

(72) 발명자

유미희

대구 달성군 다사읍 죽곡1길 42, 103동 1810호 (대
실역e편한세상아파트)

김민주

대구 달서구 계대동문로3안길 13-13, 2층 (신당동)

최준혁

대구 남구 대명로47길 43-17, 501호 (대명동, 나원
하이츠)

박윤희

대구 남구 대덕북길 72, (대명동)

김형대

대구 달성군 가창면 혈티로 204,

권승혁

대구 북구 칠곡중앙대로52길 20, 4동 1306호 (태전
동, 삼성아파트)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2012-0335

부처명 교육과학기술부

연구사업명 산학 협력 선도대학 육성사업-연구과제

연구과제명 미나리 발효 식초의 기능성 규명 연구

기 여 율 1/1

주관기관 계명대학교 산학협력단

연구기간 2012.07.01 ~ 2013.01.31

특허청구의 범위

청구항 1

미나리 발효초 20 내지 30 중량%, 감농축액 1 내지 7 중량%, 미배아대두발효추출액 0.2 내지 1.0 중량%, 당류 40 내지 60 중량% 및 잔량의 정제수를 포함하며,

상기 미나리 발효초는 미나리를 수세하여 준비하는 단계, 세척 및 살균된 용기에 상기 미나리와 침출제로서의 흑설탕(brown sugar) 또는 올리고당을 1:5 ~ 5:1의 중량 비율로 혼합하여 넣는 단계, 15~25℃에서 10~14개월 동안 자연발효시켜 미나리 발효액을 제조하는 단계, 상기 미나리 발효액에 효모를 접종하여 알콜발효시키는 단계, 상기 알콜발효된 미나리 발효액에 초산균을 접종하여 초산발효시키는 단계 및 상기 초산발효된 미나리 발효액을 여과하고 살균하는 단계를 통해 제조된 것을 특징으로 하는 미나리 발효초를 이용한 기능성 건강음료.

청구항 2

청구항 1에 있어서, 상기 당류는 액상과당, 이소말토올리고당, 벌꿀 및 폴리텍스트로스로 이루어진 군에서 선택된 것을 특징으로 하는 음용식초.

청구항 3

청구항 2에 있어서, 상기 기능성 건강음료는 비타민류, 유기산 및 향료로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 또는 둘 이상의 성분을 더 포함하는 것을 특징으로 하는 미나리 발효초를 이용한 기능성 건강음료.

청구항 4

청구항 3에 있어서, 상기 기능성 건강음료는 미나리 발효초 22 중량%, 감농축액 2 중량%, 미배아대두발효추출액 0.5 중량%, 액상과당 40 중량%, 이소말토올리고당 5 중량%, 폴리텍스트로스 0.5 중량%, 비타민C 0.15 중량%, 니코틴산아미드 0.03 중량%, 무수구연산 0.5 중량%, 드링크 후레바 0.13 중량% 및 잔량의 정제수를 포함하는 것을 특징으로 하는 미나리 발효초를 이용한 기능성 건강음료.

청구항 5

청구항 1 내지 청구항 4 중 어느 한 항에 있어서, 상기 기능성 건강음료는 항노화 활성을 갖는 것을 특징으로 하는 미나리 발효초를 이용한 기능성 건강음료.

청구항 6

청구항 5에 있어서, 상기 기능성 건강음료는 신경세포 손상으로 인한 기억력 감퇴를 예방하거나 개선하는 것을 특징으로 하는 미나리 발효초를 이용한 기능성 건강음료.

명세서

기술 분야

[0001] 본 발명은 노화의 진행과 함께 증가하는 염증성 질환, 신경세포 손상으로 인한 기억력 감퇴 등의 노인성 질환을 예방할 수 있는 미나리 발효초를 이용한 기능성 건강음료에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 식초는 초산 함량이 4~29%로 식용 가능한 초산으로 동서양을 막론하고 오래전부터 제조되어 온 발효식품이다. 식초는 크게 합성식초와 양조식초로 나눌 수 있는데, 합성 식초는 식용 빙초산을 물에 희석하여 제조한 것이며, 양조식초는 곡물이나 과일을 초산 발효시켜 생산한 것이다.

[0003] 식초는 음식을 조리할 때 신맛을 내게 하는 조미료로 주로 사용되지만, 그 외에도 생선의 비린 냄새를 감소시키고, 안토시아닌계 색소를 더욱 선명하게 하고, 육류를 연하게 하는 등 매우 다양한 용도로 사용되고 있다.

[0004] 또한, 식초는 TCA 회로에 관여하여 젖산의 분해를 촉진시켜 과격한 운동에 의한 피로회복에 좋고, 동맥경화 및

고혈압 예방 등 인체의 생리조절에도 유용한 것으로 알려져 있다.

[0005] 1970년대 국내 식초 시장은 빙초산을 원료로 한 합성식초가 주를 이루고 있었으며, 그 후 30년간은 큰 발전이 없었다. 그러나 최근, 발효 조미료로만 생각했던 식초 국내 시장은 최근 건강에 대한 관심의 증대와 다이어트 및 피부 관리에도 효능이 있다고 알려지면서 소비자들의 관심이 모아져, 2005년부터 다양한 종류의 식초가 봇물처럼 나오면서 식초 시장이 2배 이상 성장하면서 판세가 바뀌었다. 식초가 대중화된 일본은 국민 1인당 연간 섭취량이 4 ℓ에 이르며, 우리나라는 1인당 식초 섭취량은 평균 0.9 ℓ 수준이지만, 최근 꾸준히 증가하고 있는 추세이다. 이에 따라 각 업체에서는 감식초, 석류, 홍삼 등 다양한 원료를 이용한 마시는 식초 음료를 시장에 선보이기 시작했다.

[0006] 따라서 단순히 조미료 용도로 사용되었던 식초는 앞으로 식초 음료, 스낵제품 등에 기능성 소재로 활용 가능한 분말 식초, 초산균이 생성하는 셀룰로오스(cellulose) 소재(다이어트 기능, 인공피부소재, 스키퍼 소재 등), 제과 및 제빵, 칼슘 추출 및 분리, 목재의 착색 등의 용도로 개발하고 있어, 앞으로 식초 산업은 광범위하게 활용될 수 있는 발전 가능한 잠재력이 있는 산업으로 기대하고 있다.

[0007] 미나리(*Oenanthe stolonifera* DC, Dropwort)는 산형과에 속하는 다년초이며, 물이 충분하게 공급될 수 있는 습지에서 자생하며 농가에서는 특용작물로 재배되고 있다. 미나리는 식품 영양학적으로 볼 때 플라보노이드, 비타민, 칼륨, 칼슘 및 철분을 함유하는 대표적인 알칼리식품이다.

[0008] 미나리는 수분 95%, 조단백질 2%, 조지질 0.3%, 조회분 0.7%의 일반성분을 포함하고 있으며, 독특한 향기 성분인 정유, 미리스티신 등을 함유한다. 한방에서는 해열, 이뇨, 황달, 고혈압의 치료에 이용하거나 음주후의 해독을 위해서 조제에 첨가하는 것으로 알려져 있다. 재배방법에 따라서는 논에서 재배되는 미나리에 비하여 밭에서 재배되는 미나리에서 더 높은 활성이 나타난다고 보고되기도 하였다. 미나리는 주로 채소와 녹즙으로 이용되는 데 이 경우 저장성이 문제되므로 장기저장을 위하여 발효가공품으로 이용되기도 한다.

[0009] 한편, 한국공개특허 제2011-0045294호에는 쌀, 찹쌀, 밀가루의 혼합으로 조성된 고두밥에 미나리 및 미나리 추출물을 첨가한 후 발효와 숙성과정을 거쳐 이루어진 것을 특징으로 하는 미나리 추출물을 이용한 식초를 개시하고 있으나, 자연발효액을 이용한 미나리 발효초 및 이를 이용한 음용식초에 대한 개시나 암시는 전혀 없다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0010] 이에, 본 발명에서는 미나리 발효초를 이용하여 항노화 활성을 갖는 음료를 개발함으로써 본 발명을 완성하였다.

[0011] 본 발명의 목적은 미나리 발효초, 감농축액 및 미배아대두발효추출물을 포함하는 기능성 건강음료를 제공하는 데에 있다.

과제의 해결 수단

[0012] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 미나리 발효초 20 내지 30 중량%, 감농축액 1 내지 7 중량%, 미배아대두발효추출액 0.2 내지 1.0 중량%, 당류 40 내지 60 중량% 및 잔량의 정제수를 포함하며, 상기 미나리 발효초는 미나리를 수세하여 준비하는 단계, 세척 및 살균된 용기에 상기 미나리와 침출제로서의 흑설탕(brown sugar) 또는 올리고당을 1:5 ~ 5:1의 중량 비율로 혼합하여 넣는 단계, 15~25℃에서 10~14개월 동안 자연발효시켜 미나리 발효액을 제조하는 단계, 상기 미나리 발효액에 효모를 접종하여 알콜발효시키는 단계, 상기 알콜발효된 미나리 발효액에 초산균을 접종하여 초산발효시키는 단계 및 상기 초산발효된 미나리 발효액을 여과하고 살균하는 단계를 통해 제조된 것을 특징으로 하는 미나리 발효초를 이용한 기능성 건강음료를 제공한다.

[0013] 상기 당류는 액상과당, 이소말토올리고당, 벌꿀 및 폴리덱스트로스로 이루어진 군에서 선택될 수 있다.

[0014] 상기 기능성 건강음료는 비타민류, 유기산 및 향료로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 또는 둘 이상의 성분을 더 포함할 수 있다.

[0015] 상기 기능성 건강음료는 미나리 발효초 22 중량%, 감농축액 2 중량%, 미배아대두발효추출액 0.5 중량%, 액상과당 40 중량%, 이소말토올리고당 5 중량%, 폴리덱스트로스 0.5 중량%, 비타민C 0.15 중량%, 니코틴산아미드 0.03 중량%, 무수구연산 0.5 중량%, 드링크 후레바 0.13 중량% 및 잔량의 정제수를 포함할 수 있다.

[0016] 본 발명에 따른 기능성 건강음료는 항노화 활성을 가지며, 특히 신경세포 손상으로 인한 기억력 감퇴를 예방하거나 개선할 수 있다.

발명의 효과

[0017] 본 발명에 따른 음료는 미나리 발효초, 감농축액 및 미배아대두발효추출물을 포함하므로, 산화적 손상으로부터 신경세포를 보호하는 효과가 높을 뿐 아니라, 노화의 진행과 함께 증가하는 염증성 질환을 개선할 수 있어 노인성 질환을 예방하거나 개선할 수 있으므로, 기능성 건강음료로 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0018] 도 1은 미나리 발효초를 이용한 음용식초의 제조공정을 나타낸 모식도이다.
 도 2는 미나리 발효액(FDE) 및 미나리 발효초(FDV)의 신경아교세포 C6에 대한 세포 독성을 검토한 것이고,
 도 3은 t-BHP에 의한 산화적 손상에 대한 미나리 발효액 및 미나리 발효초의 보호 효과를 나타낸 것이고,
 도 4는 H₂O₂에 의한 산화적 손상에 대한 미나리 발효액 및 미나리 발효초의 보호 효과를 나타낸 것이고,
 도 5는 미나리 발효초의 RAW 264.7 세포에 대한 세포 독성을 검토한 것이고,
 도 6은 미나리 발효초의 LPS 처리한 RAW 264.7세포의 NO 생성 억제 효과를 나타낸 것이고,
 도 7은 RAW 264.7 세포의 LPS 처리로 인한 iNOS 발현에 대한 미나리 발효초의 억제 효과를 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0019] 이하, 본 발명을 보다 상세하게 설명한다.

[0020] 먼저, 본 발명은 미나리 발효초 20 내지 30 중량%, 감농축액 1 내지 7 중량%, 미배아대두발효추출액 0.2 내지 1.0 중량%, 당류 40 내지 60 중량% 및 잔량의 정제수를 포함하는 미나리 발효초를 이용한 기능성 건강음료를 제공한다.

[0021] 상기 미나리 발효초는 미나리를 수세하여 준비하는 단계, 세척 및 살균된 용기에 상기 미나리와 침출제로서의 흑설탕(brown sugar) 또는 올리고당을 1:5 ~ 5:1의 중량 비율로 혼합하여 넣는 단계, 15~25℃에서 10~14개월 동안 자연발효시켜 미나리 발효액을 제조하는 단계, 상기 미나리 발효액에 효모를 접종하여 알콜발효시키는 단계, 상기 알콜발효된 미나리 발효액에 초산균을 접종하여 초산발효시키는 단계 및 상기 초산발효된 미나리 발효액을 여과하고 살균하는 단계를 통해 제조될 수 있다.

[0022] 본 발명에서 사용되는 미나리는 종류에 관계없이 사용가능하지만, 돌미나리를 사용하는 것이 보다 바람직하다. 침출제로서 흑설탕이나 올리고당을 사용하여 발효 및 숙성시키는 경우에 미나리 발효액의 색, 향, 맛, 점도와 같은 관능적 특성이 우수하다.

[0023] 상기 자연발효를 10개월 미만으로 발효시키는 경우에 상기 활성성분의 용출 및 강화가 충분히 이루어지지 않는 문제가 있는 반면, 14개월을 초과하여 발효시키는 경우 미나리가 물러지며 풍미가 떨어지고 추출액의 수율이 감소하는 문제가 야기될 수 있다.

[0024] 상기 자연발효된 미나리 발효액을 4~6℃의 온도에서 10~26개월 냉장보관하면서 숙성시키는 단계를 더 포함할 수 있다. 이와 같이 침출액인 미나리 발효액만을 따로 냉장보관하는 것은, 미나리 고형물과 함께 상온에서 계속 숙성시키는 경우에 발효액이 다시 미나리 고형물(박)에 흡수되어 추출 수율이 감소하고 미나리 박이 물러지며 맛, 풍미, 영양이 감소하는 문제가 야기될 수 있기 때문이다. 상기 숙성과정을 통하여 환원당 함량이 증가하여 맛이나 점도와 같은 관능적 기호도가 증가하였다. 또한 상기 숙성과정을 통하여 발효액의 색과 맛이 부드럽게 되고 점도가 줄어서 상품으로서의 선호도가 증가되는 장점이 있다.

[0025] 상기 숙성을 10개월 미만으로 숙성시키는 경우에는 미나리 발효액의 풍미가 부족한 문제가 야기되는 반면, 26개월을 초과하여 숙성시키는 경우에는 기능성 활성성분이 감소하는 문제가 야기될 수 있다.

[0026] 상기 알콜발효는 효모(*S. cerevisiae*, KCTC 18224P)를 3 ~ 5 중량%를 접종하여 발효온도 30 ~ 35℃ 및 발효시간 3 ~ 7일 동안 발효시킬 수 있다. 이때, 상기 발효 조건을 벗어나 알콜발효를 수행하게 되면 알콜 생성이 잘 안 되는 문제가 야기될 수 있다.

- [0027] 상기 초산발효는 초산균(*Gluconobacter* sp. KSH-B1, KCTC 18223P)을 5 ~ 10 중량%를 접종하여 발효온도 30 ~ 35℃ 및 발효시간 3 ~ 6일 동안 발효시킬 수 있다. 이때, 상기 발효 조건을 벗어나 초산발효를 수행하게 되면 발효가 잘 안되어 산도가 충분히 올라가지 않는 문제가 야기될 수 있다.
- [0028] 상기 미나리 발효초는 NO 생성 억제 및 iNOS 발현 억제를 통한 항염증 효과와, 신경세포를 산화적 손상으로부터 보호하는 신경보호 효과가 높게 나타나 노화의 진행과 함께 증가하는 염증성 질환, 신경세포 손상으로 인한 기억력 감퇴 등의 노인성 질환을 예방하는 소재로 사용될 수 있다.
- [0029] 본 발명의 음료에서 상기 미나리 발효초의 함량이 상기 함량 범위를 벗어나면 위경련 등의 위장장애가 야기될 수 있다.
- [0030] 상기 감농축액은 미숙과인 6월부터 시작하여 완숙과가 되는 10월 사이의 감을 채취하여 부위별로 과육, 꼭지 및 잎으로 나누어 파쇄한 다음, 각각 100g에 증류수 1ℓ를 가하여 실온에서 24시간 동안 추출하여 제조할 수 있으며, 고혈압 증상을 완화하고 간 기능을 개선할 수 있다.
- [0031] 상기 미배아대두발효추출액(GMT-ALC)은 미배아와 대두를 주원료로 하며 낫도균을 이용하여 발효하여 제조된 추출액으로서, 감마 아미노뷰티르산(γ -Aminobutyric acid, GABA)을 많이 함유하고 있어 뇌기능을 개선하고 기억력을 향상시킬 수 있다.
- [0032] 상기 당류는 액상과당, 이소말토올리고당, 벌꿀 및 폴리텍스트로스로 이루어진 군에서 선택될 수 있다.
- [0033] 상기 기능성 건강음료는 비타민C 또는 니코틴산아미드 중에서 선택된 비타민류, 구연산과 같은 유기산 및 드링크 후레바와 같은 향료로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 또는 둘 이상의 성분을 더 포함할 수 있다.
- [0034] 상기 기능성 건강음료는 미나리 발효초 22 중량%, 감농축액 2 중량%, 미배아대두발효추출액 0.5 중량%, 액상과당 40 중량%, 이소말토올리고당 5 중량%, 폴리텍스트로스 0.5 중량%, 비타민C 0.15 중량%, 니코틴산아미드 0.03 중량%, 무수구연산 0.5 중량%, 드링크 후레바 0.13 중량% 및 잔량의 정제수를 포함할 수 있다.
- [0035] 본 발명에 따른 기능성 건강음료는 항염증 및 항노화 활성을 가지며, 특히 신경세포 손상으로 인한 기억력 감퇴를 예방하거나 개선할 수 있다.
- [0036] 이하, 하기의 실시예와 실험예들을 통하여 본 발명을 보다 상세하게 설명하지만, 이러한 실시예와 실험예들에 의하여 본 발명이 한정되는 것은 아니다.
- [0037] **실시예 1: 미나리 발효초의 제조**
- [0038] 대구 비슬산 가창면 정대리에서 수확한 청정미나리를 깨끗이 수세한 후 세척 및 살균된 용기에 넣고 침출제로서의 흑설탕(brown sugar)을 1:1의 중량 비율로 혼합하여 넣었다. 당에 절여진 미나리를 상온(15~25℃)에서 1년간 방치하면서 원료 중의 유용성분이 삼투압에 의하여 용출되고 동시에 자연발효가 일어나도록 하여 미나리발효액을 제조하였다. 이 미나리발효액만을 저장용기에 옮겨 4℃ 냉장실에서 냉장보관하면서 2년간 더 숙성시켜 미나리 발효액을 제조하였다.
- [0039] 상기 제조된 미나리발효액을 이용하여 도 1과 같이 미나리 발효초를 제조하였다. 즉, 상기 미나리 발효액(52° brix)을 정제수를 이용하여 실온에서 12° brix으로 희석한 후, 효모(*Saccharomyces cerevisiae* KSH-Y1, KCTC 18224P)를 접종하여 알콜발효를 수행하고, 초산균(*Gluconobacter* sp. KSH-B1, KCTC 18223P)을 접종하여 초산발효를 수행하였다. 이때, 총산은 초산으로서 5 내지 6 중량%가 되도록 하였다. 그 후 상기 발효 혼합물로부터 침전물을 제거하는 1차 여과를 통해 상등액을 취한 후, 다시 규조토여과(#200, #500)를 통해 2차 여과를 수행하였다. 2회의 여과 후 얻어진 상등액을 90℃에서 40초 동안 순간살균한 후 냉각시키며, 1.0 마이크로 필터를 이용하여 3차 여과를 수행하여 미나리발효초를 제조하였다.
- [0040] **실시예 2: 미나리 발효초를 이용한 음료의 제조**
- [0041] 실시예 1에서 제조한 미나리 발효초를 이용하여 하기 표 1과 같은 조성으로 음료를 제조하였다. 즉, 미나리 발효초를 22 중량%, 감농축액 2 중량%, 미배아대두발효추출물 0.5 중량%를 포함하는 음료를 제조하였다. 상기 감농축액과 미배아대두발효추출물은 청도 감사업단으로부터 구매하여 사용하였다.
- [0042] 이때, 제조된 음료의 당도는 41.11° brix, pH는 2.44, 산도(유기산 적용, pH 8.3적정)는 1.70, 비중은 1.1806이었다.

표 1

NO	원료명	배합비율(w/w,%)	사용량(kg)
1	액상과당	40.000	400.000
2	미나리식초(산도5%이상)	22.000	220.000
3	이소말토올리고당	5.000	50.000
4	감농축액	2.000	20.000
5	미배아대두 발효 추출액	0.500	5.000
6	폴리텍스트로스	4.000	40.000
8	비타민-C	0.150	1.500
9	니코틴산아미드	0.030	0.300
10	무수구연산	0.500	5.000
11	드링크 후레바	0.130	1.300
12	정제수	25.690	256.900
합계		100.000	1000.00

실험예 1: 신경아교세포 C6 배양 및 t-BHP의 처리에 의한 세포 생존율 측정

본 실험에 사용된 흰쥐 신경아교세포 C6(astrogloma cells)는 한국세포주은행(KCLB, Seoul, Korea)에서 구입하였으며, 10% FBS 및 1% 페니실린 및 스트렙토마이신이 포함된 DMEM(dulbecco's modified eagle medium) 배지(Gibco-BRL, Rockville, MD, USA)를 사용하여 37℃, 5% CO₂ 조건 하에서 배양하였다.

터트-부틸하이드로퍼옥사이드(t-BHP)에 의한 산화적 손상에 대한 보호 효과를 알아보기 위하여, C6 세포를 96well plate에 5 x 10⁴/well로 분주하고, 37℃, 5% CO₂ 배양기에서 16~24 시간 동안 배양한 후, 농도별로 희석한 시료를 세포에 전처리하여 2~16시간 동안 배양하였다. 그 후 t-BHP(1mM, 2hr)를 처리하고 이에 의해 유도된 C6 세포에 대한 세포독성을 MTT 에세이를 통해 측정하였다.

시료 및 손상 유도된 세포에 MTT 스타크 용액(5mg/mL, 10 μL/well)을 처리하여 37℃에서 4시간 배양시킨 후, DMSO 100 μL로 반응을 종결시켰다. 배양 종료 후 상등액을 제거하고 각 well에 100 μL의 DMSO를 첨가하여 생성된 formazan 결정을 용해시켜 마이크로플레이트 리더(microplate reader)로 550 nm에서 흡광도를 측정하였고, 세포독성은 시료의 흡광도를 대조군의 흡광도에 대한 백분율로 나타내었다.

그 결과, 도 2와 같이 미나리 발효액과 미나리 발효초 모두 세포 독성은 나타나지 않았으며, 도 3과 같이 시료 농도가 증가함에 따라 t-BHP에 의한 산화적 손상에 대한 보호 효과가 증가함을 알 수 있다. 시료 농도 1mg/mL에서 약 40%의 보호 효과가 나타났다.

실험예 2: 신경아교세포 C6 배양 및 H₂O₂의 처리에 의한 세포 생존율 측정

신경아교세포 C6을 96 well plate에 5 x 10⁴/well로 분주하고, 37℃, 5% CO₂ 배양기에서 16~24 시간 동안 배양한 후, 농도별로 희석한 시료를 세포에 전처리하여 2~16 시간 동안 배양하였다. 그 후 H₂O₂(2mM)를 30분 처리하고 이에 의해 유도된 C6 세포에 대한 세포독성을 MTT 에세이를 실시하여 측정하였다.

그 결과, 도 4와 같이 2mM 과산화수소 30분 처리로 인해 세포 생존율이 약 30%로 감소하였으며, 0.1mg/mL 시료 전처리로 약 60%로 증가하여 손상에 대한 보호 효과를 확인하였다.

실험예 3: RAW 264.7 세포배양 및 세포 독성 측정

대식세포 계열(murine macrophage cell line)인 RAW 264.7 세포를 한국 세포주 은행(KCLB, Seoul, Korea)으로부터 분양 받았으며, 10% FBS(fetal bovine serum)와 1% 항생제(penicillin/streptomycin)를 첨가한 DMEM 배지를 이용하여 5% CO₂가 존재하는 37℃ 배양기에서 1주일에 2~3회 계대 배양하였다.

세포 독성을 MTT 법으로 측정하기 위하여, RAW 264.7 세포 1 x 10⁵ cells/well을 96 well plate에 분주하고, 37℃, 5% CO₂인큐베이터에서 24시간 동안 배양하였다. 배양한 세포를 혈청 프리(serum free) 배지로 교체한 후 LPS(100 ng/mL)와 시료를 각각 처리하여 24시간 배양하여 5 mg/mL의 MTT 용액 10 μL를 각 well에 넣고 인큐베이터에서 4시간 동안 배양하였다. 배양 종료 후 상등액을 제거하고 각 well에 100 μL의 DMSO를 첨가하여 생성

된 formazan 결정을 용해시켜 마이크로 플레이트 리더(microplate reader)로 550 nm에서 흡광도를 측정하였고, 세포독성은 시료의 흡광도를 대조군의 흡광도에 대한 백분율로 나타내었다.

[0055] 그 결과, 도 5와 같이 0.01~1 mg/mL의 농도 범위에서 대식세포주 RAW 264.7 cell에 대한 유의적인 세포 독성은 나타나지 않았다.

[0056] 실험예 4: NO(Nitric Oxide) 생성량 측정

[0057] 시료의 NO(Nitric Oxide) 생성 억제능을 측정하기 위하여, 시료 또는 LPS를 처리한 상기 RAW 264.7 세포주 배양액에서의 나이트라이트(nitrite) 측정을 위해 100 μ L를 96 well plate에 취하였다. 여기에 동량의 Griess 시약을 넣어 10분간 반응시킨 후 마이크로플레이트 리더(microplate reader)를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. Nitrite의 농도는 질산나트륨(NaNO_2)을 사용하여 얻은 표준 직선과 비교하여 산출하였다.

[0058] 그 결과, 그림 6과 같이 농도 의존적으로 NO 생성 억제 효과를 나타내었으며, 1 mg/mL에서 약 80%의 억제능을 확인하였다.

[0059] 실험예 5: 단백질 분석을 통한 iNOS 발현 측정

[0060] RAW 264.7 세포를 5×10^4 cell/well로 6 well plate에 분주하고 2~4시간 동안 부착되도록 기다린 후 글루코오스 5 mM 및 25 mM이 첨가된 DMEM으로 16시간 동안 배양한 후 2시간 동안 글루코사민을 전처리한 후 LPS로 자극하였다. 그 후 24시간 동안 배양한 후 1 X PBS로 2회 세척 후 제거하고 lysis buffer (150 mM NaCl, 50 mM Tris, 0.5% NP-40, protease inhibitors, pH 8.0)로 회수하여 table-top 초원심분리기(Eppendorf, centrifuge 5415R)로 4°C에서 13,000 rpm으로 15분 동안 원심분리 하여 세포 파편을 제거한 상층액을 실험에 사용하였다.

[0061] 단백질 정량은 Bradford (Bio-Rad, Richmond, CA, USA)를 3차 증류수로 5배 희석하여 상층액 1 μ L와 반응시킨 후 595 nm에서 마이크로 플레이트 리더(microplate reader)로 측정하였다. 정제된 BSA를 0~10 mg/mL로 희석하여 단백질 표준 정량 곡선을 만들었다. 세포로부터 추출한 단백질 (각각 20~40 μ g)을 5 X 시료 완충액과 섞고, 100°C에서 5분간 가열한 후 10% SDS-PAGE 방법으로 분리하였다. 겔 상에서 분리된 단백질들은 니트로셀룰로오즈 멤브레인(Hybond ECL membrane, Amersham biosciences, Piscataway, NJ, USA)에 전이시켰다. 단백질이 이동된 멤브레인은 fast green solution으로 전이 유무를 확인한 후, 5% 탈지유 용액으로 블로킹 하였다. 4°C에서 일차 항체의 발현 정도를 검토하기 위하여 TST 용액에 1:1000으로 희석하여 24시간 반응시킨 후 TST로 3회 세척하였다. 계속하여 이차항체를 2시간 반응시키고 다시 TST로 3회 세척하였다. 증류수로 세척하고 멤브레인에 ECL 검출 키트의 발색시약 I 과 II를 1:1로 섞은 후에 혼합액을 도포하고, X선 필름에 노출하여 현상한 후 필름 상의 밴드 농도를 관찰하였다.

[0062] 앞서 LPS로 자극받은 Raw 264.7 세포에서 생성되는 NO의 양이 미나리 발효초 전처리로 억제되는 것을 알 수 있었는데, 미나리 발효초가 NO를 생성하는 효소인 iNOS의 단백질의 양에도 변화를 주는지 여부를 웨스턴 블롯으로 분석한 결과, 도 7과 같이 LPS 처리로 증가한 iNOS 발현이 시료 처리에 의해 농도 의존적으로 감소하는 결과를 보여 NO 생성 억제능과 일치하는 결과를 나타내었다.

[0063] 이러한 결과로부터, 미나리 발효초는 항염증 및 신경세포를 산화적 손상으로부터 보호하는 효과가 높게 나타나 노화의 진행과 함께 증가하는 염증성 질환, 신경세포 손상으로 인한 기억력 감퇴 등의 노인성 질환을 예방하는 소재로 활용될 수 있을 것으로 사료된다.

[0064] 이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 실시양태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

수탁번호

[0065]

기탁기관명 : 한국생명공학연구원

수탁번호 : KCTC18223P

수탁일자 : 20110915

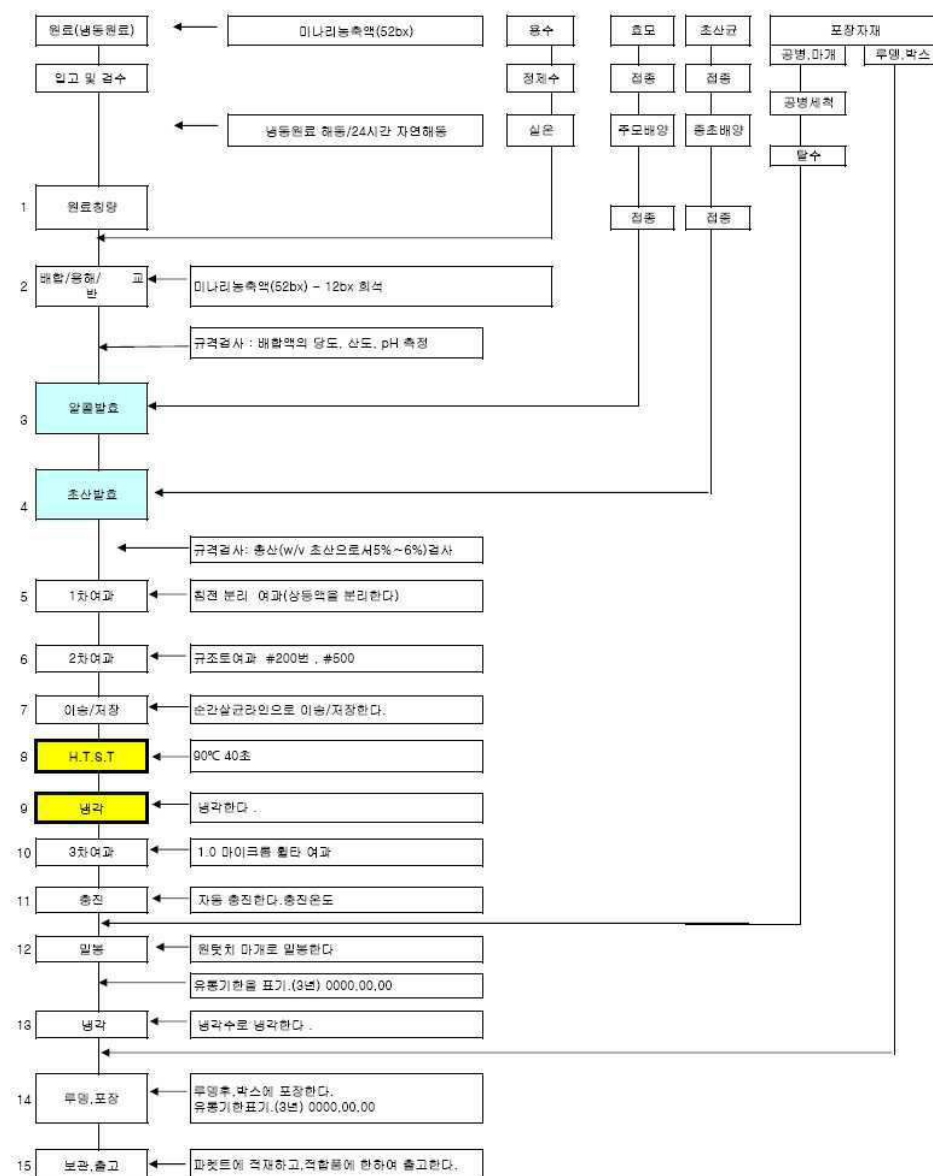
기탁기관명 : 한국생명공학연구원

수탁번호 : KCTC18224P

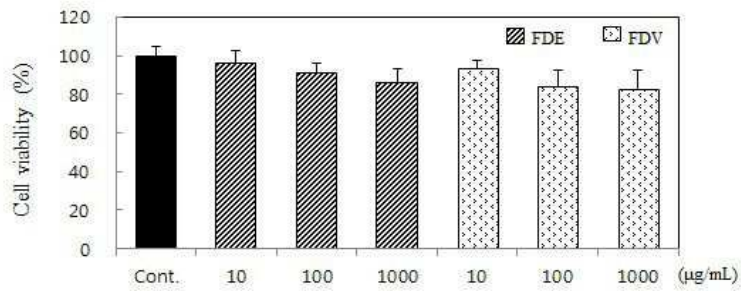
수탁일자 : 20110915

도면

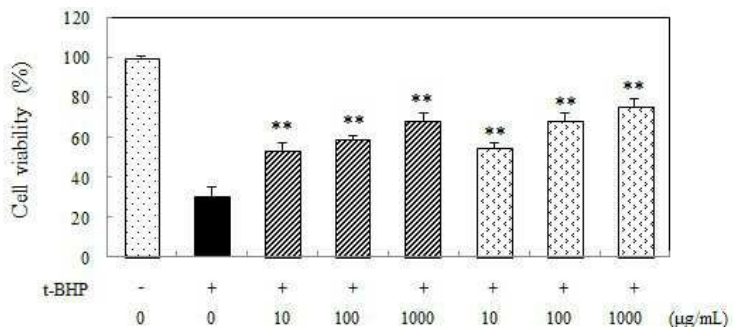
도면1



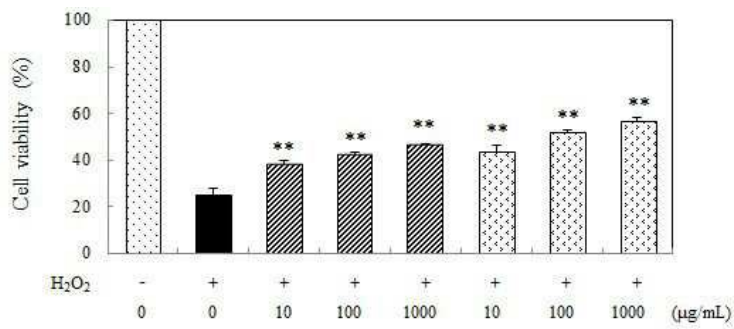
도면2



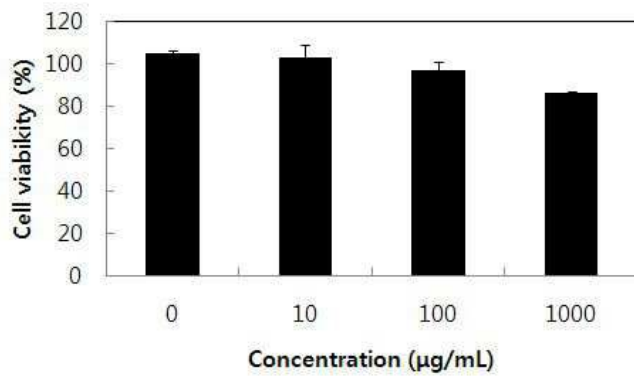
도면3



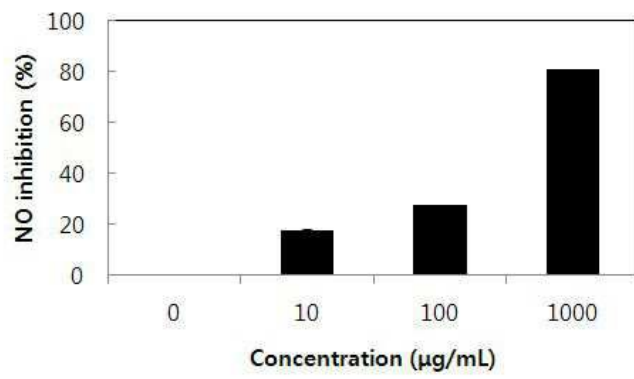
도면4



도면5



도면6



도면7

