



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0005661
(43) 공개일자 2022년01월14일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A23L 29/00 (2016.01) A23L 19/00 (2022.01)
A23L 33/10 (2022.01) A61K 8/9789 (2017.01)
C12N 1/20 (2006.01) C12R 1/24 (2006.01)
C12R 1/25 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A23L 29/065 (2016.08)
A23L 19/00 (2022.01)

(21) 출원번호 10-2020-0082608

(22) 출원일자 2020년07월06일

심사청구일자 2020년07월06일

(71) 출원인

경상국립대학교산학협력단

경상남도 진주시 진주대로 501 (가좌동)

(72) 발명자

조계만

경상남도 진주시 진주대로 829번길 21, 103동
2501호

장경진

경상남도 진주시 순환로553번길 7 한보하이타운
1308호

정성훈

경상남도 남해군 남해읍 망운로10번가길 27

(74) 대리인

조영신

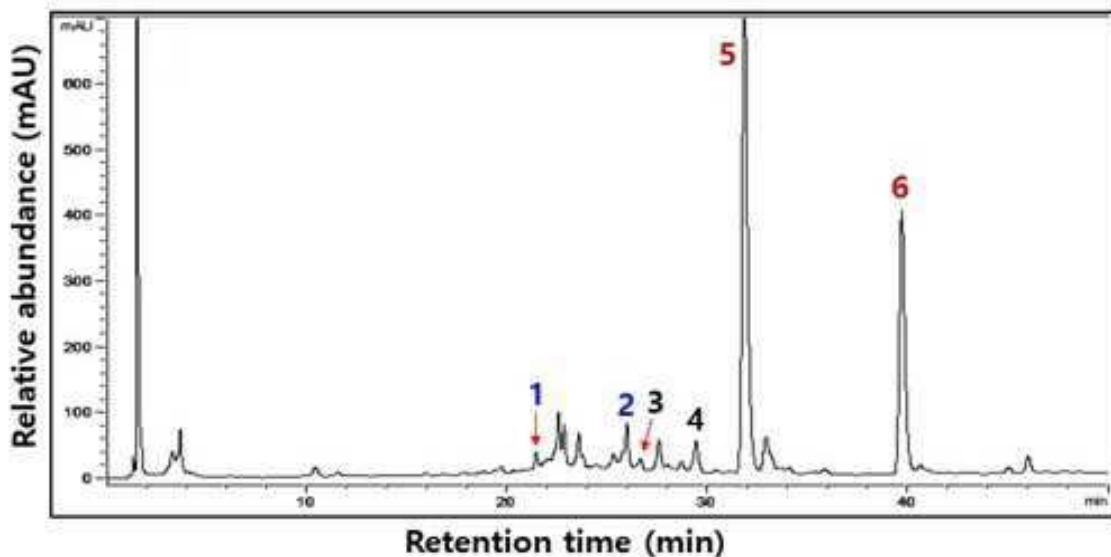
전체 청구항 수 : 총 8 항

(54) 발명의 명칭 비배당체 이소플라본, 올레산 및 니아신이 증진된 파바톤 콩잎 복합발효 조성물 및 그 제조방법

(57) 요약

본 발명에서는 비배당체 이소플라본, 올레산 및 니아신이 증진된 파바톤 콩잎 복합발효 조성물 및 그 제조방법이 제공된다. 본 발명에 따른 파바톤 콩잎 복합발효 조성물은 비배당체 이소플라본, 올레산 및 니아신의 함량이 고 함량으로 함유되어 기능성식품 및 화장품의 소재로 사용될 수 있다. 또한 본 발명에 따른 기능성식품 또는 화장품은 비배당체 이소플라본, 올레산 및 니아신의 함량이 높으며, 더불어 우수한 항산화 활성, 알파-글루코시다아제 저해활성 및 췌장-리파아제 저해활성을 가져서, 지방생성 억제효과, 체중 조절, 콜레스테롤 저하, 고지혈증 개선, 동맥경화 완화, 당뇨병 개선, 비만 개선, 혈액순환 개선, 면역력 개선, 여성 갱년기 증후군 개선용으로 유용하다.

대표도 - 도1e



(52) CPC특허분류

A23L 33/10 (2022.01)
A61K 8/9789 (2017.08)
C12N 1/20 (2021.05)
A23V 2002/00 (2013.01)
A23V 2200/328 (2013.01)
A23V 2200/332 (2013.01)
A23V 2250/188 (2013.01)
A23V 2250/2116 (2013.01)
A23V 2250/7046 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	S2666938
부처명	중소벤처기업부
과제관리(전문)기관명	중소기업기술정보진흥원
연구사업명	산학협력기술개발사업(연구마을)
연구과제명	고 이소플라본 함유 파마톤 콩잎 기반 숙취해소 및 예방 제품개발
기 여 율	1/2
과제수행기관명	농업회사법인 주식회사 제이씨엔팜
연구기간	2018.11.01 ~ 2020.10.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	2016R1D1A1B01009898
부처명	교육부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	기본연구지원사업(6년~8년)
연구과제명	폐경-비만 모델 이용 복합생균제 발효물의 식이에 따른 갱년기, 대사질환 개선 및 장내미생물과의 상관성
기 여 율	1/2
과제수행기관명	경남과학기술대학교 산학협력단
연구기간	2016.06.01 ~ 2023.05.31

명세서

청구범위

청구항 1

파바톤 콩잎을 수탁번호 KACC 92156P로 기탁된 락토바실러스 브레비스 BMK184 균주와 수탁번호 KACC91848P로 기탁된 락토바실러스 플란타륨 P1201 균주로 복합발효하여 제조된, 비배당체 이소플라본, 올레산 및 니아신이 증진된 파바톤 콩잎 복합발효 조성물.

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 조성물은 비배당체 이소플라본을 5,121 $\mu\text{g/g}$ 이상, 올레산을 113 mg/100g 이상, 및 니아신을 130 mg/100g 이상 함유하는 것을 특징으로 하는, 비배당체 이소플라본, 올레산 및 니아신이 증진된 파바톤 콩잎 복합발효 조성물.

청구항 3

제 1항에 있어서, 상기 비배당체 이소플라본은 다이드제인 및 제니스테인인 것을 특징으로 하는, 비배당체 이소플라본, 올레산 및 니아신이 증진된 파바톤 콩잎 복합발효 조성물.

청구항 4

제 3항에 있어서, 상기 조성물은 다이드제인 3,735 $\mu\text{g/g}$ 이상 및 제니스테인 1386 $\mu\text{g/g}$ 이상 함유하는 것을 특징으로 하는, 비배당체 이소플라본, 올레산 및 니아신이 증진된 파바톤 콩잎 복합발효 조성물.

청구항 5

비배당체 이소플라본, 올레산 및 니아신이 증진된 파바톤 콩잎 복합발효 조성물의 제조방법으로, 상기 방법은

- i) 파바톤 콩잎 100 중량부에 당원 1~5 중량부를 첨가하고, 물을 파바톤 콩잎의 3~5배(v/w)으로 혼합하여 살균하는 단계; 및
- ii) KACC 92156P로 기탁된 락토바실러스 브레비스 BMK184 균주와 수탁번호 KACC91848P로 기탁된 락토바실러스 플란타륨 P1201 균주의 복합 종균을 3~10%(v/w) 농도로 접종하여 25~40℃에서 2~5일간으로 발효하는 단계를 포함하는 것인 방법.

청구항 6

제 4항에 있어서, 상기 조성물은 비배당체 이소플라본을 5,121 $\mu\text{g/g}$ 이상, 올레산을 113 mg/100g 이상, 및 니아신을 130 mg/100g 이상 함유하는 것을 특징으로 하는 비배당체 이소플라본, 올레산 및 니아신이 증진된 파바톤 콩잎 복합발효 조성물의 제조방법.

청구항 7

제 1항에 따른 파바톤 콩잎 복합발효 조성물을 포함하는 당뇨 개선 및 비만 개선용 기능성식품.

청구항 8

제 1항에 따른 파바톤 콩잎 복합발효 조성물을 포함하는 화장품.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 비배당체 이소플라본, 올레산 및 니아신이 증진된 파바톤 콩잎 복합발효 조성물 및 그 제조방법에 관한 것으로, 더 상세하게는 파바톤 콩잎을 락토바실러스 브레비스 BMK184 균주와 락토바실러스 플란타륨 P1201 균주로 복합발효하여 제조된, 비배당체 이소플라본, 올레산 및 니아신이 현저히 증진된 파바톤 콩잎 복합발효 조성물 및 그 제조방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 콩잎에는 콩의 대표적인 기능성 성분인 이소플라본이 함유되어 있고, 콩잎의 생육단계에 따라 당가수분해효소 저해활성이 차이가 나며, 비만, 당뇨 등의 기능성식품 개발에 우수한 소재로 활용이 가능할 것으로 제시되고 있다 (Yuk et al., 2011, Food Chem.).

[0004] 최근 분자농법 기술을 이용하여 이소플라본 유도체 고함량 콩잎(파바톤 콩잎) 재배기술이 개발되었으나 (특허등록 10-1451298호), 이 콩잎의 이소플라본은 배당체 이소플라본인 β -글리코사이드와 말로닐- β -글리코사이드가 약 98%를 차지하고 생리활성이 우수한 비배당체 이소플라본은 약 2% 이하 정도만 존재하여 기능성식품으로 활용 면에서 충분하지 않은 실정이다.

[0005] 이소플라본은 베타-글리코시드가 연결된 배당체 형태 또는 당이 떨어져 나간 비배당체 형태로 존재한다. 비배당체 이소플라본(aglycon isoflavone)으로는 제니스테인(genistein), 다이드제인(daidzein) 및 글리시테인(glycitein) 등이 있으며, 배당체 이소플라본으로는 제니스틴(genistin), 다이드진(daidzin) 및 글리시틴(glycitin) 등이 있다. 특히 다양한 생리활성은 아글리콘 형태의 비배당체 이소플라본에 기인한다고 보고되고 있다. 비배당체 이소플라본 중에서 제니스테인(genistein)은 항산화활성 뿐만 아니라 유방암 및 전립선암 등에 효과적이며 다이드제인(daidzein)은 폐경기 여성의 골다공증에 효과적인 것으로 알려져 있다. 식품의약품안전처는 이소플라본을 건강기능식품 고시형 원료로서 폐경기 이후 뼈 건강에 도움을 줄 수 있으며 일일 섭취권장량으로 비배당체 이소플라본 유도체 총합으로 약 24 ~ 27 mg을 제시하고 있다.

[0006] 올레산은 불포화지방산으로 혈압 강하 및 유방암 발병 감소 활성을 갖고, 근육손실 예방효과가 있는 것으로 알려져 있고 (특허 10-178597호), 니아신(비타민 B3)은 지방산과 탄수화물 그리고 아미노산의 분해 및 생합성 과정에 직접적으로 관여할 뿐만 아니라 에너지의 효율적인 이용에 중요한 역할을 담당하며 피부장벽을 튼튼히 해주며, 세라마이드의 합성을 촉진시키기 때문에 표피의 수분손실을 감소시켜 피부노화도 지연시킨다고 알려져 있고, 식후 혈당상승을 억제하고, 피부 미백효과가 있다고 알려져 있다 (특허 10-2043461호).

[0007] 그러나 비배당체 이소플라본과 더불어 올레산 및 니아신이 현저히 증진된 파바톤 콩잎 가공품은 개발된바 없다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009] 이에 본 발명자들은 종래 기술의 요구에 부응하기 위한 연구를 지속한 결과, 파바톤 콩잎을 락토바실러스 브레비스 BMK184 균주와 락토바실러스 플란타륨 P1201 균주로 복합발효한 경우, 비배당체 이소플라본, 올레산 및 니아신의 함량이 현저히 증진됨을 확인하고 본 발명을 완성하게 되었다.

[0010] 따라서 본 발명의 목적은 비배당체 이소플라본, 올레산 및 니아신이 증진된 파바톤 콩잎 복합발효 조성물을 제공하는 것이다.

[0011] 본 발명의 또 다른 목적은 비배당체 이소플라본, 올레산 및 니아신이 증진된 파바톤 콩잎 복합발효 조성물의 제조방법을 제공하는 것이다.

- [0012] 본 발명의 또 다른 목적은 본 발명의 파바톤 콩잎 복합발효 조성물을 포함하는 기능성식품을 제공하는 것이다.
- [0013] 본 발명의 또 다른 목적은 본 발명의 파바톤 콩잎 복합발효 조성물을 포함하는 화장품을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0015] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 파바톤 콩잎을 락토바실러스 브레비스 BMK184 균주와 락토바실러스 플란타룸 P1201 균주로 복합발효하여 제조된, 비배당체 이소플라본, 올레산 및 니아신이 증진된 파바톤 콩잎 복합발효 조성물을 제공한다.
- [0016] 본 발명에서 파바톤 콩잎은 재배 전·후에 콩잎에 식물생장호르몬인 에틸렌(ethylene), 에틸렌 공여체(에세폰) 또는 에틸렌 발생제를 처리하여 이소플라본 유도체를 고함량으로 함유하는 콩잎을 의미한다.
- [0017] 파바톤 콩잎은 통상적으로 약 5,000 $\mu\text{g/g}$ 이상의 이소플라본 유도체를 함유하며, 상업적으로 입수할 수 있다.
- [0018] 본 발명에서 복합발효는 파바톤 콩잎을 락토바실러스 브레비스 BMK184 균주와 락토바실러스 플란타룸 P1201 균주의 복합 종균으로 발효하는 것을 의미한다.
- [0019] 본 발명에서 복합종균을 구성하는 하나의 균주인 락토바실러스 브레비스 BMK184 균주는 본 발명자들이 여주 물김치로부터 분리/동정한 신규한 균주로, 우수한 가바(GABA)의 생산성을 구비하였고, 국립농업과학원 농업유전자원센터(KACC)에 2016년 12월 12일에 기탁하여, 수탁번호 KACC 92156P를 부여받았다 (특허출원 10-2017-0068747호).
- [0020] 본 발명에서 복합종균을 구성하는 또 다른 하나의 균주인 락토바실러스 플란타룸 P1201 균주는 본 발명자들이 발효식품으로부터 분리/동정하여 국립농업과학원 농업유전자원센터(KACC)에 2013년 7월 19일에 기탁한 균주(수탁번호 KACC91848P)로서, 생균제제능이 우수하고 생리활성물질 생산성이 우수한 특성을 갖는다 (등록특허 10-154418호).
- [0021] 본 발명의 복합종균을 구성하는 락토바실러스 브레비스 BMK184 균주와 락토바실러스 플란타룸 P1201 균주는 발효 특성이 상호 보완되어 상승작용을 나타낸다. 락토바실러스 브레비스 BMK184 균주는 이형유산발효(hetero-lactic acid fermentation) 유산균으로 단독 발효시 유산 생성이 충분하지 않고, 락토바실러스 플란타룸 P1201 균주는 동형유산발효(homo-lactic acid fermentation) 유산균으로 단독 발효시 유산이 과다하게 생성되는데, 놀랍게도 파바톤 콩잎을 이들 두 가지 종균을 함께 사용하여 복합발효시 양 균주의 발효 특성이 상호 보완되고 비배당체 이소플라본인 다이드제인 및 제니스테인과 생리활성성분인 올레산과 니아신(B3)의 생성이 현저히 증진되었다 (표 1 ~ 표 3).
- [0022] 본 발명에서 복합종균은 락토바실러스 브레비스 BMK184 균주와 락토바실러스 플란타룸 P1201 균주 각각 별도의 배양액으로서 첨가될 수도 있으며, 혼합 배양된 혼합 배양액으로서 첨가될 수도 있다.
- [0023] 복합종균에서 상기 2종의 균주의 혼합 비율은 3 : 1~ 1 : 3(v/v)으로 혼합될 수 있다.
- [0024] 발효는 상기 복합종균의 배양액을 파바톤 콩잎에 3~10%(v/w) 농도로 접종하여 25~40℃에서 2~5일간 발효시키는 것으로 수행될 수 있다.
- [0025] 복합종균 접종량이 3%(v/w) 미만일 경우에는 발효 속도가 지연될 수 있고 10%(v/w) 초과시에는 균체 증식 속도가 빨라 전환율이 낮으며 신맛이 등이 과다할 수 있으며, 발효 온도가 25℃ 미만일 경우 발효기간이 길어져 잡균의 오염을 초래하고 40℃를 초과할 경우에는 균주의 생육이 정지될 수 있고, 발효 기간이 2일 미만일 경우 발효가 충분하지 않아 생리활성물질 등의 생성이 저조하게 될 수 있으며, 5일을 초과한 경우는 과발효에 의해 생리활성물질이 분해될 수 있다.
- [0026] 본 발명에 따른 파바톤 콩잎 복합발효 조성물은 비배당체 이소플라본을 5,121 $\mu\text{g/g}$ 이상 (다이드제인 3,735 $\mu\text{g/g}$ 이상, 제니스테인 1386 $\mu\text{g/g}$ 이상), 올레산을 113 mg/100g 이상, 및 니아신을 130 mg/100g 이상 함유한다 (표 1~표 3).
- [0027] 본 발명에 따른 파바톤 콩잎 복합발효 조성물은 비배당체 이소플라본의 함량은 신선한 파바톤 콩잎(비교예 3)에 비하여 약 13배 이상, 발효 전(비교예 4)에 비하여도 2.3배 이상 증진된다. 또한 단독 균주로 발효한 파바톤 콩잎 복합발효 조성물인 비교예 1 및 비교예 2에 비하여도 각각 약 2.9배 이상 및 약 1.7배 이상 증진된다 (표 1,

도 1a~도 1e).

- [0028] 본 발명에 따른 파바톤 콩잎 복합발효 조성물의 올레산의 함량은 신선한 파바톤 콩잎(비교예 3) 및 발효 전(비교예 4)에 비하여 각각 약 2.1배 및 약 1.7배 증진되고 (표 2), 니아신의 함량은 신선한 파바톤 콩잎(비교예 3) 및 발효 전(비교예 4)에 비하여 각각 약 6.8배 및 약 1.9배 증진된다 (표 3).
- [0029] 또한 본 발명에 따른 파바톤 콩잎 복합 발효조성물은 비배당체 이소플라본, 올레산, 니아신, 페놀산 및 플라보놀 등의 생리활성물의 함량이 강화되어, 증진된 항산화 활성을 갖는다 (도 4a~도 4d).
- [0030] 또한 본 발명에 따른 파바톤 콩잎 복합 발효조성물은 알파-글루코시다아제 저해활성과 췌장-리파아제 저해활성이 증진되어 우수한 당뇨 개선 및 비만 개선 효과를 갖는다 (도 5 및 도 6).
- [0031] 본 발명의 또 다른 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 파바톤 콩잎을 락토바실러스 브레비스 BMK184 균주와 락토바실러스 플란타룸 P1201 균주의 복합종균으로 발효하여 비배당체 이소플라본, 올레산 및 니아신이 증진된 파바톤 콩잎 복합발효 조성물의 제조방법을 제공한다.
- [0032] 본 발명의 제조방법에서, 파바톤 콩잎 및 복합종균은 상기에서 정의된 바와 같다.
- [0033] 파바톤 콩잎은 수확하여 세척한 후 바로 착즙하여 사용하거나 또는 건조하여 분말화한 것을 사용할 수 있다.
- [0034] 원활한 발효를 위하여 파바톤 콩잎에 당원과 물을 첨가하여 발효할 수 있다. 당원은 파바톤 콩잎 100 중량부에 1~5 중량부로 첨가될 수 있다. 물은 파바톤 콩잎의 3~5배(v/w)으로 첨가하는 것이 바람직하다. 필요에 따라서, 파바톤 콩잎, 당원 및 물의 혼합물은 접종 전에 살균할 수 있다. 살균은 통상의 방법에 따라 수행할 수 있으며, 바람직하게는 121℃에서 15분 살균한다.
- [0035] 본 발명의 또 다른 목적에 따라서, 본 발명은 상기 제조방법에 의해 제조된 비배당체 이소플라본, 올레산 및 니아신이 증진된 파바톤 콩잎 복합발효 조성물을 포함하는 기능성식품을 제공한다.
- [0036] 본 발명에 따른 기능성 식품은 우수한 항산화 활성, 당뇨 개선 및 비만 개선 효과를 갖는다 (도 4a~도 6).
- [0037] 본 발명의 또 다른 목적에 따라서, 상기 비배당체 이소플라본, 올레산 및 니아신이 증진된 파바톤 콩잎 복합발효 조성물을 포함하는化粧품을 제공한다.
- [0038] 본 발명의 식품 또는化粧품은 본 발명의 파바톤 콩잎 복합발효 조성물을 또는 이의 추출물을 그대로 첨가하거나 다른 식품 성분과 혼합되어 제조될 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 제조될 수 있다.
- [0039] 본 발명에서 상기 식품의 종류는 특별히 제한되지 않으며, 콩잎제품 (환제, 정제제, 캡슐제 등), 발효차, 발효식품 (김치류, 피클류 등), 발효음료 (파우치제, 드링크제 등) 등일 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다.化粧품의 종류는 마스크팩, 스킨, 로션, 크림 등일 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다.

발명의 효과

- [0041] 본 발명에 따른 파바톤 콩잎 복합발효 조성물은 비배당체 이소플라본, 올레산 및 니아신의 함량이 고함량으로 함유되어 기능성식품 및化粧품의 소재로 사용될 수 있다.
- [0042] 또한 본 발명에 따른 기능성식품 또는化粧품은 비배당체 이소플라본, 올레산 및 니아신의 함량이 높으며, 더불어 우수한 항산화 활성, 알파-글루코시다아제 저해활성 및 췌장-리파아제 저해활성을 가져서, 지방생성 억제효과, 체중 조절, 콜레스테롤 저하, 고지혈증 개선, 동맥경화 완화, 당뇨병 개선, 비만 개선, 혈액순환 개선, 면역력 개선, 여성 갱년기 증후군 개선용으로 유용하다.

도면의 간단한 설명

- [0044] 도 1은 파바톤 콩잎 조성물의 이소플라본 함량의 HPLC 크로마토그램을 나타낸 것이다. 도 1a는 비교예 1 조성물의 HPLC 크로마토그램이고, 도 1b는 비교예 2 조성물의 HPLC 크로마토그램이고, 도 1c는 비교예 3 조성물의 HPLC 크로마토그램이고, 도 1d는 비교예 4 조성물의 HPLC 크로마토그램이고, 도 1e는 실시예 1의 파바톤 콩잎 복합발효 조성물의 HPLC 크로마토그램이다.

도 2은 본 발명에 따른 파바톤 콩잎 복합발효 조성물의 총 페놀릭스 함량을 나타낸 것이다.

도 3은 본 발명에 따른 파바톤 콩잎 복합발효 조성물의 총 플라보노이드 함량을 나타낸 것이다.

도 4는 본 발명에 따른 파바톤 콩잎 복합발효 조성물의 항산화 활성을 나타내 것이다. 도 4a는 DPPH 라디칼 소거활성을 나타낸 것이다, 도 4b는 ABTS 라디칼 소거활성, 도 4c는 하이드록실 라디칼 소거활성, 및 도 4d는 환원력(FRAP)을 나타낸 것이다.

도 5는 본 발명에 따른 파바톤 콩잎 복합발효 조성물의 알파-글루코시다아제 저해활성을 나타낸 것이다.

도 6은 본 발명에 따른 파바톤 콩잎 복합발효 조성물의 췌장-리파아제 저해활성을 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0045] 다음의 실시예들에 의해 본 발명이 더 상세히 설명된다. 이들 실시예는 본 발명을 예시하기 위한 것이며, 본 발명의 범위가 이들에 의해 제한되어서는 안된다.

[0046] 제조예 : 파바톤 콩잎 복합발효 조성물의 제조

[0047] 파바톤 콩잎은 2018년 8월경 남해군 일대에서 재배된 것을 농업회사법인 주식회사 제이씨엔팜으로부터 건조된 상태로 공급받아 사용하였다.

[0048] 파바톤 콩잎 200 g에 설탕 4 g과 정제수 1000 ml을 첨가하여 혼합한 뒤 121℃에서 15분 살균하였고 상온으로 냉각한 발효 베이스 4개를 준비한 후, 발효 베이스 하나에는 락토바실러스 플란타룸 P1201 균주 및 락토바실러스 브레비스 BMK184 균주를 맥아엑기스 액체배지에서 종균으로 배양하며 1:1 비율로 혼합한 복합종균을 5%(v/v)로 접종하고 37℃에서 3일간 발효시켜 파바톤 콩잎 복합발효 조성물 (실시예 1)을 제조하였다. 비교를 위하여, 발효 베이스 2개에는 각각 락토바실러스 플란타룸 P1201 균주 단독 종균 5% (v/v)을 접종하거나(비교예 1), 락토바실러스 브레비스 BMK184 균주 단독 종균 5% (v/v)을 접종하여(비교예 2) 상기와 동일한 방식으로 발효하여 비교예 1의 파바톤 콩잎 발효조성물 및 비교예 2의 파바톤 콩잎 발효조성물을 제조하였다. 나머지 1개의 발효 베이스는 종균 접종없이 동일 조건에서 3일을 유지하였다 (발효 전; 비교예 4). 신선한 파바톤 콩잎(원료)을 비교예 3으로 준비하였다.

[0050] 참고예: 분석시료 준비

[0051] 제조예에서 준비된 파바톤 콩잎 복합발효 조성물(실시예 1), 파바톤 콩잎 발효조성물 (비교예 1, 비교예 2), 신선한 파바톤 콩잎 (비교예 3), 발효 전 파바톤 콩잎 (비교예 4) 각각 1g 에 80% 발효주정 30 ml을 첨가한 후 상온에서 12시간 추출한 후, 추출물을 30분간 원심분리하여 상등액만을 0.45 μ m 여과필터 (Dismic-25CS, Toyoroshikaisha, Ltd, Tokyo, Japan)로 여과하여 얻은 여과액 시료를 준비하였다.

[0053] 시험예 1: 이소플라본 함량 분석

[0054] 이소플라본 함량 분석은 Cho 등(2011)의 방법에 준하여 HPLC 크로마토그램을 이용하여 분석하였다. 구체적으로는 참고예에서 준비한 각각의 여과액 시료를 사용하였고, 분석 컬럼은 Lichrophore 100 RP C18 column(4.6×250 mm, 5 μ m, Merck, Germany)을 사용하였다. 이동상 용매는 0.2% 수중 글라시알 아세트산(glacial acetic acid in water; solution A)와 100% 아세토니트릴 중의 글라시알 아세트산 (glacial acetic acid in acetonitrile; solution B)로 분석하였고, 이때 이동상의 조건은 A 용매 기준으로 0분-100%, 15분-90%, 25분-80%, 30분-75%, 45분-65% 및 50분-65%로 분석하였다. 시료는 20 μ l를 주입하였고 이동상의 속도는 30℃에서 1 ml/min로 유지하였다. 이소플라본은 diode array UV detector(Agilent1200 series, Agilent사, USA)의 흡광도 254 nm에서 정량하여 표준품의 검량곡선과 비교하여 함량을 계산하였다. 각각의 결과를 도 1a ~ 도 1e 및 표 1에 나타냈다.

표 1

함량(μ g/g)	비교예 1	비교예 2	비교예 3	비교예 4	실시예 1
다이드제인[5]	1460.02±87.6	2008.11±120.4	270.02±13.5	1705.71±85.2	3735.10±186.7
제니스테인[6]	316.55±18.9	1055.27±63.3	121.18±6.0	565.71±28.2	1386.01±69.3

합계	1776.57	3063.38	391.2	2271.41	5121.12
----	---------	---------	-------	---------	---------

[0056] 도 1a ~ 도 1e의 크로마토그램에서 확인되는 바와 같이, 각각의 파바톤 콩잎 조성물에서 공통적으로 6종류의 이소플라본 유도체, 즉 배당체인 다이드진(daidzin [1]), 제니스틴(genistin[2]), 말로닐다이드진(malonyldaidzin[3]), 말로닐제니스틴(malonylgenistin[4]), 비배당체인 다이드제인(daidzein[5]) 및 제니스테인(genistein[6]))가 검출되었다. 비교예 3 및 비교예 4에서 검출된 주요 유도체로는 배당체 이소플라본(피크 1~4)이 높은 함량으로 측정되었으나, 실시예 1의 파바톤 콩잎 복합발효 조성물에서는 비배당체 이소플라본인 다이드제인(daidzein) 및 제니스테인(genistein) (피크 5 및 6)이 크게 증가하였음을 확인할 수 있다. 또한 실시예 1은 단독 균주로 발효한 파바톤 콩잎 복합발효 조성물인 비교예 1 및 비교예 2에 비하여도 비배당체 이소플라본인 다이드제인 및 제니스테인이 현저히 증가하였음을 확인할 수 있다.

[0057] 상기 표 1에 나타난 바와 같이, 실시예 1의 파바톤 콩잎 복합발효 조성물 은 비배당체 이소플라본의 함량은 5121.12 $\mu\text{g/g}$ (다이드제인은 3735.10 $\mu\text{g/g}$, 제니스테인은 1386.01 $\mu\text{g/g}$)으로 나타나, 가공되지 않은 신선한 파바톤 콩잎인 비교예 3 (391.2 $\mu\text{g/g}$)에 비하여 약 13배 증진되었고, 비교예 4 (2271.41 $\mu\text{g/g}$)에 비하여도 2.3배 증진되었다. 또한 실시예 1의 파바톤 콩잎 복합발효 조성물의 비배당체 이소플라본의 함량은 단독 균주로 발효한 파바톤 콩잎 복합발효 조성물인 비교예 1(1776.57 $\mu\text{g/g}$) 및 비교예 2(3063.38 $\mu\text{g/g}$)에 비하여도 각각 약 2.9배 및 약 1.7배 증진되었다.

[0058] 또한 실시예 1은 배당체 전환율 (배당체→비배당체)이 약 90%이었다.

[0059] 따라서 락토바실러스 브레비스 BMK184 균주와 락토바실러스 플란타룸 P1201 균주로 복합발효된 본 발명에 따른 파바톤 콩잎 조성물은 비배당체 이소플라본(다이드제인과 제니스테인)의 함량이 현저히 강화됨을 알 수 있다.

[0061] 시험예 2: 올레산 함량 분석

[0062] 올레산 분석은 Cho 등(2017)이 보고한 지방산 분석방법에 따라 수행하였다. 제조예에서 준비된 실시예 1, 비교예 3 및 비교예 4의 조성물 각각 1 g을 시험관에 정확히 칭량하고 여기에 0.5 N 메탄올성 NaOH 3 mL를 첨가하여 100℃에서 10분간 열처리하여 지방산과 글리세롤 가수분해 과정을 수행하였다. 이후 삼불화붕소(BF_3) 2 mL를 추가적으로 첨가하고 교반한 후 30분간 다시 열처리하여 지방산의 메틸에스테르화를 진행하였다. 메틸에스테르화 반응 종료 후 이소옥탄 1 mL를 첨가하고 격렬히 혼합 및 방치시켜 이소옥탄층만을 회수하여 무수황산나트륨과 함께 탈수한 뒤 0.45 μm -막 필터로 여과하여 GC로 분석하였다. 이동상은 질소 가스를 사용하였으며 이동상의 속도는 1 ml/min으로 유지하였다. 오븐 온도는 최초 140℃까지 상승시켜 5분간 유지 후, 180℃까지 1분당 20℃만큼 상승시켜 2분간 유지하였고 230℃까지 5℃만큼 상승시키고 최종 35분간 유지하였다. Injector와 FID detector 온도는 각각 220℃와 240℃로 하였다. 분석결과를 표 2에 나타냈다.

표 2

함량(mg/100 g))	비교예 3	비교예 4	실시예 1
Oleic acid (C18:1n9c)	53.4±2.67	66.3±3.32	113.1±5.66

[0064] 불포화 지방산인 올레산의 함량은 비교예 3이 53.4 mg/100g, 비교예 4가 66.3 mg/100g 및 실시예 1이 113.1 mg/100g으로 나타나, 실시예 1의 파바톤 콩잎 복합발효 조성물의 올레산의 함량은 비교예 1 및 비교예 2에 비하여도 각각 약 2.1배 및 약 1.7배 증진되었음을 확인할 수 있다.

[0066] 시험예 3: 니아신 함량 분석

[0067] 니아신 분석은 Joo 등(2018)의 수용성 비타민 분석 방법에 준하여 측정하였다. 제조예에서 준비된 실시예 1, 비교예 3 및 비교예 4의 조성물 각각 20 g을 회화용기에 취하여 탄화시킨 후 550~600℃의 온도에서 여러 시간 가열하여 백색~회백색의 회분이 얻어질 때까지 회화하였다. 이 회분을 방냉 후 주의하여 물로 적신 후 염산 용액 약 10 ml를 가해 수용상에서 완전 증발 건조시켰다. 이 건조물에 염산용액 약 8~10 ml를 가해 수분 가열후 100 ml 메스플라스크에 여과했다. 불용물은 여과지와 같이 사용했던 회화 용기에 옮겨 건조한 후 다시 회화했다. 이

회분을 물로 적시어 염산 용액 약 2 ml를 가하고 물을 약 5 ml로 희석한 후 수욕상에서 가온하고, 여과한 액을 앞의 100 ml 메스플라스크에 채워 물을 가하여 100 ml로 하여 시험용액으로 하여 분석하였고, 분석결과를 표 3에 나타냈다.

표 3

[0068]

함량(mg/100 g))	비교예 3	비교예 4	실시에 1
B3 (Niacin)	19.0±0.95	70.1±3.51	130.6±6.53

[0069]

표 3에 나타낸 바와 같이, 니아신(비타민 B3)의 함량은, 파바톤 콩잎 원료인 비교예 3은 19.0 mg/100 g, 발효 전인 비교예 4는 70.1 mg/100 g 및 복합발효 조성물인 실시예 1은 130.6 mg/100 g으로 나타나, 실시예 1의 니아신 함량은 비교예 3 및 비교예 4에 비하여 각각 약 6.8배 및 약 1.9배 증진되었음을 확인할 수 있다.

[0071]

시험예 4. 생리활성성분 함량 분석

[0072]

항산화 활성 등을 나타내는 생리활성성분인 총 페놀릭스, 총 플라보노이드스 함량을 분석하였다.

[0073]

<총 페놀릭스 함량>

[0074]

총 페놀릭스 함량은 Folin Denis법(1912)으로 측정하였다.

[0075]

구체적으로는 참조예에서 준비된 실시예 1, 비교예 3 및 비교예 4의 분석시료를 시험관에 0.5 ml 분주하고 여기에 25% Na₂CO₃ 용액 0.5 ml를 첨가하여 3분간 정치시켰다. 다시 2N Folin-Ciocalteu 페놀 시약 0.25 ml를 첨가하여 혼합한 다음 30℃에서 1시간 동안 정치시킨 후 750 nm에서 분광광도계(Spectronic 2D, Thermo Co., California, CL, USA)를 사용하여 흡광도를 측정하였다. 이때 총 페놀릭스 함량은 갈산(Gallic acid)을 이용하여 작성한 표준곡선으로부터 함량을 구하여 갈산에 상당하는 양으로 계산하였고 그 결과를 도 2에 나타냈다.

[0076]

도 2에 나타낸 바와 같이, 총 페놀릭스 함량은 파바톤 콩잎 원료인 비교예 3에서 8.38 GAE mg/g, 발효 전의 비교예 4에서 8.44 GAE mg/g 및 파바톤 콩잎 복합발효 조성물인 실시예 1에서 9.37 GAE mg/g로 나타나, 본 발명에 따른 조성물은 총 페놀릭스 함량이 증진됨을 확인할 수 있다.

[0077]

<총 플라보노이드스 함량>

[0078]

총 플라보노이드스 함량은 Davis 변법으로 측정하였다.

[0079]

구체적으로는 참조예에서 준비된 실시예 1, 비교예 3 및 비교예 4 시료 0.5 ml에 디에틸렌글리콜 1.0 ml를 분주한 후 1 N NaOH 0.01 ml를 첨가한 후 하여 37℃ 항온수조에서 1시간 방치 후 420 nm에서 분광광도계로 흡광도를 측정하였다. 이때 총 플라보노이드스 함량은 루틴(rutin)의 최종 농도를 0, 0.25, 0.5, 1.0 mg/ml로 제조하여 작성한 표준곡선으로부터 함량을 구하였고 그 결과는 도 3에 나타내었다.

[0080]

도 3에 나타낸 바와 같이, 총 플라보노이드스 함량도, 비교예 3의 경우 14.37 RE/g의 함량을 보였으며 비교예 4에서 15.90 RE/g의 함량을 보였으나 실시예 1에서는 18.35 RE/g으로 함량이 크게 증가하는 것을 확인할 수 있다.

[0082]

시험예 5. 항산화 활성 분석

[0083]

본 발명에 따른 활성산양삼 조성물의 항산화 활성은 DPPH 라디칼 소거활성, ABTS 라디칼 소거활성, 하이드록실 라디칼 소거활성 및 FRAP 환원력을 측정하여 분석하였다.

[0084]

<분석시료>

[0085]

시험예 2에서 준비된 각각의 추출물 시료를 60℃에서 감압농축 및 동결건조 후, 0.25, 0.5, 1 mg/ml 농도로 제조하여 분석시료로 사용하였다.

[0086]

<DPPH 라디칼 소거활성>

[0087]

DPPH 라디칼 소거활성은 Hwang 등(2014)의 방법을 변형하여 측정하였다. 상기에서 준비된 시료 (0.25, 0.5, 1

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

[0088] 라디칼 소거활성(%) = $[1 - (\text{음성대조구 흡광도} \div \text{실험구 흡광도})] \times 100$

[0089] 도 4a에 나타난 바와 같이, DPPH 라디칼 소거활성은 0.5 mg/ml의 농도에서 각각 비교예 3의 경우 48.73%, 비교예 4의 경우 49.12% 및 실시예 1의 경우 60.25%의 활성을 보여 실시예 1의 파바톤 콩잎 복합발효 조성물이 가장 높은 활성을 보였다.

[0090] <ABTS 라디칼 소거활성>

[0091] ABTS 라디칼 소거 활성도 Hwang 등(2014)의 방법에 준하여 측정하였다. 7 mM ABTS⁺와 2.45 mM K₂S₂O₈를 1:1 비율로 섞어 암실에서 12~16시간 반응시킨 후 메탄올과 1:88 비율로 섞어 732 nm에서 대조구의 흡광도 값이 0.7 ± 0.02 가 되도록 조절한 ABTS⁺ 용액을 사용하였다. 적당히 희석된 여과액 0.1 ml와 ABTS⁺ 용액 0.9 ml를 첨가하여 혼합한 후 3분간 정치 후 즉시 732 nm에서 분광광도계를 사용하여 흡광도를 측정하였다. 음성대조구 실험은 시료 대신에 추출용매를 취하여 진행하였으며 실험구와 음성 대조구의 흡광도를 구하여 상기 식에 의해 백분율(%)로 산출하여 그 결과를 도 4b에 나타냈다.

[0092] 도 4b에 나타난 바와 같이, ABTS 라디칼 소거활성은 1.0 mg/ml의 농도에서 비교예 3의 경우 74.32%의 활성을 보였고, 비교예 3의 경우 75.11%의 활성을 보였으며, 실시예 1의 경우는 87.78%으로 가장 높은 활성을 보였다.

[0093] <하이드록실 라디칼 소거활성>

[0094] 하이드록실 라디칼 소거 활성은 Kim 등 (2019)의 방법에 준하여 측정하였다. 10 mM FeSO₄ · 7H₂O-EDTA, 10 mM 2-테옥시리보스 및 10 mM H₂O₂ 0.2 ml를 시험관에 분주하고 시료를 1.4 ml를 가하여 37℃에서 4시간 반응시켰다. 1% TBA와 2.8% TCA 1 ml를 첨가하고 100℃에서 20분간 발색한 후 520 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다. 음성대조구는 시료대신 PBS 완충용액을 사용하여 실험하였으며 실험구와 음성대조구의 흡광도를 구하여 상기 식에 의해 백분율(%)로 산출하여 그 결과를 도 4c에 나타냈다.

[0095] 도 4c에 나타난 바와 같이, 하이드록실 라디칼 소거활성은 1 mg/ml의 농도에서 비교예 3은 40.12%, 비교예 4는 44.42%, 실시예 1은 51.79%로 나타나, 본 발명에 따른 파바톤 콩잎 복합발효 조성물에서 가장 높은 소거활성을 보였다.

[0096] <FRAP 환원력 분석>

[0097] FRAP (Ferric reducing antioxidant power) 환원력 분석은 화합물의 환원력을 측정하는 방법으로 Fe³⁺를 Fe²⁺로 환원시키는 힘을 측정하는 방법이다. 구체적으로는 FeIII-TPTZ(ferric tripyridyl triazine)가 시료의 환원력에 의하여 푸른색의 FeII-TPTZ(ferrous tripyridyl triazine)으로 환원될 때 흡광도를 측정하여 항산화 활성을 알아보는 것이다.

[0098] FRAP 환원력 분석에서 반응액으로는 30 mM 아세테이트 완충액(pH 3.6), 40 mM 염산에 녹인 10 mM 2,4,6-트립리딜-s-트리아진(TPTZ, T1253, C18H12N6, MW312.33) 및 20 mM FeCl₃(F7134, MW 162.20, in DW)를 준비하였으며, 아세테이트 완충액, TPTZ 용액 및 FeCl₃ 용액을 10:1:1 (v/v/v)로 혼합하여 37 °C에서 15분간 예비반응을 시켜두었다. 상기에서 준비된 각각의 분석시료(0.25, 0.5, 1 mg/ml 농도) 50 μl와 FRAP 시약 950 μl를 시험관에 분주한 후, 약 15분간 반응시키고 593 nm에서 흡광도를 측정하여 그 결과를 도 4d에 나타냈다.

[0099] 도 4d에 나타난 바와 같이, FRAP 환원력은 1 mg/ml의 농도에서 비교예 3은 0.530, 비교예 4는 0.540, 실시예 1은 0.679으로 나타나, 역시 실시예 1에서 가장 높은 환원력을 보였다.

[0100] 이들 결과로부터 본 발명에 따른 파바톤 콩잎 복합발효 조성물은 항산화 활성이 현저히 증진됨을 알 수 있다.

[0102] 시험예 6: 소화효소 저해활성 검정

[0103] 본 발명에 따른 과바톤 콩잎 발효 조성물에 대해 항당뇨(당뇨 개선) 효과의 지표인 알파-글루코시다아제 저해활성을 검정하였고, 항비만(비만 개선) 지표인 췌장 리파아제 저해활성을 검정하였다. 알파-글루코시다아제 저해활성과 췌장 리파아제 저해활성은 파라-니트로페놀법(para-nitrophenol method)으로 검정하였다.

[0104] <알파-글루코시다아제 저해활성>

[0105] 참고예에서 준비된 각각의 분석 시료 30 μ l에 알파-글루코시다아제 (0.5 U/ml) 효소용액 70 μ l, 200 mM 인산나트륨 완충용액(pH 6.8) 50 μ l를 혼합하여 37℃에서 10분간 예비반응하였다. 이후 인산나트륨 완충용액(pH 6.8)에 녹인 p-NPG (10 mM) 100 μ l를 첨가하여 다시 37℃에서 10분 반응시켰으며 반응액에 Na₂CO₃ (100 mM) 750 μ l를 첨가해 반응을 정지시킨 후 420 nm에서 분광광도계를 이용하여 흡광도를 측정하였다. 음성대조구는 시료 대신에 추출용매를 취하였으며 분석 시료 첨가구와 무첨가구 사이의 흡광도 차이를 백분율(%)로 나타내어 그 결과를 도 5에 나타냈다.

[0106] 도 5에 도시된 바와 같이, 알파-글루코시다아제 저해활성은 1.0 mg/ml 처리 시 비교예 3에서 35.13%, 비교예 4에서 38.44%로 나타났으나, 실시예 1에서는 50.46%로 현저히 증진되었다.

[0107] 따라서 본 발명에 따른 과바톤 콩잎 복합발효 조성물은 알파-글루코시다아제 저해활성이 현저히 증진되어 혈당 저하 활성이 우수하여 당뇨 개선 효과가 증진됨을 알 수 있다.

[0108] <췌장-리파아제 저해활성>

[0109] 참고예에서 준비된 각각의 분석 시료 30 μ l에 췌장 리파아제 (0.5 U/ml) 효소용액 70 μ l 및 200 mM 인산나트륨 완충용액(pH 6.8) 50 μ l를 혼합하여 37℃에서 10분간 예비반응시켰다. 반응 후 인산나트륨 완충용액에 녹인 p-NPB(10 mM) 100 μ l를 첨가하여 동일하게 10분간 반응시킨 후 100 mM Na₂CO₃ 750 μ l를 첨가해 반응을 종결시켜 420 nm에서 흡광도를 측정하였다. 음성대조구는 시료 대신에 추출용매를 취하였으며 시료용액의 첨가구와 무첨가구 사이의 흡광도 차이를 백분율(%)로 나타내어 그 결과를 도 6에 나타냈다.

[0110] 도 6에 도시된 바와 같이, 췌장 리파아제 저해활성은 0.5 mg/ml 처리 시 비교예 3에서 18.59%, 비교예 4에서 17.52%로 나타났으나, 실시예 1에서는 22.09%로 더 높은 활성을 보였다.

[0111] 따라서 본 발명에 따른 과바톤 콩잎 복합발효 조성물은 췌장 리파아제 저해활성이 증진되어 비만 개선효과가 강화됨을 알 수 있다.

[0112] 상기 활성(기능성) 검정 결과들로부터, 본 발명에 따른 과바톤 콩잎 복합발효 조성물은 비배당체 이소플라본, 올레산 및 니아신이 증진될 뿐만 아니라, 우수한 항산화 활성, 항당뇨 및 항비만 활성을 가져서 기능성 식품의 소재로 유용하다는 것을 알 수 있다.

[0114] 시험예 7: 이화학적 특성 및 생균수

[0115] 제조예에서 제조된 본 발명에 따른 과바톤 콩잎 복합발효 조성물의 이화학적 특성(pH, 산도 및 생균수)을 분석하여 표 4에 나타냈다.

[0116] pH는 pH 측정기를 사용하여 측정하였고, 산도 측정은 발효 조성물 1 ml를 0.1N-NaOH 용액으로 pH 8.2±0.1까지 중화시키는데 소요된 0.1N-NaOH의 소비 ml수를 구하고 젖산(lactic acid)양으로 환산하여 %로 총산을 나타내었다. 생균수 측정은 시료 1 ml를 멸균생리식염수에 단계별로 희석하여 MRS 평판배지에 도말하고 37℃에서 48시간 배양 후 나타난 젖산균 특유의 콜로니를 측정하여 생균수(log cfu/g)로 나타내었다.

표 4

분석항목 ¹⁾	시료		
	비교예 3	비교예 4	실시예 1
pH	6.19±0.31	6.18±0.31	4.89±0.24
총산도 (% , 젖산)	0.39±0.02	0.40±0.02	1.10±0.06
생균수 (log cfu/g)	-	8.56±0.43	10.77±0.54
¹⁾ 모든 실험은 삼 반복 수행하였음.			

[0118]

표 4에 나타난 바와 같이, 본 발명에 따른 발효 조성물은 pH는 감소하였고 산도와 총 유산균 수가 증가하여, 식품의 저장성을 향상시킬 수 있을뿐만 아니라 유산균 제품(유산균수가 9.0 log cfu/ml 이상으로 규정)으로도 사용할 수 있는 장점이 있다.

수탁번호

[0119]

기탁기관명 : 농업생명공학연구원

수탁번호 : KACC92156P

수탁일자 : 20161212

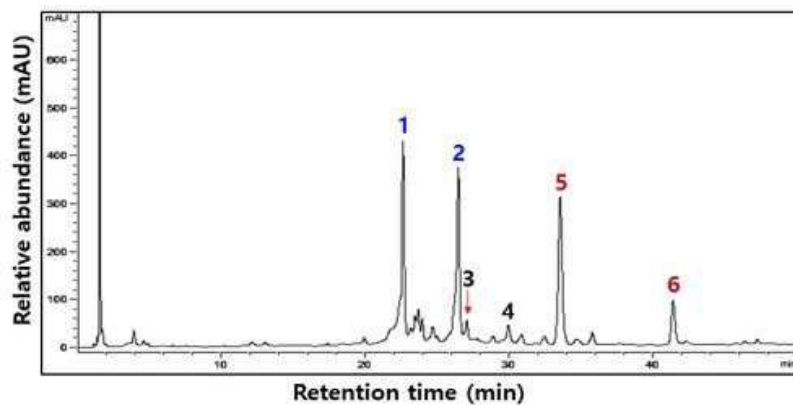
기탁기관명 : 농업생명공학연구원

수탁번호 : KACC91848P

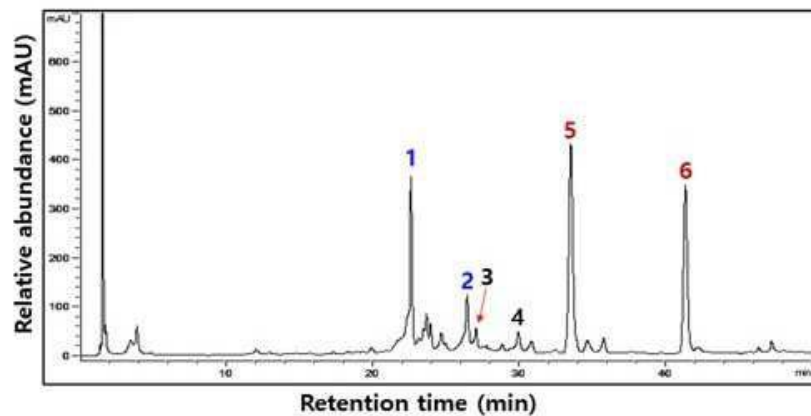
수탁일자 : 20130719

도면

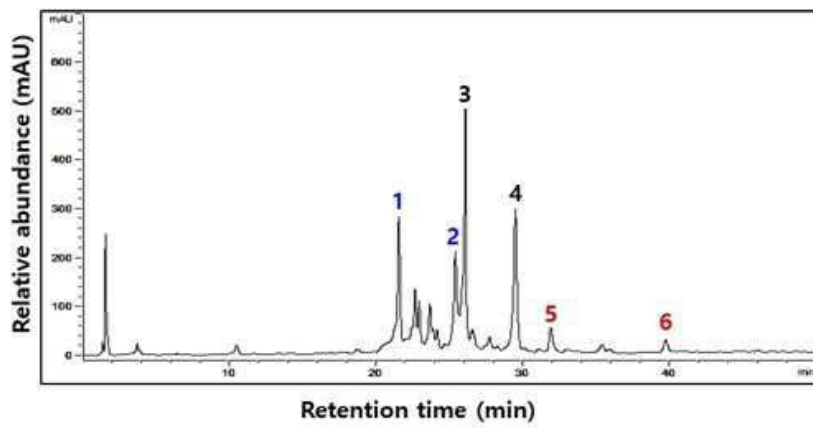
도면1a



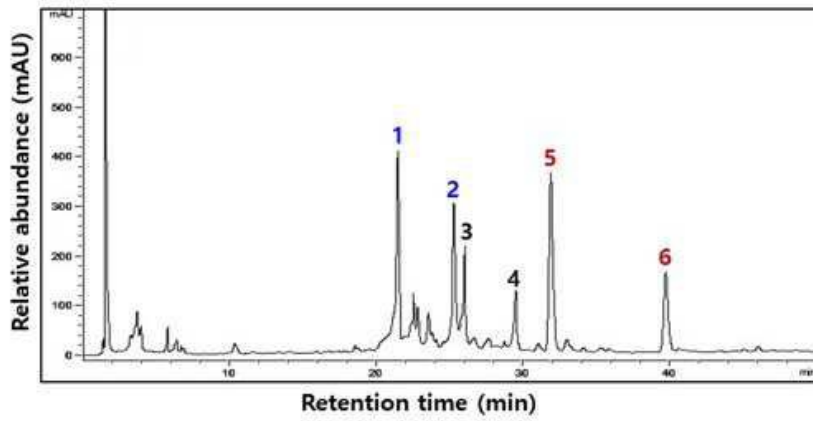
도면1b



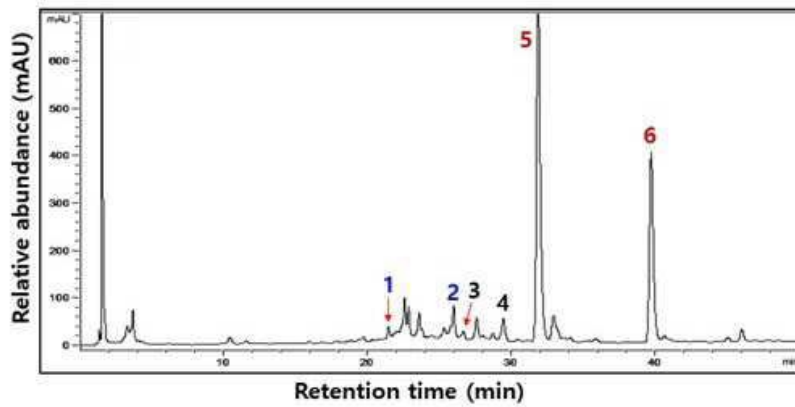
도면1c



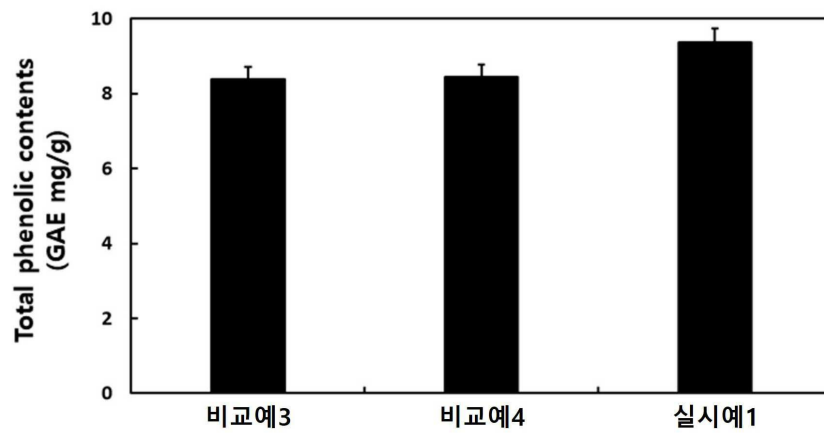
도면1d



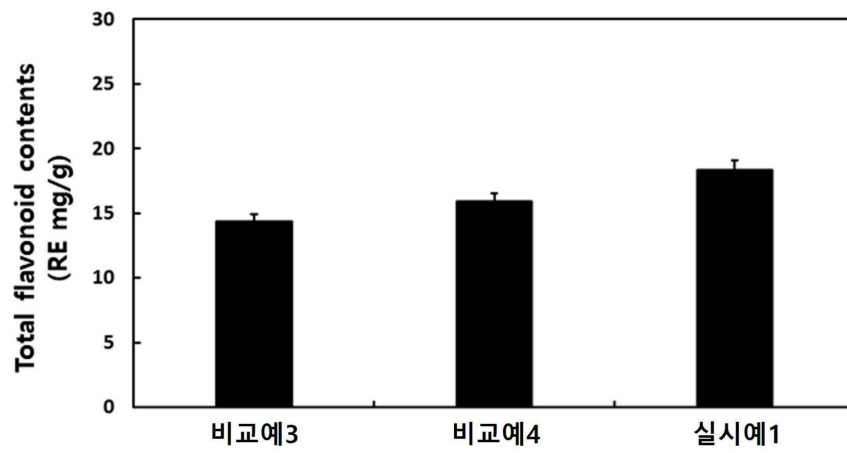
도면1e



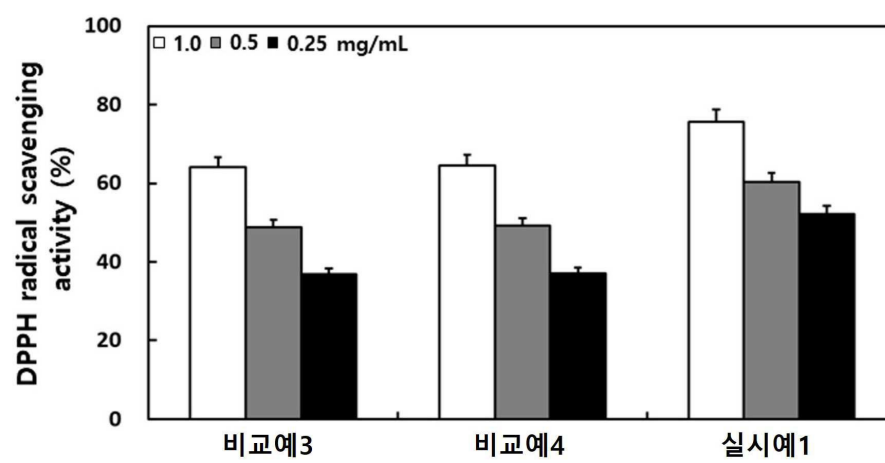
도면2



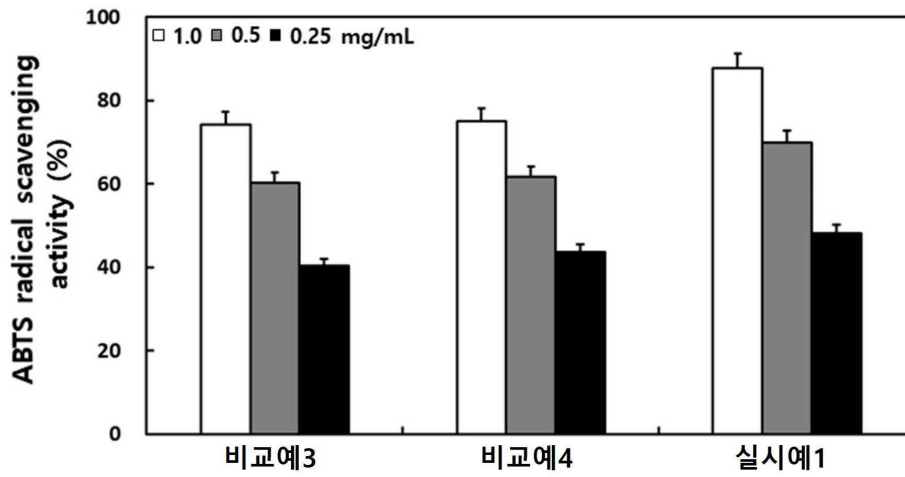
도면3



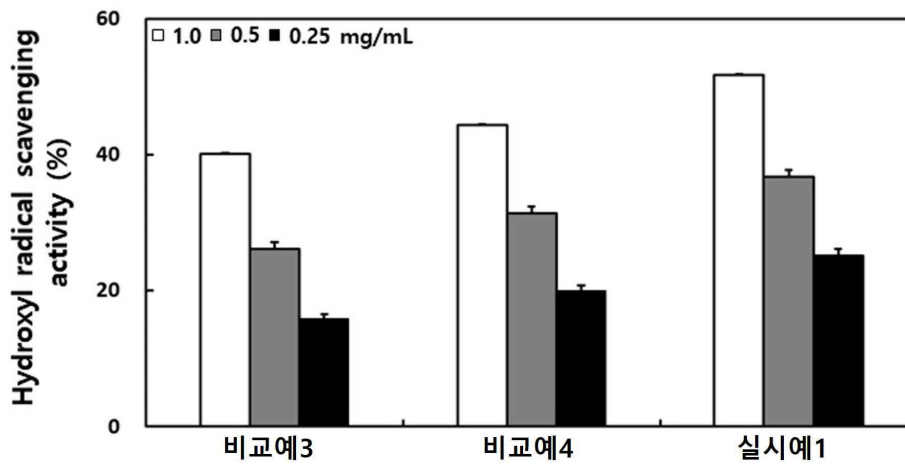
도면4a



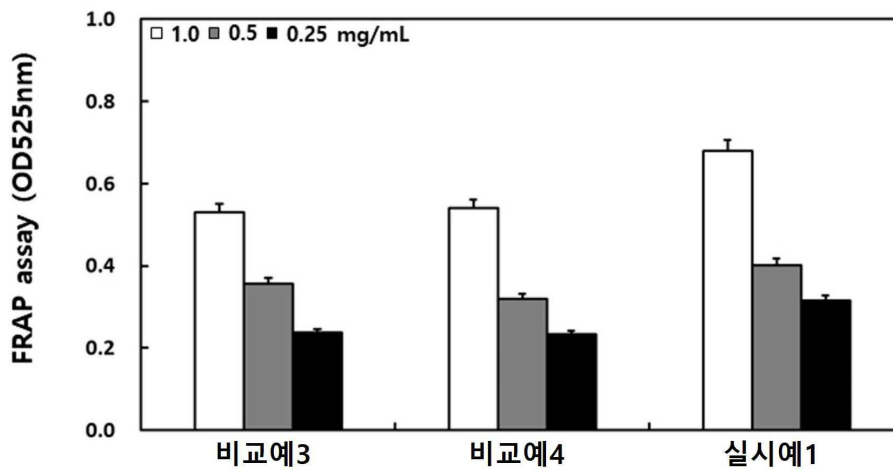
도면4b



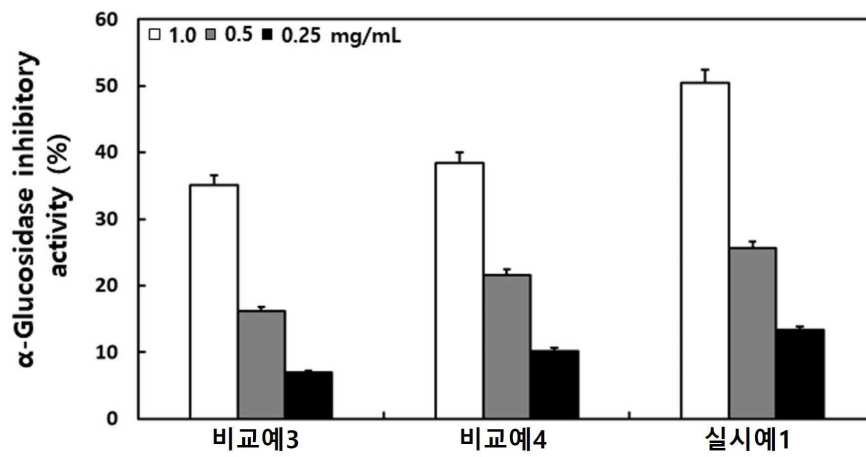
도면4c



도면4d



도면5



도면6

