(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2012-0125113
(43) 공개일자 2012년11월14일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 1/20 (2006.01) *A23L 1/29* (2006.01)
A61K 36/258 (2006.01) *C12R 1/25* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2011-0043207
(22) 출원일자 2011년05월06일
심사청구일자 2012년02월07일

(71) 출원인
충남대학교산학협력단
대전광역시 유성구 대학로 99 (궁동, 충남대학교)
(72) 발명자
남명수
대전광역시 유성구 노은서로 222, 열매마을아파트 102동 402호 (지족동)
송규용
대전광역시 중구 태평로 80, 412동 101호 (태평동, 삼부아파트)
(74) 대리인
김종관, 권오식, 박창희

전체 청구항 수 : 총 11 항

(54) 발명의 명칭 **인삼 발효능을 갖는 신규 락토바실러스 플랜타럼 CRNB?22 [KCTC11931BP] 균주 및 이를 이용한 사포닌 전환 방법**

(57) 요 약

본 발명은 인삼 및 홍삼의 사포닌 분해능을 갖는 신규한 락토바실러스 플랜타럼(*Lactobacillus plantarum*) CRNB-22 (KCTC 11931 BP) 균주 및 이를 이용한 사포닌 분해방법에 대한 것이다.

본 발명에 따른 락토바실러스 플랜타럼 CRNB-22 (KCTC 11931 BP) 균주는 인삼으로부터 기존에 알려지지 않은 새로운 사포닌 배당체를 생성할 수 있는 능력을 가지고 있으므로, 상기 균주를 이용함으로써 새로운 효능을 갖는 인삼 및 홍삼 발효물을 제조할 수 있다.

대 표 도 - 도3



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	110060-3
부처명	농림수산식품부
연구사업명	농림기술개발과제
연구과제명	금산 발효홍삼 개발 및 발효공정 표준화
주관기관	충남대학교
연구기간	2010.07.01 ~ 2013.06.30

특허청구의 범위

청구항 1

락토바실러스 플랜타럼 CRNB-22 (KCTC 11931 BP) 균주.

청구항 2

제1항에 따른 락토바실러스 플랜타럼 CRNB-22 (KCTC 11931 BP) 균주를 이용한 사포닌의 전환방법.

청구항 3

청구항 제2항에 있어서, 사포닌 Rb_1를 다른 진세노사이드로 전환하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 4

제1항에 따른 락토바실러스 플랜타럼 CRNB-22 (KCTC 11931 BP) 균주를 이용한 발효삼의 제조방법.

청구항 5

청구항 제4항에 있어서, 원료인 삼은 고려 인삼, 삼칠 인삼, 미국 인삼, 죽절 인삼, 히말라야 인삼, 베트남 인삼의 인삼 자체, 수삼 또는 홍삼임을 특징으로 하는 방법.

청구항 6

청구항 제4항에 있어서, 상기 제조방법은 원료인 삼에 락토바실러스 플랜타럼 CRNB-22 (KCTC 11931 BP) 균주를 접종하여 발효시킴을 특징으로 하는 방법.

청구항 7

청구항 제6항에 있어서, 상기 발효는 20~50 ℃의 온도에서, 20~120 시간 동안 수행됨을 특징으로 하는 방법.

청구항 8

청구항 제2항 내지 제7항 중 어느 한 항의 방법에 따라 제조된 발효삼.

청구항 9

청구항 제8항에 따른 발효삼을 원료로 하는 건강기능식품.

청구항 10

청구항 제9항에 있어서, 건강기능식품은 발효삼 자체, 액상 제제, 캔디류, 껌, 페이스트 제제, 과자류, 분말에서 선택된 제형을 가짐을 특징으로 하는 기능식품.

청구항 11

청구항 제8항에 따른 발효삼을 포함하는 염증, 알레르기, 암, 발기부전, 고혈압, 고지혈증, 혈전증 또는 노화 예방 또는 치료용 약학 조성물.

명 세 서

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 인삼 및 홍삼의 사포닌 분해능을 갖는 신규한 락토바실러스 플랜타럼(*Lactobacillus plantarum*) CRNB-22 (KCTC 11931 BP) 균주에 대한 것이다.

[0002] 또한 본 발명은 상기 락토바실러스 플랜타럼 CRNB-22 (KCTC 11931 BP) 균주를 이용한 사포닌 분해방법 및 그러한 방법에 의해 제조된 발효된 삼에 대한 것이다.

[0003] 본 발명에 따른 락토바실러스 플랜타럼 CRNB-22 (KCTC 11931 BP) 균주는 삼으로부터 기존에 알려지지 않은 새로운 사포닌 배당체를 생성할 수 있는 능력을 가지고 있으므로, 상기 균주를 이용해 제조된 발효된 삼은 새로운 효능을 가지고 있어 다양한 질병 또는 증상의 치료 및 완화에 이용될 수 있다.

배 경 기 술

[0004] 인삼(panax ginseng)은 오갈피나무과(Aralaiaceae) 인삼 속에 속하는 다년생 초본류로 과거 수천년 전부터 우리나라를 비롯한 동양에서 약제 또는 건강식품으로 널리 사용되어 왔다. 또한 인삼은 수삼, 홍삼 등의 다양한 형태로 이용이 가능하며, 특히 수삼을 증기로 쪄서 가공한 홍삼이 인체에 유용한 다양한 진세노사이드를 함유하고 있는 것으로 알려져 있다.

[0005] 인삼의 주요 효능을 나타내는 사포닌(saponin)은 30 종류 이상의 진세노사이드(ginsenoside)로 구성되는데, 진세노사이드는 면역력강화, 항염증작용, 항알러지작용, 항암효과, 발기부전에 대한 효과, 혈압강하작용, 항콜레스테롤작용, 항혈전작용, 성인병 및 노화에 대한 예방 및 치료효과가 있다고 알려져 있다.

[0006] 인삼의 사포닌은 트리터페노이드(triterpenoid) 계열의 다마란(dammarane) 골격에 글루코즈(glucose), 아라비노즈(arabinose), 자일로즈(xylose) 그리고 람노즈(rhamnose)등이 결합되어 있는 중성배당체이다. 인삼을 물과 주정으로 추출할 때 인삼 사포닌의 진세노사이드 중에서 20-O-β-D-글루코피라노실-20(S)-프로토파낙사디올(20-O-β-D-glucopyranosyl-20(S)-protopanaxadiol; Rb_1), 20-O-[α-L-아라비노피라노실(1→6)-β-D-글루코피라노실]-20(S)-프로토파낙사디올(20-O-[α-L-arabinopyranosyl(1→6)-β-D-glucopyranosyl]-20(S)-protopanaxadiol; Rb_2), 20-O-[α-L-아라비노푸라노실(1→6)-β-D-글루코피라노실]-20(S)-프로토파낙사디올(20-O-[α-L-arabinofuranosyl(1→6)-β-D-glucopyranosyl]-20(S)-protopanaxadiol; Rc), 20(S)-프로토파낙사트리올(20(S)-protopanaxatriol; Rg_1)등이 다량 존재한다.

[0007] 이러한 사포닌은 체내에서 장내 미생물에 의해 분해되어 흡수된다(Panta Med. 62, pp453-457, 1996). 진세노사이드 Rb_1의 경우, 장내 미생물에 의해 진세노사이드 Rd, 화합물 K(compound K)와 프로토파낙사디올로 순차적으로 전환되어 흡수된다. 하지만 인삼사포닌을 분해하는 장내 미생물은 사람의 체질에 따라 그리고 식습관에 따라 그 존재의 유무와 보유하고 있는 정도가 다르며, 대사 산물로 전환하는데 차이가 있어서 인삼을 복용 후 저마다 효능의 차이가 나타날 수 있다. 즉, 장내 미생물 균총이 사람마다 다르기 때문에 진세노사이드의 전환율과 생체이용율은 다르게 된다(J. Pharm. Pharmacol., 50, pp1155-1160, 1998).

[0008] 따라서 장내미생물의 차이로 인한 인삼의 효능과 흡수율의 차이를 없애기 위해, 다양한 미생물을 이용하여 인삼을 처리함으로써 진세노사이드의 체내 흡수율을 제고하고, 또한 새로운 형태의 유용한 진세노사이드를 제공하고자 하는 시도가 지속적으로 이루어지고 있다.

[0009] 현재까지 수많은 균주들이 인삼의 사포닌을 분해하여 새로운 진세노사이드를 만들 수 있는 것으로 알려져 있다. *Lactobacillus gasseri* DSM 2024, *L. plantarum* ATCC 14947 및 ATCC 10241, *L. buchneri* ATCC 4005주, *L. gasseri* ATCC 393주, *L. mail* ATCC 27304, *L. gallinarum* JCM 2011, *L. amylovorus* JCM 1126, *L. brevis* ATCC 14869, *L. rhamnosus* ATCC 7469 및 ATCC 53103, *L. kefir* NRIC 1693, *L. paracasei* NCDO 151, *Lactococcus lactis* ATCC 15577, *Bifidobacterium bifidum* JCM 7002, *B. adolescentis* ATCC 15703, *Saccharomyces cerevisiae* IFO 0309 및 IFO-2018 등이 β-glucosidse, α-arabinosidase, α-rhamnosidase 활성이 높아 사포

닌 전환능이 비교적 뛰어난 것으로 알려져 있다. 하지만, 여전히 기존에 알려지지 않은 새로운 진세노사이드로의 전환능이 있는 미생물 및 높은 진세노사이드의 전환능을 갖는 미생물에 대한 개발에 대한 필요성이 제기되고 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0010] 본 발명에서는 상기와 같은 종전의 문제점을 해결하고자 기존에 알려지지 않은 새로운 진세노사이드로의 전환능을 갖는 신규 미생물을 분리하여 제공하는 것을 목표로 한다.

[0011] 또한 본 발명은 상기와 같이 분리된 신규 미생물을 이용한 인삼 사포닌의 전환 방법 및 그러한 방법으로 전환된 새로운 효능을 갖는 인삼 발효물을 제공하는 것으로 다른 하나의 목표로 한다.

과제의 해결 수단

[0012] 본 발명자들은 상기와 같은 과제해결을 위해 김치 및 마유에서 기존에 알려지지 않은 새로운 구조의 진세노사이드를 생성할 수 있는 신규한 락토바실러스 플랜타럼(*Lactobacillus plantarum*) CRNB-22 (KCTC 11931 BP) 균주를 분리, 동정함으로써 본 발명을 완성하였다.

[0013] 또한 본 발명은 상기와 같이 분리된 신규 미생물 락토바실러스 플랜타럼 CRNB-22 (KCTC 11931 BP)를 이용한 인삼 사포닌의 전환 방법 및 그러한 방법으로 전환된 새로운 효능을 갖는 인삼 발효물을 제공한다.

[0014] 본 발명에서 락토바실러스 플랜타럼 CRNB-22 (KCTC 11931 BP)를 이용한 사포닌의 전환을 위한 원료 물질은 인삼, 수삼 또는 홍삼 자체를 사용할 수 있으며, 분말화된 형태의 인삼, 수삼이나 홍삼을 이용할 수도 있다. 본 발명에서 이용가능한 삼은 고려 인삼(Korean ginseng: Panaxa ginseng), 삼칠 인삼(Sanch ginseng: notoginseg), 미국 인삼(American ginseng: Panaxa quinquefolium L), 죽절 인삼(Chikusetsu ginseng: Panax japonicus), 히말라야인삼(Himalayan ginseng: Panaxa pseudo-ginseng) 및 베트남 인삼(Vietnamese ginseng: Panax vietnamensis.) 및 이로부터 제조되는 것들이 이용될 수 있으나 이에 한정되는 것은 아니다. 아울러 이들 삼은 단독으로 혹은 이들을 조합하여 사용될 수도 있다.

[0015] 락토바실러스 플랜타럼 CRNB-22 (KCTC 11931 BP)를 이용한 인삼, 수삼 또는 홍삼의 발효는 20~50 ℃, 특히 25~45 ℃의 온도에서 이루어지는 것이 바람직하며, 필요에 따라 쌀겨, 옥수수, 전분, 포도당, 서당, 과당, 유당 등의 탄소원을 추가적으로 투여하여 진행할 수도 있다.

[0016] 상기와 같은 방법으로 얻어진 발효삼은 그대로 건강기능식품으로 제품화할 수도 있고, 풍미나 향취를 높이기 위해 다양한 첨가물을 배합하여 제품화할 수 있다. 첨가물의 예로서는 각종 당질, 유화제, 감미료, 산미료, 과즙 등을 있다. 구체적으로는 포도당, 서당, 과당, 봉밀 등의 당질과 솔비톨, 키실리톨, 에레스리콜, 락티톨, 파라티니드 등의 당알코올, 글리세린지방산에스테르와 같은 지방산에스테르, 레시틴 등의 유화제 등이 사용될 수 있으며, 이외에도 비타민A, 비타민B, 비타민C, 비타민E 등의 각종 비타민류나 식물엑기스, 곡물성분, 야채성분 등도 첨가제로 사용가능하다.

[0017] 최종제품의 형태는 고형상, 액상 등 어떤 형태의 제품이라도 가능하며, 분말화된 형태로도 제조가능하며, 바람직한 형태는 발효삼 자체, 액상 제제, 캔디류, 껌, 페이스트 제제, 과자류, 분말에서 선택될 수 있다.

[0018] 또한 상기와 같은 방법으로 얻어진 발효삼은 면역강화를 위한 조성물 및 염증, 알레르기, 암, 발기부전, 고혈압, 고지혈증, 혈전증 또는 노화 등을 예방 또는 치료하기 위한 약학 조성물로서도 이용가능하다.

발명의 효과

[0019] 본 발명에 의해 분리, 동정된 신규 락토바실러스 플랜타럼(*Lactobacillus plantarum*) CRNB-22 (KCTC 11931 BP) 균주는 종전에 알려진 락토바실러스 플랜타럼이 가지는 통상적인 진세노사이드 전환능력뿐 아니라 진세노사이드 Rb_1로부터 기존에 알려지지 않은 새로운 진세노사이드를 생성할 수 있으므로, 새로운 효능을 가지는 진세노사이드 및 인삼 추출물을 포함하는 제품을 제공할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0020] 도 1은 분리 선발된 미생물중 표준 사포닌이 함유된 MRS 브로스 배지(pH 7.0)를 사용하여 30℃에서 7일간 배

양 후 배양액의 TLC 결과를 나타내는 도면.

(TLC 상의 숫자는 분리된 균주의 고유 번호를 의미)

도 2는 마유로부터 분리된 CRNB-A3 균주의 16S rDNA 서열(1,389 bp)을 나타내는 도면.

도 3은 김치로부터 분리된 CRNB-22 균주의 16S rDNA 서열(1,428 bp)을 나타내는 도면.

도 4는 김치로부터 분리된 CRNB-A5 균주의 16S rDNA 서열(1,662 bp)을 나타내는 도면.

도 5는 김치로부터 분리된 CRNB-A6 균주의 16S rDNA 서열(1,650 bp)을 나타내는 도면.

도 6은 김치로부터 분리된 CRNB-B9 균주의 16S rDNA 서열(1,647 bp)을 나타내는 도면.

도 7은 배지 종류에 따른 분리된 미생물의 성장 특성을 나타내는 도면.

도 8은 배양 온도에 따른 분리된 미생물의 성장 특성을 나타내는 도면.

도9는 배양 배지의 pH에 따른 분리된 미생물의 성장 특성을 나타내는 도면.

도 10은 최종 분리된 5개 미생물의 성장 특성을 나타내는 도면.

(a) 배양 시간에 따른 개체수 변화

(b) 배양시간에 따른 배지내 pH의 변화

도 11은 배양 온도에 따른 진세노사이드 분해 특성을 TLC를 이용하여 분석한 결과를 나타내는 도면.

(a) 엔테로코서스 패칼리스 CRNB-A3 균주를 이용한 결과

(b) 락토바실러스 플랜타럼 CRNB-22 균주를 이용한 결과

도 12는 배지의 pH에 따른 진세노사이드 분해 특성을 TLC를 이용하여 분석한 결과를 나타내는 도면.

(a) 엔테로코서스 패칼리스 CRNB-A3 균주를 이용한 결과

(b) 락토바실러스 플랜타럼 CRNB-22 균주를 이용한 결과

도 13은 최종 선별된 미생물 유래의 효소를 이용한 인삼의 부위별 진세노사이드의 분해특성을 TLC를 이용하여 분석한 결과를 나타내는 도면.

Lane 1 : 엔테로코서스 패칼리스 CRNB-A3 균주 효소액 (0.1 g/ml) : 사포닌 (0.2 mg/ml) 비율 = 1:4 (pH 7.0, 반응온도 35 ℃)

Lane 2 : 락토바실러스 플랜타럼 CRNB-22 균주 효소액 (0.1g/ml) : 사포닌 (0.2 mg/ml) 비율 = 1:4 (pH 6.0, 반응온도 35 ℃)

Lane 3 : 락토바실러스 플랜타럼 CRNB-22 균주 효소액 (0.1g/ml) : 사포닌 (0.2 mg/ml) 비율 = 1:4 (pH 10.0, 반응온도 35 ℃)

도 14는 최종 선별된 분리된 미생물 유래의 진세노사이드 분해 특성을 갖는 효소의 분자량을 SDS-PAGE를 이용하여 분석한 결과를 나타내는 도면.

M : 표준 분자량 물질

Lane 1 : 엔테로코서스 패칼리스 CRNB-A3 균주의 효소액

Lane 2 : 엔테로코커스 패시엄 CRNB-A5 균주의 조효소액

Lane 3 : 엔테로코커스 패시엄 CRNB-A6 균주의 조효소액

Lane 4 : 엔테로코커스 패시엄 CRNB-B9 균주의 조효소액

Lane 5 : 락토바실러스 플랜타럼 CRNB-22 균주의 효소액

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0021] 이하 본 발명을 실시예와 첨부된 도면을 참조하여 상세히 설명한다. 그러나 이들은 본 발명을 보다 상세하게 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 권리범위가 하기의 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.

[0022] **(실시예)**

[0023] **실시예 1. 사포닌 분해 미생물의 분리 및 동정**

[0024] 1.1 사포닌 분해 미생물의 분리

[0025] 사포닌 분해 미생물은 김치와 몽고의 마유로부터 분리하였다. 김치 시료 및 마유를 멸균수에 희석하고, 희석액 1 ml를 BCP 아가 플레이트(agar plate, 표 1의 조성 참조)에 분주하여 30℃와 37℃에서 3일간 배양하였다. 배양 후 BCP 아가 플레이트상에서 콜로니(colony) 주위에 노란색의 환을 형성하는 균주를 선발하여 BCP 아가 상에서 5회 계대 배양하여 순수 분리하였다.

[0026] 사포닌 분해능력을 가진 균주를 분리하기 위하여 분리된 균주를 에스컬린-아가(Esculin-agar, 표 2의 조성 참조) 배지에 접종하여 배지내의 색깔 변화를 관찰하였다. 사포닌 분해능력을 가진 균주는 β-글루코시다제(glucosidase)를 생성하고 에스컬린(esculin)에 β-글루코스(glucose)가 반응하여 생성된 에스컬레틴(esculetin)은 배지 내에서 페릭 암모늄 시트레이트(ferric ammonium citrate)와 반응하여 콜로니 주위에 검정색 환을 형성하게 된다. 따라서 콜로니 주위에 검정색 환이 형성된 균주들을 β-글루코시다제 활성을 가지는 균주라고 판단하고, 사포닌 분해능력이 있을 것으로 판단되어 사포닌 분리 균주로서 선발하였다. 이러한 과정을 거쳐 김치로부터 6개, 몽고 마유로부터 10개의 미생물이 분리되었다.

표 1

[0027]

물질	함량 (g/L)
효모 추출물(Extract Yeast Dried)	2.5
펩톤(Peptone)	5.0
포도당	1.0
L-시스테인(Cysteine)	0.1
트윈(Tween) 80	1.0
브로모크레졸 퍼플 (Bromcresol purple)	0.04
아가 분말	15.0

표 2

[0028]

물질	함량 (g/L)
카제인 추출물 (Pancreatic digest of casein)	13.0
NaCl	5.0
효모 추출물	5.0
에스컬린	1.0
페릭 암모늄 시트레이트 (Ferric ammonium citrate)	0.5
아가 분말	15.0

[0029] 선발된 균주의 β-글루코시다제 활성 측정은 MRS 브로스(broth)를 이용하여 30℃와 37℃에서 배양하여 24, 48, 72시간에 배양액을 채취하고, 효소 활성 측정 키트(Enzyme Assay Kit)를 사용하여 수행하였다. 그 결과 표 3과 같이 5개(A3, A5, A6, B9, 2-2)의 분리된 미생물에서 높은 β-글루코시다제 활성이 나타났다. 선발된 미생물의 β-글루코시다제 활성은 모두 24시간 배양시 가장 높았으며 37℃보다 30℃에서 배양한 것이 높은 활성을 보이는 것으로 나타났다.

표 3

미생물	효소활성 (enzyme activity Units/liter)					
	37 ℃			30 ℃		
	24 시간	48 시간	72 시간	24 시간	48 시간	72 시간
CRNB-A3	17.24	16.66	5.25	34.32	14.87	7.83
CRNB-A5	17.81	13.21	4.67	30.89	21.73	5.72
CRNB-A6	11.49	10.34	7.59	21.73	14.87	4.57
CRNB-B9	5.17	8.60	8.04	18.30	14.30	5.14
CRNB-22	7.47	2.29	6.32	18.30	14.87	0.00

[0030]

[0031] β-글루코시다제 활성이 높은 5개의 미생물들이 실제로 사포닌 분해능력이 있는지 확인하기 위하여 선발된 균주를 MRS 브로스 배지(pH 7.0 및 8.0)에 접종하여 계대 배양한 후, 배양액 1 ml를 채취하여 0.2 ㎛ 필터로 여과하고 1 mg/ml 농도의 표준 사포닌 용액(standard saponin) 1 ml를 혼합하여 30℃의 진탕 배양기에서 7일 동안 반응시켰다.

[0032] 반응이 종료된 후, 반응산물은 TLC(Thin Liquid Chromatography) 플레이트(실리카겔 60 F_{254}, 알루미늄 시트)에 0.8cm 간격으로 접적하고, 반응기내에 정치하고 하층 반응액으로 $CHCl_3/CH_3OH/H_2O$ (65:35:10, v/v)를 사용하여 5.5cm 전재하였다. 반응시킨 TLC 플레이트에 10% H_2SO_4를 분무하여 110℃에서 가열하여 발색시켰다.

[0033] 그 결과, 그림 1과 같이 표준 사포닌과 비교하여 CRNB-A3, CRNB-A5, CRNB-A6, CRNB-B9 및 CRNB-22의 5개 분리 균주에서 배양 후 표준 사포닌과 비교하여 새로운 분해물이 형성된 것으로 보아 특정 사포닌이 분해된 것을 확인 할 수 있었다.

[0034] 1.2 분리된 미생물의 동정

[0035] 사포닌 분해 미생물로 선발된 균주 중 β-글루코시다제 활성이 가장 뛰어난 미생물 5개(CRNB-A3, CRNB-A5, CRNB-A6, CRNB-B9 및 CRNB-22)에 대하여 16S rDNA 염기서열에 기초한 분자계통 분류학적 분석을 이용하여 동정을 실시하였다. 균주 DNA를 추출, 범용 프라이머(universal primer) (5'-GAGTTTGATCCTGGCTCAG-3', 5'-AGAAAGGAGGTGATCCAGCC-3')를 이용하여 PCR을 행하여 16S rDNA (16S rRNA 코딩 유전자)를 증폭하였다. 증폭조건은 96 ℃에서 2분간 반응한 다음 96℃에서 변성 10초, 50 ℃에서 annealing 5초, 60 ℃에서 extension을 4분간 25회 반복하고, 60 ℃에서 2분간 최종 extension을 실시하였다. 증폭된 16S rDNA는 PCR 산물 정제 키트(Product Purification Kit, 퀴아젠(Qiagen) 사)를 사용하여 정제한 후, Genetic analyzer 377 (퍼킨-엘머(Perkin-Elmer) 사)을 사용하여 결정하였다.

[0036] 그 결과 김치에서 분리된 미생물인 CRNB-22는 락토바실러스(*Lactobacillus plantarum*)로 동정되어 락토바실러스 플랜타럼 CRNB-22로 명명되었고, 마유에서 분리된 미생물인 CRNB-A3은 1,389개의 염기서열 중 1,387개의 염기서열이 동일하여 99%의 염기서열 상동성이 있는 엔테로코커스 패칼리스(*Enterococcus faecalis*)로 동정되어, 엔테로코서스 패칼리스 CRNB-A3로 명명되었으며, CRNB-A5, CRNB-A6 및 CRNB-B9는 모두 엔테로코커스 패시

엄(*Enterococcus faecium*)으로 동정되었다(도 2 내지 도 6참조).

[0037] 락토바실러스 플랜타럼 CRNB-22 균주는 한국미생물자원센터에 기탁번호 KCTC 11931 BP로 기탁되었으며, 엔테로코서스 패칼리스 CRNB-A3 균주는 한국미생물자원센터에 기탁번호 KCTC 11930 BP로 기탁되었다.

[0038]

[0039] **실시예 2. 분리된 미생물의 특성 분석**

[0040] 2.1 당분해 특성 및 효소특이성

[0041] 최종 분리된 엔테로코커스 패칼리스 CRNB-A3, 엔테로코커스 패시엄 CRNB-A5, 엔테로코커스 패시엄 CRNB-A6, 엔테로코커스 패시엄 CRNB-B9 및 락토바실러스 플랜타럼 CRNB-22의 5개 균주의 효소생산 특이성과 탄수화물의 분해특성을 시험하기 위하여 API ZYM 및 API 20 스트립 키트(strips kit)을 사용하여 확인하였다. 균주를 MRS 브로스 배지를 이용하여 30℃에서 24시간 배양한 후 원심분리를 하여 균주를 회수하고, 기본 배지에 현탁하고 접종하여 배양하였다. 배양 12, 24, 48시간에 따른 배지색의 변화로 당자화성 유, 무를 판단하였다. 그 결과를 표 4 및 표 5에 나타내었다.

[0042] 2.2 배지 조성에 따른 성장 특성

[0043] 엔테로코커스 패칼리스 CRNB-A3, 엔테로코커스 패시엄 CRNB-A5, 엔테로코커스 패시엄 CRNB-A6, 엔테로코커스 패시엄 CRNB-B9 및 락토바실러스 플랜타럼CRNB-22의 5개 균주의 최적 배지를 시험하기 위하여 Difco 사의 MRS 브로스, 영양 브로스(nutrient broth, NB) 및 트립틱 소이(tryptic soy, TS) 브로스 3 종류의 배지를 사용하였다. 선발균주를 MRS 브로스에 접종하여 30℃의 진탕 배양기에서 190 rpm으로 24시간 배양하였다. 균주배양액을 MRS, NB 및 TS에 각각 1%(v/v) 접종하고 같은 배양조건으로 24시간 배양하였고, 4시간 간격으로 $O.D_{600}$값을 측정하여 균주의 성장속도를 조사하였다. 그 결과, MRS 브로스에서 가장 성장이 빠른 것으로 나타났으며, NB에서의 성장속도가 가장 좋지 않은 것으로 나타났다(도 7 참조).

표 4

기질	반응/효소	미생물 (CRNB)				
		A3	A5	A6	B9	2-2
Sodium pyruvate	Acetoin production	+	+	+	+	+
Hippuric acid	Hydrolysis	-	-	-	-	-
Esculin ferric citrate	β-glucosidase	-	±	±	±	+
Pyroglutamic acid-β naphthylamide	Pyrrolidonyl arylamidase	+	+	+	+	-
6-bromo-2-naphthyl-α-D-galactopyranoside	α-galactosidase	-	-	-	-	±
Naphtol ASBI-glucuronic acid	β-glucuronidase	-	-	-	-	-
2-naphthyl-β-D-galactopyranoside	β-galactosidase	-	+	-	+	+
2-naphthyl phosphate	Alcaline-phosphatase	-	-	-	-	-
L-leucine-β-naphthylamide	Leucine arylamidase	+	+	+	+	+
L-arginine	Arginine dihydrolase	+	+	+	+	+
D-ribose	Acidification	+	+	+	+	+
L-arabinose	Acidification	-	+	+	+	+
D-mannitol	Acidification	+	+	+	+	+
D-sorbitol	Acidification	-	-	-	-	+
D-lactose	Acidification	+	+	+	+	+
D-trehalose	Acidification	+	+	+	+	+
Inulin	Acidification	-	-	-	-	-
D-raffinose	Acidification	-	+	+	±	+
Starch	Acidification	+	+	+	+	+
Glycogen	Acidification	-	-	-	-	-

[0044]

표 5

효소	기질	미생물 (CRNB)				
		A3	A5	A6	B9	2-2
Control		0*	0	0	0	0
Alkaline phophatase	2-naphthyl phosphate	0	0	0	0	0
Esterase (c4)	2-naphthyl butyrate	3	2	2	2	0
Esterase lipase (C8)	2-naphthyl caprylate	2	1	1	1	0
Lipase (c14)	2-naphthyl myristate	0	0	0	0	0
Leucine arylamidase	L-leucyl-2-naphthylamide	3	3	3	4	5
Valine arylamidase	L-valyl-2-naphthylamide	1	1	1	2	4
Cystine arylamidase	L-cystyl-2-naphthylamide	2	0	2	1	1
Trypsin	N-benzoyl-DL-arginine-2-naphthylamide	0	0	0	0	0
a-chymotrypsin	N-glutaryl-phenylalanine-2-naphthylamide	1	0	1	0	0
Acid phosphatase	2-naphthyl phosphate	2	2	2	2	1
Naphtol-AS-BO-phosphohydrolase	Naphthol-AS-BI-phosphate	1	1	2	2	2
a-galactosidase	6-Br-2-naphthyl-α D-galactopyranoside	0	0	0	0	1
b-galactosidase	2-naphthyl-β D-glactopyranoside	0	5	0	1	5
b-glucuronidase	Naphthol-AS-BI-β D-glucuronide	1	0	0	0	0
a-glucosidase	2-naphthyl-α D-glucopyranoside	0	0	0	0	2
b-glucosidase	6-Br-2-naphthyl-β D-glucopyranoside	0	0	0	0	5
N-acetyl-b-glucosamidase	1-naphthyl-N-acetyl-β D-glucosaminide	0	0	0	0	4
a-mannosidase	6-Br-2-naphthyl-α D-mannopyranoside	0	0	0	0	0
a-fucosidase	2-naphthyl-α L-fucopyranoside	0	0	0	0	0

[0045]

[0046] 기질 분해정도 0 : 0 nanomoles, 1 : 5 nanomoles, 2 : 10 nanomoles, 3 : 20 nanomoles, 4 : 30 nanomoles, 5 : ≥40 nanomoles

[0047] 2.3 배양 온도에 따른 성장 특성

[0048] 엔테로코커스 패칼리스 CRNB-A3, 엔테로코커스 패시엄 CRNB-A5, 엔테로코커스 패시엄 CRNB-A6, 엔테로코커스 패시엄 CRNB-B9 및 락토바실러스 플랜타럼CRNB-22의 5개 균주를 MRS 브로스에서 24시간 배양한 후 MRS 브로스에 1%씩 접종하여 20, 30, 40 ℃의 진탕배양기에서 190 rpm으로 24 시간 배양하였다. 배양액은 4시간 간격으로 O.D_{600}값을 측정하여 배양온도에 따른 성장 특성을 조사하였다.

[0049] 그 결과 40℃에서 가장 높은 성장 속도를 보이는 것으로 나타났다(도 8 참조).

[0050] 2.4 pH 조건에 따른 성장 특성

[0051] 엔테로코커스 패칼리스 CRNB-A3, 엔테로코커스 패시엄 CRNB-A5, 엔테로코커스 패시엄 CRNB-A6, 엔테로코커스 패시엄 CRNB-B9 및 락토바실러스 플랜타럼CRNB-22의 5개 균주를 MRS 브로스에서 24시간 배양한 후 pH를 6.0, 7.0, 8.0으로 조정한 MRS 브로스에 1%씩 접종하여 30 ℃의 진탕배양기에서 190 rpm으로 24시간 배양하였다. 배양액은 4시간 간격으로 $O.D_{600}$값을 측정하여 적절한 pH 조건을 시험하였다.

[0052] 그 결과 락토바실러스 플랜타럼 CRNB-22 균주는 모든 pH 조건에서 성장이 우수한 것으로 나타났으며, 나머지 균주는 pH 6에서 다소의 성장 저하를 보였지만, pH 7과 pH 8에서의 성장이 우수한 것으로 나타났다(도 9 참조).

[0053] 2.5 배양시간에 따른 미생물 개체 수와 배양액 내 pH의 변화

[0054] 엔테로코커스 패칼리스 CRNB-A3, 엔테로코커스 패시엄 CRNB-A5, 엔테로코커스 패시엄 CRNB-A6, 엔테로코커스 패시엄 CRNB-B9 및 락토바실러스 플랜타럼 CRNB-22의 5개 균주를 MRS 브로스에서 24시간 동안 배양하여 미생물수와 pH의 변화를 측정하였다. 그 결과, 미생물 개체 수는 배양초기에 급속히 성장하여 락토바실러스 플랜타럼 CRNB 22 균주를 제외한 모든 균주에서 배양 8시간째에 최대 균수에 이르러 정체기가 24 시간 동안 배양 중에 계속 유지되었으며, 락토바실러스 플랜타럼 CRNB 22 균주는 성장속도는 느리지만 지속적으로 성장하여 배양 20 시간에 최대 개체 수를 나타내었다(도 10(a) 참조).

[0055] 개체 수가 가장 많이 증가한 균주는 엔테로코커스 패칼리스 CRNB-A3, 엔테로코커스 패시엄 CRNB-A5, 엔테로코커스 패시엄 CRNB-B9, 엔테로코커스 패시엄 CRNB-A6, 락토바실러스 플랜타럼 CRNB-22의 순으로 나타났다.

표 6

[0056]

미생물	배양시간 (시간) 및 개체수						
	0	4	8	12	16	20	24
CRNB-A3	1.49×10^{7}	7.19×10^{8}	1.92×10^{9}	1.9×10^{9}	1.83×10^{9}	1.97×10^{9}	1.87×10^{9}
CRNB-A5	1.08×10^{7}	9.2×10^{8}	1.45×10^{9}	1.26×10^{9}	1.37×10^{9}	1.38×10^{9}	1.22×10^{9}
CRNB-A6	3.59×10^{6}	3.68×10^{8}	7.3×10^{8}	6.0×10^{8}	6.75×10^{8}	5.9×10^{8}	5.8×10^{8}
CRNB-B9	5.0×10^{6}	3.83×10^{8}	8.0×10^{8}	8.3×10^{8}	7.45×10^{8}	1.04×10^{9}	8.55×10^{8}
CRNB-22	3.94×10^{6}	7.9×10^{7}	1.58×10^{8}	3.17×10^{8}	4.75×10^{8}	5.55×10^{8}	3.6×10^{8}

[0057] 산생성에 따른 배지의 pH 변화는 도 10(b)에서와 같이 락토바실러스 플랜타럼 CRNB-22 균주를 제외하고는 모두 배양 8 시간째에 pH 5.0 이하로 내려갔으며, 균의 성장 속도가 느린 락토바실러스 플랜타럼 CRNB-22 균주가 배양 8시간째에 pH 4.5 이하로 내려가 특이하게 산생성 능력이 높은 것으로 나타났다. 이와 같은 결과는 락토바실러스 플랜타럼 CRNB-22 균주는 산생성 능력이 탁월하게 높으나 다른 한편으로는 생성된 산에 의한 생장이 급속이 낮아져 균의 성장에 억제를 받는 것으로 생각된다.

[0058] **실시예 3. 사포닌 분해 관련 효소의 분리 및 특성**

[0059] 3.1 사포닌 분해 관련 효소 분리

[0060] 최종 선별된 5개 균주를 MRS 배지를 사용하여 30℃의 진탕배양기에서 190 rpm으로 24시간 배양하였다. 배양액을 4 ℃에서 7,500 rpm으로 15분간 원심분리하여 균체를 제거하고 상층액을 추출하였고, 4배의 에탄올을 첨가하여 충분히 혼합시킨 후 0℃에서 40분 정치하여 단백질을 침전시켰다. 위 용액은 4℃에서 10,500 rpm으로 40분간 원심분리 후 상층액은 버리고 침전물을 채취하여 20 mM, pH 7.0의 의 소듐 인산 버퍼(sodium phosphate

buffer)에 용해시켜 조효소액으로 사용하였다.

[0061] 3.2 분리된 미생물의 사포닌 분해 효소의 온도에 따른 진세노사이드 전환 특성

[0062] 최종 선별된 5개 미생물의 효소액을 각각 0.2 mg/ml 진세노사이드 Rb_1, Rb_2, R_d, Re, Rg_1의 수용액과 4:1 (v/v) 비율로 혼합한 후 pH를 7.0로 조절하고 반응온도를 각각 20, 30, 35, 40, 50, 60 ℃로 하여 7일간 반응시켰다. 반응산물은 수포화 부탄올로 추출하고 TLC 분석을 통하여 사포닌 분해를 측정하여 배양온도에 따른 각 미생물의 사포닌 분해효소의 진세노사이드 전환특성을 조사하였다.

[0063] 그 결과, 도 11(a)에 나타난 바와 같이 테로코서스 패컬리스 CRNB-A3 균주를 이용한 경우, 진세노사이드 Rb_1, Rd, Re, Rg_1는 20, 30, 35, 40, 50, 60℃의 온도에서는 사포닌이 표준물질과 동일하게 전개되어 분해되지 않았으나, 진세노사이드 Rb_2의 경우, 30℃와 35℃에서 상이한 이동상이 전개되어 진세노사이드 Rb_2가 30~35℃ 사이에 분해되는 것을 알 수 있었다.

[0064] 또한 락토바실러스 플랜타럼 CRNB-22 균주는 35 ℃에서 진세노사이드 Rb_1이 분해되어 새로운 진세노사이드가 만들어짐을 확인할 수 있었다(도 11(b) 참조).

[0065] 하지만, 엔테로코서스 패시엄 CRNB-A6, 엔테로코서스 패시엄 CRNB-A5, 엔테로코서스 패시엄 CRNB-B9 균주는 별다른 진세노사이드 분해능을 나타내지 않았다.

[0066] 따라서, TLC 실험를 볼 때, 락토바실러스 플랜타럼 CRNB-22 균주는 Rb_1, 엔테로코서스 패컬리스 CRNB-A3 균주는 Rb_2에 대한 분해능력이 있는 것으로 조사되었다.

[0067] 3.3 분리된 미생물의 사포닌 분해 효소의 pH에 따른 진세노사이드 전환 특성

[0068] 최종 선별된 5개 미생물의 효소액을 각각 0.2 mg/ml 진세노사이드 Rb_1, Rb_2, R_d, Re, Rg_1의 수용액과 4:1 (v/v) 비율로 혼합한 후 반응용액을 pH 5.0, 6.0, 7.0, 8.0, 9.0, 10.0으로 조절하고 30℃에서 7일간 반응시켰다. 반응산물은 수포화 부탄올로 추출하고 TLC 분석을 통하여 사포닌의 분해를 측정하여 pH에 따른 각 미생물의 사포닌 분해효소의 진세노사이드 전환특성을 조사하였다.

[0069] 그 결과, 엔테로코서스 패컬리스 CRNB-A3 균주는 도 12(a)에서와 같이 진세노사이드 Rb_2의 분해능을 나타냈으며, 최적의 pH는 7.0으로 조사되었다. 또한 락토바실러스 플랜타럼 CRNB-22 균주는 진세노사이드 Rb_1의 분해능을 나타냈으며, 최적의 pH는 6.0과 7.0으로 조사되었다(도 12(b) 참조).

[0070] 3.4 인삼의 꽃 봉오리, 잎, 뿌리의 진세노사이드 전환 특성

[0071] 엔테로코서스 패컬리스 CRNB-A3 균주와 락토바실러스 플랜타럼 CRNB-22 균주가 생산하는 효소액의 최적 반응조건으로 사포닌 표준물질(STD), 꽃 봉오리, 잎, 뿌리를 반응시켰다.

[0072] 엔테로코서스 패컬리스 CRNB-A3 균주(pH 7.0, 35 ℃), 락토바실러스 플랜타럼 CRNB-22 균주(pH 6.0, 35 ℃), 락토바실러스 플랜타럼 CRNB-22 균주(pH 10.0, 35 ℃)를 이용하여 7일 동안 반응시킨 결과,

[0073] 표준물질은 새로운 분해 이동상이 제일 윗부분에 나타났다. 꽃 봉우리의 사포닌은 Rb_1, Rb_2 성분이 분해되어 Rd로 강하게 전환되었음을 나타내고 있고, 표준물질 분해와 마찬가지로 새로운 분해 이동상이 제일 윗부분에 나타났음을 알 수 있다(도 13 참조).

[0074] 잎은 Rb_1, Rb_2 성분이 분해되어 Rd로 전환되었고, Re 성분은 분해되어 TLC 상에서 나타나지 않았는데 이는 Rg_1 성분으로 전환되었음을 알 수 있었다. 뿌리는 엔테로코서스 패컬리스 CRNB-A3와 락토바실러스 플랜타럼 CRNB-22 균주가 생산하는 효소에는 영향이 없는 것으로 나타났다.

[0075] 3.5 효소의 분자량 측정

[0076] 사포닌 분해 선발균주에서 분비되는 효소의 분자량은 SDS-PAGE 시험을 통하여 조사하였다. EtOH precipitation 방법으로 효소액을 (0.1 mg/ml) 만들어서 12% 아크릴아마이드 전기영동 젤(acrylamide electrophoresis gel)을 가지고 전기영동을 했다. 전기영동 버퍼로 0.025 M 트리스-염(Tris-base), 0.192 M 글리신, pH 8.3 을 사용하였다. 전압은 50 V로 하였다.

[0077] 그 결과, 분비된 효소의 분자량은 약 8만 kDa 정도로 추정된다(도 14 참조).

[0078] 상술한 바와 같이, 본 발명의 바람직한 실시예를 참조하여 설명하였지만 해당 기술 분야의 숙련된 당업자라면 하기의 특허청구범위에 기재된 본 발명의 사상 및 영역으로부터 벗어나지 않는 범위 내에서 본 발명을 다양하게 수정 및 변경시킬 수 있음을 이해할 수 있을 것이다.

수탁번호

[0079]

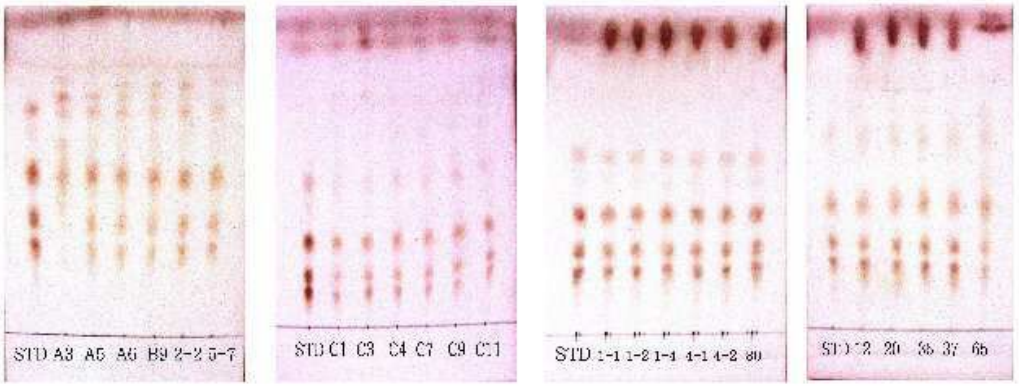
기탁기관명 : 한국생명공학연구원

수탁번호 : KCTC11931BP

수탁일자 : 20110506

도면

도면1



도면2

```
   1 AAAAGGTTAC CTCACCGACT TCGGGTGTTA CAAACTCTCG TGGTGTGACG GGCGGTGTGT ACAAGGCCCG
  71 GGAACGTATT CACCGCGGCG TGCTGATCCG CGATTACTAG CGATTCCGGC TTCATGCAGG CGAGTTGCAG
 141 CCTGCAATCC GAACTGAGAG AAGCTTTAAG AGATTTGCAT GACCTCGCGG TCTAGCGACT CGTTGTACTT
 211 CCCATTGTAG CACGTGTGTA GCCCAGGTCA TAAGGGGCAT GATGATTTGA CGTCATCCCC ACCTTCCTCC
 281 GGTTTGTCAC CGGCAGTCTC GCTAGAGTGC CCAACTAAAT GATGGCAACT AACAATAAGG GTTGCGCTCG
 351 TTGCGGGACT TAACCCAACA TCTCACGACA CGAGCTGACG ACAACCATGC ACCACCTGTC ACTTTGTCCC
 421 CGAAGGGAAA GCTCTATCTC TAGAGTGGTC AAAGGATGTC AAGACCTGGT AAGGTTCTTC GCGTTGCTTC
 491 GAATTAAACC ACATGCTCCA CCGCTTGTGC GGGCCCCGGT CAATTCCTTT GAGTTTCAAC CTTGCGGTCG
 561 TACTCCCCAG GCGGAGTGCT TAATGCGTTT GCTGCAGCAC TGAAGGGCGG AAACCCTCCA ACACTTAGCA
 631 CTCATCGTTT ACGGCGTGGA CTACCAGGGT ATCTAATCCT GTTTGCTCCC CACGCTTTCG AGCCTCAGCG
 701 TCAGTTACAG ACCAGAGAGC CGCCTTCGCC ACTGGTGTTC CTCCATATAT CTACGCATTT CACCGCTACA
 771 CATGGAATTC CACTCTCCTC TTCTGCACTC AAGTCTCCCA GTTTCCAATG ACCCTCCCCG GTTGAGCCGG
 841 GGGCTTTCAC ATCAGACTTA AGAAACCGCC TGCGCTCGCT TTACGCCCAA TAAATCCGGA CAACGCTTGC
 911 CACCTACGTA TTACCGCGGC TGCTGGCACG TAGTTAGCCG TGGCTTTCTG GTTAGATACC GTCAGGGGAC
 981 GTTCAGTTAC TAACGTCCTT GTTCTTCTCT AACAACAGAG TTTTACGATC CGAAAACCTT CTTCACTCAC
1051 GCGGCGTTGC TCGGTCAGAC TTTCGTCCAT TGCCGAAGAT TCCCTACTGC TGCCTCCCGT AGGAGTCTGG
1121 GCCGTGTCTC AGTCCCAGTG TGGCCGATCA CCCTCTCAGG TCGGCTATGC ATCGTGGCCT TGGTGAGCCG
1191 TTACCTCACC AACTAGCTAA TGCACCGCGG GTCCATCCAT CAGCGACACC CGAAAGCGCC TTTCACTTTT
1261 ATGCCATGCG ACATAAACTG TTATGCGGTA TTAGCACCTG TTTCCAAGTG TTATCCCCCT CTGATGGGTA
1331 GGTTACCCAC GTGTTACTCA CCCGTCCGCC ACTCCTCTTT CCAATTGAGT GCAAGCACT
```

도면3

```
   1 TGGTTCCTAA AAGGTTACCC CACCGACTTT GGGTGTTACA AACTCTCATG GTGTGACGGG CGGTGTGTAC
  71 AAGGCCCGGG AACGTATTCA CCGCGGCATG CTGATCCGCG ATTACTAGCG ATTCCGACTT CATGTAGGCG
 141 AGTTGCAGCC TACAATCCGA ACTGAGAATG GCTTTAAGAG ATTAGCTTAC TCTCGCGAGT TCGCAACTCG
 211 TTGTACCATC CATTGTAGCA CGTGTGTAGC CCAGGTCATA AGGGGCATGA TGATTTGACG TCATCCCCAC
 281 CTTCCTCCGG TTTGTCACCG GCAGTCTCAC CAGAGTGCCC AACTTAATGC TGGCAACTGA TAATAAGGGT
 351 TGCGCTCGTT GCGGGACTTA ACCCAACATC TCACGACACG AGCTGACGAC AACCATGCAC CACCTGTATC
 421 CATGTCCCCG AAGGGAACGT CTAATCTCTT AGATTTGCAT AGTATGTCAA GACCTGGTAA GGTTCTTCGC
 491 GTAGCTTCGA ATTAAACCAC ATGCTCCACC GCTTGTGCGG GCCCCCGTCA ATTCCTTTGA GTTTCAGCCT
 561 TGCGGCCGTA CTCCCCAGGC GGAATGCTTA ATGCGTTAGC TGCAGCACTG AAGGGCGGAA ACCCTCCAAC
 631 ACTTAGCATT CATCGTTTAC GGTATGGACT ACCAGGGTAT CTAATCCTGT TTGCTACCCA TACTTTCGAG
 701 CCTCAGCGTC AGTTACAGAC CAGACAGCCG CCTTCGCCAC TGGTGTTCTT CCATATATCT ACGCATTTCA
 771 CCGCTACACA TGGAGTTCCA CTGTCCTCTT CTGCACTCAA GTTTCCCAGT TTCCGATGCA CTTCTTCGGT
 841 TGAGCCGAAG GCTTTCACAT CAGACTTAAA AAACCGCCTG CGCTCGCTTT ACGCCCAATA AATCCGGACA
 911 ACGCTTGCCA CCTACGTATT ACCGCGGCTG CTGGCACGTA GTTAGCCGTG GCTTTCTGGT TAAATACCGT
 981 CAATACCTGA ACAGTTACTC TCAGATATGT TCTTCTTTAA CAACAGAGTT TTACGAGCCG AAACCCTTCT
1061 TCACTCACGC GGCGTTGCTC CATCAGACTT TCGTCCATTG TGGAAGATTC CCTACTGCTG CCTCCCGTAG
1121 GAGTTTGGGC CGTGTCTCAG TCCCAATGTG GCCGATTACC CTCTCAGGTC GGCTACGTAT CATTGCCATG
1191 GTGAGCCGTT ACCCCACCAT CTAGCTAATA CGCCGCGGGA CCATCCAAAA GTGATAGCCG AAGCCATCTT
1261 TCAAACTCGG ACCATGCGGT CCAAGTTGTT ATGCGGTATT AGCATCTGTT TCCAGGTGTT ATCCCCCGCT
1331 TCTGGGCAGG TTTCCCACGT GTTACTCACC AGTTCGCCAC TCACTCAAAT GTAAATCATG ATGCAAGCAC
1401 CAATCAATAC CAGAGTTCGT TCGACTGC
```

도면4

```
   1 GGCGATTGGG CCCTCTAGAT GCATGCTCGA GCGGCCGCCA GTGTGCGGGA GAGCTGCAGA ATTCGCCCTT
  71 TACGGCTACC TTGTTACGAC TTCACCCCAA TCATCTATCC CACCTTAGGC GGCTGGCTCC AAAAAGGTTG
 141 CCTCACCGAC TTCGGGTGTT ACAAACTCTC GTGGTGTGAC GGGCGGTGTG TACAAGGCCC GGGAACGTAT
 211 TCACCGCGGC GTGCTGATCC GCGATTACTA GCGATTCCGG CTTCATGCAG GCGAGTTGCA GCCTGCAATC
 281 CGAACTGAGA GAAGCTTTAA GAGATTAGCT TAGCCTCGCG ACTTCGCGAC TCGTTGTACT TCCCATTGTA
 351 GCACGTGTGT AGCCCAGGTC ATAAGGGGCA TGATGATTTG ACGTCATCCC CACCTTCCTC CGGTTTGTCA
 421 CCGGCAGTCT TGCTAGAGTG CCCAACTGAA TGATGGCAAC TAACAATAAG GGTTGCGCTC GTTGCGGGAC
 491 TTAACCCAAC ATCTCACGAC ACGAGCTGAC GACAACCATG CACCACCTGT CACTTTGCCC CCGAAGGGGA
 561 AGCTCTATCT CTAGAGTGAT CAAAGGATGT CAAGACCTGG TAAGGTTCTT CGCGTTGCTT CGAATTAAAC
 631 CACATGCTCC ACCGCTTGTG CGGGCCCCCG TCAATTCCTT TGAGTTTCAA CCTTGCGGTC GTACTCCCCA
 701 GGCGGAGTGC TTAATGCGTT AGCTGCAGCA CTGAAGGGCG GAAACCCTCC AACACTTAGC ACTCATCGTT
 771 TACGGCGTGG ACTACCAGGG TATCTAATCC TGTTTGCTCC CCACGCTTTC GAGCCTCAGC GTCAGTTACA
 841 GACCAGAGAG CCGCCTTCGC CACTGGTGTT CCTCCATATA TCTACGCATT TCACCGCTAC ACATGGAATT
 911 CCACTCTCCT CTTCTGCACT CAAGTCTCCC AGTTTCCAAT GACCCTCCCC GGTTGAGCCG GGGCTTTCA
 981 CATCAGACTT AAGAAACCGC CTGCGCTCGC TTTACGCCCA ATAAATCCGG ACAACGCTTG CCACCTACGT
1051 ATTACCGCGG CTGCTGGCAC GTAGTTAGCC GTGGCTTTCT GGTTAGATAC CGTCAAGGGA TGAACAGTTA
1121 CTCTCATCCT TGTTCTTCTC TAACAACAGA GTTTTACGAT CCGAAAACCT TCTTCACTCA CGCGGCGTTG
1191 CTCGGTCAGA CTTTCGTCCA TTGCCGAAGA TTCCCTACTG CTGCCTCCCG TAGGAGTTTG GGCCGTGTCT
1261 CAGTCCCAAT GTGGCCGATC ACCCTCTCAG GTCGGCTATG CATCGTGGCC TTGGTGAGCC GTTACCTCAC
1331 CAACTAGCTA ATGCACCGCG GGTCCATCCA TCAGCGACAC CGGAAAGCGC CTTTCAAATC AAAACCATGC
1401 GGTTTCGATT GTTATACGGT ATTAGCACCT GTTTCCAAGT GTTATCCCCT TCTGATGGGC AGGTTACCCA
1471 CGTGTTACTC ACCCGTTCGC CACTCTTCTT TTTCCGGTGG AGCAAGCTCC GGTGGAAAAA GAAGCGTACG
1641 ACTTGCATGT ATTAGGCACG CCGCCAGCGT TCGTCCTGAG CCATGATCAA ACTCTAAGGG CGAATTCCAG
1611 CACACATGCG GCACACTCGC GGCCGCTCGA GCATGCATCT AGAGGGCCCA AT
```

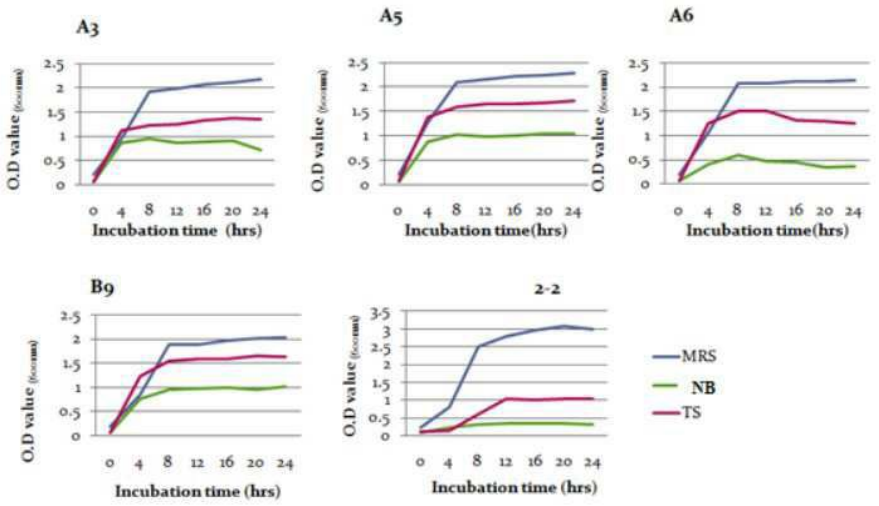
도면5

```
   1 CCTCTAGATG CATGCTCGAG CGGCCGCCAG TGTGCGGGAG ATCTGCGGAA TTCGCCCTTT ACGGCTACCT
  71 TGTTACGACT TCACCCCAAT CATCTATCCC ACCTTAGGCG GCTGGCTCCA AAAGGTTACC TCACCGACTT
 141 CGGGTGTTAC AAACTCTCGT GGTGTGACGG GCGGTGTGTA CAAGGCCCGG GAACGTATTC ACCGCGGCGT
 211 GCTGATCCGC GATTACTAGC GATTCCGGCT TCATGCAGGC GAGTTGCAGC CTGCAATCCG AACTGAGAGA
 281 AGCTTTAAGA GATTAGCTTA GCCTCGCGAC TTCGCAACTC GTTGTACTTC CCATTGTAGC ACGTGTGTAG
 351 CCCAGGTCAT AAGGGGCATG ATGATTTGAC GTCATCCCCA CCTTCCTCCG GTTTGTCACC GGCAGTCTTG
 421 CTAGAGTGCC CAACTGAATG ATGGCAACTA ACAATAAGGG TTGCGCTCGT TGCGGGACTT AACCCAACAT
 491 CTCACGACAC GAGCTGACGA CAACCATGCA CCACCTGTCA CTTTGCCCCC GAAGGGGAAG CTCTATCTCT
 561 AGAGTGGTCA AAGGATGTCA AGACCTGGTA AGGTTCTTCG CGTTGCTTCG AATTAAACCA CATGCTCCAC
 631 CGCTTGTGCG GGCCCCCGTC AATTCCTTTG AGTTTCAACC TTGCGGTCGT ACTCCCCAGG CGGAGTGCTT
 701 AATGCGTTAG CTGCAGCACT GAAGGGCGGA AACCCTCCAA CACTTAGCAC TCATCGTTTA CGGCGTGGAC
 771 TACCAGGGTA TCTAATCCTG TTTGCTCCCC ACGCTTTCGA GCCTCAGCGT CAGTTACAGA CCAGAGAGCC
 841 GCCTTCGCCA CTGGTGTTCC TCCATATATC TACGCATTTC ACCGCTACAC ATGGAATTCC ACTCTCCTCT
 911 TCTGCACTCA AGTCTCCCAG TTTCCAATGA CCCTCCCCGG TTGAGCCGGG GGCTTTCACA TCAGACTTAA
 981 GAAACCGCCT GCGCTCGCTT TACGCCCAAT AAATCCGGAC AACGCTTGCC ACCTACGTAT TACCGCGGCT
1051 GCTGGCACGT AGTTAGCCGT GGCTTTCTGG TTAGATACCG TCAAGGGATG AACAGTTACT CTCATCCTTG
1121 TTCTTCTCTA ACAACAGAGT TTTACGATCC GAAAACCTTC TTCACTCACG CGGCGTTGCT CGGTCAGACT
1191 TTCGTCCATT GCCGAAGATT CCCTACTGCT GCCTCCCGTA GGAGTTTGGG CCGTGTCTCA GTCCCAATGT
1261 GGCCGATCAC CCTCTCAGGT CGGCTATGCA TCGTGGCCTT GGTGAGCCGT TACCTCACCA ACTAGCTAAT
1331 GCACCGCGGG TCCATCCATC AGCGACACCC GAAAGCGCCT TTCAAATCAA AACCATGCGG TTTTGATTGT
1401 TATACGGTAT TAGCACCTGT TTCCAAGTGT TATCCCCTTC TGATGGGCAG GTTACCCACG TGTTACTCAC
1471 CCGTTCGCCA CTCCTCTCTT TCCGGTGGAG CAAGCTCCGG TGGAAAAAGA AGCGTTCGAC TTGCATGTAT
1641 TAGGCACGCC GCCAGCGTTC GTCCTGAGCC AGGATCAAAC TCTAAGGGCG AATTCCAGCA CACATCCGGC
1611 ACACACGCGG CGGCTCGAGC ATGCATCTAG AGGGCCCAAT
```

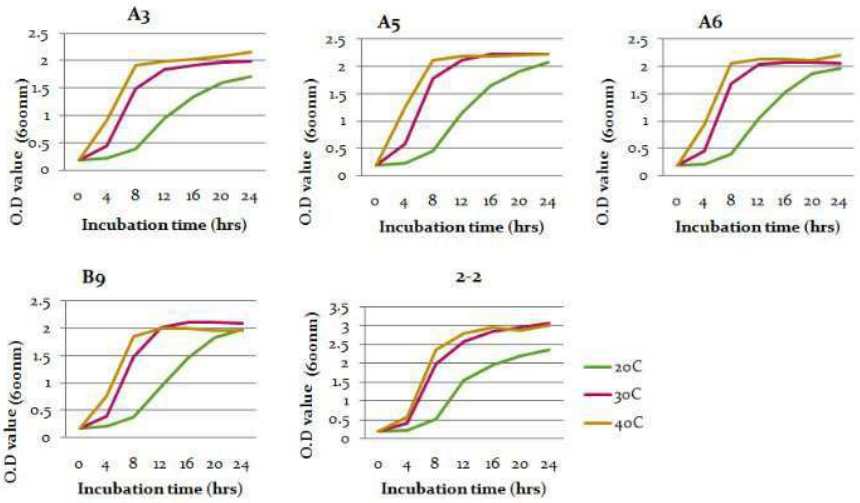
도면6

```
   1 TCTAGATGCA TGCTCGAGCG GCCGCTAGTG TGCGGGAGTG CTGCGGAATT CGCCCTTTAC GGTTACCTTG
  71 TTACGACTTC ACCCCAATCA TCTATCCCAC CTTAGGCGGC TGGCTCCAAA AAGGTTACCT CACCGACTTC
 141 GGGTGTTACA AACTCTCGTG GTGTGACGGG CGGTGTGTAC AAGGCCCGGG AACGTATTCA CCGCGGCGTG
 211 CTGATCCGCG ATTACTAGCG ATTCCGGCTT CATGTAGGCG AGTTGCAGCC TACAATCCGA ACTGAGAGAA
 281 GCTTTAAGAG ATTAGCTTAG CCTCGCGACT TCGCGACTCG TTGTACTTCC CATTGTAGCA CGTGTGTAGC
 351 CCAGGTCATA AGGGGCATGA TGATTTGACG TCATCCCCAC CTTCCTCCGG TTTGTCACCG GCAGTCTTGC
 421 TAGAGTGCCC AACTAAATGA TGGCAACTAA CAATAAGGGT TGCGCTCGTT GCGGGACTTA ACCCAACATC
 491 TCACGACACG AGCTGACGAC AACCATGCAC CACCTGTCAC TTTGCCCCCG AAGGGGAAGC TCTATCTCTA
 561 GAGTGGTCAA AGGATGTCAA GACCTGGTAA GGTTCTTCGC GTTGCTTCGA ATTAAACCAC ATGCTCCACC
 631 GCTTGTGCGG GCCCCCGTCA ATTCCTTTGA GTTTCAACCT TGCGGTCGTA CTCCCCAGGC GGAGTGCTTA
 701 ATGCGTTAGC TGCAGCACTG AAGGGCGGAA ACCCTCCAAC ACTTAGCACT CATCGTTTAC GGCGTGGACT
 771 ACCAGGGTAT CTAATCCTGT TTGCTCCCCA CGCTTTCGAG CCTCAGCGTC AGTTACAGAC CAGAGAGCCG
 841 CCTTCGCCAC TGGTGTTCCT CCATATATCT ACGCATTTCA CCGCTACACA TGGAATTCCA CTCTCCTCTT
 911 CTGCACTCAA GTCTCCCAGT TTCCAATGAC CCTCCCCGGT TGAGCCGGGG GCTTTCGCAT CAGACTTAAG
 981 AAACCGCCTG CGCTCGCTTT ACGCCCAATA AATCCGGACA ACGCTTGCCA CCTACGTATT ACCGCGGCTG
1061 CTGGCACGTA GTTAGCCGTG GCTTTCTGGT TAGATACCGT CAAGGGATGA ACAGTTACTC TCATCCTTGT
1121 TCTTCTCTAA CAACAGAGTT TTACGATCCG AAAACCTTCT TCACTCACGC GGCGTTGCTC GGTCAGACTT
1191 TCGTCCATTG CCGAAGATTC CCTACTGCTG CCTCCCGTAG GAGTTTGGGC CGTGTCTCAG TCCCAATGTG
1261 GCCGATCACC CTCTCAGGTC GGCTATGCAT CGTGGCCTTG GTGAGCCGTT ACCTCACCAA CTAGCTAATG
1331 CACCGCGGGT CCATCCATCA GCGACACCCG AAAGCGCCTT TCAAATCAAA ACCATGCGGT TTCGATTGTT
1401 ATACGGTATT AGCACCTGTT TCCAAGTGTT ATCCCCTTCT GATGGGCAGG TTACCCACGT GTTACTCACC
1471 CGTTCGCCAC TCTTCTTTTT CCGGTGGAGC AAGCTCCGGT GGAAAAAGAA GCGTACGACT TGCATGTATT
1541 AGGCACGCCG CCAGCGTTCG TCCTGAGCCA TGATCAAACT CTAAGGGCGA ATTCCAGCAC ACATCCGGCA
1611 CACTCGCGGC CGCTCGAGCA TGCATCTAGA GGGCCCA
```

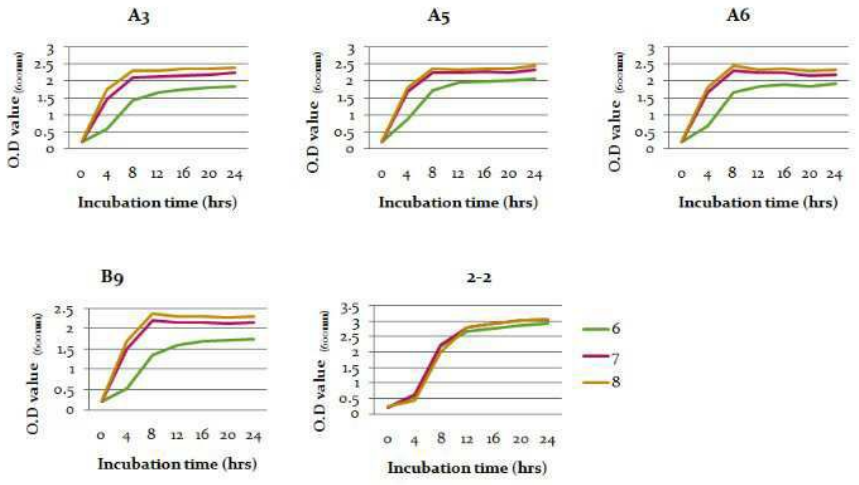
도면7


A3
A5
A6
B9
2-2
O.D value (600nm)
Incubation time (hrs)
MRS
NB
TS

도면8

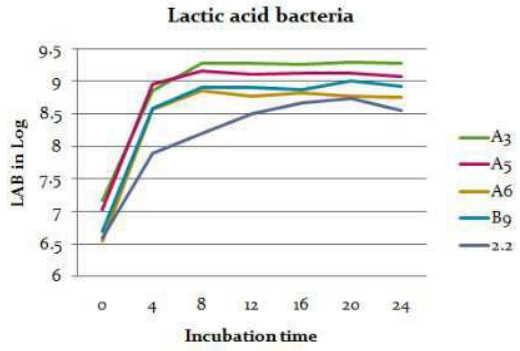

A3
A5
A6
B9
2-2
O.D value (600nm)
Incubation time (hrs)
20C
30C
40C

도면9

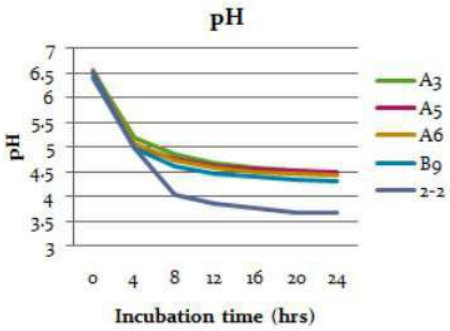

A3
A5
A6
B9
2-2
O.D value (600nm)
Incubation time (hrs)
6
7
8

도면10

(a)

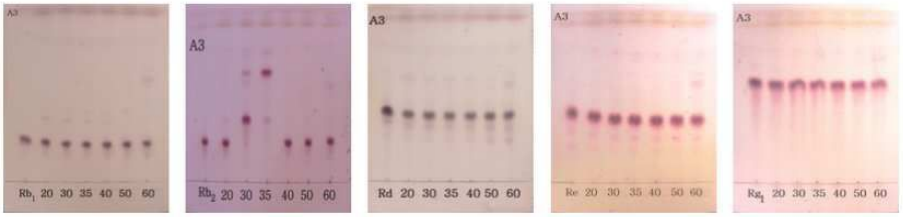


(b)



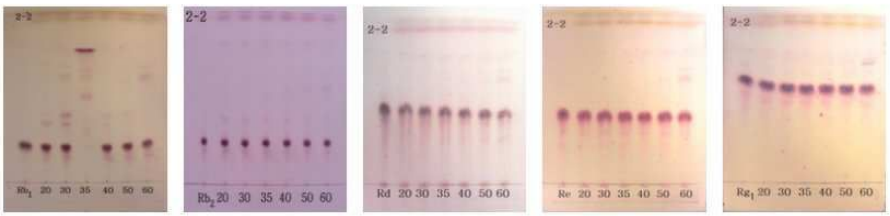
도면11

(a)



Rb1 Rb2 Rd Re Rg1

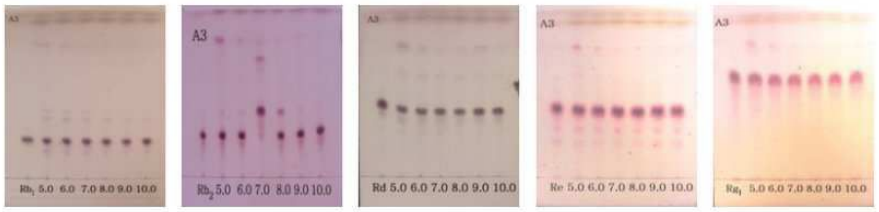
(b)



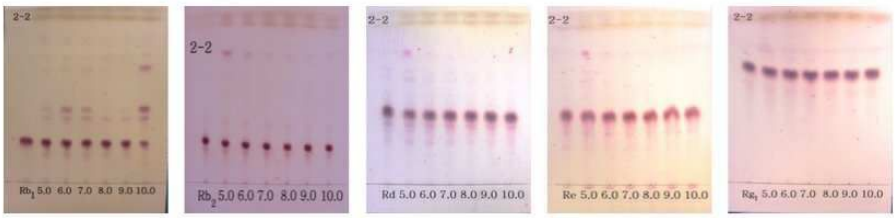
Rb1 Rb2 Rd Re Rg1

도면12

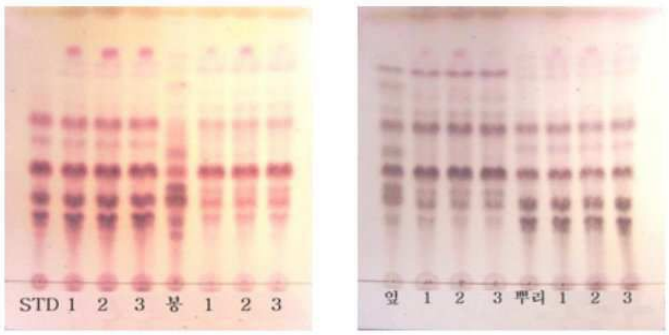
(a)



(b)



도면13



도면14

