(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2019년12월26일
(11) 등록번호 10-2059623
(24) 등록일자 2019년12월19일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 1/20 (2006.01) *A21D 8/04* (2017.01)
C12R 1/25 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 1/20 (2013.01)
A21D 8/04 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2018-0164287
(22) 출원일자 2018년12월18일
심사청구일자 2018년12월18일
(56) 선행기술조사문헌
KR100747754 B1
(뒷면에 계속)

(73) 특허권자
에스피씨 주식회사
경기도 성남시 중원구 사기막골로31번길 18 (상대원동)
(72) 발명자
서진호
서울시 서초구 방배로239 멤피스현대 아파트 101동 903호
한남수
세종시 도담동 도램마을 1204동 1703호
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인태동

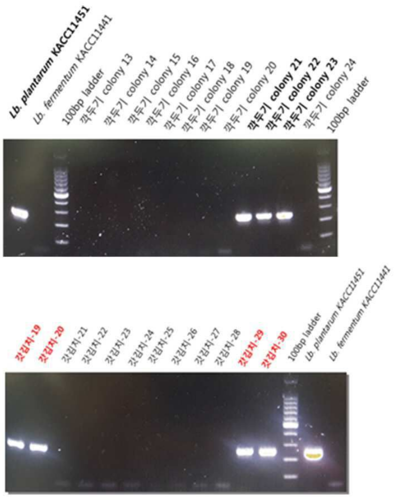
전체 청구항 수 : 총 3 항 심사관 : 김지연

(54) 발명의 명칭 **면역 조절 활성 및 제빵 적성이 우수한 프로바이오틱 유산균**

(57) 요 약

본 발명은 면역 조절 활성 및 제빵 적성이 우수한 프로바이오틱 유산균에 관한 것으로, 본 발명의 프로바이오틱 유산균은 면역 조절 활성이 특히 우수하고, 그 외에 산·담즙 내성이 우수하다. 본 발명의 프로바이오틱 유산균을 제빵효모와 함께 반죽 발효시, 빵의 물성, 향미, 유통기간을 개선하고, 높은 생존율 및 프로바이오틱의 면역 조절 활성을 가지는 빵을 제조할 수 있다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류
C12R 1/25 (2013.01)

(72) 발명자
강신달
서울특별시 광진구 자양번영로 59, 111동 307호
송성봉
서울시 관악구 호암로 399 삼성산주공 307동 406호
이덕범
서울특별시 서초구 남부순환로 2311-12 래미안방배 아트힐 110동 1901호

(56) 선행기술조사문헌
KR101551836 B1
KR101551837 B1
KR1020160144229 A
WO2007058614 A1
KR1020080080981 A*
Journal of Cereal Science, Vol.42, pp.300-308(2005.)*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

명 세 서

청구범위

청구항 1

pH 3.0에서도 산 내성을 나타내는 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) SPC-SNU 72-1 (KCTC13314BP).

청구항 2

제1항의 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) SPC-SNU 72-1 (KCTC13314BP)을 밀가루에 첨가한 후 발효시켜 제조된 것을 특징으로 하는 제빵용 반죽물.

청구항 3

제1항의 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) SPC-SNU 72-1 (KCTC13314BP)을 밀가루에 첨가한 후 발효시키고, 베이킹(baking)하여 제조된 것을 특징으로 하는 빵.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 프로바이오틱 유산균에 관한 것으로, 더욱 구체적으로 면역 조절 활성 및 제빵 적성이 우수한 프로바이오틱 유산균에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0003] 프로바이오틱스(probiotics)란 체내에 들어가서 건강에 좋은 효과를 제공하는 살아있는 균을 말한다. 현재까지 알려진 대부분의 프로바이오틱스는 유산균이다. 러시아의 과학자 엘리 메치니코프(Elie Mechinikoff)가 불가리아 사람들이 장수를 누리는 이유가 락토바실러스(*Lactobacillus*)로 발효된 발효유의 섭취 때문이라는 것을 밝힌 이래로 유산균, 프로바이오틱스의 기능성은 오랫동안 연구되어 왔다. 유산균을 비롯한 세균들이 프로바이오틱스로 인정받기 위해서는 위산과 담즙산에서 살아남아 소장 및 대장까지 도달하여 장에서 증식, 정착하여야 하며, 장관 내에서 유용한 효과를 나타내어야 하고, 독성이 없으며 비병원성이어야 한다.

[0004] 장에 도달하여 장 점막에서 생육할 수 있게 된 프로바이오틱스는 젖산을 생성하여 장내 환경을 산성으로 만든다. 산성 환경에서 견디지 못하는 유해균들은 그 수가 감소하게 되고, 산성에서 생육이 잘되는 유익균은 더욱 증식하게 되어 장내 환경을 건강하게 만들어 주게 되는 것이다. 사람의 장에는 약 1kg의 균이 서식하고 있으며 음식물의 양과 균의 양이 거의 동일하게 존재하고, 매일 배설하는 분변 내용물도 수분을 제외하면 약 40%를 균이 차지한다. 사람의 분변을 현미경으로 관찰하면 거의 균 덩어리로 이루어져 있음을 알 수 있으며, 이들 균의 99% 정도는 혐기성균이다. 모유를 먹는 건강한 아기는 분변 균 중 90% 이상이 비피도박테리움(*Bifidobacterium*)으로 이루어져 있으나, 나이가 들면서 점차 비피도박테리움은 감소하고 장내 유해균은 증가하게 된다. 이러한 정상적인 노화 과정에서 장내 균총의 분포를 건강한 상태로 유지하도록 도와주는 것이 프로바이오틱스의 기능이다.

[0005] 프로바이오틱스 유산균의 주된 건강기능 중 한가지는 면역조절기능이며 장내에서 유산균이 생성한 초산(acetic acid), 프로피온산(propionic acid), 부틸산(butylic acid)과 같은 단쇄지방산에 의한 면역시스템의 활성화와 유산균 균체의 세포벽 성분인 다당체에 의한 장내 상피조직의 수지상세포 자극에 의한 기작이 알려졌다. 특히 세포벽 다당체에 의한 면역조절 기능은 생균(live cells)뿐만 아니라 사균(dead cells)에서도 유사한 수준으로 나타나는 것으로 알려져, 사균 섭취에 의한 면역조절기능은 잠재적으로 중요한 건강 유지 수단으로 간주되고 있

다. 국내에서는 유산균 사균체의 항균활성을 바탕으로 설사치료를 위한 원료의약품으로 사용되고 있고, 일본에서는 꽃가루 알러지 등 면역 관련 효능으로 사균체 제품이 개발되었다. 그 예로 일본에서 출시된 "FK-23" 제품은 유산균을 열처리한 사균체로 구성되며 면역활성 기능으로 C형 간염 치료제이고, "acidophilus L-92" 균주의 사균체도 면역 조절 활성을 제공하는 제품으로 개발되었다.

[0006] 면역 반응은 크게 선천면역(innate immunity)과 적응면역(adaptive immunity)으로 구분한다. 선천면역은 대식세포(macrophages)와 수지상세포(dendritic cells)가 관여하여 항원을 비특이적으로 인식 후 제거하는 과정인 반면, T-세포와 B-세포로 대표되는 적응면역 세포는 특이적으로 항원과 반응한다. 항원제시세포(antigen-presenting cells)로는 B-세포, 대식세포, 수지상세포가 있는데, 이들은 항원을 포획 후 분해하여 주조직적합성복합체(major histocompatibility complex, MHC)를 통해 세포표면에 항원 펩티드를 제시하고, T-세포의 수용체에 구조정보를 전달한다. 항원을 포획 후 활성화된 항원제시세포는 CD80, CD86, CD40과 같은 분자들의 발현을 유도하고 이들은 다시 T-세포의 활성화와 항원제시세포의 활성에 작용한다.

[0007] 예를 들어 B-세포와 활성화된 보조 T-세포 사이에 있는 CD40/CD40 결합을 통해 B-세포는 항체 IgM을 생성하다가 IgA, IgG, IgE로 생성반응이 변경될 수 있다. 활성화된 보조 T-세포는 존재하는 사이토카인에 따라서 Th1과 Th2 세포로 분화된다. 대식세포와 수지상세포가 미생물을 인식하고 사이토카인인 IL-12, IL-6, TNF-α을 분비하면 활성화된 보조 T-세포는 Th1 세포로 분화하고 IFN-γ:IL-4의 분비비율이 증가한다. 반대로 미생물에 의한 자극이 없으면 사이토카인은 활성화된 보조 T-세포를 Th2 세포로 분화되도록 유도하고 IFN-γ:IL-4의 분비비율은 감소하게 되어 결과적으로 B세포가 IgE를 생성하도록 유도한다. 이렇게 Th2 세포로 분화되는 경로는 IL-12 자극신호가 없을 경우에 기본적으로 진행되는 것으로 알려졌다. IgE 항체는 외부생물 감염시 꼭 필요한 방어수단이나 과도한 분비는 점막층에서 비만세포가 염증성 매개체를 분비하여 아토피, 비염, 가래 등과 같은 알러지 증상을 일으킨다. 잘 알려진 '위생 이론(hygiene theory)'에 의하면 적절한 미생물의 자극이 없으면 IL-12를 생성하는 선천성 면역 세포의 활성이 떨어지고 Th2 세포가 과도하게 활성화되어, IgE 생성이 촉진되고 알러지 증상이 증가하는 것으로 관찰된다. 결과적으로, Th1과 Th2 세포는 서로 길항 작용을 일으키기 때문에, Th2 세포의 과도한 면역 반응에 의해 유발되는 알러지의 치료는 Th1 세포에 의한 면역 반응을 유발한 치료법이 개발되고 있다.

[0008] 한편, 유산균은 제빵기술에 활발히 이용되는데, 효모와 유산균을 함께 밀가루 반죽에서 발효시키면 빵의 부피증가, 물성 개선, 풍미향상, 유통기한 연장 등 다양한 장점을 제공한다. 이러한 사워도우(Sourdough) 발효기술은 산성반죽 발효기술이라고도 하며 일반적으로 밀가루, 물, 호밀가루를 섞어 제조하며, 효모와 유산균이 각각 알코올과 젖산을 생성하여 빵에 풍미를 부여하고 기호성을 향상시킨다. 사워도우 발효와 관련된 유산균으로는 스트렙토코쿠스(*Streptococcus*) 속, 페디오코쿠스(*Pediococcus*) 속, 락토바실러스(*Lactobacillus*) 속, 류코노스톡(*Leuconostoc*) 속, 바이셀라(*Weissella*) 속 등이 알려졌다. 한편, 자연 발효법에 의존하는 전통적인 사워도우 빵(sourdough bread)은 작업 환경에서 유래하는 다양한 종류의 세균이 오염되어 풍미가 나빠지거나 산패취 등이 발생하는 문제점이 발생한다. 또한, 공간과 시간적 차이에 의해 균등한 품질의 제품을 재현하는데 어려움이 있다. 따라서, 자연 발효빵의 오염 기회 회피와 균등한 품질을 확보하고자 기능성과 안전성이 확보된 유산균 스타터(starter)를 반죽에 첨가하는 것이 필요하다. 이미 일부 국내 제빵 업체에서는 이를 위해 수입한 스타터(starter)를 사용하고 있으나 강한 산미를 제공하여 국내 소비자의 제빵 기호도에 적합하지 않거나 계대 배양 도중 균주 특성이 쉽게 변화하는 문제점이 관찰된다. 따라서, 한국인의 기호도에 적합하면서 제빵현장에 안정적으로 사용할 수 있는 스타터의 개발이 필요한 실정이다. 더불어, 사균(dead cells)으로 섭취 후 장내에서 면역조절활성을 보이는 유산균을 스타터로 사용한다면 제빵 적성과 건강 기능성을 동시에 제공할 수 있다.

선행기술문헌

특허문헌

[0010] (특허문헌 0001) 대한민국등록특허 제10-1551836호(2015.09.03)에는, 한국 전통 누룩으로부터 분리한 제빵용 신규의 토종 천연 유산균에 관하여 기재되어 있다.

(특허문헌 0002) 대한민국등록특허 제10-1551837호(2015.09.03)에는, 한국 전통 누룩으로부터 분리한 제빵용 신규의 토종 천연 유산균에 관하여 기재되어 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0011] 본 발명은 면역 조절 활성 및 제빵 적성이 우수한 프로바이오틱 유산균을 발굴하여 제공하고자 한다.

과제의 해결 수단

[0013] 본 발명은 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) SPC-SNU 72-1 (KCTC13314BP)을 제공한다.

[0014] 한편, 본 발명은 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) SPC-SNU 72-1 (KCTC13314BP)을 밀가루에 첨가한 후 발효시켜 제조된 것을 특징으로 하는 제빵용 반죽물을 제공한다.

[0015] 한편, 본 발명은 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) SPC-SNU 72-1 (KCTC13314BP)을 밀가루에 첨가한 후 발효시키고, 베이킹(baking)하여 제조된 것을 특징으로 하는 빵을 제공한다.

발명의 효과

[0017] 본 발명의 프로바이오틱 유산균은 면역 조절 활성이 특히 우수하고, 그 외에 산·담즙 내성이 우수하다. 본 발명의 프로바이오틱 유산균을 제빵효모와 함께 반죽 발효시, 빵의 물성, 향미, 유통기간을 개선하고, 높은 생존율 및 프로바이오틱의 면역 조절 활성을 가지는 빵을 제조할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0019] 도 1은 김치로부터 분리한 균주들의 락토바실러스 플란타룸 (*Lactobacillus plantarum*) specific PCR을 수행한 결과이다.

도 2는 본 발명 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) SPC-SNU 72-1 및 공시균주 2종에 대해 바이오제닉아민 생성능이 있는지 확인한 결과이다.

도 3은 본 발명 락토바실러스 플란타룸 SPC-SNU 72-1 및 공시균주(*Lb. reuteri* KCCM40717)의 용혈현상을 측정한 결과이다.

도 4는 본 발명 락토바실러스 플란타룸 SPC-SNU 72-1의 pH에 따른 산 내성을 비교한 결과이다.

도 5는 본 발명 락토바실러스 플란타룸 SPC-SNU 72-1의 담즙 농도에 따른 유산균의 담즙내성을 비교한 결과이다.

도 6은 말토오스 배지에서 본 발명 락토바실러스 플란타룸 SPC-SNU 72-1의 배양학적 특성을 나타낸 결과이다.

도 7은 본 발명 락토바실러스 플란타룸 SPC-SNU 72-1의 말토오스 이용능을 확인한 결과이다.

도 8은 공시균주로 사용한 락토바실러스 플란타룸 KACC11451가 적용된 빵, 락토바실러스 플란타룸의 상업균주인 Lallemand L73이 적용된 빵, 본 발명 락토바실러스 플란타룸 SPC-SNU 72-1가 적용된 빵의 사진이다.

도 9는 본 발명 락토바실러스 플란타룸 SPC-SNU 72-1, 상업균주인 Lallemand L73, 공시균주로 사용한 락토바실러스 플란타룸 KACC11451가 각각 적용된 본종의 가스 발생력을 확인한 결과이다.

도 10은 본 발명 락토바실러스 플란타룸 SPC-SNU 72-1이 적용된 빵의 노화 속도를 측정한 결과이다.

도 11은 본 발명 락토바실러스 플란타룸 SPC-SNU 72-1이 적용된 빵 (시료) 1g당 검출된 휘발성 향기성분(alcohol, aldehyde, ketone, acid 류 등)의 전체적인 정량적 수치를 비교한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0020] 본 발명은 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) SPC-SNU 72-1 (KCTC13314BP)을 제공한다. 상기 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) SPC-SNU 72-1 (KCTC13314BP)은 김치로부터 분리한 신규의 유산균으로서, 면역 조절 활성이 특히 우수하며, 그 외 산·담즙 내성이 우수한 특징이 있다. 또한, 제빵에 적용시 제빵 적성 또한 우수한 것으로 나타났다.

[0021] 한편, 본 발명은 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) SPC-SNU 72-1 (KCTC13314BP)를 밀가루에 첨가한 후 발효시켜 제조된 것을 특징으로 하는 제빵용 반죽물을 제공한다. 김치로부터 분리한 신규 유산균인 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) SPC-SNU 72-1 (KCTC13314BP)이 첨가된 밀가루 반죽은 초기 가

스 발생력이 대조구보다 현저히 우수하여 제빵용으로 적합하다.

[0022] 한편, 본 발명은 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) SPC-SNU 72-1 (KCTC13314BP)를 밀가루에 첨가한 후 발효시키고, 베이킹(baking)하여 제조된 것을 특징으로 하는 빵을 제공하는데, 상기 베이킹(baking)은 굽는 것을 의미한다. 상기와 같이 제조된 빵은 상업 이스트로 제조된 빵보다 빵의 식감이 부드럽고, 경도가 낮으며 노화속도가 느려 저장성이 우수하다. 또한, 기호도가 우수한 향기 성분을 발산하여 풍미가 좋다.

[0024] 이하, 본 발명의 내용을 하기 실시예 또는 실험예를 통해 더욱 상세히 설명하고자 한다. 다만, 본 발명의 권리범위가 하기 실시예 또 실험예에만 한정되는 것은 아니고, 그와 등가의 기술적 사상의 변형까지를 포함한다.

[0026] **<실시예 1: 본 발명 프로바이오틱 유산균의 분리 및 동정>**

[0027] **(1) 유산균 분리**

[0028] 김치 10g, 0.85% NaCl 90㎖를 여과포(filter bag)에 담아 스토마커(stomacher)를 이용해 3분간 균질화하였다. 이를 다시 0.85% NaCl로 단계적 희석을 통해 적절한 농도로 희석한 후, 0.01% 사이클로헥사미드(cycloheximide), BPB(Bromophenol blue)가 첨가된 MRS(de Man Rogosa and Sharpe, Difco) 고체배지에 도말하여 분리하였다. 유산균이 생성하는 산에 의하여 콜로니 색이 변하는 특성을 이용하여 균주를 선택적으로 선발하기 위하여, 기존의 MRS 배지에 브로모페놀블루(Bromophenol-blue)를, 진균 억제를 위하여 사이클로헥사미드(cycloheximide)를 첨가하였다. 배양조건은 30℃에서 48시간 동안 혐기 배양하였고, 가운데 진한 파란색원을 가진 흰색 콜로니를 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*)후보 균주로 간주하고 순수분리 배양을 하였다.

[0030] **(2) 분리균주의 동정**

[0031] 락토바실러스 플란타룸에 특이적인 프라이머는 나오키 카토 박사의 논문(Naoki Kato, 2000, Rapid identification of 11 human intestinal Lactobacillus species by multiplex PCR assays using group- and species-specific primers derived from the 16S 23S rRNA intergenic spacer region and its flanking 23S rRNA)을 참조하여 디자인된 LplanF(5'-ATTCATAGTCTAGTTGGAGGT-3'), LplanR(5'- CCTGAACTGAGAGAATTTGA-3')을 이용하였으며, 증폭사이즈는 248bp이고, 95℃에서 3분간 프리-디네츄어레이션(pre-denaturation), 95℃에서 30초간, 60℃에서 30초간, 72℃에서 30초간 진행하는 것을 1사이클로 하여, 30사이클을 진행하고, 최종 신장을 위하여 72℃에서 5분간 PCR을 수행한 후, 전기영동하여 PCR 결과를 확인하였다 (도 1). 도 1은 김치로부터 분리한 균주들의 락토바실러스 플란타룸 (*Lactobacillus plantarum*) specific PCR을 수행한 결과이다. 실험 결과, 36종의 균주에서 248bp의 밴드가 형성되었고, 16s rRNA 서열 분석 결과 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*)으로 동정되었다. 이렇게 분리한 균주를 SPC-SNU 72-1이라 명명하였고, 한국생명공학연구원에 기탁하여 2017년 8월 24일자로 기탁번호 'KCTC13314BP'을 부여받았다.

[0033] **(3) 락토바실러스 플란타룸의 생화학적 특성**

[0034] 상기에서 분리한 분리균주(SPC-SNU 72-1), 공시균주(KACC11451), 상업균주(Lallemand L73)의 당 이용 특성을 API50CH와 API 50CHL 키트(Biomerieux사)를 이용하여 분석하고, 그 결과를 하기 표 1에 나타내었다. 실험 결과, 분리균주(SPC-SNU 72-1)는 공시균주 및 상업균주와 비교할 때, 엘-아라비노스(L-arabinose) 대사에서 차이를 보이는 신규균주로 판명되었다.

표 1

[0035] 락토바실러스 플란타룸 SPC-SNU 72-1의 당 이용 특성 분석결과

	SPC-SNU 72-1	공시균주 KACC11451	상업균주 Lallemand L73
control	-	-	-
Glycerol	-	-	-
Erythriol	-	-	-
D-arabinose	-	-	-
L-arabinose	-	+	+
D-ribose	+	+	+
D-xylose	-	-	-
L-xylose	-	-	-
D-adonitol	-	-	-

Methyl-βD-xylopyranoside	-	-	-
D-galactose	+	+	+
D-glucose	+	+	+
D-fructose	+	+	+
D-mannose	+	+	+
L-sorbose	-	-	-
L-rhamnose	-	-	-
Dulcitol	-	-	-
Inositol	-	-	-
D-mannitol	+	+	+
D-sorbitol	+	+	+
Methyl-α-D-mannopyranoside	+	+	+
Methyl-α-D-gucopyranoside	-	-	-
N-acetylglucosamine	+	+	+
Amygdalin	+	+	+
Arbutin	+	+	+
Esculin	+	+	+
Salicin	+	+	+
D-celiobiose	+	+	+
D-maltose	+	+	+
D-lactose	+	+	+
D-melibiose	+	+	+
D-saccharose	+	+	+
D-trehalose	+	+	+
Inulin	-	-	-
D-melezitose	+	+	+
D-raffinose	+	+	+
Amidon	-	-	-
Glycogen	-	-	-
Xylitol	-	-	-
Gentiobiose	+	+	+
D-turanose	+	+	+
D-lyxose	-	-	-
D-tagatose	-	-	-
D-fucose	-	-	-
L-fucose	-	-	-
D-arabitol	-	-	-
L-arabitol	-	-	-
Potassium gluconate	+	+	+
Potassium 2-ketogluconate	-	-	-
Potassium 5-ketogluconate	-	-	-

[0037] <실험예 1: 본 발명 프로바이오틱 유산균의 인체 장내 안전성 분석>

[0038] (1) 바이오제닉아민 생성능 확인

[0039] 바이오제닉 아민(Biogenic amines)은 발효식품에서 미생물에 의해 생성되며 식중독을 유발하는데, 이에 대한 안전성을 검증하기 위해 엠마누엘 코튼(Emmanuel Coton)의 논문(Multiplex PCR for colony direct detection of Gram-positive histamine- and tyramine-producing bacteria)을 참고하여, HDC3 (5'-GATGGTATTGTTTCKTATGA-3') and HDC4 (5'-CAAACACCAGCATCTTC-3'), TD2 (5'-ACATAGTCAACCATRTTGAA-3') and TD5 (5'-CAAATGGAAGAAGAAGTAGG-3')을 사용하였고, 각각 증폭사이즈는 1182bp, 436bp이며, 95℃에서 3분간 프리-디네튜어레이션(pre-denaturation), 95℃에서 30초간, 52℃에서 30초간, 72℃에서 90초간 진행하는 것을 1 사이클로 하여, 30 사이클을 진행하고, 최종 신장을 위하여 72℃에서 5분간 multiplex PCR을 수행한 후, 전기영동하여 PCR 결과를 확인하였다 (도 2). 도 2는 본 발명 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) SPC-SNU 72-1 및 공시균주 2종에 대해 바이오제닉아민 생성능이 있는지 확인한 결과이다. 실험 결과, 분리한 락토바실러스 플란타룸 SPC-SNU 72-1의 경우 바이오제닉 아민에 속하는 2종(tyramine, histamine)을 생성하는 유전자를 갖고

있지 않는 것으로 확인되었다.

[0041] (2) 용혈현상측정

[0042] 유산균은 일반적으로 안전하다고 알려졌으나, 병원성이 있는 유산균이 보고되고 있어 신규 유산균들에 대한 안전성 검증이 요구되고 있다. 안전성을 검증하기 위해 한국바이오벤처협회 단체표준(유산균의 용혈 현상 측정 방법)을 참고하여 5% 면양혈액을 첨가한 TSA(Tryptic Soy Agar) 또는 BHI(Brain Heart Infusion) 배지에 측정대상 유산균을 접종하여 30℃에서 48시간 배양한 후 배지 상에 나타나는 용혈현상을 확인하였다 (도 3). 도 3은 본 발명 락토바실러스 플란타룸 SPC-SNU 72-1 및 공시균주(*Lb. reuteri* KCCM40717)의 용혈현상을 측정한 결과이다.

[0043] 실험 결과, 락토바실러스 플란타룸 SPC-SNU 72-1 및 공시균주(*Lb. reuteri* KCCM40717) 모두에서 용혈현상이 나타나지 않았고, 배지의 색깔 변화도 없어 비병원성인 γ용혈(무색)로 판단되었다.

[0045] <실험예 2: 본 발명 프로바이오틱 유산균의 인체 장내 안정성 분석>

[0046] (1) 내산성·내담즙성 평가

[0047] 가) 위산·담즙 재현을 위한 버퍼 제조

[0048] 유산균이 장내로 도달하기 전 위산과 담즙산에 의해 많은 수의 유산균이 사멸되는 점을 고려하여, 기능성 연구에 앞서 유산균의 장내 생존력을 관찰하고자 하였다. 장내 pH를 맞추기 위해 먼저, PBS 버퍼(1ℓ 기준, Sodium chloride 8g, Potassium chloride 0.2g, Sodium phosphate 1.44g, Potassium phosphate 0.24g, pH7.4)를 제조하여 오토클레이브(autoclave) 후, HCl을 첨가하여 위산 (pH 2.0~3.0) 환경을 만들고, 담즙염(bile salt)을 첨가하여 담즙산(0.3-0.4%) 환경을 만들어 하기 실험에 사용하였다.

[0050] 나) 내산성·내담즙성 측정

[0051] 본 실험에 앞서 균주를 2회 활성화(activation)하여 1.5㎖ 튜브에 1㎖를 담아 12,000 rpm, 4℃에서 5분간 원심분리하였다. 상층액을 제거하여 균체를 회수한 후, 0.85% NaCl로 2회 세척하여 남아있는 배지를 제거하였다. pH 2.0과 3.0의 PBS 버퍼용액 및 0.3%와 0.4% 담즙염 용액을 각각 초기 배양액(1㎖)과 동량 첨가하여 재부유하였다. 음식물이 유입되어 위를 통과하는 시간이 2~4시간임을 고려하여 0, 90, 180분으로 반응시간을 설정해 시간별로 100㎕씩 샘플링하였다. 샘플링 용액(100㎕)은 900㎕의 버퍼로 pH를 회복한 뒤, 샘플로 사용하였다. 0.85% NaCl로 단계별로 희석하여 4등분 한 MRS 배지에 20㎕씩 스프레딩(spreading)하고 24시간 후, 세포 계수(cell counting)하여 Log CFU/㎖값을 구하였다.

[0052] 락토바실러스 플란타룸 SPC-SNU 72-1 (*Lb. plantarum* SPC-SNU 72-1)을 각각 pH 2, 3 버퍼용액에 0, 90, 180분간 반응시킨 후 생균수를 측정한 결과, pH 2.0에서는 반응시간별 균수가 대폭 감소하는 경향을 보였다. 반면에, pH 3.0에서는 균수에 큰 변화가 없고, 90% 이상 생존력을 나타냈었다. 이러한 결과에 따라 락토바실러스 플란타룸 SPC-SNU 72-1은 대조구로 사용한 LGG (*Lb. rhamnosus* GG)균주보다 높은 생존율을 보여, 강한 산의 환경에서도 내성을 가짐을 확인할 수 있었다 (도 4). 도 4는 본 발명 락토바실러스 플란타룸 SPC-SNU 72-1의 pH에 따른 산 내성을 비교한 결과이다.

[0053] 한편, 락토바실러스 플란타룸 SPC-SNU 72-1을 각각 담즙염 0.3%, 0.4% 용액에 0, 90, 180분간 반응시킨 후 생균수를 측정한 결과, 두 농도의 담즙에서 모두 90분 반응시 균수가 감소하였으나, 그 후에 변화없이 유지되었다. 이러한 결과에 따라, 락토바실러스 플란타룸 SPC-SNU 72-1은 대조구로 사용한 LGG균주보다 높은 생존율을 보여 담즙의 환경에서도 내성을 가짐을 확인할 수 있었다 (도 5). 도 5는 본 발명 락토바실러스 플란타룸 SPC-SNU 72-1의 담즙 농도에 따른 유산균의 담즙내성을 비교한 결과이다.

[0055] <실험예 3: 건강기능성 분석>

[0056] (1) 면역 조절 활성

[0057] 가) 대식세포 분리 및 배양

[0058] Balb/c 7주령 마우스 복강에 3.5% 타이오글리콜레이트 배지(Thioglycollate media; BD, Sparks, MD, USA) 2㎖를 주사하고 나서 4일 후에 마우스를 경추탈골한 후, 1% FBS(fetal bovine serum: Hyclone, Utah, USA), 1% 페니실린-스트렙토마이신(p/s)이 함유된 DMEM (Hyclone) 8㎖을 주입하여 대식세포를 수집하였다. 1000 rpm에 10분간 원심분리 후 대식세포를 DMEM 10% FBS, 1% p/s이 함유된 배지로 부유한 후, 세포수를 CountessⅡFL

Automated Cell Counter (Life Technologies)를 이용하여 측정하였다. 실험에 필요한 대식세포는 37℃, 5% CO_2 조건의 인큐베이터에 overnight 배양하였다. 바닥에 붙지 않은 대식세포는 제거하고 각 균을 농도별로 24시간 동안 처리한 후 상등액의 배지를 회수하였다.

[0060] 나) 유산균 배양 및 사균체 제조

[0061] 유산균은 MRS broth 배지에 접종하여 최적온도인 30℃ 또는 37℃ 조건하에서 24시간 동안 shaking 배양하였다. 원심분리를 통해 상등액을 제거하고 0.85% NaCl로 2~3회 세척 후 pellet만을 모았다. 이를 항온수조(water bath)를 사용하여 100℃ 조건으로 5분간 열처리하여 사균화 한 후 동결건조를 진행하였다. 만들어진 동결건조체를 실험 농도별로 희석하여 시료로 사용하였다.

[0063] 다) 사이토카인 측정

[0064] 사이토카인 함량은 enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA) 방법을 이용하여 측정하였다. TNF-α, IL-6 Duoset (R&D Systems, USA), IL-12 OptEIA set(BD, USA)을 사용하였으며 제조사의 프로토콜을 따라 ELISA를 수행하였다.

[0066] ① TNF-α, IL-6 Duoset (R&D Systems, USA)

[0067] 96웰 이뮤노플레이트(immunoplate)에 각각의 포획 항체(capture antibody)를 PBS에 희석하여 0.1㎖씩 분주한 후, 상온에서 overnight 반응하였다. 세척버퍼 (0.5% Tween/PBS)로 각 웰을 3번 세척한 후, 블록킹 버퍼(blocking buffer; 1% BSA in PBS) 0.3㎖를 각 웰에 넣고 1시간 동안 반응하였다. 이후, 각 웰을 세척 버퍼로 3번 세척하고, 스탠다드(standard)와 샘플(sample)을 희석하여 0.1㎖씩 분주한 후에 2시간 동안 반응시켰다. 그 후, 세척 버퍼로 각 웰을 세척한 후 블록킹 버퍼에 바이오틴(biotin)이 결합된 2차 항체를 희석하여 각 웰 당 0.1㎖씩 분주하고 2시간 동안 상온에서 반응하였다. 이후, 세척 버퍼로 웰을 3번 세척한 후, 블록킹 버퍼에 Streptavidin-HRP 용액을 희석하여 0.1㎖씩 분주하고, 상온에서 20분간 반응시켰다. 그 후, 각 웰을 세척 버퍼로 세척한 후, TMB(BD pharmingen) 용액을 웰당 0.1㎖씩 처리한 뒤, 상온에서 30분간 반응시키고, 2N H_2SO_4 용액을 0.05㎖씩 각 웰에 첨가하여 완료하였다. 96웰 microplate reader를 사용하여 450nm에서 흡광도를 측정하였다.

[0069] ② IL-12 OptEIA set (BD, USA)

[0070] 96웰 이뮤노플레이드(immunoplate)에 각각의 포획 항체(capture antibody)를 PBS에 희석하여 0.1㎖씩 분주한 후, 냉장에서 overnight 반응하였다. 세척 버퍼 (0.5% Tween/PBS)로 각 웰을 3번 세척한 후 블록킹 버퍼(10% FBS, Welgene, Korea) 0.2㎖를 각 웰에 넣고 1시간 동안 반응하였다. 각 웰을 세척 버퍼로 3번 세척하고, 스탠다드(standard)와 샘플(sample)을 희석하여 0.1㎖씩 분주한 후 2시간 반응시켰다. 세척 버퍼로 각 웰을 세척한 후 블록킹 버퍼에 바이오틴(biotin)이 결합된 2차 항체와 Streptavidin-HRP 용액을 희석하여 0.1㎖씩 분주하고, 상온에서 1시간 동안 반응시켰다. 각 웰을 세척 버퍼로 세척한 TMB(BD pharmingen) 용액을 웰당 0.1㎖씩 처리한 후, 상온에서 30분간 반응시키고 2N H_2SO_4 용액을 0.05㎖씩 각 웰에 첨가하여 반응을 완료하였다. 96 well microplate reader를 사용하여 450nm에서 흡광도를 측정하였다.

[0072] 샘플이 면역세포의 일종인 대식세포의 PAMP(pathogen-associated molecular pattern)를 자극하여 면역 관련 사이토카인의 분비를 유도하는지 확인한 결과, 락토바실러스 플란타룸 SPC-SNU 72-1균주의 TNF-α, IL-6의 분비는 균의 농도에 따라 증가하는 경향이 나타났으나, IL-12는 다른 사이토카인과 달리 최고 농도인 100㎍/㎖보다 4-20㎍/㎖의 균을 처리하였을 때, 유도능이 더욱 높게 나타나는 경향을 보였다. 결과적으로 체외(in vitro) 조건에서 세 가지의 사이토카인 (TNF-α, IL-6, IL-12) 유도능 측정 결과, 락토바실러스 플란타룸 SPC-SNU 72-1은 대조구로 사용한 LGG보다 높은 사이토카인 유도능이 확인되어 면역조절 활성을 낼 것으로 판단된다. 표 2 내지 4는 락토바실러스 플란타룸 SPC-SNU 72-1의 농도별 세 가지의 면역 사이토카인 (TNF-α, IL-6, IL-12) 유도능을 측정한 결과이다.

표 2

[0073] TNF-α(농도, pg/ml)

Cell concentration (μg/ml)	4	20	100
L. rhamnosus GG	0.00±0.00	807.33±856.71	6330.67 ±1641.65
L. plantarum SPC-SNU 72-1	12303.33 ±3636.76	17699.17 ±2485.15	19770.00 ±2934.63

표 3

[0075] IL-6(농도, pg/ml)

Cell concentration (μg/ml)	4	20	100
L. rhamnosus GG	30.83±51.26	13.33±23.09	485.83±104.83
L. plantarum SPC-SNU 72-1	1449.17±1087.00	2972.78±2475.52	5003.33±3570.03

표 4

[0077] IL-12(농도, pg/ml)

Cell concentration (μg/ml)	4	20	100
L. rhamnosus GG	17.00±29.44	25.44±44.07	109.44±62.21
L. plantarum SPC-SNU 72-1	3294.67±2656.17	3947.17±3369.89	2694.67±2445.02

[0079] <실험예 4: 제빵적성 평가>

[0080] (1) 락토바실러스 플란타룸의 말토오스 이용능 확인

[0081] 가) 생장곡선(growth curve)

[0082] 하기 표 5와 같은 조성을 가지는 2% 말토오스 함유 MRS 배지(broth medium)를 만든 후 72-1 분리균주, 공시균주(KACC11451), 상업균주(Lallemand L73)를 각각 10%(w/v)씩 접종하고 10시간 배양한 후, 600nm에서 흡광도를 측정하여 생장 곡선(growth curve)을 작성하였다 (도 6). 도 6은 말토오스 배지에서 본 발명 락토바실러스 플란타룸 SPC-SNU 72-1의 배양학적 특성을 나타낸 결과이다. 실험 결과, 72-1 분리균주가 공시균주 및 상업균주보다 말토오스(maltose) 배지에서의 생육 속도가 빠름을 확인할 수 있었다.

표 5

[0083] 2% 말토오스 함유 MRS 배지(broth medium)

조성	함량
프로테오스 펩톤	10.0g
비프 추출물	10.0g
이스트 추출물	5.0g
말토오스	20.0g
소디움 아세테이트	5.0g
디포타슘 포스페이트	2.0g
시트르산 암모늄	2.0g
폴리소르베이트 80	1.0g
마그네슘 설페이트	0.1g
망가니즈 설페이트	0.05g
증류수	1L

[0085] 나) 잔당분석(maltose)

[0086] 말토오스 함유 MRS 배지에 72-1 분리균주, 공시균주(KACC11451), 상업균주(Lallemand L73)를 각각 10%씩 접종하고 10시간 배양한 후, 2시간 간격으로 시료를 채취하여 상등액을 잔당(maltose)분석에 이용하였다. 당분석은 HPLC(SHISEIDO NANOSPACE S1-2)를 이용하여 수행하였다. HPLC 조건으로는 이동상은 80% ACN을 유속 1㎖/min으로 흘려주었고, 35℃로 가열된 당분석용 컬럼(Waters carbohydrate High performance 4㎛)과 RI detector를 이용하였다 (도 7). 도 7은 본 발명 락토바실러스 플란타룸 SPC-SNU 72-1의 말토오스 이용능을 확인한 결과이다. 실험 결과, 72-1 분리균주가 공시균주 및 상업균주보다 말토오스 이용능이 우수함을 확인할 수 있었다.

[0088] (2) 락토바실러스 플란타룸(Lactobacillus plantarum)의 제빵적용

[0089] 본 실험에서는 김치에서 분리한 락토바실러스 플란타룸과 공시균주(KACC11451), 상업균주(Lallemand L73)를 각각 제빵에 적용하고, 그 특성을 확인하고자 하였다.

[0091] 가) 유산균 발효 반죽의 제조 및 분석

[0092] 강력분 100g, 유산균수 $2x10^{10}$ cfu/g, 가열냉각수 100g을 혼합한 후, 30℃의 발효기에서 발효시켜 유산균 발효 반죽을 제조하되, 반죽의 pH가 pH 4.0±0.2에 도달하였을 때, 냉각한 후 유산균 발효 반죽의 pH, TTA 및 균수를 측정하였다. 한편, 본 실험에서 사용한 유산균은 MRS 배지에서 30℃, 22±2시간 동안 배양한 후, 원심분리하여 균체회수 후, 균체를 생리식염수로 수회 세척 후 이용하였고, 최초 균 접종량은 반죽 1g당 1×10^{8}이 될 수 있도록 접종하였다.

[0093] 실험 결과는 하기 표 6에 나타내었다. 실험 결과, 분리균주, 공시균주 적용 반죽 모두 pH 4.0±0.2 도달까지 4시간이 소요됐으며, 냉각 후 균수 분석 결과 또한 비슷한 것으로 나타났다.

표 6

[0094] 반죽의 pH가 pH 4.0±0.2에 도달하였을 때, 냉각한 후 유산균 발효 반죽의 pH, TTA 및 균수 측정

	pH	TTA (15 g 기준, ㎖)		균수 (cfu/g)	유기산
		pH 6.6	pH 8.5		
SPC-SNU 72-1 (*Lb. plantarum* KCTC13314BP) 적용 반죽	3.83	9.00	12.50	$2.90x10^{9}$	Lactic acid 0.34% Acetic acid 0.036%
상업균주(*Lb. plantarum* Lallemand L73) 적용 반죽	3.88	8.75	11.14	$1.38x10^{9}$	Lactic acid 0.35% Acetic acid 0.051%
공시균주(*Lb. plantarum* KACC 11451) 적용 반죽	3.84	9.35	11.70	$1.54x10^{9}$	Lactic acid 0.76% Acetic acid 0.076%

[0096] 나) 빵 제조

[0097] 식빵 제조방법은 스펀지(Sponge)법에 의해 진행되었다.

[0099] ① 배합공정(중종) 및 1차 발효

[0100] 하기 표 7에 제시한 바와 같은 성분을 믹서(제품명: SK101S MIXER : 일본)에 투입하고, 2단에서 2분, 3단에서 1분 동안 반죽하고, 반죽의 최종온도가 25℃가 되도록 혼합한 후, 27℃ 발효기에 넣어 4시간 동안 1차 발효시켰다.

표 7

[0101]

		대조구(상업적 이스트만 적용된 빵)	*Lb.plantarum* SPC-SNU 72-1 (KCTC13314B) 적용 빵	*상업균주 Lb. plantarum* Lallemand L73 적용 빵	*공시균주 Lb. plantarum* (KACC 11451) 적용 빵
중종	밀가루	70	70	70	70
	Sac.cerevisiae SPC 70-1	2	2	2	2
	급수	42	42	42	42
본종	밀가루	30	20	20	20
	정제염	2	2	2	2
	정백당	4	4	4	4
	탈지분유	4	4	4	4
	유지	12	12	12	12
	급수	23	13	13	13
	유산균 발효종	-	20	20	20

[0103] ② 배합공정(본종) 및 2차 발효

[0104] 상기 표 7에 제시한 바와 같은 성분으로 1차 발효된 반죽물과 밀가루, 정백당, 정제염, 전지분유, 이스트, 정제수를 믹서에 투입하여 1단에서 1분간 반죽하고 상기 중종 공정에서 제조된 발효물을 넣고 2단에서 3분 3단에서 2분간 혼합하였다. 다음으로, 버터를 첨가하고 2단에서 3분, 3단에서 3분간 반죽하여, 반죽 조성물의 최종 온도가 27℃가 되도록 하였다. 반죽을 성형한 이후 팬닝한 다음 38℃, 상대습도 85%에서 100분간 2차 발효를 하였다.

[0106] ③ 소성 및 냉각공정

[0107] 2차 발효공정을 거친 반죽을 윗불 210℃, 아랫불 250℃의 데크오븐에 37분간 구운 후, 빵틀에서 꺼내어 실온에서 내부온도가 32℃로 될 때까지 냉각하였다 (도 8). 도 8은 공시균주로 사용한 락토바실러스 플란타룸 KACC11451가 적용된 빵, 락토바실러스 플란타룸의 상업균주인 Lallemand L73이 적용된 빵, 본 발명 락토바실러스 플란타룸 SPC-SNU 72-1가 적용된 빵의 사진이다.

[0109] (3) 관능 평가 및 빵의 물성 측정

[0110] 가) 빵의 물성 측정

[0111] 대조구(상업적 이스트만 적용된 빵), 분리균주가 적용된 빵, 상업균주(Lallemand L73)가 적용된 빵, 공시균주(Lb. plantarum KACC11451)가 적용된 빵의 물성(pH, 총적정산도, 색도)을 측정하고자 하였다. pH 측정은 250㎖ 비이커에 증류수 100㎖, 시료 15g을 넣고 균질화한 후, pH 미터(pH meter)로 측정하였다. 총 적정 산도(total titrable acid; TTA)는 0.1 N NaOH 용액으로 적정하여 pH 6.6과 pH 8.5에 이를 때까지의 NaOH 용액 소비량(㎖)으로 정의하였다. 색도 측정은 빵을 약 20㎜ 두께로 잘라낸 시료를 색도계 (CR-400, KONIKA MINOLTA사)를 이용하여 측정하였고, 그 결과를 하기 표 8에 나타내었다. 실험 결과, 대조구와 유산균 첨가구의 빵의 물성은 전반적으로 유사한 것을 확인할 수 있었다.

표 8

[0112] 빵의 물성 측정

항목	적용 제품 관능평가 및 제품 특성			
	Control	Lb.plantarum SPC-SNU 72-1 적용 빵	상업균주Lb.plantarum Lallemand L73 적용 빵	공시균주 Lb.plantarum (KACC11451) 적용 빵
비용적	4.88	4.90	4.85	4.87
*식감	7.4	8.0	7.8	7.7

*풍미		7.3	7.8	7.6	7.6
pH		5.53	5.26	5.35	5.29
TTA(6.6/8.5)		2.27/4.87	3.21/5.60	3.29/5.18	3.25/5.27
수분함량(%)		41.65 %	41.57 %	41.49%	41.54%
유기산		Lactic acid 0.015% Acetic acid 0.037%	Lactic acid 0.159% Acetic acid 0.043%	Lactic acid 0.152% Acetic acid 0.043%	Lactic acid 0.154% Acetic acid 0.040%
	L	84.11	84.62	85.01	84.91
Hunter lab color values	a	-2.16	-2.36	-2.11	-2.19
	b	17.72	17.37	17.32	17.51

[0113] * 1:매우 나쁨, 9:매우 우수

[0115] **나) 반죽의 가스 발생력 확인**

[0116] 대조구(상업적 이스트만 적용된 본종), 상업균주(Lallemand L73)가 적용된 본종, 공시균주(KACC11451)가 적용된 본종, 분리균주가 적용된 본종의 가스 발생력을 비교하고자 하였다. 가스발생력 측정은 배합공정(본종)의 반죽 조성물을 25g을 취하여 가스발생력측정기(Fermometer)를 통해 30℃ 온도조건에서 10시간의 측정값을 기재하였다(도 9). 도 9는 본 발명 락토바실러스 플란타룸 SPC-SNU 72-1, 상업균주인 Lallemand L73, 공시균주로 사용한 락토바실러스 플란타룸 KACC11451가 각각 적용된 본종의 가스 발생력을 확인한 결과이다. 실험 결과, 대조구와 유산균 첨가구의 가스발생력은 전반적으로 유사하나 유산균 첨가구의 초기 가스발생력이 다소 높음을 확인할 수 있었다.

[0118] **다) 빵의 노화도 측정**

[0119] 상기와 같이 제조된 빵 중 실험구와 대조구의 시간 변화에 따른 노화 속도를 측정하고자, 빵을 상온에서 3시간 동안 식힌 후 약 20㎜ 두께로 잘라낸 시료의 노화도(hardness)를 물성측정기(Texture analyser, Stable Micro Systems사)를 이용하여 측정하였으며, 경도에 대한 값은 하기 표 9에 나타내었다 (도 10). 도 10은 본 발명 락토바실러스 플란타룸 SPC-SNU 72-1이 적용된 빵의 노화 속도를 측정한 결과이다. 제품 보관에 따른 경도(Hardness) 비교 결과, 유산균을 사용한 경우 전반적으로 경도가 적어 부드러움이 우수한 것을 알 수가 있었으며, 전반적으로 대조구보다 노화속도는 느린 것을 확인할 수 있었다.

표 9

[0120] 빵의 경도 측정

Sample	Hardness(N)		
	19시간경과	63시간경과	87시간경과
Control	1.652	2.615	2.680
Lb. plantarum SPC-SNU 72-1 발효종적용	1.511	2.482	2.556
Lb. plantarum Lallemand L73 발효종적용	1.532	2.509	2.530
Lb. plantarum(KACC 11451) 발효종적용	1.516	2.557	2.583

[0122] **라) 유산균주 적용 반죽 향기 성분 분석**

[0123] 대조구 대비 유산균 발효반죽을 이용한 제빵의 제조 시, 풍미 성분 발현을 비교하기 위하여, GC/MS 시스템을 이용하여 분석하였다. 시료 1g에 관한 분석을 수행하였고, GC/MS 분석 조건은 하기 표 10과 같았다. GC/MS 분석 후, 알코올(alcohol), 알데하이드(aldehyde), 케톤(ketone), 산(acid)류에 대한 전체적인 정량적 수치를 비교하고 (도 11), 하기 표 11에 대표적 향기 성분 19종에 대하여 각 성분의 상대적 비율을 백분율로 나타내었다. 도 11은 본 발명 락토바실러스 플란타룸 SPC-SNU 72-1이 적용된 빵 (시료) 1g당 검출된 휘발성 향기성분(alcohol, aldehyde, ketone, acid 류 등)의 전체적인 정량적 수치를 비교한 결과이다.

[0124] 실험 결과, Lallemand L73 대비 실험구에서 향기성분 함량 높게 나타났고, 분리균주는 알코올과 케톤류의 함량

이 높았다. 또한, Lallemand L73은 풋내를 일으키는 헥사날(hexanal)의 함량이 높았고, 부드러운 풍미를 나타내는 아세토인(acetoin)의 함량은 72-1 분리균주에서 높게 나타났다.

표 10

[0126] GC/MS 분석 조건

분석시스템	운영 조건
GC/MS analysis	GC Model name : Agilent 7890A Inlet temperature : 230℃ Column : DB-WAX (60 m X 250 um X 0.25 uM) Carrier gas : helium Flow rate : 1 mℓ/min Oven temperature program : from 40℃ (5 min) → 8℃/min → 230℃ (10min) MS detector : Agilent 5975C MSD (EI mode)
SPME analysis	Fiber : DVB/Carboxen/PSME (Supelco Co.) Sample equilibration time - incubation temp. 85℃ - incubation time 30 min

표 11

[0128]

		SPC-SNU 72-1		KACC11451		Lallemand L73	
		%	SD	%	SD	%	SD
alcohols	Ethyl alcohol	0.27	0.01	0.21	0.04	0.28	0.02
	1-Pentanol	3.18	0.34	3.39	0.08	3.59	0.14
	3-Methyl-1-butanol	0.80	0.09	0.78	0.20	1.01	0.16
	1-Hexanol	51.06	0.41	43.91	3.05	30.87	4.43
	1-Heptanol	1.79	0.08	1.64	0.60	1.57	0.19
	2-Ethylhexanol	2.30	0.44	2.42	0.15	2.49	0.45
	1-Octanol	1.47	0.07	1.21	0.40	1.35	0.17
	1-Nonanol	1.91	0.19	1.29	0.46	2.42	0.38
aldehydes	Hexanal	13.92	3.00	20.72	0.22	27.44	4.75
	(E)-2-Heptenal	5.04	0.02	4.08	0.63	5.31	0.55
	2-Octenal	4.53	0.18	6.73	0.45	5.35	0.01
	Nonenal	0.69	0.02	1.06	0.09	0.82	0.48
	Benzaldehyde	-	-	0.50	0.13	0.75	0.08
ketones	2-Heptanone	0.26	0.01	0.43	0.12	1.58	0.29
	Acetoin	2.46	0.04	0.50	0.09	1.19	0.09
	2-Octanone	0.96	0.00	0.41	0.14	1.03	0.17
	Phenyl methyl ketone	1.31	0.13	0.81	1.00	1.50	0.03
acids	Hexanoic acid	6.55	1.27	8.36	0.46	9.91	1.40
etc	2-Pentylfuran	1.51	0.16	1.55	0.35	1.54	0.25
sum		100	-	100	-	100	-

[0129] * 대표적 향기 성분 19종 [Alcohol (8종), Aldehyde (5종), Ketone (4종), Acid (1종), 기타 (1종)] 에 대해서 각 성분의 상대적 비율을 백분율로 나타냈다.

[0131] **마) 관능 평가**

[0132] 대조구(상업적 이스트만 적용된 빵), 분리균주가 적용된 빵, 상업균주(Lallemand L73)가 적용된 빵, 공시균주(*Lb. plantarum* KACC11451)가 적용된 빵의 관능 평가 결과, 유산균을 적용한 실험구에서는 대조구에 비해 부드러운 식감과 풍미면에서 우수한 평가를 받았다. 유산균을 첨가한 실험구에서의 비교평가에서는 큰 차이를 보이

지는 않았지만 전반적인 평가에서는 분리균주 SPC-SNU 72-1을 적용한 빵이 가장 높은 평가를 받았다.

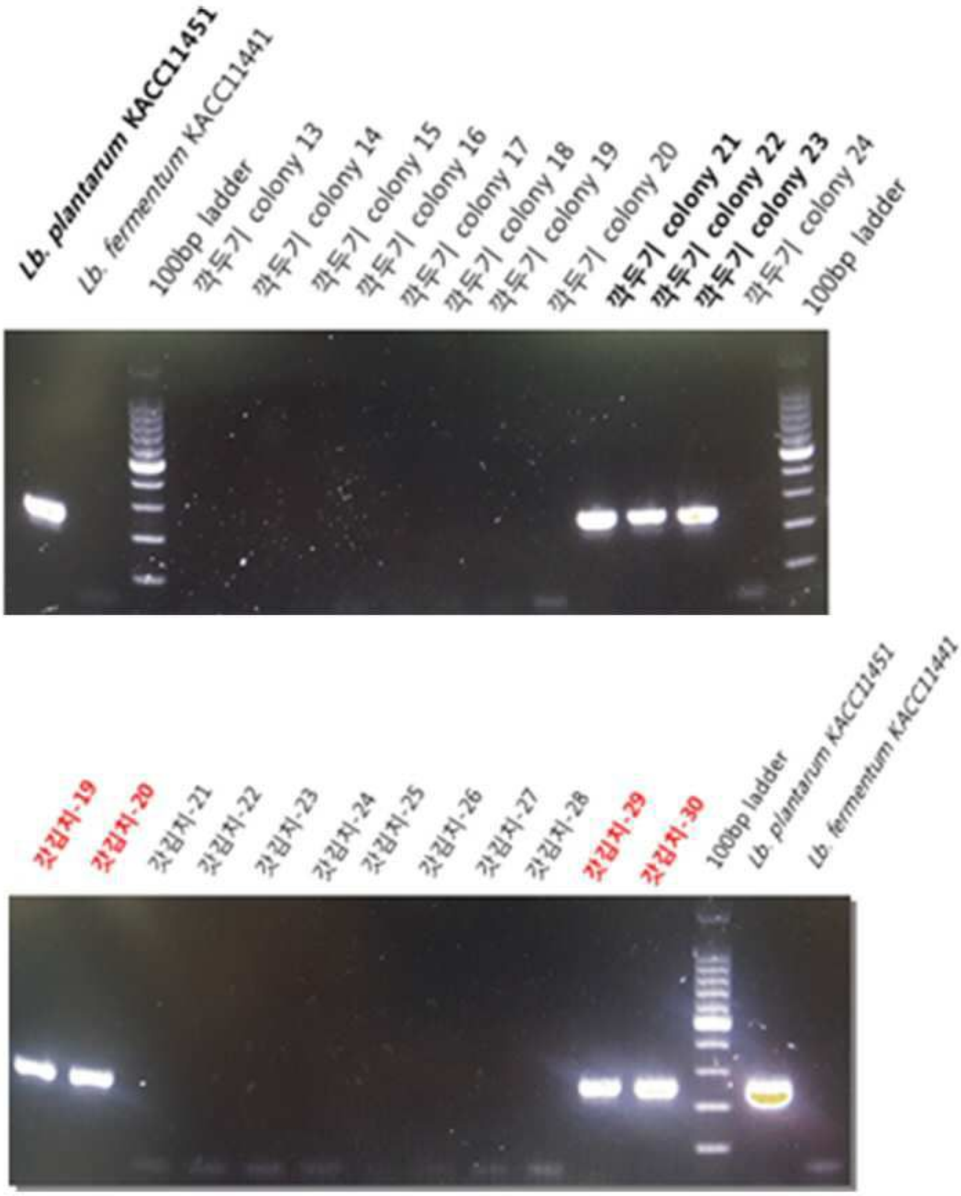
[0134] 기탁기관명 : 한국생명공학연구원

[0135] 수탁번호 : KCTC13314BP

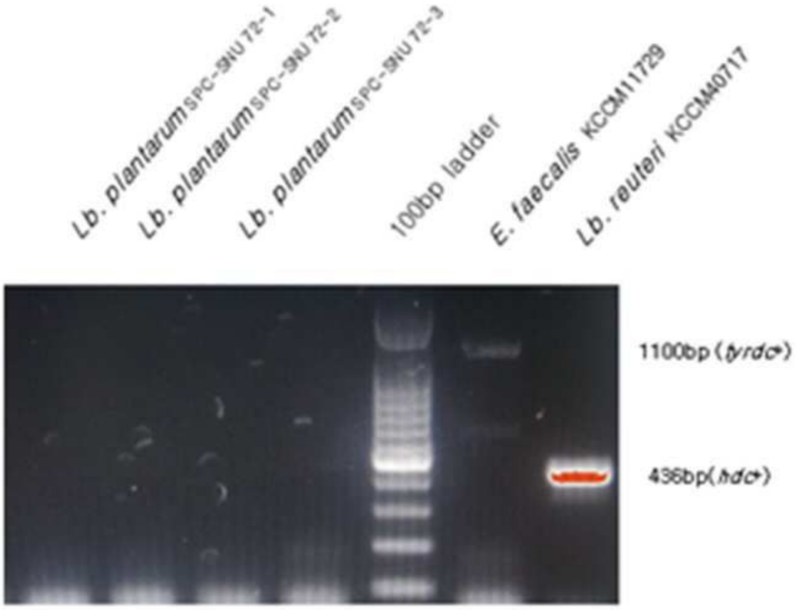
[0136] 수탁일자 : 2017824

도면

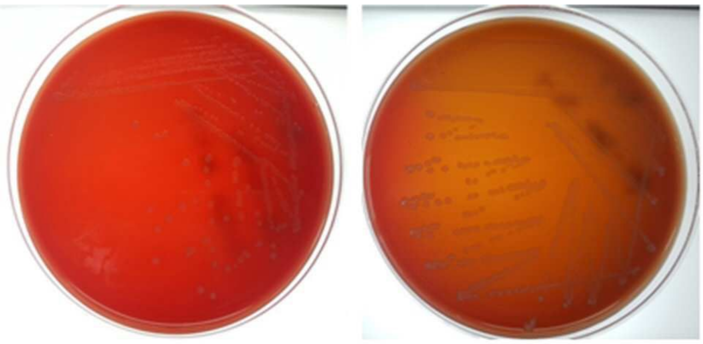
도면1



도면2



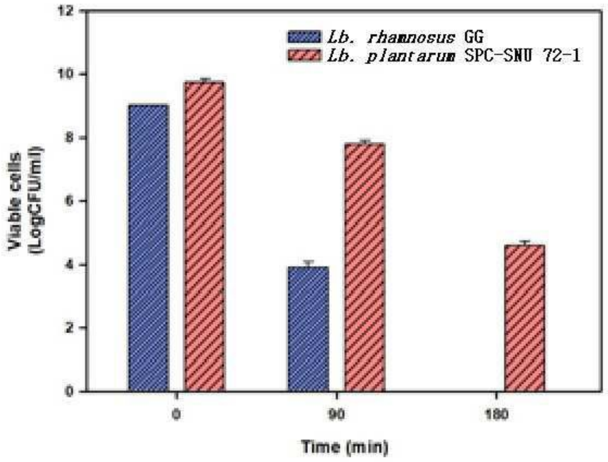
도면3



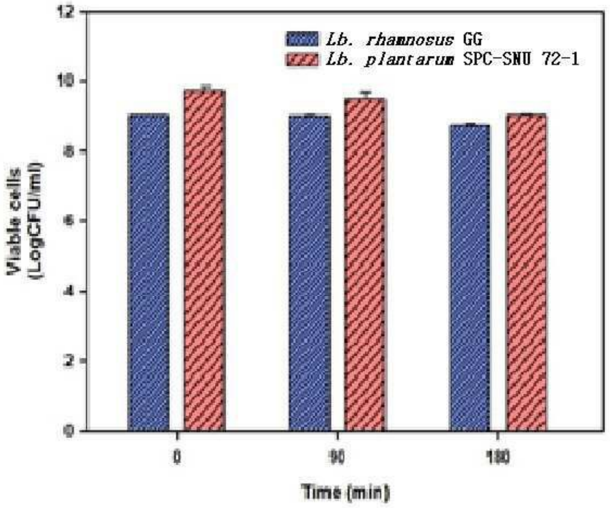
Lb. reuteri KCCM40717 *Lb. plantarum* SPC-SNU 72-1

도면4

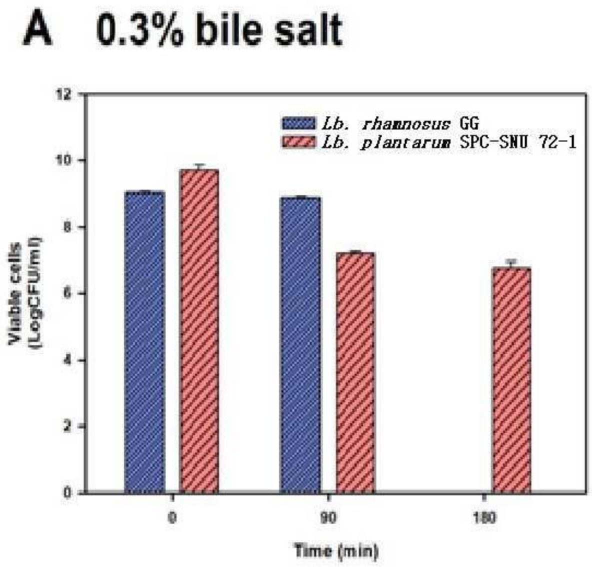
A pH2

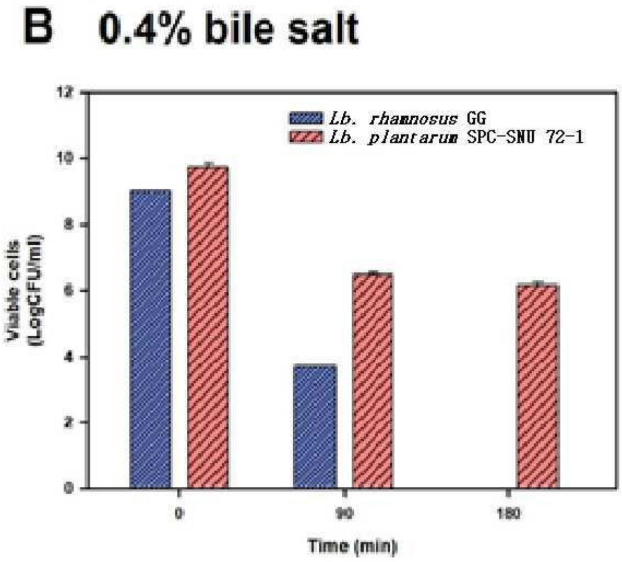


B pH3

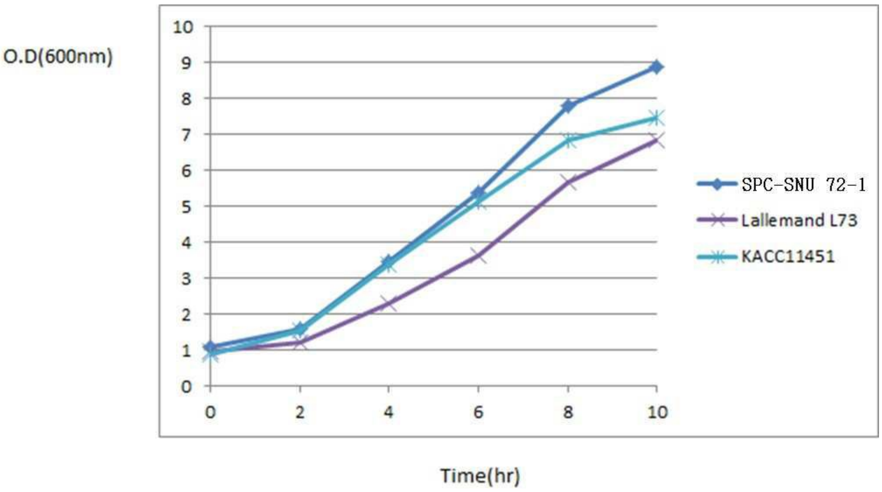


도면5

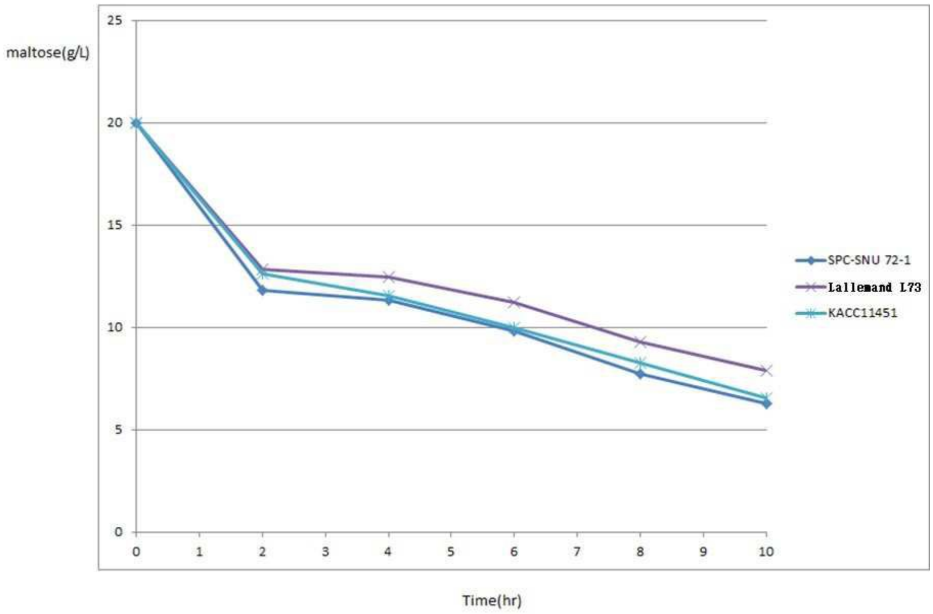

A 0.3% bile salt
Lb. rhamnosus GG
Lb. plantarum SPC-SNU 72-1
Viable cells (LogCFU/ml)
Time (min)
0
90
180
0
2
4
6
8
10
12


B 0.4% bile salt
Lb. rhamnosus GG
Lb. plantarum SPC-SNU 72-1
Viable cells (LogCFU/ml)
Time (min)
0
90
180
0
2
4
6
8
10
12

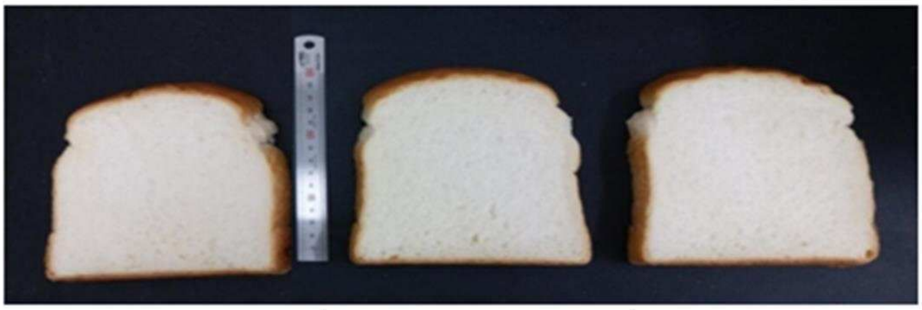
도면6


O.D(600nm)
SPC-SNU 72-1
Lallemand L73
KACC11451
Time(hr)
0
2
4
6
8
10
0
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10

도면7

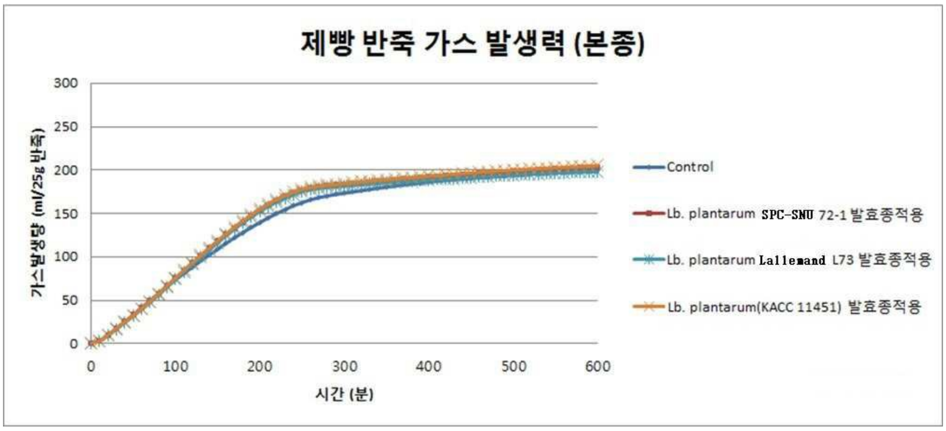


도면8

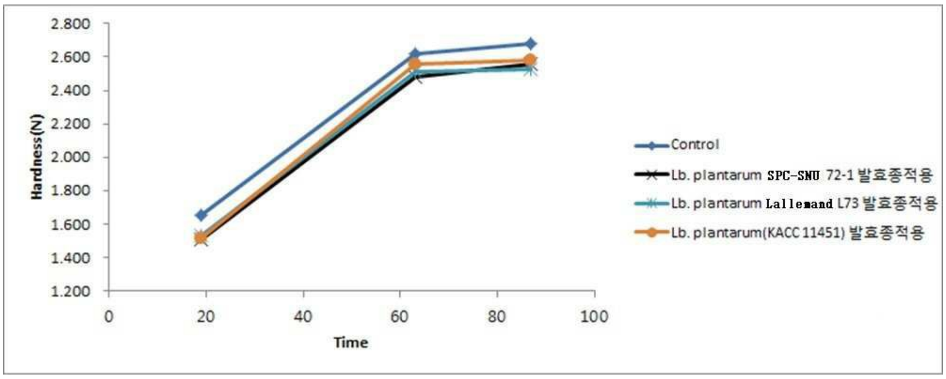


Lb. plantarum SPC-SNU 72-1 (KCTC13314BP)	상업적균주 *Lb. plantarum* Lallemand L73	공시균주 *Lb. plantarum* (KACC11451)

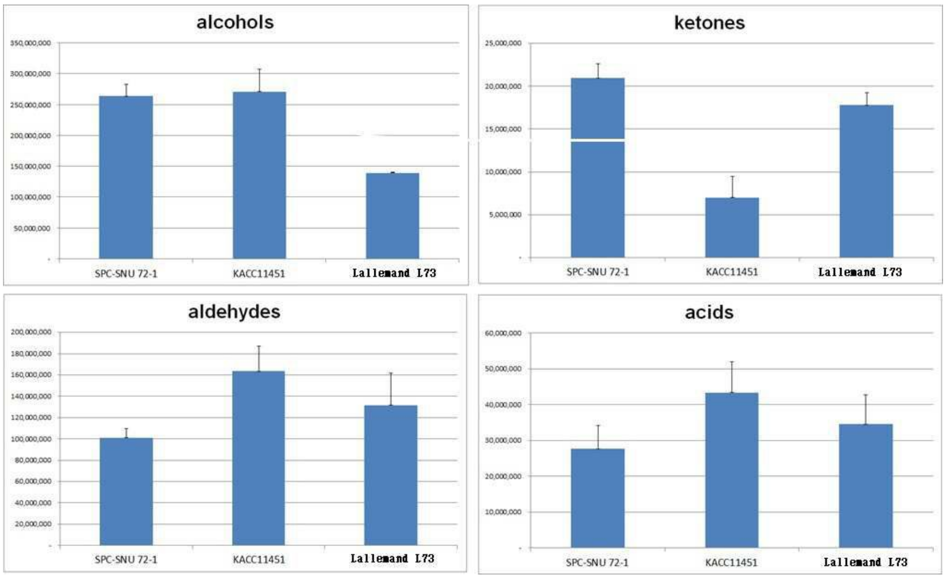
도면9



도면10


Hardness(N)
2.800
2.600
2.400
2.200
2.000
1.800
1.600
1.400
1.200
0
20
40
60
80
100
Time
Control
Lb. plantarum SPC-SNU 72-1 발효종적용
Lb. plantarum Lallemand L73 발효종적용
Lb. plantarum(KACC 11451) 발효종적용

도면11


alcohols
350,000,000
300,000,000
250,000,000
200,000,000
150,000,000
100,000,000
50,000,000
SPC-SNU 72-1
KACC11451
Lallemand L73
ketones
25,000,000
20,000,000
15,000,000
10,000,000
5,000,000
SPC-SNU 72-1
KACC11451
Lallemand L73
aldehydes
200,000,000
180,000,000
160,000,000
140,000,000
120,000,000
100,000,000
80,000,000
60,000,000
40,000,000
20,000,000
SPC-SNU 72-1
KACC11451
Lallemand L73
acids
60,000,000
50,000,000
40,000,000
30,000,000
20,000,000
10,000,000
SPC-SNU 72-1
KACC11451
Lallemand L73