



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2009-0036343
(43) 공개일자 2009년04월14일

(51) Int. Cl.

A23L 1/22 (2006.01) A23L 1/23 (2006.01)

A23C 9/123 (2006.01) A23L 1/202 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2007-0101469

(22) 출원일자 2007년10월09일

심사청구일자 2007년10월09일

(71) 출원인

인하대학교 산학협력단

인천 남구 용현동 253 인하대학교

(72) 발명자

소재성

서울 마포구 공덕2동 삼성 래미안 아파트 103/604

전정민

인천 남동구 만수2동 신동아 아파트 9/106

홍상원

인천 부평구 부평1동 동아아파트 26동 1007호

(74) 대리인

이원희

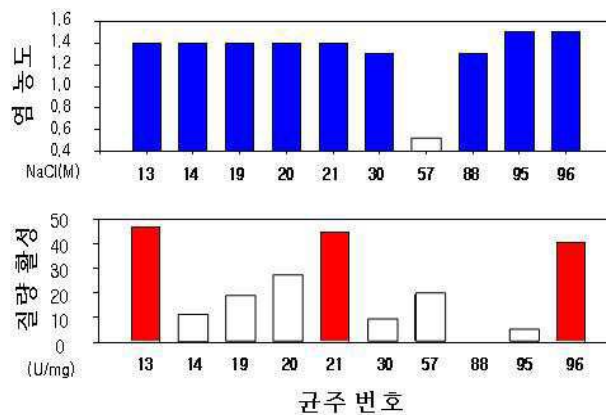
전체 청구항 수 : 총 11 항

(54) 내염성 균주를 천연 식품 첨가제로 사용하는 방법

(57) 요약

본 발명은 락토바실러스 속 유산균에 속하는 내염성 균주를 천연 식품 첨가제로 사용하는 식품의 풍미 향상 방법에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 내염성이고 글루타미네즈 활성이 40 U/mg 이상인 락토바실러스 속 유산균을 식품 제조과정에 첨가하는 단계를 포함하는 식품의 풍미 향상 방법에 관한 것이다. 본 발명의 내염성 락토바실러스 속 유산균을 천연 식품 첨가제로 사용하여 글루타민으로부터 글루타민산염을 생산하는 방법은 기존의 인공 식품 첨가제에 의한 부작용이나 병적 증세를 회피할 수 있다.

대표도 - 도3



특허청구의 범위

청구항 1

내염성이고 글루타미네즈 활성이 40 U/mg 이상인 락토바실러스 속 유산균을 식품 제조과정에 첨가하는 단계를 포함하는 식품의 풍미 향상 방법.

청구항 2

제 1항에 있어서, 식품은 고염식품인 것을 특징으로 하는 식품의 풍미 향상 방법.

청구항 3

제 2항에 있어서 고염식품은 장류, 젓갈류 및 장아찌류로 구성되는 것을 특징으로 하는 식품의 풍미 향상 방법.

청구항 4

제 3항에 있어서, 장류는 간장, 고추장 및 된장으로 구성되는 것을 특징으로 하는 식품의 풍미 향상 방법.

청구항 5

제 1항에 있어서, 락토바실러스 속 유산균은 1.3M 이상으로 NaCl이 포함된 배지에서 성장가능한 내염성 균주인 것을 특징으로 하는 식품의 풍미 향상 방법.

청구항 6

제 1항에 있어서, 락토바실러스 속 유산균은 *락토바실러스 플란타룸* KLB13 균주(수탁번호: KCTC 11185BP), *락토바실러스 크리스파투스* KLB21 균주 및 *락토바실러스 플란타룸* KLB96 균주로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 식품의 풍미 향상 방법.

청구항 7

제 6항에 있어서, *락토바실러스 플란타룸* KLB13 균주의 글루타미네이즈의 활성은 NaCl 농도는 0 내지 15%, 온도는 30 내지 60℃ 및 pH는 5 내지 9에서 유지되는 것을 특징으로 하는 식품의 풍미 향상 방법.

청구항 8

제 6항에 있어서, *락토바실러스 플란타룸* KLB13 균주의 글루타미네이즈의 최적 활성 조건은 NaCl 농도는 5%, 온도는 50℃ 및 pH는 7인 것을 특징으로 하는 식품의 풍미 향상 방법.

청구항 9

제 6항에 있어서, *락토바실러스 플란타룸* KLB96 균주의 글루타미네이즈의 활성은 NaCl 농도는 0 내지 10%, 온도는 30 내지 50℃ 및 pH는 5 내지 9에서 유지되는 것을 특징으로 하는 식품의 풍미 향상 방법.

청구항 10

제 6항에 있어서, *락토바실러스 플란타룸* KLB96 균주의 글루타미네이즈의 최적 활성 조건은 NaCl 농도는 5%, 온도는 40 내지 50℃ 및 pH는 7인 것을 특징으로 하는 식품의 풍미 향상 방법.

청구항 11

내염성이고 글루타미네즈 활성이 40 U/mg 이상의 락토바실러스 속 유산균인 *락토바실러스 플란타룸* KLB13 균주(수탁번호: KCTC 11185BP).

명세서

발명의 상세한 설명

기술분야

- <1> 본 발명은 락토바실러스 속 유산균에 속하는 내염성 균주를 천연 식품 첨가제로 사용하는 식품의 풍미 향상 방법에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 내염성이고 글루타미네즈 활성이 40 U/mg 이상인 락토바실러스 속 유산균을 식품 제조과정에 첨가하는 단계를 포함하는 식품의 풍미 향상 방법에 관한 것이다.

배경 기술

- <2> 현재 각종 식품 첨가제로 화학조미료인 MSG(Monosodium glutamate; 모노소듐 글루타민산염)가 널리 사용되고 있으며, 그 소비량은 꾸준히 증가하고 있다. 글루타민은 버섯, 육류, 김, 토마토 등 자연 식품에 단백질의 일부 분으로 존재하며, 글루타민을 자연식품에서 섭취했을 때에는 부작용이나 병적 증세가 나타나지 않지만, 화학적인 방법으로 합성한 MSG를 식품 첨가제로 사용하였을 때 경우에 따라 독성을 띄기도 한다(Tiziana P *et al.*, *Food Chemistry* 104(4):1712-1717, 2007). 그리고 화학조미료(MSG)를 과다섭취함으로써, MSG에 민감한 사람들에게서 '중국 음식점 증후군(Chinese Restaurant Syndrome)', '암과의 관련성'(고온에서는 발암물질로 변할 수 있음), '천식과의 관련성' 등이 나타난다고 보고된 바 있다. 이 같은 현상은 서구화된 식생활로 화학조미료의 사용이 늘어나면서, 영양섭취에 중요한 천연식품을 덜 사용하게 됨에 따라 나타나게 되었다.
- <3> 이에, 최근 식품 첨가제나 성분으로서 인체 내 건강에 이로운 효과를 주는 천연 식품 첨가제에 대한 관심이 대두하고 있다. 식생활의 서구화에 따라 각종 성인병 발병의 주요 원인이 식생활에 있다는 것이 밝혀지면서 생명체(동물, 식물, 미생물)와 효소로부터 인체의 생리기능을 향상시키는 기능성 물질을 찾는 연구가 함께 이루어지고 있다. 그 중에서 음식의 맛을 증진시킬 수 있는 상업적으로 중요한 효소로 알려져 있는 글루타미네이즈(glutaminase) 효소를 대표적인 예로 들 수 있다.
- <4> 글루타미네이즈는 L-글루타민을 L-글루타민산염으로 탈아민화시키는 촉매역할을 하며, 식품에 첨가하였을 때 맛을 증진시키는 효과를 가지고(Hodson & Linden, *Physiology & Behavior* 89(5):711-717, 2006), 일반적으로 간장과 같은 발효식품에 맛을 제공하는 중요한 효소로 알려져 있다. 상기 글루타민산염의 소듐 염 성분은 음식에 첨가하였을 때 맛을 내는 역할을 하며, 효모나 곰팡이뿐만 아니라 박테리아를 포함한 미생물 어디에나 포함되어 있어, 발효식품의 첨가제로 널리 쓰인다(Naohisa M *et al.*, *J. Bioscience & Bioengineering*, 2005). 글루타민산염 생성에 가장 큰 역할을 수행하는 글루타미네이즈는 대체로 온도나 열에 대한 안정성을 보이며, 염에 대한 내성이 높아 식품가공과정에서의 환경 변화 조건에 견딜 수 있기 때문에(Lapufade P *et al.*, *Appl Environ Microbiol* 64:2485-2489, 1998) 식품첨가제로서 사용이 가능하다. 글루타민의 물질대사에는 많은 효소들이 관여하는데 그 중에서 글루타민산염 생성에서 글루타미네이즈가 가장 큰 역할을 한다.
- <5> 인간의 구강계, 소화계 및 비뇨 생식계의 정상균총으로 서식하는 락토바실러스 속 유산균(*Lactobacillus* spp.)은 젖산을 생성하여 pH를 산성화시켜 병원성을 무력화시키며, 락토바실러스 속 유산균에 의해 생성된 항생물질인 박테리옌(bacterocin)은 여러 가지 병원성 균의 생육을 억제한다(Goossens D *et al.*, *Dig Dis Sci* 37:44-50, 2005; Hiller SL *et al.*, *Clin Infect Dis* 16:S273-281, 1991; Karine V *et al.*, *J Bacteriol* 70:2057-2064, 2002; Ouwehand AC *et al.*, *Antonie van Leeuwenhoek* 82:279-289, 2002). 이와 같은 특징을 갖는 락토바실러스 속 유산균은 인간과 동물의 식이요법 치료제와 정장제로 사용되는 프로바이오틱스(probiotics)로 많은 연구가 되어있다(Talarico TL *et al.*, *Antimicrob Agents Chemother* 32:1854-1858, 1988; Wolf BW *et al.*, *Food Chem Toxicol* 36:1085-1094, 1998).
- <6> 프로바이오틱스 균주의 대표적인 예로, 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*), 락토바실러스 에시도필러스(*Lactobacillus acidophilus*), 락토바실러스 헬베티쿠스(*Lactobacillus helveticus*), 락토바실러스 불가리쿠스(*Lactobacillus bulgaricus*), 락토바실러스 람노수스(*Lactobacillus rhamnosus*) 및 락토바실러스 델브루에키이(*Lactobacillus delbrueckii*) 같은 몇몇 종은 염에 내성이 높고, 열에 대한 안정성도 높은 것으로 연구되었다(Erwin G *et al.*, *J Bacteriol* 180:4718-4723, 1998; Jaya P *et al.*, *Appl Environ Microbiol* 69:917-925, 2003). 이에 락토바실러스 속 유산균은 동물의 사료, 거름, 우유 및 유제품뿐만 아니라 다양한 식품에 천연 첨가제로 사용되어 식품의 안정성, 점성 및 분산성 등에 중요한 효과를 제공하며, 동/식물성 식품의 섭취 시 저작에도 중요한 역할을 한다. 그 중에서 특히 락토바실러스 불가리쿠스를 이용한 유제품 산업이 많이 이용되고 있다.
- <7> 이에 본 발명자들은 MSG를 대체할 미생물 유래의 글루타민산염을 생성하기 위해, 프로바이오틱스로 널리 알려져 이용되고 있는 락토바실러스 속 유산균으로부터 내염성이며 높은 글루타미네이즈 활성을 나타내는 균주들을 선별하고 상기 균주들의 최적활성 조건과 안정성을 측정함으로써 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

<8> 본 발명의 목적은 식품 내 글루타민산염을 생성하는 데 있어, 내염성이며 높은 글루타미네이즈 활성을 띄는 프로바이오틱스인 락토바실러스 종을 천연 식품 첨가제로 이용하는 식품을 제조하는 방법을 제공하는 것이다.

과제 해결수단

- <9> 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 내염성이고 글루타미네이즈 활성이 40 U/mg 이상인 락토바실러스 속 유산균을 식품 제조과정에 첨가하는 단계를 포함하는 식품의 풍미 향상 방법을 제공한다.
- <10> 또한, 본 발명은 내염성이고 글루타미네이즈 활성이 40 U/mg 이상의 락토바실러스 속 유산균인 *락토바실러스 플란타룸* KLB13 균주(수탁번호: KCTC 11185BP)을 제공한다.
- <11> 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.
- <12> 본 발명은 내염성이고 글루타미네이즈 활성이 40 U/mg 이상인 락토바실러스 속 유산균을 식품 제조과정에 첨가하는 단계를 포함하는 식품의 풍미 향상 방법을 제공한다.
- <13> 상기 식품은 고염식품인 것으로 상기 고염식품에는 장류, 젓갈류 및 장아찌류 등이 포함된다. 또한, 상기 장류는 간장, 고추장 및 된장 등이 있다.
- <14> 상기 락토바실러스 속 유산균은 건강한 한국 여성의 질에서부터 분리된 것으로 내염성이며 상기 종의 글루타미네이즈는 높은 활성을 나타낸다. 상기 락토바실러스 속 유산균은 1.3M 이상으로 NaCl이 포함된 배지에서 성장 가능한 내염성 균주이며, 40 U/mg 이상의 높은 글루타미네이즈 활성을 갖는다. 상기 1.3M 이상의 내염성 균주에는 KLB13, KLB14, KLB19, KLB20, KLB21, KLB30, KLB83, KLB95 및 KLB96의 균주들이 포함된다(표 1 참조). 또한 40 U/mg 이상의 높은 글루타미네이즈 활성을 갖는 균주에는 KLB1, KLB3, KLB6, KLB13, KLB21, KLB33, KLB39, KLB70 및 KLB96의 균주들이 포함된다(표 2 참조). 아울러, 1.3M 이상의 내염성 균주이며 40 U/mg 이상의 높은 글루타미네이즈 활성을 갖는 균주에는 KLB13, KLB21 및 KLB96의 균주들이 포함된다(도 3 참조).
- <15> KLB13 및 KLB96의 균주들은 *락토바실러스 플란타룸*(*Lactobacillus plantarum*)으로 동정 되었고, KLB21은 *락토바실러스 크리스파투스*(*Lactobacillus crispatus*)으로 동정 되었다(도 4 참조). *락토바실러스 플란타룸*은 그 유래가 식물로부터 분리되었고, 김치와 같은 한국 발효 음식에 널리 사용되며 각종 식품 첨가제로 널리 인정받고 있어, 상기 *락토바실러스 플란타룸* KLB13(이하, KLB13; 수탁번호: KCTC 11185BP) 및 *락토바실러스 플란타룸* KLB96(이하, KLB96)의 균주들은 적량, 적절한 방법으로 식품에 첨가하여 사용할 수 있음은 당연할 것이다.
- <16> 상기 KLB13 및 KLB96의 균주의 글루타미네이즈의 최적 NaCl 농도는 5% NaCl이다(도 5 참조). 또한, 상기 KLB13 균주의 글루타미네이즈 활성의 최적 온도는 50℃이고, KLB96 균주의 글루타미네이즈 활성의 최적 온도는 40 내지 50℃이다(도 6 참조). KLB13 균주는 60℃에서도 70% 이상의 글루타미네이즈 활성 안정성을 나타내고, KLB96 균주는 50℃까지 70% 이상의 글루타미네이즈 활성 안정성을 나타낸다(도 7 참조). 아울러, KLB13 및 KLB96 균주의 글루타미네이즈의 최적 pH는 pH 7이다(도 8 참조). KLB13 및 KLB96 균주 모두 pH 5 내지 9의 넓은 범위에서 높은 안정성을 나타낸다(도 9 참조).
- <17> 본 발명의 KLB13 및 KLB96 균주 즉, *Lactobacillus plantarum*의 글루타미네이즈의 특성을 다른 미생물 유래(*Lactobacillus rhamnosus*, *Aspergillus oryzae*, *Micrococcus luteus*)의 글루타미네이즈의 특성과 비교하였다. 간장 발효시 염 농도인 3M NaCl에서는 KLB13 및 KLB96 균주를 포함한 *Lactobacillus* spp.의 글루타미네이즈는 다른 미생물 유래 글루타미네이즈 보다 높은 활성을 유지하였다. 최적 반응온도에 대해서는 *Aspergillus oryzae*(30℃)를 제외한 균주의 글루타미네이즈가 40 내지 50℃에서 최적 활성을 나타냈다. 또한, *Lactobacillus* spp. 유래 글루타미네이즈의 최적 pH는 pH 7.0인데 반해 나머지 미생물들의 글루타미네이즈는 염 기성 pH에서 최고 활성을 보였다. 상기 KLB13 및 KLB96 균주는 타 균주에 비해 좀 더 넓은 범위의 pH에서 안정성을 나타내었다(표 3 참조).
- <18> 또한, 본 발명은 내염성이고 글루타미네이즈 활성이 40 U/mg 이상의 락토바실러스 속 유산균인 *락토바실러스 플란타룸* KLB13 균주(수탁번호: KCTC 11185BP)을 제공한다.
- <19> 상기 KLB13 균주(수탁번호: KCTC 11185BP)의 글루타미네이즈의 최적 NaCl 농도는 5% NaCl이고(도 5 참조), 글루타미네이즈 활성의 최적 온도는 50℃이다(도 6 참조). 또한 KLB13 균주는 60℃에서도 70% 이상의 글루타미네

이즈 활성 안정성을 나타내고(도 7 참조), 글루타미네이즈의 최적 pH는 pH 7이다(도 8 참조). 아울러, KLB13 균주는 pH 5 내지 9의 넓은 범위에서 높은 안정성을 나타낸다(도 9 참조).

효 과

<20> 본 발명의 내염성 락토바실러스 속 유산균을 천연 식품 첨가제로 사용하여 글루타민으로부터 글루타민산염을 생산하는 방법은 기존의 인공 식품 첨가제에 의한 부작용이나 병적 증세를 회피할 수 있다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

<21> 이하, 본 발명을 실시예 및 비교예에 의해 상세히 설명한다.

<22> 단, 하기 실시예 및 비교예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예 및 비교예에 한정되는 것은 아니다.

<실시예 1> 내염성 균주 선별

<1-1> 균주 및 배양 조건

<23> 본 연구에 사용한 균주는 한국여성의 질로부터 분리한 락토바실러스 속 유산균을 대상으로 실험을 수행하였다.

<24> 질 도말로부터 유산균을 분리하기 위하여 유산균 선택배지인 로고사(Rogosa) 아가 플레이트에 스트리킹(streaking) 한 후에 이 플레이트를 37℃, 24~48시간 동안 촛불명(candle jar) 또는 혐기성 배양실(anaerobic chamber)에서 즉시 배양하였다. 단일 콜로니를 얻기 위하여 여러 번 로고사 아가 플레이트에 스트리킹하여 단일 콜로니를 얻었다. 각 시료들에 코드 번호(KLB)를 임의로 지어준 후 그람-염색, 카탈라아제 검사(catalase test) 및 현미경 관찰을 통하여 유산균임을 증명하였다.

<25> 상기 방법으로 분리된 유산균을 MRS 배지(1 ℓ 기준으로 글루코오스 20 g, 펩톤 No.3 10 g, 비프 추출액 10 g, 효모 추출액 5 g, 소듐 아세테이트 5 g, 암모늄 시트레이트 2 g, K₂HPO₄ 2 g, 트윈 80 1 g, FeSO₄ · 7H₂O 35 mg, MgSO₄ 575 mg, MnSO₄ · 7H₂O 120 mg)를 사용하여 37℃에서 12시간 동안 혐기적 조건으로 정치배양 하였다.

<1-2> 염도 스트레스 MIC 실험

<26> 실시예 1-1의 방법으로 배양된 락토바실러스 속 유산균을 대상으로 높은 내염성의 균주를 선별하고자 하였다.

<27> 페트리 디쉬를 기울인 상태에서 액체상태의 3M NaCl이 포함된 1.5% 아가 MRS 배지를 부어서 굳힌 후, 페트리 디쉬를 수평이 되게 한 후, 2%의 락토바실러스 속 유산균이 접종된 0.7% 아가 MRS 배지를 그 위에 부어 굳힌다. 37℃ 인큐베이터에서 24 시간 배양한 후, 전체 페트리 디쉬의 길이(A)와 미생물이 자란 길이(B)를 측정하여(도 2) 수학적 식 1에 의해 각 균주의 내염성을 계산하였다.

수학적 식 1

$$\text{내염성} = \frac{B}{A} \times 3$$

<31>

<32> 그 결과, 0.5M에서부터 1.5M에까지 내염성이 다양하게 나타났음을 확인하였고, 계산 값이 1.3M 이상 되는 내염성이 높은 KLB13, KLB14, KLB19, KLB20, KLB21, KLB30, KLB83, KLB95 및 KLB96의 9 개 균주를 선정하였다(표 1).

표 1

내염성 측정

종	NaCl(M)	종	NaCl(M)	종	NaCl(M)	종	NaCl(M)	종	NaCl(M)	종	NaCl(M)
1	0.7	19	1.4	37	1.2	55	0.5	73	0.5	91	1
2	0.8	20	1.4	38	1	56	0.5	74	0.5	92	1
3	1	21	1.4	39	1.2	57	0.5	75	0.5	93	0.7
4	0.9	22	0.6	40	1.1	58	1.1	76	0.5	94	0.6
5	0.9	23	0.5	41	1	59	0.5	77	0.6	95	1.5
6	1	24	1	42	0.5	60	0.5	78	0.5	96	1.5
7	1.2	25	1	43	1.2	61	1.1	79	0.5	97	0.5
8	1	26	1	44	1.2	62	1	80	0.6	98	1.2
9	1	27	1	45	1.2	63	0.9	81	1.1	99	0.6
10	0.9	28	1.2	46	1.2	64	0.5	82	0.9	100	0.6
11	1	29	1	47	1.1	65	0.5	83	1	101	0.6
12	1	30	1.3	48	1.2	66	0.6	84	0.5	102	0.6
13	1.4	31	0.9	49	1.2	67	1	85	1	103	0.5
14	1.4	32	0.8	50	0.9	68	0.8	86	0.6	104	0.8
15	1	33	1.2	51	0.5	69	0.5	87	0.6	105	0.5
16	1	34	1	52	0.5	70	0.5	88	1.3	106	0.5
17	1	35	1.1	53	0.5	71	0.5	89	0.5		
18	1.2	36	1.2	54	0.6	72	0.6	90	0.5		

<33>

<34>

<실시예 2> 글루타미네이즈 활성 측정

<35>

실시예 1의 방법으로 선별된 내염성 균주 9 개 균주를 포함한 본 발명의 락토바실러스 속 유산균 107 개 균주 중 총 64 개 균주의 글루타미네이즈 활성을 측정하였다.

<36>

도 1에서 설명하였듯이 글루타민은 글루타미네이즈에 의해 글루타민산염으로 탈아민화되고, 글루타민산염은 다시 조효소 NAD^+ 및 글루탐산탈수소효소(glutamate dehydrogenase; GLDH)에 의해 2-옥소글루타르산과 NADH로 변환된다. 상기 과정에서 NAD^+ 에서 NADH로의 변화는 분광학적으로 결정할 수 있다. 즉, NADH는 340 nm인 파장의 빛에 흡수 극대값을 가진다. 글루탐산탈수소효소(glutamate dehydrogenase)는 글루타민산염이 산화되고 이것이 가수분해되어 2-옥소글루타르산과 암모니아를 생성하는 반응을 촉매 하는 탈수소효소로, 반응에 피리딘 뉴클레오티드를 필요로 하는 유일한 탈수소효소이다(Kleerebezem M *et al.*, *Proc Natl Acad Sci USA* 100:1990-1995, 2003; Makarova K *et al.*, *Proc Natl Acad Sci USA* 103:15611-15616, 2006). 이에 글루탐산탈수소효소의 활성을 측정함으로써 글루타미네이즈의 활성을 간접적으로 측정하였다.

<37>

<2-1> 시료 준비

<38>

MRS 배지를 사용하여 37℃에서 12시간 동안 혐기적 조건으로 정치배양 한 세포 배양액 5 mL를 13,000 rpm에서 원심분리한 후 PBS 완충액으로 현탁하여 세척하였다. 다시 원심분리한 후 상등액을 제거하고 12 mL의 0.75M 생리식염수로 현탁한 후, 20%로 암피실린을 첨가하고 10초 간격의 펄스를 주어 2분간 소니케이터로 세포를 파쇄하였다. 세포 파쇄 과정은 얼음 상에서 수행하였다.

<39>

<2-2> 글루타미네이즈 활성 측정

<40>

37℃에서 5분 동안 L-글루타민 용액과 아세테이트 완충액을 평형시킨 후, 실시예 2-1의 방법으로 준비한 시료 0.2 mL를 첨가하고 다시 10분간 37℃에서 반응시켰다. 0.75N 과염소산(perchloric acid) 용액으로 반응을 중지시켰고, 1.5N 소듐 아세테이트로 중화시켰다. 8,000 rpm에서 5분 동안 원심분리 한 후, 상등액 50 μ L를 취해서 0.25M 하이드록실아민(hydroxylamine) 완충액(pH 8.0, 20mM EDTA), 10mM NAD^+ 용액, ddH₂O 및 770 U/mL GLDH(Sigma - Aldrich, USA)혼합물에 첨가하였다. 37℃에서 30분간 반응시킨 후 340 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다. 수학적 식 2에 의해 부피 활성(U/mL)을 계산하였다. A 시료는 상기 방법에 의해 측정된 흡광도를 의미하고, A₀는 상기 방법에서 시료의 투입과 과염소산의 투입 순서를 바꾸어서 측정한 대조군의 흡광도를 의미하였다.

수학식 2

$$\text{부피활성}(U/mL) = \frac{(A_{\text{시료}} - A_0) \times \text{반응용액부피} \times \text{총부피}}{6.2 \times L - \text{글루타민용액부피} \times \text{시료부피}}$$

질량 활성(U/mg)을 계산하고자 단백질 양을 Bradford 방법에 의해 측정하였다. 수학식 3에 의해 질량 활성(U/mg)을 계산하였다. C는 시료 내의 글루타미네이즈의 함량(mg/ml)을 의미하였다.

수학식 3

$$\text{질량활성}(U/mg) = \text{부피활성}(U/mL) \times 1/C$$

그 결과, 총 43 개의 균주가 글루타미네이즈 활성을 나타내었고, 그 중 활성이 높은 KLB1, KLB3, KLB6, KLB13, KLB21, KLB33, KLB39, KLB70 및 KLB96의 9 개 균주를 선정하였다(표 2).

표 2

글루타미네이즈 활성

#	Glutaminase activity(U/mg)	#	Glutaminase activity(U/mg)	#	Glutaminase activity(U/mg)	#	Glutaminase activity(U/mg)
1	41.2	21	44.9	46	15.8	73	17.7
3	98.7	24	18.6	48	-	75	1.8
4	26.4	25	11.8	49	11.9	78	7.6
5	38.9	27	7.8	50	-	79	-
6	42.6	30	8.4	51	-	82	-
7	2.7	31	2.7	52	-	83	-
8	9.1	32	-	53	11.4	87	-
9	32.6	33	67.3	55	-	92	-
10	7.0	35	18.9	57	19.1	94	-
11	32.9	36	6.2	58	14.5	95	4.9
12	22.9	37	-	61	-	96	40.6
13	46.7	38	10.6	62	-	105	-
14	10.6	39	49.0	63	14.4	106	80.7
16	7.3	40	6.8	64	-		
17	10.8	41	-	68	-		
19	18.1	43	-	70	131.8		
20	26.1	45	-	72	5.7		

또한 상기 결과와 실시예 1의 결과를 비교함으로써 내염성이면서 글루타미네이즈 활성이 높은 KLB13, KLB21 및 KLB96의 3 개 균주를 선정하였다(도 3)

<2-3> 균주 동정

실시예 2-2의 방법으로 선별된 KLB13, KLB21 및 KLB96 균주를 RFLP(restriction fragment length polymorphism)를 이용하여 동정하였다.

각 균주들을 대상으로 정방향 프라이머(서열번호 1: CCCAAGCTTAGAGTTTGATCCTGGCTCAG) 및 역방향 프라이머(서열번호 2: ACGCGTCGACAAGGAGGTGATCCAGCC)를 이용하여 전변성: 94℃에서 55분, 35 회 반복(변성: 94℃에서 1분, 어닐링 56℃에서 30초, 신장: 72℃에서 2분) 최종신장: 72℃에서 5분의 조건으로 16S PCR을 수행한 후 상기 PCR 반응 산물을 여러 종류의 제한효소(*AluI*, *HaeIII*, *HinfI*, *MspI*, *CfoI*; Roche, 스위스)로 각각 반응시켰다. 전기영동으로 상기 제한효소들에 의해 잘려진 패턴을 확인하고, RFLP 분석용 프로그램[NTSYS-pc (numerical taxonomy system of multivariate statistical programs); Applied Biostatistics Inc, USA]을 이용하여 비슷하게 나온 패턴별로 그룹을 지정해주었다.

그 결과, KLB13과 KLB96 균주는 *Lactobacillus plantarum*으로 동정 되었고, KLB21은 *Lactobacillus crispatus*로 동정 되었다(도 4). 또한, 상기 KLB13 균주의 16s rDNA 염기서열(서열번호 3)을 분석한 결과

*Lactobacillus plantarum*으로 동정 되었다.

<실시예 3> KLB13 및 KLB96 균주의 글루타미네이즈 최적 활성 조건

<3-1> NaCl 농도에 따른 글루타미네이즈 최적 활성 조건

실시예 2-2의 방법으로 KLB13 및 KLB96 균주의 글루타미네이즈 활성을 측정함에 있어서, L-글루타민 용액과 아세테이트 완충액을 평형 시킨 후, 실시예 2-1의 방법으로 준비한 시료 0.2 ml을 첨가한 상태의 NaCl 농도가 각각 0, 5, 10, 15, 20, 25가 되도록 하였다. 그 후 37℃에서 10분간 반응한 후, NaCl 농도에 변화를 준 시료와 대조균인 글루타미네이즈에 대한 반응을 멈추게 하는 과염소산을 먼저 첨가한 시료를 흡광도 625 nm에서 각각 측정하였다. 수학적식 2 및 수학적식 3에 의해 부피 활성(U/ml) 및 질량 활성(U/mg)을 계산하였다.

그 결과, KLB13 및 KLB96 균주 모두 5% NaCl에서 글루타미네이즈 활성이 가장 높았고, 10 내지 25%까지 NaCl 농도가 증가함에 따라서 글루타미네이즈 활성 감소에 있어서 KLB96 균주가 KLB13 균주보다 그 감소폭이 더 컸다(도 5).

<3-2> 반응 온도에 따른 글루타미네이즈 최적 활성 조건

실시예 2-2의 방법으로 KLB13 및 KLB96 균주의 글루타미네이즈 활성을 측정함에 있어서, L-글루타민 용액과 아세테이트 완충액을 평형 시킨 후, 실시예 2-1의 방법으로 준비한 시료 0.2 ml을 첨가한 상태에서 20, 30, 40, 50, 60 및 70℃에서 10분간 반응시켰다. 각 온도별로 반응시킨 시료와 대조균인 글루타미네이즈에 대한 반응을 멈추게 하는 과염소산을 먼저 첨가한 시료를 흡광도 625 nm에서 각각 측정하였다. 수학적식 2 및 수학적식 3에 의해 부피 활성(U/ml) 및 질량 활성(U/mg)을 계산하였다.

그 결과, KLB13 균주는 50℃에서 글루타미네이즈 활성이 가장 높았고, KLB96 균주는 40℃에서 가장 높은 활성을 나타냈지만 50℃에서도 비슷한 수준의 높은 활성을 나타냈다(도 6).

또한, KLB13 균주는 60℃에서도 70% 이상의 글루타미네이즈 활성 안정성을 나타냈으나, KLB96 균주는 40℃까지는 KLB13 균주와 비슷한 활성 안정성을 보이다가 60℃에서는 50%까지 활성 안정성이 하락하였다(도 7).

<3-3> pH에 따른 글루타미네이즈 최적 활성 조건

실시예 2-2의 방법으로 KLB13 및 KLB96 균주의 글루타미네이즈 활성을 측정함에 있어서, L-글루타민 용액과 아세테이트 완충액을 평형 시킨 후, 실시예 2-1의 방법으로 준비한 시료 0.2 ml을 첨가한 후, 각 시료의 pH가 3, 5, 7, 9 및 11이 되도록 보정하였다. 이때 사용한 완충용액은 pH 3과 pH 5로의 보정을 위해서 0.1M 시트릭산(citric acid)을 사용하였고, pH 9 와 11로의 보정을 위서는 Tris-HCl을 사용하였다. pH 7로의 보정을 위해서 Tris-HCl 완충용액과 1N NaOH를 이용하여 보정하였다.

그 후 37℃에서 10분간 반응한 후, 각 pH별 시료와 대조균인 글루타미네이즈에 대한 반응을 멈추게 하는 과염소산을 먼저 첨가한 시료를 흡광도 625 nm에서 각각 측정하였다. 수학적식 2 및 수학적식 3에 의해 부피 활성(U/ml) 및 질량 활성(U/mg)을 계산하였다.

그 결과, KLB13 및 KLB96 균주 모두 pH 7에서 글루타미네이즈 활성이 가장 높았고, 낮은 pH 보다 높은 pH에서 좀 더 높은 활성을 보였다. 또한, KLB13 균주가 pH 조건 변화에 따라 나타낸 활성이 KLB96 균주보다 더 높았다(도 8).

또한, KLB13 및 KLB96 균주 모두 pH 5 내지 9의 넓은 범위에서 높은 안정성을 나타냈고, 낮은 pH(pH 3)에서는 활성이 소실된 것에 반해 높은 pH(pH 11)에서는 50% 정도의 활성을 유지하는 것으로 나타났다(도 9).

<비교예> 글루타미네이즈 특성 비교

본 발명의 KLB13 및 KLB96 균주 즉, *Lactobacillus plantarum*의 글루타미네이즈의 특성을 다른 미생물 유래의 글루타미네이즈의 특성과 비교하였다.

Aspergillus oryzae(Naohisa MK et al., J. Bioscience & Bioengineering, 100: 576-578, 2005)와 *Micrococcus luteus*(Naohisa MK et al., J. Bioscience & Bioengineering, 100: 576-578, 2005) 및 *Lactobacillus rhamnosus*(Alexandra WZ et al., J Mol Catal 32:862-867, 2002)의 세 균주를 선택하여 기질, 내염성, 최적 온도, 최적 pH 및 pH 안정성을 비교하였다.

그 결과, 간장 발효시 염 농도인 3M NaCl에서는 *Lactobacillus* spp.의 글루타미네이즈가 다른 미생물 유래 글루타미네이즈 보다 높은 활성을 유지함을 알 수 있었다. 최적 반응온도에 대해서는 *Aspergillus oryzae*(30℃)를

제외한 균주의 글루타미네이즈가 40 내지 50℃에서 최적 활성을 나타냈다. 또한, *Lactobacillus* spp. 유래 글루타미네이즈의 최적 pH는 pH 7.0인데 반해 나머지 미생물들의 글루타미네이즈는 염기성 pH에서 최고 활성을 보였다. 본 발명에 의해 선별된 두 균주는 타 균주에 비해 좀 더 넓은 범위의 pH에서 안정성을 나타내었다(표 3).

표 3

글루타미네이즈 특성 비교

특성 \ 균주	<i>L. plantarum</i> KLB 13	<i>L. plantarum</i> KLB 96	<i>L. rhamnosus</i>	<i>Aspergillus oryzae</i>	<i>Micrococcus luteus</i>
기질	L-글루타민	L-글루타민	L-글루타민	L-글루타민	L-글루타민
내염성(3M)	80%	60%	100%	54%	40%
최적 온도	50 ℃	40 ℃	50 ℃	30 ℃	50 ℃
최적 pH	7.0		7.0	8.0~9.0	8.5
pH 안정성	5.0~9.0	5.0~9.0	5.5~9.0		

도면의 간단한 설명

도 1은 글루타민 대사작용 과정과 주요 효소의 반응을 나타낸 도이다.

도 2는 사면 배지를 응용한 내염성 측정 방법을 나타낸 도이다.

도 3은 본 발명의 내염성 균주들의 글루타미네이즈 활성을 비교한 도이다.

도 4는 RFLP(Restriction fragment length polymorphism)를 이용한 KBL 13 균주 및 KLB96 균주의 동정결과를 나타낸 도이다.

도 5는 NaCl 농도에 따른 글루타미네이즈 활성을 나타낸 도이다.

도 6은 온도에 따른 글루타미네이즈 최적 활성을 나타낸 도이다.

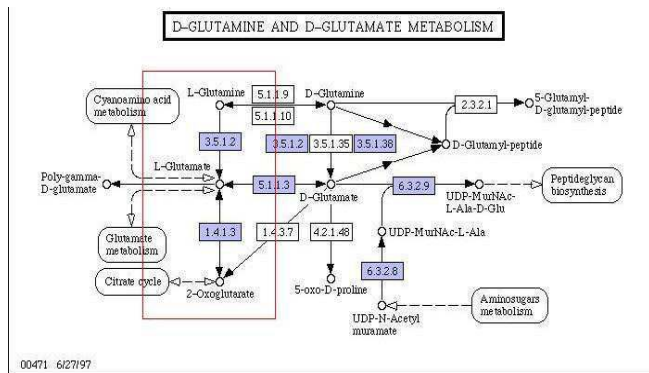
도 7은 온도에 따른 글루타미네이즈 안정성을 나타낸 도이다.

도 8은 pH에 따른 글루타미네이즈 최적 활성을 나타낸 도이다.

도 9는 pH에 따른 글루타미네이즈 안정성을 나타낸 도이다.

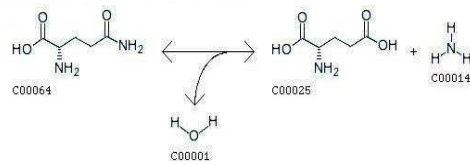
도면

도면1

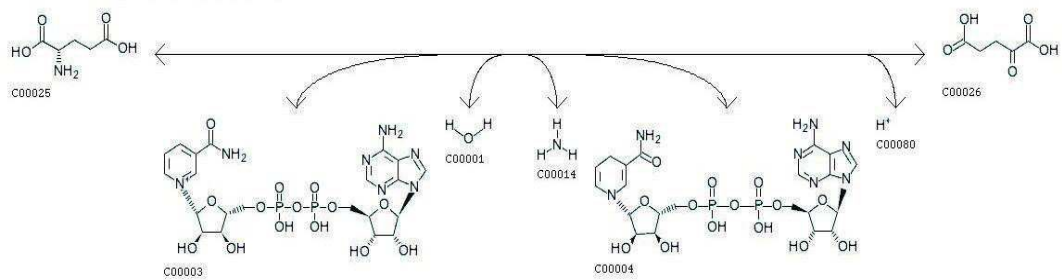


00471 6/27/97

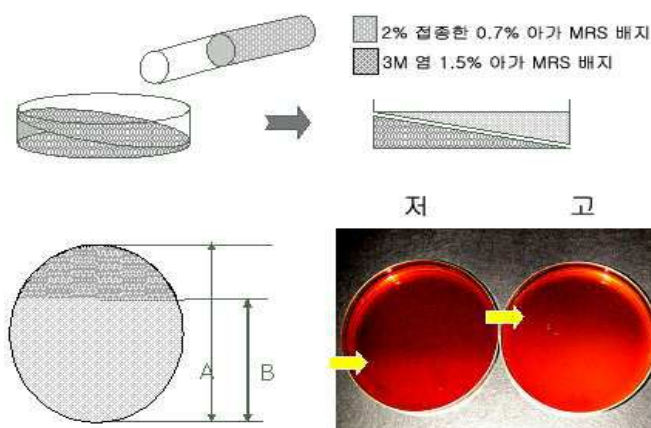
EC 3.5.1.2, 글루타미네이즈



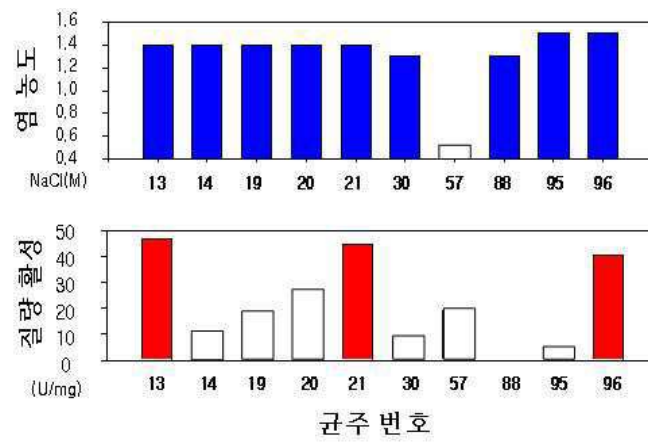
EC 1.4.1.3, 글루탐산탈수소효소



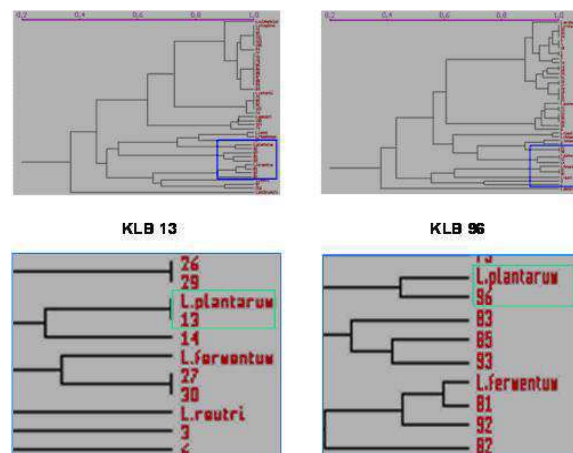
도면2



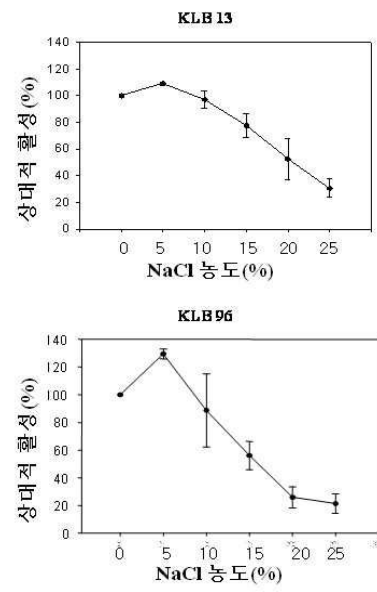
도면3



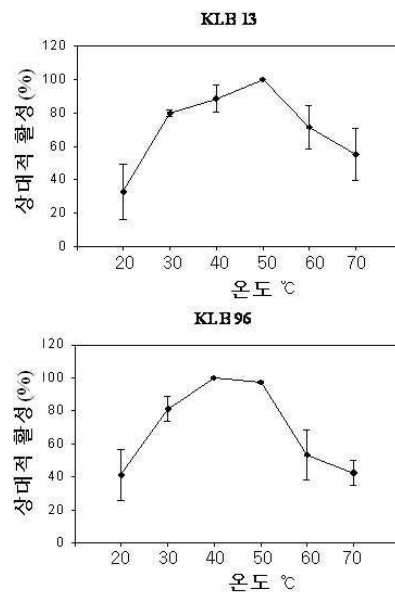
도면4



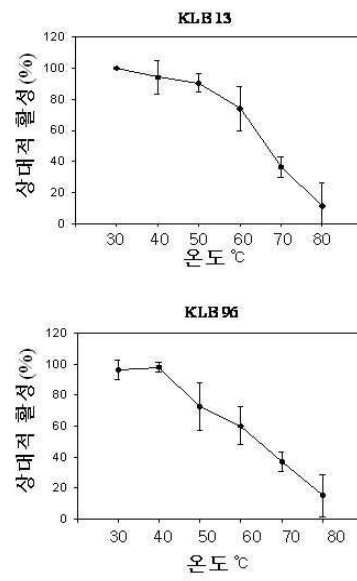
도면5



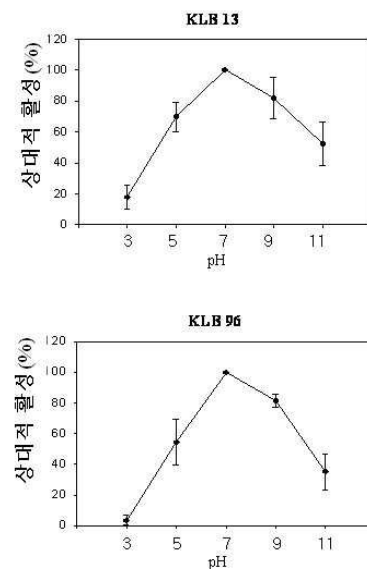
도면6



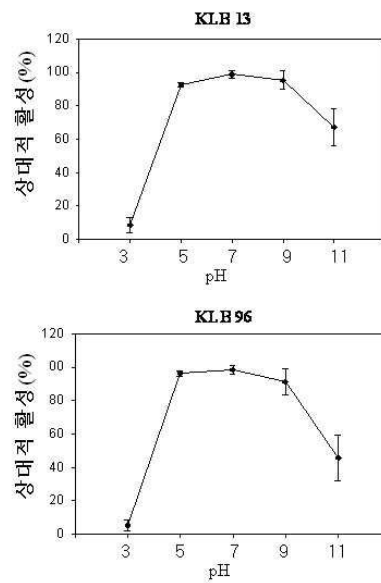
도면7



도면8



도면9



서열 목록

<110> INHA-INDUSTRY PARTNERSHIP INSTITUTE
 <120> Method for using high osmotic pressure tolerant strain as natural flavor

<130> 7P-08-41

<160> 3

<170> KopatentIn 1.71

<210> 1
 <211> 29
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence

<220>
 <223> 16s PCR Forward primer

<400> 1
 cccaagctta gagtttgatc ctggctcag

29

<210> 2
 <211> 27
 <212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 16s PCR Reverse primer

<400> 2

acgcgtcgac aaggaggtga tccagcc

27

<210> 3

<211> 1250

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> 16S rDNA of Lactobacillus sp. KLB 213 sequeces

<400> 3

cgcgttggga gctctccat atggtcgacc tgcaggcggc cgcgaattca ctagtattc

60

ccaagcttag agtttgatcc tggctcagga cgaacgctgg cggcgtgcct aatacatgca

120

agtcgaacga actctggtat tgattggtgc ttgcatcatg attacattt gagtgagtgg

180

cgaactggtg agtaacacgt gggaaacctg cccagaagcg ggggataaca cctggaaaca

240

gatgctaata ccgcataaca acttggaccg catgggccga gcttgaaaga tggcttcggc

300

tatcactttt ggatgggtccc gcggcgattt agctagatgg tggggtaatg gtcaccatg

360

gcaatgatac gtagccgacc tgagagggtg atcgccaca ttgggactga gacacggccc

420

aaactcctac gggaggcagc agtagggaat ctccacagt ggacgaaagt ctgatggagc

480

aacgccggt gaggtagaaa gggtttcggc tcgtaaaact ctgttggtta agaagaacat

540

atctgagagt aactgttcag gtattgacgg tatttaacca gaaagccag gctaactaca

600

agcattccgc ctggggagta cgcccgaag gctgaaactc aaaggaattg acgggggccc

660

gcacaagcgg tggagcatgt ggtttaattc gaagctacgc gaagaacctt accaggtctt	720
gacatactat gcaaatctaa gagattagac gttcccttcg gggacatgga tacaggtggt	780
gcatggttgt cgtcagctcg tgtcgtgaga tgttgggtta agtcccgcaa cgagcgcaac	840
ccttattatc agttgccagc attaagttgg gcactctggt gagactgccg gtgacaaacc	900
ggaggaaggt ggggatgacg tcaatcatca tgccccttat gacctgggct acacacgtgc	960
tacaatggat ggtacaacga gttgcgaact cgcgagagta agctaattctc ttaaagccat	1020
tctcagttcg gattgtaggc tgcaactccc tacatgaagt cggaatcgct agtaatcgcg	1080
gatcagcatg ccgcggtgaa tacgttcccg ggccttgtag acaccgcccg tcacaccatg	1140
agagtttgta acacccaaag tcggtggggt aaccttttag gaaccagccg cctaaggtgg	1200
gacagatgat tagggtgaag tcgtaacaag gtagccgtag gagaacctgc	1250