



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2011년03월03일  
(11) 등록번호 10-1017594  
(24) 등록일자 2011년02월18일

(51) Int. Cl.

A23L 1/29 (2006.01) A23L 1/221 (2006.01)

A23L 2/04 (2006.01) A61P 39/06 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2011-0003469

(22) 출원일자 2011년01월13일

심사청구일자 2011년01월13일

(56) 선행기술조사문헌

KR1020090113627 A

KR100998529 B1

KR1019900008213 B1

JP2008109894 A

(73) 특허권자

송성민

대구광역시 수성구 범어동 808 범어쌍용예가 10  
4동 1003호

(72) 발명자

송성민

대구광역시 수성구 범어동 808 범어쌍용예가 10  
4동 1003호

양은주

경상남도 김해시 내동 175-2

김상인

대구광역시 북구 산격4동 1498-85

(74) 대리인

김지형

전체 청구항 수 : 총 4 항

심사관 : 김기연

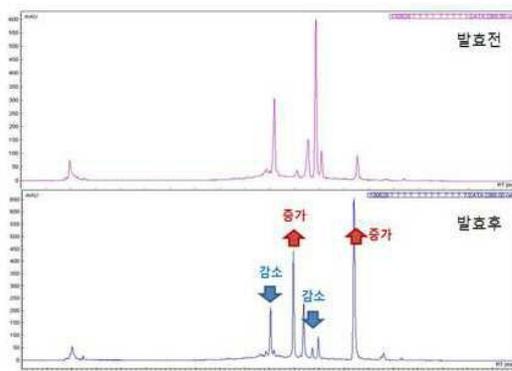
(54) 퀘르세틴 함량이 증가된 발효 양과 추출물의 제조방법

(57) 요약

본 발명은 퀘르세틴 함량이 증가된 발효 양과 추출물의 제조방법에 관한 것으로서, 양과를 세척하여 걸걸질을 제거한 후, 0.5~10mm의 크기로 분쇄하는 양과 전처리단계(제1단계)와; 상기 제1단계에서 전처리된 양과에 95% 농도의 에탄올을 중량대비 1 : 5~10의 비율로 혼합하여 50~90℃에서 3~10시간 동안 추출하는 에탄올 추출단계(제2단계)와; 상기 제2단계에서 에탄올 추출된 추출액을 여과하고 건조하는 여과 및 건조단계(제3단계)와; 상기 제3단계에서 여과 및 건조된 건조물에 100mM의 시트르산 완충액을 혼합하여 현탁시키는 완충액 혼합단계(제4단계)와; 상기 제4단계에서 완충액이 혼합된 현탁액에 메주균 액을 접종하여 발효하는 발효단계(제5단계)로 이루어진 것을 특징으로 한다.

상기의 방법으로 제조된 퀘르세틴 함량이 증가된 발효 양과 추출물은 양과, 또는 양과 추출물을 발효하여 양과의 식용부위에 함량이 적은 퀘르세틴(Quercetin)이 높여, 상기 퀘르세틴이 가지는 항산화, 뇌세포보호활성, 항염증작용, 항암작용, 항당뇨, 항비만, 항고혈압 등의 활성이 증가된 각종 건강기능성이 증가된 양과 또는 양과 추출물을 제조할 수 있으며, 이를 함유하는 식품, 건강기능성 식품, 천연물 신약 등과 관련된 조성물을 제공할 수 있다.

대표도 - 도3



**특허청구의 범위**

**청구항 1**

양파를 세척하여 겉껍질을 제거한 후, 0.5~10mm의 크기로 분쇄하는 양파 전처리단계(제1단계);

상기 제1단계에서 전처리된 양파에 95% 농도의 에탄올을 중량대비 1 : 5~10의 비율로 혼합하여 50~90℃에서 3~10시간 동안 추출하는 에탄올 추출단계(제2단계);

상기 제2단계에서 에탄올 추출된 추출액을 여과하고 건조하는 여과 및 건조단계(제3단계);

상기 제3단계에서 여과 및 건조된 건조물에 100mM의 시트르산 완충액을 혼합하여 현탁시키는 완충액 혼합단계(제4단계); 및

상기 제4단계에서 완충액이 혼합된 현탁액에 메주균 액을 접종하여 발효하는 발효단계(제5단계)로 이루어진 것을 특징으로 하는 퀘르세틴 함량이 증가된 발효 양파추출물의 제조방법.

**청구항 2**

제 1항에 있어서,

상기 제5단계의 발효단계에서 메주균 액은,

밀기울과 1% 포도당 용액을 중량대비 1 : 1~3의 비율로 혼합하여 100~140℃에서 10~30분간 멸균하여 백국균 (*Aspergillus kawachii*)을 접종하여 25~35℃에서 3~7일간 배양한 후, 상기 발효된 밀기울에 100mM 인산나트륨 완충액을 중량대비 1 : 1~3의 비율로 혼합하여 3~5℃에서 3~7시간 정치한 다음, 10,000~12,000rpm의 속도로 10~30분간 원심분리하여 상등액을 수득하여 제조된 것을 특징으로 하는 퀘르세틴 함량이 증가된 발효 양파추출물의 제조방법.

**청구항 3**

제 1항에 있어서,

상기 제5단계의 발효단계에서 상기 완충액이 혼합된 현탁액에 메주균 액을 중량대비 1 : 1~100의 비율로 접종하여 10~50℃에서 12~36시간 발효하는 것을 특징으로 하는 퀘르세틴 함량이 증가된 발효 양파추출물의 제조방법.

**청구항 4**

제 1항 내지 3항 중 어느 한 항의 방법으로 제조된 퀘르세틴 함량이 증가된 발효 양파추출물을 포함하는 향산화 및 뇌신경 세포 보호용 조성물.

**명세서**

**기술분야**

[0001] 본 발명은 퀘르세틴 함량이 증가된 발효 양파 추출물의 제조방법에 관한 것으로서, 더 상세하게는 양파를 세척하고 겉껍질을 제거하여 분쇄하는 양파 전처리단계와, 상기 전처리된 양파에 95% 농도의 에탄올을 혼합하여 추출하는 에탄올 추출단계와, 상기 에탄올 추출된 추출액을 여과하고 건조하는 여과 및 건조단계와, 상기 여과 및 건조된 건조물에 100mM의 시트르산 완충액을 현탁시키는 완충액 혼합단계와, 상기 완충액이 혼합된 현탁액에 메주균 액을 접종하여 발효하는 발효단계로 이루어진다.

[0002] 본 발명은 양파 및 양파 에탄올추출물을 미생물, 또는 미생물로부터 얻어진 효소액으로 발효함으로써 양파의 식용부위에 함량이 적은 퀘르세틴 즉, 항산화활성 및 뇌세포 보호활성의 유효성분인 퀘르세틴의 함량을 높여 퀘르세틴의 함량이 증가된 발효 양파, 또는 발효 양파 추출물의 제조방법 및 이를 함유하는 식품, 건강기능성 식

품, 천연물 신약 등과 관련된 조성물에 관한 것이다.

**배경 기술**

- [0003] 양과는 백합과에 속하는 2년초로 인경은 직경이 10cm에 달하며 편구형, 또는 구형이다. 9월에 화경 끝에서 큰 화서가 자라고 자루가 있는 많은 꽃이 산형으로 달리며 인경은 식용으로 사용한다. 또한, 양과는 2008년 농림수산식품부의 통계자료(2008 시설채소 온실현황 및 채소류 생산실적)에 따르면 조미 채소류 중 국내 생산량이 1위(약 100만 톤)로 파(50만 톤)의 두 배에 달하는 매우 중요한 농산물이다.
- [0004] 양과의 성분으로는 주로 퀘르세틴(quercetin) 배당체인 quercetin 3-O-glucoside, quercetin 3,4'-diglucoside, quercetin 4'-glucoside 등이 알려져 있으며, 매운 맛을 내는 프로필 아릴디설파이드(propyl allyldisulfide) 등 황화 아릴 계통의 화합물이 다수 함유되어 있는 것으로 나타났다. 퀘르세틴(quercetin)은 식용 부위에는 거의 함유되어 있지 않으나, 갈색의 겉껍질에 다량 함유되어 있어(건조 g당 약 8.3 mg) 그 함량은 식용부위의 수십~수백 배에 달하는 것으로 알려져 있으며, 상기 퀘르세틴(quercetin)은 항염증작용, 뇌세포 보호활성, 항암작용, 항당뇨, 항비만, 항고혈압 등 각종 생리활성을 나타내는 것으로 보고되어 있는 화합물이다.
- [0005] 발효는 넓은 의미에서 미생물이 자신의 효소로 유기물을 분해 또는 변화시켜 각기 특유의 최종산물을 만들어내는 현상이며, 좁은 의미로는 탄수화물이 무산소적으로 분해되는 복잡한 반응계열로 이루어지는 과정을 말한다. 또는 미생물이 각종 효소를 분비하여 유기화합물을 산화, 환원 또는 분해, 합성시키는 반응이라고 말할 수도 있다.
- [0006] 그리고, 발효식품의 종류로는 누룩곰팡이에 의해서 만들어지는 막걸리, 증류해서 만든 증류주(브랜디, 럼주, 위스키, 보드카, 진 소주), 초산균으로 만드는 식초, 효모로 만드는 포도주와 맥주, 빵 효모로 만드는 빵, 곰팡이에 의해서 만들어지는 된장, 간장 그리고 고추장, 유산균 등으로 만드는 김치, 그리고 서양의 치즈, 버터, 요구르트 등이 있다. 한국인들도 자연환경에 순응하여 장, 김치, 젓갈, 식초, 식혜, 술 등을 개발하였다. 김치류는 100여 가지, 젓갈류는 160여 가지, 장류는 120여 가지, 식초류는 10가지, 주류는 260여 가지나 된다. 식품 추출물 등을 발효하게 되면 발효생성물이 나오기 때문에 원래의 식품보다 특이한 영양성분이 더 많이 존재하게 되는 경우가 있다. 또한, 대두에는 이소플라본류가 건조 중량 당 약 1.5~2.5% 정도 함유되어 있는데 이들 중 배당체(glycoside, 당이 연결된 형태)인 daidzin, genistin이 전체 이소플라본의 60~70%로 가장 많은 부분을 차지하고 있다. 이에 비하여 비당부(aglycone, 배당체에서 당이 제거된 형태) 형태의 화합물, 즉 daidzein, genistein 함량은 각각의 배당체의 약 10~30분의 1에 불과한 것으로 알려져 있다. 각종 대두 가공 식품의 추출물을 이용한 항돌연변이 실험에서 발효 식품의 추출물이 비발효 식품보다 항 돌연변이 원성이 훨씬 높게 나타났으며 또한 식품에 함유된 이소플라본의 aglycone 함량에 비례하여 항돌연변이 정도가 증가하였고, 재래식 메주 및 된장 중의 항산화 활성 역시 발효기간에 비례하여 증가하는 것으로 미루어 발효 중 항산화 활성물질의 생성이 증가하는 것으로 보인다. 또한, 전통 발효에 의해 만들어진 장류에는 안지오텐신변환효소(ACE) 활성의 저해효과, 면역증강 활성 등이 대두 자체에 비해 월등히 증가하는 것으로 보고되고 있어 발효의 중요성을 시사하고 있는데, 이는 발효 시 발효균이 생산하는 가수분해 효소에 의하여 배당체가 활성을 갖는 aglycone 형태로 분해되었기 때문일 가능성이 높은 것으로 생각된다. 실제로 농림부의 한 연구보고서에 따르면 발효과정을 거치면서 배당체들이 기능성과 생체이용률이 증가된 비당부 형태의 화합물로 변환한다는 사실이 입증된 바 있다.
- [0007] 그러나, 발효를 통하여 여러 가지 건강기능성 생리활성을 나타내는 퀘르세틴(quercetin)의 함량을 증가시킬 수 있는 건강기능성이 증가된 양과 및 양과 추출물의 제조는 전무하다.

**발명의 내용**

**해결하려는 과제**

- [0008] 본 발명은 상기와 같은 문제를 해결하고자 발명한 것으로, 그 목적은 식용 가능한 균, 또는 이로부터 유래하는 효소액을 이용하여 과학적으로 양과의 식용부위에는 함량이 적은 퀘르세틴(quercetin)의 함량을 높이는 데 있으며, 이를 통하여 항산화활성 및 뇌세포 보호활성의 유효성분으로서 퀘르세틴의 함량이 증가된 양과, 또는 양과 추출물 및 이를 함유하는 식품, 건강기능성 식품, 천연물 신약 등과 관련된 조성물을 제공함에 있다.

**과제의 해결 수단**

- [0009] 상기와 같은 목적을 달성하기 위하여 본 발명에 따른 퀘르세틴 함량이 증가된 발효 양과 추출물의 제조방법은 양과를 세척하여 길썬질을 제거한 후, 0.5~10mm의 크기로 분쇄하는 양과 전처리단계(제1단계)와; 상기 제1단계에서 전처리된 양과에 95% 농도의 에탄올을 중량대비 1 : 5~10의 비율로 혼합하여 50~90℃에서 3~10시간 동안 추출하는 에탄올 추출단계(제2단계)와; 상기 제2단계에서 에탄올 추출된 추출액을 여과하고 건조하는 여과 및 건조단계(제3단계)와; 상기 제3단계에서 여과 및 건조된 건조물에 100mM의 시트르산 완충액을 혼합하여 현탁시키는 완충액 혼합단계(제4단계)와; 상기 제4단계에서 완충액이 혼합된 현탁액에 메주균 액을 접종하여 발효하는 발효단계(제5단계)로 이루어진 것을 특징으로 한다.
- [0010] 또, 상기 제5단계의 발효단계에서 메주균 액은,
- [0011] 밀기울과 1% 포도당 용액을 중량대비 1 : 1~3의 비율로 혼합하여 100~140℃에서 10~30분간 멸균하여 백국균 (*Aspergillus kawachii*)을 접종하여 25~35℃에서 3~7일간 배양한 후, 상기 발효된 밀기울에 100mM 인산나트륨 완충액을 중량대비 1 : 1~3의 비율로 혼합하여 3~5℃에서 3~7시간 정지한 다음, 10,000~12,000rpm의 속도로 10~30분간 원심분리하여 상등액을 수득하여 제조된 것을 특징으로 한다.
- [0012] 또, 상기 제5단계의 발효단계에서 상기 완충액이 혼합된 현탁액에 메주균 액을 중량대비 1 : 1~100의 비율로 접종하여 10~50℃에서 12~36시간 발효하는 것을 특징으로 한다.

**발명의 효과**

- [0013] 본 발명에 따른 퀘르세틴 함량이 증가된 발효 양과 추출물에 의하면, 양과, 또는 양과 에탄올추출물을 발효하여 양과의 식용부위에 함량이 적은 퀘르세틴(queracetin)의 함량을 높여, 상기 퀘르세틴이 가지는 항산화, 뇌세포보호, 항염증작용, 항암작용, 항당뇨, 항비만, 항고혈압 등의 활성이 증가된 각종 건강기능성이 증가된 양과 또는 양과 추출물을 제조할 수 있으며, 이를 함유하는 식품, 건강기능성 식품, 천연물 신약 등과 관련된 조성물을 제공하는 효과가 있다.

**도면의 간단한 설명**

- [0014] 도 1은 발효 전과 후의 양과 추출물의 DPPH에 의한 항산화 효과를 비교하는 그래프이다.
- 도 2는 MTT법에 의해 발효 전과 후의 양과 추출물의 뇌신경세포 보호효과를 비교하는 그래프이다.
- 도 3은 발효 전과 후의 양과 추출물에 대한 고속액체크로마토그래피의 결과를 나타내는 그래프이다.
- 도 4는 양과 및 발효 후 양과 추출물 중 존재하는 퀘르세틴 화합물의 구조를 나타낸 것이다.
- 도 5은 양과 추출물을 메주균 액으로 발효할 때 시간별로 퀘르세틴 화합물의 양의 변화를 보여주는 그래프이다.
- 도 6은 발효에 의해 생성된 화합물의 뇌신경세포 보호효과를 나타내는 그래프이다.
- 도 7은 시판 숙성 양과 중의 퀘르세틴 함량과 본 발명에 의한 발효 양과 추출물 중의 퀘르세틴 함량을 비교하는 그래프이다.
- 도 8은 발효 전과 후 양과 추출물 중의 주성분인 quercetin, quercetin 3-glucoside, quercetin 4'-glucoside, quercetin 3,4'-diglucoside의 검량선을 나타낸 그래프이다.

**발명을 실시하기 위한 구체적인 내용**

- [0015] 이하, 첨부된 도면에 의거 본 발명의 제조방법을 상세히 설명하면 다음과 같다.
- [0016] 도 9은 본 발명에 따른 퀘르세틴 함량이 증가된 발효 양과 추출물의 제조방법을 개략적으로 도시한 단계흐름도이다.

- [0017] 1. 양파 전처리 단계(제1단계)
- [0018] 양파 전처리 단계는 양파를 세척하여 겉껍질을 제거한 후 분쇄하는 단계로,
- [0019] 양파를 세척하여 겉껍질을 제거한 후, 0.5~10mm의 크기로 분쇄하는 것이다.
- [0020] 상기 양파는 퀘르세틴(quercetin) 배당체인 quercetin 3-O-glucoside, quercetin 3,4'-diglucoside, quercetin 4'-glucoside 등이 함유되어 있고, 매운맛을 내는 프로필 아릴디설파이드(propyl allyldisulfide) 등 황화 아릴 계통의 화합물이 다수 함유되어 있으며, 상기 퀘르세틴(quercetin)은 항염증작용, 뇌세포보호활성, 항암작용, 항당뇨, 항비만, 항고혈압 등 각종 생리활성을 나타낸다.
- [0021] 그리고, 상기 양파를 세척하여 겉껍질을 제거한 후, 0.5~10mm의 크기로 분쇄하는 것은 상기 겉껍질이 제거된 양파에 에탄올이 원활하게 침투되게 하기 위함이다.
- [0022] 만약, 상기 양파를 세척하여 겉껍질을 제거한 후, 0.5mm 미만의 크기로 분쇄할 경우에는 0.5~10mm로 분쇄할 경우에 동일한 수율 및 활성을 얻기 때문에 비경제적이고, 10mm를 초과한 크기로 분쇄할 경우에는 상기 겉껍질이 제거된 양파에 에탄올이 원활하게 침투되기 어려울 수 있다.
- [0023] 2. 에탄올 추출단계(제2단계)
- [0024] 에탄올 추출단계는 상기 제1단계에서 전처리된 양파에 에탄올을 혼합하여 추출하는 단계로,
- [0025] 상기 제1단계에서 전처리된 양파에 60~99% 농도의 에탄올을 중량대비 1 : 5~10의 비율로 혼합하여 50~90℃에서 3~10시간 동안 추출하는 것이다.
- [0026] 여기서, 상기 제1단계에서 전처리된 양파에 60~99% 농도의 에탄올을 중량대비 1 : 5~10의 비율로 혼합하여 50~90℃에서 3~10시간 동안 추출하는 것은 상기 제1단계에서 전처리된 양파에 함유되어 있는 퀘르세틴(quercetin)이 충분히 용출되게 하기 위함이다.
- [0027] 그리고, 상기 제1단계에서 전처리된 양파를 에탄올로 추출하는 것은 에탄올은 추출에 사용될 경우에 안전성을 높일 뿐 아니라, 인체에 무해하기 때문에 식품, 의약품 및 화장품의 첨가물로 사용할 때에도 적합할 수 있으며, 안전성 확보를 위한 엄격한 공정관리 등과 같은 비용 증가가 발생하지 않으므로 경제적이기 때문이다.
- [0028] 그리고 만약, 상기 제1단계에서 전처리된 양파에 60~90% 농도의 에탄올을 중량대비 1 : 5 미만의 비율로 혼합할 경우에는 상기 제1단계에서 전처리된 양파에 함유되어 있는 퀘르세틴(quercetin)이 충분히 용출되지 못할 수 있으며, 상기 제1단계에서 전처리된 양파에 60~90% 농도의 에탄올을 중량대비 1 : 10 초과한 비율로 혼합할 경우에는 상기 제1단계에서 전처리된 양파에 함유되어 있는 퀘르세틴(quercetin)을 용출시키기 위해 필요 이상의 알코올을 사용하게 되어 비경제적이고, 추출시간이 더 오래 걸리게 된다.
- [0029] 그리고 만약, 상기 제1단계에서 전처리된 양파에 60~90%농도의 에탄올을 중량대비 1 : 5~10의 비율로 혼합하여 50℃, 3시간 미만으로 추출할 경우에는 상기 제1단계에서 전처리된 양파에 함유되어 있는 퀘르세틴(quercetin)이 충분히 용출되지 못할 수 있으며, 90℃, 10시간을 초과하여 추출할 경우에는 상기 제1단계에서 전처리된 양파에 함유되어 있는 퀘르세틴(quercetin)이 충분히 용출되기에 필요 이상의 가열온도 및 가열시간을 소모하게 되어 비경제적이다.
- [0030] 그리고 바람직하게는, 상기 제1단계에서 전처리된 양파에 95% 농도의 에탄올을 중량대비 1 : 6의 비율로 혼합하여 70℃에서 5시간 동안 추출하는 것이다.
- [0031] 여기서, 상기 제1단계에서 전처리된 양파에 95% 농도의 에탄올을 중량대비 1 : 6의 비율로 혼합하여 70℃에서 5시간 동안 추출하는 것은 최적의 양파에 함유되어 있는 퀘르세틴(quercetin)을 용출시키기 위한 알코올 농도, 알코올 함량, 가열온도, 가열시간이 반복된 실험을 통하여 도출되었기 때문이다.
- [0032] 그리고 이때, 상기 제1단계에서 전처리된 양파에 60~99% 농도의 에탄올을 중량대비 1 : 5~10의 비율로 혼합하여 50~90℃에서 3~10시간 동안 추출한 것을 추출액이라고 한다.
- [0033] 3. 여과 및 건조단계(제3단계)

- [0034] 여과 및 건조단계는 상기 제2단계에서 에탄올 추출된 추출액을 여과하고 건조하는 단계로,
- [0035] 상기 제2단계에서 에탄올 추출된 추출액을 여과한 후, 상기 여과된 여과액을 건조하는 것이다.
- [0036] 더 상세하게는, 상기 제2단계에서 에탄올 추출된 추출액을 여과한 후, 상기 여과된 여과액을 회전감압농축기로 건조하는 것이다.
- [0037] 여기서, 상기 제2단계에서 에탄올 추출된 추출액을 여과한 후, 상기 여과된 여과액을 회전감압농축기로 건조하는 것은 상기 추출액에 함유되어 있는 유효한 성분들의 활성을 손실하지 않으면서, 상기 추출액에 함유된 에탄올의 함량을 최대한 낮추기 위함이다.
- [0038] 그리고, 상기 회전감압농축기는 당업계에서 일반적으로 사용하는 것으로, 그 종류에 한정하지 않으며 온도 및 압력을 자유롭게 설정할 수 있는 것을 사용한다.
- [0039] 그리고 이때, 상기 제2단계에서 에탄올 추출된 추출액을 여과한 후, 상기 여과된 여과액을 건조한 것을 건조물이라고 한다.
- [0040] 4. 완충액 혼합단계(제4단계)
- [0041] 완충액 혼합단계는 상기 제3단계에서 여과 및 건조된 건조물을 완충액에 혼합하여 현탁시키는 단계로,
- [0042] 상기 제3단계에서 여과 및 건조된 건조물에 100mM의 시트르산 완충액(pH 4.6)을 혼합하여 현탁시키는 것이다.
- [0043] 바람직하게는, 상기 제3단계에서 여과 및 건조된 건조물에 100mM의 시트르산 완충액(pH 4.6)을 중량대비 1 : 1~1000의 비율로 혼합하여 현탁시키는 것이다.
- [0044] 그리고, 상기 시트르산(citric acid)은 껌 속 과일에서 주로 발견되는 약한 유기산으로, 자연적인 보존제로서, pH 조절제, 갈변방지, 음식이나 음료수에 산성 또는 신맛을 첨가하기 위해 사용한다.
- [0045] 여기서, 상기 제3단계에서 여과 및 건조된 건조물에 100mM의 시트르산 완충액(pH 4.6)을 중량대비 1 : 1~1000의 비율로 혼합하여 현탁시키는 것은 상기 제3단계에서 여과 및 건조된 건조물의 pH를 4~5로 유지시키기 위함이며, 하기의 발효단계에서 발효를 더욱 원활하게 하기 위함이다.
- [0046] 그리고, 상기 제3단계에서 여과 및 건조된 건조물에 100mM의 시트르산 완충액(pH 4.6)을 중량대비 1 : 1 미만의 비율로 혼합할 경우에는 상기 제3단계에서 여과 및 건조된 건조물에 100mM의 시트르산 완충액이 골고루 혼합되지 못하여 pH를 유지하지 못할 수 있을 뿐 아니라 하기에서 발효를 원활하게 진행하지 못할 수 있으며, 상기 제3단계에서 여과 및 건조된 건조물에 100mM의 시트르산 완충액(pH 4.6)을 중량대비 1 : 1000을 초과한 비유로 혼합할 경우에는 상기 제3단계에서 여과 및 건조된 건조물에 100mM의 시트르산 완충액이 골고루 혼합되기에 필요 이상을 사용하게 되어 비경제적이다.
- [0047] 그리고 더 바람직하게는, 상기 제3단계에서 여과 및 건조된 건조물에 100mM의 시트르산 완충액(pH 4.6)을 중량대비 1 : 30~35의 비율로 혼합하여 현탁시키는 것이다.
- [0048] 여기서, 상기 제3단계에서 여과 및 건조된 건조물에 100mM의 시트르산 완충액(pH 4.6)을 중량대비 1 : 30~35의 비율로 혼합하여 현탁시키는 것은 상기 제3단계에서 여과 및 건조된 건조물의 pH를 4~5로 유지시키고, 하기의 발효단계에서 발효를 원활하게 진행할 수 있는 최적의 혼합비율이 반복된 실험을 통하여 도출되었기 때문이다.
- [0049] 그리고 이때, 상기 제3단계에서 여과 및 건조된 건조물에 100mM의 시트르산 완충액(pH 4.6)을 중량대비 1 : 1~1000의 비율로 혼합하여 현탁시킨 것을 현탁액이라고 한다.
- [0050] 5. 발효단계(제5단계)
- [0051] 발효단계는 상기 제4단계에서 완충액이 혼합된 현탁액에 메주균 액을 접종하여 발효하는 단계로,
- [0052] 상기 제4단계에서 완충액이 혼합된 현탁액에 메주균 액을 접종하여 발효하는 것이다.
- [0053] 더 상세하게는, 상기 제4단계에서 완충액이 혼합된 현탁액에 메주균 액을 중량대비 1 : 1~100의 비율로 접종하고, 10~50℃에서 12~36시간 발효하는 것이다.

- [0054] 여기서, 상기 제4단계에서 완충액이 혼합된 현탁액에 메주균 액을 중량대비 1 : 1~100의 비율로 접종하고 10~50℃에서 12~36시간 발효하는 것은 상기 제4단계에서 완충액이 혼합된 현탁액에 함유되어 있는 퀘르세틴(Quercetin) 배당체 함량이 현저히 줄어들고, 퀘르세틴의 함량이 급격히 증가하여 상기 퀘르세틴이 항산화, 뇌세포보호활성, 항염증작용, 항암작용, 항당뇨, 항비만, 항고혈압 등의 활성이 증강된 양과 추출물을 제조하기 위함이다.
- [0055] 만약, 상기 제4단계에서 완충액이 혼합된 현탁액에 메주균 액을 중량대비 1 : 1 미만의 비율로 접종할 경우에는 상기 제4단계에서 완충액이 혼합된 현탁액에 상기 메주균 액이 골고루 접종되지 못하여 발효가 원활하게 이루어지지 않을 수 있으며, 상기 제4단계에서 완충액이 혼합된 현탁액에 메주균 액을 중량대비 1 : 100을 초과한 비율로 접종할 경우에는 상기 제4단계에서 완충액이 혼합된 현탁액에 상기 메주균 액이 필요 이상으로 접종되어 발효시간이 더 오래 걸리게 될 뿐 아니라 발효도 원활하게 진행되지 않을 수 있다.
- [0056] 그리고, 상기 제4단계에서 완충액이 혼합된 현탁액에 메주균 액을 중량대비 1 : 1~100의 비율로 접종하고, 10℃, 12시간 미만으로 발효할 경우에는 발효가 충분히 이루어지지 않아 퀘르세틴이 증가된 양과 추출물을 제조하기 어려울 수 있으며, 50℃, 36시간을 초과하여 발효할 경우에는 높은 발효온도로 인해 발효가 원활하게 이루어지지 않아 퀘르세틴이 증가된 양과 추출물을 제조하기 어려울 뿐 아니라 필요 이상의 발효시간으로 비경제적이다.
- [0057] 그리고, 상기 메주균 액은,
- [0058] 밀기울과 1% 포도당 용액을 중량대비 1 : 1~3의 비율로 혼합하여 100~140℃에서 10~30분간 멸균하여 백국균(*Aspergillus kawachi*)을 접종하여 25~35℃에서 3~7일간 배양한 후, 상기 발효된 밀기울에 100mM 인산나트륨 완충액(pH 7.0)을 중량대비 1 : 1~3의 비율로 혼합하여 3~5℃에서 3~7시간 정치한 다음, 10,000~12,000rpm의 속도로 10~30분간 원심분리하여 상등액을 수득하여 제조된 것이다.
- [0059] 또한, 상기 메주균 액 이외에도 상기 메주균과 유사한 활성을 나타내는 유산균, 청국장균, 글루코시다아제(glucosidase) 중 하나를 사용할 수도 있다.
- [0060] 그리고 바람직하게는, 상기 제4단계에서 완충액이 혼합된 현탁액에 메주균 액을 중량대비 1 : 1의 비율로 접종하고, 30℃에서 24시간 발효하는 것이다.
- [0061] 여기서, 상기 제4단계에서 완충액이 혼합된 현탁액에 메주균 액을 중량대비 1 : 1의 비율로 접종하고, 30℃에서 24시간 발효하는 것은 상기 제4단계에서 완충액이 혼합된 현탁액에 함유되어 있는 퀘르세틴(Quercetin) 배당체 함량이 현저히 줄어들고, 퀘르세틴의 함량이 급격히 증가하기 위한 최적의 접종 비율, 발효온도, 발효시간이 반복된 실험을 통하여 도출되었기 때문이다.
- [0062] 그리고 이때, 상기 제4단계에서 완충액이 혼합된 현탁액에 메주균 액을 중량대비 1 : 1~100의 비율로 접종하고, 10~50℃에서 12~36시간 발효한 것을 퀘르세틴 함량이 증가된 발효 양과 추출물이라고 한다.
- [0063] 그리고, 상기 전처리된 양과를 상기 에탄올추출단계와 여과 및 건조단계를 거치지 않고, 완충액 혼합단계, 발효 단계를 거쳐 퀘르세틴 함량이 증가된 발효 양과를 제조할 수도 있다.
- [0064] 상기의 방법으로 제조된 퀘르세틴 함량이 증가된 발효 양과 추출물 또는 발효 양과를 항산화, 뇌세포보호활성, 항염증작용, 항암작용, 항당뇨, 항비만, 항고혈압예방 또는 치료제를 약제학적 제제의 형태로 제조하는 경우, 유효성분을 약제학적으로 허용되는 통상적인 담체와 함께 배합하여 투여 목적에 따라, 정제, 경질 또는 연질 캡셀제, 츄잉정, 분말제, 액제나 현탁제와 같은 경구 투여용 제제 또는 주사가능한 액제나 현탁제, 비강세척제 등과 같은 비경구 투여용 제제의 형태로 제형화할 수 있다.
- [0065] 그리고, 상기의 방법으로 제조된 퀘르세틴 함량이 증가된 발효 양과 추출물 또는 발효 양과를 경구 투여의 목적으로 정제, 캡셀제, 츄잉정, 분말제, 액제, 현탁제 등의 제제로 제형화하는 경우에는, 아라비아 고무, 옥수수 전분, 미세결정질 셀룰로오스 또는 젤라틴과 같은 결합제, 인산이칼슘 또는 락토스와 같은 부형제, 알긴산, 옥수수 전분 또는 감자 전분과 같은 붕해제, 스테아르산마그네슘과 같은 활택제, 슈크로스 또는 사카린과 같은 감미제 및 페퍼민트, 메틸 살리실산염 또는 과일향과 같은 향미제가 포함될 수 있으며, 단위 투여형이 캡셀제인 경우에는 상기 성분 외에도 폴리에틸렌글리콜 또는 지방유와 같은 액상 담체가 포함될 수도 있다.

[0066] 그리고, 상기의 방법으로 제조된 퀘르세틴 함량이 증가된 발효 양과 추출물 또는 발효 양과를 비경구 투여를 위한 용액 또는 현탁액 형태의 주사제는 비경구적으로, 예를 들면 피하, 정맥 내, 근육 내 또는 복강 내로 투여될 수 있으며, 일반적으로, 주사가 가능한 용액 또는 현탁액은 물, 염수, 수성 텍스트로스 및 관련된 설탕 용액제, 비휘발성 오일, 에탄올, 글리세린, 폴리에틸렌글리콜, 프로필렌글리콜과 같은 글리콜류 등의 약제학적으로 허용되는 액상 담체 중에 유효량의 유효성분을 균질하게 혼합시켜 제조할 수 있으며, 이외에도 필요에 따라 가용화제, 항세균제, 킬레이트제, 완충제, 보존제와 같은 보조제를 포함시킬 수도 있다.

[0067] 그리고, 상기 약제학적으로 허용되는 담체로는 약제학적으로 순수하고, 실질적으로 무독성이며, 유효성분의 작용을 저해하지 않는 임의의 모든 보조제를 사용할 수 있다.

[0068] 그리고, 본 발명에 따른 예방 또는 치료제의 1일 투여용량은 투여하고자 하는 대상의 질환의 중증도, 합병증, 체중, 연령, 성 등의 다양한 요인에 따라 변화될 수 있으나, 일반적으로는 추출물 1~1,000mg/kg, 바람직하게는 10~500mg/kg, 더 바람직하게는 10~100mg/kg을 1일 1~3회 경구투여할 수 있다.

[0069] 그리고, 상기의 방법으로 제조된 퀘르세틴 함량이 증가된 발효 양과 추출물 또는 발효 양과는 천연추출물로서, 상기한 약학적 제제 외에도, 기존의 청량 음료, 미네랄 워터, 알콜 음료 등의 음료 제품 또는 슈링겔이나 캐러멜 제품, 캔디류, 방과류, 과자류 등에 적당량 배합하거나, 비타민이나 미네랄 등을 포함한 건강 보조 식품, 또는 식품 첨가제 등에 포함시켜 식품 또는 식품 보조제의 형태로 제조할 수도 있다.

[0070] 이하에서 실시예를 통하여 본 발명을 보다 구체적으로 설명한다. 그러나 하기의 실시예는 본 발명을 구체적으로 예시하기 위한 것일 뿐, 본 발명의 권리범위를 제한하는 것이 아님은 당업자에게 있어서 명백한 사실이다. 즉, 본 발명의 단순한 변형 내지 변경은 당업자에 의하여 용이하게 실시될 수 있으며, 이러한 변형이나 변경은 모두 본 발명의 영역에 포함되는 것으로 볼 수 있다.

[0071] 실시예 1 : 본 발명에 따라 제조된 발효 양과 추출물

[0072] 양과는 시중에서 구할 수 있는 노란양과를 사용하여 비 가식부인 껍질질을 제거한 후, 상기 껍질질을 제거한 양과를 5mm 크기로 분쇄한 다음 5.96kg을 95%에탄올 36L에 넣고 70℃에서 5시간 동안 추출 한 후 여과하고, 상기 여과액을 회전감압농축기로 건조하여 건조물 399.95g을 얻었다. 이 중 3.24g을 100ml의 100mM의 시트르산 완충액(pH 4.6)에 분산시킨 후 같은 부피의 메주균 액을 넣은 다음 30℃에서 24시간 배양하여 발효 양과 추출물을 얻었다.

[0073] 상기 메주균 액의 제조는, 밀기울 10g과 1% 포도당 용액 10ml를 반죽하여 100ml 삼각플라스크에 담아 121℃에서 15분간 멸균한 후, 백국균(*Aspergillus kawachii*)을 접종하여 30℃에서 5일간 배양하였다. 발효된 밀기울 덩어리에 100mM 인산나트륨완충액(pH 7.0) 30ml를 넣고 4℃에서 5시간 방치한 다음 거즈로 걸러 12,000rpm에서 15분간 원심분리한 상등액을 발효액으로 사용하였다.

[0074] 실시예 2 : 경질 캡셀제의 제조

[0075] 아래 표 1과 같이, 통상적인 캡셀제의 제조방법에 따라 상기 성분들을 지정된 양으로 배합한 후, 1캡셀 당 33mg의 배합물이 되도록 적절한 크기의 경질 젤라틴 캡셀에 충전하여 목적하는 캡셀제를 제조하였다.

표 1

[0076]	실시예 1의 혼합추출물의 10배 농축물	10 mg
	D-소르비톨	10 mg
	락토스	5 mg
	콜로이달실리콘디옥사이드	5 mg
	스테아르산마그네슘	3 mg
	총량	33 mg

[0077] 실시예 3 : 정제의 제조

[0078] 아래 표2의 성분들을 지정된 양으로 혼합한 후, 통상적인 정제의 제조방법에 따라 정제를 제조하였다.

표 2

[0079]	실시예 1의 혼합추출물의 10배 농축물	10 mg
	D-소르비톨	10 mg
	락토스	5 mg
	콜로이달실리콘디옥사이드	5 mg
	스테아르산마그네슘	3 mg
	총량	33 mg

[0080] 실시예 4 : 연질 캡셀제의 제조

[0081] 아래 표3의 성분들을 지정된 양으로 배합한 후, 통상의 연질 캡셀제 제조방법에 따라 연질 캡셀제를 제조하였다.

표 3

[0082]	실시예 1의 혼합추출물의 10배 농축물	10 mg
	콩기름	100 mg
	팜유	76 mg
	총량	186 mg

[0083] 실시예 5 : 주사제의 제조

[0084] 1 바이알(10cc)의 주사에 상기 성분들을 통상적인 주사제 제조방법에 따라 제조하였다.

표 4

[0085]	실시예 1의 혼합추출물의 10배 농축물	10 mg
	토코페롤	172 mg
	셀레늄	30 mg
	주사용 증류수	적량
	PH 조정제	적량

[0086] 실험 1: DPPH법에 의한 항산화 활성 측정

[0087] 실시예 1(본 발명에 따라 제조된 발효 양과 추출물)를 처리했을 때 DPPH(1,1-Diphenyl-2-picrylhydrazyl)라는 라디칼 물질이 환원되는 정도를 측정하여 항산화 활성을 평가하는 실험이다. DPPH가 짙은 보라색이지만 환원이 많이 될수록 무색에 가까워지는 성질을 이용한 실험이다. DMSO로 녹인 실시예 10 $\mu$ l와 에탄올에 녹인 150  $\mu$ M의 DPPH 용액 190 $\mu$ l를 96-well plate에서 혼합하여 실온에서 빛을 차단하고 30분간 반응시켰다. 이것을 517nm에서 측정한 흡광도(OD) 값을 A로 한다. 대조구는 DPPH의 DMSO 용액의 OD값으로 하였으며, 라디칼 제거능 계산은 다음 식으로 구하였다.

[0088] 라디칼 제거능(%) = 
$$\frac{OD_{519ofcontrol}-A}{OD_{519ofcontrol}} \times 100$$

[0089] 그 결과를 도 1에 나타내었다.

[0090] 도 1에 나타난 바와 같이, 좌측에 발효 전(before)에 비해 우측의 발효 후(after)의 막대그래프가 x축에서의 농도가 진할수록 강한 라디칼 소거능을 나타내는 것을 알 수 있다. 약 20%의 저해활성을 나타내는데 필요한 농도가 발효 전에는 100ppm이었으며, 발효 후에는 10ppm에서도 같은 효과를 나타내었으므로, 이를 기준으로 하면 발효에 의해 항산화 효과가 약 10배 증가하였음을 알 수 있다.

[0091] 실험 2 : MTT법에 의한 뇌세포 보호 활성 측정

[0092] 마우스 해마 유래 신경세포주인 HT22 세포에 시료를 처리한 후 글루타메이트(glutamate)로 산화적 스트레스를 유도하여 세포 생존율을 조사함으로써 양과로부터 얻어진 물질들의 신경세포사멸 억제효과를 검증한다. 이 실험은 수용성의 MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide)가 살아있는 세포의 미토콘드리아 산화환원효소 작용에 의해 보라색의 formazan이라는 비수용성 물질로 전환되는 원리를 이용한 것으로 세포 생존율을 알아보기에 적합한 것으로 알려져 있다. 24-well plate의 각 구멍에 1ml 당  $3 \times 10^4$ 의 세포수가 되도록 접종하여 24시간 배양하고 물질을 처리하였다. 12시간 후에 10mM의 글루타메이트를 처리하여 산화적 스트레스를 유발하고 다시 12시간 후에 MTT 용액 (0.5 mg/ml)을 4시간 동안 처리하였다. Well plate 내의 MTT 용액을 제거하고 디메틸설폭시드(DMSO)를 이용하여 생성된 formazan을 용해하였다. 이를 1시간 이상 충분히 흔들어 섞은 뒤 575nm에서 흡광도(optical density, OD)를 측정하였으며, 아래 식을 이용하여 대조구(control)에 대한 % 값으로 세포 생존율을 계산하였다.

$$[0093] \text{세포생존율 (\%)} = \frac{\text{시료의 OD}}{\text{대조구의 OD}} \times 100$$

[0094] 도 2는 발효 전, 후의 양과 추출물의 뇌세포 보호효과를 비교한 것으로 25 ppm의 농도에서 발효전(왼쪽 막대그래프)에 82%의 세포 생존율을 나타낸 것에 비해 발효후(오른쪽 막대그래프)에서는 102%의 세포 생존율을 나타내어 발효에 의해 약 20% 뇌신경세포 보호효과가 증가하였음을 알 수 있다.

[0095] 실험 3 : 발효 전 후 양과 추출물의 화합물 변화

[0096] 발효 전과 후의 양과추출물을 증발 건조한 다음 메탄올을 가하고 원심분리한다. 메탄올 가용성 부분인 상정액만 취하여 다시 증발 건조하고 건조물에 100,000 ppm이 되도록 메탄올을 가한 다음 0.45 $\mu$ m 크기의 막을 통과시켜 이 중 30 $\mu$ l를 HPLC 분석용 시료로 사용하였다. 컬럼은 Thermo Hypersil-Keystone사가 만든 Hypersil BDS C18 (5 $\mu$ , 250 $\times$ 4.6 mm)을, 이동상은 99% 탈이온 증류수+1% 초산(A)와 99% 아세트니트릴+초산 1%(B)를 사용하여 분당 0.8ml의 속도로 용매를 이동시켰다. 검출기는 여러 파장을 동시에 분석할 수 있는 PDA (photodiode array)를 사용하였다. 용매 기울기는 40분 동안 0%(B) $\rightarrow$ 100%(B)로 하고, 이후 5분간 100%(B)를 유지한 다음 마지막 5분간 다시 100%(B) $\rightarrow$ 0%(B)로 돌아가도록 프로그램 하였다. 시료 주입량은 20 $\mu$ l이었으며 크로마토그램은 quercetin의 흡수극대파장인 368nm로 나타내었다.

[0097] 결론적으로 도 3에 나타낸 바와 같이, HPLC 분석 결과 발효 전(위)에 비해 발효 후(아래)에는 화살표로 나타낸 것과 같이 두 개의 peak가 감소한 대신 두 개의 peak의 크기가 증가한 것을 알 수 있으며, 증가한 화합물은 quercetin과 quercetin 3-glucoside였다.

[0098] 실험 4 : 최적 발효 시간의 측정

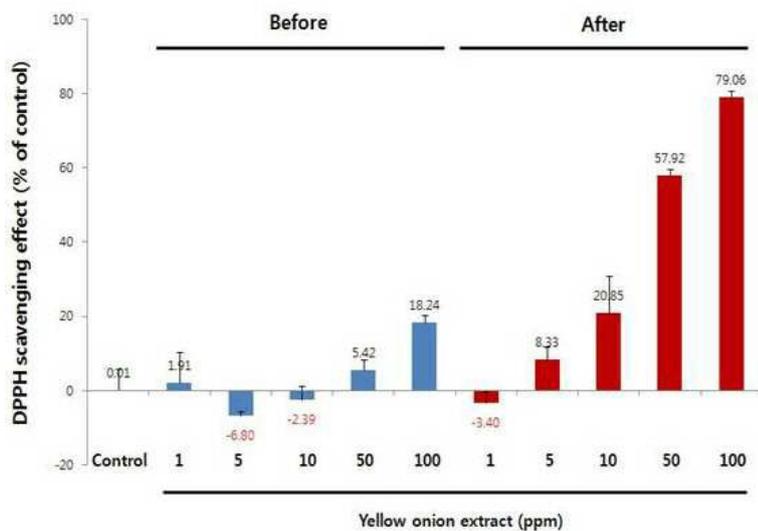
[0099] 도 4와 도 5에 나타낸 바와 같이, 발효 시간에 따른 변화를 관찰한 결과, 반응 전 크로마토그램에서는 머무름시간 20분[화합물 (1), 2.65 $\pm$ 0.23 mg/g<sub>ext</sub>]과 23분[화합물 (2), 0.86 $\pm$ 0.05 mg/g<sub>ext</sub>]의 peak가 가장 컸지만(A), 발효 시간에 따라 이 화합물들의 양이 점차 감소하여 각각 0.80 $\pm$ 0.19 mg/g<sub>ext</sub> 및 0.03 $\pm$ 0.05 mg/g<sub>ext</sub>로 줄었으며 [(B) $\sim$ (G), (I)], 발효 전에는 0.00 $\pm$ 0.01 mg/g<sub>ext</sub>이었던 22분[화합물 (3)]과 0.00 $\pm$ 0.01 mg/g<sub>ext</sub>이었던 26분[화합물 (4)]의 양이 현저히 증가하여[(B) $\sim$ (G), (H)] 발효 전에 비하여 발효 24시간 후 quercetin 3-glucoside (3)는 0.56 $\pm$ 0.02 mg/g<sub>ext</sub>로, quercetin (4)은 0.61 $\pm$ 0.10 mg/g<sub>ext</sub>로 함량이 급격히 늘어났다.

[0100] 결론적으로 발효 후 16~24시간 후에 quercetin의 함량이 최대가 되었다.

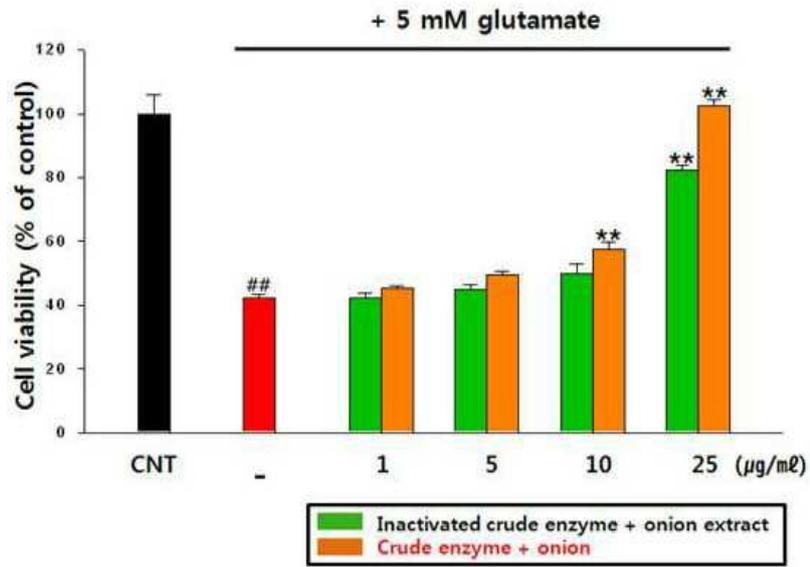
- [0101] 실험 5: 발효에 의해 증가된 화합물의 뇌신경세포 보호효과
- [0102] 발효에 의해 증가된 양파 추출물의 뇌신경세포 보호활성이 발효로 함량이 늘어난 화합물과 실제로 관련이 있는지 알아보기 위하여 quercetin 및 quercetin 3-glucoside의 뇌신경세포보호활성을 측정해 보았다. 일반적으로 활성은 농도가 높아짐에 따라 증가하므로 점차 농도를 증가시키면서 보호활성의 정도를 평가해 보았다.
- [0103] 그 결과 도 6에 나타낸 것과 같이, quercetin 3-glucoside는 거의 활성을 나타내지 않았으나 quercetin을 5 μM 이상의 농도로 처리한 경우, 세포독성물질을 처리하지 않았을 때의 생존율을 100%로 했을 때 거의 100%에 가까운 생존율을 나타내어 양성대조군으로 사용한 에스트로젠(ES)이나 트롤록스(TRX) 보다 좋은 보호활성을 나타낼 수 있었다. 한편 50 μM을 처리하였을 때는 오히려 그 이하의 농도보다 세포생존율이 낮았는데, 시료의 농도가 너무 진한 경우 세포독성을 나타낼 수 있기 때문이다.
- [0104] 결론적으로 발효에 의해 증가된 quercetin에 의해 발효 양파의 뇌세포 보호효과가 증가하였음을 알 수 있다.
- [0105] 실험 6: 시판 숙성 양파 중의 퀘르세틴 함량과 본 발명에 의한 발효 양파 중 퀘르세틴 함량 비교
- [0106] 본 발명의 발효 양파 중 quercetin의 함량과 시판 숙성 양파 중 quercetin 함량을 HPLC로 비교하여 보았다. HPLC 조건은 quercetin 정량에 사용한 방법과 동일하다. 시판 양파발효액 3종을 구한 다음 각각을 증발건조하여 무게를 재고, 메탄올에 녹는 부분을 취하여 농축한 다음 메탄올을 가하여 100,000ppm으로 농도를 맞춘 후 이 중 30 μl를 분석하였다.
- [0107] 그 결과 도 7에 나타낸 것과 같이, 건조물 1g 당 quercetin 함량은 시판 A회사의 경우 24.2 μg, B회사에는 2.4 μg, C회사 제품에는 0.2 μg으로 본 발명에 의한 발효 양파 중 quercetin 함량(0.61 mg)이 적게는 25배, 많게는 3,000배 이상 많다.
- [0108] 따라서, 양파, 또는 양파 추출물을 발효하면 퀘르세틴(quercetin)의 함량이 증가된 물질을 얻을 수 있을 뿐 아니라, 항산화효과와 신경세포 보호효과가 증강된 조성물을 얻을 수 있다. 또한, 퀘르세틴은 항산화, 뇌세포보호 활성, 항염증작용, 항암작용, 항당뇨, 항비만, 항고혈압 등의 활성이 알려져 있으므로 각종 건강기능성이 증가된 양파 및 양파 추출물을 제조할 수 있다.

**도면**

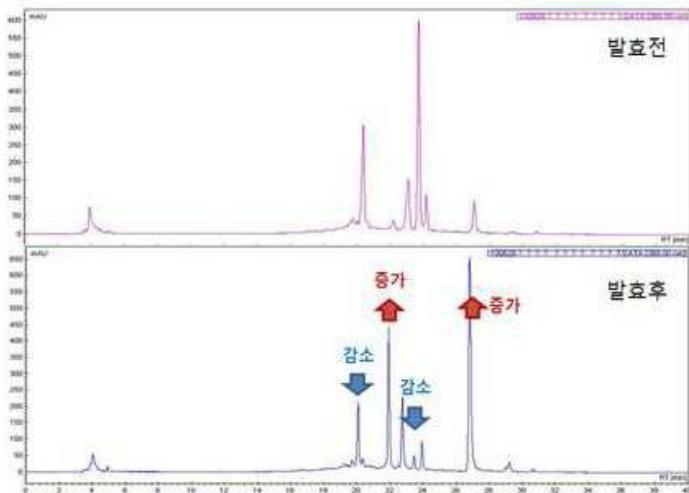
**도면1**



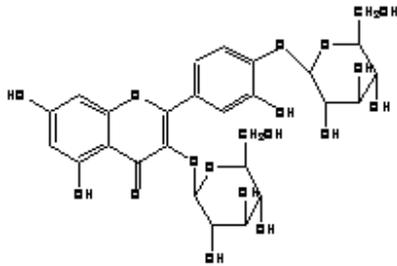
도면2



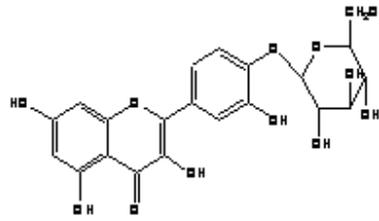
도면3



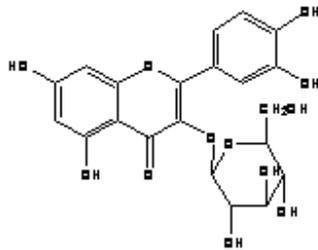
도면4



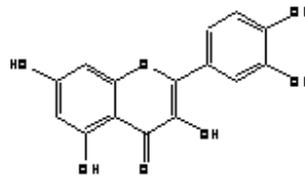
화합물 (1) (quercetin 3,4'-diglucoside)



화합물 (2) (quercetin 4'-glucoside)

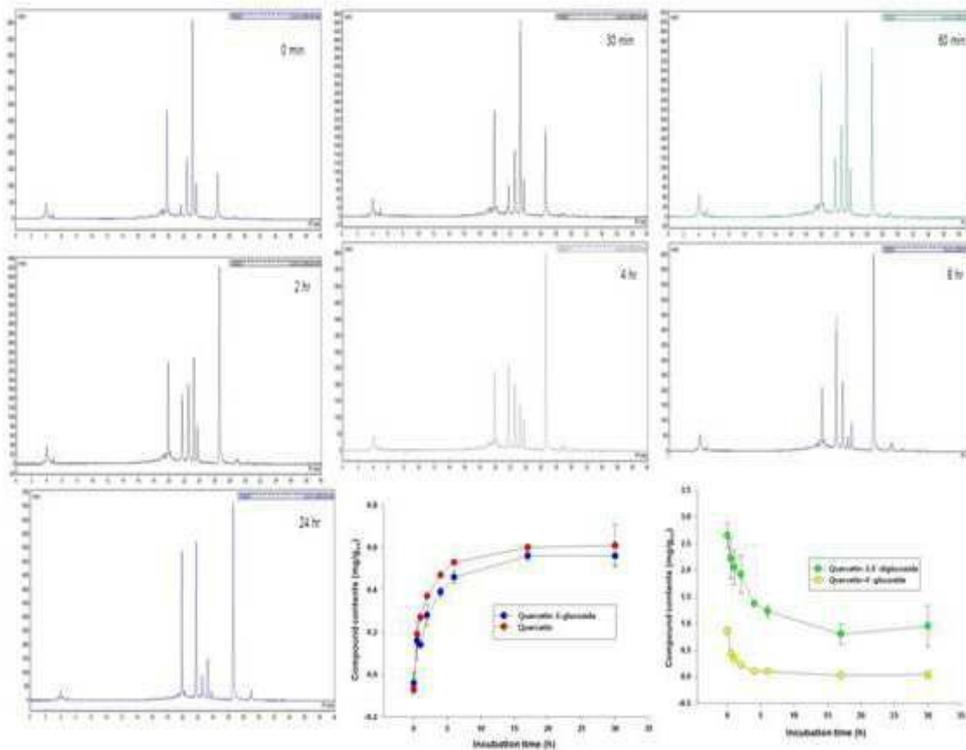


화합물 (3) (quercetin 3-glucoside)

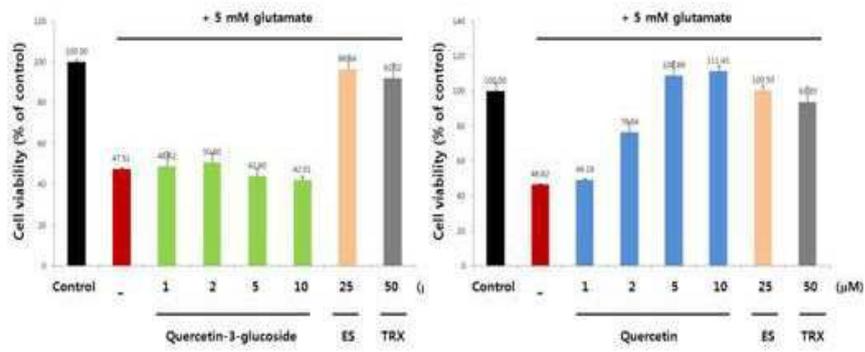


화합물 (4) (quercetin)

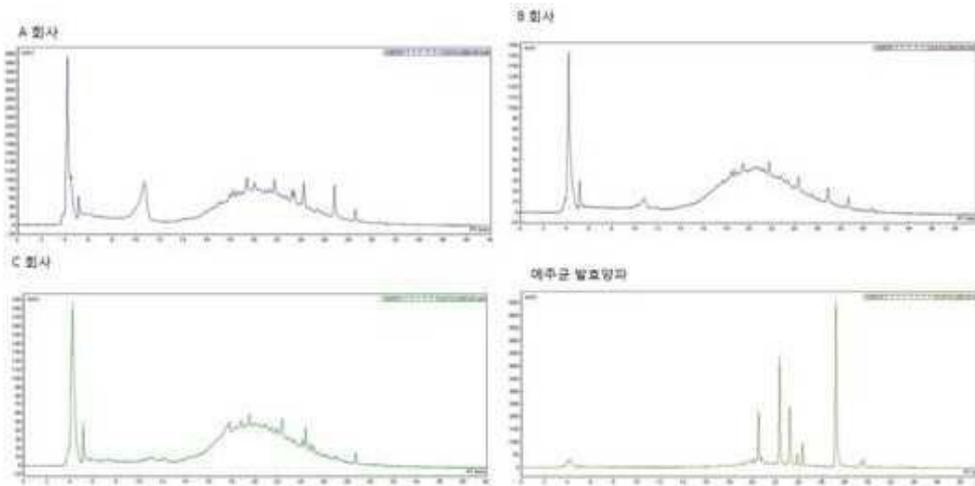
도면5



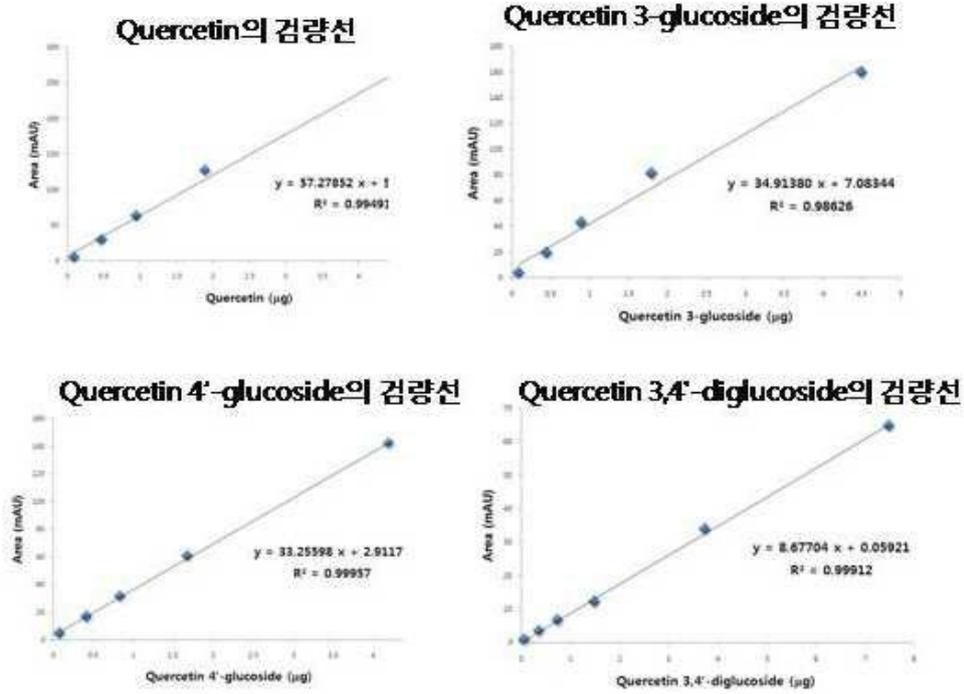
도면6



도면7



도면8



도면9

