



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2018년04월13일
(11) 등록번호 10-1832387
(24) 등록일자 2018년02월20일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 1/20 (2006.01) A23L 1/30 (2006.01)
C12P 19/44 (2006.01) C12P 33/16 (2006.01)
C12R 1/25 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 1/20 (2013.01)
A23L 33/105 (2016.08)
(21) 출원번호 10-2016-0087508
(22) 출원일자 2016년07월11일
심사청구일자 2016년07월11일
(65) 공개번호 10-2018-0006738
(43) 공개일자 2018년01월19일
(56) 선행기술조사문헌
KR1020080067076 A*
KR1020130139506 A*
강경명 등. 전통발효식품 유래 *Lactobacillus rhamnosus* GG를 이용한 산양삼 발효특성 및 생리 활성. 2015, 대구가톨릭대학교, 학위논문(박사). *
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
주식회사 위드네이처
전라북도 전주시 덕진구 원장동길 111-18(장동, 전북생물산업진흥원)
(72) 발명자
강경명
전라북도 전주시 완산구 온고을로 119, 102동 806호 (신일아파트)
이진영
경기도 안성시 공도읍 공도로 142, 102동 1802호 (디자인시티블루밍아파트)
(74) 대리인
최규환

전체 청구항 수 : 총 8 항

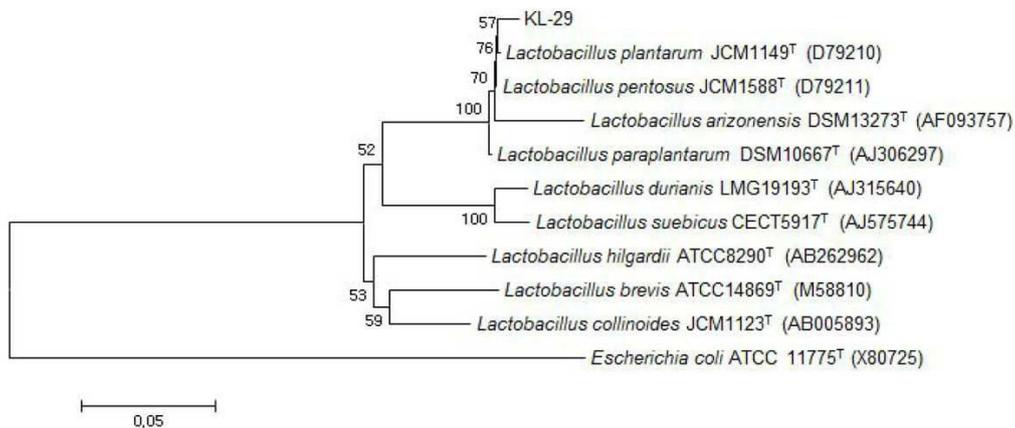
심사관 : 김정희

(54) 발명의 명칭 유산균을 이용한 특정 진세노사이드 함량이 증진된 산양삼 발효물의 제조방법

(57) 요약

본 발명은 진세노사이드 생물전환능, 항균 활성, 내산성 및 내담즙성을 가지며, β-글루코시다아제 활성을 갖는 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) KL-29 균주(기탁번호: KCCM11844P), 상기 균주 또는 이의 배양액을 포함하는 산양삼 발효용 미생물 제제, 상기 균주를 이용하여 특정 진세노사이드 함량이 증진된 산양삼 발효물의 제조방법, 상기 방법으로 제조된 특정 진세노사이드 함량이 증진된 산양삼 발효물 및 상기 균주를 이용하여 산양삼 발효물의 Rd, Rg3, Rh1, Rh2 및 C-K(Compound-K)로 이루어진 균으로부터 선택되는 하나 이상의 진세노사이드 함량을 증진시키는 방법에 관한 것이다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

C12P 19/44 (2013.01)

C12P 33/16 (2013.01)

A23V 2002/00 (2013.01)

A23V 2250/2124 (2013.01)

A23Y 2220/67 (2013.01)

C12R 1/25 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 R0004309

부처명 산업통상자원부

연구관리전문기관 대경지역사업 평가원

연구사업명 지역주력산업육성(비R&D) 기업지원사업

연구과제명 지역 전통생물자원의 기능성 DB를 기반으로 한 경북지역 기능성바이오소재 산업의 기술지원사업

기 여 율 1/1

주관기관 안동대학교

연구기간 2015.08.01 ~ 2016.07.31

공지예외적용 : 있음

명세서

청구범위

청구항 1

Rg3 및 Rh1으로의 진세노사이드 생물전환능, 항균 활성, 내산성 및 내담즙성을 가지며, β -글루코시다아제 활성을 갖는 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) KL-29 균주(기탁번호: KCCM11844P).

청구항 2

삭제

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 균주는 리스테리아 모노사이토제네스(*Listeria monocytogenes*), 스타필로코커스 아우레우스(*Staphylococcus aureus*), 바실러스 세레우스(*Bacillus cereus*), 바실러스 메가테리움(*Bacillus megaterium*), 대장균(*Escherichia coli*), 살모넬라 엔테리티디스(*Salmonella enteritidis*), 비브리오 파라헤몰리티쿠스(*Vibrio parahaemolyticus*) 및 슈도모나스 플루오레스센스(*Pseudomonas fluorescens*)에 대해 항균 활성을 갖는 것을 특징으로 하는 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) KL-29 균주(기탁번호: KCCM11844P).

청구항 4

제3항에 있어서, 상기 균주는 에스테라아제(esterase), 류신 아릴아미다제(leucine arylamidase), 발린 아릴아미다제(valine arylamidase), 시스틴 아릴아미다제(cystine arylamidase), 애시드 포스파타아제(Acid phosphatase), β -갈락토시다아제(β -galactosidase) 및 α -글루코시다아제(α -glucosidase) 활성을 추가로 갖는 것을 특징으로 하는 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) KL-29 균주(기탁번호: KCCM11844P).

청구항 5

제1항, 제3항, 제4항 중 어느 한 항의 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) KL-29 균주(기탁번호: KCCM11844P) 또는 이의 배양액을 포함하는 산양삼 발효용 미생물 제제.

청구항 6

- (a) 분쇄한 산양삼에 에탄올을 첨가한 후 추출한 추출물을 여과하고 건조하는 단계;
- (b) 배지에 상기 (a)단계의 건조한 추출물을 첨가한 후 멸균하는 단계; 및
- (c) 상기 (b)단계의 멸균한 배지에 제1항, 제3항, 제4항 중 어느 한 항의 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) KL-29 균주(기탁번호: KCCM11844P)를 접종하여 발효하는 단계를 포함하는, 진세노사이드 Rg3 및 Rh1의 함량이 증진된 산양삼 발효물의 제조방법.

청구항 7

삭제

청구항 8

- 제6항에 있어서,
- (a) 분쇄한 산양삼에 65~75%(v/v) 에탄올을 첨가한 후 20~25℃에서 20~28시간 동안 추출한 추출물을 여과하고 건조하는 단계;
- (b) 배지에 상기 (a)단계의 건조한 추출물을 0.1~1%(w/v) 첨가한 후 110~130℃에서 10~20분 동안 멸균하는 단계; 및
- (c) 상기 (b)단계의 멸균한 배지에 제1항의 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) KL-29 균주(기탁

번호: KCCM11844P)를 접종하여 35~39℃에서 66~78시간 동안 발효하는 단계를 포함하는 , 진세노사이드 Rg3 및 Rh1의 함량이 증진된 산양삼 발효물의 제조방법.

청구항 9

제6항의 방법으로 제조된 , 진세노사이드 Rg3 및 Rh1의 함량이 증진된 산양삼 발효물.

청구항 10

(a) 분쇄한 산양삼에 65~75%(v/v) 에탄올을 첨가한 후 20~25℃에서 20~28시간 동안 추출한 추출물을 여과하고 건조하는 단계;

(b) 배지에 상기 (a)단계의 건조한 추출물을 0.1~1%(w/v) 첨가한 후 110~130℃에서 10~20분 동안 멸균하는 단계; 및

(c) 상기 (b)단계의 멸균한 배지에 제1항, 제3항, 제4항 중 어느 한 항의 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) KL-29 균주(기탁번호: KCCM11844P)를 접종하여 35~39℃에서 66~78시간 동안 발효하는 단계를 포함하는 , 산양삼 발효물의 진세노사이드 Rg3 및 Rh1 함량을 증진시키는 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 진세노사이드 생물전환능, 항균 활성, 내산성 및 내담즙성을 가지며, β-글루코시다아제 활성을 갖는 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) KL-29 균주(기탁번호: KCCM11844P), 상기 균주 또는 이의 배양액을 포함하는 산양삼 발효용 미생물 제제, 상기 균주를 이용하여 특정 진세노사이드 함량이 증진된 산양삼 발효물의 제조방법, 상기 방법으로 제조된 특정 진세노사이드 함량이 증진된 산양삼 발효물 및 상기 균주를 이용하여 산양삼 발효물의 Rd, Rg3, Rh1, Rh2 및 C-K(Compound-K)로 이루어진 균으로부터 선택되는 하나 이상의 진세노사이드 함량을 증진시키는 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 고려인삼(*Panax ginseng* C.A. Meyer)은 오가피나무과(*Araliaceae*) 인삼속 (*Panax*) 식물에 속하는 다년생 반음지성 속근초로서 한국, 중국, 일본을 비롯한 동아시아와 러시아를 비롯한 유럽에서까지 뿌리를 식용 또는 약용으로 이용하여 왔다. 이러한 고려인삼의 종류로는 천연적으로 자연방임 상태로 자란 것은 산삼(山蔘), 산삼의 종자를 산림 내에 자연방임 형태로 기른 산삼을 산양산삼(山養山蔘) 혹은 산양삼(山養蔘)이라고 하며, 산림에서 재배를 하지만 인식재배 등 인위적인 방법을 통해 너두를 길게 기르는 것에서 자연방임형태로 재배하는 것을 장뇌삼(長腦蔘)이라고 한다. 또한 수삼(水蔘)은 그 씨앗을 밭에 파종하여 재배된 것을 말한다.

[0003] 이러한 고려인삼의 유효성분은 구조적 특징에 따라 크게 사포닌계와 비(非)사포닌계로 구분할 수 있다. 사포닌계에는 인삼 특유의 사포닌인 진세노사이드 등이 알려져 있으며, 비(非)사포닌계의 생리활성 물질로는 폴리아세틸렌(polyacetylene), 페놀성 화합물(phenolic compounds), 산성다당체(acidic polysaccharides), 펩티드(peptides), 알칼로이드(alkaloid), 아미노산 유도체 등이 있다. 또한 기타 성분으로는 휘발성유(volatile oil), 당(sugar), 전분(starch), 펙틴(pectins), 미네랄(minerals) 등이 있다. 이 중에서 대표적인 화학성분인 진세노사이드(ginsenoside)는 비당부(sapogenin, aqlycone)에 당류가 결합된 배당체이며, 아글리콘(aglycone)의 골격구조를 기준으로 하여 트리테르페노이드(triterpenoide)계 사포닌과 스테로이드(steroid)계 사포닌으로 크게 분류된다. 고려인삼의 진세노사이드(ginsenosides)는 담마레인(dammarane)계 트리테르페노이드(triterpenoide) 사포닌에 해당되며 인삼(*Panax*)속 식물에만 존재하는 특유의 성분으로 약성이 매우 온화하고 과량 투여에 의한 독성 및 용혈 작용이 거의 없는 것으로 밝혀져 있다. 진세노사이드는 아글리콘에 결합된 알콜성 OH의 수에 따라 2개(3, 12번 위치)가 결합된 경우 PPD(protonaxadiol)계, 3개가(3, 6, 12번 위치) 결합된 경우 PPT(protopanaxatriol)계로 구분된다. 진세노사이드의 구조는 트리테르페노이드(triterpenoide) 계열의 담마레인(dammarane) 골격에 글루코스, 람노오스 및 아라비노오스 등이 결합되어 있으며 이들을 TLC(Thin layer chromatography)에서 극성의 순서에 따라 진세노사이드-Rx라 명명하였다. 일본의 Shibata, Tanaka group은 1970년대 초부터 시작하여 지금까지 백삼 및 홍삼의 사포닌 성분에 대한 광범위한 연구로 32종 진세노사이드의 화학구조를 밝힌 바 있다.

[0004] 한편 이러한 진세노사이드에 대한 효능으로 항당뇨 활성, 항암작용, 항산화작용, 간기능 촉진 및 숙취제거효과,

항 피로 및 항스트레스 작용, 면역기능증강 등 다양한 효능 검증이 *in vitro* 또는 *in vivo* 실험을 통해 보고되어 있다. 이러한 진세노사이드의 약리 활성 이외에 진세노사이드의 분석 기술과 진세노사이드 성분이 체내에서 어떻게 흡수가 되는지에 대한 연구가 이루어지고 있다. 이들 진세노사이드 중 고분자 진세노사이드(major ginsenosides) Rb1이 구강으로 섭취하였을 경우 혈액 내에서 검출되지 않으며 가수분해 형태인 컴파운드 K(C-K)의 형태로 검출되는 것을 확인하였다. 이들 결과에 따라 장내 미생물의 차이로 인해 인삼 사포닌인 고분자 진세노사이드(major ginsenosides)의 분해 및 흡수 정도의 차이를 없애기 위해, 고분자 진세노사이드를 저분자 진세노사이드(minor ginsenosides)로 미리 가수분해를 시키는 연구가 필요한 실정이다. 하지만, 저분자 진세노사이드 Rg3, Rh1, Rh2, C-K는 일반적인 인삼에서는 거의 용출이 되지 않고 홍삼에서 일부 검출되기 때문에 인삼이나 홍삼으로부터 많은 양의 저분자 진세노사이드 Rg3, Rh1, Rh2, C-K를 얻을 수 있는 방법의 개발이 필요한 현실이다. 이러한 저분자 진세노사이드를 얻어내기 위해서는 기존에 존재하는 고분자 진세노사이드로부터 당의 전처리를 통한 가수분해를 유도하거나 발효를 하여 메이저 진세노사이드(major ginsenosides) 내부에 있는 글라이코사이드 결합을 끊어 주어야 한다. 저분자 진세노사이드를 얻기 위한 전처리 가수분해 방법 중 고온처리방법 및 증숙 공정은 높은 온도를 유지하기 위해 많은 에너지가 소모되며 그에 따른 시간과 비용의 소모가 불가피하다. 그리고 증숙 과정을 여러 번 반복하기 위해서는 보통 1주일 정도의 증숙 시간이 필요하며, 높은 온도를 장시간 유지해야하기 때문에 경제적인 손실이 따른다.

[0005] 최근 특수한 방법을 이용하여 인삼 성분을 인체에 흡수되기 용이하도록 전환하거나, 미생물이 분비하는 효소 등의 생촉매의 기능을 활용하여 기능성 물질을 생물전환반응(bioconversion 또는 biotransformation)하는 방법으로 특정성분을 강화하여 새로운 신소재나 신제품을 개발할 수 있는 인간과 환경을 고려한 청정기술로서 최근에 활발히 연구되고 있다. 하지만 이러한 연구는 다양한 고려인삼 중 수삼 및 수삼의 1차 가공형태인 인삼(백삼, 홍삼, 태극삼 등)에 대한 연구가 대부분으로 산삼 및 산양삼에 대한 발효 가능성 연구는 미비한 실정이다.

[0006] 한국등록특허 제0997054호에는 진공조건에서 중국균을 분사하여 발효시킨 산양삼의 발효방법이 개시되어 있고, 한국공개특허 제2012-0036425호에는 케피어 그레인을 이용한 산양삼의 발효방법이 개시되어 있으나, 본 발명의 유산균을 이용한 특정 진세노사이드 함량이 증진된 발효 산양삼의 제조방법과는 상이하다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명은 상기와 같은 요구에 의해 도출된 것으로서, 본 발명에서는 항균 활성, 내산성 및 내담즙성을 가지며, β-글루코시다아제 활성이 우수한 유산균을 선별하고자 하여, 김치로부터 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) KL-29 균주를 분리하였고, 상기 균주는 항균 활성, 내산성 및 내담즙성을 가지며, β-글루코시다아제 활성이 우수하면서 진세노사이드 생물전환능이 우수함을 확인하였다. 따라서, 본 발명에서 분리한 락토바실러스 플란타룸 KL-29 균주는 특정 진세노사이드 함량이 증진된 산양삼 발효물 제조에 중요하게 사용될 수 있는 것을 확인함으로써, 본 발명을 완성하였다.

과제의 해결 수단

[0008] 상기 과제를 해결하기 위해, 본 발명은 진세노사이드 생물전환능, 항균 활성, 내산성 및 내담즙성을 가지며, β-글루코시다아제 활성을 갖는 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) KL-29 균주(기탁번호: KCCM11844P)를 제공한다.

[0009] 또한, 본 발명은 상기 균주 또는 이의 배양액을 포함하는 산양삼 발효용 미생물 제제를 제공한다.

[0010] 또한, 본 발명은 (a) 분쇄한 산양삼에 에탄올을 첨가한 후 추출한 추출물을 여과하고 건조하는 단계; (b) 배지에 상기 (a)단계의 건조한 추출물을 첨가한 후 멸균하는 단계; 및 (c) 상기 (b)단계의 멸균한 배지에 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) KL-29 균주(기탁번호: KCCM11844P)를 접종하여 발효하는 단계를 포함하는 특정 진세노사이드 함량이 증진된 산양삼 발효물의 제조방법을 제공한다.

[0011] 또한, 본 발명은 상기 방법으로 제조된 특정 진세노사이드 함량이 증진된 산양삼 발효물을 제공한다.

[0012] 또한, 본 발명은 (a) 분쇄한 산양삼에 에탄올을 첨가한 후 추출한 추출물을 여과하고 건조하는 단계; (b) 배지에 상기 (a)단계의 건조한 추출물을 첨가한 후 멸균하는 단계; 및 (c) 상기 (b)단계의 멸균한 배지에 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) KL-29 균주(기탁번호: KCCM11844P)를 접종하여 발효하는 단계를 포함하는 산양삼 발효물의 Rd, Rg3, Rh1, Rh2 및 C-K(Compound-K)로 이루어진 균으로부터 선택되는 하나 이상의 진

세노사이드 함량을 증진시키는 방법을 제공한다.

발명의 효과

[0013] 본 발명에서는 김치로부터 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) KL-29 균주를 분리하였고, 상기 균주가 진세노사이드 생물전환능, 항균 활성, 내산성 및 내담즙성을 가지며, β-글루코시다아제 활성을 갖는 균주임을 확인하였다. 따라서, 본 발명에서는 분리한 락토바실러스 플란타룸 KL-29 균주를 특정 진세노사이드 함량이 증진된 산양삼 발효물 제조에 중요하게 사용될 수 있는 관련 업계에 매우 중요한 발명으로 평가된다.

도면의 간단한 설명

[0014] 도 1은 선발된 유산균의 16S rRNA 유전자 염기서열을 분석하여 GenBank에 등록되어 있는 유산균들과 상동성을 분석한 것이다.

도 2는 산양삼 발효물의 발효시간에 따른 생균수를 비교한 그래프이다.

도 3은 산양삼 발효물의 발효시간에 따른 pH 및 적정산도를 비교한 그래프이다.

도 2 내지 3의 ◇: 대조구(control, 추출물 무첨가), □: 산양삼 추출물 0.10% 첨가, △: 산양삼 추출물 0.25% 첨가, ○: 산양삼 추출물 0.5% 첨가, ×: 산양삼 추출물 1.00% 첨가하여 발효한 발효물을 의미한다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0015] 본 발명의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 진세노사이드 생물전환능, 항균 활성, 내산성 및 내담즙성을 가지며, β-글루코시다아제 활성을 갖는 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) KL-29 균주(기탁번호: KCCM11844P)를 제공한다.

[0016] 본 발명의 일 구현 예에 따른 균주에서, 상기 균주는 Rd, Rg3, Rh1, Rh2 및 C-K(Compound-K)로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 진세노사이드 함량을 증진시키는 것을 특징으로 한다.

[0017] 또한, 본 발명의 일 구현 예에 따른 균주에서, 상기 항균 활성은 리스테리아 모노사이토제네스(*Listeria monocytogenes*), 스타필로코커스 아우레우스(*Staphylococcus aureus*), 바실러스 세레우스(*Bacillus cereus*), 바실러스 메가테리움(*Bacillus megaterium*), 대장균(*Escherichia coli*), 살모넬라 엔테리티디스(*Salmonella enteritidis*), 비브리오 파라헤몰리티쿠스(*Vibrio parahaemolyticus*) 및 슈도모나스 플루오레센스(*Pseudomonas fluorescens*)에 대해 항균 활성을 갖는 것을 특징으로 한다.

[0018] 또한, 본 발명의 일 구현 예에 따른 균주에서, 상기 균주는 에스테라아제(esterase), 류신 아릴아미다제(leucine arylamidase), 발린 아릴아미다제(valine arylamidase), 시스틴 아릴아미다제(cystine arylamidase), 에시드 포스파타아제(Acid phosphatase), β-갈락토시다아제(β-galactosidase) 및 α-글루코시다아제(α-glucosidase) 활성을 추가로 갖는 것을 특징으로 한다.

[0019] 또한, 본 발명은 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) KL-29 균주(기탁번호: KCCM11844P) 또는 이의 배양액을 포함하는 산양삼 발효용 미생물 제제를 제공한다.

[0020] 본 발명에 따른 산양삼 발효용 미생물 제제는 용액, 분말, 현탁액, 분산액, 에멀전, 유성 분산액, 페이스트, 분진, 흡입물 물질 또는 과립제로 제조할 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다.

[0021] 또한, 본 발명은

[0022] (a) 분쇄한 산양삼에 에탄올을 첨가한 후 추출한 추출물을 여과하고 건조하는 단계;

[0023] (b) 배지에 상기 (a)단계의 건조한 추출물을 첨가한 후 멸균하는 단계; 및

[0024] (c) 상기 (b)단계의 멸균한 배지에 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) KL-29 균주(기탁번호: KCCM11844P)를 접종하여 발효하는 단계를 포함하는 특정 진세노사이드 함량이 증진된 산양삼 발효물의 제조방법을 제공한다.

[0025] 본 발명의 산양삼 발효물의 제조방법에서, 상기 특정 진세노사이드는 Rd, Rg3, Rh1, Rh2 및 C-K(Compound-K)로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0026] 또한, 본 발명의 산양삼 발효물의 제조방법에서, 상기 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) KL-29

균주(기탁번호: KCCM11844P)를 이용하여 산양삼 발효물을 제조하는 것에 비해 특정 진세노사이드 함량이 증진되어 품질이 우수한 산양삼 발효물로 제조할 수 있었다.

- [0027] 또한, 본 발명의 산양삼 발효물의 제조방법에서, 상기 (a)단계는 바람직하게는 분쇄한 산양삼에 65~75%(v/v) 에탄올을 8~12배량(v/w) 첨가한 후 20~25℃ 및 120~180 rpm으로 20~28시간 동안 추출한 추출물을 여과하고 건조할 수 있으며, 더욱 바람직하게는 분쇄한 산양삼에 70%(v/v) 에탄올을 10배량(v/w) 첨가한 후 20~25℃ 및 150 rpm으로 24시간 동안 추출한 추출물을 여과하고 건조할 수 있다. 산양삼을 상기와 같은 조건으로 추출한 추출물을 가지고 발효하여 발효물을 제조하는 것이, 특정 진세노사이드 함량을 더욱 증진시킬 수 있었으나, 추출하는 조건이 상기 범위를 벗어나는 경우 제조된 발효물 내 특정 진세노사이드 함량이 현저하게 감소하는 문제점이 있다.
- [0028] 또한, 본 발명의 산양삼 발효물의 제조방법에서, 상기 (b)단계의 첨가는 바람직하게는 배지에 건조한 추출물을 0.1~1%(w/v) 첨가할 수 있는데, 상기와 같은 조건으로 배지에 산양삼 추출물을 첨가하여 발효하는 것이 균주 발효 시 균주의 생장을 저해하지 않으면서 보다 효과적으로 발효시킬 수 있었으나, 추출물 첨가량이 상기 범위 미만일 경우 발효하는 효과가 미미하고, 상기 범위를 초과할 경우 균주가 잘 발효하지 못하는 문제점이 있다.
- [0029] 또한, 본 발명의 산양삼 발효물의 제조방법에서, 상기 (c)단계의 발효는 바람직하게는 35~39℃ 및 120~180 rpm으로 66~78시간 동안 발효할 수 있으며, 더욱 바람직하게는 37℃ 및 150 rpm으로 72시간 동안 발효할 수 있다. 상기와 같은 조건으로 발효한 산양삼 발효물은 발효물 내 특정 진세노사이드 함량을 더욱 증진시킬 수 있었으나, 발효하는 조건이 상기 범위를 벗어나는 경우 제조된 발효물 내 특정 진세노사이드 함량이 현저하게 감소하는 문제점이 있다,
- [0030] 본 발명의 산양삼 발효물의 제조방법은, 보다 구체적으로는
- [0031] (a) 분쇄한 산양삼에 65~75%(v/v) 에탄올을 첨가한 후 20~25℃ 및 120~180 rpm으로 20~28시간 동안 추출한 추출물을 여과하고 건조하는 단계;
- [0032] (b) 배지에 상기 (a)단계의 건조한 추출물을 0.1~1%(w/v) 첨가한 후 110~130℃에서 10~20분 동안 멸균하는 단계; 및
- [0033] (c) 상기 (b)단계의 멸균한 배지에 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) KL-29 균주(기탁번호: KCCM11844P)를 접종하여 35~39℃ 및 120~180 rpm으로 66~78시간 동안 발효하는 단계를 포함할 수 있으며,
- [0034] 더욱 구체적으로는
- [0035] (a) 분쇄한 산양삼에 70%(v/v) 에탄올을 첨가한 후 20~25℃ 및 150 rpm으로 24시간 동안 추출한 추출물을 여과하고 건조하는 단계;
- [0036] (b) 배지에 상기 (a)단계의 건조한 추출물을 0.1~1%(w/v) 첨가한 후 121℃에서 15분 동안 멸균하는 단계; 및
- [0037] (c) 상기 (b)단계의 멸균한 배지에 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) KL-29 균주(기탁번호: KCCM11844P)를 접종하여 37℃ 및 150 rpm으로 72시간 동안 발효하는 단계를 포함할 수 있다.
- [0038] 본 발명은 또한, 상기 방법으로 제조된 특정 진세노사이드 함량이 증진된 산양삼 발효물을 제공한다.
- [0039] 본 발명은 또한,
- [0040] (a) 분쇄한 산양삼에 65~75%(v/v) 에탄올을 첨가한 후 20~25℃ 및 120~180 rpm으로 20~28시간 동안 추출한 추출물을 여과하고 건조하는 단계;
- [0041] (b) 배지에 상기 (a)단계의 건조한 추출물을 0.1~1%(w/v) 첨가한 후 110~130℃에서 10~20분 동안 멸균하는 단계; 및
- [0042] (c) 상기 (b)단계의 멸균한 배지에 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) KL-29 균주(기탁번호: KCCM11844P)를 접종하여 35~39℃ 및 120~180 rpm으로 66~78시간 동안 발효하는 단계를 포함하는 산양삼 발효물의 Rd, Rg3, Rh1, Rh2 및 C-K(Compound-K)로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상의 진세노사이드 함량을 증진시키는 방법을 제공한다.
- [0043] 본 발명의 산양삼 발효물의 진세노사이드 함량을 증진시키는 방법은 보다 구체적으로는
- [0044] (a) 분쇄한 산양삼에 70%(v/v) 에탄올을 첨가한 후 20~25℃ 및 150 rpm으로 24시간 동안 추출한 추출물을 여과

하고 건조하는 단계;

[0045] (b) 배지에 상기 (a)단계의 건조한 추출물을 0.1~1%(w/v) 첨가한 후 121℃에서 15분 동안 멸균하는 단계; 및

[0046] (c) 상기 (b)단계의 멸균한 배지에 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) KL-29 균주(기탁번호: KCCM11844P)를 접종하여 37℃ 및 150 rpm으로 72시간 동안 발효하는 단계를 포함할 수 있다.

[0047] 이하, 본 발명의 실시예를 들어 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0048] **제조예 1: 산양삼 발효물 제조**

[0049] 산양삼 분쇄시료 100 g에 10배의 70% 에탄올을 가한 후 20~25℃ 및 150 rpm으로 24시간 동안 상온교반추출(SE, Stirrer Extraction)로 추출한 추출물을 여과 및 건조하였다. MRS 배지에 상기 건조된 산양삼 추출물을 일정농도(0.1~1.0%) 첨가하여 121℃에서 15분으로 가압고온 멸균하여 실온에서 서서히 식힌 다음 미리 활성화한 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) KL-29 균주(기탁번호: KCCM11844P)를 접종하여 37℃ 진탕배양기에서 150 rpm으로 72시간 발효하였다. 이후 발효가 완료된 발효물을 농축한 다음 동결건조하여 분말화 하였다.

[0050] **실험방법**

[0051] **1. 전통발효식품으로부터 프로바이오틱스 유산균 선별 및 배양특성**

[0052] 1) 전통발효식품 재료

[0053] 경북 울진군 재래시장에서 전통방법으로 제조한 발효식품으로 김치인 배추김치(2종), 깻잎김치, 열무김치 및 오이김치와 젓갈인 오징어젓, 모시조개젓, 가자미식혜, 도루묵식혜 및 된장(2종)을 수집하여 10℃에서 냉장보관하면서 사용하였다.

[0054] 2) 유산균 분리

[0055] 수집한 전통발효식품을 0.02% 아지드화나트륨(sodium azide)을 함유한 MRS agar(Difco, Detroit, MI, USA)에 도말하고, 37℃에서 24시간 배양 후 나타난 독립된 콜로니 중 특징적인 콜로니를 순수 분리하였다. 순수 분리한 유산균은 MRS 사면 한천에 접종하여 37℃에서 24시간 배양한 후 4℃에서 냉장보관하면서 사용하였다.

[0056] 3) 분리 유산균의 항균활성 측정

[0057] 전통발효식품에서 분리한 유산균의 식품부패유발미생물에 대한 항균활성은 페이퍼 디스크법(paper disc method)에 의한 클리어존(clear zone)의 생성 유무로 측정하였다.

[0058] 4) 분리 유산균의 인공위액 및 담즙산에 대한 내성 측정

[0059] 인공위액에 대한 내성은 1N HCl을 사용하여 pH 2.5로 조정된 MRS broth에 펩신 1%를 첨가한 인공위액에 선별 유산균을 접종하여 37℃에서 3시간 배양한 후 생균수를 측정하였다. 인공담즙산에 대한 내성은 MRS broth에 판크레아틴(Kanto Chemical, Tokyo, Japan) 1%와 10% oxgall(Difco, Detroit, MI, USA) 용액 1%를 첨가한 인공담즙액에 대해 인공위액에서 3시간 배양한 균체를 접종하여 37℃에서 24시간 배양한 후 나타난 콜로니수를 계측하였다.

[0060] 5) 분리 유산균의 β-글루코시다아제 활성 측정

[0061] β-글루코시다아제 활성을 갖는 유산균의 선별을 위해 에스쿨린 한천법을 이용하였다. MRS 배지로부터 분리된 유산균을 에스쿨린 한천 배지(표 1)에 접종하여 배지 내에서의 색깔 변화를 관찰하였다. 이후 콜로니 주위에

black complex가 형성된 유산균을 β-글루코시다아제 활성을 가지는 균주라고 판단하였으며, 다시 한 번 에스쿨린 한천 플레이트(Esculin agar plate)에 스트리킹(streaking)하여 순수 분리와 β-글루코시다아제 활성 여부를 재확인하였다.

표 1

에스쿨린 한천 배지 조성

Ingredients	Amount (g/L)
Pancreatic digest of casein (Casamino acids)	13
NaCl	5
Yeast extract	5
Heart muscle, solids from infusion	2
Esculin	1
Ferric ammonium citrate	0.5
Agar	15

[0062]

[0063]

6) 선발 유산균의 동정

[0064]

(1) 생화학적 특성 분석

[0065]

선발된 유산균의 생화학적 동정을 위해 그람 염색, 가스 형성 유무, 카탈라아제 활성 실험을 조사하였고, API 50CHL 키트(Biomriex, France)를 이용하여 균주의 생화학적 특성을 조사하였다. API 키트는 제조사의 사용 지침에 따라 다음과 같이 진행하였다. 균주를 MRS 액체 배지에 접종하여 37℃에서 배양한 후 에펜도르프 튜브(eppendorf tube)에 분주한 후 10,000 rpm에서 5분간 원심분리 후 세포를 회수하여 멸균 식염수로 1회 세척하였다. 세포는 멸균 증류수로 현탁하여 무균적으로 깐 API 50CHL 배지의 앰플에 접종한 후 피펫팅(pipetting)하여 고르게 섞어준 다음, 각 테스트 스트립(test strip)의 마이크로튜브(microtube)에 150 μl씩 분주하였다. 분주를 마친 후 API 키트는 37℃ 인큐베이터에서 24~72시간까지 배양하면서 색의 변화를 관찰하였다.

[0066]

(2) 16S rRNA 유전자 염기서열 분석 및 계통학적 분석

[0067]

선발된 유산균의 16S rRNA 유전자 염기서열 분석은 프라이머를 이용하여 DNA를 증폭 후 염기서열 분석을 수행하여(Solgent Co., Daejeon, Korea) 확인하였다. 분리 균주의 계통수(phylogenetic tree)를 그리기 위해서 GenBank에 등록되어 있는 시퀀스 데이터(sequence data)를 이용하여 분리 균주와 가까운 위치에 있는 여러 종(species)들의 type strain의 16S rRNA gene 염기서열을 조사하고 이들의 염기서열을 MEGA 3 Program을 사용하여 계통분류학적 위치를 결정하였다.

[0068]

7) 선발 유산균의 효소활성 측정

[0069]

선발된 유산균의 효소 활성 정도를 확인하기 위하여 API ZYM enzyme system(Biomriex, France)을 사용하였다. 선발 균주를 MRS agar에 평판도말한 후 37℃에서 18시간 배양한 후 균체를 취하여 API Suspension medium에 5.0~6.0 McFarland standard로 탁도를 맞추었다. API ZYM 스트립의 각각의 큐플에 suspension medium을 65 μl씩 분주하고 37℃에서 4시간 동안 배양하였다. 효소활성은 표준색상표를 비교하여 0~5의 수치로 나타내었다.

[0070]

2. 산양삼 추출물의 발효특성

[0071]

1) 산양삼 추출물의 발효

[0072]

산양삼 추출물의 제조는 산양삼 분쇄시료 100 g에 10배의 70% 에탄올(E)을 가한 후 상온교반추출(SE, Stirrer Extraction)로 추출물을 제조하였다. 이후 발효는 MRS 배지에 건조된 산양삼 추출물(KGE)을 일정농도(0~1.0%) 첨가하여 121℃에서 15분으로 가압고온 멸균하여 실온에서 서서히 식힌 다음 미리 활성화한 4종의 선발 균주를 접종하여 37℃ 진탕배양기에서 150 rpm으로 72시간 발효하였다. 이후 발효가 완료된 발효물을 농축한 다음 동결

건조하여 분말화 하였다.

[0073] 2) 산양삼 발효물의 pH 및 적정산도 측정

[0074] 발효 중 일정 시간별로 시료를 취하여 산양삼 발효물의 pH와 적정산도를 측정하였다. 산양삼 발효물의 pH는 pH 미터(Orion 410A, Orion Research In., LA, USA)로 측정하였다. 적정산도는 0.1N NaOH를 이용하여 pH가 8.3이 될 때까지 소비된 NaOH 량을 젖산(lactic acid)으로 환산하였다.

[0075] 3) 산양삼 발효물의 생균수 측정

[0076] 산양삼 발효물의 생균수는 발효 중 일정 시간별로 시료를 무균적으로 취한 후 0.1% 펩톤수로 적정 희석하여 MRS agar에 접종하여 37℃에서 24시간 배양 후 나타나는 콜로니 수로 나타내었다.

[0077] 4) 산양삼 발효물의 진세노사이드 함량 측정

[0078] 수포화부탄올 추출법으로 조사포닌을 추출 정량하였으며, 진세노사이드 조성 및 함량은 조사포닌 추출한 것을 메탄올에 용해한 후 이를 멤브레인 필터(0.20 μm pore size)로 여과, Acquity UPLC BEH C₁₈ column(1.7 μm, 2.1 × 100 mm)을 장착한 UPLC(Acquity UPLC System; Waters, Milford, MA, USA)에 10 μl씩 주입하여 분석하였다. 분석조건은 이동상으로 용매 A(acetonitrile 80 : water 5 : isopropyl alcohol 15)와 용매 B(acetonitrile 80 : water 25 : isopropyl alcohol 15)를 이용하여 용매 A를 0분(75%), 28분(15%), 35분(0%), 50분(75%)의 조건 하에 유속 0.8 mL/min으로 흘려주었다.

[0079] 실시예 1: 전통발효식품으로부터 유산균 선발 및 배양특성

[0080] 1) 분리 유산균의 항균활성

[0081] 전통발효식품으로부터 프로바이오틱스 기능 및 산양삼 발효에 적합한 스타터(starter)를 선발하기 위해 경북 울진군 지역에서 김치류, 된장류 및 젓갈류 등을 수집하여 총 78 균주를 분리하였다. 이들 78 균주를 대상으로 병원성 미생물의 그람양성균(gram positive bacteria)과 그람음성균(gram negative bacteria)에 대한 항균 스펙트럼(spectrum)을 페이퍼디스크법으로 조사하였다(표 2).

[0082] 분리 균주에 따라 병원성 미생물에 대한 항균성의 차이는 나타내었고, 그 중 11개 균주는 그람양성균(gram positive bacteria)인 리스테리아 모노사이토제네스(*L. monocytogenes*), 스타필로코커스 아우레우스(*St. aureus*), 바실러스 세레우스(*B. cereus*), 바실러스 메가테리움(*B. megaterium*)와 그람음성균(gram negative bacteria)인 대장균(*E. coli*), 살모넬라 엔테리티디스(*Sal. enteritidis*), 비브리오 파라헤몰리티쿠스(*V. parahaemolyticus*), 슈도모나스 플루오레센스(*P. fluorescens*)에 높은 활성을 나타내었다. 항균 스펙트럼(spectrum)이 가장 넓은 유산균은 KL-12와 KL-29으로 그람 염색 특성에 상관없이 모든 공시균주에 대한 높은 항균활성을 나타내었으며, 그 중 KL-29이 가장 높은 항균활성을 나타내었다.

[0083] 유산균은 식품 유래의 병원성 세균과 부패세균의 생육을 억제하는 기능을 가지는데 이러한 억제 기작은 유산균에 의해서 생성된 유산 및 초산, 저급 지방산, 과산화수소(hydrogen peroxide), 디아세틸(diacetyl), 박테리옌(bacteriocin), 포화 담즙산, 항생물질 및 면역체제자극 등의 작용이라고 보고되며, 장내 유산균은 병원성 세균인 스타필로코커스(*Staphylococcus*), 살모넬라(*Salmonella*), 쉬겔라(*Shigella*), 대장균형(*Coliform*) 등의 오염 및 번식을 억제함으로써 설사 등 장내질환을 예방하고 아울러 숙주의 면역시스템을 자극하여 감염에 대한 저항력을 높여주는 역할을 한다고 입증되고 있다. 본 실험에서는 KL-29가 다양한 식중독 원인 세균에 대해 그람 염색 특성에 관계없이 항균효과를 나타내는 것으로 확인되어 병원성 미생물을 억제하여 장내 균총을 개선시키는 효과를 기대할 수 있을 것으로 판단된다.

표 2

[0084]

병원균에 대한 항균활성

병원균	분리 유산균				
	KL-2	KL-12	KL-29	KL-45	KL-63
리스테리아 모노사이토제네스	+	+	++	+	+
스타필로코커스 아우레우스	+	+	++	+	+
바실러스 세레우스	+	+	+	+	+
바실러스 메가테리움	+	+	++	+	+
대장균	+	+	+	-	-
살모넬라 엔테리티디스	-	+	++	+	-
비브리오 파라헤몰리티쿠스	+	+	++	-	+
슈도모나스 플루오레센스	+	+	++	-	+
출처	김치	김치	김치	식혜	된장

[0085]

+: 항균활성 유, -: 항균활성 무

[0086]

저해환 직경(+++: 6 mm, ++: 4 mm, +: 2~3 mm)

[0087]

2) 분리 유산균의 인공위액 및 담즙액에 대한 내성

[0088]

유산균이 프로바이오틱스의 기능을 발휘하기 위해서는 소화관 내의 조건에서 생존해야 한다. 구강을 통해 섭취된 유산균은 위액과 각종 효소가 존재하는 위를 통과하고, 담즙이 존재하는 십이지장을 거쳐 최종 목적 부위인 장에 도달해야 정장의 효과를 기대할 수 있다. 그 중에서도 유산균이 위에서 위산과 같은 낮은 pH에서 생존하기 위해서 위산에 대한 내성을 나타내야 하며, 담즙성에 대한 내성을 지니는 것이 프로바이오틱스의 기본 특성이다. 분리 유산균의 인공 위액 및 담즙액에 대한 내성 측정 결과는 표 3에 나타내었다.

[0089]

배양 초기 모든 공시균주는 $10^7 \sim 10^8$ CFU/mL의 균수를 나타내었고, 인공위액에서 3시간 배양한 결과 KL-12, KL-29, KL-63은 $10^5 \sim 10^7$ CFU/mL의 생균수를 나타내어 인공 위액에 대한 내성이 있는 것으로 판단된다. 이들 유산균의 산에 대한 각기 다른 내성은 환경과 세포질 사이에 pH를 조절하면서 낮은 pH에서도 저항력을 가진 것으로 볼 수 있다.

[0090]

인공 담즙에 대한 내성을 조사하기 위해, 인공 위액에서 3시간 배양한 후, 인공 담즙액에서 24시간 배양하면서 생균수를 측정하였다(표 3). 분리 유산균인 KL-2는 인공 담즙액에서 배양시간이 진행될수록 점차 감소하는 경향을 나타내었지만, KL-12, KL-29, KL-63은 배양시간이 진행될수록 점차 증가하여 $10^6 \sim 10^7$ CFU/mL의 생균수를 나타내었다. 따라서 분리균주인 KL-12, KL-29, KL-63은 인공위액 및 담즙액에 대한 내성이 있는 것으로 나타났으며, 또한, 병원성 미생물에 대한 항균활성도 뛰어나 장내 환경을 개선시키는 프로바이오틱스로서의 기능을 발휘할 수 있을 것으로 판단된다.

표 3

[0091]

분리 유산균의 인공위액 및 담즙액에 대한 내성(log CFU/mL)

	배양시간 (hr)	분리 유산균				
		KL-2	KL-12	KL-29	KL-45	KL-63
I	0	7.84±0.04 ^{aA}	7.84±0.06 ^{aA}	7.77±0.02 ^{aA}	6.88±0.03 ^c	7.56±0.03 ^{bA}
	3	4.69±0.01 ^{dB}	5.70±0.03 ^{ad}	5.17±0.02 ^{bd}	ND	5.09±0.03 ^{cd}
II	0	4.39±0.03 ^{CC}	5.71±0.04 ^{ad}	5.11±0.09 ^{bd}	ND	5.04±0.05 ^{bd}
	6	1.69±0.04 ^{DD}	6.37±0.07 ^{ac}	5.37±0.02 ^{bc}	ND	5.69±0.03 ^{CC}
	24	1.04±0.08 ^{DE}	7.05±0.01 ^{ab}	6.17±0.02 ^{CB}	ND	7.02±0.01 ^{BB}

[0092]

같은 열 내 다른 윗첨자(A-E)와 같은 행 내 다른 윗첨자(a-d)는 유의차를 나타냄($P < 0.05$)

- [0093] I: 인공위액에서 37℃에서 3시간 동안 배양하면서 생균수 측정
- [0094] II: 인공 위액에서 37℃에서 3시간 배양한 후, 인공 담즙산에서 37℃에서 24시간 배양하면서 생균수를 측정
- [0095] ND: 검출되지 않음(not detected)

[0096] **3) 분리 유산균의 β-글루코시다아제 활성**

[0097] 에스쿨린 한천법을 이용하여 분리 유산균의 β-글루코시다아제 활성을 측정한 결과는 표 4에 나타내었다. 일반적으로 β-글루코시다아제 분비 미생물은 에스쿨린의 β-글루코스를 분리시킨다. 생성된 에스쿨레틴(esuletin)이 배지 내의 시트르산철암모늄(ferric ammonium citrate)과 반응하여 플레이트 상의 콜로니 주위에 블랙 콤플렉스(black complex)를 형성한다. 측정 결과 KL-12, KL-29, KL-63의 배양 플레이트 상의 콜로니 주위에 블랙 콤플렉스(black complex)를 형성하여, β-글루코시다아제 활성이 있는 것으로 나타났다(표 4).

표 4

[0098] 분리 유산균의 β-글루코시다아제 활성

	분리 유산균				
	KL-2	KL-12	KL-29	KL-45	KL-63
β-글루코시다아제 활성	-	+	+	-	+

[0099] +: 활성 유, -: 활성 무

[0100] **4) 분리 유산균의 효소활성**

[0101] 항균활성, 인공위액 및 담즙액 내성 및 β-글루코시다아제 활성이 우수한 3균주를 선발하였고, 균주가 성장하면서 생산하는 효소의 활성 정도를 확인하기 위하여 API ZYM 키트를 이용하여 분석하였다(표 5).

[0102] 표 5의 0~5 범위의 수치는 표준색상표와 비교하여 배정되었고, 0은 음성 반응이고, 5는 최대 강도 반응을 나타내고, 1~4는 중간반응을 나타낸다. 색상 강도로부터 1은 5 nmol, 2는 10 nmol, 3은 20 nmol, 4는 30 nmol, 5는 40 nmol로 활성이 추정된다.

[0103] 분석 결과 3 균주는 모두 β-글루코시다아제 활성이 있는 것으로 나타났으며, 그 중 KL-29가 가장 높은 40 nmol의 활성을 나타내었다. 또한 β-글루코시다아제 활성 이외에도 약 7종의 효소활성이 있는 것으로 관찰되었다. 지방 분해에 관여하는 에스테라아제(esterase), 펩타이드 가수분해 효소인 류신 아릴아미다제(leucine arylamidase), 발린 아릴아미다제(valine arylamidase), 시스틴 아릴아미다제(cystine arylamidase) 등에서 5~30 nmol의 활성을 나타내었다. 또한 벤조피렌을 발암성 물질로 전환시키는 발암효소인 β-글루쿠로니다아제 활성의 경우 락토바실러스 쿨바투스(*L. curvatus*) KL-12(5 nmol)을 제외한 다른 균주는 활성이 없는 것으로 나타나 안전한 유산균임을 알 수가 있었다. 따라서 프로바이오틱스 기능과 산양삼 발효에 적합한 스타터로 KL-29를 최종적으로 선발하였다.

표 5

[0104] 효소활성 측정

효소	KL-12	KL-29	KL-63
Control	0	0	0
Alkaline phosphatase	0	0	0
Esterase(C4)	3	1	0
Esterase Lipase(C8)	2	0	0
Lipase(C14)	0	0	0
Leucine arylamidase	3	4	5
Valine arylamidase	1	1	5
Crystine arylamidase	2	1	0
Trpsin	0	0	0

α -chymotrypsin	1	0	0
Acid phosphatase	2	2	2
Naphtol-AS-BI-phosphohydrolase	1	0	3
α -galactosidase	0	0	1
β -galactosidase	5	4	4
β -glucuronidase	1	0	0
α -glucosidase	1	1	4
β -glucosidase	2	5	3
N-acetyl- β -glucosaminidase	0	0	2
α -mannosidase	0	0	0
α -fucosidase	0	0	0

[0105] 실시예 2: 선발 유산균의 동정

[0106] (1) 생화학적 특성

[0107] 최종 선발된 KL-29 균주는 생화학적 특성을 분석한 결과 형태학적으로 KL-29는 간균으로 나타났으며, 그람 양성, 카탈라아제(catalase) 음성 그리고 정상발효유산균(homo fermentative lactic acid)으로 확인되었다. 또한 선발 균주의 생화학적 동정을 보기 위하여 API 50 CHL Kit를 이용하여 탄소원 이용성을 조사하였으며, 측정 결과 KL-29는 락토바실러스 플란타룸(98.5%)으로 간이 동정 되었다. 일반적으로 균주의 탄소원 이용 가능성을 보는 생화학적 테스트는 정확한 동정에 한계가 있으며 변종의 경우에는 차이를 보일 수 있기 때문에 이후 16S rRNA 유전자 염기서열 분석을 진행하였다.

[0108] (2) 16S rRNA 유전자 염기서열 분석

[0109] 최종 선발된 KL-29 균주의 16S rRNA 유전자 염기서열을 분석하여 GenBank에 등록되어 있는 유산균들과 상동성을 비교한 결과 KL-29는 락토바실러스 플란타룸(accession no. D79210)와 일치하여 최종적으로 락토바실러스 플란타룸(*L. plantarum*) KL-29(기탁번호: KCCM11844P)으로 명명하였다(도 1).

[0110] 실시예 3: 산양삼 발효물의 생균수, pH 및 적정산도

[0111] 프로바이오틱스 기능을 갖는 유산균을 이용하여 산양삼 추출물의 발효 가능성을 측정하기 위해 산양삼 추출물 (KGE)을 일정농도(0~1.0%) MRS broth에 첨가한 후 37°C에서 3일간 발효하면서 발효 특성을 분석하였다. 일정농도 첨가된 산양삼 발효물의 배양시간에 따른 생균수를 측정한 결과는 도 2와 같다. 선발 유산균은 산양삼 추출물에 대한 내성이 있는 것으로 나타났으며(데이터 미제시), 발효가 진행될수록 증가하는 경향을 나타내었고, 배양 12시간째 급격히 증가하여 10⁶ CFU/mL 이상의 균수를 나타내었다. 또한 대조구에 비해 산양삼 추출물 농도가 증가할수록 빠른 균 성장능을 나타내었다.

[0112] 산양삼 발효물의 pH는 모든 처리구가 발효가 진행될수록 감소하는 경향을 나타내었으며, 발효 12시간째 대조구에 비해 급격하게 감소하였고, 이후 pH는 서서히 감소하여 pH 3.9~4.0의 범위를 나타내었다(도 3). 이러한 pH의 변화는 발효 과정 중 유산균의 성장에 의해 생성된 산에 의하여 pH가 감소한 것으로 판단된다. 적정산도의 변화는 pH 변화와 유사한 경향을 나타내었다. 이상의 결과로 미루어 보아 선발 유산균은 산양삼 발효에 이용이 가능할 것으로 판단되며, 특히 프로바이오틱스 유산균을 스타터로 첨가할 경우 발효에 의한 이점과 더불어 첨가 유산균에 의한 기능성이 부가되어 기능성 식품으로서의 발효 산양삼 제조가 가능할 것으로 판단된다.

[0113] 실시예 4: 산양삼 발효물의 진세노사이드 함량

[0114] 선발 유산균인 락토바실러스 플란타룸 KL-29의 산양삼 발효물을 최종 선정하여 발효에 따른 진세노사이드 함량을 측정된 결과는 표 6과 같다. 발효 전 산양삼 추출물의 진세노사이드 함량은 15.98 mg/g을 나타내었는데, 3일간 발효한 락토바실러스 플란타룸 KL-29 발효물의 진세노사이드 함량은 10.37 mg/g으로 약 35% 감소하였다. 고분자 진세노사이드(Major ginsenoside) 함량은 발효 전 15.94 mg/g을 나타내었지만, 발효 후 8.09 mg/g으로 감소하였다. 산양삼 발효물의 고분자 진세노사이드인 Rb1, Rb2, Rb3 및 Rc는 각각 1.21, 0.68, 0.09, 0.65 mg/g

을 나타내었고, Rd, Re, Rf 및 Rg1는 각각 1.19, 2.35, 0.41, 1.51 mg/g을 나타내었다. 고분자 진세노사이드 중 진세노사이드 Rd만 증가하였는데 이는 진세노사이드 Rc에서 Rd로의 전환된 것으로 판단되며, 이는 진세노사이드- α -아라비노퓨라노시다아제(ginsenoside- α -arabinofuranosidase) 효소가 전환에 관련된 것으로 생각된다. 또한 β -글루코시다아제(β -glucosidase)에 의해 진세노사이드 Rb1의 당이 분해되어 Rd로 전환된 것을 의심해 볼 수 있다.

[0115] 저분자 진세노사이드(Minor ginsenoside) 함량은 발효 전 0.04 mg/g에서 발효 후 2.31 mg/g으로 증가하였다. 저분자 진세노사이드 Rg3, Rh1, Rh2 및 C-K는 각각 1.36, 0.71, 0.21, 0.03 mg/g을 나타내었다. 진세노사이드 Rg3의 증가는 진세노사이드 Rb1, Rb2, Rc의 C-20 위치에 부착된 안쪽 및 바깥쪽 포도당 분자를 β -글루코시다아제의 활성에 의해 순차적으로 가수분해시켜 진세노사이드 Rg3를 생성한 것으로 판단된다. 진세노사이드 Rh1 전환은 진세노사이드 Rf의 탄소 6번 위치에 β -1,2-글루코피라노실 그룹이 결합되어 있는데, 이때 β -1,2-글루코피라노실 그룹을 가수분해하는 β -글루코시다아제 활성에 의하여 Rh1으로 대사되는 것으로 추정되며, 진세노사이드 Rh2는 Rb1에서 전환된 Rg3의 탄소 3번 위치에 부착된 β -글루코피라노실 그룹 가수분해시켜 진세노사이드 Rh2로 대사되는 것으로 추정된다. 진세노사이드 컴파운드 K는 β -글루코시다아제 효소에 의해 진세노사이드 Rd 탄소 3번의 위치에 글루코스를 하나씩 끊어 F2로 전산화되며, 다시 F2를 컴파운드 K로 전환되는 과정을 추정할 수 있다.

표 6

산양삼 발효물의 진세노사이드 함량(mg/g)

[0116]

진세노사이드		KGE	
		비발효	발효
고분자 진세노사이드	Rb1	4.68	1.21
	Rb2	1.22	0.68
	Rb3	0.18	0.09
	Rc	1.56	0.65
	Rd	0.35	1.19
	Re	4.32	2.35
	Rf	1.02	0.41
	Rg1	2.59	1.51
저분자 진세노사이드	Rg3	0.01	1.36
	Rh1	0.03	0.71
	Rh2	0.00	0.21
	C-K	0.00	0.03
합계		15.98	10.37

[0117] 본 발명에서는 프로바이오틱스 기능을 갖는 유산균을 선발하고, 산양삼 효능의 극대화를 위해 선발된 유산균을 이용하여 산양삼 추출물을 발효한 후 증진된 2차적 생리활성효과와 주요 기능성 성분인 진세노사이드 성분의 조성 및 함량을 확인하고자 하였다. 이에 따라 산양삼에 대한 활용도가 식품개발 측면에서만 아니라 화장품 개발 소재와 약물학적 효능 효과를 가지는 기능성 소재로서의 개발이 가능할 것으로 판단된다.

수탁번호

[0118]

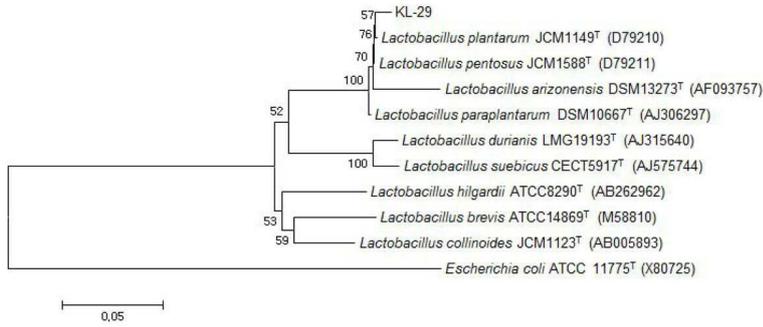
기탁기관명 : 한국미생물보존센터(국외)

수탁번호 : KCCM11844P

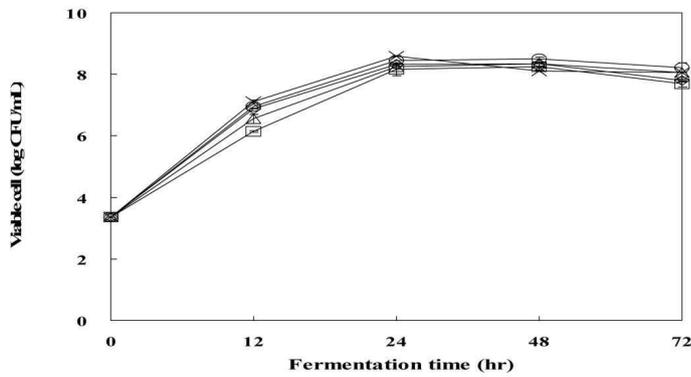
수탁일자 : 20160615

도면

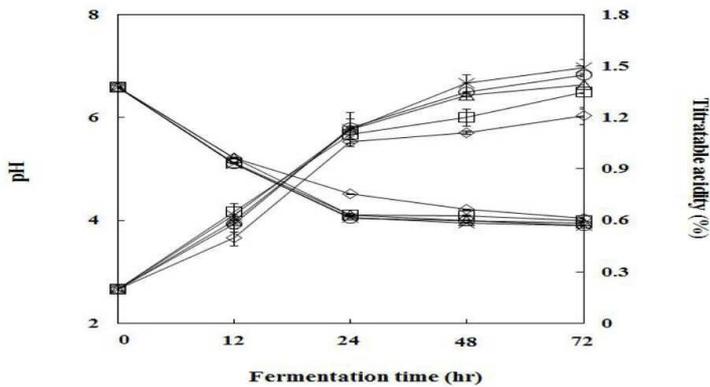
도면1



도면2



도면3



【심사관 직권보정사항】

【직권보정 1】

【보정항목】 청구범위

【보정세부항목】 청구항 10

【변경전】

산양삼 발효물의 Rg3 및 Rh1의 진세노사이드

【변경후】

, 산양삼 발효물의 진세노사이드 Rg3 및 Rh1

【식권보정 2】

【보정항목】 청구범위

【보정세부항목】 청구항 6, 8, 9

【변경전】

Rg3 및 Rh1의 진세노사이드

【변경후】

, 진세노사이드 Rg3 및 Rh1의