

최 중
연구보고서

생명공학 기술로 genistein이 보강된 전통장류식품
제조기술개발
(Development of biotechnology for functional
soy sediment enriched with genistein)

연구기관 : (주)비엔씨바이오팜

농 립 부

제 출 문

농림부 장관귀하

본 보고서를 “생명공학기술로 genistein이 보강된 전통장류식품 제조
기술개발” 연구과제의 최종보고서로 제출합니다.

2003 년 7 월 일

주관연구기관명: (주)비엔씨바이오팜

총괄연구책임자: 서 주 원

세부연구책임자:

연 구 원: 박 을 용

협동 연구기관명: 명지대학교

협동 연구책임자: 이 응 상

협동 연구기관명: 국민대학교

협동 연구책임자: 이 인 형

요 약 문

I. 제목

생명공학기술로 genistein이 보강된 전통장류식품 제조기술 개발

II. 연구개발의 목적 및 필요성

최근 들어 된장, 청국장과 같은 콩기반 전통장류식품의 유용성, 특히 의학적 가치에 관해 많은 관심이 쏟아지고 있다. 콩기반 발효식품의 항암활성 및 이를 많이 섭취하는 동양인에서 골다공증 및 암을 포함하는 몇몇 질병에서 발병률이 현저히 낮다는 사실에 대한 사례연구차원의 보고는 80년대 초반부터 이루어져 왔지만, 90년대 중반 이후 콩에 포함된 일련의 활성 isoflavone계 물질들이 골다공증 및 유방암, 전립선암 등의 저해에 확실한 역할을 한다는 사실이 알려지면서 이에 관한 생명공학적 연구가 활발히 이루어지고 있는 상태이다. 콩에 함유된 isoflavone계 물질은 genistein, daidzein, glycitein 등 몇 가지가 있으나 그 중 genistein은 전체 isoflavone 함량중 55-60%를 차지하는 주축 물질이다. Genistein은 (4,5,7-trihydroxyisoflavone)은 M.W. 270으로서 세 개의 aromatic ring이 연결된 모양으로 여성호르몬인 estrogen과 입체적 구조 및 효소적 활성이 유사하며, 분자생물학적으로는 체내에서 다른 protein kinase에 대한 ATP의 inhibitor로서 경쟁적으로 작용하여 tyrosine protein kinase의 활성을 저해하는 특성이 있다. 콩 발효식품은 극동지역을 중심으로 널리 섭취되어 왔으며, 건강식품에 대한 일반인의 인식이 날로 새로워지고 있는 양상을 볼 때 genistein의 함량이 증가된 새로운 기능성 식품 및 관련 아이템의 상품화가 이루어지면 식생활의 서구화로 점차 전통식품을 멀리해 오던 소비자들에게까지 그 시장이 크게 확대될 것이며, 항암효과 및 골다공증 치료제의 활성을 가진 식품으로서 서구지역에서 새로운 수요를 창출하게 될 것이다.

따라서 본 연구에서는 콩과식물에서 생성되며 골다공증 억제 및 항암효과에 탁월한 isoflavone 화합물의 활성화에 미생물을 이용하여 대량생산된 β -glucosidase를 isoflavone인 genistin에 적용하여 genistein으로 전환할 수 있는 효소원으로 이용하고, 골다공증 치료 및 항암활성을 가진 genistein을 다량 함유한 새로운 콩 유래 발효식품 및 관련 기능성 제제를 개발하고자 하였다.

III. 연구개발 내용 및 범위

구 분	내용 및 범위	
1차년도 (2000)	기본과제	1. 미생물에서 안정적인 β -glucosidase 발현체계를 확립 2. 생산된 β -glucosidase의 효과적인 분비 및 정제기술 개발 3. 배양액에서 정제한 β -glucosidase를 콩 및 콩추출액에 적용하여 genistin을 genistein으로 생물전환하는 기법개발
	협동과제 1	1. <i>Y. lipolytica</i> 내에 β -glucosidase gene 발현체계 구축 2. 인체안정성 및 유전적 안정성을 중심으로 <i>B. subtilis</i> 에 이용 가능한 vector를 설계
	협동과제 2	1. 단백질 분비균인 <i>B. subtilis</i> 에서 β -glucosidase의 대량생산 기술을 확보한다. 2. <i>Bacillus</i> 고유의 분비기구를 이용하기 위해 <i>B. subtilis</i> 유래 signal sequence를 도입하여 안정적인 발현 및 배양외액으로의 분비시스템 구축
2차년도 (2001)	기본과제	1. 효과적으로 genistein을 정제하고 수율을 최적화하는 기법을 개발 2. 효소적 생물전환기술의 적용을 바탕으로 한 새로운 콩 기반 장류 식품 생산공정을 개발
	협동과제 1	1. 형질전환된 <i>Y. lipolytica</i> 에서 β -glucosidase 생산 및 정제 2. <i>Bacillus</i> 고유의 분비기구를 이용하기 위해 <i>B. subtilis</i> 유래 signal sequence를 food grade vector에 도입하여 안정적인 발현 및 배양외액으로의 분비시스템 구축과 과대발현을 위한 발현체계 구축과 개발된 food grade vector의 특허화
	협동과제 2	1. β -glucosidase의 생산 및 분리 정제 2. 자연발효가 아닌 균주 접종을 통한 장류식품의 생산가능성 타진

구분	내용 및 범위	
3차년도 (2002)	기본과제	<ol style="list-style-type: none"> 1. β-glucosidase를 분비하는 장류발효균주 <i>B. subtilis</i>를 이용한 장류 발효공정을 개발 2. Genistein 함량을 증가시킨 기능성 장류식품을 개발하고 이를 상품화 3. Genistein의 첨가와 β-glucosidase가 발현되는 발효균주에 의해 생산된 장류식품의 물성 조사
	협동과제 1	<ol style="list-style-type: none"> 1. <i>B. subtilis</i>(표준균주)내에 β-glucosidase gene을 도입한 food grade vector를 구축하고 이를 발현 2. food grade vector의 특허화
	협동과제 2	<ol style="list-style-type: none"> 1. 장류발효 <i>B. subtilis</i>에 food grade vector를 이용하여 β-glucosidase gene을 도입한 산업균주 개발하고 특허화 2. 개발한 산업균주를 적용하여 장류생산공정을 개선하고 기능성 콩기반 발효식품 생산 공정개발

IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

1. 연구결과

최근 estrogen관련 질환을 예방하고 estrogen제제의 부작용을 대체하기 위한 여러 가지 기능성 물질들 중에서 isoflavone계 물질들이 각광을 받고 있다. 특히 genistein (4,5,7- trihydroxyisoflavone, M.W. 270)은 된장에 포함된 isoflavone중의 하나로서 일반적으로 각종 암의 유발 억제 및 골다공증, 백혈병, 심장질환, 콜레스테롤 수치 조절, 항산화 기능성 등 여러 가지 측면에서 효과가 있다. 본 연구에서는 생명공학 기술로 genistein이 보강된 전통장류식품 제조기술 개발을 목적으로 다음과 같은 연구개발 결과를 얻었다.

- * 미생물에서 β -glucosidase 발현체계 확립과 효과적인 분비 및 정제기술을 확립하였다. 확립된 효소적 생물전환 기술을 장류에 적용하여 genistein 함량이 증가된 식품개발의 기반 기술을 확립하였다.
- * 세포의 분비시스템이 잘알려진 *Y. lipolytica*에서 β -glucosidase 과대발현 체계를 구축하였다. 또한 *Bacillus* 고유의 분비기구를 이용하기 위해 *B. subtilis* 유래 signal sequence를 food grade vector에 도입하여 안정적인 발현 및 배양외액으로의 분비시스템 구축과 과대발현을 위한 발현체계 구축과 개발된 food grade vector 제조기술을 국제특허출원 및 논문으로 발표하였다.
 - 국제특허: 바실러스 메센테리쿠스(*Bacillus mesentericus*) KCTC 0750BP에서 분비된 pMMH1 플라스미드의 PstI-SpeI 절단부위를 함유한 식용백터 (출원번호:PCT/KR03/01170)
 - 논문: Stable Secretion Vector Derived from the RCR(rolling-circle replication) Plasmid of *Bacillus mesentericus*(2002) J.Microbiology 40:140-145
- * 단백질 분비균인 *B. subtilis* 유래의 food grade vector를 이용한 산업균주 개발을 위한 기반기술을 확립하였다.

2. 활용방안

연구계획이 성공리에 마무리될 경우 우선 기술적인 면에서 식용가능균주에서 이용할 수 있는 안정적이고도 인체에 안전한 발현 vector의 개발 및 이를 이용한 β -glucosidase의 발현기법과, genistein의 생물전환에 관한 국내외 특허의 출원과 논문 발표가 기대된다.

또한 본 연구는 국내외 다른 연구그룹과는 다르게 고부가가치를 창출할 수 있는 응용적 연구에 그 초점을 맞추어 경제성과 기질특이성이 있는 식용가능한 생물체 기원의 β -glucosidase를 산업적으로 이용할 수 있도록 대량발현 및 분비 system을 구축하고 이를 통해 고기능성 공기반 발효식품을 개발하고자 하는 것으로서, 이 연구의 결과는 산업적인 파급효과가 크리라 예상된다.

실제적으로는 이러한 연구성과를 식품생산공정에 적용하여 미생물생산 산업효소를 이용한 생물학적 생물전환을 통해 항암 및 골다공증 예방 및 치료성분이 함유된 기능성 공발효제품의 개발과 이의 상품화가 가능한 것이다. 공발효식품은 극동지역을 중심으로 널리 섭취되어 왔으며, 건강식품에 대한 일반인의 인식이 날로 새로워지고 있는 양상을 볼 때 genistein의 함량이 증가된 새로운 기능성 식품 및 관련 아이템의 상품화가 이루어지면 식생활의 서구화로 점차 전통식품을 멀리해오던 소비자들에게까지 그 시장이 크게 확대될 것이며, 항암효과 및 골다공증 치료제의 활성을 가진 식품으로서 서구지역에서 새로운 수요를 창출하게 될 것이다.

공 또는 공 추출물 자체에 대량생산한 β -glucosidase를 적용하여 효소적인 방법으로 genistein을 대량생산한 후 이를 건강식품 및 의약품으로 상품화하는 사업에도 활용할 계획이다.

3. 사업화 계획

향후 본 연구과제의 연구결과를 실용화하기 위해 다음과 같은 방법으로 자금을 조달하고 사업화를 추진할 계획이다.

㉠ 자금조달계획

① 회사의 자체 자본금을 이용한다.

향후 당사는 2억원 정도의 유상증자를 실시할 계획이며 증자자본금 중 절반을 본 사업계획의 성공을 위해 투자 할 계획이다.

② 중간기술을 상품화한 자금을 이용한다.

본 연구 결과 특징을 발전시켜 기술수출 및 중간체 공급방식 등으로 판매하여 연구 사업자금을 마련할 계획이다.

㉢ 생산 및 판매 계획

본 사업의 결실로 나타나는 판매(Marketing)에 있어서 신규로 기존 형성시장에 진입하는 당사는 기존 제품과는 차별되는, 고 기능성 제품의 차별성에 주 관점을 두고 시장 진입 목표를 갖는다. 이를 위해서는 관련 학계로부터 효능을 검증 받아 학계 및 언론 등을 통하여 일반인들에게 홍보하고 식품 전시회 등을 적극 활용하여 효능 및 섭취의 필요성을 부각시키고, 소비자들에게 인지도를 확대시켜 생소감을 제거함과 동시에 신 기능성 식품의 섭취필요성을 인정하게 함으로서 잠재소비력을 증대시키고 소비자들이 신 기능성 식품에 쉽게 접근할 수 있도록 유도한다.

초기에 식품생산 시설투자비가 상당하므로 당사는 본 제품의 원료를 생산하여 (주) 이삭식품 등의 기존 식품생산 기업과 협력하여 외주생산 및 판매를 한다. 아울러 경쟁력이 있는 식품생산 기업과는 본 신기능성 물질이 첨가된 제품을 주문생산방식으로 구축된 판매망을 통하여 판매한다. 나아가 기존제품에 골다공증 및 암 예방기능이 첨가된 다양한 신 기능성 식품을 해외로 수출하고자 한다.

SUMMARY (영문요약문)

Research aim and content

β -glucosidase can catalyze the conversion of genistin (also called isoflavone) to genistein, which is used for osteoporosis treatment and as an anticancer agent. our project is to develop soybean-derived fermented food and functional agents for overproduction of genistein, using microorganism as β -glucosidase enzyme source.

Research results

We have already obtained the technique for acquirement of β -glucosidase expression system and secretion system, as well as the purification technology and bioconversion technology. It is now possible for us to develop functional food from soybean which contains high concentration of genistein. What's more, we have also constructed β -glucosidase overexpression system using *Y.lipolytica* which contains well-documented secretion system. What's more, for the aim of using Bacillus inherent secretion system, signal sequence from *B. subtilis* has been introduced into food grade vector for production and construction of secretion system and overexpression system using food grade vector recombination technology. Additionally, technology for development of industrial strain using food grade vector derived from *B. subtilis* as protein secretion strain has also been obtained.

CONTENTS (영문목차)

1. Introduction
2. The present state of the Technology
3. Results
4. Achievement and Contribution
5. Application Plan
6. Information of overseas science and technology
7. References

목 차

제 1장 연구개발과제의 개요.....	1
1. 개발기술의 필요성.....	1
가. 개발대상기술 (또는제품)의개요.....	1
나. 기술개발의효과.....	2
제 2장 국내외 기술개발 현황.....	5
1. 국내.외 관련기술의 현황.....	5
제 3장 연구개발수행 내용 및 결과.....	7
1. 연구개발수행 내용.....	7
가. 1차년도 연구수행 방법.....	8
나. 1차년도 연구수행 결과.....	10
다. 2차년도 연구수행 방법.....	17
라. 2차년도 연구수행 결과.....	19
마. 3차년도 연구수행 방법.....	28
바. 3차년도 연구수행 결과.....	30
2. 제 1 협동과제.....	40
가. 1차년도.....	41
나. 2차년도.....	42
다. 3차년도.....	43
3. 제 2 협동과제.....	44
가. 1차년도.....	45
나. 2차년도.....	46
다. 3차년도.....	47
4. 제 3 협동과제.....	48
가. 1차년도.....	49
나. 2차년도.....	50
다. 3차년도.....	51
제 5장 연구개발결과의 활용계획.....	52
1. 활용방안 및 사업화 계획.....	52
제 6장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보.....	54
1. 일본대 이소플라본 시장 규모.....	54
2. Natto.....	54
3. 일본과 미국에서 Genistein을 이용한 건강식품 판매.....	55
제 7장 참고문헌.....	58

제 1장 연구개발과제의 개요

1. 개발기술의 필요성

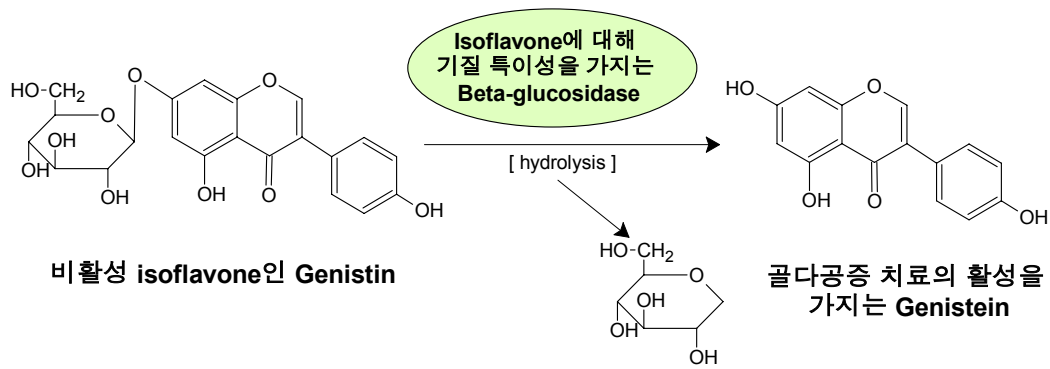
가. 개발대상기술(또는 제품)의 개요

최근 들어 된장, 청국장과 같은 콩기반 전통장류식품의 유용성, 특히 의학적 가치에 관해 많은 관심이 쏟아지고 있다(동아일보 1998, 중앙일보 1995). 콩기반 발효식품의 항암활성 및 이를 많이 섭취하는 동양인의 발병율이 골다공증 및 암을 포함하는 몇몇 질병에서 현저히 낮다는 사실에 대한 사례연구차원의 보고는 80년대 초반부터 이루어져 왔지만(Hirayama T., et al., 1982), 90년대 중반 이후 콩에 포함된 일련의 활성 isoflavone계 물질들이 골다공증 및 유방암, 전립선암 등의 저해에 확실한 역할을 한다는 사실이 알려지면서(Kennedy A. R., 1995, Xu X., et al., 1996) 이에 관한 생명공학적 연구가 활발히 이루어지고 있는 상태이다.

콩에 함유된 isoflavone계 물질은 Genistein, Daidzein, Gycitein 등 몇 가지가 있으나 그 중 genistein은 전체 isoflavone 함량중 55-60%를 차지하는 주축 물질로서(Murphy P. A. 1982) 이의 생리활성에 대하여 중점적으로 관련 연구가 이루어지고 있다. Genistein (4',5,7-Trihydroxyisoflavone)은 M.W. 270으로서 세 개의 aromatic ring이 연결된 모양으로 여성호르몬인 estrogen과 입체적 구조 및 효소적 활성이 유사하며(Kelly. et al. 1998) 분자생물학적으로는 체내에서 다른 protein kinase에 대한 ATP의 inhibitor로서 경쟁적으로 작용하여 tyrosine protein kinase의 활성을 저해하게 된다.

Genistein은 구조 및 활성에서 estrogen과 유사하여 식물성 estrogen이라 불리지만 그 활성은 estrogen의 100,000분의 1에 불과하다. 그러므로 genistein이 체내에 존재할 경우 estrogen과 경쟁적으로 작용하여 estrogen의 활성을 저해하는 효과를 나타내며 이는, estrogen이 과량으로 존재할 경우 나타날 수 있는 질병들 즉 유방암, 전립선암의 발병을 억제하는 결과를 낳는다(Messina et al., 1994). 또한 5, 60대 여성들에게서 많이 나타나는 폐경기 증후군을 억제하고 뼈의 재흡수(resorption)를 유발하는 osteoclast acid의 분비를 억제함으로써 골다공증 및 백혈병의 발병도 억제하는 효과를 가진다(Barnes, et al., 1996).

그러나 이러한 genistein의 생물학적 활성을 식품에 직접적으로 적용하기에는 몇가지 난점이 있다. 우리가 섭취하는 콩을 원료로 한 식품에서 genistein의 대부분(80% 이상)은 glycoside가 결합한 glycon 즉 비활성 isoflavone인 genistin의 형태로 존재하고 있다. genistin은 그자체로는 genistein의 활성을 가지지 않기 때문에 효소적으로 genistin에서 glycoside를 분리하여 활성 isoflavone인 genistein으로 바꾸어주는 작용이 필요하게 되며 이 과정에 작용하는 것이 기질특이성을 가지는 β -glucosidase이다.



생물계에서 β -glucosidase가 가지는 다양한 활성들을 살펴보면 식물의 β -glucosidase는 식물의 생장이나 방어 기작에서 중요한 역할을 하며 (Brzobohaty *et al.*, 1993; Campos *et al.*, 1992), 곰팡이나 대장균에서는 cellulose 또는 cellobiose의 이화작용에 관여하는 것으로 알려져 왔다 (Wood and Bhat, 1988). 그리고 인간의 경우 lysosome에서 glucosylceramide의 분해에 작용하며 해당 유전자의 이상은 유전병인 Gaucher's disease를 유발하는 것으로 알려지고 있다 (Beutler, 1992).

지금도 우리가 콩관련 식품을 섭취하였을 경우 체내에 존재하는 β -glucosidase가 작용하여 genistin을 genistein으로 변환시키고 있으나, 전체적으로는 그 양이 미미하여 다량의 genistin이 이용되지 못하고 있는 상태이다. 이에 대하여 동양권에서 장기간 이용되어 온 콩기반 발효식품들의 기능성 강화가 유용한 대안이 될 수 있으며, 발효미생물에 의하여 된장, 낫또 와 같은 콩발효식품에서 genistein의 함량이 콩보다 증가하고 있다는 연구보고도 있다(Kunst, F. 1997).

이와 같은 현재의 상황에서 콩발효식품의 제조과정에 관여하여 콩에 함유된 80% 이상의 불활성형 genistin을 효과적으로 이용하는 방법에 대한 요구는 절실하며, 만약 독자적인 기술개발을 통해 genistin을 genistein으로 활성화하는 생물전환기법을 확립하고 이를 실제적으로 응용 할 수 있다면 이의 의·약학, 식품공학적인 가치와 실용성은 매우 크다고 할 수 있다.

이러한 필요를 충족시키기 위해서는 콩 및 콩추출물에서 효율적으로 genistein을 대량생산하고 추출하는 기법이나 콩발효식품에 적용할 수 있는 β -glucosidase activity를 가지는 개량된 독자적 균주개발과 이를 바탕으로 연구성과를 전통장류의 생산공정에 도입하는 등의 기술적인 혁신이 필요하며 이는 본 과제의 성공적인 수행에 의해 달성될 수 있을 것이다.

나. 기술개발의 효과

1) 기술적 측면

본과제의 1차적 기대효과는 식물의 isoflavonoids중 골다공증이나 유방암, 전립선암의 예방에 효과적인 genistein 생산에 이용될 수 있는 β -glucosidase로서 주관연구기업에서 이미 인류가 오랫동안 섭취하던 생물체에서 선발한 바 있는 경제성과 기질특이성이 있는 효소유전자를 발현숙주로 장류식품발효에 이용되는 식용가능 균주인 *Bacillus subtilis*를 이용해 대량발현 및 분비를 시키고자하는 것이다.

이러한 방법이 확립되어 성공한다면 이는 장류발효균주로 많이 사용되고 있는 *Bacillus*에서 이종단백질을 안정적으로 대량생산 할수 있는 방법이 확립되는 획기적인 기술의 진보라 할 수 있다. 또 배양여액에서 생산된 이종단백질을 one-step affinity column purification을 확립하여 분리해 낸다면 정제단계에 소모되는 많은 시간과 노력을 줄일 수 있는 아이디어 기술개발이 될 것이다. 또한 콩관련발효식품에 포함되어 그대로 섭취할 수 있는 식용가능 균주에서 분리한 food grade vector를 통한 β -glucosidase의 발현 및 이의 대량생산과 적용이 성공리에 진행된다면 앞으로 유전자 조작으로 생산되는 여러 가지 식품생산에서 국내고유의 유전자원을 통한 발현시스템을 확립하는 것이므로 획기적인 기술로 국제경쟁력을 제고하는 결과를 가져오게 될 것이다.

2) 경제 · 산업적 측면

β -glucosidase를 산업적으로 응용하고자 하는 연구는 이제 산업화를 시도하는 단계에 이르고 있고 식용가능한 균주인 *Bacillus subtilis*에 대한 발효기술은 이미 확립되어 있는 상태이므로 이 세포에서 외래유전자 산물 즉 β -glucosidase를 안정적으로 발현시켜 배양여액으로부터 간단한 one-step으로 분리정제 할 수 있는 기술이 확립되어 이 효소를 대량생산해 낸다면 이는 발효산업의 중요한 균주자원을 개발하는 결과가 되며 이러한 균주를 이용하여 genistein을 대량생산 할 수 있다면 바로 경제적, 산업적인 면에서 큰 효과를 얻을 수 있을 것이다. 즉 대량생산된 β -glucosidase는 genistin을 genistein으로 전환할 수 있는 효소원으로 이용될 수 있으며 생산된 genistein은 골다공증이나 전립선 암의 예방을 위한 건강식품이나 식품첨가소재로 상용화되어 경제적인 효과가 상당할 것으로 예상된다. 골다공증이나 유방암 및 전립선암의 예방을 위해서는 genistein의 꾸준한 섭취가 중요한데 노인인구의 증가와 건강식품수요의 증가로 genistein의 수요는 폭발적일 것이며 콩 발효식품을 거의 섭취하지 않는 서구에서는 그 수요가 더 한층 증대할 것이다.

콩발효식품으로서 제품화 할 경우에 관해 살펴보면 최근 유전자조작을 통한 식품의 개발이 이어지면서 인체에 유해한 혹은 그 여부가 검증되지 않은 유전자의 도입에 대한 불안감이 소비자 층에서 증폭되고 있는 상황을 감안하면, 오랫동안 섭취하던 식품미생물에서 분리한 food grade vector 시스템을 통해 β -glucosidase를 다량 생산해 낼 수 있는 우수한 식용가능 *Bacillus subtilis* 산업균주를 개발하여 된장이나 낫또 발효균주로 사용할 경우 인체에 무해하면서도 genistein함량이 높은 고부가가치의 된장이나 낫또를 제조할 수 있게 되는 것이므로 본과제의 연구성과를 이용한 제품의 판매 및 수출도 용이할 것이다. 또 직접 식용하지 않는 경우 콩을 원료로 하여 식용유나 두유를 만들고 남은 찌꺼기는 현재 거의 대부분 사료용으로 사용되고 있으나 이를 회수하여 본 연구과제를 통해 확립한 대량의 생물전환기술을 이용 그 속에 남아있는 genistin으로부터 genistein을 얻어 낸다면 자원재활용이란 측면에서도 큰 경제적인 성과를 얻을 수 있을 것이다.

3) 사회 · 문화적 측면

한국을 비롯한 일본, 중국 등 동양권에서는 예부터 콩관련식품을 다량 섭취하여 왔으며 여기에는 두부, 콩나물과 같은 단순한 가공을 거친 식품외에 이 지역에서 독특하게 발전시켜온 것으로서 간장, 된장, 청국장, 미소(일본식된장), 낫토(일본식 청국장) 등 콩유래의 발효식품이 커다란주된 식량원으로 하여 콩식품문화가 그다지 발달하지 않은 서구인들에 비해 이러한 식문화를 가진 동양인들의 골다공증, 전립선암, 유방암, 대장암, 백혈병 및 관련 성인병의 발병률은 현저히 낮은 것으로 보고되어 왔으며, 최근 들어서 서구의 관련 연구자들은 서구인들을 위해 콩 관련 식품 및 이의 추출물이 가지는 기능성 건강식품으로서의 가치를 새로이 재조명하 비중을 차지하고 있다.

육류유래의 단백질을 고 있는 상태이다. 반면 동양에서는 전반적인 식생활의 서구화로 오히려 콩 관련 식품의 섭취가 점진적으로 감소하고 있는 것으로 보인다.

이러한 상황에서 콩 관련 제품의 항암활성 및 관련성인병에 대한 저해효과를 크게 증진시킨 새로운 기능성 식품이 개발된다면, 장류식품을 멀리해왔던 동양권의 신세대는 물론이고 새로이 관심을 갖고 있는 서구인들 양쪽에서 커다란 수요를 창출할 수 있으며, 2002년 월드컵 게임을 전후하여 한국을 방문하는 일본 및 서구인들에게 국내고유기술로 개발한 참신한 전통 상품과 기술을 선보일 수 있을 것이다.

제 2장 국내외 기술개발 현황

1. 국내외 관련기술의 현황

많은 종류의 생물체에서 isoenzyme으로 존재하는 이 β -glucosidase는 지금까지는 cellulose를 분해하기 위한 효소원으로 관심을 가져, 생산 균주의 분리나 효소의 대량생산을 위한 여러 가지 배양조건의 개발에 대한 연구와, 매우 다양한 종류로 존재하는 효소이기 때문에 효소학적인 성질을 규명하는 연구가 주류를 이루었다.

국내외 다른 연구그룹에서 β -glucosidase 및 그 유전자에 대한 연구동향을 살펴보면 첫째로 미생물에서 생산되는 β -glucosidase가 있다. 미생물성 β -glucosidase는 생태계의 분해자인 미생물의 생육환경의 특성상 주로 cellulose를 가수분해하는 활성을 가지며 *Trichoderma reesei*, *Fusarium oxysporum*, 등의 곰팡이와 *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*, 등의 효모와 토양 방선균인 *Streptomyces reticuli*, 또 *Bacillus subtilis*, *Bacillus polymyxa*, *Bacillus circulans*, *Agrobacterium tumefaciens*, hyperthermophilic archaee bacteria인 *Pyrococcus furiosus* 등에서 효소와 그 유전자가 보고되어 있다. 또 사람이나 초식동물의 위에 기생하는 장내 세균에서도 이 효소가 생산되는 것으로 보고되어 있다. Cellulose는 자연계에 가장 풍부하며 재사용할 수 있는 유기물로서 이를 분해하여 당으로의 전환이나 이로부터 얻은 당으로 알코올발효를 시도하기 위한 연구로 미생물의 β -glucosidase에 대한 연구가 꾸준히 진행되어 왔다. 실제로 *Trichoderma reesei*의 endoglucanase와 cellobiohydrolase는 cellulose를 분해하는 가장 좋은 효소원이나 β -glucosidase의 생산은 현저히 낮아 cellobiose의 glucose로의 전환단계가 rate-limiting한 step이 된다. 따라서 β -glucosidase를 다른균에서 대량생산하여 외부에서 첨가해 cellulose를 분해하려는 연구도 시행되고 있다.

Genistein에 관한 연구는 1966년이래 지속되어 왔으며, 초기에는 다른 isoflavone 물질들과 함께 콩의 영양성분중 한가지로서 큰 관심을 끌지 못하였으나, 90년대 들어 의학적인 활성이 새로이 조명되고 있다. 골다공증을 예방하고 치유한다는 보고(US patent 5506211 Yamaguchi and Gao, 1998), 포유류(rats)에서 유방암을 억제한다는 보고(Coral A. et al. 1996), 사람의 전립선암을 억제한다는 보고(1997), receptor로서 에스트로겐과 경쟁저해를 일으킨다는 보고(1996), tyrosine kinase의 저해제로서 작용한다는 보고(1995), isoflavone 물질이 원숭이에서 동맥경화를 개선시킨다는 연구결과 등이 알려져 있다.

기존에 이루어진 이와 같은 연구들은 대부분 생물학, 의·약학적 활성의 규명과 이에 관여하는 효소 및 유전자의 기능을 분석한 것으로 heterogenous한 효소로서의 β -glucosidase 및 동식물체 내의 isoflavone에 관하여 각각 독립적으로 이루어져 왔으며 그러한 한계로 산업화에 대하여 확실한 성과를 내놓지 못하였던 것이 사실이다.

실제 산업화와 관련된 사례들을 보면 콩기반 발효식품에 관한 것은 아직 없으며, 발효식품이외의 영역에서는 두유와 콩나물 등의 생산과정에서 genistein의 함량을 강화한 제품의 개발에 관한 연구가 진행된 바 있으나 아직 상품화에 이른 것이 없다.

외국의 경우 콩에 대한 새로운 인식과 함께 발효식품과는 무관하지만 콩 및 콩추출물을 가공하면서 genistein의 함량을 증대시킨 건강식품(ex: Netrtion co.의 "Genisoy" 등)이 출시 현재 판매되고 있으나, 농축공정을 통해 isoplavone계 물질의 함유율만을 강화한 상품으로서 β -glucosidase에 의한 효소적 생물전환기술의 적용결과는 아니다.

본 과제에서 핵심적인 아이디어로 삼고 있는 연구주제는 바로 이것으로서, 양쪽의 연구를 결합 β -glucosidase의 glycoside에 대한 hydrolysis 활성을 genistin을 genistein으로 바꾸는 생물전환기법에 적용하여 실제적으로 산업화가 가능한 기술 및 제품의 개발에 집중하고자 하는 것이다.

이상과 같이 β -glucosidase에 의한 효소적 생물전환기술을 적용한 고기능성 콩기반 발효식품을 개발하고자 하는 연구를 진행하고 있는 곳은 사실상 본 연구진이 유일하며 과제가 성공리에 수행될 경우 기술적인 면에서 강력한 국제경쟁력을 갖게 될 것으로 예측된다.

동양3국을 중심으로 한 지역에서 된장, 간장, 청국장, 낫토 등을 대표로 하는 콩관련 발효식품의 제조는 가공식품으로서는 가장 오랜 역사를 가지고 있는 분야 중 하나이다. 그러나 상당기간동안 콩발효식품의 제조는 가내수공업적인 차원에서 머물러왔고, 금세기에 들어서서 일본을 시작으로 하여 공장수준의 대량생산이 이루어지기 시작하였다. 그러나, 제조공정상의 기계화와 scale-up에 대한 기술적인 난관이 그다지 크지 않음에도 불구하고, 가정에서도 손쉽게 생산할 수 있는 정도로 장류식품 자체의 부가가치가 높지 않은 탓에 유망산업으로 발전하지 못하고 답보상태에 머물러왔던 것이 사실이다. 이의 개선을 위해 제조공정의 합리화, 균주의 표준화, 품질의 균일화 등을 기조로 여러 가지의 개량이 이루어져 왔으나, 실질적으로 양적인 개선에 불과했으며, 최종제품의 부가가치를 크게 제고할 수 있는 기능적으로 혁신적인 제품의 개발에 대한 필요는 여전하다.

본 과제에서 개발하고자 하는 골다공증치료 및 항암 활성을 가진 genistein을 다량 함유한 새로운 콩유래 발효식품 및 관련 기능성 제제들은 그러한 요구를 충족시키는 고 부가가치 상품으로서 낙후되어 있는 장류식품산업의 구조를 선진화하고 수익성을 개선하는데 커다란 역할을 할 것이다. 이러한 산업적인 개선이 성공리에 이루어질 경우, 그 성과를 유사하면서도 훨씬 대규모의 식품산업체계를 가지고 있는 일본에 제품 및 기술수출의 형태로 손쉽게 적용할 수 있을 것이며, 최근 들어 새로이 콩 관련 건강식품산업에 관심을 갖고 있는 구미지역에서도 상당한 규모의 시장성을 기대할 수 있을 것이라는 점에서 지금과 같은 시기에 콩관련 발효식품산업의 혁신에 대한 경제적 산업적인 필요성은 매우 크다고 할 수 있다.

제 3장 연구개발수행 내용 및 결과

1. 연구개발수행 내용

구 분	착 안 사 항	
1차년도 (2000)	기본과제	1. 미생물에서 안정적인 β -glucosidase 발현체계를 확립 2. 생산된 β -glucosidase의 효과적인 분비 및 정제기술 개발 3. 배양액에서 정제된 β -glucosidase를 콩 및 콩추출액에 적용하여 genistin을 genistein으로 생물전환하는 기법개발
	협동과제 1	1. <i>Y. lipolytica</i> 내에 β -glucosidase gene 발현체계 구축 2. 인체안정성 및 유전적 안정성을 중심으로 <i>B. subtilis</i> 에 이용 가능한 vector를 설계
	협동과제 2	1. 단백질 분비균인 <i>B. subtilis</i> 에서 β -glucosidase의 대량생산 기술을 확보한다. 2. <i>Bacillus</i> 고유의 분비기구를 이용하기 위해 <i>B. subtilis</i> 유래 signal sequence를 도입하여 안정적인 발현 및 배양외액으로의 분비시스템 구축
2차년도 (2001)	기본과제	1. 효과적으로 genistein을 정제하고 수율을 최적화하는 기법을 개발 2. 효소적 생물전환기술의 적용을 바탕으로 한 새로운 콩 기반 장류식품 생산공정을 개발
	협동과제 1	1. 형질전환된 <i>Y. lipolytica</i> 에서 β -glucosidase 생산 및 정제 2. <i>Bacillus</i> 고유의 분비기구를 이용하기 위해 <i>B. subtilis</i> 유래 signal sequence를 food grade vector에 도입하여 안정적인 발현 및 배양외액으로의 분비시스템 구축과 과대발현을 위한 발현체계 구축과 개발된 food grade vector의 특허화
	협동과제 2	1. β -glucosidase의 생산 및 분리 정제 2. 자연발효가 아닌 균주 접종을 통한 장류식품의 생산가능성 타진

구 분	착 안 사 항	
	기본과제	1. β -glucosidase를 분비하는 장류발효균주 <i>B. subtilis</i> 를 이용한 장류 발효공정을 개발 2. Genistein 함량을 증가시킨 기능성 장류식품을 개발하고 이를 상품화 3. Genistein의 첨가와 β -glucosidase가 발현되는 발효균주에 의해 생산된 장류식품의 물성 조사
3차년도 (2002)	협동과제 1	1. <i>B.subtilis</i> (표준균주)내에 β -glucosidase gene을 도입한 food grade vector를 구축하고 이를 발현 2. food grade vector의 특허화
	협동과제 2	1. 장류발효 <i>B.subtilis</i> 에 food grade vector를 이용하여 β -glucosidase gene을 도입한 산업균주 개발하고 특허화 2. 개발한 산업균주를 적용하여 장류생산공정을 개선하고 기능성 콩기반 발효식품 생산 공정개발

가. 1차년도 연구수행 방법

▷ 대장균에서 생산된 β -glucosidase의 activity 측정 및 정제

Activity 측정은 효소액 (상등액) 1 ml에 기질 1 mM PNPG (p-NP- β -D-glucopyranoside) 1ml를첨가하고, 37 °C에서 30분간 반응 시켰다. 1 M sodium carbonate 2 ml로 반응을 정지시키고, 흡광도 405 nm에서 생성된 p-nitrophenol의 양을 구하였다. 1 unit는 37 °C에서 분당 PNPG로부터 1 μ mol p-nitrophenol을 생성하는 효소량에 10³을 가해준 것으로 정의하였다. 정제는 배양균을 배양한 후 원심분리하여 세포를 회수하고, 이 균체를 2 mM EDTA가 함유된 50 mM Tris-HCl pH 8.0 buffer 1/10 volum에 현탁하여 세척 후 다시 원심분리하여 회수하였다. 100 μ g/ml 농도로 lysozyme 과 1% Triton X-100을 처리하여 30°C에서 15분간 반응시킨 후 sonication 하여 원심분리한 후 soluble protein을 회수하였다. Small scale로 배양하여 발현된 단백질을 확인 회수하고자 할 때는 이 대장균용 발현 vector에 histidine이 C-말단에 존재하기 때문에 이것을 tag으로 이용하여 분리하였다. 즉 ion exchange나 gel filtration column을 통과시켜 회수하고자 하며 이때 대량발효 조건이나 분리회수 조건을 반복적인 실험을 통하여 확립하였다.

▷ 배양액에서 정제한 β -glucosidase를 콩 및 콩 추출액에 적용하여 genistin을 genistein으로

생물전환율 측정

골다공증 및 항암효과 성분의 함량을 측정하고 배합원료 및 전통장류의 기능성을 규격화하기 위해서는 genistein의 함량 또는 전환율의 정확한 측정이 필요하다. 이를 위해 먼저 1~2mg 콩 추출액에 정제된 β -glucosidase 500 μ g를 처리하여 32 °C에서 overnight 반응시켰다. HPLC를 사용하여 genistein의 분석조건을 확립하였다. 컬럼은 Waters사의 symmetry c-18, 3.9x150mm를 사용하여 260 nm의 파장에서 분석하였으며, 전개용매는 유속을 1 ml/min로 하여 30%의 아세토니트릴과 0.1 %의 초산을 사용하였다. HPLC의 Area[mAU*min]의 수치를 이용하여 genistin에서 genistein으로 전환율을 계산하였고, 공식은 아래와 같다.

$$(\text{출발}+\text{반응}) \text{ 물질 수치: } 100\% = \text{반응물질 수치: } x\%$$

▷ *Yarrowia lipolytica*내에 β -glucosidase gene 발현체계 구축

- *XPR2* 발현 System에 β -glucosidase gene 구축

pET-24a vector에 있는 β -glucosidase 의 subunit인 As-Glu1를 효소로 digest하여 pBluescript KSII의 *XhoI-EcoRI* site로 Cloning하였다. pIMR100에 있는 *XPR2* terminator (250bp)를 PCR (denaturation 98 °C 1min, annealing temp. 65 °C 1min, extension 72 °C 30sec, 30 cycle)로 증폭한 다음 pBluescript KSII에 Cloning 되어있는 As-Glu1 뒤에 *XhoI-KpnI* 제한 site로 붙여 As-Glu1/*XPR2* terminator를 pBluescript KSII에 구축하였다.

SOE(splicing by overlap extention) PCR를 통해서 최종적으로 expression cassette를 구축하였는데 pIMR100에 있는 *XPR2*의 promoter/Signal sequence부분과 pBluescript KSII에 있는 As-Glu1/*XPR2* terminator 부분을 각각 1차 PCR (denaturation 98 °C 1min, annealing temp.

67 °C 1min, extension 72 °C 1min 30sec 30cycle)를 통해서 얻었다. *XPR2* promoter/signal sequence의 1차 PCR product size를 줄이기 위해서 promotor 중간에 있는 *ClaI* site부터 PCR를 수행해서 PCR product 얻었고 As-Glu1/*XPR2* terminator 부분으로부터는 PCR product 얻었다. 각각 얻은 1차 PCR products는 각 말단에 30bp 정도가 complementary 한 특징을 가지고 있기 때문에 이것을 DNA template로 이용하여 2차 PCR (denaturation 98 °C 1min, annealing temp. 67 °C 1min, extension 72 °C 4min, 40 cycle) 실시해서 *ClaI-EcoRI* site를 갖는 SOE product를 얻었다. 완전한 *XPR2* promoter를 얻기 위해 이 PCR product를 pIMR100에 있는 *XPR2* gene과 *ClaI-EcoRI* site로 digest하여 최종적으로 pIMR100안에 *XPR2* promoter/SP/ β -glucosidase/*XPR2* terminator으로 구성된 완전한 expression cassette (양쪽에 *HindIII-EcoRI* site가짐)를 구축하였다.

- 구축된 expression cassette를 pIMR53 vector에 cloning

ARS18를 가지고 있어 *Yarrowia lipolytica*내에서 독립적으로 존재할 수 있는 pIMR53으로 pIMR100안에 있는 expression cassette를 삽입하여 β -glucosidase gene 발현 Vector를 구축하였다. pIMR53의 ARS18안에 *HindIII* Site가 존재하였기 때문에 한번에 *HindIII-EcoRI* site로 구축된 발현 insert gene를 넣지 못하여 2단계를 거쳐 ligation를 하여 완전한 β -glucosidase gene 발현 vector를 구축할 수 있었다.

▷ *B. subtilis*에 이용 가능한 food grade vector 구축

Food grade vector를 만들기 위해 pWB980에서 *EcoRI*과 *BamHI* 사이에 삽입되어 있는 p43 promoter와 levansucrase signal peptide(*sacB*)를 PCR를 이용하여 얻었다. 그러기 위해 p43 앞에 있는 *EcoRI*을 *BamHI*으로 바꾸고 *SacB*뒤에 있는 *BamHI* 부분을 *EcoRI*으로 바꿔서 *BamHI-EcoRI*으로 바꾸었다. 5'-primer : AAG GGA TCC GAG CTC AGC ATT ATT GAG, 3'-primer : CCC GAA TTC CTT GGC AAA AGC TTG AGT. Insert gene인 β -glucosidase(*glu-1*)은 pET-Glu1에서 *EcoRI*과 *XhoI*으로 절단하여 pbluescriptKS(+)*EcoRI-XhoI*에 삽입하였다. 그런 후 PCR product *BamHI-EcoRI* cassette를 *glu1* 앞에 삽입하였다. 그 결과 pKS-*glu1*-cassette가 만들어졌다. 이것을 food grade vector을 위해 만들어진 pPS에 삽입하기 위해 *Apal-SadI*로 절단하여 pPS에 같은 site에 삽입하여 pJSN secretion vector를 만들었다. pPS vector은 pMMH1을 *PstI*과 *SpeI*으로 절단하고 *E. coli* vector인 pGEM5zf(+)와 붙이고 selselection marker로 cat (chloramphenicol acetyl transferase)를 *SaI*에 삽입하여 만들어진 *E. coli-Bacillus* shuttle vector이다. 클로닝하기 위해 primer를 이용하여 PCR반응을 수행하였다. PCR 반응액의 조성은 template로 쓰인 pWB980 DNA 50 ng, Ex Tag Polymerase (5 U/ μ l) 1 μ l, 2.5 mM dNTP 4 μ l, H₂O 37 μ l Primer는 각각 1 μ l, 10 \times Ex Tag buffer(15mM MgCl₂) 5 μ l를 섞어 최종 volume 50 μ l가 되게 하였다. 반응조건은 95 $^{\circ}$ C 2분간 pre-denaturation, 95 $^{\circ}$ C 1분간 denaturation, 45 $^{\circ}$ C 90초간 annealing, 72 $^{\circ}$ C 1분간 extension, 35 cycle 반응시킨 후 0.8% agarose gel에서 전기영동 하여 증폭된 DNA를 확인하였다. 이 PCR 단편은 양 말단에 T를 포함하고 있는 pGEM-T easy vector에 cloning 하였다.

▷ *Bacillus subtilis* 발현 vector 구축

앞에서 언급한 많은 장점을 가진 genistein을 미생물을 이용하여 대량으로 생산하고자 하며, 이를 위한 숙주 (*Bacillus subtilis*)도 확보하고 있다. 현재 귀리에서 분리된 우수한 β -glucosidase gene (*Glu1*)를 이용하여 콩 속의 80% 이상인 genistin을 genistein으로 전환시키고자 *Bacillus subtilis* 발현 vector를 구축하였으며 이를 위하여 *Bacillus subtilis*에서 유래한 p43 promoter와 levansucrase의 signal peptide인 *sacB*를 in-frame으로 β -glucosidase gene에 도입했다. pMK- α -25 secretion vector를 만들기 위해 pET-Glu1에 삽입되어 있는 *glu1* gene를 *BamHI-XhoI*으로 절단하여 pMK4의 *BamHI-SaI* site에 삽입하고 p8A1에서 α -amylase의 promoter와 signal sequence를 *EcoRI-BamHI*로 절단하여 *glu1* mature gene앞에 fusion하였다. *glu1*과 fuse하기 위해 *glu1*의 *BamHI*과 mature gene 사이에 있는 *EcoRI* site에 C를 삽입하여 mature gene과 fusion 할 때 정확하게 fusion되게 하도록 PCR primer를 작성하였다 (Forward primer : 5'-G GAT CCG AAT CTC GCG CTT GAA AGT-3', Reverse primer : 5'-CTG CAG CTC GAC TCA TCA CGC GGT-3').

나. 1차년도 연구수행 결과

1) 기본과제: 생명공학기술로 생산된 효소와 식용균주를 이용한 전통장류 식품제조기술 개발

(1) 미생물에서 안정적인 β -glucosidase 발현체계 확립

오랫동안 인류가 섭취하여온 곡물로부터 genistin을 genistein으로 전환시키는 높은 기질특이성을 가지는 β -glucosidase 유전자(As-Glu1)를 제2협동연구책임자인 경북대 김인수 교수로부터 확보하였고, 제한효소 *EcoRI*과 *XhoI*를 이용하여 β -glucosidase 유전자가 삽입된 발현벡터를 제작하였다. 도입된 유전자의 고 발현과 정제의 용이함을 위하여 β -glucosidase 유전자 앞에 새로운 promoter (HCE II)와 his-tag부분을 삽입하여 새로운 vector를 제작하였다 (그림 1). 제작된 vector는 대장균 host 균주를 달리하여 형질 전환 하였고, 각 형질전환체에 대한 β -glucosidase 효소활성을 비교하여 표 1에 나타내었다. 효소활성 측정은 PNPG를 사용하였으며 반응은 37℃에서 30분간 실시하였으며 파장 405 nm에서 흡광도를 측정하여 생성된 p-nitrophenol의 양을 구하여 효소활성을 비교하였다. 본 연구에서 제작된 발현벡터 pOB-glu는 *E. coli* BL21 균주와 DH5 α F'균주를 이용하여 형질전환 시켜 β -glucosidase 효소활성을 비교해본 결과 *E. coli* BL21(pOB-glu)과 DH5 α F'(pOB-glu)은 대조균인 *E. coli* BL21 균주 보다는 40배, 200배, 특허균인 *E. coli* BL21 (pET24a-glu) 보다는 6.7배, 33.3배 각각 높게 나타났다. 본 결과로서 대장균에서 안정적인 β -glucosidase의 발현체계가 확립되었으며, host 균주에 따라서도 β -glucosidase의 발현에 많은 차이가 있다는 결과를 얻을 수 있었다.



그림 1. 대장균에서의 고 발현용 vector

표 1. 형질전환 균주와 호스트균의 β -glucosidase 활성 비교

균주 및 벡터	특 성	온도(°C)	효소활성	비 고
<i>E. coli</i> BL21	host	37	0	
<i>E. coli</i> BL21(pET24a-glu)	IPTG, Kan	37 \Rightarrow 30	6	특허균
<i>E. coli</i> BL21(pOB-glu)	No IPTG, Ap	28	40	6.7배
<i>E. coli</i> DH5aF'(pOB-glu)	No IPTG, Ap	28	200	33.3배

(2) 생성된 β -glucosidase의 효과적인 분비 및 정제 기술 개발

형질전환된 균주에서 발현된 β -glucosidase의 효율적인 정제방법을 위해 형질 도입된 his-binding domain을 이용한 친화적 크로마토그램을 제조사(Novagen, 독일)의 지침 서에 따라 실시하여 순도가 높은 효소액을 1차 정제하였다. 계속되는 연구를 통해 최적의 정제과정 및 안정성을 확립하였다.

(3) 배양액에서 정제한 β -glucosidase을 콩 및 콩 추출액에 적용하여 genistin을 genistein으로 생물전환 하는 기법개발

Genistin을 genistein으로의 전환율 및 생산량을 확인하기 위해 중요한 기초가 되는 genistin과 genistein을 정량적으로 분석하는 것이 선행되어야 한다. 따라서 HPLC를 사용하여 genistein의 분석조건을 확립하였다. 컬럼은 Waters사의 symmetry c-18, 3.9x150mm를 사용하여 260 nm의 파장에서 분석하였으며, 전개용매는 유속을 1 ml/min로 하여 30%의 아세토니트릴과 0.1%의 초산을 사용한 결과 A 그림과 같이 90% isoflavone에 β -glucosidase 처리하기 전 Ret. time 1.400인 daidzin과 1.767인 genistin pick만 보이고 있다, B 그림은 β -glucosidase 처리한 후 결과로서 A 그림에서 볼 수 없었던 4.250인 daidzein과 9.433인 genistein pick가 나타난 것을 볼 수 있으며, 상대적으로 daidzin과 genistin pick보다 높게 나타난 것을 확인 할 수 있었다 (그림 2). 이 결과를 토대로 전환비율을 계산한 결과 94%의 전환비율을 보이고 있다는 것을 확인할 수 있었다. 이로써 oat의 β -glucosidase는 비활성 isoflavone인 genistin의 당을 hydrolysis하여 활성 isoflavone인 genistein으로 바꾸어주는 작용으로서 기질 특이성이 있다는 것을 증명할 수 있었다.

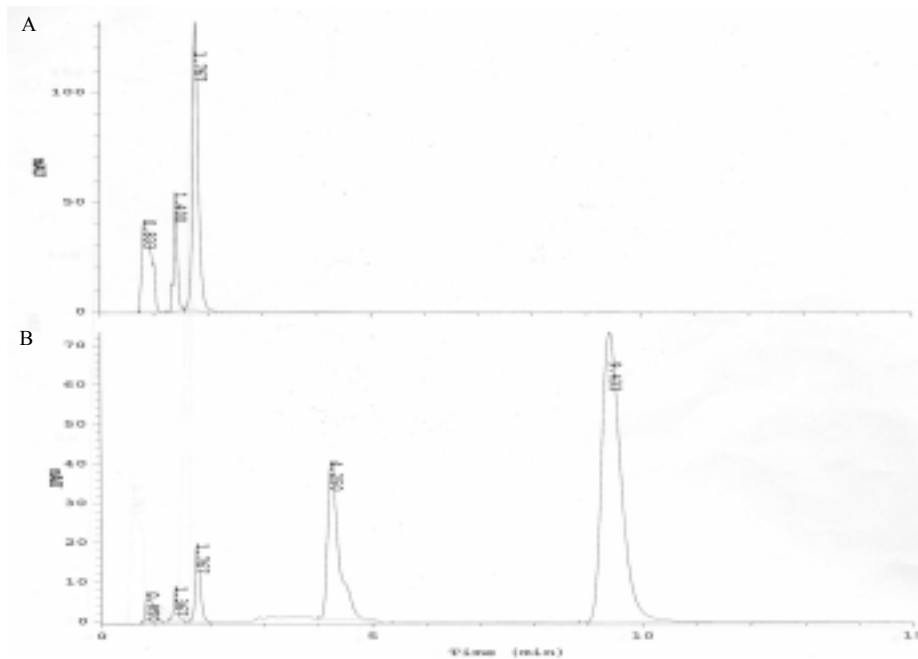


그림 2. 베타-글루코시데이즈를 이용한 genistin으로부터 변환된 genistein HPLC 분석. (A) 효소처리 전, (B) 효소처리 후; RT=genistin (1.75), RT=daidzein(4.15), RT=genistein (9.22), RT=daidzin (1.40).

2) 협동과제 1 : 효모 *Yarrowia lipolytica*에서 β -glucosidase 분비 생산 및
장류 발효 *Bacillus subtilis*용 새로운 food grade vector
개발

(1) *Yarrowia lipolytica*내에 β -glucosidase gene 발현체계 구축

① 균주 및 유전자 확보

β -glucosidase 유전자, As-Glu1과 As-Glu2를 제2협동연구책임자인 경북대 김인수 교수로부터 확보하였고 발현 system으로 쓰일 *XPR2* gene, 발현 vector인 pIMR53 그리고 숙주 균주인 *Yarrowia lipolytica* SMY2은 캘리포니아 주립대 Davis 식품공학과로부터 확보하였다.

② β -glucosidase gene 발현 vector설계

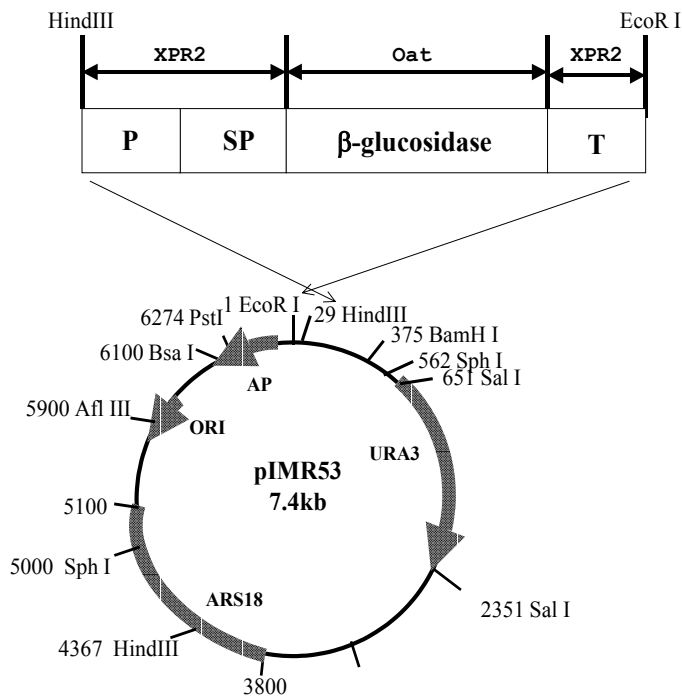


그림 3. β -glucosidase의 발현 system

Yeast *Yarrowia lipolytica*는 식품산업에 이용되는 효모로서 균체의 독성이 없으며 세포 외로 많은 단백질을 분비하는 능력을 가지고 있다. 또한 *XPR2* gene은 Yeast *Yarrowia lipolytica*에서 Alkaline Extracellular Protease를 coding하는 유전자로서 세포밖으로의 분비량이 많고 이 System를 이용하여 외래 단백질의 발현 및 분비가 효과적이라는 것이 이미 다른 실험을 통해 밝혀졌으며, 많은 연구가 진행되고 있다. 이 *XPR2* gene의 Promoter/ Signal peptide(SP)와 terminator 사이에 β -glucosidase gene를 삽입시켜 발현 System을 구축하여 β -glucosidase의 대량 생산에 이용하고자 한다 (그림 3).

(2) 인체안정성 및 유전적 안정성을 중심으로 *B. subtilis*에 이용 가능한 vector를 설계

① Wild type plasmid pMMH1을 이용한 vector construction

β -glucosidase를 발현시킬 발현 vector로서 *Bacillus*에서 유래한 것을 사용했으며, wild type plasmid pMMH1은 *B. subtilis*의 아종이며 당화균으로 알려져 있는 *B. mssentericus*에서 분리했다. Homologous search 결과 5개의 ORFs를 포함하고 있으며 이중 secretion protein coding region(SPC)과 DNA binding protein region(DBP)만 아직 기능이 밝혀져 있지 않다. 안정하고 작은 발현 vector를 만들기 위해 각각의 ORFs를 disruption 또는 deletion하여 *Bacillus subtilis*-*E. coli* shuttle vector구축하였다(그림 4). 이중에서 pMMH1의 Rep origin과 single strand origin(SSO), double strand origin(DSO)을 포함하는 pPS(6.8kb)를 발현 vector로 선택하였다.

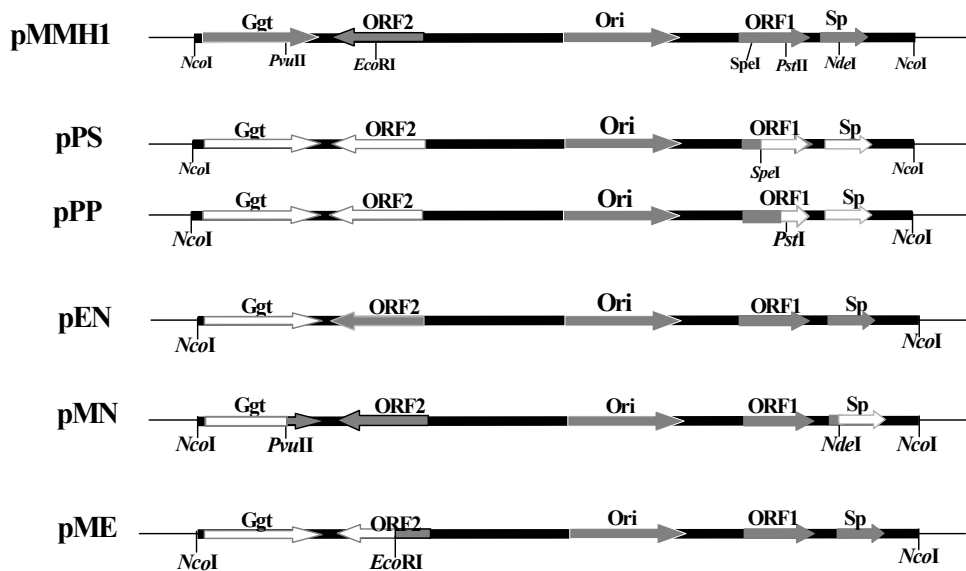


그림 4. pMMH1을 이용한 vector construction

② β -glucosidase 발현을 위한 vector 구축

β -glucosidase 발현을 위한 vector로 선택된 pPS(6.8kb)는 *Bacillus subtilis*에서 유래한 p43 promoter levansucrase의 signal peptide인 *sacB*를 β -glucosidase gene와 in-frame을 연결하여 vector를 구축하였다 (그림 5). segregational stability결과 100세대 이상 안정성을 나타내었다.

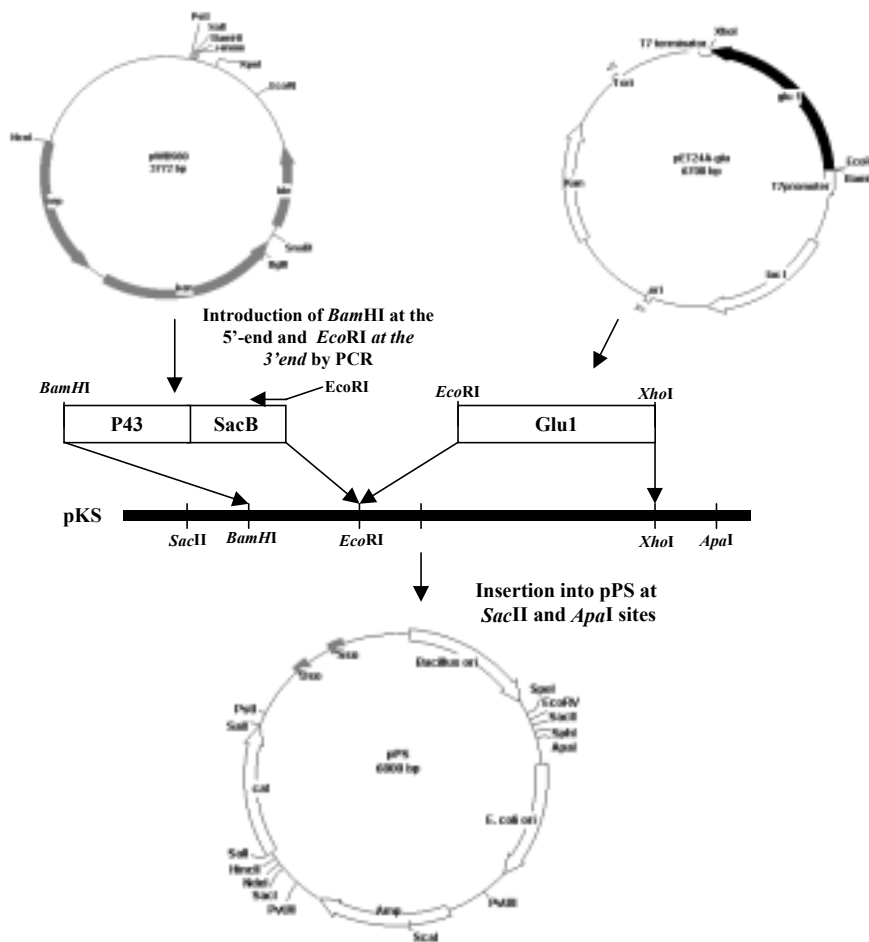


그림 5 . β -glucosidase의 발현 및 분비 food grade vector

2) 협동과제 2 : *B. subtilis*에서 β -glucosidase 발현체계 구축 및
장류발효용 산업균주 개발

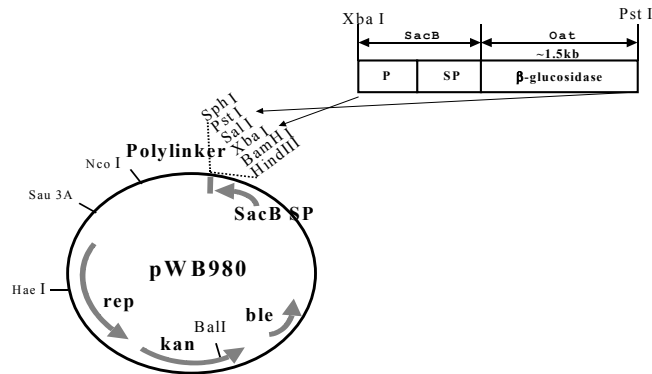
(1) 균주 및 유전자 확보

① 균주 및 유전자 확보

B. subtilis 발현 system으로 plasmid pWB980 (p43 Promoter/SP(*SacB*) 포함)와
숙주 균주 *B. subtilis* WB700는 캐나다 캘거리대학교 Sui-Lam Wong으로부터
확보하였다.

(2) β -glucosidase gene 발현 및 분비 vectors 설계

A



B

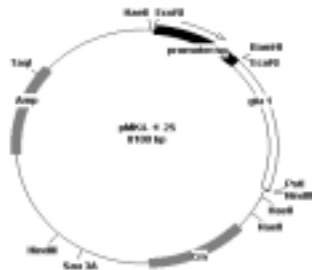


그림 6 . β -glucosidase의 발현 및 분비 vectors.

(A) constitutively expression vector. (B)incucible expression vector

*B. subtilis*에서 효율적으로 외부단백질을 발현하고 분비하는 것으로 알려진 *B. subtilis* levansucrase (*SacB*)의 promotor와 signal sequence를 이용하여 β -glucosidase를 발현하고자 다음과 같이 vector를 설계하였다. 먼저 p43 promoter와 levansucrase (*SacB*)의 signal sequence뒤에 β -glucosidase gene를 inframe으로 조합하도록 설계하였다. Shuttle vector인 pMK4의 경우 inducible promoter, signal peptide, terminator는 *B. subtilis*의 α -amylase를 이용하여 설계하였다 (그림 6). p43 promoter가 도입된 constitutively expression vector는 *B. subtilis*에서 유도물질이 없이 외부단백질을 항상 발현시키는 vector이며, α -amylase의 promoter가 도입된 pMK4 shuttle vector는 *Bacillus* 보다 비교적 안정적인 대장균에서 vector construction을 확인할 수 있고, 유도물질 없이 외부단백질이 발현되지 않아 toxic한 외부단백질 발현에 의한 cell damage를 줄일 수 있는 장점이 있다.

다. 2차년도 연구수행 방법

▷ 효과적으로 genistein을 정제하고 수율을 최적화하는 기법을 개발

- 된장으로부터 isoflavone추출

된장 500g을 -70°C 에서 동결시킨 후 더 이상 발효가 진행되지 않게 하기 위해 동결 건조를 시켰다. 동결건조된 된장을 50ml tube에 2g을 취하여 2ml의 0.1N HCl과 10ml의 acetonitrile을 섞은 후 상온에서 3시간 extraction하였고 5000rpm, 3분 centrifuge한 후 상층액을 취하여 0.2 μm pore size의 nylon membrane 을 사용하여 filter하고 얻은 sample을 evaporation시켜 용매를 제거시켰다. 순수한 된장 추출물을 80% HPLC용 Methanol에 녹인 후 0.2 μm filter에서 걸러 sample을 준비하였다.

- HPLC를 이용한 genistein의 정제

HPLC를 사용하여 genistein의 정제조건을 검토하였다. 컬럼은 Waters사의 symmetry c-18, 3.9 x 150mm를 사용하여 260 nm의 파장에서 분석하였으며, 전개용매는 유속을 1 ml/min로 하여 30%의 아세토니트릴과 0.1%의 초산을 사용하였다. 또한 genistin과 genestein을 주입하여 각각의 Retention time을 정했다. 그리고 genistin과 genesteindml 정량분석을 위하여 25, 5, 10, 30, 50 μg 을 주입하여 peak의 면적으로 검량선을 작성하였다.

- β -glucosidase첨가 후 된장에 함유된 genistin의 genistein으로의 변환

효소처리 최적조건은 pH5.0, 37°C 이며 실제로 pH4.7, 37°C 에서 β -glucosidase 1unit 이 1분당 1.7×10^{-6} mol의 glucose의 β -glucoside 결합을 끊기 때문에 10 unit의 β -glucosidase를 된장 2g에 처리하여 3시간 incubation한 후 HPLC peak변화를 관찰하여 효소활성을 보았다.

▷ 형질전환된 *Y.lipolytica*에서 β -glucosidase 생산 및 정제

- β -glucosidase gene 발현체계 구축 후 Yeast 형질전환

Escherichia coli DH5 α F'를 숙주균으로 이용하여 Yeast expression vector pIMR53의 *Hind*III / *Eco*RI site에 expression cassette(XPR2 gene의 promoter / signal peptide(SP)와 terminator사이에 β -glucosidase gene을 삽입)를 subcloning하여 발현체계를 구축하였으며, 여기서 얻은 plasmid DNA를 이용하여 Yeast *Yarrowia lipolytica* SMY2에 lithium acetate method로 형질전환을 수행하였다. transformant를 선별하기 위하여 selection medium인 YLT without uracil plate(0.67% Yeast Nitrogen Base without amino acids, 2% glucose, Uracil dropout mixture, pH 5.5)를 사용하였으며 그 결과 transformant (pIMR53Glu1이라고 명명)를 확보하였다.

- β -glucosidase의 activity assay

YLT without uracil plate에서 single colony의 transformant(pIMR53Glu1)를 5ml Medium A(0.5% glucose, 2.5% proteose peptone, 0.05% yeast extract, 0.1M phosphate buffer, PH 6.8) 배지에 접종하여 28°C에서 24 hours동안 배양하였다. 5ml Medium A에서 배양한 transformant를 6개의 50ml Medium A에 각각 약 4.6×10^6 cell 정도로 seed culture한 다음 23°C, 250rpm에서 다시 배양하였다. 그 후 sample은 seed culture후 24, 30, 36, 42, 48, 52 hours에 각각 taking하였다. 50ml의 배양액은 10000rpm, 4°C, 5min동안 centrifuge한 다음 상층액만을 따서 새 tube로 옮겼다. *Yarrowia lipolytica* SMY2는 세포외로 단백질을 분비하는 능력을 가지고 있기 때문에 분리한 상층액을 이용하여 β -glucosidase의 activity assay 측정하였다. β -glucosidase의 activity assay는 citrate buffer(0.2M Na_2HPO_4 , 0.1M citric acid)에 10mM substrate(p-NP- β -D-glucopyranoside)를 포함한 reaction mixture의 1800 μ l에 상층액 200 μ l를 넣고 37°C에서 15min 반응시켰다. 그 다음 stop solution인 0.5M Tris buffer를 동량 넣은 다음, enzyme reaction을 중지시킨 후 O.D 405nm에서 측정하였다.

▷ *B. subtilis* 고유의 분비기구를 이용하기 위해 *B. subtilis* 유래 signal sequence를 food grade vector에 도입하여 안정적인 발현 및 배양외액으로의 분비시스템 구축과 과대발현을 위한 발현체계 구축

- Secretion vector 구축

*B. subtilis*에서 사용할 분비 벡터 시스템을 만들기 위한 전략으로 *B. mesentericus*에서 분리된 pMMH1을 이용하여 여러 *B. subtilis*-*E. coli* shuttle vector를 만들어 segregational stability를 측정해서 pMMH1중에서 가장 작으면서도 안정한 2.3kb 부분만 포함하는 pPS를 선택하였다. β -glucosidase gene (*Glu1*)를 포함하고 있는 pET24a-Glu1에서 *Glu1*을 *Bam*HI / *Xho*I으로 처리하여 분리하고 *B. subtilis*에서 유래한 α -amylase promoter와 signal sequence를 포함하고 있는 p8A1의 *Bam*HI / *Pst*I에 ligation했다. p8A1과의 fusion할 때 miss match부분을 없애기 위해 PCR를 이용하여 nucleotide 하나를 삽입하여 이를 해결하였다. Forward primer 5'-GGATCCGAATCTCGCGCTTGAAAGT-3'로 제작하고 C를 삽입하였다 (밑줄친 부분은 β -glucosidase gene의 N-terminal 부분은 나타낸다.) Reverse primer 5'-CTGCAGCTCGACTCATCACGCGGT-3'로 제작하였다. 그런 후 *Eco*RI / *Pst*I으로 절단하여 pKS(+)에 같은 site로 삽입하였다 (pKS-25). pKS-25를 *Apa*I / *Sac*II로 분리하여 pPS vector의 같은 site에 삽입하였다. 이를 pJSN이라 명명하였다.

- *B. subtilis*에서 β -glucosidase 분비

귀리에서 분리된 β -glucosidase를 분비시키기 위해 *B. subtilis*에서 유래한 α -amylase promoter와 signal sequence를 fusion하여 구축된 pPS에 삽입하여 pJSN 플라스미드를 구축했다. 그런 다음 *B. subtilis* DB104에 형질 전환하여 얻어진 균체를 3 ml LB broth (chloramphenicol 10 μ g/ml)에 접종하여 30°C에서 16 시간 동안 seed culture 후 50 ml OBM 배지가 포함된 플라스크 (250 ml baffle)에 500 μ l 접종하여 26°C에서 24 시간 배양하였다.

- β -glucosidase 활성 측정

pJSN을 포함하고 있는 *B. subtilis*를 3 ml LB broth에 접종하여 30°C에서 하룻밤 키운 후

50 ml OBM broth (chloramphenicol 10 μ g/ml)에 500 μ l를 접종하고 26°C에서 24 시간 배양했다. 그런 후, 50 ml 배양액 중 1 ml를 따서 15,000 rpm, 4°C에서 20 분간 원심 분리하여 상층액을 얻었다. 그리고 50 μ l를 취해 20 mM KH_2PO_4 (pH,5.5)에 녹인 p NPG (p -nitrophenyl--D-glucopyranoside) 450 μ l와 섞어 30 분간 37°C에서 반응시켰다. 반응 후 2 M Na_2CO_3 을 1 ml를 넣어 반응을 정지시키고 405 nm에서 유리 p -nitrophenol의 흡광도를 측정했다. 1 unit는 37°C에서 1 분 동안 1 nmol의 기질 p NPG를 가수분해 시키는데 필요한 효소의 양이다.

- SDS-PAGE (polyacrylamide gel electrophoresis)를 통한 단백질 분석

β -glucosidase gene (*Glu1*)의 발현 여부를 분석하기 위해 Laemmli 방법에 따라 12% SDS-PAGE를 만들었다. 얻어진 균체 중 1.5 ml를 따서 15,000 rpm, 4°C에서 20 분간 원심 분리하여 상등액만 따서 100% TCA (trichloroacetic acid) 1/10와 섞어 얼음물에 30 분간 방치하고 15000 rpm, 4°C에서 20 분간 원심 분리하여 pellet을 얻었다. pellet은 0.1 N NaOH 50 μ l와 5X sample buffer 5 μ l를 섞어 끓는물에 5분간 끓인 후 10% SDS-PAGE에 전기영동을 실시하였다. 분비된 Protein은 Coomassie brilliant blue R-250 (BioRad)로 염색하여 60 kDa 부근에서 β -glucosidase 단일 밴드를 확인하였다. Separating gel은 acrylamid stock solution (acrylamide 30%, bisacrylamide 0.8%), 7.5 ml 1.5 M Tris-Cl (pH 8.8), 0.3 ml 10% SDS, 150 μ l 10% ammonium persulfate, 10 μ l TEME (Tetra Methyl Ethyl Diamine)로 조성되었다. 4% stacking gel은 1.5 M Tris-Cl (pH 8.8) 대신 0.5 M Tris-Cl (pH 6.8)을 넣어 조성하였다. 5X sample buffer은 30% glycerol, 0.5 M Tris-Cl (pH 6.8), 0.35 M SDS, 0.6 M DTT, 0.175 mM bromphenol blue로 조성되었다.

라. 2차년도 연구수행 결과

1) 기본과제 : 생명공학기술로 생산된 효소와 식용균주를 이용한 전통 장류식품 제조기술 개발

(1) 효과적으로 genistein을 정제하고 수율을 최적화하는 기법을 개발

효과적인 genistein을 정제하기 위해서는 정확하고 신속한 분리, 정제방법이 필요하다. 우리는 분리, 정제 방법으로 HPLC를 사용하였다. 된장 안의 genistin과 genistein의 존재와 함량을 결정하기 위하여 retention time을 결정하였으며 (genistin: 6.5 - 8분, genistein; 25 - 26분), peak면적으로 정량 하였다. 된장의 isoflavone의 추출물을 주입하여 얻은 HPLC의 chromatography를 그림-1에 나타냈다. (그림 1)에서 보여주는 것처럼 genistin에 해당하는 peak A를 명료하게 관찰할 수 있었으며 genistein에 해당하는 peak B는 broad하게 관찰되었다. 미리 작성한 genistin과 genistein의 정량선에 이 peak의 면적을 적용하여 된장에 함유된 genistin과 genistein의 함량을 정량해 보았다. 그 결과 된장 1kg중에 genistin함량을 375mg이 존재하고 있었으며 genistein은 10mg함유하고 있었다.

Peak A

Peak B

그림 1. 된장의 isoflavone의 추출물의 HPLC

이 결과는 1Kg의 된장 중에 Genistein 0.6mg이 함유 되었다는 보고(shinyang-choi, J.Korean Soc. Food Sci Nutr.28(2), 458~463(1999))와 일치하고 있다.

① 된장에 효소 처리한 후 HPLC data

다음으로 된장에 β -glucosidase를 직접 처리하여 된장에 다량 함유된 genistin을 genistein으로 변환 시킬 수 있는지를 확인하였다. *E.coli*로부터 분리, 정제한 β -glucosidase의 활성은 pH 5.0, 37°C에서 1 unit가 1분당 1.7×10^{-6} mol의 glucose의 β -glucoside 결합을 끊어주기 때문에 우리는 실험에서 10 unit의 β -glucosidase를 된장 2g에 처리하여 3시간 incubation한 후 아래와 같은(그림 2) HPLC로 peak의 변화를 보았다. 그 결과 genistin이 나타나야 할 retention time (6 - 8분) 에 해당하는 peak는 거의 소멸되었다. 이렇게 peak가 줄어든 것을 보면 genistin의 β -glucoside결합이 β -glucosidase에 의해 끊어졌다는 것을 의미하고 aglycon형태의 활성형 genistein이 25분에서 27분 사이에 나타난 것을 확인할 수 있었다. 또한 β -glucoside결합이 끊어지면 생기는 glucose단편들의 peak를 확인하기 위해 glucose의 peak를 확인한 결과 retention time이 5분51초대로 효소 처리한 된장 peak에서 5.66분에서의 peak가 glucose라는 것은 확인하였다.

② 효소(β -glucosidase)를 적용한 장류식품 공정의 개발

일반적인 콩발효 장류식품 공정은 대두, 밀짖을 이용하여 원료를 증자시키고 제곡과정을 이용하여 일반적으로 황국균주를 이용하여 40시간 가량 배양시켜 된장 발효에 이용되는 효소의 분비를 촉진 시킨다. 여기에 원료배합 및 살균처리한 후 식품 첨가물을 섞어 된장 발효를 시키게 되는데 이러한 공정 중에 효소를 제곡 과정 중에 처리하는데 있어서 효소의 활성이 37°C, pH5.0에서 1시간 이후부터 3시간정도면 Genistin으로부터 β -glucoside 결합을 끊어 genistein으로 변환 완료되므로 식품 첨가물을 넣고 살균처리 3~4시간 전에 바로 효소처리를 하는 것이 효율성을 높이는데 도움이 될 것이다. 만약 효소처리 후의 물성 특히, 점도가 변한다면 된장류로 식품 가공을 하는 것이 아니라 된장을 이용한 식품(쌈장, 고기능성 된장 파우더 등....)으로의 응용도 함께 모색 해 봐야 할 것이다.

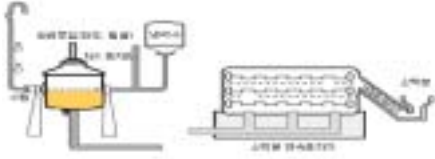
(A)

(B)



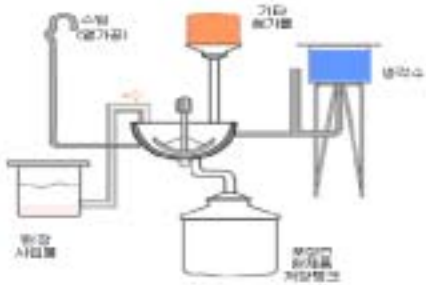
2) 효소적 생물전환기술의 적용을 바탕으로 한 새로운 공기반 장류식품 생산공정 개발

<장류 개발 공정예의 응용 예>



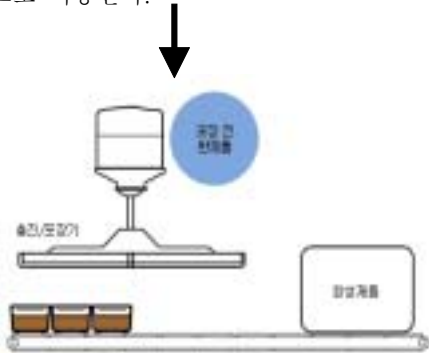
원료증자 과정

- ① 소맥분은 연속증자기에서 일정압력과 스팀을 가하여 증자 후 증자된 소맥분을 제국실로 이송한다.
- ② 밀쌀·대두는 선별 세척하여 물을 가하여 불리고 N. K증자관에서 일정압력과 스팀을 가하여 증자한다.

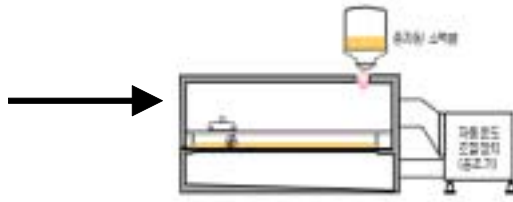


원료혼합(소맥분, 밀, 쌀, 식염, 정수)

제국된 소맥분·증자된 밀쌀·대두에 식염·정수를 일정비율로 혼합하여 숙성탱크로 이송한다.

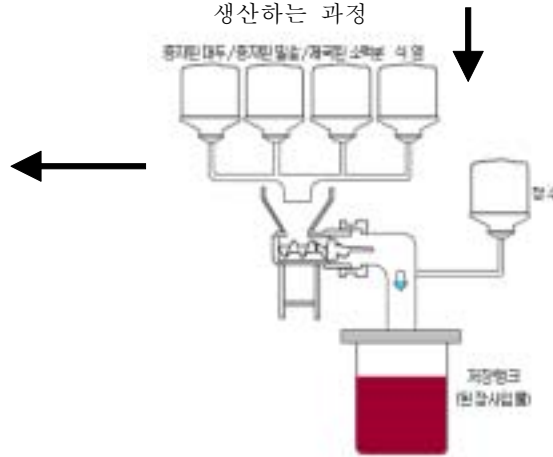


포장/제품완성



소맥분 제국과정

제국실로 이송된 증자된 소맥분에 중국(황국균)을 접종하여 약 42시간 동안 증식시켜 단백질 및 탄수화물을 분해하는 효소를 생산하는 과정



원료배합 및 살균: 숙성탱크에서 일정한 발효기간을 거쳐 잘 숙성된 반제품을 제성술으로 이송한 후 메주 및 기타첨가물을 첨가하여 열처리한 다음 냉각시켜 마쇄기로 갈은 후 완제품 서비스 탱크로 이송한다

장류식품 개발에 있어서 기존의 공정을 이용하여 Genistein이 보강된 된장을 만들려고 한다면 우선 β -glucosidase를 균주로부터 분리 정제 시켜 위 공정 중 제국과정에서 분리된 β -glucosidase를 생산 된장량을 고려하여 첨가하면 된장에 우선적으로 처리가 될 것이다. 보통 황국균의 경우 40시간이상 키워 발효에 필요한 효소를 많이 만들어내는데 β -glucosidase는 된장에 처리한 후 3시간 정도면 genistein전환이 거의 다 이루어지므로 효소를 언제 처리할 것인지를 고려해야할 것이다. 또한 원료 숙성 탱크에 보관하기 전에 효소를 바로 처리하여 온도를 37°C에 맞추고 3시간 가량 반응시켜 원료배합 및 살균과정 이전에 genistin으로부터 genistein으로의 전환을 끝내야한다. 추후 실험에서 효소처리후 장시간동안 물성 변화를 일으켜 점도가 떨어지거나 하는 경우에는 된장을 이용한 가공식품(쌈장,포장 된장국 등)에 이용할 수 있을 것이며 효소 전환된 된장을 dry 상태로 식품에 응용하는 방법도 고려해 보아야 할 것이다.

기존의 황국균주 외에 이번에 개량된 Yeast로부터 β -glucosidase를 얻어내어 genistein으로 전환시킬 때 소맥분 제국 공정 중에 Yeast를 직접 키워 β -glucosidase를 생성시키며 된장을 생산할 수도 있을 것이다.

2) 제 1협동과제 : 효모 *Y. lipolytica*에서 β -glucosidase 분비 생산 및 장류발효 *B.subtilis*용 새로운 food grade vector 개발

(1) 형질전환된 *Y. lipolytica*에서 β -glucosidase 생산 및 정제

Yeast expression vector pIMR53의 *HindIII* / *EcoRI* site에 expression cassette(XPR2 gene의 promoter / signal peptide(SP)와 terminator사이에 β -glucosidase gene을 삽입)를 subcloning하여 발현체계를 구축하였으며, (그림 3) 여기서 얻은 plasmid DNA를 이용하여 Yeast *Yarrowia lipolytica* SMY2에 형질전환을 수행하였다. 그리하여 얻은 transformant (pIMR53Glu1이라고 명명)를 50ml Medium A에 각각 약 4.6×10^6 cell 정도로 seed culture한 다음 23°C, 250rpm에서 배양하였다. 그 후 sample은 seed culture후 24, 30, 36, 42, 48, 52 hours에 각각 taking하였고 centrifuge한 다음 상층액만을 따서 새 tube로 옮겼다. Yeast *Yarrowia lipolytica*는 식품 산업에 이용되는 효모로서 균체의 독성이 없으며 세포외로 많은 단백질을 분비하는 능력을 가지고 있기 때문에 분리한 상층액을 이용하여 β -glucosidase의 activity assay 측정하였다. β -glucosidase의 activity assay는 substrate로써 p-NP- β -D-glucopyranoside를 이용하여 측정하였으며 37°C에서 15min 반응시켰다. 6시간 간격으로 taking하여 β -glucosidase의 activity를 assay한 결과 24시간 이후 activity가 증가한 것을 알 수 있었고, control로 사용한 expression vector pIMR53을 harboring한 SMY2보다 β -glucosidase activity가 증가한 것을 알 수 있었다. 이로써 Yeast *Yarrowia lipolytica* SMY2에서 Oat β -glucosidase가 분비되는 것을 알 수 있었다.

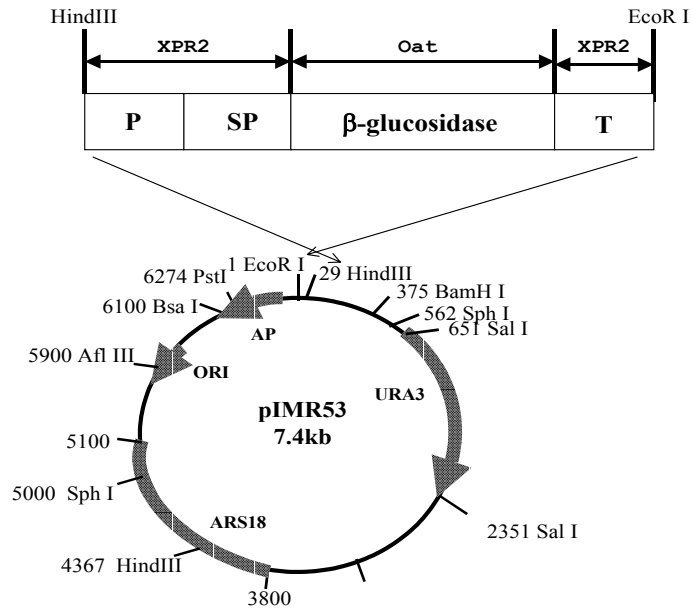


그림 3. β -glucosidase의 발현 system

(2) *Bacillus* 고유의 분비기구를 이용하기 위해 *B. subtilis* 유래 signal sequence를 food grade vector에 도입하여 안정적인 발현 및 배양외액으로의 분비 시스템 구축과 과대발현을 위한 발현체계 구축과 개발된 food grade vector의 특허화

*Bacillus*를 위한 분비 시스템은 당화균으로 알려져 있는 야생종 *B. mesentericus*에서 분리된 pMMH1 플라스미드를 이용하여 구축되었다. 재조합 벡터로서 가장 중요한 요인은 벡터의 안정성이다. 그리하여 pMMH1을 이용한 분비시스템 구축을 위해 우선적으로 안정성을 확인하였다(표 1). 가장 작으면서 안정적인 부분을 이용한 벡터 구축을 위해 DNA sequence analysis 결과로 확인된 5개의 ORFs를 하나씩 제거해서 크기를 줄였다. 그리하여 가장 작으면서 안정적인 부분을 찾아 분비 시스템 구축을 위한 벡터로 이용하였다. 또한 외래 유전자의 발현 및 분비를 돕기 위해 이전에 많이 이용되어 온 *B. subtilis*에서 유래한 α -amylase의 promoter와 sequence를 도입하였다(그림 4). 그리고 최종적으로 pJSN으로 명명하였다.(그림 5) 구축된 vector를 이용하여 귀리에서 유래한 유전자를 fusion하여 vector의 안정성 및 목적 유전자의 발현과 분비를 분석하였다. 또한 pMMH1의 가장 작은 2.6kb만으로 이루어진 replicon을 food grade vector로서 특허를 출원하였다.

(특허출원 제2002-34094호).

이후, 국제특허로 출원(출원번호: PCT/KR03/01170)

Plasmids	% of DB104 containing the plasmid after 100 generations
pPS	98%
pPN	94%
pME	97%
pMN	98%
pEN	95%

표 1. 구축된 벡터의 segregational stability

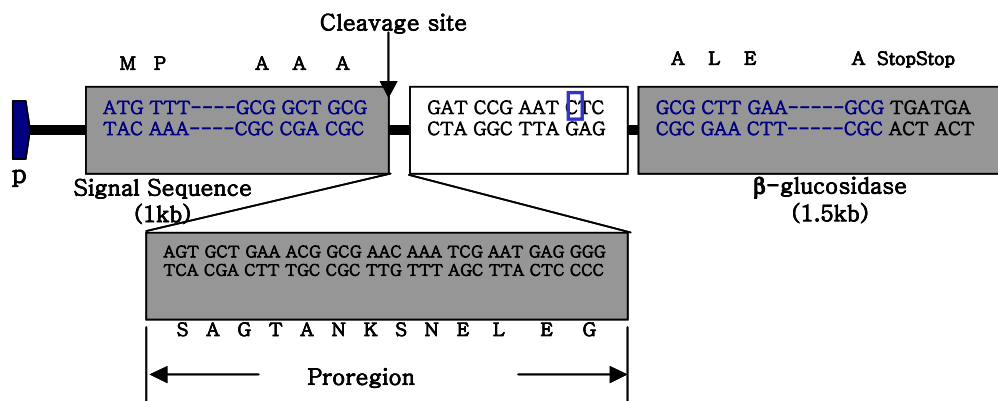
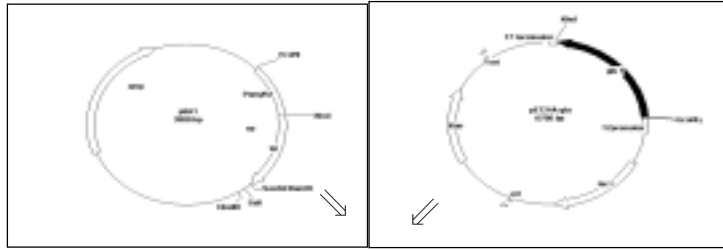


그림 4. α -amylase의 promoter와 signal sequence의 도입



glu1 gene was digested with *Bam*HI-*Xho*I and subcloned into the *Bam*HI and *Sal*I sites of p8A1 by PCR



Isolation and ligation into *Eco*RI-*Hind*III sites of pKS,



Isolation with *Sac*II/*Apa*I and insertion into the same sites of pPS

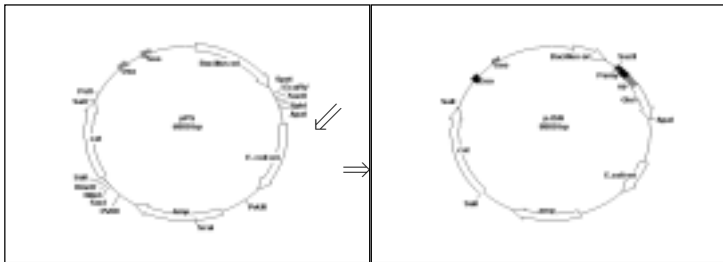


그림 5. pMMH1을 이용하여 구축된 분비 벡터 시스템(pJSN)

3) 제 2 협동과제 : *B. subtilis*에서 β -glucosidase 발현체계 구축 및 장류발효용 산업균주 개발

(1) β -glucosidase의 생산 및 분리 정제

귀리에서 유래한 β -glucosidase를 생산하기 위한 분비 벡터 시스템이 구축되었다. *B. mesentericus*에서 유래한 플라스미드와 분비 시스템을 도입하여 β -glucosidase를 생산할 수 있는 기반을 구축하였다. *B. subtilis* DB104에 형질전환하여 β -glucosidase 생산을 유도하였다. 배양온도는 37°C, 30°C, 25°C에서 각각 배양하였으나 25°C이 최적 온도(표 2)이며 활성 및 분비량에 있어서도 최고를 나타냈다. 활성과 분비된 β -glucosidase를 확인하기 위해 상층액을 이용하였다. 기질은 PNPG(p-NP- β -D-glucopyranoside)를 이용했고, 분비된 단백질은 SDS-PAGE를 통해 확인하였다. (그림 6)

Strain	Seed culture	Main culture	Amp	pH	Mediume
<i>B. subtilis</i> DB104	28-30°C	25°C	No	7.0	OMB

표 2. β -glucosidase 생산을 위한 최적 조건

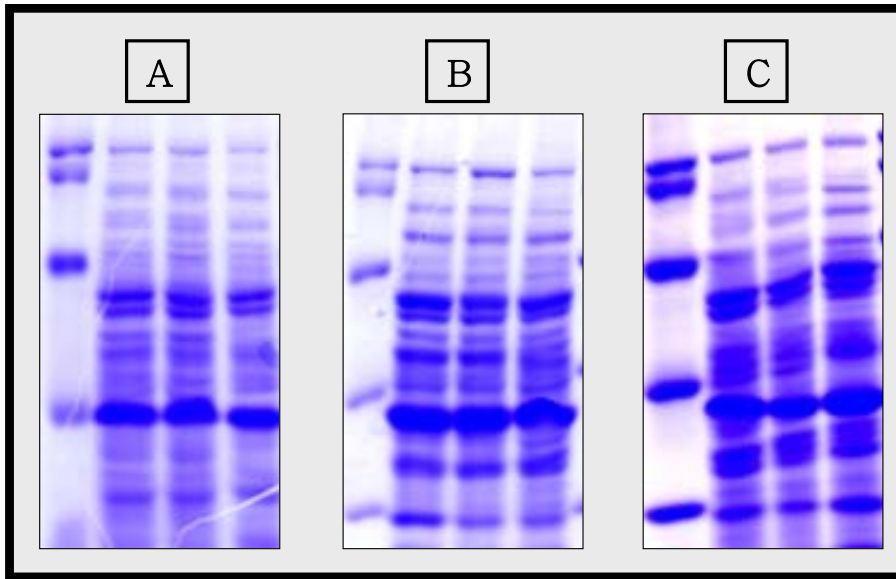


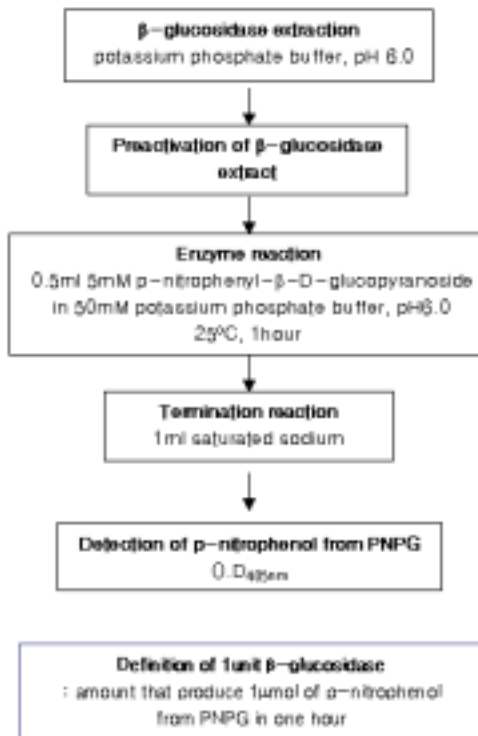
그림 6. SDS-PAGE를 통해 분리된 β -glucosidase(60kDa) 분석

(2) 자연 발효가 아닌 균주 접종을 통한 장류식품의 생산가능성 타진

지금까지 된장에서 3시간 내에 효소전환이 효과적으로 이루어 졌다는 것을 확인할 수 있었다. 이번 결과를 토대로 효소처리 10분,30분,1시간,2시간후의 β -glucosidase활성을 HPLC를 통해 확인하고 효소전환 비율을 계산하여 보다 효과적인 효소처리를 하고 물성의 변화를 측정하여 실제로 발효식품 에 이용할 수 있는 기술을 개선시켜야 할 것이다. 특히 β -glucosidase분비 균주를 직접 된장 제조공정에 이용하는 법을 알아내고 효율성을 검증한다면 기존공정과 동일한 제조단가로 genistein이 보강된 장류식품을 제조할 수 있을 것이라고 사료된다.

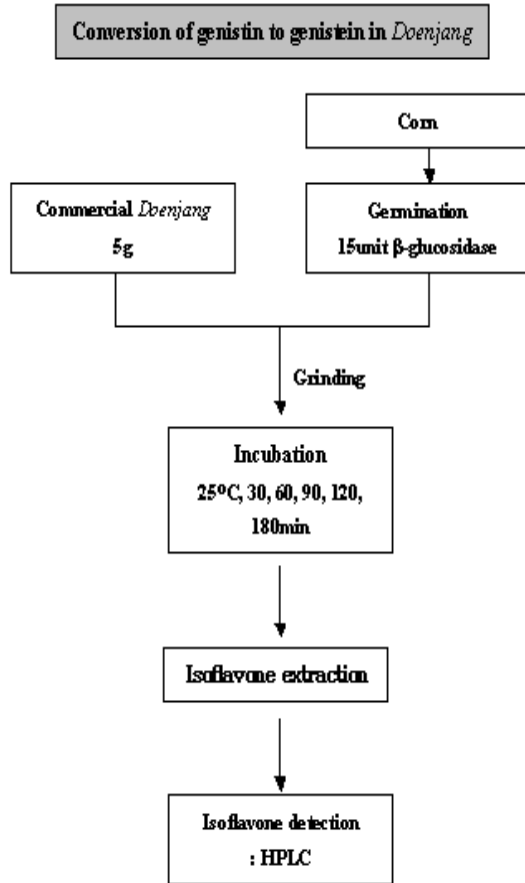
마. 3차년도 연구수행 방법

▷ β -glucosidase 활성 측정



콩과 식물의 씨앗 및 옥수수의 β -glucosidase를 추출하기 위하여 0.1M potassium phosphate buffer, pH 6.0를 1 gram당 4ml buffer 비율로 희석하여 막자 사발에 넣고 입자가 고르게 될 때 까지 분쇄 시킨 후 추출물을 1.5ml E-tube에 분취하였다. 1차 추출물을 4°C에서 9,700 x g로 2분간 원심분리 하여 상층액을 분리하여 효소액으로 사용하였다. 각각의 식물체에서 분리하여 얻은 β -glucosidase 추출액을 0.2ml 취하여 25°C에서 10분간 preactivation시킨 후 5mM p-Nitrophenol- β -D-glucopyranoside가 포함된 50mM potassium phosphate buffer, pH6.0 (PNPG solution) 0.5ml과 혼합한 후 25°C에서 1시간 반응 시켰다. 효소 반응 1시간 후 효소와 기질의 반응을 중지시키기 위해 sodium tetra- borate(BORAX) 포화용액을 1ml씩 첨가하였다. 효소 반응 전에 1ml BORAX를 첨가해서 반응이 일어나지 못하게 하여 흡광도 측정 시 대조구로 사용하였다. 효소 활성은 PNPG에 β -glucosidase가 작용하여 glucoside의 hydrolysis에 의해 생성된 p-nitrophenol의 양을 405nm에서 측정하였다. (β -glucosidase 1unit는 시간당 1mol p-nitrophenol을 생성하는 것으로 정의 하였다.

▷ Isoflavone 전환실험 개요



된장의 genistin이 식물성 β -glucosidase에 대해 기질 특이성을 가져 genistin의 glucoside 가수분해에 의해 genistein이 생성되는지의 여부를 알아보고 genistin의 genistein으로의 전환율을 보기위해 almond로부터 분리, 추출 및 정제된 β -glucosidase를 Sigma사로부터 구입하여 된장 5g에 5unit를 처리 하였다. 옥수수 β -glucosidase의 된장처리는 활성이 가장 높은 시간대에 취한 옥수수를 된장 5g과 함께 β -glucosidase가 15unit 첨가되게끔 혼합한 후 막자사발에 넣고 마쇄시켜 효소가 된장의 genistin과 고루 반응할수 있게 처리 시켜주었다. 된장에 β -glucosidase를 처리하지 않은 것을 대조군으로 하고 각각 25°C에서 3시간 반응시켰다.

▷ HPLC 조건

HPLC analyses

- 1) Instrument: Waters 746 Pump
Waters U8k injector
Waters 486 UV/VIS Detector

 - 2) Mobile phase: Gradient loading
Initial=> acetonitrile : water(1% acetic acid) = 15 : 85
0min=> acetonitrile : water(1% acetic acid) = 15 : 85
26min=> acetonitrile : water(1% acetic acid) = 35 : 65
27min=> acetonitrile : water(1% acetic acid) = 15 : 85
30min=> acetonitrile : water(1% acetic acid) = 15 : 85

 - 3) Column: Novapak C18 4 μ m 3.9 x 300mm Column
 - 4) Condition: 10 μ l injection, 254nm, and 1.0ml/min
- | | |
|-----------|---------------------------------------|
| Solvent A | 0.1% Acetic acid in dH ₂ O |
| Solvent B | 0.1% Acetic acid in acetonitrile |

바. 3차년도 연구수행 결과

1) 기본과제 : 생명공학기술로 생산된 효소와 식용균주를 이용한 전통 장류식품 제조 기술 개발

(1) β -glucosidase를 분비하는 장류발효균주 *B. subtilis*를 이용한 장류 발효공정을 개발

장류식품 개발에 있어서 기존의 공정을 이용하여 Genistein이 보강된 된장을 만들려고 한다면 우선 β -glucosidase를 균주로부터 분리 정제시켜 공정 중 제국과정에서 분리된 β -glucosidase를 생산 된장량을 고려하여 첨가하면 된장에 우선적으로 처리가 된다. 보통 황국균의 경우는 40시간 이상 키워 발효에 필요한 효소를 많이 만들어내는데 β -glucosidase는 된장에 처리한 후 3시간 정도면 genistein전환이 거의 다 이루어지므로 효소를 언제 처리할 것인지를 고려해야할 필요가 있다. 또한 원료 숙성 탱크에 보관하기 전에 효소를 바로 처리하여 온도를 37°C에 맞추고 3시간 가량 반응시켜 원료배합 및 살균과정 이전에 genistin으로부터 genistein으로의 전환을 끝내야한다. 추후 실험에서 효소처리 후 장시간동안 물성 변화를 일으켜 점도가 떨어지거나 하는 경우에는 된장을 이용한 가공식품(쌈장, 포장 된장국 등)에 이용할 수 있을 것이며 효소 전환된 된장을 dry 상태로 식품에 응용하는 방법도 고려해 보아야 할 것이다.

① 균주 접종을 통한 장류식품의 생산 가능성 타진

형질전환 된 *B.subtilis*(pJSN)의 β -glucosidase activity가 2unit로 측정 되었으나 실제로 된장 2g에 5unit 이상의 β -glucosidase를 반응 시켜야 된장의 genistin을 genistein으로 효율적으로 전환시킬 수 있기 때문에 장류식품에 직접 형질전환 된 균주를 이용하여 전환시킨다는 것은 아직까지는 불확실하다. 따라서 보다 효율적인 β -glucosidase 발현체계의 구축이나 여러가지 β -glucosidase 대체원을 고려해 보아야한다.

② β -glucosidase 대체원 확보

미생물성 β -glucosidase의 대체원으로서 식물성 β -glucosidase의 이용 가능성을 조사하였다. 아몬드로부터 분리, 추출 및 정제된 β -glucosidase를 Sigma 사로부터 구입하여 된장에 처리한 결과 genistin이 genistein으로 전환 됨을 확인하였다. 경제적이고 된장의 품질에 영향을 최소화할 수 있는 β -glucosidase 대체원으로 땅콩, 강낭콩, 백태, 흑서리, 옥수수를 정하고 이들의 β -glucosidase 활성을 조사하였다.

③ 콩과식물로부터 β -glucosidase의 추출 및 활성 측정

콩과 식물의 씨앗 및 옥수수의 β -glucosidase를 추출하기 위하여 0.1M potassium phosphate buffer, pH 6.0를 1 gram당 4ml buffer 비율로 희석하여 막자 사발에 넣고 입자가 고르게 될 때 까지 분쇄 시킨 후 추출물을 1.5ml E-tube에 분취하였다. 1차 추출물을 4°C에서 9,700 x g로 2분간 원심분리 하여 상층액을 분리하여 효소액으로 사용하였다. 각각의 식물체에서 분리하여 얻은 β -glucosidase 추출액을 0.2ml 취하여 25°C에서 10분간 preactivation시킨 후 5mM p-Nitrophenol- β -D-glucopyranoside가 포함된 50mM potassium phosphate buffer, pH6.0 (PNPG solution) 0.5ml과 혼합한 후 25°C에서 1시간 반응 시켰다. 효소 반응 1시간 후 효소와 기질의 반응을 중지시키기 위해 sodium tetra- borate(BORAX) 포화용액을 1ml씩 첨가하였다. 효소 반응 전에 1ml BORAX를 첨가해서 반응이 일어나지 못하게 하여 흡광도 측정 시 대조구로 사용하였다. 효소 활성은 PNPG에 β -glucosidase가 작용하여 glucoside의 hydrolysis에 의해 생성된 p-nitrophenol의 양을 405nm에서 측정하였다. (β -glucosidase 1unit는 시간당 1mol p-nitrophenol을 생성하는 것으로 정의 하였다.) 건 옥수수에서의 β -glucosidase 활성이 5.02 unit/g로 비교적 높게 측정되었지만 생땅콩 1.31 unit/g, 흑서리 0.97 unit/g, 백태 3.94 unit/g, 강낭콩 0.12 unit/g으로 효소활성이 낮게 나타났다. 흰 찰 옥수수과 검정 찰 옥수수에서 분리한 씨눈에서의 효소활성이 6.24 unit/g, 5.56unit/g으로 매우 높았다(그림 1). 따라서 옥수수를 β -glucosidase 원으로 선택하여 된장에서 genistin을 genistein으로 전환시키기 위해서 사용하였다.

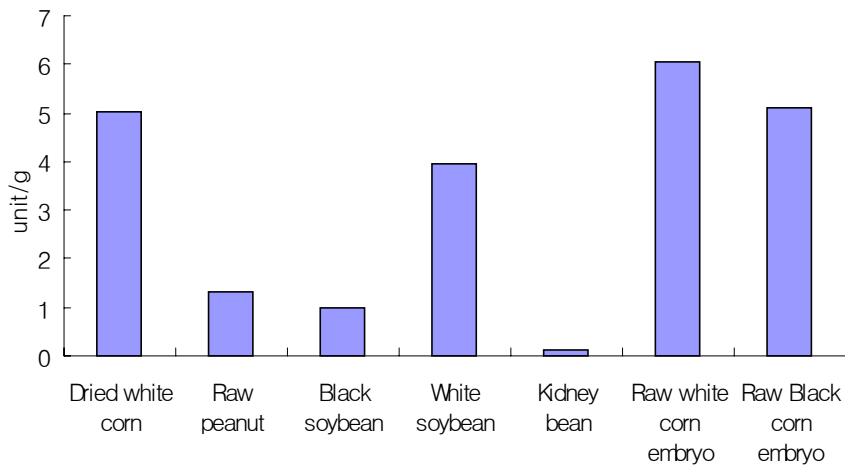


그림 1. 건 옥수수(건조), 생땅콩, 흑서리, 백태, 강낭콩, 옥수수의 씨눈(수분포함)의 β -glucosidase activity(단위: unit/1g)

④ 건 옥수수의 β -glucosidase 활성

실제로 β -glucosidase 활성을 된장에 적용시켜 isoflavone을 전환시키려고 할 때 대량 생산을 목적으로 실험을 생각해 본다면 매년 된장을 제조할 때 마다 생 옥수수를 구해 처리해주는 것 자체가 보관비용이나, 재료 수급 등의 문제점이 많기 때문에 건 옥수수를 이용하는 계기가 되었다. 건조되어 냉장 저장된 옥수수를 배양시키며 씨눈을 발아시켰다. 씨눈과 debris를 분리시키지 않은 것을 사용하여 β -glucosidase 활성을 측정한 결과 4일째 가장 높은 3.03unit/g 이 나왔다. 생 옥수수와 건 옥수수의 씨눈이 발아하여 β -glucosidase의 활성이 증가하는 시간이 차이가 났으며 이 차이는 건 옥수수 내부의 수분을 공급해주는 시간이 씨눈의 성장에 영향을 미쳤기 때문이며, β -glucosidase의 활성은 옥수수의 줄기세포가 배아로부터 성장하면서 감소하는 것으로 나타났다(그림 2).

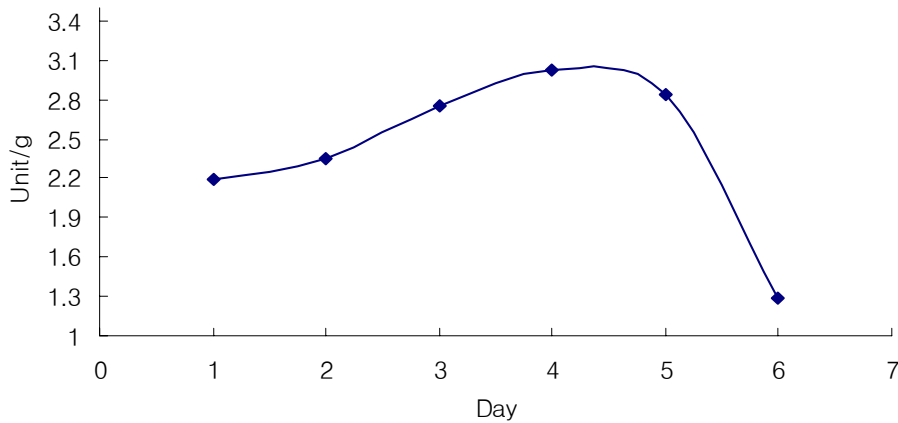


그림 2. 건 옥수수 발아사진

(2) Genistein 함량을 증가시킨 기능성 장류식품을 개발하고 이를 상품화

기존의 된장 제조공정은 우선 소맥분, 대두, 밀쌀을 스팀을 이용하여 증자시킨 후 제국실로 이동시켜 증자된 소맥분에 중국(황국균)을 접종하여 약 42시간 동안 증식시켜 단백질 및 탄수화물을 분해하는 효소를 생산한다. 제국 된 소맥분과 증자된 밀쌀, 대두에 식염, 정수를 일정비율로 혼합하여 숙성탱크로 이송하고 숙성탱크에서 일정한 발효기간을 거쳐 잘 숙성된 반제품을 메주 및 기타 첨가물을 첨가하여 열처리한 다음 냉각시켜 마쇄기로 갈은 후 완제품 서비스 탱크로 이송한다. 이 과정에서 β -glucosidase를 처리하여 된장중의 genistein함량을 높이려면 우선 원료를 배합하여 숙성 후 바로 β -glucosidase를 처리해야 한다. 25°C에서 약 3시간 교반시켜 genistin을 효소전환시킨 후 식염, 정수를 혼합한다면 genistein보강 된장을 생산할 수 있다. 이번 실험을 바탕으로 효소 처리량이나 배양시간 등을 조절 한다면 된장의 genistin 전환율을 더 높일 수 있을 것이라고 예상되어지며 genistein이 보강된 기능성 된장의 제조에 적용될 수 있을 것이다.

① 된장의 genistin을 genistein으로 전환

옥수수 β -glucosidase의 된장 처리는 활성을 확인한 후 활성이 가장 높은 시간대에 취한 옥수수를 된장 5g과 함께 β -glucosidase 가 15unit 첨가되게끔 혼합한 후 막자사발에 넣고 마쇄시켜 효소가 된장의 genistin과 고루 반응할 수 있게 처리 시켜주었다. 된장에 β -glucosidase를 처리하지 않은 것을 대조군으로 하고 각각 25°C에서 3시간 반응시켰다.

② 된장의 isoflavone추출

옥수수 β -glucosidase를 처리한 된장은 동결건조 하지 않고 반응 후 바로 된장 5g에 0.1M HCl 5ml와 acetonitrile 25ml를 첨가 시켜 3시간 동안 isoflavone을 추출하였다. 이를 8750 x g 에서 3분간 원심분리 시킨 후 상층액을 취하여 0.2um pore size의 nylon membrane (Sartorius AG, Germany)을 사용하여 여과하고 얻은 상층액 시료를 증발 시켜 용매를 제거한 후 냉동보관 하였다. 냉동 보관된 시료를 분석하기 위해 400ul 80% HPLC용 methanol에 녹인 후 0.2um size의 syringe filter에서 걸러 HPLC분석용 시료를 준비하였다.

③ HPLC 정성, 정량분석

준비된 HPLC 분석용 시료를 각각 10ul주입하여 이동상을 acetonitrile 과 H₂O를 gradient로 분당 1ml의 유속으로 pump를 통해 흘려주었다. 정성분석을 하기위해 우선 genistin과 genistein의 standard peak와 된장의 peak를 비교하였으며 실제로 된장에 genistein, genistin standard를 첨가하여 spike 되는 peak를 확인 하는 방법을 사용하였다. 정량분석을 하기위해 HPLC에 genistein, genistin 을 각각 100g/ ml, 50g/ml, 25g/ml, 10g/ml, 5g/ml의 농도로standard를 제조 하여 적분면적을 구한 후 standard curve를 만들어 된장에서 얻은 HPLC peak의 적분면적과 비교하여 양을 계산하였다.

④ 시판용 된장에서의 genistein및 genistin정성, 정량 및 효소 전환

시판 된장의 HPLC peak는 전통된장과 비슷한 형태로 genistin의 peak가 7분대에 검출되었으며 genistein은 극소량으로 peak로 검출되지 않았다. 시판 된장은 1kg 중 296mg의 genistin을 함유하고 있었으며 5.8 mg의 genistein 이 들어있는 것으로 나타났다(표 1). 옥수수 β -glucosidase 를 3unit/g을 처리해 준 후 peak를 살펴본 결과 genistin peak가 소멸되고 5분대의 glucose peak와 25분대의 genistein peak가 성장하는 것을 확인할 수 있었다. 실제로 peak가 genistin과 genistein의 peak 인지 확인하기 위해서 효소 전환시킨 된장시료에 genistin, genistein 표준시료를 첨가하여 얻은 peak를 살펴보았을 때 genistin과 genistein의 peak가 성장했다는 것을 확인할 수 있었다(그림 3). 효소 처리 된 된장은 genistin과 genistein을 각각 92mg/kg과 209.8mg/kg 함유하여 genistin의 69%가 genistein으로 전환 된 것을 확인할 수 있었다(표 1).

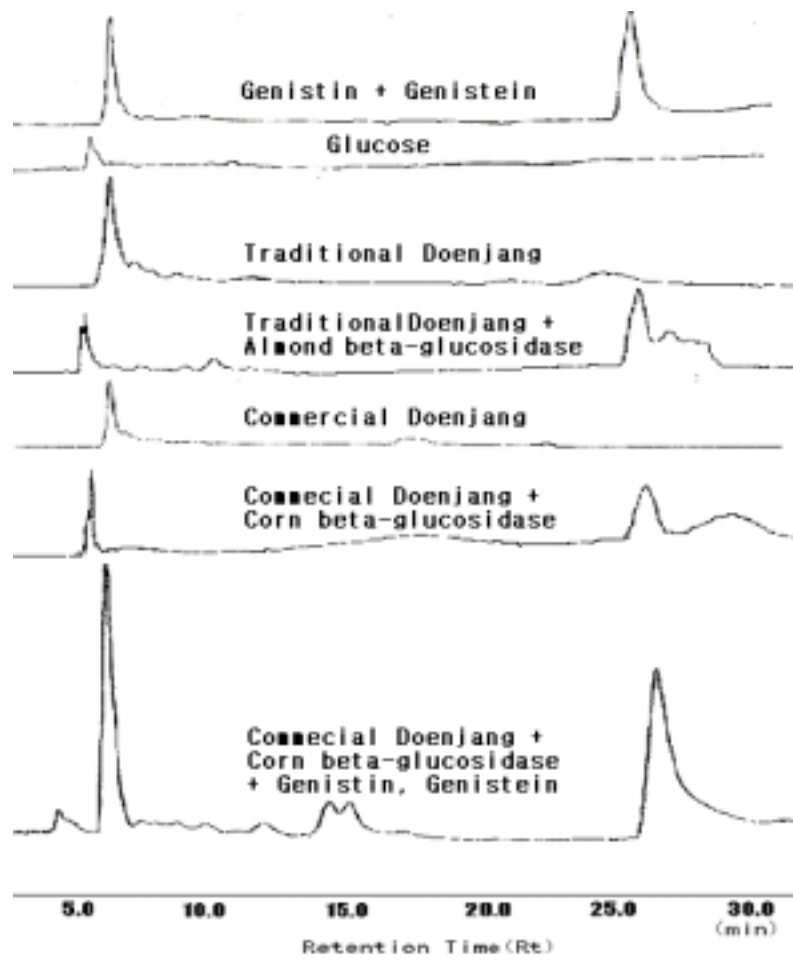


그림 3. HPLC peak 비교

	Genistin content	Genistein content	Conversion ratio	Enzyme used/ <i>Doenjang</i>
Traditional <i>Doenjang</i>	375 mg/kg	10 mg/kg		
<i>Doenjang</i> treated with purified Almond β-glucosidase	19 mg/kg	379 mg/kg	95%	1unit/g
Commercial <i>Doenjang</i> 1unit/g	296 mg/kg	5.8 mg/kg		
<i>Doenjang</i> treated with Cornβ-glucosidase	92 mg/kg	209.8mg/kg	69%	3unit/g

표 1. β -glucosidase 처리 전, 후 된장에서 genistin과 genistein의 함량변화

(3) Genistein의 첨가와 β -glucosidase가 발현되는 발효 균주에 의해 생산된 장류식품의 물성조사

옥수수 β -glucosidase의 된장 처리 후 된장의 품질변화 여부가 중요함으로 색도, 점도, pH, 향산화가를 측정하였다. 기존된장 과 genistein 보강 된장과 물성차이는 거의 없었다. 따라서 된장에 직접 옥수수를 처리한 후에도 품질의 변화가 거의 없음을 확인할 수 있었다.

(4) β -glucosidase 처리된 된장의 품질 안정성 및 물성변화 측정실험

① pH

β -glucosidase 처리 전, 후 된장을 각각 증류수와 1:1의 비율로 혼합한 후 pH meter(Istek, 735P model)를 사용하여 측정하였다. 일반적인 된장의 pH는 4.9~5.3정도로 산성을 나타내고 있다. pH를 결정하는 주된 인자는 곰팡이이다. *Aspergillus*속, *Penicillium*속, *Mucor*속, *Rhizopus*속들이 된장의 발효에 관여하고 특히 호염성인 *Pediococcus halophilus*는 증식할 때 젖산을 생성하여 된장을 pH 5.0 정도로 떨어뜨리며, pH 5.0부근이 되면 증식을 중지하게 된다. 15unit 옥수수 β -glucosidase를 된장 5g에 처리하여 실제로 pH의 변화가 있는지 10, 30, 60, 90, 120, 150, 180분 동안 배양시켜 실험하였다(그림 4). β -glucosidase처리 후에도 pH는 4.9로 변화가 거의 없었다.

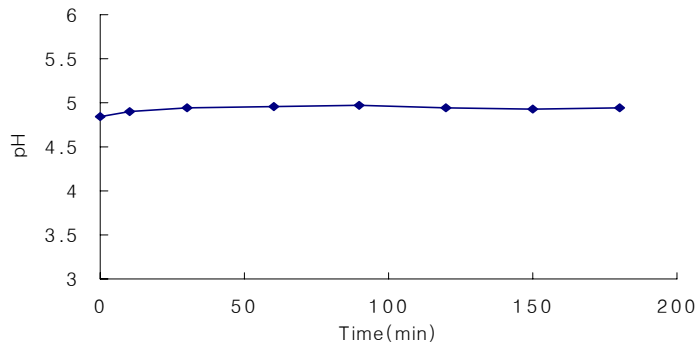


그림 4. β -glucosidase 처리 후의 pH 변화

② 점도

점도는 No.7 spindle를 장착시킨 BROOKFIELD Digital Viscometer DV-1+(Brookfield engineering Lab. Inc.)를 사용하여 0.1rpm 에서 30초간 작동시켜 점도를 측정하였다.

β -glucosidase처리 후 된장의 점도는 처리 전 보다 약 $0.7 \times 10^6 \text{cp}$ 높게 측정 되었다 (그림 5). 이러한 원인은 β -glucosidase를 처리해 줄 때 β -glucosidase를 정제해서 처리한 것이 아니라 옥수수 debris와 같이 처리하였기 때문에 된장 중의 수분 함량이 약간 감소하면서 생긴 결과로 추정된다. 그러나 $0.7 \times 10^6 \text{cp}$ 차이는 실제 된장의 품질에 있어서 점도가 높아져 품질 저하를 초래할 정도의 수치는 아니다.

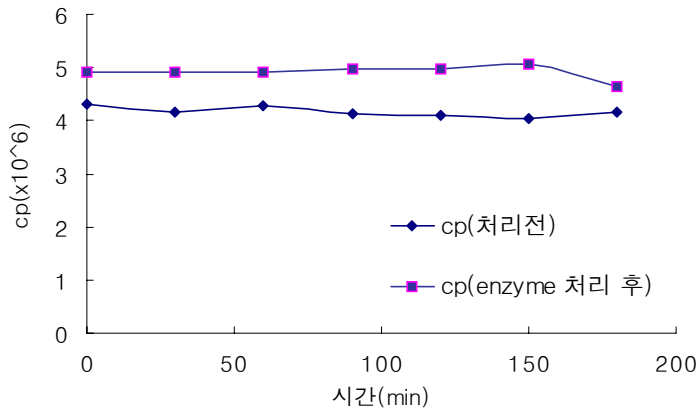


그림 5. β -glucosidase 처리 후 된장의 점도 변화

③ 항산화가

일반된장은 항산화 효과를 어느 정도 가지고 있으므로 효소 처리된 된장의 항산화가 (TBA value)를 측정하여 옥수수 β -glucosidase를 처리한 후에 된장의 항산화가에 어떤 영향을 미치는지 알아보았다. 된장 3g을 삼각 플라스크에 취하고 benzene 10ml를 혼합하여 용해시킨 후 TBA혼합액 10ml을 가하고 4분간 반응시켰다. 이 액을 분액 깔때기에 옮겨 정치시켜 2개 층으로 분리시켰다. 층 분리를 시켰을 때 된장의 수용성 혼탁액이 완전히 제거되지 않아 6,700 x g에서 5분 동안 원심분리 하여 아래층을 순수하게 분리하였고 100°C로 가열된 물에서 30분간 가열하고 다시 상온으로 냉각시켜 530nm에서 흡광도를 측정하여 TBA value를 계산하였다.

된장 중에 항산화 활성을 가지는 물질들은 우선적으로 된장 내에 존재하는 산화 가능한 지질류의 산화를 막아 된장이 안전한 식품으로서 가치를 지니도록 하고 있다. β -glucosidase처리 전, 후 된장의 산화물량을 계산하여 항산화 활성물질의 활성을TBA value로 나타내었다(그림 6). 25°C에서 배양 0시간부터 5시간 까지 시간별로 sampling 하여 530nm에서 산화물량을 측정하고 항산화가를 결정한 결과 β -glucosidase를 처리시킨 후에도 항산화 활성이 그대로 유지된다는 것을 알 수 있었다(그림 6). 된장에서 항산화 작용을 하는 물질은 콩에 함유된 황색소인 daidzein 및 daidzin을 비롯한 genistein 과 같은 isoflavone 류 이며 이들은 polyphenol류에 속하는 물질들이다. 된장 중의 또 다른 하나의 항산화 물질은 아미노산류와 당류의 반응으로 생성된 melanoidin상의 물질로서 이러한 물질들이 β -glucosidase의 처리에 의한 반응에 안정하다는 것을 알 수 있었다.

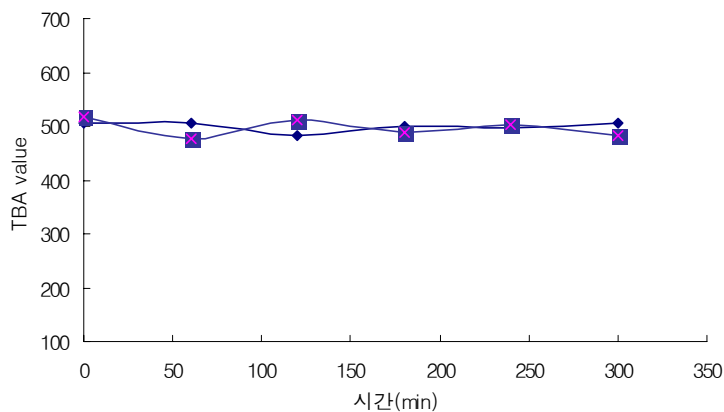


그림 6. β -glucosidase 처리 전, 후 된장의 TBA value 변화

④ 색도

된장에 1 gram당 β -glucosidase 3unit를 처리하여 1일, 2일, 4일, 6일간 25°C에서 반응시키면서 색도를 측정하였다. 색도를 측정하기 위해 Minolta CL300 색도계를 이용하였고 β -glucosidase를 처리하지 않은 control과 비교하여 Hunter value(L, a, b) 값을 결정하였다.

장류의 갈변은 영양성분인 단백질로부터 유래한 아미노산과 탄수화물로부터 유래한 당류가 서로 반응하여 형성하는 갈색의 멜라노이딘(melanoidin, 갈색색소)으로 인하여 발생한다. 멜라노이딘은 인체 내 내당성을 개선하고 트립신 저해작용 등으로 당뇨병의 예방이나 개선에 이바지 할 것으로 기대되며 위암발생, 니트로소 아민의 생성 감소 및 유산균 증식효과, 과잉 섭취된 철 성분과 체내결합방지, 유리기 발생에 의한 세포막 확산방지 등의 효과를 가지고 있어 여러 가지 가능성을 나타내고 있다. 이와 같은 기능성 물질에 있어서 β -glucosidase가 된장 색소와 반응하여 분해산물을 나타내는지 아니면 안정한지를 알아보기 위해 된장의 색도를 1일부터 6일간 측정한 결과 β -glucosidase를 처리하지 않은 대조구는 Hunter value가 L: 30.44, a: 7.1, b: 11.39였으며 β -glucosidase 처리 후의 Hunter value는 L:34.2, a:6.84, b:12.39로 측정되어 된장의 색도 변화에는 그렇게 영향을 미치지 못함을 알 수 있었다 (그림 7).

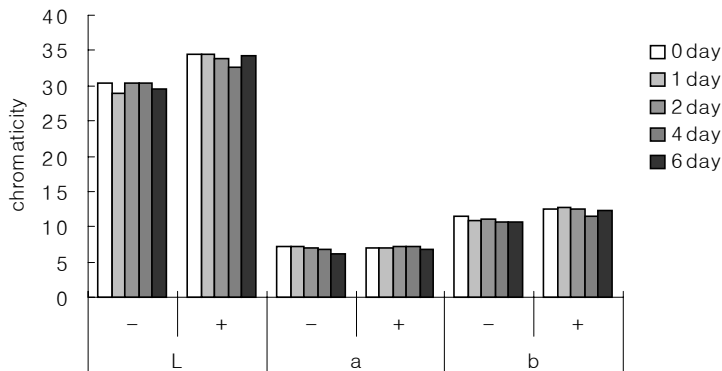


그림 7. β -glucosidase처리 전, 후 된장의 색도 변화(Hunter value)

(5) Food grade vector의 특허화

Food grade vector를 특허 출원하였다 (특허출원 제2002-34094호),
(국제특허출원:출원번호 PCT/KR03/01170)

제 4장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

기본과제 : 생명공학기술로 생산된 효소와 식용균주를 이용한
전통장류식품 제조기술개발

1. 기술개발의 최종 목표

본과제 주관연구그룹에서는 β -1,4 glycosidic bond를 가수분해할 수 있는 우수한 활성을 가진 β -glucosidase 유전자를 오랫동안 식용하여온 생물체로부터 분리하였으며 이를 이용하여 β -glucosidase를 대량생산하고 공기반 장류식품제조 공정에 도입하여 골다공증 및 암억제 활성물질이 증가된 장류제품을 상품화하고자 한다. 또 한편으로는 기존 장류발효에 이용되는 균주 중 β -glucosidase 생산능이 도입된 *B. subtilis*(협동과제2) 균주를 개발하고 이를 이용하여 골다공증 및 항암활성성분이 다량 함유된 고기능성 전통장류식품의 발효제조방법을 개발하여 신기능성 도입으로 부가가치가 향상된 한국 전통장류식품을 생산하고자 한다.

1) 평가방법 및 평가항목

구 분	평가의 착안점 및 척도	
	착 안 사 항	척 도 (점수)
1차년도(2000)	<ul style="list-style-type: none"> ○ 미생물에서 안정적인 β-glucosidase 발현체계 확립여부 ○ 생산된 β-glucosidase의 효과적인 정제기술 개발 ○ 배양액에서 정제한 β-glucosidase를 콩 및 콩추출액에 적용하여 genistin을 genistein으로 생물전환하는 기법개발 	<p>30%</p> <p>30%</p> <p>40%</p>
2차년도(2001)	<ul style="list-style-type: none"> ○ 효과적으로 genistein을 정제하고 수율을 최적화하는 기법 개발 ○ 효소적 생물전환기술의 적용을 바탕으로 한 새로운 콩기반 장류식품 생산공정을 개발 	<p>30%</p> <p>70%</p>
3차년도(2002)	<ul style="list-style-type: none"> ○ β-glucosidase를 분비하는 장류발효균주 <i>B. subtilis</i>를 이용한 장류발효공정개발 ○ Genistein 함량을 증가시킨 기능성 장류식품의 개발 및 상품화 여부 ○ Genistein의 첨가와 β-glucosidase가 발현되는 발효균주에 의해 생산된 장류식품의 물성 조사 	<p>40%</p> <p>30%</p> <p>30%</p>
최종평가	<ul style="list-style-type: none"> ○ 효소 및 개발균주를 이용하여 genistin을 genistein으로 생물전환하는 방법의 효과 ○ 골다공증 및 암억제 기능이 보강된 장류식품의 상품화 여부 	<p>50%</p> <p>50%</p>

2. 연도별 연구목표 및 달성도

가. 1차년도

1) 1차년도 개발목표

- ▶ 미생물에서 안정적인 β -glucosidase 발현체계를 확립한다
- ▶ 생산된 β -glucosidase의 효과적인 정제기술 개발
- ▶ 정제한 β -glucosidase를 콩 및 콩추출액에 적용하여 genistin을 genistein으로 생물전환하는 기법개발

2) 1차년도 개발내용 및 범위

- ▶ 우수한 활성을 가진 β -glucosidase 유전자확보
특유의 넓은 기질특이성에 근거하여 일차적으로 우수한 활성을 가진 β -glucosidase 유전자를 탐색하였고 오랫동안 식용하여온 생물체로부터 유용유전자를 확보하였다.
- ▶ 확보한 β -glucosidase 유전자의 발현조건 탐색
확보한 β -glucosidase 유전자(약 1.5kb)를 발현시킨 후 그 활성 및 콩 genistin에 대한 기질특이성을 조사한 결과 *in vitro* 반응에서 genistin을 genistein으로 전환하는 효율이 90% 이상임을 확인하였으므로, 이를 미생물에서 대량 발현시키기 위한 조건을 탐색한다.
- ▶ 효소적 생물전환기술 개발의 기초 확립
생물전환공정 기술의 개발을 위하여 배양균의 탁도가 0.4 - 10이 되도록 배양한 후 IPTG를 최종 1mM 되도록 첨가하며 2-3시간 더 배양한 후 원심분리하여 세포를 회수한다. 이 균체를 2mM EDTA가 함유된 50mM Tris-HCl pH 8.0 buffer 1/10 volume에 현탁하여 세척 후 다시 원심분리하여 회수한다. 100ug/ml 농도로 lysozyme과 1% Triton X-100을 처리하여 30°C에서 15분간 반응시킨 후 sonication하여 원심분리한 후 soluble protein을 회수한다. Small scale 로 배양하여 발현된 단백질을 확인 회수하고자 할 때는 이 대장균용 발현 vector에 histidine이 C-말단에 존재하기 때문에 이것을 tag으로 이용하여 분리 할 수 있다. 즉 ion exchange나 gel filtration column을 통과시켜 회수하고자 하며 이때 대량발효 조건이나 분리회수 조건을 반복적인 실험을 통하여 확립하고자 한다.
- ▶ 정제한 β -glucosidase를 콩 및 콩 추출액에 적용하여 genistin을 genistein으로 생물전환하는 조건을 탐색하고 최적화 반응조건을 확보한다.

3) 연구개발 목표의 달성도

▶ 대장균에서 β -glucosidase의 발현을 확인하였고, affinity chromatography 기법을 이용한 정제기술을 확립하였다. 그리고 콩추출물의 genistin의 genistein으로의 생물전환에 필수적인 genistin과 genistein의 함량을 HPLC에 의한 측정방법을 확립하였다.

→ 목표대로 진행되었음 (달성도 100%)

나. 2차년도

1) 2차년도 개발목표

- ▶ 효과적으로 genistein을 정제하고 수율을 최적화하는 기법을 개발
- ▶ 효소적 생물전환기술의 적용을 바탕으로한 신기능 장류식품 생산공정을 개발

2) 2차년도 개발내용 및 범위

▶ 효과적인 genistein의 정제와 수율의 최적화

골다공증 및 항암효과 성분의 함량을 측정하고 배합원료 및 제조된 전통장류의 기능을 규격화하기 위해서는 genistein의 함량 또는 전환율의 정확한 측정이 필요하다. 이를 위해 먼저 시료를 에탄올로 추출한 후 원심분리하여 시료를 농축한다. 구체적인 분석 조건으로 3.9×150mm symmetry C18 reverse phase column을 사용하며, 전개용매는 acetonitrile / 0.05M ammonium formate 113 (pH4.0)을 27/73 (v/v)로 또는 methanol / water를 55/45(v/v)로 하여 사용한다. Flow rate는 1ml/min으로 하며 검출 파장은 260nm으로 하여 genistin과 genistein을 정량분석한다. 상기의 방법을 토대로 실제 구현 가능한 전환효율을 살펴보면 genistin의 M.W.가 432, genistein의 M.W.가 270이므로 단순히 genistin → genistein으로 전량전환 될 때의 회수율은 62.5%이다. 원 시료에서 genistin:genistein 비율을 80:20으로 볼 경우, 시료에 함유된 genistein의 양은 이론적으로는 3.5배까지, 85:15일 경우 4.5배까지 증가할 수 있을 것으로 예상되며, 3배이상 증가할 경우 산업적으로 이용 가능한 경제성 있는 수준인 것으로 판단할 수 있다.

▶ 효소적 생물전환기술의 적용을 바탕으로 한 신기능 장류식품 생산공정 개발

본 연구과제를 통해 얻어진 연구결과를 적용하여 실제로 신기능 장류제품 생산공정을 개발하고자하며, 이를 위해 우선적으로 청국장을 선택하여 생산공정개선 및 신제품 개발을 시도한다. 예상할 수 있는 개선방안은 다음 표에 정리한 바와 같다.

[기존의 청국장 제조방법 및 그의 개선]

- 1) 원료콩을 선별후 세척하고 24시간 침지
- 2) 물을 충분히 뺀 후 121℃ 30분간 증자
- 3) 50℃로 냉각하고 벗짚이 깔린 상자에 증자한 콩을 담는다.
 - ➔ 벗짚을 첨가하지 않고 본과제 개발 균주를 접종
 - ➔ 42℃로 냉각한 후 벗짚과 함께 정제한 β-glucosidase를 직접 첨가
- 4) 40℃에서 72시간 배양
 - ➔ 효소활성을 지속시킬 수 있는 배양조건 확립
 - (ex: 이때 초반 30시간은 외부적으로 가온하며, 그 이후에는 배양체 자체의 열이 형성되므로 가온하지 않음)
- 5) 배양체 수확

기존의 방법에서는 엄밀하게 구성된 산업균주 혹은 첨가물을 접종하지 않고 벗짚에 의한 자연발효를 유도하였으나, 벗짚을 첨가하지 않고 본 과제를 통해 개발한 β-glucosidase 생산 *B. subtilis* 균주를 접종하거나, 벗짚과 함께 정제한 β-glucosidase를 직접 첨가하는 방식으로 발효

과정에 관여한다. 콩 관련 발효식품 중에 청국장은 된장에 비하면 제조기간이 짧아서 약 3일 정도에 완료되며, 균총이 복잡하지 않아 사실상 *B. subtilis* 단일균주의 작용으로 발효가 진행된다. 이러한 점을 감안하여 본 과제에서는 우선적으로 청국장에 대하여 생물 전환 및 생산공정의 개선에 관한 연구를 진행하고자 하는 것이다.

3) 연구개발 목표의 달성도

- ▶ 효과적으로 genistein을 정제하고 수율을 최적화하는 기법을 개발하였으며, 효소적 생물전환 기술의 적용을 바탕으로 한 새로운 콩 기반 장류식품 생산 공정을 개발
→ 목표대로 진행되었음 (달성도 100%)

다. 3차년도

1) 3차년도 개발목표

- ▶ β-glucosidase를 분비하는 장류발효균주 *B. subtilis*를 이용한 장류발효공정을 개발
- ▶ Genistein 함량을 증가시킨 기능성 장류식품을 개발하고 이를 상품화
- ▶ Genistein의 첨가와 β-glucosidase 발현되는 발효균주에 의해 생산된 류식품의 물성 조사

2) 3차년도 개발내용 및 범위

▶ β -glucosidase를 적용한 신기능성 장류제품 개발

우선적으로 β -glucosidase를 이용한 전통장류제품의 개발을 시도한다. 기본과제의 1,2단계에서 얻어진 연구성과를 바탕으로 대량생산된 β -glucosidase을 분리, 정제한 후 전통장류 제조공정의 발효단계에 처리하여 효소적으로 활성형의 genistein을 다량 함유하여 기능이 강화된 장류를 개발하고자 한다. 또한 장류제품의 원료가 되는 콩 및 콩 추출물에 직접 적용하여 생물전환한 genistein이 다량함유 된 원료를 혼합한 장류제품도 개발하고자 한다.

▶ 발효균주 *B. subtilis*를 이용한 장류발효제품을 개발

또한 협동과제의 연구성과를 유기적으로 도입하여 장류제품의 기능개선에 활용하고자 하며, 이를 위해 협동연구기관2에서 개발된 *B. subtilis*의 장류발효균주를 이용하여 직접 전통장류제조 공정의 초기 발효단계에 처리하여 활성형의 genistein을 다량 함유한 장류를 제조한다.

▶ 연구결과의 복합적인 적용을 통한 신제품 개발

마지막으로 효소와 *B. subtilis*를 복합적으로 적용하여 제품의 품질을 향상시킨다. 원활한 산업화 및 최대한의 경제성 확보를 위해서는 한가지 방법만을 적용하는데서 그치지 않고, 생산공정의 여러 단계에서 본 과제를 통해 개발된 연구성과들을 복합적으로 적용하여 최적의 생산조건을 탐색하는 것이 중요하다.

최적의 생산효율을 얻을 수 있는 발효조건을 탐색하기 위해 대량 생산된 β -glucosidase와 *B. subtilis*를 혼합하여 적용하는 발효공정을 연구하여 활성형의 genistein을 다량함유하고 풍미를 높여 부가가치가 향상된 제품을 개발하고자한다. FDA의 genistein 일일 권장량이 성인기준으로 40mg임으로 최종함량을 조정하여 과량 섭취에 의한 부작용을 방지토록 한다.

▶ Genistein의 첨가와 β -glucosidase가 발현되는 발효균주에 의해 생산된 장류식품의 물성조사

효소적 특이성이 강한 β -glucosidase를 이용하여 genistin을 genistein으로 전환함으로써 효소처리 및 장류발효균주에 의한 장류의 물성에는 큰 변화가 없을 것으로 사료되나 효소 첨가와 장류발효균의 β -glucosidase 생산에 의한 장류식품 물성예의 영향을 조사한다. 또한 genistein이 보강된 장류식품의 저장 중 안정성도 조사한다.

3) 연구개발 목표의 달성도

- ▶ β -glucosidase를 분비하는 장류발효균주 *B. subtilis*를 이용한 장류발효공정을 개발
→ 목표대로 진행되었음 (달성도 100%)
- ▶ Genistein 함량을 증가시킨 기능성 장류식품을 개발하고 이를 상품화
→ 목표대로 진행되었음 (달성도 100%)
- ▶ Genistein의 첨가와 β -glucosidase 발현되는 발효균주에 의해 생산된 장류식품의
물성조사
→ 목표대로 진행되었음 (달성도 100%)

제 1 협동과제 : 효모 *Yarrowia lipolytica*에서 β -glucosidase 분비 생산
및 장류발효 *Bacillus subtilis*용 새로운 food grade
vector 개발

1. 기술개발의 최종 목표

식품산업에 사용되는 효모로서 균체의 독성이 없으며 세포외로 많은 단백질을 분비하는 능력을 가지고 있는 *Yarrowia lipolytica*를 이용해 β -glucosidase를 발현 생산하고 장류발효 *B. subtilis*용 새로운 food grade vector를 개발하고자 한다.

1) 평가방법 및 평가항목

구 분	평가의 착안점 및 척도	
	착 안 사 항	척 도 (점수)
1차년도(2000)	○ <i>Y. lipolytica</i> 내에 β -glucosidase gene 발현체계 구축 ○ 인체안정성 및 유전적 안정성을 중심으로 <i>B. subtilis</i> 에 이용 가능한 vector를 설계	50% 50%
2차년도(2001)	○ 형질전환된 <i>Y. lipolytica</i> 에서 β -glucosidase 생산 및 정제 ○ <i>Bacillus</i> 고유의 분비기구를 이용하기 위해 <i>B. subtilis</i> 유래 signal sequence를 food grade vector에 도입하여 안정적인 발현 및 배양외액으로의 분비시스템 구축과 과대발현을 위한 발현체계 구축	30% 70%
3차년도(2002)	○ <i>B. subtilis</i> (표준균주)내에 β -glucosidase gene을 도입한 food grade vector를 구축하고 이를 발현 ○ food grade vector의 특허화	70% 30%
최종평가	○ <i>Y. lipolytica</i> 에서 β -glucosidase를 효과적으로 과대발현 생산했는지의 여부 ○ 인체에무해한 food grade vector의 개발이 성공적으로 진행되었는지의 여부	60% 40%

2. 연도별 연구목표 및 달성도

가. 1차년도

1) 1차년도 개발목표

- ▶ *Y. lipolytica*내에 β -glucosidase gene 발현체계 구축
- ▶ 인체안정성 및 유전적 안정성을 중심으로 *B. subtilis*에 이용가능한 vector 설계

2) 1차년도 개발내용 및 범위

▶ *Y. lipolytica* 내에 β -glucosidase gene 발현체계 구축

본 과제 의 최종 목표가 인간이 섭취 가능한 식품으로서의 제품화를 목표로 하는 것이므로

발현시스템을 구축할 때에도 이와 같은 점을 고려하여야 한다. 따라서 식품산업에 이용된 효모 *Y. lipolytica*에 β -glucosidase를 분비 생산할 수 체계를 구축한다. 발현수준이 높고 세포외로 분비하는 alkaline extracellular protease 유전자(XPR2)의 promoter와 signal sequence, terminator를 이용하여 β -glucosidase 발현 vector를 만든다.

▶ 인체안정성 및 유전적 안정성을 중심으로 *B. subtilis*에 이용가능한 vector를 설계

인체에 대한 안정성을 공인받은 *B. subtilis*에서 분리한 plasmid를 바탕으로 식용가능한 vector system을 구축한 후 이를 이용하여 β -glucosidase 유전자를 도입한다. 인체안정성을 위해 표지 유전자로는 항생제 마커를 사용하지 않고, 영양요구원에 의해 선별할 수 있는 *B. subtilis* 유래의 유전자를 이용한다.

3) 연구개발 목표의 달성도

▶ *Yarrowia lipolytica* 내에 β -glucosidase 유전자 발현을 위한 vector construction을 하였으며, Food grade vector 개발을 위한 선행연구로 야생에서 분리된 pMMH1 plasmid가 *B. subtilis*에 효과적으로 형질전환될 수 있음을 확인하였고, plasmid 안정성에 영향을 미치는 인자들을 확인하였다.

→ 목표대로 진행되었음 (달성도 100%)

나. 2차년도

1) 2차년도 개발목표

▶ 형질전환된 *Y. lipolytica*에서 β -glucosidase 생산 및 정제

▶ *Bacillus* 고유의 분비기구를 이용하기 위해 *B. subtilis* 유래 signal sequence를 food grade vector에 도입하여 안정적인 발현 및 배양외액으로의 분비시스템 구축과 과대발현을 위한 발현체계 구축

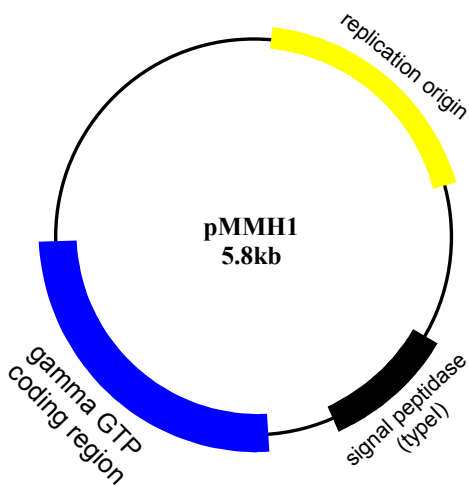
2) 2차년도 개발내용 및 범위

▶ 형질전환된 *Y. lipolytica*에서 β -glucosidase 생산 및 정제

형질전환체의 최적발현조건을 확립하고 β -glucosidase는 상등액으로 분비될 것이므로 균체분리 후 β -glucosidase를 분리 정제한다. 상등액에 존재하는 다른 단백질이 문제가 될 경우 *S. cerevisiae*의 intein 의 융합단백질로 생산한 후 chitin column chromatography를 이용하여 분리 정제한다.

▶ *B. subtilis* 고유의 wild type plasmid 이용

β -glucosidase를 발현시킬 food grade expression vector로서 *B. subtilis* 유래의 것을 사용한다. 본 연구진에서는 이러한 필요에 부응하는 wild type plasmid pMMH1을 국내의 *B. subtilis* 균주에서 분리하고 이의 분석을 실시한 바 있다. 본 연구진에서 확보하고 있는 pMMH1은 일본의 낫또와 한국의 청국장에서 주요한 물성을 구성하고 있는 γ -polyglutamate를 생합성하는 기능을 갖고 있는 인체에 무해한 plasmid로서 wild type *Bacillus*에서 안정적으로 다량의 copy 수를 유지하고 있으며 발현 효율도 매우 우수하다. 본 실험실에서 분리한 pMMH1 크기는 대략 5.8kb이며 유전자지도는 다음과 같다.



▶ Food grade vector의 설계

이러한 장점을 바탕으로 역시 인간이 상시 섭취해온 식용식물 유래의 β -glucosidase 유전자를 pMMH1 plasmid에 재조합하고 활발하게 발현이 이루어지도록 vector를 설계하고자 한다. 이를 위해 pMMH1을 바탕으로 영양요구성 선별유전자, *Bacillus*에서 이용할 수 있는 고효율의 promoter cassette를 구성한다. 이렇게 하여 얻어진 β -glucosidase expression vector는 인체에 무해한 food grade vector로서 그 산물을 안심하고 섭취할 수 있게 될 것이다.

▶ 분비 system 및 expression 체계 구축

*B. subtilis*를 산업적으로 이용하고자 할 때에 커다란 잇점으로 작용하는 것은 고유의 분비 시스템이 잘 갖추어져 있다는 점이다. 이러한 잇점을 활용하기 위하여 먼저 *Bacillus subtilis* α -amylase의 *amyR*₂ promoter와 signal sequence를 β -glucosidase 유전자와 inframe으로 연결시켜 *Bacillus* 세포내에서 발현되고 분비되도록 한다. 이 후 단계에서는 먼저 *Bacillus amyR*₂ promoter와 signal sequence가 함유된 *EcoRI*-*Bam*HI 1.0kb 단편을 다른 vector에서 분리하여 *Bam*HI-*Pst*I 1.5 kb β -glucosidase 유전자를 inframe으로 연결시킨 후 *Bacillus* expression vector pMK4에 ligation 하고 형질전환하여 그 발현여부 및 분비를 확인한다. 또한 *Bacillus*에서 분리된 levansucrase의 promoter와 signal peptide를 위에서 개발한 vector에 도입한다.

3) 연구개발 목표의 달성도

- ▶ Yeast 형질전환 기법을 이용하여 *Yarrowia lipolytica*내에 발현 vector를 삽입하였으며
 - β -glucosidase 분비를 확인하였다.
 - 목표대로 진행되었음 (달성도 100%)
- ▶ food grade vector를 특허 출원하였다 (특허출원 제2002-34094호).
 - 목표대로 진행되었음 (달성도 100%)

다. 3차년도

1) 3차년도 개발목표

- ▶ *B. subtilis*(표준균주)내에 β -glucosidase gene을 도입한 food grade vector를 구축하고 이를 발현
- ▶ Food grade vector의 특허화

2) 3차년도 개발내용 및 범위

- ▶ *B. subtilis*(표준균주)내에 β -glucosidase gene을 도입한 food grade vector를 구축하고 이를 발현
장류발효균주에 food grade vector를 이용한 기초연구로 위에서 개발된 food grade vector에 β -glucosidase를 도입한 후 *B. subtilis* (표준균주)에 형질전환한다.
- ▶ Food grade vector의 특허화
*Bacillus*는 많은 발효식품에서 발견되므로 개발된 food grade vector는 식품에 기능을 첨가하기 위한 vector로서 이용성이 매우 높을 것이다. 따라서 개발된 vector를 *Bacillus*용 food grade vector로 특허화 한다.

3) 연구개발 목표의 달성도

- ▶ *B. subtilis*내에 β -glucosidase gene을 도입한 food grade vector를 구축하고 이를 발현하는데 성공하였는지의 여부
→ 목표대로 진행되었음 (달성도 100%)
- ▶ 개발된 food grade vector의 특허화 하였는지의 여부 (특허 제 2002-34094호),국제 특허도 출원(출원번호:PCT/KR03/01170)
→ 목표대로 진행되었음 (달성도 100%)

**제 2 협동과제 : *Bacillus subtilis*에서 β -glucosidase 발현체계 구축 및
장류발효용 산업균주 개발**

1. 기술개발의 최종 목표

세포외로 많은 효소를 분비하는 능력을 가지고 있는 *Bacillus subtilis*를 이용해 β -glucosidase를 발현 생산하고, 제 1 협동과제에서 개발한 food grade vector를 이용하여 β -glucosidase 유전자가 도입된 균주를 개발하여 전통장류의 발효균주로 사용하고자 한다.

1)평가방법 및 평가항목

구 분	평가의 착안점 및 척도	
	착 안 사 항	척 도 (점수)
1차년도(2000)	<ul style="list-style-type: none"> ○ 단백질 분비균인 <i>B. subtilis</i>에서 β-glucosidase의 대량 생산기술 확보 ○ <i>Bacillus</i> 고유의 분비기구를 이용하기 위해 <i>B. subtilis</i> 유래 signal sequence를 도입하여 안정적인 발현 및 배양외액으로의 분비시스템 구축 	<p>60%</p> <p>40%</p>
2차년도(2001)	<ul style="list-style-type: none"> ○ β-glucosidase의 생산 및 분리 정제 ○ 자연발효가 아닌 균주접종을 통한 장류식품의 생산가능성 타진 	<p>50%</p> <p>50%</p>
3차년도(2002)	<ul style="list-style-type: none"> ○ 장류발효 <i>B. subtilis</i>에 food grade vector를 이용하여 β-glucosidase gene을 도입한 산업균주 개발 ○ 개발한 산업균주를 적용하여 장류생산공정을 개선 	<p>60%</p> <p>40%</p>
최종평가	<ul style="list-style-type: none"> ○ <i>B. subtilis</i> (표준균주)에서 β-glucosidase 생산 체계구축이 성공적으로 진행되었는지의 여부 ○ 장류제품생산에 이용할 수 있는 신기능성 산업균주를 개발하였는지의 여부 	<p>60%</p> <p>40%</p>

2. 연도별 연구목표 및 달성도

가. 1차년도

1) 1차년도 개발목표

- ▶ 효소 분비균인 *B. subtilis*에서 β -glucosidase의 대량 생산기술을 확보한다.
- ▶ *Bacillus* 고유의 분비기구를 이용하기 위해 *B. subtilis* 유래 signal sequence를 도입하여 안정적인 발현 및 배양외액으로의 분비시스템 구축

2) 1차년도 개발내용 및 범위

▶ 인체에 무해한 균주개발에 대한 요구

본 과제 의 최종 목표가 인간이 섭취 가능한 식품으로서의 제품화를 목표로 하는 것이므로 *B. subtilis*에서 발현시스템을 구축할 때에도 이와 같은 점을 고려하여야 한다. 위에 기술한 것과 같이 기존에 이용되고 있는 *Bacillus*에서 이용가능한 발현 vector들은 대부분 타균주에서 도입한 것으로서 미국 FDA에 의해 무조건적으로 인간에게 안전함을 공인받은 *B. subtilis*와 비교할 때 식용가능성이라는 점에서 차이가 있다.

- ▶ 이종 단백질 대량발현시 분리정제 과정에 비용이 많이 소모되며 때로는 inclusion body가 형성되어 overexpression된 효소단백질을 분리하는데 어려움이 많다. 따라서 β -glucosidase를 자연적인 단백질 분비능력을 가지고 있으며 균체의 독성이 없어 유용산물의 숙주균으로 연구되고 있는 *B. subtilis* 표준균주에서 대량생산, 분비되도록 하기 위하여 그 유전자를 *B. subtilis* 표준균주에 도입한다.

- ▶ 도입한 plasmid의 안정성을 위하여 chromosomal DNA에 삽입시킬 수 있는 방안을 모색한다. 즉 prophage vector pYCL1을 이용하여 phage induction시 대량발현될 수 있도록 조작한다. 이 prophage vector의 장점은 phage 성질은 상실한 채로 외부 유전자가 chromosomal DNA에 삽입되게 하므로 그 외래 유전자가 상당히 안정적이며 temperature shift로 phage induction 시 대량발현될 수 있는 것이다.

3) 연구개발 목표의 달성도

- ▶ 표준균주 *B. subtilis*에서 β -glucosidase를 효과적으로 분비생산하기 위해 p43 promoter와 levansucrase의 signal peptide를 이용하여 발현 vector를 construction하였다.
→ 목표대로 진행하였음 (달성도 100%)

나. 2차년도

1) 2차년도 개발목표

- ▶ β -glucosidase의 생산 및 분리 정제
- ▶ 자연발효가 아닌 균주접종을 통한 장류식품의 생산가능성 타진

2) 2차년도 개발내용 및 범위

▶ β -glucosidase의 생산 및 분리 정제

β -glucosidase가 도입된 *Bacillus* 형질전환체의 최적 발현 조건을 확립하고 제 1 협동 과제에서 개발된 분리 정제방법을 응용한다.

▶ 자연발효가 아닌 균주접종을 통한 장류식품의 생산가능성을 타진함.

지금까지 콩기반 장류제품의 생산은 과학적으로 확립한 표준균주의 접종에 의하지 않고, 지푸라기 혹은 공기중의 부유균에 의한 자연발효를 주로하여왔다. 그러나, 이와같은 방식으로는 체계적으로 품질을 개선할 수 없으므로 확립된 균주를 접종하여 장류발효를 진행하는 방안을 탐색한다.

3) 연구개발 목표의 달성도

▶ β -glucosidase의 생산 및 분리 정제

→ 목표대로 진행하였음 (달성도 100%)

▶ 자연발효가 아닌 균주접종을 통한 장류식품의 생산가능성 타진 여부

→ 목표대로 진행하였음 (달성도 100%)

다. 3차년도

1) 3차년도 개발목표

▶ 장류발효 *B. subtilis*에 food grade vector를 이용하여 β -glucosidase gene을 도입한 산업균주 개발

▶ *Bacillus subtilis*에서 분비시스템이 잘 갖추어진 genistein 생산 균주를 특허화

2) 3차년도 개발내용 및 범위

▶ 장류발효 *B. subtilis*에 food grade vector를 이용하여 β -glucosidase gene을 도입한 산업균주 개발

제 1 협동과제에서 개발된 food grade vector를 이용하여 β -glucosidase를 위에서 선발한 장류발효균주에 도입한다. *Bacillus*의 경우 한 균주내에 유사한 replication origin을 가진 두 종의 다른 plasmid 및 vector가 존재하기 힘든 *Bacillus* 자체의 미생물학적 특성에 기인한다. *Bacillus*의 wild type strain은 대부분의 경우 plasmid 혹은 phage를 포함하고 있으므로 본 연구에서 개발한 vector 시스템을 형질전환하고 그것을 안정적으로 유지하기 위해 미리 대상 *B. subtilis* 균주를 가혹한 조건에서 연속계대하는 등의 방법으로 curing하여 원래의 plasmid를 제거하는 사전조작을 한다. 일반적으로 야생 *Bacillus*는 형질전환이 어려우므로 electroporation에 의한 형질전환을 시도한다.

▶ 개발한 산업균주 *B. subtilis*를 이용한 장류발효제품을 개발

타 협동과제의 연구성과를 유기적으로 도입하여 장류제품의 기능개선에 활용하는데, 이를 위해 본과제에서 개발한 산업균주 *B. subtilis*을 전통장류의 발효균으로 사용하여 활성형의 genistein을 다량 함유한 장류를 제조하며 이의 실제적인 실행은 기본과제를 수행하는 ' (주) B&C '에 기술이전하여 실시하도록 한다.

3) 연구개발 목표의 달성도

▶ 장류발효 *B. subtilis*에 food grade vector를 이용하여 β -glucosidase gene을 도입한 산업균주 개발 여부

→ 목표대로 진행하였음 (달성도 100%)

▶ 개발한 산업균주를 적용하여 장류생산공정을 개선하여 기본과제에 성공리에 적용하였는가의 여부

→ 목표대로 진행하였음 (달성도 100%)

제 5장 연구개발결과의 활용계획

1. 활용방안 및 사업화 계획

1) 활용방안

이상과 같은 연구계획이 성공리에 수행될 경우 우선 기술적인 면에서 식용가능균주에서 이용할 수 있는 안정적이고도 인체에 안전한 발현 vector의 개발 및 이를 이용한 β -glucosidase의 발현기법과, genistein의 생물전환에 관한 국내외 특허의 출원과 논문 발표가 기대된다.

또한 본 연구는 국내외 다른 연구그룹과는 다르게 고부가가치를 창출할 수 있는 응용적 연구에 그 초점을 맞추어 경제성과 기질특이성이 있는 식용가능한 생물체 기원의 β -glucosidase를 산업적으로 이용할 수 있도록 대량발현 및 분비 system을 구축하고 이를 통해 고기능성 콩기반 발효식품을 개발하고자 하는 것으로서, 이 연구가 성공적으로 이루어진다면 그 산업적인 파급효과가 크리라 예상된다.

실제적으로는 이러한 연구성과를 식품생산공정에 적용하여 미생물생산 산업효소를 이용한 생물학적 생물전환을 통해 항암 및 골다공증 예방 및 치료성분이 함유된 기능성 콩 발효제품의 개발과 이의 상품화가 가능할 것이다. 콩발효식품은 극동지역을 중심으로 널리 섭취되어 왔으며, 건강식품에 대한 일반인의 인식이 날로 새로워지고 있는 양상을 볼 때 genistein의 함량이 증가된 새로운 기능성 식품 및 관련 아이템의 상품화가 이루어지면 식생활의 서구화로 점차 전통식품을 멀리해오던 소비자들에게까지 그 시장이 크게 확대될 것이며, 항암효과 및 골다공증 치료제의 활성을 가진 식품으로서 서구지역에서 새로운 수요를 창출하게 될 것이다.

콩 또는 콩 추출물 자체에 대량생산한 β -glucosidase를 적용하여 효소적인 방법으로 genistein을 대량생산한 후 이를 건강식품 및 의약품으로 상품화하는 사업에도 활용할 계획이다.

2) 사업화 계획

본 연구과제가 성공적으로 진행될 경우 연구결과의 실용화를 위해 다음과 같은 방법으로 자금을 조달하고 사업화를 추진할 계획이다.

㉠ 자금조달계획

① 회사의 자체 자본금을 이용한다.

본 사업계획의 1차 및 2차 년도 사업계획이 진행되는 동안 당사는 2억원 정도의 유상증자를 실시할 계획이며 증자자본금 중 절반을 본 사업계획의 성공을 위해 투자한다.

② 중간기술을 상품화한 자금을 이용한다.

본 사업계획의 1차 및 2차 년도 사업계획을 진행하면서 중간에 상품화가 가능한 중간체 및 기술을 선별, 발전시켜 기술수출 및 중간체 공급방식 등으로 판매하여 연구 사업자금을 마련할 계획이다.

⑥ 생산 및 판매 계획

본 사업의 결실로 나타나는 판매(Marketing)에 있어서 신규로 기존 형성시장에 진입하는 당사는 기존 제품과는 차별되는, 고 기능성 제품의 차별성에 주 관점을 두고 시장 진입 목표를 갖는다. 이를 위해서는 관련 학계로부터 효능을 검증 받아 학계 및 언론 등을 통하여 일반인들에게 홍보하고 식품 전시회 등을 적극 활용하여 효능 및 섭취의 필요성을 부각시키고, 소비자들에게 인지도를 확대시켜 생소감을 제거함과 동시에 신 기능성 식품의 섭취필요성을 인정하게 함으로서 잠재소비력을 증대시키고 소비자들이 신 기능성 식품에 쉽게 접근할 수 있도록 유도한다.

초기에 식품생산 시설투자비가 상당하므로 당사는 본 제품의 원료를 생산하여 (주)이삭식품 등의 기존 식품생산 기업과 협력하여 외주생산 및 판매를 한다. 아울러 경쟁력이 있는 식품생산 기업과는 본 신기능성 물질이 첨가된 제품을 주문생산방식으로 구축된 판매망을 통하여 판매한다. 나아가 기존제품에 골다공증 및 암 예방기능이 첨가된 다양한 신 기능성 식품을 해외로 수출하고자 한다.

제6장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

1. 일본내 이소플라본 시장 규모

콩 이소플라본이 일본 식품시장에서 유력한 소재로 떠오르고 있다. 콩이 식문화에 뿌리 내린 역사가 짧은 구미 나라들에서 근년 그 기능성에 착안, 콩 이소플라본을 건강보조식품의 주소재로 많이 이용하고 있는데 비해 일본에선 그동안 주로 건강보조식품의 부소재나 건강지향 일반식품에 배합하는 용도로 많이 이용해 왔다. 그런데 올해들어 일본에서도 주소재로 사용한 상품이 잇따라 발매되고 있어 콩 이소플라본이 부소재에서 주소재로 바뀌고 있는 경향이다. 현재 일본의 콩 이소플라본 시장은 규모가 80억엔 정도인 것으로 추계되고 있다.

2. Natto

캘리포니아 사우살리토에 있는 예방의학연구소 이사인 Dean Ornish박사에 따르면, 일본 남성의 전립선염의 발생률은 미국인의 4이다. 그러나 미국으로 이민간 일본남성의 전립선염 발생률은 절대적으로 상승한다. 일본에 살고 있는 일본남성의 암 발생률이 낮은 이유는 동물성 식품대신에 콩식품의 소비가 높기 때문이라고 한다.

이는 phytoestrogen과 콩에서 공급되는 인프라빈(infrabin)이라는 파이프와 같이 란형(卵形;flavonoid)의 형태를 지닌 색소성분의 항암효과 때문이다.

캘리포니아 의과대학 Amy s. Lee박사는 콩에서 대량으로 공급되는 것으로 쥐의 암세포 증식을 감소시키는 제니스테인(genistein)이라는 flavone과 유사한 형태의 물질을 보고하였다. Lee박사는 동양인들은 미국인 보다 콩을 20~30배나 소비하고 있는데, 이는 유방암, 피부암, 대장암과 편도선의 발병 빈도와 콩 소비량과의 정반대의 현상을 보이고 있다고 한다. 그러나 그녀는 이것이 실제의 경우와 같은지 확신하기 위해서는 좀더 세밀한 연구가 필요하다고 주의를 주고 있다.(국립암연구소 저널, 1988. 4.)

하와이 암센터는 1997년 제니스테인(genistein), 다이제인(daizein)과 콩이 공급하는 flavone과 유사한 또다른 형태가 자궁암 예방에 효과적이었다는 사실을 보여 주었다고 보고했다. 또다른 연구결과는 그것이 신장(콩팥)과 유방암에 저항력이 있었다는 사실을 보여 주었다.

3. 일본과 미국에서 Genistein을 이용한 건강식품 판매

1)일본 기꼬만사는 최근 체내 흡수성이 높은 콩아이소플라본 아글리콘(비당체성분)이 30% 이상 함유된 건강식품소재 「소이악트」는 누룩균 발효로 미리 당을 분리한 아이소플라본 아글리콘을 주성분으로 삼은 소재. 동물실험에서 종래 발매된 배당체인 아이소플라본보다 체내 흡수율이 높은 것으로 밝혀졌다. 아이소플라본은 여성호르몬과 같은 작용을 갖고 있는 식물성분으로 콩 속엔 약 95%가 배당체로 존재한다. 그러나 이러한 형태로는 체내에 흡수되지 않는다.장내 세균에 의해 당과 아글리콘(비당체성분)으로 분리됨으로써 비로서 흡수되는 형태로 되는데 섭취량에 대한 흡수량의 비율은 높지 않다. 이번에 기꼬만사에서 개발한 「소이악트」는 미리 당과 아글리콘을 분리하기 위해 콩을 동째로 누룩균으로 발효시켜(거의 1백%분리) 제품으로 만든 것. 랫드를 사용한 아이소플라본 아글리콘의 섭취시험에선 배당체 보다 체내 흡수율이 2배나 높았다. 또한 동사는 콩아이소플라본내에서 다이제인 보다 제니스틴이 활성이 크다는 것을 확인, 제니스틴 함량이 더 많은 제품을 개발해낸 것이 특기할만한 성과다. 통째의 콩 속에 있는 아이소플라본 함유율은 약 0.3%인데 비해 배아 중엔 약 2% 함유, 배아를 원료로 하는 것이 유리하지만 제니스틴 함유율로 비교하면 동째의 콩엔 제니스틴이 약 50% 들어 있는데 대해 배아엔 10% 함유로, 콩을 동째로 사용하는 것이 유리하다. 그래서 원료로선 콩을 동째로 사용하고 있다. 현재 자원자들을 대상으로 체내흡수율 측정시험이 실시되고있다.

2) 세계적인 콩단백 메이커인 미국의 센트럴소야사(인대이나 소재)는 물추출법으로 아이소플라본이 풍부히 함유된 기능성 농축콩단백을 개발 「소야리치(SOYA RICH)」란 상품명으로 발매했다. 농축콩단백은 단백질 식이섬유 칼륨 칼슘 마그네슘 철분 엽산 등의 영향을 균형있게 섭취할 수 있는 건강식품 소재로 알려져 있는데 동사에선 새로운 제법으로 콩아이소플라본이 더욱 풍부히 함유된 소재를 제조하는데 성공한 것이다.

「소야리치」에는 I형 T형 B형의 세 타입이 있다. 이들엔 단백질 함량은 64~65% 탄수화물 22.3~25.5% 식이섬유도 20~23.6% 들어있다. 그리고 I형과 T형엔 제니스틴을 주성으로 한 아이소플라본이 1g당 2.25mg 함유돼 있다. 이 제품들을 약 15g 사용한 단백질바는 3~10g의 단백질과 3g의 식이섬유 25mg의 아이소플라본을 섭취할 수 있도록 한다.

식감과 풍미가 좋은 시리얼바를 만드는데 최적의 소재라고 동사에서 말하고 있다.

「소야리치」는 분말음료 믹스나 뉴트리션바(영양보급용 스낵) 및 시리얼에 고품질의 단백질과 높은 수준의 아이소플라본 등 영향을 강화할 수 있다.

「소야리치T」는 플레이크(얇은 조각)모양의 소재. 4분의 1인치와 8분의 1인치 크기 그리고 색깔은 캐러멜색과 무색의 것이 있다. I형과 마찬가지로 영양보급용 스낵이나 시리얼에 좋은 식감과 조직을 준다. 채식주의자들을 위한 앙트레나 햄버거 등에 사용할 수 있다.

「소야비치B」는 아이소플라본 함량은 종래 제품과 다르지 않으나 밝은 색조의 분산성과 유동성이 좋은 분말제품. 나트륨 함량이 적고 알콜추출로 단백질 함량이 많음에도 불구하고 식감이 좋은 소재란 평판이다. 그렇기 때문에 단백질 음료나 영양보급용 스낵 등의 고품질 제품을 만드는데 이용할 수 있다.

3) 나카니시산업(주). 콩 아이소플라본과 감자녹말 유래의 칼슘을 배합한 건강보조식품 '후지후라본칼가드'였다.

4) 야마노우치제약그룹 계열인 (주)산월의 '이소플라본'은 지난해 7월 발매 이래 매월 판매실적이 신장되고 있다. 또한 (주)산월에선 콩 아이소플라본을 주소재로 사용하고 산호 분말 등을 배합한 골다공증 대응 제품도 약국 등에서 판매하고 있다.

5) 기꼬망(주)에선 6월에 '하쓰라쓰물어'를 발매했다. 이 제품엔 콩 아이소플라본을 주소재로 사용하고 비타민K₂, D, D-드로마이트 콜라겐(교원질) 포도씨 추출물을 배합, 혈관과 뼈의 노화를 방지하는 효능을 내세움으로써 갱년기 이후 여성들을 겨냥하고 있다.

6) 메디에트(주)에선 주로 젊은 여성층을 고객으로 겨냥한 건강보조식품 '본빌더'를 9월에 발매했다. 이 제품은 원래 야쿠르트스와로즈팀이 설계한 제품으로 아이소플라본을 중심으로 칼슘 마그네슘 비타민류가 균형있게 배합됐다.

7) (주)호넨코퍼레이션이 大豆 이소플라본을 발매했다. 이 제품은 콩 아이소플라본 이외에 크랜베리 추출물과 실오일(seal oil)을 배합한 제품으로 4~6살로 성인이 하루에 필요한 아이소플라본 권장량 30~50mg을 섭취할 수 있다.

8) 유니카식품(주)은 콩 아이소플라본에 독자적인 기술로 제조한 이온화(化)칼슘 `유니칼칼슘'을 배합한 `이소플라본 유니칼'을 발매했다. 이 제품은 상어 지느러미 추출물도 배합(제법특허)하여 칼슘 흡수를 촉진하고 흡수된 이 칼슘을 콩 아이소플라본이 체내에서 효율적으로 축적시키는 기능이 있다는 것을 내세우고 있다. 콩 아이소플라본과 유니칼의 배합기술은 제법특허 출원 중이다. 그밖에 아미노업화학에선 의료용 제품으로 `GCP'을 발매했다. 이 제품은 버섯을 배양할 때 생기는 베타글루코시다제와 콩 아이소플라본의 일종인 제니스틴을 반응시켜서 얻은 소재를 사용하고 있다. 제니스틴과 버섯다당체의 복합적 작용이 있다는 것을 내세우고 있다.

9) 오다큐(小田急)백화점 신주쿠점의 `건강플라자'에서도 “콩 관련 건강차“ 는 이소플라본이 들어 있기 때문” 이란 이유로 구입하는 예가 많아 소비자들 사이에서 이소플라본 인지도가 높다는 것을 알 수 있다고 백화점 관계자는 말하고 있다. 게다가 차 제품은 손쉽게 이소플라본을 섭취할 수 있다는 점이 소비자들의 호응을 얻고 있다. 오다큐백화점에선 같은 콩 관련 건강차들 중에서도 라이프 메이트(주)의 `오카라(비지)차'가 최근 가장 잘 팔리는 제품으로 손꼽고 있다. 이 제품은 맛이 좋아서 납두(納豆)나 콩비지를 싫어하는 사람도 마실 수 있다는 점과 이소플라본 함유량이 많다는 점을 내세우고 있다.

10) 후지코(주)에서도 콩 아이소플라본 함유량이 많은 건강지향형 청량음료 `대두아다'를 판매하고 있다. 이 제품은 `30세 이상 여성들을 위한 건강차'임을 내세워 통신판매 중이다.

제 7장 참고문헌

Brozobohaty, B., I. Moore., P. Kristofersen., L. Bako., N. Compos., J. Schell, and K. Palme. 1993. Relaxe of acrive cytokinin by a β -glucosidase localized to the maize root meristem. *Science*. 262(12):1051-1054.

Cassidy, A., S. Bingham, and K. D. Setchell. 1994. Biological effects of a diet of soy protein rich in isoflavones on the menstrual cycle of premenopausal women. *Am. J. Clin. Nutr.* 60:333-340.

Compos, N., L. Bako., J. Feldwisch., J. Schell, and K. Palme. 1992. A protein from maize labelled with azido-IAA has novel β -glucosidase activity. *Plant J.* 2:675-684.

Ferguson, D.J. and T. J. Anderson. 1981. Morphological evaluation of cell turn-over in relation to the menstrual cycle in the 'resting' human breast, *Br. J. Cancer*, 44:177-181.

Greiner, L. L., T. S. Stahly, and T. J. Stabel. 2001. The effect of dietary soy genistein on pig growth and viral replication during a viral challenge. *J. Anim. Sci.* 79(5):1272-1279.

Ishimi, Y., N. Arai., X. Wang., J. Wu., K. Umegaki., C. Miyaura., A. Takeda, and S. Ikegami. 2000. Diffence in effective dosage of genistein on bone and uterus in ovariectomized mice. *Biochem. and Biophy. Res. Com.* 274:697-701.

Kim, H., J. Xu., Y. Su., H. Xia., L. Li., G. Peterson., J. Murphy-Ullrich, and S. Barnes. 2001. Actions of the soy phytoestrogen genistein in models of human chronic disease: potential involvement of transforming growth factor beta. *Biochem. Soc. Trans.* 29(2):216-222.

Pagliacci, M. C., M. Smacchia., G. Migliorati., F. Grignani., C. Riccardi, and I. Nicoletti. 1994. Growth-inhibitory effects of the natural phytoestrogen genistein in MCF-7 human breast cancer cells. *Eur. J. Cancer.* 30:1675-1682.

Verma, S. P., E., Salamone, and B. Goldin. 1997. Curcumin and genistein, plant natural products, show synergistic inhibitory effects on the growth of human breast cancer MCF-7 cell induced by estrogenic pesticides. *Biochem. and Biophys. Res. Com.* 233:692-696.

Zhang, Q. H., Y. Z. Hu., S. S. Zhou, and F. Z. Wang. 2001. Inhibitory effect of genistein on the proliferation of the anterior pituitary cells of rats. *Sheng Li Xue Bao.* 53(1):51-54.

Choi, S. Y., Cheigh, M. J. (1999). Growth suppression effect of traditional fermented soybean paste (*Doenjang*) on the various tumor cells. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 28: 458~463.

Hessler, P. E., Constantinou, A. I. (1997). Isolation of isoflavones from soybased fermentations of the erythromycin producing bacterium *Saccharopolyspora erythraea*. *Appl. Microbiol. Bio-technol.* 47: 398~404.

Kim, S. H., Lee, Y. J. (1999). Isolation of angiotensin converting enzyme inhibition from *Doenjang*. *Korean J. Food Nutr.* 31: 848~854.

Lee, M. H., Park, Y. H. (2002). Isoflavone content in soybean and its processed products. *Korean J. Food Sci. Technol.* 34: 365~369.

Lee, S. K., Kim, N. D. (2002). Development of traditional *Doenjang* improvement in color. *Korean J. Food Sci. Technol.* 34: 400~406.

Wang, H. J., Murphy, P. A. (1994). Isoflavone composition of American and Japanese soybean in Iowa: Effects of variety, crop year, and location. *J. Agric. Food Chem.* 42: 1674~1677.

USDA-Iowa state university database on the isoflavone contents of foods (1999).