



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2020-0098901
(43) 공개일자 2020년08월21일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 36/484 (2006.01) A61P 5/30 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 36/484 (2013.01)
A61P 5/30 (2018.01)
(21) 출원번호 10-2019-0016601
(22) 출원일자 2019년02월13일
심사청구일자 2019년02월13일

(71) 출원인
청운대학교산학협력단
충청남도 홍성군 홍성읍 대학길 25, 청운대학교내
주식회사 지랑
충청남도 홍성군 구항면 거북로 436 ()
(72) 발명자
박민경
충청남도 홍성군 홍북면 신대로 33, 106동 504호
(극동스타클래스센터)
전병환
충청남도 홍성군 구항면 거북로 422-23
(74) 대리인
특허법인 충무

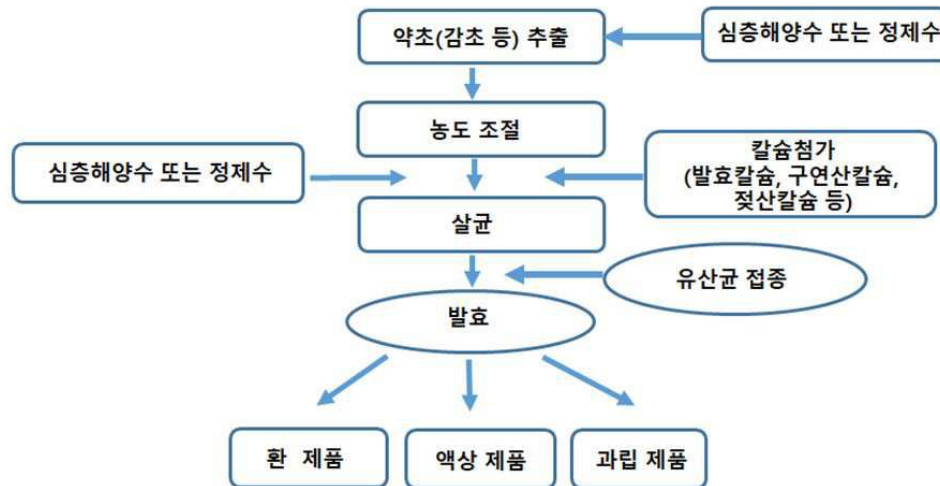
전체 청구항 수 : 총 10 항

(54) 발명의 명칭 감초추출액의 활성형 피토에스트로젠 증가 및 칼슘강화 발효액 제조방법 및 이로부터 제조된 발효액

(57) 요약

본 발명은 식물성 여성호르몬의 피토에스트로젠의 함량이 높고 국내 및 해외에서 과학적으로 작용기전이 보고되었으며 안전성이 입증되고 인지도가 높은 감초로부터 피토에스트로젠을 추출하고, 유산균 발효를 통해 활성형의 농도를 증가시키는 기술을 통해 단순 추출물보다 유효성분의 농도가 높으며, 칼슘 및 해양심층수에서 유래한 무기질이 첨가되어 여성호르몬의 부족으로 인해 발생하는 다양한 증상의 완화와 골다공증 예방에 도움이 되는, 부작용 없이 섭취할 수 있는 액상, 과립, 환 등의 다양한 형태로 제조가 가능한, 감초추출액의 활성형 피토에스트로젠 증가 및 칼슘강화 발효액 제조방법 및 이로부터 제조된 발효액에 관한 것이다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61K 2236/19 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 C0565169
부처명 중소벤처기업부
연구관리전문기관 중소기업기술정보진흥원
연구사업명 산학협력 기술개발사업
연구과제명 칼슘 강화 발효 피토에스트로젠 과립제품 개발
기 여 율 1/2
주관기관 (주)지랑
연구기간 2017.12.01 ~ 2018.11.30

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2018-04
부처명 청운대학교
연구관리전문기관 청운대학교 연구처
연구사업명 2018학년도 청운대학교 학술연구
연구과제명 유산균 발효에 의한 감초의 phytoestrogen 생전환에 관한 연구
기 여 율 1/2
주관기관 청운대학교
연구기간 2018.03.01 ~ 2019.02.28

명세서

청구범위

청구항 1

심층해양수 또는 정제수와; 약초를 혼합하고, 추출하여 약초추출물을 제조하는 단계(S10)와,
상기 약초추출물의 농도를 조절하는 단계(S20)와,
상기 단계(S20)를 통해 농도가 조절된 약초추출물 및 칼슘을 혼합하여 혼합물을 구성하는 단계(S30)와,
상기 혼합물을 살균하는 단계(S40)와,
상기 단계(S40)를 통해 살균처리된 혼합물에 유산균을 접종하는 단계(S50)와,
상기 단계(S50)를 통해 유산균을 접종한 혼합물을 발효하여 발효액을 제조하는 단계(S60)를 포함하여 구성되는
것임을 특징으로 하는 감초추출액의 활성형 피토에스트로젠 증가 및 칼슘강화 발효액 제조방법.

청구항 2

청구항 1에 있어서,
약초추출물은 세절한 감초 1.0 ~ 20.0 wt%와, 심층해양수 또는 정제수 80.0 ~ 99.0 wt%를 혼합한 후 한약추출기를 사용하여 100 ~ 120 °C에서 8 ~ 15 시간 추출하여 제조한 것임을 특징으로 하는 감초추출액의 활성형 피토에스트로젠 증가 및 칼슘강화 발효액 제조방법.

청구항 3

청구항 1에 있어서,
약초추출물의 농도는 건조 고형분 농도를 측정하여 1 ~ 5 %의 농도가 되도록 조절한 것임을 특징으로 하는 감초추출액의 활성형 피토에스트로젠 증가 및 칼슘강화 발효액 제조방법.

청구항 4

청구항 1에 있어서,
혼합물은 약초추출물 100.0 중량부에 대해,
칼슘 0.05 ~ 0.2 중량부를 혼합하여 구성되는 것임을 특징으로 하는 감초추출액의 활성형 피토에스트로젠 증가 및 칼슘강화 발효액 제조방법.

청구항 5

청구항 1 또는 청구항 4에 있어서,
칼슘은 발효칼슘, 구연산칼슘 또는 젖산칼슘 중 선택되는 어느 1종 또는 2종 이상인 것임을 특징으로 하는 감초추출액의 활성형 피토에스트로젠 증가 및 칼슘강화 발효액 제조방법.

청구항 6

청구항 1에 있어서,

혼합물 살균은 80 ~ 100 ℃에서 20 ~ 40 분 동안 가열하여 이루어지는 것임을 특징으로 하는 감초추출액의 활성형 피토에스트로젠 증가 및 칼슘강화 발효액 제조방법.

청구항 7

청구항 1에 있어서,

유산균은 김치로부터 분리한 유산균 *Lactobacillus plantarum* DK119(119), *Lactobacillus casei* DK128(128); 또는 상용 유산균(Chr. Hansen. Hoersholm Denmark) *Bifidobacterium lactis* BB-12(BB) 중 선택되는 어느 1종 또는 2종 이상인 것으로서, 감초추출액 100 중량부에 대해 0.01 ~ 0.2 중량부로 접종하는 것임을 특징으로 하는 감초추출액의 활성형 피토에스트로젠 증가 및 칼슘강화 발효액 제조방법.

청구항 8

청구항 1에 있어서,

발효액은 유산균을 접종한 혼합물을 30 ~ 38 ℃에서 3 ~ 5 일간 발효하여 제조된 것으로서, 액상, 환 또는 과립 중 선택되는 어느 하나의 형태를 이루는 것임을 특징으로 하는 감초추출액의 활성형 피토에스트로젠 증가 및 칼슘강화 발효액 제조방법.

청구항 9

청구항 1 내지 청구항 8 중 선택되는 어느 한 항의 제조방법으로 제조된 발효액으로서, 액상, 환 또는 과립 중 선택되는 어느 하나의 형태를 이루는 것임을 특징으로 하는 감초추출액의 활성형 피토에스트로젠 증가 및 칼슘강화 발효액.

청구항 10

청구항 9에 있어서,

발효액은 갱년기 증상완화를 위한 식물성 여성호르몬 보충제로 사용하는 것임을 특징으로 하는 감초추출액의 활성형 피토에스트로젠 증가 및 칼슘강화 발효액.

발명의 설명

기술 분야

- [0001] 본 발명은 식물성 여성호르몬의 피토에스트로젠의 함량이 높고 국내 및 해외에서 과학적으로 작용기전이 보고되었으며 안전성이 입증되고 인지도가 높은 감초로부터 피토에스트로젠을 추출하고,
- [0002] 유산균 발효에 의한 활성형의 농도를 증가시키는 기술을 통해 단순 추출물보다 유효성분의 농도가 높으며,
- [0003] 칼슘 및 해양심층수에서 유래한 무기질이 첨가되어 여성호르몬의 부족으로 인해 발생하는 다양한 증상의 완화와 골다공증 예방에 도움이 되도록 하는,
- [0004] 부작용 없이 섭취할 수 있는 액상, 과립, 환 등의 다양한 형태로 제조가 가능한, 감초추출액의 활성형 피토에스트로젠 증가 및 칼슘강화 발효액 제조방법 및 이로부터 제조된 발효액에 관한 것이다.

배경 기술

- [0006] 감초는 원산지가 내몽고로 콩과에 속하는 다년생 초본식물이다. 뿌리를 약재로 사용하며 맛이 달고 독이 없으며

따뜻한 기운을 가지고 있어 한약의 구성 재료로 많이 쓰인다.

[0007] 최근에는 감초의 생리활성 성분에 대한 연구가 활발하여 한약의 구성성분 뿐만 아니라 가공식품 재료로도 널리 사용되며 특히 외국에서는 감초의 식물성 에스트로젠 성분이 주목받고 있다. 감초의 생리활성 물질로는 감미성분으로 알려진 triterpenoid계통 사포닌인 glycyrrhizin, flavonoid 계통의 피토에스트로젠 성분인 lliquiritin, liquiritigenin, isoliquiritin 등이다.

[0009] 본 발명은 상기 감초로부터 식물성 여성호르몬인 피토에스트로젠을 추출하고 유산균 발효에 의한 활성형(비배당체형)의 농도를 증가시키는 기술을 통해 단순 추출물 보다 유효성분의 농도가 높으며 더불어 갈습 및 해양심층수에서 유래한 무기질이 첨가되어 여성호르몬의 부족으로 인해 발생하는 다양한 증상의 완화 및 골다공증 예방에 도움이 되는 발효액에 관한 발명이다.

[0011] 본 발명과 관련하여, 대한민국 등록특허 10-0177832(등록일자 1998.11.19)호의 '감초 추출물을 사용한 조성물'에서, 감초 추출물을 사용한 기능성 식품용 조성물 및 이 기능성 식품 조성물을 함유시킨 기능성 식품에 대한 기술이 개시되어 있고,

[0012] 대한민국 등록특허 10-0586813(등록일자 2006.05.29)호의 '혼합 생약제 추출물 및 이를 포함하는 골다공증 예방 또는 치료용 건강식품'에서, 감초를 포함하는 생약제를 알콜 또는 알코수용액에서 추출한 골다공증 예방 또는 치료용 생약 추출물에 대한 기술이 개시되어 있으며,

[0013] 대한민국 등록특허 10-1544532(등록일자 2015.08.07)호의 '백수오 추출물을 포함하는 여성 갱년기 질환의 예방 또는 치료용 조성물'에서, 감초 추출물을 포함하는 여성 갱년기 질환의 예방 또는 개선용 식품 조성물에 대한 기술이 개시되어 있다.

[0015] 그러나 종래 개시된 기술들은 본 발명을 통해 제시하고자 하는, 국내 및 해외에서 과학적으로 작용기전이 보고되었으며 안전성이 입증되고 인지도가 높은 감초로부터 피트에스트로젠을 추출하고, 유산균 발효를 통해 활성형의 농도를 증가시키는 기술을 통해 단순 추출물보다 유효성분의 농도가 높으며, 갈습 및 해양심층수에서 유래한 무기질이 첨가되어 여성호르몬의 부족으로 인해 발생하는 다양한 증상완화와 골다공증 예방에 도움이 되는 발효액 제조기술에 대해 개시되어 있지 않으며, 또한 이와 같이 개시된 기술들로부터 발효액 제조기술을 도출하기도 어렵다.

선행기술문헌

특허문헌

[0017] (특허문헌 0001) 대한민국 등록특허 10-0177832(등록일자 1998.11.19)

(특허문헌 0002) 대한민국 등록특허 10-0586813(등록일자 2006.05.29)

(특허문헌 0003) 대한민국 등록특허 10-1544532(등록일자 2015.08.07)

발명의 내용

해결하려는 과제

[0018] 본 발명은 식물성 여성호르몬의 피토에스트로젠의 함량이 높고 국내 및 해외에서 과학적으로 작용기전이 보고되었으며 안전성이 입증되고 인지도가 높은 감초로부터 피트에스트로젠을 추출하고,

[0019] 유산균 발효에 의한 활성형의 농도를 증가시키는 기술을 통해 단순 추출물보다 유효성분의 농도가 높으며,

[0020] 갈습 및 해양심층수에서 유래한 무기질이 첨가되어 여성호르몬의 부족으로 인해 발생하는 다양한 증상의 완화와

골다공증 예방에 도움이 되도록 하는,

[0021] 부작용 없이 섭취할 수 있는 액상, 과립, 환 등의 다양한 형태로 제조가 가능한, 감초추출액의 활성형 피토에스트로젠 증가 및 칼슘강화 발효액 제조방법 및 이로부터 제조된 발효액을 제공하고자 하는 것을 발명의 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

[0023] 상기 목적을 달성하기 위하여,
 [0024] 본 발명은 심층해양수 또는 정제수; 및 약초를 혼합하고, 추출하여 약초추출물을 제조하는 단계(S10)와,
 [0025] 상기 약초추출물의 농도를 조절하는 단계(S20)와,
 [0026] 상기 단계(S20)를 통해 농도가 조절된 약초추출물 및 칼슘을 혼합하여 혼합물을 구성하는 단계(S30)와,
 [0027] 상기 혼합물을 살균하는 단계(S40)와,
 [0028] 상기 단계(S40)를 통해 살균처리된 혼합물에 유산균을 접종하는 단계(S50)와,
 [0029] 상기 단계(S50)를 통해 유산균을 접종한 혼합물을 발효하여 발효액을 제조하는 단계(S60)를 포함하여 구성되는, 감초추출액의 활성형 피토에스트로젠 증가 및 칼슘강화 발효액 제조방법을 제공한다.

[0031] 또한 상기 제시된 제조방법을 통해 제조된 것으로서, 액상, 환 또는 과립 중 선택되는 어느 하나의 형태를 이루는, 감초추출액의 활성형 피토에스트로젠 증가 및 칼슘강화 발효액을 제공한다. 상기 발효액은 갱년기 증상완화를 위한 식물성 여성호르몬 보충제로 사용할 수 있다.

발명의 효과

[0033] 본 발명에 따른 감초추출액 발효액은 다음의 효과를 갖는다.

[0035] 첫째, 감초로부터 식물성 여성호르몬인 피토에스트로젠을 추출하고 유산균 발효를 통해 활성형(비배당체 형)의 농도를 증가시킴으로써, 단순 추출물보다 유효성분의 농도가 높다.

[0036] 둘째, 칼슘 및 해양 심층수에서 유래한 무기질이 첨가되어 여성호르몬의 부족으로 인해 발생하는 다양한 증상의 완화 및 골다공증 예방에 도움을 준다.

[0037] 셋째, 부작용 걱정이 없으며, 액상, 과립, 환 등의 다양한 형태로 된 식물성 보충제를 제공할 수 있다는 장점을 갖는다.

도면의 간단한 설명

[0039] 도 1은 본 발명의 감초추출액의 활성형 피토에스트로젠 증가 및 칼슘강화 발효액 제조방법에 따른 제조공정도.

도 2는 김치로부터 분리한 유산균 *Lactobacillus plantarum* DK119(119) 접종 전·후의 감초 추출액 농도에 따른 발효특성을 나타낸 그래프.

도 3은 김치로부터 분리한 유산균 *Lactobacillus casei* DK128(128) 접종 전·후의 감초 추출액의 농도에 따른 발효특성을 나타낸 그래프.

도 4는 상용 유산균(Chr. Hansen, Hoersholm Denmark) *Bifidobacterium lactis* BB-12(BB) 접종 전·후의 감초 추출액의 농도에 따른 발효특성을 나타낸 그래프.

도 5는 김치로부터 분리한 유산균 *Lactobacillus plantarum* DK119(119) 접종 농도에 따른 발효특성을 나타낸

그래프.

도 6은 김치로부터 분리한 유산균 *Lactobacillus casei* DK128(128) 접종 농도에 따른 발효특성을 나타낸 그래프.

도 7은 상용 유산균(Chr. Hansen. Hoersholm Danmark) *Bifidobacterium lactis* BB-12(BB) 접종 농도에 따른 발효특성을 나타낸 그래프.

도 8은 심층 해양수(Deep Sea Water-DSW)로 추출하고, 김치로부터 분리한 유산균 *Lactobacillus plantarum* DK119(119)를 접종한 감초 발효특성을 나타낸 그래프.

도 9는 본 발명에 따른, 심층 해양수(Deep Sea Water-DSW)로 추출하고, 김치로부터 분리한 유산균 *Lactobacillus casei* DK128(128)를 접종한 감초 발효특성을 나타낸 그래프.

도 10은 본 발명에 따른, 심층 해양수(Deep Sea Water-DSW)로 추출하고, 상용 유산균(Chr. Hansen. Hoersholm Danmark) *Bifidobacterium lactis* BB-12(BB)를 접종한 감초 발효특성을 나타낸 그래프.

도 11은 본 발명에 따른, 심층 해양수(DSW)로 추출한 감초 발효액의 환원당 함량변화를 나타낸 그래프.

도 12는 본 발명에 따른, 심층 해양수(DSW)로 추출한 감초 발효액의 Liquiritin을 유효성분으로 하는 Phytoestrogen 함량변화를 나타낸 그래프.

도 13은 본 발명에 따른, 심층 해양수(DSW)로 추출한 감초 발효액의 Liquiritigenin을 유효성분으로 하는 Phytoestrogen 함량변화를 나타낸 그래프.

도 14는 본 발명에 따른, 심층 해양수(DSW)로 추출한 감초 발효액의 Isoliquiritin을 유효성분으로 하는 Phytoestrogen 함량변화를 나타낸 그래프.

도 15는 본 발명에 따른, 심층 해양수(DSW)로 추출한 감초 발효액의 Isoliquiritigenin을 유효성분으로 하는 Phytoestrogen 함량변화를 나타낸 그래프.

도 16은 본 발명에 따른, 김치로부터 분리한 유산균 *Lactobacillus plantarum* DK119(119)를 접종, 칼슘 첨가가 감초추출물의 발효에 미치는 효과를 나타낸 그래프.

도 17은 본 발명에 따른, 김치로부터 분리한 유산균 *Lactobacillus casei* DK128(128)을 접종, 칼슘 첨가가 감초추출물의 발효에 미치는 효과를 나타낸 그래프.

도 18은 본 발명에 따른, 상용 유산균(Chr. Hansen. Hoersholm Danmark) *Bifidobacterium lactis* BB-12(BB)를 접종, 칼슘 첨가가 감초추출물의 발효에 미치는 효과를 나타낸 그래프.

도 19는 본 발명에 따른, 칼슘첨가가 감초 발효액의 환원당 함량변화에 미치는 효과를 나타낸 그래프.

도 20은 본 발명에 따른, 칼슘첨가가 감초 발효액의 Liquiritin을 유효성분으로 하는 Phytoestrogen 함량에 미치는 효과를 나타낸 그래프.

도 21은 본 발명에 따른, 칼슘첨가가 감초 발효액의 Liquiritigenin을 유효성분으로 하는 Phytoestrogen 함량에 미치는 효과를 나타낸 그래프.

도 22는 본 발명에 따른, 칼슘첨가가 감초 발효액의 Isoliquiritin을 유효성분으로 하는 Phytoestrogen 함량에 미치는 효과를 나타낸 그래프.

도 23은 본 발명에 따른, 칼슘첨가가 감초 발효액의 Isoliquiritigenin을 유효성분으로 하는 Phytoestrogen 함량에 미치는 효과를 나타낸 그래프.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0040] 이하, 상기 제시된 본 발명에 따른 기술 구성에 대해 구체적으로 살펴보도록 한다.

[0042] 상기한 바와 같이,

[0043] 본 발명에 따른 감초추출액의 활성형 피토에스트로젠 증가 및 칼슘강화 발효액 제조방법은 도 1에 도시된 바와

같이, 심층해양수 또는 정제수; 및 약초를 혼합하고, 추출하여 약초추출물을 제조하는 단계(S10)와,
 [0044] 상기 약초추출물의 농도를 조절하는 단계(S20)와,
 [0045] 상기 단계(S20)를 통해 농도가 조절된 약초추출물 및 갈습을 혼합하여 혼합물을 구성하는 단계(S30)와,
 [0046] 상기 혼합물을 살균하는 단계(S40)와,
 [0047] 상기 단계(S40)를 통해 살균처리된 혼합물에 유산균을 접종하는 단계(S50)와,
 [0048] 상기 단계(S50)를 통해 유산균을 접종한 혼합물을 발효하여 발효액을 제조하는 단계(S60)를 포함하여 구성된다.

[0050] 본 발명에 따른 발효액은 감초로부터 식물성 여성호르몬인 피토에스트로젠을 추출하고 유산균 발효를 통해 활성형(비배당체 형)의 농도를 증가시킴으로써, 단순 추출물보다 유효성분의 농도가 높으며, 또한 갈습 및 해양 심층수에서 유래한 무기질이 첨가되어 여성호르몬의 부족으로 인해 발생하는 다양한 증상의 완화 및 골다공증 예방에 도움이 된다.

[0052] 이와 같은 특징을 갖는 발효액의 제조과정을 각 단계별로 살펴보도록 한다.

[0054] [약초추출물 제조 단계(S10)]

[0056] 본 단계(S10)는 심층해양수 또는 정제수와; 약초를 혼합하고, 추출하여 약초추출물을 제조하는 단계이다.

[0058] 상기 약초추출물은 슬라이스 형태로 세절한 감초 1.0 ~ 20.0 wt%와, 심층해양수 80.0 ~ 99.0 wt%를 혼합한 후 한약추출기를 사용하여 100 ~ 120 °C에서 8 ~ 15 시간 추출하여 제조한다.

[0060] 상기 감초의 사용량이 1.0 wt% 미만인 경우에는 피토에스트로젠 함량이 낮은 문제가 있고, 20.0 wt%를 초과하게 되는 경우에는 추출이 원활하지 못한 문제가 있으므로, 상기 감초의 사용량은 심층해양수에 대해 1.0 ~ 20.0 wt%의 범위 내로 한정하는 것이 바람직하다.

[0062] 상기 심층해양수 또는 정제수의 사용량은 상기 감초의 사용량에 따라 결정되는 것으로서, 상기 감초의 사용량에 따른 80.0 ~ 99.0 wt%의 범위 내로 한정하는 것이 바람직하다.

[0065] [약초추출물 농도 조절단계(S20)]

[0067] 본 단계(S20)는 상기 단계(S10)를 거쳐 추출된 약초추출물의 농도를 조절하는 단계로서, 상기 약초추출물의 건조 고형분 농도를 측정하여 1 ~ 5 %의 농도가 되도록 조절한다. 이와 같은 농도 조절을 통해 생산공정의 표준화를 이룰 수 있다.

[0070] [약초추출물 및 갈습의 혼합물을 구성하는 단계(S30)]

[0072] 본 단계(S30)는 상기 단계(S20)로부터 농도가 조절된 약초추출물 및 갈습을 혼합하여 혼합물을 구성하는 단계이

다.

[0073] 상기 혼합물은 약초추출물 100.0 중량부에 대해, 칼슘 0.05 ~ 0.2 중량부를 혼합하여 구성된다.

[0074] 상기 칼슘의 사용량이 0.05 중량부 미만인 경우에는 칼슘 강화가 미미하여 제품에 칼슘강화 강조 표시에 문제가 있고, 0.2 중량부를 초과하게 되는 경우에는 용해도 및 맛에 문제가 있으므로, 상기 약초추출물과 혼합 구성되는 칼슘의 사용량은 0.05 ~ 0.2 중량부 범위 내로 한정하는 것이 바람직하다.

[0076] 상기 칼슘은 발효칼슘, 구연산칼슘 또는 젖산칼슘 중 선택되는 어느 1종 또는 2종 이상인 것을 사용한다.

[0079] [혼합물 살균단계(S40)]

[0081] 본 단계(S40)는 상기 단계(30)를 통해 제조된 혼합물을 살균하는 단계이다.

[0082] 상기 살균은 80 ~ 100 ℃에서 20 ~ 40 분 동안 가열하여 이루어진다. 더욱 구체적으로는 혼합물을 90 ℃에서 30 분 동안 가열한다.

[0085] [혼합물에 유산균을 접종하는 단계(S50)]

[0087] 본 단계(S50)는 상기 단계(S40)를 거쳐 살균 처리된 혼합물에 유산균을 접종하는 단계이다.

[0088] 상기 유산균은 김치로부터 분리한 유산균 *Lactobacillus plantarum* DK119(119), *Lactobacillus casei* DK128(128); 또는 상용 유산균(Chr. Hansen, Hoersholm Danmark) *Bifidobacterium lactis* BB-12(BB) 중 선택되는 어느 1종 또는 2종 이상인 것으로서, 감초추출액 100 중량부에 대해 0.01 ~ 0.2 중량부로 접종한다.

[0089] 상기 접종을 0.01 중량부 미만으로 하는 경우에는 발효가 일어나지 않는 문제가 있고, 0.2 중량부를 초과하게 되는 경우에는 급격한 산도 증가로 생리활성 성분의 파괴가 있을 수 있으므로, 상기 접종은 감초추출액 100 중량부에 대해 0.01 ~ 0.2 중량부의 범위 내에서 이루어지도록 하는 것이 바람직하다.

[0092] [혼합물 발효단계(S60)]

[0094] 본 단계(S60)는 유산균을 접종한 혼합물을 발효하여 발효액을 제조하는 단계로서, 30 ~ 38 ℃에서 3 ~ 5 일간 발효하여 제조한다.

[0095] 이와 같이 제조된 발효액은 액상 외에 필요에 따라 환 또는 과립 형태 등 다양한 형태로 제조할 수 있다.

[0097] 이하, 본 발명에 따른 감초추출액의 활성형 피토에스트로젠 증가 및 칼슘강화 발효액 제조 과정을 시험예를 통해 살펴보도록 한다.

[0099] 1) 시료 추출 및 칼슘 첨가

[0101] 감초 슬라이스(절단 생약) 한 것이 1.0 ~ 20.0 wt%가 되도록 침출 해양수((주) 큐비엠펜) 또는 정제수와 혼합하고

한약추출기를 이용하여 12 시간 추출한다.

[0102] 추출물의 농도를 조절한 후, 갈습(굴각 100%, (주)케이엠에프, 수용성발효갈습 S)은 감초 추출액 100 mL 당 0.25 g(갈습 함량 52.5 mg) 첨가한다.

[0104] 2) 유산균 접종 및 발효

[0106] 감초 추출액을 80 ~ 100 °C에서 30 분 동안 가열하여 살균하고 동결건조 형태의 유산균 3종을 이용하여 발효한다.

[0107] (주)토비코의 김치로부터 분리한 유산균 *Lactobacillus plantarum* DK119(119), *Lactobacillus casei* DK128(128) 및 Chr. Hansen(Hoersholm Danmark)의 *Bifidobacterium lactis* BB-12(BB)를 0.01 ~ 0.2 %(w/v)로 접종한 후 37 °C에서 4 일간 발효한다.

[0109] 3) pH 및 적정산도 측정

[0111] 유산균 수 측정을 제외한 모든 시료는 발효액을 원심분리기(Union 32R, Hanil Scientific Inc. Kimpo, Korea)를 이용하여 3,000 rpm, 10 분 원심분리하여 유산균을 침전 시킨 후 상등액을 시료로 사용한다.

[0113] pH는 pH meter(Orion 3 star, Thermo Fisher Scientific Inc., Beverly, MA, USA)를 이용하여 측정한다.

[0115] 적정산도는, 시료를 증류수로 희석하여 25 mL를 취하고 0.1 % 페놀프탈레인(phenolphthalein)을 지시약으로 사용하여 0.1 N NaOH로 적정하고 희석액을 중화하는데 소비된 0.1 N NaOH 용량을 %-lactic acid 함량으로 환산하여 표시한다.

[0117] 4) 환원당 분석

[0119] DNS(3,5-dinitrosalicylic acid)법에 따라 정량 분석한다.

[0121] 5) 감초의 주요 phytoestrogen 성분 분석(지표물질)

[0123] 감초의 주요 피토에스트로젠 지표 물질로 배당체 형태의 리퀴리틴(liquiritin), 아이소리퀴리틴(isoliquiritin)과 이들의 비배당체 형태인 리퀴리티제닌(liquirigenin), 아이소리퀴리티제닌(isoliquiritigenin)을 HPLC 방법으로 분석한다.

[0125] 발효 후 시료를 3,000 rpm으로 10 분간 원심분리하고 상등액을 50 %-EtOH을 이용하여 희석한 다음, 0.45 µm filter로 여과한 후 분석에 사용한다.

[0127] HPLC 분석 및 시료 조제에 사용한 용매 및 이동상은 모두 HPLC급으로 J.T. Baker(Phillipsburg, NJ, USA)사의 제품을 사용하였으며 표준물질은 Sigma(St. Louis, MO, USA)로부터 구입하여 사용한다.

[0129] 분석에 사용된 HPLC system은 Dionex Summit HPLC system(Germany)으로, P680 HPLC pump, ASI-100 automated sample injector, thermostated column compartment TCC-100, UVD 340U UV/VIS detector로 구성되어 있으며, Dionex Chromelon chromatography data system을 통해 분석되어 나온 Data을 처리한다.

[0131] 분석조건은 조건은 아래 표 1과 같다.

표 1

Parameters	Condition
HPLC model	Dionex 4000i
Column	YMC Hydrosphere C18 (S-5 μ m, 12 nm, 250 x 4.6 mm I.D.)
Detector	UV 250 nm
Flow rate	1.0 mL/min (gradient)
Column oven temperature	30°C
Injection volume	20 μ L

[0135] 이동상은 100 %-Acetonitril(Sol. A)와 0.1 %-Acetic acid(Sol. B)로 하여 아래 표 2와 같은 조건(gradient)으로 한다.

표 2

Time(min)	100%-Acetonitril(Sol. A)	0.1%-Acetic acid(Sol. B)
10	10%	90%
15	15%	75%
20	50%	50%
30	10%	90%

[결과]

[0141]

1) 추출액 농도 및 접종 균 농도를 달리한 감초의 발효 특성

[0144] 도 2 내지 도 4에 도시된 바와 같이,

[0145] 10 %-감초 추출물(w/w)에 3종의 유산균을 0.1 % 접종(w/v)하고 발효 전(D0)과 발효 1일(D1) ~ 4일(D4)의 PH를 측정한 결과 128로 발효한 감초 추출액은 D1에 pH 4에 도달해 가장 빠른 발효 속도를 보였다. 119와 BB도 D2 이후 pH 4 이하로 낮았다.

[0147] 10 %-감초 추출액(w/w)을 0.1 % 접종으로 발효한 감초액의 적정산도 변화도 128로 발효한 감초액이 가장 빠르게 상승하고 이어서 119와 BB의 적정산도가 증가하였다.

[0149] 또한, 도 2 내지 도 4는 20 %-감초 물추출액을 3종의 균주를 0.1 % 접종(w/v)하고 pH 변화를 측정한 결과로서,

20 %-감초 추출액에서도 128로 발효한 감초액의 pH가 발효 1일(D1) pH 3.8로 급격히 낮아지는 것을 볼 수 있으며 119 및 BB 발효액에서 pH가 빠르게 낮아지는 것을 알 수 있다.

[0151] 20 %-감초 추출물(w/w)을 0.1 %-접종한 감초 추출액의 적정산도 변화도 128로 발효한 감초액이 가장 빠르게 상승하고 이어서 119와 BB의 적정산도가 증가하였다.

[0153] 결론적으로, 도 2 내지 도 4에 도시된 도면을 통해 알 수 있듯이 10 %-감초 추출액 및 20 %-감초 추출액의 발효는 0.1 %의 119, 128 및 BB 접종 발효에 유산균에 따라 pH와 적정산도가 약간의 차이는 있으나 세 균주 모두에 의해 발효가 빠르게 진행되는 것으로 확인됐다.

[0155] 도 5 내지 도 7에 도시된 도면은 20 %-감초 추출액을 119, 128 및 BB를 0.2 %-접종하고 pH 및 적정산도를 측정하여 발효특성을 분석하고 0.1 %-접종결과와 비교한 것이다.

[0157] 상기 도 5 내지 도 7에 도시된 바와 같이, 20 %-감초 추출액의 발효는 119, 128 및 BB를 0.1 %와 0.2 %-접종하고 발효한 것이 유사한 발효속도를 보였다. 즉, 0.1 %-접종으로 10 % 및 20 %-감초 추출액 모두 효율적으로 발효가 일어났다.

[0160] 2) 심층 해양수로 추출한 감초액의 발효특성

[0162] 도 8 내지 도 10에 도시된 바와 같이, 물추출액과 해양수 추출액의 발효특성은 대단히 유사하여 발효 1일 pH가 급격히 낮아지고 적정산도는 증가하였다. 유산균 수는 발효 1일(D1) 이후 감소하는 것으로 나타났다. 이러한 발효특성은 119, 128 및 BB 균주에 의한 발효에서 유사하게 나타났다.

[0164] 도 11에 도시된 바와 같이, 심층 해양수로 추출한 20 %-감초액의 발효과정 중 환원당 변화를 보면 119, 128 및 BB 균 모두에서 발효 1일부터 감소하기 시작하며 특히 0.1 %-128 접종 균의 환원당 감소가 가장 큰 것으로 나타났다.

[0165] 이러한 결과는 pH 및 적정산도 변화와 일치하는 결과이다. 또한 심층 해양수 추출액이 물 추출액 보다 환원당의 감소정도가 크게 나타나 심층해양수가 유산균 발효를 촉진하는 것으로 추정된다.

[0168] 3) 심층 해양수가 감초 발효액의 phytoestrogen 함량변화에 미치는 효과

[0170] 심층 해양수로 추출한 20 %-감초추출액을 119, 128 및 BB를 0.1 % 접종하고 발효하며 유산균 발효에 의한 감초의 대표적 생리활성 물질인 식물성에스트로젠 liquiritin(리퀴리틴), isoliquiritin(아이소리퀴리틴)이 어글리콘 형태인 liquiritigenin(리퀴리티제닌) 및 isoliquiritigenin(아이소리퀴리티제닌)으로 전환하는 정도를 분석하고 이어서 심층 해양수가 생전환에 미치는 효과를 알아보고자 한다.

[0172] 도 12는 발효에 의한 리퀴리틴의 함량변화를 보여주고 있으며 물로 추출한 감초 발효액의 리퀴리틴 함량(Water 균)은 발효전과 비교하여 발효 4일 후(D4) 119 및 128 발효액에서 약 15 ~ 20 % 정도의 감소를 보이며 BB 발효액에서는 약 30 % 정도 감소함을 알 수 있다.

[0174] 심층 해양수(DSW 군)로 추출한 추출액의 리퀴리틴 함량변화도 물로 추출한 추출액의 결과와 유사하며 발효 4일 후(D4)에 119 및 128 발효액에서 15 ~ 20 % 정도의 감소를 보이며 BB 발효액에서는 약 30 % 정도 감소함을 알 수 있다.

[0176] 도 13은 발효에 의한 리퀴리티제닌의 함량변화를 보여주고 있으며 물로 추출한 추출액의 리퀴리티제닌 함량(Water 군)은 발효전과 비교하여 발효 4일 후(D4) 119 및 128의 발효에 의해 약 2.3 배 증가하였으며 BB 발효에 의해서는 약 4 배 증가하였다.

[0178] 심층 해양수(DSW 군)로 추출한 추출액의 리퀴리틴 함량변화도 물로 추출한 추출액의 결과와 유사하며 발효 4일 후(D4)에 119 및 128 발효에 의해 약 2.3 배 증가하였으며 BB 발효에 의해서는 약 4 배 증가함을 알 수 있다.

[0180] 아래 표 3과 도 14는 발효에 의한 아이소리퀴리틴의 함량변화를 보여주고 있으며 물로 추출한 감초 추출액의 아이소리퀴리틴 함량(Water 군)은 발효전과 비교하여 발효 4일 후(D4) 119 및 128로 발효한 액에서 약 44 ~ 55 % 감소하며 BB 발효 액에서는 약 84 % 감소하였다.

[0182] 심층 해양수(DSW 군)로 추출한 추출액의 아이소리퀴리틴 함량변화도 물로 추출한 추출액의 결과와 유사하며 발효 4일 후(D4)에 119 및 128 발효에 의해 약 45 ~ 55 % 감소하며 BB 발효 액에서는 약 85 % 감소함을 알 수 있다.

표 3

[0184]

해양수로 추출한 감초 발효액의 아이소리퀴리틴 함량변화(ug/mL)						
	119-0.1 % 접종		128-0.1 % 접종		BB-0.1 % 접종	
Day	DSW	Water	DSW	Water	DSW	Water
D0	86.97	85.34	86.97	85.34	86.97	85.34
D4	46.88	47.66	38.23	38.23	12.11	13.24

[0186] 아래 표 4와 도 15는 발효에 의한 아이소리퀴리티제닌의 함량변화를 보여주고 있으며 물로 추출한 감초 추출액의 아이소리퀴리티제닌 함량(Water 군)은 발효전과 비교하여 발효 4일 후(D4)의 함량은 119 및 128로 발효한 액에서는 약 2.7 배 증가하며 BB 발효 액에서는 약 4배 증가하였다.

[0188] 심층 해양수(DSW 군)로 추출한 추출액에서도 발효 4일 후(D4)의 함량은 119 및 128로 발효한 액에서는 약 2.7배 증가하였으며, BB 발효 액에서는 약 4배 증가하였다.

표 4

[0190]

해양수로 추출한 감초 발효액의 아이소리퀴리티제닌 함량변화(ug/mL)						
	119-0.1% 접종		128-0.1% 접종		BB-0.1% 접종	
Day	DSW	Water	DSW	Water	DSW	Water
D0	4.94	4.82	4.94	4.82	4.94	4.82
D4	13.26	13.21	13.43	13.33	20.93	19.63

[0192] 결론적으로 119, 128 및 BB 유산균 발효에 의해 리퀴리틴 함량은 감소하고 반면 어글리콘인 리퀴리티제닌은 증가하여 생전환이 효율적으로 일어났음을 알 수 있다.

[0193] 또한 아이소리퀴리틴은 감소하고 어글리콘 형인 아이소리퀴리티제닌은 증가하여 발효에 의해 감초의 배당체 피토에스트로젠 형태의 생리활성 물질이 비배당체 형태로 생전환이 일어남을 보여주고 있다.

[0196] 4) 칼슘첨가 감초 추출액의 발효특성

[0198] 도 16은 감초 추출액에 칼슘을 첨가하고 119-0.1%를 접종하여 발효한 칼슘첨가 감초 발효액(DSW-Ca 군)의 pH, 적정산도 및 유산균 수를 칼슘을 첨가하지 않은 군(DSW 군)과 비교한 결과이다.

[0199] pH는 칼슘을 첨가한 군에서 감소가 적었으나 적정산도는 더 크게 증가하는 것으로 나타났다. 유산균 수는 발효 2일(D2)부터 감소가 적은 것으로 나타났다. 즉, 칼슘첨가는 감초 추출액의 발효특성을 변화시키는 것으로 나타났다.

[0201] 도 17은 128-0.1%를 접종 발효한 칼슘첨가 감초 발효액(DSW-Ca 군)의 pH, 적정산도 및 유산균 수를 칼슘을 첨가하지 않은 군(DSW 군)과 비교한 결과이다.

[0202] 119로 발효한 결과와 유사하게 pH의 감소는 칼슘을 첨가한 군에서 적었으며 적정산도는 더 크게 증가하는 것으로 나타났다. 유산균 수는 발효 2일(D2)부터 감소가 적은 것으로 나타나 128에 의한 발효액에서도 칼슘첨가는 감초 추출액의 발효특성을 변화시켜 영향을 미치는 것으로 나타났다.

[0204] 도 18은 BB-0.1%를 접종 발효한 칼슘첨가 감초 발효액(DSW-Ca 군)의 pH, 적정산도 및 유산균 수를 칼슘을 첨가하지 않은 군(DSW 군)과 비교한 결과이다.

[0205] 119 및 128로 발효한 결과와 유사하게 pH의 감소는 칼슘을 첨가한 군에서 적었으며 적정산도는 더 크게 증가하는 것으로 나타났다. 유산균 수는 발효 2일(D2)부터 감소가 적은 것으로 나타나 BB에 의한 발효액에서도 칼슘첨가는 감초 추출액의 발효특성을 변화시켜 영향을 미치는 것으로 나타났다.

[0207] 도 19에 도시된 바와 같이, 칼슘첨가가 감초 발효액의 환원당 함량변화에 미치는 영향을 분석한 결과 119, 128 및 BB 접종에 의한 발효에서 칼슘을 첨가한 발효액의 환원당 감소가 큰 것으로 나타나 칼슘에 의해 발효가 촉진되는 것으로 보인다.

[0209] 5) 칼슘첨가가 감초 발효액의 phytoestrogen 함량변화(생전환)에 미치는 효과

[0211] 도 20에 도시된 바와 같이, 칼슘을 첨가하지 않은 감초 추출액(DSW)을 119, 128 및 BB로 발효한 추출액의 리퀴리틴 함량은 발효전(D0)과 비교하여 발효 4일 후(D4) 각각 15 %, 19 % 및 30 % 감소한 반면 칼슘을 첨가한 추출액(DSW+Ca)의 리퀴리틴 함량은 발효 4일 후(D4) 18 %, 25 % 및 40 % 감소하여 칼슘 첨가군에서 리퀴리틴의 감소가 다소 큰 경향을 보였다.

[0213] 도 21에 도시된 바와 같이, 칼슘을 첨가하지 않은 감초 추출액(DSW)을 119, 128 및 BB로 발효한 추출액의 리퀴리티제닌 함량은 발효전(D0)과 비교하여 발효 4일 후(D4) 각각 2.31 배, 2.9 배 및 4 배 증가한 반면 칼슘을 첨

가한 추출액(DSW+Ca)의 리퀴리티제닌 함량은 발효 4일 후(D4) 2.9 배, 3.4 배 및 4.5 배 증가하여 칼슘이 리퀴리티제닌의 증가에 약간의 영향을 미치는 경향을 보였다.

[0215] 도 22에 도시된 바와 같이, 칼슘을 첨가하지 않은 감초 추출액(DSW)을 119, 128 및 BB로 발효한 추출액의 아이소리퀴리틴 함량은 발효전(D0)과 비교하여 발효 4 일 후(D4) 각각 43 %, 56 % 및 87 % 감소한 반면 칼슘을 첨가한 추출액(DSW+Ca)의 아이소리퀴리틴 함량은 발효 4일 후(D4) 51 %, 63 % 및 93 % 감소하여 칼슘이 아이소리퀴리틴의 감소에 영향을 미치는 경향을 보였다.

[0217] 도 23에 도시된 바와 같이, 칼슘을 첨가하지 않은 감초 추출액(DSW)을 119와 128로 발효한 추출액은 발효전(D0)과 비교하여 발효 4일 후(D4) 약 2.7배 증가였으며 BB로 발효한 추출액은 약 4배 증가한 반면 칼슘을 첨가한 추출액(DSW+Ca)의 아이소리퀴리틴 함량은 발효 4일 후(D4) 119 및 128에 의해 약 3.1배가 BB 발효에 의해서는 약 4.5배가 증가하였다.

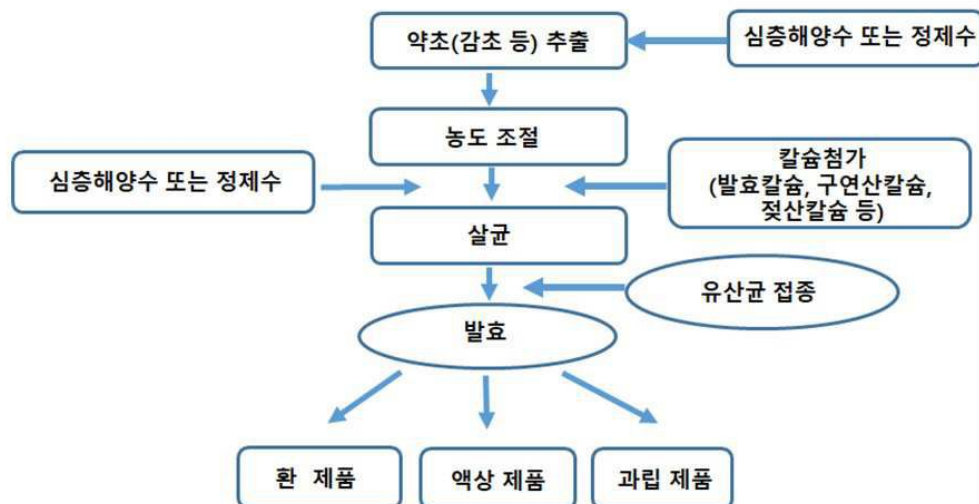
[0219] 결론적으로 칼슘첨가는 리퀴리티제닌이 리퀴리티제닌으로, 아이소리퀴리틴이 아이소리퀴리티제닌으로 전환하는 것을 촉진하는 경향을 보였다.

산업상 이용가능성

[0221] 본 발명에 따른 감초추출액의 활성형 피토에스트로젠 증가 및 칼슘강화 발효액 제조방법 및 이로부터 제조된 발효액은 감초로부터 식물성 여성호르몬인 피토에스트로젠을 추출하고 유산균 발효를 통해 활성형(비배당체 형)의 농도를 증가시킴으로써 단순 추출물보다 유효성분의 농도가 높고, 칼슘 및 해양 심층수에서 유래한 무기질이 첨가되어 여성호르몬의 부족으로 인해 발생하는 다양한 증상의 완화 및 골다공증 예방에 도움을 주는 것으로서, 산업상 이용가능성이 크다.

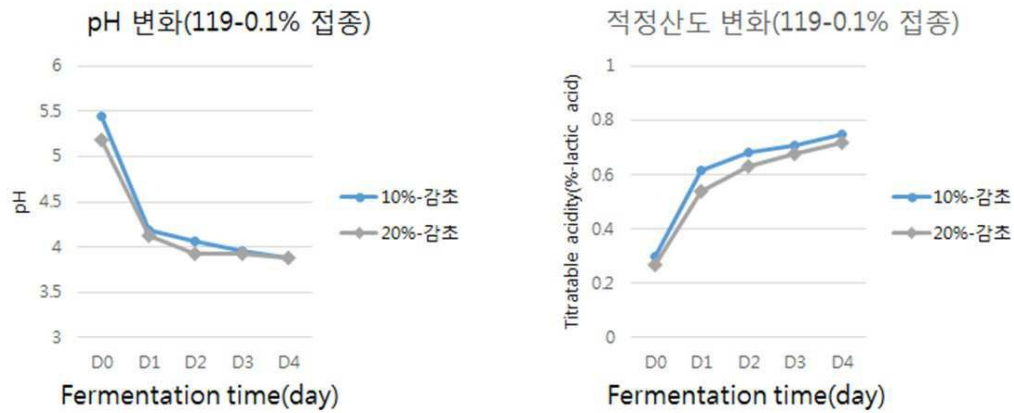
도면

도면1



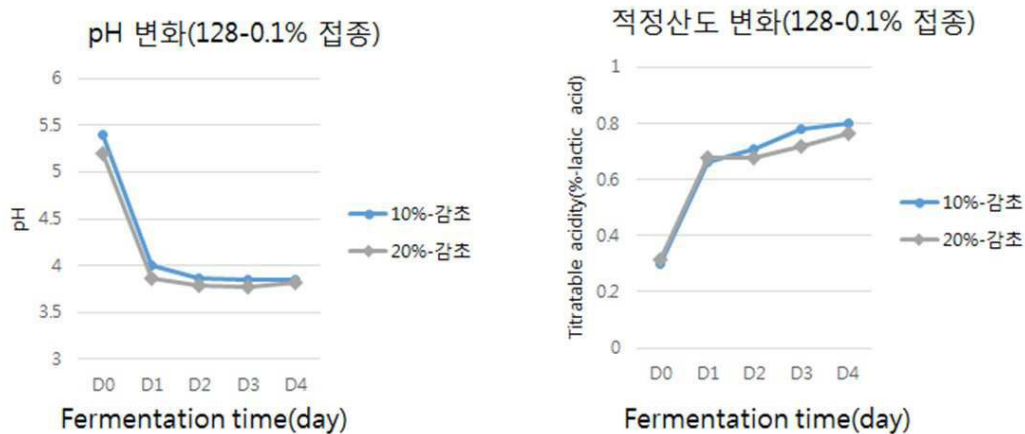
도면2

감초 추출액의 농도에 따른 발효특성



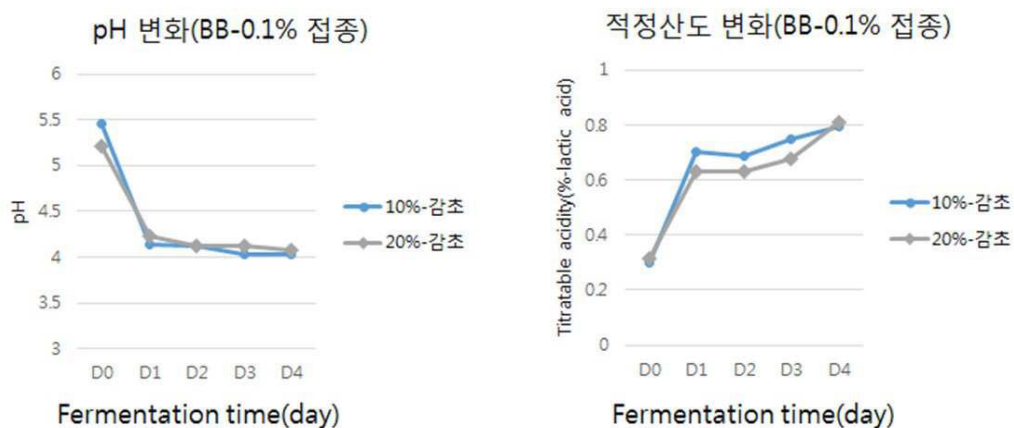
도면3

감초 추출액의 농도에 따른 발효특성



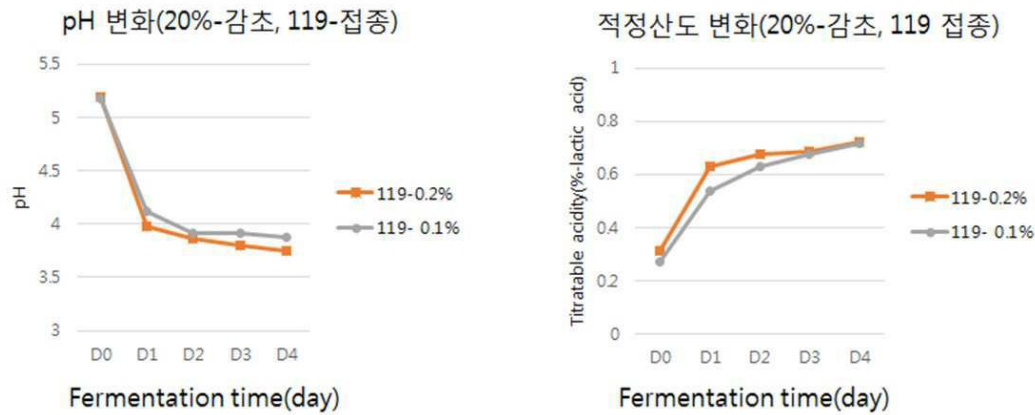
도면4

감초 추출액의 농도에 따른 발효특성



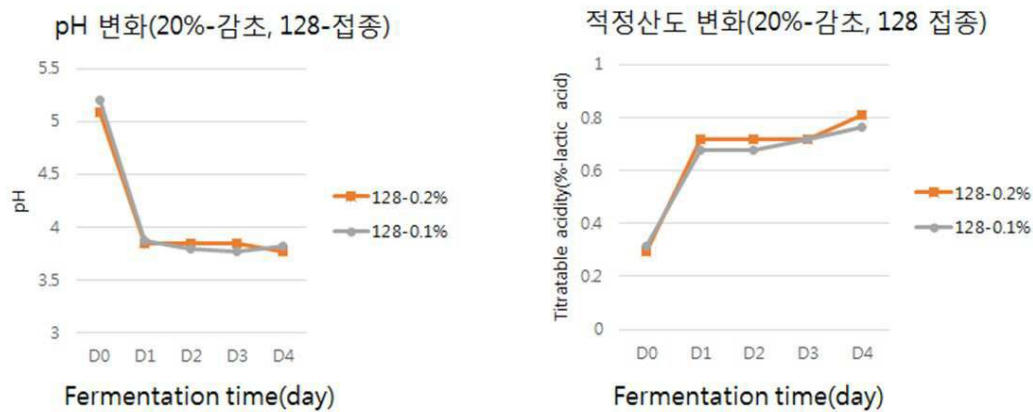
도면5

유산균 접종 농도에 따른 발효특성



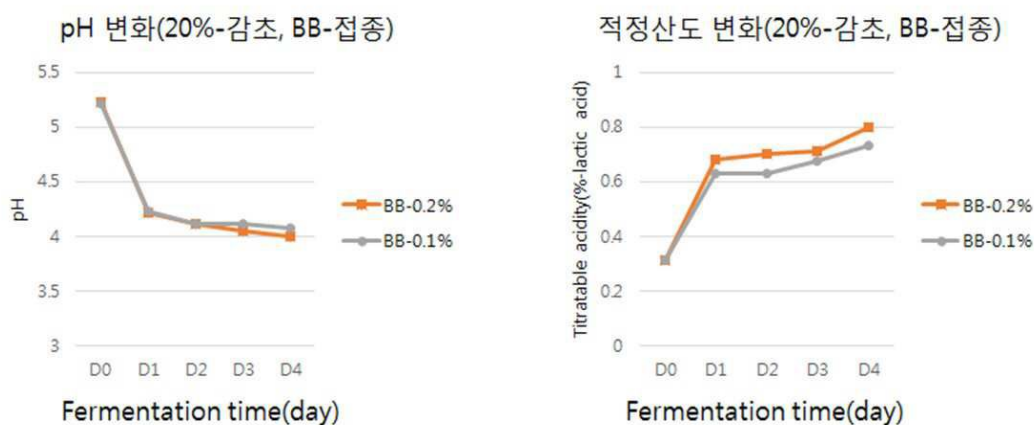
도면6

유산균 접종 농도에 따른 발효특성



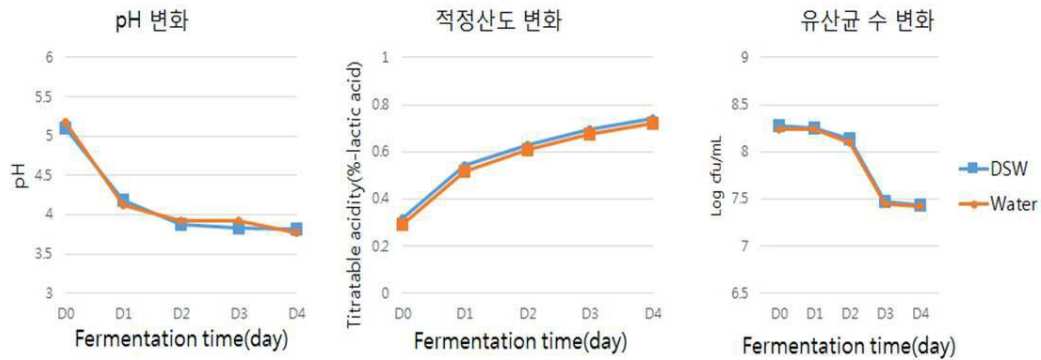
도면7

유산균 접종 농도에 따른 발효특성



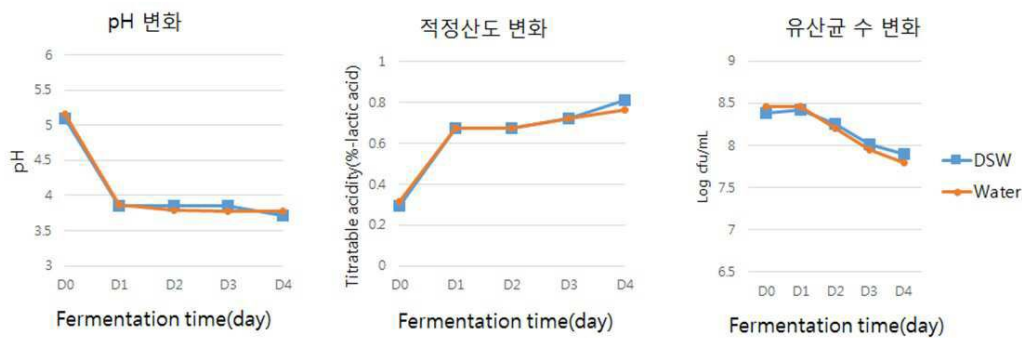
도면8

심층 해양수(Dep Sea Water-DSW)로 추출한 감초 발효특성(119-0.1% 접종 발효)



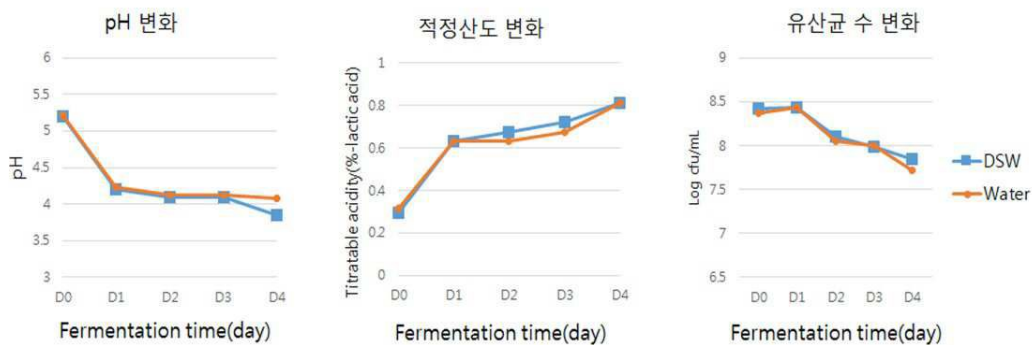
도면9

심층 해양수(Dep Sea Water-DSW)로 추출한 감초 발효특성(128-0.1% 접종 발효)



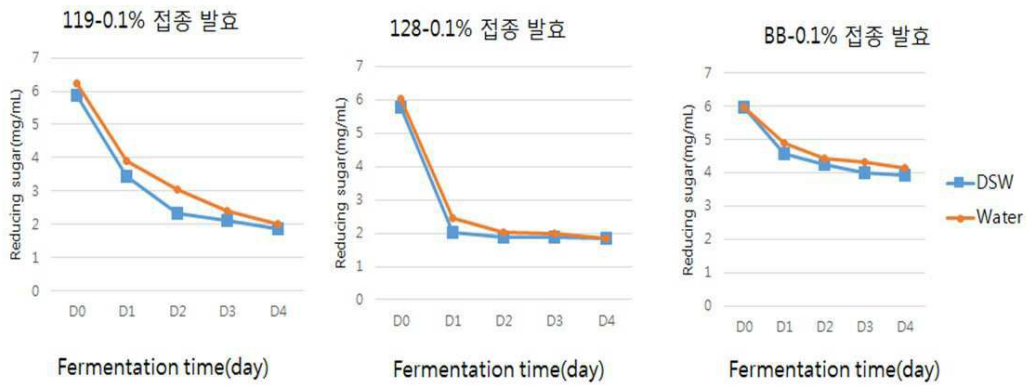
도면10

심층 해양수(Dep Sea Water-DSW)로 추출한 감초 발효특성(BB-0.1% 접종 발효)



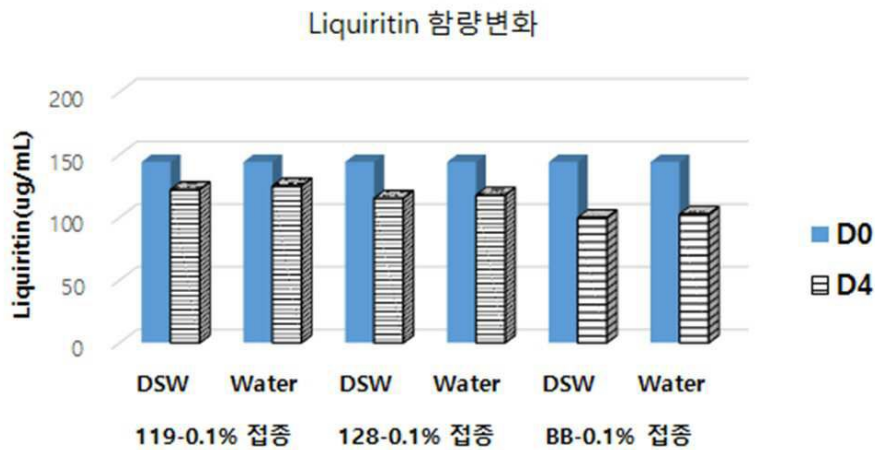
도면11

심층 해양수(DSW)로 추출한 감초 발효액의 환원당 함량변화



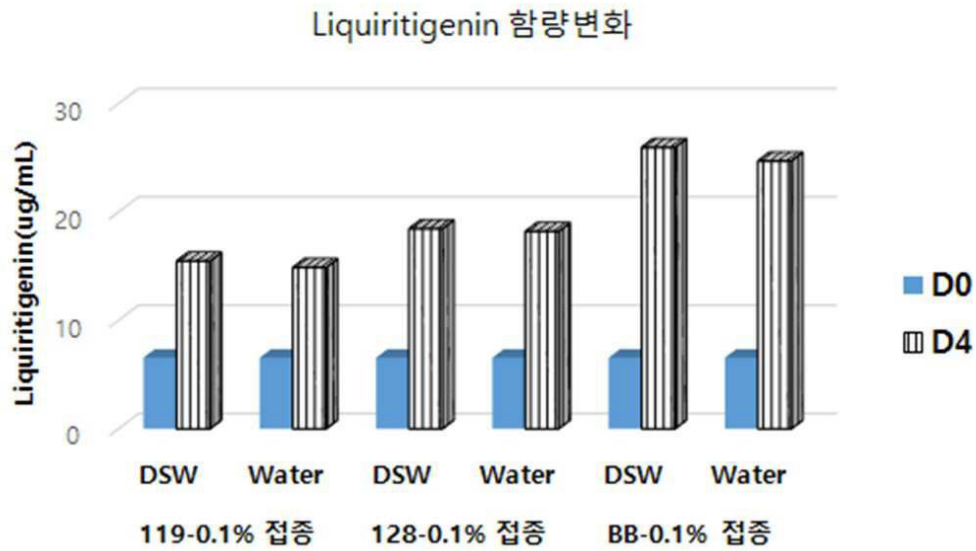
도면12

심층 해양수(DSW)로 추출한 감초 발효액의 Phytoestrogen 함량변화



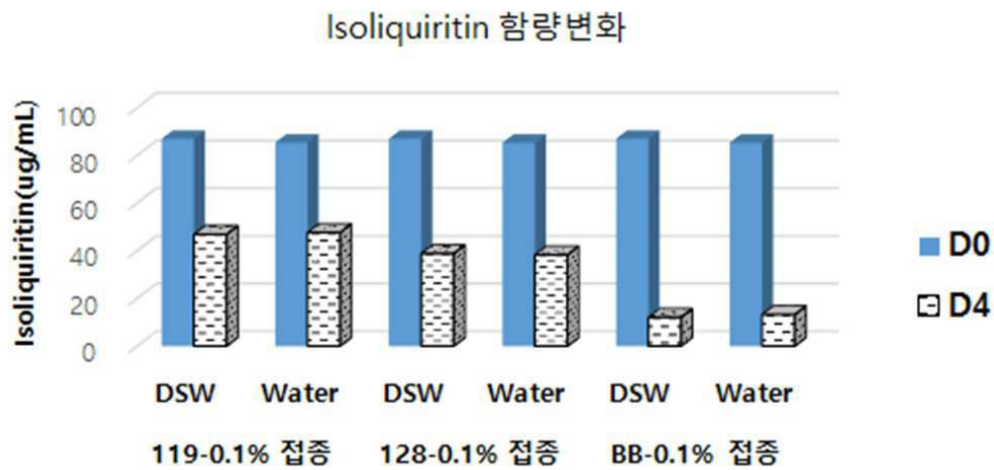
도면13

심층 해양수(DSW)로 추출한 감초 발효액의 Phytoestrogen 함량변화



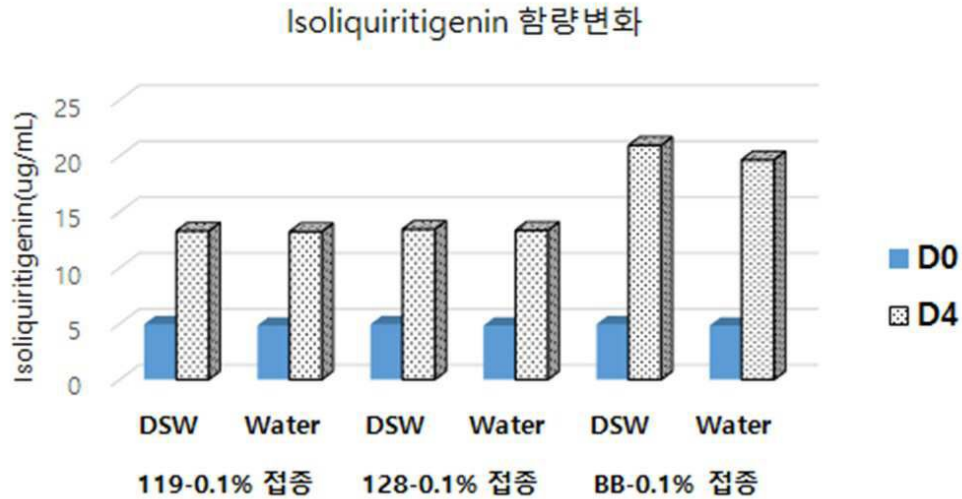
도면14

심층 해양수(DSW)로 추출한 감초 발효액의 Phytoestrogen 함량변화



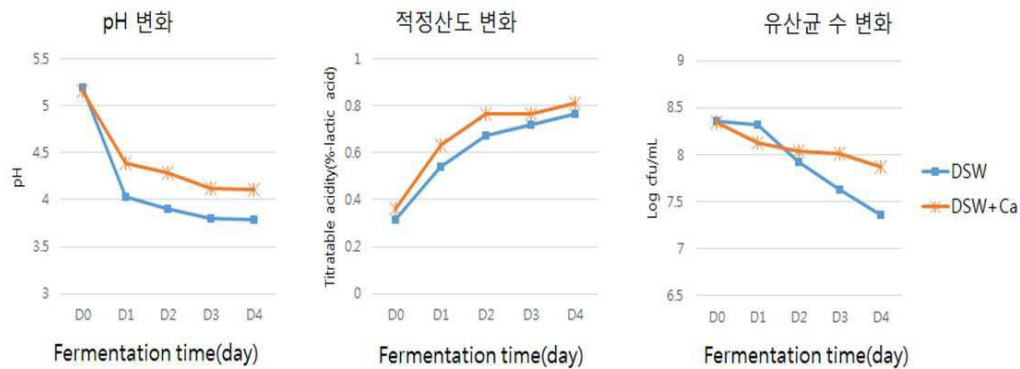
도면15

심층 해양수(DSW)로 추출한 감초 발효액의 Phytoestrogen 함량변화



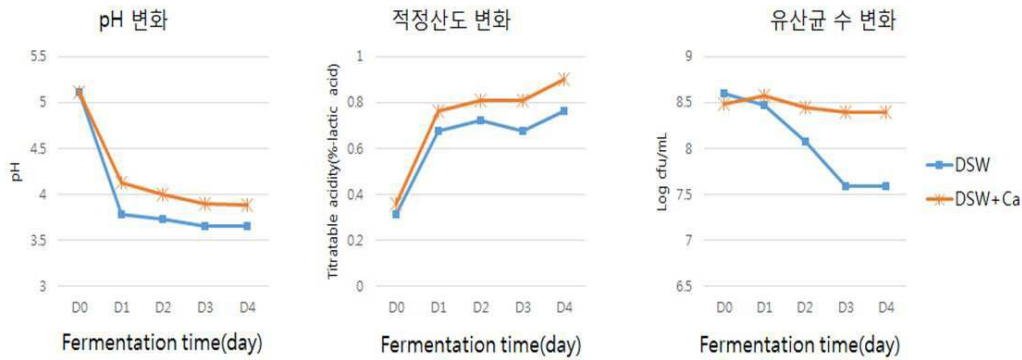
도면16

칼슘 첨가가 감초추출물의 발효에 미치는 효과(119-0.1% 접종 발효)



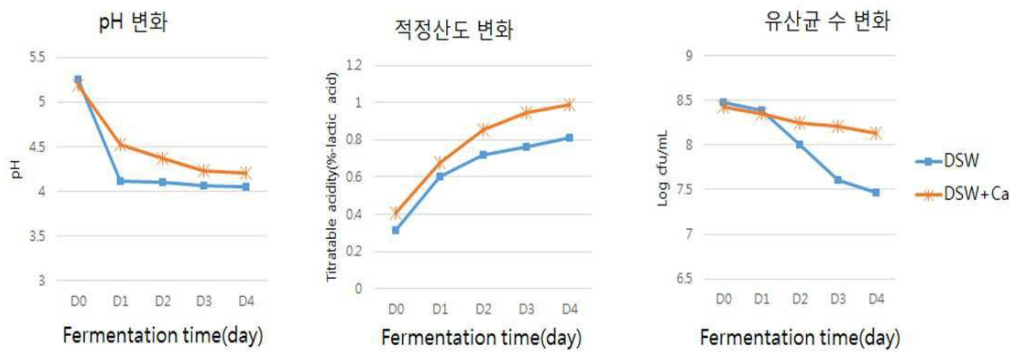
도면17

칼슘 첨가 감초추출물 발효에 미치는 효과(128-0.1% 접종 발효)



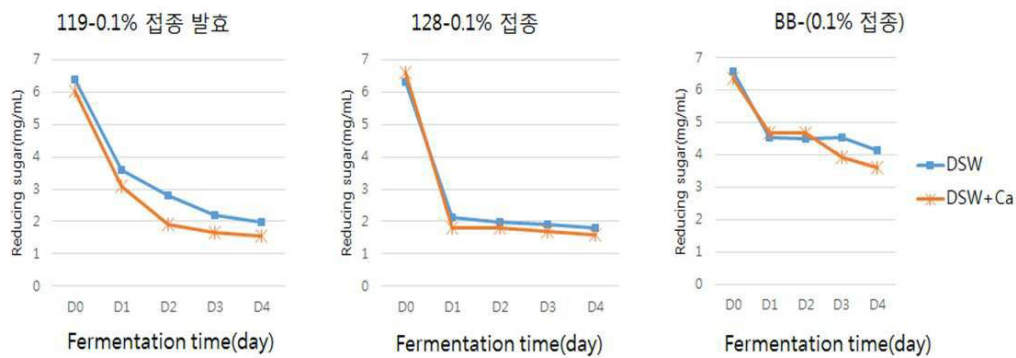
도면18

칼슘 첨가 감초추출물 발효에 미치는 효과(BB-0.1% 접종 발효)



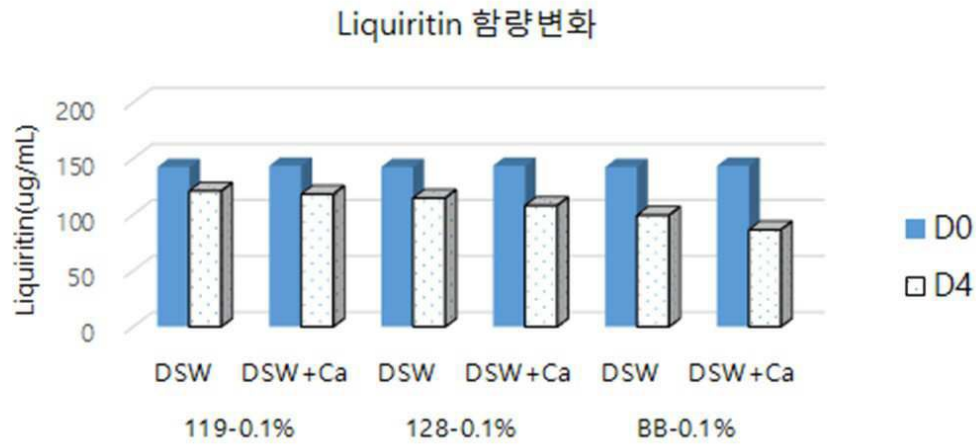
도면19

칼슘첨가가 감초 발효액의 환원당 함량변화에 미치는 효과(119-0.1% 접종 발효)



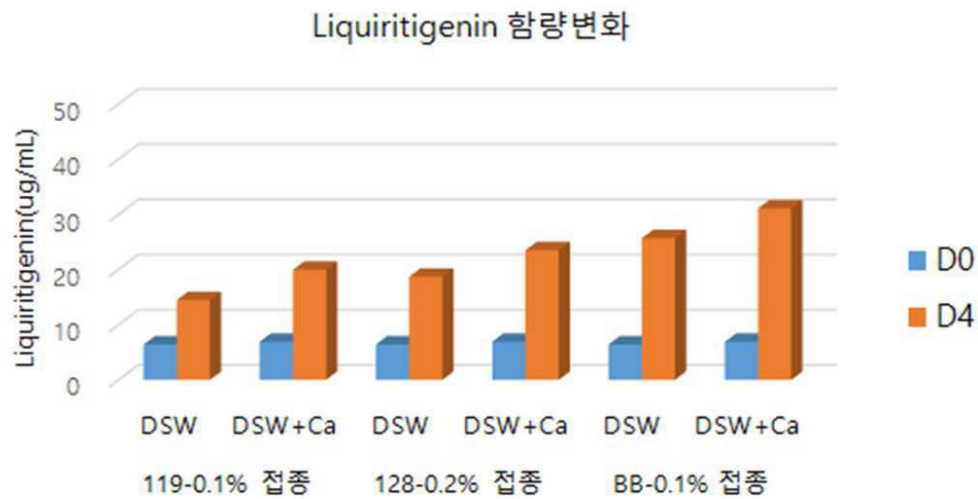
도면20

칼슘첨가가 감초 발효액의 Phytoestrogen 함량에 미치는 효과



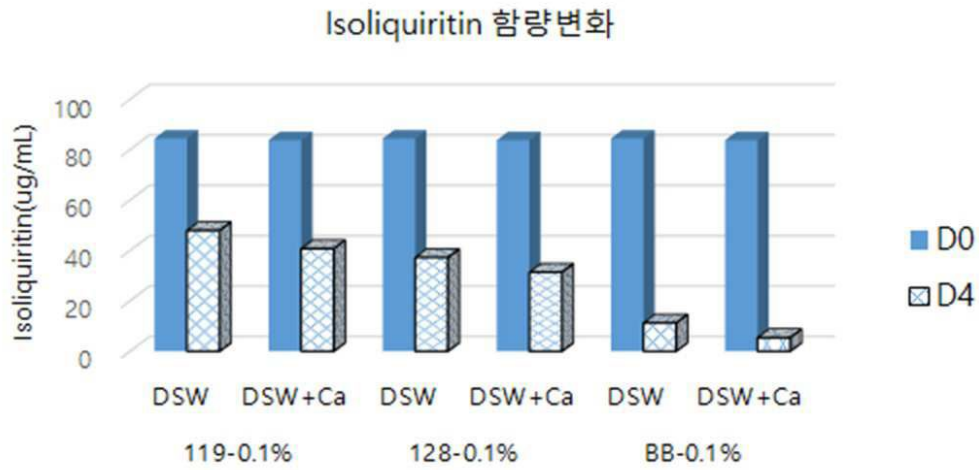
도면21

칼슘첨가가 감초 발효액의 Phytoestrogen 함량에 미치는 효과(ug/mL)



도면22

칼슘첨가가 감초 발효액의 Phytoestrogen 함량에 미치는 효과(ug/mL)



도면23

칼슘첨가가 감초 발효액의 Phytoestrogen 함량에 미치는 효과(ug/mL)

