



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2012-0087652
(43) 공개일자 2012년08월07일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

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

A61K 36/9068 (2006.01) A61P 29/00 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2011-0008991

(22) 출원일자 2011년01월28일

심사청구일자 2011년01월28일

(71) 출원인

계명대학교 산학협력단

대구광역시 달서구 달구벌대로 1095 (신당동)

(72) 발명자

양선아

대구광역시 달성군 다사읍 죽곡1길 42, e편한세상 103동 409호

최희돈

서울특별시 송파구 올림픽로 435, 225동 2504호 (신천동, 파크리오)

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

박우근, 경진영, 공민호

전체 청구항 수 : 총 8 항

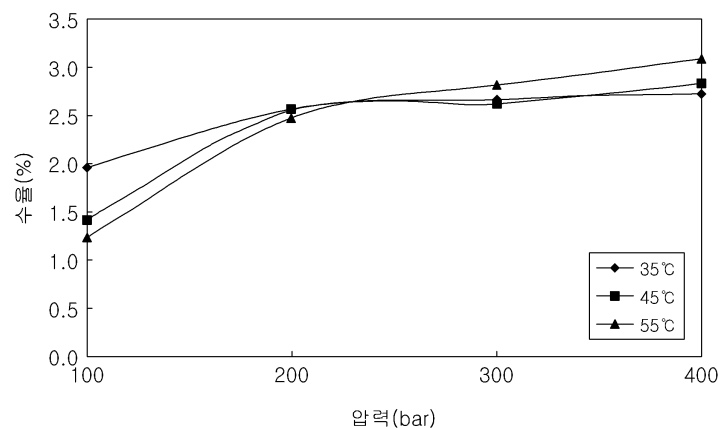
(54) 발명의 명칭 생강 추출물 제조방법 및 이에 따른 생강 추출물

(57) 요약

본 발명은 초임계 추출방법을 이용하여 항염 효과가 높은 생강 추출물을 제조하는 방법 및 이에 따른 생강 추출물에 관한 것으로, 구체적으로는 생강 분말을 초임계 이산화탄소를 이용하여 35 ~ 55℃의 온도, 100~ 400 bar의 압력에서 1 ~ 3 mL/min의 유속으로 1 ~ 3 시간 동안 초임계 추출함으로써, 생강 특유의 맛과 향기를 제거하거나 보완할 수 있을 뿐 아니라 짧은 시간 안에 추출 수율을 높으면서도 진저롤(gingerol)의 함량이 높은 추출물을 얻는 방법을 제공한다.

또한, 본 발명은 상기 초임계 추출 후 남은 박을 생강 박 무게에 대하여 5 ~ 15배(w/v)의 60 ~ 90% 주정을 가하고 실온에서 6 ~ 36시간 동안 정치시킴으로써, 생강박을 활용하여 항염 활성이 높은 생강 추출물을 얻는 방법을 제공한다.

대표도 - 도1



(72) 발명자

이은주

대구광역시 북구 매전로4길 9, 휴먼시아아파트 21
1동 705호 (매천동)

정연섭

대구광역시 달성군 다사읍 다사로109길 39-9

임효권

대구광역시 달성군 다사읍 죽곡리 대실역 e-편한세
상 103동 1810호

이삼빈

대구광역시 달서구 선원로 171, 무지개타운 102동
306호 (이곡동)

김민주

대구광역시 달서구 계대동문로3안길 13-13 (신당동)

김형대

대구광역시 달성군 가창면 혈티로 204, (비슬청록
농장)

특허청구의 범위

청구항 1

(S1) 생강 분말을 준비하는 단계; 및

(S2) 생강 분말을 초임계 이산화탄소를 이용하여 35 ~ 55℃의 온도, 100 ~ 400 bar의 압력에서 1 ~ 3 mL/min의 유속으로 1 ~ 3 시간 동안 초임계 추출법으로 추출하여 생강유를 얻는 단계;를 포함하는 생강 추출물 제조방법.

청구항 2

제1항에 있어서,

(S1) 단계에서의 생강 분말은 평균 입도가 50 ~ 500 μm 인 생강 추출물 제조방법.

청구항 3

제1항에 있어서,

추출 수율이 2.5 ~ 3.0중량%인 생강 추출물 제조방법.

청구항 4

제1항에 있어서, (S2) 단계 이후에

(S3) 생강유를 얻은 후 남은 박을 생강 박 무게에 대하여 5 ~ 15배(w/v)의 60 ~ 90% 주정을 가하고 실온에서 6 ~ 36시간 동안 정치하는 단계; 및

(S4) 여과 및 농축하는 단계;를 더 포함하는 생강 추출물 제조방법.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항의 방법에 따라 제조된 생강 추출물.

청구항 6

제5항에 있어서,

진저롤(gingerol)의 함량이 21 ~ 25중량%인 생강 추출물.

청구항 7

제5항에 있어서,

10 ~ 100 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서 NO(Nitric Oxide) 생성 억제 효과가 50 ~ 98%인 생강 추출물.

청구항 8

제5항의 생강 추출물을 포함하는 항염증 조성물.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 초임계 추출방법을 이용하여 항염 효과가 높은 생강 추출물을 제조하는 방법 및 이에 따른 생강 추출물에 대한 것이다.

배경기술

[0002] 생강은 우리나라뿐 아니라 세계적으로 널리 이용되고 있는 향신료의 하나이며 식품의 관능성을 향상시키기 위해 첨가하는 조미성분의 하나로 널리 이용되고 있다. 또한, 생강은 인체에 유익한 여러 가지 성분이 함유되어 있어 차(tea)나 약재로 널리 쓰여 왔다.

[0003] 생강은 생강과에 속하는 아열대 및 열대성 다년생 식물로서 근경을 주로 이용하여, 특유의 향과 매운 맛이 있어서 오랫동안 향신료로 사용되어 왔다. 한방에서는 생강의 뿌리줄기 말린 것을 건강이라는 약재로 쓰고 있다. 건강은 소화불량 구토설사에 효과가 있고, 혈액순환을 촉진하며 항염증과 진통효과가 있다.

[0004] 생강의 4분의 3정도는 수분이며 전체 고형분의 40~60%는 전분이 차지하고 있다. 정유성분으로는 진기베롤(zingiberol), 진기베렌(zingiberene) 등이 함유되어 있으며, 특이 성분으로는 6-진저롤(gingerol, 0.1~0.3%), 8-진저롤(gingerol), 10-진저롤(gingerol), 진저론(zingerone), 6-쇼가올(6-shogaol, 0.04%), 감마-아미노부티르산(gamma-aminobutyric acid) 등이 있다.

[0005] 초임계 유체에 의한 천연물의 추출은 많은 관심의 대상이 되고 있다. 초임계 유체를 이용하는 추출 및 분리기술은 임계점 부근 또는 임계점을 초월하는 영역에서 초임계 유체의 특이한 물리적 특성을 이용하여 혼합성분 중 특정성분을 선택적으로 추출하는 분리기술의 하나이다.

[0006] 혼합물에서 특정성분을 분리하는 방법에는 구성성분의 휘발도 차이를 이용하는 증류법과 특정 용매에 대한 용해도 차이를 이용하는 용매추출법 등이 있다. 증류법은 높은 비점에서 조작됨으로 천연물의 증류에서는 고온에 의한 유효성분의 분해와 파괴 등이 문제가 된다. 용매추출법은 적절한 유기용제의 선정, 추출상에 유기용제의 잔존 및 제거공정의 필요, 낮은 분리효과 등의 어려움이 수반된다. 그러나 초임계 유체 추출법은 증류법에 비하여 임계온도 부근의 저온에서 조작이 가능하므로 저에너지 소비공정이며 천연물과 같이 열에 민감한 물질에 적용하기 좋다. 또 용매추출법과 비교하여 볼 때 초임계 유체는 확산계수가 크고 점도가 낮아 추출속도가 빠르며 상분리가 용이하여 용매추출법처럼 잔존용매의 제거공정이 필요 없다.

[0007] 생강은 여러 기능성 중에서도 높은 항염 활성을 나타내지만 이를 활용한 다양한 기능성 식품이나 염증 치료용 약학 조성물을 개발하고자 할 때 기호적으로 양호하지 않은 맛과 특유의 향기 특성을 나타내기 때문에 제약이 따른다.

[0008] 따라서 생강 특유의 맛과 향기를 제거하거나 보완할 수 있을 뿐 아니라 짧은 시간 안에 추출 수율을 높으면서도 항염 활성성분 중 하나인 진저롤(gingerol)의 함량이 높은 추출물을 얻는 추출방법의 개발이 필요한 실정이다. 또한, 생강 추출물 뿐 아니라 생강을 초임계 추출하고 남은 생강박의 활용방법에 대한 개발이 필요하다.

발명의 내용

[0009] 본 발명은 생강 분말을 초임계 이산화탄소를 이용하여 35 ~ 55℃의 온도, 100~ 400 bar의 압력에서 1 ~ 3 mL/min의 유속으로 1 ~ 3 시간 동안 초임계 추출하여 생강유를 얻는 것을 특징으로 하는 생강 추출물 제조방법을 제공한다.

[0010] 본 발명은 또한, 상기 생강유를 얻은 후 남은 박을 생강 박 무게에 대하여 5 ~ 15배(w/v)의 60 ~ 90% 주정을 가

하고 실온에서 6 ~ 36시간 동안 정치하는 것을 특징으로 하는 생강 추출물 제조방법을 제공한다.

- [0011] 본 발명은 생강 특유의 맛과 향기를 제거하거나 보완할 수 있을 뿐 아니라 짧은 시간 안에 추출 수율이 높으면 서도 진저롤(gingerol)의 함량이 높은 추출물을 얻을 수 있는 생강 추출물 제조방법을 제공한다.
- [0012] 본 발명은 생강을 초임계 추출하고 남은 생강박을 활용하여 항염 활성이 높은 생강 추출물을 제공한다.
- [0013] 이에 본 발명은 바람직한 제1구현예로서 (S1) 생강 분말을 준비하는 단계; 및 (S2) 생강 분말을 초임계 이산화 탄소를 이용하여 35 ~ 55℃의 온도, 100~ 400 bar의 압력에서 1 ~ 3 mL/min의 유속으로 1 ~ 3 시간 동안 초임 계 추출법으로 추출하여 생강유를 얻는 단계;를 포함하는 생강 추출물 제조방법을 제공한다.
- [0014] 상기 구현예에 의한 생강 초임계 추출물 제조방법에서, (S1) 단계에서의 생강 분말은 평균 입도가 50 ~ 500 μm 인 생강 추출물 제조방법을 제공한다.
- [0015] 상기 구현예에 의한 생강 초임계 추출물 제조방법에서, 추출 수율이 2.5 ~ 3.0중량%인 생강 추출물 제조방법을 제공한다.
- [0016] 상기 구현예에 의한 생강 초임계 추출물 제조방법에서, (S2) 단계 이후에 (S3) 생강유를 얻은 후 남은 박을 생 강 박 무게에 대하여 5 ~ 15배(w/v)의 60 ~ 90% 주정을 가하고 실온에서 6 ~ 36시간 동안 정치하는 단계; 및 (S4) 여과 및 농축하는 단계;를 더 포함하는 생강 추출물 제조방법을 제공한다.
- [0017] 본 발명은 바람직한 제2구현예로서 상기의 제조방법에 따라 제조된 생강 추출물을 제공한다.
- [0018] 상기 제2구현예에 의한 생강 초임계 추출물에서, 진저롤(gingerol)의 함량이 21 ~ 25중량%인 생강 추출물을 제 공한다.
- [0019] 상기 제2구현예에 의한 생강 추출물에서, 10 ~ 100 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서 NO(Nitric Oxide) 생성 억제 효과가 50 ~ 98%인 생강 추출물을 제공한다.
- [0020] 본 발명은 바람직한 제3구현예로서 상기 생강 추출물을 포함하는 항염증 조성물을 제공한다.

도면의 간단한 설명

- [0021] 도 1은 본 발명의 바람직한 일 실시예에 따라 생강의 초임계 추출 온도와 압력별 수율 변화를 나타내는 그래프 이다.
- 도 2는 본 발명의 바람직한 일 실시예에 따라 35℃의 온도에서 압력을 달리하여 추출한 생강 추출물의 외관을 나타내는 사진이다.
- 도 3은 본 발명의 바람직한 일 실시예에 따라 초임계 추출 온도와 압력을 달리하여 추출한 생강 추출물의 항산 화 활성을 비교하여 나타낸 그래프이다. 이때, 도 3a는 35℃에서 초임계 추출한 생강 추출물의 항산화 활성을 나타낸 것이고, 도 3b는 45℃, 도 3c는 55℃에서 초임계 추출한 생강 추출물의 항산화 활성을 나타낸 그래프이 다.
- 도 4는 본 발명의 바람직한 일 실시예에 따른 생강 초임계 추출물의 세포독성 및 NO 소거능을 나타내는 그래프

이다. 구체적으로, 도 4a는 생강 초임계 추출물의 세포독성을 나타내는 그래프이고, 도 4b는 생강 초임계 추출물의 NO 소거능을 나타내는 그래프이다.

도 5는 본 발명의 바람직한 일 실시예에 따른 생강 초임계 박추출물의 세포독성 및 NO 소거능을 나타내는 그래프이다. 구체적으로, 도 5a는 생강 초임계 박추출물의 세포독성을 나타내는 그래프이고, 도 5b는 생강 초임계 박추출물의 NO 소거능을 나타내는 그래프이다.

도 6은 본 발명의 바람직한 비교예에 따른 생강 에탄올 추출물의 세포독성 및 NO 소거능을 나타내는 그래프이다. 구체적으로, 도 6a는 생강 에탄올 추출물의 세포독성을 나타내는 그래프이고, 도 6b는 생강 에탄올 추출물의 NO 소거능을 나타내는 그래프이다.

도 7은 진저롤(gingerol)의 세포독성 및 NO 소거능을 나타내는 그래프이다. 구체적으로, 도 7a는 진저롤의 세포독성을 나타내는 그래프이고, 도 7b는 진저롤의 NO 소거능을 나타내는 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0022] 이하, 본 발명을 더욱 상세히 설명한다.
- [0023] 본 발명은 초임계 추출방법을 이용하여 항염 효과가 높은 생강 추출물을 제조하는 방법 및 이에 따른 생강 추출물을 제공하는 것으로, 특히 생강 분말을 초임계 이산화탄소를 이용하여 35 ~ 55℃의 온도, 100~ 400 bar의 압력에서 1 ~ 3 mL/min의 유속으로 1 ~ 3 시간 동안 초임계 추출함으로써, 생강 특유의 맛과 향기를 제거하거나 보완할 수 있을 뿐 아니라 짧은 시간 안에 추출 수율이 높으면서도 진저롤(gingerol)의 함량이 높은 추출물을 얻는 방법을 제공한다. 상기 각각의 조건들이 범위를 벗어날 경우, 추출 수율이 낮아지거나 추출 수율이 더 이상 증가하지 않아 경제적으로 바람직하지 못하다.
- [0024] 또한, 본 발명은 상기 초임계 추출 후 남은 생강 박을 박 무게에 대하여 5 ~ 15배(w/v)의 60 ~ 90% 주정을 가하고 실온에서 6 ~ 36시간 동안 정치시킴으로써, 생강박을 활용하여 항염 활성이 높은 생강 추출물을 얻는 방법을 제공한다.
- [0025] 이를 위하여 본 발명은 (S1) 생강 분말을 준비하는 단계; 및 (S2) 생강 분말을 초임계 이산화탄소를 이용하여 35 ~ 55℃의 온도, 100 ~ 400 bar의 압력에서 1 ~ 3 mL/min의 유속으로 1 ~ 3 시간 동안 초임계 추출법으로 추출하여 생강유를 얻는 단계;를 포함하는 생강 추출물 제조방법을 제공한다.
- [0026] 먼저, (S1) 단계에서는 생강 분말을 준비한다. 생강 분말은 평균 입도가 50 ~ 500 μm 인 것이 추출속도가 높으므로 바람직하다.
- [0027] (S2) 단계에서는 상기 생강 분말을 초임계 이산화탄소를 이용하여 35 ~ 55℃의 온도, 100 ~ 400 bar의 압력에서 1 ~ 3 mL/min의 유속으로 1 ~ 3 시간 동안 초임계 추출법으로 추출한다.
- [0028] 상기 추출방법에 의하면 생강유(생강 초임계 추출물)를 짧은 시간 안에 2.5 ~ 3.0중량%의 수율로 얻을 수 있다.
- [0029] 그리고, 상기 추출방법에 의하면 항염 활성성분 중 하나인 진저롤(gingerol)의 함량이 21 ~ 25중량%인 생강 추출물을 얻을 수 있다. 즉, 상기 조건으로 생강 분말을 초임계 추출하는 경우 생강 특유의 맛과 향기를 제거하거나 보완할 수 있을 뿐 아니라 짧은 시간 안에 추출 수율을 높으면서도 진저롤(gingerol)의 함량이 높은 추출물(생강유)을 얻을 수 있다.
- [0030] 또한, 본 발명의 생강 추출물 제조방법은 상기 (S2) 단계 이후에, (S3) 생강유를 얻은 후 남은 박을 생강 박 무게에 대하여 5 ~ 15배(w/v)의 60 ~ 90% 주정을 가하고 실온에서 6 ~ 36시간 동안 정치하는 단계; 및 (S4) 여과 및 농축하는 단계;를 더 포함할 수 있다.
- [0031] 그리고, 상기 방법에 의하면 생강을 초임계 추출하고 생강박을 활용하여 10 ~ 100 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도에서 NO(Nitric

Oxide) 생성 억제 효과가 50 ~ 98%인 생강 추출물을 얻을 수 있다. 즉, 상기 추출방법에 의하면 생강을 초임계 추출하고 남은 생강박을 활용하여 항염 활성이 높은 생강 추출물을 얻을 수 있다.

[0032] 염증반응이 일어나면 여러 가지 염증인자들(proinflammatory mediators)이 만들어지는데, 염증인자에는 inducible nitric oxide synthase(iNOS)에 의해서 만들어지는 NO(Nitric Oxide)와 cyclooxygenase-2 (COX-2)에 의해서 만들어지는 prostaglandin E₂(PGE₂) 등이 있다. 이러한 염증 인자는 염증반응의 전사인자인 nuclear factor-κB(NF-κB)를 활성화시키며, 그 결과 과량의 NO와 PGE₂를 생성하여 염증을 일으킨다. 따라서, NO(Nitric Oxide)의 생성을 억제하면 염증 반응을 억제할 수 있게 된다.

[0033] 다음으로, 본 발명은 상기한 생강 추출물 제조방법에 따른 생강 추출물을 포함하는 항염증 조성물을 제공한다.

[0034] 상기 항염증 조성물은 항염 기능성을 가진 화장료 조성물, 약학 조성물, 식품 조성물 등 다양한 산업 분야에 활용될 수 있어 매우 유용한 발명이다.

[0035] 이하, 본 발명의 구성을 실시예를 통하여 보다 상세히 설명하나, 본 발명의 범위가 하기 실시예로 한정되는 것은 아니다.

[0036] [실시예]

[0037] 실시예 1

[0038] 초임계유체추출장치(SFT-100XW, Supercritical Fluid Technologies, Inc., Newark, DE, USA)를 사용하였고, 평균입도가 50 ~ 500 μm인 생강 분말 18g을 100 mL의 용량의 추출조에 넣어 추출하였다. 시료의 추출조건은 35, 45, 55℃온도에서 100, 200, 300, 400 bar로 압력을 변화시키며 실시하였고, 이산화탄소의 유속은 2 mL/min로 다이내믹 모드에서 2시간동안 추출하여 추출물을 곧바로 용기(vial)에 받아내었다.

[0039] 실시예 2

[0040] 실시예 1에서 생강 초임계 추출물(생강유)을 얻고 남은 부산물인 생강박의 무게에 대하여 10배(w/v)의 70% 주정을 가하고 실온에서 24시간 동안 정치하여 생강(박) 추출물을 얻었다.

[0041] 비교예

[0042] 평균입도가 50 ~ 500 μm인 생강 분말에 상기 생강 분말 무게에 대하여 10배(w/v)의 70% 주정(에탄올)을 가하고 실온에서 24시간 동안 정치하여 생강 추출물을 얻었다.

[0043] [실험예]

[0044] 실험예 1: 생강의 초임계 추출 수율

[0045] 생강의 초임계 추출 수율은 도 1에 나타난 바와 같이 동일한 온도에서는 압력이 증가할수록 증가하는 것으로 나타났다. 100 bar에서는 온도가 35℃에서 55℃로 증가할수록 수율이 1.91%에서 1.07%로 감소한 반면 200~400 bar에서는 온도가 증가할수록 추출수율이 증가하여 55℃의 경우 각각 2.41, 2.92, 3.00%를 나타내었다.

실험예 2: 생강 추출물의 색도 및 외관

색도는 color and color difference meter(Color QUEST II, Hunter Lab, USA)를 이용하여 L(lightness), a(redness/greenness), b(yellowness/blueness)값을 측정하였으며, 이때 표준 백색판은 L=92.68, a=-0.81, b=0.86의 값을 가진 것을 사용하였다.

도 2는 35℃에서 압력을 달리하여 추출한 생강 추출물의 외관을 나타낸 것으로, 100 bar에서는 노란색을 나타내었고 압력이 증가할수록 생강 고유의 색소성분이 많이 추출되어 색이 진하여지면서 400 bar에서는 붉은 계통의 적갈색을 나타내었다. 또한, 초임계 추출조건에 따른 생강 추출물의 색도 측정 결과 하기 표 1에서 나타낸 바와 같이 모든 온도조건에서 압력이 증가함에 따라 L 값과 b 값이 크게 감소하였으며 특히 b 값의 감소가 큰 것으로 나타나 생강의 색소 추출과 b 값의 관련성이 가장 큰 것을 알 수 있었다.

표 1

초임계 추출 온도와 압력별 생강 추출물의 색도

온도(℃)	압력(bar)	색도(Color value)		
		L	a	b
35	100	38.8±1.5	6.6±1.0	26.7±2.3
	200	29.4±0.6	10.0±1.7	10.2±1.9
	300	28.6±0.9	16.7±2.4	9.2±1.9
	400	24.4±1.4	5.0±1.1	0.2±0.9
45	100	44.4±0.9	-0.9±0.3	33.0±1.8
	200	34.0±1.3	14.4±1.0	18.7±2.6
	300	27.7±0.8	14.7±0.7	8.5±1.1
	400	24.7±0.5	6.9±0.7	1.2±0.7
55	100	45.3±3.0	-2.0±0.3	30.9±4.6
	200	35.7±1.2	12.6±0.7	21.8±1.8
	300	24.1±0.7	7.9±1.2	2.8±1.0
	400	21.8±0.7	5.0±0.2	0.6±0.1

실험예 3: 생강 추출물의 진저롤(gingerol) 함량

생강 초임계 추출물에 함유된 6-진저롤(6-gingerol), 8-진저롤(8-gingerol), 10-진저롤(10-gingerol), 6-쇼가올(6-shogaol) 등의 진저롤(gingerol)의 함량을 HPLC(Jasco Co., Japan)를 이용하여 정량하였다. 컬럼은 Waters symmetry C-8 reversed phase column (150 × 3.9 mm, Cat. No. WATO 54235)을 이용하였고, 이동상은 methanol-water(46:35, v/v)를 1 mL/min의 속도로 용출하였으며, 시료의 검출은 UV detector로 282 nm에서 측정하였다. 분석표준물질인 6-진저롤, 8-진저롤, 10-진저롤, 6-쇼가올은 크로마텍스(Chromadex)사에서 구입하여 사용하였다. 실시예 1의 생강 추출물을 5 mg/mL 농도로 메탄올에 녹인 후 0.45 μm syringe filter(Millipore)로 여과하여 제조하였고 이를 분석용 시료로 사용하였다.

초임계 추출 온도와 압력별 생강 추출물의 진저롤 함량 변화를 측정한 결과는 하기 표 2에 나타내었다. 진저롤 함량 분포는 6-진저롤이 가장 높은 함량을 나타내었고(10.78~17.17%) 8-진저롤 (2.38~4.08%), 10-진저롤 (1.01~3.07%), 6-쇼가올 (0.64~1.09%)의 순으로 나타났다. 추출온도와 상관없이 100 bar에서 가장 낮은 진저롤 함량을 나타내었고 추출온도가 증가할수록 각각 20.00, 18.02, 15.13%로 낮아지는 경향이였다. 반면 200~400 bar의 범위에서는 21.46~24.48%로서 큰 차이가 없는 진저롤(gingerol) 함량을 나타내었다.

표 2

초임계 추출 온도와 압력별 생강추출물의 진저롤 함량 변화

온도 (℃)	압력 (bar)	진저롤(Gingerol) 함량 (%)				
		6-진저롤	6-쇼가올	8-진저롤	10-진저롤	합계

35	100	15.01	0.71	2.47	1.81	20.00
	200	16.02	1.05	3.67	2.75	23.49
	300	17.17	0.98	4.08	2.25	24.48
	400	16.43	1.09	3.40	2.57	23.49
45	100	12.35	0.88	3.01	1.78	18.02
	200	16.01	0.75	3.19	2.52	22.47
	300	15.33	0.64	3.02	2.47	21.46
	400	15.37	0.66	3.17	2.69	21.89
55	100	10.78	0.96	2.38	1.01	15.13
	200	16.37	0.91	3.62	2.90	23.80
	300	16.21	0.68	3.08	2.54	22.51
	400	15.69	0.76	3.58	3.07	23.10

[0054] **실험예 4: 생강 추출물의 항산화 활성**

[0055] DPPH(2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazyl) 라디칼 소거능

[0056] 추출물의 항산화력은 윌리엄 등의 방법을 변형한 DPPH 라디칼 소거활성으로 측정하였다. 메탄올에 녹인 0.15 mM DPPH 용액 1 mL와 각 농도별로 희석한 시료 0.05 mL를 혼합하고, 20분경과 후에 525 nm에서 흡광도를 측정하였다. DPPH의 라디칼 소거활성은 시료를 첨가하지 않은 대조구와 비교하여 다음 식에 의하여 백분율로 나타내었다.

[0057]
$$\text{Inhibition \%} = \frac{B-A}{B} \times 100$$

[0058] (B: Absorbance of control / A: Absorbance of sample)

[0059] 또한, 각 추출물의 라디칼 소거활성은 추출물을 첨가하지 않은 대조구의 흡광도를 1/2로 환원시키는데 필요한 추출물의 농도인 IC₅₀ 값으로 나타내었다.

[0060] ABTS 라디칼 소거능

[0061] 추출물의 ABTS 라디칼 소거능은 Van der Berg 등의 방법을 변형한 방법으로 측정하였다. 실험 12~16시간 전에 제조해 둔 7 mM ABTS 용액은 734 nm에서 0.7±0.02의 흡광도를 나타내도록 5 mM PBS에 희석한 후 ABTS 용액 1 mL와 각 농도별로 희석한 시료 0.02 mL를 혼합하여 10분경과 후에 734 nm에서 흡광도를 측정하였다. ABTS의 라디칼 소거활성은 시료를 첨가하지 않은 대조구와 비교하여 다음 식에 의하여 백분율로 나타내었다.

[0062]
$$\text{Inhibition \%} = \frac{B-A}{B} \times 100$$

[0063] (B: Absorbance of control / A: Absorbance of sample)

[0064] 또한, 각 추출물의 라디칼 소거활성은 추출물을 첨가하지 않은 대조구의 흡광도를 1/2로 환원시키는데 필요한 추출물의 농도인 IC₅₀ 값으로 나타내었다.

[0065] Linoleic acid와 β-carotene의 coupled oxidation에 대한 항산화 활성

[0066] Linoleic acid 60 mg, β -carotene 10 mg 그리고 Tween 80 200 mg과 chloroform 10 mL를 혼합하여 농축시킨 후 증류수 50 mL에 용해하여 용액으로 사용하였다. 혼합용액 1 mL와 증류수 2 mL, 그리고 생강 추출물(20 mg/mL EtOH) 0.05 mL를 혼합한 후 40℃ water bath에서 24시간 유지하면서 꺼내어 470 nm에서 흡광도를 측정하였다. 제조 직후의 흡광도 값을 100으로 하여 측정된 흡광도 값으로부터 항산화 활성을 산출하였다. 이때 생강 추출물 대신 증류수를 0.05 mL 처리한 것을 대조구로 하였다.

[0067] 초임계 추출 온도와 압력별 생강추출물의 DPPH와 ABTS 라디칼 소거 활성을 측정한 결과는 하기 표 3에 나타낸 바와 같다. DPPH, ABTS 라디칼 소거활성 모두 100 bar에서 가장 높은 IC₅₀ 값을 그리고 온도가 증가할수록 높은 IC₅₀ 값을 나타내었고 특히 55℃, 100 bar에서는 각각 1641.0, 1156.7 μ g/mL로 가장 낮은 항산화 활성을 나타내었다. 200~400 bar의 범위에서는 각각 677.3~721.6 μ g/mL과 392.5~434.7 μ g/mL로 큰 차이가 나지 않는 항산화 활성을 나타내었다. 한편, Linoleic acid와 β -carotene의 coupled oxidation에 대한 항산화 활성을 측정한 결과는 도 3에 나타낸 바와 같다. 생강 추출물을 첨가하지 않은 대조구의 경우 2시간 경과시 71.1%의 항산화 활성을 갖는 것으로 나타나 짧은 시간에 급격히 산화가 일어남을 알 수 있었다. 생강 추출물을 첨가할 경우 처리구에 따라 차이가 있지만 84.4~99.3%의 활성을 나타내어 대조구에 비해 산화가 크게 억제됨을 알 수 있었다. 또한 24시간 경과시에도 대조구가 52.5%의 항산화 활성을 나타내는 반면 생강 추출물 처리시에는 57.3~77.8%의 항산화 활성을 나타내는 것으로 나타났다. DPPH와 ABTS 라디칼 소거 활성과 마찬가지로 추출온도에 상관없이 100 bar에서 가장 낮은 항산화 활성을 나타내고 200~400 bar의 범위에서는 큰 차이가 나지 않는 항산화 활성을 갖는 것으로 나타났다. 이와 같은 항산화 활성 결과는 앞에서 기술한 추출물의 진저롤 함량의 경향과 거의 유사한 경향인 것으로 생강 추출물의 항산화 활성이 진저롤 함량과 매우 큰 상관관계가 있음을 알 수 있었다.

표 3

[0068] 초임계 추출 온도와 압력별 생강 추출물의 항산화 활성

온도 (℃)	압력 (bar)	IC ₅₀ (μ g/ml)	
		DPPH	ABTS
35	100	811.7	546.3
	200	708.8	415.8
	300	677.3	405.0
	400	685.4	392.5
45	100	1267.8	897.2
	200	693.5	421.4
	300	699.2	418.5
	400	683.5	411.4
55	100	1641.0	1156.7
	200	721.6	434.7
	300	691.4	427.4
	400	718.1	409.9

[0069] 실험예 5: 생강 추출물의 항염증 효과

[0070] (1) 실험방법

[0071] 1) 세포배양 및 세포 독성 측정

[0072] 대식세포 계열(murine macrophage cell line)인 RAW 264.7 세포주를 한국 세포주 은행(KCLB, Seoul, Korea)으로부터 분양받았으며, 10% FBS(fetal bovine serum)와 1% 항생제(penicillin/streptomycin)를 첨가한 DMEM 배지를 이용하여 5% CO₂가 존재하는 37℃ 인큐베이터에서 1주일에 2~3회 계대 배양하였다.

[0073] 세포 독성을 MTT 법으로 측정하기 위하여, RAW 264.7 세포 1×10^5 cells/well을 96 well plate에 분주하고, 37 °C, 5% CO₂ 인큐베이터에서 24시간 동안 배양하였다. 배양한 세포를 세럼 프리(serum free) 배지로 교체한 후 LPS (100 ng/mL)와 시료(실시예 1, 실시예 2, 비교예)를 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 생성된 formazan 결정을 용해시켜 마이크로플레이트 판독기(microplate reader)로 550 nm에서 흡광도를 측정하였고, 세포독성은 시료의 흡광도를 대조군의 흡광도에 대한 백분율로 나타내었다.

[0074] Rat 유래의 비만세포주(RBL-2H3)에 대한 세포독성능도 MTT 법으로 실험하였다. 본 실험에 사용한 세포주 RBL-2H3 cell은 한국 세포주 은행(Seoul, Korea)을 통해서 분양 받아 계대배양하면서 실험하였다. 세포배양에 사용된 배지는 10% FBS (fetal bovine serum)와 1% 항생제(penicillin/streptomycin)를 첨가한 MEM 배지를 이용하여 37°C에서 5% CO₂ 인큐베이터에서 2~3일간 배양한 후 사용하였다.

[0075] 2) NO(Nitric Oxide) 생성량 측정

[0076] 시료의 NO(Nitric Oxide) 생성 억제능을 측정하기 위하여, 각 시료(실시예 1, 실시예 2, 비교예)의 추출물 혹은 LPS를 처리한 상기 RAW 264.7 세포주 배양액을 nitrite 측정을 위해 100 µL를 96 well plate에 취하였다. 여기에 동량의 Griess 시약을 넣어 10분간 반응시킨 후 마이크로플레이트 판독기(microplate reader)를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. Nitrite의 농도는 질산나트륨(NaNO_2)을 사용하여 얻은 표준 직선과 비교하여 산출하였다.

[0077] 또한, 비만세포주 RBL-2H3을 1 ml(2×10^5 cells, 24 well plate)에 anti-DNP IgE(0.45 µg/ml)로 16시간 감작 시키고, DNP-BSA(10 µg/mL)로 활성화시키기 전에 30분 동안 37°C에서 농도별 시료를 20 ml 처리하였다. 반응이 끝난 후 4°C에서 10분간 400 xg에서 원심하여 얻은 상등액 25 µL를 기질 p-nitrophenyl-N-acetyl-b-D-glucosaminide 25 µL와 37°C에서 1시간 반응시킨 후 stop solution(0.1 M NaCO/NaHCO, pH 10) 200 µL를 가하여 정지시키고 405 nm에서 흡광도를 측정하여 b-헥소사미니다제(b-hexosaminidase)의 양을 계산하였다.

[0078] (2) 실험 결과

[0079] 1) 초임계 추출물(생강유)의 세포독성 및 NO 생성 억제 활성 측정

[0080] 생강의 초임계 추출물(생강유)의 항염증 효과를 측정하기 위해, 100 bar의 압력에서 35, 45, 55°C에서 추출된 생강유(실시예 1)의 NO 소거 활성을 측정하였다. 그 결과, 55°C의 100 µg/mL 농도에서 약간의 독성이 나타났으며, 추출온도가 높아지면 NO 생성 억제능이 낮아지는 경향을 나타내어 고온에서는 활성을 억제하는 성분도 유출되는 것으로 사료되나, 온도에 의한 유의적인 차는 없었다(도 4). 이와 같이, 35-55°C, 100 bar의 마일드한 조건에서 추출된 생강 초임계 오일에서도 높은 NO 소거능이 나타났다.

[0081] 2) 초임계 박의 세포독성 측정 및 NO 생성 억제 활성 측정

[0082] 실시예 2의 생강 추출물의 NO 생성에 대한 억제 효과를 실험하였다. 그 결과, 도 5에 나타낸 바와 같이 추출 온도에 비례하여 고농도에서 세포 독성이 나타났으며, NO 소거능도 온도 상승과 함께 증가하는 경향을 나타내어 실시예 1의 생강 추출물과 일치하는 좋은 상관관계를 나타냈다. 10-50 µg/mL의 농도 구간에서 농도 의존적으로 높은 억제율을 나타내므로, 실시예 1의 생강 추출물과 함께 실시예 2의 초임계 박도 항염증에 높은 효과가 있을 것으로 기대된다.

[0083] 3) 생강 추출물의 세포독성 및 NO 생성 억제능 측정

[0084] 비교예의 생강 추출물의 NO 생성에 대한 억제 효과를 실험하였다. 그 결과, 도 6에 나타낸 바와 같이 세포 독성은 나타나지 않았으며, NO 소거능은 농도 의존적으로 함께 증가하는 경향을 나타내었다(도 6).

[0085] 4) 진저롤(Gingerol)의 세포독성 측정 및 NO 생성 억제 활성 측정

[0086] 생강의 활성 성분으로 알려진 진저롤(gingerol)의 NO 생성에 대한 억제 효과를 테스트 한 결과, 100 $\mu\text{g/mL}$ 까지는 세포 독성이 없었으며 10 $\mu\text{g/mL}$ 에서 50% 정도의 NO 억제능을 나타냈다(도 7).

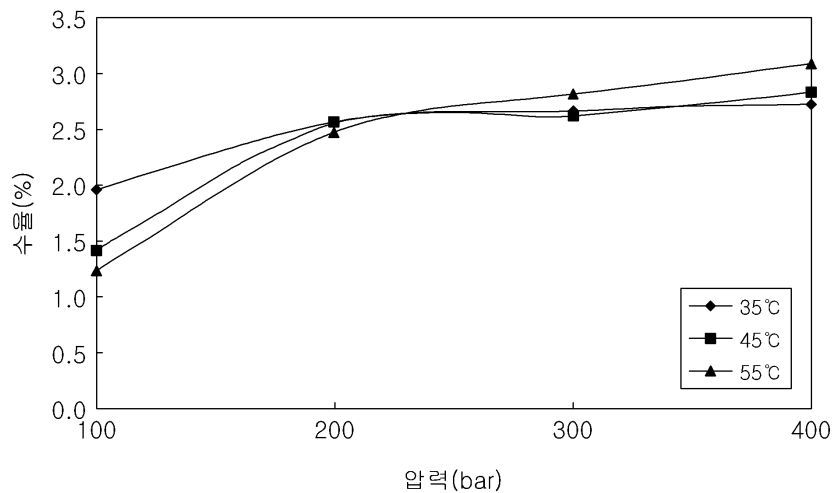
[0087] 이상 살펴본 바와 같이 본 발명은 생강을 특정 조건으로 초임계 추출함으로써 생강 특유의 맛과 향기를 제거하거나 보완할 수 있을 뿐 아니라 짧은 시간 안에 추출 수율을 높으면서도 진저롤(gingerol)의 함량이 높은 추출물을 얻을 수 있어 식품산업에 매우 유용한 발명이다.

[0088] 또한, 본 발명은 상기 초임계 추출 후 남은 생강박을 활용하여 항염 활성이 높은 생강 추출물을 얻을 수 있다.

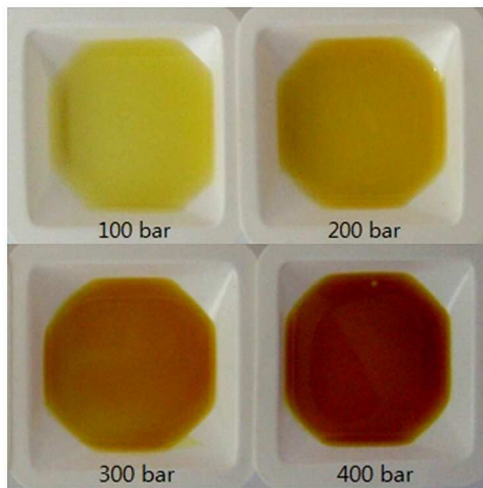
[0089] 이상에서 본 발명의 바람직한 실시예에 대하여 도시하고 또한 설명하였으나, 본 발명은 상기한 실시예에 한정되지 않고, 이하 청구범위에서 청구하는 본 발명의 요지를 벗어남이 없이 당해 발명의 분야에서 통상의 지식을 가진 자라면 누구든지 다양한 변형실시가 가능함은 물론이며, 그와 같은 변형은 청구범위의 기재 범위 내에 있게 된다.

도면

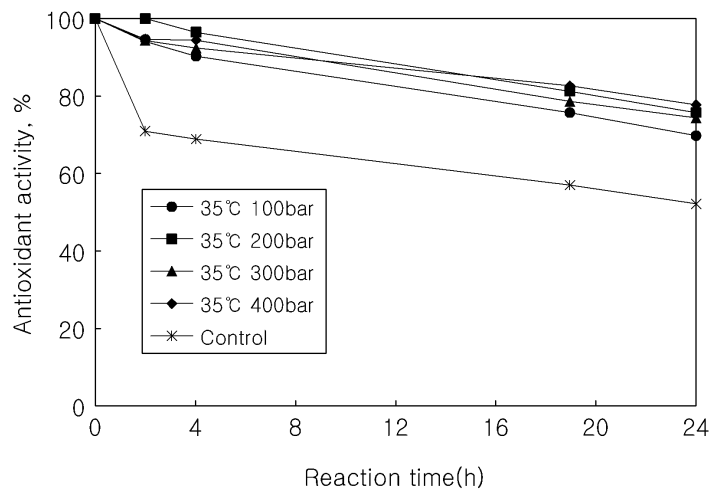
도면1



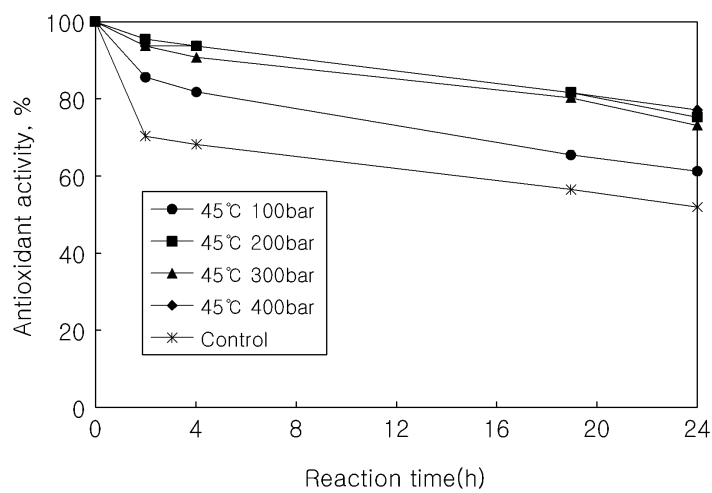
도면2



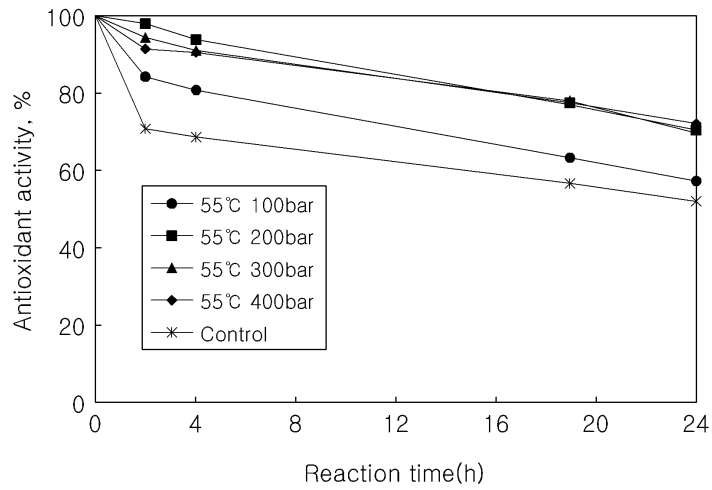
도면3a



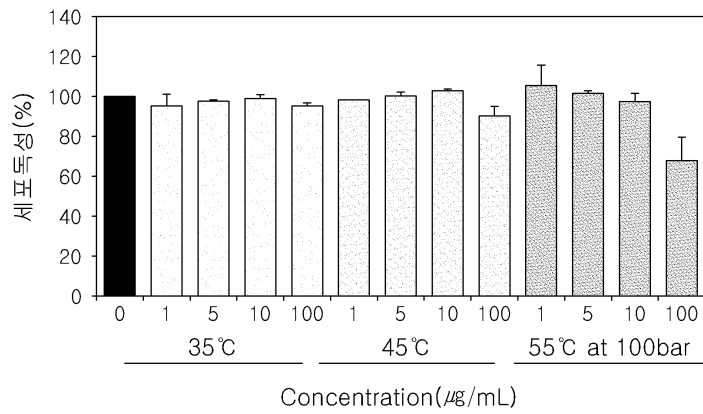
도면3b



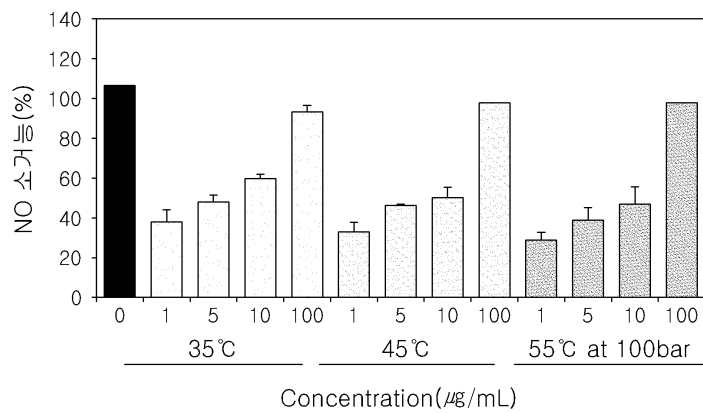
도면3c



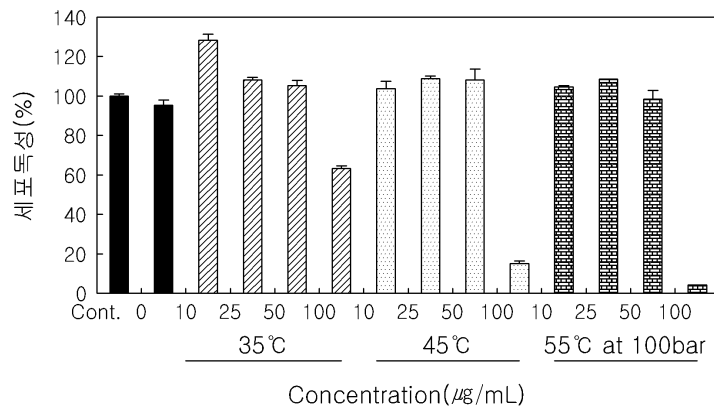
도면4a



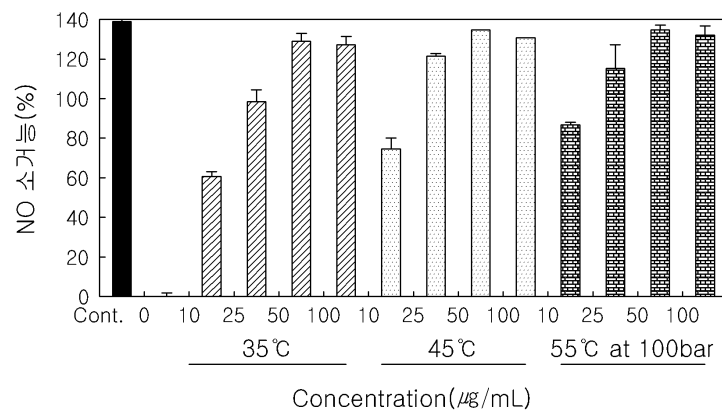
도면4b



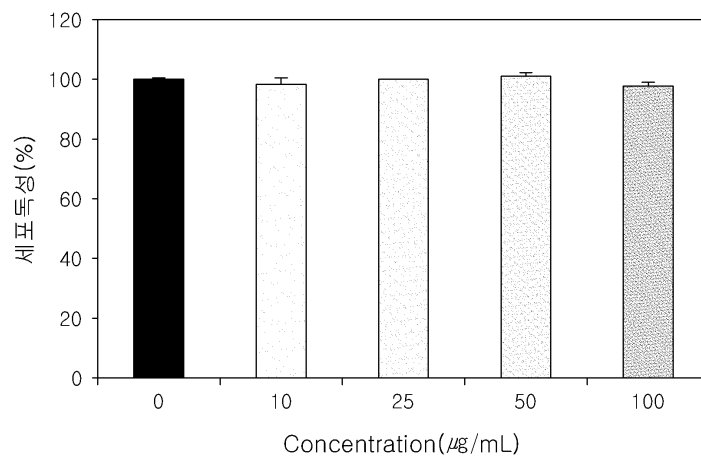
도면5a



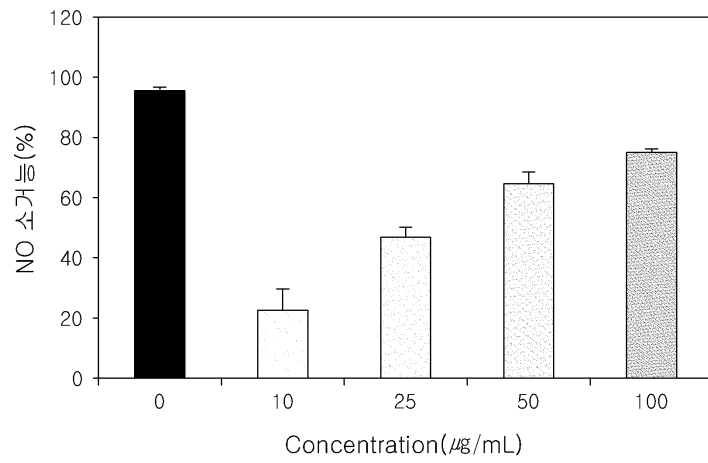
도면5b



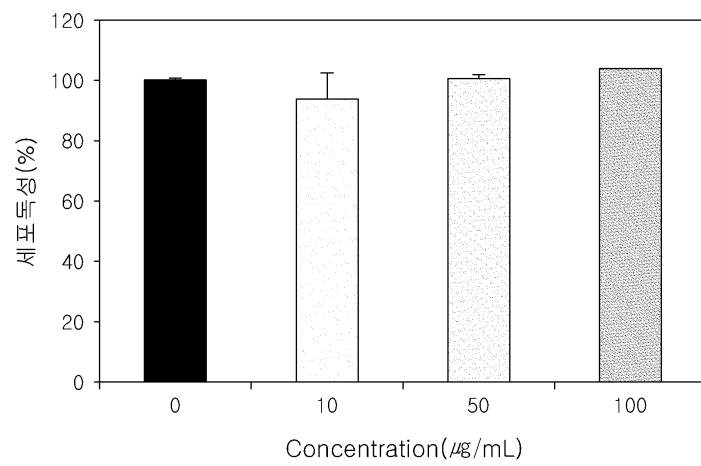
도면6a



도면6b



도면7a



도면7b

