



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2009년05월19일
(11) 등록번호 10-0898491
(24) 등록일자 2009년05월12일

(51) Int. Cl.
C12N 1/20 (2006.01) C12N 1/00 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2007-0101904
(22) 출원일자 2007년10월10일
심사청구일자 2007년10월10일
(65) 공개번호 10-2009-0036716
(43) 공개일자 2009년04월15일
(56) 선행기술조사문헌
KR1020010072440 A*
W00009080 A1
KR1020020033643 A
US20040235291 A1
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
주식회사한국야쿠르트
서울 서초구 잠원동 28-10
(72) 발명자
허철성
충남 천안시 신부동 545 대림한들아파트 203동 1303호
이정준
경기 수원시 팔달구 인계동 선경아파트 305-032
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
최익하

전체 청구항 수 : 총 3 항

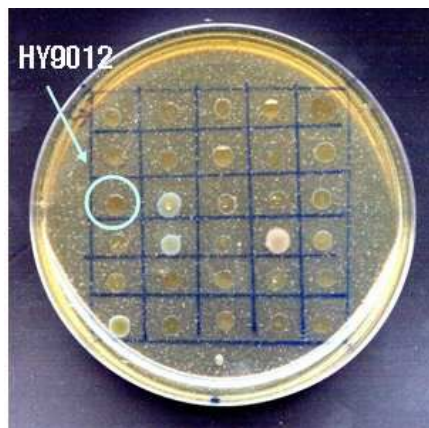
심사관 : 김명희

(54) 사람의 구강 충치균에 저해능이 있는 스트렙토코커스써머필러스 에이취와이9012 및 이를 이용한 식품

(57) 요약

본 발명은 유기산 생성이 우수하여 발효유제품의 향취를 나타내면서 충치균(*Streptococcus mutans*)에 대한 성장 억제 및 살해효능, 글루칸 합성효소(Glycosyltransferase: GTase) 저해 및 치아표면의 부착억제의 효능이 우수하고 성장속도가 빠른 신규 스트렙토코커스 써머필러스(*Streptococcus thermophilus*) HY9012 및 이를 이용한 식품에 관한 것으로서, 본 발명에 따른 스트렙토코커스 써머필러스(*Streptococcus thermophilus*) HY9012 균주는 전통적인 발효유에서 분리한 것이기 때문에 인체의 장내에서 장내균총과 문제를 일으키지 않으며 구강내에서 충치 원인균인 뮤탄스균의 성장억제 및 살해효능, 글루칸합성효소 저해, 치아표면의 부착억제의 효능이 우수하여 구강내의 충치균에 대한 유효한 활성을 나타내어 충치를 억제하여 어린이 및 성인의 구강건강에 도움을 줄 수 있는 신규주로서 발효식품 등에 다양하게 이용할 수 있다.

대표도 - 도4



(72) 발명자

임광세

경기 수원시 영통구 망포동 LG자이아파트 302동
901호

이정철

서울 성동구 금호동3가 두산아파트 112-1202

배진성

경기 성남시 분당구 이매동100
이매촌삼성아파트1005-201

특허청구의 범위

청구항 1

삭제

청구항 2

삭제

청구항 3

구강 미생물인 스트렙토코커스 뮤탄스(*Streptococcus mutans*)의 글루칸 합성효소(Glycosyltransferase)의 활성을 저하시켜 치태형성을 억제시키는 것을 특징으로 하는 스트렙토코커스 써머필러스 HY9012(*Streptococcus thermophilus* HY9012, 기탁번호:KACC 91308P).

청구항 4

삭제

청구항 5

제3항의 스트렙토코커스 써머필러스 HY9012(*Streptococcus thermophilus* HY9012)를 이용하여 제조된 구강건강에 효능을 가지는 식품.

청구항 6

제5항에 있어서,

상기 식품은 우유, 분유, 아이스크림, 발효유, 건강보조식품 중 어느 하나임을 특징으로 하는 구강건강에 효능을 가지는 식품.

명세서

발명의 상세한 설명

기술분야

<1> 본 발명은 신규 스트렙토코커스 써머필러스(*Streptococcus thermophilus*) 균주 및 이를 이용한 식품에 관한 것으로서, 보다 상세하게는 유기산 생성이 우수하여 발효유제품의 향취를 나타내면서 충치균(*Streptococcus mutans*)에 대한 성장억제 및 살해효능, 글루칸 합성효소(Glycosyltransferase: GTase) 저해 및 치아표면의 부착억제의 효능이 우수하고 성장속도가 빠른 스트렙토코커스 써머필러스(*Streptococcus thermophilus*) HY9012 및 이를 이용한 식품에 관한 것이다.

배경기술

<2> 21세기에 인간이 가지고 있는 질병 가운데 가장 많은 수의 사람이 고통 받고 있으며 가장 높은 의료비용을 창출하는 것은 구강관련 질환이다. 그중에서도 높은 치료비용 및 보정비용을 지불하는 것은 충치와 관련된 부분이다. 보건복지부의 2004년도 건강백서에 의하면 국내에서 치과와 관련하여 지출된 비용은 약 1258억원으로 매우 높은 비율을 차지하고 있다. 이러한 충치의 발생은 주로 지나치게 많은 양의 발효성 탄수화물을 섭취하고 나이에 적합한 구강관리가 미흡하기 때문에 발생하는 것으로 나타나고 있다. 즉, 식품회사의 개발기술의 발달로 소비자의 입맛을 자극하는 제품이 계속 출시되어 이러한 제품으로 인해 발생하는 치태의 제거 및 충치의 치료가 적절하게 이루어지지 않아 국내에서의 충치발생율과 관련비용은 계속적으로 증가하고 있다.

<3> 유산균은 동물의 장 및 자연적으로 생성된 발효 제품에 분포하여 유해 미생물 성장의 억제, 이상 발효의 치료, 장관 세포벽 자극을 통한 장 운동성 증진, 면역 기능의 증진 등의 효과를 나타내며, 항암 작용도 있는 것으로 보고되고 있다. 이러한 유산균을 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. delbruckii*

subsp. *bulgaricus*), 스트렙토코커스 써머필러스(*Str. thermophilus*) 등이 있다.

- <4> 유산균의 인체 주요 유용효과는 소화기관을 통과하는 과정에서 생존하여 소장내 정착한 뒤 풍부한 유기산을 생성하여 장내 유해세균들을 억제하고 장관세포벽을 자극하여 연동운동의 촉진, 면역물질의 생산촉진 등을 통하여 그 효과를 나타내었다. 그러나 유산균이 가지고 있는 특성 중에는 소화기관이외의 기관에서 다른 세균의 생물학적 활성을 억제함으로써 그 기능을 발휘하는 것을 볼 수 있다. 그 가장 대표적인 예로서는 염증을 유발하는 피부 오염균에 대한 활성, 여성 질내의 산성조건을 유지시키는 특성 등이 있다. 그러나 이 외에 유산균을 이용한 발효유 제품을 이용하여 충치환자나 일반인을 대상으로 일정기간 섭취시켰을 때 구강내의 충치균 수준의 변화를 측정하는 등 많은 연구가 진행되고 있다. 그러나 이러한 연구는 발효유 제품이나 유산균을 이용하여 구강내 스트렙토코커스의 존재 수준이 감소되는 것을 확인하는 것에 그쳤을 뿐 실질적인 억제 메커니즘을 규명하지는 못하였기 때문에 이러한 특성의 유산균을 분리, 개발하고 이를 규명하려는 노력이 다각도로 시도되고 있다.
- <5> 한편, 국내외적으로 유산균을 이용하였을 때 장의 건강에는 도움이 되는 변비, 설사, 소화연동작용의 증가 등은 인정되고 있으나 발효유에 사용되는 유산균을 이용하여 많은 비용을 지불하고 있는 의료분야의 개선에 대하여 인정하고 있지 않다. 그러나 이탈리아, 영국, 미국, 터키와 같은 국가에서는 다양한 연구자들이 어린이의 당류 섭취와 충치발생의 상관관계를 연구하고 있으며 이와 동시에 발효유를 단기간 또는 장기간 섭취하였을 때 구강세균총의 변화를 확인하고 충치균인 무탄스균의 수준변화를 관찰하여 많은 보고서들이 제시되고 있다.
- <6> 이러한 전차로 분리된 유산균이 구강 미생물 중에서 충치를 일으키는 스트렙토코커스 무탄스(*Streptococcus mutans*) 균에 유용한 기능을 하기 위해서는 상술한 항균활성, 성장억제, 글루칸합성효소 활성억제, 과산화수소의 생성, 법랑질 부착억제 등의 효능을 나타내면서 다른 구강 미생물에 영향을 미치지 않는 특성을 가져야만 사람의 충치균에 소기의 효과를 얻을 수 있으므로 이러한 특성을 가진 유산균을 개발하는 것이 요구되고 있다.
- <7> 이에 본 발명자들은 구강 미생물의 균총 및 장내 균총의 특성에 영향을 미치지 않아야 하는 특이성을 고려하여, 전통적인 유산균 발효제품으로부터 유산균을 분리함으로써, 상기한 숙주 특이성의 관계에서 유산균의 유용한 효과를 극대화할 수 있게 하여야 한다는 점을 고려하여 한국인의 생리에 맞는 발효제품을 제조하는데 적합한 균주를 분리하고자 하여 유산균을 분리하여 시험하던 중 구강미생물 중에서 충치 원인균인 스트렙토코커스 무탄스(*Streptococcus mutans*)균에 특이적인 효능을 나타내며 우유내에서 성장속도가 빠른 새로운 유산균을 분리하는데 성공하여 본 발명을 완성하게 되었다.

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

- <8> 본 발명은 구강 충치균(*Streptococcus mutans*)에 대한 항균활성이 우수하며 글루칸 합성효소의 활성을 억제하고 세균의 성장억제에 효능이 뛰어난 새로운 스트렙토코커스 써머필러스(*Streptococcus thermophilus*) HY9012를 제공하는 것을 목적으로 한다.
- <9> 또한 본 발명은 스트렙토코커스 써머필러스(*S. thermophilus*) HY9012를 이용하여 제조된 구강건강에 효능을 가지는 우유, 분유, 아이스크림, 발효유, 건강보조식품을 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제 해결수단

- <10> 상기의 목적을 달성하기 위하여 본 발명에 의하면 사람의 구강에 존재하는 충치원인균 스트렙토코커스 무탄스(*S. mutans*)에 대하여 항균활성, 글루칸 합성효소 활성억제, 치아 법랑질의 부착 억제 및 세포살해효과가 있는 과산화수소의 생성능이 우수한 스트렙토코커스 써머필러스(*Streptococcus thermophilus*) HY9012 및 이를 이용하여 제조된 우유, 분유, 아이스크림, 발효유, 건강보조식품을 제공하는 것을 특징으로 한다.
- <11> 이하 본 발명에 따른 신규주 스트렙토코커스 써머필러스(*Streptococcus thermophilus*) HY9012 균주의 분리, 동정, 균학적 성질 및 용도에 대해 자세히 설명한다.
- <12> 스트렙토코커스 써머필러스(*Streptococcus thermophilus*) HY9012 균주의 분리
- <13> 본 발명에 따른 균주를 분리하기 위하여 국외에서 제조된 다양한 전통 발효유 제품을 엠17(M17) 락토오스 배지에 넣고 24시간 배양하였다. 배양 후 백금이를 사용하여 배양액을 취하고 다시 엠17 락토오스 한천 평판배지에 도말하고 37℃에서 48시간동안 배양하였다. 형성된 균락을 순수 분리하여 스트렙토코커스 무탄스(*Streptococcus mutans*)가 도말된 연성 한천배지에 적하하여 항균활성을 시험하여 본 발명의 균주를 분리하였다.

<14> 스트렙토코커스 써머필러스(*Streptococcus thermophilus*) HY9012 균주의 동정

<15> 본 발명에 따른 신균주의 특성은 다음과 같다.

<16> 1) 균의 형태

<17> 엠17(M17)-락토오스 한천평판배지에서 37℃, 1일간 배양했을 때 균의 형태

<18> ① 세포의 형태: 구균

<19> ② 운동성: 없음

<20> ③ 포자형성능: 없음

<21> ④ 그람(Gram) 염색: 양성

<22> 2) 균총의 형태

<23> 엠17(M17)-락토오스 한천평판배지에서 37℃, 1일간 배양했을 때 균총의 형태

<24> ① 형상: 원형

<25> ② 용기: 볼록

<26> ③ 표면: 거침(rough)

<27> 3) 생리적 성질

<28> ① 생육온도: 성장가능 생육온도 25 ~ 45℃

<29> 최적 생장온도 37 ~ 40℃

<30> ② 생육 pH: 성장가능 생육 pH 4.0 ~ 7.5

<31> 최적 pH 6.0 ~ 6.5

<32> ③ 산소에 대한 영향: 통성혐기성

<33> 4) 카탈라제: -

<34> 5) 가스형성여부: -

<35> 6) 15℃에서 생육: -

<36> 7) 45℃에서 생육: +

<37> 8) 인돌생산: -

<38> 9) 젖산생산: +

<39> 10) Bergey's manual의 당 발효 시험

반응기질	결과
Pyruvate	+
Hippurate	-
Esculin	+
Pyrrolidonyl 2 naphthlyamide	-
6-Bromo-2-naphthyl α-D-galactopyranoside	-
Naphthol AS-BI β-D-glucuronate	-
2-naphthly-β-D-galactopyranoside	+
2-naphthyl phosphate	-
L-leucine-2-naphthylamide	+
Arginine	-
Ribose	-
L-Arabinose	-

Mannitol	-
Sorbitol	-
Lactose	+
Trehalose	+
Inulin	+
Raffinose	+
Starch	+
Glycogen	-

<41> 이와 같은 균의 형태학적, 생리적 및 성장 특성에 근거하여 본 발명의 균주는 스트렙토코커스 써머필러스 (*Streptococcus thermophilus*)로 동정하였고, 본 발명자들은 이를 스트렙토코커스 써머필러스 HY9012(*Streptococcus thermophilus* HY9012)로 명명하고, 2007년 04월 24일자로 한국농업미생물자원센터에 기탁하였다(기탁번호: KACC 91308P).

<42> 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 충치균의 활성저하, 글루칸 합성효소 활성억제, 치아법랑질의 부착억제가 기대되므로 발효유제품, 분말형태의 건강보조식품 등으로 사용될 수 있는 것이다. 특히 널리 식용되는 요구르트나 치즈 등의 발효식품을 본 발명의 균주를 사용하여 제조할 수 있다.

효 과

<43> 본 발명에 따른 스트렙토코커스 써머필러스(*Streptococcus thermophilus*) HY9012 균주는 전통적인 발효유에서 분리한 것이기 때문에 인체의 장내에서 장내균총과 문제를 일으키지 않으며 구강내에서 충치원인균인 뮤탄스균의 성장억제 및 살해효능, 글루칸합성효소 저해, 치아표면의 부착억제의 효능이 우수하여 구강내의 충치균에 대한 유효한 활성을 나타내어 충치를 억제하여 어린이 및 성인의 구강건강에 도움을 줄 수 있는 신균주로서 발효식품 등에 다양하게 이용할 수 있다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

<44> 이하 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 설명하기 위한 것으로서 본 발명의 범위가 이들 실시예에 국한되는 것은 아니다.

<45> <실시예 1>

<46> 스트렙토코커스 써머필러스(*Streptococcus thermophilus*) HY9012을 이용한 발효유의 제조

<47> 세균수 1등급의 원유를 UHT(130~135℃/2~3초)로 살균하여 80~40중량%로 배합하고 탈지분유 2~5중량%, 자일리톨, 말티톨, 솔비톨, 올리고당, 설탕 또는 액상과당을 8~10중량%로 첨가하고 제품의 기호도에 따라 딸기향, 커피향, 바나나향을 0.5~1.0중량%로 첨가한 가공유를 제조하였다.

<48> 각 단계별 제조법은 다음과 같다. 상기 준비된 살균유에 동결건조형으로 준비된 항 뮤탄스 항균활성의 유산균 *S. thermophilus* HY9012를 $2 \sim 5 \times 10^6$ cfu/ml로 첨가하였다. 유산균을 첨가한 후 항온조에서 37℃, 24시간동안 배양하였으며 배양액이 pH 4.5, 산도(%) 0.85에 도달하였을 경우 배양을 종료시켰다. 배양을 종료시킨 뒤 10℃이하로 냉각한 뒤 잘 혼합하여 균질기(AlphaLaval, 네덜란드)를 이용하여 150~200mBar로 균질하였다. 균질한 유성분으로 균질화된 배양액에 당류 및 향료를 최종제품에 함유되도록 준비된 시럽을 혼합하여 제품을 준비하였다. 완성된 제품의 이화화학적 특성은 pH 5.2, TA 0.65, Brix 18, 유산균 4.0×10^8 cfu/ml 이상이었다. 제조된 제품의 항 뮤탄스균 활성을 확인하기 위하여 *S. mutans* MT8148을 유산균과 동일한 수준으로 첨가하고 37℃에서 30~60분 동안 반응시켰다. 제조된 제품안에서 *S. mutans* MT8148의 생균수를 MSBT agar(Mitis-Salivarius agar + 1% tellurite(0.1%), 0.3unit Bacitracin/ml)에서 2일간 배양하여 확인하였다. 그 결과, 첨가된 *S. mutans* MT8148의 생균수가 1.5×10^5 cfu/ml에서 2.2×10^2 cfu/ml로 감소하였다. 우유류나 아이스크림류에 비하여 발효유류에서 높은 항 뮤탄스균 활성을 나타내는 이유는 우유류나 아이스크림류와 달리 발효유류는 12~48시간의 배양시간이 존재하므로 이 기간 동안 유산균에서 과산화수소가 충분히 생산되어 보다 높은 항균활성을 보이는 것으로 판단된다.

- <49> <실시예 2>
- <50> 스트렙토코커스 써머필러스(*Streptococcus thermophilus*) HY9012를 이용한 우유의 제조
- <51> 세균수 1등급의 원유를 UHT(130~135℃/2~3초)로 살균하여 80~40중량%로 배합하고 자일리톨, 말티톨, 솔비톨, 올리고당, 설탕 또는 액상과당을 8~10중량%로 첨가하고 제품의 기호도에 따라 딸기향, 커피향, 바나나향을 0.5~1.0중량%로 첨가한 가공유를 제조하였다. 또한 원유 100%의 시유를 제조하였다. 준비된 가공유 또는 백색시유에 동결건조형으로 준비된 향 뮤탄스 항균활성의 유산균 *S. thermophilus* HY9012를 $2\sim5\times 10^5$ cfu/ml로 첨가하였다. 향 뮤탄스 항균활성을 가진 유산균 *S. thermophilus* HY9012가 첨가된 우유의 안정성을 확인하기 위하여 10℃에서 10일 동안 관능변화, 유산균수 변화 및 항균활성 변화를 확인하였다. 유통기한 기간 중에 유산균수의 변화는 동일한 수준에서 유지되었으나 상온(20℃)에 노출된 제품의 경우에는 유산균수가 1.6×10^5 cfu/ml에서 3.6×10^6 cfu/ml로 상승하였다.
- <52> 또한 제조된 제품의 향 뮤탄스균 활성을 확인하기 위하여 *S. mutans* MT8148을 유산균과 동일한 수준으로 첨가하고 37℃에서 30~60분 동안 반응시켰다. 제조된 제품안에서 *S. mutans* MT8148의 생균수를 MSBT agar(Mitis-Salivarius agar + 1% tellurite(0.1%), 0.3unit Bacitracin/ml)에서 2일간 배양하여 확인하였다.
- <53> 시험결과 첨가된 *S. mutans* MT8148의 생균수가 1.5×10^5 cfu/ml에서 8.4×10^3 cfu/ml로 감소하였음을 알 수 있었다.
- <54> <실시예 3>
- <55> 스트렙토코커스 써머필러스(*Streptococcus thermophilus*) HY9012를 이용한 아이스크림의 제조
- <56> 세균수 1등급의 원유를 UHT(130~135℃/2~3초)로 살균하여 20~30중량%로 배합하고 설탕 8~10중량%, 변성전분 1~2중량%, CMC(Carboxyl methyl cellulose) 0.5~1.0중량%, 합성착색료 및 합성착향료 0.5~1.0중량%, 펙틴계열의 안정제 0.1~0.5중량% 등을 첨가하여 50g 단위의 아이스크림 콘 베이스를 준비하고 동결건조형으로 준비된 향 뮤탄스 항균활성의 유산균 *S. thermophilus* HY9012를 아이스크림 콘 한 개당 5.0×10^5 cfu/ml 수준으로 첨가되도록 하였다. 제품의 모양을 만들기 위하여 Aerator에서 약 60~75%까지 오버런(Over-run)을 시켜 사출시킨 뒤 -30℃ 냉동고에 급랭 시켰다.
- <57> 이렇게 제조된 아이스크림의 향 뮤탄스균 활성을 확인하기 위하여 제조된 아이스크림 10g을 취하여 해동시킨 후 *S. mutans* MT8148을 유산균과 동일한 수준으로 첨가하고 37℃에서 30~60분 동안 반응시켰다. 제조된 아이스크림 안에서 *S. mutans* MT8148의 생균수를 MSBT agar(Mitis-Salivarius agar + 1% tellurite(0.1%), 0.3unit Bacitracin/ml)에서 2일간 배양하여 확인하였다.
- <58> 그 결과, 첨가된 *S. mutans* MT8148의 생균수가 2.2×10^5 cfu/ml에서 9.8×10^4 cfu/ml로 감소하였다. 상기 실시예 2의 우유와 비교하여 항균활성이 낮게 나타난 이유는 급랭과정과 15일 동안의 냉동저장 기간 후에 해동시켰을 때 유산균의 생리활성이 회복되는데 시간이 부족하였을 것으로 판단된다. 그러나 유산균이 함유된 아이스크림을 상온에서 30분 정도 정치시켰다가 뮤탄스 균과 반응시켰을 때는 상기 실시예 2의 우유의 시험결과와 유사한 항균활성을 나타내었음을 알 수 있었다.
- <59> <실시예 4>
- <60> 스트렙토코커스 써머필러스(*Streptococcus thermophilus*) HY9012를 이용한 분유의 제조
- <61> 세균수 1등급의 원유를 UHT(130~135℃/2~3초)로 살균하여 30~40중량%로 배합하고 탈지분유 2~4중량%, 비타민류(B1, B6, B12, E, A)를 국민영양권장량의 소아기준으로 일일권장량의 40%, 유지류, 곡류분말, 견과류분말 등을 첨가하여 분유를 제조하였다.
- <62> 사입유에 동결건조형으로 준비된 향 뮤탄스 항균활성의 유산균 *S. thermophilus* HY9012를 $2\sim5\times 10^6$ cfu/ml로 첨가하였다. 유산균을 첨가한 후 바란스탱크에서 10℃이하로 1~2시간동안 혼합하여 유산균이 고르게 분산되도록 하였다. 준비된 사입유는 40℃로 예열하여 LTLT(60~68℃, 1~3분) 살균법으로 살균하였다. 살균된 분유액을 분무 건조기에서 115℃/82℃(in-let/out-let)서 건조시킨 뒤 100 mesh로 채질하고 공기함유량이 10~15%로 제조되었을 때 가장 안전하고 분유의 품질을 유지할 수 있었다.
- <63> 제품으로 성형시킨 분유 10g을 멸균증류수에 현탁시킨 뒤 *S. mutans* MT8148을 유산균과 동일한 수준으로 첨가하

고 37℃에서 30~60분 동안 반응시켰다. 제조된 제품안에서 *S. mutans* MT8148의 생균수를 MSBT agar(Mitis-Salivarius agar + 1% tellurite(0.1%), 0.3unit Bacitracin/ml)에서 2일간 배양하여 확인하였다.

<64> 그 결과, 첨가된 *S. mutans* MT8148의 생균수가 1.5×10^5 cfu/ml에서 8.6×10^4 cfu/ml로 감소하였다. 이와 같이 분유류에서 낮은 항균활성을 보이는 이유는 분무건조 과정에서 순간적으로 높은 온도에 노출되고 수분 이탈현상으로 유산균 세포막에 악영향을 주어 희석액에 환원시켰을 때 낮은 활성을 나타내는 것으로 판단된다.

<65> <실시예 5>

<66> 스트렙토코커스 써머필러스(*Streptococcus thermophilus*) HY9012를 이용한 건강보조식품의 제조

<67> 과립형 건강보조식품의 제조

<68> 실시예 1의 방법으로 제조된 발효유를 적당량 소분하여 -80℃이하의 급속동결기에서 48시간 동결 후 냉장상태(10℃ 이하)를 유지할 수 있는 진공건조기에서 72시간 동결건조를 실시하여 얻어진 고형물을 분쇄한 후 100 mesh의 거름채로 채질하였다. 이 분쇄물을 말토덱스트린과 같은 부형제와 3:1의 중량비율 또는 2:1의 중량비율로 V믹서를 이용하여 고르게 혼합하여 과립형태의 건강보조식품을 제조하였다.

<69> 정제형 건강보조식품의 제조

<70> 상기 실시예5의 과립형 건강보조식품을 타정기에서 찍어내는 방법으로 성형하여 정제형의 정제형태의 건강보조식품을 제조하였다.

<71> 이하의 시험예에서 사용된 엠17(M17) 배지 및 엠17(M17) 한천 평판배지의 조성은 각각 다음 표1 및 표2와 같다.

표 1

<72> 엠17(엠17(M17)) 배지의 조성

Pancreatic digest of casein	5.0g
Soy peptone	5.0g
Beef extract	5.0g
Yeast extract	2.5g
Ascorbic acid	0.5g
Magnesium sulfate	0.25g
Disodium β-glycerophosphate	19.0g
증류수	950 ml

표 2

<73> 엠17(엠17(M17)) 한천 평판배지

엠17(엠17(M17)) 배지	100ml
한천	1.5g

<74> <시험예 1>

<75> 스트렙토코커스 써머필러스(*Streptococcus thermophilus*) HY9012의 구강 충치균(*Streptococcus mutans*)에 대한 항균활성측정

<76> 엠17(M17) 액상배지에 글루코스(glucose)를 5% 첨가하여 엠17(M17)-glucose 배지를 제조하였다. 제조된 엠17(M17)-glucose 액상배지에 *S. mutans* MT8148을 접종하여 37℃에서 12시간동안 배양하였다. 배양된 *S. mutans* MT8148을 엠17(M17)-sucrose agar(agar 1.0%)에 100μl 현탁하여 잘 혼합시킨 뒤 엠17(M17) agar에 중첩하였다. 중첩된 엠17(M17)-sucrose agar가 완전히 경화된 뒤에 유산균 배양액을 약 10μl씩 적하하였다. 적하된 유산균 배양액이 흐르지 않도록 완전히 흡수될 때까지 건조시킨 후 37℃에서 2일간 배양하였다. 배양을 완료시킨 뒤 *S. mutans* MT8148이 형성한 microbial lawn에서 항균활성을 나타내는 유산균을 도1에 나타내었다.

<77> 도 1에서 확인할 수 있는 바와 같이, 본 발명의 스트렙토코커스 써머필러스(*Streptococcus thermophilus*)

HY9012에서는 *S. mutans* MT8148의 성장억제환을 확인할 수 있는데 반하여 HY9014 및 HY9055(본 발명의 HY9012와 같은 방법으로 분리된 균주임)에서는 *S. mutans* MT8148의 성장억제환을 확인할 수 없었다.

<78> 또한, 항 뮤탄스 항균활성의 유산균 *S. thermophilus* HY9012를 엠17(M17)-글루코스 액체배지에 1.0×10^6 cfu/ml로 첨가하고 이에 대한 지시균인 *S. mutans* MT8148을 동일한 수준인 1.0×10^6 cfu/ml로 첨가하였다. 37°C에서 30분 동안 반응시킨 후 균일하게 혼합시키고 멸균희석액을 이용하여 희석하였다. *S. thermophilus* HY9012에 의한 *S. mutans* MT8148의 항균활성(성장억제효과)을 확인하기 위하여 희석액을 MSBT agar(Mitis-Salivarius agar + 1% tellurite(0.1%), 0.3unit Bacitracin/ml)에서 2일간 배양하여 확인하였다. 그 결과, 첨가된 *S. mutans* MT8148의 생균수가 1.0×10^6 cfu/ml에서 4.5×10^2 cfu/ml로 감소하였다.

<79> <시험예 2>

<80> 스트렙토코커스 써머필러스(*Streptococcus thermophilus*) HY9012의 구강 충치균 글루칸 합성효소 활성억제 측정

<81> 가. *S. mutans* MT8148로부터 글루칸 중합효소(Glycosyltransferase: GTase)의 분리 및 활성확인

<82> 엠17(M17) 액상배지에 5% glucose를 함유시킨 엠17(M17)-glucose 배지 1 l에 *S. mutans* MT8148을 접종시켜 37°C에서 12시간 동안 배양하였다. 배양이 완료된 배양액을 5,000rpm에서 30분 동안 원심분리하여 균체를 회수하고 8M Urea에 현탁하였다. 현탁시킨 균체액을 4°C에서 1시간 정치시킨 뒤 다시 원심분리하여 상등액을 회수하였다. 회수된 상등액을 0.05M phosphate buffer에서 24시간 동안 투석하였다. 회수된 용액에는 *S. mutans* MT8148이 가지고 있는 글루칸 중합효소(crude GTase)를 함유하고 있다. 글루칸 중합효소(Glycosyltransferase: GTase)의 활성을 확인하기 위하여 먼저 Bradford법으로 단백질 함량을 정량하였다. 정량된 crude GTase의 활성을 확인하기 위하여 1.25% sucrose 용액 800μl, crude GTase 125μl(100μg)를 첨가하고 멸균된 증류수로 3ml로 맞추었다. 준비된 반응액을 37°C에서 16시간동안 정치시켜 불용성 글루칸을 합성하였다. 합성된 불용성 글루칸의 양은 비색정량(phenol-sulfuric method)하여 활성을 확인하였다. 그 결과를 도 2에 나타내었다.

<83> 시험구 A(*S. mutans* MT8148 생성 crude GTase + 멸균 증류수 100μl)는 *S. mutans* MT8148에 의해 생성된 crude GTase의 기질과의 반응 정도를 비교하기 위한 대조군이며, 시험구 B(*S. mutans* MT8148 생성 crude GTase + *S. thermophilus* HY9012 배양액 100μl), 시험구 C(*S. mutans* MT8148 + *S. thermophilus* HY9029 배양액 100μl), 시험구 D(*S. mutans* MT8148 + *S. thermophilus* HY9039 배양액 100μl), 시험구 E(*S. mutans* MT8148 + *S. thermophilus* HY9010 배양액 100μl)는 실험군이다.

<84> 도 2에서 확인할 수 있는 바와 같이, 상기 실험군은 crude GTase와 상기 각각의 *S. thermophilus*(본 발명의 HY9012와 같은 방법으로 분리된 균주임)의 배양액을 혼합 하였을 때 crude GTase의 기질과의 반응을 억제하는 정도를 흡광도로 측정하기 직전의 사진으로 밝은 색일 수록 crude GTase의 활성억제효과가 높은 것으로 판명한다. 따라서, 본 발명 균주인 *S. thermophilus* HY9012가 존재하는 시험구 B가 다른 시험구 C, D, E에 비하여 밝은색을 띠고 있어 crude GTase의 활성억제효과가 가장 높음을 알 수 있었다.

<85> 나. 분리된 crude GTase에 대한 유산균의 활성억제

<86> 활성이 확인된 crude GTase에 대한 유산균 배양액의 활성억제 효과를 확인하기 위하여 다음과 같이 실시하였다. 멸균된 튜브에 crude GTase 용액을 125μl 첨가하고 유산균 배양액을 100μl, 기질용액(1.25% sucrose)을 첨가하고 멸균된 증류수로 3ml로 조정하였다. 준비된 용액을 37°C에서 1시간, 3시간, 6시간동안 배양한 뒤 반응액을 80°C에서 5분간 정치하여 효소활성을 불활화 시켰다. 생성된 불용성 글루칸을 분리하기 위하여 3,000rpm에서 20분간 원심분리하여 상등액을 버리고 멸균된 증류수로 2회 세척하였다. 원심 분리하여 얻어진 불용성 글루칸에 5% 페놀 용액 1ml을 첨가하여 혼합한 뒤 황산용액을 5ml 첨가하여 흡광도(490nm)를 측정하였다. 그 결과를 도 3에 나타내었다.

<87> 시험구 A(*S. mutans* MT8148 생성 crude GTase + 멸균 증류수 100μl)는 *S. mutans* MT8148에 의해 생성된 crude GTase에 대한 유산균 배양액의 활성억제 효과를 비교하기 위한 대조군이며, 시험구 B(*S. mutans* MT8148 생성 crude GTase + *S. thermophilus* HY9012 배양액 100μl), 시험구 C(*S. mutans* MT8148 + *S. thermophilus* HY9014 배양액 100μl), 시험구 D(*S. mutans* MT8148 + *S. thermophilus* HY9055 배양액 100μl)는 실험군이다.

<88> 도 3에서 확인할 수 있는 바와 같이, *S. thermophilus* HY9012가 불용성 글루칸의 생성을 대조군(*S. mutans* MT8148)에 비하여 절반이하의 수준으로 낮추는 것을 확인할 수 있었다.

<89> <시험예 3>

<90> 스트렙토코커스 써머필러스(*Streptococcus thermophilus*) HY9012의 세포살해 효과가 있는 과산화수소 생성 측정

<91> 충치균에 대한 항균활성이 확인된 유산균의 세포살해기전을 확인하기 위하여 다음과 같이 유산균의 과산화수소 생성여부를 확인하였다. 엠17(M17)-락토오스가 함유된 액체배지에 박토아가(Bacto agar)를 1.5% 함유시키고 제조된 한천배지를 40℃까지 냉각시켜 효소의 불활화를 막고 여기에 과산화수소에 대한 기질성분으로 TMB(trimethylbenzidine) 25mg, Hemin 1ml, HRP(Horse Radish Peroxidase) 2mg를 각각 100ml 기준으로 첨가하여 상온에서 경화시켰다. 경화된 TMB agar에 12% 멸균 탈지분유에서 12시간 동안 배양한 유산균 배양액을 각각 10 μ l씩 적하하였다. 유산균 배양액을 적하시킨 뒤 흐름현상을 막기 위하여 크린벤치에서 10분 동안 송풍건조시켰다. 건조된 한천배지를 37℃에서 2~3일 동안 배양한 뒤 유산균에 의해 생성된 과산화수소의 양에 따라 TMB 기질성분이 발색된 여부를 기준으로 유산균의 과산화수소 생성여부를 확인하였다. 그 결과를 도 4에 나타내었다.

<92> 도 4에서 확인할 수 있는 바와 같이, 과산화수소가 생성되면 발색되지 않으며, 과산화수소가 생성되지 않으면 흰색으로 발색되는 것으로 과산화수소의 발생정도를 확인할 수 있는데, 본 발명의 *S. thermophilus* HY9012는 발색되지 않아 과산화수소를 생성하여 살균효과가 있음을 알 수 있었다.

<93> <시험예 4>

<94> 스트렙토코커스 써머필러스(*Streptococcus thermophilus*) HY9012에 의한 *S. mutans*의 부착 억제 효능 측정

<95> 항 충치균에 대한 활성이 확인된 *S. thermophilus* HY9012를 이용하여 충치균이 치면에 부착되는 과정을 억제할 수 있는지 확인하기 위하여 뮤카운트 키트(Mu-count kit, Showa, Japan)를 사용하여 확인하였다. 뮤카운트에서 제공된 유리관에 *S. mutans* MT8148을 1.0 \times 10⁶ cfu/ml로 첨가하고 *S. thermophilus* HY9012로 배양시킨 배양액을 0.45 μ m 필터로 여과하여 전체 반응액에 10% 첨가하였다. 혼합된 배양 여과액이 함유된 유리관을 15° 정도 기울어진 사면에 위치시키고 37℃에서 18시간 동안 정치시켰다. 반응을 완료시킨 뒤 상등액을 조심스럽게 제거하고 멸균증류수로 2회 세척하였다. 세척된 유리관에 염색약(트리판블루)이 함유된 시약을 첨가하고 발색시켜 유리관 벽면에 부착된 *S. mutans* MT8148의 군락을 확인하였다. 그 결과를 도 5에 나타내었다.

<96> 도 5에서 확인할 수 있는 바와 같이, 8148로 표시된 2개의 시험관은 충치 유발균인 *S. mutans* MT8148을 단독 배양하여 시험관 표면에 부착시킨 대조군이며 9012로 표시된 시험관(*S. mutans* MT8148 + *S. thermophilus* HY9012 배양액), 9055로 표시된 시험관(*S. mutans* MT8148 + *S. thermophilus* HY9055 배양액) 및 449로 표시된 시험관(*S. mutans* MT8148 + *L. lactis* HY449 배양액)은 실험군으로서, 상기 세 가지 균주 모두에서 충치 유발균인 *S. mutans* MT8148의 치면부착 억제효과가 높은 것으로 나타났다.

<97> <시험예 5>

<98> 스트렙토코커스 써머필러스(*Streptococcus thermophilus*) HY9012의 배지(우유성분)내 성장시험 측정

<99> 12%의 멸균 환원탈지유에 본 발명의 스트렙토코커스 써머필러스 HY9012를 1% 농도로 접종하여 37℃에서 24시간 배양하면서 엠17-글루코스 한천 평판배지에 접종하고 37℃에서 2일간 배양하여 형성된 균락수를 세어 생균수를 측정하였다. 본 발명의 신균주 스트렙토코커스 써머필러스 HY9012의 우유내 성장시험을 비교하기 위하여 *S. thermophilus* ST Body-1(CH. Hansen, 덴마크), *S. thermophilus* CSI-10(Culture system Inc, 미국)을 사용하였다. 그 결과를 도 6에 나타내었다.

<100> 도 6에서 확인할 수 있는 바와 같이, 본 발명의 스트렙토코커스 써머필러스 HY9012은 기존의 *S. thermophilus* ST Body-1 및 *S. thermophilus* CSI-10보다 생존능력이 뛰어난 것을 알 수 있었다.

도면의 간단한 설명

<101> 도 1은 *S. thermophilus* HY9012의 항 뮤탄스 항균활성을 나타내는 그림이다.

<102> 도 2는 *S. thermophilus* HY9012의 GTase 활성억제효과를 나타내는 그림이다.

<103> 도 3은 *S. thermophilus* HY9012의 GTase 활성억제효과를 나타내는 그래프이다.

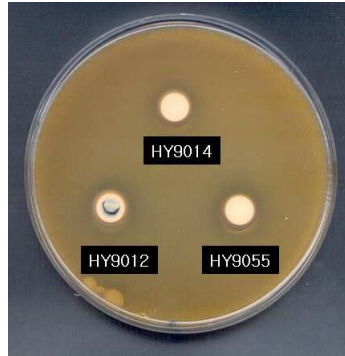
<104> 도 4는 *S. thermophilus* HY9012의 과산화수소생성을 확인한 그림이다.

<105> 도 5는 *S. thermophilus* HY9012의 치아범량질 부착억제 효과를 나타내는 그림이다.

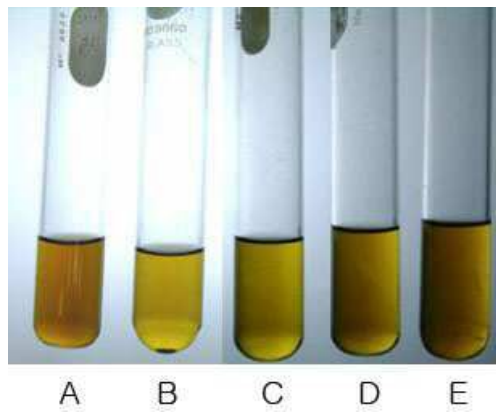
<106> 도 6은 *S. thermophilus* HY9012와 기존의 유산균의 우유 배지내 성장능력 비교시험결과를 나타내는 그래프이다.

도면

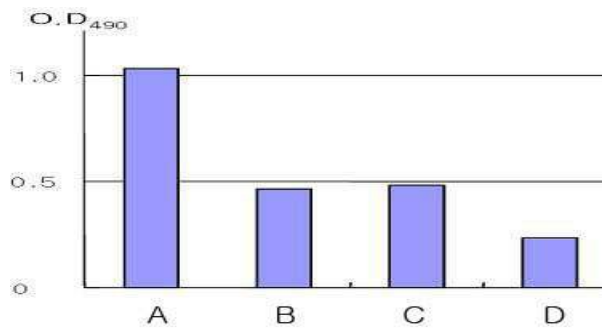
도면1



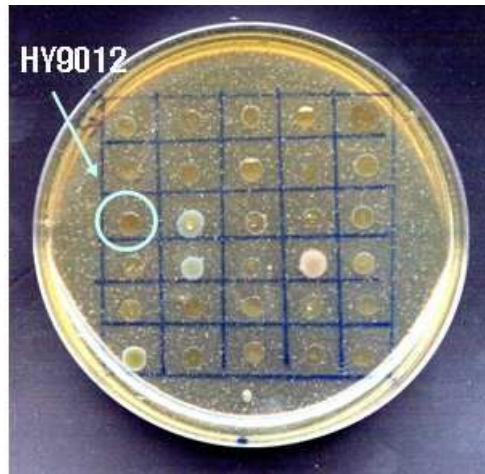
도면2



도면3



도면4



도면5



9012 9055 449 8148 8148

도면6

