

	(19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)	(11) 공개번호 10-2014-0029934 (43) 공개일자 2014년03월11일
(51) 국제특허분류(Int. Cl.) C12N 1/20 (2006.01) A23L 1/30 (2006.01) (21) 출원번호 10-2012-0096417 (22) 출원일자 2012년08월31일 심사청구일자 2013년01월23일		(71) 출원인 경희대학교 산학협력단 경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732, 국제캠퍼스 내 (서천동, 경희대학교) (72) 발명자 이태후 서울 서초구 잠원로14길 23, 202동 504호 (잠원동, 롯데캐슬아파트) 국무창 서울 영등포구 버드나루로22길 5, 602호 (당산동, 강변한솔그라치아) (74) 대리인 안소영

전체 청구항 수 : 총 6 항

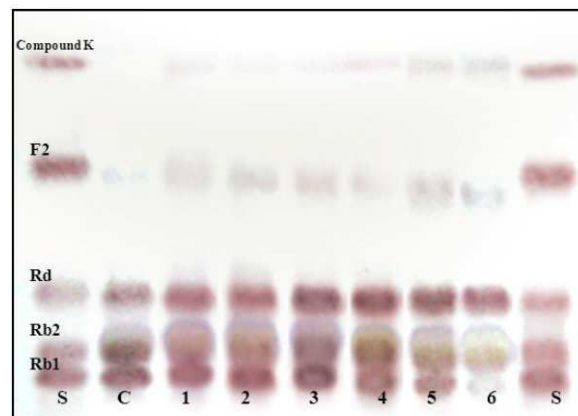
(54) 발명의 명칭 신규한 유산균 용인시스 THK-V8 및 이를 이용한 사포닌의 저분자화 방법

(57) 요약

본 발명은 락토바실러스 용인시스 THK-V8^T (*Lactobacillus yonginsis* THK-V8^T) KACC 16236 균주 및 이를 이용한 사포닌의 저분자화 방법을 제공한다.

본 발명에 따른 락토바실러스 용인시스 THK-V8^T (*Lactobacillus yonginsis* THK-V8^T) KACC 16236 균주는 기존의 균주보다 뛰어난 사포닌의 저분자화 효과를 보이고 이를 통해 저분자 진세노사이드를 효과적으로 생산할 수 있다.

대표도 - 도3



(72) 발명자

이정민

경기 성남시 중원구 마지로 9, 501호 (하대원동)

이은지

서울 광진구 천호대로134길 18-4, 1호 (구의동)

양정은

경기 의정부시 오목로 150, 206동 1701호 (민락동, 민락주공2단지)

신현섭

경기 수원시 영통구 봉영로1517번길 27, 902동 402호 (영통동, 벽적골9단지아파트)

박상용

경기 수원시 권선구 동수원로146번길 218-13, 305호 (곡반정동)

박용진

경기 화성시 영통로61번길 10, 108동 1601호 (반월동, 신영통현대1차아파트)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 810006-03-2-CG100

부처명 농림수산식품부

연구사업명 농림바이오기술사업화지원

연구과제명 [인삼소재피부과학응용사업단]임상평가 프로세스 관리 및 인삼소재 및 제품의 탈모방지 효
능검증

기 여 율 1/1

주관기관 경희대학교

연구기간 2011.11.01 ~ 2012.10.31

특허청구의 범위

청구항 1

사포닌을 진세노사이드 저분자 화합물로 전환하는 락토바실러스 용인시스 THK-V8 (*Lactobacillus yonginsis* THK-V8) KACC 16236.

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 진세노사이드 저분자화합물은 Rd, F2, Rg3, Rh2 또는 Compound K 로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나이상인 락토바실러스 용인시스 THK-V8 (*Lactobacillus yonginsis* THK-V8) KACC 16236.

청구항 3

락토바실러스 용인시스 THK-V8 (*Lactobacillus yonginsis* THK-V8) KACC 16236 균주를 인삼에 접종하고, 배양하는 단계를 포함하는 발효 인삼의 제조방법.

청구항 4

제3항에 있어서,

상기 인삼이 수삼, 백삼, 홍삼, 산양삼, 산삼 또는 산삼배양근인 발효 인삼의 제조방법.

청구항 5

제3항에 있어서,

상기 배양은 25~40℃에서 1일~30일 동안 발효시키는 단계를 포함하는 발효 인삼의 제조방법.

청구항 6

제5항에 있어서,

숙성된 배양액을 원심분리하여 취한 상등액을 농축 또는 동결건조하는 단계를 더 포함하는 발효 인삼의 제조방법.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 신규한 유산균 용인시스 THK-V8^T 및 이를 이용한 체내 흡수가 용이한 형태의 진세노사이드를 다량 함유할 수 있는 사포닌의 저분자화 방법에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 인삼은 식물 분류학상 오가과 인삼속에 속하는 다년생 숙근초로서 지구상에 약11종이 알려져 있으며, 대표적인 종으로는 고려 인삼(*Panax ginseng* C. A. Meyer), 미국삼(*Panax quinquefolium* L.), 전칠삼(*Panaxnotoginseng* F. H. Chen), 죽절삼(*Panax japonicus* C. A. Meyer) 등이 있다. 고려 인삼(*Panax ginseng* C. A.Meyer)은 아시아 극동 지역(북위 33 ~ 48도 한국, 북만주, 러시아 일부)에 자생하며, 약효가 매우 우수하다. 미국삼(*Panax quinquefolium* L.)은 미국, 캐나다에 자생 및 재배되며, 전칠삼(*Panax notoginseng* F. H. Chen)은 중국 운남성 동남부로부터 광서성 서남부 지역에서 야생 또는 재배된다. 또한 죽절삼(*Panax japonicus*

[0003] C. A. Meyer)은 일본, 중국 서남부, 네팔에 이르기까지 분포한다.

[0004] 이는 수 천년 간 동양의학에 의해 사용되어 온 대표적인 약용식물이며 현재까지도 다양한 형태로 널리 활용되고 있다. 최근에는 인삼의 오랜 임상적 경험에 근거하여 규명된 효능에 대해 서양 의학적 접근에 의한 약리성분의 분석 및 기전연구 등이 이루어지고 있다. 인삼의 주요성분으로 잘 알려진 인삼사포닌 진세노사이드(ginsenoside)는 면역기능 조절작용, 항암, 항 당뇨, 해독 작용 및 용혈 작용 등의 우수한 활성을 보이는 것으

로 보고되고 있다. 이러한 사포닌은 당과 비당이 결합한 형태인 배당체화합물의 일종으로, 크게 프로토파낙사다이올(PPD), 프로토파낙사트라이올(PPT) 및 올레아네인 계열로 구분되어 진다. 일반적으로 인삼사포닌은 경구 투여할 때, 고분자로 흡수되어 장내 세균층에 의한 생물학적 이용에 의해 체내에 흡수되게 되는데, 수율이 크게 떨어져 우수한 효능을 보이지 못한다. 이에 따라 저분자 진세노사이드를 만들기 위한 노력의 일환으로 화학적 산처리 및 염기처리, 열을 이용한 물리적 처리 등의 방법이 과거 주로 연구되어 왔으며, 최근 기질 특이적 전환이 가능한 미생물 발효에 대한 연구도 이루어지고 있다.

[0005] 김치는 삼국사기에 기록 될 정도로 오래 전부터 한국에서 전해 내려오는 전통발효 식품으로 향산화, 항암, 항균 작용 등의 다양한 기능성을 가지고 있는 것으로 알려져 있다. 또한 김치는 다양한 박테리아 원으로서 발효시기에 따라 다량의 락토바실러스(*Lactobacillus*), 락토코커스(*Lactococcus*), 류코노스톡(*Leuconostoc*), 페디오코커스(*Pediococcus*), 스트렙토코커스(*streptococcus*) 및 웨이셀라(*Weissella*)속의 유산균을 함유하고 있는 것으로 알려져 있다. 락토바실러스(*Lactobacillus*)속의 유산균은 그람양성, 카탈라아제 음성이며 구아닌 시토신 함량이 32-55%이다. 생육 적정온도는 25-35℃이며 생육과정에서 젖산을 분비하여 pH를 낮추는 특징이 있다. 최근 국내 연구자들에 의해 김치에서 분리한 락토바실러스 속의 신규한 유산균들이 다수 발견되었으며, 이들을 이용한 유산균 발효식품 및 화장품 개발에 관한 연구를 지속적으로 진행하여 국내 소유권이 없는 균들을 이용한 각종 기능성 제품과 차별화 된 토종 기능성 미생물을 개발하고자 박차를 가하고 있다.

[0006] 대한민국 특허등록 제479,803호, 제497,895호, 제517,899호, 제618,171호 등은 인삼 또는 인삼 추출액을 유산균 또는 장내 세균으로 발효시켜, 체내 흡수가 용이한 형태의 진세노사이드 저분자 물질의 함량이 높은 발효 인삼(즉, 인삼 추출물) 및 그의 제조방법을 개시한 바 있다.

[0007] 하지만, 대한민국 특허등록 제479,803호, 제497,895호, 제517,899호, 제618,171호 등에 개시된 신규 미생물인 페디오코커스 속 (*Pediococcus* Sp.) 균주 및 류코노스톡 속(*Leuconostoc* Sp.) 균주, 락토바실러스 알리멘타리우스 (*Lactobacillus alimentarius*) M-2 균주(KCTC 11054 BP), 류코노스톡 멘센테로이드스 (*Leuconostocmensenteroides*) M-3 균주(KCTC 11055 BP), 락토바실러스 브레비스(*Lactobacillus brevis*) M2 균주 (KCTC11390BP) 및 락토바실러스 플란타럼(*Lactobacillus plantarum*) P2 균주(KCTC11391BP) 등으로 상기 종래의 제조방법에 따라 인삼을 발효시키더라도, 그 저분자화에 대한 효과는 여전히 만족스럽지 못하다.

선행기술문헌

특허문헌

[0008] (특허문헌 0001) KR 10-2010-0027688, 2010.03.29

(특허문헌 0002) KR 10-2009-0032163, 2009.04.14

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009] 본 발명은 체내 흡수가 용이한 형태의 진세노사이드를 다량 함유할 수 있도록 사포닌의 저분자화에 현저한 효과를 갖는 신규한 유산균 락토바실러스 용인시스 THK-V8^T 을 제공하는 것을 목적으로 한다.

[0010] 또한, 본 발명은 상기 유산균을 이용한 사포닌의 저분자화 방법 및 이를 통한 인삼 발효 방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

[0011] 본 발명자들은 인삼 발효물을 생성할 수 있도록 인삼 사포닌을 해당 처리하여 저분자화하는 효과가 큰 미생물을 광범위하게 탐색하였다. 그 결과, 수십 종의 유산균을 분리하였으며, 이 중 락토바실러스(*Lactobacillus*) 속에 속하는 1 종의 균주가 체내 흡수가 용이한 형태의 진세노사이드를 다량 함유할 수 있는 저분자화 효과를 가지는 것을 확인하고 본 발명을 완성하였다.

[0012] 진세노사이드의 저분자화에 대해서는 도 1에 제시하였다.

[0013] 도 1에 나타낸 바와 같이, Rb1이 Rd로 전환되며, Rd는 각각 F2 또는 Rg3으로 전환된다. 마지막으로 F2는

compound K로 전환되며, Rg3은 Rh2로 전환되게 된다. 이러한 저분자화에 의하여 체내 흡수가 용이한 형태의 진세노사이드 변형되게 되는 것이다. 본 발명은 사포닌의 저분자화에 현저한 효과를 갖는 신규한 락토바실러스 용인시스 THK-V8 을 제공하는 것을 목적으로 한다.

[0014] 본 발명자들은 김치에서 분리한 98종의 균주에서 베타글루코시다아제 활성을 가지는 22종을 우선적으로 선별하고 이를 분리용 배지(MRS-BCP 배지)를 사용하여 단일 집락을 형성하는 균주들로 분리하였다. 이중 사포닌의 저분자화 효과를 가지는 균주들을 선별하고 특히, 사포닌의 저분자화 효과가 현저한 1종의 유산균을 선별하고 락토바실러스 용인시스 THK-V8^T로 명명하였다. 분리된 유산균의 16S rRNA 유전자 서열을 분석한 결과, 서열번호 3의 염기서열을 갖는다는 것이 밝혀졌고, 이를 BLAST를 사용하여 상동성을 비교하고 균주의 특성을 분석한 결과, 각각 락토바실러스속(*Lactobacillus*)에 속하는 새로운 균주로 판명되었다. 상기 균주 즉, 락토바실러스 용인시스 THK-V8^T를 농촌진흥청 농업생명공학연구원 부설 한국농업미생물보존센터(KACC)에 기탁하여, 2011년 8월 19일 수탁번호 KACC 16236을 부여받았다.

[0015] 본 발명은 또한 락토바실러스 용인시스(*Lactobacillus yonginsis*) 균주를 인삼에 접종하고, 배양하는 단계를 포함하는 인삼 발효물의 제조방법을 제공한다.

[0016] 상기한 바와 같이, 본 발명에 의해 새롭게 분리된 락토바실러스 용인시스(*Lactobacillus yonginsis*)는 우수한 사포닌의 저분자화 효과를 가지며, 특히, 이를 이용하여 인삼을 발효시킬 경우 Rd, Compound K, F2 등 저분자성 진세노사이드의 함량이 높은 인삼 발효물을 얻을 수 있다.

[0017] 본 발명의 제조방법에서 상기 균주의 기질로서 사용하는 인삼은 특별히 한정된 것은 아니며, 인삼 그 자체 및 인삼 가공물을 모두 사용할 수 있으며, 예를 들어, 수삼, 홍삼, 홍미삼, 백삼, 미삼, 인삼 열매, 인삼 잎 등을 사용하거나 인삼 추출액 및 인삼 분말 등을 사용할 수 있다. 상기 인삼의 원산지는 제한되지 아니하며, 예를 들어 고려인삼, 삼칠인삼, 미국인삼, 죽절인삼, 허말라야인삼, 베트남인삼 등을 제한 없이 사용할 수 있다. 또한, 상기 인삼은 필요에 따라 통상의 방법으로 멸균시켜 사용할 수도 있다.

[0018] 또한, 건조 분말 형태의 인삼, 산 처리 인삼, 고온처리 인삼 및 가압처리 인삼 등도 사용할 수도 있다. 그러나, 산 처리를 할 경우 배양액의 pH가 낮아져 균주의 활성이 낮아질 수 있으며, 고온으로 처리할 경우 열처리 과정에서 HMF 등의 발암물질이 생성될 수 있으므로, 인삼 또는 인삼 분말을 그대로 사용하는 것이 바람직하다. 상기 인삼 분말은 적어도 100 메쉬 이상의 입자크기를 갖는 분말이 인삼의 표면적을 증가시켜 미생물의 발효 속도를 높일 수 있다.

[0019] 인삼을 발효시키는 방법은 예를 들어, 인삼 분말 또는 인삼의 추출액(예를 들어, 알콜 또는 알콜 수용액 추출액, 열수 추출액 등)을 물에 현탁하여 상기한 균주를 넣고, 20 ~ 50 °C에서, 1 일 ~ 30 일, 바람직하게 10 시간 ~ 20 일 동안 배양함으로써 수행할 수 있다.

[0020] 상기와 같은 발효 과정을 거침으로써, 인삼 원재료에 함유된 고분자 물질을 당화과정을 거쳐 체내 흡수가 용이한 형태의 진세노사이드를 다량 함유할 수 있는저분자 물질로 바꿀 수 있다.

[0021] 본 발명의 제조방법은 상기 배양 후 얻어진 배양액을 80 ~ 95 °C에서 12 ~ 48 시간 동안 숙성시키는 단계("숙성 단계")를 추가로 포함할 수 있다. 상기와 같은 조건에서 숙성 단계를 수행하게 되면, 숙성과 동시에 멸균도 함께 이루어지게 되며, 또한 저분자 물질의 함량을 더욱 늘릴 수 있다.

[0022] 본 발명의 제조방법에 따라 얻어지는 인삼 발효물은 별도의 정제를 통하지 않고 직접 식품으로서의 사용이 가능하다. 즉, 본 발명의 제조방법에 따라 얻어진 인삼 발효물은 통상의 방법에 따라 농축시키거나 동결건조하여 분말화하여 그대로 식품에 적용할 수 있다. 즉, 숙성과정을 통하여 얻어진 숙성액을 농축 또는 동결건조한 것을 그대로 식품에 적용할 수 있으며, 또는 상기 숙성액을 원심분리하여 취한 상등액을 농축 또는 동결건조하는 단계를 거쳐 얻어진 것을 그대로 식품에 적용할 수도 있다.

발명의 효과

[0023] 본 발명에 의해 새롭게 분리된 락토바실러스 속 미생물 즉, 락토바실러스 용인시스 THK-V8^T (*Lactobacillus yonginsis* THK-V8^T) KACC 16236은 우수한 사포닌의 저분자화 효과를 갖는다. 특히, 상기 미생물을 수삼, 백삼, 홍삼 등의 인삼에 접종하고 배양할 경우, Rd, Compound K, F2 등의 함량이 높은 인삼 발효물을 얻을 수 있다.

도면의 간단한 설명

도 1은 진세노사이드의 저분자화 과정을 나타낸 도이다.

도 2은 *Lactobacillus yonginsis* THK-V8^T의 염기서열을 기초로 한 다른 세균과의 계통 발생론적 관계를 나타낸 도이다.

도 3는 *Lactobacillus yonginsis* THK-V8^T에 의한 인삼사포닌 Rb1, Rc, Rd 혼합물의 일차별 변화 TLC 분석결과를 나타낸 도이다.

도 4은 *Lactobacillus yonginsis* THK-V8^T 조효소 추출물에 의한 진세노사이드 Rb1 반응물의 TLC 분석결과를 나타낸 도이다.

도 5는 *Lactobacillus yonginsis* THK-V8^T 조효소 추출물에 의한 진세노사이드 Rb1 반응물의 HPLC 분석결과를 나타낸 도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

본 발명의 이점 및 특징, 그리고 그것들을 달성하는 방법은 상세하게 후술되어있는 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.

<실시예 1> 유산균주의 동정

1-1. 유산균주의 분리

경기도에서 수집한 배추김치를 분쇄하여 무게 1g을 측정 한 후 9mL의 멸균 생리 식염수(NaCl 0.85%)에 희석하여 단계별 10배수 희석하였다. 이를 BCP배지에 도말하고, 30℃에서 2일간 배양한 다음, 노란 환을 형성한 균주를 잠정적으로 유산균으로 확인하여 분리하였다. 분리한 균주는 MRS 배지에서 생육하였다. BCP배지와 MRS배지의 조성은 표 1과 표 2에 각각 나타냈다.

[표 1] MRS 배지의 조성

구성성분	함량(g/L)
Dextrose	20
Beef extract	9
Yeast extract	4
Ammonium citrate	2
Magnesium sulfate	0.2
Peptone	10
Sodium acetate	5
Photassium phosphate	2
Tween 80	1
Manganese sulfate	0.05
pH 6.2±0.2 at 25℃	

[0031] [표 2] BCP 한천배지의 조성

구성성분	함량(g/L)
Lactose	10
Bromocresol purple	0.025
Peptone mixture	5
Beef extract	3
pH 6.8±0.2 at 25°C	

[0032]

[0033] 1-2. 베타 글루코시다아제 생성 미생물의 스크리닝

[0034] 사포닌을 저분자화 하기 위해서는 사포닌의 비당부분에 베타결합을 하고 있는 당을 분해하는 과정이 필수적이므로 실시예 1-1에서 분리한 유산균주를 대상으로 베타글루코시다아제 생성 미생물을 스크리닝하였다. 베타 글루코시다아제 활성은 에스쿨린(6,7-디하이드록시쿠마린 6-글루코시드, $C_{15}H_{16}O_9 \cdot H_2O$)이 베타글루코시다아제에 의해 가수분해 되어 생산한 에스쿨레틴(6,7-디하이드록시쿠마린)이 철염과 결합하여 갈색 혹은 흑색의 화합물을 생성하는 원리를 이용하였다. MRS 한천배지에 1% 에스쿨린과 0.5% 구연산철을 첨가한 배지에서 갈색 혹은 흑색 환을 생성하는 베타글루코시다아제 활성균주 22종을 선발하였다.

[0035] 1-3. 유산균의 순수배양 및 동결 보존

[0036] 실시예 1-2에서 선별된 균은 MRS 액체 배지에 접종하여 30°C에서 이틀 간 배양 한 후 25%(v/v) 글리세롤 스톡(glycerol stock)을 제조하여 -70°C에서 보관하여 사용하였다.

[0037] 1-4. 균주의 염기서열 분석

[0038] 이후 MRS 플레이트에 계대하여 48시간 호기조건으로 배양한 후, (주)제노텍에 의뢰하여 이 균주의 16s rDNA 염기서열을 분석했다. 사용한 프라이머의 염기서열은 표 3(서열번호 1, 2)에 표기했다.

[0039] [표 3] 16s rDNA 염기서열 분석에 사용한 프라이머

name	sequence
27F	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG
1492R	GGTTACCTTGTTACGACTT

[0040]

[0041] 동정결과 표준균주와의 염기서열 유사도가 99% 이하인 균주 THK-V8^T을 신균주 등록 예정균주로 선정하였다. THK-V8^T의 염기서열 분석결과 서열번호 3의 DNA를 가지는 본 발명의 균주와 유사한 유산균들을 확인할 수 있었으며 이를 표 4에 나타내었다.

[0042] [표 4] 16s rRNA DNA 염기서열 비교

Rank	Name	Strain	Pairwise Similarity(%)
1	<i>Lactobacillus koreensis</i>	DCY50	98.8
2	<i>Lactobacillus parabrevis</i>	LMG 11984	97.7
3	<i>Lactobacillus senmaizukei</i>	L13	97.5
4	<i>Lactobacillus hammesii</i>	TMW 1.1236	97.3
5	<i>Lactobacillus brevis</i>	ATCC 14687	97.2
6	<i>Lactobacillus brevis</i>	ATCC 367	97.2
7	<i>Lactobacillus zymae</i>	LMG 22198	96.0
8	<i>Lactobacillus acidifarinae</i>	LMG 22200	95.9
9	<i>Lactobacillus paucivorans</i>	TMW 1.1424	95.8
10	<i>Lactobacillus spicheri</i>	LTH 5753	95.8

[0043]

[0044] 표 4에 나타난 바와 같이, 95% 이상 동정성을 가지는 유산균을 10여종 찾을 수 있었으며, 가장 유사한 유산균으로는 *Lactobacillus koreensis*(유사도, 98.8%)을 확인하였다.

[0045] 마지막으로 동정한, 상기 균주를 *Lactobacillus yonginsis* THK-V8^T으로 명명하고, 농촌진흥청 농업생명공학연구원 부설 한국농업미생물보존센터(KACC)에 기탁하여, 2011년 8월 19일 수탁번호 KACC 16236을 부여받았다.

[0046] <실시예 2> THK-V8^T의 생화학적 특성 확인

[0047] 2-1. THK-V8^T의 생리학적 특성

[0048] <실시예 1>에서 분리된 유산균 용인시스 THK-V8^T의 현미경 상 이미지 및 콜로니의 모양과 색을 관찰하였고, 그람염색과 카탈라아제 시험 등을 거쳐 표 5에 THK-V8^T의 생리학적 특성을 나타내었다.

[0049] [표 5] *Lactobacillus yonginsis* THK-V8^T의 생리학적 특성

특성	<i>Lactobacillus yonginsis</i> THK-V8 ^T
기원	배추김치
콜로니의 색	아이보리 혹은 크림색
형태(Morphology, shpe)	간균(rod)
운동성	음성
포자형성여부	음성
그람염색(Gram-stain) 여부	양성
카탈라아제 시험(Catalase test)	음성

[0050]

[0051] 상기 표 5에 나타난 바와 같이, *Lactobacillus yonginsis* THK-V8^T는 간균 형태를 띄고 있으며 그람 염색에 대하여 양성 반응을 보이며, 운동성, 포자형성 카탈라아제 시험에서 음성을 보이는 바, 일반적인 유산균의 특성을 확인할 수 있었다.

[0052] 또한, 당 이용성을 API kit(50CHL, Zym, Biomrieux Co., France)를 통하여 확인하였다. 본 발명의 신규한 균주인 *Lactobacillus yonginsis* THK-V8^T과 대비하여 기존에 알려진 유산균 균종으로 *Lactobacillus koreensis* DCY50^T, *Lactobacillus parabrevis* LMG11984^T, *Lactobacillus brevis* LMG11494^T, *Lactobacillus hammesii* TMW 1.1236^T 및 *Lactobacillus senmaizukei* L13^T를 비교하였다. 그 결과를 하기 표 6에 나타내었다.

[0053] [표 6] *Lactobacillus yonginsis* THK-V8^T 및 관련 균주의 당 이용성 검정을 통한 생리학적 특성

(+, 양성; -, 음성)	<i>L. yonginsis</i> THK-V8 ^T	<i>L. koreensis</i> DCY50 ^T	<i>L. parabrevis</i> LMG11984	<i>L. brevis</i> LMG11494	<i>L. hammesii</i> TMW 1.1236 ^T	<i>L. senmaizukei</i> L13 ^T
Carbon-source utilization						
(API 50CH) of:						
D-Ribose	+	-	+	+	+	+
D-Xylose	+	+	+	-	+	-
Methyl-β-D-Xylose	-	-	+	-	+	-
D-Galactose	+	+	+	+	-	-
D-Mannose	-	-	-	-	-	+
D-Mannitol	-	-	-	-	+	+
Methyl-α	-	-	+	-	-	+
-D-Glucopyranoside	-	-	+	-	-	+
N-Acetyl-Glucosamine	+	+	+	+	+	+
Amygdalin	-	-	-	-	-	+
Arbutin	-	-	-	-	-	+
Esculin ferric citrate	+	-	-	-	-	+
Salicin	+	-	-	-	-	+
D-Cellobiose	-	-	-	-	-	+
D-Maltose	+	+	+	-	+	-
D-Lactose	-	-	-	-	-	-
D-Melobiose	-	+	-	+	+	-
D-Saccharose	-	-	-	-	-	+
(Sucrose)	-	-	-	-	+	+
D-Trehalose	-	-	-	-	-	-
D-Raffinose	-	-	-	-	-	+
D-Gentiobiose	-	-	-	+	-	+
D-Turanose	+	+	+	-	+	-
2-Ketogluconate	-	-	-	+	-	-
(potassium)	-	-	-	-	-	-
5-Ketogluconate	-	-	-	-	-	-
(potassium)	-	-	-	-	-	-

[0054]

[0055] 표 6에 나타낸 바와 같이, API 50CHL을 통한 당이용성 검정 결과 모든 균주에서 양성을 보인 기질은 L-arabinose, D-glucose, D-fructose 그리고 gluconate가 있었다. 반면, Esculin ferric citrate와 Salicin에 대해서는 *Lactobacillus yonginsis* THK-V8^T 균주와 *Lactobacillus senmaizukei* L13만이 양성을 보였다.

[0056] 2-2. 구아닌 시토신(G+C) 함량 분석

[0057] MRS배지 30℃ 조건하에서 12시간(대수증식기 도입) 배양한 배양액을 원심분리하여 균주를 수득하였다. 수득된 균주의 DNA를 페놀 추출법에 의하여 추출하였다. 추출된 DNA는 50uL 멸균 증류수에 용해하여 100℃에서 5분간 가열한 뒤 얼음용액에서 빠르게 냉각하였다. 냉각한 DNA용액에 50uL 뉴클레아제(neuclease; 200U/mL pH 5.3) P1를 처리한 후 37℃에서 한 시간 배양하였다. 이후 글라이신 완충용액(pH 10)을 50uL 첨가하고, 50uL 알카라인 포스파타제를 처리하여 37℃에서 3시간 배양한 뒤 -70℃에서 보관하였다. HPLC 장치는 LC-4A 액상 크로마토그래피, Z-MODULE에 탑재된 RADIAL-PACK C 카트리지, Lamb do-Max 모델 481형 LC 분광광도계 및 데이터 분석기 크

로마토팩 C-R2AX로 구성된 것을 사용하였다. 뉴클레오시드는 0.6M NH₄PO₄(pH 4.0) 및 아세트나이트릴 (20:1, v/v) 혼합물에 대해 25℃에서 1mL/분의 유량으로 용출 시켰다. 흡광도는 270nm의 UV에서 측정하였으며, 표준 DNA로 *E. coli* DNA를 사용하였다. 실험 결과, THK-V8^T 균주의 G +C 함량은 47.835(mol%)가 나온 것을 확인하였다.

2-3. DNA-DNA 교잡 분석

실시에 2-2에서 추출한 균주 DNA로 유사도가 높은 각 균주간의 DNA 유사도를 검정하였다. DNA-DNA 교잡분석은 Ezaki 등(1989)이 고안한 방법을 이용하였다. 음성 대조균으로 *E. coli* DNA를 사용했으며, THK-V8^T과 높은 유사도를 보인 균주 *L. koreensis* DCY50^T와 *L. parabrevis* LMG11984^T간의 DNA-DNA 교잡을 분석하였으며 그 결과는 표 7과 같다.

[표 7] *Lactobacillus yonginsis* THK-V8^T과 비교균주 간의 DNA-DNA 교잡분석 결과

비교 균주명	DNA-DNA 유사도 (%)
<i>L. koreensis</i> DCY50 ^T	46.1±4.9
<i>L. parabrevis</i> LMG11984 ^T	10.6±2.9

표 7에 제시된 바와 같이, 유사할 것으로 판단되었던 두 균주와 비교하여 DNA-DNA 유사도는 각각 46%, 10%가 나왔으며 유사도가 다소 상이한 것을 확인할 수 있었다.

2-4. 16s rDNA 서열화 및 분류계통도 작성

THK-V8^T의 DNA염기서열을 바탕으로 동속근연관계의 균주들 간의 분류계통학적 거리를 알아보기 위해 분류계통도를 작성하였다. NCBI 유전자 데이터베이스를 바탕으로, *Lactobacillus*속에 속한 표준 균주의 16s rDNA 유전자 염기서열을 수집하여 Clustal X 프로그램을 이용하여 염기서열을 정렬하였다. 정렬된 염기서열은 Bioedit 프로그램을 이용하여 각각의 길이를 맞추어 편집한 후 MEGA 프로그램을 이용하여 분류계통도를 작성하였다.

그 결과를 도 2에 나타내었다.

도 2에 나타낸 바와 같이, *Lactobacillus yonginsis* THK-V8^T의 염기서열을 기초로 한 다른 세균과의 계통 발생론적 관계를 나타낸 *Lactobacillus koreensis* DCY50^T와 *Lactobacillus parabrevis* LMG11984^T의 사이에 위치할 수 있는 것으로 판단된다.

<실시에 3> THK-V8^T을 이용한 인삼 사포닌의 저분자물질로 생물학적 전환

3-1. 발효를 통한 인삼사포닌의 전환

인삼사포닌의 생물학적 전환을 위해 중국 대련에서 진세노사이드 Rb1, Rc, Rd를 수급하여 본 발명의 시험에 사용하였다.

발효에 의한 인삼사포닌 전환양상을 확인하기 위하여, 진세노사이드 Rb₁, Rc, Rd가 혼합된 프로토파낙사다이어올 (protopanaxadiol; PPD) 계열의 사포닌을 200ppm이 되게 혼합한 MRS 액체배지를 반응배지로 사용하였다. 30℃에서 12시간 동안 정치배양한 균주를 반응배지에 1%(v/v) 접종하여 30℃에서 3일 내지 20일간 정치 배양하였다.

전환 양상은 박층크로마토그래피를 이용하여 분석하였다.

박층크로마토그래피(TLC)는 하기의 방법으로 수행하였다.

사포닌 전환물을 에펜돌프 튜브에 100μL씩 채취한 후 동량의 수포화 부탄올을 첨가하여 혼합한다. 혼합물을 3500rpm의 속도로 1분간 원심분리하여 상층액을 취한 후 모세관을 이용하여 50μL를 TLC 판에 점적한다. 전개용매는 클로로포름: 메탄올: 물= 65: 35: 10를 사용하였으며, 10% 황산용액을 분무한 후 열을 가하여 발색하였다.

발효에 의한 THK-V8^T의 인삼사포닌 전환결과는 도 3에 나타났다.

도 7에 나타낸 바와 같이, 인삼사포닌 Rb1, Rc, Rd 혼합물의 일차별 변화를 확인할 수 있었다. control은 인삼

사포닌 Rb1, Rc, Rd 혼합물에 균을 처리하지 않은 것이며, 시간에 따른 Rb1, Rb2, Rd, F2 및 compound-K의 변화를 확인하였다. 12일 이후 compound-K로의 전환이 보였고, 20일에는 Rb1이 저분자 물질로 대부분 전환되는 양상을 보였다.

[0076] **3-2. 인삼사포닌 전환을 위한 조효소 추출**

[0077] MRS 배지 조건 아래 30℃에서 정치 배양하여 대수 증식기까지 배양한 균을 원심분리하여 상층액을 취한다. 상층액을 4배 부피의 아세톤에 혼합하여 30분 동안 4℃에서 단백질을 침전시킨 후 아세톤을 완전히 휘발시킨다. 침전물을 0.1M 포타슘포스페이트 완충용액(pH 7)을 용해시킨 후 인삼사포닌 Rb1에 접종하여 30℃에서 120rpm의 속도로 진탕 배양하였다. 인삼사포닌과 THK-V8^T의 조효소 반응은 TLC와 HPLC를 이용하여 확인하였다. TLC는 상기 3-1과 동일한 방법으로 수행하였다.

[0078] HPLC는 하기의 방법으로 수행하였다. 사포닌 전환물을 에펜돌프 튜브에 1mL씩 채취한 후 동량의 수포화 부탄올을 첨가하여 혼합한다. 원심분리하여 상층액을 취하고, 감압농축하여 부탄올을 완전히 날린다. 50% 메탄올을 이용하여 1000ppm의 농도가 되게 시료를 녹인다. Sep-pak(C18)으로 여과한 후 여과액을 물과 아세트나이트릴을 1.2mL/분의 유속으로 농도구배를 주어 분석하였다. 흡광도는 203nm의 UV에서 측정하였다.

[0079] 인삼사포닌과 THK-V8^T의 조효소 반응의 결과는 도 4와 도 5에 나타냈다.

[0080] 도 4는 TLC로 확인한 결과이며, *Lactobacillus yonginsis* THK-V8^T 조효소 추출물에 의한 진세노사이드 Rb1반응물의 상당량이 Rd로 전환된 것을 확인할 수 있었다.

[0081] 도 5는 HPLC로 확인한 결과이며, 마찬가지로 Rd가 생성된 것을 확인할 수 있었다.

[0082] 즉, 상기 실험 결과를 통해서, 신규 균주인 *Lactobacillus yonginsis* THK-V8^T에 의하여 저분자성 진세노사이드를 효과적으로 생산할 수 있는 것을 확인할 수 있었다.

[0083] <제조예> 인삼 사포닌 발효물 제제의 제조

[0084] *Lactobacillus yonginsis* THK-V8^T을 이용한 혼합 발효물 제제의 제조를 위해 다음 공정을 수행하였다. 먼저 수세한 인삼 및 홍삼을 잘게 분쇄하여 20배수의 70%(w/v) 에탄올로 상온에서 100rpm으로 진탕 추출한다. 추출과정을 2회 반복하여 여과한 후 50℃ 이하로 감압 농축한 분말을 인삼 및 홍삼 추출물로 한다. 위의 인삼 및 홍삼 추출물 0.5%와 효모 추출물(yeast extract) 1%를 혼합한 용액을 사포닌 발효 배지로 설정하였다.

[0085] MRS 배지 조건 아래 30℃에서 정치 배양하여 대수 증식기까지 배양한 균을 원심분리하여 하층의 균체를 취한다. 배지와 같은 부피의 0.85% 생리 식염수를 넣어 잘 섞은 후 다시 원심 분리하여 균체를 취하여 여액을 씻어낸다. 위의 과정을 두 번 반복한다. 균체를 배양 배지와 같은 부피의 사포닌 발효배지에 접종하여 30℃에서 15일간 발효시킨다. 배양을 마친 배양액은 초음파 분쇄기로 균체를 파쇄하여 생육을 정지 시키고 동결건조하여 인삼 및 홍삼발효물 제제를 제조하였다.

수탁번호

[0086]

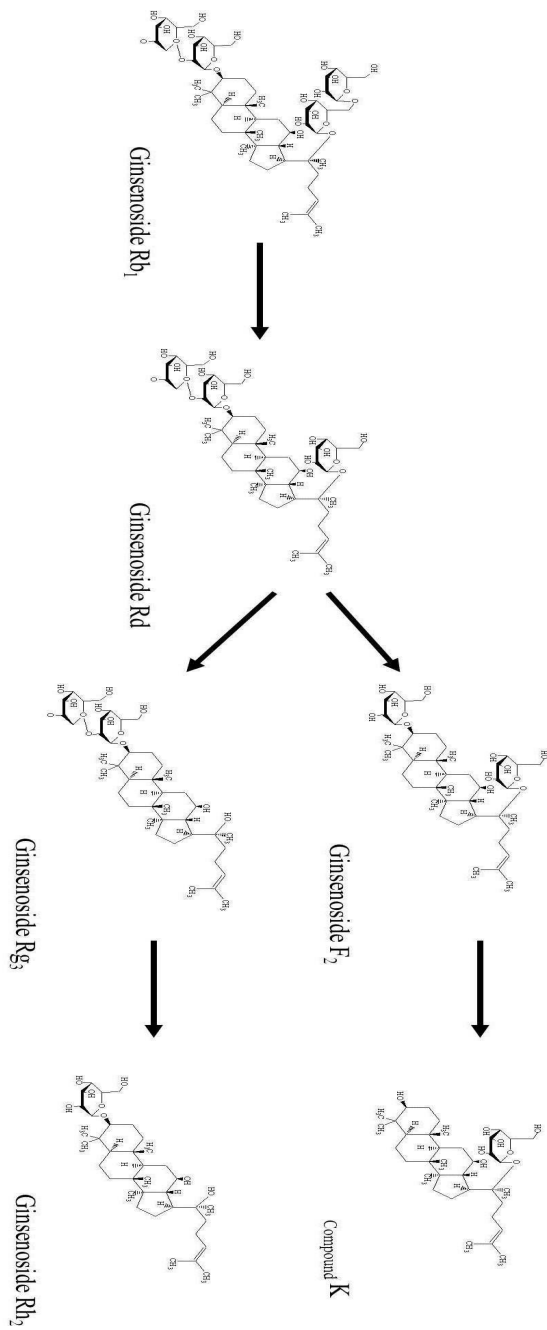
기탁기관명 : 농업생명공학연구원

수탁번호 : KACC16236

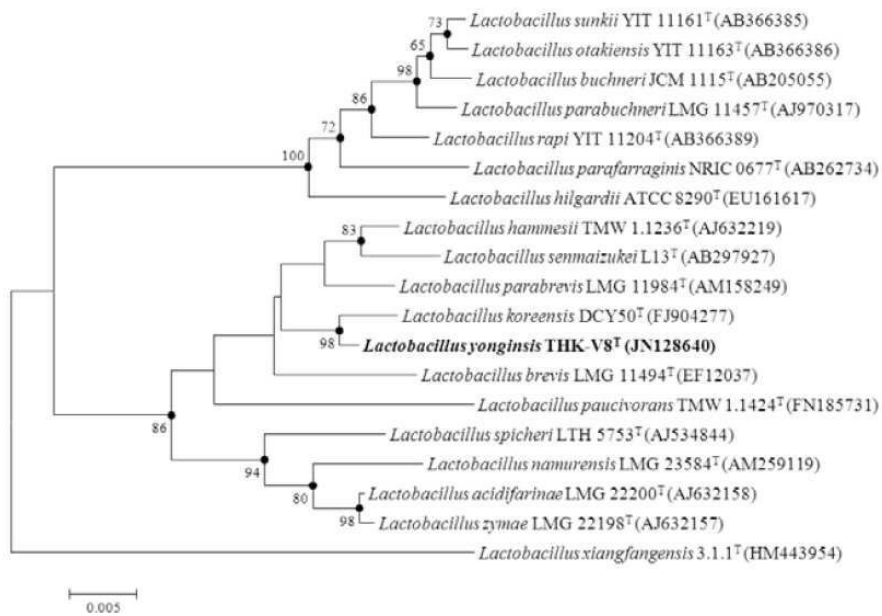
수탁일자 : 20110819

도면

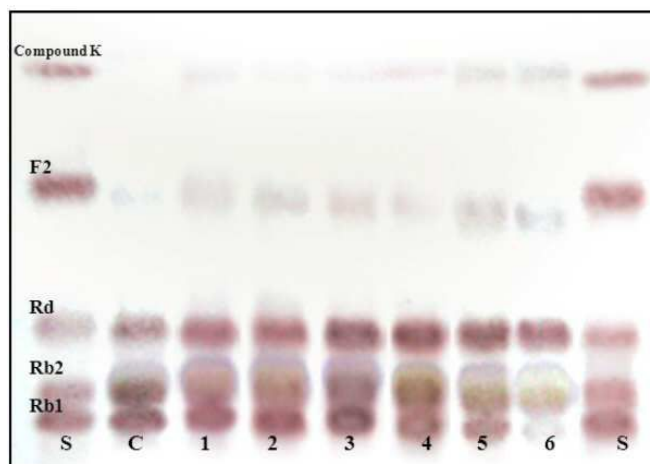
도면1



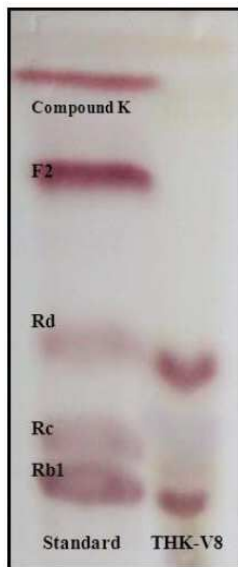
도면2



도면3

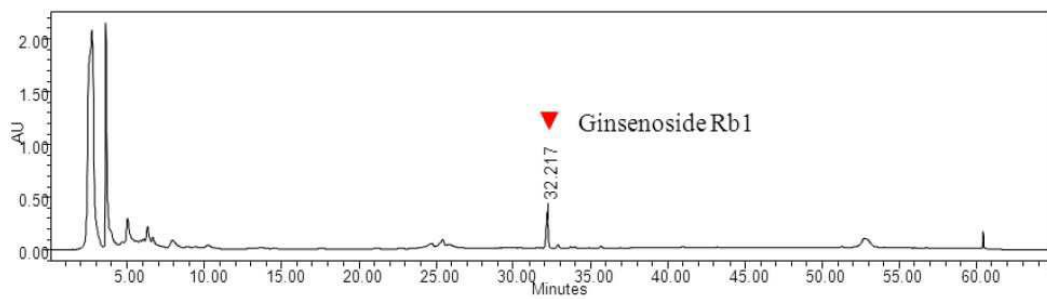


도면4

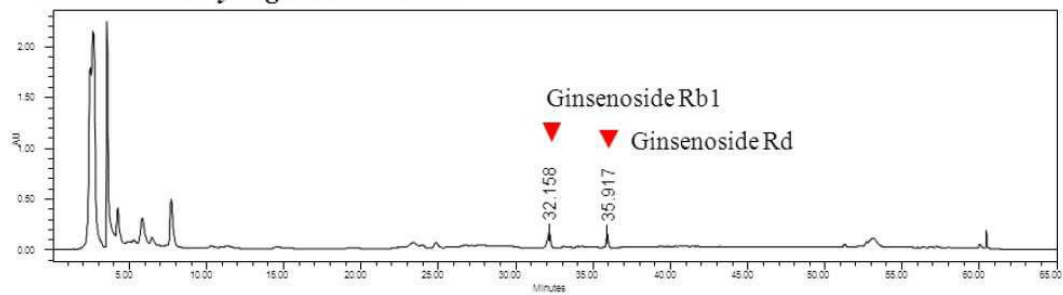


도면5

Rb₁ control



Lactobacillus yonginsis THK-V8^T



서열 목록

- <110> University-Industry Cooperation Group of Kyung Hee University
- <120> Novel *Lactobacillus yonginsis* THK-V8^T and method for lowering
molecular weight in saponin
- <130> p12-065-KHU
- <160> 3
- <170> Kopatent In 2.0

<210>	1	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	THK-V8 forward primer	
<400>	1	
	agagtttgat cctggctcag	20
<210>	2	
<211>	19	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	THK-V8 reverse primer	
<400>	2	
	ggttaccttg ttacgactt	19
<210>	3	
<211>	1451	
<212>	DNA	
<213>	Lactobacillus yonginsis THK-V8	
<400>	3	
	ccagcgcgct aactgcagtc gacgagcttc cgttgattga cgtgcttgca ctgatttcaa	60
	cattgaagcg agtggcgaac tggtagtaac cacgtgggaa atctgccag aagcagggga	120
	taacacttgg aaacaggtgc taataccgta taacaacaaa aaccgcatgg tttttgtttg	180
	aaaggtggct tcggctatca cttctggatg atcccgcggc gtattagtta gttggtgagg	240
	taaaggccca ccaagacaat gatacgtagc cgacctgaga gggtaatcgg ccacattggg	300
	actgagacac ggcccaaaact cctacgggag gcagcagtag ggaatcttcc acaatggacg	360
	aaagtctgat ggagcaatgc cgcgtgagtg aagaagggtt tcggctcgta aaactctgtt	420
	gttaaagaag aacacttctg agagtaactg ttcagaagtt gacggtatit aaccagaaag	480
	ccacggctaa ctacgtgcca gcagccgagg taatacgtag gtggcaagcg ttgtccggat	540
	ttattgggag taaagcgagc gcagcggtt ttttaagtct gatgtgaaag ccttcggctt	600
	aaccggagaa gtgcatcgga aactgggaaa cttgagtga gaagaggaca gtggaactcc	660
	atgtgtagcg gtggaatgcg tagatatatg gaagaacacc agtggcgaag gcggctgtct	720
	agtctgtaac tgacgtgag gctcgaaagc atgggtagcg aacaggatta gataccctgg	780

tagtccatgc cgtaaacgat gaggctagg tgttgagggt tttccgccct tcagtgccgc	840
agctaacgca ttaagcactc cgcctgggga gtacgaccgc aaggttgaaa ctcaaaggaa	900
ttgacggggg cccgcacaag cggtaggagca tgtggtttaa ttcgaagcta cgcgaagaac	960
cttaccaggt cttagacatac tatgcaaatac ttagagataa gacgttcctt tcggggacat	1020
ggatacaggt ggtgcatggt tgtcgtcagc tcgtgtcgtg agatgttggg ttaagtcccg	1080
caacgagcgc aacccttatt atcagttgcc agcattaagt tgggcactct ggtgagactg	1140
ccggtgacaa accggaggaa ggtggggatg acgtcaaatac atcatgcccc ttatgacctg	1200
ggctacacac gtgctacaat ggacggtaca acgagttgag aagtcgtgag gctaagctaa	1260
tctcttaaag ccgttctcag ttcggattgt aggcctgcaac tcgcctacat gaagttggaa	1320
tcgctagtaa tcgcgatca gcatgccgcg gtgaatacgt tcccgggcct tgtacacacc	1380
gcccgtcaca ccatgagagt tgtaacaccc aaagccggtg agaaacttcg ggatcagcct	1440
caagcgatg g	1451