

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구
국제사무국

(43) 국제공개일
2017년 1월 5일 (05.01.2017)



(10) 국제공개번호
WO 2017/003204 A1

- (51) 국제특허분류:
A23L 1/30 (2006.01) A61K 36/82 (2006.01)
A23L 29/00 (2016.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/KR2016/007011
- (22) 국제출원일: 2016년 6월 30일 (30.06.2016)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보:
10-2015-0093207 2015년 6월 30일 (30.06.2015) KR
10-2016-0081854 2016년 6월 29일 (29.06.2016) KR
- (71) 출원인: (주)아모레퍼시픽 (AMOREPACIFIC CORPORATION) [KR/KR]; 140-777 서울시 용산구 한강대로 106, Seoul (KR).
- (72) 발명자: 홍용덕 (HONG, Yong Deog); 17074 경기도 용인시 기흥구 용구대로 1920 아모레퍼시픽기술연구원, Gyeonggi-do (KR). 이범진 (LEE, Bumjin); 17074 경기도 용인시 기흥구 용구대로 1920 아모레퍼시픽기술연구원, Gyeonggi-do (KR). 최민식 (CHOI, Min Sik); 17074 경기도 용인시 기흥구 용구대로 1920 아모레퍼시픽기술연구원, Gyeonggi-do (KR). 김정기 (KIM, Jeongkee); 17074 경기도 용인시 기흥구 용구대로 1920 아모레퍼시픽기술연구원, Gyeonggi-do (KR).
- (74) 대리인: 김순영 (KIM, Sun-young); 110-727 서울시 중로구 종로 5길 58 석탄회관빌딩 10층, Seoul (KR).

(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW.

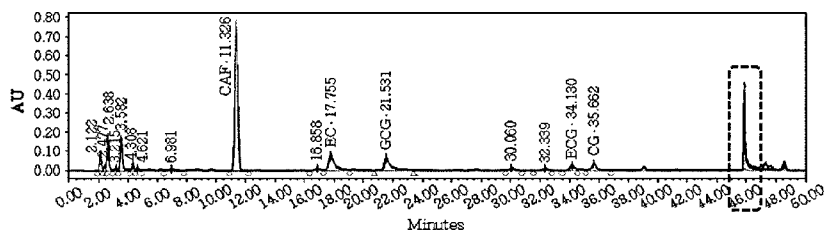
(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 역내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

공개:

- 국제조사보고서와 함께 (조약 제 21 조(3))
- 청구범위 보정 기한 만료 전의 공개이며, 보정서를 접수하는 경우 그에 관하여 별도 공개함 (규칙 48.2(h))

(54) Title: NEURON-PROTECTING COMPOSITION CONTAINING POST-FERMENTED TEA EXTRACT

(54) 발명의 명칭: 후발효차 추출물을 포함하는 신경 세포 보호용 조성물



(57) Abstract: Disclosed is a neuron-protecting composition containing post-fermented tea extract as an active ingredient. The composition according to the embodiments of the present invention exhibits neuron-protecting activity, and thus can prevent neuronal damage and cell death due to oxidation stresses and can prevent or ameliorate neurodegenerative disease progression, memory loss, cognitive decline, forgetfulness, depression and the like.

(57) 요약서: 본 명세서에는 후발효차 추출물을 유효성분으로 포함하는 신경 세포 보호용 갖는 조성물이 개시된다. 본 발명 실시예들에 따른 조성물은 신경 세포 보호 활성을 나타내어 산화 스트레스에 기인한 신경 세포의 손상 또는 사멸을 방지하고, 퇴행성 뇌질환의 증상, 기억력 손상, 인지감퇴, 건망증 또는 우울증 등을 예방 또는 개선할 수 있다.

WO 2017/003204 A1

명세서

발명의 명칭: 후발효차 추출물을 포함하는 신경 세포 보호용 조성물

기술분야

- [1] 본 명세서는 후발효차 추출물을 포함하는 신경 세포 보호용 조성물을 개시한다.

배경기술

- [2] 녹차는 잎 상태의 엽차 형태, 또는 보다 깊은 향취를 느끼기 위해 발효 상태의 차로 음용 한다. 발효 녹차는 녹차 잎에 산화 처리를 수행한 것을 의미하며, 차 잎에 존재하는 산화 효소에 의하여 산화시킨 발효차, 차 잎에 존재하는 효소가 아닌 별도의 미생물에 의하여 발효시킨 후발효차를 포함한다. 발효 정도에 따라 약발효차, 반발효차, 완전발효차 등으로 구분할 수 있다. 예를 들어, 발효 녹차는 발효 형태 및 정도에 따라, 녹차, 우롱차, 홍차, 보이차 등과 같은 다양한 명칭으로 불리워진다. 발효 상태의 차는 엽차와 비교하여 향취에 있어 차이를 나타낼 뿐만 아니라, 구체적 발효 공정에 따라 유효 성분의 종류 및 함량에 있어서 큰 차이를 나타낼 수 있다.
- [3] 산화적 스트레스는 노화, 질병 등에 의하여 유발될 수 있으며, 특히 알츠하이머, 파킨슨병 등의 퇴행성 뇌질환은 그 증상으로로서 신경 세포의 손상을 일으킨다. 산화적 스트레스에 의한 신경 세포의 손상은 기억력 손상, 인지 감퇴, 건망증, 우울증 등의 증상으로 나타난다.
- [4] 노인 인구가 증가함에 따라 노화, 퇴행성 뇌질환에 대한 치료 및 방지에 대한 요구가 증가하고 있으나, 질환이나 노화 자체의 정확한 원인이나 매커니즘이 밝혀지지 않아 노화나 질환 자체의 해소는 어려운 실정이다. 이에, 노화 또는 질환의 증상, 진행에 대한 예방, 완화 또는 개선을 위한 연구가 계속되고 있다.
- [5] 본 발명의 선행기술은 한국 등록특허공보 제10-0975199호에 기재되어 있다.

발명의 상세한 설명

기술적 과제

- [6] 일 측면에서, 본 발명이 해결하고자 하는 과제는 신경 세포 보호 활성을 나타내는 조성물을 제공하는 것이다.
- [7] 다른 측면에서, 본 발명이 해결하고자 하는 과제는 산화 스트레스에 기인한 신경 세포의 손상 또는 사멸을 방지하는 조성물을 제공하는 것이다.
- [8] 다른 측면에서, 본 발명이 해결하고자 하는 과제는 산화 스트레스에 기인한 퇴행성 뇌질환의 증상을 예방 또는 완화하기 위한 조성물을 제공하는 것이다.
- [9] 다른 측면에서, 본 발명이 해결하고자 하는 또 다른 과제는 기억력 손상, 인지감퇴, 건망증 또는 우울증을 예방 또는 개선하기 위한 조성물을 제공하는 것이다.

과제 해결 수단

- [10] 본 발명의 일 관점에 따른 조성물은 후발효차 추출물을 유효성분으로 포함하는 신경 세포 보호 활성을 갖는 조성물에 관한다.
- [11] 본 발명의 다른 관점에 따른 조성물은 후발효차 추출물을 고성능 액체 크로마토그래피(high performance liquid chromatography, HPLC)로 분리한 발효 폴리페놀을 유효성분으로 포함하는 신경 세포 보호 활성을 갖는 조성물로서,
- [12] 상기 발효 폴리페놀은 후발효차 추출물을 C18컬럼(Thermo synchronis-C18 4.6 x 250mm, Thermo fisher scientific, USA)을 사용하고, 이동상으로 0.1% 아세트산(AA) 및 아세토니트릴(ACN) 용매를 사용하여 AA/ACN이 0~29분에서 90/10 부피 구배; 30~41분에서 85/15 부피 구배; 42~43분에서 80/20 부피 구배; 44~48분에서 5/95 부피 구배; 49~50분에서 90/10 부피 구배, 유속 1 ml/min, UV 파장 280 nm 영역에서 측정한 스펙트럼에서 머무름 시간(retention time) 45.85분 내지 45.95분에서 피크를 가지는 분획 성분인 신경 세포 보호 활성을 갖는 조성물에 관한다.

발명의 효과

- [13] 일 측면에서, 본 발명은 신경 세포 보호 활성을 나타내는 조성물을 제공할 수 있다.
- [14] 다른 측면에서, 본 발명은 산화 스트레스에 기인한 신경 세포의 손상 또는 사멸을 방지하는 조성물을 제공할 수 있다.
- [15] 다른 측면에서, 본 발명은 산화 스트레스에 기인한 퇴행성 뇌질환의 증상의 발현을 예방 또는 증상을 완화하기 위한 조성물을 제공할 수 있다.
- [16] 다른 측면에서, 본 발명은 기억력 손상, 인지감퇴, 건망증 또는 우울증을 예방 또는 개선하기 위한 조성물을 제공할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [17] 도 1은 후발효차 추출물을 HPLC 분석한 스펙트럼 결과이다.
- [18] 도 2는 일반 녹차, 반발효차 및 완전발효차의 성분을 분석한 NMR 결과이다.
- [19] 도 3은 일반 녹차, 반발효차 및 완전발효차의 각 성분 함량을 비교한 그래프이다.
- [20] 도 4는 후발효차 추출물의 HPLC 분석 결과에서 발효 폴리페놀 피크를 확대한 것이다.
- [21] 도 5는 후발효차 추출물의 에탄올 수용액 농도별 카테킨과 카페인의 함량을 나타낸 그래프이다.
- [22] 도 6은 시험예 3의 산화 스트레스에 의한 세포 생존률을 나타낸 결과 그래프이다.

발명의 실시를 위한 최선의 형태

- [23] 이하, 첨부한 도면들을 참조하여, 본 출원의 실시예들을 보다 상세하게 설명하고자 한다. 그러나 본 출원에 개시된 기술은 여기서 설명되는 실시예들에

한정되지 않고 다른 형태로 구체화될 수도 있다. 단지, 여기서 소개되는 실시예들은 개시된 내용이 철저하고 완전해질 수 있도록 그리고 당업자에게 본 출원의 사상이 충분히 전달될 수 있도록 하기 위해 제공되는 것이다. 도면에서 각 구성요소를 명확하게 표현하기 위하여 구성요소의 폭이나 두께 등의 크기를 다소 확대하여 나타내었다. 또한, 설명의 편의를 위하여 구성요소의 일부만을 도시하기도 하였으나, 당업자라면 구성요소의 나머지 부분에 대하여도 용이하게 파악할 수 있을 것이다. 또한, 해당 분야에서 통상의 지식을 가진 자라면 본 출원의 기술적 사상을 벗어나지 않는 범위 내에서 본 출원의 사상을 다양한 다른 형태로 구현할 수 있을 것이다.

- [24] 본 명세서에서, 후발효차는 차 잎에 존재하는 효소가 아닌 별도의 미생물에 의하여 발효시킨 것을 의미한다.
- [25] 본 명세서에서, 완전발효차는 차잎에 미생물을 첨가하여 90% 이상 발효시켜 만든 차를 의미하고, 상기 반발효차는 차잎에 미생물을 첨가하여 30% 내지 50%로 발효시켜 만든 차를 의미한다.
- [26] 본 발명 일 실시예에 따른 신경 세포 보호용 조성물은 후발효차 추출물을 유효성분으로 포함할 수 있다.
- [27] 상기 후발효차의 발효 정도는 반발효차 또는 완전발효차일 수 있으며, 예를 들어 완전발효차일 수 있다. 상기 반발효차는 예를 들어 미생물을 첨가하고 3일 내지 4일 동안 발효시켜 제조할 수 있으며, 상기 완전 발효차는 미생물을 첨가하고 7일 내지 10일 동안 발효시켜 제조할 수 있으나 이에 제한되지 않는다.
- [28] 후발효차는 사카로마이세스속(*Saccharomyces* sp.), 락토바실러스속(*Lactobacillus* sp.) 및 루코노스톡속(*Leuconostoc mesenteroides* sp.)으로부터 선택되는 균주를 사용하여 녹차 잎을 발효시켜 제조할 수 있다.
- [29] 상기 균주는 예를 들어, 사카로마이세스 세레비지애(*Saccharomyces cerevisiae*), 락토바실러스 카세이(*Lactobacillus casei*), 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*), 락토바실러스 불가리우스(*Lactobacillus bulgarius*) 및 루코노스톡 메센테로이데스(*Leuconostoc mesenteroides*)로부터 선택될 수 있다.
- [30] 상기 균주는 한국식품연구원 '식품 미생물 유전자은행'으로부터 분양받은 균주이거나, 기타 연구기관 보유균주 또는 상용화된 균주일 수 있으며, 구체적으로 사카로마이세스 세레비지애(*Saccharomyces cerevisiae*, ATCC9763), 락토바실러스 카세이(*Lactobacillus casei*, KFRI000127), 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*, F4041, F4163), 락토바실러스 불가리우스(*Lactobacillus bulgarius*, KFRI000344) 및 루코노스톡 메센테로이데스(*Leuconostoc mesenteroides*, KFRI 818)로부터 선택된 균주일 수 있다.
- [31] 녹차 잎의 발효는 상기 균주를 녹차 잎에 접종하여 발효시키는 것을 포함할 수 있다.
- [32] 상기 녹차 잎은 건조된 녹차 잎, 예를 들어 수분 함량 5중량% 미만의 건엽을

사용하는 경우, 상기 건엽에 물을 첨가하여 사용할 수 있다. 상기 물은 물이 첨가된 녹차 잎 총 중량에 대하여 수분 함량이 20중량% 이상, 25중량% 이상 또는 30중량% 이상, 70중량% 이하, 65중량% 또는 60중량%, 예컨대 이하 30중량% 내지 60중량%가 되도록 첨가할 수 있다. 상기 범위 내에서 균주의 활성을 증진시킬 수 있으며, 녹차 잎의 균일한 발효 및 가공 용이성을 증진시킬 수 있다. 수분 함량이 상기 범위 미만인 경우 녹차 잎의 균일한 발효가 어려울 수 있으며, 상기 범위를 초과하는 경우 녹차 잎끼리 부착되어 가공 공정에 문제가 발생할 수 있고, 최종 후발효차의 형태 및 품질 저하의 원인이 될 수 있다.

- [33] 상기 균주는 활성화 된 균주를 사용할 수 있으나, 이에 한정되지 않는다. 상기 균주의 활성화는 활성 배지에 균주를 접종하고 배양하여 수행할 수 있으며, 예를 들어 활성 배지에 균주를 접종하고, 진동 배양기(shaking incubator)에서 20~30°C에서 2시간 배양할 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.
- [34] 상기 녹차 잎 총 중량에 대하여 상기 균주 0.05중량% 이상 또는 0.1중량% 이상, 10중량% 이하 또는 5중량% 이하, 예컨대 0.1~5중량%로 접종할 수 있으나, 이에 한정되지 않는다. 균주가 상기 중량 범위를 초과하면 발효 시간은 짧아지며, 최종 후발효차의 수색이 탁해지고, 상기 중량 범위 미만이면 발효 시간이 길어진다. 상기 접종은 예를 들어, 멸균된 반응탱크, 소포장 단위별로 준비된 상기 녹차 주 기질, 배양에 필요한 영양 요구 배지물들을 사용하여, 녹차중량대비 수분함량 비율이 30중량% 내지 60중량%가 되게 물을 첨가하고 활성화균을 접종할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [35] 발효 공정은 예를 들어 온도 5°C 이상, 6°C 이상 또는 7°C 이상, 8°C 이상, 9°C 이상, 또는 10°C 이상이고, 55°C 이하, 54°C 이하, 53°C 이하, 52°C 이하, 51°C 이하, 50°C 이하, 49°C 이하, 48°C 이하, 47°C 이하, 46°C 이하, 45°C 이하, 44°C 이하, 43°C 이하, 42°C 이하, 41°C 이하, 40°C 이하, 39°C 이하, 38°C 이하, 37°C 이하, 36°C 이하 또는 35°C 이하, 예컨대, 5°C, 6°C, 7°C, 8°C, 9°C, 10°C, 11°C, 12°C, 13°C, 14°C, 15°C, 16°C, 17°C, 18°C, 19°C, 20°C, 21°C, 22°C, 23°C, 24°C, 25°C, 26°C, 27°C, 28°C, 29°C, 30°C, 31°C, 32°C, 33°C, 34°C, 35°C, 36°C, 37°C, 38°C, 39°C, 40°C, 41°C, 42°C, 43°C, 44°C, 45°C, 46°C, 47°C, 48°C, 49°C, 50°C, 51°C, 52°C, 53°C, 54°C, 또는 55°C, 예컨대 7°C~55°C에서 수행될 수 있다. 상기 균주가 바실러스 서브틸리스인 경우, 발효 과정에서 바실러스 서브틸리스 이외의 잡균 증식을 억제하기 위하여 발효 공정을 25°C 이상, 26°C 이상, 27°C 이상, 28°C 이상, 29°C 이상, 또는 30°C 이상이고, 55°C 이하, 54°C 이하, 53°C 이하, 52°C 이하, 51°C 이하, 50°C 이하, 49°C 이하, 48°C 이하, 47°C 이하, 46°C 이하, 45°C 이하, 44°C 이하, 43°C 이하, 42°C 이하, 41°C 이하, 또는 40°C 이하, 예컨대 30°C 이상 55°C 이하, 35°C 이상 50°C 이하의 온도에서 수행될 수 있다. 온도가 상기 범위를 초과하여 고온이면 후발효차의 품질이 저하될 수 있으며, 온도가 상기 범위 미만의 저온이면 반응 시간이 길어지거나 발효가 일어나지 않을 수 있다.
- [36] 상기 발효 공정은 상술한 온도 범위에서 1차 발효를 수행한 후, 보다 높은 온도,

예를 들어 30°C 이상, 31°C 이상, 32°C 이상, 33°C 이상, 34°C 이상, 또는 35°C 이상이고, 90°C 이하, 89°C 이하, 88°C 이하, 87°C 이하, 86°C 이하, 85°C 이하, 84°C 이하, 83°C 이하, 82°C 이하, 81°C 이하, 또는 80°C 이하, 예컨대 35°C 이상 83°C 이하의 온도에서 2차 발효를 수행할 수 있다. 고온에서의 2차 발효를 수행하여 반응 시간을 단축시킬 수 있다.

- [37] 온도가 상기 범위를 초과하여 고온이면 후발효차의 품질이 저하될 수 있으며, 온도가 상기 범위 미만의 저온이면 반응 시간이 길어지거나 발효가 일어나지 않을 수 있다.
- [38] 발효 공정은 pH 3.5 이상 또는 pH 4.0 이상, pH 8.5 이하 또는 pH 8.0 이하, 예컨대 pH 4.0~8.0에서 이루어질 수 있으며, 상기 범위 내에서 숙성 기간 동안의 잡균 오염을 방지할 수 있다. pH가 상기 범위를 벗어나면 균주의 생육이 어려우며, 균이 실패되어 배양이 충분히 이루어지지 않을 수 있다.
- [39] 발효 공정은 예를 들어 20시간 이상, 21시간 이상, 22시간 이상, 23시간 이상 또는 24시간 이상, 1000시간 이하, 990시간 이하 980시간 이하, 970시간 이하, 960시간 이하, 950시간 이하, 940시간 이하, 930시간 이하, 920시간 이하, 910시간 이하 또는 900시간 이하, 예컨대 24시간 내지 15일 동안 수행할 수 있다.
- [40] 상기 발효 공정 후에 살균 공정을 더 수행할 수 있으며, 목적 미생물 이외의 잡균 또는 병원성 균을 제거 또는 배제하기 위한 것이다. 상기 살균 공정은 예를 들어 65°C 이상, 66°C 이상, 67°C 이상, 68°C 이상, 69°C 이상, 70°C 이상, 71°C 이상, 72°C 이상, 73°C 이상, 74°C 이상, 75°C 이상, 76°C 이상, 77°C 이상, 78°C 이상, 79°C 이상 또는 80°C 이상, 130°C 이하, 129°C 이하, 128°C 이하, 127°C 이하, 126°C 이하, 125°C 이하, 124°C 이하, 123°C 이하, 122°C 이하, 121°C 이하 또는 120°C 이하, 예컨대 70~120°C, 예컨대 70~80°C에서 열풍건조하여 수행할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 상기 열풍건조는 3시간 내지 7시간, 예를 들어 4~6시간 동안 수행할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [41] 상기 발효 공정, 또는 발효 공정 및 살균 공정 후에 숙성 공정을 더 수행할 수 있다.
- [42] 상기 숙성 공정은 온도 3°C 이상, 4°C 이상 또는 5°C 이상, 25°C 이하, 24°C 이하, 23°C 이하, 22°C 이하, 21°C 이하 또는 20°C 이하, 예컨대 5~20°C에서 수행될 수 있다. 상기 범위 내에서 장시간 동안 잡균의 오염 없이 유익한 균의 숙성을 유도하고, 잡균에 의한 곰팡이 냄새를 감소시킬 수 있으며, 유익한 균의 향미를 강화할 수 있다. 상기 온도가 20°C를 초과하면 상기 효과가 현저하게 감소한다. 상기 숙성 공정에 제주도 현무암을 이용할 수 있으며, 제주도 현무암의 강한 탈취력과 정수/정화 작용을 통하여 곰팡이 냄새 또는 잡균 냄새를 보다 경감시킬 수 있다.
- [43] 상기 숙성은 2일 이상, 3일 이상, 4일 이상, 5일 이상, 6일 이상 또는 7일 이상, 8일 이상, 9일 이상, 10일 이상, 150일 이하, 140일 이하, 130일 이하, 120일 이하, 110일 이하, 100일 이하, 90일 이하, 80일 이하, 70일 이하, 60일 이하, 50일 이하,

40일 이하, 30일 이하, 20일 이하, 19일 이하, 18일 이하, 17일 이하, 16일 이하 또는 15일 이하 동안 수행할 수 있으며, 예컨대 7일 내지 120일간 수행할 수 있다.

- [44] 후발효차 추출물은 상기 후발효차를 30부피% 이상, 31부피% 이상, 32부피% 이상, 33부피% 이상, 34부피% 이상, 35부피% 이상, 36부피% 이상, 37부피% 이상, 38부피% 이상, 39부피% 이상, 40부피% 이상, 41부피% 이상, 42부피% 이상, 43부피% 이상, 44부피% 이상, 45부피% 이상, 46부피% 이상, 47부피% 이상, 48부피% 이상, 49부피% 이상, 또는 50부피% 이상이고, 80부피% 이하, 79부피% 이하, 78부피% 이하, 77부피% 이하, 76부피% 이하, 75부피% 이하, 74부피% 이하, 73부피% 이하, 72부피% 이하, 71부피% 이하, 70부피% 이하, 69부피% 이하, 68부피% 이하, 67부피% 이하, 66부피% 이하, 65부피% 이하, 64부피% 이하, 63부피% 이하, 62부피% 이하, 61부피% 이하, 또는 60부피% 이하, 예컨대 30부피% 내지 80부피%, 40부피% 내지 70부피%, 예를 들어 50부피% 내지 60부피%의 에탄올 수용액으로 추출한 것일 수 있다. 상기 범위 내에서 신경 세포 보호 효과에 기여하는 발효 폴리페놀의 함량이 높아 신경 세포 보호 활성이 우수할 수 있다.

- [45] 상기 후발효차 추출물은 발효시키지 않은 녹차 추출물(이하, “비발효 녹차 추출물”)에 비하여 카테킨을 저감된 함량으로 포함한다. 예를 들어 비발효 녹차 추출물의 카테킨 함량에 대하여 30중량% 이하, 29%중량% 이하, 28중량% 이하, 27중량% 이하, 26중량% 이하, 25중량% 이하, 24중량% 이하, 23중량% 이하, 22중량% 이하, 21중량% 이하, 20중량% 이하, 19중량% 이하, 18중량% 이하, 17중량% 이하, 16중량% 이하, 15중량% 이하, 14중량% 이하, 13중량% 이하, 12중량% 이하, 11중량% 이하 또는 10중량% 이하이고, 0.1중량% 이상, 0.2중량% 이상, 0.3중량% 이상, 0.4중량% 이상, 0.5중량% 이상, 0.6중량% 이상, 0.7중량% 이상, 0.8중량% 이상, 0.9중량% 이상 또는 1중량% 이상, 예컨대 0.1중량% 내지 30중량%, 0.2중량% 내지 20중량%, 1중량% 내지 20중량%, 또는 0.2중량% 내지 15중량%로 포함할 수 있다. 이는 발효, 숙성 과정에서 카테킨이 산화되기 때문이다. 일 구체예에서, 상기 후발효차 추출물은 갈로카테킨갈레이트(gallocatechin gallate)를 추출물 총 중량에 대하여 0.1중량% 내지 10중량%로 포함할 수 있으며, 예를 들어 0.1중량% 이상, 0.2중량% 이상, 0.3중량% 이상, 0.4중량% 이상, 0.5중량% 이상, 0.6중량% 이상, 0.7중량% 이상, 0.8중량% 이상, 0.9중량% 이상 또는 1.0중량% 이상이고, 10중량% 이하, 9중량% 이하, 8중량% 이하, 7중량% 이하, 6중량% 이하, 5중량% 이하, 4중량% 이하 또는 3중량% 이하일 수 있다. 상기 범위 내에서 신경 세포 보호 효과를 증진시킬 수 있다.

- [46] 일 구체예에서 상기 후발효차 추출물은 카테킨갈레이트(catechin gallate)를 추출물 총 중량에 대하여 0.1중량% 내지 3중량%로 포함할 수 있으며, 예를 들어 0.1중량% 이상, 0.2중량% 이상, 0.3중량% 이상, 0.4중량% 이상, 0.5중량% 이상, 0.6중량% 이상, 0.7중량% 이상, 0.8중량% 이상, 0.9중량% 이상 또는 1.0중량%

- 이상이고, 3.0중량% 이하, 2.5중량% 이하, 2.0중량% 이하, 1.5중량% 이하 또는 1.0중량% 이하일 수 있다. 상기 범위 내에서 신경 세포 보호 효과를 증진시킬 수 있다.
- [47] 상기 후발효차 추출물은 카페인의 함량 또한 비발효 녹차 추출물에 비하여 저감된다. 일 구체예에서, 상기 후발효차 추출물은 추출물 총 중량에 대하여 카페인을 0.1중량% 내지 5중량%, 예컨대 0.1중량% 이상, 0.2중량% 이상, 0.3중량% 이상, 0.4중량% 이상, 0.5중량% 이상, 0.6중량% 이상, 0.7중량% 이상, 0.8중량% 이상, 0.9중량% 이상 또는 1.0중량% 이상이고, 5.0중량% 이하, 4.5중량% 이하, 4.0중량% 이하, 3.5중량% 이하, 3.0중량% 이하, 2.5중량% 이하, 2.0중량% 이하, 1.5중량% 이하 또는 1.0중량% 이하일 수 있다. 상기 범위 내에서 과도한 카페인으로 인한 부작용 없이 신경 세포 보호 효과가 증진될 수 있다.
- [48] 상기 후발효차 추출물은 카테킨의 함량이 비발효 녹차 추출물에 비하여는 저감되나, 카페인을 체내 안전성이 유지될 수 있는 수준으로 함유하며, 신경 세포 보호 활성이 우수할 수 있다.
- [49] 상기 후발효차 추출물은 신경 세포 보호 활성이 우수한 발효 폴리페놀을 포함한다. 발효 폴리페놀은 비발효 녹차를 본 발명 실시예들에 따른 후발효차로 제조하는 발효 과정을 통해 비발효 녹차의 폴리페놀 성분이 변형되어 생성될 수 있다. 상기 발효 폴리페놀은 후발효차 총 중량에 대한 함량이 비발효 녹차에서의 5배 내지 300배, 예를 들어 10배 내지 200배를 포함할 수 있다.
- [50] 도 1은 후발효차 추출물을 HPLC 분석한 스펙트럼으로, 붉은색 사각형으로 표시한 피크가 상기 발효 폴리페놀을 나타낸다. 구체적으로 상기 발효 폴리페놀은 후발효차 추출물을 C18컬럼(Thermo synchronis-C18 4.6 x 250mm, Thermo fisher scientific, USA)을 사용하고, 이동상으로 0.1% 아세트산(AA) 및 아세토니트릴(ACN) 용매를 사용하여 AA/ACN이 0~29분에서 90/10 부피 구배; 30~41분에서 85/15 부피 구배; 42~43분에서 80/20 부피 구배; 44~48분에서 5/95 부피 구배; 49~50분에서 90/10 부피 구배, 유속 1 ml/min, UV 파장 280 nm 영역에서 측정한 스펙트럼에서 머무름 시간(retention time) 45.85분 내지 45.95분에서 피크를 가지는 분획 성분에 해당한다.
- [51] 상기 후발효차 추출물 중 발효 폴리페놀의 함량은 비발효 녹차 추출물에 비하여 중량비로 10배 내지 200배, 예를 들어 20배 내지 1000배의 함량으로 포함할 수 있다.
- [52] 상기 조성물은 후발효차 추출물을 조성물 총 중량에 대하여 0.0001중량% 내지 100중량%, 예를 들어 0.001중량% 내지 90중량%, 또는 0.05중량% 내지 50중량%로 포함할 수 있다.
- [53] 본 발명의 다른 실시예에 따른 신경 세포 보호 활성을 갖는 조성물은 발효 폴리페놀을 유효성분으로 포함한다. 상기 발효 폴리페놀은 본 발명 일 실시예에 따른 조성물에 관하여 설명한 바와 동일하다.
- [54] 본 실시예에 따른 조성물은 상기 발효 폴리페놀을 상기 후발효차 추출물로서

함유할 수 있다.

- [55] 상기 조성물은 상기 발효 폴리페놀을 조성물 총 중량에 대하여 0.01중량% 이상, 0.02중량% 이상, 0.03중량% 이상, 0.04중량% 이상, 0.05중량% 이상, 0.06중량% 이상, 0.07중량% 이상, 0.08중량% 이상, 0.09중량% 이상, 0.1중량% 이상, 0.2중량% 이상, 0.3중량% 이상, 0.4중량% 이상, 또는 0.5중량% 이상, 40중량% 이하, 39중량% 이하, 38중량% 이하, 37중량% 이하, 36중량% 이하, 35중량% 이하, 34중량% 이하, 33중량% 이하, 32중량% 이하, 31중량% 이하, 30중량% 이하, 29중량% 이하, 28중량% 이하, 27중량% 이하, 26중량% 이하, 25중량% 이하, 24중량% 이하, 23중량% 이하, 22중량% 이하, 21중량% 이하, 또는 20중량% 이하, 예컨대 0.01중량% 내지 40중량%, 예를 들어 0.1중량% 내지 30중량%, 0.5중량% 내지 20중량%로 포함할 수 있다.
- [56] 본 실시예의 조성물은 후발효차 추출물에 포함되는 성분들의 조합을 통한 상승 작용을 통하여 보다 우수한 신경 세포 활성을 나타낼 수 있다.
- [57] 본 발명의 실시예들에 따른 조성물은 신경 세포 보호 활성을 가져 산화 스트레스에 기인한 신경 세포의 손상 또는 사멸을 방해할 수 있다.
- [58] 상기 산화 스트레스에 기인한 신경 세포의 손상 또는 사멸은 기억력 손상, 인지 감퇴, 우울증 또는 건망증과 같은 증상을 유발시키며, 상기 조성물은 상기 증상을 예방 또는 개선할 수 있다.
- [59] 상기 조성물은 알츠하이머 또는 파킨슨병과 같은 퇴행성 뇌질환의 증상을 예방 또는 완화시킬 수 있으며, 예를 들어 상기 증상은 산화 스트레스에 기인한 것일 수 있다.
- [60] 본 발명 실시예들에 따른 조성물은 상기 유효성분을 포함하는 다양한 형태의 식품 첨가제 또는 기능성 식품으로 제공될 수 있다. 상기 유효성분을 포함하는 발효유, 치즈, 요구르트, 주스, 생균제제 및 건강식품 등으로 가공될 수 있으며, 그 외 다양한 식품 첨가제의 형태로 사용될 수 있다.
- [61] 본 발명의 실시예들에 따른 조성물은 건강 식품용 조성물일 수 있다. 상기 건강 식품용 조성물은 신경 세포 보호 활성을 가져 산화 스트레스에 기인한 신경 세포의 손상 또는 사멸을 방해할 수 있으며, 신경 세포의 손상 또는 사멸에 의해 유발되는 증상을 예방 또는 개선할 수 있다. 상기 증상은 기억력 손상, 인지 감퇴, 우울증 또는 건망증 등을 포함할 수 있다. 상기 건강 식품용 조성물은 상기 퇴행성 뇌질환의 증상을 예방 또는 완화시킬 수 있다.
- [62] 구체예에서, 상기 건강 식품용 조성물은 환제, 캡셀제, 정제, 과립제, 카라멜제 또는 드링크제 등으로 제형화할 수 있다. 다른 구체예에서, 액제, 분말, 과립, 정제 또는 티백 등의 형태로 가공될 수도 있다.
- [63] 상기 조성물은 단순 음용, 주사 투여, 스프레이 방식 또는 스퀴즈 방식 등의 다양한 방법으로 투여될 수 있다.
- [64] 상기 조성물은 본 발명의 주 효과를 손상시키지 않는 범위 내에서 주 효과에 상승 효과를 줄 수 있는 다른 성분 등을 함유할 수 있다. 예를 들어, 물성 개선을

위하여 향료, 색소, 살균제, 산화방지제, 방부제, 보습제, 점증제, 무기염류, 유화제 및 합성 고분자 물질 등의 첨가제를 더 포함할 수 있다. 그 외에도, 수용성 비타민, 유용성 비타민, 고분자 펩티드, 고분자 다당 및 해초 엑기스 등의 보조 성분을 더 포함할 수도 있다. 상기 성분들은 제형 또는 사용 목적에 따라서 당업자가 적의 선정하여 배합할 수 있으며, 그 첨가량은 본 발명의 목적 및 효과를 손상시키지 않는 범위 내에서 선택될 수 있다. 예를 들어, 상기 성분들의 첨가량은, 조성물 전체 중량을 기준으로, 0.01중량% 내지 5 중량%, 예를 들어 0.01중량% 내지 3중량% 일 수 있다.

- [65] 본 발명의 실시예들에 따른 조성물은 약학 조성물일 수 있다. 상기 약학 조성물은 알츠하이머 또는 파킨슨병과 같은 퇴행성 뇌질환의 증상을 예방, 치료 또는 완화시킬 수 있다.
- [66] 구체예에서, 상기 약학 조성물은, 통상적인 방법에 따라 상용되는 무기 또는 무기의 담체를 더 포함하여 고체, 반고체 또는 액상 등 다양한 형태로 경구 또는 비경구 투여 형태로 제형화할 수 있다.
- [67] 상기 경구 투여형 제제는 예를 들어 정제, 환제, 과립제, 연/경 캡슐제, 산제, 세립제, 분제, 유탁제, 시럽제, 펠렛제 등일 수 있으며, 비경구 투여형 제제는 예를 들어 주사제, 점적제, 연고, 로션, 스프레이, 현탁제, 유제, 좌제 등일 수 있다. 상기 약학 조성물은 방부제, 안정화제, 수화제 또는 유화 촉진제, 삼투압 조절을 위한 염 또는 완충제 등의 약학적 보조제 및 기타 치료적으로 유용한 물질을 추가로 함유할 수 있다.
- [68] 상기 약학 조성물은 경구, 비경구, 국소, 경피, 피하, 직장, 정맥 내, 근육 내, 복강 내 등으로 투여될 수 있다.
- [69] 유효성분의 실제 투여량은 증상의 중증도, 선택된 투여 경로, 대상의 연령, 성별, 체중 및 건강상태 등의 여러 관련 인자에 비추어 결정되어야 하는 것으로 이해되어야 한다. 일반적으로 유효성분의 투여량은 0.001mg/kg/일 내지 2000mg/kg/일, 예를 들어 0.5mg/kg/일 내지 1500mg/kg/일이다.

발명의 실시를 위한 형태

- [70] 이하, 실시예, 비교예 및 시험예를 참조하여 본 발명을 상세히 설명한다. 이들은 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위해 예시적으로 제시한 것일 뿐, 본 발명의 범위가 이 실시예, 비교예 및 시험예에 의해 제한되지 않는다는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가지는 자에 있어서 자명할 것이다.
- [71]
- [72] [제조예 1] 후발효차(완전발효차)의 제조
- [73] 신선한 녹차(*C. sinensis* var. *Yabukita*) 잎으로 만든 녹차에 물을 첨가하여 수분 함량을 40중량%으로 조정하였다. 여기에 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*) 5×10^6 cfu/g을 접종하고, 50°C에서 3일간 발효시킨 후 80°C에서 4일간 발효시켰다. 발효된 차를 70°C 내지 80°C의 열풍으로 수분 함량 4중량% 내지 6중량%까지

건조한 후, 10°C에서 100일간 숙성하여 완전발효차를 제조하였다.

- [74] 상기 후발효차를 15초 동안 분쇄하고, 메쉬 사이즈 1mm의 스테인리스 체로 걸렀다. 분쇄된 차 50mg을 1.5ml Eppendorf tube 넣고 1ml의 탈이온수를 첨가하여 60°C 항온 수조에서 30분간 일정 속도로 교반한 후, 25°C 13,000rpm에서 15분간 원심분리하였다. 상등액을 동결 건조하여 완전발효차 시료를 제조하였다.

[75]

- [76] [제조예 2] 후발효차(반발효차)의 제조

- [77] 신선한 녹차(*C. sinensis* var. *Yabukita*) 잎으로 만든 녹차에 물을 첨가하여 수분 함량을 40중량%으로 조정하였다. 여기에 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*) 5×10^6 cfu/g을 접종하고, 50°C에서 7일간 발효시켰다. 발효된 차를 70°C 내지 80°C의 열풍으로 수분 함량 4중량% 내지 6중량%까지 건조한 후, 10°C에서 100일간 숙성하여 반발효차를 제조하였다.

- [78] 상기 반발효차를 15초 동안 분쇄하고, 메쉬 사이즈 1mm의 스테인리스 체로 걸렀다. 분쇄된 차 50mg을 1.5ml Eppendorf tube 넣고 1ml의 탈이온수를 첨가하여 60°C 항온 수조에서 30분간 일정 속도로 교반한 후, 25°C 13,000rpm에서 15분간 원심분리하였다. 상등액을 동결 건조하여 반발효차 시료를 제조하였다.

[79]

- [80] [제조예 3] 일반 녹차 시료의 준비

- [81] 발효하지 않은 일반 녹차 건엽을 15초 동안 분쇄하고, 메쉬 사이즈 1mm의 스테인리스 체로 걸렀다. 분쇄된 차 50mg을 1.5ml Eppendorf tube 넣고 1ml의 탈이온수를 첨가하여 60°C 항온 수조에서 30분간 일정 속도로 교반한 후, 25°C 13,000rpm에서 15분간 원심분리하였다. 상등액을 동결 건조하여 일반 녹차 시료를 제조하였다.

[82]

- [83] [제조예 4] 후발효차 추출물의 제조

- [84] 제조예 1에서 제조된 후발효차 시료를 시료 중량에 대하여 5배수 중량의 각각 0부피%, 10부피%, 20부피%, 30부피%, 40부피%, 50부피%, 60부피%, 70부피%, 80부피% 및 90부피%의 70°C 에탄올 수용액에 2시간 동안 추출하고, 농축 및 동결건조하여 완전발효차 추출물을 제조하였다.

[85]

- [86] [제조예 5] 일반 녹차 추출물의 제조

- [87] 상기 제조예 3에서 제조한 일반 녹차 시료를 시료 중량에 대하여 5배수 중량의 각각 0부피%, 10부피%, 20부피%, 30부피%, 40부피%, 50부피%, 60부피%, 70부피%, 80부피% 및 90부피%의 70°C 에탄올 수용액에 2시간 동안 추출하고, 농축 및 동결건조하여 일반 녹차 추출물을 제조하였다.

[88]

- [89] [시험예 1] 일반 녹차 및 후발효차의 성분 분석

- [90] 상기 제조예 1 내지 3에서 제조한 일반 녹차, 후발효차(반발효차, 완전발효차)

시료를 NMR 분석하였다. 구체적인 분석 조건 및 방법은 1H NMR-based metabolomic characterization during green tea (*Camellia sinensis*) fermentation (Jang-Eun Lee et al., Food Research International 44 (2011) pp. 597-604)에 기재된 바에 의하였으며, NMR 분석 결과는 도 2 및 도 3에 나타내었다.

[91] 도 2 및 도 3의 결과로부터 후발효차는 발효에 의하여 카테킨류 성분이 현저하게 감소하는 것을 확인할 수 있다.

[92]

[93] [시험예 2] 후발효차 추출물의 성분 분석

[94] 후발효차의 성분검출을 위하여 High performance liquid chromatography (HPLC)를 이용해 분석을 수행하였다.

[95] 제조예 4에서 제조한 완전발효차 추출물을 0.45 μ m PVDF filter에 여과, 전처리 후 기기에 주입하였다. 기기는 HPLC(Waters Alliance 2695 system, Waters, USA)를 사용하여 UV 210 ~ 400 nm영역에서 분석하였으며, C18컬럼(Thermo synchronis-C18 4.6 x 250mm, Thermo fisher scientific, USA)을 사용하여 0.1% Acetic acid용매와 Acetonitrile(ACN)용매를 사용한 기울기 용법으로 분석하였다. 구체적으로, 이동상으로 0.1% 아세트산(AA) 및 아세토니트릴(ACN) 용매를 사용하여 AA/ACN이 0~29분에서 90/10 부피 구배; 30~41분에서 85/15 부피 구배; 42~43분에서 80/20 부피 구배; 44~48분에서 5/95 부피 구배; 49~50분에서 90/10 부피 구배, 유속 1 ml/min, UV 파장 280 nm 영역에서 측정한 스펙트럼을 도 1에 나타내었다. 분석에 사용된 용매는 HPLC급 시약을 사용하였으며, 데이터 처리는 워터스사의 Empower II 프로그램을 사용하여 성분 분석을 수행하였다.

[96] 도 1의 결과에서 붉은색 사각형으로 표시한 머무름 시간(retention time) 약 45.85분 내지 45.95분 영역에 피크가 나타나는 분획 성분이 발효에 의하여 새롭게 생성된 성분인 발효 폴리페놀이다.

[97] 상기 피크를 확대하여 도 4에 나타내었으며, 에탄올 수용액의 농도에 따라 함량이 증가하는 것을 확인할 수 있다.

[98] 에탄올 수용액 농도별 카테킨과 카페인의 함량을 도 5에 나타내었다. 도 5의 결과에서, 에탄올 수용액 농도 40부피%에서 카테킨 함량 증가는 포화되어 에탄올 수용액 농도가 높아져도 카테킨 함량은 변화가 거의 없으며, 카페인의 경우 용매 농도와 관계 없이 함량 차이가 크지 않다.

[99]

[100] [시험예 3] 산화 스트레스에 의한 세포 손상 보호 효과 측정

[101] 본 실험에 사용된 세포주는 쥐 크롬친화성 세포종(Rat pheochromocytoma cell line 12, PC12)이며, 한국세포주은행 (KCLB) 에서 분양 받아 사용하였다. 세포배양을 위해 RPMI1640 배양액 에 L-glutamine (300mg/L), 25mM HEPES, 25mM NaHCO₃, heat inactivated fetal bovine serum (FBS) 10% 가 포함되도록 제조한 후, 100 unit/ml의 penicillin, 100 mg/ml의 streptomycin 을 첨가하여 사용하였다. 세포는 37°C, 5% CO₂ 조건에서 배양하였다.

- [102] 산화 스트레스에 의한 세포 손상 보호 효과는 MTT법을 변형하여 측정하였다. PC12 세포주를 96-well plate에 well 당 5×10^4 개씩 분주하여 37°C, 5% CO₂ 환경에서 배양하였다. 24시간 후, serum free 배지로 교체하고 상기 제조예 4 및 5의 완전발효차 추출물 및 일반 녹차 추출물을 처리하여 다시 24 시간 배양하였다. 배양이 끝난 후, 산화적 스트레스를 유발하여 세포 생존율을 감소시키는 것으로 알려져 있는 400μM의 과산화수소 (hydrogen peroxide, H₂O₂)를 처리하고 3시간 동안 방치하였다. 배양이 끝난 후, 각 well당 10μl의 CCK-8 (Dojindo, Japan) 용액을 첨가하고 37°C, 5% CO₂ 에서 방치하였다. 2시간 후, Micro-plate reader를 이용하여 450nm 파장에서 흡광도를 측정하였다. 정상 대조군으로는 약물을 첨가하지 않은 well을 사용하여 정상 대조군의 세포 생존율을 1.0으로 하여 정상 대조군 대비 시료 처리군의 세포 생존율을 계산하여 결과를 도 6에 나타내었다.
- [103] 도 6의 결과에서, 추출 용매인 에탄올 수용액의 농도가 30부피%~80부피%인 범위에서 후발효차 추출물의 신경 세포 손상 보호 효과가 우수한 것을 확인할 수 있다. 앞선 시험예 2의 결과로부터 에탄올 수용액 농도에 따른 카테킨 및 카페인 함량은 상기 신경 세포 손상 보호 효과의 경향성과 다르게 나타나므로, 상기 효과는 카테킨에 의한 효과가 아님을 확인할 수 있다. 반면, 에탄올 농도에 따른 신경 세포 손상 보호 효과의 경향성은 발효 폴리페놀 함량의 경향성에 대응되므로 시험예 1에서 분석된 발효 폴리페놀에 의하여 상기 효과를 나타내는 것을 알 수 있다.
- [104]
- [105] [제형예 1] 정제
- [106] 본 발명 실시예에 따른 후발효차 추출물 100mg, 락토오스 400mg, 옥수수 전분 400mg 및 스테아린산 마그네슘 2mg을 혼합한 후, 통상의 정제의 제조방법에 따라서 타정하여 정제를 제조하였다.
- [107]
- [108] [제형예 2] 캡슐제
- [109] 본 발명 실시예에 따른 후발효차 추출물 100mg, 락토오스 400mg, 옥수수 전분 400mg 및 스테아린산 마그네슘 2mg을 혼합한 후, 통상의 캡슐제의 제조 방법에 따라서 젤라틴 캡슐에 충전하여 캡슐제를 제조하였다.
- [110]
- [111] [제형예 3] 과립제
- [112] 본 발명 실시예에 따른 후발효차 추출물 50mg, 무수결정 포도당 250mg 및 전분 550mg을 혼합하고, 유동층 과립기를 사용하여 과립으로 성형한 후 포에 충전하였다.
- [113]
- [114] [제형예 4] 드링크제
- [115] 본 발명 실시예에 따른 후발효차 추출물 50mg, 포도당 10g, 구연산 0.6g, 및

액상 올리고당 25g을 혼합한 후 정제수 300ml를 가하여 각 병에 200ml씩 충전한다. 병에 충전한 후 130°C 에서 4~5 초간 살균하여 드링크제를 제조하였다.

[116]

[117] [제형예 5] 카라멜 제형

[118] 본 발명 실시예에 따른 후발효차 추출물 50mg, 옥수수 시럽(corn syrup) 1.8g, 탈지우유 0.5g, 대두 레시틴 0.5g, 버터 0.6g, 식물성 경화유 0.4g, 설탕 1.4g, 마가린 0.58g, 및 식염 20mg을 혼합하여 카라멜 성형 하였다.

[119]

[120] [제형예 6] 건강 식품

[121] [표1]

성분	함량
후발효차 추출물	1000 mg
비타민 혼합물	
비타민 A 아세테이트	70 μ g
비타민 E	1.0 mg
비타민 B1	0.13 mg
비타민 B2	0.15 mg
비타민 B6	0.5 mg
비타민 B12	0.2 μ g
비타민 C	10 mg
비오틴	10 μ g
니코틴산아미드	1.7 mg
엽산	50 μ g
판토텐산 칼슘	0.5 mg
무기질 혼합물	
황산제1철	1.75 mg
산화아연	0.82 mg
탄산마그네슘	25.3 mg
제1인산칼륨	15 mg
제2인산칼슘	55 mg
구연산칼륨	90 mg
탄산칼슘	100 mg
염화마그네슘	24.8 mg

[122]

[123] 상기 비타민 및 무기질 혼합물의 조성비는 비교적 건강식품에 적합한 성분들에 혼합 조성하였지만, 그 배합비를 임의로 변형 실시하여도 무방하며, 통상의 건강식품 제조방법에 따라 상기의 성분을 혼합한 다음, 과립을 제조하고, 통상의 방법에 따라 건강식품 조성물 제조에 사용할 수 있다.

[124]

[125] [제형예 7] 건강 음료

[126] [표2]

성분	함량
후발효차 추출물	1000 mg
구연산	1000 mg
올리고당	100 g
매실농축액	2 g
타우린	1 g
정제수	잔량
총 부피	900 ml

[127]

[128] 상기 표 2와 같이 총 부피 900ml가 되도록 잔량의 정제수를 첨가하여 통상의 건강음료 제조방법에 따라 상기의 성분을 혼합한 다음, 약 1시간 동안 85°C에서 교반 가열한 후, 만들어진 용액을 여과하여 멸균된 2ℓ용기에 취득하여 밀봉 멸균한 뒤 냉장 보관하여 건강음료 조성물 제조에 사용할 수 있다.

청구범위

- [청구항 1] 후발효차 추출물을 유효성분으로 포함하는 신경 세포 보호용 조성물.
- [청구항 2] 제1항에 있어서,
상기 후발효차 추출물은 후발효차를 30부피% 내지 80부피%의 에탄올 수용액으로 추출한 것인 조성물.
- [청구항 3] 제1항 또는 제2항에 있어서,
상기 후발효차는 사카로마이세스속(*Saccharomyces* sp.), 락토바실러스속(*Lactobacillus* sp.) 및 루코노스톡속(*Leuconostoc mesenteroides* sp.)으로부터 선택되는 균주를 사용하여 녹차 잎을 발효시킨 것인 조성물.
- [청구항 4] 제3항에 있어서,
상기 균주는 사카로마이세스 세레비지애(*Saccharomyces cerevisiae*, ATCC9763), 락토바실러스 카세이(*Lactobacillus casei*, KFRI000127), 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*, F4041, F4163), 락토바실러스 불가리우스(*Lactobacillus bulgarius*, KFRI000344) 및 루코노스톡 메센테로이데스(*Leuconostoc mesenteroides*, KFRI 818)로부터 선택되는 것인 조성물.
- [청구항 5] 제3항에 있어서,
상기 후발효차는 녹차 잎에 상기 균주를 접종하여 발효시키고, 상기 발효 후 7일 내지 15일간 숙성시키는 것을 포함하여 제조된 것인 조성물.
- [청구항 6] 제1항 또는 제2항에 있어서,
상기 조성물은 발효 폴리페놀을 0.01중량% 내지 40중량%로 포함하고, 상기 발효 폴리페놀은 상기 발효 폴리페놀은 후발효차 추출물을 C18컬럼(Thermo synchronis-C18 4.6 x 250mm, Thermo fisher scientific, USA)을 사용하고, 이동상으로 0.1% 아세트산(AA) 및 아세토니트릴(ACN) 용매를 사용하여 AA/ACN이 0~29분에서 90/10 부피 구배; 30~41분에서 85/15 부피 구배; 42~43분에서 80/20 부피 구배; 44~48분에서 5/95 부피 구배; 49~50분에서 90/10 부피 구배, 유속 1 ml/min, UV 파장 280 nm 영역에서 측정한 스펙트럼에서 머무름 시간(retention time) 45.85분 내지 45.95분에서 피크를 가지는 분획 성분인 조성물.
- [청구항 7] 제1항 또는 제2항에 있어서,
상기 조성물은 산화 스트레스에 기인한 신경 세포의 손상 또는 사멸을 방해하기 위한 건강 식품용인 조성물.
- [청구항 8] 제1항 또는 제2항에 있어서,
상기 조성물은 기억력 손상, 인지 감퇴, 우울증 또는 건망증을 예방 또는 개선하기 위한 건강 식품용인 조성물.
- [청구항 9] 제1항 또는 제2항에 있어서,

상기 조성물은 산화 스트레스에 기인한 퇴행성 뇌질환의 증상을 예방 또는 완화하기 위한 건강 식품용인 조성물.

[청구항 10] 제9항에 있어서,

상기 퇴행성 뇌질환은 알츠하이머 또는 파킨슨병인 조성물.

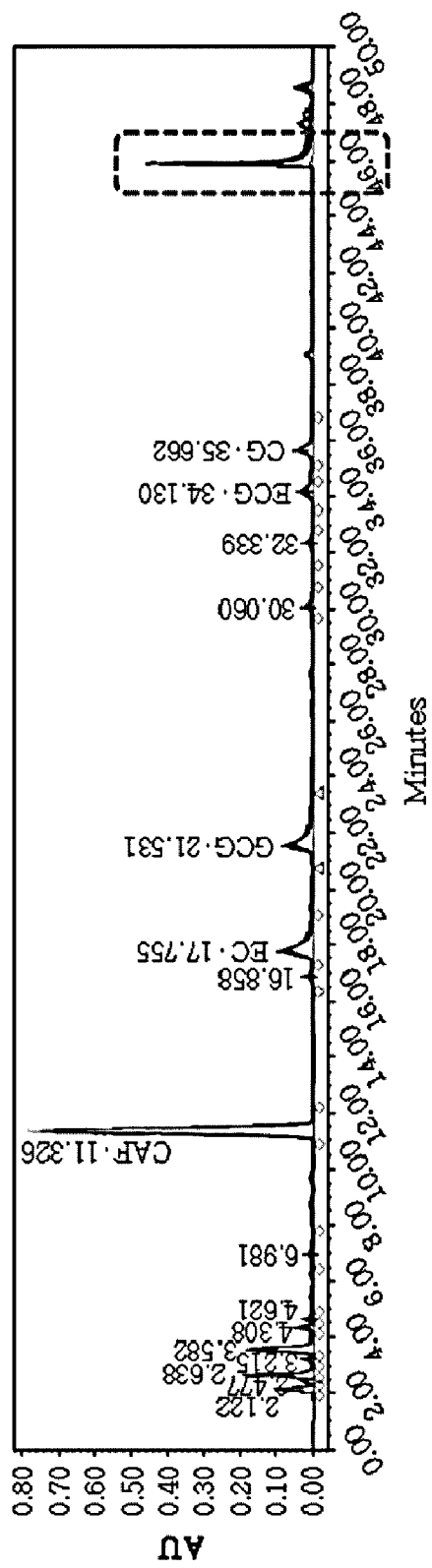
[청구항 11] 제1항 또는 제2항에 있어서,

상기 조성물은 산화 스트레스에 기인한 퇴행성 뇌질환의 증상을 예방, 치료 또는 완화하기 위한 것인 약학 조성물.

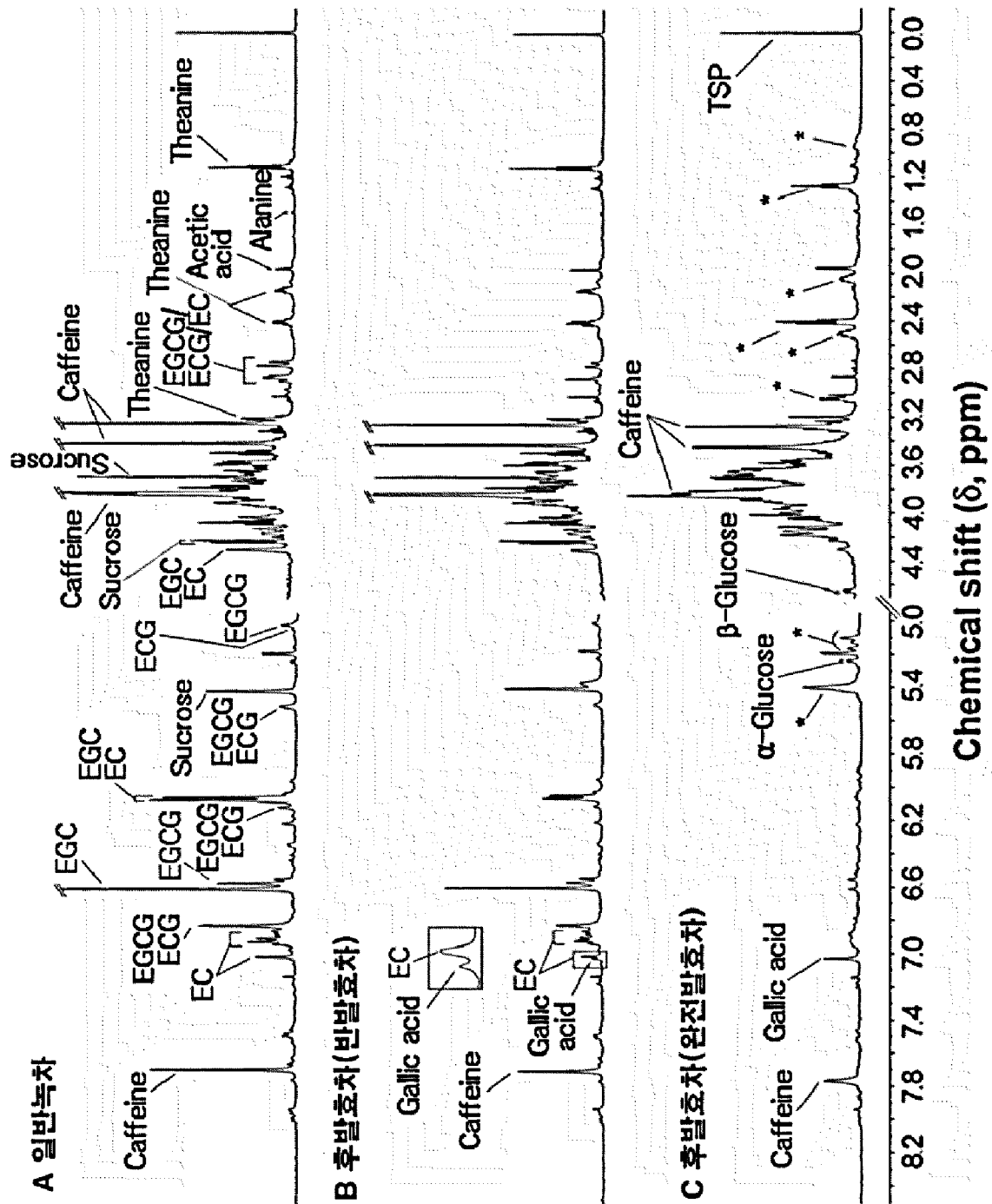
[청구항 12] 제11항에 있어서,

상기 퇴행성 뇌질환은 알츠하이머 또는 파킨슨병인 약학 조성물.

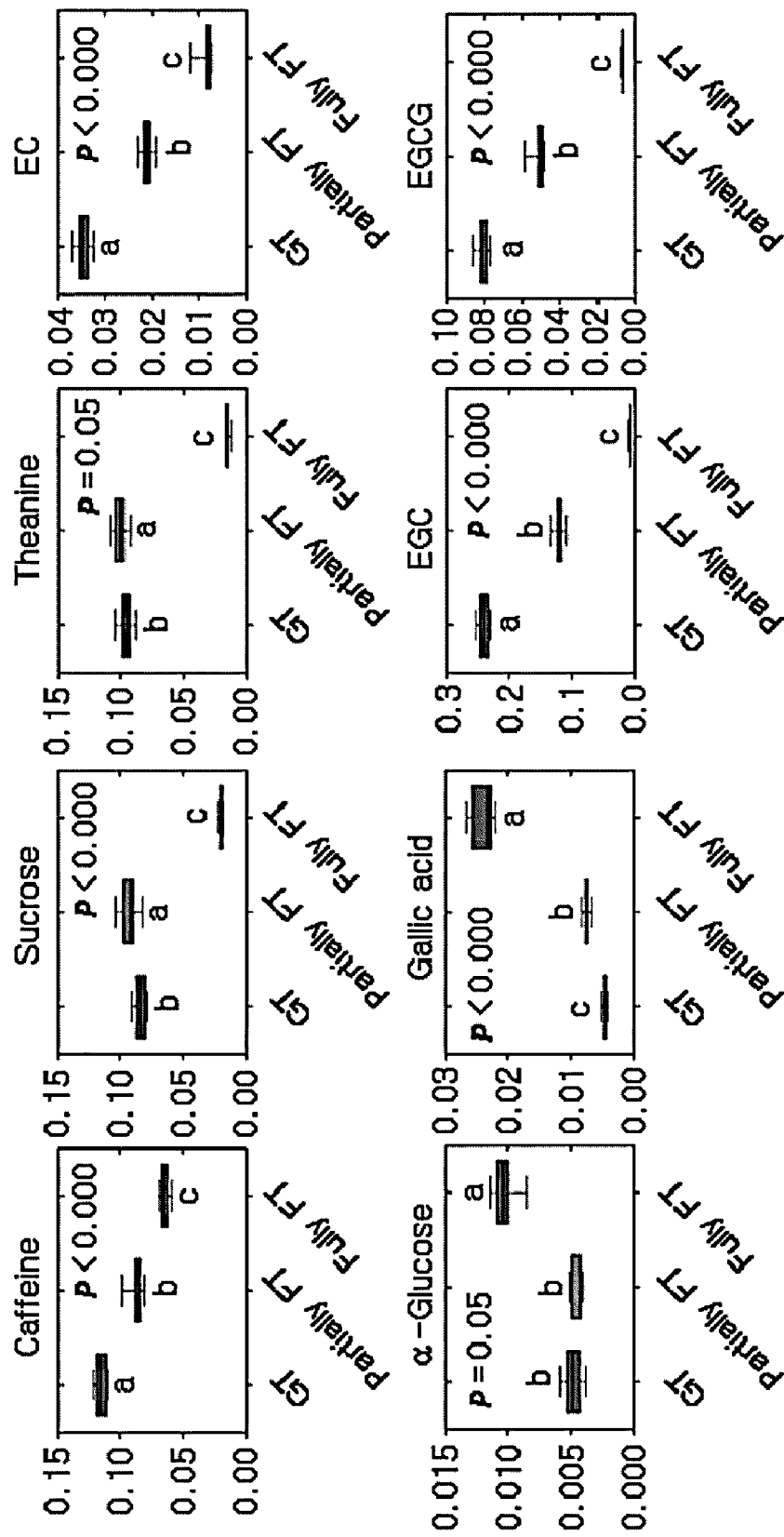
[도1]



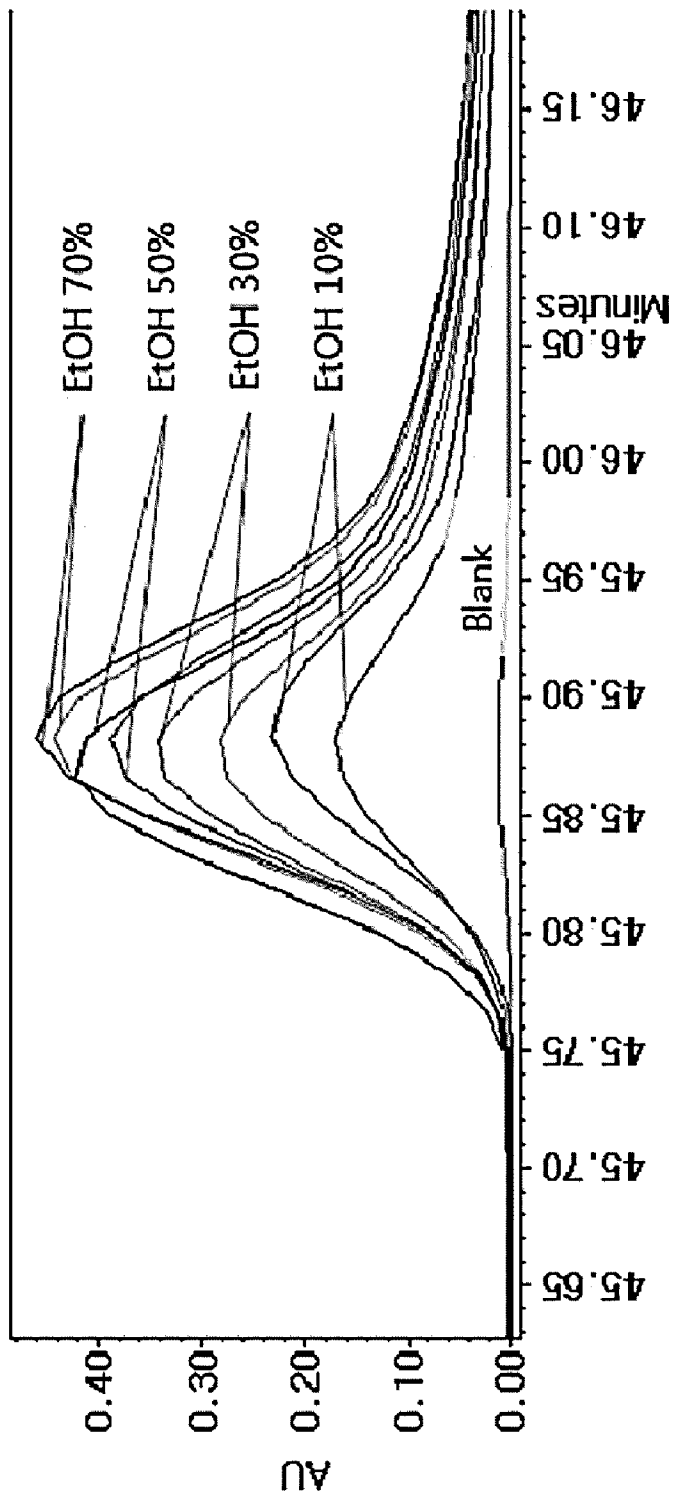
[도2]



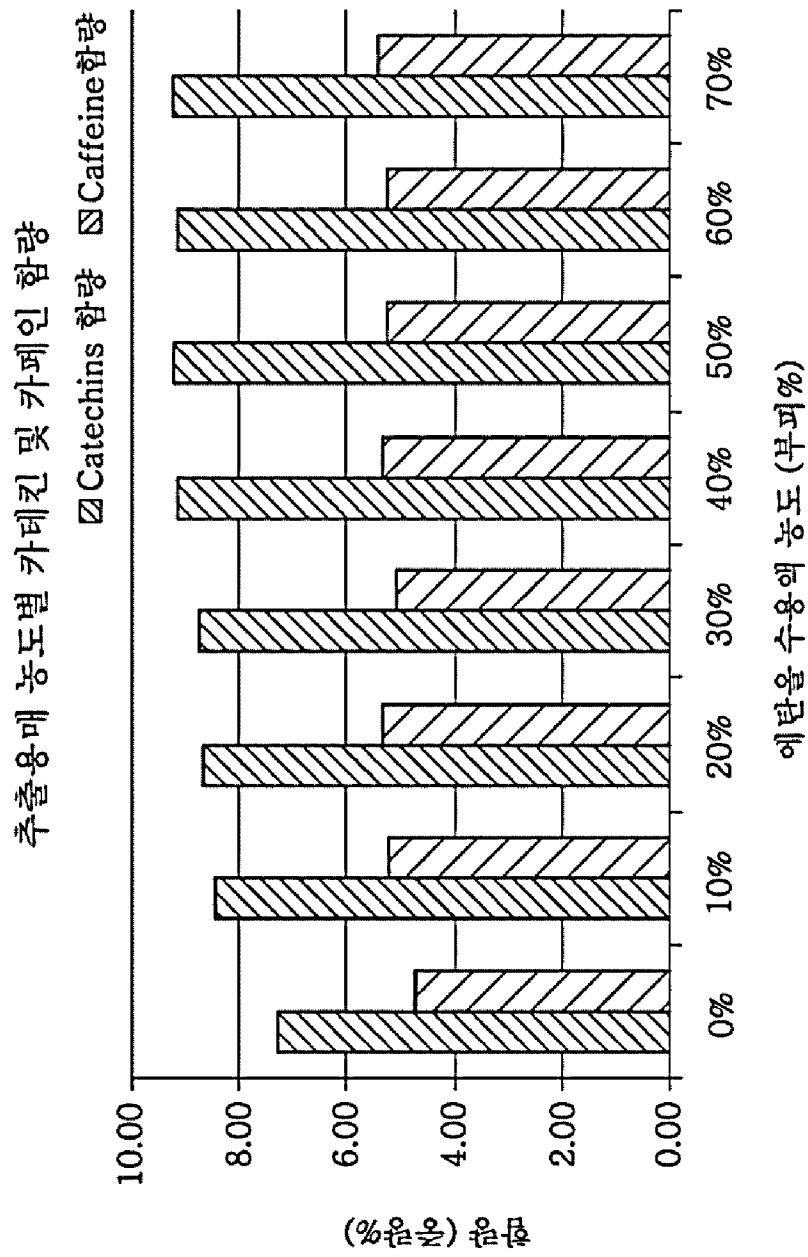
[도3]



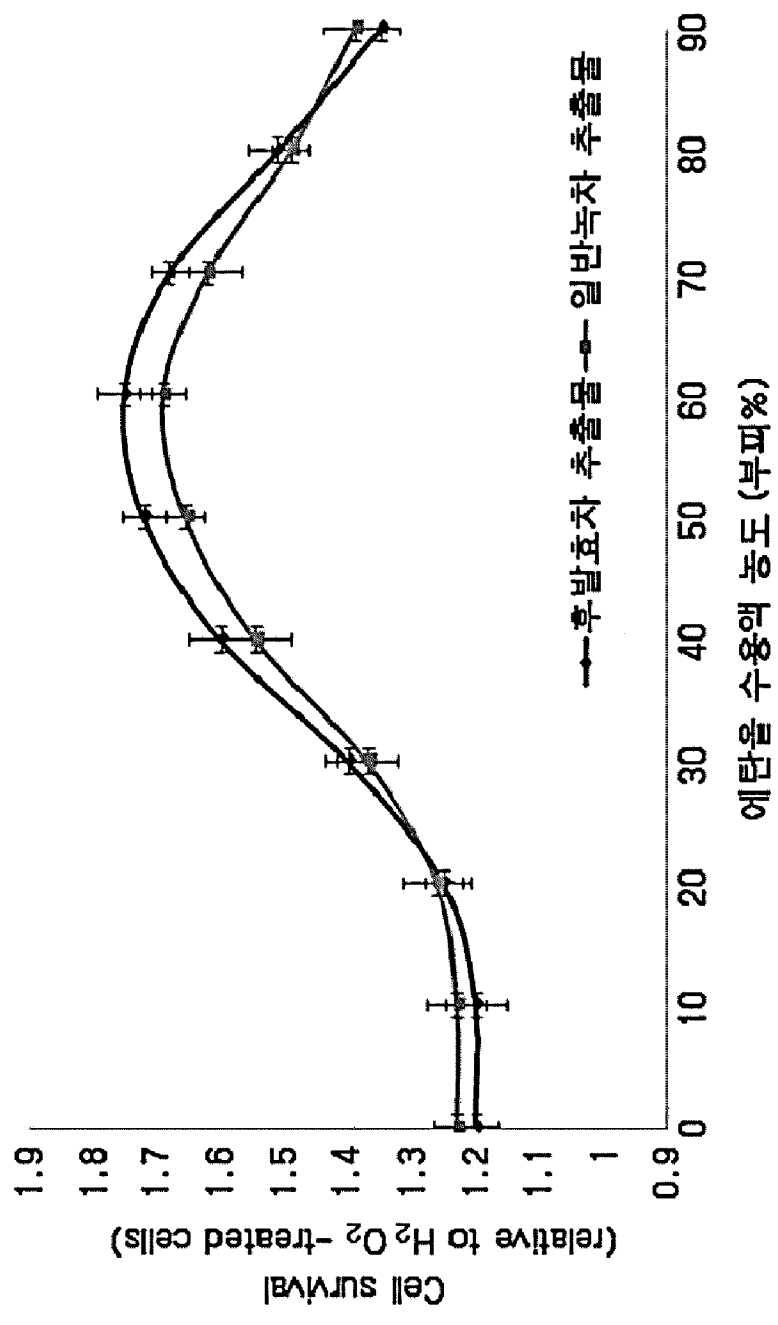
[도4]



[도5]



[도6]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2016/007011**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER***A23L 1/30(2006.01)i, A23L 29/00(2016.01)i, A61K 36/82(2006.01)i*

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A23L 1/30; A23F 3/08; A23F 3/16; A23L 19/00; A61K 36/82; A23F 3/06; A23K 1/00; A61P 25/28; A61P 3/04; A23L 29/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Korean Utility models and applications for Utility models: IPC as above

Japanese Utility models and applications for Utility models: IPC as above

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

eKOMPASS (KIPO internal) & Keywords: after-fermentation tea, nerve cell, fermented polyphenol

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CN 101856433 A (MA, Zhizhong et al.) 13 October 2010 See abstract; claims 1-3 and 5.	1-5,7-12
Y		6
Y	XIE, Guoxiang et al., "Characterization of Pu-erh Tea Using Chemical and Metabolic Profiling Approaches", Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2009, vol. 57, pages 3046-3054 See abstract; table 1.	6
A	KR 10-2015-0069175 A (WONKWANG UNIVERSITY CENTER FOR INDUSTRY-ACADEMY COOPERATION) 23 June 2015 See abstract; claims 1-3 and 6; paragraphs [0021], [0030], [0059], [0071]-[0072], [0114], [0125].	1-12
A	PAN, Min - Hsiung et al., "Black Tea in Chemo-prevention of Cancer and Other Human Diseases", Food Science and Human Wellness, 2013, vol. 2, no. 1, pages 12-21 See abstract; table 7.	1-12
A	KR 10-2011-0014885 A (INSTITUTE OF INDUSTRY-ACADEMY COLLABORATION, SEOWON UNIVERSITY et al.) 14 February 2011 See abstract; claims 1-2; paragraphs [0011]-[0012] and [0019].	1-12



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

26 OCTOBER 2016 (26.10.2016)

Date of mailing of the international search report

27 OCTOBER 2016 (27.10.2016)

Name and mailing address of the ISA/KR

Korean Intellectual Property Office
Government Complex-Daejeon, 189 Seonsa-ro, Daejeon 302-701,
Republic of Korea

Facsimile No. 82-42-472-7140

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/KR2016/007011

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JEONG, Chang - Ho et al., "Phenolic Content, Antioxidant Effect and Acetylcholinesterase Inhibitory Activity of Korean Commercial Green, Puer, Oolong, and Black Teas", Korean Journal of Food Preservation, April 2009, vol. 16, no. 2, pages 230-237 See the entire document.	1-12
A	KR 10-2012-0064299 A (AMOREPACIFIC CORPORATION) 19 June 2012 See abstract; claims 1-4.	1-12
A	CN 102630142 A (RIVERSON K. K. et al.) 08 August 2012 See abstract; claim 1.	1-12

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/KR2016/007011

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member	Publication date
CN 101856433 A	13/10/2010	NONE	
KR 10-2015-0069175 A	23/06/2015	KR 10-1584513 B1	21/01/2016
KR 10-2011-0014885 A	14/02/2011	KR 10-1125774 B1	27/03/2012
KR 10-2012-0064299 A	19/06/2012	CN 103327995 A	25/09/2013
		CN 103327995 B	04/05/2016
		EP 2650005 A2	16/10/2013
		EP 2650005 A4	07/05/2014
		JP 2014-503515 A	13/02/2014
		US 2013-0259855 A1	03/10/2013
		US 2016-0213731 A1	28/07/2016
		WO 2012-078004 A2	14/06/2012
		WO 2012-078004 A3	27/09/2012
CN 102630142 A	08/08/2012	CN 102630142 B	06/05/2015
		JP 2011-083280 A	28/04/2011
		KR 10-2012-0093886 A	23/08/2012
		US 2012-0220650 A1	30/08/2012
		US 9029110 B2	12/05/2015
		WO 2011-034218 A1	24/03/2011

A. 발명이 속하는 기술분류(국제특허분류(IPC))

A23L 1/30(2006.01)i, A23L 29/00(2016.01)i, A61K 36/82(2006.01)i

B. 조사된 분야

조사된 최소문헌(국제특허분류를 기재)

A23L 1/30; A23F 3/08; A23F 3/16; A23L 19/00; A61K 36/82; A23F 3/06; A23K 1/00; A61P 25/28; A61P 3/04; A23L 29/00

조사된 기술분야에 속하는 최소문헌 이외의 문헌

한국등록실용신안공보 및 한국공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC
일본등록실용신안공보 및 일본공개실용신안공보: 조사된 최소문헌란에 기재된 IPC

국제조사에 이용된 전산 데이터베이스(데이터베이스의 명칭 및 검색어(해당하는 경우))
eKOMPASS(특허청 내부 검색시스템) & 키워드: 후발효차, 신경 세포, 발효 폴리페놀

C. 관련 문헌

카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
X	CN 101856433 A (MA, ZHIZHONG 등) 2010.10.13 요약; 청구항 1-3 및 5 참조.	1-5, 7-12
Y		6
Y	XIE, GUOXIANG 등, 'Characterization of pu-erh tea using chemical and metabolic profiling approaches', Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2009, 제57권, 3046-3054 페이지 초록; 표 1 참조.	6
A	KR 10-2015-0069175 A (원광대학교산학협력단) 2015.06.23 요약; 청구항 1-3 및 6; 단락 [0021], [0030], [0059], [0071]-[0072], [0114], [0125] 참조.	1-12
A	PAN, MIN-HSIUNG 등, 'Black tea in chemo-prevention of cancer and other human diseases', Food Science and Human Wellness, 2013, 제2권, 제1호, 12-21 페이지 초록; 표 7 참조.	1-12
A	KR 10-2011-0014885 A (서원대학교산학협력단 등) 2011.02.14 요약; 청구항 1-2; 단락 [0011]-[0012] 및 [0019] 참조.	1-12

☒ 추가 문헌이 C(계속)에 기재되어 있습니다.

☒ 대응특허에 관한 별지를 참조하십시오.

* 인용된 문헌의 특별 카테고리:

“A” 특별히 관련이 없는 것으로 보이는 일반적인 기술수준을 정의한 문헌

“T” 국제출원일 또는 우선일 후에 공개된 문헌으로, 출원과 상충하지 않으며 발명의 기초가 되는 원리나 이론을 이해하기 위해 인용된 문헌

“E” 국제출원일보다 빠른 출원일 또는 우선일을 가지나 국제출원일 이후에 공개된 선출원 또는 특허 문헌

“X” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌 하나만으로 청구된 발명의 신규성 또는 진보성이 없는 것으로 본다.

“L” 우선권 주장에 의문을 제기하는 문헌 또는 다른 인용문헌의 공개일 또는 다른 특별한 이유(이유를 명시)를 밝히기 위하여 인용된 문헌

“Y” 특별한 관련이 있는 문헌. 해당 문헌이 하나 이상의 다른 문헌과 조합하는 경우로 그 조합이 당업자에게 자명한 경우 청구된 발명은 진보성이 없는 것으로 본다.

“O” 구두 개시, 사용, 전시 또는 기타 수단을 언급하고 있는 문헌

“&” 동일한 대응특허문헌에 속하는 문헌

“P” 우선일 이후에 공개되었으나 국제출원일 이전에 공개된 문헌

국제조사의 실제 완료일

2016년 10월 26일 (26.10.2016)

국제조사보고서 발송일

2016년 10월 27일 (27.10.2016)

ISA/KR의 명칭 및 우편주소

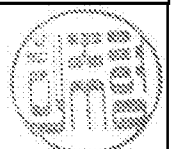
대한민국 특허청
(35208) 대전광역시 서구 청사로 189,
4동 (둔산동, 정부대전청사)

팩스 번호 +82-42-481-8578

심사관

허주형

전화번호 +82-42-481-8150



C(계속). 관련 문헌		
카테고리*	인용문헌명 및 관련 구절(해당하는 경우)의 기재	관련 청구항
A	정창호 등, ‘국내 시판 녹차, 보이차, 우롱차 및 홍차의 폴리페놀 함량, 항산화 및 아세틸콜린에스터레이스 저해 효과’, 한국식품저장유통학회지, 2009.04, 제16권, 제2호, 230-237 페이지 전체 문헌 참조.	1-12
A	KR 10-2012-0064299 A ((주)아모레퍼시픽) 2012.06.19 요약; 청구항 1-4 참조.	1-12
A	CN 102630142 A (RIVERSON K. K. 등) 2012.08.08 요약; 청구항 1 참조.	1-12

국제조사보고서에서 인용된 특허문헌	공개일	대응특허문헌	공개일
CN 101856433 A	2010/10/13	없음	
KR 10-2015-0069175 A	2015/06/23	KR 10-1584513 B1	2016/01/21
KR 10-2011-0014885 A	2011/02/14	KR 10-1125774 B1	2012/03/27
KR 10-2012-0064299 A	2012/06/19	CN 103327995 A	2013/09/25
		CN 103327995 B	2016/05/04
		EP 2650005 A2	2013/10/16
		EP 2650005 A4	2014/05/07
		JP 2014-503515 A	2014/02/13
		US 2013-0259855 A1	2013/10/03
		US 2016-0213731 A1	2016/07/28
		WO 2012-078004 A2	2012/06/14
		WO 2012-078004 A3	2012/09/27
CN 102630142 A	2012/08/08	CN 102630142 B	2015/05/06
		JP 2011-083280 A	2011/04/28
		KR 10-2012-0093886 A	2012/08/23
		US 2012-0220650 A1	2012/08/30
		US 9029110 B2	2015/05/12
		WO 2011-034218 A1	2011/03/24