 군에서 선택되는 것이 바람직하다(표 2 참조). 상기 락토바실러스 속 박테리아는 그 균이 생산하는 프로토펙티나제(protopectinase)를 이용하여 감귤박 또는 감귤박 추출액에 있는 펙틴(pectin)을 분해하여 영양소로 사용하기 때문에 상기 감귤박 또는 감귤박 추출액에서 성장할 수 있다.
- [0037] 또한, 본 발명의 단계 2) 이후에 수득한 배양액을 건조하여 분말을 제조하는 단계를 추가적으로 포함할 수 있다.
- [0038] 또한, 본 발명은 감귤박을 사일로(silo)에 저장하여 얻은 상등액의 항균활성을 확인하였다(표 3 참조). 감귤박을 사일로에 저장하는 기간은 1년에서 3년인 것이 바람직하다.
- [0039] 이하, 본 발명을 실시예 및 실험예에 의해 상세히 설명한다.
- [0040] 단, 하기 실시예 및 실험예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예 및 실험예에 한정되는 것은 아니다.
- [0041] <실시예 1> 감귤박을 이용한 사료첨가제의 제조
- [0042] 본 발명에 사용되는 균주는 락토바실러스 브레비스(*Lactobacillus brevis*) IF012005, 락토바실러스 플란타럼(*L. plantarum*) ATCC 8014, 락토바실러스 엑시도필러스(*L. acidophilus*) ATCC 4356, 락토바실러스 카제이(*L. casei*) ATCC 393, 락토바실러스 퍼멘텀(*L. fermentum*) ATCC 9338, 락토바실러스 람노서스(*L. rhamnosus*) ATCC 10863 및 락토바실러스 루테리(*L. reuteri*) ATCC 23272는 한국 미생물 보존 센터에서 분양을 받았다.

[0043] 감귤박은 감귤을 착즙한 후 남은 찌꺼기에 해당하며, 감귤박 배지는 감귤주스 가공폐기물을 이용하여 압출 건조 공정을 거쳐 나온 가공폐수를 이용하였다.

[0044] 감귤박 배지를 제조하기 위해 제주도 감귤주스 공장에서 나오는 가공폐기물인 폐감귤박(제주도, 감귤가공복합 처리단지; 수분함량 90%)을 1차 2차에 걸친 분쇄 및 압출 공정과 수산화 칼슘($\text{Ca}(\text{OH})_2$)의 처리를 통해 고상부분 27%(수분함량 55% 이하)와 액상부분 73%(수분함량 95% 이상)으로 분리하였다. 고상은 열풍건조와 pellet 성형을 통하여 수분함량 5% 이하의 CPP(citrus pulp pellet)을 생산하고, 액상(폐감귤박 가공폐수; Citrus waste water)은 균 배양 배지로 이용하여 사료첨가제로 사용하였다(도 1).

[0045] <실험예 1> 감귤박 배지에서의 락토바실러스 균주의 성장 속도 확인

[0046] 락토바실러스 브레비스(*L. brevis*)를 제외한 락토바실러스 균주는 MRS 배지를 사용하여 37℃에서 24시간 전배양 시켰고, 감귤박 배지에 질소원(표 1)을 첨가한 배지에서 1%(v/v)의 비율로 접종하였고 배양온도는 37℃였다. 락토바실러스 브레비스(*L. brevis*)는 30℃에서 배양하였고, 성장을 알아보기 위해 0, 24, 48 시간 때에 시료 추출(sampling)을 하여 생균수를 측정하였다.

[0047] 그 결과 48시간 배양 후 생균수를 측정하였을 때, 대부분의 균주는 MRS 배지에서 초기 접종 농도의 100배 이상 성장하였고, 감귤박 배지(CJM)에서는 거의 성장하지 않았다. 그러나 감귤박 배지(CJM)에 질소원을 첨가하였을 때, 락토바실러스 퍼멘텀(*L. fermentum*), 락토바실러스 루테리(*L. reuteri*), 락토바실러스 브레비스(*L. brevis*)에서 초기 접종 농도에 비해 100배 이상 증가하였다(표 2).

표 1

배지의 조성

[0048]

	1	2	3	4	5	6	7	8
락토바실러스 브레비스를 제외한 락토바실러스 균주	MRS	CJM	CJM + 1% 펩톤	CJM + 1% B.E	CJM + 0.5% Y.E.	CJM + 0.5% 펩톤 + 0.5% B.E + 0.25% Y.E.		

락토바실러스 브레비스 IFO 12005	MRS + 2% MSG	CJM + 2% MSG	CJM + 1% 펩톤 + 2% MSG	CJM + 1% B.E. + 2% MSG	CJM + 0.5% Y.E. + 2% MSG	CJM + 0.5% 펩톤 + 0.5% B.E. + 0.25% Y.E. + 2% MSG	CJM + 0.5% 펩톤 + 0.5% B.E. + 0.25% Y.E. + 0.1% MgSO ₄ ?H ₂ O + 2% MSG	CJM + 0.5% 펩톤 + 0.5% B.E. + 0.25% Y.E. + 0.01% MgSO ₄ ?H ₂ O + 0.005% MnSO ₄ ?H ₂ O + 0.2% K ₂ PO ₄ + 2% MSG
-----------------------------	--------------------	--------------------	-------------------------------	------------------------------------	---	--	---	---

- [0049] CJM : 5 브릭스(brix) 감귤박 배지
- [0050] B.E : 쇠고기 추출물(Beef extract)
- [0051] Y.E. : 효모 추출물(Yeast extract)
- [0052] MSG : L-글루타민산나트륨(Sodium L(+)-Glutamate Monohydrate)

표 2

- [0053] 배지 조성에 따른 락토바실러스 균주의 성장속도

	L. 엑시도필러 스	L. 람노서스	L. 퍼멘텀	L. 카제이	L. 루테리	L. 플란타럼	L. 브레비스 (2% MSG 첨가)
MRS	+	++	+++	++	+++	+++	+++
CJM	-	-	+++	-	+	-	+++
CJM + 1% 펩톤	-	-	+	-	+++	-	+++
CJM + 1% B.E.	-	-	+++	-	+++	-	+++
CJM + 0.5% Y.E.	-	-	+++	-	+++	-	+++
CJM + 0.5% 펩톤 + 0.5% B.E. + 0.25% Y.E.	-	-	++	+	+++	-	+++

- [0054] +++ : 1000배 이상 증가
- [0055] ++ : 100 ~ 1000배 증가
- [0056] + : 10 ~ 100배 증가
- [0057] - : 초기 농도의 10배 이하

[0058] <실험예 2> 락토바실러스 균주에 의한 항균 활성 측정

[0059] 락토바실러스 균주를 첨가하지 않고 감귤박을 사일로(silo)에 저장한 액의 상등액과 락토바실러스 균주를 MRS 배지와 감귤박 배지에서 48시간 배양한 상등액은 8000rpm에서 20분간 원심분리한 0.2 μm로 여과하여 시료를 준비하였다. 병원균은 살모넬라 엔테리티디스(*Salmonella enteritidis*)와 대장균(*E. coli*) 0-157, 대장균(*E. coli*) K88, 살모넬라 아우레우스(*Salmonella aureus*)으로, 항균 활성을 측정하여 양성 대조균인 암피실린(ampicillin) 1000ppm(1mg/ml)의 저해환의 크기와 비교하였다.

[0060] 락토바실러스 균주를 첨가하지 않고 감귤박을 사일로에 저장하여 얻은 상등액은 대장균 0-157과 살모넬라 엔테리티디스(*Salmonella enteritidis*)에 대하여 항균 활성이 있음을 확인하였다(표 3).

[0061] 락토바실러스 균주에 의한 항균 활성은 대부분의 MRS 배지에서 배양 균주에서 항균활성이 나왔으나, 대장균 0-157에서 락토바실러스 카제이(*L. casei*), 락토바실러스 루테리(*L. reuteri*)의 경우 MRS 배양액보다 감귤박 배지에 질소원을 첨가하였을 때 더 큰 항균 활성을 보였고, 락토바실러스 루테리(*L. reuteri*)는 대장균 K88에서도 항균 활성을 보였다(표 4 내지 표 6).

표 3

[0062] 감귤박을 사일로(silo)에 저장하여 얻은 상등액의 항균활성 측정

	대장균 0-157	살모넬라 엔테리티디스	살모넬라 아우레우스
사일로에 1년 저장	-	+	-
사일로에 3년 저장	++	+	-

[0063] +++ : 암피실린 1000 ppm 대비 75 ~ 100%

[0064] ++ : 암피실린 1000 ppm 대비 50 ~ 75%

[0065] + : 암피실린 1000 ppm 대비 25 ~ 50%

[0066] + : 암피실린 1000 ppm 대비 25% 이하

[0067] - : 활성 없음

표 4

[0068] 배지 조성에 따른 락토바실러스 균주의 살모넬라 엔테리티디스(*Salmonella enteritidis*)에 대한 항균활성 측정

살모넬라 엔테리티디스	L. 액시도필러스	L. 람노서스	L. 퍼멘텀	L. 카제이	L. 루테리	L. 플란타럼
MRS	++	++	+++	+++	-	++++
CJM	-	-	++	-	-	-

CJM + 1% 펩톤	-	-	++	-	-	-
CJM + 1% B.E.	-	-	++	-	-	-
CJM + 0.5% Y.E.	-	-	++	-	-	-
CJM + 0.5% 펩톤 + 0.5% B.E. + 0.25% Y.E.	-	-	++	-	-	-

[0069] ++++ : 암피실린 1000 ppm 대비 75 ~ 100%

[0070] +++ : 암피실린 1000 ppm 대비 50 ~ 75%

[0071] ++ : 암피실린 1000 ppm 대비 25 ~ 50%

[0072] + : 암피실린 1000 ppm 대비 25% 이하

[0073] - : 활성 없음

표 5

[0074] 배지 조성에 따른 락토바실러스 균주의 대장균(*E. coli*) O-157에 대한 항균활성 측정

대장균 O-157	L. 엑시도필러스	L. 람노서스	L. 퍼멘텀	L. 카제이	L. 루테리	L. 플란타럼
MRS	+++	++	-	++	-	-
CJM	-	-	-	++	-	-
CJM + 1% 펩톤	-	-	-	++	-	-
CJM + 1% B.E.	-	-	-	++	++++	-
CJM + 0.5% Y.E.	-	-	-	-	++++	-
CJM + 0.5% 펩톤 + 0.5% B.E. + 0.25% Y.E.	-	-	-	++++	++++	-

[0075] ++++ : 암피실린 1000 ppm 대비 75 ~ 100%

[0076] +++ : 암피실린 1000 ppm 대비 50 ~ 75%

- [0077] ++ : 암피실린 1000 ppm 대비 25 ~ 50%
- [0078] + : 암피실린 1000 ppm 대비 25% 이하
- [0079] - : 활성 없음

표 6

[0080] 배지 조성에 따른 락토바실러스 균주의 대장균(*E. coli*) K88에 대한 항균활성 측정

대장균 K88	L. 엑시도필러스	L. 람노서스	L. 퍼멘텐	L. 카제이	L. 루테리	L. 플란타럼
MRS	++	++	-	-	-	++
CJM	-	-	-	-	-	-
CJM + 1% 펩톤	-	-	-	-	-	-
CJM + 1% B.E.	-	-	-	-	-	-
CJM + 0.5% Y.E.	-	-	-	-	-	-
CJM + 0.5% 펩톤 + 0.5% B.E. + 0.25% Y.E.	-	-	-	-	+++	-

- [0081] ++++ : 암피실린 1000 ppm 대비 75 ~ 100%
- [0082] +++ : 암피실린 1000 ppm 대비 50 ~ 75%
- [0083] ++ : 암피실린 1000 ppm 대비 25 ~ 50%
- [0084] + : 암피실린 1000 ppm 대비 25% 이하
- [0085] - : 활성 없음

[0086] <실험예 3> 락토바실러스 균주에 의한 GABA 생성능 측정

[0087] GABA 생성능은 락토바실러스 브레비스(*L. brevis*) IFO 12005를 MRS 배지와 감귤박 배지(CJM)에 질소원을 첨가한 배지에 1% 접종한 후, 30℃에서 7일간 정지배양하였다(표 7). 배양 상등액은 8000rpm에서 20분간 원심분리한 0.2um로 필터하여 시료를 준비하였다. GABA의 생성을 확인하기 위해 배양 상등액 시료를 TLC 실리카 겔 60 F₂₅₄에 3μl씩 로딩한 후 용매로 분리하여 확인하였다. 이때 사용한 용매의 조성은 n-부탄올:아세트산:물이 5:2:2 비율이며, 대조군으로 MSG와 GABA를 사용하였다. GABA의 R_f 값은 0.54, MSG의 R_f 값은 0.42로 측정되었다. GABA는 MRS 배지와 감귤박 배지에 질소원과 MgSO₄ · 7H₂O과 같은 미량원소를 첨가한 경우에 생성되었다(도 2).

표 7

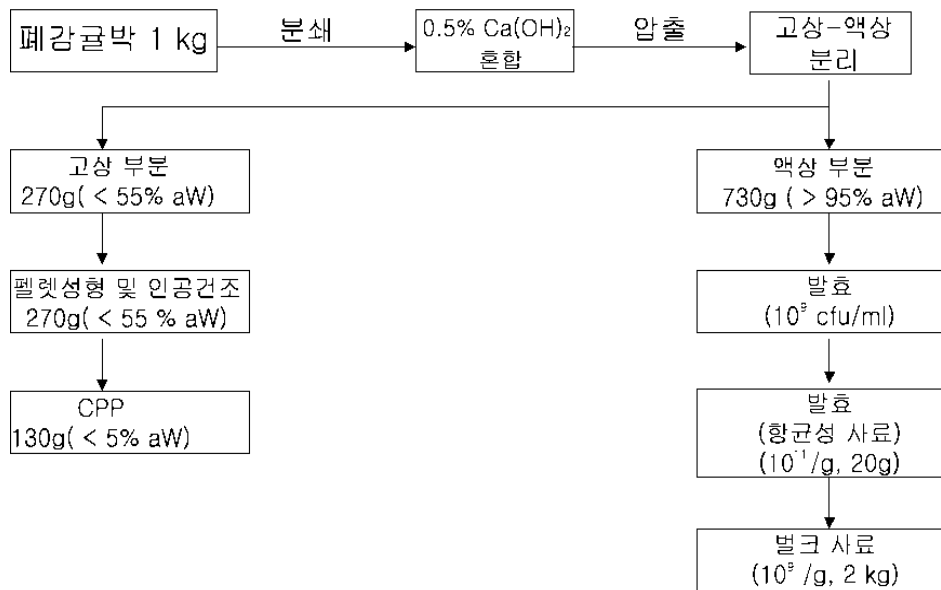
[0088]

GABA 생성을 위한 배지 조성

배지 번호	배지 조성
1	MRS +2% MSG
2	CJM + 0.5% 펩톤 + 0.5% 쇠고기 추출물 + 0.25% 효모 추출물 + 0.1% $\text{MgSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ + 2% MSG
3	CJM + 0.5% 펩톤 + 0.5% 쇠고기 추출물 + 0.25% 효모 추출물 + 0.01% $\text{MgSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ + 0.005% $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ + 0.2% K_2PO_4 + 2% MSG
4	MRS

도면

도면1



도면2

