



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2016-0116261
(43) 공개일자 2016년10월07일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12P 7/64 (2006.01) C12N 9/00 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12P 7/6409 (2013.01)
C12N 9/00 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2015-0043531
(22) 출원일자 2015년03월27일
심사청구일자 2015년03월27일

(71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)
(72) 발명자
김영준
서울특별시 서초구 효령로77길 20 1107호 (서초동, 현대ESA아파트)
허완
세종특별자치시 조치원읍 섬골길 45-4
김태균
세종시 조치원읍 세종로 2511, 고려대학교세종캠퍼스 과학기술대학 9-523
(74) 대리인
특허법인다나

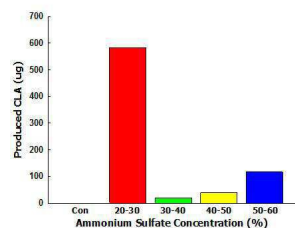
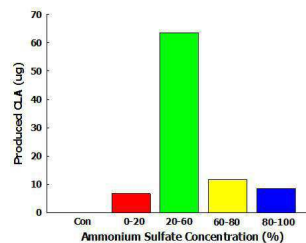
전체 청구항 수 : 총 5 항

(54) 발명의 명칭 젖산균 유래의 조효소액을 이용한 공액리놀레산의 제조방법

(57) 요약

본 발명은 젖산균 유래의 조효소액을 이용한 공액리놀레산의 제조방법에 관한 것으로, 보다 상세하게는, 장내 젖산균의 조효소액과 리놀레산과 반응시켜 유기용제의 사용 없이 안전성이 높은 공액리놀레산을 생산할 수 있고, 유기합성과는 다르게 항암 효과가 우수한 c9, t11-CLA를 선택적으로 생산하는 효과가 있다.

대표도 - 도1



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2014026479

부처명 교육부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 일반연구자지원사업

연구과제명 [2차년도]기능성 공액지방산 생합성 및 강화

기 여 율 1/1

주관기관 고려대학교 산학협력단

연구기간 2014.06.01 ~ 2015.05.31

명세서

청구범위

청구항 1

리놀레산을 기질로 하여, 비피도박테리움 브레베(*Bifidobacterium breve*) LMC520 (기탁번호: KCTC 10455BP) 균주의 조효소액을 반응시켜 공액리놀레산을 제조하는 단계를 포함하는 공액리놀레산의 제조방법.

청구항 2

제1항에 있어서,

조효소액은 비피도박테리움 브레베(*Bifidobacterium breve*) LMC520 (기탁번호: KCTC 10455BP) LMC520 균주 파쇄액에서 불용성물질을 제거한 다음, 암모늄 설페이트 포화농도가 20 내지 30%가 되도록 암모늄 설페이트를 첨가하여 해당 구간에서 응고되는 단백질을 회수하고, 투석을 통해 암모늄 설페이트를 제거하여 얻은 것인, 공액리놀레산의 제조방법.

청구항 3

제1항에 있어서,

리놀레산과 조효소액의 반응은 상온에서 수행되는, 공액리놀레산의 제조방법.

청구항 4

제1항에 있어서,

리놀레산과 조효소액의 반응은 반응 개시 후 2시간 이내에 수행되는, 공액리놀레산의 제조방법.

청구항 5

제1항에 있어서,

공액리놀레산은 시스-9, 트랜스-11 위치에 공액 이중결합을 포함하는 것인, 공액리놀레산의 제조방법.

발명의 설명

기술분야

[0001] 본 발명은 젖산균, 비피도박테리움 브레베(*Bifidobacterium breve*) LMC520의 조효소액을 이용하여 고순도의 공액리놀레산을 생합성하는 방법에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 공액리놀레산(Conjugated Linoleic Acid(CLA)는 공액결합(conjugated)을 가진 리놀레산(LA)의 이성질체를 총칭한다. 1987년 미국 위스컨신 대학의 연구팀에 의해 발견된 후 항암, 항비만, 운동능력 증진 등 다양한 기능성이 여러 차례 보고되었으며, 식품의약품안전처의 개별인정형 및 미국 FDA로부터 안정성이 검증된 세계적인 기능성 소재이다.

[0003] 다방면의 연구에 의해 널리 알려진 CLA의 고기능성에도 불구하고 그 활용에 있어서 가장 큰 문제점은 자연계에 함유량이 적다는 것이다. 따라서 대부분의 CLA는 원료로 사용되는 LA 혹은 LA의 함량이 풍부한 천연오일을 이용하여 알칼리-이성화(alkali-isomerization) 등의 유기합성을 통해 합성하고, 우레아-함유 결정화(urea-inclusion crystallization) 등을 통해 고순도의 CLA를 얻어 사용하고 있다. 하지만 이와 같은 화학적 합성은, 사용되는 유기용제의 잔류 등으로 인한 잠재 독성문제로 인하여 기능성 원료로 사용될 시 위해가 될 소지가 있다.

선행기술문헌

특허문헌

[0004] (특허문헌 0001) 대한민국 공개특허 제2004-0101551호
(특허문헌 0002) 대한민국 공개특허 제2013-0075889호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0005] 본 발명의 목적은 인체의 장내에서 분리한 젖산균, 비피도박테리움 브레베(*Bifidobacterium breve*) LMC520(이하 'LMC520'이라 함)의 조효소액을 사용하여 대량으로 공액리놀레산을 생합성하는 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0006] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 리놀레산을 기질로 하여, 비피도박테리움 브레베(*Bifidobacterium breve*) LMC520 (기탁번호: KCTC 10455BP) 균주의 조효소액을 반응시켜 공액리놀레산을 제조하는 단계를 포함하는 공액리놀레산의 제조방법을 제공한다.

발명의 효과

[0007] 본 발명은 장내 젖산균의 조효소액을 기질로 사용되는 리놀레산과 반응시켜 유기용제의 사용 없이 안전성이 높은 공액리놀레산을 생산하며, 유기합성과는 다르게 항암 효과가 우수한 c9, t11-CLA를 선택적으로 생산하는 효과가 있다.

도면의 간단한 설명

[0008] 도 1은 암모늄 셀레이트 포화농도 구간별 공액리놀레산 전환량을 비교한 결과이다.
도 2는 시간 경과에 따른 젖산균 조효소액의 공액리놀레산 전환 안정성을 확인한 결과이다.
도 3은 젖산균 조효소액의 반응시간별 공액리놀레산 전환량을 확인한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0009] 이하, 본 발명의 구성을 구체적으로 설명한다.

[0010] 본 발명자들은 등록 특허 제10-1156340호를 통해 장내 미생물의 한 종류로 장내에서 점착하여 정장작용을 나타낼 수 있는 젖산균인 LMC520이 리놀렌산을 기질로 사용하여 공액리놀렌산을 생산하는 균주임을 확인하였을 뿐만 아니라, 상기 LMC520 균주의 조효소액이 리놀레산을 기질로 하여 공액리놀레산을 생합성할 수 있음을 최초로 규명함으로써 본 발명을 완성하였다.

[0011] 따라서, 본 발명은 리놀레산을 기질로 하여, 비피도박테리움 브레베(*Bifidobacterium breve*) LMC520 (기탁번호:

KCTC 10455BP) 균주의 조효소액을 반응시켜 공액리놀레산을 제조하는 단계를 포함하는 공액리놀레산의 제조방법을 제공한다.

- [0012] 상기 조효소액은 비피도박테리움 브레베(*Bifidobacterium breve*) LMC520 (기탁번호: KCTC 10455BP) LMC520 균주 파쇄액에서 불용성물질을 제거한 다음, 암모늄 설페이트 포화농도가 20 내지 30%가 되도록 암모늄 설페이트를 첨가하여 해당 구간에서 응고되는 단백질을 회수하고, 투석을 통해 암모늄 설페이트를 제거하여 얻은 것일 수 있다.
- [0013] 상기 불용성물질은 원심분리를 통해 제거할 수 있다. 상기 원심분리는 10,000 내지 15,000 rpm, 10분 내지 20분, 4℃의 조건, 더 구체적으로, 13000 rpm, 15 분, 4℃에서 수행할 수 있으나, 이에 특별히 제한하는 것은 아니다.
- [0014] 상기 비피도박테리움 브레베(*Bifidobacterium breve*) LMC520 (기탁번호: KCTC 10455BP) 균주 파쇄액은 혐기 조건에서 MRS 배지에서 배양된 균주를 원심분리하여 상등액은 버리고, 펠렛을 세척한 후 초음파 파쇄기를 이용하여 세포를 파쇄한 것일 수 있으나, 세포 파쇄법은 공지의 기술을 이용할 수 있어 특별히 제한하지는 않는다.
- [0015] 상기 조효소액은 4℃의 온도 조건에서 1주일 경과 시 약 85%의 활성을 유지하며, 3주 경과 시 약 50%의 활성이 유지될 수 있다.
- [0016] 상기 리놀레산과 균주 조효소액의 반응은 상온, 예컨대, 20 내지 28℃, 더 구체적으로 22 내지 25℃의 온도 조건에서, 반응 개시 후 2시간 이내, 더 구체적으로, 1시간 이내에 리놀레산이 공액리놀레산으로 전환되는 반응일 수 있다.
- [0017] 본 발명의 제조방법을 통해 합성되는 공액리놀레산은 항암 효과가 우수한 시스-9, 트랜스-11 위치에 공액 이중 결합을 포함하는 공액리놀레산일 수 있다.
- [0018] 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0019] <제조예 1> 미생물 배양

- [0020] 동결건조 된 비피도박테리움 브레베(*Bifidobacterium breve*) LMC520 (기탁번호: KCTC 10455BP)을 CO₂로 치환된 혐기 상태의 20 mL 시험관에서 37℃, 18 시간 동안 0.05% L-cystein이 함유된 MRS배지 (w/v)에서 2차에 걸쳐 배양시켜 활성화를 시킨 후, 새 배지가 함유된 대량 배양기에 접종시켜 37℃, 24 시간 배양시켜 균주를 얻었다.

[0021] <제조예 2> 조효소액의 생산

- [0022] 제조예 1에서 얻은 균주 배양액을 7000 rpm, 10 분, 4℃ 조건에서 원심분리 후, 상등액을 버리고 바닥에 모여있는 균체를 Saline을 이용하여 세척하는 과정을 3회 반복하였다. 그 후 Saline에 다시 분산시킨 후 초음파 파쇄기를 이용하여(4 s 동작, 1 s 정지의 패턴으로 15 분 파쇄. AMP 30%) 세포를 파쇄하며, 모든 과정은 얼음물을 이용하여 4℃의 조건에서 수행하였다.
- [0023] 균주 파쇄액을 12000 rpm, 15 분, 4℃ 조건에서 원심분리 후 상등액을 회수하여 암모늄 설페이트(Ammonium Sulfate) 포화농도 20%에서 30% 사이에서 응고되는 단백질을 회수하고 투석막(3 kda cut off)을 사용하여 100배의 용량으로 3회 반복하여 총 100만배의 희석을 통해 암모늄 설페이트를 제거하였다.

[0024] (조효소액 반응물의 지방산 분석을 위한 전처리 (Methylation))

- [0025] 조효소액 1 mL을 내부표준물질(C17:0; 4,000 ppm / EtOH) 0.25 mL와 함께 추출용매(Hexane:Isopropanol=3:2, v/v) 5 mL에 녹인 후 포화 NaCl 3 mL과 함께 혼합하여 충분히 흔들어준 후 정지하였다. 층이 분리되면 상등액을 취해, 새로운 유리관에 옮겨 55℃ 조건에서 질소농축을 실시하였다. 용매가 다 날라가면, 톨루엔 0.5 mL, 5% KOH (MeOH) 2 mL을 넣어주고 충분히 흔들어 준 후, 70℃에서 8분간 반응 후, 흐르는 물로 냉각시켰다. 14% BF₃ 용액 2 mL을 넣어 충분히 흔들어준 후 다시 한번 70℃에서 8분간 반응 후 냉각시켰다. 여기에 헥산 0.5 mL, 포

화 NaCl 5 mL을 더 넣은 후 충분히 흔들어주고 정치하였다. 층이 완전히 분리되면 상층액을 소듐 설페이트 무수물(Anhydrous sodium sulfate)가 들어있는 용기에 옮겨 수분을 제거한 후 용액만을 분석용 용기에 옮겨 분석하였다.

[0026] (GC/FID의 분석 조건)

[0027] GC/FID system(Agilent 7890A)를 사용하였으며 컬럼은 Supelcowax-10 fused silica capillary column (100 m × 0.32 mm i.d., 0.25 μm film thickness)를 이용하였다. 이동상으로 사용된 헬륨은 1.2 mL/min의 속도로 공급하였으며 시료 주입기 및 검출기의 온도는 260℃, 오븐은 분당 4℃씩 190℃ 에서 240℃까지 승온시킨 후 유지하였다.

[0028] <실시예 1> 암모늄 설페이트 포화농도별로 회수되는 조효소액의 CLA 생산량 확인

[0029] 균주 파쇄액에 암모늄 설페이트 포화농도 구간에 해당하는 암모늄 설페이트를 넣어 각 구간에서 응고되는 단백질을 회수한 후 투석을 통해 암모늄 설페이트를 제거하여 조효소액을 시료를 확보하였다.

[0030] 이 조효소액에 2 mM의 농도가 되도록 LA를 첨가하여 상온에서 1시간 동안 반응시킨 후 CLA 함량을 분석하였다.

[0031] 도 1에 나타난 바와 같이, 균주 파쇄액 내 단백질 중 암모늄 설페이트 포화농도별 단백질을 회수하여 CLA 전환 활성을 확인한 결과 20%~ 30% 구간의 조효소액이 가장 높은 전환 활성을 나타내었다. 따라서 CLA 생산을 위한 조효소액은 20%~30%의 농도에서 응집되는 단백질로 이루어진 조효소액이 적합하다.

[0032] <실시예 2>. 시간의 경과에 따른 조효소액의 CLA 전환 안정성 확인

[0033] 최적의 활성을 나타내는 구간인 암모늄 설페이트 20~30% 구간의 조효소액에 2 mM의 농도가 되도록 LA를 첨가하여 1시간 동안 반응시킨 후 CLA 함량을 분석하였다. 그 후, 4℃의 조건에서 보관하면서 CLA 전환 활성을 측정하여 조효소액의 안정성을 확인하였다.

[0034] 도 2에 나타난 바와 같이, 조효소액 생산 후 1주일 경과 시 약 85%의 활성이 잔존하며, 3주 경과 시 약 50%의 활성이 잔존하였다. 따라서 조효소액 생산 시 가능한 바로 CLA를 생산하는 것이 요구된다.

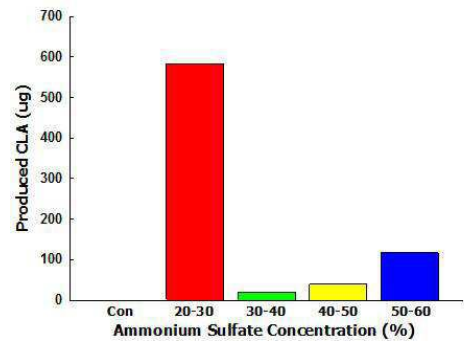
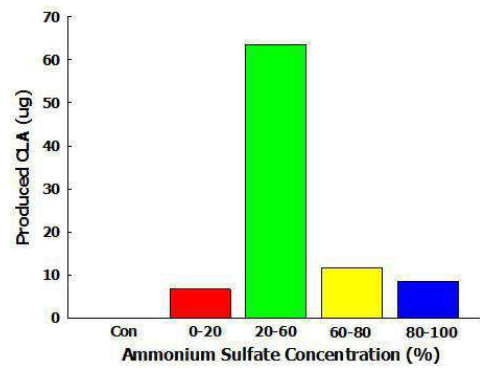
[0035] <실시예 3> CLA 생산을 위한 조효소액 처리시 합리적인 반응시간 확립

[0036] 최적의 활성을 나타내는 구간인 암모늄 설페이트 20~30% 구간의 조효소액에 2 mM의 농도가 되도록 LA를 첨가하여 상온에서 반응시간별 CLA 전환량을 측정하였다.

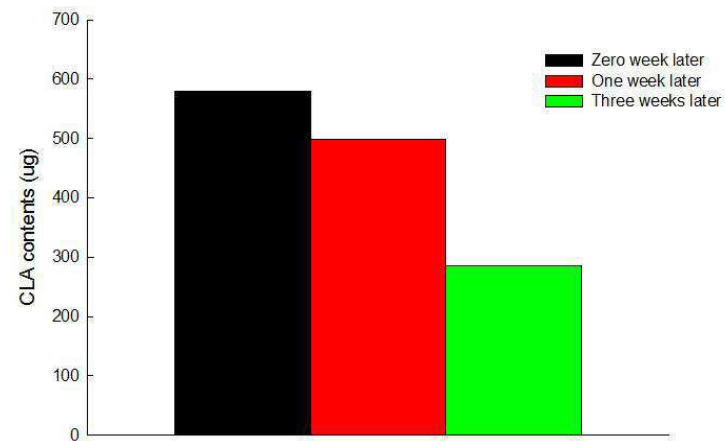
[0037] 도 3에 나타난 바와 같이, 조효소액과 기질의 반응 후 1시간이 지난 시점에서 거의 대부분의 CLA가 합성되어 최적 반응시간은 1시간이 적합하다.

도면

도면1



도면2



도면3

