(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2013년03월06일
(11) 등록번호 10-1239806
(24) 등록일자 2013년02월27일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 1/20 (2006.01) *A61P 37/00* (2006.01)
A23C 9/123 (2006.01) *C12R 1/25* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2011-0030183
(22) 출원일자 2011년04월01일
심사청구일자 2011년04월01일
(65) 공개번호 10-2012-0111608
(43) 공개일자 2012년10월10일
(56) 선행기술조사문헌
KR1020110000871 A*
KR1020090131510 A
KR1020020072807 A
KR1020110046020 A
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
주식회사한국야쿠르트
서울특별시 서초구 강남대로 577 (잠원동)
(72) 발명자
명길선
서울특별시 강남구 논현로157길 45, 405호 (신사동)
박세훈
서울특별시 성북구 화랑로48길 16, 108동 1203호 (석관동, 두산아파트)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
경일호

전체 청구항 수 : 총 1 항 심사관 : 김지연

(54) 발명의 명칭 **면역증강 활성을 가지는 신규한 락토바실러스 플란타룸 에이취와이 7712**

(57) 요 약

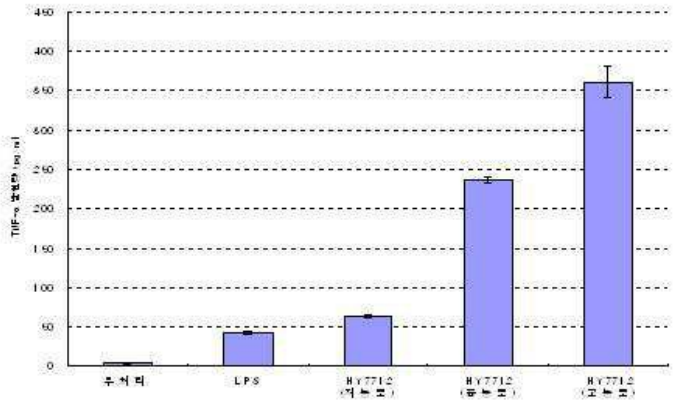
본 발명은 면역증강 및 항산화 활성을 가지는 신규한 락토바실러스 플란타룸 HY7712 및 이를 유효성분으로 함유하는 제품에 관한 것으로서, 본 발명에 따른 락토바실러스 플란타룸 HY7712는 대식세포의 TNF-α의 생산을 유도함으로써 면역증강활성이 매우 뛰어날 뿐만 아니라, 항산화 활성 및 야채를 발효능을 가지고 있어 면역증강용 약학조성물, 건강기능식품, 기능성음료, 발효제품 등 다양하게 이용될 수 있다.

과제번호: 810002-03-1-SB410

부처: 농림수산식품기술기획평가원

과제명: 국내농산물을 이용한 기능성 발효음료 개발

대 표 도 - 도2



(72) 발명자

안영태

경기도 수원시 권선구 정조로 432, 109동 312호 (세류동, 미영아파트)

허철성

경기도 용인시 기흥구 용구대로2394번길 27, 106동 901호 (마북동, 삼거마을삼성래미안1차(아))

특허청구의 범위

청구항 1

삭제

청구항 2

사람의 대식세포에서 면역지표인 TNF-α의 생산을 유도함으로써 면역증강 활성을 가지는 것을 특징으로 하는 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) HY7712(기탁번호:KCTC 11874BP).

청구항 3

삭제

청구항 4

삭제

청구항 5

삭제

청구항 6

삭제

청구항 7

삭제

청구항 8

삭제

명 세 서

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 면역증강 및 항산화 활성을 가지는 신규한 락토바실러스 플란타룸 HY7712 및 이를 유효성분으로 함유하는 제품에 관한으로서, 보다 상세하게는 사람의 대식세포에서 면역지표인 TNF-α의 생산을 유도함으로써 면역증강 활성을 가짐은 물론 항산화 활성 및 야채 발효능을 가지는 신규한 락토바실러스 플란타룸 HY7712 및 이를 유효성분으로 함유하는 약학 조성물, 건강기능식품, 기능성음료, 발효제품에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 김치와 같은 전통 발효식품에 풍부하게 존재하는 유산균은 인체의 소화계에 공생하면서 섬유질 및 복합 단백질을 분해하여 중요한 영양성분으로 만드는 역할을 담당하며, 장내 pH를 산성으로 유지시켜 대장균이나 크로스트리디움(*Chlostridum* sp.)과 같은 유해균의 번식을 억제하고 설사와 변비를 개선할 뿐만 아니라, 비타민 합성, 혈중 콜레스테롤 저하 등의 역할을 한다. 특히 유산균은 장의 점막과 상피세포에 강하게 결합할 수 있는 특성이 있어 정장작용에 많은 도움을 준다. 또한, 유산균은 대식세포의 증식을 촉진하여 대식세포(macrophage)의 장내 유해 세균에 대한 인지능력, 살균능력을 강화시키고, 면역관련 물질의 분비를 촉진하여 면역 증강효과를 나타내는 것으로 알려져 있다(Gabriela peridgon et al. J of food Protection 53: 404-411, 1990: Katsumasa sato et al., Microbiol Immunol., 32(7): 689-698, 1998).

[0003] 또한, 유산균은 면역 조절 이상과 관련된 알레르기 및 아토피 질환에도 효과가 있어 유아에 투여 시 아토피 발생이 줄어들고(Kalliomki et al., Lancet 357:1076-1079, 2001) 아토피 습진부위 및 정도가 감소한다는 보고가

있다(Rsenfeldt et al., Dermatologic and ocular diseases 111: 389-395, 2003).

[0004] 특히, 락토바실러스 플란타룸은 락토바실러스 속 유산균으로 주로 김치, 피클과 같은 침채류, 토마토, 우유, 치즈, 버터 등에서 분리되며 자연계에서 가장 분포가 넓은 유산균 중 하나로서, 김치가 발효가 많이 되어 신맛이 날 때 주로 생장하는 균으로 내산성과 내담즙성이 강하며, 푸자리움(Fusarium), 슈도모나스(Pseudomonas)에 대한 항균활성을 가지고, 항산화 및 항염증 효과를 가지고 있어 매우 유용한 균주이다.

[0005] 한편, 대한민국 특허공개 제2010-0063503호(발명의 명칭: 신규한 락토바실러스 플란타룸 및 이를 포함하는 조성물)에서는 항체성 면역인 Th2 과잉반응으로 인한 Th1/Th2 불균형을 조절하는 효과가 우수한 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) CJLP136이 공개되어 있으나, 이는 과민성 면역반응 조절에 관한 활성으로 일반적인 면역증강 활성과는 다르다.

[0006] 이에 본 발명자들은 락토바실러스 플란타룸 중 사람의 대식세포에서 TNF-α의 생산을 유도하여 대식세포를 활성화시키는 면역증강 활성을 가지는 락토바실러스 플란타룸을 선발함으로써 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명은 사람의 대식세포에서 면역지표인 TNF-α의 생산을 유도함으로써 면역증강 활성을 가짐은 물론 항산화 활성 및 야채 발효능을 가지는 신규한 락토바실러스 플란타룸 HY7712 및 이를 유효성분으로 함유하는 제품을 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

[0008] 상기의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 사람의 대식세포에서 면역지표인 TNF-α의 생산을 유도함으로써 면역증강 활성을 가짐은 물론 항산화 활성 및 야채 발효능을 가지는 신규한 락토바실러스 플란타룸 HY7712 및 이를 유효성분으로 함유하는 제품을 제공하는 것을 특징으로 한다.

[0009] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

[0010] 본 발명에 따른 락토바실러스 플란타룸 HY7712는 김치로부터 분리 및 동정된 락토바실러스 플란타룸의 신규한 균주로서 미생물 동정 및 분류를 위한 16S rRNA 염기서열 분석결과, 락토바실러스 플란타룸 KW30(*Lactobacillus plantrum* KW30)과 가장 높은 상동성을 나타내어 락토바실러스 플란타룸과 가장 높은 분자계통학적 유연관계를 보여 상기 미생물을 락토바실러스 플란타룸으로 동정하고 락토바실러스 플란타룸HY7712로 명명하였으며, 생명공학연구원 유전자은행에 2011년 2월 23일자로 기탁하였다(기탁번호 KCTC 11874BP). 락토바실러스 플란타룸 HY7712의 16S rRNA 유전자의 염기서열은 본 명세서에 첨부된 염기서열 목록 SEQ No. 1과 같다.

[0011] 본 발명의 락토바실러스 플란타룸 HY7712는 그람 양성균이며 호기적인 조건과 혐기적인 조건에서 모두 성장이 가능한 통성 혐기성(facultive anaerobe)이며 포자를 형성하지 않고 운동성이 없으며 세포의 형태는 간균이다. 락토바실러스 플란타룸 HY7712의 보다 구체적인 생리학적 특성은 당해 기술 분야의 통상의 방법에 따라 분석한 결과 표 1과 같은 것으로 나타났다.

표 1

[0012]

형태 및 생리, 생화학적 특성	
형태(Morphology)	간균(Rod)
운동성(Motility)	-
포자(spore)	-
카탈라제	-
호모-헤테로 발효	통성 헤테로 발효
15℃에서의 증식	+
45℃에서의 증식	-
NaCl 3% 에서의 증식	+
혐기성 증식	+
포도당 이용 CO2 생성	-
당 발효 특성	
글리세롤	-
에리쓰리톨	-
D-아라비노오즈	-
L-아라비노오즈	+
리보오즈	+
D-자일로오즈	-
L-자일로오즈	-
아도니톨	-
자일로사이드	-
갈락토오즈	+
D-글루코오즈	+
D-프럭토오즈	+
D-만노오즈	+
L-소르보오즈	-
람노오스	-
둘시톨	-
이노시톨	-
만니톨	+
솔비톨	+
D-만노사이드	-
D-글로코사이드	+
글루코사민	+
아미그달린	+
알부틴	+
에스큘린	+
살리신	+
셀로비오즈	+
말토오즈	+
락토오즈	+
멜리비오즈	+
슈크로오즈	+
트레할로오즈	+
이눌린	-
멜리지토오즈	+
D-라피노오즈	+
아미돈	-
글리코겐	-
자일리톨	-
겐티오비오즈	+
D-투라노오즈	+
D-릭소오즈	-
D-타가토오즈	-
D-푸코오즈	-

L-푸코오즈	-
D-아라비톨	-
L-아라비톨	-
글루코네이트	+
2-글루코네이트	-
5-글루코네이트	-

[0013] +: 양성반응, -: 음성반응

[0014] 본 발명의 락토바실러스 플란타룸 HY7712는 장기간 안정적으로 보존하기 위해서는 물에 글리세롤 성분을 일정량 혼합하여 만든 보관용액에 균체를 풀어 -70℃에서 보관하거나 멸균된 10% 탈지유에 현탁하여 동결건조하는 것이 바람직하다.

[0015] TNF-α는 면역제어와 염증반응에 핵심적 조절자 역할을 담당하는 사이토카인(cytokine)이다. TNF-α는 세균의 세포막에 있는 내독소인 LPS(lipopolysaccharide)에 의해 활성화된 림프구에 의해 만들어지는데, 많은 종류의 사이토카인 분비를 조절하는 면역반응에 있어서 가장 초기에 일차적인 매개체로 작용한다. 또한 T 세포와 B 세포의 활성화에 공동자극제(co-stimulator)로 작용하기도 한다. 따라서 TNF-α는 염증반응에서 백혈구들이 혈관 내피세포에 부착하는 것을 촉진하며 염증세포들의 미생물 살해능력을 증가시키며, 단핵 식균세포(mononuclear phagocytes)에 작용하여 여러 가지 염증반응에 관여하는 사이토카인을 생산하게 만들어 염증반응을 촉진한다. TNF-α는 또한 종양세포에 작용하여 세포자연사를 유도하기도 한다.

[0016] 대식세포는 면역반응에 관계하는 주 세포로서 면역세포의 작용을 조절하는 사이토카인을 분비하여 면역반응 조절, 자연면역에서 미생물, 항원, 죽은 조직 등을 식균 작용으로 파괴, 체액성 면역 반응에서 작용세포(effector cell)로서의 활동, 지연성 과민 반응(delayed type hypersensivity)에서 항원 제거, TNF-α 분비를 통한 종양세포의 파괴, 획득면역반응에서 항원의 조작과 제시(antigen processing and presentation), 염증반응에 관여하는 물질이나 사이토카인을 분비하여 염증반응을 조절, 섬유아세포와 혈관내피세포의 성장인자를 생산하여 손상된 조직의 치유 등 다양한 기능을 한다.

[0017] 본 발명에서는 사람의 대식세포에 김치에서 분리한 락토바실러스 플란타룸 종을 처리하고 이에 TNF-α가 특히 높게 생산되는 락토바실러스 플란타룸 HY7712를 선발하였다.

[0018] 본 발명의 면역증강 활성을 가지는 락토바실러스 플란타룸 HY7712를 유효성분으로 함유하는 면역증강용 약학 조성물은 제제 시에 통상적으로 이용되는 것으로, 락토스, 덱스트로스, 수크로스, 젤라틴 등의 부형제들과 함께 이용될 수 있으며 상기의 성분 외에 윤활제, 습윤제, 감미제, 향미제, 유화제, 현탁제, 보존제 등을 추가로 포함할 수 있다.

[0019] 본 발명의 락토바실러스 플란타룸 HY7712는 경구투여 및 기타 투여방법으로 복용하였을 시에도 다른 유익균에는 영향을 미치지 않으므로 안전하다. 본 발명의 면역증강 활성을 가지는 락토바실러스 플란타룸 HY7712를 유효성분으로 함유하는 면역증강용 약학 조성물은 건조 또는 액체상태의 제제 형태일 수 있고,락토바실러스 플란타룸 HY7712를 단일 또는 다른 미생물과 복합으로 혼합하여 이용할 수 있다.

[0020] 또한, 본 발명의 락토바실러스 플란타룸 HY7712는 항산화 활성이 매우 뛰어나다. 우리의 몸은 수없이 많은 산화적 손상 속에 노출되어 있는데 유해산소, 활성산소라고 하는 것이 자연발생적으로 생겨난다. 이 활성산소는 세포의 구성성분인 지질, 단백질, 당, DNA 등과 반응하여 파괴작용을 함으로써 노화는 물론, 암, 뇌질환, 심장질환 등의 각종 질병을 일으키는 원인이 된다. 활성산소를 막아주는 물질을 항산화제(antioxidants)라고 하는데 인체에 자연적으로 존재하는 항산화제는 물론, 비타민 E, C, 베타카로틴 등 외부에서 제공해주는 항산화제도 있다. 항산화 효과를 가지는 유산균은 비피도 박테리움 인판티스(Bifidobacterium infantis), 비피도 박테리움 롱검(Bifidobacterium longum), 락토바실러스 퍼멘텀(lactobacillus fermentum), 락토코커스 락티스(lactococcus lactis) ssp. 락티스(lactis) 등이 알려져 있으며, 본 발명의 신규한 락토바실러스 플란타룸 HY7712 역시 항산화 활성을 가지고 있다.

[0021] 또한, 본 발명의 락토바실러스 플란타룸 HY7712는 발효 야채주스를 제조하는 데에도 적합하다. 야채발효는 야채 고유의 맛과 향을 증진시키고 항산화 효과를 증진시키는 데에 도움이 된다. 풍미 이외에도 야채발효를 통해 소화력을 높이고 영양성분을 증가시키는 효과도 얻을 수 있으며 비타민 C의 경우 발효야채에서 보존이 더욱 잘된다는 연구 결과가 있다(Kalantzopolos G. 1997. Anaerobe. 3: 185-190. Nout MJR, Motarjemi Y. 1996. Food Control. 8: 553-559). 이에 따라 본 발명의 신규한 락토바실러스 플란타룸 HY7712는 야채주스를 발효시켜 풍미와 영양성분이 증진됨은 물론, 항산화 효과와 면역증강 효과를 가지는 야채주스를 제공할 수 있다.

발명의 효과

[0022] 이상에서와 같이, 본 발명의 락토바실러스 플란타룸 HY7712는 면역증강 활성, 황산화 활성 및 야채 발효능이 뛰어나, 이를 유효성분으로 함유하는 약학 조성물, 건강기능식품, 기능성음료, 발효제품 등으로 이용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0023] 도 1은 김치로부터 분리된 락토바실러스 플란타룸 균주들 중에 락토바실러스 플란타룸 HY7712가 가장 높은 면역증강율을 보임을 나타낸 그래프이다.

a: KM22-1, b: KM2-1, c: KM20-3, d: KM19-6, e: KM18-3, f: KM16-3, g: KM14-7, h: KM12-3 i: KM1-2, j: K7-9 k: K7-1, l:K6-3, m: K5-8, n: K5-5, o: K3-2 p: K20-15, q: K12-7, r: K12-2

도 2는 락토바실러스 플란타룸 HY7712의 농도별 면역지표인 TNF-α의 생산유도를 나타낸 그래프이다.

도 3은 락토바실러스 플란타룸 균종의 DPPH 라디칼 소거능을 측정한 결과를 나타낸 그래프이다.

도 4는 락토바실러스 플란타룸 균종의 환원활성을 측정한 결과를 나타낸 그래프이다.

도 5는 락토바실러스 플란타룸 균종의 활성산소 흡수력을 측정한 결과를 나타낸 그래프이다.

도 6은 락토바실러스 플란타룸 HY7712의 야채주스에서의 생장 곡선을 나타낸 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0024] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 보다 상세하게 설명한다. 그러나 다음의 실시예는 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니며, 본 발명의 기술적 사상의 범위 내에서 당업자에 의한 통상적인 변화가 가능하다.

[0025] <실시예 1>

[0026] 김치로부터 락토바실러스 플란타룸 HY7712의 분리 및 동정

[0027] 본 발명에 따른 락토바실러스 플란타룸은 각 지역에서 수집한 김치 국물에서 분리되었다. 김치 국물을 십진희석하여 1.5% 한천(agar)이 포함된 MRS 고체배지에 도말하여 37℃에서 48시간 배양한 후 콜로니(colony)를 백금이(loop)로 취하여 새로운 MRS 고체배지에 접종하고 순수분리 하였다. 순수분리된 콜로니를 MRS 액체배지에 접종하여 37℃에서 24시간 배양하였다. 실험에 이용한 락토바실러스 플란타룸은 총 53종으로 대부분 서로 다른 김치에서 분리하였다.

[0028] 이후, 분리한 균주의 형태 및 생리학적 특성을 API 50CH 및 API 50CHL 키트를 사용하여 결정하였다. 상기 표 1은 HY7712 균주의 API 키트 결과로서, HY7712 균주는 락토바실러스 플란타룸의 당이용성과 동일하였다. 또한, 유산균 동정 및 분류를 위한 16S rRNA 유전자 염기서열을 분석하였으며, 그 결과 확인된 HY7712 균주의 16S rRNA 유전자 염기서열은 서열목록에 기재하였다(SEQ No. 1). 16S rRNA 유전자 염기서열 분석결과 HY7712 균주는 락토바실러스 플란타룸 표준균주와 가장 높은 상동성을 나타내어 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*)으로 동정하고, 락토바실러스 플란타룸 HY7712로 명명하였으며, 생명공학연구원 유전자 은행에 2011년 2월 23자로 기탁하였다(기탁번호: KCTC 11874BP).

[0029] <실시예 2>

[0030] 락토바실러스 플란타룸 HY7712를 포함한 동결건조분말 제조

[0031] 상기 실시예 1의 락토바실러스 플란타룸 HY7712를 엠알에스 배지(MRS broth)에 접종하고 37℃ 배양기에서 24시간 동안 정치배양 하였다. 이것을 5000rpm에서 20분간 원심분리하여 상층액을 제거하고, 식염수로 균체를 세척한 후 다시 5000 rpm에서 20분간 원심분리하여 상층액을 제거하였다. 수거한 균체는 보존제인 탈지분유 분말과 1:1로 섞어 동결건조하여 분말을 제조하였다.

[0032] 한편, 본 발명의 락토바실러스 플란타룸 HY7712는 상기와 같이 동결건조된 분말 형태 또는 배양물 형태로 제공될 수 있다.

[0033] <실시예 3>

[0034] 락토바실러스 플란타룸 HY7712를 유효성분으로 함유하는 약학적 조성물의 제조

[0035] 액제의 제조

[0036] 상기 실시예 2의 락토바실러스 플란타룸 HY7712를 포함한 동결건조분말 100㎎,

[0037] 이성화당 10g, 만니톨 5g을 통상의 액제의 제조방법에 따라 정제수에 각각의 성분을 가하여 용해시키고 레몬향을 적량 가한 다음 정제수를 가하여 전체 100㎖로 조절한 후 갈색병에 충진하여 멸균시켜 액제를 제조하였다.

[0038] 캡슐제의 제조

[0039] 상기 실시예 2의 락토바실러스 플란타룸 HY7712를 포함한 동결건조분말 100㎎에 옥수수 전분 100㎎, 유당 100㎎, 스테아린산 마그네슘 2㎎을 완전히 혼합한 후 통상의 캡슐제의 제조방법에 따라 경질 젤라틴 캡슐에 충전하여 캡슐제를 제조하였다.

[0040] <실시예 4>

[0041] 락토바실러스 플란타룸 HY7712을 유효성분으로 함유하는 발효유의 제조

[0042] 본 발명의 면역증강 및 항산화 활성을 갖는 락토바실러스 플란타룸 HY7712를 유효성분으로 함유하는 발효유를 제조하는 방법은 다음과 같다.

[0043] 먼저, 유산균 배양액은 원유 95.36중량%와 탈지분유(또는 혼합분유) 4.6중량%를 교반하여 15℃에서의 비중은 1.0473~1.0475, 적정산도는 0.200~0.220%, pH는 6.65~6.70, 20℃에서의 브릭스(Brix°)는 16.3~16.5%정도가 되도록 혼합하였다. 혼합 후에 이를 UHT 열처리(135℃에서 2초간 살균)하고 40℃로 냉각한 뒤, 스트렙토코커스 써모필러스균과 유당분해효소(Valley laboratory, USA)를 각기 0.02중량%씩 첨가하고 6시간 동안 배양하여 BCP 배지에서의 총 유산균수가 1.0×10^{9} cfu/㎖ 이상, 적정산도가 0.89~0.91%, pH는 4.55~4.65가 되도록 하여 제조하였다.

[0044] 그런 다음, 혼합과즙시럽은 액상과당 13중량%, 백설탕 5중량%, 혼합과즙농축액 56Brix° 10.9중량%, 펙틴 1.0중량%, 후레쉬 후르츠 믹스 에센스 0.1중량% 및 정제수 70중량%를 30~35℃에서 교반하여 혼합한 후 UHT 열처리(135℃에서 2초간 살균)한 후 냉각하여 제조하였다.

[0045] 그런 다음, 상기 유산균배양액 69.5중량%와 실시예 2의 락토바실러스 플란타룸 HY7712를 포함한 동결건조분말 0.1중량% 및 상기 혼합과즙시럽 30.4중량%를 조합하여 150bar에서 균질한 후 10℃ 이하로 냉각하여 락토바실러스 플란타룸 HY7712를 유효성분으로 함유하는 발효유를 제조하였다.

[0046] <실시예 5>

[0047] 락토바실러스 플란타룸 HY7712를 유효성분으로 함유하는 야채주스의 제조

[0048] 본 발명의 면역증강 및 항산화 활성을 갖는 락토바실러스 플란타룸 HY7712를 유효성분으로 함유하는 야채주스를 제조하는 방법은 다음과 같다.

[0049] 고구마, 단호박 등의 혼합야채즙 1.7중량%, 당근즙 52중량%, 토마토즙 42중량%, 시금치즙 1중량%, 양상추즙 2중량%, 셀러리즙 1중량%, 무수구연산 0.2중량%, 상기 실시예 2의 락토바실러스 플란타룸 HY7712를 포함한 동결건조분말 0.1중량%를 배합기에서 균일하게 혼합한 후 살균기를 이용하여 85~97℃에서 살균하여 락토바실러스 플란타룸 HY7712를 유효성분으로 함유하는 야채주스를 제조하였다.

[0050] <실시예 6>

[0051] 락토바실러스 플란타룸 HY7712를 유효성분으로 함유하는 기능성 음료의 제조

[0052] 본 발명의 면역증강 및 항산화 활성을 갖는 락토바실러스 플란타룸 HY7712을 유효성분으로 함유하는 기능성 음료를 제조하는 방법은 다음과 같다.

[0053] 먼저, 혼합과즙시럽은 액상과당 13중량%, 백설탕 2.5중량%, 갈색설탕 2.5중량%, 혼합과즙농축액 56Brix° 10.9중량%, 펙틴 1.0중량%, 후레쉬 후르츠 믹스 에센스 0.1중량% 및 정제수 70중량%를 30~35℃에서 교반하여 혼합한 후 UHT 열처리(135℃에서 2초간 살균)한 후 냉각하여 제조하였다.

[0054] 그리고, 상기의 방법으로 제조된 혼합과즙시럽 30.4중량%와 상기 실시예 2의 락토바실러스 플란타룸 HY7712를 포함한 동결건조분말 0.1중량% 및 나머지 정제수 69.5중량%를 조합하여 150bar에서 균질한 후 10℃ 이하로 냉각한 후 이를 유리병, 패트병 등 소포장 용기에 포장하여 락토바실러스 플란타룸 HY7712를 유효성분으로 함유하는 기능성 음료를 제조하였다.

[0055] <실시예 7>

[0056] 락토바실러스 플란타룸 HY7712를 유효성분으로 함유하는 건강기능식품의 제조

[0057] 상기 실시예 2의 락토바실러스 플란타룸 HY7712를 포함한 동결건조분말 0.1중량%에 영양보조성분(비타민 B1, B2, B5, B6, E 및 초산에스테르, 니코틴산 아미드) 및 올리고당을 상기의 실시예 2의 락토바실러스 플란타룸 HY7712를 포함한 동결건조분말 100중량부에 대하여 10중량부가 되도록 첨가하여 고속회전 혼합기에서 혼합하였다. 상기 혼합물에 멸균 정제수 10중량부를 첨가, 혼합하고 직경 1~2㎜의 과립상으로 성형하였다. 상기 성형된 과립은 40~50℃의 진공건조기에서 건조시킨 후 12~14메쉬(mesh)를 통과시켜 균일하게 과립을 제조하였다. 상기와 같이 제조된 과립은 적당량씩 압출 성형되어 정제 또는 분말로 되거나 경질캡슐에 충전되어 경질캡슐제품으로 제조하였다.

[0058] <시험예 1>

[0059] 락토바실러스 플란타룸 HY7712의 TNF-α 생산에 대한 영향 조사

[0060] TNF-α는 면역제어와 염증반응에 핵심적 조절자 역할을 담당하는 사이토카인이다. 따라서 본 발명의 김치분리균인 락토바실러스 플란타룸 균종들이 TNF-α의 생산에 어떠한 영향을 미치는지 조사하였다.

[0061] <1-1> 대식세포의 배양

[0062] 본 시험에 사용된 동물 세포주로는 인간유래 단핵백혈구(monocyte) 세포주인 THP-1 세포주를 한국세포주은행(cellbank.snu.ac.kr)에서 분양받아 사용하였다. 일반적인 세포의 유지를 위해서 85% RPMI 1640 배지(Gibco#22400)와 15%의 FBS(Gibco#16000)가 함유된 배지에서 세포를 배양하였으며, 1:4의 비율로 주 1회 계대배양을 수행하였다.

[0063] <1-2> 유산균 시료의 제조

[0064] MRS 액체배지에 배양된 각 지역에서 수집한 김치 국물에서 분리된 락토바실러스 플란타룸 배양액을 취하여 원심분리 후 균체를 PBS로 3회 세척하였다. 세척된 락토바실러스 플란타룸 균체를 100℃에서 15분간 중탕으로 끓임으로서 사멸시킨 후 실험에 이용하였다.

[0065] <1-3> 락토바실러스 플란타룸 처리에 의한 THP-1 세포에서의 TNF-α 발현량 측정

[0066] THP-1 세포를 1:4의 비율로 96 well plate에 계대배양 한 후 48시간 동안 배양하였다. 각 well당 10^5 CFU의 사멸된 락토바실러스 플란타룸 균종을 처리한 후 18시간동안 추가 배양하였다. 각 well에서 조심스럽게 배지를 수거 후 원심분리하여 유산균체를 제거한 상등액을 취하고 TNF-α ELISA kit(BD#550610)을 사용하여 배지에 존재하는 TNF-α의 양을 정량하였다.

[0067] 간단하게 실험방법을 기술하면, ELISA plate의 각 well 당 50㎕의 ELISA diluent를 첨가하여 코팅(coating)된 항체(antibody)를 활성화 시킨 후, 여기에 샘플 또는 standard 100㎕를 첨가하고 플레이트(plate)를 sealing한 후 2시간 동안 상온에서 반응시켰다. 300㎕의 Wash buffer로 5회 세척 후, anti-TNF-α 항체 희석액을 100㎕ 첨가 한 후 플레이트를 sealing한 후 1시간 동안 반응시켰다. 300㎕의 Wash buffer로 7회 세척 후, TMB 발색 시약을 100㎕ 첨가하여 상온에서 30분간 발색 반응을 유도한 후 50㎕의 Stop solution을 첨가하고 450㎚에서 흡광도를 측정하였다. 모든 실험은 3반복을 수행하여 각 시료 당 평균과 표준 편차를 계산하였다.

[0068] 그 결과를 도 1에 나타내었다.

[0069] 도 1에서 확인할 수 있는 바와 같이, 각 지역에서 수집한 김치 국물에서 분리된 락토바실러스 플란타룸 균주들 중 본 발명의 락토바실러스 플란타룸 HY7712만이 특히 높은 수준으로 TNF-α를 유도하여 THP-1세포에서 면역반응을 증가시킴을 확인할 수 있었다.

[0070] <1-4> 락토바실러스 플란타룸 HY7712의 농도별 처리

[0071] 위의 방법과 마찬가지로 THP-1세포에 락토바실러스 플란타룸 HY7712를 농도별로 처리하여 TNF-α의 유도 정도를 비교하였다.

[0072] 무처리군은 세포에 아무 처리도 하지 않은 상태에서의 TNF-α의 양을 측정하였고, LPS 처리군은 세포에 LPS를 100 ng/mL 농도로 처리한 상태에서의 TNF-α의 양을 측정하였고, HY7712(저농도)는 HY7712 10^5 CFU/well, HY7712(중농도)는 HY7712 10^6 CFU/well, HY7712(고농도)는 HY7712 10^7 CFU/well로 처리한 상태에서 TNF-α의 양을 측정하였다.

[0073] 그 결과를 도 2에 나타내었다.

[0074] 도 2에서 확인할 수 있는 바와 같이, HY7712(저농도)는 TNF-α의 발현 유도를 LPS 처리군과 유사하게 일으키며, 농도의존적으로 TNF-α의 발현량을 증가시킴을 알 수 있는데, 이를 통하여 본 발명의 락토바실러스 플란타룸 HY7712는 농도별로 THP-1 세포에서 면역반응을 증가시켜 면역지표의 생산 유도가 락토바실러스 플란타룸 HY7712 때문임을 확인할 수 있었다.

[0075] <시험예 2>

[0076] 락토바실러스 플란타룸 HY7712의 항산화 활성에 대한 조사

[0077] 본 발명의 락토바실러스 플란타룸 HY7712 균주가 다른 락토바실러스 플란타룸 균주와 다른 활성을 갖는지 알아보기 위하여 균주의 항산화 활성을 조사하였다.

[0078] <2-1> 락토바실러스 플란타룸 HY7712의 DPPH 라디칼 소거활성 측정

[0079] (1)본 발명의 락토바실러스 플란타룸 HY7712 균주를 MRS 액체배지(10㎖)에 접종하여 37℃에서 20시간 배양하였다. 이 배양액을 3,000rpm, 4℃에서 10분간 원심분리하여 균체를 얻은 후 PBS 완충용액으로 3회 세척한 다음, PBS 완충용액으로 부피를 10㎖로 조절하여 intact cell로서 시험에 사용하였다.

[0080] DPPH 라디칼 소거능(%)은 Lin과 Chang의 방법(Lin M-Y와 Chang F-J. 2000. Antioxidative Effect of Intestinal Bacteria Bifidobacterium longum ATCC 15708 and Lactobacillus acidophilus ATCC 4356. Dig. Dis. Sci. 45:1617-1622)을 이용하여 다음과 같이 측정하였다.

[0081] 상기 Intact cell 800㎕과 DPPH 용액(0.2mM) 1㎖을 혼합하여 30분간 반응시킨 다음 5,000rpm에서 원심분리한 후 상등액의 흡광도를 517nm에서 측정하였다. DPPH 라디칼 소거능(%)은 아래와 같은 식으로 계산하였다.

[0082] DPPH 라디칼 소거능(%) = 100 X (1-유산균의 흡광도/blank의 흡광도)

[0083] (2)락토바실러스 플란타룸(Lactobacillus plantarum) KM22-1, 락토바실러스 플란타룸 KM16-3, 락토바실러스 플란타룸 K7-9, 락토바실러스 플란타룸 K5-8, 락토바실러스 플란타룸 K3-2, 락토바실러스 플란타룸 K20-15, 락토바실러스 플란타룸 K12-7, 그리고 락토바실러스 플란타룸 K12-2 각각에 대하여도 상기 (1)의 본 발명의 락토바실러스 플란타룸 HY7712의 DPPH 라디칼 소거능 측정방법과 동일한 방법으로 DPPH 라디칼 소거능을 측정하였다.

[0084] 그 결과를 도 3에 나타내었다.

[0085] 도 3의 가로축에는 락토바실러스 플란타룸(Lactobacillus plantarum) KM22-1, 락토바실러스 플란타룸 KM16-3, 락토바실러스 플란타룸 K7-9, 락토바실러스 플란타룸 K5-8, 락토바실러스 플란타룸 K3-2, 락토바실러스 플란타룸 K20-15, 락토바실러스 플란타룸 K12-7, 락토바실러스 플란타룸 K12-2, 락토바실러스 플란타룸 HY7712를 각각 'KM22-1', 'KM16-3', 'K7-9', 'K5-8', 'K3-2', 'K20-15', 'K12-7', 'K12-2', 'HY7712'로 표시하였다.

[0086] 도 3에서 확인할 수 있는 바와 같이, 본 발명의 락토바실러스 플란타룸 HY7712의 DPPH 라디칼 소거능이 약 37% 이상으로 다른 유산균들과 비교하여 가장 높게 나타나 항산화 활상이 가장 높음을 알 수 있었다.

[0087] <2-2> 락토바실러스 플란타룸 HY7712의 환원활성 측정

[0088] (1)본 발명의 락토바실러스 플란타룸 HY7712의 환원활성(reducing activity)을 Lin과 Yen의 방법(Lin M-Y과 Yen CL.1999. Antioxidative ability of lactic acid acteria. J. Agric. Food Chem. 47:1460-1466)을 이용하여 측정하였다. 본 발명의 락토바실러스 플란타룸 HY7712 균주를 MRS 액체배지(10㎖)에 접종하여 37℃에서 20시간 배양하였다. 이 배양액을 3,000rpm, 4℃에서 10분간 원심분리하여 균체를 얻은 후 PBS 완충용액으로 3회 세척한 다음, PBS 완충용액으로 부피를 10㎖로 조절하여 intact cell로 사용하였다.

[0089] 한편, Intracellular cell free extract는 다음과 같이 준비하였다.

[0090] 원심분리 튜브에 상기 intact cell 1.5㎖ 및 glass bead(212~300㎛) 200mg을 넣은 다음, FastPrep(MP Bio, USA)을 이용하여 균체를 파쇄하고, 7,800 x g에서 10분간 원심분리한 후 상등액을 취하여 intracellular cell free extract로 사용하였다.

[0091] 본 발명의 락토바실러스 플란타룸 HY7712의 intact cell의 환원능은 다음과 같이 측정하였다.

[0092] 상기 Intact cell 500㎕, 페리시안산칼륨(Potassium ferricyanide;1% w/v) 500㎕ 및 소디움포스페이트 완충용액(0.02M) 500㎕를 혼합한 다음 50℃에서 20분간 반응시키고 냉각시켰다. 여기에 트리클로로아세트산(Trichloroacetic acid; 10% w/v) 500㎕를 첨가하고 혼합한 다음 3,000rpm에서 10분간 원심분리하였다. 원심분리된 상등액 1.5㎖에 염화제2철($FeCl_3$ 0.1% w/v) 0.2㎖을 첨가하고 혼합한 후 700nm에서 흡광도를 측정하였다.

L-시스테인(L-cysteine)을 표준시료로 이용하여 위와 동일한 방법으로 처리하여 흡광도를 측정하여 표준곡선을 작성한 다음 이를 이용하여 본 발명의 락토바실러스 플란타룸 HY7712의 intact cell의 환원능을 equivalent cysteine(μM)로 표시하였다. 또한, 본 발명의 락토바실러스 플란타룸 HY7712의 intracellular cell free

extract의 환원능도 상기 intact cell의 환원능 측정방법과 동일하게 실시하여 측정하였다.

[0093] (2)락토바실러스 플란타룸(Lactobacillus plantarum) KM22-1, 락토바실러스 플란타룸 KM16-3, 락토바실러스 플란타룸 K7-9, 락토바실러스 플란타룸 K5-8, 락토바실러스 플란타룸 K3-2, 락토바실러스 플란타룸 K20-15, 락토바실러스 플란타룸 K12-7, 락토바실러스 플란타룸 K12-2 각각에 대하여도 상기 (1)의 본 발명의 락토바실러스 플란타룸 HY7712의 intact cell과 intracellular cell free extract의 환원능 측정방법과 동일한 방법으로 측정하여 각 균주들의 intact cell과 intracellular cell free extract의 환원능을 측정하였다.

[0094] 그 결과를 도 4에 나타내었다.

[0095] 도 4의 가로축에는 락토바실러스 플란타룸(Lactobacillus plantarum) KM22-1, 락토바실러스 플란타룸 KM16-3, 락토바실러스 플란타룸 K7-9, 락토바실러스 플란타룸 K5-8, 락토바실러스 플란타룸 K3-2, 락토바실러스 플란타룸 K20-15, 락토바실러스 플란타룸 K12-7, 락토바실러스 플란타룸 K12-2, 락토바실러스 플란타룸 HY7712를 각각 'KM22-1', 'KM16-3', 'K7-9', 'K5-8', 'K3-2', 'K20-15', 'K12-7', 'K12-2', 'HY7712'로 표시하였다.

[0096] 도 4에서 확인할 수 있는 바와 같이, 본 발명의 락토바실러스 플란타룸 HY7712의 intact cell과 intracellular cell free extract의 환원능이 각각 99와 85 equivalent cysteine(μM)로 다른 유산균들과 비교하여 가장 높게 나타나, 본 발명의 락토바실러스 플란타룸 HY7712는 항산화 활성이 가장 높음을 알 수 있었다.

[0097] <2-3> 락토바실러스 플란타룸 HY7712의 활성산소흡수력(ORAC) 측정

[0098] 본 발명의 락토바실러스 플란타룸 HY7712의 활성산소흡수력을 Huang 등[Huang D, Ou B, Hampsch-Woodill M, Flanagan J, 그리고 Prior R. 2002. High-throughput Assay of Oxygen Radical Absorbance Capacity(ORAC) Using a Multichannel Liquid Handling System Coupled with a Microplate Fluorescence Reader in 96-Well Format. J. Agric. Food Chem. 50:4437-4444]이 제시한 ORAC assay법에 따라 다음과 같이 측정하였다.

[0099] 본 발명의 락토바실러스 플란타룸 HY7712를 MRS 액체배지에서 약 20시간 배양한 다음 3,000rpm에서 10분간 원심분리하여, 상층액을 버리고 cell pellet을 PBS 완충용액에 현탁하여 3,000rpm에서 원심분리하고 상층액을 버리는 과정을 3회 반복하였다. Cell pellet을 assay buffer(75 mM phosphate, pH 7.4) 1mℓ에 현탁하여 ORAC 분석에 사용하였다. Fluorescein stock solution은 Sodium fluorescein을 4μM의 농도로 assay buffer에 녹여 차광한 후, 5℃에 보관하였다.

[0100] 양성대조군으로는 Trolox(6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid)를 6.25, 12.5, 25, 50, 100μM의 농도로 assay buffer에 녹여 준비하였다. 96 well, black-sided, special optics clear bottom plate의 맨 가장자리 well에 물을 300㎕씩 채워 온도 변화에 의한 실험적 오차를 줄였다. Plate의 안쪽 well에 fluorescein stock solution을 phosphate buffer로 100배 희석하여 150㎕씩 넣은 후, 시험군, 양성대조군 및 blank(phosphate buffer)를 25㎕씩 넣었다. plate를 Synergy HT Multi-Detection Microplate reader로 37℃에서 30분간 평형에 도달하게 하였다. AAPH{2,2'-Azobis(2-amidinopropane) dihydrochloride solution}을 153mM의 농도로 assay buffer에 녹여, well당 25㎕씩 넣고, 60분간 31회 형광을 측정하였다(Excitation : 485nm, Emission : 528 nm, sensitivity : 60).

[0101] 실험 결과를 KC4™ data reduction software를 이용하여, 다음과 같은 수식에 의해 Kinetic curve의 AUC(Area Under the Curve)를 구하고 양성대조군의 AUC와 비교하여 TE(Trolox equivalents)를 산출하였다[Saide JA와 Gilliland SE. 2005. Antioxidative activity of lactobacilli measured by oxygen radical absorbance capacity. J. Dairy Sci. 88(4):1352-1357].

[0102] AUC는 아래와 같이 계산하였다.

[0103] AUC = 0.5+(R2/R1)+(R3/R1)+(R4/R1)+……+ 0.5(Rn/R1)

[0104] R1은 반응 초기의 형광 측정값이고, Rn은 맨 마지막 형광 측정값이다.

[0105] 본 발명의 락토바실러스 플란타룸 HY7712의 활성산소흡수력(ORAC)은 아래와 같이 락토바실러스 플란타룸 HY7712 균수의 10^9 cells에 대한 TE(Trolox equivalents)로 나타내었다.

[0106] Trolox eq./10^9 cells = $\frac{\mu mol\ Trolox/L = alents \times 10^9}{cfu/mL}$

[0107] (2)락토바실러스 플란타룸(Lactobacillus plantarum) KM22-1, 락토바실러스 플란타룸 KM16-3, 락토바실러스 플란타룸 K7-9, 락토바실러스 플란타룸 K5-8, 락토바실러스 플란타룸 K3-2, 락토바실러스 플란타룸 K20-15, 락토바실러스 플란타룸 K12-7, 락토바실러스 플란타룸 K12-2 각각에 대하여도 상기 (1)의 본 발명의 락토바실러스 플란타룸 HY7712의 활성산소흡수력(ORAC) 측정방법과 동일하게 각 균주들의 활성산소흡수력(ORAC)을 측정하였다.

[0108] 그 결과를 도 5에 나타내었다.

[0109] 도 5의 가로축에는 락토바실러스 플란타룸(Lactobacillus plantarum) KM22-1, 락토바실러스 플란타룸 KM16-3, 락토바실러스 플란타룸 K7-9, 락토바실러스 플란타룸 K5-8, 락토바실러스 플란타룸 K3-2, 락토바실러스 플란타룸 K20-15, 락토바실러스 플란타룸 K12-7, 락토바실러스 플란타룸 K12-2, 락토바실러스 플란타룸 HY7712를 각각 'KM22-1', 'KM16-3', 'K7-9', 'K5-8', 'K3-2', 'K20-15', 'K12-7', 'K12-2', 'HY7712'로 표시하였다.

[0110] 도 5에서 확인할 수 있는 바와 같이, 본 발명의 락토바실러스 플란타룸 HY7712의 활성산소흡수력(ORAC)이 약 27.3 TE로 다른 유산균들과 비교하여 가장 높게 나타나, 본 발명의 락토바실러스 플란타룸 HY7712의 항산화 활성이 가장 높음을 알 수 있었다.

[0111] <시험예 3>

[0112] 락토바실러스 플란타룸 HY7712의 야채주스 발효능 조사

[0113] 상기 실시예 5의 혼합야채즙을 끓는 물에 5분간 중탕하여 살균시킨 후 식혀서 준비한 다음, 락토바실러스 플란타룸 HY7712를 10^6 CFU/㎖ 수준으로 접종하고 35℃에서 16~18 시간동안 배양하여 혼합야채즙 속 균주의 생장 상태를 조사하였다.

[0114] 그 결과를 도 6에 나타내었다.

[0115] 도 6에서 확인할 수 있는 바와 같이, 상기 혼합야채즙의 배양물은 pH가 낮아지고 상큼한 풍미가 있었음은 물론, 균주 농도가 $1X10^9$ CFU/㎖ 수준으로 매우 높아져 본 발명의 락토바실러스 플란타룸 HY7712는 야채주스를 발효시키는 능력이 뛰어남을 알 수 있었다.

수탁번호

[0116]

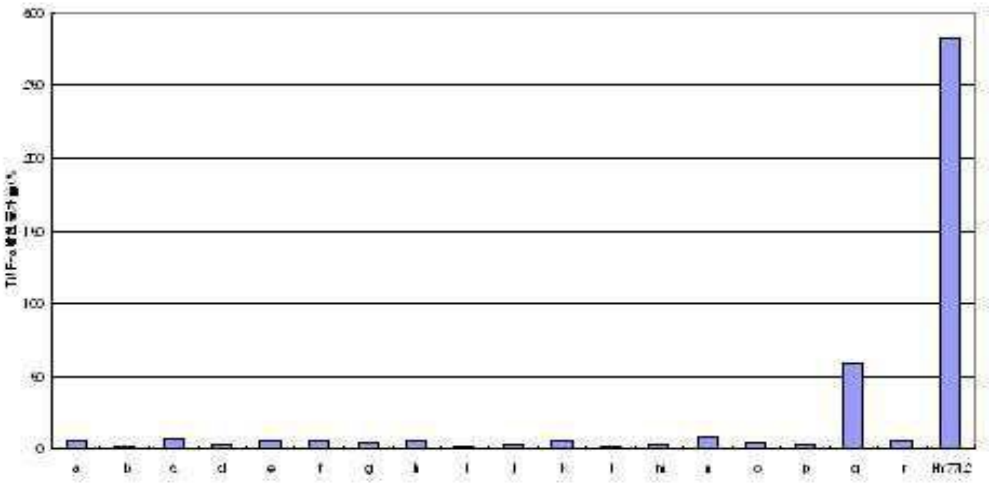
기탁기관명 : 한국생명공학연구원

수탁번호 : KCTC11874BP

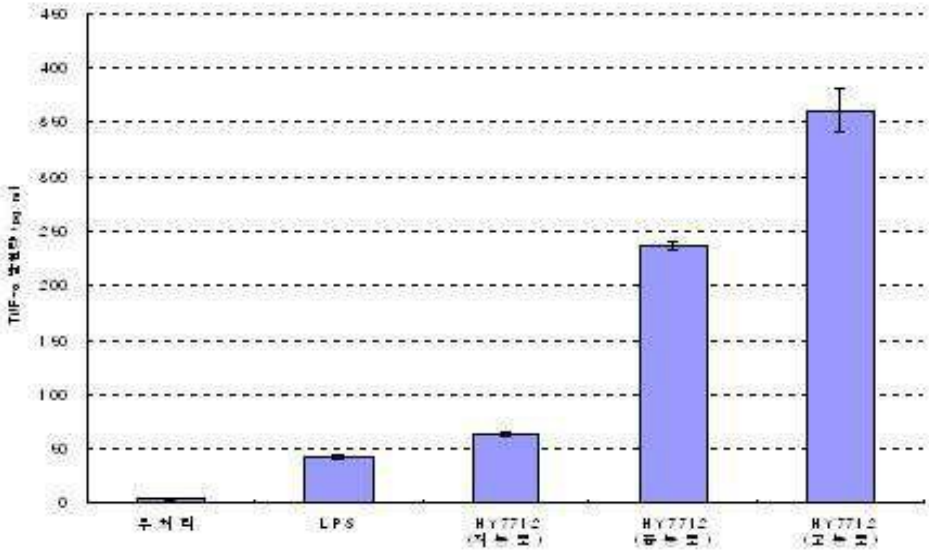
수탁일자 : 20110223

도면

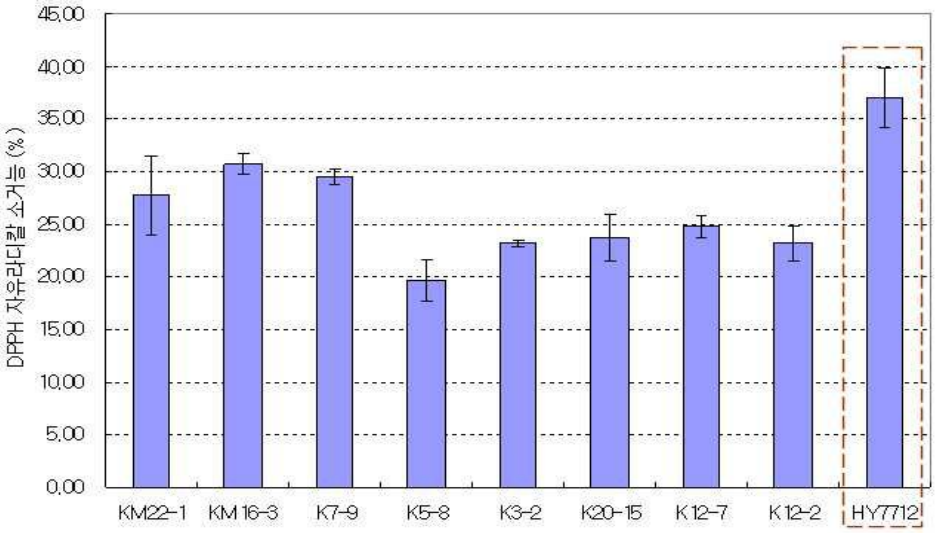
도면1



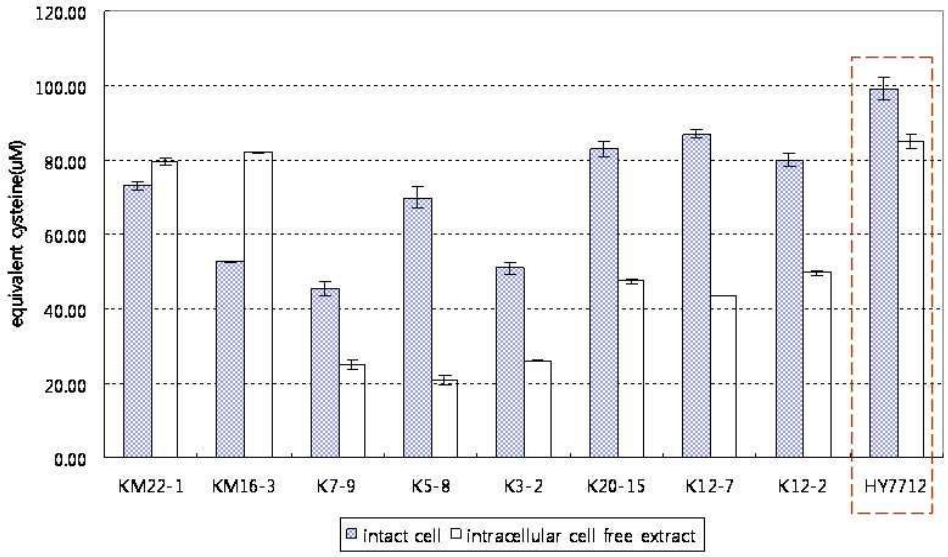
도면2



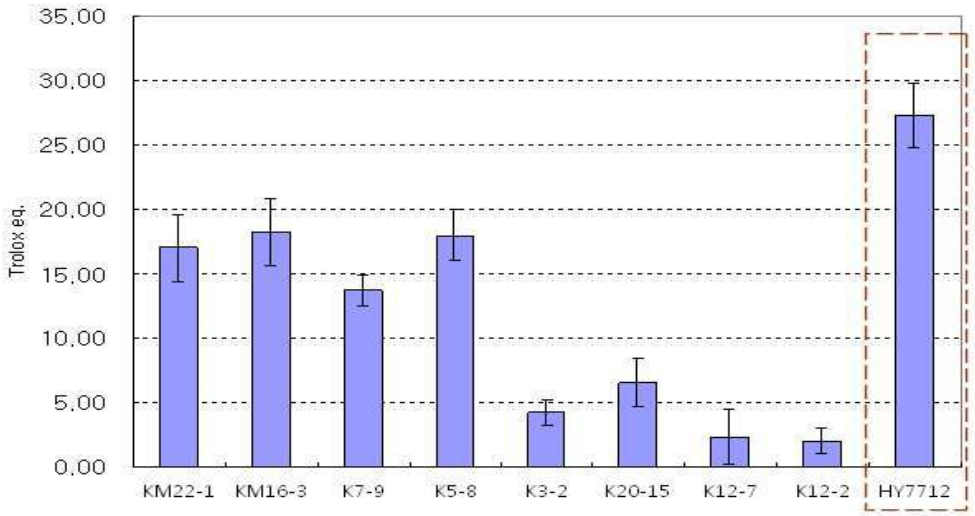
도면3


45.00
40.00
35.00
30.00
25.00
20.00
15.00
10.00
5.00
0.00
DPPH 자유라디칼 소거능 (%)
KM22-1
KM16-3
K7-9
K5-8
K3-2
K20-15
K12-7
K12-2
HY7712

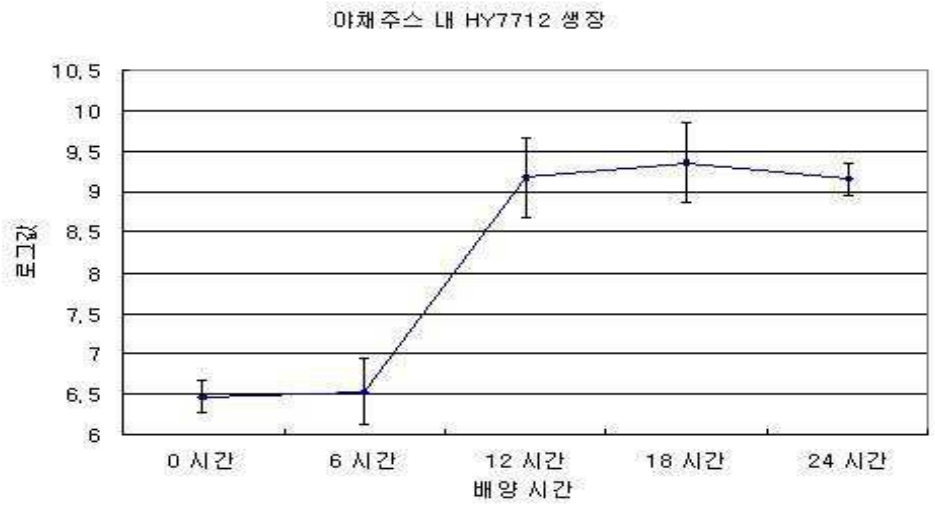
도면4


120.00
100.00
80.00
60.00
40.00
20.00
0.00
equivalent cysteine(uM)
KM22-1
KM16-3
K7-9
K5-8
K3-2
K20-15
K12-7
K12-2
HY7712
intact cell
intracellular cell free extract

도면5



도면6



서 열 목 록

<110> KOREA YAKULT CO., LTD

<120> The new Lactobacillus plantarum HY7712 stimulate immunity and products containing thereof as effective component

<130> P11-03

<160> 1

<170> KopatentIn 1.71

<210> 1

<211> 1031

<212> DNA

<213> Lactobacillus plantarum

<400> 1

atttattggg cgtaaagcga gcgcaggcgg ttttttaagt ctgatgtgaa agccttcggc 60

tcaaccgaag aagtgcatcg gaaactggga aacttgagtg cagaagagga cagtggaact 120

ccatgtgtag cggtgaaatg cgtagatata tggaagaaca ccagtggcga aggcggctgt 180

ctggtctgta actgacgctg aggctcgaaa gtatgggtag caaacaggat tagataccct 240

ggtagtccat accgtaaacg atgaatgcta agtgttggag ggtttccgcc cttcagtgct 300

gcagctaacg cattaagcat tccgcctggg gagtacggcc gcaaggctga aactcaaagg 360

aattgacggg ggcccgcaca agcggtggag catgtggttt aattcgaagc tacgcgaatt 420

ggagggtttc cgcccttcag tgctgcagct aacgcattaa gcattccgcc tggggagtac 480

ggccgcaagg ctgaaactca aaggaattga cgggggcccg cacaagcggt ggagcatgtg 540

gtttaattcg aagctacgcg aagaacctta ccaggtcttg acatactatg caaatctaag 600

agattagacg ttcccttcgg ggacatggat acaggtggtg catggttgtc gtcagctcgt 660

gtcgtgagat gttgggttaa gtcccgcaac gagcgcaacc cttattatca gttgccagca 720

ttaagttggg cactctggtg agactgccgg tgacaaaccg gaggaaggtg gggatgacgt 780

caaatcatca tgcccccttat gacctgggct acacacgtgc tacaatggat ggtacaacga 840

gttgcgaact cgcgagagta agctaatctc ttaaagccat tctcagttcg gattgtaggc 900

tgcaactcgc ctacatgaag tcggaatcgc tagtaatcgc ggatcagcat gccgcggtga 960

atacgttccc gggccttgta cacaccgccc gtcacaccat gagagtttgt aacacccaaa 1020

gtcggtgggg t 1031