



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2013-0083174  
(43) 공개일자 2013년07월22일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

*C12P 19/04* (2006.01) *C12N 9/14* (2006.01)  
*C12R 1/225* (2006.01)

(21) 출원번호 10-2012-0003783

(22) 출원일자 2012년01월12일

심사청구일자 2012년01월12일

(71) 출원인

연세대학교 원주산학협력단

강원도 원주시 흥업면 연세대길 1

(72) 발명자

윤성식

경기도 성남시 분당구 이매동 110 동신아파트 906  
동1502호

송태석

경기도 오산시 은계동 신현대아파트 101동 1410호

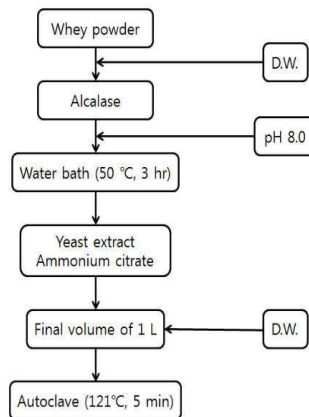
전체 청구항 수 : 총 10 항

(54) 발명의 명칭 유산균 추출물 및 유청을 이용한 갈락토올리고당의 제조방법

(57) 요약

본 발명은 유산균 배양용 유청배지에서 유산균을 배양하는 단계; 및 상기 유산균을 갈락토올리고당 생산용 유청 배지에 적용하여 갈락토올리고당을 생산하는 단계를 포함하는 신규한 갈락토올리고당의 제조방법을 제공한다. 본 발명에 따르면, 프로바이오틱스와 동시에 섭취할 수 있는 갈락토올리고당을 제공할 수 있다. 본 발명에 따르면, 종래 제조 공정에 비해 갈락토올리고당의 생산 비용을 현저하게 감소시킬 수 있다는 이점이 있다.

대표도 - 도1



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	109149-3
부처명	정부/농림수산식품부
연구사업명	농림기술개발
연구과제명	치즈유청을 이용한 프레마이오틱스 및 고부가가치성 특수 식푸소재의 개발
주관기관	연세대학교 산학협력단
연구기간	2009.04.10 ~ 2012.04.09

---

## 특허청구의 범위

### 청구항 1

다음의 단계를 포함하는 갈락토올리고당의 제조방법:

- (a) 유산균 배양용 유청배지에서 유산균을 배양하는 단계;
- (b) 상기 유산균을 갈락토올리고당 생산용 유청배지에 적용하여 갈락토올리고당을 생산하는 단계.

### 청구항 2

제 1 항에 있어서, 단계 (a) 및 (b) 사이에 상기 유산균으로부터 유산균 조효소액을 제조하는 단계를 추가적으로 포함하는 제조방법.

### 청구항 3

제 1 항에 있어서, 상기 유산균 배양용 유청배지는 10-15 중량%의 유청분말을 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

### 청구항 4

제 1 항에 있어서, 상기 유산균 배양용 유청배지는 효모 추출물(yeast extract)을 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

### 청구항 5

제 1 항에 있어서, 상기 유산균은 *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus confusus*, *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus delbrueckii*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactococcus lactis*, *Leuconostoc mesenteriodes*, *Lactobacillus helveticus* 및 *Lactobacillus paracasei*로 구성된 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 방법.

### 청구항 6

제 1 항에 있어서, 상기 유산균 조효소액은 락타아제(lactase)를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

### 청구항 7

제 2 항에 있어서, 상기 유산균 조효소액은 고정화(immobilization) 되어 있는 것을 특징으로 하는 방법.

### 청구항 8

제 1 항에 있어서, 상기 갈락토올리고당 생산용 유청배지는 20-40 중량%의 유청분말을 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

### 청구항 9

제 1 항에 있어서, 상기 갈락토올리고당 생산은 25℃-35℃의 온도 조건에서 실시하는 것을 특징으로 하는 방법.

## 청구항 10

상기 제 1 항 내지 제 9 항 어느 한 항의 방법에 의해 제조된 갈락토올리고당.

## 명세서

### 기술분야

[0001] 유산균 추출물 및 유청을 이용한 갈락토올리고당의 제조방법에 관한 것이다.

### 배경기술

[0002] 우유와 유제품의 주요 탄수화물인 유당은 포도당과 갈락토오스로 구성된 이당류로 모든 포유동물의 젖 속에만 함유되어 있으며, 우유 100 g 당 4-5 g의 유당이 함유되어 있다. 그러나 유당은 대다수의 아프리카 흑인 및 아시아 황인 성인들에게 영양학적으로 문제를 야기하는 물질이다. 소장 내에 유당을 분해할 수 있는 효소가 부족하여 섭취된 유당을 분해하지 못하므로 발생하는 복부팽만, 복통, 경련, 설사 등의 증상을 일으키는 유당불내증 또는 유당소화장애증(lactose intolerance)로 인하여 우유의 소비 감소나 유제품 제조 시 품질저하 등의 문제를 야기시켜 왔다(Jang *et al.*, *Korean J. Food Sci. Technol.*, 22(4), 426-433(1990)).

[0003] 유청은 치즈 제조 시 커드로부터 방출되는 불투명하고 황록색의 액체로서 최근 치즈의 소비가 늘어남에 따라 생산량도 늘어나고 있으며 탈지분유 대용품 등으로 중요하게 인식 되고 있는 유가공 부산물이다. 치즈 1 kg을 생산할 때 발생하는 평균 유청의 양은 치즈 생산량의 9배인 9 kg이 된다(Yoon *et al.*, *Korean J. Food Sci., Ani. Resour.*, 17(1), 38-44(1997)).

[0004] 유산균은 소장에 존재하여 유산균이 생장함에 따라 젖산을 분비하여 장내 pH를 낮춰 줌으로서 유해균의 생장을 억제하는 “프로바이오틱스(probiotics)”로 잘 알려져 있다. *Lactobacillus acidophilus*는 최초로 발견된 프로바이오틱스이고, 이후 다른 유산균종의 프로바이오틱스 효능에 대한 연구들이 활발히 진행되어 왔다. 또한 유산균은 유당불내증의 완화(Mcdonough *et al.*, *Am. J. Clin. Nutr.*, 45, 570-574(1987))와 콜레스테롤을 낮추는 역할(Holzappel *et al.*, *Int J Food Microbiol.* 26;41(2):85-101(1998)), 대장암의 위험 감소(Sanders, *Int. Dairy J.*, 8, 341-347(1998))등 많은 연구가 이루어지고 있다.

[0005] 생활수준이 향상됨에 따라 건강에 대한 관심이 높아졌고, 국내 식품 회사들도 안전한 천연식품소재 개발에 많은 노력을 기울이고 있다. 이러한 노력의 결과로 다양한 올리고당 제품이 개발 및 시판되고 있다. 올리고당은 당질원료에서 얻은 당액을 가공한 것으로 현재 생산되고 있는 올리고당은 프락토올리고당(fructooligosaccharide), 말토올리고당(maltooligosaccharide), 이소말토올리고당(isomaltooligosaccharide), 갈락토올리고당(galactooligosaccharide, GOS) 등이 있다. 프락토올리고당은 1개 이상의 과당분자가 결합되도록 효소를 작용시켜 얻은 당액이나 당질원료로부터 효소를 이용하여 얻은 당액을 여과, 정제, 농축한 액상 또는 분말상의 것을 말하며, 이소말토올리고당은 당질원료를 포도당 분자가 분지결합의 기본구조를 갖도록 효소를 작용시켜 얻은 당액을 여과, 정제, 농축한 액상 또는 분말상의 것을 말한다. 또한 갈락토올리고당은 당질원료를 이용하여 효소를 작용시켜 얻은 전이갈락토올리고당액 또는 사탕무, 대두 등에서 추출한 라피노스, 스타치오스의 당액을 여과, 정제, 농축한 액상 또는 분말상의 것을 말하며, 말토올리고당은 당질원료를 이용하여 3-10개의 포도당 분자가 직쇄 결합되도록 효소를 작용시켜 얻은 당액을 가공한 액상 또는 분말상의 것을 말한다(식품공전, 2009).

[0006] 이들 올리고당은 소장에서 분해되지 않고 대장까지 가서 장내 유용세균인 비피더스균(*Bifidobacteria*)의 증식인자로 작용하여 장내의 대장균, 장구균 및 부패성세균의 증식을 억제한다. 뿐만 아니라 영양소의 합성, 신진대사의 촉진, 면역기능의 증진과 장의 운동 촉진에 따른 변비의 개선효과를 나타내어 당뇨 등으로 당 섭취가 제한되는 사람에게 유용하다. 또한, 조제분유, 음료수, 아이스크림, 빵 등의 식품소재, 의약품 및 가축사료로도 이용되고 있다(Kim C. R., *Korean J. Food Nutr.*, 12(1), 50-54(1999)).

[0007] 장내 유익 세균인 비피더스균의 증식인자로 올리고당의 기능성이 부각되면서 올리고당의 한 종류인 갈락토올

리고당을 제조하기 위하여 유당의 가수분해에 오랫동안 사용되어온 베타-갈락토시다아제( $\beta$ -galactosidase, EC 3.2.1.23)의 당전이(transgalactosidation/transgalactosylation) 반응을 통해 생산한다(In *et al.*, *Korean J. Food Sci. Technol.*, 29(2), 376-378(1997)). 특히, 갈락토올리고당은 모유의 성분 중에 다량 존재하며 난소 화성 물질로 현재 식품산업에서 유제품 등의 첨가제로 널리 이용되고 있다. 이러한 갈락토올리고당을 생산하는 효소인 베타-갈락토시다아제는 락타아제(lactase)라고도 하며 세균, 효모, 곰팡이 등 광범위한 미생물에 의해서 생산되고, 효소원 세균으로는 *Bacillus circulans*(Fujimoto *et al.*, *Glycoconjugate Journal*, 15, 155-160(1998)), *Bacillus megaerium*(Li *et al.*, *Appl Biochem Biotechnol*, 158, 192-199(2009)), *Bifidobacterium adolescentis*(Hinz *et al.*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 66, 276-284(2004)), *Bifidobacterium infantis*(Hung *et al.*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 58, 439-445(2002)), *Enterobacter agglomerans*(Lu *et al.*, *J. Agric. Food Chem.* 54, 4989-4998(2007)), *Lactobacillus reuteri*(Nguyen *et al.*, *FEMS Microbiol Lett.*, 269, 136-144(2007)), *Streptococcus pneumonia*(Jeong *et al.*, *J. Bacteriol.*, 191(9), 3011-3023(2009)) 등이 연구되었다. 효모로는 *Cryptococcus laurentii*(Ohtsuka *et al.*, *J. Ferment. Bioeng.*, 70(5), 301-307(1990)), *Kluyveromyces fragilis*(Ladero *et al.*, *Enzyme Micro. Technol.*, 30, 392-405(2002)), *Kluyveromyces lacits*(Kim *et al.*, *Biotechnol. Lett.*, 25, 1769-1774(2003)), *Sterigmatomyces elviae*(Onishi and Tanaka, *Appl Environ Microbiol.* Nov;61(11):4026-30(1995)) 등이 연구되었다. 곰팡이로는 *Aspergillus aculeatus*(van Casteren *et al.*, *Carbohydr. Res.*, 329, 75-85(2000)), *Aspergillus oryzae*(Todorova-Balvay *et al.*, *J. Mol. Recognit.*, 19, 299-304(2006)), *Bullera singularis*(Cho *et al.*, *Biotechnol. Lett.*, 25, 2107-2111(2003)), *Sporobolomyces singularis* 등이 연구되었다(표 1-2).

표 1

[0008]

당전이 활성을 갖는 미생물 베타-갈락토시다아제의 생화학적 특징

온도 등급	효소 유래의 계통	온도 (°C)	pH	활성 (U mg <sup>-1</sup> )	참고
호냉균 (Psychrophile)	<i>Arthrobacter psychrolactophilus</i>	10	8.0	20	Nakagawa <i>et al.</i> 2007

중온균 (Mesophiles)	<i>Aspergillus aculeatus</i>	55-60	5.4	24	van Casteren <i>et al.</i> 2000
	<i>Aspergillus oryzae</i>	30	4.8	40	Todorova-Balvay <i>et al.</i> 2006
	<i>Bacillus circulans</i>	50	5.0-6.0	5.1	Fujimoto <i>et al.</i> 1998
	<i>Bacillus megaterium</i>	40	6.0-9.0	60	Li <i>et al.</i> 2009
	<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	50	6.0	526	Hinz <i>et al.</i> 2004
	<i>Bifidobacterium bifidum</i>	37	6.5	-	Dumortier <i>et al.</i> 1994
	<i>Bifidobacterium infantis</i>	50-60	7.5	569	Hung and Lee 2002
	<i>Bullera singularis</i>	50	5.0	56	Cho <i>et al.</i> 2003
	<i>Cryptococcus laurentii</i>	58	4.3	12	Ohtsuka <i>et al.</i> 1990
	<i>Enterobacter agglomerans</i>	37-40	7.5-8.0	-	Lu <i>et al.</i> 2007
	<i>Kluyveromyces fragilis</i>	30	6.5	-	Ladero <i>et al.</i> 2002
	<i>Kluyveromyces lactis</i>	37-40	6.6-7.0	-	Kim <i>et al.</i> 2003
	<i>Lactobacillus acidophils</i>	55	6.5-8.0	230	Nguyen <i>et al.</i> 2007
	<i>Lactobacillus reuteri</i>	50	6.0-8.0	180	Nguyen <i>et al.</i> 2006
	<i>Sporobolomyces singularis</i>	30	4.0	8.7	Ishikawa <i>et al.</i> 2005
	<i>Sterigmatomyces elviae</i>	85	4.5-5.0	20	Onishi and Tanaka 1995
	<i>Sterptococcus pneumonia</i>	30	5.5-7.5	-	Jeong <i>et al.</i> 2009
	<i>Alicyclobacillus acidocaldarius</i>	65	5.5	592	Di Lauro <i>et al.</i> 2008
	<i>Bacillus stearothermophilus</i>	70	7.0	125	Chen <i>et al.</i> 2008
	<i>Caldicellulosiruptor saccharolyticus</i>	80	6.0	211	Park and Oh 2009
	<i>Geobacillus stearothermophilus</i>	65	6.5	0.5	Placier <i>et al.</i> 2009
	<i>Saccharopolyspora rectivirgula</i>	60	6.5-7.2	-	Nakao <i>et al.</i> 1994
	<i>Thermus sp.</i>	70	6.5	-	Ladero <i>et al.</i> 2002
	<i>Thermus aquaticus</i>	80	5.5	5.7	Berger <i>et al.</i> 1997
고온균 (Hyperthermophiles)	<i>Sulfolobus solfataricus</i>	75	6.5	116	Pisani <i>et al.</i> 1990
	<i>Thermotoga maritima</i>	80-85	6.5	70	Kim <i>et al.</i> 2004

[0009] Park and Oh, 2010

[0010]

미생물 베타-갈락토시다아제를 이용하여 갈락토오스로부터 갈락토올리고당 생산

생체축매	효소 유래	온도 (°C)	pH	락토스 (g L <sup>-1</sup> )	GOS <sup>a</sup> , % (Conc, g L <sup>-1</sup> )	생산성 (g L <sup>-1</sup> h <sup>-1</sup> )	참고
원 효소 (Crude enzymes)	<i>Aspergillus oryzae</i>	40	4.5	380	31	24	Iwasaki <i>et al.</i> 1996
	<i>Bacillus circulans</i>	40	6.0	46	24	2.2	Mozaffar <i>et al.</i> 1985
	<i>Bifidobacterium longum</i>	45	6.8	400	33	13	Hsu <i>et al.</i> 2007
	<i>Geobacillus stearothermophilus</i>	37	6.5	180	2[2]	0.4	Placier <i>et al.</i> 2009
	<i>Lactobacillus reuteri</i>	30	6.5	205	38	3.9	Splechtna <i>et al.</i> 2006
	<i>Penicillium sp.</i>	55	4.0	400	40[160]	-	In and Chae 1998
	<i>Talaromyces thermophilus</i>	40	6.5	200	50[100]	13	Nakkharat <i>et al.</i> 2006
정제효소 (Purified enzymes)	<i>Bullera singularis</i>	50	5.0	180	50[90]	3.9	Cho <i>et al.</i> 2003
	<i>Enterobacter agglomerans</i>	50	7.5	125	38[47]	3.9	Lu <i>et al.</i> 2007
	<i>Lactobacillus acidophils</i>	30	6.5	205	39	7.9	Nguyen <i>et al.</i> 2007
	<i>Penicillium simplicissimum</i>	50	6.5	600	31[183]	11	Cruz <i>et al.</i> 1999
	<i>Saccharopolyspora rectivirgula</i>	60	6.5	600	44[264]	-	Nakao <i>et al.</i> 1994
	<i>Sterigmatomyces elviae</i>	60	5.0	200	39[78]	3.2	Onishi and Tanaka 1995
재조합 효소 (Recombinant enzymes)	<i>Bifidobacterium infantis</i>	60	7.5	300	63[190]	13	Hung and Lee 2002
	<i>Pyrococcus furiosus</i>	80	5.0	270	22[60]	-	Bruins <i>et al.</i> 2003
	<i>Sulfolobus solfataricus</i>	80	6.0	600	53[315]	5.6	Park <i>et al.</i> 2008
	<i>Thermotoga maritima</i>	80	6.0	500	19[97]	18	Ji <i>et al.</i> 2005
	<i>Thermus sp.</i>	70	7.0	300	30[91]	-	Akiyama <i>et al.</i> 2001
	<i>Geobacillus stearothermophilus R109W</i>	37	6.5	180	23[41]	6.9	Placier <i>et al.</i> 2009
톨루엔 처리 균체 (Toluene-treated cell)	<i>Bifidobacterium bifidum</i>	39	6.8	500	20[99]	65	Tzortzis <i>et al.</i> 1996
	<i>Rhodotorula minuta</i>	60	6.0	200	38[76]	3.2	Onishi and Yokizeki 1996
	<i>Sirobasidium magnum</i>	50	-	360	38[136]	3.2	Onishi <i>et al.</i> 1996
	<i>Sirobasidium magnum</i>	50	-	360	67[242]	5.8	Onishi <i>et al.</i> 1996

고정화 효소 (Immobilized enzymes)	<i>Aspergillus candidus</i>	40	6.5	400	37[148]	87	Zheng <i>et al.</i> 2006
	<i>Aspergillus oryzae</i>	40	4.5	400	27	106	Albayrak and Yang 2002
	<i>Bacillus circulans</i>	40	6.0	46	40	4.2	Mozaffar <i>et al.</i> 1986
	<i>Bacillus circulans</i>	45	3.7	300	54[120]	4.8	Shin and Yang 1998
	<i>Kluyveromyces lactis</i>	40	7.0	400	25[99]	25	Chockchaisawasdee <i>et al.</i> 2004
	<i>Talaromyces thermophilus</i>	40	6.5	200	50	70	Nakagawa <i>et al.</i> 2006
고정화 균체 (Immobilized cells)	<i>Cryptococcus laurentii</i>	40	4.3	200	40[80]	3.6	Ozawa <i>et al.</i> 1989
	<i>Sporobolomyces singularis</i>	55	5.0	600	40[242]	8.7	Sakai <i>et al.</i> 2008

[0011] Park and Oh, 2010

[0012] 효소학적으로 베타-갈락토시다아제는 락타아제로 불리며 락토오스(lactose)의  $\beta(1\rightarrow4)$ 결합을 가수분해하여 글루코오스와 갈락토오스로 분해하는 효소이고, 락토오스로부터 잘려진 갈락토오스를 다른 락토오스에 붙이는 반응을 통해 갈락토올리고당을 생성하는 효소이다(Park *et al.*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 85, 1279-1286(2010)).

[0013] 식품가공에 이용함에 있어서 대체로 수용성효소는 그 효소활성이 불안정하고 반응 후 생성물과 효소의 분리가 어렵기 때문에 값비싼 효소의 재사용이 불가능하며, 반응공정이 연속화 되지 못하는 단점이 있다. 이의 해결책으로 효소의 고정화가 매우 유용한 방법으로 인정되어 이에 대한 연구가 활발하게 진행되고 있다(Obet *al.*, *Biochem. Educ.*, 28, 164-168(2000)), (Tanaka *et al.*, *J. Biochem.*, 77(1):241-247(1975)), (Squillante *et al.*, *J. Microencapsul.*, 20(2),153-167(2003)), (Nakkharat *et al.*, *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 23(6), 759-764(2006)).

[0014]

[0015] 본 명세서 전체에 걸쳐 다수의 논문 및 특허문헌이 참조되고 그 인용이 표시되어 있다. 인용된 논문 및 특허문헌의 개시 내용은 그 전체로서 본 명세서에 참조로 삽입되어 본 발명이 속하는 기술 분야의 수준 및 본 발명의 내용이 보다 명확하게 설명된다.

## 발명의 내용

### 해결하려는 과제

[0016] 본 발명자들은 유청배지를 이용하여 저렴하게 갈락토올리고당을 생산할 수 있는 방법을 개발하고자 노력하였다. 그 결과, 유산균 배양용 유청배지에서 유산균을 배양하는 단계; 상기 유산균을 갈락토올리고당 생산용 유청배지에 적용하여 갈락토올리고당을 생산하는 단계를 포함하는 신규한 갈락토올리고당 제조 공정을 개발하였다. 이러한 공정에 따르면, 유청배지에서 배양한 유산균을 갈락토올리고당 생산용 유청배지에 적용하여 별도의 정제과정없이 연속적으로 갈락토올리고당을 생산하여 종래 제조 공정에 비해 생산 비용을 현저하게 감소시킬 수 있음을 확인함으로써, 본 발명을 완성하게 되었다.

[0017] 따라서, 본 발명의 목적은 유청배지를 이용하여 종래 제조 공정에 비해 간편하며, 생산 비용을 현저하게 감소시킨 갈락토올리고당의 제조방법을 제공하는데 있다.

[0018] 본 발명의 다른 목적은 유청배지를 이용하여 생산한 갈락토올리고당을 제공하는데 있다.



[0019] 본 발명의 다른 목적 및 이점은 하기의 발명의 상세한 설명 및 청구범위에 의해 보다 명확하게 된다.

### 과제의 해결 수단

[0020] 본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명은 다음의 단계를 포함하는 유청배지를 이용한 갈락토올리고당의 제조방법을 제공한다:

[0021] (a) 유산균 배양용 유청배지에서 유산균을 배양하는 단계; 및

[0022] (b) 상기 유산균을 갈락토올리고당 생산용 유청배지에 적용하여 갈락토올리고당을 생산하는 단계.

[0023] 본 발명자들은 유청배지를 이용하여 종래 제조 공정에 비해 소요 시간 및 생산 비용을 현저하게 감소시킨 갈락토올리고당의 제조방법을 개발하고자 노력하였다. 본 발명자들은 유산균 배양용 유청배지에서 유산균을 배양하여 유산균을 수득하고, 이를 갈락토올리고당 생산용 유청배지에 적용하여 갈락토올리고당을 생산하는 새로운 갈락토올리고당 제조방법을 도출하였다. 종래 갈락토올리고당 생산에 필요한 락타아제의 제조는 곰팡이 또는 효모에서 이루어졌는데, 곰팡이 또는 효모의 생체 내 유입을 방지하기 위해 최종 단계에서 곰팡이 또는 효모를 제거하고 락타아제를 정제하는 단계를 포함해야 했다.

[0024] 본 발명에서는 생체에 유익한 프로바이오틱스인 유산균에서 락타아제를 생산하기 때문에 별도의 정제과정 없이 갈락토올리고당의 생산에 이용할 수 있다. 따라서, 락타아제를 포함하는 유산균의 배양 및 갈락토올리고당 생산에 이르는 일련의 과정을 별도의 정제단계를 포함하지 않고 연속적으로 수행할 수 있어 시간 및 비용을 절감할 수 있다.

[0025] 본 발명자들은 유산균 배양용 유청배지에서 유산균을 배양하는 단계; 및 상기 유산균을 갈락토올리고당 생산용 유청배지에 적용하여 갈락토올리고당을 생산하는 단계를 포함하는 신규한 갈락토올리고당 제조 공정을 구축하였으며, 이러한 공정에 따르면, 락타아제가 포함된 유산균을 유청배지에 적용하여 장내 유익세균의 증식인자인 갈락토올리고당을 생산함으로써 생체에 유익한 유산균 및 갈락토올리고당을 동시에 섭취할 수 있는 갈락토올리고당을 제공할 수 있음을 확인하였다.

[0026] 본 발명의 방법을 각 단계별로 상세하게 설명하면 다음과 같다:

[0027] 단계 (a): 유산균 배양용 유청배지에서 유산균 배양

[0028] 본 발명에 따르면, 유산균 배양에 앞서 유산균 배양용 유청배지를 제조한다.

[0029] 본 명세서에서 용어 “유산균(lactic acid bacteria)”은 탄수화물 대사의 주산물로서 유산을 생성하는 박테리아 군을 의미한다. 본 발명에서의 유산균은 당업계에 공지된 유산균에서 선택하여 사용할 수 있고, 예를 들면 *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus confusus*, *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus delbrueckii* 또는 *Lactobacillus plantarum*이며, 바람직하게는 *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus acidophilus* 또는 *Lactobacillus reuteri*이고, 보다 바람직하게는 *Lactobacillus paracasei*이다.

[0030] 본 발명에서 이용되는 유산균 배양용 유청배지는 탄소원, 질소원 및 유청성분을 포함한다. 본 발명의 유산균 배양용 배지에서 탄소원은 다양한 탄수화물이 이용될 수 있으며, 바람직하게는 글루코오스(포도당), 수크로오스(자당), 말토오스(맥아당), 프럭토오스(과당), 락토오스(유당), 자일로오스, 갈락토오스 또는 아라비노오스이고, 보다 바람직하게는 수크로오스, 프럭토오스, 글루코오스, 갈락토오스, 아라비노오스 또는 락토오스이며, 가장 바람직하게는 글루코오스이다.

[0031] 본 발명의 유산균 배양용 배지에서 질소원은 다양한 유기 질소원이 이용될 수 있으며, 바람직하게는 효모추출물(yeast extract), 소이톤(soytone), 펩톤(peptone), 쇠고기추출물(beef extract), 트립톤(tryptone) 또는 카시톤(casitone)이고, 보다 바람직하게는 효모추출물, 펩톤, 트립톤 또는 소이톤이며, 가장 바람직하게는 효모추출

물이다. 질소원으로서 효모추출물이 이용되는 경우, 그 함량은 바람직하게는 0.3-3%, 보다 바람직하게는 0.5-2%, 가장 바람직하게는 0.75-1.2%이다.

[0032] 상기 유산균 배양용 유청배지의 유청은 포유류로부터 나온 젖 성분이 엉겨서 응고된 뒤 남은 액체로, 액체 상태에서 멸균하여 그대로 사용하거나 동결건조 등의 방법으로 분말화한 상태로 사용할 수 있다. 유청은 동물에서 직접 채취하거나 상업적으로 판매하는 제품을 구입하여 사용할 수 있다. 이러한 유청은 우유, 산양유, 염소유, 낙타유로부터 제조할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 본 발명에서 이용되는 유청은 바람직하게는 분말유청이다.

[0033] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 유산균 배양용 유청배지는 분말유청에 증류수를 넣어 섞은 후 알칼레이즈(alcalase)를 첨가하여 항온수조에서 완전히 녹이고 효모추출물 및 구연산 암모늄염(ammonium citrate)를 첨가하여 멸균한다.

[0034] 상기 유산균 배양용 유청배지에 첨가되는 분말유청은 5-20 중량%이고, 바람직하게는 5-15 중량%이며, 보다 바람직하게는 8-16 중량%이고, 가장 바람직하게는 9-12 중량%이다.

[0035] 상기 유산균 배양은 당업계에 공지된 다양한 방법을 통하여 실시할 수 있다.

[0036] 유산균의 접종은 배양 조건하에서 유산균이 충분히 증식할 수 있도록 전배양된 유산균을 적당한 양으로 배양배지에 첨가함으로써 수행된다. 본 발명에서 유산균 전배양에 이용 가능한 배지는 유산균 균주의 배양에 이용되는 어떠한 배지도 포함하나, 바람직하게는 MRS(deMan Rogosa Sharpe) 액체배지, APT(All Purpose with Tween) 배지 또는 BHI(Brain Heart Infusion) 배지이며, 가장 바람직하게는 MRS 액체배지이다.

[0037] 유산균 조효소액 제조를 위한 유산균 배양은 전배양된 유산균 배양액을 유산균 배양용 유청배지에 1-5%(v/v) 첨가하여 실시할 수 있다. 유산균의 배양은 당업계에 알려진 유산균 배양조건에 따라 실시할 수 있다. 이러한 과정은 당업자에 의해 선택되는 균주에 따라 용이하게 조정하여 사용할 수 있다(James et al., *Biochemical Engineering*, Prentice-Hall International Editions). 세포의 성장방식에 따라 현탁배양 또는 부착배양 할 수 있으며, 배양방법에 따라 회분식, 유가식 또는 연속배양식으로 실시할 수 있다.

[0038] 본 발명의 바람직한 구현 예에 따르면, MRS 액체배지에 유산균주를 접종하고 배양하여 활성을 키운 후, 상기 유산균 배양용 유청배지에 접종하여 배양한다. 본 발명에 있어서, 유산균 배양 온도는 바람직하게는 20-35℃이고, 보다 바람직하게는 25-32℃이며, 가장 바람직하게는 28-32℃이다.

[0039] 본 발명의 구체적인 일 실시 예를 참조하여, 상기 단계 (a)를 설명하면 다음과 같다: 유산균주를 MRS 액체배지 10 mL에 접종하여 30℃에서 18시간 동안 전배양하고, 유산균 배양용 유청배지 100 mL에 전배양액을 접종하여 30℃에서 18시간 동안 배양한다.

[0040] 단계 (b): 유산균을 이용하여 갈락토올리고당을 생산

[0041] 상기 유산균을 갈락토올리고당 생산용 유청배지에 적용하여 갈락토올리고당을 생산한다.

[0042] 본 발명에 있어서, 갈락토올리고당은 유당에 락타아제를 작용시켜 생성된 올리고당의 총칭을 의미한다. 일 예로는 상기 갈락토올리고당은 일반식  $\text{Gal}-(\text{Gal})_n-\text{Glc}$  (상기 일반식에서 Gal은 갈락토오스 잔기를 의미하고, Glc는 포도당 잔기를 의미하며, n은 1 내지 4의 정수를 의미한다)로 표현되는 당류일 수 있으며, 바람직하게는 상기 갈락토올리고당은 유당에 갈락토오스가 베타-1,4 결합된 4'-갈락토실 락토오스, 4'-갈락토실 락토오스에 갈락토오스가 베타-1,4 결합된 4당류 내지 6당류 및 전이 2당으로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상일 수 있다.

[0043] 상기 4'-갈락토실 락토스는 라피노스나 락츄로스에 비해 비피도박테리움 알도레센티스(*Bifidobacterium adolescentis*), 비피도박테리움 비피덤(*Bifidobacterium bifidum*) 또는 비피도박테리움 브레브(*Bifidobacterium breve*) 등의 비피도박테리움군만에 의해 이용이 가능하고, 다른 장내 유해균들은 거의 이용할 수 없어서, 장내 유산균 균형을 유지하는데 도움이 되는 이점이 있는 것으로 보고 되어 있으며(Ohtsuka K. et al., *Bifidus* Vol 2 pp. 143-149(1989)), 철의 생체이용률을 향상시킨다(D. Perez-Conesa et al., *Food Science and Technology International*, Vol. 13, pp. 69-77(2007)). 또한, 충치의 원인균인 스트렙토코커스 뮤탄스(*Streptococcus mutans*) 등의 세균에 의해 이용되지 않고 불용성 글루칸(glucan)도 생성되지 않아서 저충치성을 특징으로 갖는 장점이 있으며(S. Hata. et al., *Oral Microbiology and Immunology*, Vol 16 pp. 57-62(2001)), 모유의 대표적인 올리고당인 4'-갈락토실 락토오스는 모유의 대사증진 기능 재현을 위하여 유아용

분유의 구성 성분으로 그 사용이 필수적이다.

- [0044] 본 발명에서 이용되는 갈락토올리고당 생산용 유청배지에 첨가되는 분말유청은 20-45 중량%이고, 바람직하게는 25-40 중량%이며, 보다 바람직하게는 30-40 중량%이고, 가장 바람직하게는 30-35 중량%이다.
- [0045] 본 발명에 있어서, 상기 갈락토올리고당을 생산하는 단계 (b)는 효소가 실행되지 않는 온도 및 배양시간 범위 내에서 수행할 수 있으며, 바람직하게는 상기 단계 (b)는 사용되는 효소의 배양시간 및 온도 범위에서 수행될 수 있다. 상기 단계 (b)는 바람직하게는 2-8시간, 보다 바람직하게는 3-6시간, 가장 바람직하게는 4-5시간 동안 수행할 수 있다. 또한, 상기 단계 (b)는 바람직하게는 20-40℃, 보다 바람직하게는 25-35℃, 가장 바람직하게는 29-32℃에서 수행할 수 있다.
- [0046] 본 발명의 바람직한 구현 예에 따르면, 상기 단계 (a) 및 (b) 사이에 단계 (a)에서 수득한 유산균 배양액으로부터 락타아제가 포함된 유산균 조효소액을 얻는 단계를 추가적으로 포함할 수 있다. 상세하게는, 배양액 중의 유산균체를 회수하고 배양배지를 분리하기 위해 원심분리 또는 여과과정을 거칠 수 있으며 이러한 단계는 당업자의 필요에 따라 수행할 수 있다. 수득한 유산균체는 통상적인 방법에 따라 냉동하거나 냉동건조 하여 그 활성을 잃지 않도록 보존할 수 있다. 예를 들어 글리세롤 성분을 포함하여 영하 80℃에 보관하거나 멸균된 10% 탈지유에 현탁하여 동결건조 할 수 있다. 또한, 본 발명에 따른 미생물은 당업계에 공지된 통상적인 물리화학적 돌연변이 방법 등에 의해 이와 동등한 활성을 가지거나 또는 이보다 우수한 활성을 가지도록 개선 또는 개량될 수 있다.
- [0047] 본 발명에서 이용되는 유산균 조효소액은 상기 유산균 배양액을 원심분리하여 수득한 유산균체를 파쇄하여 얻은 용액이다.
- [0048] 본 발명에 따르면, 상기 유산균 조효소액은 락타아제를 포함한다. 상기 락타아제는 베타-갈락토사이드 결합을 가수분해하는 효소로서, 베타-갈락토시다아제( $\beta$ -galactosidase)라고도 한다.
- [0049] 본 발명에 있어서, 락타아제는 베타-갈락토사이드 결합을 가진 유당을 기질로 하여 갈락토오스와 글루코오스로 가수분해 하는 반응을 하는 동시에 유당에 갈락토오스를 전이시켜 갈락토올리고당 생성반응을 동시에 수행한다. 또한, 락타아제는 유당 기질로부터 갈락토오스 잔기를 포함하는 갈락토오스 효소 중간 생성물을 생성하고, 갈락토오스 효소 중간 생성물의 갈락토오스 잔기를 수용하는 물질(갈락토오스 수용체)에 따라서 다른 생성결과물 즉, 다른 종류의 갈락토올리고당이 생성되고, 반응이 계속 진행됨에 따라 생성된 갈락토올리고당을 포함한 반응 결과물이 다시 분해 및 재결합을 계속하여 다양한 결과물이 생성된다.
- [0050] 본 발명에서 이용되는 유산균 조효소액은 고정화용 담체(carrier)에 고정화(immobilization) 될 수 있다. 바람직하게는, 유산균 조효소액의 고정화용 담체는 셀룰로오스(cellulose), 덱스트란(dextran), 아가로오스(agarose), 폴리아크릴아미드(polyacrylamide), 알긴산소다(sodium alginate), 세라믹(ceramic), 슬래그(slag), 또는 플라스틱(plastics)이고, 보다 바람직하게는 셀룰로오스, 덱스트란, 아가로오스, 알긴산소다, 세라믹이며, 가장 바람직하게는 알긴산소다이다.
- [0051] 본 발명에 있어서, 유산균 조효소액 고정화에 사용되는 알긴산소다는 바람직하게는 0.5-3.0 중량%이고, 보다 바람직하게는 1.0-2.0 중량%이며, 가장 바람직하게는 1.3-1.6 중량%이다.
- [0052] 본 발명의 유산균 조효소액 고정화 방법은 담체결합법으로 당업계에 알려진 다양한 방법을 이용할 수 있고, 예를 들면 공유결합, 이온결합, 물리적 흡착 또는 생화학적 결합이 있다.
- [0053] 본 발명에 있어서, 상기 유산균 조효소액을 제조하는 단계는 효소가 실행되지 않는 pH 범위 내에서 수행할 수 있으며, 바람직하게는 사용되는 효소의 최적 pH 범위에서 수행될 수 있다. 상기 단계는 바람직하게는 pH 6-8, 보다 바람직하게는 pH 6.0-7.5, 가장 바람직하게는 pH 6.5-7.0에서 수행할 수 있다.
- [0054] 본 발명의 구체적인 일 실시 예를 참조하여, 상기 단계를 설명하면 다음과 같다: 유산균 배양액을 원심분리하여 수득한 침전균체(pellet)에 증류수 20 mL을 첨가하여 현탁한 후 라이소자임(mg/mL)을 처리하고 37℃에서 1시간 동안 정치시킨다. 그 다음, 초음파분쇄기로 현탁액을 파쇄하여 유산균 조효소액을 얻는다. 유산균 조효소액을 알긴산소다와 혼합한 후 2% 염화칼슘 용액에 1방울씩 떨어뜨려 효소를 고정화한다. 고정화시킨 유산균 조효소액은 원심분리하여 상등액을 제거하고 세척용액(예컨대, 인산염용액)으로 세척한 후 냉장고에 보관한다.
- [0055] 본 발명에 따르면, 유청배지에서 고정화된 유산균 조효소액을 이용하여 갈락토올리고당을 생산하면 최대 15.4%의 수율로 갈락토올리고당을 수득할 수 있다.

[0056]

[0057] 본 발명의 다른 양태에 따르면, 본 발명은 상술한 본 발명의 방법에 의해 제조된 갈락토올리고당을 제공한다.

### 발명의 효과

[0058] 본 발명의 특징 및 이점을 요약하면 다음과 같다:

[0059] (a) 본 발명은 유청배지를 이용한 갈락토올리고당의 신규한 제조방법을 제공한다.

[0060] (b) 본 발명에 따르면, 프로바이오틱스와 동시에 섭취할 수 있는 갈락토올리고당을 제공할 수 있다.

[0061] (c) 본 발명에 따르면, 종래 제조 공정에 비해 갈락토올리고당의 생산 비용을 현저하게 감소시킬 수 있다는 이점이 있다.

### 도면의 간단한 설명

[0062] 도 1은 유청분말 배지의 제조 방법을 도식적으로 나타낸 그림이다.

도 2는 유리된 *o*-Nitrophenol의 양을 표준 곡선으로 나타낸 그래프이다.

도 3은 소혈청알부민(bovine serum albumin)을 단백질 표준용액으로 하여 단백질 정량 표준 곡선을 나타낸 그래프이다.

도 4는 락타아제(lactase)의 고정화 방법을 도식적으로 나타낸 그림이다.

도 5는 유청분말배지(RWP) 또는 유산균배지(MRS)에서 *L. paracasei* FBT314 배양시 측정된 흡광도 결과를 나타낸 그래프이다.

◆ : 10% RWP, ● : 15% RWP, □ : MRS(control)

도 6은 유청분말배지 또는 유산균배지에서 배양한 *L. paracasei* FBT314 을 MRS 고체배지에 도말하여 배양한 후 콜로니(colony)를 계수한 결과를 나타낸 그래프이다.

◆ : 10% RWP, ● : 15% RWP, □ : MRS(control)

도 7은 유청분말배지에 포함되는 질소원에 따른 *L. paracasei* FBT314의 생육 변화를 나타낸 그래프이다.

□ : 효모추출물, \* : 소이톤, ◇ : 쇠고기 추출물, ○ : 맥아 추출물

도 8은 유청분말배지에 포함되는 효모 추출물의 농도에 따른 *L. paracasei* FBT314의 생육 변화를 나타낸 그래프이다.

▲ : 0%, □ : 0.5%, : 1%, × : 1.5%, △ : 2%

도 9는 분말유청배지에서 배양한 유산균의 침전균체(pellet) 또는 상등액에서 lactic acid bacteria(LAB) 락타아제의 활성을 나타낸 그래프이다.

도 10은 *L. paracasei* FBT314 유래 락타아제를 이용한 갈락토올리고당 생산에 있어 유청분말 농도에 따른 갈락토올리고당의 생산 변화를 나타낸 그래프이다.

도 11은 *L. paracasei* FBT314 유래 락타아제를 이용한 갈락토올리고당 생산에 있어 온도에 따른 갈락토올리고당의 생산 변화를 나타낸 그래프이다.

도 12는 *L. paracasei* FBT314 유래 락타아제를 이용한 갈락토올리고당 생산에 있어 반응시간에 따른 갈락토올리고당의 생산 변화를 나타낸 그래프이다.

도 13은 분말유청배지에 *L. paracasei* FBT314 유래 락타아제를 첨가하여 배양한 시료에서 갈락토올리고당의 유무를 박층 크로마토그래피(thin layer chromatography, TLC)를 통해 확인한 그림이다.

1. 글루코오스, 2. 갈락토오스, 3. 락토오스, 4. 갈락토올리고당

5. 샘플(1/2), 6. 샘플(1/4), 7. 샘플(1/8), 8. 샘플(1/16)

도 14는 갈락토올리고당을 정량적으로 분석하기 위해 HPLC를 수행한 결과를 나타낸 그림이다.

도 15는 고정화 효소로 생산한 갈락토올리고당을 HPLC를 이용하여 정량 분석한 결과를 나타낸 그림이다.

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0063] 이하, 실시 예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시 예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시 예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에 있어서 자명할 것이다.

### [0064] 실시예

[0065] 본 명세서 전체에 걸쳐, 특정 물질의 농도를 나타내기 위하여 사용되는 “%”는 별도의 언급이 없는 경우, 고체/고체는 (중량/중량) %, 고체/액체는 (중량/부피) %, 그리고 액체/액체는 (부피/부피) %이다.

### [0066] 실험 재료

#### [0067] 재료 및 배지

[0068] 본 발명에 사용한 유청분말(whey powder)은 국내에서 가공 치즈용 체다 치즈 제조 시에 얻어지는 것으로 (주)삼익유가공에서 제공받았다. 유청배지는 2가지의 조건으로 유산균 배양용 배지와 갈락토올리고당 생산용 배지로 조성을 달리하여 사용하였다. 유산균 배양용 배지의 조성은 유당을 1.75%로 조정하여 사용하였으며, 첨가제로는 효모추출물(yeast extract, BD, 미국) 및 구연산암모늄염(ammonium citrate, Shinyo pure chemicals, 일본)를 사용하였다. 제조 방법과 도 1 및 표 3과 같다. 갈락토올리고당 생산용 유청배지의 조성은 유당을 30%로 조정하여 90℃에서 20분간 살균하여 사용하였으며 조성은 표 4와 같다. MRS 배지는 BD사(미국) 제품을 일반 시약은 Sigma사(미국) 제품을 각각 구입하여 사용하였다.

### 표 3

[0069] 유산균의 성장을 위한 배지의 구성

분말 유청	25 g
알칼레이즈	0.1 g
효모추출물	10 g
구연산 암모늄염	2 g
증류수 (총)	1 L

[0070] 분말 유청: Samik Dairy company(덴마크), 알칼레이즈: Novozyme(덴마크)

### 표 4

[0071] 갈락토올리고당 생산을 위한 반응액의 조성

분말 유청	430 g
소듐 아자이드( $\text{NaN}_3$ )	0.5 g
증류수 (총)	1 L

### [0072] 공시 균주 및 효소

[0073] 락타아제 활성을 가진 미생물은 락토오스를 이용할 수 있고, 갈락토올리고당을 합성할 수 있는 기능도 함께 가지고 있다고 판단하여 유일한 탄소원으로 유당을 자화하여 증식할 수 있는 유당이용 유산균을 일차로 선별하였다. 선별한 유산균으로는 시판 요구르트에서 분리한 균주인 *Lactobacillus paracasei* FBT314, *Lactobacillus*



*helveticus* FBT1 및 본 발명자들의 보유 균주인 *Lactobacillus acidophilus* KCCM32820, *Lactococcus lactis* ATCC11454, *Lactobacillus rhamnosus* KCCM32405, *Lactobacillus brevis* KCCM11904, *Lactobacillus confusus* KCCM40015, *Lactobacillus reuteri* ATCC23272, *Lactobacillus delbrueckii* KCCM35468, *Lactobacillus plantarum* KCCM12116, *Leuconostoc mesenteriodes* KCCM11324 및 *Weissella kimchii* KCCM41287 등 총 12주의 공시유산균주로 실험을 진행하였다. 12주의 공시유산균은 조성을 변형시킨 MRS(BD, USA)배지에서 2회 계대하여 활성을 키운 후 유산균 배양용 유청배지를 이용하여 1회 계대 하여 사용하였다.

[0074] 유산균용 유청배지 제조에 있어 유청분말 농도의 영향

[0075] 유청분말이 중량비로 10% 및 15% 첨가된 액체배지를 제조하고 대조구는 MRS(BD, USA) 액체배지를 사용하였다. 유산균을 접종한 다음 37℃에서 60시간 동안 배양하면서 균의 성장은 분광광도계(Spectrophotometer, Thermo Scientific, 미국)로 650 nm에서 흡광도를 측정하였다.

[0076] 유산균용 유청배지에서 유산균의 증식 및 생균수 측정

[0077] 환원유청분말배지(RWP) 및 MRS 액체배지를 제조하여 유산균을 접종한 다음 37℃에서 60시간 동안 배양하면서 시간별로 일정량을 취하여 MRS 고체배지에 도말하여 37℃에 60시간 배양하여 고체 배지 상에 자란 전형적인 콜로니의 수를 계수하였다.

[0078] 유산균용 유청배지 제조에 있어 유기질소원의 영향

[0079] 분말유청배지를 기본 배지로 하여 다양한 질소원에 따른 미생물의 증식을 검토하기 위하여 효모추출물(yeast extract, BD, USA), 소이톤(soytone, BD, USA), 쇠고기 추출물(beef extract, BD, USA), 맥아 추출물(malt extract, BD, USA)을 각각 1% 첨가하여 배지를 제조하고 유산균을 접종한 다음 60시간까지 균체의 증식을 650 nm에서 흡광도로 표시하였다.

[0080] 유산균용 유청배지 제조에 있어 효모 추출물의 영향

[0081] 분말유청배지에 결합된 유기질소원으로 효모 추출물을 사용하여, 첨가량을 0, 0.5, 1, 1.5 및 2% 조건으로 하여 균체 증식 정도를 분광광도계를 이용하여 650 nm에서 흡광도를 측정하였다.

[0082] 유산균의 락타아제 효소 활성 확인

[0083] 12종의 유산균을 MRS 배지에서 배양한 후 1 mL씩 취하여 원심분리기(Vision, Korea)로 원심분리(2000×g, 20분)하였다. 상등액은 따로 취하고 펠렛(pellet)에 saline(0.85% NaCl)을 1 mL 넣어 재현탁하였다. 원심분리 한 다음 침전된 균체에 saline을 1 mL 넣은 후 현탁하였다. 멸균시험관에 ONPG disc(Sigma, USA)와 saline을 0.1 mL 넣고 상기와 같이 미리 제조해 둔 상등액, 균체 현탁액을 0.1 mL씩 넣고 충분히 진탕한 후 30℃로 배양하면서 발색 유무를 확인하였다. 효소활성은 Nguyen 등(1999)의 방법을 약간 변형하여 o-Nitrophenyl-β-D-galactopyranoside(ONPG, Sigma)로부터 유리되는 o-Nitrophenol(Sigma, USA)의 양을 측정하였다. 효소액 0.5 mL 및 100 mM 인산염 완충액(pH 7.0)을 1.4 mL 빈 시험관에 넣고 혼합한 다음 20 mM ONPG 용액 0.1 mL를 재빨리 가하여 혼합한 후 30℃ 항온수조에서 10분간 반응시켰다. 10분 후 0.2 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 용액 0.2 mL를 가하여 반응을 중지시킨 다음 405 nm에서 흡광도를 측정하였다. 효소 1 U는 반응시간 분당 ONPG로부터 생성되는 o-Nitrophenol의 μmole 수로 정의하였다. 효소단위는 유리된 o-Nitrophenol의 양을 미리 작성한 표준 곡선으로부터 산출 표시하였다(도 2).

[0084] 유산균주를 이용한 조효소액의 제조

[0085] 유산균주를 MRS 액체배지 10 mL에 접종하여 30℃에서 18시간 동안 배양하여 활성을 키운 후 액상 분말유청배지 100 mL에 접종하여 30℃에서 18시간 동안 배양하였다. 유산균 배양액을 2000×g에서 20분간 원심분리하여 상

등액은 버리고 펠렛에 증류수로 현탁하여 다시 동일 조건으로 원심분리 하였다. 상등액은 버리고 펠렛에 증류수 20 mL를 첨가하고 라이소자임을 1 mg/mL 되게 첨가한 후 37℃에서 1시간 배양하였다. 이 균체액을 초음파 분쇄기(Sonics, 미국)를 이용하여 세포를 파쇄하였다. 이를 조효소액으로 하여 무균적으로 100 mM 인산염 버퍼(pH 7.0)을 1.4 mL 넣고 조효소액 500  $\mu$ L와 20 mM ONPG 스톡 솔루션을 100  $\mu$ L 첨가하여 30℃에서 10분간 반응시킨 다음 0.2 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 200  $\mu$ L를 처리하여 효소반응을 정지 후 분광광도계를 이용하여 405 nm로 흡광도를 측정하였다.

[0086] 락타아제 활성에 대한 온도의 영향

[0087] pH 7.0의 100 mM 인산염 버퍼를 유산균 유래 조효소액과 혼합하여 20, 25, 30, 35 및 40℃ 조건으로 ONPG를 10 분간 반응을 하고, 0.2 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 용액 0.2 mL을 가하여 반응을 중지시켜 405 nm에서 흡광도를 측정하였다.

[0088] 락타아제 활성에 대한 pH의 영향

[0089] 100 mM 인산염 버퍼의 pH를 6.0, 6.5, 7.0 및 7.5으로 조정하고 유산균 유래 조효소액과 혼합하여 ONPG를 10분간 반응을 하였고, 0.2 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 용액 0.2 mL을 가하여 반응을 중지시켜 405 nm에서 흡광도를 측정하였다.

[0090] 조효소액의 단백질 정량

[0091] 유산균 유래의 조효소액 농도는 Bradford 방법(1976)에 의하여 Bio-Rad protein assay kit(Bio-Rad)를 사용하여 측정하였다. 단백질 표준용액으로는 소 혈청 알부민(Bio-Rad)를 사용하였으며 분광광도계를 이용하여 595 nm로 흡광도를 측정하였다(도 3).

[0092] TLC를 이용한 갈락토올리고당 확인

[0093] 최종 선별한 *L. paracasei* FBT314에서 유래한 락타아제에서 갈락토올리고당을 생산하는 최적 온도를 확인하기 위하여 Itoh 등(1982)의 방법을 변형하여 실험을 실시하였다. 갈락토올리고당 생산용 유청배지를 유청분말 10, 20 및 30%로 하여 각각 15 mL씩 제조하고 조효소액(206 U/protein mg)을 1, 3 및 5 mL씩 각각 첨가하여 20, 30 및 40℃에서 2, 4, 6 및 8시간 동안 배양하여 갈락토올리고당 생산 유무를 TLC(Merck, 독일)로 확인하였다. 전개용매는 이소프로판올-물(4:1)로 하였고 발색시약으로는 아닐린을 아세톤에 1% 녹인 용액과 다이페닐 아민을 아세톤에 1% 녹인 용액을 5 mL씩 혼합하고 85% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>를 1 mL 가하여 사용하였다.

[0094] 갈락토올리고당의 확인 및 정량

[0095] 갈락토올리고당을 정량하기 위하여 시료 15 mL에 활성탄소를 일정량 넣어 끓이고, 필터 페이퍼(Whatman)를 사용하여 한번 여과한 후 주사기로 옮기고 0.45  $\mu$ m 시린지 필터(Advantec, 일본)로 여과하여 튜브에 담아 고성능 액체 크로마토그래피(HPLC, Waters, 미국)를 사용하여 분석하였으며, 분석조건은 표 5와 같다.

## 표 5

[0096] 갈락토올리고당 분석을 위한 HPLC의 운행 조건

기기명	Waters e2695
디텍터	RI detector
컬럼	YMC-Pack Polyamine II
오븐 온도	25℃
이동상	Acetonitrile : Water (75 : 25, v/v %)
유속	1.0 mL/min
인젝션 볼륨	20 $\mu$ L

[0097] 락타아제 조효소액의 고정화

[0098] Jang 등(1990)의 방법을 약간 변형하여 고정화용 담체의 최적조건을 확인하기 위하여 알긴산소다(sodium alginate, Yakuri, 일본)를 실험에 사용하였다(표 6). 알긴산소다를 1, 1.5, 2% 농도로 하여 제조한 코팅물질의 점도를 측정하여 최적 조합을 결정하였다. 주사기를 사용하여 조효소액을 2% CaCl<sub>2</sub> 용액에 1방울씩 적하하여 효소를 고정화하였다. 고정화하는 방법은 도 4와 같다. 조제된 비드(bead)는 100 mM 인산염 버퍼(pH 7.0)로 수회 세척한 후 4℃에 보관하면서 실험에 사용하였다.

## 표 6

[0099] 락타아제 고정화를 위한 코팅 재료

번호	코팅 재료
1	1% 알긴산소다
2	1.5% 알긴산소다
3	2% 알긴산소다

[0100] 실험 결과

[0101] 유청배지 중 락토스 농도와 유산균의 생육

[0102] 유청배지의 유당의 함량에 따른 유산균의 생육을 알아보기 위하여 통상적으로 유청분말에는 유당 함량이 70% 함유된 것으로 알려져 있다. 유청분말을 10, 15% 첨가된 배지를 제조하여 유산균 배지인 MRS에 유산균을 접종하여 60시간까지 배양하면서 흡광도를 비교 측정한 결과는 도 5와 같다. 또한 흡광도를 측정하는 시간마다 균을 일정량 취하여 MRS 고체배지에 도말하여 30℃에서 60시간 배양하여 콜로니를 계수한 결과는 도 6와 같다. 유산균 배양용 유청배지의 유당함량을 조절한 결과 유산균 배지인 MRS와 유청분말 10% 배지와 거의 비슷한 경향을 보이고, 유청분말 15%의 배지는 균의 생장이 다른 두 배지보다는 떨어지는 것을 알 수 있었다. 이는 유당의 농도가 높아지게 되면 유산균에 존재하는 락타아제의 활성이 락토스를 글루코스(glucose)와 갈락토오스(galactose)로 분해하는 활성보다 갈락토오스를 다른 락토스에 결합시키는 활성이 일어나기 때문인 것으로 생각된다.

[0103] 유기 질소원이 유산균의 생육에 미치는 영향

[0104] 유청배지 내 질소원 종류에 따른 유산균의 생육을 알아보기 위하여 분말유청배지를 기본 배지로 하여 질소원으로 효모추출물, 소이톤, 쇠고기 추출물 및 맥아 추출물을 1%씩 각각 첨가하고 유산균을 접종하여 60시간 동안 배양하면서 12시간 단위로 시료를 취하여 흡광도를 측정하였다. 도 7과 같이 4가지의 질소원에 따른 유산균의 생육의 변화는 거의 차이가 없는 것으로 나타났다. 분말유청배지에 결핍된 유기질소원으로 가장 대표적인 효모 추출물을 사용하는 것으로 결정하였으며, 효모 추출물의 양을 0%, 0.5%, 1%, 1.5% 및 2%로 하여 유산균의 생장을 60시간까지 측정하였는데, 도 8에서 보면 질소원을 첨가하지 않은 시료에 비해 질소원을 첨가한 시료에서 유산균의 생육이 우수한 것을 알 수 있었다. 6시간까지 모든 시료에서 거의 동일한 균의 생육을 보이는 것은 질소원을 첨가하지 않은 시료는 분말유청에 존재하는 단백질을 통하여 균의 생육을 하고 6시간 이후에는 분말유청에 존재하는 질소원의 소모로 인하여 균의 생육이 저하되는 것으로 판단하였으며, 가격대비 유산균의 생육을 고려하였을 때 질소원은 1% 정도 첨가하는 것이 가장 우수할 것으로 판단하고 차후 실험에서도 질소원으로는 효모 추출물을 1% 첨가하여 유산균 배양용 유청배지를 제조하였다.

[0105] 최적 유산균의 선별을 위해 유산균의 락타아제 유무 확인

[0106] 본 발명자들이 분리한 총 12주의 공시 유산균의 락타아제 활성을 알아보기 위하여 ONPG disc를 통하여 침전균체 및 상등액(supernatant) 두 가지의 조건으로 확인한 결과는 표 7-8 및 도 9와 같다. 침전균체에서 락타아제의 효소활성을 확인하였으나 상등액에서는 락타아제 활성을 확인할 수 없었다. 이는 유산균 유래의 락타아제는



세포 외부로 배출하는 것이 아니고 세포내에 존재하는 것임을 알 수 있었다. Nguyen 등(2007)에 의하면 *L. acidophilus* 락타아제는 세포 내에 존재한다고 판단하여 프렌치 프레스(Aminco, Maryland)를 이용하여 세포를 파쇄하였다. 또한 실험에 사용한 총 12종의 유산균주 대부분에서 효소활성을 확인할 수 있었으나 김치유산균인 *Leuconostoc mesenteriodes* KCCM11324 및 *Weissella kimchii* KCCM41287에서는 락타아제 효소활성을 확인할 수 없었다. 이는 김치에 존재하는 유산균은 대부분 식물에 존재하던 유산균이기 때문에 락토오스를 분해하거나 락토오스로부터 갈락토올리고당을 생산하는 기능이 존재하지 않는 것으로 판단하였다.

표 7

[0107] 침전균체에서 LAB 락타아제의 활성 확인

번호	유산균	실험결과
1	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> KCCM32405	+
2	<i>Lactobacillus brevis</i> KCCM11904	+
3	<i>Lactobacillus confusus</i> KCCM40015	+
4	<i>Lactobacillus reuteri</i> ATCC23272	+
5	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> KCCM35468	+
6	<i>Lactobacillus acidophilus</i> KCCM32820	+
7	<i>Lactobacillus plantarum</i> KCCM12116	+
8	<i>Lactococcus lactis</i> ATCC11454	-
9	<i>Leuconostoc mesenteriodes</i> KCCM11324	-
10	<i>Weissella kimchii</i> KCCM41287	-
11	<i>Lactobacillus helveticus</i> FBT1	+
12	<i>Lactobacillus paracasei</i> FBT314	+

[0108] +, positive; -, negative

표 8

[0109] 배양 상등액에서 LAB 락타아제의 활성 확인

번호	유산균	결과
1	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> KCCM32405	-
2	<i>Lactobacillus brevis</i> KCCM11904	-
3	<i>Lactobacillus confusus</i> KCCM40015	-
4	<i>Lactobacillus reuteri</i> ATCC23272	-
5	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> KCCM35468	-
6	<i>Lactobacillus acidophilus</i> KCCM32820	-
7	<i>Lactobacillus plantarum</i> KCCM12116	-
8	<i>Lactococcus lactis</i> ATCC11454	-
9	<i>Leuconostoc mesenteriodes</i> KCCM11324	-
10	<i>Weissella kimchii</i> KCCM41287	-
11	<i>Lactobacillus helveticus</i> FBT1	-
12	<i>Lactobacillus paracasei</i> FBT314	-

[0110] +, positive; -, negative

[0111] GOS 생산용 유산균 락타아제 선별

[0112] ONPG를 이용하여 락타아제 효소활성을 측정한 결과를 바탕으로 현재 국내에서 상업적으로 제조되는 요구르트의 스타터로 널리 이용되고 있는 프로바이오틱스 유산균주 4종을 선별하여 실험을 진행하였다. 4종의 공시 유산균의 락타아제 효소활성을 측정한 결과는 표 9와 같다. 유산균주의 효소활성은 102-1,053 Unit 정도로 측정되었으며, *L. paracasei* FBT314 유래의 락타아제의 효소활성이 가장 높은 것으로 나타났다. 이 락타아제 조효소

액의 단백질 함량은 5.1 mg/mL로 측정되어 *L. paracasei* FBT314 유래 락타아제의 비활성은 206 U/protein, mg으로 계산하였다. Nguyen 등(2006, 2007)에 의하면 *L. acidophilus*와 *L. reuteri* 유래의 락타아제의 비활성은 230, 180 U/mg으로 본 발명에서 사용한 *L. paracasei* 유래 락타아제와 큰 차이를 보이지 않았다.

### 표 9

공시 유산균의 락타아제 효소활성 비교

LAB 계통	<i>L. acidophilus</i>	<i>Lc. lactis</i>	<i>L. helveticus</i>	<i>L. paracasei</i>
효소 활성(U)*	228	102	520	1,053

\* 효소 1 U는 반응시간 분당 ONPG로부터 생성되는 o-Nitrophenol 의  $\mu\text{mole}$  수로 정의하였다.

*L. paracasei* FBT314 락타아제 활성에 대한 pH의 영향

*L. paracasei* FBT314가 생산하는 락타아제 활성에 대한 pH의 영향을 알아보기 위하여 버피를 pH 6.0, 6.5, 7.0 및 7.5으로 제조하였고, 동일한 방법으로 ONPG 테스트를 실시한 결과는 표 10과 같다. 그 결과, *L. paracasei* FBT314 유래의 락타아제의 효소활성은 pH 6.5-7.0 정도에서 가장 높은 값을 나타냈으며, 이는 *L. paracasei* FBT314가 생산하는 락타아제는 중성 pH에서 효소의 활성이 높은 것을 알 수 있었다. Hung 등(1994)은 *Bifidobacterium infantis* 유래 락타아제의 최적 pH는 6.5으로 보고하였다. Hinz 등(2004)은 *B. adolescentis* 유래 락타아제의 최적 pH를 6.0으로 보고하였고, Nguyen 등(2007)은 *L. acidophilus* 유래 락타아제의 최적 pH는 6.5-8.0로 보고하였다.

### 표 10

*L. paracasei* FBT314 락타아제 활성에 대한 pH의 영향

pH	6.0	6.5	7.0	7.5
효소 활성(U)*	104	1191	1273	363

\* 효소 1 U는 반응시간 분당 ONPG로부터 생성되는 o-Nitrophenol 의  $\mu\text{mole}$  수로 정의하였다.

*L. paracasei* FBT314 락타아제 활성에 대한 온도의 영향

*L. paracasei* FBT314가 생산하는 락타아제 활성에 대한 온도의 영향을 알아보기 위하여 20, 25, 30, 35 및 40 °C조건으로 ONPG 테스트를 실시한 결과는 표 11과 같다. *L. paracasei* FBT314 유래의 락타아제의 최적 온도는 30°C로 나타났다. 이는 *L. paracasei* FBT314가 중온성균이므로 이 유산균 유래 락타아제 또한 30°C 정도에서 높은 효소활성을 가지게 된 것이라고 판단하였다.

### 표 11

*L. paracasei* FBT314 락타아제 활성에 대한 온도의 영향

온도(°C)	20	25	30	35	40
효소 활성(U)*	216	465	1254	1162	1068

- [0122] \* 효소 1 U는 반응시간 분당 ONPG로부터 생성되는 o-Nitrophenol 의  $\mu\text{mole}$  수로 정의하였다.
- [0123] 갈락토올리고당 생산에 있어 유청분말 농도의 영향
- [0124] 락토스로부터 락타아제가 갈락토올리고당을 생산하는 조건을 확인하기 위하여 유청분말의 농도를 20, 25, 30, 35 및 40%로 하여 갈락토올리고당 생산용 분말유청배지를 만들고 *L. paracasei* FBT314 유래 락타아제를 첨가하여 갈락토올리고당의 생산을 정량적으로 측정 한 결과는 도 10와 같다. 갈락토올리고당의 생산은 30%까지 급격히 증가하다 30% 이후에는 완만하게 증가하는 것을 알 수 있었다. 이를 통하여 분말유청의 농도는 30%가 최적 조건이라고 판단하였다.
- [0125] 갈락토올리고당 생산에 있어 온도의 영향
- [0126] *L. paracasei* FBT314 유래 락타아제의 최적 갈락토올리고당 생산 온도를 확인하기 위하여 20, 30, 40, 50 및 60℃ 조건으로 실험한 결과는 도 11과 같다. 갈락토올리고당 생산은 30℃ 이후부터 점차 감소하는 것을 알 수 있었는데 ONPG 테스트를 통한 락타아제 효소활성을 측정 한 결과와 마찬가지로 30℃가 *L. paracasei* FBT314 유래 락타아제의 최적 온도임을 알 수 있었다.
- [0127] 갈락토올리고당 생산에 있어 반응 시간의 영향
- [0128] 시간에 따른 갈락토올리고당 생산 수율을 확인하기 위하여 0, 2, 4, 6 및 8시간까지 측정 한 결과는 도 12과 같다. 시간이 증가함에 따라 갈락토올리고당 생산 수율도 증가하는 것을 알 수 있었다. *L. paracasei* FBT314 유래 락타아제는 분말유청배지로부터 갈락토올리고당을 생산하기 위해서는 4시간 이상 배양하는 것이 좋으나 4시간 이후에는 증가폭이 크지 않은 것을 알 수 있었다. 이를 통하여 경제적인 측면에서 4시간을 최적조건으로 하였다.
- [0129] *L. paracasei* FBT314 락타아제를 이용한 갈락토올리고당의 생산 및 정량
- [0130] 30% 분말유청배지를 제조한 후 *L. paracasei* FBT314 유래 락타아제를 첨가하고 30℃에서 4시간 동안 배양한 배양 산물을 시료로 사용하였다. 시료의 갈락토올리고당의 유무를 TLC를 통하여 확인하였다(도 13). 대조구로는 글루코오스, 갈락토오스, 락토오스, 시판 갈락토올리고당을 사용하였다. 도 13에 5-8는 시료를 희석하여 스팟팅(spotting)한 결과이다. 발색시킨 결과 7-8에서 글루코오스, 갈락토오스 및 락토오스의 반점이 존재하고 락토오스 반점 아래 여러 개의 반점이 존재하는데 이를 갈락토올리고당이라 추정하는 반점이다. 갈락토올리고당은 한 가지의 물질이 아니고 3 mer-5 mer의 물질을 포괄하기 때문에 반점이 이처럼 여러 개가 존재한 것이라고 판단하였다. 생성된 갈락토올리고당을 정량적으로 분석하기 위하여 HPLC를 사용하였다(도 14). 30%의 분말유청배지의 70%가 유당인데 이 유당이 락타아제에 의해 우선적으로 분해되면서 글루코오스와 갈락토오스가 되고, 이 중 갈락토오스는 락타아제에 의해 분해되지 않은 다른 락토스 분자에 결합을 시키는 당전이에 의해 갈락토올리고당이 생성된다. 그러므로 도 14에서 글루코스의 양은 앞의 갈락토오스의 양보다 많은 것을 볼 수 있었다. 또한 갈락토올리고당의 피크를 확인할 수 있었다. 30% 분말유청배지에서 *L. paracasei* FBT314 유래의 락타아제를 처리하여 최고 19.41%정도의 갈락토올리고당이 생산되었다(표 12).

표 12

[0131] 락타아제를 이용한 갈락토올리고당 생산에 있어 탄수화물의 조성

번호	프룩토스	글루코스	갈락토올리고당-이당류	락토스	갈락토올리고당-삼당류	4' -갈락토실락토스	6' -갈락토실락토스	갈락토올리고당-사당류<	총 갈락토올리고당
1	0.76	5.13	1.66	80.73	1.70	3.59	1.24	4.65	12.84
2	0.47	2.41	1.42	86.7	0	4.13	0.47	4.01	10.03
3	0.51	6.21	1.74	81.58	0.23	4.10	1.37	3.94	11.38

4	0.56	6.60	2.07	80.07	0	3.95	1.84	4.61	12.47
5	0	5.38	1.56	82.33	1.80	3.65	1.10	4.18	12.29
6	0	4.06	5.04	79.81	2.20	4.05	1.14	3.70	16.13
7	0	5.25	6.44	75.34	0	5.02	1.91	6.04	19.41
8	0	2.34	5.50	83.69	0	4.39	0.58	3.50	16.31
9	0.53	9.06	2.09	73.80	2.65	4.26	2.48	4.82	16.3
10	0.5	7.60	1.03	78.69	2.5	4.12	0.76	4.62	13.03
11	0.32	7.81	1.19	79.61	1.78	3.51	0.75	4.83	12.06
12	2.12	8.95	0.73	76.95	1.8	3.39	0.74	5.14	11.8

[0132] 총 갈락토올리고당 = 갈락토올리고당-이당류 + 갈락토올리고당-삼당류 +4' -갈락토실 락토스+6' -갈락토실 락토스+갈락토올리고당-사당류<

[0133] 효소의 고정화를 위해 코팅물질의 점도 측정

[0134] 1, 1.5 및 2%의 알긴산소다(Yakuri, 일본)와 1% 알긴산소다에 1, 3 및 5% 변성전분(modified starch)을 혼합하여 제조한 코팅물질의 점도를 측정한 결과는 표 13과 같다. 알긴산소다 농도가 높아질수록 점도는 증가하는 것을 알 수 있었다. 고정화 효소의 효소활성을 측정한 결과는 표 14와 같다. 고정화 물질의 점도가 낮을 경우 고정화가 잘 이루어지지 않았고, 고정화 물질의 점도가 높을 경우에는 효소의 활성이 낮게 나타나는 것을 알 수 있었다. *L. paracasei* FBT314 유래의 락타아제를 알긴산소다로 고정화할 경우 그 농도는 1.5%가 가장 적절한 것으로 판단하였다.

표 13

[0135]

	알긴산소다(%)		
	1.0	1.5	2.0
점도(cP)	25.0±0.3	38.4±0.2	61.2±0.5

표 14

[0136]

	알긴산소다(%)		
	1.0	1.5	2.0
효소 활성(U)	583±2	1,147±5	361±1

[0137] 고정화 효소로 생산한 갈락토올리고당의 HPLC 정량분석

[0138] 도 15 및 표 15는 고정화 효소로 생산한 갈락토올리고당을 HPLC를 이용하여 정량 분석한 결과이다. 도 15에서 보면 갈락토올리고당의 피크를 확인할 수 있었고 표 15에서는 *L. paracasei* FBT314 유래의 조효소액을 고정화한 효소를 이용하여 갈락토올리고당을 생산하였을 때 최고 15.4%정도의 수율을 확인할 수 있었다. 고정화하지 않은 조효소액은 최고 수율에서 큰 차이를 보였으나 평균적으로는 크게 차이가 나지 않았다.

표 15

[0139] 고정화된 락타아제를 이용한 갈락토올리고당 생산에 있어 탄수화물의 조성

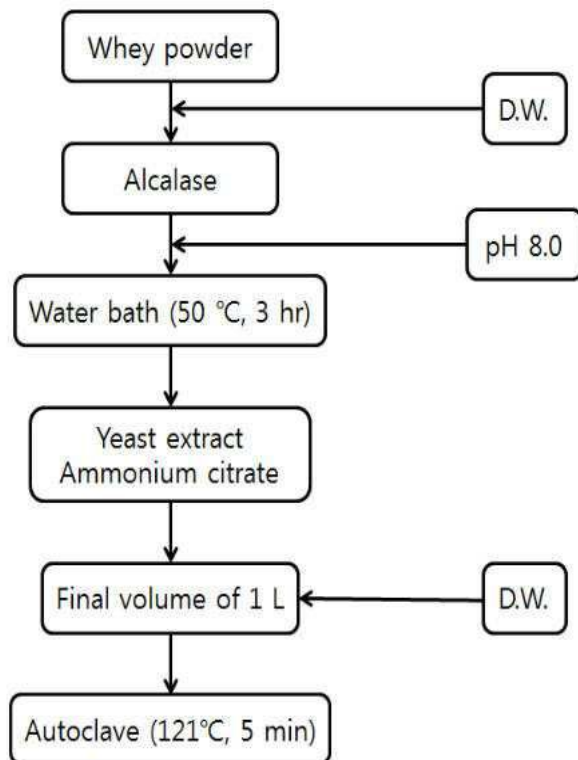
번호	프럭토오스	글루코오스	갈락토올리고당-이당류	락토오스	갈락토올리고당-삼당류	4' -갈락토실락토오스	6' -갈락토실락토오스	갈락토올리고당-사당류<	총 갈락토올리고당
1	1.06	21.55	1.92	61.77	2.38	4.39	2.08	4.64	15.41
2	2.22	10.62	1.41	71.67	1.88	4.52	1.45	5.37	14.63
3	1.99	16.32	1.35	67.88	1.9	3.78	1.42	5.03	13.48
4	4.82	18.79	2.21	65.96	0	4.58	1.85	1.80	10.44
5	0.90	19.62	1.77	65.95	2.45	4.03	1.57	4.38	14.2
6	2.1	20.15	1.27	62.02	2.18	4.03	1.57	6.34	15.39
7	0.32	14.24	0.18	70.60	2.8	3.79	1.69	6.1	14.56

[0140] 총 갈락토올리고당 = 갈락토올리고당-2당류 + 갈락토올리고당-3당류 +4' -갈락토실 락토오스+6' -갈락토실 락토오스+갈락토올리고당-4당류<

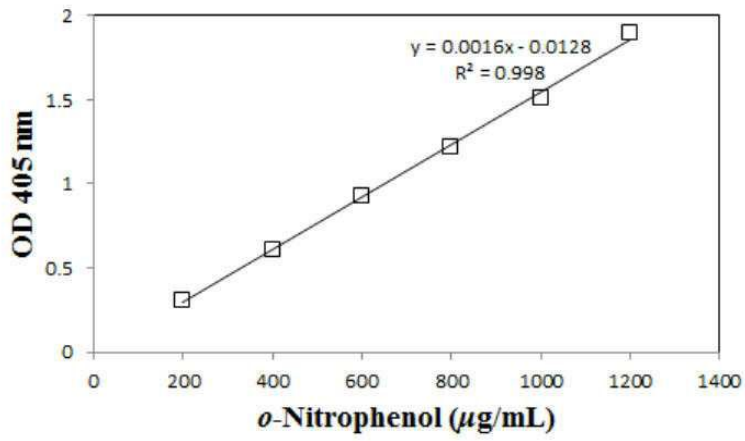
[0141] 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현 예일 뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

## 도면

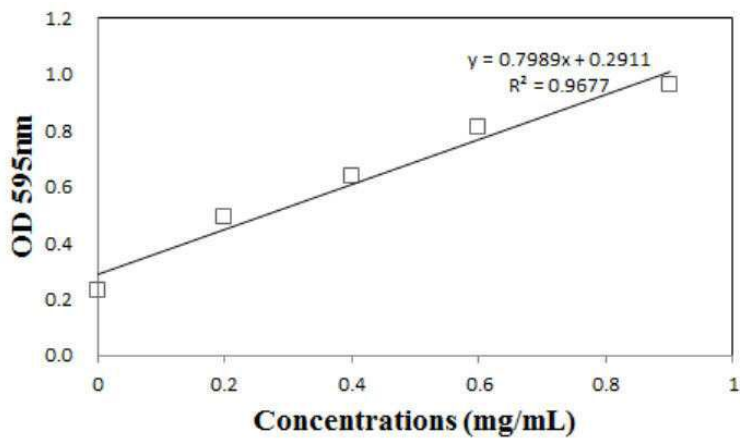
### 도면1



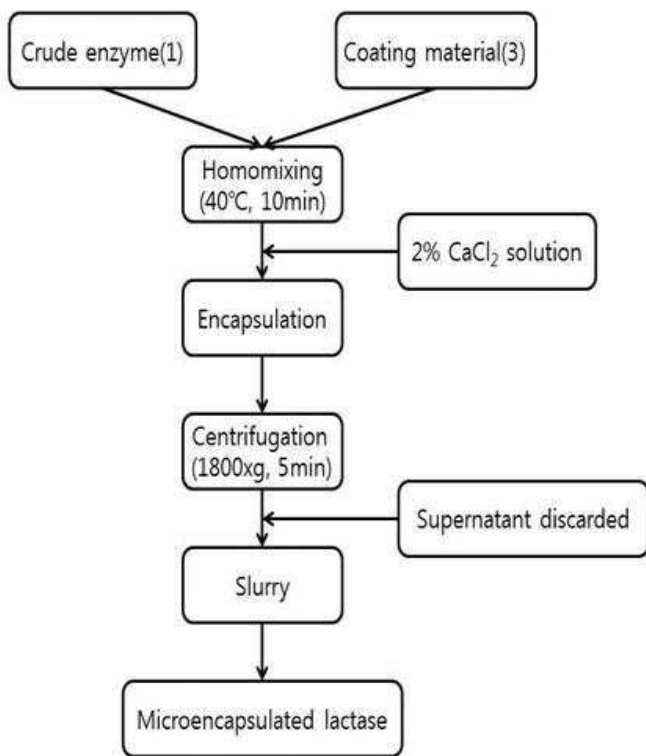
도면2



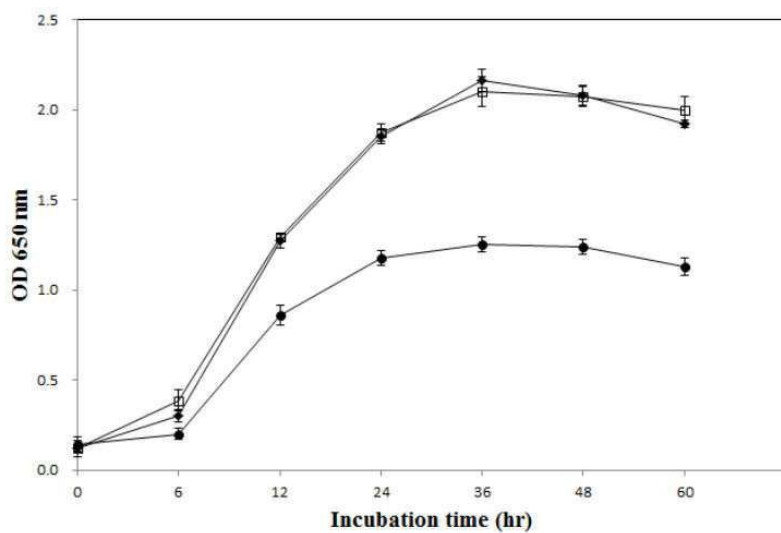
도면3



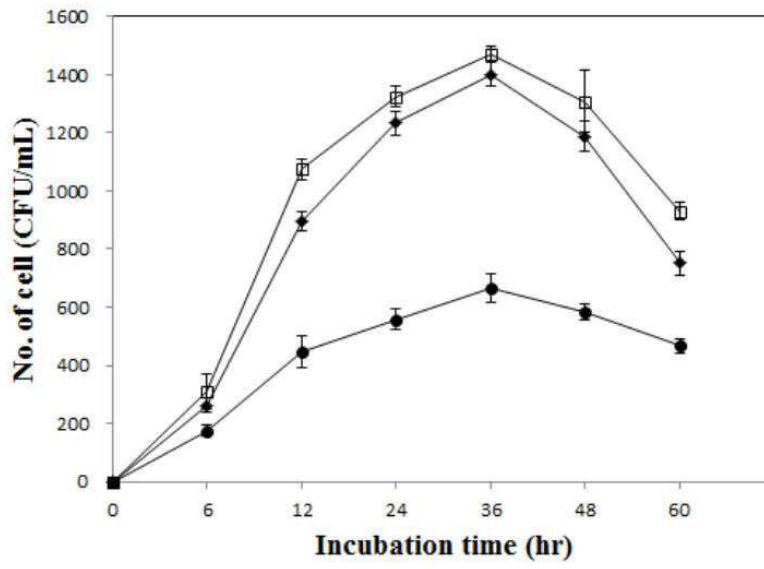
도면4



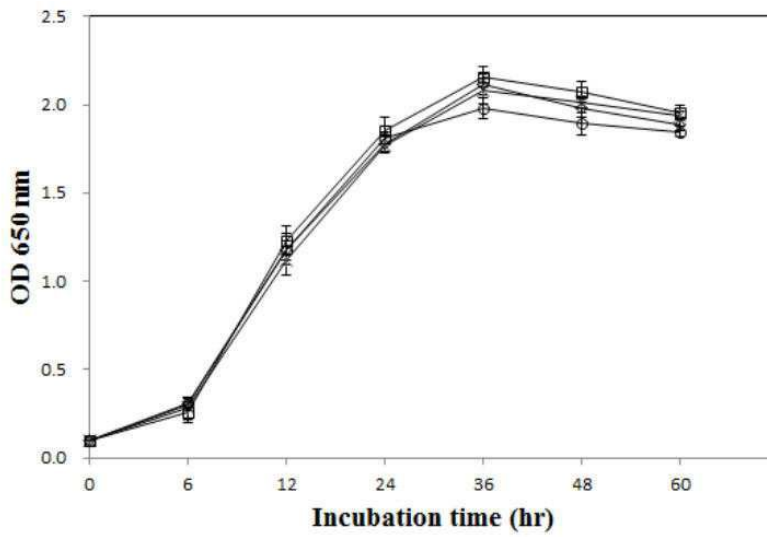
도면5



도면6

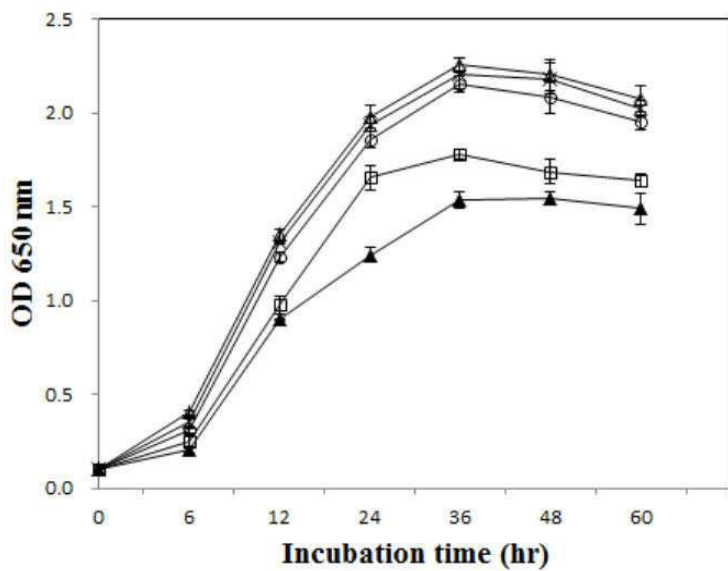


도면7

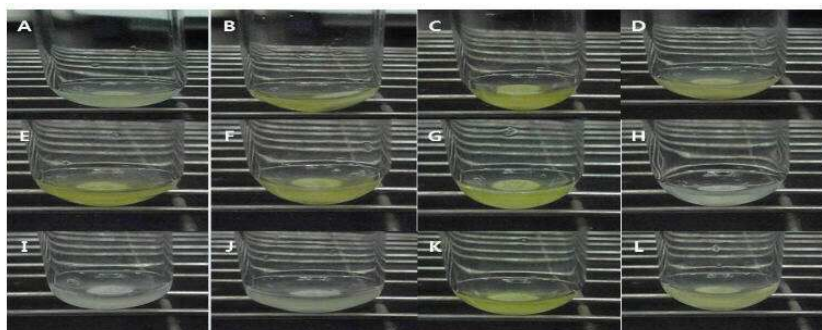




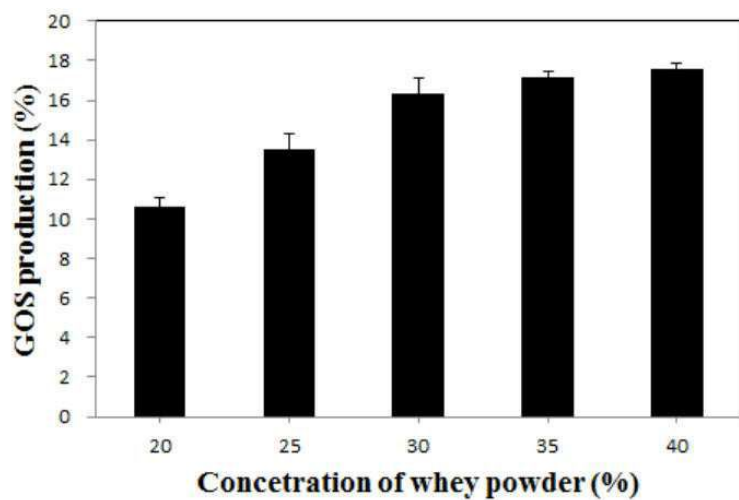
도면8



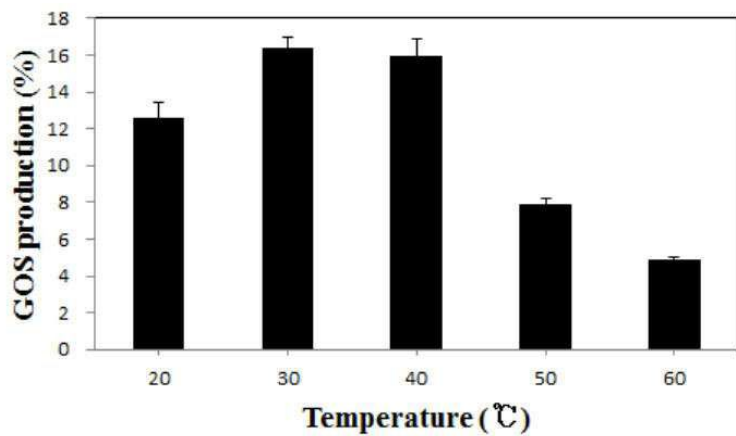
도면9



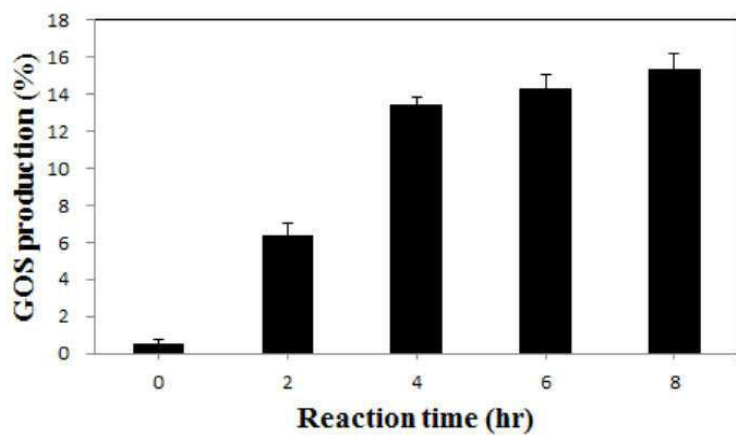
도면10



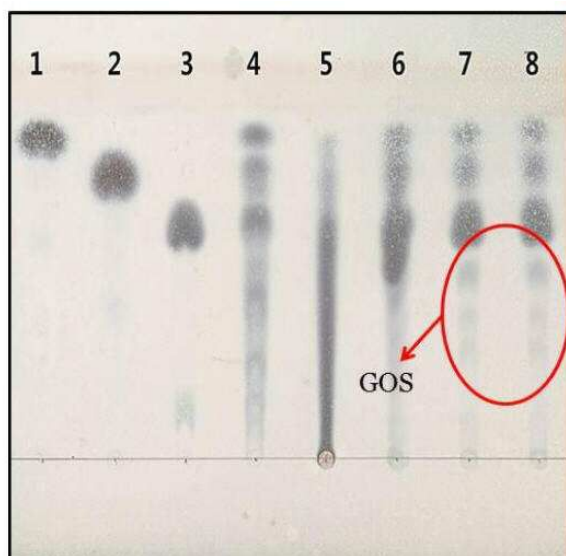
도면11



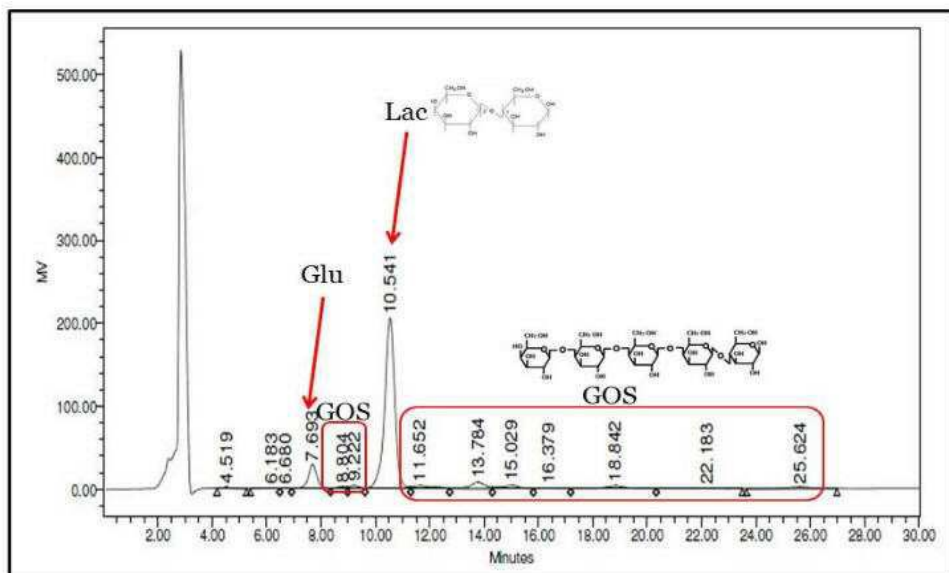
도면12



도면13



도면14



도면15

