(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2013-0096587
(43) 공개일자 2013년08월30일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 36/8962 (2006.01) *A61K 35/74* (2006.01)
A61P 3/10 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2012-0018158
(22) 출원일자 2012년02월22일
심사청구일자 2012년02월22일

(71) 출원인
중부대학교 산학협력단
충남 금산군 추부면 마전리 산 2-25
경상대학교산학협력단
경상남도 진주시 진주대로 501 (가좌동)
(72) 발명자
양재경
경상남도 진주시 호탄동 대동아파트 103동 302호
최명석
경상남도 진주시 평안동 롯데인벤스 A동 1401호
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인태백

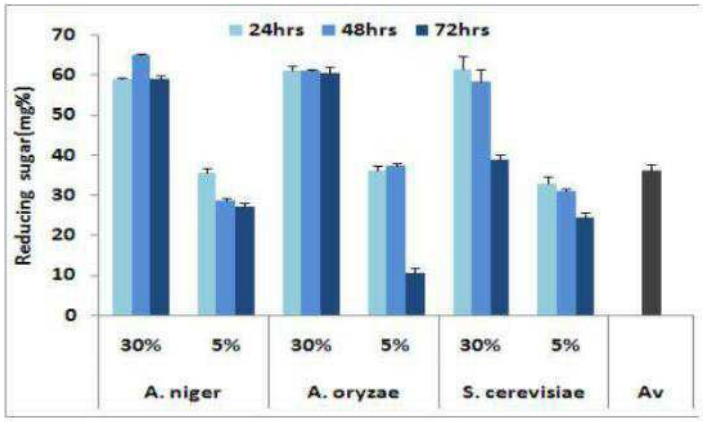
전체 청구항 수 : 총 6 항

(54) 발명의 명칭 **액상발효법을 이용한 산마늘 발효물의 제조방법 및 산마늘 발효물을 포함하는 당뇨 또는 당뇨 합병증 예방 또는 치료용 조성물**

(57) 요 약

본 발명은 액상발효법을 이용한 산마늘 발효물의 제조방법 및 산마늘 발효물을 포함하는 당뇨 또는 당뇨합병증 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것으로, 보다 구체적으로 산마늘을 추출하는 단계; 상기 추출물을 여과하고 농축하는 단계; 상기 농축액을 α-허브자임으로 처리하여 효소반응시키는 단계; 및 상기 효소반응시킨 반응물을 사카로마이세스 세레비시아, 아스퍼질러스 오리제 및 아스퍼질러스 나이걸로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 미생물과 배양시키는 단계;를 포함하는 액상발효법을 이용한 산마늘 발효물의 제조방법 및 산마늘 추출물을 α-허브자임과 반응시키고 사카로마이세스 세레비시아, 아스퍼질러스 오리제 및 아스퍼질러스 나이걸로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 미생물로 발효시킨 발효물을 포함하는 당뇨 또는 당뇨합병증 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.

대 표 도 - 도1



(72) 발명자

도은수

서울특별시 서대문구 남가좌2동 376 현대아파트 105동 1901호

장준복

대구광역시 남구 대명6동 1438-8

길기정

대전광역시 서구 둔산1동 크로바아파트 103동 802호

정지영

경상남도 사천시 향촌동 9차 에이스빌라 가동 403호

김지수

경상남도 창원시 마산합포구 문화동 8-1번지 동성아트빌라 102호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	03-2009-0140
부처명	산림청
연구사업명	산림과학기술개발사업
연구과제명	산마늘의 대량증식 및 발효이용 기술 개발
주관기관	중부대학교 산학협력단
연구기간	2009.03.01 ~ 2012.02.28

특허청구의 범위

청구항 1

산마늘을 추출하는 단계;

상기 추출물을 여과하고 농축하는 단계;

상기 농축액을 α-허브자임으로 처리하여 효소반응시키는 단계; 및

상기 효소반응시킨 반응물을 사카로마이세스 세레비시아, 아스퍼질러스 오리제 및 아스퍼질러스 나이걸로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 미생물과 배양시키는 단계;

를 포함하는 산마늘 발효물의 제조방법.

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 산마늘은 산마늘 잎을 분말화시킨 것인, 산마늘 발효물의 제조방법.

청구항 3

제 1항에 있어서, 상기 농축액을 α-허브자임으로 처리하고 증류수를 가하여 40 내지 60℃에서 1 내지 3시간 효소반응시키는, 산마늘 발효물의 제조방법.

청구항 4

제 1항에 있어서, 상기 사카로마이세스 세레비시아는 사카로마이세스 세레비시아 KCCM50549 (*Saccharomyces cerevisiae* KCCM50549)를 포함하며, 상기 아스퍼질러스 오리제는 아스퍼질러스 오리제 KCCM60241 (*Aspegillus oryzae* KCCM60241)를 포함하며, 상기 아스퍼질러스 나이걸은 아스퍼질러스 나이걸 KCCM60381 (*Aspergillus niger* KCCM60381)을 포함하는, 산마늘 발효물의 제조방법.

청구항 5

제 1항에 있어서,

산마늘 잎 분말을 60 내지 80% 에탄올 수용액과 1: 7 내지 15 (산마늘 잎 분말: 에탄올) (W/V) 비율로 혼합하여 추출하는 단계;

상기 추출물을 여과하고 농축하는 단계;

상기 농축액을 α-허브자임으로 처리하고 증류수를 가하여 40 내지 60℃에서 1 내지 3시간 효소반응시키는 단계;

상기 효소반응시킨 물질을 여과하고 다시 α-허브자임과 혼합하여 40 내지 60℃에서 1 내지 3시간 반응시키는 단계; 및

상기 반응시킨 물질을 사카로마이세스 세레비시아 KCCM50549, 아스퍼질러스 오리제 KCCM60241 및 아스퍼질러스 나이걸 KCCM60381로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 미생물과 배양시키는 단계;

를 포함하는 산마늘 발효물의 제조방법.

청구항 6

산마늘 추출물을 α-허브자임과 반응시키고 사카로마이세스 세레비시아, 아스퍼질러스 오리제 및 아스퍼질러스 나이걸로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 미생물로 발효시킨 발효물을 포함하는 당뇨 또는 당뇨합병증 예방 또는 치료용 조성물.

명 세 서

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 액상발효법을 이용한 산마늘 발효물의 제조방법 및 산마늘 발효물을 포함하는 당뇨 또는 당뇨합병증 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 당뇨병 (Diabetes mellitus)이란 생체내 인슐린을 분비하는 췌장 β세포의 파괴 혹은 기능저하로 인해 인슐린 분비의 저하 및 유전적 요인이나 비만에 의해 조직내 인슐린 수용체의 거부반응으로 혈당이 조직으로 운반되지 않고 소변을 통해 배설되는 대사성 질환으로 고혈당, 고당뇨를 주요 특징으로 한다. 당뇨가 유발되면 인슐린과 글루카곤 (glucagon)의 분비상태가 교란되어 탄수화물뿐만 아니라 단백질 및 지질대사 등 생체 내 대사 조절기능에 이상이 생겨 여러 가지 대사질환이 나타나게 되며, 당뇨증상이 오래 지속되면 모세혈관의 상피 세포막의 비후가 일어나 순환기계 등에 많은 합병증의 유발이 문제시되고 있다.

[0003] 당뇨병 치료에 있어서 가장 중요한 목표는 혈당치를 가능한 정상치에 가깝게 조절하는 것이며, 치료 방법으로 약물요법, 식이요법 및 운동요법을 실시하고 있다. 현재 제 1형 및 제 2형 당뇨병 환자에게 사용되는 경구혈당강하제로 α-글루코시다아제 (α-glucosidase) 억제제, 설포닐우레아 (sulfonylurea) 제제 및 비구아니드 (biguanide) 제제가 있으며, α-글루코시다아제 억제제는 섭취한 식이 중의 탄수화물의 소화와 흡수를 지연시켜 식후 혈당 및 혈중 인슐린의 상승을 감소시킴으로써 당뇨병의 치료효과를 나타낸다. α-글루코시다아제 저해제는 고인슐린혈증이나 저혈당을 유발하지 않고, 인슐린분비를 촉진시키며 글루카곤 분비를 억제하는 글루카곤-유사-펩티드-1 (glucagon-like peptide-1)의 소장에서의 분비를 촉진하는 장점을 가지고 있다 (Mooradian, A.D., Thurman, J.E., Drugs, 57, pp19-29, 1999; Baron, A.D. Diabetes Research and Clinical Practice, 40, ppS54-S55, 1998). 현재 임상에서 사용하고 있는 것으로는 아카보스 (acarbose), 보길리보스 (voglibose) 및 미글리톨 (miglitol) 등이 있으나, α-글리코시다아제 저해제를 장기간 복용한 경우 일부 환자에 있어서 복부팽만감, 구토 설사 등 부작용을 나타낼 수 있어 그 사용이 제한될 수 있다 (Hanefeld M., Journal of Diabetes and its Complications, 12, pp228-237, 1998).

[0004] 한편, 산마늘 (*Allium victorialis* Linne)은 백합과 다년생 초본식물로서 우리나라 북부지방, 지리산, 설악산, 오대산, 울릉도의 숲에서 자라고, 식물전체에서 강한 마늘냄새가 나며 맛은 맵고 성질은 약간 따뜻하며 독이 없다. 장기악독(臟氣惡毒)을 제거하고 종자는 유정을 치료하는 효과가 있다. 현재까지 산마늘에서 보고된 주요 성분으로는 유황화합물, 냄새의 근원이 되는 메틸 알릴 디설파이드 (methyl allyl disulfide), 다이알릴 디설파이드 (diallyl disulfide), 메틸 알릴 트리설파이드 (methyl allyl trisulfide), 항혈전작용을 가지는 3,4-디하이드로-3-비닐-1,2-티인 (3,4-dihydro-3-vinyl-1,2-thiin), 2-비닐-1,3-다이티인사포닌 (2-vinyl-1,3-dithiinsaponin), 1-케토오스 (1-kestose), 네오케스토설크 (neokestoserk) 등 (Nishimura et al., 1998; Kim et al., 1996; Lee, 2008)과 아스트라갈린 (astragalin), 푸로스탄올 글리코사이드 (furostanol glycosides), 케르세틴 (quercetin), 캠프롤 (kaempfrol) 및 페룰산 (ferulic acid) (Lee et al., 2007) 등이 있으며, 이에 따라 항산화 활성, 항돌연변이 및 암세포 생육억제 활성, 동맥경화, 고지혈증 및 콜레스테롤 억제 효과 그리고 비만억제 (Park, 1997), 항동맥경화 (Kim et al., 2000), 항돌연변이원성 및 세포보호 (Ham et al., 2004), 식이성 고지혈 및 비만(Choi et al., 2005) 등에 대한 효과가 있다.

[0005] 그러나 산마늘의 생리활성 평가는 여전히 미비한 단계에 있으며, 산마늘의 처리조건 및 추출방법에 따라 유효물질의 함량이나 생리적 활성도 다르게 나타난다 (Chung, 2001).

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 본 발명은 항당뇨 또는 항당뇨합병증에 최적의 활성을 나타낼 수 있는 액상발효법을 이용한 산마늘 발효방법을 제공하고자 한다.

[0007] 또한, 본 발명은 산마늘 발효물을 포함하는 당뇨 또는 당뇨합병증 예방 또는 치료용 조성물을 제공하고자 한다.

과제의 해결 수단

[0008] 본 발명은 산마늘을 추출하는 단계; 상기 추출물을 여과하고 농축하는 단계; 상기 농축액을 α-허브자임으로 처리하여 효소반응시키는 단계; 및 상기 효소반응시킨 반응물을 사카로마이세스 세레비시아, 아스퍼질러스 오리제

및 아스퍼질러스 나이걸로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 미생물과 배양시키는 단계;를 포함하는 산마늘 발효물의 제조방법을 제공한다.

[0009] 상기 산마늘은 산마늘 잎을 분말화시킨 것일 수 있다.

[0010] 상기 농축액을 α-허브자임으로 처리하고 증류수를 가하여 40 내지 60℃에서 1 내지 3시간 효소반응시킬 수 있다.

[0011] 상기 사카로마이세스 세레비시아는 사카로마이세스 세레비시아 KCCM50549 (*Saccharomyces cerevisiae* KCCM50549)를 포함하며, 상기 아스퍼질러스 오리제는 아스퍼질러스 오리제 KCCM60241 (*Aspegillus oryzae* KCCM60241)를 포함하며, 상기 아스퍼질러스 나이걸은 아스퍼질러스 나이걸 KCCM60381 (*Aspergillus niger* KCCM60381)을 포함할 수 있다.

[0012] 상기 산마늘 발효물의 제조방법은 산마늘 잎 분말을 60 내지 80% 에탄올 수용액과 1: 7 내지 15 (산마늘 잎 분말: 에탄올)(W/V) 비율로 혼합하여 추출하는 단계; 상기 추출물을 여과하고 농축하는 단계; 상기 농축액을 α-허브자임으로 처리하고 증류수를 가하여 40 내지 60℃에서 1 내지 3시간 효소반응시키는 단계; 상기 효소반응시킨 물질을 여과하고 다시 α-허브자임과 혼합하여 40 내지 60℃에서 1 내지 3시간 반응시키는 단계; 및 상기 반응시킨 물질을 사카로마이세스 세레비시아 KCCM50549, 아스퍼질러스 오리제 KCCM60241 및 아스퍼질러스 나이걸 KCCM60381로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 미생물과 배양시키는 단계;를 포함할 수 있다.

[0013] 본 발명은 산마늘 추출물을 α-허브자임과 반응시키고 사카로마이세스 세레비시아, 아스퍼질러스 오리제 및 아스퍼질러스 나이걸로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 미생물로 발효시킨 발효물을 포함하는 당뇨 또는 당뇨합병증 예방 또는 치료용 조성물을 제공한다.

발명의 효과

[0014] 본 발명의 액상발효법을 이용한 산마늘 발효물의 제조방법 및 산마늘 발효물은 항산화활성, SOD 유사활성, DPPH 라디칼 소거 활성, 아질산염 소거능 환원력, 히드록시 라디칼 소거 활성 등이 뛰어날 뿐만 아니라 항당뇨 효과가 뛰어나기에 이를 당뇨 또는 당뇨합병증 예방 또는 치료용 조성물로 이용할 수 있으며, 이를 약학 조성물 또는 건강식품 조성물로 활용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0015] 도 1는 산마늘을 액상발효시킨 발효물의 환원당 함량을 측정한 것으로, Av는 발효되지 않은 산마늘을 나타낸 것이다.

도 2는 산마늘을 액상발효시킨 발효물의 폴리페놀 함량을 측정한 것이다.

도 3은 산마늘을 액상발효시킨 발효물의 SOD 유사활성을 측정한 것이다.

도 4은 산마늘을 액상발효시킨 발효물의 전자 공여능을 측정한 것이다.

도 5는 산마늘을 액상발효시킨 발효물 1.0mg/mL의 농도에서 pH2.5 및 pH4.2에서 아질산염 소거능을 측정한 결과를 나타낸 것이다.

도 6은 산마늘을 액상발효시킨 발효물의 플라보노이드 함량을 측정한 것이다.

도 7은 산마늘을 액상발효시킨 발효물의 하이드록시 라디칼 소거활성을 나타낸 것이다.

도 8은 발효방법 및 발효시간에 따른 발효물의 α-글루코시다아제 활성억제능을 나타낸 것으로, 대조군은 70% 에탄올 추출물; LF-SE는 사카로마이세스 세레비시아와 알파 허브자임을 첨가하여 발효시킨 발효물을 나타낸 것이다.

도 9는 산마늘 발효물이 투여된 스트렙토조토신 (STZ)로 유도한 당뇨성 SD 렛 (rats)에서 혈당농도를 측정한 것으로, vehicle로는 증류수를, 대조군으로는 1ml 증류수를, 대조군*는 70% 에탄올 추출물 (500mg/kg)을, LF-SE는 사카로마이세스 세레비시아와 알파 허브자임을 첨가하여 발효시킨 발효물 (500mg/kg)을 나타낸 것이다.

도 10은 본 발명에서 사용한 알파 허브자임을 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0016] 본 발명은 액상발효법을 이용한 산마늘 발효물의 제조방법 및 산마늘 발효물을 포함하는 당뇨 또는 당뇨합병증 예방 또는 치료용 조성물을 제공한다.

[0017] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

[0018] 산마늘의 생리활성 평가는 여전히 미비한 단계에 있으며, 산마늘의 처리조건 및 추출방법에 따라 유효물질의 함량이나 생리적 활성 정도가 다르게 나타나기에, 본 발명에서는 당뇨 또는 당뇨합병증 치료제로서 최적의 활성을 나타낼 수 있는 산마늘 발효물의 제조방법을 제공하고 이러한 제조방법에 의해 제조된 산마늘을 포함하는 당뇨 또는 당뇨합병증 예방 또는 치료용 조성물을 제공한다.

[0019] 본 발명은 산마늘을 추출하는 단계; 상기 추출물을 여과하고 농축하는 단계; 상기 농축액을 α-허브자임 (α-herbzyme)으로 처리하여 효소반응시키는 단계; 및 상기 효소반응시킨 반응물을 사카로마이세스 세레비시아, 아스퍼질러스 오리제 및 아스퍼질러스 나이걸로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 미생물과 배양시키는 단계; 를 포함하는 산마늘 발효물의 제조방법을 제공한다.

[0020] 상기 산마늘은 동북아시아 지역에 분포하고 있으며, 우리 나라에서는 주로 울릉도 및 강원도 북부 산간의 고산대에서 많이 자라고 있다. 산마늘의 일반 성분은 수분 77.3%이며 건조 상태에서 조단백 11.6%, 조지방 10.2%, 무기질 46.3%, 섬유소 22.18%를 포함하며, 잎과 줄기 부위에는 건조물 중량으로 과당이 7.86%, 포도당이 8.89%, 자당이 1.69% 함유되어 감미가 높으며, 비타민 함량도 B 2 가 0.017%. 나이신 함량은 0.8%이고, 무기물 함량은 칼륨이 3.2%로 가장 많은 함량을 보이고 있다. 이러한 산마늘은 오랫동안 생약 및 식품으로 사용되어 오던 것으로 독성 및 부작용이 거의 없으므로 치료 및 예방 목적으로 장기간 사용시에도 안심하고 사용할 수 있다.

[0021] 상기 산마늘은 재배 또는 자생한 산마늘의 잎, 뿌리, 인경 또는 전초 등을 모두 포함할 수 있으며, 바람직하게는 산마늘 잎을 포함할 수 있다.

[0022] 일 실시예로, 산마늘 잎을 절단한 후 동결건조한 다음 믹서로 갈아 분말화할 수 있다.

[0023] 본 발명의 산마늘 추출물은 초음파 추출법, 용매추출법, 여과법 및 환류추출법 등 당업계의 통상적인 추출방법을 사용하여 추출된 것으로 그 종류에 있어서 특별히 한정된 것은 아니나, 물, C1~C4의 저급 알코올 또는 이들의 혼합용매로 추출한 추출물일 수 있으며, 바람직하게는 물, 에탄올 또는 이들의 혼합용매로 추출한 추출물일 수 있다.

[0024] 산마늘을 추출용매를 사용하여 추출시, 산마늘과 추출용매의 비는 특별히 한정된 것은 아니나, 1: 2 내지 30배, 바람직하게는 1: 7 내지 15배 (산마늘: 추출용매)(W/V)를 사용하여 추출할 수 있다.

[0025] 일 실시예로, 산마늘 잎 분말을 60 내지 80% 에탄올 수용액으로 추출시, 산마늘 잎분말과 60 내지 80% 에탄올 수용액의 비가 1: 7 내지 15 (산마늘: 에탄올 수용액 (W/V)이 되도록 혼합하여 12 시간 내지 48시간 두어 추출물을 수득할 수 있다.

[0026] 상기 추출물을 여과하고 농축하는 단계를 거친 다음, 상기 농축된 액체를 α-허브자임으로 처리하여 효소반응시키는 단계를 수행할 수 있다.

[0027] α-허브자임 (α-herbzyme)은 그 종류에 있어서 특별히 한정된 것은 아니나, 일례로 한국효소주식회사 (Korea Enzyme Co.Ltd, 경인식약청 제129호)에서 제조된 것을 사용할 수 있다 (도 10).

[0028] 본 발명에서는 미생물 발효의 효과를 높이기 위하여 미생물 처리 전에 상기 α-허브자임을 전처리함으로, 본 발명에 의해 수득된 발효물의 당뇨 또는 당뇨합병증 치료효과를 극대화시킬 수 있다.

[0029] 상기 농축액을 α-허브자임으로 처리하여 효소반응시키는 단계에 있어, 상기 농축액과 α-허브자임의 혼합비율은 특별히 한정된 것은 아니나, 바람직하게는 α-허브자임과 α-허브자임의 중량의 1 내지 3배에 해당하는 부피의 산마늘 추출농축액을 혼합한 것, 즉 α-허브자임과 산마늘 추출농축액은 1: 1 내지 3 (α-허브자임: 산마늘 추출농축액)(W/V)일 수 있다.

[0030] 상기 효소반응시키는 단계의 일 실시예로, 상기 농축액을 α-허브자임으로 처리하고 증류수를 가하여 40 내지 60℃에서 1 내지 3시간 효소반응시킬 수 있는데, 이때, 상기 농축액, α-허브자임 및 증류수의 혼합 비율은 특별히 한정된 것은 아니나, 바람직하게는 α-허브자임과 α-허브자임의 중량의 1 내지 3배에 해당하는 부피의 산

마늘 추출농축액을 혼합한 다음, α-허브자임의 중량의 20 내지 50배에 해당하는 부피의 증류수를 첨가할 수 있다.

[0031] 상기 효소반응온도보다 낮은 온도에서 반응시 효소활성이 떨어져 반응시간이 오래 걸릴 수 있으며, 상기 온도보다 높은 온도에서는 효소의 변성이 일어나 반응성이 감소될 수 있다.

[0032] 상기 α-허브자임으로 처리한 반응액을 바로 미생물 배양을 위해 사용할 수 있고, 선택적으로 항당뇨 또는 항당뇨합병증 효과를 좀 더 최대화하기 위해 α-허브자임을 재차처리한 다음 미생물 배양을 위해 사용할 수 있다.

[0033] 일례로, 상기 α-허브자임으로 1차 처리한 효소반응물을 여과시킨 후, 다시 α-허브자임과 혼합하여 2차 효소반응시킬 수 있는데, 이때 2차 효소반응 조건은 특별히 한정된 것은 아니나, 바람직하게는 40 내지 60℃에서 1 내지 3시간 반응시킬 수 있다.

[0034] 상기 효소반응시킨 반응물은 발효미생물과 배양시킬 수 있는데, 이때 사용가능한 발효미생물은 산마늘 추출액을 발효시킬 수 있는 것으로 특별히 한정된 것은 아니며, 바람직하게는 항당뇨 또는 항당뇨합병증 활성이 뛰어난 발효물을 생산하는 사카로마이세스 세레비시아, 아스퍼질러스 오리제 및 아스퍼질러스 나이걸로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 미생물을 포함할 수 있으며, 가장 바람직하게는 사카로마이세스 세레비시아를 포함할 수 있다.

[0035] 상기 사카로마이세스 세레비시아는 특별히 한정된 것은 아니나, 바람직하게는 사카로마이세스 세레비시아 KCCM50549 (*S. cerevisiae* KCCM50549)을 포함할 수 있다.

[0036] 상기 효소반응시킨 발효물을 사카로마이세스 세레비시아와 배양하는 일 실시예로, 효소반응시킨 발효물을 멸균시킨 후 사카로마이세스 세레비시아와 혼합하여 25 내지 40℃에서 12 내지 80시간 배양할 수 있다.

[0037] 상기 아스퍼질러스 오리제는 특별히 한정된 것은 아니나, 바람직하게는 아스퍼질러스 오리제 KCCM60241 (*A. oryzae* KCCM60241) 을 포함할 수 있다.

[0038] 상기 효소반응시킨 발효물을 아스퍼질러스 오리제와 배양하는 일 실시예로, 효소반응시킨 발효물을 멸균시킨 후 아스퍼질러스 오리제와 혼합하여 20 내지 35℃에서 12 내지 80시간 배양할 수 있다.

[0039] 상기 아스퍼질러스 나이걸은 특별히 한정된 것은 아니나, 바람직하게는 아스퍼질러스 나이걸 KCCM60381 (*A. niger* KCCM60381)을 포함할 수 있다.

[0040] 상기 효소반응시킨 발효물을아스퍼질러스 나이걸과 배양하는 일 실시예로, 효소반응시킨 발효물을 멸균시킨 후 아스퍼질러스 나이걸과 혼합하여 20 내지 35℃에서 12 내지 80시간 배양할 수 있다.

[0041] 본 발명은 산마늘 발효물의 제조방법의 일례로, 산마늘 잎 분말을 60 내지 80% 에탄올 수용액과 1: 7 내지 15 (산마늘 잎 분말: 에탄올; W/V) 비율로 혼합하여 추출하는 단계; 상기 추출물을 여과하고 농축하는 단계; 상기 농축액을 α-허브자임으로 처리하고 증류수를 가하여 40 내지 60℃에서 1 내지 3시간 효소반응시키는 단계; 상기 효소반응시킨 물질을 여과하고 다시α-허브자임과 혼합하여 40 내지 60℃에서 1 내지 3시간 반응시키는 단계; 및 상기 반응시킨 물질을 사카로마이세스 세레비시아 KCCM50549, 아스퍼질러스 오리제 KCCM60241 및 아스퍼질러스 나이걸 KCCM60381로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상 미생물과 배양시키는 단계;를 포함하는 산마늘 발효물의 제조방법을 제공한다.

[0042] 상기 배양물은 다시 여과 후 농축할 수 있다.

[0043] 본 발명의 제조방법을 이용한 생산된 산마늘 발효물은 발효되지 않은 산마늘에 비해 월등히 총 폴리페놀함량, 총 플라보노이드 함량이 높게 나타나는데, 상기 폴리페놀의 페놀성 수산기 (phenolic hydroxy기)가 단백질 및 기타 거대분자들과 결합하는 성질을 통해 항산화, 항암 및 항균, 항혈전 작용, 고지혈증 및 지방간 억제 작용 등의 활성을 나타내며, 상기 플라보노이드는 지방질 산화, 활성산소의 소거 및 산화적 스트레스를 막는 역할을 하여 노화방지, 암 및 심장질환 등을 예방하거나 지연시키는 효과를 나타내기에 본 발명의 산마늘 발효물이 당뇨 및 당뇨합병증 치료에 적절할 수 있다.

[0044] 또한, 본 발명에 의해 제조된 산마늘 발효물은 발효되지 않는 산마늘에 비해 환원당 함량이 증가되었고 SOD (superoxide dismutase) 활성을 나타내어 산화적 장애를 방어하며, 높은 전자공여능을 나타내어 지방질 산화를 억제하고, 발암이나 혈액 중 헤모글로빈 산화에 의해 중독을 일으키는 아질산염의 높은 소거능을 나타내고, 지질산화와 DNA에 손상을 주는 산소종인 하이드록시 라디칼을 소거하는 능력이 뛰어날 뿐만 아니라, α-글리코시다아제 저해능을 나타내고 인슐린 요구도를 감소시켜 당뇨 및 당뇨합병증 치료에 우수함을 확인할 수 있다.

[0045] 상기와 같은 발효되지 않은 산마늘에 비해 본 발명의 발효 산마늘이 당뇨 또는 당뇨합병증 치료에 효과적인 것은, 본 발명의 산마늘 발효물의 제조방법에 사용된 균주 및 효소의 선택이 탁월하였으며 제조방법의 각 단계가 당뇨 및 당뇨합병증 치료효과를 나타내도록 산마늘 발효물을 제조하는데 최적화되었기 때문이다.

[0046] 본 발명은 산마늘 추출물을 α-허브자임과 반응시키고 사카로마이세스 세레비시아, 아스퍼질러스 오리제 및 아스퍼질러스 나이걸로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 미생물로 발효시킨 발효물을 포함하는 당뇨 또는 당뇨합병증 예방 또는 치료용 조성물을 제공할 수 있다.

[0047] 상기 발효물의 제조방법은 특별히 한정된 것은 아니나, 바람직하게는 본 발명의 제조방법에 의해 제조된 발효물일 수 있다.

[0048] 상기 당뇨합병증은 특별히 한정된 것은 아니나, 바람직하게는 당뇨성 망막증, 당뇨성 백내장, 당뇨성 각막증, 당뇨성 신증, 당뇨성 신경병증, 당뇨성 말초신경장해, 아테롬성 동맥경화, 심혈관계질환, 신장병변 및 당뇨성 혈관합병증으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상일 수 있다.

[0049] 당뇨합병증은 혈당이 정상적으로 회복되었음에도 불구하고 발병하는 경우가 많다. 최종당화산물은 고혈당의 농도에 비례하여 조직에 축적되는 단백질 당화산물로 특이한 흡광도 및 형광을 나타내고, 특히 단백질의 아미노기가 서로 cross-link 반응을 일으키는 성질을 가지고 있다. 최종당화산물은 한번 생성되면 혈당이 정상적으로 조절되어도 분해되지 않고 조직에 축적되어 조직의 구조와 기능을 비정상적으로 변화시키며, atheroma성 동맥경화증, DNA의 돌연변이, 노화, 알츠하이머병, 당뇨합병증등에 관여한다고 알려져 있다.

[0050] 상기 발효물은 항산화활성, SOD 유사활성, DPPH 라디칼 소거 활성, 아질산염 소거능 환원력, 히드록시 라디칼 소거 활성 등이 뛰어날 뿐만 아니라 혈당조절 및 인슐린 조절 효과가 뛰어나기에 이를 당뇨 또는 당뇨합병증 예방 또는 치료용 조성물로 이용할 수 있으며, 이를 약학 조성물 또는 건강식품 조성물로 활용할 수 있다.

[0051] 본 발명의 발효물을 포함하는 약학조성물은 약학적 조성물의 제조에 통상적으로 사용하는 적절한 담체, 부형제 및 희석제를 더 포함할 수 있다.

[0052] 본 발명의 조성물의 약학적 투여 형태는 이들의 약학적 허용가능한 염의 형태로도 사용될 수 있고, 또한 단독으로 또는 다른 약학적 활성을 지닌 화합물과 결합할거나 적당한 집합으로 사용될 수 있다.

[0053] 본 발명에 따른 발효물을 포함하는 약학조성물은, 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀젼, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 및 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용될 수 있다.

[0054] 본 발명의 발효물을 포함하는 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 광물유 등을 들 수 있다. 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제될 수 있다. 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함될 수 있으며, 이러한 고형제제는 상기 추출물에 적어도 하나 이상의 부형제 일례로, 전분, 칼슘카보네이트 (calcium carbonate), 수크로스 (sucrose) 또는 락토오스 (lactose), 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 또한 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스티레이트, 탈크 같은 윤활제들도 사용될 수 있다. 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 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텝솔 (witepsol), 마크로골, 트윈 (tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다.

[0055] 본 발명의 발효물의 바람직한 투여량은 특별히 한정된 것은 아니나, 통상 1 내지 500 mg/kg일 수 있으며, 바람직하게는 100 내지 300mg/kg일 수 있으나, 상기 투여량은 환자의 상태 및 체중, 질병의 정도, 약물형태, 투여경로 및 기간에 따라 달라질 수 있으며 당업자에 의해 적절하게 증감될 수 있는 것으로, 이에 의해 본 발명의 범위가 한정되는 것은 아니다. 상기 투여는 하루에 한번 투여할 수도 있고, 수회 나누어 투여할 수도 있다.

[0056] 본 발명의 조성물은 쥐, 생쥐, 가축, 인간 등의 포유동물에 다양한 경로로 투여될 수 있다. 투여의 모든 방식은 예상될 수 있는데, 일례로, 경구, 직장 또는 정맥, 근육, 피하, 자궁내 경막 또는 뇌혈관내(intracerebroventricular) 주사에 의해 투여될 수 있다.

[0057] 본 발명은 당뇨 또는 당뇨합병증의 예방 또는 개선 효과를 나타내는 상기 발효물 및 식품학적으로 허용 가능한 식품보조 첨가제를 포함하는 건강기능식품을 제공한다. 산마늘 발효물을 첨가할 수 있는 식품으로는, 예를 들어, 각종 식품류, 음료, 껌, 차, 비타민 복합제, 건강 기능성 식품류 등이 있다.

[0058] 또한, 당뇨 및 당뇨합병증 예방 또는 개선 효과를 목적으로 식품 또는 음료에 첨가될 수 있다. 이때, 식품 또는 음료 중의 상기 발효물의 양은 전체 식품 중량의 0.01 내지 15 중량%로 가할 수 있으며, 건강 음료 조성물은 100 ㎖를 기준으로 0.02~5 g, 바람직하게는 0.3~1g의 비율로 가할 수 있으나, 이에 의해 본 발명의 범위가 한정되는 것은 아니다.

[0059] 본 발명의 건강 기능성 음료 조성물은 지시된 비율로 필수 성분으로서 상기 발효물을 함유하는 외에는 다른 성분에는 특별한 제한이 없으며 통상의 음료와 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다. 상술한 천연 탄수화물의 예는 모노사카라이드, 예를 들어, 포도당, 과당 등; 디사카라이드, 예를 들어 말토스, 슈크로스 등; 및 폴리사카라이드, 예를 들어 덱스트린, 시클로덱스트린 등과 같은 통상적인 당, 및 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알콜이다. 상술한 것 이외의 향미제로서 천연 향미제(타우마틴, 스테비아 추출물 (예를 들어 레바우디오시드 A, 글리시르히진 등) 및 합성 향미제 (사카린, 아스파르탐 등)를 유리하게 사용할 수 있다. 상기 천연 탄수화물의 비율은 본 발명의 조성물 100 ㎖당 일반적으로 약 1 ~ 20g, 바람직하게는 약 5 ~ 12g이나, 이에 의해 본 발명의 범위가 한정되는 것은 아니다.

[0060] 상기 외에 본 발명의 조성물은 여러 가지 영양제, 비타민, 광물 (전해질), 합성 풍미제 및 천연 풍미제 등의 풍미제, 착색제 및 중진제 (치즈, 초콜릿 등), 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.

[0061] 본 발명을 하기의 실시예에 의해 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.

[0062] **< 실시예 >**

[0063] **실시예 1: 산마늘 준비**

[0064] 본 실험에 사용된 산마늘 (*A. victorialis* Linne)은 울릉도 자연산 산마늘과 강원도 재배 산마늘을 채취하여 실험에 사용하였으며, 구매 직후 수세하여 이물질을 제거하고 물기를 제거한 다음 적당하게 절단하여 초저온냉동기 (deep freezer)에 두었다가 동결건조하고 분쇄하여 추출용 시료로 사용하였다.

[0065] **실시예 2: 산마늘 추출물의 발효 최적조건 구명**

[0066] **실시예 2-1: 발효미생물의 수집 및 분리**

[0067] 염장 산마늘 잎 현탁액 1mL를 평판배지에 떨어뜨린 후 삼각유리막대를 사용하여 배지의 표면에 넓게 펴는 확산평판법 (spread plate method)과 현탁액을 페트리디쉬 (petri dish)에 1mL처리한 후 45~50℃로 식힌 배지를 주입하고 혼합하는 주입평판법 (pour plate method)으로 산마늘 발효미생물을 분리하였다.

[0068] **실시예 2-2: 발효미생물의 수집 및 분리**

[0069] 사카로마이세스 세레비시아 KCCM50549 (*Saccharomyces cerevisiae* KCCM50549), 아스퍼질러스 나이걸 KCCM60381 (*A. niger* KCCM60381) 및 아스퍼질러스 오리제 KCCM60241 (*A. oryzae* KCCM60241) 발효균주를 수집 및 분리하였으며, 각 발효균주의 배양에 사용된 배지는 Malt Extract Agar를 사용하였다.

[0070] **실시예 2-3: 발효조건에 따른 발효균주의 생장**

[0071] **실시예 2-3-1: 추출물의 농도에 따른 발효균주의 생장**

[0072] 배지내 산마늘 추출물의 농도가 5, 10, 20, 30 및 40%가 되도록 조정한 평판배지에 미리 활성화 시킨 사카로마이세스 세레비시아 KCCM50549를 균주에 따라서 10^9 ~ 10^{11}의 농도로 조정한 다음 배양접시 당 0.1 mL를 처리하여 도말하고, 25±1℃로 조정된 배양기에 넣어 배양한 다음 3 일후 농도별로 배양접시내의 콜로니 수를 세어 mL당 콜로니 수로 산출하여 균생장 정도를 판정하였다. mL당 균수는 희석배수에 배양접시 내의 콜로니 수를 곱하여 산출하였으며 그 식은 다음과 같다.

[0073] $N = a \times u$

[0074] a : 처리된 균주의 희석배수, u : 배양접시내에 나타난 콜로니 수

[0075] 한편, 발효 곰팡이 아스퍼질러스 오리제 KCCM60241 및 아스퍼질러스 나이걸 KCCM60381는 배지내 산마늘 추출물의 농도가 5, 10, 20, 30 및 40%가 되도록 처리한 평판배지에 각각의 균을 punching접종하고 25±1℃로 조정된 배양기 (incubator) 넣어 배양한 3일 후 균총의 크기를 측정하여 균 생장정도를 판정하였다.

[0076] 사카로마이세스 세레비시아 KCCM50549의 경우도 배지내 추출물의 농도가 증가할수록 균주의 생장이 감소하는 것으로 나타났고 40%의 농도에서는 전혀 생장하지 않았다. 한편 아스퍼질러스 오리제 KCCM60241의 경우는 배지내 추출액의 농도가 10%까지는 양호하였고 그 이상의 농도에서는 점차 생장이 둔화되었으며 40%의 농도에서는 생장하지 않았다. 아스퍼질러스 나이걸 KCCM60381도 아스퍼질러스 오리제 KCCM60241의 경우와 마찬가지 경향이었으나 아스퍼질러스 나이걸 KCCM60381은 30%의 농도에서는 전혀 생장하지 않았다.

[0077] 따라서 상기의 균주들을 발효에 이용할 경우 균주에 따라 약간의 차이는 있으나 추출액의 5 내지 10%농도에서 균주들의 생장이 가장 좋은 것으로 나타났으므로 발효에 적당한 추출액의 농도는 5 내지 10%인 것으로 판단되었다.

[0078] **실시예 2-3-2: 발효전후 환원당 (Reducing sugar) 함량**

[0079] 발효 산마늘의 환원당 함량은 DNS법에 따라 각각 측정하였다(Kim et al., 2007). 발효 산마늘 분말 1 g에 초순수 100 mL를 가하여 마쇄한 후 여과하여 초순수로 100 mL로 정용한 후 100배 희석하여 시료액을 제조한 후, 시료액 1 mL에 DNS 시약(7.5 g DNS, 14.0 g NaOH, 126.1 g Rochelle염, 5.4 mL 페놀 및 5.9 g $Na_2S_2O_5$/증류수 1 L) 1 mL를 혼합하여 끓는 물에서 15분간 반응시킨 후 흐르는 찬물에서 5분간 냉각한 다음 반응액에 증류수 3 mL를 가한 후 UV-Vis 스펙트로포도메터 (spectrophotometer)를 사용하여 546 nm에서 흡광도를 측정한 후 글루코오스 (glucose)의 검량선으로부터 환원당 함량을 환산하였다.

[0080] 도 1은 액체발효한 산마늘의 환원당 측정 결과를 나타낸 것으로 아스퍼질러스 오리제 및 아스퍼질러스 나이걸로 발효한 산마늘은 환원당이 59.0~65.0mg%로 발효시간에 따른 유의차가 없었지만, 사카로마이세스 세레비시아 발효물은 발효시간이 길어짐에 따라 환원당이 감소하는 경향을 나타냈다. 또한 발효하지 않은 산마늘의 환원당 36.30 mg%와 비교하면 비해 발효 산마늘의 환원당 함량이 높게 나타나 발효에 의해 환원당 함량이 증가함을 알 수 있었다. 한편 발효물의 농도에 따라서는 30% 보다는 5%의 농도에서 환원당 함량은 낮게 나타났다.

[0081] **실시예 3: 액체발효방법**

[0082] 동결건조된 산마늘 잎 분말 150 g에 70% EtOH 1,500 mL를 가하여[산마늘 잎 분말과 용매의 희석비율 1:10(W/V)] 실온에서 24시간 동안 두어 추출하였다. 이것을 거즈로 1차 여과 후 여과지(Whatman No 2.)를 이용하여 2차 여과한 다음 45℃ 수욕상에서 환류증발장치 (rotary vaccum evaporator)로 농축 후 농축액 5 mL와 α-허브효소 (α-herbzyme) 3 g에 100 mL 증류수를 가하여 50℃에서 2시간 침출한 다음 거즈로 1차 거른 후 다시 α-허브효소와 혼합한 다음 50℃에서 2시간 동안 효소반응을 시켰다. 효소반응 후 95℃에서 10분간 살균한 다음 발효균주를 배양하였다. 배양액은 거즈와 여과지로 여과한 다음 45℃ 수욕상에서 환류증발장치를 이용하여 농축 후 -45℃ 초저온 냉장고 (deep freezer)에 12시간 두었다가 동결건조기 (freeze dryer)에 넣고 동결건조한 다음 각 시

료로 사용하였다.

[0083] **실시예 4: 발효물의 생리활성 검정**

[0084] 산마늘 발효물의 항산화활성은 총 폴리페놀함량, 과산환 제거효소 (superoxide dismutase, SOD)활성, 전자공여능 (electron donating activity, EDA), 아질산염 소거능, 총 플라보노이드 함량, 하이드록시 라디칼 제거 (Hydroxy radical scavenging) 활성을 측정하였다.

[0085] **실시예 4-1: 총 폴리페놀 함량 측정**

[0086] 총 폴리페놀 함량은 Folin-Denis법 (1915)을 응용하여 측정하였다. 산마늘의 발효물을 mg/g 농도로 만든 후, 시료 0.4 mL에 Folin-ciocalteau reagent 0.2 mL를 첨가하여 충분히 혼합한 후 실온에 3분간 반응시켰다. 정확히 3분간 반응시킨 후 Na_2CO_3포화용액 0.4 mL를 가하여 실온에서 1시간 동안 방치한 다음 UV/VIS 스펙트로포토메터 (UV-1250. Shimadzu, Japan)를 사용하여 625 nm에서 흡광도를 측정하였다. 폴리페놀 함량은 타닌산 (tannic acid)를 표준물질로 하여 표준검량곡선을 작성하여 구하였다.

[0087] 도 2는 30% 및 5% 농도에서 액체발효한 산마늘의 페놀성화합물의 함량을 나타낸 것으로 30% 농도에서 처리균주별 함량은 아스퍼질러스 나이 36.70~58.93 mg/g, 아스퍼질러스 오리제 38.19~69.67 mg/g, 사카로마이세스 세레비시아 42.26~84.48 mg/g으로 나타나 발효시간이 길어지면 함량이 증가하였다. 액체발효한 산마늘의 페놀성화합물의 함량은 사카로마이세스 세레비시아로 72시간 발효처리한 시료가 84.48 mg/g으로 가장 높게 나타났다. 5% 농도에서 처리균주별 함량은 아스퍼질러스 나이걸 28.56~33.37 mg/g, 아스퍼질러스 오리제 39.66~41.88 mg/g로 증가하였고, 사카로마이세스 세레비시아 36.70~27.45 mg/g으로 발효시간에 따라 감소하는 경향을 나타냈으며, 30%농도가 5% 농도보다는 높은 페놀화합물 함량을 나타냈다.

[0088] **실시예 4-2: 과산화 제거효소 (Superoxide dismutase, SOD)활성 측정**

[0089] SOD유사활성 측정은 Marklund와 Marklund의 방법 (1974)에 따라 활성 산소종을 과산화수소 (H_2O_2)로 전환시키는 반응을 촉매하는 피로갈롤 (pyrogallol)의 생성량을 측정하여 나타냈다. 즉, 일정 농도의 시료 0.2 mL씩 첨가한 후, Tris-HCl Buffer(50 mM Tris aminom-mthane+10 mM EDTA, pH 8.5) 3 mL와 7.2 mM 피로갈롤 0.2 mL를 첨가하여, 실온에서 10분간 반응시키고, 1N HCl 1 mL을 첨가하여 반응을 정지시킨 후 420 nm에서 흡광도를 측정하였다. SOD유사활성은 추출물 첨가구와 무첨가구 사이의 흡광도 차이를 백분율(%)로 나타내었다

[0090] $$\text{SOD 유사활성(\%)} = \left(1 - \frac{\text{시료첨가군의흡광도}}{\text{무첨가군의흡광도}}\right) \times 100$$

[0091] 도 3은 액체발효한 산마늘의 SOD 유사활성을 나타낸 것으로 균주별 SOD 유사활성은 아스퍼질러스 나이걸 35.31~58.34%,, 아스퍼질러스 오리제 23.72~52.74%, 사카로마이세스 세레비시아 30.65~67.66%로 나타나 48시간 발효에서는 감소하였지만 발효시간이 길어질수록 증가하는 경향을 나타내 72시간 발효에서 높은 활성을 나타냈다. 사카로마이세스 세레비시아 72시간 발효처리물이 67.66%로 가장 높은 활성을 나타냈다.

[0092] 발효하지 않은 강원도 재배 산마늘의 SOD 유사활성은 26.64%와 비교하면 발효 산마늘의 SOD 유사활성이 처리균별로 높은 활성을 나타내 발효처리에 의해 활성이 급격히 증가함을 알 수 있었다.

[0093] 처리농도별 SOD 유사활성은 5%의 농도보다 30%의 농도에서 높게 나타나 처리농도가 높아질수록 높아지는 경향을 나타냈다.

[0094] **실시예 4-3: 전자 공여능(Electron donating activity, EDA) 측정**

[0095] 전자공여능은 Choi et al.의 방법(2006)에 준하여 측정하였다. 즉, 에탄올에 용해한 100 μM의 DPPH 용액 900

㎕와 시료 용액 100 ㎕를 혼합하여 잘 교반하고, 이 혼합 시료를 암소에서 30분간 반응시킨 후 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. 수소전자공여능은 각 실험을 3회 반복하여 평균을 낸 다음 대조구에 대한 흡광도의 감소 정도를 다음 식에 의하여 계산하였다.

[0096] $$\text{전자공여능}(\%) = \left(1 - \frac{\text{시료첨가군의흡광도}}{\text{무첨가군의흡광도}}\right) \times 100$$

[0097] 도 4는 액체발효한 산마늘의 전자공여능을 DPPH 소거능으로 나타낸 것으로 균주별 DPPH 라디칼 소거능은 30% 농도에서 아스퍼질러스 나이걸 48.69~52.17%, 아스퍼질러스 오리제 45.09~53.38%, 사카로마이세스 세레비시아 49.00~55.93%로 발효시간이 길어짐에 따라 라디칼 소거능은 높아지는 경향을 나타내 72시간 발효에서 가장 높은 소거능을 나타냈으며, 특히 사카로마이세스 세레비시아 균주을 사용한 72시간 발효물이 55.93%로 가장 높은 소거능을 나타냈다. 발효하지 않은 산마늘의 라디칼 소거능이 46.22% 와 비교하면 발효시간이 길어짐에 따라 소거능이 약간 증가하는 경향을 나타냈다. 5%의 농도에서는 아스퍼질러스 나이걸 42.07~66.81%, 아스퍼질러스 오리제 55.86~59.53%, 사카로마이세스 세레비시아 54.37~60.34%로 나타나 5%의 농도에서 30% 보다 소거능이 약간 높게 나타났다.

[0098] **실시예 4-4: 아질산염 소거능**

[0099] 아질산염 소거능 측정은 Kato et al.의 방법(1987)으로 측정하였다. 즉, 농도별로 희석한 시료액 2 mL에 1 mM NaNO 1 mL을 넣은 다음 0.1 N HCl을 이용하여 pH를 각각 2.5와 4.2로 조정한 후 반응용액의 부피를 10 mL로 하였다. 이 용액을 37℃에서 1시간 반응시킨 후 반응액 1 mL을 취하여 2% 아세트산 (acetic acid) 5 mL과 글리에스 (Griess) 시약 0.5 mL를 가한 후 vortex하여 실온에서 15분간 방치 후 520 nm에서 흡광도를 측정하였다. 대조구로는 글리에스 (Griess)시약 대신 증류수 0.1 mL를 가하여 상기와 동일한 방법으로 측정하여 추출물을 첨가한 경우와 첨가하지 않은 경우의 아질산염 소거율을 백분율(%)로 계산하여 BHT 처리구와 비교하였다.

[0100] $N(\%) = [1 - (A - C) / B] \times 100$

[0101] N : nitrite scavenging ability, A : absorbance of 1 mM $NaNO_2$ added sample after standin for 1 hour, B : absorbance of 1 mM $NaNO_2$

[0102] 도 5는 산마늘을 액체발효시킨 발효물의 1.0mg/mL의 농도에서 pH 2.5 및 pH 4.2 에서 아질산염 소거능을 측정한 결과를 나타낸 것이다.

[0103] 30%의 농도, pH 4.2에서 소거능은 아스퍼질러스 나이걸 2.89~5.33%, 아스퍼질러스 오리제 3.07~10.15%, 사카로마이세스 세레비시아 1.72~7.04%로 나타났고, pH 2.5에서는 아스퍼질러스 나이걸 7.10~9.50%, 아스퍼질러스 오리제 5.57~22.93%, 사카로마이세스 세레비시아 10.84~31.80%로 나타나 발효시간 48시간에서 최대값을 나타냈으며, 그 이상의 발효시간에서는 감소하였다.

[0104] 5%의 농도에서는 30% 농도보다 pH 2.5에서 아스퍼질러스 나이걸은 48시간 발효물의 10.59%로 최고로 72시간 발효물에서 급격히 감소하였고, 아스퍼질러스 오리제는 9.49~2.58%로, 사카로마이세스 세레비시아는 11.56~2.97%로 발효시간이 길어짐에 따라 급격히 감소하는 경향을 나타냈으며, 발효물의 농도가 높아질수록 아질산염 소거능이 높았다.

[0105] pH 변화에 따라서는 pH 2.5가 pH 4.2보다 높게 나타나 pH가 높아질수록 감소하였다. 균주별로는 사카로마이세스 세레비시아 48시간 발효조건에서 31.80% 가장 높은 소거능을 나타냈다. 발효하지 않은 산마늘의 아질산염 소거능은 pH 2.5일 때 잎의 물 추출물에서 최고 19.18%와 비교하면 아스퍼질러스 오리제와 사카로마이세스 세레비시아 균주 발효물은 높은 아질산염 소거능을 나타냈고 합성 항산화제인 BHT의 소거능 45.18%와 비교하면 비교적 높은 소거능을 나타냄을 알 수 있다.

[0106] **실시예 4-5: 총 플라보노이드 함량 측정**

[0107] 시료 중 총 플라보노이드 함량은 Zhishen et al.(1999)이 개발한 분광분석법을 이용하여 측정하였다. 즉, 증류수 4 mL가 들어있는 시험관에 시료 1 mL를 가하고 5분이 경과한 다음 5% $NaNO_2$ 0.3 mL와 10% $AlCl_3$ 0.3 mL를 차례로 가하였다. 대조군은 시료 대신 증류수 1 mL를 가하였다. 시작시간으로부터 6분이 경과한 시간에 1 M NaOH 2 mL를 가하고 증류수를 추가로 가하여 10 mL로 만든 다음 골고루 희석하였다. 분홍색을 띄는 시료를 510 nm파장에서 흡광도를 측정하여 L 당 catechin equivalent (CE) mg으로 환산하여 플라보노이드 함량을 표시하였다.

[0108] 도 6은 액체발효한 산마늘의 1 mg/mL 농도에서 플라보노이드 함량을 나타낸 것으로 액체발효한 산마늘 발효물의 플라보노이드 함량은 30% 농도에서 아스퍼질러스 나이걸 10.38~13.49 mg/mL, 아스퍼질러스 오리제 8.07~10.82 mg/ mL, 사카로마이세스 세레비시아 12.46~15.24 mg/mL로 나타났으며, 5% 농도로 발효한 발효물의 플라보노이드 함량은 아스퍼절러스 나이걸은 52.07~66.81 mg/mL, 아스퍼질러스 오리제는 55.86~59.53 mg/ mL, 사카로마이세스 세레비시아는 49.05~60.34 mg/mL로 나타나 30% 보다는 5%농도의 발효물에서 매우 높은 플라보노이드 함량을 나타냈다. 액체발효에서도 발효물 모두 발효를 하지 않은 산마늘의 플라보노이드 함량 4.43 mg/mL보다 높은 함량을 나타내고 있다.

[0109]

[0110] **실시예 4-6: 하이드록시 라디칼 (Hydroxy radical) 소거 활성의 측정**

[0111] 하이드록시 라디칼 (Hydroxy radical) 소거활성은 Halliwell et al.의 방법(1997)을 변형하여 측정하였다. 즉, 희석한 시료 50 ㎕에 2.5 mM 2-디옥시-D-리보오스 (2-deoxy-D-ribose)를 함유한 10 mM PBS 용액 345 ㎕를 혼합한 다음 1 mM $FeCl_3$와 1.04 mM EDTA 용액 50 ㎕, 1 mM ascorbate 50 ㎕ 및 0.1 M H_2O_2 5 ㎕를 각각 첨가하였다. 37℃에서 10분간 배양한 후 2.8% 트라이클로로아세트산 (trichloroacetic acid) 500 ㎕와 1% 2-티오바르비탈산 (2-thiobarbituric acid) 250 ㎕를 첨가하고 95℃에서 8분간 가열하였다. 반응물을 냉각시킨 후 532 nm에서 흡광도를 측정하였다.

[0112] $$\text{Hydroxyl radical 소거활성(\%)} = \frac{\text{시료무첨가흡광도} - \text{시료첨가흡광도}}{\text{시료무첨가흡광도}} \times 100$$

[0113] 도 7은 액체발효한 산마늘의 1 mg/mL 농도에서 하이드록시 라디칼 소거활성을 나타낸 것이다.

[0114] 30%농도 발효물에서 균주별 소거활성은 아스퍼질러스 나이걸 41.98~53.83%,, 아스퍼질러스 오리제 55.00~60.38%, 사카로마이세스 세레비시아 51.17~59.02%로 발효시간이 길어지면 소거활성이 감소하는 경향을 나타내 24시간 발효물에서 높은 소거활성을 나타냈다. 5%에서 균주별 소거활성은 아스퍼질러스 나이걸 71.16~79.59 %,, 아스퍼질러스 오리제 73.41~77.90%, 사카로마이세스 세레비시아 72.66~77.53%로 30% 농도 발효물보다 5% 농도 발효물에서 더 높게 나타났다.

[0115] 발효하지 않은 산마늘과 비교하면 액체발효물의 소거활성은 대부분의 조건에서 미발효 산마늘보다 높은 소거활성을 나타냈다.

[0116] **실시예 5: 시료의 항당뇨성 효과 검증**

[0117] **실시예 5-1: 시료의 α-글루코시다아제 활성 저해 실험**

[0118] 시료의 α-글리코시다아제 (α-Glucosidase) 활성은 96 웰 플레이트 (well plate)를 이용하여 Watanabe 등의 방법(1997)에 준하여 분석한다. 즉, α-글리코시다아제 (α-Glucosidase) 용액(50 ㎕, 0.7 U)을 대조의 아카보스 (Acarbose) 용액 (5 mg/50㎕ distilledwater)이나 시료용액 (5 mg/50㎕ distilled water)을 함유하고 있는 96-well plate의 각 well에 첨가하고 405 nm에서의 흡광도를 Anthos 2020 microplate reader (Cambridge, England)로 측정한다(zero time 흡광도). 다음, 50㎕ 기질용액 (5 mM p-nitrophenyl-a- D-glucopyranoside in 0.1 M phosphate buffer, pH 7.0)을 α-글리코시다아제와 시료 또는 α-글리코시다아제와 아카보스를 함유하는

각 well에 첨가하고 조심스럽게 잘 혼합하고, 기질 첨가 5분 후에 다시 405 nm에 흡광도를 측정하여 α-글리코시다아제 (α-Glucosidase) 활성을 구하였다.

[0119] 도 8에 발효방법과 발효시간에 따른 발효물의 α-글리코시다아제 활성억제능을 나타냈다. 각 시료의 α-글리코시다아제 활성억제능은 LF-SE 5일, LF-SE 7일, 대조군, LF-SE 3일에서 각각 26.7%, 21.6%, 11.6%, 10.6%로 나타났고 가장 높은 활성을 나타내는 LF-SE 5일 처리구에서는 α-글리코시다아제 억제제인 아카보스와 대등한 활성을 나타냈다.

[0120] **실시예 5-2: SD rat을 이용한 시료의 항당뇨실험 (제1형 당뇨)**

[0121] 수컷 SD rat (6~7 weeks, 300~350 g)을 Samtako (오산시)로부터 구입하여 표준사료 시트레이트 버퍼 (Citrate buffer)의 제조는 다음과 같이 하였다. 즉, 0.01M 시트르산 (citric acid) 25.5 mL와 (Samtako)를 먹이면서 온도(23±2℃)와 습도 (50±10%)가 조절되는 시설(12 hr light-and-dark cycle control system)에서 1주일간 환경적응시키고 평균몸무게별로 그룹을 지정하였다. 사육 7일이 지난 다음, 10시간 절식 후 SD rat의 복강에 1 mL STZ (Streptozotocin) [65 mg/kg body weight; STZ 용액은 0.01 M 시트레이트 버퍼 (pH 4h)를 사용하여 사용전에 제조하여 얼음 위에 보관]를 주사하였다. 이때 사용한 pH 4.6 0.01 M 시트르산나트륨수화물 (sodium citrate dihydrate) 24.5 mL를 혼합한 후 100 mL로 보정하였으며 syringe filter (0.22 ㎛)로 여과하고 pH 4.6으로 보정 후 냉동 보관하여 사용하였다.

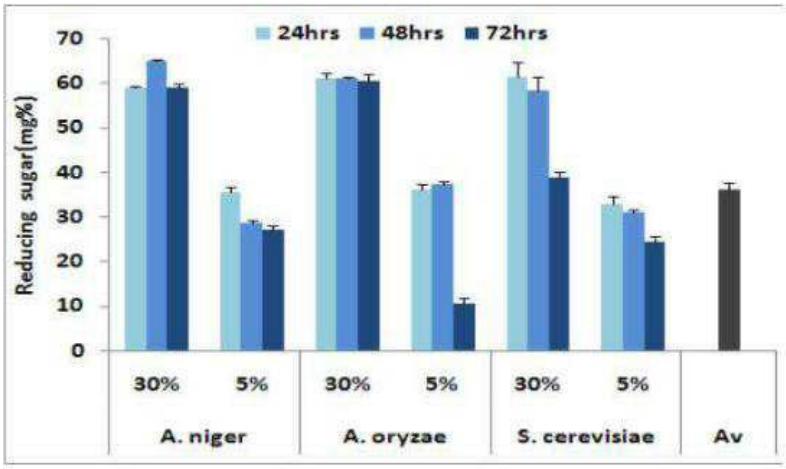
[0122] STZ투여 후 4시간 동안은 물과 사료를 공급하지 않았고 4시간이 지난 후에 다시 공급하였으며, 72시간이 지난 다음 혈당을 측정 (10시간 공복혈당)하여 250 mg/dL 이상인 동물을 당뇨병 렛 (diabetic rat)으로 간주하였다.

[0123] STZ투여 후 일주일 간 실험시작 전 까지는 자유 식이를 하였고, 공복 (10시간) 후 시료를 경구투여 하고 30분 후 글루코오스 (3 g/kg)를 증류수 (1 mL)에 녹여 경구 투여하였다. 글루코오스는 40℃ 항온수조에서 녹여 사용하였고, 각 시료의 농도는 대조군 (1 mL PBS), 사카로마이세스 세레비시아 발효추출물 (200 mg/kg) (각 처리당 6마리)을 경구투여 하였다. 시료처리 30분 후 1 mL 증류수에 용해한 글루코오스 (3 g/kg)를 경구투여 하였다. 글루코오스 투여 0, 30, 60, 120, 180 분 후에 꼬리 정맥으로부터 피를 뽑아 헤파린 처리된-배양튜브 (heparin-treated culture tubes)에 보관하여 혈당을 측정하였다.

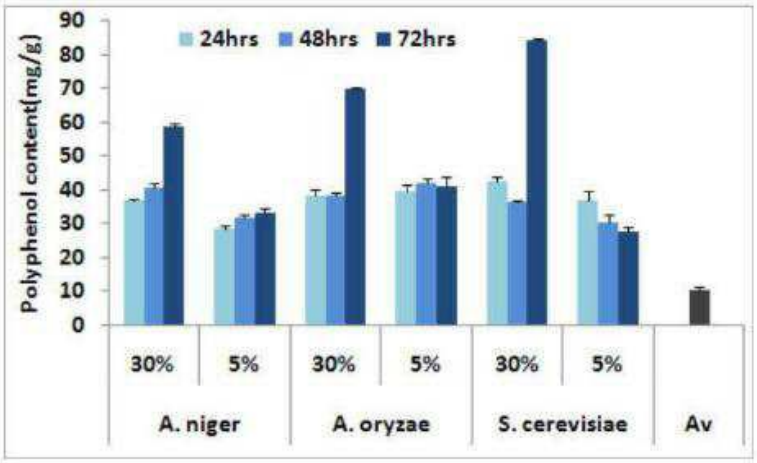
[0124] 도 9에서 나타난 바와 같이, 스트렙토조토신 (Streptozotocin)으로 유도된 당뇨쥐를 대조군 (1 mL PBS), 대조군 * (70 % ethanol extractives) LF-SE 5일 (200 mg/kg BW, 사카로마이세스 세레비시아와 효소처리한 발효물) 처리구로 그룹을 지어 10시간 절식시킨 뒤 시료 (500mg/kg)처리하고 30분 후 글루코오스 (3g/kg)를 처리한 시간 (0분)을 기준으로 30, 60, 120, 180분 후의 혈당수치를 뺀 값을 수치화한 값으로 산마늘 처리구가 대조군에 비하여 초기 글루코오스의 흡수를 저해하는 결과를 도 9에 나타냈었다. 산마늘 발효물은 시간이 지남에 따라 글루코오스 흡수를 저해하였으며, 특히 -15.3으로 나타난 대조군보다 -15.7로 나타난 LF-SE 5일 발효추출물은 글루코오스 흡수를 저해하는 물질로서 적합하다고 판단된다.

도면

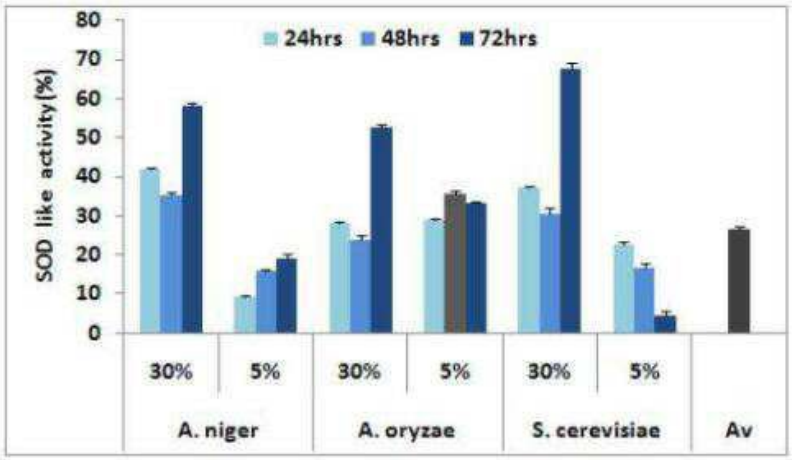
도면1



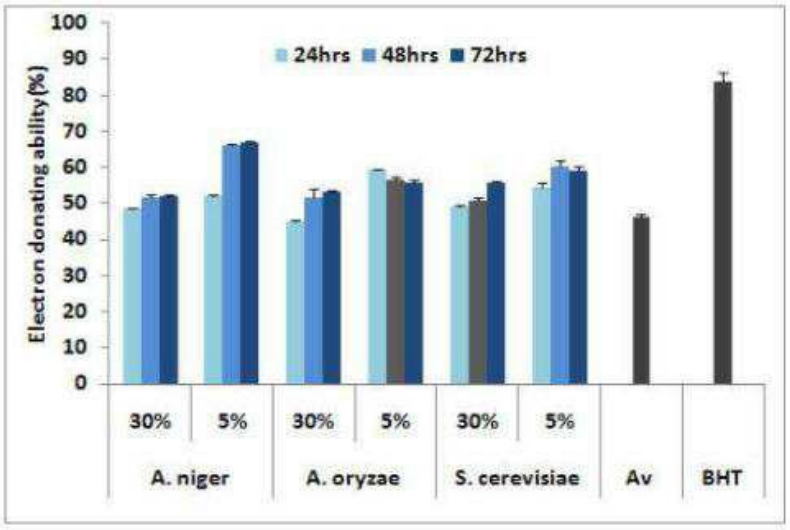
도면2



도면3

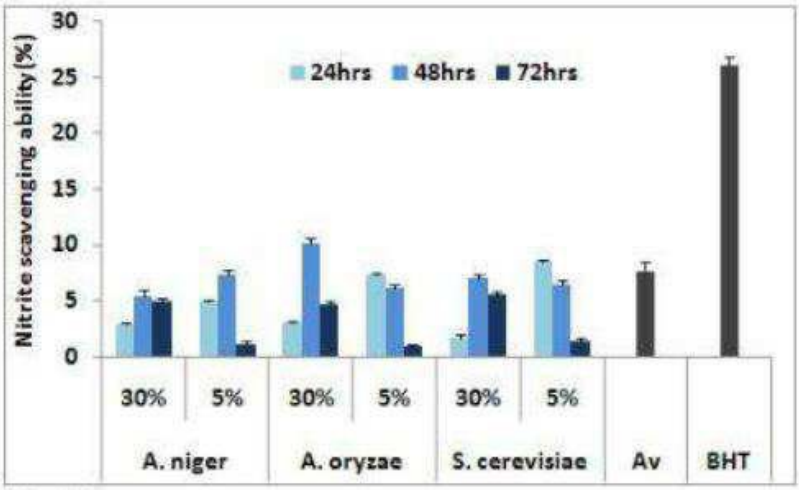


도면4

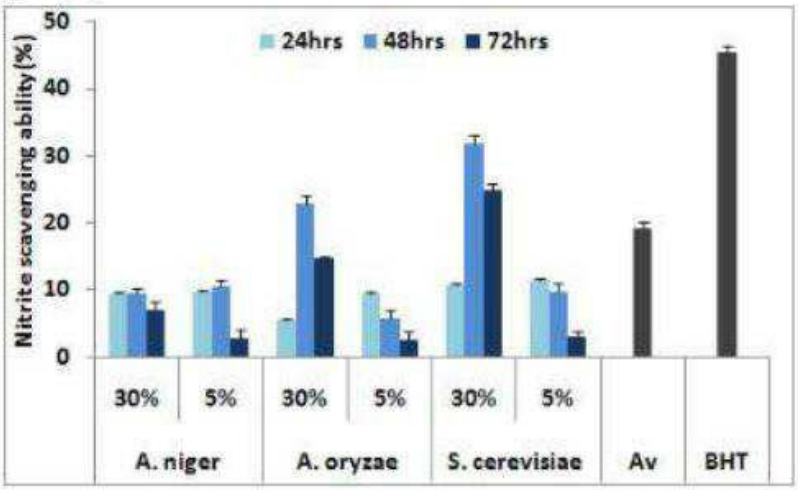


도면5

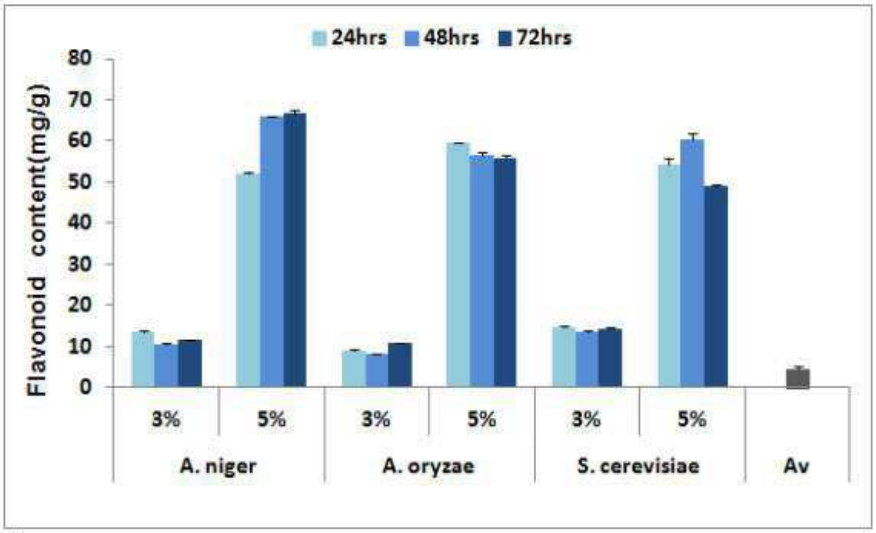
[pH 4.2]



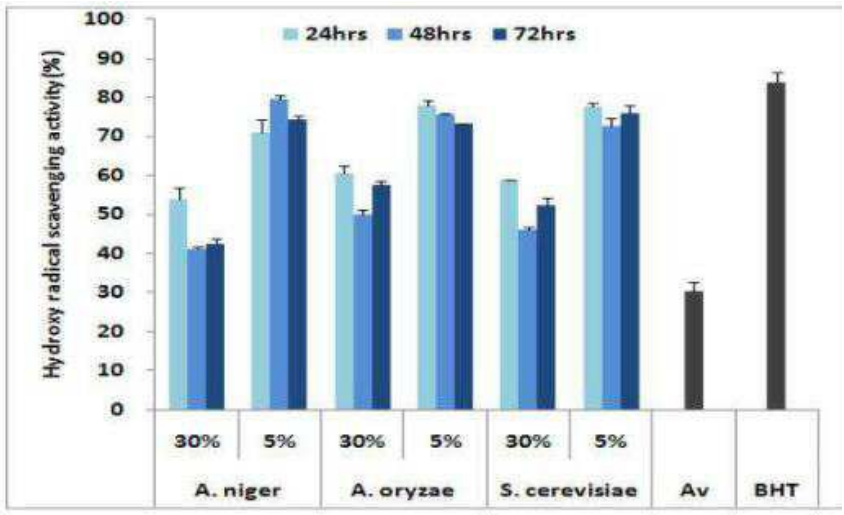
[pH 2.5]



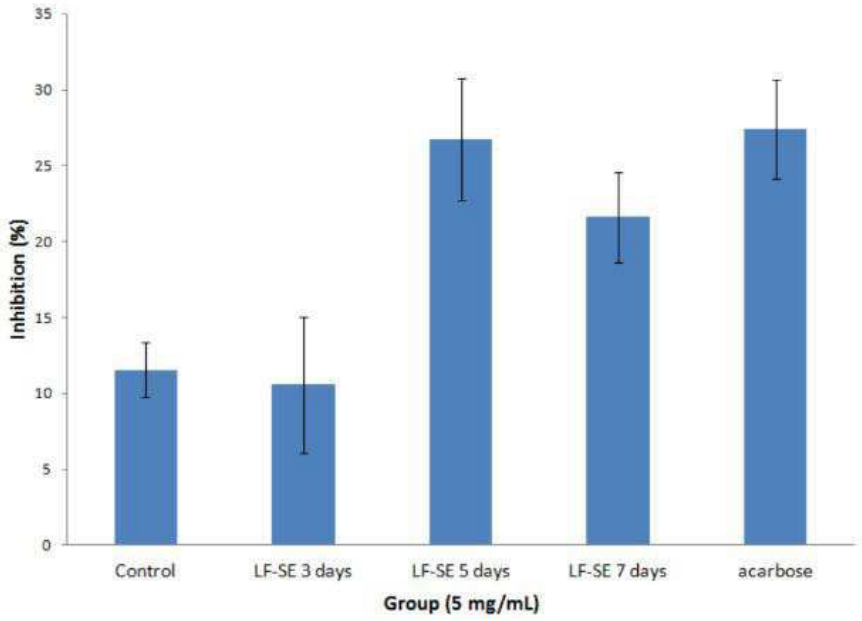
도면6


24hrs
48hrs
72hrs
Flavonoid content(mg/g)
80
70
60
50
40
30
20
10
0
3%
5%
3%
5%
3%
5%
A. niger
A. oryzae
S. cerevisiae
Av

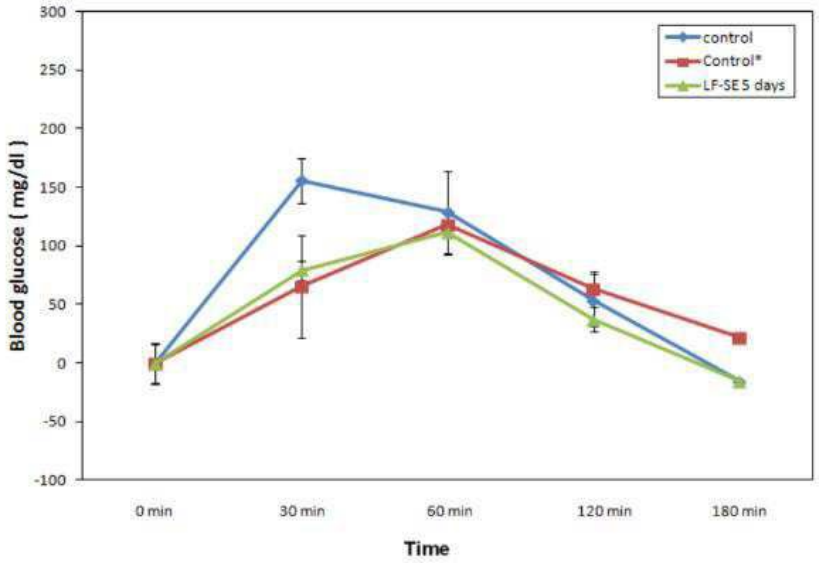
도면7


24hrs
48hrs
72hrs
Hydroxy radical scavenging activity(%)
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
30%
5%
30%
5%
30%
5%
A. niger
A. oryzae
S. cerevisiae
Av
BHT

도면8


35
30
25
20
15
10
5
0
Inhibition (%)
Control
LF-SE 3 days
LF-SE 5 days
LF-SE 7 days
acarbose
Group (5 mg/mL)

도면9


300
250
200
150
100
50
0
-50
-100
Blood glucose (mg/dl)
control
Control*
LF-SE 5 days
0 min
30 min
60 min
120 min
180 min
Time

도면10


한방발효제
α-Herbzyme
(알파 허브자임)
1000g
한국효소주식회사
Korea Enzyme Co.,Ltd.