



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2019년12월19일
(11) 등록번호 10-2057792
(24) 등록일자 2019년12월13일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 1/20 (2006.01) C12P 13/10 (2006.01)
C12R 1/10 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 1/20 (2013.01)
C12P 13/10 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2018-0136548
(22) 출원일자 2018년11월08일
심사청구일자 2018년11월08일
(56) 선행기술조사문헌
KR1020100060909 A
JOURNAL OF BACTERIOLOGY, Vol.135,
pp.920-927(1978.09.)*
AgroLife Scientific Journal, Vol.4,
pp.124-131(2015.)*
J. Bacteriol., Vol.96, pp.322-329(1968.)
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
배재대학교 산학협력단
대전광역시 서구 배재로 155-40 (도마동)
(72) 발명자
이기성
대전광역시 서구 둔지로 40, 607호(둔산동, 타임빌)
김원문
전라북도 부안군 동진면 새포로 869-110
이광수
대전광역시 서구 배재로172번길 55, 한일빌라 302호(도마동)
(74) 대리인
특허법인이름리온

전체 청구항 수 : 총 6 항

심사관 : 김지연

(54) 발명의 명칭 바실러스 리체니포르미스 KA6 균주 및 이를 이용한 오르니틴 생산 방법

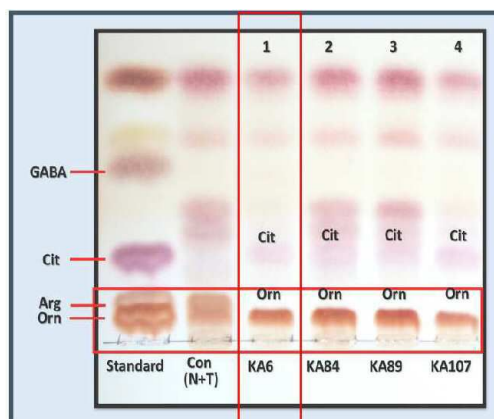
(57) 요약

본 발명은 바실러스 리체니포르미스(*Bacillus licheniformis*) KA6 균주 및 이를 이용하는 오르니틴(ornithine) 생산용 조성물 내지 생산방법에 대한 것이다.

따라서, 본 발명의 바실러스 리체니포르미스(*Bacillus licheniformis*) KA6 균주는 셀룰로오스, 단백질, 지질 내지 인산염을 분해하는 활성을 가지며, 그중에서도 특히 불용성 인산염을 분해할 수 있다. 따라서 기질로서 아르기닌을 사용하여 생전환을 통해 오르니틴을 생산할 수 있으므로, 오르니틴 생산용 조성물 내지 생산방법에 효과적으로 이용될 수 있다.

특히, 본 발명의 균주는 다양한 배지에서 모두 높은 수율의 오르니틴 생전환률을 나타내므로 산업적으로 활용가능성이 매우 높다.

대표도 - 도3



GABA: gamma-aminobutyric acid Cit : 시트룰린(citrulline)
Arg : 아르기닌(arginine) Om : 오르니틴(ornithine)

(52) CPC특허분류
C12R 1/10 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1345242691

부처명 교육부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 지역혁신창의인력양성사업

연구과제명 화학적 유도 박테리아고스트(BG)를 이용한 그람음성균 및 그람양성균 백신 및 면역증강제 개발

기여율 1/1

주관기관 배재대학교 산학협력단

연구기간 2015.07.01 ~ 2018.04.30

명세서

청구범위

청구항 1

수탁번호 KCTC 13656BP 로 기탁된 신규한 바실러스 리체니포르미스(*Bacillus licheniformis*) KA6 균주로서, 상기 균주는 김치로부터 유래되고 서열번호 1의 염기서열로 구성된 것을 특징으로 하는 균주.

청구항 2

삭제

청구항 3

삭제

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 균주는 셀룰로오스, 전분, 단백질, 지질 및 인산염으로 구성된 균에서 선택되는 어느 하나 이상의 유기물을 분해하는 활성을 가지는 것을 특징으로 하는 균주.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 균주는 시트룰린(citrulline) 또는 아르기닌(arginine)을 오르니틴(ornithine)으로 전환하는 활성을 가지는 것을 특징으로 하는 균주.

청구항 6

수탁번호 KCTC 13656BP 로 기탁된 바실러스 리체니포르미스(*Bacillus licheniformis*) KA6 균주 또는 이의 배양물을 포함하는 오르니틴 생산용 조성물로서, 상기 균주는 김치로부터 유래되고 서열번호 1의 염기서열로 구성된 것을 특징으로 하는 오르니틴 생산용 조성물.

청구항 7

i) 수탁번호 KCTC 13656BP 로 기탁된 바실러스 리체니포르미스(*Bacillus licheniformis*) KA6 균주 또는 이의 배양물을 제조하는 단계; 및

ii) 상기 단계 i)의 균주 또는 배양물과 아르기닌을 포함하는 조성물을 반응시키는 단계;

를 포함하는, 오르니틴 생산방법으로서, 상기 단계 i)의 균주는 김치로부터 유래되고 서열번호 1의 염기서열로 구성된 것을 특징으로 하는 오르니틴 생산방법.

청구항 8

제7항에 있어서, 상기 단계 ii)의 반응은 20 내지 40℃의 온도에서 40 내지 80 시간 동안 수행되는 것을 특징으로 하는 오르니틴 생산방법.

발명의 설명

기술분야

[0001] 본 발명은 바실러스 리체니포르미스(*Bacillus licheniformis*) KA6 균주 및 이를 이용하는 오르니틴(ornithine) 생산용 조성물 내지 생산방법에 대한 것이다.

배경기술

[0003] 오르니틴(ornithine)은 아르기닌(arginine), 프롤린, 및 폴리아민의 생합성에 사용되는 전구체로 식물, 동물, 미생물에서 널리 발견되는 비필수 아미노산이다. 오르티닌은 자연계에서 단백질 성분으로서는 발견되지 않으며, 티로시딘(tyrosidine) 또는 그라미시딘(gramicidine)과 같은 항생 펩타이드에 존재하는 것으로 보고되어 있다.

[0004] 오르니틴은 고등 동물의 생체 내 대사에서 오르니틴 회로를 통해 아미노산 또는 암모니아로부터 요소를 생성하여 체외로 배출하는 경로에서 중요한 역할을 한다. 또한, L-오르니틴은 성장호르몬을 분비시켜 근육의 합성을 증가시키고, 기초대사를 촉진시켜 비만을 예방하는 식품소재로서 미국을 중심으로 많이 이용되고 있으며, 최근 주름살 개선과 같은 피부미용 효과 등 새로운 기능성을 갖는 것으로 밝혀졌다. 이 외에도, 간으로부터 유해한 암모니아를 제거하는 효과를 나타내어, 간경화 및 간기능장애 개선용 의약품의 유효성분으로서도 사용되고 있다.

[0005] 뿐만 아니라, 오르니틴은 근육 생성과 체지방 감소에 효과가 있기 때문에, 영양보충제로 사용되고 있고, 오르니틴과 알파케토글루타릴산이 2:1의 비율로 함유되어 있는 오르니틴-알파케도글루타릴산염(OKG)은 면역 증강 물질로 이용되고 있다. 세계적으로 의약품 또는 건강기능식품의 유효성분으로서 오르니틴을 사용하는 예가 알려져 있다. 유럽에서는 L-오르니틴-L-아스파라긴산염의 형태로 간장장애를 개선하는 의약품이 시판되고 있고, 일본에서는 L-오르니틴 염산염의 형태로 식품소재로서 사용가능하며, 미국에서는 식이보조제로서 사용가능하다.

[0006] 이와 같이 오르니틴은 다양한 분야에서 활용 가능하므로, 오르니틴을 산업적으로 대량생산하기 위한 연구가 다양하게 진행되고 있다. 현재 사용되는 산업적인 오르니틴의 대량생산 방법은 우유 단백질인 카제인(casein)을 소화 효소로 분리하여 오르니틴을 수득하는 방법 내지 생합성 경로에서 기질을 오르니틴으로 전환할 수 있는 미생물을 이용하는 방법 등이 있다. 그 중 생합성 경로를 이용하는 방법에서는 오르니틴을 생산하기 위한 기질로서 아르기닌(L-arginine) 아미노산을 주로 사용하며, 상기 미생물로서 코리네박테리움 속(*Corynebacterium*) 균주 또는 형질전환된 대장균(*Escherichia coli*)을 주로 사용한다.

[0007] 상기 코리네박테리움 속 균주는 아미노산, 핵산, 효소 또는 항생제 유사물질의 생산에 널리 이용되는 대표적인 산업용 미생물이다. 특히 argCJBDFRGH 형태로 이루어진 아르기닌 오페론 구조의 유전자로부터 발현된 효소에 의해 글루타메이트(glutamate)로부터 아르기닌을 합성할 수 있으며, 그 과정에서 중간체로서 오르니틴이 생성되는 것으로 알려져 있다(도 1).

[0008] 따라서, 오르니틴 생산능이 향상된 균주를 제조하기 위해, 아르기닌 생산 균주의 아르기닌 오페론을 돌연변이 시키거나, 배지 또는 배양환경을 변화시키려는 시도들이 있다. 대한민국 공개특허 제 10-2010-0060909호에서는, 아르기닌 오페론 유전자의 발현을 조절하는 argR 및 아르기닌 농도에 의해 저해를 받는 argB의 조절을 통해 아르기닌의 생산량을 증가시키기 위한 방법을 개시하고 있다.

[0009] 이 외에도, 코리네박테리움 속 미생물을 프롤린(proline)을 첨가한 배지에서 배양하여 오르니틴 사이클로디아미나아제(ornithine cyclodeaminase, ocd)의 작용에 의해 오르니틴의 생성량을 증가시키는 방법, 상기 미생물의 배양시 임펠라(impeller) 및 공급(feeding) 조건의 변형에 의해 오르니틴 생산성을 향상시키는 방법 등이 알려져 있다. 형질전환된 대장균을 이용하는 경우에는 argF와 argG가 결실된 균주를 배양할 때 글루타메이트를 배지에 첨가하거나, 글루타메이트로부터 프롤린을 생성하는 경로의 첫 단계에 관여하는 감마글루타밀키나아제(γ -glutamylkinase)를 코딩하는 유전자 proB를 결실시켜 오르니틴의 생산성을 향상시키는 방법 등이 알려져 있다.

[0010] 일본 국제특허 PCT/JP2005/024280에서, 코리네박테리움 글루타미쿰(*Corynebacterium glutamicum*)의 비오틴(biotin) 결핍조건이나 페니실린 G(penicillin G) 또는 지방산 에스테르 계면활성제를 처리할 경우, 세포벽이 손상되어 글루타메이트 배출능이 증가됨을 개시하고 있다.

[0012] 그러나, 상술한 방법들은 아르기닌 생합성 유전자 오페론으로 암호화된 효소의 발현 조절을 통해 아르기닌의 생합성 경로를 차단함으로써 오르니틴의 축적을 유도하는 등의 간접적인 방법이거나, 배지 또는 배양 환경의 변화를 이용하는 방법 등 이어서 대량 생산을 요구하는 산업적인 공정에서 생산 단가의 상승 내지 낮은 오르니틴 수득율을 나타낼 수 있다는 단점이 있다. 따라서, 이러한 단점을 극복하기 위해 오르니틴을 고효율적으로 생산할

수 있는 미생물을 발굴하여, 보다 저비용으로 효율적인 오르니틴 생산을 가능하게 하고자 하는 연구가 계속되고 있다.

[0014] 김치는 오랜 역사를 가진 한국의 대표 발효식품으로 2001년 7월 Codex 국제식품규격을 획득하여 세계 각국의 절임류와는 차별화된 자연발효식품이다. 또한 김치에는 비타민 A, 비타민 B, 비타민 C 등이 풍부하며 건강에 좋은 박테리아인 젖산균이 많아 소화를 도와줄 뿐만 아니라 암세포의 성장을 막는 성분들을 가지고 있는 것으로 밝혀졌다.

[0015] 김치에는 락토바실러스(*Lactobacillus*)속, 류코노스톡(*Leuconostoc*)속, 페디오코커스(*Pediococcus*)속, 바이셀라(*Weissella*) 속 등의 주요 균주가 있고 이들 균주가 김치발효에 있어 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 이중 김치속의 풍부한 젖산균들은 락테이트(lactate), 감마아미노부티르산(γ -aminobutyric acidGABA), 박테리오신(bacteriocin) 등 다양한 물질들을 생산하여 식품의 보존, 산미와 향미의 부여, 식중독균의 억제 효과 등 다양한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 특히 류코노스톡 시트레움(*Leuconostoc citreum*), 바이셀라 코리엔시스(*Weissella koreensis*) 등의 균주는 한국 김치의 맛을 결정하는 우점종으로 알려져 있다. 또한 김치 젖산균 생성물질들은 체내 지질개선, 면역증강, 항 A1(avian influenza) 효능 등의 효과가 있어 의약품이나 화장품의 중간물질로도 이용되고 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0017] 이에, 본 발명자들은 아르기닌을 오르니틴으로 생물 전환하는 활성을 나타내는 미생물을 사용하여 오르니틴을 생산할 수 있는 방법을 개발하기 위하여 노력하던 중, 김치로부터 불용성 인산염 가용 활성을 나타내는 바실러스 리체니포르미스(*Bacillus licheniformis*) KA6 균주를 분리하였다. 상기 균주는 최소배지, 합성배지 또는 천연배지의 다양한 배지 환경에서 효과적으로 아르기닌을 오르니틴으로 생물 전환할 수 있으므로, 이를 오르니틴 대량 생산 방법에 유용하게 사용할 수 있음을 확인하고 본 발명을 완성하였다.

[0019] 따라서, 본 발명의 목적은, 수탁번호 KCTC 13656BP 로 기탁된 신규한 바실러스 리체니포르미스(*Bacillus licheniformis*) KA6 균주를 제공하는 것이다.

[0020] 본 발명의 또 다른 목적은, 수탁번호 KCTC 13656BP 로 기탁된 바실러스 리체니포르미스(*Bacillus licheniformis*) KA6 균주 또는 이의 배양물을 포함하는 오르니틴 생산용 조성물을 제공하는 것이다.

[0021] 본 발명의 또 다른 목적은, i) 수탁번호 KCTC 13656BP 로 기탁된 바실러스 리체니포르미스(*Bacillus licheniformis*) KA6 균주 또는 이의 배양물을 제조하는 단계; 및 ii) 상기 단계 i)의 균주 또는 배양물과 아르기닌을 포함하는 조성물을 반응시키는 단계; 를 포함하는, 오르니틴 생산방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0023] 상기 목적을 달성하기 위해, 본 발명은 수탁번호 KCTC 13656BP 로 기탁된 신규한 바실러스 리체니포르미스(*Bacillus licheniformis*) KA6 균주를 제공할 수 있다.

[0024] 본 발명의 바람직한 일실시예에 따르면, 상기 균주는 김치로부터 유래된 것일 수 있다.

[0025] 본 발명의 바람직한 일실시예에 따르면, 상기 균주는 서열번호 1의 염기서열로 구성된 것일 수 있다.

[0026] 본 발명의 바람직한 일실시예에 따르면, 상기 균주는 셀룰로오스, 전분, 단백질, 지질 및 인산염으로 구성된 군에서 선택되는 어느 하나 이상의 유기물을 분해하는 활성을 가지는 것일 수 있다.

[0027] 본 발명의 바람직한 일실시예에 따르면, 상기 균주는 아르기닌(arginine)을 오르니틴(ornithine)으로 전환하는 활성을 가지는 것일 수 있다.

[0028] 또한, 본 발명은 수탁번호 KCTC 13656BP 로 기탁된 바실러스 리체니포르미스(*Bacillus licheniformis*) KA6 균주 또는 이의 배양물을 포함하는 오르니틴 생산용 조성물을 제공할 수 있다.

[0029] 또한, 본 발명은 i) 수탁번호 KCTC 13656BP 로 기탁된 바실러스 리체니포르미스(*Bacillus licheniformis*) KA6 균주 또는 이의 배양물을 제조하는 단계; 및

[0030] ii) 상기 단계 i)의 균주 또는 배양물과 아르기닌을 포함하는 조성물을 반응시키는 단계; 를 포함하는, 오르니

틴 생산방법을 제공할 수 있다.

[0031] 본 발명의 바람직한 일실시예에 따르면, 상기 단계 ii)의 반응은 20 내지 40℃의 온도에서 40 내지 80 시간 동안 수행되는 것일 수 있다.

발명의 효과

[0033] 따라서, 본 발명의 바실러스 리체니포르미스(Bacillus licheniformis) KA6 균주 는 셀룰로오스, 단백질, 지질 내지 인산염을 분해하는 활성을 가지며, 그중에서도 특히 불용성 인산염을 분해할 수 있다. 따라서 기질로서 아르기닌을 사용하여 생전환을 통해 오르니틴을 생산할 수 있으므로, 오르니틴 생산용 조성물 내지 생산방법에 효과적으로 이용될 수 있다.

[0034] 특히, 본 발명의 균주는 다양한 배지에서 모두 높은 수율의 오르니틴 생전환률을 나타내므로 산업적으로 활용가능성이 매우 높다.

도면의 간단한 설명

[0036] 도 1은 미생물에서 글루타메이트로부터 아르기닌으로 생합성되는 과정을 나타내며, 상기 생합성 경로에 중간체로서 오르니틴이 관여함을 확인할 수 있다.

도 2는 바실러스 리체니포르미스(Bacillus licheniformis) KA6 균주의 셀룰로오스, 단백질, 지질 및 인산염 분해능을 나타낸다.

도 3는 바실러스 리체니포르미스 KA6 균주를 TYE+NA 복합배지에서 배양한 경우, 아르기닌으로부터 오르니틴으로 생전환된 결과를 나타낸다. 상기 균주는 특이적으로 아르기닌을 오르니틴으로 100% 생전환하였음을 확인할 수 있었다.

도 4는 바실러스 리체니포르미스 KA6 균주를 천연배지에서 배양한 경우, 아르기닌으로부터 오르니틴으로 생전환된 결과를 나타낸다. 상기 균주는 아르기닌 외에 시트룰린(citrulline; Cit)도 함께 아르기닌으로 생전환하였음을 확인할 수 있었다.

도 5는 바실러스 리체니포르미스 KA6 균주를 최소배지의 복합배지에서 배양한 경우, 아르기닌으로부터 오르니틴으로 생전환된 결과를 나타낸다. 상기 균주는 아르기닌의 약 70%를 오르니틴으로 생전환하였음을 확인할 수 있었다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0037] 이하, 본 발명을 보다 상세히 설명한다.

[0039] 상술한 바와 같이, 오르니틴은 다양한 분야, 특히 의약 및 식품 산업 분야에서 활용될 수 있으므로 오르니틴을 대량 생산하려는 노력이 계속되고 있다. 현재 산업적으로 오르니틴을 생산하는 대표적인 방법은 재조합 미생물의 아르기닌 생합성 경로를 차단하여 오르니틴의 축적을 유도하는 것이나, 이는 생산 단가나 생산 효율 측면에서 불리한 간접적인 방법이다. 따라서, 오르니틴을 대량 생산하면서 높은 수율을 나타내는 직접적인 방법 또는 이에 사용하기 위한 미생물 자원에 대한 연구가 요구되는 실정이다.

[0041] 본 발명에 따른 김치 유래의 바실러스 리체니포르미스 KA6 균주는 불용성 인산염을 분해하여 사용할 수 있는 가용 활성을 나타내며, 상기 균주는 최소배지, 합성배지 또는 천연배지의 다양한 배지 환경에서 효과적으로 아르기닌을 오르니틴으로 생물 전환할 수 있으므로, 본 발명의 바실러스 리체니포르미스 KA6 균주를 오르니틴 대량 생산 방법에서 유용하게 사용할 수 있다.

[0043] 따라서, 본 발명은 수탁번호 KCTC 13656BP 로 기탁된 신규한 바실러스 리체니포르미스(Bacillus licheniformis) KA6 균주를 제공한다.

[0044] 본 발명자들은 아르기닌을 오르니틴으로 전환할 수 있는 균주를 제공하기 위하여 불용성 인산염 분해 활성을 나타내는 미생물을 순수 분리하고자 하였다. 인산염 분해능 및 오르니틴 생전환능을 모두 가지는 균주를 김치로부터 분리하여 16S rRNA 염기서열을 분석한 결과, 상기 균주가 바실러스 리체니포르미스에 속하는 신규한 균주인 것을 확인하고 이를 바실러스 리체니포르미스 KA6 균주로 명명하였다(도 2 및 도 3).

[0045] 본 발명의 상기 균주는 서열번호 1의 염기서열로 구성된 것이 바람직하다.

- [0046] 본 발명의 상기 균주는 셀룰로오스, 전분, 단백질, 지질 및 인산염으로 구성된 군에서 선택되는 어느 하나 이상의 유기물을 분해하는 활성을 가지는 것이 바람직하며, 더욱 바람직하게는 셀룰로오스, 전분, 단백질 및 인산염을 분해하는 활성을 가지는 것이 바람직하다.
- [0047] 본 발명의 상기 균주는 시트룰린(citrulline) 또는 아르기닌(arginine)을 오르니틴(ornithine)으로 전환하는 활성을 가지는 것이 바람직하나, 더욱 바람직하게는 아르기닌을 오르니틴으로 전환하는 활성을 갖는 것이 가장 바람직하다.
- [0049] 본 발명은 또한, 수탁번호 KCTC 13656BP 로 기탁된 바실러스 리체니포르미스(Bacillus licheniformis) KA6 균주 또는 이의 배양물을 포함하는 오르니틴 생산용 조성물을 제공한다.
- [0050] 상기 조성물에 포함되는 균주는 상기 신규한 균주 발명과 동일하므로 설명은 상기 기재로 대신한다.
- [0051] 상기 균주의 배양물은 균주가 시트룰린 또는 아르기닌을 생전환하여 오르니틴을 생산할 수 있도록 배양한 결과를 말하며, 배양은 통상적으로 균주 배양에 사용되는 배지를 사용할 수 있으나 바람직하게는 TYE+NA 복합배지, MEM 천연배지 또는 M 최소배지인 것이 바람직하며, 더욱 바람직하게는 TYE+NA 복합배지 또는 MEM 천연배지인 것이 가장 바람직하고, 가장 바람직하게는 TYE+NA 복합배지인 것이 가장 바람직하다([표 1] 및 [도 3]).
- [0052] 본 발명의 균주 또는 이의 배양물은, 본 발명의 조성물에 10 내지 20 중량부로 포함되는 것이 바람직하나, 이에 한정되지 않는다. 상기 배양물은 본 발명의 균주를 배양한 배양원액 및 상기 균주를 제거한 배양 상등액을 희석하여 포함하는 것이 바람직하며, 구체적으로 0.5 내지 500 배로 희석하여 포함하는 것이 더욱 바람직하다. 상기 배양물의 조성은 통상의 엔테로코커스 속 균주에 필요한 성분뿐만 아니라, 엔테로코커스 속의 생장에 상승적으로 작용하는 것으로 공지된 모든 성분을 추가적으로 포함되는 것이 바람직하다.
- [0054] 본 발명은 또한, i) 수탁번호 KCTC 13656BP 로 기탁된 바실러스 리체니포르미스(Bacillus licheniformis) KA6 균주 또는 이의 배양물을 제조하는 단계; 및
- [0055] ii) 상기 단계 i)의 균주 또는 배양물과 아르기닌을 포함하는 조성물을 반응시키는 단계; 를 포함하는, 오르니틴 생산방법을 제공한다.
- [0056] 본 발명의 상기 단계 ii)의 반응은 20 내지 40℃의 온도에서 40 내지 80 시간 동안 수행되는 것이 바람직하며, 더욱 바람직하게는 25 내지 30℃의 온도에서 70 내지 75 시간 동안 수행되는 것이 바람직하다.
- [0057] 배지 내의 모든 시트룰린 또는 아르기닌이 오르니틴으로 전환된다면 반응을 종결할 수 있다.
- [0059] 본 발명의 김치 유래의 바실러스 리체니포르미스 KA6 균주는 다양한 배지 환경에서 효과적으로 아르기닌을 오르니틴으로 생물 전환할 수 있으므로, 본 발명의 바실러스 리체니포르미스 KA6 균주를 오르니틴 대량 생산 방법에서 유용하게 사용할 수 있다.
- [0060] 특히, 저비용의 최소배지를 사용하여도 오르니틴을 생산할 수 있으므로 배지에 필요한 비용이 감소되어 생산 단가가 저렴해질 수 있다. 또한, 최소배지에서 아르기닌을 오르니틴 및 시트룰린으로 전환함에 있어서 높은 수준의 생물 전환 효과를 나타내고, 이후 목표 생전환 산물인 고가의 기능성 오르니틴 및 시트룰린을 매우 쉽게 분리, 수확 및 정제할 수 있으므로 생산 시간이 단축될 수 있어 산업적 대량 생산에 적용했을 때 효과적이다.
- [0062] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 예시하기 위한 것으로서, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지 않는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

실시예 1

- [0064] 김치로부터 불용성 인산염 분해 활성을 나타내는 미생물의 분리
- [0065] <1-1> 김치 유래 미생물의 순수 분리
- [0066] 오르니틴을 생전환 할 수 있는 균주 제공을 위해 우선 김치로부터 미생물을 순수 분리하였다.
- [0067] 구체적으로, 김치 국물의 시료를 단계 희석하고, 이를 하기 [표 1]에 기재된 조성을 포함하는 트립톤 이스트(TYE) 및 영양 배지(NA)에서 배양하여 1차로 미생물을 분리 선별하였다. 그런 다음, 불용성 인산염인 3-마그네슘 인산(3-magnesium phosphate), 3-칼슘 인산(3-calcium phosphate) 또는 패화석을 각각 포함하는 최소 평판

배지에, 상기 1차로 분리 선별한 미생물을 접종하여 배양하였다. 배양 후, 평판 배지에서 투명환을 나타내는 미생물을 불용성 인산염 가용화 균주로서 수득하고, 이를 순수배양하였다. 순수배양된 균주를, 불용성 인산염인 3-마그네슘 인산(3-magnesium phosphate), 3-칼슘 인산(3-calcium phosphate) 또는 패화석을 각각 포함하는 최소 평판 배지에 다시 접종하고 배양하여, 각 균주의 인산염 가용화 범위를 투명환의 크기로서 확인하였다. 하기 [표 1]에서, TYE, NB, MEM 또는 M 배지를 고체 배지로 사용하는 경우, 각각의 조성에서 20 g/l의 한천(agar)를 첨가하여 사용한다.

표 1

[0068]

배지명	물질명	농도(g/l)
TYE	트립톤(Tryptone)	15.0
	효모 추출물(Yeast extract)	5.0
	염화 나트륨(sodium chloride)	8.0
영양배지 (NB)	펩톤(peptone)	
	효모 추출물	
MEM	맥아 추출물(malt extract)	5.0
천연배지	포도당(glucose)	20.0
M 최소배지 (Minimal Medium)	포도당	15.0
	MgSO ₄	0.25
	KH ₂ PO ₄	0.25
	KCl	0.12
	Ca(NO ₃) ₂	1.0
	FeCl ₃	trace

[0069]

그 결과, [도 2] 및 하기 [표 2]에서 나타난 바와 같이, 불용성 인산염 가용화능을 나타내는 김치 유래 균주를 분리하였으며, 상기 균주는 최소 평판 배지 내 함유된 셀룰로오스, 전분, 지질 및 단백질의 유기물을 분해할 수 있는 생리활성능을 나타냄으로써 유기물들을 성장원으로 이용할 수 있음을 확인하였다. 또한, 3-칼슘인산 또는 3-마그네슘인산의 가용화 능력을 나타내어 뼈성분 유래 식품의 분해 및 소화를 도와줄 뿐 아니라 3-칼슘인산 또는 3-마그네슘인산을 성장원으로 사용할 수 있음을 확인하였다.

표 2

[0070]

	CA	AA	PA	LA	Tri-Mg	Tri-Ca	Lig
분해능	◎	◎	◎	○	○	○	○
투명환 직경(mm)	42	38	16	-	-	-	-
투명환 두께(mm)	12	6	2	-	-	-	-

[0071]

상기 표에서, CA는 셀룰로오스 분해 활성능(cellulolytic enzyme, cellulase)이고, AA는 전분 분해 활성능(Amylolytic enzyme, amylase)이며, PA는 단백질 분해 활성능(proteolytic enzyme, protease)이고, LA는 지질 분해 활성능(lipolytic enzyme, fatty acid esterase)이며, Tri-Mg는 3마그네슘 인산 가용화능(trimagnesiumphosphate)이고, Tri-Ca는 3칼슘 인산 가용화능(tricalciumphosphate)이며, Lig은 리그닌 분해 활성능(Ligninase)을 나타낸다. 상기 '분해'는, ◎: 균주 성장함, 강한 활성; ○: 균주 성장함, 약한 활성; 및 ×: 균주 성장하지 않음, 활성 없음을 나타낸다. 상기 '투명환 두께'는 균주의 콜로니 끝에서부터 활성환의 가장자리까지의 거리를 나타낸다.

[0073]

<1-2> 김치 유래 KA6 균주의 생물학적 특성의 확인

[0074]

김치로부터 인산염 가용능 활성을 나타내는 것으로 분리된 균주의 생리화학적 특성을 확인하였다.

[0075]

구체적으로, 상기 실시예 <1-1>에서 분리한 균주에서 그람 염색, 요소분해효소 생성 확인(urease test), 옥시다아제 생성 확인(oxidase test), 젤라틴 분해효소 생성 확인(gelatinase test), 인돌 생성능 확인(Indole production), 포케스-프로스카우어 검정(Voges-Proskauer test), 질산 환원능 확인(Nitrate reduction test) 및 전분 가수분해능 확인(starch hydrolysis)을 수행하여 KA6 균주의 특성을 확인하였다.

[0076] 그 결과, 하기 [표 3]에 나타난 바와 같이, KA6 균주는 그람 양성 균으로서, 다양한 생물화학적 특징을 나타내는 것을 확인하였다.

표 3

특징	KA6
그람 염색	+
요소분해효소 생성 확인	+
옥시다아제 생성 확인	+
젤라틴 분해효소 생성 확인	+
인돌 생성능 확인	-
포게스-프로스카우어 검정	+
질산 환원능 확인	+
전분 가수분해능 확인	+

실시예 2

[0080] 김치 유래 불용성 인산염 분해 활성을 나타내는 미생물의 동정

[0081] 상기 실시예 <1-1>에서 분리한 균주를 확인하기 위하여 동정하였다.

[0082] 구체적으로, 상기 실시예 <1-1>에서 분리한 균주를 NB 액체 배지 5 ml에 접종하여 37 °C에서 12 내지 16 시간 동안 종균 배양한 후, NB 액체 배지 50 ml에 배양된 균주를 다시 접종하고 12 내지 16 시간 동안 본배양하였다. 배양 종료 후, 배양물을 수득하여 4°C에서 13,000 rpm으로 10 분 동안 원심분리하여 상등액은 버리고 세포를 얻었다. 얻어진 세포에 TE 완충용액 567μl, 10% SDS 30μl, 단백질 가수분해효소 K(20 mg/ml) 3 μl를 첨가한 후 vortexing하여 균질화 하였고, 37°C에서 1 시간 동안 배양하였다. 5M NaCl 100 μl을 첨가 후 균질화 하고 CTAB/NaCl 용액 80 μl를 첨가 후 vortexing하여 65°C에서 10 분 동안 반응시켰다. 혼합액에 클로로포름:이소아밀-알콜(24:1)을 동량 첨가하고 vortexing한 후, 5 분 동안 원심분리하여 상등액을 새 튜브에 옮겼다. 상등액에 동량의 페놀:클로로포름:이소아밀-알콜(25:24:1)을 첨가하고 vortexing한 다음 10 분 간 원심분리하여 상등액을 새 튜브에 옮겼다. 얻어진 상등액에 0.6배 부피의 이소프로판올을 첨가한 후 천천히 inverting하여 유전체 DNA(genomic DNA)가 배출되게 하였다. 백색의 유전체 DNA 가닥이 육안으로 보이면, 유리봉으로 건져내어 70% 에탄올 1 ml을 첨가한 후 4°C, 13,000 rpm으로 10 분 동안 원심분리하여 상등액을 버리고 건조하였다. RNA 가수분해효소가 첨가된 멸균증류수로 현탁한 후 37°C에서 30 분 간 반응하여 RNA를 제거한 후 -20°C에 보관하였다.

[0083] 균주에서 추출한 유전체 DNA를 주형 DNA로 사용하였고, PCR 증폭은 Gene Cycle™ (BIO-RAD Co.)을 사용하여 수행하였다. PCR 반응용액은 하기 [표 4]에 기재된 서열로 제작된 정방향(서열번호 2) 및 역방향(서열번호 3) 프라이머(10 pmol)를 각각 3μl씩 첨가하고, 주형 DNA(10 ng 유전체 DNA) 5μl, 멸균증류수 39 μl를 PCR Mixer(Bioneer, 한국)에 첨가하여 혼합한 후 mineral oil을 첨가하였다. PCR 반응조건은, 94°C 4 분 간 변성(denaturation)을 1 회; 94°C 1 분 동안 변성, 60°C 1 분 간 결합, 72°C 1 분 30초 간 신장(elongation) 과정을 30 회 시행한 후; 72°C에서 10 분 동안 최종 증폭(final extension)하였다. 증폭된 DNA는 0.8% 아가로즈 겔로 전기영동하여 균주 16s rRNA의 증폭된 산물을 확인하였다.

표 4

종류	명칭	정보
플라스미드	pBluescript II	pBluescript II SK(+/-) phagemid, Amp ^r , lacZ gene, MCS
호스트 균주	<i>E. coli</i> DH5 α	F ⁻ Φ80dIacZΔ(lacZYA-argF)U160 endA1 recA1 hsdR17(r _k -m _k ⁺) deoR thi-1 supE44 λ-gyrA96 relA1
프라이머 서열	16s 63F(정방향)	5'-CCCAAGCTTAACTGCAGCAGGCCTAACACATGCAAGTC-3'
	16s 1406R(역방향)	5'-CGGAATTCGGGATCCACGGWGTCAAG-3'

[0087] 대장균(*E. coli*) DH5 α를 TYE 평판배지에 도말한 후 37°C에서 12 내지 16시간 동안 배양하여 단일 콜로니를 얻었다. 단일 콜로니를 5 ml SOB(2% 트립톤, 0.5% 효모 추출물, 0.058% NaCl, 0.019% KCl, pH 7.0)에 1/100 부피

로 접종하고 A₆₀₀ 값이 0.4 ~ 0.6이 될 때까지(약 3 시간) 더 배양하였다. 배양물을 4°C에서 원심분리(4,000 rpm, 10 분)한 후 10% 글리세롤을 첨가하여 3 회 세척하였다. 이렇게 제조된 competent cell을 각각 80 μl씩 분주하여 전기천공법(electroporation)을 위해 -70°C에 보관하여 사용하였다. EcoRI로 절단된 pBluescript II KS 벡터를 self-ligation한 것과 pBluescript II vector 1μl을 각각 제조한 competent cell에 electroporator(BioRad)를 이용하여 전기충격으로 형질전환(transformation)을 수행하여 TYE-Amp 고체배지에서 형질전환율을 확인하였다.

[0088] DNA 클로닝은 상기 KA6 균주 16s rRNA의 증폭된 산물을 BamHI 과 HindIII로 이중 절단하고 pBluescript II KS 벡터도 BamHI 과 HindIII로 절단하였다. 절단한 PCR 산물과 벡터를 혼합하여 T4 리가아제(Elpis 사)로 16°C에서 2 시간 동안 결합반응하였다. 그런 다음, 반응액을 20 내지 30 분 간 투석하여 염을 제거한 후, 큐벳에 E. coli DH5α와 반응액을 섞어 30 분 간 얼음에 방치한 후 전기천공법(electroporation)을 실시하였다. SOC 1ml(SOB 980μl, 2M Mg²⁺ 10μl, 40% 포도당 10μl)에 큐벳의 시료를 옮겨 담은 후 37°C의 진탕배양기에서 1 내지 2 시간 동안 배양하였다. 80 μl의 X-gal(20mg/DMF 1ml)이 도말된 TYE Amp 고체배지에 SOC에 배양된 재조합체를 도말하여 37°C에서 16 시간 동안 배양하여, Blue-White 스크리닝을 통해 선별된 콜로니를 PCR 산물의 벡터 내 삽입 유무를 확인하기 위하여 배양하고 플라스미드를 분리하였다. 분리한 플라스미드는 BamHI 과 SalI, EcoRI 과 SalI 가하여 37 °C에서 2 시간 동안 절단한 다음 0.8% 아가로즈 젤에서 삽입체 DNA를 확인하였다.

[0089] 항생제(암피실린, Amp)가 첨가된 TYE 액체 배지 5 ml에 선별된 균주를 접종하여 37°C에서 12 내지 16 시간 동안 배양한 후, 4°C, 12,000 rpm에서 5 분간 원심분리하여 세포를 얻었다. 얻어진 세포에 100μl의 용액 I (0.9% 포도당, 10mM EDTA, 25mM Tris-HCl pH 8.0, 4mg/ml)을 넣고 혼합하여 균질화한 후, 200μl의 용액 II (0.2N NaOH, 1% SDS)를 넣어 용해하고 얼음에서 5분 동안 반응시켰다. 10 분이 경과하지 않도록 주의하면서 150μl의 용액 III (5M 인산염 아세테이트 60ml, 초산 11.5ml, dH₂O 28.5ml)을 첨가한 후, 10 분 동안 얼음에서 반응시킨 후 4°C에서 10 분 동안 원심분리하여 얻은 상등액을 새 튜브에 옮기고 동량의 페놀: 클로로포름: 이소아밀알콜(25:24:1)을 처리하여 혼탁 시킨 다음 5 분 동안 상온에서 원심분리하였다. 얻어진 상등액을 새 튜브에 옮긴 후 100% 에탄올(-20°C) 1 ml을 첨가하여 염을 제거하고 4°C에서 5 분 동안 원심분리하여 상등액을 버린다. 이어서 70% 에탄올(-20°C) 1 ml을 첨가하여 침전시킨 후 4°C에서 5 분 동안 원심분리하여 상등액을 버리고 건조한 다음 멸균증류수로 녹이고 RNase (10mg/ml)로 RNA를 분해하여 -20°C에 보관하였다. 염기서열분석을 목적으로 하는 플라스미드 DNA 분리 시 플라스미드 정제 키트(Promega 사, 미국)를 사용하여 제조사의 제공하는 프로토콜에 따라 수행하였다. 분리된 플라스미드 DNA의 염기서열을 결정하는 것을 코스모진텍(한국)에 의뢰하였고, 미국 국립생물정보센터(National Center for Biotechnology Information, NCBI)의 블라스트 N 프로그램(blast N program)을 이용하여 배열(alignment)하여 98% 이상의 상동성을 나타내는 균주로 동정하였다.

[0090] 그 결과, 김치로부터 분리된 불용성 인산염 가용 활성을 가지는 균주는 총 1,350 bp 크기의 서열번호 1로 나타나는 염기서열을 가지며, 이는 바실러스 리체니포르미스(*Enterococcus faecium*)에 속하는 신규한 균주임을 확인하였다. 이에, 상기 신규한 균주를 바실러스 리체니포르미스(*Bacillus licheniformis*) KA6 균주로 명명하였다.

실시예 3

[0092] 바실러스 리체니포르미스 KA6 균주의 아르기닌으로부터 오르니틴 생전환 여부 확인

[0093] 바실러스 리체니포르미스 KA6 균주(이하 KA6 균주)가 아르기닌으로부터 오르니틴으로의 전환능을 나타내는지 확인하기 위하여, 박층 크로마토그래피(thin layer chromatography, TLC)를 수행하여 아르기닌으로부터 오르니틴으로의 전환 여부를 확인하고자 하였다.

[0094] 구체적으로, TYE 및 NA 액상 배지에 KA6 균주를 접종하여 2 일동안 전배양한 후, TYE+NA 복합배지, M 최소배지 또는 MEM 천연배지에 0.174% 아르기닌을 첨가하여 준비한 각각의 실험용 조건 배지에, 상기 전배양한 균주 100 μl를 접종하고, 28°C에서 72 시간 동안 본배양하였다. 본배양 종료 후, 배양물 500 μl를 수득하여 5 ml 유리아미노산 추출용 용매(메탄올: 클로로포름: 증류수 = 12: 5: 3)를 첨가하여 vortexing하여 혼합한 다음, 3,000 rpm에서 5 분 동안 원심분리하고 상등액을 취하여 반응 혼합물 내의 아미노산을 추출한 추출물로서 수득하였다. 수득한 추출물은 아미노산 분석용 실리카 젤 TLC 판에 100 μl로 점적(spotting)하였다. 상기 점적한 판은 1-부탄올, 아세트산 및 물을 80:20:20(v/v/v)로 혼합한 전개 용매(develop buffer)을 포함하는 챔버(chamber)에 넣어 전개하였다. 그런 다음, 1% 닐히드린(ninhydrin)을 포함하는 에탄올을 발색 시약으로 하여 상기 전개한 판에 분무(spraying)하고, 110°C에서 5 내지 10 분간 가열하여 발색된 아르기닌 및 오르니틴의 점(spot) 위치를 비교

하여, 생성된 오르니틴의 전환 수준을 확인하였다. 무처리 대조군(아르기닌을 포함하지 않는 복합배지에서 배양한 KA6 균주), 양성 대조군으로 엔트로코커스 페시움(*Enterococcus faecium*) KA84, KA89 또는 KA107 균주를 아르기닌을 포함하는 실험용 조건 배지에서 본 배양하고, 상기와 동일한 방법으로 오르니틴의 생산 수준을 확인하였다.

[0095] 그 결과, [도 3] 내지 [도 5]에서 나타난 바와 같이, KA6 균주는 복합배지, 최소배지 및 천연배지 모두에서 오르니틴을 생산하였다. 구체적으로, TYE+NA 복합배지 및 MEM 천연배지에서 72 시간 배양 후 아르기닌이 오르니틴으로 100% 전환되었고, 더 나아가 오르니틴 뿐만 아니라 시트룰린(citrulline; Cit)도 전환할 수 있음을 확인하였으며([도 3] 및 [도 4]), M 최소배지에서도 아르기닌이 오르니틴으로 약 70% 전환되는 것을 확인하였다(도 5).

[0097] [수탁기관]

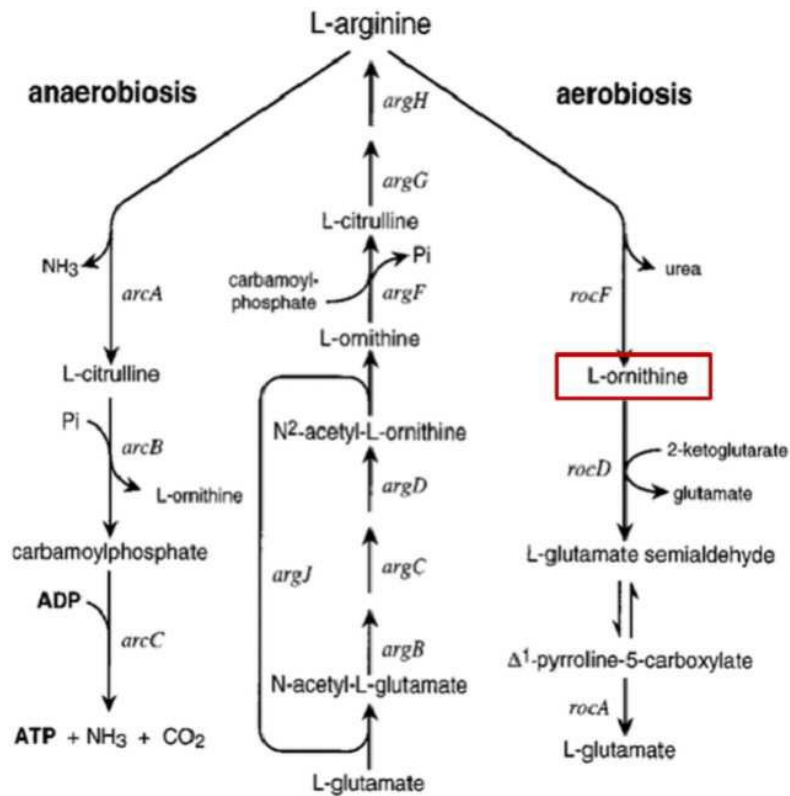
[0098] 기탁기관명 : 한국생명공학연구원

[0099] 수탁번호 : KCTC13656BP

[0100] 수탁일자 : 20181005

도면

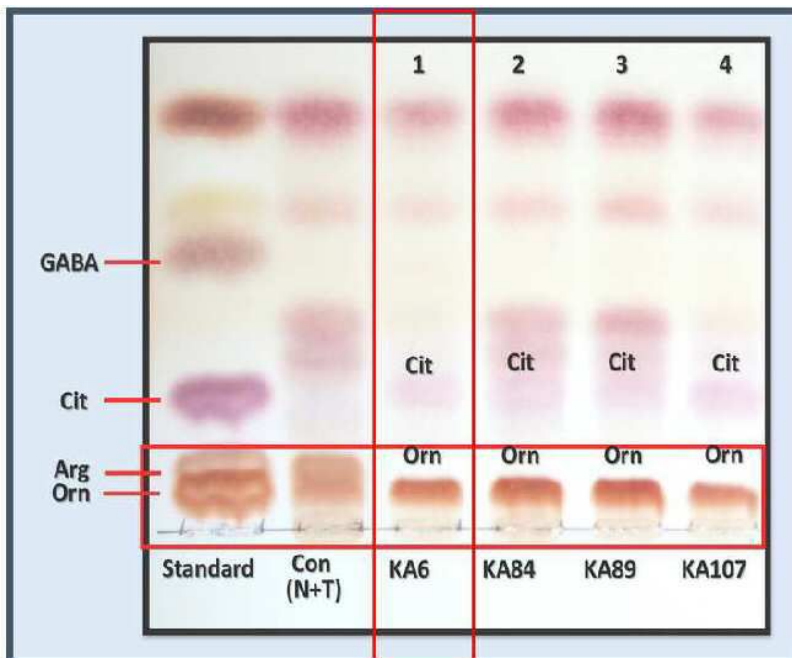
도면1



도면2



도면3

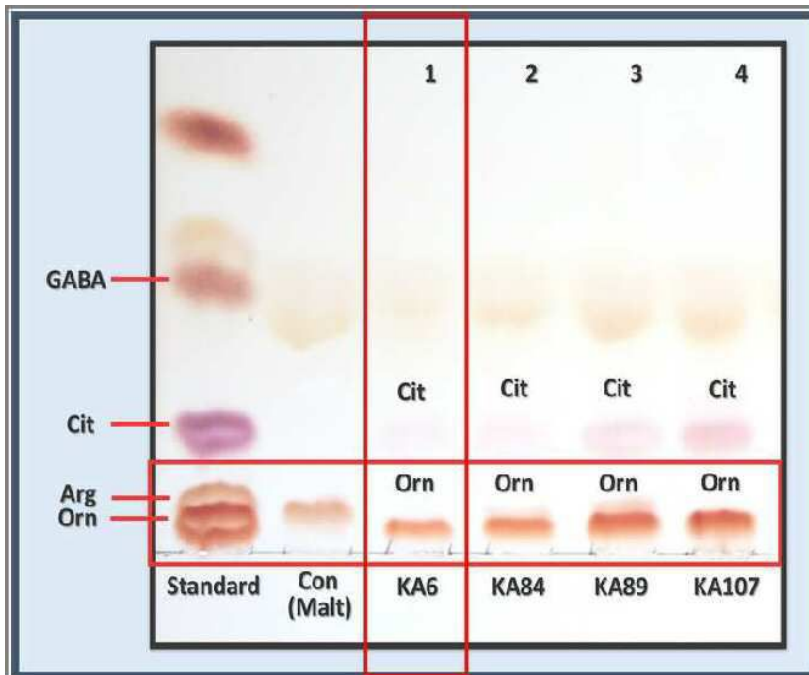


GABA: gamma-aminobutyric acid Cit : 시트룰린(citrulline)

Arg : 아르기닌(arginine)

Om : 오르니틴(ornithine)

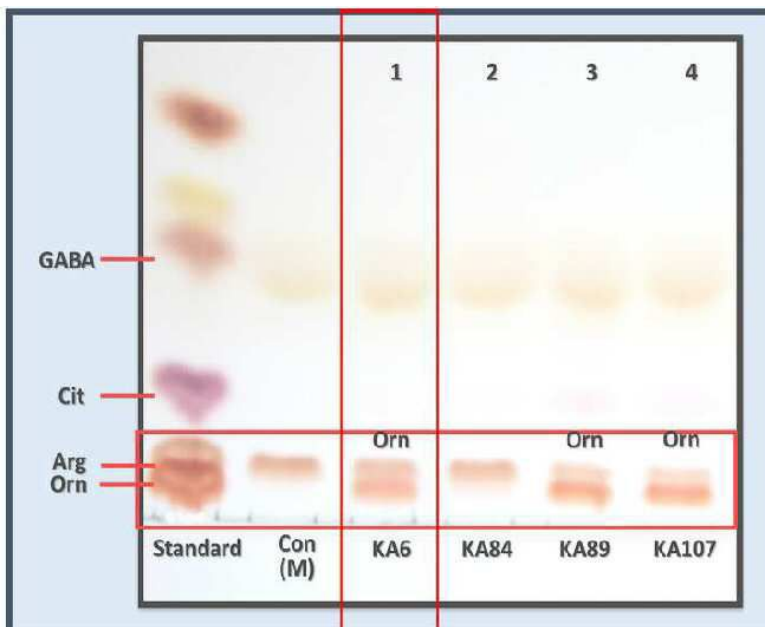
도면4



GABA: gamma-aminobutyric acid Cit : 시트룰린(citrulline)

Arg : 아르기닌(arginine) Orn : 오르니틴(ornithine)

도면5



GABA: gamma-aminobutyric acid Cit : 시트룰린(citrulline)

Arg : 아르기닌(arginine) Orn : 오르니틴(ornithine)

서열 목록

- <110> Pai Chai University Industry-Academic Cooperation Foundation
- <120> Bacillus licheniformis KA6 and method for production of ornithine using the same
- <130> 1064551
- <160> 3
- <170> KopatentIn 2.0
- <210> 1
- <211> 1117
- <212> DNA
- <213> Bacillus licheniformis
- <400> 1

```

ccctcggctg teatccetta gaagcggtta cctgctttca gactgcctcg ttgcggcgca      60
ctcactactt ccaaagcct agcattttga gacaacaatc ctttcttgtt catggcaagc      120
ttatcccgcc atggaactgc catggattgg tctttcggtg cggattgatg cacggtcgtc      180

ggcgccatta tgcatccacc gttcgcaaca ggccttaata acccgcatth cgcgcgcgtc      240
cgccaaagaa ttcagactac actttcgggg gccgagttgg cccctcccag taacctttga      300
ccccttgaac tcacgtcttc tcctctcacc ttaaggtgca catcgccact ttacgeatct      360
ctacacctcc ttgtggtcac cgcttccgct gagagaccag acattgactg cgactccgcg      420
ctttcgcacc cctcgtttgt cctaactctat gggaccatca ggtgcggcat ttgtactca      480
cgattcaciaa tcicccaaag gcgggaaatc acgacgtcgt ttgcgtaatt cgtgaggcgg      540
accctcatg ccagcgttct gactttgagt ttcttaact gccccgggc gtgttcgcca      600

cctcgtacac caaattaage ttcgttgcgc tctttggaat ggtccagaac ttaggagac      660
tgttgggac tctatcccga aggggaagcc cccgtctcac tgtccaccac gtaccaacag      720
cagtcgagca cagcactcta caaccaatt cagggcgttg ctcgcgttgg gaactagaat      780
caacggtcgt aagtcaacce gtgagattcc actgacggcc actgtttggc ctccttccac      840
ccctactgca gtttagtagt acggggaata ctggaccgca tgtgtgcacg atgttaccg      900
tcttgtttcc cgtcgttctg gcgctccgat tcggttaggg tgtttagaca agagtcaagc      960
ctagcgtcag acgttagct gacgcacttc gaccttagcg atcattagcg cctagtcgta      1020

cggcgccact tatgcaaggc cccggaacat gtgtggcggg cagtgtggtg cgctcaaagc      1080
tgaggcttcc aaccaccccg ttggacacca cggtcggg

```

- <210> 2
- <211> 38

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer_F

<400> 2

cccaagctta actgcagcag gcctaacaca tgcaagtc 38

<210> 3

<211> 27

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> primer_R

<400> 3

cggaattcgg gatccacggw gtrcaag 27