



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2019년04월04일
(11) 등록번호 10-1965582
(24) 등록일자 2019년03월29일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A23L 2/38 (2006.01) A23L 19/10 (2016.01)
A23L 29/00 (2016.01) A23L 33/105 (2016.01)
A23L 5/00 (2016.01)
(52) CPC특허분류
A23L 2/382 (2013.01)
A23L 19/10 (2016.08)
(21) 출원번호 10-2018-0083108
(22) 출원일자 2018년07월17일
심사청구일자 2018년07월17일
(56) 선행기술조사문헌
KR101822024 B1*
(뒷면에 계속)

(73) 특허권자
주식회사한국야쿠르트
서울특별시 서초구 강남대로 577 (잠원동)
(72) 발명자
정운희
경기도 용인시 기흥구 공세로 226 청구아파트 10
3동 903호
김수아
경기도 용인시 기흥구 서그내로16번길 30 영통로
효성해링턴플레이스 103동 604호
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
경일호

전체 청구항 수 : 총 3 항

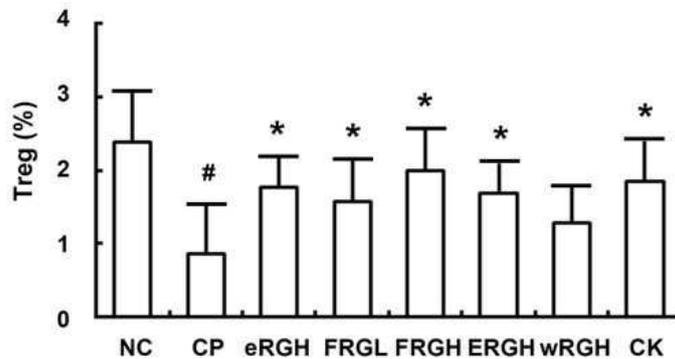
심사관 : 도현미

(54) 발명의 명칭 유산균 발효를 이용한 홍삼 유효성분의 체내 흡수 및 혈중 농도 유지시간이 개선된 발효홍삼 농축액 및 그 발효홍삼 농축액을 유효성분으로 함유하는 제품

(57) 요약

본 발명은 유산균 발효를 이용한 홍삼 유효성분의 체내 흡수 및 혈중 농도 유지시간이 개선된 발효홍삼 농축액 및 그 발효홍삼 농축액을 유효성분으로 함유하는 제품에 관한 것으로서, 홍삼을 3차에 걸친 주정추출을 통하여 추출하고, 그 추출물을 비피도박테리움 애니멀리스 락티스(*Bifidobacterium animalis ssp. lactis*) HY8002 및 비피도박테리움 아돌레센티스(*Bifidobacterium adolescentis*) HY8502의 균주조합으로 발효시킴으로써 일정 조건의 진세노사이드 함량으로 인하여 홍삼 유효성분의 체내 흡수 및 혈중 농도 유지시간이 개선된 면역증강효능, 염증억제효능, 항산화 활성 및 간손상 치료효능이 매우 우수한 발효홍삼 농축액을 얻을 수 있다.

대표도 - 도9



(52) CPC특허분류

A23L 29/065 (2016.08)
A23L 33/105 (2016.08)
A23L 5/51 (2016.08)
A23V 2002/00 (2013.01)
A23V 2200/324 (2013.01)
A23V 2250/2124 (2013.01)
A23Y 2300/19 (2013.01)
A23Y 2300/21 (2013.01)

(72) 발명자

장성식

경기도 의정부시 부용로 49, 102동 806호

라제현

경기도 수원시 권선구 서둔동 37-65 201호

최일동

경기도 용인시 기흥구 금화로82번길 14 대우현대아파트 112동 704호

안영민

서울특별시 노원구 섭발로 196 (하계동) 장미아파트 605동 1102호

김민교

서울특별시 관악구 은천로 93 벽산 블루밍 206-1104

김용태

경기도 성남시 중원구 성남동 3108 번지 102호

심재현

경기도 용인시 기흥구 공세동 대주아파트 213-901호

(56) 선행기술조사문헌

KR100618171 B1*
KR1020070030025 A*
KR1020150080206 A*
KR101370386 B1*

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

명세서

청구범위

청구항 1

3차에 걸친 주정추출을 통하여 추출된 홍삼 주정추출물을 비피도박테리움 애니멀리스 락티스(*Bifidobacterium animalis ssp. lactis*) HY8002(기탁번호: KCTC13279BP) 및 비피도박테리움 아돌레센티스(*Bifidobacterium adolescentis*) HY8502(기탁번호: KCTC13475BP)의 균주조합으로 발효시켜 다음의 진세노사이드(ginsenoside) 함량 조건을 모두 만족시킴으로써 홍삼 유효성분인 진세노사이드(ginsenoside) Rd와 화합물(compound) K의 체내 흡수 및 혈중 농도 유지시간이 개선되어 Treg 세포 분화 촉진을 통한 항염증 효능을 갖는 발효홍삼 농축액.

①진세노사이드(ginsenoside) Rd > 진세노사이드(ginsenoside) Rb1

②진세노사이드(ginsenoside) Rd > 진세노사이드(ginsenoside) Rb2 + 진세노사이드(ginsenoside) Rc

③화합물(compound) K > 진세노사이드(ginsenoside) Rh2

④진세노사이드(ginsenoside) Rg1 + 진세노사이드(ginsenoside) Rg2 + 진세노사이드(ginsenoside) Rg3 + 진세노사이드(ginsenoside) Rf > 진세노사이드(ginsenoside) Re

청구항 2

삭제

청구항 3

삭제

청구항 4

삭제

청구항 5

삭제

청구항 6

삭제

청구항 7

삭제

청구항 8

제1항의 발효홍삼 농축액을 유효성분으로 함유하는 기능성 음료.

청구항 9

제1항의 발효홍삼 농축액을 유효성분으로 함유하는 건강기능식품.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 유산균 발효를 이용한 홍삼 유효성분의 체내 흡수 및 혈중 농도 유지시간이 개선된 발효홍삼 농축액 및 그 발효홍삼 농축액을 유효성분으로 함유하는 제품에 관한 것으로서, 보다 상세하게는 홍삼을 3차에 걸친 주정추출을 통하여 추출하고, 그 추출물을 비피도박테리움 애니멀리스 락티스(*Bifidobacterium animalis ssp. lactis*) HY8002 및 비피도박테리움 아돌레센티스(*Bifidobacterium adolescentis*) HY8502의 균주조합으로의 발효를 통하여 일정 조건의 진세노사이드 함량으로 인하여 홍삼 유효성분의 체내 흡수 및 혈중 농도 유지시간이 개선됨으로써 면역증강효능, 염증억제효능, 항산화 활성 및 간손상 치료효능이 매우 우수한 발효홍삼 농축액 및 그 발효홍삼 농축액을 유효성분으로 함유하는 제품에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 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 '진세노사이드(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.

[0003] 극성이 높은 인삼사포닌은 대부분 소화관에서 잘 흡수가 되지 않는다. 그러나, 소화관에서 장내 미생물들의 대사를 받게 되면, 극성이 낮아지면서 흡수되기 쉬워진다. 특히, 프로토파낙사디올(protopanaxadiol)계 인삼사포닌은 장내 미생물에 의해 말로닐 진세노사이드(malonyl ginsenoside) Rb1, Rb2, Rc → 진세노사이드(ginsenoside) Rb1, Rb2, Rc → 진세노사이드(ginsenoside) Rd → 진세노사이드(ginsenoside) F2 → 20-O-β-D-글루코피라노실-20(S)-프로토파낙사디올[20-O-β-D-glucopyranosyl-20(S)-protopanaxadiol, 이하, '화합물 K(compound K)'라 한다]]로 대사되는 과정에서 다양한 프로토파낙사디올계 진세노사이드들이 흡수된다.

[0004] 또한, 사람에 따라 장내 미생물군집을 형성하는 미생물들이 달라, 인삼을 투여했을 때 사람에 따라 인삼의 사포닌을 거의 대사시킬 수 없는 사람이 있는가 하면 인삼사포닌을 잘 흡수되도록 소화관에서 대사시키는 사람이 있다. 그러므로, 인삼의 효능을 극대화하려면, 생리활성을 가진 사포닌 등의 성분들이 효율적으로 흡수되어 약효를 발휘할 수 있도록 인삼조성물을 만드는 것이 중요하다. 예를 들면, 흡수되기 어려운 진세노사이드(ginsenoside) Rb1에 비해 화합물 K(compound K)가 흡수되기 쉽지만 효능과 독성이 높다. 그러나, 흡수되기 쉬운 화합물 K(compound K)을 한 번에 투여되면 흡수조절이 쉽지 않아 효능과 독성이 동시에 나타나기 쉽다. 그러므로, 서방형의 약물처럼 긴 시간 동안 흡수될 수 있으면서 꾸준히 화합물 K(compound K)로 대사될 수 있는 진세노사이드(ginsenoside) Rd, 진세노사이드(ginsenoside) F2 등의 함량을 높이면, 독성을 낮추면서 진세노사이드(ginsenoside) Rd, 진세노사이드(ginsenoside) F2 등의 자체의 생리활성을 나타내면서, 소화관에서 장내 미생물에 의해 적당한 농도의 화합물 K(compound K)를 만들어 생리활성을 동시에 나타나게 하면서도 독성이 나타나지 않도록 하여 인삼의 다양한 효능을 꾸준히 나타낼 수 있다.

[0005] 이에, 본 발명자들은 홍삼을 3차에 걸친 주정추출을 통하여 추출하고, 그 추출물을 비피도박테리움 애니멀리스 락티스(*Bifidobacterium animalis ssp. lactis*) HY8002 및 비피도박테리움 아돌레센티스(*Bifidobacterium adolescentis*) HY8502의 균주조합으로의 발효를 통하여 일정 조건의 진세노사이드 함량으로 인하여 홍삼 유효성분의 체내 흡수 및 혈중 농도 유지시간이 개선됨으로써 면역증강효능, 염증억제효능, 항산화 활성 및 간손상 치료 효능이 매우 우수한 발효홍삼 농축액을 개발하여 본 발명을 완성하게 되었다.

선행기술문헌

특허문헌

[0006] (특허문헌 0001) 대한민국 공개특허공보 제10-2013-0142707호(2013.12.30.)
 (특허문헌 0002) 대한민국 등록특허공보 제10-1822024호(2018.01.25.)

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명은 홍삼을 3차에 걸친 주정추출을 통하여 추출하고, 그 추출물을 비피도박테리움 애니멀리스 락티스 (*Bifidobacterium animalis ssp. lactis*) HY8002 및 비피도박테리움 아돌레센티스(*Bifidobacterium adolescentis*) HY8502의 균주조합으로의 발효를 통하여 일정 조건의 진세노사이드 함량으로 인하여 홍삼 유효성분의 체내 흡수 및 혈중 농도 유지시간이 개선됨으로써 면역증강효능, 염증억제효능, 항산화 활성 및 간손상 치료효능이 매우 우수한 발효홍삼 농축액 및 그 발효홍삼 농축액을 유효성분으로 함유하는 제품을 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

[0008] 상기와 같은 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 홍삼을 3차에 걸친 주정추출을 통하여 추출하고, 그 추출물을 비피도박테리움 애니멀리스 락티스(*Bifidobacterium animalis ssp. lactis*) HY8002 및 비피도박테리움 아돌레센티스(*Bifidobacterium adolescentis*) HY8502의 균주조합으로 발효시켜 다음의 진세노사이드(ginsenoside) 함량 조건을 모두 만족시킴으로써 홍삼 유효성분의 체내 흡수 및 혈중 농도 유지시간이 개선된 발효홍삼 농축액 및 그 발효홍삼 농축액을 유효성분으로 함유하는 기능성 음료, 건강기능식품 등의 제품을 제공하는 것을 특징으로 한다.

[0009] ①진세노사이드(ginsenoside) Rd > 진세노사이드(ginsenoside) Rb1

[0010] ②진세노사이드(ginsenoside) Rd > 진세노사이드(ginsenoside) Rb2 + 진세노사이드(ginsenoside) Rc

[0011] ③화합물(compound) K > 진세노사이드(ginsenoside) Rh2

[0012] ④진세노사이드(ginsenoside) Rg1 + 진세노사이드(ginsenoside) Rg2 + 진세노사이드(ginsenoside) Rg3 + 진세노사이드(ginsenoside) Rf > 진세노사이드(ginsenoside) Re

[0013] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

[0014] 본 발명의 발효홍삼 농축액(FRG)의 제조방법은 다음과 같다.

[0015] 원료삼의 계량

[0016] 홍삼은 4년근 또는 6년근의 본삼 또는 미삼을 사용한다. 바람직하기로는 6년근 홍미삼을 사용하는 것이 바람직하다.

[0017] 1차 추출(주정추출)

[0018] 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.

[0019] 홍삼 추출 시에 홍삼 무게의 10~20배의 주정을 사용한다고 알려져 있어 진세노사이드 추출수율을 최대로 하기 위해서 홍삼 무게의 20배의 주정을 사용한다.

[0020] 또한, 진세노사이드 추출수율을 최대로 하기 위하여 75~85℃에서 5~7시간 동안 추출하는 것이 바람직하다.

[0021] 2차 추출(주정추출)

[0022] 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.

[0023] 3차 추출(주정추출)

[0024] 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.

[0025] 상기 1차 주정 추출 단계에서 대부분(약 80~90%)의 진세노사이드 성분이 추출되지만, 나머지 잔량까지 추출하기 위해 2차 및 3차 주정추출을 하는 것이 바람직하다.

[0026] 냉각 및 여과

- [0027] 상기 각각의 1차, 2차 및 3차 홍삼 주정추출물 40~50℃로 냉각한 후 퍼라이트(perlite)를 이용하여 여과한다.
- [0028] 상기와 같이 퍼라이트 여과를 하는 이유는 일반적으로 미세한 현탁물이나 콜로이드 입자를 제거하기 위함으로 진세노사이드 성분은 여과에 의해서 함량의 변화가 없기 때문이다.
- [0029] 한편, 상기 각각의 추출물을 40~50℃로 냉각하는 이유는 추출온도인 75~95℃에서는 추출물의 용해도 등의 원인으로 여과 효과가 반감되기 때문이다.
- [0030] 감압농축
- [0031] 상기 각각의 여과액을 25~30브릭스(Brix)로 감압농축한다.
- [0032] 상기와 같이, 감압농축을 하는 이유는 홍삼 주정추출물의 주정을 제거하고, 각 추출물의 보관 및 변질 우려를 낮추기 위함이다.
- [0033] 혼합 및 희석
- [0034] 상기 각각의 감압농축액을 혼합한 후에 유산균 발효를 위하여 정제수를 첨가하여 5브릭스(Brix)가 되게 희석한다.
- [0035] 유산균 발효
- [0036] 풍미 개선 및 화합물 K로의 최적 전환을 위하여 상기 희석액 100중량부에 대하여 유산균조합농도 0.1~1.0중량부의 비피도박테리움 애니멀리스 락티스(*Bifidobacterium animalis ssp. lactis*) HY8002 균주(기탁번호: KCTC13279BP)와 비피도박테리움 아돌레센티스(*Bifidobacterium adolescentis*) HY8502 균주(기탁번호: KCTC13475BP)의 유산균조합을 접종하여 35~39℃에서 6~24시간 동안 발효시킨다.
- [0037] 특히, 비피도박테리움 애니멀리스 락티스(*Bifidobacterium animalis ssp. lactis*) HY8002 균주 : 비피도박테리움 아돌레센티스(*Bifidobacterium adolescentis*) HY8502 균주를 혼합하는 중량비율은 1 : 0.25~4인 것이 바람직하다.
- [0038] 실활
- [0039] 상기 유산균 발효액을 85~95℃에서 9~12분 동안 가열하여 상기 유산균 2종을 불활성화시킨다.
- [0040] 상기와 같이, 유산균을 불활성화시키는 이유는 최종적으로 원하는 화합물 K가 프로토파낙사디올(protoanaxadiol; PPD)로 전환되는 것을 막기 위함이다.
- [0041] 감압농축
- [0042] 상기 유산균 2종이 불활성화된 발효액을 70~80브릭스(Brix)가 되게 감압농축한다.
- [0043] 상기와 같이, 높은 브릭스로 감압농축하는 이유는 미생물 등에 의한 오염을 예방하기 위함이다.
- [0044] 살균 및 포장
- [0045] 상기 농축액을 85~95℃에서 0.5~1.5시간 동안 살균한 후 포장하여 본 발명의 발효홍삼 농축액(FRG)을 제조한다. 특히, 완벽한 살균을 위하여 상기 온도 및 시간 동안 살균하는 것이 바람직하다.
- [0046] 한편, 본 발명의 발효홍삼 농축액(FRG)을 유효성분으로 함유하는 기능성 음료는 본 발명의 발효홍삼 농축액과 혼합과즙시럽 및 물을 일정한 비율로 조합하여 150bar에서 균질한 후 10℃ 이하로 냉각한 후 유리병, 페트병 등 소포장 용기에 포장하여 제조한다.
- [0047] 또한, 본 발명의 발효홍삼 농축액(FRG)을 유효성분으로 함유하는 건강기능식품은 본 발명의 발효홍삼 농축액(FRG)을 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

- [0048] 본 발명의 발효홍삼 농축액(FRG)은 3차에 걸친 주정추출을 통하여 추출된 홍삼 주정추출물의 비피도박테리움 애니멀리스 락티스(*Bifidobacterium animalis ssp. lactis*) HY8002 및 비피도박테리움 아돌레센티스(*Bifidobacterium adolescentis*) HY8502의 균주조합으로의 발효를 통한 일정 조건의 진세노사이드 함량으로 인하여 홍삼 유효성분의 체내 흡수 및 혈중 농도 유지시간이 개선됨으로써 면역증강효능, 염증억제효능, 항산화

활성 및 간손상 치료효능이 매우 우수한 건강기능식품 또는 식품소재로서 활용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0049]

도 1은 시클로포스파미드에 의해 유도된 면역저하 동물모델에서 홍삼추출물의 체중변화에 미치는 영향을 나타낸 그래프이다.

도 2는 시클로포스파미드에 의해 유도된 면역저하 동물모델에서 홍삼추출물의 백혈구 수치 변화에 미치는 영향을 나타낸 그래프이다.

도 3은 시클로포스파미드에 의해 유도된 면역저하 동물모델에서 홍삼추출물의 INF- γ 의 수치변화에 미치는 영향을 나타낸 그래프이다.

도 4는 시클로포스파미드에 의해 유도된 면역저하 동물모델에서의 홍삼추출물의 myeloperoxidase 활성에 미치는 영향을 나타낸 그래프이다.

도 5는 시클로포스파미드에 의해 유도된 면역저하 동물모델에서의 홍삼추출물의 IL-6 발현에 미치는 영향을 나타낸 그래프이다.

도 6은 시클로포스파미드에 의해 유도된 면역저하 동물모델에서의 홍삼추출물의 IL-10 발현에 미치는 영향을 나타낸 그래프이다.

도 7은 시클로포스파미드에 의해 유도된 면역저하 동물모델에서의 홍삼추출물의 IL-17 발현에 미치는 영향을 나타낸 그래프이다.

도 8은 시클로포스파미드에 의해 유도된 면역저하 동물모델의 비장세포에서의 홍삼추출물의 Th1 세포의 분화정도를 나타낸 그래프이다.

도 9는 시클로포스파미드에 의해 유도된 면역저하 동물모델의 비장세포에서의 홍삼추출물의 Treg 세포의 분화정도를 나타낸 그래프이다.

도 10은 YAC-1 cells에 대하여 시클로포스파미드에 의해 유도된 면역저하 동물모델에서 홍삼추출물의 splenic NK의 cytotoxicity에 미치는 영향을 나타낸 그래프이다.

도 11은 YAC-1 cells에 대하여 시클로포스파미드에 의해 유도된 면역저하 동물모델에서 홍삼추출물의 T cells의 cytotoxicity에 미치는 영향을 나타낸 그래프이다.

도 12는 TNBS에 의해 유도된 대장염 발생 동물모델에서의 홍삼추출물의 체중변화에 미치는 영향을 나타낸 그래프이다.

도 13은 TNBS에 의해 유도된 대장염 발생 동물모델에서의 홍삼추출물의 macroscopic score에 미치는 영향을 나타낸 그래프이다.

도 14는 TNBS에 의해 유도된 대장염 발생 동물모델에서의 홍삼추출물의 colon 길이에 미치는 영향을 나타낸 그래프이다.

도 15는 TNBS에 의해 유도된 대장염 발생 동물모델에서의 홍삼추출물의 colonic myeloperoxidase(MPO) activity에 미치는 영향을 나타낸 그래프이다.

도 16은 TNBS에 의해 유도된 대장염 발생 동물모델에서의 홍삼추출물의 histological exam에 미치는 영향을 나타낸 그래프이다.

도 17은 TNBS에 의해 유도된 대장염 발생 동물모델의 대장에서의 홍삼추출물의 TNF- α 발현에 미치는 영향을 나타낸 그래프이다.

도 18은 TNBS에 의해 유도된 대장염 발생 동물모델의 대장에서의 홍삼추출물의 IL-10 발현에 미치는 영향을 나타낸 그래프이다.

도 19는 TNBS에 의해 유도된 대장염 발생 동물모델의 대장에서의 홍삼추출물의 IL-17 발현에 미치는 영향을 나타낸 그래프이다.

도 20은 TNBS에 의해 유도된 대장염 발생 동물모델의 대장에서의 홍삼추출물의 NF- κ B의 활성 및 COX-2의 발현

에 미치는 영향을 나타낸 그래프이다.

도 21은 TNBS에 의해 유도된 대장염 발생 동물모델에서의 홍삼추출물의 splenic Th1의 분화에 미치는 영향을 나타낸 그래프이다.

도 22는 TNBS에 의해 유도된 대장염 발생 동물모델에서의 홍삼추출물의 splenic Th17의 분화에 미치는 영향을 나타낸 그래프이다.

도 23은 TNBS에 의해 유도된 대장염 발생 동물모델에서의 홍삼추출물의 splenic Treg cells의 분화에 미치는 영향을 나타낸 그래프이다.

도 24는 TNBS에 의해 유도된 대장염 발생 동물모델에서의 홍삼추출물의 colonic Treg cells의 분화에 미치는 영향을 나타낸 그래프이다.

도 25는 본 발명의 발효홍삼 농축액(FRG)을 투여한 생쥐에서 Rd, Rg1, Rg3, Compound K의 생체동태를 분석한 결과를 나타낸 그래프이다.

도 26은 홍삼추출물의 DPPH법으로 측정된 항산화 활성을 나타낸 그래프이다.

도 27은 tert-butylperoxide에 의해 유도된 간손상 동물모델에서 홍삼추출물의 혈액 내의 ALT 수치 변화에 미치는 영향을 나타낸 그래프이다.

도 28은 tert-butylperoxide에 의해 유도된 간손상 동물모델에서 홍삼추출물의 혈액 내의 AST 수치 변화에 미치는 영향을 나타낸 그래프이다.

도 29는 tert-butylperoxide에 의해 유도된 간손상 동물모델에서 홍삼추출물의 혈액 내의 TNF- α 수치 변화에 미치는 영향을 나타낸 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0050] 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.

[0051] <실시예 1>

[0052] 비피도박테리움 애니멀리스 락티스(*Bifidobacterium animalis ssp. lactis*) HY8002 균주의 분리 및 동정

[0053] 홍삼의 발효능을 가진 비피도박테리움 애니멀리스 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 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.

[0054] 이하, 선발된 비피도박테리움 애니멀리스 락티스(*Bifidobacterium animalis ssp. lactis*) HY8002 균주의 미생물학적 특성은 다음과 같다.

[0055] (1)균의 형태

[0056] BL 한천평판배지에서 37℃, 48시간 혐기 배양했을 때 균의 형태

[0057] 1) 세포의 형상 : 곤봉형, Y자형 등 다양

[0058] 2) 그람염색 : 양성

[0059] (2)집락의 형태

[0060] BL 한천평판배지에서 37℃, 48시간 혐기 배양했을 때 집락의 형태

[0061] 1) 형상 : 원형

[0062] 2) 크기 : 1~3mm

[0063] 3) 색조 : 유백색

- [0064] (3)생리학적 성질
- [0065] 1) 생육온도
- [0066] 생육범위 : 25~45℃
- [0067] 최적온도 : 37~41℃
- [0068] 2) 생육 pH
- [0069] 생육범위 : pH 2.0~8.0
- [0070] 최적 pH : pH 6.5~7.0
- [0071] 3) 산소의 영향 : 편성 혐기성
- [0072] 4) 보게스 - 프로스카우어(Voges - Proskauer) 반응 : -
- [0073] 5) 카탈라아제 : -
- [0074] 6) 암모니아 생성 : -
- [0075] 7) 유응고성 : -
- [0076] 8) 리트머스 밀크 환원 : -
- [0077] 9) 유래아 분해효소 : -
- [0078] 10) 베타-갈락토오스 분해효소 : +
- [0079] 11) 알파-글루코오스 분해효소 : +
- [0080] 12) 당이용성

표 1

[0081] 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-mannose	+	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	-

- [0082] (4)내산성
- [0083] 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.
- [0084] 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.

- [0085] (5)내담즙산성
- [0086] 담즙산이 첨가된 BL 한천평판배지에 본 발명의 비피도박테리움 애니멀리스 락티스(*Bifidobacterium animalis ssp. lactis*) HY8002 균주를 백색으로 접종하여 37℃에서 48시간 혐기 배양하여 집락의 생육여부를 관찰하였다.
- [0087] 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.
- [0088] (6)분리 및 동정
- [0089] 상기 본 발명의 비피도박테리움 애니멀리스 락티스(*Bifidobacterium animalis ssp. lactis*) HY8002 균주를 최신의 분자생물학적 기법을 이용하여 분류 및 동정하고자 16S rDNA 분석을 실시하여 결과를 하기의 표 2에 나타내었다.
- [0090] 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>)를 하기의 표 2에 나타내었다.
- [0091] 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%	CP008045.1
Bifidobacterium animalis strain A6, complete genome	2732	13661	89%	0.0	99%	CP010433.1
Bifidobacterium animalis subsp. lactis KDS2 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 Blt2, 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

- [0092]
- [0093] 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).
- [0094] <실시예 2>
- [0095] 비피도박테리움 아돌레센티스(*Bifidobacterium adolescentis*) HY8502 균주의 분리 및 동정
- [0096] 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 화합물 K와 비교하여 진세노사이드 F2와 화합물 K를 많이 만드는 균주를 선발하였다.
- [0097] 이하, 선발된 비피도박테리움 아돌레센티스(*Bifidobacterium adolescentis*) HY8502 균주의 미생물학적 특성은 다음과 같다.

- [0098] (1)균의 형태
- [0099] BL 한천평판배지에서 37℃, 48시간 혐기 배양했을 때 균의 형태
- [0100] 1) 세포의 형상 : 곤봉형, Y자형 등 다양
- [0101] 2) 그람염색 : 양성
- [0102] (2)집락의 형태
- [0103] BL 한천평판배지에서 37℃, 48시간 혐기 배양했을 때 집락의 형태
- [0104] 1) 형상 : 원형
- [0105] 2) 크기 : 1~3mm
- [0106] 3) 색조 : 유갈색
- [0107] (3)생리학적 성질
- [0108] 1) 생육온도
- [0109] 생육범위 : 25~42℃
- [0110] 최적온도 : 37℃
- [0111] 2) 생육 pH
- [0112] 생육범위 : pH 2.0~8.0
- [0113] 최적 pH : pH 6.5~7.0
- [0114] 3) 산소의 영향 : 편성 혐기성
- [0115] 4) 카탈라아제 : -
- [0116] 5) 암모니아 생성 : -
- [0117] 6) 당이용성

표 3

[0118]	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	-

- [0119] (4)분리 및 동정
- [0120] 상기 본 발명의 비피도박테리움 아돌레센티스(*Bifidobacterium adolescentis*) HY8502 균주를 최신의 분자생물학적 기법을 이용하여 분류 및 동정하고자 16S rDNA 분석을 실시하여 결과를 하기의 표 4에 나타내었다.
- [0121] 즉, BL 한천평판배지에서 배양된 본 발명의 비피도박테리움 아돌레센티스(*Bifidobacterium adolescentis*) HY8502 균주에서 콜로니를 취하고 이의 DNA를 분리하여 27F(5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3')와 1492R(5'-GGTTACCTGTTACGACTT-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.

[0122] 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 cover	E value	Max ident
GQ898761.1	Uncultured bacterium clone S4-97 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2638	2638	100%	0	99%
CP007443.1	<i>Bifidobacterium adolescentis</i> 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	<i>Bifidobacterium adolescentis</i> ATCC15703 DNA, complete genome	2615	12917	100%	0	99%
GQ898631.1	Uncultured bacterium clone S3-182 16S ribosomal RNA gene, partial sequence	2610	2610	100%	0	99%

[0124] 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(기탁번호: KCTC13475BP).

[0125] <실시예 3>

[0126] 발효홍삼 농축액(FRG)의 제조

[0127] (1)원료삼 계량

[0128] 풍기인삼농협에서 구입한 6년근 홍미삼 100kg을 사용하였다.

[0129] (2)1차 추출

[0130] 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.

[0131] (3)2차 추출

[0132] 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.

[0133] (4)3차 추출

[0134] 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.

[0135] (5)냉각 및 여과

[0136] 상기 각각의 추출물을 45℃로 냉각한 후 퍼라이트(perlite)를 이용하여 여과하였다.

[0137] (6)농축

[0138] 상기 각각의 여과액을 27브릭스(Brix)로 감압농축하였다.

[0139] (7)혼합 및 희석

[0140] 상기 각각의 감압농축액을 혼합한 후에 유산균 발효를 위하여 정제수를 첨가하여 5브릭스(Brix)가 되도록 희석하였다.

[0141] (8)유산균 발효

- [0142] 상기 희석액 100중량부에 대하여 유산균조합농도 1.0중량부의 비피도박테리움 애니멀리스 락티스 (*Bifidobacterium animalis ssp. lactis*) HY8002 균주(기탁번호: KCTC13279BP)와 비피도박테리움 아돌레센티스 (*Bifidobacterium adolescentis*) HY8502 균주(기탁번호:KCTC13475BP)의 유산균조합을 접종하여 37℃에서 24시간 동안 발효시켰다.
- [0143] (9)실활
- [0144] 상기 유산균 발효액을 90℃에서 10분 동안 가열하여 상기 유산균 2종을 불활성화시켰다.
- [0145] (10)농축
- [0146] 상기 유산균이 불활성화된 발효액을 75브릭스(Brix)가 되게 감압농축하였다.
- [0147] (11)살균 및 포장
- [0148] 상기 농축액을 90℃에서 1시간 동안 살균한 후 포장하여 본 발명의 발효홍삼 농축액(FRG)을 제조하였다.
- [0149] <실시에 4>
- [0150] 본 발명의 발효홍삼 농축액(FRG)을 유효성분으로 함유하는 기능성 음료의 제조
- [0151] 본 발명의 발효홍삼 농축액(FRG)과 혼합과즙시럽으로 구성된 기능성 음료를 제조하는 방법은 다음과 같다.
- [0152] 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℃에서 교반하여 혼합한 후 UHT 열처리(135℃에서 2초간 살균)한 후 냉각하여 제조하였다.
- [0153] 그리고 상기의 방법으로 제조된 혼합과즙시럽 30.4중량%와 상기 실시예 3의 발효홍삼 농축액(FRG) 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 발효홍삼 농축액(FRG)을 유효성분으로 함유하는 기능성 음료를 제조하였다.
- [0154] <실시에 5>
- [0155] 본 발명의 발효홍삼 농축액(FRG)을 유효성분으로 함유하는 건강기능식품의 제조
- [0156] 본 발명의 상기 실시예 3의 발효홍삼 농축액(FRG) 0.1중량%에 영양보조성분(비타민 B₁, B₂, 판토텐산, B₆, E 및 초산에스테르, 니코틴산 아미드) 및 올리고당을 상기 실시예 3의 발효홍삼 농축액(FRG) 100중량부에 대하여 10중량부가 되도록 첨가하여 고속회전 혼합기에서 혼합하였다. 상기 혼합물 100중량부에 대하여 멸균 정제수 10중량부를 첨가, 혼합하고 직경 1~2mm의 과립상으로 성형하였다. 상기 성형된 과립은 45℃의 진공건조기에서 건조시킨 후 13 메쉬(mesh)를 통과시켜 균일하게 과립을 제조하였다. 상기와 같이 제조된 과립은 적당량씩 압출 성형되어 정제 또는 분말로 되거나 경질캡슐에 충전되어 경질캡슐제품으로 제조하였다.
- [0157] <비교예 1>
- [0158] 홍삼 농축액(eRG)의 제조
- [0159] (1)원료삼 계량
- [0160] 풍기인삼농협에서 구입한 6년근 홍미삼 100kg을 사용하였다.
- [0161] (2)1차 추출
- [0162] 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.
- [0163] (3)2차 추출
- [0164] 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.
- [0165] (4)3차 추출
- [0166] 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.

- [0167] (5)냉각 및 여과
- [0168] 상기 각각의 추출물을 45℃로 냉각한 후 퍼라이트(perlite)를 이용하여 여과하였다.
- [0169] (6)농축
- [0170] 상기 각각의 여과액을 27브릭스(Brix)로 감압농축하였다.
- [0171] (7)혼합
- [0172] 상기 각각의 감압농축액을 혼합하였다.
- [0173] (8)살균 및 포장
- [0174] 상기 혼합액을 90℃에서 1시간 동안 살균한 후 포장하여 홍삼 농축액(eRG)을 제조하였다.
- [0175] <비교예 2>
- [0176] 효소처리 발효홍삼 농축액(ERG)의 제조
- [0177] (1)원료삼 계량
- [0178] 풍기인삼농협에서 구입한 6년근 홍미삼 100kg을 사용하였다.
- [0179] (2)1차 추출
- [0180] 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.
- [0181] (3)2차 추출
- [0182] 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.
- [0183] (4)3차 추출
- [0184] 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.
- [0185] (5)냉각 및 여과
- [0186] 상기 각각의 추출물을 45℃로 냉각한 후 퍼라이트(perlite)를 이용하여 여과하였다.
- [0187] (6)농축
- [0188] 상기 각각의 여과액을 27브릭스(Brix)로 감압농축하였다.
- [0189] (7)혼합 및 희석
- [0190] 상기 각각의 감압농축액을 혼합한 후에 효소전환을 위하여 정제수를 첨가하여 5브릭스(Brix)가 되도록 희석하였다.
- [0191] (8)효소 전환
- [0192] 상기 희석액 100중량부에 대하여 효소조합농도 2.4중량부의 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, 효소 생산 미생물: Aspergillus niger) 효소조합을 첨가하여 50℃에서 72시간 동안 반응시켰다.
- [0193] (9)유산균 발효
- [0194] 상기 효소 반응액에 김치유래 유산균 락토바실러스 사케이(*Lactobacillus sakei*) HY7802 균주(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 75브릭스(Brix)가 되게 감압농축하였다.
- [0199] (12)살균 및 포장
- [0200] 상기 농축액을 90℃에서 1시간 동안 살균한 후 포장하여 효소처리 발효홍삼 농축액(ERG)을 제조하였다.
- [0201] <비교예 3>
- [0202] 시중에 판매 중인 홍삼 농축액(wRG)
- [0203] 시중에서 판매 중인 대표적인 홍삼농축액(6년근 홍삼을 이용한 홍삼 농축액 120g, 구입시기: 2017년 5월 30일, 유통기간: 2019년 11월 1일)을 구입하여 사용하였다.
- [0204] <시험예 1>
- [0205] 홍삼 농축액의 진세노사이드 함량 분석
- [0206] 상기 실시예 3의 '발효홍삼 농축액(FRG)', 비교예 1의 '홍삼 농축액(eRG)', 비교예 2의 '효소처리 발효홍삼 농축액(ERG)' 및 비교예 3의 '시중에 판매 중인 홍삼 농축액(wRG)'의 진세노사이드 함량을 다음과 같이 분석하였다.
- [0207] 즉, Discovery C18 컬럼(250 x 4.6mm, 5 μ 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 시료[발효홍삼 농축액(FRG), 홍삼농축액(eRG), 효소처리 발효홍삼 농축액(ERG), 시중에 판매 중인 홍삼농축액(wRG)]의 주입부피(injection volume)는 10.0 μ 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.
- [0208] 그 결과를 하기의 표 5에 나타내었다.
- [0209] 하기의 표 5에서 확인할 수 있는 바와 같이, ①진세노사이드 Rd 함량이 진세노사이드 Rb1 보다 많은 홍삼농축액(Rd > Rb1)은 실시예 3의 발효홍삼 농축액(FRG) 및 비교예 2의 효소처리 발효홍삼 농축액(ERG) 뿐이었고,
- [0210] ②진세노사이드 Rd 함량이 진세노사이드 Rb2와 진세노사이드 Rc의 합보다 많은 홍삼농축액(Rd > Rb2+Rc)은 실시예 3의 발효홍삼 농축액(FRG) 뿐이었으며,
- [0211] ③화합물 K(CK) 함량이 진세노사이드 Rh2 보다 많은 홍삼농축액(CK > Rh2)은 실시예 3의 발효홍삼 농축액(FRG) 및 비교예 2의 효소처리 발효홍삼 농축액(ERG) 뿐이었고,
- [0212] ④진세노사이드 Rg1, 진세노사이드 Rg2, 진세노사이드 Rg3 및 진세노사이드 Rf의 합의 함량이 진세노사이드 Re 함량 보다 많은 홍삼농축액(Rg1+Rg2+Rg3+Rf > Re)은 실시예 3의 발효홍삼 농축액(FRG), 비교예 2의 효소처리 발효홍삼 농축액(ERG) 및 비교예 3의 시중에 판매 중인 홍삼농축액(wRG) 뿐이었다.
- [0213] 따라서, 상기 네가지의 조건을 모두 만족하는 홍삼농축액은 실시예 3의 본 발명의 발효홍삼 농축액(FRG) 뿐이었음을 알 수 있었다.

표 5

구 분	Crude saponin (%)	Ginsenoside content(mg/g)											
		Rg1	Re	Rf	Rg2	Rb1	Rc	Rb2	Rd	Rg3	F2	Rh2	CK
실시예 3	17.7	2.34	4.76	1.16	1.27	11.45	1.07	2.21	11.84	0.79	0.23	<0.40	0.42
비교예 1	19.8	2.80	6.33	1.30	1.28	16.06	7.98	6.48	3.24	0.71	0.20	<0.40	<0.40
비교예 2	18.0	4.76	1.75	<0.40	3.48	0.61	<0.40	1.35	0.62	1.09	14.59	<0.40	8.21
비교예 3	9.7	0.91	1.25	0.96	2.27	5.08	2.35	1.92	1.20	2.68	0.17	<0.40	<0.40

[0214]

- [0215] <시험예 2>
- [0216] 면역증강효능분석
- [0217] 2-1. 실험동물의 제작
- [0218] C57BL/c 생쥐(웅성, 약19~22g)에 시클로포스파미드 12.5mg/kg를 2일 간격으로 2회 투여하여 면역저하 모델 동물을 제작하였다.
- [0219] 2-2. 투여방법
- [0220] 상기 면역저하 모델 동물에 익일부터 매일 1회씩 실시예 3의 발효홍삼 농축액(FRG), 비교예 1의 홍삼농축액(eRG), 비교예 2의 효소처리 발효홍삼 농축액(ERG), 비교예 3의 시중에 판매 중인 홍삼농축액(wRG), 및 화합물 K(compound K) 각각을 50 또는 100mg/kg를 5일간 경구투여 하였다. 최종 투여 후 18시간 후에 희생하였다.
- [0221] 2-3. 적혈구, 백혈구, 비장세포의 분리
- [0222] 상기 최종투여 24시간 후에 혈액은 헤파린 튜브에 안와 채혈하고, 적혈구(erythrocyte)는 ammonium chloride solution(0.15M NH₄Cl, 10mM KHCO₃, 0.1mM EDTA, pH7.2)에 녹였다(lysis).
- [0223] 비장은 glass homogenizer와 sieve mash를 처리하여 비장세포(splenocyte)를 제조하여 serum free RPMI-1640 medium에 저장하였다.
- [0224] 체중은 저울로 무게를 측정하였고, 백혈구 측정은 혈액(20 μ l)에 2% acetic acid(280 μ l)을 넣고 혼합하고 flow cytometer[FACS(C6 Flow CytometerTM System, San Jose, CA, USA)]로 계수하였으며, 인터페론 감마는 ELISA kit(eBioscience)를 사용하여 측정하였다.
- [0225] 그 결과를 도 1내지 도 3에 나타내었다.
- [0226] 'NC'는 정상대조군, 'CP'는 시클로포스파미드 투여 후 생리식염수를 투여한 군, 'eRGH'는 시클로포스파미드 투여 후 비교예 1의 홍삼농축액(eRG) 100mg/kg을 경구투여한 군, 'FRGL'은 시클로포스파미드 투여 후 실시예 3의 발효홍삼 농축액(FRG) 50mg/kg을 경구투여한 군, 'FRGH'는 시클로포스파미드 투여 후 실시예 3의 발효홍삼 농축액(FRG) 100mg/kg을 경구투여한 군, 'ERGH'는 시클로포스파미드 투여 후 비교예 2의 효소처리 발효홍삼 농축액(ERG) 100mg/kg을 경구투여한 군, 'wRGH'는 시클로포스파미드 투여 후 비교예 3의 시중에 판매 중인 홍삼농축액(wRG) 100mg/kg을 경구투여한 군, 'CK'는 시클로포스파미드 투여 후 화합물 K(compound K) 20mg/kg을 경구투여한 군을 나타낸다.
- [0227] 도 1 내지 도 3에서 확인할 수 있는 바와 같이, 시클로포스파미드 투여는 체중 감소, 백혈구(WBC)의 수치감소 및 IFN- γ 의 발현양을 감소시켰는데, 비교예 1의 홍삼농축액(eRG), 실시예 3의 발효홍삼 농축액(FRG), 비교예 2의 효소처리 발효홍삼농축액(ERG), 비교예 3의 시중에 판매 중인 홍삼농축액(wRG) 및 화합물 K(compound K)의 투여를 통해 시클로포스파미드 투여에 의해 감소한 체중 및 IFN- γ 의 발현양을 회복시켰음을 알 수 있었다.
- [0228] 특히, 체중 회복능은 화합물 K(compound K)가 가장 우수했으며, 그 외에 실시예 3의 발효홍삼 농축액(FRG), 비교예 2의 효소처리 발효홍삼 농축액(ERG), 비교예 3의 시중에 판매 중인 홍삼농축액(wRG)은 비슷한 효과를 보였다.
- [0229] 또한, IFN- γ 의 회복능은 실시예 3의 발효홍삼 농축액(FRG), 비교예 2의 효소처리 발효홍삼 농축액(ERG), 비교예 3의 시중에 판매 중인 홍삼농축액(wRG), 화합물 K(compound K)는 비슷한 결과를 보였음을 알 수 있었다.
- [0230] 한편, 백혈구의 수치는 시클로포스파미드 투여에 의해 감소하는 경향을 보였으나, 실시예 3의 발효홍삼 농축액(FRG), 비교예 1의 홍삼농축액(eRG), 비교예 2의 효소처리 발효홍삼 농축액(ERG), 비교예 3의 시중에 판매 중인 홍삼농축액(wRG), 화합물 K(compound K) 투여에 의해 유의한 변화는 없었음을 알 수 있었다.
- [0231] 2-4. 혈청 사이토카인의 분석
- [0232] 상기 최종투여 24시간 후에 혈액을 채취하여 MPO(myeloperoxidase activity), IL-6, IL-10, IL-17을 ELISA kit로 측정하였다.
- [0233] 그 결과를 도 4 내지 도 7에 나타내었다.

- [0234] 'NC'는 정상대조군, 'CP'는 시클로포스파미드 투여 후 생리식염수를 투여한 군, 'eRGH'는 시클로포스파미드 투여 후 비교예 1의 홍삼농축액(eRG) 100mg/kg을 경구투여한 군, 'FRGL'은 시클로포스파미드 투여 후 실시예 3의 발효홍삼 농축액(FRG) 50mg/kg을 경구투여한 군, 'FRGH'는 시클로포스파미드 투여 후 실시예 3의 발효홍삼 농축액(FRG) 100mg/kg을 경구투여한 군, 'ERGH'는 시클로포스파미드 투여 후 비교예 2의 효소처리 발효홍삼 농축액(ERG) 100mg/kg을 경구투여한 군, 'wRGH'는 시클로포스파미드 투여 후 비교예 3의 시중에 판매 중인 홍삼농축액(wRG) 100mg/kg을 경구투여한 군, 'CK'는 시클로포스파미드 투여 후 화합물 K(compound K) 20mg/kg을 경구투여한 군을 나타낸다.
- [0235] 도 4 내지 도 7에서 확인할 수 있는 바와 같이, 시클로포스파미드의 투여는 소화관의 MPO(myeloperoxidase activity)의 활성을 증가시키고, IL-6, IL-10, IL-17을 감소시켰음에 반하여 비교예 1의 홍삼농축액(eRG), 실시예 3의 발효홍삼 농축액(FRG), 비교예 2의 효소처리 발효홍삼 농축액(ERG), 비교예 3의 시중에 판매 중인 홍삼농축액(wRG) 및 화합물 K(compound K)의 투여는 소화관의 MPO 활성을 모두 낮추었고, IL-6, IL-10, IL-17을 유의하지는 않지만 증가시켰음을 알 수 있었다.
- [0236] 특히, 비교예 3의 시중에 판매 중인 홍삼농축액(wRG)의 투여는 정상군(NC)의 IL-6, IL-17 수준을 훨씬 넘는 수준으로 증가시켰음을 알 수 있었다.
- [0237] 2-5. 비장에서 Th1 세포 및 Treg 세포로의 분화능 측정
- [0238] C56BL/6J 생쥐의 비장을 분리하여 적당히 분쇄하고, 10% FCS 함유 RPMI 1640 배지에 현탁하고 CD4 T cell isolation kit(MiltenyiBiotec, Bergisch Gladbach, 독일)를 사용하여 CD4 T 세포를 분리하고, anti-IFN- γ 또는 anti-FoxP3 항체로 염색하고 FACS(Fluorescence-activated cell sorting) 장치(C6 Flow Cytometer π System, San Jose, CA, USA)를 이용하여 Th1 세포 및 Treg 세포의 분포를 분석하였다.
- [0239] 그 결과를 도 8 및 도 9에 나타내었다.
- [0240] 'NC'는 정상대조군, 'CP'는 시클로포스파미드 투여 후 생리식염수를 투여한 군, 'eRGH'는 시클로포스파미드 투여 후 비교예 1의 홍삼농축액(eRG) 100mg/kg을 경구투여한 군, 'FRGL'은 시클로포스파미드 투여 후 실시예 3의 발효홍삼 농축액(FRG) 50mg/kg을 경구투여한 군, 'FRGH'는 시클로포스파미드 투여 후 실시예 3의 발효홍삼 농축액(FRG) 100mg/kg을 경구투여한 군, 'ERGH'는 시클로포스파미드 투여 후 비교예 2의 효소처리 발효홍삼 농축액(ERG) 100mg/kg을 경구투여한 군, 'wRGH'는 시클로포스파미드 투여 후 비교예 3의 시중에 판매 중인 홍삼농축액(wRG) 100mg/kg을 경구투여한 군, 'CK'는 시클로포스파미드 투여 후 화합물 K(compound K) 20mg/kg을 경구투여한 군을 나타낸다.
- [0241] 도 8 및 도 9에서 확인할 수 있는 바와 같이, 시클로포스파미드의 투여는 Th1 세포 및 regulatory T(Treg) 세포의 분화를 억제하여 그 수를 감소시켰는데, 비교예 1의 홍삼농축액(eRG), 실시예 3의 발효홍삼 농축액(FRG), 비교예 2의 효소처리 발효홍삼 농축액(ERG), 비교예 3의 시중에 판매 중인 홍삼농축액(wRG) 및 화합물 K(compound K)의 투여는 이를 회복시켰음을 알 수 있었다.
- [0242] 특히, 시클로포스파미드에 감소한 Th1 세포의 회복은 화합물 K(compound K)를 투여하였을 경우가 가장 우수하였고, 실시예 3의 발효홍삼 농축액(FRG)과 비교예 3의 시중에 판매 중인 홍삼농축액(wRG)를 투여하였을 경우에는 비슷하였다.
- [0243] 한편, 시클로포스파미드에 의해 감소한 Treg 세포의 회복은 실시예 3의 발효홍삼 농축액(FRG)을 투여하였을 경우가 가장 우수하였고, 비교예 3의 시중에 판매 중인 홍삼농축액(wRG)를 투여하였을 경우에는 거의 효과가 없었음을 알 수 있었다.
- [0244] 2-6. 종양세포에 대한 세포독성(cytotoxicity) 분석
- [0245] 상기 2-2의 비장세포(splenocytes)로부터 NK 세포 및 cytotoxic T 세포는 NK Cell Isolation Kit 및 cytotoxic T cell isolation kit(Miltenyi Biotec, Germany)을 이용하여 분리하였다.
- [0246] 종양세포(YAC-1 cells)를 3,39-Dioctadecyloxocarbocyanine perchlorate과 Propidium iodide로 표식한 세포(5×10^5 cell sperwell)와 NK 세포(2×10^5 cell sperwell) 또는 T세포(2×10^5 cell sperwell)와 24시간 배양하고, FACS(Fluorescence activated cell sorter)로 세포독성(cytotoxicity)을 측정하였다.
- [0247] 그 결과를 도 10 및 도 11에 나타내었다.

- [0248] 'NC'는 정상대조군, 'CP'는 시클로포스파미드 투여 후 생리식염수를 투여한 군, 'eRGH'는 시클로포스파미드 투여 후 비교예 1의 홍삼농축액(eRG) 100mg/kg을 경구투여한 군, 'FRGL'은 시클로포스파미드 투여 후 실시예 3의 발효홍삼 농축액(FRG) 50mg/kg을 경구투여한 군, 'FRGH'는 시클로포스파미드 투여 후 실시예 3의 발효홍삼 농축액(FRG) 100mg/kg을 경구투여한 군, 'ERGH'는 시클로포스파미드 투여 후 비교예 2의 효소처리 발효홍삼 농축액(ERG) 100mg/kg을 경구투여한 군, 'wRGH'는 시클로포스파미드 투여 후 비교예 3의 시중에 판매 중인 홍삼농축액(wRG) 100mg/kg을 경구투여한 군, 'CK'는 시클로포스파미드 투여 후 화합물 K(compound K) 20mg/kg을 경구투여한 군을 나타낸다.
- [0249] 도 10 및 도 11에서 확인할 수 있는 바와 같이, 시클로포스파미드의 투여는 NK 세포와 T 세포의 암세포 YAC-1 세포 사멸효능을 억제하였는데, 비교예 1의 홍삼농축액(eRG), 실시예 3의 발효홍삼 농축액(FRG), 비교예 2의 효소처리 발효홍삼농축액(ERG), 비교예 3의 시중에 판매 중인 홍삼농축액(wRG) 및 화합물 K(compound K)의 투여는 NK세포 및 T 세포의 암세포 YAC-1 세포 사멸효능을 정상수준으로 회복시켰음을 알 수 있었다.
- [0250] 특히, 화합물 K(compound K), 비교예 3의 시중에 판매 중인 홍삼농축액(wRG) 및 실시예 3의 발효홍삼 농축액(FRG)을 투여한 경우는 NK세포 및 T 세포의 암세포 YAC-1 세포 사멸효능을 비슷한 수준으로 회복시켰고, 다음으로는 비교예 2의 효소처리 발효홍삼 농축액(ERG) 및 비교예 1의 홍삼농축액(eRG)을 투여한 순이었음을 알 수 있었다.
- [0251] <시험예 3>
- [0252] 염증억제효능 분석
- [0253] 3-1. TNBS에 의한 대장염 유발 및 시료 투여
- [0254] C57BL/c 생쥐(웅성, 약19~22그램) 중 한 군을 정상군으로 하고, 나머지 군의 실험동물에 대해서는 2,4,6-트리니트로벤젠설폰산(2,4,6-trinitrobenzenesulfonic acid, TNBS)으로 급성 대장염을 유발하였다. 즉, 실험동물을 가볍게 에테르로 마취한 후 TNBS(2,4,6-Trinitrobenzene sulfonic acid) 용액 2.5g을 50% 에탄올 100ml에 혼합한 용액을 끝이 둥근 1ml 용량의 주사기를 이용하여 항문을 통해 대장 내로 0.1ml씩 투여하고 수직으로 들어 30초간 유지하여 염증을 유발하였다.
- [0255] 이후, 익일부터 매일 1회씩 3일간 시험시료인 실시예 3의 발효홍삼 농축액(FRG), 비교예 1의 홍삼농축액(eRG), 비교예 2의 효소처리 발효홍삼 농축액(ERG), 비교예 3의 시중에 판매 중인 홍삼농축액(wRG)을 각각 100mg/kg을 생리식염수에 현탁하여 경구투여하고 시료 투여가 종료된 다음날에 실험동물을 이산화탄소로 질식사시켜 희생시키고 대장부위 중 맹장으로부터 항문 직전 부위까지의 대장을 적출하여 사용하였다.
- [0256] 한편, 정상군(NC)에는 TNBS를 처리하지 않고 생리식염수 0.1ml만을 경구투여한 것을 제외하고는 상기 실험군과 동일하게 실험하였다.
- [0257] 또한, 음성 대조군(TNBS)에는 TNBS에 의한 대장염 유발 후 생리식염수만 0.1ml만을 경구투여한 것을 제외하고는 상기 실험군과 동일하게 실험하였다.
- [0258] 또한, 양성 대조군(SS)에는 TNBS에 의한 대장염 유발 후 대장염 치료 약물인 설파살라진(sulfasalazine)을 50mg/kg의 양으로 경구투여한 것을 제외하고는 상기 실험군과 동일하게 실험하였다.
- [0259] 3-2. 미엘로퍼옥시다아제(Myeloperoxidase, MPO) 활성 측정
- [0260] 상기 각 군에서 적출된 대장조직 100mg에 0.5% hexadecyl trimethyl ammonium bromide 함유 10mM potassium phosphate buffer(pH 7.0) 200 μ l를 넣고 균질화(homogenization) 하였다. 이후, 4 $^{\circ}$ C 및 10,000rpm의 조건에서 10분간 원심분리하여 상등액을 얻었다. 상기 상등액 50 μ l를 0.95ml의 반응액(1.6mM tetramethyl benzidine과 0.1mM H₂O₂함유)에 넣고 37 $^{\circ}$ C에서 반응시키면서 650nm에서 경시적으로 흡광도를 측정하였다. 미엘로퍼옥시다아제(Myeloperoxidase, MPO) 활성은 반응물로서 생긴 peroxide 1 μ mol/ml를 1unit로 계산하였다.
- [0261] 장손상, 장부종의 정도는 육안적인 소견은 아래와 같이 상태를 점수화하였다.
- [0262] 0: no ulcer and no inflammation
- [0263] 1: no ulceration and local hyperemia
- [0264] 2: ulceration with hyperemia

- [0265] 3: ulceration and inflammation at one site only
- [0266] 4: two or more sites of ulceration and inflammation
- [0267] 5: ulceration extending more than 2cm
- [0268] 그 결과를 도 12내지 도 16에 나타내었다.
- [0269] 'NC'는 정상대조군, 'TNBS'는 TNBS가 처리된 군, 'eRGH'는 TNBS 처리 후 비교예 1의 홍삼농축액(eRG) 100mg/kg을 경구투여한 군, 'FRGH'는 TNBS 처리 후 실시예 3의 발효홍삼 농축액(FRG) 100mg/kg을 경구투여한 군, 'ERGH'는 TNBS 처리 후 비교예 2의 효소처리 발효홍삼 농축액(ERG) 100mg/kg을 경구투여한 군, 'wRGH'는 TNBS 처리 후 비교예 3의 시중에 판매 중인 홍삼농축액(wRG) 100mg/kg을 경구투여한 군을 나타낸다.
- [0270] 도 12 내지 도 16에서 확인할 수 있는 바와 같이, TNBS의 투여는 체중감소를 비롯하여 장수축, 장손상, 장부종 및 myeloperoxidase의 활성을 유도하였는데 반하여, 실시예 3의 발효홍삼 농축액(FRG), 비교예 1의 홍삼농축액(eRG), 비교예 2의 효소처리 발효홍삼 농축액(ERG), 비교예 3의 시중에 판매 중인 홍삼농축액(wRG)의 투여는 이를 회복시켰음을 알 수 있었다.
- [0271] 특히, 장수축은 실시예 3의 발효홍삼 농축액(FRG)을 투여하였을 경우에서만 유의적으로 회복하였고, TNBS에 의해 감소한 체중은 실시예 3의 발효홍삼 농축액(FRG)을 투여하였을 경우에 가장 많이 회복하였음을 알 수 있었다.
- [0272] 또한, MPO활성 억제효과도 실시예 3의 발효홍삼 농축액(FRG)을 투여하였을 경우에 가장 우수하였음을 알 수 있었다.
- [0273] 3-3. 염증 지표 측정
- [0274] 웨스턴블롯팅 방법을 이용하여 p-p65, p65, COX-2, β -actin과 같은 염증 반응 지표 물질을 측정하였다. 즉, 상기 3-2의 미엘로퍼옥시다아제(Myeloperoxidase, MPO) 활성 측정과 동일한 방법으로 상등액을 얻은 다음, 상기 상등액 50 μ g을 취해 SDS 10%(w/v) polyacrylamide gel에서 1시간 30분 동안 전기영동을 하였다. 상기 전기영동한 샘플을 니트로셀룰로소지에 100V, 400mA의 조건에서 1시간 10분 동안 트랜스퍼(transfer) 하였다. 상기 샘플이 트랜스퍼된 니트로셀룰로소지를 5% skim milk로 30분간 blocking한 후, 5분씩 3회에 걸쳐 PBS-Tween으로 세척하고, 1차 antibody(Santa Cruz Biotechnology, 미국)를 1:100의 비율(v/v)로 하여 하룻밤 동안 반응시켰다. 이후, 10분씩 3회에 걸쳐 세척하고, 2차 antibody(Santa Cruz Biotechnology, 미국)를 1:1000의 비율(v/v)로 하여 1시간 20분 동안 반응시켰다. 이후, 15분씩 3회에 걸쳐 세척하고, 형광발색 시킨 후 현상하였다.
- [0275] 또한, ELISA kit를 이용하여 TNF- α , IL-10, IL-17 염증 관련 사이토카인을 측정하였다.
- [0276] 그 결과를 도 17내지 도 20에 나타내었다.
- [0277] 'NC'는 정상대조군, 'TNBS'는 TNBS가 처리된 군, 'eRGH'는 TNBS 처리 후 비교예 1의 홍삼농축액(eRG) 100mg/kg을 경구투여한 군, 'FRGH'는 TNBS 처리 후 실시예 3의 발효홍삼 농축액(FRG) 100mg/kg을 경구투여한 군, 'ERGH'는 TNBS 처리 후 비교예 2의 효소처리 발효홍삼 농축액(ERG) 100mg/kg을 경구투여한 군, 'wRGH'는 TNBS 처리 후 비교예 3의 시중에 판매 중인 홍삼농축액(wRG) 100mg/kg을 경구투여한 군을 나타낸다.
- [0278] 도 17 내지 도 20에서 확인할 수 있는 바와 같이, TNBS의 투여는 TNF- α 및 IL-17의 발현을 증가시키고 IL-10의 발현을 감소시켰음에 반하여, 실시예 3의 발효홍삼 농축액(FRG), 비교예 1의 홍삼농축액(eRG), 비교예 2의 효소처리 발효홍삼 농축액(ERG), 비교예 3의 시중에 판매 중인 홍삼농축액(wRG)의 투여는 이를 회복시켰음을 알 수 있었다.
- [0279] 특히, TNBS에 의해 증가한 TNF- α 는 실시예 3의 발효홍삼 농축액(FRG) 및 비교예 1의 홍삼농축액(eRG)를 투여한 경우에 유의적으로 감소하였고, TNBS에 의해 증가한 IL-17은 실시예 3의 발효홍삼 농축액(FRG)을 투여한 경우에만 유의적으로 감소하였으며, TNBS에 의해 감소한 IL-10은 실시예 3의 발효홍삼 농축액(FRG)을 투여한 경우에 유의적으로 회복하였음을 알 수 있었다.
- [0280] 또한, 실시예 3의 발효홍삼 농축액(FRG), 비교예 1의 홍삼농축액(eRG), 비교예 2의 효소처리 발효홍삼 농축액(ERG), 비교예 3의 시중에 판매 중인 홍삼농축액(wRG)의 투여는 모두 염증지표 NF- κ B 활성화 및 COX-2 발현을 저해하는 효과가 있었다.
- [0281] 3-4. 대장에서 Th1 세포, Th17 세포 또는 Treg 세포로의 분화능 측정

- [0282] 상기 3-1의 TNBS에 의한 대장염이 유발된 C57BL/c 생쥐의 비장을 분리하여 적당히 분쇄하고, 10% FCS 함유 RPMI 1640 배지에 현탁하고 CD4 T cell isolation kit(MiltenyiBiotec, Bergisch Gladbach, 독일)를 사용하여 CD4 T 세포를 분리하고, anti-IFN- γ , anti-IL-17A, 또는 anti-FoxP3 항체로 염색하고 FACS(Fluorescence-activated cell sorting) 장치(C6 Flow Cytometer[®] System, San Jose, CA, USA.)를 이용하여 Th1 세포, Th17 세포, Treg 세포의 분포를 분석하였다.
- [0283] 그 결과를 도 21내지 도 24에 나타내었다.
- [0284] 'NC'는 정상대조군, 'TNBS'는 TNBS가 처리된 군, 'eRGH'는 TNBS 처리 후 비교예 1의 홍삼농축액(eRG) 100mg/kg을 경구투여한 군, 'FRGH'는 TNBS 처리 후 실시예 3의 발효홍삼 농축액(FRG) 100mg/kg을 경구투여한 군, 'ERGH'는 TNBS 처리 후 비교예 2의 효소처리 발효홍삼 농축액(ERG) 100mg/kg을 경구투여한 군, 'wRGH'는 TNBS 처리 후 비교예 3의 시중에 판매 중인 홍삼농축액(wRG) 100mg/kg을 경구투여한 군을 나타낸다.
- [0285] 도 21 내지 도 24에서 확인할 수 있는 바와 같이, TNBS의 투여는 비장의 Th1 세포 및 Th17 세포의 분화를 증가시키고 Treg 세포로의 분화를 억제하였음에 반하여, 실시예 3의 발효홍삼 농축액(FRG), 비교예 1의 홍삼농축액(eRG), 비교예 2의 효소처리 발효홍삼 농축액(ERG) 및 비교예 3의 시중에 판매 중인 홍삼농축액(wRG)의 투여는 이를 회복시켰음을 알 수 있었다.
- [0286] 특히, TNBS에 의해 증가한 Th1 세포의 분화는 실시예 3의 발효홍삼 농축액(FRG) 및 비교예 2의 효소처리 발효홍삼 농축액(ERG)을 투여한 경우에 유의적으로 감소하였고, TNBS에 의해 증가한 Th17세포의 분화는 실시예 3의 발효홍삼 농축액(FRG) 및 비교예 3의 시중에 판매 중인 홍삼농축액(wRG)에 의해 유의적으로 감소하였음을 알 수 있었다.
- [0287] 또한, TNBS에 의해 Treg 세포의 분화는 실시예 3의 발효홍삼 농축액(FRG)을 투여한 경우에만 유의적으로 회복하였고, TNBS의 투여는 대장의 Treg의 분화도 감소시켰으며, 실시예 3의 발효홍삼 농축액(FRG)의 투여의 경우에서만 회복하였음을 알 수 있었다.
- [0288] <시험예 4>
- [0289] 본 발명의 발효홍삼 농축액(FRG)을 투여한 생쥐에서 Rd, Rg1, Rg3, Compound K 의 동태분석
- [0290] 상기 실시예 3의 발효홍삼 농축액(FRG)과 비교예 3의 시중에 판매 중인 홍삼농축액(wRG)을 각각 1,000mg/kg씩 C57BL/c 생쥐(웅성, 약19~22그램)에 경구투여하고, 각 그룹에서 0.5, 1, 2, 4, 8, 12, 16, 24시간에 혈액 100 μ L를 채취하였다. 채취한 혈액은 원심분리기(13,200rpm, 5분)로 원심분리하여 혈장을 분리하였다. 상기 분리된 혈장은 분석시까지 -70 $^{\circ}$ C deep freezer에 보관하였다. 상기 혈액 시료 50 μ L를 취해, 내부표준물질이 녹여진 아세트나이트릴 40 μ L를 첨가하여 혈장 내 단백질을 제거(protein precipitation)하고, 혈장시료 20 μ L를 확보하였다. 상기 샘플을 2분 동안 vortex한 후에, 13,200rpm에서 5분 동안 시료를 원심분리를 하였다. 그런 다음, 상층액을 취하여 LC/MS/MS(Agilent 6460) 기기를 이용한 분석법을 확립하여 생체 시료에서의 진세노사이드 Rd, 진세노사이드 Rg1, 진세노사이드 Rg3, 화합물(compound) K의 정량분석에 응용하였다. 물질의 이온화 특성에 따라 positive ion mode 또는 negative ion mode에서 ESI(electrospray ionization) 소스(source)를 이용하여 MRM(multiple reaction monitoring) 분석 조건을 확립하였다. LC/MS 이동상으로는 물과 메탄올 등을 이용하고 이온화 효율 및 column에서의 peak shape 향상을 위하여 formic acid 또는 ammonium formate 등의 organic solvent modifier를 이용하였다. 분석용 컬럼은 C18 컬럼(2.1mm \times 5mm, 3 μ m)을 사용하고 유속은 0.2mL/min로 하고 gradient elution program을 적용하였다.
- [0291] 대조군과 홍삼 처리군에서 약물의 농도 변화를 확립한 LC/MS/MS기기로 분석하여, 각군의 약동력학 파라미터(Tmax, Cmax, AUC)를 산출하였다.
- [0292] 그 결과를 표 5 및 도 25에 나타내었다.
- [0293] 하기의 표 5의 'Tmax'는 약물 투여 후 혈중농도가 최고치에 도달하는 시간을 나타내고, 'Cmax'는 약물투여 후 최고 혈중농도를 나타내며, 'AUC(area under the curve)'는 혈중 약물농도-시간 곡선하 면적으로서 약물의 생체 흡수율의 정도를 나타낸다.
- [0294] 한편, 도 25의 검정색 원(closed circle)은 실시예 3의 발효홍삼 농축액(FRG)을 나타내고, 검정색 삼각형(closed triangle)은 비교예 3의 시중에 판매 중인 홍삼농축액(wRG)을 나타낸다.
- [0295] 하기의 표 5 및 도 25에서 확인할 수 있는 바와 같이, 실시예 3의 발효홍삼 농축액(FRG)을 투여한 경우에 가장

많이 혈중으로 흡수된 것은 진세노사이드 Rd였고, 이어서 진세노사이드 Rg1, 화합물 K, 진세노사이드 Rg3 순이었음에 반하여, 비교예 3의 시중에 판매 중인 홍삼농축액(wRG)을 투여한 경우에는 가장 많이 혈중으로 흡수된 것은 진세노사이드 Rd였고, 진세노사이드 Rg3, 진세노사이드 Rg1 순이었다. 그러나, 혈중으로 흡수된 진세노사이드 Rd의 양에 있어서는 실시예 3의 발효홍삼 농축액(FRG)을 투여한 경우가 비교예 3의 시중에 판매 중인 홍삼 농축액(wRG)을 투여한 경우보다 약 28~30배 많았다.

[0296] 또한, 비교예 3의 시중에 판매 중인 홍삼농축액(wRG)을 투여한 경우에는 화합물 K(compound K)가 혈중에서 검출되지 아니하여 혈중으로 흡수되지 아니하였음에 반하여, 실시예 3의 발효홍삼 농축액(FRG)을 투여한 경우에는 화합물 K(compound K)가 검출되어 혈중으로 흡수되었음을 알 수 있었다.

표 6

반응물		Pharmacokinetic parameters		
Saponin		Tmax(h)	Cmax(ng/mL)	AUC(ng · h/mL)
실시예 3	ginsenoside Rd	7.33±3.01	1075.52±368.71	12991.67±4542.34
	ginsenoside Rg1	3.67±0.82	49.54±12.55	225.12±53.66
	ginsenoside Rg3	0.75±0.61	35.6±10.03	107.11±36.56
	compound K	3.92±4.91	14.68±7.44	160.45±39.23
비교예 3	ginsenoside Rd	6.17±2.99	40.53±17.87	458.29±173.00
	ginsenoside Rg1	2.42±1.74	6.29±1.84	27.39±11.94
	ginsenoside Rg3	1.67±1.33	62.65±21.49	333.31±79.87
	compound K	0	0	0

[0297]

[0298] <시험예 5>

[0299] in vitro 항산화 활성 측정

[0300] DPPH(2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl)를 에탄올에 0.2mM 농도가 되도록 녹여 DPPH 용액을 제조하였다. 상기 DPPH 용액 0.1mL에 각각의 실시예 3의 발효홍삼 농축액(FRG), 비교예 1의 홍삼농축액(eRG), 비교예 2의 효소처리 발효홍삼 농축액(ERG) 및 비교예 3의 시중에 판매 중인 홍삼농축액(wRG)을 각각 1mg/mL, 0.1mg/mL, 0.01mg/mL, 0.001mg/mL을 넣고 20분간 37℃에서 배양하였다. 상기 배양액을 3,000rpm에서 5분 동안 원심분리하여 상등액을 수득하였다. 이후, 517nm에서 상기 상등액의 흡광도를 측정하고, 각각의 실시예 3의 발효홍삼 농축액(FRG), 비교예 1의 홍삼농축액(eRG), 비교예 2의 효소처리 발효홍삼 농축액(ERG) 및 비교예 3의 시중에 판매 중인 홍삼농축액(wRG)의 항산화 활성을 계산하였다.

[0301] 그 결과를 표 6에 나타내었다.

[0302] 하기의 표 6에서 확인할 수 있는 바와 같이, In vitro에서 DPPH법으로 측정된 항산화 효과는 실시예 3의 발효홍삼 농축액(FRG)이 가장 우수하였고, 다음은 비교예 3의 시중에 판매 중인 홍삼농축액(wRG), 비교예 1의 홍삼농축액(eRG), 비교예 2의 효소처리 발효홍삼 농축액(ERG) 순이었음을 알 수 있었다.

표 7

농도(mg/mL)	저해율(%)							
	비교예 1		실시예 3		비교예 2		비교예 3	
	평균	표준편차	평균	표준편차	평균	표준편차	평균	표준편차
1	83.3	0.8	90.2	0.8	75.9	1.6	86.2	0
0.1	60.3	0.8	78.7	0.8	56.3	1.6	68.4	0.8
0.01	55.2	0.0	63.8	0.8	32.8	2.4	54.6	0.8
0.001	37.4	2.4	47.7	2.4	25.9	2.4	42.0	0.8
50%저해농도 (IC50) (mg/mL)	IC ₅₀ =0.0074		IC ₅₀ =0.0024		IC ₅₀ =0.077		IC ₅₀ =0.0072	

[0303]

- [0304] <시험예 6>
- [0305] tert-부틸퍼옥사이드 유도 간손상 마우스에서의 간손상 치료효능 측정
- [0306] 생쥐(BALB/c, 웅성) 6마리를 한군으로 하여, 정상군을 제외한 나머지 군의 실험동물에 터트-부틸퍼옥사이드(Tert-butylperoxide)를 2.5mmol/kg의 용량으로 복강투여 하여 간 손상을 유발하였다. 그런 다음, 터트-부틸퍼옥사이드(Tert-butylperoxide) 투여 2시간 후부터 각각의 실시예 3의 발효홍삼 농축액(FRG), 비교예 1의 홍삼농축액(eRG), 비교예 2의 효소처리 발효홍삼 농축액(ERG) 및 비교예 3의 시중에 판매 중인 홍삼농축액(wRG)을 하루 1회씩 100mg/kg로 3일간 경구투여 하였다. 그런 다음, 상기 홍삼농축액을 마지막으로 투여하고 6시간 후에 심장채혈을 하였다. 상기 채취한 혈액을 상온에서 60분 동안 방치하고 3,000rpm에서 15분간 원심분리하여 혈청을 분리하였다. 상기 분리된 혈청의 GPT(glutamic pyruvate transaminase)와 GOT(glutamic oxalacetic transaminase)를 혈액분석 키트(ALT & AST 측정 키트; Asan Pharm. Co., 대한민국)를 이용하여 측정하였다.
- [0307] 정상군에는 식염수를 50mg/kg의 양으로 하루 1회씩 3일간 경구투여 하였다.
- [0308] 음성 대조군에는 터트-부틸퍼옥사이드(Tert-butylperoxide)을 투여하여 간손상을 유발한 후 식염수를 50mg/kg의 양으로 하루 1회씩 3일간 경구투여 하였다.
- [0309] 양성 대조군에는 홍삼농축액 대신 실리마린(silymarin)을 50mg/kg의 양으로 하루 1회씩 3일간 경구투여 하였다.
- [0310] 그 결과를 도 26 내지 도 29에 나타내었다.
- [0311] 'Nor'은 정상군, 'Con'은 음성대조군, 'Silymarin'은 양성대조군, 'eRGH'는 음성대조군에 비교예 1의 홍삼농축액(eRG)을 처리한 군, 'FRGH'는 음성대조군에 실시예 3의 발효홍삼 농축액(FRG)을 처리한 군, 'ERGH'는 음성대조군에 비교예 2의 효소처리 발효홍삼 농축액(ERG)을 처리한 군, 'wRGH'는 음성대조군에 비교예 3의 시중에 판매 중인 홍삼농축액(wRG)을 처리한 군을 나타낸다.
- [0312] 도 25 내지 도 28에서 확인할 수 있는 바와 같이, 터트-부틸퍼옥사이드(Tert-butylperoxide)를 처리한 경우에 혈중 ALT, AST, TNF- α 가 유의적으로 증가하였음에 반하여, 실시예 3의 발효홍삼 농축액(FRG)을 투여한 경우가 터트-부틸퍼옥사이드(Tert-butylperoxide)에 의해 유도된 혈중 ALT, AST, TNF- α 을 개선하는데 가장 우수하였음을 알 수 있었다.

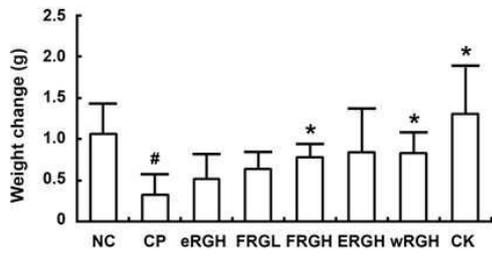
수탁번호

- [0313] 기탁기관명 : 한국생명공학연구원
수탁번호 : KCTC13279BP
수탁일자 : 20170531

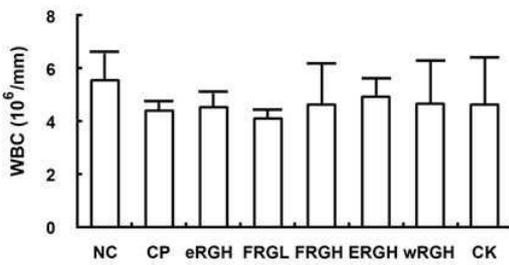
기탁기관명 : 한국생명공학연구원
수탁번호 : KCTC13475BP
수탁일자 : 20180201

도면

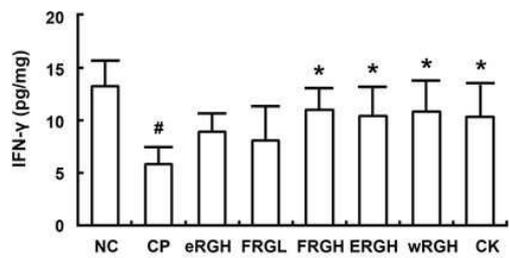
도면1



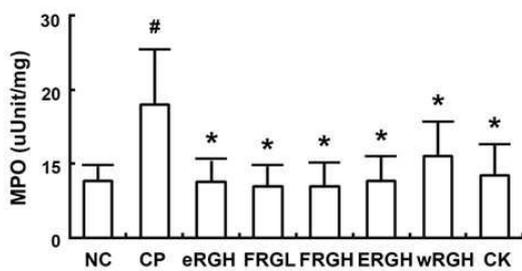
도면2



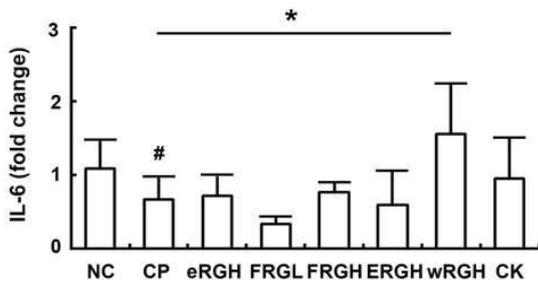
도면3



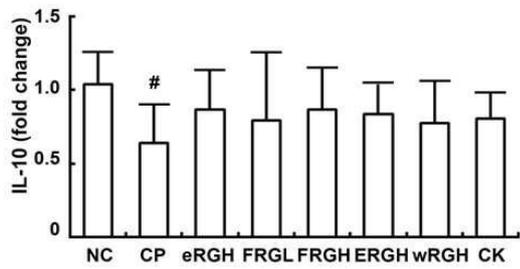
도면4



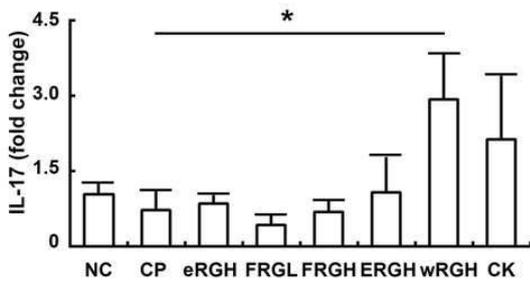
도면5



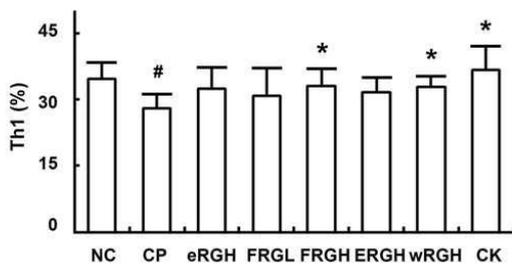
도면6



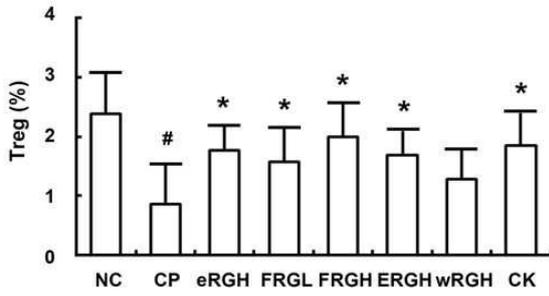
도면7



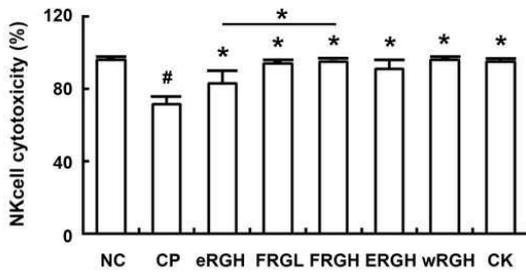
도면8



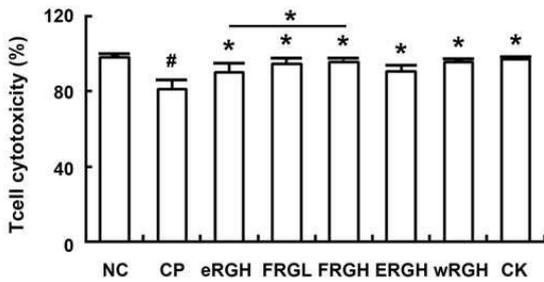
도면9



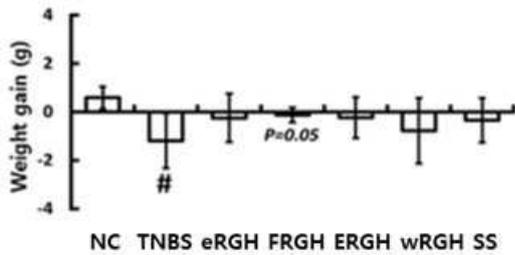
도면10



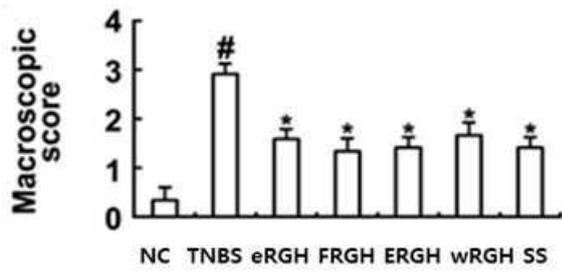
도면11



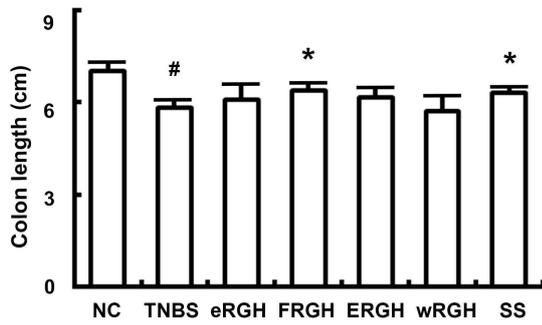
도면12



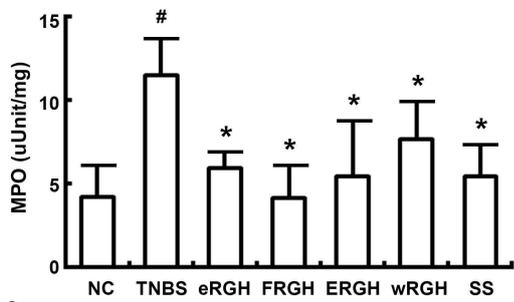
도면13



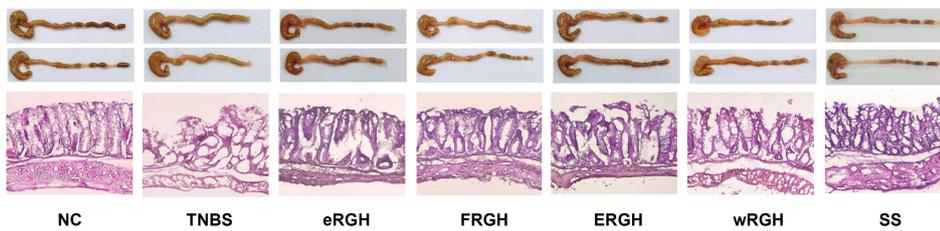
도면14



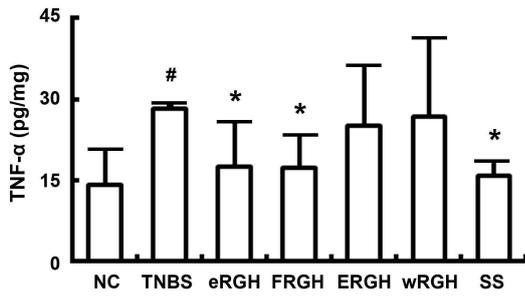
도면15



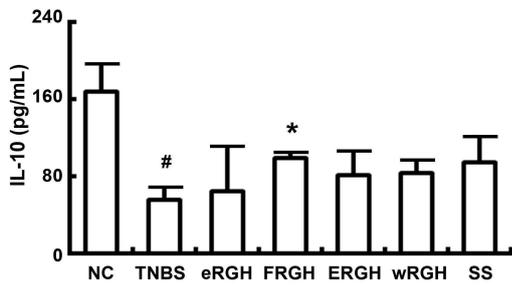
도면16



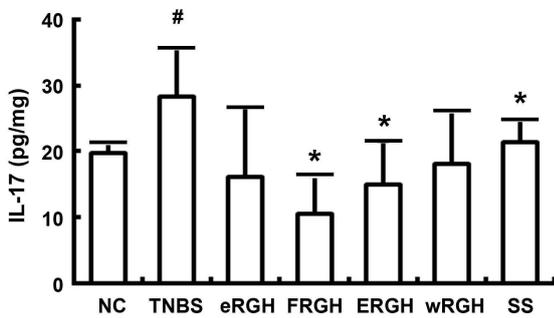
도면17



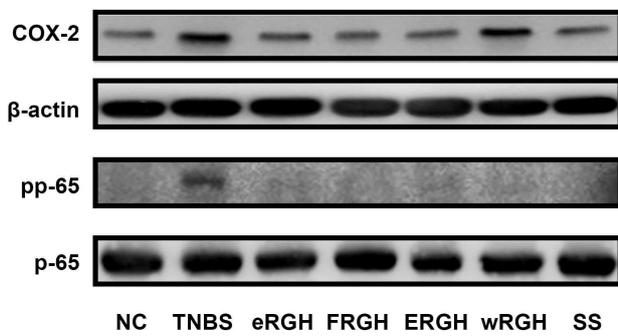
도면18



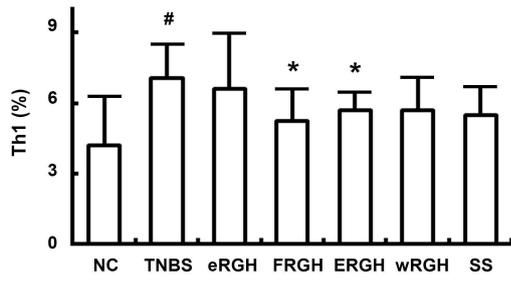
도면19



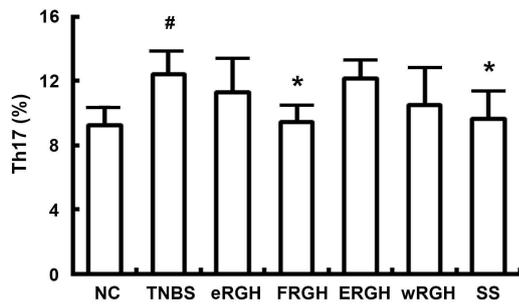
도면20



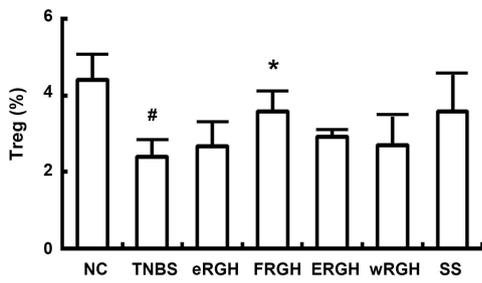
도면21



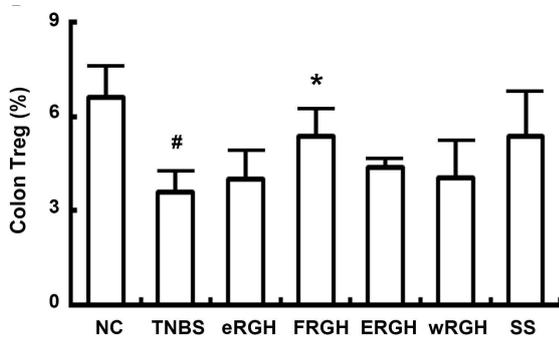
도면22



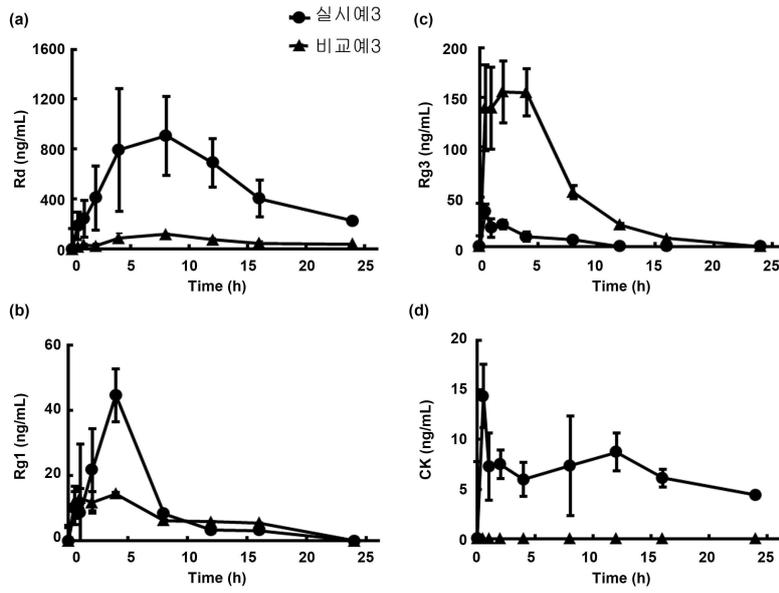
도면23



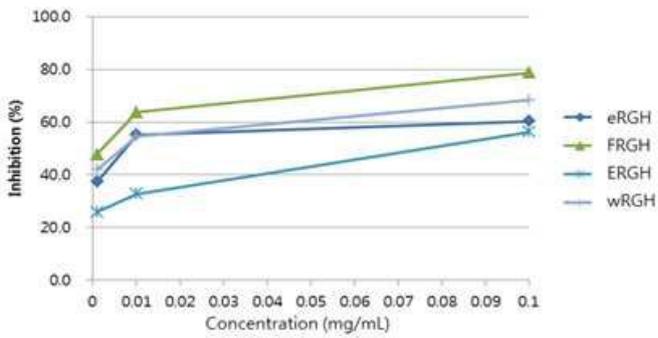
도면24



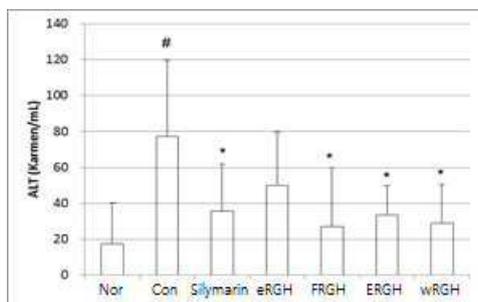
도면25



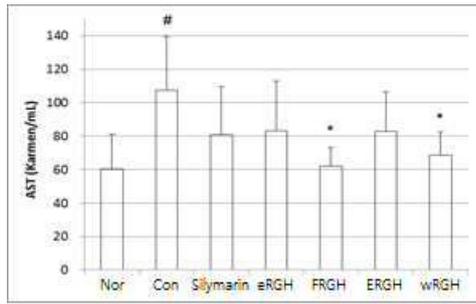
도면26



도면27



도면28



도면29

