(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2023년09월13일
(11) 등록번호 10-2578112
(24) 등록일자 2023년09월08일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 36/752 (2006.01) *A23K 10/30* (2016.01)
A23L 33/105 (2016.01) *A61K 36/804* (2006.01)
A61P 29/00 (2023.01)
(52) CPC특허분류
A61K 36/752 (2013.01)
A23K 10/30 (2016.05)
(21) 출원번호 10-2020-0179019
(22) 출원일자 2020년12월18일
심사청구일자 2020년12월18일
(65) 공개번호 10-2022-0088209
(43) 공개일자 2022년06월27일
(56) 선행기술조사문헌
KR1020130052386 A*
KR1020130092058 A*
KR1020140004933 A*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
대한민국

(72) 발명자
김상숙
제주특별자치도 서귀포시 남원읍 하례광장로 107
한승갑
제주특별자치도 서귀포시 남원읍 하례광장로 107
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인한얼

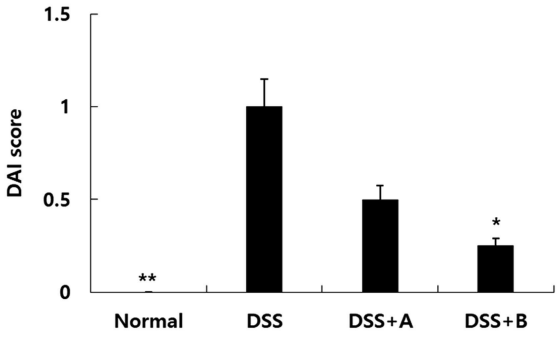
전체 청구항 수 : 총 11 항 심사관 : 정지혜

(54) 발명의 명칭 **홍팔삭 및 숙지황의 혼합 추출물을 포함하는 염증성 질환 예방 또는 치료용 조성물**

(57) 요 약

본 발명은 감귤 및 숙지황의 혼합 추출물을 유효성분으로 포함하는, 염증성 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물, 식품 조성물, 사료 조성물, 의약외품 조성물, 화장료 조성물에 관한 것이다.

대 표 도 - 도4



*=p<0.05 vs DSS group, **=p<0.01 vs DSS group

A: 홍팔삭+숙지황추출물
B: 홍팔삭+숙지황추출물+감귤바이오겔

(52) CPC특허분류
A23L 33/105 (2016.08)
A61K 36/804 (2013.01)
A61P 29/00 (2023.02)
A23V 2002/00 (2023.08)
A23V 2200/324 (2013.01)
A61K 2300/00 (2023.05)

(72) 발명자
박경진
전라북도 완주군 이서면 농생명로 100
좌재호
제주특별자치도 서귀포시 남원읍 하례광장로 107
박요섭
제주특별자치도 서귀포시 남원읍 하례광장로 107
윤석규
제주특별자치도 서귀포시 남원읍 하례광장로 107
김미선
제주특별자치도 서귀포시 남원읍 하례광장로 107

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1395066800
과제번호	PJ01383101
부처명	농촌진흥청
과제관리(전문)기관명	농촌진흥청
연구사업명	원예특작시험연구
연구과제명	감귤바이오겔 함유 장내미생물 개선 식품 소재 개발
기 여 율	1/1
과제수행기관명	국립원예특작과학원
연구기간	2018.03.01 ~ 2020.12.31

공지예외적용 : 있음

명 세 서

청구범위

청구항 1

홍팔삭, 숙지황 추출물 및 감귤 바이오겔을 유효성분으로 포함하는, 염증성 장질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 추출물은 물, 탄소수 1 내지 4의 알코올 또는 이들의 혼합용매로 추출한 것인, 약학 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 추출물은 홍팔삭 및 숙지황을 1 내지 3: 1의 중량비(w/w)로 포함하는 것인, 약학 조성물.

청구항 4

삭제

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 감귤 바이오겔은 조성물 총 중량에 대하여 5 내지 15 중량%를 포함하는 것인, 약학 조성물.

청구항 6

제1항에 있어서,

상기 염증성 장질환은 장염, 궤양성 대장염(ulcerative colitis), 크론병(Chrohn's disease), 장형 베체트병(intestinal Bechet's disease), 출혈성 직장 궤양, 및 회장낭염으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나 이상인 것인, 약학 조성물.

청구항 7

제1항에 있어서, 상기 조성물은 약학적으로 허용되는 담체, 부형제 또는 희석제를 추가로 포함하는 것인, 조성물.

청구항 8

홍팔삭, 숙지황 추출물 및 감귤 바이오겔을 유효성분으로 포함하는, 염증성 장질환의 예방 또는 개선용 식품 조성물.

청구항 9

홍팔삭, 숙지황 추출물 및 감귤 바이오겔을 유효성분으로 포함하는, 염증성 장질환의 예방 또는 개선용 사료 조성물.

청구항 10

홍팔삭, 숙지황 추출물 및 감귤 바이오겔을 유효성분으로 포함하는, 염증성 장질환의 예방 또는 개선용 의약외품 조성물.

청구항 11

홍팔삭, 숙지황 추출물 및 감귤 바이오겔을 유효성분으로 포함하는, 염증성 장질환 완화 또는 개선용 화장료 조성물.

청구항 12

삭제

청구항 13

제8항 내지 제11항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 감귤 바이오겔은 조성물 총 중량에 대하여 5 내지 15 중량%를 포함하는 것인, 조성물.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 홍팔삭 및 숙지황의 혼합 추출물을 유효성분으로 포함하는, 염증성 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물, 식품 조성물, 사료 조성물, 의약외품 조성물, 화장료 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0003] 염증성 장질환(Inflammatory bowel disease, IBD)은 위장관 내에 만성적인 염증을 유발하는 질환으로, 비교적 청년층부터 발병하며 복통, 발열, 설사, 하혈 등의 증상을 수반한다. 대체로, 궤양성 대장염(Ulcerative colitis, UC)과 크론병(Cron's disease, CD)의 2가지 형태로 분류되는데, 궤양성 대장염은 주로 점막을 침범하여, 자주 문드러짐이나 궤양을 형성하는 대장의 원인불명의 확산성 비특이성 염증(diffuse nonspecific inflammation)의 일종으로서, 혈성 설사를 비롯하여 다양한 전신 증상을 수반하고, 크론병은 구강에서 항문까지 전 소화관을 비연속성으로 점막에서 장관(腸管) 전 층에 궤양, 섬유화, 협착과 병변(病變)이 진전되는 원인불명의 육아종성 염증성 병변으로, 복통, 만성 설사, 발열, 영양장애 등의 전신 증상을 수반한다.

[0004] 최근 효과적인 염증 완화를 위하여, NO의 생성을 억제할 수 있는 물질에 대한 연구가 진행되고 있다. 그러나, 이러한 연구에 의해 개발된 항염물질의 경우 몇 가지 부작용이 문제되고 있다.

[0005] 이러한 염증성 장질환을 치료하기 위하여, 부작용이 적은 천연물로부터 염증성 장질환을 치료할 수 있는 조성물을 개발하기 위한 연구가 활발하게 진행되고 있다. 예를 들어, 한국등록특허 제1466308호에는 지모 추출물을 유효성분으로 포함하는 대장염 치료용 조성물이 개시되어 있고, 한국등록특허 1526467호에는 산수유 추출물을 유효성분으로 포함하는 대장염 치료용 조성물이 개시되어 있다. 그러나, 이러한 천연물 유래의 추출물들은 대장염의 예방 또는 치료효과가 만족할 만한 수준은 아니라는 점에서 한계가 있다.

[0006] 이에, 본 발명자들은 항염증 효능을 가지는 동시에 부작용이 적은 천연물 유래 소재를 개발하고자 여의 연구 노력한 결과, 홍팔삭 추출물 및 숙지황 추출물이 염증성 장질환의 예방 또는 치료에 효과가 있음을 확인하여 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명의 다른 하나의 목적은 홍팔삭 및 숙지황의 혼합 추출물을 유효성분으로 포함하는 염증성 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공하는 것이다.

[0009] 본 발명의 또 다른 하나의 목적은 상기 조성물을 인간을 제외한 개체에 투여하는 단계를 포함하는 염증성 질환의 예방 또는 치료방법을 제공하는 것이다.

[0010] 본 발명의 하나의 목적은 홍팔삭 및 숙지황의 혼합 추출물을 유효성분으로 포함하는 염증성 질환 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공하는 것이다.

[0011] 본 발명의 하나의 목적은 홍팔삭 및 숙지황의 혼합 추출물을 유효성분으로 포함하는 염증성 질환 예방 또는 개선용 사료 조성물을 제공하는 것이다.

[0012] 본 발명의 또 다른 하나의 목적은 홍팔삭 및 숙지황의 혼합 추출물을 유효성분으로 포함하는 염증성 질환 예방 또는 개선용 의약외품 조성물을 제공하는 것이다.

[0013] 본 발명의 또 다른 하나의 목적은 홍팔삭 및 숙지황의 혼합 추출물을 유효성분으로 포함하는 염증 완화 또는 개선용 화장료 조성물을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0015] 이하, 본 발명 내용에 대하여 구체적으로 설명하면 다음과 같다. 한편, 본 발명에서 개시한 일 양태의 설명 및 실시형태는 공통된 사항에 대하여 다른 양태의 설명 및 실시 형태에도 적용될 수 있다. 또한, 본 발명에서 개시된 다양한 요소들의 모든 조합이 본 발명의 범주에 속한다. 더불어, 하기 기술된 구체적인 서술에 의하여 본 발명의 범주가 제한된다고 볼 수 없다.

[0017] 본 발명의 또 다른 하나의 양태는, 홍팔삭 및 숙지황의 혼합 추출물을 유효성분으로 포함하는 염증성 질환 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.

[0018] 본 발명에서의 용어 "홍팔삭(C. hassaku Hort. ex Y. Tan) "은 감귤 품종 중 하나로서, 일본 감귤 품종인 팔삭의 아조변이이다. 홍팔삭 추출물이 항염증에 효과가 있는지는 현재까지 알려진 바가 없다. 감귤은 소비자들에게 잘 알려진 자원으로 플라보노이드, 카로티노이드 등 유용 성분을 다량 함유하고 있어 염증성 대장염 개선 소재로 개발 가능하다는 장점이 있다.

[0019] 본 발명에서의 용어 "숙지황(Rehmanniae Radix preparata)"은 여러해살이 약용식물인 지황의 뿌리를 약재로 만든 것으로, 지황 뿌리를 9번 찌고, 건조하는 과정을 반복하여 만든 약재이다. 지황의 뿌리는 본래 찬 성질을 가지고 있는데, 숙지황은 찬성질이 사라지고 따듯한 성질과 단맛을 나타낸다.

[0020] 본 발명에서, 상기 홍팔삭 및 숙지황의 혼합 추출물은 'HSE'로 혼용되어 명명될 수 있다. 상기 혼합 추출물은 홍팔삭 및 숙지황 혼합물의 추출물일 수 있으며, 또한 홍팔삭 및 숙지황 추출물의 혼합물일 수 있다.

[0021] 본 발명에서, 상기 홍팔삭 및 숙지황은 상업적으로 판매되는 것을 구입하여 사용하거나, 자연에서 채취 또는 재배된 것을 사용할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0023] 본 발명에서의 용어 "추출물"이란 용매에 침지한 다음, 상온 또는 가온상태에서 일정시간동안 추출하여 수득한 액상성분, 상기 액상성분으로부터 용매를 제거하여 수득한 고형분 등의 결과물을 의미할 수 있다.

[0024] 염증 반응 억제 활성을 갖는 상기 홍팔삭 추출물 및 숙지황 추출물은 천연, 잡종, 변종 식물의 다양한 기관으로부터 추출될 수 있고, 예를 들어 뿌리, 줄기, 잎, 꽃, 열매의 몸통, 열매의 껍질뿐만 아니라 식물 조직 배양물로부터 추출 가능하며, 이에 제한되지 않는다.

[0025] 본 발명에서, 상기 홍팔삭 추출물 및 숙지황 추출물은 물, 탄소수 1 내지 4의 저급 알콜 및 이들의 혼합 용매로 구성되는 군으로부터 선택되는 용매로 추출한 것을 포함하나, 이에 제한되지 않는다.

[0026] 본 발명에 있어서, 상기 추출물에는, 추출처리에 의해 얻어지는 추출액, 추출액의 희석액 또는 농축액, 추출액을 건조하여 얻어지는 건조물, 또는 이들 조정제물 또는 정제물 중 어느 하나도 포함될 수 있다.

[0027] 상기 홍팔삭 및 숙지황 추출물은 당업계에 공지된 일반적인 추출방법, 분리 및 정제방법을 이용하여 제조할 수

있다. 상기 추출방법으로는, 이에 제한되지는 않으나, 구체적으로 열탕 추출, 열수 추출, 냉침 추출, 환류 냉각 추출 또는 초음파 추출 등의 방법을 사용할 수 있다.

[0028] 본 발명에서, 홍팔삭 및 숙지황의 혼합물은 홍팔삭 및 숙지황을 4.5 : 0.5의 중량비(w/w), 4.0 : 1.0의 중량비, 3.0 : 0.5의 중량비, 3.0 : 1.0의 중량비, 2.5 : 0.5의 중량비, 2.0 : 1.0의 중량비, 2.0 : 0.5의 중량비, 1.0 : 1.0의 중량비, 1.0 : 0.5의 중량비, 구체적으로 1.0 내지 3.0 : 1.0의 중량비를 포함할 수 있으며, 더욱 구체적으로 3.0 : 1.0의 중량비를 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0030] 또한, 상기 조성물은 감귤 바이오겔을 추가로 포함하는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0031] 본 발명의 용어, "감귤 바이오겔"은 감귤 착즙액에 미생물을 배양해 만든 물질을 말하며, 감귤 셀룰로오스겔과 혼용되어 사용될 수 있다. 감귤 바이오겔은 조직이 균일하면서 틈새가 많아 새로운 물질과 흡착할 수 있는 좋은 조건을 갖추고 있어 다양한 소재를 결합하여 기능성 화장품, 약품 재료로 산업화할 수 있는 장점이 있다.

[0032] 본 발명의 용어, '흡착'은 바이오겔 및/또는 셀룰로오스겔의 표면에 목적으로 하는 성분이 모여있는 현상을 의미하는 것을 의미한다. 바이오겔 및/또는 셀룰로오스겔의 기공(pore)의 영향으로 기공이 형성된 부분의 표면에 목적으로 하는 성분이 모여있는 것으로 보여질 수 있으므로 셀룰로오스겔의 내부에 목적으로 하는 성분이 포함될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 구체적으로, 바이오겔은 감귤 착즙액 또는 감귤 착즙 후 잔류하는 부산물을 이용하여 제조된 바이오겔을 의미하며, 예를 들어, 감귤 착즙액 또는 감귤 착즙 후 남은 남은 잔류물을 배지로 하여 상기 배지에 글루콘아세토박터 속(*Gluconacetobacter sp.*) gel_SEA623-2(KACC 91526P)를 접종하여 생산된 바이오 겔일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 상기 감귤바이오겔은 불용성 식이섬유가 주성분으로, 불용성 식이섬유는 소화 기관에 존재하는 수분을 흡수해서 변의 부피를 늘리고 장을 자극하여 장 운동을 촉진하는데 탁월하며, 장내 유해 물질을 변과 함께 배설시키는 역할을 하는바, 본 발명에서는 홍팔삭 및 숙지황 추출물에 감귤 바이오겔이 포함되므로써, 장내 유익한 미생물의 다양성이 증가하는 것이다.

[0034] 또한, 본 발명의 목적상 상기 감귤은 감귤류 품종 중 하나인 홍팔삭을 이용할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0035] 본 발명에서, 상기 홍팔삭 및 숙지황의 혼합 추출물에 감귤 바이오겔을 추가로 혼합한 것은 'HSB'로 혼용되어 명명될 수 있다.

[0036] 본 발명에서, 상기 감귤 바이오겔은 조성물 총 중량에 대하여 1 내지 30 중량%, 5 내지 15 중량%, 7 내지 12 중량%를 포함하는 것일 수 있으며, 구체적으로 10 중량 %를 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0038] 본 발명의 용어, "염증성 질환"은 염증을 주병변으로 하는 질환의 총칭으로, 예를 들어, 염증성 피부질환, 알레르기성 질환, 크론씨 질환(Crohn's desease) 및 궤양성 대장염과 같은 염증성 장 질환, 복막염, 골수염, 봉소염, 뇌막염, 뇌염,췌장염, 외상 유발 쇼크, 기관지 천식, 낭포성 섬유증, 뇌졸중, 급성 기관지염, 만성 기관지염, 급성 세기관지염, 만성 세기관지염, 골관절염, 통풍, 척추관절병증, 강직성 척추염, 라이터 증후군, 건선성 관절병증, 장질환 척추염, 연소자성 관절병증, 연소자성 강직성 척추염, 반응성 관절병증, 감염성 관절염, 후-감염성 관절염, 임균성 관절염, 결핵성 관절염, 바이러스성 관절염, 진균성 관절염, 매독성 관절염, 라임병, '혈관염 증후군'과 관련된 관절염, 결절성 다발동맥염, 과민성 혈관염, 루게릭 육아종증, 류마티스성 다발성근육통, 관절 세포 동맥염, 칼슘 결정 침착 관절병증, 가성 통풍, 비-관절 류마티즘, 점액낭염, 건초염, 상과염(테니스 엘보), 신경병증성 관절 질환(charco and joint), 출혈성 관절증(hemarthrosic), 헤노흐-쉔라인 자반병, 비후성 골관절병증, 다중심성 세망조직구종, 수르코일로시스(surcoilosis), 혈색소증, 겸상 적혈구증 및 기타 혈색소병증, 고지단백혈증, 저감마글로불린혈증, 가족성 지중해열, 베하트 병, 전신성 홍반성 루푸스, 재귀열, 건선, 다발성 경화증, 패혈증, 패혈성 쇼크, 다장기 기능장애 증후군, 급성 호흡곤란 증후군, 만성 폐쇄성 폐질환(chronic obstructive pulmonary disease), 급성 폐손상(acute lung injury) 및 기관지 폐 형성장애(broncho-pulmonary dysplasia)로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나일 수 있으며, 구체적으로 염증성 피부질환, 궤양성 대장염, 만성 기관지염, 골관절염, 패혈증일 수 있으나. 이에 제한되지 않는다.

[0039] 본 발명에서의 용어 "예방"이란, 본 발명에 따른 상기 조성물의 투여로 염증성 질환을 억제 또는 지연시키는 모든 행위를 말한다.

[0040] 본 발명에서의 용어 "치료"란, 본 발명에 따른 상기 조성물의 투여로 상기 염증성 질환이 호전되거나 이롭게 변경되는 모든 행위를 말한다.

[0042] 본 발명의 구체적인 일 실시예에서는, 대장염 동물모델에 HSE(홍팔삭+숙지황) 및 HSB(홍팔삭+숙지황+감귤바이오

겔)을 처리한 결과, 상기 두 처리군 모두에서 대장 길이가 정상 그룹과 유사하게 회복되는 것을 확인하였으며, 점막손상 등도 회복됨을 확인할 수 있었다. 특히, HSB 그룹이 장염개선에 더욱 효과적임을 확인하였다(도 5 및 도 6).

[0043] 본 발명의 또 다른 구체적인 일 실시예에서는, 본 발명의 HSE와 HSB를 처리한 군 모두에서 손상된 대장의 재생을 촉친시키는데 도움을 주는 단쇄지방산이 증가됨을 확인하였다(도 7 및 도 8). 또한, 단쇄지방산 생산과 관련된 미생물이 점차 회복되는 경향을 나타냄을 확인하였다(도 9). 상기 결과 이외에도, 본 발명의 추출물(HSE와 HSB)을 처리한 경우에 microbiota의 다양성 및 균질성이 증가됨을 확인하였다(도 10).

[0044] 본 발명의 또 다른 구체적인 일 실시예에서는, 본 발명의 HSE와 HSB를 처리한 군 모두에서 염증성 사이토카인인 IL-6 및 TNF-α의 분비량을 측정한 결과, 염증성 사이토카인의 분비량이 유의적으로 감소하는 것을 확인하였다(도 11). 이는 HSE와 HSB 처리하였을 경우, 염증 반응에 직접적으로 관여하는 염증성 사이토카인의 분비를 감소시켜 염증성 질환에 대한 치료효과를 나타낼 수 있음을 시사하는 것이다.

[0046] 본 발명에서 사용된 용어 "약학 조성물"이란, 질병의 예방 또는 치료를 목적으로 제조된 것을 의미하며, 각각의 통상의 방법에 따라 다양한 형태로 제형화하여 사용될 수 있다. 예컨대, 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀젼, 시럽 등의 제형으로 제형화할 수 있고, 외용제, 좌제 및 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용될 수 있다. 구체적으로, 점안투여하기 적합한 형태, 예를 들어, 점안제, 크림제, 연고제, 겔제 또는 로션제로 제형화하여 사용될 수 있다.

[0047] 상기 본 발명의 조성물은, 약학적 조성물의 제조에 통상적으로 사용하는 적절한 담체, 부형제 또는 희석제를 추가로 포함하는 염증성 질환 예방 또는 치료용 약학 조성물의 형태로 제조될 수 있는데, 상기 담체는 비자연적 담체(non-naturally occuring carrier)를 포함할 수 있다.

[0048] 본 발명에서, 상기 약학 조성물에 포함될 수 있는 담체, 부형제 및 희석제로는 락토즈, 덱스트로즈, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 들 수 있다.

[0049] 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다. 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 상기 상엽 추출물과 이의 분획물들에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트(calcium carbonate), 수크로스(sucrose) 또는 락토오스(lactose), 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 또한 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스티레이트, 탈크 같은 윤활제들도 사용된다. 경구를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는 데 흔히 사용되는 단순희석제인 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, 동결건조 제제, 좌제가 포함된다. 비수성용제, 현탁제로는 프로필렌글리콜(propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될수 있다. 좌제의 기제로는 위텝솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다.

[0050] 본 발명의 약학 조성물은 목적하는 방법에 따라 경구, 비경구, 직장, 국소, 경피, 정맥 내, 근육 내, 복강 내, 피하 등으로 투여할 수 있으며, 약학 조성물의 유효성분은 투여받을 대상의 연령, 성별, 체중, 병리 상태 및 그 심각도, 투여 경로 또는 처방자의 판단에 따라 달라질 것이다. 이러한 인자에 기초한 적용량 결정은 당업자의 수준 내에 있으며, 이의 1일 투여 용량은 예를 들어 0.1 mg/g/일 내지 100 mg/g/일, 보다 구체적으로는 5 mg/g/일 내지 50 mg/g/일이 될 수 있고, 본 발명의 조성물의 투여빈도는 특별히 이에 제한되지 않으나, 1일 1회 투여하거나 또는 용량을 분할하여 수회 투여할 수 있다. 상기 투여량은 어떠한 면으로든 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.

[0052] 본 발명의 다른 하나의 양태는, 상기 조성물을 인간을 제외한 개체에 투여하는 단계를 포함하는 염증성 질환의 예방 또는 치료방법을 제공한다.

[0053] 상기, 홍팔삭 및 숙지황 추출물, 염증성 질환, 예방은 상기에서 설명한 바와 같다.

[0054] 본 발명에서의 용어, "개체"란, 염증성 질환이 발병하였거나 발병할 가능성이 있는 인간을 포함한 모든 동물을 의미할 수 있다. 상기 동물은 인간뿐만 아니라 이와 유사한 증상의 치료를 필요로 하는 소, 말, 양, 돼지,

염소, 낙타, 영양, 개, 고양이 등의 포유동물일 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다.

[0055] 본 발명의 상기 예방 또는 치료방법은 구체적으로, 염증성 질환이 발병하였거나 발병할 위험이 있는 개체에 상기 조성물을 약학적으로 유효한 양으로 투여하는 단계를 포함할 수 있다.

[0056] 본 발명에서의 용어, "투여"는 어떠한 적절한 방법으로 환자에게 본 발명의 약학 조성물을 도입하는 것을 의미하며, 본 발명의 조성물의 투여 경로는 목적 조직에 도달할 수 있는 한 다양한 경로를 통하여 투여될 수 있으며, 목적하는 바에 따라 점안 투여, 복강내 투여, 정맥내 투여, 근육내 투여, 피하 투여, 피내 투여, 경피 패치투여, 경구 투여, 비내 투여, 폐내 투여, 직장내 투여 등의 경로를 통해 투여 될 수 있고, 구체적으로 경구 투여의 경로를 통해 투여될 수 있다.

[0058] 상기의 목적을 달성하기 위한 본 발명의 하나의 양태는, 홍팔삭 및 숙지황의 혼합 추출물을 유효성분으로 포함하는 염증성 질환의 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공한다.

[0060] 본 발명에서의 용어, "개선"은 상기 조성물을 투여하여 염증성 질환의 증상이 호전되거나 이롭게 변경되는 모든 행위를 의미한다.

[0061] 본 발명의 식품 조성물은 다양한 형태의 식품 첨가제 또는 기능성 식품을 제공한다. 구체적으로, 상기 조성물을 포함하는 침출차, 액상차, 음료, 발효유, 치즈, 요구르트, 주스, 생균제제 또는 건강보조식품 등으로 가공될 수 있으며, 그 외 다양한 식품 첨가제의 형태로 사용될 수 있다.

[0062] 본 발명의 식품 조성물은 식품학적으로 허용가능한 담체를 추가로 포함하는 것일 수 있다.

[0063] 본 발명의 홍팔삭 추출물 및 숙지황 추출물을 포함하는 조성물을 첨가할 수 있는 식품의 종류에는 별다른 제한이 없으며, 예를 들어 각종 음료, 껌, 차, 비타민 복합제, 건강보조식품류 등이 있다. 상기 식품 조성물에는 갱년기 장애 치료 효과에 방해가 되지 않는 다른 성분을 추가할 수 있으며, 그 종류는 특별히 제한되지 않는다. 예를 들어, 통상의 식품과 같이 여러 가지 생약 추출물, 식품학적으로 허용가능한 식품보조첨가제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다.

[0064] 상기 식품보조첨가제는 각 제형의 식품 조성물을 제조하는데 첨가되는 것으로서 당업자가 적절히 선택하여 사용할 수 있다. 예를 들어 여러 가지 영양제, 비타민, 광물 (전해질), 합성 풍미제 및 천연 풍미제 등의 풍미제, 착색제 및 충진제, 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알코올, 탄산음료에 사용되는 탄산화제 등이 포함되지만, 상기 예들에 의해 그 종류가 제한되는 것은 아니다.

[0065] 이때, 상기 식품에 포함되는 추출물의 함량은 특별히 이에 제한되지 않으나, 식품 조성물의 총 중량에 대하여 0.01 내지 100 중량%, 구체적으로는 1 내지 80 중량%로 포함될 수 있다.

[0066] 식품이 음료인 경우에는 100㎖를 기준으로 1 내지 30g, 구체적으로는 3 내지 20g의 비율로 포함될 수 있다. 또한, 상기 조성물은 식품 조성물에 통상 사용되어 냄새, 맛, 시각 등을 향상시킬 수 있는 추가 성분을 포함할 수 있다. 예를 들어, 비타민 A, C, D, E, B1, B2, B6, B12, 니아신(niacin), 비오틴(biotin), 폴레이트(folate), 판토텐산(panthotenic acid) 등을 포함할 수 있다. 또한, 아연(Zn), 철(Fe), 칼슘(Ca), 크롬(Cr), 마그네슘(Mg), 망간(Mn), 구리(Cu) 등의 미네랄을 포함할 수 있다. 또한, 라이신, 트립토판, 시스테인, 발린 등의 아미노산을 포함할 수 있다. 또한, 방부제(소르빈산 칼륨, 벤조산나트륨, 살리실산, 데히드로초산나트륨 등), 살균제(표백분과 고도 표백분, 차아염소산나트륨 등), 산화방지제(부틸히드록시아니졸(BHA), 부틸히드록시톨류엔(BHT) 등), 착색제(타르색소 등), 발색제(아질산 나트륨, 아초산 나트륨 등), 표백제(아황산나트륨), 조미료(MSG 글루타민산나트륨 등), 감미료(둘신, 사이클레메이트, 사카린, 나트륨 등), 향료(바닐린, 락톤류 등), 팽창제(명반, D-주석산수소칼륨 등), 강화제, 유화제, 증점제(호료), 피막제, 검기초제, 거품억제제, 용제, 개량제 등의 식품 첨가물(food additives)을 첨가할 수 있다. 상기 첨가물은 식품의 종류에 따라 선별되고 적절한 양으로 사용된다.

[0067] 본 발명의 식품 조성물은 당업계에서 통상적으로 사용되는 방법에 의하여 제조가능하며, 상기 제조 시에는 당업계에서 통상적으로 첨가하는 원료 및 성분을 첨가하여 제조할 수 있다. 또한 일반 약품과는 달리 식품을 원료로 하여 약품의 장기 복용 시 발생할 수 있는 부작용 등이 없는 장점이 있고, 휴대성이 뛰어날 수 있다.

[0069] 본 발명의 또 다른 하나의 양태는, 홍팔삭 및 숙지황의 혼합 추출물을 유효성분으로 포함하는 염증성 질환 예방 또는 개선용 사료 조성물을 제공한다.

[0070] 상기 사료용 조성물은 사료 첨가제를 포함할 수 있다. 본 발명의 사료첨가제는 사료관리법상의 보조사료에 해당한다.

[0071] 본 발명에서 용어, "사료"는 동물이 먹고, 섭취하며, 소화시키기 위한 또는 이에 적당한 임의의 천연 또는 인공 규정식, 한끼식 등 또는 상기 한끼식의 성분을 의미한다.

[0072] 상기 사료의 종류는 특별히 제한되지 아니하며, 당해 기술 분야에서 통상적으로 사용되는 사료를 사용할 수 있다. 상기 사료의 비제한적인 예로는, 곡물류, 근과류, 식품 가공 부산물류, 조류, 섬유질류, 제약 부산물류, 유지류, 전분류, 박 류 또는 곡물 부산물류 등과 같은 식물성 사료; 단백질류, 무기물류, 유지류, 광물성류, 유지류, 단세포 단백질류, 동물성 플랑크톤류 또는 음식물 등과 같은 동물성 사료를 들 수 있다. 이들은 단독으로 사용되거나 2종 이상을 혼합하여 사용될 수 있다.

[0074] 본 발명의 또 다른 하나의 양태는, 홍팔삭 및 숙지황의 혼합 추출물을 유효성분으로 포함하는 염증성 질환 예방 또는 개선용 의약외품 조성물을 제공한다.

[0075] 본 발명에서의 용어, "의약외품"은 사람이나 동물의 질병을 진단, 치료, 개선, 경감, 처치 또는 예방할 목적으로 사용되는 물품들 중 의약품보다 작용이 경미한 물품들을 의미한다. 예를 들어, 약사법에 따른 의약외품은 의약품의 용도로 사용되는 물품을 제외한 것으로, 사람/동물의 질병 치료나 예방에 쓰이는 제품, 인체에 대한 작용이 경미하거나 직접 작용하지 않는 제품 등이 포함된다.

[0076] 구체적으로, 상기 의약외품은 피부외용제 및 개인위생용품을 포함할 수 있다. 보다 구체적으로 소독청결제, 샤워폼, 가그린, 물티슈, 세제비누, 핸드워시, 또는 연고제일 수 있으나 이에 제한되지는 않는다.

[0077] 본 발명에 따른 상기 조성물을 의약외품 첨가물로 사용할 경우, 상기 조성물을 그대로 첨가하거나 다른 의약외품 또는 의약외품 성분과 함께 사용할 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용할 수 있다. 유효성분의 혼합량은 사용 목적에 따라 적합하게 결정될 수 있다.

[0079] 본 발명의 또 다른 하나의 양태는, 홍팔삭 및 숙지황의 혼합 추출물을 유효성분으로 포함하는 염증 완화 또는 개선용 화장료 조성물을 제공한다.

[0080] 본 발명에 있어서, 상기 화장료 조성물은 용액, 외용 연고, 크림, 폼, 영양 화장수, 유연 화장수, 팩, 유연수, 유액, 메이크업 베이스, 에센스, 비누, 액체 세정료, 입욕제, 선 스크린 크림, 선 오일, 현탁액, 유탁액, 페이스트, 겔, 로션, 파우더, 비누, 계면 활성제-함유 클렌징, 오일, 분말 파운데이션, 유탁액 파운데이션, 왁스 파운데이션, 패취 및 스프레이로 구성된 군에서 선택되는 제형으로 제조할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0081] 본 발명의 상기 화장료 조성물은 일반 피부 화장료에 배합되는 화장품학적으로 허용 가능한 담체를 1 종 이상 추가로 포함할 수 있으며, 통상의 성분으로 예를 들면 유분, 물, 계면 활성제, 보습제, 저급 알코올, 증점제, 킬레이트제, 색소, 방부제, 향료 등을 적절히 배합할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0082] 본 발명의 화장료 조성물에 포함되는 화장품학적으로 허용 가능한 담체는 화장료 조성물의 제형에 따라 다양하다.

[0083] 본 발명의 제형이 연고, 페이스트, 크림 또는 젤인 경우에는, 담체 성분으로서 동물성 유, 식물성 유, 왁스, 파라핀, 전분, 트라칸트, 셀룰로오스 유도체, 폴리에틸렌 글리콜, 실리콘, 벤토나이트, 실리카, 탈크, 산화 아연 등이 이용될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 이들은 단독으로 사용되거나 2 종 이상 혼합되어 사용될 수 있다.

[0084] 본 발명의 제형이 파우더 또는 스프레이인 경우에는, 담체 성분으로서 락토스, 탈크, 실리카, 알루미늄 히드록사이드, 칼슘 실케이트, 폴리아미드 파우더 등이 이용될 수 있고, 특히 스프레이인 경우에는 추가적으로 클로로플루오로하이드로카본, 프로판/부탄 또는 디메틸 에테르와 같은 추진제를 포함할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 이들은 단독으로 사용되거나 2 종 이상 혼합되어 사용될 수 있다.

[0085] 본 발명의 제형이 용액 또는 유탁액인 경우에는, 담체 성분으로서 용매, 용해화제 또는 유탁화제 등이 이용될 수 있으며, 예컨대 물, 에탄올, 이소프로판올, 에틸 카보네이트, 에틸 아세테이트, 벤질 알코올, 벤질 벤조에이트, 프로필렌 글리콜, 1,3-부틸글리콜 오일 등이 이용될 수 있고, 특히, 목화씨 오일, 땅콩 오일, 옥수수 배종 오일, 올리브 오일, 피마자 오일 및 참깨 오일, 글리세롤 지방족 에스테르, 폴리에틸렌 글리콜 또는 소르비탄의 지방산 에스테르가 이용될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 이들은 단독으로 사용되거나 2 종 이상 혼합되어 사용될 수 있다.

[0086] 본 발명의 제형이 현탁액인 경우에는, 담체 성분으로서 물, 에탄올 또는 프로필렌 글리콜과 같은 액상의 희석제, 에톡실화 이소스테아릴 알코올, 폴리옥시에틸렌 소르비톨 에스테르 및 폴리옥시에틸렌 소르비탄 에스테르와 같은 현탁제, 미소결정성 셀룰로오스, 알루미늄 메타하이드록시드, 벤토나이트, 아가 또는 트라칸트 등이 이용될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 이들은 단독으로 사용되거나 2 종 이상 혼합되어 사용될 수 있다.

[0087] 본 발명의 제형이 계면-활성제 함유 클린징인 경우에는 담체 성분으로서 지방족 알코올 설페이트, 지방족 알코올 에테르 설페이트, 설포숙신산 모노에스테르, 이세티오네이트, 이미다졸리늄 유도체, 메틸타우레이트, 사르코시네이트, 지방산 아미드 에테르 설페이트, 알킬아미도베타인, 지방족 알코올, 지방산 글리세리드, 지방산 디에탄올아미드, 식물성 유, 리놀린 유도체 또는 에톡실화 글리세롤 지방산 에스테르 등이 이용될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 이들은 단독으로 사용되거나 2 종 이상 혼합되어 사용될 수 있다.

[0088] 본 발명의 화장료 조성물에는 상기 필수 성분과 더불어 필요에 따라 통상 화장료에 배합되는 다른 성분을 배합해도 된다. 구체적으로, 첨가해도 되는 배합 성분으로서는 유지 성분, 보습제, 에몰리엔트제, 계면 활성제, 유기 및 무기 안료, 유기 분체, 자외선 흡수제, 방부제, 살균제, 산화 방지제, 식물 추출물, pH 조정제, 알콜, 색소, 향료, 혈행 촉진제, 냉감제, 제한(制汗)제, 정제수 등을 들 수 있으나 이에 제한되지 않는다.

발명의 효과

[0090] 본 발명에서 제공하는 홍팔삭 및 숙지황의 혼합 추출물은 천연물 유래의 소재로서, 환경오염과 스트레스 등 여러요인으로 발생률이 증가하고 있는 염증성 대장염 개선 효능을 가지는 동시에 부작용이 적으며, 감귤을 활용함으로써 감귤의 소비 확대와 국민 건강 증진 효과를 기대할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0092] 도 1은 감귤 바이오겔 생산 관련 균주 및 생산제품에 관한 도이다.

도 2는 홍팔삭 추출물, 숙지황 추출물, 홍팔삭 및 숙지황 혼합 추출물(비율 포함)의 세포독성 분석 결과를 나타낸 그래프이다.

도 3은 홍팔삭 추출물, 숙지황 추출물, 홍팔삭 및 숙지황 혼합 추출물(비율 포함)의 사이토카인 분비량을 비교한 그래프이다.

도 4는 DSS로 대장염을 유발한 후 준비한 시료에 HSE와 HSB를 처리한 군의 DAI 값을 나타낸 그래프이다.

도 5는 DSS로 대장염을 유발한 후 준비한 시료에 HSE와 HSB를 처리한 군의 대장의 길이를 확인한 도이다.

도 6은 DSS로 대장염을 유발한 후 준비한 시료에 HSE와 HSB를 처리한 군의 병리 조직학적 결과를 나타낸 그래프이다.

도 7은 DSS로 대장염을 유발한 후 준비한 시료에 HSE와 HSB를 처리한 군의 마우스 분변에서 단쇄 지방산을 분석한 그래프이다.

도 8은 DSS로 대장염을 유발한 후 준비한 시료에 HSE와 HSB를 처리한 군의 마우스 분변에서 단쇄 지방산 생성 관련 미생물의 분포를 분석한 도이다.

도 9는 DSS로 대장염을 유발한 후 준비한 시료에 HSE와 HSB를 처리한 군에서 단쇄 지방산 생성 관련 미생물의 증가여부를 분석한 도이다.

도 10은 DSS로 대장염을 유발한 후 준비한 시료에 HSE와 HSB를 처리한 군에서 Microbiota의 다양성 및 균질성을 분석한 도이다.

도 11은 DSS로 대장염을 유발한 후 준비한 시료에 HSE와 HSB를 처리한 군에서 염증성 사이토카인의 분비의 감소여부를 확인한 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0093] 이하 본 발명을 하기 예에 의해 상세히 설명한다. 다만, 하기 예는 본 발명을 예시하기 위한 것일 뿐, 하기 예에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것은 아니다.

[0095] **실시예 1: 혼합 추출물의 제조 및 독성 확인**

[0096] **1-1: 감귤바이오겔의 제조**

[0097] 감귤 바이오겔은 글루콘아세토박터 속(*Gluconacetobater* sp). gel_SEA623-2(KACC91526P) 균주를 이용하여 생산하였다. 상기 감귤바이오겔을 생산하기 위하여, 당도 10 brix, 산도 pH 3.5의 온주밀감 착즙액(10%(v/v))을 포함하는 배지에 글루콘아세토박터 속 SEA623-2 균주를 $1X10^5$ cell/ml 로 접종하였고, 25℃에서 20일간 호기성 조건에서 정치배양하였다.

[0098] 그 결과, 상기 SEA623-2 균주의 초기 겔 생성 속도가 매우 뛰어나서 배양 2일부터 겔 막이 형성되기 시작하였으며, 20일 경과 후 생성된 감귤바이오겔을 회수하여 사용하였다(도 1). 또한, 본 발명에서 사용한 감귤 바이오겔은 soft형으로, 3차원의 망상구조를 가지고 있으며 섬유다발 사이의 간격이 10-20nm로 나노입자형이 가능함을 확인하였다.

[0100] **1-2: 추출물의 제조**

[0101] 추출물은 각각 홍팔삭과 숙지황을 70% 에탄올에 침지하여 추출한 후 다양한 비율로 혼합하여 사용하였다. 혼합추출물 제조 후 감귤바이오겔은 전체 조성물 대비 10 중량%로 첨가하여 사용하였다. 본 발명에 사용된 감귤바이오겔은 섭취시 이물감이 남지 않을 정도로 분쇄하여 사용하였다.

[0103] **1-3: 세포독성 평가**

[0104] 상기 실시예 1-2에서 제조한 각각의 단일 추출물(홍팔삭 추출물, 숙지황 추출물), HSE(홍팔삭+숙지황) 및 HSB(홍팔삭+숙지황+감귤바이오겔)의 추출물의 염증성 장질환 치료 효과를 확인하기에 앞서, 세포에 독성을 나타내지 않는 농도를 확인하기 위해 세포독성 평가를 수행하였다.

[0105] 세포독성평가는 MTT법을 이용하여 분석하였다. RAW BLUE 세포를 96well plate에서 24시간 배양 후 시료 100ug/mL을 처리하였다. 시료 처리 후 24시간 후 2mg/mL의 MTT 용액을 20uL/well 처리하고 4시간 배양하였다. 4시간 배양 후 배지를 제거하고 DMSO를 200uL/well 처리하여 1시간 반응 후 540nm에서 흡광도를 측정하였다.

[0106] 최소 3번의 반복적인 실험이 이루어 졌으며 이로부터 얻은 독립된 실험결과를 평균을 내어 대조군 세포의 생존능력과 비교하여 백분율로 나타내었다.

[0107] 그 결과, 90% 이상의 세포생존율을 보여 시료 처리 농도인 100ug/mL에서는 세포 독성에 영향을 미치지 않는 것으로 알 수 있었다(도 2 및 도 3).

[0109] **실시예 2: 대장염 동물모델의 확립 및 실험군 조성**

[0110] 실시예 1의 결과를 토대로, 단일 추출물(홍팔삭 추출물, 숙지황 추출물)에서 보다, 홍팔삭 및 숙지황의 혼합 추출물, 특히 홍팔삭과 숙지황의 혼합 비율이 3: 1인 경우에 세포독성이 가장 낮음을 확인하여, 하기 실험부터는 이를 토대로 실험을 하였다.

[0112] **2-1: 대장염 동물모델**

[0113] 실험동물은 ㈜ 오리엔트바이오(대한민국)으로부터 5주령 암컷 ICR mouse을 구입하여 사용하였다. 1주일간 실험실 사육 환경에 적응 시킨 후 실험에 사용하였다. 실험동물센터 사육 조건은 습도 50 - 55%, 온도 24 ± 1℃, 명암 주기: 12시간으로 제주대학교 동물실험윤리위원회 승인 (승인번호: 2020-0030) 받아 실험을 진행하였다.

[0115] **2-2: 실험군**

[0116] 실시예 2-1의 대장염 동물모델에 HSE(홍팔삭+숙지황) 및 HSB(홍팔삭+숙지황+감귤바이오겔)를 1mg/mL 농도로 포함하는 음용수를 매일 처리하였다. 처리는 4주간 수행하였고, 4주 후 변화를 확인하였다. 양성대조군으로는 DSS(Dextran Sulfate Sodium)처리 후 4주간 음용수만 처리한 마우스를 이용하였다.

[0118] **실시예 3: DSS 유도 장염 모델에 대한 혼합 추출물의 효과 실험**

[0119] **3-1: Disease activity index(DAI)**

[0120] 실험 시작 후 매일 각 군의 마우스의 체중을 측정하여 체중 감소율로 계산하였으며, 변 상태 및 혈변 유무를 확

인하였다. 상기 3가지 지표에 대해 하기 표 1의 기준에 따라 질병 활성 지수(Disease Activity Index; DAI; Elkatary et al. BJPR, 7(2): 140-151, 2015)의 점수를 계산하였다.

표 1

[0121] DAI 계산을 위한 점수 계산 기준

Score	체중 (%)	변의 굳기	출혈/잠혈 반응
0	변화 없음	단단한 변	정상
1	1~5% 감소	무른 변 1~2개	항문 부종
2	6~10% 감소	무른 변 <25%	매우 약한 출혈, 혈변 1~ 5개
3	10~15% 감소	무른 변 25~75%	중증도 출혈,혈변 5개 이상
4	>15% 감소	설 사	심한 출혈

[0123] 상기 표 1의 점수 계산 기준으로 계산한 합을 질병 활성 지수(Disease Activity Index; DAI)로 도 4에 나타내었다.

[0124] 2주 후 DAI index를 확인한 결과 DSS처리로 증가하였던 DAI index가 감소하는 것을 확인하였고, DAI index는 HSE(홍팔삭+숙지황) 및 HSB(홍팔삭+숙지황+감귤바이오겔)의 두 처리군에서 유사한 점수를 나타냄을 확인하였다.

[0126] **3-2: 대장의 길이 변화**

[0127] 맹장을 제외한 대장 전체 길이를 측정한 결과, DSS 투여군은 정상군과 비교하여 대장의 길이가 짧아졌으나, HSE 또는 HSB 처리 후 대장의 길이는 정상군만큼 회복된 것을 확인 할 수 있었다(도 5a 및 도5b). 특히, 두 처리군(HSE 또는 HSB) 을 비교하였을 때, 감귤바이오겔이 포함된 HSB 처리군의 대장의 길이는 normal 그룹과 유사하게 회복된 것을 확인할 수 있었다.

[0128] 이를 통해, 감귤(홍팔삭) 및/또는 숙지황 추출물은 우수한 장염 개선 또는 치료 효과를 갖는 것을 알 수 있으며, 특히 감귤 바이오겔이 포함된 경우에 장염 개선에 더욱 효과적임을 알 수 있다.

[0130] **실시예 4: 병리 조직학적 관찰**

[0131] 실험동물을 희생하여 얻은 장 조직은 10% 중화 포르말린으로 고정하였다. 고정된 장 표본은 파라핀을 침투시켜 굳혀서 포매 한 후 4~6um 절편으로 잘랐다. 자른 절편은 헤마톡실린(hematoxylin)과 에오신(eosin) 염색약으로 두번 염색하여 광학현미경을 이용하여 관찰하였다.

[0132] 그 결과, 정상군에 비하여 DSS 의한 장염 유발군에서 점막상피의 손상, crypt의 소실, 염증세포의 침윤과 섬유화의 증가를 나타냈으나 HSE 또는 HSB 처리 의하여 다소 완화되는 경향을 확인할 수 있다(도 6). 특히, 도 6에서 감귤바이오겔을 포함하는 D(HSB)의 조직이 더 완화된 것을 확인할 수 있다.

[0134] **실시예 5: 단쇄지방산 분석**

[0135] 장내에서 단쇄지방산은 장 상피세포의 영양소로 작용하여 세포 증식, 분화, 유전자 발현에 영향을 주며, 장내 pH를 산성화 시킨다. 또한 단쇄지방산 증가로 변화된 장내환경은 담즙산의 용해도 감소, 암모니아 흡수 감소 등의 원인을 제공하며 장내 무기질을 흡수가 용이한 형태로 변화시킨는 것으로 알려져 있다. 특히 단쇄지방산은 손상된 대장의 재생을 촉진시켜 대장의 건강을 증진하는데 도움을 주는 것으로 알려져 있다.

[0136] 이에, 본 발명자들은 본 발명의 추출물(HSE와 HSB)을 처리한 경우에도 단쇄지방산이 증가되는지 확인하고자 하였다.

[0137] 구체적으로, 단쇄지방산은 propionic acid와 butyric acid를 분석하였다. 분석 결과 DSS로 염증성 장 질환을 유발한 경우 무처리군에 비해 지방산 생성량이 감소되었고, HSE와 HSB 처리시에는 단쇄지방산이 증가하는 것을 확인할 수 있었다(도 7). 특히, 분석 결과 HSE 처리군에서 더 많은 단쇄지방산이 생성되는 것을 확인하였다. 또한, HSE 그룹의 경우 단쇄지방산 생산과 관련된 미생물의 분포가 증가한 것을 확인할 수 있었다(도 8).

[0139] **실시예 6: 지방산 관련 미생물 증가**

[0140] *Acetatifactor* 또는 *Alistipes*는 주로 ulcerative colitis와 같은 장 질병에 이환된 사람에서 감소하고 건강한 사람에서 증가하는 유익균으로서, 장 내 유익한 물질인 단쇄지방산 (short-chain fatty acid; SCFA)를 생산하는

것으로 알려져 있다(Jian Sun et al, 2020. International journal of biological macromolecules)

[0141] 이에, 본 발명자들은 본 발명의 추출물(HSE와 HSB)을 처리한 경우에 단쇄지방산을 생산하는 미생물이 증가되는지 확인하고자 하였다.

[0142] 그 결과, 본 연구에서는 DSS 그룹에서 현저하게 감소하고 A군(HSE 처리)보다는 B군(HSB 처리)에서 상기 미생물이 점차 회복하는 경향을 나타냈다(도 9a 및 도 9b).

[0144] **실시예 7: 미생물의 다양성 및 균질성 분석**

[0145] DSS 처리에 의해 염증성 대장염이 유발되면 microbiota의 다양성 및 균질성이 감소하는 것으로 알려져 있다. 이에, 본 발명자들은 본 발명의 추출물(HSE와 HSB)을 처리한 경우에도 microbiota의 다양성 및 균질성이 증가되는지 확인하고자 하였다.

[0146] Microbiota 분석을 위해 실험 마우스 분변의 16S rRNA amplicon의 염기서열을 분석하였다. 염기서열 분석을 위해서는 무선 DNA quality check가 필요하여 Victor 3 fluorometery를 이용한 picogreen 방법을 통해 샘플 DNA의 양을 체크한 후, 겔 전기영동 방법을 통해 DNA의 quality를 체크하여 최종적으로 라이브러리 제작 여부를 결정하였다. DNA 상태가 확인되면 DNA library 제작 및 quality check를 수행한다. Library를 제작하여 PCR을 진행한 후 enrichment fragments의 사이즈를 검증하고 Illumina qPCR quantification protocol guide에 따라 qPCR을 사용하여 library의 양을 체크하여 최종적으로 염기서열 분석할 샘플을 결정하였다. 장내 미생물 연구에 많이 이용되고 300 basepair 크기의 유전체 데이터를 생산하는 MiSeq 플랫폼을 이용하여 염기서열 분석을 수행하였다. 이전 과정에서 증폭된 16S rRNA의 v3-v4 region을 타겟으로 하였다. 그 다음 Bioinformatics 분석을 수행하게 되는데 전체적인 분석 파이프라인은 최근 연구에서 가장 많이 이용되는 최신버전의 QIIME2 프로그램을 이용하였다. 생산된 유전체 데이터의 quality check를 수행하여 low quality인 부분을 trimming 합하였다. OTU (Operational taxonomic unit) 방법을 통해 feature table을 생성하고 마이크로바이옴 분석과 관계없는 archeae나 Cyanobacteria 등을 필터링 하였다. 최신 명명법을 따르는 NCBI RefSeq database를 이용하여 각 feature가 어떤 세균인지 판별하고, 최종 완성된 table을 참고하여 diversity index를 구하고 통계 분석을 수행하였다.

[0147] 그 결과, HSE와 HSB 처리군에서 모두 DSS 처리군 보다 microbiota의 다양성 및 균질성이 증가한 것을 확인할 수 있었다(도 10a 및 도10b). 구체적으로, normal 그룹보다 DSS 그룹에서 microbiota의 다양성 및 균질성이 현저히 감소하는 것을 확인하였으나, HAE와 HSB 처리군에서는 normal 그룹과 유사하게 microbiota의 다양성 및 균질성이 증가하는 것을 확인하였다.

[0149] **실시예 8: 염증성 사이토카인 분석**

[0150] DSS로 유발된 염증성 장 질환 개선에 본 발명의 추출물(HSE와 HSB)이 영향을 주는지 확인하기 위해 serum 또는 colon에서 염증성 사이토카인 TNF-α와 IL-6의 생성을 측정하였다.

[0151] 염증성 사이토카인 억제 활성 측정을 위해 RAW BLUE 세포를 24 well plate에 1.5×10^5 cells/mL로 분주하여 18시간 배양 후 LPS를 1 μg/mL로 처리하여 사이토카인의 생성을 유도하였다. 사이토카인이 생선된 세포에 농도별로 시료를 처리하여 24시간 배양 후 상등액을 이용하여 사이토카인 생성 억제 활성을 측정하였다. 마우스 TNF-α(Invitrogen Corp., Carlsbad, California, USA), IL-6(Invitrogen Corp., Carlsbad, California, USA) ELISA kit를 사용하요 측정하였다.

[0152] 그 결과, DSS 처리군의 경우 대조군인 무처리군(정상대조군)에 비해 염증성 사이토카인의 생성이 급격히 증가하였고, 시료 섭취시 생성량이 감소하는 것을 확인할 수 있었다(도 11a 및 도11b). 이는 섭취된 시료들로 인해 염증이 완화되면서 사이토카인(TNF-α, IL-6)의 생성량이 줄어드는 것으로 염증성 장질환 개선에 도움을 줄 수 있는 것으로 보인다. 특히 감귤바이오겔을 함유하는 HSB 처리군에서 염증성 사이토카인의 생성이 현저히 감소한 것을 확인할 수 있었다.

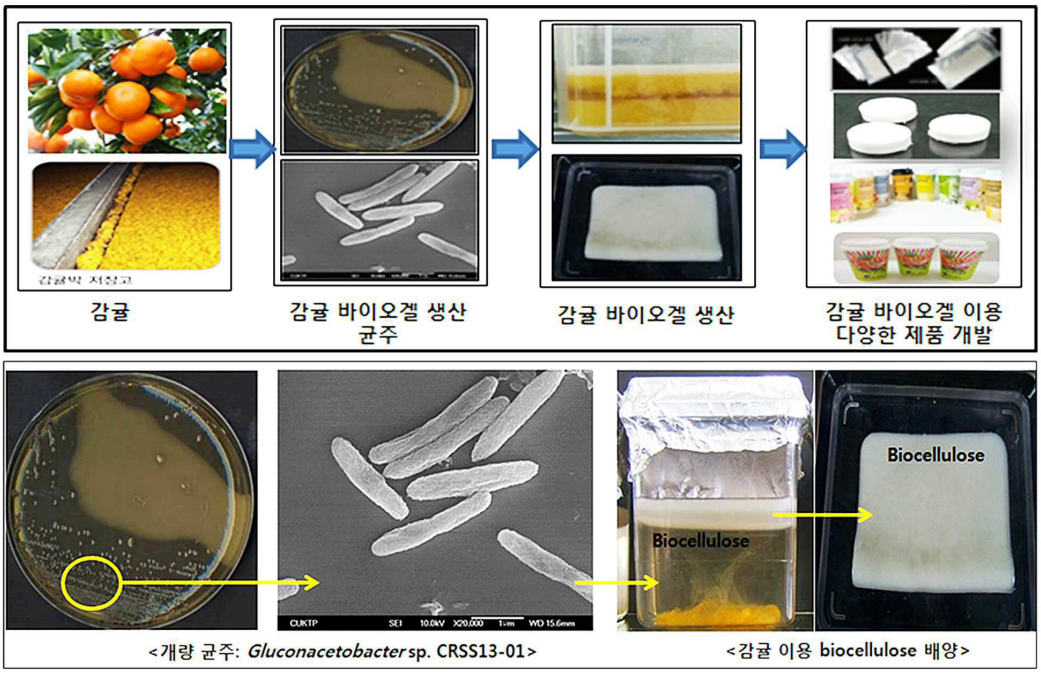
[0154] 이는, HSE와 HSB 처리하였을 경우, 염증 반응에 직접적으로 관여하는 염증성 사이토카인의 분비를 감소시켜 염증성 질환에 대한 치료효과를 나타낼 수 있음을 시사한다.

[0156] 이상의 설명으로부터, 본 발명이 속하는 기술분야의 당업자는 본 발명이 그 기술적 사상이나 필수적 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 실시될 수 있다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 이와 관련하여, 이상에서 기술한 실시 예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적인 것이 아닌 것으로서 이해해야만 한다. 본 발명의 범

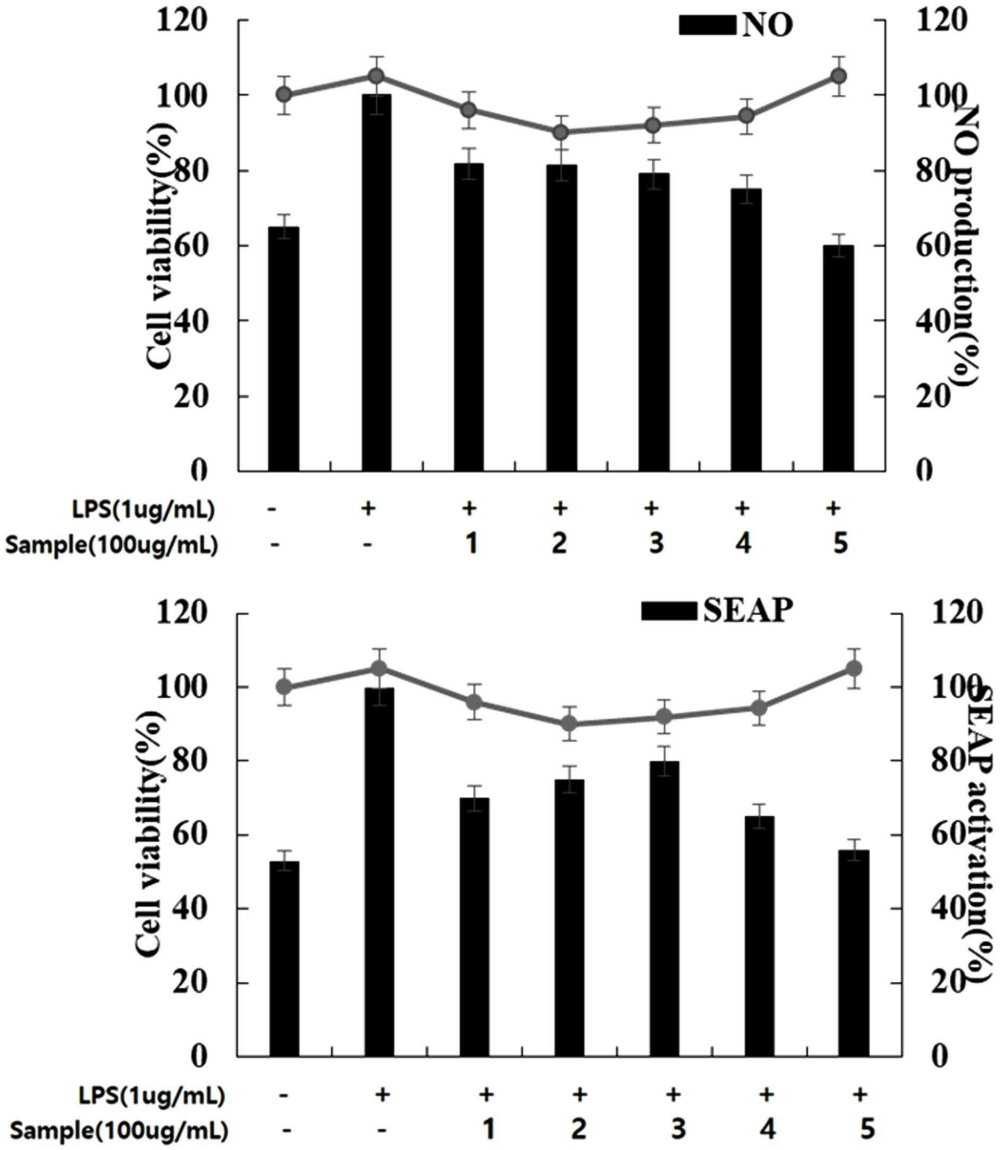
위는 상기 상세한 설명보다는 후술하는 특허 청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 등가 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

도면

도면1

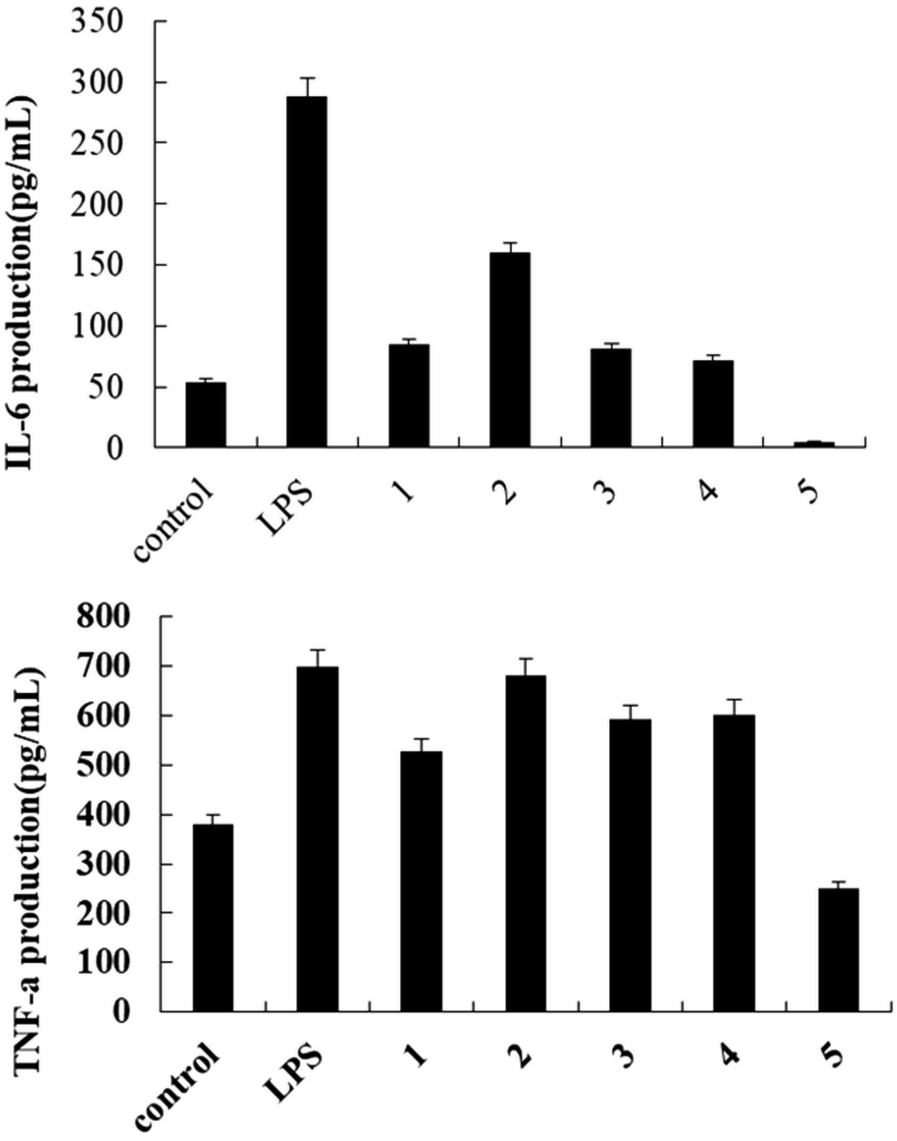


도면2



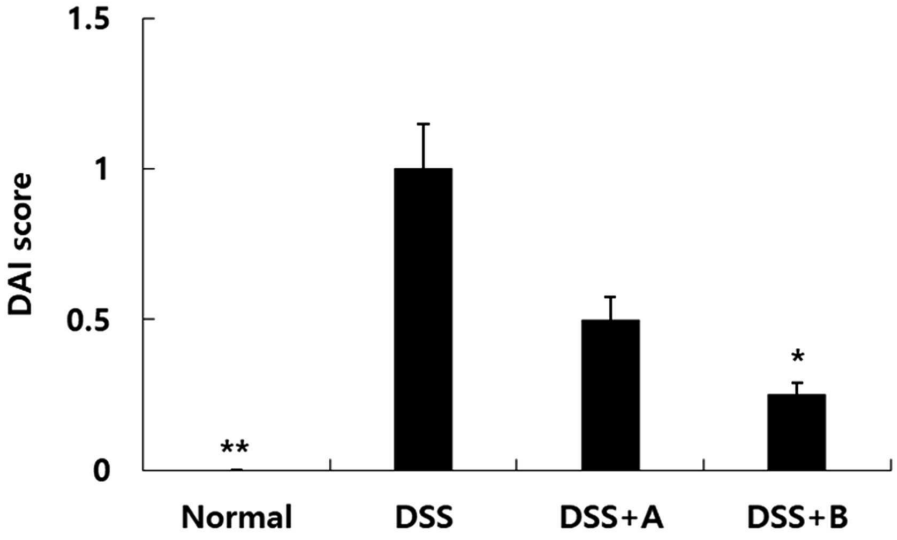
1. 홍팔삭(100ug/mL)
2. 숙지황(100ug/mL)
3. 홍팔삭(50ug/mL):숙지황(50ug/mL)=1:1
4. 홍팔삭(66ug/mL):숙지황(34ug/mL)=2:1
5. 홍팔삭(75ug/mL):숙지황(25ug/mL)=3:1

도면3



1. 홍팔삭(100ug/mL)
2. 숙지황(100ug/mL)
3. 홍팔삭(50ug/mL):숙지황(50ug/mL)=1:1
4. 홍팔삭(66ug/mL):숙지황(34ug/mL)=2:1
5. 홍팔삭(75ug/mL):숙지황(25ug/mL)=3:1

도면4



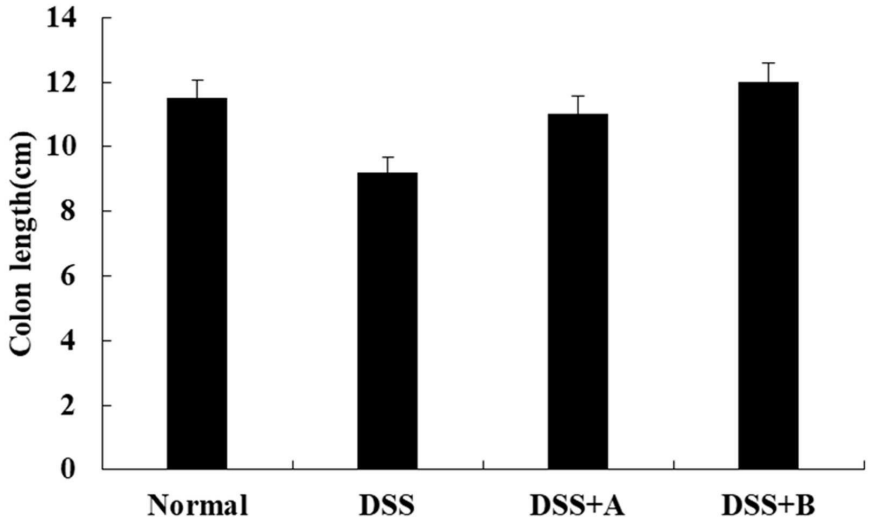
*=p<0.05 vs DSS group, **=p<0.01 vs DSS group

A: 홍팔삭+숙지황추출물
B: 홍팔삭+숙지황추출물+감귤바이오겔

도면5a

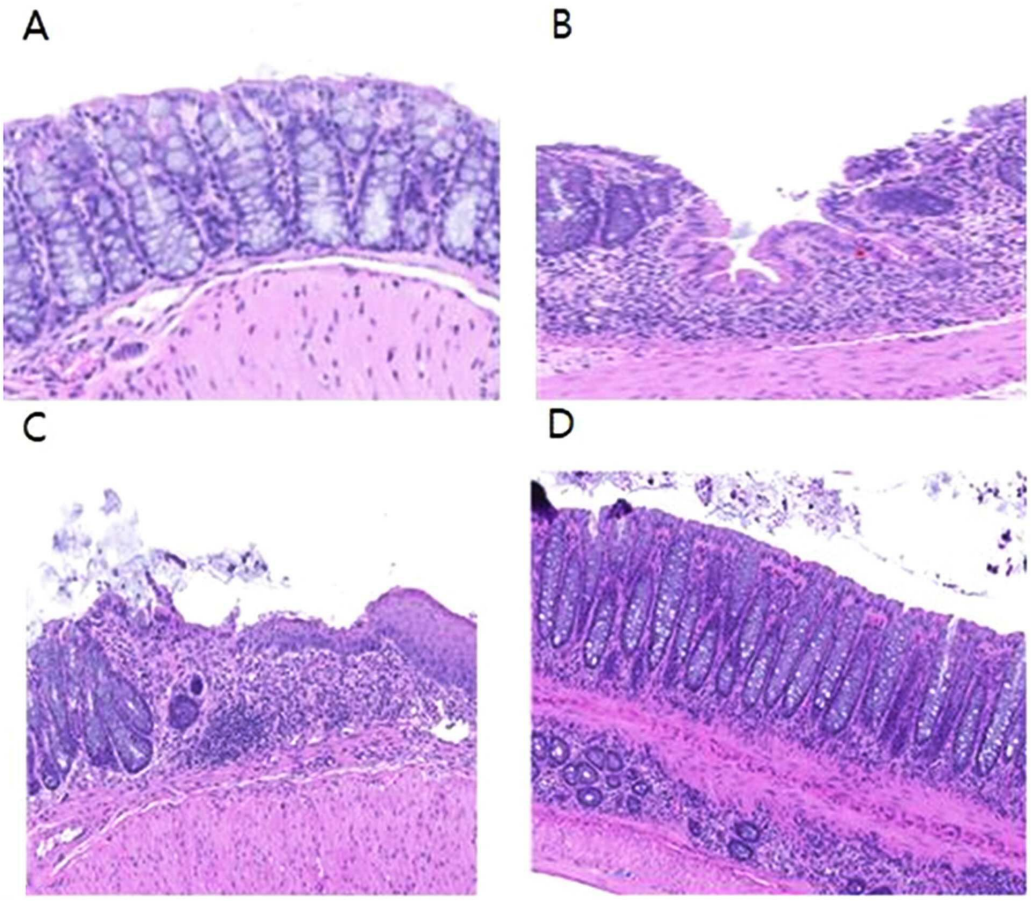


도면5b



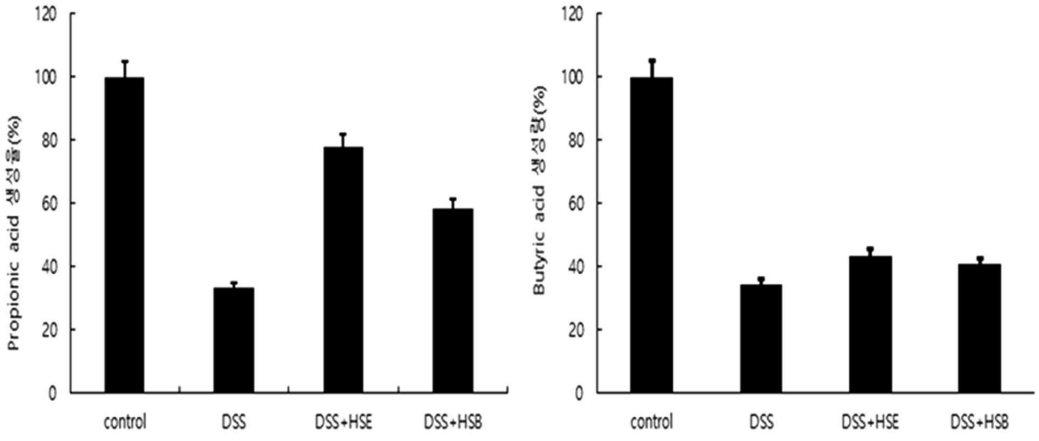
A: 홍팔삭+숙지황추출물
B: 홍팔삭+숙지황추출물+감귤바이오겔

도면6

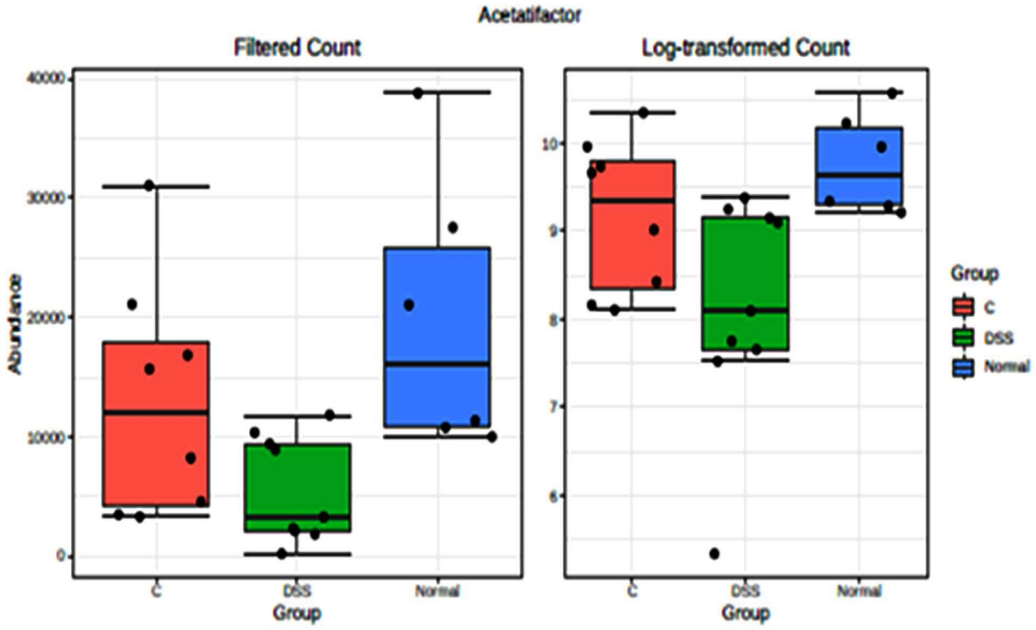


A: Normal
B: DSS
C: DSS+A(홍팔삭+숙지황추출물)
D: DSS+B(홍팔삭+숙지황추출물+감귤바이오겔)

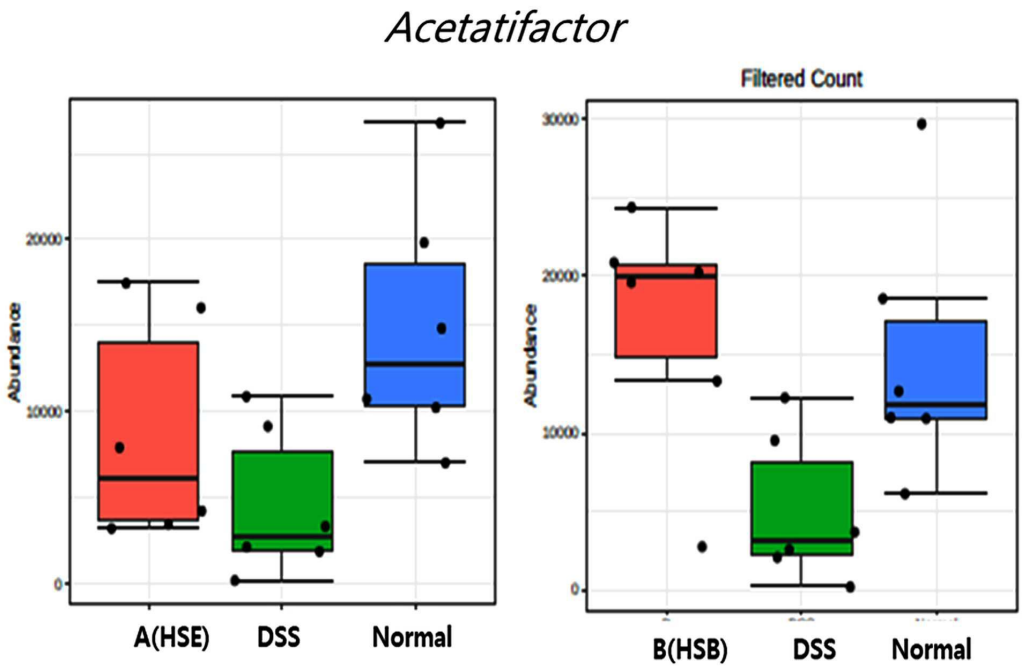
도면7



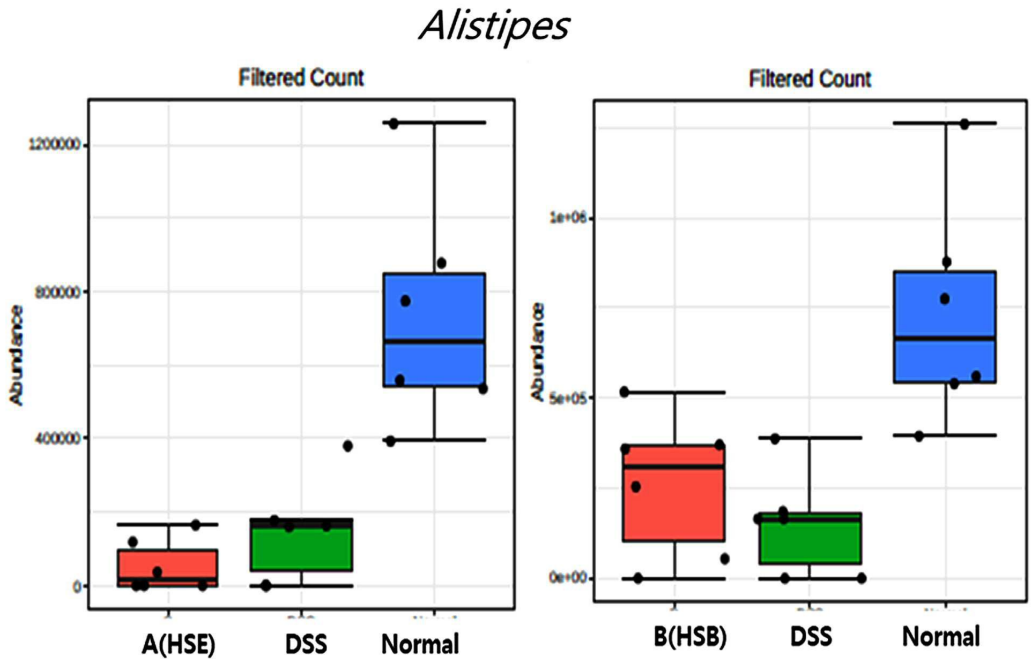
도면8


Acetatifactor
Filtered Count
Log-transformed Count
Abundance
Group
C
DSS
Normal

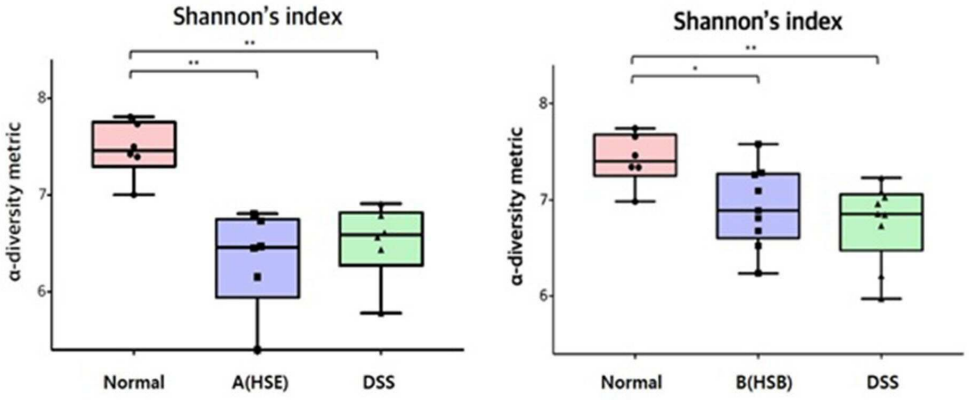
도면9a


Acetatifactor
Filtered Count
Abundance
A(HSE)
DSS
Normal
B(HSB)
DSS
Normal

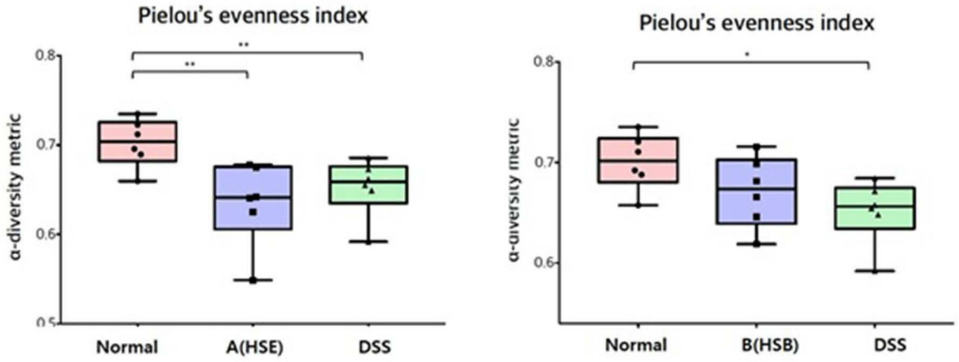
도면9b



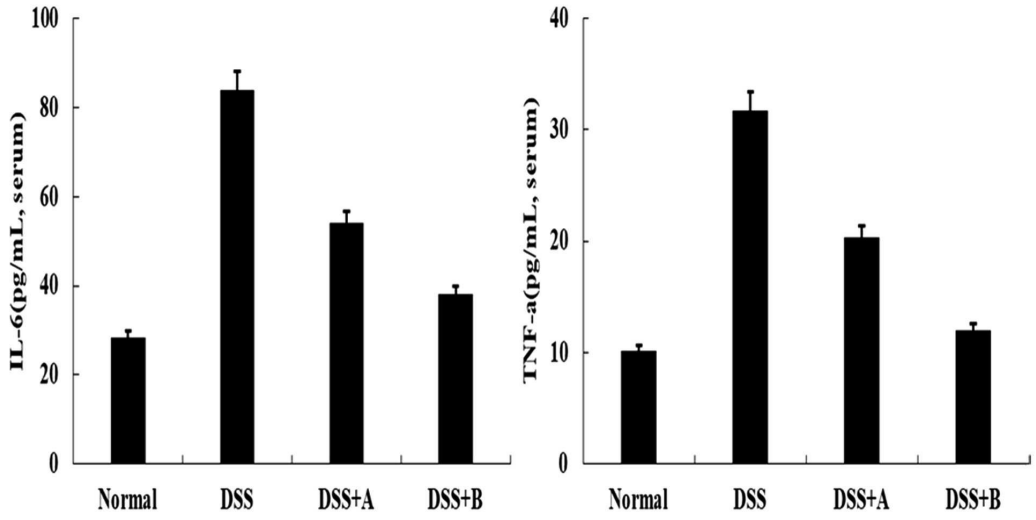
도면10a



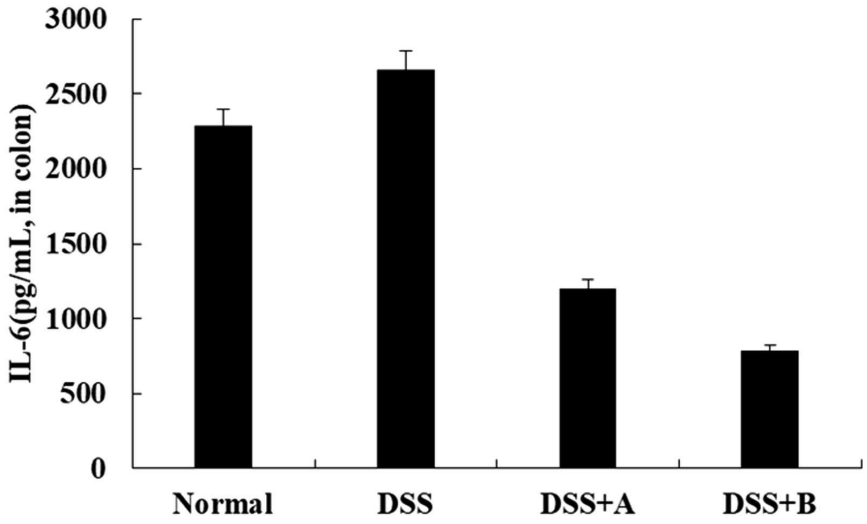
도면10b



도면11a


IL-6(pg/mL, serum)
100
80
60
40
20
0
Normal
DSS
DSS+A
DSS+B
TNF-a(pg/mL, serum)
40
30
20
10
0
Normal
DSS
DSS+A
DSS+B

도면11b


IL-6(pg/mL, in colon)
3000
2500
2000
1500
1000
500
0
Normal
DSS
DSS+A
DSS+B