

	(19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)	(11) 공개번호 10-2012-0085464 (43) 공개일자 2012년08월01일
(51) 국제특허분류(Int. Cl.) C12N 1/20 (2006.01) C12P 21/06 (2006.01) A23C 11/10 (2006.01) C12R 1/225 (2006.01) (21) 출원번호 10-2011-0006797 (22) 출원일자 2011년01월24일 심사청구일자 2011년01월24일	(71) 출원인 고려대학교 산학협력단 서울 성북구 안암동5가 1 (72) 발명자 김세현 서울특별시 강남구 학동로 609, 삼익@ 14동 1002호 (청담동) 전태훈 서울특별시 송파구 양재대로 1218, 올림픽선수촌 아파트 236동 1802호 (방이동) (74) 대리인 이문섭	

전체 청구항 수 : 총 7 항

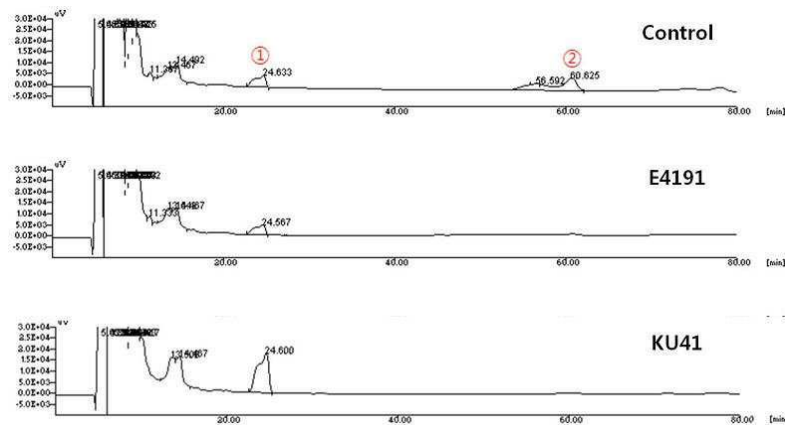
(54) 발명의 명칭 대두 사포닌 분해능을 갖는 유산균 및 이를 함유하는 대두 사포닌 분해용 조성물

(57) 요약

본 발명은 대두 사포닌 분해능을 갖는 새로운 유산균에 관한 것으로, 더욱 구체적으로 β -글루코시다아제 분해능력이 우수하고, 내산성 및 내담증성이 우수한 락토바실러스 존소니이(*Lactobacillus johnsonii*) MH8 KU41, 및 이를 유효성분으로 함유하는 대두 사포닌 분해용 조성물에 관한 것이다.

본 발명에 따르면 이집트 유아 분변, 한국 유아 분변 및 김치로부터 β -글루코시다아제 생산 능력이 우수한 유산균들을 분리할 수 있으며, 상기 유산균들 중 락토바실러스 존소니이(*Lactobacillus johnsonii*) MH8 KU41은 β -글루코시다아제 생산 능력이 우수할 뿐만 아니라, 내산성 및 내담증성에 내성을 갖고, 인체에도 무해한 특성을 갖는다. 따라서 본 발명의 유산균 균주는 기능성 식품 제조에 대한 산업적 이용가치가 우수한 균으로의 사용 가능성을 제시하고, 나아가 기능성 두유제품에 효과적으로 사용될 수 있다.

대표도 - 도3



(72) 발명자

임지영

서울특별시 마포구 성미산로5길 55-9, 진흥테크빌
402호 (성산동)

이슬

서울특별시 중구 필동로 13 (필동2가)

윤현선

서울특별시 강남구 압구정동 신현대아파트 102-502

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 109141032SB010

부처명 농림수산식품부

연구사업명 농림기술개발사업

연구과제명 녹두의 신규 항염증 성분과 사포닌 발효수식을 이용한 염증 완화 유제품개발

주관기관 고려대학교

연구기간 2009.04.10 ~ 2012.04.09

특허청구의 범위

청구항 1

대두 사포닌 분해능을 갖는 것을 특징으로 하는 락토바실러스 존소니이(*Lactobacillus johnsonii*) MH8 KU41.

청구항 2

제 1항에 있어서, β -글루코시다아제 생산 능력이 우수하고, 내산성 및 내담즙성이 우수한 것을 특징으로 하는 락토바실러스 존소니이(*Lactobacillus johnsonii*) MH8 KU41.

청구항 3

락토바실러스 존소니이(*Lactobacillus johnsonii*) MH8 KU41 또는 락토바실러스 살리바리우스(*Lactobacillus salivarius*) E4191 또는 그들의 파쇄물을 유효성분으로 포함하는 대두 사포닌 분해용 조성물.

청구항 4

제 3항에 있어서, 상기 파쇄물은 상기 균주들의 현탁액을 초음파 분쇄하고, 원심분리하여 얻은 상등액인 것을 특징으로 하는 대두 사포닌 분해용 조성물.

청구항 5

락토바실러스 존소니이(*Lactobacillus johnsonii*) MH8 KU41 또는 락토바실러스 살리바리우스(*Lactobacillus salivarius*) E4191 또는 그들의 파쇄물 및 두류 추출물을 포함하는 두유제품.

청구항 6

락토바실러스 존소니이(*Lactobacillus johnsonii*) MH8 KU41 또는 락토바실러스 살리바리우스(*Lactobacillus salivarius*) E4191 또는 그들의 파쇄물을 이용하여 사포닌이 분해된 두류 추출물을 포함하는 두유제품.

청구항 7

제 5항 또는 제 6항에 있어서, 상기 두류는 대두, 녹두, 적두, 약콩, 선비콩, 강낭콩, 완두콩, 작두콩, 백태 및 서리태로 이루어진 군 중에서 선택되는 것을 특징으로 하는 두유제품.

명세서

기술 분야

[0001] 본 발명은 대두 사포닌 분해능을 갖는 새로운 유산균에 관한 것으로, 더욱 구체적으로 β -글루코시다아제 분해 능력이 우수하고, 내산성 및 내담즙성이 우수한 락토바실러스 존소니이(*Lactobacillus johnsonii*) MH8 KU41, 및 이를 유효성분으로 함유하는 대두 사포닌 분해용 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 현대인들은 스트레스, 영양불균형 등에 의한 성인병 발병률이 증가하고 있는데, 이는 식생활과 연관성이 보고되

면서 식품과 안전성이 부각되고 있다. 따라서 이러한 질병을 예방 및 치료하기 위하여 천연식물들에서 안전성이 입증된 생리활성물질 탐색, 및 이를 이용한 기능성 식품 및 의약품 개발 등에 관한 연구가 활발히 진행되고 있다.

[0003] 유산균은 글루코오스 등 당류를 분해하여 젖산을 생성하는 균으로서, 발효에 의해 생성되는 대사산물에 의해 병원균과 유해세균을 억제하는 성질을 식품제조에 이용한다 [Fuller, R. 1989. Probiotics in man and animals. *J. Appl. Bacteriol.* 66, 365-378.].

[0004] 사포닌은 식물에 널리 분포되어 있는 열에 안정한 배당체(glycoside)로서, 비극성의 스테로이드(steroid)인 트리테르페노이드 아글리콘(triterpenoid aglycone, sapogenin)에 한 개 이상의 당이 연결된 구조를 가지는 다양한 화합물을 지칭한다. 사포닌의 구조적 특성인 양친매성은 장내에서 콜레스테롤과 결합하여 체내로 배출됨으로써 콜레스테롤 감소효과를 나타내기도 하며, 세포막의 특정 구성성분과 반응하여 세포막의 투과성을 변화시킴으로써 면역촉진 및 항균 등의 활성을 보이기도 한다 [Sparg SG, Light ME, van Staden J. 2004. Biological activities and distribution of plant saponins. *J. Ethnopharmacol.* 94: 219-243; Lee SO, Simons AL, Murphy PA, Hendrich S. 2005. Soyasaponins lowered plasma cholesterol and increased fecal bile acids in female golden Syrian hamsters. *Exp. Biol. Med.* 230: 472-478]. Gurfinkel과 Rao (2003)[Gurfinkel DM and Rao AV. 2003. Soyasaponins: The relationship between chemical structure and colon anticarcinogenic activity. *Nutr. Cancer.* 47: 24-33]에 따르면, 대장세포에 대한 대두 사포닌의 항암활성은 아글리콘(aglycone) 형태의 사포닌이 배당체 형태보다 훨씬 높은 활성을 보인다고 하였으며, 이는 사포닌의 화학적 구조가 생물학적 활성과 밀접한 관계를 가지고 있음을 의미한다. 생리활성을 증가시키기 위한 비배당화 방법은 가수분해, 효소적 변화 그리고 미생물의 β -글루코시다아제(glucosidase)에 의한 비배당화를 들 수 있다. 일부 유산균도 배당체를 가수분해 시키는 것으로 알려져 있다 [Matsuda, S., Norimoto, F., Matsumoto, Y., Ohba, R., Teramoto, Y., Ohta, N. and Ueda, S. 1994. Solubilization of a Novel Isoflavone glycoside-hydrolyzing β -glucosidase from *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus*. *J. Ferment. Bioeng.* 77(4), 439-441].

[0005] 이에, 본 발명자들은 다양한 원천으로부터 분리한 유산균 균주들 중에서 대두 사포닌 분해 능력이 우수한 유산균만을 발굴하였으며, 이들 균주가 다른 유산균 균주들과 비교하여 우수한 β -글루코시다아제 생산 능력 및 내산성 및 내담증성이 우수함을 확인하고 본 발명을 완성하게 되었다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 따라서 본 발명의 주된 목적은 β -글루코시다아제 생산 능력이 우수하고, 내산성 및 내담증성이 우수한 락토바실러스 존소니이(*Lactobacillus johnsonii*) MH8 KU41을 제공하는 데 있다.

[0007] 본 발명의 다른 목적은 상기 유산균을 이용한 대두 사포닌 분해용 조성물을 제공하는데 있다.

과제의 해결 수단

[0008] 본 발명의 한 양태에 따르면, 본 발명은 대두 사포닌 분해능을 갖는 것을 특징으로 하는 락토바실러스 존소니이(*Lactobacillus johnsonii*) MH8 KU41을 제공한다.

[0009] 본 발명자들은 대두 사포닌 분해능력이 우수한 유산균 균주를 분리하고자, 이집트 유아 분변으로부터 5종, 한국 유아 분변으로부터 27종 및 김치로부터 12종 의 유산균을 분리하고 이들 유산균의 β -글루코시다아제(glucosidase)를 생산하는 능력을 평가하였다. 그 결과, 락토바실러스 존소니이(*Lactobacillus johnsonii*) 균주를 우수한 β -글루코시다아제 생산 능력을 갖는 균주로서 확인하였으며, 상기 균주를 락토바실러스 존소니이(*Lactobacillus johnsonii*) MH8 KU41로 명명하고, 2010년 12월 29일자로 한국미생물보존센터에 기탁하여, 기탁번호 KFCC11501P를 부여받았다.

[0010] 본 발명에 따른 유산균 균주, 락토바실러스 존소니이(*Lactobacillus johnsonii*) MH8 KU41는 β -글루코시다아제 생산 능력이 우수하고, 내산성 및 내담증성이 우수한 것을 특징으로 한다.

[0011] 본 발명의 구체적인 실시예에서는 본 발명의 락토바실러스 존소니이(*Lactobacillus johnsonii*) MH8 KU41이 락토

바실러스 살리바리우스(*Lactobacillus salivarius*) E4191와 함께 높은 β -글루코시다아제 효소 활성을 나타내었다 (도 1 참조). 또한 내산성 조건(pH 2.5)에서 상기 두 균주 모두 3 시간이 지나도 사멸되지 않고 95% 정도의 생존율을 보였으며, 담즙에 대한 내성을 측정한 경우에도 담즙에 대한 생존율이 두 균주 모두 80% 이상의 생존율을 나타내었다 (도 3a 참조).

[0012] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 락토바실러스 존소니이(*Lactobacillus johnsonii*) MH8 KU41 또는 락토바실러스 살리바리우스(*Lactobacillus salivarius*) E4191 또는 그들의 파쇄물을 유효성분으로 포함하는 대두 사포닌 분해용 조성물을 제공한다.

[0013] 본 발명에 있어서, 상기 유산균 파쇄물은 상기 균주에서 생산되는 β -글루코시다아제를 포함하는 어떤 형태의 파쇄물일 수 있으며, 예컨대 상기 균주들의 현탁액을 초음파 분쇄하고, 원심분리하여 얻은 상등액인 것을 특징으로 한다.

[0014] 본 발명에 따른 상기 유산균 균주 또는 그들의 파쇄물의 사포닌 분해 능력을 측정해본 결과, soyasaponin Bb의 분해율이 측정된 다른 유산균주들과 비교하여 매우 높은 사포닌 분해율을 보였다 (도 2 참조).

[0015] 본 발명의 한 양태에 따르면, 본 발명은 락토바실러스 존소니이(*Lactobacillus johnsonii*) MH8 KU41 또는 락토바실러스 살리바리우스(*Lactobacillus salivarius*) E4191 또는 그들의 파쇄물 및 두류 추출물을 포함하는 두류 제품을 제공한다.

[0016] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 락토바실러스 존소니이(*Lactobacillus johnsonii*) MH8 KU41 또는 락토바실러스 살리바리우스(*Lactobacillus salivarius*) E4191 또는 그들의 파쇄물을 이용하여 사포닌이 분해된 두류 추출물을 포함하는 두류제품을 제공한다.

[0017] 본 발명에 있어서, 상기 두류는 대두, 녹두, 적두, 약콩, 선비콩, 강낭콩, 완두콩, 작두콩, 백태 및 서리태로 이루어진 군 중에서 선택되는 것을 특징으로 한다.

[0018] 본 발명에 따른 상기 유산균 균주는, 내산성 및 내담즙성에 대해 우수한 내성을 가지며 (도 4a 참조), 뿐만 아니라 인체 내에서도 용혈성 독성이 없고, 암모니아 생성 확인으로 유해 대사산물을 생산하지 않는 것으로 확인되었다 (도 4b 참조). 따라서 본 발명의 유산균 균주는 인체에 대해 독성을 나타내지 않으므로, 기능성 식품 제조를 위해 첨가될 수 있는 프로바이오틱스로 사용될 수 있다. 특히 본 발명에 따른 유산균 균주에 의해 사포닌이 분해되어 비배당화됨으로써 항암활성등을 더욱 높힐 수 있을 뿐만 아니라 [Gurfinkel DM and Rao AV. 2003. Soyasaponins: The relationship between chemical structure and colon anticarcinogenic activity. *Nutr. Cancer*. 47: 24-33], 사포닌 분해에 의해 콩비린내를 감소시킬 수 있으므로 [Miyanoto Taku, Miki Takashi, Kataoka Kei, Yoshiki Yumiko, Okubo Kazuyoshi and Yoneya Takefumi. 1999. Fermentation effects of lactic acid bacteria on soybean saponins. *Food Preservation Science* Vol. 25 No. 3], 두류 추출물을 함께 포함하여 기능성 두류제품을 제조할 수 있다.

발명의 효과

[0019] 이상 설명한 바와 같이, 본 발명에 따르면 이집트 유아 분변, 한국 유아 분변 및 김치로부터 β -글루코시다아제 생산 능력이 우수한 유산균들을 분리할 수 있으며, 상기 유산균들 중 락토바실러스 존소니이(*Lactobacillus johnsonii*) MH8 KU41은 β -글루코시다아제 생산 능력이 우수할 뿐만 아니라, 내산성 및 내담즙성에 내성을 갖고, 인체에도 무해한 특성을 갖는다. 따라서 본 발명의 유산균 균주는 기능성 식품 제조에 대한 산업적 이용 가치가 우수한 균으로의 사용 가능성을 제시하고, 나아가 기능성 두류제품에 효과적으로 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0020] 도 1은 분리 및 동정된 프로바이오틱스 균주들의 β -글루코시다아제 효소 활성을 측정한 결과이다.

도 2는 선발된 프로바이오틱스 균주 파쇄물들의 대두 사포닌 분해 능력을 HPLC로 측정한 결과이다.

도 3은 락토바실러스(*Lactobacillus*) E4191 및 KU41 균 자체의 대두 사포닌 분해 능력을 HPLC로 측정한 결과이다.

도 4은 락토바실러스(*Lactobacillus*) E4191 및 KU41의 내산성 및 내담즙성 평가 결과를 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0021] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하기로 한다. 이들 실시예는 단지 본 발명을 예시하기 위한 것이므로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지는 않는다.

[0022] 실시예 1. 유산균의 분리 및 동정

[0023] 하기 표 1의 다양한 유산균주는 한국의 아기와 이집트 아이의 분변 및 김치에서 분리한 균주이며, MRS(Man, Rogosa, and Saharpe) 선별배지를 이용하여 37 °C에서 18 시간 동안 배양하여 분리하였다. 분리 및 선택되어진 45개 균주로부터 16S rRNA를 분리하여 DNA 시퀀싱(sequencing)에 의해 각 균주를 동정하였다. 동정된 균주들은 하기 표 1에 나타내었다.

[0024] [표 1. 유산균주]

프로바이오틱스	균주명
probiotics KU1	Lactobacillus gasseri KU1
probiotics KU2	Lactobacillus gasseri KU2
probiotics KU3	Lactobacillus gasseri KU3
probiotics KU5	Lactobacillus gasseri KU5
probiotics KU6	Lactobacillus gasseri KU6
probiotics KU9	Lactobacillus gasseri KU9
probiotics KU10	Lactobacillus gasseri KU10
probiotics KU11	Lactobacillus gasseri KU11
probiotics KU12	Lactobacillus gasseri KU12
probiotics KU16	Lactobacillus gasseri KU16
probiotics KU20	Lactobacillus gasseri KU20
probiotics KU23	Lactobacillus gasseri KU23
probiotics KU24	Lactobacillus gasseri KU24
probiotics KU25	Lactobacillus sp. 24DCCH01MX KU25
probiotics KU29	Lactobacillus gasseri KU29
probiotics KU30	Lactobacillus gasseri KU30
probiotics KU32	Lactobacillus gasseri KU32
probiotics KU36	Lactobacillus gasseri KU36
probiotics KU37	Lactobacillus gasseri KU37
probiotics KU39	Lactobacillus gasseri KU39
probiotics KU41	Lactobacillus johnsonii strain MH8 KU41
probiotics KU42	Lactobacillus gasseri KU42
probiotics KU44	Lactobacillus gasseri KU44
probiotics 308	actobacillus salivarius SWW308
probiotics 310	Leuconostoc mesenteroides subsp. mesenterides SKR310
probiotics 311	Lactobacillus fermentum QWW311
probiotics 402	Leuconostoc mesenteroides subsp. mesenterides KFM402
probiotics 408	Leuconostoc mesenteroides subsp. mesenterides MSK408
probiotics 410	Leuconostoc mesenteroides subsp. mesenterides KDK410
probiotics 411	Leuconostoc mesenteroides subsp. mesenterides KDK411
probiotics 414	Leuconostoc mesenteroides subsp. mesenterides SRK414
probiotics 421	Leuconostoc paramesenteroides KJP421
probiotics KM13	Lactobacillus fermentum strain IMAU70162 KM13
probiotics KM29	Lactobacillus fermentum strain IMAU70086 KM29
probiotics KY21	Lactobacillus gasseri KY21
probiotics KY210	Lactobacillus fermentum KY210
probiotics E11	Lactobacillus fermentum strain IMAU70162 E11
probiotics E30L	Lactobacillus fermentum strain IMAU70162 E30L
probiotics E432L	Lactobacillus fermentum strain IMAU70162 E432L
probiotics E464L	Lactobacillus fermentum strain SFCB2-3 E464L
probiotics E4191	Lactobacillus salivarius E4191
probiotics 419	Lactobacillus curvatus KFP419

[0025]

[0026] **실시예 2. β -글루코시다아제(β -glucosidase) 생산 균주의 선발**

[0027] β -글루코시다아제 분비능력이 우수한 유산균을 선발하기 위해, Daroit 등 (2008)[Daroit DJ, Simonetti A, Hertz PF, Brandelli A. 2008. Purification and characterization of an extracellular beta-glucosidase from Monascus purpureus. J Microbiol Biotechnol. 18 (5):933-41]의 방법을 이용하여 아래의 방법을 사용하여 평가하였다.

[0028] 실시예 1에서 분리·동정된 균들을 계대배양한 배양액을 원심분리하여 얻은 세포가 제거된 상등액을 조효소액으로 이용하고, 아세트산나트륨(sodium acetate) 완충액(50 mM, pH 6)에 pNPG(p-nitrophenyl- β -D-glucopyranoside, Sigma-Aldrich)의 농도가 10 mM이 되도록 용해시킨 후, 250 mM 구연산나트륨(sodium citrate) 버퍼 (pH 4.5) 90 μ L와 조효소액 100 μ L에 기질 용액을 10 μ L 첨가하여 37 $^{\circ}$ C에서 10 분간 반응시켰다. 효소반응은 1 mL의 0.1 M 탄산나트륨(sodium carbonate) 완충액을 주입하여 종결하였다. 생성된 p-nitrophenol 양은 450 nm에서 흡광도를 측정하고, 미리 구한 표준선을 이용하여 β -글루코시다아제 1 유닛

(unit)을 37 ℃, pH 4.5 조건에서 1 분 동안 1 μM의 p-nitrophenol을 생성하는 효소의 양으로 정의하였다. p-nitrophenol 용액(Sigma-Aldrich)을 여러 농도로 희석한 뒤 450 nm에서 흡광도를 측정하여 표준선을 작성하였다.

[0029] 측정 결과, 도 1에서 보이는 바와 같이 KU12, KU20, 308, E11, E30L 및 KY21의 6개의 균주를 제외하고는 β-글루코시다아제 활성(β-glucosidase activity)을 가지는 것을 확인하였다. 가장 높은 β-글루코시다아제 효소 활성을 나타낸 균주는 이집트 유아 분변에서 분리된 락토바실러스 살리바리우스(*Lactobacillus salivarius*) E4191로서 효소 활성이 0.1±0.03 unit/mg protein이었으며, 한국 유아 분변에서 분리된 락토바실러스 존소니(*Lactobacillus johnsonii*) MH8 KU41의 경우에도 효소 활성이 0.8±0.4 unit/mg protein 으로 높은 β-글루코시다아제 생산 활성을 보였다. 반면, 락토바실러스 가세리(*Lactobacillus gasseri*) KY21, 락토바실러스 가세리(*Lactobacillus gasseri*) KU12 균주들은 가장 낮은 효소 활성을 나타내었다.

[0030] 이후, β-글루코시다아제 효소 활성이 높은 상위 5개 균주 KU41, KU44, 410, KU42 및 E4191와 하위 2개 균주 KU12 및 KY21를 가지고 사포닌 분해능력을 측정하는데 사용하였다. 본 발명에 따른 유산균의 특성은 다음과 같다.

[0031] - *Lactobacillus johnsonii* MH8 KU41

[0032] 1) 균의 형태

[0033] 엠알에스(MRS) 한천평판배지에서 37℃, 2일간 배양했을 때 균의 특성

[0034] ① 세포의 형태: 간균

[0035] ② 운동성: 없음

[0036] ③ 포자형성능: 없음

[0037] ④ 그람(Gram) 염색: 양성

[0038] 2)생리적 성질

[0039] ① 생육온도: 생장가능 생육온도: 25~40℃, 최적 생장온도: 36~38℃

[0040] ② 생육 pH: 생장가능 생육 pH: 5.0~7.5, 최적 pH: 6.0~6.5

[0041] ③ 산소에 대한 영향: 통성혐기성

[0042] 4) 카탈라제: -

[0043] 5) 가스형성여부: -

[0044] 6) 당 발효 시험 (탄소원)

[0045] 포도당: +

[0046] - *Lactobacillus salivarius* E4191

[0047] 1) 균의 형태

[0048] 엠알에스(MRS) 한천평판배지에서 37℃, 2일간 배양했을 때 균의 특성

[0049] ① 세포의 형태: 간균

[0050] ② 운동성: 없음

[0051] ③ 포자형성능: 없음

[0052] ④ 그람(Gram) 염색: 양성

[0053] 2)생리적 성질

[0054] ① 생육온도: 생장가능 생육온도: 25~40℃, 최적 생장온도: 36~38℃

[0055] ② 생육 pH: 생장가능 생육 pH: 5.0~7.5, 최적 pH: 6.0~6.5

[0056] ③ 산소에 대한 영향: 통성혐기성

[0057] 4) 카탈라제: -

[0058] 5) 가스형성여부: -

[0059] 6) 당 발효 시험 (탄소원)

[0060] 포도당: +

[0061] 실시예 3. 유산균의 대두 사포닌 분해능력 측정

[0062] 3-1. 균 준비

[0063] 상기 실시예 2에서 사포닌 분해 능력을 측정하기 위해 선정한 7개의 유산균은 사포닌 분해능력 측정 실험에 사용하기 전에, TY broth (pH 6.8)에 1% 글루코스(glucose)를 첨가한 배지에서 3회 이상 계대하여 활력을 높였다. TY broth의 조성은 다음과 같다: 1% tryptone, 0.5% yeast extract, 0.1% Tween 80 및 0.002% L-cysteine HCl.

[0064] 3-2. 균 현탁액 및 crude enzyme 준비

[0065] 미리 배양해 놓은 균 현탁액 1 ml을 글루코스(glucose)가 첨가된 1 L의 TY broth에 접종하여 30 ℃에서 24 시간 배양하였다. 배양 후, 원심분리(3,000×g, 20 분, 4 ℃)하여 균을 모은 후, 모은 균체는 McIlvaine buffer(pH 5.0)로 2번 세척한 뒤, McIlvaine buffer 10 mL에 현탁시킨다. 이후 균 현탁액을 초음파분쇄기(UP200s Ultraschallprozessor, Dr Hielscher; 20 kHz, 0.5 cycle, 90% amplitude)를 이용하여 파쇄하고, 원심분리(17,500×g, 10 분, 4 ℃)하여 상등액을 모은다. 이렇게 모은 상등액은 crude enzyme 용액으로 사용하였다.

[0066] 3-3. 유산균에 의한 대두 사포닌 분해능력 확인

[0067] 상기 3-2의 10 mL의 crude enzyme 용액 또는 유산균 자체 용액과 20 mL의 0.5% 대두 사포닌 용액을 혼합하여 24 시간 배양하였다. 배양 후, 원심분리(1,000×g, 20 분)하여 균을 제거한 뒤, 동량의 n-부탄올(butanol)을 첨가하였다. 이후 상기 혼합액의 윗층(n-butanol 층)은 HPLC(high performance liquid chromatography)를 이용한 대두 사포닌 분해 능력을 측정하는데 사용하였다. 대두 사포닌 분해 능력은 샘플의 반응 전, 즉 사포닌을 함유한 배지에 균을 접종하지 않은 대조군의 soyasaponin Bb의 peak 면적(A)과 균을 접종하여 반응시킨 후의 soyasaponin Bb의 peak 면적(B)을 HPLC로 측정한 후, 하기의 수학적식을 이용하여 사포닌 분해 능력을 계산한다.

[0068] <수학적식>

[0069] 사포닌 분해능력(%) = 100(A-B)/A

[0070] 3-4. HPLC 분석

[0071] HPLC를 이용한 사포닌 분해측정은 YMC PACK ODS-AQ column을 이용한 LC-CA 모델을 사용하였다. 전개용매로는 acetonitrile : isopropanol : water : acetic acid : EDTA를 34 : 6 : 60 : 0.1 : 0.01(v/v/v/v/g)의 비율로 사용하였으며, flow rate는 0.5 ml/min으로 설정 하였다. 20 μL의 샘플을 컬럼(column)에 주입하고 대두 사포닌을 UV detector를 이용하여 205 nm에서 측정하였다. B그룹 사포닌의 분해는 HPLC방법 [SHIRAIWA, M. 1991 (Shiraiwa, M., Harada, K., and Okubo, K. 1991. Composition and structure of “group B saponin” in soybean seed. *Agric. Biol. Chem.* 55:911-917)]을 이용하여 검출하였다.

[0072] HPLC 결과, 도 2(유산균 파쇄물) 내지 3(유산균 자체; KU41 및 E4191) 및 하기 표 2(유산균 파쇄물) 내지 3(유산균 자체; KU41 및 E4191)에서 보이는 것과 같이 측정된 7개 프로바이오틱스의 soyasaponin Bb의 분해율은 56%에서 100%로 나타났다. 이 중 락토바실러스 존소니이(*Lactobacillus johnsonii*) strain MH8 KU41과 락토바실러스 살리바리우스(*Lactobacillus salivarius*) E4191을 파쇄하여 측정한 경우에는 분해율이 모든 경우에서 100%

를 나타내었으며, 파쇄하지 않은 경우에는 두 유산균 모두 soyasaponin Bb만을 100% 분해하는 것을 확인하였다.

[표 2. HPLC 결과(유산균 파쇄물)]

	① peak area	② peak area	① Hydrolyzing activity	② Hydrolyzing activity
Control	10182525	108894661	-	-
KU12	4091515	127014	59.81826708	88.33606728
KU41	0	0	100	100
KU44	442991	13268124	56.49497546	87.81563405
410	718040912	17175328	-605.1698002	84.22757568
KY21	4073145	11922802	59.9986742	89.05106835
KU42	3733645	0	63.33281774	100
E4191	0	0	100	100

Hydrolyzing activity(%) = 100(A-B)/A
A: peak areas of soyasaponin Bb in samples before
B: peak areas of soyasaponin Bb in samples after

[표 3. HPLC 결과(유산균 자체)]

평가 항목	KU41	E4191
Hemolysis	α -hemolysis	α -hemolysis
Ammonia production	-	-
Gelatin liquefaction	-	-

상기 표 2 및 3의 ①, ②는 각각 도 2 및 3의 HPLC 결과에서 측정된 peak를 각각 나타낸 것이며, 상기 peak들의 면적을 구한 것이 peak area이고, 균 접종 후 peak 면적이 감소한 것을 각각 계산하여 hydrolyzing activity를 측정한 것이다.

도 2에 나타난 바와 같이, 락토바실러스 존소니이(*Lactobacillus johnsonii*) strain MH8 KU41 및 락토바실러스 살리바리우스(*Lactobacillus salivarius*) E4191의 HPLC 결과에서 ①, ② 위치에서 peak가 나타나지 않음을 확인할 수 있으며, 이는 분해된 당이 205 nm에서 검출되지 않기 때문인 것으로 사료된다. 따라서 상기 결과를 통해 본 발명에 따른 균 파쇄물에 의해 사포닌이 비배당화 된 것을 알 수 있다. 그리고 도 3에서는 ② 위치에서만 peak가 나타나지 않는 것으로 보아, 상기 두 유산균을 파쇄하지 않고서도 ② 위치 사포닌의 분해능이 있는 것으로 확인되었다. 상기 ② peak의 사포닌은 soyasaponin Bb에 해당한다 [Miyamoto T. et al., *Food Preservation Science*, Vol.25, No.3(1999)]. 본 발명의 두 유산균 모두 ② peak의 사포닌을 모두 100% 분해하므로 대두 사포닌 분해능이 뛰어난 것을 알 수 있다.

실시예 4. 선발유산균의 프로바이오틱스 능력 평가

4-1. 선발유산균의 내산성 및 내담즙성 평가

유산균의 내산성은 Sim 등(1995)[Sim, J. H., Oh, S. J., Kim, S. K., and Baek, Y. J. 1995. Comparative tests on the acid tolerance of some lactic acid bacteria species isolated from lactic fermented products. *Kor. J. Food Sci. Technol.* 27, 101-104]의 방법을 이용하여 다음과 같이 평가하였다. pH를 2.5로 조정된 MRS broth에 펩신(pepsin)을 1000 unit/mL이 되도록 첨가하여 내산성 측정용 배지로 사용하였다. 사포닌 분해 능력이 가장 좋은 선발유산균(락토바실러스 KU41 및 E4191)을 MRS 배지에서 2회 이상 계대하여 활력을 높였다. 이후 유산균을 10^6 cfu/mL 수준으로 내산성 배지에 접종하여 37 °C에서 3 시간 배양한 다음, 0.1% 펩톤수

에 희석하여 MRS agar에 평판도말 한 뒤 48 시간 배양하여 집락수를 계수하였다. 내담즙성 평가는 MRS배지에 oxgall(Difco, USA)을 0.3%(w/v)가 되도록 첨가하여 멸균하여 준비한 다음, 미리 준비한 유산균 현탁액(18시간 썩 3회 계대한 균배양액)을 10^6 cfu/mL 수준으로 접종하여 37 °C에서 24 시간 배양하여 생균수를 상기의 내산성 평가 방법과 동일하게 진행하여 평가하였다.

[0082] 측정 결과, 도 4의 (a)에서 보이는 것과 같이 락토바실러스(*Lactobacillus*) E4191 및 KU41 두 균주 모두 pH 2.5에서 3 시간이 지나도 사멸되지 않았으며, 약 95% 이상의 생존율을 보였다. 또한 담즙에 대한 내성 측정 실험에서도 담즙에 대한 생존율이 E4191, KU41 각각 82, 112%의 생존율을 나타내었다(도 4의 (b)).

[0083] 4-2. 유산균의 안전성 평가

[0084] Hemolysis test는 유산균이 인체 내에서 용혈성 독성이 없음을 확인하기 위한 것으로 적혈구의 파괴 또는 분해 되는 현상인 용혈성 여부를 각 유산균에 대해서 검사하였다. Sheep blood agar(BD, USA)에 각각의 유산균(E4191 및 KU41)을 streaking 한 후 37 °C에서 48 시간 배양하여 균체 주위에 투명 환의 생성여부로 용혈성을 판단하였다.

[0085] 암모니아 생성 확인은 NaCl, KH_2PO_4 , peptone, glucose가 함유된 배지에 phenol red (Sigma-Aldrich) 0.01%를 혼합하여 배지를 멸균한 후, 시린지 필터(syringe filter)로 필터한 urea 2%를 첨가하여 평판배지를 제조 하였다. 이후 각각의 유산균(E4191 및 KU41)을 백금으로 streaking하여 37 °C에서 48 시간 배양 후 색의 변화를 확인하였다.

[0086] 젤라틴(Gelatin) 액화능 검사는 유산균의 젤라틴 액화능 검사는 Harrigan과 McCance(1976)[Harrigan, W. F. and M. E. McCance. 1976. Laboratory methods in food and diary microbiology. Academic Press Inc.(London) LTD. 66~73]의 방법을 응용하여 측정하였다. 기본 MRS배지에 beef extract, peptone, gelatin을 첨가하여 멸균한 배지를 준비한 후, 각각의 유산균(E4191 및 KU41)을 1% 접종하여 37 °C에서 18 시간 배양하였다. 배양 후, 냉장고에 4 시간 보관하여 굳기 유무를 확인하였다.

[0087] 유산균의 용혈성 여부를 검사한 결과, 락토바실러스(*Lactobacillus*) E4191, KU41 두 균주 모두 colony를 둘러싼 배지의 헤모글로빈(hemoglobin)이 메트-헤모글로빈(Met-hemoglobin)으로 환원되어 배지가 녹색으로 변하는 α -hemolysis인 것으로 확인되었으며, 적혈구 막은 정상으로 인체에 무해한 것으로 나타났다. 또한 유해 대사산물 생산 검사의 하나인 암모니아 생성 확인 검사에서도 락토바실러스(*Lactobacillus*) E4191, KU41 두 균주 모두 음성으로 나왔으며, 젤라틴 액화능 검사에서도 두 균주 모두 음성으로 나와 인체에 무해한 것을 알 수 있었다 (표 4).

[0088] [표 4. 유산균 안정성 평가]

평가 항목	KU41	E4191
Hemolysis	α -hemolysis	α -hemolysis
Ammonia production	-	-
Gelatin liquefaction	-	-

[0089]

수탁번호

[0090]

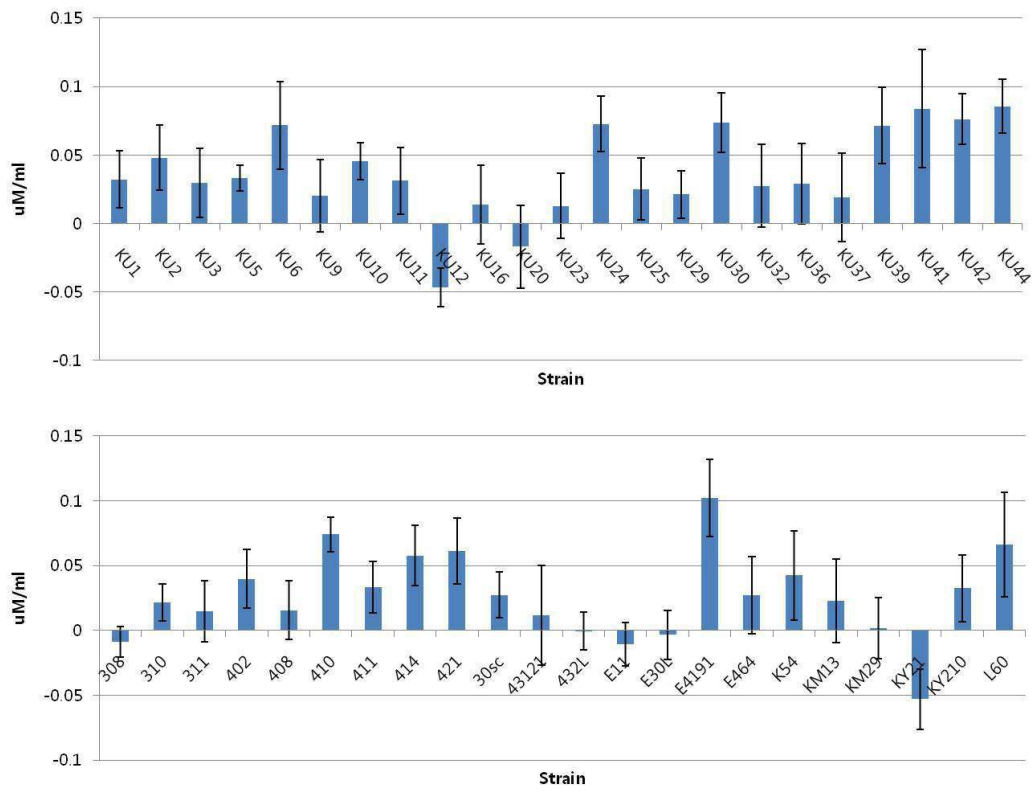
기탁기관명 : 한국미생물보존센터(국내)

수탁번호 : KFCC11501P

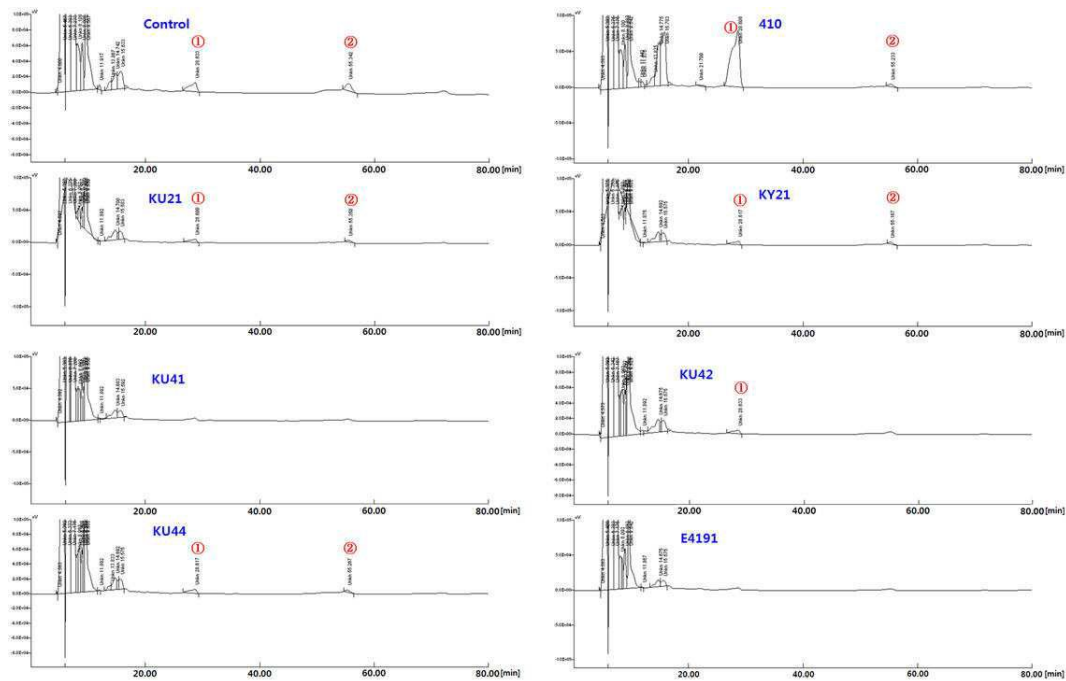
수탁일자 : 20101229

도면

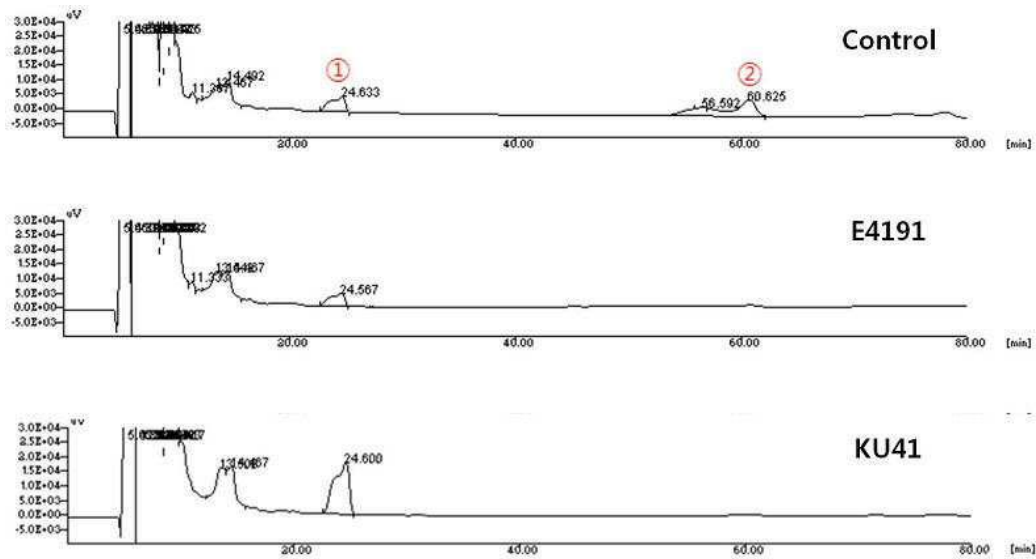
도면1



도면2



도면3



도면4

