



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2017년08월11일  
(11) 등록번호 10-1767606  
(24) 등록일자 2017년08월07일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
C12P 19/56 (2006.01) C12N 1/20 (2006.01)  
C12N 9/42 (2006.01) C12R 1/25 (2006.01)  
(21) 출원번호 10-2013-0125634  
(22) 출원일자 2013년10월21일  
심사청구일자 2015년04월10일  
(65) 공개번호 10-2015-0045846  
(43) 공개일자 2015년04월29일  
(56) 선행기술조사문헌  
J. Agric. Food Chem., Vol. 60, pp. 6210-6216  
(2012.04.24.)\*  
World Journal of Microbiology &  
Biotechnology, Vol. 20, pp. 633-637 (2004.)\*  
KR1020130014192 A  
US20070116826 A1  
\*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자  
한국생명공학연구원  
대전광역시 유성구 과학로 125 (어은동)  
(72) 발명자  
이우송  
대전광역시 유성구 과학로 125 (어은동)  
김영민  
대전광역시 유성구 과학로 125 (어은동)  
(74) 대리인  
손민  
(뒷면에 계속)

전체 청구항 수 : 총 11 항

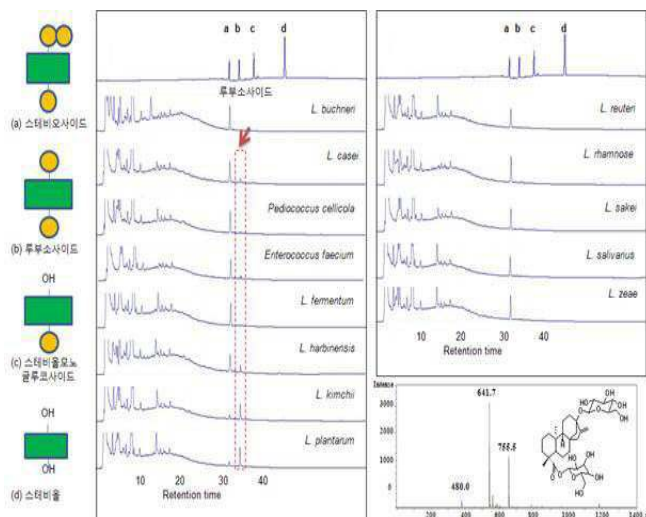
심사관 : 황상필

(54) 발명의 명칭 유산균을 이용하여 스테비오사이드로부터 루부소사이드를 생산하는 방법

(57) 요약

본 발명은 유산균의 일종인 락토바실러스 플랜타럼 균주를 이용하여 스테비오사이드로부터 루부소사이드를 생산하는 방법, 상기 방법에 사용되는 락토바실러스 플랜타럼 균주를 포함하는 루부소사이드 생산용 조성물, 상기 조성물을 포함하는 루부소사이드 생산용 키트 및 β-글루코시다제 생산능력이 우수한 신규한 락토바실러스 플랜타럼 균주에 관한 것이다. 본 발명의 루부소사이드 생산방법을 이용하면, 종래의 효소를 이용하여 생산하는 방법에 비하여, 생산비용을 절약할 수 있고, 장시간 동안 대량의 루부소사이드를 생산할 수 있으므로, 루부소사이드의 산업적 생산에 널리 활용될 수 있을 것이다,

대표도 - 도1



(72) 발명자  
**고진아**  
 대전광역시 유성구 과학로 125 (어은동)  
**노문철**  
 대전광역시 유성구 과학로 125 (어은동)  
**류영배**  
 대전광역시 유성구 과학로 125 (어은동)  
**김차영**  
 대전광역시 유성구 과학로 125 (어은동)

**박수진**  
 대전광역시 유성구 과학로 125 (어은동)  
**박찬선**  
 대전광역시 유성구 과학로 125 (어은동)  
**정형재**  
 대전광역시 유성구 과학로 125 (어은동)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 112147-03-1-SB030  
 부처명 농림수산식품부(농림부)  
 연구관리전문기관 농림수산식품기술기획평가원  
 연구사업명 생명산업기술개발사업(舊 농림기술)  
 연구과제명 친환경농자재 스테비아그린플러스이용 식물생장촉진 유효성분 및 대사체 분석  
 기 여 율 80/100  
 주관기관 한국생명공학연구원  
 연구기간 2012.12.21 ~ 2013.12.20

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2012-0001111  
 부처명 교육과학기술부  
 연구관리전문기관 한국연구재단  
 연구사업명 원천기술개발사업  
 연구과제명 바이러스 감염 염증 제어용 배당체 및 유사배당체 연구  
 기 여 율 20/100  
 주관기관 한국생명공학연구원  
 연구기간 2012.03.01 ~ 2013.02.28

---

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

(a) 기탁번호 KCTC 12503BP로 기탁된 락토바실러스 플랜타럼(*Lactobacillus plantarum*) ST100 균주의 배양물에 스테비오사이드를 가하여 반응시키고 반응물을 수득하는 단계; 및 (b) 상기 반응물로부터 루부소사이드를 회수하는 단계를 포함하는, 효소의 정제 및 추가적인 투입 없이 루부소사이드를 생산하는 방법.

#### 청구항 2

삭제

#### 청구항 3

제1항에 있어서,

상기 배양물에 가해지는 스테비오사이드의 함량은 반응물 기준 1 내지 2%(w/v)인 것인 방법.

#### 청구항 4

제1항에 있어서,

반응 pH는 pH 3.5 내지 7.5인 것인 방법.

#### 청구항 5

제1항에 있어서,

반응온도는 40 내지 50℃인 것인 방법.

#### 청구항 6

제1항에 있어서,

반응시간은 10 내지 30시간인 것인 방법.

#### 청구항 7

기탁번호 KCTC 12503BP로 기탁된 락토바실러스 플랜타럼 ST100 균주를 포함하는, 효소의 정제 및 추가적인 투입 없이 루부소사이드를 생산하는 것을 특징으로 하는, 루부소사이드 생산용 조성물.

#### 청구항 8

제7항에 있어서,

기관 또는 지지체에 고정화된 락토바실러스 플랜타럼 ST100 균주를 포함하는 것인 조성물.

**청구항 9**

제8항에 있어서,

상기 기관 또는 지지체는 폴리비닐알코올, 칼슘알기네이트, 한천, 카라기난, 폴리아크릴아미드 및 이들의 조합으로 구성된 균으로부터 선택되는 재질로 구성되는 것인 조성물.

**청구항 10**

제7항 내지 제9항 중 어느 한 항의 조성물을 포함하는 루부소사이드 생산용 키트.

**청구항 11**

제10항에 있어서,

락토바실러스 플랜타럼 ST100 균주 배양용 배지, 기포생성 억제용 소포제, 스테비오사이드, 반응용기 및 이들의 조합으로 구성된 균으로부터 선택되는 구성요소를 추가로 포함하는 것인 키트.

**청구항 12**

기탁번호 KCTC 12503BP로 기탁된 루부소사이드의 생산용 신규 락토바실러스 플랜타럼 ST100(*Lactobacillus plantarum* ST100) 균주.

**발명의 설명**

**기술 분야**

[0001] 본 발명은 유산균을 이용하여 스테비오사이드로부터 루부소사이드를 생산하는 방법에 관한 것으로, 보다 구체적으로, 본 발명은 유산균의 일종인 락토바실러스 플랜타럼 균주를 이용하여 스테비오사이드로부터 루부소사이드를 생산하는 방법, 상기 방법에 사용되는 락토바실러스 플랜타럼 균주를 포함하는 루부소사이드 생산용 조성물, 상기 조성물을 포함하는 루부소사이드 생산용 키트 및 β-글루코시다제 생산능력이 우수한 신규한 락토바실러스 플랜타럼 균주에 관한 것이다.

**배경 기술**

[0002] 최근, 인공감미료인 사이클라메이트, 사카린과 그의 염 등이 안정성의 면에서 일반 식품에의 사용이 금지되거나 사용 제한이 강화되고 있으며, 한편 설탕의 섭취는 건강상의 문제로 사용을 기피하고 있는 상황에서 이들을 대체할 수 있는 천연 감미료의 개발이 시급히 요구되고 있다.

[0003] 이런 시점에서 스테비오사이드는 설탕에 비하여 저칼로리 감미료이며 감미도는 설탕의 약 200-300배로 높아 그 수용가 급속하게 높아지고 있다. 스테비오사이드는 남미 파라과이가 원산지인 국화과 다년생 초본인 스테비아 레바우디아나 베르토니 (*Stevia rebaudiana* BERTONI)로부터 추출한 감미성분으로 스테비오사이드, 레바우디오사이드 A, B, C, E 등으로 되어 있다. 장미과의 루버스 수아비씨엄(*Rubus suavissium* S. LEE)는 중국과 일본에서 "첨차"라는 이름으로 오래전부터 음용되고 있는 차의 일종으로 폴리페놀성분(탄닌, 플라보노이드 등)과 루부소사이드(Rubusoside)라는 배당체를 다량 함유하고 있으며, 루부소사이드는 설탕의 약 150-200배 정도의 감미를 지니고 있으며, 무칼로리, 충치 방지 및 청정감(시원한맛) 지닌 감미소재이다. 이소스테비올 골격에 어글리론의 베타-글루코실 배당체로 되어 있다.

[0004] 스테비오사이드 시장은 지난 90년부터 시행된 정부의 사카린 사용규제조치에 따라 시장이 형성되기 시작했으며, 현재는 사카린 대체감미료 및 저칼로리 감미료로 주로 사용되고 있다. 스테비오사이드는 생체내 흡수가 되지 않는 무칼로리 다이어트 감미료로, 특히 온도 및 pH 변화에 안정, 소주 등에 다량 사용되고 있다. 또한, 5~18%의

식염수에서 침전을 형성, 감미변화가 없어 절임 식품과 비발효성으로 각종 가공식품류에 사용이 적합한 것으로 알려지고 있다. 하지만, 뒷맛이 오래 남으며 단맛 이외에 쓴맛, 불쾌감 등이 있는 단점을 지니고 있다. 그로 인해 사용량 및 용도의 한계가 발생하는 문제점이 있어 스테비오사이드의 미질을 개선하여야 할 필요성이 대두되었다.

[0005] 이를 위하여 스테비오사이드의 미질을 개선하기 위한 다양한 연구가 진행되었고, 그 결과 설탕, 포도당, 과당 등과 같은 천연 당질 감미료를 1종 또는 그 이상을 첨가하는 방법, 아미노산 또는 아미노산의 염과 배합하는 방법, 싸이클로텍스트린과 같이 포접능을 갖는 환형 당질에 물리적으로 결합시키는 방법(일본공개특허공보 소60-98957) 등이 개발되었다. 그러나, 상기 개발된 방법들은 상당한 함량의 첨가물을 필요로 하기 때문에, 저칼로리 감미료라는 스테비오사이드의 특성이 훼손되는 단점이 있었다. 또 다른 미질 개선 방법으로 생물전환 당전이 효소 기술을 활용하여 감미도와 감미질이 우수한 모델이었던 "레바우디오사이드 A" 유사체를 만들려고 하였다. 현재 시판중인 CGTase를 이용하여 스테비오사이드의 13-OH 또는 19-OH 부위에 무작위로 포도당이 1-12개까지 부가된 효소처리 스테비오사이드가 유일하게 시판 중에 있다. 하지만, CGTase를 이용한 방법으로는 선택적으로 한 개의 포도당만 부가할 수가 없고, 부가된 포도당이 장내 미생물에 의해 모두 분해되어 에너지원으로 전환된다면 가수 분해된 포도당 숫자만큼의 칼로리가 상승한다는 단점을 지니고 있다.

[0006] 이러한 스테비오사이드의 단점을 해소하기 위한 대안으로서 루부소사이드가 부각되고 있다. 스테비올 배당체의 일종인 루부소사이드는 난용성 소재를 가용화하는 능력이 탁월하여 천연 계면활성제로서 사용될 뿐만 아니라 감미효과가 우수하다고 알려져 있으나, 이의 제조단가가 높다는 단점이 있어, 최근에는  $\beta$ -글루코시다제에 속하는 효소를 이용하여 스테비오사이드로부터 글루코스를 제거함으로써 루부소사이드를 생산하는 방법이 개발되었다(한국특허공개 제10-2013-0014192호). 그러나, 상기 효소를 사용하는 방법은 효소자체의 비용 뿐만 아니라, 그의 활성을 유지하는 시간이 비교적 짧아서 효소를 빈번하게 가하여야 하므로, 산업적인 생산에는 사용할 수 없다는 단점이 있었다.

[0007] 이러한 배경하에서, 본 발명자들은 보다 효과적으로 루부소사이드를 생산하는 방법을 개발하기 위하여 예의 연구노력한 결과,  $\beta$ -글루코시다제를 분비생산하는 것으로 알려진 유산균을 이용할 경우, 효소의 정제 및 추가적인 투입없이도 스테비오사이드로부터 루부소사이드를 생산할 수 있고, 특히 김치로부터 유래된 락토바실러스속 유산균을 이용할 경우 가장 효과적으로 루부소사이드를 생산할 수 있음을 확인하고, 본 발명을 완성하였다.

### 발명의 내용

#### 해결하려는 과제

[0008] 본 발명의 하나의 목적은 락토바실러스 플랜타럼 균주를 이용하여 스테비오사이드로부터 루부소사이드를 생산하는 방법을 제공하는 것이다.

[0009] 본 발명의 다른 목적은 락토바실러스 플랜타럼 균주를 포함하는 루부소사이드 생산용 조성물을 제공하는 것이다.

[0010] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 조성물을 포함하는 루부소사이드 생산용 키트를 제공하는 것이다.

[0011] 본 발명의 또 다른 목적은  $\beta$ -글루코시다제 생산능력이 우수한 신규한 락토바실러스 플랜타럼 균주를 제공하는 것이다.

#### 과제의 해결 수단

[0012] 본 발명자들은 보다 효과적으로 루부소사이드를 생산하는 방법을 개발하기 위하여 다양한 연구를 수행하던 중, 유산균에 주목하게 되었다. 현재까지 알려진 효소를 이용하여 루부소사이드의 생산방법은  $\beta$ -글루코시다제를 이용하여 스테비오사이드를 분해함으로써 분해산물로서 루부소사이드를 생산하는 방법인데, 이때 사용되는  $\beta$ -글루코시다제는 쉽게 소모되기 때문에, 반응시간을 증가시켜  $\beta$ -글루코시다제의 소모시간을 연장하거나 또는  $\beta$ -글루코시다제를 지속적으로 투입함으로써, 루부소사이드를 산업적으로 생산하고자 하였으나, 둘다 산업적인 생산성이 저하되기 때문에, 루부소사이드를 산업적으로 생산하지 못하고 있는 실정이다. 이에, 본 발명자들은  $\beta$ -

글루코시다제를 지속적으로 분비생산하는 미생물을 이용하여 스테비오사이드로부터 루부소사이드를 생산하고자, 활성이 우수한  $\beta$ -글루코시다제를 지속적으로 생산할 수 있을 뿐만 아니라 감미료로서 사용되는 루부소사이드의 특성상 인체에 무해하여야 한다는 요건을 갖춘 미생물인 유산균을 도출하였다.

[0013] 한편, 지금까지 알려진 다양한 유산균 중에서 루부소사이드의 생산에 가장 적합한 유산균을 선발하기 위하여, 김치로부터 유래된 다양한 유산균을 대상으로 루부소사이드 생성능을 비교한 결과, 일부 유산균만이 스테비오사이드로부터 루부소사이드를 생산할 수 있었고, 상기 루부소사이드를 생산하는 유산균 중에서도 락토바실러스 속 유산균의 일종인 락토바실러스 플란타럼(*Lactobacillus plantarum*) 균주가 가장 우수한 루부소사이드 생성능을 나타냄을 확인하였다. 또한, 루부소사이드의 생산에 대한 상기 락토바실러스 플란타럼 균주의 특성을 분석한 결과, 상기 락토바실러스 플란타럼 균주는 약산성(pH 3.5 내지 7.5), 중온(40 내지 50℃) 및 적정반응시간(10 내지 30시간)의 조건에서 루부소사이드의 생산이 최적화됨을 확인하였다.

[0014] 한편, 상기 사용된 락토바실러스 플란타럼 균주는 상온에서 50시간 동안 루부소사이드 생산용 반응을 수행할 수 있도록,  $\beta$ -글루코시다제를 분비생산하였으므로, 상기 균주의 16s rRNA의 염기서열을 이용하여 상동성 분석을 수행한 결과, 공지된 락토바실러스 플란타럼 균주와 높은 상동성을 나타내지만 동일한 균주는 검색되지 않은 새로운 균주임을 알 수 있었다. 이에, 상기 신규한 락토바실러스 플란타럼 균주를 "락토바실러스 플란타럼 ST100(*Lactobacillus plantarum* ST100)"이라 명명하고, 이를 2013년 10월 11일자로 한국생명공학연구원 생물자원센터에 기탁하여 기탁번호 KCTC 12503BP를 부여받았다.

[0015] 상기 본 발명의 균주는  $\beta$ -글루코시다제의 생산성이 우수하여, 스테비오사이드를 분해하여 루부소사이드를 생산하는 루부소사이드의 산업적인 생산에 활용될 수 있다.

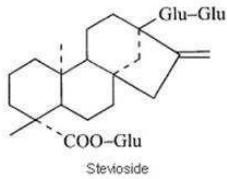
[0016] 상술한 본 발명의 목적을 달성하기 위한 일 실시양태로서, 본 발명은 락토바실러스 플란타럼(*Lactobacillus plantarum*) 균주를 이용하여 스테비오사이드로부터 루부소사이드를 생산하는 방법을 제공한다. 구체적으로, 본 발명의 루부소사이드의 생산방법은 (a) 락토바실러스 플란타럼(*Lactobacillus plantarum*) 균주의 배양물에 스테비오사이드를 가하여 반응시키고 반응물을 수득하는 단계; 및 (b) 상기 반응물로부터 루부소사이드를 회수하는 단계를 포함한다. 이때, 상기 배양물에 가해지는 스테비오사이드의 함량은 반응물 기준 1 내지 2%(w/v)이고, 반응 pH는 pH 3.5 내지 7.5이며, 반응온도는 40 내지 50℃이고, 반응시간은 10 내지 30시간이다.

[0017] 본 발명의 용어 "락토바실러스 플란타럼(*Lactobacillus plantarum*)"이란, 그람양성의 호기성 간균의 형태를 갖고, 0.7 내지 1.0 X 3.0 내지 8.0 $\mu$ m의 크기를 갖으며, 생육적정온도는 29 내지 33℃이고, 아라비노스, 글루코스, 프럭토스, 갈락토스, 말토스, 수크로스, 텍스트란, 라피노스, 트레할로스 등을 탄소원으로 사용하여 젖산을 생성하며, 김치를 비롯한 다양한 발효식품에서 분리되고, 내산성성과 내담즙성을 나타내는 락토바실러스 속 유산균의 일종을 의미한다.

[0018] 본 발명에 있어서, 상기 락토바실러스 플란타럼 균주는 스테비오사이드로부터 글루코스를 분해하여 루부소사이드를 생산하는  $\beta$ -글루코시다제의 생산균주로서 사용되므로, 상기 락토바실러스 플란타럼 또는 상기 락토바실러스 플란타럼으로부터 생산된  $\beta$ -글루코시다제를 사용하여 스테비오사이드로부터 루부소사이드를 생산할 수 있다. 이때 사용되는 락토바실러스 플란타럼 균주는 스테비오사이드로부터 글루코스를 분해하여 루부소사이드를 생산할 수 있는 한 특별히 이에 제한되지 않으나, 바람직하게는 락토바실러스 플란타럼 ST100(KCTC 12503BP)을 사용할 수 있다.

[0019] 본 발명의 용어 "스테비오사이드"란, 국화과의 다년생 식물인 스테비아(*stevia*)의 잎에 함유되어 있고, 하기 화학식 1의 구조를 가지는 감미성 화합물을 의미한다. 스테비오사이드는 설탕의 수백 배 우수한 감미도를 갖지만, 설탕에 비교하여 감미의 발현이 느리고, 뒷맛으로 감미가 오래가며, 독특한 떫은맛이나 쓴맛을 수반하는 결점이 있다. 본 발명에 있어서, 상기 스테비오사이드는 루부소사이드의 생산원료로서 사용되는데,  $\beta$ -글루코시다제의 처리에 의하여 스테비오사이드의 글루코스가 분해되면 루부소사이드가 형성된다.

화학식 1

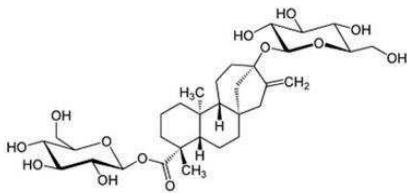


[0020]

[0021]

본 발명의 용어 "루부소사이드"란, 장미과의 다류 원료인 첨차(Rubus suavissium S. LEE)의 잎에 함유되어 있고, 하기 화학식 2의 구조를 가지는 감미성 화합물을 의미한다. 루부소사이드는 설탕의 약 115배의 감미도를 갖고, 칼로리가 없으며, 충치방지 효과를 나타내고, 청정감을 부여하는 특징을 갖는다. 본 발명에 있어서, 상기 루부소사이드는  $\beta$ -글루코시다제의 처리에 의하여 스테비오사이드의 글루코스가 분해되어 생성되는 반응산물로서 사용될 수 있다.

화학식 2



[0022]

[0023]

본 발명의 루부소사이드의 생산방법은, 상기 락토바실러스 플랜타럼 균주를 일정량의 스테비오사이드와 혼합하여 반응함으로써, 루부소사이드를 생산하는 방식(회분식 생산방법)으로 수행될 수도 있고, 상기 락토바실러스 플랜타럼 균주를 고정화시킨 다음, 상기 고정화된 균주에 균주의 생육에 필요한 배지와 스테비오사이드를 포함하는 반응액을 유가식으로 공급하고, 생산된 루부소사이드를 포함하는 반응액을 방출시키는 방식(연속식 생산방법)으로 수행될 수도 있다. 특히, 유가식으로 반응시킬 경우에는, 반응액에 포함된 스테비오사이드가 고갈되지 않고 일정수준을 유지하며, 루부소사이드의 농도가 증가되지 않으므로, 30시간 이상의 시간동안 반응을 수행할 경우에도, 루부소사이드의 생산량이 감소되지 않아, 장시간 동안 루부소사이드를 생산할 수 있다는 장점이 있어, 루부소사이드의 산업적인 대량생산에 활용될 수 있다.

[0024]

아울러, 반응물로부터 루부소사이드를 회수하는 단계는 당업계에 공지된 방법에 의해 수행될 수 있다. 구체적으로, 공지된 루부소사이드 회수 방법은 특별히 이에 제한되지 않으나, 원심분리, 여과, 추출, 분무, 건조, 증발, 침전, 결정화, 전기영동, 분별용해(예를 들면 암모늄 설페이트 침전), 크로마토그래피(예를 들면 이온 교환, 친화성, 소수성 및 크기배제) 등의 방법을 사용함이 바람직하다.

[0025]

본 발명의 일 실시예에 의하면, 락토바실러스 플랜타럼 균주의 배양상등액에 포함된  $\beta$ -글루코시다제를 이용하여, 루부소사이드를 생산하기 위한 최적의 조건을 결정한 결과, 상기  $\beta$ -글루코시다제는 pH 2.0 내지 7.5에서 안정하고, 최적의 반응 pH는 pH 6.0 이며(실시예 2-1),  $\beta$ -글루코시다제는 60℃ 이하의 온도에서 활성이 유지되었고, 최적의 반응 온도는 30 내지 40℃이며(실시예 2-2), 반응후 10시간이 경과한 시점에서 검출되었고, 30시간까지는 시간의 경과에 따라, 루부소사이드의 생산량이 증가하였으나, 30시간이 경과된 후에는 시간의 경과에 따라 루부소사이드의 생산량이 감소함을 확인하였다(실시예 2-3). 특히, 반응시간의 경우 10시간 이내에서는 락토바실러스 플랜타럼 균주로부터 생산되는  $\beta$ -글루코시다제의 생성량이 충분하지 않아 스테비오사이드의 분해수준이 미미하여, 루부소사이드의 생성량이 많지 않고, 30시간 이상에서는 상기  $\beta$ -글루코시다제의 활성은 그대로



유지되지만 스테비오사이드가 고갈되어 상기  $\beta$ -글루코시다제에 의하여 루부소사이드가 분해되어 스테비올모노글루코사이드가 생성되므로, 루부소사이드의 생산량이 감소된다는 단점이 있었다.

- [0026] 따라서, 락토바실러스 플랜타럼 균주를 사용하여 스테비오사이드로부터 루부소사이드를 생산할 경우, pH 2.0 내지 7.5 및 30 내지 40℃의 조건에서 10 내지 30시간 동안 반응시킴이 바람직함을 알 수 있었다.
- [0027] 상술한 본 발명의 목적을 달성하기 위한 다른 실시양태로서, 본 발명은 락토바실러스 플랜타럼 균주를 포함하는 루부소사이드 생산용 조성물을 제공한다.
- [0028] 상기 조성물에 포함된 락토바실러스 플랜타럼 균주는 공지된 배양방법에 의하여 배양된 것을 사용할 수 있다.
- [0029] 본 발명의 용어 "배양"이란, 락토바실러스 플랜타럼 균주를 적당히 인공적으로 조절된 환경조건에서 생육시키는 일련의 행위를 의미하는데, 상기 배양은 당업계에 널리 알려져 있는 방법을 이용하여 수행할 수 있다. 예를 들어, 상기 배양은 배치 공정 또는 주입 배치 또는 반복 주입 배치 공정(fed batch or repeated fed batch process)에서 연속식으로 수행될 수 있다.
- [0030] 상기 락토바실러스 플랜타럼 균주를 배양하기 위하여는 적당한 탄소원, 질소원, 아미노산, 비타민 등을 함유한 통상의 배지 내에서 호기성 조건 하에서 온도, pH 등을 조절하면서 적절한 방식으로 특정 균주의 생존요건을 충족시켜야 한다. 사용될 수 있는 탄소원으로는 글루코즈 및 자일로즈의 혼합당을 주 탄소원으로 사용하며 이외에 수크로즈, 락토즈, 프락토즈, 말토즈, 전분, 셀룰로즈와 같은 당 및 탄수화물, 대두유, 해바라기유, 피마자유, 코코넛유 등과 같은 오일 및 지방, 팔미트산, 스테아린산, 리놀레산과 같은 지방산, 글리세롤, 에탄올과 같은 알코올, 아세트산과 같은 유기산이 포함된다. 이들 물질은 개별적으로 또는 혼합물로서 사용될 수 있다. 사용될 수 있는 질소원으로는 암모니아, 황산암모늄, 염화암모늄, 초산암모늄, 인산암모늄, 탄산암모늄, 및 질산암모늄과 같은 무기질소원; 글루탐산, 메티오닌, 글루타민과 같은 아미노산 및 펩톤, NZ-아민, 육류 추출물, 효모 추출물, 맥아 추출물, 옥수수 침지액, 카세인 가수분해물, 어류 또는 그의 분해생성물, 탈지 대두 케이크 또는 그의 분해생성물 등 유기질소원이 사용될 수 있다. 이들 질소원은 단독 또는 조합되어 사용될 수 있다. 상기 배지에는 인원으로서는 인산 제1칼륨, 인산 제2칼륨 및 대응되는 소듐-함유 염이 포함될 수 있다. 사용될 수 있는 인원으로는 인산이수소칼륨 또는 인산수소이칼륨 또는 상응하는 나트륨-함유 염이 포함된다. 또한, 무기화합물로는 염화나트륨, 염화칼슘, 염화철, 황산마그네슘, 황산철, 황산망간 및 탄산칼슘 등이 사용될 수 있다. 마지막으로, 상기 물질에 더하여 아미노산 및 비타민과 같은 필수 성장 물질이 사용될 수 있다. 예를 들어, 락토바실러스 플랜타럼 균주 배양용 배지로는 포도당 대신 스테비오사이드를 첨가한 MRS 배지를 사용할 수 있다.
- [0031] 상기 본 발명의 루부소사이드 생산용 조성물에 포함된 락토바실러스 플랜타럼 균주는 고정화되지 않은 형태로 포함될 수도 있고, 고정화된 형태로 포함될 수도 있다. 이때, 고정화된 락토바실러스 플랜타럼 균주는 기관 또는 지지체에 고정되어 상술한 루부소사이드의 연속식 생산방법에 사용될 수 있다. 이때, 상기 기관 또는 지지체는 그의 재질이 특별히 제한되지 않으나, 미생물의 고정화에 사용되는 통상의 재질 예를 들어, 폴리비닐알코올, 칼슘알기네이트, 한천, 카라기난, 폴리아크릴아미드 등을 사용할 수 있다.
- [0032] 상술한 본 발명의 목적을 달성하기 위한 다른 실시양태로서, 본 발명은 락토바실러스 플랜타럼 균주 또는 상기 균주로부터 유래된  $\beta$ -글루코시다제를 포함하는 루부소사이드 생산용 조성물을 포함하는 루부소사이드 생산용 키트를 제공한다.
- [0033] 본 발명의 키트는 락토바실러스 플랜타럼 균주 또는 상기 균주로부터 유래된  $\beta$ -글루코시다제를 이용하여 스테비오사이드로부터 루부소사이드를 생산하는데 사용될 수 있는데, 특별히 이에 제한되지 않으나, 상기 조성물을 이용하여 루부소사이드를 생산하는데 필요한 한 종류 또는 그 이상의 다른 구성 성분 조성물, 용액 또는 장치가 포함될 수도 있다.
- [0034] 구체적인 일례로서, 본 발명의 키트는 락토바실러스 플랜타럼 균주의 생존을 유지하는데 필요한 배지를 추가로 포함할 수 있다.



- [0035] 다른 일례로서, 본 발명의 키트는 기포생성 억제용 소포제(예를 들어, 지방산 폴리글리콜 에스테르 등)를 추가로 포함할 수 있다.
- [0036] 또 다른 일례로서, 본 발명의 키트는 기질로 사용되는 스테비오사이드를 추가로 포함할 수 있다.
- [0037] 또 다른 일례로서, 본 발명의 키트는 루부소사이드의 생산반응을 수행하기 위한 반응용기를 추가로 포함할 수 있다.
- [0038] 상술한 본 발명의 목적을 달성하기 위한 또 다른 실시양태로서, 본 발명은  $\beta$ -글루코시다제 생산능력이 우수한 신규한 락토바실러스 플랜타럼 균주인 락토바실러스 플랜타럼 ST100(*Lactobacillus plantarum* ST100)(KCTC 12503BP)을 제공한다.
- [0039] 본 발명의 일 실시예에 의하면, 전통시장 및 김치에서 유산균주인 엔테로코커스 파에시움(*Enterococcus faecium*), 락토바실러스 김치(*Lactobacillus kimchi*), 락토바실러스 람노스(*Lactobacillus rhamnose*), 락토바실러스 하비넨시스(*Lactobacillus harbinensis*), 락토바실러스 플랜타럼(*Lactobacillus plantarum*), 락토바실러스 퍼멘텀(*Lactobacillus fermentum*), 락토바실러스 카세이(*Lactobacillus casei*), 락토바실러스 사케이(*Lactobacillus sakei*), 락토바실러스 루테리(*Lactobacillus reuteri*), 락토바실러스 살리바리우스(*Lactobacillus salivarius*), 락토바실러스 부크네리(*Lactobacillus buchneri*), 락토바실러스 제아에(*Lactobacillus zae*) 및 페디오코커스 셀리콜라(*Pediococcus cellicola*)를 분리하고(실시예 1), 상기 각 유산균의 배양상등액을 이용하여 스테비오사이드로부터 루부소사이드를 생산하는 균주를 스크리닝한 결과, 엔테로코커스 파에시움, 락토바실러스 김치, 락토바실러스 하비넨시스, 락토바실러스 플랜타럼 및 락토바실러스 카세이의 배양상등액을 사용할 경우 루부소사이드를 생산할 수 있음을 확인하고 그 중에서도 락토바실러스 플랜타럼의 배양상등액이 가장 우수한 루부소사이드 생산능을 나타냄을 확인하였다(도 1). 또한, 상기 락토바실러스 플랜타럼 균주가 종래의 공지된 균주인지의 여부를 확인하기 위하여, 상기 락토바실러스 플랜타럼 균주로부터 수득한 16s rRNA의 염기서열(서열번호 1)을 결정하고, 이를 이용하여 공지된 균주와의 상동성을 비교하였다. 그 결과, 공지된 락토바실러스 플랜타럼 균주와 높은 상동성을 나타내지만 동일한 균주는 검색되지 않았으므로, 상기 락토바실러스 플랜타럼 균주를 "락토바실러스 플랜타럼 ST100(*Lactobacillus plantarum* ST100)"이라 명명하고, 이를 2013년 10월 11일자로 한국생명공학연구원 생물자원센터에 기탁하여 기탁번호 KCTC 12503BP를 부여받았다(실시예 3).
- [0040] 상기 락토바실러스 플랜타럼 ST100은  $\beta$ -글루코시다제의 생산성이 우수하므로, 상술한 루부소사이드의 생산방법에 적용할 경우, 보다 효과적으로 루부소사이드를 생산할 수 있다.

### 발명의 효과

- [0041] 본 발명의 루부소사이드 생산방법을 이용하면, 종래의 효소를 이용하여 생산하는 방법에 비하여, 생산비용을 절약할 수 있고, 장시간 동안 대량의 루부소사이드를 생산할 수 있으므로, 루부소사이드의 산업적 생산에 널리 활용될 수 있을 것이다.

### 도면의 간단한 설명

- [0042] 도 1은 13종의 유산균 배양상등액을 사용하여 스테비오사이드로부터 루부소사이드를 생산한 결과를 나타내는 크로마토그램으로서, a는 스테비오사이드를 나타내고, b는 루부소사이드를 나타내며, c는 스테비올모노글루코사이드를 나타내고, d는 스테비올을 나타낸다.
- 도 2a는 pH 변화에 따른 락토바실러스 플랜타럼 균주 유래  $\beta$ -글루코시다제의 활성변화를 나타내는 그래프이다.
- 도 2b는 온도 변화에 따른 락토바실러스 플랜타럼 균주 유래  $\beta$ -글루코시다제의 활성변화를 나타내는 그래프이다.
- 도 2c는 반응시간의 경과에 따른 스테비오사이드 및 루부소사이드의 함량변화를 나타내는 크로마토그램이다.

도 2d는 반응시간의 경과에 따른 스테비오사이드 및 루부소사이드의 함량변화를 나타내는 그래프이다.

도 3은 본 발명의 락토바실러스 플랜타리움 균주의 배양상등액을 이용하여 제조된 최종 반응생성물의 1H-NMR, 13C-NMR, HMQC, HMBC, H-H COZY, DEPT 스펙트럼이다.

**발명을 실시하기 위한 구체적인 내용**

[0043] 이하 본 발명을 실시예를 통하여 보다 상세하게 설명한다. 그러나 이들 실시예는 본 발명을 예시적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0044] **실시예 1: 루부소사이드 생산 균주의 선발**

[0045] 전라남·북도 전통시장 및 김치에서 분리한 13종의 유산균 균주를 탄소원으로 포도당 대신 스테비오사이드를 첨가한 MRS 선별배지에 접종하고, 37℃에서 48 시간 동안 배양하였다. 상기 배양된 각 균주로부터 16S rRNA를 분리하고, 이의 염기서열을 결정한 다음, 이에 근거하여 상기 13종의 균주를 동정하였다(표 1)

**표 1**

전통시장과 김치로부터 분리된 유산균들

[0046]

번호	균주명
1	엔테로코커스 파에시움( <i>Enterococcus faecium</i> )
2	락토바실러스 김치( <i>Lactobacillus kimchi</i> )
3	락토바실러스 람노스( <i>Lactobacillus rhamnose</i> )
4	락토바실러스 하비넨시스( <i>Lactobacillus harbinensis</i> )
5	락토바실러스 플랜타리움( <i>Lactobacillus plantarum</i> )
6	락토바실러스 퍼멘텀( <i>Lactobacillus fermentum</i> )
7	락토바실러스 카세이( <i>Lactobacillus casei</i> )
8	락토바실러스 사케이( <i>Lactobacillus sakei</i> )
9	락토바실러스 루테리( <i>Lactobacillus reuteri</i> )
10	락토바실러스 살리바리우스( <i>Lactobacillus salivarius</i> )
11	락토바실러스 부크네리( <i>Lactobacillus buchneri</i> )
12	락토바실러스 제아에( <i>Lactobacillus zae</i> )
13	페디오코커스 셀리콜라( <i>Pediococcus cellicola</i> )

[0047] 상기 동정된 13종의 유산균 중에서 스테비오사이드로부터 루부소사이드를 생산할 수 있는 균주를 공지된 방법으로 선발하였다(2013 J. Agric. Food Chem 60(24) 6210-6216).

[0048] 구체적으로, 상기 각 균주의 배양상등액을 각각 수득하고, 상기 수득한 각 배양상등액에 50 mM 쇼둡아세테이트 완충액(pH 6.0) 및 50 mM 스테비오사이드를 첨가한 다음, 37℃에서 24시간동안 반응시켰다. 반응이 종료된 후, 각 반응물 10 ml을 박막크로마토그래피(TLC) 또는 고성능 액체 크로마토그래피(HPLC)에 적용하여 루부소사이드의 생산량을 측정하였다(도 1).

[0049] 도 1에서 보듯이, 루부소사이드는 엔테로코커스 파에시움(*Enterococcus faecium*), 락토바실러스 김치(*Lactobacillus kimchi*), 락토바실러스 하비넨시스(*Lactobacillus harbinensis*), 락토바실러스 플랜타리움(*Lactobacillus plantarum*) 및 락토바실러스 카세이(*Lactobacillus casei*)의 배양상등액을 이용하여 생산됨을 확인하였고, 특히 락토바실러스 플랜타리움의 배양상등액을 이용할 경우 가장 우수한 수준으로 루부소사이드를 생산할 수 있음을 알 수 있었다.

[0050] **실시예 2: 루부소사이드 생산 조건의 확립**

[0051] 상기 실시예 1에서 가장 우수한 수준으로 루부소사이드를 생산할 수 있는 것으로 확인된 락토바실러스 플랜타럼 균주의 배양상등액을 이용하여, 루부소사이드를 생산하기 위한 최적의 조건을 결정하고자 하였다.

[0052] **실시예 2-1: 최적 pH 조건의 결정**

[0053] 상기 락토바실러스 플랜타럼 균주의 배양상등액과 빅톤-로빈슨 완충용액(32 mM, pH 2-11)을 혼합하고, 12시간 동안 냉장고에서 방치한 후 상기 배양상등액에 존재하는 효소인  $\beta$ -글루코시다제의 잔존 활성을 조사하였다(도 2a).

[0054] 도 2a에서 보듯이, 상기  $\beta$ -글루코시다제는 pH 2.0 내지 7.5에서 안정하고, 최적의 반응 pH는 pH 6.0임을 확인하였다.

[0055] **실시예 2-2: 최적 온도 조건의 결정**

[0056] 상기 락토바실러스 플랜타럼 균주의 배양상등액과 빅톤-로빈슨 완충용액(32 mM, pH 2-11)을 혼합하고, 12시간 동안 냉장고에서 방치한 후 상기 배양상등액에 존재하는 효소인  $\beta$ -글루코시다제의 잔존 활성을 조사하였다(도 2b).

[0057] 도 2b에서 보듯이, 상기  $\beta$ -글루코시다제는 60°C 이하의 온도에서 활성이 유지되었고, 최적의 반응 온도는 30 내지 40°C임을 확인하였다.

[0058] **실시예 2-3: 최적 반응시간 조건의 결정**

[0059] 상기 실시예 2-1 및 2-2에서 결정된 조건에 따라, 상기 락토바실러스 플랜타럼 균주의 배양상등액, 50 mM 소듐 아세테이트 완충용액 (pH 6.0) 및 3g 스테비오사이드를 혼합하고, pH 6.0 및 37°C의 조건에서 50시간 동안 반응 시키고, 반응직후, 10, 15, 20 30 40 및 50시간이 경과한 시점에서 각각의 반응물을 분취하였다. 상기 분취된 각 반응물을 고성능 액체 크로마토그래피(HPLC)에 적용하여 루부소사이드의 생산량을 측정하였다(도 2c 및 2d). 도 2c 및 2d에서 보듯이, 스테비오사이드의 함량은 시간의 경과에 따라 감소하는데 반하여, 루부소사이드는 반응후 10시간이 경과한 시점에서 검출되었고, 30시간까지는 시간의 경과에 따라, 루부소사이드의 생산량이 증가 하였으나, 30시간이 경과된 후에는 시간의 경과에 따라 루부소사이드의 생산량이 감소함을 확인하였다. 이는 락 토바실러스 플랜타럼 균주의 배양상등액에 포함된  $\beta$ -글루코시다가 30시간 까지는 스테비오사이드로부터 글루코 스를 분해하여 루부소사이드를 생성하지만, 스테비오사이드가 소모된 후에는 루부소사이드로부터 글루코스를 분 해하여 스테비올모노글루코사이드를 생성하기 때문인 것으로 분석되었다.

[0060] 따라서, 스테비오사이드의 유입 및 루부소사이드의 유출이 금지된 조건에서 상기 락토바실러스 플랜타럼 균주를 이용하여 루부소사이드를 생산할 경우에는 루부소사이드가 손실되지 않는 10 내지 30시간 동안 반응시킴이 바람 직함을 알 수 있었다.

[0061] **실시예 3: 락토바실러스 플랜타럼 균주의 동정**

[0062] 상기 실시예 1 및 2의 결과에서 보듯이, 본 발명에서 사용한 락토바실러스 플랜타럼 균주는 다른 유산균에 비하 여 루부소사이드의 생산성이 우수하고, pH 2.0 내지 7.5에서 안정하고, 최적의 반응 pH는 pH 6.0이며, 60°C 이 하의 온도에서 활성이 유지되고, 최적의 반응 온도는 30 내지 40°C이며, 스테비오사이드로부터 루부소사이드를

생산하기 위한 10 내지 30시간의 최적반응시간을 나타내는 β-글루코시다제를 분비생산함을 알 수 있었다.

[0063] 이에, 상기 β-글루코시다제를 분비생산하는 균주가 종래의 공지된 균주인지의 여부를 확인하기 위하여, 상기 락토바실러스 플랜타럼 균주로부터 수득한 16s rRNA의 염기서열(서열번호 1)을 결정하고, 이를 이용하여 공지된 균주와의 상동성을 비교하였다. 그 결과, 공지된 락토바실러스 플랜타럼 균주와 높은 상동성을 나타내지만 동일한 균주는 검색되지 않았으므로, 상기 락토바실러스 플랜타럼 균주를 "락토바실러스 플랜타럼 ST100(*Lactobacillus plantarum* ST100)"이라 명명하고, 이를 2013년 10월 11일자로 한국생명공학연구원 생물자원센터에 기탁하여 기탁번호 KCTC 12503BP를 부여받았다.

[0064] **실시예 4: 반응생성물의 분석**

[0065] 상기 실시예 2-3의 방법으로 수득한 최종 반응액을 AW 90수지에 통과시켜서, 잔존 단백질 및 염을 제거하고, 상기 수지를 통과한 반응액을 Diaion HP-20 또는 C18 컬럼을 사용한 컬럼크로마토그래피에 적용하고, 0 내지 80% 에탄올 농도구배 용출액으로 분리정제하여, 최종 반응생성물 2.0g을 제조하였다.

[0066] 상기 최종 반응생성물이 루부소사이드인지의 여부를 확인하기 위하여, 상기 최종 반응생성물 40mg을 D<sub>2</sub>O에 용해시켜 분석시료를 수득하고, 상기 각 분석시료를 LC/MS, 핵자기공명(NMR) 분석(Bruker AM 500)을 통하여 1H NMR, 13C NMR, 호모-코지(HOMO-COSY), HMQC(1H-Detected heteronuclear Multiple-Quantum Coherence), HMBC(Heteronuclear Multiple-Bond Coherence) 및 DEPT(Distortionless Enhancement by Polarization) 분석에 적용하여 각각의 스펙트럼을 수득한 다음, 이를 분석하였다(도 3).

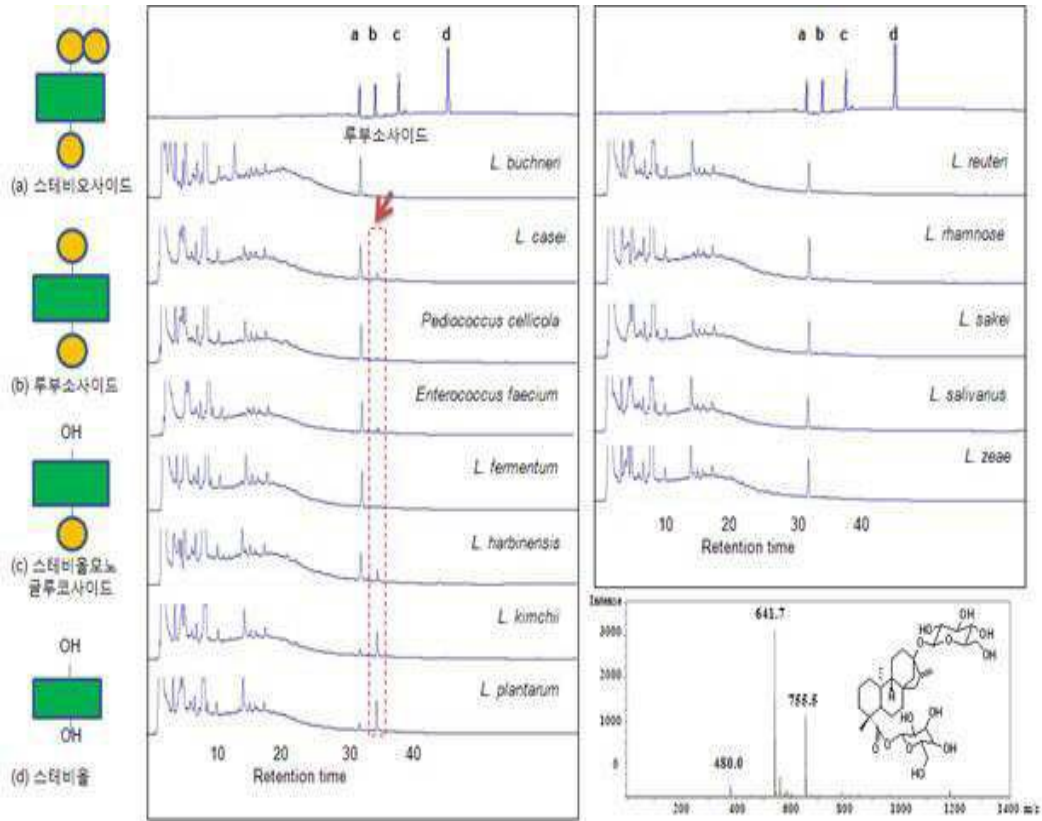
[0067] 도 3에 도시된 각 스펙트럼을 분석한 결과, 상기 최종 반응생성물은 루부소사이드임을 확인하였다.

**수탁번호**

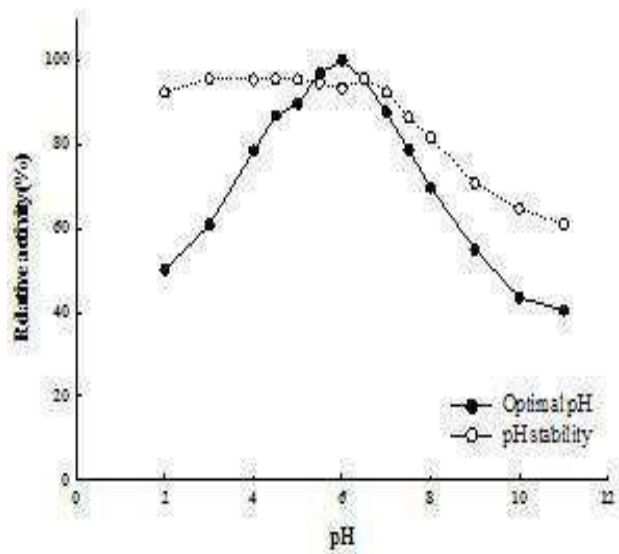
[0068] 기탁기관명 : 생물자원센터  
 수탁번호 : KCTC12503BP  
 수탁일자 : 20131011

도면

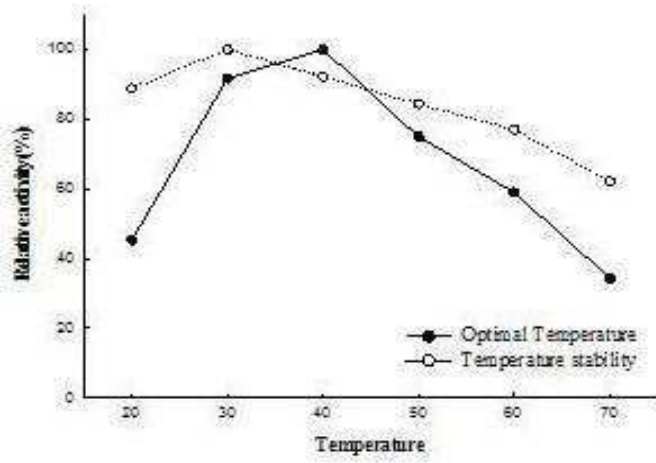
도면1



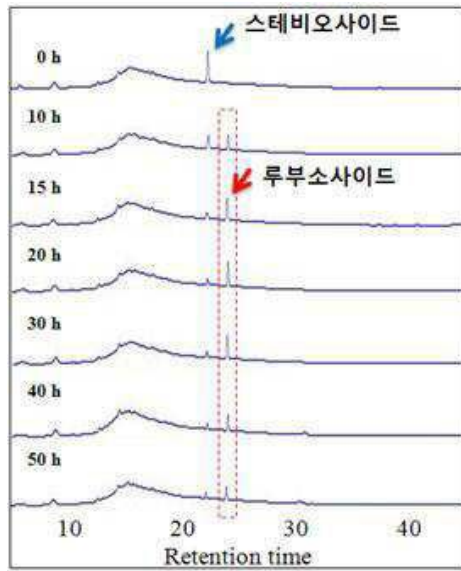
도면2a



도면2b

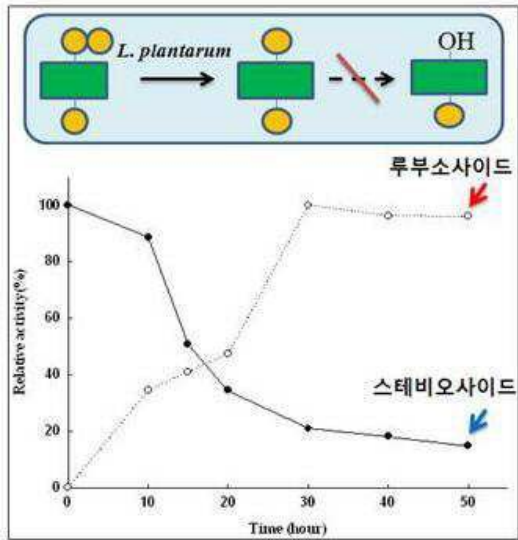


도면2c

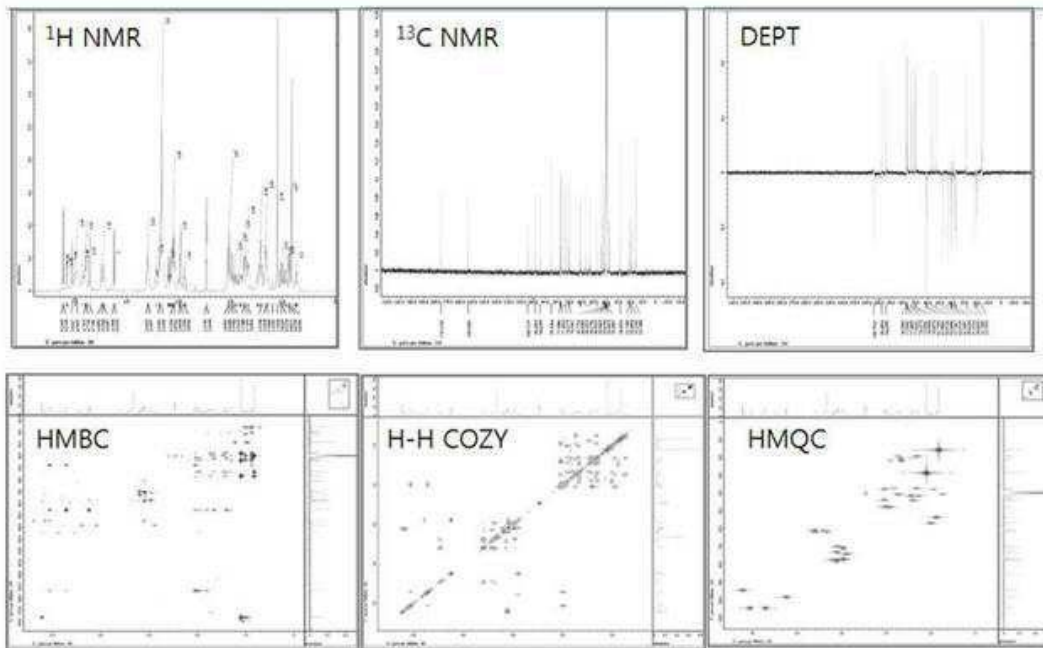




도면2d



도면3



서열 목록

- <110> Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology
- <120> Method for producing rutoside from steviol glycoside using lactic acid bacteria
- <130> PA130451/KR
- <160> 1
- <170> Kopatent In 2.0
- <210> 1
- <211> 1138

<212> DNA

<213> Lactobacillus plantarum ST100

<400> 1

tctgtcactt aggcggctgg ttcctaaaag gttacccac cgactttggg tgttacaac	60
tctcatgggtg tgacgggcgg tgtgtacaag gcccggaac gtattaccg cggcatgctg	120
atccgcgatt actagcgatt ccgacttcat gtaggcgagt tgcagcctac aatccgaact	180
gagaatggct ttaagagatt agcttactct cgcgagttcg caactcgttg taccatccat	240
tgtagcacgt gtgtagccca ggtcataagg ggcatgatga tttgacgtca tccccacctt	300
cctccggttt gtcaccggca gtctcaccag agtgccaac ttaatgctgg caactgataa	360
taagggttgc gctcgttgcg ggacttaacc caacatctca cgacacgagc tgacgacaac	420
catgcaccac ctgtatccat gtccccgaag ggaacgtcta atctcttaga tttgcatagt	480
atgtcaagac ctggtaaggt tcttcgcgta gcttcgaatt aaaccacatg ctccaccgct	540
tgtgcgggcc cccgtaatt cctttgagtt tcagccttgc ggccgtactc cccaggcgga	600
atgcttaatg cgtagctgc agcactgaag gccggaacc ctccaacact tagcattcat	660
cgtttacggt atggactacc agggatatcta atcctgtttg ctaccatac tttcgacct	720
cagcgtcagt tacagaccag acagccgct tcgccaactgg tgtttttcca tatatctacg	780
catttcaccg ctacacatgg agttccactg tcctcttctg cactcaagtt tcccagtttc	840
cgatgcactt cttcggttga gccgaaggct tcacatcag acttaaaaaa ccgcctgcgc	900
tcgctttacg cccaataaat ccggacaacg cttgccacct acgtattacc gcggtgctg	960
gcacgtagtt agccgtggct ttctggttaa ataccgtcaa tacctgaaca gttactctca	1020
gatatgttct tctttaacaa cagagtttta cgagccgaaa cctttttca ctcacgcggc	1080
gtgctccatc agactttcgt ccatiggtgg aagaattccc tactgctgcc tcccgtag	1138