

	(19) 대한민국특허청(KR) (12) 공개특허공보(A)	(11) 공개번호 10-2014-0067769 (43) 공개일자 2014년06월05일
(51) 국제특허분류(Int. Cl.) C12N 1/20 (2006.01) C12P 7/52 (2006.01) C12P 13/00 (2006.01) C12R 1/01 (2006.01)	(71) 출원인 계명대학교 산학협력단 대구광역시 달서구 달구벌대로 1095 (신당동)	
(21) 출원번호 10-2012-0135443	(72) 발명자	
(22) 출원일자 2012년11월27일	이삼빈	
심사청구일자 2012년11월27일	대구 달서구 선원로 171, 102동 306호 (이곡동, 성서무지개타운)	
	송영철	
	대구 동구 큰고개로 23, 1동 512호 (신암동, 보성아파트)	
	김지은	
	대구 달서구 대명천로12안길 40, 1동 302호 (성당동, 대영하이츠)	
	(74) 대리인	
	특허법인태백	

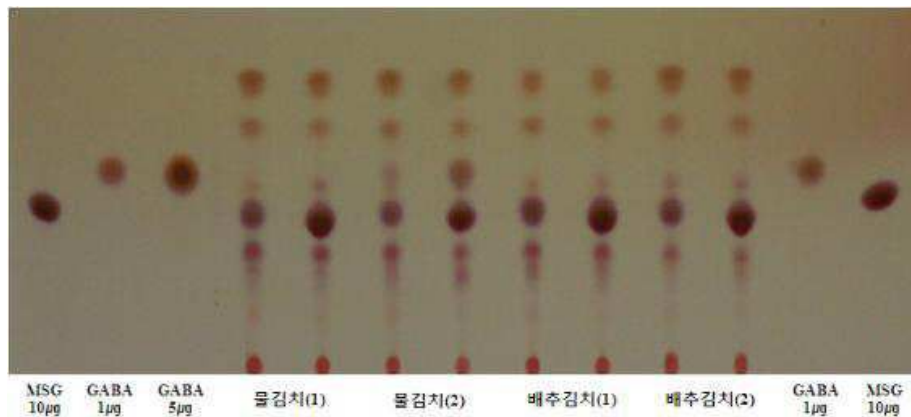
전체 청구항 수 : 총 5 항

(54) 발명의 명칭 물김치로부터 분리된 락토코커스 락티스 YC 균주 및 이를 이용한 감마-아미노부티르산의 생산방법

(57) 요약

본 발명은 물김치로부터 분리된 락토코커스 락티스(*Lactococcus lactis*) YC 균주 및 이를 이용한 감마-아미노부티르산의 생산방법에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 감마-아미노부티르산 생성능력이 있는 신규한 균주인 락토코커스 락티스(*Lactococcus lactis*) YC (KCCM11297P) 균주 및 이를 이용한 감마-아미노부티르산의 생산방법에 관한 것이다. 상기 균주를 배양하여 이용하면 GABA가 포함된 발효유, 치즈, 김치, 요구르트 등의 기능성 발효식품을 제조할 수 있다.

대 표 도 - 도1



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	2012-0270
부처명	지식경제부
연구사업명	지역혁신센터사업
연구과제명	꽃송이 버섯의 배양기술을 이용한 항균 소재 개발 및 상품화
기 여 율	1/1
주관기관	계명대학교 산학협력단
연구기간	2012.03.01 ~ 2013.02.28

특허청구의 범위

청구항 1

감마-아미노뷰티르산(gamma-aminobutyric acid; GABA) 생성능을 가진 락토코커스 락티스(*Lactococcus lactis*) YC (KCCM11297P) 균주.

청구항 2

락토코커스 락티스(*Lactococcus lactis*) YC (KCCM11297P) 균주를 배지에 배양하는 단계; 및
상기 배양물로부터 GABA를 분리하는 단계를 포함하는 GABA 생산방법.

청구항 3

제2항에 있어서, 상기 배양하는 단계는 상기 균주를 30 내지 40℃에서 12 내지 72 시간 동안 배양하는 것을 특징으로 하는 GABA 생산방법.

청구항 4

제2항에 있어서, 상기 배지에는 0.1 내지 1 중량% 모노소듐 글루타메이트(mono sodium glutamate; MSG)를 더 첨가하는 것을 특징으로 하는 GABA 생산방법.

청구항 5

락토코커스 락티스(*Lactococcus lactis*) YC (KCCM11297P) 균주에 의한 발효물을 포함하는 식품 조성물.

명세서

기술 분야

[0001] 본 발명은 물김치로부터 분리된 락토코커스 락티스 YC 균주 및 이를 이용한 감마-아미노뷰티르산의 생산방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 물김치는 한국 고유의 전통발효식품인 김치의 일종으로 열무물김치, 배추물김치(백김치), 나박물김치 등이 있으며, 각각 주재료로 열무, 절임배추, 얇게 썬 무 및 양념류(마늘, 생강, 풋고추 또는 홍고추 등)에 2% 정도의 소금물을 가하여 숙성시킨다. 물김치는 특히 국물을 이용하는 김치로서 재료로부터 우리나라 다양한 영양성분과 발효 중에 생성된 유기산을 비롯한 발효산물과 다양한 효소류가 녹아 있으며 시원한 맛을 띠는 전통음료로 국수나 냉면의 육수 대용으로도 사용되고 있다. 이러한 전통발효식품인 김치는 유제품 등과 달리 염의 농도가 높고, 고춧가루, 마늘, 생강 등 부재료의 영향을 받으며, 발효가 진행됨에 따라 pH가 낮아지는 등 미생물이 생육하기 어려운 환경을 지니고 있는데, 이러한 관점에서 김치로부터 분리된 균주는 비교적 극한 환경에서도 견딜 수 있는 장점을 가진다.

[0003] 한편, 감마-아미노뷰티르산(gamma-aminobutyric acid; GABA)은 자연계에 분포하는 비단백질 아미노산의 일종으로, 억제성 신경전달물질로서 혈압상승을 억제하고 시력증진에 효과가 있으며 불안감, 초조감 등을 진정시키는 작용을 하는 것으로 알려진 물질이다. 동물의 경우 뇌, 심장, 폐, 신장 등에 분포되어 있으며, 식물의 경우 발아현미, 녹차 등에서 주로 발견되고 있다. 스트레스에 시달리는 현대인이나 수험생, 알코올 과다 섭취자의 경우 뇌와 혈중 GABA 농도가 낮은 것으로 보고되어 있으며, 체내 GABA 농도의 극심한 부족은 발작, 경련, 간질 증세를 일으키는 것으로 알려져 있다.

[0004] GABA의 기능으로는 뇌의 혈류를 개선하여 뇌의 산소공급을 증가시켜 뇌의 대사 향상 및 의욕저하 등의 치료제로 사용되어 brain food 라고도 하며 이 외에도 연수의 혈관증추에 작용하여 항이뇨호르몬인 바소프레신의 분비를 억제하고 혈관을 확장시켜 혈관을 낮추는 고혈압 저하효과(anti-hypertensive effect) 및 이뇨효과(diuretic effect) 등 여러 생리작용이 보고되고 있다.

[0005] 현재 GABA는 현미, 녹차, 맥아, 배추 등에 자연적으로 약간 함유되어 있으나, 그 함량이 낮아 자연 식품으로 섭취하는 양으로는 생리활성을 기대하기 어려운 실정이다. 지난 수 년 동안 GABA의 대량생산에 관한 연구가 활발히 진행되어 왔으나 합성 GABA의 경우 식욕부진, 변비, 설사 등의 부작용이 있어 발효제법을 이용한 GABA의 생산이 연구되고는 있으나 아직은 수율이 낮은 형편이다. GABA는 대략 홍국쌀(red mold rice)에 20mg/100g 건물량, 가바론티(Gabaron tea)에 150mg/100g 건물량, 불린 쌀눈(soaked rice germ)에 400mg/100g 건물량이 함유하고 있다.

[0006] 한편, 한국출원번호 제10-2011-0017772호에서는 메치실린 내성 황색포도상구균(MRSA)에 대한 항균효과가 있는 박테리오신 lacticin KC 24 및 이를 생산하는 김치 유래의 신규한 유산균 *Lactococcus lactis* KC 24 에 대해 개시하고 있으나, 상기 균주의 GABA 생성능에 대한 언급은 없다.

[0007] 따라서, 본 발명자들은 물김치에서 감마-아미노뷰티르산을 생산하는 균주를 선별하기 위해 순수분리된 젖산균들을 TLC(Thin Layer Chromatography)를 통해 탐색하였고, 이 중에서 GABA를 생성하는 락토코커스 락티스(*Lactococcus lactis*) YC 균주를 분리하고, 상기 균주의 다양한 발효특성과 GABA 생성방법을 확인하고 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명의 목적은 감마-아미노뷰티르산(gamma-aminobutyric acid; GABA) 생성능을 가진 락토코커스 락티스(*Lactococcus lactis*) YC (KCCM11297P) 균주를 제공하는 데에 있다.

[0009] 본 발명의 다른 목적은 상기 균주를 배양하여 배양물로부터 GABA를 생산하는 방법을 제공하는 데에 있다.

과제의 해결 수단

[0010] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 감마-아미노뷰티르산(gamma-aminobutyric acid; GABA) 생성능을 가진 락토코커스 락티스(*Lactococcus lactis*) YC (KCCM11297P) 균주를 제공한다.

[0011] 본 발명의 락토코커스 락티스(*Lactococcus lactis*) YC (KCCM11297P) 균주는 물김치에서 분리되었으며, 후술하는 실시예의 방법에 따라 스크리닝 및 동정하였다. 미생물의 동정은 그의 형태학적, 생리학적 및 생화학적 특성을 기초로 하여 이루어졌다.

[0012] 또한 본 발명은 락토코커스 락티스(*Lactococcus lactis*) YC (KCCM11297P) 균주를 배지에 배양하는 단계; 및 상기 배양물로부터 GABA를 분리하는 단계를 포함하는 GABA 생산방법을 제공한다.

[0013] 상세하게는, 상기 배양하는 단계는 상기 균주를 30 내지 40℃에서 12 내지 72 시간 동안 배양하는 것을 특징으로 하고, 상기 배지에는 0.1 내지 1 중량% 모노소듐 글루타메이트(mono sodium glutamate; MSG)를 더 첨가하는 것을 특징으로 한다.

[0014] 상기 배지로는 MRS 배지가 바람직하나, 상기 균주의 배양에 적합한 배지라면 특별히 이에 한정되는 것은 아니다.

[0015] 상기 MSG의 첨가량이 0.1 중량% 이하인 경우 GABA 생성에 필요한 전구물질이 부족하게 되는 문제가 발생할 수 있고, 1.0 중량%를 초과하는 경우 GABA로 전환되지 않은 MSG가 남아 있게 되는 문제가 발생할 수 있다.

[0016] 한편, 배지에 축적된 GABA는 다양한 방법으로 회수할 수 있다. 예를 들어, 배양액을 분무 건조하면 저농도의 GABA-함유 분말을 대량으로 얻을 수 있으며, GABA의 함량을 높이기 위해서는 배양액을 감압 증발기를 이용하여 농축한 후 동결건조를 진행하면 가능하다. 또한, 고순도의 GABA를 얻기 위해서는 이온교환수지를 이용한 정제방법을 사용한 후 농축 및 건조 공정을 수행하면 된다. GABA는 온도 및 pH의 변화에 크게 영향을 받지 않고, 공정

안정성이 있기 때문에, 회수 공정상의 제한은 없다.

[0017] 또한, 본 발명은 상기 락토코커스 락티스(*Lactococcus lactis*) YC (KCCM11297P) 균주에 의한 발효물을 포함하는 식품 조성물을 제공한다.

[0018] 상기 얻어진 배양물은 바람직하게는 액체배양을 하여 세포를 회수한 후 동결건조하여 g당 함량을 측정한 다음 동결건조 파우더의 형태로서 다양한 식품조성물에 첨가되어질 수 있다. 또한 상기 식품조성물은 발효유, 치즈, 김치, 요구르트의 발효식품일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

발명의 효과

[0019] 본 발명자들이 물김치에서 분리한 락토코커스 락티스(*Lactococcus lactis*) YC (KCCM11297P) 균주는 GABA 생성 능력이 뛰어나므로, 상기 균주를 배양하여 이용하면 고함량의 GABA가 포함된 발효유 등의 기능성 식품을 제조할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0020] 도 1은 물김치와 배추김치에서 순수분리된 미생물의 GABA 생성 시험을 TLC로 확인한 결과를 나타낸다.

도 2는 물김치에서 GABA를 생성하는 균주의 배양시간에 따른 pH와 산도를 나타낸 그래프이다.

도 3은 GABA 생성 미생물의 온도와 시간에 따른 성장시험을 나타낸 그래프이다.

도 4는 GABA 생성 미생물의 배양시간에 따른 GABA 생성 시험을 TLC로 나타낸 그래프이다.

도 5는 GABA 생성 미생물의 온도별 GABA 생성 시험을 TLC로 나타낸 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0021] 이하, 하기 실시예를 통해 본 발명을 보다 상세하게 설명한다. 다만, 이러한 실시예에 의해 본 발명이 한정되는 것은 아니다.

[0022] < 실시예 1 > 미생물의 분리

[0023] 시료로 사용된 배추김치와 물김치는 1,000배 희석하여 MRS agar 배지(표 1)에 20 μ l를 평면도말법으로 접종한 후 30℃에서 48시간 배양하였다. 그런 다음, 각각의 균락을 MRS agar 배지에서 순수분리하고 균락을 잠정적 젖산균으로 선별하였다.

표 1

[0024] 본 발명에서 미생물 분리에 사용된 변형 MRS 배지의 조성

성분	성분비(그램/리터)
프로테오스 펩톤 #3	10.0
쇠고기 추출물	10.0
효모 추출물	5.0
텍스트로즈	20.0
폴리솔베이트 80	1.0
암모늄 시트레이트	2.0
소듐 아세테이트	5.0
마그네슘 설페이트	0.1
망간 설페이트	0.05
디포타시움 포스페이트	2.0

[0025] < 실시예 2 > 미생물의 GABA 생성능 시험

[0026] < 실시예 1 >의 방법을 통해 배추김치와 물김치에서 각각의 김치에서 2종류씩 젖산균을 분리하였고, 잠정적으로 각각의 균주를 배추김치(1), 배추김치(2), 물김치(1), 물김치(2)라고 표기하였다. 이런 4종류의 젖산균의 GABA 생성능을 확인하기 위하여 MRS배지와 MSG 0.5%를 포함한 MRS배지에 각각 순수분리된 젖산균을 한 백금이 접종하여 48시간동안 배양하여 TLC(Thin Layer Chromatography)를 이용하여 GABA 생성 유무를 확인하였다.

[0027] TLC는 전개용매로 n-butanol : water : acetic acid (3 : 1 : 1)의 비율로 혼합하여 4시간 포화 한 후 사용하였고, TLC 판에는 각각의 시료들을 2 μ l씩 동일선상에 분주 및 건조하여 전개용매에서 90분간 전개하였다. 전개 종료 후 TLC 판을 50℃에서 5분간 건조하고 아세톤에 난하이드린(0.2% w/v)를 혼합한 용액을 분무하여 105℃에서 3분간 열처리를 하여 발색하여 측정하였다.

[0028] 그 결과, 물김치(2) 조건에서 0.5% MSG가 첨가된 MRS에서 배지에서 자란 젖산균이 GABA를 생성한 것을 확인할 수 있었다(도 1). 따라서 물김치(2) 조건에서 분리된 젖산균으로 다음과 같은 시험을 수행하였다.

[0029] < 실시예 3 > GABA 생성 미생물의 생장시험

[0030] 젖산균의 생장은 pH, 적정산도 및 생균수를 측정하여 시험하였다. pH는 pH meter를 이용하여 측정하였으며, 적정산도는 시료 10ml를 취하여 0.1N-NaOH로 적정하여 종말점을 pH8.3에서 종료하여 계산하였다. 생균수는 MSG 0.5% 함유한 3% MRS 용액 100ml에 젖산균을 피펫으로 1ml 접종한 후 30℃에서 12시간 간격으로 72시간까지 배양한 각 시료를 MRS agar 평판배지에 10단계 희석법을 이용하여 도말 후 30℃에서 48시간 배양 후 계수한 결과로 도 2 및 표 2에 나타내었다.

표 2

[0031]

생균수 (CFU/mL)	시간						
	0	12	24	36	48	60	72
	0	1.74×10^9	2.06×10^9	2.2×10^9	7.75×10^9	1.15×10^7	3.2×10^3

[0032] 그 결과, pH와 산도는 12시간 만에 pH 6.35 와 산도 0.74%로 급격히 변화하였으며 발효 12~72 시간까지는 크게 변하지 않았다. 발효 72시간에는 pH 4.29, 산도 0.92% 가 되었다. 생균수는 48시간까지 7.75×10^9 CFU/mL로 증가하였으나 이후부터는 점차감소하여 72시간에는 3.2×10^3 CFU/mL로 나타났다.

[0033] 또한 온도별로 GABA 생성 미생물의 생장을 알아보기 위하여, 젖산균을 3가지 조건으로 온도를 나누어 생장 시험을 하였다. 각각 MRS 배지에 순수분리된 젖산균을 한 백금이를 접종하여 30, 37, 40℃에서 72시간 동안 12시간 간격으로 생장 시험을 하였다.

[0034] 그 결과, pH와 산도는 30℃ 발효 조건에서 시간에 관계없이 발효가 가장 빠르게 진행되는 것을 알 수 있었다. 30℃에서 72시간 발효한 결과 pH 4.21, 산도 0.96%로 가장 높았으며, 37℃ 와 40℃에서는 각각 pH 4.35, 4.63, 산도 0.74%, 0.55% 순으로 나타났다(도 3).

[0035] < 실시예 4 > GABA 생성 미생물의 시간별 GABA 생성능 시험

[0036] 젖산균의 시간별 GABA 생성능을 확인하기 위하여 MRS배지와 MSG 0.5%를 포함한 MRS배지에 각각 순수분리된 젖산균을 한 백금이 접종하고 30℃에서 12시간 간격으로 72시간 배양하여 TLC(Thin Layer Chromatography)를 이용하여 GABA 생성 변화를 확인하였다.

[0037] 그 결과, 발효 12시간이 지나면서 GABA가 생성되어 72시간 동안 꾸준히 GABA의 함량이 증가하는 것을 알 수 있었다. 하지만 발효 48시간이 지나면서는 GABA 생성이 크게 증가하지 않는 것으로 나타났다(도 4).

[0038] < 실시예 5 > GABA 생성 미생물의 온도별 생균수 시험 및 GABA 생성능 시험

[0039] 생균수는 MSG 0.5% 함유한 3% MRS 용액 100ml에 젖산균을 피펫으로 1ml 접종한 후 각각 30, 37, 40℃에서 12시간 간격으로 72시간까지 배양한 각 시료를 MRS agar 평판배지에 10단계 희석법을 이용하여 도말하여 표 3에 나타내었다.

[0040]

표 3

(단위:CFU/mL)

	0	12	24	36	48	60	72
30℃	0	1.74×10^7	2.06×10^9	5.26×10^9	7.75×10^9	1.15×10^7	3.20×10^3
37℃	0	3.72×10^6	1.76×10^7	3.76×10^9	5.14×10^8	3.76×10^5	1.98×10^3
40℃	0	2.28×10^6	1.40×10^6	6.42×10^7	3.92×10^5	2.64×10^3	4.66×10^2

[0042] 표 3에서 보는 바와 같이, 온도별에 따른 GABA 생성균주는 30℃에서 생균수가 가장 높게 나타났으며 발효 후 36~48시간까지는 생균수가 증가하다 이후부터 생균수가 급격히 감소하는 것을 알 수 있었다.

[0043] 또한, 젖산균의 온도별 GABA 생성능을 확인하기 위하여 MRS배지와 MSG 0.5%를 포함한 MRS배지에 각각 젖산균을 0.1% 접종하고 30℃, 37℃, 40℃에서 각각 24시간 간격으로 72시간 배양하여 TLC(Thin Layer Chromatography)를 이용하여 GABA 생성 변화를 확인하였다.

[0044] 그 결과, 온도에 따라 GABA 생성능은 온도가 높아질수록 GABA의 생성이 빠르게 일어나는 것을 알 수 있었으며, 균체의 성장 속도와 GABA의 생성 속도는 상이한 결과가 나타났다.

[0045] < 실시예 6 > 미생물 동정

[0046] 속과 종명을 확인하기 위하여 API 50 STREP kit(API bioMerieux, France)를 이용하여 49종의 당 발효 시험을 실시하였을 때 락토스 등 22종으로부터 산을 생성하였고 API kit 동정결과 락토코커스(*Lactococcus lactis*)로 나타났다(표 4). 16S rRNA 유전자 염기서열(Gene Sequence)을 이용하여 얻어진 결과가 일치되어 락토코커스 락티스로 판명되었다. 본 발명자들은 GABA 생성 능력이 우수한 상기 균주를 락토코커스 락티스(*Lactococcus lactis*) YC로 명명하고, 2012년 8월 29일 한국미생물보존센터(KCCM)에 기탁번호 KCCM11297P로 기탁하였다.

표 4

[0047]

본 발명에 사용된 락토코커스 락티스 YC의 생화학적 특성

당 이용 능력			
control	+	esculin ferric citrate	+
glycerol	-	salicin	+
erythritol	-	D-cellobiose	+
D-arabinose	-	D-maltose	+
L-arabinose	+	D-lacose(bovine origin)	+
D-ribose	+	D-melibiose	-
D-xylose	+	D-saccharose(sucrose)	+
L-xylose	-	D-trehalose	+
D-adonitol	-	inulin	-
Methly-βD-xylopyranoside	-	D-melezitose	-
D-galactose	+	D-rafinose	-
D-glucose	+	amidon(starch)	+
D-Fructose	+	glycogen	-
D-mannose	+	xylitol	-
L-sorbose	-	gentiobiose	+
L-rhamnose	-	D-turanose	-
dulcitol	-	D-lyxose	+
inositol	-	D-taratose	-
D-mannitol	+	D-fucose	-
D-sorbitol	-	L-fucose	-
Methly-αD-mannopyranoside	-	D-arabitol	-
Methly-αD-glucopyranoside	-	L-arabitol	-
N-acetylglucosamine	+	potassium gluconate	+
amygdalin	+	potassium 2-ketogluconate	-
arbutin	+	potassium 5-ketogluconate	-

[0048]

< 실시예 7 > 효소활성 시험

[0049]

효소활성 시험은 MRS 액체배지에서 30℃, 24시간 동안 배양한 균주를 원심분리 후 suspension 용액에 현탁하여 660nm에서 0.75~0.76으로 생리식염수로 희석하여 105 - 106 cfu/ml 수준의 시료를 조제한 후, API ZYM kit(API bioMerieux, France)를 이용하여 37℃에서 5시간 동안 배양한 다음 효소반응을 시켰다. 효소활성은 표준색상표를 비교하여 0-5의 수치로 표시한 결과는 표 5에 나타내었다.

표 5

[0050]

효 소	효소활성
알칼라인 포스파타제	0
에스테라제(C4)	0
에스테라제 리파제(C8)	0
리파제(C14)	0
류신 아릴아미다제	5
발린 아릴아미다제	1
시스틴 아릴아미다제	1
트립신	1
카이모트립신	0
산 포스파타제	5
나프톨-AS-BI-포스포하이드로라제	2
α -갈락토시다제	0
β -갈락토시다제	0
β -글루크로니다제	0
α -글루코시다제	0
β -글루코시다제	0
N-아세틸- β -글루코사민니다제	0
α -만노시다제	0
β -푸코시다제	0

[0051]

* : 0 에서 5까지 단계별로 표준색이 명시되어 있으며, 0은 음성이고 5는 최대의 강도를 나타낸다. 1은 5나노몰(nanomoles), 2는 10나노몰, 3은 20나노몰, 4는 30나노몰, 5는 40나노몰 이상의 효소활성을 나타냄.

[0052]

표 5에서 볼 수 있는 바와 같이, 락토코커스 락티스(*Lactococcus lactis*) YC는 류신 아릴아미다제, 산 포스파타제에서 효소 활성이 높게 나타났고, 나프톨-AS-BI-포스포하이드로라제, 발린 아릴아미다제, 시스틴 아릴아미다제, 트립신에서도 효소활성을 나타내었다.

수탁번호

[0053]

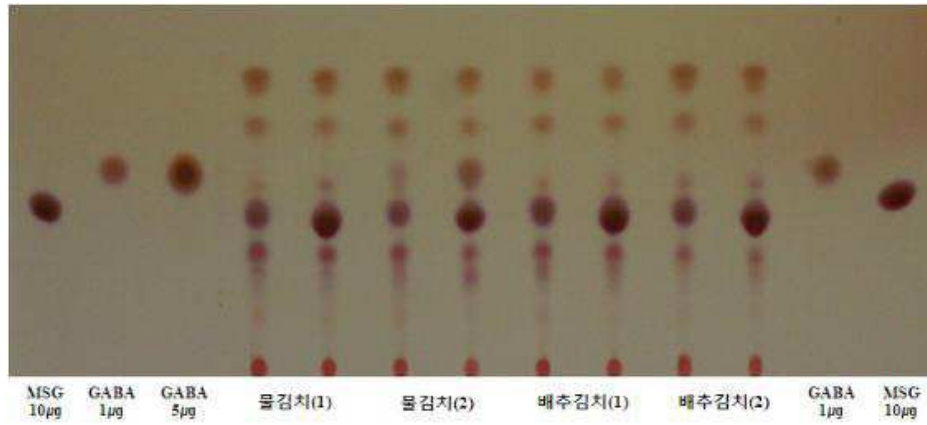
기탁기관명 : 한국미생물보존센터(국외)

수탁번호 : KCCM11297P

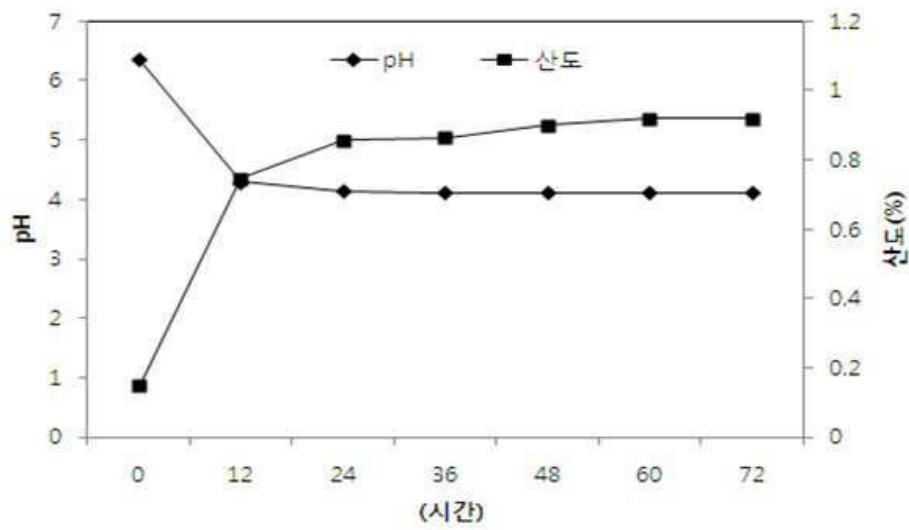
수탁일자 : 20120829

도면

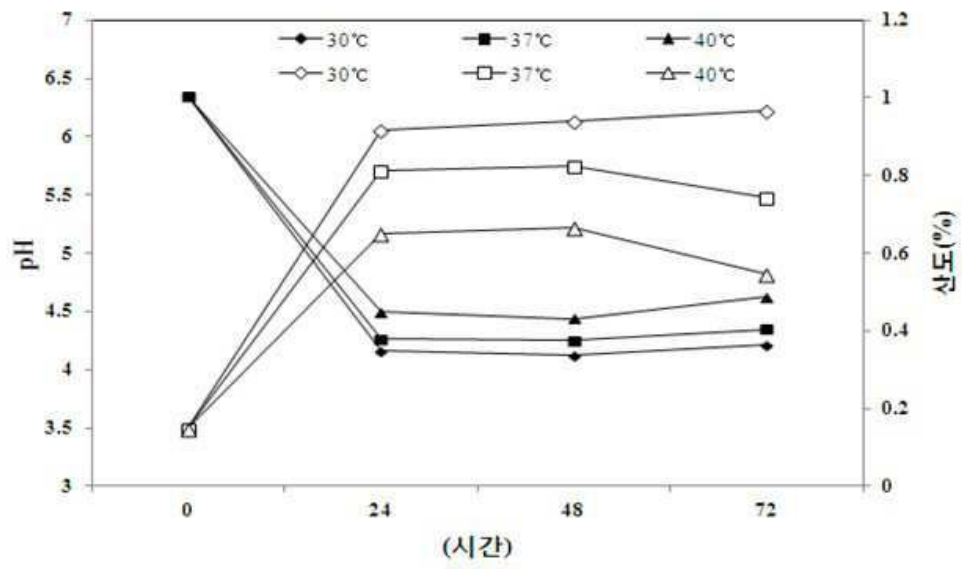
도면1



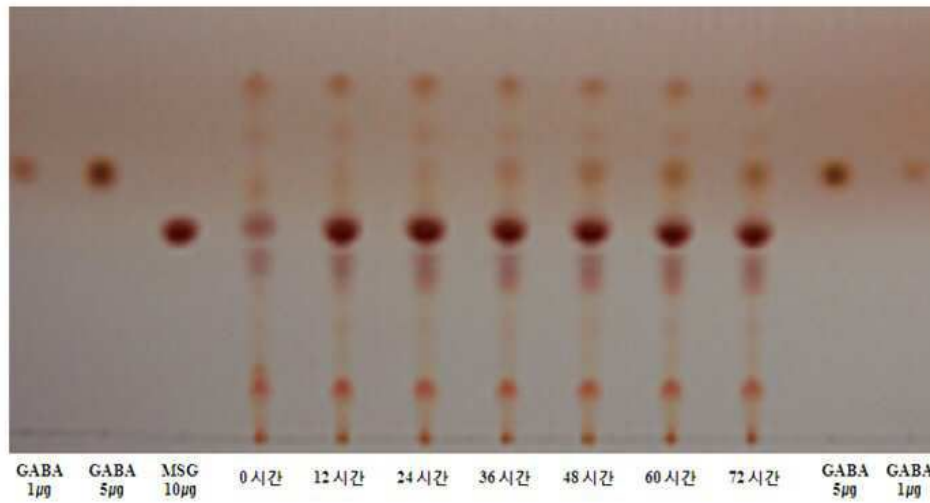
도면2



도면3



도면4



도면5

