



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2017-0077989
(43) 공개일자 2017년07월07일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12N 1/20 (2006.01) A23K 1/00 (2006.01)
A23K 20/195 (2016.01) A23L 1/30 (2006.01)
C12N 9/40 (2006.01) C12N 9/42 (2006.01)
C12R 1/07 (2006.01)

(52) CPC특허분류

C12N 1/20 (2013.01)
A23K 10/16 (2016.05)

(21) 출원번호 10-2015-0188051

(22) 출원일자 2015년12월29일

심사청구일자 2015년12월29일

(71) 출원인

충남대학교산학협력단

대전광역시 유성구 대학로 99 (궁동, 충남대학교)

청미바이오(주)

경기도 안성시 일죽면 주래본죽로 126

(72) 발명자

남명수

대전광역시 유성구 노은서로 222, 102동 402호(지
축동, 열매마을1단지)

랜친랜드

대전광역시 유성구 어은로51번길 57, 301호

라석한

경기도 안성시 서운로 791-10, 206동 301호(중리
동, 동광2차아파트)

(74) 대리인

특허법인 공간

전체 청구항 수 : 총 11 항

(54) 발명의 명칭 신규한 바실러스 코아굴란스 NRR1207 균주, 이를 이용한 발효 인삼과 프로바이오틱스 생균제
제 조성물

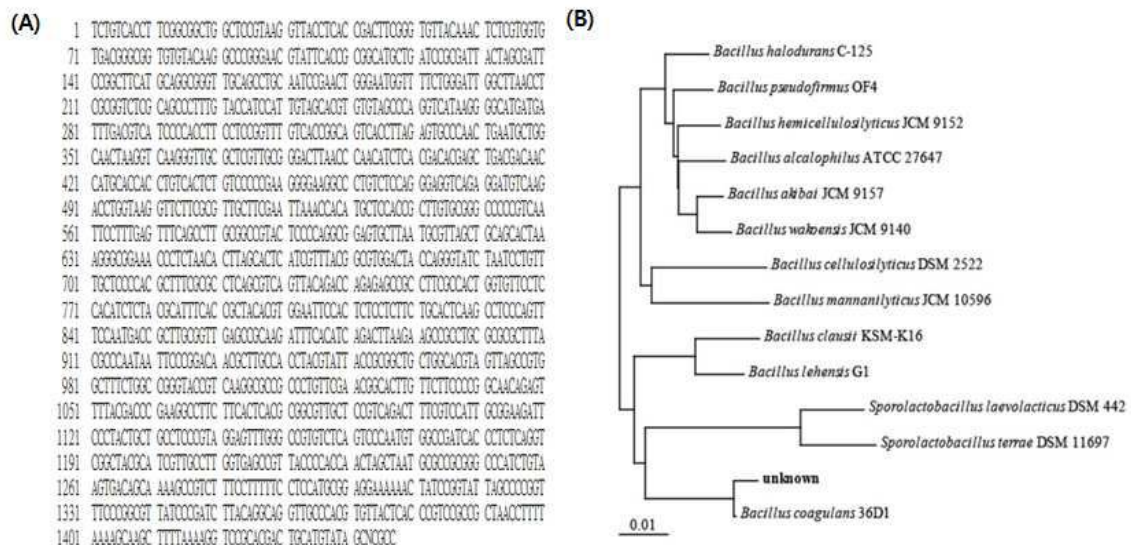
(57) 요약

본 발명은 신규한 바실러스 코아굴란스 NRR1207 균주(*Bacillus coagulans* NRR1207, 미생물 수탁번호 KACC92114P) 및 이를 이용한 발효인삼을 제공한다. 상기 바실러스 코아굴란스 NRR1207 균주는 생체 이용률이 낮은 인삼의 진세노사이드를 생체 흡수가 잘되는 진세노사이드로 전환시키는 효과가 우수하다.

또한, 본 발명의 신규한 바실러스 코아굴란스 NRR1207 균주를 이용한 프로바이오틱스 생균제제 조성물을 제공한다. 상기 바실러스 코아굴란스 NRR1207은 사료용 원료에 함유된 난소화성 성분인 스타키오스(stachyose) 및 라피노스(raffinose)를 분해하는 기능이 우수하다.

따라서, 본 발명의 신규한 바실러스 코아굴란스 NRR1207 균주를 이용하여 건강기능식품 개발 및 난소화성 성분 및 단백질 분해 가축용 생균제 개발에 이용할 수 있을 것으로 기대된다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A23K 20/195 (2016.05)
A23L 33/105 (2016.08)
A23L 33/135 (2016.08)
C12N 9/2445 (2013.01)
C12N 9/2465 (2013.01)
A23V 2002/00 (2013.01)
A23V 2200/3204 (2013.01)
A23V 2250/2124 (2013.01)
C12R 1/07 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	2015-B0011010106
부처명	미래창조과학부
연구관리전문기관	한국연구재단
연구사업명	[LINC] 산학공동기술개발사업
연구과제명	<i>Bacillus coagulans</i> sp. 를 이용한 프로바이오틱스 생균제제 기술 개발
기 여 율	1/1
주관기관	충남대학교
연구기간	2015.06.01 ~ 2015.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

신규한 바실러스 코아굴란스 NRR1207 균주(*Bacillus coagulans* NRR1207, 미생물 수탁번호 KACC92114P).

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 바실러스 코아굴란스 NRR1207 균주(*Bacillus coagulans* NRR1207, 미생물 수탁번호 KACC92114P)는 알칼리 포스파타아제(alkaline phosphatase), 에스테라아제(esterase), 에스테라아제 리파아제(esterase lipase), 리파아제(lipase), 루신아릴아미다아제(leucinearylamidase), 발린아릴아미다아제(valinearylamidase), 산성 포스파타아제(acid phosphatase), 나프톨-AS-BO-포스포히드로라아제(naphtol-AS-BO-phosphohydrolase), α -갈락토시다아제(α -galactosidase), β -갈락토시다아제(β -galactosidase), β -글루루코니다아제(β -glucuronidase), α -글루루코시다아제(α -glucosidase), β -글루루코시다아제(β -glucosidase), N-아세틸- β -글루루코사미다아제(N-acetyl- β -glucosamidase) 및 α -만노시다아제(α -mannosidase)로 이루어진 균 중에서 1종 이상의 효소 활성을 갖는 것을 특징으로 하는 바실러스 코아굴란스 NRR1207 균주.

청구항 3

제2항에 있어서,

바실러스 코아굴란스 NRR1207 균주(*Bacillus coagulans* NRR1207, 미생물 수탁번호 KACC92114P)는 β -글루루코시다아제 및 α -갈락토시다아제 효소 활성을 갖는 것을 특징으로 하는 바실러스 코아굴란스 NRR1207 균주.

청구항 4

제3항에 있어서,

상기 β -글루루코시다아제 효소 활성은 진세노사이드 Rb1을 Rd로 전환하는 것을 특징으로 하는 바실러스 코아굴란스 NRR1207 균주(*Bacillus coagulans* NRR1207, 미생물 수탁번호 KACC92114P).

청구항 5

제3항에 있어서,

상기 α -갈락토시다아제 효소 활성은 셀룰로스(cellulose), 헤미셀룰로스(hemicellulose), 펙틴(pectin), 스타키오스(stachylose) 및 라피노스(raffinose)를 포함하는 난소화성 성분을 분해하는 것을 특징으로 하는 바실러스 코아굴란스 NRR1207 균주(*Bacillus coagulans* NRR1207, 미생물 수탁번호 KACC92114P).

청구항 6

제5항에 있어서,

상기 α -갈락토시다아제 효소 활성은 스타키오스(stachylose) 및 라피노스(raffinose)를 분해하는 것을 특징으로 하는 바실러스 코아굴란스 NRR1207 균주(*Bacillus coagulans* NRR1207, 미생물 수탁번호 KACC92114P).

청구항 7

바실러스 코아굴란스 NRR1207 균주(*Bacillus coagulans* NRR1207, 미생물 수탁번호 KACC92114P)를 이용한 발효 인삼의 제조 방법으로서,

- i) 인삼 뿌리를 세절하여 15% 내지 25%의 인삼용액을 제조하는 단계;
- ii) 상기 인삼용액을 65℃ 내지 85℃에서 5분 내지 15분 동안 가열하는 단계;
- iii) 가열한 인삼 용액에 바실러스 코아굴란스 NRR1207 균주를 접종하는 단계; 및

iv) 균주를 접종한 인삼용액을 20℃ 내지 40℃에서 7일 내지 14일 동안 발효하는 단계;
를 포함하는 발효인삼의 제조 방법.

청구항 8

제7항의 발효인삼의 제조 방법을 이용하여 제조된 것을 특징으로 하는 발효인삼.

청구항 9

바실러스 코아굴란스 NRR1207 균주(*Bacillus coagulans* NRR1207, 미생물 수탁번호 KACC92114P)를 포함하는 프로바이오틱스 생균제제.

청구항 10

제9항에 있어서,

프로바이오틱스 생균제제는 인체용 및 가축용 프로바이오틱스 생균제제.

청구항 11

제10항에 있어서,

상기 가축용 프로바이오틱스 생균제제는 가축 사료용인 것을 특징으로 하는 프로바이오틱스 생균제제.

발명의 설명

기술 분야

- [0001] 본 발명은 신규한 바실러스 코아굴란스 NRR1207 균주(*Bacillus coagulans* NRR1207, 미생물 수탁번호 KACC92114P) 및 이를 이용한 발효 인삼을 제공한다.
- [0002] 또한 본 발명은 상기 바실러스 코아굴란스 NRR1207 균주를 이용한 프로바이오틱스 생균제제 조성물을 제공한다.

배경 기술

- [0003] 인삼(*Panax ginseng*)은 오갈피나목과(*Araliaceae*) 인삼 속에 속하는 다년생 초본류로 과거 수천 년 전부터 우리나라를 비롯한 동양에서 약제 또는 건강식품으로 널리 사용되어 왔다. 또한 인삼은 수삼, 홍삼 등의 다양한 형태로 이용이 가능하며, 특히 수삼을 증기로 찌서 가공한 홍삼이 인체에 유용한 다양한 진세노사이드(ginsenoside)를 함유하고 있는 것으로 알려져 있다.
- [0004] 인삼의 주요 효능을 나타내는 사포닌(saponin)은 30종류 이상의 진세노사이드로 구성되는데, 진세노사이드는 면역력 강화, 항염증 작용, 항알러지 작용, 항암효과, 발기부전에 대한 효과, 혈압강화작용, 항콜레스테롤 작용, 항혈전 작용, 성인병 및 노화에 대한 예방 및 치료 효과가 있다고 알려져 있다.
- [0005] 인삼의 사포닌은 트리테페노이드(triterpenoid) 계열의 담마란(dammarane) 골격에 글루코스(glucose), 아라비노스(arabinose), 자일로스(xylose), 람노스(rhamnose) 등이 결합되어 있는 중성배당체이다. 인삼을 물과 알코올로 추출할 때 인삼의 진세노사이드 중에서 Rb1, Rb2, Rc, Rg1 등이 다량 존재하는 것이 확인되었다. 그러나, 이러한 진세노사이드들은 체내에서 흡수가 잘 되지 않아 약학적 조성물로서 이용되기에 적합하지 않다.
- [0006] 이러한 인삼 내의 진세노사이드들은 홍삼이나 흑삼 등으로 가공 처리 되는 과정을 통해 자연계에서는 존재하지 않는 진세노사이드들로 변환됨으로써 체내에서 흡수가 잘 되어 각종 질환의 약학적 조성물에 적합하게 이용될 수 있다.
- [0007] 즉, 가공 처리 과정을 통해, 인삼의 진세노사이드 중 Rb1, Rb2, Rc, Rg1 등으로부터 글리코실 잔기가 이탈되면서 진세노사이드 Rg2, Rg3, Rh2, Rh1 등이 생성되었다가 다시 20번 위치의 탈수 과정을 통해 Rg5, Rk1, Rg6, Rk3, F4, Rh4가 생성되는 것으로 알려져 있다.
- [0008] 또한, 진세노사이드들은 유기산 첨가에 의해 가수분해가 진행되어 당이 떨어져 나가고 측쇄부분이 고리화(cyclization)되면서, 파낙사트리올(Panaxatriol)이나 파낙사디올(Panaxadiol)이 형성된다(Shibata S. et al.,

1963; Shibata S. et al., 1974; Shibata S. et al., 1974).

- [0009] 한편, 진세노사이드가 체내로 들어올 경우, Rb1, Rb2, Rc, Rg1 등의 진세노사이드는 체내의 장내 미생물에 의해 분해가 되어 흡수가 가능하게 된다(Hasegawa H. et al., 1996). 진세노사이드가 순차적으로 장내 미생물에 의해 분해가 되어 Rb1의 경우 Rd, 화합물 K(Compound K), 프로토파낙사다올로 순차적 전환이 되지만, 사실상 사람의 체질 및 식습관에 따라 미생물의 존재 유무와 보유 정도가 다르기 때문에 대사산물의 전환에 의한 흡수 정도에도 상당한 차이를 지니고 있으며, 그로 인한 효능에도 상당한 차이를 나타낼 수 있다(Akao T. et al., 1998).
- [0010] 따라서 대사산물의 전환에 의한 효능과 체내 흡수율의 차이를 없애기 위해, 미생물에 의한 인삼 내 진세노사이드의 전환을 통해 체내의 진세노사이드 흡수율을 높이고, 동시에 특정 형태로의 진세노사이드 전환을 통해 효능적으로 강화된 발효인삼에 대한 개발 필요성이 제기되고 있다.
- [0011] 사료(feed)란 가축이 생명을 유지하고 축산물을 생산하고 성장, 번식, 수유하는데 필요한 유기물, 무기물 영양소를 함유하고 있는 물질을 말한다. 좋은 사료의 조건은 가축에 영양소 공급 능력이 높고, 무해, 무독해야 하며 생산량이 많고 손쉽게 이용할 수 있어야 하고 영양소가 쉽게 변질되지 않고 신선해야 하며 영양소의 소화율이 높아야 한다.
- [0012] 사료 제조에 사용되는 재료로는 곡류(grains), 강피류(barns), 유박류(oil meals), 가공부산물(industry by-products), 동물질사료(feeds from animals), 과채류(fruits and vegetables), 괴경류(root and stems), 농산 부산물(farm by-products), 청예작물류(soiling crops), 싸일리지(silage) 등 다양한 것들이 사용된다. 그러나 이러한 재료들에는 동물들이 소화시키지 못하는 난소화성 성분들이 다수 포함되어 있다.
- [0013] 한 예로, 대두박의 경우, 대두박은 콩을 분쇄하여 헥산(hexan)으로 기름을 추출하고 남은 부산물로, 구성성분은 건조 중량을 기준으로 단백질 55~56%, 가용성 탄수화물 13~14%, 불용성 탄수화물 21~22%, 회분 4~6%, 지방 1% 내외로 구성되어 있다(한인규, 1998). 탄수화물의 경우 대두박에는 단당류(monosaccharide)가 거의 없으며 올리고당(oligosaccharide)은 수크로스(sucrose) 8.1%, 말토스(maltose) 0.6%, 라피노스(raffinose) 1.1%, 스타키오스(stachyose) 4.9% 등으로 구성되어 있고 다당류(polysaccharide)는 아라비난(arabinan) 15.0%, 아라비노갈락탄(arabinogalactan) 5.0%, 헤미셀룰로스(hemicellulose) 3.5%, 셀룰로스(cellulose) 2.0% 등으로 구성되어 있다. 이들 중 스타키오스와 라피노스는 α -갈락토실(α -galactosyl) 결합으로 이루어져 있어 α -갈락토시다아제(α -galactosidase) 효소를 갖지 않은 동물의 이들을 소화할 능력이 없다(Stale R. et al., 1999).
- [0014] 따라서, 사료의 품질 향상을 위해 사료용 원료에 함유되어 있는 난소화성 성분의 분해를 도울 수 있는 미생물 발효기술을 이용한 기술개발이 국내외적으로 활발하게 추진되고 있다.
- [0015] 이에, 본 발명자는 수많은 발효 미생물들 중 진세노사이드의 체내 흡수율을 높일 수 있는 진세노사이드로의 전환 활성이 있고, 난소화성 성분을 분해할 수 있는 미생물을 동정하기 위해 지속적으로 연구한 결과 β -글루코시다아제 효소 활성 및 α -갈락토시다아제 효소 활성을 모두 가지고 있는 미생물을 확보함으로써 본 발명을 완성할 수 있었다.
- [0016] 종래 선행기술로서 한국등록특허 제1423100호에서는 진세노사이드 Rg3 및 Rb1의 함량을 증폭시키는 발효홍삼의 제조 방법이 개시되어 있으나, 본 발명에서 이용된 균주와는 전혀 다른 균주를 이용하였다. 또한, 한국등록특허 제1343434호, 한국등록특허 제1343410호, 및 한국등록특허 제 1345226호에서는, 인삼 발효능을 갖는 락토바실러스 플랜타럼 균주, 엔테로코커스 패칼리스 균주 및 패니바실러스 속 엠비티213 균주가 각각 개시되어 있고, 이 균주를 이용하여 발효 인삼을 제조하는 방법이 개시되어 있으나, 본 발명과는 전혀 다른 균주를 이용하여 발효 인삼을 제조하고 있는 점에서 본 발명의 구성과 차이가 있다.
- [0017] 또한, 한국공개특허 제2014-0061915호에서는 신규한 미생물 바실러스 코아쿨란스 KM-1을 이용한 발효대두박 및 양어용 사료의 제조방법에 대해 개시되어 있으나, 본 발명과는 다른 균주를 이용하였다.

선행기술문헌

특허문헌

- [0018] (특허문헌 0001) 한국등록특허 제1423100호, 진세노사이드 Rg3 및 Rb1의 함량을 증폭시키는 발효홍삼의 제조 방법, 2014. 07. 18. 등록.
- (특허문헌 0002) 한국등록특허 제1343434호, 인삼 발효능을 갖는 신규 엔테로코커스 패칼리스 C RNB-A 3(K

C T C 1 1 9 3 0 B P) 균주 및 이를 이용 한 사포닌 전환 방법, 2013. 12. 13. 등록.

(특허문헌 0003) 한국등록특허 제1343410호, 인삼 발효능을 갖는 신규 락토바실러스 플랜타럼 C R N B-2 2 (K C T C 1 1 9 3 1 B P) 균주 및 이를 이용 한 사포닌 전환 방법, 2013. 12. 13. 등록.

(특허문헌 0004) 한국등록특허 제1345226호, 신규한 페니바실러스 속 엠비티213 균주, 이를 이용한 발효인삼 및 이를 이용한 발효인삼 추출물을 함유하는 아토피 피부염의 예방 또는 치료용 조성물, 2013. 12. 19. 등록.

(특허문헌 0005) 한국공개특허 제2014-0061915호, 신규한 미생물 바실러스 코아굴란스 KM-1, 및 이를 이용한 발효대두박 및 양어용 사료의 제조 방법, 2014. 05. 22. 공개.

비특허문헌

[0019] (비특허문헌 0001) 한인규, 사료가공학, 선진문화사, 67~107, 1998.

(비특허문헌 0002) Akao T. et al., Intestinal bacterial hydrolysis is required for the appearance of compound K in rat plasma after oral administration of ginsenoside Rb1 from Panax ginseng, J. Pharm. Pharmacol., 50(10), 1155-1160, 1998.

(비특허문헌 0003) Hasegawa H. et al., Main ginseng saponin metabolites formed by intestinal bacteria, Planta Med., 62(5), 453-457, 1996.

(비특허문헌 0004) Shibata S. et al. Studies on the constituents of Japanese and Chinese crude drugs. X I. Panaxadiol, a sapogenin of ginseng roots, Chem. Pharm. Bull. 11, 759-761, 1963.

(비특허문헌 0005) Shibata S. et al., Studies on the saponins of Ginseng. II. Structures of ginsenoside-Re, -Rf and -Rg2, Chem. Pharm. Bull. 22, 2407-2421, 1974.

(비특허문헌 0006) Shibata S. et al., Studies on the saponins of Ginseng. I. Structures of ginsenoside-Ro, -Rb1, -Rb2, -Rc and -Rd, Chem. Pharm. Bull. 22, 421-428, 1974.

(비특허문헌 0007) Stale R. et al., Nutrient digestibility in Atlantic salmon and broiler chickens related to viscosity and non-starch polysaccharide content in different soyabean products, Aniaml Feed Science and Technology, 97(4), 331-345, 1999.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0020] 본 발명의 목적은 신규한 바실러스 코아굴란스 NRR1207 균주(*Bacillus coagulans* NRR1207, 미생물 수탁번호 KACC92114P) 및 이를 이용한 발효 인삼을 제공하는데 있다.

[0021] 또한, 본 발명의 목적은 상기 바실러스 코아굴란스 NRR1207 균주를 이용한 프로바이오틱스 생균제제 조성물을 제공하는데 있다.

과제의 해결 수단

[0022] 본 발명은 신규한 바실러스 코아굴란스 NRR1207 균주(*Bacillus coagulans* NRR1207, 미생물 수탁번호 KACC92114P)에 관한 것이다.

[0023] 또한, 본 발명은 바실러스 코아굴란스 NRR1207 균주(*Bacillus coagulans* NRR1207, 미생물 수탁번호 KACC92114P)를 이용한 발효 인삼의 제조방법 및 이를 통해 제조한 발효 인삼에 관한 것이다.

[0024] 본 발명은, 또한 바실러스 코아굴란스 NRR1207 균주(*Bacillus coagulans* NRR1207, 미생물 수탁번호 KACC92114P)를 포함하는 프로바이오틱스 생균제제 조성물에 관한 것이다.

[0025] 이하 본 발명을 상세하게 설명한다.

[0026] 상기 바실러스 코아굴란스 NRR1207 균주의 최적 발육온도는 30℃ 내지 40℃이고, 바람직하게는 35℃이며, 균주

의 최적 발육 pH 범위는 6.0 내지 7.0이고, 바람직하게는 6.5이다.

- [0027] 상기 바실러스 코아굴란스 NRR1207 균주(*Bacillus coagulans* NRR1207, 미생물 수탁번호 KACC92114P)는 알칼리 포스파타아제(alkaline phosphatase), 에스테라아제(esterase), 에스테라아제 리파아제(esterase lipase), 리파아제(lipase), 루신아릴아미다아제(leucinearylaminidase), 발린아릴아미다아제(valinearylaminidase), 산성 포스파타아제(acid phosphatase), 나프톨-AS-BO-포스포히드로라아제(naphtol-AS-BO-phosphohydrolase), α -갈락토시다아제(α -galactosidase), β -갈락토시다아제(β -galactosidase), β -글루쿠로니다아제(β -glucuronidase), α -글루코시다아제(α -glucosidase), β -글루코시다아제(β -glucosidase), N-아세틸- β -글루코사미다아제(N-acetyl- β -glucosamidase) 및 α -만노시다아제(α -mannosidase) 효소 활성을 가진다.
- [0028] 상기 β -글루코시다아제(β -glucosidase) 효소는 진세노사이드를 전환하는 활성을 가지는 것으로 체내 흡수율이 낮은 진세노사이드를 흡수율이 높은 진세노사이드로 전환시킬 수 있다.
- [0029] 보다 자세하게는, 본 발명의 바실러스 코아굴란스 NRR1207 균주(*Bacillus coagulans* NRR1207, 미생물 수탁번호 KACC92114P)가 가지고 있는 β -글루코시다아제(β -glucosidase) 효소는 진세노사이드 Rb1 및 Rb2를 진세노사이드 Rd로 전환시킬 수 있고, 특히나 진세노사이드 Rb1의 진세노사이드 Rd로의 전환 활성이 매우 우수하다.
- [0030] 또한, 상기 α -갈락토시다아제(α -galactosidase)는 α -D-갈락토시드 결합을 가수분해하고 D-갈락토오스(D-galactose)를 유리하는 효소로 난소화성 다당류의 분해에도 작용한다.
- [0031] 본 발명의 바실러스 코아굴란스 NRR1207 균주(*Bacillus coagulans* NRR1207, 미생물 수탁번호 KACC92114P)가 가지고 있는 α -갈락토시다아제(α -galactosidase) 효소는 난소화성 다당류인 셀룰로스(cellulose), 헤미셀룰로스(hemicellulose), 펙틴(pectin), 스타키오스(starchyose) 및 라피노스(raffinose)를, 보다 바람직하게는 스타키오스(starchyose) 및 라피노스(raffinose)를 분해하는 활성이 우수하다.
- [0032] 또한, 본 발명의 바실러스 코아굴란스 NRR1207 균주(*Bacillus coagulans* NRR1207, 미생물 수탁번호 KACC92114P)는 단백질을 분해하는 효소 활성을 가지고 있다.
- [0033] 본 발명은 상기 바실러스 코아굴란스 NRR1207 균주(*Bacillus coagulans* NRR1207, 미생물 수탁번호 KACC92114P)를 이용한 발효 인삼의 제조 방법에 관한 것으로, i) 인삼 뿌리를 세절하여 15% 내지 25%, 바람직하게는 20%의 인삼용액을 제조하는 단계; ii) 상기 인삼용액을 65℃ 내지 85℃에서 5분 내지 15분, 바람직하게는 75℃에서 10분 동안 가열하는 단계; iii) 가열한 인삼 용액에 바실러스 코아굴란스 NRR1207 균주를 접종하는 단계; 및 iv) 균주를 접종한 인삼용액을 20℃ 내지 40℃에서 7일 내지 14일, 바람직하게는 30℃에서 11일 동안 발효하는 단계; 를 포함할 수 있다.
- [0034] 또한, 본 발명은 상기 제조 방법을 통해 제조된 발효 인삼에 관한 것이다.
- [0035] 상기 발효 인삼의 제조에 이용되는 인삼은 파낙스(*Panax*) 속에 속하는 다년생 식물로, 고려인삼(*Panax ginseng*), 화기삼(*Panax quinquefolia*), 전칠삼(삼칠, *Panax notoginseng*), 죽절삼(*Panax japonicus*), 허말라야삼(*Panaxa pseudoginseng*), 베트남삼(*Panax vietnamensis*), 파낙스 엘레가티오르(*Panax elegatior*), 파낙스 완지아누스(*Panax wangianus*) 및 파낙스 비핀라티피두스(*Panax bipinratifidus*), 파낙스 안구스티폴리움(*Panax angustifolium*)에서 선택되는 1종 이상의 인삼을 이용할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 아울러 이들 인삼은 단독으로 또는 2종 이상 조합하여 사용할 수도 있다.
- [0036] 상기 인삼은 4년 내지 6년 된 인삼의 뿌리를 이용하는 것이 바람직하다.
- [0037] 또한, 본 발명은 바실러스 코아굴란스 NRR1207 균주(*Bacillus coagulans* NRR1207, 미생물 수탁번호 KACC92114P)를 포함하는 프로바이오틱스 생균제제 조성물에 관한 것이다.
- [0038] 상기 생균제란 생체에 유익한 미생물을 함유하는 제품을 말하는 것으로, 장내이상 발효, 설사, 소화불량에 이용할 수 있는 인체용과 가축의 발육촉진, 설사예방 등의 생산성 향상을 위한 가축용으로 나뉘어 있다. 가축용 프로바이오틱스 생균제제는 가축 사료용 프로바이오틱스 생균제제로서 가축사료에 포함되어 있는 난소화성 다당류의 분해를 촉진하여 가축의 장내 소화 및 흡수를 도와줄 수 있도록 한다.

발명의 효과

- [0039] 본 발명은 신규한 바실러스 코아굴란스 NRR1207 균주(*Bacillus coagulans* NRR1207, 미생물 수탁번호 KACC92114P) 및 이를 이용한 발효인삼을 제공한다. 상기 바실러스 코아굴란스 NRR1207 균주는 생체 이용률이 낮

은 인삼의 진세노사이드를 생체 흡수가 잘되는 진세노사이드로 전환시키는 효과가 우수하다.

[0040] 또한, 본 발명의 신규한 바실러스 코아굴란스 NRR1207 균주를 이용한 프로바이오틱스 생균제제 조성물을 제공한다. 상기 바실러스 코아굴란스 NRR1207은 사료용 원료에 함유된 난소화성 성분인 스타키오스(stachyose) 및 라피노스(raffinose)를 분해하는 기능이 우수하다.

[0041] 따라서, 본 발명의 신규한 바실러스 코아굴란스 NRR1207 균주를 이용하여 건강기능식품 개발 및 난소화성 성분 및 단백질 분해 가축용 생균제제 개발에 이용할 수 있을 것으로 기대된다.

도면의 간단한 설명

[0042] 도 1은 바실러스 코아굴란스 NRR1207 균주의 16s rDNA 유전자 염기서열(A) 및 분자계통학적 분류(B, 하단, unknown이 NRR1207임)를 나타낸다.

도 2는 인삼뿌리에 바실러스 코아굴란스 NRR1207 균주를 접종하여 30℃에서 0일(A), 7일(B) 및 14일(C)간 반응시킨 발효인삼의 진세노사이드 성분 전환을 확인한 HPLC 분석 결과를 나타낸다.

도 3은 대두박의 고상 발효를 이용하여 바실러스 코아굴란스 NRR1207의 발효 시간에 따른 생균수를 측정한 결과를 나타낸다.

도 5는 대두박의 탄수화물 분석을 위한 프룩토스(fructose), 글루코스(glucose), 멜리비오스(melibiose), 스타키오스(stachyose), 수크로스(sucrose) 및 라피노스(raffinose)의 HPLC 표준 그래프를 나타낸다.

도 6은 바실러스 코아굴란스 NRR1207 균주를 이용한 대두박의 고상 발효 후 대두박의 탄수화물 분석 결과를 나타낸다. 발효 시간에 따른 대두박의 탄수화물 변화를 확인하기 위해 발효 0일(A), 1일(B), 3일(C) 및 7일(D)째의 시료를 가지고 HPLC로 분석하였다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0043] 이하 본 발명의 바람직한 실시예를 상세히 설명하기로 한다. 그러나, 본 발명은 여기서 설명되는 실시예에 한정되지 않고 다른 형태로 구체화될 수도 있다. 오히려, 여기서 소개되는 내용이 철저하고 완전해지고, 당업자에게 본 발명의 사상을 충분히 전달하기 위해 제공하는 것이다.

[0044] <실시예 1. 신규 미생물의 분리 및 동정>

[0045] 유산균의 기능을 가진 유산을 생산하면서 β-글루코시다제(β-glucosidase) 분비능력이 있는 바실러스(*Bacillus*) 종을 선별하기 위해, 미생물 분리원인 발효액을 유산균 선택배지(BCP, 노란색으로 변함)와 에스쿨린 배지(esculine agar, β-글루코시다제 활성 확인, 흑갈색으로 변함)에서 37℃ 및 30℃로 배양하였다. 배양 후 활성이 나타난 콜로니(colony)를 분리하여 16S rDNA를 분석하였다.

[0046] 상기 균주의 DNA를 추출하여 16S rDNA를 분석하였다. 상기 균주 DNA를 추출하고, 27F 프라이머(27F primer)세트(5'-AGAGTTTGATCACTGGCTCAG-3', 5'-GGTTACCTGTTCAGACTT-3)를 이용하여 PCR을 행하여 16S rDNA(16S rRNA 코딩 유전자)를 증폭하였다. 증폭조건은 95℃에서 3분간 초기 변성(pre-denaturation)시킨 다음 94℃에서 denaturation 20초, 56℃에서 annealing 40초, 72℃에서 extension 40초간을 30회 반복하고, 72℃에서 3분간 최종 extension을 실시하였다. 증폭된 16S rDNA는 PCR 산물 정제 키트(Product Purification Kit, Qiagen)를 사용하여 정제한 후, Genetic analyzer 377(Perkin-Elmer)을 사용하여 유전 정보를 분석하였다.

[0047] 16S rDNA 염기서열(도 1A 참조)에 기초한 분자계통학적 분석 결과, 바실러스(*Bacillus*) 속(genus)에 속하는 균주로 바실러스 코아굴란스(*Bacillus coagulans*) 표준 균주와 99.9%의 가장 높은 상동 관계를 보여주는 균주로 확인되었다(도 1B 참조). 따라서, 상기 균주는 바실러스 속 균주로 동정되었고 바실러스 코아굴란스 NRR1207 균주(*Bacillus coagulans* NRR1207)로 명명하여 국립농업과학원 농업유전자원정보센터에 2015년 12월 15일 미생물 수탁번호 KACC92114P로 기탁하였다.

[0048] <실시예 2. 분리균의 효소 활성 확인>

[0049] 상기 실시예 1에서 동정한 바실러스 코아굴란스 NRR1207 균주의 효소 활성을 확인하기 위해 API ZYM kit(Bio Merieux Inc., Mercy I' Etoile, France)를 이용하였다.

[0050] 선별된 균주를 액체배지에(0.085% NaCl, Ref 20070, Bio Merieux, France)에 현탁해 표준 탁도 농도 McFarland No 5.0-6.0 standard(Bio Merieux, France)를 맞춘 다음 API ZYM 19 dehydrated chromo-genic enzyme

substrates에 50 μ l씩 분주 후 현탁하고 37℃에서 4시간 동안 배양하였다. 효소 활성은 20, 30, 40 $\leq$ nanomoles로 구분된 표준효소활성 도표를 기준으로 배양이 끝난 API kit에 나타난 색깔로 구분하여 측정하였다.

[0051] 바실러스 코아굴란스 NRR1207의 효소 활성의 경우 효소 활성의 최대값을 5로 정하고, 색깔에 따른 효소 활성을 측정하였고, 이를 표 1에 나타내었다.

표 1

[0052]

효소	활성
대조군	0
알칼리 포스파타아제(Alkaline phosphatase)	4
에스테라아제(Esterase) (C4)	4
에스테라아제 리파아제(Esterase lipase) (C8)	4
리파아제(Lipase) (C14)	1
루신아릴아미다아제(Leucinearylamidase)	3
발린아릴아미다아제(Valinearylamidase)	1
시스티니어릴아미다아제(Cystinearylamidase)	0
트립신(Trypsin)	0
α -키모트립신(α -chymotrypsin)	0
산성 포스파타아제(Acid phosphatase)	5
나프톨-AS-BO-포스포히드로라아제(Naphtol-AS-BO-phosphohydrolase)	5
α -갈락토시다아제(α -galactosidase)	5
β -갈락토시다아제(β -galactosidase)	5
β -글루쿠로니다아제(β -glucuronidase)	2
α -글루코시다아제(α -glucosidase)	5
β -글루코시다아제(β -glucosidase)	2
N-아세틸- β -글루코사미다아제(N-acetyl- β -glucosamidase)	1
α -만노시다아제(α -mannosidase)	1
α -푸코시다아제(α -fucosidase)	0

[0053] 상기 표 1에서 보여주듯이, 본 발명의 신규한 바실러스 코아굴란스 NRR1207 균주의 경우 인삼사포닌 성분인 진세노사이드(ginsenoside)를 변환할 수 있는 β -글루코시다아제(β -glucosidase) 활성이 2로 나타났고, 곡류 성분 중 난소화성인 스타키오스(stachyose) 및 라피노스(raffinose)를 분해할 수 있는 α -갈락토시다아제(α -galactosidase) 활성은 5로 최대의 효소 활성을 나타내는 것을 알 수 있었다.

[0054] <실시예 3. 바실러스 코아굴란스 NRR1207 균주를 이용한 발효 인삼의 제작 및 진세노사이드의 전환 효과 확인>

[0055] 인삼뿌리를 세절하여 20% 인삼 뿌리용액을 제조 한 후 75℃에서 10분간 가열 처리하였고, 여기에 본 발명의 바실러스 코아굴란스 NRR1207을 접종하고 30℃에서 7일 내지 14일 동안 배양하였다. 대조군으로는 바실러스 코아굴란스 NRR1207을 접종하지 않은 시료를 이용하였다. 배양 후 배양액을 6,000 $\times$ g에서 3분간 원심 분리하여 상층액을 취한 뒤 동결 건조시켰다.

[0056] 동결 건조시킨 상기 상층액으로부터 진세노사이드의 변환을 확인하기 위해 HPLC(LC-6AD, Shimadzu Co., Japan) 분석을 수행하였고, 그 결과를 도 2에 나타내었다. 이때 사용한 컬럼은 ACE 5-C₁₈ 컬럼(250 $\times$ 4.6mm)을 사용하였으며, 사포닌의 성분을 분석한 조건은 하기 표 2와 같다.

표 2

[0057]

사포닌의 성분 분석 조건	
컬럼	ACE 5-C ₁₈ (250 $\times$ 4.6mm)
유량 (Flow rate)	1.0ml/min
디텍터 (Detector)	UV detector, 205nm

용매(Solvent)	A; H ₂ O, B; CH ₃ CN 0~35분(20% B), 35~85분(40% B), 85~105분(50% B), 105~135분(65% B), 135~145분(85% B), 145~155분(100% B), 155~160분(100% B), 160~163분(20% B), 163~165분(20% B)
온도	40℃

[0058] 도 2에서 보여주듯이, 인삼뿌리 발효에 의해 진세노사이드의 변환은 대조군(도 2A)에 비해 발효 7일(도 2B)과 14일(도 2C)째 시료에서 진세노사이드 Rb1은 감소되고, Rd가 현저히 증가되었다. 이를 통해 발효 과정 중 바실러스 코아굴란스 NRR1207에 의해 분비된 효소에 의해 진세노사이드가 전환되었음을 알 수 있었다.

[0059] <실시예 4. 바실러스 코아굴란스 NRR1207 균주를 이용한 난소화성 성분의 분해 효과 확인>

[0060] 실시예 4-1. 대두박의 고상발효를 이용한 바실러스 코아굴란스 NRR1207의 발효 시간 조건 확인

[0061] 상기 바실러스 코아굴란스 NRR1207 균주의 고상발효 시간에 따른 생균수 측정을 통해 발효시간을 확인하였다.

[0062] 10%의 수분을 함유하는 대두박 40g에 물 60g을 첨가하고 바실러스 코아굴란스 NRR1207 균주를 스타터로 대두박 및 물 혼합물 중량의 5%가 되도록 접종하고 통성혐기상태로 36℃에서 0, 4, 8, 12, 16, 24 48 및 72시간 배양하여 균수를 10진법으로 희석하여 BCP 배지(BCP agar)를 이용하여 측정하였다. 발효 시간에 따른 생균수 측정 결과를 도 3에 나타내었다.

[0063] 도 3을 통해 알 수 있듯이, 0시간 내지 16시간까지 발효한 경우 바실러스 코아굴란스 NRR1207 균주의 생균수가 급속히 증가하여 발효 16시간에는 생균수가 최대치인 9.45×10^8 CFU/ml에 도달하였고, 그 후로 점차 감소하여 발효 72시간째는 생균수가 1.65×10^8 CFU/ml이 되는 것을 확인하였다.

[0064] 실시예 4-2. 대두박의 고상발효를 이용한 바실러스 코아굴란스 NRR1207의 난소화성 성분의 분해 효과 확인

[0065] 10%의 수분을 함유하는 대두박 40g에 물 60g을 첨가하고 바실러스 코아굴란스 NRR1207 균주를 대두박 및 물 혼합물 중량의 5%가 되도록 접종한 후 비닐봉지로 밀봉하였다. 밀봉한 대두박을 35℃ 배양기에서 7일 동안 배양한 후 대두박의 탄수화물을 분리하여 HPLC로 분석하였다. 이때, 프룩토스(fructose), 글루코스(glucose), 멜리비오스(melibiose), 스타키오스(stachyose), 수크로스(sucrose) 및 라피노스(raffinose)를 이용해 표준 그래프를 얻었고, 그 결과를 도 4에 나타내었다.

[0066] 도 4에서 보여주듯이, 프룩토스는 13.703분에서, 글루코스는 12.673분에서, 멜리비오스는 10.843분에서, 스타키오스는 9.333분에서, 수크로스는 10.9분에서, 라피노스는 9.947분에서 분리되는 것을 알 수 있었다.

[0067] 도 5의 경우에는 대두박의 발효 전 및 후의 탄수화물의 변화를 보여주고 있다. 도 5에서 보여주듯이, 대두박 발효 0일 시료(도 5A)의 경우 스타키오스와 라피노스가 분리되지 않고 동시에 하나의 피크(peak)에 혼합되어 나타났다. 이는 표준 그래프(도 4)에서 보여주듯이 스타키오스와 라피노스의 분리시간 차이가 아주 적기 때문에 나타날 수 있는 결과이다. 발효 1일 경과 후(도 5B) 그래프에서는 스타키오스와 라피노스가 분리되었고, 피크의 크기도 줄어들었으며 발효 3일(도 5C)의 경우에는 스타키오스의 피크는 없어졌고 라피노스의 피크는 1일에 비해 현저히 작아진 것으로 나타났다. 발효 7일(도 5D)에는 스타키오스와 라피노스의 피크가 모두 없어진 것을 확인하였다. 이를 통해 대두박에서 난소화성 성분인 스타키오스와 라피노스가 바실러스 코아굴란스 NRR1207 균주에 의해 완전히 분해되었음을 알 수 있다.

[0068] <실시예 5. 바실러스 코아굴란스 NRR1207 균주의 배양>

[0069] 유산균 배지인 MRS 배지(pH 6.5) 1ℓ에 바실러스 코아굴란스 NRR1207 균주를 배지 부피의 3%가 되도록 접종한 다음 35℃에서 48시간 동안 교반하면서 배양하여 균주를 확보하였다.

수탁번호

[0070]

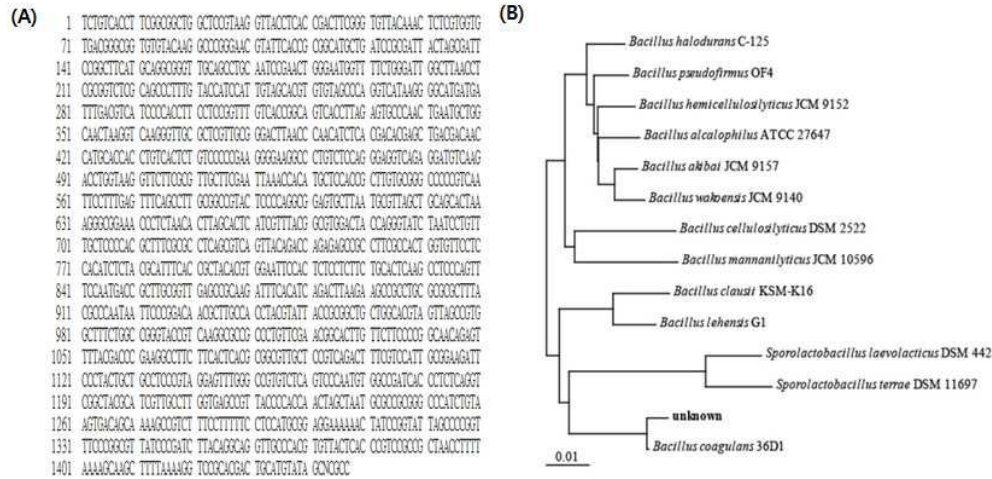
기탁기관명 : 국립농업과학원

수탁번호 : KACC92114P

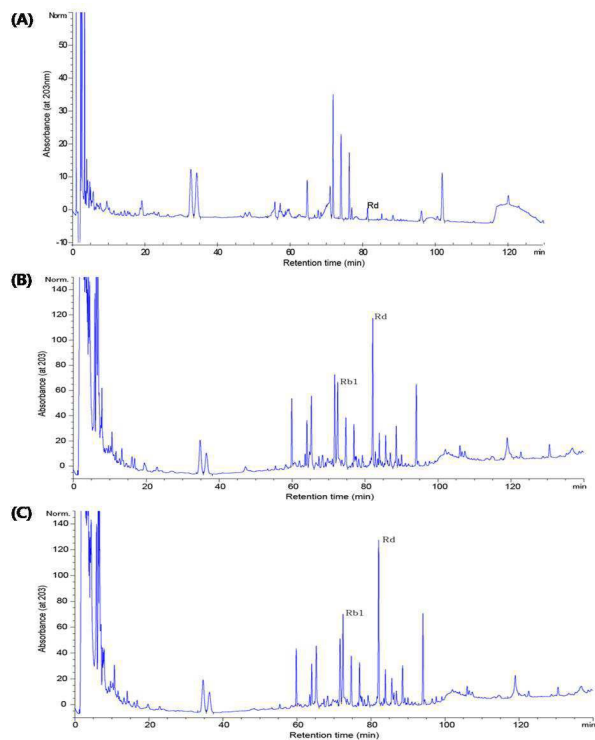
수탁일자 : 20151215

도면

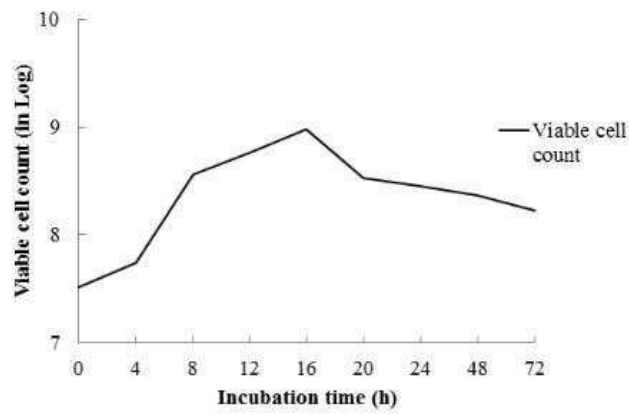
도면1



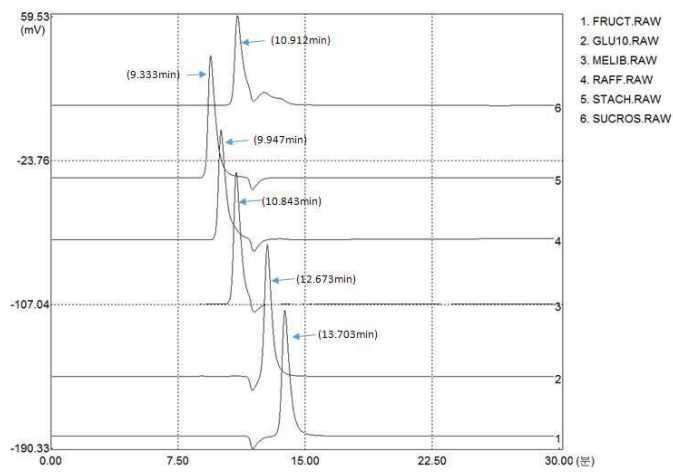
도면2



도면3



도면4



도면5

