



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호

10-2012-0128731

(43) 공개일자

2012년11월28일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A23L 1/29 (2006.01) A61P 39/06 (2006.01)

A61P 37/00 (2006.01)

(21) 출원번호

10-2011-0046197

(22) 출원일자

2011년05월17일

심사청구일자

2011년05월17일

(71) 출원인

충남대학교산학협력단

대전광역시 유성구 대학로 99 (궁동, 충남대학교)

(72) 발명자

김미리

대전광역시 유성구 가정로 65, 대림아파트 101동 201호 (신성동)

유보람

대전광역시 중구 당지로 45, 107동 301호 (산성동, 우성아파트)

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

김원준

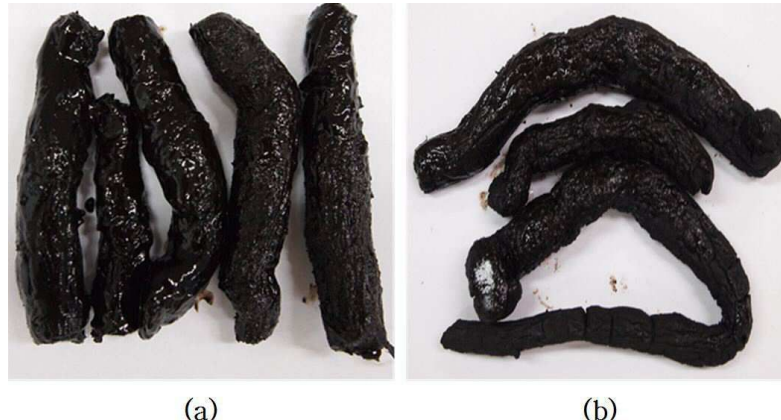
전체 청구항 수 : 총 6 항

(54) 발명의 명칭 **숙지황 제조방법**

(57) 요 약

본 발명은 숙성기간을 크게 단축하여 간단한 공정으로 보다 경제적으로 숙지황을 제조할 수 있는 방법에 관한 것으로, 보다 상세하게는 지황을 주침하는 단계; 주침된 지황을 70~90℃, 80~90% 습도에서 44~76시간 1차 숙성하는 단계; 1차 숙성된 지황을 45~55℃, 80~90% 습도에서 92~100시간 2차 숙성하는 단계; 및 2차 숙성된 지황을 60~80℃, 80~90% 습도에서 44~76시간 3차 숙성하는 단계;를 포함하는 것을 특징으로 하는 숙지황의 제조방법에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 상기 방법에 의해 제조된 항산화성과 면역성이 우수한 숙지황에 관한 것이다.

대표도 - 도1



(72) 발명자

김효진

대전광역시 서구 만년로 25, 110동 905호 (만년동,
강변아파트)

이지연

대전광역시 중구 유천로48번길 31 (유천동)

특허청구의 범위

청구항 1

지황을 주침하는 단계;

주침된 지황을 70~90℃, 80~90% 습도에서 44~76시간 1차 숙성하는 단계;

1차 숙성된 지황을 45~55℃, 80~90% 습도에서 92~100시간 2차 숙성하는 단계; 및

2차 숙성된 지황을 60~80℃, 80~90% 습도에서 44~76시간 3차 숙성하는 단계;

를 포함하는 것을 특징으로 하는 숙지황의 제조방법.

청구항 2

제 1 항에 있어서,

3차 숙성 후 건조하는 단계;를 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는 숙지황의 제조방법.

청구항 3

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서,

상기 지황은 생지황 또는 건지황인 것을 특징으로 하는 숙지황의 제조방법.

청구항 4

제 3 항에 있어서,

상기 1차 숙성단계 및/또는 3차 숙성단계에서 추가로 주침에 사용한 술을 뿌려주는 것을 특징으로 하는 숙지황의 제조방법.

청구항 5

제 4 항에 있어서,

상기 1차 내지 3차 숙성단계는 항온·항습기능이 구비된 숙성기에서 수행되는 것을 특징으로 하는 숙지황의 제조방법.

청구항 6

제 1 항 또는 제 2 항의 방법에 의해 제조된 것을 특징으로 하는 숙지황.

명세서

기술분야

본 발명은 숙성기간을 크게 단축하여 간단한 공정으로 보다 경제적으로 숙지황을 제조할 수 있는 방법에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 상기 방법에 의해 제조된 항산화성과 면역성이 우수한 숙지황에 관한 것이다.

[0001]

배경 기술

- [0002] 지황(地黃, *Rehmannia glutinosa* Libosch. var. *purpurea* Makino 또는 동속식물의 뿌리)은 현삼과(Scrophulariaceae)에 속하는 다년생 초본으로 지황의 근엽과 잔뿌리를 제거하고 흙을 깨끗이 씻은 것을 생지황 또는 선지황이라 한다. 생지황은 보혈, 강장, 진정, 빈혈, 토혈, 하혈, 자궁출혈, 결핵성 쇠약 등에 그 효능이 널리 인정되고 있다.
- [0003] 생지황을 말린 건지황을 황주 또는 백주에 넣고 주침(酒侵)하여 증숙(蒸熟)한 후 건조하는 것을 반복한 것을 숙지황(*Rehmanniae Radix Preparata*)이라고 분류하고 각각 약리를 달리하여 사용하고 있다. 숙지황은 보혈, 자음의 효능이 있으며, 생리불순, 허약체질, 어린이의 발육 부진, 치매, 조루증, 발기부전 등에 사용되고 있다. 또한 최근 혈액 순환을 개선시켜 여러 만성 질환의 말초미세 순환을 개선시키는 효과, 혈중 과산화물 제거효소(superoxide dismutase), 글루타티온 산화효소(glutathione peroxidase)의 증가와 지질과산화의 억제, 면역증가 효과, 항암작용, 섬유소용해계(fibrinolytic system)의 활성증가, 폴리브렌에 의해 유도되는 적혈구 집괴(polybrene-induced erythrocyte aggregation)의 감소, 적혈구 변형능(erythrocyte deformability)과 ATP 함량(content)의 증가 등이 보고되고 있다. 숙지황은 지황과 지황의 약리작용의 차이는 지황을 증기로 찌고, 말리는 과정에서 인체에 유익한 물질이 새롭게 생성되기 때문이다. 찌고 말리는 과정을 여러번 반복할수록 숙지황의 품질이 높은 것으로 평가되며, 한의학에서는 9번 찌고 9번 말린 구증구포 숙지황을 최고의 품질로 인정하고 있다. 숙지황의 증숙과정에서는 숙지황의 주성분인 당류가 5-HMF(5-hydroxymethyl-2-furaldehyde)로 변화하는데, 5-HMF는 당함량이 높은 가공식품의 품질을 평가하는 지표물질로 사용된다. 숙지황의 품질 평가시에도 5-HMF가 지표물질로 사용되는데, 5-HMF의 함량이 높을수록 고품질의 숙지황으로 인정된다.
- [0004] 그러나 종래의 숙지황 제조방법은 수차에 걸쳐 증숙하여도 완전 증숙이 어렵기 때문에 주침-증숙-건조를 반복해야 한다. 보통 1증숙 시 주침 2~3일, 증숙 1~3시간, 건조 1~2일 정도가 소요되어, 2증숙~9증숙 시에는 주침시간을 6시간~1일로 단축하는 점을 감안하더라도, 구증구포 숙지황을 제조하기 위해서는 빨라야 보름, 길게는 한달 이상이 걸린다. 제조과정에도 찌고 말리는 작업을 계속해야 하므로 생산성이 매우 낮다는 문제가 있다. 또한 산패, 균의 번식 및 증식, 이취의 문제로 인하여 주침에 사용되는 술을 반복하여 사용하지 못하므로 생산 단가가 높아지는 요인이 된다. 이와 같이 숙지황의 제조과정은 매우 복잡하고 시간과 비용, 인력이 많이 소요되어, 보다 간단한 공정으로 빠른 시일 내에 적은 원료를 사용하여 제조할 수 있으면서도 생리적 활성이 우수한 숙지황 제조 방법의 개발이 요구된다.
- [0005] 숙지황의 제조 방법에 관한 기존 특허에서 숙지황 제조 과정에 술을 사용하여 증숙과정에 지황에 흡수되는 증기의 양을 일정하게 하거나(등록특허 제839326호), 산사나 사과와 같은 유효성분을 추가하는(등록특허 제407237호, 제407244호) 것에 의해 생리활성을 증진시키려는 시도들이 있어 왔다. 그러나 상기 특허들은 기본적으로는 구증구포의 방법을 고수하고 있으므로 전술한 문제는 전혀 해결되지 않았다.

선행기술문헌

특허문헌

- [0006] (특허문헌 0001) 등록특허 제839326호
(특허문헌 0002) 등록특허 제407237호
(특허문헌 0003) 등록특허 제407244호

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0007] 본 발명은 전술한 문제점을 해결하기 위한 것으로, 주침-증숙-건조과정을 9번 반복하는 종래 구증구포법의 숙성기간의 장기화, 작업 효율의 저하, 주침에 사용되는 술로 인한 비용상승의 문제를 해소하여 단기간 내에 간단한 공정에 의해 경제적으로 숙지황을 제조할 수 있는 방법 및 상기 방법에 의해 제조된 숙지황을 제공하고자 하는 것을 목적으로 한다.

[0008] 본 발명의 다른 목적은 숙성 후 황산화 활성 및 면역활성과 같은 생리활성이 우수한 숙지황을 제조하는 방법 및 상기 방법에 의해 제조된 숙지황을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0009] 전술한 목적을 달성하기 위한 본 발명은 지황을 주침하는 단계; 주침된 지황을 70~90℃, 80~90% 습도에서 44~76시간 1차 숙성하는 단계; 1차 숙성된 지황을 45~55℃, 80~90% 습도에서 92~100시간 2차 숙성하는 단계; 및 2차 숙성된 지황을 60~80℃, 80~90% 습도에서 44~76시간 3차 숙성하는 단계;를 포함하는 것을 특징으로 하는 숙지황의 제조방법에 관한 것이다.

[0010] 숙성 단계가 완료되면 장기간 변질없이 유통·저장하여 사용할 수 있도록 3차 숙성 후 건조하는 단계를 추가로 포함할 수 있다. 혹은, 냉동저장하여 사용하거나 단기간 사용 시에는 냉장보관하며 사용할 수도 있다. 상기 건조 과정은 통상의 숙지황의 건조 시 사용하는 조건에서 이루어 질 수 있다. 즉, 상온에서 건조할 수도 있으며 열풍건조에 의해 50~80℃ 열풍으로 건조할 수도 있다. 건조 시 숙지황의 탄화 및 발암물질인 벤조피렌의 생성을 방지하기 위해서 열풍의 온도는 50~65℃인 것이 더욱 바람직하다. 건조 시간은 건조 장비의 크기, 건조 온도, 함께 건조하는 숙지황의 양 등에 따라 적절하게 조절하여야 함은 당연하다.

[0011] 하기에서는 본 발명의 숙지황의 제조 공정의 최적 조건을 사전 실험 결과를 참조하여 보다 구체적으로 설명한다.

[0012] 본 발명에 있어서, 상기 지황은 생지황 또는 건지황인 것을 특징으로 한다. 종래 기술에 있어서도 숙지황은 생지황 또는 건지황으로부터 제조되는 바, 본 발명 역시 생지황 또는 건지황으로부터 숙지황을 제조할 수 있다.

[0013] 주침은 지황을 술에 침지하여 담궈놓는 것으로, 상기 술로는 황주나 백주를 사용할 수 있으며 경제적인 측면을 고려하면 황주에 주침하는 것이 바람직하다. 황주와 백주는 모두 곡주로서 황주는 막걸리와 같이 황색을 나타내는 것을, 백주는 맑고 투명한 술을 의미한다. 주침과정에서 지황의 쓴맛이 제거되며 곡주인 황주나 백주에 함유된 당류에 의해 숙지황의 당도가 증가하게 된다.

[0014] 건지황은 대부분의 수분이 제거된 상태이기 때문에 주침에 의해 백주 또는 황주가 쉽게 스며들어가므로, 주침과정에서 지황 내부의 수분이 백주 또는 황주로 치환되어야 하는 생지황에 비해 주침시간이 더 짧아도 주침의 효과가 우수하였다. 즉, 생지황을 원료로 하는 경우에는 주침은 48~72시간 범위에서 이루어지는 것이 바람직하며, 건지황을 원료로 하는 경우에는 24~48시간 주침하는 것으로도 충분한 효과를 나타내었다. 따라서, 주침은 상온에서 24~76시간 하는 것이 바람직하다. 또한, 1차 숙성과 3차 숙성단계에서 숙성 중 주침에 사용한 술을 뿌려주는 것이 바람직하다. 술을 뿌려주는 것에 의해 숙지황의 색이 진해지며 표면에 광택이 형성되어 색감이 좋아지며, 당도도 증가하게 된다. 상기 숙성단계라 함은 숙성 직전, 숙성 중간 혹은 숙성 직후를 의미하는 것이다. 2차 숙성단계는 온도가 낮기 때문에 2차 숙성단계에서 술을 뿌려주는 경우에는 술의 효모로 인해 곰팡이가 생길 수 있다. 따라서, 술을 뿌리는 것은 1차 및/또는 3차 숙성단계에 한정하며 숙성단계에서 술을 뿌려주는 회수는 1~4회인 것이 바람직하다. 술을 뿌리는 회수가 너무 많은 경우에는 공정 효율성이 저하된다.

[0015] 상기 1차 숙성단계는 70~90℃, 80~90% 습도에서 44~76시간 진행된다. 온도가 70℃ 미만인 경우에는 주침에 사용한 술의 효모에 의해 곰팡이가 생기거나 술 특유의 냄새가 많이 나게되며, 온도가 너무 높아지면 벤조피렌(benzo(α)pyrene)이 생성된다. 벤조피렌은 다환방향족 탄화수소 화합물로 유기화합물의 불연소 과정에서 주로 생성된다. 벤조피렌은 체내에서 cytochrome P-450에 의해 산화되어 7-8-diol체로 된 다음 diepoxide로 재산화되어, 간장에 대하여 독성을 발현하는 것으로 알려져 있다. 숙성 시 습도가 90% 이상인 경우에는 지황이 부패하였으며 80% 미만일 경우에는 숙성효과가 좋지 않았다. 또한, 숙성시간이 44시간보다 짧은 경우에는 지황의 숙성도가 낮았으며, 76시간 이상 숙성을 지속하는 경우에는 지황이 숙성되지 못한 채 말라버리거나 속은 숙성되지 못한 채 겉표면이 갈색화가 일어났다.

- [0016] 1차 숙성단계가 완료되면 온도만 45~55℃로 낮추어 92~100시간 2차 숙성시킨다. 상기 2차 숙성단계는 보다 온화한 조건에서 숙성을 계속하여 표면의 갈변화 혹은 표면이 타는 것을 방지하면서 내부까지 숙성이 충분히 이루어지도록 하기 위한 것이다. 2차 숙성단계에서 숙성온도가 너무 낮거나 숙성시간이 너무 짧은 경우에는 숙성이 충분히 일어나지 않았으며, 온도가 너무 높으면 내부가 충분히 숙성되지 않은 상태에서 갈변화가 일어나게 된다. 2차 숙성시간은 100시간이면 충분하고, 시간을 조금 늘인다고 해서 지황의 품질이 낮아지는 것은 아니나 경제성을 고려하면 100시간 미만인 것이 바람직하다.
- [0017] 2차 숙성이 완료되면 숙지황의 신맛을 줄이고 당도를 높이는 것과 동시에 표면을 갈색이 되도록 하여 색감을 높이기 위해 다시 숙성 온도를 60~90℃로 높여 44~76시간 3차 숙성시킨다. 온도가 너무 낮거나 시간이 너무 짧은 경우에는 숙지황의 산도가 높아 신맛이 강한 반면 당도가 낮고 색감이 좋지 않게 된다. 반면 온도가 너무 높거나 시간이 너무 길어지면 숙지황에 벤조피렌이 생성되고 표면이 타는 문제가 발생할 수 있다. 숙성온도가 낮을수록 숙성시간이 길어야 함은 당연하다.
- [0018] 상기와 같이 총 3차 숙성단계로 이루어진 본발명의 숙지황 제조방법에 의하면, 주침시간을 포함하여 8~13일, 바람직하게는 9~11일이면 숙지황을 제조할 수 있으므로 빨라도 보름 이상이 소요되던 제조시간을 크게 단축하여 생산성을 크게 향상시킬 수 있다. 또한 주침을 단 1회만 하여도 되므로 주침에 사용되는 술의 양이 종래의 10~20%에 불과하게 되므로 생산단가가 크게 낮아진다.
- [0019] 상기 1차 내지 3차 숙성단계는 향온?향습기능이 구비된 숙성기에서 수행하는 것이 보다 바람직하다. 향온?향습기능이 구비된 숙성기를 사용하는 경우, 보다 간편하게 온도와 습도를 조절할 수 있으므로 생산성이 더욱 향상된다.
- [0020] 본 발명은 또한 상기 방법에 의해 제조된 숙지황에 관한 것이다.
- [0021] 본 발명의 제조방법에 의하면 숙지황 제조에 소요되는 시간이 짧을 뿐만 아니라, 건조중량대비 수율이 구증구포에 의한 숙지황 제조방법에 비해 6~7배 증가하여 숙지황을 보다 경제적으로 제조할 수 있다. 본 발명에 의한 숙지황은 당도가 종래방법에 의해 크게 향상되고 pH가 낮지 않아 식감이 보다 우수하다. 또한, 숙지황의 지표물질인 5-HMF의 함량이 구증구포에 의한 숙지황보다 현저히 높으며, 위장장애의 원인이 되는 Catapol의 함량은 구증구포 숙지황에 비해 매우 낮았다. 항산화능에 있어서는, 측정기준이 되는 DPPH 라디칼 소거능, FRAP 값, Hydroxy 라디칼 소거능 및 총 페놀함량의 모든 항목에서 구증구포 숙지황에 비해 우수한 효능을 나타내었다. 또한, RAW264.7 세포주의 증식능과 NO생성 저해능, cytokine 생성으로 측정한 면역능력에 대해서 역시 구증구포 숙지황에 비해 세포독성이 낮고 NO생성과 cytokine 생성 저해능이 우수하였다.

발명의 효과

- [0022] 이상과 같이 본 발명의 숙지황 제조방법은 종래 15일 내지 30일 이상 소요되는 숙지황의 제조기간을 크게 단축하고, 공정이 매우 간단하며, 주침에 사용되는 술의 양을 대폭 감소시켜 생산성을 향상시키고 생산 단가를 크게 낮출 수 있다.
- [0023] 또한 본 발명에 의하면 온도와 습도가 일정하게 유지되는 숙성기를 사용하면 숙성기를 개폐하지 않고 온도와 습도를 유지하며, 종래의 주침-중숙-건조를 9회 반복하여야 하는 번거로움을 해소할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0024] 도 1은 본 발명의 일 실시예에 의해 제조된 숙지황의 사진.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0025] 이하 실시예를 들어 본 발명을 보다 상세히 설명한다. 그러나 이러한 실시예는 본 발명의 기술적 사상의 내용과 범위를 쉽게 설명하기 위한 예시일 뿐, 이에 의해 본 발명의 기술적 범위가 한정되거나 변경되는 것은 아니다. 또한 이러한 예시에 기초하여 본 발명의 기술적 사상의 범위 안에서 다양한 변형과 변경이 가능함은 당업자에게는 당연할 것이다.
- [0026] **실시예**
- [0027] 하기 제조예와 비교예에 사용된 생지황은 고려지황으로 금산군 남이면 농가에서 재배한 GAP지황을 구입하여 사용하였다. 건지황은 구입한 고려지황을 40~50 ℃의 건조기에서 3~4일간 건조하여 사용하였다.
- [0028] **제조예 1 : 생지황으로부터 숙지황의 제조**
- [0029] 생지황을 3 cm 길이로 절단하고 생지황이 잠길 정도의 막걸리(알코올도수 7°)를 넣어 상온에서 48시간 주침하였다. 주침된 생지황을 건져 트레이에 펼쳐 담고 향온항습기에 넣은 후, 80℃, 80~90% 습도에서 48시간 1차 숙성시켰다. 1차 숙성 24시간 후와 48시간 후 생지황 100g 당 50 ml의 막걸리를 분무하여 주었다. 1차 숙성이 완료되면 향온항습기의 내부 온도를 50℃로 낮추고 80~90%의 습도에서 96시간 동안 2차 숙성하였다. 2차 숙성이 완료되면 다시 생지황 100g 당 50 ml의 막걸리를 분무하고, 향온항습기의 내부온도를 80℃로 올려 80℃, 80~90% 습도에서 48시간 3차 숙성하여 숙지황을 제조하였다. 제조된 숙지황을 도 1의 (a)에 도시하였다.
- [0030] **제조예 2 : 건지황으로부터 숙지황의 제조**
- [0031] 건지황을 3 cm 길이로 절단하고 건지황이 잠길 정도의 막걸리(알코올도수 7°)를 넣어 상온에서 48시간 주침하였다. 주침된 건지황을 건져 트레이에 펼쳐 담고 향온항습기에 넣은 후, 70℃, 80~90% 습도에서 72시간 1차 숙성시켰다. 1차 숙성 후 건지황 100g 당 50 ml의 막걸리를 분무하여 주었다. 1차 숙성이 완료되면 향온항습기의 내부 온도를 50℃로 낮추고 80~90%의 습도에서 96시간 동안 2차 숙성하였다. 2차 숙성이 완료되면 다시 건지황 100g 당 50 ml의 막걸리를 분무하고, 향온항습기의 내부온도를 올려 70℃, 80~90% 습도에서 24시간, 이후 60~70℃, 80~90% 습도에서 48시간 동안 3차 숙성하여 숙지황을 제조하였다. 제조된 숙지황의 사진을 도 1의 (b)에 도시하였다.
- [0032] **비교예 1 : 생지황의 구증구포에 의한 숙지황의 제조**
- [0033] 생지황을 3 cm로 절단하고 잠길 정도의 막걸리를 넣어 상온에서 48시간 주침지하였다. 주침된 생지황을 2시간 증숙하고, 50℃ 에서 18시간 열풍 건조하여 1증숙지황을 제조하였다. 2증숙에서 9증숙까지는 막걸리에 6시간 주침한 것을 제외하고는 1증숙과 동일한 방법에 의해 주침, 증숙, 건조과정을 9증숙까지 반복하여 구증구포 숙지황을 제조하였다.
- [0034] **비교예 2 : 건지황의 구증구포에 의한 숙지황의 제조**
- [0035] 원료로 생지황 대신 건지황을 사용한 것을 제외하고는 비교예 1과 동일한 방법에 의해 구증구포 숙지황을 제조하였다.
- [0036] **실시예 1 : 숙지황의 제조 수율 및 수분함량 측정**
- [0037] 상기 제조예와 비교예의 숙지황의 제조 수율을 100g의 원료로부터 얻어진 최종 숙지황의 양(%)으로 계산하여 표 1에 나타내었다. 수율의 정확한 비교를 위하여 원료 생지황 및 건지황과 제조된 숙지황의 수분을 측정하여 함께 나타내었다. 수분은 생지황, 건지황 또는 숙지황을 마쇄하여 2 ~ 3 g의 시료를 취한 후 적외선 수분 측정기(Sartorius, Germany)를 사용하여 측정하였다. 비교를 위하여 2010년 03월 시중에서 구입한 시판 숙지황의 수분 함량을 함께 나타내었다.

표 1

	제조예 1	제조예 2	비교예 1	비교예 2	시판숙지황
원료수분함량(%)	78.7	6.5	78.7	6.5	-
수분함량(%)	32.1	24.1	14.4	15.9	9.7
수율(%)	44.6	108.7	6.0	13.6	-
건조중량대비수율(%)	142.2	88.2	24.1	12.2	-

[0038]

[0039]

표 1에서 확인할 수 있듯이, 본 발명의 제조예 1 및 2의 방법은 종래기술에 의한 비교예 1 및 2의 방법에 비해 건조중량으로 환산하여 계산한 수율을 비교하여 보았을 때 생지황을 원료로 한 경우 5.9배, 건지황을 원료로 한 경우 7.2배 높았다. 특히 생지황을 원료로 한 제조예 1의 경우 건조중량대비 수율이 142.2%로 수율이 100% 이상임을 확인할 수 있었는데, 이는 생지황의 수분을 막걸리가 대체하면서 막걸리의 유용성분이 숙지황에 축적되었기 때문으로 사료된다.

[0040]

구증구포에 의한 비교예의 숙지황의 수율이 낮은 것은 반복된 주침과정에서 지황의 수용성 성분이 함께 용출되었기 때문이라 생각되며, 본 발명의 제조예에 의한 숙지황은 제조과정 중의 주침과정이 생략됨에 따라 수율저하가 일어나지 않은 것으로 판단된다. 수율의 감소는 단순히 얻어진 숙지황의 양 뿐 아니라, 제조과정 중 유용성분의 손실이 일어나지 않은 것을 의미하므로 제조된 숙지황 중 유용성분의 함량이 크게 증가할 것으로 기대된다.

[0041]

실시예 2 : 숙지황의 이화학적 특성 평가

[0042]

상기 제조예와 비교예에서 제조된 숙지황을 마쇄하여 시료를 준비한 후 당도 및 pH의 이화학적 특성을 조사하여 그 결과를 하기 표 2에 나타내었다. 비교를 위하여 2010년 03월 시중에서 구입한 시판 숙지황의 특성을 함께 나타내었다.

[0043]

pH는 AOAC(Association of Official Agricultural Chemists) 방법(1990)에 따라 측정하였다. 즉, 시료 5 g을 20 mL의 증류수와 함께 넣고 균질화 하여 3,000 rpm에서 15분간 원심분리하였다. pH는 상등액을 취하여 pH meter(420 Benchtop, Orion Research, USA)로 측정하였다.

[0044]

당도는 상기 상등액을 취하여, 당도계(N-1E Brix 0~32%, Atago, Japan)로 측정하였다.

표 2

	제조예 1	제조예 2	비교예 1	비교예 2	시판숙지황
수분함량(%)	32.1	24.1	14.4	15.9	9.7
당도(°Brix)	45.5	50.0	30.0	44.3	18.8
pH	4.3	4.0	4.2	4.0	3.8

[0045]

[0046]

본 발명의 제조공정에 의해 제조한 제조예 1 및 제조예 2의 숙지황은 종래기술의 구증구포에 의해 제조한 비교예 1 및 비교예 2의 숙지황에 비해 당도가 높게 나타났으며, pH는 유사하거나 약간 높았다. 시판숙지황은 당도 및 pH가 모두 낮게 측정되었다.

[0047]

실시예 3 : 숙지황의 유효성분 함량 분석

[0048]

제조예 1, 2, 비교예 1, 2 및 시판 숙지황 중 환원당, Catapol, 5-HMF 함량을 측정하여 표 3과 4에 그 결과를 각각 기재하였다. 환원당의 함량은 실시예 1의 pH 및 당도 측정에 사용한 상등액을 이용하여 DNS에 의한 비색

법으로 분광광도계(Model UV-1800, 240V)를 사용하여 550 nm에서 흡광도를 측정하여 포도당함량으로 나타내었다. 표준곡선은 glucose(Duksan pharmaceutical Co., LTD. Yonginuoop, Kyongkido, Korea.)를 농도에 따라 반응시켜 작성하였다.

[0049] Catapol 및 5-HMF의 함량은 숙지황 시료 2 g을 취하여 30% MeOH 100 mL을 넣고, 1분간 Blending하였다. 초음파진탕추출로 2시간 추출하여 여과한 후 여과액을 13000 rpm에서 10분간 원심분리 하였다. 상등액을 0.45 μ m syringe fliter로 여과하여 HPLC로 분석하였다. 이동상 조건은 1% ACN, 유속은 1 min/mL이었으며, HPLC column은 Agilent(USA), C18 4.6 $\times$ 150 nm 5 μ m을 사용하였다. sample injection volum은 10 μ l이며, 분석파장은 catalpol 204 - 206 nm, 5-HMF 285nm에서 측정하였다.

표 3

	제조예 1	제조예 2	비교예 1	비교예 2
Glucose(%)	5.13	7.51	4.45	4.97

[0050]

[0051] 표 3에서 확인할 수 있듯이, 본 발명의 제조방법에 의해 제조된 제조예 숙지황의 환원당 함량은 구증구포에 의한 비교예 숙지황에 비해 생지황으로부터 제조한 경우 약 1.15배, 건지황으로부터 제조한 경우 약 1.5배 높은 값을 나타내었다. 이는 본 발명의 방법에서 막걸리의 주침 및 증숙과정에서 막걸리를 뿌려주는 횟수가 감소하여도 환원당 함량이 오히려 증가하는 것을 나타낸다.

표 4

	제조예 1	제조예 2	비교예 1	시판숙지황
Catapol (mg/mL)	3.17	미검출	47.18	미검출
5-HMF (mg/mL)	147,060.16	1,127,429.34	47,231.57	45,226.62

[0052]

[0053] 표 4를 참조하면, 지황의 대표적인 부작용인 소화기 장애의 원인이 되는 것으로 알려진 catapol은 비교예 1에 비해 제조예 1은 6.7% 수준만이 함유되었으며, 제조예 2는 검출되지 않았다. 이에 반해, 숙지황의 지표물질인 5-HMF 함량은 제조예 1은 비교예 1에 비해 약 3.2배 증가하였으며, 제조예 2의 숙지황은 구증구포에 의한 비교예 1 또는 시판 숙지황에 대해 23~25배 정도 증가하였다. 시판 숙지황의 5-HMF 함량은 비교예 1의 숙지황과 거의 유사하였다.

[0054] 실시예 4 : 숙지황의 항산화 효능 분석

[0055] 제조예 또는 비교예의 분말화된 건조 시료 1.5 g에 메탄올 50 mL를 넣고 균질화한 후 상온에서 15시간 교반하였다. 메탄올 용액을 4℃, 3000 rpm에서 20분 원심 분리하여 얻어진 상등액을 evaporator를 이용하여 감압 농축하여 0.6~0.7g의 추출물을 각각 얻었다. 얻어진 추출물을 사용하여 하기 방법에 의해 항산화능을 측정하고 그 결과를 표 5에 기재하였다.

[0056] 1) 총 페놀 함량 분석

[0057] 상기 추출물의 최종 농도가 250 mg/mL이 되도록 20 mM PBS buffer를 첨가하여 시료를 제조하였다. 증류수 2.5 mL에 시료 0.33 mL, Foline-Denis 시약 0.16 mL, 포화 Na₂CO₃ 용액 0.3 mL을 넣고 암실에서 30분 발색시킨 후 760 nm에서 흡광도를 측정하여 페놀의 함량을 정량하였다. (standard는 tannic acid를 사용하였다.)

[0058] 2) DPPH 라디칼 소거능 측정

[0059] 상기 추출물의 최종 농도가 250 mg/mL이 되도록 메탄올을 첨가하여 시료 용액으로 사용하였다. 시료용액 50 μ L에 1.5×10^{-4} mM DPPH(1,1-diphenyl-2-picryl hydrazyl) 용액 150 μ L을 첨가하여 30분 반응 후에 분광광도계를 이용하여 515nm에서 흡광도를 측정하다. 하기 수학적 식 1에 의해 라디칼 소거능(%)을 계산한 후 각 농도별 라디칼 소거능에 대한 검량선에서 라디칼 소거능이 50%가 되는 농도인 IC₅₀을 구하였다.

[0060] <수학적 식 1>

[0061]

$$\text{Free radical scavenging effect(\%)} = \frac{\text{Abs}_{\text{DPPH}} - \text{Abs}_{\text{sample}}}{\text{Abs}_{\text{DPPH}}} \times 100$$

[0062] 3) Hydroxy 라디칼 소거능 측정

[0063] 상기 추출물의 최종 농도가 250 mg/mL이 되도록 20 mM PBS buffer를 첨가하여 시료 용액으로 사용하였다. 시료 용액 0.15 mL에 buffer 0.35 mL, 3 mM deoxyribose용액 0.1 mL, 0.1 mM ascorbic acid용액 0.1 mL, 0.1 mM EDTA용액 0.1 mL, 0.1 mM FeCl₃용액 0.1 mL, 1 mM H₂O₂용액 0.1 mL을 넣어 잘 교반 한 후 37℃에서 1시간 동안 반응시켰다. 반응이 끝난 후 2% TCA 용액 1 mL와 1% TBA 용액 1mL를 차례로 넣고 섞은 후 100℃에서 20분간 반응한 후 상온으로 냉각하여 원심 분리하였다. 원심분리에 의해 얻어진 상등액을 분광광도계를 이용하여 532 nm에서 흡광도를 측정하고, 하기 수학적 식 2에 의해 라디칼 소거능(%)을 계산한 후 각 농도별 라디칼 소거능에 대한 검량선에서 라디칼 소거능이 50%가 되는 농도인 IC₅₀을 구하였다.

[0064] <수학적 식 2>

[0065]

$$\text{Free radical scavenging effect(\%)} = \frac{\text{Abs}_{\text{blank}} - \text{Abs}_{\text{sample}}}{\text{Abs}_{\text{blank}}} \times 100$$

[0066] 3) FRAP(Ferric-reducing antioxidant potential) 측정

[0067] FRAP 측정은 Benzie IFF과 Strain JJ(Methods Enzymol. 299:15??27, 1996)의 방법을 참고하여 측정하였다. FRAP 시료는 25 mL acetate buffer(300 mM, pH3.6)를 37℃에서 가온한 후, 40 mM HCl에 용해한 10 mM 2,4,6-Tris(2-pyridyl)-s-tri-azine(TPTZ, Sigma Chemical co., st. Louis, MO, USA) 2.5 mL과 20 mM ferric chloride(FeCl₃) 2.5 mL을 가하여 제조하였다. 제조된 0.9 mL FRAP reagent에 상기 추출물 0.03 mL와 증류수 0.09 mL을 넣고 37℃에서 10분간 반응시킨 후 593 nm에서 흡광도를 측정하였다. 측정된 흡광도로부터 하기 수학적 식 3에 의해 FRAP 값을 구하였다. 대조군은 시료 대신 에탄올을 넣어 측정하였다. 표준곡선의 계산은 0.025, 0.05, 0.1, 0.2, 0.5 및 1 mM의 농도로 반복하여 작성한 FeSO₄의 검량식에 대입하여 구하였다.

[0068] <수학적 식 3>

[0069]

$$\text{FeSO}_4\text{의 검량식 } y = 2.5195x + 0.1747 \text{ (R}^2 = 0.9999 \text{)}$$

[0070] 이때, x는 FRAP 값을, y는 해당 농도에서의 593 nm의 흡광도를 의미한다.

표 5

	DPPH 라디칼 소거능 IC ₅₀ (mg/mL)	FRAP value (mg/mL)	Hydroxyl 라디칼 소거능 IC ₅₀ (mg/mL)	총 페놀함량 (mg/mL)
비교예 1	13.74	1.99	6.37	3.66
비교예 2	16.73	1.54	7.30	2.90
제조예 1	7.73	2.16	6.28	5.49
제조예 2	3.36	4.75	5.23	6.24

[0071]

[0072]

표 5로부터 제조예의 숙지황은 종래기술에 의한 비교예에 비해 라디칼 소거에 대한 IC₅₀값이 감소한 것을 확인할 수 있었다. DPPH 라디칼 소거에 대한 IC₅₀은 비교예 1에 비해 제조예 1이 56.3%, 비교예 2에 비해 제조예 2가 20.1%로 크게 감소하였으며, Hydroxyl 라디칼 소거에 대한 IC₅₀은 비교예 1에 비해 제조예 1이 98.6%, 비교예 2에 비해 제조예 2가 83.3%로 감소하였다. FRAP 값은 비교예1, 2에 비해 제조예 1과 2가 각각 109%, 308.4% 증가하였으며, 총 페놀함량 역시 150%, 215% 증가하여 모든 항목에서 제조예의 숙지황이 비교예에 비해 항산화능이 우수함을 나타내었다. 특히 건지황으로부터 제조한 제조예 2의 숙지황의 항산화능이 가장 우수하였다.

[0073]

[0074]

실시예 5 : 숙지황의 세포독성 및 면역능력 분석

[0075]

1) RAW 264.7에서의 면역능력 분석

[0076]

(1) 생지황 또는 숙지황 시료의 제조

[0077]

제조예 1, 비교예 1 또는 비교예 2의 숙지황 시료 또는 생지황 시료를 동결 건조한 후 마쇄하여 분말로 만들었다. 분말 5 g을 증류수 45 mL에 첨가하고 2시간 동안 초음파로 진탕 추출하였다. 이후 3000rpm에서 15분간 원심분리하여 상등액을 채취하고 이를 evaporator를 이용하여 감압 농축시킨 후 최종 농도가 1 g/mL가 되도록 증류수를 첨가하여 사용하였다.

[0078]

(2) RAW 264.7 세포주 배양

[0079]

마우스 대식세포 세포주 RAW 264.7은 한국 세포주 은행에서 분양받았으며, Dulbecco's Modified Eagle's Medium(DMEM, Hyclone Laboratories, Inc. cat.SH30243.01)에 10% heat-inactivated fetal bovine serum(10% FBS)과 penicillin 1%를 첨가하여 100 mm dish에 분주하여 37℃, 5% CO₂ incubator에서 배양하였다.

[0080]

대식세포를 5×10^4 cells/mL 세포가 되게 세포수를 조정하여 96 well culture plate의 각 well에 분주한 다음 37℃, 5% CO₂ incubator에 넣어 9시간 배양하였다. 배양 후 제조예 1, 비교예 1 또는 생지황 시료를 하기 표 5에 기재된 농도별로 각 well에 첨가하고, lipopolysaccharide (LPS from E.coli 055:B5, SIGMA cat. M2128) 2 ug/mL를 넣어 전체 부피가 100 μ L가 되게 조정한 후 37℃, 5% CO₂ incubator에 넣어 배양하였다. LPS를 처리한 시간이 24시간이 되도록, 22시간 후에 임파구 증식능을 측정하기 위한 Thiazolyl blue tetrazolium bromide(<=97.5% TLC, SIGMA, M5655-1G, 53096D) 시약 10 μ L 넣고 2시간 동안 37℃, 5% CO₂ incubator에 넣어 추가 배양하였다.

[0081]

(3) RAW 264.7 증식능 측정

[0082]

제조방법에 따른 숙지황 또는 생지황이 RAW 264.7 cells에 나타내는 세포 독성 유발 효과를 알아보기 위하여 MTT assay를 실시하였다. (2)의 배양세포로부터 배양액을 제거한 후 배양세포 표면을 phosphate buffered

saline(1×PBS)으로 세척하였다. DMSO(SIGMA, cat.D2650, Lot.BNBB3566) 100 μ L를 넣고 10분 후 540 nm에서의 흡광도로 세포증식능을 측정하고 그 결과를 표 6에 나타내었다.

표 6

시료농도 (mg/mL)	생지황	비교예 1	제조예 1
0.3	93.3	106.6	105.7
0.6	91.2	105.0	101.4
1.3	78.9	101.6	98.2
2.5	74.3	95.6	96.1
5.0	69.1	93.0	96.7

[0083]

[0084]

표 6을 참조하면 농도 의존적으로 세포증식에 대한 독성이 나타난 반면, 비교구 1은 2.5 mg/mL 농도까지 95% 이상의 세포증식능을 보였으며, 제조예 1은 모든 시험 농도에서 95% 이상의 세포증식능을 나타내었다.

[0085]

(4) NO 생성 저해능

[0086]

RAW 264.7 세포주로부터 생산된 nitric oxide (NO)의 양을 세포 배양액 중에 존재하는 NO₂의 형태로써 nitric oxide detection kit (iNtRON, Lot.90510243, Cat.21021)를 이용하여 측정하고 그 결과를 표 7에 나타내었다. 보다 구체적으로 상기 (2)의 세포배양 상등액 100 μ L와 Griess시약 (1% sulfanilamide in 5% phosphoric acid + 1% α -naphthylamide in H₂O) 100 μ L를 혼합하여 96 well plate에서 10분 동안 반응시킨 후 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. NO₂의 농도는 sodium nitrite를 사용하여 만든 표준곡선에 의해 산출하였다.

표 7

시료농도 (mg/mL)	생지황		비교예 1		제조예 1	
	NO생성량 (μ M)	감소율 (%)	NO생성량 (μ M)	감소율 (%)	NO생성량 (μ M)	감소율 (%)
대조군	33.5	—	33.5	—	33.5	—
0.3	16.8	49.8	16.7	50.2	19.1	43.0
0.6	19.5	41.9	16.3	51.3	14.5	56.7
1.3	17.6	47.6	16.3	51.4	12.6	62.4
2.5	14.0	58.1	9.0	73.2	4.9	85.3
5.0	7.9	76.4	2.0	93.9	-1.4	104.2

[0087]

[0088]

LPS를 처리하지 않은 구의 NO 생성량은 11.5 μ M로 LPS 처리에 의해 약 NO 생성이 약 2.9배 증가하였다. 생지황과, 비교예 1 및 제조예 1의 숙제황은 모두 농도 의존적으로 NO 생성을 감소시켰으나, 생지황은 감소율이 가장 낮고 제조예 1의 숙제황에 의한 NO 생성량 감소가 가장 현저하였다.

[0089]

(5) RAW 264.7 cell의 TNF- α 분비능

[0090]

RAW 264.7의 배양 상층액을 원심 분리하여 얻은 후 TNF- α (cat.88-7324-88)와 IL-6(cat.88-7064-88) ELISA set(eBioscience immunoassay kit)를 사용하여 상층액 내 TNF- α 와 IL-6(cat.88-7064-88) 농도를 정량적으로 측정하고 그 결과를 표 8과 표 9에 각각 나타내었다.

표 8

시료농도 (mg/mL)	생지황		비교예 1		제조예 1	
	TNF- α (pg/mL)	감소율 (%)	TNF- α (pg/mL)	감소율 (%)	TNF- α (pg/mL)	감소율 (%)
대조군	9,795.0	—	9,795.0	—	9,795.0	—
0.3	9,638.8	1.6	6,053.3	38.2	6,645.0	32.2
0.6	9,124.2	6.8	8,140.8	16.9	6,747.1	31.1
1.3	8,113.8	17.2	7,865.8	19.7	6,515.8	33.5
2.5	7,405.4	24.4	6,997.1	28.6	5,761.7	41.2
5.0	6,447.1	34.2	5,920.0	39.6	4,655.4	52.5

[0091]

표 9

시료농도 (mg/mL)	생지황		비교예 1		제조예 1	
	IL-6 (pg/mL)	감소율 (%)	IL-6 (pg/mL)	감소율 (%)	IL-6 (pg/mL)	감소율 (%)
대조군	10,387.9	—	10,387.9	—	10,387.9	—
0.3	6,410.2	38.3	3,518.1	66.1	1,761.0	83.0
0.6	5,135.6	50.6	3,434.0	66.9	1,708.6	83.6
1.3	3,276.8	68.5	2,129.2	79.5	1,573.7	84.9
2.5	1,092.7	89.5	818.1	92.1	468.9	95.5
5.0	714.9	93.1	119.7	98.8	—53.3	100.5

[0092]

[0093]

표 8과 표 9를 참조하면, 생지황과 비교예 1 및 제조예 1의 숙지황은 모두 TNF- α 와 IL-6의 분비를 저해하였으며, NO 생성 저해능과 마찬가지로 생지황의 효과가 가장 낮고, 제조예 숙지황의 효과가 가장 현저하였다. 특히 TNF- α 분비에 대해서 제조예 1의 숙지황은 생지황이나 비교예 1의 숙지황에 비해 강력한 저해능을 나타내었다.

[0094]

도면

도면1

