(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2020년12월01일
(11) 등록번호 10-2185132
(24) 등록일자 2020년11월25일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A23L 33/105 (2016.01) *A23L 13/20* (2016.01)
A23L 29/00 (2016.01)
(52) CPC특허분류
A23L 33/105 (2016.08)
A23L 13/20 (2016.08)
(21) 출원번호 10-2020-0069240
(22) 출원일자 2020년06월08일
심사청구일자 2020년06월08일
(56) 선행기술조사문헌
KR101679388 B1*
KR1020090041630 A
KR101776686 B1
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
주식회사 한국야쿠르트
서울특별시 서초구 강남대로 577 (잠원동)
(72) 발명자
정성은
서울특별시 송파구 송이로15길 31, 102동 603호
김성환
서울특별시 중랑구 중랑천로 43 신성아파트 102동 1003호
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인 피씨알

전체 청구항 수 : 총 5 항 심사관 : 김현주

(54) 발명의 명칭 **녹용 추출물의 유산균 발효물**

(57) 요 약

본 발명은 녹용 추출물의 유산균 발효물에 관한 것으로, 구체적으로는 녹용 추출물의 유산균 발효물 제조방법 및 이로부터 제조된 녹용 추출물의 유산균 발효물에 관한 것이다. 본 발명에 따른 제조방법은 녹용 추출물의 기능성 성분인 시알산, 우론산 등의 함량을 현저히 높일 수 있으므로, 상기 제조방법으로부터 제조된 유산균 발효물은 일반 식품, 건강기능식품 또는 약학적 조성물 등으로 폭넓게 활용 가능하다.

(52) CPC특허분류

A23L 29/065 (2016.08)

A23V 2002/00 (2013.01)

A23V 2300/08 (2013.01)

A23V 2300/14 (2013.01)

A23Y 2220/00 (2013.01)

(72) 발명자

이하예라

서울특별시 관악구 관악로 304, 104동 1501호

허건

경기도 수원시 영통구 센트럴타운로 85 번길

이정열

경기도 양평군 서종면 통점길 63

심재헌

경기도 용인시 기흥구 탑실로 152, 213-901호

명 세 서

청구범위

청구항 1

녹용 추출물을 균주로 발효시키는 단계를 포함하며,

상기 균주는 락토바실러스 커바투스(*Lactobacillus curvatus*) HY7602 (수탁번호: KCTC 14154BP) 및 엔테로코커스 파시움(*Enterococcus faecium*) HY5004 (수탁번호: KCTC 14153BP)으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상인 것인, 녹용 추출물의 유산균 발효물 제조방법.

청구항 2

청구항 1에 있어서,

상기 녹용 추출물은 물, 탄소수 1 내지 4의 알코올, 또는 이들의 혼합물을 용매로 하여 추출한 것인, 방법.

청구항 3

삭제

청구항 4

청구항 1에 있어서,

상기 균주의 사용량은 10^6 내지 10^{12} CFU/mL인 것인, 방법.

청구항 5

청구항 1에 있어서,

상기 발효시키는 단계는 녹용 추출물과 균주를 30 내지 60℃에서 1 내지 48시간 동안 배양하는 것인, 방법.

청구항 6

청구항 1의 방법으로 제조된 녹용 추출물의 유산균 발효물.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 녹용 추출물의 유산균 발효물에 관한 것으로, 구체적으로는 녹용 추출물의 유산균 발효물 제조방법 및 이로부터 제조된 녹용 추출물의 유산균 발효물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0003] 녹용(velvet antler)은 사슴, 순록 등 사슴과(*Cervidae*) 동물의 성장 단계에 있는 뿔로서, 각질화되기 전에 채취하여 건조시킨 것이다. 녹용은 예로부터 원기회복, 식욕 증진의 목적으로 사용되어 왔으며, 동의보감 등을 통해 알려진 녹용의 효능으로는 빈혈치료, 간기능 개선, 동맥경화방지, 골다공증 억제, 만성피로회복, 및 당뇨병 개선등이 있다. 녹각은 녹용이 각질화된 뿔로서, 흔히 녹용의 대용으로 사용되고 있으나 그 효능은 녹용보다 낮은 것으로 알려져 있다. 녹용 내에는 시알산(sialic acid), 헬소스(hexose), 펜토스(pentose), 헥소아민

(hexoamine), 우론산(uronic acid), 프로스타글란딘, 및 강글리오사이드(ganglioside) 등 다양한 기능성 물질이 함유된 것으로 알려져 있다.

[0004] 시알산은 뉴라민산(neuraminic acid) 유도체들의 통칭으로 대부분이 글리코시드에 결합된 형태로 존재한다. 시알산은 그 자체로도 기능성 물질이며 강글리오사이드의 지표 물질로 알려져 있다.

[0005] 강글리오사이드는 면역력 강화, 항암효과, 혈액순환, 기억력 향상, 관절건강 등에 효능이 있는 기능성 물질로 알려져 있다. 강글리오사이드는 스핑고신(sphingosine), 지방산, 복합 다당이 결합된 것으로 적어도 한분자의 시알산을 함유하고 있다. 따라서, 시알산의 함량 측정은 강글리오사이드 함량을 간접적으로 알 수 있다. 강글리오사이드는 구조에 따라 GM1(monosialotetrahexosylganglioside), GM2, GM3, GD1a, GT1b 등 다양한 형태로 분류된다.

[0006] GAG(glycosaminoglycan)은 이당류 유닛이 반복된 구조를 가지며 음전하를 띈 폴리사카라이드로서 피부, 연골 등 결합조직의 구성성분이다. GAG은 헤파린(heparin), 헤파린황산염(heparan sulfate), 케라틴황산염(keratin sulfate), 히알루로난(hyaluronan), 데르마탄황산염(dermatan sulfate) 등으로 분류된다. s-GAG(sulfated-glycosaminoglycan)은 연골의 주성분이고 관절 영양제로도 사용되는 기능성 성분이다. 콘드로이틴황산(chondroitin sulfate)는 GAG의 주성분이며, 녹용의 총 우론산 (산성 다당)의 88%를 차지하고 있다. 또한 녹용의 벨벳층의 산성 뮤코다당류(acid mucopolysaccaride) 함유량은 건조중량에 대하여 약 0.16%로 비교적 소량에 불과하며 녹용의 벨벳층의 뮤코단백질(mucoprotein) 중 산성 뮤코다당류가 차지하는 비율은 약 1.8%로 보고되고 있다. 이와 같이 우론산은 녹용 GAG의 구성성분으로 알려져 있으며, 발효에 따른 우론산, GAG 함량 증가는 곧 조골세포 성장 촉진, 골다공증 예방 및 관절염 치료 효과 증진을 예측할 수 있다.

[0007] 이와 같이 녹용은 다양한 기능성 성분을 포함하고 있으나, 종래 가열 추출만으로는 녹용의 기능성 성분이 충분히 추출될 수 없고 인체로의 흡수 효율이 낮은 문제가 있다. 또한, 녹용을 한약으로 이용하기 위해 알코올에 침지하고 세절 시, 녹용의 기능성 성분이 소실되는 문제가 있다. 녹용 추출물을 효소처리 및 발효시키면 기능성 성분의 함량을 증가할 수 있음이 알려져 있다. 대한민국 등록특허 제10-1679388호에 따르면 펙티나아제 및 셀룰라아제를 첨가하고 락토바실러스 균주로 발효시켜 강글리오사이드 및 시알산 함량이 증가된 녹용 발효물이 개시되어 있다. 하지만 기능성 성분의 함량을 더욱 증가시킬 수 있는 균주의 발굴 측면에서 개선의 여지는 여전히 남아있다.

선행기술문헌

특허문헌

[0009] (특허문헌 0001) 대한민국 등록공보 제10-1679388호(2016.11.24)

발명의 내용

해결하려는 과제

[0010] 본 발명의 일 구체예에 따르면, 녹용 또는 녹각 추출물의 유산균 발효물 제조방법 및 이로부터 제조된 녹용 또는 녹각 추출물의 유산균 발효물을 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

[0012] 본 발명의 일 양상은 녹용 추출물을 균주로 발효시키는 단계를 포함하는 녹용 추출물의 유산균 발효물 제조방법을 제공한다.

[0013] 본 발명에서 사용된 용어 "녹용"은 생후 2개월 이내의 골질화되지 않은 사슴과 동물의 뿔을 의미한다. 녹각은 사슴과 동물의 각질화된 뿔로서 한의학상의 약명이다. 상기 제조방법은 녹용 추출물뿐만 아니라 녹각 추출물을 사용할 수도 있다.

[0014] 본 발명에서, 녹용 추출물은 본 발명이 속하는 기술분야에서 공지된 통상적인 방법에 따라 통상적인 온도, 압력 조건하에서 통상적인 용매를 사용하여 추출할 수 있다.

[0015] 일 구체예에 따르면, 상기 녹용 또는 녹각 추출물은 물, 탄소수 1 내지 4의 알코올, 또는 이들의 혼합물을 용매

로 하여 추출한 것일 수 있다. 예를 들면, 용매로 물을 사용하거나, 또는 메탄올, 에탄올, 프로판올, 부탄올, 에틸렌글리콜, 프로필렌글리콜, 1,3-부틸렌글리콜, 에틸아세테이트 및 아세톤으로 이루어진 군에서 선택된 1종 또는 2종 이상의 용매를 혼합한 용매를 사용할 수 있다. 바람직하게는, 용매는 물, 에탄올, 또는 이들의 혼합물일 수 있다.

[0016] 이때, 용매의 사용량은 녹용 또는 녹각 대비 1 내지 60배, 10 내지 50배, 20 내지 40배, 또는 30배일 수 있다.

[0017] 상기 녹용 추출물의 추출은 열탕 추출, 열수 추출, 냉침 추출, 환류 추출, 초음파 추출 등 다양한 방법을 이용하여 추출할 수 있다. 추출 조건은 추출 방법에 따라 조절될 수 있으며, 온도는 60 내지 120℃, 70 내지 110℃, 80 내지 100℃, 또는 90℃일 수 있고, 시간은 1 내지 5시간, 2 내지 4시간, 또는 3시간일 수 있으나, 특별히 한정되는 것은 아니다. 이후, 추출된 녹용 추출물은 여과, 농축, 및 건조 과정 중 하나 이상을 수행하여 추출물 내 함유된 용매를 제거할 수 있으며, 필요에 따라 여과, 농축, 및 건조 과정을 모두 수행할 수 있다. 예를 들면, 여과는 여과지에 의한 여과, 감압 여과기를 이용한 감압 여과를 수행할 수 있으며, 농축은 감압 농축법을 수행할 수 있고, 건조는 동결 건조법을 수행할 수 있으나, 특별히 한정되는 것은 아니다.

[0018] 본 발명에서 사용된 용어 "발효"는 미생물 및 이들의 효소로 유기물을 분해하여 유용한 물질을 생성하는 과정을 의미하며, 발효 과정에 의해 생성된 물질을 발효물이라고 한다.

[0019] 본 발명에서, 발효시키는 단계는 균주를 접종하거나, 또는 균주 배양액을 첨가하고 배양하는 방법으로 수행할 수 있다.

[0020] 일 구체예에 따르면, 상기 균주는 락토바실러스 커바투스(*Lactobacillus curvatus*) 및 엔테로코커스 파시움(*Enterococcus faecium*)으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상인 것일 수 있다. 바람직하게는, 락토바실러스 커바투스 HY7602 또는 엔테로코커스 파시움 HY5004일 수 있다. 상기 락토바실러스 커바투스 HY7602 (수탁번호: KCTC 14154BP) 및 엔테로코커스 파시움 HY5004 (수탁번호: KCTC 14153BP)는 본 발명자에 의해 시알산 함량 증가 효과가 우수한 균주로 선발된 것으로, 한국생명공학연구원에 2020년 3월 11자로 기탁한 것이다.

[0021] 일 구체예에 따르면, 상기 2종의 균주를 사용할 경우, 균주의 혼합 비율은 락토바실러스 커바투스 HY7602 : 엔테로코커스 파시움 HY5004 = 1 : 0.1 ~ 2의 중량비, 1 : 0.5 ~ 1.5의 중량비, 또는 1 : 1의 중량비일 수 있다.

[0022] 일 구체예에 따르면, 상기 균주의 사용량은 10^6 내지 10^{12}, 10^7 내지 10^{11}, 10^8 내지 10^{10}, 또는 10^9일 수 있으며, 이때 단위는 CFU/mL 또는 CFU/g일 수 있다.

[0023] 일 구체예에 따르면, 상기 균주의 사용량은 녹용 추출물의 전체 부피에 대하여 0.01 내지 10%(v/v), 0.05 내지 5%(v/v), 0.1 내지 1%(v/v), 또는 0.5%(v/v)일 수 있다.

[0024] 일 구체예에 따르면, 상기 발효의 조건에서, 온도는 30 내지 60℃, 35 내지 55℃, 또는 37℃일 수 있다. 시간은 1 내지 72시간, 2 내지 60시간, 4 내지 48시간, 또는 6 내지 36시간 배양하는 것일 수 있다.

[0026] 또한, 본 발명의 다른 양상은 상기 녹용 추출물의 유산균 발효물 제조방법으로 제조된 녹용 추출물의 유산균 발효물을 제공한다.

[0027] 상기 녹용 추출물의 유산균 발효물은 녹용 추출물 대비 시알산, s-GAG 및 우론산의 함량이 증진된 것일 수 있다.

[0028] 일 실시예에 따르면, 상기 유산균 발효물의 시알산 함량 증가율은 녹용 추출물 대비 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 또는 50% 이상일 수 있다.

[0029] 일 실시예에 따르면, 상기 유산균 발효물의 시알산 함량은 20 ㎍/mL, 30 ㎍/mL, 40 ㎍/mL, 50 ㎍/mL, 60 ㎍/mL, 70 ㎍/mL, 80 ㎍/mL, 또는 90 ㎍/mL 이상일 수 있다.

[0030] 일 실시예에 따르면, 상기 유산균 발효물의 우론산 함량 증가율은 녹용 추출물 대비 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 또는 100% 이상일 수 있다.

[0031] 일 실시예에 따르면, 상기 유산균 발효물의 우론산 함량은 20 ㎍/mL, 30 ㎍/mL, 40 ㎍/mL, 50 ㎍/mL, 60 ㎍/mL, 70 ㎍/mL, 80 ㎍/mL, 또는 90 ㎍/mL 이상일 수 있다.

발명의 효과

[0033] 본 발명의 일 구체예에 따른 녹용 추출물의 유산균 발효물 제조방법은 녹용 추출물의 기능성 성분인 시알산, 우

론산 등의 함량을 현저히 높일 수 있으므로, 상기 제조방법으로부터 제조된 유산균 발효물은 일반 식품, 건강기능식품 또는 약학적 조성물 등으로 폭넓게 활용 가능하다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0035] 이하 하나 이상의 구체예를 실시예를 통해 보다 상세하게 설명한다. 그러나, 이들 실시예는 하나 이상의 구체예를 예시적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0037] **실시예 1: 녹용 추출물의 발효 균주 탐색**

[0038] **1-1. 발효 균주 탐색**

[0039] 녹용을 90℃에서 3시간 동안 30배수의 물로 열수 추출하여 녹용 추출물을 준비하였다. 준비된 녹용 추출물에 한천(agar) 1.5%를 첨가하여 녹용 고체 배지를 제작하고, 후보 미생물군을 녹용 고체 배지에 도말(streaking)하여 콜로니가 원활히 형성된 12 종류의 균을 선별하였다. 후보 미생물은 하기 표 1에 기재되었다.

표 1

[0040]

번호	균주명
1	*Lactobacillus fermentum*
2	*Lactobacillus brevis*
3	*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*
4	*Lactobacillus curvatus*
5	*Lactobacillus curvatus*
6	*Enterococcus faecium*
7	*Enterococcus faecium*
8	*Enterococcus faecium*
9	*Enterococcus faecium*
10	*Enterococcus faecium*
11	*Enterococcus faecium*
12	*Enterococcus faecium*
13	*Enterococcus faecium*

[0042] **1-2. 균주별 시알산 함량 변화 확인**

[0043] 녹용 추출물에 각 균주 10^8 CFU/mL를 접종하여 37℃에서 36시간 동안 배양시키고 발효물의 시알산 함량을 분석하였다. 대조군으로는 균주를 처리하지 않은 녹용 추출물을 사용하였다.

[0044] 시알산 함량 분석은 식품업계에서 주로 사용하는 Sialic acid fluorescence labeling kit(Takara, Cat. #4400)을 사용하여 분석하였다. 실험방법은 키트에 동봉된 기본 절차를 따랐다. 구체적으로 EP 튜브에 녹용 추출물 시료를 100 ㎕, 25 mM HCl 100㎕를 넣고, 80 내지 100℃로 heat block 하였다. 시료를 식히고, 튜브에 식힌 시료 50 ㎕와 혼합용액 200 ㎕ (DMB 용액:coupling 용액:증류수 = 1:5:4)를 담고 50℃에서 2.5시간 동안 반응시켰다. 5분간 냉각시켜 반응을 종료시키고 HPLC로 시알산 함량을 측정하였다.

[0045] 그 결과는 하기 표 2와 같으며, 이를 기초로 시알산 함량의 증가 효과가 우수한 1번, 4번, 9번 및 13번 균주를 선발하였다.

표 2

[0046]

번호	균주명	농도	대조군 대비 증감율 (%)
0	대조군	56.24	-
1	*Lactobacillus fermentum*	59.33	5.49
2	*Lactobacillus brevis*	57.12	1.56
3	*Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*	49.43	-12.11
4	*Lactobacillus curvatus*	65.03	15.63

5	*Lactobacillus curvatus*	54.39	-3.29
6	*Enterococcus faecium*	44.14	-21.51
7	*Enterococcus faecium*	59.67	6.10
8	*Enterococcus faecium*	60.24	7.11
9	*Enterococcus faecium*	63.12	12.23
10	*Enterococcus faecium*	56.11	-0.23
11	*Enterococcus faecium*	59.81	6.35
12	*Enterococcus faecium*	54.36	-3.34
13	*Enterococcus faecium*	73.52	30.73

[0048] **1-3. 4종 균주 발효시 시알산 함량 변화 비교**

[0049] 선발된 4종의 균주를 이용하여 1-2와 동일한 방법으로 다시 발효를 수행하여 발효물의 시알산 함량을 측정하였다. 각 균주의 0시간째 시료는 대조군으로서 균주를 접종하지 않은 녹용 추출물을 사용하였다. 그 결과는 하기 도 3과 같다.

표 3

[0050]

시료명		함량 (ug/mL)	대조군 대비 증감율 (%)
1번 *L. fermentum*	0h	56.24	-
	36h	59.33	5.49
4번 *L. curvatus*	0h	56.24	-
	36h	70.01	24.48
9번 *E. faecium*	0h	56.24	-
	36h	70.03	24.52
13번 *E. faecium*	0h	56.24	-
	36h	73.52	30.73

[0052] 실험 결과, 36시간 경과하였을 때 균주 4번, 9번 및 13번은 균주 1번 대비 시알산 함량이 많았다. 특히 13번은 시알산 함량이 약 31% 증가한 것으로, 동일 종의 균주 9번에 비해 시알산 함량이 많았다. 따라서, 균주 4번 *L. curvatus* HY7602 (수탁번호 KCTC 14154BP) 및 13번 *E. faecium* HY5004 (수탁번호 KCTC 14153BP)을 최종 후보균으로 선정하고 2020년 3월 11일에 한국생명공학연구원에 기탁하였다.

[0054] **실시예 2: 녹용 추출물에 대한 균주별 기능성 물질 함량 증가 확인**

[0055] **2-1. 시알산 함량**

[0056] 실시예 1-2와 동일한 방법으로, 녹용 추출물에 균주 *L. curvatus* HY7602 또는 *E. faecium* HY5004 10^8 CFU/mL를 접종하여 균주 발효에 의한 시알산 함량을 분석하였다. 각 균주의 0시간째 시료는 대조군으로서 균주를 접종하지 않은 녹용 추출물을 사용하였다.

[0057] 시알산 함량은 실시예 1-2와 동일한 방법으로 측정하였고, 그 결과는 하기 표 4와 같다.

표 4

[0058]

시료명		함량 (μg/mL)	대조군 대비 증감율 (%)
L. curvatus HY7602	0h	58.49	-
	36h	61.60	5.32
	48h	65.03	11.18
E. faecium HY5004	0h	63.01	-
	36h	72.50	15.06
	48h	73.52	16.68

[0060] 실험 결과, *L. curvatus* HY7602 및 *E. faecium* HY5004 모두 시간에 따라 시알산 함량을 증가하는 것으로 확인

되었다.

[0062] 2-2. 우론산 함량

[0063] 실시예 1-2와 동일한 방법으로, 녹용 추출물에 균주 *L. curvatus* HY7602 또는 *E. faecium* HY5004 10^8 CFU/mL를 접종하여 균주 발효에 의한 우론산 함량을 분석하였다. 각 균주의 0시간째 시료는 대조군으로서 균주를 접종하지 않은 녹용 추출물을 사용하였다.

[0064] 우론산 함량은 다음과 같은 방법으로 수행하였다. 먼저, EP 튜브에 H_2SO_4/sodium tetrabrorate solution 1.2 mL를 담고, 시료 200 ㎕를 분주하였다. 가볍게 vortexing하고 얼음에 둔 후, 5분간 100℃의 물에 중탕 처리하였다. 다시 얼음에 두어 10분간 냉각하고 m-hydroxydiphenyl (염색 시약)을 20 ㎕ 첨가하였다. Microplate에 200 ㎕를 분주하고 520 nm에서 흡광도를 측정하였다. 그 결과는 표 5와 같다.

[0065]

표 5

시료명		함량 (㎍/mL)	대조군 대비 증감율
L. curvatus HY7602	0h	117.667	-
	36h	163.079	39%
E. faecium HY5004	0h	117.667	-
	36h	202.816	72%

[0067] 실험 결과, *L. curvatus* HY7602 및 *E. faecium* HY5004 모두 우론산 함량을 증가하는 것으로 확인되었으며, 우론산 함량이 대조군 대비 약 39%, 72% 가량 증가하였다.

[0069] 이제까지 본 발명에 대하여 그 바람직한 실시예들을 중심으로 살펴보았다. 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자는 본 발명이 본 발명의 본질적인 특성에서 벗어나지 않는 범위에서 변형된 형태로 구현될 수 있음을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 개시된 실시예들은 한정적인 관점이 아니라 설명적인 관점에서 고려되어야 한다. 본 발명의 범위는 전술한 설명이 아니라 특허청구범위에 나타나 있으며, 그와 동등한 범위 내에 있는 모든 차이점은 본 발명에 포함된 것으로 해석되어야 할 것이다.

수탁번호

[0071]

기탁기관명 : 한국생명공학연구원

수탁번호 : KCTC14153BP

수탁일자 : 20200311

기탁기관명 : 한국생명공학연구원

수탁번호 : KCTC14154BP

수탁일자 : 20200311