



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2020-0029163
(43) 공개일자 2020년03월18일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12N 9/26 (2006.01)

(52) CPC특허분류

C12N 9/2414 (2013.01)

C12Y 302/01001 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2018-0107595

(22) 출원일자 2018년09월10일

심사청구일자 2018년09월10일

(71) 출원인

한림대학교 산학협력단

강원도 춘천시 한림대학길 1, 한림대학교(옥천동)

한국식품연구원

전라북도 완주군 이서면 농생명로 245

(72) 발명자

심재훈

강원도 춘천시 지석로 67, 210동 201호 (석사동,
현진에버빌2차)

우승혜

경기도 구리시 검배로 142, 203동 1602호

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

특허법인태동

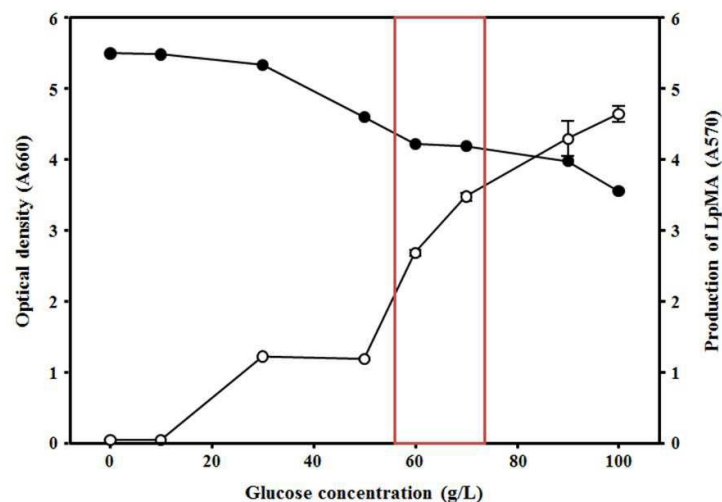
전체 청구항 수 : 총 4 항

(54) 발명의 명칭 락토바실러스 플란타룸을 이용한 LpMA의 최적 생산 방법

(57) 요약

본 발명은 전분 노화방지에 효과가 있는 락토바실러스 플란타룸 내의 조효소인 LpMA (*L. plantarum* maltose-producing α -amylase)의 생산 방법에 관한 것으로, 본 발명에 의할 경우 조효소 (LpMA)를 고생산성으로 생산할 수 있다.

대표도 - 도3



(72) 발명자

신유정

강원도 양양군 양양읍 미륵길 40, 101동 304호

정현모

전라북도 임실군 강진면 백련2길 19-4

최희돈

서울특별시 송파구 올림픽로 435, 225동 2504호(신천동, 파크리오)

홍정선

전라북도 전주시 완산구 천경로 29-11

최윤상

전라북도 전주시 덕진구 오공로 71, 103동 1101호(중동, 호반베르디움)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 E0164800-03

부처명 과학기술정보통신부

연구관리전문기관 한국식품연구원

연구사업명 한국식품연구원 주요사업

연구과제명 전분질 식품소재의 노화억제 기술 개발

기 여 율 1/1

주관기관 한국식품연구원

연구기간 2018.01.01 ~ 2018.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

말토오스, 글루코오스 및 프룩토오스 중 선택되는 어느 하나 이상의 당(糖)이 첨가된 배지에, 락토바실러스 플란타룸 (*Lactobacillus plantarum*)을 배양하는 것을 특징으로 하는 LpMA (*L. plantarum* maltose-producing α -amylase)의 생산 방법.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 락토바실러스 플란타룸 (*Lactobacillus plantarum*)은,

락토바실러스 플란타룸 서브스피시스 플란타룸 (*Lactobacillus plantarum* subsp. *plantarum*) ST-III (KCTC 3015)인 것을 특징으로 하는 LpMA (*L. plantarum* maltose-producing α -amylase)의 생산 방법.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 당(糖)은,

배지에 3~10%(w/v) 첨가되는 것을 특징으로 하는 LpMA (*L. plantarum* maltose-producing α -amylase)의 생산 방법.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 LpMA는,

조효소액 형태인 것을 특징으로 하는 LpMA (*L. plantarum* maltose-producing α -amylase)의 생산 방법.

발명의 설명

기술분야

[0001] 본 발명은 락토바실러스 플란타룸을 이용한 LpMA의 최적 생산 방법에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 전분 노화 방지에 효과가 있는 락토바실러스 플란타룸 내에서 발현되는 효소인, LpMA (*L. plantarum* maltose-producing α -amylase)의 생산량을 증대하는 방법에 관한 것이다.

배경기술

[0003] 전분의 노화는 식품을 장기간 저장하는 경우, 식품 내 수분이 감소하는 과정에서 아밀로펙틴 크리스탈을 형성하는 현상을 말하며, 호화전분을 실온에 장시간 방치하는 경우, 전분 분자들이 수소결합에 의해 다시 회합(association)된다. 이는 알파화된 전분(호화전분)이 베타 전분으로 회귀하여 미세한 결정을 형성하는 현상을 의미한다.

- [0004] 이러한 전분의 노화에 영향을 주는 인자들은 전분의 종류, 전분의 농도, pH, 수분, 온도, 염과 각종 이온의 존재 등이 있으며, 일 예로 아밀로오스 함량이 높은 전분은 노화가 잘 일어나고, 산성조건이나 60℃ 이하에서 노화가 촉진되는 반면, 염과 각종이온이 존재하는 경우에는 노화가 억제된다.
- [0005] 전분노화를 방지하기 위하여 여러 연구가 진행되어 왔으나, 변이효소 (mutant enzyme), GMO 제빵효모에 대한 거부감, 제품 특유의 물성 상실 등 실사용에 따른 어려움이 존재해왔다.
- [0006] 이러한 문제를 해결하기 위한 방안으로, 본 발명자는 대한민국특허출원 제10-2017-0037919호를 통해, 그라스 (generally recognized as safe, GRAS) 균주인 락토바실러스 플란타룸 (*Lactobacillus plantarum*)을 이용하여 전분 노화지연에 효과가 있는 조효소액을 발굴하였는데, 이 역시도 락토바실러스 플란타룸 (*Lactobacillus plantarum*) 내에서 발현되는 양이 극히 미미하여, 실제 전분제품의 가공공정에 이용되기에는 비효율적이며 비경제적인 문제가 존재하였다.

선행기술문헌

특허문헌

- [0008] (특허문헌 0001) 대한민국등록특허 제10-0630277호 (2006.09.29.)에는, 전분의 노화를 지연시키는 넌-말토제닉 엑소아밀라제에 관한 내용이 기재되어 있다.
- (특허문헌 0002) 대한민국공개특허 제10-2016-0146191호 (2016.12.21.)에는, 유산균을 함유한 미세캡슐 쌀가루 및 이를 이용한 떡 제조용 프리믹스의 제조방법에 관한 내용이 기재되어 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0009] 본 발명은 전분 노화를 효과적으로 억제할 수 있는 것으로, 락토바실러스 플란타룸 (*Lactobacillus plantarum*) 내에서 발현되는 효소 (LpMA)의 양을 증대시킬 수 있는 방법을 개발하여 제공하고자 한다.

과제의 해결 수단

- [0011] 본 발명은 말토오스, 글루코오스 및 프룩토오스 중 선택되는 어느 하나 이상의 당(糖)이 첨가된 배지에, 락토바실러스 플란타룸 (*Lactobacillus plantarum*)을 배양하는 것을 특징으로 하는 LpMA (*L. plantarum* maltose-producing α -amylase)의 생산 방법에 관한 것이다.
- [0012] 본 발명의 LpMA (*L. plantarum* maltose-producing α -amylase)의 생산 방법에 있어서, 상기 락토바실러스 플란타룸 (*Lactobacillus plantarum*)은, 일 예로 락토바실러스 플란타룸 서브스피시스 플란타룸 (*Lactobacillus plantarum* subsp. *plantarum*) ST-III (KCTC 3015)일 수 있다.
- [0013] 본 발명의 LpMA (*L. plantarum* maltose-producing α -amylase)의 생산 방법에 있어서, 상기 당(糖)은, 바람직하게 배지에 3~10%(w/v) 첨가되는 것이 좋다.
- [0014] 본 발명의 LpMA (*L. plantarum* maltose-producing α -amylase)의 생산 방법에 있어서, 상기 LpMA는, 바람직하게 조효소액 형태인 것일 수 있다.

발명의 효과

- [0016] 본 발명에 의한 경우, 락토바실러스 플란타룸 (*Lactobacillus plantarum*) 내에서 발현되는 효소인 LpMA(*L. plantarum* maltose-producing α -amylase)를 최적의 생산성으로 생산할 수 있다. 이를 통해, 본 발명은 노화 억제 전분 제품의 가공 공정에 소요되는 비용을 절감하는데 기여할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0018] 도 1은 탄소원 종류에 따른 LpMA의 역가를 측정한 결과이다.
- 도 2는 글루코오스 농도에 따른 LpMA의 역가를 측정한 결과이다.
- 도 3은 글루코오스 농도에 따른 균체량과 LpMA 생산량을 비교한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0019] 본 발명은 말토오스, 글루코오스 및 프룩토오스 중 선택되는 어느 하나 이상의 당(糖)이 첨가된 배지에, 락토바실러스 플란타룸 (*Lactobacillus plantarum*)을 배양하는 것을 특징으로 하는 LpMA (*L. plantarum* maltose-producing α -amylase)의 생산 방법을 제공한다.
- [0020] 락토바실러스 플란타룸은 균주 내에서 다양한 탄수화물 분해효소를 생산하는데, 락토바실러스 플란타룸에서 발현되는 효소 중 LpMA (*L. plantarum* maltose-producing α -amylase)는 말토게닉아밀라아제 (maltogenic amylase)의 일종으로 탄수화물 기질을 가수분해하여 말토오스를 특이적으로 생산하는 효소이다 (Hye-Yeon Jeon et. al., Characterization of a Novel Maltose-Forming α -Amylase from *Lactobacillus plantarum* subsp. *plantarum* ST-III, J. Agric. Food Chem., 2016, 64 (11), pp 2307~2314).
- [0021] 본 발명자들은 이전 실험 (대한민국 특허출원 제10-2017-0037919호)에서 GRAS 균주들 내 탄수화물 유전체 탐색을 통하여, 유효 미생물을 선별하고, 선별된 미생물을 활용하여 생물전환 공정을 실시하여 전분의 특성변화를 분석함으로써 다양한 노화 억제 소재를 개발하고자 하였다. 이 과정에서 제빵에서는 사용이 드문 락토바실러스 플란타룸 서브스피시스 플란타룸 ST-III (KCTC 3015)의 세포 파쇄액이 제빵 시 전분 노화 억제에 탁월한 효과를 발휘하는 것을 확인하였고, 추가적으로 LpMA (*L. plantarum* maltose-producing α -amylase)가 그 효과를 발휘하게 하는 것임을 확인한 바가 있다. 다만, LpMA (*L. plantarum* maltose-producing α -amylase)의 생산량이 미미하여 이의 생산량을 늘리는 것이 과제로 남아 있었다.
- [0022] 본 발명은 이와 같은 문제를 해결한 것으로, 락토바실러스 플란타룸의 배양시, 탄소원으로 말토오스, 프룩토오스, 글루코오스를 첨가한 경우, 전분을 첨가하는 경우에 비해 LpMA (*L. plantarum* maltose-producing α -amylase)의 생산량이 우수함을 확인하고 본 발명을 완성한 것이다.
- [0023] 통상적으로 락토바실러스 플란타룸은 배지 중에 전분이 존재하는 경우, 생육을 위해 이를 단당류로 분해하고자 하며, 이때 다량의 전분분해효소 (예로서, 아밀라아제 등)를 생산하게 된다. 즉, 본 발명자들은 배지 중에 전분을 첨가할 경우, 전분을 분해하기 위해 락토바실러스 플란타룸이 LpMA (*L. plantarum* maltose-producing α -amylase)를 더 많이 생산할 것이라고 예상하였는데, 실험 결과는 그 예상과 다르게, 전분 보다는 단당류 또는 소당류(oligosaccharide)를 첨가한 경우 그 생산량이 더 높게 나타났다.
- [0024] 한편, 본 발명에서는 단당류 또는 소당류의 최적 첨가량을 확인해보고자 하였는데, 실험 결과 배지에 3~10%(w/v) 첨가하는 것이 가장 높은 LpMA 생산량을 나타냈다.
- [0025] 한편, LpMA를 최적의 생산성으로 얻기 위해서는 LpMA를 생산하는 균체도 많이 회수할 필요가 있는데 (총 LpMA 생산량 = 균체량 $\times$ 단위 균체당 LpMA 생산량), 균체 생산량 증대 조건 및 단위 균체당 LpMA 생산량을 고려했을 때, 6~7%(w/v)를 배지에 첨가하는 것이 좋게 나타났다.
- [0026] 한편, 본 발명에 따른 LpMA는 조효소액 형태 또는 정제하여 정제 효소 형태로 락토바실러스 플란타룸의 배양액으로부터 분리하여 사용할 수 있다. 락토바실러스 플란타룸은 GLAS 균주이기 때문에, 조효소액을 사용하여도 안정성 문제가 없으며, 정제를 거쳐 정제 효소로 수득하는 것보다 경제적인 장점이 있다.
- [0028] 이하, 본 발명의 내용을 하기 실시예를 통해 더욱 상세히 설명하고자 한다. 다만, 본 발명의 권리범위가 하기 실시예에만 한정되는 것은 아니고, 그와 등가의 기술적 사상의 변형까지를 포함한다.

[실시예 1: 탄소원 종류에 따른 LpMA 생산량의 변화 비교]

[0031] (1) 락토바실러스 플란타룸 서브스피시스 플란타룸 (*Lactobacillus plantarum* subsp. *plantarum*) ST-III의 균체량 비교

[0032] 탄소원의 종류에 따른 LpMA 생산량의 변화를 비교하기 위하여, 기존 MRS 배지 5.5g에 가용성전분(soluble starch), 글리코겐(glycogen), 수용성 옥수수전분 (liquefied corn starch), 말토오스(maltose), 프룩토오스(fructose), 글루코오스 (glucose) 1%(w/v)를 각각 첨가하여, 다양한 탄소원을 함유한 배지를 각각 제조하였다.

[0033] 상기에서 제조한 5 mL MRS 배지에, KCTC로부터 분양받은 락토바실러스 플란타룸 서브스피시스 플란타룸 (*Lactobacillus plantarum* subsp. *plantarum*) ST-III (KCTC 3015)를 접종하고 37℃ 진탕 배양기 (shaking incubator)에서 24시간 동안 교반(150rpm)하여 배양하였다. 배양액에 글리세롤(glycerol) 5ml를 넣고 섞은 후, 1.5ml 튜브에 200 μ l씩 소분하여 딥프리저 (deep freezer)에서 스톡(stock)으로 보관하였다.

[0034] 100ml의 MRS 배지에 락토바실러스 플란타룸 서브스피시스 플란타룸 ST-III (KCTC 3015) 스톡 600 μ l를 접종하고 30℃ 진탕 배양기 (shaking incubator)에서 15시간 동안 교반(150rpm)하여 배양하였다. 다양한 탄소원이 추가된 100ml MRS 배지에 전배양액 5ml 접종하고 30℃ 진탕 배양기 (shaking incubator)에서 22시간 동안 교반 (150rpm)하여 배양하였다. 배양액 500 μ l를 큐벳(cuvet)에 담아 분광광계도 (spectrophotometer, Optizen POP, Mecasys Co. Ltd.; Daejeon, Korea)로 660nm에서 측정하여 표 1에 나타내었다.

표 1

배지	흡광도 값 (660nm)
MRS	10.32
MRS with 1%(w/v) soluble starch	11.15
MRS with 1%(w/v) glycogen	10.70
MRS with 1%(w/v) liquefied corn starch	10.70
MRS with 1%(w/v) maltose	11.04
MRS with 1%(w/v) fructose	8.39
MRS with 1%(w/v) glucose	11.08

[0038] 실험 결과, 1%(w/v) 농도의 탄소원 추가로는 균체량 변화에 유의한 차이를 나타내지 않았다.

[0040] (2) LpMA의 역가 측정

[0041] LpMA를 수득하기 위하여, 원심분리기(6,000 $\times$ g, 25분)를 이용하여 상기에서 배양한 락토바실러스 플란타룸 서브스피시스 플란타룸 ST-III (KCTC 3015)을 회수하였다. 회수한 세포를 배양액의 1/10인 50mM citric-NaOH pH 3.0 완충용액에 재부유한 후, 원심분리기(6,000 $\times$ g, 25분)를 이용하여 다시 세포를 회수하였다. 회수한 세포에 다시 배양액의 1/10인 50mM citric-NaOH pH 3.0 완충용액을 첨가하여 재부유한 후, 초음파로 세포파쇄를 수행하였다. 파쇄된 세포로부터 수득된 조효소액을 원심분리(6,000 $\times$ g, 25분)하여 상등액을 취하였다.

[0042] 한편, LpMA는 탄수화물 기질을 가수분해하여 말토오스를 특이적으로 생산하며, 인공기질인 G2- β -CD에 높은 기질 선호도를 보인다. 즉, LpMA가 G2- β -CD의 G2와 β -CD 사이의 α -1,6 글리코시드 결합을 가수분해하면 환원당인 말토오스가 생산된다. DNS(Dinitrosalicylic acid) 용액은 환원당에 의해 환원되어 색이 변하는데, 이 방법을 이용하여 LpMA가 G2- β -CD와 반응하였을 때 생산되는 말토오스의 양을 측정할 수 있다. 본 과정에서는 이러한 방법을 통해 발현된 LpMA의 양을 간접적으로 확인하고자 하였다.

[0043] 이를 위해, 락토바실러스 플란타룸 서브스피시스 플란타룸 ST-III (KCTC 3015) 조효소액과 G2- β -CD를 200 μ l씩 첨가하고 30℃에서 30분 동안 반응시켰다. 대조군으로 락토바실러스 플란타룸 서브스피시스 플란타룸 ST-III (KCTC 3015) 조효소액과 50mM citric-NaOH pH 3.0 완충용액을 200 μ l씩 첨가하고 30℃에서 30분 동안 반응시켰다. 그 후, 각각의 반응액과 DNS를 400 μ l씩 첨가하고 5분간 끓여 반응을 정지한 뒤, 얼음에 넣어 식히고 570nm에서 발색을 확인하였다 (도 1). 도 1은 탄소원 종류에 따른 LpMA의 역가를 측정한 결과이다.

[0044] 실험 결과, 가용성전분(soluble starch), 글리코겐(glycogen), 수용성 옥수수전분 (liquefied corn starch)을 포함하는 다당류를 배지에 첨가하였을 때보다, 말토오스(maltose), 프룩토오스(fructose), 글루코오스(glucose)을 포함하는 소당류 및 단당류를 배지에 첨가하였을 때, LpMA 생산량이 현저히 증가하였다.

[0046] [실시예 2: 단당류 및 소당류의 첨가 농도에 따른 LpMA 생산량의 변화 비교]

[0047] (1) 락토바실러스 플란타룸 서브스피시스 플란타룸 (*Lactobacillus plantarum* subsp. *plantarum*) ST-III의 균체량 비교

[0048] 소당류 및 단당류의 첨가 농도에 따른 LpMA 생산량의 변화를 비교하기 위하여, 대표로서 글루코오스를 선정하고 이를 기존 MRS 배지 5.5g에 각각 첨가하여, 다양한 농도의 글루코오스를 함유한 배지를 제조하였다.

[0049] 6mL MRS 배지에 락토바실러스 플란타룸 서브스피시스 플란타룸 (*Lactobacillus plantarum* subsp. *plantarum*) ST-III (KCTC 3015)을 접종하고 진탕 배양기 (shaking incubator)에서 37℃, 24시간 동안 교반(150rpm)하여 배양하였다. 배양액에 글리세롤(glycerol) 5mL를 넣고 섞은 후, 1.5mL 튜브에 200 μ L씩 소분하여 딥프리즈 (deep freezer)에 스톡(stock)으로 보관하였다.

[0050] 100mL의 MRS 배지에 락토바실러스 플란타룸 서브스피시스 플란타룸 ST-III (KCTC 3015) 스톡 600 μ L를 접종하고 30℃ 진탕 배양기 (shaking incubator)에서 15시간 동안 교반(150rpm)하여 배양하였다. 다양한 농도의 글루코오스가 추가된 100mL MRS 배지에 전배양액 5mL 접종하고 30℃ 진탕 배양기 (shaking incubator)에서 22시간 동안 교반(150rpm)하여 배양하였다. 배양액 500 μ L를 큐벳(cuvet)에 담아 분광광계도 (spectrophotometer, Optizen POP, Mecasys Co. Ltd.; Daejeon, Korea)로 660nm에서 측정하여 표 2에 나타내었다.

표 2

배지	흡광도 값 (660nm)
MRS with 1%(w/v) glucose	11.08
MRS with 3%(w/v) glucose	9.98
MRS with 5%(w/v) glucose	9.71
MRS with 6%(w/v) glucose	9.59
MRS with 7%(w/v) glucose	9.27
MRS with 9%(w/v) glucose	8.96
MRS with 10%(w/v) glucose	9.04

[0053] 실험 결과, 글루코오스 농도가 증가할수록 흡광도 값이 감소하는 것으로 보아, 균체량이 감소하는 것을 알 수 있었다.

[0055] (2) LpMA의 역가 측정

[0056] LpMA를 수득하기 위하여, 원심분리기(6,000 $\times$ g, 25분)를 이용하여 상기에서 배양한 락토바실러스 플란타룸 서브스피시스 플란타룸 ST-III (KCTC 3015)을 회수하였다. 회수한 세포를 배양액의 1/10인 50mM citric-NaOH pH 3.0 완충용액에 재부유한 후, 원심분리기(6,000 $\times$ g, 25분)를 이용하여 다시 세포를 회수하였다. 회수한 세포에 다시 배양액의 1/10인 50mM citric-NaOH pH 3.0 완충용액을 첨가하여 재부유한 후, 초음파로 세포파쇄를 수행하였다. 파쇄된 세포로부터 수득된 조효소액을 원심분리(6,000 $\times$ g, 25분)하여 상등액을 취하였다.

[0057] LpMA의 역가를 측정하기 위하여, 락토바실러스 플란타룸 서브스피시스 플란타룸 ST-III (KCTC 3015) 조효소액과 G2- β -CD를 200 μ L씩 첨가하고 30℃에서 30분 동안 반응시켰다. 대조군으로 락토바실러스 플란타룸 ST-III (KCTC 3015) 조효소액과 50mM citric-NaOH pH 3.0 완충용액을 200 μ L씩 첨가하고 30℃에서 30분 동안 반응시켰다. 그 후, 각각의 반응액과 DNS를 400 μ L씩 첨가하고 5분간 끓여 반응을 정지한 뒤, 얼음에 넣어 식히고 570nm에서 발색을 확인하였다 (도 2). 도 2는 글루코오스 농도에 따른 LpMA의 역가를 측정한 결과이다.

[0058] 실험 결과, 글루코오스 농도가 증가할수록 LpMA 생산량이 증가하는 추세를 보였다. 특히, 6%의 글루코오스를 첨

가하였을 때, LpMA 생산량이 약 2배가량 급격히 증가하였다.

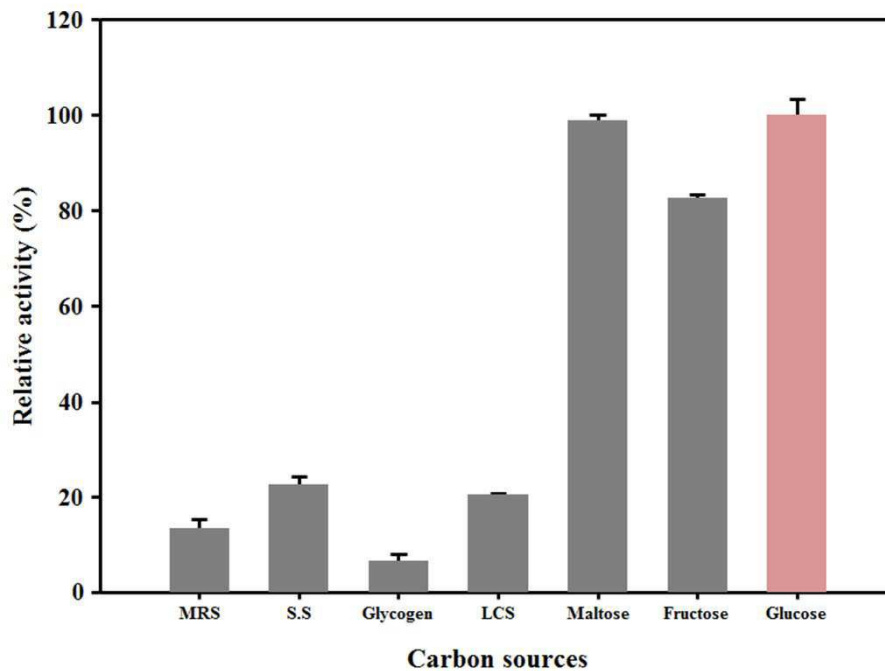
[0060] (3) 균체량과 LpMA 생산량 비교

[0061] 상기 락토바실러스 플란타룸 ST-III (KCTC 3015)의 배양에 따른 균체량과 LpMA의 생산량을 비교하였다 (도 3). 도 3은 글루코오스 농도에 따른 균체량과 LpMA 생산량을 비교한 결과이다.

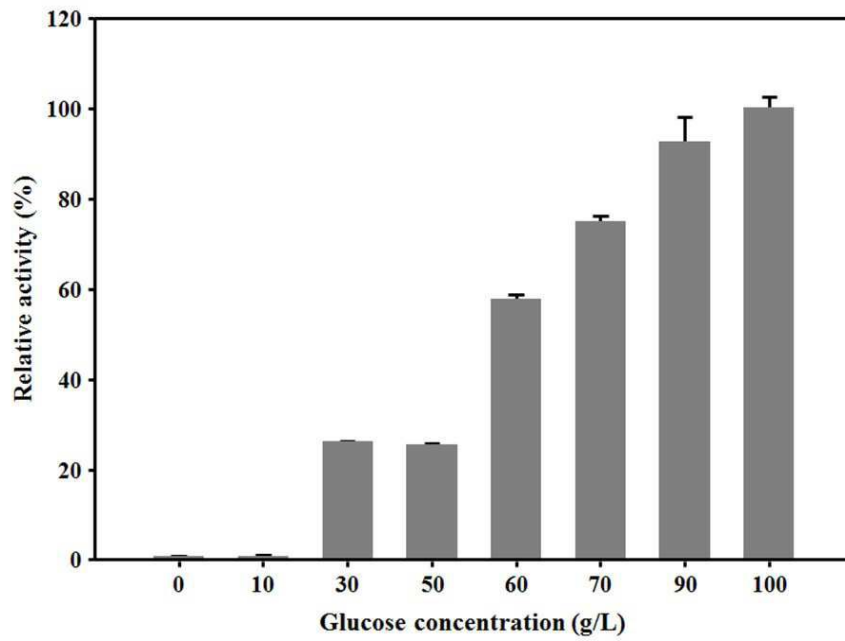
[0062] 실험 결과, 글루코오스 농도가 증가할수록 균체량은 감소하고, LpMA 생산량은 증가하였다. 특히, 6~7%(w/v) 글루코오스를 첨가한 배지에서 락토바실러스 플란타룸 서브스피시스 플란타룸 ST-III (KCTC 3015)의 균체량 감소가 가장 완만하였고, LpMA 발현량이 가장 급격히 증가하여, 이 조건에서 최적의 생산성으로 LpMA를 생산할 수 있는 것으로 판단되었다.

도면

도면1



도면2



도면3

