(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0109295
(43) 공개일자 2024년07월11일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 1/20 (2006.01) *A23L 11/50* (2021.01)
A23L 19/10 (2016.01) *A23L 33/10* (2022.01)
A23L 33/105 (2016.01) *A61K 8/49* (2006.01)
A61K 8/63 (2006.01) *A61K 8/9789* (2017.01)
A61Q 19/00 (2006.01) *C12N 9/42* (2006.01)
C12R 1/07 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 1/205 (2021.05)
A23L 11/50 (2023.05)
(21) 출원번호 10-2022-0188360
(22) 출원일자 2022년12월29일
심사청구일자 2022년12월29일

(71) 출원인
경상국립대학교산학협력단
경상남도 진주시 진주대로 501 (가좌동)
(72) 발명자
조계만
경상남도 진주시 진주대로 829번길 21, 삼환나우빌 103동 2501호
이희율
경상남도 진주시 금산면 금산로 130 금호맨션 410호
이지호
경상남도 진주시 강남로 45 금호석류마을 108동 304호
(74) 대리인
조영신

전체 청구항 수 : 총 14 항

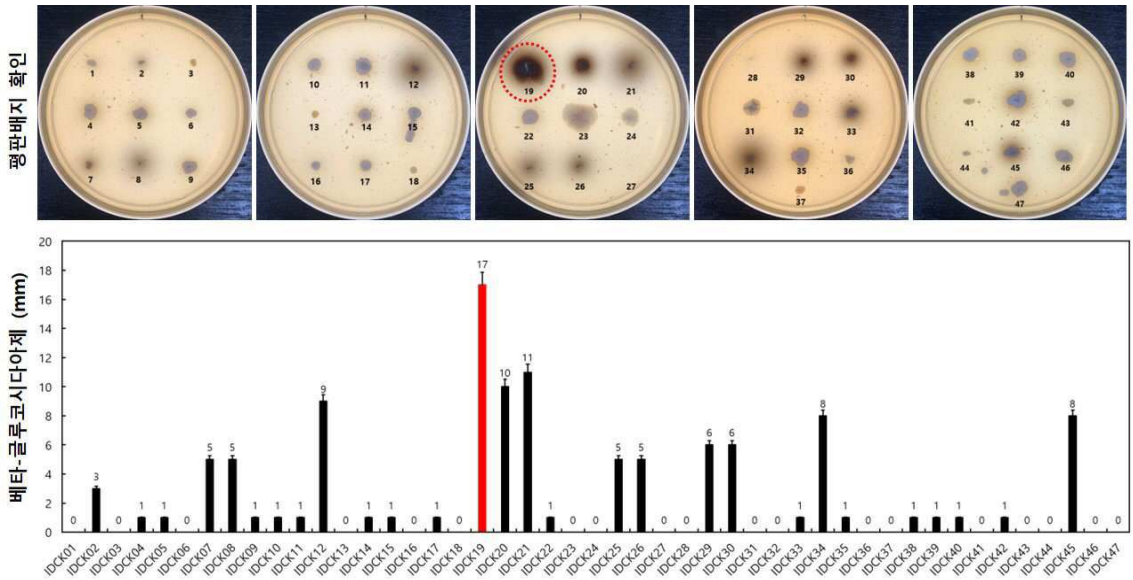
(54) 발명의 명칭 **신규한 바실러스 소노렌시스 IDCK19 균주 및 그 이용**

(57) 요 약

본 발명에서는 우수한 베타-글루코시다아제 활성을 갖는 신규한 바실러스 소노렌시스 IDCK19 균주, 이를 포함하는 청국장 발효용 종균 조성물, 이를 이용하여 비배당체 이소플라본, 진세노사이드 Rg3, 컴파운드 케이 및 Rh2가 증진된 산양삼 청국장이 제공된다.

본 발명에 따른 산양삼 청국장을 포함하는 건강기능상 식품은 다이드제인, 글리시테인과 제니스테인, 및 진세노사이드 Rg3, 컴파운드 케이와 Rh2, 총 페놀릭스 및 총 플라보노이드의 함량이 높으며, 더불어 우수한 항산화 활성을 가져서, 콜레스테롤 저하, 고지혈증 개선, 동맥경화 완화, 비만 개선, 혈액순환 개선, 면역력 개선, 여성 갱년기 증후군 개선용으로 유용하다.

대 표 도 - 도1a



(52) CPC특허분류
A23L 19/10 (2016.08)
A23L 33/10 (2022.01)
A23L 33/105 (2016.08)
A61K 8/498 (2013.01)
A61K 8/63 (2013.01)
A61K 8/9789 (2017.08)
A61Q 19/00 (2013.01)
C12N 9/2445 (2013.01)
A23V 2002/00 (2023.08)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1405005292
과제번호 2020187B10-2222-BA01
부처명 산림청
과제관리(전문)기관명 한국임업진흥원
연구사업명 산림생명자원 소재발굴사업
연구과제명 유효성분이 극대화된 산양삼 이용 호흡기 질환 예방관리 제품 개발
기 여 율 1/2
과제수행기관명 경상국립대학교 산학협력단
연구기간 2020.04.01 ~ 2022.12.31
이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1711127940
과제번호 2020M3A9I3038560
부처명 과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명 한국연구재단
연구사업명 바이오.의료기술개발(R&D)
연구과제명 대사체 농업 가능 식물공장 및 활성대사체 강화 산업화 소재 개발
기 여 율 1/2
과제수행기관명 경상국립대학교 산학협력단
연구기간 2020.06.01 ~ 2022.12.31

명 세 서

청구범위

청구항 1

수탁번호 KCTC19051P로 기탁된 바실러스 소노렌시스 IDCK19 균주.

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 균주는 증진된 베타-글루코시다아제 활성과 산양삼 청국장 발효능을 갖는 것인, 바실러스 소노렌시스 IDCK19 균주.

청구항 3

제 2항에 있어서, 상기 베타-글루코시다아제 활성은 한천확산법으로 확인시 17 ㎜ 이상인 것인, 바실러스 소노렌시스 IDCK19 균주.

청구항 4

제 1항에 따른 바실러스 소노렌시스 IDCK19 균주를 포함하는 청국장 발효용 종균 조성물.

청구항 5

제 4항에 있어서, 상기 청국장은 산양삼 청국장인 것인, 청국장 발효용 종균 조성물.

청구항 6

제 4항에 따른 발효용 종균 조성물을 사용하여 제조되는 것을 특징으로 하는 청국장.

청구항 7

제 6항에 있어서, 상기 청국장은 다이드제인을 560 ㎍/g 이상, 글리시테인을 41 ㎍/g 이상 및 제니스테인을 91 ㎍/g 이상 함유하는 것인, 청국장.

청구항 8

비배당체 이소플라본 및 진세노사이드인 Rg3, 컴파운드 케이와 Rh2가 증진된 산양삼 청국장의 제조방법으로, 상기 방법은

ⅰ) 물에 불린 콩 90 ~ 98 중량%와 산양삼 2 ~ 10 중량%의 혼합물을 제공하는 단계;

ⅱ) 혼합물을 100 ~ 120℃에서 30 ~ 60분간 증자하는 단계;

ⅲ) 바실러스 소노렌시스 IDCK19 균주를 포함하는 발효용 종균 조성물을 2 ~ 10% (v/w) 접종하여 30 ~ 40℃에서 2 ~ 5일간 발효시키는 단계;를 포함하는 것인 방법.

청구항 9

제 8항에 있어서, 상기 산양삼 청국장은 다이드제인을 488 ㎍/g 이상, 글리시테인을 30 ㎍/g 이상, 제니스테인을 128 ㎍/g 이상 함유하는 것인, 비배당체 이소플라본 및 진세노사이드인 Rg3, 컴파운드 케이와 Rh2가 증진된 산양삼 청국장의 제조방법.

청구항 10

제 8항에 있어서, 상기 산양삼 청국장은 진세노사이드 Rg3를 0.12 mg/g 이상, 진세노사이드 컴파운드 케이를 0.28 mg/g 이상, 진세노사이드 Rh2를 0.15 mg/g 이상 함유하는 것인, 비배당체 이소플라본 및 진세노사이드인 Rg3, 컴파운드 케이와 Rh2가 증진된 산양삼 청국장의 제조방법.

청구항 11

제 8항에 따른 제조방법에 의해 제조된, 비배당체 이소플라본 및 진세노사이드인 Rg3, 컴파운드 케이와 Rh2가 증진된 산양삼 청국장.

청구항 12

제 11항에 있어서, 상기 산양삼 청국장은 다이드제인을 560 ㎍/g 이상, 글리시테인을 41 ㎍/g 이상 및 제니스테인을 91 ㎍/g 이상 함유하고, 진세노사이드 Rg3를 0.12 mg/g 이상, 진세노사이드 컴파운드 케이를 0.28 mg/g 이상, 진세노사이드 Rh2를 0.15 mg/g 이상 함유하는 것인, 산양삼 청국장.

청구항 13

제 11항에 따른 산양삼 청국장을 포함하는 건강기능성 식품.

청구항 14

제 11항에 따른 산양삼 청국장을 유효성분으로 포함하는 화장품.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 신규한 바실러스 소노렌시스 IDCK19 균주 및 그 이용에 관한 것으로, 더 상세하게는 현저히 우수한 베타-글루코시다아제 활성을 갖는 신규한 바실러스 소노렌시스 IDCK19 균주, 이를 포함하는 청국장 발효용 종균 조성물, 이를 이용하여 제조된 비배당체 이소플라본, 진세노사이드 Rg3, 컴파운드 케이 및 Rh2가 증진된 산양삼 청국장에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0003] 청국장은 전통적으로 대두를 삶아 콩 사이사이 볏짚을 넣어 따뜻한 장소에서 2 ~ 5일간 35 ~ 45℃ 온도로 보온하며 야생 바실러스 나토 또는 바실러스 서브틸리스 균주에 의해 발효되어 전통 대두 발효식품 중 가장 단기간에 제조하여 영양적, 경제적으로 가장 효과적으로 콩을 섭취할 수 있는 방법으로 인정되고 있다. 청국장에는 변비예방, 발암물질과 콜레스테롤의 체외배출, 혈관강화와 혈액순환 촉진, 젖산분해, 뇌 노화와 치매 및 고혈압과 동맥경화의 예방 등 효과가 있는 것으로 보고되고 있다.

[0004] 청국장의 원료인 대두는 파이토케미칼의 일종인 이소플라본이 배당체 형태로 존재하며 비배당체 형태인 다이드

제인(daidzein), 글리시테인(glycitein)과 제니스테인(genistein)은 배당체 이소플라본에 비해 미량 존재하는 것으로 보고되고 있다.

[0005] 비배당체 이소플라본은 항암활성, 혈소판응집 억제효과, 유방암, 전립선암, 골다공증 개선효과를 가지는 것으로 알려져 있으며 배당체 이소플라본과 비해 체내 흡수율이 높아 생체 이용율이 높은 것으로 보고되어 있다.

[0006] 대두 발효식품은 발효 미생물 유래 베타-글루코시다아제(β-glucosidase)의 작용에 의해 비배당체 이소플라본 함량이 증가하며 특히 다양한 생리활성은 비배당체 이소플라본에 기인한다고 보고되고 있다. 하지만 청국장은 2 ~ 5일의 짧은 발효기간으로 된장에 비해 비배당체 이소플라본 비율이 낮은 것으로 알려져 있다.

[0007] 따라서 배당체에 당의 베타-글리코디스 결합을 분해시켜 비배당체 이소플라본을 증가시키는 베타-글루코시다아제 활성을 갖는 발효종균이 개발되고 있으나 (공개특허 10-2022-0114340호), 여전히 베타-글루코시다아제 활성이 높은 신규한 발효 종균 개발이 요구되고 있는 실정이다.

[0008] 산양삼은 오가피과에 속하며 다년생 초목인 인삼(Panax ginseng)이 산간의 삼림하의 야생상태에서 자연적으로 성장한 산삼의 씨앗이나 유삼을 인위적으로 산에서 재배한 것을 말한다. 산양삼은 여러 효능면에서 재배 인삼보다 효과가 더 높은 것으로 알려져 있다.

[0009] 삼의 약리효과는 인체 흡수형 진세노사이드의 기인하는데, 인체 흡수형 진세노사이드로는 진세노사이드 Rg3, 컴파운드 케이(compound K), Rh2 등이 있다. 진세노사이드 Rg3는 암세포 전이억제, 간보호 작용, 항암제 내성억제 작용, 진세노사이드 컴파운드 케이는 항암작용, 간보호 작용, 피부보호 작용, 종양증식억제 작용, 항산화 작용, 항알레르기 작용이 밝혀져 있다. 산양삼의 인체 흡수형 진세노사이드를 증진시키는 발효종균이 개발되고 있으나 (등록특허 10-2364062호), 여전히 산양삼의 인체 흡수형 진세노사이드를 증진시키는 신규한 발효 종균 개발이 요구되고 있는 실정이다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0011] 종래 기술에서의 요구에 부응하기 위해 지속적으로 연구한 결과, 본 발명자들은 전통 청국장에서 신규한 바실러스 소노렌시스 IDCK19 균주를 분리동정하고, 이 균주가 현저히 우수한 베타-글루코시다아제 활성을 갖고, 이 균주를 종균으로 사용할 경우, 비배당체 이소플라본 및 진세노사이드 Rg3, 컴파운드 케이와 Rh2가 현저히 증진된 산양삼 청국장을 제조할 수 있다는 것을 확인하고 본 발명을 완성하게 되었다.

[0012] 따라서 본 발명의 목적은 신규한 바실러스 소노렌시스 IDCK19 균주를 제공하는 것이다.

[0013] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 균주를 포함하는 청국장 발효용 종균 조성물을 제공하는 것이다.

[0014] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 조성물을 이용하여 비배당체 이소플라본 및 진세노사이드 Rg3, 컴파운드 케이와 Rh2가 증진된 산양삼 청국장의 제조방법을 제공하는 것이다.

[0015] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 제조방법에 따라 제조된 비배당체 이소플라본 및 진세노사이드 Rg3, 컴파운드 케이와 Rh2이 증진된 산양삼 청국장을 제공하는 것이다.

[0016] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 산양삼 청국장을 포함하는 건강기능성 식품을 제공하는 것이다.

[0017] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 산양삼 청국장을 유효성분으로 포함하는 화장품을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0019] 본 발명의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 신규한 바실러스 소노렌시스 IDCK19 균주를 제공한다.

[0020] 본 발명자들은 장류(청국장)로부터 베타-글루코시다아제 활성이 현저히 우수하고, 비배당체 이소플라본 및 진세노사이드 Rg3, 컴파운드 케이와 Rh2가 증진된 산양삼 청국장의 발효능이 우수한 바실러스 속 신규 균주를 분리동정하여, '바실러스 소노렌시스 IDCK19'로 명명하고, 한국생명공학연구원에 2022년 11월 21일에 기탁하였다 (수탁번호: KCTC19051P).

[0021] 바실러스 소노렌시스 IDCK19의 확인은 형태학적 관찰로 광학현미경 및 주사현미경 관찰을 이용하였고 16S rDNA, recA 및 gyrB 유전자 서열 분석을 통하여 확인하였다. 이들 분석을 통하여 본 발명의 바실러스 소노렌시스 IDCK19의 분류학적 위치를 알 수 있었다 (표 1, 도 1b).

[0022] 본 발명에 따른 바실러스 소노렌시스 IDCK19 균주는 한천확산법(plate assy법)으로 베타-글루코시다아제 활성을 확인한 결과 17 mm 이상인 활성이 현저히 높았다 (도 1b).

[0023] 본 발명의 또 다른 목적에 따라서 상기 균주를 포함하는 청국장 발효용 종균 조성물을 제공한다.

[0024] 본 발명에서 청국장은 산양삼 청국장일 수 있다.

[0025] 본 발명에 따른 바실러스 소노렌시스 IDCK19 균주를 포함하는 발효용 종균 조성물로 제조된 청국장은 비배당체 이소플라본인 다이드제인이 560 ㎍/g 이상, 글리시테인이 41 ㎍/g 이상 및 제니스테인이 91 ㎍/g 이상으로 증진된다 (도 3).

[0026] 본 발명에 따른 바실러스 소노렌시스 IDCK19 균주를 포함하는 발효용 종균 조성물로 제조된 산양삼 청국장은 다이드제인이 488 ㎍/g 이상, 글리시테인이 30 ㎍/g 이상 및 제니스테인이 128 ㎍/g 이상으로 증진되고 (도 4a, 도 5), 진세노사이드 Rg3가 0.12 mg/g 이상, 진세노사이드 컴파운드 케이가 0.28 mg/g 이상 그리고 진세노사이드 Rh2가 0.15 mg/g 이상으로 현저히 증진된다 (도 4b, 도 6).

[0027] 또한 본 발명의 바실러스 소노렌시스 IDCK19 균주를 포함하는 발효용 종균 조성물로 제조된 산양삼 청국장은 총 페놀릭스 함량이 9.78 GAE mg/g 이상으로 원료 혼합물에 비해 약 2배 증진되고 (도 7a), 총 플라보노이드 함량이 0.75 RE mg/g 이상으로 원료 혼합물에 비해 약 3배 증진되고 (도 7b), 항산화 활성(DPPH, ABTS 라디칼 소거활성 및 FRAP 환원력)도 원료 혼합물에 비하여 약 1.5배 ~ 2배 증진된다(도 8a ~ 도 8c).

[0028] 본 발명의 바실러스 소노렌시스 IDCK19 균주는 베타-글루코시다아제 활성이 현저히 우수하여 산양삼 첨가에도 발효율이 높아서 산양삼 청국장 발효 종균으로서의 특성을 갖추어 산양삼 청국장을 제조할 수 있다 (도 5 ~ 도 8c).

[0029] 본 발명의 또 다른 목적에 따라서, 상기 발효용 종균 조성물을 이용하여 비배당체 이소플라본 및 진세노사이드 Rg3, 컴파운드 케이와 Rh2가 증진된 산양삼 청국장의 제조방법을 제공한다.

[0030] 본 발명의 산양삼 청국장의 제조방법은

[0031] ⅰ) 물에 불린 콩 90 ~ 98 중량%와 산양삼 2 ~ 10 중량%의 혼합물을 제공하는 단계;

[0032] ii) 혼합물을 100 ~ 120℃에서 30 ~ 60분간 증자하는 단계;

[0033] iii) 바실러스 소노렌시스 IDCK19 균주를 포함하는 발효용 종균 조성물을 2 ~ 10% (v/w) 접종하여 30 ~ 40℃에서 2 ~ 5일간 발효시키는 단계를 포함하여 이루어진다.

[0034] 본 발명의 제조 방법은, 필요에 따라서, 단계 iii) 후에, 제조된 청국장을 iv) 건조하여 분말화하는 단계를 추가로 포함할 수 있다.

[0035] 단계 ⅰ): 산양삼-콩 혼합물

[0036] 물에 불린 콩 90 ~ 98 중량%와 산양삼 2 ~ 10 중량%의 혼합물을 제공한다.

[0037] 본 발명에서 콩은 백태(노란콩), 서리태(검정콩), 쥐눈이콩(약콩)을 사용할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 콩은 2 ~ 3배 가량 물을 넣어 6 ~ 24 시간 동안 불려서 물기를 제거하여 물에 불린 콩으로 준비한다.

[0038] 산양삼은 산양삼을 세척 후 콩알 정도의 크기로 절단하여 사용한다.

[0039] 산양삼이 상기 함량을 초과하여 첨가되면 산양삼의 항균력이 강하여 발효 종균의 증식이 미흡하여 청국장 발효가 잘 이루어지지 않고, 상기 함량 미만의 경우는 생리활성성분 및 항산화성 등의 증진이 미흡하게 된다.

[0040] 단계 ii): 증자

[0041] 단계 ⅰ)로부터의 산양삼-불린 콩 혼합물을 100 ~ 120℃에서 30 ~ 60분간 증자한다.

[0042] 증자를 통하여 산양삼-불린콩 혼합물을 살균하여 발효시 잡균이 증식하지 않게 하고 고분자 단백질을 저분자 단백질로 변화로 종균의 균주 증식과 청국장 발효의 효율성을 높인다.

[0043] 단계 iii): 접종 및 발효

[0044] 증자된 혼합물에 바실러스 소노렌시스 IDCK19 균주를 포함하는 발효용 종균 조성물을 2 ~ 10% (v/w) 접종하여 30 ~ 40℃에서 2 ~ 4일간 발효시킨다.

[0045] 상기 바실러스 소노렌시스 IDCK19 균주는 통상의 방법에 따라 종배양하여 사용한다. 트리틱 소이 브로스 (TSB; Trytic Soy Broth) 액체배지에서 12시간 정도 배양한 배양액으로서 종배양할 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다.

[0046] 접종량은 2 ~ 10% %(v/w)로 이루어지는 것이 바람직한데, 10 %(v/w) 초과이면 종균 배양시 경제적 비용이 과다 발생하며, 2 %(v/w) 미만이면 청국장 발효 속도가 지연되어 청국장 발효 및 품질에 영향을 미칠 수 있다.

[0047] 단계 iv): 산양삼 청국장 분말 제조

[0048] 필요에 따라서, 산양삼 청국장을 건조하여 분말화할 수 있다.

[0049] 건조는, 이에 제한되지는 않지만, 바람직하게는 청국장을 50 ~ 55℃에서 2일 이상 건조한다. 건조된 청국장은 분쇄기로 분쇄하여 80 ~ 100 메쉬 채에 걸러 분말화하여 산양삼 청국장 분말의 제조한다.

[0050] 본 발명의 제조방법에 따라 제조된 산양삼 청국장은 다이드제인 488 ㎍/g 이상, 글리시테인 30 ㎍/g 이상 및 제니스테인 128 ㎍/g 이상 함유하고, 진세노사이드 Rg3 0.12 mg/g 이상, 진세노사이드 컴파운드 케이 0.28 mg/g 이상 및 진세노사이드 Rh2 0.15 mg/g 이상 함유한다.

[0051] 본 발명의 또 다른 목적에 따라서, 상기 제조방법에 따라 제조된 비배당체 이소플라본 및 진세노사이드 Rg3, 컴파운드 케이와 Rh2이 증진된 산양삼 청국장을 제공한다.

[0052] 본 발명의 또 다른 목적에 따라서, 상기 산양삼 청국장을 포함하는 건강기능성 식품을 제공한다.

[0053] 본 발명에서 '건강기능성 식품'이란 일상 식사에서 결핍되기 쉬운 영양소나 인체에 유용한 기능을 가진 원료나 성분을 사용하여 제조한 식품으로, 인체의 건강을 유지하는데 도움을 주는 식품을 의미한다.

[0054] 본 발명에서 건강기능성 식품의 형태 및 종류는 특별히 제한되지 않는다. 구체적으로는 정제, 캅셀, 분말, 과립, 액상 및 환의 형태일 수 있다. 건강기능성 식품은 추가성분으로서 여러 가지 향미제, 감미제 또는 천연탄수화물을 포함할 수 있다. 감미제는 천연 또는 합성 감미제일 수 있고, 천연 감미제의 예로는 타우마틴, 스테비아 추출물 등이 있다. 한편, 합성 감미제의 예로는 사카린, 아스파탐 등이 있다. 또한 천연 탄수화물은 모노사카라이드, 디사카라이드, 폴리사카라이드, 올리고당 및 당알코올 등일 수 있다.

[0055] 본 발명에서 건강기능성 식품은 상기 추가성분 외에, 영양제, 비타민, 전해질, 풍미제, 착색제, 펙스탄 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알코올 등을 더 포함할 수 있다. 이러한 성분은 독립적으로 또는 조합으로 사용될 수 있다.

[0056] 본 발명에서 상기 식품의 종류는 특별히 제한되지 않으며, 환제, 정제, 캡슐제, 차, 선식, 밀가루 식품, 스프, 유제품, 소스, 음료 (파우치제, 드링크제 등) 등일 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다.

[0057] 본 발명에 따른 건강기능성 식품을 섭취시 비배당체 이소플라본, 진세노사이드 Rg3, 컴파운드 케이 및 Rh2, 항산화 활성을 보충할 수 있다.

[0058] 본 발명의 또 다른 목적에 따라서, 상기 산양삼 청국장을 유효성분으로 포함하는 화장품을 제공한다.

[0059] 본 발명에 따른 화장품은 산양삼 청국장의 추출물 또는 분획물의 형태로 다른 화장품 성분과 함께 포함될 수 있다.

[0060] 본 발명에서 화장품은 로션, 연고, 겔, 크림, 패치, 마스크팩 또는 분무제 등의 형태일 수 있으나 여기에 국한되는 것은 아니며, 추가로 지방 물질, 유기 용매, 용해제, 농축제 및 겔화제, 연화제, 항산화제, 현탁화제, 안정화제, 발포제, 방향제, 계면활성제, 물, 이온형 또는 비이온형 유화제, 충전제, 금속이온봉쇄제 및 킬레이트화제, 보존제, 비타민, 차단제, 습윤화제, 필수 오일, 염료, 안료, 친수성 또는 친유성 활성제, 지질 소낭 등 화장품에 통상적으로 사용되는 임의의 첨가제를 함유할 수 있다.

발명의 효과

[0062] 본 발명에 따른 신규한 바실러스 소노렌시스 IDCK19 균주는 현저히 우수한 베타-글루코시다아제 활성을 가져서 발효 종균으로 사용시 비배당체 이소플라본 및 진세노사이드 Rg3, 컴파운드 케이 및 Rh2가 현저히 증진된 산양삼 청국장을 제조할 수 있다.

[0063] 본 발명에 따른 산양산 청국장은 비배당체 이소플라본인 다이드제인, 글리시테인 및 제니스테인 함량이 증진되고 진세노사이드 Rg3, 컴파운드 케이와 Rh2이 증진되고, 높은 항산화 활성, 총 페놀릭스 및 총 플라보노이드 함량을 갖는다.

[0064] 또한 본 발명에 따른 산양삼 청국장을 포함하는 건강기능상 식품은 다이드제인, 글리시테인과 제니스테인, 및 진세노사이드 Rg3, 컴파운드 케이와 Rh2, 총 페놀릭스 및 총 플라보노이드의 함량이 높으며, 더불어 우수한 항산화 활성을 가져서, 콜레스테롤 저하, 고지혈증 개선, 동맥경화 완화, 비만 개선, 혈액순환 개선, 면역력 개선, 여성 갱년기 증후군 개선용으로 유용하다.

도면의 간단한 설명

[0066] 도 1a는 재래식 볏짚 청국장 유래 47종 바실러스 균주의 평판배지에서 베타-글루코시다아제 활성을 확인한 결과 사진 및 베타-글루코시다아제 활성으로서 검정환의 크기를 측정한 값을 나타내는 그래프이다.

도 1b는 바실러스 소노렌시스 IDCK19 균주의 형태학적 특징을 나타낸 것이다. (A)는 한천배지 상에서 바실러스 소노렌시스 IDCK19 균주의 클론 모양이며, (B)는 바실러스 소노렌시스 IDCK19 균주의 그람염색 후 광학현미경 사진이며, (C)는 바실러스 소노렌시스 IDCK19 균주의 주사전자현미경 사진이다.

도 2는 발효시간별 청국장의 비배당체 이소플라본 함량 변화를 나타낸 그래프이다.

도 3은 실시예 1, 비교예 1, 비교예 2의 청국장의 비배당체 이소플라본 함량을 나타낸 것이다.

도 4는 산양삼 청국장의 HPLC 크로마토그램이다. 도 4a는 본 발명에 따라 바실러스 소노렌시스 IDCK19 균주로 제조된 산양삼 청국장의 이소플라본 HPLC 크로마토그램이며, 도 4b는 바실러스 소노렌시스 IDCK19 균주로 제조된 산양삼 청국장의 진세노사이드 HPLC 크로마토그램이다.

도 5는 실시예 2의 산양삼 청국장, 비교예 3 및 비교예 4의 비배당체 이소플라본 함량을 나타낸 그래프이다.

도 6은 실시예 2의 산양삼 청국장, 비교예 3 및 비교예 4의 진세노사이드 Rg3, 컴파운드 케이 및 Rh2의 함량을 나타낸 그래프이다.

도 7a는 실시예 2의 산양삼 청국장, 비교예 3 및 비교예 4의 총 페놀릭스 함량을 분석한 결과 그래프이다.

도 7b는 실시예 2의 산양삼 청국장, 비교예 3 및 비교예 4의 총 플라보노이드 함량을 분석한 결과 그래프이다.

도 8은 실시예 2의 산양삼 청국장, 비교예 3 및 비교예 4의 항산화 활성을 분석한 결과 그래프이다. 도 8a는 DPPH 라디칼 소거활성을 나타낸 것이며, 도 8b는 ABTS 라디칼 소거활성을 나타낸 것이며, 도 8c는 FRAP 환원력을 나타낸 것이다.

도 9는 바실러스 소노렌시스 IDCK19 균주의 16S rRNA 유전자 염기서열이다.

도 10은 바실러스 소노렌시스 IDCK19 균주의 *recA* 유전자 염기서열이다.

도 11은 바실러스 소노렌시스 IDCK19 균주의 *gyrB* 유전자 염기서열이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0067] 다음의 실시예들에 의해 본 발명이 더 상세히 설명된다. 이들 실시예는 본 발명을 예시하기 위한 것이며, 본 발명의 범위가 이들에 의해 제한되어서는 안된다.

[0068] 제조예 1. 균주 분리 및 동정

[0069] <균주 분리>

[0070] 경남 함양군 소재 인당마을 종가 유래의 청국장 10개를 각각 1 g씩 9 ml의 멸균 생리식염수에 현탁시키고 강하게 진탕 후, 5분간 방치시켜 얻어진 상등액을 균주 분리를 위한 시료로 사용하였다.

[0071] 상기 시료를 각각 평판 당 30~300여 콜로니가 나타나도록 멸균생리 식염수로 희석한 후, 트리티카제 소이 아가(TSA; Tryticase Soy Agar, DIFCO사, USA) 평판배지에 도말하고, 30℃의 항온기에서 48~72시간 배양한 후, 나타난 다양한 바실러스 종의 특유의 콜로니를 취하여, 같은 조성의 평판배지를 이용하여 순수 분리하였다. 분리된 균주는 각각 20%(v/v)의 글리세롤이 들어있는 트리틱 소이 브로스 (TSB; Trytic Soy Broth, DIFCO사, USA)에 현탁시켜 냉동보존 하였으며, 필요에 따라 TSA 평판배지에서 활성화하여 사용하였다.

[0072] 순수 분리된 균주들을 판크레아틱 다이제스트 오브 카제인(Pancreatic digest of casein) 13 g, 염화나트륨(NaCl) 5 g, 이스트 추출물(Yeast extract) 5 g, 헐트 머슬(Heart muscle, solids from infusion) 2 g, 에스쿨린(Esculin) 1 g, 페릭 시트레이트(Ferric citrate) 0.5 g, 아가(Agar) 15 g 및 증류수 1 L의 조성을 가진 에스쿨린 아가(Esculin agar) 평판 배지를 이용해 베타-글루코시다아제 활성을 분석하여 현저히 우수한 활성을 갖는 IDCK19 번호 붙인 균주를 선발하였다 (도 1a).

[0073] 구체적으로는 순수 분리된 균주를 에스쿨린 아가 평판배지에 접종하여 30℃에서 24 시간 배양하여 반응을 나타내는 검은색 부위의 지름을 측정하였고, 그 결과를 도 1a에 나타냈다. IDCK19 균주는 17㎜로 현저히 우수한 베타-글루코시다아제 활성을 갖는다는 것이 확인되었다.

[0074] <균주의 동정>

[0075] 선발된 IDCK19 균주를 TS 평판배지에서 배양하여 단일집락을 형성시켜 형태를 관찰하였고 Gram 염색과 주사현미경으로 세포형태 관찰하여 형태학적 특성을 분석하였고 그 결과를 도 1b에 나타냈다.

[0076] 도 1b에 도시된 바와 같이, 광학현미경 및 주사현미경을 통해 관찰한 결과 IDCK19 균주는 간균 형태의 표면이 비교적 거친 형태를 보였다.

[0077] 분자·유전학적 특성 분석을 위해 16S rRNA, *rec*A 및 *gyr*B 유전자 염기서열 분석을 수행하였다. 구체적으로는 30℃에서 48 시간 배양한 후 G-spin Genomic DNA Purification Kit(iNtRON Biotechnology, Suwon, Korea)를 사용하여 genomic DNA를 추출하였다. 16S rDNA의 유전자 증폭을 위하여 PCR Purification Kit(iNtRON Biotechnology, Suwon, Korea)를 사용하였으며, 증폭 과정으로는 표 1에 나타낸 16S rRNA, *rec*A 및 *gyr*B 특이적 프라이머를 사용하여 PCR(polymerase chain reaction) 증폭 반응을 수행하였다.

표 1

[0078]

Genes	Name	Sequences (5′ → 3′)	서열번호
16S rRNA	16SrRNA-F	CGGAGAGTTTGATCCTGG	4
	16SrRNA-R	TACGGCTACCTTACGAC	5
*rec*A	recA-F	TGAGTGATCGTCAGGCAGCCTTAG	6
	recA-R	CYTBRGATAAGARTACCAWGMACCGC	7
*gyr*B	gyrB-F	GAAGTCATCATGACCGTTCTGCAYGCNGGNGGNAARTYGA	8
	gyrB-R	AGCAGGGTACGGATGTGCGAGCCRTCNACRTCNGCRTCNGTCAT	9

[0079] PCR 증폭과정은 95℃에서 5 min 변성 후, 94℃-30 sec, 49℃-30 sec, 72℃-1 min 30 sec 반응을 40회 반복 시행하였으며, 72℃-10 min 반응 후, 4℃로 온도를 내려 반응을 종료하였다. 증폭된 PCR 산물은 MEGA quick-spin™ 과 Total Frament DNA Purification Kit(iNtRON Biotechnology Suwon, Korea)로 정제한 후 1% 아가로오스 겔 상에서 전기영동을 수행하였다. 염기서열 분석은 NCBI(www.ncbi.nim.nih.gov)에서 blast search를 통해 상동성을 조사하여 확인하였고, 그 결과를 표 2에 나타냈다. 각각의 유전자 서열을 서열번호 1 내지 3에 나타냈다.

표 2

[0080]

확인 유전자	NCBI 조사결과(Accession No.)	유사성(%)
16S rRNA	*Bacillus sonorensis* SRCM101395 (CP021920)	99
*rec*A	*Bacillus sonorensis* SRCM101395 (CP021920)	99
*gyr*B	*Bacillus sonorensis* SRCM101395 (CP021920)	99

[0081] 표 2에 나타낸 바와 같이, 16S rRNA 유전자 분석결과 IDCK19 균주는 크기 1,516bp로 *Bacillus sonorensis*

SRCM101395L와 99% 상동성을 나타내었다. *rec*A 유전자 분석결과 IDCK19 균주는 크기 878bp이며 *Bacillus sonorensis* SRCM101395L와 99%의 상동성을 나타내었다. gryB 유전자 분석결과 IDCK19 균주는 1,251bp로 *Bacillus sonorensis* SRCM101395L와 99%의 상동성을 보였다.

[0082] 상기와 같은 분석을 종합하여 IDCK19 균주는 바실러스 소노렌시스(*Bacillus sonorensis*) IDCK19로 명명하였고, 분리·동정된 균주는 한국생명공학연구원에 2022년 11월 21일에 기탁하였다 (수탁번호: KCTC19051P).

[0084] **시험예 1. 발효기간별 청국장의 비배당체 이소플라본 함량 분석**

[0085] 제조예 1에서 분리동정된 바실러스 소노렌시스 IDCK19 균주를 발효 종균으로 사용하여 발효시간별 청국장을 제조하였다.

[0086] 구체적으로는 백태(2018년 하동군 일대에서 재배되어 실험실에서 보관된 진양콩) 1000 g을 약 2배의 물에서 약 12시간 동안 침지하고 나서 약 2시간 물을 빼고 120℃에서 60분간 증자하였다. 증자된 콩을 여섯 그룹으로 나누어 그중 다섯 그룹은 각각 발효 틀에 넣은 후, TSB 액체배지에서 12시간 정도 종균배양한 바실러스 소노렌시스 IDCK19 균주 배양액 (발효용 종균 조성물)을 각각 5%(v/w)로 접종하고, 35℃에서 각각 0, 1, 2, 3, 4 및 5일 동안 발효시켜 청국장을 제조하였다.

[0087] 각각의 청국장을 동결 건조한 후, 각각의 샘플 10 g에 대하여 200 ml의 50% 메탄올을 가하여 상온에서 160 rpm으로 12시간 추출 후, 왓트만 No.2 여과지로 여과하여 감압농축기로 농축하여 분석시료로 사용하였다.

[0088] 비배당체 이소플라본 함량 분석은 HPLC를 사용하여 Lee 등(2019)의 방법에 준하여 실시하였다. 분석에 사용된 칼럼은 Lichrophore 100 RP C18 column (4.6×250 mm, 5 ㎛, Merck KGaA, Darmstadt, Germany)을 사용하였고 이동상 용매는 0.2% 초산 함유 HPLC water (solution A)와 0.2% 초산 함유 acetonitrile (solution B)로 분석하였다. 이동상 조건은 A 용매 기준으로 0분때 100%, 15분-90%, 25분-80%, 35분-75%, 45분-65% 및 50분-65%로 분석하였다.

[0089] 각각의 분석시료를 20 ㎕를 주입하였으며 이동상 속도는 30℃에서 1 ml/min으로 유지하였다. 검출기는 diode array detector (DAD)를 사용하여 UV 254 nm에서 검출하였다. 검출된 각각의 이소플라본 피크들은 표준품 검량곡선에 대입하여 함량을 계산하였고, 그 결과를 도 2에 나타냈다.

[0090] 도 2에 나타낸 바와 같이, 비배당체 이소플라본인 다이드제인, 글리시테인과 제니스테인의 함량은 발효 기간 3일에 가장 증가되었고 그 후 다소 감소됨을 확인할 수 있다. 따라서 발효기간은 2~4일이 바람직하고, 가장 바람직하게는 3일임을 확인할 수 있다.

[0092] **제조예 2: 청국장 제조**

[0093] 제조예 1에서 분리동정된 바실러스 소노렌시스 IDCK19 균주(실시예 1) 및 종래 균주인 바실러스 서브틸리스 IDCK40 균주(비교예 2)을 각각 발효 종균으로 사용하여 청국장을 다음과 같이 제조하였다:

[0094] 백태(진양콩) 1000 g을 약 2배의 물에서 약 12시간 동안 침지하고 나서 약 2시간 물을 빼고 120℃에서 60분간 증자하였다. 증자된 콩을 세 그룹으로 나누어 그중 두 그룹은 각각 발효 틀에 넣은 후, TSB 액체배지에서 12시간 정도 배양한 바실러스 소노렌시스 IDCK19 균주 배양액(실시예 1) 및 바실러스 서브틸리스 IDCK40 균주 배양액(비교예 2)을 각각 5%(v/w)로 접종하고, 35℃에서 5일 동안 발효시켜 청국장을 제조하였다. 나머지 한 그룹의 증자된 콩 (비교예 1)도 하기 시험예에서 분석에 사용하였다.

[0096] **시험예 2. 청국장의 비배당체 이소플라본 함량 분석**

[0097] 제조예 2에서 제조된 청국장에 대해서, 상기 시험예 1과 동일한 방식으로 비배당체 이소플라본 함량 분석을 수행하였고, 그 결과를 도 3에 나타냈다.

[0098] 도 3에 나타낸 바와 같이, 비배당체 이소플라본인 다이드제인, 글리시테인과 제니스테인의 함량이 발효 전(증자콩)인 비교예 1에서는 40.97, 11.24 및 39.46 ㎍/g에 불과하였으며, 비교예 2의 청국장은 65.95, 26.63 및 64.42 ㎍/g 이었으나, 실시예 1의 청국장은 560.27, 41.53 및 91.65 ㎍/g 으로 현저히 증진되었다. 이와 같은 결과는 베타-글루코시다아제 활성이 우수한 바실러스 소노렌시스 IDCK19 균주가 발효 중 베타-글루코시다아제를

다량 생성하여 비배당체 이소플라본의 함량 증진에 작용한 것으로 추측된다.

[0100] **제조예 3: 산양삼 청국장 제조**

[0101] 제조예 1에서 분리동정된 바실러스 소노렌시스 IDCK19 균주를 사용하여 산양삼 청국장 (실시예 2)을 다음과 같이 제조하였다:

[0102] 백태(진양콩) 1000 g을 약 2배의 물에서 약 12시간 동안 침지하고 나서 약 2시간 물을 빼고 불린-콩을 준비하였다. 산양삼((주·농)진생바이오)을 세척한 후 콩 낱알 크기로 절단하여 50 g을 준비하였다. 불린-콩과 산양삼을 혼합한 후 세 그룹으로 나누어 그 중 두 그룹은 120℃에서 60분간 증자하였다. 증자된 원료 혼합물 중 한 그룹은 발효 틀에 넣은 후, TSB 액체배지에서 12시간 정도 종배양한 바실러스 소노렌시스 IDCK19 균주 배양액을 5%(v/w)로 접종하고, 35℃에서 5일 동안 발효시켜 산양삼 청국장(실시예 2)을 제조하였다. 나머지 두 그룹의 원료 혼합물(비교예 3)과 증자된 원료 혼합물 (비교예 4)도 하기 시험예에서 분석에 사용하였다.

[0104] **시험예 3: 산양삼 청국장의 비배당체 이소플라본 함량 분석**

[0105] 제조예 3에서 제조된 산양삼 청국장에 대해서, 상기 시험예 1과 동일한 방식으로 비배당체 이소플라본 함량 분석을 수행하였고, 그 결과 이소플라본 HPLC 크로마토그램을 도 4에 나타내고 함량 분석 결과를 도 5에 나타냈다.

[0106] 도 4a 및 도 5에 나타낸 바와 같이, 비배당체 이소플라본인 다이드제인, 글리시테인과 제니스테인의 함량이 원료 혼합물인 비교예 3에서는 33.16, 8.58와 30.28 ㎍/g에 불과하였으며, 발효전(증자된 원료 혼합물)인 비교예 4에서는 53.06, 20.62과 50.26 ㎍/g 이었으나, 실시예 2의 산양삼 청국장은 488.53, 30.77과 128.06 ㎍/g으로 현저히 증진되었다.

[0108] **시험예 4: 산양삼 청국장의 진세노사이드 함량 분석**

[0109] 제조예 3에서 제조된 산양삼 청국장에 대해서, 진세노사이드 함량 분석을 수행하였다.

[0110] 진세노사이드 함량 분석은 기능성식품분석법의 홍삼 사포닌 분석법에 기술된 방법을 변형하여 고압액체크로마토그래피(HPLC, high press liquid chromatograph)로 분석하였다. 분석 컬럼은 TSKgel ODS-100Z을 사용하여 분석시료 주입량 10 ㎕, 온도는 30℃, 측정파장은 203 nm, 유속은 1.0 ㎖/min으로 하였고 이 동상으로는 A용액은 HPLC water, B용액은 아세토니트릴을 사용하였다. HPLC 분석조건은 이동상 용액은 0분때 A용액 81% : B용액 19%로 흘려주고 15분때에는 A용액 80% : B용액 20%로 흘려주고 40분때 A용액 77% : B용액 23%, 40분때 A용액 77% : B용액 23%, 42분때 A용액 70% : B용액 30%, 75분때에 A용액 65% : B용액 35%, 80분때에 A용액 30% : B용액 70%, 90분때에 A용액 10% : B용액 90%로 이동상을 흘려주었다. 진세노사이드 함량 분석 결과로서, 실시예 2의 진세노사이드 HPLC 크로마토그램을 도 4b에 나타냈고, 진세노사이드 함량 분석 결과는 도 6에 나타내었다.

[0111] 도 4b 및 도 6에 나타낸 바와 같이, 비교예 3의 원료 혼합물에서는 진세노사이드 Rg3, 컴파운드케이와 Rh2가 각각 0.03, 0.02와 0.01 mg/g 검출되었으며, 비교예 4의 증자된 원료 혼합물(발효전)에서는 0.06, 0.06과 0.03 mg/g이었으나, 실시예 2의 산양삼 청국장은 0.12, 0.28과 0.15 mg/g로 현저히 높게 검출되었다.

[0113] **시험예 5: 산양삼 청국장의 총 페놀릭스 함량 및 총 플라보노이드 함량 분석**

[0114] 제조예 3에서 제조된 산양삼 청국장에 대해서, 총 페놀릭스 함량과 총 플라보노이드 함량을 분석하였다.

[0115] 총 페놀릭스(phenolics) 함량은 Folin-Ciocalteu법(Folin & Denis, 1928)으로 분석하였다. 각 분석시료를 적당히 희석한 후 0.5 mL를 시험관에 분주하고 25% Na_2CO_3 용액 0.5 mL를 첨가하여 3분간 정치시키고 2N Folin-Ciocalteu phenol 시약 0.25 mL를 첨가하여 혼합한 다음 1시간 동안 발색시킨 후 분광광도계를 이용하여 750 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이때 총 페놀릭스 표준물질은 갈산를 이용하여 표준 검량곡선을 작성하여 산출하였고, 그 결과를 도 7a에 나타냈다.

[0116] 도 7a에 나타낸 바와 같이, 총 페놀릭스 함량이 비교예 3의 원료 혼합물에서는 5.52 GAE mg/g에 불과하였고, 비

교예 4의 증자된 원료 혼합물에서는 6.68 GAE mg/g이었으나, 실시예 2의 산양삼 청국장은 9.78 GAE mg/g으로 증진되었다. 이와 같은 결과는 바실러스 소노렌시스 IDCK19 균주의 높은 베타-글루코시다아제 활성에 의한 것으로 추측된다.

[0117] 총 플라보노이드(flavonoids) 함량은 Davis변법(Davis, 1947)으로 측정하였다. 분석시료를 적당히 희석한 각 여과액 0.5 mL를 시험관에 분주한고 여기에 디에틸렌 글리콜 1.0 mL 및 1 N NaOH 0.01 mL를 가하여 37℃에서 1시간 반응시킨 후 분광광도계(Spectronic 2D)를 이용하여 420 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이때 총 플라보노이드 표준물질은 루틴을 이용하여 표준 검량곡선을 작성하여 산출하였고, 그 결과를 도 7b에 나타냈다.

[0118] 도 7b에 나타낸 바와 같이, 비교예 3의 원료 혼합물에서는 0.22 RE mg/g에 불과하였고, 비교예 4의 증자된 원료 혼합물에서는 0.40 RE mg/g이었으나, 실시예 2의 산양삼 청국장은 0.75 RE mg/g으로 증진되었다. 이와 같은 결과는 바실러스 소노렌시스 IDCK19 균주의 높은 베타-글루코시다아제 활성에 의한 것으로 추측된다.

[0120] **시험예 6: 항산화 활성 분석**

[0121] 제조예 3에서 제조된 산양삼 청국장에 대해서, 항산화 활성 분석을 DPPH, ABTS 라디칼 소거활성과 FRAP 환원력 측정을 통하여 수행하였다.

[0122] 구체적으로 DPPH 라디칼 소거활성은 2, 1, 0.5와 0.25 mg/g 농도 각각의 분석시료 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.

[0123] DPPH라디칼 소거활성의 음성 대조구는 시료 대신 추출 용매를 사용하여 동일한 방법으로 진행하여 흡광도의 차이를 다음과 같은 식에 의해 백분율(%)로 산출하였으며, 그 결과를 도 8a에 도시하였다.

[0124] DPPH 라디칼 소거활성(%)=[1-(음성대조구 흡광도÷실험구 흡광도)]×100

[0125] 도 8a에 도시된 바와 같이, DPPH라디칼 소거활성은 비교예 3의 원료 혼합물에서는 2, 1, 0.5와 0.25 mg/g 처리 시 49.92%, 28.60%, 13.38%와 7.33%에 불과하였고, 비교예 4의 증자된 원료 혼합물에서는 58.86%, 34.18%, 18.21%와 10.37%이었으나, 실시예 2의 산양삼 청국장은 84.07%, 55.06%, 32.58%와 16.05%으로 증진되었다.

[0126] ABTS 라디칼 소거활성은 2.45 mM $K_2S_2O_8$ 5 ml와 7 mM ABTS 5 mL를 혼합한 후 암실에서 12~16시간 반응시켜 ABTS 라디칼을 형성시킨 후 732 nm에서 메탄올 용액을 이용해 흡광도 값이 0.7±0.02가 되도록 조절한 ABTS 용액 0.9 ml와 2, 1, 0.5와 0.25 mg/g 농도 각각의 분석시료 0.1 ml를 첨가하여 3분간 정치시켜 732 nm에서 흡광도를 측정하였다. ABTS 라디칼 소거활성의 음성 대조구는 시료 대신 추출 용매를 사용하여 동일한 방법으로 진행하여 흡광도의 차이를 상기와 같은 식에 의해 백분율(%)로 산출하였으며, 그 결과를 도 8b에 도시하였다.

[0127] 도 8b에 도시된 바와 같이, ABTS 라디칼 소거활성은 비교예 3의 원료 혼합물에서는 2, 1, 0.5와 0.25 mg/g 처리 시 67.32%, 42.00%, 25.23%와 12.28%에 불과하였고, 비교예 4의 증자된 원료 혼합물에서는 77.52%, 55.52%, 31.57%와 20.37%이었으나, 실시예 2의 산양삼 청국장은 92.92%, 74.20%, 51.26%와 32.67%으로 증진되었다.

[0128] FRAP 환원력 측정은 아세테이트 버퍼(30 mM, pH 3.6), TPTZ 시약(10 mM in 40 mM HCl) 및 $FeCl_3$ 용액(20 mM in DW)을 10:1:1 (v/v/v)의 비율로 혼합하여 37 ℃ 항온기에서 15분 예비 반응 후 FRAP 측정 시약으로 사용하였다. 2, 1, 0.5와 0.25 mg/g 농도 각각의 분석시료 50 와 FRAP 시약 950 ㎕를 시험관에 분주하여 37 ℃에서 15분 반응시키고 분광광도계를 사용하여 593 nm에서 흡광도를 측정하였고, 그 결과를 도 8c에 나타냈다.

[0129] 도 8c에 도시된 바와 같이, FRAP 환원력은 비교예 3의 원료 혼합물에서는 2, 1, 0.5와 0.25 mg/g 처리 시 1.04, 0.69, 0.37와 0.15에 불과하였고, 비교예 4의 증자된 원료 혼합물에서는 1.23, 0.84, 0.50과 0.26이었으나, 실시예 2의 산양삼 청국장은 1.57, 1.14, 0.74 및 0.42로 증진되었다.

[0130] 상기 결과들로부터 본 발명에 따른 산양삼 청국장은 우수한 항산화 활성을 가짐을 알수 있다.

[0131]

수탁번호

[0132]

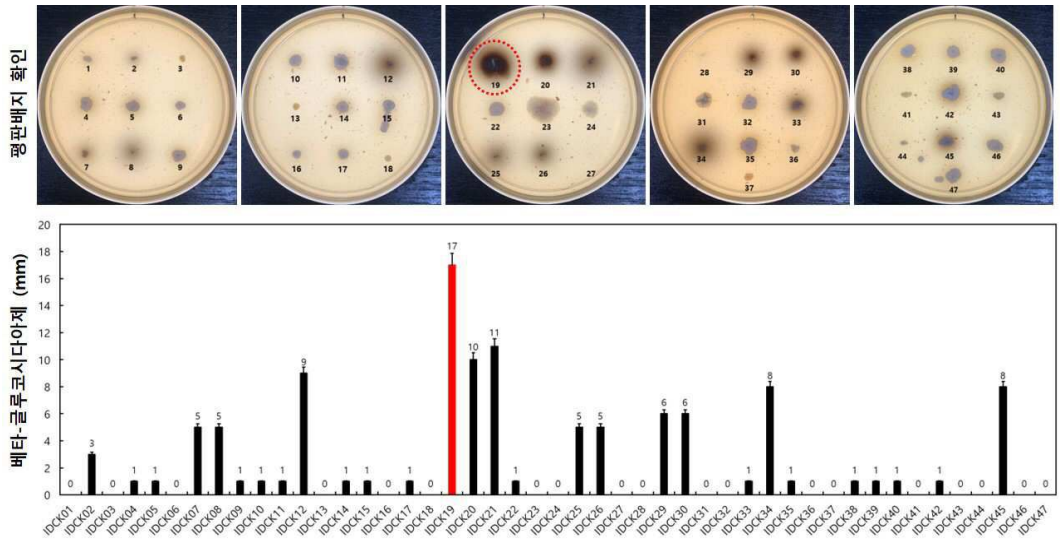
기탁기관명 : 한국생명공학연구원

수탁번호 : KCTC19051P

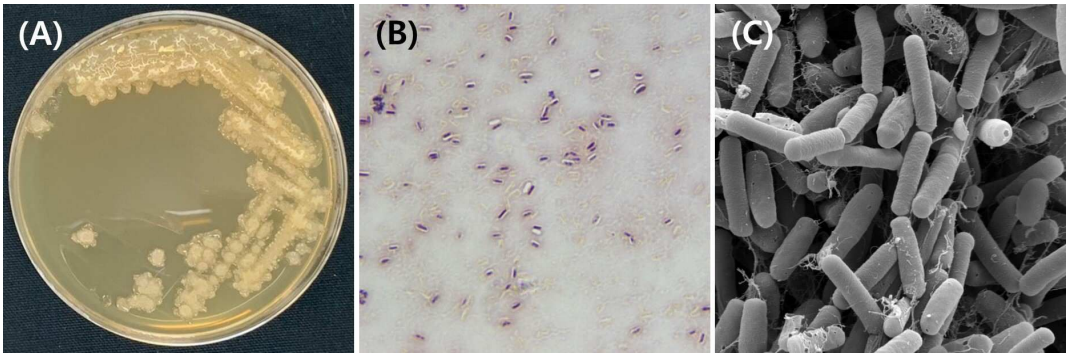
수탁일자 : 20221121

도면

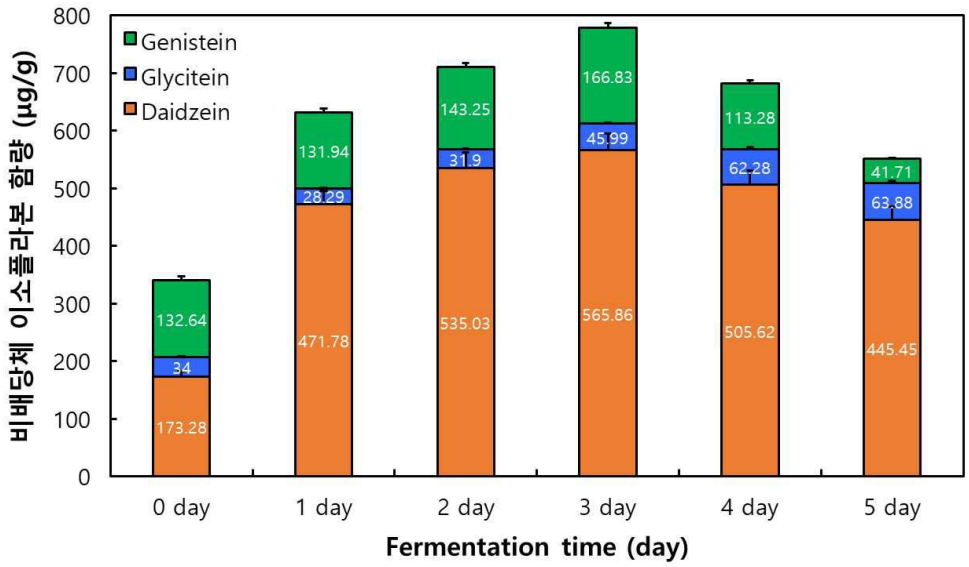
도면1a



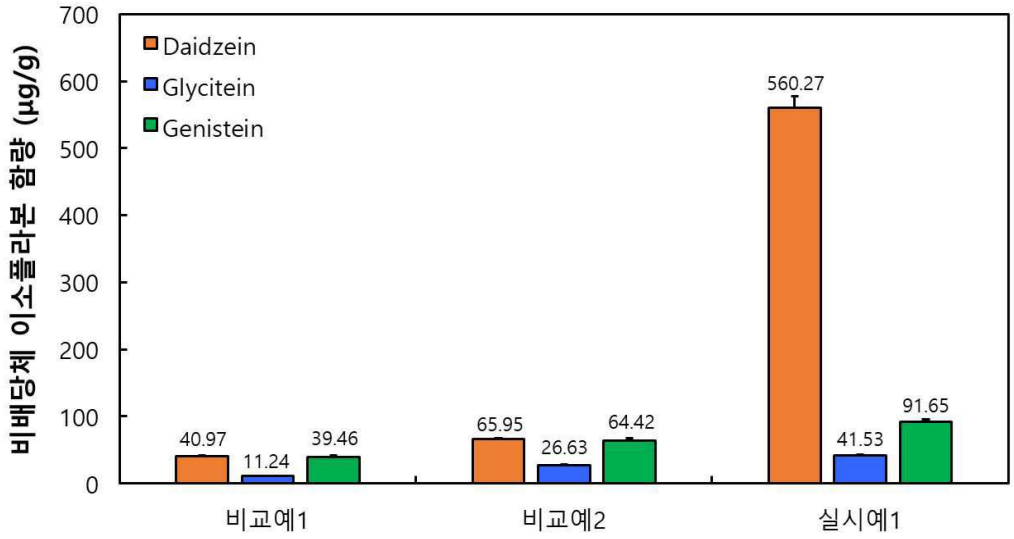
도면1b



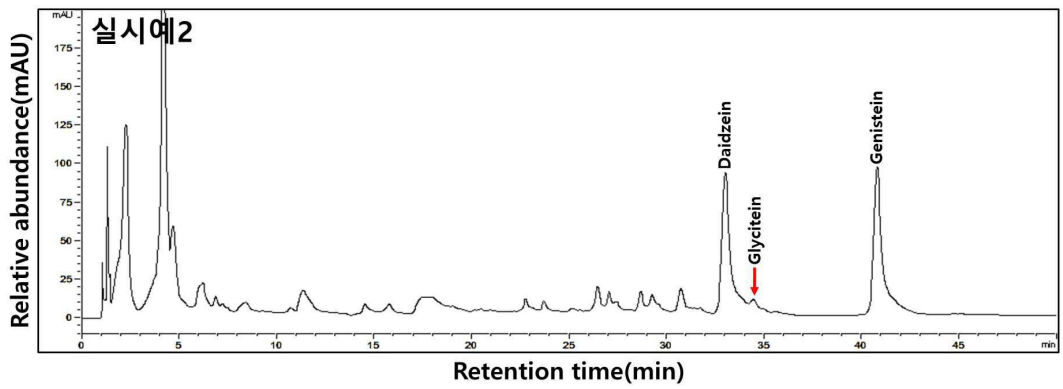
도면2


Genistein
Glycitein
Daidzein
비배당체 이소플라본 함량 (μg/g)
800
700
600
500
400
300
200
100
0
132.64
34
173.28
131.94
28.29
471.78
143.25
31.9
535.03
166.83
45.99
565.86
113.28
62.28
505.62
41.71
63.88
445.45
0 day
1 day
2 day
3 day
4 day
5 day
Fermentation time (day)

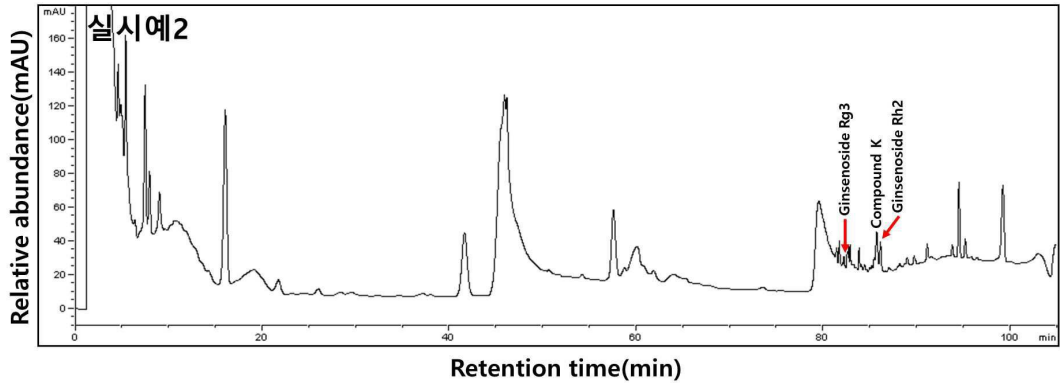
도면3


Daidzein
Glycitein
Genistein
비배당체 이소플라본 함량 (μg/g)
700
600
500
400
300
200
100
0
40.97
11.24
39.46
65.95
26.63
64.42
560.27
41.53
91.65
비교예1
비교예2
실시예1

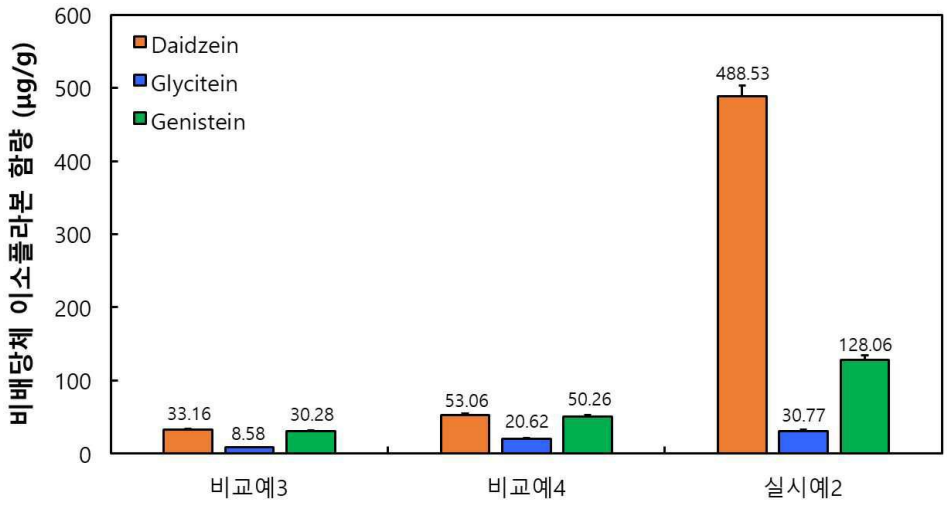
도면4a


실시예2
Relative abundance(mAU)
mAU
175
150
125
100
75
50
25
0
Daidzein
Glycitein
Genistein
0
5
10
15
20
25
30
35
40
45
min
Retention time(min)

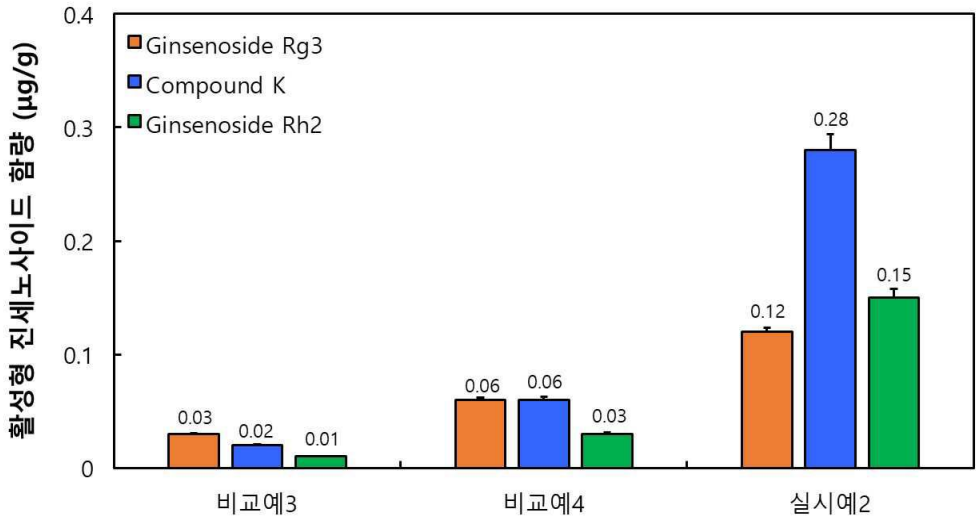
도면4b


실시예2
Relative abundance(mAU)
mAU
Ginsenoside Rg3
Compound K
Ginsenoside Rh2
Retention time(min)
min

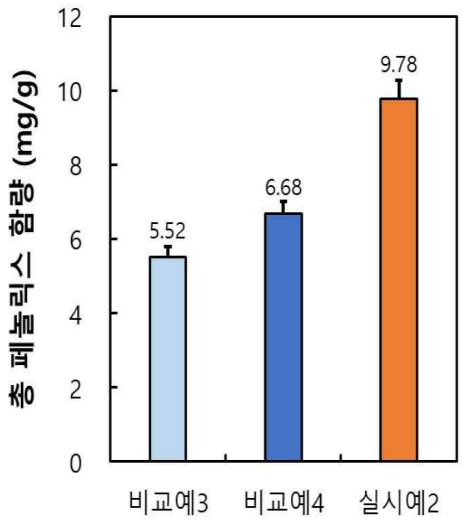
도면5


비배당체 이소플라본 함량 (μg/g)
Daidzein
Glycitein
Genistein
33.16
8.58
30.28
53.06
20.62
50.26
488.53
30.77
128.06
비교예3
비교예4
실시예2

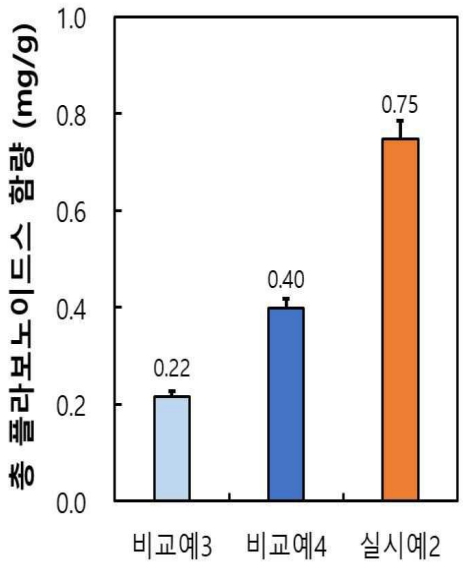
도면6


활성형 진세노사이드 함량 (μg/g)
Ginsenoside Rg3
Compound K
Ginsenoside Rh2
0.03
0.02
0.01
0.06
0.06
0.03
0.12
0.28
0.15
비교예3
비교예4
실시예2

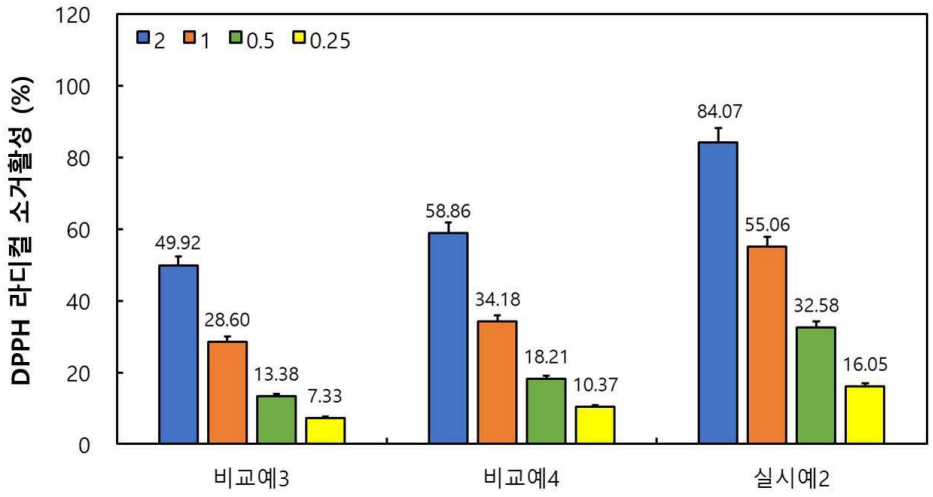
도면7a


총 페놀릭스 함량 (mg/g)
12
10
8
6
4
2
0
5.52
6.68
9.78
비교예3
비교예4
실시예2

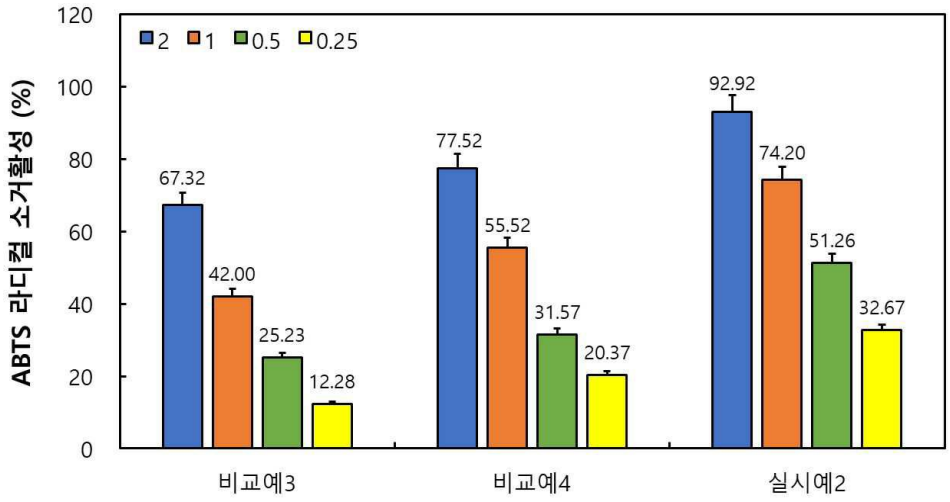
도면7b


총 플라보노이드스 함량 (mg/g)
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
0.22
0.40
0.75
비교예3
비교예4
실시예2

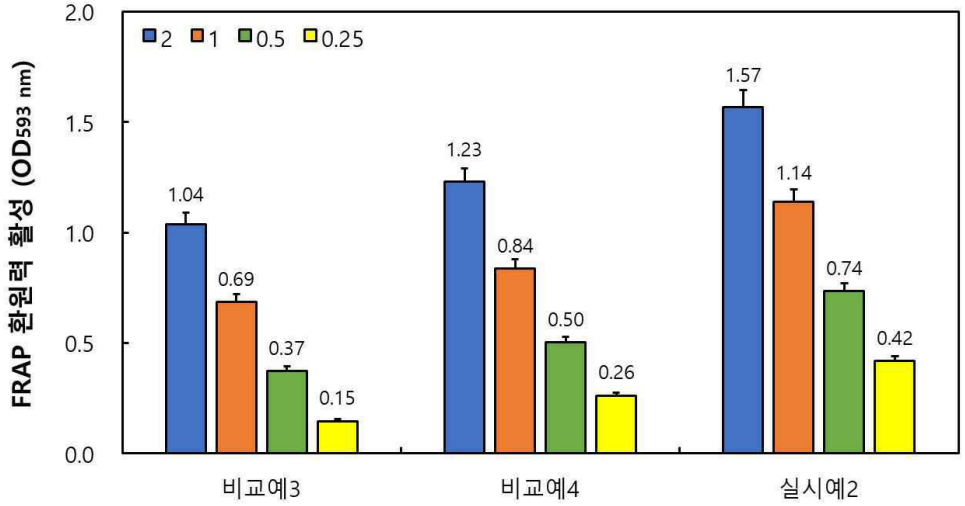
도면8a



도면8b



도면8c



도면9

16S rRNA 유전자 염기서열

1 GGAGAGTTTG ATCCTGGCTC AGGACGAACG CTGGCGGCGT GCCTAATACA TGCAAGTCGA
61 GCGAACCGAC GGGAGCTTGC TCCCTTAGGT TAGCGGCGGA CGGGTGAGTA ACACGTGGGT
121 AACCTGCCCG TAAGACTGGG ATAACTCCGG GAAACCGGGG CTAATACCGG ATGCTTGATT
181 GAACCGCATG GTTCAATTAT AAAAGGTGGC TTTTAGCTAC CACTTACAGA TGGACCCGCG
241 GCGCATTAGC TAGTTGGTGA GGTAACGGCT CACCAAGGCG ACGATGCGTA GCCGACCTGA
301 GAGGGTGATC GGCCACACTG GGACTGAGAC ACGGCCCAGA CTCCTACGGG AGGCAGCAGT
361 AGGGAATCTT CCGCAATGGA CGAAAGTCTG ACGGAGCAAC GCCGCGTGAG TGATGAAGGT
421 TTTCGGATCG TAAAACTCTG TTGTTAGGGA AGAACAAGTA CCGTTCGAAC AGGGCGGTGC
481 CTTGACGGTA CCTAACCAGA AAGCCACGGC TAACTACGTG CCAGCAGCCG CGGTAATACG
541 TAGGTGGCAA GCGTTGTCCG GAATTATTGG GCGTAAAGCG CGCGCAGGCG GTTTCTTAAG
601 TCTGATGTGA AAGCCCCCGG CTCAACCGGG GAGGGTCATT GGAAACTGGG GAACTTGAGT
661 GCAGAAGAGG AGAGTGGAAT TCCACGTGTA GCGGTGAAAT GCGTAGAGAT GTGGAGGAAC
721 ACCAGTGGCG AAGGCGACTC TCTGGTCTGT AACTGACGCT GAGGCGCGAA AGCGTGGGGA
781 GCGAACAGGA TTAGATACCC TGGTAGTCCA CGCCGTAAAC GATGAGTGCT AAGTGTTAGA
841 GGGTTTCCGC CCTTTAGTGC TGCAGCAAAC GCATTAAGCA CTCCGCCTGG GGAGTACGGT
901 CGCAAGACTG AAACTCAAAG GAATTGACGG GGGCCCGCAC AAGCGGTGGA GCATGTGGTT
961 TAATTCGAAG CAACGCGAAG AACCTTACCA GGTCTTGACA TCCTCTGACA CCCCTAGAGA
1021 TAGGGCTTCC CCTTCGGGGG CAGAGTGACA GGTGGTGCAT GGTTGTCGTC AGCTCGTGTC
1081 GTGAGATGTT GGGTTAAGTC CCGCAACGAG CGCAACCCTT GATCTTAGTT GCCAGCATTC
1141 AGTTGGGCAC TCTAAGGTGA CTGCCGGTGA CAAACCGGAG GAAGGTGGGG ATGACGTCAA
1201 ATCATCATGC CCCTTATGAC CTGGGCTACA CACGTGCTAC AATGGGCAGA ACAAAGGGCA
1261 GCGAAGCCGC GAGGCTAAGC CAATCCCACA AATCTGTTCT CAGTTCGGAT CGCAGTCTGC
1321 AACTCGACTG CGTGAAGCTG GAATCGCTAG TAATCGCGGA TCAGCATGCC GCGGTGAATA
1381 CGTTCCCGGG CCTTGTACAC ACCGCCCGTC ACACCACGAG AGTTTGTAAC ACCCGAAGTC
1441 GGTGAGGTAA CCTTTTGGAG CCAGCCGCCG AAGGTGGGAC AGATGATTGG GGTGAAGTCG
1501 TAACAAGGTA GCCGTA

도면10

recA 유전자 염기서열

```
1     CTGATATAAG AGTACCATGC ACCGCTTTTT TGCACGATGT CAAGCTCTGT TCCAAGGTCG
61    ATGATCTCCC CTTCTTTTGA GATTCCTTCG CCGTACATAA TGTCCACTTC GGCTGTCCGG
121   AAAGGAGGGG CCACTTTGTT TTTCACGACT TTAATTTTCG TCTTGTTCCC CATGACATCA
181   TTGCCTTGTT TAAGCTGTTC GGCTCGGCGC ACTTCAAGGC GCACAGAAGA ATAGAACTTC
241   AAGGCTCTTC CGCCCGGAGT CGTCTCCGGA TTACCAAACA TTACACCGAC TTTTTCGCGG
301   ATCTGGTTAA TAAAGATCGC GATGGTTTTC GATTTATTGA TGGCTCCGGA AAGCTTCCGC
361   AGCGCCTGGG ACATCAGTST GGCCTGCAGG CCGACATGAG AATCTCCCAT GTCTCCTTCG
421   ATTTCCGCTT TCGGCACGAG CGCAGCAACC GAGTCGATGA CAACGATATC AACGGCTCCG
481   CTTCTGACAA GCGCTTCCGC AATTTCAAGC GCCTGTTCTC CCGTATCAGG CTGGGACAGC
541   AGCAGCTCGT CAATGTTGAC ACCTAATTTT TGCGCGTAAA CGGGGTCCAG CGCGTGTTCG
601   GCGTCTATGA ACGCAGCCTG TCCGCCCTGC TGTTGAACTT CGGCAATCGC ATGAAGAGCC
661   ACCGTCGTTT TACCGGAGCT TTCAGGACCG TATACTTCAA TAATCCTTCC GCGCGGATAT
721   CCGCCCACAC CGAGGGCTGC ATCGAGCGCT AAAGAACCGC TCGGTACAGT TGAAATTCTT
781   GTTTCAGTCT GTTCGCCCAG TTTCATAATC GAACCTTTAC CAAACTGTTT TTCTATTTGT
841   TTAAGCGCCA TGTGCTAAGG CTGCCTGACG ATCACTCA
```

도면11

gyrB 유전자 염기서열

1 ACGGATGTGC GAGCCGTCCA CGTCTGCGTC GGTCATAATC ACGACTTTAT GGTAACGCGC
61 TTTTTCGAGG TTGAAATCTT CGCCGATTCC GGTGCCGAGC GCGGTTATCA TCGAGCGGAC
121 TTCNTTGTTT GACAAAATTT TATCAAGGCG GGCTTTTTCG ACGTTCAAAA TTTTACCCCG
181 CAAAGGCAAA ATCGCCTGGA AATGACGGTC GCGTCCCTGC TTTGCCGAGC CGCCCGCAGA
241 ATCACCCTCA ACGATATAAA GCTCGGAAAT CGTCGGATCT TTCGAAGAGC AGTCTGCCAA
301 TTTCCCTGGC AAATTCGATA CTTCCAGCGC GCTTTTTCTG CGCGTCAATT CGCGTGCTTT
361 TTTTGCGGCC ATTCGCGCTC TTGCTGCCAT CACGCCTTTT TCAACAATTT TTTTCGCTGA
421 GTCGGGGTTT TCAAGCTGGA ATTTTTCCAA TGCTTCTGAA AATAGAGCAT CTGTGATCGC
481 GCGGGCTTCT GAGTTGCCGA GCTTTGTTTT CGTCTGCCCT TCAAACTGCG GATCCGGATG
541 CTTGATTGAA ATAATCGCTG TCAAACCTTC CCGGACATCT TCCCCGCTTA AATTCGGGTC
601 GTTTTCTTTG AATACGCCGT TCCTTCTCGC GTAATCATTG ATGACCCGCG TCAAGCCTGT
661 TTTAAAGCCT GCTTCATGCG TTCCGCCTTC ATACGTATGG ATGTTGTAGG CGAATGAATA
721 GATGTTGCTC GTGTAGCTGT CATTGTATTG AAGAGCGACC TCGACCGTAA TGCCGTCTTT
781 GGACCCTTCA ATGTAGACCG GCTCCTCGTG AATGACTTCT CGTGAGCGGT TCAAGTGTTC
841 AACATAGCTT TTAATTCCGC CCTCATAGCA GTACTCATTC TTGCGTTCTT TTCCTTCACG
901 CTTGTCTTCG ATCGTGATTT TGACGCCTTT TGTCAAAAAA GCGAGTTCTC GGACACGAGT
961 GGCAAGCGTA TCATAGTCGT ATTCAGTAGT TTCCGTGAAT ATTTCCGGAT CAGGCTTGAA
1021 GTGAGTGGTC GTTCCTGTCA CATCCGTATC GCCGATGACT TTCAAATCAG CTTTTGGAAC
1081 GCCCCGTTCA TATTCCTGGT AATGGACTTT TCCGTCTCTG TAAACCGTTA CATCAAGCTC
1141 TGTTGACAGG GCGTTAACAA CAGAAGCACC GACGCCGTGC AAACCACCTG AAACTTTATA
1201 TCCGCTTCCG TCGAACTTGC CCCCTGCATG CAGAACGGTC ATGATGACTT C

서 열 목 록 (첨부)



아이콘을 클릭하시면 서열목록 파일이 열립니다.

본 공보 PDF는 첨부파일을 가지고 있습니다. Acrobat Reader PDF뷰어를 제공하지 않는 브라우저(크롬, 파이어폭스, 사파리 등)의 경우 첨부파일 열기가 제한되어 있으므로 Acrobat Reader PDF뷰어 설치 후 공보 PDF를 다운로드 받아 해당 뷰어에서 조회해주시기 바랍니다.