



**(19) 대한민국특허청(KR)**  
**(12) 등록특허공보(B1)**

(45) 공고일자 2018년04월04일  
 (11) 등록번호 10-1844778  
 (24) 등록일자 2018년03월28일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
 C12N 1/20 (2006.01) A23L 33/135 (2016.01)  
 A23L 33/15 (2016.01) A61K 35/747 (2014.01)  
 C12P 25/00 (2006.01) C12R 1/25 (2006.01)

(52) CPC특허분류  
 C12N 1/20 (2013.01)  
 A23L 33/135 (2016.08)

(21) 출원번호 10-2017-0008866

(22) 출원일자 2017년01월18일

심사청구일자 2017년01월18일

(56) 선행기술조사문헌

CN1250094 C

KR1020110093847 A

US20070026505 A1

Journal of Biotechnology, Vol.229,  
 pp.1-2(Epub.2016.04.29.)\*

\*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자

주식회사한국야쿠르트

서울특별시 서초구 강남대로 577 (잠원동)

(72) 발명자

김주연

경기도 수원시 영통구 덕영대로1555번길 20 945동  
 515호 (영통동, 벽적골9단지아파트)

이재호

서울특별시 강남구 강남대로 84길 33, 743호  
 (뒷면에 계속)

(74) 대리인

경일호

전체 청구항 수 : 총 3 항

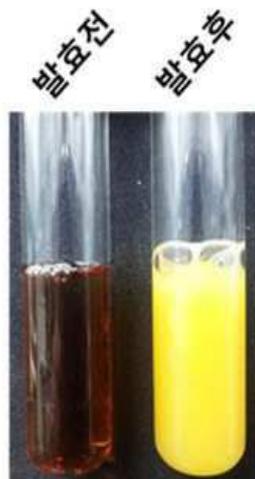
심사관 : 김지연

(54) 발명의 명칭 **비타민 B2 생합성능이 매우 우수한 락토바실러스 플란타룸 HY7715 및 이를 유효성분으로 함유하는 제품**

**(57) 요약**

본 발명은 비타민 B<sub>2</sub> 생합성능이 매우 우수한 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) HY7715 및 이를 유효성분으로 함유하는 제품에 관한 것으로서, 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) HY7715를 유효성분으로 함유하는 약학적 조성물, 건강기능식품, 기능성음료, 발효제품 등 비타민 B<sub>2</sub> 결핍에 따른 구각염, 구강염, 지루성피부염, 안구충혈, 빈혈 등의 리보플라빈결핍증(ariboflavinosis)의 개선효과를 갖는 제품에 응용될 수 있다.

**대표도** - 도9



(52) CPC특허분류

**A23L 33/15** (2016.08)  
**A61K 35/747** (2013.01)  
**C12P 25/00** (2013.01)  
*A23V 2002/00* (2013.01)  
*A23V 2250/7044* (2013.01)  
*A23Y 2220/67* (2013.01)  
*C12R 1/25* (2013.01)

(72) 발명자

**강희림**

서울특별시 영등포구 도림로102길 3-6 (신길동)

**이호진**

경기도 용인시 기흥구 상갈로29번길 4 102호 (상갈동)

**안영민**

서울특별시 강남구 역삼로11길 15 103호

**이정희**

서울특별시 광진구 아차산로36길 13 101동 102호  
(자양동, 금강KCC아파트)

**심재현**

경기도 용인시 기흥구 탑실로 152 213동 901호 (공세동, 탑실마을대주피오레2단지아파트)

공지예외적용 : 있음

---

**명세서**

**청구범위**

**청구항 1**

비타민 B<sub>2</sub> 생합성능이 우수한 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) HY7715(수탁번호: KCTC 13101BP).

**청구항 2**

삭제

**청구항 3**

삭제

**청구항 4**

제1항의 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) HY7715(수탁번호: KCTC 13101BP)를 유효성분으로 함유하는 식품조성물.

**청구항 5**

제4항에 있어서,

상기 식품조성물은 발효유, 기능성 음료, 건강기능식품 중 어느 하나인 것을 특징으로 하는 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) HY7715(수탁번호: KCTC 13101BP)를 유효성분으로 함유하는 식품조성물.

**발명의 설명**

**기술분야**

[0001] 본 발명은 비타민 B<sub>2</sub> 생합성능이 매우 우수한 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) HY7715 및 이를 유효성분으로 함유하는 제품에 관한 것으로서, 보다 상세하게는 로제오플라빈(roseoflavin)의 리보플라빈(riboflavin) 생합성 억제 특성에 관계없이 비타민 B<sub>2</sub> 생합성능이 매우 우수한 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) HY7715 및 이를 유효성분으로 함유하는 제품에 관한 것이다.

**배경기술**

[0002] 최근 건강에 대한 국민들의 관심이 올라가며 프로바이오틱스를 포함한 기능성 식품에 대한 관심이 증대되고 있다. 특히, 건강하고 안전한 먹거리가 화두로 떠오르면서 기능성 뿐만 아니라 천연원료 제품에 대한 관심이 증가하고 있다. 비타민 시장 규모는 6,500억 원대(2014.03. 조선일보)로 다양한 컨셉을 가진 제품들이 출시되고 있으며, 이 중 천연원료 비타민 시장규모는 약 300억 원대로 건강기능성 뿐만 아니라 원료의 안전에 대한 관심이 지속적으로 증가하고 있다. 천연 비타민 뿐만 아니라 건강기능식품 시장에서 발효유를 제외한 프로바이오틱스 제품 매출은 연 804억원으로 추산되며(2014.08. 한국경제), 발효유 등 일반식품을 포함한 프로바이오틱스 시장 규모는 2,000억 원대로 추정되고 있다(2014.07. 서울경제). 최근 들어 홍삼과 같은 전통 건강기능성 식품의 매출은 감소하는 반면, 프로바이오틱스 제품의 매출은 증가추세에 있다. 프로바이오틱스 세계 시장 규모는 2013년 기준 약 29조원에 육박하였으며, 아시아 시장은 3,500억원 규모로 국내 시장도 빠른 성장이 있을 것으로 보인다.

[0003] 비타민군 중 비타민 B<sub>2</sub>(riboflavin)는 여러 가지 효소반응에 조효소로 작용하는데 주로 열량 대사에 이용되며

탄수화물, 지방, 아미노산의 대사경로에서 탈수소화반응(dehydrogenation), 수산화반응(hydroxylation), 산화탈탄산반응(oxidative decarboxylation), 이산화반응(dioxygenation), 산소의 과산화수소로의 환원반응 등에 필수적인 요소로 알려져 있다.

[0004] 기존의 미생물을 활용한 천연 비타민 보충제의 경우, 유산균 및 효모 배양시 배지 내에 비타민 및 비타민 전구체를 첨가하여 균체에 비타민을 축적하도록 유도하였다. 따라서 기존의 미생물 활용 천연 비타민의 경우 미생물에 의해 100% 생합성된 것이 아니기 때문에 엄밀히 천연 비타민이라고 말하기에는 어려운 점이 있다. 또한 2013년 관세청 자료에 따르면 천연 비타민 및 비타민 전구체의 수입가격이 꾸준히 증가하고 있어 천연 비타민 생산단가 및 가격이 상승할 것으로 예상되고 있다.

[0005] J.G. LeBlanc 등은 논문에서 일부 유산균들이 비타민 B그룹을 생성한다고 보고하고 있으며, 락토바실러스 플란타륨(*Lactobacillus plantarum*)을 비롯한 락토바실러스 퍼멘텀(*L. fermentum*), 락토코커스 락티스(*Lactococcus lactis*), 류코노스톡 메센테로이데스(*Leuconostoc mesenteroides*) 등의 유산균에서의 리보플라빈(riboflavin) 생합성 및 응용가능성이 보고된 바 있다. 한편, 리보플라빈(riboflavin)의 생합성은 리보플라빈(riboflavin) 생합성 관련 유전자 클러스터인 rib 오페론(operon)의 발현에 의해 일어난다. rib 오페론(operon)의 발현은 rib 오페론(operon)의 상위(upstream)에 위치하여 리보스위치(riboswitch) 역할을 수행하는 RFN element의 피드백 조절에 의해 일어나는 것으로 알려져 있다.

[0006] 자발적으로 비타민 B를 생성하는 유산균을 발굴하고 개량한다면 건강기능식품 원료의 보충 혹은 대체제로 사용 가능할 뿐 아니라 향후 비타민 B가 보충된 발효유, 두유 등 일반식품에도 적용할 수 있다. 이에 더하여 액상 및 분말 등의 프로바이오틱스 제품에 적용 시 프로바이오틱 유산균의 고유한 효과 뿐만 아니라 천연비타민을 함유하고 있는 다양한 제형의 프로바이오틱스 제품의 개발에도 이용할 수 있을 것이다.

[0007] 이에 본 발명자들은 락토바실러스 플란타륨(*Lactobacillus plantarum*) HY7715가 비타민 B<sub>2</sub> 생합성능이 매우 우수한 것을 발견하여 본 발명을 완성하게 되었다.

**선행기술문헌**

**비특허문헌**

[0008] (비특허문헌 0001) M. Juarez del Valle, J.E. Laino, J.G. LeBlanc. Riboflavin producing lactic acid bacteria as a biotechnological strategy to obtain bio-enriched soymilk(Food Research International, 2014.08., Vol. 62).

**발명의 내용**

**해결하려는 과제**

[0009] 본 발명은 비타민 B<sub>2</sub> 생합성능이 매우 우수한 락토바실러스 플란타륨(*Lactobacillus plantarum*) HY7715 및 이를 유효성분으로 함유하는 약학적 조성물, 기능성 음료, 발효유, 건강기능식품 등을 제공하는 것을 목적으로 한다.

**과제의 해결 수단**

[0010] 상기의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 비타민 B<sub>2</sub> 생합성능이 매우 우수한 락토바실러스 플란타륨(*Lactobacillus plantarum*) HY7715 및 이를 유효성분으로 함유하는 약학적 조성물, 기능성 음료, 발효유, 건강기능식품 등을 제공하는 것을 특징으로 한다.

[0011] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

[0012] 본 발명은 비타민 B<sub>2</sub> 생합성능이 매우 우수한 락토바실러스 플란타륨(*Lactobacillus plantarum*) HY7715를 제공하는 것을 특징으로 한다.

[0013] 본 발명의 비타민 B<sub>2</sub> 생합성능이 매우 우수한 락토바실러스 플란타륨(*Lactobacillus plantarum*) HY7715를 유효성분으로 함유하는 리보플라빈결핍증(ariboflavinosis) 치료 또는 예방용 약학적 조성물은 단독 또는 약제학적으로 사용되는 부형제들과 함께 약제학적으로 통상적으로 사용되는 방법에 따라 정제, 캡슐제 등과 같은 제제형태

로 제제화 하여 사용될 수 있다.

- [0014] 사람의 경우, 통상적인 1일 투여량은 1~30mg/kg 체중의 범위일 수 있고, 1회 또는 수회로 나누어 투여할 수 있다. 그러나, 실제 투여량은 투여경로, 환자의 연령, 성별 및 체중, 건강상태 및 질환의 중증도 등의 여러 관련 인자에 비추어 결정되어야 한다.
- [0015] 물론, 본 발명의 비타민 B<sub>2</sub> 생합성능이 매우 우수한 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) HY7715를 유효성분으로 함유하는 리보플라빈결핍증(ariboflavinosis) 치료 또는 예방용 약학적 조성물은 독성 및 부작용이 없으므로 예방 목적으로 장기간 복용 시에도 안심하고 사용할 수 있는 약제이다.
- [0016] 한편, 상기 비타민 B<sub>2</sub> 결핍에 따른 리보플라빈결핍증(ariboflavinosis)에는 구각염, 구강염, 지루성피부염, 안구충혈, 빈혈 등이 해당된다.
- [0017] 또한, 본 발명의 비타민 B<sub>2</sub> 생합성능이 매우 우수한 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) HY7715를 유효성분으로 함유하는 리보플라빈결핍증(ariboflavinosis) 개선용 식품조성물은 식품, 식품첨가제, 음료, 음료첨가제, 발효유, 건강기능식품 등으로 사용될 수 있다. 식품, 식품첨가제, 음료, 음료첨가제 또는 건강기능식품으로 사용되는 경우, 각종 식품류, 발효유, 육류, 음료수, 초콜릿, 스낵류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류, 알코올 음료, 비타민 복합제, 주류 및 그 밖의 건강기능식품일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0018] 특히, 비타민 B<sub>2</sub> 생합성능이 매우 우수한 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) HY7715를 유효성분으로 함유하는 발효유는 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) HY7715 동결건조분말, 유산균 배양액 및 혼합과즙시럽을 일정비율로 조합하여 150bar에서 균질한 후 10℃ 이하로 냉각한 후 용기에 포장하여 발효유를 제조한다.
- [0019] 또한, 비타민 B<sub>2</sub> 생합성능이 매우 우수한 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) HY7715를 유효성분으로 함유하는 기능성 음료는 혼합과즙시럽, 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) HY7715 동결건조분말 및 물을 일정한 비율로 조합하여 150bar에서 균질한 후 10℃ 이하로 냉각한 후 유리병, 패트병 등 소포장 용기에 포장하여 기능성 음료를 제조한다.
- [0020] 또한, 비타민 B<sub>2</sub> 생합성능이 매우 우수한 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) HY7715를 유효성분으로 함유하는 건강기능식품은 상기 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) HY7715 동결건조분말을 포함하는 것 이외에 영양보조 성분으로 비타민 B<sub>1</sub>, B<sub>5</sub>, B<sub>6</sub>, E 및 초산에스테르, 니코틴산 아미드, 올리고당 등이 첨가될 수 있으며 여타의 식품 첨가물이 첨가되어도 무방하다.

**발명의 효과**

- [0021] 본 발명의 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) HY7715는 비타민 B<sub>2</sub> 생합성능이 매우 우수하므로 이를 유효성분으로 함유하는 비타민 B<sub>2</sub> 결핍에 따른 구각염, 구강염, 지루성피부염, 안구충혈, 빈혈 등의 리보플라빈결핍증(ariboflavinosis)의 예방, 치료 또는 개선용 약학적 조성물, 건강기능식품, 기능성음료, 발효유 등의 제품에 응용될 수 있다.

**도면의 간단한 설명**

- [0022] 도 1은 Chemically defined media(CDM) 내 리보플라빈(riboflavin) 유무에 따른 다양한 유산균의 성장능을 비교한 결과를 나타낸 그래프이다.
- 도 2는 CDM 내 리보플라빈(riboflavin) 농도에 따른 *L. rhamnosus*의 생육 흡광도 방정식을 나타낸 그래프이다.
- 도 3은 1차 선별 균주의 CDM 내 로제오플라빈(roseoflavin) 농도에 따른 생육능을 확인한 그래프이다.
- 도 4는 CDM에서 배양한 야생형 비타민 B<sub>2</sub> 생산 균주와 로제오플라빈(roseoflavin)에 순응된 균주(roseoflavin-adapted strain)의 비타민 B<sub>2</sub> 생산량을 Bioassay 정량법에 의해 비교한 그래프이다.
- 도 5는 CDM에서 배양한 비타민 B<sub>2</sub> 생산 균주 야생형과 로제오플라빈에 순응된 균주(roseoflavin-adapted

strain)의 비타민 B<sub>2</sub> 생성에 따른 색상 비교를 나타낸 사진이다.

도 6은 CDM에서 배양한 로제오플라빈에 순응된 균주(roseoflavin-adapted strain)의 비타민 B<sub>2</sub> 생산량을 HPLC로 정량한 결과를 나타낸 그래프이다.

도 7은 MRS 배지에서 배양한 로제오플라빈에 순응된 균주(roseoflavin-adapted strain)의 비타민 B<sub>2</sub> 생산량을 HPLC로 정량한 결과를 나타낸 그래프이다.

도 8은 식용배지에서 배양한 균주 9(strain 9)의 야생형과 로제오플라빈에 순응된 균주(roseoflavin-adapted strain) 9(HY7715)의 배양액 및 분말 내 비타민 B<sub>2</sub>를 HPLC로 정량한 결과를 나타낸 그래프이다.

도 9는 식용배지에서 로제오플라빈에 순응된 균주(roseoflavin-adapted strain) 9(HY7715)의 발효 전과 발효 후 비타민 B<sub>2</sub>(노란색)의 생성 유무에 따른 배지 색상 변화를 나타낸 사진이다.

도 10은 ribD 유전자의 일부분을 real time qRT-PCR 실험에서 사용한 ribD-F2 프라이머 및 ribD-R2 프라이머를 이용하여 증폭(PCR)한 산물의 전기영동 결과 사진으로서 해당 프라이머 세트의 결합 특이성을 확인한 사진이다.

도 11은 로제오플라빈에 순응된 균주(roseoflavin-adapted strain) 9(HY7715)와 야생형 균주 9(strain 9)에 존재하는 rib 오페론(operon)의 발현양 비교로서 Real time qRT-PCR을 통한 로제오플라빈에 순응된 균주(roseoflavin-adapted strain) 9(HY7715)와 야생형 균주 9(strain 9) 내 rib 오페론(operon)의 상대적 발현양을 조사한 결과를 나타낸 그래프이다.

도 12는 로제오플라빈에 순응된 균주(roseoflavin-adapted strain) 9(HY7715)와 야생형 균주 9(strain 9)의 RFN element의 염기서열을 비교하여 나타낸 것이다.

도 13은 로제오플라빈에 순응된 균주(roseoflavin-adapted strain) 9(HY7715)의 Fabiana Fernanda Pacheco Da Silva(2016), M. Juarez del Valle(2014) 등의 논문에서 사용된 리보플라빈 측정 배지(Riboflavin assay medium)에서의 리보플라빈(Riboflavin) 생산량 결과를 나타낸 그래프이다.

**발명을 실시하기 위한 구체적인 내용**

[0023] 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.

[0024] <실시예 1>

[0025] 균주의 분리

[0026] 충남 보령, 충남 서천, 전북 고창, 전북 순창, 전남 담양, 전남 고흥, 전남 여수 돌산, 전남 담양, 전남 보성 벌교, 경남 하동의 웅천장, 서천장, 고창장, 고흥장 등 재래시장 내 반찬가게에서 판매자가 갖 제조한 김치 등 발효식품을 수집하여 파쇄 후 거름액을 글리세롤(glycerol)과 혼합하여 균주 분리 전까지 -80℃에서 보관하였다.

[0027] 상기 수집시료의 글리세롤 스톡(glycerol stock)으로부터 균주를 분리하기 위해 호기성 희석액 900μl와 발효식품 시료의 글리세롤 스톡(glycerol stock) 100μl를 혼합하여 연속 희석을 수행하였다. 상기 10<sup>-1</sup>~10<sup>-6</sup> 희석 시료 중 플레이트(plate) 당 100μl를 브롬크레졸퍼플(Bromocresol Purple)이 함유된 하기 표 1의 변형 MRS-agar 배지에 평판도말하고 37℃에서 48시간 이상 배양하였다. 배양 후 형성된 노란색 미생물 군집(colony)을 멸균 루프로 취하여 동일 배지와 동일 온도조건에서 3차례 이상 계대배양을 수행함으로써 단일 미생물 군집(single colony)을 확보하였다.

표 1

조성	Broth(g/L)	Plate(g/L)
Beef extract	10.0	10.0
Enzymatic digest of animal tissue	10.0	10.0
Yeast extract	5.0	5.0
Potassium phosphate	2.0	2.0
Polysorbate 80	1.0	1.0
Ammonium citrate	2.0	2.0
Sodium acetate	5.0	5.0
Magnesium sulfate	0.1	0.1
Manganese sulfate	0.05	0.05
당 10% stock	100.0	100.0
Agar	0	15.0
Bromo cresol purple	0	0.04
증류수	864.85	849.81

[0028]

[0029] <실시에 2>

[0030] 비타민 B<sub>2</sub> 생성능력이 우수한 유산균주 선발

[0031] 2-1. 계대배양 및 균주 활성화

[0032] 상기 실시예 1에서 순수 분리된 유산균주를 MRS(Difco, USA) 액체배지에 획선도말(streak)한 후 37℃에서 48시간 배양하여 단일 미생물 군집(single colony)을 재확보하였으며, 이후 단일 콜로니를 동일 액체배지에 접종하여 37℃에서 20시간 배양하는 것을 2~3회 반복 실시함으로써 선발 시험 전 균주의 활성을 높였다.

[0033] 2-2. 비타민 B<sub>2</sub> 생산 균주의 스크리닝 실험 설계

[0034] T. Møretzø (1998)의 논문에 따르면 *L. curvatus*, *L. sake* 등의 유산균 배양시 리보플라빈(riboflavin)은 생장 필수요소로 알려져 있다. 또한, Vittorio apozzi(2012) 등은 논문을 통하여 *L. johansonii* NCC 533, *L. gasserii* ATCC 33323, *L. casei* ATCC 334, *L. rhamnosus* ATCC8530, *L. rhamnosus* ATCC 7469 등 많은 종류의 유산균이 리보플라빈(riboflavin) 생성에 관여하는 유전자 집단인 rib 오페론(operon)이 결핍되어 있어 리보플라빈(riboflavin)이 없는 배양조건에서는 생장을 할 수 없다고 보고하고 있다. 이는 리보플라빈(riboflavin)이 유산균 생장의 필수요소임에도 리보플라빈(riboflavin)을 생성하지 못하여 생장을 할 수 없는 것이라고 할 수 있다. 따라서 리보플라빈(riboflavin)이 없는 환경에서도 생장이 활발한 균주는 리보플라빈(riboflavin)을 생산할 가능성이 있는 균주라고 가정할 수 있다.

[0035] 이러한 가정을 근거로 상기 실시예 2-1의 활성화를 수행한 균주 중 비타민 B<sub>2</sub> 생산 균주 선별을 위해 Sandrine Petry(2000), HengamehvanderKaaij(2004) 등의 논문에 사용된 chemically defined media(CDM)의 조성을 변형하여 최종적으로 비타민 B<sub>2</sub>가 결핍된 영양요구성 배지인 리보플라빈이 결핍된(riboflavin free) CDM을 제조하였다.

[0036] 2-3. 비타민 B<sub>2</sub> 생산 균주의 선별력 확인 및 균주 스크리닝

[0037] 리보플라빈이 결핍된(riboflavin free) CDM 배지의 선별력 확인을 위해 락토바실러스 람노서스(*Lactobacillus rhamnosus*)를 포함하여 각각 다른 종의 유산균주(균주 A, 균주 B, 균주 C, 균주 D)를 배양하는 실험을 진행하였다.

[0038] 그 결과를 도 1에 나타내었다.

[0039] 도 1에서 확인할 수 있는 바와 같이, 각 균주마다 CDM에서 생육할 수 있는 정도에 차이가 있는데, 균주 A(strain A) 및 균주 B(strain B)의 경우는 리보플라빈(riboflavin)의 결핍여부에 관계없이 생육함을 확인할 수 있었고, 균주 C(strain C), 균주 D(strain D) 및 락토바실러스 람노서스(*Lactobacillus rhamnosus*)의 경우는 리보플라빈(riboflavin) 결핍 시(w/o Riboflavin) 생육이 현저하게 저해됨을 확인할 수 있었다. 결론적으로 CDM에서 리보플라빈(riboflavin)의 생성 유무에 따른 균주 선별이 가능한 것으로 판단되었다.

[0040] 특히, 락토바실러스 람노서스(*Lactobacillus rhamnosus*)의 경우 배지 내 리보플라빈(riboflavin) 유무에 따라 생육정도가 현저하게 차이가 남에 따라 균주 스크리닝 시 락토바실러스 람노서스(*Lactobacillus rhamnosus*)를 리보플라빈(riboflavin) 생성 확인을 위한 바이오센서(biosensor)로서 리보플라빈(riboflavin)의 생물학적 정량(bioassay)에 활용하였다. 락토바실러스 람노서스(*Lactobacillus rhamnosus*) 생육특성을 이용하여 CDM 내 리보플라빈(riboflavin) 농도에 따른 락토바실러스 람노서스(*Lactobacillus rhamnosus*)의 성장 정도를 흡광도로 측정하고, 이를 방정식으로 수식화하면 락토바실러스 람노서스(*Lactobacillus rhamnosus*) 성장 정도에 따른 대략적인 리보플라빈(riboflavin) 농도를 계산할 수 있다(도 2 참조).

[0041] 실례로 *L. rhamnosus* ATCC 7469는 사람 혈장 내 존재하는 리보플라빈(riboflavin) 농도를 측정하는 시험에 사용된 바 있다. 이와 같은 방법을 리보플라빈(riboflavin) 생성 균주 선별에 적용한다면 HPLC 등 분석기기를 이용하여 리보플라빈(riboflavin) 생성 균주의 실제 리보플라빈(riboflavin) 생산량을 분석하기 전에 리보플라빈(riboflavin)을 생성 및 배출할 가능성이 있는 균주를 우선 선별하고 대략적인 리보플라빈(riboflavin)의 생산량도 확인할 수 있다.

[0042] 최종적으로 상기의 스크리닝을 통해 리보플라빈(riboflavin)이 결핍된 CDM에서의 생육이 상대적으로 우수한 균주를 14종을 선별하였고, 리보플라빈(riboflavin) 함량을 생물학적 정량(bioassay)을 통해 하기의 표 2와 같이 나타내었다. 이후 해당 균주를 동일배지에서 연속 계대배양하였다. 리보플라빈(riboflavin)의 생물학적 정량은 도 2의 방정식의 X값에 리보플라빈이 결핍된 CDM에서 각 균주의 흡광도를 대입하여 계산하였다.

표 2

Sample	OD <sub>600</sub>	Riboflavin quantification from equation(μg/L)
Strain 1	0.69	51.9
Strain 2	0.67	46.0
Strain 3	0.68	48.1
Strain 4	0.62	36.9
Strain 5	0.62	36.1
Strain 6	0.61	34.6
Strain 7	0.83	86.6
Strain 8	0.46	11.9
Strain 9	0.71	56.1
Strain 10	0.48	14.0
Strain 11	0.65	41.6
Strain 12	0.67	46.4
Strain 13	0.44	9.6
Strain 14	0.67	46.0

[0043]

[0044] 2-4. 비타민 B<sub>2</sub> 과생산 균주의 개발

[0045] 리보플라빈(riboflavin)의 생합성은 리보플라빈(riboflavin) 생합성 관련 유전자 클러스터인 rib 오페론(operon)의 발현에 의해 일어난다. 로제오플라빈(roseoflavin)은 리보플라빈(riboflavin)의 유사체(analog)로 rib 오페론(operon)의 전사조절부위인 RFN element에 결합하여 리보플라빈(riboflavin)의 생합성을 억제하는 특징이 있다. 즉, 로제오플라빈(roseoflavin)의 농도가 높아질수록 리보플라빈(riboflavin)의 생합성은 더욱 강력하게 억제된다.

[0046] 로제오플라빈(roseoflavin)의 리보플라빈(riboflavin) 생합성 억제 특성을 이용하여 리보플라빈(riboflavin) 고생산 균주를 개발하고자, 상기 실시예 2-2의 1차 선별 균주 14종을 로제오플라빈(roseoflavin)이 10~100 $\mu$ g/ml의 농도로 포함된 리보플라빈 결핍(riboflavin free) CDM에서 반복 배양을 수행하여 로제오플라빈(roseoflavin)에 순응시킴으로써 로제오플라빈(roseoflavin)의 리보플라빈(riboflavin) 생합성 억제 특성에 관계없이 리보플라빈(riboflavin)을 합성할 수 있는 균주를 선별하고자 하였다.

[0047] 즉, 리보플라빈(riboflavin) 결핍 환경에 리보플라빈의 유사체인 로제오플라빈(roseoflavin)이 존재하는 상황에서 반복계대배양을 수행하여 살아남는 균주는 리보플라빈(riboflavin)의 생합성이 리보플라빈(riboflavin) 존재 유무에 따라 달라지는 야생형은 아닐 것이며, 어떠한 환경에서라도 리보플라빈(riboflavin)이 발현할 수 있는 일종의 돌연변이일 가능성이 높을 것으로 판단하여 그러한 균주를 선별하였다.

[0048] 그 결과를 도 3 내지 도 5 및 표 3에 나타내었다.

[0049] 도 3 내지 도 5 및 표 3에서 확인할 수 있는 바와 같이, 결과적으로 로제오플라빈(roseoflavin)이 고농도로 존재하는 환경에서도 생육이 가능한 로제오플라빈(roseoflavin) 순응 균주를 6종 확보하였으며, 생물학적 정량(bioassay)을 통해 야생형과 로제오플라빈(roseoflavin) 순응 균주의 비타민 B<sub>2</sub> 생산량을 비교한 결과, 약 3배 내지 15배 가량 생산량이 증가함을 확인하였다. 각 균주를 리보플라빈 결핍(riboflavin free) CDM에서 배양하였을 때, 로제오플라빈(roseoflavin) 순응 균주의 경우는 야생형과 달리 배양액의 색상이 연노란색을 나타냄으로써 비타민 B<sub>2</sub>의 과생성을 가시적으로 확인할 수 있었다. 수용액 상태의 비타민 B<sub>2</sub>는 노란색을 띤다.

표 3

Sample	Riboflavin(mg/L)	
	Wild type	Roseoflavin-adapted strain
Strain 1	0.424	1.682
Strain 8	0.139	1.995
Strain 9	0.228	1.624
Strain 10	0.002	1.347
Strain 11	0.305	1.461
Strain 14	0.379	1.213

[0050]

[0051] 2-5. 비타민 B<sub>2</sub> 과생산 균주의 HPLC 분석

[0052] 로제오플라빈 순응(roseoflavin adaptation)을 통해 확보한 균주가 생산하는 비타민 B<sub>2</sub>를 정확히 정량하기 위해 HPLC를 통해 비타민 B<sub>2</sub> family(riboflavin, FMN, FAD)를 분석하여 총 비타민 B<sub>2</sub>를 정량하였다. 과생성 균주 중 비타민 B<sub>2</sub> 생성량이 가장 우수한 균주를 선별하기 위해 리보플라빈 결핍(riboflavin free) CDM 및 MRS 배지에서 생육한 균주 1(strain 1), 균주 8(strain 8), 균주 9(strain 9), 균주 14(strain 14)의 배양액을 이용하여

HPLC를 수행하였다

- [0053] 그 결과를 도 6 및 도 7에 나타내었다.
- [0054] 도 6 및 도 7에서 확인할 수 있는 바와 같이, 최종적으로 2가지 배지 모두에서 free riboflavin의 함량이 가장 높게 측정된 균주 9(strain 9)를 야생형에 비해 비타민 B<sub>2</sub> 생산능이 현저하게 증가한 비타민 B<sub>2</sub> 고생산 균주로 선정하고, 로제오플라빈에 순응된 균주(roseoflavin-adapted strain 9; HY7715)라 명명하였다.
- [0055] 한편, 상기 시험에서 최종 선발된 균주 9(strain 9)의 야생형과 로제오플라빈에 순응된 균주 9(roseoflavin-adapted strain 9; HY7715)을 질소원 1 내지 10%, 탄소원 0.1 내지 5%, 미네랄류 내지 0.01 내지 1%로 성분을 조정한 식용배지에서 각각 배양하였다. 이후 각 균주의 배양액 및 각 균주의 동결건조분말에 대해 HPLC를 수행하여 비타민 B<sub>2</sub>의 함량을 분석하였다.
- [0056] 그 결과를 도 8, 도 9 및 표 4에 나타내었다.
- [0057] 도 8 및 표 4에서 확인할 수 있는 바와 같이, 균주 9(strain 9)의 야생형의 배양액의 총 비타민 B<sub>2</sub>는 7.04mg/L 인 반면, 로제오플라빈에 순응된 균주 9(HY7715)의 배양액의 총 비타민 B<sub>2</sub>는 39.66mg/L으로서 약 5.6배 정도 비타민 B<sub>2</sub> 함량이 많았으며, 균주 9(strain 9)의 야생형의 동결건조분말의 총 비타민 B<sub>2</sub>는 96.88 μg/g인 반면, 로제오플라빈에 순응된 균주 9(HY7715)의 배양액의 총 비타민 B<sub>2</sub>는 253.27 μg/g으로서 약 2.6배 정도 비타민 B<sub>2</sub> 함량이 많았음을 알 수 있었다.
- [0058] 또한, 도 9에서 확인할 수 있는 바와 같이, 로제오플라빈에 순응된 균주 9(HY7715) 접종 전의 배지(발효전)는 배지 자체의 색인 연갈색을 띠는데 반해, 로제오플라빈에 순응된 균주 9(HY7715) 접종 후의 배지(배양후)는 비타민 B<sub>2</sub>의 생성으로 인하여 진한 형광노란색으로 변화하였음을 알 수 있었다.

표 4

	Riboflavin(mg/L)	FMN(mg/L)	FAD(mg/L)	총 비타민 B <sub>2</sub> (mg/L)
Strain 9 배양액	1.21	2.17	3.66	7.04
HY7715 배양액	31.51	3.21	4.94	39.66
	Riboflavin(μg/g)	FMN(μg/g)	FAD(μg/g)	총 비타민 B <sub>2</sub> (μg/g)
Strain 9 분말	9.15	22.49	65.24	96.88
HY7715 분말	173.88	49.03	30.36	253.27

- [0059]
- [0060] <실시예 3>
- [0061] 균주의 동정
- [0062] 본 발명에 따른 균주의 종을 정하기 위해 우선 16S rRNA 염기서열을 이용한 동정 및 API 50CHL Medium kit(bioMerieux SA)를 통해 49종의 당 이용성 분석을 실시하였다.
- [0063] 그 결과를 표 5(16S rRNA 염기서열 분석을 통한 동정 결과) 및 표 6(당 이용성 결과)에 나타내었다.
- [0064] 하기의 표 5 및 표 6의 16S rRNA 염기서열 분석 결과 및 API kit를 통한 당 이용성 시험 결과를 종합하여 최종적으로 김치에서 분리한 비타민 B<sub>2</sub> 생성능이 우수한 락토바실러스 균주를 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) HY7715로 명명하고, 2016년 9월 8일에 생물자원센터(KCTC)에 기탁하였다(기탁번호: KCTC 13101BP).
- [0065] 본 발명의 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) HY7715의 특성은 다음과 같다.
- [0066] 1)균의 형태
- [0067] 엠알에스(MRS) 한천평판배지에서 37℃, 2일간 배양했을 때 균의 특성

- [0068] ①세포의 형태: 간균
- [0069] ②운동성: 없음
- [0070] ③포자형성능: 없음
- [0071] ④그람(Gram) 염색: 양성
- [0072] 2)균락의 형태
- [0073] 엠알에스(MRS) 한천평판배지에서 37℃, 2일간 배양했을 때 균락의 형태
- [0074] ①형상: 원형
- [0075] ②융기: 볼록
- [0076] ③표면: 매끈(smooth)
- [0077] 3)생리적 성질
- [0078] ①생육온도: 성장가능 생육온도 13~43℃
- [0079]                   최적 생육온도 33~37℃
- [0080] ②생육 pH: 성장가능 생육 pH 3.5~3.7
- [0081]                   최적 pH 5.0~5.5
- [0082] ③산소에 대한 영향: 통성혐기성
- [0083] 4)카탈라제: -
- [0084] 5)가스형성여부: -
- [0085] 6)15℃에서 생육: +
- [0086] 7)45℃에서 생육: -
- [0087] 8)인돌생산: -
- [0088] 9)젖산생산: +
- [0089] 10)당 분해 이용성
- [0090] Biomerieux 사의 API 50 CH kit를 이용하여 당 발효 실험을 한 결과를 하기의 표 6에 나타내었다.

**표 5**

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<i>Lactobacillus plantarum</i> strain HFC8, complete genome	2641	13137	100%	0	99%	CP012650.1

[0091]

표 6

당	0-24	사용 여부	당	25-49	사용 여부
0	Control	-	25	Esculin ferric citrate	+
1	Glycerol	-	26	Salicin	+
2	Erythritol	-	27	D-Cellobiose	+
3	D-Arabinose	-	28	D-Maltose	+
4	L-Arabinose	+	29	D-Lactose	+
5	D-Ribose	+	30	D-Melibiose	+
6	D-Xylose	-	31	D-Saccharose	+
7	L-Xylose	-	32	D-Trehalose	+
8	D-Adonitol	-	33	Inulin	-
9	Methyl-βD-xylopyranoside	-	34	D-Melezitose	+
10	D-Galactose	+	35	D-Raffinose	+
11	D-Glucose	+	36	Amidon	-
12	D-Fructose	+	37	Glycogen	-
13	D-Mannose	+	38	Xylitol	-
14	L-Sorbose	-	39	Gentiobiose	+
15	L-Rhamnose	-	40	D-Turanose	+
16	Dulcitol	-	41	D-Lyxose	-
17	Inositol	-	42	D-Tagatose	-
18	D-Mannitol	+	43	D-Fucose	-
19	D-Sorbitol	+	44	L-Fucose	-
20	M e t h t l - α D-Mannopyranoside	+	45	D-Arabitol	-
21	M e t h t l - α D-Glucopyranoside	+	46	L-Arabitol	-
22	N-Acetylglucosamine	+	47	Potassium gluconate	-
23	Amygdalin	+	48	P o t a s s i u m 2-ketogluconate	-
24	Arbutin	+	49	P o t a s s i u m 5-ketogluconate	-

[0092]

[0093] <실시예 4>

[0094] 락토바실러스 플란타룸(Lactobacillus plantarum) HY7715를 포함하는 동결건조분말의 제조

[0095] 본 발명의 락토바실러스 플란타룸(Lactobacillus plantarum) HY7715로 발효된 발효액을 17,000RPM 이상의 고속 원심분리기에 의해 분리하여 균체만을 포집하였다. 회수된 균체에 대비하여 동결보호제로써 중량비 1~5%의 다당류, 당류, 탈지분유 성분을 수용액으로 제조한 뒤 가압살균하였다. 가압살균된 동결보호제와 회수균체를 혼합하여 동결건조하였다.

[0096] <실시예 5>

[0097] 락토바실러스 플란타룸(Lactobacillus plantarum) HY7715를 유효성분으로 함유하는 약학적 조성물의 제조

[0098] 액제의 제조

[0099] 상기 실시예 4의 락토바실러스 플란타룸(Lactobacillus plantarum) HY7715 동결건조분말 100mg, 이성화당 10g, 만니톨 5g을 통상의 액제의 제조방법에 따라 정제수에 각각의 성분을 가하여 용해시키고 레몬향을 적량 가한 다음, 정제수를 가하여 전체 100ml로 조절한 후 갈색병에 충전하여 멸균시켜 액제를 제조하였다.

[0100] 캡슐제의 제조

[0101] 상기 실시예 4의 락토바실러스 플란타룸(Lactobacillus plantarum) HY7715 동결건조분말 100mg에 옥수수 전분 100mg, 유당 100mg, 스테아린산 마그네슘 2mg을 완전히 혼합한 후 약전 제제충척 중 캡슐제 제조방법에 따라 경

질 젤라틴 캡슐에 충전하여 캡슐제를 제조하였다.

- [0102] <실시에 6>
- [0103] 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) HY7715를 유효성분으로 함유하는 발효유의 제조
- [0104] 본 발명의 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) HY7715 동결건조분말을 유효성분으로 함유하는 발효유를 제조하는 방법은 다음과 같다.
- [0105] 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 6.55~6.70, 20℃에서의 브릭스(Brix<sup>0</sup>)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 BCP배지에서의 총 유산균 수가  $1.0 \times 10^9$  cfu/ml 이상, 적정산도가 0.89~0.91%, pH는 4.55~4.65가 되도록 하여 제조하였다. 그런 다음, 혼합과즙시럽은 액상과당 13중량%, 백설탕 5중량%, 혼합과즙농축액 56Brix<sup>0</sup> 10.9중량%, 펙틴 1.0중량%, 후레쉬후르츠 믹스 에센스 0.1중량% 및 정제수 70중량%를 30~35℃에서 교반하여 혼합한 후 UHT 열처리(135℃에서 2초간 살균)한 후 냉각하여 제조하였다. 그런 다음, 상기 유산균 배양액 69.5중량%와 상기 실시예 4의 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) HY7715 동결건조분말 0.1중량% 및 상기 혼합과즙시럽 30.4중량%를 조합하여 150bar에서 균질한 후 10℃ 이하로 냉각하여 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) HY7715를 유효성분으로 함유하는 발효유를 제조하였다.
- [0106] <실시에 7>
- [0107] 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) HY7715를 유효성분으로 함유하는 기능성 음료의 제조
- [0108] 본 발명의 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) HY7715를 유효성분으로 함유하는 기능성 음료를 제조하는 방법은 다음과 같다.
- [0109] 먼저, 혼합과즙시럽은 액상과당 13중량%, 백설탕 2.5중량%, 갈색설탕 2.5중량%, 혼합과즙농축액 56Brix<sup>0</sup> 10.9중량%, 펙틴 1.0중량%, 후레쉬후르츠 믹스 에센스 0.1중량% 및 정제수 70중량%를 30~35℃에서 교반하여 혼합한 후 UHT열처리(135℃에서 2초간 살균)한 후 냉각하여 제조하였다.
- [0110] 그리고, 상기의 방법으로 제조된 혼합과즙시럽 30.4중량%와 상기 실시예 4의 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) HY7715 동결건조분말 0.1중량% 및 나머지 정제수 69.5중량% 조합하여 150bar에서 균질한 후 10℃ 이하로 냉각한 후 이를 유리병, 페트병 등 소포장 용기에 포장하여 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) HY7715를 유효성분으로 함유하는 기능성 음료를 제조하였다.
- [0111] <실시에 8>
- [0112] 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) HY7715를 유효성분으로 함유하는 건강기능식품의 제조
- [0113] 상기 실시예 4의 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) HY7715 동결건조분말 0.1중량%에 영양보조성분(비타민 B<sub>1</sub>, B<sub>5</sub>, B<sub>6</sub>, E 및 초산에스테르, 니코틴산 아미드) 및 올리고당을 상기 실시예 4의 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) HY7715 동결건조분말 100중량부에 대하여 10중량부가 되도록 첨가하여 고속회전 혼합기에서 혼합하였다. 상기 혼합물에 멸균 정제수 10중량부를 첨가, 혼합하고 직경 1~2mm의 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.
- [0114] <시험예 1>
- [0115] 로제오플라빈에 순응된 균주 9(HY7715)와 야생형 균주 9(strain 9)에 존재하는 rib 오페론(operon)의 전사적 발현양상 조사
- [0116] 비타민 B<sub>2</sub> 합성에 관여하는 rib 오페론(operon)의 균주 9(strain 9) 야생형과 로제오플라빈에 순응된 균주 9(HY7715) 간 상대적인 발현량 차이를 분석하기 위해 real time qRT-PCR을 수행하였다. 리보플라빈(riboflavin)이 존재하는 CDM, 리보플라빈(riboflavin)이 존재하지 않는 CDM에서 각 균주를 배양한 후 total

RNA를 추출하였다. 이후 ribD 유전자의 일부를 PCR할 수 있는 프라이머인 ribD-F2, ribD-R2를 제작 및 이용하여 specific cDNA를 합성한 후 실험에 이용하였다.

- [0117] 그 결과를 도 10 및 도 11에 나타내었다.
- [0118] 도 10에서 확인할 수 있는 바와 같이, ribD 유전자의 일부를 타겟으로 ribD-F2 프라이머 및 ribD-R2 프라이머를 이용해 PCR을 수행한 후, 1번 레인에는 DNA 마커를, 2번 레인에는 PCR 산물을 전기영동한 결과를 나타내었는데, 2번 레인에서 단일 PCR 밴드가 형성됨에 따라 ribD-F2 프라이머 및 ribD-R2 프라이머를 이용한 PCR 반응 시 ribD 유전자가 특이적으로 증폭된다는 사실을 알 수 있었다.
- [0119] 또한, 도 11에서 확인할 수 있는 바와 같이, ribD 유전자 일부의 특이적 증폭을 가능하게 하는 ribD-F2 프라이머 및 ribD-R2 프라이머를 이용하여 균주 9(strain 9)와 로제오플라빈에 순응된 균주 9(HY7715)의 cDNA를 주형으로 real time qRT-PCR을 수행함으로써, 조사된 두 균주 내 ribD 유전자의 상대적인 발현량의 차이를 그래프로 나타낸 것으로서, 리보플라빈(riboflavin)이 존재하지 않을 시의 균주 9(strain 9) 내 ribD 유전자의 발현양을 기준(1.0)으로 할때, 리보플라빈이 존재하지 않을 경우에는 로제오플라빈에 순응된 균주 9(HY7715) 내 발현양은 35.0으로 분석되어 유전자 발현이 35배 증가함을 확인하였고, 리보플라빈(riboflavin)이 존재할 경우에는 균주 9(strain 9) 내 발현양은 1.67, 로제오플라빈에 순응된 균주 9(HY7715) 내 발현양은 28.6으로 각각 분석되어 로제오플라빈에 순응된 균주 9(HY7715)에서 ribD 유전자의 발현이 약 17배 증가함을 확인할 수 있었다.
- [0120] 이상의 결과를 종합하여 보면, 리보플라빈(riboflavin) 존재 유무에 관계없이 로제오플라빈에 순응된 균주 9(HY7715)는 야생형 균주 9(strain 9)보다 rib 오페론(operon)의 발현이 유의적으로 증가함을 알 수 있었다. 이는 로제오플라빈에 순응된 균주 9(HY7715)의 경우 리보플라빈(riboflavin)에 의해 발현 피드백(feedback) 조절을 받아야 하는 rib 오페론(operon)의 전사 조절부위인 RFN element가 유전자 수준에서의 돌연변이에 의해 그 조절기능이 약화된 것으로 추정되며, 결국 rib 오페론(operon)이 구성적 발현(constitutive expression)을 하게 됨으로써 비타민 B<sub>2</sub> 생합성이 증가한 것으로 사료되었다. 2014년 Pasquale Russo 연구팀은 RFN element 일부의 유전자 변이에 의해 비타민 B<sub>2</sub>의 합성이 증가한 결과를 보고한 바 있다.
- [0121] <시험예 2>
- [0122] 로제오플라빈에 순응된 균주 9(HY7715)와 야생형 균주 9(strain 9)에 존재하는 RFN element 분석
- [0123] rib 오페론(operon)의 전사 조절부위인 RFN element의 염기서열 분석을 통해 비타민 과생성의 원인을 파악하고자 로제오플라빈에 순응된 균주 9(HY7715)와 야생형 균주 9(strain 9)의 RFN element 추정 부위를 클로닝하여 염기서열을 분석하였다. 기존에 보고된 *L. plantarum* NCD01752의 RFN element 서열을 참고하여 로제오플라빈에 순응된 균주 9(HY7715)의 RFN element로 추정되는 염기서열을 특정하였으며 기 보고된 타균주의 RFN element의 염기서열의 특징을 기반으로 로제오플라빈에 순응된 균주 9(HY7715)의 RFN element의 서열의 특이점을 분석하였다.
- [0124] 그 결과를 도 12에 나타내었다.
- [0125] 도 12에서 확인할 수 있는 바와 같이, -35번 박스(box) 157번째 염기가 야생형 균주 9(strain 9)의 ‘아데닌(adenine; A)’ 이 로제오플라빈에 순응된 균주 9(HY7715)에서는 ‘구아닌(guanine; G)’ 로 치환되어 있는 것을 확인하였다. 치환된 ‘아데닌(adenine; A)’ 을 포함한 주변 염기서열은 비타민 B<sub>2</sub>를 생성하는 타 균주들의 RFN element에서도 매우 잘 보존되어 있으며, RNA의 이차구조를 형성하는데 중요한 염기서열임이 알려져 있다. 즉, 해당 염기서열의 단점돌연변이(single site mutation)로 인해 정상적인 RNA 이차구조를 형성하지 못하고 rib 오페론(operon)의 전사조절이 변화함으로써 비타민 B<sub>2</sub> 과생성이 유발된 것으로 판단되었다.
- [0126] 한편, 염기서열의 변이가 DNA 시퀀싱 오류 및 우연이 아님을 확인하기 위해 야생형 균주 9(strain 9)와 로제오플라빈에 순응된 균주 9(HY7715)의 단일 미생물 균집을 무작위로 각각 2개씩 선택한 후 분석하였다.
- [0127] <시험예 3>
- [0128] 본 발명의 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) HY7715의 항생제 내성 실험
- [0129] 항생제 내성 실험은 MIC Test strip(liofilchem, Italy)을 사용하여 균주의 성장 억제환을 관찰하여 최저억제농도(MIC) 값을 측정하였고, 항생제 감수성 평가는 European Food Safety Authority(EFSA) journal 2012;10(6):2740에 따라 수행하였다.

[0130] 그 결과를 표 7에 나타내었다.

[0131] 표 7에서 확인할 수 있는 바와 같이, 본 발명의 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) HY7715는 에리트로마이신(erythromycin)과 카나마이신(kanamycin)에 대해 상대적으로 내성이 있는 반면, 앰피실린(ampicillin), 클로람페니콜(chloramphenicol), 클린다마이신(Clindamycin), 겐타마이신(gentamicin), 테트라사이클린(tetracycline)에 대해 감수성이 높았다.

표 7

항생제 종류	범위( $\mu\text{g/mL}$ )	MIC( $\mu\text{g/mL}$ )	
		<i>Lactobacillus plantarum</i> HY7715	Antibiotic susceptibility
Ampicillin	0 ~ 256	0.125	S
Chloramphenicol	0 ~ 256	8	S
Clindamycin	0 ~ 256	0.5	S
Erythromycin	0 ~ 256	1.5	R
Gentamicin	0 ~ 256	16	S
Kanamycin	0 ~ 256	96	R
Streptomycin	0 ~ 1024	192	N.R
Tetracycline	0 ~ 256	3	S
Vancomycin	0 ~ 256	Etest Max 256	N.R

[0132]

[0133] <시험예 4>

[0134] 리보플라빈 측정 배지(riboflavin assay medium)에서 본 발명의 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) HY7715의 비타민 B<sub>2</sub> 생산량 측정

[0135] 인위적인 유전자 조작 생물(GMO)을 제외한 기존 보고된 락토바실러스(*Lactobacillus*), 락토코커스(*Lactococcus*), 류코노스톡(*Leuconostoc*) 속 등 유산균의 리보플라빈(riboflavin) 생성량을 살펴보면, 락토바실러스(*Lactobacillus*) 속 중 락토바실러스 퍼멘텀(*L. fermentum*)은 배양액에서 1.203mg/L[Pasquale Russo(2014)], 0.430mg/L[Mattia P. Arena(2014)], 2.29mg/L[J.G. LeBlanc(2011)], 2.8mg/L[Sathyanarayanan Jayashree(2010)]로 보고되었으며, 락토바실러스 플란타룸(*L. plantarum*)은 배양액에서 0.397mg/L[Mattia P. Arena(2014)], 0.642mg/L [Vittorio Capozzi(2011)]의 생성량이 보고되었다. 특히 M. Juarez del Valle(2014)에 따르면 *L. plantarum* CRL725은 리보플라빈 측정 배지(riboflavin assay medium)에서 리보플라빈(riboflavin) 1.1mg/L을 생성하여 기 보고된 락토바실러스 플란타룸(*L. plantarum*) 중 가장 높은 값을 보였으며, 두유에서는 1.860mg/L의 생산량을 보였다. 그 외 락토코커스 락티스(*Lactococcus lactis*) 배양액에서 0.9mg/L[Catherine Burgess(2004)], 류코노스톡 메센테로이데스(*Leuconostoc mesenteroides*) 배양액에서 0.5mg/L[Catherine M Burgess(2006)] 리보플라빈(riboflavin)의 생성이 보고되었다.

[0136] 상기 보고된 자료 중에서 본 발명의 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) HY7715와 동일한 종(species)으로 유연관계가 가장 가깝고, 가장 높은 리보플라빈(riboflavin) 생성량이 보고된 M. Juarez del Valle(2014) 논문을 참고하여 *L. plantarum* CRL 725 균주와의 비타민 B<sub>2</sub> 생산량을 비교하였다.

[0137] 이를 위해 Fabiana Fernanda Pacheco Da Silva(2016), M. Juarez del Valle(2014) 등의 논문에서 사용된 리보플라빈 측정 배지(Riboflavin assay medium)의 조성을 사용하였다.

[0138] 그 결과를 도 13에 나타내었다.

[0139] 도 13에서 확인할 수 있는 바와 같이, 리보플라빈 측정 배지(Riboflavin assay medium) 배양액에서 본 발명의 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) HY7715의 리보플라빈(riboflavin) 생성량은 8.75mg/L으로 기존 M. Juarez del Valle(2014) 논문에 보고되어있는 *L. plantarum* CRL 725의 리보플라빈(riboflavin) 생성량 1.1mg/L보다 약 8배 높은 값을 보였다. 즉, 인위적인 유전자 조작 생물(GMO)을 제외한 리보플라빈(riboflavin)을 생성하는 것으로 보고된 유산균류 중 본 발명의 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) HY7715가 리보플라빈(riboflavin)의 생성량이 가장 월등하였다.

수탁번호

[0140]

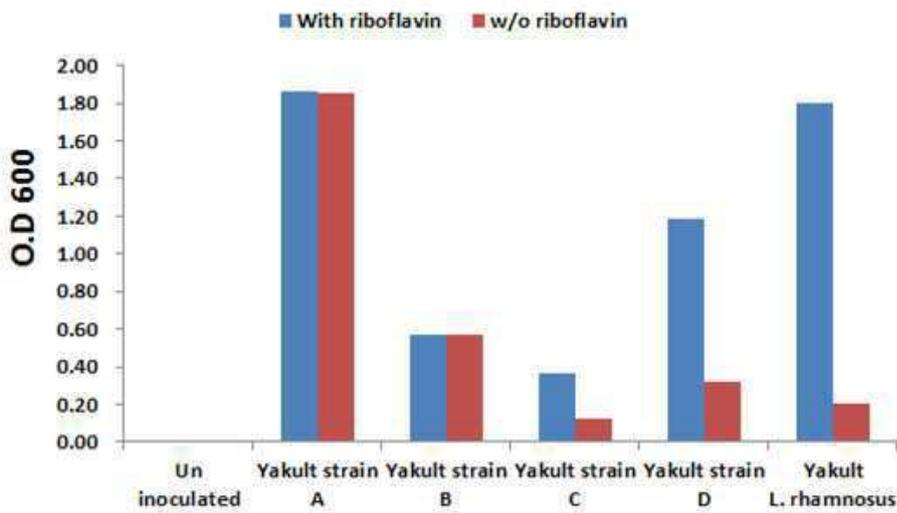
기탁기관명 : 생물자원센터

수탁번호 : KCTC13101BP

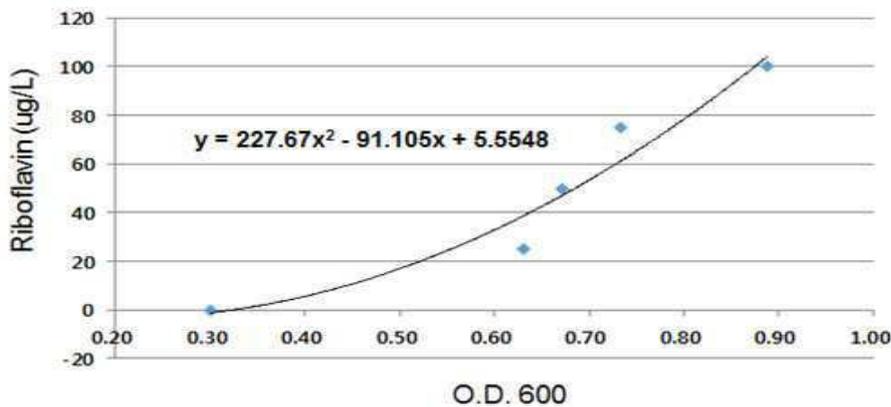
수탁일자 : 20160908

도면

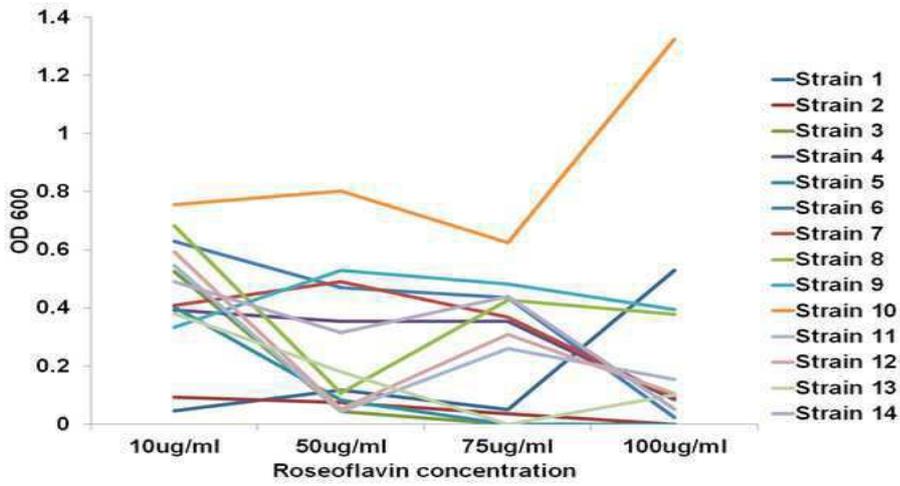
도면1



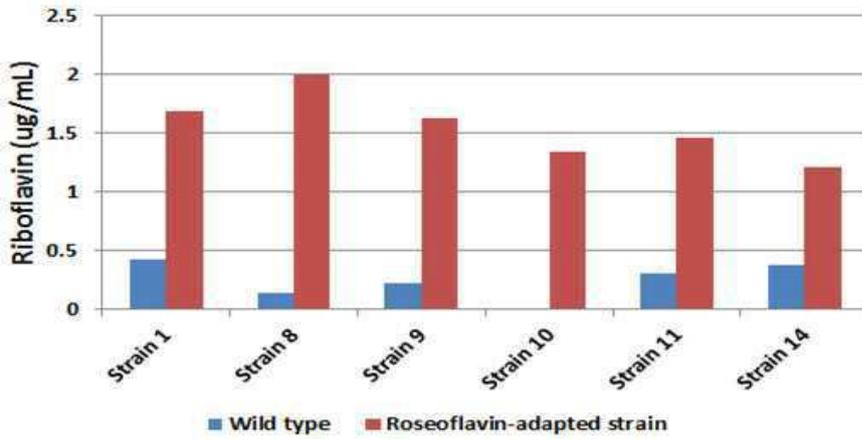
도면2



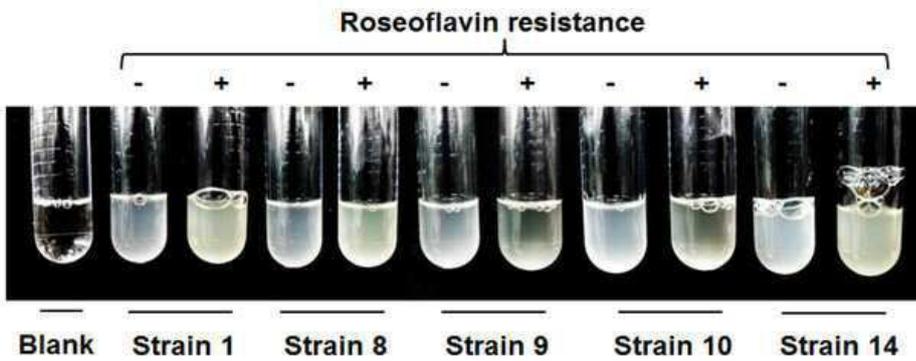
도면3



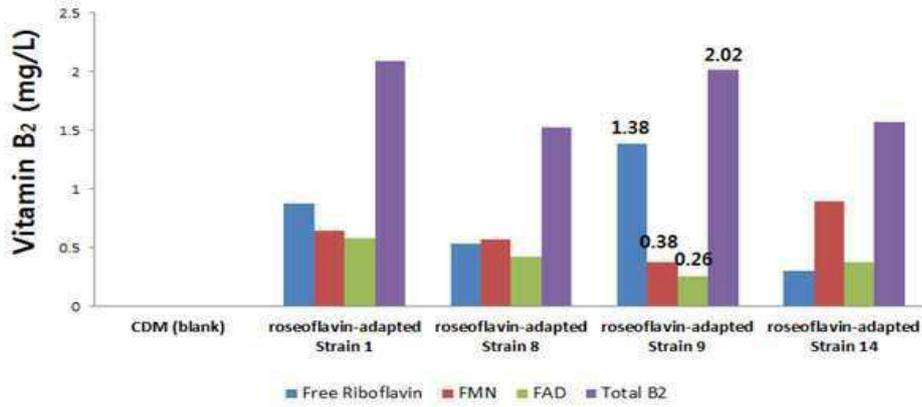
도면4



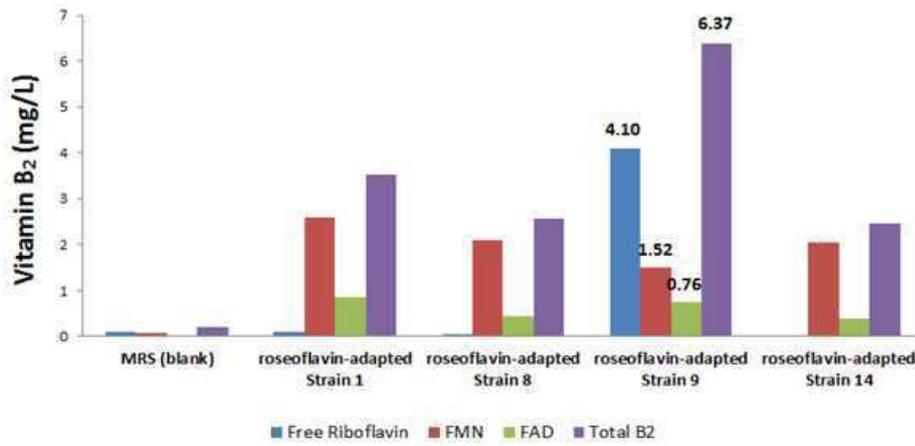
도면5



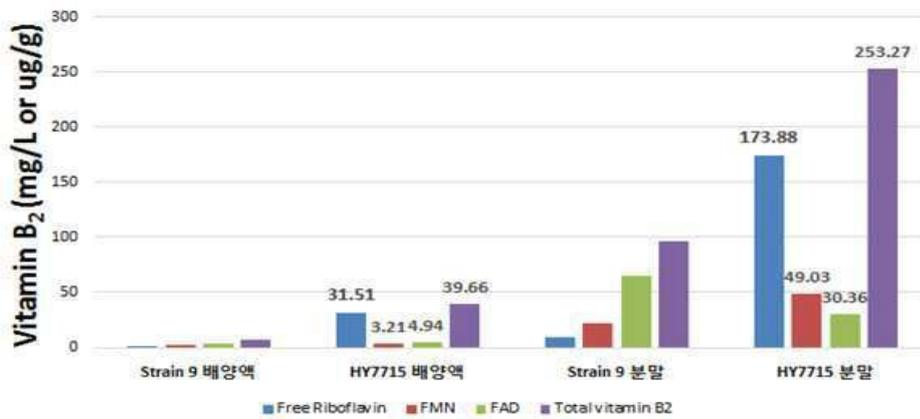
도면6



도면7



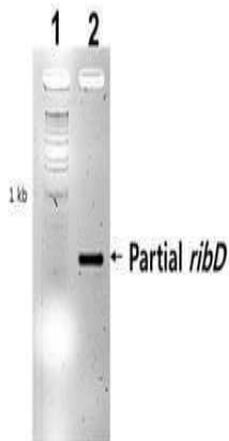
도면8



도면9



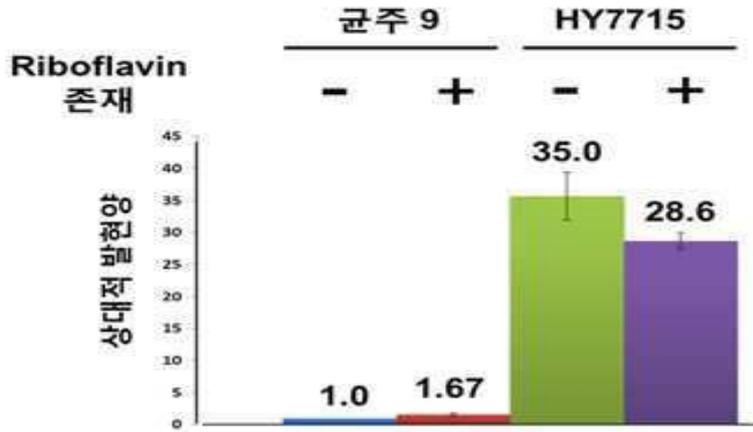
도면10



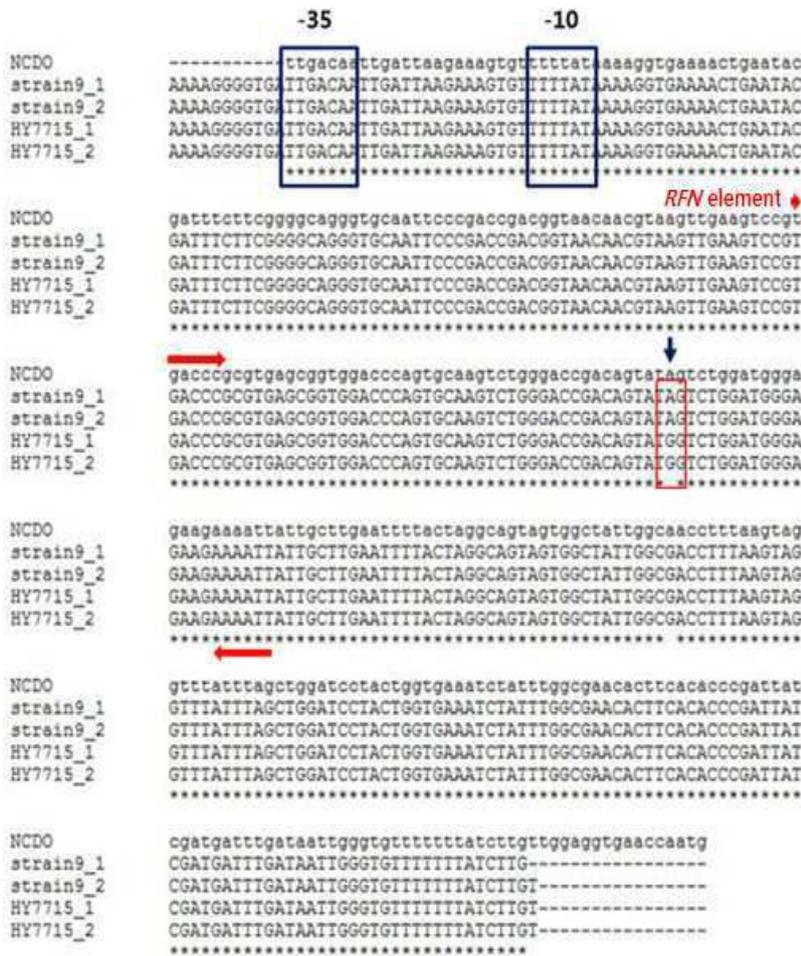
ribD-F2 primer : 5'-ATCCAATCGTGGGTGTAAG-3'

ribD-R2 primer : 5'-TATCGCCGTTTTAGGGTGA-3'

도면11



도면12



도면13

