

	(19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)	(11) 공개번호 10-2012-0119195 (43) 공개일자 2012년10월30일
(51) 국제특허분류(Int. Cl.) C12N 1/20 (2006.01) A23B 7/10 (2006.01) C12P 7/18 (2006.01)	(71) 출원인 조선대학교산학협력단 광주광역시 동구 서석동 375 조선대학교 내	
(21) 출원번호 10-2011-0037005	(72) 발명자 장해춘 광주광역시 남구 서문대로627번길 19, 한국아텔리움아파트 101동 1002호 (진월동)	
(22) 출원일자 2011년04월20일 심사청구일자 2011년04월20일	장지윤 광주광역시 남구 봉선중앙로131번길 11, 409호 (주월동, 무등프라자) (뒷면에 계속)	
	(74) 대리인 특허법인 천지	

전체 청구항 수 : 총 12 항

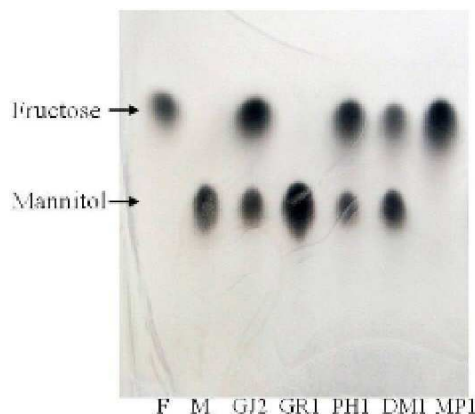
(54) 발명의 명칭 김치로부터 분리된 유산균 및 상기 유산균을 이용한 발효식품

(57) 요약

본 발명은 김치로부터 분리되고, 만니톨을 생성할 수 있으며, 바실러스균(*Bacillus* sp.), 슈도모나스균(*Pseudomonas* sp.), 스트렙토코커스균(*Streptococcus* sp.), 리스테리아균(*Listeria* sp.), 마이크로코커스균(*Micrococcus* sp.), 대장균(*E. coli*), 슈도모나스균(*Pseudomonas* sp.) 및 살모넬라균(*Salmonella* sp.)으로 이루어진 균에서 선택된 1종 이상의 균주에 대한 항균활성이 있는 루코노스톡 시트룸 균주(*Leuconostoc citreum* KTCC 11511P), 상기 균주를 유효성분으로 포함하는 항균 조성물, 상기 균주를 유효성분으로 포함하는 생균활성제, 상기 균주를 유효성분으로 포함하는 종균 조성물 및 상기 종균 조성물을 첨가하여 제조한 발효식품에 관한 것이다.

상기 루코노스톡 시트룸 균주(*Leuconostoc citreum* KTCC 11511P)는 항균활성을 가지고, 위액 및 담즙액에 대한 저항성을 가지며, 장내 부착성이 뛰어나고, 만니톨을 생성할 수 있으므로, 상기 균주는 항균 조성물, 생균 활성제 및 종균 조성물로 다양하게 이용될 수 있으며, 상기 균주를 종균으로 사용하는 경우, 김치의 산도 증가를 억제할 뿐 아니라, 김치에 단맛과 시원한 맛을 제공하는 만니톨을 계속적으로 생산하여, 김치의 관능개선에 따른 품질향상 및 보관성 증대에 이바지할 수 있다.

대표도 - 도1



(72) 발명자

정지혜

광주광역시 서구 화개1로 59-2, 종원팰리스빌 105
동 902호 (금호동)

류은혜

광주광역시 북구 송월로50번길 8-2 (오치동)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 310014-03-1-CG000

부처명 농림수산식품부

연구사업명 농림수산물 연구개발사업

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

김치로부터 분리되고, 만니톨을 생성할 수 있으며, 바실러스균(*Bacillus* sp.), 슈도모나스균(*Pseudomonas* sp.), 스트렙토코커스균(*Streptococcus* sp.), 리스테리아균(*Listeria* sp.), 마이크로코커스균(*Micrococcus* sp.), 대장균(*E. coli*), 슈도모나스균(*Pseudomonas* sp.) 및 살모넬라균(*Salmonella* sp.)으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 균주에 대한 항균활성이 있는 루코노스톡 시트룸 균주(*Leuconostoc citreum* KTCC 11511P).

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 균주는 추가로 락토바실러스 플란타리움(*Lactobacillus plantarum*)에 대한 항균활성을 갖는 것인 루코노스톡 시트룸 균주(*Leuconostoc citreum* KTCC 11511P).

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 균주는 군집(colony)이 노란색이고, 바실러스균(*Bacillus* sp.), 슈도모나스균(*Pseudomonas* sp.), 스트렙토코커스균(*Streptococcus* sp.), 리스테리아균(*Listeria* sp.), 마이크로코커스균(*Micrococcus* sp.), 대장균(*E. coli*), 슈도모나스균(*Pseudomonas* sp.) 및 살모넬라균(*Salmonella* sp.)으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 균주에 대한 항균활성을 가진 항균물질을 생산하는 것인 루코노스톡 시트룸 균주(*Leuconostoc citreum* KTCC 11511P).

청구항 4

제3항에 있어서,

상기 루코노스톡 시트룸 균주는 장내 부착성이 있고, L-아라비노스(L-Arabinose), D-만노스(D-Mannose), D-글루코오스(D-glucose), D-과당(D-fructose), 만니톨(Manitol), 알부틴(Arbutin), 말토스(Maltose), 수크로오스(Sucrose) 및 트레할로스(Trehalose)에 대한 당대사능이 있는 루코노스톡 시트룸 균주(*Leuconostoc citreum* KTCC 11511P).

청구항 5

제1항의 균주, 상기 균주의 배양액, 상기 배양액의 농축액 및 상기 배양액의 건조물로 이루어지는 군에서 선택되는 적어도 하나를 유효성분으로 포함하는 항균조성물.

청구항 6

제1항의 균주, 상기 균주의 배양액, 상기 배양액의 농축액 및 상기 배양액의 건조물로 이루어지는 군에서 선택되는 적어도 하나를 유효성분으로 포함하는 생균활성제(probiotics).

청구항 7

제6항의 생균활성제를 포함하는 식품.

청구항 8

제1항의 균주를 함유하는 발효식품용 종균 조성물.

청구항 9

제8항에 있어서,

상기 종균 조성물은 락토바실러스 플란타리움(*Lactobacillus plantarum* KFRI 464) 및 락토바실러스 델부루키 KFRI 347(*Lactobacillus delbruekii* KFRI 347)로 이루어진 군 중에서 선택된 1종 이상의 감수성 균주 또는 상

기 감수성 균주의 세포 파쇄물을 더욱 포함하는 것인 발효식품용 종균 조성물.

청구항 10

제8항의 종균 조성물을 첨가하여 제조한 발효식품.

청구항 11

제10항에 있어서,

상기 발효식품은 김치인 것인 발효식품.

청구항 12

제1항의 균주와 과당(fructose)을 반응시켜 만니톨(Mannitol)을 제조하는 방법.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 김치로부터 분리되고, 만니톨 생성능이 우수하며, 위해 미생물에 대한 항균 활성을 가진 유산균, 상기 균주의 용도, 상기 균주를 함유하는 발효식품용 종균 조성물 및 상기 종균 조성물을 이용하여 제조한 발효식품에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 김치는 특별한 지식 없이도 가정에서 누구나 전래의 보편적인 방법으로 제조 가능한 식품이고, 구체적으로는 삼국시대부터 발달한 전통발효식품으로, 소금물에 절인 배추나 무 등의 채소류에 고춧가루, 파, 마늘 등의 양념류를 혼합하여 생활환경 주변에 존재하는 미생들에 의한 발효과정을 거쳐 숙성되는 대표적인 한국의 발효식품 중 하나이다. 김치는 최근에는 우리나라에서만 아니라 전 세계적으로 그 맛과 영양적 가치가 인정되고 있다.

[0003] 그러나, 오랜 역사에도 불구하고, 김치에 대한 연구는 아직 제한적으로 진행되고 있으며, 특히, 김치의 발효과정과 관련하여 체계적이고 과학적인 김치발효를 위한 시스템이나 상기 시스템을 정량화 또는 정성화할 수 있는 연구는 거의 이루어지지 않고 있는 실정이다. 이러한 사정은 서양의 대표적인 발효식품인 발효 유제품에 대한 발효시스템 및 이와 관련된 종균의 개발 및 이를 이용한 제품 생산 및 산업화가 일찍부터 도입된 것과는 대조적이다. 또한, 김치의 상품화 및 이의 산업적 생산을 위해서, 품질의 균일화와 규격화 및 장기 보존성과 관련된 문제점을 해결하는 것이 요구된다.

[0004] 이러한 연구 개발의 필요성 및 문제 해결의 필요성과 관련하여, 김치 발효를 위한 종균의 개발 요구가 증대되고 있다. 상기 김치 품질의 균일화 및 규격화의 문제를 해결하기 위해서는 종균화에 대한 연구 및 이를 기초로 한 발효시스템의 확립이 선행되어야 한다.

[0005] 김치는 신선한 야채를 열처리하지 않고 담그기 때문에, 야채의 모든 영양소가 유지되고, 유산균에게 좋은 서식환경을 제공할 수 있으므로 유산균의 함유량이 발효유제품에 비하여 높은 것으로 보고되어 있다.

[0006] 그러나, 상기와 같은 장점을 가능케하는 김치의 제조과정 즉, 재료에 대한 열처리를 진행하지 않는다는 김치 제조과정의 특성은 서양의 발효 유제품과 달리 김치의 종균화 및 발효시스템의 구축에 장애가 되고 있다. 구체적으로, 상기와 같은 김치 제조과정의 특성상, 원재료 및 부재료들을 가열 살균할 수 없으므로, 김치 재료로부터 이행되는 초기 균수와 균종이 일정하지 않게 된다. 따라서, 우수한 종균을 개발하여도 원료에 대한 살균이 이루어지지 않은 김치 발효시스템을 고려하면, 상대적으로 많은 양의 종균을 초기 접종하여야 하고, 이러한 경우 김치발효속도를 조절하기 어렵고, 최종적으로 생산된 김치가 과발효되기 쉽기 때문에, 발효시스템을 구축하기 어려운가 것으로 보고되고 있다.

[0007] 또한, 김치의 산패를 억제하여 가식기간을 장기화할 목적으로 저온살균, 방사선조사, 방부제 처리, 완충제 첨가 또는 염혼합물의 첨가와 같은 물리/화학적 방법을 시도하고 있으나, 이 역시 품질저하 및 소비자의 거부감 등의 문제로 실용화되지 못하고 있는 실정이다.

[0008] 또한, 일반적인 발효식품의 경우 발효의 차이에 따라 독특한 풍미를 나타내는 제품이 생산되고, 발효정도에 따라 제품을 등급화하는 것이 보편화되어 있으나, 김치의 경우 김치 주재료의 다양화, 일 예로 배추, 무, 오이,

것 또는 고들빼기 등의 주재료의 종류 변화나 양념의 다양화에만 국한되어 있을 뿐, 발효균주나 발효정도의 차이에 따라 제품을 구분하거나 등급화하는 시스템은 확립되지 않고 있는 실정이다.

- [0009] 김치는 숙성과정 중 미생물군의 천이 양상과 군집발달 정도에 따라 김치품질이 결정된다. 김치발효에 직접 관여하는 유산균으로는 페디오코커스 속(*Pediococcus* sp.), 락토바실러스 속(*Lactobacillus* sp.), 락토코커스 속(*Lactococcus* sp.) 및 루코노스톡 속(*Leuconostoc* sp.) 균주가 있으며, 이외에도 약 200 여종의 미생물들이 김치로부터 분리되었다.
- [0010] 따라서, 김치 발효 시스템을 구축하기 위해서는 발효특성이 우수하면서 동시에 잡균에 대하여 항균활성을 가지는 박테리옌을 생산하는 균주의 개발이 우선되어야 한다.
- [0011] 상기 박테리옌은 항균 펩타이드 또는 단백질로, 근연 관계의 세균을 죽이거나 생육을 저해하는 물질이다. 박테리옌은 내재된 유전자에 의하여 직접 생합성(ribosomal translation)되며, 단백질 분해효소에 의하여 쉽게 분해되어 인체에 무독하고 잔류성이 없다. 이러한 이유로, 박테리옌은 주로 의학적인 용도로 이용되고, 그 외 가축의 증식촉진제, 식물병원균 퇴치 및 생물학적 식품보존제(biopreservation)로 이용되기도 한다.
- [0012] 상기 박테리옌은 다양한 종의 미생물로부터 생산되나, 특히 GRAS(Generally Recognized As Safe) 미생물인 유산균 및 바실러스 속 균주들에서부터 생산된 박테리옌의 경우 실제 산업적으로 적용되고 있다.
- [0013] 상기 GRAS 미생물인 유산균과 관련하여, 안정성과 함께 다양한 측면에서 기능성이 인정되면서, 최근 유산균을 기능성 식품에 사용하기 위하여 잠재력을 평가하기 위한 프로바이오틱 유산균에 대한 연구가 전 세계적으로 광범위하게 진행되고 있다.
- [0014] 상기 프로바이오틱 유산균은 유래 및 이용에 대한 안정성이 인정될 뿐만 아니라 위장관 상부의 산성 조건 및 담즙 존재 하에서도 존재하여야 하고, 대장에서 부착이 가능해야 하며, 균주 안정성이나 생존력이 뛰어나야 한다.
- [0015] 또한, 만니톨(Mannitol)은 식품, 의료, 제약, 화장품의 원료로 폭넓게 이용되는 당 알코올이다. 상기 만니톨의 화학식 $C_6H_{14}O_6$ 으로 표기되는데, D-형과 L-형이 존재하며, 보통 자연계에는 D-만니톨이 주로 분포되어 있다. 상기 만니톨은 고구마, 버섯, 셀러리, 갈조류 및 만나 나무에 많이 함유되어 있다. 상기 만니톨은 설탕(sucrose)의 60% 정도에 해당하는 강한 단맛을 지니고 있으나 열량은 설탕의 5% 내지 15%에 해당하는 저칼로리이며, 용해열은 설탕의 1.3배 내지 10배로 용해시 흡열량이 높기 때문에 강한 청량감을 줄 수 있다.
- [0016] 상기 만니톨은 당알코올 중에서 인체에 독성이 없어 미국 FDA에 의하여 GRAS(Generally Recognized As Safe) 물질로 승인이 되어, 식품, 화장품 및 제약 관련 산업에 매우 광범위하게 이용되고 있다.
- [0017] 현재까지 대부분의 만니톨은 포도당으로부터 촉매나 전기화학적 합성공정에 의해 주로 생산되어 왔으나, 화학적 방법은 포도당과 만니톨의 분리 정제가 어렵고 고온 고압의 반응이므로 촉매물질 사용에 의한 위험성과 폐기물 처리의 단점이 있다. 또한 최근에 인공 합성 방법으로 제조된 물질에 대한 소비자의 기피 현상과 더불어 상대적으로 천연원료에 대한 선호도가 급증하여 왔다. 따라서, 생물공학적 방법에 의한 제조공정의 대체가 절실히 필요하였으며, 생물학적 방법으로 미생물에 의한 생산방법이 연구되어지고 있다.
- [0018] 또한, 김치에서 락토바실러스 메센테로이드와 같은 이형젖산발효균(heterofermentative lactic acid bacteria)에 의해 과당으로부터 형성된 만니톨은 김치에 시원한 단맛(청량감)을 나타내며, 김치의 신 냄새와 신맛을 마스킹(masking)하는 물질로 작용하고, 김치가 과도하게 시어지는 현상을 억제한다. 이러한 측면에서, 이형젖산발효균을 김치에 종균(starter)으로 사용하는 경우, 이형젖산발효가 이루어지면서 자연발효에 비해 젖산의 생성량이 20% 내지 25% 가량 낮게 생성되어 김치의 산도 증가가 완만해지고 가식기간이 연장되는 특징을 갖게 된다.
- [0019] 상기 이형젖산발효균은 김치 제조시 초기부터 생육을 시작하여 이산화탄소, 젖산, 초산, 에탄올 및 만니톨 등의 대사산물을 생산함으로써 김치를 복합적이고 독특한 풍미를 지닌 상태로 발효시킨다. 또한 상기 이형젖산발효균에 의해 생산된 이산화탄소로 하여금 김치 내부를 혐기적 조건으로 유지시켜 호기성 세균의 번식을 강력히 억제시킴으로써, 정상적인 김치발효가 진행되게 한다. 그러나, 김치의 발효 중기에 이르러 pH가 pH 4.0 이하로 낮아지면서, 내산성이 강한 동형젖산발효균(homofermentative lactic acid bacteria), 일 예로 락토바실러스 플란타리움(*Lactobacillus plantarium*)이 왕성히 증식하게 된다. 상기 락토바실러스 플란타리움은 김치의 신맛을 내는 주된 균이며, 다량의 산을 생성시키면서 김치의 산패를 야기하는 것으로 알려져 있다. 상기 락토바실러스 플란타리움은 젖산을 다량으로 생성하고, pH 3.0의 산성 환경에서도 생육이 가능하다. 따라서, 김치의 발효 말기부터는 상대적으로 산에 약한 유산균인 이형젖산발효균의 생육은 감소되면서 신맛의 원인균인 락토바실러스 플란타리움의 생육이 증가되면서, 이에 따라 김치의 시원하고 깊은 맛이 사라지게 된다.

[0020] 상기와 같은 이유로 인해, 김치 발효시스템의 구축을 위해, 우수한 특성 즉, 만니톨 생성능이 우수하고, 낮은 pH에서도 생육이 가능하며, 종균으로 사용하는 경우 우점종이 될 수 있도록 락토바실러스 플란타리움 등의 정상 젖산 발효균 및 잡균과 같은 위해미생물의 생육을 억제할 수 있는 활성을 가진 유산균에 대한 연구의 필요성이 대두되고 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0021] 본 발명은 김치로부터 분리되고 만니톨 생성능이 우수하며, 항균활성을 가진 유산균 균주를 제공하는 것을 목적으로 한다.

[0022] 또한, 본 발명은 상기 균주, 상기 균주의 배양액, 상기 배양액의 농축액 및 상기 배양액의 건조물로 이루어지는 군에서 선택된 하나 이상을 활성성분으로 포함하는 항균조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.

[0023] 또한, 본 발명은 상기 균주, 상기 균주의 배양액, 상기 배양액의 농축액 및 상기 배양액의 건조물로 이루어지는 군에서 선택된 하나 이상을 활성성분으로 포함하는 생균활성제(probiotics)를 제공하는 것을 목적으로 한다.

[0024] 또한, 본 발명은 상기 균주를 함유하는 발효식품용 종균 조성물 및 상기 종균 조성물을 이용하여 제조한 발효식품을 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

[0025] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 김치로부터 분리되고 만니톨 생성능이 우수하며, 항균활성을 가진 루코노스톡 시트룸 균주(*Leuconostoc citreum*)를 제공한다.

[0026] 또한, 본 발명은 상기 루코노스톡 시트룸 균주(*Leuconostoc citreum*), 상기 균주의 배양액, 상기 배양액의 농축액 및 상기 배양액의 건조물로 이루어지는 군에서 선택된 하나 이상을 활성성분으로 포함하는 항균조성물을 제공한다.

[0027] 또한, 본 발명은 상기 루코노스톡 시트룸 균주(*Leuconostoc citreum*), 상기 균주의 배양액, 상기 배양액의 농축액 및 상기 배양액의 건조물로 이루어지는 군에서 선택된 하나 이상을 활성성분으로 포함하는 생균활성제(probiotics)를 제공한다.

[0028] 또한, 본 발명은 상기 균주를 함유하는 발효식품용 종균 조성물을 제공한다.

[0029] 또한, 본 발명은 상기 종균 조성물을 이용하여 제조한 발효식품을 제공한다.

[0030] 본 발명에 있어서, 배양물이란 특정 미생물을 배양배지 또는 배양액에서 배양한 것을 의미하며, 상기 배양물은 상기 특정 미생물을 포함하거나 포함하지 아니할 수 있다. 상기 배양물은 그 제형이 한정되지 아니하고, 일 예로 액체 또는 고체일 수 있다. 상기 배양배지란 동물세포나 식물세포 또는 세균 따위를 기르는 데 필요한 영양소가 들어 있는 고체 또는 액체를 의미한다.

[0031] 또한, 본 발명에 있어서, 배양액이란 액체배지에 균주를 접종하여 배양한 것을 의미한다. 상기 배양액은 균주를 포함하는 것 또는 균주를 접종하여 배양한 후, 제균 즉 균주를 제거(cell-free)한 배양여액일 수 있다.

[0032] 또한, 본 발명에 있어서, 배양액의 농축액이란 상기 배양액을 농축한 것을 말하고, 배양액의 건조물이란 상기 배양액의 물기를 없앤 것을 의미한다.

[0033] 본 발명에 있어서, 항균 조성물이란 항미생물제를 총칭하는 의미일 수 있고, 항균제, 방부제, 생물학적 보존제 또는 천연 보존제와 같은 의미일 수 있으며, 구체적으로 그람양성균, 그람음성균, 진균(효모 및 곰팡이)으로 이루어진 군에서 선택된 1 종 이상의 발육과 생활 기능을 저지 또는 억제할 수 있는 물질 즉, 항세균 및/또는 항진균 효력이 있는 물질을 의미한다.

[0034] 본 발명에 있어서, 생균활성제란 사람과 가축의 장내 미생물 군총의 개선으로 건강에 유익한 효능을 갖는 생균 제제를 의미한다. 미생물이 생균활성제로 기능하기 위해서는, 장내 생존력이 좋아 섭취 후 일정기간 그 활성이 유지되어야 하며, 많은 종류의 유해균의 증식 속도가 빠르기 때문에 섭취된 생균의 활성화 속도가 빨라야 한다.

[0035] 본 발명에 있어서, 식품이란 영양소를 한 가지 또는 그 이상 함유하고 있는 천연물 또는 가공품을 의미하며, 바람직하게는 어느 정도의 가공 공정을 거쳐 직접 먹을 수 있는 상태가 된 것을 의미하며 그 예로는 과일, 야채,

과일이나 야채의 건조제품이나 절단제품, 과일주스, 야채주스, 이들의 혼합주스이거나 칩류, 면류, 축산가공식품, 수산가공식품, 유가공식품, 발효식품, 두류식품, 곡류식품, 미생물발효식품, 제과제빵, 양념류, 육가공류, 산성음료수, 감초류, 허브류 등이 있으며 본 발명에서는 발효식품, 기능성 식품 및 가공식품을 포함하는 것을 의미하나 이에 한정되는 것은 아니다.

[0036] 본 발명에 있어서, 발효식품이란 유산균이나 효모 등 미생물을 한 가지 또는 둘 이상 첨가하고 상기 미생물의 발효 작용을 이용하여 만든 식품을 의미하며, 상세하게는 식품 기재에 발효식품용 종균을 첨가하고 숙성시켜 제조하는 식품을 의미한다. 상기 발효식품으로는 주류, 빵류, 김치, 젓갈, 된장, 간장, 치즈, 버터, 요구르트 등 비살균 개방형 발효식품 모두가 포함된다.

[0037] 본 발명에 있어서, 기능성 식품이란 식품에 물리적, 생화학적, 생물공학적 수법 등을 이용하여 해당 식품의 기능을 특정 목적에 작용, 발현하도록 부가가치를 부여한 식품군이나 식품 조성이 갖는 생체방어리듬조절, 질병방지 및 회복 등에 관한 체조절기능을 생체에 대하여 충분히 발현하도록 설계하여 가공한 식품을 의미한다.

[0038] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

[0039] 본 발명자들은 김치로부터 분리된 유산균 중에서 김치 제조과정에서 종균으로 사용되기 위한 균주에 대해 연구하던 중, 김치의 단맛과 시원한 맛에 영향을 주는 만니톨을 생성할 수 있으면서도, 위해 미생물을 포함한 다양한 균주에 대해 항균 활성을 가져서, 발효 과정에서 우점종이 될 수 있는 균주를 선별하고, 이에 대해 추가적인 연구를 통해, 내산성, 인공위액 저항성, 인공담즙 저항성 및 장내 부착능이 우수하다는 것을 확인하고, 상기 균주에 의해 실제로 김치를 제조한 경우, 김치의 발효과정에서 우점종이 될 수 있다는 것을 확인하여, 본 발명을 완성하였다.

[0040] 본 발명은 김치로부터 분리되고, 만니톨을 생성할 수 있으며, 바실러스균(*Bacillus* sp.), 슈도모나스균(*Pseudomonas* sp.), 스트렙토코커스균(*Streptococcus* sp.), 리스테리아균(*Listeria* sp.), 마이크로커커스균(*Micrococcus* sp.), 대장균(*E. coli*), 슈도모나스균(*Pseudomonas* sp.) 및 살모넬라균(*Salmonella* sp.)으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 균주에 대한 항균활성이 있는 루코노스톡 시트름 균주(*Leuconostoc citreum* KTCC 11511P)에 관한 것이다. 상기 균주는 추가로 락토바실러스 플란타리움(*Lactobacillus plantarum*)에 대한 항균활성을 가지므로, 김치 제조 공정에서 우점성을 확보할 수 있을 것으로 예상된다. 또한, 상기 균주는 군집(colony)이 노란색으로, 다른 유산균에 비하여 균주 구분이 용이하고, 바실러스균(*Bacillus* sp.), 슈도모나스균(*Pseudomonas* sp.), 스트렙토코커스균(*Streptococcus* sp.), 리스테리아균(*Listeria* sp.), 마이크로커커스균(*Micrococcus* sp.), 대장균(*E. coli*), 슈도모나스균(*Pseudomonas* sp.) 및 살모넬라균(*Salmonella* sp.)으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 균주에 대한 항균활성을 가지고, 열 및 pH에 안정한 항균물질을 생산한다. 상기 항균물질은 단백질 분해효소에 대한 내성이 없으므로, 박테리오신으로 예상된다.

[0041] 또한, 상기 루코노스톡 시트름 균주는 장내 부착성이 있고, L-아라비노스(L-Arabinose), D-만노스(D-Mannose), D-글루코오스(D-glucose), D-과당(D-fructose), 만니톨(Manitol), 알부틴(Arbutin), 말토스(Maltose), 수크로오스(Sucrose) 및 트레할로스(Trehalose)에 대한 당대사능이 있다.

[0042] 또한, 본 발명은 상기 루코노스톡 시트름 균주, 상기 균주의 배양액, 상기 배양액의 농축액 및 상기 배양액의 건조물로 이루어지는 군에서 선택되는 적어도 하나를 유효성분으로 포함하는 항균조성물에 관한 것이다.

[0043] 또한, 본 발명은 상기 루코노스톡 시트름 균주, 상기 균주의 배양액, 상기 배양액의 농축액 및 상기 배양액의 건조물로 이루어지는 군에서 선택되는 적어도 하나를 유효성분으로 포함하는 생균활성제(probiotics)에 관한 것이다.

[0044] 또한, 본 발명은 상기 생균활성제를 포함하는 식품에 관한 것이다.

[0045] 또한, 본 발명은 또한, 상기 루코노스톡 시트름 균주를 함유하는 발효식품용 종균 조성물에 관한 것이다. 상기 종균 조성물은 락토바실러스 플란타리움(*Lactobacillus plantarum* KFRI 464) 및 락토바실러스 텔부루키 KFRI 347(*Lactobacillus delbrueckii* KFRI 347)로 이루어진 군 중에서 선택된 1종 이상의 감수성 균주 또는 상기 감수성 균주의 세포 파쇄물을 더욱 포함하는 것일 수 있다.

[0046] 또한, 본 발명은 상기 종균 조성물을 첨가하여 제조한 발효식품에 관한 것이다. 상기 발효식품은 김치일 수 있다.

[0047] 본 발명은 김치로부터 분리되고 위해미생물을 포함한 미생물에 대한 항균활성을 가지며, 만니톨을 생성할 수 있는 루코노스톡 시트름 균주(*Leuconostoc citreum*), 보다 구체적으로는 루코노스톡 시트름 GR1(*Leuconostoc*

citreum GR1)에 관한 것이다.

- [0048] 상기 루코노스톡 시트름 균주 GR1(*Leuconostoc citreum* GR1)은 대한민국 서울특별시 서대문구 홍제1동 361-221번지 유럽빌딩에 위치한 한국미생물보존센터에 2011년 4월 1일자로 기탁하여, 수탁번호 KFCC 11511P를 부여 받았다.
- [0049] 상기 루코노스톡 시트름 균주 GR1은 김치로부터 분리되고 항균활성이 있으며, 구체적으로는 하기와 같은 균학적 성질을 갖는 균주이다.
- [0050] 보다 구체적으로, 상기 루코노스톡 시트름 균주 GR1은 유산균으로, 그람 양성(Gram-positive)으로, 광학현미경 관찰 결과 구균 형태이며, 다른 유산균과 달리 콜로니 색깔이 노란색, 구체적으로 밝은 노란색(Ligthy-yellow)이다.
- [0051] 상기 루코노스톡 시트름 균주 GR1은 1,488bp의 크기를 갖는 서열번호 3의 염기서열을 갖는 16S rDNA를 가지고, 상기 16S rDNA 염기서열 분석결과 루코노스톡 시트름 AF111948과 99%의 높은 상동성을 나타내었다. 따라서, 상기 루코노스톡 시트름 균주 GR1은 서열번호 3의 염기서열을 갖는 16S rDNA를 가지는 균주일 수 있다.
- [0052] 또한 상기 루코노스톡 시트름 균주 GR1은 L-아라비노스(L-Arabinose), D-만노스(D-Mannose), D-글루코오스(D-glucose), D-과당(D-fructose), 만니톨(Manitol), 알부틴(Arbutin), 말토스(Maltose), 수크로오스(Sucrose) 및 트레할로스(Trehalose)에 대한 당대사능을 나타낸다.
- [0053] 또한, 상기 루코노스톡 시트름 균주 GR1은 인공위액과 인공담즙을 이용하여 측정한 결과, 인공위액과 인공담즙에 대한 저항성을 갖고, Caco-2 세포를 이용하여 실험한 결과, 장내부착성도 매우 우수한 것으로 확인되었다. 또한, 상기 루코노스톡 시트름 균주 GR1은 적혈구와 함께 배양한 경우에도 용혈반응이 일어나지 않고, 효소반응에서도 유해한 효소를 생산하지 않는 것으로 확인되어, 인체에 무독하다는 것이 확인되었다.
- [0054] 따라서, 상기 루코노스톡 시트름 균주 GR1은 생균활성제 또는 프로바이오틱 유산균(probiotics)으로 요구되는 조건을 모두 만족하는 것으로 확인되었다.
- [0055] 또한, 상기 루코노스톡 시트름 균주 GR1은 다양한 미생물에 대한 항균활성을 갖는 항균 물질을 생성하며, 상기 항균 물질은 pH 3.0 내지 pH 7.0의 범위에서 항균 활성이 유지되거나 오히려 향상되고, 다양한 열처리 조건으로 실험한 결과, 열안정성이 인정되는 것으로 확인되었다.
- [0056] 또한, 상기 루코노스톡 시트름 균주 GR1은 위해 미생물에 대한 항균활성을 가지는 것으로 확인되었다.
- [0057] 상기 위해 미생물은 구체적으로, 바실러스속 균(*Bacillus* sp.), 슈도모나스속 균(*Pseudomonas* sp.), 충치의 원인이 되는 스트렙토코커스속 균(*Streptococcus* sp.), 유산의 원인이 되는 리스테리아속 균(*Listeria* sp.), 마이크로커커스속 균(*Micrococcus* sp.), 식중독의 원인이 되는 대장균(*E. coli*), 슈도모나스균(*Pseudomonas* sp.) 및 식중독의 원인이 되는 살모넬라속 균(*Salmonella* sp.)으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 위해 미생물일 수 있다.
- [0058] 상기 바실러스속 균(*Bacillus* sp.)은 바람직하게는 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*, *B. subtilis*)일 수 있고, 상기 슈도모나스속 균(*Pseudomonas* sp.)은 바람직하게는 녹농균(*Pseudomonas aerogigosa*, *P. aerogigosa*)일 수 있으며, 상기 스트렙토코커스속 균(*Streptococcus* sp.)은 바람직하게는 스트렙토코커스 뮤탄스(*Streptococcus mutans*)일 수 있고, 상기 리스테리아속 균(*Listeria* sp.)은 바람직하게는 리스테리아 모노사이토게네스(*Listeria monocytogenes*)일 수 있으며, 상기 마이크로커커스속 균(*Micrococcus* sp.)은 바람직하게는 마이크로커커스 류테우스(*Micrococcus luteus*)일 수 있고, 상기 슈도모나스균(*Pseudomonas* sp.)은 바람직하게는 슈도모나스 아에로지노사(*Pseudomonas aeroginosa*)일 수 있으며, 상기 살모넬라속 균(*Salmonella* sp.)은 바람직하게는 살모넬라 엔테리카(*Salmonella enterica* serovar Thphi)일 수 있다.
- [0059] 또한, 상기 루코노스톡 시트름 균주 GR1은 유산균, 일 예로 락토바실러스 플란타리움(*Lactobacillus plantarum*)이나 락토바실러스 메센테로이드(*Lactobacillus mesenteroides*) 등에 대한 항균활성을 가지고 있어서, 발효과정에서 우점종으로 자리매김할 수 있다.
- [0060] 또한, 상기 루코노스톡 시트름 균주 GR1을 배양한 배양배지는 위해 미생물에 대한 항균활성을 갖는다. 상기 균주를 배양한 배양배지는 바람직하게는 상기 균주가 배양된 배양액일 수 있다.
- [0061] 이러한 측면에서, 본 발명은 상기 루코노스톡 시트름 균주 GR1, 이의 배양액, 상기 배양액의 농축액 및 상기 배양액의 건조물로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상을 유효성분으로 포함하는 항균 조성물일 수 있다.

- [0062] 상기 항균 조성물은 상기 바실러스속 균(*Bacillus* sp.), 슈도모나스속 균(*Pseudomonas* sp.), 충치의 원인이 되는 스트렙토코커스속 균(*Streptococcus* sp.), 유산의 원인이 되는 리스테리아속 균(*Listeria* sp.), 마이크로커커스속 균(*Micrococcus* sp.), 식중독의 원인이 되는 대장균(*E. coli*), 슈도모나스균(*Pseudomonas* sp.) 및 식중독의 원인이 되는 살모넬라속 균(*Salmonella* sp.)으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 위해 미생물에 대한 항균활성을 갖는다.
- [0063] 상기 항균조성물에 포함되는 상기 유효성분의 함량은 사용목적 및 사용방법 등을 고려하여 적절하게 선택될 수 있으며, 예를 들어 전체 조성물을 기준으로 0.01 중량부 내지 99 중량부, 바람직하게는 0.1 중량부 내지 90 중량부, 더욱 바람직하게는 1 중량부 내지 75 중량부일 수 있다. 상기 항균조성물에는 통상적으로 사용되는 첨가제를 더욱 포함할 수 있다.
- [0064] 또한, 상기 루코노스톡 시트름 균주 GR1은 생균활성제 또는 프로바이오틱 유산균(probiotics)으로 요구되는 조건을 모두 만족한다는 측면에서 본 발명은 생균활성제(probiotics)를 제공한다.
- [0065] 상기 생균활성제는 상기 루코노스톡 시트름 균주 GR1, 이의 배양액, 상기 배양액의 농축액 및 상기 배양액의 건조물로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상을 유효성분으로 포함하는 것일 수 있다.
- [0066] 생균활성제는 사람과 가축의 장내 미생물 군총의 개선으로 건강에 유익한 효능을 갖는 생균제제로, 미생물이 생균활성제로 기능하기 위해서는, 장내 생존력이 좋아 섭취 후 일정기간 그 활성이 유지되어야 한다. 상기 루코노스톡 시트름 균주 GR1은 위해 미생물에 대한 항균활성을 나타낼 뿐만 아니라, 인공위액 및 인공담즙액으로 실험한 결과 위액 및 담즙액에 대한 저항성이 우수하고, 장내 부착능이 뛰어나며, 적혈구와 함께 배양한 경우 용혈반응 및 효소활성을 확인한 결과 인체에 무해한 것으로 인정되므로, 생균활성제로 기능하기 위한 조건을 모두 만족한다.
- [0067] 상기 생균활성제에 포함되는 유효성분의 함량은 사용목적 및 사용방법 등을 고려하여 적절하게 선택될 수 있으며, 바람직하게는 전체 조성물을 기준으로 0.01 중량부 내지 99 중량부, 더욱 바람직하게는 0.1 중량부 내지 90 중량부일 수 있다. 상기 생균활성제에는 통상적으로 사용되는 첨가제를 더욱 포함할 수 있다.
- [0068] 또한, 본 발명은 상기 생균활성제가 포함된 식품을 제공한다. 상기 생균활성제는 슈도모나스속 균(*Pseudomonas* sp.), 충치의 원인이 되는 스트렙토코커스속 균(*Streptococcus* sp.), 유산의 원인이 되는 리스테리아속 균(*Listeria* sp.), 마이크로커커스속 균(*Micrococcus* sp.), 식중독의 원인이 되는 대장균(*E. coli*), 슈도모나스균(*Pseudomonas* sp.) 및 식중독의 원인이 되는 살모넬라속 균(*Salmonella* sp.)을 가지므로, 식중독 등의 예방 또는 개선 효과가 있다.
- [0069] 본 발명에서 식품이란 영양소를 한 가지 또는 그 이상 함유하고 있는 천연물 또는 가공품을 의미하며, 바람직하게는 어느 정도의 가공 공정을 거쳐 직접 먹을 수 있는 상태가 된 것을 의미하며 그 예로는 과일, 야채, 과일이나 야채의 건조제품이나 절단제품, 과일주스, 야채주스, 이들의 혼합주스 이거나 칩류, 면류, 축산가공식품, 수산가공식품, 유가공식품, 발효식품, 두류식품, 곡류식품, 미생물발효식품, 제과제빵, 양념류, 육가공류, 산성음료수, 감초류, 허브류 등이 있으나 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0070] 본 발명의 식품은 지시된 비율로 필수 성분으로서 상기 생균활성제를 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. 상기 생균활성제는 식품류, 음료, 건강음료, 껌, 차, 비타민 복합제, 건강 기능성 식품류의 제조시 원료 물질에 첨가되거나 조리된 식품에 적절히 혼합하는 방법으로 첨가될 수 있으며, 식품학적으로 허용 가능한 식품 보조 첨가제와 함께 첨가될 수 있다. 이 때, 식품 또는 음료 중의 상기 생균활성제의 양은 전체 식품 중량의 0.01 중량% 내지 90 중량%로 가할 수 있으며, 음료의 경우 100 mL를 기준으로 0.02 g 내지 20 g, 바람직하게는 0.5 g 내지 10 g의 비율로 가할 수 있다.
- [0071] 상기 식품은 일 예로 발효식품, 건강기능성식품 또는 음료일 수 있다.
- [0072] 본 발명에서 발효식품이란 유산균이나 효모 등 미생물을 한 가지 또는 둘 이상 첨가하고 상기 미생물의 발효 작용을 이용하여 만든 식품을 의미하며, 상세하게는 식품 기재에 발효식품용 종균을 첨가하고 숙성시켜 제조하는 식품을 의미한다. 상기 발효식품으로는 주류, 빵류, 김치, 젓갈, 된장, 간장, 치즈, 버터 또는 요구르트 등 비살균 개방형 발효식품 모두가 포함된다.
- [0073] 본 발명에서 기능성 식품이란 식품에 물리적, 생화학적, 생물공학적 수법 등을 이용하여 해당 식품의 기능을 특정 목적에 작용, 발현하도록 부가가치를 부여한 식품군이나 식품 조성이 갖는 생체방어리듬조절, 질병방지와 회

복 등에 관한 제조절기능을 생체에 대하여 충분히 발현하도록 설계하여 가공한 식품을 의미한다.

- [0074] 본 발명에서 음료란 갈증을 해소하거나 맛을 즐기기 위하여 마시는 것의 총칭을 의미하고 주류, 청량음료, 물, 시럽, 차, 커피, 과실음료 등이 이에 해당되며 유산균 음료를 포함한다. 유산균 음료란 유산균을 배양하여 유산발효시킨 것에 살균수를 가해서 희석하고 당분, 향료 등을 가한 음료를 의미한다. 상기 음료는 지시된 비율로 필수 성분으로서 상기 생균활성제를 함유하는 외에는 다른 성분에는 특별한 제한이 없으며 통상의 음료와 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다.
- [0075] 또한, 상기 루코노스톡 시트럼 균주 GR1은 GRAS 미생물인 유산균으로, 김치로부터 유래되고, 내산성이 있으며, 만니톨 생성능이 다른 균주에 비하여 현저하게 우수하여, 발효식품용 종균으로 적합하다. 이러한 측면에서, 본 발명은 상기 루코노스톡 시트럼 균주 GR1을 포함하는 발효식품용 종균 조성물에 관한 것이다. 상기 발효식품은 일 예로, 김치, 젓갈, 된장 또는 간장이 있으나 이에 한정되지 않고, 비살균 개방형 발효식품을 모두 포함할 수 있다. 상기 발효식품은 바람직하게는 김치일 수 있다.
- [0076] 상기 종균 조성물은 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum* KFRI 464) 및 락토바실러스 델부루키 KFRI 347(*Lactobacillus delbruekii* KFRI 347)로 이루어진 군 중에서 선택된 1종 이상의 감수성 균주 또는 상기 감수성 균주의 세포 파쇄물을 더욱 포함한 것일 수 있다.
- [0077] 상기 종균 조성물에 상기 감수성 균주 또는 상기 감수성 균주의 세포 파쇄물을 첨가하는 경우, 상기 루코노스톡 시트럼 균주 GR1의 항균활성이 향상되어, 종균 외에 다른 유산균이나 위해 미생물의 생육을 억제하여, 우점종으로서의 위치를 더욱 용이하게 확보할 수 있다.
- [0078] 또한, 본 발명은 상기 종균 조성물을 첨가하여 제조한 발효식품일 수 있다. 상기 발효식품은 바람직하게는 김치일 수 있다. 상기 발효식품에는 상기 종균 조성물을 식품 기재 100 중량을 기준으로 0.0001 중량% 내지 0.01 중량%(습윤중량부)로 첨가할 수 있다.
- [0079] 상기한 바와 같이, 김치의 경우 주재료를 살균하지 않는 상태로 사용하며, 다양한 종류의 부원료(양념류)를 혼합하여 제조하여 인위적 발효조절과 종균화가 어려운 식품이나, 상기 루코노스톡 시트럼 균주 GR1을 종균으로 사용하는 경우, 종균 이외의 잡균을 제어할 수 있고, 내산성이 있으며, 만니톨 생성능이 우수하여, 김치의 향미유지를 포함한 관능 개선 효과 및 김치의 산도 상승을 억제하여, 장기간 보관할 수 있는 보관성을 향상시킬 수 있다.
- [0080] 상기 김치는 상기 종균 조성물을 첨가하여 제조할 수 있다. 상기 김치의 주재료는 김치종류에 따라 다르며, 통상적으로 양념으로 분류하는 이외의 재료를 의미한다. 상기 김치의 주재료는 일 예로 배추, 무, 오이, 열무, 파 또는 부추일 수 있다.
- [0081] 상기 김치 제조시 종균 조성물을 첨가하는 방법은 김치 양념 또는 김치 다대기에 종균을 첨가하는 방법으로 수행할 수 있다.
- [0082] 상기 루코노스톡 시트럼 균주 GR1은 박테리오신으로 추측되는 항균물질을 생성하며, 상기 루코노스톡 시트럼 균주 GR1의 항균활성 또는 상기 항균물질의 항균활성은 감수성 균주 또는 이의 세포 파쇄물을 가하는 단계를 포함하는 방법으로 강화될 수 있다. 상기 감수성 균주는 상기 루코노스톡 시트럼 균주 GR1에 의하여 생육이 저해되며 박테리오신 생산 유산균에 특이적으로 작용하여 박테리오신 생산을 증강시키는 균주로서, 구체적으로 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum* KFRI 464) 및 락토바실러스 델부루키 KFRI 347(*Lactobacillus delbruekii* KFRI 347)로 이루어진 군 중에서 선택된 1종일 수 있다.
- [0083] 상기 세포 파쇄물은 파쇄된 균체의 상청액 또는 파쇄된 균체의 펠렛일 수 있다. 상기 감수성 균주 또는 이의 세포 파쇄물의 함량은 상기 루코노스톡 시트럼 균주 GR1의 중량을 기준으로 1 : 0.01 내지 1 : 10(상기 루코노스톡 시트럼 균주 GR1 : 상기 감수성 균주 또는 이의 세포 파쇄물) 또는 1 : 0.5 내지 1 : 5(상기 루코노스톡 시트럼 균주 GR1 : 상기 감수성 균주 또는 이의 세포 파쇄물)일 수 있다.
- [0084] 또한, 본 발명은 루코노스톡 시트럼 균주 GR1을 감수성 균주 또는 이의 세포 파쇄물과 함께 배양하여 항균활성이 향상된 루코노스톡 시트럼 균주 GR1을 수득하는 단계를 포함하는 박테리오신 생산 강화 또는 항균활성이 향상된 루코노스톡 시트럼 균주 GR1 제조방법에 관한 것으로, 상기 제조방법에 의하면 루코노스톡 시트럼 균주 GR1의 항균활성이 강화된다.
- [0085] 이러한 측면에서, 본 발명은 상기 항균활성이 향상된 루코노스톡 시트럼 균주 GR1 제조방법으로 제조한 항균활

성이 향상된 루코노스톡 시트룸 균주 GR1 제조방법에 관한 것이다.

- [0086] 이러한 측면에서 본 발명은, 기존에 사용되는 유전자조작을 통하지 않고도 미생물의 항균활성 및 박테리오파지 생산능을 극대화시킬 수 있으므로, GMO(genetically modified organism)에 대한 규정에 해당되지 않는 비유전자적 방법을 제공 가능하게 한다.
- [0087] 본 발명의 만니톨을 생성할 수 있는 루코노스톡 시트룸 GR1(*Leuconostoc citreum* GR1)은 본 발명의 실시예에서 확인된 바와 같이, 투여된 과당을 거의 모두 만니톨로 전화시킬 수 있을 정도로 현저하게 우수한 만니톨 생성능을 가진다.
- [0088] 기존에 보고된 다른 균주에서 확인된 적이 없을 정도의 현저하게 우수한 만니톨 생성능을 가진 상기 루코노스톡 시트룸 GR1 균주는 이러한 측면에서 만니톨 생성을 위해 사용될 수 있다.
- [0089] 따라서, 본 발명은 루코노스톡 시트룸 GR1 균주를 이용하여 만니톨을 생성하는 방법을 제공한다. 상기 만니톨 생성방법은 상기 루코노스톡 시트룸 GR1 균주와 과당을 반응시키는 방법으로 수행할 수 있다.
- [0090] 이러한 측면에서, 본 발명은 또한 상기 루코노스톡 시트룸 GR1 균주, 상기 균주의 배양액 및 상기 배양액의 농축액으로 이루어진 군 중에서 적어도 하나를 유효성분으로 포함하는 만니톨 생성용 반응 조성물을 제공한다. 상기 배양액은 균주를 포함하는 것일 수 있다.

발명의 효과

- [0091] 이상 살펴본 바와 같이, 본 발명에 따른 루코노스톡 시트룸 GR1(*Leuconostoc citreum* GR1)은 인공위액 및 인공담즙에 대한 저항성이 높고, 적혈구를 이용한 용혈 실험 및 효소활성을 통하여 확인한 결과 인체에 안전할 뿐만 아니라 다양한 위해 미생물에 대한 항균활성을 가져서 위해 미생물과 관련된 각종 질병의 개선 또는 예방과 관련된 다양한 식품 등에 사용될 수 있고, 김치 발효과정에서 신맛을 내는 동형젖산발효균인 락토바실러스 플란타리움(*Lactobacillus plantarum*)에 대한 항균활성을 가져서, 상기 루코노스톡 시트룸 GR1을 종균으로 사용하는 경우, 우점종으로 자리매김하여, 김치의 산도 증가를 억제할 뿐 아니라, 김치에 단맛과 시원한 맛을 제공하는 만니톨을 계속적으로 생산하여, 김치의 관능개선에 따른 품질향상 및 보관성 증대에 이바지할 수 있으므로, 종균으로서 산업적 이용가치도 매우 크다 할 것이다.

도면의 간단한 설명

- [0092] 도 1은 본 발명의 일실시예에 따른 분리균주 GR1의 만니톨 생성능을 얇은 막 크로마토그래피(Thin Layer Chromatography, TLC)를 통하여 확인한 사진이다.
- 도 2는 본 발명의 일실시예에 따른 분리균주 GR1의 만니톨 생성능을 정량적으로 확인하기 위하여, 고성능 액체 크로마토그래피(High-Performance Liquid Chromatography, HPLC)를 수행한 결과를 나타낸 사진이다.
- 도 3은 본 발명의 일 실시예에 따른 분리균주 GR1의 전자현미경 촬영 사진이다.
- 도 4는 본 발명의 일실시예에 따른 분리균주 GR1의 16S rRNA의 염기서열이다.
- 도 5는 본 발명의 일실시예에 따른 분리균주 GR1의 염기서열을 기초로 한 다른 세균(bacteria)과의 계통발생론적 관계를 나타내는 그림이다.
- 도 6은 본 발명의 일실시예에 따른 분리균주 GR1의 배양시간에 따른 생육도, 배양배지의 pH 및 항균활성을 측정 한 그래프를 나타낸 그래프이다.
- 도 7은 본 발명의 일실시예에 따른 분리균주 GR1의 감수성 균주에 의한 항균활성의 증감 여부를 확인한 결과를 나타낸 사진으로, 상기 사진의 1은 분리균주 GR1을 배양한 결과를 나타낸 것이고, 상기 사진의 2는 분리균주 GR1과 감수성 균주의 세포내 분획(IC)을 함께 배양한 결과를 나타낸 것이며, 상기 사진의 3은 분리균주 GR1과 감수성 균주의 세포 과쇄물(D)을 함께 배양한 결과를 나타낸 것이고, 상기 사진의 4는 분리균주 GR1과 감수성 균주의 사균(WC)을 함께 배양한 결과를 나타낸 것으로, 상기 도 7a는 감수성 균주로 *Lb. plantarum* KFRI 464를 사용한 결과이고, 상기 도 7b는 감수성 균주로 *Lb. delbruekii* KFRI 347를 사용한 결과이다.
- 도 8은 본 발명의 일실시예에 따른 분리균주 GR1의 인공위액 및 인공담즙액을 처리한 후의 장내 생존성을 확인한 그래프이다.
- 도 9는 본 발명의 일실시예에 따른 분리균주 GR1의 안전성을 확인하기 위하여, 용혈반응을 확인한 사진이다.

도 10은 본 발명의 일실시예에 따른 분리균주 GR1을 종균으로 이용하여 제조한 김치의 김치액을 CaCO_3 가 2% 함유된 MRS 고체배지에 도말한 결과를 나타낸 사진으로, 밝은 노란색(Light-yellow)으로 확인된 균주가 분리균주 GR1이다.

도 11은 본 발명의 일실시예에 따른 분리균주 GR1 및 GR1과 같은 속의 유산균인 특허균주를 고체배지에 배양한 후, 비교한 사진으로, GR1은 분리균주 GR1을 나타내고, GJ7은 루코노스톡 시트륨 GJ7을 나타내며, C3은 루코노스톡 시트륨 C3을 나타내고, C16은 루코노스톡 시트륨 C16을 나타낸다.

도 12는 본 발명의 일실시예에 따른 분리균주 GR1을 종균으로 이용하여 제조한 김치의 김치액 내 존재하는 만니톨을 확인하기 위한 얇은 막 크로마토그래피(Thin Layer Chromatography, TLC)를 통하여 확인한 사진으로, F는 과당을 의미하고, M는 만니톨을 의미한다.

도 13은 본 발명의 일실시예에 따른 분리균주 GR1을 종균으로 이용하여 제조한 김치의 김치액 내 존재하는 만니톨을 확인하기 위한 고성능 액체크로마토그래피(High-Performance Liquid Chromatography, HPLC)를 수행한 결과를 나타낸 사진이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0093] 이하 본 발명의 실시예를 기재한다. 하기 실시예는 본 발명을 예시하기 위한 것일 뿐 본 발명의 권리범위가 하기 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.

[0094] <실시예 1> 유산균주의 분리 및 동정

[0095] 1-1 유산균주의 분리

[0096] 전국 각 지역에서 수집된 각종 김치의 각각의 무게 500g을 측정 후, 내용물 전체를 마쇄한 다음, 무균적으로 여과하고, 멸균수를 추가하여 시료액을 제조하였다. 상기 제조된 시료액을 단계별로 희석(serial dilution)하여, 탄산칼슘(CaCO_3)이 2% 함유된 MRS(Difco Co., France)배지에 분주하고, 30℃에서 2일간 배양한 다음, 투명환을 형성한 균주를 분리하였다. 상기 분리된 균주에 대해 그람 염색(Gram stain kit BD Co., USA)과 카탈라아제 테스트(Biomriex Co., France)를 수행하여, 그람양성이고, 카탈라아제 음성인 집락을 유산균으로 잠정적으로 확인하여 분리하였다.

[0097] 상기 분리된 유산균주들을, 5%(w/v) fructose가 포함된 LM 고체배지(yeast extract 5 g/L, peptone 5 g/L, K_2HPO_4 2 g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2 g/L, NaCl 0.01 g/L, FeSO_4 0.01 g/L, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.015 g/L 및 agar 15 g/L)에서 자란 콜로니(colony)로부터 분리된 균주를 만니톨(mannitol) 생성균주로 추정하였다.

[0098] 상기 만니톨 생성균주로 추정된 분리균주는 MRS 액체배지에 접종한 후, 30℃에서 18시간 동안 배양하여 25%(v/v)가 되게 첨가하여 glycerol stock을 만들어, 실험 수행 전까지 -70℃에서 보관하였다.

[0099] 상기 만니톨 생성균주를 만니톨 생산 실험에 사용할 경우, 상기 보관중인 균주를 5 mL MRS 액체배지에 접종하여, 30℃에서 24시간 배양한 후 5 % fructose가 포함된 LM 액체배지에 계대하여 30℃에서 48시간 배양하여 사용하는 방법으로 수행하였다.

[0100] 1-2 만니톨 생성능이 우수한 유산균주의 선정

[0101] 상기 만니톨 생성균주로 추정된 분리균주인 GJ2 균주, GR1 균주, PH1 균주, DM1 균주 및 MP1 균주에 대해, 얇은 막 크로마토그래피(Thin Layer Chromatography, TLC)를 이용하여 만니톨 생성 능력을 비교하는 방법으로, 만니톨 생성능이 우수한 만니톨 생성균주를 선발하였다.

[0102] 상기 균주의 만니톨 생성은 상기한 바와 같이, 5 mL MRS 액체배지에 상기 균주를 접종한 후, 30℃에서 24시간 배양하고, 5% fructose가 포함된 LM 액체배지에 1% 접종하여 30℃에서 48시간 배양하는 방법으로 수행하였다.

[0103] 상기 균주의 만니톨 생성능의 확인은 TLC법으로 수행하였다. 보다 구체적으로, 상기 배양액을 9950×g의 조건에서 5분 동안 원심분리한 후에, 상정액을 회수한 다음, 0.45 μm membrane filter로 제공하고, 2배 희석하여 4 μL 를 TLC plate에 점적하였다. 상기 TLC법에서 이동상은 acetonitrile : ethyl acetone : 1-propanol :

water(85 : 20 : 20 : 15, v/v/v/v)을 사용하였고, 발색은 AgNO₃-acetone에 5분 처리 후, alkaline-methanol에서 2분, Na₂S₂O₃(1.5M)에서 2분, Na₂S₂O₃(0.08M)에서 2분 및 NaHSO₃(0.25M)에서 2분 처리한 후 물에 세척하여 건조하는 방법으로 수행하였다. 상기 TLC법을 수행한 결과를 도 1에 나타내었다.

[0104] 상기 도 1에 나타난 바와 같이, 5% fructose가 포함된 LM 배지에서 배양된 균주 중에서, GR1 균주, GJ2 균주, PH1 균주 및 DM1 균주에서 만니톨이 생성되는 것이 확인되었고, 특히 GR1 균주의 상정액을 TLC를 시행한 결과, 과당(fructose)이 확인되지 않고 만니톨만이 확인되어, 상기 GR1 균주의 경우 배지 내 과당(fructose)이 만니톨로 완전히 전환된 것으로 추측되었다. 상기 결과로부터, 상기 GR1 균주의 만니톨 생성능이 가장 우수한 것으로 확인되었다.

[0105] 상기 결과를 보다 구체적으로 즉, 정량적으로 확인하기 위하여, 고성능 액체크로마토그래피(High-Performance Liquid Chromatography, HPLC)법으로 분석하였다. 상기 HPLC법에 사용된 분석 컬럼으로 Sugar-pak(Waters)을 사용하였고, 이동상으로는 3차 증류수를 사용하였다. 상기 이동상의 유속은 0.5 mL/min로 하였으며, 시료는 10 µL씩 주입하였고, 검출기로 RI(Refractive Index: Shodex RI-101)를 사용하였다. 상기 HPLC법을 수행한 결과를 도 2에 나타내었다.

[0106] 상기 도 2에 나타난 바와 같이, HPLC법으로 생성된 만니톨량을 분석한 결과, GR1 균주는 전구체로 넣어준 과당이 검출되지 않았고, 상기 과당으로부터 생성된 만니톨량이 33.890 mg/kg으로, 다른 균주의 약 165% 내지 235%의 만니톨을 생성한 것으로 확인되어, 가장 우수한 만니톨 생성능이 있는 것으로 확인되었으며, 상기 결과는 상기 TLC법에 의한 결과와 일치하였다.

[0107] 상기 결과로부터, 본 발명의 만니톨 생성 유산균주로 GR1 균주를 선정하였다.

[0108] 1-3 만니톨 생성 유산균의 동정

[0109] 실시예 1-2에서 분리된 유산균인 GR1은 그람염색(Gram stain kit, BD Co., USA) 및 주사전자현미경(SEM)을 이용한 형태학적 특성 분석, API 50CHL kit(Biomrieux Co., France)을 이용한 생화학적 특성 분석 및 16S rDNA 염기서열 분석을 통하여 동정하였다.

[0110] 상기 형태학적 특성에 대한 분석은 상기 실시예 1-1의 분리균주인 GR1의 콜로니의 모양 및 색을 관찰하고, 상기 균주를 그람염색한 후에, 광학현미경(SEM)으로 관찰하여 모양을 관찰하였으며, 그 결과를 표 1 및 도 3에 나타내었다.

표 1

[0111]

특 성	GR1
그람염색(Gram-stain) 여부	+
콜로니 형태(Colony Morphology)	coccus & circular
콜로니 표면(Colony surface)	smooth
콜로니 색깔(Colony Color)	light-yellow
콜로니 불투명도(Colony opacity)	opaque

[0112] 상기 표 1 및 도 3에 나타난 바와 같이, 상기 분리균주인 GR1 균주는 그람 양성 균주이고, 광학현미경 관찰 결과 구균 형태이며, 콜로니 색깔이 연한 노란 빛을 나타내었다. 상기 결과로부터 상기 GR1 균주가 루코노스톡속 균주(*Leuconostoc* sp.)로 예상되었으나, 콜로니 색깔이 일반적으로 아이보리(ivory)색인 다른 균주와 구별되는 색깔을 갖는 것으로 확인되었다.

[0113] 상기 형태학적 분석에 추가로 생화학적 특성에 대한 분석을 API 50CHL kit(Biomrieux Co., France)을 이용하여 당 대사능을 검토하는 방법으로 수행하였으며, 그 결과를 하기 표 2에 나타내었다.

표 2

[0114]

Reaction	GR1	Reaction	GR1
Control	-	Esculine	+
Glycerol	-	Salicine	+

Erythritol	-	Cellobiose	+
D-Arabinose	-	Maltose	+
L-Arabinose	+	Lactose	-
Ribose	-	Melibiose	-
D-Xylose	-	Sucrose	+
L-Xylose	-	Trehalose	+
Adonitol	-	Inuline	-
β -Methyl-xyloside	-	Melezitose	-
Galactose	-	Rafinose	-
D-Glucose	+	Starch	-
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	+
Arbutin	+	5-Keto-Gluconate	-

[0115] 상기 표 2에 나타난 바와 같이, 상기 분리균주인 GR1 균주는 L-아라비노스, D-만노스, 만니톨, 알부틴 등을 당 원으로 이용할 수 있는 것으로 확인되었다.

[0116] 또한, 상기 16S rDNA 염기서열 분석을 통한 동정을 수행하였다. 구체적으로, Genome DNA kit(Qiagen)을 이용하여 상기 분리균주 GR1으로부터 genomic DNA를 추출한 후, 하기 표 3에 기재된 프라이머 쌍을 이용하여 PCR을 수행함으로써 16S rRNA 염기서열 분석을 수행하여, 상기 분리균주 GR1의 16S rRNA로 총 1,488bp의 염기서열을 결정하였으며, 그 결과를 도 4 및 서열번호 3에 나타내었다.

표 3

Primers	서열 (5' → 3')	서열번호
518F	CCAGCAGCCGCGTAATACG	1
800R	TACCAGGGTATCTAATCC	2

[0118] 상기 수행한 염기서열을 기초로 염기서열의 상동성 검사는 GeneBank database에 등록된 정보를 대상으로 Blast program (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/Blast.cgi>)에 의해 실행하였다.

[0119] 상기 16S rRNA 염기서열 분석을 통해 결정된 서열을 이용하여 상동성 검색을 실시한 결과를 기초로 다른 세균과의 계통발생론적 관계를 도 5에 나타내었다. 상기 도 5에 나타난 바와 같이, 루코노스톡 시트륨 AF111948(*Leuconostoc citreum* AF111948)와 99%의 상동성을 나타내어, 루코노스톡 시트륨(*Leuconostoc citreum*)로 최종 동정되었다.

[0120] 상기한 결과, 즉, 형태학적 특성, 당대사능 및 16S rRNA 염기서열 분석 결과, 김치로부터 분리되고 만니톨 생성 능이 우수한 GR1 균주는 루코노스톡 시트륨(*Leuconostoc citreum*)으로 동정되었고, 그 결과 분리균주인 GR1 균주를 루코노스톡 시트륨 GR1로 명명하였고, 대한민국 서울특별시 서대문구 홍제1동 361-221번지 유림빌딩에 위치한 한국미생물보존센터에 2011년 4월 1일자로 기탁하여, 수탁번호 KFCC 11511P를 부여 받았다.

[0121] <실시예 2> 위해 미생물에 대한 항균 활성 측정

[0122] 상기 루코노스톡 시트륨 GR1의 항균활성을 확인하기 위하여, 조항균물질을 준비한 후, 배양시간에 따른 생육도 및 항균활성과 항균 스펙트럼(spectrum)을 확인하는 방법으로 항균 활성을 측정하고, 상기 조항균물질의 특성

및 감수성 균주에 의한 항균효과 즉, 조항균물질 생성효과를 확인하였다.

2-1. 조항균 물질의 준비

분리균주의 항균활성을 확인하기 위하여, 조항균 물질을 준비하였다.

구체적으로, 상기 분리균주 루코노스톡 시트롭 GR1을 MRS 액체 배지 5 mL에 접종하여 30℃에서 24시간 동안 전 배양한 후, 100 mL 새 MRS 액체 배지에 상기 전배양액을 1%(v/v) 접종하고, 다시 30 ℃에서 24시간 동안 본배양 하였다. 상기 본배양액을 4℃ 및 9,500 × g의 조건에서 15분간 원심분리하여 얻은 상정액을 0.45 μm membrane filter(Advantec MFS, Inc., 일본)를 이용하여 제균하였다. 상기 제균된 상정액을 동결 건조한 후에 20 mM sodium acetate(pH 4.0) 완충용액에 녹여 25배 농축배율로 준비하여 항균활성 실험에 사용하였다.

2-2. 분리균주의 항균 스펙트럼

루코노스톡 시트롭 GR1의 항균 활성에 대한 조사는 4종의 그람 양성균 및 4종의 그람 음성균, 5종의 유산균을 이용하여 spot-on-the lawn test 법으로 수행하였다.

상기 항균 활성 측정을 위해 사용된 배지는 각 지시균주 별로 감수성 세균으로 사용한 그람양성 균주 및 그람음 성 균주의 경우 LB 평판배지 또는 TSA 평판배지에 1×10^6 cfu/mL로 도말하여 사용하였고, 감수성 유산균으로 사 용한 균주의 경우 MRS soft agar(0.75%, w/v) 10 mL에 1×10^5 CFU/mL가 되게 첨가하여 top agar로 부어서 사용 하였다.

상기 항균활성의 측정은 상기 실시예 2-1에서 제조된 조항균물질 5 μL를 상기 감수성균이 도말된 배지 위에 spotting하여 37℃에서 13시간 동안 배양한 후, 항균활성을 측정하는 방법으로 수행하였다. 상기 항균활성의 역가는 상기 항균물질을 순차적으로 2배씩 희석하여 저해환을 형성하는 최대 희석배수의 역을 취하여, 이 값에 1 mL에 대해서 환산계수를 AU/mL로 나타내었다. 상기 측정결과를 표 4에 나타내었다.

표 4

Microorganisms		Antibacterial activity (AU/mL)
Gram(+)	<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	3200
	<i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175	800
	<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 19113	400
	<i>Micrococcus luteus</i> ATCC 13513	400
Gram(-)	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	800
	<i>Escherichia coli</i> O157:H7 ATCC 43895	400
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	1600
	<i>Salmonella enterica</i> serovar Typhi ATCC 19430	400
LAB	<i>Lactobacillus plantarum</i> KFRI 464	800
	<i>Lactobacillus plantarum</i> KFRI 236	1600
	<i>Lactobacillus delbruekii</i> KFRI 347	3200
	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> KFRI 218	3200
	<i>Lactobacillus acidophilus</i> KFRI 150	3200

상기 표 4에 나타난 바와 같이, 상기 실시예 2-1에서 수득한 조항균 물질은 그람 양성균, 그람 음성균 및 유산 균에 대해 모두 항균활성을 나타내었고, 특히, 그람양성균인 *B. subtilis* ATCC 6633과 유산균인 *Lb. delbruekii* KFRI 347, *Leuc. mesenteroides* KFRI 218 및 *Lb. acidophilus* KFRI 150에 대해 가장 높은 저해활성 을 나타내었다.

2-3. 분리균주의 생육시기에 따른 항균활성

- [0134] 상기 루코노스톡 시트름 GR1의 배양시간에 따른 생육도 및 상기 조항균물질의 항균 활성을 측정하기 위해, 상기 분리균주 루코노스톡 시트름 GR1을 상기 실시예 2-1과 같이 MRS 액체 배지(pH 6.5 ± 0.2)에 1% 접종하고, 30℃에서 48시간 동안 정치배양하였다. 상기 정치배양을 수행하면서, 매 6시간 마다 A₆₀₀(Ultrospec 2100 pro, Amersham Biosciences, Sweden)에서 흡광도를 측정하여 생육도를 측정하였고, 이와 함께 배양액의 pH를 측정하였으며, 상기 6시간 마다 *B. subtilis* ATCC 6633 균주에 대하여 상기 실시예 2-2의 방법으로 항균활성을 측정하여 배양시간에 따른 항균활성을 측정하였다. 상기 측정결과를 도 6에 나타내었다.
- [0135] 상기 도 6에 나타낸 바와 같이, 생육곡선 측정 결과 상기 루코노스톡 시트름 GR1 균주는 배양 12시간까지 대수적으로 증가하였고, 상기 배양 12시간 후에 대수가 중반을 지나 24시간 정도에 최대가 되었으며, 24시간이 경과한 후에는 생육 정지기에 이르렀다는 것을 알 수 있었다.
- [0136] 또한, 상기 루코노스톡 시트름 GR1 균주의 배양시간에 따른 배양배지의 pH 변화는 배양초기 pH가 pH 6.4이었고, 배양 12시간 시점에서 pH가 pH 4.48로 급격히 저하하였으나, 이 후 pH 4.3을 유지하였다.
- [0137] 또한, 상기 루코노스톡 시트름 GR1의 항균 활성은 상기 루코노스톡 시트름 GR1은 생육 초기에는 항균활성을 나타내지 아니하였으나, 배양 6시간 이후부터 생육저지환이 조금씩 나타나 항균활성을 나타내었고, 대수증식기 후기에 이르는 18시간부터 최대활성(3,200 AU/mL)을 나타내었으며, 균주의 생육이 사멸기에 접어든 것으로 예상되는 36시간이 경과한 시점 이후에서도 최대 항균활성(3,200 AU/mL)이 유지되었다.
- [0138]
- [0139] 2-4. 분리균주의 조항균물질의 안정성
- [0140] 상기 루코노스톡 시트름 GR1의 조항균물질의 pH, 온도 및 각종 단백질 분해효소처리에 대한 안정성을 조사하였다. 상기 안정성을 확인하기 위한 균주로는 *B. subtilis* ATCC 6633를 사용하였다.
- [0141] 보다 구체적으로, pH에 대한 영향의 조사는 상기 실시예 2-1에서 제조한 루코노스톡 시트름 GR1의 배양상정액을 5 N HCl과 5 N NaOH를 사용하여, pH를 pH 3.0 내지 pH 7.0으로 조정하여 37℃에서 4시간 동안 처리한 다음, 항균 활성을 측정하는 방법으로 수행하였다.
- [0142] 또한, 온도에 의한 영향의 조사는 실시예 2-1에서 제조한 루코노스톡 시트름 GR1의 배양상정액 즉, 조항균물질을 4℃, 30℃, 50℃ 및 70℃에서 24시간, 100℃에서 30분 및 121℃에서 15분간 열처리한 후에 항균 활성을 측정하는 방법으로 수행하였다.
- [0143] 또한, 각종 분해효소에 대한 영향의 조사는 상기 실시예 2-1에서 제조한 루코노스톡 시트름 GR1의 배양상정액의 10배 농축물에 proteinase K(EC 3.4.21.64, Sigma Co., U.S.A.), protease(type I, Sigma) 및 trypsin(EC 3.4.21.4, Sigma)을 각각 50 mM Tris-HCl(pH 7.5)에 녹여 2 mg/mL의 농도로 37℃에서 5시간 처리한 후에, 100℃에서 5분 동안 끓여 효소를 불활성화시킨 후, 잔존하는 항균 활성을 측정하는 방법으로 수행하였다.
- [0144] 상기 측정 결과를 하기 표 5에 나타내었다.

표 5

Treatment			Activity(AU/mL)	
			GR1	Control(MRS)
pH	3.0		6400	1600
	4.0		3200	1600
	5.0		1600	800
	6.0		1600	800
	7.0		1600	800
pH-renaturation	3.0	→ 4.3	3200	800
	4.0		3200	800
	5.0		3200	800
	6.0		3200	800
	7.0		3200	800

Heating	30℃, 24h	3200
	50℃, 24h	3200
	70℃, 24h	3200
	100℃, 30min	3200
	121℃, 15min	3200
Enzymes (2mg/mL)	Trypsin	0
	Proteinase K	0
	Protease	0

[0146] 상기 표 5에 나타내 바와 같이, pH 안정성 실험에서 향균 활성은 pH 4.0에서는 최대 활성을 유지하였고, pH 3.0에서는 오히려 활성이 증가(6,400 AU/mL)하였으나, pH 5.0 내지 pH 7.0 구간에서는 활성이 감소하였다. 또한, 상기 pH 처리 후, pH를 상기 루코노스톡 시트름 GR1의 배양배지의 pH인 pH 4.3으로 복원시킨 경우에는 pH 처리 전 구간에서 향균활성이 100%(3,200 AU/mL)로 회복되었다. 상기 측정결과로부터, 상기 루코노스톡 시트름 GR1의 조향균물질은 pH에 대해 비교적으로 안정한 것으로 확인되었다.

[0147] 또한, 온도에 대한 안정성의 경우, 상기 조향균물질은 향균 활성은 온도에 대해 매우 안정한 것으로 확인되었다. 구체적으로, 상기 조향균물질은 30℃, 50℃ 및 70℃에서 24시간 처리한 경우와 100℃에서 30분 처리한 경우 그리고 121℃에서 15분 처리한 경우 모두에서 기존 향균활성의 100%가 유지되어, 온도에 매우 안정한 것으로 확인되었다.

[0148] 한편, 단백질 분해효소 즉, Trypsin, Proteinase K 및 Protease 처리에 의해 모두 향균활성이 소실되어 상기 조향균물질은 단백가수분해효소에 의해 분해가 되는 단백질 또는 펩타이드인 단백질성 물질로 예상되어, 상기 조향균물질은 박테리옌 또는 박테리옌 유사 물질로 예측되었다.

[0149] <실시예 3> 감수성균주에 의한 향균활성 개선 효과 확인

[0150] 상기 루코노스톡 시트름 GR1의 향균활성이 증가되는 경우, 김치 내에서 상기 루코노스톡 시트름 GR1이 우점종으로 자리매김할 수 있는 가능성이 높아질 수 있다. 따라서, 감수성 균주를 이용하여 상기 루코노스톡 시트름 GR1의 향균활성이 증가될 수 있는지 여부를 확인하였다. 상기 감수성 균주로는 식품으로서 안전성을 확보하기 위해 GRAS 미생물인 유산균을 사용하였다.

[0151] 3-1. 감수성 균주의 준비

[0152] 상기 루코노스톡 시트름 GR1과 공동배양(associative culture)을 통해 향균활성이 변화되는지 여부를 확인하기 위한 감수성 균주로, GRAS 미생물인 유산균, 구체적으로 *Lactobacillus plantarum* KFRI 464 및 *Lactobacillus delbruekii* KFRI 347을 사용하였다. 상기 *Lb. plantarum* KFRI 464 및 *Lb. delbruekii* KFRI 347는 각각 100 mL의 MRS 액체 배지(pH 6.5 ± 0.2)에 접종하고, 30 ℃에서 24시간 동안 본배양하였다. 상기 본배양액을 4℃ 및 9,500 × g의 조건에서 10분간 원심분리하여 균체와 상정액을 분리하였다.

[0153] 상기 상정액을 제거하여 수득한 균체에 대해 50 mM Tris-HCl(pH 8.3) 완충용액을 20 mL 가하고, 초음파처리(sonication, Amp: 60, Pulse: 2 sec, Time: 10 min, Sonics VC 130, Newtown, USA)한 후 4℃ 및 9,500 × g의 조건에서 15분간 원심분리하여, 세포내 분획(intracellular extract; IC)과 세포 파쇄물(cell debris; D)로 분리하였다. 상기 세포내 분획은 0.45 μm membrane filter(Advantec MFS, Inc., 일본)를 이용하여 제균하였고, 세포 파쇄물은 20 mL의 50 mM Tris-HCl(pH 8.3) 완충용액에 풀어 사용하였다.

[0154] 또한, 상정액을 제거하여 수득한 균체는 121℃에서 15분간 멸균시킨 균체인 사균(whole cell; WC)를 20 mL의 50 mM Tris-HCl 완충용액(pH 8.3)에 풀어 사용하였다.

[0155] 3-2. 향균활성 증가여부 확인

[0156] 상기 실시예 2-1과 같이 상기 루코노스톡 시트름 GR1 균주를 MRS 액체 배지 5 mL에 접종하여 30℃에서 24시간 동안 전배양하였다. 상기 전배양된 루코노스톡 시트름 GR1 배양액을 100 mL 새 MRS 액체 배지에 1%(v/v) 접종하고, 상기 실시예 3-1의 각각의 감수성균주의 세포내 분획(IC), 세포 파쇄물(D) 및 사균(WC)을 각각 2.5% 첨가

한 후, 30℃에서 24시간 배양하였다.

- [0157] 각각의 세포배양액을 실시예 2-1의 방법과 같이, 4℃ 및 $9,500 \times g$ 의 조건에서 15분간 원심분리하여 얻은 상정액을 0.45 μm membrane filter(Advantec MFS, Inc., 일본)를 이용하여 제균하였다. 상기 제균된 상정액을 동결 건조한 후에 20 mM sodium acetate(pH 4.0) 완충용액에 녹여 25배 농축배율로 준비하여 항균활성 실험에 사용하였다.
- [0158] 상기 상정액을 이용한 항균활성 실험은 *B. subtilis* ATCC 6633 균주에 대하여 상기 실시예 2-2의 spot-on-the lawn test 법으로 항균활성을 측정하였으며, 상기 측정결과를 도 7에 나타내었다.
- [0159] 상기 도 7에 나타난 바와 같이, *Lactobacillus plantarum* KFRI 464(도 7a) 및 *Lactobacillus delbrueckii* KFRI 347(도 7b)와 함께 공동배양을 한 경우, 항균활성이 증가하는 것이 확인되었다. 보다 구체적으로, 상기 루코노스톡 시트름 GR1 균주를 단독 배양한 경우, *B. subtilis* ATCC 6633 균주에 대한 항균 활성은 3,200 AU/mL이었으나, 세포 파쇄물(D, 3변) 및 사균(WC, 4변)과 함께 배양한 경우 *B. subtilis* ATCC 6633 균주에 대한 항균활성이 6,400 AU/mL로 항균활성이 증강되는 것이 확인되었다. 이와 같은 항균활성의 개선효과는 세포내 분획(IC, 2변)과 함께 배양한 경우에는 나타나지 아니하였다.
- [0160] 따라서, 상기 루코노스톡 시트름 GR1 균주를 GRAS 미생물인 유산균 중 *Lactobacillus plantarum* KFRI 464 또는 *Lactobacillus delbrueckii* KFRI 347의 세포 파쇄물이나 사균과 함께 배양하는 경우 항균활성이 증대되어, 상기 항균활성이 증대된 상기 루코노스톡 시트름 GR1 균주를 사용하여 발효식품을 제조하는 경우 상기 루코노스톡 시트름 GR1 균주가 우점종으로 자리매김할 수 있는 가능성이 높아질 수 있을 것으로 예상되었다.
- [0161] <실시예 4> 루코노스톡 시트름 GR1의 프로바이오틱 이용 가능성
- [0162] 구강을 통하여 섭취된 균이 최종 목적 부위인 장에 도달하기 위해서는 강산성의 위액을 통과하여 생존해야 한다. 상기 루코노스톡 시트름 GR1의 경우, 실시예 2-3에서 기재된 바와 같이 배양배지의 pH가 pH 4.3인 것으로 나타나 산성 환경에서 잘 자라는 것으로 예상되어 프로바이오틱 균주로 이용하기 위한 내산성을 확보하는 것으로 예상된다.
- [0163] 이에 추가로, 루코노스톡 시트름 GR1이 위를 거쳐 장에 도달하여 프로바이오틱 균주로 이용가능한지 여부를 확인하기 위하여, 위액(인공위액)에 대한 저항성과 췌장과 십이지장에서는 분비되는 담즙액(인공담즙)에 대한 내성 확보 여부를 확인하였다.
- [0164] 또한, 루코노스톡 시트름 GR1이 장에 도달하여, 프로바이오틱 미생물로 작용하기 위해서 장 내에 오랜 시간동안 존재하여야 하므로, 장내 부착성에 관한 시험을 수행하였다.
- [0165] 또한, 프로바이오틱 미생물로 작용하기 위해 안전성 확보가 요구되므로, 이와 관련하여, 루코노스톡 시트름 GR1의 효소활성 및 용혈성 독성을 확인하였다.

[0166] 4-1. 인공위액 및 인공담즙에 대한 저항성

- [0167] 구강을 통하여 섭취된 균이 최종 목적 부위인 장에 도달하기 위해서는 강산성의 위액 및 췌장과 십이지장에서 분비되는 담즙액에 대한 내성을 갖추어야 한다. 따라서, 상기 루코노스톡 시트름 GR1에 대해 인공위액 및 인공담즙에 대한 저항성 시험을 수행하였다.
- [0168] 상기 루코노스톡 시트름 GR1의 위액에 대한 저항성 시험은 인공위액을 이용하여 수행하였다. 상기 인공위액의 제조는 Kobayashi 등의 방법(Kobayashi, Y. et al, Jpn. J. Microbiol. 29:691-698(1974))을 변형하여 1 N HCl을 사용하여 pH 2.5로 조정된 MRS 액체배지(Difco, France)에 pepsin(Sigma co., USA)을 1,000 Unit/mL가 되도록 첨가하여 제조하였다.
- [0169] 또한, 상기 루코노스톡 시트름 GR1의 담즙액에 대한 저항성 시험은 인공담즙액을 이용하여 수행하였다. 상기 인공담즙액의 제조는 MRS 액체배지에 0.45 μm filter(Milipore Co., USA)로 여과 제균된 황소의 담즙(oxgall, Sigma Co., USA) 용액을 0.3%, 0.5%가 되도록 첨가하여 제조하였다.
- [0170] 상기 인공위액 및 인공담즙액에 대한 저항성 실험은 상기 루코노스톡 시트름 GR1을 100 mL MRS 액체 배지에 1%(v/v) 접종하고, 30℃에서 48시간 배양한 후, 4℃ 및 $9,500 \times g$ 의 조건에서 5분간 원심분리하여 상정액을 제

거하고 균체를 회수한 다음, 상기 제조된 인공위액을 제거된 상징액과 동량으로 첨가하고 현탁한 후, 30℃에서 2시간 반응시켰다. 프로바이오틱 미생물의 경우 위를 통과하여 장으로 이동할 것임을 고려하여, 인공담즙액에 대한 저항성은 위액에서 생존된 미생물 즉, 인공위액으로 실험을 수행한 미생물에 대해 수행하였다. 보다 구체적으로, 상기 인공위액으로 2시간 동안 반응시킨 배양액을 4℃ 및 $9,500 \times g$ 의 조건에서 5분간 원심분리하여 상징액을 제거하고 균체를 회수한 다음, 상기 제조된 인공담즙액을 제거된 상징액과 동량으로 첨가하고 현탁한 후, 30℃에서 24시간 반응시켰다.

[0171] 상기 24시간 반응시킨 후, 생균수를 측정하였고, 상기 실험을 3회 반복하여 측정한 결과를 평균치로 계산하여, 인공위액 및 인공담즙액에 대한 저항성을 도 8에 나타내었다.

[0172] 상기 도 8에 나타낸 바와 같이, 인공위액(pH 2.5, pepsin)에서 2시간 처리 후, 연속적으로 인공담즙으로 24시간 처리한 경우에, 생균수는 $9.11 \log \text{CFU/mL}$ 로 초기균수인 $9.39 \log \text{CFU/mL}$ 에 비하여 감의 감소하지 않고, 초기균수를 유지하여, 즉, 상기 루코노스톡 시트름 GR1은 인공위액 및 인공담즙의 처리한 후에도 초기균수의 97%의 생존율을 나타내어, 높은 인공위액에 대한 저항성 및 인공담즙에 대한 저항성이 확인되어, 생균활성제 또는 프로바이오틱 미생물로 기능할 수 있을 것으로 예상되었다. 즉, 상기 루코노스톡 시트름 GR1을 구강으로 섭취하는 경우, 우수한 위액 및 담즙에 대한 내성으로 인해 목적부위인 장에 도달하여 인체에 정장작용을 할 수 있을 것으로 기대된다.

[0173] 4-2. 장내 부착능

[0174] 상기 루코노스톡 시트름 GR1의 장내 부착능을 Caco-2 세포주를 이용하여, Caco-2 세포주에 대한 부착능을 측정하였다.

[0175] 보다 구체적으로, 상기 루코노스톡 시트름 GR1을 30℃에서 24시간 동안 배양한 후, 4℃ 및 $9,500 \times g$ 의 조건에서 5분간 원심분리하여 상징액을 제거하고 균체를 회수하였다. 상기 회수한 균체의 농도를 phosphate buffered saline(PBS)으로 3번 세척하였다. 상기 Caco-2 세포주는 15일 배양하여 PBS로 2번 세척 한 후, 여기에 상기 루코노스톡 시트름 GR1을 10^8CFU/mL 가 되도록 넣고 항생제와 fetal bovine serum이 들어있지 않은 배지를 각 well마다 1 mL씩 넣었다. 상기 Caco-2 세포주에 상기 루코노스톡 시트름 GR1을 첨가한 후, 37℃ 및 5% CO_2 조건하에서 1시간동안 배양하고, 부착되지 못한 유산균을 버리기 위해 PBS로 세 번 세척하였다.

[0176] 이 후, 각 well에 메탄올을 1 mL씩 넣고, 5분 동안 세포가 cover slip에 고정되도록 한 후, Gram 염색(staining)하고 광학 현미경으로 관찰하였다. 또한, plate counting을 위해 각 well 마다 0.05% tritition X-100을 사용하여, 상기 췌장 세포 및 상기 루코노스톡 시트름 GR1을 well plate 바닥에서 떼어내고 일정 수준으로 희석 후, 생균수를 측정하였다. 상기 생균수를 측정하기 위하여, 각 well 마다 0.05% tritition X-100 1 mL를 넣고, 10분 동안 흔들어 준 후, 10^4 배 희석하여 MRS 배지에 도말하고, 30℃에서 2일 동안 배양한 후, 생균수를 측정하는 방법으로 수행하였다. 비교예로 장내부착능이 우수한 것으로 알려진 락토바실러스 람노서스 GG(*Lactobacillus rhamnosus* GG)와 또 다른 김치유산균인 락토바실러스 부취너리 MS(*Lactobacillus buchneri* MS KCTC 10922BP)를 사용하여 비교하였다. 상기 측정결과를 하기 표 6에 나타내었다.

표 6

균종 명(Strain name)	처리 전(CFU/mL/well)	처리 후(CFU/mL/well)	부착율(%)
<i>Lb. rhamnosus</i> GG	4.24×10^8	4.03×10^6	0.95 ± 0.32
<i>L. citreum</i> GR1	1.21×10^8	9.06×10^5	0.75 ± 0.46
<i>Lb. acidophilus</i>	3.71×10^8	3.03×10^5	0.082 ± 0.05

[0178] 상기 표 6에 나타낸 바와 같이, 장내부착능이 우수한 균주인 락토바실러스 람노서스 GG의 경우 $4.24 \times 10^8 \text{CFU/mL}$ 의 균수를 Caco-2 세포주에 1시간 동안 처리한 경우, 4.03×10^6 의 균수가 남아 부착율 0.95%의 부착능을 나타내었다. 한편, 락토바실러스 부취너리 MS는 3.71×10^8 의 균수를 1시간 처리시, 3.03×10^5 의 균수가 남아있어 0.082%의 부착능을 나타내었다. 또한, 상기 루코노스톡 시트름 GR1은 1.21×10^8 의 균수를 1시간 동안

처리시, 9.06×10^5 의 군수가 남아있어, 0.75%의 부착능을 나타내었다.

[0179] 상기 루코노스톡 시트름 GR1은 락토바실러스 부취너리 MS 보다 부착능이 9배 이상 우수한 것으로 확인되었고, 부착능이 우수한 것으로 알려진 락토바실러스 람노시스 GG의 부착능의 약 80% 정도의 부착능을 나타내어, 상기 락토바실러스 시트름 GR1은 장내에서의 부착 가능성이 매우 높을 것으로 예상되었다.

[0180] 4-3. 용혈성 독성 확인

[0181] 상기 루코노스톡 시트름 GR1이 생균활성제 또는 프로바이오틱 미생물로 활용되기 위해서는 인체에 대한 용혈성 독성이 없는 안전성이 요구된다. 이와 관련하여, 상기 항균활성이 인정되는 루코노스톡 시트름 GR1이 적혈구의 파괴 또는 분해를 유도할 수 있는지 여부와 관련하여, 용혈성 여부를 검사하였다.

[0182] 상기 용혈성 확인은 Blood agar base(Oxoid, England)를 멸균 후에, 7% horse blood(Oxoid, England)를 첨가하고, 평판배지를 만든 후에 상기 루코노스톡 시트름 GR1을 도말(streaking)한 후, 30℃에서 48시간 배양하여 균체주위에 투명환의 생성여부로 용혈성을 판단하였으며, 그 결과를 도 9에 나타내었다.

[0183] 상기 도 9에 나타난 바와 같이, 상기 루코노스톡 시트름 GR1은 용혈성 검사에서 균체주위에 적혈구가 파괴되어 생기는 투명환이 전혀 생성하지 않아 용혈반응을 유도하지 않는 것으로 확인되었다. 따라서, 상기 루코노스톡 시트름 GR1은 유해균주에 대하여 항균작용은 있으나 용혈성과 같은 인체에 대한 유해작용은 없는 것으로 확인되어, 생균활성제 또는 프로바이오틱 미생물로서의 안전성이 있는 것으로 확인되었다.

[0184] 4-3. 효소 활성의 확인

[0185] 프로바이오틱 미생물이 가지는 특성 중, 효소 활성은 인체에 대한 안전성과 관련된 중요한 부분이다. 일 예로, β -glucuronidase는 발암효소로서 benzo(a)pyrene 등의 발암물질이 체내에 들어오면 간에서 glucuronic acid와 포함되어 해독작용이 이루어지지만, 이것이 담즙과 함께 장내에 배설되어 장내 세균의 β -glucuronidase에 의해 탈포합되면서 다시 독성을 가지게 된다. 그러므로, 생균활성제 또는 프로바이오틱 미생물은 발암효소인 β -glucuronidase의 활성을 가지지 않아야 한다.

[0186] 이러한 효소 활성과 관련하여, 상기 루코노스톡 시트름 GR1의 효소 활성을 API ZYM kit을 이용하여 확인하였고, 그 결과를 하기 표 7에 나타내었다.

표 7

No.	Enzyme	GR1	No.	Enzyme	GR1
1	Control	-	11	Acid phosphatase	+
2	Alkaline phosphate	-	12	Naphtol-AS-BI-phosphohydrolase	+
3	Esterase(C4)	-	13	α -Galactosidase	-
4	Esterase lipase(C8)	-	14	β -Galactosidase	-
5	Lipase(C14)	-	15	β -Glucuronidase	-
6	Leucine arylamidase	-	16	α -Glucosidase	+
7	Valine arylamidase	-	17	β -Glucosidase	-
8	Crystine arylamidase	-	18	N-Acetyl- β -glucosaminidase	-
9	Trypsin	-	19	α -Mannosidase	-
10	α -Chymotrypsin	-	20	α -Fucosidase	-

[0187]

[0188] 상기 표 7에 나타난 바와 같이, 상기 루코노스톡 시트름 GR1은 발암효소인 β -glucuronidase에 대한 활성이 없는 것으로 나타났고, 예비적 발암 물질을 발암 물질로 변환시키는 β -glucosidase의 활성도 없는 것으로 확인되었다. 상기 결과로부터 루코노스톡 시트름 GR1은 프로바이오틱 균주로서 발암 유발의 위험이 없는 매우 안전한

미생물임을 알 수 있었다.

[0189] 상기 결과로부터, 본 발명의 균주인 루코노스톡 시트류 GR1은 내위액 및 담즙액에 대한 저항성이 우수하여, 경구섭취 시 다량의 생균이 장내에 도착할 수 있는 것은 물론, 장내에 부착하여 활동할 수 있을 뿐만 아니라, 용혈성 독성 및 효소독성도 없는 것으로 확인되었으므로, 상기 루코노스톡 시트류 GR1은 프로바이오틱 미생물 또는 생균활성제로 유용하게 사용할 수 있는 것으로 확인되었다.

[0190] <실시예 5> 루코노스톡 시트류 GR1을 이용한 제조된 김치에서의 활성

[0191] 5-1. 만니톨 생성 균주를 이용한 김치의 제조

[0192] 상기 실시예 1에서 동정되고 실시예 2 내지 실시예 4에서 그 우수성이 확인된 상기 루코노스톡 시트류 GR1을 이용하여 김치를 제조하였다. 상기 루코노스톡 시트류 GR1을 사용한 것을 제외하고는 실제 가정에서 김치를 담그는 조건과 동일한 조건으로 김치를 제조하였다.

[0193] 구체적으로, 4등분한 배추를 염도가 16.6%인 천일염 용액에 6시간 절이고, 흐르는 물에 3회 세척한 후, 4℃에서 5시간 탈수하여 절임배추를 제조하였다. 상기 절임배추(100g)에 고춧가루 2.7 g, 무 1.22 g, 파 1.33 g, 마늘 1.33 g, 생강 0.5 g, 당근 0.66 g, 젓갈 4.06 g, 참쌀풀 6.1 g 및 과당 1.1 g 등의 부재료를 혼합하여 만든 양념을 가하여, 최종염도 2.4%가 되도록 제조하였다. 상기 절임배추에 양념을 절여 제조한 김치에 상기 실시예 3-2와 같이 감수성균주 *Lb. plantarum* KFRI 464의 세포 파쇄물로 박테리옌 생성능을 강화시켜 배양된 상기 루코노스톡 시트류 GR1을 상기 김치 1 g당 10^7 CFU가 되도록 첨가하여, 종균첨가김치를 제조하였다. 대조군으로는 상기 루코노스톡 시트류 GR1을 첨가한 것을 제외하고는 모든 조건을 동일조건으로 제조된 종균비첨가 김치를 사용하였다. 상기 제조된 김치들은 7℃에서 12일간 저장하여 최적가식 산도인 0.5% 내지 0.6%에 이르게 한 후, -1℃에서 저장하였다.

[0194] 상기 제조된 김치를 이용한 하기 실험은 상기 김치를 각 단계별로 수득하여, hand blender(Hanil Co., 대한민국)로 2분간 마쇄 후, 멸균거즈로 여과한 김치액을 제조하여, 이를 이용하여 수행하였다

[0195] 5-2. 김치의 특성 확인

[0196] 상기 루코노스톡 시트류 GR1을 종균으로 사용한 경우, 김치에 미치는 영향을 확인하기 위하여, 김치의 pH, 산도를 확인하였다. 또한, 상기 루코노스톡 시트류 GR1이 종균으로 사용될 수 있는지 여부를 확인하기 위하여, 김치 내 균총 및 분리 균주 중 루코노스톡 시트류 GR1이 차지하는 비율을 확인하였다.

[0197] 상기 김치의 pH 측정은 pH meter(Denver Instrument, Arvada, USA)를 사용하여 실온에서 측정하였다. 상기 산도는 AOAC법에 의해 상기 실시예5-1에서 제조된 김치액 10 mL에 0.1 N NaOH 용액을 적정하여 pH 8.3이 되도록 조절한 후, 0.1 N NaOH 용액의 소비량(mL)를 측정하고, 하기 계산식에 의해 총산량(total acidity, %)을 구하는 방법으로 수행하였다.

[0198] [계산식]

[0199] 총산량(%) = 0.1 N NaOH 용액의 소비량(mL) x 0.1 N NaOH 용액의 factor x 0.1 N NaOH 용액의 1 mL 에 상당하는 유기산 계수(젓산인 경우 0.009).

[0200] 상기 김치 내 균총 및 분리 균주 중 루코노스톡 시트류 GR1이 차지하는 비율을 확인하기 위해 다음과 같은 배지를 사용하였다. 우선, 총균수를 확인하기 위하여, PCA 배지(Plate Count Agar, Merck, Dann stadt, 독일)를 사용하였고, 유산균수를 확인하기 위하여, MRS 고체배지와 CaCO₃가 2% 함유된 MRS 고체배지를 사용하였다. 상기 균총의 확인은 상기 실시예5-1에서 제조된 김치여액을 0.1% peptone water로 10배씩 희석하고, 각각의 평판배지에 도말하여 30℃에서 3일간 배양한 후, 균주를 확인하는 방법으로 수행하였다.

[0201] 상기 루코노스톡 시트류 GR1의 확인은 MRS 고체배지와 CaCO₃가 2% 함유된 MRS 고체배지에서 형성된 유산균 중 상기 루코노스톡 시트류 GR1의 선별은 콜로니 형태를 관찰하여 밝은 노란색(light-yellow)인 콜로니를 1차적으로 선별한 후, 5% fructose가 첨가된 액체배지에 30℃에서 48시간 배양하여 만니톨 생성 여부를 TLC로

확인하여, 최종적으로 루코노스톡 시트류 GR1인지 여부를 결정하는 방법으로 수행하였다.

[0202] 상기 측정결과를 하기 표 8 및 표 9와 도 10 및 도 11에 나타내었다. 하기 표 8은 상기 루코노스톡 시트류 GR1을 종균으로 사용하여 제조한 김치에 관한 것이고, 하기 표 9는 루코노스톡 시트류 GR1을 종균으로 사용하지 않은 대조군에 관한 것이다.

표 8

GR1 starter kimchi									
항목		7℃				-1℃			
		0	4	7	11	12	6	15	24
pH		6.112	6.082	5.977	4.989	4.450	4.384	4.323	4.287
산도(%)		0.183	0.198	0.25	0.46	0.63	0.66	0.69	0.72
염도(%)		2.30	2.25	2.08	2.37	2.23	2.53	2.26	2.24
당도(brix)		14.25	14.00	17.50	17.00	14.75	14.00	14.50	14.00
균총	총균	3.4×10^7	5.1×10^7	4.2×10^8	9.2×10^8	8.6×10^8	2.6×10^{10}	7.4×10^8	5.3×10^8
	유산균	2.1×10^7	4.6×10^7	2.1×10^8	7.3×10^8	8.1×10^8	1.6×10^{10}	5.1×10^8	1.6×10^8
	GR1	85.7%	83.5%	78.1%	83.5%	73.3%	61.6%	66.6%	62.5%
	구균	9.5%	16.5%	17.8%	16.5%	2.3%	14.5%	27.5%	37.5%
	간균	4.8%	-	-	4.1%	24.4%	23.9%	5.9%	-

[0203]

표 9

non-starter kimchi									
항목	7℃					-1℃			
	0	4	7	11	12	6	15	24	
pH	6.114	6.084	5.989	4.858	4.653	4.281	4.207	4.198	
산도(%)	0.183	0.195	0.23	0.48	0.60	0.79	0.84	0.93	
염도(%)	2.26	2.31	2.18	2.38	2.26	2.45	2.32	2.22	
당도(brix)	14.50	16.00	16.50	16.00	14.50	15.50	13.00	13.75	
균총	총균	5.5×10^5	2.9×10^8	5.3×10^8	7.5×10^8	8.0×10^8	1.5×10^{10}	3.4×10^8	1.7×10^8
	유산균	2.8×10^4	3.5×10^5	1.5×10^8	2.4×10^8	2.7×10^8	1.1×10^{10}	8.7×10^8	5.6×10^8
	구균	92.8%	94.3%	73.3%	66.7%	77.7%	66.6%	16.1%	8.9%
	간균	7.2%	5.7%	26.7%	33.3%	22.3%	33.4%	83.9%	91.1%

[0204]

[0205] 상기 표 8 및 표 9에 나타난 바와 같이, 상기 루코노스톡 시트류 GR1을 첨가한 김치와 상기 루코노스톡 시트류 GR1을 첨가하지 않은 대조군 김치에서 7℃로 12일까지 발효하는 경우의 pH 및 산도의 변화가 비슷한 경향을 나타내었으며, 발효 12일에 산도는 약 0.6% 정도인 것으로 확인되었다. 그러나, 7℃에서 발효 12일에 산도 0.6%에 이른 두 김치를 김치냉장고에서 -1℃로 저장한 결과, 상기 루코노스톡 시트류 GR1을 첨가한 김치에 비해 상기 루코노스톡 시트류 GR1을 첨가하지 않은 대조군 김치의 산도가 더 급격히 증가되는 것으로 확인되었다.

[0206] 또한, 상기 루코노스톡 시트류 GR1을 첨가한 김치 내 총균수는 7℃에서 발효 초기 3.4×10^7 CFU/mL에서 발효 12일에 8.6×10^8 CFU/mL로 증가하였으며, 김치냉장고에서 저장한 경우 24일까지 10^9 CFU/mL를 유지하였다. 한편, 대조군 김치에서는 발효 초기 5.5×10^5 CFU/mL에서 발효 12일에 8.0×10^8 CFU/mL로 급격히 증가하였으며, 김치냉장고에서 저장한 경우 24일까지 10^9 CFU/mL를 유지하였다.

[0207] 또한, 상기 루코노스톡 시트류 GR1을 첨가한 김치 내 유산균수는 7℃에서 발효 초기 2.1×10^7 CFU/mL에서 발효 12일에 8.1×10^8 CFU/mL로 증가하였으며, 김치냉장고에서 저장한 경우 24일까지 10^9 CFU/mL를 유지하였다. 상기 유산균 중 루코노스톡 시트류 GR1의 점유율은 7℃에서 발효 초기 85.7%를 차지하였으며, 발효 12일에 73.3%, 김치냉장고에서 저장한 경우, 24일까지 60% 이상을 유지하였다. 한편, 대조군 김치 내 유산균수는 7℃

에서 발효 초기 2.8×10^4 CFU/mL에서 발효 12일에 2.7×10^9 CFU/mL으로 증가하였으며, 김치냉장고에서 저장한 경우, 24일에 10^8 CFU/mL으로 감소되었다.

[0208] 상기 결과로부터 상기 루코노스톡 시트름 GR1을 첨가한 경우, 산도의 증가폭이 낮아 김치를 저장하는 동안 신맛이 강해지는 관능적인 문제점을 해결할 수 있을 것으로 예상되었다. 또한, 상기 루코노스톡 시트름 GR1은 종균으로 사용한 시점에서 발효기간 및 저장기간 동안 계속적으로 우점적으로 유지되었으며, 상기 루코노스톡 시트름 GR1의 위해 미생물에 대한 항균 활성 및 정상젖산발효균인 락토바실러스 플란타리움 등에 대한 항균 활성으로 인해, 김치의 산도증가 및 신맛이 강해지는 관능상의 문제점을 해결할 수 있는 것으로 기대되었다.

[0209] 또한, 상기 루코노스톡 시트름 GR1은 루코노스톡 속 유산균임에도 불구하고, 도 10에서 확인되는 바와 같이, 상기 실시예 5-1의 김치액을 CaCO_3 가 2% 함유된 MRS 고체배지에 도말한 경우, 콜로니가 노란색(light-yellow)으로 나타나, 콜리니의 색깔만으로도 균주의 구분이 용이한 것으로 확인되었다.

[0210] 이를 추가적으로 확인하기 위하여, 본 발명자들이 확보하고 있는 루코노스톡 속에 해당하는 다른 유산균인 다른 루코노스톡 시트름 GJ7(대한민국 등록특허 제0528641호), 루코노스톡 시트름 C3(대한민국 등록특허 제0808956호) 및 루코노스톡 시트름 C16(대한민국 등록특허 제986292호)와 함께 배양하여, 콜로니의 색깔을 비교하여, 그 결과를 도 11에 나타내었다.

[0211] 상기 도 11에 나타난 바와 같이, 다른 루코노스톡 시트름의 특허균주의 콜로니는 아이보리 색(ivory)을 나타낸 반면, 상기 루코노스톡 시트름 GR1은 밝은 노란색(light-yellow)를 나타내어, 상기 균주의 색깔이 현저하게 구분되었다. 따라서, 상기 루코노스톡 시트름 GR1은 고체배지에서의 배양만으로도 해당 균주를 사용하는지 여부를 용이하게 관찰할 수 있어서, 종균으로 사용되는 경우 해당 균주의 사용여부를 용이하게 판단할 수 있다는 장점이 있는 것으로 확인되었다.

[0212] 5-3. 김치 내 생산된 만니톨의 확인

[0213] 상기 루코노스톡 시트름 GR1을 종균으로 사용한 경우, 김치에서 만니톨의 생성 여부를 확인하기 위하여, 상기 실시예 5-1의 김치 시료액을 이용하여, 상기 실시예 1-2와 같은 방법으로 TLC와 HPLC를 수행하였다.

[0214] 보다 구체적으로, 상기 루코노스톡 시트름 GR1을 종균으로 사용한 김치를 각 발효 및 저장 단계별로 수득하여, hand blender(Hanil Co., 대한민국)로 2분간 마쇄 후, 4°C 및 $9950 \times g$ 의 조건으로 15분 동안 원심분리하고 수득한 상등액을 filter No. 1(Waters Co.)을 사용하여 여과한 후, $0.45 \mu\text{m}$ membrane filter로 여과하여 제공하였다. 상기 김치 시료액은 2배 희석하여, $4 \mu\text{L}$ 를 TLC에 점적하였고, HPLC 분석에서는 $1 \times 10 \mu\text{L}$ 를 주입하였다. 대조군으로 상기 실시예 5-1에서 제조된 대조군 김치를 상기와 같은 방법으로 제조한 김치 시료액을 사용하였다. 상기 TLC 결과를 도 12에 나타내었고, 상기 HPLC 결과를 도 13에 나타내었다.

[0215] 상기 도 12에 나타난 바와 같이, 상기 루코노스톡 시트름 GR1을 종균으로 사용한 김치의 경우, 7°C 에서 발효 11일째부터 확실한 만니톨(mannitol spot)이 검출되어, 상기 루코노스톡 시트름 GR1을 종균으로 사용하는 경우 김치 내 만니톨이 생성되는 것이 확인되었다. 한편, 종균을 사용하지 않은 대조구에서는 만니톨이 거의 생성되지 않는 것으로 확인되었다.

[0216] 상기 도 12를 통하여 만니톨 생성이 확인된 결과를 기초로, 상기 루코노스톡 시트름 GR1을 종균으로 사용한 김치에서 생성된 만니톨의 함량을 정량적으로 분석하였다. 상기 HPLC로 분석한 도 13에 나타난 바와 같이, 상기 루코노스톡 시트름 GR1을 종균으로 사용하는 경우 김치는 7°C 에서 발효 4일째 1.011 mg/kg 의 만니톨이 검출되었고, 상기 함량은 계속 증가하여 발효 12일째 13.607 mg/kg 이 검출되었으며, 김치냉장고에서 저장한 후, 24일이 경과된 시점에서도 15.187 mg/kg 이 검출되어, 저온 저장에서도 만니톨이 계속적으로 생산되는 것으로 확인되었다.

[0217] 상기 결과로부터 상기 루코노스톡 시트름 GR1을 종균으로 사용하는 경우, 상기 루코노스톡 시트름 GR1이 우점종으로 자리매김하여, 김치의 산도 증가를 억제할 뿐 아니라, 김치에 단맛과 시원한 맛을 제공하는 만니톨을 계속적으로 생산하여, 김치의 관능개선에 따른 품질향상 및 보관성 증대에 이바지할 수 있을 것으로 예상되었다.

수탁번호

[0218]

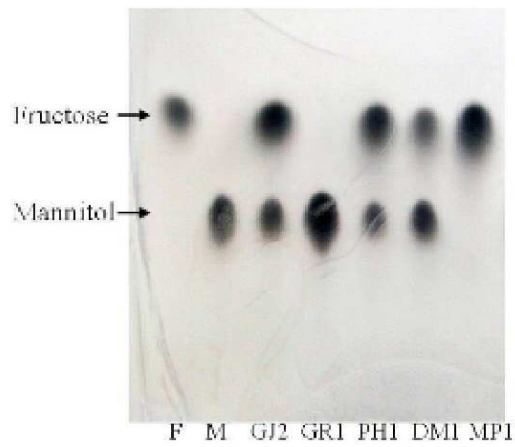
기탁기관명 : 한국미생물보존센터(국내)

수탁번호 : KFCC11511P

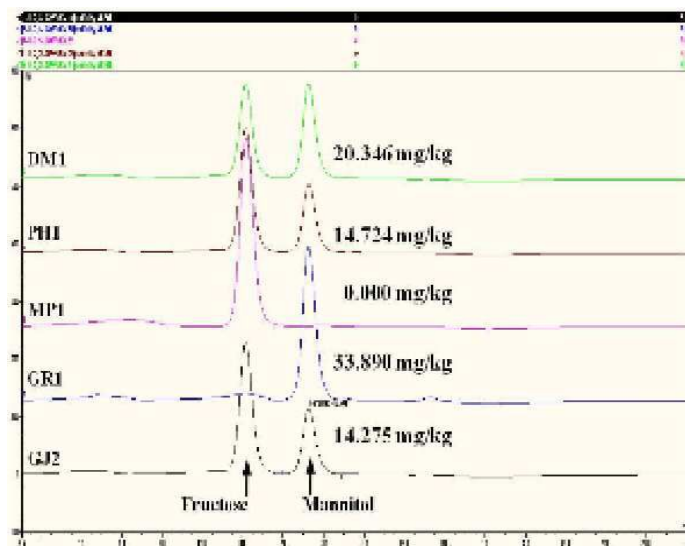
수탁일자 : 20110401

도면

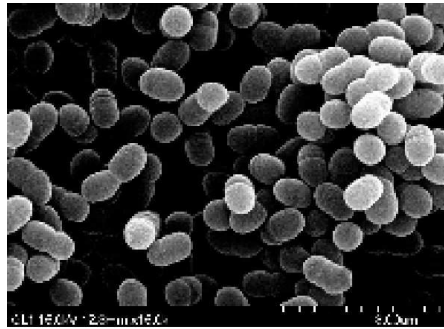
도면1



도면2



도면3



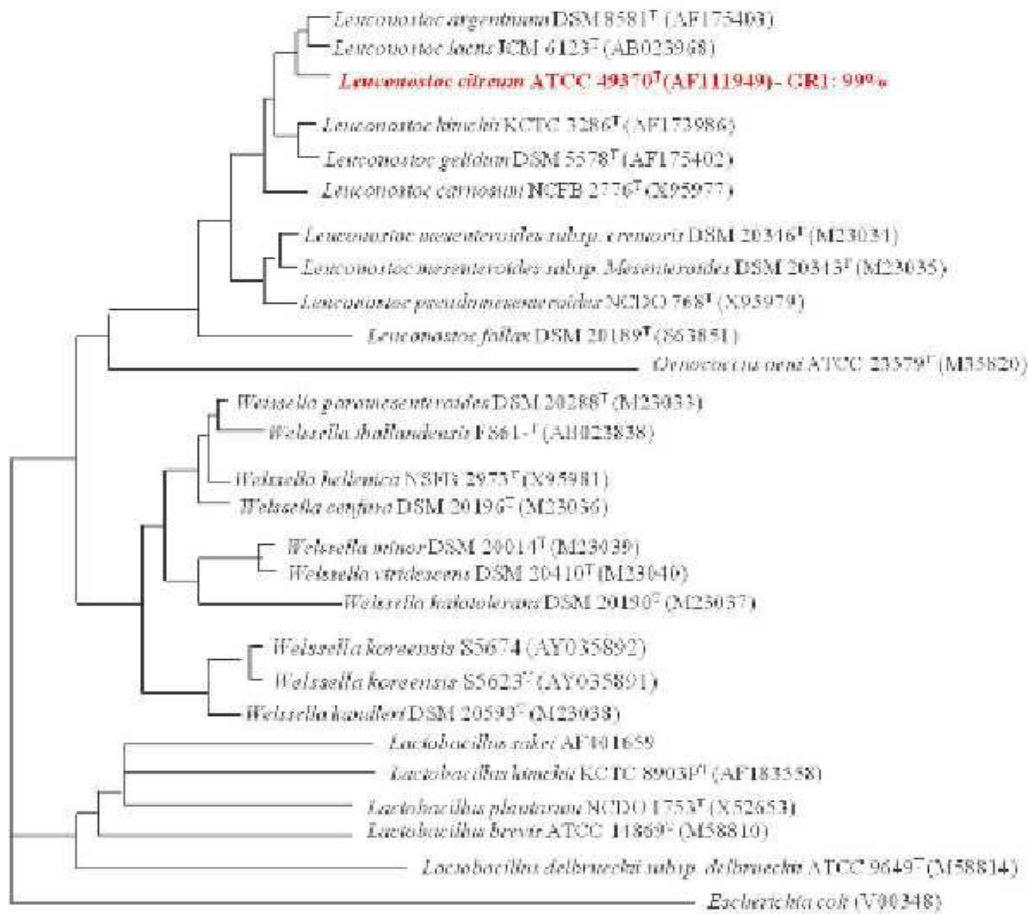
도면4

```

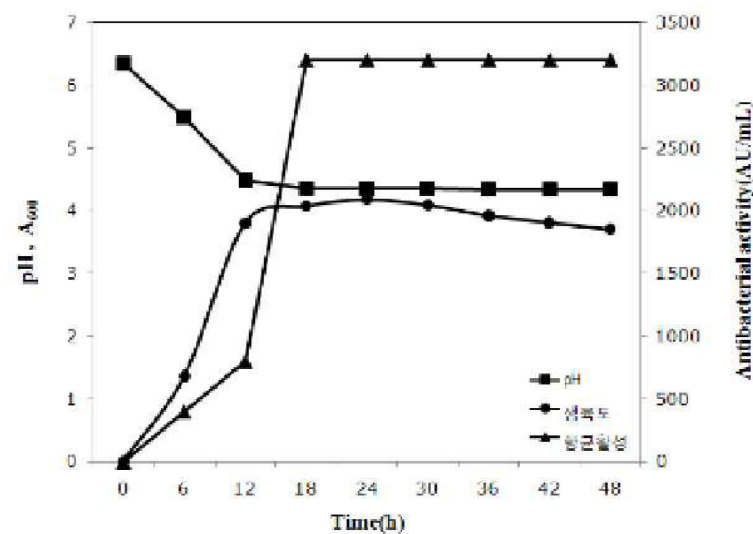
1  CAGGCTCAGG ATGAACGCTG GCGGCGTGCC TAATACATGC AAGTCGAACG CGCAGCGAGA
61 GGTGCTTGCA CCTTTCAAGC GAGTGGDGAA CGGGTGAGTA ACACGTGGAT AACCTGCCCTC
121 AAGGCTGGGG ATAACATTTG GAAACAGATG CTAATACCGA ATAAAACCTA GTATGBCATG
181 ATATCAAGTT AAAAGGCGCT ACGGCGTCAC CTAGAGATGG ATCCGCGGTG CATTAGTTAG
241 TTGGTGGGGT AAAGGCTTAC CAAGACGATG ATGCATAGCC GAGTTGAGAG ACTGATCGGC
301 CACATTGGGA CTGAGACACG GCCCAAACTC CTACGGGAGG CTGCAGTAGG GAATCTTCCA
361 CAATGGGCGC AAGCCTGATG GAGCAACGCC GCGTGTGTGA TGAAGGCTTT CCGGTCGTAA
421 AGCACTGTTG TATGGGAAGA AATGCTAAAA TAGGGAATGA TTTTAGTTTG ACGGTACCAT
481 ADDAGAAAGG GACGCTAAA TADGTGDCAG CAGCDGCGGT AATACGTATG TCCCGAGCGT
541 TATCCGGATT TATTGGGCGT AAAGCGAGCG CAGACGGTTG ATTAAGTCTG ATGTGAAAGC
601 CCGGAGCTCA ACTCGGAAT GGCATTGGA AACTGTTAAC TTGAGTGTG TAGAGGTAAG
661 TGGAACTCCA TGTGTAGCGG TGBAATGCGT AGATATATGG AAGAACAACA GTGGCGAAGG
721 CCGCTTACTG GACAACAAC GADGTTGAGG CTCGAAAGTG TGGGTAGCAA ACAGGATTAG
781 ATACCCTGGT AGTCCACACC GTAAACGATG AATACTAGGT GTTAGGAGGT TTCCGCTCT
841 TAGTGCCGAA GCTAACGCAT TAAGTATTCC GCTGGGGAG TACGACCGCA AGGTTGAAAC
901 TCAAGGGAAT TGACGGGGAC CCGCACAAAGC GGTGGAGCAT GTGGTTTAAT TCGAAGCAAC
961 GCGAAGAACC TTACCAGGTC TTGACATCCT TTGAAGCTTT TAGAGATAGA AGTGTCTCT
1021 TCGGAGACAA AGTGACAGGT GGTGCATGGT CGTCGTCAGC TCGTGTGCTG AGATGTTGGG
1081 TTAAGTCCCG CAACGAGCGC AACCTTATT GTTAGTTGCC AGCATTCACT TGGGCACTCT
1141 AGCGAGACTG CCGGTGACAA ACDGGAGGAA GCGGGGAGG ACBTCAGATC ATCATGCCDC
1201 TTATGACCTG GGCTACACAC GTGCTACAA GTGCTATACA ACGAGTTGCC AACCTGCGAA
1261 GGTGAGCTAA TCTCTTAAAG TADGTCTCAG TTCGACTGC AGTCTGCAAC TCGACTGCAC
1321 GAAGTCGSA TCGCTAGTAA TCGCGGATCA GCACGDCGDS GTGAATAAGT TCCCGGGTCT
1381 TGTACACACC GCCCGTCACA CCATGGGAGT TTGTAATGCC CAAAGCCGGT GGCCTAACCT
1441 TCGGGAGGGA GCGTCTAAG CAGGACAGAT GACTGGGGTG AGTCTACA

```

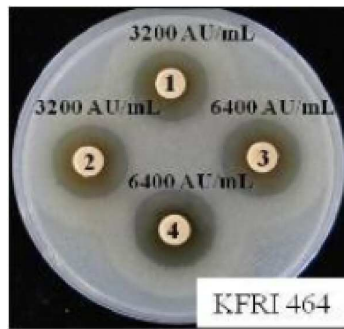
도면5



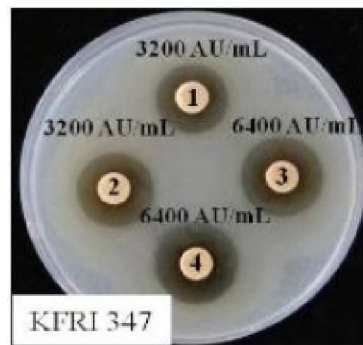
도면6



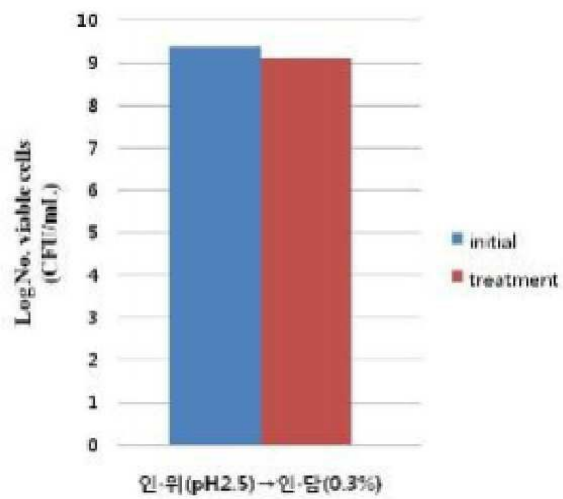
도면7a



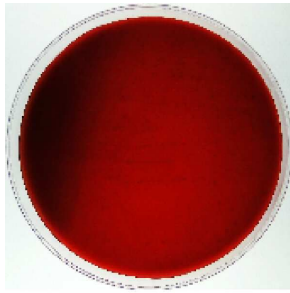
도면7b



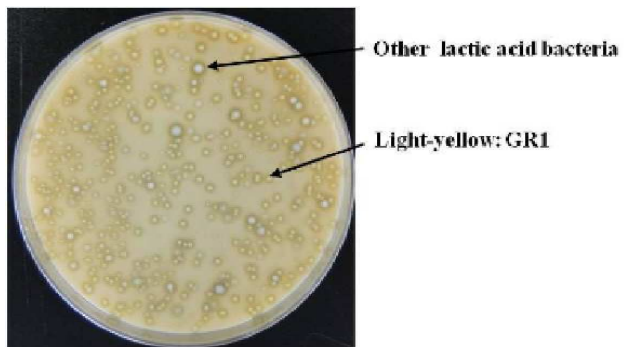
도면8



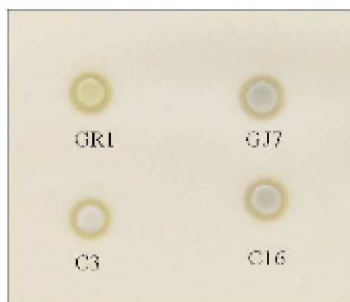
도면9



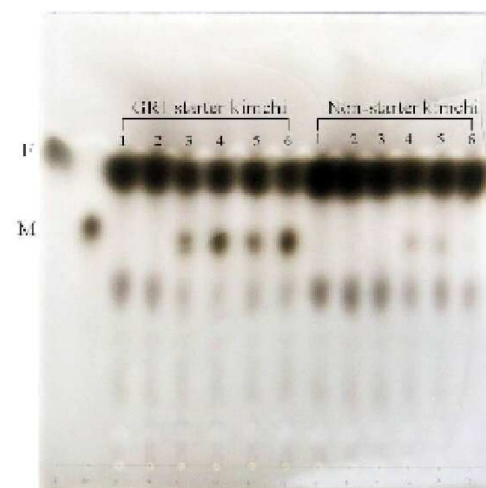
도면10



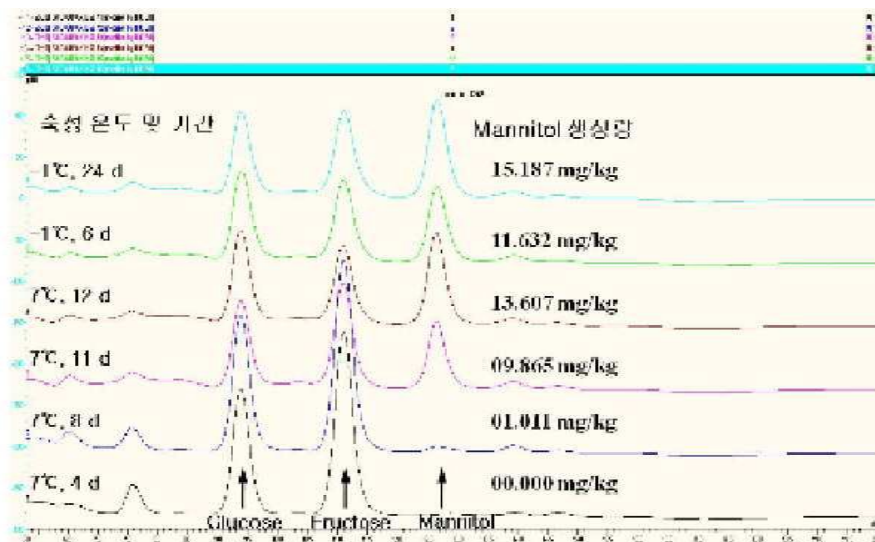
도면11



도면12



도면13



서열 목록

- <110> Industry-Academic Cooperation Foundation Chosun University
- <120> LACTIC ACID BACTERIUM SEPARATED FROM KIMCHII AND FERMENTED FOOD USING THE STRAIN
- <130> DP20110132
- <160> 3
- <170> Kopatent In 1.71
- <210> 1
- <211> 20
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence
- <220><223> 518F primer
- <400> 1
- ccagcagccg cggtaatacg
- <210> 2
- <211> 18
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence
- <220><223> 800R primer

20

- <400> 2
- taccagggtg tctaattcc
- <210> 3

18

<211> 1488

<212> DNA

<213> GR1 16S rRNA

<400> 3

caggctcagg atgaacgctg gcggcgtgcc taatacatgc aagtcgaacg cgcagcgaga	60
gggtgcttgca cttttcaagc gagtggcgaa cgggtgagta acacgtggat aacctgcctc	120
aaggctggggg ataacatttg gaaacagatg ctaataccga ataaaactta gtatcgcatg	180
atatcaagtt aaaaggcgct acggcggtcac cttagagatgg atccgcggtg cattagttag	240
ttggtgggggt aaaggcttac caagacgatg atgcatagcc gagttgagag actgatcggc	300
cacattggga ctgagacacg gccc aaactc ctacgggagg ctgcagtagg gaatcttcca	360
caatgggcgc aagcctgatg gagcaacgcc gcgtgtgtga tgaaggcttt cgggtcgtaa	420
agcactgttg tatgggaaga aatgctaaaa tagggaatga ttttagtttg acggtacat	480
accagaaagg gacggctaaa tacgtgccag cagccgcggt aatacgtatg tcccagcgt	540
tatccggtat tatttggcgct aaagcgagcg cagacggttg attaatgtctg atgtgaaagc	600
ccggagctca actccggaat ggcatgtgaa actggttaac ttgagtgttg tagaggttaag	660
tggaactcca tgtgtagcgg tggaatgcgt agatatatgg aagaacacca gtggcgaagg	720
cggttactg gacaacaact gacgttagagg ctcgaaagtg tgggtagcaa acaggattag	780
ataccctggt agtccacacc gtaaacgatg aatactaggt gttaggaggt ttccgcctct	840
tagtgccgaa gctaacgcat taagtattcc gcctggggag tacgaccgca aggttgaaac	900
tcaaaggaat tgacggggac ccgcacaagc ggtggagcat gtggtttaat tcgaagcaac	960
gcgaagaacc ttaccaggtc ttgacatcct ttgaagcttt tagagataga agtgttctct	1020
tcggagacaa agtgacaggt ggtgcatggt cgtcgtcagc tcgtgtcgtg agatgttggg	1080
ttaagtcccg caacgagcgc aacccttatt gttagttgcc agcattcagt tgggcactct	1140
agcgagactg ccggtgacaa accggaggaa ggccggggacg acgtcagatc atcatgcccc	1200
ttatgacctg ggctacacac gtgctacaat ggcgatatca acgagttgcc aacctgcgaa	1260
ggtagactaa tctcttaaag tacgtctcag ttcggactgc agtctgcaac tcgactgcac	1320
gaagtccgaa tcgctagtaa tcgcggatca gcacgccgcg gtgaatacgt tcccgggtct	1380
tgtacacacc gcccgtcaca ccatgggagt ttgtaatgcc caaagccggt ggcctaacct	1440
tcgggaggga gccgtctaag caggacagat gactggggtg agtctaca	1488