(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2012-0111146
(43) 공개일자 2012년10월10일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A23L 1/29 (2006.01) *A61P 29/00* (2006.01)
A61P 39/06 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2011-0029487
(22) 출원일자 2011년03월31일
심사청구일자 2012년02월08일

(71) 출원인
부경대학교 산학협력단
부산광역시 남구 신선로 365 (용당동, 부경대학교)
(72) 발명자
김영목
부산광역시 남구 분포로 111, LG 메트로 시티 101동 1802호 (용호동)
송호수
부산광역시 남구 대연3동 대우그린1차아파트 103동 1701호
(74) 대리인
김순웅

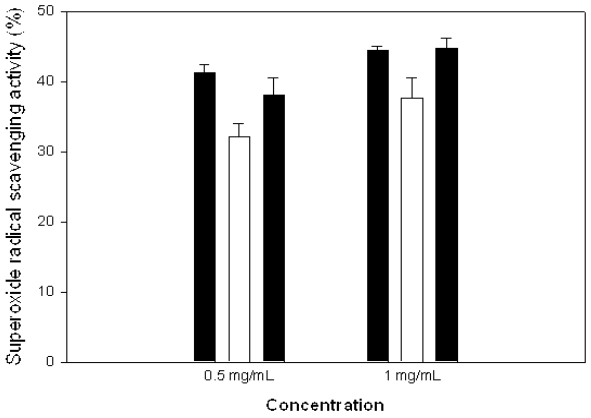
전체 청구항 수 : 총 4 항

(54) 발명의 명칭 **유산균 톳 발효 산물을 포함하는 식품 및 항균제**

(57) 요 약

본 발명은 톳(Hizikia fusiforme) 추출액을 발효시킨 톳 발효 산물을 포함하는 식품에 관한 것이다. 본 발명에 따른 톳 발효 산물을 포함하는 식품은 톳의 유산균 발효에 의하여 항산화, 항염증, 항균 효과를 증가시키는 효과가 있다.

대 표 도 - 도4



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	2010-3001
부처명	지식경제부
연구사업명	2010년 지역기반육성기술개발사업
연구과제명	톳으로부터 발효기술을 이용한 기능성 천연식품개발
주관기관	부경대학교 식품가공센터
연구기간	2010.04.01 ~ 2011.03.31

특허청구의 범위

청구항 1

유산균을 접종한 톳 발효 산물을 포함하는 것을 특징으로 하는 염증 완화용 식품.

청구항 2

유산균을 접종한 톳 발효 산물을 포함하는 것을 특징으로 하는 항산화용 식품.

청구항 3

유산균을 접종한 톳 발효 산물을 포함하는 것을 특징으로 하는 항균제.

청구항 4

제3항에 있어서, 상기 유산균은 락토바실러스 브레비스(*Lactobacillus brevis*) 임을 특징으로 하는 항균제.

명 세 서

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 유산균 발효 톳 추출물을 포함하는 식품 및 항균제에 관한 것으로써, 보다 상세하게는 항산화 효과 및 항염증 효과가 증진되고 항균성이 증대된, 유산균 발효 톳 추출물을 포함하는 식품 및 항균제에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 톳 (Hizikia fusiforme)은 갈조식물의 모자반과 톳 속에 속하며 녹미채(鹿尾菜) 또는 토의채 (土衣菜)라고 부른다. 우리나라에서는 제주를 포함하여 남도지역에서 예로부터 식용으로 이용되어 왔다 (Kim et al., 2010). 톳은 다시마와 더불어 천연 정미 성분인 아미노산 (glutamic acid 및 aspartic acid 등)과 기능성 천연소재로 각광을 받고 있는 해조 다당류 (fucoidan 등) 또한 풍부하며, 최근 톳의 항산화 활성이 알려지면서 식품으로서 가치가 한층 높아져 이상적인 천연식품으로 인식되고 있다 (Kim et al., 2004; Park et al., 2005).

[0003] 톳의 생리활성에 관한 연구는 주로 일본에서 많이 이루어 졌으며, 한국에서의 톳에 대한 연구는 톳에서 추출한 fucoidan의 화학적 특성 (Koo et al., 1995; Koo et al., 1997), 용매 별 건조 톳의 추출물들에 대한 향균성에 관한 연구 (Kim et al., 1994; Lim et al., 1995) 및 톳 추출물이 지질대사 및 간 효소활성에 미치는 영향 등에 대해서 보고가 이루어지고 있다 (Jung et al., 2001). 하지만, 연간 2만?4만 톤 정도 생산되고 있는 톳의 대부분은 1차적인 단순 가공품 형태로 판매되고 있는 실정으로 현재까지 톳을 이용한 제품개발은 찐 톳 상태로 만들어 판매하거나 단순 가공을 통해 건조분말 형태로의 판매에 머물러 있어 부가가치가 낮은 상태이다 (Ki, 2002).

[0004] 일반적으로 해조류의 유용성분을 추출하여 이용할 때에는 해조류를 열수 추출이나 알칼리, 산 또는 효소처리 등에 의하여 추출 후 가공하는 방법들이 대부분이다 (Do et al., 1997; Kim and Bae, 2002). 그러나 이러한 추출 공정은 해조류에 포함되어 있는 탄수화물의 대부분이 비소화성 복합다당류로서 산이나 알칼리에 비교적 안정하고 특수한 미생물 효소에 의하지 않고서는 분해되기가 어려워 여러 가지 생체 활성물질의 변질 및 파괴 등을 수반하는 결과를 초래하거나 또는 효과적으로 추출해내지 못하는 단점이 있다 (Lim et al., 1995; Kim et al., 2002). 또한 해조류 추출공정에서 발생하는 알긴산 등의 점질 다당류와 해조류 특유의 향, 풍미 및 조직감 등이 해조류를 이용한 제품 개발의 문제점으로 지적되고 있다 (Eom et al., 2010).

[0005] 또한 톳은 다시마와 더불어 천연 정미 성분인 아미노산 (glutamic acid 및 aspartic acid 등)과 혈액응고작용 (Kim et al., 1998), 면역증강작용 등의 기능성이 있는 것으로 알려진 중성다당류인 jaminaran과 황산성 다량류인 fucoidan이 많이 함유되어 있는 것으로 알려져 있다 (Koo et al., 1995; Koo et al., 1997; Shon et al.,

2006).

[0006] 톳의 생리활성에 관한 연구는 주로 톳에서 추출한 fucoidan의 화학적 특성 (Koo et al., 1995; Koo et al., 1997), 및 톳 추출물이 지질대사 및 간 효소활성에 미치는 영향 등에 대해서 보고가 이루어지고 있으며 (Jang et al., 2007; Jung et al., 2001), 또한 생체 내 항고지혈증 (Shan et al., 1999), 항고콜레스테롤 (Abdussalam, 1990)에 대한 연구가 이루어지고 있다.

[0007] 하지만 톳과 같은 해조류의 유용성분을 추출하여 이용할 때에는 해조류를 열수 추출이나 알칼리, 산 또는 효소처리 등에 의하여 추출 후 가공하는 방법들이 대부분이다 (Do et al., 1997; Kim and Bae, 2002). 그러나 이러한 추출공정은 해조류에 포함되어 있는 탄수화물의 대부분이 비소화성 복합다당류로서 산이나 알칼리에 비교적 안정하고 특수한 미생물 효소에 의하지 않고서는 분해되기가 어려워 여러 가지 생체 활성물질의 변질 및 파괴 등을 수반하는 결과를 초래하거나 또는 효과적으로 추출해내지 못하는 단점을 가지고 있다 (Lim et al., 1995; Kim and Bae, 2002).

[0008] 따라서, 해조류가 가지고 있는 상기와 같은 단점을 극복하고 안전성 및 기능성이 향상된 발효 추출물을 얻는 것이 필요한 실정이다.

[0009] 본 발명자들은 톳 특유의 이취를 경감시키면서 GABA와 같은 유용성분을 증대시킬 수 있는 방법을 연구한 결과 본 발명을 완성하게 되었다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0010] 본 발명의 목적은 톳 추출물에 유산균을 접종함으로써 항산화 효과 및 항염증 효과가 증대된 발효 톳 산물을 포함하는 식품을 제공하는 것이다.

[0011] 본 발명의 또 다른 목적은 항균 효과가 증진된 발효 톳 산물을 이용한 항균제를 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0012] 본 발명은 유산균을 접종한 톳 발효 산물을 포함하는 것을 특징으로 하는 염증 완화용 식품을 제공한다.

[0013] 또한, 본 발명은 유산균을 접종한 톳 발효 산물을 포함하는 것을 특징으로 하는 항산화 효과가 증대된 식품을 제공한다.

[0014] 본 발명의 또 다른 양태로써, 유산균을 접종한 톳 발효 산물을 포함하는 것을 특징으로 하는 항균제를 제공한다.

발명의 효과

[0015] 본 발명에 따르면, 해조류인 톳을 유산균 발효를 통하여 발효시킴으로써 항 산화 및 항산화 효과가 증진된다. 또한 본 발명에 따르면 톳의 항균 효과가 증진될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0016] 도 1는 톳 추출물에서의 유산균의 생육도를 배양시간에 따라 도시한다. (●, Lactobacillus brevis BJ-1; ○, L. brevis BJ -6; ▼, L. brevis BJ -7; ▽, L. Brevis BJ -12; ■, L. brevis BJ -18; □, L. brevis BJ -19; ◆, L. brevis BJ -20.)

도 2은 톳 추출물을 유산균으로 발효시킨 후 관능 평가 결과를 나타낸 것이다. (막대그래프: 향, 꺾은 선 그래프: 맛)

도 3은 톳 추출물을 발효하는 경우에 DHPH 라디칼 소거능을 도시한다. (■, 아스코르브산; □, 톳 추출물; □,

Lactobacillus brevis BJ -20의한 톳 추출물의 발효 산물).

도 4는 톳 추출물을 발효하는 경우에 수퍼다이옥사이드 라디칼 소거능을 도시한다. (■, 아스코르브산; □, 톳 추출물; □, *Lactobacillus brevis* BJ -20의한 톳 추출물의 발효 산물).

도 5는 톳 추출물을 발효하는 경우에 알킬 라디칼 소거능을 도시한다. (■, 아스코르브산; □, 톳 추출물; □, *Lactobacillus brevis* BJ -20의한 톳 추출물의 발효 산물).

도6은 톳 추출물을 발효하는 경우에 하이드록시 라디칼 소거능을 도시한다. (■, 아스코르브산; □, 톳 추출물; □, *Lactobacillus brevis* BJ -20의한 톳 추출물의 발효 산물).

도7은 톳 추출물의 발효에 따른 세포 독성을 나타낸다. (Raw 264.7 cells ■, 코직산; □, 톳 추출물; □, *Lactobacillus brevis* BJ -20의한 톳 추출물의 발효 산물)

도8는 톳 추출물의 발효에 따른 NO 라디칼 저해 능을 나타낸다. (HepG2 cell, ■, 코직산; □, 톳 추출물; □, *Lactobacillus brevis* BJ-20의한 톳 추출물의 발효 산물)

도9은 톳 추출물 발효 시 톳 추출물(HFW)와 톳 추출물 발효산물(HFWF)에서의 TNF-α 와 iNOS 단백질의 발현 속도를 나타낸다. (A는 리포폴리사카라이드의 처리시, B는 TNF-α (□)와 iNOS (□) 의 발현. C는 웨스턴 블랏 결과)

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0017] 이하 본 발명을 상세히 설명한다.

[0018] 본 발명은 톳 추출물에 유산균을 접종함으로써 항산화 효과 및 항염증 효과가 증대된 발효 톳 산물을 제공한다.

[0019] 본 발명에서 “발효”란, 미생물이 자신이 가지고 있는 효소를 이용해 유기물을 분해시키는 과정을 말하고 특히 “젖산 발효”란 유산균을 이용하여 발효과정을 수행하는 것을 말한다.

[0020] 본 발명의 유산균 톳 발효 산물을 제공하기 위하여 톳 추출액을 제조한다. 추출액 제조에 사용되는 톳은 시중에 판매되고 있는 모든 톳을 이용할 수 있다. 톳에서 추출액을 제조하기 위해서는 당업계에서 공지된 모든 추출 방법을 사용할 수 있다.

[0021] 구체적으로 본 발명의 톳 추출액을 얻기 위해서 일반적으로 해조류의 유용성분을 추출하여 이용할 때 사용되는 열수 추출이나 알칼리, 산 또는 효소처리 등에 의하여 추출 후 가공하는 방법들을 수행할 수 있다. 바람직하게는 열수 추출법에 의하여 톳 추출액을 제조할 수 있고 더욱 바람직하게는 톳 중량 대비 16배의 물을 첨가하고 70~80℃에서 30분 내지 한 시간 동안 열수 추출이 가능하나 이에 제한되는 것은 아니다.

[0022] 톳 추출액의 발효에 사용되는 균주는 유산균 발효를 위한 모든 균주를 사용 가능하다. 본 발명의 “유산균”이란, 당류를 발효하여 에너지를 획득하고 다량의 락트산을 생성하는 세균의 총칭을 말하며 통상적으로 락토바실러스, 락토코쿠스, 루코노스톡, 페디오코커스, 비피더스균 등의 균 속을 말한다. 따라서 본 발명에 사용되는 유산균으로는 본 균 속의 특징을 갖는 산소가 적은 환경에서 잘 발육하여 각종 당으로부터 락트산을 생성하는 것을 제한 없이 사용할 수 있다. 바람직하게는 락토바실러스 브레비스를 사용할 수 있고 더욱 바람직하게는 락토바실러스 브레비스 BJ20을 이용하여 발효를 수행할 수 있으며 상기의 유산균을 조합하여 사용할 수 있다.

[0023] 한편, 유산균으로써 접종 될 수 있는 락토바실러스 브레비스 BJ1, BJ 6, BJ 7, BJ 12, BJ 18, BJ 19, BJ 20(수탁번호 KCTC 11377BP, 균주명 : *Lactobacillus brevis* BJ20)은 동일 종에 속하는 균주와 비교하여 일반적인 분류학적 특성은 동일한 것을 특징으로 한다. 락토바실러스 브레비스 BJ20(수탁번호 KCTC 11377BP)는 한국 전통식품인 김치에서 추출한 유산균이다.

[0024] 본 발명의 톳의 유산균 발효를 위하여 상기 균주를 전 배양한 후 배양액의 톳 추출액에 접종하고 후 배양하는 단계를 거친다. 발효 물을 수득하는 방법이 특별하게 한정되지는 않으며, 당업계에 통상적인 방법을 사용하여 발효에 사용하는 유산균의 발효조건에 적당한 것으로 알려진 조건으로 발효를 수행할 수 있으며, 구체적으로는 예를 들어 24시간 동안 전 배양을 한 후, 그로부터 얻어진 배양액 10%를 톳 추출액에 접종하고 30 ℃에서 진탕 배양하는 것을 특징으로 하는 방법에 의하여 얻어질 수 있다.

[0025] 본 발명의 유산균 발효 톳을 생산하기 위하여 적합한 유산균주들을 선정하기 위한 생육도를 측정할 수 있다. 본 발명에서의 생육도 측정에 따라 BJ-20균주를 이용하는 경우 상대적으로 다른 유산균에 비하여 안정적으로 균수가 유지되므로 BJ-20균주를 이용하는 것이 바람직할 수 있다. 본 발명에 의하면 약 40시간이상 48시간 이하로

배양한 톳 추출물을 이용하는 경우 균주의 최대 증식도를 나타냄을 알 수 있고 가장 바람직하게는 48시간 동안 배양한 톳 추출물을 이용하는 것이 바람직할 수 있다.

[0026] 효율적인 발효기간을 정하기 위하여 톳의 정미 성분에 영향을 미치는 유리 아미노산의 발효에 따른 변화를 살필 수 있다. 이를 위하여 상기의 공지된 유산균들을 이용할 수 있으나 바람직하게는 락토바실러스 브레비스, 더욱 바람직하게는 락토바실러스 브레비스 BJ-20을 이용할 수 있다. 유산균을 이용하여 4일 내지 7일 동안 발효를 시킨 후 유리 아미노산 함량을 살핀다. 발효에 따라 유리 아미노산의 변화가 일어나며 발효 시작 후 글루탐산의 경우 48시간이상의 발효를 하는 경우 대폭 감소될 수 있으며 감마-아미노부티릭 산의 경우(GABA)의 함량은 60배 이상 증가할 수 있다.

[0027] GABA는 미생물이 가지고 있는 glutamate decarboxylase (GAD) 효소작용에 의한 glutamic aicd의 탈 탄산 반응으로 생성되는 기능성 물질(Kook et al., 2009)로 GABA는 중추신경계의 신경전달물질로서 뇌의 혈류를 활발하게 하고 산소 공급량을 증가시켜 뇌세포의 대사기능을 촉진시키기도 하고 (Narayan and Nair, 1990) 혈압강하와 알코올 대사를 증진시키는 것으로 알려져 있는 물질이며 (Omori et al., 1987; Bae and Kim, 2010). 톳 발효액에서 생성된 GABA도 L. brevis BJ-20이 생산하는 GAD에 의해 glutamate가 GABA로 전환된 것으로 GABA 함량은 2일 이상의 발효가 진행될 때 최고 함량을 나타낼 수 있다.

[0028] 본 발명의 발효 톳 산물은 하기 실시예에서 입증되는 바와 같이 톳 자체의 향기 성분 등이 개선되고 항산화, 항염증, 항균능이 개선된 효과를 갖는다. 이에 따라 본 발명의 톳 추출액을 이용하는 경우 고부가 가치의 기능성 식품 소재로써 유산균을 이용한 발효 공정을 적용할 수 있다. 특히 유용한 균주로써 락토바실러스 브레비스를 사용할 수 있으며, 더욱 바람직하게 락토바실러스 브레비스 BJ20을 통하여 발효 과정을 수행하는 경우 분말 입자의 크기를 감소시킴으로써 다양한 소재의 식품 소재에 가능하다.

[0029] 본 발명이 적용 가능한 식품이란, 인간의 생명유지를 위한 영양성분의 섭취목적으로 인간이 먹고 마시는 모든 음식물을 의미하며, 농?축?임?수산물을 그대로 유통하는 신선식품과 이들의 원료를 제조?가공 처리하여 저장성, 영양성, 기호성 등을 높인 가공식품을 포함할 수 있다.

[0030] 본 발명은 유산균 발효 톳을 유효성분으로 포함하는 식품 조성물을 제공한다. 상기 식품이란 건강보조식품, 건강기능식품, 기능성 식품 등이나 이에 제한되는 것은 아니며, 천연식품, 가공식품, 일반적인 식자재 등에 유산균 발효 톳을 첨가한 것도 포함된다. 유산균 발효 톳은 추출물 형태 또는 추출물 분말 가공 형태 어느 것으로나 제한 없이 첨가될 수 있다.

[0031] 본 발명의 유산균 발효 톳을 유효성분으로 포함하는 식품 조성물은, 상기 조성물을 그대로 첨가하거나 다른 식품 또는 식품 조성물과 함께 사용될 수 있으며, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다.

[0032] 또한 본 발명의 발효 톳 산물을 이용하여 건강 기능 식품을 제조하여 제공할 수 있으며 본 발명의 “건강기능식품”이란, 인체에 유용한 기능을 갖는 원료를 사용하여 정제, 캅셀, 분말, 과립, 액상, 환 등의 형태로 가공된 모든 보조 식품을 포함할 수 있다.

[0033] 상기 건강기능식품을 식품 또는 음료로 제조 시에 원료에 대하여 발효 톳 산물을0.01 내지 70.00 중량%, 바람직하게는 0.01 내지 30.00 중량%의 양으로 첨가될 수 있으며, 더욱 바람직하게는 0.01 내지 10.00 중량%의 양으로 첨가될 수 있다. 또한, 건강 및 위생을 목적으로 하거나 또는 건강 조절을 목적으로 하는 장기간의 섭취의 경우에는 상기 범위 외에도 안전성 명에서 문제되지 않으므로 상기 범위 이상의 첨가도 가능하다.

[0034] 식품의 종류에는 특별한 제한이 없으며, 예를 들어 육류, 소시지, 빵, 쵸코렛, 캔디류, 스넥류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류를 포함한 낙농제품, 각종 스프, 음료수, 차, 드링크제, 알콜 음료 및 비타민 복합제 등을 들 수 있으나 이들 종류의 식품으로 제한되는 것은 아니다.

[0035] 본 발명은 또한, 유산균 발효 톳을 함유하는 항균제를 제공한다. “항균제”란 궁극적으로 인간생활의 쾌적함과 건강을 유지하기 위해서고, 그 방법은 항균 효과를 나타내는 물질을 이용하여 미생물의 생장을 제어하는 것으로써 구체적으로 우리신체에는 영향을 적게 미치면서 미생물인 세균에 대하여 선택적으로 작용하는 약물을 말한다. 본 발명에서의 유산균 발효 톳을 함유하는 항균제는 그람 음성균 및 그람 양성균 모두에 적용가능하며 구체적으로 살모넬라균, 이질균, 티푸스균, 페스트균, 콜레라 균등의 그람 음성균과 포도상구균, 연쇄상구균, 폐렴균, 나병균, 파상풍균, 방선균 등의 그람양성균에 적용가능하다. 더욱 구체적으로 본 발명의 유산균 발효 톳을 함유하는 항균제는 *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*등에 항균작용을 나타낸다. 그러나 이는 하나의 실시 예일 뿐 이에 제한됨 없이 항균제를 적용 가능한 모든 미생물에 항균작용을 나타낼 수 있음은 자명하

다.

[0036] 이하, 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로서, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

[0037] **실시예1. 톳 추출액의 제조.**

[0038] 톳은 2009년 6월에 채취한 완도 산을 구입하여 사용하였다.

[0039] 톳 추출액을 제조하기 위하여 톳을 수세하였다. 해조류인 톳의 염분 제거를 위하여 탈염하는 과정을 처리하고 추출하기에 적합하도록 분쇄하였다. 획득된 톳 분쇄물에 톳 중량 대지 16배의 물을 첨가하였다. 열수 추출을 하기 위하여 80℃에서 30분간 열수 추출하고 20 mesh 망으로 잔사를 제거하여 추출액을 얻었다.

[0040] **실시예2. 발효균주 및 균주의 배양 조건.**

[0041] 톳 추출액의 발효를 위하여 사용된 균주는 전통 발효식품에서 분리하여 부경대학교 식품공학과 식품미생물학연구실에서 보관중인 7종의 *Lactobacillus brevis* (BJ-1, BJ -6, BJ -7, BJ -12, BJ -18, BJ -19 및 BJ -20)을 사용하였다.

[0042] Lactobacilli MRS Broth (MRS; Difico, USA) 배지에 각각의 균주를 24 시간 전 배양 후, 배양액 10%를 톳 추출액에 접종하고 30℃에서 진탕 배양하면서 배양시간에 따른 특성 변화를 조사하였다.

[0043] 분리한 유산균주들의 톳 추출 액에서 생육도를 측정하였다 (도. 1).

[0044] 실험에 사용된 7종의 유산균주 모두 톳 추출 액에서 비교적 성장이 잘되는 것으로 나타났으며 유산균주들 간의 생육도에는 약간의 차이는 있지만 모두 배양 48시간에 최대 생육곡선을 나타내었다.

[0045] BJ-20 균주를 제외하고는 48시간 이후의 배양 조건에서는 유산균들이 급속히 사멸하였다. 이는 톳 추출액 중의 영양성분의 고갈 및 독성 대사산물의 축적에 의한 것으로 BJ -20 균주는 다른 유산균에 비하여 상대적으로 안정적으로 균수가 유지 되는 것으로 나타나 균의 생존력이 뛰어난 것으로 나타났다. (도. 1).

[0046] **실시예3. 항산화 효과.**

[0047] 본 실험에 사용된 7종의 균주들 중에서 톳 발효에 의한 기능성 상승 효과를 나타내는 균주를 탐색하기 위해 최대 증식도를 나타내는 48시간 배양한 톳 추출액을 이용하여 항산화 활성 및 총 페놀함량을 비교하였다.

[0048] **3.1. DPPH 라디칼 소거능 측정**

[0049] DPPH 라디칼 소거능은 Nanjo et al. (1996)의 방법에 따라 측정하였다. 시료 30 μL에 60 μM DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) 용액 30 μL를 혼합 후 반응 액을 100 μL quartz capillary tube에 옮겨 2분 후 전자스핀공명 스펙트로미터(ESR) (JES-FA, JEOL Ltd., Tokyo, Japan)로 측정하였다. 실험조건은 다음과 같다: magnetic field, 336.5±5 mT; power, 5 mW; modulation frequency, 9.41 GHz; amplitude, 1 × 1,000; sweep time, 30 s; temperature, 298 K. DPPH radical 소거능은 H 와 H_0 의 상대적인 라디컬 신호 높이의 차에 의하여 계산하였다.

[0050] Radical scavenging activity (%) $= (1 - \frac{H}{H_0}) \times 100$

[0051] 톳 추출액과 유산균 톳 발효액을 대상으로 전자스핀공명 스펙트로미터를 이용하여 DPPH 라디칼 소거능을 실험한 결과는 도3와 같다.

[0052] 양성대조군인 아스코르브산의 경우 0.5 mg/mL와 1 mg/mL의 농도에서 각각 80.15%, 86.04%의 활성을 나타내었고 유산균 톳 발효액은 동일 농도에서 각각 52.82%, 67.51%로 유산균 발효에 의해서 DPPH 라디칼 소거활성이 증가

함을 확인하였다.

[0053] **3.2 페놀함량의 측정.**

[0054] 상기와 같은 라디칼 소거능의 원인을 규명하기 위하여 페놀 함량의 증가 여부를 측정하였다. 총 페놀 함량의 측정은 표준용액으로 프로로글루시놀(phloroglucinol)을 사용하여 Folin-Denis colorimetric method로 측정 하였다

[0055] 또한 총 페놀함량을 비교한 결과에 있어서도 대조구에 비해 약간의 함량 증가가 나타났지만 균주에 따른 함량의 차이는 크게 없는 것으로 조사되었다 (표1).

[0056] 이러한 결과를 살펴볼 때 발효 과정 중 유산균 균주의 발효에 의한 톳 추출액의 가수분해에 의해 대조구(비 발효구)에 비해 폴리페놀함량이 다소 증가하였고 그 결과 항산화 활성도 증가한 것으로 고찰된다.

표 1

[0057] Change of DPPH radical scavenging activity and total phenolic content in *Hizikia fusiforme* water extract fermented by *Lactobacillus brevis* strains

Sample	DPPH scavenging activity (%)	Total phenolic content (mg/g)
Control[a]	72.57±0.25	92.27±0.25
L. brevis BJ-1	77.82±1.87	92.34±0.40
L. brevis BJ -6	79.88±0.41	92.76±0.12
L. brevis BJ -7	78.67±0.30	93.31±0.18
L. brevis BJ -12	77.24±0.13	93.09±0.61
L. brevis BJ -18	74.16±5.22	92.73±0.18
L. brevis BJ -19	80.40±0.22	93.31±0.38
L. brevis BJ -20	81.12±0.13	94.06±0.12

[0058] Fermentation was carried out for 48 hr at 30℃. [a]*H. fusiforme* water extract.

[0059] **3.3 수퍼옥사이드 라디칼 소거능 측정.**

[0060] 수퍼옥사이드 라디칼은 Guo et al. (1999)에 따라 시료 10 μL에 0.3 mM 리보플라빈10 μL, 1.6 mM EDTA 10 μL, 800 mM DMPO 10 μL를 첨가 후 365 nm의 자외선 램프에서 1분 동안 조사하였다. 반응물을 quartz capillary tube에 옮긴 후 ESR 스펙트로미터를 이용하여 분석하였으며

[0061] 실험조건은 다음과 같다: magnetic field, 336.5±5 mT; power, 10 mW; modulation frequency, 9.41 GHz; amplitude, 1×1,000; sweep time, 30 s; temperature 298 K. 수퍼옥사이드 라디칼 소거능은 H 과 H_0 의 상대적인 피크를 이용하는 수식에 의해 계산되었다.

[0062] Radical scavenging activity (%)
$$= \left(1 - \frac{H}{H_0}\right) \times 100$$

[0063] O^{2} (superoxide radical)를 소거하는 효과를 톳 추출액과 유산균 톳 발효액을 대상으로 평가하였다 (도4). 톳 추출액의 경우에는 각각 0.5 mg/mL와 1 mg/mL의 농도에서 32.11%, 37.62%로 나타났다. 하지만 유산균 톳 발효액은 동일 농도에서 각각 37.99%, 44.67%로 대조구인 톳 추출액 (비 발효액)에 비해 소폭 증가하는 경향을 나타내었다. 특히, 1 mg/mL 농도의 유산균 톳 발효액의 경우 정제된 화합물이 아님에도 불구하고 양성 대조군으로 사용한 같은 농도의 아스코르브산 보다 뛰어난 수퍼옥사이드 라디칼 소거 활성을 나타내고 있어 활성산소를 제어하는 천연 항산화제로서의 가치가 높은 것으로 판단된다.

[0064] **3.4 알킬라디칼 소거능 측정.**

[0065] 알킬라디칼(peroxyl radical)은 Hiramoto et al. (1993)의 방법에 따라 다음과 같이 측정하였다.

[0066] 10 μL의 시료에 각각 10 μL의 PBS (Phosphate buffered saline), 40 mM AAPH (2,2-azobis-(2-amidinopropane)-dihydrochloride), 40 mM POBN α-(4-pyridyl-1- oxide)-*N*-*tert*-butylnitrone을 첨가한다. 그리고 37℃에서 30분간 반응시킨 후 quartz capillary tube에 옮겨 ESR 스펙트로미터를 이용하여 측정하였다.

[0067] 실험조건은 다음과 같다: magnetic field, 336.5±5 mT; power, 10 mW; modulation frequency, 9.41 GHz; amplitude, 1×1000; sweep time, 1 min; temperature 298 K. Alkyl radical 소거능은 아래의 식으로 계산하였다.

[0068] Radical scavenging activity (%) $= (1 - \frac{H}{H_0}) \times 100$

[0069] 톳 추출액과 유산균 톳 발효액을 대상으로 알킬라디칼 소거 활성을 실험한 결과는 도5와 같다. 양성 대조군인 아스코르브산의 경우 0.5 mg/mL와 1 mg/mL의 농도에서 각각 79.51%, 81.25%의 활성을 나타내었고, 톳 추출액의 경우에는 각각 70.59%, 73.08.%, 유산균 톳 발효액은 동일 농도에서 각각 76.34%, 81.07%로 유산균 발효에 의해 톳 추출액의 알킬 라디칼 소거 활성이 소폭 증진 되는 것을 알 수 있다. 또한 천연 항산화제 중 알킬 라디칼 소거능이 매우 우수한 것으로 알려진 아스코르브산과 비교 시 동일농도에서 대등한 알킬라디칼 소거능을 나타내었으며 알킬라디칼의 소거활성이 뛰어나다고 알려진 키토산과도 대등한 소거활성을 나타내었다 (Lee et al., 2009; Park and Kim, 2007).

[0070] **3.5 하이드록시 라티칼 소거능 측정**

[0071] Hydroxyl radical 소거능은 Rosen et al. (1984)의 방법으로 분석하였다. 시료 20 μL에 0.3 M DMPO 20 μL, 10 mM $FeSO_4$ 20 μL, 10 mM H_2O_2 20 μL을 혼합한 다음 quartz capillary tube에 옮긴 후 2.5분 후에 ESR spectrometer로 측정하였다. 실험조건은 다음과 같다: magnetic field, 336.5±5 mT; power, 1 mW; modulation frequency, 9.41 GHz; amplitude, 1×200; sweep time, 4 min; temperature 298 K. Hydroxy radical 소거능은 H 과 H_0 의 상대적인 높이에 의해 측정하는 다음 수식에 의해 계산되었다.

[0072] Radical scavenging activity (%) $= (1 - \frac{H}{H_0}) \times 100$

[0073] 결과는 도6 같다. 양성대조군인 아스코르브산의 경우 0.5 mg/mL와 1 mg/mL의 농도에서 각각 41.27%, 44.36%의 활성을 나타내었고, 톳 추출액의 경우에는 각각 47.63%, 64.16%의 활성을 나타내었다.

[0074] 하지만, 유산균 톳 발효액은 동일 농도에서 각각 61.36%, 79.08%로 0.5 mg/mL 농도의 경우 톳 추출액 (비 발효액)과 비교 시 2배 이상의 하이드록시 라디칼 소거 활성 증가가 나타났다.

[0075] 유산균 톳 발효액이 정제된 화합물이 아닌 점을 고려한다면 유산균 톳 발효액은 상당히 뛰어난 하이드록시 라디칼 소거 활성을 가지고 있는 것으로 판단되었다

[0076] 이상의 항산화 실험결과를 종합해 볼 때 톳 추출액은 DPPH 라디칼, 하이드록시 라디칼, 수퍼옥사이드 라디칼, 알킬 라디칼과 같은 각종 유해 라디칼의 생성을 억제시키는 효과를 가지고 있으며 그 활성은 유산균 발효에 의해서 증가되는 것을 확인 할 수 있었다. 이에 유산균 발효에 의해서 세포 독성이 생성되지 않는 다면 천연 항산화제로써의 이용 가능성이 높을 것으로 판단되어 이후 MTT 분석을 이용한 세포 독성에 관한 연구를 진행하였다.

[0077] **실시예4. 항염증 효과.**

[0078] *L. brevis*를 이용한 톳 추출액과 발효액의 세포독성은 MTT [3-(4,5-dimet- hylthiozol-2-ly)-2,5-

diphebyltetrazolium bromide] assay로 항염 활성은 cell based NO assay 및 western blotting analysis 방법에 의하여 측정하였다.

[0079] **4.1 세포배양.**

[0080] 사람의 간암세포 유래 HepG2 세포 주는 American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA) 로부터 분양받아 사용하였으며 10% inactivated fetal bovine serum과 1% 페니실린과 스트렙토마이신이 포함된 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)을 배양액으로 37℃, 5% CO_2 와 95% air 조건에서 배양하였다.

[0081] **4.2 MTT 분석**

[0082] 24 well에 HepG2세포 5 × 10^5개를 분주하고, 4시간 뒤에 새 배지로 교체 후 일정농도 (0.5 및 1 mg/mL)의 톳 추출액 및 유산균 톳 발효액을 24시간 동안 처리하였다. 이후, 3-(4,5-dimethylthiozol-2-ly)-2,5-diphebyltetrazolium bromide (0.1 mg/mL)을 각 well에 처리하여 4 시간 배양한 후 형성된 insoluble formazan을 DMSO에 녹이고 ELISA reader (Wallac 1420, USA)를 통해 540 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 다음의 식으로 계산하였다.

[0083] Cell viability (%) = $\left(\frac{\text{반응군}}{\text{대조군}}\right) \times 100$

[0084] MTT 분석에 의한 세포 독성 실험 결과, HepG2 세포 생존율은 톳 추출물의 농도가 0.5 mg/mL의 경우 112.12%, 1 mg/mL의 경우 112.44%이고 유산균 톳 발효액은 동일농도에서 각각 105.47%, 121.37%로 유산균 발효에 의한 세포 독성은 없는 것으로 나타났다. (도7참조)

[0085] 이러한 결과는 전통발효식품에서 분리한 유산균 및 효모 등의 발효미생물이 해조류의 발효 중에 인체에 유해한 독성물질을 생산하지 않는다는 것을 의미한다 (Eom et al., 2010; Kang et al. 2010). 이러한 연구 결과는 향후 전통발효식품에서 분리된 미생물을 이용한 다양한 해조류 가공 기술 개발에 연결될 것으로 기대된다.

[0086] **4.3 NO 분석**

[0087] HepG2 세포를 24 well plate에 5 × 10^5개를 분주하고, 4시간 뒤에 새 배지로 교체 후 일정농도 (0.5 및 1 mg/mL)의 톳 추출액 및 유산균 톳 발효액을 1시간 동안 전처리 후 리포폴리사카라이드(lipopolysaccharide (LPS))를 1 μg/mL로 16 시간 동안 처리하였다. 세포배양 상층 액 100 μl를 96 well에 덜어놓고 Griess 용액 (1% sulfanilamide/0.1% N-(1-naphthyl)- ethylenediamine dihydrochloride/2.5% H_3PO_4) 100 μL를 첨가하고 5분 후 ELISA reader (Wallac 1420, USA) 를 통해 540 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 3반복을 원칙으로 하여 평균값을 구하였다.

[0088] Nitric oxide Inhibition (%) = $\left[1-\left(\frac{\text{반응군} - \text{보조군}}{\text{대조군}}\right)\right] \times 100$

[0089] 유산균 톳 발효액의 세포보호효과 (cell protective effect)를 항염증 활성의 지표로 측정되는 세포 내 NO (nitric oxide)를 세포 내 독소인 1 μg/mL LPS 처리로 생성을 유도하였다. 톳 추출액의 경우 0.5 mg/mL 농도에서는 3.80%, 1 mg/mL의 경우에는 14.69%의 NO 생성 억제 효과를 나타났으며 유산균 톳 발효액에서는 각각 11.34% 및 21.95%로 유산균 발효에 의해 억제 활성이 증가하였으며 농도 의존적인 경향을 나타내었다 (도8)

[0090] 톳 발효 추출액은 양성 대조군인 코지산(kojic acid)(79.4%, 80.53%) 보다는 NO 생성 정도의 억제 율은 떨어지는 것으로 나타났지만, 발효액이 정제된 화합물이 아닌 점을 고려한다면 상당한 억제능을 가진 것으로 판단된다.

[0091] **4.4 웨스턴 블랏 검사**

[0092] HepG2 세포를 6well 배양 판에 1 × 10^6cells/well을 분주 후, 24시간 후에 각 well에 일정농도 (0.5 mg/mL, 1.0 mg/mL)의 유산균 톳 발효액을 24시간 처리하고, 새 배지로 교체 후, 1.0 μg/mL LPS를 24시간 동안 처리하였다. 처리한 세포는 PRO-PREP buffer (iNtRON, Korea)로 단백질을 추출 후, Bradford법 (1976)을 이용하여 정량하였다. 추출 단백질은 10% SDS-PAGE를 이용하여 분리하였고, 니트로셀룰로오스막으로 전이시킨 후, 비특이적 결합을 줄이기 위해 5% 스킴밀크 (containing 0.1% Tween-20)를 4° C에서 16시간 처리하였다. 실험에 사용한 일차 항체는 염증 관련 사이토카인 단백질인 TNF-α(Tumor necrosis factor α)및 iNOS 항체 (1:1000, Santa Cruz Biotechnology, CA, U.S.A.)를 사용하였고, 이차 항체는 페록시다아제-콘쥬게이티드 이차 항체 (peroxidase-conjugated secondary antibodies) (1:2000, Santa Cruz Biotechnology)를 이용하여 화학발광 (chemiluminescense)으로 확인하였다. 밴드의 강도는 밀도계측으로 정량 하였고, 대조구로는 housekeeping 유전자인 β-actin을 이용하였다.

[0093] 세포 내 NO 생성 정도를 측정한 결과 유산균 톳 발효액에 의해 NO 생성이 최고 21.95% 억제되는 것을 확인하였다 (도9).

[0094] 이에 유산균 톳 발효액의 염증관련 cytokine 단백질에 대한 저해 효과를 확인하기 위해 HepG2 세포에 *L. brevis* LB-20으로 2일째까지 발효 시킨 유산균 톳 발효액과 톳 추출액을 각각 0.5 mg/mL과 1 mg/mL로 처리한 후 24시간 배양한 후 LPS (1 μg/mL)를 처리하고 24시간 뒤 염증 관련 사이토카인 단백질 발현 변화를 웨스턴 블랏으로 확인 하였다. 결과를 살피면 양성대조군인 LPS 단독처리에 의한 염증 관련 싸이토카인 단백질인 TNF-α와 iNOS의 발현이 증가하였다 (도9, lane 2).

[0095] 반면, 톳 추출액과 유산균 톳 발효액을 첨가한 경우에는 염증 관련 싸이토카인 단백질의 발현이 감소하는 결과를 나타내었으며 특히 0.5 mg/mL 유산균 톳 발효액을 첨가한 경우 가장 우수한 결과를 나타내었다 (도 9, lane 3?6).

[0096] HepG2 세포에서 LPS에 의해 유도된 염증 관련 싸이토카인 단백질인 TNF-α와 iNOS의 발현 억제 효과는 결론적으로 유산균 톳 발효액에 의한 NO 생성 억제로 연결 되고 이를 통한 항염증 효과가 기대됨을 확인하였다.

[0097] **실시예5. 항균 효과**

[0098] 톳에 물을 첨가하여 121℃에서 가압 열수 추출한 후 실험 군에는 유산균 톳 발효 균주인 LB20을 넣어 3일차까지 발효를 하였다. 발효를 하지 않은 추출물을 대조군으로 하고 발효를 한 실험 군까지 각각의 추출물을 비극성 용매인 핵산부터 다이클로로메탄, (Dichloro methane, DCM), 에틸아세테이드, 극성인 물까지 총 4개의 분획으로 나누었다. 이렇게 얻은 각 분획의 추출물을 시료로 하여 항균활성을 알아보기 위해 페이퍼 디스크 법을 실시하였다.

[0099] 균주는 그람 음성균인 *Escherichia coli*와 그람 양성균인 *Staphylococcus aureus*를 사용하여 그람 양성균과 음성균에서의 각각의 감수성을 체크하였다. 배지는 Mueller Hinton agar를 사용하였고, 6mm의 페이퍼 디스크에 각각의 추출물을 5mg씩 투입하여 37℃에서 24시간 배양을 하여 클리어 존의 크기를 비교하여 항균활성을 체크하여 보았다.

[0100] 그람 음성균인 *Escherichia coli*에서는 핵산분획과 물 분획에서는 전혀 항균 활성이 나타나지 않았고, DCM분획에서는 약간의 항균 활성이 나타났지만 발효를 한 추출물과 하지 않은 추출물 사이의 활성차이는 거의 없었다.

[0101] 하지만 에틸아세테이트 분획물의 경우 비 발효 추출물에서는 2,3일차에서만 약간 나타났던 것이 발효 추출물에서는 활성이 증가한 것을 볼 수 있었으며, 발효1일차의 경우 13mm로 가장 큰 활성을 나타내었다.

[0102] 그람 양성균인 *Staphylococcus aureus*는 비 발효 추출물의 경우 물 층을 제외하고는 모든 분획에서 13~15mm의 비교적 큰 항균활성을 나타내었다. 발효추출물과 비교하여 보면, 핵산 분획과 DCM분획의 경우에는 발효를 하지 않은 추출물과 차이가 없었으며, DCM분획의 경우에는 오히려 활성이 줄어든 것을 볼 수 있었다. 하지만 그람 음성균의 경우와 마찬가지로 에틸아세테이트분획에서는 1일차의 경우 clear zone이 2mm가량 증가한 것으로 보아 항균활성이 증가한 것을 알 수 있다. 종합하여 보면, 그람 음성균과 양성균 모두 나머지 분획에서는 발효로 인하여 추출물의 항균활성이 증가하지 않았으나 에틸아세테이트분획의 경우에는 발효 추출물의 항균활성이 증가한

것으로 보아 유산균 발효를 함으로써 에틸아세테이트분획에 존재하는 항균활성물질이 발효로 인하여 증가하였음을 예상할 수 있다. (표2, 표3)

표 2

[0103] *E.coli*(그람음성균) Inhibition zone Diameter (mm)[a] 5mg/disc

	핵산	DCM	에틸아세테이트	물
0일	-	8	-	-
1일	-	9	-	-
2일	-	-	8	-
3일	-	-	8	-
(발효)1일	-	9	13	-
(발효)2일	-	8	10	-
(발효)3일	-	-	10	-

[0104] (6mm disk 사용)

표 3

[0105] *S.aureus* (그람 양성균) Inhibition zone Diameter (mm)[a] 5mg/disc

	핵산	DCM	에틸아세테이트	물
0일	15	14	13	-
1일	15	15	12	-
2일	10	12	11	-
3일	8	12	11	-
(발효)1일	15	10	14	-
(발효)2일	12	08	11	-
(발효)3일	11	08	11	-

[0106] (6mm disk 사용)

[0107] 이상의 실시예에 따라 톳 추출액의 유산균 발효는 독성에는 영향을 미치지 않으면서 톳 추출액의 항산화 활성뿐만 아니라 항염 활성도 증가시키는 것을 확인하였으며 톳의 관능성 및 기능성을 개선시킨 유산균 톳 발효액을 제공할 수 있음을 확인하였다.

[0108] **제제 예1. 건강기능성 식품의 제조.**

[0109] 유산균 톳 발효 조성물 1000 mg

[0110] 비타민 혼합물 20 g

[0111] 비타민 A 아세테이트 70 ㎍

[0112] 비타민 E 1 mg

[0113] 비타민 B1 0.13 mg

[0114] 비타민 B2 0.15 mg

[0115] 비타민 B6 0.5 mg

[0116] 비타민 B12 0.2 ㎍

[0117] 비타민 C 10 mg

[0118] 비오틴 10 ㎍

[0119] 니코틴산아미드 1.7 ㎎

[0120] 엽산 50 ㎍

[0121] 판토텐산 칼슘 0.5 ㎎

[0122] 무기질 혼합물 적량

[0123] 황산제1철 1.75 ㎎

[0124] 산화아연 0.82㎎

[0125] 탄산마그네슘 25.3 ㎎

[0126] 제1인산칼륨 15 ㎎

[0127] 제2인산칼슘 55 ㎎

[0128] 구연산칼륨 90 ㎎

[0129] 탄산칼슘 100 ㎎

[0130] 염화마그네슘 24.8 ㎎

[0131] 상기 비타민 및 미네랄 혼합물의 조성비는 비교적 건강식품에 적합한 성분을 바람직한 실시예로 혼합 조성하였지만, 그 배합 비를 임의로 변형 실시하여도 무방하며, 통상의 건강식품 제조 방법에 따라 상기의 성분을 혼합한 다음, 과립을 제조하고, 통상의 방법에 따라 건강식품 조성물 제조에 사용할 수 있다.

[0132] 제제 예2. 건강음료의 제조.

[0133] 유산균 톳 발효 조성물 1000 ㎎

[0134] 구연산 100 ㎎

[0135] 올리고당 100 g

[0136] 정제수를 가하여 전체 900㎖

[0137] 통상의 건강음료 제조방법에 따라 상기의 성분을 혼합한 다음, 약 1시간 동안 85℃에서 교반 가열한 후, 만들어진 용액을 여과하여 멸균된 2ℓ 용기에 취득하여 밀봉 멸균한 뒤 냉장 보관한 다음 본 발명의 건강음료 조성물 제조에 사용한다.

수탁번호

[0138]

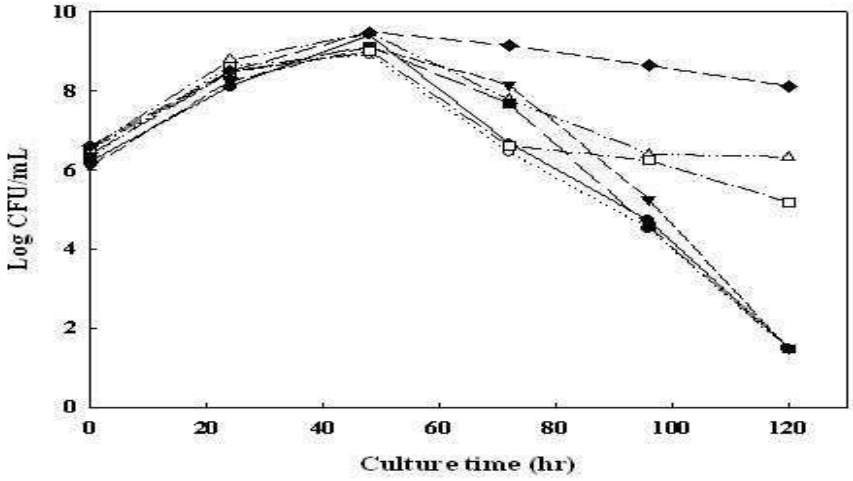
기탁기관명 : 한국생명공학연구원

수탁번호 : KCTC11377BP

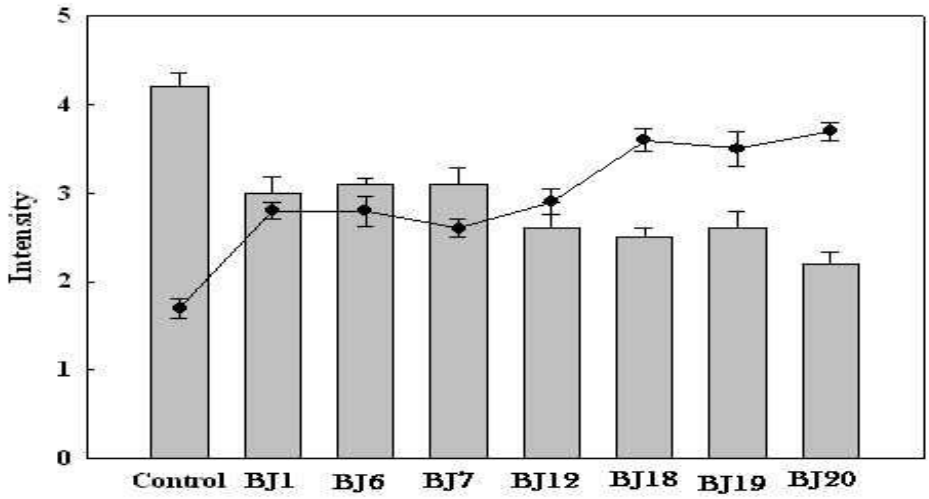
수탁일자 : 20080819

도면

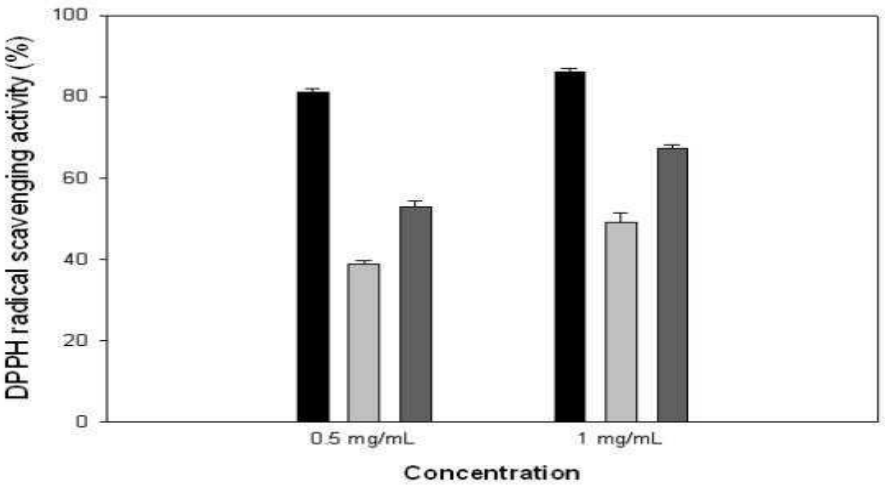
도면1



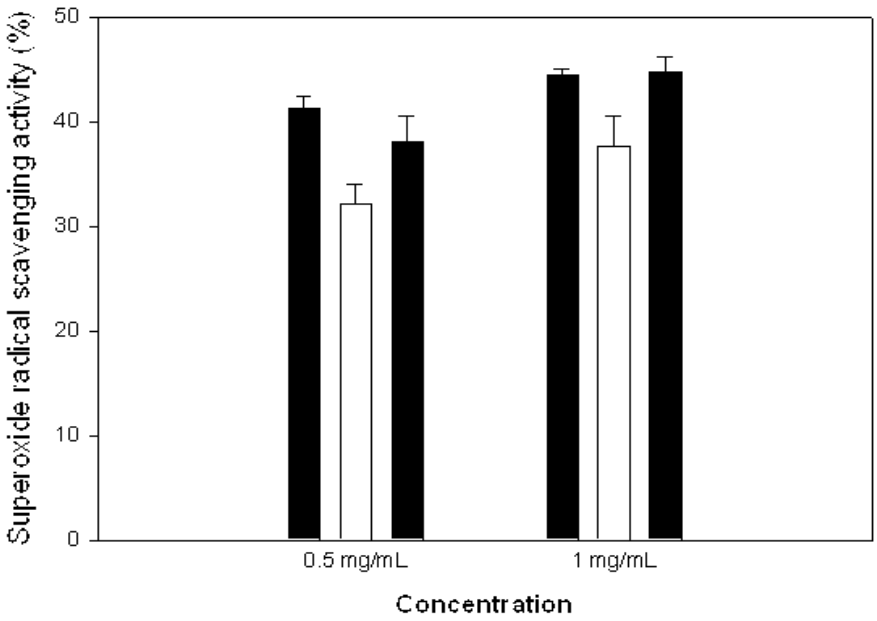
도면2



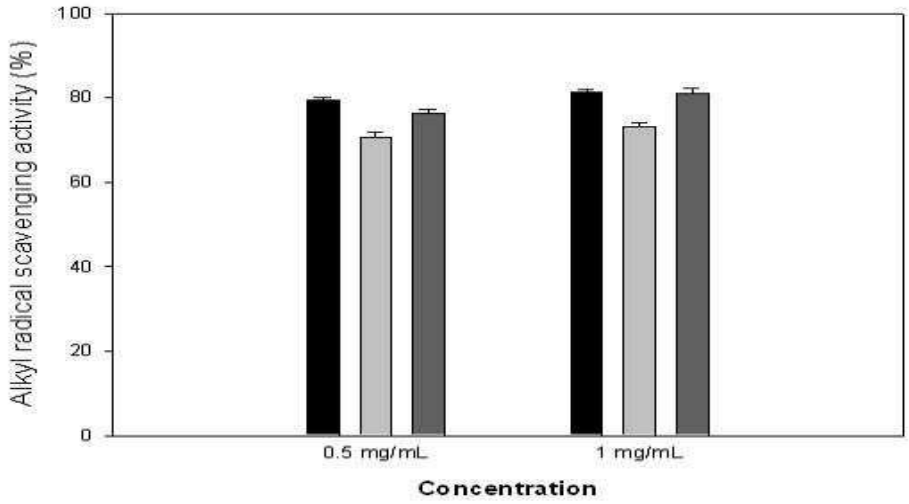
도면3



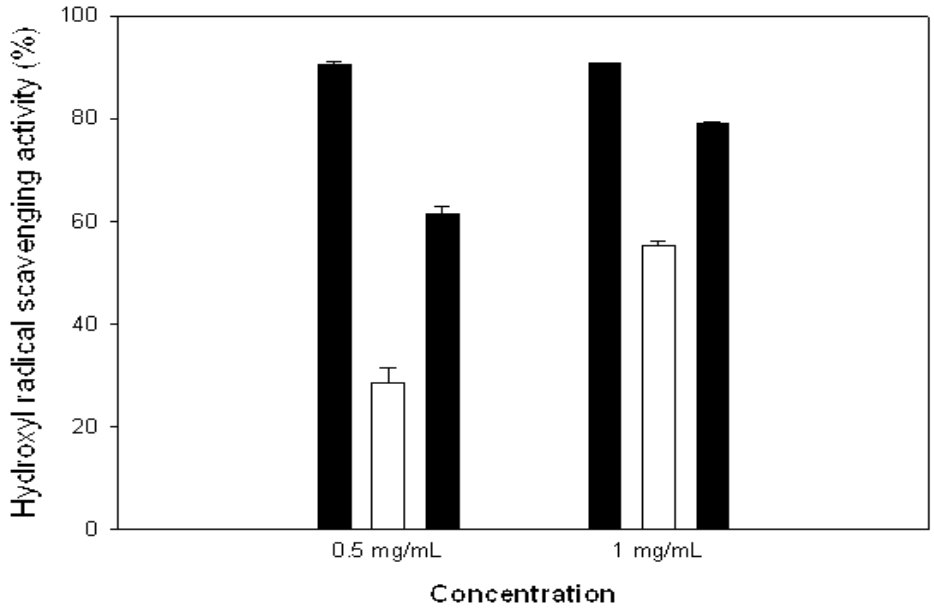
도면4


Superoxide radical scavenging activity (%)
50
40
30
20
10
0
0.5 mg/mL
1 mg/mL
Concentration

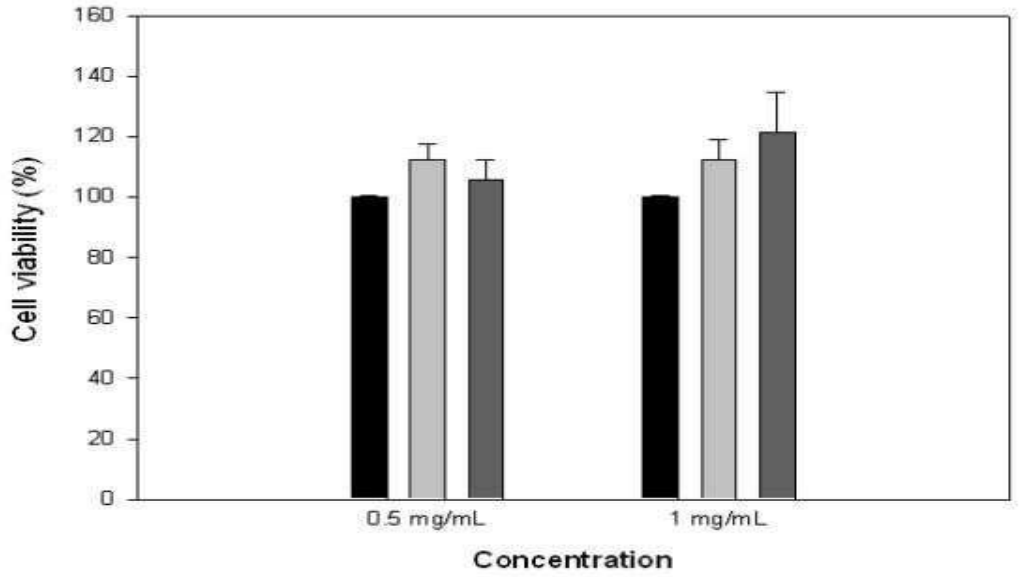
도면5


Alkyl radical scavenging activity (%)
100
80
60
40
20
0
0.5 mg/mL
1 mg/mL
Concentration

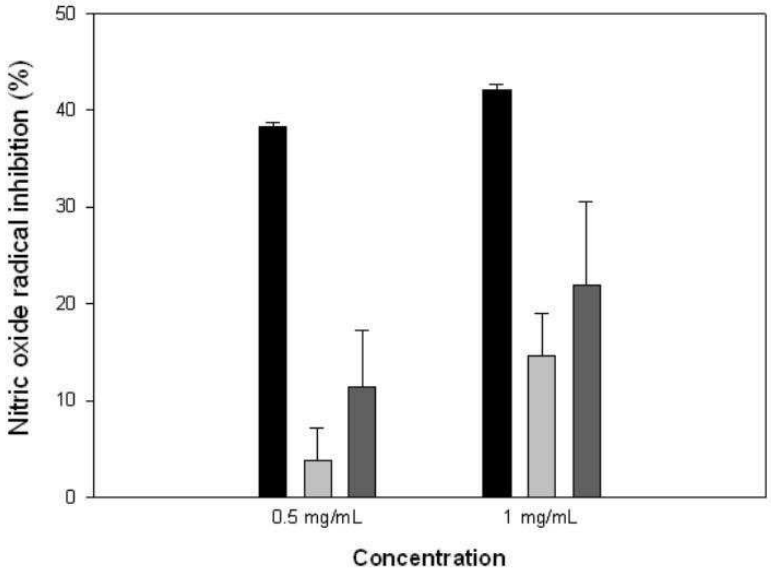
도면6


Hydroxyl radical scavenging activity (%)
100
80
60
40
20
0
0.5 mg/mL
1 mg/mL
Concentration

도면7


Cell viability (%)
160
140
120
100
80
60
40
20
0
0.5 mg/mL
1 mg/mL
Concentration

도면8

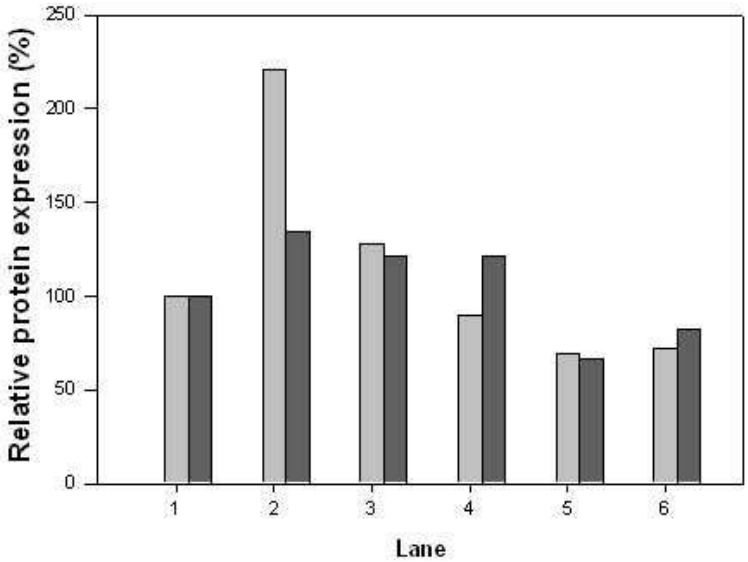


도면9

A)

	Lane 1	Lane 2	Lane 3	Lane 4	Lane 5	Lane 6
LPS (μg/mL)	-	1	1	1	1	1
HFW (mg/mL)	-	-	0,5	1,0	-	-
HFWF (mg/mL)	-	-	-	-	0,5	1,0

B)



C)

