



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2009-0132899  
(43) 공개일자 2009년12월31일

(51) Int. Cl.

A61K 36/15 (2006.01) A61P 7/02 (2006.01)  
A61P 3/06 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2008-0059092

(22) 출원일자 2008년06월23일

심사청구일자 2008년09월23일

(71) 출원인

조선대학교산학협력단

광주광역시 동구 서석동 375, 조선대학교 산학기  
획팀

(72) 발명자

정현숙

광주광역시 북구 일곡동 롯데아파트 107동 404호

황인덕

광주광역시 광산구 신동 302

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

황주명, 성정현, 위병갑

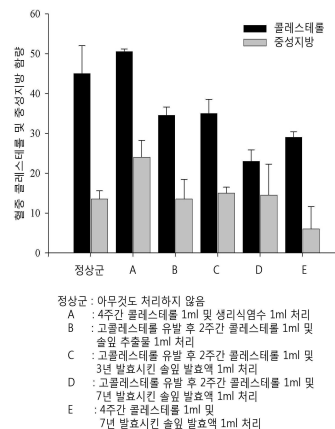
전체 청구항 수 : 총 7 항

(54) 혈행개선용 솔잎 발효액

(57) 요약

본 발명은 혈행개선용 솔잎 발효액에 관한 것이다. 보다 구체적으로, 본 발명은 혈중 콜레스테롤, 중성지방 및 혈전 저하 기능을 갖는 솔잎 발효액에 관한 것이다. 본 발명에 따른 솔잎 발효액은 솔잎으로부터 추출한 추출물을 일정 기간 이상 발효시켜 수득한 것으로써 혈중에 있는 콜레스테롤 및 중성지방의 함량을 감소시키는 효과뿐만 아니라 혈전을 용해시키는 효과가 있다. 따라서 본 발명의 솔잎 발효액은 혈중의 높은 콜레스테롤 함량 및 혈전의 축적으로 인해 야기되는 고지혈증, 고혈압 및 동맥경화 등과 같은 심혈관계 질환을 효과적으로 예방하고 건강을 증진시키기 위한 건강보조 식품으로 유용하게 사용될 수 있다.

대표도 - 도1



(72) 발명자

**박재영**

광주광역시 남구 월산5동 광남연립 201호

**정주영**

광주광역시 동구 학1동 631-9번지

**차후덕**

전라남도 장성군 북이면 수성리 505-1

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 S5207D04600

부처명 중소기업청

연구사업명 유니비즈(산학협력실 지원사업)사업

연구과제명 술잎발효액의 혈행개선을 위한 기능성강화 및 산업화

주관기관 조선대학교산학협력단

연구기간 2006년 8월 1일 ~ 2008년 3월 31일

---

## 특허청구의 범위

### 청구항 1

술잎 추출액을 저장 발효시켜 페놀 화합물이 증가되는 것을 특징으로 하는 콜레스테롤 및 혈전 저하용 술잎 발효액.

### 청구항 2

제1항에 있어서, 상기 술잎 발효액은 1년 ~ 10년 동안 발효시켜 수득한 것임을 특징으로 하는 콜레스테롤 및 혈전 저하용 술잎 발효액.

### 청구항 3

제1항에 있어서, 상기 페놀 화합물은 1,8-시네올/유칼립톨(1,8-cineole/eucalyptol), 2-메틸-1-부탄올(2-methyl-1-butanol), 3-메틸-1-부탄올(3-methyl-1-butanol), 5-이소피레닐-2-2-메틸-2비닐테트라히드로푸란(5-isopropenyl-2-methyl-2-vinyltetrahydrofuran), 비시클로[2,2,1]헵탄-2-올(bicyclo[2,2,1]heptan-2-ol), 캄퍼(camphore), 허브옥사이드 세컨드 이소머(herboxide second isomer), 헥사노익산(hexanoic acid), 에틸 에스테르(ethyl ester) 및 이소시네올(isocineole)로 이루어진 군 중에서 선택되는 것을 특징으로 하는 콜레스테롤 및 혈전 저하용 술잎 발효액.

### 청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항의 술잎 발효액을 유효성분으로 함유하는 심혈관계 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

### 청구항 5

제4항에 있어서, 상기 심혈관계 질환은 고혈압, 고지혈증, 뇌경색, 노인성 치매, 동맥경화증, 부정맥, 협심증, 관상동맥 질환, 맥혈전증 및 심근경색으로 이루어진 군 중에서 선택되는 것임을 특징으로 하는 약학적 조성물.

### 청구항 6

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항의 술잎 발효액을 함유하는 건강식품.

### 청구항 7

제6항에 있어서, 상기 건강식품은 차, 생식, 육류, 소세지, 빵, 초코렛, 캔디류, 스낵류, 과자류, 피자, 라면, 면류, 껌류, 낙농제품, 스프, 음료수, 드링크제, 알콜음료 및 비타민 복합제로 이루어진 군 중에서 선택되는 것을 특징으로 하는 건강식품.

## 명세서

### 발명의 상세한 설명

#### 기술분야

<1> 본 발명은 혈행개선용 술잎 발효액에 관한 것이다. 보다 구체적으로, 본 발명은 혈중 콜레스테롤, 중성지방 및 혈전 저하 기능을 갖는 술잎 발효액에 관한 것이다.

#### 배경기술

<2> 소나무 잎으로도 불리는 술잎은 예로부터 건위 및 보혈작용이 있으며 중풍, 당뇨병, 관절염, 부종, 근육통 및 감기 등과 같은 질환을 예방하는 효능이 있는 것으로 알려져 왔고(최신동의보감, 1983, 960), 특히 중국에서는 오랫동안 술잎이 일부 약제의 보충 재료로서 사용될 수 있다는 견해가 있어 왔다. 예컨대, 중국 약초 대사전에 수집된 치료 방법 중에는 술잎이 상처, 부종, 습진, 만성 기관지염 및 불면증을 치료하거나 또는 인플루엔자 및 유행성 뇌염을 예방할 수 있는 효과가 있어서 치료제의 한 성분으로 사용되는 예가 개시된 바 있다.

<3> 또한, 최근에는 솔잎에 존재하는 각종 생리활성 물질들에 대한 연구가 활발히 진행되고 있는데 이러한 연구 결과, 솔잎에 함유된 테르펜 성분은 항생, 항암, 호르몬 분비촉진 및 항산화 등과 같은 독특한 약리 작용 효과가 있다는 것이 밝혀졌으며, 비타민 C 성분은 혈액정화 및 항괴혈병성 효과가 있고, 비타민 A 성분은 점막을 튼튼히 하는 기능을 하여 야맹증 치료에 효과가 있으며, 수지 및 탄닌 성분은 소화기의 기능을 돕는 효과가 있음이 밝혀졌다. 또한, 알콜 및 에스테르는 체내의 노폐물을 배출시켜 신진대사를 촉진시키고, 아피에틴산 성분은 폐결핵이나 늑막염 및 위장질환에 효능이 있음이 밝혀진 바 있다.

<4> 그러나 이렇게 유용한 성분들을 함유하고 있는 솔잎을 지금까지 주로 선식이나 차의 형태로만 이용되고 있어 솔잎을 이용한 보다 다양한 제품들의 개발이 요구되고 있는 실정이다.

<5> 한편, 대다수의 사람들은 인스턴트 음식, 햄버거 및 피자 등 서양식 식문화와 고콜레스테롤 음식에 많이 노출되어 있어 다량의 콜레스테롤을 섭취하게 되면 인체의 콜레스테롤 대사 균형이 파괴되어 콜레스테롤이 혈중 내에 축적되고 이로 인해 동맥 경화, 심장 질환, 고혈압, 뇌졸중 및 심부전과 같은 심혈관계 질환이 발생하게 된다. 또한, 혈관 내의 혈액이 응고되어 생기는 혈전은 혈액 점도 증가의 원인이 되어 고콜레스테롤과 같은 심혈관계 질환을 유발하게 되고 특히 노인성 치매와 중풍의 원인이 되기도 한다. 또한 최근에는 고콜레스테롤 및 혈전으로 인한 심혈관계 환자들이 급증하고 있어 이를 예방 및 치료하기 위한 치료제의 개발이 시급한 실정이다.

<6> 이에 심혈관계 질환들을 치료할 수 있는 많은 치료제들이 개발되기는 하였으나, 화학약품에 의한 치료제는 각종 부작용을 초래하고 그 비용 또한 고가인 문제점이 있어서 이러한 약제를 이용하여 치료하는 방법에서 탈피하여 지속적인 치료와 예방효과를 동시에 나타낼 수 있는 물질을 천연물로부터 수득하려는 연구가 활발히 진행되고 있다. 따라서 현재까지 각종 천연물을 이용한 약제 및 건강식품들이 개발되었는데, 이와 관련된 종래 기술들을 살펴보면, 대한민국 등록특허 제0319397호에는 천연식물소재 추출물을 이용한 항혈전 및 고지혈증 억제용 조성물이 개시된 바 있고, 대한민국 등록특허 0449886호에는 혈압강하, 콜레스테롤 억제 및 혈전 저하 효과가 우수한 버섯유산발효액이 개시된 바 있으며, 대한민국 등록특허 제0345040호에는 홍삼복합물을 함유한 혈액순환개선제 및 그 제조방법이 개시된 바 있다. 그러나 상기 종래기술에서 개시된 천연물은 콜레스테롤 및 혈전 저하 효과가 낮은 단점이 있어서, 보다 우수한 효과를 가진 다른 천연물을 이용한 제품 개발이 시급한 실정이다.

<7> 이에 본 발명자들은 혈행개선을 위한 새로운 천연물을 연구하던 중 솔잎을 일정 기간 동안 발효시켜 수득한 솔잎 발효액이 혈중의 콜레스테롤 및 중성지방의 함량을 감소시키는 효과가 있을 뿐만 아니라 혈전을 용해시키는 효과가 매우 우수함을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

## 발명의 내용

### 해결 하고자하는 과제

<8> 따라서 본 발명의 목적은 솔잎 추출액을 저장 발효시켜 페놀 화합물이 증가되는 것을 특징으로 하는 콜레스테롤 및 혈전 저하용 솔잎 발효액을 제공하는 것이다.

<9> 본 발명의 다른 목적은 상기 솔잎 발효액을 유효성분으로 함유하는 심혈관계 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.

<10> 본 발명의 다른 목적은 상기 솔잎 발효액을 유효성분으로 함유하는 콜레스테롤 및 혈전 저하제를 제공하는 것이다.

<11> 또한 본 발명의 다른 목적은 상기 솔잎 발효액을 유효성분으로 함유하는 건강식품을 제공하는 것이다.

### 과제 해결수단

<12> 상기와 같은 본 발명의 목적을 달성하기 위해서, 본 발명은 솔잎 추출액을 저장 발효시켜 페놀 화합물이 증가되는 것을 특징으로 하는 콜레스테롤 및 혈전 저하용 솔잎 발효액을 제공한다.

<13> 또한 본 발명은 상기 솔잎 발효액을 유효성분으로 함유하는 심혈관계 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

<14> 또한 본 발명은 상기 솔잎 발효액을 유효성분으로 함유하는 콜레스테롤 및 혈전 저하제를 제공한다.

<15> 나아가 본 발명은 상기 솔잎 발효액을 유효성분으로 함유하는 건강식품을 제공한다.

## 효 과

<16> 본 발명에 따른 솔잎 발효액은 솔잎으로부터 추출한 추출물을 일정 기간 이상 발효시켜 수득한 것으로써 혈중에 있는 콜레스테롤 및 중성지방의 함량을 감소시키는 효과뿐만 아니라 혈전을 용해시키는 효과가 있다. 따라서 본 발명의 솔잎 발효액은 혈중의 높은 콜레스테롤 함량 및 혈전의 축적으로 인해 야기되는 고지혈증, 고혈압 및 동맥경화 등과 같은 심혈관계 질환을 효과적으로 예방하고 건강을 증진시키기 위한 건강보조 식품으로 유용하게 사용될 수 있다.

## 발명의 실시를 위한 구체적인 내용

<17> 본 발명은 솔잎으로부터 추출한 추출액을 저장 발효시킴으로써 페놀 화합물이 증가된 콜레스테롤 및 혈전 저하용 솔잎 발효액을 제공함에 특징이 있다.

<18> 본 발명에 따른 솔잎 발효액을 수득하기 위한 솔잎 추출물은 아황산가스의 오염을 최소화하기 위해 해발 350m 이상에서 자란 청정지역의 건강한 소나무를 선택하여 영양상태가 좋은 가지부분을 채취한 후 싱싱하고 푸른 솔잎만을 선별한 다음 통상적인 방법을 통해 추출하여 수득할 수 있다. 바람직하게는 물 추출방법, 물-알코올 추출방법 및 알코올 추출방법을 사용할 수 있다.

<19> 상기 솔잎 추출물의 발효는 일반적인 자연 발효 또는 발효조 탱크를 이용한 발효일 수 있으며, 바람직하게는 자연 저장 발효일 수 있고, 본 발명에 따른 솔잎 발효액은 1년 ~ 10년 동안 발효시켜 수득한 것을 사용할 수 있다.

<20> 또한, 페놀 화합물은 일반적으로 식물 화합물 중의 하나로써 항산화 효과, 항암 효과, 시력개선 효과, 혈관보호 효과, 항게양 효과, 동맥경화 예방효과, 혈전 예방 효과 및 콜레스테롤 저하 효과 등이 있는 것으로 알려져 있으며, 본 발명에 따른 솔잎 발효액에 함유된 상기 페놀 화합물은 1,8-시네올/유칼립톨(1,8-cineole/eucalyptol), 2-메틸-1-부탄올(2-methyl-1-butanol), 3-메틸-1-부탄올(3-methyl-1-butanol), 5-이소피레닐-2-2-메틸-2비닐테트라하이드로푸란(5-isoprenyl-2-2-methyl-2vinyltetrahydrofuran), 비시클로[2,2,1]헵탄-2-올(bicyclo[2,2,1]heptan-2-ol), 캄페(camphore), 허브옥사이드 세컨드 이소머(herboxide second isomer), 헥사노익산, 에틸 에스테르(hexanoic acid, ethyl ester) 및 이소시네올(isocineole)일 수 있다.

<21> 한편, 본 발명에 따른 솔잎 발효액은 혈중의 콜레스테롤 및 중성지방을 감소시키는 효과가 뛰어나다.

<22> 일반적으로 콜레스테롤은 세포를 구성하는 필수성분으로 세포의 성장, 분화 및 발육에 중요한 역할을 담당하고 있으나 이를 과다 섭취하여 혈관에 축적될 때에는 동맥경화, 고지혈증 및 협심증 등의 심각한 심혈관계 질환을 초래하게 된다.

<23> 따라서 본 발명자들은 본 발명의 솔잎 발효액이 이러한 심혈관계 질환을 예방할 수 있는 효과가 있는지 확인하기 위하여, 본 발명의 일실시예에서는 쥐에게 고콜레스테롤을 유도한 다음, 본 발명에 따른 솔잎 발효액을 경구 투여하여 솔잎 발효액이 혈중 콜레스테롤 및 중성지방에 미치는 영향을 조사하였다. 그 결과, 솔잎 발효액을 투여하지 않은 쥐에 비해 솔잎 발효액을 투여한 쥐에서 혈중 콜레스테롤 및 중성지방 함량이 감소되는 것을 확인할 수 있었으며(도 1 참조), 특히 3년 저장 발효시킨 발효액 보다 7년 저장 발효시킨 발효액이 더 월등하게 혈중 콜레스테롤 및 중성지방 함량을 감소시키는 것으로 나타났다(도 2a 내지 2b 참조).

<24> 또한, 본 발명에 따른 솔잎 발효액은 혈전을 용해시키는 효과가 뛰어나다. 혈관이 손상을 받아 출혈이 일어나게 되면 혈액이 응고되는 체내 방어 시스템이 작동하게 되는데, 이러한 과정은 활성화된 트롬빈(thrombin)에 의해 피브리노겐(fibrinogen)이 피브린(fibrin)으로 전환됨으로써 유도된다. 이렇게 생성된 혈전(fibrin clots)은 상처 회복 후 플라즈민과 같은 혈전용해효소(fibrinolytic enzyme)에 의해 용해되는데, 만약 생성된 혈전이 체내에 과도하게 축적되거나 혈전 용해 기작이 원활하게 작동하지 못할 경우 혈전증(thrombosis)을 유발하여 인체에 치명적인 손상을 줄 수도 있다. 따라서 생체 내에서의 혈액은 응고와 용해작용이 항상 평형을 이루고 있어, 정상적인 상태에서는 출혈이나 혈전 등에 의해 흐름이 방해 받지 않아야 한다. 그러나 여러 가지 요인으로 인해 이러한 평형상태가 깨지게 되면 혈관의 흐름이 원활치 못하게 되고 이로 인해 심혈관계 질환이 발생하게 된다.

<25> 따라서 본 발명자들은 본 발명의 솔잎 발효액이 혈전을 분해하는 활성이 있는지를 확인하기 위하여 피브린 아가로스 플레이트(fibrin agarose plate)를 이용하여 혈전 용해 실험을 수행하였다. 그 결과, 본 발명의

술잎 발효액이 피브린을 용해하여 혈전을 분해하는 것으로 알려진 플라즈민(plasmin) 보다도 혈전 분해 활성이 더 월등한 것을 확인할 수 있었고(도 3a 참조), 또한 술잎 발효액의 발효 기간과 반응 시간이 길어질수록 분해 활성이 더 우수한 것을 확인할 수 있었다(도 3b 참조).

<26> 나아가 본 발명자들은 본 발명에 따른 술잎 발효액의 혈전 용해 활성이 발효에 의한 것인지를 확인하기 위하여, 발효가 진행되지 않은 술잎 추출물 및 발효가 진행된 술잎 발효액을 대상으로 혈전 용해 실험을 수행하였다. 그 결과, 발효가 진행되지 않은 술잎 추출물의 경우 혈전 분해 활성을 확인할 수 없었던 반면 발효가 진행된 술잎 발효액에서만 혈전 분해 활성을 확인할 수 있었다(도 4 참조). 따라서 상기 결과로부터 술잎 추출물의 혈전 분해 활성은 발효가 매우 중요하다는 것을 알 수 있었다.

<27> 따라서 본 발명은 본 발명의 술잎 발효액을 유효성분으로 함유하는 심혈관계 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

<28> 또한 본 발명은 본 발명의 술잎 발효액을 유효성분으로 함유하는 콜레스테롤 및 혈전 저하제를 제공한다.

<29> 상기 심혈관계 질환은 콜레스테롤 및 중성지방이 혈관에 축적되어 발생하는 질환 또는 혈전에 의해 발생하는 질환일 수 있으며, 상기 심혈관계 질환의 예로는 이에 한정되지는 않으나, 고혈압, 고지혈증, 뇌경색, 노인성 치매, 동맥경화증, 부정맥, 협심증, 관상동맥 질환, 맥혈전증 및 심근경색 등이 포함될 수 있다.

<30> 본 발명에 따른 약학적 조성물은 본 발명의 술잎 발효액을 단독으로 함유하거나 또는 하나 이상의 약학적으로 허용되는 담체, 부형제 또는 희석제를 추가로 함유할 수 있다. 상기에서 ‘약학적으로 허용되는이란 생리학적으로 허용되고 인간에게 투여될 때, 통상적으로 알레르기 반응 또는 이와 유사한 반응을 일으키지 않는 조성물을 말한다.

<31> 본 발명의 심혈관계 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물은 포유동물에 어떠한 방법으로도 투여할 수 있으며, 바람직하게는 경구 투여할 수 있다.

<32> 또한 본 발명의 약학적 조성물은 경구 투여용 제제로 제형화 할 수 있으며, 경구 투여용 제제의 경우에 본 발명의 조성물은 분말, 과립, 정제, 환제, 당의정제, 캡슐제, 액제, 겔제, 시럽제, 슬러리제, 현탁액 등으로 당업계에 공지된 방법을 이용하여 제형화될 수 있다. 예를 들어, 경구용 제제는 활성성분을 고체 부형제와 배합한 다음 이를 분쇄하고 적합한 보조제를 첨가한 후 과립 혼합물로 가공함으로써 정제 또는 당의정제를 수득할 수 있다. 적합한 부형제의 예로는 락토즈, 텍스트로즈, 수크로즈, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨 및 말티톨 등을 포함하는 당류와 옥수수 전분, 밀 전분, 쌀 전분 및 감자 전분 등을 포함하는 전분류, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 나트륨 카복시메틸셀룰로오스 및 하이드록시프로필메틸-셀룰로오스 등을 포함하는 셀룰로오스류, 젤라틴, 폴리비닐피롤리돈 등과 같은 충전제가 포함될 수 있다. 또한, 경우에 따라 가교결합 폴리비닐피롤리돈, 한천, 알긴산 또는 나트륨 알기네이트 등을 붕해제로 첨가할 수 있다. 나아가, 본 발명의 약학적 조성물은 향응집제, 윤활제, 습윤제, 향료, 유화제 및 방부제 등을 추가로 포함할 수 있다.

<33> 본 발명에 따른 술잎 발효액의 총 유효량은 단일 투여량(single dose)으로 환자에게 투여될 수 있으며, 다중 투여량(multiple dose)으로 장기간 투여되는 분할 치료 방법(fractionated treatment protocol)에 의해 투여될 수 있다. 본 발명의 약학적 조성물은 심혈관계 질환의 정도에 따라 유효성분의 함량을 달리할 수 있다. 바람직하게 본 발명의 술잎 발효액의 바람직한 전체 용량은 1일당 환자 체중 1 kg 당 약 100  $\mu$ g 내지 1 mg, 가장 바람직하게는 150  $\mu$ g 내지 1.5 mg일 수 있다. 그러나 투여되는 상기 술잎 발효액의 양은 약학적 조성물의 투여 경로 및 치료 횟수뿐만 아니라 환자의 연령, 체중, 건강 상태, 성별, 질환의 중증도, 식이 및 배설율등 다양한 요인들을 고려하여 환자에 대한 유효 투여량이 결정되는 것이므로, 이러한 점을 고려할 때 당 분야의 통상적인 지식을 가진 자라면 상기 술잎 발효액의 심혈관계 질환의 예방 또는 치료제로서의 특정한 용도에 따른 적절한 유효 투여량을 결정할 수 있을 것이다. 본 발명에 따른 약학적 조성물은 본 발명의 효과를 보이는 한 그 제형, 투여 경로 및 투여 방법에 특별히 제한되지 아니한다.

<34> 나아가, 본 발명은 본 발명에 따른 술잎 발효액을 유효성분으로 함유하는 건강 보조 식품을 제공한다.

<35> 본 발명의 술잎 발효액은 혈중의 콜레스테롤 및 중성지방 함량을 저하시키는 효과뿐만 아니라 혈전을 용해시키는 효과가 우수하여 이를 이용한 혈행개선 및 건강을 증진시키기 위한 건강보조 식품을 제조할 수 있다. 본 발명의 술잎 발효액을 이용하여 건강보조 식품을 제조할 경우, 상기 술잎 발효액을 그대로 첨가하거나 다른 식품 또는 식품 성분과 함께 사용될 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다. 유효 성분

의 혼합량은 그의 사용 목적(예방, 건강 또는 치료적 처치)에 따라 적합하게 결정될 수 있다.

<36> 상기 식품의 종류는 특별히 제한되지 않으며, 상기 본 발명의 솔잎 발효액을 첨가할 수 있는 식품의 예로는 생식, 육류, 소세지, 빵, 초코렛, 캔디류, 스넥류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류를 포함한 낙농제품, 각종 스프, 음료수, 차, 드링크, 알콜 음료 및 비타민 복합제 등이 있으며, 통상적인 의미에서의 건강식품을 모두 포함한다.

<37> 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명하기로 한다. 그러나 이들 실시예는 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로서, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

#### <38> <실시예 1>

#### <39> 솔잎 발효액의 제조

<40> 본 발명에 따른 솔잎 발효액을 제조하기 위한 솔잎은 아황산가스의 오염을 최소화하기 위해 해발 350 m 이상에서 자란 청정지역의 건강한 소나무를 선택하여 영양상태가 좋은 가지부분을 채취한 후 싱싱하고 푸른 잎만 선별하였다. 상기 선별된 솔잎은 솔잎의 불순물이 녹아 나오도록 자외선 살균기로 살균된 맑은 물에 담근 후 맑은 물이 나올때까지 3-4회 세척하였다. 탈수된 솔잎을 녹즙기(인화정밀, 삼광무력공사, 명신상사)로 분쇄하여 착즙하였다. 본 발명에서 사용한 녹즙기는 재래식 녹즙기에 비해 성능이 향상된 것으로 분쇄기와 압착기를 따로 사용하고, 착즙시 전력 소모가 적으며, 감속기어를 사용하기 때문에 소음과 진동이 적고, 작업 과정이 단조로워 영양소의 손실이 적고, 부품이 세분화되어 있어 수리비용이 적게 들며, 착즙액의 비율이 재래식보다 약 3배 이상 높은 장점이 있다. 상기 솔잎의 분쇄 과정 중에는 열이 발생하지 않도록 압착점이 정밀하도록 하였다. 상기 분쇄기로 착즙된 솔즙은 4℃에서 3시간 동안 방치하여 섬유소층과 상등액이 분리되도록 저온 분리하였고, 상기 상등액만을 수득하여 상온에서 발효시킴으로써 솔잎 발효액을 제조하였다. 이후, 하기 실험에서 사용되는 솔잎 발효액은 상기 기술된 방법으로 제조된 솔잎 발효액을 1년, 3년 및 7년 동안 각각 발효시켜 수득된 것을 사용하였다.

#### <41> <실시예 2>

#### <42> 본 발명에 따른 솔잎 발효액에 함유된 페놀 화합물의 성분 조사

<43> 본 발명자들은 상기 실시예 1에서 제조된 본 발명의 솔잎 발효액에 대하여, 항산화효과, 항암효과, 항게양효과, 콜레스테롤 억제 효과 및 혈관보호 등의 효과가 있는 것으로 알려진 페놀 화합물들의 성분을 분석하였고, 특히, 추출 후 3년 및 7년 동안 발효시킨 발효액의 페놀 화합물 성분들을 분석하였다. 상기 페놀 화합물의 성분 분석은 상기 실시예 1에서 제조된 발효시키지 않은 솔잎 추출액, 3년 발효시킨 솔잎 발효액 및 7년 발효시킨 솔잎 발효액을 각각 증류수로 10배 희석하여 퍼지 앤 트랩(purge & trap)방법을 사용하여 수행하였다. 퍼지 앤 트랩 농축기로 Tekmar 3000을 사용하였고, 퍼지 시간은 11분, 드라이 퍼지 시간은 2분, 탈착 예열온도 175℃, 탈착온도 180℃, 탈착시간 4분, 트랩 굽는 온도 180℃, 트랩 굽는 시간 7분의 조건으로 분석하였다. 퍼지 앤 트랩 후 가스크로마토그래프/질량분석계(GC-MS)를 사용하여 페놀 화합물을 분석하였다. GC는 휴렛 팩커드사 제품을 사용하였으며, 컬럼은 HP-5 용융 실리카 캐필러리 컬럼(I.D 0.25mm, 길이 30m, 막두께 0.25μm)을 사용하였다. 액상은 5% 페닐메틸실리콘, 컬럼 온도는 35℃(3min) - 10℃/min - 280℃를 유지하였고, 캐리어 가스로 헬륨(1ml/분, 평균선속도 : 36cm/초)를 사용하였다. MS는 휴렛 팩커드사 HP-6890 GC를 사용하였다. EI 이온화법, 70V 이온화 전압, 이온원 온도는 230℃를 유지하여 스캔(m/z 35-700)하여 분석하였고, 그 결과는 하기 표 1에 나타내었다.

**표 1**

<44> 솔잎추출액, 솔잎추출액을 3년 발효시킨 것, 7년 발효시킨 것의 특정 성분 분석

|                            | 솔잎추출액 | 3년 발효시킨것 | 7년 발효시킨것 |
|----------------------------|-------|----------|----------|
| 화합물                        | 함량%   | 함량%      | 함량%      |
| 알파-피넨(alpha-pinene)        | 9.303 | -        | -        |
| 베타 미르센(beta myrcene)       | 0.536 | -        | -        |
| 베타 펠란드렌(beta phellandrene) | 1.37  | -        | -        |
| 캄페네(camphene)              | 2.23  | -        | -        |
| 델타 3-카렌(delta 3-carene)    | 0.63  | -        | -        |

|                                                                             |        |        |        |
|-----------------------------------------------------------------------------|--------|--------|--------|
| 유칼립톨(eucalyptol)                                                            | 0.334  | -      | -      |
| 스티렌(styrene)                                                                | 66.321 | -      | -      |
| 3-펜타논(3-pentanone)                                                          | 11.707 | 7.439  | -      |
| 톨루엔                                                                         | 7.586  | 7.175  | 7.843  |
| 1,8-시네올/유칼립톨(1,8-cineole/eucalyptol)                                        | -      | 1.816  | 2.003  |
| 2-메틸-1-부탄올                                                                  | -      | 2.521  | 3.613  |
| 3-메틸-1-부탄올                                                                  | -      | 5.05   | 4.815  |
| 5-이소피레닐-2-2-메틸-2-비닐테트라히드로푸란(5-isopyrenyl-2-2-methyl-2-vinyltetrahydrofuran) | -      | 4.021  | 7.555  |
| 비시클로[2,2,1]헵탄-2-올                                                           | -      | 38.645 | 17.962 |
| 캄페(camphore)                                                                | -      | 6.888  | 24.195 |
| 허브옥사이드 세컨드 이소머(hernoxide second isomer)                                     | -      | 9.139  | 10.906 |
| 헥사노익산, 에틸 에스테르(hexanoic acid, ethyl ester)                                  | -      | 1.359  | 1.193  |
| 이소시네올(isocineole)                                                           | -      | 15.947 | 19.914 |

<45>

분석 결과, 상기 표 1에 나타난 바와 같이, 유독한 발암성 물질인 스티렌(styrene)은 3년 발효 후 완전히 분해된 것을 확인할 수 있었으며 페놀 화합물의 대부분은 톨루엔(Toluene)과 유칼립톨(Eucalyptol)이라고 예상되는데, 이 물질들은 특히 불안정하고 새로운 물질로의 내부 변환 비율이 높은 것으로 판단된다. 페놀산의 몇몇은 또한 필수 오일로 사료되는데 이러한 필수 오일로 분류되는 것은 알파-피넨(alpha-pinene), 캄페네(camphene), 펠란드레네(phellandrene) 및 유칼립톨(eucalyptols)이다. 또한, 초기 술잎 발효액에서는 5-이소피레닐-2-2-메틸-2-비닐테트라히드로푸란(5-isopyrenyl-2-2-methyl-2-vinyltetrahydrofuran)은 검출되지 않은 반면, 추출 후 3년 및 7년 동안의 발효가 진행된 후에야 그 함량이 증가하는 것을 확인할 수 있었다. 또한, 식물에 있어서 필수적인 캄페(camphore) 역시 발효 초기의 술잎 발효액에서는 검출되지 않다가 3년 발효 후 6.888 %에서 7년 발효 후 24.195%로 증가한 것을 확인할 수 있었다. 따라서 상기 결과로 초기 발효액에 함유된 몇몇의 페놀 화합물은 매우 불안정한 상태로 존재하나 발효 기간이 길어질수록 안정한 상태로 변화한다는 것을 알 수 있었고, 또한 대표적인 발암물질로 알려진 스티렌을 제거하는데 있어서 발효 과정이 매우 필수적임을 알 수 있었다.

<46>

### <실시에 3>

<47>

### 본 발명에 따른 술잎 발효액의 콜레스테롤 및 중성지방 억제 효과 분석

<48>

상기 실시예 1에서 제조한 술잎 발효액이 혈중 콜레스테롤 및 중성지방을 억제하는 효과가 있는지 확인하기 위하여 쥐에게 고콜레스테롤을 유발시킨 후, 술잎 발효액을 섭취시켜 혈중의 콜레스테롤 및 중성지방 함량을 측정하였다. 이를 위해, 실험동물로 체중이  $347 \pm 53\text{g}$ 의 Sprague-Dawley계 12주 된 수컷 쥐를 사용하였으며, 2마리를 1군으로 하여 6군으로 나눈 뒤, 이중 정상군만을 제외하고는 콜레스테롤 15%, 초콜릿 1% 및 옥수수유 84%가 혼합된 혼합액 1ml을 2주간 경구 투여하였다. 2주후, 상기 혼합액이 투여된 군에서 고지혈증이 유발되면, 정상군을 제외한 다른 군에게는 하기에 표 2에 기재된 바와 같이 각기 다른 조건의 혼합액을 다시 2주간 경구투여 하였다. 이때, 양성대조군으로는 총 4주 동안 상기 혼합액 및 7년 동안 발효시킨 술잎 발효액을 함께 투여한 것을 사용하였다. 총 4주 후, 각 군들의 쥐를 마취시킨 다음 심장에서부터 혈액 10 ml을 채취하여 원심분리함으로써 혈청을 얻었고, 혈중 총 콜레스테롤의 양 및 중성지방의 양을 측정하여 상기 실험군들과 대조군 간의 차를 비교하였으며, 그 결과는 도1 및 도2a 내지 2b에 나타내었다.

### 표 2

<49>

고콜레스테롤 유발 후 각 군에게 2주간 투여한 콜레스테롤 및 술잎발효액

| 실험군      | 투여 내용                            |
|----------|----------------------------------|
| A(음성대조군) | 콜레스테롤(1ml) 및 생리식염수(1ml)          |
| B        | 콜레스테롤(1ml) 및 술잎 추출물(1ml)         |
| C        | 콜레스테롤(1ml) 및 3년 발효시킨 술잎 발효액(1ml) |

|          |                                        |
|----------|----------------------------------------|
| D        | 콜레스테롤(1ml) 및 7년 발효시킨 술잎 발효액(1ml)       |
| E(양성대조군) | 총 4주간 콜레스테롤(1ml) 및 7년 발효시킨 술잎 발효액(1ml) |

<50>

<51>

그 결과, 도 1에 나타난 바와 같이, 고콜레스테롤을 유발시킨 쥐에게 술잎 추출물(B) 및 술잎 발효액을 투여한 실험군들(C,D 및 E)이 술잎 발효액을 투여하지 않은 음성대조군(A)에 비해 혈중 총 콜레스테롤 함량 및 총 중성지방 함량이 감소된 것을 확인할 수 있었다. 또한, 2주간 고콜레스테롤을 유발시킨 후 7년 동안 발효시킨 술잎 발효액을 2주간 투여한 군(D)이 발효시키지 않은 술잎 추출물 및 3년 동안 발효시킨 술잎 발효액을 각각 2주간 투여한 군보다 혈중 콜레스테롤 함량이 월등히 감소된 것을 확인할 수 있었으며, 특히 처음부터 4주간 동안 콜레스테롤 및 7년간 발효시킨 술잎 발효액을 함께 투여한 군보다도 혈중 콜레스테롤 함량이 더 감소된 것을 확인할 수 있었다(도 2a 참조). 반면, 중성지방 감소 효과에 있어서는 처음부터 4주간 동안 콜레스테롤 및 7년간 발효시킨 술잎 발효액을 함께 투여한 군이 다른 실험군들에 비해 혈중 중성지방이 가장 많이 감소된 것으로 나타났다(도 2b 참조). 따라서 상기 결과로, 본 발명의 술잎 발효액이 혈중 콜레스테롤 및 중성지방의 함량을 감소시키는 효과가 있음을 알 수 있었다.

<52>

#### <실시예 4>

<53>

#### 본 발명에 따른 술잎 발효액의 혈전 분해 효과 분석

<54>

본 발명자들은 본 발명의 술잎 발효액이 혈전 분해 효과가 있는지 확인하기 위한 실험을 수행하였다. 상기 실험은 피브리노겐을 0.3%가 되도록 증류수에 용해시킨 용액 5ml에 동량의 2% 아가로즈 용액 5ml를 첨가하여 혼합한 후, 다시 트롬빈 (100NIH unit/ml) 10 $\mu$ l을 첨가한 다음 1시간 동안 실온에서 고체화시켜 피브린 아가로즈 플레이트(fibrin agarose plate)를 제조하였다. 이후 혈전 분해 테스트를 위해 상기 플레이트에 지름이 5mm 되도록 구멍을 만든 후 각 시료를 20 $\mu$ l를 침적하였고 37℃에서 반응시켜 형성되는 투명대를 확인하였다. 이때 음성대조군으로는 물을 사용하였고 양성대조군으로 피브린을 용해하여 혈전을 분해시키는 것으로 알려진 플라즈민(plasmin)을 사용하였으며, 실험군으로 1년, 3년 및 7년간 발효시킨 술잎 발효액을 각각 시료로 사용하였다. 상기 시료들을 플레이트에 침적시킨 후 30분, 1시간 및 2시간 동안을 각각 반응시켜 형성되는 분해환을 확인하였으며, 그 결과는 도 3a 및 3b에 나타내었다.

<55>

실험 결과, 1년, 3년 및 7년 동안 발효시킨 술잎 발효액 모두는 양성대조군으로 사용된 플라즈민(plasmin)보다 혈전 분해 활성이 더 빠르게 나타났으며 더 넓은 투명대를 형성하는 것으로 나타났다(도 3a 참조). 또한, 반응 시간이 길면 길수록 혈전 분해능이 향상되는 것을 확인할 수 있었으며, 발효시킨 시간이 긴 발효액 일수록 혈전 분해능이 더 월등함을 확인할 수 있었다(도 3b 참조).

<56>

#### <실시예 5>

<57>

#### 술잎에서 추출한 추출물과 술잎 발효액의 혈전 분해 활성 비교

<58>

본 발명자들은 본 발명의 술잎 발효액이 가지는 혈전 분해 활성이 발효에 의한 것인지를 확인하기 위하여, 혈전 분해 활성 실험을 상기 실시예 1에서 제조된 1년, 3년 및 7년 동안 발효시켜 수득한 각각의 술잎 발효액과 발효가 진행되지 않은 상태의 술잎수추출물을 대상으로 수행하였다. 상기 술잎수추출물은 일반적인 열수추출 방법으로 수득한 것으로써, 즉, 술잎 200g을 500ml의 물에 넣고 100℃에서 1시간 동안 가열하여 추출한 것을 사용하였다. 혈전 분해 활성 실험은 상기 실시예 4에서 수행한 방법과 동일하게 피브린 아가로즈 플레이트(fibrin agarose plate)를 사용하여 수행하였다.

<59>

실험 결과, 도 4에 나타난 바와 같이, 1년 및 3년간 발효시킨 술잎 발효액은 약 10mm의 혈전 분해환을 확인할 수 있었으며, 7년간 발효시킨 술잎 발효액은 약 13mm의 혈전 분해환을 확인할 수 있었다. 반면, 발효과정을 거치지 않은 술잎수추출물의 경우에는 혈전 분해환을 확인할 수 없었다. 따라서 이러한 결과로부터 술잎 착즙액의 혈전 분해 활성은 발효정도가 혈전분해능에 매우 중요한 역할을 함을 알 수 있었다.

<60>

#### <실시예 6>

<61>

#### 에탄올로 분리된 술잎 발효액의 혈전 분해 활성

<62>

앞서 상기 실시예 4에서 살펴본 바와 같이, 발효과정을 거치지 않은 술잎 추출물은 혈전 분해 활성이 없는 반면, 발효 과정을 거친 술잎 발효액만이 혈전 분해 활성을 가지고 있었다. 이에 본 발명자들은 본 발명의

술잎 발효액을 에탄올을 이용하여 상등액 분획과 침전물 분획으로 분리한 후, 각각의 분획들에 대하여 혈전 분해 활성 실험을 수행하였다. 상기 실험을 수행하기 위하여, 실시예 1에서 제조된 1년, 3년 및 7년간 발효시킨 각각의 술잎 발효액에 동량의 50% 에탄올을 첨가하여 혼합한 후, 원심분리 하여 침전물과 상등액으로 분리한 다음, 이를 가지고 상기 실시예 4에서 수행한 방법과 동일하게 피브린 아가로스 플레이트(fibrin agarose plate)를 사용하여 혈전 분해 활성 실험을 수행하였다. 또한, 상기 분리된 상등액은 다시 동량의 75% 에탄올을 첨가하여 혼합한 다음, 원심분리 하여 침전물과 상등액으로 분리하였고 이렇게 수득한 침전물과 상등액을 가지고 상기 와 같은 방법으로 혈전 분해 활성 실험을 수행하였다.

<63> 그 결과, 술잎 발효액을 에탄올로 분리한 분획 중에서 상등액 부분이 혈전 분해 활성이 있는 것으로 나타난 반면, 침전물 분획에서는 혈전 분해 활성이 없는 것으로 나타났으며, 특히 1년 발효과정을 거친 발효액의 경우는 10mm의 혈전 분해환을 확인할 수 있었고 7년 발효과정을 거친 발효액의 경우는 12mm의 혈전 분해환을 확인할 수 있었다(도 5a 참조). 또한, 50%의 에탄올로 분리한 분획 중에서 상등액만을 가지고 다시 75%의 에탄올로 분리한 분획에 대한 혈전 분해 활성 실험 결과는 상기 와 동일하게 1년 발효과정을 거친 발효액에 비해 7년 발효과정을 거친 발효액이 더 높은 혈전 분해 활성이 있음을 확인할 수 있었다. 그러나 75%의 에탄올로 분획하였을 경우에는 7년간 발효시킨 발효액이 상등액 뿐만 아니라 침전물에서도 혈전 분해 활성이 있는 것을 확인할 수 있었다(도 5b 참조).

### 도면의 간단한 설명

<64> 도 1은 고콜레스테롤 쥐에서 본 발명의 술잎 발효액이 혈중 콜레스테롤 및 중성지방 함량에 미치는 영향을 나타낸 막대 그래프이다.

<65> 도 2a는 고콜레스테롤 쥐에게 발효 기간이 다른 본 발명의 술잎 발효액을 각각 투여한 후 혈중 감소된 콜레스테롤의 함량을 나타낸 막대 그래프이다.

<66> 도 2b는 고콜레스테롤 쥐에게 발효 기간이 다른 본 발명의 술잎 발효액을 각각 투여한 후 혈중 감소된 중성지방의 함량을 나타낸 막대 그래프이다.

<67> 도 3a는 본 발명의 술잎 발효액이 혈전 분해 활성이 있는지를 확인하기 위하여 피브린 아가로스 플레이트를 이용하여 분석한 결과를 나타낸 그림이다.

<68> 도 3b는 1년, 3년 및 7년간 발효시킨 본 발명의 술잎 발효액에 대하여 각각의 반응 시간에 따른 혈전 분해 활성을 나타낸 막대 그래프이다.

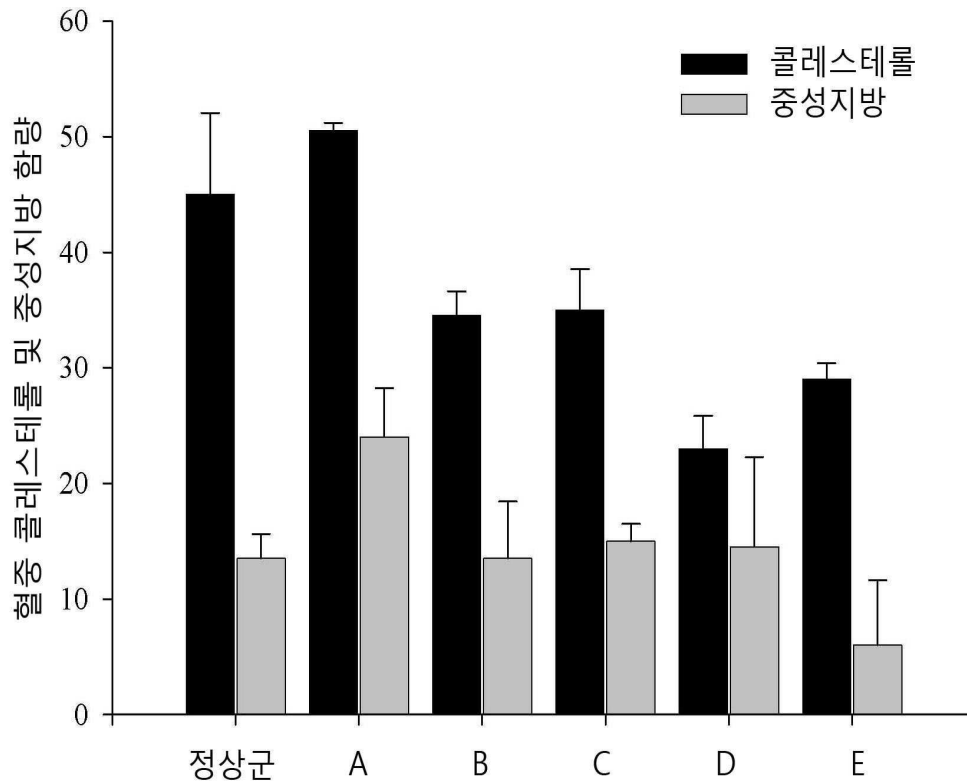
<69> 도 4는 1년, 3년 및 7년간 발효시킨 본 발명의 술잎 발효액 및 발효가 진행되지 않은 상태인 술열수추출물 각각에 대한 혈전 분해 활성을 나타낸 막대 그래프이다.

<70> 도 5a는 1년, 3년 및 7년간 발효시킨 본 발명의 술잎 발효액을 50% 에탄올로 분획한 상등액 및 침전물 각각에 대하여 혈전 분해 활성을 나타낸 막대 그래프이다.

<71> 도 5b는 50% 에탄올로 분획한 술잎 발효액의 상등액을 다시 75%의 에탄올로 분획하여 수득한 상등액 및 침전물 각각에 대하여 혈전 분해 활성을 나타낸 막대 그래프이다.

도면

도면1



정상군 : 아무것도 처리하지 않음

A : 4주간 콜레스테롤 1ml 및 생리식염수 1ml 처리

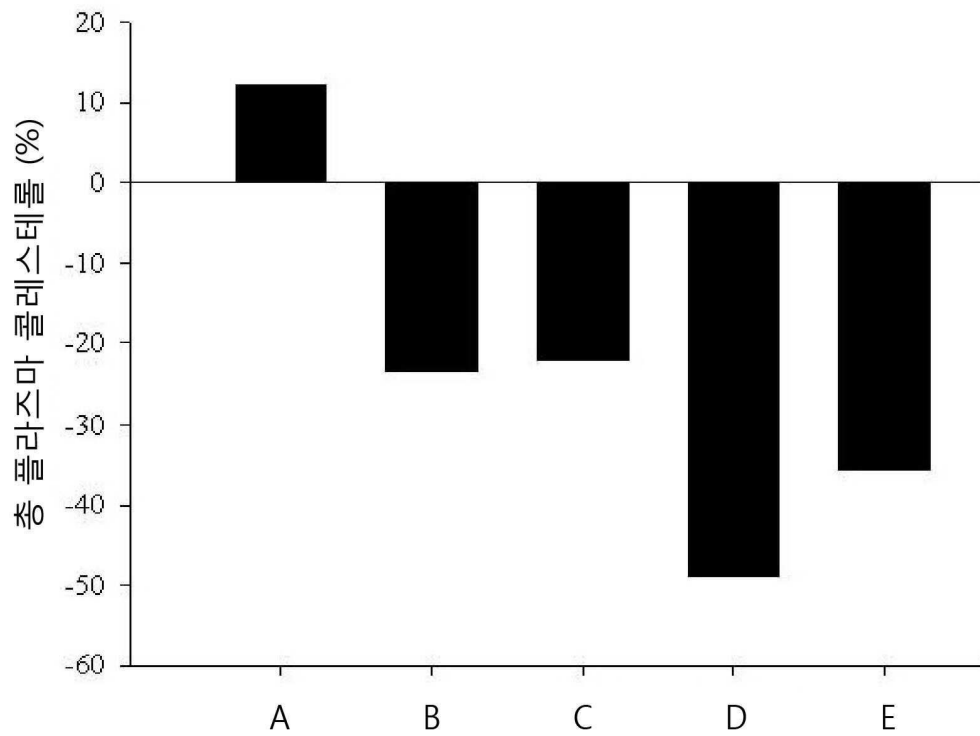
B : 고콜레스테롤 유발 후 2주간 콜레스테롤 1ml 및  
술잎 추출물 1ml 처리

C : 고콜레스테롤 유발 후 2주간 콜레스테롤 1ml 및  
3년 발효시킨 술잎 발효액 1ml 처리

D : 고콜레스테롤 유발 후 2주간 콜레스테롤 1ml 및  
7년 발효시킨 술잎 발효액 1ml 처리

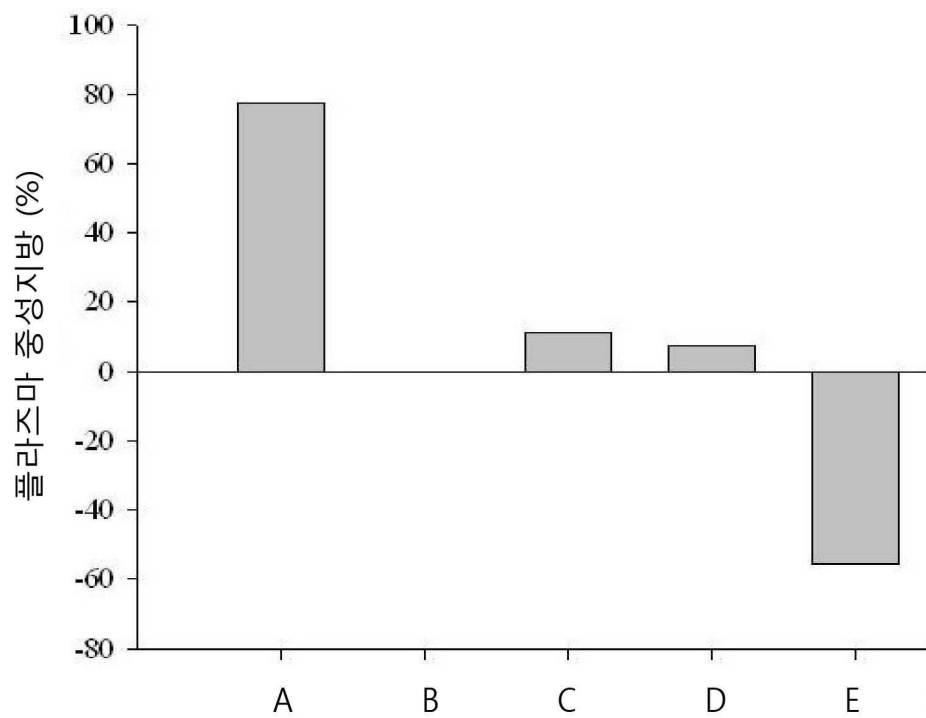
E : 4주간 콜레스테롤 1ml 및  
7년 발효시킨 술잎 발효액 1ml 처리

도면2a



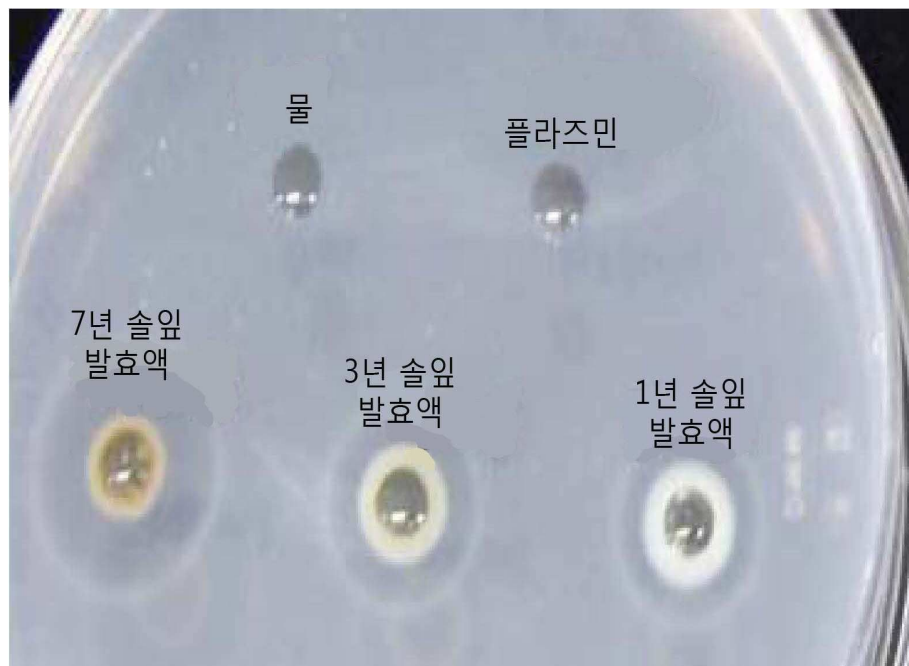
- A : 4주간 콜레스테롤 1ml 및 생리식염수 1ml 처리  
 B : 고콜레스테롤 유발 후 2주간 콜레스테롤 1ml 및  
 술잎 추출물 1ml 처리  
 C : 고콜레스테롤 유발 후 2주간 콜레스테롤 1ml 및  
 3년 발효시킨 술잎 발효액 1ml 처리  
 D : 고콜레스테롤 유발 후 2주간 콜레스테롤 1ml 및  
 7년 발효시킨 술잎 발효액 1ml 처리  
 E : 4주간 콜레스테롤 1ml 및  
 7년 발효시킨 술잎 발효액 1ml 처리

도면2b

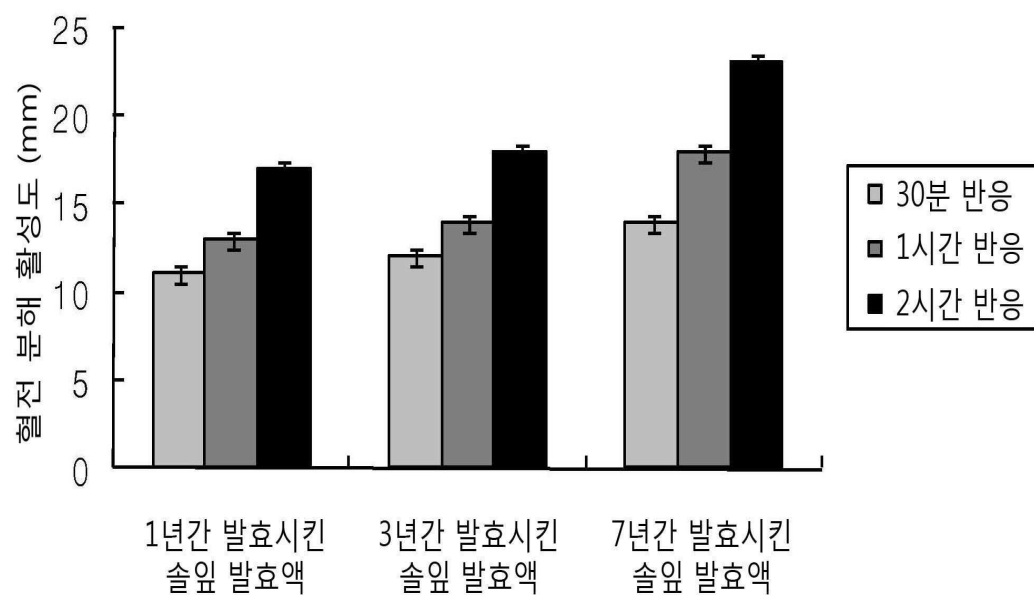


- A : 4주간 콜레스테롤 1ml 및 생리식염수 1ml 처리  
 B : 고콜레스테롤 유발 후 2주간 콜레스테롤 1ml 및  
 솔잎 추출물 1ml 처리  
 C : 고콜레스테롤 유발 후 2주간 콜레스테롤 1ml 및  
 3년 발효시킨 솔잎 발효액 1ml 처리  
 D : 고콜레스테롤 유발 후 2주간 콜레스테롤 1ml 및  
 7년 발효시킨 솔잎 발효액 1ml 처리  
 E : 4주간 콜레스테롤 1ml 및  
 7년 발효시킨 솔잎 발효액 1ml 처리

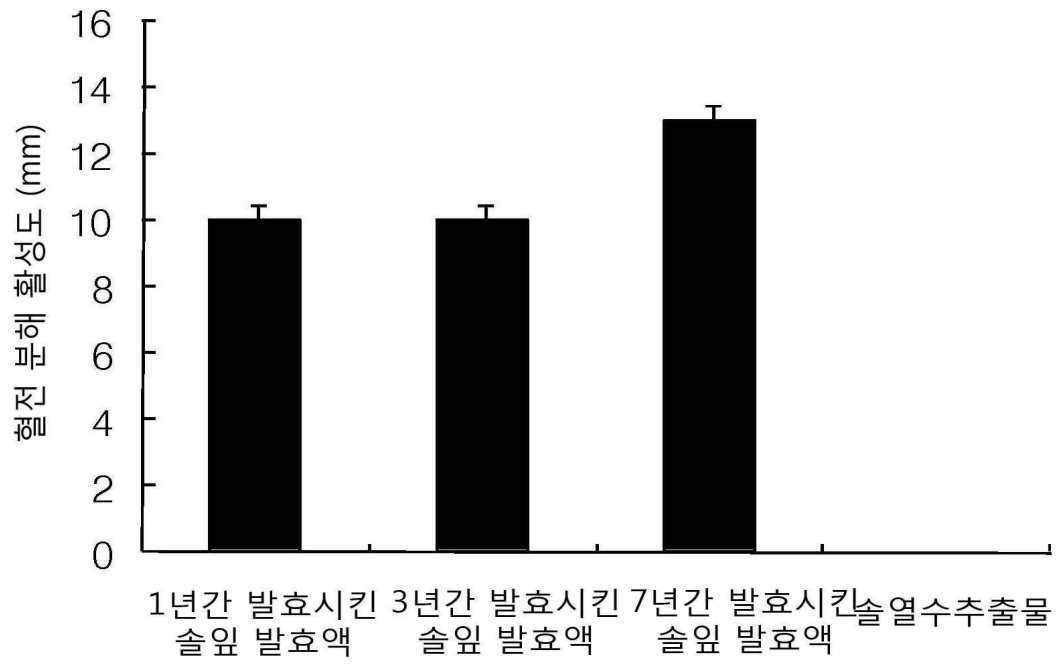
도면3a



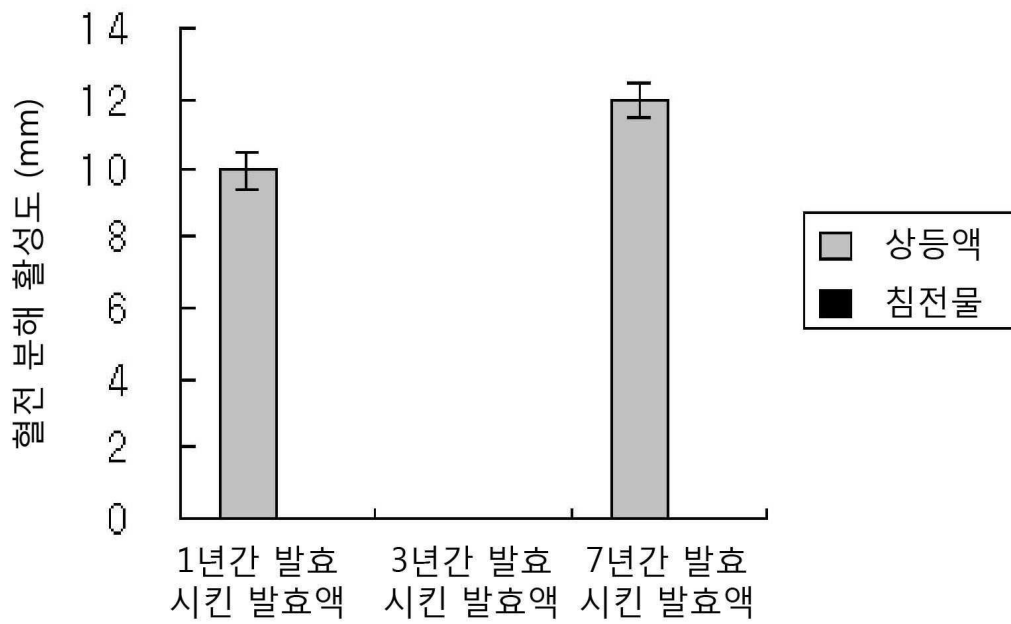
도면3b



도면4



도면5a



도면5b

