

특허청구의 범위

청구항 1.

삭제

청구항 2.

감마아미노부티르산을 다량으로 생산하는 것을 특징으로 하는 락토바실러스 부시네리 OPM-2(*Lactobacillus buchneri* OPM-2, 기탁번호 KFCC 11353P) 균주.

청구항 3.

락토바실러스 부시네리 OPM-2(*Lactobacillus buchneri* OPM-2, 기탁번호 KFCC 11353P) 균주 및 모노소듐글루타메이트와 칼슘을 포함하는 용액을 포함하는 발효 출발 물질 조성물.

청구항 4.

제3항에 있어서, 상기 모노소듐글루타메이트의 농도는 1% 내지 7%이고, 상기 칼슘의 농도는 1% 내지 3%인 것을 특징으로 하는 발효 출발 물질 조성물.

청구항 5.

제3항 또는 제4항에 따른 발효 출발 물질 조성물을 이용하여 제조된 발효 식품.

청구항 6.

삭제

명세서

발명의 상세한 설명

발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

본 발명은 감마아미노부티르산을 다량 생산할 수 있는 균주 및 그 이용에 관한 것으로서, 더욱 구체적으로는 발효유제품의 제조 공정 등에 활용되어 다양한 식품 첨가물 또는 의약품 첨가물로서 유용한 감마아미노부티르산을 효과적으로 생산할 수 있는 락토바실러스속 균주, 이를 포함하는 발효 출발 물질 조성물 및 이를 이용하여 제조된 발효 식품 및 기능성 식품에 관한 것이다.

감마아미노부티르산 (Gamma-amino butyric acid, GABA)는 억제성 신경전달 물질로서, 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 발아 현미, 녹차 등에서 주로 발견되고 있다. 스트레스에 시달리는 현대인, 특히 수험생, 알코올 과다 섭취자 등의 경우에는, 뇌와 혈중 GABA 농도가 낮은 것으로 보고되어 있으며, 체내 GABA 농도의 극심한 부족은 발작, 경련, 간질 증세를 일으키는 것으로 알려져 있어서, 이들 증세를 완화 내지는 치료하기 위해서, 체내 GABA 농도를 높이기 위한 목적의 식품 또는 약제 개발이 이루어지고 있다.

한편, 락토바실러스속의 균주들은 다양한 발효식품의 제조에 사용되는 균주로서, 예를 들어 치즈와 같은 영양 식품의 제조에 유용하게 사용된다. 특히, 치즈는 단백질과 지방을 농축시켜 만든 것으로서 함유된 성분들이 발효과정 중에 분해되어 체내에서 소화흡수가 용이한 상태로 되어 있기 때문에 유제품의 꽃으로 불리우는 고급 식품이며, 저장성이 좋고 기타 식품 첨가물이 없는 자연식품으로 인식된다. 또한, 치즈는 위산과다인 사람에게는 단백질 성분의 완충 역할을 수행하여 중화제로 작용하며, 칼슘을 다량 함유하여 골다공증 등과 질병의 방지도 유익하다.

치즈, 김치, 장류 등과 같은 발효 식품의 제조에 있어서, 락토바실러스속의 균주들은 매우 중요한 역할을 담당하는 미생물 균이다. 따라서, GABA와 같은 유용한 물질을 다량 생산할 수 있는 락토바실러스 균주의 개발이 매우 시급한 실정이다.

발명이 이루고자 하는 기술적 과제

본 발명은, 상기와 같은 요구에 부응하기 위해서, 감마아미노부티르산을 다량 생산하는 균주를 제공하고, 상기 균주를 포함하는 발효 출발 물질 조성물 및 이를 이용하여 제조된 발효 식품 및 기능성 식품을 제공하고자 하는 데에 그 목적이 있다.

발명의 구성

본 발명은 상기 기술적 과제를 달성하기 위한 일 태양에서,

감마아미노부티르산을 다량으로 생산하는 락토바실러스 부시네리 OPM-2(*Lactobacillus buchneri* OPM-2, 기탁번호 KFCC 11353P) 균주를 제공한다.

본 발명은 다른 태양에서,

상기 락토바실러스 부시네리 OPM-2(*Lactobacillus buchneri* OPM-2, 기탁번호 KFCC 11353P) 균주 및 모노소듐글루타메이트와 칼슘을 포함하는 용액을 포함하는 발효 출발 물질 조성물을 제공한다.

또한, 본 발명은 또 다른 태양에서,

상기 발효 출발 물질 조성물을 이용하여 제조된 발효 식품 및 기능성 식품을 제공한다.

이하, 본 발명에 대해서 더욱 상세하게 설명하기로 한다.

본 발명자들은 실험실에서 제조하여 자연 숙성된 치즈로부터 분리된 새로운 균주 락토바실러스 부시네리 OPM-2 (*Lactobacillus buchneri* OPM-2)가 감마아미노부티르산을 다량으로 생산하는 능력을 보유함을 확인하고, 본 발명을 완성하게 되었다.

구체적으로, 본 발명은 발효 치즈로부터 분리된 균주 락토바실러스 부시네리 OPM-2 (*Lactobacillus buchneri* OPM-2), 상기 균주를 포함하는 발효 출발 물질 조성물 (fermentation starter composition) 및 상기 균주를 이용하여 제조된 발효 식품 및 기능성 식품에 관한 것이다.

본 발명에 의할 경우, 간편하고 경제적인 방법으로 감마아미노부티르산을 대량으로 생산할 수 있게 되며, 본 발명에 따른 균주를 이용하여 다양한 기능성 및 발효 식품들을 편리하게 제조할 수 있게 된다.

본 발명자들은 상기와 같은 다양한 기능과 응용성을 가지고 있는 GABA 고생산 미생물을 얻기 위하여, 실험실에서 제조하여 자연 숙성시킨 치즈로부터 감마아미노부티르산의 생산성이 우수한 균주를 탐색·분리하였다.

상기 탐색 결과, 감마아미노부티르산을 다량 생산하는 우수한 락토바실러스 균주를 분리하였으며, 이를 락토바실러스 부시네리 OPM-2 (*Lactobacillus buchneri* OPM-2)로 명명하고, 2005년 8월 25일자로 한국미생물보존센터 (KFCC)에 KFCC 11353P의 수탁번호로 기탁하였다. 상기 분리된 균주는 실험실에서 제조하여 자연숙성시킨 치즈로부터 수득된 것이며, 따라서 상기 균주가 생산하는 감마아미노부티르산은 적량, 적절한 방법으로 다양한 식품 및 약품 등에 첨가하여 사용될 수 있다.

본 발명에 따른 균주의 형태학적 및 생리학적 특성은 다음과 같다.

즉, 본 발명에 따른 균주는 그람 양성균으로서, 1.0 내지 1.5 μm 정도 크기의 막대형이며, 기타 포자 미형성, 글루코오스 배지 중에서의 CO₂ 생산 등의 특성을 갖는다. 본 발명에 따른 균주의 기타 형태학적 및 생리학적 특성을 하기 표 1에 요약하였다.

본 발명에 따른 균주에 의해서 생산된 감마아미노부티르산은 다양한 의약품 및 식품 등에 첨가될 수 있다.

예를 들어, 본 발명에 따른 감마아미노부티르산을 포함하는 약학적 조성물을 제조하는 경우에, 약제학적으로 허용가능한 다양한 첨가제가 포함될 수 있으며, 이러한 첨가제로는 통상적인 부형제, 붕해제, 결합제, 활택제, 현탁화제 등 중에서 1종 또는 2종 이상이 선택적으로 사용될 수 있다. 또한, 이러한 약학적 조성물을 정제 또는 경질캡셀제 등의 고형제형으로 제조할 경우, 부형제로서 미결정 셀룰로오즈, 유당, 저치환도 히드록시셀룰로오즈 등이 사용될 수 있고, 붕해제로서 전분글리콜산 나트륨, 무수인산일수소 칼슘 등이 사용될 수 있다. 결합제로는 폴리비닐피롤리돈, 저치환도 히드록시프로필셀룰로오즈, 히드록시프로필셀룰로오즈 등이 사용될 수 있고, 활택제로서는 스테아린산 마그네슘, 이산화규소, 탈크 등으로부터 선택하여 사용할 수 있다. 또한, 현탁화제로는 약제학 분야에서 통상적으로 사용되는 계면활성제 (예를 들어, 소르비탄 에스테르류, 또는 폴리소르베이트류 등)를 사용할 수 있다.

상기 약학적 조성물은 고형 및 액상 형태를 포함한 다양한 형태의 제형으로 제제화할 수 있으며, 이들 제형은 정제, 캡셀제 (경질 또는 연질), 액제 (solution), 현탁제, 유제, 및 시럽제 등을 포함한다.

상기 약학적 조성물은 경구 또는 비경구를 포함한 다양한 투여방법으로 투여될 수 있으며, 투여량은 나이, 연령 및 성별과 같은 상태 및 질병의 경중 등에 따라 적당한 양으로 조정하여 투여될 수 있고, 이러한 투여량은 임상적으로 환자의 치료 또는 예방에 종사하는 당업자라면 용이하게 조정할 수 있다.

또한, 본 발명은 다른 태양에서, 상기 락토바실러스속 균주 및 모노소듐글루타메이트와 칼슘을 포함하는 용액을 포함하는 발효 출발 물질 조성물을 제공한다.

바람직하게는, 상기 모노소듐글루타메이트의 농도는 1% 내지 7%이고, 상기 칼슘의 농도는 1% 내지 3%이다.

또한, 본 발명은 또 다른 태양에서, 본 발명에 따른 발효 출발 물질 조성물을 이용하여 제조된 발효 식품을 제공한다.

한편, 본 발명에 따른 락토바실러스속 균주를 이용하여 제조된 감마아미노부티르산은 다양한 형태의 발효 식품에 별도로 첨가될 수도 있으며, 이 경우 당업자라면 다양한 종류의 첨가제를 적당한 함량 범위 내에서 첨가하는 것이 가능하다.

이하 본 발명을 실시예를 통하여 보다 구체적으로 설명한다. 그러나, 하기 실시예는 본 발명을 예시적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 하기 실시예로만 한정되는 것은 아니다.

실시에 1. 본 발명에 따른 균주의 분리 및 동정

1.1 균주의 분리

실험실에서 제조 및 자연 숙성된 치즈를 균주의 선별 및 분리에 사용하였으며, 시료를 샘플링하는 즉시 액상과 고형물을 분리한 다음, 글리세롤 15% 용액을 샘플 총중량에 대하여 20%로 가하여 4°C 및 -20°C에서 각각 보관하였다. 1차적으로, 샘플들을 락토바실러스 MRS 배지 10ml당 2ml의 샘플을 첨가하여 37°C에서 사전-배양하였다. 이어서, 10진 희석법을 통하여 MRS+ CaCO₃ 배지에 도달한 후, 37°C 배양기에서 24~36 시간 동안 배양하고 선별한 다음, MRS 배지 (1% 모노소듐글루타메이트, MSG)에 접종하여 박막 크로마토그래피를 수행하여 1차 선별하였다. 2차적으로, 아미노산 자동분석기를 이용해서 감마아미노부티르산 고생산 균주를 선별하였다. 선별은, 먼저 균주가 생성되는 환이 큰 것을 중점적으로 선별하였으며, 이어서 1% MSG의 전환 능력을 정성하기 위해서 박막 크로마토그래피를 수행하고, 그 후 3% MSG, 5% MSG를 처리하여 감마아미노부티르산의 생산량을 비교하여 최종 선별에 이용하였다. 도 1은 본 발명에 따른 균주의 MSG의 농도에 따른 감마아미노부티르산 생산량을 도시한 그래프이다. 또한, 하기 표 1에는 최종 선별된 균주의 형태학적 및 생리학적 특성들을 열거하였다.

[표 1]

특성	균주
그램성	+
형태	막대형
포자 형성	-
글루코오스 배지 중에서의 가스 생산 능력	CO ₂ 생산
카탈라아제 생산	-
글루코오스	+
리보오스	+
갈락토오스	+
프럭토오스	+
말토오스	+
수크로오스	+
자일로오스	-
글리세롤	+
전분	-
아세트산	-
아라비노오스	+
멜레지토오스	+
멜리비오스	+
자일로오스 (위에 기재된 사항과 중복됩니다)	+
셀로비오스	-
트레할로오스	-
15℃에서의 생존성	+
45℃에서의 생존성	-
50℃에서의 생존성	-
크기	1.0-1.5μm

(+: 양성, -: 음성)

1.2 균주의 동정

2차적으로 최종 선정된 감마아미노부티르산 고생산 균주 중 하나의 균주를 16s 리보솜 DNA 서열분석을 통하여 동정하였다. 먼저, 각 균주의 게놈 DNA를 Promega genomic DNA isolation kit를 이용하여 분리하였다. 분리한 각 균주의 게놈 DNA를 이용하여 박테리아의 16s 리보솜 DNA에 특이적인 프라이머 (하기 표 2에 서열 기재)를 이용하여 polymerase chain reaction (PCR)을 수행하였다. 1.5kb 정도의 크기를 지닌 PCR 산물을 pGEM T-Easy vector (Promega)에 리게이션시키고, *E.coli* (UT481)에 형질전환시켜서 클로닝을 수행하였다. LB+ 앰피실린 (50μg/ml) 플레이트에서 형질전환된 *E.coli*를 분리하여 (X-gal selection), LB 배지에서 배양한 후, Qiagen mini-prep kit를 이용하여 인서트트를 확인한 뒤, DNA 서열분석을 의뢰하였다. 첨부된 서열번호 1의 서열목록에는 16s 리보솜 DNA의 부분 서열을 나타내었다. 이러한, 16s rDNA 서열분석 결과를 이용하여 GeneBank의 블라스트를 통해 균주를 동정하였다.

동정된 균주는 *Lactobacillus buchneri* gene for 16s ribosomal RNA, partial sequence (Genbank accession no. AB205055)와 98%의 상동성을 보였으며, *Lactobacillus parakefiri* 16s ribosomal RNA gene, partial sequence (AY026750)와 97%의 상동성을 나타내었다. 따라서, 선발 균주를 *Lactobacillus buchneri* OPM-2로 명명하였다.

[표 2]

선택된 균주의 게놈 DNA로부터의 16s 리보솜 DNA를 PCR 증폭시키는데 사용된 프라이머들

프라이머	서열	%GC
포워드 (20mer)	AGAGTTTGATCMTGGCTCAG	45.0
리버스 (15mer)	ACGGGCGGTGTGTRC	66.7

시약 및 기구

HPLC는 Waters사 (AccQ Tag Amino Acid Analysis System) (USA) 제품을 사용하였고, 동결건조기는 IIsin사 (Korea) 제품을 사용하였다. GABA 표준품은 Sigma사 (USA) 제품을 사용하였으며, MRS 배지는 Difco사(USA) 제품을 사용하였다. MSG는 Sigma사 (USA) 제품을, 유리 아미노산 표준품은 Pierce사 (USA) 제품을 사용하였다. 또한, 6-아미노퀴놀릴-N-히드록시숙신이미딜 카르보네이트 (AccQ·Flour Reagent) 및 아세테이트-포스페이트 버퍼 (AccQ·Tag Eluenta A)는 Waters사 (USA) 제품을 사용하였다.

실시에 2. 본 발명에 따른 균주의 감마아미노부티르산 생산능 측정

감마아미노부티르산 및 유리 아미노산 측정 방법은 저온 보관된 샘플로부터 유기 용매 혼합액을 가하여 섞어준 다음, 감마아미노부티르산 및 유리 아미노산을 포함하는 수용액 층을 원심분리하여 얻었고, 이를 다시 한번 원심분리하여 불순물을 제거하였다. 상등액을 동결건조하여 소량의 물로 녹여준 후, 0.45µm PVDF 필터로 여과하여 분석에 사용하였다. 아미노산의 형광 유도체화를 위하여 AccQ·Tag 시약을 사용하였으며, 이들 유도체 분리를 위해 3.9×150 mm AccQ·Tag™ (Nova-Pak™ C18, Waters) 컬럼을 사용하였다. 컬럼으로부터 유도체를 용출시키기 위해서 AccQ·Tag Eluenta A와 60% 아세토니트릴의 혼합액을 분당 1ml의 유속으로 흘려 주었다. 감마아미노부티르산 및 유리아미노산의 함량은 표준 GABA 및 유리아미노산의 분석결과와 비교하여 산출하였다. 하기 표 3에는 종래 통상적인 락토바실러스 균주들과 본 발명에 따른 균주의 감마아미노부티르산 생산능을 비교한 결과를 나타내었다.

[표 3]

균주	감마아미노부티르산 함량 (nmol/ml)
본 발명에 따른 균주	9028.28
락토바실러스 플란타룸 KCTC 3103	30.09
락토바실러스 브레비스 KCTC 41028	2.09
락토바실러스 브레비스 KCTC 41029Q	5.15

발명의 효과

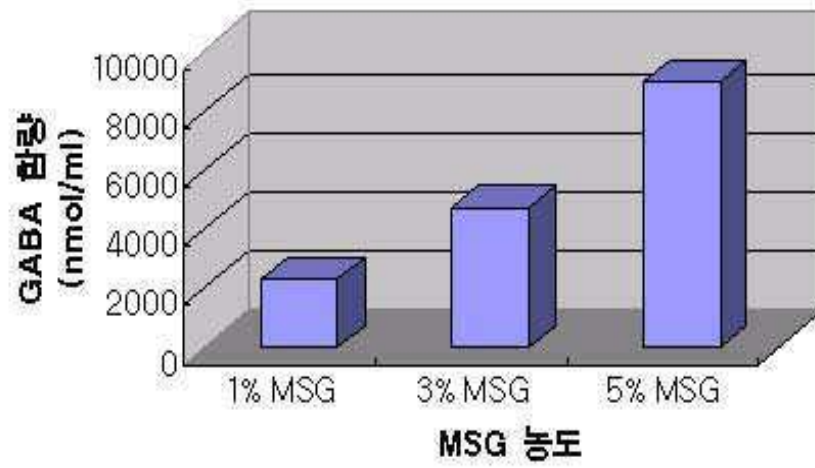
본 발명에 따르면, 발효유제품의 제조 공정 등에 활용되어 다양한 식품 첨가물 또는 의약품 첨가물로서 유용한 감마아미노부티르산을 효과적으로 생산할 수 있는 락토바실러스속 균주를 제공할 수 있다는 효과가 있다.

도면의 간단한 설명

도 1은 본 발명에 따른 균주의 모노소듐글루타메이트의 농도에 따른 감마아미노부티르산 생산량을 도시한 그래프이다.

도면

도면1



서열목록

서열목록 전자파일 첨부