(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2012 년 11 월 1 일 (01.11.2012)

WIPO | PCT

(10) 국제공개번호
WO 2012/148249 A2

(51) 국제특허분류:
C12N 9/24 (2006.01) *C12N 15/70* (2006.01)
C12N 15/56 (2006.01) *C12N 15/74* (2006.01)

(21) 국제출원번호: PCT/KR2012/003387

(22) 국제출원일: 2012 년 4 월 30 일 (30.04.2012)

(25) 출원언어: 한국어

(26) 공개언어: 한국어

(30) 우선권정보:
10-2011-0041178 2011 년 4 월 29 일 (29.04.2011) KR

(71) 출원인 (US 을(를) 제외한 모든 지정국에 대하여): **한국생명공학연구원 (KOREA RESEARCH INSTITUTE OF BIOSCIENCE AND BIOTECHNOLOGY)** [KR/KR]; 대전광역시 유성구 과학로 125 (어은동), 305-806 Daejeon (KR).

(72) 발명자; 겸
(75) 발명자/출원인 (US 에 한하여): **김성건 (KIM, Song Gun)** [KR/KR]; 대전광역시 유성구 과학로 125 (어은동), 305-806 Daejeon (KR). **이은지 (LEE, Eun Ji)** [KR/KR]; 대전광역시 유성구 과학로 125 (어은동), 305-806 Daejeon (KR). **이서연 (LEE, Su Yun)** [KR/KR]; 대전광역시 유성구 과학로 125 (어은동), 305-806 Daejeon (KR). **안동선 (AN, Dong Shan)** [CN/KR]; 대전광역시 유성구 과학로 125 (어은동), 305-806 Daejeon (KR).

(74) 대리인: **손민 (SON, Min)**; 서울 강남구 테헤란로 87 길 36, 6 층 한얼국제특허사무소(삼성동, 도심공항타워), 135-973 Seoul (KR).

(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

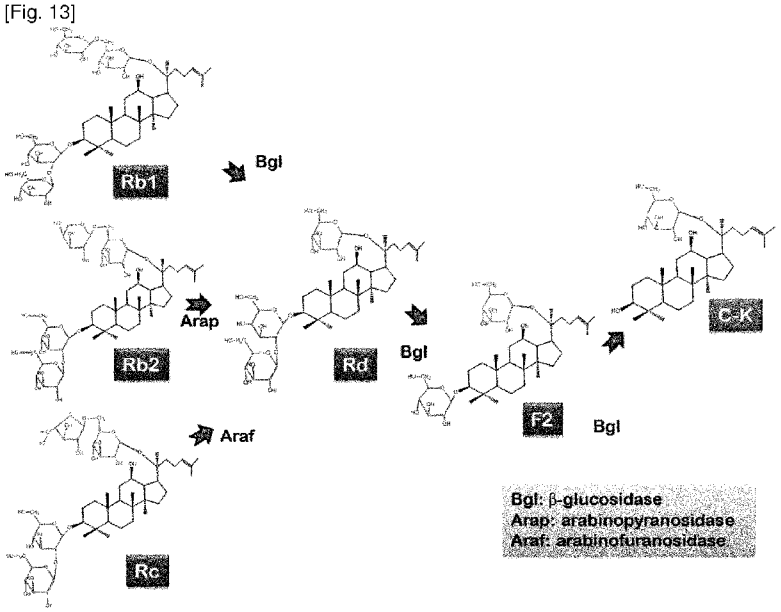
(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR),

[다음 쪽 계속]

(54) **Title**: LACTIC ACID BACTERIA-DERIVED GLYCOSIDE HYDROLASE AND USES THEREOF

(54) **발명의 명칭** : 유산균 유래의 글리코시드 히드롤라제 및 이의 용도

[Fig. 13]



(57) **Abstract**: The present invention relates to a lactic acid bacteria-derived glycoside hydrolase, specifically to a glycoside hydrolase derived from *Weissella confuse, Pediococcus pentosaceus, Leuconostoc citreum* or *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides*, and uses thereof.

(57) **요약서**: 본 발명은 유산균 유래의 글리코시드 히드롤라제, 구체적으로는 바이셀라 콘푸사(*Weissella confusa*), 페디오코커스 팬토사시우스(*Pediococcus pentosaceus*), 루코노스톡 시트리움(*Leuconostoc citreum*) 또는 루코노스톡 메센테로이드스(*Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides*) 유래의 글리코시드 히드롤라제 및 이의 용도에 관한 것이다.

WO 2012/148249 A2

OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

공개:

— 국제조사보고서 없이 공개하며 보고서 접수 후 이를 별도 공개함 (규칙 48.2(g))

— 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

명세서

발명의 명칭: 유산균 유래의 글리코시드 히드롤라제 및 이의 용도

기술분야

[1] 본 발명은 유산균 유래의 글리코시드 히드롤라제, 구체적으로는 바이셀라 콘푸사(*Weissella confusa*), 페디오코커스 펜토사시우스(*Pediococcus pentosaceus*), 루코노스톡 메센테로이드스(*Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides*), 또는 루코노스톡 시트리움(*Leuconostoc citreum*) 유래의 글리코시드 히드롤라제 및 이의 용도에 관한 것이다.

배경기술

[2] 인삼은 한국, 중국 및 일본을 포함한 아시아에서 건강과 장수를 촉진하기 위한 의약품으로서 사용되어 왔으며, 또한 미국에서는 식물 수준에서의 치료 용도로 사용되고, 유럽, 특히 독일에서는 한방 치료를 목적으로 사용된다.

[3] 사포닌은 식물계에 널리 존재하는 배당체에서 당이 아닌 부분이 여러 고리 화합물로 이루어진 물질을 의미하며, 인삼 또는 홍삼에 주요 생리활성 성분으로 포함된 사포닌 성분인, 트리테르펜사포닌(triterpene saponin)은 타 식물에서 발견되는 사포닌과는 화학 구조가 상이하므로 이러한 인삼 사포닌을 타 식물계 사포닌과 구별하기 위해서 인삼(Ginseng) 배당체(Glycoside)란 의미로 진세노사이드라고 부른다.

[4] 현재까지, 180개가 넘는 진세노사이드가 정제, 특성화 및 분류되었다. 진세노사이드의 기본 구조는 주 골격에 특이적 위치로 부착된, 하나 내지 세 개의 잔기, 즉 글리코피라노실, 아라비노피라노실, 아라비노퓨라노실, 자일로피라노실, 또는 람노피라노실 그룹을 가진 테트라사이클릭 트리테르펜 다마렌(dammarane) 또는 펜타사이클릭 올레아난(oleanane) 골격으로 구성된다. 다마렌 타입 진세노사이드는 주로 그들 고유의 아글리콘 잔기에 따라서 분류된다: 프로토파낙사이다이올계 (PPD), 프로토파나사트라이올계(PPT), 및 오코티롤(ocotillol).

[5] 진세노사이드 조성은 여러 가지 인삼 종으로 다양화된다. 예를 들어, 한국 인삼 (*Panax ginseng*)은 22개의 PPD 타입 진세노사이드와 14 개의 PPT 타입 진세노사이드를 포함하는 반면, 미국 인삼 (*Panax notoginseng*)은 13개의 PPD 타입 진세노사이드와 5개의 PPT 타입 진세노사이드를 포함한다. 특정한 종의 *Panax* 속에서, 진세노사이드의 조성은 뿌리, 잎, 및 열매와 같은 인삼 체의 다른 부분에서 또한 다양하게 나타난다.

[6] 일반적으로, 진세노사이드의 유효성은 그의 소수성과 세포벽 투과율을 강화시키는, 탈글라이코실화 정도와 함께 증가한다. 그러나, 탈글라이코실화된 진세노사이드는 인삼 추출물에 미량인 반면, Rb1{3-*O*-[β-D-글리코피라노실-(1-2)-β-D-글리코피라노실]-20-*O*-[β-D-글리코피라노실-(1-

6)-β-D-글리코피라노실]-20(*S*)-프로토파낙사이다이올계}, Rb2{3-*O*-[β-D-글리코피라노실-(1-2)-β-D-글리코피라노실]-20-*O*-[α-L-아라비노피라노실-(1-6)-β-D-글리코피라노실]-20(*S*)-프로토파낙사이다이올계}, Rb3{3-*O*-[β-D-글리코피라노실-(1-2)-β-D-글리코피라노실]-20-*O*-[β-D-자일로피라노실-(1-6)-β-D-글리코피라노실]-20(*S*)-프로토파낙사이다이올계}, Rc{3-*O*-[β-D-글리코피라노실-(1-2)-β-D-글리코피라노실]-20-*O*-[α-L-아라비노퓨라노실-(1-6)-β-D-글리코피라노실]-20(*S*)-프로토파낙사이다이올계}, 및 Rd {3-*O*-[β-D-글리코피라노실-(1-2)-β-D-글리코피라노실]-20-*O*-β-D-글리코피라노실-20(*S*)-프로토파낙사이다이올계}와 같은 PPD 부류의 더 큰 진세노사이드는 인삼 추출물 전체 진세노사이드의 3분의 2 이상을 구성한다.

[7] 인삼에는 극미량 존재하지만 생리활성이 높은 것으로 알려진 희귀 진세노사이드의 의학적인 적용과 분자적 수준의 생물학적인 특성에 대한 연구를 촉진하기 위해서, 탈글라이코실화된 진세노사이드를 생산하는 방법이 요구된다. 스티밍(가열)과 산 처리와 같은 물리화학적 과정이 진세노사이드의 주 구성성분을 탈글라이코실화된 진세노사이드로 전환하기 위해서 개발되었다. 그러나 가장 바람직한 방법은 목적한 생산물에 대하여 사전 계획에 따라 알려진 활성을 가진 효소를 순차적으로 반응시키거나 알려진 활성을 가진 효소를 두 가지 이상의 조합으로 사용하는 생물전환법인데, 이는 생물전환이 부산물의 생성과 같은 문제점들을 피하고 공지의, 정의된 산물을 생성하기 때문이다. 최근, 곰팡이류와 박테리아로부터 큰 분자량의 진세노사이드를 희귀한 저분자량의 진세노사이드로 전환할 수 있는 야생형의 효소를 동정하고, 이를 산업적으로 활용하기 위해 이에 대한 특성을 규명하는 연구에 일부 진전이 있었다. 그러나 이러한 연구들은 두 가지 제약에 직면했다: 1) 효소에 대한 서열정보의 부족으로 인하여 진세노사이드 생물전환 효소의 생화학적 특성의 발견에 관해서는 진전이 거의 없었다; 및 2) 야생형 미생물을 배양하고 야생형 효소를 정제하는 방법은 경제적 타당성이 결여되는 것으로 판단된다.

[8] 최근에, 미생물로부터 진세노사이드 생물전환활성을 나타내는 3종의 효소의 서열정보가 밝혀져서 글리코시드 가수분해효소(Glycoside Hydrolase) 패밀리에 속하는 효소로 동정되었다: (1) Rb1 또는 Rc를 화합물 (C)-K [20-*O*-(β-D-글리코피라노실)-20(*S*)-프로토파낙사이다이올계]로 전환하는 열안정성 β-글루코시다제; (2)Rb1를 Rd로 전환하는 토양 메타게놈으로부터의 β-글루코시다제; 및 (3) Rb1를 C-K로, Rb2를 C-K로, 및 Rc를 C-Mc{20-*O*-[α-L-아라비노퓨라노실-(1-6)-β-D-글리코피라노실]-20(*S*)-프로토파낙사이다이올계}로 전환하는 *Sulfolobus acidocaldarius*로부터의 β-갈락토시다제. Rb1를 Gypenoside 17 {3-*O*-β-D-글리코피라노실-20-*O*-[β-D-글리코피라노실-(1-6)-β-D-글리코피라노실]-20(*S*)-프로토파낙사이다이올계}로, 그 후 Gypenoside LXXV {20-*O*-[β-D-글리코피라노실-(1-6)-β-D-글리코피라노실]-20(*S*)-프로토파낙사이다이올

계}로 그리고 최종적으로 C-K로 연속적으로 전환하는 것을 촉매하는 GH 패밀리 3의 효소가 최근에 본 발명자들에 의해서 보고되었다.

[9] 한편, 프로바이오틱스는 1989년 R. Fuller에 의해 "숙주동물의 장내 미생물 균총의 개선으로 숙주동물에 유익한 작용을 생균제"라고 정의되었다. 생균제로 사용되는 균주로는 락토바실러스, 엔테로코커스, 비피도박테리움, 바실러스 등의 세균류, 사카로마이세스를 포함하는 효모류, 아스퍼질러스 등을 포함하는 곰팡이류 등이 있다. 프로바이오틱스는 GRAS(Generally Recognized As Safe)로 분류되며, 사람과 동물에 대한 독성유전자를 보유하고 있지 않으며 병원성물질 또한 생산하지 않는다. 그리고 축산 생산성에 대한 개선 효능이 확인된 미생물이여야 한다. 생균제의 특징은 비병원성이며, in vitro 증식이 용이하며, 생체 내에서 빠른 성장을 하며, 내산성, 내담즙성을 가지고 있어야 한다. 또한 사료성분에 의한 활성이 억제되지 않아야 하며, 실온에서 효과를 유지하며, 사료에 혼합하여 사용하기 편리하여야 한다.

[10] 이러한 프로바이오틱스의 효능은, 강력한 부착력으로 장점막에 붙어 장질환을 유발하는 병원균을 경쟁적으로 떨어뜨려 밖으로 배설시켜주며, 항생제 투여에 따른 장내균총의 파괴를 신속히 회복시켜준다. 또한 병원성 미생물의 감염에 대한 예방효과와 증식을 억제하며, 장내 유익균의 발육에 최적인 환경 및 증식을 촉진하고, 장내 유기산의 주요 구성성분인 젖산이나 아세트산을 생산하며, 장내 pH를 낮춰 줌으로써 유해 병원균의 발육을 억제한다. 이에 여러가지 복합적인 작용에 의해 급여 시 정상균총을 유지하고 가축의 생산성 향상을 도모할 수 있다. 또한, 양식에서의 프로바이오틱스는 사료에 첨가하거나 부수적으로 물에 투여하고 있다. 최근 양어 및 새우에 프로바이오틱스를 급여에 병원성에 대한 면역력 증강 및 수질 개선으로 인한 질병 개선에 대해 활발한 연구가 진행되고 있다(Jiqiu Li et al. Aquaculture 291(2009) 35-40).

발명의 상세한 설명

기술적 과제

[11] 이에 본 발명자들은 김치에서 분리되어 동정된, 유산균 루코노스톡 메센테로이드스, 루코노스톡 시트리움, 바이셀라 콘푸사, 페디오코커스 펜토사시우스에서 진세노사이드를 생물전환시키는 진세노시다제(ginsenosidase) 효소활성, 바람직하게는 글리코시드 히드롤라제 활성을 확인하였다. 즉, 루코노스톡 메센테로이드스, 루코노스톡 시트리움, 바이셀라 콘푸사, 페디오코커스 펜토사시우스가 Rb1, Rc, Rd, Gyp 17 또는 F2와 같은 PPD, 또는 Re와 같은 PPT를 생물전환시키는 것을 발견하고, 본 발명을 완성하였다.

과제 해결 수단

[12] 본 발명의 하나의 목적은 유산균 유래의 글리코시드 히드롤라제, 이를 코딩하는 핵산, 상기 핵산을 포함하는 재조합 벡터, 상기 핵산 또는 상기 재조합

벡터로 형질전환된 형질전환체를 제공하는 것이다.

[13] 본 발명의 또 다른 목적은 본 발명에 따른 형질전환체를 배양하여 글리코시드 히드롤라제를 제조하는 방법을 제공하는 것이다.

[14] 본 발명의 또 다른 목적은 본 발명에 따른 글리코시드 히드롤라제, 본 발명에 따라 제조된 글리코시드 히드롤라제, 본 발명에 따른 형질전환체, 상기 형질전환체의 배양물, 바이셀라 콘푸사(*Weissella confusa*), 페디오코커스 펜토사시우스(*Pediococcus pentosaceus*), 루코노스톡 메센테로이드스(*Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides*), 또는 루코노스톡 시트리움(*Leuconostoc citreum*), 상기 균주의 배양물, 또는 이들의 혼합물을 이용하는 단계를 포함하여 제 1 진세노사이드로부터 탈글라이코실화된 제 2 진세노사이드를 제조하는 방법을 제공하는 것이다.

[15] 본 발명의 또 다른 목적은 본 발명에 따른 글리코시드 히드롤라제, 본 발명에 따라 제조된 글리코시드 히드롤라제, 본 발명에 따른 형질전환체, 상기 형질전환체의 배양물, 바이셀라 콘푸사(*Weissella confusa*), 페디오코커스 펜토사시우스(*Pediococcus pentosaceus*), 루코노스톡 메센테로이드스(*Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides*), 또는 루코노스톡 시트리움(*Leuconostoc citreum*), 상기 균주의 배양물, 또는 이들의 혼합물을 유효성분으로 포함하는 PPD(protopanaxadiol) 또는 PPT(Protopanaxatriol) 타입 진세노사이드로부터 탈글라이코실화된 희귀 진세노사이드로의 전환용 키트를 제공하는 것이다.

[16] 본 발명의 또 다른 목적은 본 발명에 따른 글리코시드 히드롤라제, 본 발명에 따라 제조된 글리코시드 히드롤라제, 본 발명에 따른 형질전환체, 상기 형질전환체의 배양물, 바이셀라 콘푸사(*Weissella confusa*), 페디오코커스 펜토사시우스(*Pediococcus pentosaceus*), 루코노스톡 메센테로이드스(*Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides*), 또는 루코노스톡 시트리움(*Leuconostoc citreum*), 상기 균주의 배양물, 또는 이들의 혼합물을 포함하는 식품 또는 식품 첨가제를 제공하는 것이다.

발명의 효과

[17] 본 발명에 따른 유산균, 구체적으로는 바이셀라 콘푸사(*Weissella confusa*), 페디오코커스 펜토사시우스(*Pediococcus pentosaceus*), 루코노스톡 메센테로이드스(*Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides*), 또는 루코노스톡 시트리움(*Leuconostoc citreum*) 유래의 글리코시드 히드롤라제는 진세노사이드를 탈글라이코실화된 희귀 진세노사이드로 전환시키는 우수한 활성을 나타낸다.

도면의 간단한 설명

[18] 도 1은 PPD와 PPT 타입의 인삼 사포닌의 화학적 구조를 나타낸 것이다.

[19] 도 2는 바이셀라 콘푸사(*Weissella confusa*) 균주 GL24 유래의 단백질

GL24GH1과 GL24GH43의 정제에 대한 SDS-PAGE 분석을 나타낸 것이다. (M: 단백질마커; 레인 1: 플로우-스루(flow through); 레인 2,3 및 4: GL24GH1의 말토오스로 용출한 분획(maltose-eluted fractions of GL24GH1); 레인 5: 플로우-스루(flow through); 레인 6,7 및 8: GL24GH43의 말토오스로 용출한 분획(maltose-eluted fractions of GL24GH43))

[20] 도 3은 유산균 바이셀라 콘푸사(*Weissella confusa*)에 속하는 균주 GL24에서 유래한 글리코시드 히드롤라제(glycoside hydrolase) GL24GH1의 진세노사이드 전환 여부를 분석한 TLC 결과물이다. (레인 1: 표준 Rb1(standard Rb1); 레인 2: 표준 Gyp17; 레인 3: 표준 Rd; 레인 4: 표준 F2; 레인 5: 표준 Rh2(s); 레인 6: 표준 C-K; 레인 7: 표준 PPDA(protopanaxadiol aglycon); 레인 14: 표준 Re; 레인 15: 표준 Rg1; 레인 16: 표준 Rg2; 레인 17: 표준 F1; 레인 18: 표준 Rh1(S); 레인 19: 표준 PPTA(protopanaxatriol aglycon); 레인 8: Rb1과 효소를 반응시킨 후 반응생성물; 레인 9: Gyp17과 효소의 반응생성물; 레인 10: Rd와 효소의 반응생성물; 레인 11: F2와 효소의 반응생성물; 레인12: Re와 효소의 반응생성물; 레인 13: Rg1과 효소의 반응생성물)

[21] 도 4는 유산균 바이셀라 콘푸사(*Weissella confusa*)에 속하는 균주 GL24에서 유래한 글리코시드 히드롤라제(glycoside hydrolase) GL24GH43의 진세노사이드 전환 여부를 분석한 TLC 결과물이다. (레인 1: 표준 Rb1(standard Rb1); 레인 2: 표준 Gyp17; 레인 3: 표준 Rd; 레인 4: 표준 F2; 레인 5: 표준 Rh2(s); 레인 6: 표준 C-K; 레인 7: 표준 PPDA(protopanaxadiol aglycon); 레인 14: 표준 Re; 레인 15: 표준 Rg2; 레인 16: 표준 Rg1; 레인 17: 표준 F1; 레인 18: 표준 Rh1; 레인 19: 표준 PPTA(protopanaxatriol aglycon); 레인 8: Rb1과 효소 간의 반응생성물; 레인 9: Gyp17과 효소의 반응생성물; 레인 10: Rd와 효소의 반응생성물; 레인 11: F2와 효소의 반응생성물; 레인12: Re와 효소의 반응생성물; 레인 13: Rg1과 효소의 반응생성물)

[22] 도 5는 유산균 바이셀라 콘푸사(*Weissella confusa*)에 속하는 균주 GL24에서 유래한 글리코시드 히드롤라제(glycoside hydrolase) GL24GH3의 PPD type 진세노사이드 전환 여부를 분석한 TLC 결과물이다. (레인 1: 표준 Rb1(standard Rb1); 레인 2: 표준 Gyp17; 레인 3: 표준 Rd; 레인 4: 표준 F2; 레인 5: 표준 C-K; 레인 6: GL24GH3와 Rb1과의 효소 반응 생성물; 레인 7: Gyp17과 효소 간의 반응생성물; 레인 8: Rd와 효소 간의 반응 생성물)

[23] 도 6은 유산균 페디오코커스 펜토사시우스(*Pediococcus pentosaceus*)에서 유래한 글리코시드 히드롤라제(glycoside hydrolase) PedGH1의 PPD type 진세노사이드 전환 여부를 분석한 TLC 결과물이다. (레인 1: 표준 Rb1(standard Rb1); 레인 2: 표준 Gyp17; 레인 3: 표준 Rd; 레인 4: 표준 F2; 레인 5: 표준 C-K; 레인 6: PedGH1와 Rb1과의 효소 간의 반응생성물; 레인 7: Gyp17과 효소 간의 반응생성물; 레인 8: Rd와 효소 간의 반응 생성물)

[24] 도 7은 유산균 바이셀라 콘푸사(*Weissella confusa*)에 속하는 균주 GL24의

진세노사이드의 생물전환 여부를 분석한 TLC 결과물이다. (레인 1: 표준 Rb1(standard Rb1); 레인 2: 표준 Gyp17; 레인 3: 표준 Rd; 레인 4: 표준 F2; 레인 5: 표준 Rh2(s); 레인 6: 표준 C-K; 레인 7: 표준 PPDA(protopanaxadiol aglycon); 8: Rb1과 바이셀라 콘푸사(*Weissella confusa*)에 속하는 균주 GL24의 조효소 간의 반응생성물; 레인 9: Gyp17과 조효소 간의 반응생성물; 레인 10: Rd와 조효소 간의 반응생성물)

[25] 도 8은 유산균 바이셀라 콘푸사(*Weissella confusa*)에 속하는 균주 GL24의 진세노사이드의 생물전환 여부를 분석한 TLC 결과물이다. (레인 1: 표준 Re(standard Re); 레인 2: 표준 Rg1; 레인 3: 표준 Rg2; 레인 4: 표준 Rh1(S); 레인 5: 표준 F1; 레인 6: 표준 PPTA; 레인 7: Re와 바이셀라 콘푸사(*Weissella confusa*)에 속하는 균주 GL24의 조효소 간의 반응생성물; 레인 8: Rg1과 조효소 간의 반응생성물; 레인 9: Re와 조효소 간의 반응생성물; 레인 10: Rg1와 조효소 간의 반응생성물; 레인 11: Re와 조효소 간의 반응생성물; 레인 12: Rg1와 조효소 간의 반응생성물)

[26] 도 9은 유산균 페디오코커스 펜토사시우스(*Pediococcus pentosaceus*) 에 속하는 균주 100118TI-4의 PPD type 진세노사이드 생물전환 여부를 분석한 TLC 결과물이다. (레인 1: 표준 Rb1(standard Rb1); 레인 2: 표준 Gyp17; 레인 3: 표준 Rd; 레인 4: 표준 F2; 레인 5: 표준 Rh2(s); 레인 6: 표준 C-K; 레인 7: 표준 PPDA(protopanaxadiol aglycon); 레인 8: Rb1과 페디오코커스 펜토사시우스 균주 100118TI-4의 조효소(crude enzyme)간의 반응생성물; 레인 9: Gyp17과 조효소 간의 반응생성물; 레인 10: Rd와 조효소 간의 반응생성물)

[27] 도 10은 유산균 페디오코커스 펜토사시우스(*Pediococcus pentosaceus*) 에 속하는 균주 100118TI-4의 PPT type 진세노사이드 생물전환 여부를 분석한 TLC 결과물이다. (레인 1: 표준 Re(standard Re); 레인 2: 표준 Rg1; 레인 3: 표준 Rg2; 레인 4: 표준 F1; 레인 5: 표준 Rh1(S); 레인 6: 표준 C-K; 레인 7: 표준 PPTA; 레인 8: Re와 페디오코커스 펜토사시우스 균주 100118TI-4의 조효소(crude enzyme)간의 반응 생성물; 레인 9: Rg1과의 조효소 간의 반응 생성물)

[28] 도 11은 유산균 루코노스톡(*Leuconostoc*)속에 속하는루코노스톡 시트륨(*Leuconostoc citreum*)의 진세노사이드 전환 여부를 TLC 분석한 결과물이다.(레인 1: 표준 Rb1(standard Rb1); 레인 2: 표준 Gyp17; 레인 3: 표준 Rd; 레인 4: 표준 F2; 레인 5: 표준 Rh2(s); 레인 6: 표준 C-K; 레인 7: 표준 PPDA(protopanaxadiol aglycon); 레인 14: 표준 Re; 레인 15: 표준 Rg1; 레인 16: 표준 Rg2; 레인 17: 표준 F1; 레인 18: 표준 Rh1(S); 레인 19: 표준 PPTA(protopanaxatriol aglycon); 레인 8: Rb1과 루코노스톡 시트륨(*Leuconostoc citreum*)에 속하는 균주 GL29의 조효소 간의 반응생성물; 레인 9: Gyp17과 효소간의 반응생성물; 레인 10: Rd와 효소 간의 반응생성물; 레인 11: F2와 효소 간의 반응생성물; 레인12: Re와 효소 간의 반응생성물; 레인 13: Rg1과 효소 간의 반응생성물)

[29] 도 12는 유산균 루코노스톡 메센테로이데스(*Leuconostoc mesenteroides* subsp.

mesenteroides)에 속하는 균주의 진세노사이드 전환 여부를 TLC 분석한 결과물이다. (레인 1: 표준 Rb1(standard Rb1); 레인 2: 표준 Gyp17; 레인 3: 표준 Rd; 레인 4: 표준 F2; 레인 5: 표준 Rh2(s); 레인 6: 표준 C-K; 레인 7: 표준 PPDA(protopanaxadiol aglycon); 레인 14: 표준 Re; 레인 15: 표준 Rg1; 레인 16: 표준 Rg2; 레인 17: 표준 F1; 레인 18: 표준 Rh1(S); 레인 19: 표준 PPTA(protopanaxatriol aglycon); 레인 8: Rb1과 루코노스톡 메센테로이데스(*Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides*)에 속하는 균주 25의 조효소 간의 반응생성물; 레인 9: Gyp17과 효소간의 반응생성물; 레인 10: Rd와 효소 간의 반응생성물; 레인 11: F2와 효소 간의 반응생성물; 레인12: Re와 효소간의 반응생성물; 레인 13: Rg1과 효소간의 반응생성물)

[30] 도13는 본 발명에서 생성되는 PPD type 진세노사이드의 반응경로를 나타낸 모식도이다.

발명의 실시를 위한 최선의 형태

[31] 하나의 양태로서, 본 발명은 유산균 유래의 글리코시드 히드롤라제, 구체적으로는 바이셀라 콘푸사(*Weissella confusa*), 페디오코커스 펜토사시우스(*Pediococcus pentosaceus*), 루코노스톡 메센테로이드스(*Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides*), 또는 루코노스톡 시트리움(*Leuconostoc citreum*) 유래의 글리코시드 히드롤라제를 제공한다.

[32] 본 발명에서 용어, "글리코시드 히드롤라제"는 유산균 유래의 글리코시드 히드롤라제를 의미하며, 바람직하게는 바이셀라 콘푸사(*Weissella confusa*), 페디오코커스 펜토사시우스(*Pediococcus pentosaceus*), 루코노스톡 메센테로이드스(*Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides*), 또는 루코노스톡 시트리움(*Leuconostoc citreum*) 유래의 글리코시드 히드롤라제일 수 있다.

[33] 상기 바이셀라 콘푸사(*Weissella confusa*) GL24 균주로부터 분리한 글리코시드 히드롤라제는 GL24GH1, GL24GH43 또는 GL24GH3로 명명되며, 페디오코커스 펜토사시우스(*Pediococcus pentosaceus*)로부터 분리한 글리코시드 히드롤라제는 PedGH1으로 명명된다. 상기 GL24GH1의 아미노산 서열은 서열번호 1로, GL24GH43의 아미노산 서열은 서열번호 2로 나타내었으며, 상기 GL24GH3의 아미노산 서열은 서열번호 3으로 나타내었으며, 상기 PedGH1의 아미노산 서열은 서열번호 4로 나타내었다.

[34] 상기 바이셀라 콘푸사(*Weissella confusa*) GL24 균주로부터 분리된 글리코시드 히드롤라제 아미노산 서열은 서열번호 1, 2 또는 3으로 구성된 서열이며, 페디오코커스 펜토사시우스(*Pediococcus pentosaceus*)로부터 분리된 글리코시드 히드롤라제 아미노산 서열은 서열번호 4로 구성된 서열로서, 바람직하게는 상기 서열뿐만 아니라, 상기 서열과 70% 이상의 유사성을 가지는 아미노산 서열, 바람직하게는 80% 이상의 유사성, 더욱 바람직하게는 90% 이상의 유사성,

더욱더 바람직하게는 95% 이상의 유사성, 가장 바람직하게는 98% 이상의 유사성을 나타내는 아미노산 서열로서 실질적으로는 글리코시드 히드롤라제의 활성을 갖는 서열을 포함한다. 또한, 이러한 유사성을 갖는 서열로서 실질적으로 글리코시드 히드롤라제와 동일하거나 상응하는 생물학적 활성을 갖는 아미노산 서열이라면, 일부 서열이 결실, 변형, 치환 또는 부가된 아미노산 서열을 갖는 단백질도 본 발명의 범위에 포함됨은 자명하다.

[35] 본 발명에서 용어, "유산균"은 당을 발효시켜, 우세하게 생성되는 산으로서의 유산을 비롯하여 산을 생성하는 그람-양성, 미세호기성 또는 혐기성 박테리아를 의미한다.

[36] 본 발명자는 루코노스톡 메센테로이드스, 루코노스톡 시트리움, 바이셀라 콘푸사 또는 페디오코커스 펜토사시우스가 Rb1, Rd 또는 Gyp17과 같은 PPD를 생물전환시켜 희귀진세노시드인 Rh2, F2 또는 화합물 K 등을 생산할 수 있는 것을 발견하였다. 즉, 본 발명자들은 루코노스톡 메센테로이드스, 루코노스톡 시트리움, 바이셀라 콘푸사 또는 페디오코커스 펜토사시우스와 같은 유산균에서 진세노사이드를 생물전환시키는 진세노시다제(ginsenosidase) 효소활성, 바람직하게는 글리코시드 히드롤라제 활성을 확인하였다 (실시예 4 참조).

[37] 상기 진세노시다제 효소활성은 진세노사이드의 β-1,6 글루코피라노실 잔기, β-1,2 글루코피라노실 잔기 또는 글루코스, α-아라비노퓨라노시드, 아라비노피라노시드, 또는 α-람노피라노실 잔기를 포함하는 올리고당류 잔기에 대한 선택적 가수분해능을 가지는 글리코시드 히드롤라제일 수 있다. 바람직하게는 PPD(protopanaxadiol) 타입의 진세노사이드의 3번째 및 20번째 탄소에 각각 위치한 β-1,2 글루코피라노실 잔기 및 β-1,6 글루코피라노실 잔기 또는 20번째 탄소에 위치한 α-아라비노퓨라노시드 또는 아라비노피라노시드, 또는 PPT(protopanaxtriol) 타입 진세노사이드의 6번째 탄소에 위치한 α-람노피라노실 잔기에 대한 선택적 가수분해능을 발휘할 수 있다.

[38]

[39] 또 하나의 양태로서, 유산균 유래의 글리코시드 히드롤라제, 구체적으로는 루코노스톡 메센테로이드스(*Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides*), 루코노스톡 시트리움(*Leuconostoc citreum*), 바이셀라 콘푸사(*Weissella confusa*) 또는 페디오코커스 팬토사시우스(*Pediococcus pentosaceus*)유래의 글리코시드 히드롤라제를 코딩하는 핵산, 상기 핵산을 포함하는 재조합 벡터, 상기 핵산 또는 상기 재조합 벡터로 형질전환된 형질전환체를 제공한다.

[40] 바이셀라 콘푸사 GL24GH1, GL24GH43 및 GL24GH3의 핵산 서열은 각각 서열번호 5, 6 및 7로 나타내었으며, 페디오코커스 팬토사시우스의 PedGH1의 핵산 서열은 서열번호 8로 나타내었다. 본 발명의 핵산은 유산균 유래의 글리코시드 히드롤라제를 코딩하는 핵산이며, 바람직하게는 바이셀라 콘푸사(*Weissella confusa*), 페디오코커스 팬토사시우스(*Pediococcus pentosaceus*),

루코노스톡 메센테로이드스(*Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides*), 또는 루코노스톡 시트리움(*Leuconostoc citreum*) 유래의 글리코시드 히드롤라제를 코딩하는 핵산이며, 더욱 바람직하게는 바이셀라 콘푸사(*Weissella confusa*), 페디오코커스 펜토사시우스(*Pediococcus pentosaceus*) 유래의 글리코시드 히드롤라제를 코딩하는 핵산이다. 상기 바이셀라 콘푸사(*Weissella confusa*)로부터 분리한 글리코시드 히드롤라제를 코딩하는 핵산 서열은 서열번호 5,6 또는 7로 구성된 핵산서열이며, 페디오코커스 펜토사시우스(*Pediococcus pentosaceus*)로부터 분리한 글리코시드 히드롤라제를 코딩하는 핵산 서열은 서열번호 8로 구성된 핵산서열로서, 바람직하게 상기 서열 뿐만 아니라 상기 서열과 70% 이상의 유사성을 가지는 서열, 바람직하게는 80% 이상의 유사성, 더욱 바람직하게는 90% 이상의 유사성, 보다 더욱 바람직하게는 95% 이상의 유사성, 가장 바람직하게는 98% 이상의 유사성을 나타내는 서열로서 실질적으로 진세노시드 글리코시다제의 활성을 갖는 서열을 포함한다.

[41] 본 발명에서 용어, '유사성'이란 야생형(wild type) 단백질의 아미노산 서열과의 유사한 정도를 나타내기 위한 것으로서, 본 발명의 글리코시드 히드롤라제를 코딩하는 서열과 상기와 같은 퍼센트 이상의 동일한 서열을 가지는 서열을 포함한다. 이러한 유사성의 비교는 육안으로나 구입이 용이한 비교 프로그램을 이용하여 수행할 수 있다. 시판되는 컴퓨터 프로그램은 2개 이상의 서열 간의 유사성을 백분율(%)로 계산할 수 있으며, 유사성(%)은 인접한 서열에 대해 계산될 수 있다.

[42] 본 발명에서 용어, '벡터'란 적당한 숙주 세포에서 목적 단백질을 발현할 수 있는 발현 벡터로서, 핵산 삽입물이 발현되도록 작동 가능하게 연결된 필수적인 조절 요소를 포함하는 핵산 작제물을 말한다. 본 발명은 글리코시드 히드롤라제를 코딩하는 핵산을 포함하는 재조합 벡터를 제조할 수 있다.

[43] 한편, 본 발명에 따라 글리코시드 히드롤라제를 코딩하는 핵산 또는 상기 핵산을 포함하는 재조합 벡터는 숙주 세포에 형질전환(transformation) 또는 형질감염(transfection) 시킴으로써, 본 발명의 글리코시드 히드롤라제의 활성을 나타낼 수 있다.

[44] 본 발명의 재조합 벡터는 본 발명의 핵산을 적당한 벡터에 연결(삽입)하여 획득할 수 있다. 본 발명의 핵산이 삽입될 벡터는 그것이 숙주 안에서 복제될 수 있는 한 특별히 제한되지는 않는다. 예를 들어, 플라스미드 DNA, 파아지 DNA 등이 사용될 수 있다. 플라스미드 DNA의 구체적인 예로는 pCDNA3.1+ (Invitrogen) 같은 상업적인 플라스미드를 포함한다. 본 발명에 사용될 수 있는 플라스미드의 다른 예로는 대장균 유래 플라스미드 (pYG601BR322, pBR325, pUC118 및 pUC119), 바실러스 서브틸리스 (*Bacillus subtilis*)-유래 플라스미드 (pUB110 및 pTP5) 및 효모-유래 플라스미드(YEp13, YEp24 및 YCp50)가 있다. 파아지 DNA의 구체적인 예로는 λ-파아지 (Charon4A, Charon21A, EMBL3, EMBL4, λgt10, λgt11 및 λZAP)가 있다. 또한, 리트로바이러스 (retrovirus),

아데노바이러스 (adenovirus) 또는 백시니아 바이러스 (vaccinia virus)와 같은 동물 바이러스, 배큘로바이러스 (baculovirus)와 같은 곤충 바이러스가 또한 사용될 수 있다.

[45] 아울러 본 발명의 벡터로서, 핵산 발현 활성화 단백질 (예를 들어, B42같은)이 연결된 융합 플라스미드(fusion plasmid, 예를 들어, pJG4-5)가 사용될 수 있으며, 이러한 융합 플라스미드에는 GST, GFP, His-tag, Myc-tag 등이 있으나, 상기 예들에 의해 본 발명의 융합 플라스미드가 한정되는 것은 아니다.

[46] 본 발명의 핵산을 벡터로 삽입하기 위해, 정제된 DNA를 적당한 제한효소로 절단하여 적당한 벡터 DNA의 제한 부위 또는 클로닝 부위에 삽입하는 방법이 사용될 수 있다.

[47] 본 발명의 핵산은 벡터에 작동 가능하게 연결되는 것이 바람직하다. 본 발명의 벡터는 프로모터 및 본 발명의 핵산 외에 인핸서(enhancer)와 같은 시스 요소 (cis element), 스플라이싱 시그널(splicing signal), 폴리 A 추가 시그널(poly A addition signal), 선택 마커(selection marker), 라이보좀 결합 서열(ribosome binding sequence, SD sequence) 등을 추가로 포함할 수 있다. 선택 마커의 예로, 클로람페니콜 저항 핵산, 암피실린 저항 핵산, 디하이드로폴레이트 환원효소(dihydrofolate reductase), 네오마이신 저항 핵산 등이 사용될 수 있으나, 상기 예들에 의해 작동 가능하도록 연결되는 추가적 구성요소가 제한되는 것은 아니다.

[48] 본 발명에서 용어, '형질전환 (transformation)'이란 DNA를 숙주로 도입하여 DNA가 염색체의 인자로서 또는 염색체 통합 완성에 의해 복제 가능하게 되는 것으로 외부의 DNA를 세포 내로 도입하여 인위적으로 유전적인 변화를 일으키는 현상을 의미한다.

[49] 본 발명의 형질전환 방법은 임의의 형질전환 방법이 사용될 수 있으며, 당업계의 통상적인 방법에 따라 용이하게 수행할 수 있다. 일반적으로 형질전환 방법에는 $CaCl_2$침전법, $CaCl_2$방법에 DMSO(dimethyl sulfoxide)라는 환원물질을 사용함으로써 효율을 높인 Hanahan 방법, 전기천공법 (electroporation), 인산칼슘 침전법, 원형질 융합법, 실리콘 카바이드 섬유를 이용한 교반법, 아그로박테리아 매개된 형질전환법, PEG를 이용한 형질전환법, 덱스트란 설페이트, 리포펙타민 및 건조/억제 매개된 형질전환 방법 등이 있다.

[50] 본 발명의 글리코시드 히드롤라제를 코딩하는 핵산 또는 이를 포함하는 벡터를 형질전환시키기 위한 방법은 상기 예들에 국한되지 않으며, 당업계에서 통상적으로 사용되는 형질전환 또는 형질감염 방법이 제한 없이 사용될 수 있다.

[51] 목적 핵산인 글리코시드 히드롤라제를 코딩하는 핵산 또는 이를 포함하는 재조합 벡터를 숙주로 도입함으로써 본 발명의 형질전환체(transformant)를 획득할 수 있다.

[52] 숙주는 본 발명의 핵산을 발현하도록 하는 한 특별히 제한되지는 않는다. 본 발명에 사용될 수 있는 숙주의 특정한 예로는 대장균 (E. coli)과 같은

에스케리키아 (*Escherichia*)속 세균; 바실러스 서브틸리스 (*Bacillus subtilis*)같은 바실러스 (*Bacillus*)속 세균; 슈도모나스 푸티다 (*Pseudomonas putida*)같은 슈도모나스 (Pseudomonas)속 세균; 락토바실러스와 엔테로코커스등 유산균; 사카로마이세스 세레비지애 (*Saccharomyces cerevisiae*), 스키조사카로마이세스 폼베 (*Schizosaccharomyces pombe*)같은 효모; 동물세포 및 곤충 세포가 있다.

[53] 본 발명에 사용될 수 있는 대장균 균주의 구체적인 예로는 CL41(DE3), BL21(DE3) 및 HB101이 있으며, 바실러스 서브틸리스 균주의 구체적인 예로는 WB700 및 LKS87이 있다.

[54] 대장균과 같은 세균이 숙주로서 사용될 때, 본 발명의 재조합 벡터는 숙주 내에서 자율적인 복제를 할 수 있고, 프로모터, 라이보좀 결합서열, 본 발명의 핵산 및 전사 종료 서열 (transcription termination sequence)로 구성되어 있다.

[55] 본 발명의 프로모터는, 본 발명의 핵산을 대장균과 같은 숙주에서 발현하도록 하는 한 어떠한 프로모터도 사용될 수 있다. 예를 들어, trp 프로모터, lac 프로모터, PL 프로모터 또는 PR 프로모터 같은 대장균 또는 파아지-유래 프로모터; T7 프로모터 같은 대장균 감염 파아지-유래 프로모터가 사용될 수 있다. 또한 tac 프로모터 같은 인공적으로 변형된 프로모터도 사용될 수 있다.

[56] 본 발명의 숙주 역시 식품 또는 사료에 사용될 수 있으므로, 숙주로 식품과 사료에 적합한 유산균을 사용하는 것이 바람직하다.

[57] 유산균의 예로는 락토코커스 속, 스트렙토코커스 속, 락토바실러스 속, 류코노스톡 속, 페디오코커스 속, 브레비박테리움 속 및 프로피오니박테리움 속이 있다. 식품 발효 배양물로서 단독으로 또는 유산균과 함께 사용되기도 하는, 엄밀하게는 혐기성 군인 비피더스균(즉, 비피도박테리움 속(Bifidobacterium spp.)에 속하는 유산 생성 박테리아)도 유산균 부류에 포함된다. 상기 유산균으로는 *Lactobacillus lactis* 가 특히 바람직하다.

[58] 본 발명에 따른 글리코시드 히드롤라제를 코딩하는 뉴클레오티드 서열은 당업계에 공지된 방법을 이용하여 적절한 조절 뉴클레오티드 서열(들)에 임의로 연결되어 상기 코딩 서열의 발현을 제어할 수 있다 (예를 들면, 문헌 [Sambrook et al., 1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY] 참조). 또한, 상이한 락토바실러스 종으로부터의 다수의 서열분석된 유전자의 코돈 사용 패턴을 분석하여 필요에 따라 바이패스 코돈 바이어스(bypass codon bias)에 대한 접근법을 개발할 수 있다. 예를 들면, 문헌 [Pouwels and Leunissen, 1994, Nucleic Acids Res. 22:929-936]을 참조한다.

[59] 재조합 유산균은 하나 이상의 구성 프로모터, 또는 코딩 뉴클레오티드 서열에 작동가능하게 연결된 하나 이상의 조절가능한 프로모터를 포함할 수 있다. 본원에 사용된 용어 "작동가능하게 연결된"은 뉴클레오티드 서열 요소가 기능적 관계로 연결되는 것을 나타낸다. 예를 들면, "작동가능하게 연결된" 프로모터는 조절 요소가 뉴클레오티드 코딩 서열과 관련하여 적절한 위치 및 배향으로 존재하여 RNA 폴리머라제 개시 및 핵산의 발현을 제어함(예를 들면, 이는 코딩

서열의 전사에 영향을 미침)을 의미한다. 프로모터 영역은 임의의 원핵 세포에 존재하는 프로모터 및 유산균에서 기능할 수 있는 (예를 들면, 작동가능하게 연결된 핵산 서열의 발현을 촉진할 수 있는) 프로모터 기재일 수 있으나, 몇몇 실시양태에서는 유산균 종으로부터 유래된다. 예를 들면, 몇몇 실시양태에서, 프로모터 영역은 락토코커스 락티스 하위종 락티스(*Lactococcus lactis* subspecies l*actis*), 예를 들면 MG1363으로 지칭되는 균주 (또한, 문헌에서 락토코커스 락티스 하위종 크레모리스(cremoris)로도 지칭됨) (문헌[Nauta et al., 1997, Nat Biotechnol. 15:980-983]), 및 락토코커스 락티스 하위종 락티스 비오바르. 디아세틸락티스(lactis biovar. diacetylactis)를 비롯한 락토코커스 락티스의 프로모터 영역으로부터 유래될 수 있다. 재조합 유산균 구축에 사용하기 적합한 다른 프로모터 영역의 예는 WO 94/16086에 게시되어 있으며, 프로모터 P170을 포함하는 영역 및 이들의 유도체를 포함하고, 그 예는 WO 98/10079 및 미국 출원 공개공보 제2002/0137140호 (그 게시문은 모두 상기 거명을 통해 본원에 참고로 포함됨)에 게시되어 있다.

[60] 몇몇 실시양태에서, 재조합 글리코시드 히드롤라제 발현에 사용되는 유산균은 세포외 하우스키핑(housekeeping) 프로테아제 HtrA가 실활된 변이체일 수 있다. 예를 들면, 문헌 [Miyoshi, et al., 2002, Appl Environ Microbiol.68:3141-3146] (그 게시문은 모두 상기 거명을 통해 본원에 참고로 포함됨)을 참조한다.

[61] 몇몇 실시양태에서, 재조합 유산균에 사용되는 프로모터는 조절가능한 프로모터 또는 유도가능한 프로모터일 수 있다. 프로모터를 조절 또는 유도하는 요인(들)은 프로모터 서열의 활성을 조절할 수 있는 임의의 물리적 및 화학적 요인을 포함하며, 예를 들면 온도 및 빛과 같은 물리적 조건; IPTG, 트립토판, 락테이트 또는 니신과 같은 화학 물질; 및 pH, 인큐베이션 온도 및 산소 함량과 같은 환경 또는 성장 조건 요인 등이 있다. 프로모터 활성을 조절하는 다른 조건은 열충격 유전자의 발현을 도출하는 온도 이동; 배양 배지의 조성, 예컨대 이온 강도/NaCl 함량; 세포내 또는 배지 내의 대사물 (유산/락테이트 포함)의 축적; 필수 세포 구성성분 또는 이들에 대한 전구물질의 존재/부재; 및 박테리아의 성장 단계 또는 성장 속도 등을 포함할 수 있다. 예를 들면, 미국출원 제2002/0137140호 (그 게시문은 모두 상기 거명을 통해 본원에 참고로 포함됨)를 참조한다.

[62] 유산균에서 사용되는 다수의 유도가능한 유전자 발현 시스템이 개발되었다 (예를 들면, 문헌 [Kok, 1996,Antonie Van Leeuwenhoek. 70:129-145]; [Kuipers et al., 1997, Trends Biotechnol. 15:135-40]; [Djordjevic and Klaenhammer, 1998, Mol Biotechnol. 9:127-139]; [Kleerebezem, et al., 1997, Appl Environ Microbiol. 63:4581-4584] 참조). 유용한 유산균 발현 시스템으로는 NICE 시스템 (문헌 [de Ruyter et al., 1996, Appl Environ Microbiol. 62:3662-3667])이 있으며, 이는 엘. 락티스에서 항균성 펩티드 니신의 생합성을 제어하는 2-성분 시스템으로부터의 유전자 요소에 기초한다. 다른 유용한 유도가능한 발현 시스템은 엘. 락티스

박테리오파지 f 31 (문헌 [O'Sullivan et al., 1996, Biotechnology (N.Y.), 14:82-87] 및 [Walker and Klaenhammer, 1998, J Bacteriol. 180:921-931]) 및 rlt (문헌 [Nauta et al., 1997, Nat Biotechnol. 15:980-983])로부터의 유전자 요소, pH와 같은 환경 변화에 의해 유도된 프로모터 (문헌 [Israelsen et al., 1995, Appl Environ Microbiol. 61:2540-2547]), Zn2+ (문헌 [Llull and Poquet, 2004, Appl Environ Microbiol. 70:5398-5406]), 염 농도 (문헌 [Sanders et al., 1998, Mol Gen Genet, 257:681-685]) 및 숙주 세포 또는 숙주 세포 성장 동안 자연적으로 발생하는 조건에 의해 생성된 대사물의 사용을 포함한다. 이러한 프로모터로는 pH 유도가능한 P170 프로모터 및 이들의 유도체 등이 있다 (WO 94/16086, WO 98/10079, 미국 출원 공개공보 제2002/0137140호 및 문헌 [Madsen et al., 1999, Mol Microbiol. 107:75-87]에 게시되어 있음).

[63] 몇몇 실시양태에서, 글리코시드 히드롤라제를 코딩하는 프로모터 및 뉴클레오티드 서열은 플라스미드, 전이 인자, 박테리오파지 또는 코스미드와 자발적 복제 레플리콘 상에서 유산균에 도입될 수 있다. 몇몇 실시양태에서, 프로모터 및 재조합단백질 뉴클레오티드 코딩 서열은 재조합단백질 뉴클레오티드 코딩 서열이 유산균 세포 염색체에 통합되어 박테리아에서 재조합단백질 뉴클레오티드 코딩 서열이 안정하게 유지되도록 하는 조건하에 도입될 수 있다. 통합은 상동성 재조합, 트랜스포존, 접합 이동 및 파지 인테그라제 등에 기초한 통합 시스템에 의해 수행할 수 있다 (예를 들면, 문헌 [Frazier et al., 2003, Appl Environ Microbiol. 69(2):1121-8.]; [Christiansen et al., 1994, J Bacteriol. 176(4):1069-76]; [Romero et al., 1992, Appl Environ Microbiol. 58(2):699-702.]; [Romero et al., 1991, J Bacteriol. 173(23):7599-606.]; [Leenhouts et al., 1991, Appl Environ Microbiol. 57(9):2562-7.]; [Leenhouts et al., 1990, Appl Environ Microbiol. 56(9):2726-2735]; [Chopin et al., 1989, Appl Environ Microbiol. 55(7):1769-74] 및 [Scheirlinck et al.,1989, Appl Environ Microbiol. 55(9):2130-7] 참조).

[64] 다른 실시양태에서, 글리코시드 히드롤라제 뉴클레오티드 코딩 서열은 선별된 숙주 유기체의 염색체에서 자연적으로 발생하는 프로모터에 작동가능하게 연결되는 위치에서 유산균 세포 염색체에 도입될 수 있다 (예를 들면, 문헌 [Rauch et al., 1992, J Bacteriol. 174(4):1280-7]; [Israelsen et al., 1993, Appl Environ Microbiol.59(1):21-26.] 및 [Maguin et al., 1996, J Bacteriol. 178(3):931-5] 참조).

[65] 몇몇 실시양태에서, 글리코시드 히드롤라제 뉴클레오티드 코딩 서열은 시그널 펩티드(SP)를 코딩하는 뉴클레오티드 서열에 작동가능하게 연결되어 유전자 생성물이 박테리아 외부로 분비되어 배양 배지에 도입되도록 할 수 있다. Usp45를 비롯한 유산균에서 사용하기 적합한 시그널 펩티드가 미국 공개공보 제2002/0137140호 (그 게시문은 모두 상기 거명을 통해 본원에 참고로 포함됨)에 게시되어 있다.

[66] 몇몇 실시양태에서, 유산균에서 이종 단백질의 생성 및 분비를 개선시키는데

사용되는 것과 같은 추가의 뉴클레오티드 서열이 본원에 기재된 방법 및 조성물에 사용될 수 있다. 예를 들면, 몇몇 실시양태에서, 스타필로코커스 뉴클레아제 (Nuc)를 코딩하는 뉴클레오티드 서열 및 합성 프로펩티드 LEISSTCDA는 글리코시드 히드롤라제를 코딩하는 뉴클레오티드 서열에 연결될 수 있다. 예를 들면, 문헌 [Nouaille et al., 2005, Braz J Med Biol Res.38:353-359] (그 게시문은 모두 상기 거명을 통해 본원에 참고로 포함됨)을 참조한다.

[67] 몇몇 실시양태에서, pLF22 (예를 들면, 문헌 [Trakanov, et al., 2004, Microbiology 73:170-175] 참조) 및 pTREX (예를 들면, 문헌 [Reuter, et al., 2003, "Vaccine Protocols," In Methods in Molecular Medicine 87:101-114]) 등을 비롯한 유산균에서 사용되도록 개발된 발현 벡터를 사용하여 유산균에서 재조합 글리코시드 히드롤라제를 발현시킬 수 있다.

[68] 다양한 실시양태에서, 글리코시드 히드롤라제를 코딩하는 뉴클레오티드 서열을 포함하는 유산균은 예를 들면 미국 공개공보 제2002/0137140호에 게시된 바와 같이 배양하여 내독소-무함유 글리코시드 히드롤라제를 생성할 수 있다. 이 방법은 아포지단백질의 발현에 적합한 조건하에 형질전환된 유산균을 배양하는 단계 및 형질전환된 유산균으로부터 글리코시드 히드롤라제를 회수하는 단계를 포함할 수 있다. 재조합 세포 및/또는 글리코시드 히드롤라제는 당업자에게 공지된 통상적인 기술을 이용하여 수확할 수 있다. 예를 들면, 미국 출원 공개공보 제2002/0137140호 (그 게시문은 모두 상기 거명을 통해 본원에 참고로 포함됨)를 참조한다.

[69] 몇몇 실시양태에서, 단쇄 아실 인지질이 재조합 글리코시드 히드롤라제 (상기 기재된 바와 같음)을 포함하는 유산균의 배양에 사용되는 배지 (즉, 발효 배지)에 첨가된다. 유산균은 영양소 공급원으로 단쇄 아실 인지질을 이용할 수있다. 또한, 단쇄 아실 인지질을 보조제로 사용하여 발현된 아포지단백질을 용해시킬 수 있다. 단쇄 아실 인지질은 아실 쇄를 분해하는 포스포리파제를 첨가하고, 단쇄 지방산 및 단쇄 lysoPL을 유리시켜 용이하게 제거할 수 있다.

[70] 본 발명에서 회수되는 목적 단백질의 정제를 용이하게 하기 위하여, 플라스미드 벡터는 필요에 따라 다른 서열을 추가로 포함할 수 있다. 상기 추가로 포함될 수 있는 서열은 단백질 정제용 태그 서열일 수 있으며, 예컨대, 글루타티온 S-트랜스퍼라제 (Pharmacia, USA), MBP(말토스 결합 단백질, USA), FLAG (IBI, USA) 및 헥사히스티딘(hexahistidine; Quiagen, USA) 등이 있고, 가장 바람직하게는 MBP 일 수 있으나, 상기 예들에 의하여 목적 단백질의 정제를 위하여 필요한 서열의 종류가 제한되는 것은 아니다.

[71] 또한, 상기 융합 서열이 포함되어 있는 벡터에 의해 발현된 융합 단백질의 경우, 친화성 크로마토그래피에 의해 정제될 수 있다. 예컨대, 글루타티온-S-트랜스퍼라제가 융합된 경우에는 이 효소의 기질인 글루타티온을 이용할 수 있고, MBP가 이용된 경우에는 아밀로오즈 컬럼을 이용하여 원하는 목적 단백질을 용이하게 회수할 수 있다.

[72] 본 발명의 글리코시드 히드롤라제를 발현시키기 위해 상기의 방법으로 형질전환된 숙주 세포는 당업계에서 사용되는 통상적인 방법으로 배양할 수 있다. 예를 들면, 상기 글리코시드 히드롤라제를 발현하는 형질전환체는 다양한 배지에서 배양할 수 있으며, 페드-배치(fed-batch) 배양 및 연속 배양 등을 수행할 수 있으나, 상기 예에 의해 본 발명의 형질전환체의 배양방법이 제한되는 것은 아니다. 또한, 숙주 세포의 생장을 위하여 배지 중에 포함될 수 있는 탄소원은 제조된 형질전환체의 종류에 따라 당업자의 판단에 의해 적절하게 선택될 수 있고, 배양 시기 및 양을 조절하기 위해 적당한 배양 조건을 채택할 수 있다.

[73] 적절한 숙주 세포를 선택하여 배지 조건을 조성하여 주면 목적 단백질이 성공적으로 형질전환된 형질전환체는 글리코시드 히드롤라제를 생산하게 되며, 벡터의 구성 및 숙주 세포의 특징에 따라 생산된 글리코시드 히드롤라제는 숙주 세포의 세포질 내, 페리플라즈믹 스페이스(periplasmic space) 또는 세포 외로 분비될 수 있다. 또한 목적 단백질은 가용성 형태 또는 불용성 형태로 발현될 수 있다.

[74] 숙주 세포 내 또는 외에서 발현된 단백질은 통상의 방식으로 정제될 수 있다. 정제 방법의 예로는 염석(예를 들어 황산암모늄 침전, 인산 나트륨 침전 등), 용매 침전(예를 들어, 아세톤, 에탄올 등을 이용한 단백질 분획 침전 등), 투석, 겔 여과, 이온 교환, 역상 컬럼 크로마토그래피와 같은 크로마토그래피 및 한외여과 등의 기법을 단독 또는 조합으로 적용하여 본 발명의 단백질을 정제할 수 있다.

[75] 상기의 방법으로 분리된 글리코시드 히드롤라제를 이용하여 진세노사이드가 존재하는 인 비트로(*in vitro*) 또는 인 비보(*in vivo*) 시스템에서 용이 흡수가 가능한, 탈글리코실화된 진세노사이드를 생산할 수 있다.

[76] 제1 진세노사이드로부터 탈글라이코실화된 제2 진세노사이드 제조시, 적어도 하나의 단계에서 본 발명은 본 발명의 글리코시드 히드롤라제, 본 발명의 형질전환체 또는 상기 형질전환체의 배양물, 바이셀라 콘푸사(*Weissella confusa*), 페디오코커스 펜토사시우스(*Pediococcus pentosaceus*), 루코노스톡 메센테로이드스(*Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides*), 또는 루코노스톡 시트리움(*Leuconostoc citreum*), 상기 균주의 배양물, 또는 이들의 혼합물을 이용할 수 있다.

[77] 본 발명에서 출발물질로 이용되는 제 1 진세노이드는 PPD 또는 PPT 타입의 진세노사이드일 수 있으며, 분리 및 정제된 형태의 진세노사이드를 이용할 수도 있고, 또는 인삼 또는 홍삼의 분말 또는 추출물에 포함되어 있는 진세노사이드를 이용할 수도 있다. 즉, 진세노사이드를 포함하는 인삼 또는 홍삼의 분말 또는 추출물을 직접 출발물질로 이용하여 본 발명의 방법을 실시할 수도 있다. PPD 또는 PPT 타입의 진세노사이드에 대해서 도 1에 나타내었다.

[78]

[79] 본 발명에서 이용되는 인삼으로는, 공지된 다양한 인삼을 사용할 수 있으며, 고려삼(*Panax ginseng*), 회기삼(*P. quiquefolius*), 전칠삼(*P. notoginseng*), 죽절삼(*P.*

japonicus), 삼엽삼(*P. trifolium*), 히말라야삼(*P. pseudoginseng*) 및 베트남삼(*P. vietnamensis)*을 포함하나, 이에 한정되지 않는다.

[80] 본 발명은 글리코시드 히드롤라제의 기질인 제1진세노사이드는 Rg1, Rg2, Rb1, Rc, Rb2, Rd, F2, Rg3, Gyp17, 화합물 O, 화합물 Y, 화합물 Mc1, 화합물 Mc 또는 Re 일 수 있으며, 바람직하게는 Rb1, Gyp17, Rd 또는 Re일 수 있다.

[81] 본 발명의 글리코시드 히드롤라제는 비환원된 β-1,6 글루코피라노실 잔기, β-1,2 글루코피라노실 잔기, 또는 글루코스를 가지는 진세노사이드라면 모두 선택적으로 가수분해할 수 있고, 바람직하게 당업계에 알려진 모든 PPD 또는 PPT 타입의 진세노사이드의 비환원된 β-1,6 글루코피라노실 잔기, β-1,2 글루코피라노실 잔기, α-람노피라노실 잔기 또는 글루코스를 선택적으로 가수분해할 수 있으며, 예를 들어, PPD 타입의 진세노사이드 중 Rb1이 C20(20번째 탄소를 의미함)에서 비환원된 β-1,6 글루코피라노실 잔기를 가지므로 상기 Rb1의 비환원된 β-1,6 글루코피라노실 잔기는 본 발명의 글리코시드 히드롤라제에 의해 선택적으로 가수분해할 수 있다. 또한 진세노사이드 Rc의 C3의 아라비노퓨라노시드, Rb2의 아라비노피라노시드 등의 잔기도 본 발명의 글리코시드 히드롤라제에 의해 선택적으로 가수분해될 수 있다. 또한 진세노사이드 Re의 C6에서 α-람노피라노실 잔기를 가지므로, 상기 α-람노피라노실 잔기가 본 발명의 글리코시드 히드롤라제에 의해 선택적으로 가수분해될 수 있다.

[82] 본 발명의 글리코시드 히드롤라제, 본 발명의 형질전환체 또는 상기 형질전환체의 배양물, 바이셀라 콘푸사(*Weissella confusa*), 페디오코커스 펜토사시우스(*Pediococcus pentosaceus*), 루코노스톡 메센테로이드스(*Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides*), 또는 루코노스톡 시트리움(*Leuconostoc citreum*), 상기 균주의 배양물, 또는 이들의 혼합물은 PPD(protopanaxadiol) 또는 PPT 타입의 진세노사이드를 상대적으로 탈글라이코실화된 희귀 진세노사이드로 전환시킬 수 있는데, 이는 PPD 타입 또는 PPT 타입의 진세노사이드의 비환원된 β-1,6 글루코피라노실 잔기, β-1,2 글루코피라노실 잔기, α-람노피라노실 잔기, 글루코스, 아라비노퓨라노시드 잔기, 아라비노피라노시드 등의 잔기를 선택적으로 가수분해하고, 보다 바람직하게는 PPD 타입 진세노사이드의 20번째 탄소에 위치한 비환원된 β-1,6 글루코피라노실 잔기, 아라비노퓨라노시드, 또는 아라비노피라노시드 잔기를, 또는 3번째 탄소에 위치한 비환원된 β-1,2 글루코피라노실 잔기 또는 글루코스를, 또는 PPT 타입 진세노사이드의 6번째 탄소에 위치한 α-람노피라노실 잔기를 선택적으로 가수분해함으로써 수행될 수 있다.

[83] 이러한 전환은 생전환(bioconversion)을 통해 이루어지며, 연속 또는 비연속적으로 PPD 타입의 진세노사이드의 비환원된 β-1,6 글루코피라노실 잔기, β-1,2 글루코피라노실 잔기 또는 글루코스, 아라비노퓨라노시드, 아라비노피라노시드, 또는 PPT 타입 진세노사이드의 6번째 탄소에 위치한

α-람노피라노실 잔기를 선택적으로 가수분해함으로써 달성될 수 있다.

[84] 바람직하게, 본 발명의 단백질에 의한 생전환의 예로는 진세노사이드 Rb1를 Rd로 전환, 진세노사이드 Rc를 Rd로 전환, 진세노사이드 Rb2를 Rd로 전환, 진세노사이드 Rd를 F2로 전환, 진세노사이드 Rd을 화합물 K로 전환, 진세노사이드 Rb1을 F2로 전환, 진세노사이드 Gyp17을 F2로 전환, 진세노사이드 Rb1을 화합물 K로 전환, 진세노사이드 F2를 화합물 K로 전환, 진세노사이드 Rd를 Rg3로 전환, 진세노사이드 Rb1을 Rh2로 전환, 진세노사이드 Rg3를 Rh2로 전환, 진세노사이드 Rb1를 Gyp17로 전환, 진세노사이드 Gyp17을 GypLXXV로 전환, 진세노사이드 gyp17을 화합물 K로 전환, 진세노사이드 Rb2를 화합물 O로 전환, 진세노사이드 화합물 O를 화합물 Y로 전환, 진세노사이드 Rc를 화합물 Mc로 전환, 진세노사이드 Re를 Rg1으로 전환, 진세노사이드 화합물 Mc를 화합물 Mc1으로 전환하는 방법이 모두 포함되며, 더욱 바람직하게는 Rb1을 Rh2로 전환, Rb1을 화합물 K로 전환, Gyp17를 F2로 전환, Rd를 F2로 전환, Re를 Rg1으로 전환, Rb1을 F2로 전환하는 방법이 포함될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 본 발명에 따라 생성될 수 있는 PPD 타입 진세노사이드의 반응경로가 도 13에 도시되어 있다.

[85] 이러한 진세노사이드의 탈글리코실화는 본 발명의 글리코시드 히드롤라제의 비환원된 α-람노피라노실 잔기, β-1,6 글루코피라노실 잔기, β-1,2 글루코피라노실 잔기 또는 글루코스에 대한 선택적 가수분해능에 의한 것일 수 있으며, 상기와 같은 가수분해를 통해 생성된 탈글라이코실화된 희귀 진세노사이드는 체내 흡수가 용이하다. 아울러, 이러한 생전환은 PPD 타입 진세노사이드, 예를 들어 진세노사이드 Rb1가 그의 가장 탈글라이코실화된 형태인, 화합물 K로 전환되는 것을 촉진한다.

[86] 본 발명의 글리코시드 히드롤라제는 활성 및 안정성이 유지될 수 있는 한 다양한 온도 및 pH 조건에서, PPT 타입 진세노사이드의 α-람노피라노실 잔기, PPD(protopanaxadiol) 타입 진세노사이드의 β-1,6 글루코피라노실 잔기, β-1,2 글루코피라노실 잔기 또는 글루코스의 선택적 가수분해 및 PPD(protopanaxadiol) 타입 또는 PPT(protopanaxatriol) 타입 진세노사이드를 체내 흡수가 용이한 형태의 희귀 진세노사이드로의 전환에 사용될 수 있다.

[87] 아울러, 본 발명의 글리코시드 히드롤라제는 $MgCl_2$, EDTA, NaCl, KCl, DTT 및 베타-머캅토에탄올로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 금속 및 화학 제재를 함께 사용할 수 있으나 이에 제한되지 않는다.

[88] 한편, 제1 진세노사이드로부터 탈글라이코실화된 제2 진세노사이드를 제조시, 본 발명의 글리코시드 히드롤라제, 본 발명의 형질전환체 또는 상기 형질전환체의 배양물, 바이셀라 콘푸사(*Weissella confusa*), 페디오코커스 펜토사시우스(*Pediococcus pentosaceus*), 루코노스톡 메센테로이드스(*Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides*), 또는 루코노스톡 시트리움(*Leuconostoc citreum*),상기 균주의 배양물, 또는 이들의 혼합물은, 동시에 또는

일정한 순서에 따라 다른 효소(들)와 함께 사용할 수 있다. 다른 효소들의 비제한적인 예로는 α-*N*-아라비노퓨라노시다제, β-갈락토시다제, 글리코시다제, α-L-아라비노피라노시다제, α-L-아라비노퓨라노시다제, β-자일로시다아제, 및 α-L-람노시다제 등이 있다. 글리코시드 히드롤라제 단독 또는 다른 효소와의 조합에 의해 제조되는 제2 진세노사이드들은 상이할 수 있으며, 이러한 제2진세노사이드는 1종 또는 2종 이상의 제2진세노사이드일 수 있다.

[89] 본 발명의 글리코시드 히드롤라제, 본 발명의 형질전환체 또는 상기 형질전환체의 배양물, 바이셀라 콘푸사(*Weissella confusa*), 페디오코커스 펜토사시우스(*Pediococcus pentosaceus*), 루코노스톡 메센테로이드스(*Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides*), 또는 루코노스톡 시트리움(*Leuconostoc citreum*), 상기 균주의 배양물, 또는 이들의 혼합물은 다른 효소(들)와 동일 용기 또는 상이한 용기에 담아 제공될 수 있다.

[90]

[91] 또 하나의 양태로서, 본 발명은 글리코시드 히드롤라제, 본 발명의 형질전환체 또는 상기 형질전환체의 배양물, 바이셀라 콘푸사(*Weissella confusa*), 페디오코커스 펜토사시우스(*Pediococcus pentosaceus*), 루코노스톡 메센테로이드스(*Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides*), 또는 루코노스톡 시트리움(*Leuconostoc citreum*), 상기 균주의 배양물, 또는 이들의 혼합물을 포함하는 식품 또는 식품 첨가제를 제공한다.

[92] 사료 또는 사료 첨가제는 본 발명에 따른 식품 또는 식품 첨가제에 포함된다. 상기 식품 또는 식품 첨가제는 바람직하게는 PPD 또는 PPT 타입의 진세노사이드, 또는 삼을 추가로 더 포함할 수 있다. 상기 식품은 건강기능식품뿐만 아니라, 인간이 널리 통상적으로 매일 섭취하는 일반적인 식품을 포함하는 것이다. 건강기능식품으로서 이용될 경우 식품학적으로 허용 가능한 담체 또는 첨가제와 함께 당해 기술분야에 공지되어 있는 통상적인 건강기능식품의 제형으로 제제화될 수 있다. 상기 건강기능식품은 예를 들어 산제, 과립제, 정제, 캡셀제, 현탁액, 에멀젼, 시럽제, 액제, 엑스제, 차, 젤리, 또는 음료 등으로 제조될 수 있다. 상기 식품학적으로 허용 가능한 담체 또는 첨가제는 제조하고자 하는 제형의 제조에 당해 기술분야에서 사용 가능한 것으로 공지되어 있는 임의의 담체 또는 첨가제가 이용될 수 있다.

[93] 상기 식품은 발효식품일 수 있으며, 발효식품의 예로는 김치, 채소발효물, 된장, 간장, 청국장, 젓갈, 발효된 유제품(발효유, 요구르트, 치즈) 등을 포함하나 이에 제한되지는 않는다.

[94] 식품, 식품 첨가제, 사료 또는 사료첨가제에서, 진세노사이드 또는 삼내 진세노사이드는 글리코시드 히드롤라제에 의해 가수분해된 것일 수 있고, 가수분해되지 않은 것일 수 있다.

[95] 사료 첨가제로서 이용될 경우, 본 발명의 글리코시드 히드롤라제, 본 발명의 형질전환체 또는 상기 형질전환체의 배양물, 바이셀라 콘푸사(*Weissella confusa*),

페디오코커스 펜토사시우스(*Pediococcus pentosaceus*), 루코노스톡 메센테로이드스(*Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides*), 또는 루코노스톡 시트리움(*Leuconostoc citreum*), 상기 균주의 배양물, 또는 이들의 혼합물은 20 내지 90wt% 고농축액이거나 분말 또는 과립형태로 제조될 수 있다. 상기 사료 첨가제는 구연산, 후말산, 아디픽산, 젖산, 사과산 등의 유기산이나 인산나트륨, 인산칼륨, 산성 피로인산염, 폴리인산염(중합인산염) 등의 인산염이나, 폴리페놀, 카테킨, 알파-토코페롤, 로즈마리 추출물, 비타민 C, 녹차 추출물, 감초 추출물, 키토산, 탄닌산, 피틴산 등의 천연 항산화제 중 어느 하나 또는 하나 이상을 추가로 포함할 수 있다. 사료로서 이용될 경우, 상기 조성물은 통상의 사료 형태로 제제화될 수 있으며, 통상의 사료 성분을 함께 포함할 수 있다.

[96] 상기 사료 첨가제 및 사료는 곡물, 예를 들면 분쇄 또는 파쇄된 밀, 귀리, 보리, 옥수수 및 쌀; 식물성 단백질 사료, 예를 들면 평지, 콩, 및 해바라기를 주성분으로 하는 사료; 동물성 단백질 사료, 예를 들면 혈분, 육분, 골분 및 생선분; 당분 및 유제품, 예를 들면 각종 분유 및 유장 분말로 이루어지는 건조 성분 등을 더 포함할 수 있으며, 이외에도 영양 보충제, 소화 및 흡수 향상제, 성장 촉진제 등을 더 포함할 수 있다.

[97] 상기 사료 첨가제는 동물에게 단독으로 투여하거나 식용 담체 중에서 다른 사료 첨가제와 조합하여 투여할 수도 있다. 또한, 상기 사료 첨가제는 탑 드레싱으로서 또는 이들을 동물 사료에 직접 혼합하거나 또는 사료와 별도의 경구 제형으로 용이하게 동물에게 투여할 수 있다. 상기 사료 첨가제를 동물 사료와 별도로 투여할 경우, 당해 기술분야에 잘 알려진 바와 같이 약제학적으로 허용 가능한 식용 담체와 조합하여, 즉시 방출 또는 서방성 제형으로 제조할 수 있다. 이러한 식용 담체는 고체 또는 액체, 예를 들어 옥수수 전분, 락토오스, 수크로오스, 콩 플레이크, 땅콩유, 올리브유, 참깨유 및 프로필렌글리콜일 수 있다. 고체 담체가 사용될 경우, 사료 첨가제는 정제, 캡슐제, 산제, 트로키제 또는 함당정제 또는 미분산성 형태의 탑 드레싱일 수 있다. 액체 담체가 사용될 경우, 사료 첨가제는 젤라틴 연질 캡슐제, 또는 시럽제나 현탁액, 에멀젼제, 또는 용액제의 제형일 수 있다.

[98] 상기 사료는 동물의 식이 욕구를 충족시키는데 통상적으로 사용되는 임의의 단백질-함유 유기 곡분을 포함할 수 있다. 이러한 단백질-함유 곡분은 통상적으로 옥수수, 콩 곡분, 또는 옥수수/콩 곡분 믹스로 주로 구성되어 있다.

[99] 또한, 상기 사료 첨가제 및 사료는 보조제, 예를 들어 보존제, 안정화제, 습윤제 또는 유화제, 용액 촉진제 등을 함유할 수 있다. 상기 사료 첨가제는 침투, 분무 또는 혼합하여 동물의 사료에 첨가하여 이용될 수 있다.

[100] 본 발명의 사료 또는 사료 첨가제는 포유류, 가금 및 어류를 포함하는 다수의 동물 식이에 적용할 수 있다. 상기 포유류로서 돼지, 소, 양, 염소, 실험용 설치 동물, 및 실험용 설치 동물뿐만 아니라, 애완 동물(예: 개,고양이) 등에게 사용할

수 있으며, 상기 가금류로서 닭, 칠면조, 오리, 거위, 꿩, 및 메추라기 등에도 사용할 수 있고, 상기 어류로서 송어 등에 이용될 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

발명의 실시를 위한 형태

[101] 이하, 본 발명을 실시예를 통하여 보다 상세하게 설명한다. 그러나, 이들 실시예는 본 발명을 예시적으로 실시하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[102]

[103] **실시예 1: 재조합 GL24GH1, GL24GH43 및 GL24GH3의 분자 클로닝, 발현 및 정제**

[104]

[105] **(1-1) 균주 GL24의 특성 분석**

[106] GL24 균주의 특성을 분석하기 위하여 정방향 프라이머(16S-27F; 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' (서열번호 9)) 및 역방향 프라이머(16S-1492R; 5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3' (서열번호 10))을 사용하여 PCR 증폭을 통해 수행하였고, Solgent(주)에 의뢰하여 염기서열을 결정하였다. 결정된 16S rRNA 유전자 서열을 수집하였고, NCBI 데이터베이스에서 블라스팅하였다. GL24 균주의 16S rRNA 염기서열 분석 결과, 바이셀라 콘푸사(*Weissella confusa*)로 동정되었다. 바이셀라 콘푸사(*Weissella confusa*)로 동정된 GL24 균주에서 글리코시드 히드롤라제 유전자를 클로닝하였다.

[107]

[108] **(1-2) 재조합 GL24GH1의 분자 클로닝 및 발현**

[109] 글리코시드 히드롤라제 유전자를 PCR을 이용하여 증폭시키기 위하여 GL24 균주를 MRS 평판배지에 배양한 후 균체를 수집한 다음, 게노믹 DNA 추출키트(genomic DNA extraction kit, MoBio)를 사용하여 게노믹 DNA(genomic DNA)를 분리하였다. 클로닝에 사용한 벡터인 pET21a 벡터는 Maltose binding protein epitope이 N-terminal 쪽에 부가된 KCTC11478 (pMBP-BglQM6775)를 사용하였다.

[110] PCR을 수행하기 위하여 바이오니어(Bioneer)의 PCR pre-mix를 사용하였으며, 하기와 같은 프라이머(primer)를 주문제작하여 사용하였다. 이때 주형 DNA(template DNA)는 GL24의 gDNA(genomic DNA)를 100ng을 사용하였다.

[111]

[112] 정방향 프라이머:

[113] 5'-GAA GAA TTC ATG TCA TTA CGG GGC AAA GAA-3' (서열번호 11)

[114] 역방향 프라이머:

[115] 5'-CCA AGC TTC TAC TTC CCT CGA TAC TCT AA-3' (서열번호 12)

[116] (상기 프라이머 서열의 밑줄 친 부분은 각각 EcoRI 및 HindIII의 제한효소 절단 부위를 나타낸다)

[117]

[118] 상기 증폭된 단편의 서열을 BLSTP를 이용하여 분석한 결과 글리코시드 히드롤라제 패밀리 I(Glycoside hydrolase family I)에 속하는 효소로 규명되었으며, 이를 GL24GH1으로 명명하였다.

[119]

[120] 상기 증폭된 단편을 pET21a 발현 벡터에 EcoRI 및 HindIII 제한효소 전달 부위를 이용하여 클로닝하였다. 상기 클로닝된 GL24GH1-pET21a를 대장균 균주 C41(*E. coli* strain C41)에 형질전환하였다. 상기 형질전환된 대장균을 LB 액체배지에 접종하여 OD_{600}= 0.4 ~ 0.6이 되었을 때 IPTG를 최종농도 0.2mM가 되도록 첨가하고 37에서 6시간 배양하였다. 균체를 원심분리 하여 수집한 후, 50mM 인산 완충용액(phosphate buffer, pH7.5)로 현탁한 다음 초음파 분쇄기로 파쇄하였다. 12,500 Xg에서 20분간 원심분리된 상등액을 효소 단백질의 분리정제에 사용하였다.

[121]

[122] **(1-3) 재조합 GL24GH43의 분자 클로닝, 발현**

[123] 유전자를 PCR하여 증폭하기 위하여 균주를 MRS평판배지에 배양한 후 균체를 수집하여 genomic DNA extraction kit (MoBio)를 사용하여 genomic DNA를 분리하였다. 클로닝에 사용한 백터는 Maltose binding protein epitope이 N-terminal 쪽에 부가된 KCTC11478(pMBP-BglQM6775)를 사용하였다.

[124] PCR을 위하여 BIONEER의 PCR premix 사용하였으며 다음과 같은 프라이머를 주문제작하여 사용하였다. 이때 주형 DNA(template DNA)는 GL24의 gDNA를 100ng을 사용했다.

[125]

[126] 정방향 프라이머:

[127] 5'-CCG AAT TCA TGA CAG TTC GCT ACG AAA AC-3' (서열번호 13)

[128] 역방향 프라이머:

[129] 5'-CCC AAA GCT TTT AGT TAA AAG TAA ATG GTT GTG-3' (서열번호 14)

[130] (상기 프라이머 서열의 밑줄 친 부분은 각각 EcoRI 및 HindIII의 제한효소 절단 부위를 나타낸다)

[131]

[132] 그 아미노산 서열은 서열번호 2에 나타내었으며 BLSTP 분석결과 글리코시드 히드롤라제 패밀리 43(Glycoside hydrolase family43)에 속하는 효소로 나타났다. GL24GH43로 명명하였다.

[133] 상기 증폭된 단편을 pET21a 발현 벡터에 EcoRI 및 HindIII 제한효소 전달 부위를 이용하여 클로닝하였다. 상기 클로닝된 GL24GH43-pET21a를 대장균 균주 C41(*E. coli* strain C41)에 형질전환하였다.

[134] 상기 형질전환된 대장균을 LB 액체배지에 접종하여 OD_{600}= 0.4 ~ 0.6이 되었을 때 IPTG를 최종농도 0.2mM가 되도록 첨가하고 37℃에서 6시간 배양하였다. 균체를 원심분리 하여 수집한 후, 50mM 인산 완충용액(phosphate buffer, pH7.5)로 현탁한 다음 초음파 분쇄기로 파쇄하였다. 12,500 Xg에서 20분간 원심분리된 상등액을 효소 단백질의 분리정제에 사용하였다.

[135]

[136] **(1-4) 재조합 GL24GH3의 분자 클로닝, 발현**

[137] 유전자를 PCR하여 증폭하기 위하여 균주를 MRS 평판배지에 배양한 후 균체를 수집하여 게노믹 DNA 추출 키트(genomic DNA extraction kit, (MoBio))를 사용하여 게노믹 DNA(genomic DNA)를 분리하였다. 클로닝에 사용한 pET21a 벡터는 Maltose binding protein epitope이 N-terminal 쪽에 부가된 KCTC11478 (pMBP-BglQM6775)를사용하였다.

[138] PCR을 위하여 BIONEER 의 PCR premix 사용하였으며 다음과 같은 프라이머를 주문제작하여 사용하였다. 이때 주형 DNA(template DNA)는 *W. confusa* GL24의 gDNA를 100ng을 사용했다.

[139]

[140] 정방향 프라이머:

[141] 5'-CCG AAT TCA TGA CCC AGC AAC TCA CTC AC-3' (서열번호 15)

[142] 역방향 프라이머:

[143] 5'-GCC AAG CTT TCA ATG TGT TGT CTG ACT ACC-3' (서열번호 16)

[144] (상기 프라이머 서열의 밑줄 친 부분은 각각 EcoRI 및 HindIII의 제한효소 절단 부위를 나타낸다)

[145]

[146] 상기 글리코시드 히드롤라제의 아미노산 서열은 서열번호 3에 나타냈으며, BLSTP 분석결과 Glycoside hydrolase family3에 속하는 효소로 나타났다. GL24GH3로 명명하였다.

[147] 상기 증폭된 단편을 pET21a 발현 벡터에 EcoRI 및 HindIII 제한효소 전달 부위를 이용하여 클로닝하였다. 상기 클로닝된 GL24GH3-pET21a를 대장균 균주 C41(*E. coli* strain C41)에 형질전환하였다.

[148] 상기 형질전환된 대장균을 LB 액체배지에 접종하여 OD_{600}= 0.4 ~ 0.6이 되었을 때 IPTG를 최종농도 0.2mM가 되도록 첨가하고 37에서 6시간 배양하였다. 균체를 원심분리 하여 수집한 후, 50mM 인산 완충용액(phosphate buffer, pH7.5)로 현탁한 다음 초음파 분쇄기로 파쇄하였다. 12,500 Xg에서 20분간 원심분리된 상등액을 효소 단백질의 분리정제에 사용하였다.

[149]

[150] **(1-5) 재조합 GL24GH1 및 GL24GH43의 정제**

[151] MBP 택(tag)이 결합된 GL24GH1-pET21a 또는 GL24GH43-pET21a의 과발현 플라스미드를 함유하는 상기 대장균(*E.coli* C41, DE3)을 LB-앰피실린 배지에서

O.D 값이 600nm에서 0.6이 될 때까지 37℃의 온도에서 배양하였고, 6시간 동안 아이소프로필-D-싸이오갈락토피라노사이드(isopropyl-D-thiogalactopyranoside) 0.2mM을 처리하여 단백질 발현을 유도하였다. 상기 대장균 세포를 4℃에서 20분 동안 5,000Xg로 원심분리한 다음, 수득하였다. 현탁 완충용액(50mM 인산나트륨(sodium phosphate), 5mM EDTA, pH 7.5)을 이용하여, 세포 펠렛(pellet)을 재현탁하였고, 초음파처리(ultrasonification)한 후 12,500Xg로 원심분리하였다. FPLC 시스템을 이용하여 상등액을 MBPTrap(GE) 컬럼에 로딩한 후, 상기 인산 완충용액으로 세척한 후, 말토오스(maltose) 200mM로 용출한 다음, 단백질을 분리정제 하였다. 그 다음, GL24GH1 및 GL24GH43에 대하여 SDS-PAGE 분석을 수행하였다.

[152] 그 결과, 2,3 및 4번 레인에서 GL24GH1 단백질이 발현된 것이 확인되었고(95 kDa), 6,7 및 8번 레인에서 GL24GH43 단백질(70kDa)이 발현된 것이 확인되었다 (도 2).

[153]

[154] **실시예 2. 재조합 PedGH1(*Pediococcus pentosaceus* glycoside hydrolase 1)의 분자 클로닝 및 발현**

[155]

[156] 100118TI-4 균주의 특성을 분석하기 위하여 정방향 프라이머(16S-27F; 5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' (서열번호 9)) 및 역방향 프라이머(16S-1492R; 5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3' (서열번호 10))을 사용하여 PCR 증폭을 통해 수행하였고, Solgent(주)에 의뢰하여 염기서열을 결정하였다. 결정된 16S rRNA 유전자 서열을 수집하였고, NCBI 데이터베이스에서 블라스팅하였다. GL24 균주의 16S rRNA 염기서열 분석 결과, 페디오코커스 펜토사이우스(*Pediococcus pentosaceus*)로 동정되었다.

[157] 페디오코커스 펜토사이우스(*Pediococcus pentosaceus*)로 동정된 100118TI-4 균주에서 글리코시드 히드롤라제 유전자를 클로닝하였다. 유전자를 PCR하여 증폭하기 위하여 필요한 게노믹 DNA(genomic DNA)를 확보하기 위하여, 균주를 MRS 평판배지에 배양한 후 균체를 수집하여 게노믹 DNA 추출 키트(genomic DNA extraction kit, MoBio)를 사용하여 게노믹 DNA(genomic DNA)를 분리하였다. 클로닝에 사용한 백터는 pET21a 벡터는 KCTC11478(pMBP-BglQM6775)를 사용하였다.

[158] PCR을 위하여 BIONEER의 PCR premix 사용하였으며 다음과 같은 프라이머를 주문제작하여 사용하였다. 이때 주형 DNA(template DNA)는 페디오코커스 펜토사시우스(*Pediococcus pentosaceus*) 100118TI-4의 gDNA를 100ng을 사용했다.

[159]

[160] 정방향 프라이머:

[161] 5'-CCG AAT TCA TGA CTG AAA AGC ATT ATA AG-3' (서열번호 17)

[162] 역방향 프라이머:

[163] 5'-GCC AAG CTT CTA TAA ATC TTC ACC ATT AG-3' (서열번호 18)

[164] (상기 프라이머 서열의 밑줄 친 부분은 각각 EcoRI 및 HindIII의 제한효소 절단 부위를 나타낸다)

[165]

[166] 상기 클로닝한 글리코시드 히드롤라제의 아미노산 서열은 서열번호 4에 나타내었으며, BLSTP 분석결과 글리코시드 히드롤라제 패밀리 1(Glycoside hydrolase family1)에 속하는 효소로 나타났으며, 이를 PedGH1로 명명하였다.

[167]

[168] **실시예 3: 유산균 배양 및 효소발현 유도**

[169] 하기 [표 1]에 기재된 유산균 및 배양배지를 사용하여, 100ml MRS 액체배지에 유산균을 접종하고 37℃ 진탕 배양기에서 배양하였다.

[170]

[171] 표 1

[Table 1]

유산균 및 배양배지		
번호	균주 이름	배양배지
1	*Weissella confusa* GL24	MRS
2	*Pediococcus pentosaceus* 100118TI-4	MRS
3	*Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* strain 25	MRS
4	*Leuconostoc citreum* GL29	MRS

[172]

[173] 상기 루코노스톡(*Leuconostoc)* 속에 속하는 유산균과 바이셀라 콘푸사(*Weissella confusa*)에 속하는 유산균, 페디오코커스 팬토사시우스(*Pediococcus pentosaceus*)의 균주(strain)들은 MRS 배지에서 잘 자랐다.

[174] 8시간 후 배양액의 흡광도(OD 600nm)가 0.5-0.6으로, 균체가 대수성장기에 들어갔을 때, PPD 혼합물(mixture) 또는 PPT 혼합물로 진세노시다제(ginsenosidase) 활성을 나타내는 글리코시드 히드롤라제 효소발현을 유도하였다. 배양 1일 또는 2일 후, 50ml 세포 배양액을 각각 회수하였다.

[175]

[176] **실시예 4: 인삼사포닌(진세노사이드) 생물전환 실험**

[177] 실시예 1에서 과발현하여 분리정제한 효소액, 실시예 2의 PedGH1 효소액과 야생형 균주의 상기 조효소액을 인산나트륨 완충용액(50mM, pH7.5)에 용해시킨 Rb1, Gyp17, Rd, F2, Re 및 Rg1(1mg/ml)과 부피비 1:1(200ul:200ul)이 되도록 반응시켰다. 반응 후, 시간별로 샘플링하고 같은 체적의 부탄올로 추출하여 TLC

분석을 진행하였다. 반응산물의 확인은 효소반응기질과 같은 순도의 표준물질을 이용하여 TLC 상의 전개도로 판단하였다.

[178] 상기 실시예 3에서 얻은 100ml의 배양액의 세포들을 2ml의 인산 완충용액에 현탁하고 1분간 초음파분쇄하였다. 상기 세포 추출액을 15,000rpm에서 20분간 원심분리하여 조효소액을 얻었다.

[179]

[180] 실시예 1에서 분리, 정제한 재조합 GL24GH1 및 GL24GH43에 대하여, 진세노사이드의 전환 활성을 확인한 결과를 전환 여부를 분석한 TLC(thin layer chromatography)의 결과를 도 3 내지 5에 나타내었다. 도 3는 GL24GH1이 Rb1 -> Rh2 및 C-K, Gyp17 -> F2, Rd -> F2, Re -> Rg1으로의 전환활성을 가지고 있음을 나타낸다. 또한, 도 4은 GL24GH43가 PPD type 진세노사이드인 Rb1 -> F2, Gyp17 -> F2, Rd -> F2, Re -> Rg1로의 전환활성이 있음을 나타낸다. 도 5는 GL24GH3가 Rb1 -> F2, Gyp17 -> F2, Rd -> F2로의 전환활성이 있음을 나타낸다.

[181]

[182] 도 6는 PedGH1이 Rb1 -> F2, Rd -> F2로의 전환활성이 있음을 나타낸다.

[183]

[184] 또한, 상기 조효소액을 인삼 사포닌과 반응시켜, 생물전환되는지 여부를 TLC를 이용하여 확인하였고, 그 결과를 도 7 내지 12에 나타내었다.

[185]

[186] 도 7은 유산균 바이셀라 콘푸사(*Weissella confusa*) 에 속하는 GL24균주가 PPD 타입 진세노사이드 Rb1, gyp17, Rd을 F2 로 생물전환하는 활성을 가지고 있음을 나타낸다.

[187]

[188] 도 8은 유산균 바이셀라 콘푸사(*Weissella confusa*)에 속하는 GL24균주가 PPT 타입 진세노사이드 Re를 Rg1으로 생물전환하는 활성을 가지고 있음을 나타낸다.

[189]

[190] 도 9은 유산균 페디오코커스 펜토사시우스(*Pediococcus pentosaceus*) 에 속하는 균주 100118TI-4가 PPD 타입의 진세노사이드중에서 Rb1 -> F2, Gyp17 -> F2, Rd -> F2 의 생물전환활성이 있음을 나타낸다.

[191]

[192] 도 10는 유산균 페디오코커스 펜토사시우스 균주 100118TI-4(*Pediococcus pentosaceus* 100118TI-4)가 PPT 타입의 진세노사이드를 Re -> Rg1으로 생물전환하는 효소활성을 가지고 있음을 나타내는 것이다.

[193]

[194] 도 11은 유산균 루코노스톡 스트리움(*Leuconostoc citreum*)GL29가 PPD 타입의 진세노사이드 Rb1 -> F2 ->C-K로, gyp17 -> C-K, Rd->C-K, F2 -> C-K로 생물전환하는 활성을 가지고 있으며 PPT 타입의 진세노사이드 Re -> Rg1으로

생물전환하는 활성을 가지고 있음을 TLC 분석으로 확인한 결과를 나타내는 것이다.

[195] 도 12은 유산균 루코노스톡 메센테로이드스(*Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides*) 균주 25가 PPD 타입의 진세노사이드 Rb1 -> F2 ->C-K로, F2 -> C-K로 생물전환하는 활성을 가지고 있으며 PPT 타입의 진세노사이드 Re -> Rg1으로 생물전환하는 활성을 가지고 있음을 TLC 분석으로 확인한 결과를 나타내는 것이다.

청구범위

[청구항 1] 유산균 유래의 글리코시드 히드롤라제(glycoside hydrolase).

[청구항 2] 제1항에 있어서, 바이셀라 콘푸사(*Weissella confusa*), 페디오코커스 팬토사시우스(*Pediococcus pentosaceus*), 루코노스톡 시트리움(*Leuconostoc citreum*) 및 루코노스톡 메센테로이드스(*Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides*)로 구성된 군에서 선택된 유산균 유래의 글리코시드 히드롤라제.

[청구항 3] 제2항에 있어서, 상기 바이셀라 콘푸사(*Weissella confusa*) 유래의 글리코시드 히드롤라제는 서열번호 1, 2 또는 3으로 구성되며, 페디오코커스 팬토사시우스(*Pediococcus pentosaceus*) 유래의 글리코시드 히드롤라제는 서열번호 4로 구성되는 아미노산 서열을 갖는 글리코시드 히드롤라제.

[청구항 4] 제1항에 있어서, PPD(protopanaxadiol) 타입 진세노사이드의 3번째 또는 20번째 탄소에 각각 위치한 β-1,2 글루코피라노실 잔기 또는 β-1,6 글루코피라노실 잔기 또는 20번째 탄소에 위치한 α-아라비노퓨라노시드, 또는 아라비노피라노시드, 또는 PPT(protopanaxtriol) 타입 진세노사이드의 6번째 탄소에 위치한 α-람노피라노실 잔기에 대한 선택적 가수분해능을 가지는 것을 특징으로 하는 글리코시드 히드롤라제.

[청구항 5] 제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 기재된 글리코시드 히드롤라제를 코딩하는 핵산.

[청구항 6] 제5항의 핵산을 포함하는 재조합 벡터.

[청구항 7] 제5항의 핵산 또는 상기 핵산을 포함하는 재조합 벡터로 형질전환된 형질전환체.

[청구항 8] 제7항에 있어서, 상기 형질전환체는 대장균(*E.coli*) 또는 유산균인 형질전환체.

[청구항 9] (a) 제7항의 형질전환체를 배양하는 단계;
(b) 상기 배양된 형질전환체로부터 글리코시드 히드롤라제를 생산하는 단계; 및
(c) 상기 생산된 글리코시드 히드롤라제를 회수하는 단계를 포함하는 글리코시드 히드롤라제의 제조방법.

[청구항 10] 제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 기재된 글리코시드 히드롤라제, 제9항에 의해 제조된 글리코시드 히드롤라제, 제7항의 형질전환체, 상기 형질전환체의 배양물, 바이셀라 콘푸사(*Weissella confusa*), 페디오코커스 팬토사시우스(*Pediococcus pentosaceus*), 루코노스톡 시트리움(*Leuconostoc citreum*) 또는 루코노스톡 메센테로이드스(*Leuconostoc mesenteroides* subsp.

mesenteroides), 상기 균주의 배양물, 또는 이들의 혼합물을 이용하는 단계를 포함하여 제 1 진세노사이드로부터 탈글라이코실화된 제2 진세노사이드를 제조하는 방법.

[청구항 11] 제10항에 있어서, 글리코시드 히드롤라제의 기질인 진세노사이드는 Re, Rg1, Rg2, Rb1, Rc, Rb2, Rd, F2, Rg3, Gyp17, 화합물 O, 화합물 Y, 화합물 Mc1 및 화합물 Mc로 구성된 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 방법.

[청구항 12] 제10항에 있어서, 상기 단계는 진세노사이드 Rb1를 Rd로 전환, 진세노사이드 Rc를 Rd로 전환, 진세노사이드 Rb2를 Rd로 전환, 진세노사이드 Rd를 F2로 전환, 진세노사이드 Rb1을 F2로 전환, 진세노사이드 Rb1을 화합물 K로 전환, 진세노사이드 F2를 화합물 K로 전환, 진세노사이드 Rd를 Rg3로 전환, 진세노사이드 Rd를 K로 전환, 진세노사이드 Rb1을 Rh2로 전환, 진세노사이드 Rg3를 Rh2로 전환, 진세노사이드 Rb1를 Gyp17로 전환, 진세노사이드 Gyp17를 GypLXXV로 전환, 진세노사이드 Gyp17를 F2로 전환, 진세노사이드 Gyp17를 화합물 K로 전환, 진세노사이드 Rb2를 화합물 O로 전환, 진세노사이드 화합물 O를 화합물 Y로 전환, 진세노사이드 Rc를 화합물 Mc로 전환, 진세노사이드 화합물 Mc를 화합물 Mc1으로 전환 및 진세노사이드 화합물 Re를 Rg1으로 전환으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 전환 단계인 것을 특징으로 하는 방법.

[청구항 13] 제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 기재된 글리코시드 히드롤라제, 제9항에 의해 제조된 글리코시드 히드롤라제, 제7항의 형질전환체, 상기 형질전환체의 배양물, 바이셀라 콘푸사(*Weissella confusa*), 페디오코커스 팬토사시우스(*Pediococcus pentosaceus*), 루코노스톡 시트리움(*Leuconostoc citreum*) 또는 루코노스톡 메센테로이드스(*Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides*), 상기 균주의 배양물, 또는 이들의 혼합물을 유효성분으로 포함하는 PPD(protopanaxadiol) 또는 PPT(protopanaxatriol) 타입 진세노사이드로부터 탈글라이코실화된 희귀 진세노사이드로의 전환용 키트.

[청구항 14] 제13항에 있어서, 동일 용기 또는 상이한 용기에 담아 추가로α-*N*-아라비노퓨라노시다제, β-갈락토시다제, 글리코시다제, α-L-아라비노피라노시다제, α-L-아라비노퓨라노시다제, β-자일로시다아제, 및 α-L-람노시다제 및 이들의 혼합물로 구성된 군에서 선택된 효소를 더 포함하는 것이 특징인 키트.

[청구항 15] 제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 기재된 글리코시드 히드롤라제, 제9항에 의해 제조된 글리코시드 히드롤라제, 제7항의

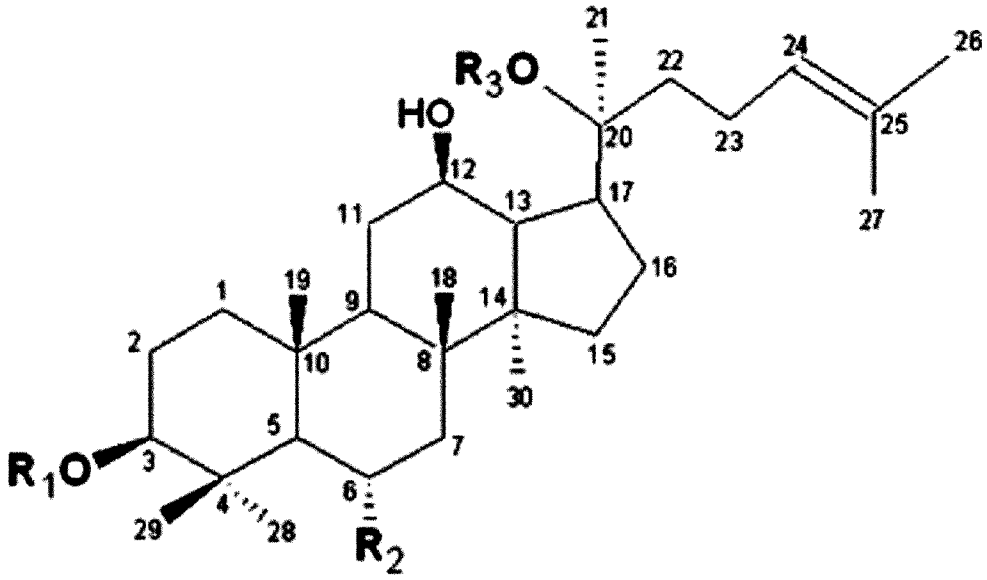
형질전환체, 상기 형질전환체의 배양물, 루코노스톡 메센테로이드스(*Leuconostoc mesenteroides subsp. mesenteroides*), 루코노스톡 시트리움(*Leuconostoc citreum*), 바이셀라 콘푸사(*Weissella confusa*) 또는 페디오코커스 펜토사시우스(*Pediococcus pentosaceus*), 상기 균주의 배양물, 또는 이들의 혼합물을 포함하는 식품 또는 식품첨가제.

[청구항 16] 제15항에 있어서, PPD(protopanaxadiol) 타입 또는 PPT(protopanaxatriol) 타입 진세노사이드, 또는 삼을 추가로 포함하는 식품 또는 식품 첨가제.

[청구항 17] 제15항에 있어서, 상기 식품은 발효식품인 것이 특징인 식품 또는 식품 첨가제.

[청구항 18] 제16항에 있어서, 진세노사이드 또는 삼내 진세노사이드가 글리코시드 히드롤라제에 의해 가수분해된 것이 특징인 식품 또는 식품 첨가제.

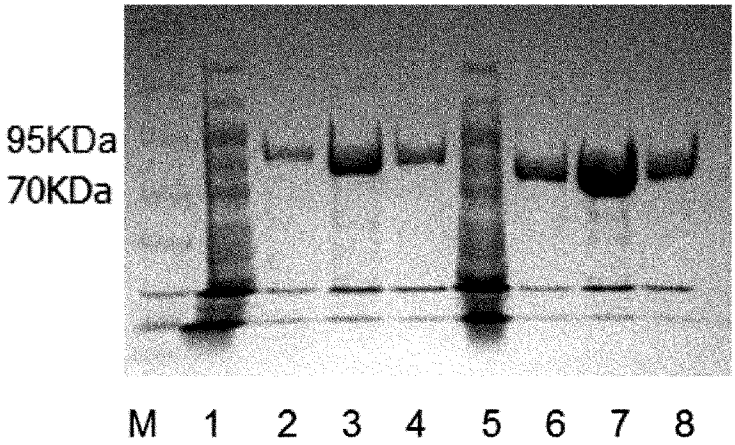
[Fig. 1]



Ginsenoside	R_1	R_2	R_3
Rb1	glc(2→1)glc	H	glc(6→1)glc
Rb2	glc(2→1)glc	H	glc(6→1)arap
Rc	glc(2→1)glc	H	glc(6→1)araf
Rd	glc(2→1)glc	H	glc
Gyp17	glc	H	glc(6→1)glc
Gyp75	H	H	glc(6→1)glc
C-O	glc	H	glc(6→1)arap
C-Y	H	H	glc(6→1)arap
C-Mc1	glc	H	glc(6→1)araf
C-Mc	H	H	glc(6→1)araf
F2	glc	H	glc
20-Rg3	glc(2→1)glc	H	H
20-Rh2	glc	H	H
C-K	H	H	glc
Re	H	-O-glc(2→1)rha	glc
Rg1	H	-O-glc	glc
20-Rg2	H	-O-glc(2→1)rha	H
Rf	H	-O-glc(2→1)glc	glc
Rh1	H	-O-glc	H

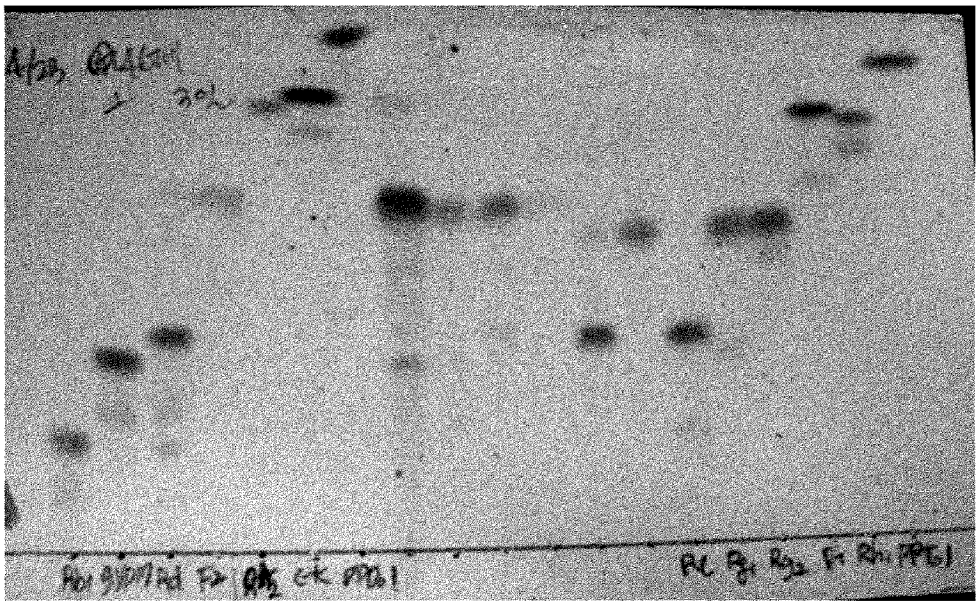
glc, β-D-glucopyranosyl; arap, α-L-arabinopyranosyl; araf, α-L-arabinofuranosyl; rha, α-L-rhamnopyranosyl; Gyp, gypenoside; C, Compound

[Fig. 2]



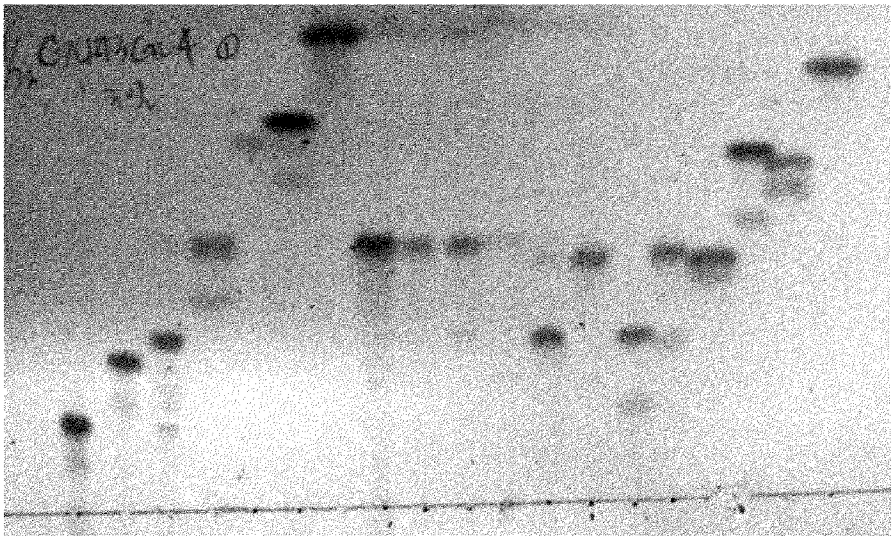
M, Protein marker; 1, Flow through; 2, 3, 4, maltose-eluted fractions of GL4GH1; 5, Flow through; 6, 7, 8, maltose-eluted fractions of GL4GH43

[Fig. 3]



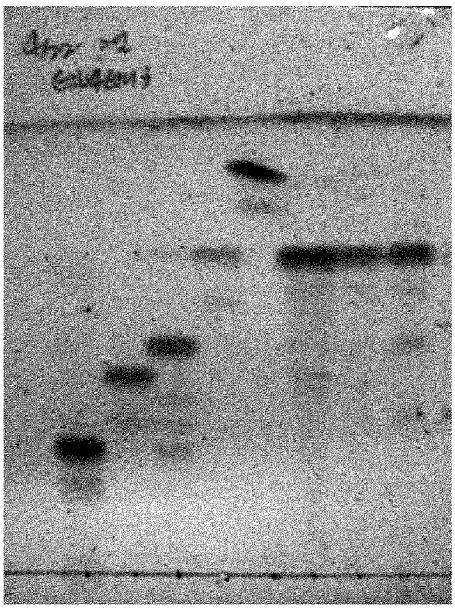
1, std Rb1; 2, std Gyp17; 3, Rd; 4, std F2; 5, std Rh2(s); 6, std C-K; 7, std PPDA; 14, std Re; 15, std Rg1; 16, std Rg2; 17, std F1; 18, std Rh1; 19, std PPTA; 8, enzyme reaction product from Rb1; 9, enzyme reaction product from Gyp17; 10, enzyme reaction product from Rd; 11, enzyme reaction product from F2; 12, enzyme reaction product from Re; 13, enzyme reaction product from Rg1

[Fig. 4]



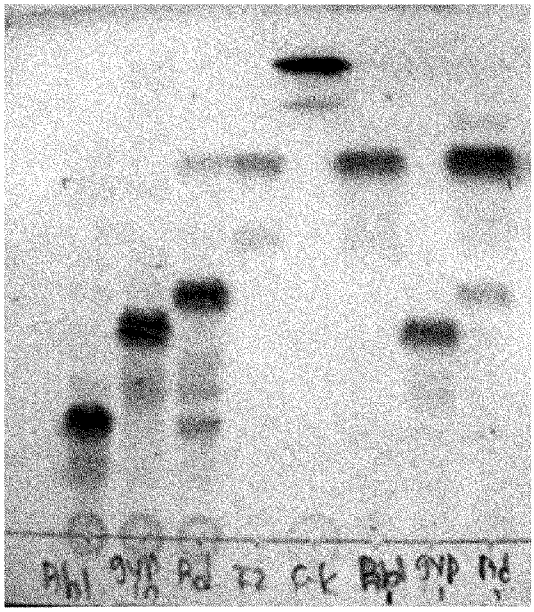
1, std Rb1; 2, std Gyp17; 3, std Rd; 4, std F2; 5, std Rh2(s); 6, std C-K; 7, std PPDA; 14, std Re; 15, std Rg2; 16, std Rg1; 17, std F1; 18, std Rh1; 19, std PPTA;
8, enzyme reaction product from Rb1; 9, reaction product from Gyp17; 10, reaction product from Rd; 11, reaction product from F2; 12, reaction product from Re; 13, enzyme reaction product from Rg1 (std, standard)

[Fig. 5]



1, std Rb1; 2, std Gyp17; 3, std Rd; 4, std F2; 5, std C-K; 6, enzyme reaction product from Rb1 reacted with GL4GH3; 7, reaction product from Gyp17; 8, reaction product from Rd

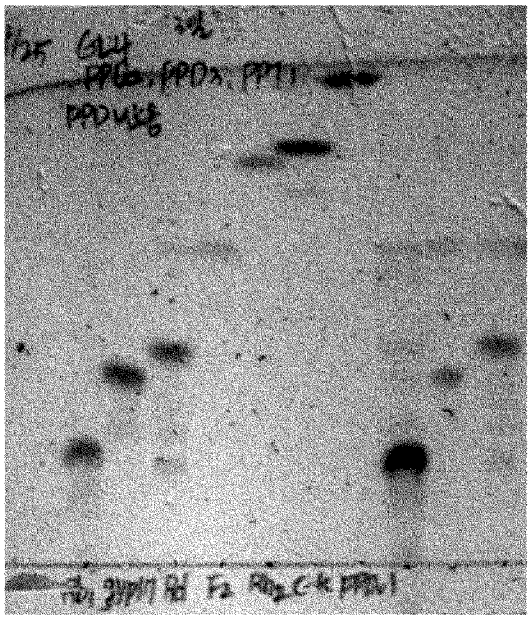
[Fig. 6]



1 2 3 4 5 6 7 8

1, std Rb1; 2, std gyp17; 3, std Rd; 4, std F2;
5, std C-K; 6, PedGH1 reaction with Rb1;
7, reaction with gyp17; 8, reaction with Rd

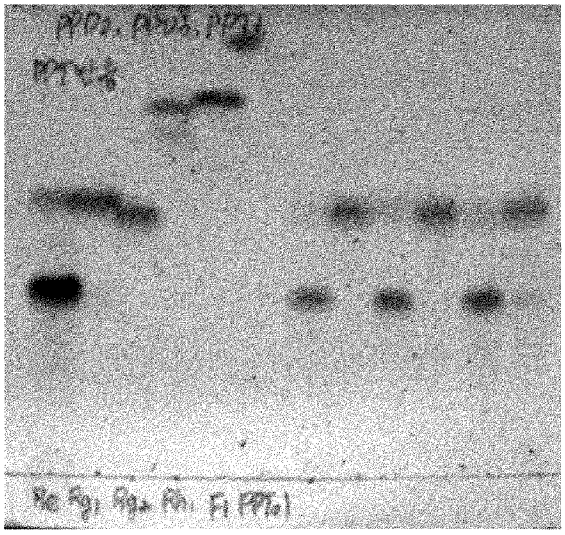
[Fig. 7]



1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

1, std Rb1; 2, std Gyp17; 3, std Rd; 4, std F2; 5, std Rh2(s); 6, std C-K; 7, std PPDA; 8, enzyme reaction product from Rb1 reacted with crude enzyme of Weissella confusa GL24; 9, enzyme reaction product from Gyp17; 10, enzyme reaction product from Rd

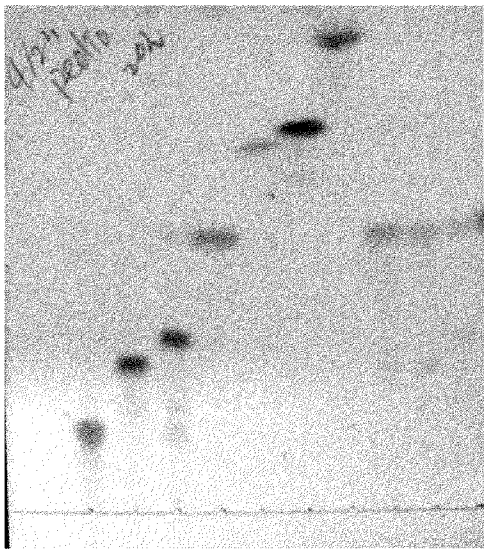
[Fig. 8]



1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12

1, std Re; 2, std Rg1; 3, std Rg2; 4, std Rh1(S); 5, std F1; 6, std PPTA; 7, enzyme reaction product from Re reacted with crude enzyme of Weissella confusa strain GL24; 8, enzyme reaction product from Rg1; 9, enzyme reaction product from Re; 10, enzyme reaction product from Rg1; 11, enzyme reaction product from Re; 12, enzyme reaction product from Rg1;

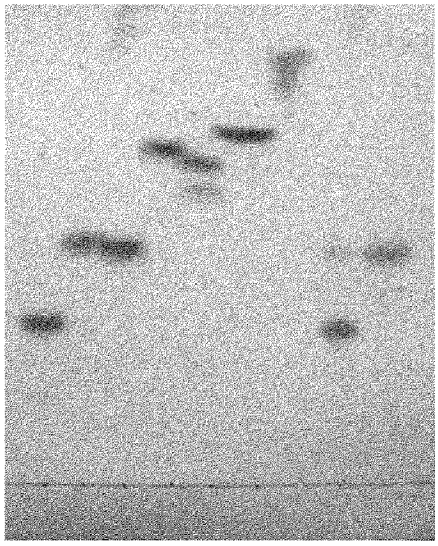
[Fig. 9]



1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

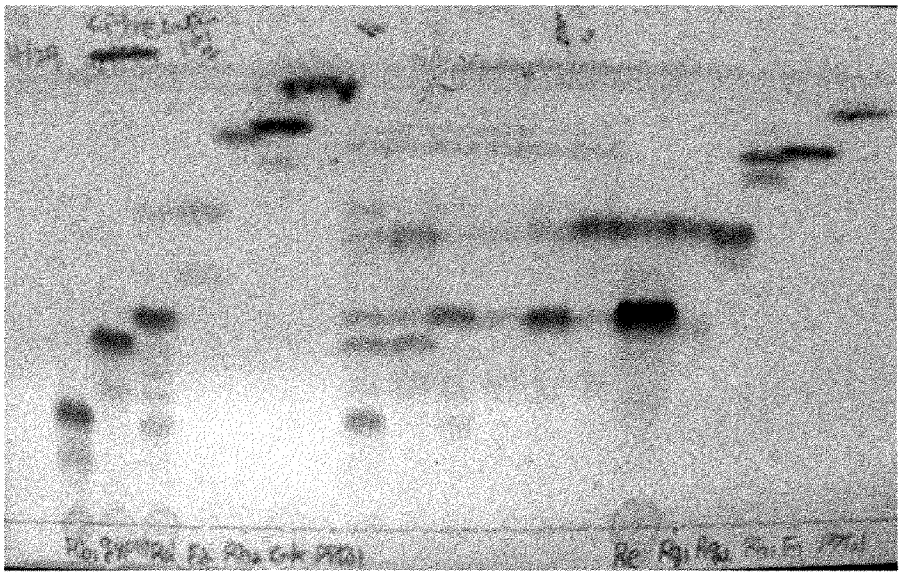
1, std Rb1; 2, std Gyp17; 3, std Rd; 4, std F2; 5, std Rh2(s); 6, std C-K; 7, std PPDA; 8, enzyme reaction product from Rb1 reacted with crude enzyme of Pediococcus pentosaceus strain 100118TI-4; 9, enzyme reaction product from Gyp17; 10, enzyme reaction product from Rd

[Fig. 10]



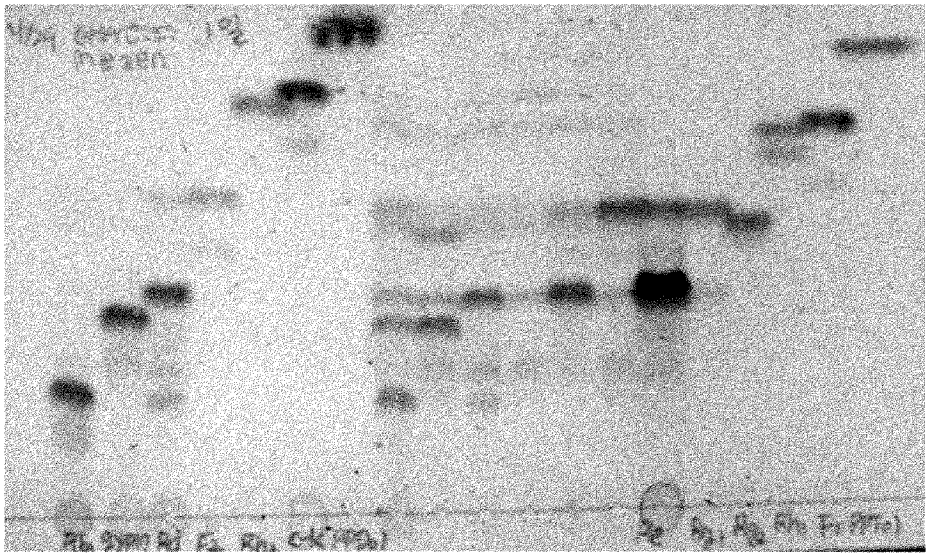
1, std Re; 2, std Rg1; 3, std Rg2; 4, std F1; 5, std Rh1; 6, std C-K; 7, std PPTA; 8, enzyme reaction product from Re reacted with crude enzyme of *Pediococcus pentosaceus* strain 100118TI-4; 9, enzyme reaction product from Rg1

[Fig. 11]

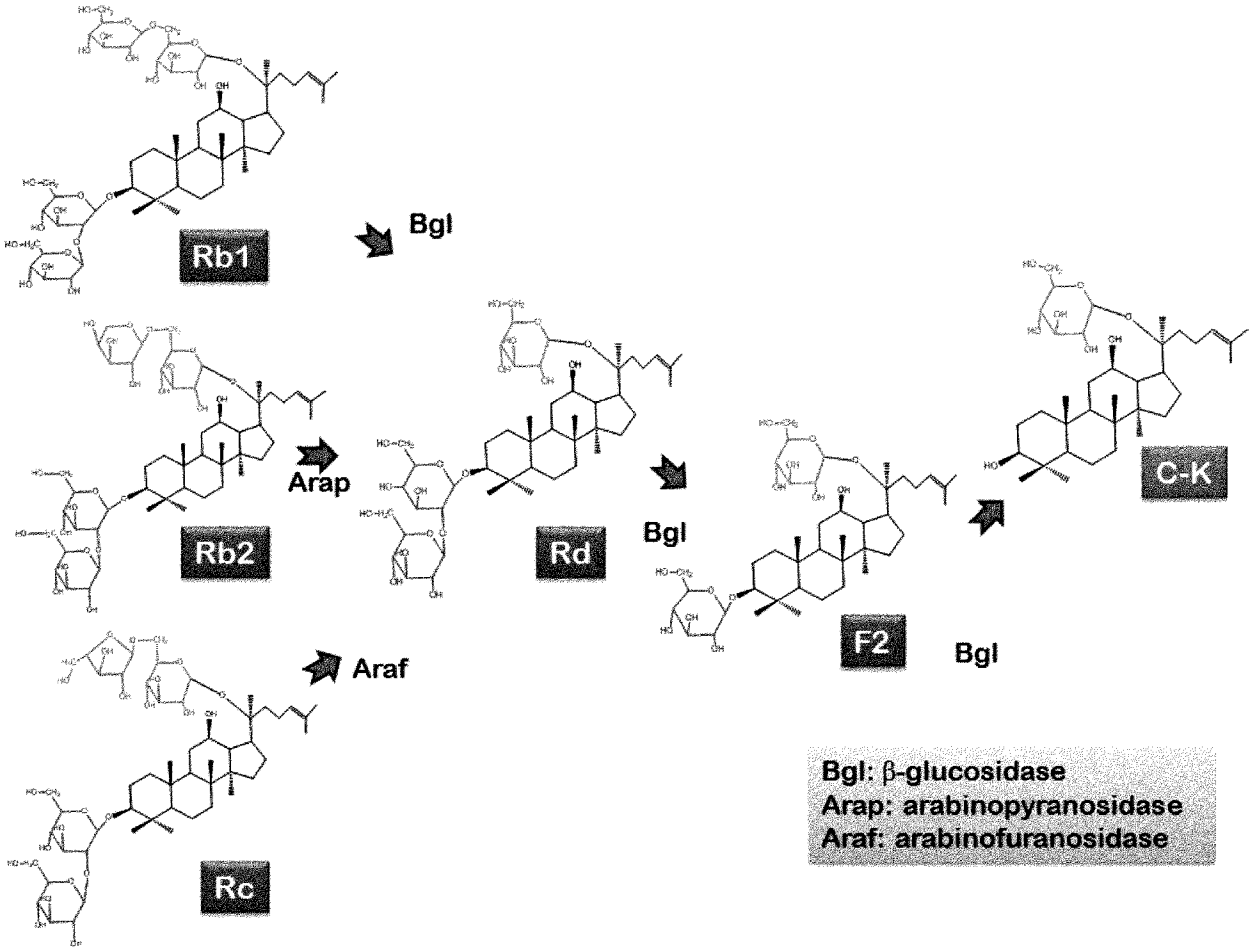


1, std Rb1; 2, std Gyp17; 3, std Rd; 4, std F2; 5, std Rh2(s); 6, std C-K; 7, std PPDA; 14, std Re; 15, std Rg1; 16, std Rg2; 17, std F1; 18, std Rh1; 19, std PPTA; 8, enzyme reaction product from Rb1; 9, reaction product from Gyp17; 10, reaction product from Rd; 11, reaction product from F2; 12, reaction product from Re; 13, enzyme reaction product from Rg1 (std, standard)

[Fig. 12]



1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19

1, std Rb1; 2, std Gyp17; 3, std Rd; 4, std F2; 5, std Rh2(s); 6, std C-K; 7, std PPDA; 14, std Re; 15, std Rg1; 16, std Rg2; 17, std F1; 18, std Rh1; 19, std PPTA;
8, enzyme reaction product from Rb1; 9, reaction product from Gyp17; 10, reaction product from Rd; 11, reaction product from F2; 12, reaction product from Re; 13, enzyme reaction product from Rg1 (std, standard)

[Fig. 13]