



(19)대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(51) 。 Int. Cl. C12N 1/20 (2006.01)	(45) 공고일자 (11) 등록번호 (24) 등록일자	2007년06월04일 10-0725012 2007년05월28일
--	-------------------------------------	--

(21) 출원번호 (22) 출원일자 심사청구일자	10-2005-0072576 2005년08월09일 2005년08월09일	(65) 공개번호 (43) 공개일자	10-2007-0018171 2007년02월14일
----------------------------------	---	------------------------	--------------------------------

(73) 특허권자 주식회사한국야쿠르트
 서울 서초구 잠원동 28-10

(72) 발명자 이정렬
 서울 성동구 금호동3가 두산아파트 112-1202

 임광세
 경기 수원시 영통구 망포동 LG자이아파트 302동 901호

 안영태
 경기 수원시 권선구 세류2동 미영아파트 109동 302호

(74) 대리인 최익하

(56) 선행기술조사문헌 KR100240687 B1 KR100316517 B1 KR100434610 B1	KR100299306 B1 KR100357668 B1 KR1020050080134 A
---	---

심사관 : 이충호

전체 청구항 수 : 총 2 항

(54) 한국인 성인 장내 분리, 유기산 생성능이 우수하여 변비개선능과 정장작용이 탁월한 신규 락토바실러스에시도필러스 에이취와이 7036 및 이를 함유하는 제품

(57) 요약

본 발명은 건강한 한국 성인의 분변에서 분리한 유기산 생성능이 우수하여 변비개선능과 정장작용이 탁월한 새로운 락토바실러스 에시도필러스(*L. acidophilus*) HY 7036 균주 및 이를 함유하는 제품에 관한 것이다.

본 발명에 따른 락토바실러스 에시도필러스 HY7036 균주는 건강한 한국성인의 생체에서 분리한 것이기 때문에 한국인의 장에 정착하여 장의 운동성을 촉진하여 변비를 개선시킬 수 있으며 내산성과 내담즙산성, 유해균 생장억제능력 우수하며, 우유 내에서 성장속도가 빠른 특성이 있어 발효식품 등에 다양하게 이용할 수 있다.

대표도

도 1

특허청구의 범위

청구항 1.

한국인의 분변에서 분리한 내산성, 내담즙산성, 장내 유해균 성장억제 및 변비개선효능이 우수하고 성장 속도가 빠른 락토 바실러스 애시도필러스 HY 7036(기탁일자와 기탁장소 : 2005. 8. 1, 농업생명공학연구원. 기탁번호: KACC 91167P).

청구항 2.

제1항에 따른 락토바실러스 애시도필러스 HY 7036을 이용하여 발효시킨 발효식품.

명세서

발명의 상세한 설명

발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

본 발명은 새로운 락토바실러스 애시도필러스 균주에 관한 것으로서, 보다 상세하게는 유기산 생성이 우수하여 인체의 소화 장기에서의 생존력이 탁월하고, 장내 유해균에 대한 억제력이 우수하며, 성장속도가 빠른 락토바실러스 애시도필러스 HY 7036 및 이를 함유하는 제품에 관한 것이다.

젖산균은 동물의 장내에 분포하여 유해 미생물 성장의 억제, 이상 발효의 치료, 장관 세포벽 자극을 통한 장운동성 증진, 면역 기능의 증진 등의 효과를 나타내며, 항암 작용도 있는 것으로 보고되고 있다.

이러한 젖산균을 사람이 섭취하여 건강을 증진할 수 있도록 발효 유제품이 상용화되어 널리 응용 또는 식용되고 있다. 상기 발효 유제품에 사용되는 대표적인 균주로는 락토바실러스 애시도필러스(*L. acidophilus*), 락토바실러스 카세이(*L. casei*), 락토바실러스 델부르엑키 아종 불가리쿠스(*L. delbrueckii subsp. bulgaricus*), 스트렙토코커스 써모필러스(*Str. thermophilus*) 등이 있다.

젖산균이 인체에 유용한 효과를 나타내려면 소화기관을 통과하는 과정에서 생존하여 소장내 정착할 수 있어야 한다. 따라서 유기산 생성능이 우수하여 장내의 다양한 유해균들이 생산하는 독소 및 대사산물에 대항하고 이들의 성장을 억제함으로써 장내에 정착할 수 있으며 소장 내에서의 생존수가 높아지게 할 수 있기 때문에, 이러한 성질을 갖는 젖산균을 사용하여 발효제품을 제조하였을 때 실질적으로 인체에 유용한 기능을 할 수 있는 것이다.

또한 생성된 유기산이 장관세포벽을 자극하여 장관의 활동성에 영향을 주게 되고, 장관벽 활동성의 증가로 배변활동에 긍정적인 영향을 주는 것이 가장 중요한 문제가 되어 왔으나 현실적으로 증명된 바가 매우 적기 때문에 이러한 특성이 우수한 균주를 분리, 개발하려는 노력이 다각도로 시도되고 있다.

한편, 젖산균이 지속적으로 유용한 기능을 하기 위해서는 상술한 유기산에 의한 장관벽 자극을 통한 배변 용이성 이외에 장내에서의 정착율이 높아야 한다. 그러나 젖산균은 숙주 특이성을 나타내기 때문에, 사람을 위한 발효제품을 위해서는 사람으로부터 분리한 젖산균이 실제로 인체 내에 정착하여야 소기의 효과를 얻을 수 있다.

또한, 젖산균은 현대인의 소화기능 장애 중 가장 평범하지만 다수의 사람들이 가지고 있는 변비의 개선효과가 있기 때문에, 이러한 특성이 우수한 젖산균을 개발하는 것이 요구되고 있다.

특히 젖산균은 인간의 구강, 장, 질, 분변 등에 널리 분포한다. 따라서 이들로부터 젖산균을 분리하여 그 특성을 시험함으로써 원하는 성질을 갖는 젖산균을 획득하는 방법이 행해지고 있으며, 특히 분변으로부터 젖산균을 분리하는 방법이 유용하게 사용되고 있다.

본 발명에서는 숙주 특이성을 고려하여, 한국인을 위한 발효제품에 사용되는 젖산균으로서 한국인의 인체로부터 젖산균을 분리함으로써, 상기한 숙주 특이성의 관계에서 젖산균의 유용한 효과를 극대화할 수 있는 것이다. 본 발명자들은 이러한 점을 고려하여 한국인의 생리에 맞는 발효제품을 제조하는데 적합한 균주를 분리하고자 한국 성인들로부터 젖산을 분리하여 시험하던 중 유기산 생성 능력이 우수하고 장내 유해균 생장을 억제하며 장관벽 자극을 통한 배변 촉진기능 및 성장속도가 빠른 새로운 젖산균을 분리하는데 성공하여 본 발명에 도달하였다.

발명이 이루고자 하는 기술적 과제

따라서 본 발명의 목적은 유기산 생성이 왕성하고 성장속도가 빠르고, 인체 유해균에 대한 성장억제 효과가 우수하며, 인체의 장관 운동성을 증가시키는 능력이 우수한 새로운 락토바실러스 애시도필러스 HY 7036(*Lactobacillus acidophilus* HY 7036)을 제공하는 것이다.

본 발명의 또다른 목적은 한국인에 적합한 새로운 락토바실러스 애시도필러스 HY 7036을 제공하는 것이다.

본 발명의 또다른 목적은 락토바실러스 애시도필러스 HY 7036 을 이용하여 제조한 발효제품을 제공하는 것이다.

발명의 구성

상기의 목적을 달성하기 위하여 본 발명에 의하면 한국인 성인에게 적합하며 유기산 생성이 왕성하고 성장속도가 빠르고, 인체 유해균에 대한 성장억제 효과가 우수하며, 인체의 장관 운동성을 증가시키는 능력이 우수한 새로운 락토바실러스 애시도필러스 HY 7036 균주를 제공한다.

이하 본 발명에 따른 새로운 락토바실러스 애시도필러스 HY 7036 균주의 분리, 동정, 균학적성질 및 용도에 대해 자세히 설명한다.

락토바실러스 애시도필러스 HY 7036 균주의 분리

본 발명에 따른 균주를 분리하기 위하여 건강한 한국인 성인의 분변을 0.02 % 소듐 아지드(sodium azide)가 포함된 엠알에스(MRS) 액체 배지에 넣고 37 °C에서 24시간 배양하였다. 배양 후 백금이를 사용하여 배양액을 취하여 다시 0.02 % 소듐 아지드가 포함된 엠알에스 한천 평판배지에 도말하고 37 °C에서 48 시간동안 배양하였다. 형성된 균락 중에서 내산성 및 내담즙산성을 시험하여 본 발명의 균주를 분리하였다. 본 발명의 젖산균은 2005. 8. 1일자로 농업생명공학연구원에 기탁하였다(기탁번호: KACC 91167P).

락토바실러스 애시도필러스 HY 7036 균주의 동정

본 발명에 따른 신균주의 특성은 다음과 같다.

1) 균의 형태

엠알에스(MRS) 한천평판배지에서 37 °C, 2일간 배양했을 때 균의 형태

① 세포의 형태: 간균

② 운동성: 없음

③ 포자형성능: 없음

④ 그람(Gram) 염색: 양성

2) 균총의 형태

엠알에스(MRS) 한천평판배지에서 37 °C, 2일간 배양했을 때 균총의 형태

- ① 형상: 원형
- ② 용기: 불록
- ③ 표면: 거침(rough)

3) 생리적 성질

① 생육온도: 성장가능 생육온도: 25 ~ 45 °C

최적 생장온도: 37 ~ 40 °C

② 생육 pH: 성장가능 생육 pH: 4.0 ~ 7.5

최적 pH: 6.0 ~ 6.5

③ 산소에 대한 영향: 통성혐기성

4) 카탈라제: -

5) 가스형성여부: -

6) 15 °C에서 생육: -

7) 45 °C에서 생육: +

8) 인돌생산: -

9) 젖산생산: +

10) Bergey's manual의 당 발효 시험

반응기질	결과	반응기질	결과
Glycerol	-	Salicin	-
Erythritol	-	Celliobiose	+
D-Arabinose	-	Maltose	+
L-Arabinose	-	Lactose	+
Ribose	-	Melibiose	-
D-Xylose	-	Sucrose	+
L-Xylose	-	Trehalose	+
Adonitol	-	Inulin	-
β-Methyl-D-Xyloside	-	Melezitose	-
Galactose	+	Raffinose	+
Glucose	+	Starch	+
Fructose	+	Glycogen	-
Mannose	+	Xylitol	-
Sorbose	-	Genitobiose	+
Rhamnose	-	D-Turanose	-
Dulcitol	-	D, L-Xylose	-

Inositol	-	D-Tagatose	+
Mannitol	-	D-Fucose	-
Sorbitol	-	L-Fucose	-
α-Methyl-D-Mannoside	-	D-Arabitol	-
α-Methyl-D-Glucoside	-	L-Arabitol	-
N-Acetyl-Glucosamine	+	Gluconate	-
Amygdalin	-	2-keto-Gluconate	-
Esculin	+	5-keto-Gluconate	-

이와 같은 균의 형태학적, 생리적 및 성장 특성에 근거하여 본 발명의 균주는 락토바실러스 에시도필러스로 동정하였고, 본 발명자들은 이를 락토바실러스 에시도필러스 HY 7036로 명명하였다.

본 발명의 균주는 배양물 또는 동결건조된 분말 형태로 제공될 수 있다. 이와 같이 본 발명의 균주 자체 또는 본 발명의 균주를 이용하여 당 또는 단백질을 발효시킴으로써 얻어지는 본 발명의 균주가 포함된 배양물은 정상 효과가 기대되므로 정장제로 사용될 수 있는 것이다. 특히 널리 식용되는 요구르트나 치즈 등의 발효식품을 본 발명의 균주를 사용하여 제조할 수 있다.

이하 실시예 및 비교예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 설명하기 위한 것으로서 본 발명의 범위가 이들 실시예에 국한되는 것은 아니다.

이들 실시예 및 비교예에서 사용된 MRS 배지 및 MRS 한천 평판배지의 조성은 각각 다음 표1 및 2와 같다.

[표 1]
MRS 배지의 조성

프로테오스 펩톤 No. 3	10 g
육 추출물	10 g
효모 추출물	5 g
포도당	20 g
트윈 80(Tween 80)	1 g
암모늄 시트레이트	2 g
소듐 아세테이트	5 g
황산마그네슘(MgSO ₄ ·7H ₂ O)	0.1 g
황산망간(MnSO ₄ ·4H ₂ O)	0.05 g
인산칼륨(dibasic)	2 g
증류수	1000 ml

[표 2]
MRS 한천 평판배지

MRS 배지	100 ml
한천	1.5 g

실시예 1: 내산성 시험

MRS 액상배지에 0.2% 소듐 티오글리콜레이트(sodium thioglycollate)를 첨가하여 MRS 티오(MRS Thio)배지를 조성하였다. 이 배지에 본 발명의 락토바실러스 에시도필러스 HY 7036 균주를 접종하여 37 °C에서 24시간 배양하였다. 이 배양물에 멸균한 1.25 N 염산 용액을 첨가하여 배지를 pH 2로 조절하였다. 배지를 계속해서 37°C에서 배양하면서 30분 간격으로 시료를 채취하였다.

멸균한 0.1% 펩톤 용액 8.5 ml와 0.5 N NaOH 용액 0.5 ml의 혼합용액으로 채취한 시료를 중화 및 희석시킨 후, 0.1 % 펩톤 용액 9 ml로 연속 희석하였다. 희석된 시료를 MRS 한천 평판배지에 접종하고 37 °C에서 2일간 배양하여 형성된 균락수를 세어 생균수를 측정하였다. 본 발명의 락토바실러스 에시도필러스 HY 7036의 내산성을 비교하기 위하여 상업용 중균으로 사용빈도가 높은 락토바실러스 에시도필러스 CH-5(CHR. Hansen, Denmark), 락토바실러스 NCFM을 사용하였다. 본 발명의 락토바실러스 에시도필러스 HY 7036과 비교 예로 시험한 유산균의 내산성 결과는 도1에 나타내었다.

도1에서 확인할 수 있는 바와 같이 본 발명의 락토바실러스 에시도필러스 HY 7036은 기존의 락토바실러스 에시도필러스 CH-5나 락토바실러스 NCFM보다 내산성이 뛰어난 것을 알 수 있었다.

실시예 2: 내담즙산성 시험

MRS 액체배지에 옥스갈(oxgall, Difco 제조)을 최종 농도가 0%, 0.3% 및 0.5 %가 되도록 첨가한 후 락토바실러스 에시도필러스 HY 7036을 1% 접종하여 37 °C에서 배양하였다. UV-VISIBLE SPECTROPHOTOMETER(UV-1601, SHIMADZU, Co. Japan)를 사용하여 620nm에서 흡광도를 측정하였다. 본 발명의 균주 락토바실러스 에시도필러스 HY 7036의 내담즙산성을 비교하기 위하여 락토바실러스 에시도필러스 CH-5(CHR. Hansen, Denmark), 락토바실러스 NCFM을 사용하였다. 본 발명의 락토바실러스 에시도필러스 HY 7036과 비교 예로 시험한 유산균의 내담즙성 결과는 도2에 나타내었다.

도2에서 확인할 수 있는 바와 같이 본 발명의 락토바실러스 에시도필러스 HY 7036은 기존의 락토바실러스 에시도필러스 CH-5나 락토바실러스 NCFM보다 내담즙산성이 뛰어난 것을 알 수 있었다.

실시예 3 : 배지(우유성분)내 생장시험

12%의 멸균 환원탈지유에 본 발명의 락토바실러스 에시도필러스 HY 7036을 1% 농도로 접종하여 37°C에서 24시간 배양하면서 MRS 한천 평판배지에 접종하고 37°C 에서 2일간 배양하여 형성된 균락수를 세어 생균수를 측정하였다. 본 발명의 균주 락토바실러스 에시도필러스 HY 7036의 우유내 생장시험을 비교하기 위하여 락토바실러스 에시도필러스 CH-5(CHR. Hansen, Denmark), 락토바실러스 NCFM을 사용하였다. 본 발명의 락토바실러스 에시도필러스 HY 7036과 비교 예로 시험한 유산균의 우유 생장시험 비교 결과는 도3에 나타내었다.

도3에서 확인할 수 있는 바와 같이 본 발명의 락토바실러스 에시도필러스 HY 7036은 기존의 락토바실러스 에시도필러스 CH-5나 락토바실러스 NCFM보다 생존능력이 뛰어난 것을 알 수 있었다.

실시예 4: 락토바실러스 에시도필러스 HY 7036을 이용한 발효유의 제조예

유고형분 함량 8.5%로 준비된 우유를 초고온 살균기를 이용하여 135°C에서 3-5초 동안 살균한 뒤 37°C로 냉각하였다. 본 발명의 유산균 락토바실러스 에시도필러스 HY 7036을 5.0×10^6 cfu/ml 수준으로 접종하여 37°C에서 24시간 동안 배양하였다. 상기 배양물의 최종 산도 및 pH가 0.65%, 4.8에 도달하였을 때 배양을 중단시켰다. 배양을 종료시킨 뒤 8°C이하로 냉각한 뒤 잘 혼합하여 균질기(AlphaLaval, 네델란드)를 이용하여 130-150mBar로 균질하였다. 균일한 유성분으로 균질화된 배양액에 사과과즙 5중량%, 설탕 3중량%, 고과당 5중량%가 최종제품에 함유되도록 준비된 시럽을 혼합하여 제품을 준비하였다. 완성된 제품의 이화학적 특성은 pH 4.8, TA 0.68, Brix 18, 유산균 4.0×10^8 cfu/ml 이상이였다. 제조된 발효유는 임상실험에 사용하기 위하여 청결하게 준비된 공병에 충전하여 150ml 씩 준비하여 사용하였다. 본 발명 락토바실러스 에시도필러스 HY 7036으로 준비된 유산균 발효유의 변비개선 효능을 비교하기 위하여 락토바실러스 에시도필러스 CH-5(CH. Hansen, Denmark), 락토바실러스 NCFM을 사용하여 동일한 유산균 발효유를 제조하였다.

실시예 5: 변비 개선 효능 실험

상기 실시예 4에서 제조한 유산균 발효유 조성물을 변비증상을 호소하는 피험자 160명을 선발하여 무작위로 4개 그룹을 분류한 뒤 각 조성물을 2주간 매일 2개씩 공급하면서 설문조사를 통해 그 실험결과를 확인하였다. 제품의 변비 개선기능에서 발효유의 음용에 따른 배변회수의 변화, 변비증상의 호전도, 용변 후 잔변감의 변화를 설문지를 통하여 체크하였다. 확인된 각 실험군별 결과는 표3, 표4, 표5에 나타내었다.

[표 3]
발효유 음용에 따른 배변회수의 변화(단위 : 명)

구분		회수	<i>L. acidophilus</i> HY 7036	락토바실러스 애시도필러스 CH-5	락토바실러스 NCFM
항목	기간				
배변회수	섭취 전	1회이하	32	32	32
		2-3회	8	8	8
		4-5회	0	0	0
		6회이상	0	0	0
	섭취 1주후	1회이하	22	30	33
		2-3회	18	1	7
		4-5회	0	0	0
		6회이상	0	0	0
	섭취 2주후	1회이하	11	26	31
		2-3회	18	11	9
		4-5회	8	3	0
		6회이상	3	0	0

[표 4]
발효유 음용에 따른 변비증상의 호전도(단위 : 명)

구분		회수	<i>L. acidophilus</i> HY 7036	락토바실러스 애시도필러스 CH-5	락토바실러스 NCFM
항목	기간				
배변회수	섭취 1주후	동일	12	30	31
		조금개선	22	10	9
		대체로개선	6	0	0
		완전개선	0	0	0
	섭취 2주후	동일	6	25	31
		조금개선	12	12	9
		대체로개선	16	3	0
		완전개선	6	0	0

[표 5]
발효유 음용에 따른 잔변감의 변화(단위 : 명)

구분		회수	<i>L. acidophilus</i> HY 7036	락토바실러스 애시도필러스 CH-5	락토바실러스 NCFM
항목	기간				

배변회수	섭취 1주후	없다	1	0	0
		가끔	17	0	0
		자주	12	12	8
		항상	10	28	32
	섭취 2주후	없다	8	0	0
		가끔	12	8	0
		자주	16	21	10
		항상	4	11	30

표3,4,5에서 확인할 수 있는 바와 같이 본 발명의 락토바실러스 애시도필러스 HY 7036은 기존의 락토바실러스 애시도필러스 CH-5나 락토바실러스 NCFM보다 변비개선 효능이 뛰어난을 알 수 있었다.

실시에 6 : 장내 유해 미생물 성장 억제 능력 실험

본 발명의 락토바실러스 애시도필러스 HY 7036를 이용하여 제조한 발효유 조성물을 변비 증상을 호소하는 피험자에게 공급하였을 때, 분변에 존재하는 유해 미생물의 수준변화를 관찰하였다. 락토바실러스 애시도필러스 HY7036을 이용하여 제조한 유산균 발효유(150ml)를 하루에 2개씩 2주간 공급하였고 피험자에게 분변을 수거하여 분변내 유해 지표 미생물의 수를 관찰하였다. 유해 미생물은 대장균(*E. coli*), 포도상구균(*Staphylococcus*), 클로스트리디움 퍼스리젠스(*Clostridium perfringens*)로 지정하여 관찰하였으며 섭취 전, 섭취 1주, 섭취 2주, 섭취 중지 1주, 섭취 중지 2주로 구별하여 분변내의 미생물 수준의 변화를 관찰하였다. 관찰한 실험결과는 표6에 나타내었다.

[표 6]

락토바실러스 애시도필러스 HY 7036을 이용한 발효유 음용에 따른 대변의 미생물적 특성의 변화

		기간				
		섭취전	섭취 1주	섭취 2주	중지 1주	중지 2주
pH		6.9 - 7.6	6.4 - 6.7	5.4 - 5.7	6.6 - 6.8	6.9 - 7.1
유산균수(cfu/ml)		6.5×10^6	1.2×10^8	4.2×10^8	3.0×10^7	8.3×10^6
유해균수 (cfu/ml)	<i>E. coli</i>	6.5×10^7	8.2×10^6	1.3×10^6	5.2×10^6	3.3×10^7
	<i>Staphylococcus</i>	4.8×10^5	1.0×10^5	4.4×10^4	6.0×10^4	1.3×10^5
	<i>C. perfringens</i>	3.3×10^5	2.1×10^3	1.2×10^3	4.4×10^4	1.6×10^5

표6에서 확인할 수 있는 바와 같이 본 발명의 락토바실러스 애시도필러스 HY 7036은 장내 유해 미생물 성장 억제 능력이 뛰어난을 알 수 있었다.

발명의 효과

이상에서 상세히 설명한 바와 같이, 본 발명에 따른 락토바실러스 애시도필러스 HY7036 균주는 건강한 한국성인의 생체에서 분리한 것이기 때문에 한국인의 장에 정착하여 장의 운동성을 촉진하여 변비를 개선시킬 수 있으며 내산성과 내담즙 산성, 유해균 성장억제능력 우수하며, 우유 내에서 성장속도가 빠른 특성이 있다. 그러므로 본 발명의 균주는 유용한 신균주로서 발효식품 등에 다양하게 이용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

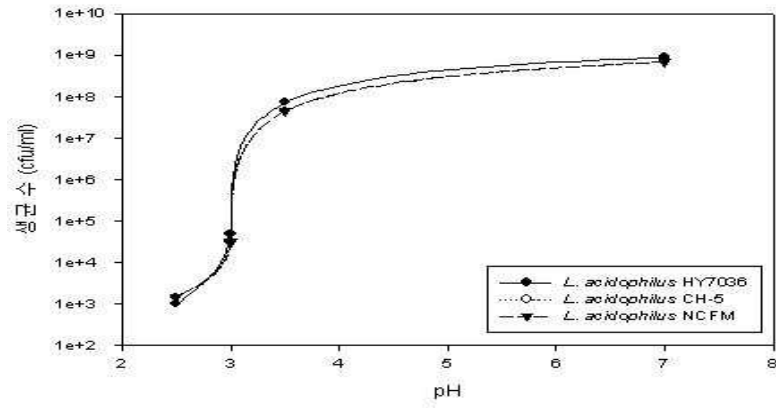
도1은 *L. acidophilus* HY 7036의 내산성시험 결과를 나타내는 그래프이다.

도2는 *L. acidophilus* HY 7036의 내담즙성시험 결과를 나타내는 그래프이다.

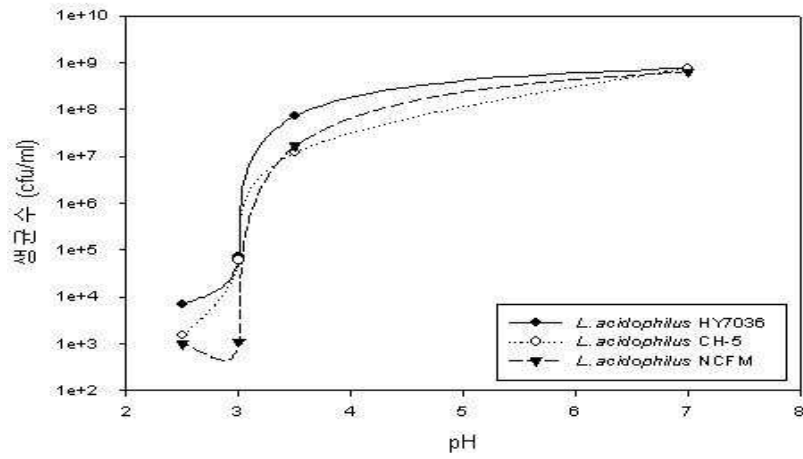
도3은 *L. acidophilus* HY 7036의 배지(우유성분)내 성장시험 결과를 나타내는 그래프이다.

도면

도면1



도면2



도면3

