



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2018년01월25일
(11) 등록번호 10-1822024
(24) 등록일자 2018년01월19일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A23L 33/00 (2016.01) A23L 19/10 (2016.01)
A23L 2/38 (2006.01) A23L 29/00 (2016.01)
A23L 33/105 (2016.01)
(52) CPC특허분류
A23L 33/00 (2016.08)
A23L 19/10 (2016.08)
(21) 출원번호 10-2017-0105405
(22) 출원일자 2017년08월21일
심사청구일자 2017년08월21일
(56) 선행기술조사문헌
KR1020130142707 A*
KR1020140140899 A*
KR1020130085970 A*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
주식회사한국야쿠르트
서울특별시 서초구 강남대로 577 (잠원동)
(72) 발명자
안영민
서울특별시 강남구 역삼로11길 15 103호
김용태
경기도 성남시 중원구 원터로75번길 22 진성주택 102호
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
경일호

전체 청구항 수 : 총 10 항

심사관 : 김지연

(54) 발명의 명칭 효소전환과 유산균 발효를 이용한 화합물 K의 함량이 강화된 발효홍삼 농축액의 제조방법 및 그 제조방법에 의해 제조된 발효홍삼 농축액을 유효성분으로 함유하는 제품

(57) 요약

본 발명은 효소전환과 유산균 발효를 이용한 화합물 K의 함량이 강화된 발효홍삼 농축액의 제조방법 및 그 제조방법에 의해 제조된 발효홍삼 농축액을 유효성분으로 함유하는 제품에 관한 것으로서, 2차에 걸친 주정추출과 1차에 걸친 열수추출을 통한 홍삼추출물에 식용가능 효소인 Sumizyme AC와 PYR FLO의 2종의 효소를 사용하고, 비피도박테리움 애니멀리스 락티스(*Bifidobacterium animalis ssp. lactis*) HY8002를 이용하여 발효함으로써 홍삼으로부터 소화율 및 흡수율이 증대된 화합물 K가 강화된 발효홍삼 농축액을 얻을 수 있다.

대표도 - 도1

원료삼 계량	→	홍미삼 : 100 kg
추출	1, 2차	20배 50% 주정 (주정 1,000 L + 정제수 1,000 L) 80℃에서 6시간 추출
	3차	20배 정제수 (정제수 2,000 L) 90℃에서 6시간 추출
냉각	→	40 ~ 50℃로 냉각
여과	→	퍼라이트 여과
농축	→	25 ~ 30 brix로 감압 농축
혼합	→	1, 2 및 3차 추출농축액 혼합
희석	→	추출농축액을 5 brix로 희석
효소 전환	→	50℃에서 72시간 동안 효소 전환
유산균 발효	→	37℃에서 유산균 발효
실활	→	90℃에서 10분 동안 가열
농축	→	70 ~ 80 brix로 감압 농축
살균	→	90℃에서 1시간 동안 가열
포장	→	포장하여 제품화

(52) CPC특허분류

A23L 2/382 (2013.01)
A23L 29/065 (2016.08)
A23L 33/105 (2016.08)
A23V 2002/00 (2013.01)
A23V 2250/2124 (2013.01)
A23V 2300/14 (2013.01)

(72) 발명자

라제현

경기도 수원시 권선구 세화로151번길 36 201호(서
둔동)

최일동

경기도 용인시 기흥구 금화로58번길 10 금화마을주
공4단지아파트 405-1704

안영태

경기도 수원시 권선구 덕영대로1323번길 25-33 우
남아파트 111동 801호

심재현

경기도 화성시 동탄대로시범길 276 우남퍼스트빌
913동 401호

명세서

청구범위

청구항 1

- a) 홍삼에 50% 주정(酒精)을 첨가하여 1차 홍삼 주정추출물을 제조하는 단계;
- b) 상기 a)단계의 1차 주정(酒精) 추출에 사용된 홍삼에 50% 주정(酒精)을 첨가하여 2차 홍삼 주정추출물을 제조하는 단계;
- c) 상기 b)단계의 2차 주정(酒精) 추출에 사용된 홍삼에 정제수를 첨가하여 3차 홍삼 열수추출물을 제조하는 단계;
- d) 상기 a)단계의 1차 홍삼 주정추출물, 상기 b)단계의 2차 홍삼 주정추출물 및 상기 c)단계의 3차 홍삼 열수추출물을 각각 냉각한 후 여과하는 단계;
- e) 상기 d)단계의 각각의 여과액을 25~30브릭스(Brix)까지 감압농축하는 단계;
- f) 상기 e)단계의 각각의 감압농축액을 혼합한 후 정제수를 첨가하여 희석하는 단계;
- g) 상기 f)단계의 희석액에 Sumizyme AC(제조사: ShinNippon, 효소종류: Cellulase, β -glucosidase and Hemicellulase, 효소생산 미생물: *Aspergillus niger*) 및 PYR FLO(제조사: CONNELL BROS, 효소종류: Pectinase and Arabinase, 효소생산 미생물: *Aspergillus niger var*)를 첨가하여 사포닌(saponin)을 전환시키는 단계;
- h) 상기 g)단계의 효소 반응액에 비피도박테리움 애니멀리스 락티스(*Bifidobacterium animalis ssp. lactis*) HY8002 균주(기탁번호: KCTC13279BP)를 접종하여 발효시키는 단계;
- i) 상기 h)단계의 발효액을 가열하여 상기 g)단계의 효소 및 상기 h)단계의 유산균을 불활성화시키는 단계; 및
- j) 상기 i)단계의 효소 및 유산균이 불활성화된 발효액을 70~80브릭스(Brix)까지 감압농축하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 화합물 K가 강화된 발효홍삼 농축액의 제조방법.

청구항 2

삭제

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 홍삼은 6년근 홍미삼인 것을 특징으로 하는 화합물 K가 강화된 발효홍삼 농축액의 제조방법.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 d)단계의 냉각은 40~50℃까지 하며, 여과는 펄라이트(perlite)를 이용하는 것을 특징으로 하는 화합물 K가 강화된 발효홍삼 농축액의 제조방법.

청구항 5

제3항에 있어서,

상기 d)단계의 냉각은 40~50℃까지 하며, 여과는 펄라이트(perlite)를 이용하는 것을 특징으로 하는 화합물 K가 강화된 발효홍삼 농축액의 제조방법.

청구항 6

제1항에 있어서,

상기 f)단계의 회석액 100중량부에 대하여 상기 g)단계의 Sumizyme AC(제조사: ShinNippon, 효소종류: Cellulase, β -glucosidase and Hemicellulase, 효소생산 미생물: *Aspergillus niger*)는 1~2중량부 및 PYR FLO(제조사: CONNELL BROS, 효소종류: Pectinase and Arabinase, 효소생산 미생물: *Aspergillus niger var*)는 0.4~1.4중량부로 첨가되는 것을 특징으로 하는 화합물 K가 강화된 발효홍삼 농축액의 제조방법.

청구항 7

제3항에 있어서,

상기 f)단계의 회석액 100중량부에 대하여 상기 g)단계의 효소 Sumizyme AC(제조사: ShinNippon, 효소종류: Cellulase, β -glucosidase and Hemicellulase, 효소생산 미생물: *Aspergillus niger*)는 1~2중량부 및 PYR FLO(제조사: CONNELL BROS, 효소종류: Pectinase and Arabinase, 효소생산 미생물: *Aspergillus niger var*)는 0.4~1.4중량부로 첨가되는 것을 특징으로 하는 화합물 K가 강화된 발효홍삼 농축액의 제조방법.

청구항 8

제1항의 방법으로 제조된 화합물 K가 강화된 발효홍삼 농축액을 유효성분으로 함유하는 기능성 음료.

청구항 9

제3항의 방법으로 제조된 화합물 K가 강화된 발효홍삼 농축액을 유효성분으로 함유하는 기능성 음료.

청구항 10

제1항의 방법으로 제조된 화합물 K가 강화된 발효홍삼 농축액을 유효성분으로 함유하는 건강기능식품.

청구항 11

제3항의 방법으로 제조된 화합물 K가 강화된 발효홍삼 농축액을 유효성분으로 함유하는 건강기능식품.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 효소전환과 유산균 발효를 이용한 화합물 K의 함량이 강화된 발효홍삼 농축액의 제조방법 및 그 제조방법에 의해 제조된 발효홍삼 농축액을 유효성분으로 함유하는 제품에 관한 것으로서, 보다 상세하게는 홍삼을 2차에 걸친 주정추출과 1차에 걸친 열수추출을 통하여 추출하고, 그 추출물을 식용가능 효소인 Sumizyme AC와 PYR FLO의 2종의 효소로 전환시킨 후, 비피도박테리움 애니멀리스 락티스(*Bifidobacterium animalis ssp. lactis*) HY8002로 발효시킴으로써 다양한 기능의 생체유효성이 높은 화합물 K의 함량이 강화된 발효홍삼 농축액의 제조방법 및 그 제조방법에 의해 제조된 발효홍삼 농축액을 유효성분으로 함유하는 제품에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 인삼 및 홍삼의 효능성분으로 알려진 것은 사포닌(saponin)이다. 인삼 및 홍삼의 사포닌은 배당체의 일종으로 다른 식물에서 발견되는 사포닌과는 다른 특이한 화학구조를 가지고 있으며, 그 효능도 큰 차이가 난다. 인삼 및 홍삼의 사포닌은 타 식물계 사포닌과 구별하기 위해서 인삼(ginseng) 배당체(glycoside)란 의미로 '진세노사

이드(Ginsenoside)'라고 부른다. 최근 분석기술의 발달에 따라 지금까지 30여종의 진세노사이드 화학구조가 밝혀졌다. 이는 서양삼 14종, 중국의 전칠삼 15종에 비해 월등히 많은 종류가 들어있다. 진세노사이드는 담마란(dammarane) 골격을 갖는 배당체에 일종의 화학구조상 R1, R2, R3 자리에 어떤 종류의 당이 몇 개 붙느냐에 따라 디올계(PPD)와 트리올계(PPT)의 진세노사이드 등으로 분류된다. 가공과정 중 이러한 진세노사이드에 높은 압력을 가하거나 효소 첨가, 또는 가열을 하면 당이 일부 떨어져 나가기도 하고 새로운 이중결합이 생기면서 특이한 진세노사이드가 만들어진다. 따라서 인삼의 가공방법에 따라 여러 가지 특이 진세노사이드가 함유된 제품들이 출시되고 있다.

[0005] 인삼 사포닌이 체내에 흡수되기 위해서는 디올계 진세노사이드는 20-O-β-D-글루코피라노실-20(S)-프로토파낙사디올 {20-O-β-D-glucopyranosyl-20(S)-protopanaxadiol, FGM 1, 이하, '화합물 K(Compound K)' 라 함}로, 그리고 트리올계 진세노사이드는 20(S)-프로토파낙사트리올 {20(S)-protopanaxatriol, FGM 4}로 분해된 후 체내에 흡수되면서 효능을 발휘하는데 열이나 산, 압력, 소화효소 등에 의해서는 소량만 전환·흡수될 뿐이다. 최근 연구결과에 따르면 인삼 사포닌이 이러한 최종산물로 전환할 때 장내미생물이 필요하다고 밝혀졌다.

[0007] 경구 복용한 사포닌이 흡수되려면 장내 미생물에 의해 분해되어야 하는데 프리보텔라 오리스(Privotella oris) 균이 사포닌을 대사하는 대표적 균이며 이외에 유산균 등의 여러 가지 유익균이 사포닌 대사에 관여한다. 일반인들 중 인분을 조사해 추정된 연구에서 정상인 중 30%는 사포닌을 대사할 수 있는 균이 전혀 없고, 비록 균이 있는 나머지 70% 중에도 대사 능력에 차이가 있어 디올계와 트리올계 사포닌을 모두 정상적으로 대사할 수 있는 사람은 소수에 지나지 않는다. 특히, 지속적인 항암치료나 약제를 복용하는 경우에는 장내균총이 안정적이지 않으므로 사포닌 대사율이 더 떨어짐이 보고되었다. 이런 면에서 이미 외부에서 장내 미생물로 발효하여 개인의 신체 상황에 관계없이 인삼의 효능성분을 흡수할 수 있는 형태로 전환하여 누구나 효과를 볼 수 있도록 발효 홍삼을 개발하는 것은 매우 바람직하다고 볼 수 있다.

[0009] 지금까지 언급한 바와 같이, 모든 인삼사포닌은 장내 미생물의 분해를 통해 최종 대사물로 대사되어야 흡수된다. 그러나, 사람의 장내 미생물 균총은 균일하지도 않고 시시각각 변하는 것이어서 개인에 따라 인삼 사포닌 흡수율이 다름이 밝혀졌다. 따라서 이것을 극복할 수 있는 방법이 바로 인삼 및 홍삼을 장내 미생물로 발효시켜 직접 체내에 흡수시키는 방안이 있다. 발효 홍삼은 이러한 장내미생물의 차이로 인한 흡수와 효능의 차이를 줄이기 위해 홍삼을 미리 특유 미생물로 발효시킴으로써 흡수가 용이한 유용 사포닌으로 전환하여 개인차·민족차를 극복하여 인삼 효능의 표준화를 이룰 수 있다는 장점이 있다. 이러한 이유 때문에 국내에서 최근 발효 홍삼에 대한 제품이 출시되고 있으며, 이에 대한 효능이 연구되고 있다.

[0011] 발효 홍삼은 사포닌의 균형적인 대사에도 도움을 준다. 디올계 사포닌은 신체를 안정화시키고 면역력을 높이며 지나친 것은 낮추어 정상화시키는 작용이 있다. 트리올계 사포닌의 경우 혈액순환을 좋게 하고 원기를 높이며 활력을 주는 서로 보완하며 상반되는 작용을 가지고 있다. 만약 장내 균총이 불안정하여 디올계와 트리올계 사포닌 중 한 쪽만 대사시키거나 둘 다 대사시키지 못하면 사포닌 흡수에 불균형이 오고, 따라서 인삼을 복용하여도 효과가 떨어질 수 있으며 일부 사람에서는 열이 나거나 답답함 등의 불편한 경험을 하게 된다. 그러나, 외부에서 디올계와 트리올계 사포닌을 균형적으로 대사시켜 신체에 흡수시켰을 경우에는 인삼 및 홍삼이 가지고 있는 본연의 효능을 모두 볼 수 있으며, 그 외 부작용 등이 현저히 줄어든다는 연구결과들이 보고되고 있다.

선행기술문헌

특허문헌

- [0013] (특허문헌 0001) 대한민국 공개특허공보 제10-2013-0142707호(2013.12.30.)
- (특허문헌 0002) 대한민국 공개특허공보 제10-2016-0076851호(2016.07.01.)

발명의 내용

해결하려는 과제

[0014] 본 발명은 홍삼으로부터 효소전환과 유산균을 이용한 발효를 통하여 화합물 K의 함량이 강화된 발효홍삼 농축액을 제조하는 방법 및 그 제조방법에 의해 제조된 발효홍삼 농축액을 유효성분으로 함유하는 제품을 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

- [0016] 상기와 같은 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 a)홍삼에 50% 주정(酒精)을 첨가하여 1차 홍삼 주정추출물을 제조하는 단계; b)상기 a)단계의 1차 주정(酒精) 추출에 사용된 홍삼에 50% 주정(酒精)을 첨가하여 2차 홍삼 주정추출물을 제조하는 단계; c)상기 b)단계의 2차 주정(酒精) 추출에 사용된 홍삼에 정제수를 첨가하여 3차 홍삼 열수추출물을 제조하는 단계; d)상기 a)단계의 1차 홍삼 주정추출물, 상기 b)단계의 2차 홍삼 주정추출물 및 상기 c)단계의 3차 홍삼 열수추출물을 각각 냉각한 후 여과하는 단계; e)상기 d)단계의 각각의 여과액을 25-30브릭스(Brix)까지 감압농축하는 단계; f)상기 e)단계의 각각의 감압농축액을 혼합한 후 정제수를 첨가하여 희석하는 단계; g)상기 f)단계의 희석액에 Sumizyme AC(제조사: ShinNippon, 효소종류: Cellulase, β -glucosidase and Hemicellulase, 효소생산 미생물: *Aspergillus niger*) 및 PYR FLO(제조사: CONNELL BROS, 효소종류: Pectinase and Arabinase, 효소생산 미생물: *Aspergillus niger var*)를 첨가하여 사포닌(saponin)을 전환시키는 단계; h)상기 g)단계의 효소 반응액에 비피도박테리움 애니멀리스 락티스(*Bifidobacterium animalis ssp. lactis*) HY8002 균주(기탁번호: KCTC13279BP)를 접종하여 발효시키는 단계; i)상기 h)단계의 발효액을 가열하여 상기 g)단계의 효소 및 상기 h)단계의 유산균을 불활성화시키는 단계; 및 j)상기 i)단계의 효소 및 유산균이 불활성화된 발효액을 70~80브릭스(Brix)까지 감압농축하는 단계를 포함하는 화합물 K가 강화된 발효홍삼 농축액의 제조방법 및 그 제조방법에 의해 제조된 발효홍삼 농축액을 유효성분으로 함유하는 기능성 음료, 건강기능식품 등을 제공하는 것을 특징으로 한다.
- [0018] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.
- [0019] 본 발명의 화합물 K가 강화된 발효홍삼 농축액의 제조방법은 다음과 같다.
- [0020] 원료삼의 계량
- [0021] 홍삼은 4년근 또는 6년근의 본삼 또는 미삼을 사용한다. 바람직하기로는 6년근 홍미삼을 사용하는 것이 바람직하다.
- [0023] 1차 추출(주정추출)
- [0024] 상기 6년근 홍미삼에 식품원료로 사용할 수 있는 50% 주정(酒精) 2,000L(주정 1,000L + 정제수 1,000L)를 첨가하여 75~85℃에서 5~7시간 동안 추출하여 1차 홍삼 주정추출물을 얻는다.
- [0025] 홍삼 추출 시에 홍삼 무게의 10~20배의 주정을 사용한다고 알려져 있어 진세노사이드 추출수율을 최대로 하기 위해서 홍삼 무게의 20배의 주정을 사용한다.
- [0026] 또한, 진세노사이드 추출수율을 최대로 하기 위하여 75~85℃에서 5~7시간 동안 추출하는 것이 바람직하다.
- [0028] 2차 추출(주정추출)
- [0029] 상기 1차 추출에 사용된 홍미삼에 식품원료로 사용할 수 있는 50% 주정 2,000L(주정 1,000L + 정제수 1,000L)를 다시 첨가하여 75~85℃에서 5~7시간 동안 추출하여 2차 홍삼 주정추출물을 얻는다.
- [0030] 상기 1차 주정 추출 단계에서 대부분(약 80~90%)의 진세노사이드 성분이 추출되지만, 나머지 잔량까지 추출하기 위해 2차 주정추출을 하는 것이 바람직하다.
- [0032] 3차 추출(열수추출)
- [0033] 상기 2차 추출에 사용된 홍미삼에 정제수 2,000L를 첨가하여 85~95℃에서 5~7시간 동안 추출하여 3차 홍삼 열수추출물을 얻는다.
- [0034] 상기와 같이 열수추출을 함으로써 홍삼의 기능성분 중 진세노사이드 이외의 다양한 효능이 알려진 산성 다당체(Acidic Polysaccharide)를 추출할 수 있다.
- [0035] 또한, 산성 다당체의 추출수율을 최대로 하기 위하여 85~95℃에서 5~7시간 동안 추출하는 것이 바람직하다.
- [0037] 냉각 및 여과
- [0038] 상기 1차 및 2차 홍삼 주정추출물과 3차 홍삼 열수추출물 각각을 40~50℃로 냉각한 후 퍼라이트(perlite)를 이용하여 여과한다.
- [0039] 상기와 같이 퍼라이트 여과를 하는 이유는 일반적으로 미세한 현탁물이나 콜로이드 입자를 제거하기 위함으로

진세노사이드 성분은 여과에 의해서 함량의 변화가 없기 때문이다.

[0040] 한편, 상기 각각의 추출물을 40~50℃로 냉각하는 이유는 추출온도인 75~95℃에서는 추출물의 용해도 등의 원인으로 여과 효과가 반감되기 때문이다.

[0042] 감압농축

[0043] 상기 각각의 여과액을 25~30브릭스(Brix)로 감압농축한다.

[0044] 상기와 같이, 감압농축을 하는 이유는 홍삼 주정추출물의 주정을 제거하고, 각 추출물의 보관 및 변질 우려를 낮추기 위함이다.

[0045] 특히, 최소한 25브릭스(Brix)까지 감압농축을 하지 않으면 남아 있는 주정이 효소반응을 저해할 수 있다.

[0047] 혼합 및 희석

[0048] 상기 각각의 감압농축액을 혼합한 후에 효소전환을 위하여 정제수를 첨가하여 5브릭스(Brix)가 되게 희석한다.

[0050] 효소 전환

[0051] 상기 희석액 100중량부에 대하여 Sumizyme AC(제조사: ShinNippon, 효소종류: Cellulase, β -glucosidase and Hemicellulase, 효소생산 미생물: Aspergillus niger) 1~2중량부 및 PYR FLO(제조사: CONNELL BROS, 효소종류: Pectinase and Arabinase, 효소생산 미생물: Aspergillus niger var) 0.4~1.4중량부를 추가로 첨가하여 45~55℃에서 70~74시간 동안 반응시킨다.

[0052] 상기 효소의 첨가량, 반응온도 및 반응시간은 홍삼추출물의 사포닌(saponin) 전환을 위한 최적의 조건이다.

[0053] 특히, 상기 Sumizyme AC 및 PYR FLO의 효소조합 농도가 상기 희석액 100중량부에 대하여 2.4중량부일 때 홍삼추출물의 사포닌(saponin) 전환효율이 최대로 되기 때문에 Sumizyme AC 1~2중량부 및 PYR FLO 0.4~1.4중량부로 첨가되는 것이 바람직하다.

[0055] 유산균 발효

[0056] 상기 효소 반응액 100중량부에 대하여 비피도박테리움 애니멀리스 락티스(*Bifidobacterium animalis ssp. lactis*) HY8002 균주 0.03~0.06중량부를 추가로 접종하여 35~37℃에서 5~7시간 동안 발효시킨다.

[0057] 상기와 같이, 효소 전환 후 유산균 발효를 통하여 잔존하는 진세노사이드 Rb1 → Rd → F2를 거쳐 최종적으로 화합물 K로 전환된다.

[0058] 특히, 풍미 개선 및 화합물 K로의 최적 전환을 위하여 상기 균주를 0.03~0.06중량부로 접종하고, 35~37℃에서 5~7시간 동안 발효시키는 것이 바람직하다.

[0060] 실활

[0061] 상기 유산균 발효액을 85~95℃에서 9~12분 동안 가열하여 상기 효소 2종(Sumizyme AC 및 PYR FLO) 및 비피도박테리움 애니멀리스 락티스(*Bifidobacterium animalis ssp. lactis*) HY8002 균주를 불활성화시킨다.

[0062] 상기와 같이, 효소 및 유산균을 불활성화시키는 이유는 최종적으로 원하는 화합물 K가 프로토파낙사디올(protopanaxadiol; PPD)로 전환되는 것을 막기 위함이다.

[0064] 감압농축

[0065] 상기 효소 및 유산균이 불활성화된 발효액을 70~80브릭스(Brix)가 되게 감압농축한다.

[0066] 상기와 같이, 높은 브릭스로 감압농축하는 이유는 미생물 등에 의한 오염을 예방하기 위함이다.

[0068] 살균 및 포장

[0069] 상기 농축액을 85~95℃에서 0.5~1.5시간 동안 살균한 후 포장하여 본 발명의 화합물 K가 강화된 발효홍삼 농축액을 제조한다. 특히, 완벽한 살균을 위하여 상기 온도 및 시간 동안 살균하는 것이 바람직하다.

[0071] 한편, 본 발명의 화합물 K가 강화된 발효홍삼 농축액을 유효성분으로 함유하는 기능성 음료는 본 발명의 화합물 K가 강화된 발효홍삼 농축액과 혼합과즙시럽 및 물을 일정한 비율로 조합하여 150bar에서 균질한 후 10℃ 이하로 냉각한 후 유리병, 페트병 등 소포장 용기에 포장하여 제조한다.

[0073] 또한, 본 발명의 화합물 K가 강화된 발효홍삼 농축액을 유효성분으로 함유하는 건강기능식품은 화합물 K가 강화된 발효홍삼 농축액을 포함하는 것 이외에 영양보조성분으로서 비타민 B₁, B₂, 판토텐산, B₆, E 및 초산에스테르, 니코틴산 아미드, 올리고당 등이 첨가될 수 있으며 여타의 식품 첨가물이 첨가되어도 무방하다.

발명의 효과

[0075] 본 발명의 화합물 K가 강화된 발효홍삼 농축액은 효소전환과 유산균 발효과정을 통하여 진세노사이드를 변환시킴으로써 인체 내에서 소화 흡수율이 증대된 화합물 K를 다량 함유하고 있는 건강기능식품 또는 식품소재로서 활용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0077] 도 1은 본 발명의 효소전환 및 유산균 발효에 의한 화합물 K가 강화된 발효홍삼 농축액의 제조방법에 관한 공정도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0078] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 보다 상세하게 설명한다. 그러나, 다음의 실시예는 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니며, 본 발명의 기술적 사상의 범위 내에서 당업자에 의한 통상적인 변화가 가능하다.

[0080] <실시예 1>

[0081] 비피도박테리움 애니멀리스 락티스(*Bifidobacterium animalis ssp. lactis*) HY8002 균주의 분리 및 동정

[0082] 홍삼의 발효능을 가진 비피도박테리움 애니멀리스 락티스(*Bifidobacterium animalis ssp. lactis*) HY8002 균주는 건강인의 분변을 취하여 이를 pH 2.3의 완충용액을 이용하여 혐기적으로 희석하여 내산성이 높은 균주의 생존과 선발에 활용하였다. 이렇게 희석된 분변 용액을 비피도박테리움을 분리하는 배지인 BL 한천평판배지에 도말하고 37℃에서 2~3일간 혐기적으로 배양한 후 균주 집락을 분리하였다. 다시 BL 한천평판배지를 이용하여 단일 균주 집락을 분리하는 과정을 거친 후, 인체 내에서 생존하여 유익한 활성을 나타내기 위하여 필요한 내산성 및 내담즙성의 특징을 가진 비피도박테리움 균주를 선발하였다.

[0084] 이하, 선발된 비피도박테리움 애니멀리스 락티스(*Bifidobacterium animalis ssp. lactis*) HY8002 균주의 미생물학적 특성은 다음과 같다.

[0086] (1)균의 형태

[0087] BL 한천평판배지에서 37℃, 48시간 혐기 배양했을 때 균의 형태

[0088] 1) 세포의 형상 : 곤봉형, Y자형 등 다양

[0089] 2) 그람염색 : 양성

[0091] (2)집락의 형태

[0092] BL 한천평판배지에서 37℃, 48시간 혐기 배양했을 때 집락의 형태

[0093] 1) 형상 : 원형

[0094] 2) 크기 : 1~3mm

[0095] 3) 색조 : 유백색

[0097] (3)생리학적 성질

[0098] 1) 생육온도

[0099] 생육범위 : 25~45℃

[0100] 최적온도 : 37~41℃

[0101] 2) 생육 pH

[0102] 생육범위 : pH 2.0~8.0

- [0103] 최적 pH : pH 6.5~7.0
- [0104] 3) 산소의 영향 : 편성 혐기성
- [0105] 4) 보게스 - 프로스카우어(Voges - Proskauer) 반응 : -
- [0106] 5) 카탈라아제 : -
- [0107] 6) 암모니아 생성 : -
- [0108] 7) 유응고성 : -
- [0109] 8) 리트머스 밀크 환원 : -
- [0110] 9) 유래아 분해효소 : -
- [0111] 10) 베타-갈락토오스 분해효소 : +
- [0112] 11) 알파-글루코오스 분해효소 : +
- [0113] 12) 당이용성

표 1

[0114]	당류	이용성	당류	이용성
	자일로오스	-	에스쿨린	+
	아라비노오스	-	살리신	+
	리보오스	+	셀로비오스	+
	아도니톨	-	말토오스	+
	갈락토오스	+	락토오스	+
	D-글루코오스	+	멜리비오스	+
	D-프럭토오스	+	사카로오스	+
	D-만노오스	+	트레할로오스	-
	만니톨	-	이눌린	-
	솔비톨	-	멜레지토오스	-
	알파메틸-D-만노사이드	+	라피노오스	+
	알파메틸-D-글루코사이드	+	스타치	-
	N-아세틸글루코사이드	+	베타-젠티오비오스	+
	아미그달린	+	D-트라노오스	+
	아부틴	+	D-타가토오스	-

[0116] (4)내산성

[0117] 본 발명의 비피도박테리움 애니멀리스 락티스(*Bifidobacterium animalis ssp. lactis*) HY8002 균주를 10ml BL 액체배지에 접종하여 37℃에서 18시간 배양한 후, 이 배양액의 일정량을 다시 pH 2.3의 완충용액에 접종하여 37℃에서 2시간 동안 배양하였다. 상기 배양액의 일정량을 취하여 혐기성 완충용액에 일정비율로 희석하였다. BL 한천평판배지에 상기의 희석액을 일정량 접종한 후 37℃에서 48시간 동안 혐기 배양하여 나타나는 집락수를 계수하였다.

[0119] 그 결과, 본 발명의 비피도박테리움 애니멀리스 락티스(*Bifidobacterium animalis ssp. lactis*) HY8002 균주는 10% 정도의 낮은 사멸율을 보여 산에 대한 강한 내성을 갖고 있음을 알 수 있었다.

[0121] (5)내담즙산성

[0122] 담즙산이 첨가된 BL 한천평판배지에 본 발명의 비피도박테리움 애니멀리스 락티스(*Bifidobacterium animalis ssp. lactis*) HY8002 균주를 백금이로 접종하여 37℃에서 48시간 혐기 배양하여 집락의 생육여부를 관찰하였다.

[0124] 그 결과, 본 발명의 비피도박테리움 애니멀리스 락티스(*Bifidobacterium animalis ssp. lactis*) HY8002 균주는 0.15%(w/v)의 담즙산이 첨가된 배지에서도 생육하여 담즙산에 대한 내성도 지니고 있음을 알 수 있었다.

[0126] (6)분리 및 동정

[0127] 상기 본 발명의 비피도박테리움 애니멀리스 락티스(*Bifidobacterium animalis ssp. lactis*) HY8002 균주를 최

신의 분자생물학적 기법을 이용하여 분류, 동정하고자 16S rDNA 분석을 실시하여 결과를 하기의 표 2에 나타내었다.

[0128] 즉, BL 한천평판배지에서 배양된 본 발명의 비피도박테리움 애니멀리스 락티스(*Bifidobacterium animalis ssp. lactis*) HY8002 균주에서 콜로니를 취하고 이의 DNA를 분리하여 27F(5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3')와 1492R(5'-GGTTACCTTGTACGACTT-3') 프라이머(primer)를 사용하여 PCR 반응[(95℃, 3분) x 1 cycle, (95℃, 30초; 50℃, 30초; 72℃, 90초) x 30 cycles, (72℃, 10분) x 1 cycle]을 수행하였다. 그 결과, 1.5kbp의 증폭산물을 얻은 후 정제하여 시퀀싱(sequencing) 반응을 통해 염기서열을 분석한 결과를 토대로 BLAST 검색결과(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>), 하기의 표 2에 나타내었다.

[0130] 하기의 표 2에서 확인할 수 있는 바와 같이, 본 발명의 균주의 16S rDNA 유전자는 비피도박테리움 애니멀리스 락티스(*Bifidobacterium animalis ssp. lactis*)의 16S rDNA 유전자와 99% 일치하는 것으로 확인되었다.

표 2

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
Bifidobacterium animalis subsp. lactis strain CECT 8145 16S ribosomal RNA gene, partial seq	2732	2732	89%	0.0	99%	KP202873.1
Bifidobacterium animalis subsp. lactis strain BF052, complete genome	2732	10929	89%	0.0	99%	CP009045.1
Bifidobacterium animalis strain A6, complete genome	2732	13661	89%	0.0	99%	CP010433.1
Bifidobacterium animalis subsp. lactis K1DS2 0603, complete genome	2732	13294	89%	0.0	99%	CP007522.1
Bifidobacterium animalis strain RH, complete genome	2732	5464	89%	0.0	99%	CP007755.1
Bifidobacterium animalis subsp. lactis ATCC 27673	2732	10929	89%	0.0	99%	CP003941.1
Bifidobacterium animalis subsp. lactis R12, complete genome	2732	10929	89%	0.0	99%	CP004053.1
Bifidobacterium animalis subsp. lactis BLC1, complete genome	2732	10929	89%	0.0	99%	CP003039.2

[0132]

[0134] 이상의 미생물학적 및 분자생물학적 동정 결과를 토대로 본 발명의 균주는 비피도박테리움 애니멀리스 락티스(*Bifidobacterium animalis ssp. lactis*)로 확인되었으며, 비피도박테리움 애니멀리스 락티스(*Bifidobacterium animalis ssp. lactis*) HY8002로 명명하고, 한국생명공학연구원 생물자원센터에 2017년 5월 31일자로 기탁하였다(기탁번호: KCTC13279BP).

[0136] <실시에 2>

[0137] 본 발명의 화합물 K가 강화된 발효홍삼 농축액의 제조

[0138] 도 1의 공정도에서와 같이 본 발명의 화합물 K가 강화된 발효홍삼 농축액의 제조방법은 다음과 같다.

[0139] (1)원료삼 계량

[0140] 풍기인삼농협에서 구입한 6년근 홍미삼 100kg을 사용하였다.

[0141] (2)1차 추출(주정추출)

[0142] 상기 홍미삼에 식품원료로 사용할 수 있는 50% 주정 2,000L(주정 1,000L + 정제수 1,000L)를 첨가하여 80℃에서 6시간 동안 추출하여 1차 추출물을 얻었다.

[0143] (3)2차 추출(주정추출)

[0144] 상기 1차 추출에 사용된 홍미삼에 식품원료로 사용할 수 있는 50% 주정 2,000L(주정 1,000L + 정제수 1,000L)를 다시 첨가하여 80℃에서 6시간 동안 추출하여 2차 추출물을 얻었다.

[0145] (4)3차 추출(열수추출)

[0146] 상기 2차 추출에 사용된 홍미삼에 정제수 2,000L를 첨가하여 90℃에서 6시간 동안 추출하여 3차 추출물을 얻었다.

[0147] (5)냉각 및 여과

[0148] 상기 각각의 추출물들을 40~50℃로 냉각한 후 퍼라이트(perlite)를 이용하여 여과하였다.

- [0149] (6)농축
- [0150] 상기 각각의 여과액을 25~30브릭스(Brix)로 감압농축하였다.
- [0151] (7)혼합 및 희석
- [0152] 상기 각각의 감압농축액을 혼합한 후에 효소전환을 위하여 정제수를 첨가하여 5브릭스(Brix)가 되게 희석하였다.
- [0153] (8)효소 전환
- [0154] 상기 희석액 100중량부에 대하여 Sumizyme AC(제조사: ShinNippon, 효소종류: Cellulase, β -glucosidase and Hemicellulase, 효소생산 미생물: Aspergillus niger) 1.56중량부 및 PYR FLO(제조사: CONNELL BROS, 효소종류: Pectinase and Arabinase, 효소생산 미생물: Aspergillus niger var) 0.84중량부를 추가로 첨가하여 50℃에서 72시간 동안 반응시켰다.
- [0155] (9)유산균 발효
- [0156] 상기 효소 반응액 100중량부에 대하여 비피도박테리움 애니멀리스 락티스(*Bifidobacterium animalis ssp. lactis*) HY8002 균주(기탁번호: KCTC13279BP) 0.05중량부를 추가로 접종하여 37℃에서 6시간 동안 발효시켰다.
- [0157] (10)실활
- [0158] 상기 유산균 발효액을 90℃에서 10분 동안 가열하여 상기 효소 2종(Sumizyme AC 및 PYR FLO) 및 비피도박테리움 애니멀리스 락티스(*Bifidobacterium animalis ssp. lactis*) HY8002 균주를 불활성화시켰다.
- [0159] (11)농축
- [0160] 상기 효소 및 유산균이 불활성화된 발효액을 70~80브릭스(Brix)가 되게 감압농축하였다.
- [0161] (12)살균 및 포장
- [0162] 상기 농축액을 90℃에서 1시간 동안 살균한 후 포장하여 본 발명의 화합물 K가 강화된 발효홍삼 농축액 87.8kg을 제조하였다.
- [0164] <실시에 3>
- [0165] 본 발명의 화합물 K가 강화된 발효홍삼 농축액을 유효성분으로 함유하는 기능성 음료의 제조
- [0166] 본 발명의 화합물 K가 강화된 발효홍삼 농축액과 혼합과즙시럽으로 구성된 기능성 음료를 제조하는 방법은 다음과 같다.
- [0167] 먼저, 혼합과즙시럽은 액상과당 13중량%, 백설탕 2.5중량%, 갈색설탕 2.5중량%, 혼합과즙농축액 56Brix^o 10.9중량%, 펙틴 1.0중량%, 후레쉬 후르츠 믹스 에센스 0.1중량% 및 정제수 70중량%를 30~35℃에서 교반하여 혼합한 후 UHT 열처리(135℃에서 2초간 살균)한 후 냉각하여 제조하였다.
- [0169] 그리고 상기의 방법으로 제조된 혼합과즙시럽 30.4중량%와 상기 실시예 2의 화합물 K가 강화된 발효홍삼 농축액 0.1중량% 및 나머지 정제수 69.5중량%를 조합하여 150bar에서 균질한 후 10℃ 이하로 냉각한 후 이를 유리병, 페트병 등 소포장 용기에 포장하여 본 발명의 화합물 K가 강화된 발효홍삼 농축액을 유효성분으로 함유하는 기능성 음료를 제조하였다.
- [0171] <실시에 4>
- [0172] 본 발명의 화합물 K가 강화된 발효홍삼 농축액을 유효성분으로 함유하는 건강기능식품의 제조
- [0173] 상기 실시예 2의 화합물 K가 강화된 발효홍삼 농축액 0.1중량%에 영양보조성분(비타민 B₁, B₂, 판토텐산, B₆, E 및 초산에스테르, 니코틴산 아미드) 및 올리고당을 상기 실시예 2의 화합물 K가 강화된 발효홍삼 농축액 100중량부에 대하여 10중량부가 되도록 첨가하여 고속회전 혼합기에서 혼합하였다. 상기 혼합물 100중량부에 대하여 평균 정제수 10중량부를 첨가, 혼합하고 직경 1~2mm의 과립상으로 성형하였다. 상기 성형된 과립은 40~50℃의 진공건조기에서 건조시킨 후 12~14 메쉬(mesh)를 통과시켜 균일하게 과립을 제조하였다. 상기와 같이 제조된 과립은 적당량씩 압출 성형되어 정제 또는 분말로 되거나 경질캡슐에 충전되어 경질캡슐제품으로 제조하였다.

- [0175] <비교예 1>
- [0176] 추출방법을 주정추출 3회로 하고, 효소는 Cytolase PCL5(제조사: DSM, 효소 종류: pectinase, pectin lyase, polygalacturonase and endoarabinase, 효소 생산 미생물: Aspergillus niger), Sumizyme AC(제조사: ShinNippon, 효소 종류: cellulase, beta-glucosidase and hemicellulase, 효소 생산 미생물: Aspergillus niger) 및 Rapidase C80Max(제조사: YC International, 효소 종류: pectinase, 효소생산 미생물: Aspergillus niger)를 사용하며, 유산균은 락토바실러스 사케이(*Lactobacillus sakei*) HY7802를 사용한 것을 제외하고는 상기 실시예 2와 동일한 방법으로 발효홍삼 농축액을 제조하였다.
- [0177] 즉, (1)원료삼 계량
- [0178] 풍기인삼농협에서 구입한 6년근 홍미삼 100kg을 사용하였다.
- [0179] (2)1차 추출(주정추출)
- [0180] 상기 홍미삼에 식품원료로 사용할 수 있는 50% 주정 2,000L(주정 1,000L + 정제수 1,000L)를 첨가하여 80℃에서 6시간 동안 추출하여 1차 추출물을 얻었다.
- [0181] (3)2차 추출(주정추출)
- [0182] 상기 1차 추출에 사용된 홍미삼에 식품원료로 사용할 수 있는 50% 주정 2,000L(주정 1,000L + 정제수 1,000L)를 다시 첨가하여 80℃에서 6시간 동안 추출하여 2차 추출물을 얻었다.
- [0183] (4)3차 추출(주정추출)
- [0184] 상기 2차 추출에 사용된 홍미삼에 식품원료로 사용할 수 있는 50% 주정 2,000L(주정 1,000L + 정제수 1,000L)를 다시 첨가하여 80℃에서 6시간 동안 추출하여 3차 추출물을 얻었다.
- [0185] (5)냉각 및 여과
- [0186] 상기 각각의 추출물들을 40~50℃로 냉각한 후 퍼라이트(perlite)를 이용하여 여과하였다.
- [0187] (6)농축
- [0188] 상기 각각의 여과액을 25~30브릭스(Brix)로 감압농축하였다.
- [0189] (7)혼합 및 회석
- [0190] 상기 각각의 감압농축액을 혼합한 후에 효소전환을 위하여 정제수를 첨가하여 5브릭스(Brix)가 되게 회석하였다.
- [0191] (8)효소 전환
- [0192] 상기 회석액 100중량부에 대하여 효소조합농도 2.4중량부의 Cytolase PCL5, Sumizyme AC 및 Rapidase C80Max 효소조합을 첨가하여 50℃에서 72시간 동안 반응시켰다.
- [0193] (9)유산균 발효
- [0194] 상기 효소 반응액에 김치유래 유산균 락토바실러스 사케이(*Lactobacillus sakei*) HY7802(기탁번호: KCTC12097BP)를 상기 효소 반응액 100중량부에 대하여 0.05중량부를 접종하여 37℃에서 6시간 동안 발효시켰다.
- [0195] (10)실활
- [0196] 상기 발효액을 90℃에서 10분 동안 가열하여 상기 효소 3종(Cytolase PCL5, Sumizyme AC 및 Rapidase C80Max) 및 락토바실러스 사케이(*Lactobacillus sakei*) HY7802 균주를 불활성화시켰다.
- [0197] (11)농축
- [0198] 상기 효소 및 유산균이 불활성화된 발효액을 70~80브릭스(Brix)가 되게 감압농축하였다.
- [0199] (12)살균 및 포장
- [0200] 상기 농축액을 90℃에서 1시간 동안 살균한 후 포장하여 화합물 K가 강화된 발효홍삼 농축액 68kg을 제조하였다.

- [0202] <비교예 2>
- [0203] 유산균을 락토바실러스 사케이(*Lactobacillus sakei*) HY7802 균주 대신 비피도박테리움 애니멀리스 락티스(*Bifidobacterium animalis ssp. lactis*) HY8002 균주를 사용한 것을 제외하고는 상기 비교예 1의 방법에 따라 발효홍삼 농축액을 제조하였다.
- [0205] <비교예 3>
- [0206] 상기의 희석액 100중량부에 대하여 효소조합농도 2.4중량부의 Cytolase PCL5, Sumizyme AC 및 Rapidase C80Max 효소조합을 사용하고, 비피도박테리움 애니멀리스 락티스(*Bifidobacterium animalis ssp. lactis*) HY8002 균주 대신에 락토바실러스 사케이(*Lactobacillus sakei*) HY7802 균주를 사용한 것을 제외하고는 상기 실시예 2와 동일한 방법으로 발효홍삼 농축액 84.5kg을 제조하였다.
- [0208] <비교예 4>
- [0209] 상기의 희석액 100중량부에 대하여 Sumizyme AC 2.4중량부를 사용한 것을 제외하고는 상기 실시예 2와 동일한 방법으로 발효홍삼 농축액을 제조하였다.
- [0211] <비교예 5>
- [0212] 상기의 희석액 100중량부에 대하여 Rapidase C80Max 2.4중량부를 사용한 것을 제외하고는 상기 실시예 2와 동일한 방법으로 발효홍삼 농축액을 제조하였다.
- [0214] <비교예 6>
- [0215] 상기의 희석액 100중량부에 대하여 Cytolase PCL5 2.4중량부를 사용한 것을 제외하고는 상기 실시예 2와 동일한 방법으로 발효홍삼 농축액을 제조하였다.
- [0217] <비교예 7>
- [0218] 상기의 희석액 100중량부에 대하여 PYR FLO 2.4중량부를 사용한 것을 제외하고는 상기 실시예 2와 동일한 방법으로 발효홍삼 농축액을 제조하였다.
- [0220] <비교예 8>
- [0221] 상기의 희석액 100중량부에 대하여 Sumizyme AC 1.20중량부 및 PYR FLO 1.20중량부를 사용한 것을 제외하고는 상기 실시예 2와 동일한 방법으로 발효홍삼 농축액을 제조하였다.
- [0223] <비교예 9>
- [0224] 상기의 희석액 100중량부에 대하여 Sumizyme AC 1.38중량부 및 PYR FLO 1.02중량부를 사용한 것을 제외하고는 상기 실시예 2와 동일한 방법으로 발효홍삼 농축액을 제조하였다.
- [0226] <시험예 1>
- [0227] 유산균의 종류에 따른 발효홍삼 농축액의 진세노사이드 함량 비교
- [0228] 상기 비교예 1과 비교예 2의 발효홍삼 농축액의 진세노사이드 함량은 메탄올을 이용하여 추출한 후 고성능액체 크로마토그래피(HPLC, High Performance Liquid Chromatography)를 이용한 정량분석법을 통하여 측정하였다.
- [0229] 그 결과를 하기의 표 3에 나타내었다.
- [0231] 표 3에서 확인할 수 있는 바와 같이, 유산균 발효에 의한 화합물 K의 생성단계는 진세노사이드 Rb1에서 진세노사이드 Rd를 거쳐 진세노사이드 F2로 전환된 후 최종적으로 화합물 K로 전환되는데, 화합물 K의 전구물질 중 진세노사이드 Rd의 함량은 비교예 1에서는 1.21mg/g인데 반하여 비교예 2에서는 6.94mg/g으로 비교예 2에서 약 5.7배 더 높게 나왔다.
- [0233] 또한, 화합물 K의 함량은 비교예 1에서는 8.94mg/g인데 반하여 비교예 2에서는 9.03mg/g으로서 비교예 2에서 더 높게 나왔다.
- [0235] 따라서, 유산균은 락토바실러스 사케이(*Lactobacillus sakei*) HY7802 균주 대신 비피도박테리움 애니멀리스 락티스(*Bifidobacterium animalis ssp. lactis*) HY8002 균주를 사용하는 것이 발효홍삼 농축액에서 화합물 K의 함량을 더 높일 수 있음을 알 수 있었다.

표 3

[0237]

구분(mg/g)	비교예 1	비교예 2
Rb1	0.10	0.03
Rd	1.21	6.94
F2	11.06	10.59
화합물 K	8.94	9.03

[0239] <시험예 2>

[0240] 추출방법에 따른 발효홍삼 농축액의 진세노사이드 함량 비교

[0241] 상기 비교예 1과 비교예 3의 발효홍삼 농축액의 진세노사이드 함량은 메탄올을 이용하여 추출한 후 고성능액체 크로마토그래피를 이용한 정량분석법을 통하여 측정하였다.

[0242] 그 결과를 하기의 표 4 및 표 5에 나타내었다.

[0244] 표 4에서 확인할 수 있는 바와 같이, 화합물 K의 함량은 비교예 1(주정추출 3회)에서는 8.94mg/g인데 반하여 비교예 3(주정추출 2회 및 열수추출 1회)에서는 7.38mg/g으로서 비교예 3에서 화합물 K의 함량이 더 낮게 나왔다.

[0246] 한편, 표 5에서 확인할 수 있는 바와 같이, 동일한 6년근 홍미삼 원물 100kg을 이용하여 최종 생산된 발효홍삼 농축액은 비교예 1(주정추출 3회)에서는 68.0kg인데 반하여 비교예 3(주정추출 2회 및 열수추출 1회)에서는 84.5kg으로서 비교예 3에서 더 높은 수율로 생산되었다.

[0248] 따라서, 표 5에서 확인할 수 있는 바와 같이, 최종 발효홍삼 농축액에 함유된 화합물 K의 총량은 비교예 1(주정추출 3회)에서는 607.92g(8.94mg/g × 68.0kg)인데 반하여 비교예 3(주정추출 2회 및 열수추출 1회)에서는 623.61g(7.38mg/g × 84.5kg)으로서 비교예 3에서 더 높게 나왔다.

[0250] 이상의 사실을 통하여, 주정추출 3회 보다는 주정추출 2회에 열수추출 1회를 추가로 사용하는 추출방법이 발효홍삼 농축액의 생산수율 뿐만 아니라 화합물 K의 함량을 더 높일 수 있음을 알 수 있었다.

표 4

[0252]

구분(mg/g)	비교예 1	비교예 3
Rb1	0.10	0.06
F2	11.06	9.25
화합물 K	8.94	7.38

표 5

[0254]

구분	비교예 1	비교예 3
6년근 홍미삼 투입량(kg)	100	100
최종 발효홍삼 농축액 생산량(kg)	68.0	84.5
최종 발효홍삼 농축액에 함유된 화합물 K 농도(mg/g)	8.94	7.38
최종 발효홍삼 농축액에 함유된 화합물 K 총량(g)	607.92	623.61

[0256] <시험예 3>

[0257] 효소의 종류에 따른 발효홍삼 농축액의 진세노사이드 함량 비교

[0258] 상기 비교예 4 내지 비교예 7의 발효홍삼 농축액의 진세노사이드 함량은 메탄올을 이용하여 추출한 후 고성능액체 크로마토그래피를 이용한 정량분석법을 통하여 측정하였다.

[0259] 그 결과를 하기의 표 6에 나타내었다.

[0261] 표 6에서 확인할 수 있는 바와 같이, 효소전환에 의한 화합물 K의 생성단계는 진세노사이드 Rb1에서 진세노사이드 Rd를 거쳐 진세노사이드 F2로 전환된 후 최종적으로 화합물 K로 전환되는데, 화합물 K의 전구물질인 진세노사이드 F2의 함량은 비교예 4(Sumizyme AC)에서는 8.43mg/g, 비교예 5(Rapidase C80Max)에서는 0.84mg/g, 비교

예 6(Cytolase PCL5)에서는 16.55mg/g인데 반하여 비교예 7(PYR FLO)에서는 20.92mg/g으로서 비교예 7에서 진세노사이드 F2의 함량이 가장 높게 나왔다.

[0263] 또한, 화합물 K의 함량은 비교예 5(Rapidase C80Max)에서는 0.16mg/g, 비교예 6(Cytolase PCL5)에서는 7.50mg/g, 비교예 7(PYR FLO)에서는 4.11mg/g인데 반하여 비교예 4(Sumizyme AC)에서는 8.99mg/g으로서 비교예 4에서 화합물 K의 함량이 가장 높게 나왔다.

[0265] 따라서, 화합물 K의 전환율이 우수한 Sumizyme AC 효소와 진세노사이드 F2의 전환율이 우수한 PYR FLO 효소를 조합하여 사용하는 것이 발효홍삼 농축액에서 화합물 K의 함량을 더 높일 수 있음을 알 수 있었다.

표 6

[0267]

구분(mg/g)	비교예 4	비교예 5	비교예 6	비교예 7
Rb1	0.12	13.80	0.11	0.07
F2	8.43	0.84	16.55	20.92
화합물 K	8.99	0.16	7.50	4.11

[0269] <시험예 4>

[0270] 효소의 농도에 따른 발효홍삼 농축액의 진세노사이드 함량 비교

[0271] 상기 실시예 2와 비교예 8 및 9의 발효홍삼 농축액의 진세노사이드 함량은 메탄올을 이용하여 추출한 후 고성능액체크로마토그래피를 이용한 정량분석법을 통하여 측정하였다.

[0272] 그 결과를 하기의 표 7에 나타내었다.

[0274] 표 7에서 확인할 수 있는 바와 같이, 화합물 K의 함량이 비교예 8(Sumizyme AC 1.20중량부, PYR FLO 1.20중량부)에서는 8.66mg/g, 비교예 9(Sumizyme AC 1.38중량부, PYR FLO 1.02중량부)에서는 9.15mg/g인데 반하여 실시예 2(Sumizyme AC 1.56중량부, PYR FLO 0.84중량부)에서는 9.38mg/g으로서 실시예 2에서 화합물 K의 함량이 가장 높게 나왔다.

[0276] 따라서, 상기 실시예 2의 희석액 100중량부에 대하여 Sumizyme AC 1.56중량부 및 PYR FLO 0.84중량부의 농도로 첨가하는 것이 발효홍삼 농축액의 화합물 K의 함량을 더 높일 수 있음을 알 수 있었다.

표 7

[0278]

구분(mg/g)	비교예 8	비교예 9	실시예 2
Rb1	0.11	0.11	0.02
F2	10.72	7.58	5.18
화합물 K	8.66	9.15	9.38

[0280] <시험예 5>

[0281] 최종제품의 발효홍삼 농축액의 진세노사이드 함량 비교

[0282] 상기 실시예 2와 비교예 1의 발효홍삼 농축액의 진세노사이드 함량은 메탄올을 이용하여 추출한 후 고성능액체크로마토그래피를 이용한 정량분석법을 통하여 측정하였다.

[0283] 그 결과를 하기의 표 8 및 표 9에 나타내었다.

[0285] 표 8에서 확인할 수 있는 바와 같이, 화합물 K의 함량이 비교예 1(기준제품)에서는 8.94mg/g인데 반하여 실시예 2(본 발명 제품)에서는 9.38mg/g으로서 실시예 2(본 발명 제품)에서 화합물 K의 함량이 더 높게 나왔다.

[0287] 표 9에서 확인할 수 있는 바와 같이, 동일한 6년근 홍미삼 원물 100kg을 이용하여 최종 생산된 발효홍삼 농축액은 비교예 1(기준제품)에서는 68.0kg인데 반하여 실시예 2(본 발명 제품)에서는 87.8kg으로서 실시예 2(본 발명 제품)에서 더 높은 수율로 발효홍삼 농축액이 생산되었다.

[0289] 또한, 최종 발효홍삼 농축액에 함유된 화합물 K의 총량은 비교예 1(기준제품)에서는 607.92g(8.94mg/g × 68.0kg)인데 반하여 실시예 2(본 발명 제품)에서는 823.56g(9.38mg/g × 87.8kg)으로서 실시예 2(본 발명

제품)에서 최종 발효홍삼 농축액에 함유된 화합물 K의 총량이 더 높게 나왔다.

표 8

[0291]

구분(mg/g)	비교예 1	실시예 2
Rb1	0.10	0.02
F2	11.06	5.18
화합물 K	8.94	9.38

표 9

[0293]

구분	비교예 1	실시예 2
6년근 홍미삼 투입량(kg)	100	100
최종 발효홍삼 농축액 생산량(kg)	68.0	87.8
최종 발효홍삼 농축액에 함유된 화합물 K 농도(mg/g)	8.94	9.38
최종 발효홍삼 농축액에 함유된 화합물 K 총량(g)	607.92	823.56

[0295]

이상의 시험예 1 내지 시험예 5를 통하여 본 발명의 효소 2종(Sumizyme AC, PYR FLO) 및 신규 유산균(비피도박테리움 애니멀리스 락티스 HY8002 균주)에 의해 화합물 K로의 전환율이 높아짐에 따라 화합물 K가 기존대비 더 높은 함량을 나타낸 것임을 알 수 있었고, 본 발명의 홍삼 추출방법(주정추출 2회 및 열수 추출 1회)에 의해 최종 생산된 발효홍삼 농축액의 생산수율이 높아진 것임을 알 수 있었다.

수탁번호

[0297]

기탁기관명 : 한국생명공학연구원

수탁번호 : KCTC13279BP

수탁일자 : 20170531

도면

도면1

원료삼 계량	→	홍미삼 : 100 kg
추출	1, 2차	→ 20배 50% 주정 (주정 1,000 L + 정제수 1,000 L) 80℃에서 6시간 추출
	3차	→ 20배 정제수 (정제수 2,000 L) 90℃에서 6시간 추출
냉각	→	40 ~ 50℃로 냉각
여과	→	퍼라이트 여과
농축	→	25 ~ 30 brix로 감압 농축
혼합	→	1, 2 및 3차 추출농축액 혼합
희석	→	추출농축액을 5 brix로 희석
효소 전환	→	50℃에서 72시간 동안 효소 전환
유산균 발효	→	37℃에서 유산균 발효
실활	→	90℃에서 10분 동안 가열
농축	→	70 ~ 80 brix로 감압 농축
살균	→	90℃에서 1시간 동안 가열
포장	→	포장하여 제품화