



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0051584
(43) 공개일자 2022년04월26일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A23L 29/00 (2016.01) A23L 11/00 (2021.01)
A23L 19/10 (2016.01) A23L 31/00 (2016.01)
A23L 5/10 (2016.01) A23L 7/10 (2016.01)
A61K 8/96 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A23L 29/065 (2016.08)
A23L 11/00 (2021.01)

(21) 출원번호 10-2020-0135163

(22) 출원일자 2020년10월19일

심사청구일자 2020년10월19일

(71) 출원인

경상국립대학교산학협력단

경상남도 진주시 진주대로 501 (가좌동)

함양군

경상남도 함양군 함양읍 고운로 35

(72) 발명자

조계만

경상남도 진주시 진주대로 829번길 21, 103동
2501호

조두용

경상남도 양산시 회현1길 3, 101동 306호

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

조영신

전체 청구항 수 : 총 8 항

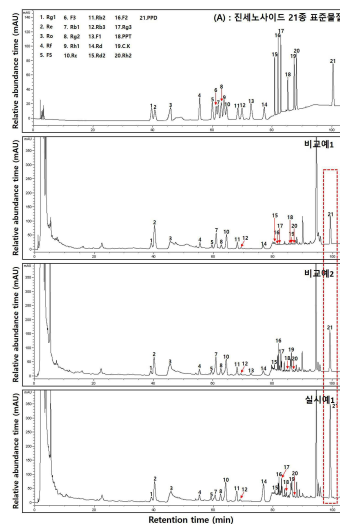
(54) 발명의 명칭 진세노사이드 Rd, Rc 및 프로토파낙사디올이 강화된 산양삼의 송이버섯균사체 발효조성물 및 그 제조방법

(57) 요약

본 발명에서는 산양삼을 송이버섯균사체로 발효하여 제조한 진세노사이드 Rd, Rc 및 프로토파낙사디올, 올레산 및 리놀레산이 현저히 증진된 발효조성물 및 그 제조방법이 개시된다.

본 발명에 따른 산양삼 송이버섯균사체 발효조성물은 진세노사이드 Rd, Rc 및 프로토파낙사디올, 올레산, 및 리놀레산이 고함량으로 함유되어 기능성식품 및 화장품의 소재로 사용될 수 있다.

대표도 - 도2



(52) CPC특허분류

A23L 19/10 (2016.08)
A23L 31/00 (2020.05)
A23L 5/13 (2016.08)
A23L 7/10 (2016.08)
A61K 8/96 (2013.01)
A23V 2002/00 (2013.01)
A23V 2200/302 (2013.01)
A23V 2200/328 (2013.01)
A23V 2200/332 (2013.01)

김수철

경상남도 진주시 하대동 대신로389번길 6-5 3층

(72) 발명자

이희율

경상남도 진주시 금산면 금산로 130, 410호(금호맨션)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1405004272
과제번호	2020187A00-2022-BA01
부처명	산림청
과제관리(전문)기관명	한국임업진흥원
연구사업명	산림생명자원 소재발굴사업
연구과제명	유효성분이 극대화된 산양삼 이용 호흡기 질환 예방, 관리 제품 개발
기 여 율	1/2
과제수행기관명	경남과학기술대학교 산학협력단
연구기간	2020.04.01 ~ 2022.12.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711119157
과제번호	2020M3A9I3038560
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	바이오, 의료기술개발사업
연구과제명	대사체 농업 가능 식물공장 및 활성대사체 강화 산업화 소재 개발
기 여 율	1/2
과제수행기관명	경남과학기술대학교 산학협력단
연구기간	2020.06.01 ~ 2022.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

산양삼 90~94 중량%, 콩 3~5 중량% 및 현미 3~5 중량%를 혼합한 혼합물을 송이버섯균사체로 발효하여 제조된 진세노사이드 Rd, Rc 및 프로토파낙사디올, 올레산 및 리놀레산이 증진된 산양삼의 송이버섯균사체 발효조성물.

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 발효조성물은 진세노사이드 Rd가 2.64 mg/g 이상, 진세노사이드 Rc가 2.45 mg/g 이상, 진세노사이드 프로토파낙사디올이 7.1 mg/g 이상, 올레산이 263 mg/100g 이상 및 리놀레산이 859 mg/100g 이상 함유되는 것을 특징으로 진세노사이드 Rd, Rc 및 프로토파낙사디올, 올레산 및 리놀레산이 증진된 산양삼의 송이버섯균사체 발효조성물.

청구항 3

제 1항에 있어서, 상기 발효는 송이버섯균사체를 3~10%(v/w) 농도로 접종하여 25~30℃에서 8~12일간 발효하는 것인, 진세노사이드 Rd, Rc 및 프로토파낙사디올, 올레산 및 리놀레산이 증진된 산양삼의 송이버섯균사체 발효조성물.

청구항 4

제 1항에 있어서, 상기 혼합물은 발효 전에, 물을 2~3배(v/w)으로 혼합하여 5~7시간 수화한 후, 100℃ 이상에서 30 ~ 90분 증자하는 것을 특징으로 하는 진세노사이드 Rd, Rc 및 프로토파낙사디올, 올레산 및 리놀레산이 증진된 산양삼의 송이버섯균사체 발효조성물.

청구항 5

진세노사이드 Rd, Rc 및 프로토파낙사디올, 올레산 및 리놀레산이 증진된 산양삼의 송이버섯균사체 발효조성물의 제조방법으로, 상기 방법은

- i) 산양삼 90~94 중량%, 콩 3~5 중량% 및 현미 3~5 중량%를 혼합한 후 물을 2~3배(v/w)으로 혼합하여 5~7시간 수화하는 단계;
- ii) 100℃ 이상에서 30 ~ 90분 증자하는 단계; 및
- iii) 송이버섯균사체를 3~10%(v/w) 농도로 접종하여 25~30℃에서 8~12일간 발효하는 단계를 포함하는 것인 방법.

청구항 6

제 1항에 따른 발효조성물을 포함하는 증진된 항산화 활성을 갖는 식품.

청구항 7

제 1항에 따른 발효조성물을 포함하는 당뇨 개선 및 비만 개선용 기능성식품.

청구항 8

제 1항에 따른 발효조성물을 포함하는 화장품.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 진세노사이드 Rd, Rc 및 프로토파낙사디올이 강화된 산양삼의 송이버섯균사체 발효조성물 및 그 제조 방법에 관한 것으로, 더 상세하게는 산양삼을 송이버섯균사체로 발효하여 제조한 진세노사이드 Rd, Rc 및 프로토파낙사디올, 올레산 및 리놀레산이 현저히 증진된 발효조성물 및 그 제조방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 삼(*Ginseng*)은 재배환경에 따른 인위적인 성장과 자연적인 성장의 차이와 형태학적 차이 등에 따라 인삼(人蔘), 산삼(山蔘), 또는 산양삼(山羊蔘)으로 구분한다. 특히 산양삼은 오가피과에 속하며 다년생 초목인 인삼(*Panax ginseng*)이 산간의 삼림하의 야생상태에서 자연적으로 성장한 산삼의 씨앗이나 유삼을 인위적으로 산에서 재배한 것을 말하며 이들을 산양삼이라 한다. 인삼의 경우에는 대부분 노두(머리 부분)가 3-7개 정도이나 산양삼은 연령에 따라 그 이상인 것이 많으며 인삼의 뿌리는 굵고 짧으나 산양삼은 길고 가늘다.

[0004] 사포닌은 식물계에 널리 분포하고 있는 트리테넨과 스테로이드계 배당체 화합물의 총칭이다. 삼의 사포닌인 진세노사이드(ginsenoside)를 함유한 산양삼은 한약처방전에서 천연 자연 산삼 다음으로 효능을 높이 평가하고 있다. 또한 재배인삼과 비교시 진세노사이드 함량이 높다고 보고되어져 있으며 재배된 인삼보다 효능 또한 뛰어난 것으로 알려져 있다. 그러나 알려진 산양삼 관련 가공품들은 진세노사이드 함유량이 기준치 미달이거나 약리작용이 있는 희귀 진세노사이드 Rd, Rc는 거의 함유되어 있지 않은 실정이다.

[0005] 진세노사이드 Rd는 면역력증강, 뇌인지기능향상, 신경 퇴행성 뇌질환 개선, 주름개선 기능이 보고되어 있고, 진세노사이드 Rc는 항당뇨 효능, 항염증 효능이 알려져 있고, 진세노사이드 프로토파낙사디올은 진정작용, 면역증강, 해독작용, 항암작용, 항산화 효능이 알려져 있다 (등록특허 10-1198266호).

[0006] 올레산(oleic acid)은 단일불포화 오메가-9 지방산으로 분류되며, 리놀레산(linoleic acid)은 다불포화 오메가-6 지방산이며, 음식을 통해 섭취해야 하는 사람의 필수 지방산들 중 하나이다. 올레산과 리놀레산은 혈중 콜레스테롤 농도를 낮추고 저밀도 콜레스테롤을 감소시키며, 혈압을 낮추고, 심장 질환 예방에 효과가 있으며, 피부보습 효능도 보고되어 있다.

[0007] 그러나 진세노사이드 Rd, Rc 및 프로토파낙사디올, 올레산 및 리놀레산이 현저히 증진된 발효조성물은 개발된 바 없다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009] 이에 본 발명자들은 종래 기술의 요구에 부응하기 위한 연구를 지속한 결과, 산양삼을 송이버섯균사체로 발효한 경우, 진세노사이드 Rd, Rc 및 프로토파낙사디올, 올레산 및 리놀레산이 현저히 증진됨을 확인하고 본 발명을 완성하게 되었다.

[0010] 따라서 본 발명의 목적은 진세노사이드 Rd, Rc 및 프로토파낙사디올, 올레산 및 리놀레산이 강화된 산양삼의 송이버섯균사체 발효조성물을 제공하는 것이다.

[0011] 본 발명의 또 다른 목적은 진세노사이드 Rd, Rc 및 프로토파낙사디올, 올레산 및 리놀레산이 강화된 산양삼의 송이버섯균사체 발효조성물의 제조방법을 제공하는 것이다.

[0012] 본 발명의 또 다른 목적은 본 발명의 산양삼의 송이버섯균사체 발효조성물을 포함하는 기능성식품을 제공하는 것이다.

[0013] 본 발명의 또 다른 목적은 본 발명의 산양삼의 송이버섯균사체 발효조성물을 포함하는 화장품을 제공하는 것이

다.

과제의 해결 수단

- [0015] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 산양삼, 콩 및 현미의 혼합물을 송이버섯균사체로 발효하여 제조된 진세노사이드 Rd, Rc 및 프로토파낙사디올, 올레산 및 리놀레산이 증진된 산양삼의 송이버섯균사체 발효조성물을 제공한다.
- [0016] 본 발명에서 산양삼은 「산지관리법」 제2조 제1호에서 정의하고 있는 산지에서 차광막 등 인공시설을 설치하지 아니하고 생산되는 삼을 칭하는 것으로, 바람직하게는 3년근에서 5년근 사이 재배된 것을 사용한다.
- [0017] 본 발명의 혼합물에서 산양삼은 90~94 중량%, 콩은 3~5 중량%, 현미는 3~5 중량%로 포함되는 것이 바람직하고, 가장 바람직하게는 산양삼 90 중량%, 콩 5 중량%, 현미 5중량%가 포함된다.
- [0018] 산양삼의 중량%가 상기 범위를 벗어나면, 진세노사이드 Rd, Rc 및 프로토파낙사디올, 올레산 및 리놀레산의 함량이 떨어지며, 콩 및 현미의 중량%가 상기 범위를 벗어나면 송이버섯균사체의 균사 성장이 충분하지 않을 수 있다. 송이버섯균사체의 성장 정도와 진세노사이드 Rd, Rc 및 프로토파낙사디올, 올레산 및 리놀레산의 함량을 모두 고려할 때 산양삼 : 콩 : 현미의 중량비는 90 : 5 : 5인 것이 가장 바람직하다.
- [0019] 본 발명에서 콩과 현미는 주로 송이버섯균사체가 생육에 필요한 질소원과 탄소원의 역할을 하면서도 송이버섯균사체의 발효(물질전환작용)를 증진시키는 기능도 한다.
- [0020] 본 발명에서 산양삼은 세척한 후 건조하고 세절하여 사용하는 것이 바람직하며, 콩과 현미는 세척하고 물기를 제거한 것을 사용한다.
- [0021] 본 발명에서 '송이버섯균사체'는 송이버섯의 균사체를 의미한다. 송이버섯균사체는 수확시기와 상관없이 언제든지 이용가능하고 자실체와 유사한 향암, 체지방 감소, 혈중 콜레스테롤 저하 및 면역증가 효과 등의 효능을 가지며, 특히 균사체 성장 중에 β -글루코시다아제를 포함한 섬유소 분해효소, 단백질 분해효소, 지방질 분해효소 등의 다양한 가수분해효소를 생성한다.
- [0022] 본 발명에서 '발효'는 송이버섯균사체를 종균으로 사용하여 발효하는 것을 의미한다. 산양삼, 콩 및 현미의 혼합물을 송이버섯균사체로 발효시, 놀랍게도 진세노사이드 Rd, Rc 및 프로토파낙사디올, 올레산 및 리놀레산이 현저히 증진되었다 (표 1, 표 2).
- [0023] 본 발명에서 송이버섯균사체는 산양삼, 콩 및 현미의 혼합물에 3~10%(v/w) 농도로 접종하여 25~30℃에서 8~12일간 발효시키는 것으로 수행될 수 있다. 가장 바람직하게는 10일간 발효한다.
- [0024] 송이버섯균사체 접종량이 3%(v/w) 미만일 경우에는 발효 속도가 지연될 수 있고 10%(v/w) 초과시에는 균사체 증식 속도가 빨라 전환율이 낮을 수 있으며, 발효 온도가 25℃ 미만일 경우 발효기간이 길어져 잡균의 오염을 초래하고 30℃를 초과할 경우에는 균사체의 생육이 저하될 수 있고, 발효 기간이 8일 미만일 경우 발효가 충분하지 않아 생리활성물질 등의 생성이 저조하게 될 수 있으며, 12일을 초과한 경우는 과발효에 의해 생리활성물질이 분해될 수 있다.
- [0025] 본 발명에서 산양삼, 콩 및 현미의 혼합물은 발효 전에, 2~3배(v/v)의 물을 첨가하여 5~8시간 수화시켜 수분이 40~50% 정도 되게 조정한 후 100℃ 이상에서 30~90분 증자처리하는 것이 바람직하다. 가장 바람직하게는 121℃에서 60분 증자한다.
- [0026] 본 발명에서 수화 처리 시 수분 함량이 40% 이하의 송이버섯 균사 생육이 원활하지 않으며, 수분 함량이 50% 이상의 경우 송이버섯 균사 생육뿐만 아니라 세균 등의 증식이 이루어질 수 있다. 한편, 증자 처리 시 30분 이하 처리 시 살균이 완벽하게 이루어지 않아 송이버섯 균사 이외에 세균 등의 증식에 의하여 이상발효가 진행될 수 있고 90분 이상 처리 시 영양성분 파괴되는 과다하게 진행될 수 있다.
- [0027] 본 발명에 따른 산양삼의 송이버섯균사체 발효조성물은 진세노사이드 Rd가 2.64 mg/g 이상, 진세노사이드 Rc가 2.45 mg/g 이상 및 진세노사이드 프로토파낙사디올이 7.1 mg/g 이상, 올레산이 263 mg/100g 이상 및 리놀레산이 859 mg/100g 이상 함유한다 (표 1, 표 2).
- [0028] 본 발명에 따른 산양삼의 송이버섯균사체 발효조성물은 진세노사이드 Rd, Rc 및 프로토파낙사디올의 함량이 가공 전 혼합물(비교예 1)에 비하여 각각 약 6.7배 이상, 약 1.5배 이상 및 약 3.2배 이상 증진되고, 발효 전(비교

예 2)에 비하여도 각각 약 3.5배 이상, 약 1.2배 이상 및 약 3.2배 이상 증진된다 (표 1).

- [0029] 또한 본 발명에 따른 산양삼의 송이버섯균사체 발효조성물은 올레산 및 리놀레산의 함량이 가공전 혼합물(비교예 1) 및 발효 전(비교예 2)에 비하여 각각 약 2.1배 이상 및 약 1.8배 이상 증진된다 (표 2).
- [0030] 또한 본 발명에 따른 산양삼의 송이버섯균사체 발효조성물은 진세노사이드 Rd, Rc 및 프로토파낙사디올, 올레산, 리놀레산, 총 페놀릭스 및 총 플라보노이드스, 갈변물질 등의 생리활성물의 함량이 강화되어, 증진된 항산화 활성을 갖는다 (표 1, 표 2, 도 3a ~도 4d).
- [0031] 또한 본 발명에 따른 산양삼의 송이버섯균사체 발효조성물은 알파-글루코시다아제 저해활성과 췌장-리파아제 저해활성이 증진되어 우수한 당뇨 개선 및 비만 개선 효과를 갖는다 (도 5 및 도 6).
- [0032] 본 발명의 또 다른 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 산양삼, 콩 및 현미의 혼합물을 송이버섯균사체로 발효하여 진세노사이드 Rd, Rc 및 프로토파낙사디올, 올레산, 및 리놀레산이 증진된 산양삼의 송이버섯균사체 발효조성물의 제조방법을 제공한다.
- [0033] 구체적으로 상기 방법은
- [0034] i) 산양삼 90~94 중량%, 콩 3~5 중량% 및 현미 3~5 중량%를 혼합한 후 물을 2~3배(v/w)으로 혼합하여 5~7시간 수화하는 단계;
- [0035] ii) 100℃ 이상에서 30 ~ 90분 증자하는 단계; 및
- [0036] iii) 송이버섯균사체를 3~10%(v/w) 농도로 접종하여 25~30℃에서 8~12일간 발효하는 단계를 포함한다.
- [0037] 본 발명의 제조방법에서, 산양삼, 콩 및 현미의 혼합물의 중량비, 수화, 증자, 송이버섯균사체 및 발효는 상기에서 정의된 바와 같다.
- [0038] 송이버섯균사체 원활한 발효를 위하여 발효 전에 산양삼, 콩 및 현미의 혼합물에 물을 첨가하여 수화할 수 있다.
- [0039] 발효 전에, 살균하기 위하여 증자 처리될 수 있다. 증자는 100℃ 이상에서 30 ~ 90분 증자하는 것이 바람직하고, 가장 바람직하게는 121℃에서 60분 증자한다.
- [0040] 본 발명의 또 다른 목적에 따라서, 본 발명은 상기 제조방법에 의해 제조된 진세노사이드 Rd, Rc 및 프로토파낙사디올, 올레산, 및 리놀레산이 증진된 산양삼 송이버섯균사체 발효조성물을 포함하는 기능성식품을 제공한다.
- [0041] 본 발명에 따른 기능성 식품은 우수한 항산화 활성, 당뇨 개선 및 비만 개선 효과를 갖는다 (도 4a~도 6).
- [0042] 본 발명의 또 다른 목적에 따라서, 진세노사이드 Rd, Rc 및 프로토파낙사디올, 올레산, 및 리놀레산이 증진된 산양삼 송이버섯균사체 발효조성물을 포함하는 화장품을 제공한다.
- [0043] 본 발명의 식품 또는 화장품은 본 발명의 발효조성물 또는 이의 추출물을 그대로 첨가하거나 다른 식품 성분과 혼합되어 제조될 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 제조될 수 있다.
- [0044] 본 발명에서 상기 식품의 종류는 특별히 제한되지 않으며, 환제, 정제, 캡슐제, 발효차, 발효식품 (김치류, 피클류 등), 발효음료 (파우치제, 드링크제 등) 등일 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다. 화장품의 종류는 마스크팩, 스킨, 로션, 크림 등일 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다.

발명의 효과

- [0046] 본 발명에 따른 산양삼 송이버섯균사체 발효조성물은 진세노사이드 Rd, Rc 및 프로토파낙사디올, 올레산, 및 리놀레산이 고함량으로 함유되어 기능성식품 및 화장품의 소재로 사용될 수 있다.
- [0047] 또한 본 발명에 따른 기능성식품 또는 화장품은 진세노사이드 Rd, Rc 및 프로토파낙사디올, 올레산, 및 리놀레산의 함량이 높으며, 더불어 우수한 항산화 활성, 알파-글루코시다아제 저해활성 및 췌장-리파아제 저해활성을 가져서, 지방생성 억제효과, 체중 조절, 콜레스테롤 저하, 고지혈증 개선, 동맥경화 완화, 당뇨병 개선, 비만 개선, 혈액순환 개선, 면역력 개선, 여성 갱년기 증후군 개선용으로 유용하다.

도면의 간단한 설명

- [0049] 도 1은 본 발명의 발효조성물의 제조 공정도의 일례이다.
- 도 2는 진세노사이드 HPLC 크로마토그램을 나타낸 것이다. (A)는 진세노사이드 21종 표준물질의 HPLC 크로마토그램이고, (B)는 비교예 1의 진세노사이드 HPLC 크로마토그램이며, (C)는 비교예 2의 진세노사이드 HPLC 크로마토그램이며, (D)는 본 발명에 따른 발효조성물의 진세노사이드 HPLC 크로마토그램이다.
- 도 3a는 본 발명에 따른 발효조성물의 총 페놀릭스 함량을 나타낸 것이다.
- 도 3b는 본 발명에 따른 발효조성물의 총 플라보노이드 함량을 나타낸 것이다.
- 도 3c는 본 발명에 따른 발효조성물의 갈변물질의 함량을 나타낸 것이다.
- 도 4는 본 발명에 따른 발효조성물의 항산화 활성을 나타내 것이다. 도 4a는 DPPH 라디칼 소거활성을, 도 4b는 ABTS 라디칼 소거활성, 도 4c는 하이드록실 라디칼 소거활성, 및 도 4d는 환원력(FRAP)을 나타낸 것이다.
- 도 5는 본 발명에 따른 발효조성물의 알파-글루코시다아제 저해활성을 나타낸 것이다.
- 도 6은 본 발명에 따른 발효조성물의 췌장-리파아제 저해활성을 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0050] 다음의 실시예들에 의해 본 발명이 더 상세히 설명된다. 이들 실시예는 본 발명을 예시하기 위한 것이며, 본 발명의 범위가 이들에 의해 제한되어서는 안된다.
- [0051] **제조예 1: 발효조성물 제조**
- [0052] 산양삼은 2020년도 함양군 백전면 일대에서 재배된 것을 농업회사법인 주식회사 진생바이로으로부터 공급받아 사용하였다. 콩(오리알태콩)과 현미는 진주시 소재 대형마트에서 구입하여 사용하였다.
- [0053] 송이버섯 균사체는 경상대학교 임산공학과 목질화학연구실에 보관되어 있던 것을 분양받아 사용하였다. 송이버섯 균사체 계대 배양은 Potato Dextrose broth/agar(PDB/PDA, BD-Difco사, Sparks, MD, USA)를 사용하였다.
- [0054] 산양삼은 흐르는 물에 3회 세척한 후 약 1 cm 정도로 절단한 후 55℃에서 3일간 건조하여 준비하였다. 건조 산양삼과 콩, 현미를 90:5:5의 중량비로 혼합하여 산양삼 혼합시료를 준비하였다.
- [0055] 산양삼 혼합시료에 2배(v/w) 정제수를 첨가하고 6시간 수화시켜 수분 함량을 약 40% 정도 되게 조정한 후 고압 멸균기를 이용하여 121℃에서 1시간 동안 증자 처리하고 송이버섯 균사체 배양액을 5%(v/w) 접종한 뒤 25℃에서 10일간 발효를 진행하여 발효조성물을 얻었다 (실시예 1; 도 1).
- [0056] 비교를 위하여, 건조 산양삼과 콩, 현미를 9:0.5:0.5의 중량비로 혼합하여 산양삼 혼합시료 조성물(비교예 1), 산양삼 혼합시료에 2배(v/v) 정제수를 첨가하고 6시간 수화시켜 수분 함량을 약 40% 정도 되게 조정한 후 121℃에서 1시간 동안 증자 처리한 증자시료 조성물(비교예 2)을 준비하였다.
- [0058] **참조예: 분석시료**
- [0059] 실시예 1의 발효조성물, 비교예 1의 조성물, 비교예 2의 조성물을 각각 55℃에서 3일간 건조하여 분쇄시켜 분말 시료를 준비하였다.
- [0060] 분말 시료 1 g에 50% 메탄올을 20배 첨가하여 12시간 동안 추출한 완전히 농축한 후 50% 메탄올을 2 ml을 첨가하여 녹인 후 0.45 μm 여과 필터로 여과하여 HPLC 베일에 담아 진세노사이드를 분석하였다.
- [0061] 분말 시료 10 g에 50% 주정을 20배 첨가하여 12시간 동안 추출한 일부 0.45 μm 여과 필터로 여과하여 총 페놀릭스와 총 플라보노이드 분석에 사용하였고 나머지 추출액은 감압여과기를 이용해 여과하고 감압농축기를 이용하여 완전 농축시킨 후 동결건조기(FD-1000, Tokyo, Rikakikai, Japan)를 이용하여 동결건조하였다. 최종 동결건조된 시료에 50% 주정을 첨가하여 시료농도가 0.25, 0.5, 1.0 및 2.0 mg/ml이 되게 제조한 후 하기 생리활성시험에 사용하였다.

[0063] **시험예 1: 진세노사이드 함량 분석**

[0064] 진세노사이드 분석은 기능성식품분석법의 홍삼 사포닌 분석법에 기술된 방법을 변형하여 고압액체크로마토그래피(HPLC, high press liquid chromatograph)로 분석하였다. 분석 컬럼은 TSKgel ODS-100Z를 사용하여 시료주입량 10 μ l, 온도는 30℃, 측정파장은 203 nm, 유속은 1.0 ml/min으로 하였고 이동상으로는 A용액은 HPLC water, B용액은 아세트니트릴을 사용하였다. HPLC 분석 조건은 이동상 용액은 0분때 A용액 81% : B용액 19%로 흘려주고 15분때에는 A용액 80% : B용액 20%로 흘려주고 40분때 A용액 77% : B용액 23%, 40분때 A용액 77% : B용액 23%, 42분때 A용액 70% : B용액 30%, 75분때에 A용액 65% : B용액 35%, 80분때에 A용액 30% : B용액 70%, 90분때에 A용액 10% : B용액 90%로 이동상을 흘려주었다. 실시예 1, 비교예 1 및 비교예 2의 진세노사이드 HPLC 크로마토그램을 도 2에 나타냈고, 분석된 진세노사이드 Rd, Rc 및 프로토파낙사디올 함량을 표 1에 나타내었다.

표 1

함량 (mg/g d.w.)	비교예 1	비교예 2	실시예 1
Ginsenoside Rc (10)	1.55±0.0.8	2.07±0.10	2.45±0.12
Ginsenoside Rd (14)	0.39±0.02	0.74±0.04	2.64±0.13
Protopanaxadiol (21)	2.16±0.11	3.15±0.16	7.10±0.36

[0066] 도 2에 나타난 바와 같이, 비교예 1 및 비교예 2의 조성물에서는 진세노사이드 Rd 피크(14), Rc 피크(10) 및 프로토파낙사디올 피크(21)이 낮게 나타난 반면에, 본 발명에 따른 실시예 1의 발효조성물에서는 진세노사이드 Rd 피크(14), Rc 피크(10) 및 프로토파낙사디올 피크(21)가 현저히 높아진 것을 확인할 수 있다.

[0067] 또한, 표 1에 나타난 바와 같이, 실시예 1의 발효조성물은 진세노사이드 Rd가 2.64±0.13 mg/g, 진세노사이드 Rc가 2.45±0.12 mg/g, 및 진세노사이드 프로토파낙사디올이 7.10±0.36 mg/g으로 나타나, 가공되지 않은 산양산 혼합원료인 비교예 1(0.39±0.02 mg/g, 1.55±0.0.8 mg/g, 2.16±0.11 mg/g)에 비하여 각각 약 6.7배 이상, 약 1.5배 이상 및 약 3.2배 이상 증진되었고, 비교예 2 (0.74±0.04 mg/g, 2.07±0.10 mg/g, 3.15±0.16mg/g)에 비하여도 각각 약 3.5배 이상, 약 1.2배 이상 및 약 2.2배 이상 증진되었음을 확인할 수 있다.

[0068] 따라서 송이버섯균사체 발효된 본 발명에 따른 산양삼 발효조성물은 진세노사이드 Rd, Rc 및 프로토파낙사디올의 함량이 현저히 강화됨을 알 수 있다.

[0069]

[0070] **시험예 2: 불포화지방산 함량 분석**

[0071] 불포화지방산 (올레산, 리놀레산) 분석은 Hwang 등이 보고한 지방산 분석방법에 따라 수행하였다. 제조예에서 준비된 실시예 1, 비교예 1 및 비교예 2의 조성물 각각 1 g을 시험관에 정확히 칭량하고 여기에 0.5 N 메탄올성 NaOH 3 ml를 첨가하여 100℃에서 10분간 열처리하여 지방산과 글리세롤 가수분해 과정을 수행하였다. 이후 삼불화붕소(BF₃) 2 ml를 추가적으로 첨가하고 교반한 후 30분간 다시 열처리하여 지방산의 메틸에스테르화를 진행하였다. 메틸에스테르화 반응 종료 후 이소옥탄 1 ml를 첨가하고 격렬히 흔든 후 방치시켜 이소옥탄층만을 회수하여 무수황산나트륨과 함께 탈수한 뒤 0.45 μ m-막 필터로 여과하여 GC(질소 및 수소 가스와 SP-2560 capillary column (100 m×0.25 mm i.d., 0.25- μ m film thickness, Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA)로 분석하였다. 분석결과를 표 2에 나타냈다.

표 2

함량(mg/100 g)	비교예 1	비교예 2	실시예 1
Oleic acid (C18:1c)	124.4±6.22	124.4±6.22	263.4±13.17
Linoleic acid (C18:2c)	466.0±23.30	466.0±23.30	859.3±42.97

[0073] 불포화지방산인 올레산 및 리놀레산 함량은 비교예 1 및 비교예 2의 조성물이 동일하게 124.4±6.22 mg/100g 및 466.0±23.30 mg/100g 으로, 증자 처리에 의해서는 불포화지방산의 함량이 증진되지 않는다는 것을 확인할 수 있다.

[0074] 이에 비하여, 실시예 1의 발효조성물의 올레산 및 리놀레산의 함량은 각각 263.4 ± 13.17 mg/100g 및 859.3 ± 42.97 mg/100g으로 나타나, 비교예 1 및 비교예 2에 비하여 각각 약 2.1배 및 약 1.8배 이상 증진되었음을 확인할 수 있다.

[0076] 시험예 3. 생리활성성분 함량 분석

[0077] 항산화 활성 등을 나타내는 생리활성성분인 총 페놀릭스, 총 플라보노이드스 함량 및 갈변물질 함량을 분석하였다.

[0078] <총 페놀릭스 함량>

[0079] 분석시료를 시험관에 0.5 ml 분주하고 여기에 25% Na_2CO_3 용액 0.5 ml를 첨가하여 3분간 정치시킨 후, 2N Folin-Ciocalteu 페놀 시약 0.25 ml를 첨가하여 혼합한 다음 30℃에서 1시간 동안 정치시킨 후 750 nm에서 분광광도계를 사용하여 750nm에서 흡광도를 측정하였다. 이때 총 페놀릭스 함량은 갈산(Gallic acid)을 이용하여 작성한 표준곡선으로부터 함량을 구하여 갈산에 상당하는 양으로 계산하였고 그 결과를 도 3a에 나타냈다.

[0080] 도 3a에 나타난 바와 같이, 총 페놀릭스 함량은 비교예 1 및 비교예 2에서는 각각 3.26 및 4.88 mg/g이었으며, 실시예 1에서는 5.56 mg/g으로 나타나, 본 발명에 따른 발효조성물은 총 페놀릭스 함량이 증진됨을 확인할 수 있다.

[0081] <총 플라보노이드스 함량>

[0082] 분석시료 0.5 ml에 디에틸렌글리콜 1.0 ml를 분주한 후 1 N NaOH 0.01 ml를 첨가한 후 하여 37℃ 항온수조에서 1시간 방치 후 420 nm에서 분광광도계로 흡광도를 측정하였다. 이때 총 플라보노이드스 함량은 루틴(rutin)을 이용하여 작성한 표준곡선으로부터 함량을 구하였고 그 결과는 도 3b에 나타내었다.

[0083] 도 3b에 나타난 바와 같이, 총 플라보노이드스 함량도, 비교예 1, 비교예 2 및 실시예 1에서 각각 0.35, 0.86 및 1.30 mg/g으로 나타나, 본 발명에 따른 발효조성물은 총 플라보노이드스의 함량도 크게 증가하는 것을 확인할 수 있다.

[0084] <갈변물질 함량>

[0085] 갈변물질 측정은 비효소적 갈변측정법을 이용하여 측정하였다. 분말 시료 1 g에 3차 증류수 10배 첨가한 후 1시간 동안 추출한 후 0.45 μm 여과 필터로 여과한 후 여과액 1 ml 취하여 420 nm에서 분광광도계로 흡광도를 측정하여 그 결과를 도 3c에 나타내었다.

[0086] 도 3c에 나타난 바와 같이, 갈변물질 함량도, 비교예 1, 비교예 2 및 실시예 1에서 0.385, 0.893, 및 2.240 $\text{OD}_{420 \text{ nm}}$ 으로 나타나, 본 발명에 따른 발효조성물은 갈변물질의 함량도 크게 증가하는 것을 확인할 수 있다.

[0088] 시험예 4. 항산화 활성 분석

[0089] 항산화 활성은 DPPH 라디칼 소거활성, ABTS 라디칼 소거활성, 하이드록실 라디칼 소거활성 및 FRAP 환원력을 측정하여 분석하였다.

[0090] 참고예에서와 같이 실시예 1, 비교예 1 및 비교예 2의 분석시료를 0.25, 0.5, 1, 2 mg/ml 농도로 제조하여 사용하였다.

[0091] <DPPH 라디칼 소거활성>

[0092] 각각의 시료 0.2 ml에 DPPH 메탄올 용액(1.5×10^{-4} M) 0.8 ml를 첨가하여 10초간 교반후 암실에서 30분간 방치한 후 525 nm에서 흡광도를 측정하여 수행하였다. DPPH 라디칼 소거활성의 음성 대조구는 시료 대신 추출용매를 사용하여 동일한 방법으로 진행하여 흡광도의 차이를 다음과 같은 식에 의해 백분율(%)로 산출하였으며, 그 결과를 도 4a에 도시하였다.

[0093] 라디칼 소거활성(%) = $[1 - (\text{음성대조구 흡광도} \div \text{실험구 흡광도})] \times 100$

[0094] 도 4a에 나타난 바와 같이, DPPH 라디칼 소거활성은 1 mg/ml의 농도에서 비교예 1, 비교예 2 및 실시예 2는 각

각 16.67%, 49.76% 및 54.41%의 활성을 나타내 실시예 1의 발효조성물이 가장 높은 활성을 보였다.

[0095] <ABTS 라디칼 소거활성>

[0096] 7 mM ABTS⁺와 2.45 mM K₂S₂O₈를 1:1 비율로 섞어 암실에서 12~16시간 반응시킨 후 메탄올과 1:88 비율로 섞어 732 nm에서 대조구의 흡광도 값이 0.7±0.02가 되도록 조절한 ABTS⁺ 용액을 사용하였다. 각각의 시료 0.1 ml와 ABTS⁺ 용액 0.9 ml를 첨가하여 혼합한 후 3분간 정치 후 즉시 732 nm에서 분광광도계를 사용하여 흡광도를 측정하였다. 음성대조구 실험은 시료 대신에 추출용매를 취하여 진행하였으며 실험구와 음성 대조구의 흡광도를 구하여 상기 식에 의해 백분율(%)로 산출하여 그 결과를 도 4b에 나타냈다.

[0097] 도 4b에 나타난 바와 같이, ABTS 라디칼 소거활성은 0.5 mg/ml의 농도에서 비교예 1, 비교예 2 및 실시예 2는 각각 26.22%, 39.13% 및 47.60%의 활성을 나타내 실시예 1의 발효조성물이 가장 높은 활성을 보였다.

[0098] <하이드록실 라디칼 소거활성>

[0099] 각각의 시료를 1.4 ml에 10 mM FeSO₄·7H₂O-EDTA 0.2 ml, 10 mM 2-데옥시리보스 0.2 ml 및 10 mM H₂O₂ 0.2 ml를 시험관에 분주하고 37℃에서 4시간 반응시켰다. 1% TBA와 2.8% TCA 1 ml를 첨가하고 100℃에서 20분간 발색한 후 520 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다. 음성대조구는 시료대신 PBS 완충용액을 사용하여 실험하였으며 실험구와 음성대조구의 흡광도를 구하여 상기 식에 의해 백분율(%)로 산출하여 그 결과를 도 4c에 나타냈다.

[0100] 도 4c에 나타난 바와 같이, 하이드록실 라디칼 소거활성은 1 mg/ml의 농도에서 비교예 1, 비교예 2 및 실시예 2는 각각 35.57%, 45.36% 및 50.38%의 활성을 나타내 실시예 1의 발효조성물이 가장 높은 활성을 보였다.

[0101] <FRAP 환원력 분석>

[0102] FRAP 환원력 분석에서 반응액으로는 30 mM 아세테이트 완충액(pH 3.6), 40 mM 염산에 녹인 10 mM 2,4,6-트리피리딜-s-트리아진(TPTZ, T1253, C18H12N6, MW312.33) 및 20 mM FeCl₃(F7134, MW 162.20, in DW)를 준비하였으며, 아세테이트 완충액, TPTZ 용액 및 FeCl₃ 용액을 10:1:1 (v/v/v)로 혼합하여 37 °C에서 15분간 예비반응을 시켜두었다. 각각의 시료 0.05 ml에 FRAP 시약 0.95ml를 첨가하여 37 °C에서 약 15분간 반응시키고 590 nm에서 흡광도를 측정하여 그 결과를 도 4d에 나타냈다.

[0103] 도 4d에 나타난 바와 같이, FRAP 환원력은 1 mg/ml의 농도에서 실시예 1은 1.029 OD_{593 nm}의 가장 높은 활성을 보였다.

[0104] 이들 결과로부터 본 발명에 따른 발효조성물은 항산화 활성이 현저히 증진됨을 알 수 있다.

[0105]

[0106] 시험예 5: 소화효소 저해활성 검정

[0107] 본 발명에 따른 산양삼의 송이버섯사체 발효조성물에 대해 향당노(당노 개선) 효과의 지표인 알파-글루코시다아제 저해활성을 검정하였고, 항비만(비만 개선) 지표인 췌장 리파아제 저해활성을 검정하였다.

[0108] <알파-글루코시다아제 저해활성>

[0109] 분석시료 30 μl에 알파-글루코시다아제 (0.5 U/ml) 효소용액 70 μl, 200 mM 인산나트륨 완충용액(pH 6.8) 50 μl를 혼합하여 37℃에서 10분간 예비반응하였다. 이후 인산나트륨 완충용액(pH 6.8)에 녹인 p-NPG (10 mM) 100 μl를 첨가하여 다시 37℃에서 10분 반응시켰으며 반응액에 Na₂CO₃ (100 mM) 750 μl를 첨가해 반응을 정지시킨 후 420 nm에서 분광광도계를 이용하여 흡광도를 측정하였다. 음성대조구는 시료 대신에 추출용매를 취하였으며 분석시료 첨가구와 무첨가구 사이의 흡광도 차이를 백분율(%)로 나타내어 그 결과를 도 5에 나타냈다.

[0110] 도 5에 도시된 바와 같이, 알파-글루코시다아제 저해활성은 2.0 mg/ml 처리 시 비교예 1에서 14.142%로 나타났으나, 실시예 1에서는 32.83 %로 증진되었다.

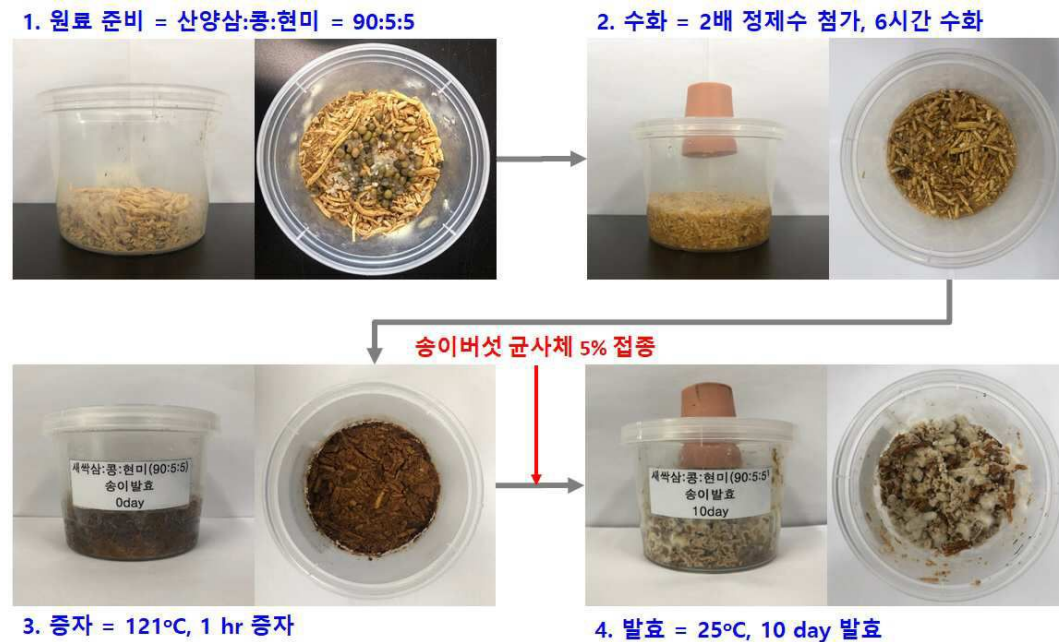
[0111] 따라서 본 발명에 따른 발효조성물은 알파-글루코시다아제 저해활성이 현저히 증진되어 혈당저하 활성이 우수하여 당뇨 개선효과가 증진됨을 알 수 있다.

[0112] <췌장-리파아제 저해활성>

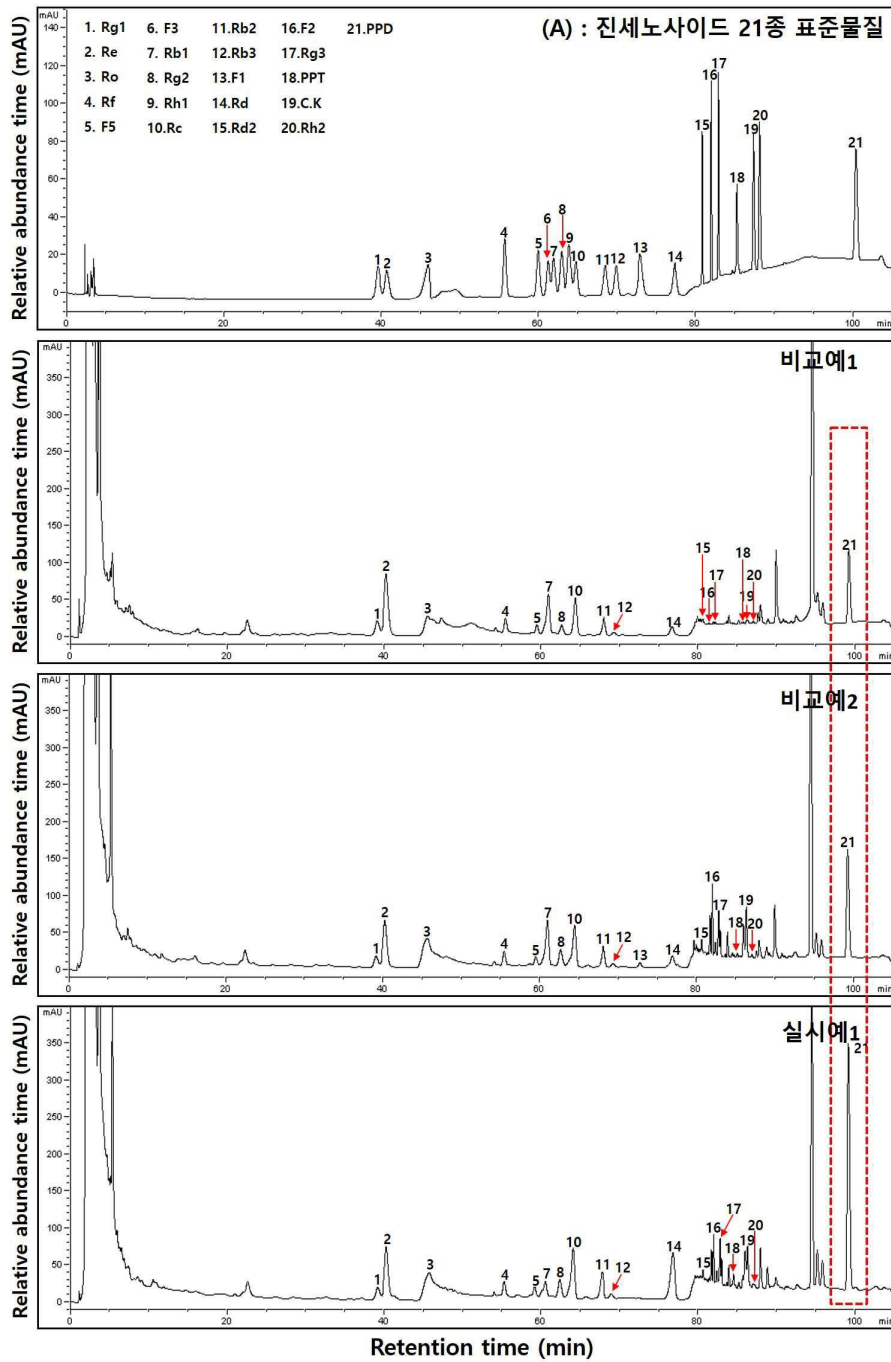
- [0113] 분석시료 30 μl 에 췌장 리파아제 (0.5 U/ml) 효소용액 70 μl 및 200 mM 인산나트륨 완충용액(pH 6.8) 50 μl 를 혼합하여 37 $^{\circ}\text{C}$ 에서 10분간 예비반응시켰다. 반응 후 인산나트륨 완충용액에 녹인 p-NPB(10 mM) 100 μl 를 첨가하여 동일하게 10분간 반응시킨 후 100 mM Na_2CO_3 750 μl 를 첨가해 반응을 종결시켜 420 nm에서 흡광도를 측정하였다. 음성대조구는 시료 대신에 추출용매를 취하였으며 시료용액의 첨가구와 무첨가구 사이의 흡광도 차이를 백분율(%)로 나타내어 그 결과를 도 6에 나타냈다.
- [0114] 도 6에 도시된 바와 같이, 췌장 리파아제 저해활성은 2.0 mg/ml 처리 시 비교예 1에서 10.00%, 비교예 2에서 28.77%로 나타났으나, 실시예 1에서는 35.12%로 더 높은 활성을 보였다.
- [0115] 따라서 본 발명에 따른 발효조성물은 췌장 리파아제 저해활성이 증진되어 비만 개선효과가 강화됨을 알 수 있다.
- [0116] 상기 활성(기능성) 검정 결과들로부터, 본 발명에 따른 발효조성물은 진세노사이드 Rd, Rc 및 프로토파낙사디올, 올레산, 및 리놀레산의 함량이 증진될 뿐만 아니라, 우수한 항산화 활성, 항당뇨 및 항비만 활성을 가져서 기능성 식품 및 화장품의 소재로 유용하다는 것을 알 수 있다.

도면

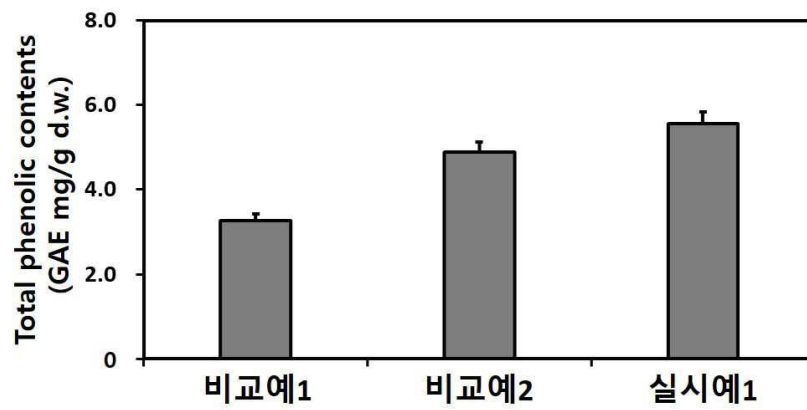
도면1



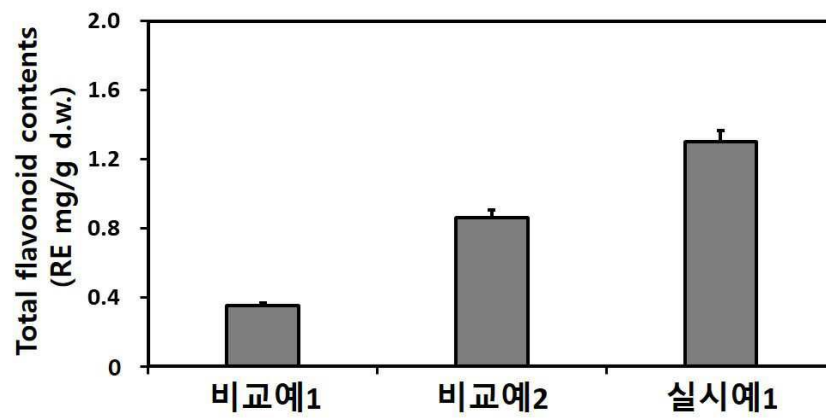
도면2



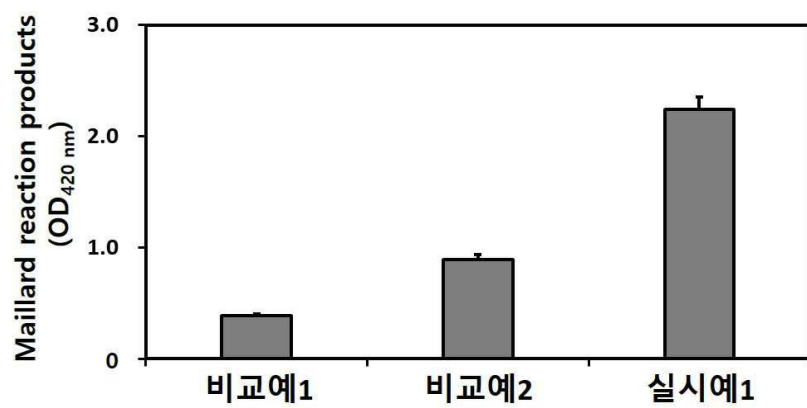
도면3a



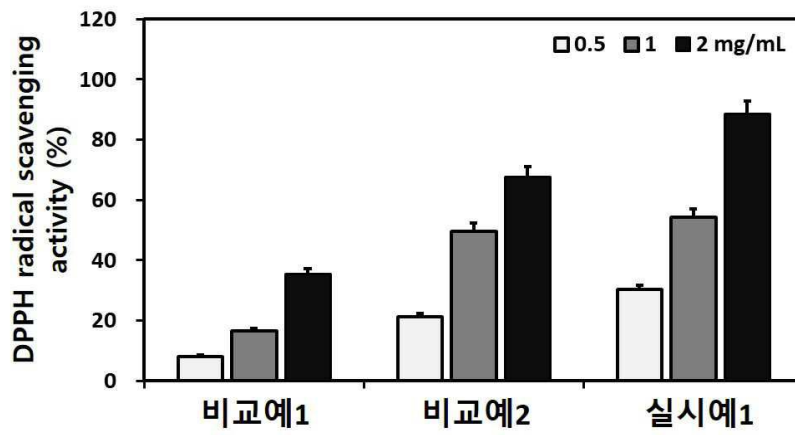
도면3b



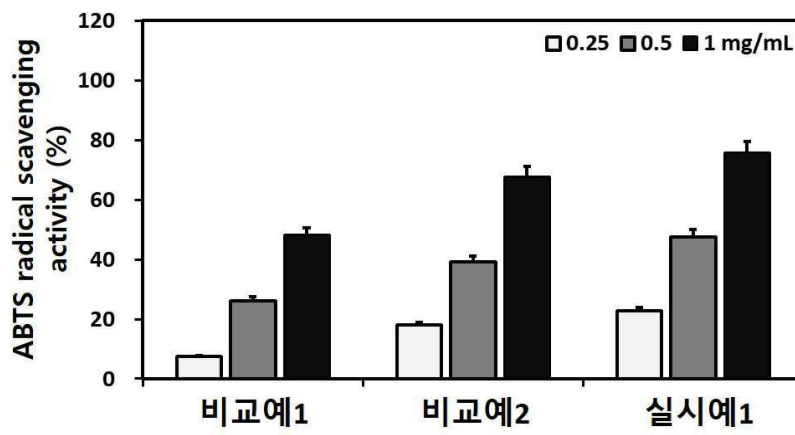
도면3c



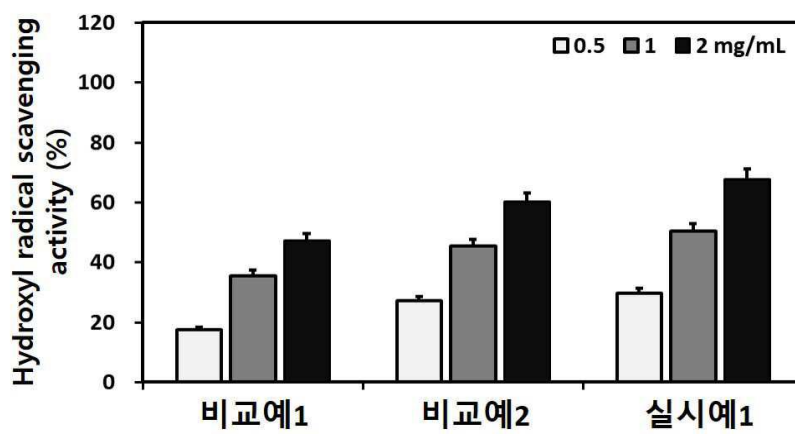
도면4a



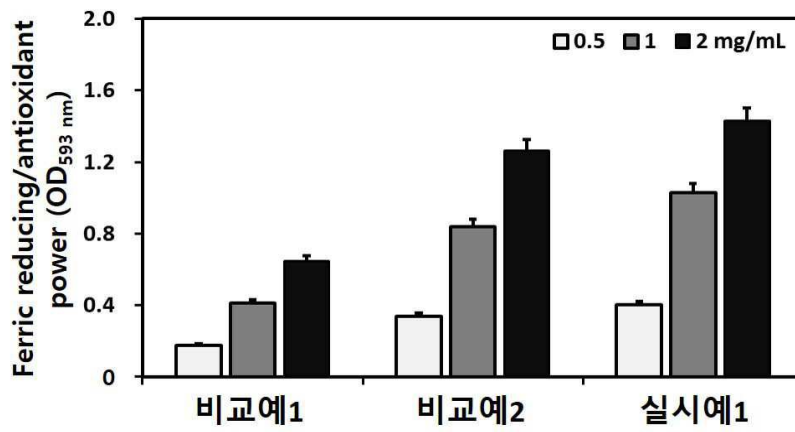
도면4b



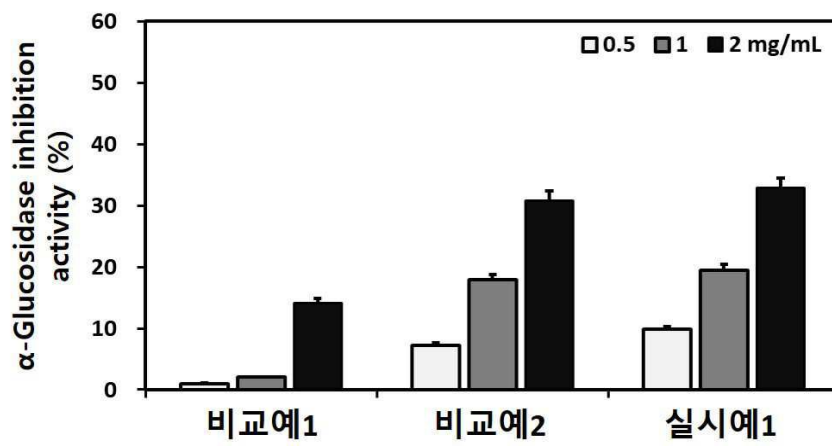
도면4c



도면4d



도면5



도면6

