



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2021년02월02일
(11) 등록번호 10-2210223
(24) 등록일자 2021년01월26일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 1/20 (2006.01) A23L 33/135 (2016.01)
C12R 1/245 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 1/20 (2013.01)
A23L 33/135 (2016.08)
(21) 출원번호 10-2020-0126027
(22) 출원일자 2020년09월28일
심사청구일자 2020년09월28일
(30) 우선권주장
1020200077888 2020년06월25일 대한민국(KR)
(56) 선행기술조사문헌
KR100760987 B1
KR100407662 B1
KR101669599 B1
US20100209988 A1

(73) 특허권자
한국교통대학교산학협력단
충청북도 충주시 대소원면 대학로 50
(72) 발명자
문기성
충청북도 충주시 청원구 오창읍 오창중앙로 83,
706동 702호(이안오창아파트)
김자이
충청북도 진천군 진천읍 문화로 237-19, 104동
901호(진천벽암휴먼시아)
김선규
충청북도 충주시 상당구 중고개로142번길 31, 10
3동 1202호(용암동, 시티프라디움 1단지)
(74) 대리인
김정수

전체 청구항 수 : 총 7 항

심사관 : 김지연

(54) 발명의 명칭 락토바실러스 파라카제이 CJNU 1877 균주 및 이의 용도

(57) 요약

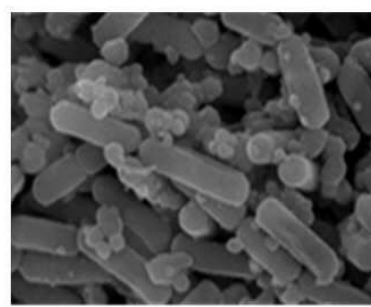
본 발명은 신규한 락토바실러스 파라카제이 CJNU 1877 균주 및 이의 용도에 관한 것으로, 상기 락토바실러스 파라카제이 CJNU 1877 균주는 낱 흡착 능력이 우수하고 내산성 및 내담즙성이 있으며, 유해세균에 대한 항균활성이 우수하므로 낱의 제거 및 장내 건강 개선을 위한 조성물 등으로 활용 가능하다.

대표도 - 도3

MRS broth



MRS broth + 낱



(52) CPC특허분류

A23V 2002/00 (2013.01)

A23V 2200/32 (2013.01)

C12R 1/245 (2013.01)

공지예외적용 : 있음

명세서

청구범위

청구항 1

락토바실러스 파라카제이 CJNU 1877 균주(기탁번호 KCTC 14222BP).

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 균주는 서열번호 1의 16S rRNA를 암호화하는 유전자 염기서열을 포함하는 것인, 락토바실러스 파라카제이 CJNU 1877 균주.

청구항 3

락토바실러스 파라카제이 CJNU 1877 균주(기탁번호 KCTC 14222BP)를 포함하는 납 흡착용 식품 조성물.

청구항 4

제3항에 있어서, 상기 납은 체내 존재하는 것인, 식품 조성물.

청구항 5

락토바실러스 파라카제이 CJNU 1877 균주(기탁번호 KCTC 14222BP)를 포함하는 납 흡착용 화장료 조성물.

청구항 6

락토바실러스 파라카제이 CJNU 1877 균주(기탁번호 KCTC 14222BP)를 포함하는 장건강 개선용 식품 조성물.

청구항 7

제6항에 있어서, 상기 장건강 개선은 장내 유해균의 증식 억제를 통해 달성되는 것이고, 상기 장내 유해균은 *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* 또는 *Clostridium difficile* 인 것인, 식품 조성물.

발명의 설명

기술분야

[0001] 본 발명은 신규한 락토바실러스 파라카제이 CJNU 1877 균주 및 이의 용도에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 최근 급격한 산업 발달은 심각한 환경오염을 일으키고, 직간접적으로 인간의 건강을 위협하고 있다. 특히 '미세먼지'는 산업 활동의 과정에서 배출된 납, 비소, 카드뮴 등 유해 중금속을 포함하며, 미세먼지 속 중금속은 공기, 식수, 식품을 통해 노출되어 인체 내로 유입된다.

[0003] 중금속은 섭취나 호흡을 통해 인체 내로 유입되어 다량 섭취 시 급성중독, 소량 장기간 섭취 시 만성중독을 일으킨다. 환경 중 유해 중금속의 용해성 및 비용해성은 미생물에 의해서 결정되는 경우가 많으며, 그러한 기작은 중금속에 의해 오염된 환경을 복원시키는데 활용된다. 생물학적 중금속 제거 및 처리 방법은 생물흡착

(biosorption), 생물축적(bioaccumulation) 산화·환원반응(oxidoreduction), 메틸화·탈메틸화(methylation·demethylation), 불용성 복합체 형성(insoluble complex formation)등이 있다.

[0004] 그 중 생물흡착(biosorption)은 화학적 침전법의 단점을 보완하기 위해 많은 연구가 이루어져 왔다. 주요 기작은 세포벽 표면의 리간드(ligand)나 작용기(functional group)의 금속이온 결합을 통한 흡착, 세포 외 고분자에 의한 표면 흡착, 세포 내 효소에 의한 활성화, 세포 내 중금속의 변화 등이 있으며, 표면 흡착이 주요 연구대상이다.

[0005] 이에 본 발명은 인체에 유익한 프로바이오틱스인 락토바실러스 파라카제이 CJNU 1877 균주의 납 흡착능을 확인하였고 또한 내산성, 내담즙성 및 장내 유해균의 증식 억제능을 검증하였다.

선행기술문헌

특허문헌

[0006] (특허문헌 0001) 대한민국 등록특허 10-2094768

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명의 목적은 납 흡착능, 내산성, 내담즙성 및 장내 유해균의 증식 억제능을 갖는 락토바실러스 파라카제이 CJNU 1877 균주(기탁번호 KCTC 14222BP)를 제공하는 것이다.

[0008] 본 발명의 다른 목적은 락토바실러스 파라카제이 CJNU 1877 균주(기탁번호 KCTC 14222BP)를 포함하는 납 흡착용 식품 조성물을 제공하는 것이다.

[0009] 본 발명의 다른 목적은 락토바실러스 파라카제이 CJNU 1877 균주(기탁번호 KCTC 14222BP)를 포함하는 납 흡착용 화장료 조성물을 제공하는 것이다.

[0010] 본 발명의 또 다른 목적은 락토바실러스 파라카제이 CJNU 1877 균주(기탁번호 KCTC 14222BP)를 포함하는 장건강 개선용 식품 조성물을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0011] 상기 본 발명의 목적을 달성하기 위해 본 발명은 납 흡착능, 내산성, 내담즙성 및 장내 유해균의 증식 억제능을 갖는 락토바실러스 파라카제이 CJNU 1877 균주(기탁번호 KCTC 14222BP)를 제공한다.

[0012] 본 발명의 일 구현예로, 상기 균주는 서열번호 1의 16S rRNA를 암호화하는 유전자 염기서열을 포함할 수 있다.

[0013] 또한, 본 발명은 락토바실러스 파라카제이 CJNU 1877 균주(기탁번호 KCTC 14222BP)를 포함하는 납 흡착용 식품 조성물을 제공한다.

[0014] 본 발명의 일 구현예로, 상기 납은 체내 존재하는 것일 수 있다.

[0015] 또한, 본 발명은 락토바실러스 파라카제이 CJNU 1877 균주(기탁번호 KCTC 14222BP)를 포함하는 납 흡착용 화장료 조성물을 제공한다.

[0016] 또한, 본 발명은 락토바실러스 파라카제이 CJNU 1877 균주(기탁번호 KCTC 14222BP)를 포함하는 장건강 개선용 식품 조성물을 제공한다.

[0017] 본 발명의 일 구현예로 상기 장건강 개선은 장내 유해균의 증식 억제를 통해 달성될 수 있다.

발명의 효과

[0018] 본 발명의 락토바실러스 파라카제이 CJNU 1877 균주는 납에 대한 흡착능이 우수하여 환경 중의 납 제거 효과가 있으며 내산성 및 내담즙성을 가지고 있어 프로바이오틱스로서의 조건을 갖추고 있다. 또한 식중독 및 장내 유해세균인 *Staphylococcus aureus* KCTC 3881 균주, *Listeria monocytogenes* KCTC 3569 균주 및 *Clostridium difficile* KCTC 5009 균주에 대한 항균활성이 우수하여 장내 건강기능성 균주로 사용 가능하다.

도면의 간단한 설명

- [0019] 도 1은 락토바실러스 파라카제이 CJNU 1877 균주의 그람염색 결과를 나타낸 것이다.
- 도 2는 납 첨가 유무에 따른 MRS broth 상의 락토바실러스 파라카제이 CJNU 1877 균주의 광학현미경 사진을 나타낸 것이다.
- 도 3은 납 첨가 유무에 따른 MRS broth 상의 락토바실러스 파라카제이 CJNU 1877 균주의 주사전자현미경 사진을 나타낸 것이다.
- 도 4는 락토바실러스 파라카제이 CJNU 1877 균주의 내산성을 확인한 결과이다.
- 도 5는 락토바실러스 파라카제이 CJNU 1877 균주의 내담즙성을 확인한 결과이다.
- 도 6은 락토바실러스 파라카제이 CJNU 1877 균주의 유해세균 억제능을 확인한 결과이다(A, *Staphylococcus aureus* KCTC 3881; B, *Listeria monocytogenes* KCTC 3569; C, *Clostridium difficile* KCTC 5009).

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0020] 본 발명은 납 흡착능, 내산성, 내담즙성 및 장내 유해균의 증식 억제능을 갖는 락토바실러스 파라카제이 CJNU 1877 균주(기탁번호 KCTC 14222BP)를 제공한다.
- [0021] 상기 신규 균주는 납 흡착능이 우수하며, 장내유해세균의 증식을 억제하는 특성이 있다. 나아가 내산성, 내담즙성이 있어 프로바이오틱스 소재로도 활용할 수 있다.
- [0022] 이에 본 발명자들은 상기 신규한 균주를 락토바실러스 파라카제이 CJNU 1877로 명명하고, 2020년 6월 23일자로 한국생명공학연구원에 기탁번호 KCTC 14222BP으로 기탁하였다.
- [0023] 상기 균주는 서열번호 1의 16S rRNA를 암호화하는 유전자 염기서열을 포함한다.

[0024] [서열번호 1]

```

ATCGGTGCTTGCACCGAGATTCAACATGGAACGAGTGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGG
GTAACCTGCCCTTAAAGTGGGGGATAACATTGGAAACAGATGCTAATACCGCATAGATCC
AAGAACC GCATGGTTCTTGGCTGAAAGATGGCGTAAGCTATCGCTTTTGGATGGACCCGC
GGCGTATTAGCTAGTTGGTGAGGTAATGGCTCACCAAGGCGATGATACGTAGCCGAACTG
AGAGGTTGATCGCCACATTGGGACTGAGACACGGCCCAAATCCTACGGGAGGCAGCAG
TAGGGAATCTTCCACAATGGACGCAAGTCTGATGGAGCAACGCCGCTGAGTGAAGAAGG
CTTTCGGGTCGTAAAACTCTGTTGTGGAGAAGAAATGGTCGGCAGAGTAACTGTTGTCGG
CGTGACGGTATCCAACAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACG
TAGGTGGCAAGCGTTATCCGATTTATTTGGGCATAAAGCGAGCGCAGGCGGTTTTTAAAG
TCTGATGTGAAAGCCCTCGGCTTAACCGAGGAAGCGCATCGGAAACTGGGAACTTGAGT
GCAGAAGAGGACAGTGGAACTCCATGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATATGGAAGAAC
ACCAAGTGGCGAAGGCGGCTGTCTGGTCTGTAAGTACGCTGAGGCTCGAAAGCATGGGTA
GCGAACAGGATAGATAACCTGGTAGTCCATGCCGTAAACGATGAATGCTAGGTGTTGGA
GGGTTTCCGCCCTTCAGTGCCGCAGCTAACGCATTAAAGCATtCCGCCTGGGGAGTAoGAC
CGCAAGGTTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCCGCAAAAGCGGTGGAGCATGTGGTT
TAAATTCGAAGCAACGCGAAGAACCTTACCAGGTCTTGACATCTTTTGATCACoTGAGAGA
TCaagTTTTCCCTTCGGGGGCAAAATGACAGGTGGTGATGGTTGTCGTGAGCTCGTGTCT
GTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCTTATGACTAGTTGCCAGCATT
AGTTGGGCACTCTAGTAAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGTGGGGATGACGTCAA
ATCATCATGCCCTTATGACCTGGGCTACACACGTGCTACAAATGGATGGTACAACGAGTT
GCGAGACCGCGAGGTCAGCTAACTCTTTAAAGCCATCTCAGTTCGGACTGTAGGCTGC
AACTCGCCTACACGAAGTCGGAATCGCTAGTAATCGCGGATCAGCACGCCGCGGTGAATA
CGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGAGAGTTTGTAAACCCCGAAGCC
GGTGGCGTAACCTTTTTAGGGAGCGAGCCGCTTAAGGTGGGACAAATGATTAGGGTGAAG
TCGTAAACAAGGTAGCCGTAGGAGAACCCTGCGGCTGGATCACCTCCTTTCT
    
```

[0025]

- [0026] 다른 양태로서 본 발명은 락토바실러스 파라카제이 CJNU 1877 균주(기탁번호 KCTC 14222BP)를 포함하는 납 흡착용 조성물을 제공한다.
- [0027] 상기 조성물은 식품 조성물 또는 화장료 조성물을 포함할 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니고 납에 오염된 토양이나 하천을 정화하는 등 납의 흡착 및/또는 제거가 필요한 분야에 제한없이 사용될 수 있다.
- [0028] 상기 식품 조성물은 락토바실러스 파라카제이 CJNU 1877 균주의 납 흡착 특성을 이용한 것이다.
- [0029] 본 발명의 식품 조성물 관련, 상기 납은 체내 존재할 수 있으며, 바람직하게는 소화기관에 존재하는 납일 수 있으며, 가장 바람직하게는 장내 존재하는 납일 수 있다.
- [0030] 상기 식품 조성물은 락토바실러스 파라카제이 CJNU 1877 균주를 유효성분으로 포함하고, 상기 식품 조성물은 건강기능성 식품 조성물을 포함하는 의미이다.
- [0031] 본 발명에서 사용되는 용어, 건강기능성 식품 조성물은 담체, 희석제, 부형제, 및 첨가제 중 하나 이상을 포함하여 정제, 환제, 산제, 과립제, 분말제, 캡슐제, 및 액제 제형으로 이루어진 군에서 선택된 하나로 제형된 것을 특징으로 한다. 본 발명의 조성물에 첨가할 수 있는 식품으로는, 각종 식품류, 분말, 과립, 정제, 캡슐, 시럽제, 음료, 껌, 차, 비타민 복합제, 건강기능성 식품류 등이 있다. 상기 본 발명에 더 포함될 수 있는 첨가제로는, 천연 탄수화물, 향미제, 영양제, 비타민, 광물(전해질), 풍미제(합성 풍미제, 천연 풍미제 등), 착색제, 충전제, 팩트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH조절제, 안정화제, 방부제, 산화 방지제, 글리세린, 알코올, 탄산화제 및 과육으로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상의 성분을 사용할 수 있다. 상술한 천연 탄수화물의 예는 모노사카라이드, 예를 들어, 포도당, 과당 등; 디사카라이드, 예를 들어 말토오스, 수크로오스 등; 및 폴리사카라이드, 예를 들어 텍스트린, 시클로텍스트린 등과 같은 통상적인 당, 및 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알코올이다. 상기 향미제로서 천연 향미제(타우마틴, 스테비아추출물(예를 들어 레바우디오시드 A, 글리시르히진 등) 및 합성 향미제(사카린, 아스파르탐 등)를 유리하게 사용할 수 있다. 상기 외에 본 발명에 따른 조성물은 여러 가지 영양제, 비타민, 광물(전해질), 합성 풍미제 및 천연 풍미제 등의 풍미제, 착색제 및 충전제, 팩트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알코올, 탄산음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다.
- [0032] 그 밖에 본 발명에 다른 조성물은 천연 과일 주스 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다. 이러한 성분은 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있다. 상기 담체, 부형제, 희석제, 및 첨가제의 구체적인 예로는 이에 한정하는 것은 아니나, 락토오스, 텍스트로즈, 수크로오스, 솔비톨, 만니톨, 에리스리톨, 진분, 아카시아고무, 인산칼슘, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이이트, 미세결정성 셀룰로즈, 폴리비닐피롤리돈, 셀룰로즈, 폴리비닐피리리돈, 메틸셀룰로즈, 물, 설탕시럽, 메틸 하이드록시 벤조에이트, 프로필하이드록시 벤조에이트, 활석, 스테아르산 마그네슘 및 미네랄 오일로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상이 사용되는 것이 바람직하다.
- [0033] 상기 조성물이 화장료 조성물로 이용되는 경우 피부에 존재하는 납 흡착 용도로 이용할 수 있으며 이는 락토바실러스 파라카제이 CJNU 1877 균주의 납 흡착 특성을 이용한 것이다.
- [0034] 본 발명에서 상기 화장료 조성물은 용액, 현탁액, 유탁액, 페이스트, 겔, 크림, 파우더, 비누, 계면활성제-함유 클렌징, 오일, 분말 파운데이션, 유탁액 파운데이션, 왁스 파운데이션 및 스프레이로 구성된 군으로부터 선택되는 제형을 가질 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0035] 본 발명의 상기 화장료 조성물은 화장료 조성물에 통상적으로 이용되는 성분들을 포함할 수 있으며, 예컨대 항산화제, 안정화제, 용해화제, 비타민, 안료, 및 향료와 같은 통상적인 보조제, 그리고 담체를 포함할 수 있다.
- [0036] 또한, 본 발명의 조성물은 유기 자외선 차단제를 혼합하여 사용할 수도 있다. 상기 유기 자외선 차단제로는 글리세틸파바, 드로메트리졸트리실록산, 드로메트리졸, 디갈로일트리올리에이트, 디소듦페닐디벤즈이미다졸테트라설포네이트, 디에틸헥실부타미도트리아존, 디에틸아미노하이드록시벤조일헥실벤조에이트, 디이에이-메톡시신나메이트, 로우손과 디하이드록시아세톤의 혼합물, 메틸렌비스-벤조트리아졸틸테트라메칠부틸페놀, 4-메틸벤질리텐 캠퍼, 멘틸안트라닐레이트, 벤조페논-3(옥시벤존), 벤조페논-4, 벤조페논-8(디옥시페벤존), 부틸메톡시디벤조일메탄, 비스에틸헥실옥시페놀메톡시페닐트리아진, 시녹세이트, 에틸디하이드록시프로필파바, 옥토크릴렌, 에틸헥실디메틸파바, 에틸헥실메톡시신나메이트, 에틸헥실살리실레이트, 에틸헥실트리아존, 이소아말-p-메톡시신나메이트, 폴리실리콘-15(디메치코디에틸벤잘말로네이트), 테레프탈릴리덴디캠퍼설포닉에씨드 및 그 염류, 티이에이-살리실레이트 및 아미노벤조산(파바)으로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상을 사용할 수 있다.

- [0037] 다른 양태로서 본 발명은 락토바실러스 파라카제이 CJNU 1877 균주(기탁번호 KCTC 14222BP)를 포함하는 장건강 개선용 식품 조성물을 제공한다.
- [0038] 본 발명에서 상기 장건강 개선이란 통상적인 장 기능을 저해하는 요소는 감소 또는 제거시키고 통상적인 장 기능을 증진시키는 요소는 촉진하는 것을 의미하며, 예시로서 장내 균총을 정상화하거나 유해 물질을 제거하는 것을 의미할 수 있다.
- [0039] 본 발명에서 상기 장건강 개선은 장내 유해균의 증식 억제를 통해 달성되는 것일 수 있다.
- [0040] 본 발명에서 상기 장내 유해균이란 장내에서 서식하고 있으면서 장염 등과 같이 인체에 해로운 효과를 미치는 미생물을 총칭할 수 있다. 예컨대, 상기 장내 유해균은 대장균 (*Escherichia coli*), 푸소박테리움 (*Fusobacterium*) 속, 클로스트리듐(*Clostridium*) 속, 스태필로코쿠스(*Staphylococcus*) 속, 리스테리아 (*Listeria*) 속, 또는 포피로모나스(*Porphyromonas*) 속을 포함할 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0042] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 바람직한 실시예를 제시한다. 그러나 하기의 실시예는 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐, 하기 실시예에 의해 본 발명의 내용이 한정되는 것은 아니다.
- [0044] <실시예 1: 락토바실러스 파라카제이 CJNU 1877 균주 준비>
- [0045] 락토바실러스 파라카제이 CJNU 1877 균주는 막걸리로부터 분리되었으며 MRS 배지를 이용하여 37℃에서 12시간 정도 배양한다. CJNU 1877 균주의 동정은 상기 16S rRNA 유전자 염기서열 분석을 통하여 이루어졌으며 이는 국내 생명공학회사((주)마크로젠)에 의뢰하여 진행하였다.
- [0047] <실시예 2: 실험방법>
- [0048] 실시예 2-1. 납 흡착능 측정
- [0049] 납에 대한 락토바실러스 파라카제이 CJNU 1877 균주의 흡착능을 광학 및 전자 현미경을 통하여 관찰하였다. 5mL의 MRS broth에 Pb(NO₃)₂를 100ppm 되게 첨가한 후 균 배양액 1%를 접종하여 37℃, 24시간 배양 후 시료를 취해 광학 현미경(1,000×배율)을 통하여 형태를 관찰하였다. 또한 정교한 관찰을 위해 주사전자현미경(scanning electron microscope; JSM-670F, JEOL, Tokyo, Japan)을 사용하였다. 시료의 준비는 MRS broth에 Pb(NO₃)₂를 25ppm을 첨가한 후 균 배양액 1%를 접종하였다. 12시간 배양한 시료를 20uL 취하여 원심분리(13,000rpm, 1분)한 후 균체를 회수하여 50% 에탄올 20uL에 현탁한 후 실온에서 15분 동안 방치하였다. 다시 원심분리하여 에탄올 제거 후 60, 70, 90, 95, 100% 에탄올에 대해서도 동일한 과정을 반복하였다. 탈수한 균체를 마지막으로 100% 에탄올 20uL에 현탁하여 여과 필터(0.22um)에 점적한 후 코팅과정을 거쳐 관찰하였다.
- [0050] 납 용액 상에서 흡착 반응을 한 후 상등액 속에 남아있는 납의 최종 농도를 분석하기 위해서 유도결합플라즈마 분광기(ICP-AES, Perkin Elmer, Waltham, MA, USA)를 사용하였다. 먼저, 3차 증류수 5mL에 Pb(NO₃)₂ 100ppm을 첨가하여 납 용액을 만들었다. 균 배양액 5mL를 원심분리(10,000rpm, 4℃, 5분)한 후 상등액을 제거한 균체에 3차 증류수 100uL를 넣어 현탁한 다음, 균 현탁액 100uL를 납 용액에 첨가하여 섞어준 후 200rpm, 30℃, 6시간 동안 교반하면서 반응하였다. 이후 원심분리(10,000rpm, 4℃, 5분)하여 상등액 5mL 전체를 채취한 다음, 여과(membrane filter; 0.45um) 후 상등액에 남아있는 납의 농도를 측정하였다.
- [0052] 실시예 2-2. 내산성 및 내담즙성 측정
- [0053] 락토바실러스 파라카제이 CJNU 1877 균주의 내산성 확인을 위해 염산(HCl)으로 pH를 2.5, 3.0으로 조정된 MRS broth에 락토바실러스 파라카제이 CJNU 1877 균주를 접종한 후 경시적으로(0, 1, 2, 3, 4시간) 생균수를 측정하였다.
- [0054] 락토바실러스 파라카제이 CJNU 1877 균주의 내담즙성 확인을 위해 담즙염 0, 0.25, 0.5%가 함유된 MRS broth에 락토바실러스 파라카제이 CJNU 1877 균주를 접종한 후 경시적으로(0, 6, 12, 24시간) 생균수를 측정하였다.
- [0056] 실시예 2-3. 유해 세균에 대한 항균활성 측정
- [0057] 락토바실러스 파라카제이 CJNU 1877 균주 배양액 1uL를 MRS, RCM agar plate에 점적한 후 37℃에서 12시간 배양하였다. 이후 MRS soft agar에 *Staphylococcus aureus* KCTC 3881 균주와 *Listeria monocytogenes* KCTC 3569 균주를 그리고 RCM soft agar에 *Clostridium difficile* KCTC 5009 균주를 1% 섞은 후 락토바실러스 파라카제이 CJNU 1877 균주 콜로니가 자란 MRS, RCM agar plate 위에 붓고 37℃에서 24시간 배양하여 콜로니 주변에 생육저

해환이 생성되는지 확인하였다.

[0059] <실시예 3. 락토바실러스 파라카제이 CJNU 1877 균주의 납 흡착능 확인>

[0060] 납에 대한 락토바실러스 파라카제이 CJNU 1877 균주의 흡착능 검증을 위해 Pb(NO₃)₂가 100ppm 농도로 포함된 MRS broth에 균 배양액 1% 접종 후 24시간 배양한 시료의 세포 응집도를 관찰하였다. 그 결과, 납에 노출된 락토바실러스 파라카제이 CJNU 1877 균주의 경우 24시간이 지났을 때 응집현상이 관찰된 반면, 대조군(납 무첨가)은 그러한 현상이 관찰되지 않았다(도 2).

[0061] 보다 정교한 관찰을 위해 MRS broth에 Pb(NO₃)₂ 25ppm을 첨가한 후 락토바실러스 파라카제이 CJNU 1877 균주를 접종하여 12시간 배양과 탈수과정을 거쳐 주사전자현미경으로 관찰하였다. 그 결과, 납 유무에 따라 락토바실러스 파라카제이 CJNU 1877 균주의 표면 모양 차이가 관찰되었고, 이는 세포 표면에 응집되어 있는 납으로 판단되었다(도 3). 이는 선발균주인 락토바실러스 파라카제이 CJNU 1877 균주가 납에 대해 흡착능이 있음을 의미하는 것이다.

[0062] 납 용액에 락토바실러스 파라카제이 CJNU 1877 균주 현탁액을 반응시킨 후, 제균 상등액 상에 남아있는 납의 농도를 유도결합플라즈마 분광기(ICP-AES, Perkin Elmer)로 정량분석하였다. 그 결과, 락토바실러스 파라카제이 CJNU 1877 균주를 처리하지 않은 대조군은 55.90ppm이 검출된 반면, 균주가 적용된 시료는 17.84ppm이 검출되어 납 68%가 제거됨을 확인하였다(표 1 참조).

표 1

[0063]

	대조구(무처리구*)	CJNU 1877 균주 처리
납 (ppm)	55.90	17.84

[0064] *무처리구: 균 대신 물을 첨가함.

[0066] <실시예 4: 락토바실러스 파라카제이 CJNU 1877 균주의 내산성 및 내담즙성 확인>

[0067] 순수한 위액의 경우 pH(1.4-2.0)가 아주 낮아 대부분의 미생물은 사멸한다. 그러나 음식물을 섭취하게 되면 pH(2.0-3.0)가 다소 높아져 내산성의 유산균들은 생존할 수 있다(Kor. J. Microbiol. Biotechnol. Vol. 31(3): 297-300; Korean J. Food Sci. Technol. Vol. 39(6): 681-687). 락토바실러스 파라카제이 CJNU 1877 균주는 pH 2.5으로 조정된 MRS broth에서 4시간 동안 생균수의 감소가 관찰되지 않아 내산성이 있는 것으로 확인되었다(도 4).

[0068] 락토바실러스 파라카제이 CJNU 1877 균주가 프로바이오틱스로서 장까지 활성을 유지하려면 위산뿐만 아니라 장내 담즙의 농도(0.3%)에서도 생존해야 한다(Korean J. Food Sci. Technol. Vol. 39(6): 681-687). 담즙염 0, 0.25, 0.5%가 함유된 MRS broth에 락토바실러스 파라카제이 CJNU 1877 균주를 접종한 후 경시적으로(0, 6, 12, 24시간) 생균수를 측정된 결과 모든 담즙염의 농도에서 균의 증식이 관찰되었다(도 5). 이는 락토바실러스 파라카제이 CJNU 1877 균주가 장내 담즙에 대한 내성을 가지고 있음을 의미한다.

[0070] <실시예 5: 락토바실러스 파라카제이 CJNU 1877 균주의 장내 유해 세균에 대한 항균활성 확인>

[0071] 락토바실러스 파라카제이 CJNU 1877 균주의 유해 세균에 대한 항균활성을 확인하기 위하여 *Staphylococcus aureus* KCTC 3881 균주, *Listeria monocytogenes* KCTC 3569 균주 및 *Clostridium difficile* KCTC 5009 균주에 대한 생육 저해 유무를 확인한 결과 세 균주 모두에 대해서 락토바실러스 파라카제이 CJNU 1877 균주는 강한 생육저해환을 형성하였다(도 6). 이는 상기 균주에 의한 식중독이나 장내 기회감염을 효과적으로 예방할 수 있음을 의미한다.

[0073] 기탁기관명 : 한국생명공학연구원

[0074] 수탁번호 : KCTC 14222BP

[0075] 수탁일자 : 20200623

도면

도면1



도면2

MRS broth



MRS broth + 납

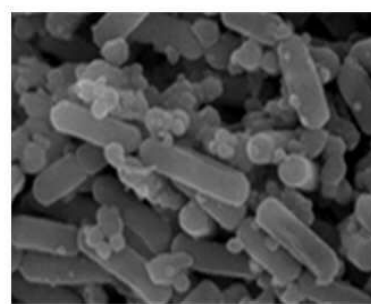


도면3

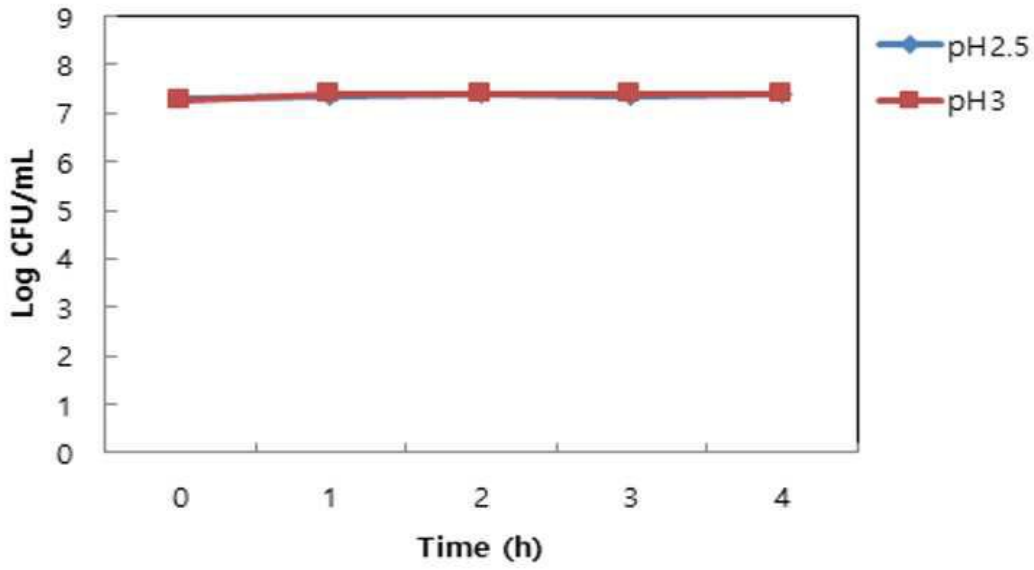
MRS broth



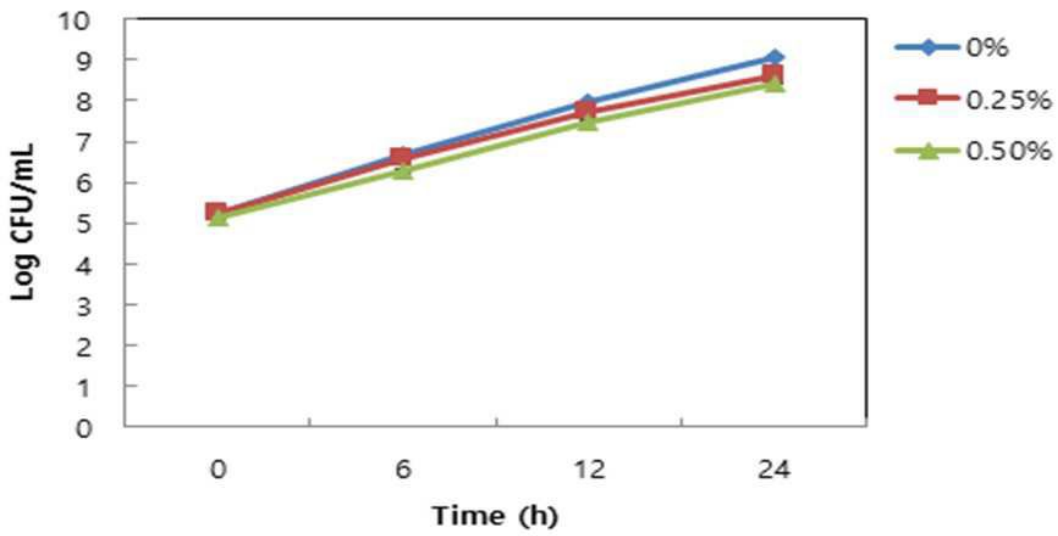
MRS broth + 납



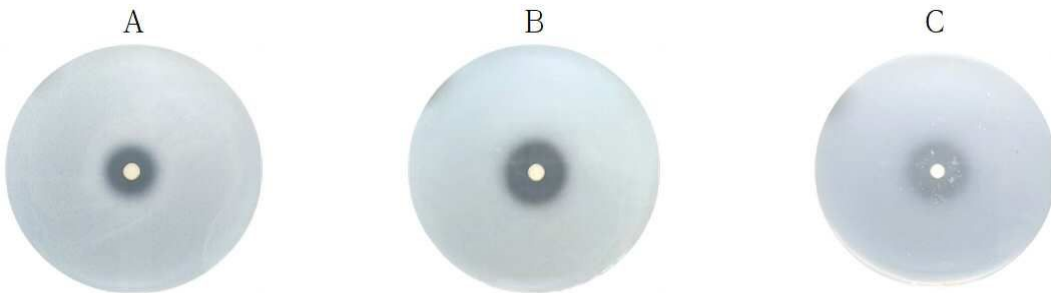
도면4



도면5



도면6



서열 목록

<110> KOREA NATIONAL UNIVERSITY OF TRANSPORTATION Industry-Academic Cooperation Foundation

<120> Novel Lactobacillus Paracasei CJNU 1877 strain and uses thereof
 <130> P200918P
 <150> KR 10-2020-0077888
 <151> 2020-06-25
 <160> 1
 <170> KoPatentIn 3.0
 <210> 1
 <211> 1490
 <212> DNA
 <213> Lactobacillus Paracasei CJNU 1877 16S rRNA
 <400> 1

atcggtgctt gcaccgagat tcaacatgga acgagtggcg gacgggtgag taacacgtgg 60
 gtaacctgcc cttaagtggg ggataacatt tggaaacaga tgctaatacc gcatagatcc 120

aagaaccgca tggttcttgg ctgaaagatg gcgtaagcta tcgcttttgg atggaccgcg 180
 ggcgtattag ctagtgtgtg aggtaatggc tcaccaaggc gatgatacgt agccgaactg 240
 agaggttgat cggccacatt gggactgaga cacggcccaa actcctacgg gaggcagcag 300
 tagggaatct tccacaatgg acgcaagtct gatggagcaa cgcccgctga gtgaagaagg 360
 ctttcgggtc gtaaaactct gttgttggag aagaatggtc ggacagagtaa ctgttgcgg 420
 cgtgacgcta tccaaccaga aagccacggc taactacgtg ccagcagccg cgtaatac 480
 taggtggcaa gcgttatccg gatttattgg gcgtaaagcg agcgcaggcg gtttttaag 540

tctgatgtga aagccctcgg cttaaccgag gaagcgcac ggaaactggg aaacttgagt 600
 gcagaagagg acagtggaac tccatgtgta gcggtgaaat gcgtagatat atggaagaac 660
 accagtggcg aaggcggctg tctggtctgt aactgacgt gaggctcga agcatgggta 720
 gcgaacagga ttagataccc tggtagtcca tgccgtaaac gatgaatgct aggtgttgg 780
 gggtttccgc ccttcagtgc cgcagctaac gcattaagca ttcgcctgg ggagtacgac 840
 cgcaaggttg aaactcaaag gaattgacgg gggcccgcac aagcgggtga gcatgtggtt 900
 taattcgaag caacgcgaag aacctacca ggtcttgaca tctttgatc acctgagaga 960

tcaagtttc ccttcggggg caaaatgaca ggtggtgcat ggttgcgtc agctcgtgtc 1020
 gtgagatgtt gggttaagtc ccgcaacgag cgcaaccctt atgactagt gccagcattt 1080
 agttgggcac tctagtaaga ctgccggtga caaacggag gaaggtgggg atgacgtcaa 1140
 atcatcatgc cccttatgac ctgggctaca cacgtgtac aatggatggt acaacgagtt 1200
 gcgagaccgc gaggtcaagc taatctctta aagccattct cagttcggac ttaggctgc 1260

aactgccta cacgaagtcg gaatcgctag taatcgcgga tcagcacgcc gcggtgaata	1320
cgttcccggg cctgtacac accgcccgtc acacatgag agtttgaac acccgaagcc	1380
ggtggcgtaa cccttttagg gagcgagccg tctaaggtgg gacaaatgat tagggtgaag	1440
tcgtaacaag gtagccgtag gagaacctgc ggctggatca cctcctttct	1490