(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2017년02월07일
(11) 등록번호 10-1704126
(24) 등록일자 2017년02월01일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
*A61K 36/258* (2006.01) *A23L 1/30* (2006.01)
*A61K 31/704* (2006.01) *A61K 35/74* (2015.01)
*C12N 1/20* (2006.01) *C12R 1/66* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2014-0158294
(22) 출원일자 2014년11월13일
심사청구일자 2014년11월13일
(65) 공개번호 10-2015-0143252
(43) 공개일자 2015년12월23일
(30) 우선권주장
1020140071429 2014년06월12일 대한민국(KR)
(56) 선행기술조사문헌
Food Science and Biotechnology, 23(1), 2014.2, pp.215-219*
Brazilian Journal of Microbiology, 42, 2011, pp.1227-1237*
Liver International, 25, 2005, pp.1069-1073*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
**동국대학교 경주캠퍼스 산학협력단**
경상북도 경주시 동대로 123 (석장동)
(72) 발명자
**조민경**
경상북도 경주시 동대로 123, 한의과대학 약리학교실 (석장동)
**김좌진**
서울특별시 금천구 가산디지털2로 98, 롯데IT캐슬 1동 703호 (가산동)
**금상일**
경상북도 경주시 동대로 123, 한의과대학 약리학교실 (석장동)
(74) 대리인
**이명진**

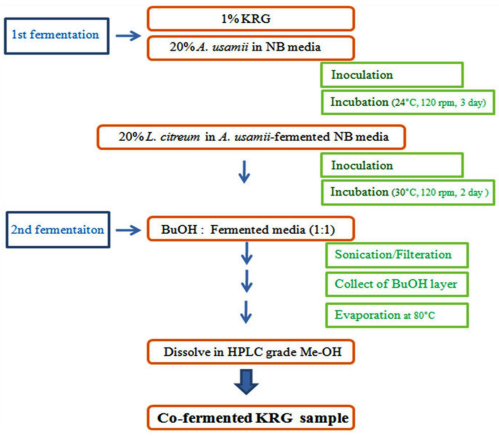
전체 청구항 수 : 총 11 항 심사관 : 김강필

(54) 발명의 명칭 **아스퍼질러스 우사미 및 류코노스톡 시트륨 균주를 이용한 진세노사이드 함량이 증가된 홍삼 제제 및 이의 제조방법**

## (57) 요 약

본 발명은 compoud K 함량이 증가된 홍삼 제제의 제조방법에 관한 것으로, 아스퍼질러스 우사미 및 류코노스톡 시트륨 균주를 접종하여 공생배양하는 것을 그 특징으로 한다. 본 발명의 제조 방법을 이용하면 기존에 알려진 진세노사이드의 함량보다 증가된 홍삼 추출액을 제조할 수 있으며, 특히 본 발명의 방법을 이용하면 진세노사이드 중에서도 compound K를 증가시킬 수 있으므로, 항암 효능 강화, 암치료, 항암제 독성 감소, 암예방, 혈전병 예방 효과가 증가하는 효과가 있다. 또한, 본 발명의 제조방법에 따른 홍삼 제제는 해독화 효소의 활성을 증가시킴으로써 간 보호에 탁월한 효과를 나타낼 수 있는 장점이 있다.

## 대 표 도



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

| | |
|---|---|
| 과제고유번호 | 1425079640 |
| 부처명 | 중소기업청 |
| 연구관리전문기관 | 한국산업기술평가관리원 |
| 연구사업명 | 산학연협력기술개발사업 |
| 연구과제명 | 특이 사포닌 함량이 높은 발효홍삼의 발효조건 확립 |
| 기 여 율 | 1/1 |
| 주관기관 | 동국대학교 경주 산학협력단 |
| 연구기간 | 2013.06.01 ~ 2014.05.31 |

# 명 세 서

## 청구범위

### 청구항 1

하기 단계를 포함하는 진세노사이드 함량이 증가된 홍삼 제제의 제조 방법:

a) 홍삼 추출물을 영양 배지에 첨가한 후, 멸균하는 단계;

b) 상기 배지에 아스퍼질러스 우사미(*Aspergillus usamii*)를 10~30 %(v/v)의 농도로 1차 접종하고, 액체배양하여 1차 배양액을 얻는 단계;

c) 상기 1차 배양액에 류코노스톡 시트륨(*Leuconostoc citreum*)을 10~30 %(v/v)의 농도로 2차 접종하고, 액체배양하여 2차 배양액을 얻는 단계; 및

d) 상기 2차 배양액에 부탄올(BuOH)를 첨가한 후, 초음파처리(sonication)하여 부탄올 분획물을 분리하는 단계.

### 청구항 2

제1항에 있어서,

상기 진세노사이드는 컴파운드케이(Compound K)인 것을 특징으로 하는, 방법.

### 청구항 3

제1항에 있어서,

상기 홍삼 추출물은 0.01 내지 5 부피%의 농도로 첨가되는 것을 특징으로 하는, 방법.

### 청구항 4

제1항에 있어서,

상기 a)단계에서 멸균은 100 내지 150℃에서 수행되는 것을 특징으로 하는, 방법.

### 청구항 5

제1항에 있어서,

상기 a)단계에서 멸균은 10 내지 30분간 수행되는 것을 특징으로 하는, 방법.

### 청구항 6

삭제

### 청구항 7

삭제

### 청구항 8

제1항에 있어서,

상기 b)단계에서 액체배양은 1일 내지 5일 동안 수행되는 것을 특징으로 하는, 방법.

**청구항 9**

제1항에 있어서,

상기 c)단계에서 액체배양은 1일 내지 3일 동안 수행되는 것을 특징으로 하는, 방법.

**청구항 10**

제1항에 있어서,

상기 부탄올은 2차 배양액 대비 3:7~7:3의 부피비로 첨가되는 것을 특징으로 하는, 방법.

**청구항 11**

제1항에 있어서,

상기 초음파처리는 10분 내지 120분 동안 수행되는 것을 특징으로 하는, 방법.

**청구항 12**

제1항 내지 제5항 또는 제8항 내지 제11항 중 어느 한 항에 따른 방법에 의해 제조된 진세노사이드 함량이 증가된 홍삼 제제를 유효성분으로 포함하는, 간 보호용 약학적 조성물.

**청구항 13**

제1항 내지 제5항 또는 제8항 내지 제11항 중 어느 한 항에 따른 방법에 의해 제조된 진세노사이드 함량이 증가된 홍삼 제제를 유효성분으로 포함하는, 간 보호용 건강기능식품 조성물.

## *발명의 설명*

### *기 술 분 야*

[0001] 본 발명은 진세노사이드 성분이 강화된 홍삼 제제를 제조하는 방법에 관한 것이다.

### *배 경 기 술*

[0002] 인삼은 식물학적으로 오가과(Araliaceae)의 인삼속(Panax)에 속하는 식물로서, 동양에서는 오래전부터 효능 및 유효성이 잘 알려져 온 한약재이다.

[0003] 근래 들어 인삼의 약리효능 연구의 과학적 진보에 따라 인삼으로부터 특유의 진세노사이드 성분을 분리하고, 그 화학구조를 밝히는 한편, 인삼의 유효성분과 약리효능을 구명함에 따라 인삼의 개별 사포닌마다 그 약리 효능이 각각 다르고 새로운 효능이 속속들이 밝혀짐으로써 특정 성분의 사포닌을 강화시킨 기능성 제품을 효율적이고 경제성 있게 제조하기 위한 인삼의 가공 및 제조방법과 관련된 기술이 개발되고 있으며, 이러한 기술들이 각광을 받고 있다.

[0004] 인삼에 함유된 특정성분의 사포닌을 강화시킨 기술과 관련하여 고전적인 방법으로 구증구포에 의한 흑삼 제조 방법이 알려져 있으며, 홍삼 추출액 및 추출액을 고온 고압처리하여 열처리에 의한 방법이 있는데, 고전적인 흑삼 제조의 방법은 제조공정에 따른 시간이 너무 긴 단점이 있고, 고온고압처리 방법은 제조공정에 따른 시간은 단축할 수 있으나 고온고압에 의한 에너지 소비에 따른 비용이 증가하고, 공정 안정성이 낮은 단점이 있다.

[0005] 그리고 미생물(유산균)에 의한 방법, 산 및 효소에 의한 가수분해방법 등이 있으며, 미생물(유산균)에 의한 방법은 특정 사포닌을 선택적으로 강화시킬수 있는 장점이 있으나, 유산균의 선택과 배양하는 기술이 어렵고, 공정이 복잡하고 관리하기가 어렵다는 단점이 있으며, 상기 가수 분해 방법은 산의 종류나 효소의 종류에 따라서 특정 사포닌의 선택성이나 변환효율이 차이가 나고, 일반적으로 미생물에 의한 방법보다 선택성이나 변환효율이 다소 떨어진다는 것이 단점이 있지만 공정이 간단하여 생산단가를 현저히 낮출 수 있는 장점이 있고, 특히 특정 사포닌 변환에 적합한 산이나 효소의 선택과 공정의 최적조건을 개발한다면 산업경쟁력이 가장 큰 기술이다.

[0006] 인삼에 함유된 특정성분의 사포닌을 강화시키는 방법으로, 대한민국 공개특허 공보 공개번호 10-2010-0098208호에는 Rg3 및 Rh2의 함량이 증가된 흑삼의 제조방법을 개시된 바 있으나, 이는 복잡한 공정을 가지고 있다는 단점이 있다.

## 발명의 내용

### 해결하려는 과제

[0007] 이에 본 발명자들은 종래기술의 문제점을 극복하기 위해서, 아스퍼질러스 우사미 균주 및 류코노스톡 시트륨 균주를 이용하여 미량의 진세노사이드인 컴파운드 케이(Compound K)를 다량 함유할 수 있도록 하는 홍삼 제제를 제조하는 기술을 제공하고자 한다.

[0008] 또한, 본 발명의 목적은 진세노사이드 함량이 증가된 홍삼 제제를 유효성분으로 포함하는 간 보호용 약학적 조성물과 간 보호용 건강기능식품 조성물을 제공하는 것에 있다.

### 과제의 해결 수단

[0009] 상기와 같은 본 발명의 목적을 달성하기 위해서, 본 발명은 하기 단계를 포함하는 진세노사이드를 다량 함유하는 홍삼 제제의 제조 방법을 제공한다:

[0010] a) 홍삼 추출물을 영양 배지에 첨가한 후, 멸균하는 단계;

[0011] b) 상기 배지에 아스퍼질러스 우사미(Aspergillus usamii)를 1차 접종하고, 액체배양하여 1차 배양액을 얻는 단계;

[0012] c) 상기 1차 배양액에 류코노스톡 시트륨(Leuconostoc citreum)을 2차 접종하고, 액체배양하여 2차 배양액을 얻는 단계; 및

[0013] d) 상기 2차 배양액에 부탄올(BuOH)를 첨가한 후, 초음파처리(sonication)하여 부탄올 분획물을 분리하는 단계.

[0014] 본 발명의 다른 구현예에 있어서, 상기 진세노사이드는 컴파운드케이(Compound K)인 것을 특징으로 한다.

[0015] 본 발명의 또다른 구현예에 있어서, 상기 홍삼 추출물은 0.01 내지 5 부피%의 농도로 첨가되는 것을 특징으로 한다.

[0016] 본 발명의 또다른 구현예에 있어서, 상기 a)단계에서 멸균은 100 내지 150℃에서 수행되는 것을 특징으로 한다.

[0017] 본 발명의 또다른 구현예에 있어서, 상기 a)단계에서 멸균은 10 내지 30분간 수행되는 것을 특징으로 한다.

[0018] 본 발명의 또다른 구현예에 있어서, 상기 아스퍼질러스 우사미는 10~30 %(v/v)의 농도로 첨가되는 것을 특징으로 한다.

[0019] 본 발명의 또다른 구현예에 있어서, 상기 류코노스톡 시트륨은 10~30 %(v/v)의 농도로 첨가되는 것을 특징으로 한다.

[0020] 본 발명의 또다른 구현예에 있어서, 상기 b)단계에서 액체배양은 1일 내지 5일 동안 수행되는 것을 특징으로 한다.

[0021] 본 발명의 또다른 구현예에 있어서, 상기 c)단계에서 액체배양은 1일 내지 3일 동안 수행되는 것을 특징으로 한다.

[0022] 본 발명의 또다른 구현예에 있어서, 상기 부탄올은 2차 배양액 대비 3:7~7:3의 비율로 첨가되는 것을 특징으로 한다.

[0023] 본 발명의 또다른 구현예에 있어서, 상기 초음파처리는 10분 내지 120분 동안 수행되는 것을 특징으로 한다.

[0024] 또한, 본 발명은 상기 방법에 의해 제조된 진세노사이드 함량이 증가된 홍삼 제제를 유효성분으로 포함하는 간 보호용 약학적 조성물을 제공한다.

[0025] 이에 더하여, 본 발명은 상기 방법에 의해 제조된 진세노사이드 함량이 증가된 홍삼 제제를 유효성분으로 포함하는 간 보호용 건강기능식품 조성물을 제공한다.

[0026] 상기 조성물은 제 2상 해독화 효소의 활성을 증가시킴으로써 외부 독성물질에 대한 방어 효과를 증진시켜 간 보호 효과를 나타내는 것을 특징으로 한다.

## *발명의 효과*

[0027] 본 발명은 아스퍼질러스 우사미를 접종한 후, 류코노스톡 시트륨을 2차 접종하여 공생배양하는 방법으로 홍삼 추출액의 미량 진세노사이드가 높은 함량으로 포함된 홍삼 제제를 제조할 수 있다. 이는 홍삼이 분리, 정제과정을 거치면서 생산수율이 낮아지고, 이에 따라 단가가 높아지는 단점을 해결할 수 있다. 이렇게 제조된 홍삼 제제는 기존의 분리, 정제과정을 거치는 것보다 비교적 낮은 단가에도 불구하고, 높은 함량의 컴파운드 케이가 함유되고 주름개선, 항산화 및 미백 효과가 뛰어나 효능의 미미 및 피부 부작용 유발 등의 여러 가지 문제점을 가지고 있는 기존 화장품 원료들의 단점을 개선하여 높은 성장률을 보이는 기능성 화장품 시장에 좋은 원료 및 항암 효능 강화, 암치료, 항암제 독성 감소, 암예방, 면역증진 및 혈전병 예방에 특히 우수한 컴파운드케이가 강화된 기능성을 가진 식품의 원료나 제품이 될 수 있다. 뿐만 아니라, 해독화 효소의 활성을 증가시킴으로써 간 보호에 탁원한 효과를 나타낼 수 있는 장점이 있다.

## *도면의 간단한 설명*

[0028] 도 1은 본 발명의 홍삼 제제 제조 방법을 단계별로 나타낸 모식도이다.

도 2는 아스퍼질러스 우사미 및 류코노스톡 시트륨 균 중 그 무엇도 접종하지 않은 홍삼 추출물과, 아스퍼질러스 우사미만을 접종한 홍삼 추출물, 그리고 아스퍼질러스 우사미 및 류코노스톡을 모두 접종한 홍삼 추출물의 TLC 분석 결과를 나타낸 도면이다.

도 3은 아스퍼질러스 우사미 및 류코노스톡 시트륨 균 중 그 무엇도 접종하지 않은 홍삼 추출물과 아스퍼질러스 우사미 및 류코노스톡을 모두 접종한 홍삼 추출물의 HPLC-ELSD 분석 결과를 나타낸 도면이다.

도 4는 아스퍼질러스 우사미만을 접종한 홍삼 추출물, 그리고 아스퍼질러스 우사미 및 류코노스톡을 모두 접종한 홍삼 추출물의 GSTA2(glutathione S-transferase A2)의 발현 변화를 나타낸 도면이다.

## *발명을 실시하기 위한 구체적인 내용*

[0029] 본 발명자들은 아스퍼질러스 우사미(Aspergillus usamii) 및 류코노스톡 시트륨(leuconostoc citreum) 균주를 접종하여 홍삼 제제를 제조하여, 진세노사이드의 함량이 현저히 증가된 홍삼 제제를 제조하는 방법을 개발함으로써, 본 발명을 완성하였다.

[0030] 즉, 본 발명은 하기 단계를 포함하는 진세노사이드 컴파운드케이(Compound K)를 다량 함유하는 홍삼 제제의 제조 방법을 제공하는 것을 그 목적으로 한다:

[0031] a) 홍삼 추출물을 영양 배지에 첨가한 후, 멸균하는 단계;

[0032] b) 상기 배지에 아스퍼질러스 우사미(Aspergillus usamii)를 1차 접종하고, 액체배양하여 1차 배양액을 얻는 단계;

[0033] c) 상기 1차 배양액에 류코노스톡 시트륨(Leuconostoc citreum)을 2차 접종하고, 액체배양하여 2차 배양액을 얻는 단계; 및

[0034] d) 상기 2차 배양액에 부탄올(BuOH)를 첨가한 후, 초음파처리(sonication)하여 부탄올 분획물을 분리하는 단계.

[0035] 본 발명에서 제조하는 홍삼 제제는, 진세노사이드 성분이 현저히 증가된 것을 특징으로 하고, 특히 진세노사이드 성분 중 컴파운드 케이의 함량이 현저히 증가된 장점을 가진다.

[0036] 본 발명자들은 본 발명에서 사용하는 균주가 접종되지 않은 홍삼 추출액과, 아스퍼질러스 우사미만 단독 접종된 홍삼 추출액과, 아스퍼질러스 우사미 및 류코노스톡 시트륨이 접종되어 공생배양된 홍삼 추출액을 비교한 결과, 본 발명의 방법으로 제조된 홍삼 추출액은 Compound K가 현저하게 증가하였고(실시예 2 및 실시예 3 참조), 체내에 유입된 외부 독성물질에 대한 방어 효능이 현저하게 증가할 수 있음을 확인하였다(실시예 4 참조).

[0037] 따라서, 본 발명의 방법을 이용하면 진세노사이드의 함량이 획기적으로 증가한 기능성 제품을 제공할 수 있다.

[0038] 하기에서 본 발명의 단계들을 보다 상세하게 설명한다.

[0039] 상기 a)단계는 홍삼 추출물을 영양 배지에 첨가한 후, 멸균하는 단계이다. 상기 홍삼 추출물은 홍삼을 재료로 하여 추출하여 얻어내는 것이라면 무엇이든 가능하다.

[0040] 본 발명의 일실시예로, 상기 홍삼 추출물은 영양배지에 0.01 내지 5 부피% 농도로 첨가될 수 있고, 바람직하게는 0.1~3 부피%일 수 있고, 더욱 바람직하게는 본 발명의 실시예와 같이 1 부피% 농도일 때 우수한 진세노사이드 증가 효과를 가질 수 있다.

[0041] 본 발명의 다른 실시예로, 상기 a) 단계에서 멸균은 100 내지 150℃에서 10분 내지 30분 간 수행될 수 있고, 보다 바람직한 온도는 110 내지 130℃일 수 있으나, 배지를 멸균시킬 수 있는 온도 및 시간이라면 상기 범위에 제한되지 않는다.

[0042] 상기 b) 단계는 배지에 아스퍼질러스 우사미를 1차 접종하고, 액체배양하여 1차 배양액을 얻는 단계이다. 상기 아스퍼질러스 우사미 배양액은 homogenase하여 첨가되며, 배지에 대하여 10~30%(v/v)로 접종될 수 있고, 바람직하게는 15~25%(v/v) 접종될 수 있으며, 가장 바람직하게는 20%(v/v) 접종될 수 있다. 상기 범위보다 적은 아스퍼질러스 우사미를 사용하면 진세노사이드의 증가 효과를 획득하지 못할 수 있으며, 상기 범위보다 많은 아스퍼질러스 우사미를 사용할 경우 추후 농축 과정에서 불순물이 발생할 가능성이 있다.

[0043] 본 발명의 다른 실시예로, 상기 액체배양은 1일 내지 5일 동안 수행될 수 있고, 가장 바람직하게는 3일 동안 수행될 때 우수한 진세노사이드 증가효과를 보인다.

[0044] 상기 c) 단계는 배지에 류코노스톡 시트륨을 2차 접종하고, 액체배양하여 2차 배양액을 얻는 단계이다. 상기 류코노스톡 시트륨 배양액은 homogenase하여 첨가되며, 배지에 대하여 10~30%(v/v)로 접종될 수 있고, 바람직하게는 15~25%(v/v) 접종될 수 있으며, 가장 바람직하게는 20%(v/v) 접종될 수 있다. 상기 범위보다 적은 류코노스톡 시트륨을 사용하면 진세노사이드의 증가 효과를 획득하지 못할 수 있으며, 상기 범위보다 많은 류코노스톡 시트륨을 사용할 경우 추후 농축 과정에서 불순물이 발생할 가능성이 있다.

[0045] 본 발명의 또다른 실시예로, 상기 액체배양은 1일 내지 3일 동안 수행될 수 있고, 가장 바람직하게는 2일 동안 수행될 때 우수한 진세노사이드 증가효과를 보인다.

[0046] 본 발명의 d) 단계는 2차 배양액에 부탄올을 첨가하고, 초음파처리하여 부탄올 분획물을 분리하는 단계로, 상기 부탄올의 양은 배양액 대비 3:7~7:3의 비율로 첨가될 수 있고, 가장 바람직하게는 5:5의 비율로 첨가될 수 있으나, 배양액을 농축할 수 있는 양이라면 이에 제한되지 않는다.

[0047] 상기 초음파처리는 10분 내지 120분 동안 수행될 수 있고, 바람직하게는 1시간 동안 초음파처리하여 감압농축할 수 있다.

[0048] 또한, 본 발명은 간 보호용 약학적 조성물 및 건강기능식품 조성물을 제공할 수 있다. 본 발명에 따른 약학적 조성물은 유효성분 이외에 약제학적으로 허용되는 담체를 포함할 수 있다. 이때, 약제학적으로 허용되는 담체는 제제 시에 통상적으로 이용되는 것으로서, 락토스, 덱스트로스, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 전분, 아카시아고무, 인산 칼슘, 알기네이트, 젤라틴, 규산 칼슘, 미세 결정성셀룰로스, 폴리비닐피로리돈, 셀룰로스, 물, 시럽, 메틸 셀룰로스, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필 히드록시벤조에이트, 활석, 스테아르산 마그네슘 및 미네랄 오일 등을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 또한, 상기성분들 이외에 윤활제, 습윤제, 감미제, 향미제, 유화제, 현탁제, 보존제 등을 추가로 포함할 수 있다.

[0049] 본 발명의 약학적 조성물은 목적하는 방법에 따라 경구 투여하거나 비경구투여(예를 들어, 정맥 내, 피하, 복강 내 또는 국소에 적용)할 수 있으며, 투여량은 환자의 상태 및 체중, 질병의 정도, 약물형태, 투여경로 및 시간

에 따라 다르지만, 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다.

[0050] 본 발명의 약학적 조성물은 약학적으로 유효한 양으로 투여한다. 본 발명에 있어서 "약학적으로 유효한 양"은 의학적 용도에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 사용하기에 충분한 양을 의미하며, 유효용량 수준은 약물의 활성, 환자의 약물에 대한 민감도, 투여 시간, 투여 경로 및 배출비율, 치료기간, 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다. 본 발명에 따른 약학적 조성물은 개별로 투여하거나 다른 치료제와 병용하여 투여될 수 있고 종래의 치료제와는 순차적 또는 동시에 투여될 수 있으며, 단일 또는 다중 투여될 수 있다. 상기한 요소들을 모두 고려하여 부작용 없이 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양을 투여하는 것이 중요하며, 이는 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다.

[0051] 구체적으로 본 발명의 약학적 조성물의 유효량은 환자의 연령, 성별, 상태, 체중, 체내에 활성 성분의 흡수도, 불활성율 및 배설속도, 질병종류, 병용되는 약물에 따라 달라질 수 있으며, 일반적으로는 체중 1kg 당 0.001 내지 150mg, 바람직하게는 0.01내지 100mg을 매일 또는 격일 투여하거나, 1일 1내지 3회로 나누어 투여할 수 있다. 그러나 상기 투여량이 어떠한 방법으로도 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.

[0052] 또한, 본 발명의 건강기능식품 조성물은 유효성분 이외에 추가로 약제학적으로 허용 가능한 담체를 1종 이상 포함하여 건강기능식품 조성물로 바람직하게 제제화할 수 있다. 상기 건강기능식품 조성물의 제제 형태는 정제, 캅셀, 분말, 과립, 액상, 환 등이 될 수 있다.

[0053] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 바람직한 실시예를 제시한다. 그러나 하기의 실시예는 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐, 하기 실시예에 의해 본 발명의 내용이 한정되는 것은 아니다.

[0054] **[실시예]**

[0055] **실시예 1. 홍삼 추출액 제조**

[0056] 건조된 홍삼추출물(KRG)을 영양배지(Nutrient broth)에 1%의 농도로 첨가하고, 121℃에서 20분 간 멸균해주었다.

[0057] 아스퍼질러스 우사미(Aspergillus usamii) 배양액은 homogenase하여 KRG가 첨가된 영양 배지에 20% (v/v)로 접종하고, 3일 동안 24℃에서 액체배양 해주었다. 이후, 류코노스톡 시트륨(Leuconostoc citreum)을 20% (v/v)으로 2차 접종하여 30℃에서 2일 동안 공생배양(co-culture)해주었다.

[0058] 배양이 끝난 flask에 BuOH(부탄올)를 1:1로 첨가하고 1시간 동안 sonication한 후, BuOH층을 분리하여 감압농축하여 홍삼 추출액을 제조하였다.

[0059] **실시예 2. 진세노사이드 함량 확인**

[0060] 본 발명의 홍삼 추출액의 진세노사이드 함량을 확인하기 위해서, 농축이 끝난 BuOH 분획물은 MeOH를 넣어 녹여낸 후, 0.2 um syringe filter하여 TLC 분석에 사용하였다.

[0061] 홍삼 추출액에 대한 분석을 위해 사용된 TLC는 (TLC silica gel 60 F254)를 사용하였고, 진세노사이드 TLC 분석은 부탄올로 fraction 한 시료를 silica gel TLC 판에 점적하여 클로로포름:에탄올 (8:1)로 40분간 전개한 다음 10% $H_2SO_4$ 용액을 분무한 후 100℃에서 5분간 가열하여 발색시켜 표준품 대비 시료 중의 ginsenosides pattern을 비교 분석하였다.

[0062] 그 결과, 도 2에 나타낸 것과 같이, 아스퍼질러스 우사미와 류코노스톡 시트륨을 접종하여 공생배양한 홍삼추출물은 compound K 함량이 현저히 증가하는 것으로 관찰되었다.

[0063] **실시예 3. 균주 접종 발효 홍삼의 진세노사이드 함량 분석**

[0064] 본 발명의 아스퍼질러스 우사미 및 류코노스톡 시트륨을 접종하여 공생배양한 홍삼 추출액의 진세노사이드 함량을, 아스퍼질러스 우사미 및 류코노스톡 시트륨 중 그 무엇도 접종하지 않은 홍삼추출액과 비교하여 분석을 실시하였다. 본 실시예에서 분석을 위한 분석기기로는 HPLC(agilent)와 검출기는 증기화 광산란 검출기(ELSD)인

ELSD(agilent)를 이용하여 HPLC 분석에 사용하였다.

[0065] 본 실시예에서 이동상은 acetonitril과 water를 사용하여 상온의 조건에서 분석을 실시하였으며, 유속은 1ml/min으로 하고, 시료의 주입량은 10㎕로 하였다.

[0066] 그 결과, 도 3에 나타낸 것과 같이, 아스퍼질러스 우사미 및 류코노스톡 시트륨 중 그 무엇도 접종하지 않은 홍삼 추출액에 비해서, 아스퍼질러스 우사미와 류코노스톡 시트륨을 접종하여 공생 배양한 본 발명의 홍삼추출물의 compound K 함량이 보다 현저히 증가하는 것을 확인할 수 있었다.

[0067] **실시예 4. 단일 균주 발효 홍삼과의 외부 독성물질 방어 효능 비교**

[0068] 본 발명의 아스퍼질러스 우사미 및 류코노스톡 시트륨을 접종하여 공생배양한 홍삼 추출액과 아스퍼질러스 우사미만을 단일 접종한 홍삼추출액의 외부 독성물질 방어 효능을 비교하기 위해서, 제 2상 해독화 효소인 GSTA2(glutathione S-transferase A2)의 발현 변화를 관찰하였다.

[0069] HepG 간세포주에 시료를 1/1000의 농도로 24시간 처리한 후 dish를 ice-cold PBS(phosphate-buffered saline)으로 세척하고 세포를 긁어내 튜브에 옮겼다. 튜브에 옮긴 모아진 세포를 용해 완충액(lysis buffer: 10mM Tris·HCl(pH 7.1), 100mM NaCl, 30mM sodium pyrophosphate, 1mM EGTA, 10% glycerol, 1mM PMSF, leupeptin, 0.5% TritonX-100)으로 4℃에서 1시간 동안 반응시킨 후, 10,000g로 10분간 원심분리하여 lysate를 얻었다. Protein sample은 -70℃에서 보관하면서 사용하였고, 면역화학적 분석을 위해 SDS(Sodium dodecylsulfate)-polyacrylamide gel 전기영동장치를 이용하여 protein을 분리하고, 나이트로섬유소막(nitrocellulose membrane)에 단백질을 전이하였다. 측정하고자 하는 1차 항체를 반응시키고, HRP 포함 2차 항체를 반응시킨 후 chemiluminescence detection kit로 현상하였다.

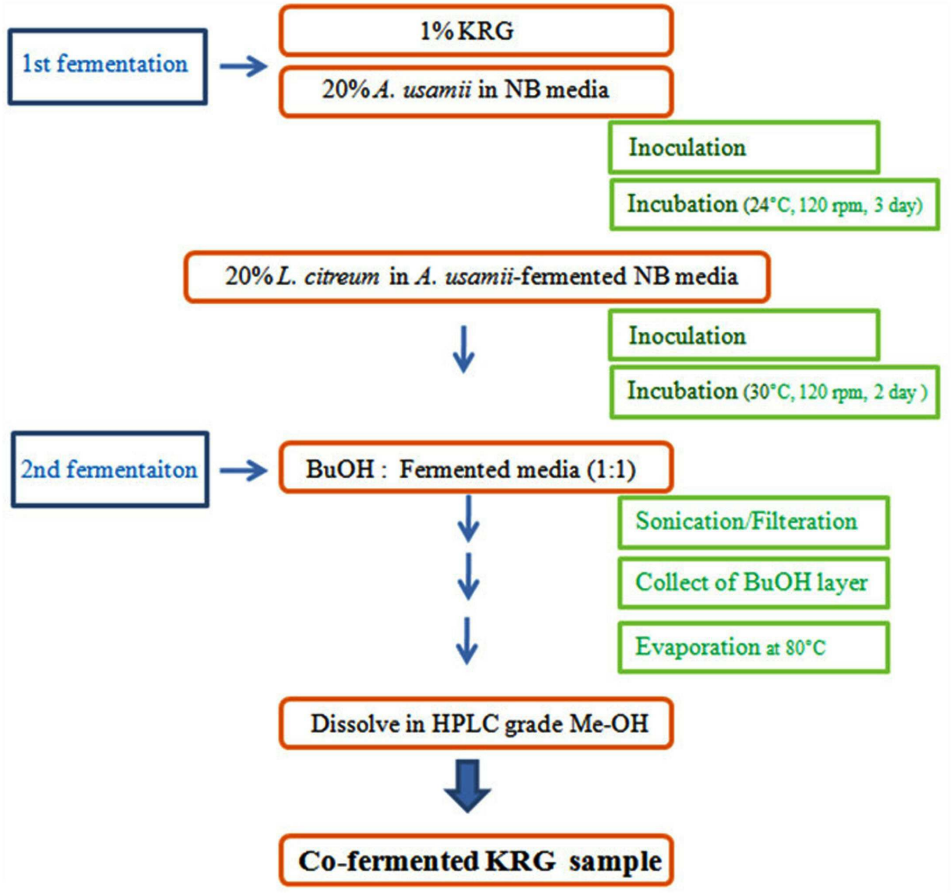
[0070] 그 결과, 도 4에 나타낸 것과 같이, 아스퍼질러스 우사미 및 류코노스톡 시트륨을 접종하여 공생 배양한 KRG는 아스퍼질러스 우사미만을 단일 접종하여 발효한 KRG보다 GSTA2의 발현이 현저히 증가하였다.

[0071] 상기 결과로부터, 아스퍼질러스 우사미 및 류코노스톡 시트륨을 접종하여 공생배양한 KRG가 체내에 유입된 외부 독성물질에 대한 방어 효능을 현저히 증가시킬 수 있을 것으로 예상된다.

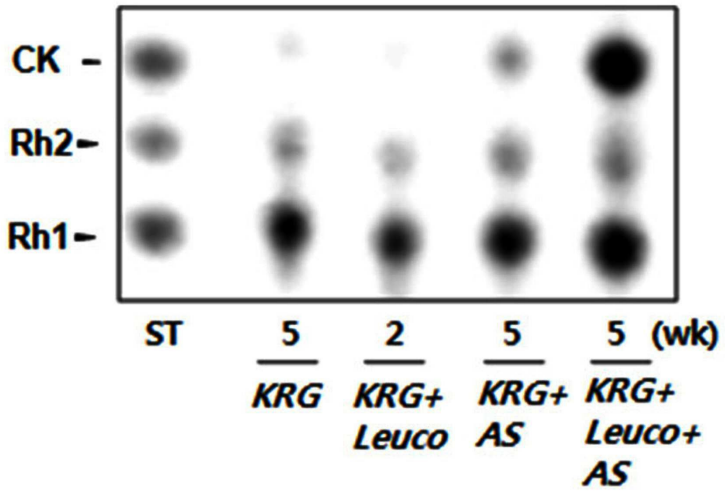
[0072] 전술한 본 발명의 설명은 예시를 위한 것이며, 본 발명이 속하는 기술분야의 통상의 지식을 가진 자는 본 발명의 기술적 사상이나 필수적인 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 쉽게 변형이 가능하다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적이 아닌 것으로 이해되어야 한다.

도면

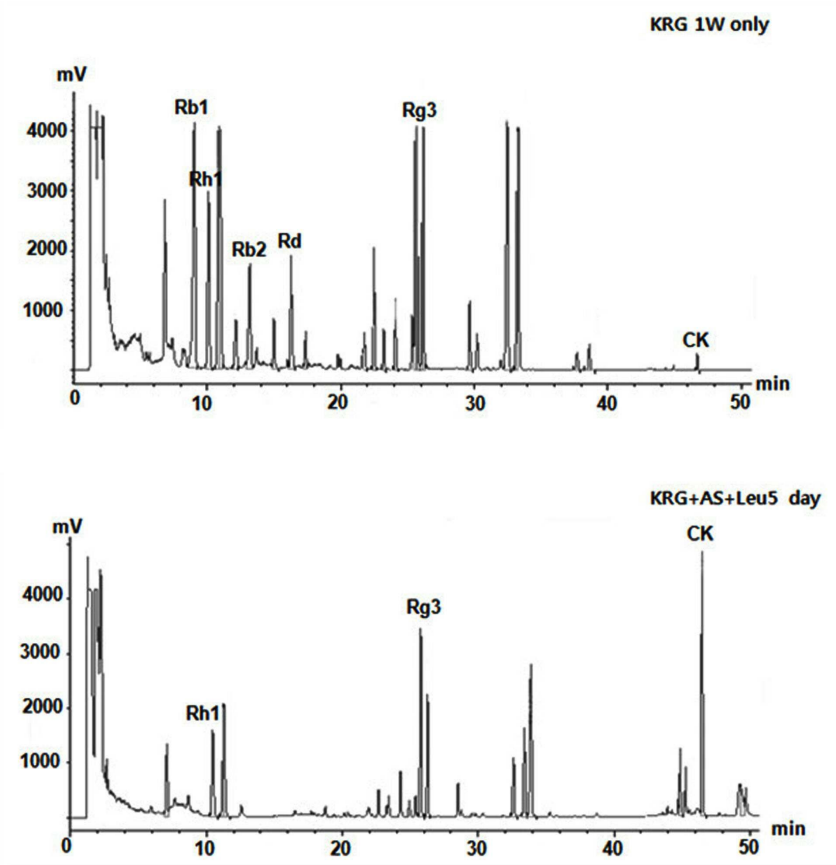
도면1


1st fermentation
1% KRG
20% A. usamii in NB media
Inoculation
Incubation (24°C, 120 rpm, 3 day)
20% L. citreum in A. usamii-fermented NB media
Inoculation
Incubation (30°C, 120 rpm, 2 day )
2nd fermentaiton
BuOH : Fermented media (1:1)
Sonication/Filteration
Collect of BuOH layer
Evaporation at 80°C
Dissolve in HPLC grade Me-OH
Co-fermented KRG sample

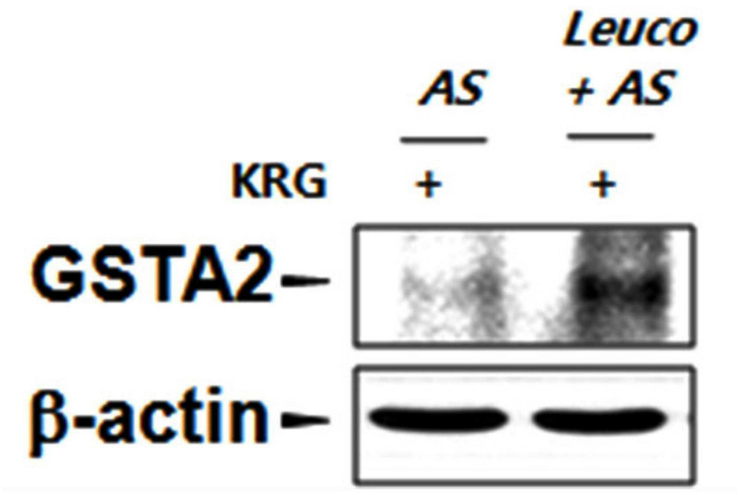
도면2


CK
Rh2
Rh1
ST
5
KRG
2
KRG+ Leuco
5
KRG+ AS
5
KRG+ Leuco+ AS
(wk)

도면3


KRG 1W only
mV
4000
3000
2000
1000
Rb1
Rh1
Rb2
Rd
Rg3
CK
0
10
20
30
40
50
min
KRG+AS+Leu5 day
mV
4000
3000
2000
1000
Rh1
Rg3
CK
0
10
20
30
40
50
min

도면4


AS
Leuco + AS
KRG
+
+
GSTA2
β-actin