(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2023-0064287
(43) 공개일자 2023년05월10일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A23L 29/00 (2016.01) *A23L 11/00* (2021.01)
A23L 19/00 (2022.01) *A23L 33/10* (2022.01)
A23L 5/10 (2016.01) *A61K 8/96* (2006.01)
(52) CPC특허분류
A23L 29/065 (2016.08)
A23L 11/00 (2023.05)
(21) 출원번호 10-2021-0149719
(22) 출원일자 2021년11월03일
심사청구일자 2021년11월03일

(71) 출원인
경상국립대학교산학협력단
경상남도 진주시 진주대로 501 (가좌동)
(72) 발명자
조계만
경상남도 진주시 진주대로 829번길 21, 103동 2501호
강다원
경상남도 진주시 새평거로 30 엠코타운 더 프라하 104동 204호
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
조영신

전체 청구항 수 : 총 12 항

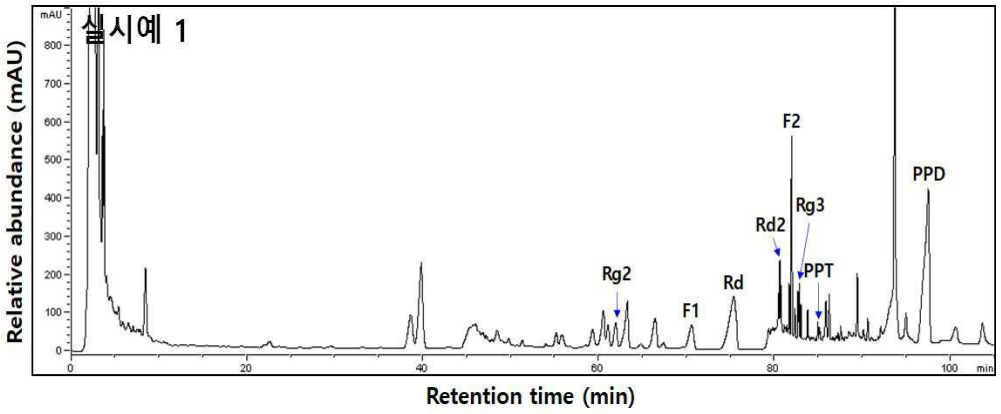
(54) 발명의 명칭 **진세노사이드 Rg2, F1, Rd, Rd2, F2, Rg3, 프로토파낙사트리올 및 프로토파낙사디올이 강화된 산양삼새싹 홍국균 발효조성물 및 그 제조방법**

(57) 요 약

본 발명에서는 산양삼새싹을 홍국균으로 발효하여 제조한 진세노사이드 Rg2, F1, Rd, Rd2, F2, Rg3, 프로토파낙사트리올, 및 프로토파낙사디올과 항산화 활성, 알파-글루코시다아제 저해활성 및 췌장-리파아제 저해활성이 현저히 증진된 발효조성물 및 그 제조방법이 개시된다.

본 발명에 따른 산양삼새싹 홍국균 발효조성물은 진세노사이드 Rg2, F1, Rd, Rd2, F2, Rg3, 프로토파낙사트리올, 및 프로토파낙사디올이 고함량으로 함유되고, 항산화 활성, 당뇨 및 비만 개선 효과가 우수하여 기능성식품 및 화장품의 소재로 사용될 수 있다.

대 표 도 - 도2b



(52) CPC특허분류
A23L 19/00 (2022.01)
A23L 33/10 (2022.01)
A23L 5/13 (2016.08)
A61K 8/96 (2013.01)
A23V 2002/00 (2013.01)
A23V 2200/302 (2013.01)
A23V 2200/328 (2013.01)
A23V 2200/332 (2013.01)

(72) 발명자
조두용
경상남도 양산시 회현1길 3, 101동 306호
이희율
경상남도 진주시 금산면 금산로 130 금호맨션 410호
정재각
경상남도 함양군 함양읍 인당2길 26-7
장무연
경상남도 거제시 아주2로2길 거제아주코오롱하늘채아파트 103동 301호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1425140149
과제번호	2020187A00-2022-BA01
부처명	산림청
과제관리(전문)기관명	한국임업진흥원
연구사업명	산림생명자원 소재발굴사업
연구과제명	유효성분이 극대화된 산양삼 이용 호흡기 질환 예방, 관리 제품 개발
기 여 율	50/100
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, 의료기술개발사업
연구과제명	대사체 농업 가능 식물공장 및 활성대사체 강화 산업화 소재 개발
기 여 율	50/100
과제수행기관명	경상국립대학교 산학협력단
연구기간	2020.06.01 ~ 2022.12.31

명 세 서

청구범위

청구항 1

산양삼 90~94 중량% 및 콩 6~10 중량%를 혼합한 혼합물을 홍국균으로 발효하여 제조된 Rg2, F1, Rd, Rd2, F2, Rg3, 프로토파낙사트리올 및 프로토파낙사디올이 강화된 산양삼새싹의 홍국균 발효조성물.

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 발효조성물은 진세노사이드 Rg2를 1.34 mg/g 이상, F1을 1.3 mg/g 이상, 프로토파낙사트리올을 0.22 mg/g 이상 함유하는 것을 특징으로 하는, 진세노사이드 Rg2, F1, Rd, Rd2, F2, Rg3, 프로토파낙사트리올, 및 프로토파낙사디올이 강화된 산양삼새싹의 홍국균 발효조성물.

청구항 3

제 1항에 있어서, 상기 발효조성물은 Rd를 5.63 mg/g 이상, Rd2를 1.18 mg/g 이상, F2를 3.25 mg/g 이상, Rg3를 1.15 mg/g 이상, 및 프로토파낙사디올이 14.6 mg/g 이상 함유하는 것을 특징으로 하는, 진세노사이드 Rg2, F1, Rd, Rd2, F2, Rg3, 프로토파낙사트리올, 및 프로토파낙사디올이 강화된 산양삼새싹의 홍국균 발효조성물.

청구항 4

제 1항에 있어서, 상기 발효는 홍국균을 3~10%(v/w) 농도로 접종하여 20~30℃에서 8~12일간 발효하는 것인, 진세노사이드 Rg2, F1, Rd, Rd2, F2, Rg3, 프로토파낙사트리올, 및 프로토파낙사디올이 강화된 산양삼새싹의 홍국균 발효조성물.

청구항 5

제 1항에 있어서, 상기 혼합물은 발효 전에, 물을 5~10배(v/w)으로 혼합하여 5~7시간 수화한 후, 100~120℃에서 30~90분 증자하는 것을 특징으로 하는, 진세노사이드 Rg2, F1, Rd, Rd2, F2, Rg3, 프로토파낙사트리올, 및 프로토파낙사디올이 강화된 산양삼새싹의 홍국균 발효조성물.

청구항 6

제 1항에 있어서, 상기 홍국균은 모나스커스 필로서스(*Monascus pilosus*) 및 모나스커스 퍼프레우스(*Monascus purpureus*)로 구성되는 군에서 선택되는 1종 이상인 것인, 진세노사이드 Rg2, F1, Rd, Rd2, F2, Rg3, 프로토파낙사트리올, 및 프로토파낙사디올이 강화된 산양삼새싹의 홍국균 발효조성물.

청구항 7

진세노사이드 Rg2, F1, Rd, Rd2, F2, Rg3, 프로토파낙사트리올 및 프로토파낙사디올이 강화된 산양삼새싹의 홍국균 발효조성물의 제조방법으로, 상기 방법은

ⅰ) 산양삼새싹 90~94 중량% 및 콩 6~10 중량%를 혼합한 후 물을 5~10배(v/w)으로 혼합하여 5~7시간 수화하는 단계;

ⅱ) 100~120℃에서 30~60분 증자하는 단계; 및

iii) 홍국균을 3~10%(v/w) 농도로 접종하여 25~30℃에서 8~12일간 발효하는 단계를 포함하는 것인 방법.

청구항 8

제 7항에 있어서, 상기 홍국균은 모나스커스 필로서스(*Monascus pilosus*) 및 모나스커스 퍼프레우스(*Monascus purpureus*)로 구성되는 군에서 선택되는 1종 이상인 것인, 진세노사이드 Rg2, F1, Rd, Rd2, F2, Rg3, 프로토파낙사트리올 및 프로토파낙사디올이 강화된 산양삼새싹의 홍국균 발효조성물의 제조방법.

청구항 9

제 1항에 따른 발효조성물을 포함하는 증진된 항산화 활성을 갖는 기능성식품.

청구항 10

제 1항에 따른 발효조성물을 포함하는 당뇨 개선용 기능성식품.

청구항 11

제 1항에 따른 발효조성물을 포함하는 비만 개선용 기능성식품.

청구항 12

제 1항에 따른 발효조성물을 포함하는 화장품.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 진세노사이드 Rg2, F1, Rd, Rd2, F2, Rg3, 프로토파낙사트리올 및 프로토파낙사디올이 강화된 산양삼새싹 홍국균 발효조성물 및 그 제조방법에 관한 것으로, 더 상세하게는 산양삼새싹을 홍국균으로 발효하여 제조한 진세노사이드 Rg2, F1, Rd, Rd2, F2, Rg3, 프로토파낙사트리올, 및 프로토파낙사디올과 항산화 활성, 알파-글루코시다아제 저해활성, 및 췌장-리파아제 저해활성이 현저히 증진된 발효조성물 및 그 제조방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0003] 삼(*Ginseng*)은 재배환경에 따른 인위적인 성장과 자연적인 성장의 차이와 형태학적 차이 등에 따라 인삼(人蔘), 산삼(山蔘), 또는 산양삼(山羊蔘)으로 구분한다. 특히 산양삼은 오가피과에 속하며 다년생 초목인 인삼(*Panax ginseng*)이 산간의 삼림하의 야생상태에서 자연적으로 성장한 산삼의 씨앗이나 유삼을 인위적으로 산에서 재배한 것을 말하며 이들을 산양삼이라 한다. 인삼의 경우에는 대부분 노두(머리 부분)가 3-7개 정도이나 산양삼은 연령에 따라 그 이상인 것이 많으며 인삼의 뿌리는 굵고 짧으나 산양삼은 길고 가늘다. 산양삼(山養蔘)이란 「산지관리법」 제2조 1호의 산지에서 재배하고 「임업 및 산촌 진흥촉진에 관한 법률」 제18조의 4에 따른 품질검사에 합격한 오갈피나무과(科) 인삼속(人蔘屬) 식물을 말한다. 산양삼은 고려인삼(高麗人蔘)의 인삼종으로 *Panax ginseng* C.A. Mey.라는 학명으로 불리며, 속명인 '*Panax*'는 만병통치약을 뜻한다.

[0004] 진세노사이드는 트리터펜노이드(triterpenoid)의 담마란네(dammarane)계의 인삼 속의 식물에만 존재하는 특유 사포닌이다. 기본 골격의 탄소 3, 6, 및 20번의 위치에 글루코스, 자일로스 및 람노스 등의 당을 결하는 형태의 구조를 가지며 이들은 프로토파낙사디올(protopanaxadiol), 프로토파낙사트리올(protopanaxatriol), 올레놀익산(oleanolic acid), 및 옥틸롤(octillol) 계열로 나눠지며, 약성이 매우 온화하고 과량투여에 의한 독성이 없으

며 용혈작용이 거의 없는 것으로 알려졌다. 프로토파낙사디올 계열은 진세노사이드 Rb1, Rb2, Rb3, Rc, Rd, 및 Rg1 등이 있으며, 프로토파낙사트리올 계열은 진세노사이드 Re, Rf, Rg1, 및 Rg2 등이 있다. 이러한 진세노사이드들은 여러 효능들이 알려져 있다. 대표적으로 항암, 항당뇨작용 및 면역기능 조절작용 등에 효능이 있다고 보고되었다. 보통 인삼은 뿌리만 식용으로 사용되고 있으며 이는 재배 년 수가 지날수록 잎의 경질화 등에 의해 식용이 어렵기 때문이다. 하지만 광합성과 관련이 있는 인삼의 잎에도 적지 않은 진세노사이드가 함유되어 있다고 보고되었다.

[0005] 산양삼새싹(mountain-cultivated ginseng sprout)은 산양삼 3년근 이상을 해발 500m 이상 숲에서 5월에서 6월 사이 잎과 줄기 자란 것이나 혹은 산양삼 3년근 이상을 일정한 환경이 제어되는 시설(스마트팜 혹은 식물공장)에서 20일~120일 동안 잎과 줄기 자란 것을 칭한다. 산양삼새싹은 재배동안에는 환경이 제어되는 시설에서는 연중생산 가능하고 재배 기간의 짧아서 산업적 이용면에서 장점이 있어, 이의 가공품의 개발이 요구되고 있다.

[0006] 홍국균은 반자낭균과(Hemiascomycetaceae) 홍국균속(Monascaceae)에 속하며 현재 약 70종류가 분리되어 동정되어 있다. 증백미에 *Monascus*속 곰팡이를 배양하여 적색 색소를 내는 것이 특징으로 약 600년 전부터 동아시아권 국가에서 보존제, 수산 연제품, 축산가공품 등에 착색제, 소화 촉진제 등의 목적으로 사용되어왔다. 홍국균을 이용하여 발효시킨 커피 생두 발효물을 포함하는 항염증 및 면역증진용 조성물(한국특허등록: 제10-1492174)이 개시되어 있다.

[0007] 그러나 산양삼새싹은 홍국균에 의한 성공적인 발효의 전례가 없을 뿐만 아니라, 특히 진세노사이드 Rg2, F1, Rd, Rd2, F2, Rg3, 프로토파낙사트리올 및 프로토파낙사디올이 현저히 증진된 산양삼새싹 홍국균 발효조성물은 개발된 바 없다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009] 이에 본 발명자들은 종래 기술의 요구에 부응하기 위한 연구를 지속한 결과, 산양삼새싹을 홍국균으로 발효한 경우, 진세노사이드 Rg2, F1, Rd, Rd2, F2, Rg3, 프로토파낙사트리올 및 프로토파낙사디올이 현저히 증진됨을 확인하고 본 발명을 완성하게 되었다.

[0010] 따라서 본 발명의 목적은 진세노사이드 Rg2, F1, Rd, Rd2, F2, Rg3, 프로토파낙사트리올 및 프로토파낙사디올이 강화된 산양삼새싹의 홍국균 발효조성물을 제공하는 것이다.

[0011] 본 발명의 또 다른 목적은 진세노사이드 Rg2, F1, Rd, Rd2, F2, Rg3, 프로토파낙사트리올 및 프로토파낙사디올이 강화된 산양삼새싹의 홍국균 발효조성물의 제조방법을 제공하는 것이다.

[0012] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 산양삼새싹의 홍국균 발효조성물을 포함하는 기능성식품을 제공하는 것이다.

[0013] 본 발명의 또 다른 목적은 본 발명의 산양삼새싹의 홍국균 발효조성물을 포함하는 화장품을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0015] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 산양삼새싹과 콩의 혼합물을 홍국균으로 발효하여 제조된 진세노사이드 Rg2, F1, Rd, Rd2, F2, Rg3, 프로토파낙사트리올, 및 프로토파낙사디올이 강화된 산양삼새싹의 홍국균 발효조성물을 제공한다.

[0016] 본 발명에서 산양삼새싹은 산양삼 3년근 이상을 해발 500m 이상 숲에서 5월에서 6월 사이 잎과 줄기 자란 것이나 혹은 산양삼 3년근 이상을 일정한 환경이 제어되는 시설(스마트팜 혹은 식물공장)에서 20~120일 동안 잎과 줄기 자란 것을 칭하는 것으로, 바람직하게는 산양삼 3년근 이상을 해발 500m 이상 숲에서 5월 및 일정한 환경이 제어되는 시설에서 25~45일 동안 생육시켜 잎과 줄기가 자란 것을 사용하는 것이 바람직하다.

[0017] 본 발명의 혼합물에서 산양삼새싹은 90~94 중량%, 콩은 6~10 중량%로 포함되는 것이 바람직하고, 가장 바람직하게는 산양삼새싹 90 중량% 및 콩 10 중량%가 포함된다.

[0018] 본 발명에서 콩은 주로 홍국균이 생육에 필요한 질소원의 역할을 하면서도 홍국균의 발효(물질전환작용)를 증진

시키는 기능도 한다.

[0019] 산양삼새싹의 함량이 상기 범위를 벗어나면, 진세노사이드 Rg2, F1, Rd, Rd2, F2, Rg3, 프로토파낙사트리올, 및 프로토파낙사디올의 함량이 떨어지며, 콩의 함량이 상기 범위를 벗어나면 홍국균의 균사 성장이 충분하지 않을 수 있다. 홍국균의 성장 정도와 진세노사이드 Rg2, F1, Rd, Rd2, F2, Rg3, 프로토파낙사트리올 및 프로토파낙사디올의 함량을 모두 고려할 때 산양삼새싹 : 콩의 중량비는 9 : 1인 것이 가장 바람직하다.

[0020] 본 발명에서 산양삼새싹은 세척한 후 건조하고 세절하여 50~55℃에서 2~3일간 건조하여 사용하는 것이 바람직하며, 콩은 세척하고 물기를 제거한 것을 사용한다.

[0021] 본 발명에서 '홍국균'은 모나스쿠스(*Monascus*) 속의 진균을 의미한다.

[0022] 본 발명에서 산양삼새싹 기질과 혼합 배양되는 홍국균은 모나스커스(*Monascus*) 속에 속하고 2차 대사산물로 모나콜린 K를 생성할 수 있는 균이라면 그 종류가 제한되지 않는다. 예를 들어, 본 발명에서 사용될 수 있는 홍국균은 모나스커스 필로서스(*Monascus pilosus*), 모나스커스 러버(*Monascus ruber*), 모나스커스 퍼프레우스(*Monascus purpureus*), 모나스커스 카올리앙(*Monascus kaoliang*), 모나스커스 바리케리(*Monascus barykery*), 모나스커스 안카(*Monascus anka*) 등이 있고, 모나콜린 K의 높은 생산성 및 시트리닌(citrinin)의 낮은 생산성을 고려할 때 모나스커스 필로서스(*Monascus pilosus*) 및/또는 모나스커스 퍼프레우스(*Monascus purpureus*)이 선택되는 것이 바람직하다.

[0023] 본 발명에서 '발효'는 홍국균을 종균으로 사용하여 발효하는 것을 의미한다. 산양삼새싹 및 콩의 혼합물을 홍국균으로 발효시, 놀랍게도 진세노사이드 Rg2, F1, Rd, Rd2, F2, Rg3, 프로토파낙사트리올 및 프로토파낙사디올이 현저히 증진되었다 (표 1, 표 2).

[0024] 본 발명에서 홍국균은 산양삼새싹 및 콩의 혼합물에 3~10%(v/w) 농도로 접종하여 20~30℃에서 8~12일간 발효시키는 것으로 수행될 수 있다. 가장 바람직하게는 10일간 발효한다.

[0025] 홍국균 접종량이 3%(v/w) 미만일 경우에는 발효 속도가 지연될 수 있고 10%(v/w) 초과시에는 균사체 증식 속도가 빨라 전환율이 낮을 수 있으며, 발효 온도가 20℃ 미만일 경우 발효기간이 길어져 잡균의 오염을 초래하고 30℃를 초과할 경우에는 균사체의의 생육이 저하될 수 있고, 발효 기간이 8일 미만일 경우 발효가 충분하지 않아 생리활성물질 등의 생성이 저조하게 될 수 있으며, 12일을 초과한 경우는 과발효에 의해 생리활성물질이 분해될 수 있다.

[0026] 본 발명에서 산양삼새싹 및 콩의 혼합물은 발효 전에, 5~10배(v/v)의 물을 첨가하여 5~8시간 수화시켜 수분이 40~50% 정도 되게 조정한 후 100~120℃ 이상에서 30~60분 증자처리하는 것이 바람직하다. 가장 바람직하게는 120℃에서 30분 증자한다.

[0027] 본 발명에서 수화 처리 시 수분 함량이 40% 이하의 홍국균 균사 생육이 원활하지 않으며, 수분 함량이 50% 이상의 경우 홍국균 균사 생육뿐만 아니라 세균 등의 증식이 이루어질 수 있다. 한편, 증자 처리 시 30분 이하 처리 시 살균이 완벽하게 이루어지 않아 홍국균 균사 이외에 세균 등의 증식에 의하여 이상발효가 진행될 수 있고 60분 이상 처리 시 영양성분 파괴되는 과다하게 진행될 수 있다.

[0028] 본 발명에 따른 산양삼새싹의 홍국균 발효조성물은 진세노사이드 Rg2를 1.34 mg/g 이상, F1을 1.3 mg/g 이상, 프로토파낙사트리올을 0.22 mg/g 이상, Rd를 5.63 mg/g 이상, Rd2를 1.18 mg/g 이상, F2를 3.25 mg/g 이상, Rg3를 1.15 mg/g 이상 및 프로토파낙사디올을 14.6 mg/g 이상 함유한다 (표 1).

[0029] 본 발명에 따른 산양삼새싹의 홍국균 발효조성물은 진세노사이드 Rg2, F1, 프로토파낙사트리올, Rd, Rd2, F2, Rg3 및 프로토파낙사디올의 함량이 가공전 혼합물(비교예 1)에 비하여 각각 약 2.8배 이상, 1.6배 이상, 2.4배 이상, 2.1배 이상, 3.2배 이상, 4.2배 이상, 6.7배 이상 및 약 7.9배 이상 증진된다 (표 1).

[0030] 본 발명에 따른 산양삼새싹의 홍국균 발효조성물에서 프로토파낙사트리올 계열, 프로토파낙사디올 계열, 및 총 진세노사이드 함량은 각각 2.98 mg/g 이상, 25.81 mg/g 이상, 및 28.79 mg/g 이상 함유된다 (도 3).

[0031] 본 발명에 따른 산양삼새싹의 홍국균 발효조성물은 프로토파낙사트리올 계열, 프로토파낙사디올 계열 및 총 진세노사이드의 함량이 가공전 혼합물(비교예 1)에 비하여 각각 약 2.3배 이상, 4.5배 이상, 및 4.1배 이상 증진된다 (도 3).

[0032] 또한 본 발명에 따른 산양삼새싹의 홍국균 발효조성물은 진세노사이드 Rg2, F1, 프로토파낙사트리올, Rd, Rd2, F1, Rg3, 및 프로토파낙사디올, 총 페놀릭스 및 총 플라보노이드 등의 생리활성물질의 함량이 강화되어, 증진된

항산화 활성, 항당뇨 활성 및 항비만 활성을 갖는다 (표 1 ~ 표 2, 도 3 및 도 4 ~ 8).

[0033] 본 발명의 또 다른 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 산양삼새싹 및 콩의 혼합물을 홍국균으로 발효하여 진세노사이드 Rg2, F1, 프로토파낙사트리올, Rd, Rd2, F1, Rg3, 및 프로토파낙사디올이 증진된 산양삼의 홍국균 발효조성물의 제조방법을 제공한다.

[0034] 구체적으로 상기 방법은

[0035] ⅰ) 산양삼새싹 90~96 중량% 및 콩 6~10 중량%를 혼합한 후 물을 5~10배(v/w)으로 혼합하여 5~7시간 수화하는 단계;

[0036] ⅱ) 100~120℃에서 30~60분 증자하는 단계; 및

[0037] ⅲ) 홍국균을 3~10%(v/w) 농도로 접종하여 20~30℃에서 8~12일간 발효하는 단계를 포함한다.

[0038] 본 발명의 제조방법에서, 산양삼새싹 및 콩의 혼합물의 중량비, 수화, 증자, 홍국균 및 발효는 상기에서 정의된 바와 같다.

[0039] 홍국균 원활한 발효를 위하여 발효 전에 산양삼새싹 및 콩의 혼합물에 물을 첨가하여 수화할 수 있다.

[0040] 발효 전에, 살균하기 위하여 증자 처리될 수 있다. 증자는 100~120℃ 이상에서 30 ~ 60분 증자하는 것이 바람직하고, 가장 바람직하게는 120℃에서 30분 증자한다.

[0041] 본 발명의 또 다른 목적에 따라서, 본 발명은 상기 제조방법에 의해 제조된 진세노사이드 Rg2, F1, Rd, Rd2, F2, Rg3, 프로토파낙사트리올 및 프로토파낙사디올이 증진된 산양삼새싹 홍국균 발효조성물을 포함하는 기능성 식품을 제공한다.

[0042] 본 발명에 따른 기능성식품은 우수한 항산화 활성, 당뇨 개선 및 비만 개선 효과를 갖는다 (도 4a~도 6).

[0043] 본 발명의 또 다른 목적에 따라서, 진세노사이드 진세노사이드 Rg2, F1, Rd, Rd2, F2, Rg3, 프로토파낙사트리올 및 프로토파낙사디올이 증진된 산양삼새싹 홍국균 발효조성물을 포함하는 화장품을 제공한다.

[0044] 본 발명의 식품 또는 화장품은 본 발명의 발효조성물 또는 이의 추출물을 그대로 첨가하거나 다른 식품 성분과 혼합되어 제조될 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 제조될 수 있다.

[0045] 본 발명에서 상기 식품의 종류는 특별히 제한되지 않으며, 환제, 정제, 캡슐제, 발효차, 발효식품 (김치류, 피클류 등), 발효음료 (파우치제, 드링크제 등) 등일 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다. 화장품의 종류는 마스크팩, 스킨, 로션, 크림 등일 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다.

발명의 효과

[0047] 본 발명에 따른 산양삼새싹 홍국균 발효조성물은 진세노사이드 Rg2, F1, Rd, Rd2, F2, Rg3, 프로토파낙사트리올 및 프로토파낙사디올이 고함량으로 함유되어 기능성식품 및 화장품의 소재로 사용될 수 있다.

[0048] 또한 본 발명에 따른 기능성식품 또는 화장품은 진세노사이드 Rg2, Rg3 F1, F2, Rd, Rd2, 프로토파낙사트리올 및 프로토파낙사디올의 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, 피부 미용, 여성 갱년기 증후군 개선용으로 유용하다.

도면의 간단한 설명

[0050] 도 1은 본 발명의 홍국균 발효조성물의 제조 공정도의 일례이다.

도 2는 진세노사이드 HPLC 크로마토그램을 나타낸 것이다. (A)는 비교예인 산양삼새싹 원료의 진세노사이드 HPLC 크로마토그램이며, (B)는 실시예 1인 모나스커스 퍼프레우스의 발효조성물의 진세노사이드 HPLC 크로마토그램이며, (C)는 실시예 2인 모나스커스 필로서스의 발효조성물의 진세노사이드 HPLC 크로마토그램이다.

도 3은 본 발명에 따른 발효조성물의 프로토파낙사트리올 계열, 프로토파낙사디올 계열, 및 총 진세노사이드 함량을 나타낸 것이다.

도 4는 본 발명에 따른 발효조성물의 DPPH 라디칼 소거활성을 나타낸 것이다,

도 5는 본 발명에 따른 발효조성물의 ABTS 라디칼 소거활성을 나타낸 것이다.

도 6은 본 발명에 따른 발효조성물의 환원력(FRAP)을 나타낸 것이다.

도 7은 본 발명에 따른 발효조성물의 알파-글루코시다아제 저해활성을 나타낸 것이다.

도 8은 본 발명에 따른 발효조성물의 췌장-리파아제 저해활성을 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0051] 다음의 실시예들에 의해 본 발명이 더 상세히 설명된다. 이들 실시예는 본 발명을 예시하기 위한 것이며, 본 발명의 범위가 이들에 의해 제한되어서는 안된다.

[0052] **제조예 1: 발효조성물 제조**

[0053] 산양삼새싹은 2020년도 함양군 백전면 일대에서 재배된 것을 농업회사법인 주식회사 진생바이오로로부터 공급받아 사용하였다. 콩(오리알태콩)은 진주시 소재 대형마트에서 구입하여 사용하였다.

[0054] 홍국균은 한국미생물보존센터로부터 모나스커스 필로서스(*Monascus pilosus*) 및 모나스커스 퍼프레우스(*Monascus purpureus*)를 분양받아 활성화시켜 사용하였다. 홍국균 계대 배양은 Potato Dextrose broth/agar(PDB/PDA, BD-Difco사, Sparks, MD, USA)를 사용하였다.

[0055] 산양삼새싹은 흐르는 물에 3회 세척한 후 약 1 cm 정도로 절단한 후 55℃에서 3일간 건조하여 준비하였다. 건조 산양삼과 콩을 9:1의 중량비로 혼합하여 산양삼새싹 혼합시료를 준비하였다.

[0056] 산양삼새싹 혼합시료에 10배(v/w) 정제수를 첨가하고 6시간 수화시켜 수분 함량을 약 40% 정도 되게 조정한 후 고압멸균기를 이용하여 120℃에서 30분 동안 증자 처리하고 홍국균 배양액을 5%(v/w) 접종한 뒤 25℃에서 10일간 발효를 진행하여 발효조성물을 얻었다 (실시예 1 (모나스커스 필로서스로 발효), 실시예 2 (모나스커스 퍼프레우스 발효); 도 1).

[0057] 비교를 위하여, 건조 산양삼새싹과 콩을 9:1의 중량비로 혼합하여 산양삼새싹 혼합시료 조성물(비교예)을 준비하였다.

[0059] **참조예: 분석시료**

[0060] 실시예 1 및 실시예 2의 발효조성물, 비교예 1의 조성물을 각각 55℃에서 3일간 건조하여 분쇄시켜 분말 시료를 준비하였다.

[0061] 분말 시료 1 g에 50% 메탄올을 20배 첨가하여 12시간 동안 추출한 완전히 농축한 후 50% 메탄올을 2 ml을 첨가하여 녹인 후 0.45 μm 여과 필터로 여과하여 HPLC 베일에 담아 진세노사이드를 분석하였다.

[0062] 분말 시료 10 g에 50% 주정을 20배 첨가하여 12시간 동안 추출한 일부 0.45 μm 여과 필터로 여과하여 총 페놀릭스와 총 플라보노이드 분석에 사용하였고 나머지 추출액은 감압여과기를 이용해 여과하고 감압농축기를 이용하여 완전 농축시킨 후 동결건조기(FD-1000, Tokyo, Rikakikai, Japan)를 이용하여 동결건조하였다. 최종 동결건조된 시료에 50% 주정을 첨가하여 시료농도가 0.25, 0.5, 1.0 및 2.0 mg/mL이 되게 제조한 후 하기 생리활성 시험에 사용하였다.

[0064] **시험예 1: 진세노사이드 함량 분석**

[0065] 진세노사이드 분석은 기능성식품분석법의 홍삼 사포닌 분석법에 기술된 방법을 변형하여 고압액체크로마토그래피(HPLC, high press liquid chromatograph)로 분석하였다. 분석 컬럼은 TSKgel ODS-100Z을 사용하여 시료주입량 10 ㎕, 온도는 30℃, 측정파장은 203 nm, 유속은 1.0 ㎖/min으로 하였고 이동상으로는 A용액은 HPLC water, B용액은 아세토니트릴을 사용하였다. HPLC 분석 조건은 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. 실시예 1, 실시예 2 및 비교예의 진세노사이드 HPLC 크로마토그

램을 도 2에 나타냈고, 분석된 진세노사이드 Rg2, Rg3 F1, F2, Rd, Rd2, 프로토파낙사트리올(PPT) 및 프로토파낙사디올(PPD) 함량을 각각 표 1에 나타내었다. 또한 프로토파낙사트리올 계열(Rg2, F1, 및 PPT) 진세노사이드, 프로토파낙사디올 계열(Rd, Rd2, F2, Rg3, 및 PPD) 진세노사이드, 및 총 진세노사이드 함량을 산출하여 도 3에 나타냈다.

표 1

[0066]

함량 (mg/g)	비교예 1 (원료)	실시예 1 (홍국균-1)	실시예 2 (홍국균-2)
Ginsenoside Rg2	0.48	1.37	1.34
Ginsenoside F1	0.66	1.78	1.30
Protopanaxtriol	0.14	0.22	0.34
Ginsenoside Rd	2.65	8.08	5.63
Ginsenoside Rd2	0.37	1.32	1.18
Ginsenoside F2	0.77	3.49	3.25
Ginsenoside Rg3	0.17	1.40	1.15
Protopanaxdiol	1.84	16.18	14.60
홍국균-1: 모나스커스 퍼프레우스(*Monascus purpureus*). 홍국균-2: 모나스커스 필로서스(*Monascus piolsus*). 모든 실험은 5반복 진행하여 평균값으로 표시함.			

[0067] 도 2에 나타낸 바와 같이, 비교예 1의 조성물에서는 Rg2, Rg3 F1, F2, Rd, Rd2, 프로토파낙사트리올 및 프로토파낙사디올 피크가 낮게 나타난 반면에, 본 발명에 따른 실시예 1의 모나스커스 필로서스 발효조성물 및 실시예 2의 모나스커스 퍼프레우스 발효조성물에서는 Rg2, Rg3 F1, F2, Rd, Rd2, 프로토파낙사트리올 및 프로토파낙사디올 피크가 현저히 높아진 것을 확인할 수 있다.

[0068] 또한, 표 1에 나타낸 바와 같이, 가공되지 않은 산양삼새싹 혼합원료인 비교예 1의 Rg2, F1, PPT, Rd, Rd2, F2, Rg3 및 PPD 함량은 각각 0.48 mg/g, 0.66 mg/g, 0.14 mg/g, 2.65 mg/g, 0.37 mg/g, 0.77 mg/g, 0.17 mg/g, 및 1.84 mg/g이며, 실시예 1의 모나스커스 필로서스 발효조성물의 Rg2, F1, PPT, Rd, Rd2, F2, Rg3 및 PPD 함량은 각각 1.37 mg/g, 1.78 mg/g, 0.22 mg/g, 8.08 mg/g, 1.32 mg/g, 3.49 mg/g, 1.40 mg/g, 및 16.18 mg/g로 각각 약 2.9배, 2.7배, 1.6배, 3.0배, 3.6배, 4.5배, 8.2배, 및 8.8배 증가하였고, 실시예 2의 모나스커스 퍼프레우스 발효조성물의 Rg2, F1, PPT, Rd, Rd2, F2, Rg3 및 PPD 함량은 각각 1.34 mg/g, 1.30 mg/g, 0.34 mg/g, 5.63 mg/g, 1.18 mg/g, 3.25 mg/g, 1.15 mg/g, 및 14.60 mg/g로 각각 약 2.8배, 2.0배, 2.4배, 2.1배, 3.2배, 4.2배, 6.7배, 및 7.9배 증가됨을 확인할 수 있다.

[0069] 도 3에 도시된 바와 같이, 가공되지 않은 산양산 혼합원료인 비교예 1의 프로토파낙사트리올 계열(Rg2, F1, 및 PPT) 진세노사이드, 프로토파낙사디올 계열(Rd, Rd2, F2, Rg3, 및 PPD) 진세노사이드, 및 총 진세노사이드 함량은 각각 1.28 mg/g, 5.80 mg/g, 및 7.08 mg/g이며, 실시예 1의 모나스커스 필로서스 발효조성물의 프로토파낙사트리올 계열(Rg2, F1, 및 PPT) 진세노사이드, 프로토파낙사디올 계열(Rd, Rd2, F2, Rg3, 및 PPD) 진세노사이드, 및 총 진세노사이드 함량은 각각 3.37 mg/g, 30.47 mg/g, 및 33.84 mg/g으로 약 2.6배, 5.3배, 및 4.8배 증가하였으며, 실시예 2의 모나스커스 퍼프레우스 발효조성물의 프로토파낙사트리올 계열(Rg2, F1, 및 PPT) 진세노사이드, 프로토파낙사디올 계열(Rd, Rd2, F2, Rg3, 및 PPD) 진세노사이드, 및 총 진세노사이드 함량은 각각 2.98 mg/g, 25.81 mg/g, 및 28.79 mg/g으로 약 2.3배, 4.5배, 및 4.1배 증가됨을 확인할 수 있었다.

[0070] 따라서 홍국균으로 발효된 본 발명에 따른 산양삼새싹 발효조성물은 진세노사이드 Rg2, F1, PPT, Rd, Rd2, F2, Rg3 및 PPD의 함량이 현저히 강화됨을 알 수 있다.

[0072] **시험예 2. 생리활성성분 함량 분석**

[0073] 항산화 활성 등을 나타내는 생리활성성분인 총 페놀릭스 및 총 플라보노이드스 함량 함량을 분석하였다.

[0074] <총 페놀릭스 함량>

[0075] 분석시료를 시험관에 0.5 ml 분주하고 여기에 25% Na_2CO_3 용액 0.5 ml를 첨가하여 3분간 정치시킨 후, 2N Folin-Ciocalteu 페놀 시약 0.25 ml를 첨가하여 혼합한 다음 30℃에서 1시간 동안 정치시킨 후 750 nm에서 분광

광도계를 사용하여 750nm에서 흡광도를 측정하였다. 이때 총 페놀릭스 함량은 갈산(Gallic acid)을 이용하여 작성한 표준곡선으로부터 함량을 구하여 갈산에 상당하는 양으로 계산하였고 그 결과를 표 2에 나타냈다.

[0076] 표 2에 나타낸 바와 같이, 총 페놀릭스 함량은 비교예 1에서는 3.28 mg/g이었으며, 실시예 1에서는 5.50 mg/g으로 나타났고, 실시예 2에서는 4.85 mg/g 나타나, 본 발명에 따른 발효조성물은 총 페놀릭스 함량이 증진됨을 확인할 수 있다.

표 2

[0077]

함량 (mg/g)	비교예 1 (원료)	실시예 1 (홍국균-1)	실시예 2 (홍국균-2)
총 페놀릭스	3.28	5.50	4.85
총 플라보노이드	1.36	2.86	2.75
홍국균-1: 모나스커스 퍼프레우스(*Monascus purpureus*). 홍국균-2: 모나스커스 필로서스(*Monascus piolsus*). 모든 실험은 5반복 진행하여 평균값으로 표시함.			

[0078] <총 플라보노이드 함량>

[0079] 분석시료 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)을 이용하여 작성한 표준곡선으로부터 함량을 구하였고 그 결과는 표 2에 나타내었다.

[0080] 표 2에 나타낸 바와 같이, 총 플라보노이드 함량도, 비교예 1, 실시예 1 및 실시예 2에서 각각 1.36 mg/g, 2.86 mg/g, 및 2.75 mg/g으로 나타나, 본 발명에 따른 발효조성물은 총 플라보노이드스의 함량도 크게 증가하는 것을 확인할 수 있다.

[0082] **시험예 3. 항산화 활성 분석**

[0083] 항산화 활성은 DPPH 라디칼 소거활성, ABTS 라디칼 소거활성, 및 FRAP 환원력을 측정하여 분석하였다.

[0084] 참고예에서와 같이 실시예 1, 실시예 2 및 비교예 1의 분석시료를 0.25, 0.5, 1, 및 2 mg/ml 농도로 제조하여 사용하였다.

[0085] <DPPH 라디칼 소거활성>

[0086] 각각의 시료 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 4에 도시하였다.

[0087] 라디칼 소거활성(%) = [1-(음성대조구 흡광도 ÷실험구 흡광도)] ×100

[0088] 도 4에 나타난 바와 같이, DPPH 라디칼 소거활성은 1 mg/ml의 농도에서 비교예 1, 실시예 1 및 실시예 2는 각각 17.81%, 66.89%, 및 64.03%의 활성을 나타내 실시예 1 및 실시예 2의 발효조성물이 현저히 높은 활성을 보였다.

[0089] <ABTS 라디칼 소거활성>

[0090] 7 mM $ABTS^+$와 2.45 mM $K_2S_2O_8$를 1:1 비율로 섞어 암실에서 12~16시간 반응시킨 후 메탄올과 1:88 비율로 섞어 732 nm에서 대조구의 흡광도 값이 0.7±0.02가 되도록 조절한 $ABTS^+$ 용액을 사용하였다. 각각의 시료 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 5에 나타냈다.

[0091] 도 5에 나타난 바와 같이, ABTS 라디칼 소거활성은 0.5 mg/ml의 농도에서 비교예 1, 실시예 1 및 실시예 2는 각각 32.93%, 78.16%, 및 72.24%의 활성을 나타내 실시예 1 및 실시예 2의 발효조성물이 현저히 높은 활성을 보

였다.

[0092] <FRAP 환원력 분석>

[0093] FRAP 환원력 분석에서 반응액으로는 30 mM 아세테이트 완충액(pH 3.6), 40 mM 염산에 녹인 10 mM 2,4,6-트리피리딜-s-트리아진(TPTZ, T1253, $C_{18}H_{12}N_6$, MW312.33) 및 20 mM $FeCl_3$(F7134, MW 162.20, in DW)를 준비하였으며, 아세테이트 완충액, TPTZ 용액 및 $FeCl_3$ 용액을 10:1:1 (v/v/v)로 혼합하여 37 ℃에서 15분간 예비반응을 시켜 두었다. 각각의 시료 0.05 ml에 FRAP 시약 0.95ml를 첨가하여 37 ℃에서 약 15분간 반응시키고 590 nm에서 흡광도를 측정하여 그 결과를 도 6에 나타냈다.

[0094] 도 6에 나타난 바와 같이, FRAP 환원력은 2 mg/ml의 농도에서 비교예 1은 0.789 $OD_{593\ nm}$인 반면에, 실시예 1 및 실시예 2는 1.566 $OD_{593\ nm}$ 및 1.502 $OD_{593\ nm}$의 높은 활성을 보였다.

[0095] 이들 결과로부터 본 발명에 따른 발효조성물은 항산화 활성이 현저히 증진됨을 알 수 있다.

[0096]

[0097] **시험예 4: 소화효소 저해활성 검정**

[0098] 본 발명에 따른 산양삼새싹의 홍국균 발효조성물에 대해 항당뇨(당뇨 개선) 효과의 지표인 알파-글루코시다아제 저해활성을 검정하였고, 항비만(비만 개선) 지표인 췌장 리파아제 저해활성을 검정하였다.

[0099] <알파-글루코시다아제 저해활성>

[0100] 분석시료 30 ㎕에 알파-글루코시다아제 (0.5 U/ml) 효소용액 70 ㎕, 200 mM 인산나트륨 완충용액(pH 6.8) 50 ㎕를 혼합하여 37℃에서 10분간 예비반응하였다. 이후 인산나트륨 완충용액(pH 6.8)에 녹인 p-NPG (10 mM) 100 ㎕를 첨가하여 다시 37℃에서 10분 반응시켰으며 반응액에 Na_2CO_3 (100 mM) 750 ㎕를 첨가해 반응을 정지시킨 후 420 nm에서 분광광도계를 이용하여 흡광도를 측정하였다. 음성대조구는 시료 대신에 추출용매를 취하였으며 분석시료 첨가구와 무첨가구 사이의 흡광도 차이를 백분율(%)로 나타내어 그 결과를 도 7에 나타냈다.

[0101] 도 7에 도시된 바와 같이, 알파-글루코시다아제 저해활성은 2.0 mg/ml 처리 시 비교예 1에서 19.84%로 나타났으나, 실시예 1에서는 45.66% 및 실시예 2에서는 40.58%로 증진되었다.

[0102] 따라서 본 발명에 따른 발효조성물은 알파-글루코시다아제 저해활성이 현저히 증진되어 혈당저하 활성이 우수하여 당뇨 개선효과가 증진됨을 알 수 있다.

[0103] <췌장-리파아제 저해활성>

[0104] 분석시료 30 ㎕에 췌장 리파아제 (0.5 U/ml) 효소용액 70 ㎕ 및 200 mM 인산나트륨 완충용액(pH 6.8) 50 ㎕를 혼합하여 37 ℃에서 10분간 예비반응시켰다. 반응 후 인산나트륨 완충용액에 녹인 p-NPB(10 mM) 100 ㎕를 첨가하여 동일하게 10분간 반응시킨 후 100 mM Na_2CO_3 750 ㎕를 첨가해 반응을 종결시켜 420 nm에서 흡광도를 측정하였다. 음성대조구는 시료 대신에 추출용매를 취하였으며 시료용액의 첨가구와 무첨가구 사이의 흡광도 차이를 백분율(%)로 나타내어 그 결과를 도 8에 나타냈다.

[0105] 도 8에 도시된 바와 같이, 췌장 리파아제 저해활성은 2.0 mg/ml 처리 시 비교예 1에서 15.46%로 나타났으나, 실시예 1에서는 48.46% 및 실시예 2에서는 44.33%로 더 높은 활성을 보였다.

[0106] 따라서 본 발명에 따른 발효조성물은 췌장 리파아제 저해활성이 증진되어 비만 개선효과가 강화됨을 알 수 있다.

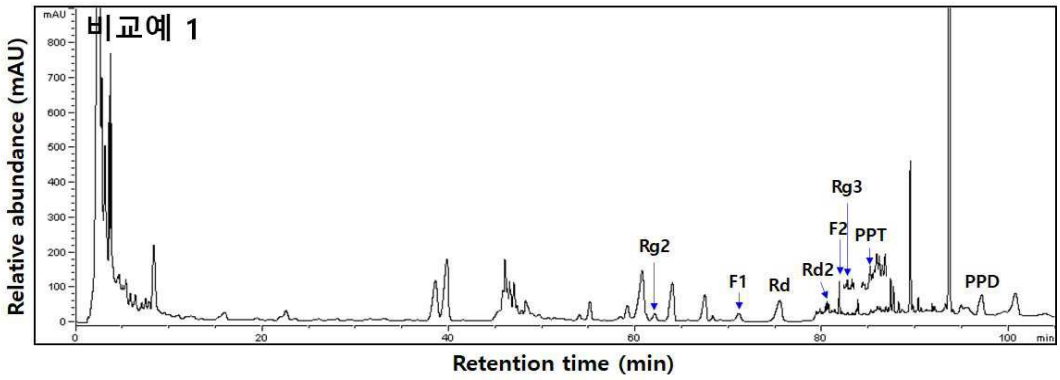
[0107] 상기 활성(기능성) 검정 결과들로부터, 본 발명에 따른 발효조성물은 진세노사이드 Rg2, F1, PPT, Rd, Rd2, F2, Rg3 및 PPD의 함량이 증진될 뿐만 아니라, 우수한 항산화 활성, 항당뇨 및 항비만 활성을 가져서 기능성 식품 및 화장품의 소재로 유용하다는 것을 알 수 있다.

도면

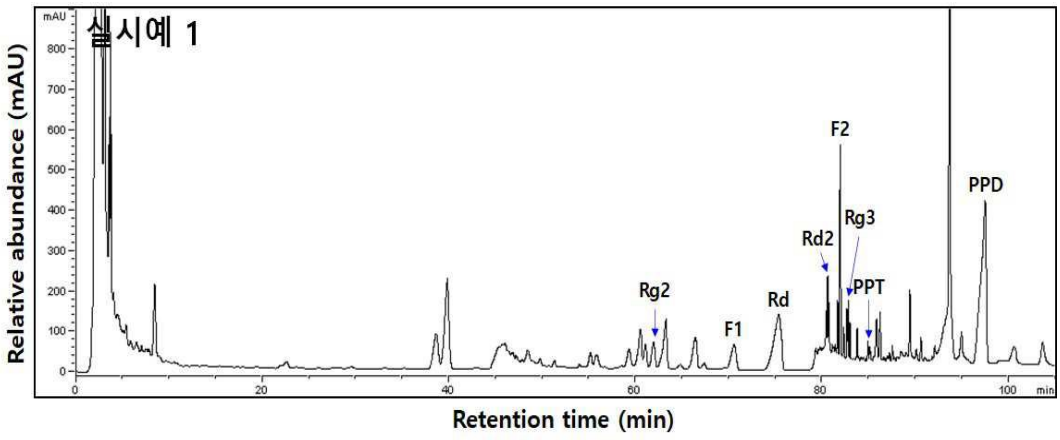
도면1



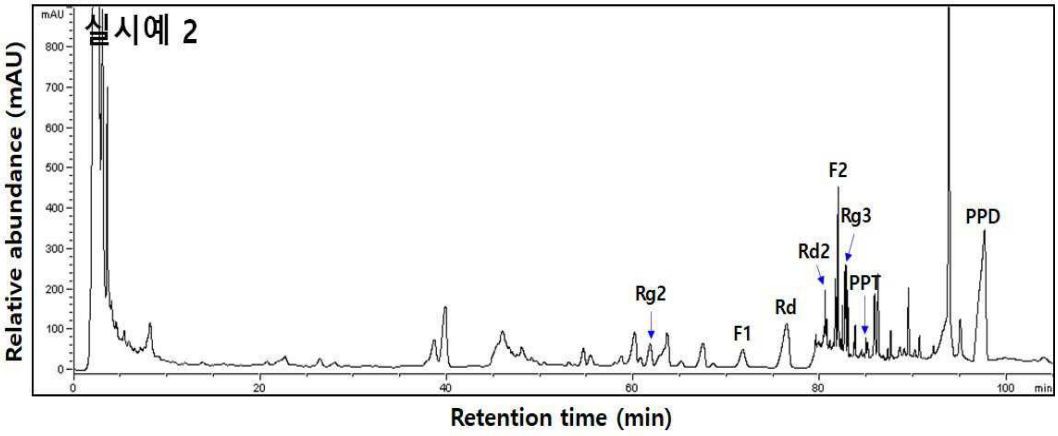
도면2a



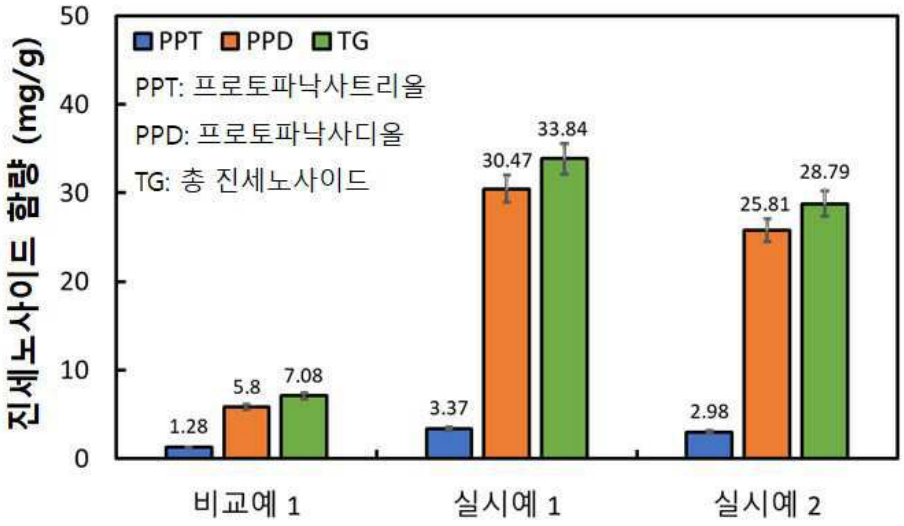
도면2b



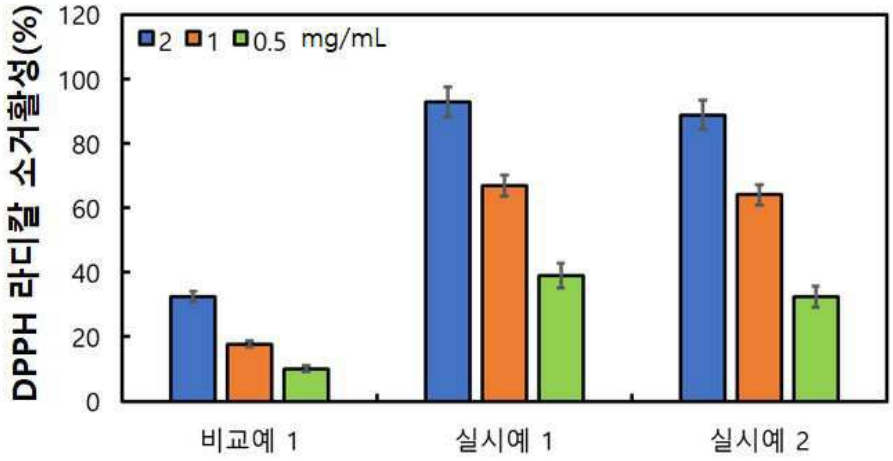
도면2c


실시예 2
Relative abundance (mAU)
Retention time (min)
Rg2
F1
Rd
Rd2
F2
Rg3
PPT
PPD

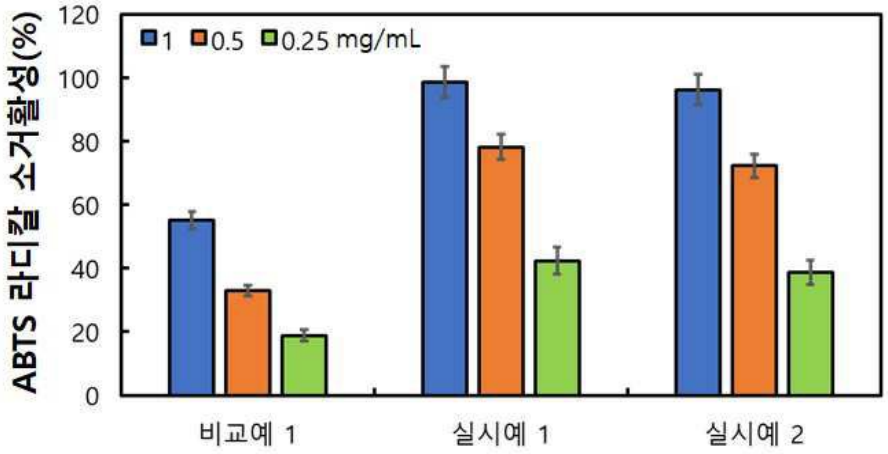
도면3


PPT
PPD
TG
PPT: 프로토파낙사트리올
PPD: 프로토파낙사디올
TG: 총 진세노사이드
진세노사이드 함량 (mg/g)
1.28
5.8
7.08
3.37
30.47
33.84
2.98
25.81
28.79
비교예 1
실시예 1
실시예 2

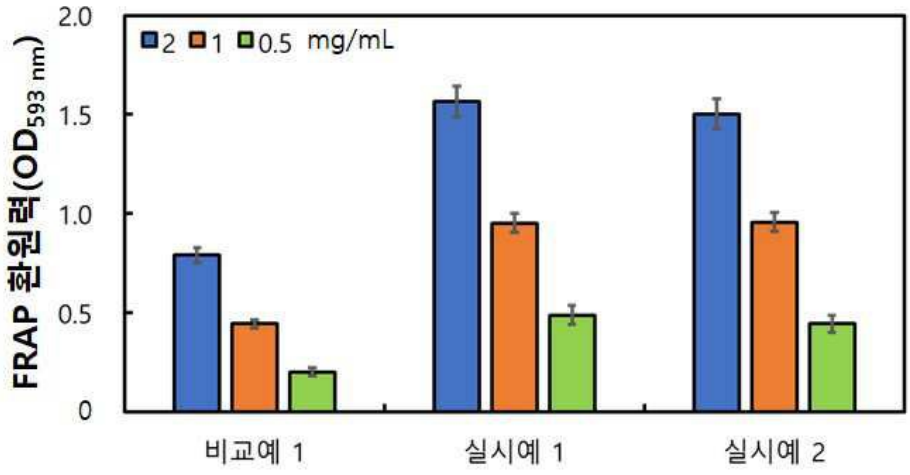
도면4


2
1
0.5 mg/mL
DPPH 라디칼 소거활성(%)
비교예 1
실시예 1
실시예 2

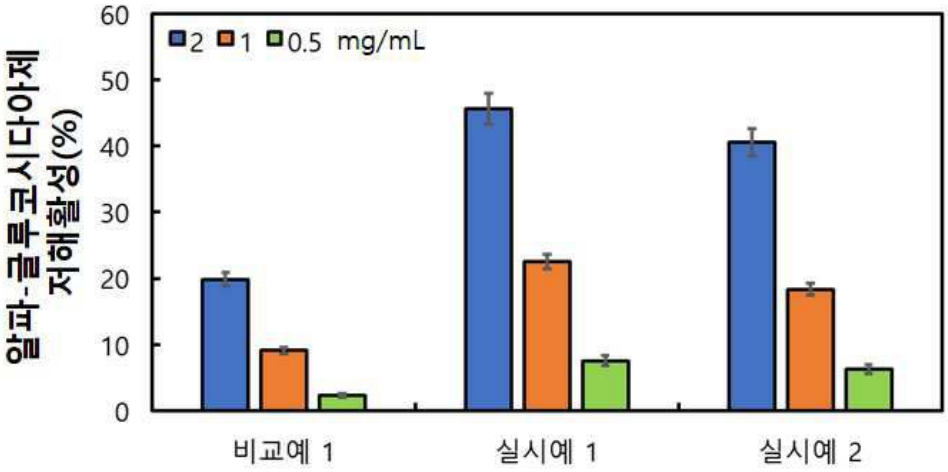
도면5


ABTS 라디칼 소거활성(%)
120
100
80
60
40
20
0
1
0.5
0.25 mg/mL
비교예 1
실시예 1
실시예 2

도면6


FRAP 환원력(OD593 nm)
2.0
1.5
1.0
0.5
0
2
1
0.5 mg/mL
비교예 1
실시예 1
실시예 2

도면7


알파-글루코시다아제
저해활성(%)
60
50
40
30
20
10
0
2
1
0.5 mg/mL
비교예 1
실시예 1
실시예 2

도면8

