



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0171610
(43) 공개일자 2024년12월09일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A23L 33/105 (2016.01) A23L 33/135 (2016.01)
A61K 8/9789 (2017.01) A61K 8/9794 (2017.01)
A61Q 19/00 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A23L 33/105 (2016.08)
A23L 33/135 (2016.08)

(21) 출원번호 10-2023-0069775

(22) 출원일자 2023년05월31일

심사청구일자 2023년05월31일

(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 16 항

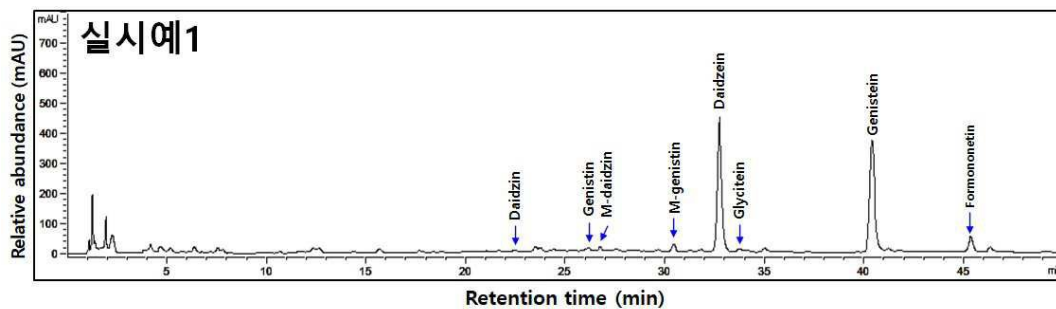
(54) 발명의 명칭 비배당체 이소플라본, 루틴 및 나린진이 강화된 파바톤 콩잎 홍국균 균사체 발효조성물 및 그 제조방법

(57) 요약

본 발명에서는 파바톤 콩잎을 홍국균 균사체로 발효하여 제조된 다이드제인, 글라이시테인, 제니스테인, 폴모노네틴, 루틴 및 나린진이 증진된 파바톤 콩잎의 홍국균 균사체 발효조성물 및 그 제조방법이 개시된다.

본 발명에 따른 파바톤 콩잎의 홍국균 균사체 발효조성물은 다이드제인, 글라이시테인, 제니스테인, 폴모노네틴, 루틴 및 나린진이 고함량으로 함유되어 기능성식품 및 화장품의 소재로 사용될 수 있다.

대표도 - 도2c



(52) CPC특허분류

A61K 8/9789 (2017.08)

A61K 8/9794 (2017.08)

A61Q 19/00 (2013.01)

A23V 2002/00 (2023.08)

A23V 2250/2116 (2013.01)

(72) 발명자

정재각

경상남도 함양군 함양읍 인당2길 26-7

김민주

경상남도 진주시 도동천로 310, 하대대림 아파트 610호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1345352028

과제번호 2016R1D1A1B01009898

부처명 교육부

과제관리(전문)기관명 한국연구재단

연구사업명 개인기초연구(교육부)

연구과제명 폐경-비만 모델 이용 복합생균제 발효물의 식이에 따른 갱년기 대사질환 개선 및 장내미생물과의 상관성

기 여 율 1/2

과제수행기관명 경상국립대학교 산학협력단

연구기간 2016.06.01 ~ 2023.05.31

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

명세서

청구범위

청구항 1

파바톤 콩잎 70 ~ 90 중량% 및 현미 10 ~ 30 중량%를 혼합한 혼합물을 홍국균 균사체로 발효하여 제조된 다이드제인, 글라이시테인, 제니스테인 및 폴모노네틴이 증진된 파바톤 콩잎의 홍국균 균사체 발효조성물.

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 발효조성물은 다이드제인을 831 $\mu\text{g/g}$ 이상, 글라이시테인을 56 $\mu\text{g/g}$ 이상, 제니스테인을 538 $\mu\text{g/g}$ 이상 및 폴모노네틴을 85 $\mu\text{g/g}$ 이상 함유하는 것을 특징으로 하는, 다이드제인, 글라이시테인, 제니스테인 및 폴모노네틴이 증진된 파바톤 콩잎의 홍국균 균사체 발효조성물.

청구항 3

파바톤 콩잎 70 ~ 90 중량% 및 현미 10 ~ 30 중량%를 혼합한 혼합물을 홍국균 균사체로 발효하여 제조된 루틴 및 나린진이 증진된 파바톤 콩잎의 홍국균 균사체 발효조성물.

청구항 4

제 3항에 있어서, 상기 발효조성물은 루틴을 543 $\mu\text{g/g}$ 이상 및 나린진을 3580 $\mu\text{g/g}$ 이상 함유하는 것을 특징으로 하는, 루틴 및 나린진이 증진된 파바톤 콩잎의 홍국균 균사체 발효조성물.

청구항 5

제 1항에 있어서, 상기 홍국균은 모나스커스 필로서스(*Monascus pilosus*) 또는 모나스커스 퍼프레우스(*Monascus purpureus*)인 것인, 다이드제인, 글라이시테인, 제니스테인 및 폴모노네틴이 증진된 파바톤 콩잎의 홍국균 균사체 발효조성물.

청구항 6

제 3항에 있어서, 상기 홍국균은 모나스커스 필로서스(*Monascus pilosus*) 또는 모나스커스 퍼프레우스(*Monascus purpureus*)인 것인, 루틴 및 나린진이 증진된 파바톤 콩잎의 홍국균 균사체 발효조성물.

청구항 7

제 1항에 있어서, 상기 혼합물은 발효 전에 100℃ 이상에서 60 ~ 120분 증자된 것을 특징으로 하는, 다이드제인, 글라이시테인, 제니스테인 및 폴모노네틴이 증진된 파바톤 콩잎의 홍국균 균사체 발효조성물.

청구항 8

제 3항에 있어서, 상기 혼합물은 발효 전에 100℃ 이상에서 60 ~ 120분 증자된 것을 특징으로 하는, 루틴 및 나린진이 증진된 파바톤 콩잎의 홍국균 균사체 발효조성물.

청구항 9

다이드제인, 글라이시테인, 제니스테인 및 폴모노네틴이 증진된 파바톤 콩잎의 홍국균 균사체 발효조성물의 제조방법으로, 상기 방법은

- i) 파바톤 콩잎 70 ~ 90 중량% 및 현미 10 ~ 30 중량%를 혼합한 후 물을 3~5배(v/w)으로 혼합하는 단계;
- ii) 100℃ 이상에서 60 ~ 120분 증자하는 단계; 및
- iii) 홍국균 균사체를 3~10%(v/w) 농도로 접종하여 25~30℃에서 8~12일간 발효하는 단계를 포함하는 것인 방법.

청구항 10

루틴 및 나린진이 증진된 파바톤 콩잎의 홍국균 균사체 발효조성물의 제조방법으로, 상기 방법은

- i) 파바톤 콩잎 70 ~ 90 중량% 및 현미 10 ~ 30 중량%를 혼합한 후 물을 3~5배(v/w)으로 혼합하는 단계;
- ii) 100℃ 이상에서 60 ~ 120분 증자하는 단계; 및
- iii) 홍국균 균사체를 3~10%(v/w) 농도로 접종하여 25~30℃에서 8~12일간 발효하는 단계를 포함하는 것인 방법.

청구항 11

제 9항에 있어서, 상기 홍국균은 모나스커스 필로서스(*Monascus pilosus*) 또는 모나스커스 퍼프레우스(*Monascus purpureus*)인 것인, 다이드제인, 글라이시테인, 제니스테인 및 폴모노네틴이 증진된 파바톤 콩잎의 홍국균 균사체 발효조성물의 제조방법.

청구항 12

제 10항에 있어서, 상기 홍국균은 모나스커스 필로서스(*Monascus pilosus*) 또는 모나스커스 퍼프레우스(*Monascus purpureus*)인 것인, 루틴 및 나린진이 증진된 파바톤 콩잎의 홍국균 균사체 발효조성물의 제조방법.

청구항 13

제 1항에 따른 발효조성물을 포함하는 다이드제인, 글라이시테인, 제니스테인 및 폴모노네틴이 증진되고 항산화 활성을 갖는 기능성식품.

청구항 14

제 3항에 따른 발효조성물을 포함하는 루틴 및 나린진이 증진되고 항산화 활성을 갖는 기능성식품.

청구항 15

제 1항에 따른 발효조성물을 포함하는 다이드제인, 글라이시테인, 제니스테인 및 폴모노네틴이 증진된 화장품.

청구항 16

제 3항에 따른 발효조성물을 포함하는 루틴 및 나린진이 증진된 화장품.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 비배당체 이소플라본이 강화된 파바톤 콩잎 홍국균 균사체 발효조성물 및 그 제조방법에 관한 것으로, 더 상세하게는 파바톤 콩잎을 홍국균 균사체로 발효하여 제조한 비배당체 이소플라본인 다이드제인, 제니스테인, 글라이시테인 및 폴모노네틴과 루틴 및 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 있다.

[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] 이에 파바톤 콩잎에 함유된 고함량의 이소플라본 유도체를 비배당체 이소플라본으로의 전환기술 개발과 이를 통한 유효성분이 증진된 파바톤 콩잎의 가공식품의 개발이 요구되고 있다.

[0006] 이소플라본은 베타-글리코시드가 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. 비배당체 이소플라본 중에서 제니스테인(genistein)은 항산화활성 뿐만 아니라 지방암 및 전립선암 등에 효과적이며 다이드제인(daidzein)은 폐경기 여성의 골다공증에 효과적인 것으로 알려져 있다. 글라이시테인(glycitein) 및 폴모노네틴(formononetin)은 항암 효과, 항염증 효과, 여성 갱년기 증상 완화가 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.

[0007] 루틴(rutin)은 플라보노이드로 감귤류, 메밀, 사과 등 다양한 식물에 존재하며 항염증 효과, 항산화 효과 및 혈관 기능 지원과 건강한 혈액순환 촉진에 도움을 주는 것으로 알려져 있어 심혈관 건강 증진을 위해 판매되는 제품에 자주 사용되고 있다. 나린진(naringin)은 감귤류 과피에 다량 함유되어 있는 플라보노이드 화합물로서 항산화 및 항암 효과 등이 알려져 있다.

[0008] *Monascus* 속의 홍국균은 전통적으로 홍국을 제조하는데 사용되었으며, 아시아에서는 홍국균이 생산하는 빨간 색소에 의해 식용색소에 사용되거나 그밖에 살균제, 보존료, 발효식품 제조에 이용되어왔다. 홍국균을 이용해 제조한 홍국쌀은 모나콜린 케이가 다량 존재하여 콜레스테롤 생합성 억제 활성을 가지는 것으로 알려져 있으며 그 밖에도 항균 활성, 혈압강하, 혈관 이완, 항비만 등 다양한 연구가 진행되어 왔으나 쌀 이외 소재를 이용한 홍국균 발효 연구는 미비한 실정이다.

[0009] 홍국균 발효와 관련된 등록 특허로는 '버섯 및 홍국균 종균을 이용한 커피생두 발효방법, 조성물, 및 발효커피' (특허 10-1258893호), '홍국균 발효산물을 포함한 여성 갱년기 질환 예방 또는 치료용 조성물' (특허 10-1798882호) 등이 있다.

[0010] 그러나 다이드제인, 글라이시테인, 제니스테인 및 폴모노네틴과 루틴 및 나린진이 현저히 증진된 파바톤 콩잎의 홍국균 발효조성물은 개발된 바 없다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0012] 이에 본 발명자들은 종래 기술의 요구에 부응하기 위한 연구를 지속한 결과, 파바톤 콩잎을 홍국균 균사체로 발효한 경우, 비배당체 이소플라본인 다이드제인, 글라이시테인, 제니스테인 및 폴모노네틴과 루틴 및 나린진이 현저히 증진됨을 확인하고 본 발명을 완성하게 되었다.
- [0013] 따라서 본 발명의 목적은 다이드제인, 글라이시테인, 제니스테인 및 폴모노네틴이 증진된 파바톤 콩잎의 홍국균 균사체 발효조성물을 제공하는 것이다.
- [0014] 본 발명의 또 다른 목적은 루틴 및 나린진이 증진된 파바톤 콩잎의 홍국균 균사체 발효조성물을 제공하는 것이다.
- [0015] 본 발명의 또 다른 목적은 다이드제인, 글라이시테인, 제니스테인 및 폴모노네틴이 증진된 파바톤 콩잎의 홍국균 균사체 발효조성물의 제조방법을 제공하는 것이다.
- [0016] 본 발명의 또 다른 목적은 루틴 및 나린진이 증진된 파바톤 콩잎의 홍국균 균사체 발효조성물의 제조방법을 제공하는 것이다.
- [0017] 본 발명의 또 다른 목적은 다이드제인, 글라이시테인, 제니스테인 및 폴모노네틴이 증진된 파바톤 콩잎의 홍국균 균사체 발효조성물을 포함하는 기능성식품을 제공하는 것이다.
- [0018] 본 발명의 또 다른 목적은 루틴 및 나린진이 증진된 파바톤 콩잎의 홍국균 균사체 발효조성물을 포함하는 기능성식품을 제공하는 것이다.
- [0019] 본 발명의 또 다른 목적은 다이드제인, 글라이시테인, 제니스테인 및 폴모노네틴이 증진된 파바톤 콩잎의 홍국균 균사체 발효조성물을 포함하는 화장품을 제공하는 것이다.
- [0020] 본 발명의 또 다른 목적은 루틴 및 나린진이 증진된 홍국균 균사체 발효조성물을 포함하는 화장품을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0022] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 파바톤 콩잎과 현미의 혼합물을 홍국균 균사체로 발효하여 제조된 다이드제인, 글라이시테인, 제니스테인, 폴모노네틴 및/또는 루틴 및 나린진이 증진된 파바톤 콩잎의 홍국균 균사체 발효조성물을 제공한다.
- [0023] 본 발명에서 '파바톤 콩잎'은 재배 전 또는 후에 콩잎에 식물생장호르몬인 에틸렌(ethylene), 에틸렌 공여체(에세폰) 또는 에틸렌 발생체를 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.
- [0024] 본 발명에서 파바톤 콩잎은 건조하고 분쇄하여 분말화하여 사용하는 것이 바람직하며, 현미도 분말화하여 사용하는 것이 바람직하다.
- [0025] 본 발명의 혼합물에서 파바톤 콩잎은 70~90 중량%, 현미는 10~30 중량%로 포함되는 것이 바람직하고, 가장 바람직하게는 파바톤 콩잎 80 중량% 및 현미 20 중량%가 포함된다.
- [0026] 본 발명에서 현미는 주로 홍국균이 생육에 필요한 탄소원의 역할을 하면서도 홍국균의 발효(물질전환작용)를 증진시키는 기능도 한다.
- [0027] 현미의 함량이 10 중량% 미만이면 홍국균의 균사체의 성장이 느려지고 30 중량% 초과일 경우 균사체의 생육이 저하될 수 있다.
- [0028] 본 발명에서 '홍국균 균사체'는 홍국균의 균사체를 의미한다. 홍국균은 모나스커스 필로서스(*Monascus pilosus*), 모나스커스 러버(*Monascus ruber*), 모나스커스 퍼프레우스(*Monascus purpureus*), 모나스커스 카올리양(*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.
- [0029] 홍국균 균사체는 언제든지 이용가능하고, 균사체 성장 중에 β -글루코시다아제를 포함한 섬유소 분해효소, 단백

질 분해효소, 지방질 분해효소 등의 다양한 가수분해효소를 생성한다.

- [0030] 본 발명에서 '발효'는 홍국균 균사체를 종균으로 사용하여 발효하는 것을 의미한다. 과바톤 콩잎과 현미의 혼합물을 홍국균 균사체로 발효 시, 놀랍게도 다이드제인, 글라이시테인, 제니스테인, 폴모노네틴이 현저히 증진되었다 (표 1).
- [0031] 본 발명에서 홍국균 균사체는 과바톤 콩잎과 현미의 혼합물에 3~10%(v/w) 농도로 접종하여 25~30℃에서 8~12일간 발효시키는 것으로 수행될 수 있다. 가장 바람직하게는 25℃에서 10일간 발효한다.
- [0032] 홍국균 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.
- [0033] 본 발명에서 과바톤 콩잎과 현미의 혼합물은 발효 전에 증자 처리될 수 있다. 증자는 100℃ 이상에서 30 ~ 90분 증자하는 것이 바람직하고, 가장 바람직하게는 120℃에서 60분 증자한다.
- [0034] 본 발명에서 증자 처리시 100℃ 미만 혹은 30분 미만의 경우 잡균이 완전히 살균되지 않아 발효에 영향을 미칠 수 있으며, 120℃ 초과 혹은 90분 초과 처리시 과도한 열처리에 의하여 영양성분과 유효성분 등의 파괴가 많이 될 수 있다.
- [0035] 본 발명에 따른 과바톤 콩잎의 홍국균 균사체 발효조성물은 다이드제인 831 $\mu\text{g/g}$ 이상, 글라이시테인 56 $\mu\text{g/g}$ 이상, 제니스테인 538 $\mu\text{g/g}$ 이상, 폴모노네틴 85 $\mu\text{g/g}$ 이상 함유한다 (표 1).
- [0036] 본 발명에 따른 과바톤 콩잎의 홍국균 균사체 발효조성물은 다이드제인, 글라이시테인, 제니스테인 및 폴모노네틴의 함량이 가공전 혼합물(비교예 1)에 비하여 각각 약 9.4배 이상, 약 56배 이상, 약 6.5배 이상 및 약 3.7배 이상 증진된다 (표 1).
- [0037] 본 발명에 따른 과바톤 콩잎의 홍국균 균사체 발효조성물은 루틴을 543 $\mu\text{g/g}$ 이상, 나린진을 3580 $\mu\text{g/g}$ 이상 함유한다 (표 2).
- [0038] 본 발명에 따른 과바톤 콩잎의 홍국균 균사체 발효조성물은 루틴 및 나린진의 함량이 가공전 혼합물(비교예 1)에 비하여 각각 약 2.3배 이상 및 약 3.6배 이상 증진된다 (표 2).
- [0039] 또한 본 발명에 따른 과바톤 콩잎의 홍국균 균사체 발효조성물은 총 페놀릭스 및 총 플라보노이드스 등의 생리활성물질의 함량도 강화되어, 증진된 항산화 활성을 갖는다 (도 4 및 도 5).
- [0040] 본 발명의 또 다른 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 과바톤 콩잎과 현미의 혼합물을 홍국균 균사체로 발효하여 다이드제인, 글라이시테인, 제니스테인, 폴모노네틴 및/또는 루틴 및 나린진이 증진된 과바톤 콩잎의 홍국균 균사체 발효조성물의 제조방법을 제공한다.
- [0041] 구체적으로 상기 방법은
- [0042] i) 과바톤 콩잎 70 ~ 90 중량% 및 현미 10 ~ 30 중량%를 혼합한 후 물을 3 ~ 5배(v/w)으로 혼합하는 단계;
- [0043] ii) 100℃ 이상에서 60 ~ 120분 증자하는 단계; 및
- [0044] iii) 홍국균 균사체를 3 ~ 10%(v/w) 농도로 접종하여 25 ~ 30℃에서 8 ~ 12일간 발효하는 단계를 포함한다.
- [0045] 본 발명의 제조방법에서, 과바톤 콩잎, 혼합물의 중량비, 홍국균 균사체 및 발효는 상기에서 정의된 바와 같다.
- [0046] 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.
- [0047] 발효 전에, 과바톤 콩잎, 현미 및 물의 혼합물은 살균하기 위하여 증자 처리될 수 있다. 증자는 100℃ 이상에서 60 ~ 120분 증자하는 것이 바람직하고, 가장 바람직하게는 120℃에서 60분 증자한다.
- [0048] 본 발명의 또 다른 목적에 따라서, 본 발명은 상기 제조방법에 의해 제조된 다이드제인, 글라이시테인, 제니스테인, 폴모노네틴 및/또는 루틴 및 나린진이 증진된 과바톤 콩잎의 홍국균 균사체 발효조성물을 포함하는 기능성식품을 제공한다.

- [0049] 본 발명에 따른 기능성식품은 우수한 항산화 활성 효과를 갖는다 (도 5).
- [0050] 본 발명의 또 다른 목적에 따라서, 다이드제인, 글라이시테인, 제니스테인, 폴모노네틴 및/또는 루틴 및 나린진이 증진된 파바톤 콩잎의 홍국균 균사체 발효조성물을 포함하는 화장품을 제공한다.
- [0051] 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.
- [0052] 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

- [0054] 본 발명에 따른 발효조성물은 다이드제인, 글라이시테인, 제니스테인, 폴모노네틴 및/또는 루틴 및 나린진이 고 함량으로 함유되어 기능성식품 및 화장품의 소재로 사용될 수 있다.
- [0055] 또한 본 발명에 따른 기능성식품 또는 화장품은 다이드제인, 글라이시테인, 제니스테인, 폴모노네틴 및/또는 루틴 및 나린진의 함량이 높으며, 더불어 우수한 항산화 활성을 가져서 면역력 개선, 여성 갱년기 증후군 개선용으로 유용하다.

도면의 간단한 설명

- [0057] 도 1은 본 발명의 파바톤 콩잎의 홍국균 균사체 발효조성물의 제조 공정도의 일례이다.
- 도 2a ~ 도 2d는 이소플라본 HPLC 크로마토그램을 나타낸 것이다. 도 2a는 비교예 1의 조성물, 도 2b는 비교예 2의 조성물, 도 2c는 실시예 1의 발효조성물, 도 2d는 실시예 2의 발효조성물의 이소플라본 HPLC 크로마토그램을 나타낸 것이다.
- 도 3은 본 발명 (실시예 1, 2)에 따른 발효조성물의 배당체 및 비배당체 이소플라본 함량을 나타낸 것이다
- 도 4는 본 발명 (실시예 1, 2)에 따른 발효조성물의 총 페놀릭스 및 플라보노이드 함량을 나타낸 것이다.
- 도 5는 본 발명 (실시예 1, 2)에 따른 발효조성물의 항산화 활성을 나타내 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0058] 다음의 실시예들에 의해 본 발명이 더 상세히 설명된다. 이들 실시예는 본 발명을 예시하기 위한 것이며, 본 발명의 범위가 이들에 의해 제한되어서는 안된다.

[0060] 제조예 1: 발효조성물의 제조

- [0061] 파바톤 콩잎은 2020년도 9월경 진주시 대곡면 경상국립대학교 부속농장에서 재배된 것을 건조된 상태로 공급받아 사용하였다. 또한 혼합물로 이용되는 현미는 진주시 소재 대형마트에서 구입하여 사용하였다. 파바톤 콩잎과 현미는 각각 분쇄하여 분말로 준비해 두었다.
- [0062] 홍국균 2종 모나스커스 퍼프레우스 (*Monascus purpureus* KCCM 11832) 및 모나스커스 필로서스 (*Monascus pilosus* KCCM 60160)을 한국미생물보존센터(KCCM)에서 분양받아 사용하였다. 이들의 계대 배양 배지로 Potato Dextrose broth/agar(PDB/PDA, BD-Difco사, Sparks, MD, USA)를 사용하였고, 균사체 액체 배양액으로 준비하였다.
- [0063] 파바톤 콩잎 분말과 현미 분말을 8:2 비율로 혼합한 혼합물 50g에 정제수를 5배 첨가하고 1시간 동안 수화시킨 후 120℃에서 1시간 동안 증자 처리하였다. 이후 모나스커스 퍼프레우스 및 모나스커스 필로서스 균사체 액체 배양액을 각각의 혼합물에 5% (v/w) 접종하여 25℃에서 10일간 발효를 진행하여 본 발명에 따른 발효조성물을 제조하였고 (실시예 1 및 2), 그 결과 사진을 도 1에 나타냈다.

[0064] 비교를 위하여, 과바톤 콩잎 분말과 현미 분말을 8:2 비율로 혼합한 혼합물 (비교예 1). 과바톤 콩잎 분말과 현미 분말을 8:2 비율로 혼합한 혼합물 50g에 정제수를 5배(w/w) 첨가하고 1시간 동안 수화시킨 후 120℃에서 1시간 동안 증자 처리한 것(비교예 2)을 준비하였다.

[0066] **참조예: 분석시료 제조**

[0067] 실시예 1 및 실시예 2의 발효조성물, 비교예 1 및 비교예 2의 조성물을 각각 55℃에서 3일간 건조하여 분쇄시켜 분말 시료를 준비하였다.

[0068] 분말 시료 20 g에 50% 주정을 50배 첨가하여 약 12시간 동안 추출하여 여과한 뒤 감압농축기를 이용하여 완전 농축시킨 후 동결건조기(FD-1000, TOKYO RIKAKIKAI, Japan)를 이용하여 수분을 완전히 제거하였다. 생리활성 등 분석시료로 이용하기 위해 최종 동결건조된 시료 0.1 g에 50% 주정을 10배 첨가하여 추출물을 제조하여 분석 시료로 이용하였다.

[0070] **시험예 1: 비배당체 이소플라본 함량 분석**

[0071] 상기 제조예 1에서 제조된 비교예 1, 비교예 2의 조성물 및 실시예 1, 실시예 2의 발효조성물 각각에 대해 비배당체 이소플라본 함량을 분석하였다.

[0072] 이소플라본 함량 분석은 Cho 등(2011)의 방법에 준하여 HPLC 크로마토그램을 이용하여 분석하였다. 구체적으로 분석에 이용된 이동상 용매는 0.2% 수중 글라시알 아세트산(glacial acetic acid in water; solution A)와 0.2% 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. 참고예에서 준비된 각각의 분석시료는 20 μ l를 주입하였고 이동상은 30℃에서 1 ml/min 속도를 유지하였다. 고정상 컬럼은 Lichrophore 100 RP C18 column(ichroCART 125-4, 5 μ m, 125mm $\times$ 4mm, Merck KGaA, Darmstadt, Grmany)을 사용하였다. 흡광도 측정은 diode array UV detector(Agilent1200 series, Agilent사, USA)를 이용하여 흡광도 254 nm에서 정량하여 표준품의 검량곡선과 비교하여 함량을 계산하였다.

[0073] 분석 결과 각각의 HPLC 크로마토그램을 도 2a ~도 2d에 나타내었고 각각의 다이드제인, 글라이시테인, 제니스테인 및 폴모노네틴의 함량을 표 1에 나타냈다.

[0074] 도 2a ~ 도 2d의 크로마토그램 및 도 3에서 확인되는 바와 같이, 비교예 1의 조성물(가공전 원료)에서는 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 조성물(증자된 조성물)에서는 여전히 배당체인 다이드진(daidzin)과 제니스틴(genistin)의 피크가 높게 나타났으며 비배당체의 피크는 약간 상승했을 뿐이며 (도 2b), 이에 비하여 실시예 1 및 실시예 2의 발효조성물에서는 비배당체인 다이드제인(daidzein), 글라이시테인(glycitein), 제니스테인(genistein) 및 폴모노네틴(formononetin)의 피크가 현저히 높아졌다 (도 2c 및 도 2d).

표 1

[0075]

함량(μ g/g)	비교예 1	비교예 2	실시예 1	실시예 2
다이드제인 (Daidzein)	88.15 $\pm$ 1.88	287.06 $\pm$ 4.16	1096.47 $\pm$ 10.72	831.19 $\pm$ 4.16
글라이시테인 (Glycitein)	-	35.94 $\pm$ 0.57	56.03 $\pm$ 1.21	70.24 $\pm$ 1.67
제니스테인 (Genistein)	82.01 $\pm$ 1.43	151.97 $\pm$ 3.80	694.92 $\pm$ 8.83	538.84 $\pm$ 7.24
폴모노네틴 (Formonetin)	22.98 $\pm$ 0.28	33.97 $\pm$ 0.61	111.76 $\pm$ 1.96	85.30 $\pm$ 1.89
합계	193.14	508.94 $\pm$ 1.88	1959.18	1525.57

[0076] 상기 표 1에 나타낸 바와 같이, 비교예 1의 조성물은 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 않았고, 비교예 2의 조성물은 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. 실시예 1의 발효조성물은 다이드제인, 글라이시테인, 제니스테인 및 폴모노네틴이 각각 1096.47 $\pm$ 10.72 $\mu\text{g/g}$, 56.03 $\pm$ 1.21 $\mu\text{g/g}$, 694.92 $\pm$ 8.83 $\mu\text{g/g}$ 및 111.76 $\pm$ 1.96 $\mu\text{g/g}$ 로 증가되었고, 실시예 2의 발효조성물도 다이드제인, 글라이시테인, 제니스테인 및 폴모노네틴이 각각 831.19 $\pm$ 4.16 $\mu\text{g/g}$, 70.24 $\pm$ 1.67 $\mu\text{g/g}$, 538.84 $\pm$ 7.24 $\mu\text{g/g}$ 및 85.30 $\pm$ 1.89 $\mu\text{g/g}$ 로 증가되었다.

따라서 홍국균 균사체로 발효된 본 발명에 따른 파바톤 콩잎의 발효조성물은 다이드제인, 글라이시테인, 제니스테인 및 폴모노네틴의 함량이 현저히 강화됨을 알 수 있다.

시험예 2. 루틴 및 나린진 함량 분석

루틴(rutin)과 나린진(narigin)의 함량은 상기와 같이 준비된 각각의 분석시료에 대해 HPLC(high performance liquid chromatography)를 사용하여 분석하였다.

분석 컬럼은 XBridge C18(4.6 $\times$ 250 mm, 5 μm , Waters Corp., Milford, MA, USA) 컬럼을 사용하였고 0.5% 글라이시알 아세트산 (glacial acetic acid, 이동상 용매 A)와 100% 메탄올(이동상 용매 B)을 0 ~ 100% 선형 구배 (linear gradient)로 30 $^{\circ}\text{C}$ 에서 60분간 1분당 1 ml의 속도로 가동하면서 UV 검출기로 270 nm 에서 검출하였고 그 결과를 표 2에 나타냈다.

표 2

함량 ($\mu\text{g/g}$)	비교예 1	비교예 2	실시예 1	실시예 1
루틴(Rutin)	227.70 $\pm$ 1.96	347.05 $\pm$ 2.39	659.19 $\pm$ 5.58	543.66 $\pm$ 3.36
나린진(Naringin)	978.36 $\pm$ 3.63	1139.47 $\pm$ 11.71	4585.53 $\pm$ 13.44	3580.35 $\pm$ 15.43

표 2에 나타난 바와 같이, 루틴과 나린진의 함량은, 비교예 1의 조성물은 각각 227.70 $\pm$ 1.96 $\mu\text{g/g}$ 및 978.36 $\pm$ 3.63 $\mu\text{g/g}$, 비교예 2의 조성물은 각각 3347.05 $\pm$ 2.39 $\mu\text{g/g}$ 및 1139.47 $\pm$ 11.71 $\mu\text{g/g}$ 에 불과하였으나, 실시예 1의 발효조성물은 루틴과 나린진의 함량이 각각 659.19 $\pm$ 5.58 $\mu\text{g/g}$ 및 4585.53 $\pm$ 13.44 $\mu\text{g/g}$ 로 현저히 증진되었고, 실시예 2의 발효조성물은 루틴과 나린진의 함량이 각각 543.66 $\pm$ 3.36 $\mu\text{g/g}$ 및 3580.35 $\pm$ 15.43 $\mu\text{g/g}$ 으로 현저히 증진되었음을 확인할 수 있다.

시험예 3. 생리활성성분 함량 분석

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

<총 페놀릭스 및 플라보노이드스 함량>

총 페놀릭스 분석은 시험관에 분석시료를 0.5 ml 분주하고 25% Na_2CO_3 용액 0.5 ml를 첨가하여 3분간 정치시킨 후, 2N Folin-Ciocalteu's phenol 시약 0.25 ml를 첨가하여 30 $^{\circ}\text{C}$ 에서 1시간 동안 정치한 후 분광광도계를 사용하여 750nm에서 흡광도를 측정하였다. 이때 총 페놀릭스 함량의 결과 값은 갈산(Gallic acid)의 최종 농도를 0, 0.25, 0.5, 0.75, 1.0 mg/ml로 제조하여 작성한 표준곡선으로부터 산출된 계산식에 대입하여 함량을 환산하였다. 그 결과는 도 4에 나타내었다.

총 플라보노이드 분석은 시험관에 분석시료 0.5 ml에 디에틸렌글리콜(diethylene glycol) 1.0 ml를 혼합한 후 1N NaOH 0.01 ml를 첨가하여 37 $^{\circ}\text{C}$ 항온수조에서 1시간동안 방치 후 420 nm에서 분광광도계로 흡광도를 측정하였다. 이때 총 플라보노이드스 함량의 결과 값은 루틴(rutin)의 최종 농도를 0, 0.25, 0.5, 0.75, 1.0 mg/ml로 제조하여 작성한 표준곡선으로부터 산출된 계산식에 대입하여 함량을 환산하였다. 그 결과년도 도 4에 나타내었다.

도 4에 나타난 바와 같이, 총 페놀릭스 함량은 비교예 1 및 비교예 2의 조성물에서는 각각 3.48 mg/g 및 5.76 mg/g이었으며, 실시예 1 및 실시예 2의 발효조성물에서는 9.33 mg/g 및 7.95 mg/g으로 나타나, 본 발명에 따른 발효조성물은 총 페놀릭스 함량이 현저히 증진됨을 확인할 수 있다. 또한, 총 플라보노이드스 함량도 비교예 1의 조성물, 비교예 2의 조성물, 실시예 1의 발효조성물, 실시예 2의 발효조성물에서 각각 5.38 mg/g, 6.06

mg/g, 7.77 mg/g 및 7.01 mg/g으로 나타나, 본 발명에 따른 발효조성물은 총 플라보노이드스의 함량도 현저히 증진되는 것을 확인할 수 있다.

[0092] 시험예 4. 항산화 활성 분석

[0093] 항산화 활성은 DPPH 라디칼 소거활성, ABTS 라디칼 소거활성을 측정하여 분석하였다.

[0094] <DPPH 라디칼 소거활성>

[0095] 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. 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.

[0096] 라디칼 소거활성(%) = $[1 - (\text{음성대조구 흡광도} \div \text{실험구 흡광도})] \times 100$

[0097] 도 5에 나타난 바와 같이, 비교예 1의 조성물, 비교예 2의 조성물, 실시예 1의 발효조성물, 실시예 2의 발효조성물은 DPPH 라디칼 소거활성이 각각 43.42 %, 49.31 %, 75.04 % 및 67.52 %로 나타나, 본 발명에 따른 발효조성물은 DPPH 라디칼 소거활성이 현저히 증진되는 것을 확인할 수 있다.

[0098] <ABTS 라디칼 소거활성>

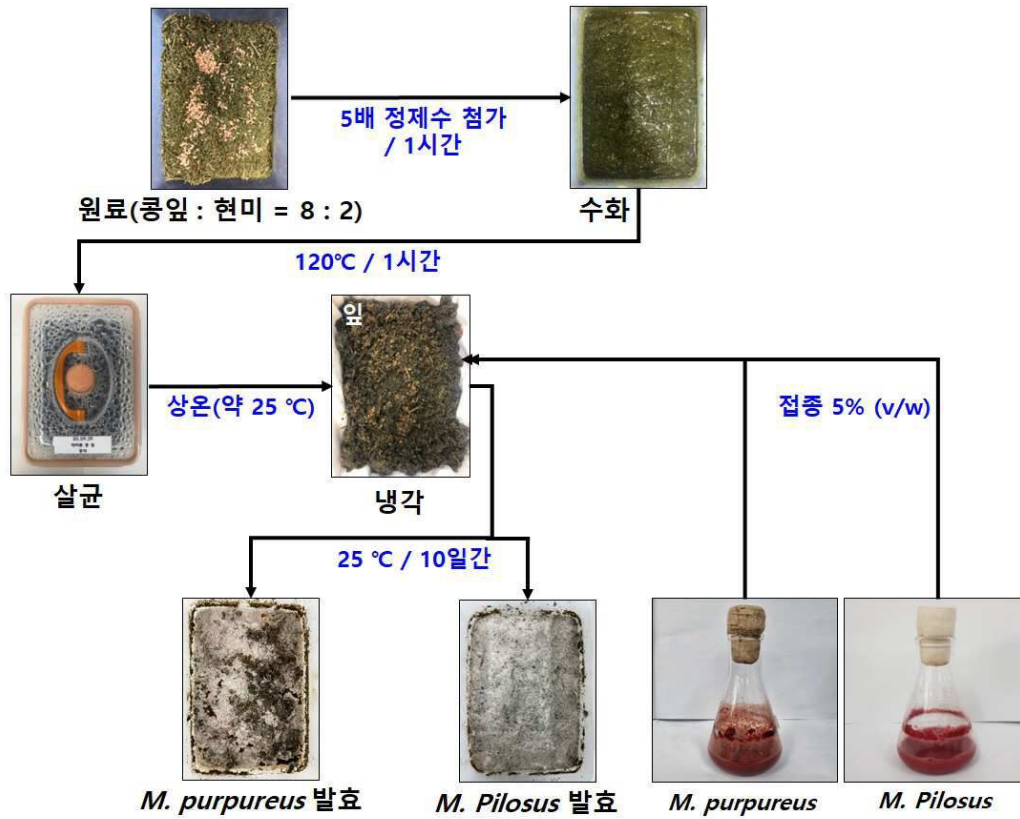
[0099] 7 mM ABTS⁺와 2.45 mM K₂S₂O₈를 1:1 비율로 섞어 암실에서 12~16시간 반응시킨 후 메탄올과 1:88 비율로 섞어 732 nm에서 대조구의 흡광도 값이 0.7 ± 0.02 가 되도록 조절한 ABTS⁺ 용액을 사용하였다. 각각의 분석시료 0.1 ml와 ABTS⁺ 용액 0.9 ml를 첨가하여 혼합한 후 3분간 정치 후 즉시 732 nm에서 분광광도계를 사용하여 흡광도를 측정하였다. 음성대조구 실험은 시료 대신에 추출용매를 취하여 진행하였으며 실험구와 음성 대조구의 흡광도를 구하여 상기 식에 의해 백분율(%)로 산출하여 그 결과를 도 5에 나타냈다.

[0100] 도 5에 나타난 바와 같이, 비교예 1의 조성물, 비교예 2의 조성물, 실시예 1의 발효조성물, 실시예 2의 발효조성물은 ABTS 라디칼 소거활성이 각각 60.66 %, 63.22 %, 87.81 % 및 80.67 %로 나타나, 본 발명에 따른 발효조성물은 ABTS 라디칼 소거활성이 현저히 증진되는 것을 확인할 수 있다.

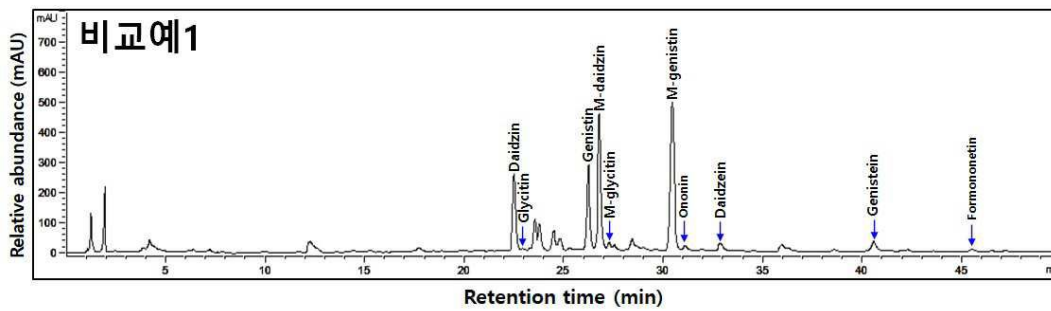
[0101] 이들 결과로부터 본 발명에 따른 발효조성물은 항산화 활성이 현저히 증진됨을 알 수 있다.

도면

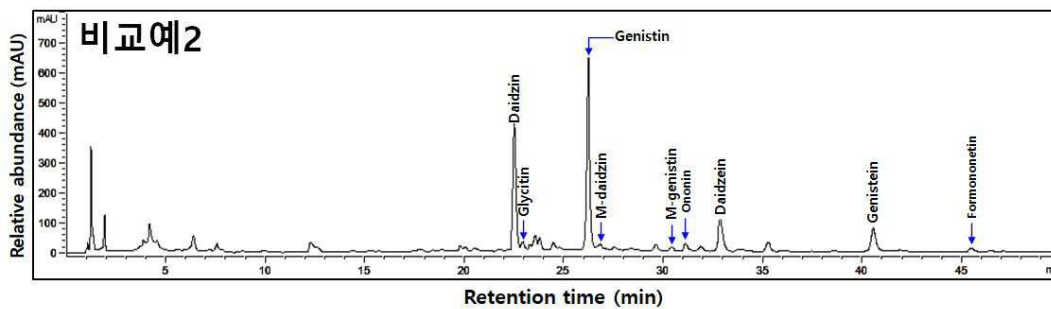
도면1



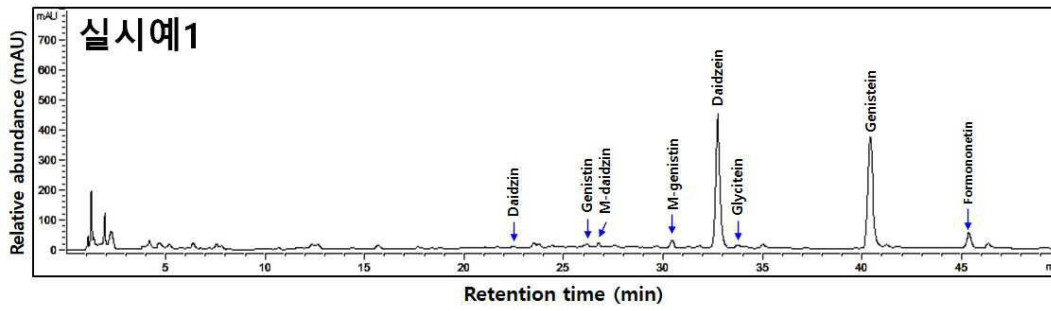
도면2a



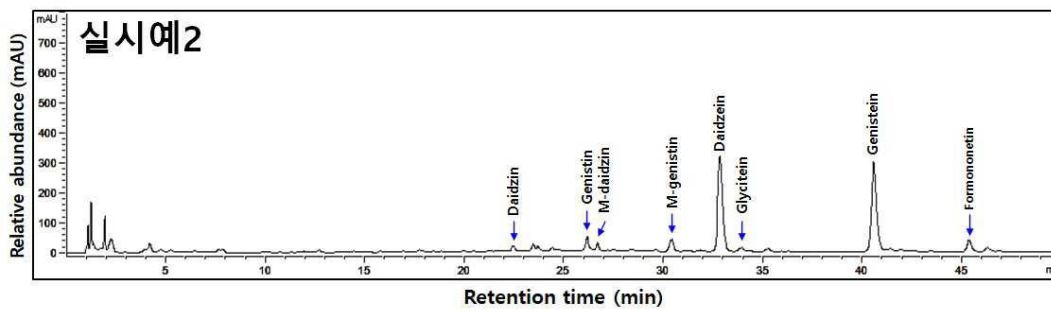
도면2b



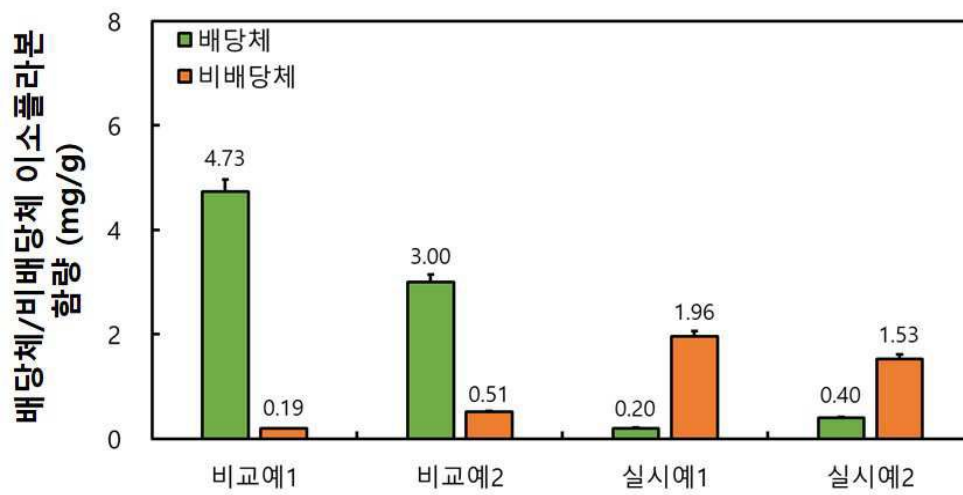
도면2c



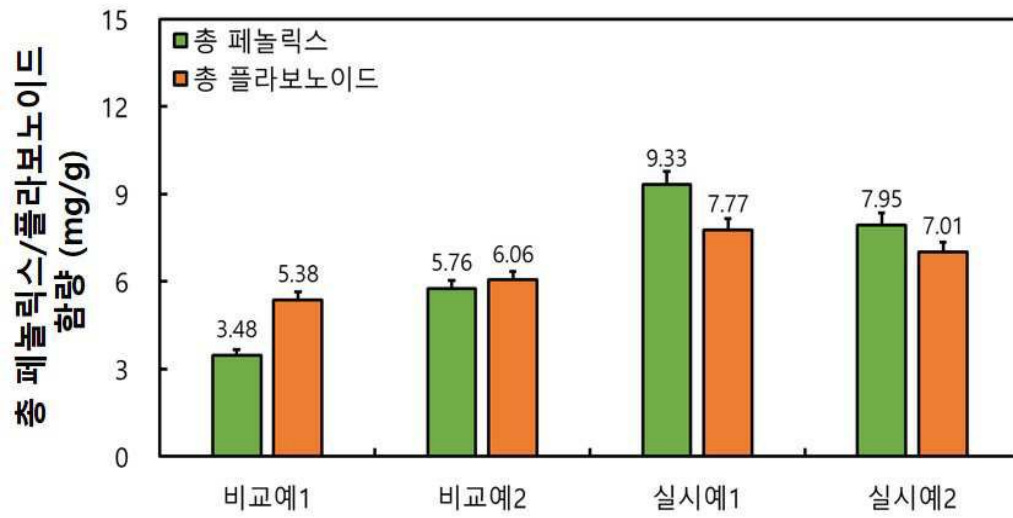
도면2d



도면3



도면4



도면5

