(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2011-0106640
(43) 공개일자 2011년09월29일

(51) Int. Cl.
A23L 1/337 (2006.01) *A23L 1/29* (2006.01)
A23P 1/02 (2006.01) *A61P 39/06* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2010-0025806
(22) 출원일자 2010년03월23일
심사청구일자 2010년03월23일

(71) 출원인
부경대학교 산학협력단
부산 남구 용당동 산 100번지 부경대학교내
(주)마린바이오프로세스
부산광역시 기장군 일광면 횡계리 27 해양생물산업육성센터 203호
(72) 발명자
김영목
부산광역시 남구 용호1동 LG메트로시티아파트 109동 1103호
송호수
부산광역시 남구 대연3동 대우그린1차아파트 103동 1701호
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
김순웅

전체 청구항 수 : 총 14 항

(54) 유산균 발효공법을 이용한 기능성 다시마 발효분말 및 그의 제조방법

(57) 요 약

본 발명은 다시마를 발효 균주로 발효하는 단계를 포함하는 다시마 발효분말을 제조하는 방법에 있어서, 상기 다시마를 10 내지 30 중량%로 함유하는 것을 특징으로 다시마 발효분말의 제조방법에 관한 것으로, 본 발명의 제조방법에 의해 수용성 및 비수용성 다시마 발효분말을 동시에 생산 가능하여 간소화된 제조공정을 통해 생산성과 수율이 높은 발효분말 및 발효환을 얻을 수 있으며, 이러한 제조방법에 의해 제조된 다시마 발효분말은 항산화, 숙취해소 및 간기능개선에 효능을 나타낸다.

대 표 도 - 도1



(72) 발명자

이배진

부산광역시 북구 구포1동 1015-1 대영빌라 가동 101호

장동욱

부산광역시 남구 용호1동 LG메트로시티아파트 220동 302호

강영미

부산광역시 금정구 구서2동 177-5번지

특허청구의 범위

청구항 1

다시마를 발효 균주로 발효하는 단계를 포함하는 다시마 발효분말을 제조하는 방법에 있어서, 상기 다시마를 10 내지 30 중량%로 함유하는 것을 특징으로 하는 다시마 발효분말의 제조방법.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 발효하는 단계 전에, 다시마의 전처리 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 제조방법.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 발효하는 단계 후에,

(ㄱ) 발효액과 발효된 다시마를 분리하는 분리단계;

(ㄴ) (ㄱ)에서 분리된 발효액 및 발효된 다시마를 각각 건조하고 분쇄하고 분말화하여 수용성 (발효액) 및 비수용성 (발효된 다시마) 다시마 발효분말을 제조하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 제조방법.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 다시마에는 건다시마, 생다시마 및 다시마 추출농축액으로 이루어진 군에서 선택된 것을 특징으로 하는 제조방법.

청구항 5

제4항에 있어서,

상기 다시마 추출농축액은,

(a) 다시마의 전처리 단계;

(b) 다시마에 물을 가수하여 추출하는 단계;

(c) 상기 추출 후 다시마의 잔사를 제거하는 단계; 및

(d) 상기 잔사를 제거한 다시마 추출액을 농축하는 단계;

를 포함하여 제조되는 것을 특징으로 하는 제조방법.

청구항 6

제1항에 있어서,

상기 발효균주는 GABA (Gamma Amino butyric acid) 생성력을 지닌 균주인 것을 특징으로 하는 제조방법.

청구항 7

제1항에 있어서,

상기 발효단계는 발효균주로 0.1 내지 20 % (v/v)의 유산균을 접종하여 1 내지 10일간 발효하는 것을 특징으로 하는 제조방법.

청구항 8

제7항에 있어서,

상기 유산균은 Lactobacillus brevis BJ-20인 것을 특징으로 하는 제조방법.

청구항 9

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 따른 제조방법에 의해 제조된 다시마 발효분말.

청구항 10

제9항에 따른 다시마 발효분말을 유효성분으로 포함하여 환 (sphere)모양으로 성형된 다시마 발효환.

청구항 11

다시마 발효분말을 유효성분으로 포함하는 항산화용 조성물.

청구항 12

다시마 발효분말을 유효성분으로 포함하는 숙취해소용 조성물.

청구항 13

다시마 발효분말을 유효성분으로 포함하는 간기능 개선용 조성물.

청구항 14

제 11항 내지 제13항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 다시마 발효분말은, 다시마를 발효 균주로 발효하는 단계를 포함하는 다시마 발효분말을 제조하는 방법에 있어서 상기 다시마를 10 내지 30 중량%로 함유하는 제조방법에 의한 것임을 특징으로 하는 조성물.

명 세 서

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 기능성 다시마 발효분말, 발효환, 이의 제조방법 및 이의 용도에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 갈조식물 다시마목 다시마과에 속하는 다시마는 한대, 아한대의 연안에 분포하는 한해성 식물로서, 태평양 연안에만 대략 20여 종 이상이 자생하고 있으며, 예로부터는 우리나라와 일본, 중국 등에서 식용으로 사용해 온 바닷말이다.

[0003] 상기 다시마의 성분은 종류에 따라서 다르지만, 대체로 수분 16%, 단백질 7%, 지방 1.5%, 탄수화물 49%, 무기염류 26.5% 정도이며, 탄수화물의 20%는 섬유소이고 나머지는 알긴산과 나미나린 등 생리기능성이 있는 다당류이며, 그 외에, 요오드, 칼륨, 칼슘 등의 무기질, 비타민 B2를 비롯한 각종 비타민, 아미노산, 특히 글루탐산의 함량이 풍부하다. 특히 소화가 어려운 난소화성의 다당류는 식이섬유로서 정장작용과 비만방지, 항암, 콜레스테롤치 저하, 중금속의 배출 등 각종 건강식품의 소재로서 각광을 받고 있다. 이러한 다당류로부터 만들어지는 올리고당은 일반적으로 난소화성이고, 비피더스 증식인자로 작용하며, 충치예방에도 효과가 있는 것으로 알려지고 있어, 최근에는 알긴산으로부터 올리고당을 제조하려는 연구가 활발히 이루어지고 있다.

[0004] 이와 같이 다시마에는 각종 유익한 성분이 많이 함유되어 있기 때문에, 이러한 유효성분을 이용하는 다양한 형태의 연구가 진행되고 있다.

[0005] 한편, GABA는 1950년 Florey와 Robert에 의해 포유류의 뇌 추출액에서 처음 발견된 이래 연구가 활발하게 진행되고 있다. GABA는 분자량이 103.2 달톤 (dalton)으로 피페리인산으로 불리며 용융점이 202℃로 열에 안정한 편이며 C4H9NO2의 분자식을 가지며 물에 대한 용해성이 크다.

[0006] 일반적으로 GABA (Gamma Amino Butyric Acid)는 자연계에 널리 분포하는 비단백질 아미노산의 일종으로 포유동물의 뇌나 척수에 존재하며 흥분 억제성 신경전달물질 (Inhibitory Neurotransmitter)이다. GABA는 인체의 많은

생리적인 메커니즘의 조절에 관여하여 뇌의 혈류를 활발하게 하고 산소 공급량을 증가시켜 뇌세포의 대사기능을 항진시키는 작용을 하는 것으로 알려져 있다.

[0007] 최근에는 GABA가 학습능력을 유의적으로 증강시키고 장기 기억 촉진에 기여할 뿐만 아니라 혈압상승을 억제하며 식용과 포만감을 조절하는 요소로 작용한다고 발표되어 전 세계적으로 주목을 받고 있는 물질의 하나로서 경구적 처방약으로서는 5, 10mg의 환제가 시판되고 있으나 의약품의 합성 GABA 제제의 경우 식욕부진, 변비, 설사 등의 소화기계의 부작용이 있다고 한다.

[0008] 이러한 GABA의 역할로 인해 의약품으로서 뿐만 아니라, 최근에는 기능성 식품소재로서의 GABA에 대한 관심이 고조되고 있다. GABA는 발아현미를 비롯한 발아곡류, 녹차, 배추 뿌리 등 곡물에서도 많이 검출되고 있으므로 경구적으로 섭취하는 것이 가능하다. 그러나 이들에 함유된 GABA의 양은 많지 않아 약리작용을 발휘하기 위한 필요량을 식품에서 섭취하는 것은 용이하지 않다.

[0009] 최근 전 세계적으로 임상시험을 통한 혈압저하, 뇌세포 대사촉진 등에 탁월한 생리활성 효과가 있는 것으로 검증된 GABA의 경우 GAD의 탈탄산작용에 의하여 전구물질인 글루탐산을 통하여 생성됨이 규명되었는데 일본을 비롯하여 전세계적으로 GABA의 함유량을 증대시키기 위한 기술이 개발 중이지만 주로 화학적 MSG를 인위적으로 첨가 증량한 이후 이의 발효를 통하여 GABA로 전환시키는 발효기술로 귀결되고 있는 실정이어서 현재 안정성 및 천연성을 요구하는 흐름을 거스르고 있다. 이를 극복하기 위해 GABA가 다량 함유된 식품소재를 발굴하여 이러한 식물소재로부터 높은 수율의 산업적으로 활용하려는 연구가 활발히 진행되고 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0010] 본 발명에서는 우리나라에서 풍부한 해조류인 다시마를 이용하여, 기능성 다시마 발효분말, 기능성 다시마 발효환 및 이의 제조방법을 제공하고자 하며, 이러한 제조방법은 발효액과 발효된 다시마 조체를 분리하여 수용성과 비수용성의 두 가지 제품을 동시에 생산할 수 있기에 생산공정의 간편화와 원가의 절감에 기여할 수 있다. 또한 본 발명에서는 항산화, 숙취해소 및 간기능 개선에 뛰어난 효능을 나타내는 기능성 다시마 발효분말을 제공하고자 한다.

과제의 해결 수단

[0011] 본 발명에서는 다시마를 발효 균주로 발효하는 단계를 포함하는 다시마 발효분말을 제조하는 방법에 있어서, 상기 다시마를 10 내지 30 중량%로 함유하는 것을 특징으로 기능성 다시마 발효분말의 제조방법을 제공하고자 한다. 본 발명은 상기 방법에 따라 제조된 기능성 다시마 발효분말 및 상기 기능성 다시마 발효분말을 유효성분으로 포함하는 기능성 다시마 발효환을 제공하고자 한다. 또한, 다시마 발효분말을 유효성분으로 포함하는 항산화용 조성물, 숙취해소용 조성물 또는 간기능 개선용 조성물을 제공하고자 한다.

[0012] 본 발명자들은 해조류 중에서, 산화에 저항하거나, 숙취해소에 효율적이거나 간기능을 개선시킬 수 있는 원재료 및 추출방법을 찾고자 노력하던 중, 다시마를 본 발명의 추출방법에 의해 추출하여 발효할 경우 항산화 활성, 숙취해소 활성 및 간기능 개선능을 갖음과 수용성과 비수용성의 두 가지 제품을 동시에 생산하여 간편한 공정으로 생산성과 높은 수율의 제품을 얻을 수 있음을 확인하고 본 발명을 완성하였다.

[0013] 이하 본 발명을 상세히 설명하도록 하겠다.

[0014] 본 발명에서 본원발명자에 의해 개발된 “외부 순환식 감압형 분리막 시스템 (특허 제 10-0888897)”은 외부의 환경과 격리된 막분리공정으로서 기존의 가압식 공정과는 달리 여과액이 나오는 부분에 자흡식 펌프를 부착하여 감압식으로 70~400mmHg 사이의 마일드한 조건에서 운전함으로써, 압력에 따른 막의 부담을 최소화시킬 뿐만 아니라 여과액 방출부로부터 자흡식 펌프로 액을 흡입하여 여과하기 때문에 펌프와 농축액이 직접적으로 접촉하는 일이 없으며 항상 저압에서 운전하고 별도의 농축 탱크가 필요 없고, 배관, 밸브 및 시스템의 비용이 최소화되

어 매우 경제적이다. 또한 각각의 멤브레인 (모듈)의 하단으로부터 지속적으로 공기를 방출하여 막의 외부 표면에 흡착될 수 있는 오염물질을 지속적으로 떨어낼 수 있도록 설계됨에 따라 여과공정이 진행되면서 막의 오염이 가속화되지 않고 지속적으로 안정한 투과성을 가지는 장점을 가지며 (도 13), 또한 여과액을 분획분으로 분리하여 제조할 수 있는 시스템을 말한다 (도 14).

[0015] 본 발명에서는 다시마를 발효 균주로 발효하는 단계를 포함하는 다시마 발효분말을 제조하는 방법에 있어서, 상기 다시마를 10 내지 30 중량%로 함유하는 것을 특징으로 다시마 발효분말의 제조방법을 제공하고자 한다.

[0016] 상기 다시마를 전체중량의 10 내지 30 중량%로 포함할 수 있는데, 다시마가 발효공정에서 30%를 초과할 경우 염분이 상승하여 고염의 환경을 조성함으로써 유산균의 생육을 저해하며, 다시마의 흡수율이 높아 생산수율이 감소하며, 발효공정에서 10% 이하일 경우 다시마 발효분말 생산수율이 감소할 수 있으므로 상기의 다시마 양을 첨가하는 것이 바람직하다.

[0017] 선택적으로, 본 발명에서 다시마 발효분말을 제조하기 위해 다시마 전처리 단계를 포함할 수 있다. 다시마 전처리 단계는 세척 및 다시마 내의 염분 농도를 낮추기 위한 것으로 특별히 한정되는 것은 아니나, 바람직하게는 다시마를 수세, 탈염 및 분쇄 공정을 수행함으로 이루어질 수 있는데, 이러한 과정을 세척과정 및 탈염과정을 거침으로 다시마 원재료의 위생적 청결을 유지하고 염분 농도를 낮출 수 있으며, 분쇄공정을 거침으로 수용성 성분의 추출이 효율적으로 이루어질 수 있고, 하기 유산균이 다시마를 원료로 하여 발효하기 수월하게 하며, 추후 발효분말, 발효환, 다시마 발효분말을 원료로 한 조성물을 소비자가 섭취시 소화를 수월하게 할 수 있다.

[0018] 본 발명에 있어서, 상기 다시마를 발효하는 발효균주로는 특별한 제한이 없으나, GABA (Gamma Amino butyric acid) 생성력을 지닌 균주일 수 있다.

표 1

[0019] 발효에 의한 글루탐산과 GABA의 함량 변화 (단위 : ppm)

구분	발효 전	발효 후
글루탐산	2,354	10
GABA	0	2,286

[0020] 본 발명의 일례로, 상기 발효 균주는 유산균일 수 있으며, 유산균을 0.1 내지 20% (v/v), 바람직하게는 0.5 내지 10% (v/v), 더욱 바람직하게는 1 내지 5%(v/v)가 되도록 접종하여 25 내지 40℃, 바람직하게는 30 내지 37℃에서 발효할 수 있다. 이때 발효기간은 1일 내지 10일, 바람직하게는 2 내지 7일일 수 있는데, 이는 발효미생물에 의해 발효가 충분히 일어날 수 있는 바람직한 기간이다. 상기 유산균에는 특별히 제한이 없으나, 바람직하게는 락토바실러스 사케이 (Lactobacillus sakei), 락토바실러스 브레비스 (Lactobacillus brevis), 락토바실러스 플렌타럼 (Lactobacillus plantarum), 락토코커스 락티스 (Lactococcus lactis), 바실러스 코아귤런스 (Bacillus coagulance) 또는 그 혼합 균주일 수 있으며, 보다 바람직하게는 Lactobacillus brevis BJ20 (기탁번호 : KCTC 11377BP)를 사용할 수 있다. Lactobacillus brevis BJ20은 GABA(gamma aminobutyric acid)를 고수율로 생성하는 특징을 가지고 있어, 원료상의 글루탐산으로부터 98%이상의 GABA 전환할 수 있어, 발효 후 생리활성물질인 GABA를 함유하게 되어 기능성을 부가할 수 있다. 상기 표1은 Lactobacillus brevis BJ20에 의하여 다시마 유래의 글루탐산이 GABA로 전환되는 것을 나타내고 있다.

[0021] 본 발명에서 사용하는 다시마는 건다시마, 생다시마, 다시마 추출농축액 또는 이들의 혼합물을 사용할 수 있다.

[0022] 이때, 상기 다시마 추출농축액은

[0023] (a) 다시마의 전처리 단계;

[0024] (b) 다시마에 물을 가수하여 추출하는 단계;

[0025] (c) 상기 추출 후 다시마의 잔사를 제거하는 단계; 및

[0026] (d) 상기 잔사를 제거한 다시마 추출액을 농축하는 단계;

[0027] 를 포함하여 제조될 수 있다.

[0028] 본 발명에서 다시마 추출농축액을 제조하는 일례로, 상기 다시마 추출농축액은 수세, 탈염 및 분쇄 공정을 거칠 수 있는데, 이러한 과정을 거침으로서 염분의 농도를 낮추어 유산균이 발효하는데 적절한 조건을 형성할 수 있고 추출수율을 높일 수 있다. 상기 전처리된 다시마에 물을 5배 내지 30배, 바람직하게는 10배 내지 20배를 첨가하고 50 내지 150℃, 바람직하게는 60 내지 100℃에서 가온할 수 있다. 상기 추출물에서 다시마 잔사를 제거할 수 있는데, 추출물에서 다시마 잔사를 제거하는 방법 또는 기계는 특별히 한정되지 않으나, 바람직하게는 진동체를 이용할 수 있으며, 이러한 잔사 제거단계를 통하여 수용성 물질을 빠르고 효율적으로 분리할 수 있다.

[0029] 선택적으로, 상기 잔사가 제거된 수용성 추출물을 분리하는 분리막, 바람직하게는 외부순환식 감압형 분리막, 더욱 바람직하게는 공경 (pore size)이 0.05~0.1um의 모듈을 가지는 외부순환식 감압형 분리막을 이용하여 상기 수용성 물질만을 정밀여과할 수 있다.

[0030] 본 발명에서는 상기 잔사를 제거한 다시마 추출액 또는 상기 정밀여과된 다시마 추출액을 농축할 수 있는데, 브릭스가 5 내지 50%, 바람직하게는 20 내지 40% 가 되도록 농축하여 다시마 추출 농축액을 제조할 수 있다. 상기 분리막은 효과적인 여과효율을 나타낼 뿐만 아니라, 여과과정에서 외부의 노출이 방지됨으로 여과시 발생하는 향미의 손실을 최소화하며 오염을 방지하고 지속적으로 안정한 투과성을 가지는 장점이 있다.

[0031] 본 발명에서는 다시마를 발효 균주로 발효하는 단계를 포함하는 다시마 발효분말을 제조하는 방법에 있어서, 상기 다시마를 10 내지 30 중량%로 함유하는 것을 특징으로 다시마 발효분말의 제조방법을 제공하고자 하며,

[0032] 본 발명의 일례로 상기 발효하는 단계 전에,

[0033] 다시마의 전처리 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 제조방법을 제공할 수 있다.

[0034] 본 발명의 일례로, 상기 전처리 단계로는 수세, 탈염 및 분쇄 공정을 거칠 수 있는데, 이러한 과정을 거침으로서 염분의 농도를 낮추어 유산균이 생육하며 발효하는데 적절한 환경조건을 형성할 수 있고 추출 수율을 높일 수 있다.

[0035] 본 발명의 일례로, 상기 전처리된 다시마를 전체중량의 10 내지 30 중량%로 포함하여, 100 내지 150℃, 바람직하게는 121℃에서 5 내지 60분, 바람직하게는 10분 내지 30분간 멸균하여 잡균을 제거할 수 있다.

[0036] 본 발명의 일례로 상기 발효하는 단계 후에,

[0037] (ㄱ) 발효액과 발효된 다시마를 분리하는 분리단계;

[0038] (ㄴ) 상기 분리된 발효액 및 발효된 다시마를 각각 건조하고 분쇄하고 분말화하여 수용성 (발효액) 및 비수용성 (발효된 다시마) 다시마 발효분말을 제조하는 단계를 포함할 수 있다.

[0039] 상기 (ㄱ)단계에서 발효액과 발효된 다시마를 분리할 수 있는데, 이러한 분리방법 또는 기계에 대해서는 특별히 한정되는 것은 아니나, 바람직하게는 진동체를 이용할 수 있다. 본 발명의 제조방법을 이용하면 발효 후 다시마 발효물 중의 발효액과 발효된 다시마 조체를 분리하여 수용성 (발효액) 발효분말과 비수용성 (발효된 다시마) 발효분말의 두 가지 제품을 동시에 생산할 수 있기 때문에, 간편한 공정을 통해 생산성과 수율을 높이는 데 중추적인 역할을 할 수 있다.

[0040] 본 발명에서는 (ㄴ) 단계 이후, 생성된 발효액과 발효된 다시마를 각각 건조하고 분쇄하여 분말화하여 다시마 발효분말을 제조할 수 있는데, 이러한 발효분말의 제조는 당업계에서 통상적으로 이루어지는 방법에 따라 이루어질 수 있다.

[0041] 본 발명의 일례로, 수용성의 발효액은 분무건조 또는 동결건조로 건조한 후 분쇄하여 분말화할 수 있으며, 비수용성의 발효된 다시마는 진공건조 또는 열풍건조로 건조한 후 분쇄하여 분말화할 수 있다.

[0042] 선택적으로, (ㄴ) 단계에 있어서 분리된 발효액을 정밀여과 단계를 거친후 이를 건조하고 분쇄하여 분말화할 수 있다. 이때 여과는 상기 발효액을 분리할 수 있는 분리막, 바람직하게는 외부순환식 감압형 분리막, 더욱 바람직하게는 공경 (pore size)이 0.05~0.1㎛의 모듈을 가지는 외부순환식 감압형 분리막을 이용하여 수용성 물질만을 정밀여과할 수 있다. 상기 분리막은 효과적인 여과효율을 나타낼 뿐만 아니라, 여과과정에서 외부의 노출이 방지됨으로 여과시 발생하는 향미의 손실을 최소화하며 오염을 방지하고 지속적으로 안정한 투과성을 가지는 장점이 있다.

[0043] 본 발명에서는 상기 제조방법에 의해 제조된 다시마 발효분말을 제공하고자 한다. 상기 공정을 통해 수용성 (발효액) 발효분말과 비수용성 (발효된 다시마) 발효분말의 두 가지 제품을 동시에 생산할 수 있으며 간편한 공정을 통해 높은 생산성과 수율을 보이며, 항산화, 숙취해소 및 간기능 개선에 뛰어난 효과를 보인다.

[0044] 본 발명에서는, 상기 다시마 발효분말을 유효성분으로 포함하여 환모양 (sphere)으로 성형된 다시마 발효환을 제공하고자 한다.

[0045] 본 발명의 다시마 발효환는 수용성 다시마 발효분말 또는/및 비수용성 다시마 발효분말을 포함할 수 있는데, 발효환에 포함되는 다시마 발효분말은 30 내지 95 중량%, 바람직하게는 50 내지 90 중량%일 수 있으나, 이러한 함량비율에 본 발명의 권리범위가 한정되는 것은 아니다.

[0046] 본 발명의 환의 제조기는 특정한 기계에 한정되는 것은 아니며, 당업계에서 통상적으로 사용하는 기계를 이용하여 제조할 수 있는데, 이때 이물질의 혼입이나 미생물 오염을 방지할 수 있는 제환기를 사용하는 것이 바람직할 수 있다.

[0047] 본 발명의 발효환의 크기는 특별히 한정되는 것은 아니나, 바람직하게는 환의 직경 4 내지 11㎜, 보다 바람직하게는 환의 직경 5 내지 10㎜일 수 있다. 환의 직경이 상기 범위를 초과하는 크기일 경우 경구 투입시 장애을 일으킬 수 있다. 그러나 상기 환의 직경은 환자의 연령, 상태 등에 따라 변할 수 있는 것으로 상기 환의 직경에 의해 본 발명의 범위가 한정되는 것은 아니다.

[0048] 상기 제조된 환은 열풍건조 및 진공건조하는 것이 바람직하나, 이에 한정되지 않고 이외의 생산수율 및 건조비용을 줄일 수 있는 건조방법을 사용할 수 있다.

[0049] 본 발명에서는 다시마 발효분말을 유효성분으로 포함하는 항산화용 조성물, 숙취해소용 조성물 또는 간기능 개선용 조성물을 제공하고자 한다.

[0050] 이때, 다시마 발효분말은 그 제조방법에 있어 특별히 한정되는 것은 아니나, 바람직하게는 본 발명에서 제시된 다시마 발효분말의 제조방법에 의해 얻어진 것일 수 있다.

[0051] 본 발명의 조성물은 천연물질로부터 추출된 것으로 항산화력, 숙취해소력 및 간기능 개선력이 뛰어나고 부작용이 적으면서도 안정적이어서, 식품, 의약품, 화장품 등 원료로서 사용 가능하며, 또한 약학적으로 허용되는 범위에서 직접 복용할 수도 있을 것이다.

[0052] 본 발명의 조성물은 오일 또는 수성매질에서 용액, 현탁액 또는 유화액의 형태가 되거나, 사용하기 전에 무균상태의, 발열물질이 제거된 물로 녹여 사용하는 건조분말의 형태 등의 피부 외용제 또는 경구용 제형으로 제형화할 수도 있고, 피하주사, 정맥주사 또는 근육주사 등의 비경구형 제형으로 제형화할 수도 있다.

[0053] 피부 외용제의 경우는 본 발명의 피부외용제 조성물은 피부에 적용할 수 있는 통상적인 제형으로 제형화될 수 있으며, 예를 들면 유연화장수, 수렴화장수, 영양화장수, 영양크림, 마사지크림, 에센스, 아이크림, 아이에센스, 클렌징크림, 클렌징폼, 클렌징워터, 팩, 파우더, 보디로션, 보디크림, 보디오일, 보디에센스, 메이컵 베이스, 파운데이션, 보디 세정제, 치약 또는 구강청정액 등과 같은 화장품뿐만 아니라 액상비누, 고형비누, 세안 폼 (foam)과 같은 인체세정제 등으로 제형화될 수 있다. 이들 각 제형은 그 제형의 제제화에 필요하고 적절한 각종의 기제와 첨가물을 함유할 수 있으며, 이들 성분의 종류와 양은 당업자에 의해 용이하게 선정될 수

있다.

[0054] 경구용 제형의 경우는 약제학적으로 허용 가능한 담체 (carrier) 또는 부형제 (forming agent)를 이용하여 공지의 방법으로, 예를 들면, 정제, 트로키제, 함당정제, 수성 또는 유성 현탁액, 분산 가능한 가루 혹은 입자, 유화액, 연질 혹은 경질 캡슐, 시럽, 일릭서와 같은 형태의 경구형 제형으로 제제화될 수 있으며, 이는 단위 투여량, 형태 등에 따라 알맞게 제조될 수 있다. 비경구형 제형은 멸균된 주사 가능 용액 혹은 무독성의 사용 가능한 희석제 (diluent)나 1,3-부탄디올 등의 용매에 활성성분을 현탁시킨 현탁액으로 제제화하여 주사할 수 있다. 사용 가능한 부형제나 용매로는 물, 링거액 그리고 등장성 식염수용액이 있으며, 에탄올, 폴리에틸렌글리콜, 폴리프로필렌글리콜 같은 공용매를 사용할 수 있다. 또한, 멸균된 비휘발성 오일을 관습적으로 용매 혹은 현탁 용매로 사용할 수 있다. 좌제 형태는 약물을 상온에서는 고체였다가 직장내의 온도에서는 액체가 되어 직장 내에서 녹아 약물을 방출하게 하는 적절한 무자극성 부형제, 예를 들면, 코코아버터 또는 폴리에틸렌글리콜 등과 혼합하여, 제제화한 후, 직장에 투여한다.

[0055] 본 발명의 조성물을 첨가할 수 있는 식품으로는, 예를 들어, 각종 식품류, 음료, 껌, 차, 비타민 복합제, 건강기능 식품류 등이 있다. 본 발명의 조성물을 함유하는 외에는 다른 성분에는 특별한 제한이 없으며 통상의 음료와 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다.

발명의 효과

[0056] 본 발명에서는 다시마를 발효 균주로 발효하여 수용성 및 비수용성 다시마 발효분말을 제조하는 방법을 제공함으로, 동시에 두 가지 제품을 생산할 수 있으므로 생산성과 수율을 높일 수 있다. 또한 본 발명의 제조방법에 의해 제조된 기능성 다시마 발효분말은 항산화, 숙취해소 및 간기능 개선에 있어 뛰어난 효능을 나타내기에 약학, 건강식품, 화장품 등 다양한 산업분야에 활용가능함으로 본 발명의 산업적 가치는 클 것이다.

도면의 간단한 설명

[0057] 도 1은 본 발명에 의한 유산균 발효공법에 의한 기능성 다시마 발효분말을 제조하는 전체적인 공정의 흐름도를 나타낸 것이다.

도 2는 본 발명에 의한 주 원료인 다시마 추출농축액을 제조하는 전체적인 공정의 흐름도를 나타낸 것이다.

도 3은 본 발명에 의해 제조된 기능성 다시마 발효분말과 대표적인 항산화 물질인 BHA와의 DPPH 라디칼 소거 활성을 비교한 그래프를 나타낸 것이다.

도 4는 본 발명에 의해 제조된 기능성 다시마 발효분말과 대표적인 항산화 물질인 BHA와의 Superoxide 라디칼 소거 활성을 비교한 그래프를 나타낸 것이다.

도 5는 본 발명에 의해 제조된 기능성 다시마 발효분말과 대표적인 항산화 물질인 BHA와의 xanthine oxidase 억제 활성을 비교한 그래프를 나타낸 것이다.

도 6은 본 발명에 의해 제조된 기능성 다시마 발효분말의 알코올 분해능을 나타내는 그래프를 나타낸 것이다.

도 7은 본 발명에 의해 제조된 기능성 다시마 발효분말의 아세트알데하이드 분해능을 나타내는 그래프를 나타낸 것이다.

도 8은 실시예3의 본 발명에 의해 제조된 기능성 다시마 발효분말을 이용하여 간기능 개선능을 분석하기 위한 동물시험개요를 나타낸 것이다.

도 9는 본 발명에 의해 제조된 기능성 다시마 발효분말의 sd rats의 간손상 모델에 의한 GPT 수치의 변화에 미치는 영향을 나타내는 그래프를 나타낸 것이다.

도 10은 본 발명에 의해 제조된 기능성 다시마 발효분말의 sd rats의 간손상 모델에 의한 감마-GT 수치의 변화에 미치는 영향을 나타내는 그래프를 나타낸 것이다.

도 11은 본 발명에 의해 제조된 기능성 다시마 발효분말의 sd rats의 간손상 모델에 의한 간손상으로부터 간기능 개선에 미치는 영향을 병리조직학적 관찰로 알아본 그림를 나타낸 것이다.

도 12은 본 발명에 의해 제조되는 기능성 다시마 발효환의 제조공정도를 나타낸 것이다.

도 13은 외부순환식 감압형 분리막 장치의 작동원리를 나타내는 흐름도이다.

도 14는 외부순환식 가압형 분리막 장치의 사진과 공경 (pore size)별로 fraction을 받아내는 과정을 나타내는 흐름도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0058] 본 발명은 이하 실시예 및 실험예로써 상세히 설명하지만, 본 발명의 기술적 범위가 이들 실시예 및 실험예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예 및 실험예에 의해 한정되는 것은 아니다.

[0059] **<실시예>**

[0060] **실시예1 : 기능성 다시마 발효분말의 제조 공정 (도1)**

[0061] 1) 본 발명의 제조공정에 사용되는 다시마는 건다시마, 생다시마 및/또는 다시마 추출농축액을 사용한다. 기능성 다시마 발효분말의 주원료인 다시마를 수세, 탈염 및 분쇄를 비롯한 분쇄 등의 방법으로 전처리한다. 전처리된 원료를 전체중량의 10~30%이 되도록 물을 혼합한 후, 121℃에서 15분간 멸균하여 잡균을 제거한 후, 발효 적정 온도인 30~37℃까지 냉각한다. 발효균주로 유산균인 Lactobacillus brevis BJ-20을 접종하고, 30℃~37℃의 온도에서 발효한다.

[0062] 이때 발효미생물은 1~10% (v/v)가 되도록 접종하며, 발효미생물을 접종하고 발효미생물에 의한 발효가 충분히 일어날 수 있도록 2~7일간 발효한다. 발효가 끝난 다시마 및 발효액을 121℃에서 15~20분간 고온가압 멸균하여 발효기간 중에 대수적으로 증식한 발효미생물을 사멸시킨다. 진동체를 이용하여 발효액과 발효된 다시마를 분리한다.

[0063] 2) 상기 멸균된 발효액을 0.05~0.1um이하의 수용성 물질만을 정밀 여과하여 맑고 깨끗한 발효액만을 취한 후, 수용성의 발효액은 분무건조 또는 동결건조 등의 방법으로 건조한 후, 분쇄하여 분말화한다.

[0064] 3) 상기 1)에서 비수용성의 발효된 다시마를 진공건조 또는 열풍건조 등의 방법으로 건조한 후, 분쇄하여 분말화한다.

[0065] 4) 상기 2) 및 3)에서 분말화된 기능성 발효소재를 용량에 맞게 포장한다.

[0066] **실시예2 :다시마 추출 농축액의 제조 공정 (도2)**

[0067] 다시마 추출농축액은, 다시마를 수세, 탈염 및 분쇄하여 전처리한 후, 전처리된 다시마에 물을 10~20배수로 가수하여 60~100℃로 가온한 후 교반하면서 30~180분간 추출한다. 추출이 완료되면 이를 냉각하여 진동체로 다시마의 잔사를 제거한다. 잔사가 제거된 다시마 추출액을 공경 (pore size)이 0.05um~0.1um인 모듈을 가지는 외부순환식 감압형 분리막을 이용하여 수용성 물질만을 정밀여과하고 정밀여과된 다시마 추출액을 브릭스가 10~30%가 되도록 농축한다. 농축된 다시마 추출농축액을 유산균 발효공정에 첨가하기에 용이하도록 포장한다.

[0068] **실시예3 : 시험계의 선정**

[0069] 1) 시험계 정보

표 2

[0070]

항목	본시험
종(계통)	SD계통의 특정병원체부재(SPF) 랫드
공급원	㈜ 샘타코
성 별	수컷
입수시 주령	5

입수시 동물수	20 마리
입수시 체중범위	120 - 150 g (체중범위 20% 이내)
투여개시시 주령	6
투여개시시 동물수	20 마리

[0071] 2) 시험계 선정이유

[0072] SD 랫드는 간 기능 개선 시험에 있어서 비교 가능한 기초자료가 풍부하게 축적되어 있어 시험결과의 해석이 용이하여 이를 선택하였다

[0073] 3) 동물사육환경

[0074] 온습도 범위 : 40 ~ 60 %, 19 ~ 25 ℃

[0075] 기류속도 : 13 ~ 18 cm/초

[0076] 환기횟수 : 10 ~ 20 회/hr

[0077] 기압차 : 2 ~ 10 mmH2O

[0078] 명암 cycle : 07:00 점등 ~ 19:00 소등

[0079] 조도 : 150 ~ 300 Lux

[0080] 사육 상자의 종류(크기) : Polycarbonate cage (폭 26 cm, 길이 42 cm, 높이 18 cm)에 각 5마리씩 수용한다. 사육 상자에는 시험번호와 동물번호를 기재한 개체식별카드를 부착하였다.

[0081] 깔짚 : (주) 샘타코로부터 아스펜포로우스 (동물사료용 깔짚)를 도입하여 고압증기멸균 (121 ℃, 20분)한 후 시험에 사용하였다.

[0082] 4) 사료

[0083] 종류 : 방사선 (Cobalt 60 Irradiator Js 10000) 멸균된 실험동물용 고형 사료

[0084] 공급원 : 샘타코 (경기도 오산시 서랑동 77-1번지)

[0085] 급여법 : 사료전용 삽 이용하여 철망 위에 공급하여 자유섭취시켰다.

[0086] 오염물질 확인 : 사료공급업체의 성적서로 대체하고 이상발견시 즉시 반환하지만 본 시험에서는 오염물질 등의 이상이 발견되지 않았다.

[0087] 5) 물

[0088] 종류 : 유수살균처리 장치 ((주)대성테크윈) 통해 여과 후 고압멸균 처리된 물을 사용하였다.

[0089] 급여법 : 유수살균처리 장치를 통해 여과된 물을 급수병에 담아 고압멸균 처리 후 자유섭식 시켰다.

[0090] 오염물질의 분석 : 물 중의 오염물질 검사는 1년에 2회 정기적으로 공인 수질검사소를 통해 검사하고, 이상발생 시 즉시 조치하도록 하나 본 시험에서는 검사 의뢰하여 음용수로 적합함을 통보받았다.

[0091] 6) 예비과정

[0092] 검역 및 순화 (SOP-사육-017) : 입수 시 모든 동물의 일반건강상태에 대한 수의학적 검사를 실시하였고, 1주간의 순화/검역 기간을 거친 후 체중감소 및 일반증상 등의 이상이 없어 시험에 사용하였다. 본 시험에서는 검역 및 순화관찰 중 이상동물의 발생이 없었다.

[0093] 군분리법 (SOP-사육-011): 투여개시일에 체중을 측정하고 순위화한 체중을 이용하여 각 군별 평균과 표준편차

가 일정하도록 군분리하였다.

[0094] 식별법 (SOP-사육-012) : 개체식별은 미부 표시법을 사용하며 순화시에는 검정색으로, 군 분리 이후부터는 청색으로 표시하였다. 사육상자식별은 개체식별카드 표시법을 사용하여 순화시 흰색으로 표시하고, 군분리 이후에는 흰색 (G1군: 에탄올 투여 대조군), 노란색 (G2군:시험물질 투여군 - 저농도 25mg/kg/day), 파란색 (G3군:시험물질 투여군 - 중농도 250mg/kg/day), 빨간색 (G4군:시험물질 투여군 - 고농도 2500mg/kg/day)으로 표시하였다. 사육상자대에 N-GLP시험을 표시하고, 사용동물실의 입구에는 시험번호, 시험제목, 동물실 사용기간, 시험책임자명, 시험자명을 기재한 동물실 사용기록지를 부착하였다.

[0095] **실시예 4: 시험물질 및 독성 유발물질**

[0096] 1) 시험물질

[0097] 명칭 : 기능성 다시마 발효분말

[0098] 외관 및 성상 : 연갈색의 분말

[0099] 농도 설정: 2,500 mg//kg/day을 최고농도로 하여 공비 10의 3단계로 설정하였다.

[0100] 취급: 초순수 제조장치로부터 생산된 3차 증류수로 희석한 20% 에탄올에 용해하여 최고용량군의 시험물질을 조제하고, 20% 에탄올로 단계 희석하는 방법으로 낮은 용량군의 시험물질을 조제하였다.

[0101] 투여 : 농도별 시험물질 용액 5 ml/kg/day를 존대를 사용하여 경구로 투여하였다.

[0102] 2) 독성유발물질

[0103] ① 에탄올

[0104] 로트번호 : K39133283

[0105] 취급 : 삼차 증류수에 20%로 희석하여 제조하였다.

[0106] 투여 : 시험물질 투여 4시간 후 20% 에탄올 5 ml/kg/day를 추가로 경구투여하였다.

[0107] ② 사염화탄소 (CCl4)

[0108] 로트번호 : 5G2207

[0109] 취급 : Olive oil에 50% 또는 20%로 혼합하여 조제하였다.

[0110] 투여 : 급성 간손상 유도를 위하여 50% 사염화탄소 1 ml/kg/day를 일회 복강주사하였으며, 간손상 유지를 위하여 20% 사염화탄소 2 ml/kg/day를 경구투여하였다.

[0111] **실시예5 : 유산균 발효에 의한 기능성 다시마 발효분말을 이용한 기능성 다시마 발효환의 제조공정** (도12)

[0112] 상기 실시예1에 의하여 제조된 수용성 기능성 다시마 발효 분말과 비수용성 다시마 발효분말 및 헛개나무 과병분말을 준비하고, 상기 준비된 원료를 배합비율에 맞게 혼합하였다. 수용성 기능성 다시마분말은 전체 중량의 5~30%, 비수용성 다시마 발효분말은 50~90%, 헛개나무 과병분말은 5~30%가 되도록 혼합비율을 조절하여, 적당량의 급수 (2~20%)를 첨가하여 이들 원료가 100%가 되도록 칭량하였다.

[0113] 혼합된 수용성 및 비수용성 기능성 다시마 발효분말과 헛개나무 과병분말을 제환기를 이용하여 직경이 5~10㎜의 크기의 환으로 제조한 후, 건조기로 이송하여 건조하였다. 상기 건조된 환을 포장단위에 맞게 포장하였다.

[0114] **<실험예 >**

[0115] **실험예1 : 기능성 다시마 발효분말의 항산화 활성 분석**

[0116] 상기의 실시예에서 제조된 수용성의 기능성 다시마 발효분말의 항산화 활성을 알아보았다.

[0117] **실험예 1-1 DPPH radical scavengng activity**

[0118] 기능성 다시마 발효분말의 농도별 항산화 활성을 positive control인 BHA와 비교하여 알아보았다 (A: 건다시마 발효분말, B: 생다시마 발효분말, C: 다시마 추출농축액 발효분말, D: 건다시마, 다시마 추출농축액의 혼합 발효분말).

[0119] 시료를 96 well plate에 0.1 ml씩 분주하고 0.4 mM DPPH (a,a'-diphenyl-β-picrylhydrazyl) 용액을 동량 첨가하여 실온에서 30분간 방치한 후 540 nm에서 흡광도를 측정하였다 (Wallac 1420, USA). 이때 대조구인 BHA는 시료와 같은 농도로 첨가하여 위에서와 동일한 방법으로 흡광도를 측정하였으며 (Wallac 1420, USA), 3번 반복을 원칙으로 하여 평균값을 구하였다.

[0120]

[0121] Electronic donating ability (%) = [(공시료군- 반응군)/공시료군]×100

[0122] 하기 도3에서 나타난 바와 같이, positivity control인 BHA에 비하여 유사하거나 높은 수치를 나타내었다. BHA는 DPPH 소거활성이 50ug/ml에서 48.7%, 100ug/ml에서 83.8%를 나타내었으며, 각 시료의 경우 A는 50ug/ml에서 41.6%, 100ug/ml에서 72.7%를, B는 50ug/ml에서 28.3%, 100ug/ml에서 52.0%를, C는 50ug/ml에서 67.0%, 100ug/ml에서 80.5%를, D는 50ug/ml에서 89.7%, 100ug/ml에서 91.6%를 각각 나타내었다. 이는 본 발명에 의해 제조된 기능성 다시마 발효액이 정제되지 않은 crude한 상태인 것을 감안할 때, 상당히 높은 수치를 나타내는 것으로 확인되었다.

[0123] **실험예 1-2 Superoxide radical scavengng activity**

[0124] 상기 실험예 1-1과 같은 시료에 0.5 mM xanthine과 1 mM EDTA를 200 mM phosphate buffer (pH 7.5) 100 ㎕에서 준비하였고 50 mU/mL xanthine oxidase를 첨가하여 1시간 동안 반응을 유도한다. 그 후 0.5mM NBT를 첨가한 후 37℃에서 20분 동안 반응시켰다. 다음, 여기에 2.0 N HCl를 첨가하여 반응을 중지시키고 560 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이때 대조구인 BHA는 시료와 같은 농도로 첨가하여 위에서와 동일한 방법으로 흡광도를 측정하였으며 (Wallac 1420, USA), 3번 반복을 원칙으로 하여 평균값을 구하였다.

[0125] Superoxide scavenging activity (%)=(공시료군-반응군)/(공시료군-색보정군)×100

[0126] 하기 도 4에 나타난 바와 같이, positivity control인 BHA에 비하여 유사하거나 높은 수치를 나타내었다. BHA는 Superoxide 소거활성이 50ug/ml에서 56.4%, 100ug/ml에서 93.8%를 나타내었으며, 각 시료의 경우 A는 50ug/ml에서 25.7%, 100ug/ml에서 49.2%를, B는 50ug/ml에서 34.6%, 100ug/ml에서 55.7%를, C는 50ug/ml에서 52.3%, 100ug/ml에서 83.8%를, D는 50ug/ml에서 80.2%, 100ug/ml에서 91.4%를 각각 나타내었다. 이는 본 발명에 의해 제조된 기능성 다시마 발효액이 정제되지 않은 crude한 상태인 것을 감안할 때, 상당히 높은 수치를 나타내는 것으로 확인되었다.

[0127] **실험예 1-3 Xanthine oxidase inhibitory assay**

[0128] 상기 실험예 1-1과 같은 시료와 0.5 mM xanthine과 1 mM EDTA를 200 mM phosphate buffer (pH 7.5) 100 ㎕에서 준비하였고 50 mU/mL xanthine oxidase를 첨가하여 1시간 동안 uric acid의 생성을 유도하였다. Xanthine/xanthine oxidase에 의한 uric acid 생성은 290 nm에서 증가된 흡광도 (Wallac 1420, USA)에 의해 측정하였고, 이때 대조구인 BHA는 시료와 같은 농도로 첨가하여 위에서와 동일한 방법으로 흡광도를 측정하였으며 (Wallac 1420, USA), 3번 반복을 원칙으로 하여 평균값을 구하였다.

[0129] Xanthine oxidase scavenging activity (%)=(공시료군-반응군)/(공시료군-색보정군)×100

[0130] 하기 도 5에 나타난 바와 같이, positivity control인 BHA에 비하여 유사하거나 높은 수치를 나타내었다. BHA는 xanthine oxidase 억제 활성이 50ug/ml에서 71.3%, 100ug/ml에서 99.4%를 나타내었으며, 각 시료의 경우 A는 50ug/ml에서 45.1%, 100ug/ml에서 61.8%를, B는 50ug/ml에서 50.5%, 100ug/ml에서 68.3%를, C는 50ug/ml에서 70.9%, 100ug/ml에서 93.9%를, D는 50ug/ml에서 88.1%, 100ug/ml에서 92.3%를 각각 타내었다. 이는 본 발명에 의해 제조된 기능성 다시마 발효액이 정제되지 않은 crude한 상태인 것을 감안할 때, 상당히 높은 수치를 나타내는 것으로 확인되었다.

[0131] **<실험예 2> 기능성 다시마 발효분말의 숙취해소능 분석**

[0132] 상기의 실시예1에서 제조된 수용성의 기능성 다시마 발효분말의 숙취해소능을 알아보기 위하여, 건다시마를 이용하여 제조된 수용성의 기능성 다시마 발효분말을 대상으로 알코올과 숙취의 주원인 물질인 아세트 알데하이드 분해능을 조사하였다.

[0133] **실험예 2-1 알코올 분해능 측정**

[0134] ADH activity은 Blandino의 방법 (Bostian. et. al., 1978)을 변형하여 측정하였다. 반응액의 조성은 증류수 1.4 mL, 1.0 M tris-HCl buffer (pH 8.8) 0.75 mL, 20 mM NAD+ 0.3 mL, ethanol 0.3 mL, sample 0.1 mL의 혼합액과 효소원 0.15 mL를 cuvette에 넣어 총 3 mL가 되도록 조절한 다음, 30℃에서 5분간 preincubation한 후, 5분간 340 nm에서 흡광도의 변화를 측정하였다. ADH activity는 대조군에 대한 상대활성(%)으로 나타내었다. 대조군은 상기의 기능성 다시마 발효분말을 첨가하지 않은 것으로 하였다.

[0135]

[0136] ADH activity (%) = (시료 흡광도 -blank 흡광도)/(대조군 흡광도-blank 흡광도) X 100

[0137] 하기 도 6에 나타난 바와 같이, 대조군에 비하여 높은 수치를 나타내었으며, ADH activity는 기능성 다시마 발효분말을 첨가하지 않은 경우를 기준으로 10 mg/mL인 경우 124 %, 50 mg/mL인 경우 138 % 및 100 mg/mL인 경우 142 %로 농도 의존적으로 증가하였다. 이와 같은 다시마 발효물의 처리농도에 따른 ADH activity 변화의 결과로 미루어 보아 다시마 발효물은 ADH의 활성을 증가시키는 효과가 있는 것으로 확인되어 알코올 분해에 기여할 것이라 사료되었다.

[0138] **실험예 2-2 아세트알데하이드 분해능 측정**

[0139] ALDH activity는 Blandino의 방법 (Bostian. et. al., 1978)을 변형하여 측정하였고, 흡광도 340 nm에서 NADH의 생성속도를 지표로 사용하였다. 증류수 2.1 mL, 1.0 M tris-HCl buffer (pH 8.8) 0.3 mL, 20 mM NAD+ 0.1 mL, 1.0 M acetaldehyde 0.1 mL, 3.0 M KCl 0.1 mL, 0.33 M 2-mercaptoethanol 0.1 mL, sample 0.1 mL를 반응혼액으로 하여 여기에 효소원 0.1 mL를 cuvette에 넣어 총 3 mL가 되도록 조절하여 30℃에서 5분간 preincubation 한 후, 5분간 340nm에서의 흡광도의 변화를 측정하였다. 시료의 ALDH activity은 대조군에 대한 상대활성 (%)으로 나타내었다.

[0140]

[0141] ALDH activity (%) = [(시료 흡광도-blank 흡광도)/(대조군 흡광동-blank 흡광도)] X 100

[0142] 하기 도 7에 나타난 바와 같이, ALDH activity는 다시마 발효물을 첨가하지 않은 것을 기준으로 10 mg/mL인 경우 104 %, 그리고, 50 mg/mL인 경우 107 %로 2종의 농도 간에는 차이가 없었으나, 다시마 발효물의 농도가 100 mg/mL인 경우 117 %로 0-50 mg/mL인 경우에 비하여 5% 유의수준에서 차이가 있었다.

[0143] **<실험예 3> 기능성 다시마 발효분말의 간기능 개선능 분석**

[0144] 실시예 3 및 실시예4에 따라서 에탄올 및 사염화탄소를 복합적으로 병행하여 간손상을 유발시킨 흰쥐의 간손상 모델을 이용하여 기능성 다시마 발효분말의 간손상에 대한 방어능력 및 간기능 회복능을 평가하고자 하였다. 본 실험예에서는 실험예 2에서 사용한 것과 동일한 건다시마를 이용하여 상기의 실시예 1의 과정으로 제조된 수용성의 기능성 다시마 발효분말을 이용하였다.

[0145] 본 발명의 시험계를 4가지로 구분하였다: G1 (M01~M05)는 에탄올만 투여한 대조군이고; G2 (M06~M10)는 저농도 시험물질(25 mg/kg/day) 투여군이며; G3 (M11~M15)는 중농도 시험물질(250 mg/kg/day) 투여군이고; G4 (M16~M20)는 고농도 시험물질(2500 mg/kg/day) 투여군이다.

[0146] 에탄올과 함께 시험물질을 13주간 연속으로 투여하는 과정에서 주기적으로 측정한 혈액 생화학분석 결과, 모든 시험군에서 간 손상의 징후가 나타나지 않았다. 따라서 50% 사염화탄소를 일회 복강주사하고 (1 ml/kg/day), 24시간 뒤 혈액 생화학분석을 통하여 급성 간손상 정도를 확인하였다. 이후로 20% 사염화탄소를 10일간 경구투여하고 (2 ml/kg/day), 혈액 생화학분석을 통하여 반복노출에 의한 간 손상 정도를 최종 확인한 다음, 3일 간의 회복기간을 거치고 모든 실험동물을 부검하였다 (도8). 본 실험에서 얻은 측정치의 통계학적 분석은 SPSS Package를 이용하여 일원배치 분산분석 (one-way analysis of variance)을 한 후, 대조군과 각 용량군 사이에 유의수준 $p<0.05$ 및 $P<0.01$ 로 Dunnett's t-test를 이용하여 비교하였다.

[0147] **실험예3-1 혈액 생화학검사**

[0148] 미정맥 또는 부검 시 복대동맥을 통하여 채혈한 혈액으로부터 분리한 혈청에서 Glutamic Pyruvate Transaminase (GPT), γ-glutamylpeptide (γ-GT)을 자동생화학분석기 (Clima plus, RAL, Germany)를 이용하여 분석하였다.

[0149] 일반적으로 초기 간질환 유발의 형태는 간세포 손상 (hepatocytic injury)과 담관폐쇄 (bile duct obstruction)의 두 가지 유형으로 구분되며, 간세포 손상에 의해서는 혈액 내 GPT의 급격한 증가가, 담관폐쇄에 의해서는 γ-GT의 상승이 특징이므로 보편적인 간 손상의 지표로 이용되고 있다.

[0150] 하기 도 9에 나타낸 바와 같이, GPT 측정결과는 간 손상 대조군인 G1군의 경우 pre-injury 시료와 acute injury 시료를 분석하였을 때, 30 U/L에서 520 U/L로 급격하게 증가하여 ($P<0.01$), 급성 간손상이 유발되었음을 확인하였다. 또한 사염화탄소 반복 노출 이후의 repeated injury 시료에서도 644 U/L로 지속적인 증가 양상을 보일 뿐만 아니라, 3일간의 회복기를 거친 recovery 시료에서도 135 U/L로 비교적 높은 수치를 나타내었다.

[0151] 시험물질을 투여한 시험군의 경우 acute injury 시료에서는 G1군에 비해 G2, G3, G4군 모두 통계적으로 유의한 차이를 보이지 않았지만, repeated injury 시료와 recovery 시료에서는 G1군에 비해 G2, G3, G4군 모두 통계적으로 유의한 차이를 나타내었고 ($p<0.05$), 특히 recovery 시료에서 G2, G3, G4군 모두 정상적인 수준으로 회복되는 양상을 확인하였다. 이러한 결과는 시험물질이 간 독성 물질 노출에 대하여 어느 정도의 방호작용과 빠른 회복에 기여함을 시사한다.

[0152]

[0153] **실험예 3-2 부검**

[0154] 실험이 종료된 시점에서 모든 실험동물을 부검하면서 특정 장기의 이상 여부를 관찰하면서 특히 간에 대한 외형적 손상 여부를 확인하였다. 부검 과정 중에 복대동맥을 통하여 채혈한 혈액은 혈액 생화학분석과 혈액학적 분석을 실시하였다. 또한, 간을 적출하여 조직병리학적 검사를 실시하였다.

[0155] 하기 도 10에 나타낸 것과 같이, γ-GT 측정결과는 G1군의 경우, pre-injury 시료와 acute injury 시료를 분석하였을 때, 4 U/L에서 5 U/L로 수치 변화가 없었으나, repeated injury 시료에서는 21 U/L로 증가 양상을 확인하였다. 이는 일반적으로 랫드에서 간 독성물질에 대하여 큰 변화를 보이지 않는 γ-GT도 지속적인 알코올 투여

상태에서 사염화탄소 반복 노출로 인한 상승효과에 기인하는 것이라 보인다.

[0156] 시험물질을 투여한 시험군의 경우, acute injury 시료에서는 G1군과 마찬가지로 변화를 보이지 않았지만, repeated injury 시료에서는 G2, G3, G4군 모두 수치의 증가 정도가 대조군에 비하여 현저히 적었으며($p<0.05$) 분명한 농도 의존적 양상을 보였다. 특히 recovery 시료에서도 G1군에 비해 G2, G3, G4군 모두 통계적으로 유의한 차이를 나타내며 정상적인 수치로 떨어졌다.

[0157] 이러한 결과는 시험물질인 GABA추출물이 알코올에 대한 간기능 저하를 상당 부분 완충하고 있음을 확인할 수 있었다.

[0158] **실험예 3-3 병리조직학적 검사**

[0159] 간 손상의 정도를 검사하기 위하여 적출한 간을 10% 중성 formalin 용액에 고정한 후 일정한 두께 (3 ㎜)로 삭정한 다음, 일반적인 조직처리과정을 거쳐 paraffin에 포매하여 4개의 조직절편을 제작하였다. 일반적인 염색방법인 hematoxylin & eosin (H&E)으로 염색한 후 광학현미경(ZEISS, Germany) 하에서 관찰하였다. 간 조직의 손상 정도는 참고문헌 (Brunt etal.1999)을 근거로 지방변성, 공포변성, 염증소견 (소엽, 간문맥)으로 구분하여 수치화하였다. 병리조직학적 관찰 결과는 간 조직의 손상 정도는 지방변성 (macrovesicular steatosis; 0~3점), 공포변성 (hepatocellular ballooning; 0~2점), 소엽의 염증소견 (lobular inflammation; 0~3점) 및 간문맥의 염증소견 (portal tract inflammation; 0~3점) 점수를 부가하여 비교하였다.

[0160] 하기 도 11에 나타난 바와 같이, G1군 (손상군)의 경우, 에탄올 및 사염화탄소 투여에 의한 간세포의 지방변성, 공포변성, 국소성 괴사 및 염증소견을 나타내어 간 손상이 유발되었음을 확인할 수 있었다. 시험물질을 투여한 시험군의 경우, 병리조직학적 손상 정도가 대조군에 비하여 감소하였다. 각 점수의 합산 값은 G1군 5.2점, G2군 3.8점, G3군 3.5점 그리고 G4군 3.0점으로 시험물질의 농도에 비례하여 감소하는 효과를 보였다.

[0161] 이러한 결과는 시험물질인 GABA 추출물의 간 손상에 대한 방호작용과 회복능에 미치는 영향을 병리조직학적으로 뒷받침해준다.

도면

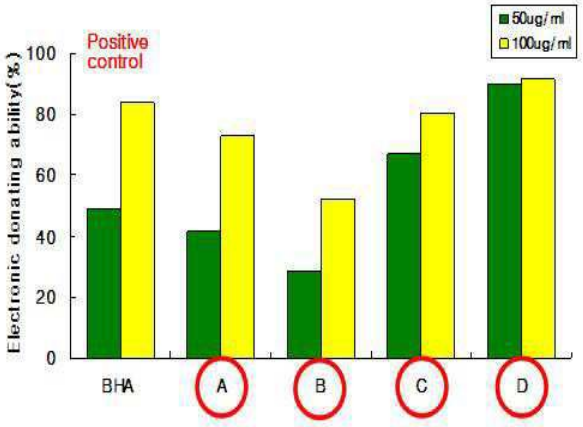
도면1


1) 원료의 전처리단계
2) 멸균단계
3) 냉각단계
4) 발효단계
5) 멸균단계
6) 고액 분리단계
수용성
비수용성
7) 정밀여과 단계
8) 건조 및 분쇄 단계
9) 포장 단계
10) 건조 및 분쇄 단계
11) 포장 단계

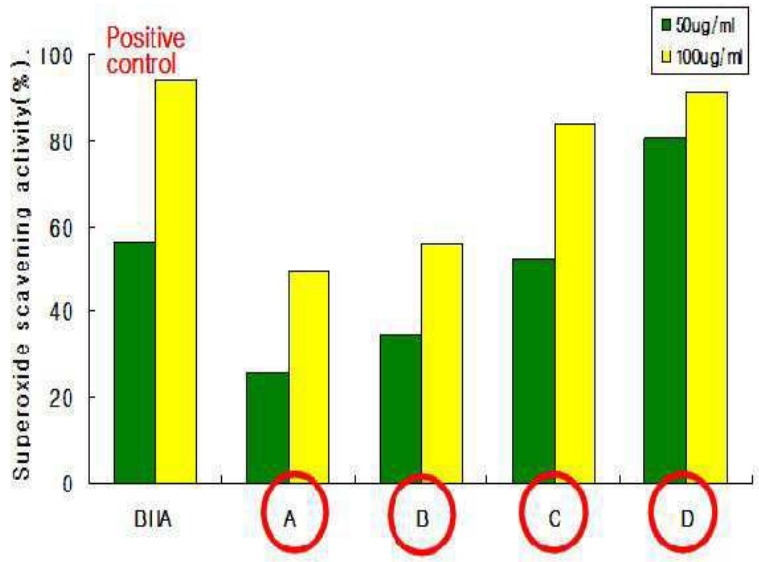
도면2


1) 원료의 전처리단계
2) 추출단계
3) 잔사의 제거 단계
4) 정밀여과 단계
5) 농축 단계
6) 포장단계

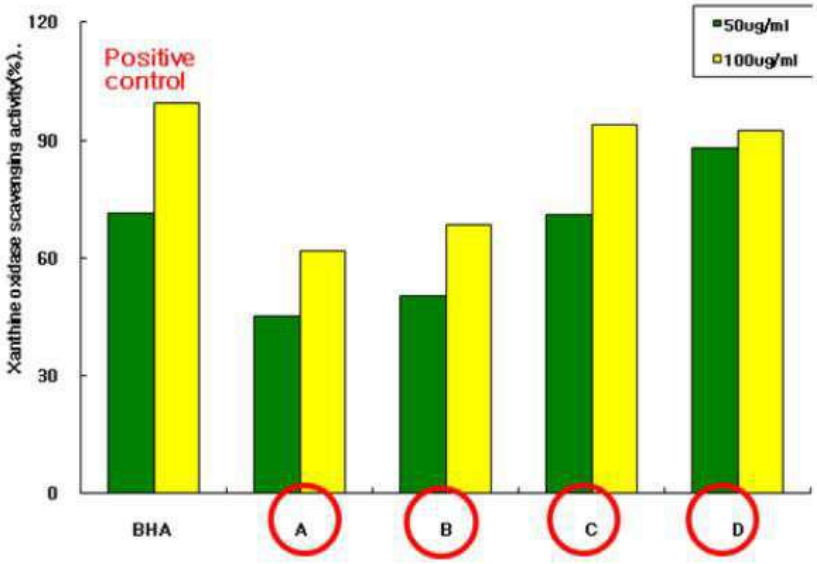
도면3


50ug/ml
100ug/ml
Positive control
Electronic donating ability(%)
100
80
60
40
20
0
BHA
A
B
C
D

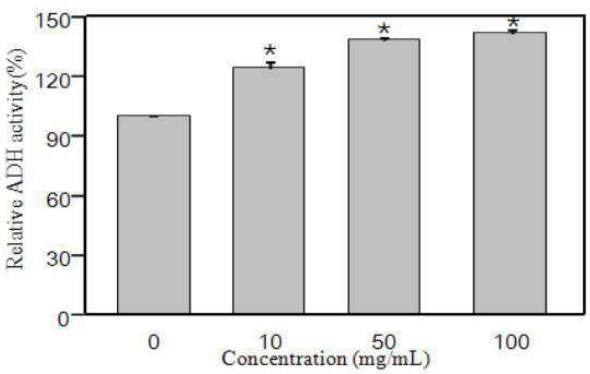
도면4


Positive control
50ug/ml
100ug/ml
Superoxide scavening activity(%).
100
80
60
40
20
0
BHA
A
B
C
D

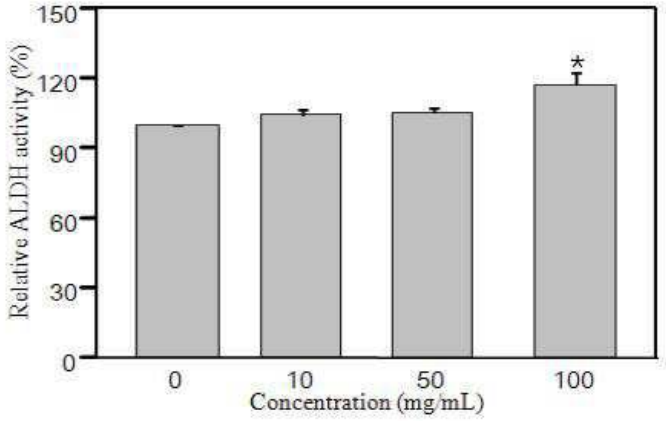
도면5


Positive control
50ug/ml
100ug/ml
Xanthine oxidase scavenging activity(%).
120
90
60
30
0
BHA
A
B
C
D

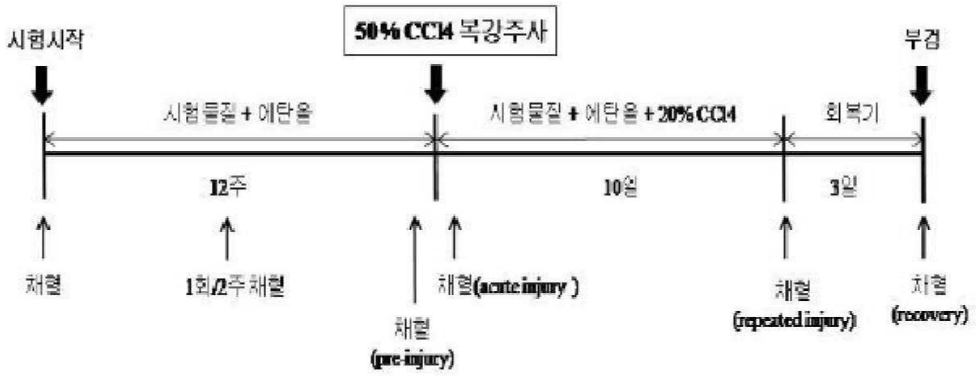
도면6


Relative ADH activity(%)
150
120
90
60
30
0
0
10
50
100
Concentration (mg/mL)

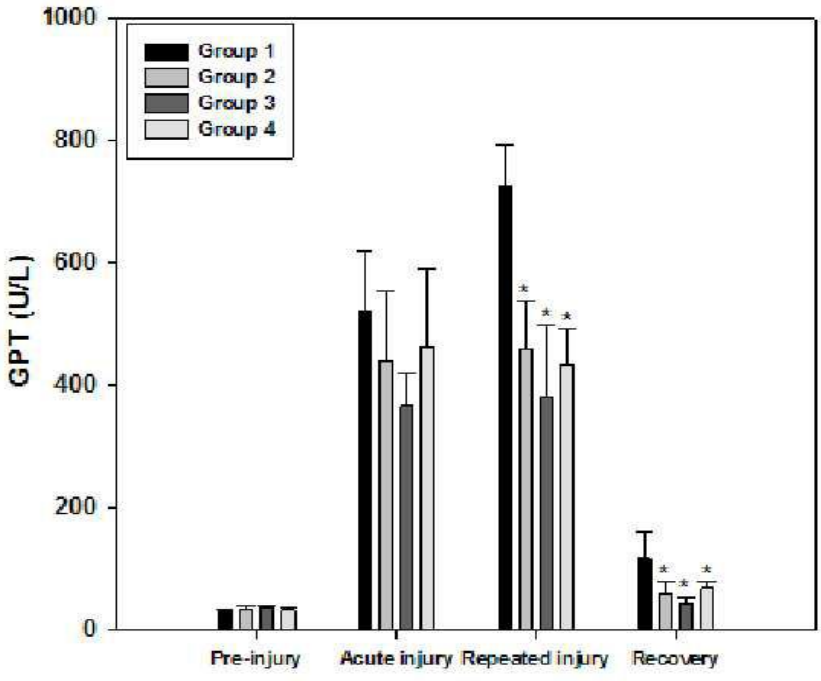
도면7


Relative ALDH activity (%)
150
120
90
60
30
0
*
0
10
50
100
Concentration (mg/mL)

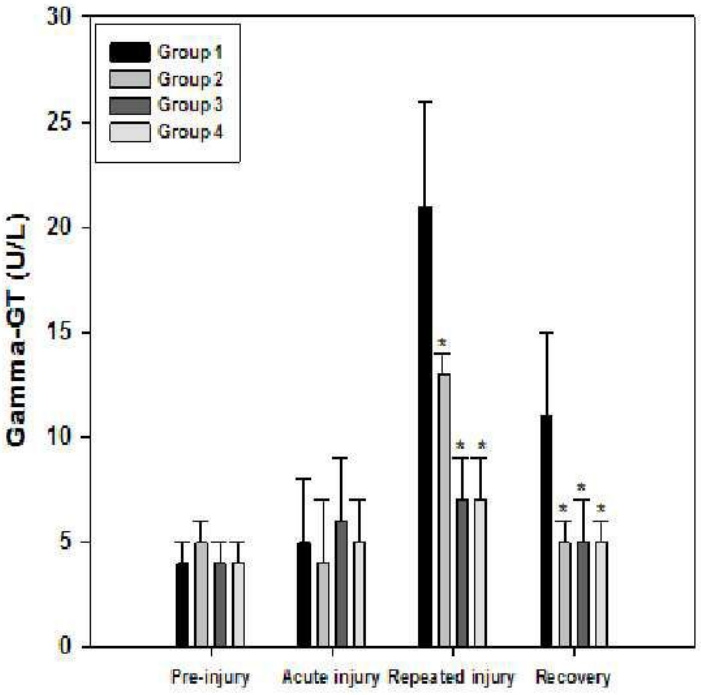
도면8


시험시작
50% CCl4 복강주사
부검
시험물질 + 에탄올
시험물질 + 에탄올 + 20% CCl4
회복기
12주
10일
3일
채혈
1회/2주 채혈
채혈(acute injury)
채혈
(pre-injury)
채혈
(repeated injury)
채혈
(recovery)

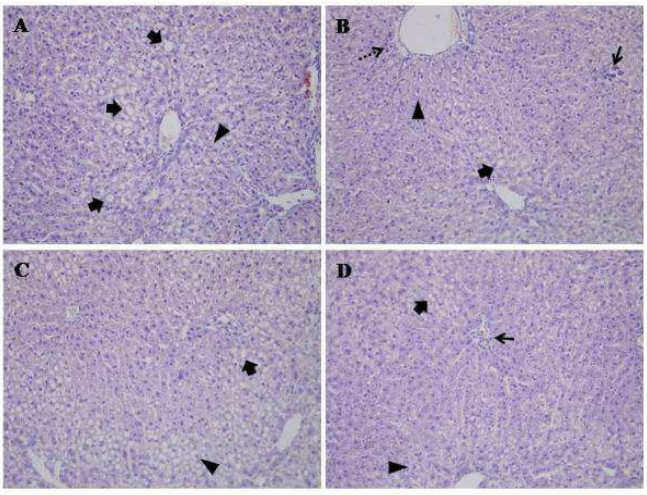
도면9


Group 1
Group 2
Group 3
Group 4
GPT (U/L)
1000
800
600
400
200
0
*
Pre-injury
Acute injury
Repeated injury
Recovery

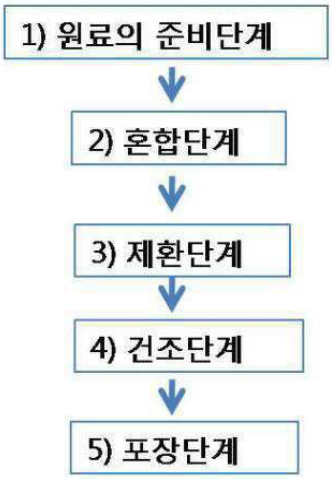
도면10


Group 1
Group 2
Group 3
Group 4
Gamma-GT (U/L)
30
25
20
15
10
5
0
Pre-injury
Acute injury
Repeated injury
Recovery

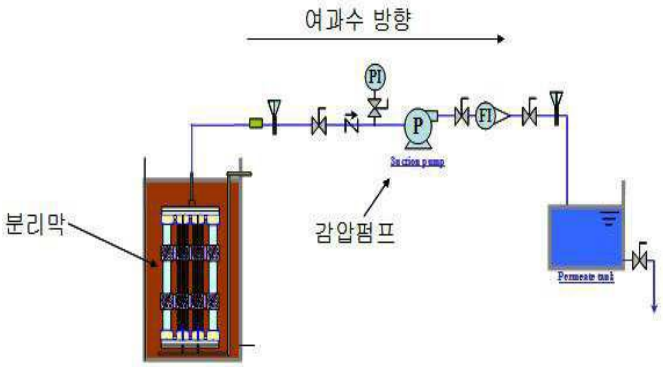
도면11


A
B
C
D

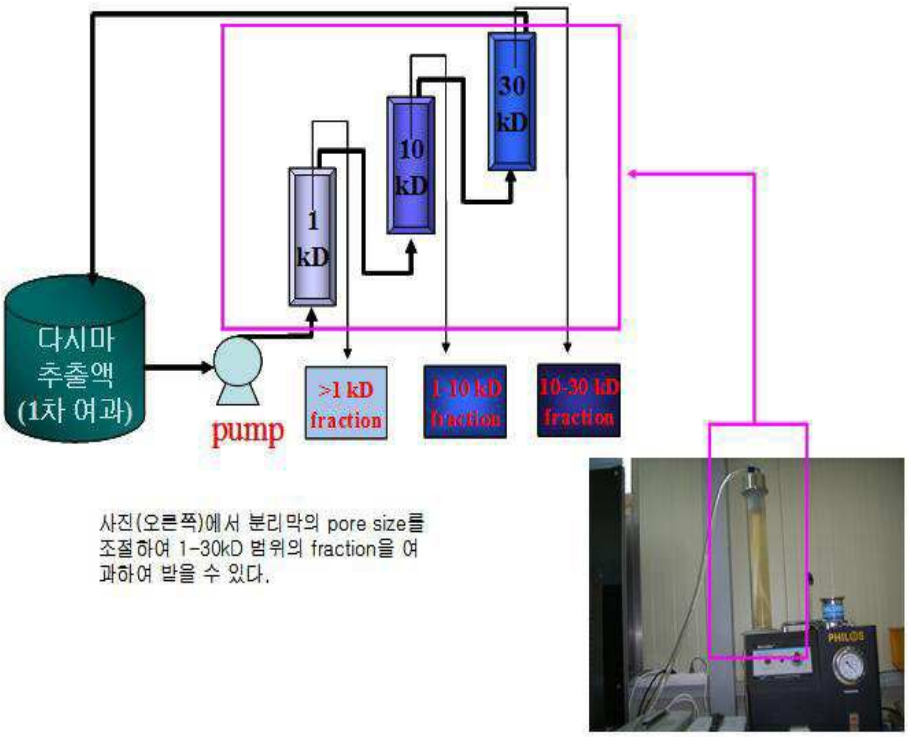
도면12



도면13



도면14



사진(오른쪽)에서 분리막의 pore size를 조절하여 1-30kD 범위의 fraction을 여과하여 받을 수 있다.