



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2014년10월14일

(11) 등록번호 10-1448496

(24) 등록일자 2014년10월01일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A23L 1/29 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2013-0037653

(22) 출원일자 2013년04월05일

심사청구일자 2013년04월05일

(56) 선행기술조사문헌

KR101184349 B1*

KR100936457 B1

KR1019930000418 B1

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자

서승태

서울특별시 양천구 목동서로 400 ,1019동1504호(신정동,신시가지10단지아파트)

(72) 발명자

최성원

경기 용인시 수지구 정평로 41, 601동 1605호 (풍덕천동, 우성아파트)

서승태

서울특별시 양천구 목동서로 400 ,1019동1504호(신정동,신시가지10단지아파트)

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

특허법인충현

전체 청구항 수 : 총 8 항

심사관 : 김민정

(54) 발명의 명칭 **녹용 초고압추출발효 조성물 및 이의 제조방법**

(57) 요약

본 발명은 초고압처리기술과 장류에서 분리한 바실러스 속 균주를 이용하여 녹용을 추출발효하는 방법 및 이를 유효물질로 포함하는 녹용 초고압추출발효 조성물에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 녹용을 초고압처리 함으로써 종래의 열수추출에 비하여 녹용의 생리활성물질 파괴가 줄어들었으며, 본 발명의 장류에서 분리한 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*) SST-9960 [기탁번호: KCCM 11402P]에 의해 발효된 녹용 추출발효물은 조단백질 함량, 항산화능 및 스쿠알렌 합성효소에 대한 저해활성이 우수하고, 면역증강 기능을 가진다.

(72) 발명자

백무열

경기도 성남시 분당구 서현동시범한양아파트
320-401

허남윤

서울 마포구 창전로2길 10, 101동 602호 (신수동,
대원칸타빌아파트)

박정민

서울 노원구 중계로12길 24, 101동 1215호 (
중계동, 금호아파트)

박혜련

서울특별시 양천구 목동 목동아파트 1019동 1504호

서승호

서울 노원구 마들로 31, 117동 1401호 (월계동, 그
랑빌아파트)

특허청구의 범위

청구항 1

- (1) 녹용 고형분을 물에 현탁시켜 녹용현탁액을 제조하는 단계;
- (2) 녹용현탁액을 초고압기를 이용하여 100-500 MPa에서 1-300 분간 반응시켜 녹용추출물을 제조하는 단계; 및
- (3) 초고압처리된 녹용추출물에 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*) SST-9960 [기탁번호: KCCM 11402P]를 첨가하여 발효시키는 단계;를 포함하여 수행되는 것을 특징으로 하는 녹용 초고압추출발효 조성물의 제조방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 (3) 단계는 발효처리된 녹용추출물을 80-150 °C에서 1-5 시간 동안 환류 추출하는 과정을 더 포함하는 것을 특징으로 하는 녹용 초고압추출발효 조성물의 제조방법.

청구항 3

제1항 또는 제2항 중 어느 한 항에 따라 제조된 녹용 초고압추출발효 조성물.

청구항 4

제3항에 있어서, 상기 녹용 초고압추출발효 조성물은 750nm 파장에서 측정한 로리(Lowry) 법을 이용한 단백질 정량에서 조단백질 함량이 1800-2500 mg%인 것을 특징으로 하는 녹용 초고압추출발효 조성물.

청구항 5

제3항에 있어서, 상기 녹용 초고압추출발효 조성물은 DPPH(1,1-diphenyl-2-picryldrazyl) 라디칼 소거능에서 항산화 활성능이 40-60 %를 나타내는 것을 특징으로 하는 녹용 초고압추출발효 조성물.

청구항 6

제3항에 있어서, 상기 녹용 초고압추출발효 조성물은 스쿠알렌 합성효소 저해 활성을 나타내는 것을 특징으로 하는 녹용 초고압초고압효 조성물.

청구항 7

장류에서 분리된 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*) SST-9960 [기탁번호: KCCM 11402P].

청구항 8

삭제

청구항 9

제1항 내지 제2항 중 어느 한 항에 따라 제조된 녹용 초고압추출발효 조성물을 유효성분으로 포함하는 콜레스테롤 저하용 건강기능식품.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 녹용을 초고압처리기술과 장류에서 분리한 바실러스 속 균주를 이용하여 초고압추출발효하는 제조방법 및 이에 의해 제조된 녹용 초고압추출발효 조성물에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 녹용(Cornu cervi parvum, antler)은 사슴과에 속하는 매화목, 마록 및 동속 근연 동물의 털이 밀생되고 골질화되지 않은 어린 뿔로 매년 재생되는 연골조직을 말하며, 각질화되지 않은 것은 녹용이고, 각질화된 것은 녹각이라 하는데, 우리나라를 비롯한 중국 및 일본 등의 동양권 국가들에서는 녹용을 오래전부터 최고의 보혈 강장제로 널리 사용해 왔으며, 그 성장과 효능에 관해서는 본초강목과 동의보감 등의 문헌에 수록되어 있다.

- [0003] 녹용은 주로 강정, 강장의 목적으로 사용되고 있는데, 녹용의 약리효과에는 성장촉진, 조혈, 단백질 합성촉진, 콜레스테롤 저하 및 면역활성 증가 등의 작용을 하는 것으로 알려져 있으며, 그 외에도 모노아민 옥시다제(monoamine oxidase) 활성억제, in vivo 및 in vitro에서 녹용 추출물이 지질 과산화의 방어효과를 가지며, 추출물을 반복투여시 노화에 미치는 영향 등이 보고되어 있다.
- [0004] 지금까지의 녹용에 관한 연구는 한방에서 임상적인 효과를 규명하고, 양방에서 녹용의 생리화학적 작용기작을 밝히는 정도에 국한되어 있었다. 최근 들어 녹용의 생리활성 성분에 대한 활발한 연구가 진행되고 있는데, 녹용은 추출물 수준에서 면역기능 증진, 항산화, 항피로, 항혈전, 항노화, 혈압강하, 항염증작용 등 매우 다양한 효능이 있는 것으로 보고되었다.
- [0005] 일반적으로, 녹용은 설사 등의 부작용을 동반하고 있어, 한방에서는 수렴작용이 있는 성분과 병용하여 사용되고 있는데, 이 과정에서 녹용의 효능이 감쇄될 수 있으며, 한약에 이용하기 위해 알콜에 담그는 과정에서 녹용의 유효성분이 다량 소실되고 있는 문제점이 있다. 또한 전통적인 녹용 처리방법인 열수추출법은 많은 시간이 소요되며, 추출되는 유효성분의 구성이 일정하지 않아 품질관리가 어려운 단점이 있으며, 유기용매를 이용한 추출법은 녹용이 보유하고 있는 지질성분만을 추출하기 때문에, 수성 유효성분을 추출하기 어려우며, 제거되지 못한 잔존 유기용매로 인하여 인체에 해로울 수 있다는 단점이 있다.
- [0006] 최근 이러한 문제점을 해결하기 위하여, 한국공개특허 제10-2012-0039991호에서는 초고압 저온 추출법을 이용하여 녹용으로부터 유효성분을 추출하고 있으며, 한국등록특허 제10-0206182호에서는 동물의 장 또는 변으로부터 분리한 바실러스 속 균주를 이용하여 녹용 분해능을 연구하여 분해활성이 우수한 바실러스 속 Py-92 균주를 개시하고 있으며, 한국등록특허 제10-1184349호 및 제10-1090657호에서는 녹용 발효 활성을 갖는 바실러스 서브틸리스 KCTC 11454BP를 이용하여 얻은 녹용발효추출물에 관하여 개시하고 있다.
- [0007] 그러나 상기와 같은 발명은 녹용 발효물의 유효성분 및 약리활성이 낮다는 단점이 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0008] 본 발명은 장류에서 분리한 녹용 발효 활성을 가지는 바실러스 속 균주를 제공하는 것을 목적으로 한다.
- [0009] 또한, 본 발명은 녹용을 초고압처리기술과 상기 신규의 균주를 이용한 녹용 초고압추출발효 조성물의 제조방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.
- [0010] 또한, 본 발명은 상기 제조방법에 따라 제조된 녹용 초고압추출발효 조성물을 유효성분으로 포함하는 항산화, 콜레스테롤 저하 또는 면역기능 증강용 건강기능식품을 제공한다.

과제의 해결 수단

- [0011] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 녹용 발효 활성을 갖는 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*) SST-9960 [기탁번호: KCCM 11402P]를 제공한다.
- [0012] 본 발명의 일 실시예에 의하면 상기 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*) SST-9960 [기탁번호: KCCM 11402P]는 장류로부터 분리한 것이다.
- [0013] 본 발명은 녹용 고형분에 상기 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*) SST-9960 [기탁번호: KCCM 11402P]를 접종하는 단계를 포함하는 녹용 발효물의 제조방법을 제공한다.
- [0014] 상기 다른 목적을 달성하기 위하여 본 발명은 (1) 녹용 고형분을 물에 현탁시켜 녹용현탁액을 제조하는 단계; (2) 녹용현탁액을 초고압기를 이용하여 5-50 ℃, 100-500 MPa에서 5-60 분간 반응시켜 녹용추출물을 제조하는 단계; 및 (3) 초고압처리된 녹용추출물을 바실러스 균주를 첨가하여 발효시키는 단계;를 포함하여 수행되는 것을 특징으로 하는 녹용 초고압추출발효 조성물의 제조방법을 제공한다.
- [0015] 본 발명의 다른 일 실시예에 의하면, 상기 바실러스 균주는 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*) SST-9960 [기탁번호: KCCM 11402P]일 수 있으며,
- [0016] 상기 (3) 단계는 발효처리된 녹용추출물을 80-150 ℃에서 1-5 시간 동안 환류 추출하는 과정을 더 포함할 수 있다.

[0017] 또한, 본 발명은 상기 제조방법에 따라 제조된 녹용 초고압추출발효 조성물을 제공한다.

[0018] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 상기 녹용 초고압추출발효 조성물은 750nm 파장에서 측정된 로리(Lowry) 법을 이용한 단백질 정량에서 조단백질 함량이 1800-2500 mg%일 수 있으며, DPPH(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) 라디칼 소거능에서 항산화 활성능이 40-60 %를 나타낼 수 있고, 스쿠알렌 합성효소의 활성을 저해할 수 있다.

발명의 효과

[0019] 본 발명에 따른 초고압처리 후, 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*) SST-9960 [기탁번호: KCCM 11402P]에 의해 발효시킨 녹용 초고압추출발효 조성물의 제조방법은 녹용의 생리활성 물질, 유효성분 및 수율이 향상되었으며, 이에 따라 제조된 녹용 초고압추출발효 조성물은 조단백질 함량, 항산화능 및 스쿠알렌 합성효소에 대한 저해활성이 우수하고, 면역증강 기능을 가지므로 건강기능식품로서 이용될 수 있다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0020] 일반적으로 녹용으로부터 유효물질을 추출하기 위하여 열수추출 또는 알콜을 이용한 방법을 사용하여 유효성분을 추출하고 있으나, 상기와 같은 방법은 녹용의 유효성분이 추출되지 못하고 소실되는 단점이 있다. 최근 바실러스 속 균주와 같은 미생물을 이용하여 발효시킬 경우 흡수율이 증가될 수 있다는 연구들이 보고되고 있으나 아직까지 녹용 발효물의 약리활성이 만족스럽지 못한 문제점이 있다.

[0021] 이에 본 발명자들은 열수 추출 또는 알콜추출에서 조건에서 추출하기 힘들었던 녹용의 유효성분을 물리적인 방법인 초고압을 이용하여 추출함으로써 기존 방법에 비해 수율을 향상시켰으며, 조단백질 및 미네랄의 함량이 증가된 녹용 추출물을 얻을 수 있었다. 또한, 바실러스 속 균주를 이용하여 녹용 추출물을 발효시켜, 수율 및 조단백질 함량이 증가되고, 항산화 활성능 및 콜레스테롤 생합성 과정에 중요한 영향을 미치는 스쿠알렌 합성효소 저해활성에 우수한 특성을 나타내는 균주를 찾기 위해 예의 노력한 결과 본 발명에 따른 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*) SST-9960를 발견하여 본 발명을 완성하게 되었다.

[0022] 이하, 본 발명을 상세하게 설명한다.

[0023] 본 발명의 균주는 장류에서 분리된 것으로 녹용을 발효시켜 항산화 활성 및 스쿠알렌 합성효소 저해활성이 우수하다.

[0024] 본 발명의 균주는 동정 결과 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*)에 속했으며, 본 발명에서는 이를 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*) SST-9960로 명명하고, 한국미생물보존센터에 기탁하여 2013년 3월 25일자로 기탁번호를 KCCM 11402P로 부여받았다.

[0025] 본 발명은 (1) 녹용 고형분을 물에 현탁시켜 녹용현탁액을 제조하는 단계; (2) 녹용현탁액을 초고압기를 이용하여 100-500 MPa에서 1-300 분간 반응시켜 녹용추출물을 제조하는 단계; 및 (3) 초고압처리된 녹용추출물에 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*) SST-9960를 첨가하여 발효시키는 단계;를 포함하여 수행되는 것을 특징으로 하는 녹용 초고압추출발효 조성물의 제조방법을 제공한다.

[0026] 상기 (2) 단계는 초고압기를 이용하여 200-400 MPa에서 15-45 분간 반응시켜 추출되는 것이 좀더 바람직한데, 상기 범위를 벗어나면 경제적이지 않아 바람직하지 않다. 또한, 상기 (3) 단계는 발효처리된 녹용추출물을 80-150 °C에서 1-5 시간 동안 환류 추출하는 과정을 더 포함할 수 있는데, 상기 환류 추출 과정은 초고압처리 과정 및 발효단계에서 추출되지 않은 유효성분을 추출할 수 있어 바람직하며, 90-120 °C에서 2-4시간 동안 환류시켜 추출하는 것이 경제적이므로 좀더 바람직하다.

[0027] 본 발명에 따라 제조된 녹용 초고압추출발효 조성물은 750nm 파장에서 측정된 로리(Lowry) 법을 이용한 단백질 정량에서 조단백질 함량이 1800-2500 mg% 일 수 있으며,

[0028] 상기 조단백질은 아스파틱 산, 글루탐릭 산, 세린, 히스티딘, 글리신, 트레오닌, 아르기닌, 알라닌, 티로신, 발린, 페닐알라닌, 이소루신, 루신, 라이신 및 프로린으로 이루어진 군 중에서 선택되는 1종 이상일 수 있으나 이에 한정되지는 않는다.

- [0029] 또한 본 발명에 의하면 상기 녹용 초고압추출발효 조성물은 DPPH(1,1-diphenyl-2-picryldrazyl) 라디칼 소거능 측정에 따른 항산화 활성능이 45-60 %일 수 있고,
- [0030] 스쿠알렌 합성효소 저해 활성이 80-90 %일 수 있다.
- [0031] 또한, 본 발명은 장류에서 분리된 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*) SST-9960 [기탁번호: KCCM 11402 P]를 제공한다.
- [0032] 본 발명은 녹용 고형분에 바실러스 서브틸리스 SST-9960를 접종하는 단계를 포함하는 녹용 발효물의 제조방법을 제공한다.
- [0033] 본 발명에 의하면, 상기 접종단계 후, 25-35 ℃에서 24-72 시간 동안 배양하는 단계를 더 포함할 수 있다.
- [0034] 상기 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*) SST-9960는 녹용을 발효하는 특성이 우수하여, 바실러스 서브틸리스 SST-9960에 의해 발효된 녹용 발효 추출물은 기준에 보고된 녹용 발효 균주에 비하여 수율 및 조단백질 함량 증가하였으며, 항산화 활성능 및 스쿠알렌 합성효소 저해활성이 이 우수하다.
- [0035] 본 발명에 의하면, 상기 바실러스 서브틸리스 SST-9960에 의해 발효된 녹용 발효물은 pH가 7.0-7.2 일 수 있으며,
- [0036] 750nm 파장에서 측정한 로리(Lowry) 법을 이용한 단백질 정량에서 조단백질 함량이 1000-1760 mg%일 수 있고,
- [0037] DPPH(1,1-diphenyl-2-picryldrazyl) 라디칼 소거능 측정에 따른 항산화 활성능이 30-40% 일 수 있으며,
- [0038] 스쿠알렌 합성효소 저해율이 60-75 %일 수 있다.
- [0039] 또한, 본 발명은 상기 초고압처리된 녹용추출물을 바실러스 서브틸리스 SST-9960로 발효시킨 제조방법에 따라 제조된 녹용 초고압추출발효 조성물을 유효성분으로 포함하는 항산화, 콜레스테롤 저하 또는 면역기능 증강용 건강기능식품을 제공한다.
- [0040] 건강기능식품이란, 섭취할 경우 건강상 특정한 효과를 가져오는 것을 의미하나, 일반 약품과는 달리 식품을 원료로 하여 약품의 장기 복용시 발생할 수 있는 부작용 등이 없는 장점이 있다. 이와 같이 하여 얻어지는 본 발명의 건강기능식품은, 일상적으로 섭취하는 것이 가능하기 때문에 매우 유용하다.
- [0041] 본 발명에 따른 녹용 초고압추출발효 조성물을 건강기능식품 또는 일반식품의 유효성분 첨가물로 사용하는 경우 본 발명에 따른 녹용 초고압추출발효 조성물을 그대로 사용하거나 다른 식품 또는 식품성분과 함께 사용할 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용할 수 있다. 유효 성분의 혼합량은 예방, 건강 또는 치료 등의 각 사용 목적에 따라 적합하게 결정할 수 있다.
- [0042] 일반적으로, 식품 또는 음료의 제조시에 본 발명에 따른 녹용 초고압추출발효 조성물은 원료에 대하여 0.01-15 중량부 이하, 바람직하게는 0.1-10 중량부 이하의 양으로 첨가할 수 있다.
- [0043] 그러나, 건강 및 위생을 목적으로 하거나 또는 건강 조절을 목적으로 하는 장기간의 섭취의 경우에는 상기 양은 상기 범위 이하일 수 있으며, 또한 본 발명은 천연물로부터의 추출물을 이용하는 점에서 안전성 면에서 문제가 없으므로 상기 범위 이상의 양으로도 사용할 수 있다.
- [0044] 상기 건강기능식품의 종류에는 특별히 제한은 없고, 상기 녹용 초고압추출발효조성물을 포함하는 분말, 과립, 정제 또는 캡슐 형태일 수 있으며, 음료수, 과자류, 다이어트바, 에너지바, 면류, 껌류, 아이스크림류 등의 식품에 첨가제로 이용될 수 있다.
- [0045] 건강기능식품을 분말, 과립, 정제 또는 캡슐 형태로 제형화 할 경우, 식품제조에 통상적으로 사용하는 적절한 담체, 부형제 및 희석제를 더 포함할 수 있다. 상기 담체, 부형제 및 희석제로는 락토즈, 텍스트로즈, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 들 수 있다. 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다. 상기 부형제 이외에 마그네슘 스테arate, 탈크 같은 윤활제들도 사용된다.

- [0046] 이하, 바람직한 실시예를 들어 본 발명을 더욱 상세하게 설명한다. 그러나, 이들 실시예는 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이에 의하여 제한되지 않는다는 것은 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 자명할 것이다.
- [0047] 실시예 1. 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*) SST-9960의 분리
- [0048] 가. 장류로부터 바실러스 균의 분리 및 배양
- [0049] 여러 지역에서 구입한 7 종류의 장류로부터 LB(Luria Bertani) 평판배지를 이용하여 바실러스속(*Bacillus* sp.) 균의 분리 및 배양하였다. LB 배지는 증류수 1 L에 트립톤(tripton) 10 g, 효모 추출물(yeast extract) 5 g 및 염화나트륨(sodium chloride) 10 g을 넣고, pH를 7.0으로 조절한 후, 121 °C에서 15분간 멸균하여 준비하였다. 채집된 장류 시료에 멸균 생리식염수를 가하고 균질기를 이용하여 저온에서 균질화하였다. 장류 시료 0.1 ml을 LB 평판배지에 가한 후, 유리막대를 도말봉으로 사용하여 잘 퍼서 발라 접종하였다. LB 평판 배지에서 분리한 균주를 LB 액체배지에 접종한 후, 진동 배양기(shaking incubator)를 이용하여 30 °C에서 2일간 배양하였으며, 콜로니 성장별로 분리하여 바실러스 속 균주 92종을 분리하였다.
- [0050] 나. 장류에서 분리한 바실러스 균주의 배양 및 접종균주의 준비
- [0051] 장류에서 분리한 92종의 균주를 LB 액체배지에 접종한 후, 30 °C에서 2일간 배양하고, 배양액을 3000 rpm으로 10분간 원심분리하여 상층액의 배지를 제거하였다. 여기에 0.75 % 생리 식염수를 첨가하여 바실러스 균주를 현탁시킨 후, 3000 rpm의 속도로 10분간 원심분리하여 식염수를 제거하였다. 상기 생리식염수를 첨가하는 단계를 3회 반복하여 배지 성분을 완전히 제거한 후, 최종적으로 0.75 %의 생리 식염수를 첨가하여 생균수가 10^9 cfu/ml 이 되도록 접종균주를 준비하였다.
- [0052] 다. 녹용발효에 적합한 균주선발
- [0053] 녹용 배양액은 100 °C에서 3시간 환류 추출하고 이를 Kimble-filtering flask를 이용하여 여과한 후 동결건조하여 -20 °C에 냉동보관하여 사용하였다.
- [0054] 3.1. 녹용분말 평판 배지에서의 배양
- [0055] 녹용분말 2 g 및 가루한천 2 g에 증류수 100 ml을 가하여 평판배지를 제조하였으며 장류에서 분리한 균주 92종을 녹용분말 평판배지에 백금이를 이용하여 도말하였으며, 대조군으로 녹용 발효효능을 가진다고 보고된 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*) KCCM 11314, 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*) KCCM 11496, 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*) KCCM 11730 및 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*) KCTC11454BP를 이용하여 30 °C에서 3일간 배양하면서 균주의 성장여부를 측정하였다.
- [0056] 3.2. 녹용분말 액체배지에서의 배양
- [0057] 녹용분말 10 g에 증류수 100 g을 가하여 액체배지를 제조하였으며, 상기 2 단계에서 준비한 92종의 균주 및 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*) KCCM 11314, 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*) KCCM 11496, 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*) KCCM 11730 및 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*) KCTC11454BP를 생균수 10^9 cfu/ml의 접종균주를 2 % (v/v)가 되도록 가하고, 30 °C에서 3일간 배양하면서 균주의 성장여부를 확인하였다.
- [0058] 3.3 미생물의 성장여부 평가
- [0059] 녹용분말 고체배지 및 액체배지에서 배양된 균주의 성장여부를 평가하였으며, 이를 하기 표 1에 나타내었다.

- [0060] 균주 성장이 왕성 : +++
- [0061] 균주 성장이 보통 : ++
- [0062] 균주 성장이 약함 : +
- [0063] 전혀 성장하지 않음 : -

표 1

[0064]

균주	성장정도	균주	성장정도	균주	성장정도	균주	성장정도
1	-	25	+	49	+++	73	-
2	-	26	-	50	-	74	++
3	-	27	+	51	+++	75	+
4	+	28	++	52	-	76	++
5	++	29	-	53	-	77	-
6	+	30	-	54	++	78	+
7	-	31	+	55	+	79	+++
8	+	32	++	56	-	80	+
9	+	33	-	57	+	81	-
10	+	34	-	58	-	82	++
11	-	35	-	59	-	83	-
12	+++	36	-	60	+++	84	-
13	+	37	-	61	+	85	+++
14	+	38	+	62	+	86	+
15	-	39	-	63	+++	87	++
16	++	40	+++	64	-	88	-
17	-	41	++	65	+	89	+
18	++	42	+++	66	++	90	-
19	-	43	-	67	-	91	+++
20	+++	44	+	68	++	92	-
21	+	45	+	69	+	KCCM 11314	+++
22	++	46	+	70	++	KCCM 11496	+++
23	+++	47	-	71	-	KCCM 11730	+++
24	-	48	++	72	+	KCTC 11454BP	+++

[0065] 표 1에 나타난 바와 같이, 균주 성장이 왕성한 12종 및 균주 성장이 보통인 16종을 1차 선정하였다.

[0066] 3.4 조단백질 함량 평가

[0067] 균주 성장정도 평가에서 선정된 28종 및 KCCM 11314, KCCM 11496, KCCM 11730, KCTC 11454BP 및 음성대조군에 대한 조단백질 함량 평가를 수행하였다. 단백질 함량은 Lowry의 방법을 이용하여 750nm에서 흡광도를 측정하였으며 표준단백질로는 BSA(bovine serum albumin)를 사용하였고 BSA에 대한 함유량으로 단백질함량을 계산하였으며 하기 표 2에 나타내었다.

[0068] 하기 표에서 음성대조군은 증류수에 녹용 10%(w/v)를 첨가하여 100 ℃에서 3 시간 환류시켜 열수처리에 따른 녹용추출물이다.

표 2

[0069]

균주	조단백질(mg%)	균주	조단백질(mg%)	균주	조단백질(mg%)
5	544.5	42	912.3	76	601.3
12	568.1	48	556.7	79	605.4
16	554.4	49	621.3	82	554.7
18	554.5	51	908.5	85	611.2
20	705.6	54	579.8	87	544.5

22	541.6	60	1624.7	91	598.1
23	801.5	63	1344.3	음성대조군	554.5
28	554.7	66	591.1	KCCM 11314	576.1
32	557.9	68	556.7	KCCM 11496	588.2
40	594.1	70	568.6	KCCM 11730	701.7
41	567.1	74	577.2	KCTC 11454BP	803.2

[0070] 3.5 항산화능 평가

[0071] 균주 성장정도 평가에서 선정된 29종 및 KCCM 11314, KCCM 11496, KCCM 11730, KCTC 11454BP에 대한 항산화능 평가를 위해 DPPH(1,1-diphenyl-2-picryldrazyl) 라디칼 소거능을 측정하였다. DPPH 라디칼 소거능은 0.1 mM DPPH 용액 2.95 mL에 녹용발효추출액 0.05 mL를 가하여 흡광도의 변화를 517 nm에서 정확히 30분 후에 측정하였고 녹용발효물의 첨가 전 후의 차이를 백분율로 표기하였으며, 이를 표 3에 나타내었다.

[0072] 하기 표에서 음성대조군은 증류수에 녹용 10%(w/v)를 첨가하여 100 °C에서 3 시간 환류시켜 열수처리에 따른 녹용추출물이다.

표 3

[0073]

균주	항산화 활성능(%)	균주	항산화 활성능(%)	균주	항산화 활성능(%)
5	6.4	42	19.5	76	7.6
12	6.5	48	7.5	79	6.8
16	8.4	49	6.2	82	6.5
18	6.3	51	21.1	85	7.0
20	6.6	54	6.1	87	6.6
22	7.1	60	38.7	91	8.1
23	25.4	63	28.1	음성대조군	6.4
28	11.2	66	7.0	KCCM 11314	6.2
32	7.3	68	6.7	KCCM 11496	8.5
40	4.5	70	6.5	KCCM 11730	17.1
41	9.1	74	7.3	KCTC 11454BP	20.53

[0074] 표 3에 나타난 바와 같이, DPPH(1,1-diphenyl-2-picryldrazyl) 라디칼 소거능을 이용한 항산화 활성능 평가에서, 대조군인 KCCM 11730 및 KCTC 11454BP이 각각 17.1과 20.53을 나타내었으며, 23, 42, 51, 60 및 63 균주가 각각 25.4, 19.5, 21.1, 38.7 및 28.1로 대조군과 비슷하거나 우수한 특성을 나타내었다. 따라서, 23, 42, 51, 60 및 63 균주를 후보로 선정하였다.

[0075] 3.6 스쿠알렌 합성효소(Squalene synthase, SQS)에 대한 저해 활성 평가

[0076] 항산화 활성능 평가에서 선정된 23, 42, 51, 60 및 63 균주 및 KCCM 11314, KCCM 11496, KCCM 11730, KCTC 11454BP에 대한 스쿠알렌 합성효소(Squalene synthase, SQS)에 대한 저해 활성 평가를 수행하였다. 하기 표에서 음성대조군은 증류수에 녹용 10%(w/v)를 첨가하여 100 °C에서 3 시간 환류시켜 열수처리에 따른 녹용추출물이다.

[0077] 돼지간에서 분리한 마이크로솜 (5 mg 단백질/mL) 50 μ l와 반응용액(5 mM $MgCl_2$, 100 mM KCl, 10 mM DTT, 2 mM NADPH(nicotinamide adenine dinucleotide phosphate)를 포함한 100 mM 인산완충용액(pH 7.4)) 150 μ l, 그리고 녹용발효추출물 50 μ l를 혼합하여 37 °C에서 10 분간 방치시킨 후 [3H]-파네실 피로포스페이트(0.05 μ Ci) 20 μ l의 기질을 첨가시켜 37°C에서 다시 30분간 반응시켰다. 그런 다음, 200 μ l의 냉각에탄올을 첨가해 반응을 정지시키고 n-헥산 900 μ l를 가하여 3분간 격렬하게 섞어준 후, 8,000 rpm에서 10 분간 원심분리하여 헥산층을 수득하였다. 이렇게 수득한 500 μ l의 hexane층과 5 ml의 각테일용액을 혼합하여, 신틸레이션 카운터하는 방법으로 스쿠알렌 합성효소(Squalene synthase, SQS)에 대한 저해 활성을 평가하였으며 하기 표 4 나타내었다.

표 4

균주	SQS 저해활성(%)	균주	SQS 저해활성(%)
23	31.5	음성대조군	32.3
42	40.3	KCCM 11314	26.3
51	41.6	KCCM 11496	34.4
60	70.7	KCCM 11730	41.1
63	32.4	KCTC 11454BP	51.0

표 4에 나타난 바와 같이 균주에 대한 스쿠알렌 합성효소 저해활성을 측정하였으며, 균주 60에서 우수한 효과가 측정되었다. 이에, 균주 60의 이름을 SST-9960으로 명명하였다.

스쿠알렌 합성효소는 acetyl-CoA에서 시작하여 콜레스테롤이 합성되는 콜레스테롤 생합성 과정 중에서 FPP(farnesyl pyrophosphate)가 스쿠알렌으로 전환되는 단계를 촉매하는 효소로, 스쿠알렌 합성효소의 활성을 저해하게 되면 콜레스테롤 생합성이 저해되고 세포에 저밀도 지단백-콜레스테롤 수용체(LDL-cholesterol receptor)의 합성이 촉진되어, 결국 혈액내의 콜레스테롤의 수치가 낮아지게 된다. 이러한 스쿠알렌 합성효소의 저해는 HMG-CoA (3-Hydroxymethyl-Glutaryl Coenzyme A) 저해제와는 달리 콜레스테롤 생합성 경로상 하류(downstream)에 해당하는 효소를 저해하는 것이기 때문에 HMG-CoA에 의해 파생되는 많은 생체내 isoprenoid 물질들의 전구체 비생성 현상이 나타나지 않아, HMG-CoA 저해제에 의한 여러 가지 부작용을 막을 수 있을 것으로 기대된다.

3.7 바실러스균에 따른 녹용 발효액의 평가

SST-9960, 음성대조군, KCCM 11314, KCCM 11496, KCCM 11730 및 KCTC 11454BP에 대한 pH, 수율(%), 단백질 함량, 항산화능 및 스쿠알렌 합성효소 저해활성에 대한 특성을 평가하였으며, 이를 하기 표 5에 나타내었다.

표 5

균주	pH	수율(%)	조단백질(mg%)	항산화 활성능(%)	SQS 저해(%)
SST-9960	7.11	15.4	1624.7	38.7	70.7
음성대조군	7.49	3.7	554.5	6.4	32.3
KCCM 11314	7.37	3.9	576.1	6.2	26.5
KCCM 11496	7.35	4.1	558.2	8.5	34.4
KCCM 11730	7.21	6.8	701.7	17.1	41.1
KCTC 11454BP	7.19	10.4	803.2	20.53	51.0

상기 표에 나타난 바와 같이, 본 발명에 따른 SST-9960은 15.4의 높은 수율을 나타내었으며, 조단백질 함량이 음성 대조군의 약 3 배로 향상되었으며, 항산화특성 및 스쿠알렌 합성효소를 저해하는 능력이 향상되었다.

실시예 2. 균주의 동정

본 발명에서 선정된 SST-9960을 동정하기 위하여 16S rDNA 염기서열분석을 실시하였다. 16S rDNA 염기서열분석은 선발된 균주를 LB 액체배지에 배양시킨 후 genomic DNA extraction kit(iNtRON Biotechnology, Korea)를 사용하여 DNA를 추출하였다. 추출된 DNA는 1% agarose gel을 이용하여 확인하였다. 16S rDNA를 증폭하기 위하여 추출된 genomic DNA를 템플레이트로 하여 27F(5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3', forward), 1492R(5'-GGCTACCTTGT TACGACTT-3', reverse) 프라이머를 이용하여 PCR을 진행하였다. PCR조건은 95 ℃에서 1분간 denaturation, 45 ℃에서 1 분간 annealing, 72 ℃에서 1 분 30 초간 extension으로 30 cycle을 수행하였다. 얻어진 PCR product는 sequencing을 위하여 purification Kit(iNtRON Biotechnology, Korea)를 이용하여 정제하였다. DNA 염기서열은 ABI PRISM 3700 DNA analyzer (Perkin Elmer, USA)를 사용하여 염기서열을 결정하였으며, 이를 NCBI의 BLAST를 이용하여 GenBank database와 비교하여 분리균주를 동정하였다.

[0087] 장류에서 순수 분리한 균주 중 녹용 발효능이 우수하다고 판단되는 SST-9960 균주의 16S rDNA 염기서열을 분석한 결과 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*)과 가장 유사하였으나 16s rDNA의 상동성 평가결과에서 동일균주는 없었으며 녹용발효물의 제조에 있어 수율, 조단백질 함량, 생리적인 특성으로 항산화능, 스쿠알렌 합성효소에 대한 저해활성에서 우수하다는 점이 관찰되었다. 상기 결과로부터 SST-9960 균주를 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*) SST-9960으로 명명하였다.

[0088] 제조예 1. 녹용의 초고압처리

[0089] 녹용분말 10 g에 증류수 100 ml을 가하여 녹용현탁액을 제조하고 레토르트 파우치에 넣고 밀봉하였다. 상기 녹용현탁액이 담긴 레토르트파우치를 초고압용기에 넣고 압력전달매개로서 증류수를 채운 후 초고압기를 이용하여 25 ℃, 300 MPa에서 30 분간 압력을 가하였다. 초고압처리된 녹용시료는 100 ℃에서 3 시간 환류추출하고 이를 Kimble-filtering flask를 이용하여 여과한 후 동결건조하여 -20 ℃에서 냉동보관하여 사용하였다.

[0090] 실시예 3.

[0091] 제조예 1에서 준비한 초고압처리된 녹용 추출물을 실시예 1과 동일한 방법으로 pH, 단백질 함량, 항산화능 및 스쿠알렌 합성효소에 대한 저해 활성을 측정하였으며 하기 표 6에 나타내었다.

표 6

균주	pH	수율(%)	조단백질(mg%)	항산화 활성능(%)	SQS 저해(%)
초고압처리녹용	7.45	5.1	720.4	11.1	45.6
음성대조군	7.49	3.7	554.5	6.4	32.3

[0093] 제조예 2. 초고압처리된 녹용의 SST-9960 발효처리

[0094] 제조예 1의 초고압처리된 녹용시료를 실시예 1의 3 단계에서 제조한 생균수 10^9 cfu/ml의 접종균주를 2 %(v/v)가 되도록 가하고 30 ℃에서 3일간 배양하고, 100 ℃에서 3 시간 환류추출한 후, Kimble-filtering flask를 이용하여 여과하여 녹용 발효 추출물을 얻었다.

[0095] 실시예 4. 초고압 및 발효처리된 녹용 추출발효액의 평가

[0096] 제조예 2에서 준비한 초고압처리된 녹용 추출물을 실시예 1과 동일한 방법으로 pH, 단백질 함량, 항산화능 및 스쿠알렌 합성효소에 대한 저해 활성을 측정하였으며 하기 표 7에 나타내었다.

표 7

균주	초고압 처리	발효 처리	pH	수율(%)	조단백질 (mg%)	항산화 활성능(%)	SQS 저해 (%)
초고압처리 및 발효녹용	o	o	7.12	17.7	1889.5	45.7	82.2
SST-9960	x	o	7.11	15.4	1624.7	38.7	70.7
초고압처리	o	x	7.45	5.1	720.4	11.1	45.6
음성대조군	x	x	7.49	3.7	554.5	6.4	32.3

[0098] 이와 같이, 본 발명에 따른 녹용 초고압추출발효 조성물은 초고압처리를 통해 음성대조군과 비교하여 수율을 향상시켰으며, 상압 조건에서 추출하지 못했던 조단백질 및 미네랄 등을 추출하였으며, 발효 후에 추가로 환류추출 함으로써 초고압처리에서 추출되지 않은 유효물질을 추가로 추출하였다.

[0099] 또한, 본 발명에 따라 초고압처리후 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*) SST-9960로 발효시킨 녹용 추출발

효물은 본 발명에 따른 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*) SST-9960로 발효된 발효추출물에 비하여, 수율, 조단백질 함량이 우수하였으며, 향산화 활성능 및 스쿠알렌 합성효소 저해활성이 향상되었다.

[0100] 제제예 1. 건강기능식품 (분말제)의 제조

[0101] 제조예 2의 녹용 추출발효 분말 20 mg

[0102] 유당 100 mg

[0103] 탈크 10 mg

[0104] 상기의 성분들을 혼합하고 기밀포에 충전하여 산제를 제조한다.

[0105] 제제예 2. 정제의 제조

[0106] 제조예 2의 녹용 추출발효 분말 10 mg

[0107] 옥수수전분 100 mg

[0108] 유당 100 mg

[0109] 스테아린산 마그네슘 2 mg

[0110] 상기의 성분들을 혼합한 후 통상의 정제의 제조방법에 따라서 타정하여 정제를 제조한다.

[0111]

[0112] 제제예 3. 캡슐제의 제조

[0113] 제조예 2의 녹용 추출발효 분말 10 mg

[0114] 결정성 셀룰로오스 3 mg

[0115] 락토오스 14.8 mg

[0116] 마그네슘 스테아레이트 0.2 mg

[0117] 통상의 캡슐제 제조방법에 따라 상기의 성분을 혼합하고 젤라틴 캡슐에 충전하여 캡슐제를 제조한다.

[0118] 제제예 4. 액제의 제조

[0119] 제조예 2의 녹용 추출발효 분말 20 mg

[0120] 이성화당 10 g

[0121] 만니톨 5 g

[0122] 정제수 적량

[0123] 통상의 액제의 제조방법에 따라 정제수에 각각의 성분을 가하여 용해시키고 레몬향을 적량 가한 다음 상기의 성분을 혼합한 다음 정제수를 가하여 전체를 정제수를 가하여 전체 100로 조절한 후 갈색병에 충전하여 멸균시켜 액제를 제조한다.

[0124] 제제예 5. 건강기능식품의 제조

[0125] 제조예 2의 녹용 추출발효 분말 1,000 mg

[0126] 비타민 혼합물 적량

[0127] 비타민 A 아세테이트 70 μ g

[0128] 비타민 E 1.0 mg

[0129]	비타민 B1	0.13 mg
[0130]	비타민 B2	0.15 mg
[0131]	비타민 B6	0.5 mg
[0132]	비타민 B12	0.2 μ g
[0133]	비타민 C	10 mg
[0134]	비오틴	10 μ g
[0135]	니코틴산아미드	1.7 mg
[0136]	엽산	50 μ g
[0137]	판토텐산 칼슘	0.5 mg
[0138]	무기질 혼합물	적량
[0139]	황산제1철	1.75 mg
[0140]	산화아연	0.82 mg
[0141]	탄산마그네슘	25.3 mg
[0142]	제1인산칼륨	15 mg
[0143]	제2인산칼슘	55 mg
[0144]	구연산칼륨	90 mg
[0145]	탄산칼슘	100 mg
[0146]	염화마그네슘	24.8 mg
[0147]	상기의 비타민 및 미네랄 혼합물의 조성비는 비교적 건강기능식품에 적합한 성분을 바람직한 실시예로 혼합 조성하였지만, 그 배합비를 임의로 변형 실시하여도 무방하며, 통상의 건강기능식품 제조방법에 따라 상기의 성분을 혼합한 다음, 과립을 제조하고, 통상의 방법에 따라 건강기능식품 조성물 제조에 사용할 수 있다.	
[0148]	<u>제제예 6. 기능성 음료의 제조</u>	
[0149]	제조예 2의 녹용 추출발효 분말	1,000 mg
[0150]	구연산	1,000 mg
[0151]	올리고당	100 g
[0152]	매실농축액	2 g
[0153]	타우린	1 g
[0154]	정제수를 가하여	전체 900 mL
[0155]	통상의 건강음료 제조방법에 따라 상기의 성분을 혼합한 다음, 약 1 시간 동안 85 ℃에서 교반 가열한 후, 만들어진 용액을 여과하여 멸균된 2 L 용기에 취득하여 밀봉 멸균한 뒤 냉장 보관한 다음 본 발명의 기능성 음료 조성물 제조에 사용한다.	
[0156]	상기 조성비는 비교적 기호음료에 적합한 성분을 바람직한 실시예로 혼합 조성하였지만, 수요계층, 수요국가, 사용용도 등 지역적, 민족적 기호도에 따라서 그 배합비를 임의로 변형 실시하여도 무방하다.	

수탁번호

[0157]

기탁기관명 : 한국미생물보존센터(국외)

수탁번호 : KCCM11402P

수탁일자 : 20130325

서 열 목 록

<110> SU, SEUNG TAE

<120> Ultra High Pressure and Fermented extract of Antler and Preparing
Method thereof

<130> HPC-3993

<160> 1

<170> Kopatent In 2.0

<210> 1

<211> 1440

<212> DNA

<213> Bacillus subtilis

<400> 1

ccccgcgcgt cgctatctgc agtcgagcgg acgatgggag cttgctccct gatgttagcg	60
gcggacgggt gagtaacacg tgggtaacct gcctgtaaga ctgggataac tccgggaaac	120
cggggctaata accggatgggt tgtttgaacc gcatgggtca aacataaaag gtggcttcgg	180
ctaccactta cagatggacc cgcggcgcgt tagctagtgt gtgaggtaac ggctcaccaa	240
ggcaacgatg cgtagccgac ctgagagggt gatcgccac actgggactg agacacggcc	300
cagactccta cgggaggcag cagtagggaa tcttccgcaa tggacgaaag tctgacggag	360
caacgccgct tgagtgaatg aggttttcgg atcgtaaagc tctgttgta gggaagaaca	420
agtaccgttc gaataggcgg gtaccttgac ggtacctaac cagaaagcca cggctaacta	480
cgtgccagca gccgcggtaa tacgtagggt gcaagcgttg tccggaatta ttgggcgtaa	540
agggctcgca ggccggtttct taagtctgat gtgaaagccc ccggctcaac cggggagggt	600
cattggaaac tggggaactt gtagtcagaa gaggagagtg gaattccacg ttagcgggtg	660
aaatgcgtag agatgtggag gaacaccagt ggcgaaggcg actctctggt ctgtaactga	720
cgctgaggag cgaagcgtg gggagcgaac aggattagat accctggtag tccacgccgt	780
aaacgatgag tgctaagtgt tagggggttt ccgccctta gtgctgcagc taacgcatta	840
agcactccgc ctggggagta cggtcgcaag actgaaactc aaaggaattg acgggggccc	900
gcacaagcgg tggagcatgt ggtttaattc gaagcaacgc gaagaacctt accaggtctt	960
gacatcctct gacaatccta gagataggac gtccccttcg ggggcagagt gacagtggt	1020

gcatggttgt cgtcagctcg tgtcgtgaga tgttgggtta agtcccgcaa cgagcgcaac	1080
ccttgatctt agttgccagc attcagttgg gcactctaag gtgactgccg gtgacaaacc	1140
ggaggaaggt ggggatgacg tcaaatacgc atgccccctta tgacctgggc tacacacgtg	1200
ctacaatgga cagaacaaag ggcagcgaaa ccgcgaggtt aagccaatcc cacaaatctg	1260
ttctcagttc ggatcgagc ctgcaactcg actgcgtgaa gctggaatcg ctagtaatcg	1320
cggatcagca tgccgcggtg aatacgttcc cgggccttgt acacaccgcc cgtcacacca	1380
cgagagtttg taacaccga agtcggtgag gaacctttag agccgccga agtgacgggg	1440
	1440