

	(19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)	(11) 공개번호 10-2012-0083807 (43) 공개일자 2012년07월26일
(51) 국제특허분류(Int. Cl.) C12P 7/64 (2006.01) C12N 1/20 (2006.01) C12R 1/01 (2006.01)	(71) 출원인 고려대학교 산학협력단 서울 성북구 안암동5가 1	
(21) 출원번호 10-2011-0005151	(72) 발명자 김영준 서울특별시 강남구 도곡동 895-3 역삼한신아파트 1동 502호	
(22) 출원일자 2011년01월18일 심사청구일자 2011년01월18일	박희규 경기도 용인시 수지구 상현로 101, 수지현대센트 럴 I'park 104동 1401호 (상현동) (뒷면에 계속)	
	(74) 대리인 특허법인다나	

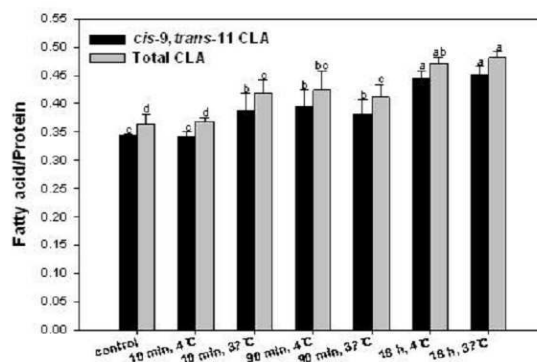
전체 청구항 수 : 총 9 항

(54) 발명의 명칭 고정수압을 이용한 공액 리놀레인산의 생산 방법

(57) 요약

본 발명은 초고압을 이용한 공액 리놀레인산의 생산 방법에 관한 것이다. CLA 생산능을 갖는 미생물에 초고압 처리를 하면 살균과 동시에 유익한 성분인 CLA 함량은 증가시키면서 트랜스 지방산은 저감화시키는 다중적 효과를 제공할 수 있다. 따라서, 본 발명에 따른 방법은 CLA 함량의 증진이 요구되는 유제품, 기능성 오일 등의 다양한 제품의 생산을 위해 유용하게 사용될 수 있다.

대표도 - 도1



(72) 발명자

임수영

광주광역시 북구 일곡동 동아아파트 104동 503호

김태균

충청남도 연기군 조치원읍 세종로 2511, 고려대학교 세종캠퍼스 과학기술대학 9동 523호

김상범

충청남도 천안시 서북구 성거읍 봉주로 120, 삼환 나우빌아파트 107동 503호

김현섭

경기도 수원시 권선구 매탄로 11, 권선현대아파트 202-101 (권선동)

이홍구

경기도 안양시 동안구 부림로 55, 대원 아파트 301동 504호 (평촌동)

신동훈

서울특별시 강남구 대치동 670 동부센트레빌 101-2103

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 201004010300290010300

부처명 농촌진흥청

연구사업명 FTA 대응기술개발사업

연구과제명 [2차년도]생리활성이 강화된 고부가가치 우유 생산기술 개발

주관기관 고려대학교 산학협력단

연구기간 2010.01.01 ~ 2010.12.31

특허청구의 범위

청구항 1

CLA 생산능을 갖는 미생물을 포함하는 배지에 대해 고정수압(高靜水壓) (High hydrostatic pressure, HHP) 처리를 수행하는 단계; 및 상기 고정수압 처리를 거친 미생물을 포함하는 배지에 기질을 첨가하여 반응시키는 단계를 포함하는 CLA의 생산 방법.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 방법은 상기 미생물과 배지로부터 CLA를 회수하는 단계를 추가로 포함하는 것인 CLA의 생산 방법.

청구항 3

상기 CLA 생산능을 갖는 미생물은 비피도박테리움 브레베 (*Bifidobacterium breve*), 또는 프로피오니박테리움 프레우덴레이치(*Propionibacterium freudenreichii*)인 CLA의 생산 방법.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 CLA의 생산능을 갖는 미생물은 비피도박테리움 브레베 (*Bifidobacterium breve*) LMC520 (KCTC 10455BP)인 CLA의 생산 방법.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 고정수압 처리는 초고압 액화처리장치를 이용하여 수행되는 것인 CLA의 생산 방법.

청구항 6

제1항에 있어서,

상기 고정수압은 80 내지 200MPa의 압력인 CLA의 생산 방법.

청구항 7

제1항에 있어서,

상기 고정수압 처리는 6 내지 18시간 동안 수행되는 것인 CLA의 생산 방법.

청구항 8

제1항에 있어서,

상기 고정수압 처리시의 온도는 30 내지 38℃인 CLA의 생산 방법.

청구항 9

제1항에 있어서,

상기 기질은 리놀레인을 포함하는 오일인 CLA의 생산 방법.

명 세 서

기술 분야

[0001] 본 발명은 고정수압(高靜水壓)을 이용한 공액 리놀레인산의 생산 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 생균제(probiotics)는 "살아있는 미생물 첨가물로써 호스트내 장내 미생물의 균형을 증진시켜 유익한 효과를 나타내는 것"이라 정의된다. 건강 증진에 있어서 생균제의 유익성, 기능성, 특성들에 관한 과학적 근거들이 축적됨에 따라 영양적 측면에서 점점 더 주목되고 있다. 이러한 생균제들 중에서, 비피도박테리아(*Bifidobacteria*)는 무기물 이용도와 비타민 합성의 증진, 면역력 증강 그리고 위장 장애와 암 발병의 감소와 같은 특유의 인체 유익성을 지니고 있는 것을 보였다. 또한 일부의 비피도박테리움 브레베(*Bifidobacterium breve*)는 기능성 지방산인 공액 리놀레인산(conjugated linoleic acid, CLA)을 생산한다고 보고되고 있다. 비록 CLA는 반추동물 내에 풍부하다고 알려져 있지만, 그 유효성이 매우 제한적이기 때문에, 일부의 영양보충제로써 이용되는 CLA는 유기 합성을 통해 연구되고 있다. 그러나 유기 합성된 CLA와 반추동물 내에 함유되어 있는 CLA에는 여러 가지 동정되지 않은 이성질체들이 존재하기 때문에, 제약 또는 건강식으로 이용되기 위해서는 이성질체들에 대한 안전성의 확보와 선별이 요구된다.

[0003] 고정수압(高靜水壓) (High hydrostatic pressure, HHP) 처리란 기체나 열을 사용하지 않고 물을 압력매개체로 수압을 이용하여 각종 식품소재를 초고압의 (1000기압, 100MPa) 압력을 가해 액화 처리하는 방법으로, 액기스 추출, 살균 등이 가능한 세계적으로 주목 받고 있는 최첨단 초고압 액화처리 방법이다. HHP는 생명공학, 그 중에서도 식품공학에서 저온살균에 이용되고 있으며, 바이러스의 불활성화를 통한 백신의 개발 및 바이러스 살균에도 이용되고 있다. 반면, 단백질의 잘못된 접힘(misfolding) 및 잘못된 조립(misassemblies)에 의해 생물학적 활성의 손실을 야기시킬 수도 있다. 이러한 HHP는 단백질 연구에 있어서 흥미로운 분야지만 CLA 생산에 어떤 영향을 미치는지에 대해서는 선행연구가 없다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0004] 본 발명에서는 고정수압 처리를 통해 CLA 생산능을 갖는 미생물로부터 생산되는 CLA의 함량을 향상시키고 트랜스 지방산의 함량을 저감화시키는 방법을 제공하고자 한다.

과제의 해결 수단

[0005] 본 발명은 CLA 생산능을 갖는 미생물을 포함하는 배지에 대해 고정수압(高靜水壓) (High hydrostatic pressure, HHP) 처리를 수행하는 단계; 및 상기 고정수압 처리를 거친 미생물을 포함하는 배지에 기질을 첨가하여 반응시키는 단계를 포함하는 CLA의 생산 방법을 제공한다.

[0006] 하기 실시예에서 확인할 수 있는 바와 같이, CLA 생산능을 갖는 미생물을 포함하는 배지에 대해 고정수압 처리를 수행한 후 기질을 후처리하는 경우 CLA의 함량은 증가하고 CLA 중 트랜스 지방산의 함량은 감소되는 것으로 나타났다. 이러한 효과는 미생물에 포함된 CLA 생산에 관여하는 효소가 고정수압 처리에 의해 활성 자리의 입체구조가 변화되어 CLA 생산을 증가시키는 것으로 예상되었다.

[0007] 상기 CLA 생산능을 갖는 미생물이 제품에 그대로 사용될 수 있는 미생물인 경우에는 CLA를 별도로 회수하는 단계가 필요하지 않을 수 있으나, CLA의 순수 분리가 요구되는 경우에는 상기 본 발명의 방법은, 상기 미생물과 배지로부터 CLA를 회수하는 단계를 추가로 포함할 수 있다.

[0008] 본 발명에서 사용할 수 있는 CLA 생산능을 갖는 미생물은 특별히 제한되지 않으며, CLA를 생산하는 것으로 알려져 있는 공지의 미생물이거나 어떠한 것이든 사용할 수 있다. 예를 들어, 비피도박테리움 브레베(*Bifidobacterium breve*), 프로피오니박테리움 프레우덴레이치(*Propionibacterium freudenreichii*) 등이 이러한 미생물로 공지되어 있다. 바람직하게는, 비피도박테리움 브레베 (*Bifidobacterium breve*) LMC520 (KCTC 10455BP)를 사용할 수 있을 것이다.

[0009] 본 발명에서 사용되는 CLA 생산능을 갖는 미생물을 포함하는 배지는 미생물의 배양을 위해 사용되는 일반적인 배지만 아니라 완충액과 같이 담체로서 사용할 수 있는 용액을 모두 포함한다. 배지에 함유되는 성분은 특별

히 제한되지 않는다. 예를 들어, CLA의 함량을 증진시키고자 하는 제품이 유제품일 경우 배지는 우유, 요구르트와 같은 유제품 그 자체일 수 있다. 고정수압 처리 전과 후의 배지의 성분은 동일하거나 상이할 수 있다. 고정수압 처리 후의 배지에는 CLA의 합성을 위한 기질을 포함한다.

- [0010] 한편, 본 발명에 있어서, 고정수압 처리는 상업적으로 입수가능한 초고압 액화처리장치를 이용하여 수행될 수 있다. 한 구체예에서, 상기 고정수압은 80 내지 200MPa의 압력일 수 있다. CLA의 생산성 향상과 산업상 이용가능한 초고압 액화처리장치의 사용가능한 압력을 고려할 때, 바람직하게는 상기 고정수압은 90 내지 120MPa의 압력일 수 있다.
- [0011] 고정수압 처리의 시간은 특별히 제한되는 것은 아니다. 다만, CLA 생산 향상과 함께 트랜스 지방산의 함량을 저감화시키고자 한다면 고정수압 처리 시간은 6 내지 18시간이 바람직할 것이다.
- [0012] 또한, 고정수압 처리시의 온도는 CLA 합성을 위한 미생물의 활성을 저해하지 않는 범위이면 특별히 제한되지 않는다. 바람직하게는 고정수압 처리시의 온도는 30 내지 38℃일 수 있다.
- [0013] 하기 실시예에서는 비피도박테리움 브레베 (*Bifidobacterium breve*) LMC520(KCTC 10455BP)을 포함하는 배지를 초고압 액화처리장치에 넣고 고정수압 처리를 하였을 때, 압력에 따라 CLA 생산량이 증가하고, 트랜스지방산인 *trans*-9, *trans*-11 CLA는 감소하는 것을 보여준다. 따라서, 비피도박테리움 브레베 (*Bifidobacterium breve*)와 같은 유산균을 함유하는 유제품의 경우 고정수압 처리를 하면 살균과 동시에 유익한 성분인 CLA 함량은 증가시키면서 트랜스 지방산은 저감화시키는 다중적 효과를 제공할 수 있다.
- [0014] 한편, 고정수압 처리를 거친 미생물을 포함하는 배지에 기질을 첨가하여 반응시키는 단계에서 사용되는 기질로는 리놀레인산을 포함하는 오일이면 어떠한 것이든 사용가능하다. 고정수압 처리를 거친 미생물을 포함하는 배지에 기질을 첨가하여 반응시키는 단계는 이에 제한되는 것은 아니나 1 내지 5시간 동안 수행될 수 있다. 이는 기질의 종류 또는 양에 따라 당업자가 적절히 조절할 수 있을 것이다. 한편, 고정수압 처리를 거친 미생물과 배지로부터 CLA를 회수하는 방법은 공지의 방법을 사용할 수 있다.

발명의 효과

- [0015] CLA 생산능을 갖는 미생물에 고정수압 처리를 하면 살균과 동시에 유익한 성분인 CLA 함량은 증가시키면서 트랜스 지방산은 저감화시키는 다중적 효과를 제공할 수 있다. 따라서, 본 발명에 따른 방법은 CLA 함량의 증진이 요구되는 유제품, 기능성 오일 등의 다양한 제품의 생산을 위해 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0016] 도 1 및 2는 각각 고정수압 처리에 따른 CLA의 생산능 및 트랜스 지방산의 함량 변화를 보여주는 그래프이다.
- 도 3은 고정수압 처리시의 압력에 따른 CLA의 생산능의 함량 변화를 보여주는 그래프이다.
- 도 4 및 5는 각각 고정수압 처리시의 처리 시간에 따른 CLA의 생산능 및 트랜스 지방산의 함량 변화를 보여주는 그래프이다.
- 도 6 및 7은 각각 고정수압 처리시의 기질 처리 시점에 따른 CLA의 생산능 및 트랜스 지방산의 함량 변화를 보여주는 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0017] 본 발명의 이점 및 특징, 그리고 그것들을 달성하는 방법은 상세하게 후술되어 있는 실시예들을 참조하면 명확해질 것이다. 그러나 본 발명은 이하에서 개시되는 실시예들에 한정되는 것이 아니라 서로 다른 다양한 형태로 구현될 것이며, 단지 본 실시예들은 본 발명의 개시가 완전하도록 하고, 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 발명의 범주를 완전하게 알려주기 위해 제공되는 것이며, 본 발명은 청구항의 범주에 의해 정의될 뿐이다.

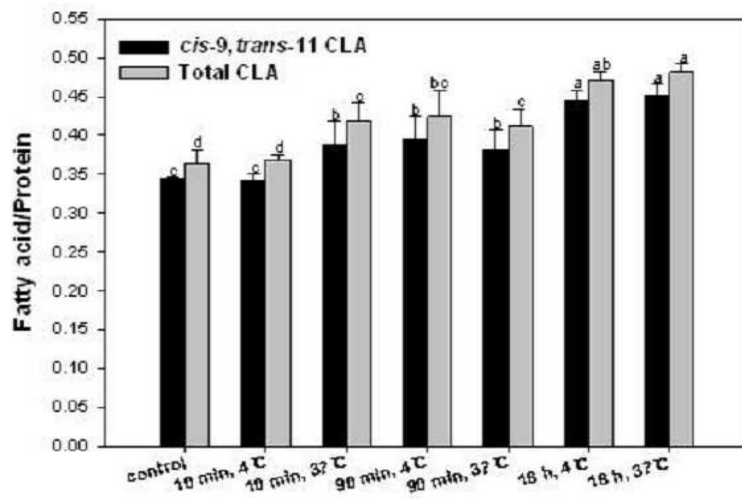
- [0018] 실시예 1: 생균제에 고정수압을 처리하여 CLA 생산 활성 증진여부 및 트랜스 지방산 저감화 효과 확인

- [0019] 본 실시예에서는 스크린된 비피도박테리아 중에 가장 높은 CLA 생산 활성을 가지는 비피도박테리움 브레베 LMC520 균주(KCTC 10455BP)를 사용하였다.
- [0020] 상기 균주를 셉텀 스톱퍼(septum stopper)(Bellco)와 알루미늄 실(seal)(Bellco)로 덮은 벨코 튜브(18×150mm; Bellco, Vineland, NJ, USA) 내, 0.05% L-시스테인?HCl이 포함된 MRS 배지(mMRS; Sigma)에서 O₂가 존재하지 않는 CO₂ 하에서, 37℃로 24시간 동안 배양한 후 원심분리 (3000×g, 9 min)하여 균체만을 회수하여 인산완충식염수(PBS, pH 7.0)를 이용하여 세척하고, 균체 (약 0.25 g)만 회수하여 다시 1 ml의 PBS에 현탁시켰다. 이 현탁액에 0.25 ml의 용해 완충액(lysis buffer)을 첨가하여 진공포장용 비닐에 담아 진공포장 (BUSCH KOREA, Korea)하여 High Pressure Liquefy Extractor (DFS-2L, TOYO KOATSU, Japan)에서 100 MPa의 압력에서 시간대별 온도별로 구분하여 처리하였다. 고정수압 처리 후, 균현탁액을 1ml만 회수하여 기질인 리놀레인산(linoleic acid)을 2.0 mg/ml이 되게 첨가하여 shaking incubator에서 3시간 동안 100 rpm에서 반응시켜 주었다. 반응 후, 균주 배양물로부터 지방산을 추출하기 위해, 내부표준(IS) 물질로서 4,000 ppm의 헵타데카노익산(C_{17:0})을 0.25 mL 첨가한 1ml의 배양물을 12ml의 클로로포름/메탄올(1:1, v/v)과 2ml의 0.88% KCl용액과 격렬하게 혼합하면 두 층이 생긴다. 이중 하층액을 회수하여 건조될 때까지 질소로 증발시켰다.
- [0021] 상기 추출된 지질을 80℃에서 60분 동안 10ml의 에탄올 내 2% H₂SO₄가 첨가된 용매를 이용하여 에틸 에스테르화하였다. 반응 후에 냉각시킨 후, 8ml의 포화 NaCl 용액과 4ml의 n-헥산을 첨가한 후, 지방산 에틸 에스테르를 n-헥산층에서 획득하고, 불꽃 이온화 검출기 (flame ionization detector)(Agilent Technologies)를 사용한 7890A 가스 크로마토그래피 (gas chromatography, GC)를 이용하여 CLA 이성질체를 포함한 총 지방산을 분석하였다.
- [0022] 상기 지방산 에틸 에스테르는 1.2ml/분의 헬륨 기류로 슈펠코왁스-10 융합 실리카 모세관 컬럼(Supelcowax-10 fused silica capillary column, 100m×0.25mm i.d., 0.2μm 필름 두께; Supelco, Inc., Bellefonte, PA, USA)을 이용하여 분리하였다. 오븐의 온도는 4℃/분의 속도로 190℃로부터 240℃까지 증가시켰다. 주입기와 검출기의 온도는 둘 다 260℃였다. 1μl의 시료를 스플릿 모드(50:1)로 컬럼에 주입하였다.
- [0023] 각각의 CLA이성질체의 피크는 지방산 표준 물질의 머무름 시간(retention time) 및 피크 면적과 비교함으로써 확인 및 정량되었다. 내부표준 물질은 각 시료 내 지방산의 회수를 측정하기 위하여 추출 전에 내부기준 물질로서 첨가되었다.
- [0024] 결과 처리를 위한 단백질 함량은 표준물질로써 소 혈청 알부민(bovine serum albumin)을 이용하여Bradford 방법으로 측정하였다.
- [0025] 우선 최적 운전 조건을 검색하기 위해 진행된 실험으로써 CLA 생산에 있어서 100 MPa에서 온도와 반응시간에 따른 양상을 확인해 보았다. 그 결과, 도 1에서 확인할 수 있는 바와 같이, 4℃ 10분을 제외하고 대조구보다 높은 CLA 생산능을 보였으며, 반응시간에 따라 증가하는 양상을 보였으며, 또한 90분을 제외하고 37℃에서 더 높은 생산능을 보였다. 이로써, 고압처리에 있어서 CLA 생산은 반응시간과 온도에 영향을 받는 것을 확인할 수 있었다.
- [0026] 다른 한편으로는, 고정수압 처리에 의해 *trans*-9, *trans*-11 CLA가 감소되었음을 확인할 수 있었다. 도 2에서 볼 수 있는 바와 같이, 4℃ 16시간 조건에서 *trans*-9, *trans*-11 CLA가 가장 많이 감소하였으며, 37℃ 16시간 조건과 37℃ 90분 조건에서도 *trans*-9, *trans*-11 CLA의 함량이 감소됨을 확인할 수 있었다. 따라서, 압력이 트랜스 지방산을 감소시켜줄 수 있는 주요인자일수도 있다는 것을 확인할 수 있었다. 따라서 고정수압 처리는 제조 공정 안 생성되는 트랜스 지방산을 감소시키는데 적용될 수 있을 것이다.
- [0027] **실시예 2: 압력에 따른 CLA 생산 활성 증진여부 확인**
- [0028] 고정수압 처리를 위한 전처리 과정은 실시예 1과 동일하였으며, 압력을 0, 25, 50, 75, 100 MPa로 변화시켜 압력에 따른 CLA 생산능을 확인하고자 하였다. 그 결과, 도 3에서 확인할 수 있는 바와 같이, 생산된 CLA의 양이 100 MPa에서 2.5배정도 증가하였다.
- [0029] **실시예 3: 반응시간에 따른CLA 생산 활성 증진여부 확인 및 트랜스 지방산 저감화 효과 확인**

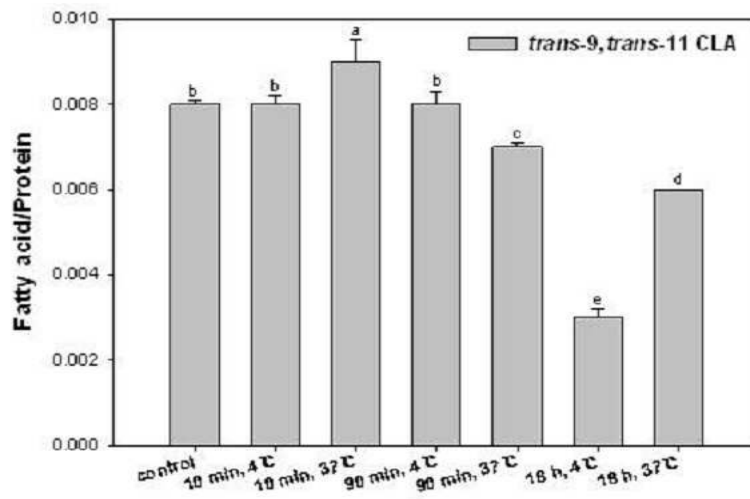
- [0030] 고정수압 처리를 위한 전처리 과정은 실시예 1과 동일 하였으며, 반응시간을 0, 1, 2, 3, 6, 12, 18, 24, 48시간으로 변화시켜, 반응시간에 따른 CLA 생산 활성과 트랜스 지방산 저감화 효과를 조사하였다. 그 결과, 도 4에서 볼 수 있는 바와 같이, CLA 생산은 12시간까지 반응시간에 따라 증가되었고, 18시간 이후부터 유의적으로 감소되었다. 한편, 도 5에서 볼 수 있는 바와 같이, 반응시간과 *trans*-9,*trans*-11 CLA생산 간에는 뚜렷한 상관관계를 찾을 수는 없었지만, *trans*-9,*trans*-11 CLA의 생산은 48시간까지 감소된 것을 확인할 수 있었다. 위 결과에서 나타난 것처럼, 최적 반응시간은 6시간에서 18시간 사이였으며, 트랜스 지방산은 고정수압 처리에 의해 감소될 수 있음을 확인할 수 있었다.
- [0031] **실시예 4: 고정수압 처리에 있어서 기질의 처리 시점에 따른 CLA 생산 활성 증진여부 확인 및 트랜스 지방산 저감화 효과 확인**
- [0032] 고정수압 처리를 위한 전처리 과정은 실시예 1과 동일하게 수행하였다. 고정수압 처리에 있어서 기질의 첨가 시점에 따른 지방산 조성의 변화를 확인하기 위해 기질로써 리놀레산(linoleic acid, LA) 및 CLA를 이용하였다. 우선, 기질만 고정수압 처리 후 분석하였고, 다음으로 기질을 균체와 함께 고정수압 처리 후 분석하였으며 (pretreated-HHP), 마지막으로 균체를 고정수압 처리 후에 기질을 첨가하여 분석하였다 (posttreated-HHP). 마지막의 post-treated-HHP가 양성 대조군으로써 실시예 1 내지 3에서 수행된 것이다.
- [0033] 모든 기질들은 고정수압 처리 후 지방산 조성의 변화를 나타내지 않았다(테이터 미도시).
- [0034] LA를 기질로써 처리하였을 때, 도 6에서 볼 수 있는 바와 같이, *cis*-9,*trans*-11 CLA생산에 있어서 post-treatment 그룹이 pre-treatment 그룹 보다 높았으며, 흥미롭게도 *trans*-9,*trans*-11 CLA는 *cis*-9,*trans*-11 CLA가 감소한 만큼 pre-treatment 그룹에서 유의적으로 증가했다. 이는 *cis*-9,*trans*-11 CLA와 *trans*-10,*cis*-12 CLA는 *trans*-9,*trans*-11 CLA로 전환될 수 있다는 기존의 연구 결과와 동일하였다.
- [0035] CLA를 기질로써 처리하였을 때, LA로 진행된 실험과 유사한 경향을 보였다. 도 7에서 볼 수 있는 바와 같이, pretreated-HHP에서 *cis*-9,*trans*-11 CLA는 감소한 반면, *trans*-9,*trans*-11 CLA는 *cis*-9,*trans*-11 CLA가 감소한 만큼 증가하였다. 이러한 결과는 *cis*-9,*trans*-11 CLA의 전환에 의한 것이라 판단되며, 이전 실험에서 반응조건에 따라 *trans*-9,*trans*-11 CLA를 감소시킨 결과로 볼 때, 고정수압 처리는 *trans*-9,*trans*-11 CLA생산에 있어서 주요 인자일 것이라 사료된다.
- [0036] 모든 기질들의 전환능에 있어서 post 그룹이 pre 그룹보다 높았으며, 이를 이용하여 CLA 생산능을 증진시킬 수 있을 것이다. 또한 고정수압 처리 후에 기질의 첨가는 트랜스지방산의 생산을 감소시킨 반면, 기질과 함께 고정수압을 처리한 경우 트랜스 지방산의 생산이 증진되었다. 이 결과는 고정수압 처리로 인해 효소반응에 의하여 트랜스지방산이 생성 또는 증가될 수도 있음을 보여주고 있다.

도면

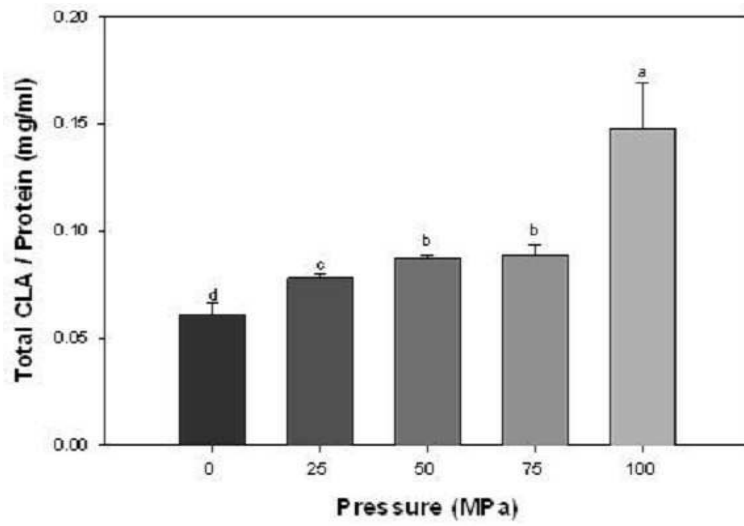
도면1



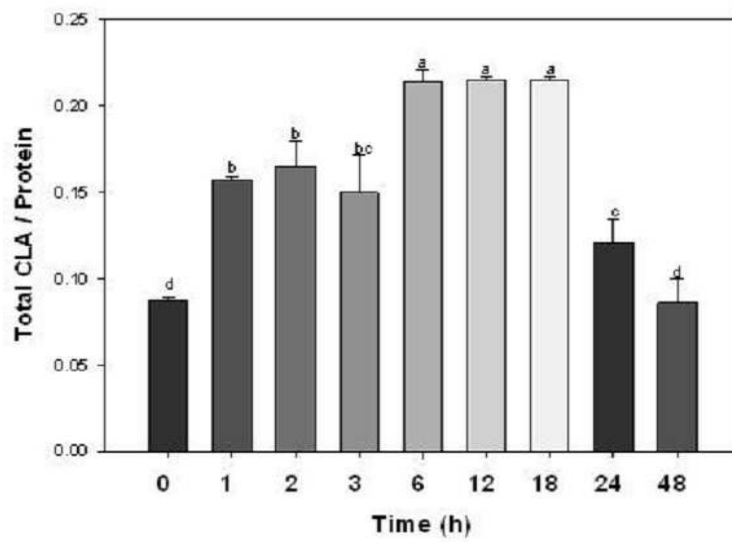
도면2



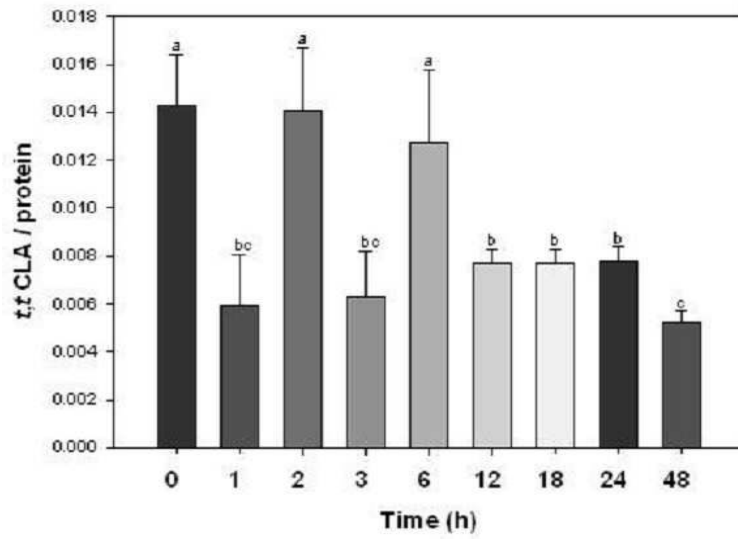
도면3



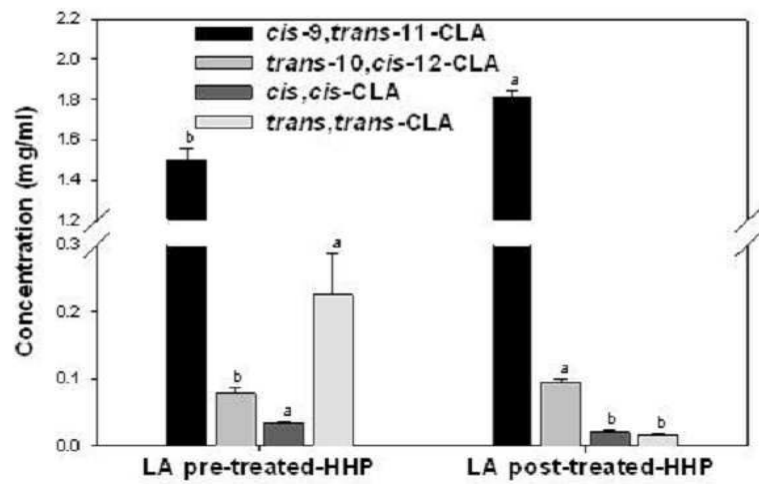
도면4



도면5



도면6



도면7

