



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2017-0072162
(43) 공개일자 2017년06월26일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A23L 33/105 (2016.01) A23L 33/135 (2016.01)
(52) CPC특허분류
A23L 33/105 (2016.08)
A23L 33/135 (2016.08)
(21) 출원번호 10-2016-0172700
(22) 출원일자 2016년12월16일
심사청구일자 2016년12월16일
(30) 우선권주장
1020150180099 2015년12월16일 대한민국(KR)

(71) 출원인
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, 죽곡청아람2단지)
(74) 대리인
특허법인태백

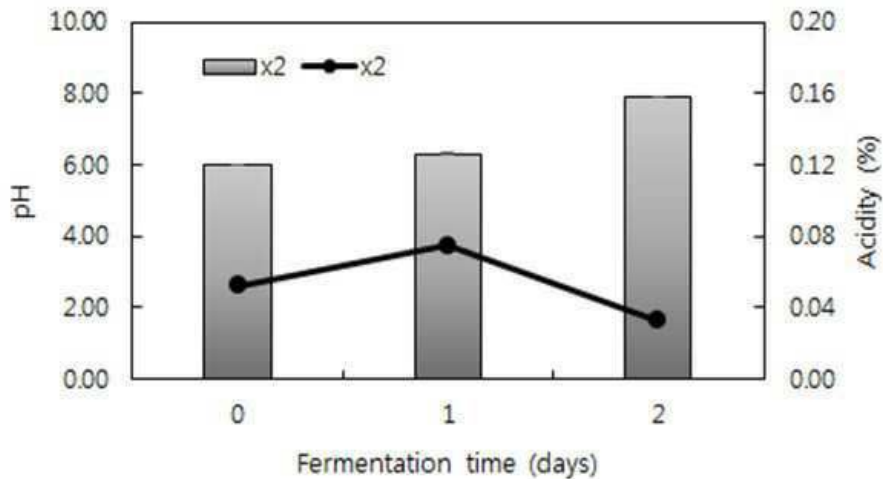
전체 청구항 수 : 총 9 항

(54) 발명의 명칭 면역 증진 또는 알러지 억제 효과가 있는 γ -PGA 및 GABA가 강화된 한방 소재 혼합발효물 및 그의 제조방법

(57) 요약

본 발명은 황칠나무 추출물, 황기 및 두충의 혼합 추출물, 천문동 추출물 또는 홍삼 추출물에서 선택된 하나 이상을 포함하는 추출물을, 모노소듐 글루타메이트(mono sodium glutamate; MSG) 1 내지 5 중량부, 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*) HA (KCCM 10775P) 균주 및 락토바실러스 플란타럼(*Lactobacillus plantarum*) EJ2014 (KCCM11545P) 균주를 이용하여 혼합발효시킴으로써 점질물인 감마-폴리글루탐산(γ -polyglutamic acid, γ -PGA) 및 감마-아미노뷰티르산(gamma-aminobutyric acid; GABA)이 고농도로 생성된 추출물 혼합발효액 및 그의 제조방법에 관한 것으로, 상기 추출물 혼합발효액은 γ -PGA 및 GABA를 모두 고농도로 함유하고 있어 인지능 개선뿐만 아니라 면역 증진 및 알러지 억제 효과를 나타내므로 다양하게 활용될 수 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A23V 2002/00 (2013.01)
A23V 2200/322 (2013.01)
A23V 2200/324 (2013.01)
A23V 2250/038 (2013.01)
A23Y 2220/67 (2013.01)

권순영

대구광역시 북구 연암공원로5길 18(산격동)

(72) 발명자

임중순

경상북도 의성군 봉양면 도원길 2(도원리)

최재원

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

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 ~ 2015.12.18

명세서

청구범위

청구항 1

- (1) 황칠나무 추출물, 황기 및 두충의 혼합 추출물, 천문동 추출물 또는 홍삼 추출물에서 선택된 하나 이상을 포함하는 추출물을 제조하는 단계;
- (2) 상기 추출물을 희석하여 희석액을 제조하는 단계;
- (3) 상기 희석액 100 중량부에 대하여 모노소듐 글루타메이트(mono sodium glutamate; MSG) 1 내지 5 중량부 및 글루코즈(glucose) 1 내지 5 중량부를 혼합하여 혼합물을 제조하는 단계;
- (4) 상기 단계 (3)의 혼합물에 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*) HA (KCCM 10775P) 균주 스타터(starter)를 접종 및 배양하여 상기 단계 (3)의 혼합물을 1차 발효시킴으로써 점질물인 감마-폴리글루탐산(γ -polyglutamic acid, γ -PGA)이 생성된 추출물 1차 발효액을 획득하는 단계;
- (5) 상기 추출물 1차 발효액 100 중량부에 대하여 탈지분유(skim milk) 0.5 내지 5 중량부 및 글루코즈(glucose) 1 내지 5 중량부를 혼합하여 혼합물을 제조하는 단계; 및
- (6) 상기 단계 (5)의 혼합물에 락토바실러스 플란타럼(*Lactobacillus plantarum*) EJ2014 (KCCM11545P) 균주 스타터(starter)를 접종 및 배양하여 상기 단계 (5)의 혼합물을 2차 발효시킴으로써 점질물 및 감마-아미노뷰티르산(gamma-aminobutyric acid; GABA)이 생성된 추출물 2차 발효액을 획득하는 단계;를 포함하는 고농도 γ -PGA 및 GABA 함유 추출물 혼합발효액의 제조방법.

청구항 2

제 1 항에 있어서, 상기 단계 (4)에서 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*) HA (KCCM 10775P) 균주 스타터는 상기 단계 (3)의 혼합물 100 중량부에 대하여 1 중량부 내지 10 중량부로 접종되는 것을 특징으로 하는 고농도 γ -PGA 및 GABA 함유 추출물 혼합발효액의 제조방법.

청구항 3

제 1 항에 있어서, 상기 단계 (4)에서 1차 발효는 30℃ 내지 50℃의 발효 온도에서 1 내지 3일 동안 진행되는 것을 특징으로 하는 고농도 γ -PGA 및 GABA 함유 추출물 혼합발효액의 제조방법.

청구항 4

제 1 항에 있어서, 상기 단계 (4)에서 1차 발효 시에, 바실러스 서브틸리스 HA가 단계 (3)에서 혼합한 MSG를 γ -PGA로 전환시키는 것을 특징으로 하는 고농도 γ -PGA 및 GABA 함유 추출물 혼합발효액의 제조방법.

청구항 5

제 1 항에 있어서, 상기 단계 (6)에서 락토바실러스 플란타럼(*Lactobacillus plantarum*) EJ2014 (KCCM11545P) 균주 스타터는 상기 단계 (5)의 혼합물 100 중량부에 대하여 0.5 중량부 내지 5 중량부로 접종되는 것을 특징으로 하는 고농도 γ -PGA 및 GABA 함유 추출물 혼합발효액의 제조방법.

청구항 6

제 1 항에 있어서, 상기 단계 (6)에서 2차 발효는 25℃ 내지 35℃의 발효 온도에서 1 내지 7일 동안 진행되는 것을 특징으로 하는 고농도 γ -PGA 및 GABA 함유 추출물 혼합발효액의 제조방법.

청구항 7

제 1 항에 있어서, 상기 단계 (6)에서 2차 발효 시에, 락토바실러스 플란타럼 EJ2014가 추출물 1차 발효액에 잔존하는 MSG를 GABA로 전환시키는 것을 특징으로 하는 고농도 γ -PGA 및 GABA 함유 추출물 혼합발효액의 제조방법.

청구항 8

제 1 항 내지 제 7 항 중 어느 하나의 항에 따른 제조방법에 의해 제조된 고농도 γ -PGA 및 GABA 함유 추출물 혼합발효액.

청구항 9

제 8 항에 있어서, 상기 추출물 혼합발효액은 일산화질소의 생성을 촉진하거나 β -헥소사미니다아제(β -hexosaminidase)의 활성을 억제함으로써, 면역 활성을 증진시키거나 알러지 반응을 억제하는 것을 특징으로 하는 고농도 γ -PGA 및 GABA 함유 추출물 혼합발효액.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 한방소재 추출액의 혼합발효를 통한 면역 증진 또는 알러지 억제 효과가 있는 추출물 혼합발효액 및 이의 제조방법에 대한 것이다.

배경 기술

[0002] 황칠나무는 높이 15 m에 달하며 수피는 회색으로 껍질눈이 있으며 노목은 가늘고 얇게 세로로 갈라진다. 어긋나게 달리는 잎은 난형 또는 마름모형의 타원형이며 3~5갈래로 깊게 갈라지기도 하는 등 변화가 심하다. 양면에 털이 없고 전체적으로 광택이 돈다. 가장자리는 밋밋하다. 가지 끝에 나오는 산형화서에 황록색의 꽃이 모여 달린다. 꽃받침은 끝이 5개로 갈라지고 5개의 꽃잎과 수술이 있으며 암술머리는 5개로 갈라진다. 핵과인 열매는 10월에 초록색에서 검은색으로 익는다. 나무껍질에 상처가 나면 노란색의 액이 나오는데 이를 황칠이라 하여 도료로 사용한다. 간에 좋으며, 피로회복에 쓰인다. 피를 맑게 하여 당조절, 혈압강하 작용이 있다.

[0003] 황기는 산지에서 자라며 높이가 1 m에 달하고 전체에 잔털이 있으며, 잎은 6~11쌍의 소엽으로 구성된 기수1회 우상복엽이다. 소엽은 난상의 긴 타원형이고 양끝이 둔하거나 둥글며 가장자리가 밋밋하다. 꽃은 7, 8월에 피고 길이 15~18mm로서 연한 황색이며 총상화서(總狀花序: 긴 꽃대에 여러 개의 꽃이 어긋나며 피는 꽃차례)를 이룬다. 뿌리는 약재로 이용하는데 약효성분은 폴리산(folic acid), 콜린(choline) 등이다. 동물실험에서는 중추신경계통의 흥분작용과 이노작용도 현저하였으며, 흰쥐에게 대량의 분말을 투여하였을 때에는 신염(腎炎)의 발생을 억제시키고 단백질과 콜레스테롤혈증의 발생도 지연시켰으며, 혈압강화작용도 인정되었다. 황기는 약성은 온화하고 맛이 달다. 효능은 쉽게 피로하고 힘이 약하며, 음성이 낮고 맥박이 연약하고 땀을 많이 흘리는 사람에게 현저한 효능을 나타내고 있어서 예로부터 인삼 대용으로 많이 사용하여왔다. 그리고 자궁하수, 위하수, 탈홍, 자궁출혈에도 널리 이용되며, 체력을 항진시켜 주고 전신근육의 긴장도를 높여주기도 한다.

[0004] 두충은 높이가 10 m이고 수피는 갈색을 띠는 회백색이고 가지가 많이 갈라진다. 잎은 어긋나며 길이 5~16cm, 너비 2~7cm의 타원모양이고 끝이 갑자기 좁아지면서 뽕죽해지고 양면에 털이 거의 없으나 잎자루는 길이 1cm이고 위에는 잔털이 있으며 가장자리에는 예리한 거치가 있다. 꽃은 단성화로 4월에 잎겨드랑이에서 피지만 꽃잎이 없고 수꽃은 6~10개의 길이가 짧은 수술을 가지며 붉은빛을 띤 갈색이고 암꽃은 짧은 자루가 1개씩 붙는다. 열매는 시과로 10~11월에 길이가 3~3.5 cm의 장타원 모양이다. 혈압강하, 진정, 진통작용 등이 있으며, 장기간 복용해도 부작용은 없는 것으로 알려져 있다.

[0005] 천문동은 잎처럼 생긴 가지는 1~3개씩 총생하고 선형이며 끝이 뽕죽하고, 길이 1~2cm, 너비 1~1.2mm로서 활처럼 굽으며 윤채가 있다. 꽃은 연한 황색으로 5~6월에 피고 잎겨드랑이 [葉腋]에 1~3개씩 달린다. 열매는 백색이고 흑색 종자가 1개 들어 있다. 한방에서는 뿌리를 약재로 이용한다. 유효성분으로는 아스파라진(asparagine), 베타-시토스테롤(β -sitosterol) 등이 함유되어 있다. 동물실험에서 이노, 강장 효과가 인정되었으며 실험관 내에서는 황색포도상구균, 용혈성연쇄상구균, 폐렴쌍구균, 디프테리아균 등에 대한 항균효과가 나타났다.

[0006] 홍삼(紅蔘)은 수삼(水蔘, *Panax ginseng* C.A. Meyer)의 뿌리를 썰서 말린 붉은 인삼을 말한다. 홍삼의 중요 성분으로는 백삼과 같이 배당체(glycosides), 인삼향성분(panacen), 폴리아세틸렌계 화합물, 함질소성분, 플라보노이드, 비타민(B군), 미량원소, 효소, 항산화 물질과 유기산 및 아미노산 등이 있다. 홍삼은 중추신경에 대해서 진정작용과 흥분작용이 있으며, 순환계에 작용하여 고혈압이나 동맥경화의 예방효과가 있다고 알려져 있다. 그외에도 혈당치(血糖値)를 저하시켜 주고, 간을 보호하며, 내분비계에 작용하여 성행동(性行動)이나 생식효과

에 간접적으로 유효하게 작용하며, 항염(抗炎) 및 항종양작용(抗腫瘍作用)이 있고, 방사선에 대한 방어효과와 피부를 보호하며 부드럽게 하는 작용이 있다. 또한, 홍삼은 피로회복, 면역력 증진, 혈소판 응집 억제를 통한 혈액 흐름 개선에 관한 기능성이 인정되었다.

[0007] 한편, 감마 아미노부티르산(γ -aminobutyric acid; GABA)은 중추신경계의 신경전달물질인 L-글루탐산(L-glutamic acid)이 글루타메이트 디카르복실레이즈(glutamate decarboxylase; GAD, EC 4.1.1.15) 효소에 의해 생성된다. GABA는 동식물 등 자연계에 널리 분포하는 억제계의 신경 전달물질로써 불면증, 항스트레스, 우울증, 혈압강하 등의 다양한 효능을 지니고 있는 것을 보고되고 있다.

선행기술문헌

특허문헌

[0008] (특허문헌 0001) 1. 한국공개특허 제10-2003-0087319호(2003.11.14 공개)

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009] 본 발명의 목적은 한방소재 추출물의 혼합발효를 통한 면역 증진 또는 알러지 반응 억제용 추출물 혼합발효액 제조방법을 제공하는 것이다.

[0010] 본 발명의 다른 목적은 상기 제조방법으로 제조되어 면역 증진 또는 알러지 반응 억제 효과가 우수한 추출물 혼합발효액을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0011] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 (1) 황칠나무 추출물, 황기 및 두충의 혼합 추출물, 천문동 추출물 또는 홍삼 추출물에서 선택된 하나 이상을 포함하는 추출물을 제조하는 단계; (2) 상기 추출물을 희석하여 희석액을 제조하는 단계; (3) 상기 희석액 100 중량부에 대하여 모노소듐 글루타메이트(mono sodium glutamate; MSG) 1 내지 5 중량부 및 글루코즈(glucose) 1 내지 5 중량부를 혼합하여 혼합물을 제조하는 단계; (4) 상기 단계 (3)의 혼합물에 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*) HA (KCCM 10775P) 균주 스타터(starter)를 접종 및 배양하여 상기 단계 (3)의 혼합물을 1차 발효시킴으로써 점질물인 감마-폴리글루탐산(γ -polyglutamic acid, γ -PGA)이 생성된 추출물 1차 발효액을 획득하는 단계; (5) 상기 추출물 1차 발효액 100 중량부에 대하여 탈지분유(skim milk) 0.5 내지 5 중량부 및 글루코즈(glucose) 1 내지 5 중량부를 혼합하여 혼합물을 제조하는 단계; 및 (6) 상기 단계 (5)의 혼합물에 락토바실러스 플란타럼(*Lactobacillus plantarum*) EJ2014 (KCCM11545P) 균주 스타터(starter)를 접종 및 배양하여 상기 단계 (5)의 혼합물을 2차 발효시킴으로써 점질물 및 감마-아미노부티르산(γ -aminobutyric acid; GABA)이 생성된 추출물 2차 발효액을 획득하는 단계;를 포함하는 고농도 γ -PGA 및 GABA 함유 추출물 혼합발효액의 제조방법을 제공한다.

[0012] 또한, 상기 다른 목적을 달성하기 위하여 본 발명은 상기 제조방법에 의해 제조된 고농도 γ -PGA 및 GABA 함유 추출물 혼합발효액을 제공한다.

발명의 효과

[0013] 본 발명은 한방소재 추출물의 혼합발효를 이용한 면역 증진 또는 알러지 반응 억제용 추출물 혼합발효액 및 이의 제조방법에 관한 것으로, 상세하게는 한방소재 추출물에 모노-소듐글루타메이트(mono-sodium L-glutamate; MSG)를 첨가한 후 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*) HA 균주를 이용하여 발효함으로써 감마 폴리글루탐산 등의 기능성 물질이 고농도로 포함된 추출물 1차 발효액을 생산한 후, 락토바실러스 플란타럼(*Lactobacillus plantarum*) EJ2014 균주를 이용하여 2차 발효를 진행함으로써 감마 아미노부티르산(GABA)을 생산하는 바, 본 발명에 따른 추출물 혼합발효액은 다기능성 물질이 고농도로 포함되어 있어 특히 면역을 증진하거나 알러지 반응을 억제하는 데에 탁월한 효과를 나타낼 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0014]

- 도 1은 황칠나무 추출물 1차 발효액의 pH 및 산도 변화를 확인한 결과이다.
- 도 2는 황칠나무 추출물 1차 발효액의 점질물 및 점조도를 확인한 결과이다.
- 도 3은 황칠나무 추출물 1차 발효액의 액상 2차 발효 시 혼합발효액의 pH 및 산도를 확인한 결과이다.
- 도 4는 황칠나무 추출물 1차 발효액을 액상 2차 발효 시 혼합발효액의 점조도를 확인한 결과이다.
- 도 5는 황칠나무 추출물 1차 발효액을 액상 2차 발효시킨 후 혼합발효물의 GABA 함량 측정 결과를 나타낸 것이다.
- 도 6은 RAW264.7 세포에서 황칠나무 추출물의 혼합발효액의 세포독성을 확인한 결과이다.
- 도 7은 RAW264.7 세포에서 황칠나무 추출물의 혼합발효액 처리 시 일산화질소 생성량을 측정한 결과이다.
- 도 8은 RBL-2H3 세포에서 황칠나무 추출물의 혼합발효액 처리 시 베타-헥소사미니다아제의 방출량을 확인한 결과이다.
- 도 9는 RBL-2H3 세포에서 황칠나무 추출물의 혼합발효액의 세포독성을 확인한 결과이다.
- 도 10은 황기 및 두충 혼합 추출물의 액상 1차 발효 시의 pH 및 산도 변화를 확인한 결과이다.
- 도 11은 황기 및 두충 혼합 추출물 1차 발효액의 점질물 및 점조도를 나타낸 것이다.
- 도 12는 황기 및 두충 혼합 추출물 1차 발효액의 액상 2차 발효 시 혼합발효액의 pH 및 산도 변화를 나타낸 것이다.
- 도 13은 황기 및 두충 혼합 추출물 1차 발효액의 액상 2차 발효 시 혼합발효액의 점조도를 확인한 것이다.
- 도 14는 황기 및 두충 혼합 추출물 1차 발효액의 액상 2차 발효시킨 후 혼합발효물의 GABA 함량 측정 결과를 나타낸 것이다.
- 도 15는 껍질 유무 및 갈변화 시간에 따른 천문동 상태 변화를 나타낸 것이다.
- 도 16은 갈변화한 천문동 추출물의 1차 및 2차 액상 발효에 따른 pH 및 산도를 확인한 결과이다.
- 도 17은 갈변화한 천문동 추출물의 1차 및 2차 발효액의 점질물 및 점조도를 확인한 것이다.
- 도 18은 천문동 추출물 1차 발효액의 2차 발효 후 혼합발효액의 GABA 함량 측정 결과를 나타낸 것이다.
- 도 19는 홍삼 추출물의 1차 및 2차 액상 발효에 따른 pH 및 산도를 나타낸 것이다.
- 도 20은 홍삼 추출물의 1차 및 2차 발효에 따른 발효액의 점질물 및 점조도를 나타낸 것이다.
- 도 21은 홍삼 추출물의 1차 발효액의 2차 발효 후 혼합발효액의 GABA 함량 측정 결과를 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0015]

본 발명의 발명자들은 한방 소재 추출액을 천연원료로 이용하여 유용 미생물인 고초균과 젖산균의 액상 혼합발효를 통한 건강기능성 식품 소재인 γ -PGA 및 GABA의 생산을 최적화하여 다기능성 한방 발효소재를 개발하고자 하였다.

[0016]

이에, 다양한 한방 소재인 황칠나무, 황기 및 두충, 천문동 및 홍삼 추출물을 제조한 후 각각의 추출물에 다른 영양성분 첨가 없이 기질로서 모노소듐 글루타메이트(mono sodium glutamate; MSG) 용액을 3% 수준으로 첨가하여 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*) HA로 1차 발효시킴으로써 기능성 물질인 감마-폴리글루탐산(γ -polyglutamic acid, γ -PGA)가 고농도로 함유된 발효물을 제조하였다. 또한, 2차 발효를 락토바실러스 플란타럼(*Lactobacillus plantarum*)을 접종하여 잔존하는 MSG를 감마-아미노뷰티르산(gamma-aminobutyric acid; GABA)로 전환시킴으로써 보다 효과적으로 생성된 고농도의 GABA를 포함한 최종 발효액을 생산하였는 바, γ -PGA와 GABA를 고농도로 함유한 다기능성의 천연의 한방 소재 추출물 혼합발효액을 개발하였다. 또한, 다양한 한방소재의 혼합발효액의 효능평가를 세포실험을 통해서 입증하고 본 발명을 완성하였다.

[0017]

따라서, 본 발명은 (1) 황칠나무 추출물, 황기 및 두충의 혼합 추출물, 천문동 추출물 또는 홍삼 추출물에서 선택된 하나 이상을 포함하는 추출물을 제조하는 단계; (2) 상기 추출물을 희석하여 희석액을 제조하는 단계; (3) 상기 희석액 100 중량부에 대하여 모노소듐 글루타메이트(mono sodium glutamate; MSG) 1 내지 5 중량부 및 글

루코즈(glucose) 1 내지 5 중량부를 혼합하여 혼합물을 제조하는 단계; (4) 상기 단계 (3)의 혼합물에 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*) HA (KCCM 10775P) 균주 스타터(starter)를 접종 및 배양하여 상기 단계 (3)의 혼합물을 1차 발효시킴으로써 점질물인 감마-폴리글루탐산(γ -polyglutamic acid, γ -PGA)이 생성된 추출물 1차 발효액을 획득하는 단계; (5) 상기 추출물 1차 발효액 100 중량부에 대하여 탈지분유(skim milk) 0.5 내지 5 중량부 및 글루코즈(glucose) 1 내지 5 중량부를 혼합하여 혼합물을 제조하는 단계; 및 (6) 상기 단계 (5)의 혼합물에 락토바실러스 플란타럼(*Lactobacillus plantarum*) EJ2014 (KCCM11545P) 균주 스타터(starter)를 접종 및 배양하여 상기 단계 (5)의 혼합물을 2차 발효시킴으로써 점질물 및 감마-아미노뷰티르산(γ -aminobutyric acid; GABA)이 생성된 추출물 2차 발효액을 획득하는 단계;를 포함하는 고농도 γ -PGA 및 GABA 함유 추출물 혼합발효액의 제조방법을 제공한다.

- [0018] 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. 일반적으로 미생물 중에서 스타터로 사용되고 있는 것은 박테리아, 곰팡이, 효모 등이 있으며, 이것을 단독 혹은 혼합하여 사용할 수 있다.
- [0019] 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.
- [0020] 본 발명에 있어서, "점질물"에는 "감마-폴리글루탐산(γ -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 동중 중합체(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.
- [0021] 또한, 본 발명에서 사용된 락토바실러스 플란타럼(*Lactobacillus plantarum*) EJ2014 균주는 한국미생물보존센터에 KCCM 11545P로 수탁하였다.
- [0022] 본 발명에 있어서, "감마 아미노뷰티르산(γ -amino butyric acid; GABA)"은 4-아미노뷰티르산으로써 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.
- [0023] 상기 단계 (4)에서 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*) HA (KCCM 10775P) 균주 스타터는 상기 단계 (3)의 혼합물 100 중량부에 대하여 1 중량부 내지 10 중량부로 접종될 수 있는 바, 상기 수치 범위 내에서 가장 효과적으로 1차 발효를 진행하여 고농도의 γ -PGA를 포함하는 추출물 1차 발효액을 제조할 수 있다.
- [0024] 상기 단계 (4)에서 1차 발효는 30℃ 내지 50℃의 발효 온도에서 1 내지 3일 동안 진행될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0025] 이때, 상기 단계 (4)에서 1차 발효 시에, 바실러스 서브틸리스 HA가 단계 (3)에서 혼합한 MSG를 γ -PGA로 전환시킬 수 있는 바, 특정 수치 범위 내에서 접종된 상기 바실러스 서브틸리스 HA를 이용한 발효를 진행하므로 고농도의 γ -PGA가 포함된 추출물 1차 발효액을 획득할 수 있다.
- [0026] 또한, 상기 단계 (6)에서 락토바실러스 플란타럼(*Lactobacillus plantarum*) EJ2014 (KCCM11545P) 균주 스타터는 상기 단계 (5)의 혼합물 100 중량부에 대하여 0.5 중량부 내지 5 중량부로 접종될 수 있는 바, 상기 수치 범위 내에서 가장 효과적으로 2차 발효를 진행하여 고농도의 GABA를 더 포함하는 추출물 2차 발효액을 제조할 수 있다.
- [0027] 상기 단계 (6)에서 2차 발효는 25℃ 내지 35℃의 발효 온도에서 1 내지 7일 동안 진행될 수 있으나, 이에 제한

되는 것은 아니다.

[0028] 이때, 상기 단계 (6)에서 2차 발효 시에, 락토바실러스 플란타럼 EJ2014가 추출물 1차 발효액에 잔존하는 MSG를 GABA로 전환시킬 수 있는 바, 최종적으로 얻어지는 추출물 2차 발효액은 고농도의 γ -PGA 뿐만 아니라 고농도의 GABA를 더 포함하여 다양한 생리 활성 기능을 나타낼 수 있다.

[0029] 더욱이, 본 발명은 상기 방법에 의해 제조된 고농도 γ -PGA 및 GABA 함유 추출물 혼합발효액을 제공한다.

[0030] 상기 추출물 혼합발효액은 일산화질소의 생성을 촉진하거나 β -헥소사미니다아제(β -hexosaminidase)의 활성을 억제함으로써, 면역 활성을 증진시키거나 알러지 반응을 억제할 수 있는 바, 고농도의 GABA를 포함함으로써 인지능 기능을 향상시키면서도, 면역 활성 또는 알러지 반응과 관련된 질환을 예방, 개선 또는 치료하는 효과를 나타낼 수 있다.

[0032] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 실시예를 들어 상세하게 설명하기로 한다. 다만 하기의 실시예는 당업계에 있어 평균적인 지식을 가진 자에게 본 발명을 보다 완전하게 설명하기 위해 제공되는 것이며 본 발명의 내용을 예시하는 것일 뿐이므로 본 발명의 범위가 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0034] <준비에 1> 배양 배지 및 스타터(starter) 배양

[0035] 기본 배지로 NB 육즙 배지(0.1% 포도당, 1.5% 펩톤, 0.3% 비프 추출물, 0.6% 염화나트륨, 0.3% 이스트 엑기스; Difco)와 MRS 육즙 배지(1% 펩톤, 1% 비프 추출물, 0.4% 이스트엑기스, 2% 포도당, 0.5% 소듐아세테이트, 0.1% 폴리솔베이트 80, 0.2% 디포타슘 포스페이트, 0.2% 암모늄시트레이드, 0.02% 마그네슘 설페이트, 0.005% 망간 설페이트; Difco)를 이용하여 스타터 배양액을 제조하였으며, NB 배지에서 바실러스 서브틸리스 HA(*Bacillus subtilis* HA; KCCM 10775P)를 접종한 후 42℃에서 24시간 동안 진탕배양하였다. 이후, 상기 바실러스 서브틸리스 HA를 1 백금이 접종한 뒤 진탕 배양기(SI-900R, JEIO TECH Co., Ltd., Korea)에서 42℃, 160 rpm의 조건으로 24시간 동안 배양한 후, 8,000 rpm, 20분간 원심분리하였다. 마지막으로 멸균 생리 식염수를 이용해 10배 농축하여 이를 스타터로 사용하였다.

[0036] 또한, MRS 배지에서 30℃, 24시간 배양한 락토바실러스 플란타럼(*Lactobacillus plantarum*) EJ2014(KCCM11545P)를 이용하여 상기와 동일한 방법으로 스타터를 제조하여 2차 발효에 사용하였다.

[0038] <실시에 1> 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*) HA를 이용한 황칠나무 추출물 1차 액상 발효에 따른 물성 변화 확인

[0039] (1) 황칠나무 추출물의 제조

[0040] 황칠나무 추출물로는 (주)리더스바이오텍에서 받은 한방소재 추출물을 이용하였다. 상기 황칠나무 추출물 50%(×2)에 포도당(Glucose) 3%, MSG 3%, 상기 준비에 1에서 준비한 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*) HA 5%를 처리하여 2일간 1차 발효시키면서, 160 rpm~200 rpm, 42℃에서 MSG가 γ -PGA로 전환되도록 하였다.

[0041] (2) pH 및 산도 변화 측정

[0042] 상기에서 얻은 발효된 황칠나무 추출물의 pH는 추출물 1차 발효액 1 g에 증류수 9 mL을 혼합한 후 pH 미터(420A+, Thermo Orion, USA)를 이용하여 측정하였다. 적정 산도는 추출물 1차 발효액 1 g에 증류수 9 mL를 첨가하여 pH 미터로 pH가 8.3에 도달할 때까지 적정 시에 사용된 0.1 N 수산화나트륨(NaOH) 소비량을 주석산(lactic acid) 함량(% , v/w)으로 환산하였다.

[0043] 그 결과, 도 1에 나타난 바와 같이, 황칠나무 추출물을 이용하여 MSG 및 포도당 첨가에 따른 황칠나무 추출물 액상 1차 발효액의 pH 변화는 발효 1-2일동안 각각 pH 6.32, pH 7.93으로 2일째에 크게 증가하는 경향을 보였다. 산도 변화는 발효 1-2일동안 각각 0.08%, 0.03%로 점차 감소하는 경향을 띄었으나, 기본적으로 본 발명에서 진행되는 발효가 고초균을 이용한 것이기 때문에 산도는 전체적으로 매우 낮은 값을 나타내었다.

[0044] (3) 생균수 변화 측정

[0045] 생균수는 상기 추출물 1차 발효액 1 mL에 멸균수 9 mL를 첨가하여 10배씩 단계별로 희석하여 MRS 육즙 아가

(broth agar) 배지에 20 μ l 도말하고, 42℃ 항온배양기에서 24시간 배양한 후의 바실러스 서브틸리스 HA 생균수를 CFU(colony forming unit)/mL으로 나타내었다.

[0046] 그 결과, 하기 <표 1>에 나타난 바와 같이, MSG 및 포도당 첨가에 따른 황칠나무 추출물 액상 1차 발효물의 생균수 변화는 각각 1일 발효에 2.25×10^9 CFU/mL, 2일 발효에 3.58×10^8 CFU/mL 로 1일째에 가장 높은 균 활성을 나타냈고, 발효 2일째부터 점차 감소하는 경향을 보였는 바, 첫 스타터 생균수는 2.00×10^6 CFU/mL인 것을 바탕으로 상기 추출물 1차 발효액에서 균이 자란 것을 확인하였다.

표 1

황칠나무 추출물의 균수 변화	발효 시간 (일)		
	0	1	2
x2	2.00×10^6	2.25×10^9	3.58×10^8

[0048] (단위: CFU/mL)

[0049] (4) 점질물 및 점조도의 변화 측정

[0050] 상기 추출물 1차 발효액을 10 mL씩 취하여 18,000 rpm에서 20분 동안 원심분리한 상등액을 2-3배의 이소프로필알코올을 첨가한 후 생성된 점질물을 50℃, 24시간 드라이오븐(dry oven)에서 건조 시킨 후 무게를 측정함으로써 점질물의 함량으로 환산하였다.

[0051] 또한, 점조도는 흐름에 대한 저항값을 나타내는 것으로, 콘 플레이트 장치(cone plate device; Plate PP35Ti, 3.5 cm diameter)를 장착한 물성 측정기를 이용하여 측정하였다. 즉, 추출물 1차 발효액 1 mL를 상기 플레이트에 올리고 구간 당 10초 동안의 평균값을 측정하여 얻은 값을 전단속도(shear rate, 1/s)와 전단응력(shear stress, Pa)으로 나타내었다. 이때 측정온도는 20℃, 전단속도($\dot{\gamma}$)는 $1-100 \text{ s}^{-1}$ 의 범위였으며, 이렇게 얻은 값들을 이용하여 하기 식에 나와 있는 대로 계산하여 점조도 지수를 확인하였다.

[0052] Power law model : $\sigma = K \dot{\gamma}^n$

[0053] (상기 식에서 σ 는 전단응력(shear stress, Pa), K는 점조도 지수(consistency index, Pas^n), $\dot{\gamma}$ 는 전단속도(shear rate, s^{-1}), n은 유동성 지수(flow behavior index, n)이다.)

[0054] 그 결과, 도 2에 나타난 바와 같이, MSG 및 글루코즈 첨가에 따른 황칠나무 추출물 액상 1차 발효물의 발효 1-2일 동안 $1.55 \pm 0.01\%$, $2.08 \pm 0.01\%$ 의 점질물을 나타낸 바, 발효 2일에 가장 많은 양의 점질물이 나오는 것을 알 수 있었다. 또한, 점조도는 발효 1-2일 동안 각각 $1.405 \pm 0.102 \text{ Pas}^n$, $0.971 \pm 0.093 \text{ Pas}^n$ 로 발효 1일에 가장 높은 점성을 띄는 것을 알 수 있었으며 발효 2일에 서서히 감소하는 경향을 나타냈다.

[0056] <실시예 2> 락토바실러스 플란타럼(*Lactobacillus plantarum*) EJ2014를 이용한 황칠나무 2차 발효 조건의 최적화

[0057] (1) 2차 발효

[0058] 락토바실러스 플란타럼(*Lactobacillus plantarum*) EJ2014를 이용한 황칠나무 추출물의 2차 발효를 위해, 상기 실시예 1에서 얻은 추출물 액상 1차 발효액에 포도당 2%, 탈지분유 분말 1%, 락토바실러스 플란타럼(*Lactobacillus plantarum*) EJ2014 1%를 처리하고 30℃에서 총 7일 동안 2차 발효시켰다.

[0059] (2) pH 및 산도 변화 측정

[0060] 2차 발효 후의 추출물 발효액의 pH 및 산도 변화를 확인하기 위하여, 상기 2차 발효 후의 추출물 2차 발효액의 pH 및 산도를 발효 시작 1일부터 7일까지 매일 측정하였다. 구체적으로, pH는 추출물 2차 발효액 1 g에 증류수 9 mL을 혼합한 후 pH 미터(420A+, Thermo Orion, USA)를 이용하여 측정하였다. 적정 산도는 시료 1 g에 증류수 9 mL을 첨가하여 pH 미터로 pH가 8.3에 도달할 때까지 적정한 0.1 N 수산화나트륨(NaOH)의 소비량을 젖산(lactic acid) 함량(% , v/w)으로 환산하였다.

[0061] 그 결과, 도 3에 나타난 바와 같이 탈지분유 분말, 포도당 첨가에 따른 황칠나무 추출물 액상 2차 발효액의 pH 변화는 발효 1-7일간 각각 pH 4.79, pH 4.57, pH 4.52, pH 4.50 로 점차 감소하는 경향을 보였으며, 산도 변화는 발효 1-7일 동안 각각 0.80%, 0.74%, 0.77%, 0.58%로 점차 증가하다 감소하는 경향을 보였다.

[0062] (3) 생균수 변화 측정

[0063] 추출물 2차 발효액의 생균수 변화를 측정하기 위하여, 상기 추출물 2차 발효액 1 mL에 멸균수 9 mL을 첨가하여 10배로 단계별 희석하여 MRS 육즙 고체 배지에 20 μ l 도말하고, 30℃ 항온배양기에서 24시간 배양한 후의 락토 바실러스 플란타럼 EJ2014 및 바실러스 서브틸리스 HA 생균수를 CFU(colony forming unit)/mL으로 나타내었다. 이때 생균수 측정은 발효 후 0일, 1일, 3일, 5일, 7일마다 수행되었다.

[0064] 그 결과, 하기 <표 2>에 나타난 바와 같이, 황칠나무 추출물 액상 2차 발효액의 젖산균의 생균수 변화는 각각 1일 발효에 9.90×10^8 CFU/mL, 3일 8.00×10^8 CFU/mL, 5일 5.03×10^8 CFU/mL, 7일 1.05×10^8 CFU/mL 로 1일에 가장 높은 균 활성을 보이다가 발효 3일째부터 점차 감소하는 경향을 나타냈었으며, 첫 스타터 생균수는 2.75×10^7 CFU/mL이므로 발효가 진행되면서 균이 자란 것을 알 수 있었고, 같이 공존하는 바실러스 서브틸리스 HA균은 2차 발효 1일부터 균의 활성이 나타나지 않는 것을 볼 수 있었다.

표 2

황칠나무 추출물 균수 변화	발효시간 (일)				
	0	1	3	5	7
x2 (EJ2014)	2.75×10^7	9.90×10^8	8.00×10^8	5.03×10^8	1.05×10^8
x2 (HA)	3.58×10^8	N.D*	N.D	N.D	N.D

[0066] (단위: CFU/mL, *) 검출되지 않음.)

[0067] (4) 점조도의 변화 측정

[0068] 황칠나무 추출물의 2차 발효액의 점도를 확인하기 위하여, 콘 플레이트 장치(cone plate device; Plate PP35Ti, 3.5 cm diameter)를 장착한 물성 측정기를 이용하여 측정하였다. 즉, 추출물 2차 발효액 1 mL을 상기 플레이트에 올리고 구간당 10초 동안의 평균값을 측정하여 얻은 값을 전단속도(shear rate, 1/s)와 전단응력(shear stress, Pa)으로 나타내었다. 이때 측정온도는 20℃, 전단속도($\dot{\gamma}$)는 $1-100 \text{ s}^{-1}$ 의 범위였으며, 이렇게 얻은 값들을 이용하여 하기 식에 나와 있는 대로 계산하여 점조도 지수를 나타내었다. 점조도는 발효 1일째부터 3일째 되는 날까지 측정하였다.

[0069] Power law model : $\sigma = K \dot{\gamma}^n$

[0070] (상기 식에서 σ 는 전단응력(shear stress, Pa), K는 점조도 지수(consistency index, Pas^n), $\dot{\gamma}$ 는 전단속도(shear rate, s^{-1}), n은 유동성 지수(flow behavior index, n)이다.)

[0071] 그 결과, 도 4에 나타난 바와 같이, 탈지분유 분말, 포도당 첨가에 따른 황칠나무 추출물 액상 2차 발효액의 점조도는 발효 1-3일 동안 $0.05 \pm 0.001 \text{ Pas}^n$, $0.001 \pm 0.001 \text{ Pas}^n$ 로 발효 1일부터 점성이 모두 떨어지는 경향을 볼 수 있었다.

[0072] (5) GABA TLC 측정

[0073] 2차 발효 시 잔존한 MSG로부터 GABA 생성이 잘 되었는지를 확인하기 위하여, GABA 함량을 측정하였다. 구체적으로, TLC 실리카 겔 60 F₂₅₄ (25 알루미늄 시트 20 x 20 cm)를 이용하여 추출물 2차 발효액을 2배 희석하여 측정하였다. 즉, 상기 추출물 2차 발효액 1 mL을 2 mL E-튜브에 넣은 후, 원심분리기(effendorf centrifuge 5415 R)를 이용하여 13200 rpm로 10분간 원심분리하고, 상등액을 분리한 후, GABA(sigma) 및 MSG(junsei)의 가루 용액을 섞어 만든 농도별 GABA 표준용액 0.5 1% 와 MSG 1% 또는 2%를 각각 실리카겔에 찍어서 확인하였다.

[0074] 그 결과, 도 5에 나타난 바와 같이, 발효 5일째부터 MSG의 소진이 거의 다 되어 대부분 GABA로 전환된 것을 확

인할 수 있었다.

[0076] <실시예 3> RAW264.7 대식세포에서 황칠나무 발효액의 면역 증진 효능 평가

[0077] (1) RAW264.7 대식세포의 배양

[0078] 마우스 유래 대식세포주인 RAW 264.7 세포는 한국세포주은행(KCLB)에서 분양을 받았으며 세포배양을 위해 10% 소태아혈청(fetal bovine serum, FBS)과 1% 페니실린을 첨가한 DMEM 배지(㈜웰진사의 LM001-05)를 이용하여 5% CO₂가 존재하는 37℃ 배양기에서 1주일에 2, 3회 계대 배양을 실시하였다.

[0079] (2) 세포독성 시험

[0080] 세포독성 시험은 MTT assay를 사용하여 세포 생존율을 측정함으로써 수행하였다. MTT 시약은 세포 내로 흡수된 후, 미토콘드리아 내 효소인 숙신산 탈수소효소(succinate dehydrogenase)에 의해 포르마잔(formazan)으로 변하여 세포의 성장을 멈추게 하며, 세포가 죽을수록 포르마잔의 생성이 줄어드는 원리를 이용한 실험이다. 상기에 서 배양한 대식세포주를 1×10^5 cells/mL의 농도로 96 웰 플레이트에 분주하여 5% CO₂ 배양기에서 24시간 동안 예비 배양한 후 시료를 농도별(발효 원액을 10-500배 희석)로 처리하고 24시간을 더 배양하였다. 이렇게 배양한 세포에 인산완충식염수(PBS)에 MTT(5 mg/mL)를 녹인 MTT 용액 10 mL를 각 웰에 넣고 배양기에서 4시간 동안 반응시켰다. 반응 종료 후 상등액을 제거하고, 각 웰에 100 mL의 다이메틸 설펡소이드(dimethyl sulfoxide, DMSO)를 첨가하여 생성된 포르마잔 결정을 용해시킨 후, 550 nm 파장에서 ELISA reader(SPECTRA max 340PC, Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)를 이용하여 흡광도를 측정하였다. 측정된 포르마잔 결정 생성 정도는 정상적인 세포의 값과 비교하여 백분율(%)로 표시하였다.

[0081] Cell viability (%) = (시료 처리군의 흡광도) / (대조군의 흡광도) × 100

[0082] 그 결과, 도 6에 나타난 바와 같이, 시험한 발효액 농도 범위 중 20-500배 희석 범위 내에서는 유의한 세포 독성은 나타나지 않았으나 10배 희석액에서는 70% 이하의 세포 생존율을 보였다.

[0083] 이에, 20-500배 희석액을 이용하여 NO 생성능을 비교하였다.

[0084] (3) 일산화질소(Nitric oxide, NO) 생성량 측정

[0085] NO의 농도는 배양액 내의 아질산염(nitrite) 농도를 그리스 시약 시스템(Griess Reagent System)의 방법을 이용하여 측정하였다. 상기에서 배양한 RAW 264.7 세포를 1×10^5 Cells/mL의 농도로 96 웰 플레이트에 분주한 후 37℃, 5% CO₂ 배양기를 이용하여 24시간 동안 배양하였다. 배양 후, 상기 황칠나무 추출물의 혼합발효액을 농도별(발효 원액의 40배-500배 희석)로 처리하여 24시간 동안 배양하였다. 이후, 배양 상등액 100 μL를 새로운 96 웰 플레이트에 취하고 여기에 동량의 그리스 시약(1% 설펡닐아마이드, 0.1% 나프틸에틸렌다이아민 및 2.5% 인산)을 첨가하여 10분간 반응시킨 후 ELISA reader를 이용하여 540 nm의 흡광도로 측정하였다. 아질산염의 농도(μM)는 아질산나트륨(NaNO₂)를 사용하여 얻은 표준 직선과 비교하여 산출하였다.

[0086] 그 결과, 도 7에 나타난 바와 같이, 황칠나무 추출물의 혼합발효액은 500배 희석액에서 40배 희석액까지 발효액의 농도가 증가함에 따라 NO의 생성능이 높아져 LPS 100 ng/mL과 유사하게 NO를 생성하는 것을 확인하였으며 20배 희석액부터는 NO 활성이 감소하는 것을 확인하였다.

[0088] <실시예 4> RBL-2H3 세포에서 황칠나무 추출물의 혼합발효액의 면역 증진 효능 평가

[0089] (1) RBL-2H3 세포의 배양 및 β-헥소사미니다아제(β-hexosaminidase) 방출 확인

[0090] RBL-2H3 세포에서 황칠나무 추출물의 혼합발효액의 β-헥소사미니다아제 방출 억제 효과를 확인하였다. 비만세포가 함유하고 있는 과립에는 히스타민 및 트립신분해효소(tryptase) 등 다양한 알레르기 증상을 유발하는 매개체들이 함유되어 있어 항원에 의한 이러한 매개체들의 분비를 확인하는 것은 특히 알러지 반응을 억제하는 데에 있어 매우 중요하다. β-헥소사미니다아제는 비만세포가 면역학적으로 활성화될 때 히스타민과 함께 부수적으로 분비되므로 비만세포 탈과립의 표지인자로 널리 사용되고 있다.

[0091] 먼저, RBL-2H3 세포는 ATCC에서 분양받아 10% 소태아혈청(fetal bovine serum, FBS)과 1% 페니실린/스트렙토마

이신을 첨가한 EMEM(ATCC)배지를 이용하여 5% CO₂가 존재하는 37℃ 배양기에서 1주일에 2, 3회 계대 배양을 실시하였다.

[0092] 배양한 RBL-2H3 세포를 24-웰 플레이트에 웰 당 1×10^5 세포로 분주하고 항-DNP IgE(450 ng/mL)를 처리하여 37℃에서 하룻밤동안 세포를 자극하였다. 그 후 세포를 Siraganian 버퍼(119 mM NaCl, 5 mM KCl, 0.4 mM MgCl₂, 25 mM PIPES, 40 mM NaOH, pH 7.2)로 세척하고 인큐베이트 버퍼(119 mM NaCl, 5 mM KCl, 0.4 mM MgCl₂, 25 mM PIPES, 40 mM NaOH, 5.6 mM glucose, 1 mM CaCl₂, 0.1% 소혈청알부민(bovine serum albumin), pH 7.2) 160 μ l를 첨가하여 37℃에서 20분 동안 배양한 후, 황칠나무 추출물 혼합발효액 20 μ l를 10분 동안 세포에 처리하고 항원(DNP-BSA, 10 μ g/mL) 20 μ l를 첨가하여 37℃에서 10분 동안 세포가 과립을 형성하도록 자극하였다.

[0093] 그 후, 얼음 수조에 10분 동안 담가 반응을 중단시키고, 상층액 50 μ l를 96-웰 플레이트로 옮긴 후 기질(1 mM p-니트로페닐-N-아세틸- β -글루코사미나이드(p-nitrophenyl-N-acetyl- β -D-glucosaminide))가 녹아있는 0.1 M 시트르산염(citrate) 버퍼(pH 4.5) 50 μ l를 첨가하여 37℃에서 1시간 동안 반응하였다. 그 후 정지액(0.1 M Na₂CO₃/NaHCO₃, pH 10.0) 100 μ l를 첨가하여 반응을 중단시키고 마이크로플레이트 리더기(microplate reader)를 이용하여 405 nm에서 흡광도를 측정하였다.

[0094] 그 결과, 도 8에 나타난 바와 같이, 250, 100, 80, 40, 20, 10배 희석된 황칠나무 추출물 혼합발효액이 처리된 세포에서 유리되는 β -헥소사미니다아제의 활성은 대조군에 비해 각각 50, 41, 38, 16, -11, -12%를 나타내어, 농도 의존적으로 감소함을 확인할 수 있었다.

[0095] (2) 세포독성 측정

[0096] RBL-2H3 세포에 대한 황칠나무 추출물 혼합발효액의 독성은 MTT assay 방법으로 측정하였다. 먼저 RBL-2H3 세포 (4×10^4 cells/well)를 37℃, 5% CO₂ 조건에서 하룻밤 배양한 후, 여러 농도(발효 원액 대비 10-250배 희석)의 황칠나무 추출물의 혼합발효액을 세포에 처리하였다. 24시간 후, 각 웰에 5 mg/mL 농도의 MTT 용액을 20 μ l씩 첨가하고 다시 4시간 동안 37℃ 배양기에서 배양하였다. 배양한 후, 배지를 제거하고 200 μ l의 DMSO로 웰에 생성된 포르마잔 결정을 완전히 용해시켜 마이크로플레이트를 사용하여 550 nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포독성은 시료의 흡광도를 대조군의 흡광도에 대한 백분율로 나타내었다.

[0097] 그 결과, 도 9에 나타난 바와 같이, 황칠나무 추출물 혼합발효액은 실험에 사용된 20-250배 희석액에서 24시간 동안 어떠한 세포독성도 나타내지 않았으나, 10배 희석된 황칠나무 추출물 혼합발효액에서는 강한 독성활성이 나타났다.

[0099] <실시에 5> 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*) HA를 이용한 황기 및 두충의 1차 액상 발효에 따른 물성 변화

[0100] (1) 황기와 두충 추출물의 준비

[0101] 황기와 두충 추출물은 약탕기를 이용하여 황기와 두충(바른약초)을 70℃에서 3일간 추출하여 획득하였다. 이렇게 얻은 황기 및 두충 추출물 50%에 포도당(Glucose) 3%, MSG 3%, 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*) HA 5%를 처리하고 160rpm, 42℃의 조건으로 1차 발효를 2일간 진행하여 γ -PGA 생성 실험을 진행하였다.

[0102] (2) pH 및 산도 변화 측정

[0103] 황기와 두충 추출물의 1차 발효액의 pH 및 산도를 확인하기 위하여, 상기 실시예 1에서 수행한 방법과 동일한 방법으로 pH 및 산도의 변화를 측정하였다.

[0104] 그 결과, 도 10에 나타난 바와 같이, MSG 및 포도당 첨가에 따른 황기 및 두충 추출물 1차 발효액의 pH 변화는 발효 1-3일동안 각각 pH 6.16, pH 7.73 pH 7.93으로 계속해서 증가하는 경향을 보였다. 또한, 산도 변화는 발효 1-3일 동안 각각 0.09%, 0.04%, 0.03%로 점차 감소하는 경향을 띄었으나, 바실러스 서브틸리스 균을 이용한 발효이기 때문에 기본적으로 산도를 매우 낮은 값을 나타 내었다.

[0105] (3) 생균수 변화 측정

[0106] 황기와 두충 추출물의 1차 발효액에서의 생균수 변화를 확인하기 위하여, 상기 실시예 1에서 수행한 방법과 동

일한 방법으로 생균수 변화를 측정하였다.

[0107] 그 결과, 하기 <표 3>에 나타난 바와 같이, MSG 및 포도당 첨가에 따른 황기 및 두충 추출물의 1차 발효액의 생균수 변화는 각각 발효 1일째에 1.80×10^9 CFU/mL, 2일째에 7.00×10^8 CFU/mL, 3일째에 3.00×10^8 CFU/mL로 1일에 가장 높은 균 활성을 보이고 발효 1일째부터 점차 감소하는 경향을 나타내었으며, 첫 스타터 생균수는 2.00×10^7 CFU/mL였으므로 상기 1차 발효 추출물에서 균이 자란 것을 알 수 있었다.

표 3

황기+두충 균수 변화	발효시간 (일)			
	0	1	2	3
H+D	2.00×10^7	1.65×10^9	7.00×10^8	3.00×10^8

[0109] (단위: CFU/mL)

[0110] (4) 점질물과 점조도의 변화 측정

[0111] 황기와 두충 추출물의 1차 발효액의 점질물 및 점조도 변화를 확인하기 위하여, 상기 실시예 1에서 수행한 방법대로 점질물 및 점조도 확인 실험을 수행하였다.

[0112] 그 결과, 도 11에 나타난 바와 같이, 황기와 두충을 혼합 이용하여 MSG 및 포도당 첨가에 따른 황기, 두충 추출물의 1차 발효액의 점질물 양은 발효시작 후 1-3일동안 각각 $1.11 \pm 0.01\%$, $1.00 \pm 0.01\%$, $1.00 \pm 0.01\%$ 로 나타난 바, 발효 1일에 가장 많은 양의 점질물이 나오는 것을 알 수 있었다. 또한, 점조도는 발효 후 1-3일 동안 각각 1.222 ± 0.196 Pasⁿ, 1.048 ± 0.070 Pasⁿ, 1.065 ± 0.024 Pasⁿ 로 발효 1일에 가장 높은 점성을 띄는 것을 알 수 있었으며 발효 2일부터 서서히 감소하는 경향을 나타냈다.

[0114] <실시예 6> 락토바실러스 플란타럼(*Lactobacillus plantarum*) EJ2014를 이용한 황기 및 두충 2차 발효 조건 최적화

[0115] (1) 2차 발효

[0116] 락토바실러스 플란타럼(*Lactobacillus plantarum*) EJ2014를 이용한 황기 및 두충 추출물의 2차 발효를 위해, 1차 액상발효물에 포도당 2%, 탈지분유 분말 1%, 락토바실러스 플란타럼(*Lactobacillus plantarum*) EJ2014 1%를 처리하고 30℃에서 5일동안 발효시켰다.

[0117] (2) pH 및 산도 변화 측정

[0118] 상기에서 얻은 황기 및 두충 추출물의 2차 발효액의 pH 및 산도 변화를 측정하기 위하여, 상기 실시예 2에서 수행한 방법대로 상기 2차 발효액의 pH 및 산도를 측정하였다.

[0119] 그 결과, 도 12에 나타난 바와 같이, 탈지분유 분말, 포도당 첨가에 따른 황기 및 두충 추출물의 액상 2차 발효물의 pH는 발효 0, 1, 3, 5일에 각각 pH 6.18, pH 4.55 pH 4.36 로 점차 감소하는 경향을 보였으며, 산도 변화는 발효 0, 1, 3, 5일에 각각 0.07%, 0.25%, 0.90%, 1.20%로 점차 증가하다 감소하는 경향을 보였다.

[0120] 또한, 맛의 경우 황기보단 두충의 향과 탈지분유의 향으로 인해 요구르트와 같은 발효향이 나며 맛 역시 요구르트보다는 달지 않은 맛이 났다.

[0121] (3) 생균수 변화 측정

[0122] 상기 황기 및 두충의 2차 발효 추출물에서의 생균수 변화를 확인하기 위하여, 상기 실시예 2에서 수행한 방법대로 상기 2차 발효액의 생균수를 측정하였다.

[0123] 그 결과, 하기 표 4에 나타난 바와 같이, 탈지분유 분말, 포도당 첨가에 따른 황기 및 두충 추출물의 액상 2차 발효물의 젖산균 생균수 변화는 각각 1일 발효에 4.60×10^9 CFU/mL, 3일 1.10×10^9 CFU/mL, 5일 9.58×10^8 CFU/mL로 1일째에 가장 높은 균 활성을 보이며 발효 3일째부터 점차 감소하는 경향을 나타냈다. 스타터 생균수가 3.60×10^7 CFU/mL였으므로 상기 2차 발효액에서 균이 자란 것을 알 수 있었고, 같이 공존하는 바실러스 서브

틸리스 HA 균주는 발효 1일째에 4.50×10^8 CFU/mL 로 균의 활성이 10^8 이상으로 계속해서 유지되는 것을 볼 수 있었다.

표 4

항기+두충 균수 변화	발효시간 (일)			
	0	1	3	5
H+D(EJ2014)	3.60×10^7	4.60×10^9	1.10×10^9	9.58×10^8
H+D(HA)	3.00×10^8	2.00×10^8	5.00×10^7	*N.D

(단위: CFU/mL, *) 검출되지 않음.)

(4) 점조도의 변화 측정

상기 항기 및 두충 추출물의 2차 발효액의 점조도 변화를 확인하기 위하여, 상기 실시예 2에서 수행한 방법대로 상기 2차 발효액의 점조도를 측정하였다.

그 결과, 도 13에 나타난 바와 같이, 탈지분유 분말, 포도당 첨가에 따른 항기 및 두충 추출물의 액상 2차 발효물의 점조도는 발효 0, 1, 3, 5일에 $0.328 \pm 0.011 \text{ Pas}^n$, $0.119 \pm 0.019 \text{ Pas}^n$ 로 발효 5일부터는 점조도 측정이 불가하였으며 발효 5일부터 점성이 모두 떨어지는 경향을 볼 수 있었다.

(5) GABA 측정

상기 항기 및 두충 추출물의 2차 발효액에서 MSG의 GABA로의 전환량을 확인하기 위하여, 상기 실시예 2에서 수행한 방법대로 상기 2차 발효액의 GABA 함량을 측정하였다.

그 결과, 도 14에 나타난 바와 같이, 탈지분유(Skim milk), 포도당 첨가에 따른 항기 및 두충 추출물의 액상 2차 발효물에서 발효 3일째부터 MSG가 소진되는 것을 볼 수 있었으나, 5일째에 대부분이 전환되어 GABA 함량이 약 0.7% 정도로 나오는 것을 확인할 수 있었다.

<실시예 7> 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*) HA 및 락토바실러스 플란타럼(*Lactobacillus plantarum*) EJ2014를 이용한 천문동 추출물의 혼합 액상 발효에 따른 물성 변화 확인

(1) 겹질 유무와 갈변화 시간에 따른 상태 변화 확인

전남 광양에서 재배되는 천문동을 1 kg씩 파는 천년약초에서 구매하여 이용하였다. 천문동을 겹질 유무에 따른 변화를 보기 위해 일정한 크기로 어슷썰기를 하여 건조 채반에 겹치지 않게 펼쳐 다목적 전기건조기에 3시간 열풍건조하였다. 건조된 천문동을 300 g씩 밀폐용기에 담아 건조기에서 5일간 갈변화를 확인하였다. 이 같은 실험은 천문동의 갈변화는 천문동 고유의 이취를 감소시키는 바, 맛을 개선하기 위해서 수행하였다. 그 변화 과정은 도 15에 나타난 바와 같았다.

(2) 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*) HA를 이용한 천문동 추출물의 γ -PGA 생성(1차 발효)

갈변화 천문동 추출물 10%에 포도당(Glucose) 3%, MSG 3%, 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*) HA 2%를 혼합하고 200rpm, 42℃에서 2일간 1차 발효를 진행하여 γ -PGA가 생성된 천문동 추출물의 1차 발효액을 획득하였다.

(3) 락토바실러스 플란타럼(*Lactobacillus plantarum*) EJ2014를 이용한 천문동 추출물 1차 발효액의 2차 발효

락토바실러스 플란타럼(*Lactobacillus plantarum*) EJ2014를 이용한 천문동 추출물의 2차 발효를 위해, 상기에서 획득한 천문동 추출물의 1차 발효액에 포도당 2%, 탈지분유 분말 1%, 락토바실러스 플란타럼(*Lactobacillus plantarum*) EJ2014 1%를 혼합하고 30℃에서 7일동안 2차 발효를 진행하였다.

(4) 1차 발효 및 2차 발효 시의 pH 및 산도 변화 측정

상기에서 수행한 1차 발효 및 2차 발효 시의 천문동 추출물의 발효액들의 pH 및 산도 변화를 확인하기 위하여,

상기 실시예 1 및 2에서 수행한 방법과 동일하게 pH 및 산도의 변화를 측정하였다.

[0142] 그 결과, 도 16에 나타난 바와 같이, 1차 발효 시 pH는 1-2일에 각각 pH 6.23, pH 7.06으로 2일째에 증가하는 경향을 보였으며, 산도는 발효 1-2일 동안 각각 0.04%, 0.04%로 감소하는 경향을 띄었다.

[0143] 또한, 탈지분유 분말, 포도당을 첨가한 2차 발효물의 pH 및 산도 변화는 발효 0, 1, 3, 5, 7일에 각각 pH 6.01, pH 4.25 pH 4.23 pH 4.27로 점차 감소하는 경향을 볼 수 있었으며, 산도는 0.15%, 0.15%, 0.93%, 0.96%로 점차 증가하는 경향을 띄었다.

[0144] (5) 생균수 변화 측정

[0145] 상기에서 수행한 1차 발효 및 2차 발효 시의 천문동 추출물의 발효액들의 생균수 변화를 확인하기 위하여, 상기 실시예 1 및 2에서 수행한 방법과 동일한 방법으로 생균수 변화를 측정하였다.

[0146] 그 결과, 하기 <표 5>에 나타난 바와 같이, 천문동 추출물의 1차 발효액의 고초균 생균수는 발효 1일째에 3.00×10^8 CFU/mL, 발효 2일째에 5.69×10^8 CFU/mL 로 2일째에 가장 높은 균활성을 보였다.

[0147] 또한, 2차 발효 시에 젖산균 생균수는 3일째 1.34×10^9 CFU/mL, 5일째에 1.51×10^9 CFU/mL로 증가하는 경향을 나타내었으며, 스타터 생균수는 3.25×10^7 CFU/mL였으므로 균이 자란 것을 알 수 있었다.

[0148] 반면, 같이 공존하는 고초균은 2차 발효가 시작된 후 1일차부터 9.54×10^7 CFU/mL로 점차 감소하기 시작한 바, 스타터 생균수가 4.76×10^6 CFU/mL로 균의 활성이 증가하였다가 감소되는 것을 볼 수 있었다.

표 5

[0149]

천문동 균수 변화	발효시간 (일)						
	0	1	2	1	3	5	7
<i>B. subtilis</i> HA	4.76×10^6	3.00×10^8	5.69×10^8	9.54×10^7	1.73×10^7	3.13×10^7	1.26×10^7
<i>L. plantarum</i> EJ2014			3.25×10^7	1.19×10^8	1.34×10^9	1.51×10^9	9.85×10^8

[0150] (단위: CFU/mL)

[0151] (6) 점질물 및 점조도의 변화 확인

[0152] 천문동 추출물의 1차 발효액 및 2차 발효액의 점질물 및 점조도 변화를 확인하기 위하여, 상기 실시예 1 및 2에서 수행한 방법대로 점질물 및 점조도 확인 실험을 수행하였다.

[0153] 그 결과, 도 17에 나타난 바와 같이, 1차 발효 시에 발효 1-2일 동안 점질물의 양이 $1.51 \pm 0.01\%$, $1.87 \pm 0.01\%$ 로 발효 2일에 가장 많은 양의 점질물이 나오는 것을 알 수 있었다. 또한, 점조도는 발효 1-2일 동안 0.343 ± 0.003 Pasⁿ, 1.629 ± 0.299 Pasⁿ로 발효 2일에 가장 높은 점성을 띄는 것을 알 수 있었다. 반면, 2차 발효를 시작하면서 점질물과 점조도 모두 서서히 감소하는 경향을 보였다.

[0154] (7) GABA 측정

[0155] 상기 천문동 추출물의 2차 발효액에서 MSG의 GABA로의 전환량을 확인하기 위하여, 상기 실시예 2에서 수행한 방법대로 상기 2차 발효액의 GABA 함량을 측정하였다. 구체적으로, 상기 발효액을 희석하지 않고 원액을 실리카겔에 찍어 확인하였다.

[0156] 그 결과, 도 18에 나타난 바와 같이, 발효 3일째부터 MSG의 소진이 되는 것을 볼 수 있었으나 완벽하게 소진된 것이라고 볼 수는 없었고, 7일째에는 대부분의 MSG가 소진되는 것으로 나타났으며, GABA 함량이 약 1% 정도인 것으로 측정되었다.

[0158] <실시예 8> 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*) HA 및 락토바실러스 플란타럼(*Lactobacillus plantarum*) EJ2014를 이용한 홍삼 추출물의 액상 혼합발효에 따른 물성 변화 확인

[0159] (1) 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*) HA를 이용한 홍삼 추출물의 γ -PGA 생성(1차 발효)

[0160] 홍삼 진액(농협홍삼)에 포도당(Glucose) 2%, MSG 3%, 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*) HA 5%를 혼합하고, 200rpm, 42℃에서 3일간 1차 발효를 진행하여 홍삼 추출물의 γ -PGA를 생성된 홍삼 추출물의 1차 발효액을 획득하였다.

[0161] (2) 락토바실러스 플란타럼(*Lactobacillus plantarum*) EJ2014를 이용한 홍삼 추출물 1차 발효액의 2차 발효

[0162] 락토바실러스 플란타럼(*Lactobacillus plantarum*) EJ2014를 이용한 홍삼 추출물의 2차 발효를 위해, 상기 홍삼 추출물의 1차 발효액에 포도당 2%, 탈지분유 분말 1%, 락토바실러스 플란타럼(*Lactobacillus plantarum*) EJ2014 1%를 혼합하고 30℃에서 6일 동안 2차 발효를 진행하였다.

[0163] (3) pH 및 산도 변화 측정

[0164] 상기에서 수행한 1차 발효 및 2차 발효 시의 홍삼 추출물의 발효액들의 pH 및 산도 변화를 확인하기 위하여, 상기 실시예 1 및 2에서 수행한 방법과 동일하게 pH 및 산도의 변화를 측정하였다.

[0165] 그 결과, 도 19에 나타난 바와 같이, 1차 발효 시 pH는 발효 1-2일 기간동안 각각 pH 7.2, pH 7.1로 1일째에 증가하는 경향을 보였고, 산도는 1차 발효 동안 1.12%에서 0.09%로 점차 감소하는 경향을 띄었으나 고초균을 이용한 발효를 진행하므로 산도는 매우 낮은 값을 나타내었다.

[0166] 또한, 탈지분유 분말, 포도당을 첨가한 2차 발효액의 pH는 발효 2-6일 동안 각각 pH 4.33, pH 4.23, pH 4.08로 점차 감소하는 경향을 볼 수 있었으며, 산도는 1.01%, 1.18%, 1.31%로 점차 증가하는 경향을 띄었다.

[0167] (4) 생균수 변화 측정

[0168] 상기에서 수행한 1차 발효 및 2차 발효 시의 홍삼 추출물의 발효액들의 생균수 변화를 확인하기 위하여, 상기 실시예 1 및 2에서 수행한 방법과 동일한 방법으로 생균수 변화를 측정하였다.

[0169] 그 결과, 하기 <표 6>에 나타난 바와 같이, 홍삼 추출물의 1차 발효액의 고초균 생균수는 발효 1일째에 1.81×10^9 CFU/mL, 2일 째에 1.10×10^9 CFU/mL 로 2일째에 가장 높은 균 활성을 보였다.

[0170] 또한, 2차 젖산균 발효 시에 젖산균 생균수는 2일째 1.40×10^9 CFU/mL 로 증가하는 경향을 나타내었으며, 스타터 생균수는 2.00×10^7 CFU/mL이므로 균이 자란 것을 알 수 있었다. 반면에, 같이 공존하는 고초균은 스타터 생균수가 2.00×10^7 CFU/mL였고, 2차 젖산균 발효 2일차부터 2.12×10^7 CFU/mL으로 점차 감소하기 시작한 바, 균의 활성이 증가하였다가 감소되는 것을 볼 수 있었다.

표 6

[0171]

홍삼 균수 변화	Fermentation time (days)					
	0	1	2	2	4	6
<i>B. subtilis</i> HA	2.00×10^7	1.81×10^9	1.10×10^9	2.12×10^7	1.10×10^7	2.10×10^7
<i>L. plantarum</i> EJ2014	0	0	2.00×10^7	1.40×10^9	6.10×10^8	4.00×10^8

[0172] (단위: CFU/mL)

[0173] (5) 점질물 및 점조도의 변화

[0174] 홍삼 추출물의 1차 발효액 및 2차 발효액의 점질물 및 점조도 변화를 확인하기 위하여, 상기 실시예 1 및 2에서 수행한 방법대로 점질물 및 점조도 확인 실험을 수행하였다.

[0175] 그 결과, 도 20에 나타난 바와 같이, 1차 발효 시에, 발효 1-2일 기간동안 각각 $0.60 \pm 0.01\%$, $0.61 \pm 0.01\%$ 로 발효 1일에 점질물이 생성되는 것을 알 수 있었다. 또한, 점조도는 발효 1-2일 동안 각각 $0.15 \pm 0.01 \text{ Pas}^n$, $0.05 \pm 0.01 \text{ Pas}^n$ 로 발효가 진행되면서 점성이 감소하는 경향을 보였다. 또한, 2차 젖산균 발효에서 점조도 및 점질물은 감소하는 경향을 보였다.

[0176] (6) GABA 측정

[0177] 상기 홍삼 추출물의 2차 발효액에서 MSG의 GABA로의 전환량을 확인하기 위하여, 상기 실시예 2에서 수행한 방법대로 상기 2차 발효액의 GABA 함량을 측정하였다. 구체적으로, 상기 발효액을 2배 희석하여 실리카겔에 찍어 확인하였다.

[0178] 그 결과, 도 21에 나타난 바와 같이, 발효 2일째부터 MSG의 대부분이 소진이 되는 것을 볼 수 있었고, 발효 6일째에는 GABA 함량이 약 1.0% 이상으로 생성되는 것을 알 수 있었다.

[0180] 이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시양태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 즉, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다.

수탁번호

[0181]

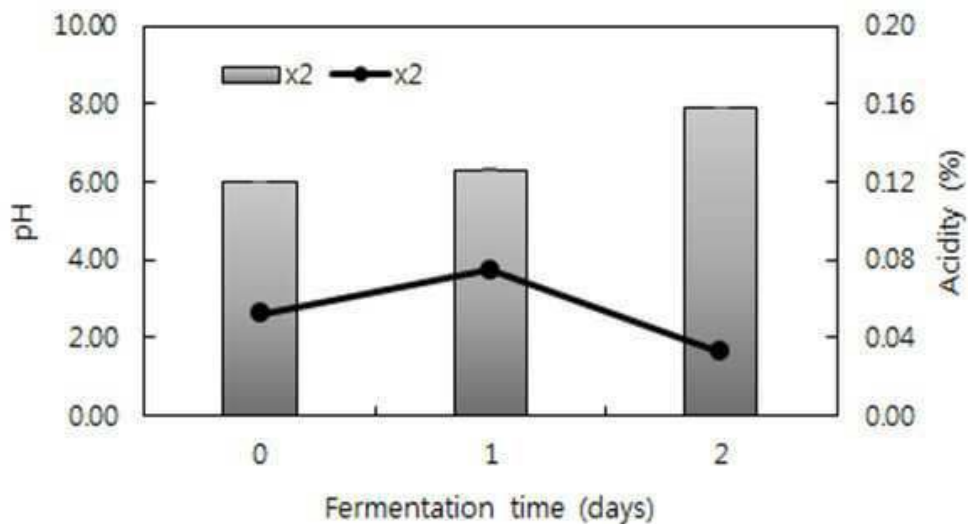
기탁기관명 : 한국미생물보존센터(국외)

수탁번호 : KCCM11545P

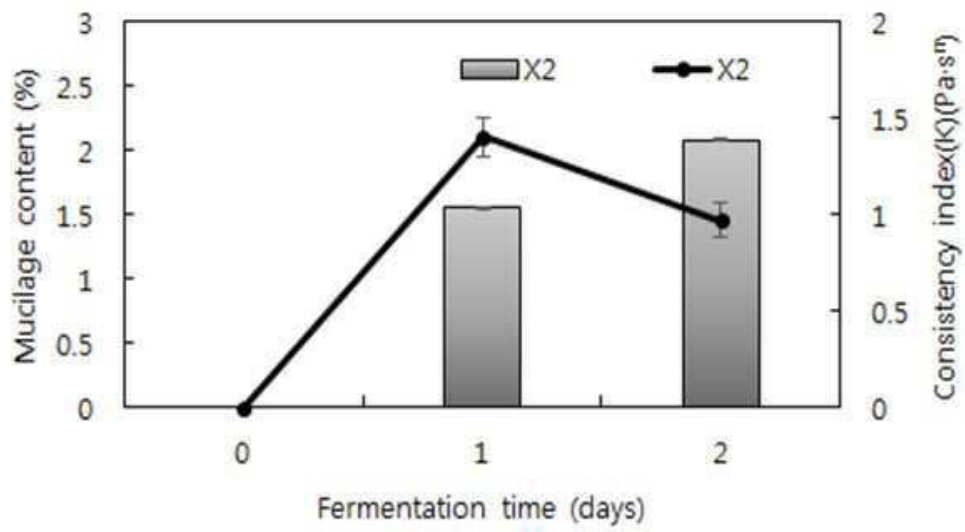
수탁일자 : 20140609

도면

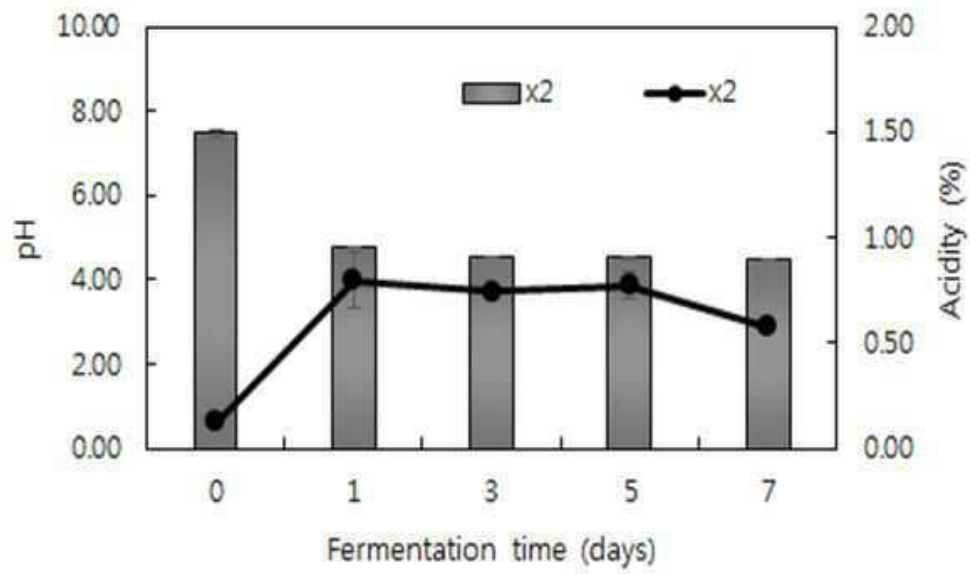
도면1



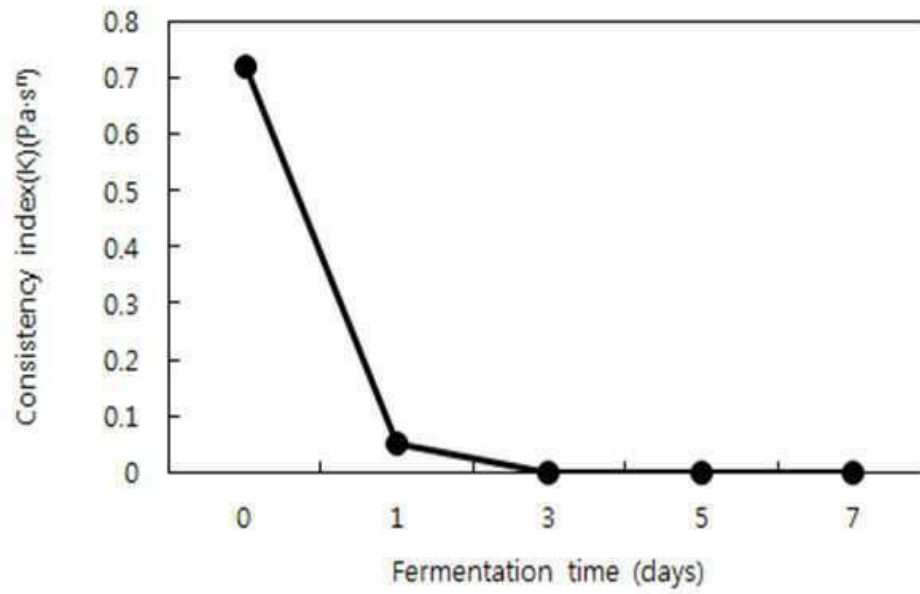
도면2



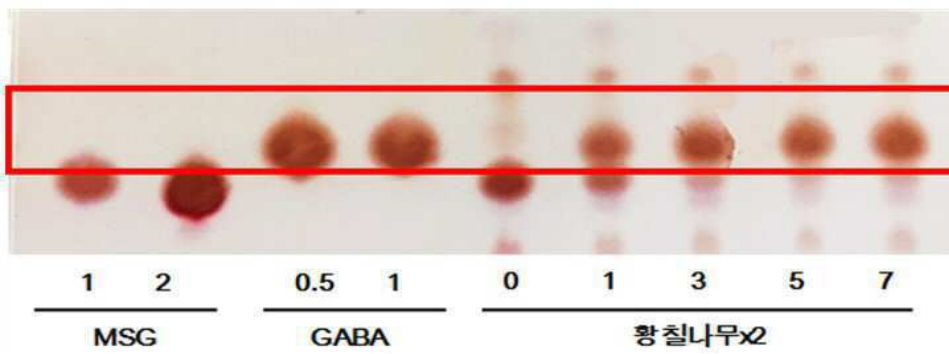
도면3



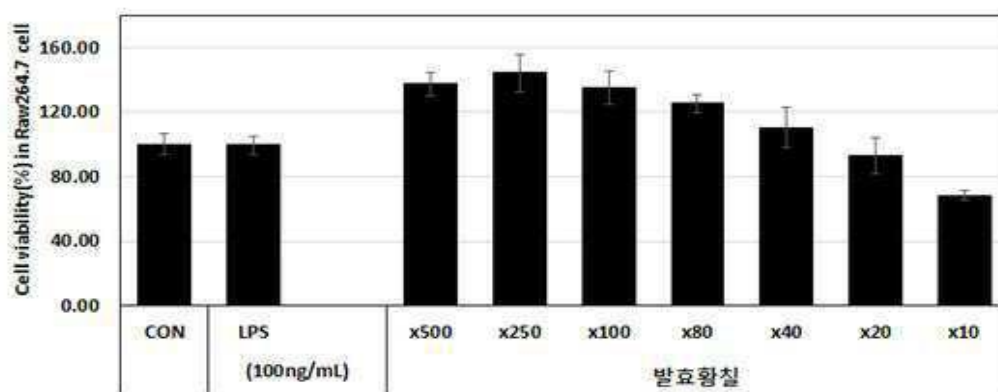
도면4



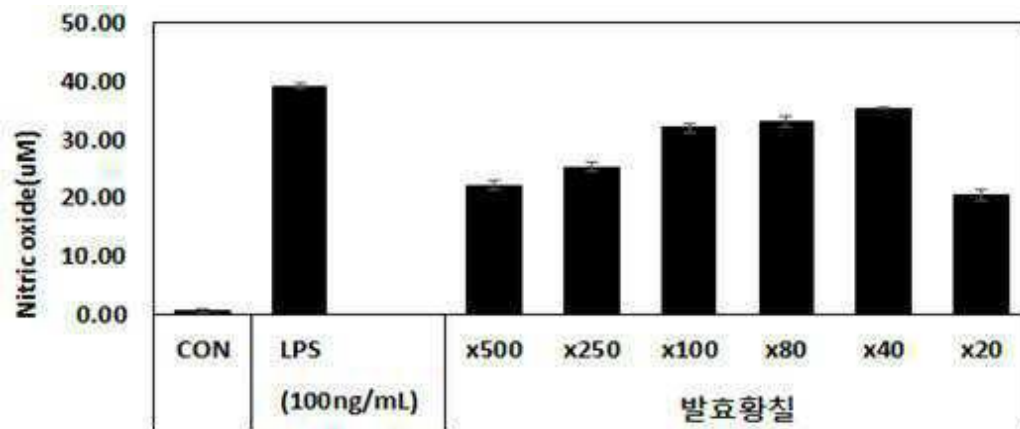
도면5



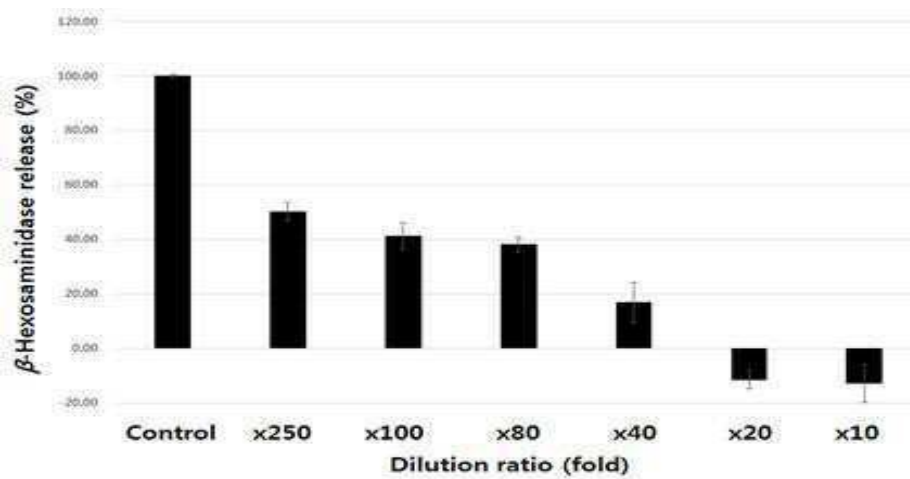
도면6



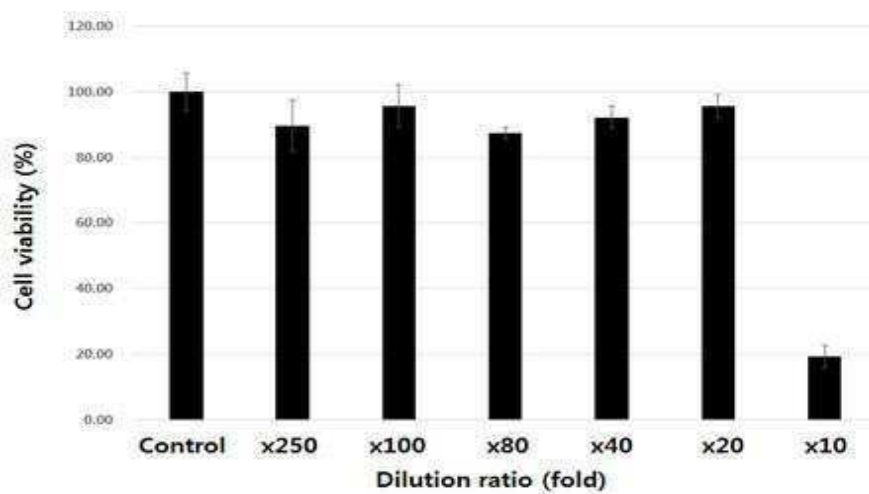
도면7



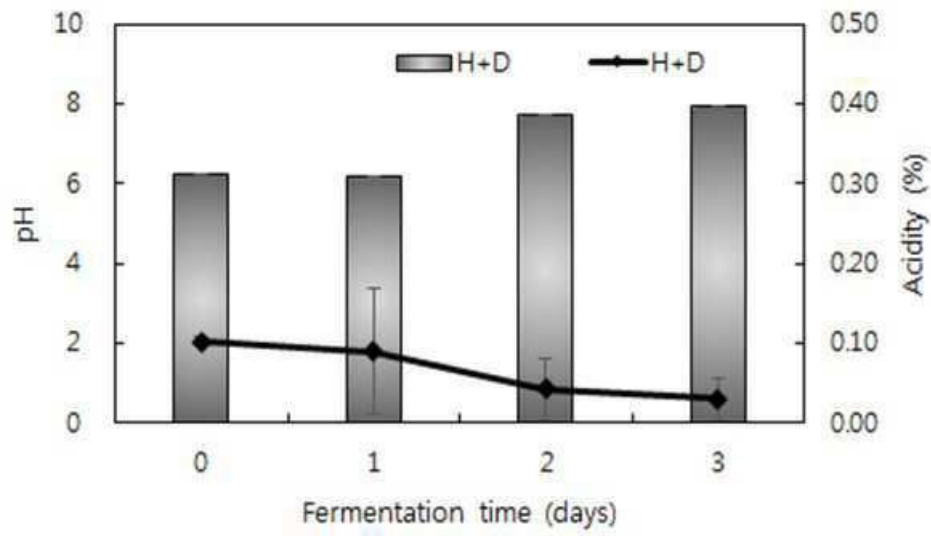
도면8



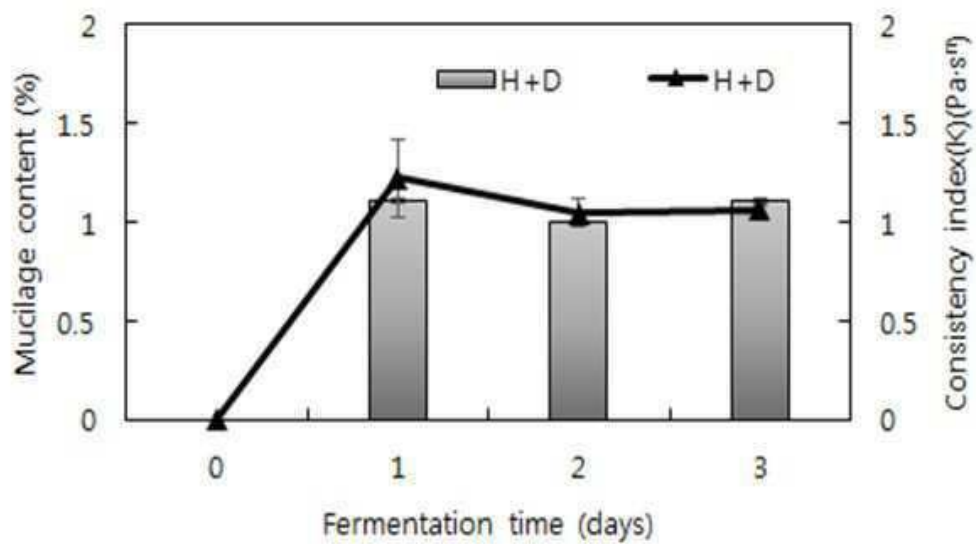
도면9



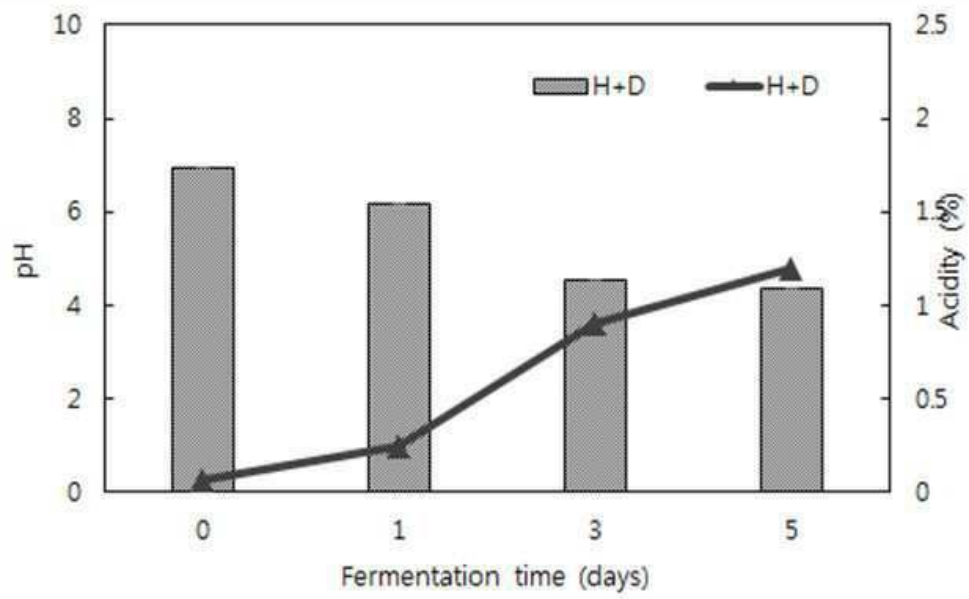
도면10



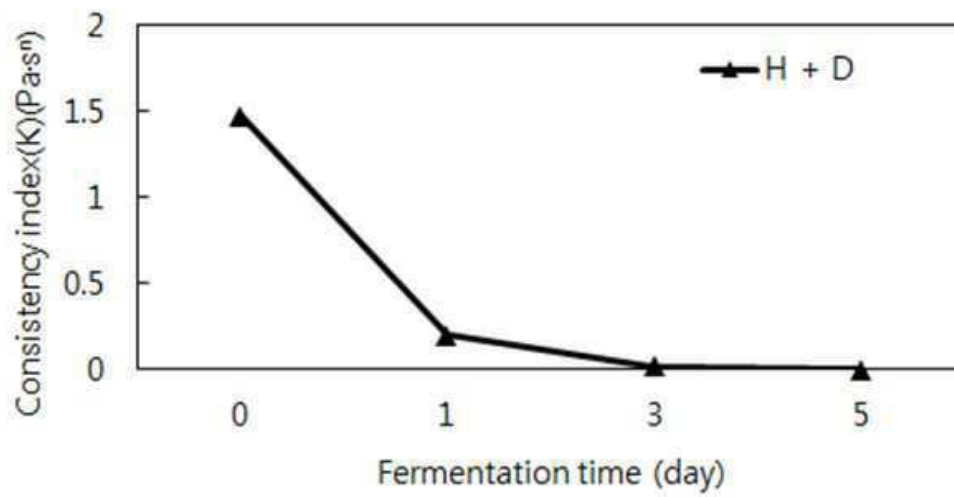
도면11



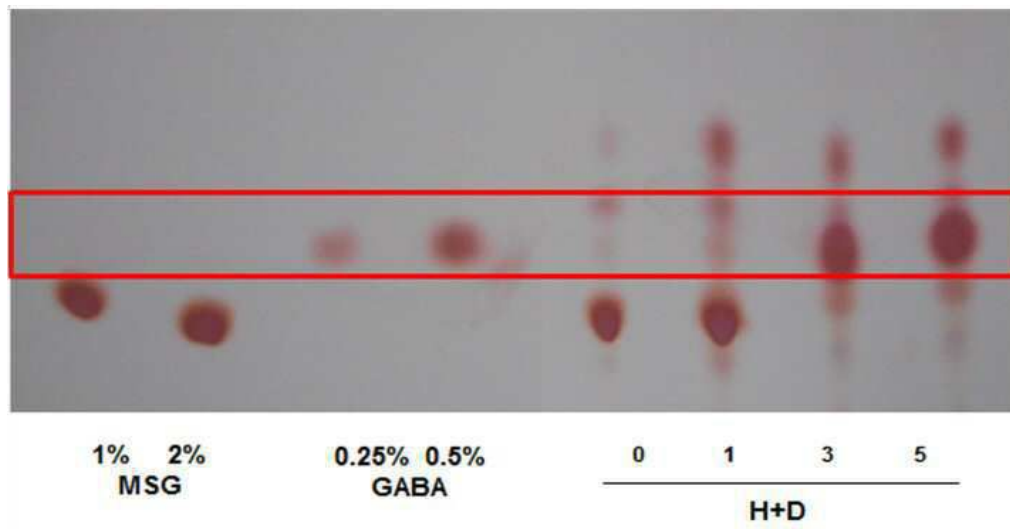
도면12



도면13



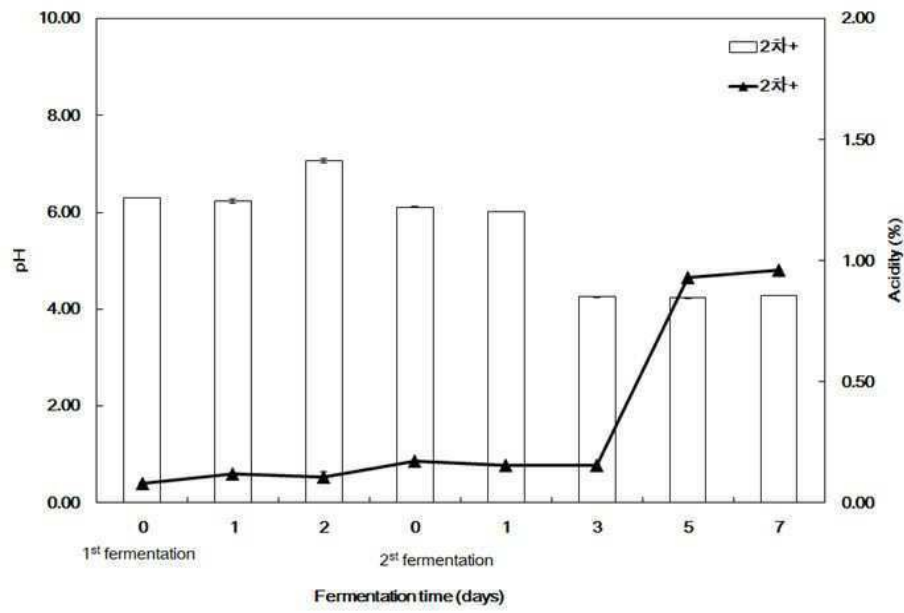
도면14



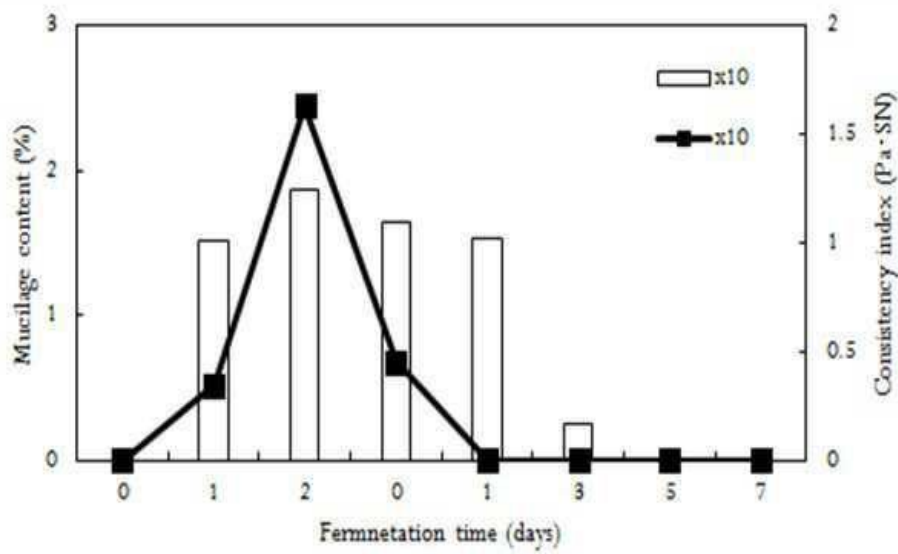
도면15



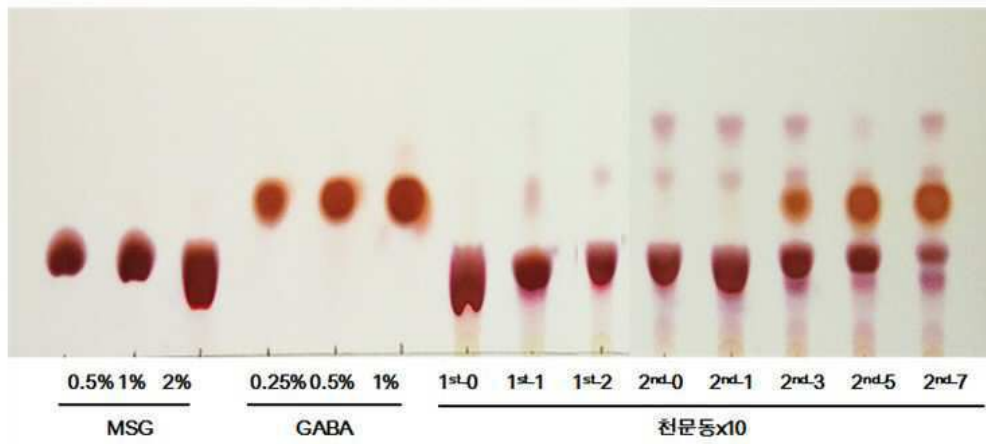
도면16



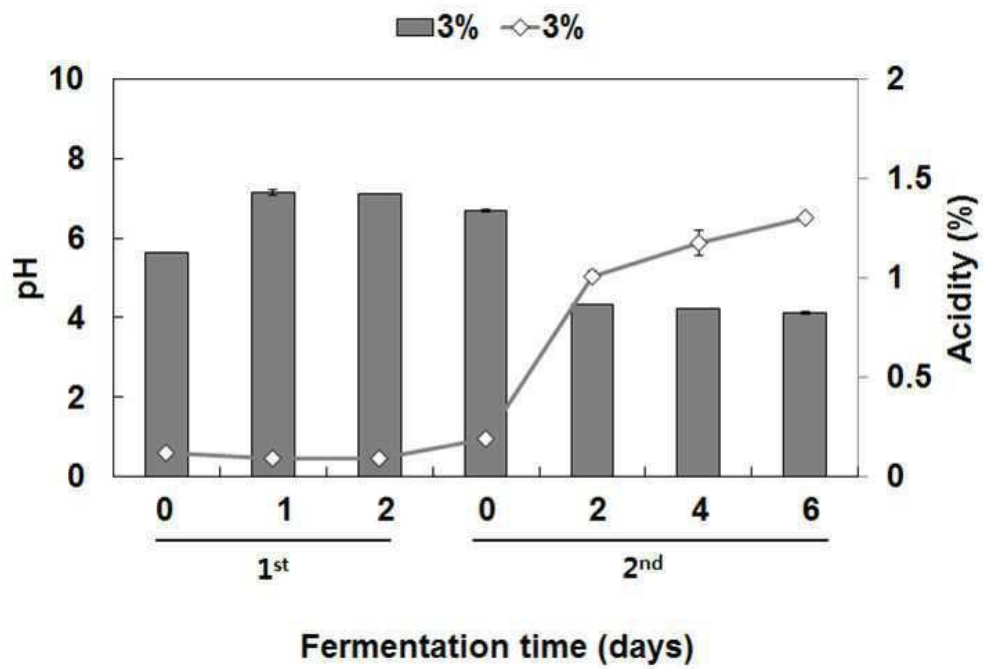
도면17



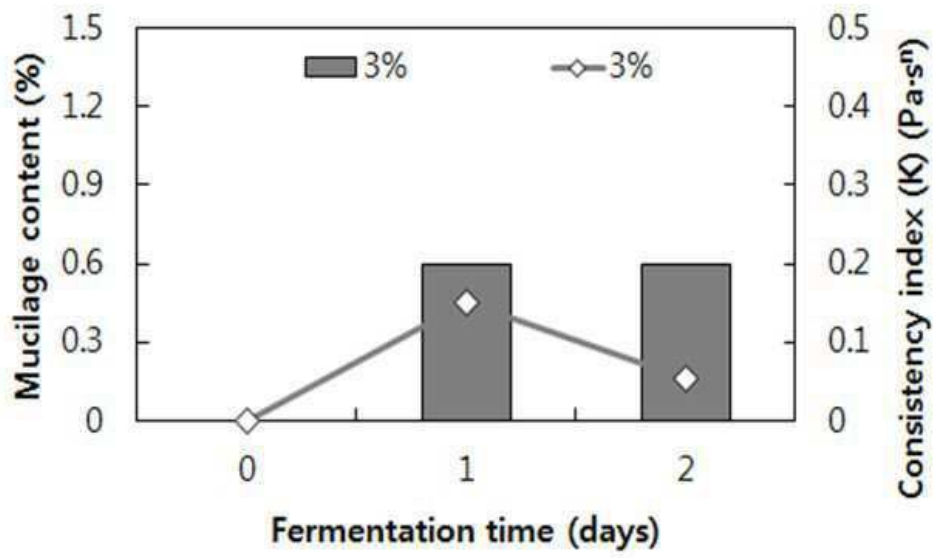
도면18



도면19



도면20



도면21

