



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2013-0118625
(43) 공개일자 2013년10월30일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 1/20 (2006.01) A01N 63/02 (2006.01)
A23B 7/10 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2012-0041645
(22) 출원일자 2012년04월20일
심사청구일자 2012년04월20일

(71) 출원인
조선대학교산학협력단
광주광역시 동구 서석동 375 조선대학교 내
(72) 발명자
장해춘
광주광역시 남구 진월동 514-22 한국아텔리움아파트 101동 1002호
양은주
광주광역시 북구 동림동 푸른마을 주공A 415-1104
(74) 대리인
특허법인 천지

전체 청구항 수 : 총 14 항

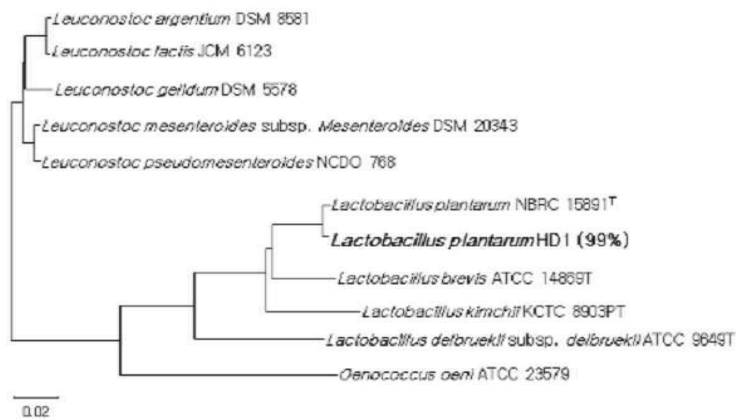
(54) 발명의 명칭 항진균 활성을 갖는 락토바실러스 플란타룸 및 이를 포함하는 항진균 조성물

(57) 요약

본 발명은 산막효모를 포함한 다양한 진균에 대한 항진균 활성을 갖는 락토바실러스 플란타룸 HD1 균주와 상기 락토바실러스 플란타룸 HD1 균주, 상기 균주의 배양물, 상기 배양물의 농축물, 상기 배양물의 건조물 및 이들의 조합으로 이루어진 균에서 선택된 어느 하나를 유효성분으로 포함하는 항진균 조성물에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 상기 항진균 조성물을 유효성분으로 포함하는 식품보존제 조성물, 상기 식품보존제 조성물을 식품에 첨가하는 단계를 포함하는 식품 보존 방법 및 .상기 락토바실러스 플란타룸 HD1 균주, 상기 균주의 배양물, 상기 배양물의 농축물, 상기 배양물의 건조물 및 이들의 조합으로 이루어진 균에서 선택된 어느 하나를 유효성분으로 포함하는 발효식품에 관한 것이다.

상기 균주는 다양한 위해 진균에 대한 우수한 항진균 활성을 가지므로, 상기 락토바실러스 플란타룸 HD1 균주 및 상기 항진균 조성물은 식품 등에 첨가하여 인체에 유해한 효모 및 곰팡이를 억제할 수 있는 천연 식품보존제로서 사용될 수 있다.

대표도 - 도2



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 310014-03

부처명 농림수산식품부

연구사업명 고부가가치 식품기술개발사업

연구과제명 김치 발효조절 및 품질균일화를 위한 미생물 천이 조절 기술 개발

주관기관 조선대학교 산학협력단

연구기간 2010.07.01 ~ 2013.06.30

특허청구의 범위

청구항 1

산막효모인 이사첸키아 속(*Issatchenkia* sp.) 진균에 대한 항진균 활성을 가지고, 기탁번호 KFCC11512P를 갖는 락토바실러스 플란타룸 HD1 균주(*Latobacillus plantarum* HD1, KFCC11512P).

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 균주는 칸디다 속(*Candida* sp.), 사카로마이세스 속(*Saccharomyces* sp.), 카자크스탄니아 속(*Kazachstania* sp.), 아스퍼질러스 속(*Aspergillus* sp.), 클라도스포리움 속(*Cladosporium* sp.), 페니실리움 속(*Penicillium* sp.) 및 이들의 조합으로 이루어지는 균에서 선택된 어느 하나에 대한 항진균 활성을 갖는 것인 락토바실러스 플란타룸 HD1 균주(*Latobacillus plantarum* HD1, KFCC11512P).

청구항 3

제2항에 있어서,

상기 균주는 생육활성 및 항진균활성에 있어서, 최적 배양 온도 조건이 30℃인 락토바실러스 플란타룸 HD1 균주(*Latobacillus plantarum* HD1, KFCC11512P).

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 균주는 5-옥소도데카노익 산(5-oxododecanoic acid), 3-하이드록시데카노익 산(3-hydroxydecanoic acid) 및 3-하이드록시-5-도데세노익 산(3-hydroxy-5-dodecenoic acid)을 생산하는 균주인 락토바실러스 플란타룸 HD1 균주(*Latobacillus plantarum* HD1, KFCC11512P).

청구항 5

제1항의 락토바실러스 플란타룸 HD1 균주(*Latobacillus plantarum* HD1, KFCC11512P), 상기 균주의 배양물, 상기 배양물의 농축물, 상기 배양물의 건조물 및 이들의 조합으로 이루어진 균에서 선택된 어느 하나를 유효성분으로 포함하는 항진균 조성물.

청구항 6

제5항에 있어서,

상기 항진균 조성물의 pH는 pH 2.8 내지 pH 4.2인 항진균 조성물.

청구항 7

제5항에 따른 항진균 조성물을 유효성분으로 포함하는 식품보존제 조성물.

청구항 8

제7항에 의한 식품보존제 조성물을 식품에 첨가하는 단계를 포함하는 식품 보존 방법.

청구항 9

제1항의 락토바실러스 플란타룸 HD1 균주(*Latobacillus plantarum* HD1, KFCC11512P), 상기 균주의 배양물, 상기 배양물의 농축물, 상기 배양물의 건조물 및 이들의 조합으로 이루어진 균에서 선택된 어느 하나를 유효성분으로 포함하는 발효식품.

청구항 10

제9항에 있어서,

상기 발효식품은 김치인 발효식품.

청구항 11

5-옥소도데카노익 산(5-oxododecanoic acid)을 유효성분으로 포함하는 항진균 조성물

청구항 12

제11항에 있어서, 상기 5-옥소도데카노익 산은 제1항의 락토바실러스 플란타룸 HD1 균주(*Latobacillus plantarum* HD1, KFCC11512P)에 의해 제조된 것인 항진균 조성물.

청구항 13

5-옥소도데카노익 산(5-oxododecanoic acid)을 유효성분으로 포함하는 식품보존제 조성물.

청구항 14

제13항에 의한 식품보존제 조성물을 식품에 첨가하는 단계를 포함하는 식품 보존 방법.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 항진균 활성을 갖는 미생물 및 상기 미생물을 유효성분으로 포함하는 항진균 조성물에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 인체에 유해한 미생물 중 곰팡이는 많은 종류의 식품에서 부패를 일으키며 이취나 변색 등 식품의 품질저하를 일으키며, 최근 보고에 의하면 세계 식량생산량의 5% 내지 10%가 곰팡이성 변패에 의해 손실된다고 알려져 있다. 또한, 곰팡이의 오염으로 인한 가장 큰 문제는 곰팡이 독소(mycotoxin)의 생성으로, 곰팡이 독소는 인체에 여러 가지 만성적 또는 급성적인 영향을 미치므로, 곰팡이에 의해 오염된 식품을 섭취하는 경우 곰팡이 독소에 의해 여러 질환이 발생될 수 있다.

[0003] 식품의 품질저하를 일으키는 효모 중 산막효모(film yeast)는 간장, 김치, 된장 등의 발효식품이나 고농도의 식염을 포함한 식품을 저장하고 있는 동안에 표면에 증식하는 소위 '흰 곰팡이' 류의 유해균 또는 효모를 액체 배양할 때 배양용기의 벽에 등반성의 건조한 느낌의 얇은 피막을 형성하는 유해균이다. 특히, 상기 산막효모 중 실제 김치 연부현상을 가져오는 여러 종의 산막효모 중 대표적인 산막효모는 이사첸키아 속(*Issatchenkia* sp.)과 사카로마이세스 속(*Saccharomyces* sp.)으로 대별된다. 상기 김치 연부현상을 가져오는 대표적인 산막효모는 상기한 바와 같이 이사첸키아 속(*Issatchenkia* sp.) 또는 피키아 속(*Pichia* sp.), 구체적으로 피키아 쿠드리아브제비(*Pichia kudriavzevii*) 또는 이사첸키아 오리엔탈리스(*Issatchenkia orientalis*)라 호칭되는 효모 등이 해당된다.

[0004] 상기 산막효모는 대부분 증식기가 지나가면 아세트알데히드 등의 카르보닐화합물이 생성되어 불쾌한 냄새를 생성하기 때문에, 양조 또는 된장, 김치 등의 발효식품 제조에 있어서 품질 저하의 원인이 되고 있다.

[0005] 또한, 아스페질러스 속(*Aspergillus* sp.) 또는 페니실리움 속(*Penicillium* sp.)은 다양한 종류의 식품이나 사료를 저장기간 중 변패시키는 것으로 알려져 있고, 아스페질러스 속 곰팡이는 아플라톡신(aflatoxin)과 같은 곰팡이 독소를 생성하여 간암을 유발하는 등 심각한 인체질환의 원인이 되기도 한다.

[0006] 또한, 칸디다 속(*candida* sp.) 균주는 칸디다증, 질칸디다증, 조갑백선 및 폐칸디다증의 원인균으로, 상기 칸디다 속 균주에 의해 발명되는 질병은 90% 이상이 칸디다 알비칸스(*Candida albicans*)가 원인균인 것으로 보고되고 있다.

[0007] 상기 곰팡이의 생육을 억제하는 방법, 구체적으로 식품의 저장단계에서 곰팡이 생육을 억제하는 방법으로, 냉동저장, 건조저장, 열처리저장 등 물리적 방법과 방부제 등의 첨가에 의한 화학적 방법이 제안되어 왔다. 그러나, 최근 화학적 방부제나 화학 첨가물의 사용에 대한 소비자의 거부감이 증가 됨에 따라 미생물이나 그 대사산물로서 변패 미생물의 생육을 저해하여 식품의 저장기간을 연장할 수 있는 천연보존제에 대한 관심이 급증하고 있다.

- [0008] 유산균은 예로부터 발효채소류나 발효유제품에 활용되어온 균주로서, 발효식품의 풍미 증가와 함께 식품보존 작용을 지닌 것으로 알려져 있다. 유산균의 식품보존 기능은 유산균이 생산하는 유기산에 의한 pH 저하와 함께 H_2O_2 , 나 박테리오신(bacteriocin) 등 다양한 항균 물질로 인해 유해 미생물들의 번식을 저해하기 때문으로 알려져 있다.
- [0009] 상기 유산균은 오랜 시간 동안 인류가 발효식품과 함께 섭취한 GRAS(generally recognized as safe) 균주로, 이러한 유산균의 기능성과 안전성에 관한 장점으로 인해, 상기 유산균을 이용한 기능성 식품과 천연 식품보존제의 개발에 관심이 집중되고 있다.
- [0010] 이에 따라 유산균의 항미생물 활성(antimicrobial activity)과 관련된 수많은 연구들이 이루어지고 있으나 대부분의 연구들이 유산균의 항세균 활성(antibacterial activity)과 항균 물질인 박테리오신(bacteriocin)에 집중되고 있다. 유산균에서는 실제 강력한 항진균 활성(antifungal activity)을 지니는 경우가 많지 않아, 항진균 활성에 대한 연구는 극히 미흡한 실정이다. 보고된 연구들도 대부분이 단순히 항진균 활성을 지니는 유산균에 대한 보고에 그치고 있는 실정이다. 그러나 실제 식품산업에서 유산균 또는 유산균 유래 물질이 식품보존제로 활용되기 위해서는 항세균 활성에 한정되지 않고, 항진균 활성까지 포괄적으로 보유될 것이 요구된다.
- [0011] 우리나라의 전통 발효 식품인 김치는 숙성 중에 다양한 김치 유산균이 증식하여 발효에 관여하므로 유용 유산균의 훌륭한 보고가 될 수 있다. 김치 유산균의 항균 활성에 대한 연구들이 활발히 이루어지고 있으나, 항진균 활성에 대해서는 그 연구결과는 제한적으로 보고되고 있다. 따라서, 더욱 활발한 연구를 통해 세균뿐만 아니라 인체에 유해한 효모 및 곰팡이를 억제하는 유산균에 대한 연구 및 이를 이용한 천연 식품보존제의 개발이 요구되고 있다.

선행기술문헌

특허문헌

- [0012] (특허문헌 0001) KR 10-0986306 B
(특허문헌 0002) KR 10-0720815 B

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0013] 상기 문제점을 해결하기 위하여, 본 발명은 항진균 활성을 갖는 균주를 제공한다.
- [0014] 또한 본 발명은 상기 균주를 이용한 항진균 조성물, 보존제 조성물, 식품 및 식품 보존 방법을 제공한다.

과제의 해결 수단

- [0015] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 일 실시예에 산막효모에 대한 항진균 활성을 가지고, 기탁번호 KFCC11512P를 갖는 락토바실러스 플란타룸 HD1 균주(*Latobacillus plantarum* HD1, KFCC11512P)를 제공한다. 상기 산막효모는 이사첸키아 속(*Issatchenkia* sp.)일 수 있다.
- [0016] 상기 락토바실러스 플란타룸 HD1 균주는 칸디다 속(*Candida* sp.), 사카로마이세스 속(*Saccharomyces* sp.), 카자흐스탄리아 속(*Kazachstania* sp.), 아스퍼질러스 속(*Aspergillus* sp.), 클라도스포리움 속(*Cladosporium* sp.), 페니실리움 속(*Penicillium* sp.) 및 이들의 조합으로 이루어지는 균에서 선택된 어느 하나에 대한 항진균 활성을 갖는 것일 수 있다. 생육활성 및 항진균활성에 있어서, 상기 락토바실러스 플란타룸 HD1 균주의 최적 배양 온도 조건은 30℃일 수 있다.
- [0017] 또한, 상기 락토바실러스 플란타룸 HD1 균주는 항진균 활성을 갖는 화합물, 구체적으로 5-옥소도데카노익 산(5-oxododecanoic acid), 3-하이드록시데카노익 산(3-hydroxydecanoic acid) 및 3-하이드록시-5-도데세노익 산(3-hydroxy-5-dodecenoic acid)을 생산할 수 있다.
- [0018] 본 발명은 다른 일 실시예에 따라 상기 락토바실러스 플란타룸 HD1 균주(*Latobacillus plantarum* HD1, KFCC11512P), 상기 균주의 배양물, 상기 배양물의 농축물, 상기 배양물의 건조물 및 이들의 조합으로 이루어진

균에서 선택된 어느 하나를 유효성분으로 포함하는 항진균 조성물을 제공한다. 상기 항진균 조성물의 pH는 pH 2.8 내지 pH 4.2일 수 있다.

- [0019] 본 발명은 또 다른 일 실시예에 따라 항진균 조성물을 유효성분으로 포함하는 식품보존제 조성물을 제공한다.
- [0020] 본 발명은 또 다른 일 실시예에 따라 상기 식품보존제 조성물을 식품에 첨가하는 단계를 포함하는 식품 보존 방법을 제공한다.
- [0021] 본 발명은 또 다른 일 실시예에 따라 상기 락토바실러스 플란타룸 HD1 균주(*Latobacillus plantarum* HD1, KFCC11512P), 상기 균주의 배양물, 상기 배양물의 농축물, 상기 배양물의 건조물 및 이들의 조합으로 이루어진 균에서 선택된 어느 하나를 유효성분으로 포함하는 발효식품을 제공한다. 상기 발효식품은 김치 일 수 있다.
- [0022] 본 발명은 또 다른 일 실시예에 따라 5-옥소도데카노익 산(5-oxododecanoic acid)을 유효성분으로 포함하는 항진균 조성물을 제공한다. 상기 5-옥소도데카노익 산은 상기 락토바실러스 플란타룸 HD1 균주(*Latobacillus plantarum* HD1, KFCC11512P)에 의해 제조된 것일 수 있다.
- [0023] 본 발명은 또 다른 일 실시예에 따라 5-옥소도데카노익 산(5-oxododecanoic acid)을 유효성분으로 포함하는 식품보존제 조성물을 제공한다.
- [0024] 본 발명은 또 다른 일 실시예에 따라 상기 식품보존제 조성물을 식품에 첨가하는 단계를 포함하는 식품 보존 방법을 제공한다.
- [0025] 본 명세서에서 특별한 언급이 없는 한, 항균은 항세균 및 항진균을 포함하는 것을 의미한다.
- [0026] 본 명세서에서 특별한 언급이 없는 한, 배양물이란 특정 미생물을 배양배지 또는 배양액에서 배양한 것을 의미하며, 상기 배양물은 상기 특정 미생물을 포함하는 배양물 또는 상기 미생물을 제공한 제공 배양물을 포함하는 것일 수 있다. 상기 배양물 또는 배양물의 농축물은 그 제형이 한정되지 아니하고, 일 예로 상기 제형은 액체 또는 고체일 수 있다.
- [0027] 상기 배지는 특정 미생물을 배양하기 위하여, 배양대상 즉, 배양체가 되는 미생물이 필요로 하는 영양물질을 포함하는 것으로 특수한 목적을 위한 물질이 추가로 첨가되어 혼합된 것일 수 있다. 상기 배지는 배양기 또는 배양액이라고도 하며, 천연배지, 합성배지 또는 선택배지를 모두 포함하는 개념이다.
- [0028] 본 발명의 발명자들은 항진균 활성을 갖는 유산균에 대하여 연구하던 중, 김치로부터 분리된 HD1 균주가 강한 항진균 활성을 갖는 것을 확인하였고, 특히 김치로부터 분리된 다른 균주와 달리 양조과정 또는 발효식품의 제조 과정에서 제품의 품질 저하의 원인이 되는 산막효모인 이사철킨키아 오리엔탈리스(*Issatchenkia orientalis*)에 대한 항진균활성을 가지는 것을 확인하여, 상기 분리된 HD1 균주를 동정하고, 상기 HD1 균주의 항진균 활성 범위 및 항진균 활성에 대한 안정성을 조사하여 본 발명을 완성하였다.
- [0029] 이하 본 발명을 상세히 설명한다.
- [0030] 본 발명은 일 실시예에 따른 항진균활성을 갖는 락토바실러스 플란타룸(*Latobacillus plantarum*)에 관한 것이다. 상기 락토바실러스 플란타룸(*Latobacillus plantarum*)은 산막효모에 대한 항진균활성을 갖고, 여러 진균에 대한 항진균활성을 갖는 락토바실러스 플란타룸 HD1 균주(*Latobacillus plantarum* HD1)일 수 있다.
- [0031] 상기 락토바실러스 플란타룸 HD1 균주는 김치로부터 분리된 유산균으로, 그람 양성, 간균이고, 둥글고 매끈하며 밝은 노란색의 불투명한 집락을 형성하는 것으로 확인됐다. 상기 HD1 균주는 람노스(Rhamnos), D-튜라노스(D-turanose) 및 D-아라비톨(D-arabitol)에 대한 당대사능이 있고, 항진균 활성이 있다.
- [0032] 16S rRNA 염기서열이 락토바실러스 플란타룸 NBRC15891^T와 99%의 상동성을 가져 락토바실러스 플란타룸으로 동정되었다. 상기 락토바실러스 플란타룸 HD1 균주의 16S rRNA 염기서열은 GenBank에 JQ343914로 등록되었고, 상기 락토바실러스 플란타룸 HD1 균주는 한국미생물보존센터에 2011년 4월 1일자로 기탁하여 수탁번호 KFCC11512P를 부여 받았다.
- [0033] 상기 락토바실러스 플란타룸 HD1 균주는 통상의 유산균 배지에서 생육 가능하며, 일 예로 MRS 액체배지에서 배양할 수 있다. 상기 배지는 특정 미생물을 배양하기 위하여 배양대상 즉 배양체가 되는 미생물이 필요로 하는 영양물질을 포함하는 것으로 특수한 목적을 위한 물질이 추가로 첨가되어 혼합된 것일 수 있다. 상기 배지는 배양기 또는 배양액이라고도 하며, 천연배지, 합성배지 또는 선택배지를 모두 포함하는 개념이다.
- [0034] 상기 락토바실러스 플란타룸 HD1 균주는 유산균을 배양하는 통상의 배양방법에 따라 배양할 수 있고, 일 예로

29℃ 내지 31℃에서 16시간 내지 19시간 배양 할 수 있다. 상기 범위의 온도 및 시간으로 배양하는 경우 상기 락토바실러스 플란타룸 HD1 균주를 생육도가 우수하고, 최대 향진균 활성에 도달하는 시간을 단축시킬 수 있다.

[0035] 상기 향진균 활성이란 진균의 생장, 생식 등을 억제하도록 작용하는 것을 의미하고, 상기 진균은 곰팡이, 버섯, 효모 등을 포함하는 미생물군을 의미한다.

[0036] 상기 락토바실러스 플란타룸 HD1 균주의 향진균 활성은 구체적으로 곰팡이, 효모 및 이들의 조합으로 이루어 지는 군에서 선택된 어느 하나에 대한 것일 수 있다.

[0037] 상기 효모는 칸디다 속(*Candida* sp.), 이사첸키아 속(*Issatchenkia* sp.) 또는 피키아 속(*Pichia* sp.), 사카로마이세스 속(*Saccharomyces* sp.), 카자크스타니아 속(*Kazachstania* sp.) 및 이들의 조합으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 일 수 있고, 보다 구체적으로 칸디다 속(*Candida* sp.)의 일 예로 칸디다 알비칸스(*Candida albicans*)일 수 있고, 상기 이사첸키아 속(*Issatchenkia* sp.) 또는 피키아 속(*Pichia* sp.)의 일 예로 피키아 쿠드리야브제비(*Pichia kudriavzevii*) 또는 이사첸키아 오리엔탈리스(*Issatchenkia orientalis*)일 수 있으며, 상기 사카로마이세스 속(*Saccharomyces* sp.)의 일 예로 사카로마이세스 세르바지(*Saccharomyces servazzii*) 또는 사카로마이세스 볼더리(*Saccharomyces bulderi*)일 수 있고, 상기 카자크스타니아 속(*Kazachstania* sp.)의 일 예로 카자크스타니아 엑시구아(*Kazachstania exigua*) 또는 사카로마이세스 엑시구어스 (*Saccharomyces exiguous*)일 수 있다.

[0038] 상기 곰팡이는 아스퍼질러스 속(*Aspergillus* sp.), 클라도스포리움 속(*Cladosporium* sp.), 페니실리움 속(*Penicillium* sp.) 및 이들의 조합으로 이루어지는 군에서 선택된 어느 하나 일 수 있고, 보다 구체적으로 상기 아스퍼질러스 속(*Aspergillus* sp.)은 일 예로 아스퍼질러스 푸미가투스(*Aspergillus fumigatus*), 아스퍼질러스 오크라세우스(*Aspergillus ochraceus*), 아스퍼질러스 니둘란스(*Aspergillus nidulans*), 아스퍼질러스 페트라키(*Aspergillus petrakii*) 또는 아스퍼질러스 플라부스(*Aspergillus flavus*)일 수 있고, 상기 클라도스포리움 속(*Cladosporium* sp.)은 일 예로 클라도스포리움 고시퍼콜라(*Cladosporium gossypiiicola*)일 수 있으며, 상기 페니실리움 속은 일 예로 페니실리움 로크포르티(*Penicillium roqueforti*) 일 수 있다.

[0039] 상기 락토바실러스 플란타룸 HD1 균주는 상기 산막효모를 포함한 효모 등의 진균의 증식을 효과적으로 억제할 수 있으므로, 일 예로 도 6 내지 도 8에 나타난 바와 같이, 상기 산막효모 등의 번식에 의해 발생하는 식품의 변패나 부패 또는 식품에서 발생하는 악취의 발생을 방지함으로써, 식품을 장기간 동안 보관할 수 있게 해준다.

[0040] 상기 도 6에 나타난 바와 같이, 상품성이 인정되는 일반적인 김치(도 6a)에 산막효모가 발현되기 시작하여, 산막효모 집락이 생기기 시작하면(도 6b), 김치는 물러지거나 구린내가 심하지는 않지만, 시각적으로 집락이 인식되어 상품성이 없어지게 되며, 산막효모가 표면에 완전히 도포되면(도 6c), 김치는 물러지고 구린내가 심하여 못 먹는 상태가 된다. 따라서, 단순히 김치가 과 발효되는 것이 아닌 산막효모의 발현은 김치의 상품성 저하와 직접적으로 연결되어, 김치의 유통 특히, 국내에서 제조된 김치의 해외 수출과 관련하여 유통기간 및 저장기간의 단축과 관련된 문제점이 발생되게 된다.

[0041] 상기한 바와 같이, 상기 락토바실러스 플란타룸 HD1 균주는 김치에서 산막효모의 발현을 억제하고(도 7), 막걸리에서도 산막효모의 발현을 제어(도 8)할 뿐만 아니라 안전성이 보장되는 미생물(GRAS) 즉, 천연물질이므로, 발효과정에 효모가 이용되거나 효모의 번식이 용이한 발효식품에서 산막효모의 제어를 통한 식품의 저장성 향상 등의 다양한 용도에 널리 사용될 수 있을 것으로 기대된다.

[0042] 또한, 상기 락토바실러스 플란타룸 HD1 균주는 상기 곰팡이 등의 진균의 증식을 억제함으로써 식품 또는 사료 등의 부패 또는 변패를 억제할 수 있고, 상기 곰팡이가 원인이 되는 알레르기, 염증성 폐렴 또는 간암의 발병을 억제할 수 있다.

[0043] 상기 락토바실러스 플란타룸 HD1 균주의 향진균 활성은 pH 3 내지 pH 7에서 유지될 수 있으며, 상기 락토바실러스 플란타룸 HD1 균주는 pH 2.8 내지 pH 4.2, 구체적으로는 pH 2.8 내지 pH 3.2에서 최적 향진균 활성을 가진다.

[0044] 또한, 상기 락토바실러스 플란타룸 HD1 균주는 향진균 활성을 갖는 화합물, 구체적으로 5-옥소도데카노익 산(5-oxododecanoic acid), 3-하이드록시데카노익 산(3-hydroxydecanoic acid) 및 3-하이드록시-5-도데세노익 산(3-hydroxy-5-dodecenoic acid)을 생산할 수 있다.

[0045] 본 발명에서 발명자들은 상기 락토바실러스 플란타룸 HD1 균주가 상기 향진균 활성을 갖는 것으로 알려진 3-하이드록시데카노익 산(3-hydroxydecanoic acid) 및 3-하이드록시-5-도데세노익 산(3-hydroxy-5-dodecenoic acid)을 천연적으로 생산할 수 있어, 상기 균주를 이용한 천연 향균제의 제조방법을 제안하였을 뿐만 아니라,

기준에 식품에 사용할 수 있는 GRAS(generally recognized as safe) 향료(flavoring substance)로 알려진 5-옥소도데카노익 산(5-oxododecanoic acid)이 산막 효모 등에 대한 항진균 활성을 갖는다는 것을 최초로 확인하여, 상기 5-옥소도데카노익 산의 항진균과 관련된 새로운 용도를 제안하였다.

[0046] 상기 락토바실러스 플란타룸 HD1 균주의 항진균 활성은 상기 락토바실러스 플란타룸 HD1 균주를 배양한 배양물 및 상기 균주를 제공한 계균 배양물에서도 유지됨을 배양 상정액을 사용하여 항진균 활성을 측정하는 시험을 통하여 확인 하였다.

[0047] 구체적으로, 상기 락토바실러스 플란타룸 HD1 균주의 배양물은 pH 2.8 내지 pH 3.2에서 가장 우수한 항진균 활성을 나타내었고, 주로 산성 조건에서 우수한 항진균활성을 나타내었으며, 염기성 조건 즉 pH 7 초과 조건에서 항진균 활성이 감소 또는 소실된 후에도 산성 상태, 구체적으로 배양액의 pH와 동일한 pH인 pH 3.8로 처리하는 경우, 항진균 활성이 다시 회복되는 것으로 확인되었다.

[0048] 또한, 상기 배양물의 항진균 활성은 70℃ 이상의 열처리에도 그 활성이 감소되지 않았고, 120℃에서 열처리 한 경우에도 항진균 활성이 영향을 받지 않아 내열성이 있는 것으로 확인 되었다. 또한 4℃의 저온에서도 항진균 활성이 영향을 받지 않는 것이 실험적으로 확인 되었다.

[0049] 또한, 상기 배양물의 항진균 활성은 각종 단백질분해효소로 처리한 경우에도, 그 항진균 활성이 감소되지 아니하여, 효소에 대하여 안정성이 우수한 것으로 확인되었다.

[0050] 이러한 측면에서, 본 발명은 상기 락토바실러스 플란타룸 HD1 균주(*Lactobacillus plantarum* HD1, KFCC11512P), 상기 균주의 배양물, 상기 배양물의 농축물, 상기 배양물의 건조물 및 이들의 조합으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나를 유효성분으로 포함하는 항진균 조성물에 관한 것이다.

[0051] 상기 배양물이란 특정 미생물을 배양배지 또는 배양액에서 배양한 것을 의미하며, 상기 배양물은 상기 특정 미생물을 포함하는 것 및 상기 미생물을 제공한 계균 배양물을 포함할 수 있다. 상기 배양물 또는 배양물의 농축물은 그 제형이 한정되지 아니하고, 일 예로 액체 또는 고체일 수 있다.

[0052] 상기 배지는 특정 미생물을 배양하기 위하여 배양대상 즉 배양체가 되는 미생물이 필요로 하는 영양물질을 포함하는 것으로 특수한 목적을 위한 물질이 추가로 첨가되어 혼합된 것일 수 있다. 상기 배지는 배양기 또는 배양액이라고도 하며, 천연배지, 합성배지 또는 선택배지를 모두 포함하는 개념이다.

[0053] 상기 항진균 조성물 또는 상기 항진균 조성물은 pH를 pH 2.8 내지 pH 4.2, 바람직하게는 pH 2.8 내지 pH 3.2로 조절할 경우, 그 항진균활성이 우수하다는 것을 실험적으로 확인하였으므로, 상기 항진균 조성물의 pH는 pH 2.8 내지 pH 4.2, 바람직하게는 pH 2.8 내지 pH 3.2일 수 있다.

[0054] 상기 항진균 조성물은, 조성물 총 중량에 대하여 상기 락토바실러스 플란타룸 HD1 균주, 상기 균주의 배양물, 상기 배양물의 농축물, 상기 배양물의 건조물 및 이들의 조합으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나를 유효성분으로 0.001 내지 99.99 중량%, 바람직하게는 0.1 내지 99 중량%로 포함할 수 있고, 상기 항진균 조성물의 사용방법 및 사용목적에 따라 유효성분의 함량을 적절히 조절할 수 있다.

[0055] 상기 항진균 조성물의 항진균 스펙트럼은 상기 락토바실러스 플란타룸 HD1 균주가 항진균 활성을 나타내는 진균 스펙트럼과 같다. 구체적으로, 상기 항진균 조성물은 효모 및 곰팡이 구체적으로, 칸디다 속(*Candida* sp.), 이사첸키아 속(*Issatchenkia* sp.), 사카로마이세스 속(*Saccharomyces* sp.), 카자크스타니아 속(*Kazachstania* sp.) 및 이들의 조합으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나의 효모 및 아스퍼질러스 속(*Aspergillus* sp.), 클라도스포리움 속(*Cladosporium* sp.), 페니실리움 속(*Penicillium* sp.) 및 이들의 조합으로 이루어지는 군에서 선택된 어느 하나의 곰팡이로 이루어진 군 중에서 선택된 1종의 진균에 대해 항진균 활성을 가질 수 있다.

[0056] 상기 칸디다 속(*Candida* sp.) 균주는 칸디다 알비칸스(*Candida albicans*)일 수 있고, 상기 이사첸키아 속(*Issatchenkia* sp.) 균주는 이사첸키아 오리엔탈리스(*Issatchenkia orientalis*)일 수 있으며, 상기 사카로마이세스 속(*Saccharomyces* sp.) 균주는 사카로마이세스 세르바지(*Saccharomyces servazzii*) 또는 사카로마이세스 볼더리(*Saccharomyces bulderi*)일 수 있고, 상기 카자크스타니아 속(*Kazachstania* sp.) 균주는 카자크스타니아 엑시구아(*Kazachstania exigua*) 일 수 있다. 또한, 상기 아스퍼질러스 속(*Aspergillus* sp.) 균주는 아스퍼질러스 푸미가투스(*Aspergillus fumigatus*), 아스퍼질러스 오크라세우스(*Aspergillus ochraceus*), 아스퍼질러스 니둘란스(*Aspergillus nidulans*), 아스퍼질러스 페트라키(*Aspergillus petrakii*) 또는 아스퍼질러스 플라부스(*Aspergillus flavus*)일 수 있고, 상기 클라도스포리움 속(*Cladosporium* sp.) 균주는 클라도스포리움 고시피콜라(*Cladosporium gossypicola*)일 수 있으며, 상기 페니실리움 균주는 페니실리움 로크포르티(*Penicillium*

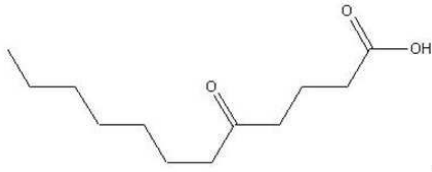
roqueforti) 일 수 있다.

- [0057] 상기 항진균 조성물은 인간을 포함한 동물에 직접 적용되어 항진균 활성을 나타낼 수 있고, 곡류 및 김치를 포함하는 식품, 화장품 또는 의약에 적용되어 효모 또는 곰팡이에 의한 제품의 부패를 억제하거나 예방할 수 있다.
- [0058] 상기 동물은 식물에 대응하는 생물군으로 주로 유기물을 영양분으로 섭취하며, 소화나 배설 및 호흡기관이 분화되어 있는 것을 말하고, 바람직하게는 꿩 또는 닭 등의 가금류를 포함하는 조류 또는 인간, 돼지, 소, 염소 등의 포유류 일 수 있다.
- [0059] 상기 항균 조성물은 상기 유효성분 외에 당질, 단백질, 지질, 비타민류 및 미네랄류를 포함할 수 있다.
- [0060] 상기 당질은 그 사용 목적 및 용도에 따라 적절히 선택될 수 있고, 일례로 벌꿀, 텍스트린, 수크로오스, 팔라티노스, 포도당, 과당, 물엿, 당알콜(sugar alcohol), 소르비톨, 크실리톨, 말티톨일 수 있으나, 특별히 이에 제한되는 것은 아니다. 상기 단백질은 그 사용 목적 및 용도에 따라 적의 선택될 수 있으며, 일례로, 카제인(casein), 유청 단백질(whey protein) 등의 우유 유래 단백질, 대두 단백질, 이들 단백질의 트립신, 펩신 등의 동물 유래 효소 및 뉴트라아제(neutrase), 알칼라아제(alkilase)에 의한 가수분해물일 수 있으나, 특별히 이에 제한되는 것은 아니다. 상기 지질은 그 사용 목적 및 용도에 따라 적의 선택될 수 있으며, 일례로, 제1가 포화 지방산, 다가 불포화지방산을 포함하는 해바라기유, 채종유(rapeseed oil), 올리브유, 홍화유(safflower oil), 옥수수유, 대두유, 팜유(palm oil), 야자유 등의 각종 식물 유래 유지, 중쇄 지방산(middle-chain fatty acid), EPA, DHA, 대두유래 인지질, 우유 유래 인지질일 수 있으나, 특별히 이에 제한되는 것은 아니다. 상기 비타민류는 특별한 제한은 없으며, 상기 미네랄류는 그 사용 목적 및 용도에 따라 적의 선택될 수 있으며, 일례로, 인산칼륨, 탄산칼륨, 염화칼륨, 염화나트륨, 유산칼슘, 글루콘산칼슘, 판토텐산칼슘, 카제인칼슘, 염화마그네슘, 황산제1철, 탄산수소나트륨일 수 있으나, 특별히 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0061] 상기 당질, 단백질, 지질, 비타민류 및 미네랄류 중 어느 것에 대해서도, 조성물의 항진균성이 유지되는 한 상기 구체예에 한정되지 않고 다른 성분을 포함할 수 있으며, 각각의 함량은 항균성이 유지되는 한 제한되지 아니하고, 바람직하게는 전체 조성물 대비 0.1 내지 15 중량%, 바람직하게는 0.5 내지 10 중량%일 수 있다.
- [0062] 본 발명은 또 다른 일 실시예에 따라 상기 항진균 조성물을 유효성분으로 포함하는 보존제 조성물을 제공한다. 상기 보존제는 식품 보존제일 수 있다.
- [0063] 상기 보존제 조성물은 세균, 곰팡이 및 효모 등의 위해 미생물 또는 부패 미생물의 증식을 억제하거나 살균하여, 위해 미생물 또는 부패 미생물에 의해 감염되거나 부패될 수 있는 보존대상의 변질, 산패 또는 부패를 방지하고 보존대상의 상태를 유지하기 위하여 사용되는 물질을 의미하며, 바람직하게는 식품, 사료, 화장품 및 의약품으로 이루어진 군중에서 선택된 1종 이상, 더욱 바람직하게는 식품에 사용될 수 있는 것을 의미한다.
- [0064] 상기 식품은 통조림식품 등을 포함하는 식품가공품, 어육제품, 두부류, 묵류, 건강보조식품, 조미식품, 제빵 및 제과류, 유제품을 포함하는 유가공품, 절임식품, 발효유 및 발효알콜음료를 포함하는 발효식품 또는 음료 등을 포함하며, 상기 사료는 일 예로 가축 사료일 수 있고, 그 용도에 제한되지 아니하고, 고체 또는 액체일 수 있다.
- [0065] 상기 보존제 조성물은 상기 유효성분을 포함하는 것을 제외하고는 보존제에 포함되는 통상의 물질을 추가로 포함할 수 있다. 상기 보존제 조성물은 전체 조성물 100 중량부에 대하여 상기 항균 조성물을 0.1 내지 50 중량부 또는 0.5 내지 10 중량부 포함하는 것일 수 있다.
- [0066] 상기 보존제 조성물은 항진균 활성으로 인한 보존제가 사용되는 식품 또는 사료 등의 저장성을 향상시킬 수 있을 뿐만 아니라, 열처리량 감소에 의한 영양적가치, 조직감 및 맛을 향상시킬 수 있는 효과가 있다. 또한, 상기 보존제 조성물은 상기 보존제 조성물의 항진균 활성이 저온에서 고온의 범위에서 모두 유지된다는 점에서, 저온성균의 제어에도 적용가능하며, 다양한 병원성균이나 식품오염의 주원인이 되는 곰팡이 또는 부패의 원인이 되는 미생물 등의 제어가 요구되는 다양한 용도에 응용될 수 있다.
- [0067] 상기 보존제 조성물에는 본 발명의 효과를 유지하는 범위 내에서 필요에 따라, 천연보존제, 합성 보존제 또는 유기산 혼합물을 함께 사용할 수 있다.
- [0068] 또한, 본 발명은 또 다른 일 실시예에 따라 상기 식품보존제 조성물을 식품에 첨가하는 단계를 포함하는 식품 보존 방법을 제공한다.

- [0069] 상기 식품 보존 방법은 세균, 곰팡이 및 효모 등의 위해 미생물 또는 부패 미생물의 증식에 의하여 식품이 변질, 산패 또는 부패되는 것을 방지하고 식품의 상태를 변질되지 않게 유지하는 방법을 의미한다.
- [0070] 상기 식품 보존 방법에 사용되는 식품보존제 조성물은 pH 조건이 pH 2.8 내지 pH 4.2, 바람직하게는 pH 2.8 내지 3.2일 수 있다. 이러한 측면에서 상기 식품 보존 방법은 식품 보존제 조성물의 pH를 pH 2.8 내지 pH 4.2, 바람직하게는 pH 2.8 내지 3.2로 조절하는 단계 및 상기 pH가 조절된 식품 보존제를 식품에 첨가하는 단계를 포함하는 식품 보존 방법일 수 있다.
- [0071] 본 발명은 또 다른 일 실시예에 따라 상기 락토바실러스 플란타룸 HD1 균주(*Latobacillus plantarum* HD1, KFCC11512P), 상기 균주의 배양물, 상기 배양물의 농축물, 상기 배양물의 건조물 및 이들의 조합으로 이루어진 균에서 선택된 어느 하나를 유효성분으로 포함하는 식품 또는 식품 조성물을 제공한다.
- [0072] 상기 식품이란 영양소를 한 가지 또는 그 이상 함유하고 있는 천연물 또는 가공품을 의미하며, 일 예로 발효식품 또는 기능성 식품일 수 있다. 상기 식품은 상기 유효성분을 함유하는 외에는 다른 성분에는 특별한 제한이 없으며, 통상의 식품과 같이 여러 가지 향미제 또는 탄수화물 등을 추가 성분으로 함유할 수 있으나 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0073] 상기 유효성분은 상기 식품의 제조시 원료물질에 첨가되거나 조리된 식품에 적절히 혼합하는 방법으로 첨가될 수 있으며, 식품학적으로 허용 가능한 식품 보조 첨가제와 함께 첨가될 수 있다. 이 때, 식품 또는 음료 등에 첨가되는 상기 유효성분의 양은 전체 식품 중량의 0.01 내지 90 중량%일 수 있고, 음료의 경우 100 ml를 기준으로 0.02 내지 20g의 비율로 가할 수 있으며, 상기 유효성분에 포함된 균체의 양을 기준으로 할 때, 전체 식품 중량을 기준으로 10kg 당 1×10^6 개(1×10^6 cfu) 내지 5×10^7 개(5×10^7 cfu)일 수 있다.
- [0074] 본 발명에서 발효식품이란 유산균이나 효모 등 미생물을 한가지 또는 둘 이상 첨가하고 상기 미생물의 발효 작용을 이용하여 만든 식품을 의미하며, 상세하게는 식품 기재에 발효식품용 종균을 첨가하고 숙성시켜 제조하는 식품을 의미한다.
- [0075] 상기 발효식품의 일 예로는 주류, 빵류, 김치, 젓갈, 된장, 간장, 치즈, 버터, 요구르트 등일 수 있고, 비살균 개방형 발효식품을 포함할 수 있으며, 바람직하게는 김치일 수 있다.
- [0076] 상기 발효식품에 상기 락토바실러스 플란타룸 HD1 균주(*Latobacillus plantarum* HD1, KFCC11512P), 상기 균주의 배양물, 상기 배양물의 농축물, 상기 배양물의 건조물 및 이들의 조합으로 이루어진 균에서 선택된 어느 하나가 유효성분으로 포함될 수 있을 뿐만 아니라, 발효식품용 종균으로 사용될 수 있다.
- [0077] 상기 발효식품용 종균은 바람직하게는 김치의 종균일 수 있다. 이 때, 종균의 사용량은 발효식품의 종류 및 종균의 종류에 따라 적절히 조절될 수 있으며, 일 예로 식품 주재료 전체 중량을 기준으로 0.0001 중량% 내지 0.01중량%(습윤 중량) 접종할 수 있다.
- [0078] 상기 락토바실러스 플란타룸 HD1 균주(*Latobacillus plantarum* HD1, KFCC11512P), 상기 균주의 배양물, 상기 배양물의 농축물, 상기 배양물의 건조물 및 이들의 조합으로 이루어진 균에서 선택된 어느 하나를 김치에 이용하는 경우 산막효모의 생식 및 증식을 억제하여 김치 발효 시 발생하는 이취 등을 억제할 수 있고, 김치를 고품질의 상태에서 장기간 보호할 수 있게 한다.
- [0079] 본 발명에서 기능성 식품이란 식품에 물리적, 생화학적, 생물공학적인 수법 등을 이용하여 해당 식품의 기능을 특정 목적에 작용, 발현하도록 부가가치를 부여한 식품균이나 식품 조성이 갖는 생체방어리듬조절, 질병방지와 회복 등에 관한 체조절기능을 생체에 대하여 충분히 발현하도록 설계하여 가공한 식품을 의미한다.
- [0080] 본 발명에서 음료란 갈증을 해소하거나 맛을 즐기기 위하여 마시는 것의 총칭을 의미하고, 주류, 청량음료, 물, 시럽, 차, 커피, 과실음료 등이 이에 해당되고, 유산균 음료를 포함한다. 유산균 음료는 유산균을 배양하여 유산 발효시킨 것에 살균수를 가해서 희석하고 당분, 향료 등을 가한 음료를 의미한다. 상기 음료는 지시된 비율로 필수 성분으로서 상기 유효성분을 함유하는 외에는 다른 성분에는 특별히 제한이 없으며, 통상의 음료와 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다.
- [0081] 본 발명의 발명자들은 상기 락토바실러스 플란타룸 HD1 균주가 향진균 활성을 갖는 3-하이드록시데카노익 산(3-hydroxydecanoic acid) 및 3-하이드록시-5-도데세노익 산(3-hydroxy-5-dodecenoic acid)을 천연적으로 생산할 수 있을 뿐만 아니라, 기존에 향료(flavoring substance)로 알려진 하기 화학식 1의 구조를 갖는 5-옥소도데카노익 산(5-oxododecanoic acid)이 산막 효모 등에 대한 향진균 활성을 갖는다는 것을 최초로 확인하여, 상기 5-

옥소도데카노익 산의 항진균과 관련된 새로운 용도를 제안하였다.

[0082] [화학식 1]



[0083]

[0084] 이러한 측면에서, 본 발명은 5-옥소도데카노익 산(5-oxododecanoic acid)을 유효성분으로 포함하는 항진균 조성물에 관한 것이다.

[0085] 상기 항진균 조성물은, 조성물 총 중량에 대하여 상기 5-옥소도데카노익 산을 유효성분으로 0.001 내지 99.99 중량%, 바람직하게는 0.1 내지 99 중량%로 포함할 수 있고, 상기 항진균 조성물의 사용방법 및 사용목적에 따라 유효성분의 함량을 적절히 조절할 수 있다.

[0086] 상기 항진균 조성물은 효모 및 곰팡이 구체적으로, 칸디다 속(*Candida* sp.), 이사첸키아 속(*Issatchenkia* sp.), 사카로마이세스 속(*Saccharomyces* sp.), 카자크스타니아 속(*Kazachstania* sp.) 및 이들의 조합으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나의 효모 및 아스퍼질러스 속(*Aspergillus* sp.), 클라도스포리움 속(*Cladosporium* sp.), 페니실리움 속(*Penicillium* sp.) 및 이들의 조합으로 이루어지는 군에서 선택된 어느 하나의 곰팡이로 이루어진 군 중에서 선택된 1종의 진균에 대해 항진균 활성을 가질 수 있다.

[0087] 상기 칸디다 속(*Candida* sp.) 균주는 칸디다 알비칸스(*Candida albicans*)일 수 있고, 상기 이사첸키아 속(*Issatchenkia* sp.) 균주는 이사첸키아 오리엔탈리스(*Issatchenkia orientalis*)일 수 있으며, 상기 사카로마이세스 속(*Saccharomyces* sp.) 균주는 사카로마이세스 세르바지(*Saccharomyces servazzii*) 또는 사카로마이세스 불더리(*Saccharomyces bulderi*)일 수 있고, 상기 카자크스타니아 속(*Kazachstania* sp.) 균주는 카자크스타니아 엑시구아(*Kazachstania exigua*)일 수 있다. 또한, 상기 아스퍼질러스 속(*Aspergillus* sp.) 균주는 아스퍼질러스 푸미가투스(*Aspergillus fumigatus*), 아스퍼질러스 오크라세우스(*Aspergillus ochraceus*), 아스퍼질러스 니둘란스(*Aspergillus nidulans*), 아스퍼질러스 페트라키(*Aspergillus petrakii*) 또는 아스퍼질러스 플라부스(*Aspergillus flavus*)일 수 있고, 상기 클라도스포리움 속(*Cladosporium* sp.) 균주는 클라도스포리움 고시피콜라(*Cladosporium gossypiicola*)일 수 있으며, 상기 페니실리움 균주는 페니실리움 로크포르티(*Penicillium roqueforti*)일 수 있다.

[0088] 상기 항진균 조성물은 인간을 포함한 동물에 직접 적용되어 항진균 활성을 나타낼 수 있고, 곡류 및 김치를 포함하는 식품, 화장품 또는 의약에 적용되어 효모 또는 곰팡이에 의한 제품의 부패를 억제하거나 예방할 수 있다.

[0089] 또한, 상기 항균 조성물은 상기 유효성분 외에 당질, 단백질, 지질, 비타민류 및 미네랄류를 포함할 수 있다.

[0090] 상기 당질은 그 사용 목적 및 용도에 따라 적절히 선택될 수 있고, 일례로 벌꿀, 텍스트린, 수크로오스, 팔라티노스, 포도당, 과당, 물엿, 당알콜(sugar alcohol), 소르비톨, 크실리톨, 말티톨일 수 있으나, 특별히 이에 제한되는 것은 아니다. 상기 단백질은 그 사용 목적 및 용도에 따라 적의 선택될 수 있으며, 일례로, 카제인(casein), 유청 단백질(whey protein) 등의 우유 유래 단백질, 대두 단백질, 이들 단백질의 트립신, 펩신 등의 동물 유래 효소 및 뉴트라아제(neutrased), 알칼라아제(alkilase)에 의한 가수분해물일 수 있으나, 특별히 이에 제한되는 것은 아니다. 상기 지질은 그 사용 목적 및 용도에 따라 적의 선택될 수 있으며, 일례로, 제1가 포화 지방산, 다가 불포화지방산을 포함하는 해바라기유, 채종유(rapeseed oil), 올리브유, 홍화유(safflower oil), 옥수수유, 대두유, 팜유(palm oil), 야자유 등의 각종 식물 유래 유지, 중쇄 지방산(middle-chain fatty acid), EPA, DHA, 대두유래 인지질, 우유 유래 인지질일 수 있으나, 특별히 이에 제한되는 것은 아니다. 상기 비타민류는 특별한 제한은 없으며, 상기 미네랄류는 그 사용 목적 및 용도에 따라 적의 선택될 수 있으며, 일례로, 인산칼륨, 탄산칼륨, 염화칼륨, 염화나트륨, 유산칼슘, 글루콘산칼슘, 판토텐산칼슘, 카제인칼슘, 염화마그네슘, 황산제1철, 탄산수소나트륨일 수 있으나, 특별히 이에 제한되는 것은 아니다.

[0091] 상기 당질, 단백질, 지질, 비타민류 및 미네랄류 중 어느 것에 대해서도, 조성물의 항진균성이 유지되는 한 상기 구체예에 한정되지 않고 다른 성분을 포함할 수 있으며, 각각의 함량은 항균성이 유지되는 한 제한되지 아니하고, 바람직하게는 전체 조성물 대비 0.1 내지 15 중량%, 바람직하게는 0.5 내지 10 중량%일 수 있다.

- [0092] 본 발명은 또 다른 일 실시예에 따라 5-옥소도데카노익 산(5-oxododecanoic acid)을 유효성분으로 포함하는 보존제 조성물을 제공한다. 상기 보존제는 식품 보존제일 수 있다.
- [0093] 상기 보존제 조성물은 세균, 곰팡이 및 효모 등의 위해 미생물 또는 부패 미생물의 증식을 억제하거나 살균하여, 위해 미생물 또는 부패 미생물에 의해 감염되거나 부패될 수 있는 보존대상의 변질, 산패 또는 부패를 방지하고 보존대상의 상태를 유지하기 위하여 사용되는 물질을 의미하며, 바람직하게는 식품, 사료, 화장품 및 의약품으로 이루어진 군중에서 선택된 1종 이상, 더욱 바람직하게는 식품에 사용될 수 있는 것을 의미한다.
- [0094] 상기 식품은 통조림식품 등을 포함하는 식품가공품, 어육제품, 두부류, 목류, 건강보조식품, 조미식품, 제빵 및 제과류, 유제품을 포함하는 유가공품, 절임식품, 발효유 및 발효알콜음료를 포함하는 발효식품 또는 음료 등을 포함하며, 상기 사료는 일 예로 가축 사료일 수 있고, 그 용도에 제한되지 아니하고, 고체 또는 액체일 수 있다.
- [0095] 상기 보존제 조성물은 상기 유효성분을 포함하는 것을 제외하고는 보존제에 포함되는 통상의 물질을 추가로 포함할 수 있다. 상기 보존제 조성물은 전체 조성물 100 중량부에 대하여 상기 항균 조성물을 0.1 내지 50 중량부 또는 0.5 내지 10 중량부 포함하는 것일 수 있다.
- [0096] 상기 보존제 조성물은 항진균 활성으로 인한 보존제가 사용되는 식품 또는 사료 등의 저장성을 향상시킬 수 있을 뿐만 아니라, 열처리량 감소에 의한 영양적가치, 조직감 및 맛을 향상시킬 수 있는 효과가 있다. 또한, 상기 보존제 조성물은 기존에 식품에 사용되던 향료(flavoring substance)일 뿐만 아니라, GRAS 미생물에 해당하는 유산균인 락토바실러스 플란타룸 즉, 본 발명의 락토바실러스 플란타룸 HD1 균주(*Latobacillus plantarum* HD1, KFCC11512P)에 의해 제조된 것이므로, 안전한 천연물질에 해당하여, 다양한 병원성균이나 식품오염의 주원인이 되는 곰팡이 또는 부패의 원인이 되는 미생물 등의 제어가 요구되는 다양한 용도에 응용될 수 있다.
- [0097] 상기 보존제 조성물에는 본 발명의 효과를 유지하는 범위 내에서 필요에 따라, 천연보존제, 합성 보존제 또는 유기산 혼합물을 함께 사용할 수 있다.
- [0098] 또한, 본 발명은 또 다른 일 실시예에 따라 상기 식품보존제 조성물을 식품에 첨가하는 단계를 포함하는 식품 보존 방법을 제공한다.
- [0099] 상기 식품 보존 방법은 세균, 곰팡이 및 효모 등의 위해 미생물 또는 부패 미생물의 증식에 의하여 식품이 변질, 산패 또는 부패하는 것을 방지하고 식품의 상태가 변질되지 않게 유지하는 방법을 의미한다.

발명의 효과

- [0100] 본 발명에 따른 락토바실러스 플란타룸 HD1 균주는 다양한 곰팡이 및 효소에 대한 폭넓은 항진균 활성을 가지고, 특히 발효식품의 품질 저하의 원인이 되는 산막 효모에 대한 항진균 활성, 구체적으로 이사첸키아 속(*Issatchenkia* sp.)을 포함한 효모 등에 대한 항진균 활성을 가지고, 상기 항진균 활성은 온도 및 pH에 대한 안정성이 뛰어나고, 단백질 분해효소에 대한 내성도 강하므로, 항진균 조성물, 천연식품보존제, 사료보존제 및 식품 등 다양한 산업분야에 이용될 수 있어 그 산업적 이용가치가 매우 클 것으로 평가된다.

도면의 간단한 설명

- [0101] 도 1은 본 발명의 일 실시예에 따른 락토바실러스 플란타룸 HD1 균주의 16S rRNA의 염기서열을 나타낸 도면이다.

도 2는 본 발명의 일 실시예에 따른 락토바실러스 플란타룸 HD1 균주의 16S rRNA의 염기서열을 기초로 한 다른 세균과의 계통발생론적 관계를 나타내는 도면이다.

도 3은 본 발명의 일 실시예에 따른 락토바실러스 플란타룸 HD1 균주의 항진균(항효모) 활성을 나타낸 것으로, 도 3a는 본 발명의 일 실시예에 따른 이체첸키아 오리엔탈리스 GY1(*Issatchenkia orientalis* GY1)에 대한 항진균 활성을 나타내는 사진이고, 도 3b는 본 발명의 일 실시예에 따른 사카로마이세스 세르바지 DY2(*Saccharomyces servazzii* DY2)에 대한 항진균 활성을 나타내는 사진이며, 도 3c는 본 발명의 일 실시예에 따른 사카로마이세스 볼더리 HY(*Saccharomyces bulderi* HY)에 대한 항진균 활성을 나타내는 사진이고, 도 3d는 본 발명의 일 실시예에 따른 카자크스타니아 엑시구아 WY3(*Kazachstania exigua* WY3)에 대한 항진균 활성을 나타내는 사진이며, 도 3e는 본 발명의 일 실시예에 따른 칸디다 알비칸스 ATCC 11006(*Candida albicans* ATCC 11006)에 대한 항진균 활성을 나타내는 사진이다.

도 4는 본 발명의 일 실시예에 따른 락토바실러스 플란타룸 HD1 균주의 항진균(항곰팡이) 활성을 나타낸 것으로, 도 4a는 본 발명의 일 실시예에 따른 아스퍼질러스 푸미가투스 ATCC 96918(*Aspergillus fumigatus* ATCC 96918)에 대한 항진균 활성을 나타내는 사진이고, 도 4b는 본 발명의 일 실시예에 따른 아스퍼질러스 오크라세우스 PF-2(*Aspergillus ochraceus* PF-2)에 대한 항진균 활성을 나타내는 사진이며, 도 4c는 본 발명의 일 실시예에 따른 아스퍼질러스 니둘란스 PF-3(*Aspergillus nidulans* PF-3)에 대한 항진균 활성을 나타내는 사진이고, 도 4d는 본 발명의 일 실시예에 따른 클라도스포리움 고시피콜라 KF-2(*Cladosporium gossypii* KF-2)에 대한 항진균 활성을 나타내는 사진이며, 도 4e는 본 발명의 일 실시예에 따른 아스퍼질러스 페트라키 PF-1(*Aspergillus petrakii* PF-1)에 대한 항진균 활성을 나타내는 사진이고, 도 4f는 본 발명의 일 실시예에 따른 페니실리움 로크포르티 ATCC 10110(*Penicillium roqueforti* ATCC 10110)에 대한 항진균 활성을 나타내는 사진이며, 도 4g는 본 발명의 일 실시예에 따른 아스퍼질러스 플라부스 ATCC 22546(*Aspergillus flavus* ATCC 22546)에 대한 항진균 활성을 나타내는 사진이다.

도 5는 본 발명의 일 실시예에 따른 락토바실러스 플란타룸 HD1 균주의 생육에 따른 항진균 활성을 나타낸 그래프로, 가로축은 배양 시간을 나타내고, 세로축의 좌측은 600 nm에서 흡광도를 측정한 값으로 생육곡선을 나타내고, 세로축의 우측은 상기 균주의 항진균 활성 정도를 나타내는 것으로 단위는 AU/ml이다. 도 5a는 28℃에서 배양시 생육곡선 및 항진균 활성을 나타낸 그래프이고, 도 5b는 30℃에서 배양시 생육곡선 및 항진균 활성을 나타낸 그래프이며, 도 5c는 37℃에서 배양시 생육곡선 및 항진균 활성을 나타낸 그래프이다.

도 6은 본 발명의 일 실시예에 따른 김치에 발현한 산막효모에 관한 사진으로, 도 6a는 산막효모가 발현되기 전의 김치를 나타낸 사진이고, 도 6b는 산막효모가 발현되어, 산막효모집락이 생기기 시작한 김치로, 하얀 알갱이가 산막효모의 집락을 나타내며, 도 6c는 산막효모가 표면에 완전히 도포된 상태의 김치를 나타낸다.

도 7은 본 발명의 일 실시예에 따른 락토바실러스 플란타룸 HD1 균주의 김치에 발현되는 산막효모에 대한 저해능에 관한 사진으로, 도 7a는 대조군으로 락토바실러스 플란타룸 HD1 균주 배양액을 첨가하지 않은 김치에 산막효모가 발현된 사진을 나타내고, 도 7b 및 도 7c는 김치를 분쇄한 김치여액에 산막효모가 발현된 것을 나타내며, 도 7d는 실험군으로 락토바실러스 플란타룸 HD1 균주 배양액을 첨가한 김치의 사진을 나타내고, 도 7e 및 도 7f는 락토바실러스 플란타룸 HD1 균주를 첨가한 김치를 분쇄한 김치여액을 나타낸다.

도 8은 본 발명의 일 실시예에 따른 락토바실러스 플란타룸 HD1 균주의 막걸리에 발현되는 산막효모에 대한 저해능에 관한 사진으로, 도 8a 및 도 8b는 대조군으로 락토바실러스 플란타룸 HD1 균주 배양액을 첨가하지 않은 막걸리에 산막효모가 발현된 사진을 나타내고, 도 8c 및 도 8d는 산막효모가 실험군으로 락토바실러스 플란타룸 HD1 균주 배양액을 첨가한 막걸리의 사진을 나타낸다.

도 9은 본 발명의 일 실시예에 따른 락토바실러스 플란타룸 HD1 균주의 배양액의 항진균 물질을 분리하기 위해 1차 HPLC(pre-HPLC)를 수행한 결과를 나타낸 것으로, 도 9a는 상기 1차 HPLC(pre-HPLC)를 수행한 과정 및 1차 HPLC에 따라 분리된 21개의 분획을 구분한 그래프 및 상기 21개의 주요 분획의 *A. fumigatus* ATCC 96918(도 9b)와 *I. orientalis* GY1(도 9c)에 대한 항진균 활성을 확인한 사진이다.

도 10은 본 발명의 일 실시예에 따른 락토바실러스 플란타룸 HD1 균주의 배양액의 항진균 물질을 분리하기 위해 2차 HPLC를 수행한 결과를 나타낸 것으로, 도 10a는 상기 2차 HPLC를 수행한 과정 및 2차 HPLC에 따라 분리된 11개의 분획을 구분한 그래프 및 상기 11개의 주요 분획의 *A. fumigatus* ATCC 96918(도 10b)와 *I. orientalis* GY1(도 10c)에 대한 항진균 활성을 확인한 사진이다.

도 11은 본 발명의 일 실시예에 따른 락토바실러스 플란타룸 HD1 균주의 배양액의 항진균 물질을 분리하기 위해 3차 HPLC를 수행한 결과를 나타낸 것으로, 도 11a는 상기 3차 HPLC를 수행한 과정 및 3차 HPLC에 따라 분리된 22개의 분획을 구분한 그래프 및 상기 22개의 주요 분획의 *A. fumigatus* ATCC 96918(도 11b), *I. orientalis* GY1(도 11c) 및 *C. albicans* ATCC 11006(도 11d)에 대한 항진균 활성을 확인한 사진이다.

도 12는 본 발명의 일 실시예에 따른 락토바실러스 플란타룸 HD1 균주의 배양액의 항진균 물질을 분리하기 위해 3차 HPLC의 6번째 및 7번째 분획을 합하여 4차 HPLC를 수행한 결과를 나타낸 것으로, 도 12a는 상기 4차 HPLC를 수행한 과정 및 4차 HPLC에 따라 분리된 13개의 분획을 구분한 그래프 및 상기 13개의 주요 분획의 *A. fumigatus* ATCC 96918(도 12b)와 *I. orientalis* GY1(도 12c)에 대한 항진균 활성을 확인한 사진이다.

도 13은 본 발명의 일 실시예에 따른 락토바실러스 플란타룸 HD1 균주의 배양액의 항진균 물질을 분리하기 위해 3차 HPLC의 12번째 분획을 이용하여 두 번째 4차 HPLC(4-2 HPLC)를 수행한 결과를 나타낸 것으로, 도 13a는 상기 두 번째 4차 HPLC(4-2 HPLC)를 수행한 과정 및 두 번째 4차 HPLC(4-2 HPLC)에 따라 분리된 7개의 분획을 구

분한 그래프 및 상기 7개의 주요 분획의 *A. fumigatus* ATCC 96918(도 13b)와 *I. orientalis* GY1(도 13c)에 대한 항진균 활성을 확인한 사진이다.

도 14는 본 발명의 일 실시예에 따른 락토바실러스 플란타룸 HD1 균주의 배양액의 항진균 물질을 분리하기 위해 4차 HPLC를 수행하여 최종적으로 확정된 3가지 분획에 대해서 ¹H NMR 및 ¹³C NMR을 수행한 결과를 나타낸 것으로, 도 14a 및 도 14b는 3차 HPLC의 11번째 분획(3-11 분획)의 ¹H NMR 결과를 나타내는 그래프이고, 도 14c는 3차 HPLC의 11번째 분획(3-11 분획)의 ¹³C NMR 결과를 나타내는 그래프이며, 도 14d는 4차 HPLC의 7번째 분획(4-7 분획)의 ¹H NMR 결과를 나타내는 그래프이고, 도 14e는 4차 HPLC의 7번째 분획(4-7 분획)의 ¹³C NMR 결과를 나타내는 그래프이며, 도 14f는 두 번째 4차 HPLC(4-2 HPLC)의 5번째 분획(12-5 분획)의 ¹H NMR 결과를 나타내는 그래프이고, 도 13e는 두 번째 4차 HPLC(4-2 HPLC)의 5번째 분획(12-5 분획)의 ¹³C NMR 결과를 나타내는 그래프이다.

도 15는 본 발명의 일 실시예에 따른 락토바실러스 플란타룸 HD1 균주의 배양액의 항진균 물질을 분리하기 위해 4차 HPLC를 수행하여 최종적으로 확정된 3가지 분획에 대해서 MASS를 수행한 결과를 나타낸 것으로, 도 15a 및 도 15b(확대)는 3차 HPLC의 11번째 분획(3-11 분획)의 TOF MS ES+ 결과를 나타내는 그래프이고, 도 15c 및 도 15d(확대)는 3차 HPLC의 11번째 분획(3-11 분획)의 TOF MS ES- 결과를 나타내는 그래프이며, 도 15e 및 도 15f(확대)는 4차 HPLC의 7번째 분획(4-7 분획)의 TOF MS ES+ 결과를 나타내는 그래프이고, 도 15g 및 도 15h(확대)는 4차 HPLC의 7번째 분획(4-7 분획)의 TOF MS ES- 결과를 나타내는 그래프이며, 도 15i 및 도 15j(확대)는 두 번째 4차 HPLC(4-2 HPLC)의 5번째 분획(12-5 분획)의 TOF MS ES+ 결과를 나타내는 그래프이고, 도 15k 및 도 15l(확대)는 두 번째 4차 HPLC(4-2 HPLC)의 5번째 분획(12-5 분획)의 TOF MS ES- 결과를 나타내는 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0102] 이하 본 발명의 실시예를 기재한다. 하기 실시예는 본 발명을 예시하기 위한 것일 뿐 본 발명이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.

<실시예1> 균주의 분리 및 동정

1-1. 항진균 활성 균주의 분리

[0105] 광주 및 전남 지역을 포함한 전국의 가정집, 명가, 식당 또는 사찰 등 80여 곳에서 수집한 맛이 좋은 최적 숙성기의 김치로부터 분리하여 보유 중인 91종의 김치 유산균에 대해 항진균 활성을 확인하였다.

[0106] 상기 김치로부터 김치 유산균을 분리하는 과정은 다음과 같은 방법으로 수행하였다. 우선, 상기 김치 전체를 마쇄한 후 멸균거르로 여과하여 김치 여과액을 수득하였다. 상기 김치 여과액을 멸균수를 이용하여 단계적으로 희석한 후에, 100 μ l를 취하여 CaCO₃가 2%(w/v) 첨가된 MRS(Difco Laboratories, MI, USA) 한천배지(1.5% agar, w/v)에 도말한 후, 30℃에서 평판배양하였다. 상기 평판배양 결과, 간균의 세포 형태(단간균 제외)를 가지는 유산균 91종을 분리하였다.

[0107] 상기 김치 유산균 중 진균 특히, 산막효모에 대한 저해 활성을 가진 유산균을 선별하기 위하여 상기 91종의 김치유산균을 MRS 액체배지에 접종하여 30℃에서 24시간 동안 배양하여 농축 배양 상정액을 준비하였다. 상기 농축 배양 상정액을 이용하여 진균에 대한 paper disc assay를 수행하여, 진균 활성을 확인하였다.

[0108] 보다 상세하게는, 상기 진균 활성을 확인하기 위한 지시균으로 본 발명자가 시중 김치에서 분리하여 실험실에서 보관하고 있는 산막효모, 구체적으로 산막효모 중 실제 김치 연부현상을 가져오는 대표적인 산막효모인 이사첸키아 속(*Issatchenkia* sp.)과 사카로마이세스 속(*Saccharomyces* sp.) 중, 시중 김치로부터 본 발명의 발명자가 직접 분리한 산막효모인 김치에서 분리한 표면이 거친 부정형의 집락을 나타내는 이사첸키아 오리엔탈리스 GY1(*Issatchenkia orientalis* GY1) 또는 피키아 쿠드리야브제비 GY1(*Pichia kudriavzevii* GY1)라고 명명된 효모와 매끈하고 둥근 집락을 나타내는 효모인 사카로마이세스 세르바지 DY2(*Saccharomyces servazzii* DY2)라고 명명한 효모를 선택하여 이를 disk에 배양하였으며, 상기 91종의 유산균의 항진균 활성을 상기 지시균이 배양된 disk를 이용하여 상기 지시균에 대한 생육 저해 활성 여부로 확인하였으며, 그 결과를 하기 표 1에 나타내었다.

표 1

[0109]

No.	유산균	생육저해환		No.	유산균	생육저해환	
		GY1	DY2			GY1	DY2
1	금호4	-	11.80	47	화순4	-	-
2	BU1	-	9.54	48	장성1	-	11.39
3	NJ1	-	12.09	49	장성10	-	12.33
4	배추C	-	11.33	50	장성14	-	11.82
5	HJ5	-	11.57	51	민속C항6	-	11.72
6	HJC	-	10.83	52	목CB1	-	11.23
7	NJ2	-	10.59	53	목CB2	-	-
8	YY4	-	11.15	54	목CB3	-	-
9	굴2	-	11.10	55	주월8	-	11.53
10	SI3	-	11.70	56	영광21	-	-
11	현C2	-	11.14	57	양산5	-	11.92
12	WH1	-	10.28	58	양산9	-	12.00
13	대C3	-	10.90	59	진도III-3	-	11.54
14	불C1	-	9.78	60	진도III-12	-	12.18
15	BM5	-	11.30	61	임암동3	-	12.03
16	금호1	-	10.46	62	나주6	-	11.21
17	곡성1	-	10.77	63	나주11	-	12.05
18	곡성2	-	10.46	64	봉운사1	-	11.68
19	곡성3	-	10.84	65	봉운사2	-	11.84
20	곡성4	-	10.20	66	봉운사3	-	11.12
21	고서2	-	10.71	67	달성사1	-	11.73
22	중흥1	-	10.46	68	달성사2	-	-
23	중흥2	-	11.12	69	심향사12	-	11.71
24	계림4	-	11.09	70	운주사1	-	11.46
25	순창1	-	11.19	71	운주사5	-	11.44
26	순창4	-	11.53	72	증심사6	-	12.02
27	주월1	-	11.78	73	봉선8	-	-
28	주월3	-	11.89	74	배추D	-	11.19
29	HD1	10.78	12.43	75	GJ3	-	11.12
30	민속CA1	-	11.62	76	GJ6	-	11.94
31	민속CA2	-	11.85	77	YY4	-	11.13
32	민속C항1	-	11.08	78	전복5	-	11.32
33	민속C항2	-	10.97	79	전복9	-	11.26
34	민속C항3	-	10.73	80	전복10	-	11.23
35	민속C항4	-	11.06	81	나C3	-	11.25
36	목CA3	-	11.29	82	나M2	-	-
37	목CA4	-	-	83	최M1	-	12.32
38	HA2	-	11.91	84	최M3	-	11.30
39	학동4	-	12.07	85	최M4	-	-
40	진도C3	-	-	86	최M6	-	-
41	진도C11	-	-	87	진도12	-	11.80
42	진도C14	-	12.15	88	백양사MB2	-	10.85
43	용봉9	-	-	89	백양사MC1	-	11.03
44	용봉10	-	11.14	90	백양사MC2	-	10.96
45	용봉13	-	11.32	91	백양사MC4	-	12.46
46	봉선9	-	11.84				

[0110] 상기 표 1에서, GY1은 상기 지시균인 이사켄치아 오리엔탈리스 GY1을 의미하고, DY2는 상기 지시균인 사카로마이세스 세르바지 DY2를 의미하며, 생육저해환(inhibition zone)에서 단위는 mm이고, - 는 생육저해환이 형성되지 않은 것을 의미한다.

[0111] 상기 표 1에 나타난 바와 같이, 진균에 대한 항진균 활성을 측정한 결과 사카로마이세스 세르바지 DY2에 대해서 여러 유산균들이 저해환을 형성하여 항진균 활성을 갖는 것으로 확인된 반면, 산막효모인 이사켄치아 오리엔탈

리스 GY1에 대해서는 대부분의 유산균들이 항진균 활성을 갖지 아니하고, HD1 균주만이 생육저해환을 형성시켜 항진균 활성을 갖는 것으로 확인되어, 산막효모에 대한 항진균 활성을 갖는 균주로 HD1 균주를 선정하여 분리하였다.

1-2. 분리 균주의 형태학적 동정

상기 실시예 1-1에서 산막효모에 대한 항진균 활성을 갖는 균주로 분리된 HD1 균주를 동정하기 위하여, 일차적으로 형태학적 특성을 관찰하였다. 상기 형태학적 특성의 조사는 그람 염색 여부와 현미경을 이용하여 균의 형태 등을 관찰하는 방법으로 수행하였으며, 그 결과를 하기 표 2에 나타내었다.

표 2

특성(Characteristics)	균주(HD1)
그람 염색(Gram-stain)	양성(+)
세포 형태(Cell morphology)	막대형(rod)
집락(Colony)	둥글(circular)
집락 표면(Colony surface)	매끈함(smooth)
집락 색(Colony color)	밝은 노란색(light-yellow)
집락 투명도(Colony opacity)	불투명

상기 표 2에 나타낸 바와 같이, 상기 분리된 HD1 균주는 그람 양성의 간균으로, 둥글고 매끈하며 밝은 노란색의 집락(colony)을 형성하는 것으로 확인되었다.

1-3. 분리 균주의 생화학적 동정

상기 분리 균주를 동정하기 위하여 생화학적 조사를 수행하였다. 생화학적 조사는 API 50CHL system(BioMerieux, Marcy l'Etoile, France)을 이용하여 당이용성을 조사한 후 균주동정 프로그램(<http://apiweb.biomerieux.com>)을 이용하여 확인하는 방법으로 수행하였다. 상기 API 50CHL system을 이용한 당 이용성 조사결과는 하기 표 3에 나타내었다.

표 3

Sugar	Metabolism	Sugar	Metabolism
Glycerol	-	Salicine	+
Erythritol	-	Cellobiose	+
D-Arabinose	-	Maltose	+
L-Arabinose	+	Lactose	+
Ribose	+	Melibiose	+
D-Xylose	-	Saccharose	+
L-Xylose	-	Trehalose	+
Adonitol	-	Inuline	-
β -Methyl-xyloside	-	Melezitose	+
Galactose	+	D-Raffinose	-
D-Glucose	+	Amidon	-
D-Fructose	+	Glycogen	-
D-Mannose	+	Xylitol	-
L-Sorbose	-	β -Gentiobiose	+
Rhamnose	+	D-Turanose	+
Dulcitol	-	D-Lyxose	-
Inositol	-	D-Tagatose	-
Manitol	+	D-Fucose	-
Sorbitol	+	L-Fucose	-
α -Methyl-D-mannoside	-	D-Arabitol	+
α -Methyl-D-glucoside	-	L-Arabitol	-

N-Acetyl-glucosamine	+	Gluconate	+
Amygdaline	+	2-keto-gluconate	-
Arbutine	+	5-keto-gluconate	-
Esculine	+		

[0119] 상기 표 3에서, -또는 +는 당대사능 또는 당이용능을 기준으로 결정한 것으로, 각 당에 대한 당대사능이 없는 경우 -라고 표시하고, 당대사능이 있는 경우 +라고 표시하였다.

[0120] 상기 표 3에 나타난 바와 같이, 상기 HD1 균주는 갈락토스, D-글루코스, D-프룩토스, D-만노스, 람노스, 만니톨, 솔비톨, 알부틴, 말토스, 락토스, D-타카토스, D-아라비톨 등에 대해 당대사능을 갖는 것으로 확인되었다.

[0121] 상기 동정결과는 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*)과 99%의 상동성을 나타내어 상기 HD1 균주는 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*)으로 추정되었다.

[0122] 1-4. 분리 균주의 분자생물학적 동정

[0123] 상기 생화학적 동정 결과 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*)로 추정된 HD1 균주를 최종적으로 동정하기 위하여, 16S rRNA 염기서열 분석을 실시하였다. 구체적으로, HD1의 16S rRNA 염기서열을 결정하고, 이를 GenBank에 등록된 다른 균주들의 염기서열과 비교하여 16S rRNA 염기서열 분석을 수행하였다.

[0124] 상기 분리균주의 16S rRNA의 염기서열은 다음과 같은 방법으로 수행하였다. 상기 분리균주의 chromosomal DNA를 Genomic DNA purification kit(Q-Biogene, U.S.A.)를 이용하여 분리한 후에, 하기 표 4의 서열을 갖는 프라이머를 이용하여 PCR을 수행하였다.

표 4

Primers	서열 (5' →3')
518F	CCAGCAGCCGCGTAATACG
800R	TACCAGGTATCTAATCC

[0126] 상기 PCR은 95℃에서 5분간 전변성단계(pre-denaturation)를 수행한 후, 95℃에서 30초, 53℃에서 30초 및 72℃에서 1분 30초의 과정을 30회 반복하고, 72℃에서 10분간 후연장단계(post-elongation)를 수행하는 방법으로 진행하였다. 상기 증폭된 PCR 산물은 pGEM-T easy vector(Promega Co., USA)에 클로닝(cloning)한 후, ABI PRISM 3730 DNA analyzer(Applied Biosystems, Foster City, CA, U.S.A.)를 이용하여 염기서열을 결정하였으며, 상기 결과로부터 도 1에 나타난 바와 같이, 총 1,368bp의 염기서열을 확인하였다.

[0127] 상기 결정된 염기서열을 BLASTN 프로그램을 이용하여 GenBank에 ribosomal RNA gene sequence로 등록된 염기서열과 비교하였으며, 염기서열간의 상동성은 Clustal X program을 이용하여 비교분석하였다. 상기 비교분석한 결과를 바탕으로, 다른 균과의 계통발생론적 관계를 도 2에 나타내었다.

[0128] 상기 도 2에 나타난 바와 같이, HD1 균주의 16S rRNA 염기서열은 락토바실러스 플란타룸 NBRC 15891^T 균주(*Lactobacillus plantarum* NBRC 15891^T)와 99% 상동성을 나타냄을 확인하였다. 따라서, 최종적으로 상기 HD1 균주는 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*)으로 동정하고, 상기 HD1 균주를 락토바실러스 플란타룸 HD1(*Lactobacillus plantarum* HD1)으로 명명하였다.

[0129] 상기 락토바실러스 플란타룸 HD1(*Lactobacillus plantarum* HD1) 균주의 16S rRNA 염기서열은 GenBank에 JQ343914로 등록하였고, 상기 락토바실러스 플란타룸 HD1(*Lactobacillus plantarum* HD1)는 한국미생물보존센터에 2011년 4월 1일자로 기탁하여 수탁번호 KFCC11512P를 부여받았다.

[0130] <실시예2> 락토바실러스 플란타룸 HD1 균주의 항진균 활성 확인

[0131] 2-1. 조항균 물질의 준비

- [0132] 상기 락토바실러스 플란타룸 HD1 균주의 항진균 활성 범위를 조사하기 위하여 항균 물질에 의한 항균 활성을 측정하는 spot-on-the lawn test를 수행하기 위하여 조항균 물질을 준비하였다.
- [0133] 구체적으로, 상기 분리 균주 락토바실러스 플란타룸 HD1을 MRS 액체배지 5 ml에 접종하여 30℃에서 24시간 동안 전 배양한 후, 상기 전 배양액을 100 ml MRS 액체배지에 1% 접종하여 30℃에서 24시간 동안 본 배양하였다. 상기 본 배양액을 9,500xg 및 4℃ 조건에서 15분간 원심분리하여 얻은 상정액을 0.45 μ m membrane filter(Advantec MFS, Inc., 일본)로 제균하였다. 상기 제균 과정 후, 수득한 배양 상정액을 동결건조(Labconco Co., USA)후 20 mM sodium acetate(pH 4.0) 완충액에 5배 농도로 농축하여 사용하였다.
- [0134] 2-2. 항효모 활성
- [0135] 상기 락토바실러스 플란타룸 HD1 균주의 발효식품의 품질을 저하시키는 주원인에 해당하는 산막효모를 포함한 효모에 대한 항진균 활성을 확인하기 위하여, dual culture overlay assay와 spot-on-the lawn test를 수행하였다.
- [0136] 상기 효모에 대한 항진균 활성을 위한 지시 균주로 이체켄시아 오리엔탈리스 GY1(*Issatchenkia orientalis* GY1), 사카로마이세스 세르바지 DY2(*Saccharomyces servazzii* DY2), 사카로마이세스 불더리 HY(*Saccharomyces bulderi* HY) 및 카자크스타니아 엑시구아 WY3(*Kazachstania exigua* WY3) 균주와 칸디다증을 유발하는 병원성 진균인 칸디다 알비칸스 ATCC 11006(*Candida albicans* ATCC 11006)을 사용하였다.
- [0137] 상기 dual culture overlay assay 방법은 다음과 같은 방법으로 수행하였다. 우선, 24시간 동안 배양된 분리 균주의 배양액 10 μ l(7.8×10^9 cfu/mL)를 micropipette을 이용하여 MRS 평판배지의 중앙에 3 cm 길이로 그어주었다. 상기 분리 균주가 접종된 MRS 평판배지 위에 YPD(1% yeast extract, 2% peptone, 2% dextrose) soft agar(0.7% agar, Difco Laboratories, USA) 10 mL에 1×10^6 cfu의 지시 균주를 첨가하여 부어주었다. 상기 분리 균주와 지시 균주가 함께 접종된 평판배지를 30℃에서 24시간 또는 48시간 배양한 후 생육 저해환의 생성 여부를 관찰하였으며, 그 결과를 도 3 에 나타내었다.
- [0138] 상기 도 3에 나타난 바와 같이, 상기 락토바실러스 플란타룸 HD1 균주는 5종의 효모에 대해 모두 항진균 활성을 가지며, 특히 칸디다 알비칸스(도 3e)에 대한 항진균 활성이 가장 높은 것으로 확인되었다.
- [0139] 상기 spot-on-the lawn test는 다음과 같은 방법으로 수행하였다. 우선, YPD 고체배지에 상기 지시 균주 1×10^6 cfu를 도말한 후 항진균 물질 10 μ l를 배지 위에 spotting하여 30℃에서 24시간 또는 48시간 배양한 후 활성을 측정하는 방법으로 수행하였다. 상기 측정법에서 활성 역가는 항진균 물질을 순차적으로 2배씩 희석하여 저해환을 형성하는 최대 희석배수의 역을 취하고, 이 값에 1 ml에 대해서 환산해주는 환산계수를 곱하여 AU/ml로 나타내었으며, 측정값은 3회의 반복실험을 한 후 평균값을 사용하였고, 그 결과를 하기 표 5에 나타내었다.

표 5

[0140]

지시 균주	활성 (AU/ml)
<i>Issatchenkia orientalis</i> DY1	160
<i>Saccharomyces servazzii</i> GY2	80
<i>Saccharomyces bulderi</i> HY	40
<i>Kazachstania exigua</i> WY3	640
<i>Candida albicans</i> ATCC 11006	40

- [0141] 상기 표 5에 나타난 바와 같이, 상기 락토바실러스 플란타룸 HD1 균주가 생산하는 항균 물질은 역가는 다르지만 5종의 효모에 대하여 모두 항진균 활성을 가지는 것으로 확인되었다. 상기 표 5에 나타난 바와 같이, 상기 도 3에 나타난 균체에 의한 생육저해 활성 결과와 달리 항균 물질은 카자크스타니아 엑시구아 에 대한 항진균 활성이 가장 우수한 것으로 확인되었다.

[0142] 2-3. 항곰팡이 활성

- [0143] 항곰팡이 활성을 확인하기 위한 지시 균주로 식품 오염 곰팡이 및 병원성 곰팡이에 속하는 7종의 곰팡이로 아스

퍼질러스 플라부스 ATCC 22546(*Aspergillus flavus* ATCC 22546), 아스퍼질러스 푸미가투스 ATCC 96918(*Aspergillus fumigatus* ATCC 96918), 아스퍼질러스 오크라세우스 PF-2(*Aspergillus ochraceus* PF-2), 아스퍼질러스 니둘란스 PF-3(*Aspergillus nidulans* PF-3), 아스퍼질러스 페트라키 PF-1(*Aspergillus petrakii* PF-1), 아스퍼질러스 플라부스(*Aspergillus flavus*), 클라도스포리움 고시피콜라 KF-2(*Cladosporium gossypiiicola* KF-2) 및 페니실리움 로크포르티 ATCC 10110(*Penicillium roqueforti* ATCC 10110)를 사용하였다.

[0144] 상기 항진균 활성에 대한 실험은 상기 실시예 2-2와 같은 방법으로 dual culture overlay assay 및 spot-on-the lawn test으로 수행하였다.

[0145] 상기 dual culture overlay assay 방법은 다음과 같은 방법으로 수행하였다.

[0146] 우선, 24시간 동안 배양된 분리 균주의 배양액 $10\ \mu\text{l}$ (7.8×10^9 cfu/mL)를 micropipette을 이용하여 MRS 평판배지의 중앙에 3 cm 길이로 그어주었다. 지시 균주는 malt extract 또는 potato dextrose soft agar(0.7% agar, Difco Laboratories, USA) 10 mL에 1×10^6 cfu의 지시 균주 포자를 첨가하여 분리 균주가 접종된 MRS 평판배지 위에 부어주었다. 분리 균주와 지시 균주가 함께 접종된 평판배지를 30℃에서 24시간 배양한 후 각 지시 균주의 생육 온도에서 배양하면서 생육 저해환의 생성 여부를 관찰하였다.

[0147] 상기 spot-on-the lawn test는 다음과 같은 방법으로 수행하였다.

[0148] 우선, 상기 지시 균주의 포자를 MEA(malt extract agar) 또는 PDA(potato dextrose agar) 배지 20 mL에 1×10^6 cfu를 첨가하여 petri dish에 부은 후에 굳으면 항진균 물질 10 μl 를 배지 위에 spotting하여 각 지시 균주의 생육 온도에서 48시간 배양한 후 활성을 측정하는 방법으로 수행하였다. 상기 측정법에서 활성 역가는 상기 실시예 2-2와 같은 방법으로 구하여 표시하였다.

[0149] 상기 dual culture overlay assay 시험 결과는 도 4에 나타내었고, spot-on-the lawn test 결과는 표 6에 나타내었다.

표 6

지시 균주	활성(AU/ml)
<i>Aspergillus flavus</i> ATCC 22546	3200
<i>Aspergillus fumigatus</i> ATCC 96918	3200
<i>Aspergillus petrakii</i> PF-1	1600
<i>Aspergillus ochraceus</i> PF-2	1600
<i>Aspergillus nidulans</i> PF-3	1600
<i>Cladosporium gossypiiicola</i> KF-2	800
<i>Penicillium roqueforti</i> ATCC 10110	800

[0151] 상기 표 6에 나타난 바와 같이, 락토바실러스 플란타룸 HD1 균주가 생산하는 항균 물질은 아스퍼질러스 플라부스와 아스퍼질러스 푸미가투스에 가장 강한 항진균 활성을 나타내었고, 아스퍼질러스 속 곰팡이에 대해서 전반적으로 우수한 생육 저해 활성을 나타내었으며, 클라도스포리움 속 진균 및 페니실리움 진균에 대해서도 생육 저해 활성을 나타내었다.

[0152] 또한, 상기 도 4에 나타난 바와 같이, 락토바실러스 플란타룸 HD1 균주의 균체는 아스퍼질러스 푸미가투스, 아스퍼질러스 오크라세우스, 아스퍼질러스 니둘란스, 그리고 클라도스포리움 고시피콜라의 병원성 곰팡이에 대한 강한 저해 활성을 갖는 것으로 확인되었다.

[0153] <실시예 3> 락토바실러스 플란타룸 HD1 균주의 최적 배양 조건

[0154] 상기 락토바실러스 플란타룸 HD1 균주의 최적 배양 조건을 확인하기 위하여, 항진균 활성 락토바실러스 플란타룸 HD1 균주의 배양 온도를 28℃, 30℃ 및 37℃로 달리하여 생육 활성 및 생육에 따른 항진균 활성을 측정하였다. 상기 항진균 활성 측정을 위한 지시균으로는 아스퍼질러스 푸미가투스 ATCC 96918(*Aspergillus fumigatus* ATCC 96918)을 사용하였다.

[0155] 상기 생육 활성은 600 nm에서 흡광도를 측정(Ultrospec 2100 pro, Amersham Biosciences, Sweden)하여 생육 정

도를 확인하는 방법으로 수행하였고, 항진균 활성은 해당 시기의 배양액으로부터 상기 실시예 2-1의 방법으로 항균 물질을 제조하여, 상기 제조된 항균 물질을 이용하여 상기 실시예 2-2에 기재된 spot-on-the lawn test 법으로 항진균 활성 측정을 수행하였고, 그 결과를 하기 표 7 및 도 5에 나타내었다.

표 7

배양 온도	28℃	30℃	37℃
최대 생육도(A ₆₀₀)	10.82	10.21	8.38
최대 항진균 활성(AU/mL)	3,200	3,200	3,200
최대 항진균 활성 도달 시간(hr)	20	16	16

[0156]

[0157]

상기 표 7 및 도 5a에 나타낸 바와 같이, 상기 락토바실러스 플란타룸 HD1 균주를 28℃에서 배양한 결과 20시간 정도에 생육 정지기에 이르렀고, 항진균 활성은 20시간에서 최대 활성을 나타내었다. 또한, 상기 표 7 및 도 5b에 나타낸 바와 같이, 상기 락토바실러스 플란타룸 HD1 균주를 30℃에서 배양한 결과 20시간 정도에 생육 정지기에 이르렀고, 항진균 활성은 16시간에서 최대 활성을 나타내었다. 또한, 상기 표 7 및 도 5c에 나타낸 바와 같이, 상기 락토바실러스 플란타룸 HD1 균주를 37℃에서 배양한 결과 20시간 정도에 생육 정지기에 이르렀고, 항진균 활성은 16시간에 최대 활성을 나타내었다.

[0158]

또한, 모든 온도 조건에서 상기 항진균 활성은 120시간까지 안정하게 유지되었고, 균주의 생육은 37℃ 배양 온도 조건에서 가장 낮은 생육도를 나타내었으나, 생육도와 상관없이 항진균 활성은 유사한 것으로 확인되었다. 또한 최대 항진균 활성은 30℃와 37℃ 배양 온도에서 16시간으로 28℃ 보다 좀 더 빠른 시간에 나타났다.

[0159]

따라서, 상기 결과를 바탕으로 상기 락토바실러스 플란타룸 HD1 균주의 최적 배양 온도조건은 30℃이며, 상기 온도조건에서 18시간 동안 배양하는 조건으로 설정하였다.

[0160]

<실시예 4> 락토바실러스 플란타룸 HD1의 항진균 물질의 안정성 확인

[0161]

상기 락토바실러스 플란타룸 HD1 균주가 생산하는 항진균 물질 즉, 상기 락토바실러스 플란타룸 HD1 균주의 배양액으로부터 상기 실시예 2-1의 방법으로 제조된 항진균물질의 항진균 활성에 대한 pH, 온도 또는 각종 효소의 영향을 조사하기 위하여 5배 농축한 배양 상정액을 각 조건에서 처리한 후, 상기 실시예 2-3에 기재된 방법으로 spot-on-the lawn test를 시행하였다. 지시 균주로는 아스피질러스 푸미가투스 ATCC 96918을 사용하였다.

[0162]

4-1. 항진균 활성의 pH 안정성

[0163]

상기 락토바실러스 플란타룸 HD1 균주의 항진균 활성에 대한 pH 안정성 실험을 위하여 상기에서 수득한 배양 상정액을 5 N HCl과 5 N NaOH를 사용하여 pH 3.0 내지 pH 8.0으로 조정한 후 37℃에서 2시간 동안 처리한 후, 항진균 활성에 대한 잔존 활성을 측정하는 방법으로 수행 하였다. pH-renaturation 실험에서는 pH 3.0 내지 pH 8.0으로 처리된 상기 배양 상정액을 원래의 배양액 pH인 pH 3.8로 조정하여 항진균 활성에 대한 잔존 활성을 측정하는 방법으로 수행하였으며, 그 결과를 하기 표 8에 나타내었다.

표 8

Treatment		AU/mL
pH	3.0	6,400
	4.0	3,200
	5.0	400
	6.0	200
	7.0	100
	8.0	0

[0164]

pH- renaturation	3.0 → 3.8	3,200
	4.0 → 3.8	3,200
	5.0 → 3.8	3,200
	6.0 → 3.8	3,200
	7.0 → 3.8	3,200
	8.0 → 3.8	3,200

[0165] 상기 표 8에 나타난 바와 같이, 상기 pH 안정성 실험 결과 항진균 물질의 활성은 pH 4.0 까지는 안정하였으나 pH 5.0 이상에서는 활성이 급격히 상실되어 락토바실러스 플란타룸 HD1의 항진균 활성이 산성 영역에서 안정함을 확인 하였다. 그러나 pH 처리 후 이를 다시 배양액의 pH인 pH 3.8로 복원시켰을 때 항진균 활성이 100% 회복됨을 확인 하였다. 따라서 상기 HD1 균주의 항진균 물질은 pH 3.0 내지 pH 4.0의 낮은 pH에서 극히 안정하며, pH 5.0이상의 알칼리 처리에도 이를 pH 3.8로 보정하여주면 원래 활성을 나타내어 물질 pH처리에 내구성이 뛰어난 것으로 확인되었다.

[0166] 4-2. 항진균 활성의 온도 안정성

[0167] 상기 락토바실러스 플란타룸 HD1 균주의 항진균 활성의 온도에 대한 안정성을 조사하기 위하여 상기 배양 상정액을 4℃, 30℃, 50℃, 70℃에서 24시간, 100℃에서 30분, 121℃에서 15분간 열처리한 후에 항진균 활성에 대한 잔존활성을 측정하고, 그 결과는 하기 표 9에 나타내었다.

표 9

[0168]

Treatment		AU/mL
Heating	4℃, 24 h	3,200
	30℃, 24 h	3,200
	50℃, 24 h	3,200
	70℃, 24 h	3,200
	100℃, 30 min	3,200
	121℃, 15 min	3,200

[0169] 상기 표 9에 나타난 바와 같이, 상기 락토바실러스 플란타룸 HD1 균주의 항진균 활성은 모든 구간에서 100% 활성을 유지하여 저온 또는 고온에서도 항균 활성 유지되어, 열에 대한 안정성이 우수한 것으로 확인되었다. 따라서, 상기 락토바실러스 플란타룸 HD1 균주의 항진균 물질은 고온처리와 함께 사용될 수 있을 뿐만 아니라, 식품의 종류에 따라 고온처리가 제한되는 경우에 저온성 부패균주에 대해서도 효과적으로 사용될 수 있을 것으로 예상되었다.

[0170] 4-3. 항진균 활성의 효소 안정성

[0171] 상기 락토바실러스 플란타룸 HD1 균주가 생산하는 항진균 물질의 각종 효소에 대한 안정성을 조사하기 위하여 상기 배양 상정액에 proteinase K(EC 3.4.21.64, Sigma, U.S.A.), protease(type I, Sigma), trypsin(EC 3.4.21.4, Sigma), a-chymotrypsin(EC 3.4.21.1, type I-S, Sigma), aminopeptidase I(Sigma), carboxypeptidase A(Sigma), lipase(type VII, Sigma), amylase(type VIII, Sigma)의 효소를 2 mg/mL의 농도로 첨가하여 25℃ 또는 37℃에서 6시간 처리한 후 잔존하는 항진균 활성을 측정하여 표 10에 나타내었다.

표 10

[0172]

처리 효소	AU/mL
Proteinase K	3,200
Protease	3,200
Trypsin	3,200
a-Chymotrypsin	3,200
Aminopeptidase I	3,200

Carboxypeptidase A	3,200
Lipase	3,200
Amylase	3,200

- [0173] 상기 표 10에 나타난 바와 같이, 실험 결과 락토바실러스 플란타룸 HD1의 항진균 활성은 단백가수분해효소를 비롯한 여러 효소에도 영향을 받지 않으므로, 효소의 영향에 대한 안정성이 강한 것으로 판단되었다.
- [0174] <실시에 5> 락토바실러스 플란타룸 HD1의 식품 보존성 향상 여부 확인
- [0175] 상기 락토바실러스 플란타룸 HD1 균주가 생산하는 항진균 물질 즉, 상기 락토바실러스 플란타룸 HD1 균주의 배양액에 의한 식품 보존성 향상 여부를 김치 및 막걸리를 이용하여 확인하였다.
- [0176] 5-1. 김치 보존성 향상 여부 확인
- [0177] 시중에서 판매하는 김치(두메김치, 광주)에 상기 락토바실러스 플란타룸 HD1 균주를 첨가한 실험예와 아무런 시료를 첨가하지 않은 대조군으로 나누어 산막효모의 발생여부를 확인하였다.
- [0178] 구입 김치에 락토바실러스 플란타룸 HD1 배양액을 5%(w/w) 첨가한 구와, 구입즉시 김치를 hand blender(Hanil Co., 대한민국)로 2분간 마쇄 후, 멸균거즈로 여과한 김치액을 제조하여, 여기에 락토바실러스 플란타룸 HD1 배양액을 5%(v/v) 첨가한 두가지 구로 나누어 실험하였다. 실험구는 모두 20℃에서 20일간 보관하면서 산막효모 발생 유무를 관찰하였으며, 그 결과를 도 7에 나타내었다.
- [0179] 도 7a에서 확인된 바와 같이, 락토바실러스 플란타룸 HD1 배양액 비첨가 김치에서는 하얀색 효모 집락이 확인되었고, 도 7b 및 도 7c에서 확인된 바와 같이, 김치액의 경우에도 윗 부분에 하얀색 층이 확인되고, 비이커 표면에 지저분한 하얀색 또는 베이지색 균주 집락이 확인되어, 산막효모를 확인할 수 있었다. 그러나, 상기 락토바실러스 플란타룸 HD1 균주 배양액을 첨가한 김치에서는 하얀색 효모 집락이 전혀 확인되지 아니하였고, 김치액의 경우에도 맑은 김치액만이 확인되어, 산막효모가 전혀 자라지 않은 것으로 확인되었다.
- [0180] 상기 결과로부터, 상기 락토바실러스 플란타룸 HD1 균주는 김치의 산막효모의 발생을 효과적으로 억제할 수 있는 것으로 확인되었다.
- [0181] 5-2. 막걸리 보존성 향상 여부 확인
- [0182] 시중에서 판매하는 막걸리(무등막걸리, 광주)에 상기 락토바실러스 플란타룸 HD1 균주를 첨가한 실험예와 아무런 시료를 첨가하지 않은 대조군으로 나누어 산막효모의 발생 여부를 확인하였다. 상기 락토바실러스 플란타룸 HD1 균주 배양액을 막걸리에 5%(v/v) 첨가하였다.
- [0183] 상기 막걸리는 4℃에서 보관되던 것을 구입한 것으로, 상기 균주를 첨가한 후, 각각의 막걸리를 비이커에 담고 20℃에서 20일간 보관하였다.
- [0184] 상기 20일간 보관한 후, 각각의 막걸리를 촬영하였다. 상기 촬영한 결과를 도 8에 나타내었다.
- [0185] 도 8a에서 확인된 바와 같이, 락토바실러스 플란타룸 HD1 배양액 비첨가 막걸리의 표면에서는 하얀색 효모 집락이 확인되었고, 도 8b에서 확인된 바와 같이, 옆면에서도 더욱 뚜렷하게 변하여 탁도가 증가하였다. 그러나, 상기 락토바실러스 플란타룸 HD1 균주 배양액을 첨가한 막걸리에서는 표면에 아무런 집락도 형성되지 아니하였고, 막걸리 액도 덜 탁한 것으로 확인되어, 산막효모가 전혀 자라지 않은 것으로 확인되었다.
- [0186] 상기 결과로부터, 상기 락토바실러스 플란타룸 HD1 균주는 막걸리의 산막효모의 발생을 효과적으로 억제하는 것으로 확인되었다.
- [0187] 상기 실험결과로부터, 상기 락토바실러스 플란타룸 HD1 균주는 김치나 막걸리와 같은 발효식품에서 산막효모와 같은 위해 진균을 포함한 위해 미생물의 번식을 효과적으로 억제하는 천연 항진균제 또는 천연 보존제로 유효하게 사용할 수 있을 것으로 예상되었다.

- [0188] <실시예 6> 락토바실러스 플란타룸 HD1의 항진균 물질의 구조 확인
- [0189] 상기 락토바실러스 플란타룸 HD1 균주가 생산하는 항진균 물질과 관련하여, 해당 물질의 구조를 확인하기 위하여 SPE에 의한 정제, HPLC에 의한 분리 및 NMR 측정과 Mass 측정을 통한 구조확인을 수행하였다.
- [0190] **6-1. 락토바실러스 플란타룸 HD1 균주가 생산하는 항진균 유효성분 물질의 분리**
- [0191] 상기 락토바실러스 플란타룸 HD1 균주가 생산하는 항진균 물질과 관련하여, 항진균 활성을 갖는 배양액에 함유된 활성 본체 즉, 항진균 활성을 갖는 화합물을 규명하기 위해 활성물질의 단리를 시도하였다.
- [0192] 먼저, HPLC에 의한 정제 전단계로 Solid phase extraction(SPE) 정제를 통해 전처리를 수행하였다.
- [0193] 상기 전처리 과정을 수행하기 위한 배양액은 상기 락토바실러스 플란타룸 HD1 균주를 30℃에서 18시간 동안 배양한 후, 500 ml tube를 이용하여, 8,000 rpm의 조건에서 30분간 원심분리를 수행하여 수득한 상정액을 0.45 μ m 여과막(membrane filter)으로 여과하여 제조하였다.
- [0194] 상기 전처리 과정은 기존 항진균 활성을 갖는 것으로 알려진 유기산과 구분하기 위하여, C18 SPE 컬럼(solid phase extraction column)을 이용하여 항진균 활성을 나타내는 비극성 화합물(hydrophobic compounds)만을 상기 컬럼에 흡착시킨 후, 95% 아세토니트릴 수용액(95% aqueous acetonitrile)으로 용출시켜 수득하였다. 상기 수득된 용출 분획은 용매를 휘발시켜 HPLC를 수행하기 위한 시료로 준비하였다.
- [0195] 상기 SPE 정제를 통해 분리된 용출 분획을 시료로, 항진균 활성을 갖는 화합물을 분리하기 위해 HPLC를 이용한 정제과정을 수행하였다.
- [0196] 상기 HPLC 정제는 Recycling preparative LC9104 HPLC system(Japan Analytical Industry, 일본)을 이용하여 수행하였고, 상기 HPLC에 사용된 컬럼은 JAIGEL-W gel permeation chromatography 컬럼(W252, 20×500 mm, Japan Analytical Industry, 일본)을 사용하였으며, 검출기로는 3702 UV 검출기(Japan Analytical Industry, 일본)을 사용하였다.
- [0197] 우선, 1차 HPLC(pre-HPLC)에서 50% 아세토니트릴 수용액을 용출용매로 하여 3mL/min의 용출속도로 용출한 결과, 총 21개의 분획을 수득하였다.
- [0198] 상기 수득한 분획의 아스퍼질러스 푸미가투스 ATCC 96918(*Aspergillus fumigatus* ATCC 96918)와 이체켄시아 오리엔탈리스 GY1(*Issatchenkia orientalis* GY1)에 대한 항진균 활성 확인을 실시예 2에 기재된 spot-on-the lawn test법으로 수행하였으며, 그 결과를 도 9에 나타내었다.
- [0199] 상기 도 9a는 상기 1차 HPLC(pre-HPLC)를 통하여 수득한 21개의 주요 분획에 관한 것으로, 상기 도 9b 및 도 9c는 상기 도 9a에서 분리된 주요 분획의 *A. fumigatus* ATCC 96918와 *I. orientalis* GY1에 대한 항진균 활성을 확인한 결과이다. 상기 도 9b 및 도 9c에서 확인된 바와 같이, 상기 분획 중에서 11번째 분획 내지 15번째의 분획에서 *A. fumigatus* ATCC 96918와 *I. orientalis* GY1에 대한 항진균 활성이 우수한 것으로 확인되어, 상기 11번째 분획 내지 15번째의 분획에 대해 추가적인 HPLC를 수행하였다.
- [0200] 상기 1차 HPLC(pre-HPLC)와 동일한 조건으로 상기 1차 HPLC의 분획 중 상기 11번째 분획 내지 15번째의 분획의 혼합액에 대해 2차 HPLC를 수행하였다. 상기 11번째 분획 내지 15번째의 분획의 혼합액을 JAIGEL-W gel permeation chromatography 컬럼에 주입하고, 50% 아세토니트릴 수용액을 용출용매로 하여 용출한 결과, 총 11개의 분획을 수득하였다. 상기 수득한 분획의 아스퍼질러스 푸미가투스 ATCC 96918(*Aspergillus fumigatus* ATCC 96918)와 이체켄시아 오리엔탈리스 GY1(*Issatchenkia orientalis* GY1)에 대한 항진균 활성 확인을 실시예 2에 기재된 spot-on-the lawn test법으로 수행하였으며, 그 결과를 도 10에 나타내었다.
- [0201] 상기 도 10a는 상기 2차 HPLC를 통하여 수득한 11개의 주요 분획에 관한 것으로, 상기 도 10b 및 도 10c는 상기 도 10a에서 분리된 주요 분획의 *A. fumigatus* ATCC 96918와 *I. orientalis* GY1에 대한 항진균 활성을 확인한 결과이다. 상기 도 10b 및 도 10c에서 확인된 바와 같이, 상기 분획 중에서 8번째 분획 내지 11번째의 분획에서 *A. fumigatus* ATCC 96918와 *I. orientalis* GY1에 대한 항진균 활성이 우수한 것으로 확인되어, 상기 11번째 분획 내지 15번째의 분획에 대해 추가적인 HPLC를 수행하였다.
- [0202] 상기 1차 HPLC 및 2차 HPLC의 기기를 이용하여 상기 2차 HPLC의 분획 중 상기 8번째 분획 내지 11번째의 분획의

혼합액에 대해 3차 HPLC를 수행하였다. 상기 8번째 분획 내지 11번째의 분획의 혼합액을 JAIGEL-W gel permeation chromatography 컬럼에 주입하고, 40% 아세토니트릴 수용액을 용출용매로 하여 용출한 결과, 총 22개의 분획을 수득하였다. 상기 수득한 분획의 아스퍼질러스 푸미가투스 ATCC 96918(*Aspergillus fumigatus* ATCC 96918), 이체켄시아 오리엔탈리스 GY1(*Issatchenkia orientalis* GY1) 및 칸디다 알비칸스 ATCC 11006(*Candida albicans* ATCC 11006)에 대한 항진균 활성 확인을 실시예 2에 기재된 spot-on-the lawn test 방법으로 수행하였으며, 그 결과를 도 11에 나타내었다.

[0203] 상기 도 11a는 상기 3차 HPLC를 통하여 수득한 22개의 주요 분획에 관한 것으로, 상기 도 11b 내지 도 11d는 상기 도 11a에서 분리된 주요 분획의 *A. fumigatus* ATCC 96918, *I. orientalis* GY1 및 *C. albicans* ATCC 11006에 대한 항진균 활성을 확인한 결과이다. 상기 도 11b 및 도 11c에서 확인된 바와 같이, 상기 분획 중에서 11번째 분획이 *A. fumigatus* ATCC 96918, *I. orientalis* GY1 및 *C. albicans* ATCC 11006에 대해 현저하게 우수한 항진균 활성을 나타내었고, 6번째 분획 내지 7번째의 분획에서 *A. fumigatus* ATCC 96918, *I. orientalis* GY1 및 *C. albicans* ATCC 11006에 대한 항진균 활성이 우수한 것으로 확인되었다.

[0204] 상기 11번째 분획의 경우, 항진균 활성이 우수할 뿐만 아니라, 추가적으로 recycling HPLC를 수행한 결과 단일 물질인 것으로 예상되어, 화합물 분석 대상 시료(III-11)로 특정하였으며, *A. fumigatus* ATCC 96918, *I. orientalis* GY1 및 *C. albicans* ATCC 11006 모두에 대해 항진균 활성이 우수한 것으로 확인된 상기 6번째 분획 및 7번째 분획에 대해 추가적인 HPLC를 수행하였다.

[0205] 또한, 상기 도 11b 내지 도 11d에서 확인된 바와 같이, 상기 분획 중에서 12번째의 분획에서 *A. fumigatus* ATCC 96918 및 *C. albicans* ATCC 11006에 대한 항진균 활성이 우수한 것으로 확인되어, 상기 12번째의 분획에 대해서도 추가적인 HPLC를 수행하였다.

[0206] 상기 6번째 분획 내지 7번째의 분획의 혼합액을 JAIGEL-W gel permeation chromatography 컬럼에 주입하고, 40% 아세토니트릴 수용액을 용출용매로 하여 용출하면서, 총 6회의 recycling HPLC(4차 HPLC)를 수행한 결과, 총 13개의 분획을 수득하였다. 상기 수득한 분획의 아스퍼질러스 푸미가투스 ATCC 96918(*Aspergillus fumigatus* ATCC 96918)와 이체켄시아 오리엔탈리스 GY1(*Issatchenkia orientalis* GY1)에 대한 항진균 활성 확인을 실시예 2에 기재된 spot-on-the lawn test 방법으로 수행하였으며, 그 결과를 도 12에 나타내었다.

[0207] 상기 도 12a는 상기 4차 HPLC를 통하여 수득한 13개의 주요 분획에 관한 것으로, 상기 도 12b 및 도 12c는 상기 도 12a에서 분리된 주요 분획의 *A. fumigatus* ATCC 96918 및 *I. orientalis* GY1에 대한 항진균 활성을 확인한 결과이다. 상기 도 12b 및 도 12c에서 확인된 바와 같이, 상기 분획 중에서 7번째 분획에서 *A. fumigatus* ATCC 96918 및 *I. orientalis* GY1에 대한 항진균 활성이 우수한 것으로 확인되었다. 상기 7번째 분획을 화합물 분석 대상 시료(IV-7)로 특정하였다.

[0208] 또한, 상기 12번째의 분획액을 JAIGEL-W gel permeation chromatography 컬럼에 주입하고, 40% 아세토니트릴 수용액을 용출용매로 3 ml/min의 속도로 용출하면서, 총 4회의 recycling HPLC(4-2 HPLC)를 수행한 결과, 총 7개의 분획을 수득하였다. 상기 수득한 분획의 아스퍼질러스 푸미가투스 ATCC 96918(*Aspergillus fumigatus* ATCC 96918)와 칸디다 알비칸스 ATCC 11006(*Candida albicans* ATCC 11006)에 대한 항진균 활성 확인을 실시예 2에 기재된 spot-on-the lawn test 방법으로 수행하였으며, 그 결과를 도 13에 나타내었다.

[0209] 상기 도 13a는 상기 4-2 HPLC를 통하여 수득한 7개의 주요 분획에 관한 것으로, 상기 도 13b 및 도 13c는 상기 도 13a에서 분리된 주요 분획의 *A. fumigatus* ATCC 96918 및 *C. albicans* ATCC 11006에 대한 항진균 활성을 확인한 결과이다. 상기 도 13b 및 도 13c에서 확인된 바와 같이, 상기 분획 중에서 5번째 분획에서 *A. fumigatus* ATCC 96918 및 *C. albicans* ATCC 11006에 대한 항진균 활성이 우수한 것으로 확인되었다. 상기 5번째 분획을 화합물 분석 대상 시료(12-5)로 특정하였다.

[0210] 6-2. 항진균 유효성분 물질의 분석

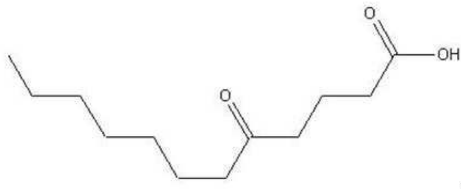
[0211] 상기 락토바실러스 플란타룸 HD1 균주가 생산하는 항진균 물질과 관련하여, 상기 실시예 6-1에서 해당 물질의 구조를 확인하기 위해 분리된 시료인 분석 대상 시료(III-11, IV-7 및 12-5)에 대해서 MASS 및 NMR 분석을 통하여 화합물의 구조를 확인하였다.

[0212] 상기 분석 대상 시료의 NMR 분석(핵자기공명분광분석)은 Bruker AVANCE 600(600 MHz) NMR spectrometer(Bruker, 독일)를 이용하고, 분석용매로 MeOD solvent를 이용하여, ¹H-NMR 및 ¹³C-NMR을 서울대학교 농생명과학공동기기원에 의뢰하여 측정하였으며, 그 결과를 도 14에 나타내었다.

[0213] 또한, 상기 분석 대상 시료의 MASS 분석은 Thermo Finnigan LTQ-Orbitrap Mass Spectrometer(Thermo Fisher Scientific, 독일)를 구비한 대한민국 충청북도 오창 소재 한국기초과학지원연구원 오창 센터에 의뢰하여, ESI-positive/negative mode에서 분석하였으며, 그 결과를 도 15에 나타내었다.

[0214] 상기 도 14a 내지 14c에 나타낸 바와 같이, III-11은 $C_{12}H_{22}O_3$ 의 분자식을 갖는 물질로 확인되었고, 도 15a 및 도 15b의 positive mode에서 분자량이 237.1471로 214로 확인되고, 도 15c 및 도 15d의 negative mode에서 분자량이 213.1501로 214로 확인되어, 분자량이 214.30으로 특정되었다. 따라서, 상기와 같은 결과에 따라 상기 III-11은 하기 화학식 1과 같은 구조를 갖는 화합물인 5-옥소도데카노익 산(5-oxododecanoic acid)인 것으로 확인되었다.

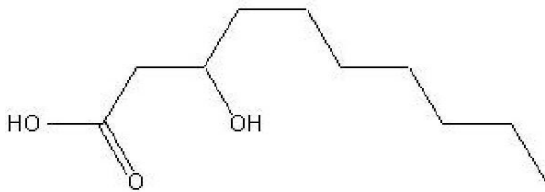
[0215] [화학식 1]



[0216]

[0217] 또한, 상기 도 14d 내지 14e에 나타낸 바와 같이, IV-7은 $C_{10}H_{20}O_3$ 의 분자식을 갖는 물질로 확인되었고, 도 15e 및 도 15f의 positive mode에서 분자량이 211.1308로 188로 확인되고, 도 15g 및 도 15h의 negative mode에서 분자량이 187.1360로 188로 확인되어, 분자량이 188.26으로 특정되었다. 따라서, 상기와 같은 결과에 따라 상기 IV-7은 하기 화학식 2와 같은 구조를 갖는 화합물인 3-하이드록시데카노익 산(3-hydroxydecanoic acid)인 것으로 확인되었다.

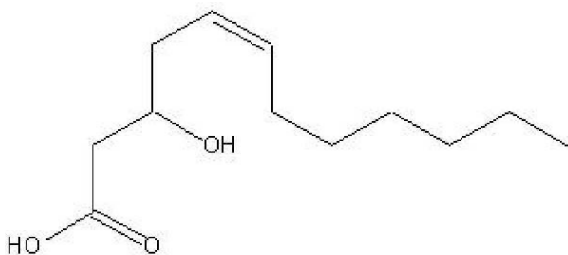
[0218] [화학식 2]



[0219]

[0220] 상기 도 14f 내지 14g에 나타낸 바와 같이, 13-5는 $C_{12}H_{22}O_3$ 의 분자식을 갖는 물질로 확인되었고, 도 15i 및 도 15j의 positive mode에서 분자량이 237.1471로 214로 확인되고, 도 15k 및 도 15l의 negative mode에서 분자량이 213.1501로 214로 확인되어, 분자량이 214.30으로 특정되었다. 따라서, 상기와 같은 결과에 따라 상기 12-5는 하기 화학식 3과 같은 구조를 갖는 화합물인 3-하이드록시-5-도데세노익 산(3-hydroxy-5-dodecenoic acid)인 것으로 확인되었다.

[0221] [화학식 3]



[0222]

[0223] 상기 화학식 2 및 화학식 3의 화합물은 기존에 항진균 활성을 갖는 화합물인 것으로 보고된 적이 있으나, 상기 화학식 1의 화합물인 5-옥소도데카노익 산(5-oxododecanoic acid)은 항진균으로 사용되는 물질로, 항진균 활성 등은 전혀 보고된 적이 없어서, 본 발명의 실시예에 의해 처음 확인되었다.

수탁번호

[0224]

기탁기관명 : 한국미생물보존센터(국내)

수탁번호 : KFCC11512P

수탁일자 : 20110401

도면

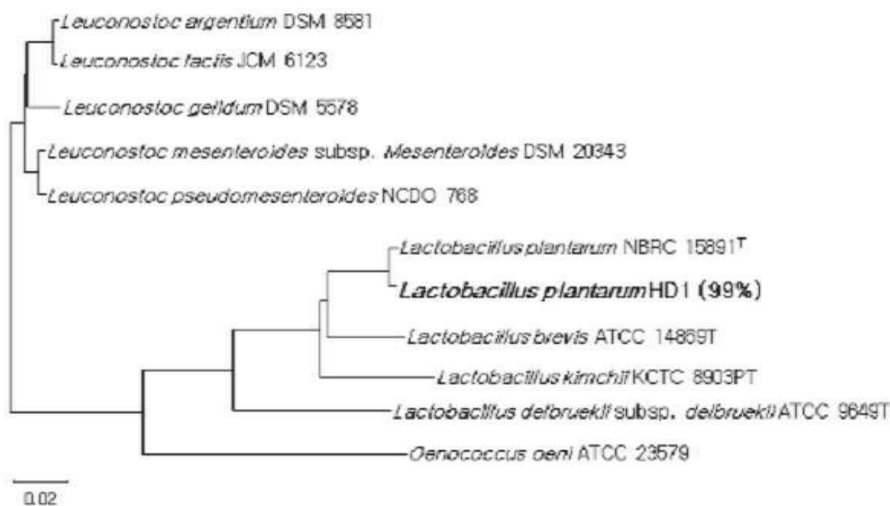
도면1

```

1  CTCAGGACGA  ACGCTGGCGG  CGTGCTAAT  ACATGCAAGT  CGAACGAAC  CTGATTGA
61  TTGGTGTTCG  CATCATGATT  TACATTTGAG  TGAGTGGCGA  ACTGGTGAGT  AACACGTGGG
121  AAACTGCCCC  AGAAGCGGGG  GATAACACCT  GGAAACAGAT  GCTAATACCG  CATAACAAC
181  TGGACCGCAT  GGTCCGAGTT  TGAAGATGG  CTTCGGCTAT  CACTTTTGG  TGGTCCCGG
241  GCGTATTAGC  TAGATGGTGG  GGTAAOGGCT  CACCATGGCA  ATGATACGTA  GCGACCTGA
301  GAGGGTAATC  GGGCACATTG  GGAAGTGGAC  ACGGCGCAAA  CTCTACGGG  AGGACGAGT
361  AGGGAATCTT  CCACAATGGA  CGAAGTCTG  ATGGAGCAAC  GCGCGTGAG  TGAAGAAAGG
421  TTTGCGCTCG  TAAACCTCTG  TTGTTAAGA  AGAACATATC  TGAGAGTAAC  TGTTCAGGTA
481  TTGACGCTAT  TTAACCGAAA  AGCCACGGCT  AACTACGTGC  CAGCAGCGCG  GGTAAATAGT
541  AGGTGGCAAG  CGTTGTCCGG  ATTTATTGGG  CGTAAAGCGA  GCGCAGGCGG  TTTTTAAAGT
601  CTGATGTGAA  AGCCTTCGGC  TCAXCCGAAG  AAGTGCAATG  GAAACTGGGA  AACTTGAGTG
661  CAGAAAGGGA  CAGTGGAACT  CCATGTGTAG  CGGTGAATG  CGTAGATATA  TGGAAAGACA
721  CCAATGGCGA  AGGCGGCTGT  CTGGTCTGTA  ACTGACGCTG  AGGCTCGAAA  GTATGGGTAG
781  CAAACAGSAT  TAGATACGCT  GGTAGTCCAT  ACCGTAAACG  ATGAATGCTA  AGTGTGGAG
841  GGTTCGGCC  CTTCAGTGT  GCACTAACG  CATTAAAGAT  TCGGCTGGG  GAGTACGGCC
901  GCAAGGCTGA  AACTCAAGG  AATTGACGGG  GGCCCGCACA  AGCGGTGGAG  CATGTGGTTT
961  AATTGCAAGC  TACGCGAAGA  ACCTTACCAG  GTCTTGACAT  ACTATGCAAA  TCTAAGAGAT
1021  TAGACGTTCC  CTTGCGGGAC  ATGGATACAG  GTGGTGATG  GTTGTCGTCA  GCTGTGTGG
1081  TGAATGTTG  GGTAAAGTCC  CGCAACGAGC  GCAACCCCTA  TTATCAGTTG  CCAGCATTAA
1141  GTTGGGCACT  CTGGTGAGAC  TCGCGTGAC  AAACCGAAGG  AAGGTGGGGA  TGAAGTCAAA
1201  TCATCATGCC  CCTATGACC  TGGGCTACAC  ACGTGCTACA  ATGGATGGTA  CAAOGAGTTG
1261  CGAACTCGCG  AGAGTAAGCT  AATCTCTTAA  AGCCATTCTC  AGTTCGGATT  GTAGGCTGCA
1321  ACTGCGCTAC  ATGAAGTCGG  AATGCTAGT  AATCGGGGAT  CAGCATGC

```

도면2



도면3a



도면3b



도면3c



도면3d



도면3e



도면4a



도면4b



도면4c



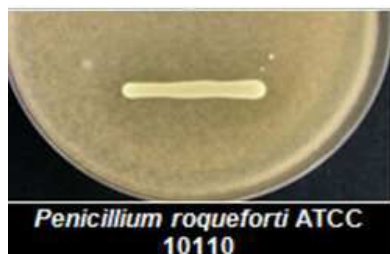
도면4d



도면4e



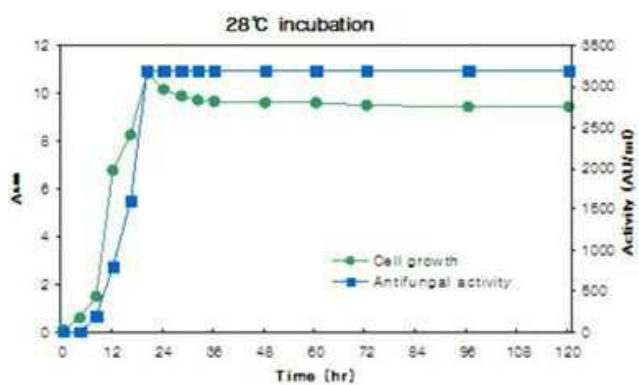
도면4f



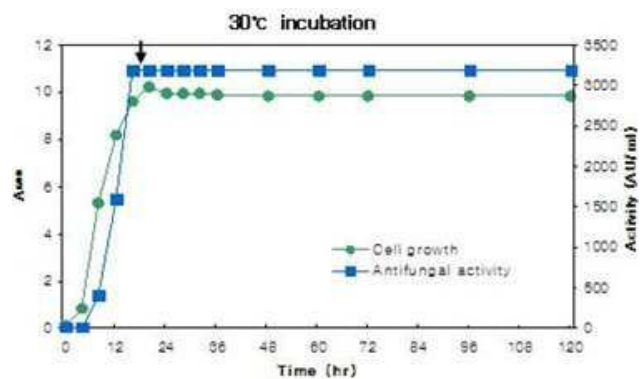
도면4g



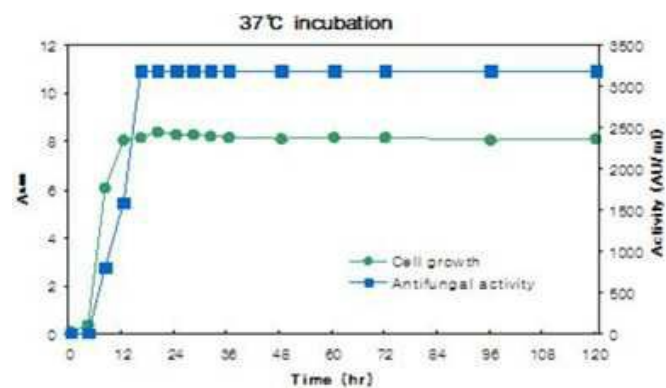
도면5a



도면5b



도면5c



도면6a



도면6b



도면6c



도면7a



도면7b



도면7c



도면7d



도면7e



도면7f



도면8a



도면8b



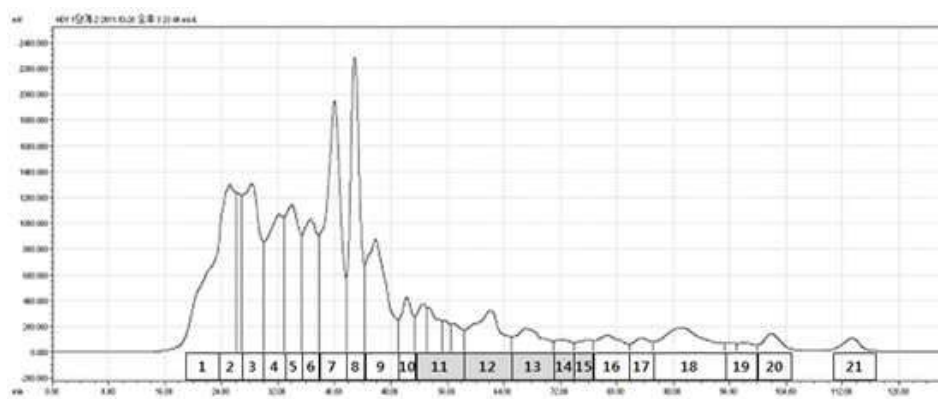
도면8c



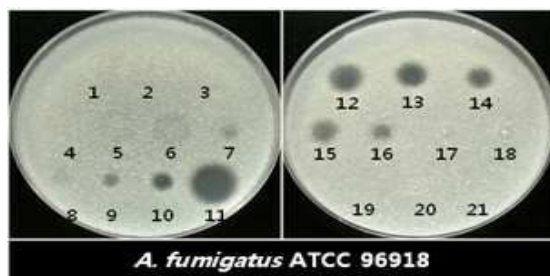
도면8d



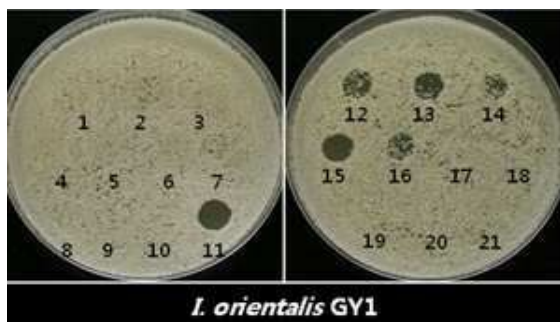
도면9a



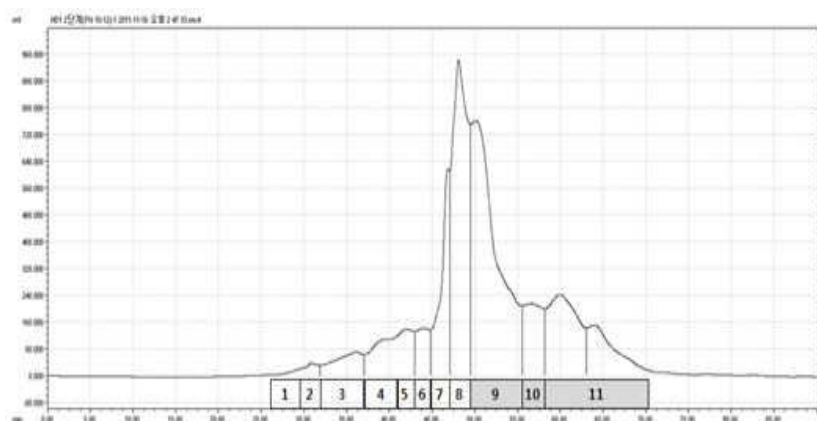
도면9b



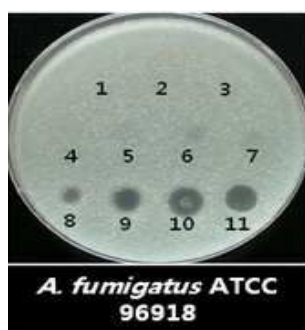
도면9c



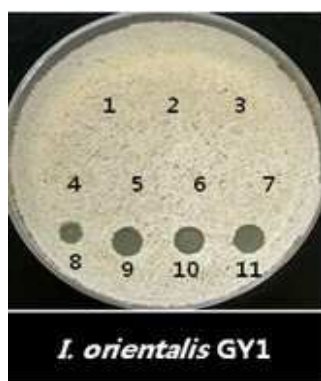
도면10a



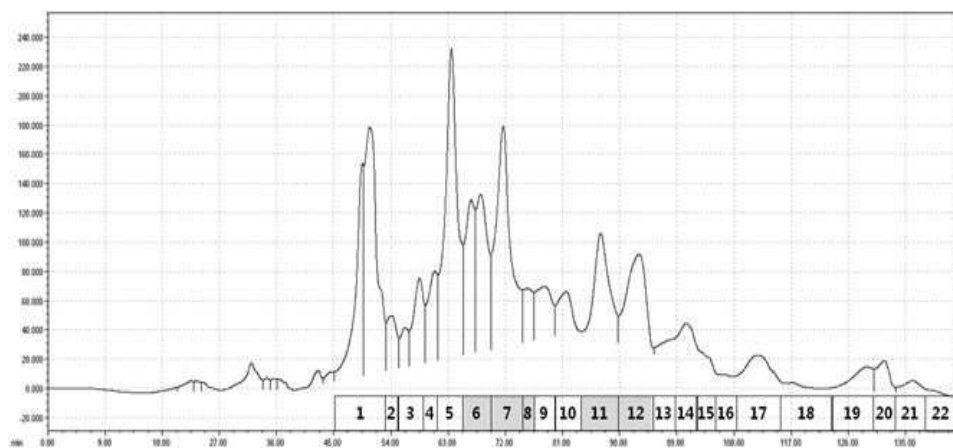
도면10b



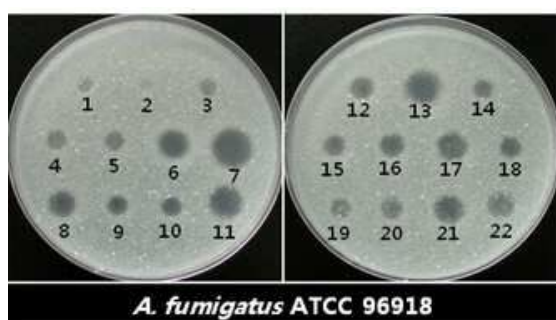
도면10c



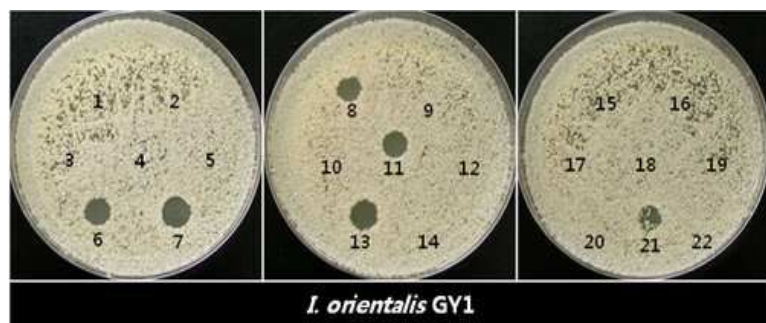
도면11a



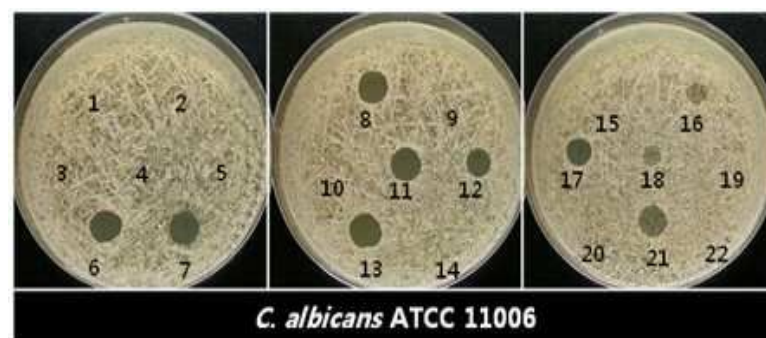
도면11b



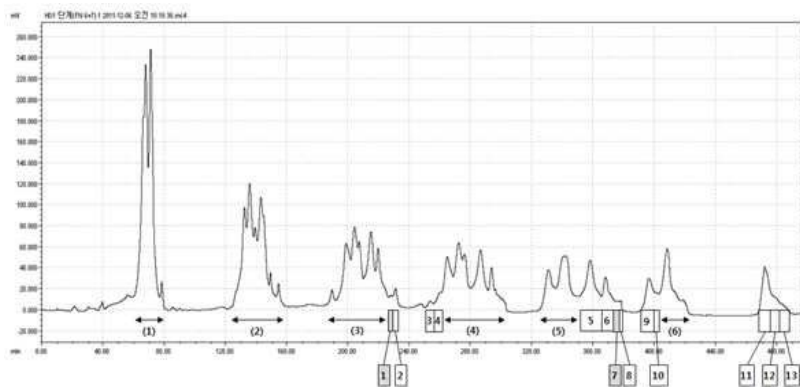
도면11c



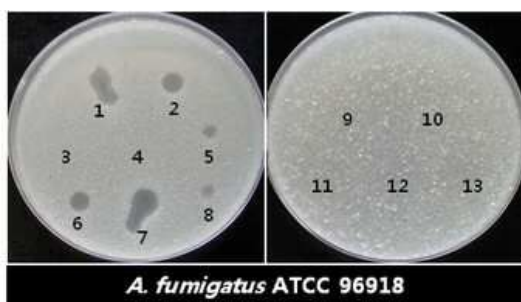
도면11d



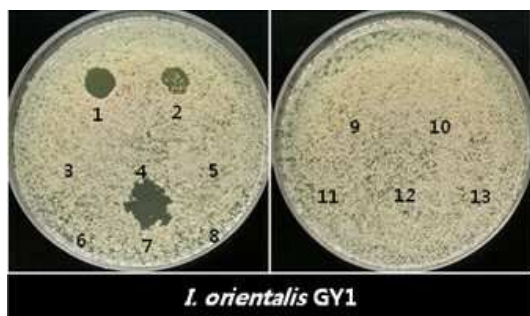
도면12a



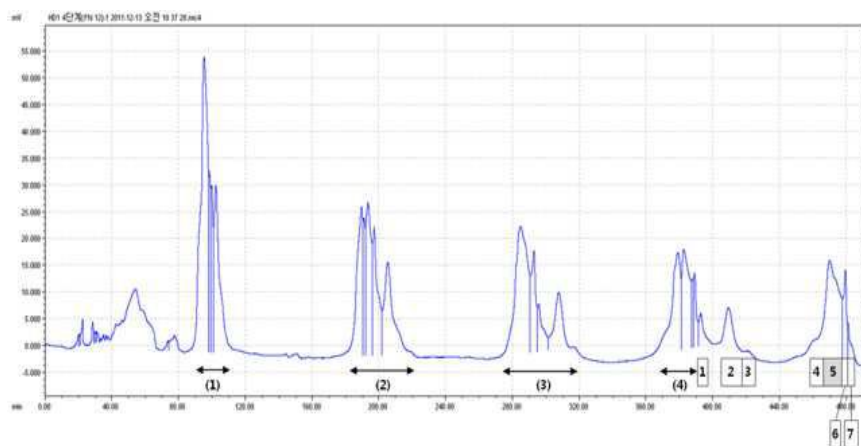
도면12b



도면12c



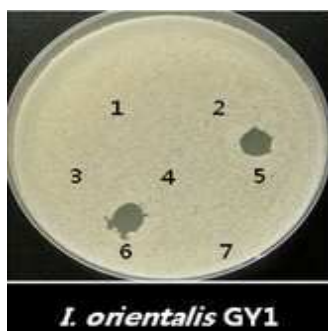
도면13a



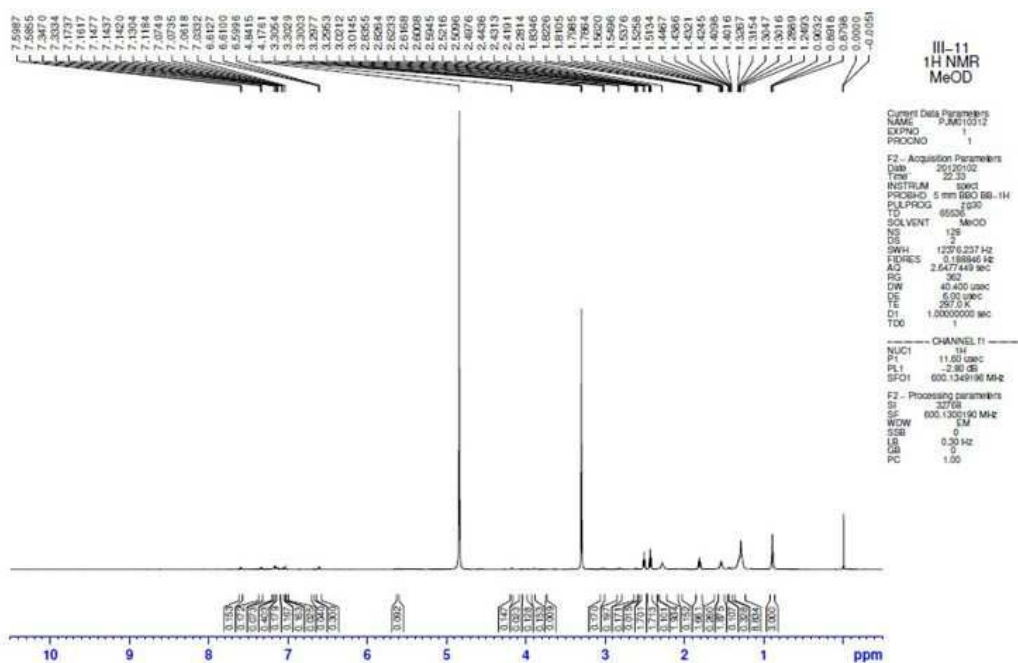
도면13b



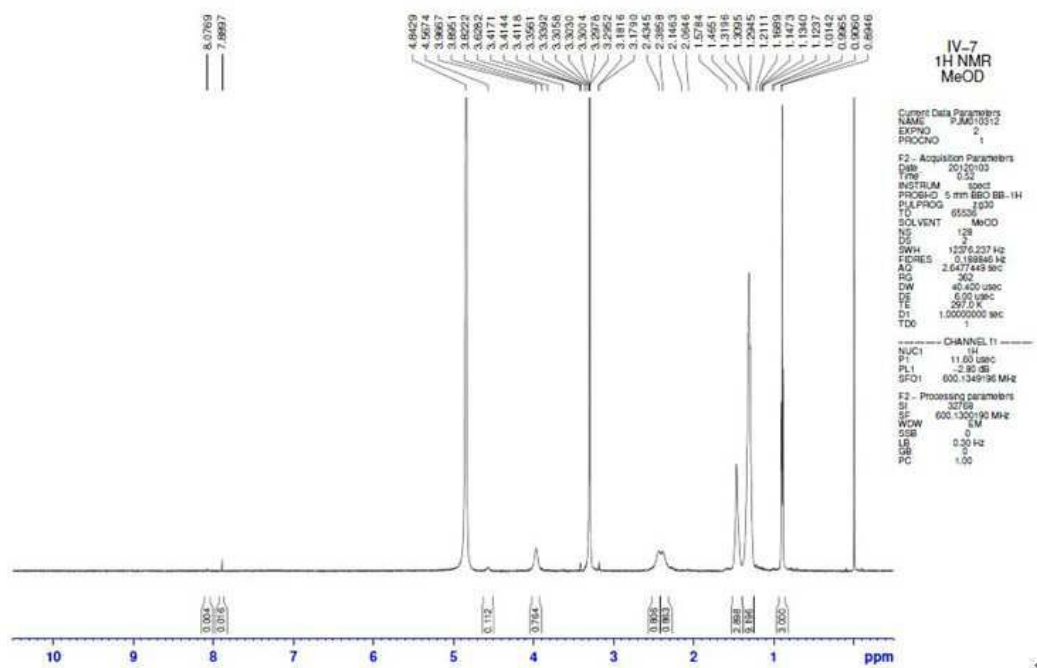
도면13c



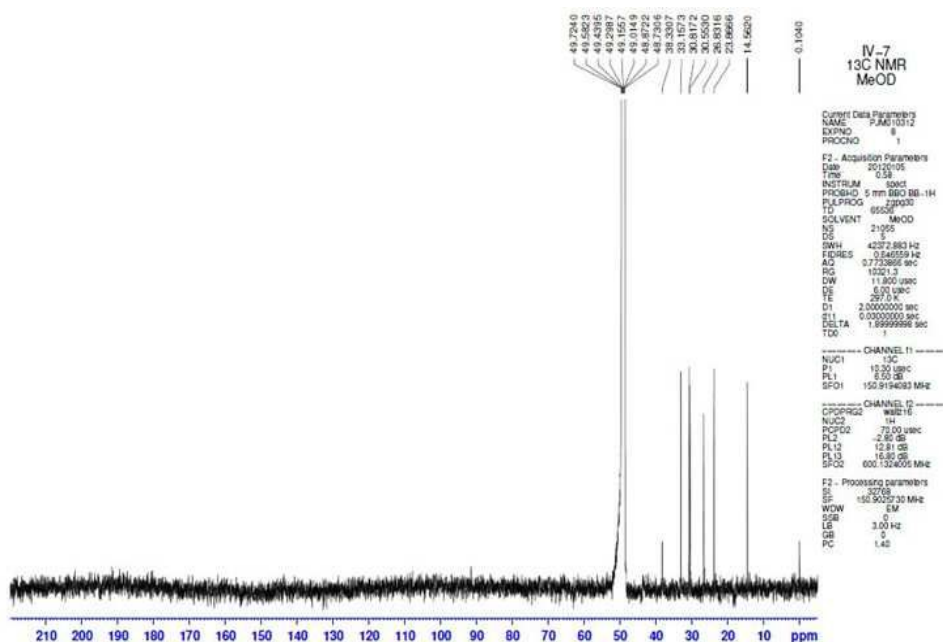
도면14a



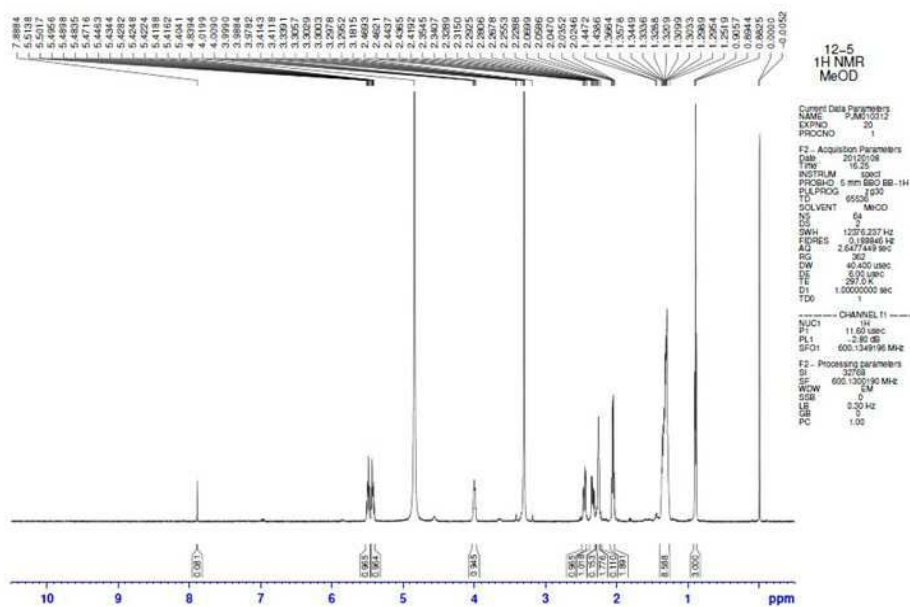
도면14d



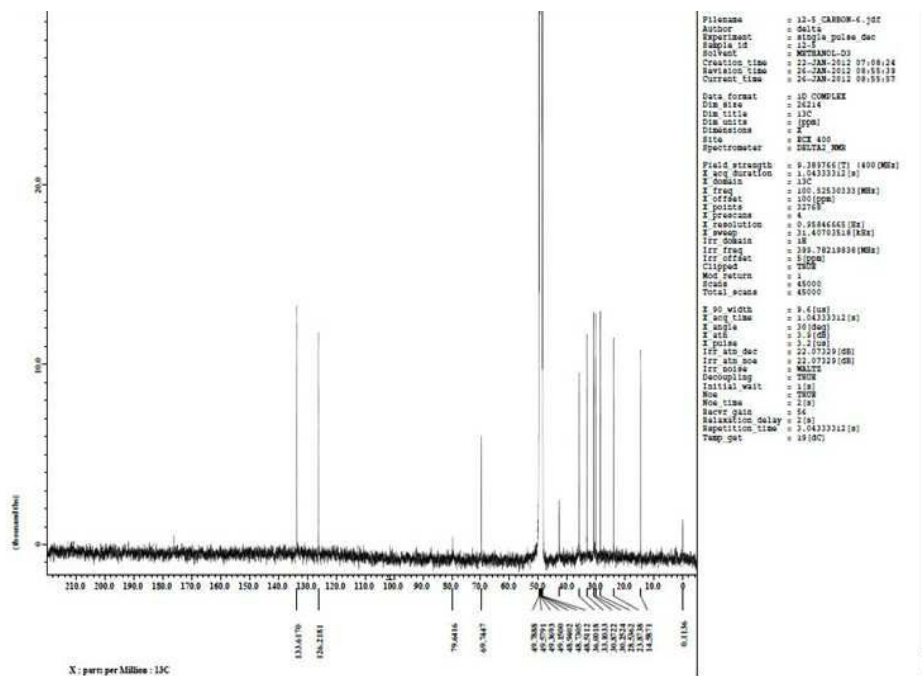
도면14e



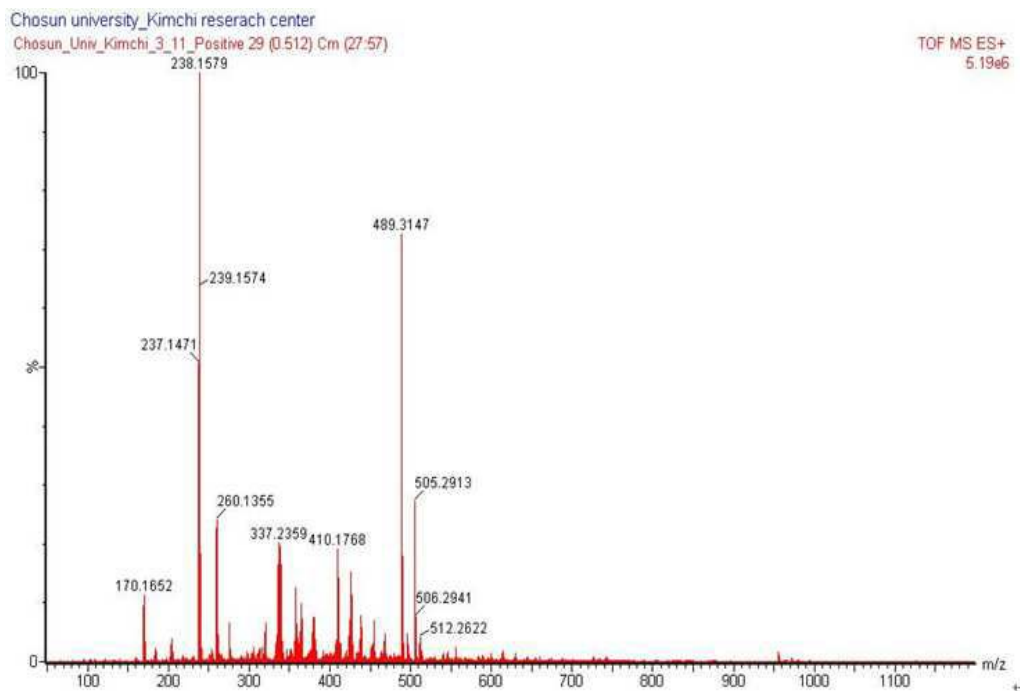
도면14f



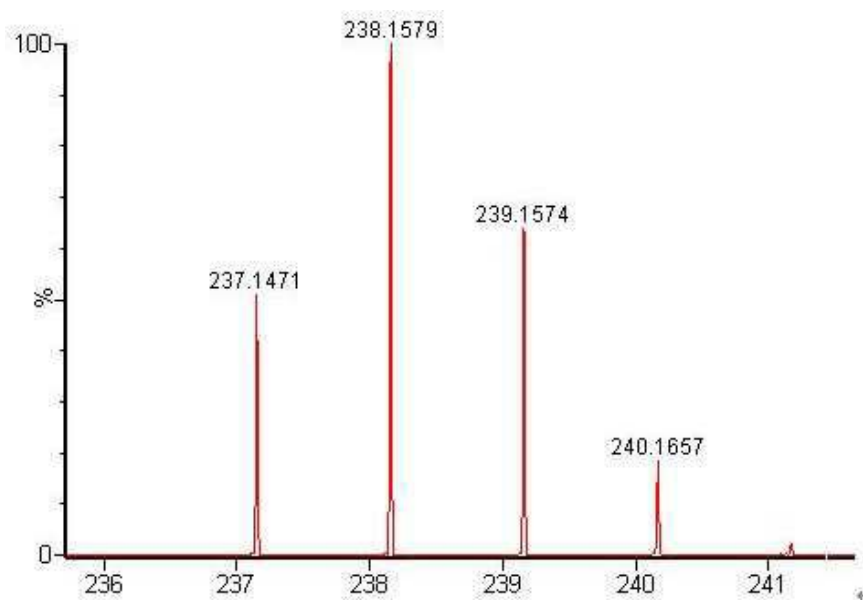
도면14g



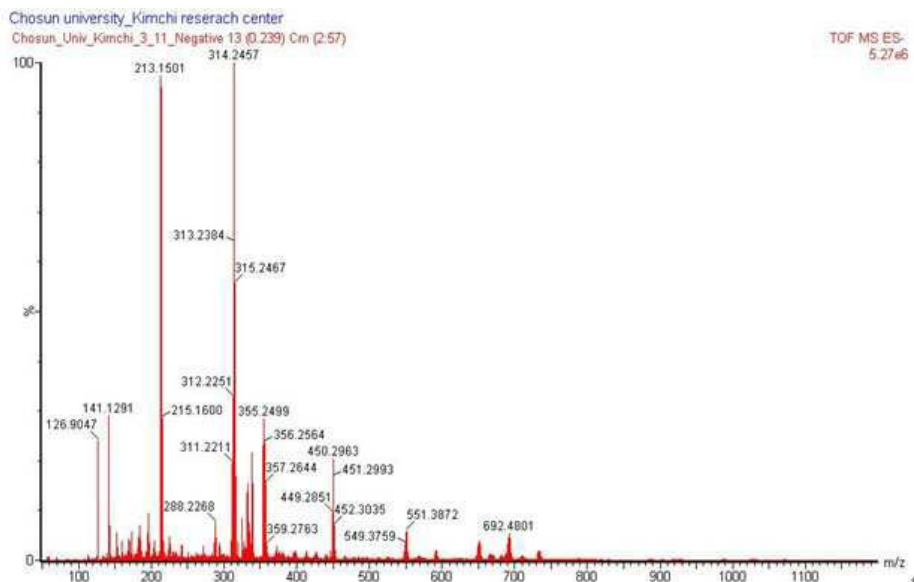
도면15a



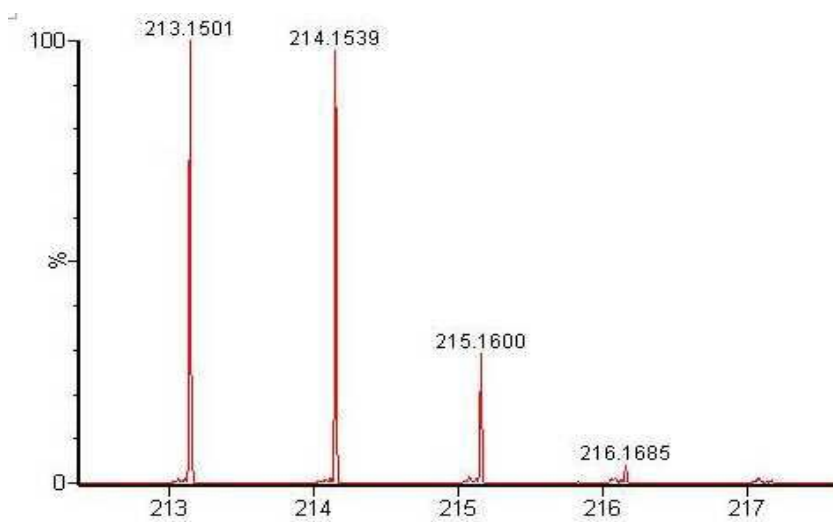
도면15b



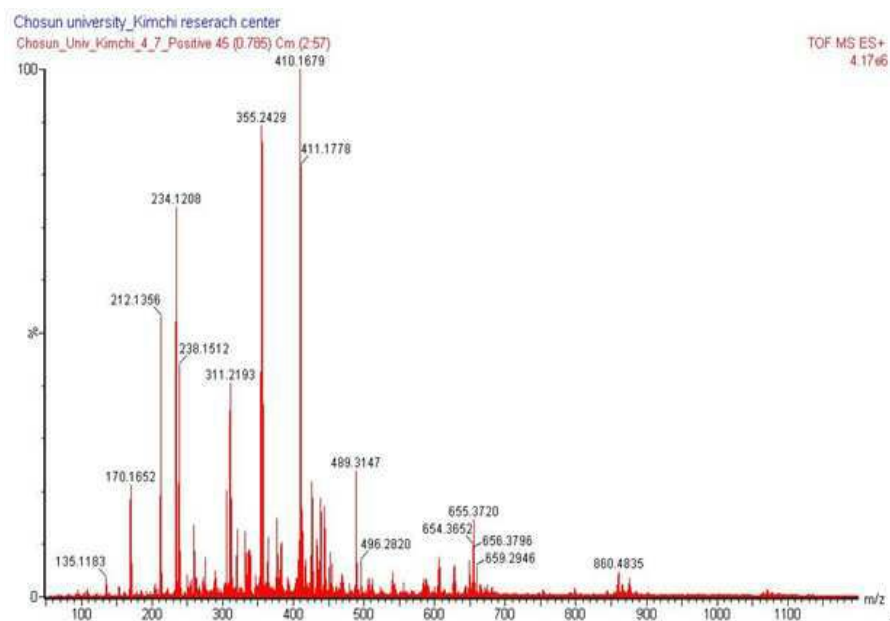
도면15c



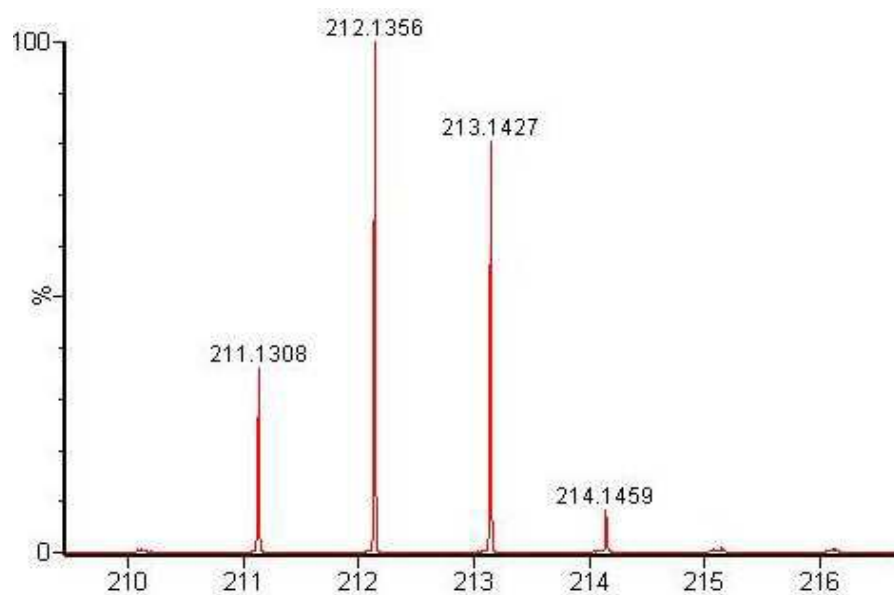
도면15d



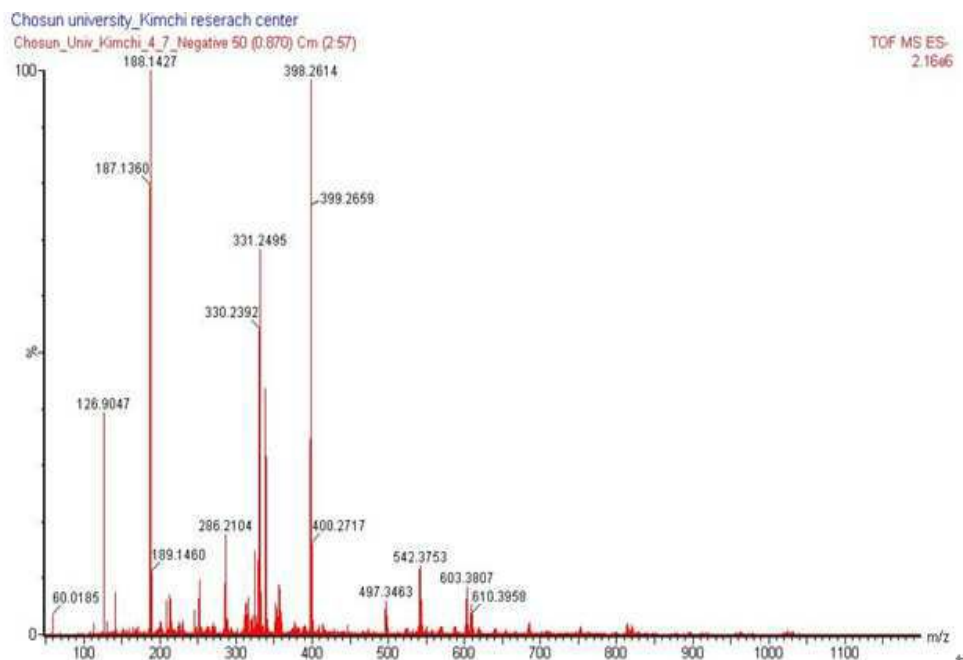
도면15e



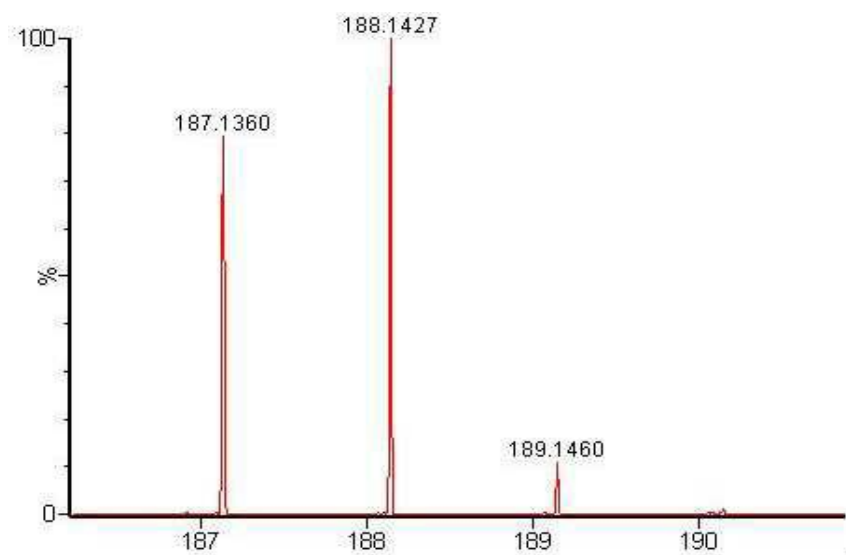
도면15f



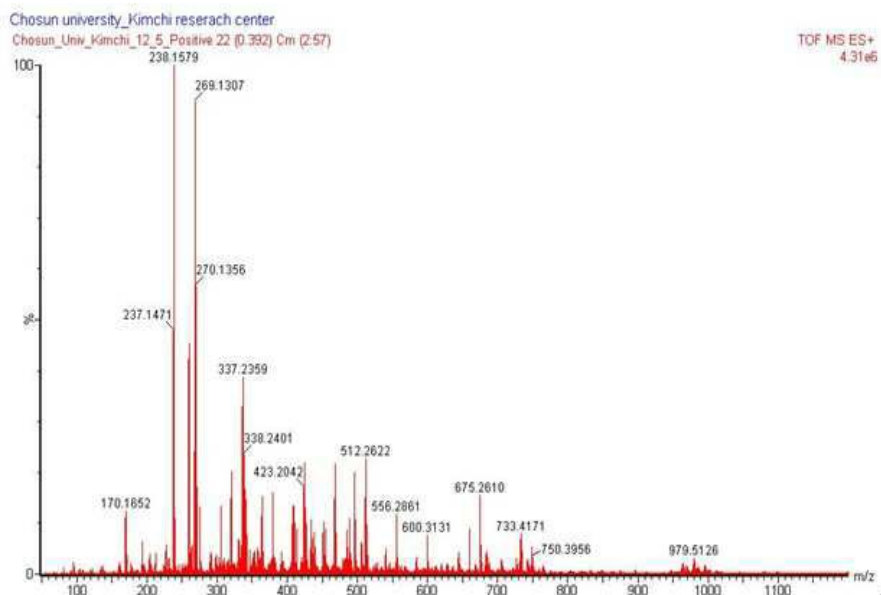
도면15g



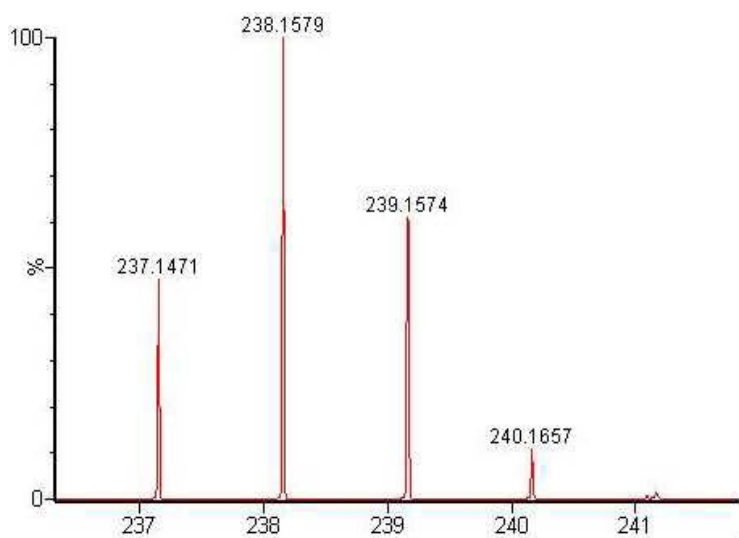
도면15h



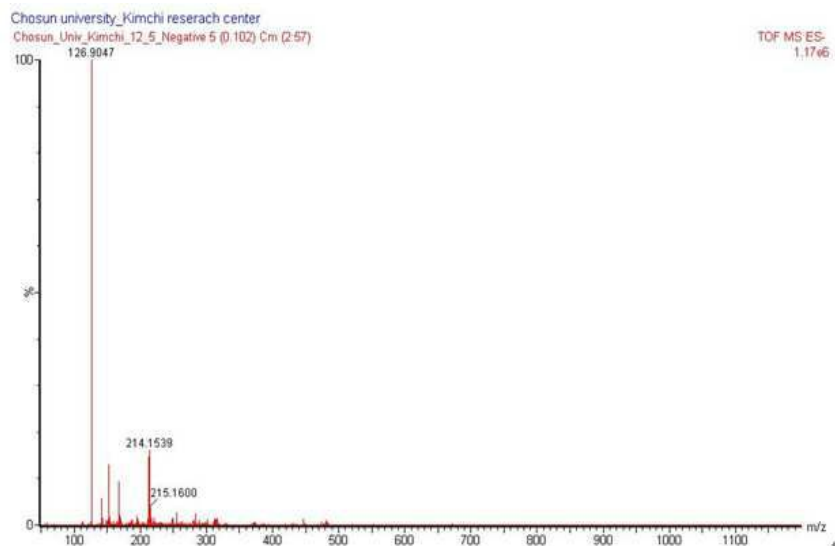
도면15i



도면15j



도면15k



도면15l

