(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0054132
(43) 공개일자 2022년05월02일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A23K 10/30 (2016.01) *A23K 20/121* (2016.01)
A23K 50/40 (2016.01) *A61K 39/00* (2006.01)
(52) CPC특허분류
A23K 10/30 (2016.05)
A23K 20/121 (2016.05)
(21) 출원번호 10-2020-0138698
(22) 출원일자 2020년10월23일
심사청구일자 2020년10월23일

(71) 출원인
대한민국(농촌진흥청장)
전라북도 전주시 덕진구 농생명로 300 (중동)
충북대학교 산학협력단
충청북도 청주시 서원구 충대로 1 (개신동)
인천대학교 산학협력단
인천광역시 연수구 아카데미로 119 (송도동)
(72) 발명자
이대영
경기도 용인시 기흥구 서천동로 22, 509동 304호 (서천동, 힐스테이트서천)
이영섭
충청북도 음성군 음성읍 설성공원길 23-7, 103동 303호(음성지평더웰아파트)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
위병갑

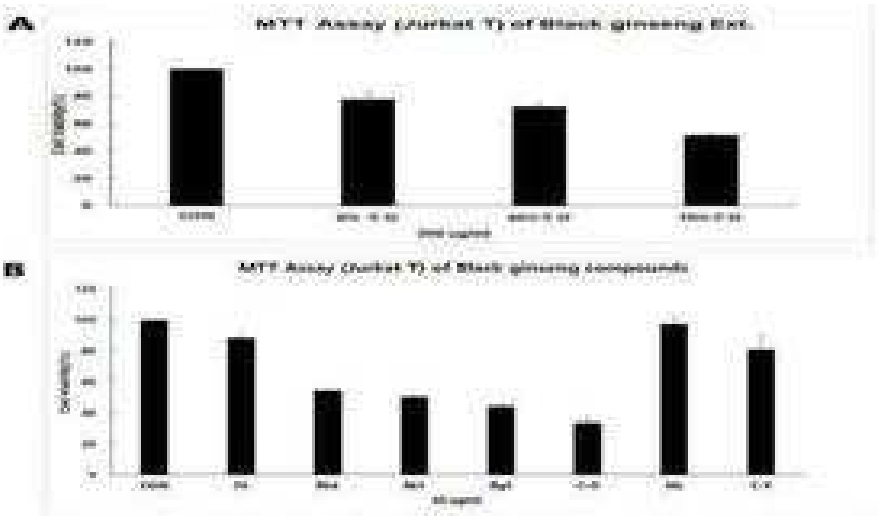
전체 청구항 수 : 총 28 항

(54) 발명의 명칭 **흑삼 추출물을 유효성분으로 포함하는 반려동물의 면역력 증진용 조성물**

(57) 요 약

본 발명은 흑삼 추출물 및 흑삼에서 분리한 화합물을 유효성분으로 포함하는 반려동물의 면역력 증진용 조성물을 제공하는 것으로, 본 발명의 흑삼 추출물 및 흑삼에서 분리한 화합물은 세포독성이 적고 면역 억제능이 우수한 것을 반려동물의 임상시험을 통해, INF-γ 증가, NK cell 증가 및 혈중 글라이신(glycine) 농도의 증가로 확인하여, 면역력 조성물, 면역 증진용 건강기능식품 조성물, 면역 증진용 사료조성물로 유용하게 이용할 수 있다.

대 표 도 - 도3



(52) CPC특허분류
A23K 50/40 (2016.05)
A61K 2039/55577 (2013.01)
Y10S 514/885 (2013.01)

(72) 발명자
윤다혜
충청북도 청주시 청원구 오창읍 중부로 760, 2102호(오창 롯데캐슬 더 하이스트)
김금숙
경기도 화성시 동탄나루로 55, 642동 802호(반송동, 동탄나루마을월드메르디앙 반도유보라)
최두진
서울특별시 구로구 개봉로11길 55-7, 302호(개봉동, 영아맨션)
김동휘
경기도 수원시 권선구 동수원로145번길 73, 307동 905호(권선동, 수원아이파크시티3단지)
이완규
충청북도 청주시 서원구 충대로 1(개신동)
김재광
경기도 수원시 장안구 화산로 85, 132동 904호(천천동, 천천 푸르지오)
김예진
인천광역시 남동구 앵고개로815번길 70, 110동 506호(논현동, 소래휴먼시아1단지아파트)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1395060018
과제번호	PJ01283403
부처명	농촌진흥청
과제관리(전문)기관명	농촌진흥청
연구사업명	사료자원 안전관리 기술 개발
연구과제명	인삼특작을 활용한 반려견 면역증진 사료첨가물 개발
기 여 율	1/1
과제수행기관명	충북대학교 산학협력단
연구기간	2017.03.01 ~ 2019.12.31

명 세 서

청구범위

청구항 1

흑삼 추출물을 유효성분으로 하는 포함하는 면역 증강용 약학적 조성물.

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 흑삼 추출물은 혈중 글라이신(glycine)의 농도를 증가시키는 것을 특징으로 하는 조성물.

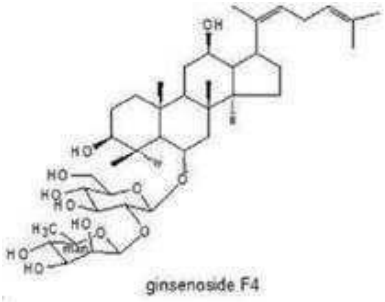
청구항 3

흑삼 추출물에서 분리한 화합물을 유효성분으로 포함하는 면역 증강용 약학적 조성물.

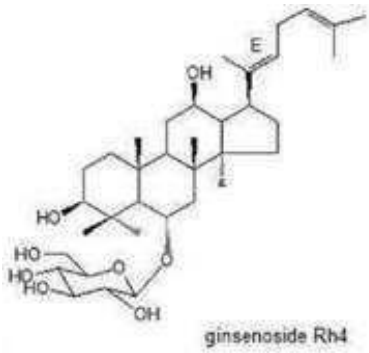
청구항 4

제 3항에 있어서, 상기 화합물은:

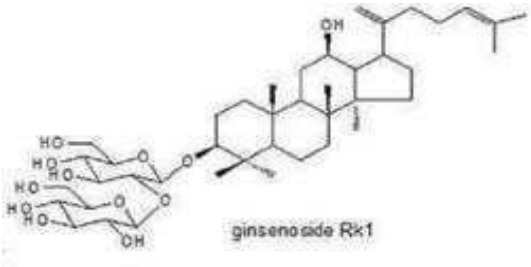
[화학식 1]



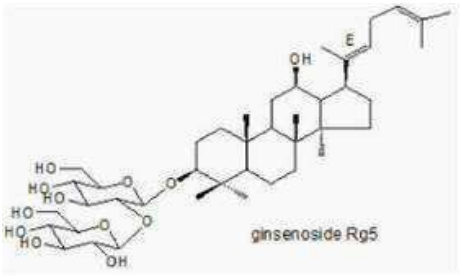
[화학식 2]



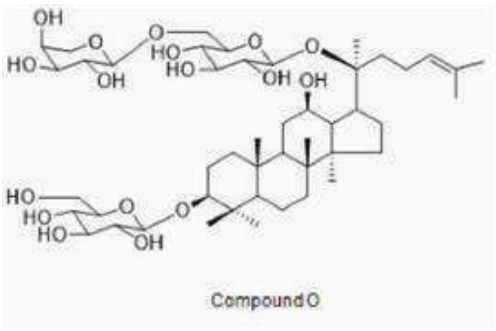
[화학식 3]



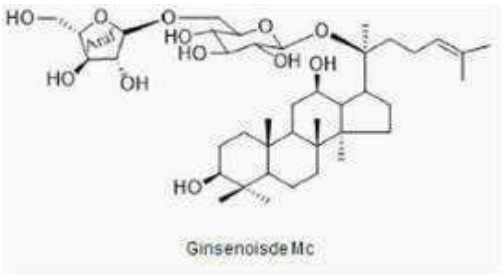
[화학식 4]



[화학식 5]

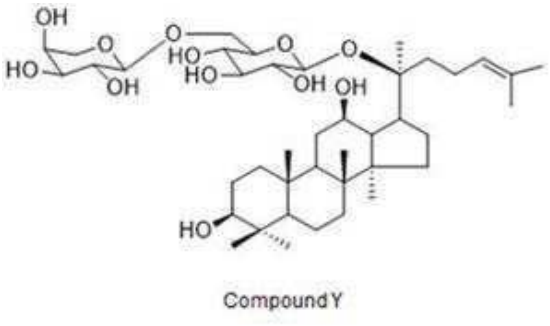


[화학식 6]



및

[화학식 7]



Compound Y

로 이루어진 군에서 선택된 화합물을 포함하는 것인 면역 증강용 약학적 조성물.

청구항 5

흑삼 추출물을 유효성분으로 하는 포함하는 면역 증진용 건강기능식품 조성물.

청구항 6

흑삼 추출물에서 분리한 화합물을 유효성분으로 포함하는 면역 증진용 건강기능식품 조성물.

청구항 7

흑삼 추출물을 유효성분으로 하는 포함하는 면역 증진용 사료조성물.

청구항 8

흑삼 추출물에서 분리한 화합물을 유효성분으로 포함하는 면역 증진용 사료조성물.

청구항 9

a) 인삼을 건조하는 단계;

b) 상기 건조된 인삼을 실온에서 50℃ 내지 80℃까지 승온하여 증삼하는 단계;

c) 상기 50 내지 80℃에서 증삼한 인삼을 80℃ 내지 110℃까지 승온하여 재증삼 하는 단계;

d) 상기 b)단계 및 c)단계를 2회 내지 6회 반복하여 흑삼을 제조하는 단계; 및

e) 추출용매를 이용하여 상기 흑삼으로부터 흑삼 추출물을 추출하는 단계;

를 포함하는 흑삼 추출물의 제조 방법.

청구항 10

a) 인삼을 건조하는 단계;

b) 상기 건조된 인삼을 실온에서 50℃ 내지 80℃까지 승온하여 증삼하는 단계;

c) 상기 50 내지 80℃에서 증삼한 인삼을 80℃ 내지 110℃까지 승온하여 재증삼 하는 단계;

d) 상기 b)단계 및 c)단계를 2회 내지 6회 반복하여 흑삼을 제조하는 단계;

e) 추출용매를 이용하여 상기 흑삼으로부터 흑삼 추출물을 추출하는 단계; 및

f) 상기 흑삼 추출물에 추출 용매를 이용하여 화합물을 분리 및 정제하는 단계;를 포함하는 흑삼 추출물에서 분리한 화합물의 제조 방법.

청구항 11

a) 인삼을 건조하는 단계;

b) 상기 건조된 인삼을 실온에서 50℃ 내지 80℃까지 승온하여 증삼하는 단계;

c) 상기 50 내지 80℃에서 증삼한 인삼을 80℃ 내지 110℃까지 승온하여 재증삼 하는 단계;

d) 상기 b)단계 및 c)단계를 2회 내지 6회 반복하여 흑삼을 제조하는 단계; 및

e) 추출용매를 이용하여 상기 흑삼으로부터 흑삼 추출물을 추출하는 단계;

를 포함하는 면역 증진용 사료조성물의 제조 방법.

청구항 12

제10항에 있어서,

상기 e) 단계는 상기 흑삼 추출물에 추출 용매를 이용하여 화합물을 분리 및 정제하는 단계;를 더 포함하는, 면역 증진용 사료조성물의 제조 방법.

청구항 13

흑삼 추출물을 유효성분으로 하는 포함하는 반려동물의 면역 증강용 약학적 조성물.

청구항 14

제 13항에 있어서, 상기 흑삼 추출물은 반려동물의 혈중 일차 대사산물의 농도를 증가시키는 것을 특징으로 하는 반려동물의 면역 증강용 약학적 조성물.

청구항 15

제 14항에 있어서, 상기 일차 대사산물은 글라이신(glycine), 발린(valine), 글루타민(glutamine), 아세테이트(acetate), 류신(leucine) 및 이소류신(isoleucine)으로 이루어진 군에서 1이상 선택된 대사산물인 것을 특징으로 하는 반려동물의 면역 증강용 약학적 조성물.

청구항 16

제 15항에 있어서, 상기 일차 대사산물은 글라이신(glycine)인 것을 특징으로 하는 반려동물의 면역 증강용 약학적 조성물.

청구항 17

제 13항에 있어서,

상기 반려동물은, 포유동물인 것을 특징으로 하는 반려동물의 면역 증강용 약학적 조성물.

청구항 18

제 17항에 있어서,

상기 포유동물은, 개, 고양이, 원숭이, 말, 돼지, 양, 기니피그, 알파카, 당나귀, 염소, 햄스터, 고슴도치 및 페릿으로 이루어진 군에서 선택된 1이상을 특징으로 하는 반려동물의 면역 증강용 약학적 조성물.

청구항 19

제 13항에 있어서, 상기 흑삼 추출물은 반려동물에 50 내지 1,000mg/day의 농도로 투여될 수 있는 것을 특징으로 하는 반려동물의 면역 증강용 약학적 조성물.

청구항 20

제 19항에 있어서,

상기 투여는, 경구투여, 정맥, 근육, 피하 및 복강내 주사로 이루어진 군에서 선택된 1이상의 방법으로 투여될 수 있는 것을 특징으로 하는 반려동물의 면역 증강용 약학적 조성물.

청구항 21

제 13항에 있어서,

상기 흑삼 추출물은, 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 및 부형제로 이루어진 군에서 1이상

선택된 제제를 사용하여 조제되는 것을 특징으로 하는 반려동물의 면역 증강용 약학적 조성물.

청구항 22

제 21항에 있어서,

상기 제제는, 락토스, 덱스트로스, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로스, 메틸 셀룰로스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유로 이루어진 군에서 1이상 선택된 담체로 혼입시킨 것을 특징으로 하는 반려동물의 면역 증강용 약학적 조성물.

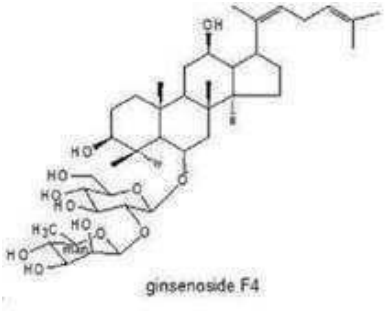
청구항 23

흑삼 추출물에서 분리한 화합물을 유효성분으로 포함하는 반려동물의 면역 증강용 약학적 조성물.

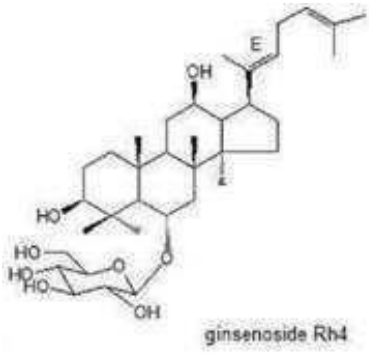
청구항 24

제 23항에 있어서, 상기 화합물은:

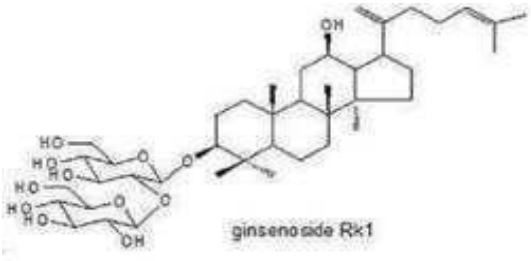
[화학식 1]



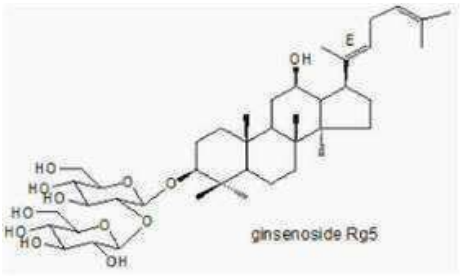
[화학식 2]



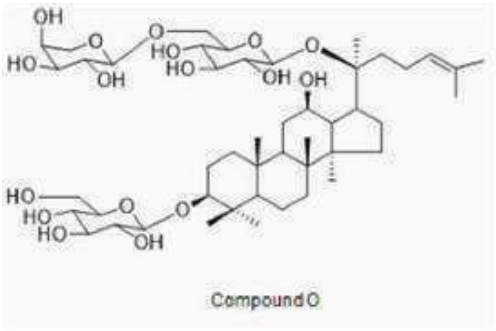
[화학식 3]



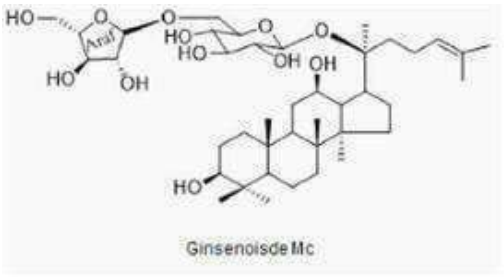
[화학식 4]



[화학식 5]

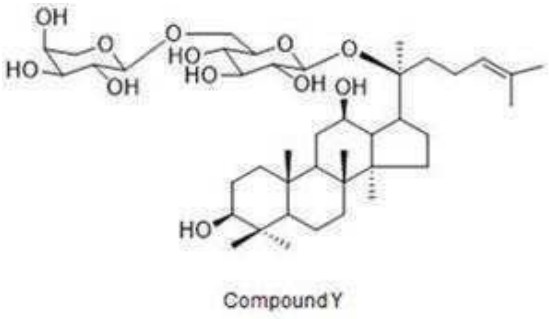


[화학식 6]



및

[화학식 7]



로 이루어진 군에서 선택된 화합물을 포함하는 것인 반려동물의 면역 증강용 약학적 조성물.

청구항 25

흑삼 추출물을 유효성분으로 하는 포함하는 반려동물의 면역 증진용 건강기능식품 조성물.

청구항 26

흑삼 추출물에서 분리한 화합물을 유효성분으로 포함하는 반려동물의 면역 증진용 건강기능식품 조성물.

청구항 27

흑삼 추출물을 유효성분으로 하는 포함하는 반려동물의 면역 증진용 사료조성물.

청구항 28

흑삼 추출물에서 분리한 화합물을 유효성분으로 포함하는 반려동물의 면역 증진용 사료조성물.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 흑삼 추출물 및 흑삼에서 분리한 화합물을 유효성분으로 포함하는 반려견의 면역력 증진용 조성물을 제공하는 것이다.

배 경 기 술

[0002] 면역은 체내에 존재하는 자기방어체계로서 인체가 외부로부터 침입해 오는 각종 물질이나 생명체를 자기 자신에 대한 이물질로 인식하여 제거하고 대사시키는 과정이다.

[0003] 외부 자극에 의한 손상이나 병원 미생물의 침입으로부터 자신을 방어하기도 하지만 염증반응 등과 같이 자기 자신의 조직에 손상을 줄 수도 있다. 면역기능의 변화를 조절하여 정상으로 회복시키거나 변화의 폭을 줄여 주는 작용으로 면역기능 억제나 면역기능 증강으로 구분된다. 과민면역 반응 완화는 외부 물질에 대해 불리하게 반응하여 초래되는 알레르기 반응 자기항원 또는 변형된 자기항원에 대한 반응 등 바람직하지 않게 증가된 면역 반응을 억제시키는 것을 의미한다.

[0004] 이러한 면역 반응이 발생하는 문제점을 극복하기 위하여, 다양한 면역 증강제 및 치료제가 사용되고 있으나, 부작용 문제들이 있고, 주로 시판되는 것은 예방보다는 치료용으로 복용되는 것으로, 부작용이 없어 장기 복용이 가능하고, 예방용으로도 적합한 면역증진용 조성물이 요구되는 실정이다.

[0005] 이에 발명자들은 부작용이 없으면서도 면역 증진용 조성물로 이용하기 위한 물질을 연구하던 중 가공된 인삼이 인삼 자체보다 유용물질의 함량이 증진되는 것을 알게되었으며, 인삼을 수회 증식 및 건조과정을 거치면서 기본적으로 존재하는 인삼 사포닌이 소실되지 않을 뿐만 아니라 인삼 사포닌의 함량을 증긴할 수 있는 흑삼을 제조하는 방법을 확립하였다. 또한, 제조된 흑삼에서 추가 유용성분을 분석하여 이에 대한 반려견의 면역을 증진하는 효과를 확인하여 본 발명을 완성하였다.

선행기술문헌

특허문헌

[0006] (특허문헌 0001) KR 10-2019-0018175 A

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명의 목적은 흑삼 추출물 또는 분리한 화합물을 유효성분으로 하는 포함하는 면역 증강용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.

[0008] 본 발명의 다른 목적은 흑삼 추출물 또는 분리한 화합물을 유효성분으로 하는 포함하는 면역 증진용 건강기능식품 조성물을 제공하는 것이다.

[0009] 본 발명의 또 다른 목적은 흑삼 추출물 또는 분리한 화합물을 유효성분으로 하는 포함하는 면역 증진용 사료조성물을 제공하는 것이다.

[0010] 본 발명의 또 다른 목적은 흑삼 추출물의 제조 방법을 제공하는 것이다.

[0011] 본 발명의 또 다른 목적은 흑삼 추출물에서 분리한 화합물의 제조 방법을 제공하는 것이다.

[0012] 본 발명의 또 다른 목적은 면역 증진용 사료조성물의 제조 방법을 제공하는 것이다.

[0013] 본 발명의 또 다른 목적은 흑삼 추출물 또는 분리한 화합물을 유효성분으로 하는 포함하는 반려동물의 면역 증강용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.

[0014] 본 발명의 또 다른 목적은 흑삼 추출물 또는 분리한 화합물을 유효성분으로 하는 포함하는 반려동물의 면역 증진용 건강기능식품 조성물을 제공하는 것이다.

[0015] 본 발명의 또 다른 목적은 흑삼 추출물 또는 분리한 화합물을 유효성분으로 하는 포함하는 반려동물의 면역 증진용 사료조성물을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0016] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 흑삼 추출물 또는 분리한 화합물을 유효성분으로 하는 포함하는 면역 증강용 약학적 조성물을 제공한다.

[0017] 또한, 본 발명은 흑삼 추출물 또는 분리한 화합물을 유효성분으로 하는 포함하는 면역 증진용 건강기능식품 조성물을 제공한다.

[0018] 또한, 본 발명은 흑삼 추출물 또는 분리한 화합물을 유효성분으로 하는 포함하는 면역 증진용 사료조성물을 제공한다.

[0019] 또한, 본 발명은 흑삼 추출물의 제조 방법을 제공한다.

[0020] 또한, 본 발명은 흑삼 추출물에서 분리한 화합물의 제조 방법을 제공한다.

[0021] 또한, 본 발명은 면역 증진용 사료조성물의 제조 방법을 제공한다.

[0022] 또한, 본 발명은 흑삼 추출물 또는 분리한 화합물을 유효성분으로 하는 포함하는 반려동물의 면역 증강용 약학적 조성물을 제공한다.

[0023] 또한, 본 발명은 흑삼 추출물 또는 분리한 화합물을 유효성분으로 하는 포함하는 반려동물의 면역 증진용 건강기능식품 조성물을 제공한다.

[0024] 또한, 본 발명은 흑삼 추출물 또는 분리한 화합물을 유효성분으로 하는 포함하는 반려동물의 면역 증진용 사료조성물을 제공한다.

발명의 효과

[0025] 본 발명은 흑삼 추출물 및 흑삼에서 분리한 화합물을 유효성분으로 포함하는 반려동물의 면역력 증진용 조성물을 제공하는 것으로, 본 발명의 흑삼 추출물 및 흑삼에서 분리한 화합물은 세포독성이 적고 면역 억제능이 우수한 것을 반려동물의 임상시험을 통해, INF-γ 증가, NK cell 증가 및 혈중 글라이신(glycine) 농도의 증가로 확인하여, 면역력 조성물, 면역 증진용 건강기능식품 조성물, 면역 증진용 사료조성물로 유용하게 이용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0026] 도 1은 본 발명의 제조방법으로 제조된 흑삼에서 분리한 화합물(ginsenoside F4, ginsenoside Rh4, ginsenoside Rk1, ginsenoside Rg5, compound O, ginsenoside Mc, compound Y)의 함량을 나타낸 그래프이다.

도 2는 흑삼 추출물의 면역 억제 효과를 나타낸 그래프이다;

A: NO 생성, B: 세포생존율.

도 3은 흑삼 추출물 및 흑삼 추출물에서 분리한 화합물의 세포 독성 실험 결과를 나타낸 그래프이다:

A: 흑삼 추출물, B: 흑삼 추출물에서 분리한 화합물(ginsenoside F4, ginsenoside Rh4, ginsenoside Rk1, ginsenoside Rg5, compound O, ginsenoside Mc, compound Y).

도 4는 흑삼 추출물 및 흑삼 추출물에서 분리한 화합물의 면역 지표(IL-2) 분석 결과를 나타낸 도면이다 :

A: 흑삼 추출물, B: 흑삼 추출물에서 분리한 화합물(ginsenoside F4, ginsenoside Rh4, ginsenoside Rk1, ginsenoside Rg5, compound O, ginsenoside Mc, compound Y).

도 5는 흑삼 추출물을 포함하는 반려견용 면역증진제의 임상제제의 제조방법 및 가공된 임상제제를 나타낸 도이다(흑삼 추출물 100 mg/정).

도 6은 흑삼 추출물을 투여한 비글 및 노령견의 투여 주차에 따른 혈중 IFN-γ의 농도를 나타낸 도이다(Normal: 비투여 대조군, BGM: 임상제제 저농도 투여군, BGH: 임상제제 고농도 투여군).

도 7은 흑삼 추출물을 투여한 비글 및 노령견의 투여 주차에 따른 혈중 TNF-α의 농도를 나타낸 도이다(Normal: 비투여 대조군, BGM: 임상제제 저농도 투여군, BGH: 임상제제 고농도 투여군).

도 8은 흑삼 추출물을 투여한 비글 및 노령견의 투여 주차에 따른 혈중 IgG의 농도를 나타낸 도이다(Normal: 비투여 대조군, BGM: 임상제제 저농도 투여군, BGH: 임상제제 고농도 투여군).

도 9은 흑삼 추출물을 투여한 비글 및 노령견의 투여 주차에 따른 혈중 IgA의 농도를 나타낸 도이다(Normal: 비투여 대조군, BGM: 임상제제 저농도 투여군, BGH: 임상제제 고농도 투여군).

도 10은 흑삼 추출물을 투여한 비글 및 노령견의 투여 주차에 따른 자연살해 세포 활성도(NK cell activity)를 나타낸 도이다(Normal: 비투여 대조군, BGM: 임상제제 저농도 투여군, BGH: 임상제제 고농도 투여군).

도 11은 임상 실험에서의 비글 및 노령견의 혈중 대사산물 분석을 위한 HR-MAS NMR 기법을 위한 장치를 나타낸 도이다.

도 12는 흑삼 추출물을 투여한 비글 및 노령견의 투여 주차에 따른 혈중 1차 대사산물의 농도를 NMR 스펙트럼으로 나타낸 도이다(A: 비투여 대조군, B: 임상제제 저농도 투여군, C: 임상제제 고농도 투여군).

도 13은 흑삼 추출물의 급여 기간별, 혈중 일차 대사산물의 농도의 변화를 모식화한 도이다.

도 14는 흑삼 추출물을 8주 이상 급여한 비글 및 노령견에서, 혈청 대사산물에 의한 PLS-DA 모델의 스코어 플롯 및 로딩플랏을 나타낸 도이다(Control: 비투여 대조군, BG-M: 임상제제 저농도 투여군, BG-H: 임상제제 고농도 투여군).

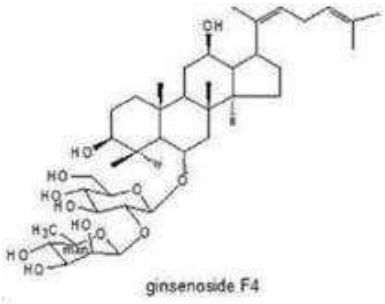
발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0027] 본 발명은 효율적으로 흑삼을 제조하는 방법 및 추출물을 제조하는 방법의 제공을 목적으로 하며, 보다 상세하게는 흑삼의 추출조건별 항염증 효능 및 흑삼제조과정에 의해 새롭게 생성된 성분 7종의 면역력 개선기능성을 목적으로 한다.

[0028] 따라서 본 발명은 흑삼 추출물 또는 흑삼 추출물에서 분리한 화합물을 유효성분으로 하는 포함하는 면역 증강용 약학적 조성물을 제공한다.

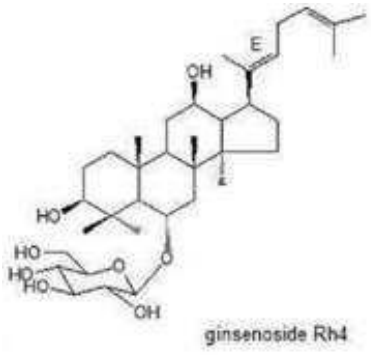
[0029] 상기 화합물을 하기의 화학식 1 내지 7로 기재할 수 있다.

[0030] [화학식 1]



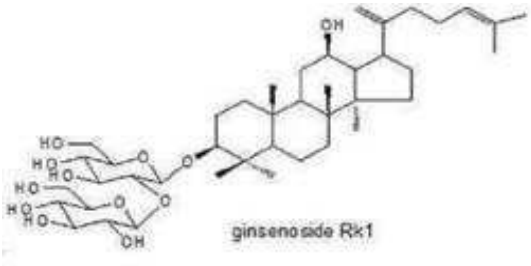
[0031]

[0032] [화학식 2]



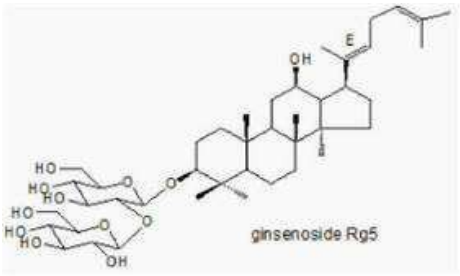
[0033]

[0034] [화학식 3]



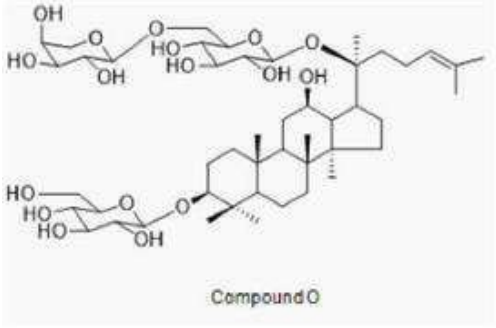
[0035]

[0036] [화학식 4]



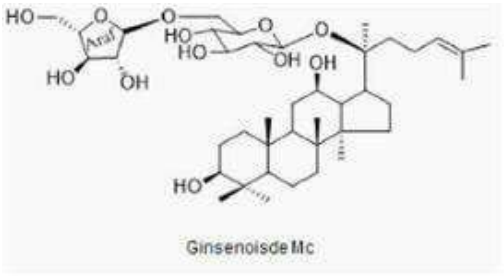
[0037]

[0038] [화학식 5]



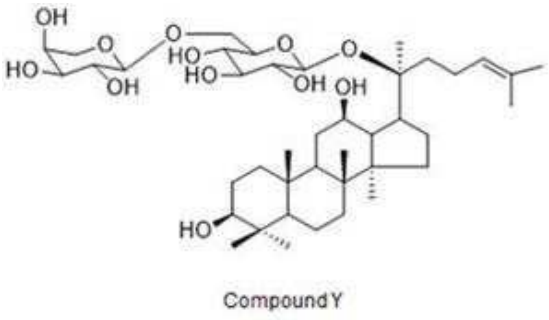
[0039]

[0040] [화학식 6]



[0041]

[0042] [화학식 7]



[0043]

[0045] 본 발명의 약학 조성물에는 유효성분 이외에 보조제(adjuvant)를 추가로 포함할 수 있다. 상기 보조제는 당해 기술분야에 알려진 것이라면 어느 것이나 제한 없이 사용할 수 있으나, 예를 들어 프로인트(Freund)의 완전 보조제 또는 불완전 보조제를 더 포함하여 그 면역성을 증가시킬 수 있다.

[0046] 본 발명에 따른 약학 조성물은 유효성분을 약학적으로 허용된 담체에 혼입시킨 형태로 제조될 수 있다. 여기서, 약학적으로 허용된 담체는 제약 분야에서 통상 사용되는 담체, 부형제 및 희석제를 포함한다. 본 발명의 약학 조성물에 이용할 수 있는 약학적으로 허용된 담체는 이들로 제한되는 것은 아니지만, 락토스, 덱스트로스, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로스, 메틸 셀룰로스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 들 수 있다.

[0047] 본 발명의 약학 조성물은 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 또는 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용될 수 있다.

[0048] 제제화할 경우에는 통상 사용하는 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제될 수 있다. 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 그러한 고형 제제는 유효성분에 적어도 하나 이상의 부형제, 예를 들면 전분, 칼슘 카르보네이트, 수크로스, 락토오스, 젤라틴 등을 섞어 조제될 수 있다. 또한, 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트, 탈크 같은 윤활제들도 사용될 수 있다. 경구투여를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데, 일반적으로 사용되는 희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수용성용제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제 및 좌제가 포함된다. 비수용성용제, 현탁제로는 프로필렌 글리콜, 폴리에틸렌 글리콜, 올리브유와 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텝솔(witepsol), 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로젤라틴 등이 사용될 수 있다.

[0049] 본 발명에 따른 약학 조성물은 개체에 다양한 경로로 투여될 수 있다. 투여의 모든 방식이 예상될 수 있는데, 예를 들면 경구, 정맥, 근육, 피하, 복강내 주사에 의해 투여될 수 있다.

[0050] 본 발명에 따른 약학 조성물의 투여량은 개체의 연령, 체중, 성별, 신체 상태 등을 고려하여 선택된다. 상기 약학 조성물 중 포함되는 유효성분의 농도는 대상에 따라 다양하게 선택할 수 있음은 자명하며, 바람직하게는 약

학 조성물에0.01 ~ 5,000 ㎍/ml의 농도로 포함되는 것이다. 그 농도가 0.01 ㎍/ml 미만일 경우에는 약학 활성이 나타나지 않을 수 있고, 5,000 ㎍/ml를 초과할 경우에는 인체에 독성을 나타낼 수 있다.

[0051] 상기 약학 조성물은 다양한 경구 또는 비경구 투여 형태로 제형화될 수 있다.

[0052] 경구 투여용 제형으로는 예를 들면 정제, 환제, 경질, 연질 캅셀제, 액제, 현탁제, 유화제, 시럽제, 과립제 등이 있는데, 이들 제형은 유효성분 이외에 희석제(예: 락토즈, 덱스트로즈, 수크로즈, 만니톨, 솔비톨, 셀룰로즈 및/또는 글리신), 활택제(예: 실리카, 탈크, 스테아르산 및 그의 마그네슘 또는 칼슘염 및/ 또는 폴리에틸렌 글리콜)를 추가로 포함할 수 있다. 또한, 상기 정제는 마그네슘 알루미늄 실리케이트, 전분 페이스트, 젤라틴, 트라가칸스, 메틸셀룰로즈, 나트륨 카복시메틸셀룰로즈 및/또는 폴리비닐피롤리딘과 같은 결합제를 함유할 수 있으며, 경우에 따라 전분, 한천, 알긴산 또는 그의 나트륨 염과 같은 붕해제 또는 비등 혼합물 및/또는 흡수제, 착색제, 향미제 및 감미제를 함유할 수 있다. 상기 제형은 통상적인 혼합, 과립화 또는 코팅 방법에 의해 제조될 수 있다.

[0053] 또한, 비경구 투여용 제형의 대표적인 것은 주사용 제제이며, 주사용 제제의 용매로서 물, 링거액, 등장성 생리식염수 또는 현탁액을 들 수 있다. 상기 주사용 제제의 멸균 고정 오일은 용매 또는 현탁 매질로서 사용할 수있으며 모노-, 디-글리세라이드를 포함하여 어떠한 무자극성 고정오일도 이러한 목적으로 사용될 수 있다.

[0054] 또한, 상기 주사용 제제는 올레산과 같은 지방산을 사용할 수 있다.

[0055] 본 발명의 일실시예에 따르면, 상기 흑삼 추출물은 혈중 글라이신(glycine)의 농도를 증가시키는 것일 수 있다.

[0056] 본 발명의 일실시예에 따르면, 상기 흑삼 추출물은 물, C1 내지 C4의 저급 알코올, 저급 알코올 수용액, 헥산, 부탄올, 에틸아세테이트 및 클로로포름으로 이루어진 군에서 선택된 용매로 추출 또는 분획될 수 있으며, 바람직하게는 저급 알코올 수용액이나, 이에 제한되지는 않는다.

[0058] 또한, 본 발명은 흑삼 추출물 및 흑삼 추출물에서 분리한 화합물을 유효성분으로 하는 포함하는 면역 증진용 건강기능식품 조성물을 제공한다.

[0059] 본 발명의 식품 조성물은 유효성분인 추출물을 함유하는 것 외에 통상의 식품 조성물과 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다.

[0060] 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 향미제는 천연 향미제 (타우마틴), 스테비아 추출물(예를 들어 레바우디오시드 A, 글리시르히진 등) 및 합성 향미제 (사카린, 아스파르탐 등)를 유리하게 사용할 수 있다. 본 발명의 식품 조성물은 상기 약학적 조성물과 동일한 방식으로 제제화되어 기능성 식품으로 이용하거나, 각종 식품에 첨가할 수 있다. 본 발명의 조성물을 첨가할 수 있는 식품으로는 예를 들어, 음료류, 육류, 초코렛, 식품류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 사탕류, 아이스크림류, 알코올 음료류, 비타민 복합제 및 건강보조식품류 등이 있다.

[0061] 또한 상기 식품 조성물은 유효성분인 추출물 외에 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, 탄산음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다. 그밖에 본 발명의 식품 조성물은 천연 과일 쥬스 및 과일 쥬스 음료 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다.

[0062] 본 발명의 기능성 식품 조성물은, 정제, 캅셀, 분말, 과립, 액상, 환 등의 형태로 제조 및 가공될 수 있다. 본 발명에서 '건강기능성 식품 조성물'이라 함은 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 보건용도에 유용한 효과를 얻을 목적으로 섭취하는 것을 의미한다. 본 발명의 건강기능식품은 통상의 식품 첨가물을 포함할 수 있으며, 식품 첨가물로서의 적합 여부는 다른 규정이 없는 한, 식품의약품안전청에 승인된 식품 첨가물 공전의 총칙 및 일반시험법 등에 따라 해당 품목에 관한 규격 및 기준에 의하여 판정한다. 상기 '식품 첨가물 공전'에 수재된 품목으로는 예를 들어, 케톤류, 글리신, 구연산칼슘, 니코틴산, 계피산 등의 화학적 합성물; 감색소, 감초추출물, 결정셀룰로오스, 고량색소, 구아검 등의 천연첨가물; L-글루타민산나트륨 제제, 면류첨가알칼리제, 보존료 제제, 타르색소제제 등의 혼합제제류 등을 들 수

있다. 예를 들어, 정제 형태의 건강기능식품은 본 발명의 유효성분을 부형제, 결합제, 붕해제 및 다른 첨가제와 혼합한 혼합물을 통상의 방법으로 과립화한 다음, 활택제 등을 넣어 압축성형하거나, 상기 혼합물을 직접 압축성형할 수 있다. 또한 상기 정제 형태의 건강기능식품은 필요에 따라 교미제 등을 함유할 수도 있다. 캅셀 형태의 건강기능식품 중 경질 캅셀제는 통상의 경질 캅셀에 본 발명의 유효성분을 부형제 등의 첨가제와 혼합한 혼합물을 충진하여 제조할 수 있으며, 연질 캅셀제는 본 발명의 유효성분을 부형제 등의 첨가제와 혼합한 혼합물을 젤라틴과 같은 캅셀기제에 충진하여 제조할 수 있다. 상기 연질 캅셀제는 필요에 따라 글리세린 또는 소르비톨 등의 가소제, 착색제, 보존제 등을 함유할 수 있다. 환 형태의 건강기능식품은 본 발명의 유효성분과 부형제, 결합제, 붕해제 등을 혼합한 혼합물을 기존에 공지된 방법으로 성형하여 조제할 수 있으며, 필요에 따라 백당이나 다른 제피제로 제피할 수 있으며, 또는 전분, 탈크와 같은 물질로 표면을 코팅할 수도 있다. 과립형태의 건강기능식품은 본 발명의 유효성분의 부형제, 결합제, 붕해제 등을 혼합한 혼합물을 기존에 공지된 방법으로 입상으로 제조할 수 있으며, 필요에 따라 착향제, 교미제 등을 함유할 수 있다.

[0064] 아울러, 본 발명은 흑삼 추출물 및 흑삼 추출물에서 분리한 화합물을 유효성분으로 하는 포함하는 면역 증진용 사료조성물을 제공한다.

[0065] 본 발명의 사료 조성물은 동물체의 건강상태를 양호하게 하고, 가축의 증체량과 육질을 개선시키며, 산유량 및 면역력을 증가시키는 효과를 기대할 수 있다. 본 발명의 사료 조성물은 발효사료, 배합사료, 펠렛 형태 및 사일레지 등의 형태로 제조될 수 있다. 상기 발효사료는 본 발명의 유효성분 이외의 여러 가지 미생물군 또는 효소들을 첨가함으로서 유기물을 발효시켜 제조할 수 있으며, 배합사료는 여러 종류의 일반사료와 본 발명의 유효성분을 혼합하여 제조할 수 있다. 펠렛 형태의 사료는 상기 배합사료 등을 펠렛기에서 열과 압력을 가하여 제조할 수 있으며, 사일레지는 청예 사료를 본 발명에 따른 미생물로 발효시킴으로써 제조할 수 있다. 습식발효사료는 음식물 쓰레기 등과 같은 유기물을 수집 및 운반하여 살균과정과 수분조절을 위한 부형제를 일정비율로 혼합한 후, 발효에 적당한 온도에서 24시간 이상 발효하여, 수분함량이 약 70%으로 포함되도록 조절하여 제조할 수 있다. 발효건조사료는 습식 발효 사료를 건조과정을 추가로 거쳐 수분함량이 30% 내지 40% 정도 함유되도록 조절하여 제조할 수 있다.

[0066] 본 발명의 사료 조성물은 종래 사료에 첨가되는 성분을 더 포함할 수 있다. 이러한 사료에 첨가되는 성분의 일예로서 곡류분말, 고기분말, 및 두류 등을 포함할 수 있다. 상기에서 곡류분말은 쌀가루, 밀가루, 보리가루, 및 옥수수가루 중에서 선택된 1종 이상을 사용할 수 있다. 상기에서 고기분말은 닭고기, 소고기, 돼지고기, 및 타조고기 중에서 선택된 어느 하나 이상을 분말화한 고기분말을 사용할 수 있다. 상기에서 두류는 대두, 강낭콩, 완두콩, 및 검정콩 중에서 선택된 1종 이상을 사용할 수 있다.

[0067] 본 발명의 사료 조성물은 상기에서 언급한 종래 사료에 첨가되는 성분인 곡류분말, 고기분말, 및 두류 이외에도 사료의 영양성을 증대시키기 위해 영양제, 및 무기물 중에서 선택된 어느 하나 이상을 첨가할 수 있으며, 사료 품질의 저하를 막기 위해 항곰팡이제, 항산화제, 항응고제, 유화제, 및 결착제 중에서 선택된 1종 이상을 포함할 수 있다.

[0069] 또한, 본 발명은 흑삼 추출물의 제조 방법을 제공한다.

[0070] 또한, 본 발명은 흑삼 추출물에서 분리한 화합물의 제조 방법을 제공한다.

[0071] 또한, 본 발명은 면역 증진용 사료조성물의 제조 방법을 제공한다.

[0072] 또한, 본 발명은 흑삼 추출물 또는 분리한 화합물을 유효성분으로 하는 포함하는 반려동물의 면역 증강용 약학적 조성물을 제공한다.

[0073] 본 발명의 일실시예에 따르면, 상기 흑삼 추출물은 반려동물의 혈중 일차 대사산물의 농도를 증가시키는 것일 수 있다.

[0074] 본 발명의 일실시예에 따르면, 상기 일차 대사산물은 글라이신(glycine), 발린(valine), 글루타민(glutamine), 아세테이트(acetate), 류신(leucine) 및 이소류신(isoleucine)으로 이루어진 군에서 1이상 선택된 대사산물인 것일 수 있으며, 바람직하게는 글라이신(glycine)이다.

[0075] 본 발명의 일실시예에 따르면, 상기 반려동물은 포유동물인 것일 수 있으며, 상기 포유동물은 개, 고양이, 원숭

이, 말, 돼지, 양, 기니피그, 알파카, 당나귀, 염소, 햄스터, 고슴도치 및 페릿으로 이루어진 군에서 선택된 1 이상인 것일 수 있으나, 이에 제한되지는 않는다.

[0076] 본 발명의 일실시예에 따르면, 상기 흑삼 추출물은 반려동물에 50 내지 1,000 mg/day의 농도로 투여될 수 있다.

[0077] 본 발명의 일실시예에 따르면, 상기 투여는 경구투여, 정맥, 근육, 피하 및 복강내 주사로 이루어진 군에서 선택된 1이상의 방법으로 투여될 수 있다.

[0078] 본 발명의 일실시예에 따르면, 상기 흑삼 추출물은 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 및 부형제로 이루어진 군에서 1이상 선택된 제제를 사용하여 조제되는 것일 수 있다.

[0079] 본 발명의 일실시예에 따르면, 상기 제제는 락토스, 덱스트로스, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로스, 메틸셀룰로스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유로 이루어진 군에서 1이상 선택된 담체로 혼입시킨 것일 수 있다.

[0080] 또한, 본 발명은 흑삼 추출물 또는 분리한 화합물을 유효성분으로 하는 포함하는 반려동물의 면역 증진용 건강기능식품 조성물을 제공한다.

[0081] 또한, 본 발명은 흑삼 추출물 또는 분리한 화합물을 유효성분으로 하는 포함하는 반려동물의 면역 증진용 사료 조성물을 제공한다.

[0083] 이하 본 발명의 바람직한 실시를 보다 상세하게 설명한다. 그러나 본 발명은 다수의 상이한 형태로 구현될 수 있고, 기술된 실시 예에 제한되지 않음을 이해하여야 한다. 하기에 설명되는 본 발명의 실시 예는 당업자에게 본 발명의 사상을 충분하게 전달하기 위한 것임에 유의하여야 한다.

[0085] **<실시예 1> 흑삼 추출물의 제조**

[0086] 세척한 인삼을 열풍건조기에서 40℃로 3~10시간 건조한다. 1차 증삼건조한 인삼을 증삼기에 넣고 실온에서 60~70℃까지 빠르게 승온하여 10분간 유지하고 목적온도(90~98℃)까지 승온하여 2시간~5시간 증삼을 3-5회 반복하여 제조된 흑삼을 80% MeOH 수용액에 24시간 담가서 실온에서 3번 반복 추출하고, 얻어진 여액을 각각 합쳐 감압 농축하여 MeOH 추출물을 얻었다. 얻어진 MeOH 추출물을 TLC(thin layer chromatography)를 사용하여 비교한 후 추출물을 합쳐 총 300 g의 농축물을 얻었다. 농축된 추출물을 EtOAc(3 L)/H_2O(3 L)로 3회 분배 추출하였고, 다시 H_2O층을 n-BuOH(2.7 L)로 3회 분배 추출하였다. 각층을 감압 농축하여, EtOAc 분획과 n-BuOH 분획 및 H_2O 분획을 얻었다. 그 중 에틸 아세테이트 분획물을 사용하였다.

[0087] 또한, 상기의 추출방법과 동일한 방법에서, 용매를 40% 및 70% 에탄올(40%, 70% EtOH)로 대체하여 흑삼 추출물을 제조하였다.

[0089] **<실시예 2> 흑삼 추출물로부터 유효성분의 분리**

[0090] 실시예 1에서 수득한 에틸 아세테이트 분획물을 이산화 규소 컬럼 크로마토그래피(SiO2 column chromatography,이하 'SiO_2 c.c.'로 표기)(Φ 14 × 16 ㎝, $CHCl_3$-MeOH-H_2O=15:3:1) → $CHCl_3$-MeOH-H_2O=7:3:1)를 실시하여 100 ㎖씩 분취하여 분취액을 수득하였다. 상기 분취액을 TLC($CHCl_3$-MeOH-H_2O=9:3:1)로 확인하여, 유사한 부분을 함께 모으고, 감압농축기를 사용하여 농축하여 10개의 분획물(BGE1 내지 BGE10)을 수득하였다.

[0091] 이후, 상기 10개의 분획물을 이용하여 화합물을 분리 정제하였다.

[0092] (1) 상기 10개 분획물 중 1번째 분획물(BGE, 1 g)에 대하여 옥타데실실레인화된 실리카 컬럼 크로마토그래피(Octadecyl Silicas column chromatography; ODS c.c., Waters사 제품; Φ 4×9 ㎝, MeOH-H_2O=3:1)를 실시하여 총 5개의 분획물(BGE1-1 내지 BGE1-5)를 수득하였다.

[0093] 상기 5개 분획물 중 1번째 분획물(BGE1-1-1, 300 ㎎)에 대하여 ODS 컬럼 크로마토그래피(Φ 2.5×7 ㎝, MeOH-H2O=3:1)을 실시하여 총 8개의 분획물(BGE1-1-1-1내지 BGE1-1-1-8)을 수득하였으며, 최종적으로 compound 0 (8

mg)를 분리하였다.

[0094] (2) 그 다음, 상기 10개 분획물 중 3번째 분획물(BGE3, 1.5 g)에 대하여 ODS 컬럼 크로마토그래피(Φ 3×8 ㎝, MeOH-H_2O=3:1)을 실시하여 총 5개의 분획물(BGE3-1 내지 BGE3-5)을 수득하였으며, 이 중 5번째 분획물(BGE3-5, 500 ㎎)에서 ODS 컬럼 크로마토그래피(Φ 3×7 ㎝, MeOH-H_2O=2.5:1)을 실시하여 총 10개의 분획물(BGE3-5-1내지 BGE3-5-10)을 수득하였으며, 최종적으로 ginsenoside F4 (8 ㎎)를 분리하였다.

[0095] (3) 최초 10개 분획물 중 7번째 분획물(BGE7, 3.30 g)에 대하여 ODS 컬럼 크로마토그래피(Φ 3×10 ㎝, MeOH-H2O=4:1)을 실시하여 총 8개의 분획물(BGE7-1 내지 BGE7-8)을 수득하였으며, BGE7-5 분획에 대하여(400 ㎎), prep LC를 이용하여, 약 100 ㎎ 씩 1 ㎖의 용매에 녹여 주입하였고, CH_2Cl_2-MeOH (5:1)의 비율로 분당 1.5㎖의 유속으로 흘려주었다. 이때 사용된 검출기(Detector)는 굴절률검출기(Refractive Index Detector)를 사용했으며, 검출기에 나오는 signal을 확인하면서 회수를 하였으며, 위의 과정을 반복적으로 진행하여 같은 분획을 모은 뒤 TLC로 확인을 하여 최종적으로 ginsenoside MC (5 ㎎), compound Y (6 ㎎), ginsenoside Rk1(18 ㎎), Rg 5(12 ㎎), ginsenoside Rh4을 분리하였다.

[0097] **<실시예 3> 흑삼 추출물에서 분리한 화합물의 함량 비교 분석**

[0098] 상기 실시예 1에서 제조한 흑삼 추출물에서 실시예 2에 기재된 방법으로 분리한 화합물 ginsenoside F4, ginsenoside Rh4, ginsenoside Rk1, ginsenoside Rg5, compound O, ginsenoside Mc, compound Y의 함량을 분석하였다.

[0099] 비교예로는 시판용 흑삼인 천일고려인삼(C 사 흑삼), 대동인삼(D사 흑삼)을 이용하였다.

[0100] 그 결과, 본 발명의 실시예 1에 기재된 방법으로 제조한 흑삼에서 분리한 화합물 7종의 함량이 시판용 흑삼보다 높은 것을 확인하였다(도 1).

[0102] **<실시예 4> 흑삼 추출물의 면역 증진 효과 분석**

[0103] **<4-1> 세포 배양**

[0104] 본 실험에 사용된 BV2 세포는 한국세포주은행에서 구매하여 사용하였다. DMEM 배지에 10% FBS와 1% penicillin-streptomycin을 첨가하여 37℃, 5% CO_2 조건에서 배양하였다. 모든 실험에서 BV2 세포는 흑삼 추출용매별 추출물을 각각 1시간 선처리한 후 LPS (500 ng/ml)를 처리하여 24시간 배양하였다.

[0106] **<4-2> MTT assay에 의한 세포독성 조사**

[0107] 세포 배양용 6 well plate에 BV2 세포를 6 $\times 10^5$ cells/well로 분주하여 24시간 안정화시킨 후, 흑삼 추출용매별 추출물을 각각 농도별로 1시간 선처 리 후 LPS를 후처리하여 24시간 배양하였다. 그 후 배지를 모두 제거하고, tetrazolium bromide salt (MTT)를 0.5 ㎎/ml 농도로 희석하여 well 당 1 ml씩 분주하였다. 2시간 배양 후 상층액을 제거하고 dimethylsulfoxide (DMSO)로 formazin을 모두 용해시켜 96 well plate에 200 ㎕씩 옮긴 다음 ELISA reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)로 흡광도를 측정하였다.

[0109] **<4-3> NO의 측정**

[0110] Griess assay를 통하여 NO 생성량을 측정하였다. 이를 위해 세포 배양용 6 well plate에 상기한 방식으로 세포를 배양한 후, 각 well에서 상층액을 100 ㎕씩 회수하여 각각 Griess reagent[1% sulfanilamide, 0.1% N-(1-naphthyl)-ethylenediamine dihydrochloride, 2.5% H_3PO_4] 100 ㎕와 혼합하여 96 well plate에 분주하였다. ELISA reader (540nm)를 사용하여 흡광도를 측정한 후, sodium nitrite ($NaNO_2$)의 standard curve를 바탕으로 NO 농도를 계산하였다.

[0112] **<4-4> 흑삼 추출물의 NO 생성 분석 결과**

[0113] 체내 혹은 세포계에서 LPS와 같은 자극에 의해 염증 반응이 시작되면 염증성 유전자인 iNOS가 발현되고, iNOS가 관여하는 염증반응에 의해 과량의 NO가 생성된다. (Chen 등,1998) 그러므로, 체내에서 NO가 소된다는 것은 염증반응이 저해되고 있다는 것을 의미한다. 흑삼 추출물(40%, 70% EtOH)의 NO 저해능을 측정한 결과 LPS 0.1 μg/ml을 처리한 군에서 NO 생성이 감소함을 확인하였다(도 2A).

[0115] **<4-5> 흑삼 추출물의 세포생존율에 미치는 영향 분석 결과**

[0116] 흑삼 추출물이 BV2 세포에 대한 세포 독성을 확인한 결과, 흑삼 추출물의 모든 처리군에서 세포 생존을 저해한 유의적 차이가 없는 것으로 나타나 흑삼 추출물이 BV2 세포의 생존에 미치는 영향은 없다고 사료된다(도 2B).

[0118] **<실시예 5> 흑삼 추출물 및 흑삼 추출물에서 분리한 화합물의 면역 증진 효과 분석**

[0119] **<5-1> 세포 배양**

[0120] 면역세포 Jurkat T세포는 CO_2 세포배양기 (37℃, 5%, CO_2)에서 소태아혈청(10%), 페니실린G(100 IU/mL), 스트렙토마이신(100 ug/mL), 그리고 L-글루타민(2 mM)을 첨가한 RPMI640 배지에서 배양하였다. Jurkat T세포에서의 자극제로서 phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA), A23187는 Sigma (St. Louis, MO)시약을 사용하였다. Log-phase에 해당하는 세포를 각각의 실험에 맞게 12-well, 6-well 혹은 60-mm dish에 분주하여 사용하였다.

[0122] **<5-2> MTT assay**

[0123] Human Jurkat Tcell(5 X 10^5 Cell/ml)을 48well plate에 분주하고 하루 동안 37℃, 5% 이산화탄소배양기에서 배양하였다. 각 well에 10% 우태아혈청과 1% 항생제가 포함된 DMEM 배양액에 배양한 후, 시약을 처리하였다. 음성 대조군으로 용매인 dimethyl sulfoxide(DMSO)를 첨가하였다. 하루 동안 37℃, 5% 이산화탄소배양기에서 배양한 후, 세포의 성장 정도를 MTT 방법으로 확인하였다. 48 well 배양용기의 각 well에 0.1% MTT(Sigma M2128) 용액을 100 ul씩 넣고 3시간 동안 37℃, 5% 이산화탄소배양기에서 반응시킨다. 배양액과 MTT용액을 제거한 후, dimethyl sulfoxide 100 ul를 첨가하여 형성된 결정을 녹인다. Microplate reader를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

[0125] **<5-3> RNA isolation**

[0126] Jurkat T세포는 6-well plate에서 키운 세포(2×10^6)를 추출물 및 화합물을 처리하여 배양시키고, RNA를 추출하기 위하여 chlorform을 첨가하여 voltex를 20-30초로 해준 후 4℃에서 15,000 rpm으로 15분간 원심분리하였다. 이때 용액이 세 부분으로 나누어지는데 상층액을 새 튜브에 옮긴 뒤, Isopropanol을 동량을 넣고 10분간 상온에 놓은 뒤 4℃에서 15,000 rpm으로 20분간 원심분리를 하였다. 상층액을 버리고 75% EtOH(in DEPC water)로 washing한 후 4℃에서 13,000 rpm으로 5분간 원심분리를 한 후 상층액은 버리고, pellet을 DEPC water를 이용하여 녹였다. 이렇게 추출된 RNA는 -80℃에 보관하였다. 전체 RNA농도 측정은 RNase가 처리된 0.1% DEPC water로 용해시켜 UV spectrophotometer로 260 nm/280 nm에서 흡광도를 측정하였다.

[0128] **<5-4> 역전사 반응(Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction, RT-PCR)**

[0129] Jurkat T세포는 semiquantitative RT-PCR법을 이용하여 mRNA에 대한 PCR 산물을 정량하였다. 역전사반응은 추출된 전체 RNA(1 μg)와 Oligonucleotide dT primer (100 *p*mol)을 *Accupower* RT PreMix (Bioneer Co, Korea) tube에 혼합한 후, 반응 전체 용량을 20 μl로 하여 70℃에서 5분 동안 전처리하였다. cDNA합성은 42℃에서 1시간 동안 반응시켰고, 역전사 효소를 불활성화하기 위해 80℃에서 15분 동안 열처리하였다. PCR (Polymerase Chain Reaction)은 *Accupower* PCR PreMix (Bioneer Co., Korea) tube에 역전사된 cDNA 1 μg과 각각 Forward와 Reverse Primer 10*p*mol을 사용하여 중합반응 하였다. 중합반응 조건은 초기 94℃에서 5분 동안 열처리하여

cDNA를 변성시킨 후 다음과 같이 시행하였다. Human의 primer IL-2 (s 5′ -CCG GAG AGG AGA CTT CAC AG-3′ (서열번호 1) as 5′ -GGA AAT TGG GGT AGGAAGGA-3′ (서열번호 2)) 및 GAPDH의 발현은 5'-CGG AG TCA ACG GAT TTG GTC GTA T-3′ (sense)(서열번호 3)와 5-AGC TTC TCC ATG GT GGT GAA GAC-3′ (antisense)(서열번호 4)를 이용하여 확인하였다. 증폭된 PCR products는 1%의 agarose gel에서 전기영동하여 band의 정량을 ImageJ 1.44d (Image J is a public domain Java image processing program inspired by NIH Image)를 사용하여 band를 정량화하였다.

[0131] **<5-5> Jurkat T세포에서의 흑삼 추출물, 흑삼 유래 화합물이 세포독성에 미치는 영향 분석 결과**

[0132] Jurkat Tcell(5 X 10^5 Cell/ml)을 48well plate에 분주하고 하루 동안 37℃, 5% 이산화탄소배양기에서 배양하였다. 각 well에 10% 우태아혈청과 1% 항생제가 포함된 DMEM 배양액에 배양한 후, 시약을 처리하였다. 음성 대조군으로 용매인 dimethyl sulfoxide(DMSO)를 첨가하였다. 하루 동안 37℃, 5% 이산화탄소배양기에서 배양한 후, 세포의 성장 정도를 MTT 방법으로 확인하였다. 48 well 배양용기의 각 well에 0.1% MTT(Sigma M2128) 용액을 100 ul씩 넣고 3시간동안 37℃, 5% 이산화탄소배양기에서 반응시킨다. 배양액과 MTT용액을 제거한 후, dimethyl sulfoxide 100 ul를 첨가하여 형성된 결정을 녹인다. Microplate reader를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. Jurkat Tcell에 RPMI+10%FBS가 들어가 있는 배양액에 12시간 배양하였다. 추출물 200 ug/ml의 농도 및 화합물 7종을 50 ug/ml의 농도로 처리하였다. 24시간 후에 MTT 시약(Sigma M2128)을 1 mg/ml을 넣고 4시간 뒤에 microplate reader를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. Jurkat T cell의 결과는 추출물 및 화합물에서 Cell viability 결과는 다음과 같으며, 70% 흑삼 추출물에서 가장 좋은 저해 활성을 보였다(도 3A). 화합물에서는 50 ug/ml의 농도로 처리하였을 때, MC를 제외하고 모든 화합물에서 유의적인 효과를 확인하였으며, 특히 Rh4, Rk1, Rg5, compound O에서 좋은 활성을 확인하였다(도 3B).

[0134] **<5-6> Jurkat 세포에서의 PMA/A23187 처리에 의한 추출물 및 화합물의 IL-2 mRNA 발현 억제 분석 결과**

[0135] Jurkat T세포는 semiquantitative RT-PCR법을 이용하여 mRNA에 대한 PCR 산물을 정량하였다. 역전사반응은 추출된 전체 RNA(1 μg)와 Oligonucleotide dT primer (100 *p*mol)을 *Accupower* RT PreMix (Bioneer Co, Korea) tube에 혼합한 후, 반응 전체 용량을 20 μl로 하여 70℃에서 5분 동안 전처리하였다. cDNA합성은 42℃에서 1시간 동안 반응시켰고, 역전사 효소를 불활성화하기 위해 80℃에서 15분동안 열처리하였다. PCR (Polymerase Chain Reaction)은 *Accupower* PCR PreMix (Bioneer Co., Korea) tube에 역전사된 cDNA 1 μg과 각각 Forward와 Reverse Primer 10*p*mol을 사용하여 중합반응을 하였다.

[0136] 또한, PMA(200 nM) A23187(1 uM)로 자극한 다음 추출물 200 ug/ml의 농도 및 화합물 7종을 50 ug/ml로 전처리 후 6시간 후에 harvest를 하여 RNA를 추출하였으며 농도를 측정하였다. 이후 분석은 IL-2를 RT-PCR로 분석하였다.

[0137] 그 결과, PMA(200 nM) A23187(1 uM)로 처리후 상승된 인터루킨2(IL-2)이 70% 흑삼 추출물에서 저해되는 것을 확인하였다(도 4A).

[0138] 또한, Rh4, Rk1, Rg5, compound O처리의 의해서는 IL-2를 저해하는 것을 확인하였다(도 4B).

[0140] **<실시예 6> 비글견에서의 흑삼 추출물의 효과 확인**

[0141] **<6-1> 비글견 투여 방법**

[0142] 흑삼 추출물의 비글견에서 구체적인 면역 효과를 확인하기 위하여, 평균 몸무게가 10 kg인 비글견을 대상으로 하여, 본 발명의 흑삼 추출물을 투여하였다. 더욱 구체적으로는, 흑삼 추출물을 포함하는 정제를 제조하였으며, 정제 1정은 200 mg 이며, 정제 1정당 흑삼 추출물은 100 mg이 포함되도록 임상 정제를 제조하였다. 또한, 비글견에 대한 흑삼 추출물의 면역 증진효과를 확인하기 위하여, 비글견을 3군으로 분류 하였다.

[0143] 분류된 비글견에서 흑삼 추출물의 임상 섭취량은, 고농도군(BG-H)에서는 4마리 × 8정(흑삼 추출물 800mg 함유) × 56일 =1792정으로 계산하고 전·식후·자기 전 중 일반식이로 제공된 사료가 모두가 소화된 공복에 1회/일 투여하고 저농도군(BG-M)에서는 4마리 × 4정(흑삼 추출물 400mg 함유) × 56일 = 896정, 대조군은 4마리 × 일

반식이 × 56일 동안 투여하였다. 또한 비글견의 식전일 경우, 흑삼제제가 모두 소화되었을 때 투여 하였으며 식후일 경우, 일반식이가 모두 소화되었을 때 투여하는 것으로 흑삼 추출물을 투여하였다. 자세한 투여 방법, 투여 농도 및 제조방법은 하기 표 1, 표 2 및 도 5에 나타내었다.

표 1

[0144]

비글견 임상실험을 위한 흑삼 추출물 제형
타블렛 총 무게 : 200 mg / 개(정) 1정당 흑삼 추출물 함량 : 100 mg / 개(정) 섭취군 * 고농도군 흑삼 추출물 투여량/day : 800 mg (8정) * 저농도군 흑삼 추출물 투여량/day : 400 mg (4정)

표 2

[0145]

Group	No. of beagle	Concentration	Duration of administration (Day)
NOR	4	-	56
BG-M	4	400mg/10kg	56
BG-H	4	800mg/10kg	56

[0147] **<6-2>비글견의 혈청 내 cytocine 측정**

[0148] 흑삼 추출물의 비글견에 대한 면역력 증진 효과를 확인하기 위하여, 흑삼 추출물을 투여한 비글견의 혈청 내 cytokine을 측정하였다. 구체적으로는 비투여 대조군 및 흑삼 추출물 투여군(저농도 및 고농도)의 반려견에서 수집한 혈액에서 혈청을 분리하여 혈청 내 존재하는 IL-6 및 TNF-α 생성량은 ELISA kit (R&D system, USA) 를 이용하여 Sandwich ELISA 방법으로 제조사의 지침에 따라 450nm에서 측정하였다.

[0149] 그 결과 도 6 내지 도 9에 나타난 바와 같이 흑삼 추출물을 투여한 후 4주, 8주차에 흑삼 투여군의, 혈청 내 IFN-γ은 고농도 투여군에서, 비투여 대조군 및 저농도 투여군에서보다 유의적으로 증가한 것을 확인하였다(도 6). TNF-α(도 7), IgG(도 8) 및 IgA(도 9)는 상대적으로 흑삼 추출물 투여군에서 비투여 대조군보다 높은 것을 확인하였으며, 특히 8주차에서 높은 것을 확인하였다.

[0151] **<6-3>자연 살해 세포 활성도 측정**

[0152] 비투여 대조군 및 흑삼 추출물 투여군(저농도 및 고농도)에서 수집된 혈액을 37℃에서 20~24시간 배양 후, 혈장을 수집하고 ATGen의 NKVue® Kit를 이용하여 체외에서 자연 살해 세포(NK cell)세포를 인위적으로 활성화시켜 IFN-γ 생성량을 측정하였다.

[0153] 그 결과 도 10에 나타낸 바와 같이, 흑삼 추출물을 8주간 투여하였을 경우, 흑삼 추출물을 비투여 하였을 때 보다, 저농도 및 고농도 흑삼 추출물 투여군에서 NK cell의 활성도가 유의적으로 증가한 것을 확인하였다.

[0155] **<6-4>혈액학적(complete blood cell, CBC) 검사**

[0156] 비글견의 경정맥에서 채혈한 혈액을 수집하여, 백혈구 (White blood cell, WBC)의 수, 백혈구 감별계산(Lymphocyte, Neutrophil, Monocyte, Eosinophil, Basophil), 적혈구(Red blood cell, RBC)의 수, 적혈구용적률(Hematocrit, Hct), 혈색소 농도(Hemoglobin, Hb), 평균적혈구용적(Mean corpuscular volume, MCV), 평균 적혈구혈색소(Mean corpuscular hemoglobin, MCH), 평균적혈 구혈색소농도(Mean corpuscular hemoglobin concentration, MCHC), 혈소판 (Platelet)의 수 및 평균 혈소판용적(Mean platelet volume, MPV) 등을 분석하였다. 또한, 면역세포 증식 분석을 위하여 말초 혈액을 채취 후 Histopaque-1077을 이용해 말초혈액단핵구(Peripheral Blood Mononuclear Cell; PBMC)층을 분리하고, LPS와 concanavalin A를 첨가하여 면역세포의 증식을 유도하여 72시간 후에 면역세포의 증식정도를 XTT assay로 분석하였다.

[0157] CBC 측정 결과, 흑삼 추출물을 투여한 그룹 및 비투여 대조군 모두 혈액 지표들이 정상 범위에 속해, 흑삼 추출물을 투여하여도, 혈액학적으로 비글견에게 영향을 미치지 않는 것을 확인하였다.

[0159] **<실시예 7> 메타볼로믹스 기반의 비글견 생체내 대사체 분석**

[0160] **<7-1> HR-MAS NMR 측정**

[0161] 흑삼 추출물의 혈장을 이용하여, 비글견 생체내 대사체를 분석하였다. 별도의 추출과정 없이 HR-MAS NMR 기법(도 11)을 이용하여, 흑삼 추출물 비투여 대조군, 흑삼 추출물 저농도 투여군, 흑삼 추출물 고농도 투여군의 비글견 혈장 내에 포함된 일차 대사체의 NMR 스펙트럼을 비교하였다. 총 20종의 일차 대사체에 대하여 농도 분석을 진행하였다.

[0162] 그 결과, glycerol이 가장 큰 변화율을 보였으며, 0주에 대비하여 4주 투여 시 30.71% 감소, 8주 투여 시 51.17% 감소하였으며 급여 기간이 늘어남에 따라 함량이 감소한 대사체는 글리세롤(glycerol), 글루타메이트(glutamate), 시트레이트(citrate), 숙시네이트(succinate), 피루베이트(pyruvate), 크레아틴(creatine), 프롤린(proline), 세린(serine)이 확인 하였으며, 증가한 대사체로는 발린(valine), 글루타민(glutamine), 아세테이트(acetate), 류신(leucine), 이소류신(isoleucine)인 것을 확인하였다(도 12 및 도 13).

[0164] **<7-2> GC-FID 및 GC-TOF/MS 측정**

[0165] GC 기반 분석 장비를 이용하여 흑삼 투여에 의한 비글견의 혈장 내 대사체 변화를 추적하였다. 이를 위해 흑삼 추출물 비투여 대조군, 흑삼 추출물 저농도 투여군, 흑삼 추출물 고농도 투여군에서 혈장 내에 포함된 저분자량 대사체의 함량을 비교하였다. GC-FID 및 GC-TOF/MS 분석을 통해 9종의 지방산, 21종의 아미노산, 10종의 유기산, 5종의 당류, 1종의 아민과 3종의 당알코올이 검출되었고 총 49종의 저분자량 대사체에 대하여 함량 변화를 조사하였다.

[0166] 그 결과, 0주, 4주에 대비하여 8주 투여에 의해 흑삼 추출물 비투여 대조군 및 흑삼 추출물 투여군에서 대사체 변화를 확인하였다. 또한, 급여 기간이 늘어남에 따라 흑삼 추출물 저농도 투여군 및 흑삼 추출물 고농도 투여군에서도 혈장 내 대사체 변화가 나타남을 확인하였다. 8주 투여한 흑삼 추출물 저농도 투여군에서 8종의 아미노산이 감소하였으나 글라이신의 증가를 나타내고 있었으며, 8주 투여한 흑삼 추출물 고농도 투여군에서도 글라이신의 뚜렷한 증가를 확인하였다. 이전에 글라이신은 에너지 대사 개선 뿐 만 아니라 항염증 유도자 및 면역기능 개선 효과가 나타난다고 알려져 있었으며, 따라서 흑삼 추출물 투여에 대한 바이오 마커로 보이는 글라이신은 면역기능 개선을 나타내는 물질임을 시사한다.

[0168] **<7-3> 흑삼 추출물의 반려견 체내 대사체 발현 특성 조사**

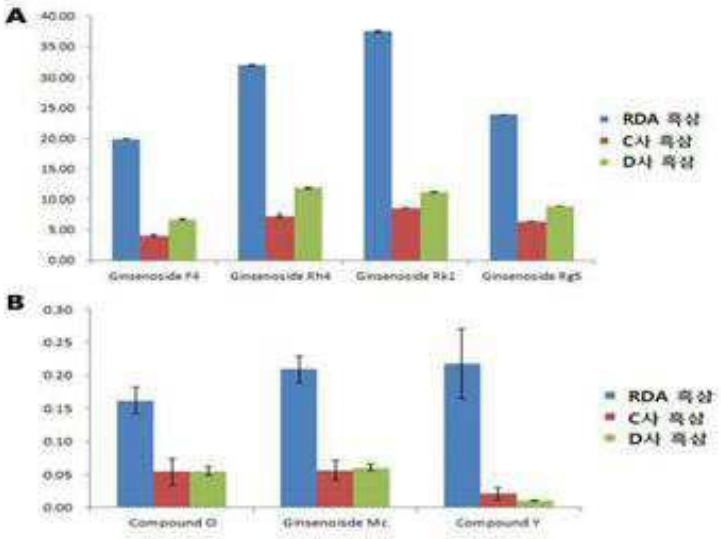
[0169] 비글견의 혈청에서 대사산물을 분석하였다. 흑삼 추출물을 저농도 또는 고농도로 투여한 비글견의 혈청에서 모두 동일하게 글라이신(glycine)이 높게 검출된 것을 확인할 수 있었다. 추가적으로, 이전 연구 결과에 따르면, 글라이신(glycine)은 항염증 반응에 효과적인 물질로 알려져 있다. 비글견 혈청에서 얻어진 대사체 발현 정보는 비처리 대조군, 흑삼 추출물 저농도 투여군 및 흑삼 추출물 고농도 투여군의 혈청 샘플은 High resolution-magic angle spinning (HR-MAS) nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy로 분석하였으며, HR-MAS NMR 결과로 얻어진 대사체의 프로파일 정보를 통해, 서로 상관이 있는 다종의 변량(다변량) 자료 특성을 분석하고, 종합적인 성격을 표현하는 최소자승판별 분석(partial least square discriminant analysis, PLS-DA)를 통해 분석하였다. PLS-DA는 SIMCA 15 (Umetrics, UmeaSweden)를 사용하여 수행되었다.

[0170] 대사체 발현 특성을 조사하기 위하여, PLS-DA 모델 분석의 스코어 플롯 및 로딩 플랏을 확인한 결과, 흑삼을 투여한 비글견에서 글라이신(glycine)이 높게 검출되는 것을 확인할 수 있었다(도 14).

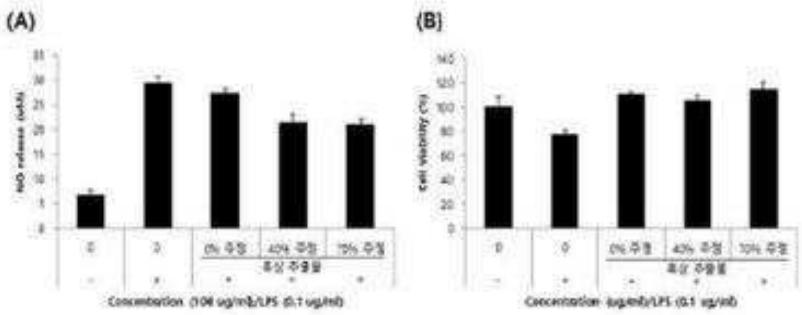
[0172] 따라서, 본 발명의 흑삼 추출물은, 세포독성이 없고, 면역 증진 효과를 가지고 있으며, 비글견에게 투여하였을 때에도, 흑삼 추출물을 투여하지 않았을 때 보다, 혈중 cytokine, INF-γ, NK cell 활성 증가 및 혈중 glycine 농도를 증가시켜, 비글견의 면역력을 증진시킬 수 있는 것을 확인하였다.

도면

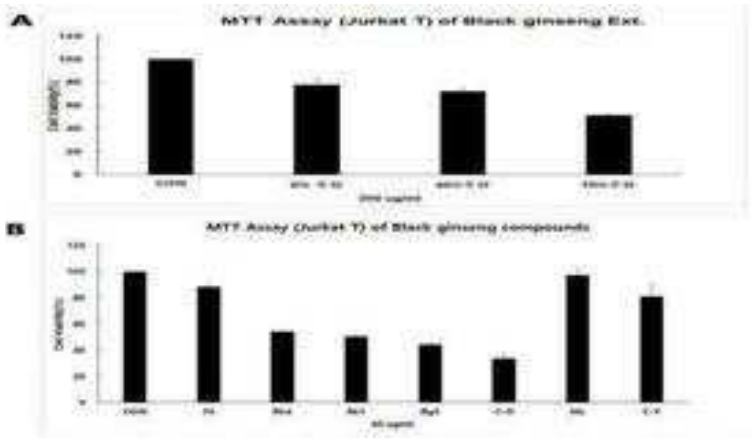
도면1



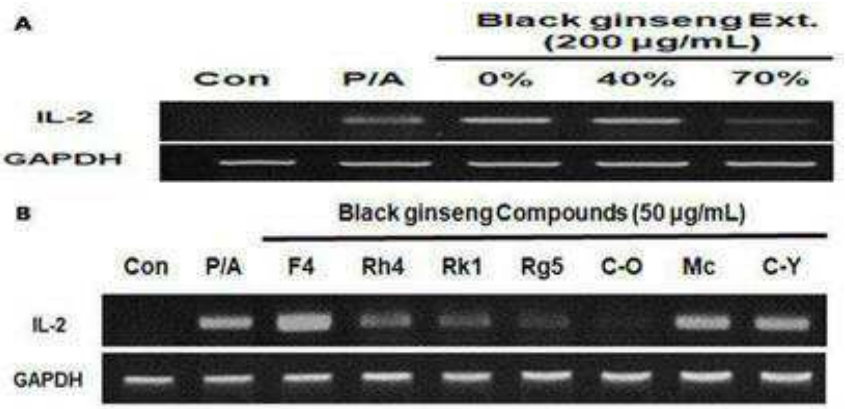
도면2



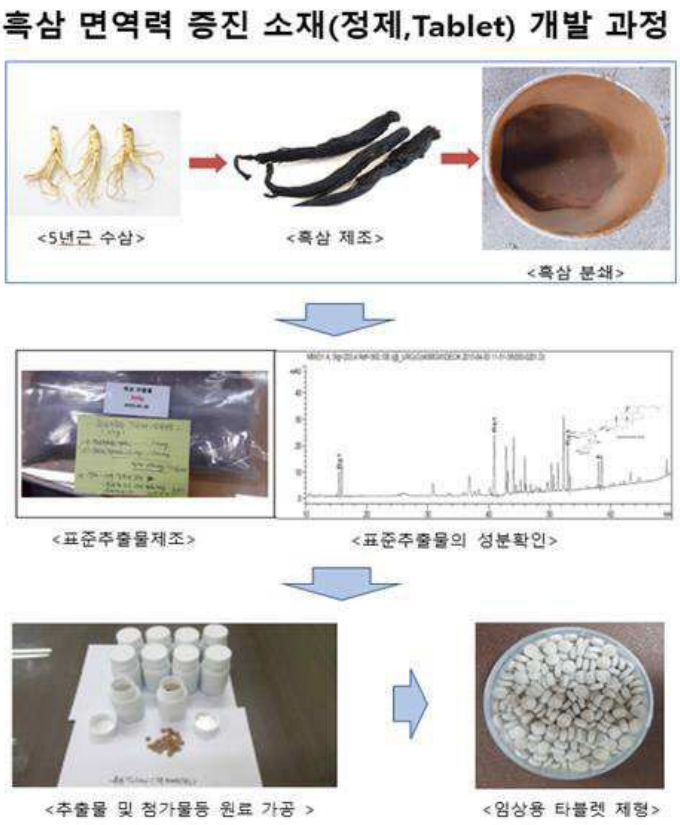
도면3



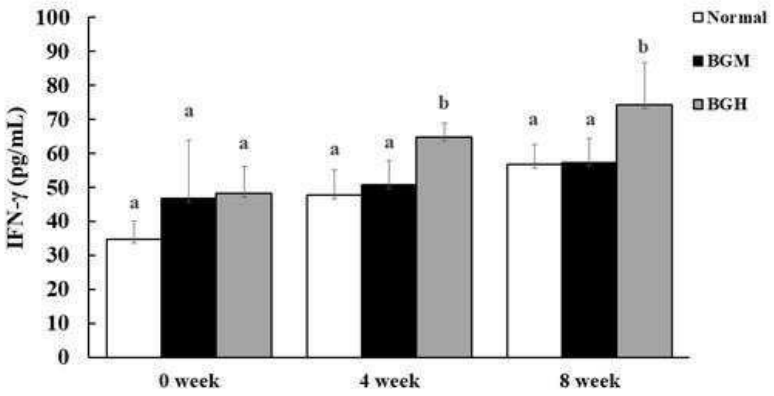
도면4


A
Black ginseng Ext. (200 μg/mL)
Con
P/A
0%
40%
70%
IL-2
GAPDH
B
Black ginseng Compounds (50 μg/mL)
Con
P/A
F4
Rh4
Rk1
Rg5
C-O
Mc
C-Y
IL-2
GAPDH

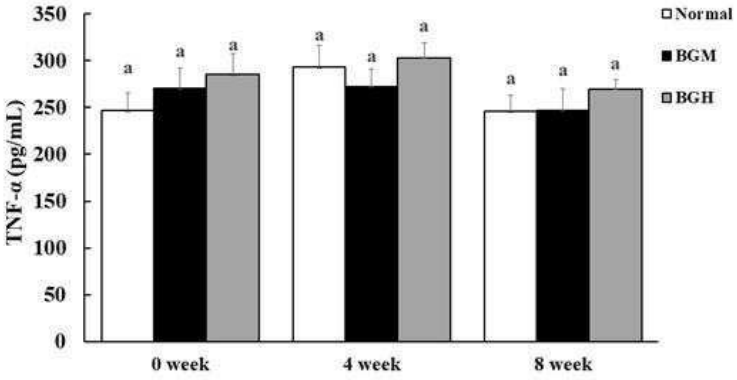
도면5


흑삼 면역력 증진 소재(정제,Tablet) 개발 과정
<5년근 수삼>
<흑삼 제조>
<흑삼 분쇄>
<표준추출물제조>
<표준추출물의 성분확인>
<추출물 및 첨가물등 원료 가공 >
<임상용 타블렛 제형>

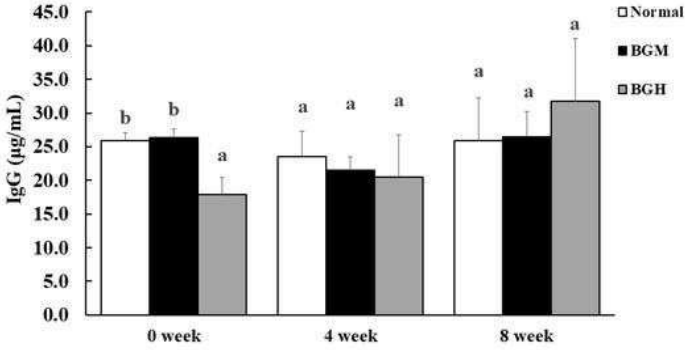
도면6


IFN-γ (pg/mL)
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
0 week
4 week
8 week
Normal
BGM
BGH

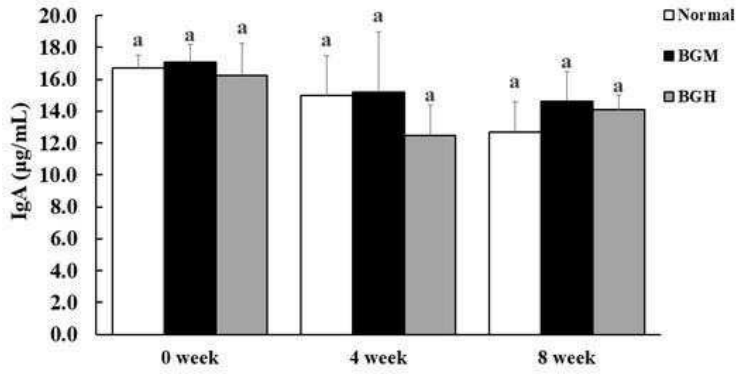
도면7


TNF-α (pg/mL)
350
300
250
200
150
100
50
0
0 week
4 week
8 week
Normal
BGM
BGH

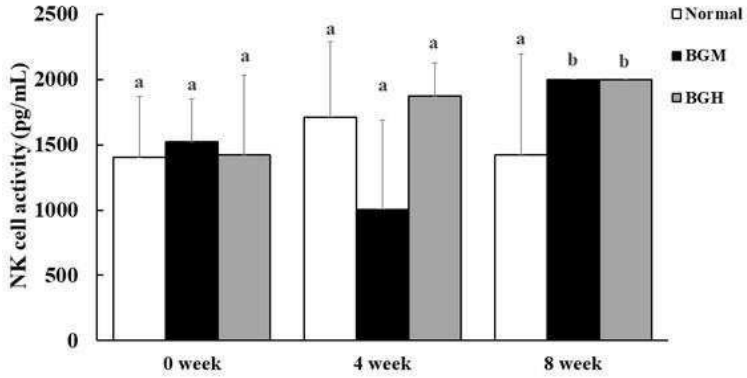
도면8


IgG (μg/mL)
45.0
40.0
35.0
30.0
25.0
20.0
15.0
10.0
5.0
0.0
0 week
4 week
8 week
Normal
BGM
BGH

도면9



도면10

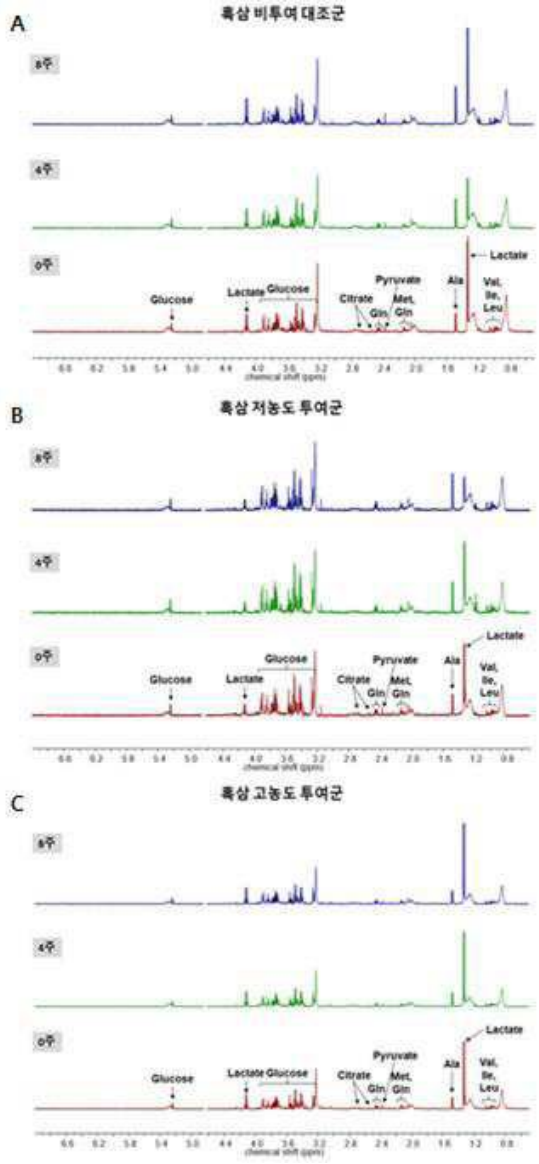


도면11

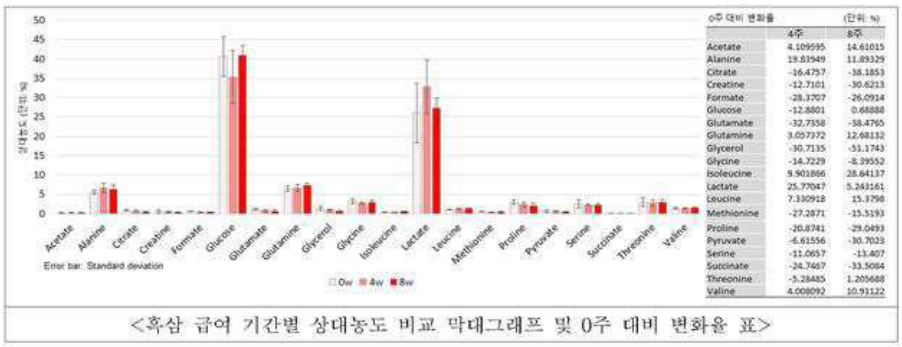


<HR-MAS 측정에 사용된 NMR nanotube, NMR spectrometer 및 nanoprobe>

도면12



도면13



0주 대비 변화율 (단위: %)

	4주	8주
Acetate	4.109595	14.61015
Alanine	19.83949	11.89329
Citrate	-16.4757	-38.1853
Creatine	-12.7101	-30.6213
Formate	-28.3707	-26.0914
Glucose	-12.8801	0.68888
Glutamate	-32.7358	-38.4765
Glutamine	3.057372	12.68132
Glycerol	-30.7135	-51.1743
Glycine	-14.7229	-8.39552
Isoleucine	9.901866	28.64137
Lactate	25.77047	5.243161
Leucine	7.330918	15.3798
Methionine	-27.2871	-15.5193
Proline	-20.8741	-29.0493
Pyruvate	-6.61556	-30.7023
Serine	-11.0657	-13.407
Succinate	-24.7467	-33.5094
Threonine	-5.28485	1.205688
Valine	4.008092	10.91122

<흑삼 급여 기간별 상대농도 비교 막대그래프 및 0주 대비 변화율 표>

도면14

