

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2020-0056012

(43) 공개일자 2020년05월22일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A23L 33/105 (2016.01)

(52) CPC특허분류

A23L 33/105 (2016.08)

A23V 2002/00 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2018-0139819

(22) 출원일자 2018년11월14일

심사청구일자 2018년11월14일

(71) 출원인

경희대학교 산학협력단

경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경희대학교 국제캠퍼스내)

(72) 발명자

장윤혁

서울특별시 강남구 삼성로 151, 11동 802호(대치동, 선경아파트)

이준구

대전광역시 서구 도안동로 123, 1703동 1203호(도안동, 도안리슈빌)

박건희

울산광역시 동구 옥류로 65, 201동 202호(동부동, 현대하이아트맨션)

(74) 대리인

특허법인 하나

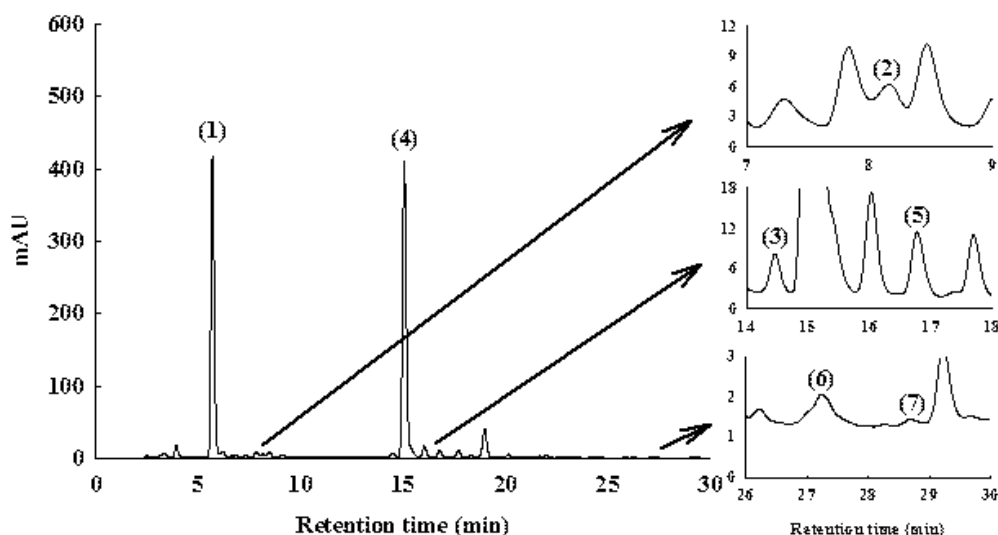
전체 청구항 수 : 총 12 항

(54) 발명의 명칭 향산화 및 항비만 활성 증진을 위한 금은화 가공방법

(57) 요약

본 발명은 금은화(*Lonicera japonica* Thunb.)에 가열 처리하는 단계를 포함하는 금은화의 가공 방법 및 금은화 가공물에 관한 것이다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A23V 2200/302 (2013.01)

A23V 2200/332 (2013.01)

A23V 2250/21 (2013.01)

A23V 2300/14 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 PJ013471032018

부처명 농촌진흥청

연구관리전문기관 국립농업과학원

연구사업명 농축산물 수확후 용·복합 실용화 기술 개발_빅데이터 기반의 농식품성분 DB 구축

연구과제명 비만 개선 성분 증진을 위한 물질전환 기술 개발 연구

기 여 율 1/1

주관기관 국립농업과학원

연구기간 2018.01.01 ~ 2020.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

금은화(*Lonicera japonica* Thunb.)에 가열 처리하는 단계를 포함하는,금은화의 가공 방법.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 가열 처리는 90 ℃ 내지 110 ℃에서 이루어지는 것인, 금은화의 가공 방법.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 가열 처리는 30 분 내지 150 분 동안 이루어지는 것인, 금은화의 가공 방법.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 가열 처리 전에 0 ℃ 내지 10 ℃에서 방치하는 단계를 추가로 포함하는, 금은화의 가공 방법.

청구항 5

제4항에 있어서, 상기 0 ℃ 내지 10 ℃에서 방치하는 단계는 20 시간 내지 30 시간 동안 이루어지는 것인, 금은화의 가공 방법.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 금은화는 금은화 원재료, 추출물, 분쇄물, 분산액, 분쇄액, 발효물로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상인 것인, 금은화의 가공 방법.

청구항 7

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항의 가공 방법에 의하여 제조된 금은화 가공물.

청구항 8

제7항에 있어서, 상기 금은화 가공물은 항산화 또는 항비만 활성이 증진된 것인, 금은화 가공물.

청구항 9

제7항에 있어서, 상기 금은화 가공물은 클로로겐산(chlorogenic acid), 카페익산(caffeic acid), 4,5-디카페오일퀸산(4,5-dicaffeoylquinic acid), 3,5-디카페오일퀸산(3,5-dicaffeoylquinic acid), 루틴(rutin), 퀘르세틴(quercetin), 루테올린(luteolin), 퀸산(quinic acid) 및 시킵산(shikimic acid)으로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 화합물의 함량이 증가된 것을 특징으로 하는, 금은화 가공물.

청구항 10

제7항의 금은화 가공물을 열수 또는 유기용매로 추출한 금은화 추출물.

청구항 11

제7항의 금은화 가공물 또는 제10항의 금은화 추출물을 포함하는, 식품 조성물.

청구항 12

제11항에 있어서, 상기 식품 조성물은 항산화 또는 항비만 활성을 나타내는 것인, 식품 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 금은화(*Lonicera japonica* Thunb.)에 가열 처리하는 단계를 포함하는 금은화의 가공 방법 및 금은화 가공물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 생체 내에서는 에너지 생산을 위한 산화과정 중 상당량의 활성산소가 생성된다. 활성산소가 순간적으로 다량 발생되거나 만성적으로 활성산소가 발생하게 되면 세포의 구성성분과 강하게 반응하여 세포와 조직에 손상을 유발하며, 지속적인 세포의 손상은 DNA 변성, 지질 산화, 단백질 분해 등을 초래할 수 있다.

[0003] 인체 내에는 과산화물제거효소(Superoxide dismutase, SOD), 글루타티온과산화효소(glutathione peroxidase, GPX), 카탈라아제(catalase, CAT), 글루타티온환원효소(glutathione reductase), 글루타티온-S-전달효소(glutathione-S-transferase) 등과 같이 활성산소에 대항하는 항산화 효소가 존재하나, 산업화와 함께 증가하는 각종 환경오염 물질, 흡연, 스트레스 등으로 인해 인체 내의 항산화 효소 등의 활성만으로는 단백질 분해, DNA 손상을 방어하는데 한계가 있다.

[0004] 항산화제로 부틸레이트하이드록시아니솔(butylated hydroxyanisole, BHA), 부틸레이트하이드록시톨루엔(butylated hydroxytoluene, BHT)과 같은 합성물질들이 개발되었으나, 인체에 대한 여러 가지 부작용을 야기할 수 있어 천연물질로부터 유래한 안전한 항산화 물질을 찾는 연구가 요구되고 있다.

[0005] 한편, 인류가 풍요로운 사회로 점점 발전해 감에 따라 비만이 심각한 질병 중의 하나로 등장하게 되었고 이에 세계보건기구(WHO)는 비만을 치료해야 할 질병의 대상이라고 선언하였다.

[0006] 비만은 열량의 섭취와 소비의 불균형으로 발생하는 대사성 질환이며, 형태학적으로 볼 때 체내 지방 세포의 크기 증가(hypertrophy) 또는 수의 증가(hyperplasia)에 의해 초래된다. 비만은 서구사회에서 가장 흔한 영양장애 일 뿐만 아니라, 최근 우리나라에서도 경제발전에 의한 식생활의 향상과 생활 방식의 서구화로 비만의 빈도가 급속히 증가하는 추세에 있어서 그 치료와 예방에 대한 중요성이 크게 부각되고 있다.

[0007] 상기와 같은 실정에 따라 항산화 및 항비만 활성을 증진시키기 위한 연구가 요구되고 있다.

선행기술문헌

특허문헌

[0008] (특허문헌 0001) 한국등록특허 제10-1861796호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009] 본 발명의 목적은 금은화(*Lonicera japonica* Thunb.)에 가열 처리하는 단계를 포함하는, 금은화의 가공 방법을 제공하는 것이다.

[0010] 본 발명의 다른 목적은 상기 가공방법에 의하여 제조된 금은화 가공물을 제공하는 것이다.

[0011] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 금은화 가공물을 추출한 금은화 추출물을 제공하는 것이다.

[0012] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 금은화 가공물 또는 금은화 추출물을 포함하는 식품 조성물을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0013] 상기와 같은 목적을 달성하기 위한 본 발명의 일 측면은 금은화(*Lonicera japonica* Thunb.)에 가열 처리하는 단계를 포함하는, 금은화의 가공 방법을 제공한다.

- [0014] 구체적으로, 상기 가열 처리는 90 ℃ 내지 110 ℃에서 이루어질 수 있다.
- [0015] 또한 구체적으로, 상기 가열 처리는 30 분 내지 150 분 동안 이루어질 수 있다.
- [0016] 또한 구체적으로, 상기 가열 처리 전에 0 ℃ 내지 10 ℃에서 방치하는 단계를 추가로 포함할 수 있으며, 상기 0 ℃ 내지 10 ℃에서 방치하는 단계는 20 시간 내지 30 시간 동안 이루어질 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0017] 본 발명에서 “금은화(*Lonicera japonica*)”는 인동과(*caprifoliaceae*) 인동속(*genus Lonicera*)에 속하는 인동덩굴(*L. japonica* Thunb.)의 꽃으로 이노, 건위, 관절염, 화농성 피부염, 기관지염에 효과가 알려져 있어, 의약품 또는 화장품산업에 이용되었으나, 특유의 향과 약간의 독성을 가지고 있어, 식품에 첨가될 경우 소비자의 기호도를 감소시켜 식품에 적용하기에 어려움이 있었다.
- [0018] 본 발명에서는 금은화에 가열 처리를 함으로써 항산화 활성 및 항비만 활성이 증진되도록 하였으며, 식품에 적용할 수 있도록 하였다.
- [0019] 본 발명 일 실시예에서는 금은화에 가열 처리를 한 경우, 항비만 활성을 나타내는 페놀산, 플라보노이드 및 유기산의 함량이 증가하는 것을 확인하였으며, 가열 시간 전체에서 항산화 활성이 증진된 것을 확인하였다.
- [0020] 본 발명에서 사용되는 금은화는 금은화 원재료, 추출물, 분쇄물, 분산액, 분쇄액, 발효물로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상일 수 있으며, 이에 제한되는 것은 아니며, 필요에 따라 변형된 형태로 적용할 수 있다. 상기 '금은화 원재료'는 채취되거나 재배된 금은화 전체 또는 금은화의 일부를 말하며 가공, 추출, 분쇄 등의 단계가 수행되기 이전의 상태를 말한다.
- [0021] 본 발명의 다른 측면은 상기 가공 방법에 의하여 제조된 금은화 가공물을 제공한다.
- [0022] 구체적으로 상기 금은화 가공물은 항산화 또는 항비만 활성이 증진된 것일 수 있으며, 클로로겐산(chlorogenic acid), 카페익산(caffeic acid), 4,5-디카페오일퀸산(4,5-dicaffeoylquinic acid), 3,5-디카페오일퀸산(3,5-dicaffeoylquinic acid), 루틴(rutin), 퀘르세틴(quercetin), 루테올린(Luteolin), 퀸산(quinic acid) 및 시킵산(shikimic acid)으로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 화합물의 함량이 증가된 것을 특징으로 할 수 있다.
- [0023] 본 발명 일 실시예에서는 금은화에 가열 처리를 할 경우, 항비만 활성을 나타내는 페놀산인 클로로겐산, 카페익산, 4,5-디카페오일퀸산 및 3,5-디카페오일퀸산이 증가하고, 플라보노이드인 루틴, 퀘르세틴 및 루테올린이 증가하는 것을 확인하였다(표 5). 또한, 가열 시간 전체에서 유기산인 퀸산 및 시킵산의 함량이 증가함을 확인하였다(표 7). 나아가, 가열 시간 전체에서 DPPH 라디칼 소거능, ABTS 라디칼 소거능, FRAP(Ferric reducing antioxidant power) 값 및 환원력이 증가함을 확인하여 항산화 활성 역시 증진되었음을 확인하였다(도 2 내지 도 5).
- [0024] 상기 클로로겐산은 카페익산 및 퀸산의 에스테르 결합으로 이루어진 물질로, 과산화지질의 생성 억제, 콜레스테롤 생합성 억제, 항산화, 항암 및 항비만 효과가 있는 것으로 알려져 있다. 식물에 존재하는 클로로겐산은 클로로겐산의 카르복실기와 세포벽의 탄수화물과 단백질과 에스테르 결합을 이루고, 클로로겐산의 하이드록실기는 리그닌과 에테르 결합을 이루고 있다. 가열 처리시 이들 결합이 파괴됨으로써 결합되어 있던 클로로겐산이 유리되어 함량이 증가할 수 있다.
- [0025] 또한, 디카페오일퀸산은 퀸산에 2개의 카페익산이 에스테르결합으로 이루어진 물질로서, 금은화에 존재하는 4,5-디카페오일퀸산과 3,5-디카페오일퀸산의 카페익산이 가열 처리시 부분적으로 가수분해되어 클로로겐산으로 전환되어 함량이 증가할 수 있다.
- [0026] 상기 카페익산은 카볼산(carbolic acid)이라고도 하며, 발암억제제 또는 항산화제로도 알려져 있으며, 금은화 추출물의 카페익산 함량은 추출 전 가열 처리 공정에 의해 현저히 증대될 수 있다.
- [0027] 상기 퀸산은 클로로겐산, 4,5-디카페오일퀸산 및 3,5-디카페오일퀸산의 가수분해 산물로, 금은화의 가열 처리에 의해 상기 클로로겐산, 4,5-디카페오일퀸산 및 3,5-디카페오일퀸산이 가수분해되어 퀸산의 함량이 증대될 수 있다.
- [0028] 상기 시킵산은 퀸산의 유도체로서, 금은화의 가열 처리에 의해 상기 퀸산이 가수분해되어 퀸산 락톤 또는 시킵산으로 전환될 수 있으므로, 상기 시킵산의 함량이 증대될 수 있다.

- [0029] 본 발명의 또 다른 측면은 상기 금은화 가공물을 열수 또는 유기용매로 추출한 금은화 추출물을 제공한다.
- [0030] 상기 “추출물”은 용매와 추출재료를 특정 조건하에서 접촉시킴으로써 추출재료에 함유된 유효성분을 분리해낸 것으로, 상기 추출물은 금은화 추출물에 대한 추출 공정에 의해 원료 내의 유효성분을 포함할 수 있다.
- [0031] 상기 금은화 추출물은 천연물로부터 추출물을 추출하는 당업계에 공지된 통상적인 방법에 따라, 즉, 통상적인 온도, 압력의 조건 하에서 통상적인 용매를 사용하여 추출할 수 있다. 예컨대, 상기 금은화 추출물은 물, 알코올, 에틸아세테이트, 아세톤, 헥산, 디클로로메탄 또는 이들의 혼합 용매를 사용하여 추출할 수 있으며, 이는 필요에 따라 변형하여 적용할 수 있다.
- [0032] 상기 추출 방법은 열수 추출, 냉침 추출, 환류 추출, 초음파 추출 등의 다양한 방법을 사용할 수 있으며, 바람직하게는 열수 추출을 사용할 수 있으나 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0033] 또한, 금은화 추출물을 기초로 가열 처리를 하여 금은화 가공물을 제공한 경우라도 당업자의 필요에 따라 재추출 과정을 거칠 수 있다.
- [0034] 본 발명의 금은화 가공물은 가열 처리를 통하여 항산화 또는 항비만 활성이 증진되었는 바, 이를 이용하여 추출물을 제조함으로써 항산화 또는 항비만 활성이 증진된 금은화 추출물이 제공될 수 있다.
- [0035] 본 발명의 또 다른 측면은 상기 금은화 가공물 또는 금은화 추출물을 포함하는 식품 조성물을 제공한다. 구체적으로, 상기 식품 조성물은 항산화 또는 항비만 활성을 나타내는 것일 수 있다.
- [0036] 본 발명 일 실시예에서는 금은화에 가열 처리를 함으로써 금은화의 항산화 활성이 증진된 것을 확인하였으며(도 2 내지 도 5), 항비만 활성을 나타내는 것으로 알려진 페놀산 및 플라보노이드의 함량이 증가되는 것을 확인하였다(표 5 및 표 7).
- [0037] 상기 식품 조성물은 식품학적으로 허용가능한 담체를 포함할 수 있다.
- [0038] 본 발명의 식품 조성물은 기능성 식품(functional food), 영양 보조제(nutritional supplement), 건강 식품(health food) 및 식품 첨가제(food additives)등의 모든 형태를 포함하여, 상기 유형의 식품 조성물은 당업계에 공지된 통상적인 방법에 따라 다양한 형태로 제조할 수 있다.
- [0039] 본 발명은 금은화 가공물 또는 금은화 추출물을 식품 첨가물로 사용할 경우, 그대로 첨가하거나 다른 식품 또는 식품 성분과 함께 사용될 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다. 유효 성분의 혼합량은 사용 목적(예방, 건강 또는 치료적 처치)에 따라 적합하게 결정될 수 있다.
- [0040] 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.
- [0041] 상기 외에 본 발명의 식품 조성물은 여러 가지 영양제, 비타민, 전해질, 풍미제, 착색제, 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알코올, 탄산음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다. 그밖에 천연 과일주스, 과일주스 음료 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다. 이러한 성분은 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있다. 또한, 상기 식품은 공지의 제조방법에 따라 정제, 과립, 분말, 캡셀, 액상의 용액 및 환 등의 제형으로도 제조될 수 있다. 또한, 통상의 여러가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가성분으로서 포함할 수 있다.
- [0042] 또한 구체적으로, 상기 식품 조성물은 건강기능식품일 수 있다.
- [0043] 상기 건강기능식품은 건강기능식품에 관한 법률 제6727호에 따른 인체에 유용한 기능성을 가진 원료나 성분을 사용하여 제조 및 가공한 식품을 말하며, 인체의 구조 및 기능에 대하여 영양소를 조절하거나 생리학적 작용 등과 같은 보건 용도에 유용한 효과를 얻을 목적으로 섭취하는 것을 말한다. 본 발명의 건강기능식품은 통상의 식품 첨가물을 포함할 수 있으며, 식품 첨가물로서의 적합 여부는 다른 규정이 없는 한, 식품의약품안전처에 승인된 식품 첨가물 공전의 총칙 및 일반시험법 등에 따라 해당 품목에 관한 규격 및 기준에 의하여 판정한다.
- [0044] 본 발명의 가공방법에 의해 제조된 금은화 가공물 또는 금은화 추출물을 포함하는 건강기능식품 또는 건강기능음료에 포함하여 사용할 경우, 상기 화합물을 그대로 첨가하거나 다른 식품 또는 식품 성분과 함께 사용하고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용할 수 있다. 또한, 혼합량은 그의 사용 목적(예방, 건강 또는 개선, 치료적 처치)에 따라 적합하게 결정될 수 있다.

발명의 효과

- [0045] 본 발명의 가열 처리 방법을 통해 금은화의 항산화 또는 항비만 활성을 증진시킬 수 있으며, 이에 의해 제조된 금은화 가공물 및 금은화 추출물은 항산화 또는 항비만용 식품 조성물로 활용될 수 있다.
- [0046] 본 발명의 효과는 상기한 효과로 한정되는 것은 아니며, 본 발명의 상세한 설명 또는 청구범위에 기재된 발명의 구성으로부터 추론 가능한 모든 효과를 포함하는 것으로 이해되어야 한다.

도면의 간단한 설명

- [0047] 도 1은 본 발명의 실시예 및 대조군 시료의 페놀산 및 플라보노이드 함량을 RP-HPLC를 통해 분석한 결과로, 구체적으로, (1)은 클로로겐산, (2)는 카페익산, (3)은 4,5-디카페오일퀸산, (4)는 3,5-디카페오일퀸산, (5)는 루틴, (6)은 케르세틴 그리고 (7)은 루테올린이다.
- 도 2는 본 발명의 실시예 및 대조군 시료의 DPPH 라디칼 소거능을 측정한 결과이다.
- 도 3은 본 발명의 실시예 및 대조군 시료의 ABTS 라디칼 소거능을 측정한 결과이다.
- 도 4는 본 발명의 실시예 및 대조군 시료의 FRAP(Ferric reducing antioxidant power)를 측정한 결과이다.
- 도 5는 본 발명의 실시예 및 대조군 시료의 환원력을 측정한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0048] 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명이 하기 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.
- [0049] 금은화의 일반 성분 분석
- [0050] 금은화의 일반 성분은 AOAC 방법에 따라 수분, 조회분, 조지방, 조단백질 함량을 분석하였으며, 탄수화물은 100에서 이들 함량을 뺀 값으로 하였다.
- [0051] 하기 표 1에 나타난 바와 같이, 금은화의 수분함량은 6.06, 조회분 함량은 6.20, 조지방 함량은 3.77, 단백질 함량은 10.35 그리고 탄수화물 함량은 73.62%로 나타났다.

표 1

표본	성분비(%)				
	수분	조회분	조지방	조단백질	탄수화물
금은화	6.06 ± 0.15	6.20 ± 0.10	3.77 ± 0.16	10.35 ± 0.13	73.62 ± 0.11

제조예 1. 금은화 가열처리

- [0053] 금은화 12 g을 4 ℃에서 24 시간 동안 방치 후, 100 ℃ 드라이 오븐에서 시간을 달리하여 가열 처리하였다.
- [0054] 구체적으로, 각각 30, 60, 90, 120 및 150분씩 가열처리하였으며, 순서대로 각각 실시예 1(30분 가열처리), 실시예 2(60분 가열처리), 실시예 3(90분 가열처리), 실시예 4(120분 가열처리) 및 실시예 5(150분 가열처리)로 명명하였다.

실험예 1. 가열 처리한 금은화의 이화학적 특성 분석

1-1. 가열 처리한 금은화의 색도 분석

- [0055] 상기 가열 처리한 금은화의 이화학적 특성을 분석하기 위해 색도를 분석하였으며, 가열 처리하지 않은 금은화를 대조군으로 하였다.
- [0056] 상기 금은화의 색도 분석은 Minolta Chroma Meter CR-400 (Konica Minolta, Tokyo, Japan)을 이용하여 측정하였으며, 결과는 L^* (명도), a^* (적색도), b^* (황색도), ΔE (총색차), H° (색상각) 및 C^* (채도)로 나타내었다.
- [0057] ΔE , H° 및 C^* 는 하기 수식 1 내지 3으로 측정하였다(표 2).

[0061] [수식 1]

$$\Delta E = [(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2]^{0.5}$$

[0063] [수식 2]

$$H^\circ = \tan^{-1} (b^*/a^*)$$

[0065] [수식 3]

$$C^* = [(a^*)^2 + (b^*)^2]^{0.5}$$

표 2

구분	색도					
	L^*	a^*	b^*	ΔE	H°	C^*
대조군	38.62 ± 1.00 ^{a1)}	2.60 ± 0.03 ^f	19.47 ± 0.18 ^c	-	82.43 ± 0.06 ^a	19.64 ± 0.18 ^c
실시예 1	37.09 ± 0.56 ^b	4.04 ± 0.06 ^e	22.35 ± 0.19 ^b	3.59 ± 0.22 ^d	79.80 ± 0.21 ^b	22.72 ± 0.18 ^b
실시예 2	37.07 ± 0.07 ^b	4.58 ± 0.04 ^d	23.18 ± 0.11 ^a	4.49 ± 0.05 ^c	78.86 ± 0.13 ^c	23.63 ± 0.10 ^a
실시예 3	36.57 ± 0.63 ^b	4.97 ± 0.12 ^c	23.04 ± 0.30 ^a	4.78 ± 0.16 ^{bc}	77.88 ± 0.22 ^d	23.56 ± 0.31 ^a
실시예 4	36.79 ± 0.64 ^b	5.16 ± 0.08 ^b	23.34 ± 0.25 ^a	5.02 ± 0.05 ^b	77.57 ± 0.12 ^d	23.91 ± 0.26 ^a
실시예 5	36.09 ± 1.93 ^b	5.48 ± 0.07 ^a	23.35 ± 0.79 ^a	5.71 ± 0.24 ^a	76.82 ± 0.47 ^e	23.98 ± 0.77 ^a
*동일 컬럼 내의 동일 알파벳 문자가 붙은 값은 유의적 차이를 보이지 않음(p<0.05)						

[0068] 표 2를 참조하면, 실시예 1 내지 5의 금은화의 L^* 값은 대조군보다 유의적으로 낮게 나타나 가열 처리시 금은화의 색이 어두워짐을 확인하였다.

[0069] a^* 값은 가열 시간이 증가함에 따라 증가하였는데, 이는 녹색이 감소하고 적색이 증가하였음을 의미한다. 즉, 가열 처리에 의해 녹색을 나타내는 클로로필이 갈색의 페오피틴 및 피로페오피틴으로 전환되어, 결과적으로 a^* 값이 증가한 것으로 볼 수 있다.

[0070] ΔE 는 값이 5가 넘어가면 사람이 눈으로 대조군과 색 차이가 나는 것으로 뚜렷하게 인지할 수 있는데, 실시예 4 및 5에서 ΔE 값은 5이상인 5.02 ± 0.05 및 5.71 ± 0.24로 측정되었다. 따라서, 가열 처리시 90분을 초과하는 경우 색상의 변화가 나타남을 확인하였으며, 가열 처리의 시간에 따라 금은화의 색을 변화시킬 수 있음을 확인하였다. 90분 미만으로 가열 처리할 경우 금은화의 원래의 색을 유지시킬 수 있다.

[0071] 1-2. 가열 처리한 금은화의 총 페놀산(phenolic acid) 및 플라보노이드(flavonoid) 함량 분석

[0072] 상기 가열 처리한 금은화의 이화학적 특성을 분석하기 위해 총 페놀산 및 플라보노이드의 함량을 분석하였다.

[0073] 구체적으로, 상기 금은화의 총 페놀산 함량은 Folin-Ciocalteu 방법을 변형하여 측정하였다.

[0074] 0.1 g의 실시예 및 대조군 시료에 70 % (v/v) 메탄올 10 mL를 가한 후, 1 분간 교반하였다. 이후, 30 분간 소니케이션 후 3,500 rpm에서 20 분간 원심분리하였다. 상등액은 증류수를 이용해 5 배 희석하였고, 0.5 mL 시료액에 1 N Folin 시약 0.5 mL를 가한 후 3 분 뒤 10 % (w/v) Na_2CO_3 용액 1.5 mL를 가하였다. 이후 암실에서 1 시간 보관 후 725 nm에서 흡광도를 측정하였고, 갈산(gallic acid, GAE)을 스탠다드로 사용하였다.

[0075] 또한, 상기 금은화의 총 플라보노이드 함량은 aluminum chloride colorimetric method 방법을 변형하여 측정하

였다.

[0076] 0.1 g의 실시예 및 대조군 시료에 70% (v/v) 메탄올 10 mL을 가한 후, 1분간 교반하였다. 이후, 30분간 소니케이션 후 3,500 rpm에서 20분간 원심분리하였다. 상등액은 70% (v/v) 메탄올을 이용해 5 배 희석하였고, 0.3 mL 시료액에 증류수 0.3 mL 및 5 % (w/v) NaNO₂ 30 uL를 가하였다. 5 분 후, 10 % (w/v) AlCl₃ 60 uL를 가하였고, 5분 후 1 M NaOH 200 uL를 가하였다. 이후 500 nm에서 흡광도를 측정하였고, 루틴(rutin, RE)을 스탠다드로 사용하였다(표 3).

표 3

구분	총 페놀산 함량 (ug GAE/100 mg)	총 플라보노이드 함량 (ug RE/100 mg)
대조군	2013.08 ± 22.86 ^{d3}	4494.79 ± 99.37 ^d
실시예 1	2423.48 ± 66.36 ^b	5501.74 ± 39.44 ^b
실시예 2	2594.18 ± 73.06 ^a	5644.10 ± 57.37 ^a
실시예 3	2581.63 ± 11.21 ^a	5432.29 ± 52.08 ^b
실시예 4	2302.51 ± 79.54 ^c	4994.79 ± 72.92 ^c
실시예 5	2297.13 ± 29.61 ^c	4956.60 ± 53.45 ^c
*동일 컬럼 내의 동일 알파벳 문자가 붙은 값은 유의적 차이를 보이지 않음(p<0.05)		

[0078] 상기 표 3에 나타난 바와 같이, 대조군의 총 페놀 및 총 플라보노이드 함량은 각각 2013.08 ug GAE/100mg, 4494.79 ug RE/100mg으로 나타났다. 반면, 실시예 1 및 2의 총 페놀산 및 플라보노이드 함량은 대조군에 비해 유의적으로 증가하였고, 특히, 실시예 3의 총 페놀산 및 플라보노이드 함량은 최대치를 나타내었다(각각 2594.18 ug GAE/100 mg 및 5644.10 ug RE/100 mg). 상기 결과는 열처리에 의해 세포벽이 파괴되어 세포벽과 결합되어 있던 페놀 물질들이 유리된 상태로 전환됨에 기인한 것이라 할 수 있다.

[0079] 1-3. 가열 처리한 금은화의 RP-HPLC를 이용한 페놀산 및 플라보노이드 함량 분석

[0080] 상기 가열 처리한 금은화의 이화학적 특성을 분석하기 위해 페놀산 및 플라보노이드의 함량을 분석하였다.

[0081] 구체적으로, 0.1 g의 실시예 및 대조군 시료에 70 % (v/v) 메탄올 5 mL를 가한 후, 1분간 볼텍싱하고 30분간 소니케이션 후 3,500 rpm에서 20분간 원심분리하였다. 상등액은 0.45 um membrane filter (Millipore, Ireland)로 필터링하여 준비하였고, Agilent 1200 HPLC system(Agilent Technologies, Palo Alto, USA)를 이용하여 하기 표 4의 조건에서 페놀산 및 플라보노이드의 함량을 분석하였다(도 1 및 표 5). 금은화의 페놀산과 플라보노이드 정량평가를 위한 각각의 물질의 농도 범위는 10-500, 0.1-10, 1-100, 10-250, 1-50, 0.1-5, 및 0.1-10 ug/mL로 설정하였다.

[0082] 페놀산은 클로로젠산(chlorogenic acid), 카페익산(caffeic acid), 4,5-디카페오일퀸산(4,5-dicaffeoylquinic acid) 및 3,5-디카페오일퀸산(3,5-dicaffeoylquinic acid)을, 플라보노이드는 루틴(rutin), 퀘르세틴(quercetin) 및 루테올린(luteolin)을 스탠다드 물질로 사용하였고, 이는 모두 항비만과 연관이 있는 물질로 알려져 있다.

표 4

컬럼	Agilent Eclipse XDB-C ₁₈ Column(250x4.6mm,i.d.,5um)
농도구배	Phosphoric acid (A: 0.2%, v/v) and methanol (B) 0-30 min: 30-60% B.
파장	340 nm
유속	1 mL/min
주입용량	10 uL
온도	25 °C

표 5

구분	페놀산 함량(ug/100 mg)				플라보노이드 함량(ug/100 mg)		
	클로로젠산	카페익산	4,5-디카페오일킨산	3,5-디카페오일킨산	루틴	퀘르세틴	루테올린
대조군	1006.51 ± 7.31 ^{d1)}	1.92 ± 0.12 ^d	13.38 ± 0.43 ^f	648.77 ± 21.31 ^c	36.07 ± 2.51 ^b	6.49 ± 0.34 ^c	0.09 ± 0.02 ^d
실시예 1	1260.71 ± 10.69 ^b	2.64 ± 0.02 ^b	18.92 ± 0.63 ^e	800.18 ± 1.50 ^a	42.12 ± 0.11 ^a	7.26 ± 0.27 ^b	0.15 ± 0.02 ^c
실시예 2	1367.42 ± 1.87 ^a	2.96 ± 0.04 ^a	25.30 ± 0.29 ^d	791.28 ± 1.08 ^a	41.96 ± 1.23 ^a	8.08 ± 0.12 ^a	0.16 ± 0.03 ^{bc}
실시예 3	1389.81 ± 30.15 ^a	2.96 ± 0.05 ^a	30.29 ± 0.26 ^a	740.17 ± 19.66 ^b	40.88 ± 1.10 ^a	8.41 ± 0.20 ^a	0.21 ± 0.02 ^a
실시예 4	1214.81 ± 26.12 ^c	2.40 ± 0.06 ^c	28.50 ± 0.51 ^b	614.33 ± 13.54 ^d	36.52 ± 0.45 ^b	7.10 ± 0.44 ^b	0.20 ± 0.01 ^{ab}
실시예 5	1029.96 ± 11.51 ^d	2.00 ± 0.05 ^d	26.80 ± 0.60 ^c	462.19 ± 8.22 ^e	30.96 ± 0.19 ^c	5.64 ± 0.42 ^d	0.10 ± 0.03 ^d
*동일 컬럼 내의 동일 알파벳 문자가 붙은 값은 유의적 차이를 보이지 않음(p<0.05)							

[0085] 도 1에 나타난 바와 같이, 금은화에는 페놀산(클로로젠산, 카페익산, 4,5-디카페오일킨산 및 3,5-디카페오일킨산) 및 플라보노이드(루틴, 퀘르세틴 및 루테올린)이 포함되어 있음을 확인하였다. 클로로젠산은 금은화의 주요한 물질 중 하나로, 카페익산과 퀴산의 에스테르 결합으로 이루어져 있다.

[0086] 표 5에 나타난 바와 같이, 금은화의 페놀산 물질인 클로로젠산 및 카페익산 함량은 가열시간이 60 분이 될 때까지 유의적으로 증가하다가(실시예 2), 90분까지 일정하였다(실시예 3). 특히, 실시예 2의 경우 대조군의 클로로젠산 함량(1006.51 ug/100 mg)에 비교하여 약 35% 증가하였으며, 가열시간 전체에서 카페익산의 함량이 증가하였다.

[0087] 또한, 금은화의 4,5-디카페오일킨산 함량은 90분 가열 시까지 유의적으로 증가하였으며, 대조군과 비교하여 4,5-디카페오일킨산 함량은 실시예 2는 1.23배, 실시예 3은 2.26배 증가하였다. 금은화의 3,5-디카페오일킨산 함량은 90 분 가열 시까지 유의하게 증가하였다.

[0088] 한편, 금은화의 플라보노이드 물질인 루틴, 퀘르세틴 및 루테올린 함량은 각각 대조군과 비교하여 실시예 1 내지 3에서 유의적으로 증가하였다.

[0089] 상기 결과는 금은화의 가열 처리 시간을 조절함으로써 항비만과 관련있는 클로로젠산, 카페익산, 4,5-디카페오일킨산, 3,5-디카페오일킨산, 루틴, 퀘르세틴 및 루테올린의 함량을 유의적으로 증가시켜 현저하게 우수한 비만 억제용 조성물로 사용될 수 있음을 시사한다.

[0090] 1-4. 가열 처리한 금은화의 HPLC를 이용한 유기산 함량 분석

[0091] 상기 가열 처리한 금은화의 이화학적 특성을 분석하기 위해 유기산의 함량을 분석하였다.

[0092] 구체적으로, 0.1 g의 실시예 및 대조군 시료에 증류수 5 mL를 가한 후, 1분간 볼텍싱하고 30분간 소니케이션 후 3,500 rpm에서 20분간 원심분리하였다. 상등액은 0.45 um 멤브레인 필터(Millipore, Ireland)로 필터링하여 준비하였다. Agilent 1200 HPLC system (Agilent Technologies, Palo Alto, USA)를 이용하여 하기 표 6의 조건에서 유기산의 함량을 분석하였다(표 7).

[0093] 퀴산(quinic acid), 사과산(malic acid), 시킵산(shikimic acid) 및 구연산(citric acid)을 유기산의 스탠다드 물질로 사용하였다.

표 6

컬럼	Zorbax SB-Aq column (150 x 4.6 mm, i.d., 5 μ m)
등용매(isocratic)	200 mM aqueous phosphate buffer (pH 2.0)/acetonitrile (99:1, v/v)
파장	214 nm, ref 360 nm
유속	0.6 mL/min
주입용량	10 μ L
온도	25°C

표 7

구분	유기산 함량(ug/100 mg)			
	퀸산(Quinic acid)	사과산(Malic acid)	시킴산(Shikimic acid)	구연산(Citric acid)
대조군	2488.00 $\pm$ 3.94 ^{d1)}	511.14 $\pm$ 14.98 ^{ab}	15.36 $\pm$ 0.30 ^d	170.42 $\pm$ 9.82 ^f
실시예 1	2562.57 $\pm$ 7.88 ^c	515.22 $\pm$ 7.24 ^a	15.50 $\pm$ 0.11 ^d	231.17 $\pm$ 16.11 ^e
실시예 2	2676.15 $\pm$ 25.77 ^b	479.94 $\pm$ 18.36 ^c	16.08 $\pm$ 0.05 ^c	543.49 $\pm$ 19.61 ^d
실시예 3	2699.41 $\pm$ 22.83 ^b	483.74 $\pm$ 2.84 ^c	16.24 $\pm$ 0.42 ^c	754.47 $\pm$ 13.30 ^c
실시예 4	2704.15 $\pm$ 4.83 ^b	489.41 $\pm$ 12.54 ^{bc}	17.33 $\pm$ 0.17 ^b	855.28 $\pm$ 13.57 ^b
실시예 5	2776.56 $\pm$ 14.57 ^a	478.45 $\pm$ 18.10 ^c	18.06 $\pm$ 0.14 ^a	956.22 $\pm$ 21.63 ^a

*동일 컬럼 내의 동일 알파벳 문자가 붙은 값은 유의적 차이를 보이지 않음(p<0.05)

표 7을 참조하면, 금은화에서 유기산 중 퀸산의 함량이 가장 많았으며, 특히, 가열 처리 시간이 증가할수록 퀸산 및 시킴산의 함량이 유의적으로 증가함을 확인하였다.

실험예 2. 가열 처리한 금은화의 항산화 활성 평가

상기 가열 처리한 금은화의 항산화 활성을 평가하였다.

구체적으로, 실시예 1 내지 5 및 대조군(가열처리 하지 않은 금은화) 시료 0.1 g에 70% (v/v) 메탄올 10 mL를 가하였다. 이후 1분간 볼텍싱한 후 30분간 소니케이션하고 3,500 rpm에서 20분 간 원심분리하였다. 상등액은 70% (v/v) 메탄올로 10배 희석하였으며 이후 각각의 항산화 활성 평가에 이용하였다.

2-1. DPPH 라디칼 소거능 측정

가열 처리한 금은화의 DPPH 라디칼 소거능은 Blois 방법(Blois MS 1958)을 변형하여 측정하였다.

구체적으로, 실시예 1 내지 5 및 대조군 시료 0.2 mL에 200 mM DPPH를 0.6 mL를 가한 후 15분간 암실에서 보관하였다. 이후 517 nm에서 흡광도를 측정하였고, 항산화제인 아스코르브산에 대한 ascorbic acid equivalent antioxidant capacity(AEAC)로 비교 및 산출하였다(도 2).

도 2를 참조하면, 가열 처리한 실시예 1 내지 5의 경우, 대조군과 비교하여 현저하게 우수한 DPPH 라디칼 소거능을 보였으며, 특히, 실시예 2는 대조군과 비교하여 약 26 % 증가된 DPPH 라디칼 소거능을 보였다.

2-2. ABTS 라디칼 소거능 측정

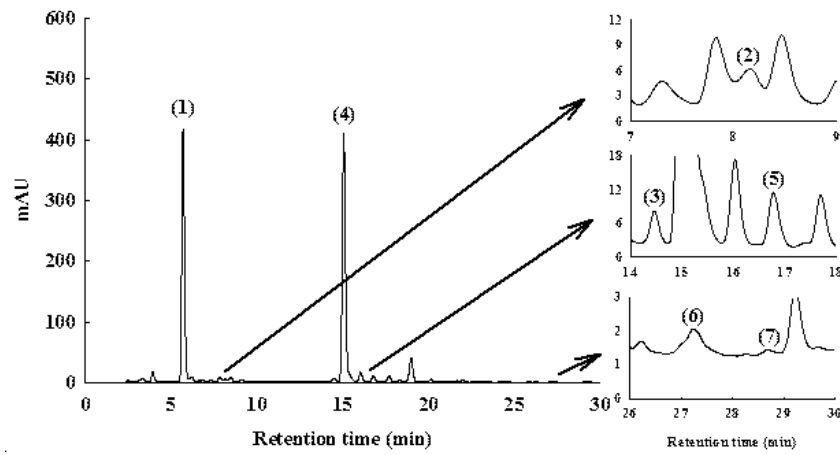
가열 처리한 금은화의 ABTS 라디칼 소거능은 Indian Journal of Geo-Marine Sciences Vol. 42(5), September 2013, pp. 556-564 「Comparison of DPPH and ABTS assays for determining antioxidant potential of water and methanol extracts of *Spirulina platensis*」의 방법을 변형하여 측정하였다.

구체적으로, ABTS⁺ 용액을 만들기 위해, 7 mM ABTS 시약과 2.45 mM potassium persulfate를 1:1 (v/v)로 섞은 후 암실에서 12-16시간 방치하였다. 이후 만들어진 ABTS⁺ 시약을 메탄올로 희석해 734 nm에서의 흡광도 값을 0.700 $\pm$ 0.005로 조정하였다.

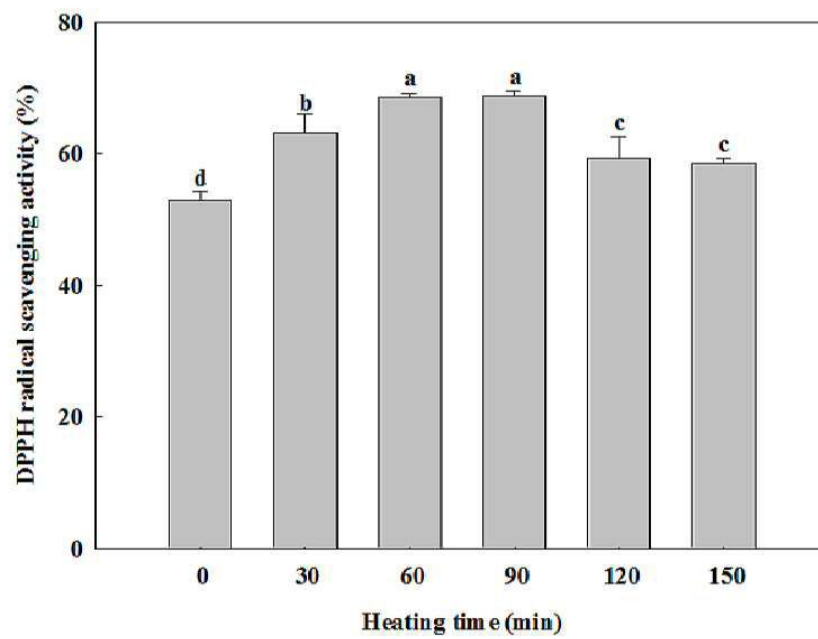
- [0107] 실시예 1 내지 5 및 대조군 시료 0.1 mL에 $ABTS^+$ 0.9 mL를 가한 후, 암실에서 6분간 보관하였다. 734 nm에서 흡광도를 측정하였고 항산화제인 트로록스에 대한 Trolox equivalent antioxidant capacity(TEAC)로 비교 및 산출하였다(도 3).
- [0108] 도 3을 참조하면, 실시예 1 내지 5의 경우 대조군과 비교하여 현저하게 우수한 $ABTS$ 라디칼 소거능을 보였으며, 특히, 실시예 2의 $ABTS$ 라디칼 소거능은 대조군보다 약 35 % 증가하였다.
- [0109] 2-3. FRAP(Ferric reducing antioxidant power) 측정
- [0110] 실시예 1 내지 5 및 대조군의 FRAP(Ferric reducing antioxidant power) 값은 ANALYTICAL BIOCHEMISTRY 239, 70-76 (1996) 「The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of ''Antioxidant Power'': The FRAP Assay」의 방법을 변형하여 측정하였다.
- [0111] 구체적으로, FRAP 시약은 300 mM 소듐 아세테이트버퍼(sodium acetate buffer, pH 3.6)와 40 mM 염산에 녹인 10 mM 2,4,6,-tripyridyl-s-triazine (TPTZ)과 20 mM $FeCl_3$ 를 10 : 1 : 1 (v/v/v)로 섞은 후 37℃에서 가온하여 제조하였다.
- [0112] 실시예 1 내지 5 및 대조군 시료 0.15 mL에 상기 제조한 FRAP 시약 2.85 mL를 가한 후, 37℃의 암실에서 15 분간 보관하였다. 593 nm에서 흡광도를 측정하였고 $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ (0 내지 1 mM)을 스탠다드 물질로 사용하였다(도 4).
- [0113] 도 4를 참조하면, 실시예 1 내지 5의 경우 대조군과 비교하여 FRAP 값이 현저하게 증가하였으며, 특히, 실시예 2의 FRAP 값은 대조군보다 약 31 % 증가하였다.
- [0114] 2-4. 환원력 측정
- [0115] 실시예 1 내지 5 및 대조군의 환원력은 Sanjukta et al. (2015), *Journal of Functional Foods*, 14, 650-658 「Enhancement of antioxidant properties of two soybean varieties of Sikkim Himalayan region by proteolytic *Bacillus subtilis* fermentation」의 방법을 변형하여 측정하였다.
- [0116] 구체적으로, 실시예 1 내지 5 및 대조군의 시료 0.1 mL에 200 mM 인산 버퍼(pH 6.6) 0.9 mL 및 1 % (w/v) 칼륨 시안화제2철(potassium ferric cyanide) 0.9 mL를 가하였다. 이후 10 % (w/v) 트리클로로아세트산(trichloroacetic acid) 0.9 mL를 가하고 3,500 rpm에서 20 분 간 원심분리하였다. 상등액(0.9 mL)를 증류수 0.9 mL와 0.1 % (w/v) $FeCl_3$ 0.9 mL와 섞었고, 700 nm에서 흡광도를 측정하였다. 아스코르브산(0 내지 100 ug/mL)를 스탠다드 물질로 사용하였다(도 5).
- [0117] 도 5를 참조하면, 실시예 1 내지 5의 경우 대조군과 비교하여 우수한 환원력을 보였으며, 특히, 실시예 2의 환원력은 대조군보다 26 % 증가하였다.
- [0118] 상기와 같은 결과는 본 발명의 가열 처리 방법을 이용하여 금은화를 가공함으로써 금은화의 항산화 활성이 증진됨을 확인한 것이다.
- [0119] 전술한 본 발명의 설명은 예시를 위한 것이며, 본 발명이 속하는 기술분야의 통상의 지식을 가진 자는 본 발명의 기술적 사상이나 필수적인 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 쉽게 변형이 가능하다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적이 아닌 것으로 이해해야만 한다. 예를 들어, 단일형으로 설명되어 있는 각 구성요소는 분산되어 실시될 수도 있으며, 마찬가지로 분산된 것으로 설명되어 있는 구성요소들도 결합된 형태로 실시될 수 있다.
- [0120] 본 발명의 범위는 후술하는 청구범위에 의하여 나타내어지며, 청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 균등 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

도면

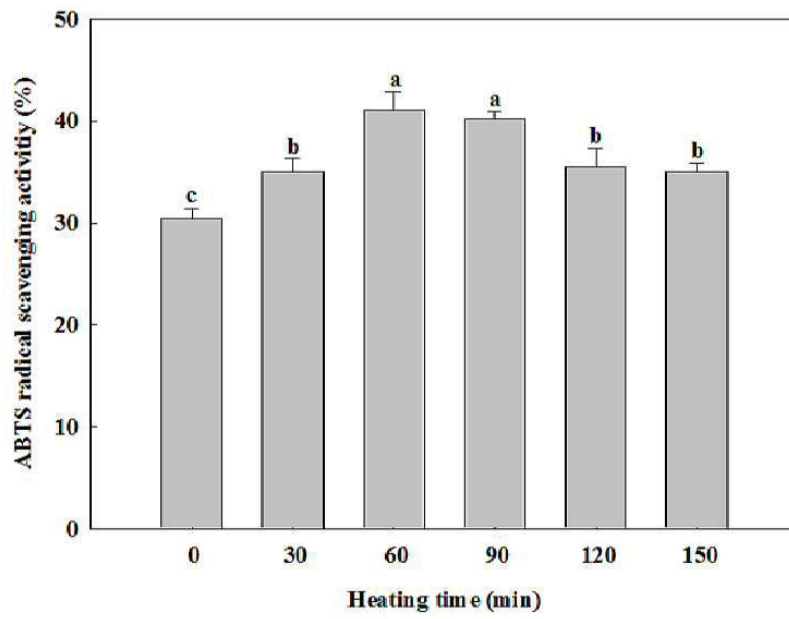
도면1



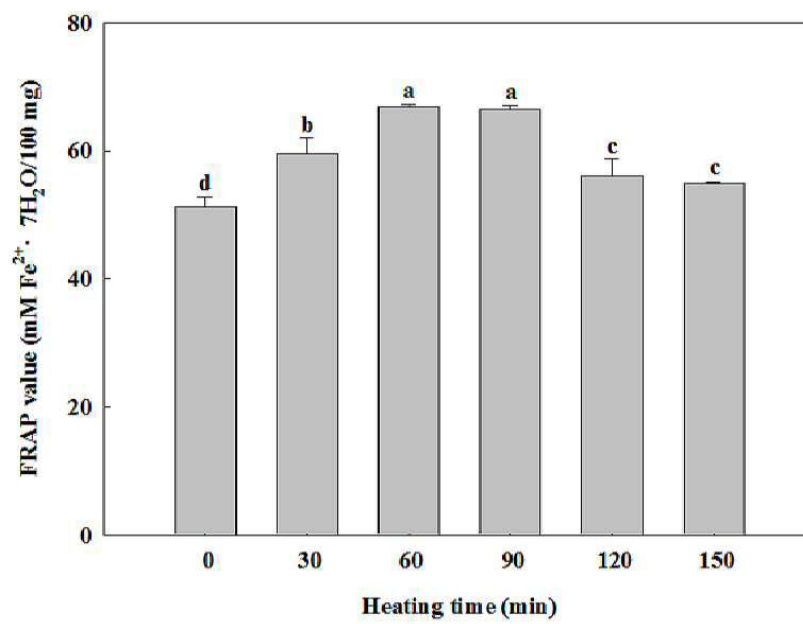
도면2



도면3



도면4



도면5

