



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2019-0018204  
(43) 공개일자 2019년02월22일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
*C12N 1/20* (2006.01) *A23C 9/123* (2017.01)  
*A23L 11/00* (2016.01) *A23L 27/10* (2016.01)  
*A23L 29/00* (2016.01) *A23L 33/135* (2016.01)  
*C12R 1/24* (2006.01)
- (52) CPC특허분류  
*C12N 1/20* (2013.01)  
*A23C 9/123* (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2017-0102863  
 (22) 출원일자 2017년08월14일  
 심사청구일자 2017년08월14일
- (71) 출원인  
 경남과학기술대학교 산학협력단  
 경상남도 진주시 동진로 33 (칠암동)
- (72) 발명자  
 조계만  
 경상남도 진주시 진주대로 829번길 21, 103동 2501호  
 황정은  
 경상남도 진주시 서장대로 278번길 17, 나동 501호  
 김수철  
 경상남도 진주시 대신로389번길 6-5
- (74) 대리인  
 조영신

전체 청구항 수 : 총 9 항

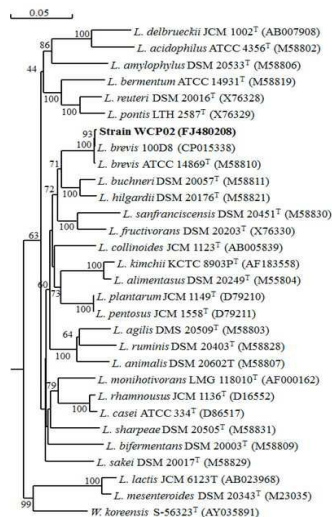
(54) 발명의 명칭 위액산 내성과 담즙산 내성이 탁월하고 높은 가바 생산성을 갖는 락토바실러스 브레비스 WCP02 균주, 이를 이용한 생균제제 및 발효식품

**(57) 요약**

본 발명에서 위액산 내성과 담즙산 내성이 탁월하여 생균제제로서의 활용성이 크고 또한 가바 생산성이 현저히 높아 기능성식품 소재의 발효 종균으로 사용될 수 있는 락토바실러스 브레비스 WCP02 균주, 이를 이용한 생균제제 및 발효식품이 제공된다.

본 발명의 락토바실러스 브레비스 WCP02 균주로 발효되어 제조된 콩 발효식품은 가바, 페놀릭스 및 비배당체 이소플라본의 함량이 증진될 뿐만 아니라, 알파-글루코시다아제 저해활성 및 췌장-리파아제 저해활성이 증진되어 콜레스테롤 저하, 당뇨, 비만, 고지혈증 및 동맥경화의 완화 및 개선 효과를 발휘하는 기능성 식품·의약품의 소재로 사용될 수 있다.

**대표도 - 도4**



(52) CPC특허분류

- A23L 11/09 (2016.08)
- A23L 27/10 (2016.08)
- A23L 29/065 (2016.08)
- A23L 33/135 (2016.08)
- A23V 2002/00 (2013.01)
- A23V 2200/328 (2013.01)
- A23V 2200/332 (2013.01)
- A23Y 2220/13 (2013.01)
- C12R 1/24 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

- 과제고유번호 314021-03
- 부처명 농림축산식품부
- 연구관리전문기관 농림수산식품기술기획평가원
- 연구사업명 농생명산업기술개발사업
- 연구과제명 지리산 권역 약용작물의 고부가가치 제품 및 6차 산업화 연계모델 개발
- 기여율 1/2
- 주관기관 경상대학교 산학협력단
- 연구기간 2014.07.29 ~ 2017.07.28

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

- 과제고유번호 2016R1D1A1B01009898
  - 부처명 교육부
  - 연구관리전문기관 한국연구재단
  - 연구사업명 이공학개인기초연구지원사업
  - 연구과제명 폐경-비만 모델 이용 복합생균제 발효물의 식이에 따른 갱년기·대사질환 개선 및 장내 미생물과의 상관성
  - 기여율 1/2
  - 주관기관 경남과학기술대학교 산학협력단
  - 연구기간 2016.06.01 ~ 2023.05.31
-

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

위액산 내성과 담즙산 내성이 우수하고 가바 생산성이 우수하고, 수탁번호 KACC92159P로 기탁된 락토바실러스 브레비스 WCP02 균주.

#### 청구항 2

제 1항에 따른 락토바실러스 브레비스 WCP02 균주의 배양물.

#### 청구항 3

제 1항에 있어서, 위액산 내성은 pH 2의 위액산에서 4시간 배양후 39% 이상의 생존율을 나타내고, 담즙산 내성은 pH 3.0의 담즙산에서 48시간 배양후 86% 이상의 생존율을 나타내고, 가바 생산성은 0.1%(w/v)의 모노소듐글루탐산(MSG) 농도에서 95% 이상의 가바 전환율을 나타내는 것을 특징으로 하는 락토바실러스 브레비스 WCP02 균주.

#### 청구항 4

제1항의 균주 또는 제2항의 배양물을 유효성분으로 포함하는 생균제제.

#### 청구항 5

제 4항에 있어서, 상기 생균제제는 건조된 세포 형태 또는 발효식품, 음료, 및 김치로 구성되는 균으로부터 선택되는 어느 하나의 형태로 제공되는 것을 특징으로 하는 생균제제.

#### 청구항 6

제 1항에 따른 락토바실러스 브레비스 WCP02 균주로 발효되고, 가바, 향산화 활성, 페놀릭스 및 비배당체 이소플라본 함량이 증진되고, 알파-글루코시다아제 저해활성 및 퀘장-리파아제 저해활성이 증진된 콩 발효식품.

#### 청구항 7

제 6항에 있어서, 콩 발효식품은 두유-요구르트 또는 콩발효 조미료인 것을 특징으로 하는 콩 발효식품.

#### 청구항 8

발아콩 두유에 제1항에 따른 락토바실러스 브레비스 WCP02 균주를 접종하여 발효하여 제조되는 두유-요구르트로,

상기 두유-요구르트는 증진된 가바, 페놀릭스 및 비배당체 이소플라본을 함유하고, 증진된 향산화 활성, 증진된 향당뇨 및 항비만 활성을 갖는 것을 특징으로 하는 두유-요구르트.

**청구항 9**

콩 가수분해물에 제1항에 따른 락토바실러스 브레비스 WCP02 균주를 접종하여 발효하여 제조되는 콩발효 조미료로,

상기 콩발효 조미료는 증진된 가바 함량을 갖는 것을 특징으로 하는 콩발효 조미료.

**발명의 설명**

**기술 분야**

[0001] 본 발명은 위액산 내성과 담즙산 내성이 탁월하고 우수한 가바 생산성을 갖는 락토바실러스 브레비스 WCP02 균주, 이를 이용한 생균제제 및 발효식품에 관한 것이다. 더 상세하게는 위액산 내성과 담즙산 내성이 탁월하여 생균제제로서의 활용성이 크고 또한 가바 생산성이 현저히 높아 기능성식품 소재의 발효 종균으로 사용될 수 있는 락토바실러스 브레비스 WCP02 균주, 이를 이용한 생균제제 및 발효식품에 관한 것이다.

**배경 기술**

[0003] 식생활이 서구화됨에 따라 동물성 식품의 섭취량이 증가하는 추세이고 이로 인해 여러 심혈관 질환, 각종 암, 당뇨 등과 같은 대사증후군이 증가하고 있다. 이러한 질병들의 치료는 의학 기술에 의존을 많이 하였으나, 최근 생균제제, 발효식품 등의 미생물 기반 기능성식품을 이용한 개선 및 예방에서 해법을 찾고자 하는 노력과 연구들이 증가하고 있다.

[0004] 생균제제(프로바이오틱스; Probiotics)는 '활성 생균 배양물'이라는 뜻으로 인간이나 동물 등 숙주의 위장관을 건강하게 유지해주는 '생균' 즉, 살아있는 세균을 의미한다. 2002년 FAO-WHO에서는 생균제제의 대표적인 균주로서 *Bifidobacterium* 및 *Lactobacillus* 속 균주를 권장하였다. 이들 균주는 유산균으로 분류되며 포도당을 분해하여 젖산을 생성하는 그람 양성균으로 알려져 있고, 장표면에서 우점종을 형성하며 이들이 생산하는 항균성 단백질(bacteriocin)에 의해 유해세균 억제, 장내 세균총의 안정화, 유당 불내증 및 과민성 대장증후군과 같은 대장질환 개선에 큰 효과가 있는 것으로 알려져 있다.

[0005] 이러한 프로바이오틱스(생균제제)가 유용한 효과를 보기 위해서는 유산균이 숙주의 소화기관을 거쳐 대장과 소장까지 생존하여 장내 및 상피세포에 어떠한 상태로든 결합하여 살아갈 수 있어야만 한다. 그러나 섭취된 통상의 유산균들은 위산에 의해 90% 이상이 사멸되며 생존한다 하더라도 담즙산에 의해 또다시 사멸되며 최종적으로 대장과 소장에도착할 확률은 약 5% 이내인 것으로 보고되고 있다. 따라서 생균제제로서 활용성이 높은, 위산과 담즙산에 내성인 유산균 균주의 발굴 및 연구가 활발히 진행되고 있다.

[0006] 가바(Gamma-aminobutyric acid, GABA)는 탄소 4개로 구성되어진 비-단백성 아미노산으로 글루타메이트 디카르복실라제(GADase)에 의해 글루탐산(glutamic acid; GA)으로부터 탈탄산 반응과 함께 이산화탄소가 방출됨으로써 가바로 전환되어진다. 가바는 뇌에서 신경전달물질로서의 역할뿐 아니라 뇌기능 촉진, 정신안정작용, 혈압저하 작용, 이뇨작용, 간 기능 개선 작용, 비만 방지 작용, 알코올대사 촉진작용 및 소취작용 등 매우 다양한 생리기능을 갖고, 또한 의약품으로 등록되어 뇌졸중 또는 뇌동맥 후유증에 의한 두통, 이명 및 의욕저하 등의 치료에 사용되고 있다. 보통 인체에서 가바를 생성하지만 부적절한 식품 또는 첨가물의 과잉섭취, 비타민이나 무기질류의 섭취 부족에 의해 노화가 진행되면서부터 체내의 가바 생성에는 한계가 오게 된다. 따라서 가바 생산성이 우수한 생균제제의 필요성과 유용성이 크게 대두된다.

[0007] 종래 기술에서는 가바 생성능을 갖는 유산균이 몇몇 발굴되었으나 (등록특허 10-1461116호, 등록특허 10-1131069호), 가바 생산성이 높지 않거나 위액 내성과 담즙산 내성이 충분치 않아 생균제제로 사용되기에 적합하지 않은 실정이었다.

**발명의 내용**

**해결하려는 과제**

[0009] 이에 본 발명자들은 종래 기술의 요구에 부응하기 위한 연구 결과, 김치에서 가바 생성능과 위액 내성과 담즙산

내성이 현저히 우수한 신규한 락토바실러스 브레비스 WCP02 균주를 분리·동정하고, 이 균주가 생균제제로 사용되기에 적합한 특성을 갖는다는 것을 확인하고 본 발명을 완성하게 되었다.

- [0010] 따라서 본 발명의 목적은 위액산 내성과 담즙산 내성이 탁월하여 생균제제로서의 활용성이 크고 또한 가바 생산성이 현저히 높아 기능성식품 소재의 발효 종균으로 사용될 수 있는 신규한 락토바실러스 브레비스 WCP02 균주를 제공하는 것이다.
- [0011] 본 발명의 또 다른 목적은 락토바실러스 브레비스 WCP02 균주 및/또는 그 배양물을 유효성분으로 포함하는 생균제제를 제공하는 것이다.
- [0012] 본 발명의 또 다른 목적은 락토바실러스 브레비스 WCP02 균주로 발효되어 가바 함량이 현저히 증진되고, 더불어 항산화 활성, 페놀릭스, 비배당체 이소플라본이 증진된 콩 발효식품을 제공하는 것이다.

### 과제의 해결 수단

- [0014] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 위액산 내성과 담즙산 내성이 우수하고 가바 생산성이 우수한 신규한 락토바실러스 브레비스 WCP02 균주 및 그 배양물을 제공한다.
- [0015] 본 발명자들은 김치로부터 우수한 생균제제 특성 (내산성, 위액 내성, 담즙산 내성) 및 우수한 가바 생성능을 구비한 균주를 분리/동정하였고, 이 균주를 '락토바실러스 브레비스 WCP02'로 명명하고 국립농업과학원 농업유전자원센터(KACC)에 2016년 12월 12일에 기탁하여, 수탁번호 KACC 92159P를 부여받았다 (실시예 1).
- [0016] 락토바실러스 브레비스 WCP02 균주의 확인은 형태학적 관찰로 그램염색과 전자현미경 관찰을 이용하였고 생리·생화학적 특성 규명은 당이용성 검정방법인 API kit를 이용하였으며, 균주의 세포벽 지방산 분석(MIDI 분석) 및 16S rDNA 염기서열 분석을 통하여 확인하였다. 16S rRNA 염기서열을 바탕으로 한 본 발명의 락토바실러스 브레비스 WCP02 균주가 락토바실러스 속에 속함을 알 수 있었다 (도 1 ~ 도 3).
- [0017] 락토바실러스 브레비스 WCP02 균주는 pH 2의 위액산에서 4시간 배양후 39% 이상의 생존율을 보이고, pH 3.0의 담즙산에서 48시간 배양후 86% 이상의 생존율을 보이고, 0.1%(w/v)의 모노소듐글루탐산(monosodium glutamate, MSG) 농도에서 95% 이상의 가바 전환능을 가진다 (표 1~ 표 3).
- [0018] 본 발명에 따른 락토바실러스 브레비스 WCP02 균주는 가바 등의 유효성분이 증진된 발효식품의 제조용 종균으로 사용될 수 있다.
- [0019] 본 발명의 또 다른 목적에 따라서, 락토바실러스 브레비스 WCP02 균주 및/또는 그것의 배양물을 유효성분으로 포함하는 생균제제(probiotics)가 제공된다.
- [0020] 본 발명에 따른 생균제제는 그 균주를 안전한 발효식품인 김치에서 선별하였으므로 안전성이 담보되어서 독성 없는 생균제제로서 유용하게 이용될 수 있다. 따라서 본 발명에 따른 생균제제는 인간을 포함하는 동물의 식용으로 사용될 수 있으며, 구체적으로는 식품 또는 의약품 소재로 사용될 수 있다.
- [0021] 생균제제는 건조된 세포형태나 발효산물 등 여러 형태로 공급될 수 있다. 예를들면 발효식품, 음료, 김치 형태로 제공될 수 있다.
- [0022] 본 발명의 또 다른 목적에 따라서, 락토바실러스 브레비스 WCP02 균주로 발효되어 가바 함량이 현저히 증진되고, 항산화 활성, 페놀릭스, 비배당체 이소플라본이 증진된 콩 발효식품이 제공된다.
- [0023] 특히 본 발명의 콩 발효식품은 두유-요구르트, 콩발효 조미료 등을 포함한다.
- [0024] 본 발명에 따른 락토바실러스 브레비스 WCP02 균주로 발효된 콩 발효식품은 가바 함량이 현저히 증진됨과 더불어, 항산화 활성, 페놀릭스 함량 및 비배당체 이소플라빈 함량이 증진되고, 알파-글루코시다아제 저해활성 및 췌장-리파아제 저해활성이 증진되어 당뇨 및 비만의 완화 및 개선 효과를 갖는 기능성 식품이다.

### 발명의 효과

- [0026] 본 발명의 신규한 락토바실러스 브레비스 WCP02 균주는 우수한 가바 생산성을 가지면서도 위액산 내성 및 담즙산 내성이 모두 우수하여 생균제제로 활용성이 크다. 또한 가바 등의 유효성분이 증진된 발효식품의 제조용 중

균으로 사용될 수 있다.

[0027] 본 발명에 따른 생균제제는 우수한 위액산 내성 및 담즙산 내성으로 체내에서 생존률이 증진될 뿐만 아니라, 증진된 가바, 항산화 활성, 항당뇨 및 항비만 활성을 부여할 수 있다.

[0028] 본 발명의 락토바실러스 브레비스 WCP02 균주로 발효되어 제조된 콩 발효식품은 가바, 페놀릭스 및 비배당체 이소플라본의 함량이 증진될 뿐만 아니라, 알파-글루코시다아제 저해활성 및 췌장-리파아제 저해활성이 증진되어 콜레스테롤 저하, 당뇨, 비만, 고지혈증 및 동맥경화의 완화 및 개선 효과를 발휘하는 기능성 식품·의약품의 소재로 사용될 수 있다.

**도면의 간단한 설명**

[0030] 도 1은 박층 크로마토그래피법(TLC)에서 가바 생성능에 기초하여 락토바실러스 브레비스 WCP02 균주의 선별과정을 보여주는 사진이다.

도 2는 락토바실러스 브레비스 WCP02 균주의 형태학적 사진이다. a는 MRS 고체배지 상에서의 형태학적 사진이고, b는 그램염색 후 전자현미경으로 관찰한 사진이다.

도 3은 락토바실러스 브레비스 WCP02 균주의 16S rRNA 염기서열을 나타낸 것이다.

도 4는 락토바실러스 브레비스 WCP02 균주의 계통발생학적 유연관계도이다.

도 5는 락토바실러스 브레비스 WCP02 균주(동결건조 균체 추출물)의 항산화 활성을 나타낸 것이다. a는 DPPH 라디칼 소거활성, b는 ABTS 라디칼 소거활성 및 c는 하이드록실 라디칼 소거활성을 나타낸다.

도 6은 락토바실러스 브레비스 WCP02 균주의 소화효소 저해활성을 나타낸 것이다. a는 알파-글루코시다아제 저해활성 및 b는 췌장-리파아제 저해활성을 나타낸다.

도 7은 락토바실러스 브레비스 WCP02 균주의 생화학적 특성을 나타낸다.

도 8은 락토바실러스 브레비스 WCP02 균주의 균체 지방산 조성을 나타낸다.

**발명을 실시하기 위한 구체적인 내용**

[0031] 다음의 실시예들에 의해 본 발명이 더 상세히 설명된다. 이들 실시예는 본 발명을 예시하기 위한 것이며, 본 발명의 범위가 이들에 의해 제한되어서는 안된다.

[0032] **실시예**

[0033] 실시예 1. 균주 분리 및 선별

[0034] <균주 분리>

[0035] 경남지역 (진주, 함양 등)에서 수집한 배추김치, 동치미 및 열무물김치 1 g 혹은 1 ml을 9 ml의 멸균 생리식염수에 현탁시키고 강하게 진탕 후, 5분간 방치시킨 후 상층액 부분만을 균주 분리를 위한 시료로 사용하였다.

[0036] 상기 시료를 멸균생리식염수로 10단 희석법을 이용하여 단계별  $10^6 \sim 10^8$  희석하여 약 500여종의 유산균을 순수 분리하였고, 순수 분리된 유산균은 MRS 액체배지에 접종하여 30℃에서 2일간 배양하여 나타낸 집락에 대해 20%(v/v) 글리세롤을 첨가하여 70℃ 냉동고에서 보관하며 필요에 따라 활성화시켜 사용하였다.

[0037] <가바 생성능에 기초한 균주 선별>

[0038] 순수 분리한 유산균을 5%(w/v) MSG (모노소듐글루탐산)가 함유된 MRS 액체배지에 접종한 후 30℃에서 2일간 배양하고 배양액을 원심분리한 후 상등액을 박층 크로마토그래피법(thin layer chromatograph, TLC)을 이용하여 가바 생성 여부를 확인하였다. 이때 5% MSG, 가바 그리고 각각의 균주 배양액은 2μl씩 분주하여 전개용매(부탄올, 초산, 물 4:1:1(v/v/v))가 들어 있는 전개조에 넣어 약 20분 전개시킨 후 송풍 건조하고 1% 닐하이드린(ninhydrin) 발색 용액에 침지 및 건조시키고 100℃에서 약 10초간 발색시켜 유산균들의 가바 생성 유무를 확인하여 가바 생성능이 우수한 최종 10 종의 유산균을 1차 선별하였고, 각 각 WCP02, LAB28, LAB40, LAB48, LAB62, LAB112, LAB224, BMK41, BMK184, BMK484로 명칭하였다(도 1). 대조를 위하여 공시균주 *L. brevis* KCTC3320를 동일한 방식으로 배양하고 TLC에 전개하였다(도 1).

[0040] 실시예 2: 가바 전환률 측정

[0041] 상기에서 분리한 1차 선발된 10 종의 유산균과 공시균주에 대해서 MSG 기질에서 가바 전환율을 조사하였다.

[0042] MSG를 0.05%(w/v) 및 0.1%(w/v)의 농도로 첨가한 MRS 액체배지에, MRS 고체배지 상에서의 단일집락을 MRS 액체 배지에 접종하여 30℃에서 2일간 배양해 둔, 1차 선발 10 종의 유산균 균주와 공시균주 배양액을 각각 2.5%(v/v) 접종하여 30℃에서 60시간 배양하여 유리아미노산 전처리 과정을 통해 글루탐산(GA) 및 가바(GABA) 함량 및 전환율을 계산하였고 그 결과를 표 1에 나타냈다. 참조구로서 무접종 배양 배지(NIM)를 동일한 방식으로 배양하여 동일하게 측정하여 결과를 표 1에 나타냈다:

[0043] 가바 전환율(%) = [글루탐산 ÷ (글루탐산+가바)] × 100

[0044] 글루탐산과 가바 함량 측정을 위한 유리아미노산 분석은 자동아미노산 분석기(Hitachi, L-8900, Japan)를 이용하여 분석하였다. 구체적으로는 시료 1ml를 정확히 시험관에 칭량하고 증류수 4ml를 가하여 60℃에서 1시간 동안 가수분해를 진행하였다. 그리고 나서 10% 5-술폰살리실산(sulfosalicylic acid) 1ml 첨가하여 4℃에서 2시간 방치하여 단백질을 침전시킨 후, 글라스 필터로 여과하고 얻은 여액을 60℃에서 감압 농축하여 물을 완전 증발시켰다. 농축된 시료는 리튬시트레이트 완충액(lithium citrate buffer, pH 2.2) 2ml에 용해 후 0.45μm 막필터(Dismic-25CS, Toyoroshikaisha Ltd)로 여과한 여액을 자동아미노산 분석기로 분석하였다.

표 1

[0045]

| 균주       | 함량 (mg/100 ml) / 전환률 (%) |        |         |          |        |         |
|----------|--------------------------|--------|---------|----------|--------|---------|
|          | 0.05% MSG                |        |         | 0.1% MSG |        |         |
|          | GA                       | GABA   | 전환률 (%) | GA       | GABA   | 전환률 (%) |
| NIM      | 844.58                   | 42.86  | -       | 1182.30  | 35.30  | -       |
| KCTC3320 | 66.65                    | 581.43 | 89.72   | 39.27    | 560.12 | 93.45   |
| WCP02    | 43.72                    | 629.79 | 93.51   | 29.58    | 572.23 | 95.08   |
| LAB28    | 236.62                   | 479.56 | 66.96   | 192.33   | 474.53 | 71.16   |
| LAB40    | 97.17                    | 586.30 | 85.78   | 52.91    | 602.76 | 91.93   |
| LAB48    | 81.08                    | 588.88 | 87.90   | 48.66    | 531.00 | 91.61   |
| LAB62    | 98.73                    | 577.21 | 85.39   | 129.48   | 596.46 | 82.16   |
| LAB112   | 107.39                   | 609.92 | 85.03   | 80.61    | 573.88 | 87.68   |
| LAB224   | 101.58                   | 578.41 | 85.06   | 48.74    | 613.36 | 92.64   |
| BMK41    | 120.97                   | 576.27 | 82.65   | 124.77   | 583.66 | 82.39   |
| BMK184   | 131.69                   | 558.92 | 80.93   | 132.68   | 512.82 | 79.44   |
| BMK484   | 78.65                    | 530.70 | 87.09   | 83.03    | 597.54 | 87.80   |

GA, glutamic acid, GABA, γ-aminobutyric acid  
NIM: 무접종

[0046] 표 1에 나타낸 바와 같이, 글루탐산(GA)로부터 가바(GABA)로의 전환율은 WCP02 균주가 MSG 0.05%(w/v) 및 0.1%(w/v) 농도에서 각각 93.51% 및 95.06%로 가장 우수하였으며, 심지어 공시균주 KCTC3320의 전환률(각각 89.72%, 93.45%) 보다도 더 높다는 것이 확인되었다.

[0048] 실시예 3. 균주의 생균제제능 측정

[0049] 상기 1차 선발 10종의 유산균 균주의 생균제제능 측정은 위액산 내성과 담즙산 내성에 대해 측정하여 수행하였다.

[0050] <위액산 내성 측정>

[0051] pH(2.0, 3.0)가 조정된 MRS 액체배지에 펩신(pepsin)을 1% 첨가하여 인공 위액산을 제조한 후, 1차 선발된 10 종의 유산균과 공시균주 배양액을 각각 5%로 접종하여 37℃에서 4시간 정치 배양하였다. 각각의 유산균들은 배양 즉시와 배양 2시간 및 4시간째 MRS 고체 배지에서 단계별 희석법을 통해 생균수를 확인하였고 생존율은 배양 초기 생존 균수와 배양 2시간 및 4시간째 MRS 고체 배지 상에 형성된 집락수를 비교하여 생존율(%)을 산출하여

표 2에 나타냈다.

[0052] 생존율(%) = (초기 생균수 ÷ 배양후 생균수) × 100

**표 2**

[0053]

| 균주        | 생존율 (%) / 배양시간 (h) |       |        |        |
|-----------|--------------------|-------|--------|--------|
|           | pH 2.0             |       | pH 3.0 |        |
|           | 2                  | 4     | 2      | 4      |
| KCTC 3320 | 15.27              | nd    | 94.05  | 94.86  |
| WCP02     | 44.43              | 39.64 | 98.86  | 102.24 |
| LAB 28    | 42.52              | 38.27 | 94.74  | 96.65  |
| LAB 40    | 36.59              | 32.54 | 95.65  | 92.77  |
| LAB 48    | nd                 | nd    | 91.64  | 88.62  |
| LAB 62    | 18.30              | 11.42 | 94.14  | 90.56  |
| LAB 112   | nd                 | nd    | 96.91  | 91.46  |
| LAB 224   | nd                 | nd    | 97.52  | 95.32  |
| BMK 41    | nd                 | nd    | 105.65 | 94.29  |
| BMK 184   | nd                 | nd    | 101.32 | 85.42  |
| BMK 484   | 24.30              | nd    | 93.91  | 105.19 |

nd = 검출되지 않음

[0054] 표 2에 나타난 바와 같이, 공시균주의 경우에는 pH 2.0의 위액산에서 배양 4시간째 사멸하였으나 WCP02 균주는 39.64%의 생존률로 위액산 내성이 가장 우수한 것을 확인할 수 있고, 또한 WCP02 균주는 pH 3.0의 위액산에서도 배양 4시간째 102.24%의 생존률을 나타내어 공시균주 (94.86%)에 비하여 더 내성이 우수하였다.

[0055] <담즙산 내성>

[0056] pH (2.5, 3.0) 조정된 MRS 액체배지에 1% 판크레아틴과 담즙염(bile salt)를 첨가하여 담즙산을 제조한 후, 1차 선발된 10종의 유산균과 공시균주 배양액을 각각 5%로 접종하여 37℃에서 48시간 배양한 후 MRS 고체배지 상에서 형성된 생균수를 배양 초기 생균수와 비교하여 %로 생존율을 산출하여 표 3에 나타내었다.

[0057] 생존율(%) = [초기 생균수 ÷ 배양후 생균수] × 100

**표 3**

[0058]

| 균주       | 생존율 (%) |        |
|----------|---------|--------|
|          | pH 2.5  | pH 3.0 |
| KCTC3320 | 49.58   | 79.59  |
| WCP02    | 51.26   | 86.25  |
| LAB28    | 38.98   | 74.54  |
| LAB40    | 42.10   | 61.22  |
| LAB48    | nd      | 60.09  |
| LAB62    | nd      | 59.25  |
| LAB112   | nd      | 49.65  |
| LAB224   | nd      | 66.66  |
| BMK41    | nd      | nd     |
| BMK184   | nd      | nd     |
| BMK484   | nd      | nd     |

nd = 검출되지 않음

[0059] 표 3에 나타난 바와 같이, 담즙산 내성은 pH 2.5와 pH 3.0에서 모두 WCP02 균주가 각각 51.26% 및 86.25%로 가장 우수하였고, 공시균주 (49.58%, 79.59%)에 비하여도 높았다.

[0061] 실시예 4. 락토바실러스 브레비스 WCP02 균주 동정

[0062] 상기 실시예들에서 가바 생성능, 위액산 내성, 담즙산 내성이 모두 우수하였던 WCP02 균주를 선발하고 이 균주



의 형태학적, 생화학적, 균체 지방산 조성, 분자유전학적 특성들을 조사하여 동정하였다.

- [0063] <형태학적 특성>
- [0064] WCP02 균주의 형태학적 특성은 MRS 고체배지에 4분법을 통해 단일집락 형성 및 그람염색 후 광학현미경으로 세포를 확인하였고, 그 결과 사진을 도 2에 나타냈다.
- [0065] 도 2에 도시된 바와 같이, 균체 형태는 백색의 타원형 형태를 취하고 있었으며(도 2의 a), 그람염색 결과 간균 형태로 남색과 보라색 계통의 색을 띄어 그람양성 세균인 것으로 나타났다(도 2의 b).
- [0066] <생화학적 특성>
- [0067] 생화학적 특성 확인은 배양온도, pH 및 NaCl 농도를 달리 조정하여 WCP02 균주의 생육 유무를 검정하고, 당 이용성을 검정하여 수행하였다.
- [0068] 구체적으로는 MRS 액체 배지에 HCl 및 NaOH를 이용하여 pH를 각각 3, 6, 9, 11로 조정하고 WCP02 균주 배양액을 2.5% 접종하여 37℃에서 48시간 정치 배양한 후 배양액의 색을 육안으로 확인하고 평판 도말법을 통해 잔존 균수를 확인하여 pH에 대한 민감성을 측정하였다.
- [0069] 내염성 측정은 MRS 액체 배지에 NaCl을 각각 0, 2, 4, 8, 10% 만큼 첨가한 후 WCP02 균주 배양액을 2.5% 접종하여 37℃에서 정치 배양한 후 평판 도말법으로 잔존 균수를 측정하였다.
- [0070] 배양온도에 따른 생육 유무 확인은 MRS 액체 배지에 WCP02 균주 배양액을 2.5% 접종하고 10, 20, 30, 40, 50℃의 온도에서 48시간 정치 배양한 후 평판 도말법을 통해 잔존 균수를 측정하였다.
- [0071] 당 이용성은 API kit (For Growth Promotion Tests, BB coporation, Korea)를 이용하여 50종류의 당 이용성을 측정하였다.
- [0072] 측정 결과, WCP02 균주의 생육특성은 10℃와 50℃에서는 생육 활성이 저조하였으나 20~40℃ 사이의 온도에서는 생육이 활발하였고 내염성은 6% 까지는 생육이 가능하였다. pH 3.0 배양 조건에서는 생육 활성이 약하였으나 pH 5, 7, 9, 11 배양 조건에서는 생육이 활발하였다. 당 이용성은 L-아라비노스, 리보스, D-자일로스, 갈락토스, D-프룩토스, D-글루코스, α-메틸-D-글루코사이드, 에술린(esculine), 말토스, 멜리보스, 글루코네이트를 이용할 수 있었고 나머지 당 들은 이용하지 못하는 것으로 나타났다 (도 7).
- [0073] <균체 지방산 조성 분석>
- [0074] 균체 지방산 조성 분석은 WCP02 균주 배양액 1 ml를 시험관에 취하고 0.5 N 메탄올성 NaOH를 4 ml 첨가하여 100℃의 히팅 블록을 이용하여 약 10분간 가온하여 지방산과 글리세롤을 가수분해시켰다. 그리고 나서 삼불화붕소(BF<sub>3</sub>) 2ml를 가하여 교반한 후 30분간 다시 가온함으로써 지방산의 메틸에스테르화를 진행하였다. 반응이 끝난 후 이소옥탄 1ml를 첨가하고 격렬히 흔든 후 원심분리 및 이소옥탄층만을 회수하여 무수황산나트륨과 함께 탈수한 뒤 0.45μm 막필터 (Dismic-25CS)로 여과하여 GC 및 페닐메틸 실리콘 용해된 실리카 캐필러리 컬럼(2.5 mm, Hewlett Packard)을 사용하여 지방산을 검출하였으며 최종적으로 MIDI 프로그램을 통해 분석하였다.
- [0075] 분석 결과, 포화 지방산에서는 팔미트산(C16:0)이 32.37%로 가장 많은 비율을 차지하였고 11,12-미틸렌 헥사데칸산(methylene hexadecanoic acid) (C19:0 CYCLO)이 17.16%로 두 번째 높은 비율을 차지하였다. 불포화 지방산에서는 올레산 n9c (C18:1)가 4.14%로 가장 많은 비율을 차지하였으며 이 외 불포화 지방산들은 0.26~0.95%를 차지하고 있었다 (도 8).
- [0076] <분자유전학적 특성: 16S rRNA 염기서열 분석>
- [0077] WCP02 균주의 분자유전학적인 동정은 MRS 액체배지에서 2일간 진탕 배양하고 Intron Genomic DNA 정제 키트 (Intron Botechnology Co.)를 사용하여 게놈 DNA를 분리하고 이를 주형으로 PCR 증폭하여 16S rDNA 염기서열을 결정하였다.
- [0078] PCR 반응은 95℃에서 5분간 변성, 49℃에서 30초간 DNA 풀림, 72℃에서 1분간 신장을 거쳤고 이 반응은 30회를 반복 수행하였다. 프라이머 제작은 세균의 16S rDNA 보존 지역에서 약 1,500 bp 정도가 되게 제작을 하였다. 전위(Forward) 프라이머는 5'-CGGAGAGTTTGATCCTGG-3', 역위(reverse) 프라이머는 5'-TACGGCTACCTACGAC-3'을 사용하였다. PCR 반응 종료 후 전기 영동하여 16S rRNA 단편을 확인하고 Total Fragment DNA Purification Kit (Intron Botechnology)의 기술된 방법에 따라 아가로스 겔에서 DNA를 분리하였다. 정제한 16S rRNA 단편을 주형으로 염기서열을 결정하였다. 염기서열 결정은 PRISM Ready Reaction Dye terminator/primer cycle

sequencing Kit (Perkin-Elmer Corp., Norwalk, CT, USA)를 사용한 디데옥시 사슬 종결법으로 실시하였고, 그 결과 1,520 bp 염기서열이 결정되었다 (도 3).

- [0079] 결정된 염기서열을 또 다른 세균의 16s rDNA와 비교분석 하였으며 유사성 값은 DNAMAN analysis system (Lynnon Biosoft)를 사용하여 정렬, 진화거리로부터 계산하여 계통발생학적 유연관계도(Phylogenetic tree)를 작성하였고 그 결과를 도 4에 나타냈다.
- [0080] 도 4에 도시된 바와 같이, *Lac. brevis* 100D8(CP015338) 균주와 99%의 유사성을 나타내었다.
- [0081] 형태학적, 생화학적, 균체 지방 조성 및 분자유전학적 특성을 고려하여 WCP02 균주를 최종 락토바실러스 브레비스(*Lactobacillus brevis*) WCP02로 명명하였고, 국립농업과학원 농업유전자원센터 (KACC)에 2016년 12월 12일에 기탁하여 수탁번호 KACC 92159P를 특허균주로 부여 받았다.
- [0083] 실시예 5. 락토바실러스 브레비스 WCP02 균주의 항산화 활성 검정
- [0084] 락토바실러스 브레비스 WCP02 균주의 항산화 활성은 DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl), ABTS (2,2'-azino-bis-3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid), 및 하이드록실( $\cdot\text{OH}$ ) 라디칼의 소거활성 측정하여 검정하였다.
- [0085] <시료 준비>
- [0086] 락토바실러스 브레비스 WCP02 균주와 공시균주를 각각 MRS 액체배지(50 ml)에 2.5%로 접종하여 30℃에서 48시간 1차 배양한 후 새로운 MRS 액체배지(500 ml  $\times$ 4)에 2차 계대배양을 72시간 실시한 후, 각각의 유산균 배양액을 원심분리 후 상등액을 버리고 유산균 균체를 회수하였다. 그리고 나서 멸균증류수로 3회 세척하고 동결 건조하여 최종적으로 순수한 유산균 균체의 동결건조 분말을 획득하였다.
- [0087] 유산균 균체 동결건조 분말에 50% 메탄올 10ml에 용해하고 12시간 추출하여 0.45 $\mu\text{m}$  필터로 여과하여 농축한 후 1mg/ml 농도로 제조하여 항산화 활성 검정 시료를 준비하였다.
- [0088] <DPPH 라디칼 소거활성>
- [0089] DPPH 라디칼 소거활성은 상기에서 준비된 각각의 시료 0.2 ml에, DPPH 용액( $1.5^{-4}$  M) 0.8 ml를 첨가하여 균일하게 혼합한 30분간 방치한 후 525 nm에서 흡광도를 측정하여 수행하였다. DPPH 라디칼 소거활성의 음성 대조구는 시료 대신 증류수를 사용하여 동일한 방법으로 진행하여 흡광도의 차이를 다음과 같은 식에 의해 백분율(%)로 산출하였으며, 그 결과를 도 5에 도시하였다.
- [0090] 라디칼 소거활성(%) =  $[1 - (\text{음성대조구 흡광도} \div \text{실험구 흡광도})] \times 100$
- [0091] 도 5의 a에 도시된 바와 같이, 본 발명의 WCP02 균주의 DPPH 라디칼 소거활성은 공시균주에 비하여 현저히 높다는 것이 확인된다.
- [0092] <ABTS 라디칼 소거활성>
- [0093] ABTS 라디칼 소거활성은 7mM ABTS 시약 5ml과 140mM  $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$  (FW 270.3, Sigma 9392) 5ml을 섞어 어두운 곳에 14~16시간 방치시켜 양이온 라디칼을 생성시킨 후, 이를 메탄올로 섞어 732nm에서 대조구의 흡광도 값이 0.7가 되도록 조절된 ABTS 용액을 사용하였다. 각각의 시료 0.1ml과 ABTS 용액 0.9ml를 혼합하여 3분간 반응시키고 732nm에서 흡광도를 측정하였다. ABTS 라디칼 저해활성 역시 음성 대조구는 시료 대신 증류수를 사용하여 동일한 방법으로 진행하여 흡광도의 차이를 상기 식에 의해 백분율(%)로 산출하였으며, 그 결과를 도 5에 도시하였다.
- [0094] 도 5의 b에 도시된 바와 같이, 본 발명의 WCP02 균주의 ABTS 라디칼 소거활성은 공시균주에 대등하게 높다는 것이 확인된다.
- [0095] <하이드록실 라디칼 소거활성>
- [0096] 하이드록실 라디칼 소거활성 측정은 10mM  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ -EDTA 0.2ml, 10mM 2-데옥시리보스 0.2ml, 10mM  $\text{H}_2\text{O}_2$  0.2ml, 추출물 1.4ml 혼합한 뒤 37℃에서 4시간 동안 반응시켜 혼합액을 만든 후, 이 혼합액에 1% 티오바르비탈산(in D.W) 와 2.8% 트리클로로아세트산(in D.W)를 각각 1ml를 가하여 100℃에서 20분간 발색시켜 냉각시킨 후 520nm

에서 흡광도를 측정하였다. 음성 대조구로는 시료 대신에 PBS(1L 기준 NaCl 8.76g, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.11g, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.596g)을 사용하였다. 하이드록실 라디칼 소거활성은 시료 용액의 첨가구와 무첨가구 사이의 흡광도의 차이를 상기 식에 의해 % 값을 산출하였고, 그 결과를 도 5에 나타냈다.

[0097] 도 5의 c에 도시된 바와 같이, 본 발명의 WCP02 균주의 DPPH 라디칼 소거활성은 공시균주에 비하여 더 높다는 것이 확인된다.

[0098] 상기 결과들로부터, 락토바실러스 브레비스 WCP02 균주 및 그 배양물을 포함하는 생균제제는 증진된 항산화 활성을 갖는다는 것을 알 수 있다.

[0100] 실시예 6. 락토바실러스 브레비스 WCP02 균주의 당뇨 및 비만 개선효과 검증

[0101] 락토바실러스 브레비스 WCP02 균주의 항당뇨 효과는 알파-글루코시다아제 저해활성을 측정하여 평가하였고, 항비만 효과는 췌장-리파아제 저해활성으로 측정하여 평가하였다.

[0102] <알파-글루코시다아제 저해활성>

[0103] 실시예 5에서 준비된 각각의 시료 50 $\mu$ l에 0.5 U/ml 알파-글루코시다아제 효소액 50 $\mu$ l를 첨가하고 여기에 200mM 인산나트륨 완충액(pH 6.8) 50 $\mu$ l를 혼합하여 37 $^{\circ}$ C에서 10분간 예비 배양한 후, 인산나트륨 완충액(pH 6.8)을 100 $\mu$ l 가하여 37 $^{\circ}$ C에서 10분간 반응시켰다. 반응액에 100mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 0.75ml를 첨가하여 반응을 정지시키고 420nm에서 흡광도를 측정하였으며 음성 대조구는 시료 대신 증류수를 사용하여 동일한 방법으로 진행하여 흡광도의 차이를 다음과 같은 식에 의해 백분율(%)로 산출하였으며, 그 결과를 도 6에 도시하였다.

[0104] 알파-글루코시다아제 저해활성(%) =

[0105]  $[1 - (\text{음성대조구 흡광도} \div \text{실험구 흡광도})] \times 100$

[0106] 도 6의 a에 도시된 바와 같이, 본 발명의 WCP02 균주의 알파-글루코시다아제 저해활성은 공시균주에 비하여 더 높다는 것이 확인된다.

[0107] <췌장 리파아제 저해활성>

[0108] 실시예 5에서 준비된 각각의 시료 50 $\mu$ l, 1.0 U/ml 췌장 리파아제 효소액 50 $\mu$ l, 200 mM 인산나트륨 완충액(pH 6.8) 50 $\mu$ l를 혼합하여 37 $^{\circ}$ C에서 10분간 예비 배양한 후, 인산나트륨 완충액(pH 6.8)을 100 $\mu$ l 가하여 37 $^{\circ}$ C에서 10분간 반응시켰다. 이 반응액에 100mM Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 0.75ml를 첨가하여 반응을 정지시키고 420nm에서 흡광도를 측정하고 음성 대조구는 증류수를 사용하여 동일한 방법으로 진행하여 흡광도의 차이를 다음과 같은 식에 의해 백분율(%)로 산출하였으며, 그 결과를 도 6에 도시하였다.

[0109] 췌장-리파아제 저해활성(%) =

[0110]  $[1 - (\text{음성대조구 흡광도} \div \text{실험구 흡광도})] \times 100$

[0111] 도 6의 b에 도시된 바와 같이, 본 발명의 WCP02 균주의 췌장-리파아제 저해활성은 공시균주에 비하여 현저히 증진된다는 것이 확인된다.

[0112] 상기 결과들로부터, 락토바실러스 브레비스 WCP02 균주 및 그 배양물을 포함하는 생균제제는 증진된 알파-글루코시다아제 저해활성 및 췌장-리파아제 저해활성을 부여하여 항당뇨 및 항비만 효과를 갖는다는 것을 알 수 있다.

[0114] 실시예 7. 락토바실러스 브레비스 WCP02를 이용한 두유-요구르트의 제조

[0115] <콩 분말 준비>

[0116] 원료콩(품종명: 우람콩) 무게에 약 2배가 되도록 수돗물을 가수하여 상온에서 12시간 동안 수침 후, 채반에 받쳐 물기를 제거하고 콩나물 재배기(model HANCELL, hi green, Korea)에 적당히 쌓은 후 주기적으로 수분을 공급하면서 발아체가 원료콩 낱알의 2배가 되게끔 발아를 시켰다. 발아된 콩을 121 $^{\circ}$ C에서 30분간 증자 처리하였고 55 $^{\circ}$ C에서 2~3일간 열풍건조 후 분쇄하여 콩-분말을 준비하였다.

[0117] 250ml 삼각플라스크에 콩-분말 10g과 정제수 100ml를 가하여 교반한 후 121℃에서 15분간 살균하여 콩-분말 두유를 제조하였다. 콩-분말 두유를 실온(25℃)에서 냉각 과정을 거친 뒤, 락토바실러스 브레비스 WCP02 배양액을 2.5% 접종하여 72시간 발효시켜 두유-요구르트를 제조하였다.

[0118] <이화학적 특성>

[0119] 콩-분말 두유와 두유-요구르트의 pH 측정은 pH meter를 사용하여 측정하였고, 총산도 측정은 중화적정법으로 시료 1ml를 pH 8.2까지 중화시키는데 소비된 0.1 N NaOH의 양을 구하고 젯산 양으로 환산하였다. 생균수 측정은 멸균수를 사용하여 단계회석한 후 MRS 평판배지에 도말한 후 30℃에서 48시간 배양한 후 나타난 집락을 계수하였고, 그 결과를 표 4에 나타냈다.

표 4

[0120]

|             | 이화학적 특성 |        |                     |
|-------------|---------|--------|---------------------|
|             | pH      | 산도 (%) | 생균수<br>(log cfu/ml) |
| 콩-분말 두유     | 6.49    | 0.32   | nd                  |
| 두유-요구르트     | 5.57    | 0.45   | 11.01               |
| nd: 검출되지 않음 |         |        |                     |

[0121] 표 4에 나타난 바와 같이, 두유-요구르트는 pH는 5.57, 산도는 0.45%, 생균수 약 10 log cfu/ml로서 발효식품으로서 적합하였다. 통상 요구르트의 경우 pH는 5.0 이하, 산도는 0.5% 이상으로 신맛이 강하여 이를 상제 시키기 위해 감미료(예: 설탕)를 첨가하나, 본 발명의 두유-요구르트는 pH와 산도가 적정하여 소량의 감미료 첨가로 신맛, 단맛 등의 조화로운 기호성을 획득할 수 있는 장점이 있다.

[0122] <시료 준비>

[0123] 상기에서 제조된 콩-분말 두유와 두유-요구르트를 동결 건조하여 분말화하였다. 각각의 동결건조된 분말 1g에 50% 메탄올을 10배 첨가하고 상온에서 12시간 추출하였다. 추출물은 30분간 원심분리 하여 상등액만을 0.45µm 막필터(Dismic-25CS)로 여과하여 총 페놀릭스 및 이소플라본 함량과 생리활성 측정에 사용하였다.

[0124] <유효성분 함량 측정: 가바, 총 페놀릭스 및 이소플라본 유도체>

[0125] 두유-요구르트에 대해 유효성분인 가바, 총 페놀릭스 및 이소플라본 유도체 함량을 분석하였다. 비교를 위하여 발효 전 콩-분말 두유에 대해서도 유효성분 분석을 수행하였다.

[0126] 실시예 2에서와 같은 방식으로 글루탐산과 가바 함량을 유리아미노산 분석으로 수행하였다. 총 페놀릭스 함량은 상기에서 준비한 시료를 Folin Denis법(1952)으로 측정하였다. 구체적으로는 시료 0.5 ml를 시험관에 분주하고 25% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 용액 0.5ml를 첨가하여 3분간 정치시켰다. 다시 2 N Folin-Ciocalteu phenol 시약 0.25 ml를 첨가하여 혼합한 다음 30℃에서 1시간 동안 정치시켜 발색시켰다. 발색된 청색을 750nm에서 분광광도계(Spectronic 2D)를 사용하여 흡광도를 측정하였다. 이때 총 페놀릭스 함량은 갈릭산을 이용하여 작성한 표준곡선으로부터 함량을 구하였다. 이소플라본은 상기에서 준비한 시료를 HPLC로 분석하였다. 분석 컬럼은 Lichrophore 100 RP C18 column (4.6mm, 5µm, Merck)을 사용하였고 이동상 용매는 0.2% 글라시알 아세트산(수중)(solution A)와 0.2% 아세트오니트릴(글라시알 아세트산 중)(solution B)로 분석하였다. 이동상 조건은 A 용매 기준으로 0분-100%, 15분-90%, 25분-80%, 35분-75%, 45분-65% 및 50분-65%로 유지하였다. 시료는 20µl를 주입하였으며 이동상 속도는 30℃에서 1ml/min으로 유지하였다. 검출기는 diode array detector (DAD)를 사용하여 254nm에서 검출하였다. 모든 분석결과를 표 5에 나타냈다

표 5

[0127]

| 분석항목                           | 시료      |         |
|--------------------------------|---------|---------|
|                                | 콩 분말 두유 | 두유-요구르트 |
| GA& GABA (mg/100 g d.w.)       |         |         |
| 글루탐산 (GA)                      | 175.59  | 11.04   |
| 가바 (γ-Aminobutyric acid, GABA) | 57.86   | 135.89  |
| 총 페놀릭스 함량 (mg/g d.w.)          | 0.42    | 0.66    |
| 이소플라본 (µg/g d.w.)              |         |         |

|                        |         |        |
|------------------------|---------|--------|
| Glycosides (배당체 이소플라본) | 1290.93 | 59.49  |
| Daidzin                | 485.06  | 25.06  |
| Glycitin               | 198.29  | 21.23  |
| Genistin               | 607.58  | 13.20  |
| Aglycones (비배당체 이소플라본) | 59.26   | 487.29 |
| Daidzein               | 26.85   | 236.21 |
| Glycitein              | 16.19   | 57.92  |
| Genistein              | 16.22   | 193.16 |

[0128] 표 5에 나타난 바와 같이, 두유-요구르트의 가바, 총 페놀릭스 및 비배당체 이소플라본(aglycones)의 함량은 각각 135.89mg/100g, 0.66mg/g 및 487.29µg/g로 발효 전의 콩 분말 두유에 비하여 모두 현저히 증진되었다.

[0129] <생리활성 검정: 항산화 활성, 항당뇨 및 항비만 효과>

[0130] 두유-요구르트에 대해 생리활성인 항산화 활성, 항당뇨 효과 및 항비만 효과를 검정하였다. 비교를 위하여 발효 전 콩-분말 두유에 대해서도 생리활성 검정을 수행하였다.

[0131] 항산화 활성은 실시예 5에서와 같은 방식으로, 항당뇨 효과 및 항비만 효과는 실시예 6에서와 같은 방식으로 측정하였고, 그 결과를 표 6에 나타냈다.

표 6

| 분석항목         | 시료      |         |
|--------------|---------|---------|
|              | 콩-분말 두유 | 두유-요구르트 |
| 라디칼 소거활성 (%) |         |         |
| DPPH         | 47.25   | 63.65   |
| ABTS         | 53.80   | 98.82   |
| Hydroxyl     | 15.83   | 62.52   |
| 효소 저해 활성 (%) |         |         |
| α-글루코시다제     | 6.49    | 55.11   |
| 췌장 리파아제      | 15.02   | 41.12   |

[0133] 표 6에 나타난 바와 같이, 발효 전 콩-분말 두유에 비하여 본 발명에 따른 두유-요구르트는 DPPH, ABTS와 하이드록실 라디칼 소거활성이 더 높아 항산화 활성이 증진되었다. 또한 알파-글루코시다아제 저해활성은 약 10배, 췌장-리파아제 저해활성은 약 3배 증진되었다.

[0134] 상기와 같은 결과로부터, 본 발명의 균주로 발효된 두유-요구르트는 가바 등의 생리활성물질이 풍부하고 증진된 항산화 활성, 항당뇨 및 항비만 효과를 갖는다는 것을 확인할 수 있다.

[0136] 실시예 8. 락토바실러스 브레비스 WCP02를 이용한 콩발효 조미료 제조

[0137] 본 발명의 균주를 이용하여 콩발효 조미료를 제조하였다.

[0138] <콩 가수분해물 준비>

[0139] 콩 (우람콩)을 12시간 수침한 후 물기를 제거하고 121℃에서 1시간 증자한 후 고초균(*Bacillus subtilis* 2TDJ15) 배양액을 5% 접종하고 37℃에서 3일간 발효시킨 후 55℃에서 이틀간 건조하여 분쇄기로 분쇄하여 콩알 메주 분말을 제조하였다. 콩알 메주 분말 400g에 6% 염수 1,600 ml을 가하여 수화시킨 후 키위과즙을 100 ml(5%, v/v) 첨가하여 40℃에서 24시간 반응시킨 후, 120℃에서 15분간 살균하여 콩 가수분해물을 제조하여 준비하였다.

[0140] <콩발효 조미료 제조>

[0141] 준비된 콩 가수분해물에 본 발명의 WCP02 균주 배양액을 5%(v/v) 접종하여 30일간 25℃에서 발효하여 콩발효 조미료를 제조하였다.

[0142] <이화학적 특성>

[0143] 콩발효 조미료의 발효 전후 이화학적 특성을 실시예 6에서와 동일한 방식으로 측정하였고, 염도 측정은 염도계로 측정하였고, 단백질 정량은 Biuret법을 이용하여 측정하여 그 결과를 표 7에 나타냈다.

표 7

[0144]

|               | pH   | 산도 (%) | 염도 (%) | 단백질 (mg/ml) |
|---------------|------|--------|--------|-------------|
| 콩 가수분해물(발효 전) | 6.11 | 0.87   | 6.11   | 29.09       |
| 콩발효 조미료(발효 후) | 5.34 | 1.12   | 6.30   | 27.35       |

[0145] 표 7에 나타난 바와 같이, 콩발효 조미료는 pH 5.34, 산도 1.12, 염도 6.3%, 단백질 함량 27.35mg/ml로서 발효 식품으로서 적합하였다. 본 발명의 조미료는 발효를 통해 적당한 산미와 염도를 함유하고 있어 다양한 요리에 적용할 수 있는 천연조미료로 사용할 수 있다.

[0146] <시료 준비>

[0147] 상기에서 제조된 콩 가수분해물(발효전) 및 콩발효 조미료 각각 50ml에 100% 메탄올을 동량(50 ml) 가하고 상온에서 12시간 추출하였다. 추출물은 30분간 원심분리하여 상등액만을 0.45 $\mu$ m 막필터(Dismic-25CS)로 여과하여 총 페놀릭스 및 이소플라본 함량과 생리활성 측정에 사용하였다.

[0148] <유효성분 함량 검정: 가바, 총 페놀릭스 및 이소플라본 유도체>

[0149] 실시예 7에서와 동일한 방식으로, 콩발효 조미료에 대해 유효성분인 이소플라본 유도체 함량을 분석하고, 비교를 위하여 발효 전 콩 가수분해물에 대해서도 유효성분 분석을 수행하였고, 그 결과를 표 8에 기재하였다.

표 8

[0150]

| 분석항목                                    | 콩 가수분해물  | 콩발효 조미료  |
|-----------------------------------------|----------|----------|
| GA& GABA (mg/100 ml)                    |          |          |
| 글루탐산 (GA)                               | 1,709.39 | 422.01   |
| 가바 ( $\gamma$ -Aminobutyric acid, GABA) | 31.57    | 1,365.24 |

[0151] 표 8에 나타난 바와 같이, 콩발효 조미료의 가바 함량은 1,365.24 mg/100 ml로 발효 전의 콩 가수분해물에 비하여 약 43배로 현저히 증진되었다.

[0152] <생리활성 검정: 항산화, 항당뇨 및 항비만 효과>

[0153] 콩발효 조미료에 대해 생리활성인 항산화 활성, 항당뇨 효과 및 항비만 효과를 검정하였다. 비교를 위하여 발효 전 콩 가수분해물에 대해서도 생리활성 검정을 수행하였다.

[0154] 항산화 활성은 실시예 5에서와 같은 방식으로, 항당뇨 효과 및 항비만 효과는 실시예 6에서와 같은 방식으로 측정하였고, 그 결과를 표 9에 나타냈다.

표 9

[0155]

| 분석항목             | 시료      |         |
|------------------|---------|---------|
|                  | 콩 가수분해물 | 콩발효 조미료 |
| 라디칼 소거활성 (%)     |         |         |
| DPPH             | 79.66   | 92.61   |
| ABTS             | 61.93   | 77.04   |
| Hydroxyl         | 54.32   | 65.38   |
| 효소 저해 활성 (%)     |         |         |
| $\alpha$ -글루코시다제 | 14.95   | 25.31   |
| 췌장 리파아제          | 15.41   | 23.77   |

[0156] 표 9에 나타난 바와 같이, 발효 전 콩 가수분해물에 비하여 본 발명에 따른 콩발효 조미료는 DPPH, ABTS와 하이드록실 라디칼 소거활성이 더 높아 항산화 활성이 증진되고, 알파-글루코시다제 저해활성과 췌장-리파아제 저

해활성도 50% 이상 증진되었다.

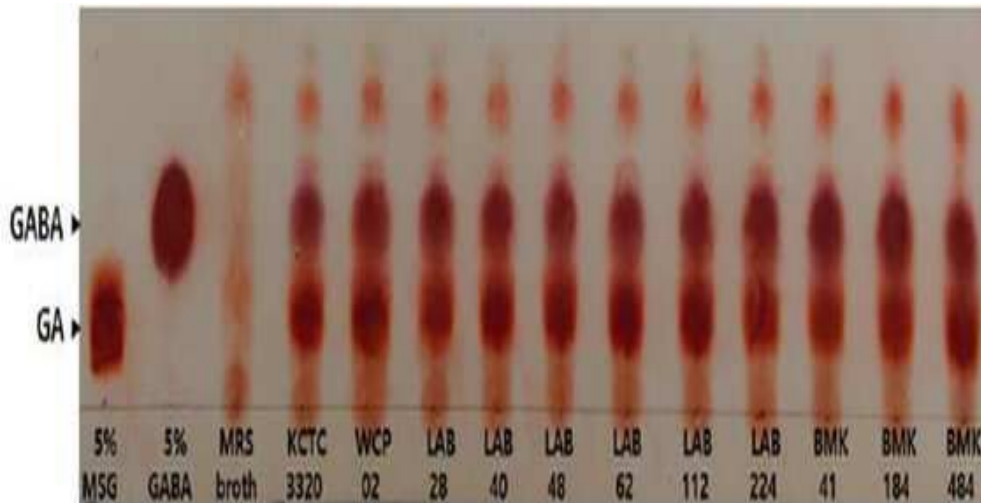
[0157] 상기와 같은 결과로부터, 본 발명의 균주로 발효된 콩발효 조미료는 가바 함량이 풍부하고 증진된 항산화 활성, 항당뇨 및 항비만 효과를 갖는다는 것을 확인할 수 있다.

**수탁번호**

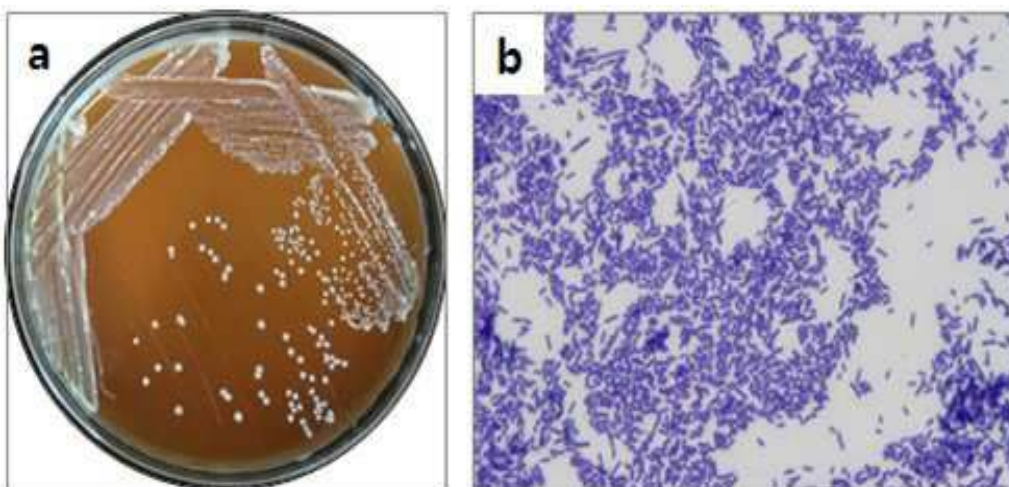
[0159] 기탁기관명 : 농업생명공학연구원  
 수탁번호 : KACC92159P  
 수탁일자 : 20161212

**도면**

**도면1**



**도면2**



도면3

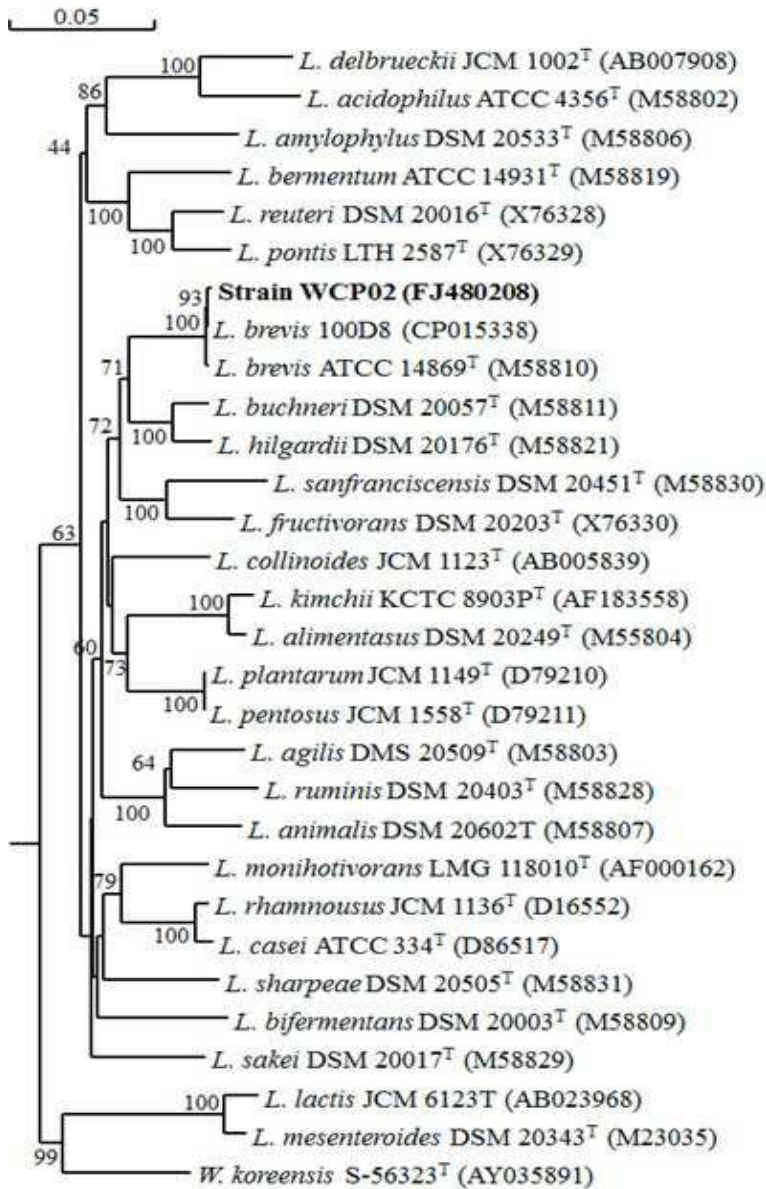
```

1   CGGAGAGTTT GATCCTGGCT CTTGACGAAC GCTGGGGGCA TGCCTAATAC ATGCAAGTGG
61  AACGAGCTTC CGTTGAATGA CGTGCTTGCA CTGATTTCAA CAATGAAGCG AGTGGGGAAC
121 TGGTGAGTAA CACGTGGGGA ATCTGCCAG AAGCAGGGGA TAACACTTGG AAACAGGTGC
181 TAATACCGTA TAACAACAAA ATCCGCATGG ATTTTGTGTTG AAAGGTGGCT TCGGCTATCA
241 CTTCTGGATG ATCCCGCGC GTATTAGTTA GTTGGTGAGG TAAAGGCCCA CCAAGACGAT
301 GATACGTAGC CGACCTGAGA GGTAAATCGG CCACATTGGG ACTGAGACAC GGCCAAACT
361 CCTACGGGAG GCAGCAGTAG GGAATCTTCC ACAATGGAAG AAAGTCTGAT GGAGCAATGC
421 CGCGTGAGTG AAGAAGGGTT TCGGCTCGTA AAACCTCTGTT GTTAAAGAAG AGCACCTTTG
481 AGAGTAACTG TTCAAGGGTT GACGGTATTT AACCAGAAAG CCACGGCTAA CTACGTGCCA
541 GCAGCCGCGG TAATACGTAG GTGGCAAGCG TTGTCCGGAT TTATTGGGCG TAAAGCGAGC
601 GCAGGCGGTT TTTAAGTCT GATGTGAAAG CCTTCGGETT AACCGGAGAA GTGCATCGGA
661 AACTGGGAGA CTTGAGTGCA GAAGAGGACA GTGGAACCTC ATGTGTTGGG GTGGAATGGG
721 TAGATATATG GAAGAACACC AGTGGCGAAG GCGGCTGTCT AGTCTGTAAC TGACGCTGAG
781 GCTCGAAAGC ATGGGTAGCG AACAGGATTA GATAOCTGG TAGTCCATGC CGTAAACGAT
841 GAGTGCTAAG TGTTGGAGGG TTTCCGCCCT TCAGTGCTGC AGCTAACGCA TTAAGCACTC
901 CGOCTGGGGG AGTACGACCG CAAGGTTGAA ACTCAAAGGA ATTGACGGGG GCCCGCACAA
961 GCGGTGGAGC ATGTGTTTAA ATTGGAAGCT ACGCGAAGAA CCTTACCAGG TCTTGACATC
1021 TTCTGCCAAT CTTAGAGATA AGACGTTDCC TTCGGGGACA GAATGACAGG TGGTGATGG
1081 TTGTGCTCAG CTCGTGTGCT GAGATGTTGG GTTAAGTCCG GCAACGAGCG CAACCCCTAT
1141 TATCAGTTGC CAGCATTGAG TTGGGCACTC TGGTGAGACT GCCGGTGACA AACCGGAGGA
1201 AGGTGGGAAT GACGTCAAAT CATCATGCCC CTTATGACCT GGGCTACACA CGTGCTACAA
1261 TGGACGGTAC AACGAGTGGC AAAGTGTGTA GGCTAAGCTA ATCTCTTAAA GCGGTTCTCA
1321 GTTCGGATTG TAGGCTGCAA CTCGCCTACA TGAAGTTGGA ATCGCTAGTA ATCGCGGATC
1381 AGCATGCCGC GGTGAATAAG TTCCCGGGCC TTGTACACAC CGCCCGTCAC ACCATGAGAG
1441 TTTGTAACAC CCAAAGCCGG TGAGATAACC TTCGGGAGTC AGCCGTCTAA GGTGGGACAG
1501 ATGATTAGGG TGAAGTCGTA

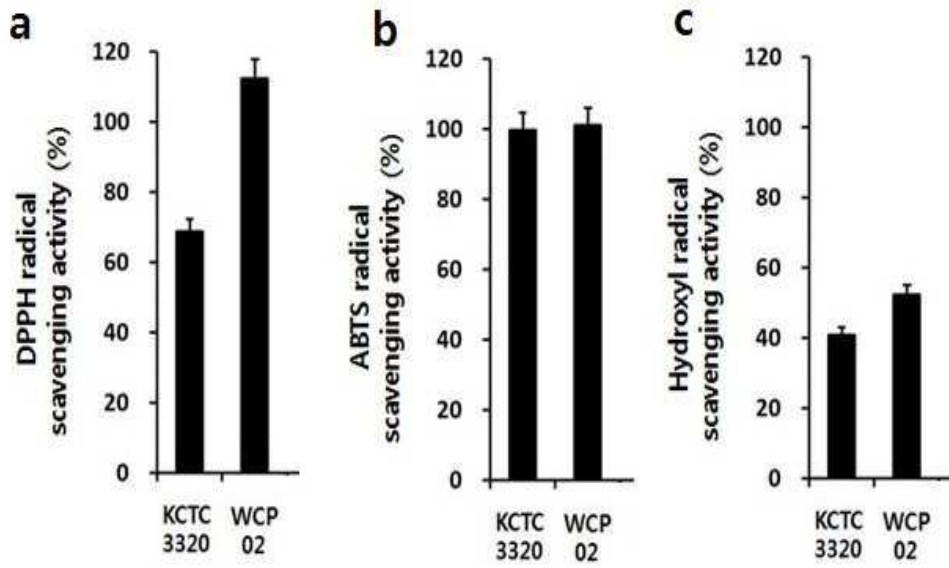
```



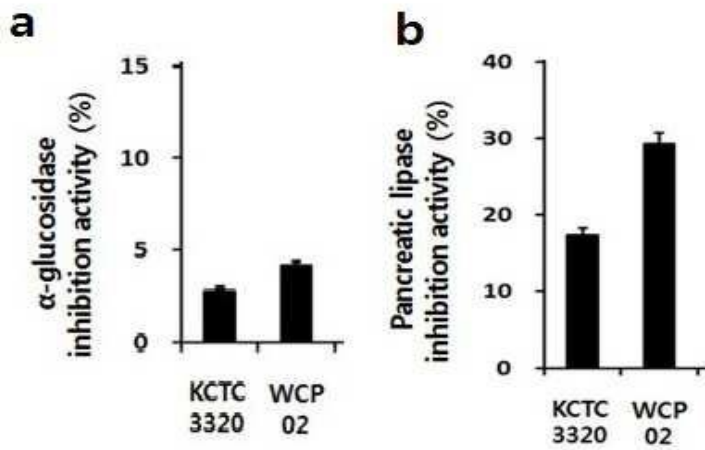
도면4



도면5



도면6



도면7

| Characteristics                                                         | Reaction    | Characteristics             | Reaction |
|-------------------------------------------------------------------------|-------------|-----------------------------|----------|
| <b>Morphology</b>                                                       |             | Ribose                      | +        |
| Shape                                                                   | Rod         | D-Xylose                    | +        |
| Gram stain                                                              | +           | L-Xylose                    | -        |
| Cell dimension                                                          | 2-8 $\mu$ m | Adonitol                    | -        |
| <b>Physiological properties</b>                                         |             | $\beta$ -Methyl-xyloside    | -        |
| Aerobic growth                                                          | +           | Galactose                   | +        |
| Growth at                                                               |             | D-Glucose                   | +        |
| 10°C                                                                    | w           | D-Fructose                  | +        |
| 20°C                                                                    | +           | D-Mannose                   | -        |
| 25°C                                                                    | +           | L-sorbose                   | -        |
| 30°C                                                                    | +           | Rhamnose                    | -        |
| 35°C                                                                    | +           | Dulcitol                    | -        |
| 40°C                                                                    | +           | Inositol                    | -        |
| 50°C                                                                    | w           | Mannitol                    | -        |
| Growth in NaCl                                                          |             | Sorbitol                    | -        |
| 0%                                                                      | +           | $\alpha$ Methyl-D-mannoside | -        |
| 2%                                                                      | +           | $\alpha$ Methyl-D-glucoside | +        |
| 4%                                                                      | +           | N Acetyl glucosamine        | +        |
| 6%                                                                      | +           | Amygdaline                  | -        |
| 8%                                                                      | -           | Arbutine                    | -        |
| 10%                                                                     | -           | Esculine                    | +        |
| pH                                                                      |             | Salicine                    | -        |
| 3                                                                       | w           | Cellobiose                  | -        |
| 5                                                                       | +           | Maltose                     | +        |
| 7                                                                       | +           | Lactose                     | -        |
| 9                                                                       | +           | Melibiose                   | +        |
| 11                                                                      | +           | Saccharose                  | -        |
| <b>Carbohydrates</b>                                                    |             | Trehalose                   | -        |
| Control                                                                 | -           | Inuline                     | -        |
| Glycerol                                                                | -           | Melezitose                  | -        |
| Erythritol                                                              | -           | D-Raffinose                 | -        |
| D-Arabinose                                                             | -           | Amidon                      | -        |
| L-Arabinose                                                             | +           | Glycogene                   | -        |
| Xylitol                                                                 | -           | L-Fucose                    | -        |
| $\beta$ -Gentiobiose                                                    | -           | D-Arabitol                  | -        |
| D-Turanose                                                              | -           | L-Arabitol                  | -        |
| D-Lyxose                                                                | -           | Gluconate                   | +        |
| D-Tagatose                                                              | -           | 2 ceto-gluconate            | -        |
| D-Fucose                                                                | -           | 5 ceto-gluconate            | -        |
| * Symbol: +, positive reaction; -, negative reaction; w, weak reaction. |             |                             |          |

도면8

| Fatty acid                                                                                                                        | Contents     |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------|
| <b>Straight-chain saturated</b>                                                                                                   |              |
| C12:0                                                                                                                             | 0.17 ± 0.01  |
| C14:0                                                                                                                             | 3.22 ± 0.16  |
| C16:0                                                                                                                             | 32.37 ± 1.62 |
| C18:0                                                                                                                             | 1.54 ± 0.08  |
| C19:0 ISO                                                                                                                         | 0.95 ± 0.05  |
| C19:0 CYCLO <i>n8c</i>                                                                                                            | 17.16 ± 0.86 |
| C20:0                                                                                                                             | 0.51 ± 0.03  |
| Sum In Feature 3*                                                                                                                 | 3.62 ± 0.18  |
| Sum In Feature 7*                                                                                                                 | 14.51 ± 0.73 |
| <b>Mono-unsaturated</b>                                                                                                           |              |
| C18:1 <i>n7c</i>                                                                                                                  | 0.34 ± 0.02  |
| C18:1 <i>n9c</i>                                                                                                                  | 4.14 ± 0.21  |
| C19:1 ISO                                                                                                                         | 0.95 ± 0.05  |
| C20:1 <i>n7c</i>                                                                                                                  | 0.29 ± 0.01  |
| C20:2 <i>n6,9c</i>                                                                                                                | 0.26 ± 0.01  |
| *Summed features represent of two or three fatty acids that could not be separated by GC with the Microbial Identification (MIDI) |              |
| *Summed feature 3 contained one or more of following fatty acids: C15:0 ISO 20H/C16:1 <i>n7c</i>                                  |              |
| *Summed feature 7 contained one or more of following fatty acids: C19:0 CYCLO <i>n10c</i> /C19 <i>n6</i> .                        |              |

서열목록

- <110> Gyeongnam National University Of Science And Technology Industry-Academic Cooperation Foundation
- <120> Lactobacillus brevis WCP02 strain having high gastric acid tolerance and bile acid, and high GABA productivity, and probiotics and fermented food by using the same
- <130> p10188
- <160> 3
- <170> KoPatentIn 3.0
- <210> 1
- <211> 1520
- <212> RNA
- <213> Lactobacillus brevis
- <220><221> rRNA
- <222> (1)..(1520)
- <223> 16s rRNA
- <400> 1

cggagagttt gatcctggct cttgacgaac gctggcggca tgcctaatac atgcaagtcg 60  
 aacgagcttc cgttgaatga cgtgcttgca ctgatttcaa caatgaagcg agtggcgaac 120  
 tggtagtaaa cacgtgggga atctgccag aagcagggga taacacttgg aacaggtgc 180  
 taataccgta taacaacaaa atccgcatgg attttgttg aaaggtggct tcggctatca 240  
 cttctggatg atcccgggc gtattagtta gttggtgagg taaaggcca ccaagacgat 300  
 gatacgtagc cgacctgaga gggtaatcgg ccacattggg actgagacac ggcccaaact 360  
 cctacgggag gcagcagtag ggaatcttc acaatggacg aaagtctgat ggagcaatgc 420  
  
 cgcgtgagtg aagaagggtt tcggctcgta aaactctgtt gttaaagaag agcacctttg 480  
 agagtaactg ttcaagggtt gacggtatit aaccagaaag ccacggctaa ctacgtgcca 540  
 gcagccgagg taatacgtag gtggcaagcg ttgtccgat ttattgggcg taaagcgagc 600  
 gcaggcggtt ttttaagtct gatgtgaaag ccttcggctt aaccggagaa gtgcatcgga 660  
 aactgggaga cttgagtcca gaagaggaca gtggaactcc atgtgttcg gtggaatgag 720  
 tagatatatg gaagaacacc agtggcgaag gcggctgtct agtctgtaac tgacgtgag 780  
 gctcgaaagc atgggtagcg aacaggatta gataccctgg tagtccatgc cgtaaacgat 840  
  
 gagtgctaag tgttggaggg tttccgcct tcagtgtgc agtaacgca ttaagcactc 900  
 cgctggggg agtacaccg caagttgaa actcaaagga attgacggg gcccgcaaa 960  
 gcggtggagc atgtggttta attcgaagct acgcaagaa ccttaccagg tcttgacatc 1020  
 ttctgcaat cttagagata agacgttccc ttcgggaca gaatgacagg tggtagatgg 1080  
 ttgtcgtcag ctctgtcgt gagatgttg gtttaagtccc gcaacgagcg caacccttat 1140  
 tatcagttgc cagcattcag ttgggcactc tggtagact gccggtgaca aaccggagga 1200  
 aggtgggaat gacgtcaaat catcatgcc cttatgacct gggctacaca cgtgctaaa 1260  
  
 tggacggtac aacgagtcgc aaagtcgtga ggctaagcta atctcttaa gccgttctca 1320  
 gttcggattg taggctgcaa ctgcctaca tgaagtggga atcgctagta atcgcgatc 1380  
 agcatgccg ggtgaatacgt ttcccggcc ttgtacacac cggcgtcac accatgagag 1440  
 tttgtaaac ccaagccgg tgagataacc ttcgggagtc agccgtctaa ggtgggacag 1500  
 atgattaggg tgaagtcgta 1520  
  
 <210> 2  
 <211> 18  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> forward primer  
 <400> 2

cggagagttt gatcctgg

18

<210> 3

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> reverse primer

<400> 3

tacggctacc ttacgac

17