



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2020년10월16일
(11) 등록번호 10-2166789
(24) 등록일자 2020년10월12일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 15/74 (2006.01) A23K 10/16 (2017.01)
A23L 33/135 (2016.01) A23L 7/196 (2016.01)
C02F 3/34 (2017.01) C05F 11/08 (2006.01)
C05F 3/00 (2006.01) C12R 1/25 (2006.01)

(52) CPC특허분류
C12N 15/746 (2013.01)
A23K 10/16 (2016.05)

(21) 출원번호 10-2020-0066012

(22) 출원일자 2020년06월01일

심사청구일자 2020년06월01일

(56) 선행기술조사문헌

KR100435168 B1*

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자

최정식

경기도 용인시 처인구 백옥대로1392번길 14-1 (유방동)

최병철

대전광역시 중구 동서대로1340번길 46, 505호 (용두동, 용정아파트)

최병선

충청북도 진천군 덕산읍 이덕로 755-13, 406호

(72) 발명자

최정식

경기도 용인시 처인구 백옥대로1392번길 14-1 (유방동)

최병철

대전광역시 중구 동서대로1340번길 46, 505호 (용두동, 용정아파트)

최병선

충청북도 진천군 덕산읍 이덕로 755-13, 406호

(74) 대리인

박원용

전체 청구항 수 : 총 11 항

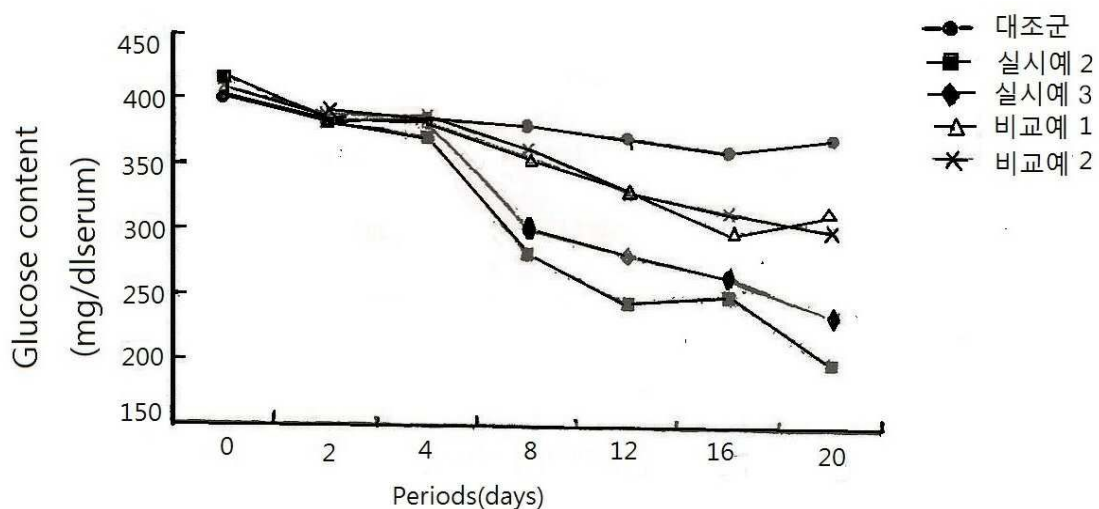
심사관 : 김재현

(54) 발명의 명칭 내산성, 내열성의 유산균 돌연변이 균주 및 상기 균주를 유효 성분으로 포함하는 배양 조성물

(57) 요약

본 발명은 고온 및 낮은 pH에서 생존이 가능한 유산균 돌연변이 균주인 Lactobacillus fermentum JS 1 (KCCM-80171) 및 그 배양 조성물에 관한 것으로서, 보다 상세히 설명하면 혈당강하, 콜레스테롤 저하, 항산화, 과산화지질 억제 효능을 가지는 Lactobacillus fermentum의 돌연변이 균주인 Lactobacillus fermentum JS1 및 상기 균주를 유효 성분으로 함유하는 배양 조성물 및 그 조성물의 용도에 관한 것이다.

대표도 - 도2



(52) CPC특허분류

A23L 33/135 (2016.08)

A23L 7/1963 (2016.08)

C02F 3/34 (2013.01)

C05F 11/08 (2013.01)

C05F 3/00 (2013.01)

C12R 1/25 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

서열번호 1의 DNA로 코딩되는 16S rRNA를 갖는 내열성 및 내산성을 갖는 락토바실러스 퍼멘텀(*Lactobacillus fermentum*) JS1 유산균 돌연변이 균주 (기탁번호 KCCM-80171).

청구항 2

혈당 강하, 항산화, 과산화지질 생성 억제 및 콜레스테롤 저하 기능을 갖는 제 1항의 락토바실러스 퍼멘텀 JS1 유산균 돌연변이 균주를 유효 성분으로 포함하는 유산균 배양 조성물.

청구항 3

제 2항에 있어서, 상기 조성물은 락토바실러스 퍼멘텀 JS1 유산균 돌연변이 균주를 물 1ℓ 당 포도당 20~30g, 효모 추출물 10~20g, 소이펩톤(soyptone) 5~8g, 카제인 3~5g, MgSO₄·7H₂O 0.1~0.15g, K₂HPO₄ 1~2g, MnSO₄·5H₂O 0.05~0.1 g, 아세트산나트륨(sodium acetate) 3~5g, 시트르산암모늄(ammonium citrate) 2~3g, 트윈 80 1~2g, 네올린(neoline) 0.25~0.3g을 혼합한 배지에서 배양하여 제조되는 것을 특징으로 하는 유산균 배양 조성물.

청구항 4

제 2항에 있어서, 상기 조성물은 효모인 사카로마이세스 세레비지애(*Saccharomyces cerevisiae*) 균주를 물 1ℓ 당 프로티아제 펩톤(protease peptone) No3 5~10g, malt 추출물(malt extract) 3~5g, 포도당 10~20g, 효모 추출물 10~15g, 아세트산나트륨 5~10g, 시트르산암모늄 3~5g을 함유하는 배지에서 배양된 효모 배양액을 추가적으로 포함하는 것을 특징으로 하는 유산균 배양 조성물.

청구항 5

제 3항 또는 제 4항의 유산균 배양 조성물을 이용한 가축 또는 양어에 사용가능한 보조사료 조성물.

청구항 6

제 3항 또는 제 4항의 유산균 배양 조성물을 이용한 버섯 폐배지 발효사료 제조 방법.

청구항 7

제 3항 또는 제 4항의 유산균 배양 조성물을 가축분에 첨가되는 것을 특징으로 하는 유기질 추비의 제조 방법.

청구항 8

제 7항의 유기질 추비를 토양중에 혼입하는 것을 특징으로 하는 토양 개량 방법.

청구항 9

제 3항 또는 제 4항의 유산균 배양 조성물을 물이 통하는 망자루 또는 플라스틱 박스에 담아 흐르는 물 또는 수조에 설치하는 것을 특징으로 하는 수질 개선 방법.

청구항 10

제 1항의 유산균 돌연변이 균주를 쌀에 분무 및 살포하는 것을 특징으로 하는 유산균 함유 쌀의 제조 방법.

청구항 11

제 10항의 방법으로 제조된 유산균 함유 쌀.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 고온 및 낮은 pH에서 생존이 가능한 유산균 돌연변이 균주 및 상기 균주를 유효 성분으로 포함하는 유산균 배양 조성물에 관한 것으로서, 보다 상세하게는 고온 및 낮은 pH에서 생존이 가능하며, 혈당강하, 콜레스테롤 저하, 항산화, 과산화 지질 생성억제 효능을 가지는 락토바실러스 퍼멘텀(Lactobacillus fermentum) JS1 유산균 돌연변이 균주 (기탁번호 KCCM-80171) 및 상기 균주를 유효성분으로 포함하는 유산균 배양 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 유산균은 세균 중에서 가장 오래 전부터 인간에게 유용하게 이용되고 있는 균으로서, 특히 발효 유제품에서 보편적으로 이용되고 있다. 유산균은 영양소의 흡수를 개선하고 유당불내성(Lactose intolerance)을 완화시키며, 장의 운동성을 개선하고 항암효과를 갖는다고 보고되고 있다.

[0004] 메치니코프의 장수이론 이후로 유산균 또는 유산균을 사용한 식품의 생리학적 효과에 대하여 다양하게 연구되어 왔다.

[0005] 요거트와 같은 발효유에 함유된 유산균의 작용으로서 장내 미생물 총 개량효과 및 정장작용 등이 공지 되어 있다. 최근에는, 유산균이 다양한 기능, 예를 들어 면역 활성화 작용, 항균작용 및 항종양 작용 등을 갖는다고 보고되었다. 또한, 유산균의 다양한 기능, 예를 들어 면역 활성화 작용, 항균작용 및 항종양 작용 등을 갖는다고 보고되어 있다. 상술한 바와 같이 유산균의 다양한 건강효과가 기대되기 때문에 사람의 장에서 검출되는 락토바실러스 아시도필루스(Lactobacillus acidophilus), 스트렙토코커스 썬모필러스(Streptococcus thermophilus) 및 비피도 박테리움(Bifidobacterium)속 같은 균주를 사용하는 발효유 및 유산균 음료가 시판되고 있다.

[0006] 그러나, 이러한 유산균들은 내산성이나 내열성이 약하기 때문에 인간이 섭취했을 때 위에서 분비되는 위산에 의해 거의 사멸되어 장까지 도달하지 못하는 단점을 가지고 있다.

[0007] 이러한 문제를 해결하기 위해 유산균을 내산성이고 장용해성인 코팅물로 이루어진 캡슐에 포집하여 섭취하는 방법이 발명되었으나, 유산균이 캡슐내에서 무사히 위를 통과해서 장에 도달하여도 장에서 캡슐이 장의 소화효소 내지 장의 pH에 의해 제대로 분해 내지 용해되지 않거나 입안에서 캡슐이 씹혀서 내부의 유산균들이 캡슐 밖으로 유출되는 문제점 등을 가지고 있다.

[0009] 이에, 본 발명자들은 유산균을 캡슐에 포집시키지 않고 위를 통과할 수 있는 방안을 강구하던 중, 낮은 pH에 내산성이 있는 유산균을 연구한 결과, 고온 및 낮은 pH에서 생존이 가능한 락토바실러스 퍼멘텀(Lactobacillus fermentum) JS1 유산균 돌연변이 균주를 발견하고 그 기능을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0011] 본 발명의 목적은 고온 및 낮은 pH에서 생존이 가능한 락토바실러스 퍼멘텀(*Lactobacillus fermentum*) JS1 유산균 돌연변이 균주를 제공하는 것이다.
- [0012] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 락토바실러스 퍼멘텀 JS1 유산균 돌연변이 균주를 유효성분으로 하는 포함하는 배양 조성물을 제공하는 것이다.
- [0013] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 락토바실러스 퍼멘텀 JS1 유산균 돌연변이 균주의 배양 조성물이 항산화 작용, 콜레스테롤 저하작용, 항산화 작용, 과산화지질 억제용 기능을 가지므로, 이를 건강 보조식품, 기능식품, 동물 및 어류 보조사료 및 발효사료, 토양개량용 미생물 비료, 수질개선 등에 사용하는 용도를 제공하는 것이다.
- [0014] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 락토바실러스 퍼멘텀 JS1 유산균 돌연변이 균주인 식물성 유산균을 쌀에 분무, 살포함으로써 유산균 쌀의 제조 방법과 상기 방법으로 제조된 쌀을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0016] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 서열번호 1의 DNA로 코딩되는 16S rRNA를 갖는 내열성 및 내산성을 갖는 락토바실러스 퍼멘텀(*Lactobacillus fermentum*) JS1 유산균 돌연변이 균주 (기탁번호 KCCM-80171)를 제공한다.
- [0017] 또한, 본 발명은 혈당 강하, 항산화, 과산화지질 생성 억제 및 콜레스테롤 저하 기능을 갖는 상기 락토바실러스 퍼멘텀 JS1 유산균 돌연변이 균주를 유효 성분으로 포함하는 유산균 배양 조성물을 제공한다.
- [0018] 또한, 본 발명은 상기 유산균 배양 조성물을 이용한 가축 또는 어류에 사용가능한 보조사료 조성물, 버섯 폐배지를 이용한 발효사료 제조 방법, 및 수질 개선 방법을 제공한다.
- [0019] 또한, 본 발명은 상기 유산균 배양 조성물을 가축분에 첨가되는 것을 특징으로 하는 유기질 추비와, 상기 유기질 추비를 토양중에 혼입하는 것을 특징으로 하는 토양 개량 방법을 제공한다.
- [0020] 또한, 본 발명은 상기 유산균 돌연변이 균주를 쌀에 분무 및 살포하는 것이 바람직하고, 상기 방법으로 제조된 유산균 함유 쌀을 제공한다.
- [0022] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.
- [0023] 본 발명은 서열번호 1의 DNA로 코딩되는 16S rRNA를 갖는 내열성 및 내산성을 갖는 락토바실러스 퍼멘텀(*Lactobacillus fermentum*) JS1 유산균 돌연변이 균주 (기탁번호 KCCM-80171)를 제공한다.
- [0024] 본 발명자는 락토바실러스 퍼멘텀(*Lactobacillus fermentum*) 야생 균주를 2016년 2월 11일 일본 협전상사에서 입수한 후(도 1 참조), 인공배양에 성공한 후에 여러 가지 곡식들과 혼합하여 제조한 배지로 최악조건의 배양조건에서 배양함으로써 고온 및 낮은 pH에서 생존이 가능한 유산균 돌연변이 균주를 제조하였다. 구체적으로, 상기 유산균주 배양 조성물을 제조하는 과정에서 실시한 내산성 및 내열성 실험도중 pH 2~3에서 생존력이 탁월한 돌연변이 균주를 발견하고 이 돌연변이 균주를 통상적인 방법으로 분리하여 배양한 결과 종래의 락토바실러스 퍼멘텀(*Lactobacillus fermentum*) 균주와는 다른 균주임을 확인하고 'Lactobacillus fermentum JS1 균'이라 명명하게 되었다. 본 발명에 의한 *Lactobacillus fermentum* JS1 균주는 서열 1의 DNA로 코딩되는 16S rRNA를 가지며, 2017년 10월 26일자로 한국미생물보존센타에 기탁하여 수탁번호 KCCM-80171를 부여받았다.
- [0026] 또한, 본 발명은 혈당 강하, 항산화, 과산화지질 생성 억제 및 콜레스테롤 저하 기능을 갖는 상기 락토바실러스 퍼멘텀 JS1 유산균 돌연변이 균주를 유효 성분으로 포함하는 유산균 배양 조성물을 제공한다.
- [0027] 본 발명의 유산균 배양 조성물에 있어서, 상기 조성물은 락토바실러스 퍼멘텀 JS1 유산균 돌연변이 균주를 물 1 ℓ 당 포도당 20~30g, 효모 추출물 10~20g, 소이펩톤(soyptone) 5~8g, 카제인 3~5g, MgSO₄·7H₂O 0.1~0.15g, K₂HPO₄ 1~2g, MnSO₄·5H₂O 0.05~0.1 g, 아세트산나트륨(sodium acetate) 3~5g, 시트르산암모늄(ammonium citrate) 2~3g, 트윈 80 1~2g, 네올린(neoline) 0.25~0.3g을 혼합한 배지에서 배양하여 제조되는 것이 바람직하고, 상기 조성물은 효모인 사카로마이세스 세레비지에(*Saccharomyces cerevisiae*) 균주를 물 11 당 프로티아제 펩톤(protease peptone) No3 5~10g, 말트 추출물(malt extract) 3~5g, 포도당 10~20g, 효모 추출물 10~15g, 아세트산나트륨 5~10g, 시트르산암모늄 3~5g을 함유하는 배지에서 배양된 효모 배양액을 추가적으로 포함하는 것이 보다 바람직하다.

- [0028] 또한, 본 발명은 상기 유산균 배양 조성물을 이용한 가축 또는 어류에 사용가능한 보조사료 조성물, 버섯 폐배지를 이용한 발효사료 제조 방법, 및 수질 개선 방법을 제공한다.
- [0029] 또한, 본 발명은 상기 유산균 배양 조성물을 가축분에 첨가되는 것을 특징으로 하는 유기질 추비와, 상기 유기질 추비를 토양중에 혼입하는 것을 특징으로 하는 토양 개량 방법을 제공한다.
- [0030] 또한, 본 발명은 상기 유산균 돌연변이 균주를 쌀에 분무 및 살포하는 것이 바람직하고, 상기 방법으로 제조된 유산균 함유 쌀을 제공한다.

발명의 효과

- [0032] 상기에서 살펴본 바와 같이, 본 발명에 의한 락토바실러스 퍼멘텀(Lactobacillus fermentum) JS1균을 함유하는 유산균 배양 조성물은 종래의 유산균과는 달리 열과 산에 강하며 학설상 불가능하다고 하는 암모니아 성분을 분해하는 전혀 새로운 성질을 가지고 있었으며 혈당강하에도 탁월한 효능을 나타내었다. 이러한 균의 개발과 이 균의 혈당강하에 매우 효과적인 것으로 나타난 실험결과로 볼 때 당뇨병 환자들에게 있어서 약물로 인한 부작용과 주기적인 인슐린 공급의 불편함을 없앨 수 있을 뿐만 아니라 본 연구의 결과로 새로운 치료방법을 제공함으로써 국민의 건강증진에 크게 기여할 수 있을 것이다.

도면의 간단한 설명

- [0034] 도 1은 일본 협전상사에서 입수한 돌연변이 되기 전의 야생형 락토바실러스 퍼멘텀(Lactobacillus fermentum)에 대한 유산균 인도서이다.
- 도 2는 유산균 함유 제품을 섭취한 ob/ob mice(n=5)의 혈액내 포도당 수준을 보여주는 그래프이다.(^ap < 0.01; ^bp < 0.001 (대조군과 비교))
- 도 3은 본 발명의 식물성 유산균 락토바실러스 퍼멘텀(Lactobacillus fermentum) JS1 원말과 효모인 사카로마이세스 세레비지에(Saccharomyces cerevisiae) 원말을 함유한 플라스틱 박스를 설치한 소하천 수로의 수질개선 방법을 도안화한 것이다.
- 도 4 및 도 5는 본 발명의 식물성 유산균 락토바실러스 퍼멘텀(Lactobacillus fermentum) JS1 원말과 효모인 사카로마이세스 세레비지에(Saccharomyces cerevisiae) 원말을 함유한 쌀에 함유된 각 균주의 함량을 나타낸 시험 성적서이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0035] 이하, 본 발명에 따른 바람직한 실시예를 더욱 구체적으로 제시하여 상세하게 설명하기로 한다. 그러나, 이하의 실시예는 이 기술분야에서 통상적인 지식을 가진 자에게 본 발명이 충분히 이해되도록 제공되는 것으로서 여러 가지 다른 형태로 변형될 수 있으며, 상기와 같은 실시예들에 의하여 본 발명이 한정되는 것은 아니다.
- [0037] <실시예 1> 돌연변이 락토바실러스 퍼멘텀(Lactobacillus fermentum) JS1의 제조
- [0038] 본 발명자는 일본 협전상사로부터 돌연변이 되기 전의 야생형 락토바실러스 퍼멘텀(Lactobacillus fermentum) 유산균 원균을 인도받았다(도 1).
- [0039] 상기 야생형 락토바실러스 퍼멘텀으로부터 돌연변이를 제조하기 위하여 다음과 같은 3단계의 배지 조성에서 순차적으로 계대 배양하였다. 구체적으로, 먼저, 페트리디쉬 MRS 한천을 121℃, 15분 멸균 후에 클린벤치 내에서 페트리디쉬에 MRS 한천을 20 ml 넣고 24시간 후에 이 배지에 상기 원균을 접종하여 37℃에서 48시간 동안 배양하였다. 그 후, MRS 액체 배지 250cc를 121℃, 15분 멸균 후에 클린벤치에서 식힌 후에 상기 MRS 한천 배지에 배양된 콜로니를 백금이로 접종한 후에 42℃에서 15~18시간 배양한 후, 2℃ 냉장고에 냉동 보관하였다. 마지막으로, 비지 92%, 쌀겨 5%, 찹쌀 가루 1%, 검은 콩가루 2%를 혼합하면 수분이 78% 정도되는 배지를 121℃, 15분 멸균한 후에 42℃로 식힌 다음, 삼각플라스크에 있는 유산균을 배지량의 1%를 넣고 5시간 배양한 후에 99% 수산화나트륨을 물 1 리터에 160ml를 희석해서 4 mol을 제조하여 이것으로 배지의 pH를 2.5로 조정하였다. 배양온도를 98℃로 높여 36 시간을 배양한 후, 상기 사이클을 3년간 200여회 반복하였다. pH를 1.5로 조정한 기타 다른 배지에서도 98℃로 200여회에 걸쳐 배양하였으며, 최종 DNA를 검사하여 천신 만고 끝에 자연돌연변이 균주인 JS1 균주를 제조하고, 이것을 2017년 10월 26일자로 기탁번호 KCCM 80171로 기탁하였다.

- [0041] <실시예 2> 락토바실러스 퍼멘텀 JS1 유산균 배양액 조성물의 제조
- [0042] 유산균 배양액 조성물의 제조 방법은 다음과 같다.
- [0043] 250cc 삼각플라스크에 200cc 증류수를 넣고 MRS 액체(broth) 배지 11g을 넣고 증탕하여 배지가 완전히 혼합된 다음 고압 멸균기에 넣고 121℃에서 15~30분간 멸균한 다음 꺼내어 클린벤치내에서 35℃ 정도로 식힌 다음 페트리디쉬 MRS 한천 배지에 배양된 상기 실시예 1에서 얻어진 락토바실러스 페멘텀(*Lactobacillus fermentum*) JS1 원균을 접종한 다음 37~40℃에서 20~30시간 배양한 후 접종원을 냉장 보관하였다.
- [0044] 그런 다음 본 배양은 물 1리터당 포도당 20~30g, 효모 추출물 10~20g, 소이펩톤(soyptone) 5~8g, 카제인 3~5g, MgSO₄·7H₂O 0.1~0.15g, K₂HPO₄ 1~2g, MnSO₄·5H₂O 0.05~0.1g, 아세트산나트륨(sodium acetate) 3~5g, 시트르산암모늄(ammonium citrate) 2~3g, 트윈 80 1~2g, 네올린(neoline) 0.25~0.3g을 배양탱크에 넣고 희석한 다음 121℃로 1시간 멸균한 다음 37℃로 식힌 후 접종원을 1~3% 접종한 다음 39~42℃로 18~24시간 배양한 후에 원심분리기를 사용하여 유산균을 분리한 슬러지량에 탈지분유 10~15%, 트레할로스 5~10%를 혼합한 후에 진공냉동 건조기에서 -80℃로 72시간 진공냉동 건조한 후에 꺼내어 과쇄기로 분쇄하여 유산균 원말을 제조하여 알루미늄 백에 담아 냉장 보관하였다.
- [0045] 유산균 원말의 유산균수는 3.5×10^{11} cfu/g ~ 4.5×10^{11} cfu/g이었다.
- [0046] 상기 원말을 사용 용도에 따라 포도당으로 희석하여 1.5×10^7 cfu/g, 1.5×10^8 cfu/g, 1.5×10^9 cfu/g으로 혼합해서 사용하였다.
- [0047] 상기 유산균 원말을 사용하여 멸균수를 넣어 희석하여 6.8×10^7 ml가 되게 하여 이하 실험에 사용하였다.
- [0049] <실시예 3> 효모(*Saccharomyces cerevisiae*)의 배양액의 혼합
- [0050] YM 액체 배지를 250cc 삼각플라스크에 넣고 증류수를 200ml를 넣고 희석시킨 다음 증탕하여 배지가 완전히 혼합된 다음 고압 멸균기에 넣고 121℃에서 15~30분간 멸균한 후에 꺼내어 클린벤치안에서 식혔다. 페트리디쉬 YM 한천 배지에 배양된 효모 원균을 접종한 후에 배양기에서 37℃로 72시간 접종원을 배양한 후에 냉장 보관하였다.
- [0051] 그런 다음 본 배양은 물 1ℓ 당 프로티아제 펩톤(protease peptone) No3 5~10g, malt 추출물(malt extract) 3~5g, 포도당 10~20g, 효모 추출물 10~15g, 아세트산나트륨 5~10g, 시트르산암모늄 3~5g의 비율로 배양탱크에 넣고 희석한 다음 121℃로 멸균한 후에 37℃로 식힌 다음 배양량의 1~3%의 접종원을 접종한 후에 37℃로 2~3일간 배양한 후에 원심분리기로 분리한 슬러지량에 탈지분유 10~15%, 트레할로스 5~10%를 넣고 효모슬러지와 혼합한 후에 진공냉동 건조기로 -80℃에서 72시간 진공냉동 건조한 후에 꺼내어 과쇄기로 분쇄한 후 알루미늄 백에 담아 효모 원말을 냉장 보관하였다.
- [0052] 효모 원말의 효모수는 2×10^9 cfu/g ~ 1.5×10^{10} cfu/g이 되며 효모 원말은 보조사료나 미생물 비료로 사용시 유산균 배양액 조성물과 혼합해서 사용하였다. 또한, 효모 원말은 보조사료나 미생물비료에 사용시에는 옥수수 가루나 포도당을 혼합해서 유산균 1.5×10^7 cfu/g, 효모 1.5×10^6 cfu/g되게 혼합해서 사용하였다.
- [0054] <비교예 1>
- [0055] 유산균으로 락토바실러스 아시도필러스(*Lactobacillus acidophilus*)를 함유하는 타사에서 시판되고 있는 유산균 음료를 사용하였다.
- [0056] <비교예 2>
- [0057] 유산균으로 락토바실러스 카제이(*Lactobacillus casei*)를 함유하는 타사에서 시판되고 있는 유산균 음료를 사용하였다.
- [0059] <시험예 1> 내산성 시험
- [0060] 본 발명에 의한 락토바실러스 페르멘텀 JS1균이 낮은 pH에서도 생존 가능성을 확인하기 위해 내산성 시험을 하였다. 이때 배지는 BCP 첨가 배지를 사용하였고 배양조건은 37~39℃에서 72시간 배양하였고 pH는 구연산 및 HCl을 사용하여 각각 pH 2 및 pH 3으로 조절하였다. 상기 조건에서 배양한 후 발생한 황색 집락을 유산균 집락으로 계측하였으며 그 결과를 표 1에 나타내었다.

표 1

	pH	pH 조정전	1시간후	2시간 후
실시예 2	pH 3.0	$6.8 \times 10^7 \text{ ml}$	$5 \times 10^7 \text{ ml}$	$6.5 \times 10^6 \text{ ml}$
	pH 2.0	$6.8 \times 10^7 \text{ ml}$	$6.2 \times 10^6 \text{ ml}$	$4.8 \times 10^5 \text{ ml}$
비교예 1	pH 3.0	$6.8 \times 10^7 \text{ ml}$	$3.0 \times 10^4 \text{ ml}$	$6.3 \times 10^2 \text{ ml}$
	pH 2.0	$6.8 \times 10^7 \text{ ml}$	$4.1 \times 10^3 \text{ ml}$	$5.5 \times 10^2 \text{ ml}$

[0064] <시험예 2>

[0065] <2-1> 실험동물 및 사육조건

[0066] C57BL/6J-Leb^{ob} (ob mouse)는 비만형 당뇨실험에 사용되는 동물로서 미국 The Jacson Laboratory(JAX)에서 구입하여 사육시설은 SPF barrier system에서 시행하였으며 사육조건은 자동조절 (23℃, 습도 52 + 10%, 소음 60 phone 이하, 취기 20 ppm 이하, 조명 200~250 Lux)되고 명암은 12시간 사이클(18:00~06:00)로 자동조절하였다. 사육상자는 polycarbonate cage(180W × 240D 125H mm)를 사용했고 깔짚은 미루나무 분쇄톱밥을 사용했고 동물 사육상자 교환은 주 2회 실시하였다. 사육실 내에서 사용되는 모든 기자재 및 깔짚은 고압멸균기(121℃ 30분 멸균, 30분 건조)를 사용하였다. 사료는 마우스 실험동물 사료를 구입하여 자유로이 섭취하도록 하여 3주간 사육하였다.

[0067] 사료의 조성은 수분 12.5 중량%, 조단백 22 중량%, 조지방 4.3 중량%, 조섬유 4.1 중량%, 회분 6.3 중량%, 칼슘 0.8 중량%이며 대조군의 음수는 상수를 여과한 후 자외선 유수 멸균기(Dynamics, M600, USA)를 통과시킨 물을 섭취케 하였다.

[0069] <2-2> 동물 선별 및 시료의 준비

[0070] 본 실험에 사용한 시험동물의 경우 3~4주령이 되면 비만을 나타내는 동물을 선별하여 사용했고 시험동물의 연령은 9주령의 수컷을 사용했다. 시험 직전에 체중과 기초 혈당을 측정하여 평균 수치를 각 군마다 비슷하게 조정하여 사용했으며 이때의 평균 혈당치는 380~420 mg/dl 내외로 했다.

[0071] 실시예 2~3 및 비교예 1~2의 유산균 원말을 포도당을 사용하여 유산균 1.5×10^8 cfu/g되게 혼합한 것 1kg을 음용수 10 리터에 용해하여 자유롭게 섭취하도록 물병에 넣어 3주간 섭취하도록 했다.

[0073] <2-3> 식이 섭취량 및 식이효율

[0074] 실험기간중 자유 섭식(ad libitum) 시켰으며 물은 물병으로 매일 일정시간에 공급하여 자유롭게 섭취케 하였다. 식이 섭취량은 매일 일정시간 측정하였으며 체중은 실험기간 동안 2, 4, 8, 12, 16, 21일째에 각각 측정했다.

[0075] 식이효율은 전체중 증가량을 같은 기간 동안의 식이 섭취량으로 나누어 계산하였다. 식이 섭취량 및 식이효율에 미치는 영향은 하기 표 2와 같다. 식이 섭취량은 대조군과 유산균 분말을 음료수에 희석하여 실험군에서 섭취하는 사료의 양 (1일 섭취량)을 나타낸 것으로 유의차는 보이지 않았다. 또한 사료 섭취(g)에 대한 체중 증가(g)의 지표로 사용되는 사료 효율비를 비교하면 체중변화와 거의 일치 했다.

표 2

식이 섭취, 체중 증가 및 식이 효율비(FER)의 비교

그룹	식이 섭취 (g/day)	체중 증가 (g/21days)	FER
대조군	5.10 ±0.70	7.26 ±1.20	0.07 ±0.01
실시예 2	5.30 ±0.50	7.15 ±0.56	0.06 ±0.01
실시예 3	5.30 ±0.60	7.52 ±0.57	0.07 ±0.01

[0078] FER= 체중 증가 (g)/ 식이 섭취 (g) 비율

- [0079] 모든 수치는 평균 \pm S.E. (n=5)이다.
- [0081] <시험예 3> 활성농도의 측정
- [0082] 채혈은 안와 정맥 채혈법을 이용해서 14:00시에 시작하여 전체 동물을 채혈하는데 30분 이상이 걸리지 않도록 하였다. 모든 개체의 혈당의 농도를 one touch basic(Lifescan Co. USA)을 사용하여 측정하였다. 혈당은 2, 4, 8, 12, 16, 21일 경과 후에 동일한 방법으로 측정하였다.
- [0083] 실시예 2~3 및 비교예 1~2의 유산균, 효모균 용해수 섭취에 따른 혈당량의 변화를 비교 관찰하였다. 대조군(Control group)은 음용수를 사용했으며 실시예 2~3 및 비교예 1~2의 유산균, 효모균 용해수 섭취에 따른 혈당량의 변화를 비교 관찰하였다. 대조군(control group)은 음용수를 사용했으며 실시예 2~3, 비교예 1~2의 유산균, 효모균 용해수를 각각 자유롭게 섭취하도록 하면서 3주간의 혈당 억제효과를 비교한 결과를 도 2에 나타내었다. 도 2에서 보는 바와 같이 실시예 2~3의 유산균, 효모균 용해수는 대조군에 비해 4일 이후부터 유의적인 혈당 강하효과가 나타나기 시작하였고 마지막 21일째 혈당치를 비교하면 대조군 대비 각각 약 45%, 35%의 현저한 혈당 강하 효과가 나타났다. 또한, 비교예 1~2 역시 4일 이후부터 혈당 수치가 떨어지기 시작하였고 21일째 마지막 날 혈당치는 대조군 대비 각각 약 17%~21%의 혈당 강하 효과가 나타났다.
- [0085] <시험예 4>
- [0086] <4-1> 혈액 채취 및 분리
- [0087] 실험동물을 에테르로 마취시키고 심장에서부터 혈액을 분취하여 저온에서 2시간 동안 방치한 후에 700g 에서 10분간 원심분리하여 얻은 상층액인 혈청을 항응고제인 sodium heparin(100 Units, Sima)을 혈액 1.0ml 당 0.05 ml로 처리한 CBC 병(complete blood cell count: 녹색자)에 넣어 -70℃에서 동결 보존하면서 분석에 사용하였다.
- [0088] <4-2> 중성지질 및 단백질의 측정
- [0089] 혈청중의 중성 지질로서 트리글리세라이드(triglyceride: TG)의 함량은 혈청 중성지질 측정용 TG 키트시약(Sigma, USA)으로 처리하여 표준 검량선에 의거 혈청중의 중성지질의 함량을 정량하였다. 혈청중의 단백질의 함량은 BSA (표준 혈청 알부민)를 표준 물질로 하여 Lowry의 방법(1951)에 따라 측정하였다.
- [0090] <4-3> 콜레스테롤 함량의 측정
- [0091] 총 콜레스테롤의 함량은 Rude1 등(Rude1 LL, 1973)의 방법에 따라 o-프탈알데히드(o-phthalaldehyde)법으로 측정하였다. 먼저 시료를 0.1ml씩 취한 후 15분간 60℃ 수조에서 가열한 후에 냉각시켰다. 여기에 헥산 5.0ml를 가하여 혼합하고 다시 증류수 3.0ml를 가한 후에 다음 1분간 잘 혼합한 후에 층을 분리하여 1.0ml의 헥산층을 취하였다. 이 헥산층을 질소로 농축 건조시키고 o-phthalaldehyde 시약을 2.0ml를 가하여 잘 혼합하고 10분 후에 발색 시약으로서 진한 황산 1.0ml를 가하여 혼합하였다. 황산 첨가후 10분에서 90분 이내에 분광광도계를 사용하여 550nm에서 흡광도를 측정하고 표준 검량선에 의하여 혈액중의 총 콜레스테롤의 함량을 정량하였다.
- [0092] <4-4> 지단백-콜레스테롤 함량의 측정
- [0093] 혈청 중의 저밀도 지단백(LDL) 및 고밀도 지단백(HDL) 콜레스테롤의 함량의 측정은 HDL-콜레스테롤(HDL-C555, Eiken 일본), LDL-콜레스테롤(BLF, Eiken 일본) 키트시약을 사용하였다.
- [0094] <4-4-1> HDL 콜레스테롤 함량의 측정
- [0095] 혈청 0.3ml를 시험관에 넣고 여기서 침전 시약 0.3ml를 넣어 잘 혼합한 다음 실온에서 10분간 방치한 후에 700g 에서 10분간 원심분리 하였다. 그 후에 상층액 50 μ l, 표준용액(100mg/dl) 50 μ l, blank로 증류수 50 μ l에 각각 HDL 발색시약 3.0ml씩을 첨가하고 잘 섞은 후에 37℃ 수조상에서 5분간 가온시켰다. blank를 대조군으로 하여 555nm에서 흡광도를 측정하여 HDL-콜레스테롤의 함량(mg/dl serum)을 정량하였다.
- [0096] <4-4-2> LDL 콜레스테롤 함량의 측정
- [0097] 혈청 0.1ml, 표준혈청 0.1ml를 시험관에 넣고 여기에 BLF 키트시약 I, II를 각각 4.0ml씩 넣은 후 5초간 잘 혼합한 다음 실온 (25 \pm 3℃)에서 25분간 방치한 후 10분 이내에 증류수를 대조군으로 하여 650nm에서 흡광도를 측정하여 LDL-콜레스테롤의 함량 (mg/dl serum)을 정량하였다.
- [0098] <4-4-3> 동맥경화 지표(Atherogenic index)의 계산

[0099] 성인병의 초기증상으로 알려진 동맥경화증의 발병 지표로서 활용되고 있는 동맥경화지수 (atherogenic index : AI)는 Haglund 등 (1991)의 방법에 따라 총 콜레스테롤의 함량을 뺀 다음 이것을 다시 HDL-콜레스테롤로 나누어 계산하였다.

[0100] 식물성 유산균 (Lac, F-100, 50) 및 동물성 유산균 발효음료(HYW-100, 50)가 성인병 원인 물질로 알려진 중성지질(triglyceride : TG)과 콜레스테롤 및 지단백 콜레스테롤의 함량에 미치는 영향을 조사하기 위하여 obese mouse에 실시예 2~3 및 비교예 1~2의 유산균 용해수를 각각 자유롭게 섭취토록 하면서 3주간 투여의 영향을 비교하여 보면 하기 표 3과 같다.

표 3

[0102] ob/ob mice의 지질 조성물 함량에 Lac. F 음료 투여의 효과

과라미터	대조군	실시예 2	실시예 3	비교예 1	비교예 2
단백질 (mg/dl 혈청)	25.510±0.58 (100%)	25.90±0.64 (101.6%)	29.940±31 (105.6%)	27.150±39 (106.5%)	27.210±32 (106.7%)
트리글리세리드 (mg/dl 혈청)	137.51±1.35 (100%)	119.88±0.39 (87.2%)	125.63±7.14 (91.4%)	124.57±4.80 (90.6%)	129.69±2.32 (94.3%)
총 콜레스테롤 (mg/dl 혈청)	123.956±92 ^c (100%)	104.33±2.23 ^c (84.2%)	115.72±3.23 ^a (93.4%)	112.60±5.45 ^a (90.8%)	121.81±4.55 ^a (98.3%)
LDL-콜레스테롤 (mg/dl 혈청)	112.03±5.78 ^c (100%)	83.630±0.47 ^c (74.7%)	90.92±1.77 ^c (81.2%)	91.87±2.27 ^c (82.0%)	95.46±3.44 ^c (85.2%)
HDL-콜레스테롤 (mg/dl 혈청)	56.02±2.90 ^c (100%)	68.070±0.96 ^c (121.5%)	65.47±0.38 ^c (116.9%)	59.17±2.12 ^c (105.6%)	58.21±1.15 ^c (103.9%)
동맥경화지수 (AI)	1.20±0.12 ^c (100%)	0.520±0.09 ^c (43.8%)	0.75±0.07 ^c (62.8%)	0.91±0.17 ^a (74.4%)	1.08±0.16 ^c (90.1%)

[0103] * 모든 수치는 평균 ±S.E (n=5)이다

[0104] * *^a p < 0.05: ^b p < 0.01: ^c p < 0.001 (대조군과 비교)

[0106] 실시예 2~3의 식물성 유산균 발효음료를 투여한 그룹의 중성지질과 총 콜레스테롤의 함량은 각각 대조군 대비 8.2~12.5% 및 6.4~15.6%로 현저히 억제됨을 알 수 있었다. 실제 성인병의 발병과 직접 관계가 있는 LDL-콜레스테롤의 저하 효과를 비교하여 보면 대조군 대비 약 17.8~24.5% 이상의 억제 효과가 나타났다. 또한 성인병의 초기 발병 지표로 알려진 동맥경화지수(atherogenic index: AI)도 실시예 2~3의 식물성 유산균 발효음료의 투여군은 거의 37.5~55.6%나 현저하게 억제됨을 알 수 있었다. 이러한 동맥경화지수의 감소가 LDL-콜레스테롤의 함량의 감소와 거의 일치하고 있다는 사실은 매우 흥미롭다. 이것은 LDL-콜레스테롤의 함량과 동맥경화지수의 증가가 바로 성인병의 발병과 밀접한 관계가 있음을 시사하고 있기 때문이다.

[0107] 항콜레스테롤 인자로 널리 알려졌고 운동 및 장수와 연관성이 높은 HDL-콜레스테롤의 수치 역시 식물성 유산균 투여군이 15.6~21.2%나 증가되었다는 것은 성인병 예방에도 매우 효과적이라고 판단할 수 있다.

[0108] 비교예 1~2의 동물성 유산균 발효음료 역시 대조군 대비 중성지질 및 LDL-콜레스테롤의 수치 역시 저하시킴을 보여주었다. 그러나 실시예 2~3의 식물성 유산균에 비교하면 그 억제 정도가 약한 것으로 조사되었다.

[0109] 본 발명에 의한 실시예 2~3의 식물성 유산균은 혈당 저하뿐만 아니라 지질대사에 중요한 역할을 담당하는 혈중 콜레스테롤의 함량을 유의적으로 저하시키므로 성인병의 예방에 큰 도움을 줄 것으로 기대된다.

[0111] <시험예 5> 활성산소 및 과산화지질(LPO)의 측정

[0112] <5-1> 활성 산소의 측정

[0113] 활성산소 중에서 가장 강력한 자유 라디칼(free radicals)로 알려진 하이드록실 라디칼의 측정은 데옥시리보스(Deoxyribose)의 파괴 정도로 하이드록실 라디칼(hydroxyl radical) 생성 정도를 측정하는 방법으로서 반응성 산소 대사물에 의해 데옥시리보스가 파괴되어 알데히드(aldehyde)가 생성되며 이 알데히드는 산성용액에서 티오

바비튜릭 산(thiobabituric acid)과 반응하여 발색되는 것을 이용한 방법(Halliwell, B, 1981)에 따라 측정하였다.

[0114] 이들 활성산소(oxygen radicals)에 의해서 생성되는 것으로 알려진 혈청중의 과산화지질 (lipid peroxide:LP O)의 함량은 최 등(Choi, J, H, 1994)의 실험 방법에 따라 측정하였다.

[0115] <5-2> 제거효소의 활성 측정

[0116] 활성산소종의 제거효소로서 중요한 슈퍼옥시드 디스무타제(superoxide dismutase: SOD) 활성의 측정은 Oyanagui 등 (Oyanagui, Y, 1984)의 방법에 따라 정량하였다. 또한 생체 내의 중요한 제거 효소로서 340nm에서 NADPH의 감소를 측정하기 위한 방법으로 혈청중의 글루타치온 퍼옥시다아제(glutathione peroxidase: GSHPx)의 활성을 측정하였다 (Lawrence, R, A, 1978).

[0118] <시험예 6> 분석결과의 통계처리

[0119] 본 발명의 모든 실험결과는 통계 처리하여 평균치와 표준 편차를 계산하였으며 각 실험군간의 유의성 검정은 Student's t-test(Steel, R, G, D, 1960)로 실시하였다.

[0120] 실시예 2~3의 식물성 유산균 용해수 투여가 obese mouse의 혈액 중의 지질과산화에 미치는 영향으로서 활성산소 중에서 자유 라디칼(free radical)중 초기 단계에서 발생하는 활성산소로 보고되어 있는 슈퍼옥시드 라디칼 (superoxide radical)과 가장 강력한 자유 라디칼로 알려진 하이드록실 라디칼(hydroxyl radical)의 생성과 이 때 생성되는 과산화지질(lipid proxide:LPO)의 함량을 비교하여 보면 하기 표 4와 같다. 또한 생체방어 효소인 슈퍼옥시드 디스무타아제(superoxide dismutase: SOD), 글루타치온 퍼옥시다아제(glutathione peroxidase:GSHPx) 등은 체내에 존재하는 강력한 항산화 효소로서 널리 식물성 유산균 용해수 투여는 강력한 활성산소인 하이드록실 라디칼 및 슈퍼옥시드 라디칼등의 프리 라디칼의 생성을 억제할 수 있을 뿐만 아니라 성인병의 발병이나 노화와 밀접한 관계가 있는 것으로 알려진 과산화 지질의 생성도 아주 효과적으로 억제한다는 사실을 알 수 있었다.

표 4

[0122] ob/ob mice의 반응성 산소종과 청소원(scavenger) 효소 활성에 Lac, F 음료 투여의 효과

파라미터	대조군	실시예 2	실시예 3	비교예 1	비교예 2
지질 퍼옥사이드(LPO) (nmol/ml 혈청)	5.10±0.22 ^c (100%)	4.36±0.14 ^c (85.7%)	4.55±0.27 ^b (89.4%)	4.48±0.38 ^a (88.0%)	4.51±0.32 ^a (88.6%)
하이드록시 라디칼 (nmol/mg 단백질)	4.26±0.41 ^a (100%)	3.67±0.26 ^a (86.2%)	3.90±0.12 ^b (91.6%)	3.79±0.12 ^b (89.0%)	3.91±0.09 ^c (91.8%)
슈퍼옥시드 라디칼(nmol/mg 단백질)	86.59±3.01 ^a (100%)	71.74±3.10 ^c (82.9%)	77.83±4.85 ^b (89.9%)	78.29±4.10 ^b (90.4%)	82.23±0.80 ^a (95.0%)
슈퍼옥시드 디스무타제(SOD) (unit/mg 단백질)	212.82±7.96 ^c (100%)	258.96±5.4 ^c (121.7%)	245.26±3.04 ^c (115.2%)	257.20±8.61 ^c (120.9%)	242.43±5.32 ^c (113.9%)
글루타치온 퍼옥시다제(GSHPx) IU/g 단백질	7.31±0.23 ^b (100%)	8.63±0.56 ^b (118.0%)	7.95±0.10 ^b (108.7%)	7.90±0.51 ^b (108.1%)	7.53±0.54 ^b (103.0%)

[0123] * 모든 수치는 평균 ±S.E. (n=5)이다

[0124] ^a p < 0.05; ^b p < 0.001 (대조군과 비교)

[0126] 항산화와 관련된 효소인 SOD의 활성에 미치는 영향을 비교하여 보면 대조군 대비 14.8~21.5%로 효과적으로 활성이 증가하고 있음을 알 수 있었다. 또한 GSHPx의 활성 역시 대조군 대비 8.5~18.2%로 실시예 2~3의 식물성 유산균 용해수 섭취가 생체 내의 항산화효소의 활성을 증가시키는 것으로 나타났다.

[0127] 생체내에서 자유 라디칼로서 슈퍼옥시드 음이온(superoxide anion), 하이드록실 라디칼, 과산화수소 등의 활성 산소종(reactive oxygen species :ROS)의 생성은 여러 가지 성인병을 유발할 뿐만이 아니라 노화과정을 촉진하

는 것으로 알려져 있다. 생체 내에서 자유 라디칼에 의해 생성되는 슈퍼옥시드 음이온이나 과산화수소 및 하이드록실 그룹(hydroxyl group)의 유해산소를 제거하기 위한 체내의 혈액이나 모든 장기에 존재하고 있는데 이들 방어체계로는 superoxide dismutase(SOD), glutathione peroxidase(GSHPx), catalase 등이 알려져 있다. 우유와 발효유 제품의 활성산소종의 활성 저하에 대해 보고되고 있으며 이러한 기작은 항산화효소와 밀접한 관련이 있다고 알려졌다.

[0128] 따라서 본 발명에 의한 실시예 2~3의 식물성 유산균 용해수는 이러한 활성산소종의 생성을 억제할 뿐만 아니라 항산화 효소를 유의적으로 상승시킴으로 성인병뿐만 아니라 노화과정의 억제에도 영향을 미칠 것으로 판단된다.

[0130] 본 발명에서는 유산균의 섭취에 따른 당뇨병의 치료 및 예방작용을 과학적으로 규명하기 위하여 *Lactobacillus fermentum* JS1 균을 이용한 식물성 유산균 용해수를 당뇨실험동물인 ob. mouse를 사용하여 3주 동안 사육하면서 체중변화, 혈액 중의 중성지방과 콜레스테롤의 함량 저하효과, LDL-콜레스테롤 및 동맥경화지수(atherogenic radical)의 감소효과와 하이드록실 라디칼(hydroxyl radical), 슈퍼옥시드 라디칼(superoxide radical) 및 과산화지질(lipid peroxide: LPO)의 생성 억제효과, 그리고 이들 활성산소의 제거 효소인 슈퍼옥시드 디스무타아제(SOD) 및 글루타치온 퍼옥시다아제(GSHPx)등의 활성에 미치는 영향을 평가하였다.

[0131] 혈당량의 변화는 실시예 2~3의 식물성 유산균 용해수를 투여한 실험군에서 대조군 대비 각각 35~45%의 현저한 혈당강하 작용을 나타내었다. 실시예 2~3의 식물성 유산균 용해수의 장기간 경구투여는 ob. mouse에서 유의성 있는 혈당강하 작용으로 나타났다. 실시예 2~3의 식물성 유산균 용해수 투여군의 중성지방(TG), 총콜레스테롤 및 LDL-콜레스테롤의 함량도 대조군 대비 저하효과가 인정되었을 뿐만 아니라 성인병의 초기증상으로 발병하는 동맥경화지수도 50%이상의 감소 효과가 나타났다. 실시예 2~3의 식물성 유산균 용해수 투여군은 활성산소 중에서 슈퍼옥시드 라디칼 및 하이드록실 라디칼의 생성이 대조군 대비 현저히 억제 되었을 뿐만 아니라 활성산소에 따라 생성되는 과산화지질(LPO)의 함량도 현저히 감소하였다. 또한 활성 산소의 제거 효소로서 슈퍼옥시드 디스무타아제(SOD) 및 글루타치온 퍼옥시다아제(GSHPx)의 활성도 대조군 대비 증가된 것을 확인하였다. 이상의 결과에서 볼 때 *Lactobacillus fermentum* JS1균을 함유하는 실시예 2~3의 식물성 유산균 용해수를 당뇨모델 obese mouse에 3주간 투여한 결과, 혈당강하 작용 외에도 성인병 및 노화 방지 또는 지연시킬 수 있다는 사실을 실험적으로 입증하였다.

[0133] <시험예 7> 육계 사육시험

[0134] 식물성 유산균 *Lactobacillus fermentum* JS1 원말과 효모인 *Saccharomyces cerevisiae* 원말을 사용하여 포도당과 혼합하여 유산균 1×10^7 cfu/g, 효모 1×10^6 cfu/g 되게 제조한 후에 육계사료에 사료량의 0.2%를 혼합하여 급여하였다.

[0135] 육계 사육시 3.3m²에 50수씩 대조구, 항생제 첨가구, 유산균 0.2% 첨가구 3개 처리구에 4반복 시험을 하였다. 시험사육 육계는 50수 × 3 처리구 × 4 반복 = 600수를 시험하였다.

표 5

사육시험 결과(4회 반복 시험 평균)

구분	사육수	사육일수	총사료량	평균 체중	비고
대조구	200 수	35일	680.4 kg	1.8kg	
항생제 구	200 수	35일	650.2 kg	1.8kg	
유산균 0.2%	200 수	32 일	620.4 kg	1.8kg	1수당 사료절약 300g

[0139] 대조구나 항생제구는 사육일수 35일에 평균 체중이 1.8kg이었으며 유산균 0.2% 급여구는 사육일수 3일에 평균 체중이 1.8kg이 되어 사육기간이 3일 단축되어 한 마리당 평균 사료비가 300g이 절약되었다. 그리고 계분 약취가 60~70%가 감소하였고 파리 발생이 억제되어 친환경 육계사육을 할 수가 있었고 무항생 닭고기를 공급할수 있게 되었다. 항생제구는 사육기간은 대조구와 같으나 사료비가 평균 151g이 절약되었다.

[0140] 일반 사육농가에서 유산균 0.2%를 사용하여 30,000수를 사육시 9,000kg의 사료가 절약되고 항생제 구입비가 절약되어 농가 소득에 크나큰 기여를 할 수 있으며 무항생제 닭고기를 공급함으로써 국민 건강 증진에 기여가 된

다.

[0142] <시험예 8> 양어 사육시험

[0143] 식물성 유산균 *Lactobacillus fermentum* JS1 원말과 효모인 *Saccharomyces cerevisiae* 원말을 사용하여 포도당과 혼합하여 유산균 1×10^7 cfu/g, 효모 1×10^6 cfu/g되게 제조한 후에 사료량의 0.2%를 혼합하여 펠렛을 제조해서 양어사료로 급여하였다.

[0144] 잉어 시험 사육시 대조구, 항생제구, 유산균 0.2% 3개 처리구에 각각 100마리씩 4회 반복 시험을 4개월간 하였다. 사육시험 잉어수는 3개 처리구 \times 100마리 \times 4 반복 = 1,200 마리를 시험했다.

표 6

[0145] 양어 사육 시험 결과 (4회 반복시험 평균)

	대조구	<i>Lactobacillus fermentum</i> JS1(0.2%)	Flavomycine 4% mg/KG
간채장			
체중	2.19±0.27 ^a	3.60±0.56 ^c	2.63±0.43 ^b
HSI	2.38±0.50 ^a	3.21±0.53 ^c	2.78±0.21 ^b
HPC	8.64±0.27 ^a	10.01±0.42 ^c	9.19±0.46 ^b
장			
체중	2.11±0.27 ^a	2.91±0.38 ^c	2.61±0.26 ^b
ISI	2.32±0.22 ^a	2.61±0.36 ^b	2.58±0.40 ^b
IPC	6.39±0.32 ^a	8.31±0.38 ^d	6.82±0.23 ^b
길이	21.63±0.67 ^a	28.44±1.70 ^c	23.29±1.44 ^b
RGL	141.27±7.96 ^a	175.44±17.08 ^b	149.63±1.20 ^a

[0147] 잉어 사육시험한 결과 유산균 0.2% 급여구가 대조구에 비하여 잉어의 길이는 약 30%가 크게 성장했으며 중량은 약 24%가 증체되었다. 항생제 투여구에 비해서도 유산균 0.2% 투여구가 잉어의 길이는 약 22%가 크게 성장했으나 중량은 약 17%가 증체되었다.

[0148] 그리고 대조구나 항생제 투여구는 잉어 사육 수조의 물을 1주에 1회 교체해 주어야 했으나 유산균 투여구는 수조에 있는 물이 유산균으로 정화되어 8주에 1회 교체해 주었다.

[0150] <시험예 9> 각종 버섯 폐배지 발효사료 제조

[0151] 각종 버섯 재배 후 발생하는 버섯 폐배지를 이용하여 발효사료를 제조하여 가축 사료로 사용하면 사료비 절감으로 농가 소득에 기여할 수 있다.

[0152] 식물성 유산균 *Lactobacillus fermentum* JS1 원말과 효모인 *Saccharomyces cerevisiae* 원말을 사용하여 포도당과 혼합하여 유산균 1×10^7 cfu/g, 효모 1×10^6 cfu/g 되게 제조한 후에 버섯 폐배지량의 0.2%를 물에 용해해서 사용하였다. 발효사료 제조시 옥수수 가루 10%, 밀기울 10%, 버섯 폐배지 80%, 유산균 0.2%를 발효기에 넣고 40~50℃로 48시간 발효시키면 발효사료가 되었다.

[0153] 또 다른 방법은 버섯 폐배지 80%, 밀기울 10%, 옥수수가루 10%를 발효기에 넣고 고압수증기 121℃로 30분간 살균한 다음 배지 온도를 40℃로 식힌 후에 유산균, 효모균을 0.2% 혼합하여 40~50℃로 15~18시간 발효시키면 발효사료가 완성되었다.

[0154] 육계 사육시에는 육계 배합사료 90%, 버섯 폐배지 발효사료 10%를 급여하여 사육하면 되고 양돈의 경우에는 양돈 배합사료 80%, 버섯 폐배지 발효사료 20%를 급여하여 사육하면 되고 한우 비육우는 유성기(생후 5개월부터 13개월)에는 한우 배합사료 40%에 버섯 폐배지 발효사료를 60%를 혼합해서 급여하며 비육전기(생후 14개월부터 21개월)에는 배합사료 60%에 버섯 폐배지 40%를 혼합해서 급여하며 비육후기(생후 22개월부터 29개월)에는 배합

사료 80%에 버섯 폐배지 20%를 혼합해서 급여하였다.

- [0155] 버섯 폐배지 발효사료를 제조하여 비육우를 사육하면 사료비가 30% 이상 절감되어 농가소득에 크게 기여할 수 있다.
- [0156] 버섯 폐배지 발효사료를 급여하면 양계 사육시에는 계분의 약취가 약 70% 감소하고 양돈의 경우에는 돈분의 약취가 약 80% 감소하며 비육우 사육시에는 우분의 약취가 약 90% 감소가 되며 계사, 돈사, 우사에서 파리발생이 억제되어 친환경 축산을 할 수 있고 항생제를 사용하지 않아 친환경 닭고기, 돼지고기, 소고기를 공급할 수 있어 친환경 축산물을 국민에게 공급함으로써 국민 건강 증진에 크게 기여할 수 있다.
- [0157] 발효사료를 사용하여 육계를 사육하면 닭고기 내에 이노신산(Inosinic acid)이 2배가 증가하고 양돈의 경우에는 돼지고기 내에 5배가 증가하며 비육우의 경우에는 소고기내에 3배가 증가하여 아주 고기 맛이 좋아지면 비육우의 경우에는 1등급육이 90%가 생산되어 농가 소득이 증대된다.
- [0158] 버섯 폐배지는 버섯균사체이기 때문에 버섯균사체내에는 천연 항생제인 베타클루칸이 함유되어 있어 항생제를 사용할 필요가 없다.
- [0159] 버섯배지는 주로 원목 톱밥을 사용하는데 나무 톱밥내에는 리그닌을 함유하고 있어 동물은 리그닌을 섭취하면 안되지만 톱밥속에 있는 리그닌을 분해할 수 있는 것은 오직 버섯균사체이기 때문에 버섯 폐배지 내에는 리그닌이 완전 분해되어 존재하지 않으며 버섯 폐배지는 리그닌이 완전 분해된 톱밥과 버섯 균사체로 되어 있다.

표 7

버섯 폐배지 발효사료 성분 분석표

[0161]

성분명	단위	분석 결과
수분	%	56.11
조단백질	%	6.41
조지방 (F.E)	%	2.76
조섬유	%	12.58
조회분	%	3.17
가용성무질소물	%	19.76
열량	Kcal/kg	2,150
탄수화물	%	31.95
효모	cfu/g	2.2×10^7
유산균	cfu/g	5.4×10^8

[0163] <시험예 10> 미생물 유기 비료 제조

[0164] 식물성 유산균 *Lactobacillus fermentum* JS1 원말과 효모인 *Saccharomyces cerevisiae* 원말을 사용하여 포도당과 혼합하여 유산균 1×10^7 cfu/g, 효모 1×10^6 cfu/g되게 제조한 후에 계분 50%, 톱밥 50%를 유기퇴비 발효장에서 혼합한 후에 상기 유산균과 효모를 혼합한 것을 계분, 톱밥량의 0.2%를 물에 용해해서 표면에다 고 골고루 뿌린 후에 퇴비 발효기를 이용해서 30일간 발효시키면 유산균 유기 퇴비가 완성되었다. 유기 퇴비 발효시 발효 온도는 85℃인데도 유산균이나 효모가 죽지 않고 증식하였다.

[0165] 농작물 재배시에 1 단보당 채소류인 시금치 당근, 배추, 무, 고추 재배에는 유산균 유기퇴비를 2,600kg 과채류인 수박, 참외, 오이, 가지 재배시에는 4,000kg을 토지 위에 골고루 뿌리고 경운기로 갈고 로타리 친 다음 씨앗이나 모종을 이식하여 재배하였다.

[0166] 그러면 탄저병, 페토병, 균핵병, 역병, 반고사병, 청고사병 등이 거의 발생하지 않기 때문에 농약을 사용하지 않아 무공해 농산물을 생산할 수가 있다. 토양 속에 있는 병원균을 유산균이 유산을 분비해서 병원균을 죽이고 토양 속에 있는 해충의 알을 유산균이 유산을 분비해서 해충의 알껍데기를 녹여서 해충의 발생을 원천적으로 억제한다. 그리고 농작물에 진딧물이 발생하면 유산균, 효모 분말을 100배액을 만들어 살포하면 유산균이 유산을 분비해서 진딧물을 죽인다.

표 8

[0168]

유산균 유기질 비료 성분분석표

분석 항목	단위	분석 결과
질소	%	0.40
유기물	%	31.71
인산 (P ₂ O ₅)	%	0.78
가리 (K ₂ O)	%	0.75
유산균수	cfu/g	1.2 × 10 ⁶
효모균수	cfu/g	2.3 × 10 ⁵

[0170] <시험예 11> 수질개선 방법

[0171] 식물성 유산균 *Lactobacillus fermentum* JS1 원말과 효모인 *Saccharomyces cerevisiae* 원말을 사용하여 포도당과 혼합하여 유산균 1 × 10⁷ cfu/g, 효모 1 × 10⁶ cfu/g 되게 제조한 후에 삼나무 톱밥 90%에 밀기울 10%를 혼합하여 수분을 50%되게 한 후에 상기 기술한 유산균과 효모를 1%를 넣고 혼합한 후에 발효온도 40~45℃로 3일간 발효하면 삼나무톱밥에 유산균 1.5 × 10⁷ cfu/g, 효모 2 × 10⁶ cfu/g 조성물이 되었다.

[0172] 이 조성물 80%, 숯가루 10%, 백토 10%를 혼합하여 톱밥이 새지 않고 물이 통하는 망자루에 담아서 사방이 뚫어진 플라스틱 박스에 담아서 소하천에 흐르는 물에 플라스틱 박스를 물에 떠내려가지 않게 붙여 놓아 흐르는 물이 플라스틱 박스를 지나가도록 설치하였다. 도 3과 같이 20m 간격으로 두 곳에 설치하였다.

[0173] 소하천에는 상류에서 축산 폐수 등이 혼합되어 흐르기 때문에 흐르는 물속에 질소성분과 암모니아 성분으로 인해 수질이 오염되어 있으나 플라스틱 박스에 있는 자루에서 유산균이 나와서 질소와 암모니아를 분해하고 숯가루와 백토가 흐르는 물을 정화하기 때문에 수질이 개선되어 하천 바닥에 이끼가 발생하지 않고 물에서 악취가 없어서 수질이 정화되었다.

[0174] 그리고 대형 건물 옥상에 에어컨 수냉식 냉각탑 밑에 있는 수조에 유산균으로 발효된 삼나무톱밥을 물이 통하는 망자루에 담아 냉각탑 수조에 담가 놓으면 수조에 있는 세균 등을 사멸시키며 악취가 나지 않는다. 모든 대형 건물의 에어컨 수냉식 냉각탑 수조에 보면 세균이 번식하고 악취가 많이 나며 물이 아주 탁한 것을 볼수 있는데 상기한 방법을 사용하면 수조의 물의 수질 개선이 된다.

[0175] 그리고 가정집 목욕탕의 욕조나 바닥면 타일에 물때가 많이 끼는데 잘 지워지지 않는데 유산균 1 × 10⁷ cfu/g, 효모 1 × 10⁶ cfu/g인 분말을 100배액으로 물에 용해해서 목욕탕 욕조나 바닥 타일에 스프레이로 뿌리면 물때가 끼지 않아 항상 깨끗하게 유지가 되는데 매일 3~4회 뿌리면 된다.

표 9

소하천 수질 분석표

[0177]

	소하천 상류	상류로부터 4km 하류	상류로부터 8km 하류	실험수로에서 1km 상류	실험수로에서 200m 하류	실험수로에서 500m 하류
pH	6.3	7.2	7.6	7.9	7.2	7.1
TH	2 *	2 *	3.2 *	4.8 *	2.8 *	2 *
NH ₃	0.0ppm	0.2ppm	0.2ppm	0.23ppm	0.23ppm	0.0ppm
NO ₃	5mg/ℓ	11.5mg/ℓ	48.0mg/ℓ	48.0mg/ℓ	23.0mg/ℓ	23mg/ℓ
NO ₂	0.1mg이상	0.1mg이상	0.13mg이상	0.1mg이하	0.1mg이하	0.1mg이하
CO ₂	3 mg	3 mg	5 mg	8 mg	5 mg	3 mg
O ₂	12mgO ₂ /ℓ	12mgO ₂ /ℓ	7mgO ₂ /ℓ	4mgO ₂ /ℓ	10mgO ₂ /ℓ	710mgO ₂ /ℓ
COD ppm	2mgO/ℓ	3mgO/ℓ	3mgO/ℓ	5mgO/ℓ	2mgO/ℓ	2mgO/ℓ

- [0178] 수질 검사항목
- [0179] pH (산도) NH₃(암모니아농도) NO₂ (아초산) O₂(산소) TH(총경도)
- [0180] NO₃(초산염) CO₂(이산화탄소) COD(ppm)
- [0182] <시험예 12> 유산균 쌀의 제조 방법
- [0183] 상기 식물성 유산균 들연변이 균주를 쌀에 분무 살포함으로써 유산균 쌀을 제조할 수 있으며, 이러한 방법으로 제조된 유산균 쌀을 사용하여 밥을 지었을 때 식물성 유산균이 죽지 않고 유산균 쌀의 유산균수의 약 250배로 증식하였다.
- [0184] 본 발명에서 식물성 유산균 쌀의 배양배지는 전술한 배지를 사용하는 것이 아니라 음용수물에 콩가루, 쌀겨, 찹쌀을 사용하여 배양하였다. 구체적으로, 물 1리터에 콩가루 100~130g, 쌀겨 40~50g, 찹쌀 15~20g을 넣고 121℃로 멸균한 다음 식힌 후에 유산균과 효모균 접종원을 접종하고 39~42℃로 15~18시간 배양한 후에 배지를 완전히 걸러낸 후에 유산균 쌀 분무살포 유산균으로 사용하였다.
- [0185] 예를 들면, 유산균 배양을 10리터 할 경우에는 음용 지하수 3리터에 10리터 배지량을 넣고 121℃로 20분간 멸균한 후에 음용 지하수를 7리터를 보충하고 유산균·효모균 접종원 100~130ml를 접종한 후에 39~42℃로 15~18시간 배양하고 식혀서 배지를 걸러낸 후에 유산균쌀 분무액으로 사용하였다.
- [0186] 배지 원료로 찹쌀을 이용하는 이유는 찹쌀에는 메치오닌 성분이 다량 함유되어 있어 유산균이 메치오닌 성분을 이용하게 하기 위함이며, 음용 지하수를 보충하는 이유는 음용 지하수에는 다량의 미네랄 성분이 함유되어 있는데 고압으로 멸균하면 미네랄 성분이 파괴되어 유산균이 미네랄 성분을 이용할 수 없기 때문에 멸균 후 음용 지하수를 보충하고 배양하여 유산균이 각종 성분이 함유된 미네랄 성분을 충분히 이용하게 하기 위함이다.
- [0187] 유산균 쌀의 제조 방법은 도정이 완료되어 포장지에 넣기 직전에 분무장치로 도정된 쌀에 분무한 후에 포장지에 포장하게 되는데 유산균 분무 쌀은 보존기간이 길어지고 신선도를 유지하였다.
- [0188] 배양된 유산균수는 $2\sim4 \times 10^9$ cfu/g이고 효모균수는 $1\sim1.4 \times 10^9$ cfu/g이다. 1리터의 유산균으로 100 kg의 쌀에 분무살포한 후에 포장 마감하였다. 유산균 쌀로 밥을 지을 때는 물에 쌀을 넣고 손으로 박박 문지르지 않고 물에 쌀을 가볍게 걸러낸 후에 밥솥에 넣고 물을 맞춘다. 물에 유산균 쌀을 넣고 박박 문질러 씻으면 쌀에 붙어 있는 유산균이 떨어져 내려가 유산균수가 감소한다. 압력 밥솥에 유산균쌀로 밥을 지으면 유산균이 고온에도 죽지 않고 증식하여 유산균 쌀에 함유된 유산균수의 약 250배로 증식한다.
- [0189] 본 발명의 도 4 및 도 5는 본 발명의 식물성 유산균 락토바실러스 퍼멘텀(Lactobacillus fermentum) JS1 원말과 효모인 사카로마이세스 세레비지애(Saccharomyces cerevisiae) 원말을 함유한 쌀에 함유된 각 균주의 함량을 나타낸 시험성적서이다.
- [0191] 이상, 바람직한 실시예를 들어 본 발명을 상세하게 설명하였으나, 본 발명은 상기 실시예에 한정되는 것은 아니며, 본 발명의 기술적 사상의 범위내에서 당 분야에서 통상의 지식을 가진 자에 의하여 여러 가지 변형이 가능하다.

수탁번호

- [0193] 기탁기관명 : 한국미생물보존센터
- 수탁번호 : KCCM80171
- 수탁일자 : 20171026

도면

도면1

植物性乳酸菌の引渡書

日付：2016年2月11日

内容：韓国の崔正植に *Lactobacillus fermentum* 菌を引き渡す。

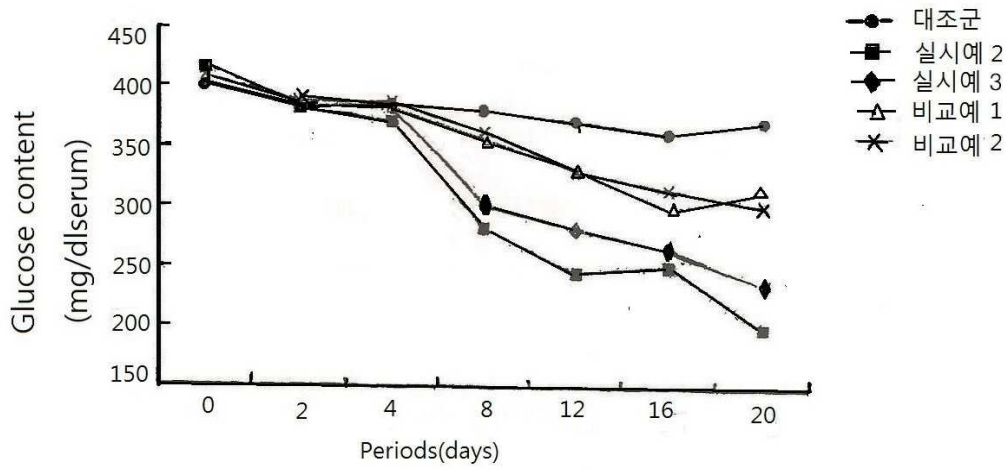
住所：日本長野縣長野市稻里町中氷鉤字上荒沢 435

協全商事株式會社代表 平森親男

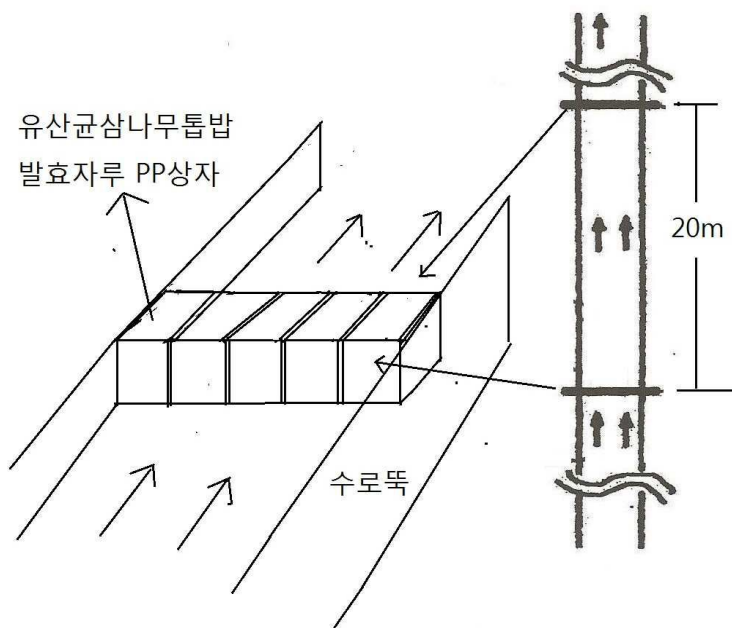
平森親男

CHIKAO HIRAMORI

도면2




도면3



도면4

제 20- 2- 01614 호		발급번호 : 제 R20200521- 005 호	
시 험 성 적 서			
검 체 명	유산균쌀		
제 품 유 형	기준규격외(식중독균)		
의뢰인 주소 및 성명	JSC Bio- tech 최정식	대 표 자	최정식
	경기도 용인시 처인구 백옥대로 1392번길 14- 1 B동 01호		
접 수 년 월 일	2020년 05월 12일	검사완료일	2020년 05월 21일
시 험 의뢰 목적	참고용		
귀하가 시험 의뢰한 결과 및 판정은 의뢰된 시험항목에 한하며 다음과 같습니다.			
결과 :			
시 험 항 목	규 격 기 준	결 과	항 목 판 정
유산균수	-	3500000/g	-
효모수	-	140/g	-
비고: 내부검사용			
<p>식품위생검사기관지정기준 제4호의 2 규정에 의하여 위와같이 검사성적서를 발급합니다.</p> <p>2020년 05월 21일</p> <p>계명대학교 전통미생물자원개발 및 산업화연구센터장</p> <p>대구지방식품의약품안전청 식품동 시험검사기관 제112호 대구지방식품의약품안전청 축산물 시험검사기관 제13호</p>			
<p>이 검사결과는 제출된 검체에 한하며 의뢰목적 이외의 상업적인 광고 및 법적인 해결수단으로 사용할 수 없습니다.</p>			

도면5

 계명대학교 전통미생물자원개발 및 산업화연구센터 <small>TRADITIONAL MICROORGANISM RESOURCES CENTER</small>		http://www.tmr.or.kr	
제 20-2-01615 호		발급번호 : 제 R20200521-006 호	
시 험 성 적 서			
검 체 명	유산균쌀밥		
제 품 유 형	기준규격외(식중독균)		
의뢰인 주소 및 성명	JSC Bio-tech 최정식	대 표 자	최정식
	경기도 용인시 처인구 백옥대로 1392번길 14-1 B동 01호		
접 수 년 월 일	2020년 05월 12일	검사완료일	2020년 05월 21일
시 험 의뢰 목 적	참고용		
귀하가 시험 의뢰한 결과 및 판정은 의뢰된 시험항목에 한하며 다음과 같습니다.			
결과 :			
시 험 항 목	규 격 기 준	결 과	항 목 판 정
유산균수	-	880000000/g	-
효모수	-	30/g	-
비고: 내부검사용			
<p>식품위생검사기관지정기준 제4호의 2 규정에 의하여 위와같이 검사성적서를 발급합니다.</p> <p>2020년 05월 21일</p> <p>계명대학교 전통미생물자원개발 및 산업화연구센터장</p> <p>대구지방식품의약품안전청 식품등 시험검사기관 제112호 대구지방식품의약품안전청 축산물 시험검사기관 제13호</p>			
<p>이 검사결과는 제출된 검체에 한하며 의뢰목적 이외의 상업적인 광고 및 법적인 해결수단으로 사용할 수 없습니다.</p>			

서 열 목 록

- <110> CHOI, Jung Sik
 CHOI, Byung Chul
 CHOI, Byung Sun
- <120> Mutant lactic acid bacterium strain having acid and heat
 resistance, and culturing composition comprising this strain as
 effective gredient
- <130> 2018TE-0012
- <160> 1
- <170> KopatentIn 2.0

<210> 1
 <211> 1510
 <212> DNA
 <213> Lactobacillus fermentum 16S rRNA
 <400> 1

ctgtcaggat gaacgccggc ggtgtgccta atacatgcaa gtcgaacgcg ttggtccaat 60
 tgattgatgg tgcttgacc tgattgattt tggtcgcaa cgagtggcgg acgggtgagt 120

aacacgtagg taacctgccc agaagcgggg gacaacattt ggaaacagat gctaataaccg 180
 cataacaacg ttgttcgat gaacaacgct taaaagatgg cttctcgcta tcacttctgg 240
 atggacctgc ggtgcattag cttgttggg ggtaatggcc taccaaggcg atgatgcata 300
 gccgagtga gagactgac gccacaatg ggactgagac acggcccata ctctacggg 360
 aggcagcagt agggaatctt ccacaatggg cgcaagcctg atggagcaac accgcgtgag 420
 tgaagaaggg ttcggctcg taaagctctg ttgttaaaga agaacacgta tgagagtaac 480
 tgttcatacg ttgacggtat ttaaccagaa agtcacggct aactacgtgc cagcagccgc 540

ggtaatacgt aggtggcaag cgttatccgg atttattggg cgtaaagaga gtcagggcgg 600
 ttttctaagt ctgatgtgaa agccttcggc ttaaccggag aagtgcacg gaaactggat 660
 aacttgagtg cagaagagg tagtggaact ccatgtgtag cggtggaatg ctagatata 720
 tgaagaaca ccagtggcga aggcggctac ctggtctgca actgacgctg agactcgaaa 780
 gcatgggtag cgaacaggat tagatacct ggtagtccat gccgtaaac atgagtgcta 840
 ggtgttggag ggttccgcc cttcagtgcc ggagctaacg cattaagcac tccgcctggg 900
 gagtacgacc gcaaggttga aactcaaagg aattgacggg ggcccgcaca agcgggtggag 960

catgtggttt aattcgaagc tacgcgaaga accttaccag gtcttgacat cttgcgcaa 1020
 ccctagatag agggcgttc cttcgggaac gcaatgacag gtggtgcatg gtcgtcgtca 1080
 gctcgtgctg tgagatgttg ggttaagtcc cgcaacgagc gcaaccctg ttactagtgg 1140
 ccagcattaa gtggggcact ctagtgagac tgccggtgac aaaccggagg aaggtgggga 1200
 cgacgtcaga tcatcatgcc cttatgacc tggctacac acgtgctaca atggacgta 1260
 caacgagtgc cgaactcgg agggcaagca aatctcttaa aaccgttctc agttcggact 1320
 gcaggctgca actcgcctgc acgaagtcgg aatcgctagt aatcgcgat cagcatgccg 1380

cggtgaatac gttcccgggc cttgtacaca cgccccgta caccatgaga gtttgaaca 1440
 ccaaagtgc gtgggtaac ctttaggag ccagccct aaggtgggac agatgattag 1500
 ggtgaagtct 1510