



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2019년04월22일  
(11) 등록번호 10-1971186  
(24) 등록일자 2019년04월16일

- |  |  |
|--|--|
| <p>(51) 국제특허분류(Int. Cl.)<br/>A23L 2/385 (2006.01) A23L 2/38 (2006.01)<br/>A23L 33/105 (2016.01) A23L 33/135 (2016.01)</p> <p>(52) CPC특허분류<br/>A23L 2/385 (2013.01)<br/>A23L 2/382 (2013.01)</p> <p>(21) 출원번호 10-2018-0134382</p> <p>(22) 출원일자 2018년11월05일<br/>심사청구일자 2018년11월05일</p> <p>(56) 선행기술조사문헌<br/>KR101331171 B1*<br/>(뒷면에 계속)</p> | <p>(73) 특허권자<br/>주식회사한국야쿠르트<br/>서울특별시 서초구 강남대로 577 (잠원동)</p> <p>(72) 발명자<br/>라계현<br/>경기도 수원시 권선구 세화로151번길 36 201호(서둔동)<br/>김용태<br/>경기도 성남시 중원구 원터로75번길 22 진성주택 102호<br/>(뒷면에 계속)</p> <p>(74) 대리인<br/>경일호</p> |
|--|--|

전체 청구항 수 : 총 1 항

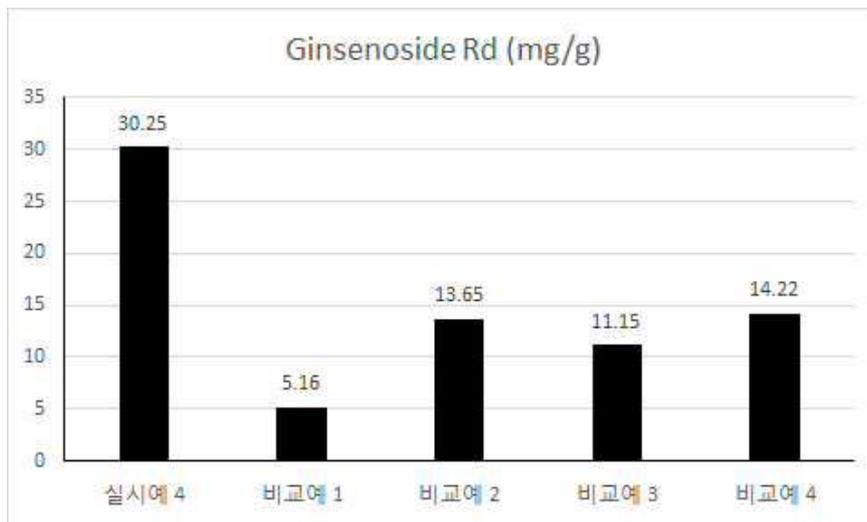
심사관 : 도현미

(54) 발명의 명칭 비피도박테리움 애니멀리스 서브스페시스 락티스 HY8002와 비피도박테리움 아돌레센티스 HY8502의 유산균 조합을 이용한 진세노사이드 Rd가 강화된 발효홍삼 농축액의 제조방법

(57) 요약

본 발명은 비피도박테리움 애니멀리스 서브스페시스 락티스(*Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis*) HY8002와 비피도박테리움 아돌레센티스(*Bifidobacterium adolescentis*) HY8502의 유산균 조합을 이용한 진세노사이드 Rd가 강화된 발효홍삼 농축액의 제조방법에 관한 것으로서, 홍삼을 비피도박테리움 애니멀리스 서브스페시스 락티스(*Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis*) HY8002와 비피도박테리움 아돌레센티스(*Bifidobacterium adolescentis*) HY8502의 유산균 조합을 일정비율로 함으로써 pH조건에 제한되지 않아 시너지(synergetic)한 발효 효율 개선을 통하여 산업화가 용이한 몸에 흡수가 뛰어나고 기능적 활성을 가진 진세노사이드 Rd 함량이 강화된 발효홍삼 농축액을 제조할 수 있는 장점이 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

*A23L 33/105* (2016.08)  
*A23L 33/135* (2016.08)  
*A23V 2002/00* (2013.01)  
*A23V 2250/2124* (2013.01)  
*A23V 2300/14* (2013.01)  
*A23V 2300/50* (2013.01)  
*A23Y 2300/19* (2013.01)  
*A23Y 2300/49* (2013.01)

(72) 발명자

**정승희**

경기도 용인시 기흥구 금화로82번길 17 금화마을  
5단지 502동 1603호

**강희림**

서울특별시 영등포구 신길3동 355-254

**이하예라**

서울특별시 관악구 관악로 304 관악현대아파트 10  
4동 1501호

**최일동**

경기도 용인시 기흥구 금화로58번길 10 금화마을주  
공4단지아파트 405-1704

**이정열**

경기도 양평군 서종면 통점길 63 404-1

**심재현**

경기도 용인시 기흥구 탑실로 152 213-901호

(56) 선행기술조사문헌

KR101822024 B1\*  
KR1020160036836 A\*  
KR100618171 B1\*  
KR1020070030025 A\*  
KR1020150080206 A\*  
KR101370386 B1\*

\*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

**명세서**

**청구범위**

**청구항 1**

삭제

**청구항 2**

삭제

**청구항 3**

삭제

**청구항 4**

삭제

**청구항 5**

- 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 50% 주정(酒精)을 첨가하여 3차 홍삼 주정추출물을 제조하는 단계;
- d)상기 a)단계의 1차 홍삼 주정추출물, 상기 b)단계의 2차 홍삼 주정추출물 및 상기 c)단계의 3차 홍삼 주정추출물을 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 비피도박테리움 애니멀리스 서브스페시스 락티스(*Bifidobacterium animalis ssp. lactis*) HY8002(수탁번호: KCTC13279BP) : 비피도박테리움 아돌레센티스(*Bifidobacterium adolescentis*) HY8502(수탁번호: KCTC13475BP)가 1:1 또는 1:2의 중량비율로 조합되는 유산균 조합을 접종하여 발효시키는 단계;
- h)상기 g)단계의 유산균 발효액을 가열하여 유산균을 불활성화시키는 단계; 및
- i)상기 h)단계의 유산균이 불활성화된 유산균 발효액을 감압농축하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 진세노사이드(ginsenoside) Rd가 강화된 발효홍삼 농축액의 제조방법.

**발명의 설명**

**기술 분야**

[0001] 본 발명은 비피도박테리움 애니멀리스 서브스페시스 락티스(*Bifidobacterium animalis ssp. lactis*) HY8002와 비피도박테리움 아돌레센티스(*Bifidobacterium adolescentis*) HY8502의 유산균 조합을 이용한 진세노사이드(ginsenoside) Rd가 강화된 발효홍삼 농축액의 제조방법에 관한 것으로서, 보다 상세하게는 비피도박테리움 애니멀리스 서브스페시스 락티스(*Bifidobacterium animalis ssp. lactis*) HY8002와 비피도박테리움 아돌레센티스(*Bifidobacterium adolescentis*) HY8502의 유산균 조합비율을 일정하게 함으로써 발효홍삼 농축액의 진세노사이드(ginsenoside) Rd 함량이 강화된 발효홍삼 농축액의 제조방법에 관한 것이다.

**배경 기술**

- [0002] 인삼(*Panax ginseng* C. A. Meyer)은 오가과(Araliaceae), 인삼속(*Panax*)에 속하는 식물로 뿌리를 약용으로 이용하는 대표적인 약용식물이다. 인삼의 약리성분이라 할 수 있는 진세노사이드(ginsenoside)는 현재 약 40여 종 이상 분리되었으며, 메이저 진세노사이드인 진세노사이드 Rb1, Rb2, Rc, Rd, Re 및 Rg1을 포함한 6 종 진세노사이드가 총 진세노사이드의 90%를 차지하고 있다.
- [0003] 진세노사이드는 사람이 섭취했을 때 장내 세균이 배당체를 기질로 하는 β-글루코시다아제(β-glucosidase)의 작용으로 글리코시드 결합(glycosidic bond)을 끊어 배당체가 비당체가 되어 체내로 흡수되어 약리 효능을 나타낸다. 그러나, 한국인 98명의 장내미생물을 이용하여 진세노사이드 Rb1의 전환능력을 확인한 결과 20%는 진세노사이드 대사 능력이 없거나 현저히 낮고, 약 60% 정도만이 진세노사이드 전환 가능한 미생물을 가지고 있어 많은 사람들이 진세노사이드를 효율적으로 대사하지 못하는 것으로 보고 되고 있다. 이렇듯 인삼의 개인별 효능차는 사람의 장내에 서식하는 장내 미생물 조성의 차이 및 장내 미생물의 효소활성의 차이에 의한 것이다. 이에 개인 간의 장내 미생물의 차이로 인한 인삼 약효 발현의 개인차를 줄이고 효능을 증대시키고자 유산균 또는 곰팡이를 이용하여 발효하거나 효소를 처리하는 방법이 시도되고 있다.
- [0004] 대한민국 등록특허공보 제10-1331171호에 락토바실러스 플란타룸(*lactobacillus plantarum*) KACC 11451를 이용하여 진세노사이드 Rd를 함유하는 발효홍삼을 제조하는 방법이 개시되어 있는 바와 같이, 일반적으로 발효 홍삼에 사용되는 균주는 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*) 균주를 포함하는 통성 유산균을 활용한 것이 대부분이고, 균주를 이용한 제조방법에서 pH 조건 및 배양시간이 5일이 걸리는 등 산업화 하기에는 어려움이 우려되고 있다.
- [0005] 이에, 본 발명자들은 홍삼을 3차에 걸친 주정추출을 통하여 추출하고, 그 추출물을 비피도박테리움 애니멀리스 서브스페시스 락티스(*Bifidobacterium animalis ssp. lactis*) HY8002 및 비피도박테리움 아돌레센티스(*Bifidobacterium adolescentis*) HY8502의 유산균 조합을 일정비율로 함으로써 시너지( Synergetic)한 발효효율 개선을 통하여 산업화가 용이한 진세노사이드(ginsenoside) Rd 함량이 강화된 발효홍삼 농축액의 제조방법을 개발하여 본 발명을 완성하게 되었다.

**선행기술문헌**

**특허문헌**

- [0006] (특허문헌 0001) 대한민국 등록특허공보 제10-1331171호(2013.11.13.)

**발명의 내용**

**해결하려는 과제**

- [0007] 본 발명은 홍삼을 3차에 걸친 주정추출을 통하여 추출하고, 그 추출물을 비피도박테리움 애니멀리스 서브스페시스 락티스(*Bifidobacterium animalis ssp. lactis*) HY8002 및 비피도박테리움 아돌레센티스(*Bifidobacterium adolescentis*) HY8502의 유산균 조합을 일정비율로 함으로써 시너지( Synergetic)한 발효효율 개선을 통하여 산업화가 용이한 진세노사이드(ginsenoside) Rd 함량이 강화된 발효홍삼 농축액의 제조방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.

**과제의 해결 수단**

- [0008] 상기와 같은 본 발명의 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 50% 주정(酒精)을 첨가하여 3차 홍삼 주정추출물을 제조하는 단계; d)상기 a)단계의 1차 홍삼 주정추출물, 상기 b)단계의 2차 홍삼 주정추출물 및 상기 c)단계의 3차 홍삼 주정추출물을 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 비피도박테리움 애니멀리스 서브스페시스 락티스(*Bifidobacterium animalis ssp. lactis*) HY8002(수탁번호: KCTC13279BP)와 비피도박테리움 아돌레센티스(*Bifidobacterium adolescentis*) HY8502(수탁번호: KCTC13475BP)의 유산균 조합을 접종하여 발효시키는 단계; h)상기 g)단계의 유산균 발효액을 가열하여 유산균을 불활성화시키는 단계; 및 i)상기 h)단계의 유산균이 불활

상화된 유산균 발효액을 감압농축하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 진세노사이드(ginsenoside) Rd가 강화된 발효홍삼 농축액의 제조방법을 제공하는 것을 특징으로 한다.

- [0009] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.
- [0010] 원료삼의 계량
- [0011] 홍삼은 4년근 또는 6년근의 본삼 또는 미삼을 사용한다. 바람직하기로는 6년근 홍미삼을 사용하는 것이 바람직하다.
- [0012] 1차 추출(주정추출)
- [0013] 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.
- [0014] 홍삼 추출 시에 홍삼 무게의 10~20배의 주정을 사용한다고 알려져 있어 진세노사이드 추출수율을 최대로 하기 위해서 홍삼 무게의 20배의 주정을 사용한다.
- [0015] 또한, 진세노사이드 추출수율을 최대로 하기 위하여 75~85℃에서 5~7시간 동안 추출하는 것이 바람직하다.
- [0016] 2차 추출(주정추출)
- [0017] 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.
- [0018] 3차 추출(주정추출)
- [0019] 상기 2차 추출에 사용된 홍미삼에 식품원료로 사용할 수 있는 50% 주정(酒精) 2,000L(주정 1,000L + 정제수 1,000L)를 다시 첨가하여 75~85℃에서 5~7시간 동안 추출하여 3차 홍삼 주정추출물을 얻는다.
- [0020] 상기 1차 주정 추출 단계에서 대부분(약 80~90%)의 진세노사이드 성분이 추출되지만, 나머지 잔량까지 추출하기 위해 2차 및 3차 주정추출을 하는 것이 바람직하다.
- [0021] 냉각 및 여과
- [0022] 상기 각각의 1차, 2차 및 3차 홍삼 주정추출물 40~50℃로 냉각한 후 퍼라이트(perlite)를 이용하여 여과한다.
- [0023] 상기와 같이 퍼라이트 여과를 하는 이유는 일반적으로 미세한 현탁물이나 콜로이드 입자를 제거하기 위함으로 진세노사이드 성분은 여과에 의해서 함량의 변화가 없기 때문이다.
- [0024] 한편, 상기 각각의 추출물을 40~50℃로 냉각하는 이유는 추출온도인 75~95℃에서는 추출물의 용해도 등의 원인으로 여과 효과가 반감되기 때문이다.
- [0025] 감압농축
- [0026] 상기 각각의 여과액을 25~30브릭스(Brix)로 감압농축한다.
- [0027] 상기와 같이, 감압농축을 하는 이유는 홍삼 주정추출물의 주정을 제거하고, 각 추출물의 보관 및 변질 우려를 낮추기 위함이다.
- [0028] 혼합 및 희석
- [0029] 상기 각각의 감압농축액을 혼합한 후에 유산균 발효를 위하여 정제수를 첨가하여 5브릭스(Brix)가 되게 희석한다.
- [0030] 유산균 발효
- [0031] 풍미 개선 및 진세노사이드 Rd의 함량을 강화하기 위하여 상기 희석액 100중량부에 대하여 유산균조합농도 0.1~1.0중량부의 비피도박테리움 애니멀리스 서브스페시스 락티스(*Bifidobacterium animalis ssp. lactis*) HY8002 균주(수탁번호: KCTC13279BP)와 비피도박테리움 아돌레센티스(*Bifidobacterium adolescentis*) HY8502 균주(수탁번호: KCTC13475BP)의 유산균 조합을 접종하여 35~39℃에서 6~24시간 동안 발효시킨다.
- [0032] 특히, 비피도박테리움 애니멀리스 서브스페시스 락티스(*Bifidobacterium animalis ssp. lactis*) HY8002 균주 : 비피도박테리움 아돌레센티스(*Bifidobacterium adolescentis*) HY8502 균주를 혼합하는 중량비율은 1:1~4인 것

이 바람직하다. 특히, 상기 중량비율이 1:2인 것이 더욱 바람직하다.

[0033] 실황

[0034] 상기 유산균 발효액을 85~95℃에서 9~12분 동안 가열하여 상기 유산균 2종을 불활성화시킨다.

[0035] 감압농축

[0036] 상기 유산균 2종이 불활성화된 유산균 발효액을 70~80브릭스(Brix)가 되게 감압농축한다.

[0037] 상기와 같이, 높은 브릭스로 감압농축하는 이유는 미생물 등에 의한 오염을 예방하기 위함이다.

[0038] 살균 및 포장

[0039] 상기 농축액을 85~95℃에서 0.5~1.5시간 동안 살균한 후 포장하여 발효홍삼 농축액을 제조한다. 특히, 완벽한 살균을 위하여 상기 온도 및 시간 동안 살균하는 것이 바람직하다.

### 발명의 효과

[0040] 본 발명에 따른 발효홍삼의 제조방법은 홍삼을 비피도박테리움 애니멀리스 서브스페시스 락티스 (*Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis*) HY8002와 비피도박테리움 아돌레센티스(*Bifidobacterium adolescentis*) HY8502의 유산균 조합을 일정비율로 함으로써 pH조건에 제한되지 않아 시너지(synergetic)한 발효 효율 개선을 통하여 산업화가 용이한 몸에 흡수가 뛰어나고 기능적 활성을 가진 진세노사이드 Rd 함량이 강화된 발효홍삼 농축액을 제조할 수 있는 장점이 있다.

### 도면의 간단한 설명

[0041] 도 1은 발효전 홍삼농축액과 유산균에 의해 발효된 홍삼농축액의 진세노사이드 Rd의 함량을 나타낸 그래프이다.

도 2는 유산균 조합 비율에 따른 홍삼 농축액의 진세노사이드 Rd의 함량을 나타낸 그래프이다.

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0042] 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.

[0043] <실시예 1>

[0044] 비피도박테리움 애니멀리스 서브스페시스 락티스(*Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis*) HY8002 균주의 분리 및 동정

[0045] 홍삼의 발효능을 가진 비피도박테리움 애니멀리스 서브스페시스 락티스(*Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis*) HY8002 균주는 건강한 사람의 분변을 취하여 이를 pH 2.3의 완충용액을 이용하여 혐기적으로 희석하여 내산성이 높은 균주의 생존과 선발에 활용하였다. 이렇게 희석된 분변 용액을 비피도박테리움을 분리하는 배지인 BL 한천 평판배지에 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.

[0046] 이하, 선발된 비피도박테리움 애니멀리스 서브스페시스 락티스(*Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis*) HY8002 균주의 미생물학적 특성은 다음과 같다.

[0047] (1)균의 형태

[0048] BL 한천평판배지에서 37℃, 48시간 혐기 배양했을 때 균의 형태

[0049] 1) 세포의 형상 : 곤봉형, Y자형 등 다양

[0050] 2) 그람염색 : 양성

[0051] (2)집락의 형태

[0052] BL 한천평판배지에서 37℃, 48시간 혐기 배양했을 때 집락의 형태

[0053] 1) 형상 : 원형

- [0054] 2) 크기 : 1~3mm
- [0055] 3) 색조 : 유백색
- [0056] (3)생리학적 성질
- [0057] 1) 생육온도
- [0058] 생육범위 : 25~45℃
- [0059] 최적온도 : 37~41℃
- [0060] 2) 생육 pH
- [0061] 생육범위 : pH 2.0~8.0
- [0062] 최적 pH : pH 6.5~7.0
- [0063] 3) 산소의 영향 : 편성 혐기성
- [0064] 4) 보게스 - 프로스카우어(Voges - Proskauer) 반응 : -
- [0065] 5) 카탈라아제 : -
- [0066] 6) 암모니아 생성 : -
- [0067] 7) 유응고성 : -
- [0068] 8) 리트머스 밀크 환원 : -
- [0069] 9) 유래아 분해효소 : -
- [0070] 10) 베타-갈락토오스 분해효소 : +
- [0071] 11) 알파-글루코오스 분해효소 : +
- [0072] 12) 당이용성

**표 1**

[0073]	당류	이용성	당류	이용성
	D-xylose	-	Esculin	+
	L-arabinose	-	Salicin	+
	D-ribose	+	D-cellobiose	+
	Adonitol	-	D-maltose	+
	D-galactose	+	D-lactose	+
	D-glucose	+	D-melibiose	+
	D-fructose	+	D-saccharose	+
	D-manose	+	D-trehalose	-
	D-mannitol	-	Inulin	-
	D-sorbitol	-	D-melezitose	-
	αmethyl-D-mannoside	+	D-raffinose	+
	αmethyl-D-glucoside	+	Starch	-
	N-acetylglucoside	+	β-gentiobiose	+
	Amygdalin	+	D-turanose	+
	Arbutin	+	D-tagatose	-

- [0074] (4)내산성
- [0075] 본 발명의 비피도박테리움 애니멀리스 서브스페시스 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.

[0076] 그 결과, 본 발명의 비피도박테리움 애니멀리스 서브스페시스 락티스(*Bifidobacterium animalis ssp. lactis*) HY8002 균주는 10% 정도의 낮은 사멸율을 보여 산에 대한 강한 내성을 갖고 있음을 알 수 있었다.

[0077] (5)내담즙산성

[0078] 담즙산이 첨가된 BL 한천평판배지에 본 발명의 비피도박테리움 애니멀리스 서브스페시스 락티스(*Bifidobacterium animalis ssp. lactis*) HY8002 균주를 백금으로 접종하여 37℃에서 48시간 혐기 배양하여 집락의 생육여부를 관찰하였다.

[0079] 그 결과, 본 발명의 비피도박테리움 애니멀리스 서브스페시스 락티스(*Bifidobacterium animalis ssp. lactis*) HY8002 균주는 0.15%(w/v)의 담즙산이 첨가된 배지에서도 생육하여 담즙산에 대한 내성도 지니고 있음을 알 수 있었다.

[0080] (6)분리 및 동정

[0081] 상기 본 발명의 비피도박테리움 애니멀리스 서브스페시스 락티스(*Bifidobacterium animalis ssp. lactis*) HY8002 균주를 최신의 분자생물학적 기법을 이용하여 분류 및 동정하고자 16S rDNA 분석을 실시하였다.

[0082] 즉, BL 한천평판배지에서 배양된 본 발명의 비피도박테리움 애니멀리스 서브스페시스 락티스(*Bifidobacterium animalis ssp. lactis*) HY8002 균주에서 콜로니를 취하고 이의 DNA를 분리하여 27F(5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3')와 1492R(5'-GGTACCTGTACGACTT-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)를 하기의 표 2에 나타내었다.

[0083] 하기의 표 2에서 확인할 수 있는 바와 같이, 본 발명의 균주의 16S rDNA 유전자는 비피도박테리움 애니멀리스 서브스페시스 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
<a href="#">Bifidobacterium animalis subsp. lactis strain CECT 8145 16S ribosomal RNA gene, partial seq</a>	2732	2732	89%	0.0	99%	<a href="#">KP202873.1</a>
<a href="#">Bifidobacterium animalis subsp. lactis strain BF052 complete genome</a>	2732	10929	89%	0.0	99%	<a href="#">CP009045.1</a>
<a href="#">Bifidobacterium animalis strain A6 complete genome</a>	2732	13661	89%	0.0	99%	<a href="#">CP010433.1</a>
<a href="#">Bifidobacterium animalis subsp. lactis KLD52.0603 complete genome</a>	2732	13294	89%	0.0	99%	<a href="#">CP007522.1</a>
<a href="#">Bifidobacterium animalis strain RH complete genome</a>	2732	5464	89%	0.0	99%	<a href="#">CP007755.1</a>
<a href="#">Bifidobacterium animalis subsp. lactis ATCC 27673</a>	2732	10929	89%	0.0	99%	<a href="#">CP003941.1</a>
<a href="#">Bifidobacterium animalis subsp. lactis Bl12 complete genome</a>	2732	10929	89%	0.0	99%	<a href="#">CP004053.1</a>
<a href="#">Bifidobacterium animalis subsp. lactis BlC1 complete genome</a>	2732	10929	89%	0.0	99%	<a href="#">CP003039.2</a>

[0084] 이상의 미생물학적 및 분자생물학적 동정 결과를 토대로 본 발명의 균주는 비피도박테리움 애니멀리스 서브스페시스 락티스(*Bifidobacterium animalis ssp. lactis*)로 확인되었으며, 비피도박테리움 애니멀리스 서브스페시스 락티스(*Bifidobacterium animalis ssp. lactis*) HY8002로 명명하고, 한국생명공학연구원 생물자원센터에 2017년 5월 31일자로 기탁하였다(수탁번호: KCTC13279BP).

[0086] <실시예 2>

[0087] 비피도박테리움 아돌레센티스(*Bifidobacterium adolescentis*) HY8502 균주의 분리 및 동정

[0088] 인삼을 항상 복용하는 건강한 사람의 분변을 BL 한천배지(일본, Nissui 제약(주))에 이식하여 혐기적으로 72시간 배양하고, 자라나온 콜로니들은 각각의 GAM 액체배지(일본, Nissui 제약(주))에 이식하여 24시간 배양하였다. 그리고, 여기에 하기의 비교예 1의 홍삼농축액을 1%(w/v, 1g/100mL) 넣어 24시간 배양하였다. 상기 배양액(10mL)을 배양액의 2배(20mL)의 아세트산에틸(ethylacetate)로 추출하여 TLC [Silica gel 60G F254, Merck; 전개용매, 클로로포름-메탄올-물(65:35:10) 혼합물의 하층]을 수행하고 표준품 진세노사이드 F2 및 화합

물 K와 비교하여 진세노사이드 F2와 화합물 K를 많이 만드는 균주를 선발하였다.

[0089] 이하, 선발된 비피도박테리움 아돌레센티스(*Bifidobacterium adolescentis*) HY8502 균주의 미생물학적 특성은 다음과 같다.

[0090] (1)균의 형태

[0091] BL 한천평판배지에서 37℃, 48시간 혐기 배양했을 때 균의 형태

- [0092] 1) 세포의 형상 : 곤봉형, Y자형 등 다양
- [0093] 2) 그람염색 : 양성

[0094] (2)집락의 형태

[0095] BL 한천평판배지에서 37℃, 48시간 혐기 배양했을 때 집락의 형태

- [0096] 1) 형상 : 원형
- [0097] 2) 크기 : 1~3mm
- [0098] 3) 색조 : 유갈색

[0099] (3)생리학적 성질

- [0100] 1) 생육온도
  - [0101] 생육범위 : 25~42℃
  - [0102] 최적온도 : 37℃
- [0103] 2) 생육 pH
  - [0104] 생육범위 : pH 2.0~8.0
  - [0105] 최적 pH : pH 6.5~7.0
- [0106] 3) 산소의 영향 : 편성 혐기성
- [0107] 4) 카탈라아제 : -
- [0108] 5) 암모니아 생성 : -
- [0109] 6) 당이용성

표 3

당류	이용성	당류	이용성
L-tryptophan	-	gelatin	-
Urea	-	Esculin	-
D-Glucose	+	glycerol	-
D-mannitol	-	D-cellobiose	-
D-lactose	+	D-mannose	-
D-saccharose	-	D-melesitose	-
D-maltose	+	D-raffinose	+
Salicin	±	D-sorbitol	-
D-xylose	±	D-rhamnose	-
L-arabinose	±	D-trehalose	-

[0111] (4)분리 및 동정

[0112] 상기 본 발명의 비피도박테리움 아돌레센티스(*Bifidobacterium adolescentis*) HY8502 균주를 최신의 분자생물학적 기법을 이용하여 분류 및 동정하고자 16S rDNA 분석을 실시하였다.

[0113] 즉, BL 한천평판배지에서 배양된 본 발명의 비피도박테리움 아돌레센티스(*Bifidobacterium adolescentis*) HY8502 균주에서 콜로니를 취하고 이의 DNA를 분리하여 27F(5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3')와 1492R(5'-

GGTTACCTTGTTACGACTT-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 4에 나타내었다.

[0114] 하기의 표 4에서 확인할 수 있는 바와 같이, 본 발명의 균주의 16S rDNA 유전자는 비피도박테리움 아돌레센티스 (*Bifidobacterium adolescentis*)의 16S rDNA 유전자와 99% 일치하는 것으로 확인되었다.

표 4

Accession	Description	Max score	Total score	Query over	E valule	Max ident
GQ898761.1	Uncultured bacteriumclone S4-97 16S ribosomal RNAgene, partial sequence	2638	2638	100%	0	99%
CP007443.1	Bifidobacterium adolescentis strain 22L, complete genome	2632	10530	100%	0	99%
GQ898816.1	Uncultured bacterium clone S4-173 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2632	2632	100%	0	99%
GQ898692.1	Uncultured bacterium clone S4-26 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2627	2627	100%	0	99%
AP009256.1	Bifidobacterium adolescentis ATCC15703 DNA, complete genome	2615	12917	100%	0	99%
GQ898631.1	UnculturedbacteriumcloneS3-182 16S ribosomal RNAgene, partial sequence	2610	2610	100%	0	99%

[0116] 이상의 미생물학적 및 분자생물학적 동정 결과를 토대로 본 발명의 균주는 비피도박테리움 아돌레센티스 (*Bifidobacterium adolescentis*)로 확인되었으며, 비피도박테리움 아돌레센티스(*Bifidobacterium adolescentis*) HY8502로 명명하고, 한국생명공학연구원 생물자원센터에 2018년 2월 1일자로 기탁하였다(수탁번호: KCTC13475BP).

[0117] <실시예 3>

[0118] 3-1. 비피도박테리움 애니멀리스 서브스페시스 락티스(*Bifidobacterium animalis ssp. lactis*) HY8002 : 비피도박테리움 아돌레센티스(*Bifidobacterium adolescentis*) HY8502를 1:2의 중량비율로 조합한 경우의 발효홍삼 배양액의 제조

[0119] (1)원료삼 계량

[0120] 풍기인삼농협에서 구입한 6년근 홍미삼 100kg을 사용하였다.

[0121] (2)1차 추출

[0122] 상기 홍미삼에 식품원료로 사용할 수 있는 50% 주정(酒精) 2,000L(주정 1,000L + 정제수 1,000L)를 첨가하여 80℃에서 6시간 추출하여 1차 홍삼 주정추출물을 얻었다.

[0123] (3)2차 추출

[0124] 상기 1차 추출에 사용된 홍미삼에 식품원료로 사용할 수 있는 50% 주정(酒精) 2,000L(주정 1,000L + 정제수 1,000L)를 첨가하여 80℃에서 6시간 추출하여 2차 홍삼 주정추출물을 얻었다.

[0125] (4)3차 추출

[0126] 상기 2차 추출에 사용된 홍미삼에 식품원료로 사용할 수 있는 50% 주정(酒精) 2,000L(주정 1,000L + 정제수 1,000L)를 첨가하여 80℃에서 6시간 추출하여 3차 홍삼 주정추출물을 얻었다.

[0127] (5)냉각 및 여과

[0128] 상기 각각의 추출물을 45℃로 냉각한 후 퍼라이트(perlite)를 이용하여 여과하였다.

- [0129] (6)농축
- [0130] 상기 각각의 여과액을 27브릭스(Brix)로 감압농축하였다.
- [0131] (7)혼합 및 희석
- [0132] 상기 각각의 감압농축액을 혼합한 후에 유산균 발효를 위하여 정제수를 첨가하여 5브릭스(Brix)가 되도록 희석하였다.
- [0133] (8)유산균 발효
- [0134] 상기 희석액 300중량부에 대하여 비피도박테리움 애니멀리스 서브스페시스 락티스(*Bifidobacterium animalis ssp. lactis*) HY8002 : 비피도박테리움 아돌레센티스(*Bifidobacterium adolescentis*) HY8502가 1:2의 중량비율로 조합된 유산균조합농도 3중량부를 접종하여 45℃에서 24시간 동안 발효시켜 발효홍삼 배양액을 제조하였다.
- [0135] 3-2. 비피도박테리움 애니멀리스 서브스페시스 락티스(*Bifidobacterium animalis ssp. lactis*) HY8002 : 비피도박테리움 아돌레센티스(*Bifidobacterium adolescentis*) HY8502를 1:1의 중량비율로 조합한 경우의 발효홍삼 배양액의 제조
- [0136] 비피도박테리움 애니멀리스 서브스페시스 락티스(*Bifidobacterium animalis ssp. lactis*) HY8002 : 비피도박테리움 아돌레센티스(*Bifidobacterium adolescentis*) HY8502를 1:1의 중량비율로 조합한 것을 제외하고는 상기 실시예 3-1과 동일한 방법으로 발효홍삼 배양액을 제조하였다.
- [0137] 3-3. 비피도박테리움 애니멀리스 서브스페시스 락티스(*Bifidobacterium animalis ssp. lactis*) HY8002 : 비피도박테리움 아돌레센티스(*Bifidobacterium adolescentis*) HY8502를 2:1의 중량비율로 조합한 경우의 발효홍삼 배양액의 제조
- [0138] 비피도박테리움 애니멀리스 서브스페시스 락티스(*Bifidobacterium animalis ssp. lactis*) HY8002 : 비피도박테리움 아돌레센티스(*Bifidobacterium adolescentis*) HY8502를 2:1의 중량비율로 조합한 것을 제외하고는 상기 실시예 3-1과 동일한 방법으로 발효홍삼 배양액을 제조하였다.
- [0139] <실시예 4>
- [0140] 비피도박테리움 애니멀리스 서브스페시스 락티스(*Bifidobacterium animalis ssp. lactis*) HY8002 : 비피도박테리움 아돌레센티스(*Bifidobacterium adolescentis*) HY8502를 1:2의 중량비율로 조합한 경우의 발효홍삼 농축액의 제조
- [0141] (1)원료삼 계량
- [0142] 풍기인삼농협에서 구입한 6년근 홍미삼 100kg을 사용하였다.
- [0143] (2)1차 추출
- [0144] 상기 홍미삼에 식품원료로 사용할 수 있는 50% 주정(酒精) 2,000L(주정 1,000L + 정제수 1,000L)를 첨가하여 80℃에서 6시간 추출하여 1차 홍삼 주정추출물을 얻었다.
- [0145] (3)2차 추출
- [0146] 상기 1차 추출에 사용된 홍미삼에 식품원료로 사용할 수 있는 50% 주정(酒精) 2,000L(주정 1,000L + 정제수 1,000L)를 첨가하여 80℃에서 6시간 추출하여 2차 홍삼 주정추출물을 얻었다.
- [0147] (4)3차 추출
- [0148] 상기 2차 추출에 사용된 홍미삼에 식품원료로 사용할 수 있는 50% 주정(酒精) 2,000L(주정 1,000L + 정제수 1,000L)를 첨가하여 80℃에서 6시간 추출하여 3차 홍삼 주정추출물을 얻었다.
- [0149] (5)냉각 및 여과
- [0150] 상기 각각의 추출물을 45℃로 냉각한 후 퍼라이트(perlite)를 이용하여 여과하였다.
- [0151] (6)농축
- [0152] 상기 각각의 여과액을 27브릭스(Brix)로 감압농축하였다.

- [0153] (7)혼합 및 희석
- [0154] 상기 각각의 감압농축액을 혼합한 후에 유산균 발효를 위하여 정제수를 첨가하여 5브릭스(Brix)가 되도록 희석하였다.
- [0155] (8)유산균 발효
- [0156] 상기 희석액 300중량부에 대하여 비피도박테리움 애니멀리스 서브스페시스 락티스(*Bifidobacterium animalis ssp. lactis*) HY8002 : 비피도박테리움 아돌레센티스(*Bifidobacterium adolescentis*) HY8502가 1:2의 중량비율로 조합된 유산균조합농도 3중량부를 접종하여 45℃에서 24시간 동안 발효시켰다.
- [0157] (9)실활
- [0158] 상기 유산균 발효액을 90℃에서 10분 동안 가열하여 상기 유산균 2종을 불활성화시켰다.
- [0159] (10)농축
- [0160] 상기 유산균이 불활성화된 유산균 발효액을 70브릭스(Brix)가 되게 감압농축하였다.
- [0161] (11)살균 및 포장
- [0162] 상기 농축액을 90℃에서 1시간 동안 살균한 후 포장하여 발효홍삼 농축액을 제조하였다.
- [0163] <비교예 1>
- [0164] 홍삼 농축액의 제조
- [0165] (1)원료삼 계량
- [0166] 풍기인삼농협에서 구입한 6년근 홍미삼 100kg을 사용하였다.
- [0167] (2)1차 추출
- [0168] 상기 홍미삼에 식품원료로 사용할 수 있는 50% 주정(酒精) 2,000L(주정 1,000L + 정제수 1,000L)를 첨가하여 80℃에서 6시간 추출하여 1차 홍삼 주정추출물을 얻었다.
- [0169] (3)2차 추출
- [0170] 상기 1차 추출에 사용된 홍미삼에 식품원료로 사용할 수 있는 50% 주정(酒精) 2,000L(주정 1,000L + 정제수 1,000L)를 첨가하여 80℃에서 6시간 추출하여 2차 홍삼 주정추출물을 얻었다.
- [0171] (4)3차 추출
- [0172] 상기 2차 추출에 사용된 홍미삼에 식품원료로 사용할 수 있는 50% 주정(酒精) 2,000L(주정 1,000L + 정제수 1,000L)를 첨가하여 80℃에서 6시간 추출하여 3차 홍삼 주정추출물을 얻었다.
- [0173] (5)냉각 및 여과
- [0174] 상기 각각의 추출물을 45℃로 냉각한 후 퍼라이트(perlite)를 이용하여 여과하였다.
- [0175] (6)농축
- [0176] 상기 각각의 여과액을 70브릭스(Brix)로 감압농축하였다.
- [0177] (7)혼합
- [0178] 상기 각각의 감압농축액을 혼합하였다.
- [0179] (8)살균 및 포장
- [0180] 상기 혼합액을 90℃에서 1시간 동안 살균한 후 포장하여 홍삼 농축액을 제조하였다.
- [0181] <비교예 2>
- [0182] 비피도박테리움 애니멀리스 서브스페시스 락티스(*Bifidobacterium animalis ssp. lactis*) HY8002를 이용한 발효홍삼 농축액의 제조
- [0183] (1)원료삼 계량

- [0184] 풍기인삼농협에서 구입한 6년근 홍미삼 100kg을 사용하였다.
- [0185] (2)1차 추출
- [0186] 상기 홍미삼에 식품원료로 사용할 수 있는 50% 주정(酒精) 2,000L(주정 1,000L + 정제수 1,000L)를 첨가하여 80℃에서 6시간 추출하여 1차 홍삼 주정추출물을 얻었다.
- [0187] (3)2차 추출
- [0188] 상기 1차 추출에 사용된 홍미삼에 식품원료로 사용할 수 있는 50% 주정(酒精) 2,000L(주정 1,000L + 정제수 1,000L)를 첨가하여 80℃에서 6시간 추출하여 2차 홍삼 주정추출물을 얻었다.
- [0189] (4)3차 추출
- [0190] 상기 2차 추출에 사용된 홍미삼에 식품원료로 사용할 수 있는 50% 주정(酒精) 2,000L(주정 1,000L + 정제수 1,000L)를 첨가하여 80℃에서 6시간 추출하여 3차 홍삼 주정추출물을 얻었다.
- [0191] (5)냉각 및 여과
- [0192] 상기 각각의 추출물을 45℃로 냉각한 후 퍼라이트(perlite)를 이용하여 여과하였다.
- [0193] (6)농축
- [0194] 상기 각각의 여과액을 27브릭스(Brix)로 감압농축하였다.
- [0195] (7)혼합 및 희석
- [0196] 상기 각각의 감압농축액을 혼합한 후에 유산균 발효를 위하여 정제수를 첨가하여 5브릭스(Brix)가 되도록 희석하였다.
- [0197] (8)유산균 발효
- [0198] 상기 희석액 300중량부에 대하여 3중량부의 비피도박테리움 애니멀리스 서브스페시스 락티스(*Bifidobacterium animalis ssp. lactis*) HY8002를 접종하여 45℃에서 24시간 동안 발효시켰다.
- [0199] (9)실활
- [0200] 상기 유산균 발효액을 90℃에서 10분 동안 가열하여 상기 유산균을 불활성화시켰다.
- [0201] (10)농축
- [0202] 상기 유산균이 불활성화된 유산균 발효액을 70브릭스(Brix)가 되게 감압농축하였다.
- [0203] (11)살균 및 포장
- [0204] 상기 농축액을 90℃에서 1시간 동안 살균한 후 포장하여 발효홍삼 농축액을 제조하였다.
- [0205] <비교예 3>
- [0206] 비피도박테리움 아돌레센티스(*Bifidobacterium adolescentis*) HY8502를 이용한 발효홍삼 농축액의 제조
- [0207] (1)원료삼 계량
- [0208] 풍기인삼농협에서 구입한 6년근 홍미삼 100kg을 사용하였다.
- [0209] (2)1차 추출
- [0210] 상기 홍미삼에 식품원료로 사용할 수 있는 50% 주정(酒精) 2,000L(주정 1,000L + 정제수 1,000L)를 첨가하여 80℃에서 6시간 추출하여 1차 홍삼 주정추출물을 얻었다.
- [0211] (3)2차 추출
- [0212] 상기 1차 추출에 사용된 홍미삼에 식품원료로 사용할 수 있는 50% 주정(酒精) 2,000L(주정 1,000L + 정제수 1,000L)를 첨가하여 80℃에서 6시간 추출하여 2차 홍삼 주정추출물을 얻었다.
- [0213] (4)3차 추출
- [0214] 상기 2차 추출에 사용된 홍미삼에 식품원료로 사용할 수 있는 50% 주정(酒精) 2,000L(주정 1,000L + 정제수

1,000L)를 첨가하여 80℃에서 6시간 추출하여 3차 홍삼 주정추출물을 얻었다.

[0215] (5)냉각 및 여과

[0216] 상기 각각의 추출물을 45℃로 냉각한 후 퍼라이트(perlite)를 이용하여 여과하였다.

[0217] (6)농축

[0218] 상기 각각의 여과액을 27브릭스(Brix)로 감압농축하였다.

[0219] (7)혼합 및 희석

[0220] 상기 각각의 감압농축액을 혼합한 후에 유산균 발효를 위하여 정제수를 첨가하여 5브릭스(Brix)가 되도록 희석하였다.

[0221] (8)유산균 발효

[0222] 상기 희석액 300중량부에 대하여 3중량부의 비피도박테리움 아돌레센티스(*Bifidobacterium adolescentis*) HY8502를 접종하여 45℃에서 24시간 동안 발효시켰다.

[0223] (9)실활

[0224] 상기 유산균 발효액을 90℃에서 10분 동안 가열하여 상기 유산균을 불활성화시켰다.

[0225] (10)농축

[0226] 상기 유산균이 불활성화된 유산균 발효액을 70브릭스(Brix)가 되게 감압농축하였다.

[0227] (11)살균 및 포장

[0228] 상기 농축액을 90℃에서 1시간 동안 살균한 후 포장하여 발효홍삼 농축액을 제조하였다.

[0229] <비교예 4>

[0230] 비피도박테리움 애니멀리스 서브스페시스 락티스(*Bifidobacterium animalis ssp. lactis*) HY8002와 비피도박테리움 아돌레센티스(*Bifidobacterium adolescentis*) HY8502로 각각 발효한 발효홍삼 농축액의 제조

[0231] (1)원료삼 계량

[0232] 풍기인삼농협에서 구입한 6년근 홍미삼 100kg을 사용하였다.

[0233] (2)1차 추출

[0234] 상기 홍미삼에 식품원료로 사용할 수 있는 50% 주정(酒精) 2,000L(주정 1,000L + 정제수 1,000L)를 첨가하여 80℃에서 6시간 추출하여 1차 홍삼 주정추출물을 얻었다.

[0235] (3)2차 추출

[0236] 상기 1차 추출에 사용된 홍미삼에 식품원료로 사용할 수 있는 50% 주정(酒精) 2,000L(주정 1,000L + 정제수 1,000L)를 첨가하여 80℃에서 6시간 추출하여 2차 홍삼 주정추출물을 얻었다.

[0237] (4)3차 추출

[0238] 상기 2차 추출에 사용된 홍미삼에 식품원료로 사용할 수 있는 50% 주정(酒精) 2,000L(주정 1,000L + 정제수 1,000L)를 첨가하여 80℃에서 6시간 추출하여 3차 홍삼 주정추출물을 얻었다.

[0239] (5)냉각 및 여과

[0240] 상기 각각의 추출물을 45℃로 냉각한 후 퍼라이트(perlite)를 이용하여 여과하였다.

[0241] (6)농축

[0242] 상기 각각의 여과액을 27브릭스(Brix)로 감압농축하였다.

[0243] (7)혼합 및 희석

[0244] 상기 각각의 감압농축액을 혼합한 후에 유산균 발효를 위하여 정제수를 첨가하여 5브릭스(Brix)가 되도록 희석하였다.

- [0245] (8)유산균 발효
- [0246] 상기 희석액을 동량으로 두 개의 탱크로 나누어, 하나는 상기 희석액 300중량부에 대하여 비피도박테리움 애니멀리스 서브스페시스 락티스(*Bifidobacterium animalis ssp. lactis*) HY8002를 1.5중량부 접종하고, 다른 하나는 상기 희석액 300중량부에 대하여 비피도박테리움 아돌레센티스(*Bifidobacterium adolescentis*) HY8502를 1.5중량부로 접종하여 각각 45℃에서 24시간 동안 발효시켰다.
- [0247] (9)실활
- [0248] 상기 각각의 유산균 발효액을 90℃에서 10분 동안 가열하여 상기 유산균 2종을 불활성화시켰다.
- [0249] (10)혼합 및 농축
- [0250] 상기 유산균이 불활성화된 각각의 유산균 발효액을 혼합한 후에 70브릭스(Brix)가 되게 감압농축하였다.
- [0251] (11)살균 및 포장
- [0252] 상기 농축액을 90℃에서 1시간 동안 살균한 후 포장하여 발효홍삼 농축액을 제조하였다.
- [0253] <시험예 1>
- [0254] 유산균 조합 여부에 따른 홍삼 농축액의 진세노사이드 함량 분석
- [0255] 상기 실시예 4의 '비피도박테리움 애니멀리스 서브스페시스 락티스(*Bifidobacterium animalis ssp. lactis*) HY8002와 비피도박테리움 아돌레센티스(*Bifidobacterium adolescentis*) HY8502의 유산균조합을 이용한 발효홍삼 농축액', 비교예 1의 '홍삼 농축액', 비교예 2의 '비피도박테리움 애니멀리스 서브스페시스 락티스(*Bifidobacterium animalis ssp. lactis*) HY8002를 이용한 발효홍삼 농축액', 비교예 3의 '비피도박테리움 아돌레센티스(*Bifidobacterium adolescentis*) HY8502를 이용한 발효홍삼 농축액' 및 비교예 4의 '비피도박테리움 애니멀리스 서브스페시스 락티스(*Bifidobacterium animalis ssp. lactis*) HY8002와 비피도박테리움 아돌레센티스(*Bifidobacterium adolescentis*) HY8502로 각각 발효한 발효홍삼 농축액'의 진세노사이드 함량을 다음과 같이 분석하였다.
- [0256] Discovery C18 컬럼(250 x 4.6mm, 5 $\mu$ m, Sigma-Aldrich, MO, USA)과 203nm 흡광도를 갖는 자외선 검출기(UV detector)를 갖춘 Agilent 1200 series HPLC system(Agilent, Foster City, CA, USA)를 사용하여 상기 각각의 실시예 4의 발효홍삼 농축액, 비교예 1의 홍삼 농축액, 비교예 2의 발효홍삼 농축액, 비교예 3의 발효홍삼 농축액 및 비교예 4의 발효홍삼 농축액의 주입부피(injection volume)는 10.0 $\mu$ l, 이동상(mobile phase)은 아세트니트릴(용매 A) 및 증류수(용매 B)이고, 이동속도(flow rate)는 1.6mL/min를 적용하였으며, 구배조건(gradient condition)은 용매 A/용매 B가 각각 15/85, 20/80, 39/61, 48/52, 70/30, 90/10, 15/85, 15/85이고, 이동시간(run time)은 각각 0~5분, 5~17분, 17~57분, 57~70분, 70~80분, 80~82분, 82~94분, 94~115분으로 하여 진세노사이드 함량을 분석하였다.
- [0257] 그 결과를 하기의 표 5와 도 1에 나타내었다.
- [0258] 하기의 표 5와 도 1에서 확인할 수 있는 바와 같이, 진세노사이드 Rd 함량이 비교예 1의 홍삼농축액은 5.16mg/g, 비교예 2의 발효홍삼 농축액은 13.65mg/g, 비교예 3의 발효홍삼 농축액은 11.15mg/g, 실시예 4의 발효홍삼 농축액은 30.25mg/g으로서, 유산균을 이용한 발효홍삼 농축액이 유산균을 이용하지 않은 홍삼농축액 보다 진세노사이드 Rd 함량이 2배 내지 6배 높게 나타났음을 알 수 있었다.
- [0259] 또한, 실시예 4의 발효홍삼 농축액의 진세노사이드 Rd 함량은 30.25mg/g로서 비교예 2의 발효홍삼 농축액의 진세노사이드 Rd 함량 13.65mg/g과 대비하여 약 2.2배 높았고, 비교예 3의 발효홍삼 농축액의 진세노사이드 Rd 함량 11.15mg/g과 대비하여 약 2.7배 높게 나타났음을 알 수 있었다.
- [0260] 또한, 실시예 4의 발효홍삼 농축액의 진세노사이드 Rd 함량은 30.25mg/g로서 비교예 4의 발효홍삼 농축액의 진세노사이드 Rd 함량 14.22mg/g 보다 약 2.1배 높음을 알 수 있었다.
- [0261] 이러한 사실을 통하여, 비피도박테리움 애니멀리스 서브스페시스 락티스(*Bifidobacterium animalis ssp. lactis*) HY8002 및/또는 비피도박테리움 아돌레센티스(*Bifidobacterium adolescentis*) HY8502를 이용한 홍삼발효가 홍삼 농축액의 진세노사이드 Rd 함량을 높였고, 비피도박테리움 애니멀리스 서브스페시스 락티스(*Bifidobacterium animalis ssp. lactis*) HY8002와 비피도박테리움 아돌레센티스(*Bifidobacterium adolescentis*) HY8502의 유산균 조합을 이용한 홍삼발효가 비피도박테리움 애니멀리스 서브스페시스 락티스

(*Bifidobacterium animalis ssp. lactis*) HY8002 또는 비피도박테리움 아돌레센티스(*Bifidobacterium adolescentis*) HY8502 단독을 이용한 발효홍삼 농축액의 진세노사이드 Rd 함량의 단순합 이상으로 홍삼 농축액의 진세노사이드 Rd 함량을 높여 시너지 효과를 가짐을 알 수 있었다.

표 5

구 분	Ginsenoside content (mg/g)								
	Rg1	Re	Rf	Rg2	Rb1	Rc	Rb2	Rd	Rg3
실시에 4	3.89	8.84	2.05	2.66	10.26	6.02	6.93	30.25	1.88
비교예 1	3.95	9.80	2.57	1.77	25.07	12.25	9.56	5.16	1.03
비교예 2	2.91	7.72	2.19	2.31	20.16	2.39	7.13	13.65	1.72
비교예 3	3.43	9.06	1.86	1.76	17.39	1.90	6.16	11.15	1.02
비교예 4	2.75	6.57	1.71	2.78	17.88	0.97	6.86	14.22	1.72

[0262]

[0263] <시험예 2>

[0264] 유산균 조합 비율에 따른 발효홍삼 배양액의 진세노사이드 함량 분석

[0265] 상기 실시예 3-1 내지 3-3의 발효홍삼 배양액에 대하여 상기 시험예 1과 동일한 방법으로 진세노사이드 함량을 분석하였다.

[0266] 그 결과를 하기의 표 6과 도 2에 나타내었다.

[0267] 하기의 표 6과 도 2에서 확인할 수 있는 바와 같이, 진세노사이드 Rd 함량이 실시예 3-2의 발효홍삼 배양액(HY8002:HY8502=1:1)은 500 $\mu$ g/ml, 실시예 3-3의 발효홍삼 배양액(HY8002:HY8502=2:1)은 480.2 $\mu$ g/ml, 실시예 3-1의 발효홍삼 배양액(HY8002:HY8502=1:2)은 527.1 $\mu$ g/ml로서 비피도박테리움 애니멀리스 서브스페시스 락티스(*Bifidobacterium animalis ssp. lactis*) HY8002 : 비피도박테리움 아돌레센티스(*Bifidobacterium adolescentis*) HY8502의 조합비율이 1:2 중량비율일 때 진세노사이드 Rd 함량이 최대로 생성되는데 가장 최적임을 알 수 있었다.

표 6

구 분	Ginsenoside content ( $\mu$ g/ml)			
	Rg1	Rb1	Rd	Rg3
실시에 3-2	110.7	514.7	500.0	40.9
실시에 3-3	111.0	585.5	480.2	38.1
실시에 3-1	112.4	505.8	527.1	36.8

[0268]

수탁번호

[0269]

기탁기관명 : 한국생명공학연구원

수탁번호 : KCTC13279BP

수탁일자 : 20170531

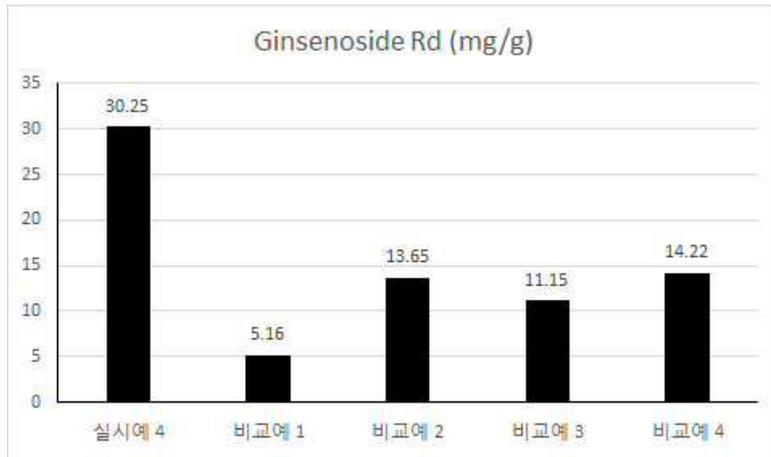
기탁기관명 : 한국생명공학연구원

수탁번호 : KCTC13475BP

수탁일자 : 20180201

도면

도면1



도면2

