



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2013년07월02일
(11) 등록번호 10-1280852
(24) 등록일자 2013년06월26일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A23L 1/214 (2006.01) A23L 1/29 (2006.01)
A61P 3/04 (2006.01) A23C 9/133 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2011-0021024
(22) 출원일자 2011년03월09일
심사청구일자 2011년03월09일
(65) 공개번호 10-2012-0104651
(43) 공개일자 2012년09월24일
(56) 선행기술조사문헌
JP2008283922 A
KR100716123 B1

(73) 특허권자
(주)인트라
전라북도 전주시 덕진구 혁신로 399 (장동)
(72) 발명자
조순현
전라북도 순창군 순창읍 교성리 700번지 경천주공
아파트 104동 304호
신정식
전라북도 순창군 순창읍 교성리 700번지 경천주공
아파트 104동 304호
(74) 대리인
최규환

전체 청구항 수 : 총 7 항

심사관 : 최정현

(54) 발명의 명칭 **마(산약) 발효물 및 이의 제조 방법**

(57) 요약

본 발명은 천연 생마(생산약) 분쇄물 또는 마(산약) 분말을 효소를 단계적으로 사용해 당화액으로 만든 다음, 프로바이오틱스 균 및 유산균을 이용하여 발효시킨 마(산약) 발효물을 제공한다. 본 발명의 마(산약) 발효물에는 프로바이오틱스 균 및 유산균과 발효 부산물이 포함되어 있어, 본 발명은 기능성이 증대된 마(산약) 발효물을 제공한다.

대표도 - 도6

마경말	생마(산약)의 경우 길질을 벗긴 후 분쇄한다. 마(산약) 분말의 경우 고품분 20%를 골라 섞는다.
↓	
교반	반송이 잘 일어날 수 있도록 교반한다.
↓	
액화	액화효소인 알파-아밀라아제(선약된 1차 효소)를 고품분의 0.2% 농도로 첨가한 후, 불용성으로 95%를 유지하면서 1시간 동안 교반 반응시킨다.
↓	
냉각	액화 후 60℃로 냉각한다.
↓	
당화	냉각된 액화 액에 당화효소인 글루코아밀라아제(선약된 2차 효소)를 고품분의 0.5% 농도로 첨가한 후, 불용성으로 62℃를 유지하면서 1시간 30분간 교반 반응시킨다.
↓	
멸균	액당화된 마(산약)를 110℃에서 45분간 멸균시킨다.
↓	
발효	멸균 무류에 생기 마(액당화 액)에 20%농도가 되게 첨가하고 유산균 <i>Bifidobacterium breve</i> 등 선약된 유산균을 접종하여 37℃에서 15시간 배양한다.
↓	
재분쇄	발효된 마 요구르트를 분쇄하여 잘 재분쇄한다.

특허청구의 범위

청구항 1

- a) 생마(생산약)의 주피를 제거한 근경 분쇄물 30-80% 또는 마(산약)의 주피를 제거한 근경분말이 20-50% 포함된 마(산약) 수용액을 제조하는 단계;
- b) 상기 마(산약) 수용액에 알파-아밀라아제(α -amylase)를 첨가하여 60℃-100℃에서 가온하여 0.5-1.5시간 교반하는 단계;
- c) 상기 교반 후 55-65℃로 냉각하는 단계;
- d) 상기 냉각된 반응액에 글루코아밀라아제(glucoamylase)를 첨가하여 1-2시간 교반하여 마(산약) 당화액을 제조하는 단계;
- e) 상기 마(산약) 당화액을 100-120℃에서 40-50분간 멸균하고, 상온으로 냉각하는 단계; 및
- f) 상기 냉각된 마(산약) 당화액에 비피도박테리움 브레베(*Bifidobacterium breve*), 비피도박테리움 롱검(*B. longum*) 및 비피도박테리움 에니말리스(*B. animalis*)의 프로바이오틱스 균과 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*), 락토바실러스 가세리(*L. gasseri*), 락토바실러스 퍼멘툼(*L. fermentum*) 및 락토바실러스 페칼리스(*L. faecalis*)의 유산균의 혼합균을 0.5-2% 접종하여 36-38℃에서 15-72시간 발효하는 단계를 포함하는 체지방 감소용 마(산약) 발효물의 제조방법.

청구항 2

삭제

청구항 3

삭제

청구항 4

삭제

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 마(산약)는 마속 식물 (*Dioscorea* spp.)인 것을 특징으로 하는 체지방 감소용 마(산약) 발효물의 제조방법.

청구항 6

제1항 또는 제5항의 방법으로 제조된 체지방 감소용 마(산약) 발효물.

청구항 7

- a) 생마(생산약)의 주피를 제거한 근경 분쇄물 30-80% 또는 마(산약)의 주피를 제거한 근경분말이 20-50% 포함된 마(산약) 수용액을 제조하는 단계;
- b) 상기 마(산약) 수용액에 알파-아밀라아제(α -amylase)를 첨가하여 60℃-100℃에서 가온하여 0.5-1.5시간 교반하는 단계;
- c) 상기 교반 후 55-65℃로 냉각하는 단계;
- d) 상기 냉각된 반응액에 글루코아밀라아제(glucoamylase)를 첨가하여 1-2시간 교반하여 마(산약) 당화액을 제조하는 단계;
- e) 상기 마(산약) 당화액을 100-120℃에서 40-50분간 멸균하고, 상온으로 냉각하는 단계;
- f) 상기 냉각된 마(산약) 당화액에 우유 시유 또는 탈지분유를 첨가하는 단계; 및

g) 상기 우유 시유 또는 탈지분유가 첨가된 마(산약) 당화액에 비피도박테리움 브레베(*Bifidobacterium breve*), 비피도박테리움 롱검(*B. longum*) 및 비피도박테리움 에니말리스(*B. animalis*)의 프로바이오틱스 균과 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*), 락토바실러스 가세리(*L. gasseri*), 락토바실러스 퍼멘툼(*L. fermentum*) 및 락토바실러스 페칼리스(*L. faecalis*)의 유산균의 혼합균을 0.5-2% 접종하여 36-38℃에서 15-72시간 발효하는 단계를 포함하는 체지방 감소용 마(산약) 요구르트의 제조방법.

청구항 8

삭제

청구항 9

제7항의 방법으로 제조된 체지방 감소용 마(산약) 요구르트.

청구항 10

제6항의 마(산약) 발효물을 유효성분으로 포함하는 체지방 감소용 건강기능식품.

청구항 11

제9항의 마(산약) 요구르트를 유효성분으로 포함하는 체지방 감소용 건강기능식품.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 프로바이오틱스 균 및 유산균을 이용하여 제조한 마(산약) 발효물과 이의 활용 방법에 관한 것이다. 더욱 상세하게는, 천연 생마(생산약) 분쇄물 또는 마(산약) 분말을 효소를 단계적으로 사용해 당화액으로 만든 다음, 프로바이오틱스 균 및 유산균을 이용하여 발효시킨 마(산약) 발효물을 제공한다. 본 발명의 마(산약) 발효물에는 프로바이오틱스 균 및 유산균과 발효 부산물이 포함되어 있어, 본 발명은 기능성이 증대된 마(산약) 발효물을 제공한다.

배경기술

[0002] 마(산약)속의 식물 (*Dioscorea* spp.)은 백합목 마과에 포함되며, 현재까지 10속 650여 종이 알려져 있고, 한국, 일본 등지에 널리 분포하고 있다. 마(산약)에는 전분질, 단백질, 지질 등을 주성분으로 하여 미량의 미네랄과 비타민이 함유되어 있으며, 더욱이 사포닌(saponin), 탄닌(tannin), 폴리페놀(polyphenol), 알란토인(allantoin), 우론산(uronic acid), 시토스테롤(sitosterol), 뮤신(mucin), 크립토게닌(kryptogenin) 등의 다양한 생리활성물질들이 함유되어 있어 건강기능성 식품재료로 널리 이용되고 있다. 최근, 마의 유용 생리활성 물질에 의한 콜레스테롤 저하효과, 항당뇨, 혈당 강화, 지질분해효소 저해 활성 및 항돌연변이 활성과 뮤신에 의한 항비만 및 배변 증대 활성에 대한 연구도 보고된 바 있다.

[0003] 인체 내 장관은 외부 미생물 및 식품으로부터 기원하는 항원 및 병원체에 대하여 핵심적인 방어벽 구실을 하고 있는데, 이러한 방어 기작은 주로 장관 내 미생물 군총의 건전성 여부에 의존하고 있다. 유산균은 대표적인 장관 내 유익균총으로서 유해산물의 제거 및 항돌연변이 활성, 장점막 면역 활성의 강화, 장관 내 부패균 및 병원균의 증식 억제와 유익 균총의 유지, 장관 내 항염증 작용 및 면역세포 증강 작용 등을 보유하여, 장관 내 방어 작용 및 면역 조절자로서의 역할을 담당하고 있다. 유산 간균 및 구균, 비피더스 생균제 투여의 경우 위장관에서 발생하는 다양한 질병을 예방하거나 치료하는 효과를 나타낸다.

[0004] 본 발명은 콜레스테롤 저하효과 및 항산화작용, 항비만, 배변증대 등의 효과를 나타내며, 여러 생리활성 물질을 포함하고 있는 프로바이오틱스(Probiotics) 유산균 및 유산균을 이용한 마(산약) 발효물 및 이를 이용한 유산균 발효 요구르트를 제공함으로써, 비만 및 성인병 예방효과 등을 통하여 국민건강에 이바지하며 마의 소비증가를 통한 국내 농산물의 활용도를 증진시키고 건강지향적인 사회적 요구에도 부응할 수 있을 것으로 기대된다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0005] 본 발명은 상기와 같은 요구에 의해 안출된 것으로서, 본 발명자는 프로바이오틱스 균 및 유산균을 이용하여 마(산약) 발효물을 제조하여, 기능성이 증대된 마(산약) 발효물 및 이를 이용한 체지방 감소용 건강기능식품을 제공하고자 한다.

과제의 해결 수단

[0006] 상기 과제를 해결하기 위해, 본 발명은 체지방 감소용 마(산약) 발효물의 제조방법 및 상기 방법으로 제조된 체지방 감소용 마(산약) 발효물을 제공한다.

[0007] 본 발명은 또한, 체지방 감소용 마(산약) 요구르트의 제조방법 및 상기 방법으로 제조된 체지방 감소용 마(산약) 요구르트를 제공한다.

[0008] 본 발명은 또한, 상기 마(산약) 발효물 또는 상기 마(산약) 요구르트를 유효성분으로 포함하는 체지방 감소용 건강기능식품을 제공한다.

발명의 효과

[0009] 본 발명의 마(산약) 발효물은 생리활성물질과 프로바이오틱스 균에 의한 항비만, 콜레스테롤 저하, 항당뇨, 항돌연변이 활성, 배변 증대, 유산균에 의한 유해물의 제거, 장 점막 면역 활성의 강화, 장관 내 부패균 및 병원균의 증식 억제, 유익 균총의 유지, 장관 내 항염증 작용 등의 효과가 있다.

도면의 간단한 설명

[0010] 도 1은 마(산약) 분말 및 프로바이오틱스 균 및 유산균을 이용한 마(산약) 발효물의 HPLC 분석 결과를 보여준다. 상단의 검정색 피크: 프로바이오틱스 균 및 유산균을 이용한 마(산약) 발효물 추출물; 중단의 분홍색 피크: 마(산약) 추출물; 하단의 청색 피크: 마(산약) 성분의 지표물질인 β -시토스테롤(β -sitosterol), 스티그마스테롤(stigmasterol), 디오스게닌(diosgenin), 알란토인(allantoin).

도 2는 발효 마(산약)을 투여한 Sprague-Dawley 래트(Rat)의 체중 변화를 보여준다.

도 3은 쥐의 정소상체 지방(Epididymal fat fad)의 지방세포수를 보여준다.

도 4는 쥐의 정소상체 지방(Epididymal fat fad)의 지방세포를 보여준다.

도 5는 간조직을 현미경으로 관찰한 그림이다. a. 정상 대조군, H&E 염색, x400. b. 음성 대조군, H&E 염색, x400. c. 400mg/kg 급여군, H&E 염색, x400. d. 2.5g/kg 급여군, H&E 염색, x400.

도 6은 마(산약) 당화액 제조방법과 프로바이오틱스 균 및 유산균을 이용한 마(산약) 발효물 및 이를 함유한 발효 요구르트 제조과정을 보여준다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0011] 본 발명의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 체지방 감소용 마(산약) 발효물의 제조방법을 제공한다.

[0012] 바람직하게는, 본 발명은

[0013] a) 생마(생산약) 분쇄물 또는 마(산약) 분말이 포함된 마(산약) 수용액을 제조하는 단계;

[0014] b) 상기 마(산약) 수용액에 알파-아밀라아제(α -amylase)를 첨가하여 교반하는 단계;

[0015] c) 상기 교반 후 냉각하는 단계;

[0016] d) 상기 냉각된 반응액에 글루코아밀라아제(glucoamylase)를 첨가하고 교반하여 마(산약) 당화액을 제조하는 단계;

[0017] e) 상기 마(산약) 당화액을 멸균하고, 냉각하는 단계; 및

[0018] f) 상기 냉각된 마(산약) 당화액에 프로바이오틱스 균, 유산균, 또는 상기 균의 혼합균을 접종하여 발효하는 단계를 포함하는 체지방 감소용 마(산약) 발효물의 제조방법을 제공한다.

[0019] 더욱 바람직하게는, 본 발명은

[0020] a) 생마(생산약) 분쇄물 30~80% 또는 마(산약) 분말이 20~50% 포함된 마(산약) 수용액을 제조하는 단계;

- [0021] b) 상기 마(산약) 수용액에 알파-아밀라아제(α -amylase)를 첨가하여 60℃~100℃에서 가온하여 0.5~1.5시간 교반하는 단계;
- [0022] c) 상기 교반 후 55~65℃로 냉각하는 단계;
- [0023] d) 상기 냉각된 반응액에 글루코아밀라아제(glucoamylase)를 첨가하여 1~2시간 교반하여 마(산약) 당화액을 제조하는 단계;
- [0024] e) 상기 마(산약) 당화액을 100~120℃에서 40~50분간 멸균하고, 상온으로 냉각하는 단계; 및
- [0025] f) 상기 냉각된 마(산약) 당화액에 프로바이오틱스 균, 유산균, 또는 상기 균의 혼합균을 0.5~2% 접종하여 36~38℃에서 15~72시간 발효하는 단계를 포함하는 체지방 감소용 마(산약) 발효물의 제조방법을 제공한다.
- [0026] 상기 생마(생산약) 분쇄물 또는 마(산약) 분말은 마(산약) 수용액 제조 시, 수용액 100mL에 대해 각각 30~80g 또는 20~50g 포함될 수 있다.
- [0027] 가장 바람직하게는, 본 발명은
- [0028] a) 생마(생산약) 분쇄물 30% 또는 마(산약) 분말이 30% 포함된 마(산약) 수용액을 제조하는 단계;
- [0029] b) 상기 마(산약) 수용액에 알파-아밀라아제를 첨가하여 60℃~100℃에서 가온하여 1시간 교반하는 단계;
- [0030] c) 상기 교반 후 60℃로 냉각하는 단계;
- [0031] d) 상기 냉각된 반응액에 글루코아밀라아제를 첨가하여 1.5시간 교반하여 마(산약) 당화액을 제조하는 단계;
- [0032] e) 상기 마(산약) 당화액을 110℃에서 45분간 멸균하고, 상온으로 냉각하는 단계; 및
- [0033] f) 상기 냉각된 마(산약) 당화액에 프로바이오틱스 균, 유산균, 또는 상기 균의 혼합균을 1% 접종하여 37℃, 혐기조건에서 48시간 발효하는 단계를 포함하는 체지방 감소용 마(산약) 발효물의 제조방법을 제공한다.
- [0034] 본 발명의 마(산약) 발효물의 제조방법에서, 리퀴자임 수프라(Liquozyme[®] Supra)와 같은 알파-아밀라아제를 사용할 수 있으며, 스피리자임 플러스 FG(Spirizyme[®] Plus FG)와 같은 글루코아밀라아제를 사용할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 또한, 마(산약) 분말을 50%를 초과하여 첨가하면 교반 시에 문제 발생 및 제품의 균질성이 저하될 수 있으므로 마(산약) 분말은 50%를 초과하지 않게 포함하는 것이 바람직하다.
- [0035] 또한, 본 발명은 체지방 감소 효과를 나타내는 상기 마(산약) 발효물, 및 본 발명의 마(산약) 발효물을 유효성분으로 포함하며 식품학적으로 허용 가능한 식품보조 첨가제를 포함하는 체지방 감소용 건강기능식품을 제공한다.
- [0036] 마(산약) 발효물을 첨가할 수 있는 식품으로는, 예를 들어, 각종 식품류, 음료, 껌, 차, 비타민 복합제, 건강기능성 식품류 등이 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0037] 또한, 본 발명의 마(산약) 발효물은 체지방 감소 효과를 목적으로 식품 또는 음료에 첨가될 수 있다. 이때, 식품 또는 음료 중의 마(산약) 발효물의 양은 전체 식품 중량의 0.01 내지 95 중량%로 가할 수 있으며, 건강 음료 조성물은 100mL를 기준으로 0.01 내지 95g, 바람직하게는 0.1 내지 10g의 비율로 가할 수 있으며, 식품의 종류 및 사용방법에 따라 적절히 조절하는 것이 좋다.
- [0038] 본 발명의 건강 기능성 음료 조성물은 지시된 비율로 필수 성분으로서 상기 마(산약) 발효물을 함유하는 외에는 다른 성분에는 특별한 제한이 없으며, 통상의 음료와 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다. 상술한 천연 탄수화물의 예는 모노사카라이드, 예를 들어, 포도당, 과당 등; 디사카라이드, 예를 들어 말토스, 슈크로스 등; 및 폴리사카라이드, 예를 들어 텍스트린, 시클로텍스트린 등과 같은 통상적인 당, 및 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알콜이다. 상술한 것 이외의 향미제로서 천연 향미제(타우마틴, 스테비아 추출물(예를 들어 레바우디오시드 A, 글리시르히진 등) 및 합성 향미제(사카린, 아스파르탐 등)를 유리하게 사용할 수 있다. 상기 천연 탄수화물의 비율은 본 발명의 조성물 100mL당 일반적으로 약 1 내지 20g, 바람직하게는 약 5 내지 12g이다.
- [0039] 상기 외에 본 발명의 마(산약) 발효물은 여러 가지 영양제, 비타민, 광물(전해질), 합성 풍미제 및 천연 풍미제 등의 풍미제, 착색제 및 증진제(치즈, 초콜릿 등), 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알콜, 탄산 음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수

있다. 그밖에 본 발명의 마(산약) 발효물은 천연 과일 주스 및 과일 주스 음료 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다. 이러한 성분은 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있다. 이러한 첨가제의 비율은 그렇게 중요하진 않지만 본 발명의 마(산약) 발효물 100 중량부 당 0 내지 약 20 중량부의 범위에서 선택되는 것이 일반적이다.

- [0040] 또한, 본 발명은 체지방 감소용 마(산약) 요구르트의 제조방법을 제공한다.
- [0041] 바람직하게는, 본 발명은
- [0042] a) 생마(생산약) 분쇄물 또는 마(산약) 분말이 포함된 마(산약) 수용액을 제조하는 단계;
- [0043] b) 상기 마(산약) 수용액에 알파-아밀라아제(α -amylase)를 첨가하여 교반하는 단계;
- [0044] c) 상기 교반 후 냉각하는 단계;
- [0045] d) 상기 냉각된 반응액에 글루코아밀라아제(glucoamylase)를 첨가하고 교반하여 마(산약) 당화액을 제조하는 단계;
- [0046] e) 상기 마(산약) 당화액을 멸균하고, 냉각하는 단계;
- [0047] f) 상기 냉각된 마(산약) 당화액에 우유 시유 또는 탈지분유를 첨가하는 단계; 및
- [0048] g) 상기 우유 시유 또는 탈지분유가 첨가된 마(산약) 당화액에 프로바이오틱스 균, 유산균, 또는 상기 균의 혼합균을 접종하여 발효하는 단계를 포함하는 체지방 감소용 마(산약) 요구르트의 제조방법을 제공한다.
- [0049] 더욱 바람직하게는, 본 발명은
- [0050] a) 생마(생산약) 분쇄물 30~80% 또는 마(산약) 분말이 20~50% 포함된 마(산약) 수용액을 제조하는 단계;
- [0051] b) 상기 마(산약) 수용액에 알파-아밀라아제(α -amylase)를 첨가하여 60℃~100℃에서 가온하여 0.5~1.5시간 교반하는 단계;
- [0052] c) 상기 교반 후 55~65℃로 냉각하는 단계;
- [0053] d) 상기 냉각된 반응액에 글루코아밀라아제(glucoamylase)를 첨가하여 1~2시간 교반하여 마(산약) 당화액을 제조하는 단계;
- [0054] e) 상기 마(산약) 당화액을 100~120℃에서 40~50분간 멸균하고, 상온으로 냉각하는 단계;
- [0055] f) 상기 냉각된 마(산약) 당화액에 우유 시유 또는 탈지분유를 첨가하는 단계; 및
- [0056] g) 상기 우유 시유 또는 탈지분유가 첨가된 마(산약) 당화액에 프로바이오틱스 균, 유산균, 또는 상기 균의 혼합균을 0.5~2% 접종하여 36~38℃에서 15~72시간 발효하는 단계를 포함하는 체지방 감소용 마(산약) 요구르트의 제조방법을 제공한다.
- [0057] 본 발명의 체지방 감소용 마(산약) 요구르트의 제조방법에서, 마(산약) 분말을 50%를 초과하여 첨가하면 교반 시에 문제 발생 및 제품의 균질성이 저하될 수 있으므로 마(산약) 분말은 50%를 초과하지 않게 포함하는 것이 바람직하다.
- [0058] 가장 바람직하게는, 본 발명은
- [0059] a) 생마(생산약) 분쇄물 30% 또는 마(산약) 분말이 30% 포함된 마(산약) 수용액을 제조하는 단계;
- [0060] b) 상기 마(산약) 수용액에 알파-아밀라아제를 첨가하여 60℃~100℃에서 가온하여 1시간 교반하는 단계;
- [0061] c) 상기 교반 후 60℃로 냉각하는 단계;
- [0062] d) 상기 냉각된 반응액에 글루코아밀라아제를 첨가하여 1.5시간 교반하여 마(산약) 당화액을 제조하는 단계;
- [0063] e) 상기 마(산약) 당화액을 110℃에서 45분간 멸균하고, 상온으로 냉각하는 단계;
- [0064] f) 상기 냉각된 마(산약) 당화액에 우유 시유 90~95% 또는 탈지분유 15~20%를 첨가하는 단계; 및
- [0065] g) 상기 우유 시유 또는 탈지분유가 첨가된 마(산약) 당화액에 프로바이오틱스 균, 유산균, 또는 상기 균의 혼합균을 1% 접종하여 37℃, 혐기 또는 호기 조건에서 24시간 발효하는 단계를 포함하는 체지방 감소용 마(산약) 요구르트의 제조방법을 제공한다.

- [0066] 또한, 본 발명은 상기 방법으로 제조된 체지방 감소 효과를 나타내는 마(산약) 요구르트, 및 본 발명의 마(산약) 요구르트를 유효성분으로 포함하며 식품학적으로 허용 가능한 식품보조 첨가제를 포함하는 체지방 감소용 건강기능식품을 제공한다.
- [0067] 마(산약) 요구르트를 첨가할 수 있는 식품 및 음료는 상기 마(산약) 발효물에서 기재한 바와 같다.
- [0068] 본 발명에 있어서, 프로바이오틱스 균은 비피도박테리움 브레베(*Bifidobacterium breve*), 비피도박테리움 롱검(*B. longum*), 비피도박테리움 에니말리스(*B. animalis*)로부터 선택된 한 종류 이상일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0069] 본 발명에 있어서, 유산균은 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*), 락토바실러스 가세리(*L. gasserii*), 락토바실러스 퍼멘툼(*L. fermentum*), 락토바실러스 페칼리스(*L. faecalis*)로부터 선택된 한 종류 이상일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0070] 본 발명의 마(산약)는 마속 식물 (*Dioscorea* spp.)의 주피를 제거한 근경일 수 있다. 상기 마(산약)는 바람직하게는 마 (*Dioscorea batatas* Decne.), 참마 (*D. japonica* Thunb.), 디오스코레아 오포지타 (*D. opposita* Thunb.), 둥근마 (*D. bulbifera* L.), 단풍마 (*D. quinqueloba* Thunb.), 국화마 (*D. septemloba* Thunb.), 부채마 (*D. nipponica* Makino), 도꼬로마 (*D. tokoro* Makino), 각시마 (*D. tenuipes* Franch. & Sav.) 또는 알라타마 (*D. alata*)일 수 있으며, 더욱 바람직하게는 마 (*D. batatas* Decne.) 또는 참마 (*D. japonica* Thunb.)일 수 있으며, 가장 바람직하게는 마 (*D. batatas* Decne.)일 수 있다.
- [0071] 본 발명에서, %는 특별히 지정되지 않는 한, 중량%를 의미한다.
- [0072] 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.
- [0073] <실시예 1>
- [0074] 천연 생마(생산약) 30% 또는 마(산약) 분말 30%가 포함된 수용액에 1차 처리 효소인 리퀴자임 수프라(Liquozyme[®] Supra)를 고형분의 0.05~1.0%로 첨가하여 80~90℃에서 1시간 동안 교반한다. 반응 후 60℃로 냉각하여 2차 처리 효소인 스피리자임 플러스 FG(Spirizyme[®] Plus FG)을 고형분의 0.05~1.0%로 첨가하여 1시간 30분간 교반한다. 효소 처리된 마(산약)을 110℃에서 45분간 멸균하고 상온으로 냉각하여, 프로바이오틱스 균인 비피도박테리움 브레베(*Bifidobacterium breve*) CBG-C2, 비피도박테리움 롱검(*B. longum*), 비피도박테리움 에니말리스(*B. animalis*)의 혼합 유산균 10⁶cfu/ml를 1% 접종하여 37℃, 혐기조건에서 24시간 배양한다. 배양액을 동결 건조하여 BL-아가(agar) 배지에 0.85% 생리식염수(NaCl)로 10배수씩 희석하여 스프레딩(spreading)하여, 혐기조건 37℃에서 48시간 배양하면 상기 프로바이오틱스 균이 10⁹~10¹⁰cfu/ml 함유되고, 도 1에서와 같은 기능성 성분이 증가된 발효 마(산약) 분말을 수득한다.
- [0075] <실시예 2>
- [0076] 천연 생마(생산약) 30% 또는 마(산약) 분말 30%가 포함된 수용액에 1차 처리 효소인 리퀴자임 수프라(Liquozyme[®] Supra)를 고형분의 0.05~1.0%로 첨가하여 80~90℃에서 1시간 동안 교반한다. 반응 후 60℃로 냉각하여 2차 처리 효소인 스피리자임 플러스 FG(Spirizyme[®] Plus FG)를 고형분의 0.05~1.0%로 첨가하여 1시간 30분간 교반한다. 효소 처리된 마(산약)에 탈지분유 1%를 첨가한 후 110℃에서 45분간 멸균하고 상온으로 냉각하여, 프로바이오틱스 균인 비피도박테리움 브레베(*Bifidobacterium breve*) CBG-C2, 비피도박테리움 롱검(*B. longum*), 비피도박테리움 에니말리스(*B. animalis*)의 혼합 유산균 10⁶CFU/ml를 1% 접종 후 37℃, 혐기조건에서 20시간 배양한다. 배양액을 동결 건조하여 BL-아가(agar) 배지에 0.85% 생리식염수(NaCl)로 10배수씩 희석하여 스프레딩(spreading)하여, 혐기조건 37℃에서 48시간 배양하면 상기 프로바이오틱스 균이 10⁹~10¹⁰cfu/ml 함유되고 도 1에서와 같은 기능성 성분이 증가된 발효 마(산약) 분말을 수득한다.

[0077] <실시예 3>

[0078] 천연 생마(생산약) 30% 또는 마(산약) 분말 30%가 포함된 수용액에 1차 처리 효소인 리퀴자임 수프라(Liquozyme[®] Supra)를 고형분의 0.05~1.0%로 첨가하여 80~90℃에서 1시간 동안 교반한다. 반응 후 60℃로 냉각하여 2차 처리 효소인 스피리자임 플러스 FG(Spirizyme[®] Plus FG)를 고형분의 0.05~1.0%로 첨가하여 1시간 30분간 교반한다. 효소 처리된 마(산약)을 110℃에서 45분간 멸균시킨 후 상온으로 냉각하여, 절대 혐기성 프로바이오틱스 균인 비피도박테리움 브레베(*Bifidobacterium breve*) CBG-C2, 비피도박테리움 롱검(*B. longum*), 비피도박테리움 에니말리스(*B. animalis*)와 혐기적 통성 유산균인 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*), 락토바실러스 가세리(*L. gasseri*), 락토바실러스 퍼멘툼(*L. fermentum*), 락토바실러스 페칼리스(*L. faecalis*)의 혼합 유산균 10⁶CFU/ml를 1% 접종 후 37℃, 혐기조건에서 24시간 배양한다. 상기 배양액을 동결 건조하여 MRS-아가(agar) 배지에 0.85% 생리식염수(NaCl)로 10배수씩 희석하여 스프레딩(spreading)하여, 혐기조건 37℃에서 48시간 배양하면 상기 절대 혐기성 프로바이오틱스 균과 상기 혐기적 통성 유산균이 10⁹~10¹⁰cfu/ml 함유되고 도 1에서와 같은 기능성 성분이 증가된 발효 마(산약) 분말을 수득한다.

[0079] <실시예 4>

[0080] 천연 생마(생산약) 30% 또는 마(산약) 분말 30%가 포함된 수용액에 1차 처리 효소인 리퀴자임 수프라(Liquozyme[®] Supra)를 고형분의 0.05~1.0%로 첨가하여 80~90℃에서 1시간 동안 교반한다. 반응 후 60℃로 냉각하여 2차 처리 효소인 스피리자임 플러스 FG(Spirizyme[®] Plus FG)를 고형분의 0.05~1.0%로 첨가하여 1시간 30분간 교반한다. 효소 처리된 마(산약)을 110℃에서 45분간 멸균하고 상온으로 냉각하여, 상기 효소 처리된 마(산약)에 원유 90~95% 또는 탈지분유 15~20%를 첨가하여, 절대 혐기성 프로바이오틱스 균인 비피도박테리움 브레베(*Bifidobacterium breve*) CBG-C2, 비피도박테리움 롱검(*B. longum*), 비피도박테리움 에니말리스(*B. animalis*)와 혐기적 통성 유산균인 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*), 락토바실러스 가세리(*L. gasseri*), 락토바실러스 퍼멘툼(*L. fermentum*), 락토바실러스 페칼리스(*L. faecalis*)의 혼합 유산균 10⁶CFU/ml 1%를 스타터로 접종하여 37℃, 혐기조건에서 20시간 배양하면 상기 유산균이 10⁹~10¹⁰cfu/ml 함유되고 도 1에서와 같은 기능성 성분이 증가된 마(산약) 발효 요구르트를 수득한다.

[0081] <실시예 5>

[0082] 천연 생마(생산약) 30% 또는 마(산약) 분말 30%가 포함된 수용액에 1차 처리 효소인 리퀴자임 수프라(Liquozyme[®] Supra)를 고형분의 0.05~1.0%로 첨가하여 80~90℃에서 1시간 동안 교반한다. 반응 후 60℃로 냉각하여 2차 처리 효소인 스피리자임 플러스 FG(Spirizyme[®] Plus FG)를 고형분의 0.05~1.0%로 첨가하여 1시간 30분간 교반한다. 효소 처리된 마(산약)을 110℃에서 45분간 멸균하고 상온으로 냉각하여, 절대 혐기성 프로바이오틱스 균인 엔테로코커스 페칼리스(*Enterococcus faecalis*), 엔테로코커스 페숨(*E. faessum*)과 바실러스 폴리퍼멘티쿠스(*Bacillus polyfermenticus*)의 혼합 유산균 10⁶CFU/ml를 1% 접종 후 37℃, 혐기조건에서 24시간 배양한다. 배양액을 동결 건조하여 MRS-아가(agar) 배지에 0.85% 생리식염수(NaCl)로 10배수씩 희석하여 스프레딩(spreading)하여, 혐기조건 37℃에서 48시간 배양하면 상기 프로바이오틱스 균이 10⁹~10¹⁰cfu/ml 함유되고 도 1에서와 같은 기능성 성분이 증가된 발효 마(산약) 분말을 수득한다.

[0083] <실시예 6>

[0084] 본 발명의 프로바이오틱스 균 및 유산균을 이용한 마(산약) 발효물의 항비만 및 콜레스테롤 저하 효과를 확인하기 위해, 고콜레스테롤 및 고지방 사료를 급여하여 유발한 고콜레스테롤 비만모델 래트(Rat)를 대상으로 프로바이오틱스 균 및 유산균을 이용한 마(산약) 발효물을 급여하여 체지방 개선에 미치는 효능을 알아보았으며, 실험 방법은 하기와 같다.

- [0085] ○ HPLC 분석조건
- [0086] 고정상은 reversed-phase C18 column (Pinnacle II C18 4.6x250mm, 5 μ m)을, 이동상은 MeOH : Water = 95 : 5를 사용하였다. 유속은 1.0 mL/min, 컬럼(column) 온도는 37 $^{\circ}$ C, 검출기는 UV(210 nm)를 사용하였으며, 주입량은 20 μ L이다.
- [0087] ○ 검체준비
- [0088] 마(산약) 분말, 프로바이오틱스 균 및 유산균을 이용한 마(산약) 발효물 약 500 mg을 50 mL 볼륨플라스크에 넣고 메탄올 약 40 mL에 녹여 60분간 초음파추출을 진행한 다음, 메탄올을 추가하여 50 mL로 맞춘다.
- [0089] <실시에 7>
- [0090] 본 발명에서는 고콜레스테롤 및 고지방 사료를 급여하여 유발한 고콜레스테롤 비만모델 래트(Rat)에서 프로바이오틱스 균 및 유산균을 이용한 마(산약) 발효물 급여가 체지방 개선에 미치는 효능을 알아보려고 하였다.
- [0091] ○ 재료 및 방법: 6주령의 수컷 SD 래트(Rat) 5개 군 10마리씩 총 50두를 사용하여 8주간 정상 대조군, 고콜레스테롤 유도군에 마 발효물 (각각 400mg/kg, 1g/kg, 2.5g/kg)을 경구투여 후 체중변화, 사료 및 음수 섭취량, 혈중지질(TG), 주요 장기(간, 신장, 비장, 폐)의 절대 및 상대 장기 중량, 복막후 지방(Retroperitoneal fat fad), 정소상체 지방(Epididymal fat fad) 및 신장 지방피막(perirenal fat fad)의 중량, 정소상체 지방의 크기를 측정하였다.
- [0092] ○ 결과 및 결론: 현대인의 생활과 비슷한 식습관을 제공하기 위해 8주간의 고콜레스테롤, 고지방사료를 급여하면서 프로바이오틱스 균 및 유산균을 이용한 마(산약) 발효물 각각 400mg/kg, 1g/kg, 2.5g/kg를 급여한 래트(Rat)에서 용량 의존적으로 체중이 유의한 차이를 보이며 감소하였으며, 내장지방과 지방세포 크기가 유의하게 감소하였으며, 간 조직 내에 지방의 억제를 볼 수 있었다.
- [0093] 상기 결과는 이후 체중 관련한 바이오 마커를 추가하여 프로바이오틱스 균 및 유산균을 이용한 마(산약) 발효물이 체지방감소에 미치는 영향에 대한 기작을 밝히는 근거가 될 수 있을 것으로 사료된다.
- [0094] I. 시험 재료 및 방법
- [0095] 1. 시험 물질
- [0096] 시험 물질명: 프로바이오틱스 균 및 유산균을 이용한 마(산약) 발효물
- [0097] 2. 시험 물질의 조제
- [0098] Vehicle로서 D.W.를 사용하였으며, 주 1회 체중을 측정하여 각각 400mg/kg, 1g/kg, 2.5g/kg의 농도로 1주일 급여량을 조제하여, 볼텍싱(vortexing)한 후 냉장 보관하였다.
- [0099]
- [0100] 3. 사용동물 및 환경조건
- [0101] (1) 사용동물
- [0102] ① 종 및 계통: Sprague-Dawley 래트(SD Rat)
- [0103] ② 시험계통 선정 이유: 상기 래트는 효능평가 및 독성시험에 적당한 동물로서 효능평가에 널리 사용되고 있다. 본 계통의 래트는 풍부한 시험 기초 자료가 축적되어 있어, 시험결과의 해석 및 평가에 축적된 자료를 이

용하는 것이 가능하다.

- [0104] ③ 구입 시 주령(성별) 및 체중범위: SD 래트 웅성, 6주령, 160 ~ 190g
- [0105] ④ 시험 물질 투여 시 주령(성별) 및 체중범위: SD 래트 웅성, 7주령, 190 ~ 240g
- [0106] ⑤ 검역순화 방법 및 기간: 입수 시 모든 동물의 일반 건강상태에 대한 수의학적 검역을 실시하였다. 시험 실시에 적합하도록 1주일간의 순화기간을 두었다.
- [0107] ⑥ 군 분리 및 개체식별: 군간 체중을 균일하게 하였으며, 개체식별을 위하여 꼬리에 유성펜으로 표시하였다.
- [0108] (2) 환경조건
- [0109] ① 동물실명: 101호 사육실
- [0110] ② 사육상자(종류 및 크기) 및 사육 동물 수: 폴리셀폰 사육상자(쓰리샤인㈜)에 5마리씩 수용하였다.
- [0111] ③ 온도 및 습도: 22±2℃, 50±5%로 유지
- [0112] ④ 환기 횟수: 10회/시간, 전 배기 방식
- [0113] ⑥ 조명시간 및 명암주기: 12hr 점등/12hr 소등(오전 7시 ~ 오후 7시 조명)
- [0114] ⑦ 조도: 150 ~ 300 Lux

[0115] 4. 시험군의 구성

표 1

시험군	동물 수	급여 용량
정상 대조군	10	주간 체중 근거
고콜레스테롤, 비만 유도군	10	주간 체중 근거
고콜레스테롤, 비만 + 저농도군	10	마 발효물 400mg/kg
고콜레스테롤, 비만 + 중농도군	10	마 발효물 1g/kg
고콜레스테롤, 비만 + 고농도군	10	마 발효물 2.5g/kg

표 2

[0117] 고콜레스테롤, 고지방 사료의 조성

구성분	mg	kcal
카제인	75	300
콩단백질	130	520
DL-메티오닌	2	8
옥수수 전분	275	1100
말토덱스트린 10	150	600
서당	30	120
셀룰로오스	90	0
대두유	50	450
코코아버터	75	675
코코넛유	35	315
미네랄믹스	35	0
탄산칼슘	5.5	0
염화나트륨	8	0
구연산칼슘	10	0
비타민 혼합물	10	40
타타르산수소칼륨	2	0
콜레스테롤	12.5	0
콜산나트륨	5	0
합	1000.1	4128

[0118] 5. 시험 방법

[0119] 1) 체중 변화량 측정

[0120] 각 군별로 1주일 간격으로 측정하였으며, 체중 측정일 전에 사료 및 물의 정량을 급여한 후 익일에 측정하였다.

[0121] 2) 혈중 TG 측정

[0122] 에테르(Ether) 마취 후 개복한 뒤 복대동맥에서 10mL을 채혈하여, 3000rpm 20분간 원심 분리하여 혈청을 분리한 뒤, -70℃에 보관한 후 (재)UB의학연구소에 검사 의뢰하였다.

[0123] 3) 주요 장기의 절대 및 상대 장기 중량

[0124] 에테르 마취 후 개복한 뒤 간, 신장(좌, 우), 비장 및 폐를 적출하여 각각의 무게를 측정하였다.

[0125] 4) 지방 무게 측정

[0126] 지방의 축적에 미치는 영향을 알아보기로 복막후 지방(Retroperitoneal fat fad), 정소상체 지방(Epididymal fat fad), 신장 지방피막(perirenal fat fad)을 적출하여 중량을 측정하였다.

[0127] 5) 간, 지방세포 크기 측정

[0128] 실험동물의 희생 후 복막후 지방(Retroperitoneal fat fad)의 무게를 측정된 뒤 일정 크기로 절편하여 가위로 한번에 잘라 10% 포르말린 용액에 고정시켜, 파라핀으로 포맷한 후에 헤마톡실린-에오신(hematoxylin-eosin)으로 염색하였다. 영상분석기(Image analyser)를 이용하여 100배의 시야에서 일정 크기를 지정한 후, 지방세포를 관찰하여 지방세포의 수를 측정하였다.

[0129]

[0130] 6. 통계처리

[0131] 통계 프로그램은 SPSS v12를 이용하여 One-way ANOVA(Duncan's multiple range test)를 이용하여 비교하였으며 p<0.05 이하일 때 유의한 수준으로 판단하였다.

[0132]

[0133] II. 시험 결과

[0134] 1. 체중의 변화

표 3

체중의 변화 (평균±표준편차, n=10)

[0135]

	개시 체중	최종 체중	증체율(%)
정상 대조군	208.5	394.3±12.3 ^b	89
음성 대조군	211.5	432.3±9.28 ^a	104
400mg/kg 급여	211	437.9±14.14 ^a	107
1g/kg 급여	210.5	447.2±6.79 ^a	112
2.5g/kg 급여	210.5	394.7±9.58 ^b	87

a,b: 실험 집단과의 유의 차 p<0.05
증체율 : (최종체중-개시체중)/개시체중 x 100

[0136] 8주간의 고콜레스테롤 및 고지방 사료를 급여하며, 실험기간 동안 프로바이오틱스 균 및 유산균을 이용한 마(산 약) 발효물을 강제 경구 투여하여 체중의 변화량을 관찰한 결과, 음성 대조군에서의 432.3±9.28g에 비해 2.5g/kg 투여군에서는 394.7±9.58g으로 유의한 감소를 나타내었다.

[0137] 2. 혈중 트리글리세라이드(Triglyceride)의 측정

[0138] 혈중 트리글리세라이드 함량의 변화에 있어서, 정상 대조군에 비하여 고콜레스테롤, 고지방이 함유된 사료를 급여한 식이군에서 유의한 감소를 보였다.

[0139] 이는 실험식이 사료에 함유된 대두유(soybean oil)가 지방을 연소하여 에너지로 전환시키는 특성이 영향을 미쳤을 것으로 사료된다.

[0140] 3. 간 및 지방 무게 측정

표 4

간 및 지방 무게

[0141]

	간	RFP	EFP	PPF	복부지방
정상 대조군	10.47±0.29 ^c	3.83±0.87	4.73±0.76	1.29±0.4	9.74±0.67 ^{ab}
음성 대조군	19.93±0.7 ^a	5.19±1.45	5.84±1.32	1.57±0.53	12.58±1.04 ^a
400mg/kg 급여	18.68±1.03 ^{bc}	5.26±1.93	6.39±2.06	1.57±0.75	12.64±1.64 ^a
1g/kg 급여	19.88±0.6 ^a	5.02±1.18	6.48±0.88	1.76±0.48	12.8±0.81 ^a
2.5g/kg 급여	16.62±0.87 ^b	3.6±1.29	4.44±0.85	1.21±0.34	8.85±0.8 ^b
a,b: 실험 집단과의 유의 차 p<0.05 (평균±표준편차)					
RFP: 복막후 지방(Retroperitoneal fat fad)					
EFP: 정소상체 지방(Epididymal fat fad)					
PPF: 신장 지방피막(perirenal fat fad)					

[0142] 8주간의 실험식이 투여 후 회생시켜 측정된 간의 중량에 있어서 2.5g/kg 급여군이 16.62±0.87g으로써 음성 대조군 19.93±0.7g에 비하여 유의하게 감소하였으며, 복막후 지방(Retroperitoneal fat fad), 정소상체 지방(Epididymal fat fad) 및 신장 지방피막(perirenal fat fad)을 합한 지방의 무게가 음성 대조군 12.58±1.04g에 비하여 2.5g/kg 급여군에서 8.85±0.8g으로 유의하게 감소한 것으로 나타났다.

[0143] 4. 지방세포수의 측정

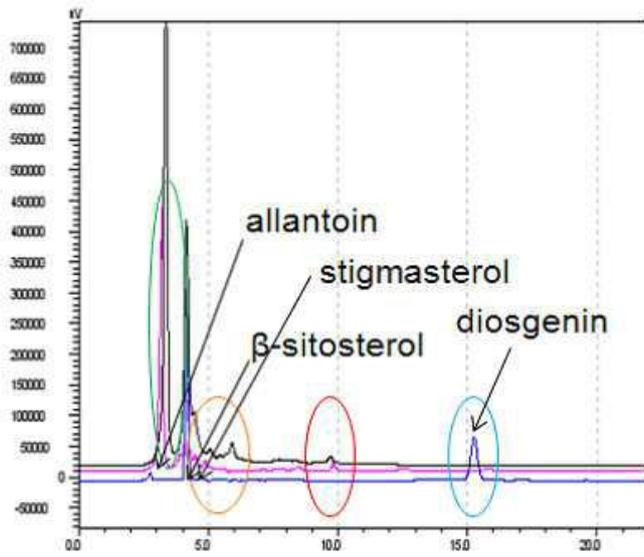
[0144] 현미경 시야 200배 상에서 촬영하여 일정 크기의 픽셀을 설정한 뒤, 지방세포의 수를 측정된 결과 실험 식이군에서 용량 의존적으로 증가하였으며, 2.5g/kg 급여군에서 음성 대조군에 비하여 유의하게 증가하였다. 이는 일정 크기에서의 세포수는 지방세포의 크기가 증가하지 않아 많은 수가 측정된 것임을 반영한 것이다.

[0145] 5. 간조직의 현미경 관찰

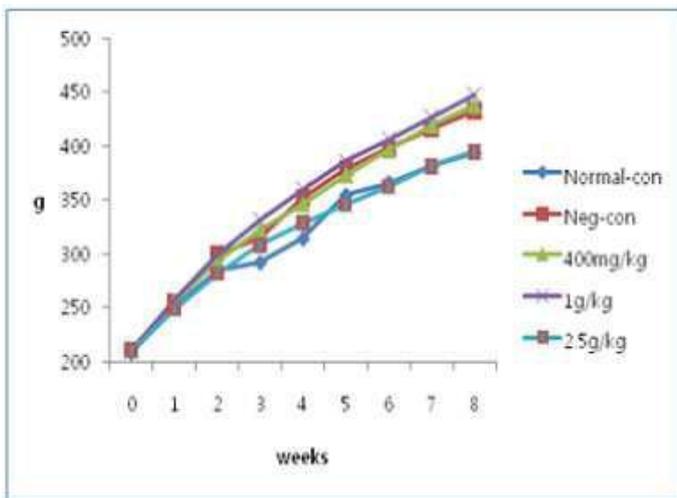
[0146] 정상 대조군에서는 중심 정맥 주변으로 정상적인 간세포 모양을 볼 수 있었다(도 5a). 음성 대조군에서는 중심 정맥 주변으로 간세포의 세포질에 지방적(fatty droplet)이 다량 침착되어 공포 형태로 간세포들이 심하게 변성되어 있는 것을 볼 수 있었다 (도 5b). 400mg/kg 급여군에서는 중심 정맥 주변으로 간세포의 세포질에 지방적의 침착 정도가 음성 대조군에 비해 적게 침착되어 있는 것을 볼 수 있었다 (도 5c). 2.5g/kg 급여군에서는 중심 정맥 주변으로 간세포의 세포질에 지방적의 침착 정도가 음성 대조군에 비해 현저하게 감소되어 있으며, 간세포의 모양과 형태가 정상 대조군의 형태로 유지되고 있는 것을 볼 수 있었다 (도 5d).

도면

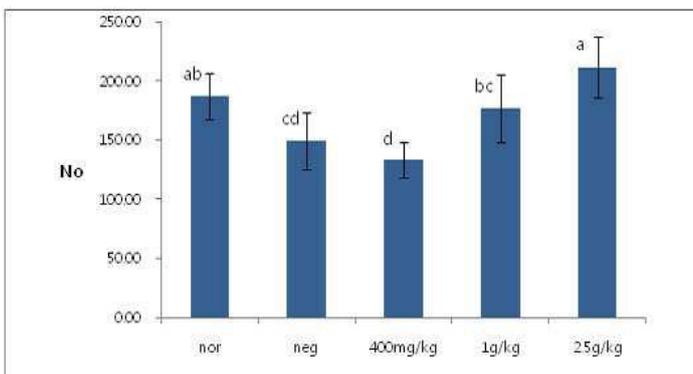
도면1



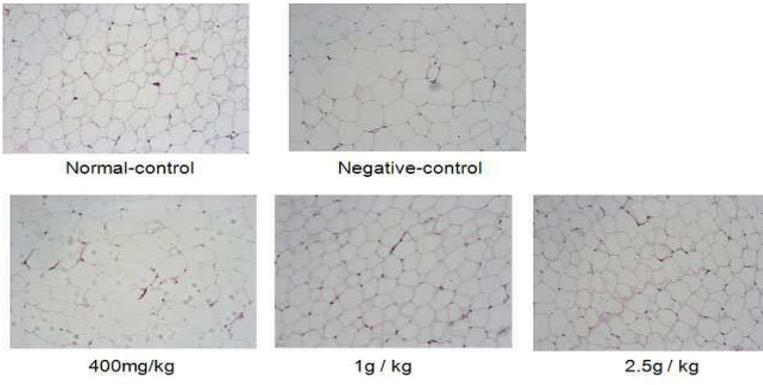
도면2



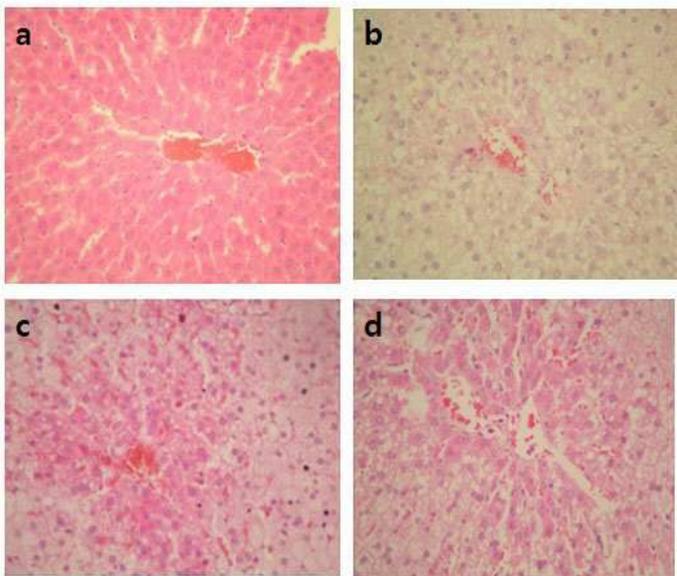
도면3



도면4



도면5



도면6

