



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2017-0001397
(43) 공개일자 2017년01월04일

- | | |
|---|--|
| <p>(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
 <i>C12N 1/20</i> (2006.01) <i>A23L 29/00</i> (2016.01)
 <i>A23L 33/105</i> (2016.01) <i>A61K 36/258</i> (2006.01)
 <i>A61K 8/97</i> (2006.01)</p> <p>(52) CPC특허분류
 <i>C12N 1/20</i> (2013.01)
 <i>A23L 29/065</i> (2016.08)</p> <p>(21) 출원번호 10-2015-0091329
 (22) 출원일자 2015년06월26일
 심사청구일자 2015년06월26일</p> | <p>(71) 출원인
 충남대학교산학협력단
 대전광역시 유성구 대학로 99 (궁동, 충남대학교)</p> <p>(72) 발명자
 송규용
 대전광역시 유성구 대학로 99, 약학과 (궁동, 충남대학교)
 남명수
 대전광역시 유성구 노은서로 222, 102동 402호
 (뒷면에 계속)</p> <p>(74) 대리인
 특허법인 공간</p> |
|---|--|

전체 청구항 수 : 총 12 항

(54) 발명의 명칭 **신규한 패니바실러스 속 RMKS 72 균주, 이를 이용한 발효인삼 및 이를 이용한 발효인삼 추출물을 함유하는 향산화 활성을 갖는 조성물**

(57) 요약

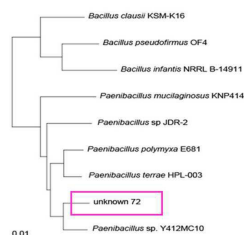
본 발명은 신규한 패니바실러스 속 RMKS 72 균주(*Paenibacillus* sp. RMKS 72, 미생물 수탁번호 KACC92078P), 이를 이용한 발효인삼, 및 이 발효인삼의 추출물을 함유하는 향산화 활성을 갖는 조성물에 관한 것으로서, 상기 패니바실러스 속 RMKS 72 균주(*Paenibacillus* sp. RMKS 72, 미생물 수탁번호 KACC92078P)의 배양액은 인삼 내의 진세노사이드 Rb1을 Rd로 변환시키는 효과가 우수하여, 상기 균주를 이용하여 제조한 발효인삼 또는 이의 추출물은 활성산소종에 대한 제거능이 뛰어나, 향산화 및 노화방지용 화장품 조성물, 건강기능식품, 또는 약학 조성물로 유용하게 사용될 수 있다.

대표도 - 도1

```

1  ACAATCTCC GACTTGCGG GCTGACGCC TTGGGGTTA CCCACGGC TTGGGGTTT GTAAACCTC
71  GTGGTGGAC GGGGCTGGG TACAGAGCC GGAAGCTAT TCACCGGGC ATCTGTATC GCGATTACTA
141  GCAATCTCGA CTTCATGGG GCGGGTGGC GCGTCAATC GACCTTGGG CAGCTTGGG TAGGATTGGC
211  TCCATCTGGC GACTTGCCTT CCGGTTTAC TGCGCATTTG AGTACGCTG TAGCCAGGT CATAGGGGC
281  ATGATGATT GACTTGCCTT CCGGTTTAC TGCGCATTTG AGTACGCTG TAGCCAGGT CATAGGGGC
351  AGTGTGGCA ACTAAATCA AGGGTTGGC TGCTGGGGG ACTTACCCA ACATCTAGG ACACAGGCTG
421  ACAGCAACA TGACCACTT GTCACTCTG TCCGGAAGG GCGCTTATC TCTAGAGGT TCAGAGGCT
491  GTCAAGCTT GTTAAAGTTT TCGGCTTTC TTGGAATTA ACCGATATC CACTCTCTG TGCGGTTTC
561  GTCGAATTC TTGGGTTTC AGTGTGGCA GCGTCAATC CAGCGGAT GTCTAATGG TTACTTGGG
631  CACCAAGGT ATGGAAGCTT GTCACTCTG GCGTCAATC TTACCGGAT GCGTCAATG GTTACTTAT
701  CTGTTTGGT CCGGCTTTC TGCGGTTTC TTGGAATTA ACCGATATC CACTCTCTG TGCGGTTTC
771  TGCTTGGCA TATCTAGCA TTTCAGGCT ACAGTGGAA TTGCACTCTT CTCTCTTGA CTAAGTCTG
841  CAGTTTGGC GTGGAAGCA AGGTTGGCT TTGCGTTAA ACAGTGGAA TTGCACTCTT CTCTCTTGA CTAAGTCTG
911  CTTTACGCTT ACTAATTCG GACAAGCTT CCGGCTTTC TATTACGCTT GCGTCTTGA CTAAGTCTG
981  GCGGCTTTC TCTCAGCTT CCGGCTTTC TATTACGCTT GCGTCTTGA CTAAGTCTG TGGCAAGCA
1051 GCTTACGAT CCGGAACTT TCATCACTA CCGGCTTTC TCTCAGCTT

```



(52) CPC특허분류

A23L 33/105 (2016.08)

A61K 36/258 (2013.01)

A61K 8/97 (2013.01)

A23V 2002/00 (2013.01)

A23V 2200/302 (2013.01)

A23V 2250/2124 (2013.01)

(72) 발명자

경기열

대전광역시 유성구 엑스포로123번길 46-15, 501동
302호 (도룡동, 스마트시티주상복합아파트)

조수현

대전광역시 서구 문예로 174, 116동 105호(둔산동,
샘머리아파트1단지)

손지윤

대전광역시 유성구 배울1로 119, 1204동 704호 (용
산동, 대덕테크노밸리12단지아파트)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 C0191588

부처명 중소기업청

연구관리전문기관 중소기업청

연구사업명 산학연 협력 기술사업

연구과제명 진세노사이드 Rd를 선택적으로 대량 생산하는 인삼발효기술 확립 및 이를 활용한 제품개발

기 여 율 1/1

주관기관 충남대학교

연구기간 2014.06.01 ~ 2015.05.31

명세서

청구범위

청구항 1

신규한 패니바실러스 속 RMKS 72 균주(*Paenibacillus* sp. RMKS 72, 미생물 수탁번호 KACC92078P).

청구항 2

패니바실러스 속 RMKS 72 균주(*Paenibacillus* sp. RMKS 72, 미생물 수탁번호 KACC92078P)를 이용한 발효인삼.

청구항 3

제2항에 있어서,

상기 발효인삼은 인삼 100 중량부, 물 200~1000 중량부 및 패니바실러스 속 RMKS 72 균주의 배양액 1~25 중량부를 혼합하고 25~40℃에서 3~15일간 발효한 것을 특징으로 하는 발효인삼.

청구항 4

패니바실러스 속 RMKS 72 균주(*Paenibacillus* sp. RMKS 72, 미생물 수탁번호 KACC92078P)를 이용한 발효인삼의 추출물을 함유하는 것을 특징으로 하는 향산화 활성을 갖는 화장료 조성물.

청구항 5

제4항에 있어서,

상기 발효인삼은 인삼 100 중량부, 물 200~1000 중량부 및 패니바실러스 속 RMKS 72 균주의 배양액 1~25 중량부를 혼합하고 25~40℃에서 3~15일간 발효한 것을 특징으로 하는 향산화 활성을 갖는 화장료 조성물.

청구항 6

제4항에 있어서,

상기 발효인삼의 추출물은 패니바실러스 속 RMKS 72 균주를 이용한 발효인삼을 물, C1 내지 C4의 저급 알코올, 또는 이들의 혼합용매로 추출한 것을 특징으로 하는 향산화 활성을 갖는 화장료 조성물.

청구항 7

패니바실러스 속 RMKS 72 균주(*Paenibacillus* sp. RMKS 72, 미생물 수탁번호 KACC92078P)를 이용한 발효인삼의 추출물을 함유하는 것을 특징으로 하는 향산화 활성을 갖는 건강기능식품.

청구항 8

제7항에 있어서,

상기 발효인삼은 인삼 100 중량부, 물 200~1000 중량부 및 패니바실러스 속 RMKS 72 균주의 배양액 1~25 중량부를 혼합하고 25~40℃에서 3~15일간 발효한 것을 특징으로 하는 향산화 활성을 갖는 건강기능식품.

청구항 9

제7항에 있어서,

상기 발효인삼의 추출물은 패니바실러스 속 RMKS 72 균주를 이용한 발효인삼을 물, C1 내지 C4의 저급 알코올, 또는 이들의 혼합용매로 추출한 것을 특징으로 하는 향산화 활성을 갖는 건강기능식품.

청구항 10

패니바실러스 속 RMKS 72 균주(*Paenibacillus* sp. RMKS 72, 미생물 수탁번호 KACC92078P)를 이용한 발효인삼의

추출물을 함유하는 것을 특징으로 하는 노화방지용 약학 조성물.

청구항 11

제1항에 기재된 패니바실러스 속 RMKS 72 균주를 이용하여 진세노사이드 Rb1을 진세노사이드 Rd로 전환하는 방법으로서,

패니바실러스 속 RMKS 72 균주의 배양액을 수득하는 단계;

0.01~10mg/ml의 진세노사이드 Rb1과 상기 배양액을 1:1~5의 부피비로 혼합하는 단계; 및

25~40℃, pH 5.0~9.0에서 3~15일간 반응시키는 단계;를 포함하는 것을 특징으로 하는 진세노사이드 Rb1을 진세노사이드 Rd로 전환하는 방법.

청구항 12

제1항에 기재된 패니바실러스 속 RMKS 72 균주를 이용하여 진세노사이드 Rd가 강화된 발효인삼을 제조하는 방법으로서,

패니바실러스 속 RMKS 72 균주의 배양액을 수득하는 단계;

인삼 100 중량부, 물 200~1000 중량부 및 패니바실러스 속 RMKS 72 균주의 배양액 1~25 중량부를 혼합하는 단계; 및

25~40℃, pH 5.0~9.0에서 3~15일간 반응시키는 단계;를 포함하는 것을 특징으로 하는 진세노사이드 Rd가 강화된 발효인삼을 제조하는 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 신규한 패니바실러스 속 RMKS 72 균주(*Paenibacillus* sp. RMKS 72, 미생물 수탁번호 KACC92078P) 및 이를 이용한 발효인삼에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 상기 패니바실러스 속 RMKS 72 균주를 이용한 발효인삼의 추출물을 함유하는 항산화 활성을 갖는 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 인삼(*Panax ginseng*)은 오갈피나목과(*Araliaceae*) 인삼 속에 속하는 다년생 초본류로 과거 수천년 전부터 우리나라를 비롯한 동양에서 약제 또는 건강식품으로 널리 사용되어 왔다. 또한 인삼은 수삼, 홍삼 등의 다양한 형태로 이용이 가능하며, 특히 수삼을 증기로 쪄서 가공한 홍삼이 인체에 유용한 다양한 진세노사이드를 함유하고 있는 것으로 알려져 있다.

[0003] 인삼의 주요 효능을 나타내는 사포닌(saponin)은 30종류 이상의 진세노사이드(ginsenoside)로 구성되는데, 진세노사이드는 면역력강화, 항염증작용, 항알러지작용, 항암효과, 발기부전에 대한 효과, 혈압강화작용, 항콜레스테롤작용, 항혈전작용, 성인병 및 노화에 대한 예방 및 치료효과가 있다고 알려져 있다.

[0004] 인삼의 사포닌은 트리테르페노이드(triterpenoid) 계열의 담마란(dammarane) 골격에 글루코즈(glucose), 아라비노즈(arabinose), 자일로즈(xylose), 람노즈(rhamnose) 등이 결합되어 있는 중성배당체이다. 인삼을 물과 알코올로 추출할 때 인삼의 진세노사이드 중에서 Rb1, Rb2, Rc, Rg1 등이 다량 존재하는 것이 확인된다. 그러나, 이러한 진세노사이드들은 체내에서 흡수가 잘 되지 않아 약학적 조성물로서 이용되기에 적합하지 않다. 이러한 인삼 내의 진세노사이드들은 홍삼이나 흑삼 등으로 가공 처리 되는 과정을 통해 자연계에서는 존재하지 않는 진세노사이드들로 변환됨으로써, 체내에서 흡수가 잘 되어, 각종 질환의 약학적 조성물로 적합하게 이용될 수 있다.

[0005] 즉, 가공 처리 과정을 통해, 인삼의 진세노사이드 중 Rb1, Rb2, Rc, Rg1 등으로부터 글리코실 잔기가 이탈되면서, 진세노사이드 Rg2, Rg3, Rh2, Rh1 등이 생성되었다가, 다시 20번 위치의 탈수 과정을 통해 Rg5, Rk1, Rg6, Rk3, F4, Rh4가 생성되는 것으로 알려져 있다.

[0006] 또한, 진세노사이드들은 유기산 첨가에 의해 가수분해가 진행되어 당이 떨어져 나가고 측쇄부분이 고리화(cyclization)되면서, 파낙사트리올(Panaxatriol)이나 파낙사디올(Panaxadiol)이 형성된다(Chem. Pharm. Bull. 11. 759-761, 1963; Chem. Pharm. Bull. 22. 2407-2421, 1974; Chem. Pharm. Bull. 22. 421-428, 1974).

- [0007] 한편, 진세노사이드가 체내로 들어올 경우, Rb1, Rb2, Rc, Rg1 등의 진세노사이드는 체내의 장내 미생물에 의해 분해가 되어 흡수가 가능하게 된다(Planta Med. 62. 453-457, 1996). 진세노사이드가 순차적으로 장내 미생물에 의해 분해가 되어 Rb1의 경우 Rd, 화합물 K(Compound K), 프로토파낙사다이올로 순차적 전환이 되지만, 사람의 체질 및 식습관에 따라 미생물의 존재 유무와 보유 정도가 사실상 다르기 때문에 대사산물의 전환에 의한 흡수도 상당한 차이를 지니고 있으며, 그로 인한 효능에도 상당한 차이를 나타낼 수 있다(J. Pharmacol. 50. 1155-1160, 1998).
- [0008] 따라서 대사산물의 전환에 의한 효능과 체내 흡수율의 차이를 없애기 위해, 미생물에 의한 인삼 내 진세노사이드의 전환을 통해 체내의 진세노사이드 흡수율을 높이고, 동시에 특정 형태로의 진세노사이드 전환을 통해 효능적으로 강화된 발효인삼에 대한 개발 필요성이 제기되고 있다.
- [0009] 한편, 피부는 신체의 최외각에 존재하며 외부로부터 몸을 보호하는 중요한 기관이다. 모든 생명체의 모든 기관은 나이가 들어감에 따라 노화가 진행되는데 피부 또한 예외가 아니다. 일반적으로 피부노화는 내인성 노화(intrinsic aging)와 광노화(photoaging)와 같은 외인성 노화로 나뉘는데, 내인성 노화는 나이가 들면서 자연적으로 노화가 일어나는 것을 의미하며 광노화는 햇빛에 의해 나타나는 노화현상을 말한다.
- [0010] 내인성 노화로는 신진대사를 조절하는 각종 호르몬의 분비가 감소하고, 면역 세포의 기능과 세포들의 활성이 저하되어 생체에 필요한 면역 단백질 및 생체 구성 단백질들의 생합성이 줄어들게 되며, 외인성 노화로는 오존층 파괴로 인하여 태양 광선 중 지표에 도달하는 자외선의 함량이 증가하게 되고 환경오염이 더욱 심화됨에 따라 자유 라디칼 및 활성 유해 산소 등이 증가함으로써, 피부의 두께가 감소하고, 주름이 증가되고, 탄력이 감소될 뿐 아니라 피부 혈색도 칙칙하게 안 좋아지게 되고, 피부트러블이 자주 발생하며, 기미와 주근깨 및 검버섯 또한 증가하는 등 여러 가지 변화를 일으키게 된다.
- [0011] 내인성 노화든 외인성 노화든 간에 이들은 활성산소가 깊이 관여하는 것으로 알려져 있는데, 내인성 노화는 생체 세포내에서의 대사과정에서 발생하는 활성산소가 주로 작용하고 외인성 노화의 경우에는 자외선에 의한 활성산소의 발생이 주된 원인이다.
- [0012] 따라서 피부노화 방지용 약학조성물 또는 피부노화 지연 또는 개선용 화장품을 만들기 위해서 활성산소를 제거할 수 있는 항산화제의 개발이 필요하다. 종래 대표적으로 사용되는 항산화제로서 수퍼옥사이드디스뮤타제(SOD)라는 효소와 비타민 C, 비타민 E(토코페롤), 플라보노이드 등이 있으나, 이들 항산화제들은 불안정하기 때문에 장기간의 유통기간을 갖는 화장품에 적용이 쉽지 않고 과량 사용시 피부에 부작용을 일으킬 수 있는 문제점이 있다.
- [0013] 이에, 본 발명자는 수많은 발효 미생물들 중 진세노사이드의 체내 흡수율을 높일 수 있는 진세노사이드로의 전환이 가능한 미생물을 동정하기 위하여 지속적으로 연구한 결과, 인삼 내의 Rb1을 선택적으로 Rd로 전환할 수 있는 β -글루코시다아제 효소를 생성하는 미생물을 얻게 되었다. 또한, 당해 미생물로 발효한 발효인삼의 추출물이 우수한 항산화 활성을 가지면서도 천연물로서 부작용이 적어 약학 조성물, 건강기능식품 또는 화장품 조성물로 유용하게 적용될 수 있음을 확인하여 본 발명을 완성하게 되었다.
- [0014] 종래 선행기술로서 한국등록특허 제1285681호와 한국등록특허 제472964호에는 사포닌 생물전환능을 갖는 유산균을 이용하여 체내흡수율이 증진된 발효인삼이 개시되어 있고, 한국공개특허 제2013-0063959호 및 한국등록특허 제1182741호에는 미생물 유래의 β -글루코시다아제가 진세노사이드 Rb1을 체내에서 이용하기 쉬운 타입의 진세노사이드 Rd로 변환시키는 기능이 있음이 개시되어 있으나, 이들 기술은 본 발명에서 이용된 균주와는 전혀 다른 균주를 이용한다.
- [0015] 또한, 한국등록특허 제1343434호, 한국등록특허 제1343410호, 및 한국등록특허 제1345226호에는, 인삼 발효능을 갖는 락토바실러스 플랜타럼 균주, 엔테로코커스 패칼리스 균주, 및 패니바실러스 속 엠비티213 균주가 각각 개시되어 있고, 이 균주를 이용하여 발효 인삼을 제조하는 방법이 개시되어 있으나, 이들 선행기술 역시 본 발명과는 전혀 다른 균주를 이용하여 발효인삼을 제조하고 있는 점에서 본 발명의 구성과 차이가 있다.

선행기술문헌

특허문헌

- [0016] (특허문헌 0001) 한국등록특허 제472964호 (사포닌분해물을 함유하는 발효인삼 및 그 제조방법, 2005.02.15. 등록)

(특허문헌 0002) 한국등록특허 제1017378호 (발효인삼, 발효홍삼의 제조방법 및 이에 적합한 청국장 유래의 바실러스 서브틸리스 균주, 2011.02.17. 등록)

(특허문헌 0003) 한국등록특허 제1182741호 (진세노사이드 알비1의 효율적인 생물전환 방법 및 그 산물, 2012.09.07. 등록)

(특허문헌 0004) 한국등록특허 제1285681호 (사포닌 생물전환능을 갖는 균주 및 이를 이용한 체내흡수율이 증진된 발효인삼의 제조방법, 2013.07.04. 등록)

(특허문헌 0005) 한국등록특허 제1343434호 (인삼 발효능을 갖는 신규 엔테로코커스 패칼리스 C R N B-A 3 [K C T C 1 1 9 3 0 B P] 균주 및 이를 이용한 사포닌 전환 방법, 2013.12.13. 등록)

(특허문헌 0006) 한국등록특허 제1343410호 (인삼 발효능을 갖는 신규 락토바실러스 플랜타럼 C R N B-2 2 [K C T C 1 1 9 3 1 B P] 균주 및 이를 이용한 사포닌 전환 방법, 2013.12.13. 등록)

(특허문헌 0007) 한국등록특허 제1345226호 (신규한 패니바실러스 속 엠비티213 균주, 이를 이용한 발효인삼 및 이를 이용한 발효인삼 추출물을 함유하는 아토피 피부염의 예방 또는 치료용 조성물, 2013.12.19. 등록)

(특허문헌 0008) 한국공개특허 제2013-0063959호 (아스퍼질러스 우사미 케이씨티씨 6954 균주가 생산하는 효소를 이용한 진세노사이드 알비1의 효율적인 전환방법 및 그 산물, 2013.06.17. 공개)

비특허문헌

[0017]

(비특허문헌 0001) David Kiefer et al., Panax ginseng. American Family Physician 68(8), 1539-1542, 2003.

(비특허문헌 0002) Shibata S. et al. Studies on the constituents of Japanese and Chinese crude drugs. X I. Panaxadiol, a sapogenin of ginseng roots. Chem. Pharm. Bull. 11, 759-761, 1963.

(비특허문헌 0003) Shibata S. et al., Studies on the saponins of Ginseng. II. Structures of ginsenoside-Re, -Rf and -Rg2. Chem. Pharm. Bull. 22, 2407-2421, 1974.

(비특허문헌 0004) Shibata S. et al., Studies on the saponins of Ginseng. I. Structures of ginsenoside-Ro, -Rb1, -Rb2, -Rc and -Rd. Chem. Pharm. Bull. 22, 421-428, 1974.

(비특허문헌 0005) Hasegawa H. et al., Main ginseng saponin metabolites formed by intestinal bacteria. Planta Med. 62(5), 453-457, 1996.

(비특허문헌 0006) Akao T. et al., Intestinal bacterial hydrolysis is required for the appearance of compound K in rat plasma after oral administration of ginsenoside Rb1 from Panax ginseng. J Pharm Pharmacol. 50(10), 1155-1160, 1998.

(비특허문헌 0007) Chang-Su Park, et al., Biotransformation of ginsenosides by hydrolyzing the sugar moieties of ginsenosides using microbial glycosidases. Microbiol Biotechnol. 89, 9-19, 2010.

(비특허문헌 0008) Bong-Gwan Kim. et al., Changes of ginsenosides in Korean red ginseng (Panax ginseng) fermented by Lactobacillus plantarum M1. Process Biochemistry. 45, 1319-1324, 2010.

(비특허문헌 0009) Le-Qin Cheng. et al., Conversion of major ginsenoside Rb 1 to ginsenoside F 2 by Caulobacter leidyia. Biotechnol Lett. 28, 1121-1127, 2006.

(비특허문헌 0010) Le-Qin Cheng, et al., Conversion of major ginsenoside Rb1 to 20(S)-ginsenoside Rg3 by Microbacterium sp. GS514. Phytochemistry. 69, 218-224, 2008.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0018] 본 발명의 목적은 신규한 패니바실러스 속 RMKS 72 균주(*Paenibacillus* sp. RMKS 72, 미생물 수탁번호 KACC92078P) 및 이를 이용한 발효인삼을 제공하는 데에 있다.
- [0019] 또한, 본 발명의 목적은 상기 패니바실러스 속 RMKS 72 균주를 이용한 발효인삼의 추출물을 함유하는 향산화 활성을 갖는 조성물을 제공하는 데에 있다.
- 과제의 해결 수단**
- [0020] 본 발명은 신규한 패니바실러스 속 RMKS 72 균주(*Paenibacillus* sp. RMKS 72, 미생물 수탁번호 KACC92078P)에 관한 것이다.
- [0021] 또한, 본 발명은 패니바실러스 속 RMKS 72 균주를 이용한 발효인삼에 관한 것이다.
- [0022] 상기 발효인삼은, 인삼 100 중량부, 물 200~1000 중량부 및 패니바실러스 속 RMKS 72 균주의 배양액 1~25 중량부를 혼합하고 25~40℃에서 3~15일간 발효한 것일 수 있다.
- [0023] 본 발명은, 또한, 패니바실러스 속 RMKS 72 균주를 이용한 발효인삼의 추출물을 함유하는 향산화 활성을 갖는 화장료 조성물에 관한 것이다.
- [0024] 상기 발효인삼의 추출물은, 패니바실러스 속 RMKS 72 균주를 이용한 발효인삼을 물, C1 내지 C4의 저급 알코올, 또는 이들의 혼합용매로 추출한 추출물일 수 있다.
- [0025] 또한, 본 발명은 패니바실러스 속 RMKS 72 균주를 이용한 발효인삼의 추출물을 함유하는 향산화 활성을 갖는 건강기능식품에 관한 것이다.
- [0026] 또한, 본 발명은 패니바실러스 속 RMKS 72 균주를 이용한 발효인삼의 추출물을 함유하는 노화방지용 약학 조성물에 관한 것이다.
- [0027] 또한, 본 발명은, 패니바실러스 속 RMKS 72 균주를 이용하여 진세노사이드 Rb1을 진세노사이드 Rd로 전환하는 방법으로서, 패니바실러스 속 RMKS 72 균주의 배양액을 수득하는 단계; 0.01~10mg/ml의 진세노사이드 Rb1과 상기 배양액을 1:1~5의 부피비로 혼합하는 단계; 및 25~40℃, pH 5.0~9.0에서 3~15일간 반응시키는 단계;를 포함하는 방법에 관한 것이다.
- [0028] 또한, 본 발명은, 패니바실러스 속 RMKS 72 균주를 이용하여 진세노사이드 Rd가 강화된 발효인삼을 제조하는 방법으로서, 패니바실러스 속 RMKS 72 균주의 배양액을 수득하는 단계; 인삼 100 중량부, 물 200~1000 중량부 및 패니바실러스 속 RMKS 72 균주의 배양액 1~25 중량부를 혼합하는 단계; 및 25~40℃, pH 5.0~9.0에서 3~15일간 반응시키는 단계;를 포함하는 방법에 관한 것이다.
- [0029] 이하, 본 발명을 더 자세하게 설명한다.
- [0030] 상기 패니바실러스 속 RMKS 72 균주는 혐기성, 그람 양성, 운동성, 유포자 간균으로서, 생육가능한 온도는 25~40℃, 바람직하게는 30~37℃이고, 생육가능한 pH는 5.0~8.0, 바람직하게는 pH 5.0~7.5이고, 배양에 적절한 시간은 36~96시간, 바람직하게는 48~96시간, 가장 바람직하게는 48~72시간이다. 상기 균주는 25℃ 미만, 40℃ 초과, pH 5.0 미만, pH 8.0 초과 조건에서는 잘 자라지 않는다.
- [0031] 상기 패니바실러스 속 RMKS 72 균주는 일반적인 균주의 배양 배지에서는 다 생육 가능하지만, 배양에 가장 적합한 배지로는 TS 배지(trypticase soy broth), BCP 배지(Bromo Cresol Purple-Deoxycholate-Citrate-Lactose-Sucrose broth), GYP 배지(Glucose-Yeast-Peptide broth)이다.
- [0032] 상기 패니바실러스 속 RMKS 72 균주는 β-글루코시다아제(β-glucosidase) 활성을 가져, 다른 진세노사이드에는 작용하지 않으면서 진세노사이드 Rb1을 Rd로 선택적으로 전환한다. 특히, 패니바실러스 속 RMKS 72 균주는, 진세노사이드 Rd로의 전환율이 높은 특징을 갖는다.
- [0033] 상기 패니바실러스 속 RMKS 72 균주를 이용한 발효인삼은, 인삼 100 중량부, 물 200~1000 중량부 및 패니바실러스 속 RMKS 72 균주 배양액 1~25 중량부를 혼합하여 발효한 것일 수 있다. 이 때, 물은 첨가하지 않거나 극히 소량만 첨가해도 발효는 진행되지만, 진세노사이드의 전환효과가 나타나기까지 발효가 진행되는 시간이 증가된다. 따라서 물의 함량은 200 중량부 이상인 것이 바람직하며, 물의 함량이 1000 중량부를 초과해도 발효는 진행될 수 있으나, 이 역시 발효가 진행되는 시간이 증가된다. 또한, 인삼 100 중량부를 기준으로, 균주 배양액이 1 중량부 미만일 경우에는 발효가 진행되는 시간이 증가되어 바람직하지 않고, 균주 배양액이 25 중량부를 초과해

도 되지만, 25 중량부까지만 넣어도 발효가 충분히 진행되기에 그 이상은 첨가하지 않아도 된다.

- [0034] 상기 발효는, 온도 25~40℃에서 3~15일간 진행하는 것이 바람직하다. 온도가 25℃ 미만이거나, 40℃를 초과하는 경우, 발효가 잘 되지 않는다. 또한, 발효 기간이 3일 미만인 경우에는 발효가 충분히 진행되지 않아 바람직하지 않고, 15일을 초과하여 발효하여도 좋으나 이미 15일 내에서 진세노사이드의 전환이 충분히 수행되기 때문에, 제조비용면에서 발효 기간은 15일 이내인 것이 적절하다. 따라서, 상기 발효 온도 및 발효기간의 범위에서 가장 발효효과가 좋은 발효인삼을 제조할 수 있다.
- [0035] 본 발명의 패니바실러스 속 RMKS 72 균주를 이용한 발효인삼은, 발효 전 인삼에 들어있던 진세노사이드들이 체 내에서 흡수 및 이용하기에 좋은 형태로 전환된 것이며, 특히 진세노사이드 Rd의 함량이 강화된 발효인삼이다.
- [0036] 한편, 본 발명의 패니바실러스 속 RMKS 72 균주를 단독의 진세노사이드 Rb1에 적용함으로써, 진세노사이드 Rb1 으로부터 진세노사이드 Rd를 수득할 수도 있다. 이를 위해, 패니바실러스 속 RMKS 72 균주의 배양액을 원심분리한 후, 물에 녹인 0.01~10mg/ml의 진세노사이드 Rb1과 상기 원심분리된 배양액을 1:1~5의 부피비로 혼합하여 25~40℃, pH 5.0~9.0에서 3~15일간 반응시킬 수 있다. 이 때, 배양액의 원심분리는 5000rpm~10000rpm으로 수행하는 것이 적절하다.
- [0037] 상기 진세노사이드 Rb1의 농도는 어떤 농도에서도 사용가능하나, 진세노사이드의 전환 효율면에서 0.01~10mg/ml가 가장 적절하다. 이 때, 진세노사이드 Rb1과 상기 원심분리된 배양액을 혼합할 때, 1:1~5의 부피비를 벗어나도 진세노사이드 Rd로의 전환은 가능하지만, 배양액의 소모가 많아 제조비용이 많이 들거나 진세노사이드 변환 시간이 오래 걸리기 때문에 비경제적이다.
- [0038] 또한, 진세노사이드 전환 조건인, 온도 25~40℃, pH 5.0~9.0, 및 3~15일 동안의 반응조건에 있어서, 25℃ 미만 또는 40℃ 초과 조건에서는 진세노사이드의 전환이 잘 되지 않거나 시간이 많이 걸릴 수 있으며, pH 5.0 미만, 또는 pH 9.0 초과 조건에서도 균주의 생육에 바람직하지 못하여 진세노사이드의 전환이 잘 되지 않거나 시간이 많이 걸릴 수 있다. 또한, 반응기간이 3일 미만인 경우에도 진세노사이드의 전환이 충분히 일어나지 않거나, 시간이 많이 걸릴 수 있다. 단, 15일을 초과하는 경우에도 진세노사이드의 전환이 잘 되지만, 이미 15일 이내에 대부분의 진세노사이드의 전환이 완료되어 15일까지만 반응을 수행해도 적절한 결과를 얻을 수 있다.
- [0039] 상기 패니바실러스 속 RMKS 72 균주를 이용한 발효인삼의 추출물은 패니바실러스 속 RMKS 72 균주를 이용한 발효인삼(건조물 기준)에, 상기 발효인삼 중량의 2~20배(w/w)의 물, C1 내지 C4의 저급 알코올 또는 이들의 혼합 용매를 가하여 제조할 수 있다. 상기 패니바실러스 속 RMKS 72 균주를 이용한 발효인삼의 추출물은 물 추출물로 제조되었을 경우, 그대로 이용할 수도 있으며, 물을 비롯한 다른 형태의 용매를 이용하여 추출하였을 어느 경우에도 농축물 또는 건조물 형태로 이용될 수 있다.
- [0040] 상기 패니바실러스 속 RMKS 72 균주를 이용한 발효인삼의 추출물은 필요에 따라, 유기용매(알코올, 에테르, 아세톤 등)에 의한 추출, 유기용매(n-헥산, 에틸아세테이트, n-부탄올)와 물의 분배, 컬럼크로마토그래피에 의한 방법, 식물체 성분의 분리 추출에 이용되는 공지의 방법 등을 단독 또는 적합하게 조합하여 더욱 정제할 수 있으며, 필요에 따라 상법에 따라서 더욱 정제할 수 있다.
- [0041] 본 발명에서 사용하는 크로마토그래피에는 실리카겔 컬럼 크로마토그래피(silica gel column chromatography), 엘에이취-20 컬럼 크로마토그래피(LH-20 column chromatography), 이온교환수지 크로마토그래피(ion exchange resin chromatography), 박층크로마토그래피(thin layer chromatography), 중압크로마토그래피(medium pressure liquid chromatography) 및 고성능 액체 크로마토그래피(high performance liquid chromatography) 등이 이용될 수 있다.
- [0042] 상기 발효인삼의 제조에 이용되는 인삼은 파낙스(*Panax*) 속에 속하는 다년생 식물로, 고려인삼(*Panax ginseng*), 화기삼(*Panax quinquefolia*), 전칠삼(삼칠, *Panax notoginseng*), 죽절삼(*Panax japonicus*), 히말라야삼(*Panax pseudoginseng*), 베트남삼(*Panax vietnamensis*), 파낙스 엘레가티오르(*Panax elegatior*), 파낙스 완지아누스(*Panax wangianus*) 및 파낙스 비핀라티피두스(*Panax bipinratifidus*), 파낙스 안구스티폴리움(*Panax angustifolium*)에서 선택되는 1종 이상의 인삼을 이용할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 아울러 이들 인삼은 단독으로 또는 2종 이상 조합하여 사용할 수도 있다.
- [0043] 상기 인삼은 4~6년된 인삼의 뿌리를 이용하는 것이 바람직하다.
- [0044] 또한, 본 발명은 패니바실러스 속 RMKS 72 균주를 이용한 발효인삼 추출물을 포함하는 항산화 활성을 갖는 화장료 조성물을 제공한다.

- [0045] 상기 패니바실러스 속 RMKS 72 균주를 이용한 발효인삼 추출물은 화장료 조성물 총중량에 대하여, 0.001~90중량%가 포함될 수 있으며, 바람직하게는, 0.01~50중량%, 보다 바람직하게는 0.1~30중량%가 포함될 수 있다.
- [0046] 상기 화장료 조성물은, 패니바실러스 속 RMKS 72 균주를 이용한 발효인삼 추출물 이외에, 화장료에 일반적으로 이용되는 성분 모두를 포함할 수 있다. 예를 들면, 유화제, 점증제, 유제, 계면활성제, 윤활제, 알코올류, 수용성 고분자제, 겔화제, 안정화제, 비타민, 무기염류, 유화제, 향료 같은 일반적인 보조 성분을 포함할 수 있다. 상기 성분들은 제형 또는 사용목적에 따라 그 첨가량을 화장료 고유의 효과를 손상시키지 않는 범위 내에서 선택할 수 있다.
- [0047] 본 발명의 화장료 조성물은 당업계에서 통상적으로 제조되는 어떠한 제형으로도 제조될 수 있으며, 예를 들어, 용액, 현탁액, 유탁액, 페이스트, 겔, 크림, 로션, 파우더, 비누, 계면활성제-함유 클렌징, 오일, 분말 파운데이션, 유탁액 파운데이션, 왁스 파운데이션 및 스프레이 등으로 제형화될 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 보다 상세하게는, 유연 화장수, 영양 화장수, 영양크림, 맛사지 크림, 에센스, 아이크림, 헤어토닉, 샴푸, 린스, 클렌징 크림, 클렌징폼, 클렌징워터, 팩, 스프레이 및 파우더의 제형으로 제조될 수 있다.
- [0048] 본 발명의 화장료 조성물은 매일 사용할 수 있으며 또한 정해지지 않은 기간 동안에도 사용할 수 있다. 바람직하게는 사용자의 연령, 피부상태 또는 피부타입, 발효추출물의 농도에 따라 사용량, 사용횟수 및 기간을 조절할 수 있다.
- [0049] 또한, 본 발명은 패니바실러스 속 RMKS 72 균주를 이용한 발효인삼의 추출물을 함유하는 노화방지용 약학 조성물을 제공한다. 상기 노화는 피부노화인 것이 바람직하나, 이에 한정하지 않는다.
- [0050] 본 발명의 약학 조성물은, 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 및 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용될 수 있다.
- [0051] 상기 약학 조성물에 포함될 수 있는 담체, 부형제 및 희석제로는 락토즈, 텍스트로즈, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 들 수 있다. 제제화 할 경우에는 보통 사용하는 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다. 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 상기 패니바실러스 속 RMKS 72 균주를 이용한 발효인삼의 추출물에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 탄산칼슘, 수크로스 또는 락토오스, 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 또한 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트, 탈크 같은 윤활제들도 사용된다. 경구를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데 흔히 사용되는 단순 희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조제, 좌제가 포함된다. 비수성용제, 현탁제로는 프로필렌글리콜, 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텟솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다.
- [0052] 상기 패니바실러스 속 RMKS 72 균주를 이용한 발효인삼의 추출물의 투여량은 치료받을 대상의 연령, 성별, 체중, 치료할 특정 질환 또는 병리 상태, 질환 또는 병리 상태의 심각도, 투여경로 및 처방자의 판단에 따라 달라질 것이다. 이러한 인자에 기초한 투여량 결정은 당업자의 수준 내에 있으며, 일반적으로 투여량은 건조물 기준으로 0.01mg/kg/일 내지 대략 2000mg/kg/일의 범위이다. 더 바람직한 투여량은 0.1mg/kg/일 내지 500mg/kg/일이다. 투여는 하루에 한 번 투여할 수도 있고, 수 회 나누어 투여할 수도 있다. 상기 투여량은 어떠한 면으로든 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다. 본 발명의 패니바실러스 속 RMKS 72 균주를 이용한 발효인삼의 추출물은 쥐, 가축, 인간 등의 포유동물에 다양한 경로로 투여될 수 있다. 투여의 모든 방식은 예상될 수 있는데, 예를 들면, 경구, 직장 또는 정맥, 근육, 피하, 자궁내 경막 또는 뇌혈관내 주사에 의해 투여될 수 있다. 또한 본 발명의 발효인삼의 추출물은 천연물 유래이기 때문에, 독성 및 부작용은 거의 없으므로 예방 목적으로 장기간 복용시에도 안심하고 사용할 수 있는 약제이다.
- [0053] 또한, 본 발명은 패니바실러스 속 RMKS 72 균주를 이용한 발효인삼의 추출물을 함유하는 항산화 활성을 갖는 건강기능식품을 제공한다.
- [0054] 상기 건강기능식품에는 식품학적으로 허용 가능한 식품보조 첨가제가 첨가될 수 있다. 또한, 상기 건강기능식품은 정제, 캡슐제, 환제 또는 액제 등의 형태를 포함하며, 상기 건강기능식품으로는 드링크제, 육류, 소세지,

빵, 캔디류, 스낵류, 면류, 아이스크림을 포함한 낙농제품, 스프, 이온음료를 포함한 음료수, 알코올 음료 및 비타민 복합제를 포함한 영양 공급용 제품이 포함될 수 있다.

- [0055] 또한, 상기 패니바실러스 속 RMKS 72 균주를 이용한 발효인삼의 추출물은 그대로 건강기능식품으로 제품화할 수도 있고, 풍미나 향취를 높이기 위해 다양한 첨가물을 배합하여 제품화할 수 있다. 첨가물의 예로서 각종 당질, 유화제, 감미료, 산미료, 과즙 등이 있다. 구체적으로는 포도당, 서당, 과당, 봉밀 등의 당질과 솔비톨, 키실리톨, 에레스리콜, 락티톨, 파라티니드 등의 당알코올, 글리세린지방산에스테르와 같은 지방산에스테르, 레시틴 등의 유화제 등이 사용될 수 있으며, 이외에도 비타민A, 비타민B, 비타민C, 비타민E 등의 각종 비타민류나 식물 엑기스, 곡물성분, 야채성분 등도 첨가제로 사용가능하다. 한편, 상기 발효인삼의 추출물은 파우치 형태에 멸균 포장되어 복용하기 용이한 형태로서 제공될 수도 있다.

발명의 효과

- [0056] 본 발명은 신규한 패니바실러스 속 RMKS 72 균주(*Paenibacillus* sp. RMKS 72, 미생물 수탁번호 KACC92078P) 및 이를 이용한 발효인삼, 및 이 발효인삼의 추출물을 함유하는 항산화 활성을 갖는 조성물을 제공한다.
- [0057] 상기 패니바실러스 속 RMKS 72 균주는 생체 이용률이 낮은 진세노사이드 Rb1을 Rd로 전환시키는 효과가 우수하다. 또한, 이와 같은 RMKS 72 균주를 이용하여 제조한 발효인삼 또는 이의 추출물은, 활성산소종(reactive oxygen species)에 대한 소거 활성이 뛰어나, 항산화 및 노화방지용 화장품 조성물, 건강기능식품, 또는 약학 조성물로 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0058] 도 1은 패니바실러스 속 RMKS 72 균주의 16s DNA 유전자의 염기서열(상단) 및 계통학적 위치를 나타내는 서식도(하단, unknown 72이 RMKS 72임)이다.
- 도 2A는 패니바실러스 속 RMKS 72 균주 배양액에 온도별(30, 35, 40℃)로 진세노사이드 Rb1을 7일간 반응시킨 것의 TLC 분석 결과를 나타낸다.
- 도 2B는 패니바실러스 속 RMKS 72 균주 배양액에 pH별(pH 4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 8.0, 9.0)로 Rb1을 7일간 반응시킨 것의 TLC 분석 결과를 나타낸다.
- 도 2C는 패니바실러스 속 RMKS 72 균주 배양액에 pH 7.0, 35℃에서 진세노사이드 Rb1을 3~14일간 반응시킨 것의 TLC 분석 결과를 나타낸다.
- 도 2D는 패니바실러스 속 RMKS 72 균주 배양액에 pH 7.0, 35℃에서 인삼을 3~14일간 반응시킨 발효인삼의 TLC 분석 결과를 나타낸다.
- 도 3은 패니바실러스 속 RMKS 72 균주 배양액으로 pH 7.0, 35℃, 3~14일 동안 Rb1을 반응시켜 분석한 HPLC 분석 스펙트럼을 나타낸다.
- 도 4는 패니바실러스 속 RMKS 72 균주 배양액으로 pH 7.0, 35℃, 3~14일 동안 발효한 발효인삼을 분석한 HPLC 분석 스펙트럼을 나타낸다.
- 도 5는 패니바실러스 속 RMKS 72 균주를 이용한 발효인삼의 추출물의 활성산소종(reactive oxygen species) 소거활성을 측정한 결과를 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0059] 이하 본 발명의 바람직한 실시예를 상세히 설명하기로 한다. 그러나, 본 발명은 여기서 설명되는 실시예에 한정되지 않고 다른 형태로 구체화될 수도 있다. 오히려, 여기서 소개되는 내용이 철저하고 완전해지고, 당업자에게 본 발명의 사상을 충분히 전달하기 위해 제공하는 것이다.
- [0060] <실험예 1. 신규 미생물의 분리 및 동정>
- [0061] EM 배양액으로부터 BCP 한천배지(Bromo Cresol Purple-Deoxycholate-Citrate-Lactose-Sucrose agar)를 이용하여 44종류의 미생물을 분리하였다. 그 중에서 β -글루코시다아제(β -glucosidase) 활성을 가진 콜로니(colony)를 확인하기 위하여 에스컬린 한천배지(Esculin agar)에서 배양하고 검정색(β -glucosidase 활성 양성반응) 콜로니를 분리하여 16S DNA를 분석하였다.

- [0062] 상기 에스컬린 한천배지에서 분리된 균주(콜로니)는 혐기성, 그람 양성, 운동성, 유포자 간균으로서, TS 액체배지를 이용하여 배양하였을 때, 생육가능한 온도는 25~40℃, 바람직하게는 30~37℃이고, 생육가능한 pH는 5.0~8.0, 바람직하게는 pH 6.0~7.5이었다. 상기 균주의 배양에 적절한 시간은 36~96시간, 바람직하게는 48~96시간, 가장 바람직하게는 48~72시간이었다.
- [0063] 한편, 분리된 상기 균주의 DNA를 추출하여 16S DNA를 (주)솔젠트(대전)에서 분석했다. 상기 균주 DNA를 추출하고, 범용 프라이머(universal primer, 5'-GAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' 및 5'-AGAAAGGAGGTGATCCAGCC-3')를 이용하여 PCR을 행하여 16S rDNA(16S rRNA 코딩 유전자)를 증폭하였다. 증폭조건은 96℃에서 2분간 반응한 다음 96℃에서 denaturation 10초, 50℃에서 annealing 5초, 60℃에서 extension을 4분간 25회 반복하고, 60℃에서 2분간 최종 extension을 실시하였다. 증폭된 16S rDNA는 PCR 산물 정제 키트(Product Purification Kit, Qiagen)를 사용하여 정제한 후, Genetic analyzer 377(Perkin-Elmer)을 사용하여 유전 정보를 분석하였다. 16S rDNA의 염기서열에 기초한 분자계통학적 분석결과, 패니바실러스(*Paenibacillus*) 속을 포함하는 계통학적 그룹에 속하는 균주로서 패니바실러스 속 Y412MC10(*Paenibacillus* sp. Y412MC10)의 16s DNA와 1,089bp 중에서 1,059bp가 동일하여 97%의 유연관계를 나타내는 것으로 확인되었다(도 1 하단 참조). 따라서, 상기 균주는 패니바실러스 속 균주(*Paenibacillus* sp)로 동정되었고, 패니바실러스 속 RMKS 72 균주(*Paenibacillus* sp. RMKS 72)로 명명하여 국립농업과학원 농업유전자원센터에 2015년 06월 05일 미생물 수탁번호 KACC92078P로 기탁하였다.
- [0064] <실험예 2. 패니바실러스 속 RMKS 72 균주를 이용한 진세노사이드 전환 효과 확인>
- [0065] 실험예 2-1. 균주 배양액의 준비
- [0066] 상기 패니바실러스 속 RMKS 72 균주는 TS 액체배지(trypticase soy broth, pH 7.3)에서 배양온도 30℃에서 24시간 동안 배양하였다. 배양 후 7,500rpm에서 15분 원심분리하여, 상기 원심분리된 상층액(상층액, 균주 pellet 제외한 액상)을 배양액으로 이용하여, 진세노사이드를 전환하였다.
- [0067] 실험예 2-2. 진세노사이드 전환을 위한 조건 확인
- [0068] 진세노사이드의 전환을 위한 조건을 확인하기 위해서는 상기 원심분리된 배양액과 진세노사이드 0.2mg/ml의 Rb1을 1:1(v/v)의 비율로 혼합하고, 0.2μm 필터로 여과하였다. 여과한 시료를 진탕배양기(shaking incubator)에서 35℃, 190rpm으로 3, 7, 10, 14일 발효시켰다.
- [0069] pH의 영향은 배양액을 pH 4, 5, 6, 7, 8, 9로 조정하여 0.2mg/ml Rb1을 1:1 비율로 혼합해서 0.2μm 필터로 여과하고, 이 후 30, 35, 40℃에 7일 반응시켰다. 온도의 영향은 배양액을 pH 4, 5, 6, 7, 8, 9으로 맞추고 0.2mg/ml Rb1과 1:1 비율로 혼합해서 0.2μm 필터로 여과한 다음, 시료를 30, 35, 40℃로 7일 반응시켰다.
- [0070] 실험예 2-3. TLC 및 HPLC를 이용한 Rb1의 전환 결과 확인
- [0071] 반응이 끝난 시료는 TLC 및 HPLC를 이용하여 진세노사이드 Rb1의 전환을 분석하였다.
- [0072] TLC 분석을 위해서는, TLC plate sheet(Silica gel 60 F₂₅₄, Aluminium sheets)에 0.8cm 간격으로 각각 3μg을 집적한 후, 반응기 내에 정치하고 하층 반응액으로 클로로포름/메탄올/물(65/35/10, v/v/v)을 사용하여 5.5cm 전개하였다. 반응시킨 TLC plate에 10% 황산(H₂SO₄)을 분무하여 110℃에서 가열하여 발색시켰다. 상기 TLC 분석 결과는 도 2에 나타내었다.
- [0073] HPLC 분석을 위해, 사용한 장치는 Agilent Technologies 1260 infinity 이었으며, 컬럼은 ACE 5-C₁₈ 컬럼(250×4.6mm)을 사용하였고, 사포닌의 성분을 분석한 조건은 하기 표 1과 같다.

표 1

사포닌의 성분 분석 조건 -Agilent Technologies 1260 infinity	
컬럼	ACE 5-C ₁₈ (250×4.6mm)
유량 (Flow rate)	1.0ml/min
디텍터 (Detector)	UV detector, 205nm

용매(Solvent)	A; H ₂ O, B; CH ₃ CN 0~35분(20% B), 35~85분(40% B), 85~105분(50% B), 105~135분(65% B), 135~145분(85% B), 145~155분(100% B), 155~160분(100% B), 160~163분(20% B), 163~165분(20% B)
온도	40℃

[0075] 도 2A를 참고하면, 패니바실러스 속 RMKS 72 배양액으로 진세노사이드 Rb1을 30, 35, 40℃의 조건에서 7일 동안 반응시킨 결과, 대부분의 진세노사이드 Rb1이 거의 진세노사이드 Rd로 변화 되었고, 온도가 증가할수록 남아 있는 진세노사이드 Rb1의 밴드가 조금 연한 것으로 확인되었다. 따라서 패니바실러스 속 RMKS 72 배양액의 활성은 35~40℃에서 가장 높은 것임을 알 수 있었다.

[0076] 한편, 사전 예비실험을 통해, 25℃에서는 5~10%의 진세노사이드가 변환되는 것으로 확인되었으며, 20℃ 이하, 및 45℃ 이상에서는 진세노사이드의 변환이 거의 되지 않는 것으로 확인되었다.

[0077] 도 2B를 참고하면, 진세노사이드의 전환에 효과적인 패니바실러스 속 RMKS 72 배양액의 최적 반응 pH를 알아보기 위해서 pH 4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 8.0, 9.0로 조절하여 진세노사이드 Rb1을 35℃에서 7일 동안 반응시킨 결과, pH 4.0은 거의 진세노사이드의 변환이 되지 않았고, pH 5.0, 8.0, 9.0보다 pH 6.0과 7.0에서 진세노사이드 Rb1이 Rd로의 전환이 잘 되었다. 따라서 패니바실러스 속 RMKS 72 배양액이 작용하기 위한 최적 pH는 6.0~7.0으로 확인되었다.

[0078] 한편, 사전 예비실험을 통해, pH 10.0에서도 거의 진세노사이드의 변환이 되지 않는 것으로 확인되었다.

[0079] 또한, 도 2C에는, 패니바실러스 속 RMKS 72 배양액을 도 2A 및 2B에서 확인된 최적 온도 35℃, 최적 pH 7.0으로 조절하여 진세노사이드 Rb1을 14일 동안 반응시킨 결과를 나타내었다. 도 2C의 TLC 결과를 보면, 3, 7, 10, 14일로 반응기간이 길어질수록 진세노사이드 Rb1에서 Rd로의 전환이 시간에 따라 확연하게 증가하는 것을 확인할 수 있었다. 특히, 14일째는 진세노사이드 Rb1이 Rd로 대부분 전환된 것으로 나타나, 패니바실러스 속 RMKS 72는 진세노사이드 Rb1을 진세노사이드 Rd로 전환하는 효과가 매우 우수한 것으로 확인되었다.

[0080] 또한, 패니바실러스 속 RMKS 72 배양액을 도 2A 및 2B에서 확인된 최적 온도 35℃, 최적 pH 7.0로 조절하여 인삼뿌리를 14일 동안 반응시킨 결과는 도 2D에 나타내었다. 도 2D의 TLC 결과를 보면, 3, 7, 10, 14일로 반응기간이 길어질수록 진세노사이드 Rb1에서 Rd로의 전환이 시간에 따라 확연하게 증가하는 것을 확인할 수 있었다. 14일째는 인삼내의 진세노사이드 Rb1이 Rd로 대부분 전환된 것으로 나타나, 패니바실러스 속 RMKS 72는 진세노사이드 Rb1을 진세노사이드 Rd로 전환하는 효과가 매우 우수한 것으로 확인되었다.

[0081] 아울러, 도 3을 참고하면, 패니바실러스 속 RMKS 72 배양액을 35℃, pH 7.0으로 조절하여 진세노사이드 Rb1을 14일 동안 반응시킨 후 확인한 HPLC 결과는, TLC 결과와 유사한 패턴을 갖는 것으로 확인되었다. 0일째는 진세노사이드 Rb1 peak가 보였고, 반응 3일째는 진세노사이드 Rb1에서 진세노사이드 Rd가 생성되는 것을 확인할 수 있었으며, 반응 7일, 및 14일이 경과하면서 진세노사이드 Rb1의 peak는 점점 줄어드는 반면에 진세노사이드 Rd의 peak가 점점 커지는 것을 확인할 수 있었다.

[0082] <실시에 및 비교예: 발효인삼, 및 발효인삼 추출물의 제조>

[0083] <실시에 1. 패니바실러스 속 RMKS 72 균주 배양액을 이용한 발효인삼의 제조>

[0084] 5년근 인삼뿌리를 분쇄기를 이용하여 분쇄하고, 상기 분쇄된 인삼 100g에 물 400g을 첨가하였다. 물이 첨가된 상기 인삼 분쇄물을 75℃로 10분간 중탕으로 가열처리하고 30℃로 냉각시킨 후, 패니바실러스 속 RMKS 72 균주 배양액(TS 액체배지에서 30℃ 조건으로 72시간 배양) 15g을 접종하고 14일째까지 발효시켰다. 상기 패니바실러스 속 RMKS 72 균주 배양액은 진세노사이드 변환 실험(실험예 2)과 달리, 원심분리하지 않고, 배양 직후의 배양 물을 바로 사용하였다.

[0085] <실시에 2. 패니바실러스 속 RMKS 72 균주 배양액을 이용한 발효인삼 물 추출물의 제조>

[0086] 상기 실시예 1에서 제조한 14일째의 발효인삼을 수분 14%가 되도록 건조한 후, 물 10kg에 상기 발효인삼 건조물 1kg을 넣고 90℃에서 8시간 동안 추출한 후, 고형분을 제거한 여액을 동결건조하여 발효인삼 물 추출물을 제조하였다.

[0087] <실시에 3. 패니바실러스 속 RMKS 72 균주 배양액을 이용한 발효인삼 100% 에탄올 추출물의 제조>

[0088] 상기 실시예 1에서 제조한 14일째의 발효인삼을 수분 14%가 되도록 건조하고, 100% 에탄올 4kg에 상기 발효인삼 건조물 1kg을 넣고 50℃에서 8시간 동안 추출한 후, 고형분을 제거한 여액을 감압증류하여 발효인삼 100% 에탄올 추출물을 제조하였다.

[0089] <비교예 1. 패니바실러스 속 MBT213 균주 배양액을 이용한 발효인삼의 제조 >

[0090] 상기 실시예 1과 동일한 방법을 이용하여 발효인삼을 제조하되, 패니바실러스 속 RMKS 72 균주 배양액 대신에 한국등록특허 제1345226호에 개시된 패니바실러스 MBT213 균주 배양액(TS 액체배지에서 30℃ 조건으로 72시간 배양)을 사용하는 것만을 달리하여, 인삼을 14일 동안 발효하였다

[0091] <비교예 2. 패니바실러스 속 MBT213 균주 배양액을 이용한 발효인삼 추출물의 제조>

[0092] 위 비교예 1에서 제조한 14일째의 발효인삼을 수분 14%가 되도록 건조한 후, 100% 에탄올 4kg에 상기 발효인삼 건조물 1kg을 넣고 50℃에서 8시간 동안 추출한 후, 고형분을 제거한 여액을 감압증류하여 MBT213 균주에 의한 발효인삼 100% 에탄올 추출물을 제조하였다.

[0093] <실험예 3. 발효인삼의 진세노사이드 전환 효과 확인>

[0094] 패니바실러스 속 RMKS 72 균주 배양액을 이용한 발효인삼(실시예 1)에 대한 HPLC 분석을 위해서, 상기 동일 인삼 분쇄물에 균주 배양액을 접종한 후 3, 7, 14일째에 각각의 발효일자의 발효인삼을 취하여 에탄올 처리를 하였다. 이 때, 각각의 발효인삼과 95% 에탄올 수용액을 1:4 중량비(총 20g)로 혼합한 후에 10,000×g에서 10분 원심분리한 후 상층액을 동결건조시켰다. 이 후, 상기 동결건조된 샘플을 증류수에 녹이고 부탄올 처리를 하였다. 부탄올 처리할 때도, 상기 물에 녹인 샘플과 수포화 부탄올은 1:1(v:v) 비율로 혼합(총 2mℓ)하고, 부탄올 층을 추출 및 동결건조하여 최종적으로 얻은 샘플을 HPLC로 진세노사이드 Rb1에서 Rd로의 전환을 분석하였으며 이에 대한 결과는 도 4에 나타내었다. HPLC는 상기 실험예 2-3의 진세노사이드 전환 실험과 동일하게 하여 분석하였다.

[0095] 도 4의 HPLC 결과를 참고하면, 0일에는 진세노사이드 Rb1의 peak(71분째의 peak)가 보였지만, 진세노사이드 Rd의 peak는 약하게 나타났(81분째의 peak). 그러나 발효기간이 지남에 따라 진세노사이드 Rd가 생성되면서, 발효 14일째는 진세노사이드 Rb1의 peak는 줄어들었고, 진세노사이드 Rd의 peak는 크게 나타난 것으로 확인되었다.

[0096] 한편, 패니바실러스 속 MBT213 균주 배양액을 이용한 비교예 1의 발효인삼에 대해, 위 실시예 1에 대한 HPLC 분석 방법과 동일하게 HPLC 분석하여, 발효후 Rd에 대한 함량을 하기 표 2에 나타내었다. 표 2를 참고하면, 실시예 1의 발효인삼의 경우가, 비교예 1의 발효인삼에 비하여, 진세노사이드 Rb1에서 Rd로의 전환율이 2배 정도로 훨씬 높은 것으로 확인되었다.

표 2

구분	Peak No.	Ret Time[min]	Type	Area[mAU*s]	Amount [mg/ml]
실시예 1의 발효인삼	8	82.015	VV	3068.44238	0.123406
비교예 1의 발효인삼	8	81.735	VV	2000.27380	0.070014

[0098] <실험예 4. 발효인삼 추출물의 활성산소종(Reactive Oxygen Species, ROS) 제거능 평가(DCF-DA assay)>

[0099] 2'7'-Dichlorofluorescein diacetate (DCF-DA) assay는 시험물질을 처리한 다음 실리카(silica)로 자극한 세포 내에서 생성되는 활성산소의 양을 공시료액과 비교하여 활성산소 제거능을 평가하는 목적으로 사용되는 시험방법이다.

[0100] 먼저, 24시간 배양한 Raw 264.7 세포를 PBS로 1회 세척 후, 세포를 수확하였다. 해당 세포를 15mℓ PBS로 현탁후, 15μℓ의 20mM DCF-DA 용액(Sigma-Aldrich)을 첨가하고 1시간 동안 반응시켰다. 1200×g으로 2분간 원심분리한 후 PBS로 1회 세척하여 1×10^5 cells/ml로 희석한 다음, 각 시험군 및 양성대조군 시료를 처리하고 10분간 반응시켰다. 이때, 각 처리 농도는, 시험군으로서 실시예 2의 발효인삼 물추출물, 실시예 3의 발효인삼 에탄올추출물, 및 비교예 2의 발효인삼 에탄올추출물은 각각 200mg/ml이고, 양성대조군 1로서 아스코르브산(ascorbic acid)은 100μg/ml, 양성대조군 2로서 N-acetyl-L-cysteine은 1mM이었다. 그 후 20mg/ml의 실리카를 50μℓ 처리하여 1시간 동안 추가 반응시켰다. 6000×g으로 5분간 원심분리하여 얻은 세포 펠렛(pellet)을 200μℓ PBS로 분산시킨 후 96-well plate에 접종하였다. 그 후 fluorescence microplate reader (Bio-Rad)를 이용하여

485nm excitation/ 535nm emission에서 형광도를 측정하여 ROS level를 결정하였다. 결과 값은 세 번의 독립적 실험으로부터 평균값 $\pm$ 표준편차로 나타내었다. $P<0.05$ 는 Student's t-test를 통해 검증하였으며, 결과값의 유의성을 나타낸다.

[0101] 각 시료의 활성산소종 제거능에 대한 평가는 Raw 264.7 세포에 silica와 시료물질을 동시에 처리하여, 나타나는 활성산소 양을 ROS에 결합능을 가지는 DCF 형광물질의 발광력을 측정하여 검증하였다.

표 3

[0102]

시료	DCF 형광물질의 상대적 발광력(%)
음성대조군 1	100%
음성대조군 2(silica 처리군)	183.6%
실시에 2의 발효인삼 물추출물	137.7%
실시에 3의 발효인삼 에탄올추출물	144.7%
비교예 2의 발효인삼 에탄올추출물	177.4%
양성대조군 1(ascorbic acid)	130.2%
양성대조군 2(N-acetyl-L-cysteine)	111.5%

[0103] 도 5, 및 표 3에 나타낸 바와 같이, 음성대조군 1(실리카 처리하지 않은 군)과, 음성대조군 2(실리카 처리군; 세포 내 활성산소 유도)의 비교시, 실리카에 의해서 세포 내 활성산소종의 양이 80% 이상으로 증가함을 확인하였다. 또한, 이렇게 증가된 활성산소종은, 실시에 2 및 실시에 3의 발효인삼 추출물을 처리하는 경우, 각각 45.9% 및 38.9%로 감소되는 효과가 있음을 확인하였다. 한편, 비교예 2와 같이, 패니바실러스속의 다른 종 균주를 이용한 비교예 2의 추출물의 활성산소종 제거능은 본 발명의 추출물에 비해 감소 효과가 낮은 점이 확인되었다.

[0104] <실험예 5. 독성 및 피부자극 확인 실험>

[0105] 실험예 5-1. 급성 독성

[0106] 본 발명의 패니바실러스 속 RMKS 72 배양액을 이용한 발효인삼의 추출물(실시에 2의 물 추출물의 동결건조물)을 단기간에 과량을 섭취하였을 때 급성적(24시간 이내)으로 동물체내에 미치는 독성을 조사하고, 치사율을 결정하기 위하여 본 실험을 수행하였다. 일반적인 마우스인 ICR 마우스 계통 20마리를 대조군과 실험군에 각각 10마리씩 배정하였다. 대조군에는 PEG-400/tween-80/에탄올(8/1/1, v/v/v)만을 투여하고, 실험군은 본 발명의 패니바실러스 속 RMKS 72 배양액을 이용한 발효인삼의 추출물을 상기 PEG-400/tween-80/에탄올(8/1/1, v/v/v)에 녹여 각각 경구투여하였다. 투여 24시간 후에 각각의 치사율을 조사한 결과, 대조군과 2g/kg/day 농도의 패니바실러스 속 RMKS 72 배양액을 이용한 발효인삼의 추출물을 투여한 실험군에서 마우스가 모두 생존하는 것으로 확인되었다.

[0107] 실험예 5-2. 인체피부자극 확인 실험

[0108] 본 발명의 패니바실러스 속 RMKS 72 배양액을 이용한 발효인삼의 추출물(실시에 2의 물 추출물의 동결건조물)을 함유하는, 하기 제제에 1-3의 크림을 10명의 자원자를 대상으로 첩포검사를 시행하였으며, 모두 아무런 피부 자극 반응이 없었던 것으로 나타났다.

[0109] <제제예 1. 화장료의 제조>

[0110] 1-1. 유연 화장수의 제조

[0111] 상기 실시에 2에 따른 패니바실러스 속 RMKS 72 배양액을 이용한 발효인삼 추출물(물 추출물의 동결건조물)을 이용하여, 하기 표 4에 기재된 조성에 따라 통상의 방법으로 유연 화장수를 제조하였다.

표 4

[0112]

원료명	함량(중량%)
실시에 2의 발효인삼 추출물	4.0
부틸렌글리콜	3.5
글리세린	2.5
폴리옥시에틸렌 경화 피마자유	0.1
에탄올	2.5

베타인	1.0
구연산	0.01
구연산나트륨	0.03
방부제	적량
향료	적량
정제수	to 100

[0113] 1-2. 영양 에센스의 제조

[0114] 실시예 2의 발효인삼 추출물을 이용하여, 하기 표 5에 기재된 조성에 따라 통상의 방법으로 영양 에센스를 제조하였다.

표 5

원료명	함량(중량%)
실시예 2의 발효인삼 추출물	7.0
세토스테아릴알코올	1.0
자기유화형모노스테아린산	1.0
밀납	0.5
스쿠알란	5.0
이소세틸옥타노에이트	3.0
디메틸실록산	0.3
모노스테아린산소르비탄	0.5
모노스테아린산폴리에틸렌글리콜	8.0
글리세린	4.0
프로필렌글리콜	0.2
카르복시폴리머	0.22
트리에탄올아민	0.25
방부제	적량
향료	적량
착색료	적량
정제수	to 100

[0116] 1-3. 크림의 제조

[0117] 실시예 2의 발효인삼 추출물을 이용하여, 하기 표 6에 기재된 조성에 따라 통상의 방법으로 크림을 제조하였다.

표 6

원료명	중량%(w/w)
실시예 2의 발효인삼 추출물	7.0
세토스테아릴알코올	3.0
자기유화형모노스테아린산	1.5
친유형모노스테아린산	1.5
밀납	0.5
유동파라핀	8.0
스쿠알란	7.0
이소세틸옥타노에이트	4.0
정제호호바유	4.0
디메틸실록산	0.3
모노스테아린산소르비탄	1.0
모노스테아린산폴리에틸렌글리콜	1.2
글리세린	6.0
프로필렌글리콜	4.0
베타인	4.0
산탄검	0.06
트리에탄올아민	0.10
방부제	0.25

향료	적량
착색료	적량
정제수	to 100

[0119] 1-4. 팩의 제조

[0120] 실시예 2의 발효인삼 추출물을 이용하여, 하기 표 7에 기재된 조성에 따라 통상의 방법으로 팩을 제조하였다.

표 7

원료명	함량(중량%)
실시예 2의 발효인삼 추출물	8.0
글리세린	7.0
1,3-부틸렌글리콜	3.0
스쿠알렌	3.0
디메치콘	3.0
소듐하이루로네이트	0.1
글리신	2.0
폴리아크릴아마이드	5.0
트리에탄올아민	0.1
EDTA	0.1
정제수	to 100

[0122] <제제예 2. 약학적 제제>

[0123] 2-1. 친수성 연고제의 제조

[0124] 실시예 2의 발효인삼 추출물을 이용하여, 하기 표 8에 기재된 조성에 따라 통상의 방법으로 친수성 연고제를 제조하였다.

표 8

원료명	함량(중량%)
실시예 2의 발효인삼 추출물	8.0
백색 바세린	35.0
스테아릴 알콜	30.0
에칠(또는 메칠)p-옥시벤조에이트	미량
프로필렌글리콜	20.0
라우릴 황산 나트륨	3.4
프로필 p-옥시벤조에이트	미량

[0126] 2-2. 정제의 제조

[0127] 실시예 2의 발효인삼 추출물을 이용하여, 하기 표 9에 기재된 성분을 혼합한 후, 통상의 정제 제조방법에 따라 서 타정하여 정제를 제조하였다.

표 9

원료명	중량(mg)
실시예 2의 발효인삼 추출물	100mg
옥수수전분	100mg
유당	100mg
스테아린산 마그네슘	2mg

[0129] <제제예 3. 식품 제조>

[0130] 3-1. 조리용 양념의 제조

- [0131] 실시예 2의 발효인삼 추출물을 조리용 양념에 1 중량%로 첨가하여 건강 증진용 조리용 양념을 제조하였다.
- [0132] **3-2. 밀가루 식품의 제조**
- [0133] 실시예 2의 발효인삼 추출물을 밀가루에 0.1 중량%로 첨가하고, 이 혼합물을 이용하여 빵, 케이크, 쿠키, 크래커 및 면류를 제조하여 건강 증진용 식품을 제조하였다.
- [0134] **3-3. 스프 및 육즙(gravies)의 제조**
- [0135] 실시예 2의 발효인삼 추출물을 스프 및 육즙에 0.1 중량%로 첨가하여 건강 증진용 스프 및 육즙을 제조하였다.
- [0136] **3-4. 유제품(dairy products)의 제조**
- [0137] 실시예 2의 발효인삼 추출물을 우유에 0.1 중량%로 첨가하고, 상기 우유를 이용하여 버터 및 아이스크림과 같은 다양한 유제품을 제조하였다.
- [0138] **3-5. 야채주스 제조**
- [0139] 실시예 2의 발효인삼 추출물 0.5g을 토마토주스 또는 당근주스 1,000㎖에 가하여 건강 증진용 야채주스를 제조하였다.
- [0140] **3-6. 과일주스 제조**
- [0141] 실시예 2의 발효인삼 추출물 0.1g을 사과주스 또는 포도주스 1,000㎖에 가하여 건강 증진용 과일주스를 제조하였다.

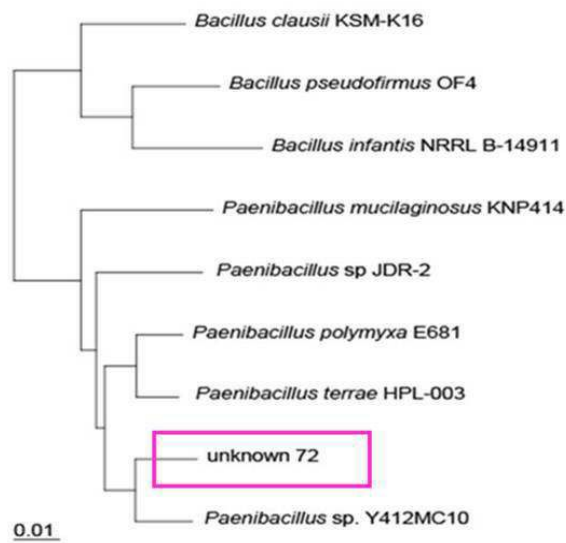
수탁번호

- [0142]
- 기탁기관명 : 국립농업과학원
- 수탁번호 : KACC92078P
- 수탁일자 : 20150605

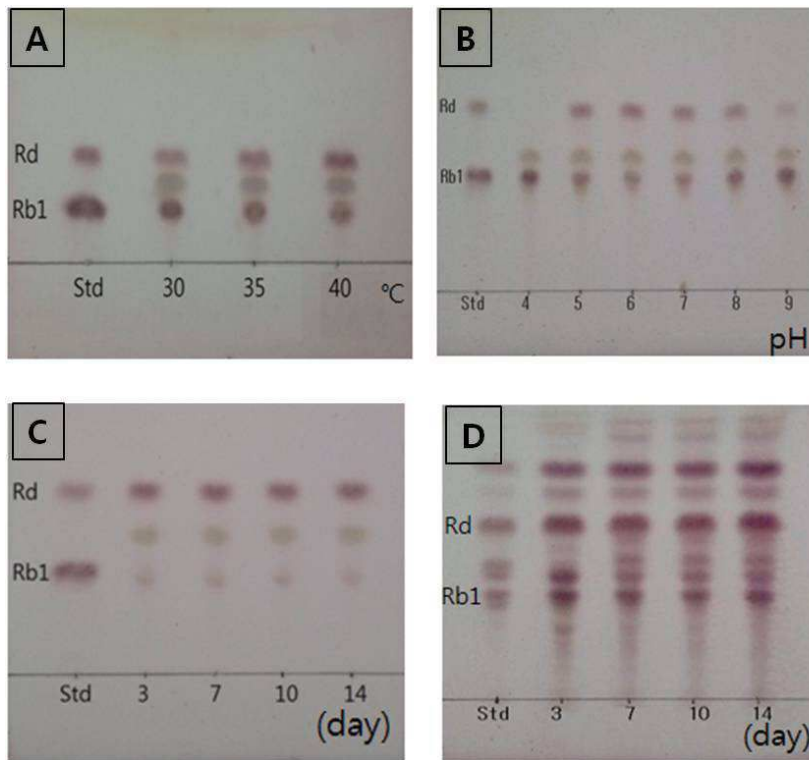
도면

도면1

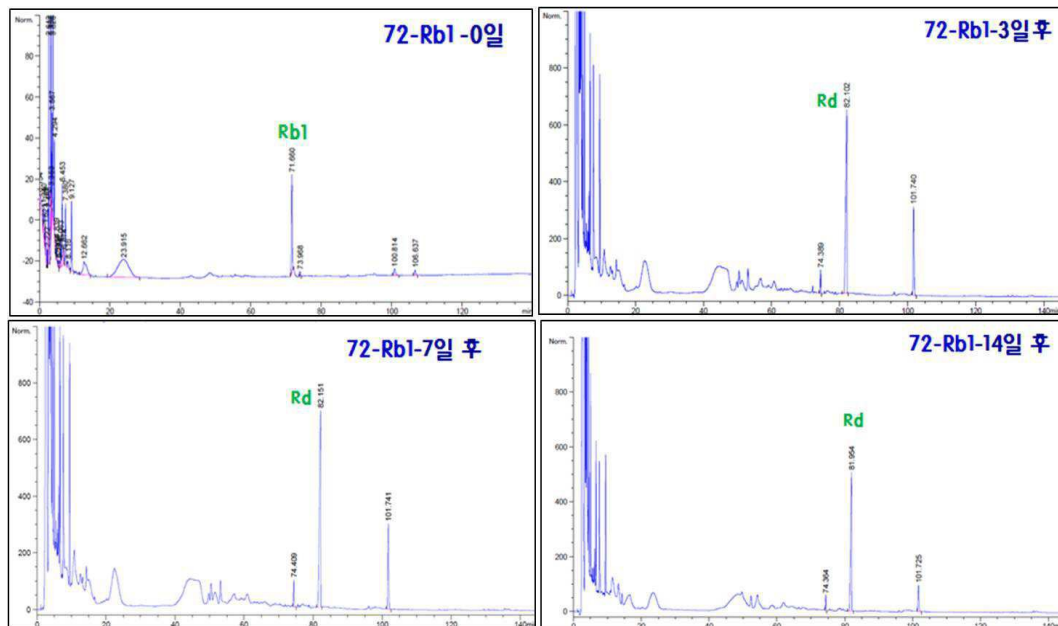
1 ACAATTCTCC CACTTCGGCG GCTGGCTCCC TTGCGGGTTA CCCCACCGAC TTCGGGTGTT GTAAACTCTC
 71 GTGGTGTGAC GGGCGGTGTG TACAAGACCC GGGAACTGAT TCACCGCGGC ATGCTGATCC GCGATTACTA
 141 GCAATTCCGA CTTCATGCAG GCGGGTTGCA GCCTGCAATC CGAACTGAGA CCAGCTTTGA TAGGATTGGC
 211 TCCATCTCGC GACTTCGCTT CCCGTTGTAC TGGCCATTGT AGTACGTGTG TAGCCCAAGT CATAAGGGGC
 281 ATGATGATTG GACGTCATCC CCGCCTTCTT CCGGTTTGTG ACCGGCAGTC ATTCTAGAGT GCCCACCCGA
 351 AGTGCTGGCA ACTAAAATCA AGGGTTGCGC TCGTTGCGGG ACTTAACCA ACATCTCACG ACACGAGCTG
 421 ACGACAACCA TGCACCACCT GTCACCTCTG TCCCGAAGGC CGCCTCTATC TCTAGAGGAT TCAGAGGGAT
 491 GTCAAGACTT GGTAAGGTTC TTCGCGTTGC TTCGAATTAA ACCACATACT CCACTGCTTG TCGGGGTCCC
 561 CGTCAATTCC TTIGAGTTTC AGTCTTGCGA CCGTACTCCC CAGGCGGAAT GCTTAATGTG TTAACCTCGG
 631 CACCAAGGGT ATCGAAACCC CTAACACCTA GCATTTCATG TTTACGGCGT GGACTACCAG GGTATCTAAT
 701 CCTGTTTGTG CCCCACGCTT TCGCGCCTCA GCGTCAGTTA CAGCCCAGAG AGTCGCCCTC GCCACTGGTG
 771 TTCTCCACA TATCTACGCA TTTCACGCT ACACGTGGAA TTCCACTCTC CTCTTCTGCA CTCAAGTCAC
 841 CCAGTTTCCA GTGCGAACCA AGGTTGAGCC TTGGCCTTAA ACACCAGACT TAAGTGACCG CTGCGCGCGG
 911 CTTTACGCC AATAATTCCG GACAACGCTT GCCCCCTACG TATTACCGCG GCTGCTGGCA CGTAGTTAGC
 981 CGGGGCTTTC TTCTCAGTA CCGTCACTCC GGTAGCAGIT ACTTACCAG ACGTCTTCCC TGGCAACAGA
 1051 GCTTTACGAT CCGGAAACCT TCATCACTCA CGCGGCGTTG CTCCGGTC



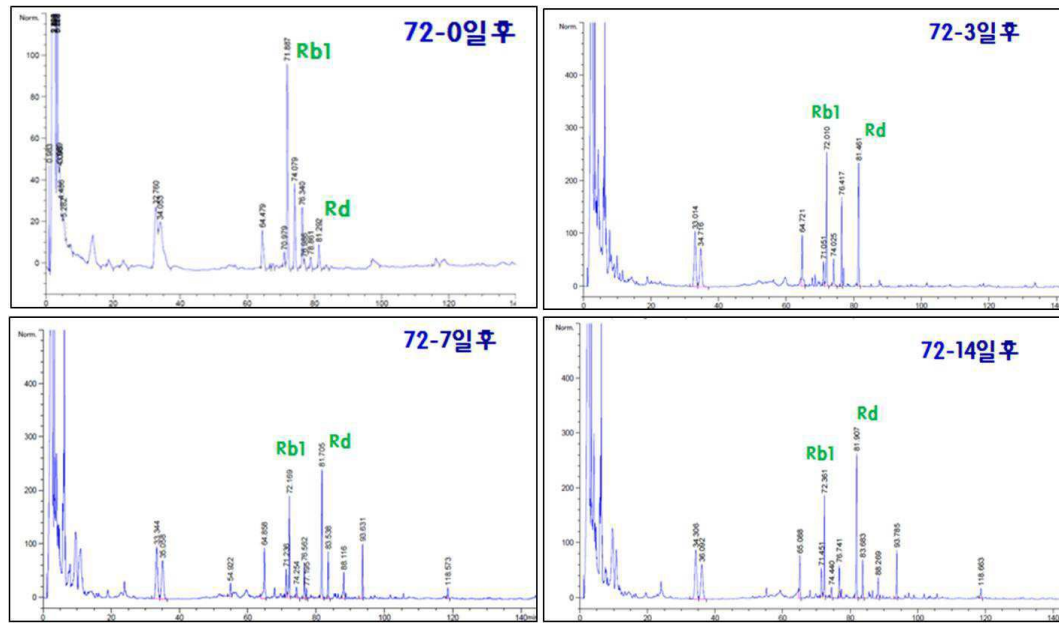
도면2



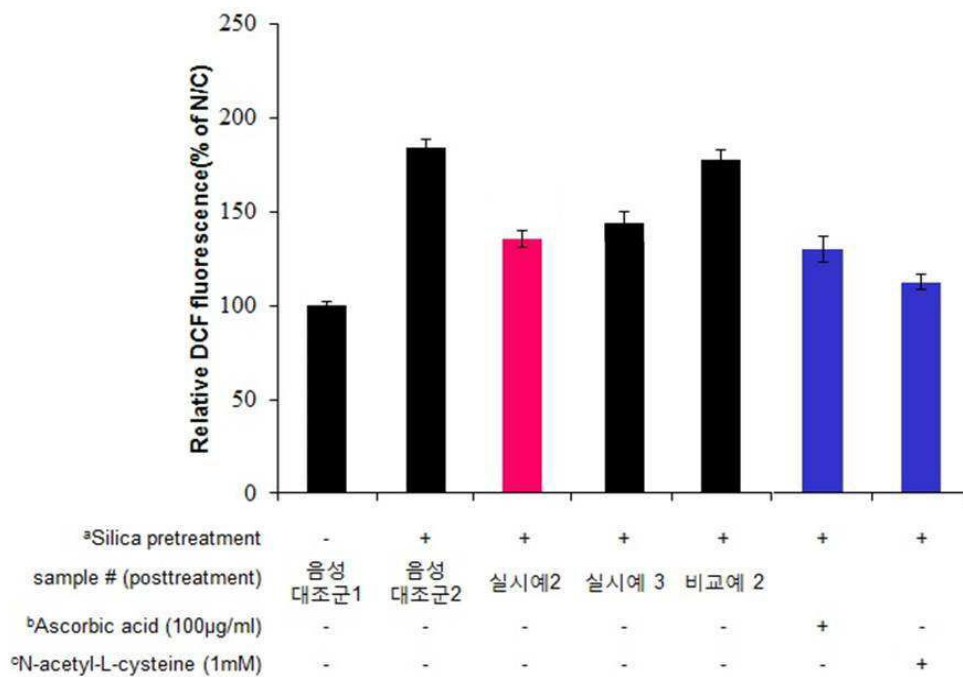
도면3



도면4



도면5



서열 목록

- <110> THE INDUSTRY & ACADEMIC COOPERATION IN CHUNGNAM NATIONAL UNIVERSITY
- <120> Novel Paenibacillus sp. RMKS 72, fermented ginseng using the same and composition having anti-oxidant activity comprising extract of fermented ginseng using the same
- <130> DPC-15-0051
- <160> 1

<170> KoPatent In 3.0

<210> 1

<211> 1098

<212> DNA

<213> Paenibacillus sp.

<400> 1

acaattctcc cacttcggcg gctggctccc ttgcgggtta cccaccgac ttcgggtgtt 60

gtaaactctc gtggtgtgac gggcgggtgtg tacaagacc gggaacgtat tcaccgcggc 120

atgctgatcc gcgattacta gcaattccga cttcatgcag gcgggttgca gcctgcaatc 180

cgaactgaga ccagctttga taggattggc tccatctcgc gacttcgctt cccgttgtac 240

tggccattgt agtacgtgtg tagcccaagt cataaggggc atgatgattt gacgtcatcc 300

ccgccttctt ccggtttgtc accggcagtc attctagagt gcccaccga agtgctggca 360

actaaaaatc agggttgcgc tcgttgcggg acttaacca acatctcacg acacgagctg 420

acgacaacca tgcaccacct gtcacctctg tcccgaagge cgctctatc tctagaggat 480

tcagagggat gtcaagactt ggtaagggtt ttcgcgttgc ttcgaattaa accacatact 540

ccactgcttg tgcgggtccc cgteaattcc tttgagtctc agtcttgca cgtactccc 600

caggcggat gcttaatgtg ttaacttcgg caccaagggt atcgaaacc ctaacaccta 660

gcattcatcg tttacggcgt ggactaccag ggtatctaata cctgtttgct cccacgctt 720

tcgcgcctca gcgtcagtta cagcccagag agtcgccttc gccactgggtg ttcctccaca 780

tatctacgca tttcaccgct acacgtggaa ttccactctc ctcttctgca ctcaagtcac 840

ccagtttcca gtgcgaacca aggttgagcc ttggccttaa acaccagact taagtaccg 900

cctgcgcgcg ctttacgccc aataattccg gacaacgctt gcccctacg tattaccgcg 960

gctgctggca cgtagttagc cggggctttc ttctcaggta ccgtcactcc ggtagcagtt 1020

actctaccgg acgtcttccc tggcaacaga gctttacgat ccggaacct tcactactca 1080

cgcggcgttg ctccggtc 1098