



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2019년08월16일
(11) 등록번호 10-2010834
(24) 등록일자 2019년08월12일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 1/20 (2006.01) A23K 10/16 (2017.01)
A23L 29/00 (2016.01) A23L 33/135 (2016.01)
A61K 35/745 (2014.01) A61K 8/99 (2017.01)
A61Q 19/00 (2006.01) C12R 1/01 (2006.01)

(52) CPC특허분류
C12N 1/20 (2013.01)
A23K 10/16 (2016.05)

(21) 출원번호 10-2018-0077958
(22) 출원일자 2018년07월05일
심사청구일자 2018년07월05일

(56) 선행기술조사문헌

KR101726207 B1*
KR100852984 B1
KR101412268 B1
KR1020130063525 A

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
서울대학교 산학협력단
서울특별시 관악구 관악로 1 (신림동)
광동제약 주식회사
서울특별시 서초구 서초중앙로 85 (서초동)

(72) 발명자
허철성
경기도 용인시 기흥구 용구대로 2394번길27, 106
동901호(마북동, 삼성래미안1차아파트)

두은희
경기도 김포시 김포한강2로 362, 616동 603호(장
기동, 청송마을 중흥S-클래스아파트)
(뒷면에 계속)

(74) 대리인
전문성

전체 청구항 수 : 총 2 항

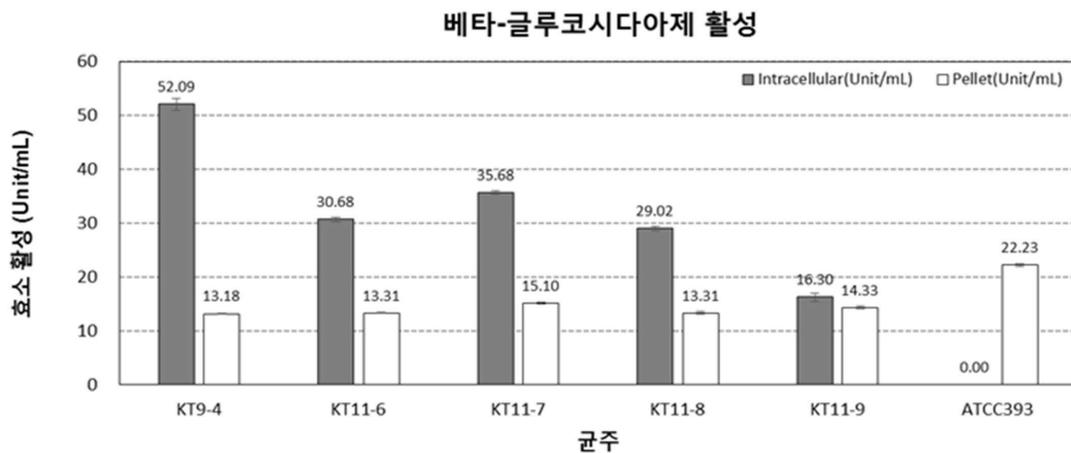
심사관 : 김지연

(54) 발명의 명칭 베타-글루코시다아제 활성이 우수한 비피도박테리움 애니멀리스 서브스페시스 락티스 LDTM8102 신규주[KCTC13392BP]

(57) 요약

본 발명 베타-글루코시다아제(β -glucosidase) 활성이 높은 비피도박테리움 애니멀리스 서브스페시스 락티스 (*Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*) LDTM8102 신규주[KCTC13392BP]는 pH 2.0에서도 강하게 생존하는 우수한 내산성 외에도 내담즙성, 항생제 내성 등 생균제 사용조건을 모두 검증하여 건강기능식품, 의약품 생균제 개발에 응용할 수 있고, 나아가 다양한 식품, 사료, 화장품 또는 의약품 제조에 이용하거나, 바이오매스 발효에도 이용할 수 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

- A23L 29/065 (2016.08)
- A23L 33/135 (2016.08)
- A61K 35/745 (2013.01)
- A61K 8/99 (2013.01)
- A61Q 19/00 (2013.01)
- A23V 2002/00 (2013.01)
- A23Y 2300/49 (2013.01)
- C12R 1/01 (2013.01)

김승일

경기도 안산시 상록구 충정공길 14-2

(72) 발명자

이기원

서울특별시 관악구 난곡로 55, 230동1202호(신림동, 관악산휴먼시아아파트)

박상현

경기도 안양시 동안구 경수대로 665번길 64(호계동)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	2015R1A2A1A10053567
부처명	미래창조과학부
연구관리전문기관	한국연구재단
연구사업명	도약연구지원사업(전략)(연구분야지정)
연구과제명	한국 유아 장내 유래 유산균을 이용한 고기능성 식품소재 개발
기여율	1/1
주관기관	서울대학교 산학협력단
연구기간	2015.11.01 ~ 2018.10.31

명세서

청구범위

청구항 1

한국생명공학연구원에 기탁번호 KCTC13392BP로 기탁된 하기의 특징을 나타내는 비피도박테리움 애니멀리스 서브스페시스 락티스(*Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*) LDTM8102 신균주

(a) 앰피실린(ampicillin), 카나마이신(kanamycin), 스트렙토마이신(streptomycin) 및 에리스로마이신(erythromycin)에 대한 내성이 없음.

(b) 베타-글루코시다아제(β -glucosidase), 에스테라제(Esterase), 에스테라제 리파아제(Esterase lipase), 리파아제(Lipase), 발린 아릴아미다아제(Valine arylamidase) 및 알파-갈락토시다아제(α -galactosidase)에 활성이 있음.

(c) pH 2에서 2시간 생존율이 100% 이상임.

청구항 2

제1항의 LDTM8102 신균주를 식품, 사료, 화장품 또는 의약품 제조에 이용하거나, 바이오매스 발효에 이용하는 방법

청구항 3

삭제

발명의 설명

기술분야

[0001] 본 발명은 한국인 유아의 분변으로부터 분리한 새로운 유산균 균주에 관한 것으로서 특히 높은 베타-글루코시다아제(β -glucosidase) 생산 능력을 가지며, 내산성 및 내담즙성이 우수한 비피도박테리움 애니멀리스 서브스페시스 락티스(*Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*) LDTM8102 신균주[KCTC13392BP]에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 육류 위주의 서구식 식단 섭취, 불규칙한 식사, 음주, 흡연, 운동부족, 과도한 스트레스 등에 의해 소화불량을 동반한 장 질환을 호소하는 한국인의 수가 증가하고 있다. 국민건강보험공단 자료에 따르면 국내 소화불량 환자의 수는 2006년 48만 9천명에서 2011년 64만명으로 5년 사이에 31% 증가하였다. 이에 한국인의 장 건강을 향상시키기 위해서 생균제(probiotics) 제품 섭취에 대한 관심과 그 중요성이 높아지고 있다.

[0003] 그런데, 연구에 따르면 생균제는 적당히 섭취 시 사람 또는 동물 장내 미생물의 균형을 개선시켜 숙주에게 건강상 유익한 효과를 주는 살아있는 미생물 혹은 미생물의 성분으로서 유산균이 잘 알려지며, 특히, 유산균은 당류를 이용하여 젖산을 생성하는 균으로서 식품제조에 이용되며 기능적으로 혈당 저하, 체중 감소, 피부질환 완화, 염증반응 조절, 면역기능 강화 등의 효과도 있는 것으로 알려진다.

[0004] 그런데, 생균제 시장은 원료, 첨가제 또는 식품 분야로 구분할 수 있으나, 대부분은 발효유에 응용됨으로써 식품분야에 적용되어지곤 한다. 그 중에서도 특히, 유산균 락토바실러스 애시도필러스(*Lactobacillus acidophilus*) La5와 비피도박테리움 락티스(*Bifidobacterium lactis*) Bb12를 함유하는 요거트의 섭취는 제2형 당뇨병 환자들의 총 콜레스테롤과 LDL-콜레스테롤 농도를 감소시킴으로써 심혈관질환의 위험요인들을 개선하는 효과가 있는 것으로 밝혀져 비만 및 당뇨를 억제하는 유산균을 이용한 발효유, 유제품, 발효식품, 기능식품의 개발 가능성을 높여왔다.

[0005] 유산균 종류 중 비피도박테리움 속(*Bifidobacterium* spp.)은 생균제에 사용되는 대표적인 유산균으로 미국 에프디에이(Food and Drug Administration, FDA)에서는 이를 그라스(Generally Recognized as Safe, GRAS)에 등재하여 안전한 식품 소재로 인정하고 있다. 즉, 연구 발표된 바와 같이 비피도박테리움 속은 비만 및 당뇨 개선과

더불어 설사, 장염, 과민성 대장증후군 및 염증성 장질환의 개선, 장내 유익균의 증식, 장내 유해균이나 병원성 미생물의 억제에 효과가 있고, 피부염과 알레르기도 완화시키는 것으로 알려져 있다.

[0006] 셀룰로오스를 분해하는 효소 중 하나인 베타-글루코시다아제(β -glucosidase)는 수용성 올리고당 또는 셀로비오스에 작용하여 베타-글루코시드 결합(β -glucoside bond)을 가수 분해하는 활성을 갖는 효소로서 셀룰로오스 분해에 의해 생성되는 셀로비오스의 축적을 감소시킴으로써 셀룰로오스 분해 효율을 향상시킬 수 있다. 또한, 베타-글루코시다아제(β -glucosidase)는 미생물 발효에 이용되는 글루코오스를 생산하기 위해서 필수적인 효소이므로 식품 및 바이오매스 발효에서 있어서 매우 중요하다.

[0007] 대한민국공개특허공보 제10-2013-0014516은 글루코시다아제(glucosidase)의 제조 방법, 효소 조성물 및 바이오매스의 가수 분해 방법에 관한 것으로서, 호열성 균 유래 글루코시다아제(glucosidase)를 인코딩하는 DNA에 분비 시그널 서열을 인코딩하는 DNA 및 Asn-X-Ser 또는 Asn-X-Thr를 인코딩하는 DNA를 도입하여 호열성 균 유래 변이형 글루코시다아제(glucosidase)를 인코딩하는 DNA를 진핵 미생물에 도입해 분비 단백질로서 발현되게 하는 것을 포함한다. 또한, 상기 변이형 글루코시다아제를 포함하는 효소 조성물 및 상기 효소 조성물을 사용하는 바이오매스의 가수 분해 방법을 제공하고 있다.

[0008] 또한, 최근 생물전환을 통하여 다양한 기능성을 지닌 천연물 소재를 개발하는 연구가 많이 이루어지고 있으나, 현재까지는 유전자재조합 효소 또는 미생물을 이용하거나, 식품에는 사용이 제한되어 있는 곰팡이를 활용하여 생물전환을 한 사례가 많다. 이에, 식품 소재로 활용될 수 있는 생물전환 소재는 많지 않은 실정이다. 이를 해결하기 위해서 자체적으로도 건강 기능성을 가지고 있고, 베타-글루코시다아제(β -glucosidase) 등의 생물전환 효소를 가지고 있는 유산균에 대한 연구자들의 관심을 집중되고 있으나, 유산균의 생물전환 수율이 상대적으로 낮고, 유산균을 활용한 생물전환 공정 최적화에 대한 연구가 미흡한 상황이다. 또한, 현재까지의 유산균에 대한 연구는 주로 김치, 치즈 등 발효식품에서 유래한 유산균에 집중되어 있어 유산균을 다양한 식품 소재에 적용하는 것에 한계가 있다.

선행기술문헌

특허문헌

[0010] (특허문헌 0001) - 등록특허공보 제10-1726207호(2017.04.12.공고)
 (특허문헌 0002) - 공개특허공보 제10-2014-0047886호(2014.04.23.공개)

비특허문헌

[0011] (비특허문헌 0001) - ' β -glucosidase formation in Cellulomonas sp.'(충남대학교 농업기술연구보고 제3권제2호, 1976.12.)
 (비특허문헌 0002) - '김치에서 분리된 젖산균의 베타글루코시다아제 활성 탐색'(Food Engineering progress, Vol.14, No.3, pp.243-248(2018))

발명의 내용

해결하려는 과제

[0012] 본 발명은 베타-글루코시다아제(β -glucosidase) 생산 능력이 우수하여 식품, 사료, 화장품 및 의약품 등에 이용가능한 유산균을 선발하는 것을 목적으로 한다. 이를 통해 바이오매스 생물전환을 산업적으로 도입하도록 지원할 수 있다.

[0013] 또한, 본 발명은 내산성과 내 담즙성이 우수하며 항생제 내성이 없는 생균제를 제공하고자 한다. 이를 통해 인체 무해하고 장까지 살아가서 정착하여 증식할 수 있는 안전한 생균제 개발을 지원할 수 있다.

과제의 해결 수단

[0015] 따라서 상기와 같은 과제를 해결하기 위하여 본 발명은 한국생명공학연구원에 기탁번호 KCTC13392BP로 기탁된

하기의 특징을 나타내는 비피도박테리움 애니멀리스 서브스페시스 락티스(*Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*) LDTM8102 신균주로 (a) 앰피실린(ampicillin), 카나마이신(kanamycin), 스트렙토마이신(streptomycin) 및 에리스로마이신(erythromycin)에 대한 내성이 없음, (b) 베타-글루코시다아제(β -glucosidase), 에스터라제(Esterase), 에스터라제 리파아제(Esterase lipase), 리파아제(Lipase), 발린 아릴아미다아제(Valine arylamidase) 및 알파-갈락토시다아제(α -galactosidase)에 활성이 있음, (c) pH 2에서 2시간 생존율이 100% 이상인 것을 특징으로 한다.

또한, 본 발명은 비피도박테리움 애니멀리스 서브스페시스 락티스(*Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*) LDTM8102 신균주를 식품, 사료, 화장품 또는 의약품제조에 이용하거나, 바이오매스 발효에 이용하는 방법을 제 공함으로써 달성할 수 있다.

[0016] 삭제

발명의 효과

[0017] 본 발명은 한국인 유아의 분변으로부터 분리한 비피도박테리움 애니멀리스 서브스페시스 락티스 (*Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*) LDTM8102 신균주[KCTC13392BP]를 제공하는데, LDTM8102 신균주 [KCTC13392BP]는 베타-글루코시다아제(β -glucosidase) 생산 능력이 우수하여 다양한 식품, 사료, 화장품 및 의 약품 등에 제공될 수 있다.

[0018] 또한, 본 발명 LDTM8102 신균주[KCTC13392BP]는 베타-글루코시다아제(β -glucosidase) 생산 능력이 우수하여 바이오매스의 효율적인 생물전환을 가능하게 함으로써 바이오에탄올 등과 같은 바이오연료를 생산하는 방법을 제공할 수 있다.

[0019] 또한, 본 발명 LDTM8102 신균주[KCTC13392BP]는 우수한 내산성 및 내담즙성을 가지며, 항생제 내성을 갖지 않기에 장내 생존성이 좋으며 인체에 무해하여 의약품 생균제 개발에 활용될 수 있다.

[0020] 또한, 본 발명 LDTM8102 신균주[KCTC13392BP]는 식품, 사료, 의약품, 화장품, 바이오연료를 포함하는 다양한 산업 분야에서 상기 유산균 균주 그대로 또는 그것을 포함한 조성물로 다양하게 활용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0021] 도면 1은 한국인 유아의 분변으로부터 분리, 동정된 유산균 균주 5종의 베타-글루코시다아제(β -glucosidase) 활성 정도를 측정한 것이다.

또한, 도면 2는 분리, 동정된 유산균 균주 5종의 산성 조건에서의 내성을 평가한 것으로, 강한 산성 조건에서 상기 유산균 균주의 높은 생존율을 확인할 수 있다.

도면 3은 분리, 동정된 유산균 균주 5종의 내담즙성을 평가한 것으로, 상기 유산균 균주가 장내 담즙의 농도에 대한 내성을 가지고 있음을 확인할 수 있다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0022] 이하, 본 발명을 실시예를 통하여 보다 상세하게 설명한다. 그러나, 이들 실시예는 본 발명을 예시적으로 설명 하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0024] <실시예 1.> 균주 분리, 동정

[0026] 1-1. 균주 분리

[0028] 한국인의 장내 유래 유산균 균주를 분리하기 위해 100일 미만의 영유아의 분변을 제공받아(IRB No. 1605/003-006), 락토바실러스 속(*Lactobacillus* spp.)과 비피도박테리움 속(*Bifidobacterium* spp.)을 선택배지를 활용하여 균주 분리하였다.

[0029] 구체적으로는, 수집된 분변 시료는 0.85% sodium chloride(NaCl) 용액에 10배 단계 희석하여 0.02% sodium azide를 첨가한 De Man Rogosa, Sharpe agar (MRS agar; Difco, USA)와 50mg/L lithium mupirocin을 첨가한 TOS-propionate agar(Merck KGaA, Germany)에 도말한 후 37℃의 온도에서 48시간 동안 혐기 배양하였다.

[0030] 또한 배양 후 콜로니(colony) 형태가 서로 다른 균주를 선별하고, 선별된 균주는 MRS broth와 Glucose Blood

Liver broth(BL broth; MB cell, Korea)에서 계대배양한 후 20% 글리세롤이 함유된 MRS broth와 BL broth에서 -80℃의 온도에서 동결 보관하였다.

[0032] 1-2. 균주 동정

[0034] 가. API kit를 이용한 균주 동정

[0036] 상기 1-1.과정을 통해 분리된 유산균 균주의 정확한 동정을 위해서, API 20A kit, API-ZYM kit(BioMetriex Co. France)를 이용하여 탄수화물 발효, 효소 활성을 측정함으로써 상기 유산균 균주의 생화학적 특성을 검토하였다.

[0037] 그 결과, 상기 동정한 비피도박테리움 애니멀리스 서브스페시스 락티스(*Bifidobacterium animalis* subsp.*lactis*) 5종은 하기 [표 1]와 같은 탄수화물 발효 프로파일에 있어도 글루코스(glucose), 락토스(lactose), 수크로스(sucrose), 말토스(maltose), 살리신(salicin), 자일로스(xylose), 아라비노스(arabinose),라피노스(raffinose)를 모두 이용할 수 있고, 비피도박테리움 속(*Bifidobacterium* spp.)과 82.8% 내지 96.8 %의 상동성을 보여 그 이용가능성을 확인하였다.

표 1

[0039]

Biochemical reaction, enzyme, or isolate identification	Strain				
	KT 9-4	KT 11-6	KT 11-7	KT 11-8	KT 11-9
Indole	-	-	-	-	-
Urease	-	-	-	-	-
Glucose	+	+	+	+	+
Mannitol	+	+	-	+	+
Lactose	+	+	+	+	+
Sucrose	+	+	+	+	+
Maltose	+	+	+	+	+
Salicin	+	+	+	+	+
Xylose	+	+	+	+	+
Arabinose	+	+	+	+	+
Gelatin	-	-	-	-	-
Esculin	-	-	-	-	-
Glycerol	-	-	-	-	-
Cellobiose	-	-	-	-	-
Mannose	-	+	-	-	-
Melezitose	-	-	-	-	-
Raffinose	+	+	+	+	+
Sorbitol	-	-	-	-	-
Rhamnose	-	-	-	-	-
Trehalose	-	-	-	-	-
Isolate identification	<i>Bifidobacterium</i> spp.				
	96.8 %	91.1 %	82.8 %	96.8 %	96.8 %

[0041] 또한, 상기 동정한 비피도박테리움 애니멀리스 서브스페시스 락티스(*Bifidobacterium animalis* subsp.*lactis*) 5종은 하기 [표 2]과 같이 베타-글루코시다아제(β -glucosidase) 외에도 에스터라제(esterase), 류신 아릴아미다아제(leucine arylamidase), 알파-갈락토시다아제(α -galactosidase), 베타-갈락토시다아제(β -galactosidase), 알파-글루코시다아제(α -glucosidase)의 활성도가 높은 균주들로 확인되었고, 특히 KT9-4는 타 균주에 비해 에스터라제 리파아제, 리파아제, 발린 아릴아미다아제 활성까지 확인되었다. 본 발명에서는 특히 베타-글루코시드 결합(β -glucoside bond)을 가수분해하는 활성을 갖는 식품 및 바이오매스 발효에 유용한 베타-글루코시다아제(β -glucosidase)를 중심으로 심화 연구하였다.

표 2

Enzymes	Strain				
	KT 9-4	KT 11-6	KT 11-7	KT 11-8	KT 11-9
Control	-	-	-	-	-
Esterase (C4)	+	+	+	+	+
Esterase lipase	+	-	-	-	-
Lipase	+	-	-	-	-
Leucine arylamidase	+	+	+	+	+
Valine arylamidase	+	-	-	-	-
Cystine arylamidase	+	+	-	+	+
Acid phosphatase	+	+	+	+	+
Naphtol-AS-BI-phosphohydrolase	+	+	+	+	+
α -galactosidase	+	+	+	+	+
β -galactosidase	+	+	+	+	+
β -glucuronidase	-	-	-	-	+
α -glucosidase	+	+	+	+	+
β -glucosidase	+	+	+	+	+

나. 16S ribosomal RNA(16S rRNA) gene sequencing을 통한 균주 동정

상기 1-1.의 과정에서 분리된 유산균 균주들의 더 정확한 동정을 위해서, 염기서열 분석회사인 (주)Macrogen에 16S rRNA gene sequencing을 의뢰하였고, 27F(5' -AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3'), 1492R(5' -GGT TAC CTT GTT ACG ACT T-3') 프라이머를 사용하여 PCR 증폭 후 분석, 동정한 결과 하기 [표 3]에 보는 것과 같이 균주가 비피도박테리움 애니멀리스 서브스페시스 락티스(*Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*)임을 확인하였고, [표 3]의 KT9-4 즉, LDTM8102균주[KCTC13392BP]의 염기서열은 도 4와 같이 확인되었다.

표 3

No.	균주	16S rRNA gene sequencing 결과
1	KT9-4	<i>Bifidobacterium animalis</i> subsp. <i>lactis</i>
2	KT11-6	<i>Bifidobacterium animalis</i> subsp. <i>lactis</i>
3	KT11-7	<i>Bifidobacterium animalis</i> subsp. <i>lactis</i>
4	KT11-8	<i>Bifidobacterium animalis</i> subsp. <i>lactis</i>
5	KT11-9	<i>Bifidobacterium animalis</i> subsp. <i>lactis</i>

이처럼, API kit를 이용한 탄수화물 발효 특성, 효소 활성 프로파일링과 염기서열 분석(16S rRNA gene sequencing) 등을 통해 상기 1-1.에서 분리된 유산균 균주는 비피도박테리움 애니멀리스 서브스페시스 락티스(*Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*)로 확인되었다.

<실시예 2.> 균주의 베타-글루코시다아제(β -glucosidase) 활성 평가

상기 <실시예 1.>에서 분리, 동정된 균주 5종 및 대조균인 락토바실러스 카제이(*Lactobacillus casei*)[ATCC393]을 대상으로 colorimetric assay를 이용하여 β -glucosidase 활성을 측정하였다. 베타-글루코시다아제(β -glucosidase) 활성 측정은 MRS broth에 계대배양한 상기 유산균 균주의 배양액을 17,000g에서 5분간 원심분리한 후 상등액과 균체를 과쇄하여 효소액으로 사용하고, 5mM 4-Nitrophenyl β -D-glucopyranoside(Sigma, USA)에 준비한 효소액을 넣고 37°C에서 20분간 반응시킨 후, 차가운 500mM sodium carbonate(Na_2CO_3) 용액을 첨가하여 반응을 중단시킨 반응액을 1분간 원심분리한 후 405nm에서 흡광도를 측정하여 확인하였다.

베타-글루코시다아제 활성 정도는 [표 4] 및 도면 1과 같이 유산균 균주 5 종과 대조균 대비시 KT9-4 스트레인의 세포 내(intracellular) 베타-글루코시다아제(β -glucosidase) 활성이 현저히 높은 것을 알 수 있다. 즉, 세

포 내 효소활성도는 KT11-6 등 동일 소재로부터 분리된 타 스트레인에 비해서조차 KT9-4는 약 72% 내지 220% 현저한 특이점이 확인되어 향후 쌀, 보리, 우유, 콩, 인삼 등 식품과 해조류, 목질계 등을 포함하는 바이오매스 천연물에 대해 미생물 대사를 통해 유용물질로 생물전환하는데 효과적으로 활용할 수 있는 것으로 확인되었다.

표 4

[0058]

균주	효소 활성 결과	
	Intracellular(Unit/mL)	Pellet(Unit/mL)
KT9-4	52.09 ± 1.10	13.18 ± 0.15
KT11-6	30.68 ± 0.46	13.31 ± 0.07
KT11-7	35.68 ± 0.26	15.10 ± 0.20
KT11-8	29.02 ± 0.40	13.31 ± 0.27
KT11-9	16.30 ± 0.76	14.33 ± 0.26
ATCC393	-	22.23 ± 0.27

[0060]

<실시예 3.> 균주의 내산성(acid resistance) 평가

[0062]

상기 <실시예 1.>에서 분리, 동정된 유산균 균주 5종의 내산성을 평가하기 위해 균주를 0.05% cysteine을 함유한 MRS broth에 계대배양하여 준비하였다. pH에 따른 상기 유산균 균주의 생육 정도를 확인하기 위해 hydrochloric acid (HCl) 용액을 이용하여 pH 2, 2.5, 3, 3.5으로 조절한 0.05% cysteine을 함유한 MRS broth에 세척한 유산균 균체를 2×10^6 CFU/mL로 접종하였다. 접종 후 37°C에서 2시간 동안 혐기배양한 균주의 생존율을 측정, 비교하였다.

수학적 식 1

[0064]

$$\text{생존율(\%)} = \frac{\text{접종 후 2시간배양된 생균수(CFU/mL}_{120\text{min}})}{\text{접종시 생균수(CFU/mL}_{0\text{min}})} \times 100$$

[0066]

하기 [표 5] 및 도면 2는 균주의 생존성을 보여주는 것으로 균주 5종은 강 산성 조건에서 생존율이 매우 높았다. 그 중에서도 특히 KT9-4 균주는 동일 소재로부터 분리된 타 스트레인에 비해 pH2.0의 강산성 조건에서 2시간 배양 시 배양 전 균수의 100.84%가 살아 있어 식품이나 약품에 사용시 체내 위액의 영향을 받지 않고 장까지 효과적으로 도달할 수 있는 우수한 내산성을 확인하여 생균제에 이용할 수 있다는 점을 확인하였다.

표 5

[0068]

균주	2시간 배양시 생존율(%)			
	pH 2.0	pH 2.5	pH 3.0	pH 3.5
KT9-4	100.84	99.12	100.62	101.39
KT11-6	100.69	100.46	99.94	101.08
KT11-7	98.35	99.67	100.58	99.77
KT11-8	97.45	96.74	98.58	100.22
KT11-9	99.97	100.52	100.77	100.13

[0070]

<실시예 4.> 균주의 내담즙성(bile resistance) 평가

[0072]

상기 <실시예 1.>에서 분리, 동정된 유산균 균주 5종의 내담즙성을 확인하기 위해 상기 유산균 균주를 0.05% cysteine을 함유한 MRS broth에 계대배양하여 준비하였다. 배양액의 담즙산의 농도에 따른 상기 균주 생육을 확인하기 위해 bovine bile이 각각 0.015%, 0.031%, 0.062%, 0.125%, 0.25%, 0.5%, 1%, 2% 첨가된 0.05% cysteine을 함유한 MRS agar에 세척한 유산균 균체를 20 μL씩 접종하고 이를 37°C에서 48시간 동안 혐기배양한 후 MIC(minimal inhibitory concentration)를 측정하였다.

[0073]

유산균 균주 5종의 MIC 조사 결과, [표 6] 및 도면 3과 같이 균주들은 모두 0.25% 이하 bovine bile에서 정상 성장하는 것을 확인하였고, 이를 통해 균주들은 모두 장내 담즙 농도에 생육 가능하여 생균제로 이용할 수 있음

을 확인하였다.

표 6

균주	MIC of bovine bile(%)
KT9-4	0.25
KT11-6	0.25
KT11-7	0.25
KT11-8	0.25
KT11-9	0.25

<실시예 5.> 균주의 안전성 평가

상기 <실시예 1.>에서 분리, 동정된 유산균 균주 5종의 항생제 내성 여부를 확인하기 위해 microdilution method(CLSI, M07-A9)를 이용하여 검정하였다.

먼저 균주를 0.05% cysteine을 함유한 MRS broth에 계대배양한 후 2번 세척하여 균체를 Mcfarland 1, optical density 600nm(OD₆₀₀)에서 0.3이 되도록 2× LAB susceptibility test medium broth(LSM broth)에 희석하였다. 이후 희석액을 2× LSM broth에 300배 희석하여 준비하고, 이를 microplate에 100 μL씩 분주한 후 2× 항생제 (ampicillin, kanamycin, streptomycin, erythromycin) 희석액을 100 μL씩 분주하였다.

또한, 항생제는 1 mg/L에서 128 mg/L까지 단계적으로 희석하여 준비하였다. 37℃에서 48시간 동안 혐기배양한 후 MIC를 측정하였고, 하기 [표 7]은 분리된 균주 5종의 MIC 측정 결과로, European Food Safety Authority 기준에 의하면 균주들은 모두 ampicillin, kanamycin, streptomycin, erythromycin에 대한 내성이 없음을 알 수 있다. 이를 통해 분리된 균주 5종 모두 생균제로 사용하기에 적합한 것을 확인하였다.

표 7

균주	MIC(mg/L)			
	Amp*	Kan*	Str*	Ery*
KT 9-4	≤ 1	> 128	> 128	≤ 1
KT 11-6	≤ 1	> 128	> 128	≤ 1
KT 11-7	≤ 1	> 128	> 128	≤ 1
KT 11-8	≤ 1	> 128	> 128	≤ 1
KT 11-9	≤ 1	> 128	> 128	≤ 1
Microbiological cut-off values of <i>Bifidobacterium</i> spp. (mg/L)				
EFSA*	2	n.r.	128	1

(* Amp: Ampicillin; Kan: Kanamycin; Str: Streptomycin; Ery: Erythromycin; Tet: Tetracycline; Chl: Chloramphenicol; EFSA: European Food Safety Authority)

이상 살펴본 바와 같이, 본 발명에 의한 베타-글루코시다아제(β-glucosidase) 활성이 높은 비피도박테리움 애 니멀리스 서브스페시스 락티스(*Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*) LDTM8102 신균주[KCTC13392BP]는 pH 2.0에서도 강하게 생존하는 우수한 내산성 외에도 내담즙성, 항생제 내성 등 생균제 사용조건을 모두 검증하여 건강기능식품, 의약품 생균제 개발에 응용할 수 있고, 나아가 다양한 식품, 사료, 화장품 또는 의약품 제조에 이용하거나, 바이오매스 발효에도 이용할 수 있다.

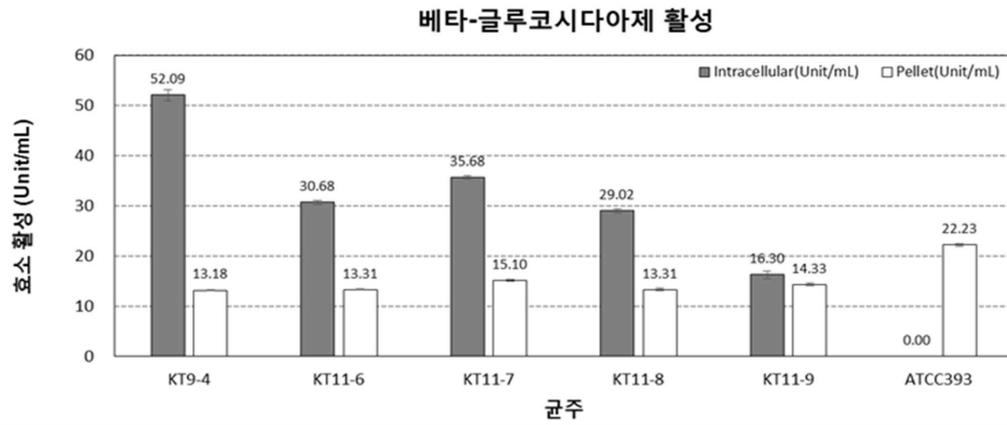
수탁번호

기탁기관명 : 한국생명공학연구원
 수탁번호 : KCTC13392BP

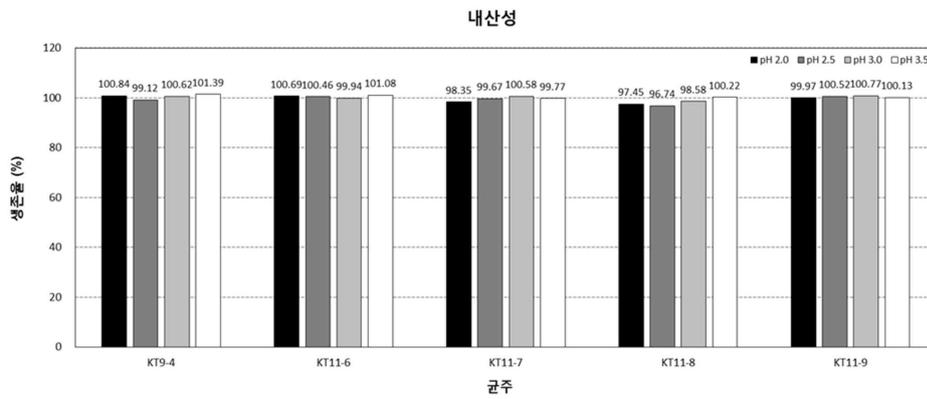
수탁일자 : 20171114

도면

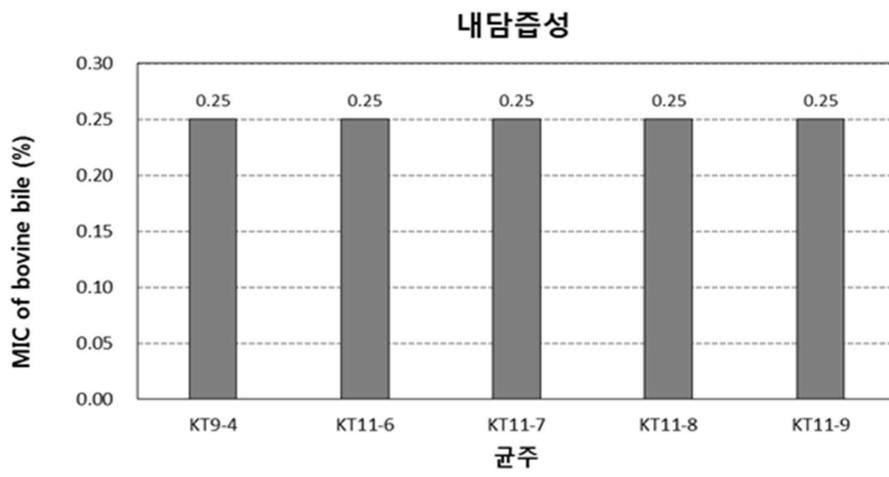
도면1



도면2



도면3



도면4

<p>LDTM8102 F</p>	<p>TGGGGTTCGTGGATGCTGGATGTGGGGCCCTTCCACGGGTCCCGTGTCG GAGCCAACGCGTTAAGCATCCCGCCTGGGGAGTACGGCCGCAAGGCTAAA ACTCAAAGAAATTGACGGGGGCGCCGACAAAGCGGCGGAGCATGCGGATTA ATTGATGCAACGCGAAGAACCCTTA CCTGGGCTTGACATGTGCCGGATCG CCGTGAGACACGGTTTCCCTTCGGGGCCGGTTCACAGGTGGTGCATGGT CGTCGTACGCTCGTGTGTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGC AACCTCGCCGCATGTTGCCAGCGGGTGA TGCCGGGAACATCATGTGGGAC CGCCGGGGTCAACTCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTACATCATATGCC CCTTACGTCCAGGGCTTACGCATGCTACAATGGCCGGTACAACGCGGTG CGACAGGTGACGTGGGGCGGATCGCTGAAAACCGGTCTCAGTTCGGATC GCAGTCTGCAAC TCGACTGCGTGAAGGCGGAGTGCCTAGTAATCGCGGAT CAGCAACGCGCGGTGAATGCGTTCGGGGCCCTGTACACACCGCCCGTC AAGTCATGAAAGTGGGTAGCACCCGAAGCCGGTGGCCCGACCCCTGTGGG GGGAGCCGTCTAAGGTGAGACTCGTGATTGGGACTAAGTCGTAACAGGTT AACCCGTAATAATGGTGAAGCCCTTAAATTTTAAATCCCTAGGGGTAA GGA CAAGGCCCAAAACCCCTCCCTTCCCGCTTGGGGTTCCTCCCAAAATTTCA ACATTTCCCCCTTTTCCCGGGAATTTCCGTCTCCCCCTCGAGCCCTAT CCCACCCCGCTTATCCGGGGCTGAAA CCCCCCTTGAAGAGCGGAGA TTTTCCCCCGAGCACAGCGAAAAACCCCA GCCAAAACCCCTTTTACCC CCAAAAATCCACGAGGAAAAACCCCGCCCCCGCTAGTTTTTAAATCTT GCGGGCTGGGACCCGACAAATAATCCCATTCCTTTTTTTTTGAAAATCC CCCCTCTCTTGCA GGCAGAAAGAAAGATTACTTTTTCTTTTTTCAAAA AAACGATTTTTTTTATCCCTAAGGACCA CCGCTCCCTCCCCACCCCGA CCGTTCGTGGTTTTTGGTCCGGTCTAGCCCCGTGCCTGGCCAGGTAT AATCCCACCTCGGTGGCTCCCCCATCAAGGAAAATATGGGGGGGTT TTGGGCATCAAGCCCAACCTGTAGGTCTCTAATGGTTCTTCCCTCCCCC CCACCTTTCAACTACGGCGTCCCGCCCCCCCCCTATTTAAGGGAATGG GGCGGGCCCGTCCCCCCCCCCCCCCCCCTGTGAAACAAAAATGC GGGTCCCA TTCCCGGACCCCCCCCCCATCCCCCCCCCTTACCCCCA CTC ACTCTGGCGGTCCCCCCCCCCCCCTCCCGACCCACCCCGAACATC CGGACGGCCCCCAACCCCAAGCCCCACCCCTCCGCGCCCC</p>
<p>LDTM8102 R</p>	<p>CCCAGTGGGCGTATCCAGGGCGGATGCTTAAAGCGTTGGCTCCGACACG GGACCGTGGAAAAGGGCCCCACATCCAGCATCCACCGTTTACGGCGTGGG CTACCAGGGTATCTAATCCTGTTCGCTCCCCACGCTTTCGCTCCTCAGCG TCA GTGACGGCCAGAGACCTGCCTTCGCCATTGGTGTCTTCCCGATAT CTACACATTCACCGTTACACCGGGAATTCAGTCTCCCGTACCGCACTC CAGCCCGCCCGTACCGGGCGCAGATCCACCGTTAGGCGATGGACTTTCAC ACCGGACGCGACGAACCGCCTACGAGCCCTTACGCCCAATAAAATCCGGA TAACGCTCGCACCCCTACGTA TTACCGCGGCTGCTGGCACGTAGTTAGCCG GTGCTTATTCGAACAATCCACTCAA CACGGCCGAAACCGTGCCTTGCCT TGAACAAAAGCGGTTTACAACCCGAAGGCCTCATCCCGCAGCGGGCGTC GCTGCATCAGGCTTGCGCCATTGTGCAATA TTCCCACTGCTGCCTCCC GTAGGAGTCTGGGCGTATCTCAGTCCCAATGTGGCCGGTCAACCTCTCA GGCCGGCTACCCGTCAACGCCTTGGTGGGCCATACCCCGCCAACAAGCT GATAGGACGCGA CCCCATCCCATGCCGCAAAGCATTTCACCCCAACA TGCGATGGAGCGGAGCATCCGGTATTACCA CCGTTCAGGAGCTATTC CGGTGCACAGGGCAGGTTGGTCAAGCATTA CTACCCGTTCCGCACTCTC ACCCCGACAGCAAAGCTGCCAGGATCCCGTTGACTTGCATGTGTTAAGC ACGCCGCCAGCGTTATCCTGAGCCTGATTCCAACTCTACAGTGGGGG GGGGTTACAAATTTGCGAAGTAACGGAATCTAAGGCTCAAAACTACCC C G G T T A C A C T C T T T T C C T G T C T</p>

서열목록

- <110> Seoul National University R & DB Foundation
- <120> A new Bifidobacterium animalis subsp. lactis LDTM8102
strain(KCTC13392BP) having advanced beta-glucosidase activity
- <130> P18-005
- <160> 1
- <170> KoPatentIn 3.0

<210> 1
 <211> 1541
 <212> DNA
 <213> Unknown
 <220><223> Bifidobacterium animalis subsp. lactis LDTM8102
 <400> 1

tgggggtcgt ggatgctgga tgtggggccc ttccacggg tcccgtgtcg gagccaacgc 60
 gttaagcadc ccgcctgggg agtacggccg caaggctaaa actcaaagaa attgacgggg 120

gcccgcacaa gcggcggagc atgcggatta attcgatgca acgcgaagaa cttacctgg 180
 gcttgacatg tgccgatcg ccgtggagac acggtttccc ttcggggccg gttcacaggt 240
 ggtgcatggt cgtcgtcagc tcgtgtcgtg agatgttggg ttaagtcccg caacgagcgc 300
 aaccctcgcc gcatgttgcc agcgggtgat gccgggaact catgtgggac gccggggtc 360
 aactcggagg aaggtgggga tgacgtcaga tcatcatgcc cttacctcc agggcttcac 420
 gcatgctaca atggccgta caaccggtg cgacacggtg acgtggggcg gatcgtgaa 480
 aaccggtctc agttcggatc gcagtctgca actcgactgc gtgaaggcgg agtcgctagt 540

aatcgcggat cagcaacgcc gcggtgaatg cgttcccggg cttgtacac accgcccgtc 600
 aagtcatgaa agtgggtagc acccgaagcc ggtggcccga cccttgtggg gggagccgtc 660
 taagtgaga ctcgtgattg ggactaagtc gtaacaggtt aaccgtaaa atggtgagcc 720
 ccttaaatth ttaateccta ggggtaagga caaggcccga aaaccctccc tcccccttg 780
 gggttcctcc ccaaattca acatttccc ctttttccc gggaatttcc gtctccccc 840
 tcgagcctat cccaccccc cttatccgg ggtgaaacc cccctttga agagcggaga 900
 tttttcccc cgagcacagc gaaaaacecc agccaaaace ctttttacc caaaaatec 960

acgaggaaaa acccccccc cccctagt ttttaattt gcgggctggg acccgacaaa 1020
 taatecccat ctttttttt ttgaaaatcc cccctctct tgcaggccga agaaagatta 1080
 ctttttct tttacaaaa aaacgatttt tttttatccc ctaaggacca cccttccctc 1140
 cccaccccg cggttcgtg gtttttggc cggttctagc cccgtgctg gccaggtat 1200
 aatccccacc tcgtggctc cccccatca aggaaaaacta tgggggggtt ttgggcatca 1260
 agcccaacct gtaggtctct aatggttctt cctcccccc ccactttca actacggcgt 1320
 ccccccccc cccctattt aaggaatgg ggcgggcccg gtccccccc ccccccccc 1380

cccctgtgaa acaaaaaatgc gggteccatt cccggacccc cccccatcc ccccccttc 1440
 acccccactc actcctggcg gtccccccc cccctccc acccaccac cccgaacatc 1500

cggacggccc cccaaccca agccccacc cctccgccc c

1541