



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2017년05월12일
 (11) 등록번호 10-1734367
 (24) 등록일자 2017년05월02일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 1/20 (2006.01) *A23L 11/00* (2016.01)
A23L 11/20 (2016.01) *A23L 27/50* (2016.01)
A23L 29/00 (2016.01) *C12R 1/24* (2006.01)
 (52) CPC특허분류
C12N 1/20 (2013.01)
A23L 11/09 (2016.08)
 (21) 출원번호 10-2015-0108048
 (22) 출원일자 2015년07월30일
 심사청구일자 2015년07월30일
 (65) 공개번호 10-2017-0015687
 (43) 공개일자 2017년02월09일
 (56) 선행기술조사문헌
 KR1020150056395 A
 KR1020140012411 A
 KR1020130068839 A
 KR1020150000372 A

(73) 특허권자
재단법인 발효미생물산업진흥원
 전라북도 순창군 순창읍 민속마을길 61-27
 (72) 발명자
양희중
 대전광역시 서구 가장로 107 삼성래미안아파트
 205동 402호
정수지
 전라북도 순창군 동계면 서호리 483-3번지
 (뒷면에 계속)
 (74) 대리인
최규환

전체 청구항 수 : 총 3 항

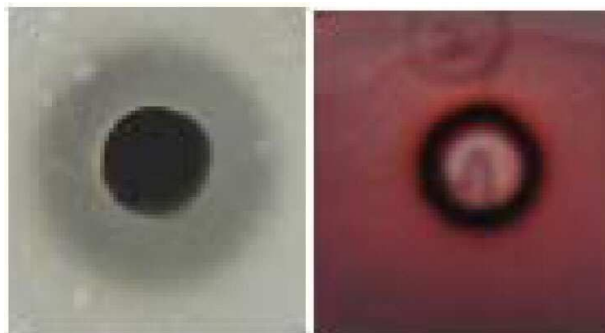
심사관 : 김지연

(54) 발명의 명칭 **유해 미생물에 대한 항균 활성, 항생제 내성, 항산화 활성, β -글루코시다제 및 세포의 효소 분비능이 우수하고, 바이오제닉 아민을 생성하지 않는 전통장류 유래의 락토바실러스 브레비스 SCML67 균주 및 이의 용도**

(57) 요약

본 발명은 유해 미생물에 대한 항균 활성, 항생제 내성, β -글루코시다제 활성, 항산화 활성 및 세포의 효소 분비능이 우수하고, 바이오제닉 아민(biogenic amine)을 생성하지 않는 전통장류 유래의 락토바실러스 브레비스 (*Lactobacillus brevis*) SCML67 균주(KACC81007BP), 상기 락토바실러스 브레비스 SCML67 균주 또는 이의 배양액을 유효성분으로 포함하는 장류 유해 미생물에 대한 항균용 미생물 제제, 상기 락토바실러스 브레비스 SCML67 균주를 포함하는 식품, 상기 락토바실러스 브레비스 SCML67 균주 또는 이의 배양액을 장류에 처리하는 단계를 포함하는 장류 유해 미생물 제어 방법에 관한 것이다.

대표도 - 도2



(52) CPC특허분류

A23L 11/20 (2016.08)
A23L 27/50 (2016.08)
A23L 29/065 (2016.08)
A23V 2002/00 (2013.01)
A23V 2200/10 (2013.01)
A23Y 2220/13 (2013.01)
C12R 1/24 (2013.01)

정도연

전라북도 전주시 완산구 평화로 95 호반리젠시빌아
파트 101동 1203호

(72) 발명자

정성엽

전라북도 순창군 순창읍 순창7길 해피하우스 401호

허주희

전라북도 순창군 순창읍 순창11길 47-22 가동 402
호 (순화리, 신천아파트)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	313037-3
부처명	농림축산식품부
연구관리전문기관	농림수산물기술기획평가원
연구사업명	고부가가치식품기술개발사업
연구과제명	전통장류 유래 기능성 미생물소재를 활용한 고부가가치 제품 개발
기여율	1/1
주관기관	전북대학교 산학협력단
연구기간	2014.11.20 ~ 2015.11.19

명세서

청구범위

청구항 1

바실러스 세레우스(*Bacillus cereus*)에 대한 항균 활성, 아미카신(amikacin), 세팔로신(cephalothin), 시프로플록사신(ciprofloxacin), 콜리스틴(colistin), 린코마이신(lincomycin), 카나마이신(kanamycin), 노르플록사신(norfloxacin), 스트렙토마이신(streptomycin), 테트라사이클린(tetracycline) 및 트리메토프림/설파메톡사졸(trimethoprim/sulfamethoxazole) 항생제에 대한 내성, 항산화 활성, β-글루코시다제, 프로테아제(protease) 및 셀룰라제(cellulase)를 분비하고, 히스타민(histamine) 및 티라민(tyramine)을 생성하지 않는 전통장류 유래의 락토바실러스 브레비스(*Lactobacillus brevis*) SCML67 균주(KACC81007BP).

청구항 2

삭제

청구항 3

제1항의 락토바실러스 브레비스(*Lactobacillus brevis*) SCML67 균주 또는 이의 배양액을 유효성분으로 포함하는 바실러스 세레우스(*Bacillus cereus*)에 대한 항균용 미생물 제제.

청구항 4

제1항의 락토바실러스 브레비스(*Lactobacillus brevis*) SCML67 균주를 포함하는 장류.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 유해 미생물에 대한 항균 활성, 항생제 내성, 항산화 활성, β-글루코시다제 및 세포외 효소 분비능이 우수하고, 바이오제닉 아민을 생성하지 않는 전통장류 유래의 락토바실러스 브레비스 SCML67 균주 및 이의 용도에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 전통 장류의 발효 과정은 주로 바실러스(*Bacillus*), 아스퍼질러스(*Aspergillus*), 유산균 및 효모들의 복합적인 대사 과정으로 이루어져 있다. 장류 제조는 프로테아제(proteases) 활성이 높은 바실러스와 아스퍼질러스 속으로 단백질 함량이 높은 콩을 가수분해하는 과정을 거치며, 적절한 증식 온도와 여러 미생물들의 상호 작용에 의한 발효가 이루어지기 때문에 바이오제닉 아민이 생산되기 적당한 조건이다.

[0003] 실제로 2006년 국내 유통 발효 식품 중에 바이오제닉 아민 분포를 조사한 결과에 따르면 전통 된장의 퓨트레신 함량은 99.6~1453.7(평균 462.6)mg/kg, 히스타민은 260.1~952(평균 569.4) mg/kg, 티라민은 284.7~1430.7(평균 669.5) mg/kg으로 한국인들이 주로 섭취하는 34종의 식품 가운데 평균적으로 가장 높았고, 그 다음으로 멸치 젓갈, 현대식 간장, 재래식 간장, 현대식 된장 순이었다. 한국인 식단 중 바이오제닉 아민 함량이 가장 높은 식품 7종 중 4종이 장류이고, 식단 특성상 장류 사용량이 젓갈보다 더 많다는 것을 고려하면, 한국인은 식사를 통해 건강에 해로운 수준까지도 바이오제닉 아민을 섭취할 수 있다.

[0004] 현재까지 아미노산 디카르복실라제 활성을 지녀 바이오제닉 아민을 생성할 수 있는 바실러스 아밀로리퀘파시엔스(*Bacillus amyloliquefaciens*), 바실러스 서틸리스(*Bacillus subtilis*), 바실러스 리케니포미스(*Bacillus licheniformis*)가 청국장에서 동정되었으며, 히스타민 디카르복실라제(histamine decarboxylase) 유전자는 결손 되었지만 티로신 디카르복실라제(tyrosine decarboxylase) 유전자를 함유한 2종의 바실러스 서틸리스 균주들이 바이오제닉 아민 함량이 낮은 청국장에서 분리되었다.

[0005] 바이오제닉 아민은 모노아민 옥시다제(monoamine oxidase)와 폴리아민 옥시다제(polyamine oxidase)에 의해 분해되며 현재까지 이들 효소 활성은 마이크로코커스(*Micrococcus*), 나트리네마(*Natrinema*), 브레비박테리움

(Brevibacterium), 락토바실러스(Lactobacillus), 스타필로코커스(Staphylococcus), 아쓰로박터(Arthrobacter), 클렙시엘라(Klebsiella), 슈도모나스(Pseudomonas), 세라티아(Serratia), 살모넬라(Salmonella) 속에서 발견되고 있다(Naila et al., 2010 J. Food Sci. 75, 139-150). 그러나 한국 전통 장류 발효에서 가장 핵심적인 역할을 하는 바실러스 속의 바이오제닉 아민 분해 능력은 바실러스 리케니포미스를 제외하고는 전혀 알려져 있지 않았다. 또한 바실러스 리케니포미스는 한국식품의약품안전청(KFDA)에서 식품 첨가물로서 현재까지 사용이 허용된 상태가 아니기 때문에 실제 장류에 적용할 수는 없는 실정이다. 이에 따라 우리는 KFDA에 GRAS (generally recognized as safe) 균주로서 장류 제조에 허용될 수 있는 바실러스 서틸리스 균주들을 대상으로 바이오제닉 아민 분해능을 조사하였다. 앞으로, 전통 장류는 전통적인 장류의 풍미는 유지되 바이오제닉 아민 저감화를 통한 식품 안전성을 동시에 확보할 수 있어야 한다. 이러한 점을 고려해 본 발명에서는 전통 장류의 주 발효 세균인 바실러스 서틸리스와 바실러스 아밀로리케파시엔스를 중심으로 유해 물질인 바이오제닉 아민 분해능력을 가지면서 안전성 확보를 위해 독소 유전자를 함유하지 않는 균주들의 분리에 목표를 두었다.

[0006] 한편, 한국공개특허 제2015-0000372호에서는 '감마아미노부틸산 고생산성 락토바실러스 브레비스 및 그의 용도'가 개시되어 있으나, 본 발명에서와 같이 '유해 미생물에 대한 항균 활성, 항생제 내성, 항산화 활성, β-글루코시다제 및 세포외 효소 분비능이 우수하고, 바이오제닉 아민을 생성하지 않는 전통장류 유래의 락토바실러스 브레비스 SCML67 균주 및 이의 용도'에 대해서는 밝혀진 바가 전혀 없다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명은 상기와 같은 요구에 의해 도출된 것으로서, 본 발명에서는 유해 미생물인 바실러스 세레우스(*Bacillus cereus*)에 대한 항균 활성, 10종의 항생제 내성, 항산화 활성, β-글루코시다제 및 프로테아제 및 셀룰라제 분비능이 우수하고, 바이오제닉 아민을 생성하지 않는 전통장류 유래의 새로운 락토바실러스 브레비스(*Lactobacillus brevis*) SCML67 균주(KACC81007BP)를 분리하였다. 본 발명에서 분리한 균주를 장류에 처리할 경우, 특히, 전통 장류의 발효 과정 중 발생하는 장류 유해 미생물을 효과적으로 제어할 수 있어 매우 유용하게 사용될 수 있음을 확인함으로써, 본 발명을 완성하였다.

과제의 해결 수단

[0008] 상기 과제를 해결하기 위해, 본 발명은 유해 미생물에 대한 항균 활성, 항생제 내성, 항산화 활성, β-글루코시다제 및 세포외 효소 분비능이 우수하고, 바이오제닉 아민을 생성하지 않는 전통장류 유래의 락토바실러스 브레비스(*Lactobacillus brevis*) SCML67 균주(KACC81007BP)를 제공한다.

[0009] 또한, 본 발명은 상기 락토바실러스 브레비스 SCML67 균주 또는 이의 배양액을 유효성분으로 포함하는 장류 유해 미생물에 대한 항균용 미생물 제제를 제공한다.

[0010] 또한, 본 발명은 상기 락토바실러스 브레비스 SCML67 균주를 포함하는 식품을 제공한다.

[0011] 또한, 본 발명은 상기 락토바실러스 브레비스 SCML67 균주 또는 이의 배양액을 장류에 처리하는 단계를 포함하는 장류 유해 미생물 제어 방법을 제공한다.

발명의 효과

[0012] 본 발명에서는 전통 장류에서 분리한 락토바실러스 브레비스(*Lactobacillus brevis*) SCML67 균주가 장류의 발효 과정 동안 발생하는 유해 미생물의 증식을 억제하고, β-글루코시다제, 프로테아제 및 셀룰라제의 세포외 효소를 분비하며, 항생제 내성 및 항산화 활성이 우수하며, 바이오제닉 아민을 생성하지 않는 것을 확인하였다. 본 발명의 락토바실러스 브레비스 SCML67 균주를 이용하여 독성이 없는 안전한 장류 식품 생산 효과를 가져올 수 있으므로, 식품산업에 유용하게 이용될 수 있을 것으로 판단된다.

도면의 간단한 설명

[0013] 도 1은 본 발명에 따른 SCML67 분리주의 16S rRNA 염기서열을 나타낸다.

도 2는 본 발명에 따른 SCML67 분리주의 세포외 효소 활성 검정 결과이다. (좌부터 프로테아제, 셀룰라제)

도 3은 선별된 균주에 대한 항산화활성을 조사한 결과이다.

도 4는 본 발명에 따른 SCML67 분리주의 생장 곡선을 확인한 결과이다. MRS 배지에 접종하여 150 rpm, 30°C에서 배양한 락토바실러스 브레비스 SCML67 균주의 세포 건조 균체량 및 흡광도를 배양 시간별로 나타내었다. 실험은 3번 반복구로, 데이터는 평균(n=3)을 구하였고, 평균±표준편차로 나타내었다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0014] 본 발명의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 유해 미생물에 대한 항균 활성, 항생제 내성, 항산화 활성, β-글루코시다제 및 세포외 효소 분비능이 우수하고, 바이오제닉 아민을 생성하지 않는 전통장류 유래의 락토바실러스 브레비스(*Lactobacillus brevis*) SCML67 균주(KACC81007BP)를 제공한다.
- [0015] 상기 락토바실러스 브레비스(*Lactobacillus brevis*) SCML67 균주(KACC81007BP)는 전통 장류에서 분리하였으며, 유해 미생물인 바실러스 세레우스(*Bacillus cereus*)에 길항 능력을 가지며, β-글루코시다제 활성이 있고, 프로테아제 및 셀룰라제 분비능이 우수하고, 항산화 활성이 우수하며, 바이오제닉 아민(biogenic amine)을 생성하지 않는 균주이다. 상기 락토바실러스 브레비스(*Lactobacillus brevis*) SCML67 균주를 국립농업과학원 농업유전자원센터에 2015년 07월 28일자로 기탁하였다(기탁번호 : KACC 81007BP).
- [0016] 본 발명의 일 구현 예에 따른 균주에서, 상기 유해 미생물은 바실러스 세레우스(*Bacillus cereus*)일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0017] 본 발명의 일 구현 예에 따른 균주에서, 상기 세포외 효소는 프로테아제(protease) 또는 셀룰라제(cellulase)일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0018] 본 발명의 일 구현 예에 따른 균주에서, 상기 바이오제닉 아민(biogenic amine)은 히스타민(histamine) 또는 티라민(tyramine)일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0019] 본 발명의 바이오제닉 아민(biogenic amine)은 미생물의 아미노산 디카복실라제 작용에 의해 아미노산으로부터 형성되며, 인체의 분해 한도를 넘어서는 바이오제닉 아민을 식품에서 섭취하는 경우에는 발진, 국소적 피부염증, 알레르기, 구토, 오심, 설사 등의 증상을 유발한다.
- [0020] 또한, 본 발명은 상기 락토바실러스 브레비스(*Lactobacillus brevis*) SCML67 균주 또는 이의 배양액을 유효성분으로 포함하는 장류 유해 미생물에 대한 항균용 미생물 제제를 제공한다.
- [0021] 본 발명의 일 구현 예에 따른 미생물 제제에서, 상기 유해 미생물은 바실러스 세레우스(*Bacillus cereus*)일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0022] 상기 미생물 제제는 장류로부터 분리된 유해 미생물에 대해 항균 활성, 항산화 활성, 항생제 내성 활성 및 바이오제닉 아민을 생성하지 않는 락토바실러스 브레비스(*Lactobacillus brevis*) SCML67 균주를 유효성분으로 포함할 수 있다. 본 발명에 의한 미생물 제제는 액상 형태로 제조될 수 있으며 이에 증량제를 첨가하여 가루분말의 형태로 이용하거나 이를 제형화하여 과립화시킬 수도 있다. 그러나 그 제형에 특별히 한정되지는 않는다.
- [0023] 본 발명은 또한, 본 발명의 락토바실러스 브레비스(*Lactobacillus brevis*) SCML67 균주를 배양하는 단계를 포함하는 장류 유해 미생물에 대한 항균용 미생물 제제의 제조 방법을 제공한다. 본 발명의 락토바실러스 브레비스 SCML67 균주를 배양하는 방법은 당업계에 알려진 통상의 방법을 이용할 수 있다.
- [0024] 또한, 본 발명은 상기 락토바실러스 브레비스(*Lactobacillus brevis*) SCML67 균주를 포함하는 식품을 제공한다.
- [0025] 상기 식품은 본 발명의 락토바실러스 브레비스(*Lactobacillus brevis*) SCML67 균주를 평균적으로 이용한 발효식품일 수 있고 더욱 상세하게는 장류일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 본 발명의 일 구현 예에 따른 식품에서, 상기 장류는 메주, 한식된장, 된장, 조미된장, 고추장, 조미고추장, 춘장, 청국장, 혼합장, 한식간장, 양조간장 및 혼합간장으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나인 것을 특징으로 하나, 이에 제한되지 않는다.
- [0026] 본 발명은 또한, 본 발명의 락토바실러스 브레비스(*Lactobacillus brevis*) SCML67 균주 또는 이의 배양액을 장류에 처리하는 단계를 포함하는 장류 유해 미생물 제어 방법을 제공한다.
- [0027] 상기 장류 유해 미생물 제어는 본 발명의 락토바실러스 브레비스 SCML67 균주를 장류에 처리함으로써, 유해 미생물의 성장을 지연시키거나 저해시키는 것을 의미한다.

[0028] 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0029] **균주 분리 및 배양**

[0030] 메주, 된장, 고추장 시료는 전라북도 순창군 11개의 면단위에서 전통적인 방법으로 제조된 장류 약 200 여종을 수집하였으며, 수집한 시료 1g을 취하여 멸균된 0.85% NaCl 용액 9 ml에 현탁하여 각 단계별로 희석한 후 희석액 100 μ l을 Luria- bertani agar(LB, Difco™) 배지에 도말하여 30℃에서 24시간 배양하였다. 순수한 균주를 분리하기 위해 배양된 미생물의 형태적 차이를 이용하여 1차적으로 선별한 후 다시 순수 배양하여 균주를 분리하였다. 분리한 미생물은 다음 연구에 사용을 위하여 20%의 글리세롤을 포함한 LB 액체 배지와 혼합하여 -80℃에서 보관하여 사용하였다.

[0031] **선별 균주의 세포의 효소 분비능 측정**

[0032] 분리 미생물이 균체외로 방출하는 세포의 효소들 중 프로테아제 및 셀룰라제의 활성 검증을 위하여 한천 확산법 (agar well diffusion method)을 이용하였고, 각 효소와 특이적으로 반응할 기질의 성분이 포함된 고체 선별배지를 사용하였다. 프로테아제 분비능은 스킴 밀크(skim milk)를 기질로 선택하여 2%의 스킴 밀크 (Difco™)에 1.5%의 아가를 첨가한 스킴 밀크 아가 배지를 제조(Vermelho *et al.*, 1996, Mem. Inst. Oswaldo Cruz, 91, 755-760)하여 사용하였고, 셀룰라제 분비능은 카르복실메틸 셀룰로오스(carboxylmethyl cellulose, CMC, JUNSEI chemical Co. Ltd.)을 기질로 선택하여 1% 카르복실메틸 셀룰로오스를 함유한 CMC 아가 배지를 제조 (Teather and Wood, 1982, Appl. Environ. Microbiol, 43, 777-780)하여 사용하였다. 제조된 효소 분비능 측정 배지에 각 균주의 배양 상등액을 0.45 μ m 막 필터 (Sartorius)로 제균한 뒤 100 μ l씩을 직경 8 mm의 준비한 웰 (well)에 분주하여 25℃에서 24시간 동안 반응시킨 후 프로테아제 및 셀룰라제 분비능을 투명한 직경으로 조사하였다.

[0033] **바실러스 세레우스에 대한 항균활성 측정**

[0034] 식품 유해미생물을 대상으로 선별한 균주의 항균활성을 조사하였다. 식품 유해 미생물은 부패원인균으로 알려진 바실러스 세레우스(*Bacillus cereus*, KCTC 3624), 바실러스 세레우스(*Bacillus cereus*, KCCM 40935) 등 총 2 균주를 대상으로 수행하였다. 유해 미생물의 대한 항균 활성은 유해 미생물이 포함되어 있는 0.8% 소프트 아가 플레이트를 이용한 한천 확산법(Park *et al.*, 2002, Kor. J.Life Science, 12, 200-207)에 준하여 조사하였으며, 0.45 μ m 막 필터(Sartorius)로 제균한 분리 균주의 배양 상등액 100 μ l을 각 항균활성 측정 배지의 웰에 분주하고 30℃ 배양기에서 24시간 동안 배양하여 억제환의 크기에 따라 항균활성을 측정하였다.

[0035] **β -글루코시다제(β -glucosidase) 활성을 갖는 유산균의 선별**

[0036] 앞서 선별한 균주를 대상으로 β -글루코시다제 활성을 측정하기 위해 RS(소고기 추출물 1%, 프로테오스 펩톤 No. 3 1%, 효모 추출물 0.5%, 텍스트로스 2%, 폴리소르베이트 80 0.1%, 암모늄 시트레이트 0.2%, 소듐 아세테이트 0.5%, 마그네슘 설페이트 0.01%, 망가니즈 설페이트 0.005%, 디포타슘 포스페이트 0.2%)와 EIA(에스쿨린 0.1%, 페릭 암모늄 시트레이트 0.05%, 아가 1.5%)를 혼합하여 멸균 후 고체 배지를 만들어 균화 후 선별한 균주를 접종하여 37℃에서 2일간 배양한 후 콜로니 주변의 색의 변화를 조사하여 갈색 또는 검정색 존(zone)을 형성하는 균주를 선별하였다.

[0037] **항산화 활성 측정**

[0038] 선별한 균주에 대한 항산화 활성의 측정은 DPPH (2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazyl, Sigma-aldrich)의 방법(Lee *et al.*, 2009 Food Sic. Biotechnol, 18, 959-964)에 따라 실험하였다. 100 μ M DPPH 에탄올 용액 1ml에 200 μ l의 배양 상등액을 가한 다음 반응 산물은 30분 동안 실온에서 반응시킨 후 528 nm에서 UV/VIS 스펙트로포토미터 (SPECORD 200, Analytic jena)로 흡광도를 측정하여 아래 식에 따라 항산화 활성의 정도를 측정하였다. 대조구

로는 배양 배지만을 첨가한 실험구를 사용하여 동일하게 측정하였다.

[0039] $\text{항산화 활성(\%)} = [1 - \text{Abs}_{528\text{nm of sample}} / \text{Abs}_{528\text{nm of control}}] \times 100$

[0040] **바이오제닉 아민(Biogenic amine) 생성 확인**

[0041] 선별 분리주를 대상으로 바이오제닉 아민 정량 실험은 MRS 액체 배지에 각 분리 미생물을 접종한 후 37℃ 현탁 배양기 (VS-1203P3V, Vision Scientific Co. Ltd., Daejeon, Korea)에서 150 rpm, 24시간 전배양한 후 전배양액 1 ml을 전구체 0.1% 히스티딘과 티로신이 포함된 MRS 액체 배지 9 ml에 접종하고 37℃ 현탁 배양기, 150 rpm, 24시간 동안 본 배양 하였다. 본 배양액은 13,000 rpm에서 30분간 원심분리하여 균체를 제거한 상등액을 바이오제닉 아민 분석을 위한 전처리 시료로 사용하였다. 전처리 시료용액과 표준용액을 각각 0.5ml 취한 후 0.25µl 1,7-디아미노헵탄 (Sigma-aldrich, MO, USA)와 0.25ml 포화 Na₂CO₃ 용액 (Sigma-aldrich, MO, USA), 1% 아세톤 (Sigma-aldrich, MO, USA), 0.4ml 댄실 클로라이드 (dansyl chloride, Sigma-aldrich, MO, USA)을 혼합한 후 45℃에서 1시간 동안 유도체화 하였다. 유도체화한 시료에 0.25ml의 10% 프롤린(Sigma-aldrich, MO, USA)을 가한 후 여분의 댄실 클로라이드를 제거한 뒤 2.5ml의 에틸 에테르 (Samchun, Seoul, Korea)를 가하여 3분간 진탕한 후, 분리된 상등액을 취하여 증발시킨 후 남은 잔사를 0.5ml 아세토니트릴(acetonitrile, Mallinckrodt J. T. Baker, Phillipsberg, NJ, USA)에 정용하여 0.45µm 시린지 필터 (Sartorius, Frankfurt, Germany)로 여과한 것을 분석에 사용하였다. 바이오제닉 아민 분석을 위한 기기 분석 조건(Jeong *et al.*, 2014, J. Korean. Soc. Food. Sci. Nutr, 43, 550-556)은 아래와 같다.

표 1

[0042] 바이오제닉 아민 검출을 위한 HPLC 분석 조건

Instrument	Agilent 1200 series (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA)
Column	CapcellPak C18 Column
Detector	DAD detector (254 nm)
Mobile phase	A: 0.1% formic acid in H ₂ O B: 0.1% formic acid in Acetonitrile
Gradient condition	A:B = 45:55, 0~10 min A:B = 35:65, 10~15 min A:B = 20:80, 15~20 min A:B = 10:90, 20~30 min A:B = 10:90, 40 min over
Flow rate	1.0ml/min
Temperature	40℃
Injection volume	20µl

[0043] **균주의 동정**

[0044] 최종 선별 균주의 동정을 위하여 16S rRNA 유전자 분석을 실시하였다. 균주의 동정을 위하여 균체를 Nutrient broth (NB, Difco™)에 접종하여 30℃에서 24시간 동안 배양한 후 원심 분리하여 균체를 회수한 뒤 ZR Fungal/Bacterial DNA Miniprepkit (Zymo Research Corp.)를 이용하여 DNA를 추출하였다. 16S rRNA 유전자는 유니버설 프라이머(universal primer)인 27F와 1492R로 합성하여 유전자 단편을 PCR로 증폭시켰고(Baek *et al.*, 2010, Korean J. Microbiol, 38, 379-384), 증폭된 PCR 산물은 QIAquick PCR Purification kit (QIAGEN)로 정제한 후 Cosmogentech Co.에 의뢰하여 염기서열을 분석하였다.

[0045] **API ZYM을 이용한 락토바실러스 브레비스(Lactobacillus brevis)의 효소 활성 조사**

[0046] 최종 선별한 락토바실러스 브레비스 SCML67의 효소활성을 조사하기 위해 API ZYM 키트(Biomérieux)를 사용하여 알칼리성 인산가수분해효소(alkaline phosphatase) 외 18가지 효소의 활성을 검사하였으며, 락토바실러스 브레비스 SCML67를 MRS 고체 배지에서 배양한 후 균체를 회수하여 0.85% NaCl 용액에 현탁하였다(Mcfarland 탁도 5~6

으로 조정). ZYM 키트의 각 cupule에 현탁액을 분주하고 37°C에서 4시간 배양한 후에 색깔의 변화를 관찰함으로써, 효소 활성 정도를 조사하였다.

[0047] **항생제 및 감수성 조사**

[0048] 동정 후 선별한 균주에 대하여 항생제 감수성 시험은 NCCLS(National Committee for Clinical Laboratory Standards)의 디스크 확산법(diffusion method)으로 실시하였다. 사용한 항생제 디스크(BBL Sensi-disc, Becton Dickinson Co., USA)는 아미카신(amikacin, 30 µg, AN), 아목시실린/클라불란산(amoxicillin/clavulanic acid, 20 µg/10 µg, AMC), 암피실린(ampicillin, 10 µg, AM), 세팔로신(cephalothin, 30 µg, CF), 시프로플록사신(ciprofloxacin, 5 µg, CIP), 콜리스틴(colistin, 10 µg, CL), 독시사이클린(doxycycline, 30 µg, D), 에리스로마이신(erythromycin, 15 µg, E), 젠타마이신(gentamicin, 10 µg, GM), 린코마이신(lincomycin, 2 µg, L), 카나마이신(kanamycin, 30 µg, K), 네오마이신(neomycin, 30 µg, N), 노르플록사신(norfloxacin, 10 µg, NOR), 스트렙토마이신(streptomycin, 10 µg, S), 테트라사이클린(tetracycline, 30 µg, TE), 트리메토프림/설파메톡사졸(trimethoprim/sulfamethoxazole, 1.25 µg/23.75 µg, SXT) 등 16종을 사용하였다. 감수성 시험방법은 최종 선별 균주를 Mueller Hinton Broth(MERck, Germany)에 접종하고 37°C에서 5시간 동안 배양한 후 0.5 MacFarland(BioMerieux)의 균액으로 희석한 후 Muller-Hinton agar(Difco)에 도말한 후 30분간 건조시킨 후 16종의 항생제 디스크를 올려놓고 37°C에서 1일간 배양하였다. 각 항생제에 대한 억제환의 크기를 측정하고 CLSI 가이드라인에 의해 감수성과 내성을 판정하였다.

[0049] **균체 성장조사**

[0050] 배양시간에 따른 생육 정도를 조사하기 위하여 MRS 배지에 선별한 균주 5%를 접종하여 37°C 현탁 배양기에서 150rpm, 72시간 배양한 후 건조 균체량 및 흡광도를 측정하였으며, 시간에 따른 균체 성장의 조사를 위해 4시간 간격으로 배양액을 회수하였다. 건조 균체량의 측정은 배양액 10ml를 13,000 rpm에서 30분간 원심 분리한 후 멸균 증류수로 3회 세척하여 80°C에서 항량에 도달할 때까지 건조한 후 무게를 측정하였다. 또한 흡광도의 조사를 위하여 배양액 1 ml를 회수하여 13,000 rpm에서 30분간 원심 분리한 후 멸균 증류수로 3회 세척하고, 멸균 증류수 1 ml에 재부유하여 UV/VIS 스펙트로포토미터 (SPECORD 200, Analytic jena) 600 nm에서 흡광도를 측정하였다.

[0051] **실시예 1. 균주의 분리**

[0052] 다양한 기능성 및 생리활성을 갖는 국내 토종 발효미생물을 분리하기 위해 전라북도 순창군에서 전통적인 방법으로 제조한 메주, 된장, 고추장 시료 약 200여종을 수집하였다. 수집한 시료를 멸균 증류수에 현탁하여 단계 희석법을 이용하여 세균 배양 배지에 균주를 배양한 후 육안으로 집락의 형태, 색 등의 형태적 특징에 따라 583종의 미생물을 분리하였다. 선별을 완료한 균주는 MRS 배지에 접종하여 2일간 배양한 후 다음 연구에 사용하였다.

[0053] **실시예 2. 세포의 효소 분비능 측정**

[0054] 장류 발효에 관여하는 대표적인 균주로는 바실러스 서틸리스(*Bacillus subtilis*), 바실러스 리케니포미스(*B. licheniformis*), 바실러스 시트레아스(*B. citreus*) 등이 알려져 있으며, 이들은 발효과정에서 프로테아제(protease), 아밀라아제(α-amylase), 셀룰라제(cellulase) 및 리파아제(lipase)와 같은 미생물의 다양한 효소에 의해 아미노산(amino acid), 유리당(free sugar), 이소플라본(isoflavone), 아글리콘(aglycone), 지방산(fatty acid) 등으로 분해되어 풍미뿐만 아니라 다양한 기능성을 갖는 2차 산물이 생성된다고 알려져 있다. 특히 프로테아제는 발효 시 단백질을 분해하여 특유의 구수한 맛 성분인 유리아미노산의 함량에 영향을 준다고 밝혀졌으며(Kim et al., 2005, Kor. J. Life Science, 15, 749-754), Ra 등(Ra et al., 2004, J. Korean Soc. Food Sci. Nutr, 33, 439-442)은 된장으로부터 β-글루코시다아제 활성이 우수한 균주를 분리하는 등 전통 장류로부터 다양한 미생물 자원을 확보하기 위하여 다양한 기능성을 갖는 미생물 분리가 활발히 진행되고 있다.

[0055] 따라서 앞서 선별한 583종의 분리주를 대상으로 세포의 효소 활성을 측정한 결과 29종의 분리주에서 프로테아제

(protease) 및 셀룰라제(cellulase) 2가지 효소를 생성하는 것을 확인하였다(도 2).

[0056] 실시예 3. 분리 균주의 바실러스 세레우스에 대한 항균 활성

[0057] 앞서 효소활성 측정을 통하여 선별된 분리주 29종을 대상으로 바실러스 세레우스에 대한 항균활성을 조사하였다. 총 2종의 바실러스 세레우스에 대하여 항균 활성을 측정한 결과 대부분 2종 모두의 유해 미생물에 대하여 항균활성을 지니고 있었으며, 분리주 중에서 SCML26, SCML67, SCML125, SCML229, SCML310, SCML337, SCML383, SCML419, SCML500 등 9종이 바실러스 세레우스에 대하여 우수한 항균 활성을 지니고 있었다. 특히, 분리주 중 SCML67은 가장 우수한 활성을 보였으며, 전통 장류 발효 및 식품 제조에 있어서 바실러스 세레우스에 대한 항균 효과는 식중독 원인균에 대한 효과적인 방안이 될 것으로 사료된다.

표 2

[0058] 선별된 균주에 대한 효소 활성, 항균 활성의 비교 결과

시험 항목		선별된 균주								
		SCML26	SCML67	SCML125	SCML229	SCML310	SCML337	SCML383	SCML419	SCML500
효소 활성(mm) ^a	Protease	1.4	1.4	1.4	1.4	1.3	1.5	1.4	1.4	1.3
	Cellulase	0.8	1.1	0.8	1.0	0.8	0.8	1.0	0.8	1.2
항균 활성 (mm)	KCTC 3624 ^b	1.8	1.9	1.7	1.7	1.5	1.6	1.6	1.8	1.6
	KCCM 40935 ^c	1.4	1.8	1.3	1.6	1.6	1.5	1.4	1.3	1.4

[0059] ^a클리어존 크기(직경)

[0060] ^bKCTC 3624: 바실러스 세레우스(*Bacillus cereus*), ^cKCCM40935: 바실러스 세레우스(*Bacillus cereus*)

[0061] 실시예 4. 항산화 활성 측정

[0062] 앞선 실험을 바탕으로 하여 항균력이 있는 분리주에 대하여 항산화 활성 측정은 DPPH에 의한 자유 라디칼 제거 효과를 측정하여 조사하였다. DPPH는 항산화 활성을 측정하기 위한 대표적인 기질로 페놀성 물질에 대한 항산화 작용의 지표 중 하나이며, 자유 라디칼에 전자를 공여하여 식품 내 지방질 산화를 억제하고, 인체 내 활성산소에 의한 노화를 억제하여 질병 및 노화를 예방하는데 중요한 역할을 한다(Lee *et al.*, 1997, Korean J. Food Sci. Technol, 29, 432-436).

[0063] 따라서, DPPH를 이용하여 분리주의 항산화 활성을 측정한 결과 선별 균주 중 SCML26, SCML67, SCML500이 15% 이상의 DPPH 활성을 나타냈으며, SCML67은 17.71%의 가장 높은 항산화 활성을 갖고 있어, 앞선 효소활성, 항균활성, 항산화 활성 측정 결과를 통하여 가장 우수한 균주로써 SCML67을 최종 선별하였다(도 3).

표 3

[0064] 선별된 균주에 대한 항산화활성의 비교 결과

시험항목	선별된 균주								
	SCML26	SCML67	SCML125	SCML229	SCML310	SCML337	SCML383	SCML419	SCML500
항산화활성 (%)	16.04 ±0.12	17.71 ±0.61	13.83 ±0.04	14.89 ±0.15	10.87 ±0.31	5.79 ±0.24	14.00 ±0.32	6.13 ±0.02	15.02 ±0.22

[0065] 실시예 5. 바이오제닉 아민 생성확인

[0066] 정량분석은 선별된 균주를 히스티딘, 티로신이 포함된 액체배지에 첨가하고, 해당 아미노산에 대한 탈탄산 활성능과 균주가 생성한 히스티딘, 티로신의 함량을 측정한 결과를 아래에 나타내었다. SCML26, SCML125, SCML229,

SCML337, SCML500의 일부 분리주에서 바이오제닉 아민이 검출되었으나 정량이 되지 않는 검출수치를 나타내었고, 식품 내 히스타민은 840 mg은 약한 정도, 4080 mg은 중증 정도, 100 mg 이상은 극심한 중독증상을 일으킬 수 있고, tyramine은 100 mg 이상을 섭취해야 중독증상을 일으킬 수 있다고 보고하고 있어(Maijala and Eerola, 1993, Meat Sci, 35, 387-395) 앞서 선별한 균주 모두 유해한 수준은 아님을 확인하였다.

[0067] 특히 SCML67, SCML310, SCML383, SCML419의 분리주에서는 히스티딘, 티로신이 모두 검출되지 않았다.

표 4

[0068] 선별된 균주에 대한 바이오제닉 아민의 정량적 비교 결과

시험 항목		선별된 균주								
		SCML 26	SCML 67	SCML 125	SCML 229	SCML 310	SCML 337	SCML 383	SCML 419	SCML 500
바이오제닉 아민 (mg/L)	Histamine	N.Q ^a	N.D	N.Q	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D	N.D
	Tyramine	N.D ^b	N.D	N.D	N.Q	N.D	N.Q	N.D	N.D	N.Q

[0069] ^aN.D : 미검출

[0070] ^bN.Q : 미정량

[0071]

[0072] **실시예 6. β-글루코시다제(β-glucosidase) 활성 측정**

[0073] 대두를 이용하여 발효한 식품에는 당 성분이 혼합되어 있는 아글리콘(aglycone) 형태의 배당체가 존재하며 대표적인 물질이 이소플라본(isoflavone)이다. 이소플라본은 피토에스트로젠(phytoestrogen)이라고 불리우며, 체내에 활성물질로 일컫는 것이 다이드제인(daidzein)과 제니스테인(genistein)이다. 배당체 형태로 존재하고 있는 이소플라본은 위산과 장내 미생물이 생산하는 효소인 β-글루코시다제에 의하여 유리된 형태, 즉 비배당화 형태의 다이드제인과 제니스테인 등으로 전환되어 장에서 흡수가 된다. 최근 보고에 따르면 제니스테인은 강한 항암 작용을 하는 것으로 확인되었으며, 특히 이러한 효소를 생산하는 미생물을 이용한 발효식품은 더욱더 기능성 식품으로 각광받을 것으로 예측되고 있다. 따라서, 선별한 균주를 대상으로 β-글루코시다제 활성을 조사한 결과 선별 균주인 SCML67을 제외하고 모두 활성이 없는 것으로 나타나 앞선 효소활성, 항균활성, 항산화능 등을 조사한 결과와 비교하여 가장 우수하였기 때문에 최종선별 균주로 선택하였다.

표 5

시험 항목		선별된 균주								
		SCML 26	SCML 67	SCML 125	SCML 229	SCML 310	SCML 337	SCML 383	SCML 419	SCML 500
β-글루코시다제 활성 (발색정도)		-	++	-	-	-	-	-	-	-

[0075] 활성: + 하, ++ 중, +++ 상

[0076] **실시예 7. 균주의 동정**

[0077] 최종 선별한 SCML67의 16S rRNA 유전자 염기서열 분석 결과(도 1)를 이용하여 BLAST 검색 결과 락토바실러스 브레비스(*Lactobacillus brevis*)로 판명되었으며, 최종적으로 락토바실러스 브레비스 SCML67로 명명하였다. SCML67은 한국농업미생물자원센터(KACC, Korean Agricultural Culture Collection)에 락토바실러스 브레비스 KACC 81007BP로 기탁하였다.

[0078] **실시예 8. API ZYM 키트를 이용한 락토바실러스 브레비스 SCML67의 효소 활성 조사**

[0079] 최종 선별한 락토바실러스 브레비스 SCML67의 효소 생산 여부를 확인하기 위하여, API ZYM 키트를 이용하여 조사하였다. 아래 표와 같이 SCML67은 발린 아릴아미다제(valine arylamidase), 시스틴 아릴아미다제(cystine arylamidase) 계열의 프로테아제 효소를 생산하였고, 대두와 같은 곡류에 다량 존재하여 대장 내 가스 발생을 유발하는 라피노오스(raffinose)나 스타키오스(stachyose)와 같은 당류를 분해시키는 효소인 α -갈락토시다제 활성을 지녀 사람이나 동물에 있어서 정장효과를 기대할 수 있고, α 와 β -글루코시다제 활성 또한 지님을 확인하였다.

표 6

[0080] API ZYM 키트에 의한 SCML67 균주의 효소 활성 분석 결과

효소	결과
Control	-
Alkaline phosphatase	-
Esterase (C4)	-
Esterase lipase (C8)	+
Lipase (C14)	-
Leucine arylamidase	-
Valine arylamidase	+
Cystine arylamidase	+
Trypsin	-
α -chymotrypsin	-
Acid phosphatase	-
Naphol-AS-BI-phosphohydrolase	+
α -galactosidase	+
β -glucuronidase	+
β -glucosidase	+
α -glucosidase	+
β -glucosidase	+
N-acetyl- β -glucosaminidase	+
α -mannosidase	-
α -fucosidase	-

[0081] 실시예 9. 항생제 내성 조사

[0082] 최종 선별 균주 SCML67의 항생제 감수성을 조사한 결과 아목시실린/클라불란산(Amoxicillin/Clavulanic acid), 독시사이클린(doxycycline), 에리스로마이신(erythromycin)에 대하여 생육이 억제됨을 확인하였고, 아미카신(amikacin), 세팔로신(cephalothin), 시프로플록사신(ciprofloxacin), 콜리스틴(colistin), 린코마이신(lincomycin), 카나마이신(kanamycin), 노르플록사신(norfloxacin), 스트렙토마이신(streptomycin), 테트라사이클린(tetracycline), 트리메토프림/설파메톡사졸(trimethoprim/sulfamethoxazole) 계열의 항생제에 대하여는 내성을 지니고 있음을 확인하였다.

표 7

[0083] 락토바실러스 브레비스 SCML67의 항생제 내성 및 감수성 조사

Enzyme	Code/Disc potency	Result ^a
Amikacin	AN/30 μ g	ND
Amoxicillin/clavulanic acid	AMC/20 μ g, 10 μ g	SS
Ampicillin	AM/10 μ g	S
Cephalothin	CF/30 μ g	ND
Ciprofloxacin	CIP/5 μ g	ND
Colistin	CL/10 μ g	ND
Doxycycline	D/30 μ g	SS
Erythromycin	E/15 μ g	SS
Gentamicin	GM/10 μ g	S
Lincomycin	L/2 μ g	ND

Kanamycin	K/30 μg	ND
Neomycin	N/30 μg	S
Norfloxacin	NOR/10 μg	ND
Streptomycin	S/10 μg	ND
Tetracycline	TE/30 μg	ND
Trimethoprim/sulfamethoxazole	SXT/1.25 μg , 23.75 μg	ND

[0084] ^a 직경, cm; ND, Not; S, 1.2~1.5; SS, 1.6~2.0

[0085] 실시예 10. 균체 성장조사

[0086] SCML67의 생장곡선을 확인하기 위해 MRS (Difco) 배지에 접종하여 37°C 현탁 배양기, 150 rpm에서 배양하였고, 4시간 간격으로 흡광도, 건조 균체량을 측정하였다(도 4). 생육곡선 측정 결과 4시간에서 20시간까지 대수기를 나타냈고, 24시간 이후 증식이 점차 느려져 28시간부터 정지기에 들어갔다. 또한 20시간에 흡광도 1.8014 (OD₆₀₀)로 가장 높은 값을 나타내었고, 24시간에 2.4573 g/L의 건조 균체량으로 가장 높은 세포성장을 보였다. 이러한 결과를 바탕으로 최적 배양 시간을 대수기에서 정지기로 들어가는 24시간으로 설정하였다.

수탁번호

[0087]

기탁기관명 : 농업생명공학연구원

수탁번호 : KACC81007BP

수탁일자 : 20150728

도면

도면1

Sequence of SCML67

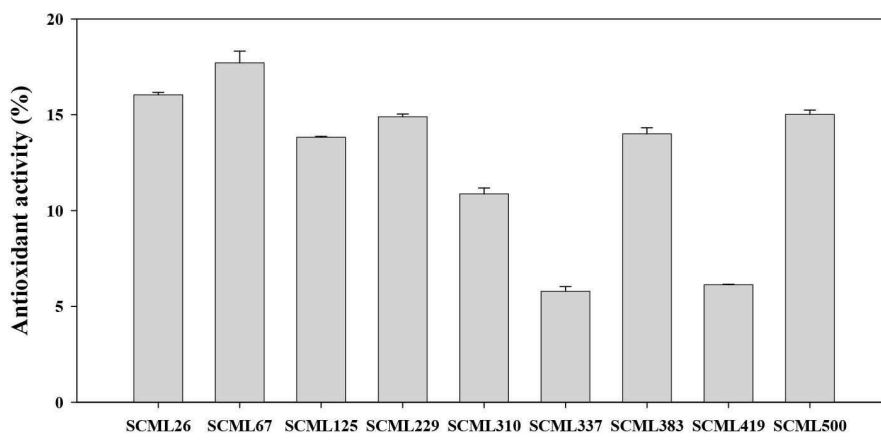
```

GGACATTGCAAAGAGTGGCGAACGGGTGAGTAACACGTGGGAAACCTACCTCTTAGCAGGGGATAACA
CTTGAAACAAGTGCTAATACCGTATAACACTAATAACCGCATGGTTATTAGTTAAAAGATGGTCTTG
CTATCACTAAGAGATGGTCCC CGCGGTGATTAGCTAGTTGGTAAGGTAATGGCTTACCAAGGCAATGAT
ACATAGCCGAGTTGAGAGACTGATCGGCCACAATGGGACTGAGACACGGCCATACTCCTACGGGAGG
CAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGACGAAAAGTCTGATGGAGCAACGCCCGGTGTGTGATGAAGGGT
TTCGGCTCGTAAAACACTGTTGTAAGAGAAGAATGACATTGAGAGTAACTGTTCAAGTGTGTGACGGTA
TCTTACCAGAAAGGAACGGCTAAATACGTGCCAGCAGCCCGGTAATACGTATGTTCCAAGCGTTATC
CGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGACGGTTATTTAAGTCCGAAGTGAAAGCCACAGCTTAAC
TGTGGAAGTGCTTTGGAACTGGATAACTTGAGTGCAGTAGAGGAGAGTGGAAGTCCATGTGTAGCGGT
GAAATGCGTAGATATATGGAAGAACCAGTGCGGAAGGCGGCTCTCTGGACTGTAAGTACGTTGAG
GCTCGAAAGTGTGGGTAGCAAACAGGATTAGATACCTGGTAGTCCACACCGTAAACGATGAGTGCTA
GATGTTTGGGGTTCCCGCCTTAAGTGTGCGCAGCTAACGCATTAAGCACTCCGCTGGGGAGTACGAC
CGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGACCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTGCA
AGCAACGCGAAGAACCCTTACCAGGTCTTGACATCCTTTGACCACTTCAGAGATGAAGCTTTCCCTTCG
GGGACAAAGTGACAGGTGGTGCATGGTTGTGTCGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCA
ACGAGCGCAACCCTTATTACTAGTTGCCAGCATTCAGTTGGGCACTCTAGTGAGACTGCCGGTGACAA
ACCGGAGGAAGGTGGGGATGACGTCAAATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACA
ATGGCAAGTACAACGAGCAGCTAACCCGCGAGGGTACGCGAATCTTTAAAACCTTGCTCAGTTCGGA
TTGTAGGCTGCAACTCGCCTACATGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCACGCCCGGTGA
ATACGTTCCCGGTCTTGTACACACCCGCCG
    
```

도면2



도면3



도면4

