(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2015-0140617
(43) 공개일자 2015년12월16일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A23F 3/34 (2006.01) *A23F 3/06* (2006.01)
(52) CPC특허분류
A23F 3/34 (2013.01)
A23F 3/06 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2015-0168228(분할)
(22) 출원일자 2015년11월30일
심사청구일자 2015년11월30일
(62) 원출원 특허 10-2015-0080757
원출원일자 2015년06월08일
심사청구일자 2015년06월08일

(71) 출원인
계명대학교 산학협력단
대구광역시 달서구 달구벌대로 1095 (신당동)
(72) 발명자
정용진
대구광역시 수성구 달구벌대로 2435 두산위브더제네스아파트 109동 3803호
김선화
대구광역시 달서구 달구벌대로 1095 계명대학교 자연식품공학과
(74) 대리인
이덕록

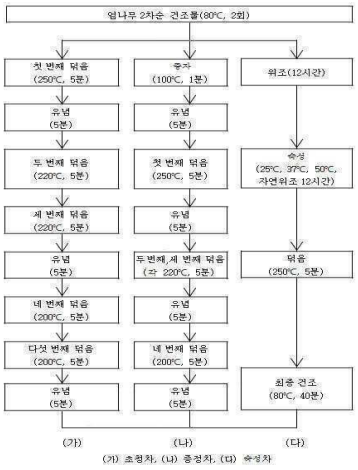
전체 청구항 수 : 총 4 항

(54) 발명의 명칭 **항산화 및 항염 기능성 엄나무순 차 및 그 제조방법**

(57) 요 약

본 발명은 엄나무순을 이용하여 초청차, 증청차 및 숙성차 중 어느 하나를 제조하여 항산화 및 항염 기능성이 높은 엄나무순 차를 제공하는 뛰어난 효과가 있다.

대 표 도 - 도1



엄나무순 비효소 및 숙성처리 한 차의 제조방법

(52) CPC특허분류
A23V 2250/2116 (2013.01)
A23V 2250/2132 (2013.01)
A23V 2250/214 (2013.01)
A23V 2300/10 (2013.01)
A23V 2300/14 (2013.01)
A23V 2300/20 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	2011-0803
부처명	경상북도농업기술원
연구관리전문기관	농촌진흥청
연구사업명	지역전략작목산학연협력사업
연구과제명	친환경 햇순나물을 활용한 향토음식 개발 및 식소재의 상품화
기 여 율	1/1
주관기관	계명대학교
연구기간	2012.02.13 ~ 2014.12.31

명 세 서

청구범위

청구항 1

엄나무(*Kalopanax pictus* Nakai) 2차순의 건조물을 100℃에서 1분간 수증기로 증자하고 5분간 유념한 후, 상기에서 얻은 유념물을 250℃에서 5분간 덖음하고 5분간 유념한 후, 상기에서 얻은 유념물을 다시 220℃에서 5분간 덖음하는 과정을 2회 반복하고 5분간 유념한 후, 상기에서 얻은 유념물을 또 200℃에서 5분간 덖음하고 5분간 유념한 후, 상기에서 얻은 유념물을 80℃에서 40분간 건조하는 것이 특징인 엄나무 증청차의 제조방법.

청구항 2

제 1항의 방법에 따라 제조된 엄나무 증청차.

청구항 3

제 2항의 엄나무 증청차에 가수하여 가온 추출 후 여과한 것이 특징인 엄나무 증청차.

청구항 4

제 3항의 엄나무 증청차를 동결건조한 것이 특징인 엄나무 증청차.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 항산화 및 항염 생리활성을 가진 엄나무순 차 및 그 제조방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 음나무, 엄목 및 개두릅으로도 불리는 엄나무(*Kalopanax pictus*)는 두릅나무과(Araliaceae) 낙엽교목으로, 전국 각지 또는 산지의 숲속에서 잘 자라며, 우리나라, 중국, 일본 등에 분포되어 있다. 엄나무는 약 25 m까지 자라고 크고 밑이 퍼진 가시가 있는 특징을 가지며, 7-8월에 꽃이 펴서 10월에 검게 열매 익는다. 또한, 엄나무의 껍질을 해동피로 불리고 약용으로 이용되며, 뿌리와 어린잎은 식용으로 이용된다(Jeong, Y. J. et al., Studies on the storage of *Kalopanax pictus* extract, 2004, *Korean J. Food Preserv.*, 11, 299-303). 엄나무의 기능성 성분으로는 saponin인 kalopanaxsaponin과 정유, 큐마린 및 페놀성 화합물로서 liriodendrin, syringin, chlorogenic acid 등이 알려져 있다(Sano K. et al., Studies on the constituents of the stem bark of *Kalopanax pictus* Nakai, 1991, *Chem. Pharm. Bull.*, 39, 865-870). 특히, 엄나무에 있는 saponin은 trierpenoid계 oleanane형 saponin으로 뿌리에 3.3%, 수피에 2.4%, 잎에 1.9% 함유되어 있으며, Aglycon인 hederagenin과 kalosaponins의 주요 생리활성은 용해도 증가, 진통소염 효과(Park H. J. et al., In vivo antinociceptive antiinflamatory and antioxidative effects of the leaf and stem bark of *Kalopanax pictus* in rats, 2005, *Korean J. Pharmacogn.*, 36, 318-323), 항돌연변이 효과(Kim M. J. et al., Antimutagenic and cytotoxic effects of extracts of *Kalopanax pictus* Nakal endodermis, 2002, *Korean J. Medicinal Crop Sci.*, 10, 132-138), 항당뇨 효과(Ko B. S. et al., Natural products, organic chemistry: Insulin sensitizing and insulin-like effects of water extracts from *Kalopanax pictus* Nakal in 3T3-L1 adipocyte, 2002, *J. Korean Soc. Agric. Chem. Biotechnol.*, 45, 42-46) 등이 보고된 바 있다.

[0003] 차(tea)는 차나무의 어린 잎을 따서 만든 음료로 잎의 종류, 차의 품종, 재배지역, 가공공정 및 향기와 맛에 따라 다양하게 분류할 수 있으나 기본적으로 가공방법에 따라서 녹차, 우롱차, 홍차로 분류하는 것이 일반적이다(Hou C. W. et al., Enhancement of fermentation process in Pu-Erh tea by tea-leaf extract, 2010, J.

Food Sci., 75, 44-48).

[0004] 최근에는 녹차뿐만 아니라 쑥, 뽕잎, 으름나무, 감나무, 밤나무, 취나물, 민들레, 곰취, 메밀, 진피 등 건강기능성 소재를 이용한 건강 음용차의 항산화 효과에 대한 기능성 연구(Roh Y. K. et al., Analysis of components and leaf yield by cultivar for *Persimmon* leaf tea, 2000, *Korean J. Postharvest Sci. Technol.*, 7, 99-102)와 침출차의 품질 향상을 위한 열처리 효과에 관한 연구(Park N. Y. et al., Changes in flavor compounds of *Polygonatum odoratum* root during roasting, 2006, Korean J. Food Sci. Technol., 39, 99-103) 등 기호도를 향상시킬 수 있는 연구가 이루어진 바 있다. 이는 맛과 영양적 기능성 식품을 선호하며, 생리활성을 나타내는 약리성이 첨가된 식품의 탐색 및 전통식품의 기능적 연구 등과 같이 급변하는 소비자의 욕구를 충족시키기 위한 움직임이라 볼 수 있다(Kim HK (2004) Current status and prospect of nutraceuticals. J. Food Indust. Nutr. 9: 1-14), 현재 엄나무를 소재로하여 티백용 조성물 및 그 제조방법이 대한민국 공개특허 10-2012-0105762에 개시된 바 있다. 그러나, 항산화 및 항염 기능성을 확인한 엄나무순 차와 그 제조방법에 대하여는 지금까지 암시되거나 교시된 바 없다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0005] 따라서, 본 발명의 목적은 엄나무순 특히 엄나무 2차순을 이용하여 초청차, 증청차 및 숙성차를 제조하여 항산화 및 항염 활성이 높은 엄나무 2차순 차를 제공하는데 있다.

[0006] 본 발명의 다른 목적은 상기 기능성 엄나무 2차순 차 제조방법을 제공하는데 있다.

과제의 해결 수단

[0007] 본 발명의 상기 목적은 엄나무 2차순을 80℃에서 건조 및 100℃에서 증기로 가공한 후 80℃에서 재건조하는 단계와; 상기에서 얻은 엄나무 2차순으로 초청차를 제조하는 단계와; 상기에서 얻은 엄나무 2차순으로 증청차를 제조하는 단계와; 상기에서 얻은 엄나무 2차순으로 숙성차를 제조하는 단계와; 상기에서 제조한 엄나무순 차의 pH, 수분함량 및 색도를 측정하는 단계와; 다양한 생리활성 및 세포독성을 측정하여 기능성을 평가하는 단계를 통하여 달성하였다.

발명의 효과

[0008] 본 발명은 엄나무 2차순을 소재로하는 항산화 및 항염 기능성 차(tea)를 제공하는 뛰어난 효과가 있다.

도면의 간단한 설명

[0009] 도 1은 본 발명의 실시예에 따른 엄나무순 2차순 차의 제조방법을 도시한 블록 다이어그램이다.

도 2는 본 발명의 실시예에 따른 엄나무순 2차순 차의 DPPH radical 소거능을 보인 그래프이다.

도 3은 본 발명의 실시예에 따른 엄나무순 2차순 차의 MTT assay 세포독성능을 보인 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0010] 본 발명에 있어서 엄나무순 차를 제조하기 위하여 사용한 재료 중 엄나무순은 2011년 5월 하순 경상북도 상주시 소재 농가에서 재배된 엄나무 햇순인 1차순 수확 후 발생되는 2차순을 사용하였다.

[0011] 이하, 본 발명을 실시예에 따라 더욱 상세하게 설명한다. 그러나 하기 실시예는 본 발명을 예시하기 위한 것에 불과하므로 본 발명의 권리범위를 한정하는 것으로 의도되지는 않는다.

[0012] **<실시예> 본 발명 엄나무순 차 제조**

[0013] 엄나무 2차순은 80℃에서 건조하고 이 건조물을 100℃에서 1분간 수증기로 증자한 후 상기 증자물을 80℃에서 재건조한 엄나무 2차순을 사용하였다. 비숙성차인 초청차(덖음차)와 증청차 및 숙성차 제조방법은 도 1에 도시한 바와 같이 실시하여 각 침출차를 제조하였다. 비숙성차는 엄나무 2차순을 초청 및 증청으로 1차적 효소활성을 억제시켜 5분간 유념 후 덖음 및 유념을 반복하여 제조하였다.

[0014] 초청차는 첫 덖음을 250℃에서 5분간 덖음 후 상기에서 얻은 덖음물을 5분간 유념하고 두 번째, 세 번째 덖음은 각각 220℃에서 5분씩 각각 덖고 각각 5분간 유념한 후, 상기 유념물을 네 번째 및 다섯 번째 덖음은 각각 200

℃에서 5분간 덖고 5분간 유념을 하였다. 끝으로 상기에서 얻은 유념물을 최종 80℃에서 40분간 건조하여 본 발명 초청차를 완성하였다.

[0015] 한편, 증청차는 첫 가열을 100℃에서 1분간 수증기로 증자하여 네 번의 덖음과 유념으로 제조하였다. 즉, 수증기로 증자한 후 5분간 유념하고, 상기에서 얻은 유념물을 250℃에서 5분간 첫덖음 후 5분간 유념한 다음 다시 상기 유념물을 두 번째 및 세 번째 2회 덖음은 220℃에서 5분간씩 덖음을 한 다음 5분간 유념하고, 상기에서 얻은 유념물을 또 네 번째 덖음은 200℃에서 5분간 덖은 후 5분간 유념하였다. 마지막으로 상기에서 얻은 유념물을 80℃에서 40분간 건조하여 본발명 증청차를 완성하였다.

[0016] 한편, 숙성차는 엄나무 2차순을 12시간의 위조과정을 거친 후 숙성온도 25℃, 37℃, 50℃에서 각각 자연위조로 각각 12시간씩 숙성하여 마지막에 상기 숙성물을 80℃에서 40분간 건조하여 완성하였다.

[0017] 상기 초청차, 증청차 및 숙성차에서 덖음, 건조, 숙성와 관련한 각 수치들은 다수의 실험결과 기호성을 증대하고 본 발명 목적 달성을 위해 가장 바람직한 임계적 의미를 가진 것임은 자명하다. 이하 동일하다.

[0018] **<실험예 1> 본 발명 엄나무순 차 품질특성 평가**

[0019] (1) 추출물 제조

[0020] 채취한 시료는 수분 약 82.00%인 엄나무 2차순을 다듬어 씻어서 물기를 제거한 후 침출차 제조방법에 따라 제조한 초청차, 증청차 등 비숙성차와 숙성차 시료 50 g에 물 1,000 mL을 넣고, 90℃, 1시간씩 2회 가온추출한 후 여과지(Whatman. No. 1, Whatman International Ltd., Maidstone, England)로 여과하여 55℃에서 감압 농축하여 동결 건조한 시료를 사용하였다. 상기에 설정된 적정온도를 바탕으로 제조된 엄나무 비숙성차의 덖음 횟수를 설정하기 위해 각각의 덖음 횟수에 따른 성분변화를 조사하였으며, 숙성온도에 따른 숙성차의 품질특성을 비교 조사하였다.

[0021] (2) 엄나무순 차의 pH, 수분함량 및 색도 측정

[0022] 실험된 재료의 수분함량은 105℃ 상압가열건조법(HB-502M, Hanbaek scientific Co., Korea)으로 측정하였다. 분말시료 1 g에 증류수 가해 녹인 시료를 이용하여 pH meter(Metrohm 691, Metrohm UK Ltd., Herisau, Switzerland)를 이용하여 측정하였으며, 색도는 시료 추출액을 UV-visible spectrophotometer(UV-1601, Shimadzu Co, Kyoto, Japan)를 이용하여 L, a, b값으로 측정하였으며, 대조군는 증류수의 L, a, b값(100.04, 0.05, -0.11)으로 나타내었다.

[0023] 실험결과, [표 1]에 나타낸 바와 같이 수분함량은 제조방법에 따른 차이보다는 덖음 횟수가 가해질수록 감소하는 경향을 보였으며, 초청차보다 증청차의 함량이 유의적으로 높게 나타났다. 엄나무순 차의 pH 변화는 대조구인 제조 및 건조 전 시료는 pH 6.10, 수증기로 1분간 제조한 시료는 pH 6.20이며, 이를 건조한 시료는 pH 5.87 및 5.92로 낮아졌다. 증청차로 3회 덖음 처리를 한 시료는 pH 6.20로 제조방법에 따른 변화보다는 덖음 횟수를 가할수록 증가하는 경향을 나타냈으며, 증청차로 3회 덖음 처리를 한 시료는 pH 6.27로 가장 높게 나타났다. 엄나무순 차의 경우 덖음 횟수에 따른 변화가 제조 전 시료보다 낮지만 덖음 횟수에 따라 건조한 시료의 pH는 조금씩 증가하는 경향을 보였다. 한편, 엄나무순 숙성차는 엄나무순 2차순을 37℃에서 12시간 숙성시킨 시료는 75.30%로 가장 높았으며, 자연 숙성시킨 엄나무순 시료는 59.10%로 가장 낮았다.

[0024] 또, 본 발명의 제조방법에 따른 엄나무순 차의 색도 변화를 조사한 결과, 대조군인 엄나무 2차순의 제조 및 건조하지 않은 시료의 L, a 및 b값은 77.00, -2.14 및 29.25이었으며, 수증기로 1분간 제조한 시료의 L, a 및 b값은 89.75, -0.74 및 27.63으로 조금 더 선명한 녹색을 나타내었다. L값은 초정차보다 증청차가 유의적으로 높았으며, b값은 초청차는 덖음 횟수가 가해질수록 조금씩 증가하는 경향을 나타냈으나, 반대로 증청차는 감소하는 양상을 보여 첫 제조방법에 따른 색의 변화로 생각된다. 숙성정도를 달리하여 제조한 찻잎을 우린 찻물의 L값은 숙성시간이 길어질수록 현저히 낮아지는 경향을 나타내었다.

【표 1】 엄나무순 차의 수분함량, pH 및 색도 변화

처리방법		수분	pH	색도		
				L	a	b
대조군[1]		81.99±0.04[3]	6.10±0.02	77.00±0.01	-2.10±0.01	29.20±0.01
초청차	0	79.15±0.15	5.87±0.02	80.42±0.01	-4.29±0.03	23.41±0.02
	1st	58.86±0.08	5.92±0.03	85.05±0.01	-2.90±0.02	29.87±0.03
	3rd	31.87±0.04	5.90±0.04	85.53±0.02	-3.29±0.05	27.36±0.02
	5th	14.71±0.12	5.97±0.02	85.62±0.02	-2.94±0.01	28.37±0.03
증청차	0	79.21±0.05	5.92±0.03	87.76±0.01	-5.09±0.01	21.81±0.02
	1st	63.16±0.13	6.07±0.02	86.46±0.02	-4.59±0.01	22.08±0.01
	3rd	35.53±0.07	5.90±0.05	89.10±0.02	-5.01±0.01	20.86±0.02
	5th	23.27±0.13	6.02±0.02	87.77±0.01	-4.98±0.03	20.76±0.02
숙성차	25℃	69.36±0.32	5.98±0.02	41.86±0.02	1.42±0.02	12.16±0.02
	37℃	72.34±0.21	6.18±0.04	39.82±0.05	0.98±0.02	9.77±0.03
	50℃	70.88±1.10	5.32±0.04	40.25±0.02	0.4±0.03	10.53±0.01
	I. W[2]	63.40±0.42	5.93±0.02	37.44±0.04	-1.07±0.02	5.08±0.02

[1]대조군 : 무처리 시료

[2]I. W: 실내 건조

[3]Values are means of triplicate determinations.

[0025]

[0026] **<실험예 2> 본 발명 엄나무순 차의 총 페놀성 화합물 및 총 플라보노이드 측정**

[0027] 상기 시료 2 mL에 50% phenol reagent(Folin-Ciocalteu's reagent) 2 mL 첨가하여 3분 동안 방치한 다음 10% Na_2CO_3 2 mL 첨가하고 진탕한 후 실온에서 30분간 반응시켜 UV-visible spectrophotometer(UV-1601, Shimadzu, Japan)를 이용하여 700 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준물질로 tannic acid(Duksan Pure Chemical Co., Korea)를 사용하여 작성한 표준곡선으로부터 환산하였으며, 대조군는 증류수를 사용하였다. 총 플라보노이드 함량은 상기 시료 추출액 1 mL에 90% diethylene glycol 10 mL과 1 N NaOH 0.75 mL 넣고 30분간 실온에 방치하였다가 UV-spectrophotometer로 흡광도 420 nm에서 측정하였다. 표준곡선은 quercetin(Sigma Co., USA)의 농도를 0-0.5 mg 범위가 되도록 제조하였으며, 검량선으로부터 시료 추출물의 총 플라보노이드 함량을 계산하였다.

[0028] 실험결과, [표 2]에 나타낸 바와 같이 엄나무순 차는 덖음 횟수가 가해질수록 페놀화합물 함량이 증가하는 경향을 보였으나, 증청차보다 초청차의 함량이 미미하게 높게 나타났다. 건조하지 않은 시료는 23.95 mg/g, 수증기로 1분간 증자하여 제조한 시료는 25.15 mg/g이었으나, 건조 후에는 53.95 mg/g 및 55.15 mg/g로 증가하였으며, 3회 덖음까지 서서히 증가하다가 5회 덖음 후에는 조금 감소하였다. 엄나무순 숙성차는 숙성온도에 따른 차이는 미미하였으며, 37℃에서 12시간 숙성한 시료의 총 페놀성 함량이 가장 높았다. 제조 전에 건조한 시료의 총 페놀성 함량은 41.01 mg/g이며, 37에서 숙성한 시료는 44.42 mg/g로 비교적 높았으며, 50에서 숙성한 시료는 38.75 mg/g로 가장 낮게 나타났다.

[0029] 또, 총 플라보노이드 함량은 건조하지 않은 시료는 12.51 mg/g, 수증기로 1분간 제조한 시료는 12.74 mg/g이었으며, 시료를 건조시키거나, 덖음 횟수를 가할수록 플라보노이드 함량이 조금씩 증가하였으며, 증청차로 3회 덖음 처리할 때 22.94 mg/g로 가장 높게 나타났다. 엄나무순 숙성차는 37℃에서 12시간 숙성한 시료가 14.81 mg/g, 자연 숙성한 시료는 8.15 mg/g로 가장 낮게 나타났다.

【표 2】 엄나무순 차의 총 페놀성 화합물 및 총 플라보노이드

(unit: mg/g)

처리방법		총 페놀성 화합물	총 플라보노이드
Control[1]		23.95±0.07[3]	19.25±0.04
초청차	0	53.95±0.14	19.25±0.05
	1st	58.45±0.17	22.28±0.07
	3rd	59.11±0.07	22.65±0.15
	5th	58.15±0.04	22.52±0.14
증청차	0	55.15±0.07	20.07±0.08
	1st	57.78±0.07	22.30±0.13
	3rd	58.63±0.16	22.94±0.06
	5th	58.43±0.05	22.72±0.05
숙성차	25℃	42.94±0.04	11.14±0.07
	37℃	44.42±0.09	14.81±0.04
	50℃	38.75±0.03	11.90±0.09
	I, W[2]	43.90±0.05	8.15±0.03

[1]대조군 : 무처리 시료

[2]I, W: 실내 건조

[3]Values are means of triplicate determinations

[0030]

[0031] **<실험예 3> 본 발명 엄나무순 차의 DPPH radical 소거활성 측정**

[0032] DPPH 0.15 mM을 absolute ethanol 100 mL에 용해한 후, 50% ethanol용액을 대조군으로 하여 517 nm에서 DPPH 용액의 흡광도가 약 1.0이 되도록 희석하여 사용하였다. 상기 제조한 DPPH용액 5 mL과 상기 시료 0.5 mL에 혼합하여 정확히 3분 동안 반응시킨 후 UV-visible spectrophotometer를 이용하여 517 nm에서 흡광도를 측정하여 DPPH radical 이 50% scavenging 되는 농도를 50% radical scavenging activity concentration(RC_{50})으로 나타내었다. 대조군은 ascorbic acid를 사용하였다.

[0033] 실험결과, 도 2에 보는 바와 같이 증청차보다는 초청차가 비교적 높은 DPPH radical 소거활성을 보였으며, 덖음 횟수에 따른 차이는 미미하였다. 엄나무순 차 추출물을 1 mg/mL, 10 mg/mL, 25 mg/mL, 50 mg/mL 및 100 mg/mL로 사용하였을 때, 농도의존적으로 DPPH radical 소거활성이 증가하였으며 엄나무순 초청차보다 증청차의 활성이 다소 높게 나타났다. 엄나무순 차의 DPPH radical 소거활성은 L-ascorbic acid의 DPPH radical 소거능보다 낮은 활성을 보였지만, 덖음 횟수에 따라서는 3회 덖음을 한 엄나무순 증청차의 DPPH radical 소거활성은 25.9%, 36.9%, 48.6%, 55.3% 및 79.2%로 가장 높은 활성을 보였다.

[0034] 또, [표 3] 및 [표 4]에 나타낸 바와 같이 엄나무순 차 추출물 DPPH radical RC_{50}은 엄나무순 증청차로 3회 덖음 처리를 한 시료 43.9 mg/mL을 나타냈다. 엄나무순 숙성차 추출물의 RC_{50}은 37℃에서 숙성한 숙성차가 78.6 mg/mL의 소거활성을 나타내었다.

【표 3】 엄나무순 초청차 및 증청차의 DPPH radical RC_{50}

(unit: mg/mL)

RC_{50}	Control[1)]	0	1st	3rd	5th	Ascorbic acid
초청차	39.5	47.2	46.9	48.1	47.9	8.4
증청차	51.7	44.7	48.2	43.9	48.0	

[1)]대조군 : 무처리 시료

[0035]

【표 4】 엄나무순 숙성차의 DPPH radical RC_{50}

(unit: mg/mL)

Temp. (℃)	Control[1)]	25	37	50	I. W[2)]	Ascorbic acid
발효차	39.5	89.4	78.6	92.5	83.5	8.4

[1)]대조군 : 무처리 시료

[2)]I. W: 실내 건조

[0036]

[0037] **<실험예 4> 본 발명 엄나무순 차의 MTT assay에 대한 세포독성 측정**

[0038] 대식세포인 P388D1 cells을 한국 세포주 은행(KCLB, Seoul)으로부터 분양받아 계대 배양하여 실험에 사용하였으며, MTT를 환원시켜 생성된 formazan crystals를 DMSO로 녹여 15분간 혼합한 ELISA reader(Flurostar optima)를 사용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

[0039] 실험결과, 도 3에 보는 바와 같이 엄나무순 초청차 추출물의 1 mg/mL에서 100.03%, 93.24%, 97.32% 및 102.20%를 보였으나, 5 mg/mL에서는 조금 증가하여 117.46%, 105.48%, 114.47% 및 134.04%의 세포생존율을 나타내었다. 증청차는 1 mg/mL에서 96.52%, 94.00%, 105.83% 및 94.46%의 생존율을 보였으며, 5 mg/mL에서 129.47%, 91.52%, 118.75% 및 90.01%로 농도가 증가할수록 생존율은 대조구와 비슷하거나 조금 높은 경향을 나타내었다. 숙성온도 25℃, 37℃, 50℃에서 자연위조로 각각 제조한 엄나무순 숙성차 추출물의 0.1 mg/mL에서 96.90%, 93.44%, 96.81% 및 103.41%의 세포생존율을 보였다. 5 mg/mL에서는 129.80%, 94.29%, 95.25% 및 95.53%로 37℃에서 숙성한 시료의 세포생존율이 비교적 낮게 나타났다.

[0040] **<실험예 5> 본 발명 엄나무순 차의 NO(nitric oxide) 생성 측정**

[0041] NO의 기질인 L-알기닌은 L-시트롤과 NO로 변하는데, 이는 빠르게 안정된 이산화질소, 아질산염, 질산염으로 변하므로, Griess reagent(1% sulfanilamide in 5% phosphoic acid 50 L 및 0.1% naphthylethylenediamine dihydrochloride 50 L)는 아질산염과 화학 반응하여 보라색의 아조염을 형성하고 이것은 NO의 농도와 일치하기 때문에, 아조염의 농도로부터 아질산염의 농도를 측정하기 위해 Griess reagent system(Wang, S. et al., Inhibition of vascular smooth muscle cell proliferation by serum from rat treated orally with *Gastrodia* and *Uncaria* decoction, a traditional chinese formulation, 2007, *J. Ethnopharmacol*, 114, 458-462)을 이용하여 다음과 같이 NO의 생성정도를 측정하였다. 대식세포인 P388D1 cell을 1×10^5 cells/mL로 맞추고 96 well plate에 LPS를 500 g/mL씩 첨가하여 37℃, 5% CO_2 incubator에서 24시간 배양하였다. 추출물을 0 mg/mL, 0.1 mg/mL, 0.5 mg/mL, 1 mg/mL, 2 mg/mL 및 5 mg/mL가 되도록 처리하여 24시간 배양한 후 배양액에 NED solution(0.1% naphthylethylenediamine dihydrochloride in water) 50 L와 sulfanilamide solution(1%

sulfanilamide in 5% phosphoric acid) 50 L을 처리하여 15분간 반응시킨 후 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 항염증 활성은 LPS만 처리한 대조군과 비교하여 NO의 생성량을 다음 공식으로 계산되었다.

[0042]

$$\text{Production of Nitric oxide(\%)} = 100 \times \frac{\text{시료첨가군 흡광도}}{\text{대조군 흡광도}}$$

[0043] 실험결과, [표 5]에 나타낸 바와 같이 대식세포에 LPS만 처리한 구의 NO 생성능을 100%로 보았을 때, 엄나무순 차 추출물은 처리농도가 높아질수록 NO 생성능이 감소하는 경향을 보였다. 엄나무순 증청차의 3회 덖음 처리를 한 추출물의 5 mg/mL에서 49.94%로 가장 낮은 생성능을 나타내었다. 엄나무순 차 추출물은 LPS에 의해 대식세포에 생성된 NO의 생성양이 감소되어 생성저해능을 확인할 수 있었다.

【표 5】 엄나무순 차의 NO(nitric oxide)생성 측정

(unit: %)

처리방법		함량 (mg/mL)					
		0[2]	0.1	0.5	1	2	5
초청차	0	100	96.25±0.21[3]	85.20±1.53	76.52±0.75	59.12±1.75	54.27±0.95
	1st	100	94.76±0.57	86.97±1.75	75.88±0.95	65.14±1.21	59.73±0.35
	3rd	100	95.43±1.21	87.31±0.57	74.00±1.51	62.92±1.35	55.61±1.51
	5th	100	93.76±0.54	83.06±1.95	74.46±0.65	61.09±1.95	56.16±1.35
증청차	0	100	97.35±1.75	80.78±0.75	73.91±1.21	52.70±1.53	48.85±1.75
	1st	100	97.94±1.53	80.72±1.21	75.80±0.75	56.85±2.15	51.59±1.53
	3rd	100	97.13±1.21	77.93±0.51	74.78±2.15	52.57±1.75	49.94±0.95
	5th	100	97.15±1.36	79.47±0.95	76.93±1.59	57.03±1.02	50.52±0.75
숙성차	25℃	100	97.57±1.61	83.56±2.37	72.60±2.65	56.07±0.75	44.07±1.99
	37℃	100	96.55±1.54	81.53±0.97	71.17±1.35	57.17±0.97	43.15±1.35
	50℃	100	98.84±1.15	82.99±2.12	75.37±1.51	59.98±1.31	48.29±1.15
	I. W[1]	100	98.14±1.75	79.84±1.51	70.85±1.97	58.62±1.53	43.80±1.75

[1] I. W: 실내 건조

[2] 0: Not treated with *Kalopanax pictus* tea

[3] Values are means of triplicate determinations

[0044]

[0045] **<실험예 6> 본 발명 엄나무순 차 PGE_2(prostaglandin E_2)의 측정**

[0046] goat anti-mouse로 coating된 96 well plate에 각각의 P388D1 cell 배양액을 100 ㎍/L씩 분주한다. 상기 분주액에 primary antibody solution 50 ㎍/L와 PGE_2 conjugate 50 ㎍/L을 첨가하여 4℃에서 암소에서 24시간 배양시켰다. 상기 배양액에 Ellman's reagent(5-5'-dithio-bis-(2-nitrobenzoic acid), acetylthiocholine)를 200 ㎍/L 첨가하여 30분간 반응시킨 후, 100 ㎍/L의 stop solution을 처리하고 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

[0047] 실험결과, [표 6]에 나타낸 바와 같이 LPS는 염증반응 매개물질인 PGE_2의 생성을 유의성 있게 증가시켰다. 엄나무순 차는 초청차보다 증청차의 PGE_2 생성 억제효과가 높았으며, 처리농도 1 mg/mL에서 억제능이 가장 높았다. 그 이상의 처리농도에서는 조금씩 감소하는 경향을 나타내었다. 엄나무순 숙성차 추출물의 1 mg/mL에서 73.25%, 68.44%, 70.31% 및 69.25%를 나타냈으나, 5 mg/mL에서는 78.30%, 71.34%, 72.18% 및 73.15%의 PGE_2 생성량을 보여, 37℃에서 숙성한 시료의 PGE_2 생성량이 조금 낮았다.

【표 6】 엄나무순 차의 PGE_2(prostaglandin E_2) 측정

(unit: %)

처리방법		함량 (mg/mL)					
		0[2]	0.1	0.5	1	2	5
초청차	0	100	98.50±1.21[3]	89.79±1.39	68.19±1.21	80.53±1.54	85.35±0.95
	1st	100	94.56±1.02	76.02±1.75	69.14±0.54	73.64±0.89	77.74±0.59
	3rd	100	93.64±1.75	66.09±0.95	47.39±0.68	69.56±1.57	69.75±1.35
	5th	100	95.53±0.75	81.76±0.75	64.56±0.95	71.33±0.59	72.98±1.95
증정차	0	100	97.58±1.95	77.20±1.60	72.14±1.57	74.56±0.95	75.21±1.75
	1st	100	91.74±1.54	84.14±1.21	68.75±1.35	73.41±1.35	75.92±1.32
	3rd	100	89.79±0.95	76.14±0.95	41.87±2.51	54.85±1.75	61.18±1.99
	5th	100	91.18±0.21	75.951.63	61.18±1.39	63.18±1.35	63.16±1.35
숙성차	25℃	100	98.79±1.95	91.52±1.95	73.25±1.65	77.50±1.35	78.30±1.19
	37℃	100	98.55±2.35	92.24±2.37	68.44±2.75	71.46±1.41	71.34±1.57
	50℃	100	99.18±1.92	95.55±1.21	70.31±1.83	71.86±1.39	72.18±1.75
	I. W[1]	100	98.79±2.21	93.60±2.51	69.25±1.39	70.17±1.53	73.15±1.75

[1] I. W: 실내 건조

[2] 0: Not treated with *Kalopanax pictus* tea

[3] Values are means of triplicate determinations

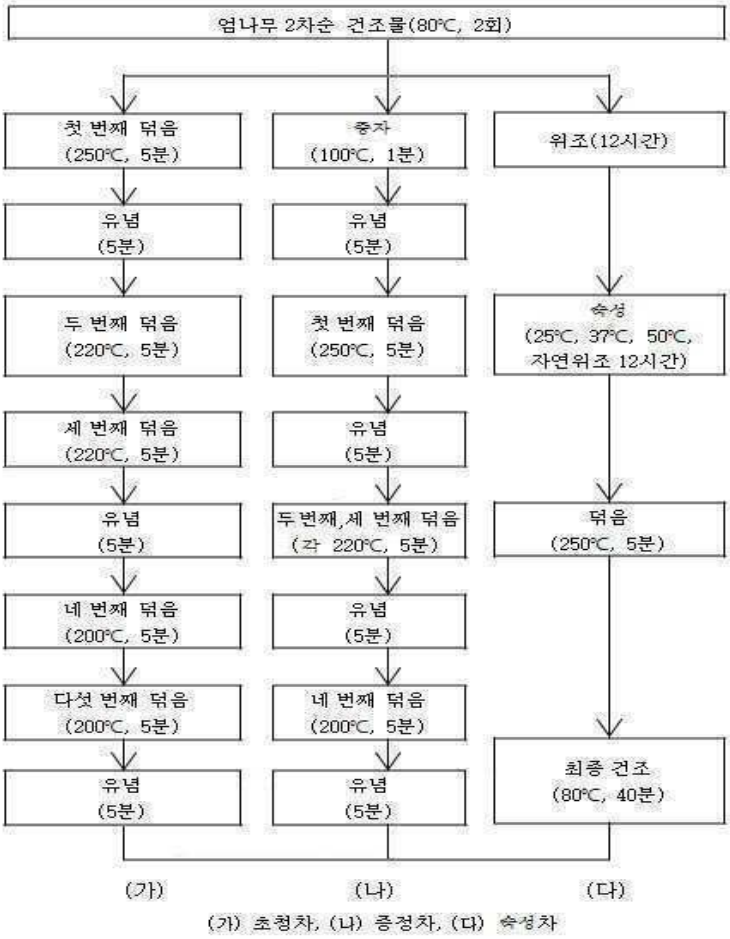
[0048]

산업상 이용가능성

[0049] 본 발명은 다양한 기능성을 갖는 엄나무순 차를 제공하는 뛰어난 효과가 있으므로 식품 산업상 매우 유용한 발명인 것이다.

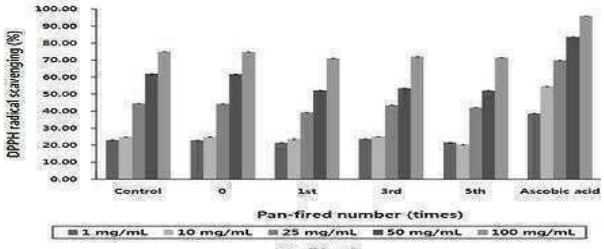
도면

도면1

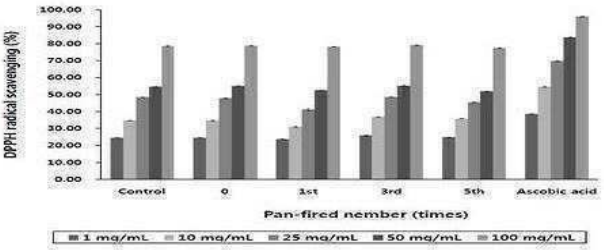


엄나무순 비효소 및 숙성처리 한 차의 제조방법

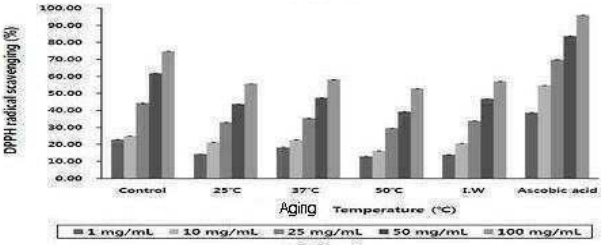
도면2



초청차



증청차

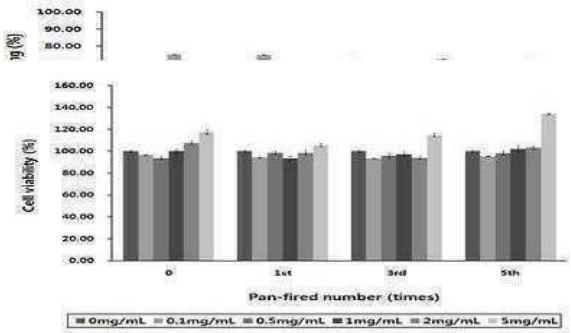


숙성차

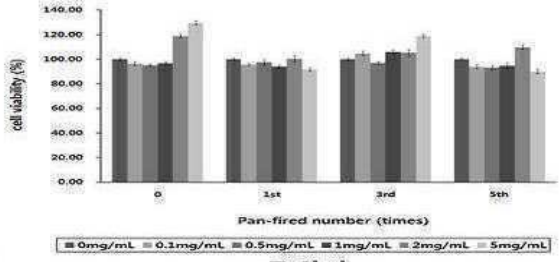
대조군 : 무처리 시료, I. W: 실내 건조

엄나무순 차 DPPH radical 소거활성 측정

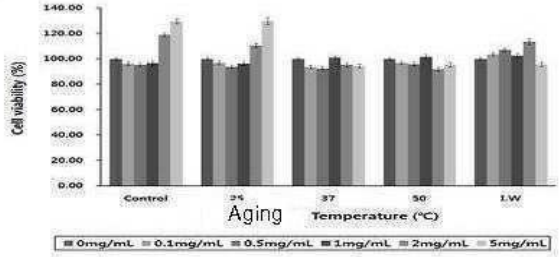
도면3



초청차



중청차



숙성차

대조군 : 무처리 시료, I. W: 실내 건조