



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2018년11월12일
(11) 등록번호 10-1917871
(24) 등록일자 2018년11월06일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A01G 7/06 (2006.01) A01C 1/06 (2006.01)
A01G 2/00 (2018.01) A23L 33/105 (2016.01)
(52) CPC특허분류
A01G 7/06 (2013.01)
A01C 1/06 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2017-0118013
(22) 출원일자 2017년09월14일
심사청구일자 2017년09월14일
(56) 선행기술조사문헌
KR1020110114351 A*
KR1020080027858 A*
KR1020110114353 A
“배지만들기”, 네이버 블로그,
<https://blog.naver.com/bigtree03/90025686679>
(2007.12.19)*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
충남대학교 산학협력단
대전광역시 유성구 대학로 99 (궁동, 충남대학교)
(72) 발명자
박상언
대전광역시 유성구 어은로 57, 129동 502호 (어은동, 한빛아파트)
전진
대전광역시 유성구 구즉로 25, 315동 1001호 (송강동, 송강그린아파트)
(74) 대리인
최규환

전체 청구항 수 : 총 4 항

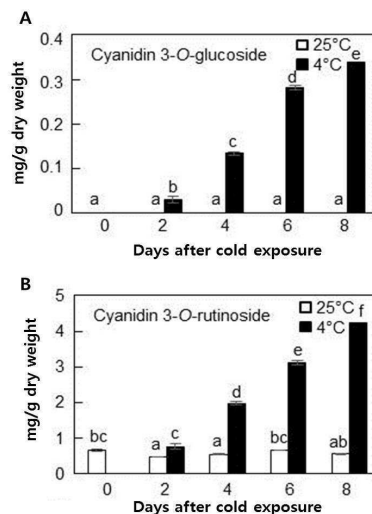
심사관 : 도현미

(54) 발명의 명칭 저온 처리를 이용한 안토시아닌 및 프로안토시아닌 함량이 증가된 쓴메밀 새싹의 생산방법

(57) 요약

본 발명은 (a) 쓴메밀 종자를 배지에 침종시켜 발아시키는 단계; 및 (b) 상기 (a) 단계의 발아된 쓴메밀 종자를 저온 처리하는 단계;를 포함하는 대조구에 비해 항산화 활성이 증가하고, 안토시아닌 및 프로안토시아닌 함량이 증가된 쓴메밀 새싹의 생산방법, 상기 방법으로 생산된 항산화 활성이 증가하고, 안토시아닌 및 프로안토시아닌 함량이 증가된 쓴메밀 새싹 및 상기 쓴메밀 새싹을 함유하는 가공식품에 관한 것이다.

대표도 - 도2



(52) CPC특허분류

A01G 22/00 (2018.02)

A23L 33/105 (2016.08)

A23V 2200/00 (2013.01)

A23V 2250/2104 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2016R1A6A3A11935897

부처명 교육부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 리서치펠로우지원사업

연구과제명 환경 요인을 활용한 식물 유래 기능성 물질 대량 생산 및 작용기전 연구

기 여 율 1/1

주관기관 충남대학교산학협력단

연구기간 2016.11.01 ~ 2019.10.31

공지예외적용 : 있음

명세서

청구범위

청구항 1

(a) 쓴메밀 종자를 배지에 침종시키고, 22~28℃에서 13~19시간의 광조건으로 6일 동안 발아시키는 단계; 및
(b) 상기 (a) 단계의 발아된 쓴메밀 종자를 2~6℃에서 2~10일 동안 생육시키는 단계;를 포함하는 대조구에 비해 항산화 활성이 증가하고, 시아니딘 3-O-글루코시드(cyanidin 3-O-glucoside), 시아니딘 3-O-루티노시드(cyanidin 3-O-rutinoside), 카테킨(catechin) 및 에피카테킨(epicatechin) 함량이 증가된 쓴메밀 새싹의 생산 방법.

청구항 2

삭제

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 (a) 단계에서 배지는 MS(Murashige-Skoog), SH(Schenk and Hildebrandt), WPM(woody plant media) 및 N6으로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나의 배지인 것을 특징으로 하는 대조구에 비해 항산화 활성이 증가하고, 시아니딘 3-O-글루코시드(cyanidin 3-O-glucoside), 시아니딘 3-O-루티노시드(cyanidin 3-O-rutinoside), 카테킨(catechin) 및 에피카테킨(epicatechin) 함량이 증가된 쓴메밀 새싹의 생산방법.

청구항 4

삭제

청구항 5

삭제

청구항 6

제1항 또는 제3항의 방법으로 생산된 항산화 활성이 증가하고, 시아니딘 3-O-글루코시드(cyanidin 3-O-glucoside), 시아니딘 3-O-루티노시드(cyanidin 3-O-rutinoside), 카테킨(catechin) 및 에피카테킨(epicatechin) 함량이 증가된 쓴메밀 새싹.

청구항 7

제6항의 쓴메밀 새싹을 함유하는 가공식품.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 저온 처리를 이용한 안토시아닌 및 프로안토시아닌 함량이 증가된 쓴메밀 새싹의 생산방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 일반적으로 쓴메밀(*Fagopyrum tartaricum*)은 단메밀(*Fagopyrum esculentum*)과 구별되는 것으로, 메밀의 종(species)은 재배종과 야생종을 포함하여 20여 종이 지구상에 분포하고 있다. 재배종에는 단메밀과 쓴메밀 두 종이 주류를 이루고 있으며, 우리나라에 도입되어 지금까지 재배되어 이용되는 것은 단메밀(sweet buckwheat)이며 보통종이라고 불리기도 하며, 학명으로는 파고피룸 에스쿨렌텀(*Fagopyrum esculentum*)이다. 반면, 쓴메밀(bitter buckwheat)은 중국 및 네팔 등지에 많이 자생하거나 재배되는 종으로서 달단종이라고 하며, 타타리메밀이라고도 한다.

[0003] 쓴메밀은 생육기간이 짧고, 내한성이나 흡수력이 강하여 산간지방에서 재배가 용이하여 오래전부터 중국 남부의 해발 200m 이상의 고산지대에서 재배되어 왔다. 메밀은 주로 식품으로 사용하여 왔으며 이전부터 높은 약리 작용을 가진 천연 작물이다. 이러한 메밀의 주요성분으로 알려진 루틴(Rutin)은 폴리페놀(Poly phenol) 화합물로서 퀘세틴(queracetin)에 루티노시드(Rutinoside)가 결합된 물질로서 항산화, 항당뇨 활성, 혈압 강하 작용을 한다. 이러한 루틴은 다른 식물에 비해 메밀에 풍부하며, 그 중 쓴메밀은 보통 메밀보다 더욱 많은 양의 루틴을 함유하고 있다.

[0004] 한편, 한국등록특허 제1174495호는 안토시아닌과 비타민 C 함량이 증진된 쓴메밀 새싹의 생산방법을 개시하고 있으며, 한국공개특허 제2011-0114353호는 폴리페놀 함량이 증진된 연녹색 쓴메밀 새싹의 생산방법을 개시하고 있다. 하지만, 본 발명의 저온 처리를 이용한 안토시아닌 및 프로안토시아닌 함량이 증가된 쓴메밀 새싹의 생산방법에 대해 아직까지 개시된 바가 없다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0005] 본 발명은 상기와 같은 요구에 의해 도출된 것으로서, 본 발명에서는 쓴메밀 새싹을 4℃에서 8일 동안 생육시킨 후, 안토시아닌 및 프로안토시아닌 함량을 측정한 결과, 25℃에서 8일 동안 생육시킨 쓴메밀 새싹에 비해 시아니딘 3-O-글루코시드(cyanidin 3-O-glucoside) 및 시아니딘 3-O-루티노시드(cyanidin 3-O-rutinoside)라는 두 종류의 안토시아닌과 카테킨(catechin) 및 에피카테킨(epicatechin)이라는 두 종류의 프로안토시아닌의 함량이 현저히 증가하였을 뿐만 아니라, 항산화 활성도 더 우수한 것을 확인함으로써, 본 발명을 완성하였다.

과제의 해결 수단

[0006] 상기 과제를 해결하기 위하여, 본 발명은 (a) 쓴메밀 종자를 배지에 침종시켜 발아시키는 단계; 및 (b) 상기 (a) 단계의 발아된 쓴메밀 종자를 저온 처리하는 단계;를 포함하는 대조구에 비해 항산화 활성이 증가하고, 안토시아닌 및 프로안토시아닌 함량이 증가된 쓴메밀 새싹의 생산방법을 제공한다.

[0007] 또한, 본 발명은 상기 방법으로 생산된 항산화 활성이 증가하고, 안토시아닌 및 프로안토시아닌 함량이 증가된 쓴메밀 새싹을 제공한다.

[0008] 또한, 본 발명은 상기 쓴메밀 새싹을 함유하는 가공식품을 제공한다.

발명의 효과

[0009] 본 발명은 저온 처리를 이용한 안토시아닌 및 프로안토시아닌 함량이 증가된 쓴메밀 새싹의 생산방법에 관한 것으로, 보다 상세하게는 본 발명은 간단한 공정단계로 인해 저렴한 가격으로 안토시아닌 및 프로안토시아닌의 함량과 항산화 활성이 증가된 쓴메밀 새싹을 생산할 수 있으므로, 이를 원료로 한 화장품, 건강기능식품 또는 의약품 제조시 기존 방법에 비해 비용 절감 효과가 있을 것이다.

도면의 간단한 설명

[0010] 도 1은 본 발명의 저온(4℃) 처리한 쓴메밀 새싹 내의 안토시아닌 생합성 관련 유전자들의 발현 양상을 나타낸 것이다.

도 2는 본 발명의 저온(4℃) 처리한 쓴메밀 새싹 내의 시아니딘 3-O-글루코시드(cyanidin 3-O-glucoside)(A) 및 시아니딘 3-O-루티노시드(cyanidin 3-O-rutinoside)(B)의 함량 변화를 나타낸 것이다. 25℃는 대조구이다.

도 3은 본 발명의 저온(4℃) 처리한 쓴메밀 새싹 내의 에피카테킨(epicatechin)(A) 및 카테킨(catechin)(B)의 함량 변화를 나타낸 것이다. 25℃는 대조구이다.

도 4는 본 발명의 저온(4℃) 처리한 쓴메밀 새싹의 항산화 활성 변화를 나타낸 것이다. 25℃는 대조구이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0011] 본 발명의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은

[0012] (a) 쓴메밀 종자를 배지에 침종시켜 발아시키는 단계; 및

- [0013] (b) 상기 (a) 단계의 발아된 쓴메밀 종자를 저온 처리하는 단계;를 포함하는 대조구에 비해 항산화 활성이 증가하고, 안토시아닌 및 프로안토시아닌 함량이 증가된 쓴메밀 새싹의 생산방법을 제공한다.
- [0014] 본 발명의 일 구현 예에 따른 방법에서, 상기 (a) 단계에서 쓴메밀 종자를 배지에 침종시키고, 22~28℃에서 13~19시간의 광조건으로 발아시키는 것일 수 있으며, 바람직하게는 25℃에서 16시간의 광조건으로 발아시키는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0015] 또한, 상기 (a) 단계에서 배지는 MS(Murashige-Skoog), SH(Schenk and Hildebrandt), WPM(woody plant media) 및 N6으로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나의 배지일 수 있으며, 바람직하게는 MS(Murashige-Skoog) 배지일 수 있으며, 더 바람직하게는 1/2 MS 배지일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0016] 또한, 상기 (b) 단계에서 발아된 쓴메밀 종자를 2~6℃에서 2~10일 동안 생육시키는 것일 수 있으며, 바람직하게는 4℃에서 2~8일 동안 생육시키는 것일 수 있으며, 더 바람직하게는 4℃에서 8일 동안 생육시키는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0017] 또한, 상기 대조구는 (b) 단계에서 발아된 쓴메밀 종자를 25℃에서 생육시킨 것을 의미한다.
- [0018] 또한, 상기 안토시아닌은 시아니딘 3-O-글루코시드(cyanidin 3-O-glucoside) 또는 시아니딘 3-O-루티노시드(cyanidin 3-O-rutinoside)이고, 상기 프로안토시아닌은 카테킨(catechin) 또는 에피카테킨(epicatechin)인 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0019] 또한, 본 발명은 상기 방법으로 생산된 항산화 활성이 증가하고, 안토시아닌 및 프로안토시아닌 함량이 증가된 쓴메밀 새싹을 제공한다.
- [0020] 또한, 본 발명은 상기 쓴메밀 새싹을 함유하는 가공식품을 제공한다.
- [0021] 상기 가공식품의 종류에는 특별한 제한은 없다. 상기 쓴메밀 새싹을 첨가할 수 있는 식품의 예로는 장류, 무침, 육류, 소세지, 빵, 초코렛, 캔디류, 스낵류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류를 포함한 낙농제품, 각종 스프, 음료수, 차, 드링크제, 알콜 음료 및 비타민 복합제 등이 있으며, 통상적인 의미에서의 가공식품을 모두 포함한다.
- [0022] 이하, 실시예를 이용하여 본 발명을 더욱 상세하게 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들에 의해 제한되지 않는다는 것은 당해 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어 자명한 것이다.
- [0023] **실시예 1. 저온 처리한 쓴메밀 새싹 내의 안토시아닌 생합성 관련 유전자들의 발현 변화 분석**
- [0024] 본 실시예 1에서는 저온 처리가 실제로 쓴메밀 새싹 내의 안토시아닌 생합성 관련 유전자들의 발현에 영향을 미치는지 확인하기 위해, 쓴메밀 종자를 수크로오스가 포함되지 않은 1/2 MS(2.5mM Mes, pH 5.7 및 0.8% 아가) 배지에 파종하고 25℃에서 16시간의 광 조건으로 생장상(growth chamber)에서 6일 키운 후, 4℃에서 0시간, 1시간, 2시간, 4시간, 8시간, 24시간, 48시간 및 96시간 동안 저온 처리된 쓴메밀 새싹을 대상으로 실시간 RT-PCR을 수행하였다. 총 RNA는 총 RNA 추출키트(Geneaid사, Taiwan)을 이용하여 분리하였으며, 실시간 RT-PCR 분석을 위해 프라이머를 제작하여 PCR 수행 후 특이적으로 유전자가 증폭되는 것을 확인하였다. 실시간 RT-PCR은 QuantiTect SYBR Green RT-PCR 키트(Qiagen, USA)를 사용하여 50℃에서 30분, 95℃에서 15분 이후 94℃에서 15초, 55℃에서 30초, 72℃에서 30초 조건으로 45회 동안 증폭하였다. CFX96 RT-PCR 시스템(Bio-Rad; Hercules, CA, USA) 기기를 이용하였고, 레퍼런스 유전자로 *H3*를 사용하였다.
- [0025] 그 결과, 도 1에 개시한 바와 같이 총 12개의 안토시아닌 생합성 관련 유전자 중 *FtDFR* 유전자를 제외한 11개의 유전자들의 발현량이 저온 처리로 인해 현저히 증가하였으며, *FtPAL*, *FtC4H* 및 *Ft4CL* 유전자의 경우 저온 처리 24시간에서 가장 높은 유전자 발현율을 보였으며, 0시간에 비해 각각 3.3배, 3.2배 및 3.1배 증가하였다. 또한, *FtCHS*, *FtCHI*, *FtF3H*, *FtF3'H1*, *FtF3'H2*, *FtFLS1* 및 *FtANS* 유전자의 경우 저온 처리 48시간에서 가장 높은 유전자 발현율을 보였으며 0시간에 비해 각각 5.9배, 2.5배, 15.9배, 9.8배, 4.0배, 2.7배 및 15.2배 증가하였다. 플라보놀 생합성의 주요 유전자인 *FtFLS2*의 경우, 저온 처리 96시간에서 0시간에 비해 24배 증가하였다.
- [0026]

[0027] **실시예 2. 쓴메밀 새싹에서 저온이 안토시아닌 및 프로안토시아니딘의 함량에 미치는 영향 분석**

[0028] 쓴메밀은 시아니딘 3-O-글루코시드와 시아니딘 3-O-루티노시드라는 두 종류의 안토시아닌과 카테킨과 에피카테킨이라는 두 종류의 프로안토시아니딘을 함유하고 있다. 따라서 본 실시예 2에서는 저온 처리가 안토시아닌 및 프로안토시아니딘의 함량 증가에 미치는 영향을 분석하기 위해, 쓴메밀 새싹을 16시간의 광 조건으로 성장상에서 6일 키운 후 4℃ 및 25℃에서 각각 2, 4, 6, 8일간 배양한 다음, HPLC 분석을 수행하였다. HPLC를 통해 안토시아닌을 분석하기 위해, 물과 포믹산이 혼합된 용액에 100mg의 건조된 샘플(쓴메밀 새싹)을 넣은 후, 20분 동안 초음파 분쇄기 상에서 반응하여 상층액만 분리하였다. Agilent 1200 HPLC가 부착된 4000 Q-Trap LC-ESI-MS/MS 시스템(Applied Biosystems)을 사용하여 HPLC 분석을 수행하였으며, 시큐리티 가드 카트리지 키트 AQ C18 칼럼(Phenomenex, USA)이 장착된 시너지 4μm의 POLAR-RP 80A 칼럼(250 × 4.6 mm, i.d., particle size 4 μm; Phenomenex, USA)을 사용하여 520nm 파장에서 물질을 탐지하였다. 그 결과, 도 2에 개시한 바와 같이 저온 처리하지 않은 쓴메밀 새싹(25℃)에 비해 8일 동안 저온(4℃) 처리한 쓴메밀 새싹에서 시아니딘 3-O-글루코시드 함량이 약 34배 증가하였으며, 시아니딘 3-O-루티노시드 함량은 9배 이상 증가하였다.

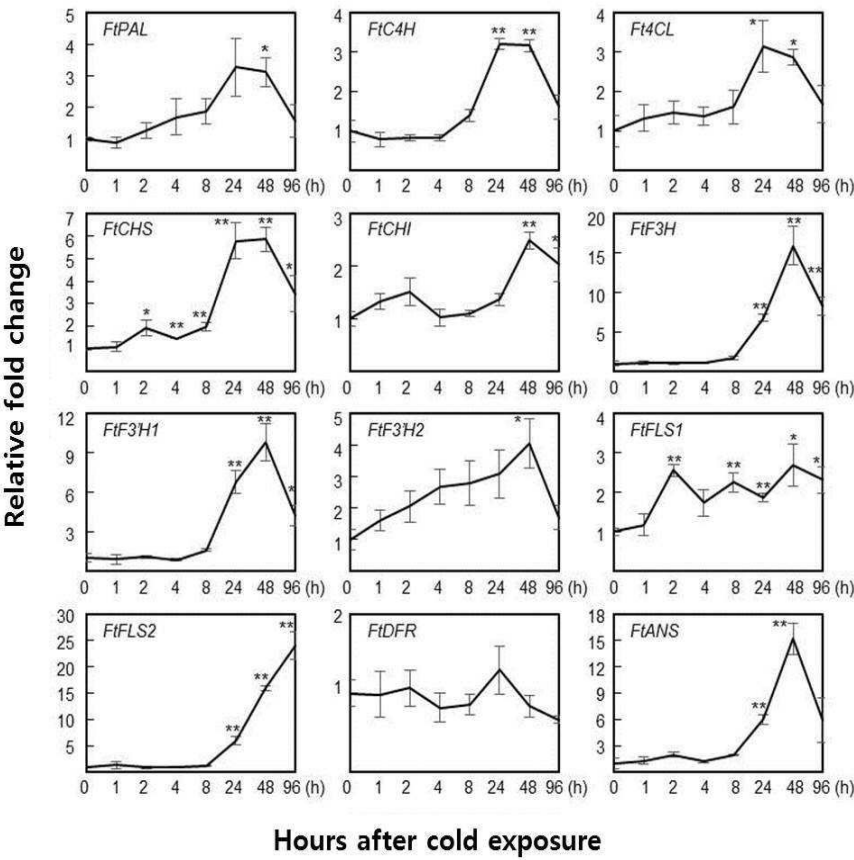
[0029] 또한, HPLC 분석을 통해 프로안토시아니딘의 함량을 확인하기 위해, 80% 메탄올 용액에 100mg의 동결 건조된 샘플(쓴메밀 새싹)을 넣은 후 1시간 동안 초음파 분쇄기 상에서 반응하여 상층액만 분리하였으며, 휴텍스 모델 NS-4000 HPLC(Daejeon, Korea)을 사용하여 280nm 파장에서 물질을 탐지하였다. 그 결과, 도 3에 개시한 바와 같이 저온 처리하지 않은 쓴메밀 새싹(25℃)에 비해 8일 동안 저온(4℃) 처리한 쓴메밀 새싹에서 에피카테킨 함량이 13배 이상 증가하였으며, 카테킨 함량은 4배 이상 증가하였다.

[0030] **실시예 3. 저온 처리에 의한 쓴메밀 새싹의 항산화 활성 변화 분석**

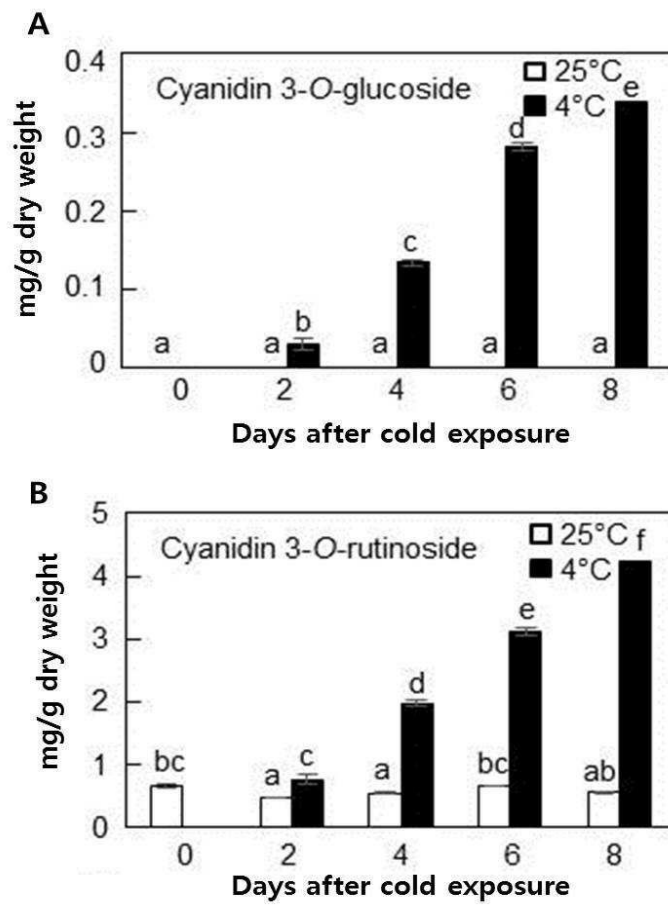
[0031] 본 실시예 3에서는 저온 처리에 의한 쓴메밀 새싹의 항산화 활성 변화를 측정하기 위해, 16시간의 광 조건으로 성장상에서 6일 키운 후, 쓴메밀 새싹을 4℃ 및 25℃에서 각각 2, 4, 6, 8일간 배양한 다음, DPPH(2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazyl)를 사용하여 실험을 수행하였다. 구체적으로, 동결 건조한 쓴메밀 새싹에 4ml의 메탄올을 첨가하여 추출한 쓴메밀 새싹 추출물에 메탄올에 녹인 0.15% DPPH 200μl를 첨가하고, 상온의 암조건에서 30분간 반응한 후 517nm에서 흡광도를 측정하였다. 그 결과, 도 4에 개시한 바와 같이 저온을 처리하지 않은 쓴메밀 새싹(25℃)에 비해 8일 동안 저온 처리한 쓴메밀 새싹(4℃)에서 5배 이상 높은 항산화 활성을 나타내는 것을 확인할 수 있었다.

도면

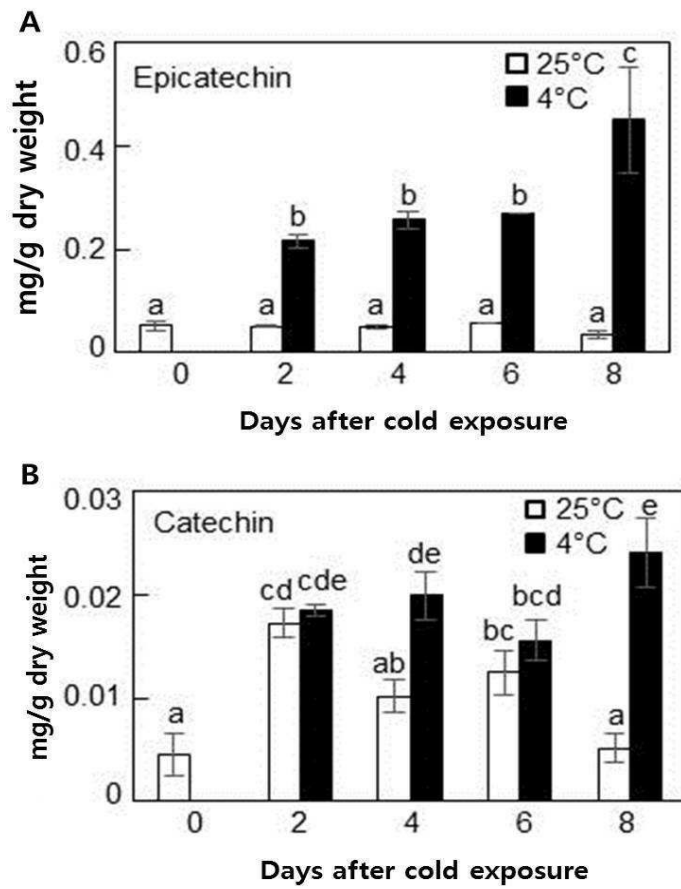
도면1



도면2



도면3



도면4

