



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2017년04월12일
(11) 등록번호 10-1725665
(24) 등록일자 2017년04월04일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A23L 1/30 (2006.01) A23L 1/09 (2006.01)
A23L 29/00 (2016.01)
(52) CPC특허분류
A23L 33/105 (2016.08)
A23L 29/065 (2016.08)
(21) 출원번호 10-2015-0142063
(22) 출원일자 2015년10월12일
심사청구일자 2015년10월12일
(56) 선행기술조사문헌
KR101526106 B1*
KR1020140093437 A*
KR101296995 B1*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
계명대학교 산학협력단
대구광역시 달서구 달구벌대로 1095 (신당동)
(72) 발명자
이삼빈
대구광역시 달서구 선원로 171 102동 306호 (이곡동, 성서무지개타운)
양선아
대구광역시 달성군 다사읍 대실역남로 93 203동 1402호 (죽곡리, 죽곡청아람푸르지오2단지아파트)
(74) 대리인
특허법인태백

전체 청구항 수 : 총 4 항

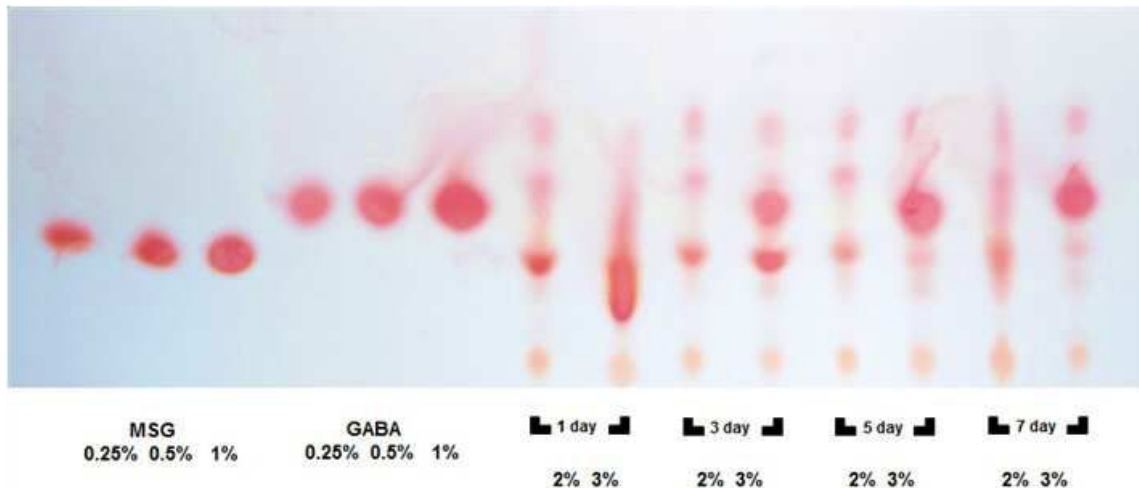
심사관 : 엄금희

(54) 발명의 명칭 민들레 당절임 추출액의 혼합발효를 통한 기능성 민들레 발효물 제조방법

(57) 요약

본 발명은 민들레 당절임액을 이용한 점질물 및 GABA가 증진된 민들레 발효물 제조방법에 관한 것으로, 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*) HA 균주 및 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) K154 균주를 이용한 점질물 및 GABA가 증진된 민들레 발효물 제조 방법을 제공한다. 그 결과, 점질물(γ -PGA), 가바(GABA) 및 펩타이드(peptide) 등 기능성 물질이 강화되고 물성이 개선되며, 간 기능 개선 및 면역증진 효과가 있는 기능성 식품 소재로 활용 가능할 것으로 예상된다.

대표도 - 도9



(52) CPC특허분류

A23L 29/30 (2016.08)

A23L 33/145 (2016.08)

A23V 2002/00 (2013.01)

A23V 2200/30 (2013.01)

A23V 2200/324 (2013.01)

A23V 2250/038 (2013.01)

(72) 발명자

김민주

대구광역시 달서구 계대동문로3안길 13-13 2층 (신당동)

임종순

경상북도 의성군 봉양면 도원길 2 (도원리)

최재원

대구광역시 달서구 달서대로 719 105동 2005호 (신당동, 한화꿈에그린아파트)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 314082-3

부처명 농림축산식품부

연구관리전문기관 농림수산물기술기획평가원

연구사업명 농생명산업기술개발사업

연구과제명 농산물 소재를 활용한 고부가가치 제품 개발 지원을 위한 CRO 구축

기 여 율 1/1

주관기관 계명대학교 산학협력단

연구기간 2014.12.19 ~ 2017.12.18

명세서

청구범위

청구항 1

- (1) 민들레와 당을 혼합하여 민들레 당절임액을 제조하고 멸균시키는 단계;
- (2) 상기 멸균된 민들레 당절임액을 물로 10배 희석하는 단계;
- (3) 상기 민들레 당절임 희석액 전체 100 중량부에 대하여 모노소듐 글루타메이트(mono sodium glutamate; MSG) 3 중량부를 포함한 혼합물에 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*) HA (KCCM 10775P) 균주 스타터(starter)를 접종하고 배양하여 점질물을 생산하는 1차 발효 단계; 및
- (4) 상기 1차 발효물 전체 100 중량부에 대하여 스킵 밀크(skim milk) 0.5 내지 5 중량부 및 글루코스(glucose) 1 내지 5 중량부를 포함하는 혼합물에 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) K154 (KACC91727P) 균주 스타터(starter)를 접종하고 배양하는 2차 발효 단계를 포함하는 점질물 및 감마-아미노뷰티르산(gamma-aminobutyric acid; GABA)이 증진된 민들레 발효물 제조방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 민들레 당절임액을 제조하는 단계는 민들레 및 당을 1:0.5~2의 중량비로 혼합하여, 1일 내지 6달 동안 실온에서 당절임하는 것을 특징으로 하는 민들레 발효물 제조방법.

청구항 3

삭제

청구항 4

삭제

청구항 5

제1항 또는 제2항에 따른 방법에 의해 제조된 점질물 및 GABA 증진된 민들레 발효물.

청구항 6

삭제

청구항 7

제5항에 따른 민들레 발효물을 유효성분으로 포함하는 면역기능 증진용 식품 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 민들레 당절임 추출액의 혼합발효를 통한 기능성 민들레 발효물 제조방법에 대한 것이다.

배경 기술

[0002] 민들레는 쌍자엽강에 속하는 식물로 들판에서 별이 잘 드는 곳에서 자라며, 줄기는 없고, 잎이 뿌리에서 뭉쳐나며 옆으로 퍼진다. 잎은 거꾸로 세운 바소꼴이고 길이가 6~15cm, 폭이 1.2~5cm이며 깃꼴로 깊이 패어 들어간 모양이고 가장자리에 톱니가 있고 털이 약간 있다. 한방에서는 뿌리와 꽃피기 전의 전초를 포공영(蒲公英)이라 하며 해열, 소염, 이뇨, 건위의 효능이 있다고 하여, 감모발열, 인후염, 기관지염, 임파선염, 안질, 유선염, 간염, 담낭염, 소화불량, 소변불리, 변비, 정창(瘡)의 치료제로 이용한다.

[0003] 대표적인 발효미생물인 고초균은 그람 양성균이며, 호기성 포자 형성균으로서, 콩 원료로부터 점질물(감마 폴리글루탐산, γ -PGA)을 생산하는 특징을 갖는다. 최근 고초균을 이용한 감마 폴리글루탐산의 생산 및 정제에 관한 보고가 있으며, 고분자 감마 폴리글루탐산은 면역개선의 건강기능성식품의 원료로 식품의약품안전처에 등재되었다. 앞으로 고분자 감마 폴리글루탐산의 식품 및 기능성식품의 원료로 활용 확대가 기대된다.

[0004] 또한, 젖산균은 전통발효식품인 김치 등의 주된 발효 미생물로서 최근에 인체에 정장장용을 포함한 장내 유익균 이면서 다양한 인체 효능을 제공하는 프로바이오틱스(probiotics)로서 각광을 받고 있다. 특히 특정 젖산균이 생산하는 기능성 물질인 GABA(γ -aminobutyric acid)는 뇌기능과 관련된 아미노산 유도체 물질로서 앞으로 고령화 100세 시대에 건강장수를 위한 식품건강소재로 활용이 기대된다. 이런 기능성 물질을 효과적으로 발효를 통해서 생산하기 위해서는 발효원료 선택, 발효조성물, 발효미생물의 선택 및 발효공정의 노하우를 필요로 한다.

[0005] 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) K154 균주는 GABA를 생산하는 균주이며, GABA는 자연계에 분포하는 비단백질 아미노산의 일종으로 동물의 뇌나 척수에 존재하는 신경전달물질이면서, 뇌 대사를 촉진시켜서 집중력과 기억력 증진에 관여하는 기능성 식품소재이다. GABA는 아미노산의 전이 반응에 의해 석시닉 세미알데히드(succinic semialdehyde)로 전환된 다음 산화에 의하여 석시네이트(succinate)가 된다. 이와 같이 GABA의 대사는 에너지를 생산하고 TCA 회로에서 산화를 위한 탄소의 제공, 질소 저장화합물 및 아미노산 대사산물 등의 여러 가지 기능이 알려져 있다.

선행기술문헌

특허문헌

[0006] (특허문헌 0001) 한국공개특허 제10-2013-0128066호(2013.11.26 공개)

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명의 목적은 민들레 당절임액을 이용하여 점질물 및 GABA가 증진된 민들레 발효물 제조방법에 관한 것으로, 상세하게는 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*) HA 균주 및 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) K154 균주를 이용한 점질물 및 GABA가 증진된 민들레 발효물 제조 방법을 제공하는데 있다.

과제의 해결 수단

[0008] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 (1) 민들레와 당을 혼합하여 민들레 당절임액을 제조하는 단계; (2) 상기 민들레 당절임액을 희석하는 단계; (3) 상기 민들레 당절임 희석액 전체 100 중량부에 대하여 모노소듐 글루타메이트(mono sodium glutamate; MSG) 1 내지 5 중량부를 포함한 혼합물에 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*) HA (KCCM 10775P) 균주 스타터(starter)를 접종하고 배양하여 점질물을 생산하는 1차 발효 단계; 및 (4) 상기 1차 발효물 전체 100 중량부에 대하여 스킵 밀크(skim milk) 0.5 내지 5 중량부 및 글루코즈(glucose) 1 내지 5 중량부를 포함하는 혼합물에 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) K154 (KACC91727P) 균주 스타터(starter)를 접종하고 배양하는 2차 젖산발효 단계를 포함하는 점질물 및 감마-아미노뷰티르산(γ -aminobutyric acid; GABA)이 증진된 민들레 발효물 제조방법을 제공한다.

[0009] 또한, 본 발명은 상기의 방법에 의해 제조된 점질물 및 GABA가 증진된 민들레 발효물을 제공하는데 있다.

[0010] 또한, 본 발명은 상기 민들레 발효물을 유효성분으로 포함하는 간 기능 개선용 식품 조성물 또는 면역기능 증진용 식품 조성물을 제공한다.

발명의 효과

[0011] 본 발명은 민들레 당절임 추출액의 혼합발효를 통한 기능성 민들레 발효물 제조방법에 관한 것으로, 상세하게는 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*) HA 균주 및 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) K154 균주를 이용하여 점질물(γ -PGA) 및 GABA가 증진된 민들레 발효물을 제조하는 방법에 대한 것이다. 본 발명을 통하여, 점질물(γ -PGA), 가바(GABA) 및 펩타이드(peptide) 등 기능성 물질이 강화되고 물성이 개선되며, 간 기

능 개선 및 면역증진 효과가 있는 기능성 식품 소재를 개발하고자 하였다.

도면의 간단한 설명

[0012]

도 1은 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*) HA 균주를 이용한 1차 발효에 있어, 민들레 당절임의 멸균상태와 효모 추출물 첨가별의 pH, 산도 변화를 나타낸다.

도 2는 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*) HA 균주를 이용한 1차 발효에 있어, 민들레 당절임의 멸균상태와 효모 추출물 첨가별의 점질물, 점조도 변화를 나타낸다.

도 3은 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*) HA 균주를 이용한 1차 발효에 있어, 민들레 당절임 농도별의 pH, 산도 변화를 나타낸다.

도 4는 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*) HA 균주를 이용한 1차 발효에 있어, 민들레 당절임 농도별의 점질물, 점조도 변화를 나타낸다.

도 5는 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*) HA 균주를 이용한 1차 발효에 있어, 민들레 당절임에 첨가한 MSG 농도별의 pH, 산도 변화를 나타낸다.

도 6은 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*) HA 균주를 이용한 1차 발효에 있어, 민들레 당절임에 첨가한 MSG 농도별의 점질물, 점조도 변화를 나타낸다.

도 7은 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) K154 균주를 이용한 2차 발효에 있어, 민들레 당절임의 MSG 농도별의 따른 pH, 산도 변화를 나타낸다.

도 8은 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) K154 균주를 이용한 2차 발효에 있어, 민들레 당절임에 첨가한 MSG 농도별의 점질물, 점조도 변화를 나타낸다.

도 9는 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) K154 균주를 이용한 2차 발효에 있어, 민들레 당절임에 첨가한 MSG 농도별의 GABA 측정 결과를 나타낸다.

도 10은 HepG2 세포에서 민들레 발효액의 세포독성을 나타낸다.

도 11은 HepG2 세포에서 t-BHP 유도된 산화적 손상에 대한 민들레 발효액의 독성 억제 효과를 나타낸다.

도 12는 RAW 264.7 세포에서 민들레 발효액의 세포독성을 나타낸다.

도 13은 RAW 264.7 세포에서 민들레 발효액의 NO 생성능을 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0013]

본 발명자들은 민들레를 당절임한 추출물을 고초균과 젖산균을 이용하여 점질물(γ -PGA)과 감마아미노부틸산(γ -aminobutyric acid; GABA)을 함유한 액상의 기능성 발효물을 제조함으로써, 물성과 기능성이 강화된 민들레 발효제품을 제조하는 방법에 관한 것이다. 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*) HA 균주를 이용하여 1차 고초균 발효를 통해 민들레 당절임 추출물로부터 생고분자인 감마 폴리글루탐산(γ -PGA) 등의 기능성 물질이 강화된 발효물을 생산하였으며, 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) K154 균주를 이용하여 2차 젖산균 발효를 통해서 GABA 생산을 최적화하였다. 이를 위하여 민들레 당절임 추출액에 다른 영양성분 첨가 없이 모노-소듐 L-글루탐산(mono-sodium L-glutamic acid; MSG)만을 기질로 첨가하여 생물전환 시킴으로써 경제적이면서 간편한 방법으로, 기능성 물질인 감마폴리글루탐산(γ -PGA)과 감마아미노부틸산(GABA)이 고농도 함유된 다기능성 물질로서 민들레 발효물을 개발하고 본 발명을 완성하였다.

[0014]

본 발명은 (1) 민들레와 당을 혼합하여 민들레 당절임액을 제조하는 단계; (2) 상기 민들레 당절임액을 희석하는 단계; (3) 상기 민들레 당절임 희석액 전체 100 중량부에 대하여 모노소듐 글루타메이트(mono sodium glutamate; MSG) 1 내지 5 중량부를 포함한 혼합물에 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*) HA (KCCM 10775P) 균주 스타터(starter)를 접종하고 배양하여 점질물을 생산하는 1차 발효 단계; 및 (4) 상기 1차 발효물 전체 100 중량부에 대하여 스킴 밀크(skim milk) 0.5 내지 5 중량부 및 글루코즈(glucose) 1 내지 5 중량부를 포함하는 혼합물에 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) K154 (KACC91727P) 균주 스타터(starter)를 접종하고 배양하는 2차 발효 단계를 포함하는 점질물 및 감마-아미노부티르산(γ -aminobutyric acid; GABA)이 증진된 민들레 발효물 제조방법을 제공한다.

- [0015] 바람직하게는, 상기 민들레 당절임액을 제조하는 단계는 민들레 및 당을 1:0.5-2의 중량비로 혼합하여, 1일 내지 6달 동안 실온에서 당절임할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0016] 바람직하게는, 상기 민들레 당절임액을 희석하는 단계는 물로 2 내지 10 배 희석할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0017] 바람직하게는, 상기 1차 발효 단계의 혼합물은 효모 추출물(yeast extract) 0.5 내지 3 중량부를 더 포함할 수 있다.
- [0018] 본 발명에 사용된 바실러스 서브틸리스 HA(*Bacillus subtilis* HA)(KCCM 10775P) 균주는 전통 청국장에서 분리 및 동정한 균주로서, 한국등록특허 제10-0864850호(등록일 2008.10.16)에 개시되어 있다.
- [0019] 본 발명에서 사용된 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) K154(KACC91727P)로서 한국식품과학연구원으로부터 분양받아 사용하였다.
- [0020] 본 발명에 있어서, "스타터(starter)"란 발효물을 제조하는 경우에 사용하는 미생물 배양액을 말한다. 따라서 스타터 미생물의 종류는 그 제품의 특성을 결정하게 되며 제품의 품질에 중요한 영향을 미친다. 미생물 중에서 스타터로 사용되고 있는 것은 박테리아, 곰팡이, 효모 등을 들 수 있으며, 이것을 단독 혹은 혼합하여 사용할 수 있다.
- [0021] 본 발명에 있어서, "감마 아미노부티르산(gama amino butyric acid; GABA)"은 4-아미노부틸산으로써 L-글루타메이트(L-glutamate) 기질이 탈탄산 반응에 의해 생성되며, 이에 관여하는 효소로는 글루타메이트 디카르복실라제(glutamate decarboxylase; GAD)가 있으며 피리독시드-5'-포스페이트(pyridoxid-5'-phosphate) 의존성 경로로 합성된다. GABA는 단백질에서는 발견이 되지 않는 비단백질성 아미노산으로 뇌나 척수에 존재하는 신경전달물질로 혈류를 개선하며 뇌의 산소공급을 증가시켜 뇌의 대사촉진 및 뇌 기억을 증진시키는 뇌의 영양제로 알려져 있다. GABA는 글루타메이트(glutamate)가 신경을 활성화시키는 것과는 달리 신경활성을 억제하는 것으로 알려져 있으며, 이러한 기능은 신경세포의 기능과 정보처리에 지대한 영향을 미치게 되는데 특히 감각 뇌에서 방향 민감성, 각도 민감성 반응 등을 결정하며 정교한 운동기능도 조절하는 것으로 알려져 있다. GABA의 뇌혈류 촉진 효과와 산소공급 증가효과는 뇌세포의 대사를 촉진시킴으로써 뇌졸중의 후유증 및 뇌동맥경화증 등에 개선효과가 나타나 의약품으로 사용되고 있다.
- [0022] 본 발명에 있어서, "점질물"에는 "감마-폴리글루탐산(gamma-poly glutamic acid; γ -PGA)"이 포함되어 있으며, 상기 γ -PGA는 글루탐산 단량체(monomer glutamic acid)의 α -아미노기와 γ -카르복실기 사이의 아미드 결합(amide linkage)에 의해 결합된 동중합체(homopolymer)이다. 일본의 전통발효식품인 낫토(natto)의 점액성 물질이 고초균(*Bacillus*)에 의해 생산되는 대표적인 γ -PGA로서 바실러스 낫토 사와무라(*Bacillus natto* Sawamura)에 의해 생산되었다는 보고가 있다. 일반적으로 γ -PGA는 수용성, 음이온성, 무독성, 생분해성, 생체 적합성, 식용 등의 다양한 특성이 있기 때문에 다양한 분야에서 응용되고 있다.
- [0023] 또한, 본 발명은 상기의 방법에 의해 제조된 점질물 및 GABA 증진된 민들레 발효물을 제공한다.
- [0024] 또한, 본 발명은 민들레 발효물을 유효성분으로 포함하는 간 기능 개선용 식품 조성물을 제공한다.
- [0025] 또한, 본 발명은 민들레 발효물을 유효성분으로 포함하는 면역기능 증진용 식품 조성물을 제공한다.
- [0026] 본 발명의 식품 조성물인 경우, 상기 식품의 종류에는 특별한 제한은 없다. 상기 민들레 복합 발효액을 첨가할 수 있는 식품의 예로는 육류, 소세지, 빵, 초코렛, 캔디류, 스낵류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류를 포함한 낙농제품, 각종 스프, 음료수, 차, 드링크제, 알콜 음료 및 비타민 복합제 등이 있다.
- [0027] 이하에서는, 본 발명을 한정하지 않는 실시예에 따라 본 발명을 상세히 설명한다. 본 발명의 하기 실시예는 본 발명을 구체화하기 위한 것일 뿐 본 발명의 권리범위를 제한하거나 한정하는 것이 아님은 물론이다. 따라서, 본 발명의 상세한 설명 및 실시예로부터 본 발명이 속하는 기술분야의 전문가가 용이하게 유추할 수 있는 것은 본 발명의 권리범위에 속하는 것으로 해석된다.
- [0028] <실험예>
- [0029] 하기의 실험예들은 본 발명에 따른 각각의 실시예에 공통적으로 적용되는 실험예를 제공하기 위한 것이다.
- [0030] 1. 스타터 배양 및 배양배지
- [0031] (1) 기본 배지

- [0032] 기본 배지로 MRA broth와 NB broth를 이용하여 스타터 배양액을 제조하였으며, NB broth에서 바실러스 서브틸리스 HA(*Bacillus subtilis* HA; KCCM 10775P)를 접종한 후 42℃에서 24시간 동안 진탕배양하였다. MRA broth에서 30℃, 24시간 배양한 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) K154 스타터를 제조하여 2차 발효에 사용하였다
- [0033]
- [0034] (2) 사용 균주 및 농축 스타터 제조
- [0035] 바실러스 서브틸리스 HA 균주는 121℃에서 15분간 멸균한 NB(nutrient broth) 배지 50 mL에 MRS agar plate를 이용해 42℃, 24 hr 배양한 바실러스 서브틸리스 HA를 1 백금이 접종한 뒤 진탕배양기(SI-900R, JEIO TECH Co., Ltd., Korea)에서 42℃, 160 rpm, 24시간 동안 배양한 후, 8,000 rpm, 20분간 원심분리 하고 멸균생리식염수를 이용해 10배 농축하여 스타터로 사용하였다.
- [0036] **2. 바실러스 서브틸리스 HA 균주를 이용한 1차 발효 최적화 및 효능평가**
- [0037] (1) pH 및 산도 측정
- [0038] pH는 pH meter(420A+, Thermo Orion, USA)를 이용하여 측정하였으며, 발효물 1 g에 증류수 9 mL을 혼합한 후 측정하였다. 적정 산도는 시료 1 g에 증류수 9 mL을 첨가하여 pH meter로 pH가 8.3에 도달할 때까지 0.1 N NaOH로 적정한 소비량을 주석산(lactic acid) 함량(% , v/w)으로 환산하였다.
- [0039] (2) 생균수 측정
- [0040] 생균수는 발효물 1 mL에 멸균수 9 mL을 첨가하여 10배로 단계별 희석하여 MRS broth agar 배지에 20 μL 도말하고, 42℃ 항온배양기에서 24시간 배양한 후의 바실러스 서브틸리스 HA 생균수를 CFU (colony forming unit)/mL으로 나타내었다.
- [0041] (3) 점질물 및 점도 측정
- [0042] 점질물 함량은 민들레 당절임 액상 발효물을 각각 10 mL씩 취하여 18,000 rpm에서 20분 동안 원심분리한 상등액을 2-3배의 이소프로필알코올을 첨가한 후 생성된 점질물을 60℃, 24시간 dry oven에서 건조 시킨 후 무게를 측정하여 함량을 환산하였다.
- [0043] 점조도 측정은 cone plate device(Plate PP35Ti, 3.5 cm diameter)를 장착한 물성측정기를 이용하여 측정하였다. 발효물 1 mL을 plate에 올려 구간당 10초 동안의 평균값이 측정되어 얻은 값을 shear rate (1/s)와 shear stress (Pa)로 나타내어 점조도를 측정하였다. 측정온도는 20℃에서 전단속도($\dot{\gamma}$)는 1-100 s⁻¹의 범위로 유동특성을 알아보고, 점조도 지수는 다음과 같은 식을 사용하여 나타냈다.
- [0044] Power law model : $\sigma = K \cdot \dot{\gamma}^n$
- [0045] σ 는 전단응력(shear stress, Pa), K는 점조도 지수(consistency index, Pa · sⁿ), $\dot{\gamma}$ 는 전단속도(shear rate, s⁻¹), n은 유동성 지수(flow behavior index, n)이다.
- [0046] **3. 락토바실러스 플란타룸 K154 균주를 이용한 2차 발효 최적화 및 효능평가**
- [0047] (1) pH 및 산도 측정
- [0048] pH는 pH meter(420A+, Thermo Orion, USA)를 이용하여 측정하였으며, 발효물 1 g에 증류수 9 mL을 혼합한 후 측정하였다. 적정 산도는 시료 1 g에 증류수 9 mL을 첨가하여 pH meter로 pH가 8.3에 도달할 때까지 0.1 N NaOH로 적정한 소비량을 젖산(lactic acid) 함량(% , v/w)으로 환산하였다.
- [0049] (2) 생균수 측정
- [0050] 생균수는 발효물 1 mL에 멸균수 9 mL을 첨가하여 10배로 단계별 희석하여 MRS broth agar 배지에 20 μL 도말하고, 30℃ 항온배양기에서, 24시간 배양한 후의 락토바실러스 플란타룸 K154 생균수를 CFU (colony forming unit)/mL으로 나타내었다.
- [0051] (3) 점도 측정
- [0052] 점조도 측정은 cone plate device(Plate PP35Ti, 3.5 cm diameter)를 장착한 물성측정기를 이용하여 측정하였

다. 발효물 1 mL을 plate에 올려 구간 당 10초 동안의 평균값이 측정되어 얻은 값을 shear rate (1/s)와 shear stress (Pa)로 나타내어 점조도를 측정하였다. 측정온도는 20℃에서 전단속도($\dot{\gamma}$)는 1-100 s⁻¹의 범위로 유동특성을 알아보고, 점조도 지수는 다음과 같은 식을 사용하여 나타냈다.

[0053] Power law model : $\sigma = K \cdot \dot{\gamma}^n$

[0054] σ 는 전단응력(shear stress, Pa), K는 점조도 지수(consistency index, Pa·sⁿ), $\dot{\gamma}$ 는 전단속도(shear rate, s⁻¹), n은 유동성 지수(flow behavior index, n)이다.

[0055] (4) TLC 측정

[0056] TLC 측정은 TLC Silica gel 60 F₂₅₄ (25 Aluminium sheets 20 x 20 cm)를 이용하여 측정하였다. 발효물 1mL을 2mL E-tube에 넣은 후, 원심분리기(effendorf centrifuge 5415R)를 이용하여 13200rpm로 10분간 돌리고, 상등액을 분리하여 GABA 용액 0.25, 0.5, 1% 와 MSG 0.25, 0.5, 1%를 각각 Silica gel에 찍어서 확인하였다.

[0057] (5) 간세포보호 실험

[0058] 1) 세포주

[0059] HepG2 세포주는 한국세포주은행에서 분양을 받아 사용하였다. 10% 우태아혈청(fetal bovine serum; FBS)과 1% antibiotics(penicillin/streptomycin)를 첨가한 DMEM(Dulbecco' Modified Eagle' Medium) 배지를 사용하여 37℃, CO₂ 5% 조건에서 배양하여 사용하였다.

[0060] 2) 세포독성 시험

[0061] 세포독성 시험은 MTT assay를 사용하여 세포 생존율을 측정함으로써 수행하였다. MTT 시약은 세포 내로 흡수된 후, 미토콘드리아 내 효소인 succinate- dehydrogenase에 의해 포르마잔(formazan)으로 변하여 세포의 성장을 멈추게 하며, 세포가 죽을수록 포르마잔(formazan)의 생성이 줄어들게 되는 것을 이용한 것이다. 배양된 간암 세포주를 96 well plate에 5×10^4 cells/well이 되게 분주하여 5% CO₂ 배양기에서 16-24시간 동안 예비 배양한 후 시료를 농도별로 처리하여 24시간 배양한 세포에 PBS에 녹인 MTT(5 mg/mL) 용액 10 mL를 각 웰에 넣고 배양기에서 4시간 동안 반응시킨다. 배양 종료 후 상등액을 제거하고, 각 웰에 100 mL의 디메틸 설펝사이드(dimethyl sulfoxide; DMSO)를 첨가하여 생성된 포르마잔 결정(formazan crystal)을 용해시켜 550 nm 파장에서 ELISA reader(SPECTRA max 340PC, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)로 흡광도를 측정하였다. 측정한 포르마잔(formazan) 생성정도는 정상적인 세포의 값과 비교하여 백분율(%)로 표시하였다.

[0062] 3) t-BHP에 의한 간세포 독성 억제 시험

[0063] 5×10^4 cells/well의 HepG2 세포를 96 well plate에 분주한 후 24시간 동안 배양하였다. 세포가 plate에 부착되고 특징적인 형태를 나타내고 있음을 확인한 후, 시료가 포함된 배양액 200 mL를 넣고 24시간 동안 배양하였다. 상층액을 제거한 후 t-BHP(1 mM)가 포함된 배양액을 가하고 2시간 동안 배양하였다.

[0064] (6) 면역증진효과

[0065] 1) RAW264.7 대식 세포 배양

[0066] 마우스 유래 대식세포주인 RAW 264.7 세포는 한국세포주은행(KCLB)에서 분양을 받았으며, 세포배양을 위해 10% FBS(fetal bovine serum)와 1% antibiotics (penicillin)를 첨가한 DMEM 배지를 이용하여 5% CO₂가 존재하는 37℃ 배양기에서 1주일에 2-3회 계대배양을 실시하였다.

[0067] 2) 세포독성 시험

[0068] 세포독성 시험은 MTT assay를 사용하여 세포 생존율을 측정함으로써 수행하였다. MTT 시약은 세포 내로 흡수된 후, 미토콘드리아 내 효소인 succinate- dehydrogenase에 의해 포르마잔(formazan)으로 변하여 세포의 성장을 멈추게 하며, 세포가 죽을수록 포르마잔(formazan)의 생성이 줄어들게 되는 것을 이용한 것이다. 배양된 대식세포주를 1×10^5 cells/mL의 농도로 96 well plate에 분주하여 5% CO₂ 배양기에서 24시간 동안 예비 배양한 후, 시료를 농도별로 처리하여 24시간 배양한 세포에 PBS에 녹인 MTT(5 mg/mL) 용액 10 mL를 각 웰에 넣고 배양기에

서 4시간 동안 반응시킨다. 배양 종료 후 상등액을 제거하고, 각 웰에 100 mL의 디메틸 설펍사이드(dimethyl sulfoxide; DMSO)를 첨가하여 생성된 포르마잔 결정(formazan crystal)을 용해시켜 550 nm 파장에서 ELISA reader(SPECTRA max 340PC, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)로 흡광도를 측정하였다. 측정된 포르마잔(formazan) 생성정도는 정상적인 세포의 값과 비교하여 백분율(%)로 표시하였다.

[0069] 세포 생존능 (%) = (시료 처리군의 흡광도) / (대조군의 흡광도)

[0070] 3) 산화질소(Nitric oxide; NO) 생성량 측정

[0071] NO의 농도는 배양액 내의 아질산염(nitrite) 농도를 Griess Reagent System의 방법을 이용하여 측정하였다. RAW 264.7 세포를 1×10^5 Cells/mL의 농도로 96 well plate에 분주 후 37°C, 5% CO₂ 배양기를 이용하여 24시간 동안 배양하였다. 배양 후 시료를 농도별로 처리하여 24시간 동안 배양하여 배양 상등액 100 µL를 새로운 96 well palte에 취하고 여기에 동량의 Griess 시약 (1% Sulfanilamide, 0.1% naphthylethylenediamine in 2.5% phosphoric acid)을 첨가하여 10분간 반응 후 ELISA reader를 이용하여 540 nm의 흡광도로 측정하였다. 아질산염(Nitrite)의 농도(µM)는 아질산나트륨(sodium nitrite; NaNO₂)를 사용하여 얻은 표준 직선과 비교하여 산출하였다.

[0072] <실시예 1> 1차 발효에 있어 민들레 당절임의 멸균상태와 효모추출물(yeast extract; YE) 첨가별에 따른 물성 변화

[0073] 민들레 당절임은 문경에서 재배된 민들레 줄기, 뿌리 및 꽃을 설탕을 이용하여 민들레 원료 대비 100~200% 수준으로 첨가하여 당절임한 후, 25°C 전후에서 6개월 동안 숙성시킨 민들레 당절임 추출물로 이용하였다.

[0074] 민들레 당절임 10% 희석액에 YE 1%, MSG 3%를 포함하는 혼합액에 고초균 스타터 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*) HA 5%를 접종한 후, 42°C, 160~200rpm에서 2일 동안 진탕배양하였다.

[0075] 1. pH 및 산도 변화

[0076] 민들레 당절임을 이용하여 멸균상태와 효모추출물(yeast extract; YE) 첨가별에 따른 민들레 당절임 액상 발효물의 pH 변화는 멸균을 시키지 않은 발효 1-2일 기간 동안 각각 pH 6.25 pH 7.03으로 큰 차이를 보이지 않았다. 멸균을 시킨 상태였을 때는 pH 6.21에서 pH 6.88로 멸균시키지 않은 상태와 차이를 많이 보이지 않았으며, 멸균을 시키지 않고 효모추출물을 첨가하였을 때는 pH 5.65, pH 7.31로 나타났으며, 멸균을 시킨 상태에서 효모추출물을 첨가하였을 때는 pH 6.04, pH 7.31로 나타났다(도 1).

[0077] 산도 변화는 멸균을 시키지 않은 발효 1-2일 기간 동안 각각 0.07%, 0.07%였고, 멸균을 시킨 상태였을 때는 0.17%, 0.06%, 멸균을 시키지 않고 효모추출물을 첨가하였을 때는 0.08%, 0.06%, 멸균을 시킨 상태에서 효모추출물을 첨가하였을 때는 0.12%, 0.06%로 나타났다(도 1).

[0078] 2. 생균수 변화

[0079] 민들레 당절임을 이용한 액상발효물의 생균수 변화는 멸균을 시키지 않았을 때, 1일 발효에 7.18×10^8 CFU/mL 이 나타난 후 발효 2일에는 1.31×10^{10} CFU/mL 생균수가 나타내었다. 멸균을 시킨 원료의 생균수는 발효 1-2일 기간 동안 각각 1.26×10^9 , 1.23×10^{10} 로 점차 균의 활성이 높아지는 것을 볼 수 있었다. 멸균을 시키지 않은 상태에서 이스트 엑스트랙트를 첨가 하였을 때 발효 1-2일 기간 동안 각각 4.00×10^8 , 8.00×10^9 CFU/mL로 나타내었다. 멸균을 시킨 원료에 효모 추출물을 첨가하였을 때 발효 기간 동안 4.33×10^8 , 8.20×10^9 으로 나타내었다(표 1).

표 1

단위: CFU/mL

[0080]

민들레 당절임 조건별 첨가(%)	발효시간 (일)	
	1	2
민들레당절임	7.18×10^8	1.31×10^{10}
민들레당절임+Y.E	4.00×10^8	8.00×10^9
민들레당절임 Auto 멸균	1.26×10^9	1.23×10^{10}

민들레당절임 Auto+Y.E 멸균	4.33×10^8	8.20×10^9
--------------------	--------------------	--------------------

[0081]

3. 점조도와 점질물의 변화

[0082]

민들레 당절임을 이용한 액상발효물의 점조도와 점질물 변화는 멸균을 시키지 않았을 때 발효 1-2일 동안 $0.64 \pm 0.04 \text{ Pa} \cdot \text{s}^n$, $0.89 \pm 0.004 \text{ Pa} \cdot \text{s}^n$ 점조도가 나타났고, 멸균을 시킨 상태의 발효 1-2일 동안 $0.77 \pm 0.06 \text{ Pa} \cdot \text{s}^n$, $2.41 \pm 0.04 \text{ Pa} \cdot \text{s}^n$ 로 크게 증가하였다. 멸균을 시키지 않은 상태에서 효모 추출물을 첨가하였을 때 발효 1-2일 동안 $0.01 \pm 0.001 \text{ Pa} \cdot \text{s}^n$, $1.97 \pm 0.02 \text{ Pa} \cdot \text{s}^n$ 로 크게 증가하였으며, 멸균을 시킨 상태에 효모 추출물을 첨가하였을 때 발효 1-2일 동안 각각 $0.06 \pm 1.22 \text{ Pa} \cdot \text{s}^n$, $0.12 \pm 0.04 \text{ Pa} \cdot \text{s}^n$ 로 발효 2일에 크게 증가하는 경향을 보였다(도 2).

[0083]

점질물의 변화는 멸균을 시키지 않았을 때 발효 1-2일 동안 각각 1.95 ± 0.001 , $1.35 \pm 0.001\%$ 의 함량을 보이며 멸균을 시킨 상태의 발효 상태의 점질물은 1.96 ± 0.01 , $2.01 \pm 0.001\%$ 의 함량을 보이는 것을 알 수 있었다. 멸균을 시키지 않은 상태에서 효모 추출물을 첨가하였을 때 발효 1-2일 동안 각각 0.00 ± 0.00 , $1.67 \pm 0.02\%$ 의 함량을 보여 1 일차에 비해 크게 늘어난 것을 알 수 있었다. 멸균을 시킨 상태에 효모 추출물을 첨가하였을 때 발효 1-2일 동안 각각 0.58, 1.69%의 함량을 보이며, 1 일차에 비해 크게 늘어난 것을 알 수 있었다(도 2).

[0084]

<실시예 2> 1차 발효에 있어 민들레 당절임의 농도별에 따른 물성 변화

[0085]

민들레 당절임의 희석배수에 따른 최적 발효조건을 결정하기 위해서 물로 희석(% , dilution)을 50%(x2), 25%(x4), 10%(x10)로 한 후 MSG 3%를 동일하게 첨가하여 고초균 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*) HA를 5% 수준으로 접종한 후, 160rpm, 42℃에서 2일 동안 진탕배양 하였다.

[0086]

1. pH 및 산도 변화

[0087]

민들레 당절임을 이용하여 농도별에 따른 민들레 당절임 액상 발효물의 pH 변화는 2배 희석을 시킨 발효 1-2일 기간 동안 각각 pH 4.87, pH 4.88로 큰 차이를 보이지 않았다. 5배 희석을 시킨 상태였을 때는 pH 5.26에서 pH 5.28로 역시 차이를 많이 보이지 않았으며, 10배 희석을 시킨 상태였을 때는 pH 6.54, pH 7.65로 발효 전 대비 많이 증가하는 경향을 보였다. 산도 변화는 2배 희석을 시킨 발효 1-2일 기간동안 각각 0.48%, 0.50%였고, 5배 희석을 시킨 상태였을 때는 0.19%, 0.21%, 10배 희석을 시킨 상태였을 때는 0.05%, 0.02%로 낮은 산도수치를 보였다(도 3). 이로 보아 2배 희석과 5배 희석은 발효가 진행이 안 되었다는 점을 알 수 있다.

[0088]

2. 생균수 변화

[0089]

민들레 당절임을 이용한 액상 발효물의 생균수 변화는 2배 희석을 시킨 1일 발효에 나타나지 않았으며, 발효 2 일에는 5.00×10^7 CFU/mL 생균수를 나타내었다. 5배 희석을 시킨 상태였을 때는 발효 1일에 나타나지 않았으며, 발효 2일차에 5.00×10^7 로 균의 활성이 낮은 것을 볼 수 있었다. 10배 희석을 시킨 상태였을 때는 발효 1-2일 기간동안 각각 1.00×10^8 , 1.70×10^9 CFU/mL로 높은 균의 활성을 나타내었다(표 2).

표 2

[0090]

단위: 생균수 CFU/mL

민들레 당절임 희석 조건	Fermentation time (days)		
	0	1	2
x 2	2.00×10^6	¹⁾ N.D	5.00×10^7
x 5	2.00×10^6	N.D	5.00×10^7
x 10	2.00×10^6	1.00×10^8	1.70×10^9

[0091]

¹⁾ 검출되지 않음.

[0092]

3. 점조도와 점질물의 변화

[0093] 민들레 당절임을 이용한 고초균 발효 후에 액상발효물의 점조도와 점질물 변화는 2배 희석을 시켰을 때 발효 1-2일 동안 점조도가 나타나지 않았고, 5배 희석시킨 상태의 점조도 역시 나타나지 않았다. 그러나 민들레 당절임을 10배 희석하였을 때 발효 1-2일 동안 $1.53 \pm 0.001 \text{ Pa} \cdot \text{s}^n$, $1.626 \pm 0.001 \text{ Pa} \cdot \text{s}^n$ 으로 크게 증가한 경향을 볼 수 있었다. 점질물의 변화는 2배 희석을 시켰을 때 발효 1-2일 동안 각각 0.02 ± 0.001 , $0.02 \pm 0.001\%$ 의 함량을 보이며 점질물이 거의 생성되지 않았으며, 5배 희석시킨 상태의 점질물도 0.02 ± 0.001 , $0.02 \pm 0.001\%$ 의 함량을 보이며 역시 거의 생성되지 않은 것을 볼 수 있었다. 10배 희석하였을 때 발효 1-2일 동안 각각 0.76 ± 0.02 , $2.412 \pm 0.02\%$ 의 함량을 보이며 높은 함량을 보이므로 2배, 5배 보다 10배 희석을 시킨 민들레 당절임액이 고초균에 의한 발효가 잘된다고 볼 수 있다(도 4).

[0094] <실시예 3> 1차 발효에 있어 민들레 당절임의 MSG 농도별에 따른 물성 변화

[0095] 민들레 당절임 10%(x10) 희석액에 MSG 각각 2%, 3%를 첨가한 후 고초균 스타터 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*) HA 5% 수준으로 접종한 후 160rpm 42℃에서 2일 동안 진탕배양 시켰다.

[0096] 1. pH 및 산도 변화

[0097] 민들레 당절임을 10배 희석한 추출물을 이용하여 MSG 농도별에 따른 민들레 당절임 액상 발효물의 pH 변화는 MSG를 2% 넣고 발효한 1-2일 동안 각각 pH 7.65, pH 7.76으로 발효 전 pH 5.67에 비해 큰 차이를 보였다. MSG를 3% 넣고 발효한 1-2일 동안은 pH 6.81에서 pH 6.52로 발효 전 pH 5.67에 대비해 차이를 많이 보이지 않았다(도 5).

[0098] 산도 변화는 MSG를 2% 넣고 발효한 1-2일 동안 각각 0.09, 0.22%였고, MSG를 3% 넣고 발효한 1-2일 동안은 0.07%, 0.23%로 낮은 산도치수를 보였다(도 5).

[0099] 2. 생균수 변화

[0100] 민들레 당절임을 10배 희석한 추출물을 이용하여 MSG 농도별에 따른 민들레 당절임 액상 발효물의 생균수는 MSG를 2% 넣고 발효시킨 1일차에 1.06×10^9 CFU/mL로 크게 변하지 않았으며, 발효 2일에는 2.25×10^9 CFU/mL 생균수를 나타내었다. MSG를 3% 넣고 발효시킨 상태였을 때는 발효 1일에 2.90×10^9 CFU/mL로 높은 생균수를 보였으며, 발효 2일차에 1.80×10^9 CFU/mL로 균의 활성이 역시 높은 것을 볼 수 있었다(표 3).

표 3

단위: CFU/mL

[0101]

민들레 당절임 MSG 첨가(%)	Fermentation time (days)		
	0	1	2
2%	2.00×10^6	1.06×10^9	2.25×10^9
3%	2.00×10^6	2.90×10^9	1.80×10^9

[0102] 3. 점조도와 점질물의 변화

[0103] 민들레 당절임을 10배 희석한 추출물을 이용하여 MSG 농도별에 따른 민들레 당절임 액상발효물의 점조도와 점질물 변화는 MSG를 2% 넣고 발효 1-2일 기간 동안 각각 $0.013 \pm 0.001 \text{ Pa} \cdot \text{s}^n$, $3.357 \pm 0.001 \text{ Pa} \cdot \text{s}^n$ 로 나타나 발효 1일차에 비해 크게 점조도가 증가된 것을 알 수 있었다. MSG를 3% 넣은 상태의 점조도는 발효 1-2일 기간 동안 각각 $1.106 \pm 0.001 \text{ Pa} \cdot \text{s}^n$, $3.485 \pm 0.001 \text{ Pa} \cdot \text{s}^n$ 로 MSG를 2% 첨가한 발효물에 비해 점조도가 크게 높은 것을 알 수 있었다. 점질물의 변화는 MSG를 2% 첨가하였을 때 발효 1-2일 동안 각각 0.16 ± 0.01 , $0.83 \pm 0.01\%$ 의 함량을 보이며, 점질물이 약간 형성된 것을 볼 수 있었으며, MSG를 3% 첨가한 상태의 점질물은 1.96 ± 0.01 , $1.62 \pm 0.01\%$ 의 함량을 보이며 MSG 2% 첨가한 발효물에 비해 많은 점질물 함량이 생산되는 것을 알 수 있었다(도 6).

[0104] <실시예 4> 민들레 당절임의 MSG 농도별에 따른 2차 발효의 물성 변화

[0105] 민들레 당절임 10%(x10) 희석액에 스킴 밀크(skim milk) 1% 및 글루코즈(glucose) 2%를 첨가하고, 젖산균 스타터 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) K154 균주 1% 접종한 후, 30℃에서 0-7일 동안 진탕배양

시켰다.

[0106] 1. pH 및 산도 변화

[0107] 민들레 당절임을 10배 희석한 추출물을 이용하여 MSG 농도별에 따른 민들레 당절임 액상 발효물의 pH는 MSG를 2% 넣고 발효 1-2일 동안 각각 pH 7.65, pH 7.76으로 발효 전 pH 5.67에 비해 큰 차이를 보였다. MSG를 3% 넣고 발효한 1-2일 동안은 pH 6.81에서 pH 6.52로 발효 전 pH 5.67에 대비해 차이를 많이 보이지 않았다(도 7).

[0108] 산도 변화는 MSG를 2% 넣고 발효 1-2일 동안 각각 0.09, 0.22%였고, MSG를 3% 넣고 발효 1-2일 동안은 0.07%, 0.23%로 낮은 산도수치를 보였다(도 7).

[0109] 2. 생균수 변화

[0110] 민들레 당절임을 10배 희석한 추출물을 이용하여 MSG 농도별에 따른 민들레 당절임 액상 발효물의 생균수는 MSG를 2% 넣고 발효시킨 1일차에 1.06×10^9 CFU/mL로 크게 차이가 나지 않았으며, 발효 2일에는 2.25×10^9 CFU/mL 생균수가 나타났었다. MSG를 3% 넣고 발효시킨 상태였을 때는 발효 1일에 2.90×10^9 CFU/mL로 높은 균활성을 보였으며, 발효 2일차에 1.80×10^9 CFU/mL로 균활성이 역시 높은 것을 볼 수 있었다(표 4).

[0111] 표 4

[0112] 단위: CFU/mL

민들레 당절임 조건별 첨가(%)	Fermentation time (days)				
	0	1	3	5	7
2%	3.60×10^7	3.60×10^7	3.60×10^7	2.50×10^8	2.90×10^8
3%	3.60×10^7	3.60×10^7	1.85×10^8	3.55×10^8	4.30×10^8

[0113] 3. 점조도의 변화

[0114] 민들레 당절임을 10배 희석한 추출물을 이용하여 MSG 농도별에 따른 민들레 당절임 액상발효물의 점조도와 점질물은 MSG를 2% 넣고 발효 1-2일 동안 각각 0.013 ± 0.001 Pa · sⁿ, 3.357 ± 0.001 Pa · sⁿ로 나타나 발효 1일차에 비해 크게 점조도가 증가됨을 알 수 있었고, MSG를 3% 넣은 상태의 점조도는 발효 1-2일 동안 각각 1.106 ± 0.001 Pa · sⁿ, 3.485 ± 0.001 Pa · sⁿ로 MSG를 2% 첨가한 발효물에 비해 점조도가 크게 높은 것을 알 수 있었다. 점질물의 변화는 MSG를 2% 첨가하였을 때 발효 1-2일 동안 각각 0.16 ± 0.01 , $0.83 \pm 0.01\%$ 의 함량을 보이며 점질물이 약간 형성된 것을 볼 수 있었으며, MSG를 3% 첨가한 상태의 점질물은 1.96 ± 0.01 , $1.62 \pm 0.01\%$ 의 함량을 보이며 MSG 2% 첨가한 발효물에 비해 많은 점질물 함량이 높은 것을 알 수 있었는데, 이는 MSG 3%가 2% 첨가량에 비해 점질물 생성 효과가 높은 것을 확인 할 수 있었다(도 8).

[0115] 4. GABA 측정

[0116] 민들레 당절임의 MSG 첨가 조건에 따른 젖산 발효물의 GABA 생성을 TLC를 통해 측정하였다. 그 결과 MSG 3% 첨가 발효물에서 GABA 생성량이 약 0.5% 이상으로 가장 높은 것을 알 수 있었다. MSG 2% 첨가 발효물과 대비하여 GABA 생성량과 MSG 소진율이 증가하는 것으로 나타났다. 민들레 당절임의 MSG 농도별로 보아 MSG를 2% 첨가하는 것 보다 3% MSG를 첨가하는 것이 GABA 생산에 최적인 것으로 나타났다(도 9). 또한, 기질로 첨가된 MSG는 모두 1차 고초균 발효에 의해서 기능성 물질 r-PGA로 전환되며, 이때 잔존하는 MSG는 2차 젖산균발효에 의해서 GABA로 생물전환 됨으로써 최종 발효물에는 존재하지 않은 것으로 나타났다.

[0117] <실시예 5> 민들레 당절임 액상 발효물의 간기능 개선 효능 평가

[0118] 1. 민들레발효액(발효 전, 후)의 세포독성 시험

[0119] 세포배양을 활용하여 민들레 발효액의 활성 효과를 측정하기 위해, 시료 자체의 세포 독성이 최소화된 농도 조건을 확인하기 위하여 세포 배양액에 민들레 발효액(발효 전, 후)을 시료로 가하고 24시간 동안 처리하여 얼마나 세포가 손상 받는지를 MTT assay를 통해 시험하였고, 농도는 10, 20, 40배 희석 범위로 하였다. 그 결과, 시

험한 농도 범위 내에서는 유의한 세포 독성은 나타나지 않았다(도 10).

2. t-BHP 유도 독성에 노출된 HepG2 세포에 대한 민들레 발효액(발효 전, 후)의 독성 억제 효과

HepG2 세포를 t-BHP로 처리한 경우 아무것도 처리하지 않은 경우에 비해 세포 생존율이 45.86%로 감소하였다. 민들레 발효액(발효 전, 후)으로 세포를 전처리하면 모든 시료에서 발효 후 보호 효과가 농도 의존적으로 증가하는 것을 확인하였으며, 특히 10배 희석액으로 비교한 경우 민들레 발효액 발효 후 세포 생존율이 54.51%에서 86.02%로 유의적으로 증가하여 보호 활성이 높아지는 것을 알 수 있다(도 11).

<실시예 6> 민들레 당절임 액상 발효물의 면역력 증진 효능 평가

1. 민들레발효액(발효 전, 후)의 세포독성 시험

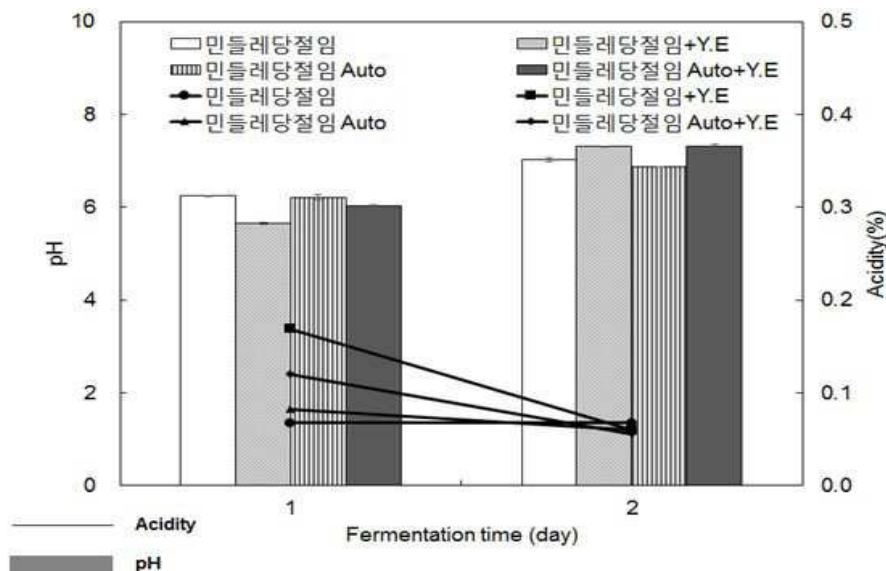
세포배양을 활용하여 민들레발효액의 활성 효과를 측정하기 위해 시료 자체의 세포 독성이 최소화 된 농도 조건을 확인하기 위하여 세포 배양액에 민들레발효액(발효 전, 후)을 시료로 가하고 24시간 동안 처리하여 얼마나 세포가 손상 받는지를 MTT assay를 통해 시험하였고 농도는 20, 30, 40, 60, 80배 희석 범위로 하였다. 그 결과, 시험한 농도 범위 내에서는 유의한 세포 독성은 나타나지 않았다(도 12).

2. 민들레발효액(발효 전, 후)의 NO 생성능 비교

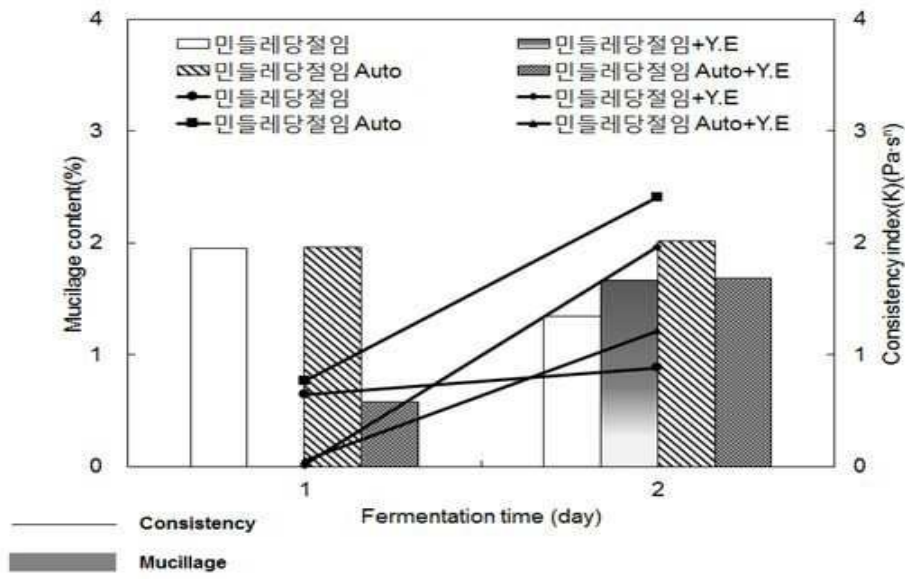
민들레 발효액의 농도에 따라 NO 생성이 증진되는지 확인하기 위해 양성 대조군으로 LPS 100 ng/mL와 민들레 발효액 농도별로 하여 비교분석 하였다. 민들레 발효액은 발효 전, 후로 하여 20, 30, 40, 60, 80배 희석하여 실험하였다. 민들레 발효 전에서는 모든 농도구간에서 NO를 생성하지 않는 것을 확인하였으며, 민들레 발효 후에는 80배 희석에서 20배 희석까지 발효물의 농도가 증가함에 따라 NO의 생성능이 높아져 LPS 100 ng/mL과 유사하게 NO를 생성하는 것을 확인 하였다(도 13). 따라서 민들레 발효물은 발효 전의 민들레에 비해서 면역증진 효과가 있음을 확인하였다.

도면

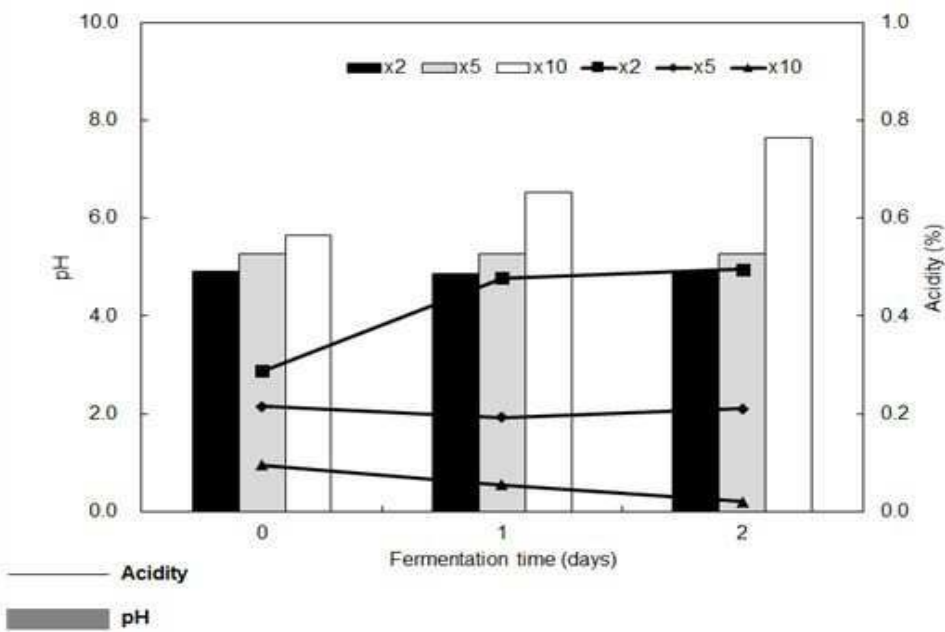
도면1



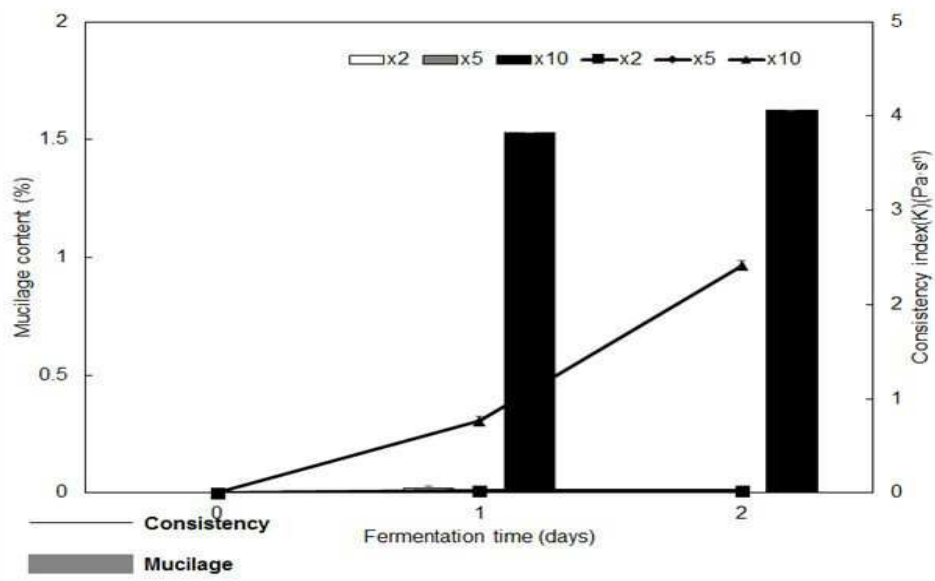
도면2



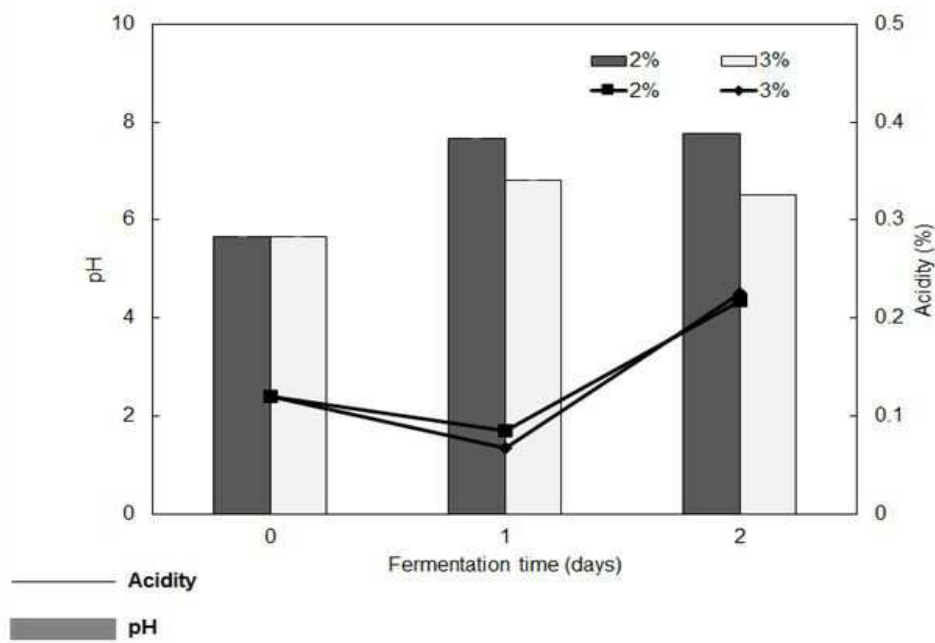
도면3



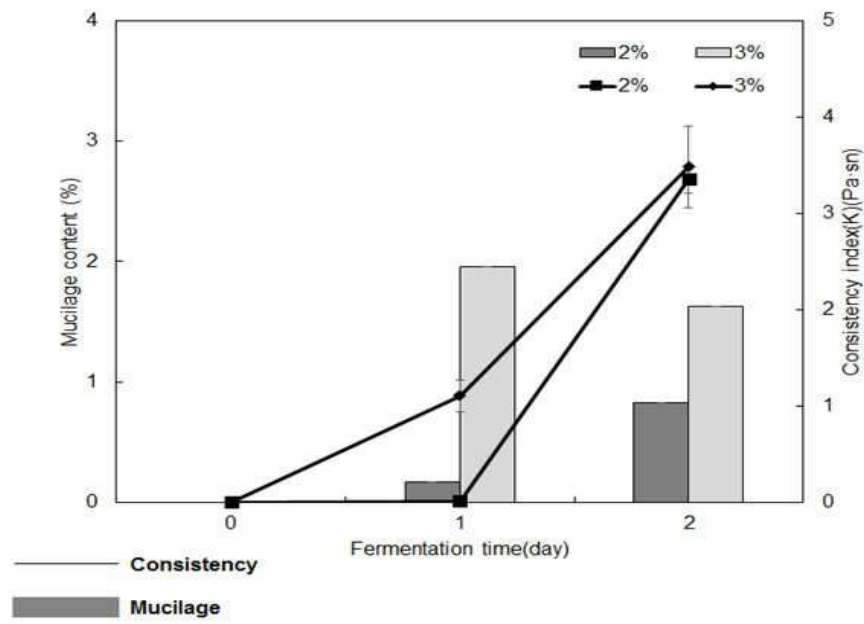
도면4



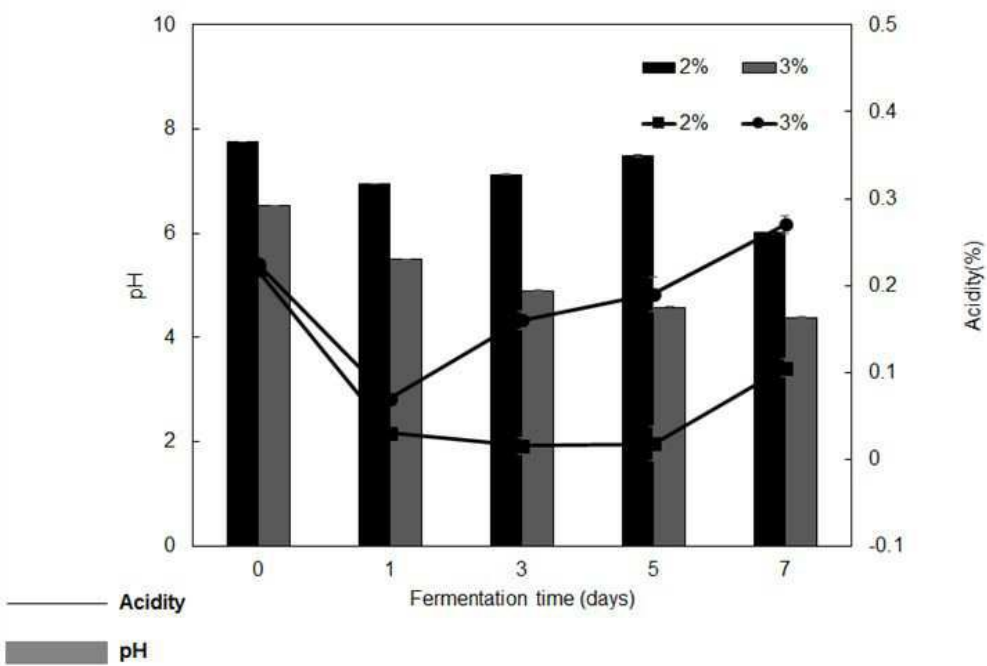
도면5



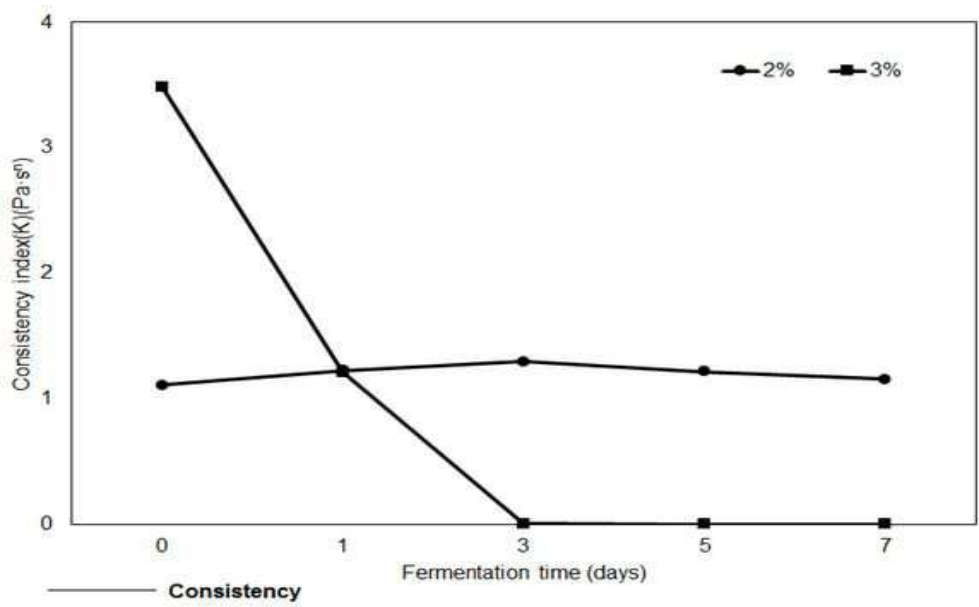
도면6



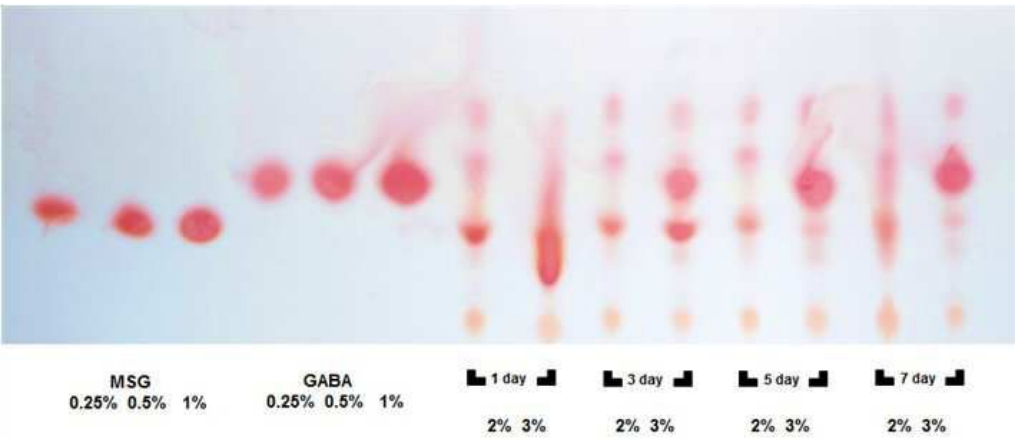
도면7



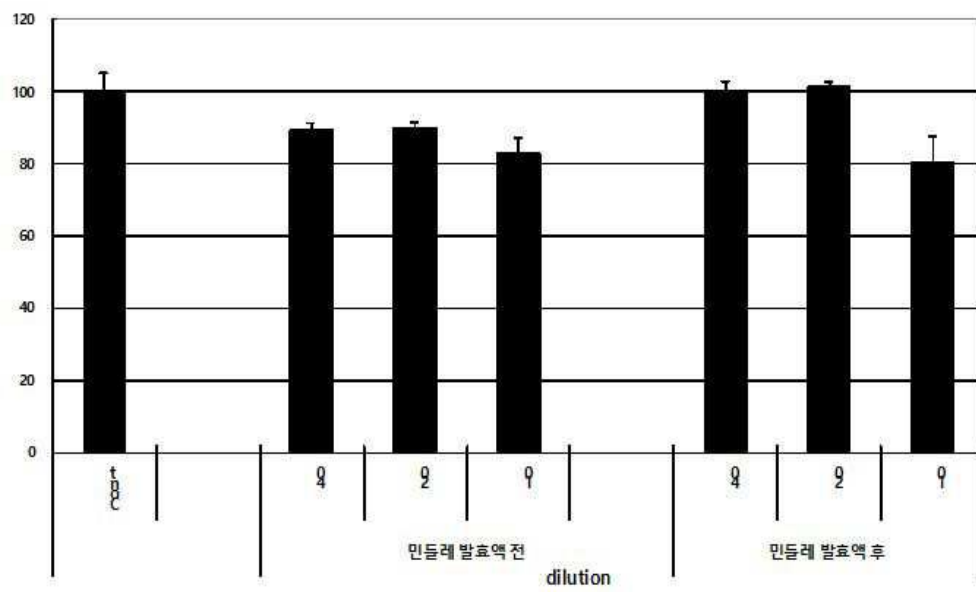
도면8



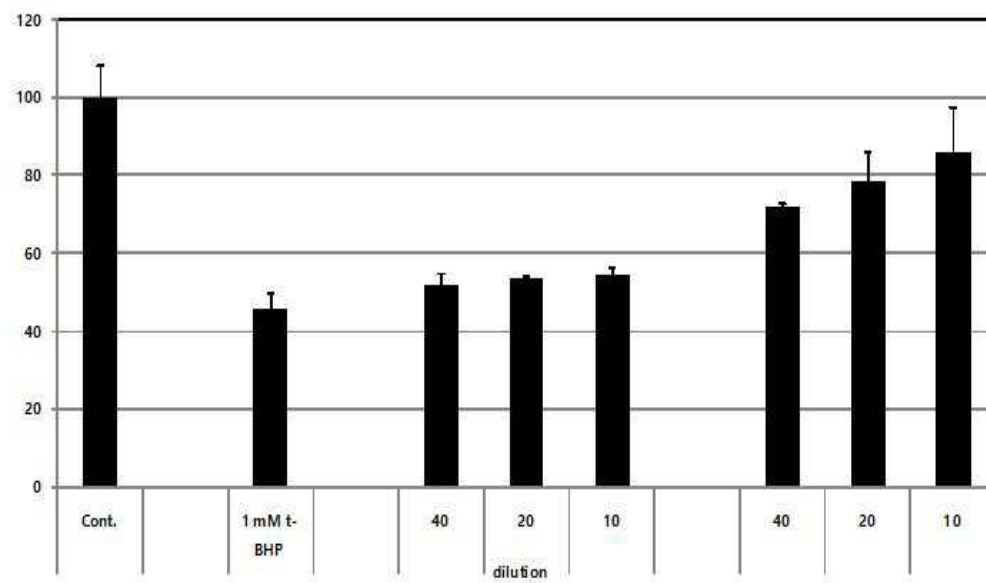
도면9



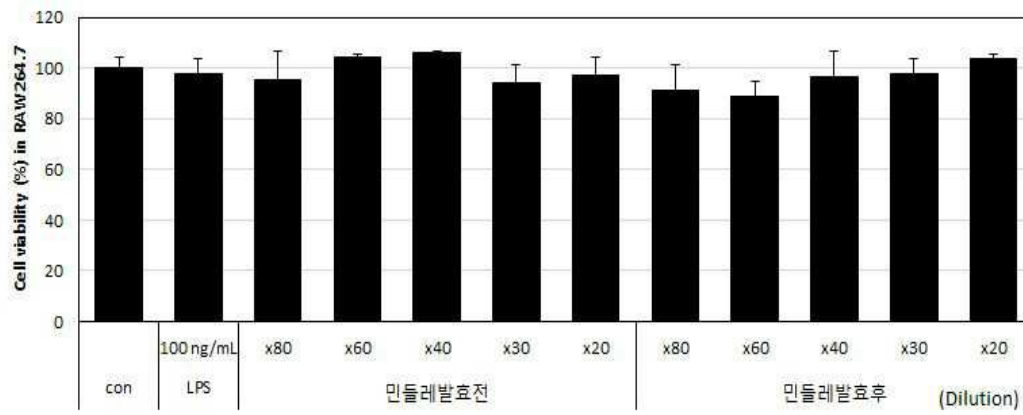
도면10



도면11



도면12



도면13

