



(19)대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(51) 。 Int. Cl.

A61K 36/488 (2006.01)

A61P 19/10 (2006.01)

(11) 공개번호 10-2007-0066571

(43) 공개일자 2007년06월27일

(21) 출원번호 10-2005-0127922

(22) 출원일자 2005년12월22일

심사청구일자 2005년12월22일

(71) 출원인 한국 한의학 연구원
대전 유성구 전민동 461-24
한국식품연구원
경기 성남시 분당구 백현동 산46-1
경희대학교 산학협력단
경기도 용인시 기흥구 서천동 1 경희대학교 수원캠퍼스내

(72) 발명자 이영철
경기도 성남시 분당구 이매동 140 송림아파트 514-402호
마진열
대전광역시 유성구 지족동 919 열매마을 702-1403호
김동현
서울시 강남구 압구정동 369-1 현대아파트 20-902
신지은
서울시 용산구 이촌동 한가람 아파트 216-1802
이정운
대전광역시 유성구 전민동 363-18 302호

(74) 대리인 특허법인태평양

전체 청구항 수 : 총 7 항

(54) 갈근 추출물의 발효물 및 이를 함유하는 골다공증 예방또는 치료용 조성물

(57) 요약

본 발명은 갈근 추출물의 유산균 발효물에 관한 것으로서, 보다 상세하게는 갈근에 물을 가한 후 열수추출하고 상기 수추출물에 유산균을 접종하여 발효시킴으로써 제조되는 것을 특징으로 하는 갈근 수추출물의 유산균 발효물 및 상기 발효물을 유효성분으로 함유하는 골다공증 예방 또는 치료용 약학적 조성물 및 건강식품에 관한 것이다. 본 발명의 갈근 추출물의 발효물은 갈근 추출물만으로는 얻을 수 없는 뛰어난 골다공증 예방 또는 치료 효과를 보이며, 알콜, 특히 독성이 있는 메탄올과 같은 유기용매를 사용하지 않아 인체에 적용시키기 위한 고도의 정제과정이 필요하지 않으므로, 골다공증의 예방 또는 치료에 유용하게 사용될 수 있다.

대표도

도 5

특허청구의 범위

청구항 1.

갈근에 물을 가한 후 열수추출하고 상기 수추출물에 유산균을 접종하여 발효시킴으로써 제조되는 것을 특징으로 하는 갈근 수추출물의 유산균 발효물.

청구항 2.

제 1항에 있어서, 상기 유산균은 비피도박테리움, 락토바실러스, 스트렙토코커스, 류코노스톡, 페디오코카스 및 락토코커스 속(屬)의 미생물로 구성된 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 발효물.

청구항 3.

제 2항에 있어서, 상기 유산균은 비피도박테리움 속의 미생물인 것을 특징으로 하는 발효물.

청구항 4.

제 1항 내지 제 3항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 유산균은 시료 중량의 1 내지 5 중량%의 양으로 접종하는 것을 특징으로 하는 발효물.

청구항 5.

제 1항 내지 제 3항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 유산균은 30 내지 40℃의 온도에서 24 내지 52시간 동안 발효시키는 것을 특징으로 하는 발효물.

청구항 6.

제 1항의 갈근 수추출물의 유산균 발효물을 유효성분으로 함유하는 골다공증 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 7.

제 1항의 갈근 수추출물의 유산균 발효물을 유효성분으로 함유하는 골다공증 예방 또는 치료용 건강식품.

명세서

발명의 상세한 설명

발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

본 발명은 갈근 추출물의 발효물에 관한 것으로서, 보다 상세하게는 골다공증 예방 및/또는 치료용으로 유용하게 사용될 수 있는 갈근 추출물의 발효물에 관한 것이다.

생물의 뼈조직은 조골세포에 의한 조직의 형성과 파골세포에 의한 조직의 흡수가 끊임없이 반복되는 동적인 평형 상태를 유지하고 있다. 골다공증은 조골세포와 파골세포의 평형이 무너져 골 흡수가 골 형성보다 항진됨으로서 유발되는 질병으로, 골 조직의 석회화 감소되어 뼈의 치밀질이 얇아지고 그로 인해 골수강(骨髓腔)이 넓어지게 되며, 증세가 진전됨에 따라 뼈가 약해지기 때문에 작은 충격에도 골절되기 쉽다. 골다공증의 원인으로는 노령, 운동 부족, 저체중, 흡연, 저칼슘 식이, 폐경, 난소 절제 등이 알려져 있는데, 특히 여성의 경우 30세 이후부터 골 감소가 지속적으로 진행되며, 폐경기에 이르면 호르몬의 변화에 의해 골 감소가 급격히 진행된다. 즉, 골다공증은 정도의 차이는 있으나 노년층, 특히 폐경기 이후의 여성에게 있어서는 피할 수 없이 나타나는 증상으로, 선진국에서는 인구가 노령화됨에 따라 골다공증 및 그 치료제에 대한 관심이 점차 증가되고 있다. 골다공증은 크게 3가지 유형으로 나눌 수 있는데, 첫째는 원인불명(idiopathic)의 골다공증, 둘째는 폐경기 이후 여성호르몬 부족에 의해 나타나는 타입 I 골다공증, 셋째는 고령화된 노인층의 남녀에게 발견되는 타입 II 골다공증이다.

현재 사용되고 있는 골다공증 치료제는 대부분 에스트로겐(estrogen) 계통의 물질로서, 이들은 장기 투여할 경우 암, 담석, 혈전증 등의 부작용이 나타나는 문제점이 있다. 골다공증은 약물의 단기 투여만으로는 치료할 수 없고 약물의 장기 투여가 필수적인 질환이므로, 약물을 장기 투여할 때에도 상기와 같은 부작용이 없고 에스트로겐을 대체할 수 있을 만큼 우수한 약효를 갖는 새로운 물질의 개발이 요구되고 있다. 따라서, 콩 및 콩 가공품 등 식품에 함유된 제니스테인(genistein)이나 다이드제인(daidzein) 등의 피토에스트로겐(phytoestrogen)을 응용하여 장기간 복용할 수 있고 상대적으로 부작용이 적은 골다공증 예방 및 치료제를 개발하고자 많은 연구가 진행 중이다.

식물성 호르몬인 피토에스트로겐은 생체이용률은 비교적 낮으나 에스트로겐 수용체- α (ER- α) 및 에스트로겐 수용체- β (ER- β)에 대한 친화력이 좋고 유방암 등의 부작용이 적어 골다공증 치료제인 E2의 대체 의약품으로 각광받고 있다. 피토에스트로겐으로 알려진 물질로는 다이드제인, 제니스테인, 포르모노네티네(formononetin), 비오카닌 A (biochanin A) 등의 이소플라본(isoflavanone)류 화합물, 쿠메스트롤(coumestrol) 등의 쿠메스탄(coumestan)류 화합물, 엔테로락톤(enterolactone) 등의 리그난(lignan)계 화합물 및 엔테로디올(enterodiol) 등의 페놀(phenol)계 화합물이 있다. 상기 화합물들 중 당 화합물은 장내 박테리아의 β -글루코시다제(glucosidase) 또는 위산에 의해 가수분해되어 결국 비배당체 형태인 유리(free) 이소플라본으로 흡수된다.

한편, 갈근(葛根)은 콩과 식물의 다년생 초본인 쑥(Pueraria lobata Ohwi)의 주피를 제거하여 뿌리를 건조시킨 것으로 한국, 중국, 일본 각 지역의 산에 자생하는 생약이다. 한의학에서는 쑥의 여러 부위를 각각 분류하여 쑥뿌리를 건조한 것을 갈근, 꽃은 갈화, 열매는 갈곡 또는 갈실, 잎은 갈엽, 덩굴은 갈만이라 부르며 질병의 증상 및 치료방법에 따라 각각 다르게 사용하여 왔다.

한방에서 갈근은 기욕을 풀어 주는 작용을 하므로 감기 몸살이나 발진성 질환, 항강통 등에 해표시킬 목적으로 사용되며, 비장과 위장의 기를 상승하게 도와주어 진액을 만들어 갈증을 해소하게 하고 지사시키는 작용을 한다(본초학, 148, 1995). 또한, 사상의학에서는 태음인의 약물로 분류하여 갈근해기탕, 열다한소탕, 갈근승기탕, 조각대항탕, 갈근부평탕 등의 기본처방에 사용한다(사상의학원론, 343-50, 1985).

갈근은 이소플라보노이드(isoflavonoide)를 다량 함유하고 있으며(중약현대연구여임상응용, 626, 1994), 주로 이소플라보노이드와 관련한 성분의 연구가 많이 보고되어 있다. 갈근과 관련한 약리 작용으로는 항알콜중독(antidipsotropic) 작용(Proceeding of National Academy of Sciences of USA, 95(5):2198-203, 1998; Alcoholism: Clinical & Experimental Research 40(4):659-63, 1996), 간보호 작용(Planta Medica, 64(5):413-6, 1998), 숙취 억제 작용(Proceeding of National Academy of Sciences of USA, 94(5):1675-9, 1997), 항산화 작용(Chem. Pharm. Bull. 40(3):721-4, 1992) 등이 알려져 있다. 또한, 평활근의 이완 작용, 심혈관계에서 관상동맥 확장 및 혈압 강하, 심박동 조절 작용, 혈소판 응집 억제 작용, 강혈당 작용, 해열 작용 등이 알려져 있으며(중약현대연구여임상응용, 626-632, 1994), 노년 질환의 두통, 항강, 사지 감각 장애, 이통, 당뇨 등에도 응용된다(항노쇠중약학, 186-187, 1989).

이러한 갈근을 골다공증에 사용한 것으로는 갈근을 알콜로 추출하거나 또는 산이나 염기로 가수분해한 후, 다이드제인, 제니스테인 또는 포르모노네티네를 포함하는 추출물을 골다공증의 예방 또는 치료에 적용시킨 예가 보고된 바 있다(대한민국 특허공개 제2001-0077411호). 그러나, 상기 문헌에서는 알콜, 특히 독성이 있는 메탄올 수용액으로 갈근을 추출함으로써 실제로 인체에 적용시키기 위해서는 고도의 정제과정이 추가로 필요하다는 단점이 있었다.

이에, 본 발명자들은 물을 이용한 갈근의 수추출물을 제조한 후, 이를 미생물을 이용하여 다시 발효시킨 발효물을 제조하였고, 상기 발효물이 갈근 추출물만으로는 얻을 수 없는 뛰어난 골다공증 예방 또는 치료 효과를 보인다는 사실을 밝힘으로써 본 발명을 완성하였다.

발명이 이루고자 하는 기술적 과제

본 발명은 갈근 수추출물의 유산균 발효물과 이를 유효성분으로 함유하는 골다공증 예방 또는 치료용 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.

발명의 구성

상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 갈근 수추출물의 유산균 발효물을 제공한다.

또한, 본 발명은 상기 발효물을 유효성분으로 함유하는 골다공증 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

또한, 본 발명은 상기 발효물을 유효성분으로 함유하는 골다공증 예방 또는 치료용 건강식품을 제공한다.

이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

본 발명은 갈근 수추출물의 유산균 발효물을 제공한다.

본 발명에 따르는 갈근 수추출물의 유산균 발효물(이하, "갈근 발효물"이라 약칭함)을 제조하기 위해서는, 먼저 갈근, 바람직하게는 건조 갈근에 2~10배량의 물을 가한 후 70 내지 100℃에서 열수 추출한 수추출물을 제조한다. 상기 추출물을 냉각한 뒤 유산균을 시료 중량의 1 내지 5 중량%, 바람직하게는 2 중량%로 접종하고, 30 내지 40℃, 바람직하게는 37℃에서 24 내지 52시간, 바람직하게는 48시간 발효시킴으로써 본 발명의 갈근 발효물이 제조된다.

상기에서, 유산균으로는 분리균주 또는 시판중인 다양한 유산균을 제한없이 사용할 수 있다. 구체적으로, 비피도박테리움, 락토바실러스, 스트렙토코커스, 류코노스톡, 페디오코커스 및 락토코커스 속(屬)의 미생물, 바람직하게는 비피도박테리움 브레브(*Bifidobacterium breve*), 비피도박테리움 롱굼(*B. longum*), 비피도박테리움 인판티스(*B. infantis*), 락토바실러스 불가리쿠스(*Lactobacillus bulgaricus*), 락토바실러스 애시도필러스(*L. acidophilus*), 스트렙토코커스 쉴모필러스(*Streptococcus thermophilus*), 스트렙토코커스 패시움(*S. faecium*), 스트렙토코커스 패칼리스(*S. faecalis*), 류코노스톡 메센테로이데스(*Leuconostoc mesenteroides*), 페디오코커스 세레비시아(*Pediococcus cerevisiae*) 및 클로스트리디움 부티리쿰(*Clostridium butyricum*) 중에서 선택될 수 있으며, 이 중에서 비피도박테리움 속의 미생물을 사용하는 것이 바람직하다.

또한, 본 발명은 상기 발효물을 유효성분으로 함유하는 골다공증 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

본 발명에 따른 갈근 발효물은 임상 투여시에 경구 또는 비경구로 투여가 가능하며 일반적인 의약품 제제의 형태로 사용될 수 있다. 즉, 본 발명의 갈근 발효물은 실제 임상 투여시에 경구 및 비경구의 여러 가지 제형으로 투여될 수 있는데, 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충전제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다. 경구 투여를 위한 고형 제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형 제제는 상기 갈근 발효물에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 탄산칼슘, 수크로스 또는 락토오스, 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 또한, 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스티레이트, 탈크 같은 윤활제들도 사용된다. 경구 투여를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데 흔히 사용되는 단순 희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조제, 좌제가 포함된다. 비수성용제, 현탁용제로는 프로필렌글리콜, 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텟솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세롤, 젤라틴 등이 사용될 수 있다. 또한, 골다공증 예방 또는 치료 효능 증진을 위해 칼슘이나 비타민 D₃를 추가로 첨가할 수 있다.

투약 단위는, 예를 들면 개별 투약량의 1, 2, 3 또는 4배로, 또는 1/2, 1/3 또는 1/4배로 함유할 수 있다. 개별 투약량은 유효 약물이 1회에 투여되는 양을 함유하며, 이는 통상 1일 투여량의 전부, 1/2, 1/3 또는 1/4배에 해당한다.

본 발명의 갈근 발효물의 인체 투여량은 체내에서의 활성성분의 흡수도, 불활성화율 및 배설속도, 환자의 연령, 성별, 상태, 질병의 정도 등에 따라 적절히 선택되며, 성인에게 10~300 mg/kg이고, 바람직하기로는 20~100 mg/kg이며, 하루 1 내지 6회 나누어 투여될 수 있다.

본 발명의 갈근 발효물을 마우스에 경구 투여시 및 복강내 투여시의 독성 실험을 수행한 결과, 경구 독성시험에 의한 50% 치사량(LD₅₀)은 적어도 5 g/kg 이상인 안전한 물질로 판명되었다.

본 발명의 바람직한 실시예에서는 본 발명에 따른 갈근 발효물을 제조하는데 가장 효과적인 유산균 균주를 선별하기 위하여, 예비적으로 30여종의 유산균 중에서 β -글루코시다제의 활성이 우수한 균주를 선별한 후 갈근 및 갈화를 발효시켜 에스트로겐상 활성을 측정하였다. 그 결과, 갈근 및 갈화의 발효물을 투여한 경우 시험관내에서 에스트로겐상 활성이 현저히 증가됨을 확인할 수 있었으며, 갈근보다는 갈화 발효물에서 에스트로겐상 활성이 더 높은 것으로 나타났다(도 1 참조). 또한, 여러 유산균을 실험한 결과, 그중 비피도박테리움 K111에서 에스트로겐상 활성이 가장 크게 증가하는 것을 확인하였다(도 2 참조).

다음으로, 난소를 적출하여 골다공증을 유도한 동물 모델을 이용하여 본 발명의 갈근 발효물이 골다공증에 미치는 영향을 조사하였다. 본 발명의 갈근 발효물을 투여한 결과 특별한 임상증상 및 사망동물은 관찰되지 않았으며, 부검소견으로는 난소 적출에 의한 자궁 위축 현상이 음성대조군에서 뚜렷이 관찰되었으나, 갈근 발효물 투여군에서는 음성대조군보다 위축된 정도가 통계적으로 유의성 있게 억제되었다(도 3 참조). 또한, 비장 장기는 정상대조군에 비해 난소 적출군에서 증대되었으나, 갈근 발효물을 연속 경구투여시에는 비대된 장기가 유의성 있게 감소되었다(표 3 참조). 이는 본 발명의 갈근 발효물이 에스트로겐 결핍에 의한 자궁 및 비장 장기의 변화에 대하여 에스트로겐 대체 효능이 있음을 의미한다.

일반적으로 골 성장이 활발히 이루어질 때 혈장내 ALP (alkaline phosphatase) 농도가 증가한다. 시험 동물의 난소제거시, ALP의 농도는 정상대조군보다 증가되었으나, 갈근 발효물 투여군에서는 혈청내 ALP 농도의 증가폭이 더 유의성 있게 나타났다(표 4 참조). 이는 갈근 발효물 투여에 의해 골 성장이 활발히 진행되고 있음을 의미한다. 또한, 난소 적출시 에스트로겐 함량은 정상대조군에 비해 20% 이상 감소되었으나, 갈근 발효물 투여군에서는 정상대조군에 비해 다소 증가되었다(표 5 참조).

흉골 및 대퇴골의 골밀도는 난소적출 후 정상대조군에 비해 감소되었으나, 갈근 발효물 투여시에는 그 감소된 양의 40% 가량을 회복시키는 것으로 나타났다(표 6 참조). 따라서, 갈근 발효물은 뼈지주세포 및 파골세포에 관여하여 골밀도를 증가시키는 물질로 작용되는 것을 알 수 있다.

대퇴골에서 분리한 파골세포의 활성을 비교하여 본 발명의 갈근 발효물이 파골세포에 미치는 영향을 평가한 결과, 파골세포의 활성은 난소적출 동물에서 증가되었으나, 갈근 발효물 투여군에서는 음성대조군에 비해 미약한 활성을 보였다(도 4 참조). 이상의 결과로부터, 본 시험조건에서 파골세포의 활성감소에 갈근 발효물이 영향을 미치는 것을 확인하였다.

또한, 정상대조군에서는 대퇴골의 뼈지주가 정상적으로 많이 관찰되는 병리조직 소견을 보였으며, 파골세포의 출현빈도는 매우 미약하였다. 이에 반해 음성대조군에서는 대퇴골에서 뼈 지주가 현저히 감소되었고 대퇴골 파골세포의 출현빈도는 상대적으로 증가하였다. 본 발명의 갈근 발효물을 투여한 경우 대퇴골의 뼈 지주에서 구별이 가능한 정도의 유의한 개선효과가 확인되었다(도 5 참조). 파골세포의 출현빈도에 있어서도 갈근 발효물 투여군에서는 대퇴골의 파골세포가 음성대조군에 비해 구별이 가능한 정도로 감소된 것을 확인할 수 있었다(도 6 참조). 또한, 자궁에 대한 병리학적 소견에 있어서도 정상대조군에서는 정상적인 자궁조직소견이 관찰된 반면 난소 절제한 음성대조군에서는 현저한 자궁위축 현상이 관찰되었다. 비교군에서는 난소 절제한 음성대조군과 비교할 때 주목할만한 차이점은 확인하지 못하였으나, 갈근 발효물 투여군에서는 미약한 자궁위축소견이 관찰되었다(도 7 참조). 결론적으로 갈근 발효물을 투여한 결과 대퇴골 뼈 지주와 파골세포의 출현빈도에서 개선효과가 확인되었고, 특히 14주 시험의 경우 대퇴골 뼈 지주에서 7주 시험보다 더 현저한 개선효과가 관찰되었다.

본 발명에 따르면, 식물성 에스트로겐인 피토에스트로겐의 함량이 더 많은 갈화 발효물보다 본 발명의 갈근 발효물을 투여한 경우에 골다공증 예방 및 치료효과가 우수한 것으로 나타났는데, 이로부터 갈근의 수추출물을 발효시킴으로써 단순히 피토에스트로겐의 함량이 늘어나 것 이외에 골다공증 예방 및 치료에 있어서 상승효과를 부여하는 특정한 효능 성분이 증가하였음을 예측할 수 있다. 따라서, 본 발명의 갈근 발효물은 호르몬 균형을 일정부분 유지시키는 물질로 작용하는 것으로 생각되며, 골다공증 타입 I 뿐만 아니라 각종 내분비 질환 예방, 치료에 도움이 될 것으로 예상된다.

또한, 본 발명은 상기 발효물을 유효성분으로 함유하는 골다공증 예방 또는 치료용 건강식품을 제공한다.

본 발명의 갈근 발효물은 골다공증 개선을 목적으로 건강식품에 첨가될 수 있으며, 본 발명의 갈근 발효물을 식품 첨가물로 사용할 경우, 상기 갈근 발효물을 그대로 첨가하거나 다른 식품 또는 식품 성분과 함께 사용될 수 있고, 통상적인 방법

에 따라 적절하게 사용될 수 있다. 유효 성분의 혼합량은 사용 목적(예방, 건강 또는 치료적 처치)에 따라 적절하게 결정될 수 있다. 일반적으로, 식품 또는 음료의 제조시에는 본 발명의 갈근 발효물이 원료에 대하여 30 중량% 이하, 바람직하게는 10 중량% 이하의 양으로 첨가된다. 그러나, 건강 및 위생을 목적으로 하거나 또는 건강 조절을 목적으로 하는 장기간의 섭취의 경우에는 상기 양은 상기 범위 이하일 수 있으며, 안전성 면에서 아무런 문제가 없기 때문에 유효성분은 상기 범위 이상의 양으로도 사용될 수 있다.

상기 식품의 종류에는 특별한 제한은 없다. 상기 물질을 첨가할 수 있는 식품의 예로는 육류, 소세지, 빵, 초코렛, 캔디류, 스낵류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류를 포함한 낙농제품, 각종 스프, 음료수, 차, 드링크제, 알콜 음료 및 비타민 복합제 등이 있으며, 통상적인 의미에서의 건강식품을 모두 포함한다.

또한, 본 발명의 갈근 발효물은, 여러 한의학 처방들, 예를 들면, 가감속명탕(加減續命湯), 갈근(葛根), 갈근귤피탕(葛根橘皮湯), 갈근맥문동산(葛根麥門冬散), 갈근죽여탕(葛根竹茹湯), 갈근탕(葛根湯), 갈근해기탕(葛根解肌湯), 갈출탕(葛出湯), 갈황환(葛黃丸), 지각자산(枳殼煮散), 당귀백출탕(當歸白朮湯), 맥문동음자(麥門冬飲子), 발운탕(撥雲湯), 방풍탕(防風湯), 백출산(白朮散), 사물해기탕(四物解肌湯), 사위탕(瀉胃湯), 산중괴견탕(散腫潰堅湯), 삼두해정탕, 삼양탕(三陽湯), 생갈근즙(生葛根汁), 소풍순기탕(疏風順氣湯), 승마갈근탕(升麻葛根湯), 승마부자탕(升麻附子湯), 승마위풍탕(升麻胃風湯), 승양보위탕(升陽補胃湯), 시호승마탕(柴胡升麻湯), 시호조경탕(柴胡調經湯), 신달탕(腎疸湯), 신선불취단(神仙不醉丹), 신성산(神聖散), 신효명목탕(神效明目湯), 십신탕(十神湯), 여택통기탕(麗澤通氣湯), 연교승마탕(連翹升麻湯), 영선제통음(靈仙除痛飲), 옥설탕(沃雪湯), 온폐탕(溫肺湯), 익기충명탕(益氣聰明湯), 익지화중탕(益智和中湯), 인삼청기산(人蔘淸肌散), 인진사황탕(茵陳瀉黃湯), 일보일발단(一補一發丹), 자음청위환(滋陰淸胃丸), 전생활혈탕(全生活血湯), 정력산(散), 조중탕(調中湯), 지갈탕(止渴湯), 지유산(地榆散), 진교승마탕(秦교升麻湯), 청양탕(淸陽湯), 청열해기탕(淸熱解肌湯), 충화순기탕(沖和順氣湯), 취향보설(醉鄉寶屑), 통치백물독일방(通治百物毒一方), 평위지유탕(平胃地榆湯), 평혈음(平血飲), 해백물독일방(解百物毒一方), 해소주독일방(解燒酒毒一方), 해약중독(解藥中毒), 해주화독산(解酒化毒散), 해채소독일방(解菜蔬毒一方), 해파두독방(解巴豆毒方), 홍설통중산(紅雪通中散) 등에도 사용될 수 있다.

본 발명의 건강음료 조성물은 통상의 음료와 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다. 상술한 천연 탄수화물에는 포도당, 과당과 같은 모노사카라이드, 말토스, 슈크로스 및 같은 디사카라이드, 및 텍스트린, 사이클로텍스트린과 같은 폴리사카라이드, 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알콜이 있다. 감미제로서는 타우마틴, 스테비아 추출물과 같은 천연 감미제나, 사카린, 아스파르탐과 같은 합성 감미제 등을 사용할 수 있다. 상기 천연 탄수화물의 비율은 본 발명의 갈근 발효물 100 ml당 일반적으로 약 0.01~0.04 g, 바람직하게는 약 0.02~0.03 g 이다.

상기 외에 본 발명의 갈근 발효물은 여러가지 영양제, 비타민, 전해질, 풍미제, 착색제, 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알콜, 탄산 음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다. 그 밖에 본 발명의 갈근 발효물은 천연 과일주스, 과일주스 음료 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다. 이러한 성분은 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있다. 이러한 첨가제의 비율은 크게 중요하진 않지만 본 발명의 갈근 발효물 100 중량부 당 0.01~0.1 중량부의 범위에서 선택되는 것이 일반적이다.

이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다.

단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하기 위한 것일 뿐, 본 발명의 범위가 하기 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.

실시예 1: 갈근 발효물의 제조

<1-1> 갈근 수추출물의 제조

국내산 건조 갈근을 구입하여 시료로 사용하였다. 정선한 갈근 1 kg에 물 5 l를 가한 후 100℃에서 열수 추출하여 추출물을 얻었다.

<1-2> 균주의 배양

예비적으로 30여종의 유산균 중에서 β -글루코시다제 활성이 우수한 균주로 비피도박테리움 브레브 K-111(경희대약대 김동현교수실), 비피도박테리움 브레브 K-110 (KCCM 10097) 및 스트렙토코커스 패시움(KCTC 3077) 균주를 먼저 선발하였다. 선발된 분리균주 및 시판중인 락토바실러스, 비피도박테리움 및 스트렙토코커스 속의 미생물들을 표준배지(호기성균; MRS 배지, 혐기성균; GAM 배지)에서 계대 배양한 뒤 초기균수를 10^8 으로 조절하여 실험에 사용하였다.

<1-3> 수추출물 발효물의 제조

상기 실시예 <1-1>에서 제조한 갈근의 열수추출물을 냉각시킨 후 실시예 <1-2>의 표준배지에서 배양한 유산균을 시료 중량의 2%로 접종하였고, 37℃에서 48시간 동안 발효시킨 후 동결건조시켜 본 발명의 갈근 발효물 분말을 제조하였다.

비교예 1: 갈화 및 대두 수추출물의 발효물 제조

갈근 대신에 갈화 또는 대두를 사용한 것을 제외하고는 상기 실시예 1과 동일한 방법으로 처리하여 동결건조한 갈화 또는 대두 수추출물의 발효물(이하, "대두 발효물"이라 약칭함) 분말을 제조하였다.

비교예 2: 갈근, 갈화 및 대두 수추출물의 제조

실시예 <1-1>과 동일한 방법으로 갈근, 갈화 및 대두의 수추출물을 제조한 후 동결건조시켜 이들의 수추출물 분말을 제조하였다.

실험예 1: 갈근 수추출물과 이의 발효물의 이소플라보노이드 성분 분석

실시예 1에서 제조한 갈근 수추출물과 이의 발효물에 포함되어 피토에스트로젠으로 작용하는 이소플라본의 함량을 HPLC (일본 미쯔비시사)를 이용하여 분석하였다. 구체적으로, 4.6×250 mm 크기의 칼럼을 사용하였으며, 이동상으로는 0.1% 아세트산을 함유한 아세트니트릴과 0.1% 아세트산을 함유한 2차 증류수를 30:70 비로 혼합한 용매를 사용하였다. 시료의 주입량은 10 μ l 였으며, 유속은 1.0 ml/분으로 조정하였다. 시료내에 포함된 이소플라보노이드의 함량은 254 nm의 파장에서 UV 검출기로 검출하였으며, 이소플라본 표준물질은 미국 시그마사의 제품을 사용하였다. 그 결과를 표 1에 나타내었다.

【표 1】
유산균 발효중 이소플라보노이드 함량의 변화(단위: mg/건조분말 100 g)

발효시간 성분	0	12	24	36	48
푸에라린	1606.0	1619.0	1615.0	1624.2	1665.4
다이드진	774.6	-	-	-	-
글리시틴	237.1	-	-	-	-
제니스틴	24.9	-	-	-	-
마로닐 다이드진	197.0	-	-	-	-
이리소리돈	-	-	-	-	207.1
다이드제인	476.7	3545.9	3759.2	3849.4	3850.4
칼칼라이드	-	259.3	278.9	270.2	273.4
제니스테인	-	36.8	46.9	66.4	48.2

상기 결과로부터, 본 발명의 발효물은 유산균 발효에 의해 이소플라보노이드 성분에 많은 변화가 생기며, 특히 활성성분인 다이드제인과 제니스테인의 함량이 매우 증가하게 된다는 것을 확인하였다.

실험예 2: 수추출물 및 발효물의 에스트로겐상 작용 측정

본 발명의 발효물이 에스트로겐 의존적 세포의 성장에 미치는 영향을 조사하기 위하여, 유방암 세포주인 MCF-7 세포주를 이용한 에스트로겐상 효과를 측정하였다.

이를 위하여, 먼저 10% FBS가 함유된 DMEM 배지(Dulbecco's modified Eagle's medium, 미국 Sigma 사)를 사용하여 MCF-7 세포를 5% CO₂, 37℃ 조건하에서 배양하였다. 호르몬 유도하기 전에 PBS 완충액으로 세포를 세척하였으며, 시

료처리 전에 모든 에스트로겐 원(source)을 제거하기 위해 10% CD-FBS (charcoal-dextran stripped FBS)가 함유된 페놀레드가 없는 DMEM에서 2일 동안 세포를 배양하였다. 배양된 세포는 0.25% 트립신(trypsin)-EDTA를 처리하여 1,000 rpm에서 5분간 원심분리하였고, 세포수를 측정하여 5×10^3 세포/웰이 되도록 96웰 배양판에 0.1 ml씩 분주하였다. 24시간 후 시료를 각각 6 $\mu\text{g/ml}$ 및 25 $\mu\text{g/ml}$ 씩 처리하고 6일(144시간) 동안 배양한 후 MTT 분석 시험으로 세포의 증식 정도를 측정하였다. 이때, 시료는 상기 실시예 및 비교예에서 제조한 갈근 및 갈화 수추출물의 발효물과 갈근 및 갈화의 수추출물의 에틸 아세테이트 분획물을 최종농도가 0.1% 이하가 되도록 DMSO에 녹여 사용하였다.

MTT 분석을 위하여, 6일간 배양된 상기 세포에 2 mg/ml의 MTT 시약을 웰 당 50 μl 씩 가하여 30분 동안 인큐베이터에서 반응시켰다. 배지를 제거한 후 DMSO (Dimethyl sulfoxide) 100 μl 를 가하여 540 nm 파장에서 ELISA 판독기로 흡광도를 측정하였다.

그 결과, 시료를 6 $\mu\text{g/ml}$ 농도로 사용한 경우 갈근 및 갈화 모두에서 단순 수추출물(G, K)에서보다 추출물을 발효시킨 경우에 에스트로겐상 효과가 크게 증가하였으며, 전체적인 에스트로겐상 효과는 갈근보다 갈화가 우수함을 확인하였다(도 1). 또한, 유산균으로는 비피도박테리움 K111 (G111, K111)이 에스트로겐상 효능을 가장 많이 증가시키는 것을 알 수 있었다.

한편, 고농도의 시료를 사용한 경우에도 역시 전체적인 에스트로겐상 효과는 갈근 보다는 갈화가 우수하였으며, 갈화의 경우는 유산균으로 비피도박테리움 K110을 사용한 경우에, 그리고 갈근의 경우는 비피도박테리움 K111을 사용한 경우에 에스트로겐상 효과가 크게 상승하였다(도 2).

실험예 3: 실험동물을 이용한 골다공증 효능 실험

<3-1> 골다공증의 유발 모델의 확립 및 육안 관찰

<3-1-1> 골다공증 유발 모델의 확립

골다공증을 유발하는 동물모델은 폐경기 이후의 타입 I 으로, 실험동물은 8주령의 SD (Sprague-Dawley)계 래트 암컷을 (주)오리엔트로부터 구입하여 사용하였다. 9주령에 난소를 적출하여 골다공증을 유발하였으며, 1주간 순화시킨후 10주령에 실험을 실시하였다. 이때, 난소를 적출하지 않은 군을 정상대조군으로 사용하였고 난소를 적출하고 아무런 약물치료를 하지 않은 군을 음성대조군으로 사용하였다.

구체적으로, 마취약(염산 케타민(ketamine) 50 mg/ml, 유한양행 + 자일라진(xylazine) 20 mg/ml, 바이엘코리아 주식회사)을 실험동물 등배부에 피하주사하여 전신마취시킨 다음, 하복부의 털을 제거하고 동물의 체위를 반듯이 눕힌 상태에서 요오드(삼일제약)로 수술부위를 소독한 후 난소를 적출하였다. 실험동물의 정중선을 중심으로 하복부에서 1 cm 정도로 피부, 복근 및 복막을 차례로 절개하고 소독된 핀셋으로 난소를 노출시켜 난관을 건사로 결찰한 후, 좌측 및 우측의 난소를 제거하였다. 감염방지를 위해 항생제(셀파포르테-4, 유니화학 주식회사) 0.4 ml를 복강내 주입하였고 건사로 복막, 복근 및 피부를 봉합하였다.

<3-1-2> 시료의 투여

상기 실시예 및 비교예에서 제조한 건조함량(추출전시료량) 5 g/kg의 시료를 생리식염수 10 ml/kg에 녹여 투여용량으로 동물실험에 사용하였다. 시험군당 실험동물의 수, 시험물질의 투여량은 하기 표 2와 같다. 정상대조군 및 음성대조군에 대해서는 주사용 멸균 생리식염수(10 ml/kg)를 투여하였다. 배부피부 고정법으로 실험동물을 고정하고 경구투여용 금속제 존대와 주사관을 이용하여 위내에 강제 경구투여하였다. 투여기간은 1일 1회 7주 및 14주간 투여하였으며, 투여량은 매주 1회 측정된 체중을 기준으로 하여 각각의 군별 투여량에 맞게 투여액량을 계산하였다.

[표 2]

군	동물수 (마리)	동물번호	투여액량 (g / kg)	투여량 (ml / kg)
C	15	1 ~ 15	0	10
N.C	15	16 ~ 30	0	10

T1	15	31~45	5	10
T2	15	46~60	5	10
T3	15	61~75	5	10
T4	15	76~90	5	10

C ; 정상대조군, N.C ; 음성대조군, T1 ; 대두추출물 투여군, T2 ; 대두 발효물 투여군, T3 ; 갈근 발효물 투여군, T4 ; 갈화 발효물 투여군.

<3-1-3> 부검 및 장기무게 측정

시료 투여 후 7주 및 14주째에 에테르 마취하에서 하복부를 개복한 후, 복대동맥에서 채혈하였고, 내부 장기를 육안으로 관찰하였다. 채혈한 후 잔혈은 방혈하였으며, 자궁, 뇌, 뇌하수체, 비장, 부신, 신장, 간, 폐 및 심장의 무게를 저울(Mettler, AT261)을 이용하여 측정하였다. 모든 실험군에 대하여 동물 측정용 저울로 무게를 측정하고 평균과 표준 편차를 구하였으며, 하기 모든 실험에서 대조군과 시험군 간의 통계학적 유의성은 스튜던트 t-테스트에 의해 검정하였다. 이때, $p < 0.05$ 를 실험군간의 유의성 있는 차이로 판정하였다.

그 결과, 난소 적출에 의한 자궁 위축 현상이 관찰된 것을 제외하고는 모든 투여군에서 시험물질 투여와 관련된 이상 소견은 나타나지 않았다. 음성대조군에서는 정상대조군의 자궁과 대비될 정도로 자궁이 현저히 위축되었으나, 본 발명의 갈근 발효물을 투여한 경우에는 다른 시료 투여군에 비해 자궁 위축이 유의적으로 억제되었다(도 3). 장기 무게로부터도 정상치는 아니지만 다른 실험군에 비하여 자궁의 위축이 현저히 억제됨을 확인하였다(표 3).

[표 3]

성별	암컷					
실험군	C	N.C	T1	T2	T3	T4
용량(g/kg/day)	0	0	5	5	5	5
동물수	5	5	5	5	5	5
자궁	0.65(0.18)**	0.10 ^a (0.02) ^b	0.10(0.01)	0.10(0.01)	0.23*(0.04)	0.11(0.02)
폐	1.24(0.12)	1.31(0.24)	1.45(0.15)	1.52(0.14)	1.32(0.08)	1.40(0.08)
심장	0.85*(0.06)	1.05(0.09)	1.10(0.09)	1.09(0.09)	0.87*(0.08)	1.11(0.16)
간	6.47(0.63)	7.55(0.9)	8.4(0.61)	8.39(1.42)	7.76(0.48)	8.17(0.66)
비장	0.40**(0.05)	0.58(0.07)	0.62(0.10)	0.58(0.1)	0.58(0.09)	0.64(0.06)
좌측신장	0.77(0.07)	0.79(0.07)	0.89(0.09)	0.87(0.07)	0.80(0.07)	0.92(0.13)
우측신장	0.77(0.05)	0.79(0.08)	0.87(0.06)	0.88(0.04)	0.81(0.08)	0.92(0.13)
부신(좌측)	0.03(0.01)	0.03(0.02)	0.03(0.0)	0.03(0.01)	0.02(0.0)	0.03(0.0)
부신(우측)	0.03(0.0)	0.03(0.01)	0.03(0.01)	0.03(0.01)	0.02(0.01)	0.02(0.01)

a ; 수치는 평균치로 나타냄, b ; $\pm$ S.D., 음성대조군과 통계학적으로 유의적인 차이를 보임(* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$).

<3-2> 골성장과 관련된 혈액학적 검사

<3-2-1> 무기인 농도 측정

인체내 인산의 80% 이상이 뼈에 인산칼슘염의 형태로 존재하며, 칼슘과 무기 인산염의 농도는 서로 반비례하는 경향이 있다. 인산이 폴리브덴산 암모늄(ammonium molybdate)과 함께 폴리브도인산염(phosphomolybdate)을 생성하고 폴리브데늄 블루(molybdenum blue)로 변화하는 것을 이용하여 생성된 폴리브도인산염을 340 nm/380 nm에서 흡광도를 측정하여 정량하였고(Wang J, Chen CC and Osaki S, Clin. Chem., 29: 1225, 1983), 그 결과를 표 4에 나타내었다.

<3-2-2> 혈중 칼슘 농도 측정

골다공증의 주된 요인 중 하나가 혈중칼슘 농도의 변화이다. 채취한 혈액에 8-하이드록시-퀴놀린을 첨가하여 마그네슘을 제거한 후 570 nm/600 nm에서 흡광도의 변화를 측정함으로써 칼슘 농도를 측정하였고(Moorehead WR and Briggs HC, Clin. Chem., 20: 1458-1460, 1974), 그 결과를 표 4에 나타내었다.

<3-2-3> 혈중 ALP 농도 측정

ALP는 주로 뼈와 간, 골, 태반 및 장에 많이 존재하는데, 일반적으로 골성장이 활발히 이루어질 때 그 농도가 증가한다. 본 발명에 따른 갈근 발효물의 골성장에 대한 효능을 확인하기 위하여 생화학분석기를 사용하여 바우어(Bower)와 맥콤(McComb)의 방법에 따라 405 nm에서 흡광도를 측정하여 ALP의 농도를 결정하였다(Raab WP, Clin. Chem., 18: 5-25, 1972).

그 결과, 혈청내 인산염 및 칼슘의 농도는 실험군 모두에서 이상이 관찰되지 않았다. 그러나, ALP의 농도는 대조군보다 증가되었으며 시험물질 투여 T3군에서 혈청내(7주 및 14주차) ALP 농도의 증가폭이 더 유의성($p < 0.01$) 있게 나타났다.

상기 결과로부터, 본 발명의 갈근 발효물의 투여에 의해 골 성장이 활발히 진행되고 있음을 확인하였다.

[표 4]

성별	암컷					
실험군	C	N.C	T1	T2	T3	T4
용량(g/kg/day)	0	0	5	5	5	5
동물수	5	5	5	5	5	5
ALP (IU/ l)	110.4 ^{a*}	237.4	246.8	188.4	280.8	261.2
SD	(31.67) ^b	(81.05)	(62.21)	(10.19)	(74.12)	(93.96)
인산(mg/dl)	5.94	6.62	6.24	6.08	6.4	6.98
SD	(1.17)	(1.16)	(0.33)	(0.93)	(0.51)	(1.36)
칼슘(mg/dl)	10.4	10.02	10.02	10.14	10.0	10.48
SD	(0.35)	(0.44)	(0.4)	(0.38)	(0.26)	(0.61)

a ; 수치는 평균값으로 나타냄, b ; $\pm$ S.D., 시험물질 14주후 투여후 혈청의 생화학적 수치. 음성대조군에 대한 통계학적 유의성(** $p < 0.01$, * $p < 0.05$)

<3-2-4> 호르몬 농도 측정

부검시 채취한 혈액으로부터 혈중 에스트로겐 함량을 측정하였다. 그 결과, 난소적출시 에스트로겐 함량은 정상대조군에 비해 21.37% 감소하였다. 대두추출물 투여군(T1) 및 대두 발효물 투여군(T2)의 경우에는 에스트로겐 농도가 정상대조군에 비해 각각 4.49 및 7.62% 감소되어 음성대조군보다 증가하는 경향을 보였으며, 본 발명에 따른 갈근 발효물 투여군(T3) 및 갈화 발효물 투여군(T4)의 경우에는 각각 100.46% 및 117.65%로 나타나 음성대조군보다 현저하게 증가되었다. 특히, T4군은 통계적으로 유의성($p < 0.01$) 있게 증가되었다(표 5).

[표 5]

성별	암컷					
실험군	C	N.C	T1	T2	T3	T4
용량(g/kg/day)	0	0	5	5	5	5
14 주간 투여						

에스트로겐 (pg/dl)	183.38 ^a (44.37) ^b	144.2 (48.64)	175.14 (38.86)	169.4 (38.06)	184.22 (32.36)	215.75** (42.88)
---------------	---	------------------	-------------------	------------------	-------------------	---------------------

a ; 수치는 평균값으로 나타냄, b ; $\pm$ S.D., 음성대조군에 비하여 통계적 유의성(**p<0.01).

<3-3> 골밀도 측정

7주 및 14주간 시료를 투여한 후, 흉골 및 우측 대퇴골을 적출하여 근육을 제거하였고, 10% 중성 포르말린에 7일간 고정하였다. 포르말린을 제거한 후 DEXA (Dual Energy X-ray Absortimetry) 기기(LUNAR[®] Corp. PIXl mus. Madison, WI USA)를 사용하여 골밀도를 측정하였다.

그 결과, 7주 부검동물에서 흉골 및 대퇴골의 골밀도 변화는 관찰되지 않았다. 그러나, 난소적출 14주 대퇴골에서 정상대조군에 비해 음성대조군 9.33%, 갈근 발효물(T3) 5.46% 감소되었으며, 시험물질 14주 연속 경구투여시 그 감소된 양의 41.48%를 회복시키는 것으로 나타났다(표 6). 따라서, 본 발명에 따른 갈근 발효물(T3)은 뼈지주세포 및 파골세포에 관여하여 골밀도를 증가시키는 물질로 작용되는 것을 확인하였다.

[표 6]

성별		암컷					
실험군		C	N.C	T1	T2	T3	T4
용량(g/kg/day)		0	0	5	5	5	5
AD 7주	흉골	0.0750 ^a (0.005) ^b	0.0732 (0.016)	0.0729 (0.012)	0.0762 (0.004)	0.0701 (0.005)	0.071 (0.007)
	대퇴골	0.1814 (0.112)	0.1863 (0.008)	0.1891 (0.008)	0.183 (0.008)	0.1839 (0.010)	0.1853 (0.009)
AD 14주	흉골	0.0658 (0.005)	0.056 (0.003)	0.0571 (0.005)	0.0563 (0.003)	0.0592 (0.006)	0.0558 (0.005)
	대퇴골	0.2068 (0.007)	0.1875 (0.01)	0.1912 (0.012)	0.1878 (0.007)	0.1955 (0.008)	0.1867 (0.009)

a ; 숫자는 평균값으로 나타낸다, b ; $\pm$ S.D.

<3-4> 파골세포 측정

<3-4-1> 파골세포의 분리 및 활성 측정

파골세포 측정을 위하여, 먼저 근육을 제거한 후 0.85% 생리식염수를 이용하여 대퇴골의 골수를 제거하였다. 골수가 제거된 대퇴골을 효소 용액(1 mg/ml type II collagenase, 0.05% trypsin, 4 mM EDTA in HBSS) 5 ml이 들어있는 50 ml 튜브에 넣은 후 37℃ 항온조에서 15분간 방치하였다. 효소 용액 상등액 3 ml에 혈청(FBS) 300 ml를 넣고 1,200 rpm에서 10분간 원심분리한 후 상층액을 버리고 차가운 HBSS로 세척하였다. 4℃ α -MEM 배지를 5 ml씩 넣고 15분간 방치하였다. 40 μ m 세포여과기로 여과한 후 여과액을 1,440 rpm으로 10분간 원심분리 하였다. 침전물에 4℃ α -MEM 배지를 넣어 세포를 부유시킨 후 파골세포를 계수하였고, 인산칼슘 아파타이트가 코팅된(calcium phosphate apatite-coated) 48 웰에 2×10^5 세포/0.3 ml/웰이 되도록 세포를 분주하였다. 파골세포를 배양하는 48 웰은 바닥에 칼슘이 코팅되어 이를 영양분으로 하여 파골세포가 성장하게 된다. 그래서, 파골세포의 활성이 높으면 바닥에 코팅되어 있는 칼슘의 양이 적어지기 때문에 칼슘을 염색하는 시약인 차아염소산 나트륨에 의해 염색이 안되기 때문에 흰색의 점처럼 보인다. 활성을 사진으로 판정하는 기준은 이러한 측정원리를 근거로하여 사진상으로 흰색의 점이 많으면 활성이 증가한 것이고, 흰색이 적으면 활성이 감소한 것으로 판정하였다.

7일 동안 37℃, 5% CO₂ 인큐베이터에서 세포를 배양한 후 증류수로 2번 세척하였고, 5% 차아염소산 나트륨(sodium hypochlorite)을 넣고 5분간 방치하였다. 증류수로 세척한 후 클린벤치에서 24시간 물기없이 말려 흡수된 부위를 관찰하였다. 이후, 광학현미경에서 사진촬영하여 파골세포의 양을 육안으로 관찰하였다.

그 결과, 도 4에서 알 수 있는 바와 같이, 파골세포의 활성화는 난소적출 동물에서 증가되었으며, 본 발명에 따르는 갈근 발효물을 7주간 투여한 경우(T3)에서는 음성대조군에 비해 미약한 활성을 보였다. 상기 결과로부터, 본 발명에 따른 갈근 발효물(T3)이 파골세포의 활성감소에 영향을 미친다는 것을 확인하였다.

<3-4-2> 조직 소견

현미경 관찰 결과, 시험물질을 7주 및 14주간 연속 경구투여 후, 정상대조군의 모든 동물에서 대퇴골의 뼈지주, 파골세포의 출현빈도 및 골수내 지방축적(Fatty accumulation)이 정상으로 관찰되었다. 음성대조군에서는 뼈지주가 현저히 감소되었고 파골세포의 출현빈도는 상대적으로 증가하였다(도 5). 난소적출 후에 대두추출물(T1), 대두 발효물(T2) 및 갈화 발효물(T4) 투여시 미세한 개선 효과가 형태학적으로 관찰되었으며, 본 발명에 따른 갈근 발효물에서는 시험물질 7주 및 14주 연속경구 투여시, 대퇴골 뼈지주와 파골세포의 출현빈도에서 음성대조군에 비해 개선효과가 확인되었다. 특히, 14주 시험의 경우 대퇴골 뼈지주에서 7주 시험보다 더 현저한 개선효과가 뚜렷이 관찰되었다(도 6).

자궁조직의 경우, 정상대조군에서는 정상적인 자궁조직 소견이 관찰되었으나 음성대조군, 대두 추출물 및 갈화 발효물 군에서는 현저한 자궁위축 소견이 나타났다. 그러나, 본 발명에 따른 갈근 발효물 군에서는 미약한 자궁위축소견이 관찰되었다(도 7).

결론적으로, 7주 및 14주 시험 모두에서 시험물질 T3에서 대퇴골 뼈 지주와 파골세포의 출현빈도 개선효과가 확인되었고, 특히 14주 시험의 경우 대퇴골 뼈 지주에서 7주 시험보다 더욱 현저한 개선효과가 관찰되었을 뿐만 아니라 지방축적에서도 구별이 가능한 정도의 개선효과가 있는 것으로 나타났다.

제조예 1: 갈근 발효물을 포함하는 약학적 조성물의 제조

<1-1> 시럽제의 제조

본 발명의 갈근 발효물을 유효성분 2%(중량/부피)로 함유하는 시럽은 다음과 같은 방법으로 제조하였다. 먼저, 실시예 1에서 제조한 갈근 발효물 분말, 사카린, 당을 온수 80 g에 용해시켰다. 상기 용액을 냉각시킨 후, 여기에 글리세린, 사카린, 향미료, 에탄올, 소르브산 및 증류수로 이루어진 용액을 제조하여 혼합하였다. 이 혼합물에 물을 첨가하여 100 ml가 되게 하였다.

상기 시럽제의 구성 성분은 다음과 같다.

갈근 발효물	----- 2 g
사카린	----- 0.8 g
당	----- 25.4 g
글리세린	----- 8.0 g
향미료	----- 0.04 g
에탄올	----- 4.0 g
소르브산	----- 0.4 g
증류수	----- 정량

<1-2> 정제의 제조

유효성분 15 mg이 함유된 정제를 다음과 같은 방법으로 제조하였다.

갈근 발효물 250 g을 락토오스 175.9 g, 감자전분 180 g 및 콜로이드성 규산 32 g과 혼합하였다. 상기 혼합물에 10% 젤라틴 용액을 첨가시킨 후, 분쇄해서 14 메쉬체를 통과시켰다. 이것을 건조시키고 여기에 감자전분 160 g, 활석 50 g 및 스테아린산 마그네슘 5 g을 첨가해서 얻은 혼합물을 정제로 만들었다.

상기 정제의 구성 성분은 다음과 같다.

갈근 발효물	-----	250 g
락토오스	-----	175.9 g
감자전분	-----	180 g
콜로이드성 규산	-----	32 g
10% 젤라틴 용액		
감자전분	-----	160 g
활석	-----	50 g
스테아르산 마그네슘	-----	5 g

<1-3> 주사액제의 제조

유효성분 10 mg을 함유하는 주사액제를 다음과 같은 방법으로 제조하였다.

갈근 발효물 1 g, 염화나트륨 0.6 g 및 아스코르브산 0.1 g을 증류수에 용해시켜서 100 ml을 만들었다. 상기 용액을 병에 넣고 20℃에서 30분간 가열하여 멸균시켰다.

상기 주사액제의 구성 성분은 다음과 같다.

갈근 발효물	-----	1 g
염화나트륨	-----	0.6 g
아스코르브산	-----	0.1 g
증류수	-----	정량

제조예 2: 갈근 발효물을 함유하는 건강식품의 제조

<2-1> 식품의 제조

본 발명의 갈근 발효물을 포함하는 식품들을 다음과 같이 제조하였다.

1. 조리용 양념의 제조

본 발명의 갈근 발효물 20~95 중량%로 건강 증진용 조리용 양념을 제조하였다.

2. 토마토 케첩 및 소스의 제조

본 발명의 갈근 발효물 0.2~1.0 중량%를 토마토 케첩 또는 소스에 첨가하여 건강 증진용 토마토 케첩 또는 소스를 제조하였다.

3. 밀가루 식품의 제조

본 발명의 갈근 발효물 0.5~5.0 중량%를 밀가루에 첨가하고, 이 혼합물을 이용하여 빵, 케이크, 쿠키, 크래커 및 면류를 제조하여 건강 증진용 식품을 제조하였다.

4. 스프 및 육즙(gravies)의 제조

본 발명의 갈근 발효물 0.1~5.0 중량%를 스프 및 육즙에 첨가하여 건강 증진용 육가공 제품, 면류의 수프 및 육즙을 제조하였다.

5. 그라운드 비프(ground beef)의 제조

본 발명의 갈근 발효물 10 중량%를 그라운드 비프에 첨가하여 건강 증진용 그라운드 비프를 제조하였다.

6. 유제품(dairy products)의 제조

본 발명의 갈근 발효물 5~10 중량%를 우유에 첨가하고, 상기 우유를 이용하여 버터 및 아이스크림과 같은 다양한 유제품을 제조하였다.

7. 전식의 제조

현미, 보리, 찹쌀, 울무를 공지의 방법으로 알파화시켜 건조시킨 것을 배전한 후 분쇄기로 입도 60메쉬의 분말로 제조하였다. 검정콩, 검정깨, 들깨도 공지의 방법으로 찌서 건조시킨 것을 배전한 후 분쇄기로 입도 60메쉬의 분말로 제조하였다. 본 발명의 갈근 발효물을 진공 농축기에서 감압·농축하고, 분무, 열풍건조기로 건조하여 얻은 건조물을 분쇄기로 입도 60 메쉬로 분쇄하여 건조분말을 얻었다. 상기에서 제조한 곡물류, 종실류 및 갈근 발효물의 건조분말을 다음의 비율로 배합하여 제조하였다.

곡물류(현미 30 중량%, 울무 15 중량%, 보리 20 중량%),

종실류(들깨 7 중량%, 검정콩 8 중량%, 검정깨 7 중량%),

갈근 발효물의 건조분말(3 중량%),

영지(0.5 중량%),

지황(0.5 중량%)

<2-2> 음료의 제조

1. 탄산음료의 제조

설탕 5~10%, 구연산 0.05~0.3%, 카라멜 0.005~0.02%, 비타민 C 0.1~1%의 첨가물을 혼합하고, 여기에 79~94%의 정제수를 섞어서 시럽을 만들고, 상기 시럽을 85~98℃에서 20~180초간 살균하여 냉각수와 1:4의 비율로 혼합한 다음 탄산가스를 0.5~0.82%를 주입하여 본 발명의 갈근 발효물을 함유하는 탄산음료를 제조하였다.

2. 건강음료의 제조

액상과당(0.5%), 올리고당(2%), 설탕(2%), 식염(0.5%), 물(75%)과 같은 부재료와 갈근 발효물을 균질하게 배합하여 순간 살균을 한 후 이를 유리병, 페트병 등 소포장 용기에 포장하여 건강음료를 제조하였다.

3. 야채주스의 제조

본 발명의 갈근 발효물 5 g을 토마토 또는 당근주스 1,000 ml에 가하여 건강 증진용 야채주스를 제조하였다.

4. 과일주스의 제조

본 발명의 갈근 발효물 1 g을 사과 또는 포도주스 1,000 ml에 가하여 건강 증진용 과일주스를 제조하였다.

발명의 효과

상기에서 살펴본 바와 같이, 본 발명의 갈근 발효물은 갈근 추출물만으로는 얻을 수 없는 뛰어난 골다공증 예방 또는 치료 효과를 보이며, 알콜, 특히 독성이 있는 메탄올 수용액으로 추출한 종래 갈근 추출물에 비해 물에서 추출한 후 발효시켰으므로 인체에 적용하기 위한 고도의 정제과정을 추가로 필요로 하지 않는다는 장점이 있다.

도면의 간단한 설명

도 1은 서로 다른 유산균에 의해 발효된 갈근(A) 및 갈화(B) 수추출물의 발효물을 6 $\mu\text{g/ml}$ 농도로 첨가한 후 MCF-7 세포의 성장에 미치는 영향을 보여주는 그래프이다.

도 2는 서로 다른 유산균에 의해 발효된 갈근(A) 및 갈화(B) 수추출물의 발효물을 25 $\mu\text{g/ml}$ 농도로 첨가한 후 MCF-7 세포의 성장에 미치는 영향을 보여주는 그래프이다.

도 3은 골다공증(osteoporosis) 유발 동물에 시료 투여 후 자궁의 위축이 일어났는지 여부를 보여주는 사진이다.

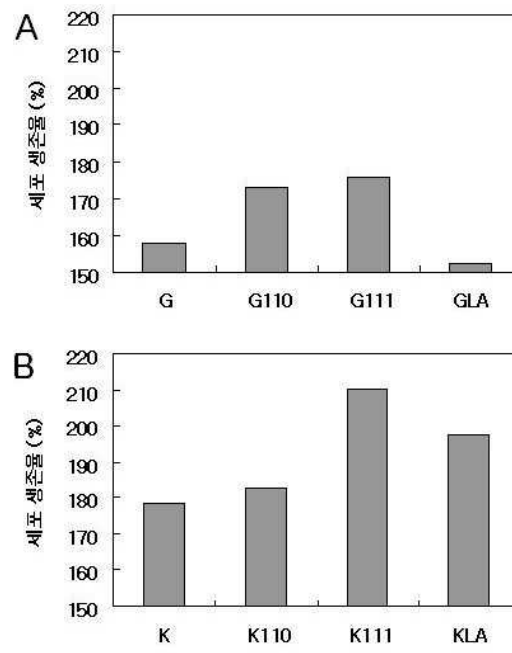
도 4는 골다공증 유발 동물에 시료 투여 후 파골세포(osteoclast)의 활성 변화를 보여주는 사진이다.

도 5 및 도 6은 골다공증 유발 동물에 시료 투여 후 뼈지주(trabeculae) 세포의 조직 소견을 보여주는 단면 사진이다.

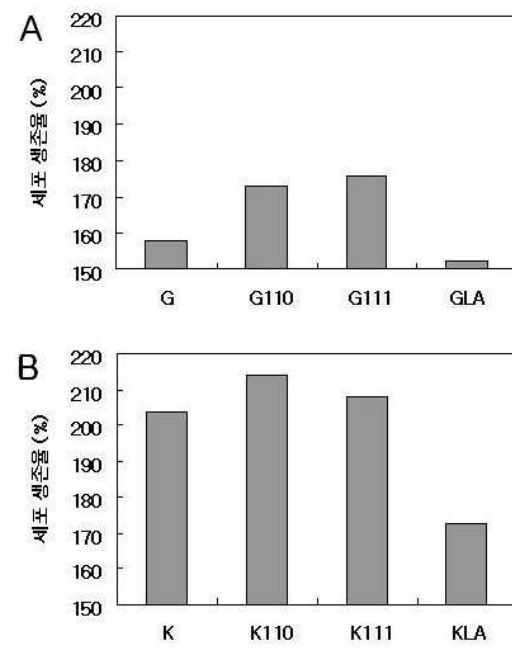
도 7은 골다공증 유발 동물에 시료 투여 후 자궁의 위축 여부를 보여주는 단면 사진이다.

도면

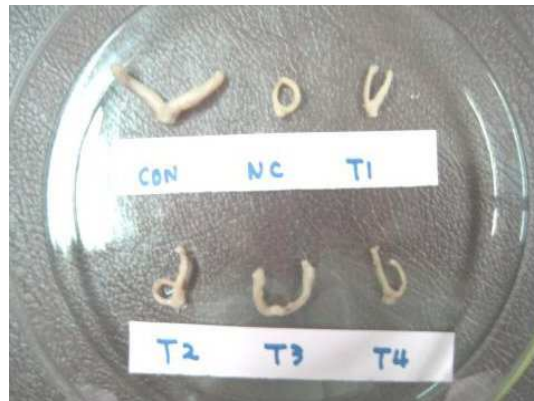
도면1



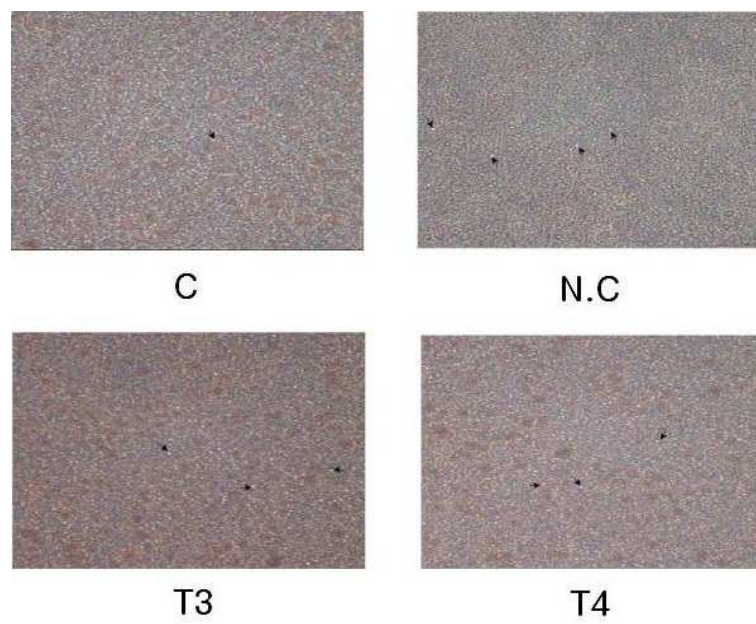
도면2



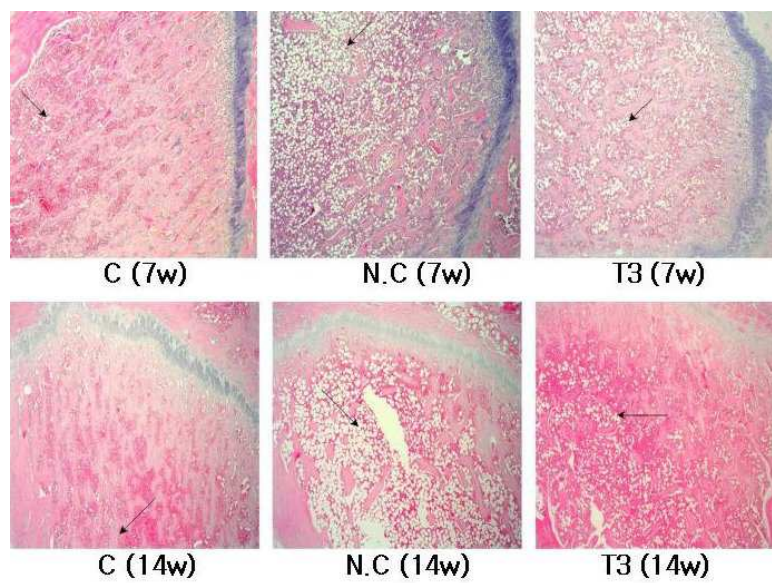
도면3



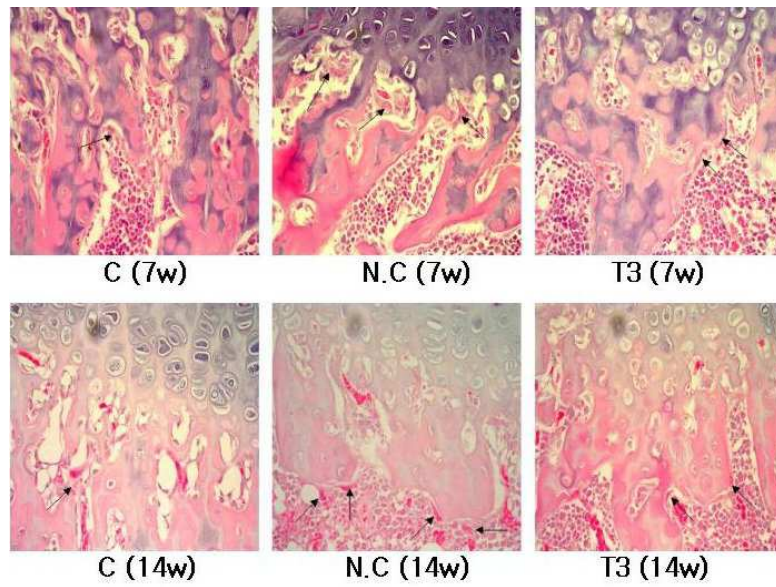
도면4



도면5



도면6



도면7

