

**(19) 대한민국특허청(KR)**
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0133520

(43) 공개일자 2022년10월05일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12N 1/20 (2006.01) *A23L 33/105* (2016.01)*A23L 33/135* (2016.01) *C12P 13/00* (2006.01)*C12R 1/25* (2006.01)

(52) CPC특허분류

C12N 1/20 (2021.05)*A23L 33/105* (2016.08)

(21) 출원번호 10-2021-0038728

(22) 출원일자 2021년03월25일

심사청구일자 2021년03월25일

(71) 출원인

계명대학교 산학협력단

대구광역시 달서구 달구벌대로 1095, 계명대학교
산학협력관 201호(신당동)

(72) 발명자

이삼빈

대구광역시 달서구 선원로 171, 102동 306호(이곡
동, 성서무지개타운)

박윤금상

대구광역시 달서구 장산남로 33, 102동 205호(용
산동, 용산롯데캐슬그랜드)

(뒷면에 계속)

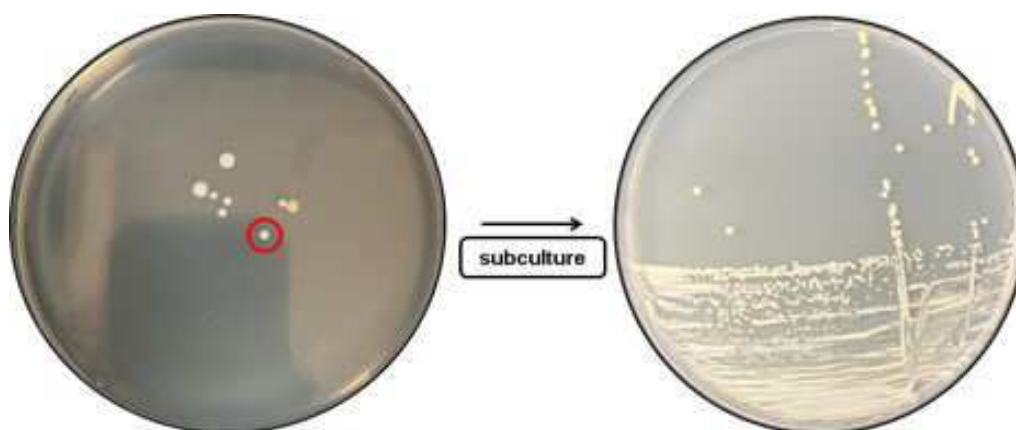
(74) 대리인

특허법인태백

전체 청구항 수 : 총 12 항

(54) 발명의 명칭 **GABA 생산 활성을 갖는 신규한 락토바실러스 플란타럼 KS2020 균주, 및 이를 이용한 고농도 γ -PGA 및 GABA 함유 홍삼발효물 또는 옷나무발효물의 제조방법****(57) 요약**

본 발명은 GABA 생산 활성을 갖는 신규한 락토바실러스 플란타럼 KS2020 균주 및 이를 이용한 고농도 γ -PGA 및 GABA 함유 홍삼발효물 또는 옷나무발효물의 제조방법에 관한 것으로, 상세하게 고초균인 바실러스 균주와 신규 젖산균인 락토바실러스 플란타럼 KS2020 (KCCM 12782P) 균주를 이용한 이단발효를 통해 γ -PGA 및 GABA가 증진된 발효물을 제조하는 방법에 관한 것이다. 상기의 방법에 의해 제조된 발효물은 γ -PGA, GABA, 펩티드, 프로바이오틱스 등 다양한 기능성 물질을 함유하여 있기에 식품 및 기능성 식품, 화장품, 사료 소재로 이용할 수 있다.

대 표 도 - 도1

(52) CPC특허분류

A23L 33/135 (2016.08)

C12P 13/005 (2013.01)

A23V 2002/00 (2013.01)

A23V 2200/326 (2013.01)

A23V 2250/038 (2013.01)

A23V 2250/0618 (2013.01)

A23V 2250/2124 (2013.01)

A23Y 2220/67 (2013.01)

C12R 2001/25 (2021.05)

(72) 발명자

윤용규

대구광역시 수성구 동대구로 95, 107동 3401호(두산동, 수성 SK리더스뷰)

강혜미

전라남도 여수시 여서로 134, 102동 1406호(여서동, 현대건설아파트)

조범수

대구광역시 수성구 동대구로 95, 102동 1402호(두산동, 수성 SK리더스뷰)

강하린

대구광역시 달서구 달구벌대로 1095, 백은관 461호(신당동, 계명대학교)

양선아

경상북도 칠곡군 왜관읍 아곡5길 79

명세서

청구범위

청구항 1

GABA(γ -aminobutyric acid) 생산 활성을 갖는 락토바실러스 락토바실러스 플란타럼 KS2020(KCCM 12782P) 균주.

청구항 2

제 1 항에 있어서, 상기 균주는 김치에서 분리한 것을 특징으로 하는 균주.

청구항 3

- (1) 홍삼추출물을 농축하여 얻은 농축액 또는 옷나무 추출물을 농축하여 얻은 농축액을 준비하는 단계;
- (2) 상기 농축액을 희석하여 얻은 희석액에 모노소듐 글루타메이트(mono sodium glutamate; MSG), 글루코오스(glucose), 및 탈지유(skim milk)를 혼합하여 혼합물을 제조하는 단계;
- (3) 상기 단계 (2)의 혼합물에 고초균 스타터(starter)를 접종 및 배양하여 상기 단계 (2)의 혼합물을 1차 발효 시킴으로써 1차 발효물을 획득하는 단계;
- (4) 상기 1차 발효물에 대하여 탈지유(skim milk) 및 글루코오스(glucose)로 이루어진 균으로부터 선택된 1종 이상을 혼합하여 혼합물을 제조하는 단계; 및
- (5) 상기 단계 (4)의 혼합물에 젖산균인 락토바실러스 플란타럼(*Lactobacillus plantarum*) KS2020 (KCCM 12782P) 균주 스타터(starter)를 접종 및 배양하여 상기 단계 (4)의 혼합물을 2차 발효시킴으로써 2차 발효물을 획득하는 단계;를 포함하는 고농도 γ -PGA 및 GABA 함유 홍삼발효물 또는 옷나무발효물의 제조방법.

청구항 4

제 3 항에 있어서, 상기 단계 (2)에서 고초균은 (1) 단계에서 홍삼 추출물을 준비한 경우 서브틸리스(*Bacillus subtilis*) HA (KCCM 10775P) 균주 또는 바실러스 벨레젠시스(*Bacillus velezensis*) WK2019 (KCCM 12589P) 인 것을 특징으로 하는 고농도 γ -PGA 및 GABA 함유 홍삼발효물 또는 옷나무발효물의 제조방법.

청구항 5

제 3 항에 있어서, 상기 단계 (2)에서 고초균은 (1) 단계에서 옷나무 추출물을 준비한 경우 바실러스 벨레젠시스(*Bacillus velezensis*) MK 균주인 것을 특징으로 하는 고농도 γ -PGA 및 GABA 함유 홍삼발효물 또는 옷나무발효물의 제조방법.

청구항 6

제 3 항에 있어서, 상기 단계 (3)에서 고초균 스타터는 상기 단계 (2)의 혼합물 100 중량부에 대하여 1 중량부 내지 10 중량부로 접종되는 것을 특징으로 하는 고농도 γ -PGA 및 GABA 함유 홍삼발효물 또는 옷나무발효물의 제조방법.

청구항 7

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

청구항 8

제 3 항에 있어서, 상기 단계 (3)에서 1차 발효 시 고초균은 단계 (2)에서 혼합한 MSG를 γ -PGA로 전환시키는 것을 특징으로 하는 고농도 γ -PGA 및 GABA 함유 홍삼발효물 또는 옷나무발효물의 제조방법.

청구항 9

제 3 항에 있어서, 상기 단계 (5)에서 2차 발효는 25℃ 내지 35℃의 발효 온도에서 5 내지 15일 동안 진행되는 것을 특징으로 하는 고농도 γ -PGA 및 GABA 함유 홍삼발효물 또는 율나무발효물의 제조방법.

청구항 10

제 3 항에 있어서, 상기 단계 (5)에서 2차 발효 시 락토바실러스 플란타럼 KS2020 균주는 1차 발효물에 잔존하는 MSG를 GABA로 전환시키는 것을 특징으로 하는 고농도 γ -PGA 및 GABA 함유 홍삼발효물 또는 율나무발효물의 제조방법.

청구항 11

제 3 항 내지 제 10 항 중 어느 하나의 항에 따른 제조방법에 의해 제조된 고농도 γ -PGA 및 GABA 함유 홍삼발효물 또는 율나무발효물.

청구항 12

제 11 항에 따른 홍삼발효물 또는 율나무발효물을 유효성분으로 함유하는 γ -PGA 및 GABA 증진용 건강식품 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001]

본 발명은 GABA 생산 활성을 갖는 신규한 락토바실러스 플란타럼 KS2020 균주 및 이를 이용한 고농도 γ -PGA 및 GABA 함유 홍삼발효물 또는 율나무발효물의 제조방법에 관한 것으로, 상세하게 고초균인 바실러스 균주와 신규 젖산균인 락토바실러스 플란타럼 KS2020 (KCCM 12782P) 균주를 이용한 이단발효를 통해 γ -PGA 및 GABA가 증진된 발효물을 제조하는 방법에 관한 것이다. 상기의 방법에 의해 제조된 발효물은 γ -PGA, GABA, 펩티드, 프로바이오틱스 등 다양한 기능성 물질을 함유하여 있기에 식품 및 기능성 식품, 화장품, 사료 소재로 이용할 수 있다.

배경 기술

[0002]

홍삼(紅蔘)은 수삼(水蔘, *Panax ginseng* C.A. Meyer)의 뿌리를 썰어 말린 붉은 인삼을 말한다. 홍삼의 중요 성분으로는 백삼과 같이 배당체(glycosides), 인삼항성분(panacen), 폴리아세틸렌계 화합물, 합질소성분, 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. 그 외에도 혈당치(血糖値)를 저하시켜 주고, 간을 보호하며, 내분비계에 작용하여 성행동(性行動)이나 생식효과에 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 최근 홍삼의 면역 개선, 피로 회복, 혈액순환 개선, 항산화, 갱년기 증상 완화, 항암 효과 등 다양한 효과들이 임상 및 연구를 통해 보고되고 있다.

[0003]

율나무는 뿌리, 뿌리껍질 및 줄기껍질, 심재(心材), 수지(樹脂), 칠엽(漆葉), 종자 등도 약용으로 쓰고 있으며, 절상 치료, 소적(消積), 구충(驅蟲), 어혈제, 신경통, 관절염, 피부병, 결핵균억제 등에 효능이 있다고 알려져 있으며, 율나무의 주성분으로는 건칠이란 생칠속의 우루시올(Urushiol)이 락케이즈(laccase)의 작용으로 공기중에서 산화되어 생성된 검은색의 수지(resin)이란 물질이 함유되어 있다. 최근에는 율나무에서 MU2 및 머틸 칼레 이르라는 항암물질이 국내에서 추출되었는데, 이는 인체노화방지에 뛰어난 효과가 있고, 기존의 항암치료제보다 암세포 증식억제에 탁월한 효과가 있는 것으로 보고된 바 있다.

[0004]

한편, 감마-아미노부티르산(γ -aminobutyric acid; GABA)은 비단백질 구성 아미노산으로서 사람에 있어서는 신경계 및 혈액에 함유되어 있고, 이의 대부분은 뇌의 골수에 존재하여 아세틸 콜린이라 불리는 신경전달 물질은 증가시키고, 뇌 기능을 촉진시키는 등의 생리작용을 한다. GABA는 신경전달물질, 뇌기능 촉진 뿐만 아니라, 다른 여러 생리활성을 가지고 있는데 오래 전부터 혈압저하작용, 이뇨작용 등을 가진다는 것이 알려져 있으며, 특히 뇌졸중 치료제로서 의약품에도 등록되어 있다. GABA 함유 차, 쌀 및 콩 발효 식품, 김치 등에서 분리한 유산균들이 GABA를 고농도로 생산한다는 연구 보고가 있는데 실제 일본에서는 김치에서 분리한 젖산균을 이용하여

GABA를 고농도 생산함으로써 식품에 실제 응용하고 있다.

[0005] 또한, 일본 소주에서부터 락토바실러스 브레비스(*Lactobacillus brevis*)를 배양하여 직접 GABA를 만드는 방법까지 보고되고 있다. 이런 고혈압 예방, 뇌기능 촉진 등의 효과는 계속 건강에 대한 관심이 높아지고 있는 시점에서 GABA의 산업적 응용을 더욱 가속화할 것으로 예측된다.

[0006] 이러한 배경 하에서, 본 발명자들은 홍삼을 이용하여 γ -PGA, GABA, 펩티드, 프로바이오틱스 등 다양한 기능성 물질을 함유된 홍삼발효물 또는 율나무발효물을 개발하고자 하였다.

선행기술문헌

특허문헌

[0007] (특허문헌 0001) 대한민국 등록특허 제10-1616187호 (2016.04.21. 등록)

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 홍삼은 국내에서 잘 알려진 건강기능식품으로 6년된 수삼의 껍질을 제거하지 않고 증기를 통해 오랜 시간 쪄 후 건조한 것을 홍삼이라 한다. 이 홍삼으로부터 물과 주정 등 용매를 통해 추출 및 여과하여 농축한 것을 ‘홍삼농축액’이라고 하는데, 인삼에는 진세노사이드(Ginsenoside)라고 하는 트리테르페니드(Triterpenoid)계 인삼사포닌이 함유되어 있고, 항암 활성, 면역기능 조절, 항산화 활성 및 노화 억제 등의 효능이 알려져 있다. 이러한 인삼을 통해 제조한 홍삼에는 인삼에는 없는 사포닌을 함유하고 있으며, 최근 홍삼의 면역 개선, 피로 회복, 혈액순환 개선, 항산화, 갱년기 증상 완화, 항암 효과 등 다양한 효과들이 임상 및 연구를 통해 보고되었다. 이러한 홍삼은 발효를 통해 특정 진세노사이드를 강화하며 다양한 기능성 물질을 포함할 수 있다. 세계적으로 고령화와 생활 습관성 질병 및 만성 질환에 대한 관심과 함께 건강기능식품의 소비 또한 증가되는 추세이다. 따라서 홍삼농축액을 이용하여 종래의 고초균과 신규 젖산균인 락토바실러스 플란타럼 KS2020 균주의 혼합 발효를 통해 점질물, γ -PGA, GABA, 펩티드, 프로바이오틱스 등 다양한 기능성물질이 강화된 발효홍삼 제품을 개발하였다.

[0009] 상세하게, 본 발명자들은 홍삼농축액(RGC)을 희석한 5% 홍삼 희석액에 발효성 당으로 포도당 및 탈지유(skim milk)를 첨가한 후 점질물 r-PGA와 GABA 생산의 전구물질인 MSG를 소정량 첨가하여 고초균으로 1차 발효하고, 다시 신규 젖산균인 락토바실러스 플란타럼 KS2020 균주를 접종하여 2차 발효를 통해 이단발효(또는 복합발효)를 최적화하는 경우 고농도 γ -PGA 및 GABA 함유 발효물을 제조할 수 있음을 확인할 수 있었다. 또한 본 발명에서 이용한 신규 젖산균인 락토바실러스 플란타럼 KS2020 균주는 종래에 알려진 균주인 락토바실러스 플란타럼 EJ2014와 대비하여 GABA 전환능이 월등히 우수하다는 것을 확인하였다.

[0010] 따라서, 본 발명은 GABA 생산 활성을 갖는 신규한 락토바실러스 플란타럼 KS2020 균주를 제공한다.

[0011] 또한, 본 발명은 고초균과 젖산균을 이용한 이단발효법을 통해 고농도 감마-폴리글루타민산(γ -poly glutamic acid; γ -PGA)과 감마-아미노뷰티르산(γ -aminobutyric acid; GABA)를 포함하는 고농도 γ -PGA 및 GABA 함유 홍삼발효물 또는 율나무발효물의 제조방법을 제공한다.

[0012] 또한, 본 발명은 상기 제조방법으로 제조된 홍삼발효물 또는 율나무발효물을 유효성분으로 함유하는 γ -PGA 및 GABA 증진용 건강식품 조성물을 제공한다.

과제의 해결 수단

[0013] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 GABA(γ -aminobutyric acid) 생산 활성을 갖는 락토바실러스 락토바실러스 플란타럼 KS2020(KCCM 12782P) 균주를 제공한다.

[0014] 또한, 본 발명은 (1) 홍삼추출물을 농축하여 얻은 농축액 또는 율나무 추출물을 농축하여 얻은 농축액을 준비하는 단계; (2) 상기 농축액을 희석하여 얻은 희석액에 모노소듐 글루타메이트(mono sodium glutamate; MSG), 글루코오스(glucose), 및 탈지유(skim milk)를 혼합하여 혼합물을 제조하는 단계; (3) 상기 단계 (2)의 혼합물에 고초균 스타터를 접종 및 배양하여 상기 단계 (2)의 혼합물을 1차 발효시킴으로써 1차 발효물을 획득하는 단계; (4) 상기 1차 발효물에 대하여 탈지유(skim milk) 및 글루코오스(glucose)로 이루어진 균으로부터 선택된 1종

이상을 혼합하여 혼합물을 제조하는 단계; 및 (5) 상기 단계 (4)의 혼합물에 젖산균인 락토바실러스 플란타럼 KS2020 (KCCM 12782P) 균주 스타터(starter)를 접종 및 배양하여 상기 단계 (4)의 혼합물을 2차 발효시킴으로써 2차 발효물을 획득하는 단계;를 포함하는 고농도 γ -PGA 및 GABA 함유 홍삼발효물 또는 율나무발효물의 제조방법을 제공한다.

[0015] 또한, 본 발명은 상기 제조방법으로 제조된 홍삼발효물 또는 율나무발효물을 유효성분으로 함유하는 γ -PGA 및 GABA 증진용 건강식품 조성물을 제공한다.

발명의 효과

[0016] 본 발명은 고초균과 신규한 젖산균을 이용한 이단발효법을 통해 감마-폴리글루타민산(gamma-poly glutamic acid; γ -PGA)과 감마-아미노뷰티르산(gamma-aminobutyric acid; GABA)를 동시에 생산하는 방법에 관한 것으로, 혼합 발효 형태인 2단 발효를 수행함으로써 풍미가 우수하고 점질물, GABA, 혈전용해효소 등을 포함하는 기능성 홍삼발효물 또는 율나무발효물을 제조함으로써, 이를 활용하여 기능성 음료 및 식품 개발의 가능성을 높일 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0017] 도 1은 신규 젖산균을 동정하기 위해 균주를 MRS 배지에 도말하는 모습을 나타낸 것이다.

도 2는 본 발명에 따른 *L. plantarum* KS2020 균주의 동정을 위한 BLAST 결과이다.

도 3은 본 발명에 따른 *L. plantarum* KS2020 균주의 계통수(Phylogenetic tree)이다.

도 4는 본 발명에 따른 고초균 및 젖산균을 이용한 이단 발효 과정을 나타낸 모식도이다.

도 5는 홍삼농축액(RGC)에 대한 고초균인 *B. subtilis* HA 또는 *B. velezensis* WK2019에 의한 발효 과정을 나타낸 모식도이다.

도 6은 홍삼농축액(RGC)에 대한 고초균인 *B. velezensis* 및 *L. plantarum* 균주(*L. plantarum* EJ2014, *L. plantarum* KS2020)에 의한 발효 과정을 나타낸 모식도이다.

도 7은 율나무회석액(TVE)의 고초균인 *B. velezensis* MK 및 *L. plantarum* 균주(*L. plantarum* EJ2014, *L. plantarum* KS2020)에 의한 발효 과정을 나타낸 모식도이다.

도 8은 홍삼농축액(RGC)의 고초균을 이용한 발효 시 발효물의 pH 및 산도를 나타낸 그래프이다.

도 9는 홍삼농축액(RGC)의 고초균을 이용한 발효 시 점조도(Consistency index) 및 점질물량(Mucilage content)을 나타낸 그래프이다.

도 10은 홍삼농축액(RGC)의 *B. velezensis* WK2019 및 *L. plantarum* 균주(*L. plantarum* EJ2014, *L. plantarum* KS2020)를 이용한 이단발효 시의 발효물의 pH 및 산도를 나타낸 그래프이다.

도 11은 홍삼농축액(RGC)의 *B. velezensis* WK2019 및 *L. plantarum* 균주(*L. plantarum* EJ2014, *L. plantarum* KS2020)를 이용한 이단발효 시 발효물 내 생존 가능한 박테리아 수를 확인한 결과 그래프이다.

도 12는 홍삼농축액(RGC)의 *B. velezensis* WK2019 및 *L. plantarum* 균주(*L. plantarum* EJ2014, *L. plantarum* KS2020)를 이용한 이단발효 시 발효물의 TLC 분석 결과이다.

도 13은 율나무회석액(TVE)의 *B. velezensis* MK 및 *L. plantarum* 균주(*L. plantarum* EJ2014, *L. plantarum* KS2020)를 이용한 이단발효 시 발효물의 TLC 분석 결과이다.

도 14는 *L. plantarum* EJ2014 균주와 *L. plantarum* KS2020 균주의 GABA 생성 능력을 glucose 2%, MSG 3%가 첨가된 MRS broth에서 배양 후 TLC 분석을 통해 비교한 결과이다.

도 15는 홍삼농축액(RGC)의 *B. velezensis* WK2019와 *L. plantarum* 균주(*L. plantarum* EJ2014, *L. plantarum* KS2020)에 의해 이단발효 시 티로신 함량 결과를 나타낸 그래프이다.

도 16은 홍삼농축액(RGC) 시료의 RAW264.7 대식세포에 대한 세포 독성 결과이다.

도 17은 홍삼농축액(RGC) 시료의 RAW264.7 대식세포에 대한 산화질소(NO) 생성 결과를 나타낸 그래프이다.

도 18은 LPS가 처리되어 염증이 유도된 RAW264.7 대식세포에 대한 홍삼농축액 및 홍삼농축액 발효물의 세포 생

존율을 측정하여 나타낸 그래프이다.

도 19는 LPS가 처리되어 염증이 유도된 RAW264.7 대식세포에 대한 산화질소(NO) 생성 억제 결과를 나타낸 그래프이다.

도 20은 *L. plantarum* KS2020의 API 50CHL 키트 결과를 토대로 균주를 동정한 결과이다.

도 21은 *L. plantarum* KS2020의 API 50CHL 키트 결과로 반응전(좌) 및 반응후(우)를 나타내는 사진이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0018] 본 발명자들은 고초균과 젖산균을 이용한 이단발효법을 통해 감마-폴리글루타민산(γ -poly glutamic acid; γ -PGA)과 감마-아미노뷰티르산(γ -aminobutyric acid; GABA)를 동시에 생산하는 방법에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 홍삼 추출물 또는 옷 추출물에 고초균(*Bacillus subtilis*)인 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*) HA (KCCM 10775P) 균주 또는 바실러스 벨레젠시스(*Bacillus velezensis*) WK2019 (KCCM 12589P)를 이용한 1차 발효를 수행한 후 젖산균인 신규한 락토바실러스 플란타럼 KS2020 (KCCM 12782P) 균주로 2차 발효를 통해 혼합 발효를 수행함으로써 풍미가 우수하고 점질물, GABA, 펩티드 등을 포함하는 기능성 발효물을 제조할 수 있다는 것을 알게 되었다. 특히, 락토바실러스 플란타럼 KS2020 (KCCM 12782P) 균주는 종래의 락토바실러스 플란타럼 EJ2014와 대비하여 GABA 전환능이 월등히 우수하다는 것을 확인하였다.
- [0019] 따라서, 종래의 발효물 제조방법보다 고농도 γ -PGA, GABA, 펩티드 등의 성분이 다량 함유된 홍삼발효물 또는 옷나무발효물을 얻을 수 있다는 것을 알게 되어 본 발명을 완성하기에 이르렀다.
- [0020] 이에 본 발명은 GABA(γ -aminobutyric acid) 생산 활성을 갖는 락토바실러스 락토바실러스 플란타럼 KS2020(KCCM 12782P) 균주를 제공한다.
- [0021] 상기 균주는 김치에서 분리된 것으로, 한국미생물보존센터에 KCCM 12782P로 수탁하였다.
- [0022] 또한, 본 발명은 (1) 홍삼추출물을 농축하여 얻은 농축액 또는 옷나무 추출물을 농축하여 얻은 농축액을 준비하는 단계; (2) 상기 농축액을 희석하여 얻은 희석액에 모노소듐 글루타메이트(mono sodium glutamate; MSG), 글루코오스(glucose), 및 탈지유(skim milk)를 혼합하여 혼합물을 제조하는 단계; (3) 상기 단계 (2)의 혼합물에 고초균 스타터(starter)를 접종 및 배양하여 상기 단계 (2)의 혼합물을 1차 발효시킴으로써 점질물인 감마-폴리글루탐산(γ -polyglutamic acid, γ -PGA)이 생성된 추출물 1차 발효물을 획득하는 단계; (4) 상기 1차 발효물에 대하여 탈지유(skim milk) 및 글루코오스(glucose)로 이루어진 균으로부터 선택된 1종 이상을 혼합하여 혼합물을 제조하는 단계; 및 (5) 상기 단계 (4)의 혼합물에 젖산균인 락토바실러스 플란타럼 KS2020 (KCCM 12782P) 균주 스타터(starter)를 접종 및 배양하여 상기 단계 (4)의 혼합물을 2차 발효시킴으로써 점질물 및 감마-아미노뷰티르산(γ -aminobutyric acid; GABA)이 생성된 2차 발효물을 획득하는 단계를 포함하는 고농도 γ -PGA 및 GABA 함유 홍삼발효물 또는 옷나무발효물의 제조방법을 제공한다. 도 4는 본 발명에 고초균 및 젖산균을 이용한 이단 발효 과정을 나타낸 모식도를 나타낸 것이다.
- [0023] 상세하게, 상기 (1) 단계는 홍삼추출물을 농축하여 얻은 농축액 또는 옷나무 추출물을 농축하여 얻은 농축액을 준비하는 단계로서, 홍삼 또는 옷나무를 물과 또는/및 주정 등의 용매를 통해 추출 및 여과하여 농축하여 얻은 농축액을 말하나, 반드시 이에 제한되지 않는다.
- [0024] 다음으로 상기 (2) 단계는 상기 농축액을 희석하여 얻은 희석액에 모노소듐 글루타메이트(mono sodium glutamate; MSG), 글루코오스(glucose), 및 탈지유(skim milk)를 혼합하여 혼합물을 제조하는 단계이다.
- [0025] 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.
- [0026] 본 발명에 사용된 바실러스 서브틸리스 HA(*Bacillus subtilis* HA)(KCCM 10775P) 균주는 전통 청국장에서 분리 및 동정한 균주이다.
- [0027] 또한, 본 발명에 사용된 바실러스 벨레젠시스(*Bacillus velezensis*) WK2019 (KCCM 12589P) 균주는 김치에서 분리 및 동정한 균주이다.
- [0028] 또한, 본 발명에 사용된 바실러스 벨레젠시스(*Bacillus velezensis*) MK 균주는 맥아에서 분리 및 동정한 균주로

서 공지된 균주이다.

- [0029] 상기 (1) 단계에서 홍삼 추출물을 사용하는 경우 서브틸리스(*Bacillus subtilis*) HA (KCCM 10775P) 균주 또는 바실러스 벨레젠시스(*Bacillus velezensis*) WK2019 (KCCM 12589P)일 수 있으나, 반드시 이에 제한되지 않는다.
- [0030] 또한, 상기 (1) 단계에서 옷나무 추출물을 준비한 경우 바실러스 벨레젠시스(*Bacillus velezensis*) MK 균주일 수 있으나, 반드시 이에 제한되지 않는다.
- [0031] 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 점액성물질이 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, 생체적합성, 식용 등의 다양한 특성이 있기 때문에 다양한 분야에서 응용되고 있다.
- [0032] 또한, 본 발명에서 사용된 락토바실러스 플란타럼(*Lactobacillus plantarum*) EJ2014 균주는 한국미생물보존센터에 KCCM 12782P로 수탁하였다.
- [0033] 본 발명에 있어서, "감마 아미노부티르산(γ -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 촉진효과와 산소공급 증가효과는 뇌세포의 대사를 촉진시킴으로써 뇌졸중의 후유증 및 뇌동맥경화증 등에 개선효과가 나타나 의약품으로 사용되고 있다.
- [0034] 상기 단계 (3)에서 바실러스 균주 스타터는 상기 단계 (2)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.
- [0035] 이때 상기 단계 (3)에서 1차 발효는 30℃ 내지 50℃의 발효 온도에서 1 내지 3일 동안 진행될 수 있으며, 바람직하게는 42℃의 발효 온도에서 2일 동안 진행할 수 있으나, 반드시 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0036] 상기 (4) 단계는 상기 1차 발효물에 대하여 탈지유(skim milk) 및 글루코오스(glucose)로 이루어진 균으로부터 선택된 1종 이상을 혼합하여 혼합물을 제조하는 단계로서, 홍삼농축액을 사용하는 경우 (4) 단계에서 탈지유 및 글루코오스를 모두 혼합하는 것이 바람직하다.
- [0037] 상기 단계 (5)에서 2차 발효 시에, 락토바실러스 플란타럼 KS2020 균주가 1차 발효물에 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.
- [0038] 상기 단계 (5)에서 2차 발효는 25℃ 내지 35℃의 발효 온도에서 7 내지 15일 동안 진행될 수 있으나 반드시 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0039] 또한, 본 발명은 상기 방법에 의해 제조된 고농도 γ -PGA 및 GABA 함유 홍삼발효물 또는 옷나무발효물을 제공한다.
- [0040] 상기 발효물은 혼합 발효액은 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.
- [0041] 또한, 본 발명은 상기 홍삼발효물 또는 옷나무발효물을 유효성분으로 함유하는 GABA 증진용 건강식품 조성물을 제공한다.
- [0042] 상기 건강식품은 분말, 과립, 정제, 캡슐, 시럽 또는 음료 등으로 제조될 수 있고, 본 발명에 따른 상황버섯 발효물, 또는 상황버섯 추출물 이외에 다른 식품 또는 식품 첨가물과 함께 제조될 수 있다. 즉, 상기 건강식품은

당 업계에서 통상적으로 사용되는 방법에 의하여 제조가능하고, 건강식품으로 인정되는 제형이면 제한 없이 제조될 수 있다. 또한, 상기 건강식품 제조 시에는 당 업계에서 통상적으로 첨가하는 원료 및 성분을 첨가하여 제조할 수 있으며 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다. 상기 건강식품은 일반 약품과는 달리 식품을 원료로 하여 약품의 장기 복용 시 발생할 수 있는 부작용 등이 없는 장점이 있고, 휴대성이 뛰어나, 불면증 개선, 스트레스 해소, 우울증 완화, 혈압강하, 면역 증진 등의 다양한 효과를 위한 보조제로 섭취될 수 있다.

[0043] 상기 발효물 유효성분의 혼합량은 그의 사용 목적, 예를 들어, 예방, 건강 개선 등 처치에 따라 적합하게 결정될 수 있다.

[0044] 상기 건강기능 식품 조성물은 여러 가지 영양제, 비타민, 광물(전해질), 합성 풍미제 및 천연 풍미제 등의 풍미제, 착색제 및 증진제(치즈, 초콜릿 등), 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알코올, 탄산음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다.

[0045] 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.

[0046] <준비에 1> 재료 준비

[0047] 본 발명에 사용한 홍삼농축액(Red ginseng concentrate, 이하 'RGC' 임)은 고려금산홍삼(Geumsan, Korea)에서 구입하여 사용하였다. 고초균(1차 발효) 및 젖산발효(2차 발효) 시 γ -PGA와 GABA 생성을 위하여 첨가한 부원료인 모노소듐 글루타메이트(MSG)와 글루코오스(glucose)는 각각 CJ Cheiljedang (Seoul, Korea), Samyang Genex Corporation(Incheon, Korea)에서 구입하였고, 펩타이드(peptide) 생성을 위해 첨가한 탈지유(skim milk)는 서울우유(Seoul, Korea)에서 구매하여 사용하였다. MRS 배지는 Difco™ Lactobacilli MRS(Becton, Dickinson and Company, Sparks, MD, USA)사의 제품을 구매하여 사용하였고, 그 외 실험에 사용된 시약은 특급 시약들을 구매하여 사용하였다.

[0048] <준비에 2> 균주 동정

[0049] (1) 시료채취 및 유산균 분리

[0050] 가정에서 제조한 김치 시료를 수거하여, 1차적으로 내산성, 내담즙성을 갖는 유산균을 분리하였다. 김치액을 0.1% pepsin solution(pH 2.0; Sigma-Aldrich Co.)을 첨가한 후, 37℃에서 2시간 동안 배양하였다. 연속 배양을 위해 2시간 동안 반응한 용액을 0.3% 담즙염(pH 6 ~ 7; Sigma-Aldrich Co.)에 접종하였다. 반응액을 BCP(Bromocresol-purple)지시약을 첨가한 MRS 배지에 도말하고, 30℃ 배양기에서 24 시간 배양 후, 젖산 생산에 의해 노랗게 형성된 콜로니(colony)를 분리하였다. 분리한 콜로니를 3회 이상 MRS agar medium에 순수 배양한 것을 동결보관 및 유지하여 균주의 특징을 분석하였다.

[0051] (2) 균주의 특징 분석 및 동정

[0052] 선별된 균주의 형태학적 및 생화학적 특징을 분석하였다. API 50CHL kit를 통해 분석 결과(그림 20,21), 균주의 속종은 Lactobacillus plantarum으로 확인되었고 Lactobacillus plantarum은 잘 알려진 Gram(+), Catalase(-)인 혐기성-통성 혐기성 간균으로 발효에 사용하는 당은 하기 표 1과 같음을 확인할 수 있었다.

표 1

당	결과	당	결과
0 Control	-	25 Esculin ferric citrate	+
1 Glycerol	+	26 Salicin	+
2 Erythritol	-	27 D-cellobiose	+
3 D-arabinose	-	28 D-maltose	+
4 L-arabinose	-	29 D-lactose(bovine origin)	+
5 D-ribose	+	30 D-melibiose	+
6 D-xylose	-	31 D-saccharose(sucrose)	+
7 L-xylose	-	32 D-trehalose	+
8 D-adonitol	-	33 Inulin	-
9 Methyl-βD-xylopyranoside	-	34 D-melezitose	+
10 D-galactose	+	35 D-raffinose	-

11	D-glucose	+	36	Amidon(starch)	-
12	D-fructose	+	37	Glycogen	-
13	D-mannose	+	38	Xylitol	-
14	L-sorbose	-	39	Gentiobiose	+
15	L-rhamnose	-	40	D-turanose	+
16	Dulcitol	-	41	D-Lyxose	-
17	Inositol	-	42	D-tagatose	-
18	D-mannitol	+	43	D-fucose	-
19	D-sorbitol	+	44	L-fucose	-
20	Methyl- α D-mannopyranoside	-	45	D-arabitol	-
21	Methyl- α D-glucopyranoside	-	46	L-arabitol	-
22	N-acetylglucosamine	+	47	potassium gluconate	-
23	amygdalin	+	48	potassium 2-ketogluconate	-

[0054] 아울러, 도 2에 나타난 바와 같이 블라스트(Blast)를 이용하여 데이터베이스(Database)에 등록된 염기서열과 상동성을 비교하고 계통도 작성(MEGA-X Program)한 결과로서, 본 발명자는 상기 균주를 새로운 락토바실러스 플랜타럼(*L. plantarum*) 균주로 동정하였고, 락토바실러스 플랜타럼 KS2020로 명명하여 한국미생물 보존센터(KCCM)에 2020년 9월 9일자로 기탁하였다(기탁번호 KCCM 12782P)(도 2 및 도 3).

[0055] <준비에 3> 균주 스타터(starter) 제조

[0056] 1차 발효에 사용되는 고초균인 *Bacillus subtilis* HA 균주를 MRS 배지에 접종하여 42℃에서 24시간 배양하고, 영양배지(Nutrient broth)에 접종하여 42℃에서 24시간 160 rpm으로 진탕배양 하였다. 이후 원심분리하여 상등액을 제거하고 균체를 멸균수로 희석하여 10배 농축하여 *Bacillus subtilis* HA 스타터를 제조하였다. 또 다른 고초균인 *Bacillus velezensis* WK2019 균주도 동일한 방법으로 제조하였다.

[0057] 아울러, 옷나무 추출액의 발효를 위해 맥아에서 분리된 *B. velezensis* MK 균주 스타터는 MRS 배지에 *B. velezensis* MK 균주를 접종하고 42℃에서 24시간 배양 후 5% 탈지유 배지(skim milk broth)에 접종하여 42℃에서 24시간 160rpm으로 진탕 배양하여 스타터로 제조하였다.

[0058] 본 발명자들이 동정한 신규 균주인 *L. plantarum* KS2020 균주는 MRS 배지에 접종하고 30℃에서 24시간 배양 후 스타터로 제조하였다.

[0059] <실험예 1> 고초균 발효(1차 발효)를 위한 최적 균주 선별 및 발효

[0060] 점질물의 생산 최적화를 위한 균주 선별을 목적으로 121℃, 15분간 오토클레이브(autoclave)에서 고압증기멸균 과정을 거친 5% 홍삼농축액(red ginseng concentrate, RGC)에 40% 글루코스, 50% MSG를 사용하여 각각 2%(w/v), 5%(w/v) 농도로 혼합하였다. 특히, 10% 탈지유 용액(w/v)을 각각 전체 부피의 10%, 2%, 5%, 2.5%가 되도록 첨가 후 1차 고초균 발효(alkaline fermentation)를 위해서 *B. subtilis* HA 균주 또는 *B. velezensis* WK2019 균주의 농축 스타터를 5% 접종하여 진탕배양기(SI-900R, Jeio Tech. Co., Ltd., Daejeon, Korea)에서 42℃, 160 rpm으로 2일 동안 진탕배양한 후 점질물 생산이 우수한 균주를 최적 균주로서 채택하였다(도 5, 표 2).

표 2

[0061]

component (mL)	A ¹⁾	B ²⁾
50% RGC		20
40% glucose		10
50% MSG		20
10% skim milk		50
D, W.		90
HA starter	10	-
WK2019 starter	-	10
Total		200
¹⁾ A : <i>B. subtilis</i> HA, ²⁾ B : <i>B. velezensis</i> WK2019		

[0062] <실험예 2> 고초균 발효(1차 발효)

[0063] 점질물의 생산 최적화를 위해, 발효 조건을 최적화하여 발효시켰다. 상세하게, 121℃, 15분간 오토클레이브 (autoclave)에서 고압증기멸균 과정을 거친 50% 홍삼농축액(RGC), 40% 글루코오스, 50% MSG, 10% 탈지유(Skim milk) 용액(w/v)을 각각 전체 부피의 10%, 2%, 5%, 2.5%가 되도록 첨가 후 *B. velezensis* WK2019 균주 스타터 5%를 접종하여 진탕배양기에서 42℃, 160 rpm으로 2일 동안 진탕 배양한 후 발효물의 이화학적 분석을 하였다 (도 6 및 표 2).

[0064] <실험예 3> 고초균 및 젖산균을 이용한 이단발효(복합발효)

[0065] 실험예 2에서 수득한 고초균에 의한 1차 발효물을 이용하여 GABA 생산 최적화를 위해 젖산균을 통한 2차 혼합 발효를 위해, 먼저 고초균 발효를 진행한 1차 발효물에 *L. plantarum* EJ2014 스타터 또는 *L. plantarum* KS2020 스타터를 각각 1%(v/v) 접종한 홍삼농축액 배지를 항온배양기(IS-971R, JeioTech. Kimpo, Korea)에서 30℃로 7 일간 정치 배양 후 홍삼발효물의 이화학적 분석을 하였다(도 6 및 표 3).

표 3

[0066]

Component (mL)	A ¹⁾	B ²⁾
50% RGC		20
40% glucose		10
50% MSG		20
10% skim milk		50
D. W.		90
WK2019 starter		10
Total		200
Fermented RGC		200
40% glucose		10
10% skim milk		100
D. W.		86
EJ2014 starter	4	-
KS2020 starter	-	4
Total		400
¹⁾ A : <i>L. plantarum</i> EJ2014, ²⁾ B : <i>L. plantarum</i> KS2020		

[0067] <실험예 5> 옷나무 추출물을 이용한 이단발효(복합발효)

[0068] 농업법인(주)옷가네의 발효를 통해 우루시올이 제거된 참옷 발효진액을 옷나무 추출물로서 준비하였다. 이렇게 준비한 옷나무 추출물을 실험예 1 내지 4와 동일한 과정으로 진행하되, 도 7에 나타난 바와 같이 고초균의 경우 *B. subtilis* MK를 사용하여 이단발효를 수행하였다(표 4).

표 4

[0069]

Component (mL)	A ¹⁾	B ²⁾	C ³⁾	D ⁴⁾
TVE			60	
50% glucose		-		8
50% MSG			20	
MK starter			10	
D. W.		110		102
Total			200	
10% skim milk			200	
EJ2014 starter	4	-	4	-
KS2020 starter	-	4	-	4
Total (mL)			404	
¹⁾ A : glucose 0%, EJ2014 starter, ²⁾ B : glucose 0%, KS2020 starter, ³⁾ C : glucose 2%, EJ2014 starter, ⁴⁾ D : glucose 2%, KS2020 starter				

[0070] <실시예 1> 홍삼발효물의 이화학적 성분 분석

[0071] 1-1. 고초균 발효 시 pH 및 산도 변화

[0072] 홍삼농축액(RGC) 5%, 글루코오스 2%, MSG 5%, 탈지유 2.5% 첨가한 조건에서 1차 고초균 발효 0일차 pH 6.40, 산도(acidity) 0.20%에서 1차 접종 균주인 *B. subtilis* HA, 또는 *B. velezensis* WK2019 조건에서 각각 pH 6.66, 6.96, 및 산도(acidity) 0.24%, 0.21%로 나타내었다. 발효 시작 후 2일차에 pH 7.48, 7.67, 및 산도(acidity) 0.15%, 0.14%로 pH는 증가하고 산도는 감소하는 경향을 보였다(도 8).

[0073] 1-2. 고초균 발효 시 점조도 및 점질물 생성 변화

[0074] 홍삼농축액(RGC) 5%, 글루코오스(glucose) 2%, MSG 5%, 탈지유(skim milk) 2.5% 첨가한 조건에서 고초균인 *B. subtilis* HA, 또는 *B. velezensis* WK2019 균주 스타터를 이용한 발효 2일간의 점조도 및 점질물 생성 변화를 측정하였다.

[0075] 그 결과, 점조도는 *B. subtilis* HA, 및 *B. velezensis* WK2019 균주는 0 일차일 때 각각 0.00 Pa·sn, 0.00 Pa·sn에서 1일차일 때 0.05 Pa·sn, 0.14 Pa·sn까지 증가한 후 2일차에 *B. subtilis* HA는 0.05 Pa·sn, *B. velezensis* WK2019는 0.08 Pa·sn로 감소하는 경향을 보였다. 점질물의 경우 *B. subtilis* HA, *B. velezensis* WK2019는 각각 1일차 3.90%, 2.80%로 나타났고, 발효 2일차에 *B. subtilis* HA는 감소하였으며, *B. velezensis* WK2019는 증가하여 각각 2.00%, 4.20%의 점질물 함량을 나타내었다(도 9).

[0076] 1-3. 고초균 및 젖산균을 이용한 혼합 발효 시 pH 및 산도 변화

[0077] 홍삼농축액(RGC) 5%, 글루코오스(glucose) 2%, MSG 5%, 탈지유(skim milk) 2.5% 첨가한 조건에서 고초균으로 1차 발효 0일차 pH 6.53, 산도(acidity) 0.16%에서 발효 2일차 pH 7.79, 산도(acidity) 0.09%로 pH는 증가하고 산도는 감소하는 경향을 보였다. 고초균인 *B. subtilis* HA 또는 *B. velezensis* WK2019와 젖산균인 *L. plantarum* KS2020을 이용하여 2차 혼합 발효가 진행되면, 발효 7일차 발효물의 pH는 크게 감소하여 *B. subtilis* HA를 고초균으로 사용한 경우 pH 4.68, *B. velezensis* WK2019를 고초균으로 사용한 경우 4.80를 보였다. 아울러, 산도(acidity)는 *B. subtilis* HA를 고초균으로 사용한 경우 1.57%, *B. velezensis* WK2019를 고초균으로 사용한 경우 1.30%를 나타내었다(도 10).

[0078] <실시예 2> 홍삼발효물의 생균수 변화

[0079] 홍삼농축액(RGC) 5%, 글루코스 2%, MSG 5%, 탈지유(skim milk) 2.5% 첨가한 조건에서 *B. subtilis* HA 또는 *B. velezensis* WK2019를 이용하여 1차 발효 시 생균수는 발효 0일차 8.10 log CFU/mL에서 2일차에 9.54 log CFU/mL까지 증가하였다. 아울러, *L. plantarum* EJ2014 또는 *L. plantarum* KS2020을 이용하여 2차 발효 시 각각 0일차 7.14, 7.25 log CFU/mL에서 발효 7일차 8.97, 9.16 log CFU/mL로 증가하는 경향을 나타내었다. *B. subtilis* HA, 또는 *B. velezensis* WK2019를 이용한 경우 생균수는 2차 발효 기간 동안 두 조건 모두 감소하는 경향을 나타냈고 7일차 각각 6.91, 6.50 log CFU/mL로 나타내었다(도 11).

[0080] <실시예 3> 락토바실러스 플란타럼 KS2020 균주의 우수한 GABA 생산능 확인

[0081] 3-1. 홍삼발효물에서의 GABA 생산능 확인

[0082] 홍삼농축액(RGC) 5%, 글루코스 2%, MSG 5%, 탈지유(skim milk) 2.5% 첨가한 조건에서 1차 *B. velezensis* WK2019에 의해서 배양된 점질물 배양액을 이용하여 *L. plantarum* EJ2014 또는 *L. plantarum* KS2020을 이용한 혼합 발효 기간 동안 MSG에서 GABA 전환을 TLC(Thin Layer Chromatography) 분석을 통해 비교 측정하였다.

[0083] 그 결과, *L. plantarum* EJ2014 경우 발효 5일차까지 MSG가 잔존하며 7일차에 GABA 전환이 완료된 것을 확인하였고, *L. plantarum* KS2020의 경우 발효 3일차에 MSG가 모두 소진되면서 GABA 전환이 완료되어 약 2% 이상의 GABA 함량을 나타내었다. 이는 기존의 GABA 생산 우수 균주인 *L. plantarum* EJ2014를 사용하는 경우 보다 신규 젖산균인 *L. plantarum* KS2020이 전구물질 MSG로부터 GABA전환이 보다 짧은 발효 기간 동안에 이루어지면서 GABA 생성 능력이 우수하다는 것으로 확인할 수 있었다(도 12).

[0084] 3-2. 율나무 발효물에서의 GABA 생산능 확인

[0085] 율나무 추출액의 1차 고초균 발효물은 글루코스 2%, MSG 5% 첨가 후에 *B. velezensis* MK을 5% 탈지유에서 배양 시킨 스타터를 5% 접종하여 점질물을 함유한 1차 고초균 발효물을 제조하였다. 2차 발효를 위해서 추가적으로

5% 탈지유를 첨가한 후 젖산균인 *L. plantarum* EJ2014 또는 *L. plantarum* KS2020을 1% 수준으로 접종하고 혼합 발효(도 7) 하여 GABA 생산을 비교하였다.

[0086] 젖산균과의 혼합 발효에서 발효 기간 동안 MSG에서 GABA 전환을 TLC(Thin Layer Chromatography) 분석을 통해 확인하였다. 그 결과 *L. plantarum* KS2020을 사용한 B, D 조건에서 발효 3일차부터 GABA 전환이 이루어져 5일차에 MSG가 대부분 소진된 것을 확인하였다. 반면에 *L. plantarum* EJ2014를 사용한 A, C 조건에서는 발효 5일 동안 GABA 전환이 미비하였다. 결과적으로 *L. plantarum* KS2020이 율나무 추출액의 고초균 및 젖산균 혼합 발효를 통해서 GABA 생성이 우수한 것으로 나타났다(도 13).

[0087] **3-3. *L. plantarum* EJ2014와 *L. plantarum* KS2020의 GABA 생성능 비교**

[0088] 50% MRS 배지에 글루코스 2%, MSG 3%가 추가된 배지에 젖산균인 *L. plantarum* EJ2014 또는 *L. plantarum* KS2020을 1 loop 씩 접종 후 7일 동안 배양하여 MSG에서 GABA 전환 정도를 TLC(Thin Layer Chromatography) 분석을 통해 비교 측정하였다.

[0089] 그 결과, *L. plantarum* EJ2014 경우 발효 7일차까지 MSG가 잔존하며 GABA 전환이 완료되지 않은 것을 확인되었고, *L. plantarum* KS2020의 경우 발효 1일차에 GABA 생성이 뚜렷하게 확인되었고 MSG의 소진은 3일차에 완전히 이루어진 것으로 확인되었다. 이는 기존의 GABA 생산 우수 균주인 *L. plantarum* EJ2014 균주를 사용하는 경우보다 신규 젖산균인 *L. plantarum* KS2020이 전구물질 MSG로부터 GABA 전환이 보다 짧은 시간 동안에 이루어지면서 GABA 생성 능력이 우수함을 확인할 수 있었다(도 14).

[0090] **<실시예 4> 홍삼발효물의 타이로신 함량 측정**

[0091] 홍삼농축액(RGC) 5%, 글루코스 2%, MSG 5%, 탈지유 2.5% 첨가한 조건에서 1차 고초균 WK2019로 발효된 후 2차 젖산균 발효시에 탈지유가 추가로 첨가되어 혼합 발효를 수행하였다. 혼합 발효 기간 동안 발효물에 존재하는 펩티드 함량을 측정하기 위해서 타이로신 함량은 측정하였다. 측정 결과, 고초균 발효 0일차 59.07 mg%에서 2일차 143.33 mg%로 증가한 후 혼합 발효가 진행되며 혼합 발효 7일차 A, B 조건 각각 117.53, 120.56 mg%로 유지되는 경향을 나타냈다(도 15).

[0092] **<실시예 5> 홍삼발효물의 면역활성 확인**

[0093] **5-1. RAW264.7 대식세포에 대한 세포 독성**

[0094] RGC¹⁾, RGC 1-2²⁾, RGC 2-7³⁾은 식품공전에 따른 고형분 분석 방법에 의해 측정하였으며 그 결과 각각 3.6, 8.4, 6.6%의 고형분 함량을 나타냈다(RGC¹⁾ : 20배 희석한 홍삼농축액, RGC 1-2²⁾ : *B. velezensis* WK2019로 발효한 발효물, RGC 2-7³⁾ : *B. velezensis* WK2019 및 *L. plantarum* KS2020로 혼합 발효한 발효물).

[0095] 아울러, 홍삼농축액 및 발효기간에 따른 홍삼농축액 발효물의 농도(10 ~ 1000배 희석액) RAW264.7 대식세포(macrophage)에 대한 세포 독성을 측정한 결과, 시료 3종 RGC¹⁾, RGC 1-2²⁾, RGC 2-7³⁾ 모두 전 농도에서 RAW264.7 대식세포에 대한 세포 독성이 없음을 알 수 있었다(도 16).

[0096] **5-2. RAW264.7 대식세포에 대한 산화질소 생성 증진을 통한 면역활성**

[0097] RAW264.7 대식세포에서 홍삼농축액 및 발효기간에 따른 홍삼농축액 발효물의 산화질소(NO) 생성을 측정하였다. 그 결과, 발효 전의 홍삼농축액의 희석농도에서 산화질소 생성은 음성 대조군과 비슷하게 산화질소 생성이 미약하면서 면역활성을 보이지 않았다. 반면에 1차 고초균 발효한 홍삼발효물(RGC 1-2)을 처리한 경우 산화질소 생성이 크게 증가하면서 면역 활성이 농도 의존적으로 증가하는 것을 나타내었다. 특히 희석배수가 250배일 때 29.00 μ M으로 가장 높은 산화질소 발생량을 보여 대식세포의 활성이 가장 우수함을 알 수 있었다. 이는 면역증진 기능성 소재로 알려진 r-PGA의 500ug/mL 농도에서와 유사한 효과를 나타내었다. 고초균 및 젖산균을 이용하여 혼합 발효한 홍삼발효물(RGC 2-7)의 경우 희석배수가 50배일 때 가장 좋은 대식세포 활성을 나타내었다(도 17). 이는 고초균 및 젖산균을 이용하여 혼합 발효한 홍삼발효물이 면역 활성이 우수함을 시사한다.

[0098] **<실시예 6> 홍삼발효물의 항염증 효과**

[0099] **6-1. LPS가 처리된 RAW264.7 대식세포에 대한 세포 독성 평가**

[0100] RGC¹⁾, RGC 1-2²⁾, RGC 2-7³⁾은 식품공전에 따른 고형분 분석 방법에 의해 측정하였으며 그 결과 각각 3.6, 8.4,

6.6%의 고형분 함량을 나타냈다(RGC¹⁾ : 20배 희석한 홍삼농축액, RGC 1-2²⁾ : *B. velezensis* WK2019로 발효한 발효물, RGC 2-7³⁾ : *B. velezensis* WK2019 및 *L. plantarum* KS2020로 혼합 발효한 발효물). 또한, 홍삼농축액 및 발효기간에 따른 홍삼농축액 발효물의 농도에 따른 LPS가 처리된 RAW264.7 대식세포에 대한 세포 독성을 측정 한 결과, 시료 3종 RGC¹⁾, RGC 1-2²⁾, RGC 2-7³⁾ 모두 전 농도에서 RAW264.7 대식세포에 대한 세포 독성이 없음을 알 수 있었다(도 18).

[0101] 6-2. LPS가 처리된 RAW264.7 대식세포에 대한 산화질소(NO) 생성 억제

[0102] LPS가 처리되어 염증이 유도된 RAW264.7 대식세포에서의 시료 3종의 산화질소(NO) 생성을 측정한 결과, 시료 3종에서 공통적으로 10배 희석 구간에서 산화질소 생성이 감소되면서 항염증 효능이 가장 우수하였다. 특히 고초균 및 젖산균을 이용하여 혼합 발효한 홍삼발효물(RGC 2-7)의 경우 15.11 μ M으로 나타났다(도 19). 이는 고초균 및 젖산균을 이용하여 혼합 발효한 홍삼발효물이 염증을 억제함을 시사한다.

[0103] 따라서, 본 발명은 홍삼추출물 또는 옷나무 추출물을 고초균과 신규한 젖산균인 락토바실러스 플란타럼 KS2020 균주의 혼합 발효하여 점질물, γ -PGA, GABA, 펩티드, 프로바이오틱스 등 다양한 기능성물질이 강화된 홍삼발효물 또는 옷나무 발효물을 제공할 수 있다.

[0104] 이상으로 본 발명의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 구현 예일뿐이며, 이에 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항과 그의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

수탁번호

[0105]

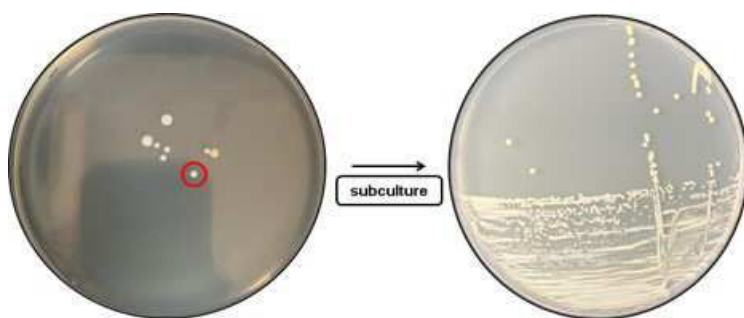
기탁기관명 : 한국미생물보존센터(국외)

수탁번호 : KCCM12782P

수탁일자 : 20200909

도면

도면1



도면2

BLASTN 2.10.0+

Reference:

Zheng Zhang, Scott Schwartz, Lukas Wagner, and Webb Miller (2000),
"A greedy algorithm for aligning DNA sequences", J Comput Biol 2000;
7(1-2):203-14.

Database: 16S ribosomal RNA (Bacteria and Archaea type strains)
21,030 sequences; 30,580,655 total letters

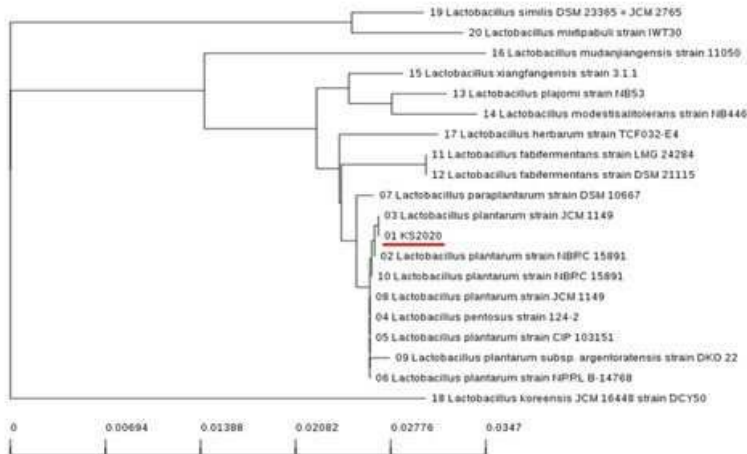
Query= KS2020

Length=1471

Sequences producing significant alignments:

	Score (Bits)	E Value
NR_113338.1 Lactobacillus plantarum strain NBRC 15891 16S ribosom...	2704	0.0
NR_115605.1 Lactobacillus plantarum strain JCM 1149 16S ribosomal...	2704	0.0
NR_029133.1 Lactobacillus pentosus strain 124-2 16S ribosomal RNA...	2702	0.0
NR_104573.1 Lactobacillus plantarum strain CIP 103151 16S ribosom...	2689	0.0
NR_042394.1 Lactobacillus plantarum strain NRRL B-14768 16S ribos...	2689	0.0

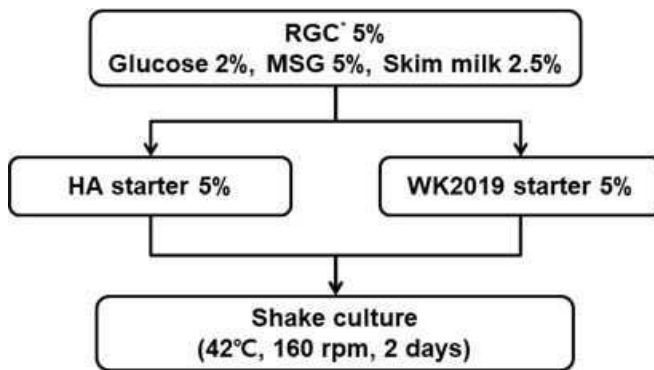
도면3



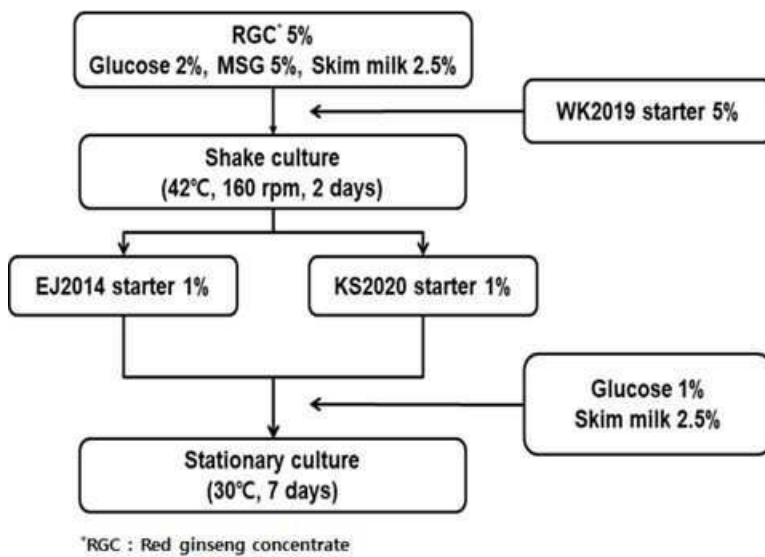
도면4



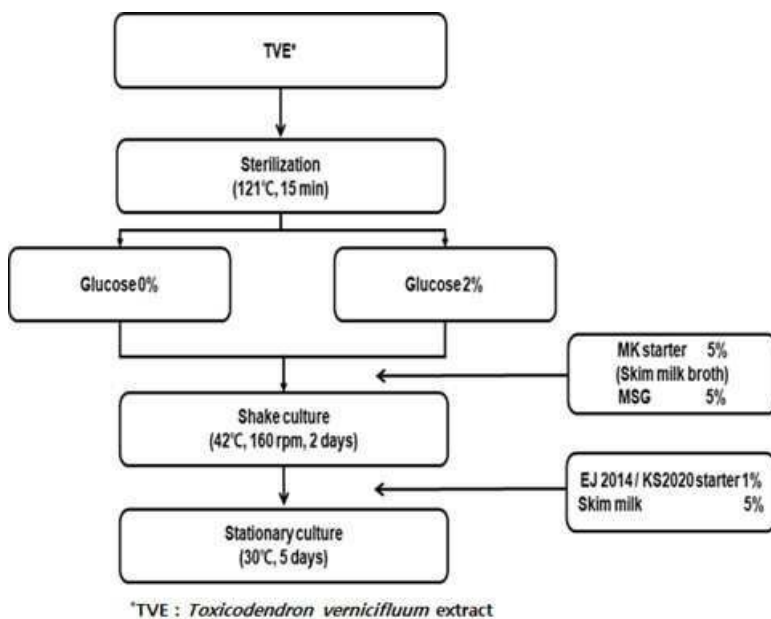
도면5



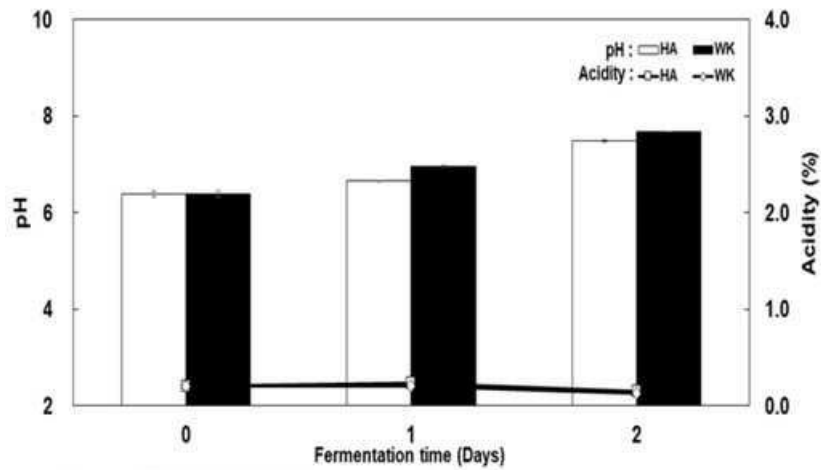
도면6



도면7

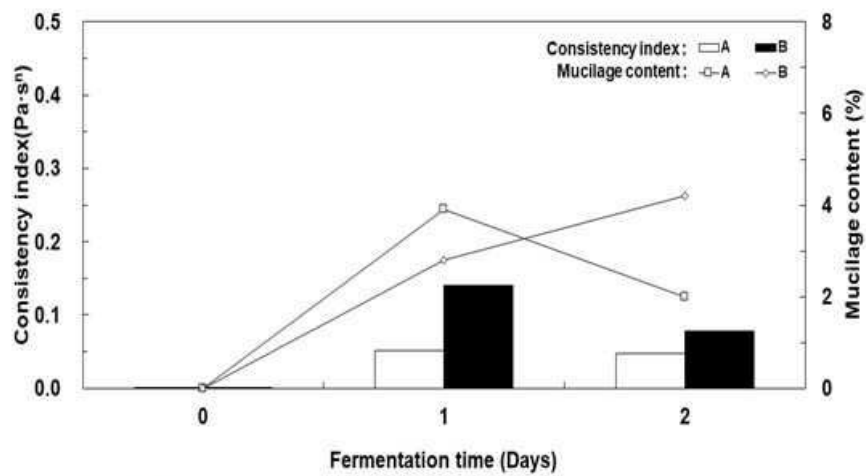


도면8



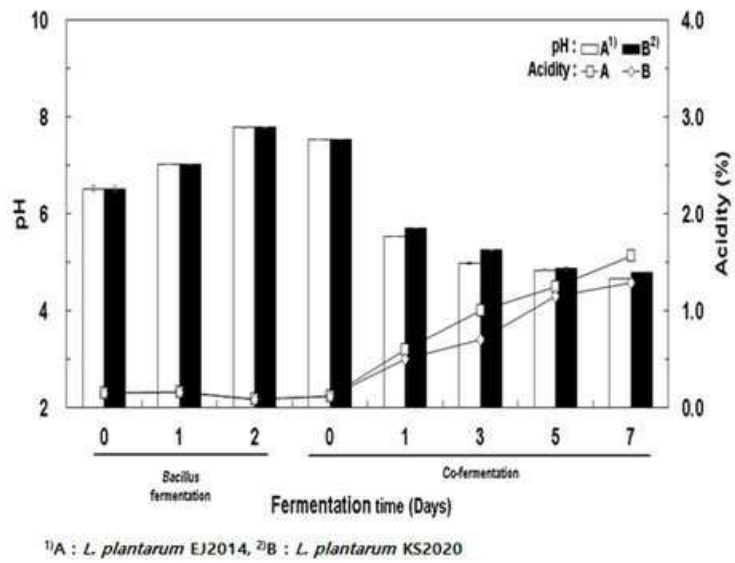
¹⁾A : *B. subtilis* HA, ²⁾B : *B. velezensis* WK2019

도면9

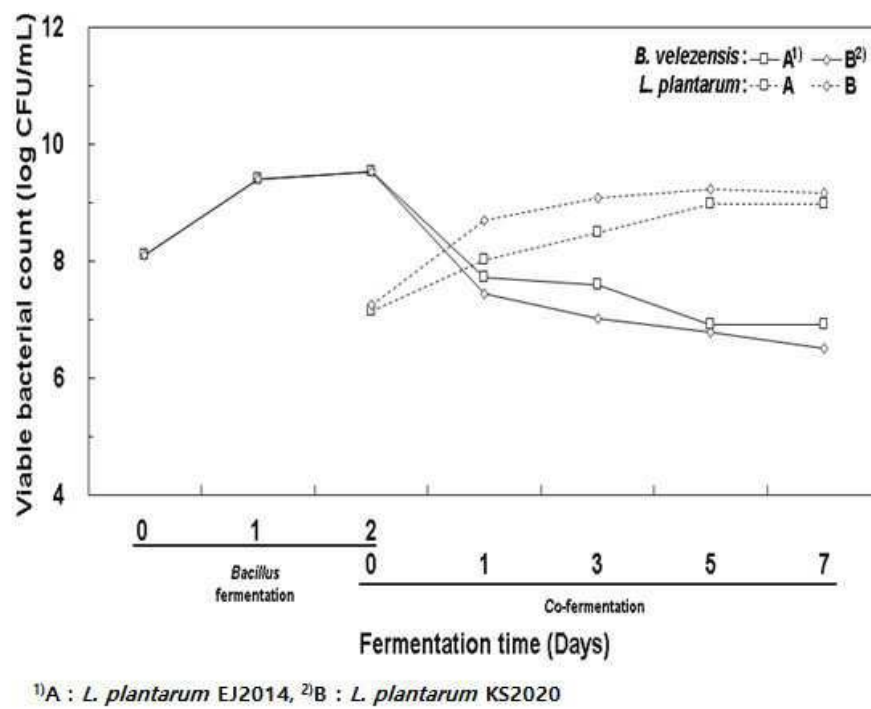


¹⁾A : *B. subtilis* HA, ²⁾B : *B. velezensis* WK2019

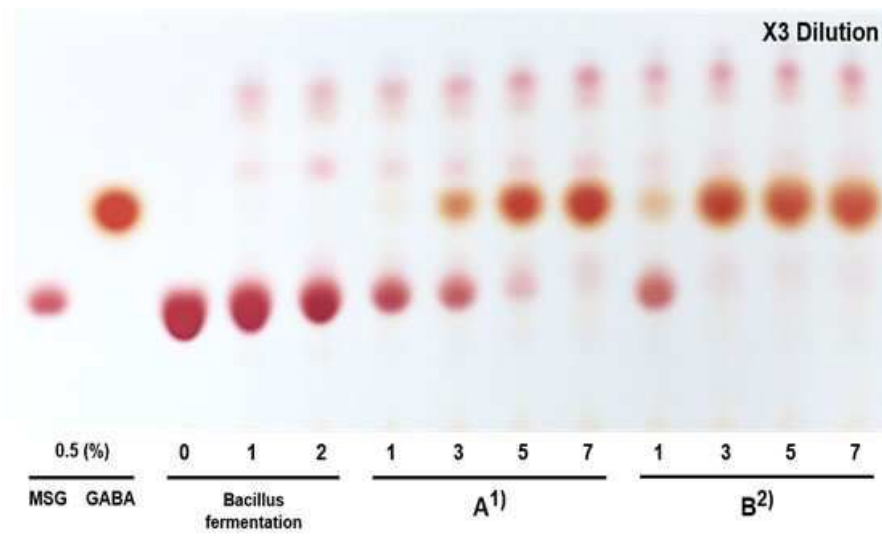
도면10



도면11

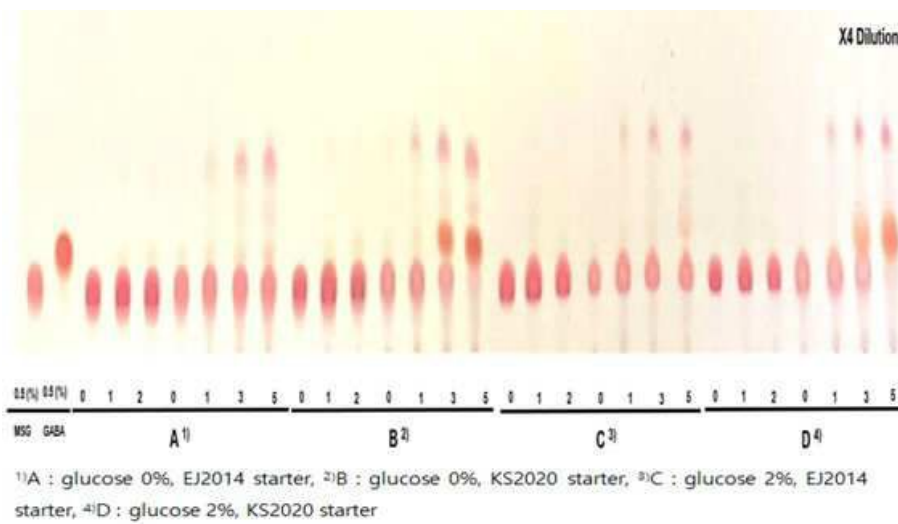


도면12



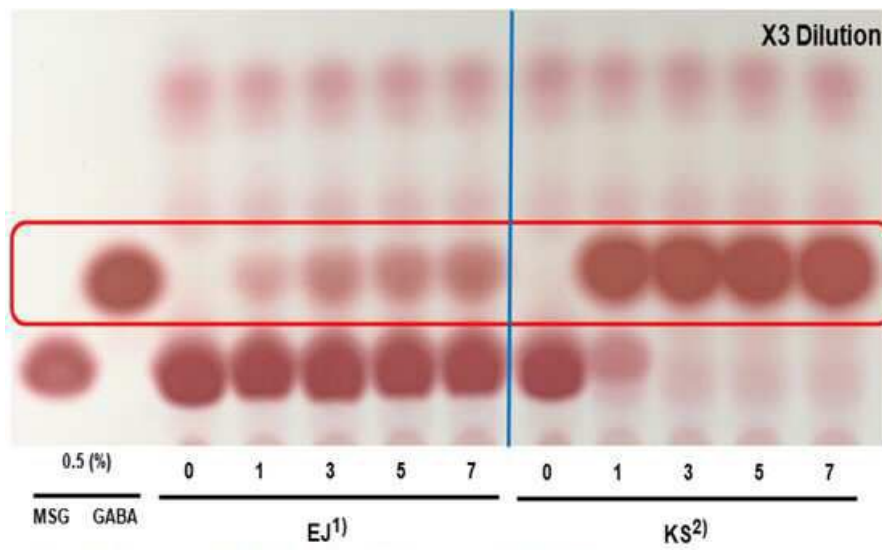
¹⁾A : *L. plantarum* EJ2014, ²⁾B : *L. plantarum* KS2020

도면13



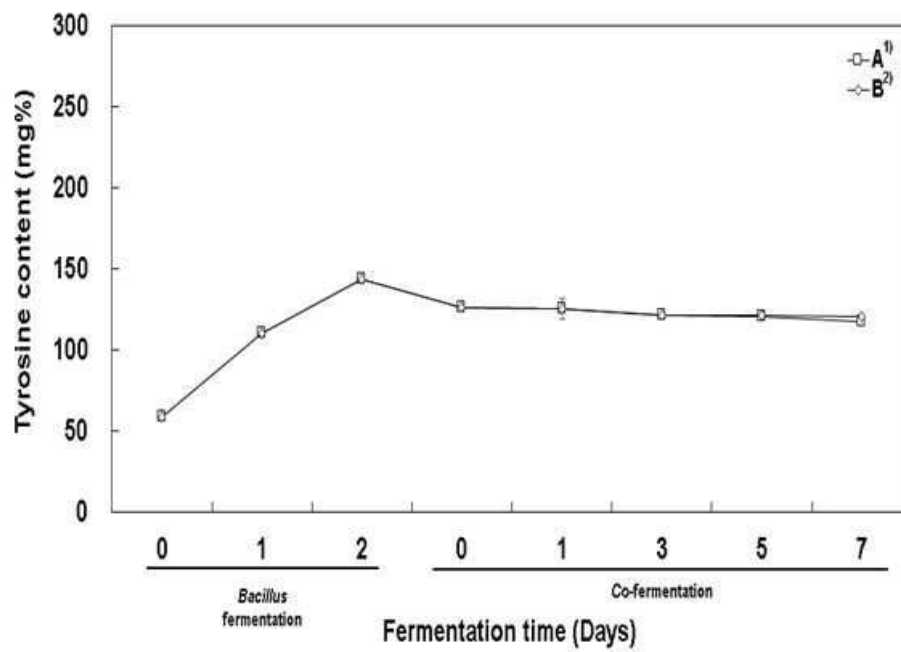
¹⁾A : glucose 0%, EJ2014 starter, ²⁾B : glucose 0%, KS2020 starter, ³⁾C : glucose 2%, EJ2014 starter, ⁴⁾D : glucose 2%, KS2020 starter

도면14



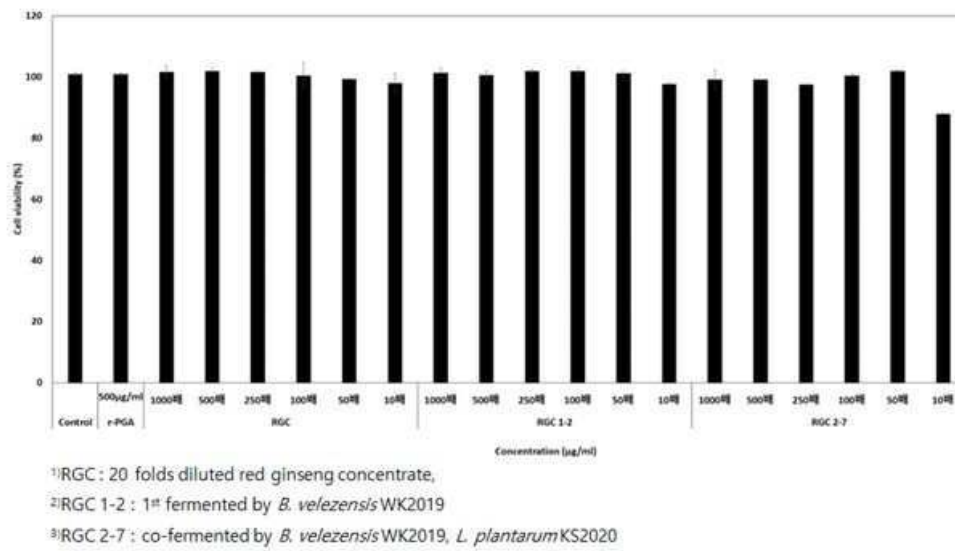
¹⁾EJ : *L. plantarum* EJ2014, ²⁾KS : *L. plantarum* KS2020

도면15

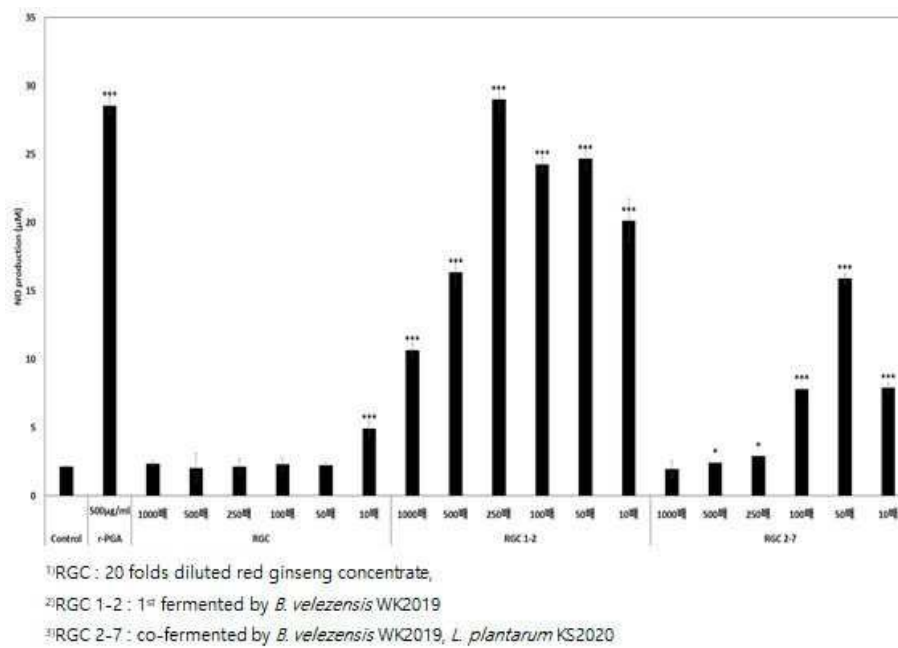


¹⁾A : *L. plantarum* EJ2014, ²⁾B : *L. plantarum* KS2020

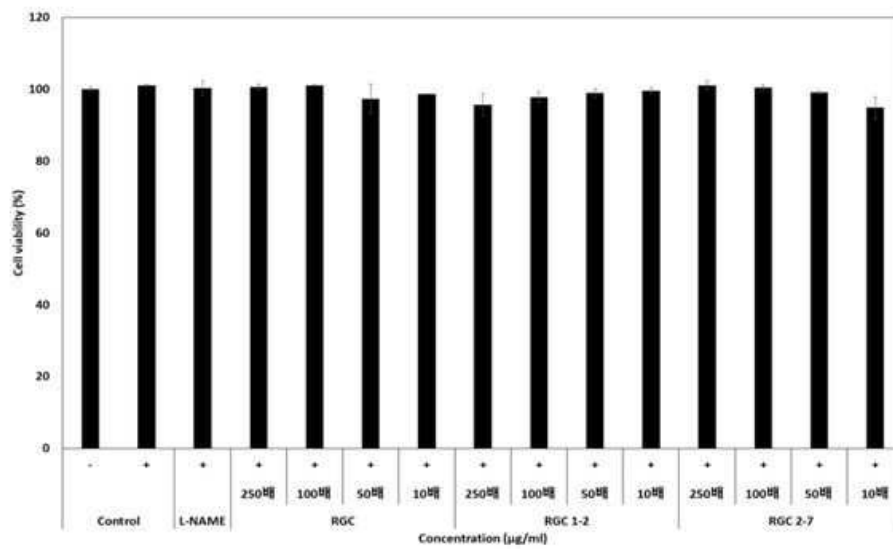
도면16



도면17



도면18

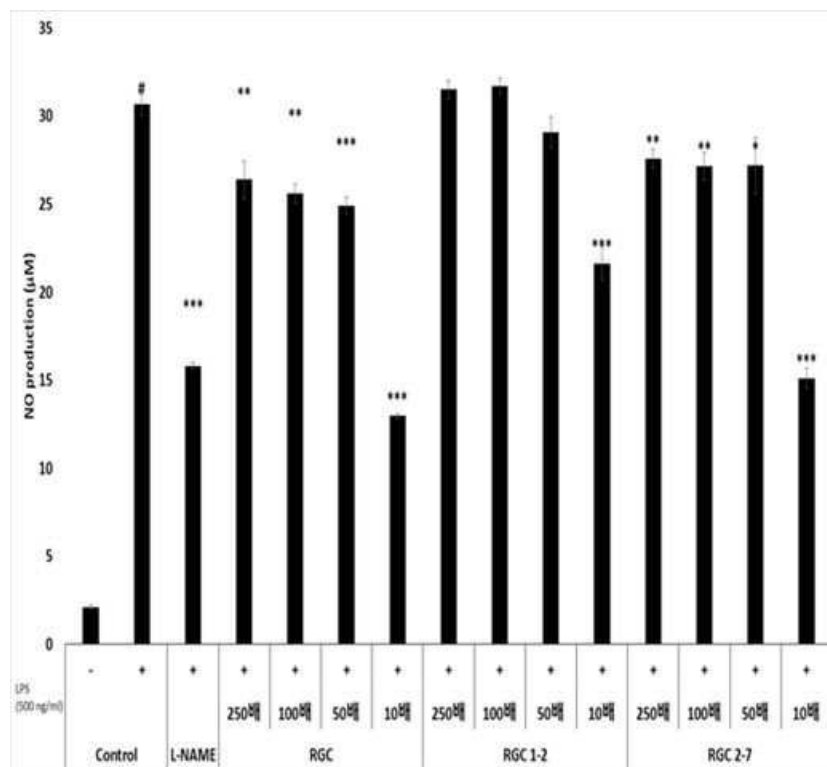


¹⁾RGC : 20 folds diluted red ginseng concentrate,

²⁾RGC 1-2 : 1st fermented by *B. velezensis* WK2019

³⁾RGC 2-7 : co-fermented by *B. velezensis* WK2019, *L. plantarum* KS2020

도면19



- L-NAME hydrochloride: NG-Nitro arginine methyl ester hydrochloride

도면20

DOUBTFUL PROFILE							
스트립	API 50 CHL V5.2						
숫자화된 생화학적 패턴	- + - - - + - - - - + + + - - - + - - + + + + + + + + + - - - - - + - - - - - +						
참고사항							

동정결과	% ID	T Index	상반되는 생화학적 특성(Test against)				
Lactobacillus plantarum 1	94.1	0.39	GLY	1%	5KG	0%	

자순위 동정결과	% ID	T Index	상반되는 생화학적 특성(Test against)				
Lactobacillus pentosus	5.2	0.21	LARA 100%	DXYL 100%	MLZ 25%	RAF 75%	
			5KG	0%			

도면21

