



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2025-0029435
(43) 공개일자 2025년03월05일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A23L 33/105 (2016.01) A23L 31/00 (2016.01)
A61K 8/9789 (2017.01) A61K 8/9794 (2017.01)
A61Q 19/08 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A23L 33/105 (2016.08)
A23L 31/00 (2020.05)

(21) 출원번호 10-2023-0110333

(22) 출원일자 2023년08월23일

심사청구일자 2023년08월23일

(71) 출원인

경상국립대학교산학협력단

경상남도 진주시 진주대로 501 (가좌동)

(72) 발명자

조계만

경상남도 진주시 진주대로 829번길 21, 삼환나우빌 103동 2501호

조두용

경상남도 양산시 회현1길 3, 101동 306호

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

조영신

전체 청구항 수 : 총 14 항

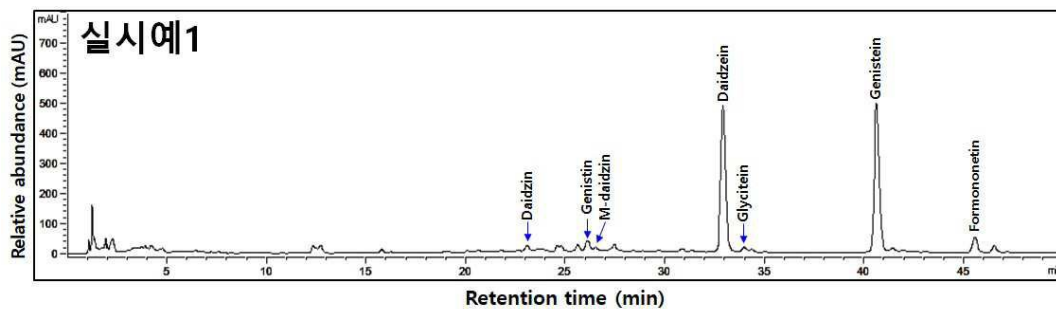
(54) 발명의 명칭 글라이시테인, 폴모노네틴 및 나린진이 강화된 파바톤 콩잎의 팽이버섯 균사체 발효조성물 및 그 제조방법

(57) 요약

본 발명에서는 글라이시테인, 폴모노네틴 및 나린진이 강화된 파바톤 콩잎 팽이버섯 균사체 발효조성물 및 그 제조방법이 개시된다.

본 발명에 따른 발효조성물은 글라이시테인, 폴모노네틴 및 나린진의 함량이 고함량으로 함유되고 또한 다이드제인 및 제니스테인도 고함량으로 함유하여 기능성 식품 및 화장품의 소재로 사용될 수 있다.

대표도 - 도2c



(52) CPC특허분류

A61K 8/9789 (2017.08)

A61K 8/9794 (2017.08)

A61Q 19/08 (2013.01)

A23V 2002/00 (2023.08)

A23V 2200/302 (2013.01)

(72) 발명자

장무연

경상남도 거제시 아주2로2길 거제아주코오롱하늘채
아파트 103동 301호

정중빈

경상남도 진주시 대신로207번길 16-3 1층

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

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1345370778

과제번호 00245096

부처명 교육부

과제관리(전문)기관명 한국연구재단

연구사업명 지역대학우수과학자지원사업

연구과제명 대사체-발효 전환 기반 활성대사체 강화 바이오소재 식이에 따른 갱년기 여성의 근

감소-장-마이크로바이옴 축

기 여 율 1/2

과제수행기관명 경상국립대학교 산학협력단

연구기간 2023.06.01 ~ 2029.05.31

명세서

청구범위

청구항 1

글라이시테인, 폴모노네티 및 나린진이 증진된 파바톤 콩잎의 팽이버섯 균사체 발효조성물.

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 발효조성물은 파바톤 콩잎과 현미의 9: 1 내지 7:3의 중량비로 혼합한 혼합물을 팽이버섯 균사체로 발효하여 제조된 것인, 파바톤 콩잎의 팽이버섯 균사체 발효조성물.

청구항 3

제 1항에 있어서, 상기 발효조성물은 글라이시테인 55 $\mu\text{g/g}$ 이상, 폴모노네티 110 $\mu\text{g/g}$ 이상 및 나린진 4332 $\mu\text{g/g}$ 이상 함유하는 것인, 파바톤 콩잎의 팽이버섯 균사체 발효조성물.

청구항 4

제 2항에 있어서, 상기 혼합물은 발효 전에 100℃ 이상에서 60 ~ 120분 증자된 것인, 파바톤 콩잎의 팽이버섯 균사체 발효조성물.

청구항 5

다이드제인, 글라이시테인, 제니스테인, 폴모노네티 및 나린진이 증진된 파바톤 콩잎의 팽이버섯 균사체 발효조성물.

청구항 6

제 5항에 있어서, 상기 발효조성물은 파바톤 콩잎과 현미의 9: 1 내지 7:3의 중량비로 혼합한 혼합물을 팽이버섯 균사체로 발효하여 제조된 것인, 파바톤 콩잎의 팽이버섯 균사체 발효조성물.

청구항 7

제 5항에 있어서, 상기 발효조성물은 다이드제인 1277 $\mu\text{g/g}$ 이상, 글라이시테인 55 $\mu\text{g/g}$ 이상, 제니스테인 896 $\mu\text{g/g}$ 이상, 폴모노네티 110 $\mu\text{g/g}$, 및 나린진 4332 $\mu\text{g/g}$ 이상 함유하는 것인, 파바톤 콩잎의 팽이버섯 균사체 발효조성물.

청구항 8

제 5항에 있어서, 상기 혼합물은 발효 전에 100℃ 이상에서 60 ~ 120분 증자된 것인, 파바톤 콩잎의 팽이버섯 균사체 발효조성물.

청구항 9

글라이시테인, 폴모노네틴 및 나린진이 증진된 파바톤 콩잎의 팽이버섯 균사체 발효조성물의 제조방법으로, 상기 방법은

- i) 파바톤 콩잎 분말과 현미 분말을 9:1 내지 7:3 중량비로 혼합한 후 물을 3~5배(v/w)으로 혼합하는 단계;
- ii) 100℃ 이상에서 60 ~ 120분 증자하는 단계; 및
- iii) 팽이버섯균사체를 3~10%(v/w) 농도로 접종하여 25~30℃에서 8~12일간 발효하는 단계;를 포함하는 것인, 방법.

청구항 10

다이드제인, 글라이시테인, 제니스테인, 폴모노네틴 및 나린진이 증진된 파바톤 콩잎의 팽이버섯 균사체 발효조성물의 제조방법으로, 상기 방법은

- i) 파바톤 콩잎 분말과 현미 분말을 9:1 내지 7:3 중량비로 혼합한 후 물을 3~5배(v/w)으로 혼합하는 단계;
- ii) 100℃ 이상에서 60 ~ 120분 증자하는 단계; 및
- iii) 팽이버섯균사체를 3~10%(v/w) 농도로 접종하여 25~30℃에서 8~12일간 발효하는 단계;를 포함하는 것인, 방법.

청구항 11

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

청구항 12

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

청구항 13

제 5항에 따른 발효조성물을 포함하는 증진된 항산화 활성을 갖는 식품.

청구항 14

제 5항에 따른 발효조성물을 포함하는 증진된 항산화 활성을 갖는 화장품.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 글라이시테인, 폴모노네틴 및 나린진이 강화된 파바톤 콩잎 팽이버섯 균사체 발효조성물 및 그 제조방법에 관한 것으로, 더 상세하게는 파바톤 콩잎을 팽이버섯 균사체로 발효하여 제조한 비배당체 이소플라본인 글라이시테인, 폴모노네틴 및 플라보노이드인 나린진이 현저히 증진된 발효조성물 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 있

다 (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. 이에 파바톤 콩잎에 함유된 고함량의 이소플라본 유도체를 비배당체 이소플라본으로의 전환기술 개발과 이를 통한 유효성분이 증진된 파바톤 콩잎의 가공식품의 개발이 요구되고 있다.
- [0005] 이소플라본은 베타-글리코사이드가 연결된 배당체 형태 또는 당이 떨어져 나간 비배당체 형태로 존재한다. 비배당체 이소플라본(aglycon isoflavone)으로는 제니스테인(genistein), 다이드제인(daidzein), 글라이시테인(glycitein) 및 폴모노네틴(formononetin) 등이 있으며, 배당체 이소플라본으로는 제니스틴(genistin), 다이드진(daidzin), 글리시틴(glycitin) 및 오노닌(ononin) 등이 있다. 특히 다양한 생리활성은 아글리콘 형태의 비배당체 이소플라본에 기인한다고 보고되고 있다.
- [0006] 비배당체 이소플라본 중에서 제니스테인(genistein)은 항산화활성 뿐만 아니라 유방암 및 전립선암 등에 효과적이며 다이드제인(daidzein)은 폐경기 여성의 골다공증에 효과적인 것으로 알려져 있다. 특히 글라이시테인(glycitein)은 구강질환 예방 효과가 알려져 있고, 폴모노네틴(formononetin)은 자가사멸세포 제거 과정을 활성화하고, 뼈형성 및 근형성 분화 촉진 효능이 있고, 탈모방지 및 발모촉진 효능이 있다고 알려져 있다 (특허공개 10-2017-0139971호, 특허공개 10-2022-0091747호, 특허등록 10-2390871호, 특허등록 10-1664531호).
- [0007] 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.
- [0008] 나린진(naringin)은 감귤류 과피에 다량 함유되어 있는 플라보노이드 화합물로서 항산화 및 항암 효과 등이 알려져 있고, 또한 알코올대사를 촉진한다고 알려져 있다 (특허등록 10-0375047호).
- [0009] 그러나 비배당체 이소플라본인 폴모노네틴, 다이드제인, 글라이시테인과 제니스테인 및 플라보노이드인 나린진이 현저히 증진된 파바톤 콩잎의 팽이버섯 균사체 발효조성물은 개발된 바 없다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0011] 이에 본 발명자들은 종래 기술의 요구에 부응하기 위한 연구를 지속한 결과, 파바톤 콩잎을 팽이버섯 균사체로 발효한 경우, 글라이시테인, 폴모노네틴 및 나린진이 현저히 증진되고 또한 다이드제인, 제니스테인도 현저히 증진된 발효조성물을 얻을 수 있다는 것을 확인하고 본 발명을 완성하게 되었다.
- [0012] 따라서 본 발명의 목적은 글라이시테인, 폴모노네틴 및 나린진이 증진된 파바톤 콩잎의 팽이버섯 균사체 발효조성물을 제공하는 것이다.
- [0013] 본 발명의 또 다른 목적은 다이드제인, 글라이시테인, 제니스테인, 폴모노네틴 및 나린진이 증진된 파바톤 콩잎의 팽이버섯 균사체 발효조성물을 제공하는 것이다.
- [0014] 본 발명의 또 다른 목적은 글라이시테인, 폴모노네틴 및 나린진이 증진된 파바톤 콩잎의 팽이버섯 균사체 발효조성물의 제조방법을 제공하는 것이다.
- [0015] 본 발명의 또 다른 목적은 다이드제인, 글라이시테인, 제니스테인, 폴모노네틴 및 나린진이 증진된 파바톤 콩잎의 팽이버섯 균사체 발효조성물의 제조방법을 제공하는 것이다.
- [0016] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 발효조성물을 포함하는 기능성식품을 제공하는 것이다.
- [0017] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 발효조성물을 포함하는化粧품을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0019] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 글라이시테인, 폴모노네틴 및 나린진이 증진된 파바톤 콩잎의 팽이버

섯 균사체 발효조성물을 제공한다.

- [0020] 또한 본 발명은 다이드제인, 글라이시테인, 제니스테인, 폴모노네틴 및 나린진이 증진된 파바톤 콩잎의 팽이버섯 균사체 발효조성물을 제공한다.
- [0021] 본 발명에서 '파바톤 콩잎'은 재배 전·후에 콩잎에 식물생장호르몬인 에틸렌(ethylene), 에틸렌 공여체(에세폰) 또는 에틸렌 발생제를 처리하여 이소플라본 유도체를 고함량으로 함유하는 콩잎을 의미한다. 파바톤 콩잎은 통상적으로 약 5,000 $\mu\text{g/g}$ 이상의 이소플라본 유도체를 함유하며, 상업적으로 입수할 수 있다.
- [0022] 본 발명에서 '팽이버섯 균사체'는 팽이버섯의 균사체를 의미한다. 팽이버섯은 분류학상 담자균문 주름버섯목 송이과 팽나무버섯속에 속하고 독특한 맛, 향 및 조직감을 가지고 있어 아시아 지역에서 인기가 높은 식용버섯으로 자실체와 균사체로 구분되어있다. 이중 균사체는 스펀지모양의 형태로 낙엽, 부식토와 같은 유기물에서 기생하는 곰팡이의 몸체로써 식이섬유, 필수아미노산, 비타민, 무기질 등 영양학적 가치 우수하고 베타글루칸과 같은 다당류를 함유하고 있어 면역력 및 항암 효과를 높이는 기능성 효과도 가지고 있다. 팽이버섯 균사체는 수확시기와 상관없이 언제든지 이용가능하고 균사체 성장 중에 β -글루코시다아제를 포함한 섬유소 분해효소, 단백질 분해효소, 지방질 분해효소 등의 다양한 가수분해효소를 생성한다.
- [0023] 본 발명에서 파바톤 콩잎의 발효시 탄소원 등의 송이버섯 균사체의 영양원으로서 현미를 혼합할 수 있다.
- [0024] 파바톤 콩잎과 현미의 혼합 중량비는 9 : 1 내지 7 : 3이 바람직하며, 가장 바람직하게는 8 : 2이다.
- [0025] 파바톤 콩잎 : 현미의 혼합 중량비가 상기 범위를 벗어나면, 다이드제인, 글라이시테인, 제니스테인 및 폴모노네틴의 함량이 떨어지거나 팽이버섯 균사체의 균사 성장이 충분하지 않을 수 있다. 팽이버섯 균사체의 성장 정도와 다이드제인, 글라이시테인, 제니스테인 및 폴모노네틴의 함량을 모두 고려할 때 파바톤 콩잎 : 현미의 혼합 중량비는 8 : 2인 것이 가장 바람직하다.
- [0026] 본 발명에서 파바톤 콩잎은 건조하고 분쇄하여 분말화하여 사용하는 것이 바람직하며, 현미도 분말화하여 사용하는 것이 바람직하다.
- [0027] 본 발명에서 '발효'는 팽이버섯 균사체를 종균으로 사용하여 발효하는 것을 의미한다. 파바톤 콩잎을 팽이버섯 균사체로 발효시, 놀랍게도 다이드제인, 글라이시테인, 제니스테인, 폴모노네틴 및 나린진이 현저히 증진되었다(표 1 ~ 표 2).
- [0028] 본 발명에서 팽이버섯 균사체는 파바톤 콩잎과 영양원인 현미의 총 중량에 3~10%(v/w) 농도로 접종하여 25~30℃에서 8~12일간 발효시키는 것으로 수행될 수 있다. 가장 바람직하게는 10일간 발효한다.
- [0029] 팽이버섯 균사체 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 25℃ 미만일 경우 발효기간이 길어져 잡균의 오염을 초래하고 30℃를 초과할 경우에는 균사체의 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.
- [0030] 본 발명에서 파바톤 콩잎과 영양원인 현미는 발효 전에 증자 처리될 수 있다. 증자는 100℃ 이상에서 30 ~ 90분 증자하는 것이 바람직하고, 가장 바람직하게는 120℃에서 60분 증자한다.
- [0031] 본 발명에서 증자 처리를 하는 이유는 파바톤 콩잎이나 현미에 존재하는 세균 등의 필요 없는 미생물을 살균하기 위함이며 100℃ 이하 혹은 30분 이하의 경우 필요 없는 미생물(잡균)이 완전히 살균되지 않아 발효에 영향을 미칠 수 있었으며, 120℃ 이상 혹은 90분 이상 처리 시 과도한 열처리에 의하여 영양성분과 유효성분 등의 파괴가 많이 될 수 있다.
- [0032] 본 발명에 따른 발효조성물은 다이드제인 1277 $\mu\text{g/g}$ 이상, 글라이시테인 55 $\mu\text{g/g}$ 이상, 제니스테인 896 $\mu\text{g/g}$ 이상, 폴모노네틴 110 $\mu\text{g/g}$ 이상, 및 나린진 4332 $\mu\text{g/g}$ 이상 함유한다(표 1).
- [0033] 본 발명에 따른 발효조성물은 다이드제인, 제니스테인 및 폴모노네틴의 함량이 가공전 혼합물(비교예 1)에 비하여 각각 약 14.5배, 10.9배, 4.7배, 글라이시테인 새로이 생성되었고, 발효 전(비교예 2)에 비하여 다이드제인, 제니스테인 및 폴모노네틴의 함량이 각각 약 4.4배, 1.5배, 5.9배 및 3.2배 이상 증진된다(표 1).
- [0034] 또한 본 발명에 따른 발효조성물은 나린진의 함량이 가공전 혼합물(비교예 1)에 비하여 약 4.4배 이상, 발효 전(비교예 2)에 비하여도 약 3.8배 이상 현저히 증진된다(표 2).

- [0035] 또한 본 발명에 따른 발효조성물은 다이드제인, 글라이시테인, 제니스테인, 폴모노네티, 나린진, 총 페놀릭스 및 총 플라보노이드 등의 생리활성물질의 함량이 강화되어, 증진된 항산화 활성을 갖는다 (표 1~표 2, 도 4 ~ 도 5). 구체적으로는 본 발명에 따른 발효조성물은 총 페놀릭스 함량이 11.64 mg/g 이상 및 총 플라보노이드 함량이 8.14 mg/g이다.
- [0036] 본 발명의 또 다른 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 과바톤 콩잎을 팽이버섯 균사체로 발효하여 폴모노네티 및 나린진이 증진된 발효조성물의 제조방법을 제공한다.
- [0037] 또한 본 발명은 과바톤 콩잎을 팽이버섯 균사체로 발효하여 다이드제인, 글라이시테인, 제니스테인, 폴모노네티 및 나린진이 증진된 발효조성물의 제조방법을 제공한다.
- [0038] 구체적으로 상기 방법은
- [0039] i) 과바톤 콩잎 분말과 현미 분말을 9:1 내지 7:3 중량비로 혼합한 후 물을 3~5배(v/w)으로 혼합하는 단계;
- [0040] ii) 100℃ 이상에서 60 ~ 120분 증자하는 단계; 및
- [0041] ii) 팽이버섯균사체를 3~10%(v/w) 농도로 접종하여 25~30℃에서 8~12일간 발효하는 단계를 포함한다.
- [0042] 본 발명의 제조방법에서, 과바톤 콩잎, 혼합물의 중량비, 팽이버섯 균사체 및 발효는 상기에서 정의된 바와 같다.
- [0043] 원활한 발효를 위하여 과바톤 콩잎과 현미의 혼합물에 물을 첨가하여 발효할 수 있다. 물은 과바톤 콩잎과 현미의 혼합물의 3~5배(v/w)으로 첨가하는 것이 바람직하다.
- [0044] 발효 전에, 과바톤 콩잎, 현미 및 물의 혼합물은 살균하기 위하여 증자 처리될 수 있다. 증자는 100℃ 이상에서 60 ~ 120분 증자하는 것이 바람직하고, 가장 바람직하게는 121℃에서 60분 증자한다.
- [0045] 본 발명의 또 다른 목적에 따라서, 본 발명은 상기 제조방법에 의해 제조된 글라이시테인, 폴모노네티 및 나린진이 증진된 발효조성물을 포함하는 기능성 식품을 제공한다.
- [0046] 또한 본 발명은 상기 제조방법에 의해 제조된 다이드제인, 글라이시테인, 제니스테인, 폴모노네티 및 나린진이 증진된 발효조성물을 포함하는 기능성 식품을 제공한다.
- [0047] 본 발명에 따른 기능성 식품은 우수한 항산화 활성을 갖는다 (도 5).
- [0048] 본 발명의 또 다른 목적에 따라서, 글라이시테인, 폴모노네티 및 나린진이 증진된 발효조성물을 포함하는化粧품을 제공한다.
- [0049] 또한 다이드제인, 글라이시테인, 제니스테인, 폴모노네티 및 나린진이 증진된 발효조성물을 포함하는化粧품을 제공한다.
- [0050] 본 발명의 식품 또는化粧품은 본 발명의 발효조성물 또는 이의 추출물을 그대로 첨가하거나 다른 식품 성분과 혼합되어 제조될 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 제조될 수 있다.
- [0051] 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.化粧품의 종류는 마스크팩, 스킨, 로션, 크림 등일 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다.

발명의 효과

- [0053] 본 발명에 따른 발효조성물은 다이드제인, 글라이시테인, 제니스테인, 폴모노네티 및 나린진의 함량이 고함량으로 함유되어 기능성 식품 및化粧품의 소재로 사용될 수 있다.
- [0054] 또한 본 발명에 따른 기능성식품 또는化粧품은 다이드제인, 글라이시테인, 제니스테인, 폴모노네티 및 나린진의 함량이 높으며, 총 페놀릭스 함량 및 총 플라보노이드 함량이 높고, 더불어 우수한 항산화 활성을 가져서, 혈액순환 개선, 콜레스테롤 저하, 고지혈증 개선, 비만 개선, 면역력 개선, 여성 갱년기 증후군 개선용으로 유용하다.

도면의 간단한 설명

- [0056] 도 1은 본 발명의 발효조성물의 제조 공정도의 일례이다.
- 도 2a는 본 발명의 발효조성물의 원료 혼합물의 이소플라본 HPLC 크로마토그램을 나타낸다.
- 도 2b는 본 발명의 발효조성물의 원료 혼합물을 증자 후 발효 전의 이소플라본 HPLC 크로마토그램을 나타낸다.
- 도 2c는 본 발명의 발효조성물의 이소플라본 HPLC 크로마토그램을 나타낸다.
- 도 3은 본 발명에 따른 발효조성물(실시예1), 원료 혼합물(비교예1) 및 발효 전 조성물(비교예2)의 배당체 이소플라본과 비배당체 이소플라본 함량을 나타낸 것이다.
- 도 4는 본 발명에 따른 발효조성물, 원료 혼합물 및 발효 전 조성물의 총 페놀릭스와 총 플라보노이드 함량을 나타낸 것이다.
- 도 5는 본 발명에 따른 발효조성물, 원료 혼합물 및 발효 전 조성물의 DPPH 라디칼 소거활성 및 ABTS 라디칼 소거활성을 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0057] 다음의 실시예들에 의해 본 발명이 더 상세히 설명된다. 이들 실시예는 본 발명을 예시하기 위한 것이며, 본 발명의 범위가 이들에 의해 제한되어서는 안된다.

[0058] 재료 및 방법

- [0059] <재료>
- [0060] 파바톤 콩잎은 경상남도 남해군 일대에서 재배된 것을 농업회사법인 주식회사 제이씨엔팜으로부터 건조된 상태로 공급받아 사용하였다. 구체적으로는 대원콩 종자를 파종 후 약 60일(R3 생육단계: 까투리가 맺히기 전 최대 성장 시기) 동안 재배된 콩잎에 에테폰을 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도로 약액이 흐를 정도로 충분히 24시간 간격으로 2회 살포하였다. 첫 살포 후 96시간 후에 콩잎을 수확하여 물로 세척 후 식품건조기(35℃)에서 건조하였다. 현미는 진주시 소재 대형마트에서 구입하여 사용하였다.
- [0061] 팽이버섯 균사체(*Flammulina velutipes* KCCM 60233)는 한국미생물보존센터로부터 분양받아 사용하였다. 팽이버섯 균사체 계대 배양은 Yeast Mold broth/agar(PDB/PDA, BD-Difco사, Sparks, MD, USA)를 사용하였다.
- [0062] <분석시료 제조>
- [0063] 분말 시료 1 g에 50% 주정을 50배 첨가하여 12시간 동안 추출한 뒤 감압여과기를 이용해 여과하고 감압농축기를 이용하여 완전 농축시킨 후 동결건조기(FD-1000, TOKYO RIKAKIKAI, Japan)를 이용하여 동결건조하였다. 최종 동결건조된 시료 1 g에 50% 주정을 100배 첨가하여 추출물을 제조하여 분석시료로 사용하였다.
- [0064] <이소플라본 함량 분석>
- [0065] 이소플라본 함량 분석은 Cho 등(2011)의 방법에 준하여 HPLC 크로마토그램을 이용하여 분석하였다. 분석에 이용된 고정상 컬럼은 Lichrophore 100 RP C18(ichroCART 125-4, 5 μm , 125mm $\times$ 4mm, Merck KGaA, Darmstadt, Grmany)을 사용하였고, 이동상 용매는 0.2% 수증 글라시알 아세트산(glacial acetic acid in water; solution A)와 0.2% 아세토니트릴 중의 아세트산(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 μl 를 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.
- [0066] 제조예 : 발효조성물의 제조
- [0067] 건조된 분쇄한 파바톤 콩잎 분말과 현미 분말을 8:2의 중량비로 혼합하여 정제수를 5배(w/w) 첨가하고 수화시킨 후 121℃에서 1시간 동안 증자 처리하고 팽이버섯 균사체 액체 배양액을 5%(v/w)접종하여 25℃에서 10일간 발효하여 본 발명에 따른 발효조성물을 제조하였고(실시예 1), 그 결과 사진을 도 1에 나타냈다.
- [0068] 비교를 위하여, 건조된 분쇄한 파바톤 콩잎 분말과 현미 분말을 8:2의 중량비로 혼합한 원료 혼합물(비교예

1). 건조된 분쇄한 과바톤 콩잎 분말과 현미 분말을 8:2의 중량비로 혼합하여 정제수를 5배(w/w) 첨가하고 수화시킨 후 121℃에서 1시간 동안 증자 처리한 발효 전 조성물(비교예 2)을 준비하였다.

[0069] 시험예 1: 비배당체 이소플라본 함량 분석

[0070] 상기 제조예에서 제조된 비교예 1의 원료 혼합물, 비교예 2의 발효 전 조성물 및 실시예1의 발효조성물의 이소플라본 함량을 분석하였으며, 그 결과 각각의 HPLC 크로마토그램을 도 2a ~ 도 2c, 도 3에 나타냈고 그 결과의 각각의 비배당체 이소플라본의 함량을 표 1에 나타냈다.

[0071] 도 2a ~ 도 2c의 크로마토그램 및 도 3의 그래프에서 확인되는 바와 같이, 비교예 1의 원료 혼합물에서는 배당체인 다이드진(daidzin), 제니스틴(genistin), 말로닐다이드진(malonyldaidzin), 말로닐글라이시틴(malonylglycitin), 말로닐제니스틴(malonylgenistin) 및 오노닌(ononin)의 피크가 높게 나타났고 (도 2a), 비배당체인 다이드제인(daidzein), 제니스테인(genistein) 및 폴모노네틴(formononetin)의 피크는 거의 나타나지 않았다. 비교예 2의 발효 전 조성물에서는 여전히 배당체인 다이드진(daidzin)과 제니스틴(genistin)의 피크가 높게 나타났으며 비배당체의 피크는 약간 상승했을 뿐이며 (도 2b), 이에 비하여 실시예 1의 발효조성물에서는 비배당체인 다이드제인(daidzein), 글라이시테인(glycitein), 제니스테인인(genistein) 및 폴모노네틴(formononetin)의 피크가 현저히 높아졌다 (도 2c).

표 1

함량($\mu\text{g/g}$)	비교예 1	비교예 2	실시예 1
다이드제인(Daidzein)	88.15 ± 1.88	287.06 ± 4.16	1277.15 ± 12.35
글라이시테인(Glycitein)	nd	35.94 ± 0.57	55.63 ± 1.08
제니스테인(Genistein)	82.01 ± 1.43	151.97 ± 3.80	896.40 ± 9.14
폴모노네틴(Formononetin)	22.98 ± 0.28	33.97 ± 0.61	110.82 ± 1.21
합계	193.14	508.94	2340.00

[0073] 상기 표 1에 나타난 바와 같이, 비교예 1의 다이드제인, 제니스테인 및 폴모노네틴이 각각 $88.15 \pm 1.88 \mu\text{g/g}$, $82.69 \pm 1.43 \mu\text{g/g}$ 및 $22.98 \pm 0.28 \mu\text{g/g}$ 로 나타났고 글라이시테인은 검출되지 않았다. 비교예 2는 다이드제인, 글라이시테인, 제니스테인 및 폴모노네틴이 각각 $287.06 \pm 4.16 \mu\text{g/g}$, $35.94 \pm 0.57 \mu\text{g/g}$, $151.85 \pm 3.80 \mu\text{g/g}$ 및 $33.97 \pm 0.61 \mu\text{g/g}$ 로 나타났다. 이에 비하여 실시예 1의 발효조성물은 다이드제인, 글라이시테인, 제니스테인 및 폴모노네틴이 각각 $1277.15 \pm 12.35 \mu\text{g/g}$, $55.63 \pm 1.08 \mu\text{g/g}$, $896.40 \pm 9.14 \mu\text{g/g}$ 및 $110.82 \pm 1.21 \mu\text{g/g}$ 로 현저히 증진되었다. 즉 실시예 1은 비교예 1에 비해 다이드제인, 제니스테인 및 폴모노네틴이 각각 약 14.5배, 10.9배 및 4.7배로 현저히 증가하였고, 글라이시테인은 새로이 생성되었고, 비교예 2에 비해서도 다이드제인, 글라이시테인, 제니스테인 및 폴모노네틴이 각각 약 4.4배, 1.5배, 5.9배 및 3.2배 이상 증가하였다.

[0074] 도 3에 나타난 바와 같이, 비교예 1(원료 혼합물)은 배당체 이소플라본 함량은 각각 4.73 mg/g으로 현저히 높았으나, 비배당체 이소플라본 함량은 0.19 mg/g으로 현저히 낮았다. 비교예 2(발효 전 조성물)는 배당체 이소플라본 함량이 약간 감소하여 3.0 mg/g 있었고, 비배당체 이소플라본 함량은 약 2.6배 증가한 0.51 mg/g이었다. 이에 비하여 실시예 1(발효조성물)는 배당체 이소플라본 함량이 현저히 감소하여 0.13 mg/g 이었고, 비배당체 이소플라본 함량은 약 12.3배 이상 현저히 증가한 2.34 mg/g 이었다.

[0075] 따라서 팽이버섯 균사체로 발효된 본 발명에 따른 과바톤 콩잎의 발효조성물은 다이드제인, 글라이시테인, 제니스테인 및 폴모노네틴의 함량이 현저히 강화됨을 알 수 있다.

[0077] 시험예 2. 나린진 함량 분석

[0078] 나린진(narigin)의 함량은 상기와 같이 준비된 각각의 시료에 대해 HPLC(high performance liquid chromatography)를 사용하여 분석하였다. 분석 컬럼은 XBridge C18(4.6×250 mm, 5 μm , Waters Corp., Milford, MA, USA) 컬럼을 사용하였고 0.5% 글라시알 아세트산 (glacial acetic acid, 이동상 용매 A)와 100% 메탄올(이동상 용매 B)을 0 ~ 100% 선형 구배(linear gradient)로 30℃에서 60분간 1분당 1 ml의 속도로 가동하면서 UV 검출기로 270 nm에서를 검출하였고 그 결과를 표 2에 나타냈다.

표 2

함량($\mu\text{g/g}$)	비교예 1	비교예 2	실시예 1
나린진(Naringin)	978.36 ± 3.63	1139.47 ± 11.71	4332.08 ± 13.13

표 2에 나타난 바와 같이, 나린진의 함량은, 비교예 1은 $978.36 \pm 3.63 \mu\text{g/g}$, 비교예 2는 $1139.47 \pm 11.71 \mu\text{g/g}$, 실시예 1은 $4332.08 \pm 13.13 \mu\text{g/g}$ 으로 나타났다. 실시예 1의 나린진의 함량은 비교예 1 및 비교예 2에 비하여 각각 약 4.4배 및 약 3.8배 증진되었음을 확인할 수 있다.

시험예 3. 생리활성성분 함량 분석

생리활성성분인 총 페놀릭스, 총 플라보노이드스 함량을 분석하였다.

<총 페놀릭스 함량>

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 분광광도계를 사용하여 750nm에서 흡광도를 측정하였다. 이때 총 페놀릭스 함량은 갈산(Gallic acid)을 이용하여 작성한 표준곡선으로부터 함량을 구하여 갈산에 상당하는 양으로 계산하였고 그 결과를 도 4에 나타냈다.

도 4에 나타난 바와 같이, 총 페놀릭스 함량은 비교예 1 및 비교예 2에서는 각각 3.48 mg/g 및 5.76 mg/g이었으며, 실시예 1에서는 11.64 mg/g으로 나타나, 본 발명에 따른 발효조성물은 총 페놀릭스 함량이 2배 이상 증진됨을 확인할 수 있다.

<총 플라보노이드스 함량>

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)의 최종 농도를 0, 0.25, 0.5, 1.0 mg/ml로 제조하여 작성한 표준곡선으로부터 함량을 구하였고 그 결과는 도 4에 나타내었다.

도 4에 나타난 바와 같이, 총 플라보노이드스 함량도, 비교예 1, 비교예 2 및 실시예 1에서 각각 5.38 mg/g, 6.06 mg/g 및 8.14 mg/g으로 나타나, 본 발명에 따른 발효조성물은 총 플라보노이드스의 함량도 크게 증가되는 것을 확인할 수 있다.

시험예 4. 항산화 활성 분석

항산화 활성은 DPPH 라디칼 소거활성, ABTS 라디칼 소거활성을 측정하여 분석하였다.

<DPPH 라디칼 소거활성>

각각의 분석시료 0.2 ml에 DPPH 메탄올 용액($1.5 \times 10^{-4} \text{ M}$) 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 5에 도시하였다.

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

도 5에 나타난 바와 같이, DPPH 라디칼 소거활성은, 비교예 1, 비교예 2 및 실시예 1은 각각 43.42%, 49.31% 및 76.2%의 활성을 나타내 실시예 1의 발효조성물이 가장 높은 라디칼 소거활성을 보였다.

<ABTS 라디칼 소거활성>

7 mM ABTS^+ 와 2.45 mM $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ 를 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. 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.

[0099] 도 5에 나타난 바와 같이, ABTS 라디칼 소거활성은 비교예 1, 비교예 2 및 실시예 1은 각각 60.66%, 63.22% 및 91.56%의 활성을 나타내 실시예 1의 발효조성물이 가장 높은 활성을 보였다.

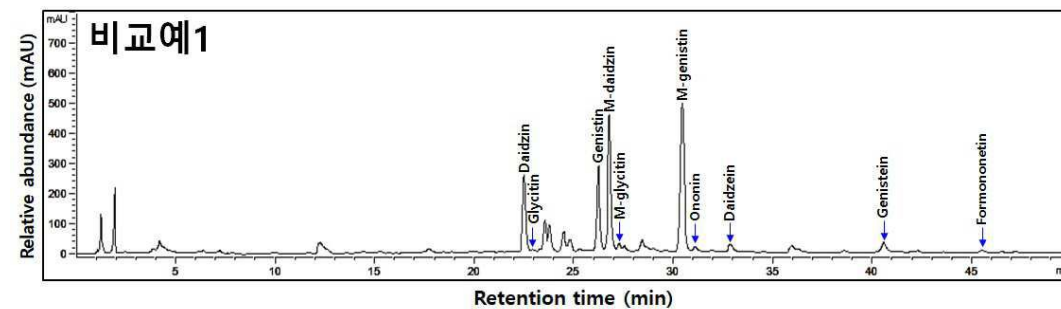
[0100] 이들 결과로부터 본 발명에 따른 발효조성물은 항산화 활성이 현저히 증진됨을 알 수 있다.

도면

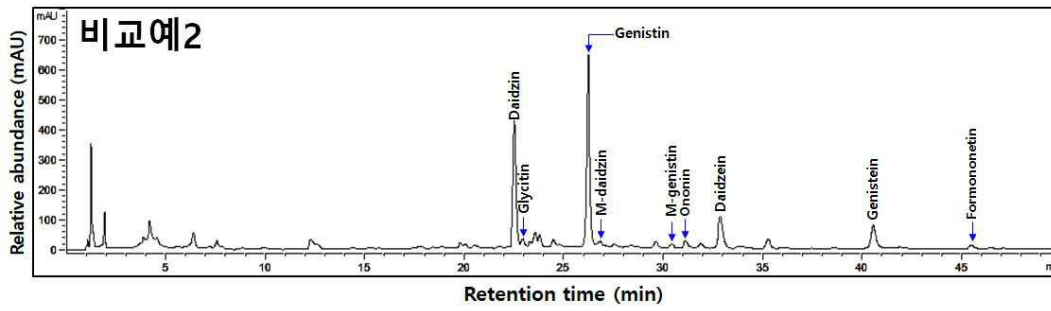
도면1



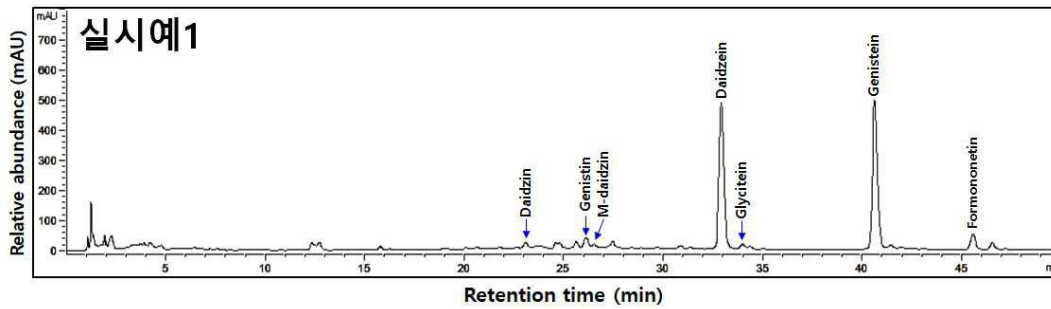
도면2a



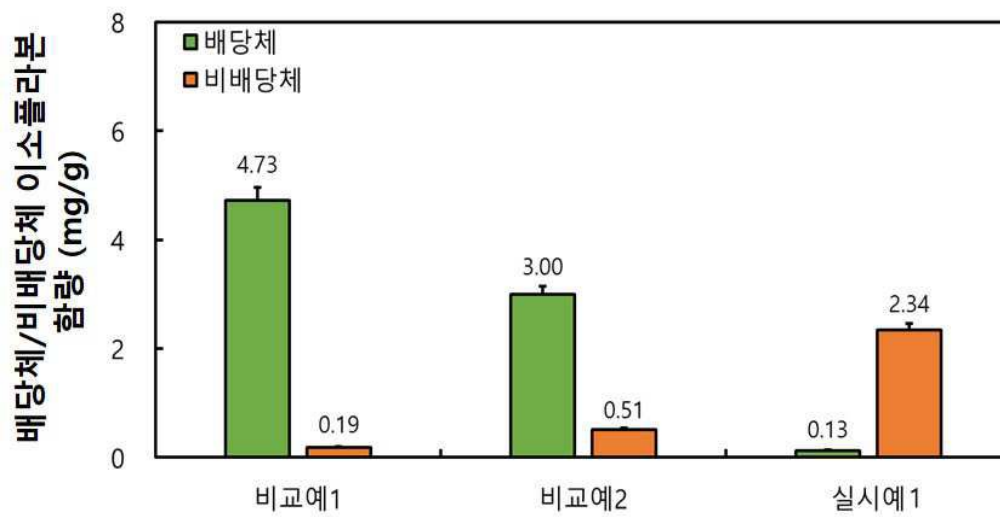
도면2b



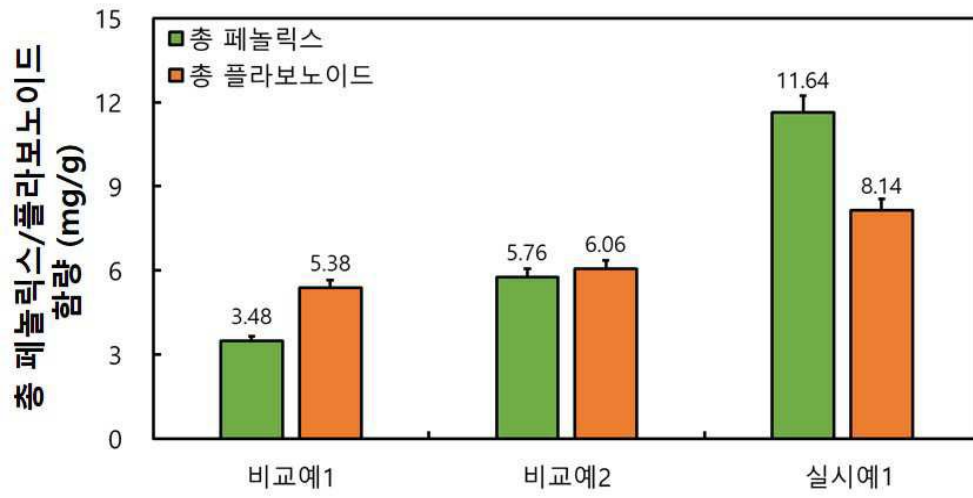
도면2c



도면3



도면4



도면5

