



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2021-0154614
(43) 공개일자 2021년12월21일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A23L 33/105 (2016.01) A23L 29/00 (2016.01)
A23L 5/20 (2016.01)
(52) CPC특허분류
A23L 33/105 (2016.08)
A23L 29/06 (2016.08)
(21) 출원번호 10-2020-0071794
(22) 출원일자 2020년06월12일
심사청구일자 2020년06월12일

(71) 출원인
경희대학교 산학협력단
경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경희대학교 국제캠퍼스내)
충북대학교 산학협력단
충청북도 청주시 서원구 충대로 1 (개신동)
(72) 발명자
김대옥
경기도 용인시 수지구 수지로113번길 16 강남빌리지아파트 103동 203호 (성북동, 강남빌리지)
장다빈
부산광역시 해운대구 해운대로349번길 24 11동 206호(우동 삼호가든아파트)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인한얼

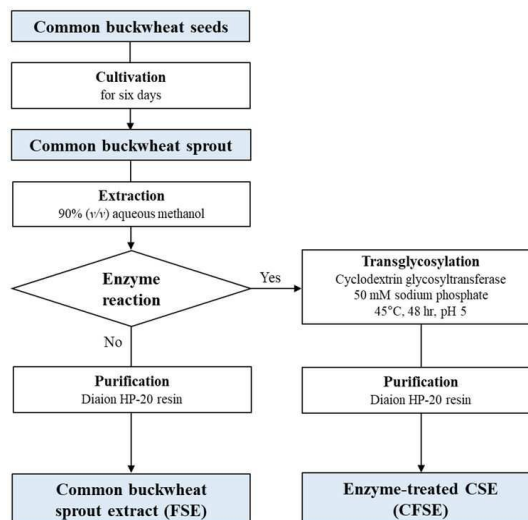
전체 청구항 수 : 총 13 항

(54) 발명의 명칭 **인체 소화기관 안정성이 향상된 플라보노이드 배당체를 포함하는 단메밀 새싹 추출물 및 이의 용도**

(57) 요약

본 발명은 인체 소화기관 안정성이 향상된 플라보노이드 배당체를 포함하는 단메밀 새싹 추출물의 제조방법 및 이의 용도에 관한 것이다. 본 발명에 따라 제조된 단메밀 새싹 추출물에 포함된 플라보노이드 배당체는 위에서는 안정성이 높고, 장에서는 소화를 통해 분해 및 흡수되어 체내 이용율이 향상되는 바, 식품 산업 등에 활용될 수 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A23L 5/23 (2016.08)
A23V 2002/00 (2013.01)
A23V 2200/32 (2013.01)
A23V 2250/2116 (2013.01)
A23V 2300/14 (2013.01)
A23V 2300/48 (2013.01)

(72) 발명자

정영성

광주광역시 서구 월드컵4강로112번길 10 3동 502
 호(화정동 대륙아파트 3동)

한남수

세종특별자치시 보듬4로 19 1204동 1703호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	20171847
과제번호	20171847
부처명	경희대학교 산학협력단
과제관리(전문)기관명	(재)울촌재단
연구사업명	지원사업
연구과제명	효소 처리 메밀 새싹 추출물의 노화방지 산화방지능 및 소화기관 안정성 연구
기 여 율	1/1
과제수행기관명	경희대학교 산학협력단
연구기간	2017.11.01 ~ 2018.10.31

명세서

청구범위

청구항 1

- a) 단메밀 새싹을 추출 용매를 이용하여 상온에서 초음파 추출하는 단계; 및
- b) 상기 추출한 추출물에 사이클로덱스트린 글리코실트랜스퍼레이즈를 첨가하여 당전이 반응시키는 단계;를 포함하는, 단메밀 새싹에 함유된 플라보노이드가 당전이된 단메밀 새싹 추출물의 제조방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 당전이된 플라보노이드는 플라보노이드 배당체인, 제조방법.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 a) 단계의 단메밀 새싹은 단메밀 종자를 6 내지 10시간 침지 후 20 내지 30℃에서 2 내지 6일간 암조건에서 발아시킨 것인, 제조방법.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 a) 단계의 추출 용매는 물, 탄소수 1 내지 4의 알코올 및 이들의 혼합용매로 구성되는 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상인 것인, 제조방법.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 b) 단계는 사이클로덱스트린 글리코실트랜스퍼레이즈 : 단메밀 새싹 추출물을 1 : 5 내지 15 (w/w)로 첨가하여 반응시키는 것인, 제조방법.

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 b) 단계의 당전이 반응은 pH 4 내지 6, 40 내지 50℃조건에서 24 내지 72 시간 동안 반응시키는 것인, 제조방법.

청구항 7

제2항에 있어서, 상기 플라보노이드 배당체는 L-glc₃(luteolin-glucoside₃), L-glc_{3'}(luteolin-glucoside_{3'}), L-glc₂(luteolin-glucoside₂), L-glc_{2'}(luteolin-glucoside_{2'}), 오리엔틴(orientin), 클로제닉산(chlorogenic acid), 이소오리엔틴(isorientin), A-glc₂(apigenin-glucoside₂), 비텍신(vitexin), A-glc_{2'}(apigenin-glucoside_{2'}), A-glc_{2''}(apigenin-glucoside_{2''}), 이소비텍신(isovitexin), 퀘르세틴-3-로비노바이오사이드(querctetin-3-robinobioside), 루틴(rutin), 퀘르세틴-3-글리코사이드(querctetin-3-glycoside), Q-glc(querctetin-glucoside) 및 퀘르세틴(querctetin)으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상인, 제조방법.

청구항 8

제2항에 있어서, 상기 플라보노이드 배당체는 위액에 의해 분해되지 않고 장액에 의해 분해되어 아글리콘의 형태로 체내로 흡수되는 것인, 제조방법.

청구항 9

당전이 효소 처리된 단메밀 새싹 추출물을 유효성분으로 포함하는, 당전이 효소 처리되지 않은 단메밀 새싹 추출물에 비하여 체내 소화기관에서의 안정성이 향상된 식품 조성물.

청구항 10

제9항에 있어서, 상기 당전이 효소는 사이클로덱스트린 글리코실트랜스퍼레이즈(cyclodextrin glycosyltransferase)인, 식품 조성물.

청구항 11

제9항에 있어서, 상기 당전이 효소 처리된 단메밀 새싹 추출물은 플라보노이드 배당체를 유효성분으로 포함하는 것인, 식품 조성물.

청구항 12

제11항에 있어서, 상기 플라보노이드 배당체는 L-glc₃(luteolin-glucoside₃), L-glc_{3'}(luteolin-glucoside_{3'}), L-glc₂(luteolin-glucoside₂), L-glc_{2'}(luteolin-glucoside_{2'}), 오리엔틴(orientin), 클로제닉산(chlorogenic acid), 이소오리엔틴(isoorientin), A-glc₂(apigenin-glucoside₂), 비텍신(vitexin), A-glc_{2'}(apigenin-glucoside_{2'}), A-glc_{2''}(apigenin-glucoside_{2''}), 이소비텍신(isovitexin), 퀘르세틴-3-로비노바이오사이드(querctetin-3-robinobioside), 루틴(rutin), 퀘르세틴-3-글리코사이드(querctetin-3-glycoside), Q-glc(querctetin-glucoside) 및 퀘르세틴(querctetin)으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상인, 식품 조성물.

청구항 13

제11항에 있어서, 상기 플라보노이드 배당체는 위액에 의해 분해되지 않고 장액에 의해 분해되어 아글리콘의 형태로 체내로 흡수되는 것인, 식품 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001]

본 발명은 인체 소화기관 안정성이 향상된 플라보노이드 배당체를 포함하는 단메밀 새싹 추출물의 제조방법 및 이의 용도에 관한 것이다.

배경 기술

[0003]

천연물에서 유래된 생리활성물질은 소비자에게 안전하고 몸에 이롭다는 이미지를 더욱 부각시켜 건강기능식품에서 경쟁력을 갖추게 되는 중요한 요소로 자리 잡고 있다. 오늘날 생활 습관과 식생활 방식의 변화에 따라 발생하는 당뇨, 고혈압, 암 등 각종 질병들의 원인인 산화스트레스의 해소를 위해 산화방지능의 중요성이 대두되었고, 이에 따라 산화방지능이 있는 생리활성성분을 함유하는 채소에 대한 관심이 높아지고 있다. 웰빙 문화가 자

리 잡으면서 주목받고 있는 천연물 소재인 새싹채소는 단기간(5-10일)에 종자에서 발아시켜 키운 싹을 식용하는 것으로, 다양한 2차 대사산물을 포함하게 된다. 일반적으로 식물 종자는 발아가 진행됨에 따라 성분 변화가 일어나며, 발아에 의한 영양소 및 생리활성물질의 활용도를 극대화하기 위한 연구가 곡류 및 두류를 중심으로 활발하게 진행되어 왔다(Hwang, E. J., et al., (2006) Korean Journal of Medicinal Crop Science, 14, 1-7.).

[0004] 한편, 메밀은 생리활성성분인 루틴(rutin)의 기원 식물로 라이신(lysine), 아르기닌(arginine) 등의 필수 아미노산이 풍부하며 필수 지방산, 철, 인 등의 함유량이 다른 곡류에 비해 높다. 최근 아시아는 물론 유럽과 미국까지 메밀 또는 이의 새싹을 식용하고 있다. 메밀 속은 현재까지 약 20여개의 종이 발견되어 분류되었으며 이들 중 쓴메밀(*Fagopyrum tataricum*)과 단메밀(*Fagopyrum esculentum* Moench)이 주로 재배된다. 단메밀은 보통메밀(common buckwheat, *Fagopyrum esculentum*) 또는 일반메밀이라고도 불리우며 자가불화합성 타가수정작물로서 우리나라에서 주로 재배된다.

[0005] 현재까지 추출 수율 향상과 특정 유용 성분의 함량 증대를 위해 홍삼, 황기 및 은행잎 등을 효소 처리하여 이들의 성분과 생리활성을 변화시키는 연구는 꾸준히 진행되어 왔으나, 메밀, 그 중에서도 단메밀의 새싹을 효소 처리하여 특정 유용 성분의 전환과 그에 따른 생리활성 및 장내 미생물에 미치는 영향에 대한 연구는 미비한 실정이다.

[0006] 이러한 배경 하에서, 본 발명자들은 당전이 효소 반응을 통해 제조한 플라보노이드 배당체를 포함하는 단메밀 새싹 추출물의 소화기관 내 안정성을 확인하여 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명의 하나의 목적은 a) 단메밀 새싹을 추출 용매를 이용하여 상온에서 초음파 추출하는 단계; 및 b) 상기 추출한 추출물에 사이클로덱스트린 글리코실트랜스퍼레이즈를 첨가하여 당전이 반응시키는 단계;를 포함하는, 단메밀 새싹에 함유된 플라보노이드가 당전이된 단메밀 새싹 추출물의 제조방법을 제공하는 것이다.

[0009] 본 발명의 다른 하나의 목적은 당전이 효소 처리된 단메밀 새싹 추출물을 유효성분으로 포함하는, 당전이 효소 처리되지 않은 단메밀 새싹 추출물에 비하여 체내 소화기관에서의 안정성이 향상된 식품 조성물을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0011] 이하에서는, 본 발명을 더욱 상세히 설명한다.

[0012] 한편, 본 발명에서 개시되는 각각의 설명 및 실시형태는 각각의 다른 설명 및 실시 형태에도 적용될 수 있다. 즉, 본 발명에서 개시된 다양한 요소들의 모든 조합이 본 발명의 범주에 속한다. 또한, 하기 기술되는 구체적인 서술에 의하여 본 발명의 범주가 제한된다고 할 수 없다. 또한, 당해 기술분야의 통상의 지식을 가진 자는 통상의 실험만을 사용하여 본 발명에 기재된 본 발명의 특정 양태에 대한 다수의 등가물을 인지하거나 확인할 수 있다. 또한, 이러한 등가물은 본 발명에 포함되는 것으로 의도된다.

[0014] 상기 목적을 달성하기 위한 본 발명의 하나의 양태는 a) 단메밀 새싹을 추출 용매를 이용하여 상온에서 초음파 추출하는 단계; 및 b) 상기 추출한 추출물에 사이클로덱스트린 글리코실트랜스퍼레이즈를 첨가하여 당전이 반응시키는 단계;를 포함하는, 단메밀 새싹에 함유된 플라보노이드가 당전이된 단메밀 새싹 추출물의 제조방법을 제공한다.

[0016] 본 발명에서, 용어 "단메밀(*Fagopyrum esculentum* Moench)"은 메밀 속의 식물로 우리나라에 도입되어 지금까지 재배 이용되고 있으며, 보통메밀(common buckwheat, *Fagopyrum esculentum*) 또는 일반메밀이라고도 불린다. 단메밀과 구분되는 쓴메밀(*Fagopyrum tataricum*)은 중국, 네팔 등지에 많이 자생하거나 재배되는 종으로서 달단종 또는 타타리메밀이라고도 명명된다.

- [0018] 본 발명에서, 용어 "추출물"은 목적하는 물질을 다양한 용매에 침지한 다음, 상온, 저온 또는 가온 상태에서 일정시간 동안 추출하여 수득한 액상성분, 상기 액상성분으로부터 용매를 제거하여 수득한 고형분 등의 결과물을 의미한다. 뿐만 아니라, 상기 결과물에 더하여, 상기 결과물의 회석액, 이들의 농축액, 이들의 조정제물, 정제물 등을 모두 포함하는 것으로 포괄적으로 해석될 수 있다. 본 발명에 있어서, 상기 추출물은 단메밀 새싹 추출물일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0019] 상기 추출물은 물 또는 다양한 유기용매 등으로 추출하여 수득할 수 있다. 이때, 사용되는 유기용매는 추출물을 수득할 수 있는 한, 특별히 이에 제한되지 않으나, 구체적으로는 물, 극성용매 또는 비극성용매가 될 수 있고, 보다 구체적으로는 물, 탄소수 1 내지 4의 저급 알코올(C1 내지 C4의 알코올로서, 메탄올, 에탄올, 프로판올 또는 부탄올 등), 이들의 혼합용매 일 수 있다.
- [0020] 또한, 상기 추출물을 수득하기 위한 방법은 상기 추출물을 수득할 수 있는 한, 특별히 이에 제한되지 않으나, 구체적으로는 단메밀 새싹을 상기 용매에 침지하고, 상온에서 추출하는 냉침추출법, 가열추출법, 초음파를 가하여 추출하는 초음파추출법, 환류 냉각기를 이용한 환류추출법 등의 방법을 사용할 수 있다.
- [0021] 또한, 본 발명은 전술한 추출방법으로 제조한 추출물에 제한되지 않고, 상용화된 단메밀 새싹 추출물을 시중에 서 구입하여 사용할 수 있다.
- [0023] 본 발명에서, 용어 "사이클로덱스트린 글리코실트랜스퍼레이즈(cyclodextrin glycosyltransferase)"는 글리코실-하이드롤라제 패밀리에 속하는 박테리아 유래 당전이 효소로, 전분, 아밀로오스 및 기타 다당류로부터 출발하는 시클로덱스트린(cyclodextrin)으로 알려진 비 환원 환형 덱스트린(non-reducing cyclic dextrin)의 합성에서 중요한 하나 이상의 반응을 촉매한다. 사이클로덱스트린 글리코실트랜스퍼레이즈는 많은 박테리아 중, 특히 바실러스(*Bacillus*) 속 및 일부 고세균(archaea)에 공통적인 효소이지만 다른 종에는 존재하지 않는 것으로 알려져 있다. 상기 사이클로덱스트린 글리코실트랜스퍼레이즈는 사이클로덱스트린 글루카노트랜스퍼라제(Cyclodextrin glucanotransferase) 또는 CGTase(EC 2.4.1.19)와 혼용될 수 있다.
- [0025] 상기 a) 단계의 단메밀 새싹은 단메밀 종자를 6 내지 10시간 침지 후 20 내지 30℃에서 2 내지 6일간 암조건에서 발아시킨 것일 수 있고, 구체적으로 단메밀 종자를 8시간 침지 후 25℃에서 6일간 암조건에서 발아시킨 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 단메밀은 발아시작 후 약 35시간이 지나면 싹이 트고, 6일이 지나면 약 15-20 cm까지 자라며, 이 때 광원에 노출되면 줄기 부분이 붉게 변하면서 안토시아닌이 생성되므로 단메밀 새싹 추출물의 유효성분을 균일하게 얻기 위해서 암조건을 확보하였다.
- [0026] 본 발명에 있어서, 상기 a) 단계의 단메밀 새싹은 발아가 완료된 단메밀 새싹을 수확하여 초저온 냉동고에서 보관 후 동결 건조해 수분을 제거하고 분쇄하여 분말화한 것일 수 있으며, 상기 단메밀 새싹 추출물은 전술한 단메밀 새싹의 분말을 추출한 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0028] 상기 a) 단계의 추출 용매는 물, 탄소수 1 내지 4의 알코올 및 이들의 혼합용매로 구성되는 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상인 것일 수 있고, 구체적으로 70 %(v/v) 이상의 수용성 메탄올, 보다 구체적으로 90 %(v/v)의 수용성 메탄올일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 상기 메탄올의 농도가 상기 수치보다 낮을 경우 단메밀 새싹으로부터 유효성분인 플라보노이드의 추출이 효율적으로 이루어지지 않을 수 있다.
- [0030] 상기 a) 단계의 초음파 추출은 단메밀 새싹을 메탄올 존재 하에서 상온에서 20분 내지 1시간 동안 30 내지 50 KHz 세기로 초음파 추출하는 것일 수 있고, 구체적으로 30분 동안 40 KHz 세기로 초음파 추출하는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0032] 본 발명에 있어서, 상기 a) 단계는 초음파 추출 후에 추출물을 여과한 뒤 메탄올로 분리하고 이를 동결 건조하

는 단계를 추가로 포함하여 단메밀 새싹 추출물을 제조하는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

- [0033] 구체적으로, 본 발명의 일구현예에서는 상기 a) 단계 이후 추출물을 원심분리하고 상층액을 필터를 사용하여 여과한 뒤 레진 흡착제에서 증류수와 메탄올로 당과 플라보노이드를 분리한 후 분리된 메탄올을 동결 건조하여 단메밀 새싹 추출물을 제조하였으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0035] 본 발명에 있어서, 건조된 단메밀 새싹을 추출 및 동결건조하여 얻은 단메밀 새싹 추출물 분말은 단메밀 새싹 대비 평균 25.2%의 수율(중량 기준)을 나타내었다.
- [0037] 상기 b) 단계는 사이클로텍스트린 글리코실트랜스퍼레이즈 : 단메밀 새싹 추출물을 1 : 5 내지 15 (w/w)로 첨가하여 당전이 반응시키는 것일 수 있고, 구체적으로 1 : 10 (w/w)로 첨가하여 당전이 반응시키는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0039] 상기 b) 단계의 당전이 반응은 pH 4 내지 6, 40 내지 50℃조건에서 24 내지 72 시간 동안 반응시키는 것일 수 있고, 구체적으로 pH 5, 45℃조건에서 48 시간 동안 반응시키는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 상기 pH 및 온도 범위를 벗어나는 경우 사이클로텍스트린 글리코실트랜스퍼레이즈의 활성이 저하되어 당전이 반응이 일어나지 않을 수 있으며, 상기 시간 범위를 벗어나는 경우 플라보노이드 배당체가 충분히 생성되지 않을 수 있다.
- [0040] 상기 b) 단계의 당전이 반응에는 버퍼로써 50 mM 인산 나트륨(sodium phosphate) 버퍼가 사용될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0042] 본 발명에 있어서, 상기 b) 단계의 당전이 반응이 완료된 후 반응물은 동결 및 초음파 처리 과정을 통해 효소 활성이 제거될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0043] 구체적으로, 본 발명의 일구현예에서는 상기 b) 단계 이후 당전이 반응이 완료된 반응물을 레진 흡착제에서 증류수와 메탄올로 당과 플라보노이드를 분리한 후 분리된 메탄올을 동결 건조하여 당전이 반응시킨 단메밀 새싹 추출물을 제조하였으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0045] 본 발명에 있어서, 상기 a) 단계의 초음파 추출 후 추출물을 동결건조하는 단계를 추가로 포함할 경우, 상기 b) 단계는 동결건조된 추출물에 사이클로텍스트린 글리코실트랜스퍼레이즈를 첨가하여 당전이 반응시키는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0047] 본 발명에 있어서, 당전이 효소인 사이클로텍스트린 글리코실트랜스퍼레이즈 처리된 단메밀 새싹 추출물은 a) 단계에서 제조한 단메밀 새싹 추출물 대비 평균 46.0%의 수율(중량 기준)을 나타내었다.
- [0049] 상기 방법에 따라 제조된 당전이 효소 처리된 단메밀 새싹 추출물은 플라보노이드 배당체를 유효성분으로 포함할 수 있다.
- [0051] 본 발명에서, 용어 플라보노이드(flavonoid)는, 식물에서 주로 발견되는 이차 대사 산물이다. 플라보노이드는 당과 컨쥬게이트된 플라보노이드 글루코사이드(flavonoid glycoside, 플라보노이드 배당체)와 플라보노이드 아글리콘(flavonoid aglycone, 플라보노이드 비배당체)으로 분류될 수 있다. 플라보노이드 글루코사이드는 플라보노이드가 당과 결합(컨쥬게이트, Conjugated)하여 분자량이 크고, 아글리콘은 플라보노이드에서 당이 제거된 상태(비배당체)로 플라보노이드 글루코사이드에 비하여 분자량이 작다.
- [0052] 본 발명에 있어서, 상기 플라보노이드 글루코사이드는 플라보노이드 배당체와 혼용될 수 있고, 상기 아글리콘은

플라보노이드 아글리콘과 혼용될 수 있다.

- [0053] 또한, 상기 플라보노이드 글루코사이드에 결합되어 있는 당이 복수 개(2개 이상)일 경우, 해당 플라보노이드 글루코사이드는 "플라보노이드 다당체"로 명명될 수 있다.
- [0055] 본 발명의 당전이 효소 처리된 단메밀 새싹 추출물에 유효성분으로 포함된 플라보노이드 배당체는 L-glc₃(luteolin-glucoside₃), L-glc₃'(luteolin-glucoside₃'), L-glc₂(luteolin-glucoside₂), L-glc₂'(luteolin-glucoside₂'), 오리엔틴(orientin, Ori), 클로제닉산(chlorogenic acid, Ch.A), 이소오리엔틴(isoorientin, IO), A-glc₂(apigenin-glucoside₂), 비텍신(vitexin, Vit), A-glc₂'(apigenin-glucoside₂'), A-glc₂''(apigenin-glucoside₂'''), 이소비텍신(isovitexin, IV), 퀘르세틴-3-로비노바이오사이드(quercetin-3-robinobioside, Q₃R 또는 Q₃R^d), 루틴(rutin, Rut), 퀘르세틴-3-글리코사이드(quercetin-3-glycoside), Q-glc(quercetin-glucoside 또는 quercetin-galactoside) 및 퀘르세틴(quercetin, Que)으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0056] 본 발명의 일구현예에서, 당전이 효소 처리된 단메밀 새싹 추출물의 생리활성성분을 HPLC 분석한 결과 상기 L-glc₃, L-glc₃', L-glc₂, L-glc₂', Ori, Ch.A, IO, A-glc₂, Vit, A-glc₂', A-glc₂'', IV, Q₃R, Rut, 퀘르세틴-3-saccharide, Q-glc 및 Que을 포함하는 17 종의 플라보노이드 배당체가 확인되었다(도 2C).
- [0058] 상기 당전이 효소 처리된 단메밀 새싹 추출물 내 플라보노이드 배당체는 위액에 의해 분해되지 않고 장액에 의해 분해되어 아글리콘의 형태로 체내로 흡수되는 것일 수 있다.
- [0059] 본 발명의 일구현예에서, 효소 처리되지 않은 단메밀 새싹 추출물의 생리활성성분은 모사 위액(simulated gastric fluid, SGF; pH 2.0)과 모사 장액(simulated intestinal fluid, SIF; pH 7) 조건 모두에서 비교적 안정한 것을 확인하였다(도 4). 그러나, 당전이 효소 처리된 단메밀 새싹 추출물의 주요 생리활성성분은 SGF 조건에서는 비교적 안정하였으나, SIF 조건에서는 생성된 당전이 성분과 Que 등이 분해되었다(도 5). 이는 SIF의 pH 조건과 효소 복합물 등에 포함된 α-글루코시다제(α-glucosidase)의 효과로 인해 당전이 효소에 의해 결합됐던 당전이 성분이 소장 조건에서 분해된 것으로 분석되었다. 더불어, 당전이 효소의 부수 효과로 생성된 Que 또한 소장 조건에서 분해되었으나 이외 Ori, Vit 등 당전이 효소 처리된 단메밀 새싹 추출물의 주요 생리활성성분은 아무런 처리를 하지 않은 대조군과 비교해볼 때 상대적으로 안정한 것을 확인하였다.
- [0060] 본 발명의 다른 일구현예에서, 효소 처리되지 않은 단메밀 새싹 추출물과 당전이 효소 처리된 단메밀 새싹 추출물의 *in vitro* 대장 모사 발효 후 생리활성성분 변화량을 확인한 결과, 효소 처리되지 않은 단메밀 새싹 추출물은 *in vitro* 대장 모사 발효가 진행되는 동안 Ori, Vit 및 IV의 함량 변화가 유의적이지 않았고 IO, Q₃R, Rut 및 Que는 발효가 진행됨에 따라 함량이 감소하는 결과를 확인할 수 있었다(도 8). 특히 Rut의 경우 발효가 시작되면서 0시간에서는 발견되지 않았던 Rut-dg1 성분이 발견되는 것으로 보아 대장 모사 발효 조건에서 Rut의 당이 가수분해 되는 것으로 추측된다. 당전이 효소 처리된 단메밀 새싹 추출물은 *in vitro* 대장 모사 발효가 진행되는 동안 Ori, Vit, IV와 Que의 함량이 유의적으로 증가했고, Q₃R와 Rut-dg2의 함량은 감소하였다. 당전이 효소에 의해 당이 전이된 당전이 효소 처리된 단메밀 새싹 추출물의 특성상 대장 모사 조건에서 장내미생물에 의한 발효가 진행됨에 따라 전이됐던 당이 다시 가수분해 되면서 특정 성분의 함량이 증가했을 가능성이 있다. Que의 경우 효소 처리되지 않은 단메밀 새싹 추출물은 발효가 진행됨에 따라 Rut과 함께 함량이 감소하였으나 당전이 효소 처리된 단메밀 새싹 추출물에서는 특이적으로 함량이 증가하였다. 이는 Rut의 아글리콘이 Que인 것을 고려할 때 배당체 등의 형태인 Rut으로 존재하던 성분이 분해 및 대사되어 Que 형태가 됨으로써 결론적으로 Que의 함량이 증가한 것으로 확인된다.
- [0061] 더하여, 본 발명의 다른 일구현예에서, 효소 처리되지 않은 단메밀 새싹 추출물과 당전이 효소 처리된 단메밀 새싹 추출물을 각각 *in vitro* 대장 모사 발효한 후 장내 미생물 대사산물인 단쇄지방산(short chain fatty acids; SCFAs) 증감량을 분석한 결과, 효소 처리되지 않은 단메밀 새싹 추출물과 당전이 효소 처리된 단메밀 새싹 추출물에서의 단쇄지방산 함량이 상이한 것을 확인하였다(도 9). 이는 효소 처리되지 않은 단메밀 새싹 추출물과 당전이 효소 처리된 단메밀 새싹 추출물은 동일 중량 대비 이에 포함되어 있는 배당체의 비율이 다르기 때문에 당 분자가 차지하고 있는 비율도 달라지므로, 미생물 대사와 생육에 다른 영향을 주었기 때문인 것으로 확

인된다.

- [0062] 상기 결과로부터 당전이 효소 처리된 단메밀 새싹 추출물은 단메밀 새싹에 함유된 플라보노이드에 당이 전이되어 생성된 배당체 형태의 플라보노이드를 포함하고, 상기 배당체 형태의 플라보노이드는 위에서는 안정성이 높고 장에서는 장내세균이 분비하는 효소의 작용을 받아 당이 유리된 후 아글리콘 형태로 전환되어 흡수되고 그 후 혈액, 뇨, 혈구 등으로 이동되어 검출된다고 알려져 있는 바, 이와 동일한 과정으로 소장 조건에서는 소화를 통해 분해 및 흡수될 수 있을 것임을 알 수 있다.
- [0063] 즉, 본 발명의 당전이 효소 처리된 단메밀 새싹 추출물에 포함된 플라보노이드 배당체는 효소 처리되지 않은 단메밀 새싹 추출물에 비해 위에서의 안정성이 향상되고 소장에서의 흡수가 용이한 바, 체내 이용율이 향상될 수 있다.
- [0065] 본 발명의 다른 하나의 양태는 단메밀 새싹에 함유된 플라보노이드가 당전이된 단메밀 새싹 추출물을 유효성분으로 포함하는, 당전이 효소 처리되지 않은 단메밀 새싹 추출물에 비하여 체내 소화기관에서의 안정성이 향상된 식품 조성물을 제공한다.
- [0067] 상기 "당전이 효소 처리된 단메밀 새싹 추출물"은 전술한 양태에 따라 제조한, 플라보노이드 배당체를 포함하는 단메밀 새싹 추출물일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0068] 상기 당전이 효소는 사이클로덱스트린 글리코실트랜스퍼레이즈(cyclodextrin glycosyltransferase)일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0070] 본 발명에 있어서, 상기 당전이 효소 처리된 단메밀 새싹 추출물은 플라보노이드 배당체를 유효성분으로 포함하는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0071] 상기 플라보노이드 배당체는 상기 L-glc₃, L-glc_{3'}, L-glc₂, L-glc_{2'}, Ori, Ch.A, IO, A-glc₂, Vit, A-glc_{2'}, A-glc_{2''}, IV, Q₃R, Rut, 퀘르세틴-3-saccharide, Q-glc 및 Que으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0072] 상기 플라보노이드 배당체는 위액에 의해 분해되지 않고 장액에 의해 분해되어 아글리콘의 형태로 체내로 흡수되는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않으며, 이에 대해서는 전술한 바와 같다.
- [0074] 상기 당전이 효소 처리된 단메밀 새싹 추출물은 위액에 의해 분해되지 않는 플라보노이드 배당체를 유효성분으로 포함함에 따라 당전이 효소 처리되지 않은 단메밀 새싹 추출물에 비하여 위에서의 안정성이 향상된 것일 수 있다. 즉, 상기 양태에서 체내 소화기관은 위일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0076] 본 발명의 식품 조성물에 포함될 수 있는 식품학적으로 허용 가능한 염은 식품학적으로 허용 가능한 유리산(free acid)에 의해 형성되는 산부가염 또는 염기에 의해 형성되는 금속염이 유용하다. 하나의 예로, 유리산으로는 무기산과 유기산을 사용할 수 있다. 무기산으로는 염산, 황산, 브롬산, 아황산 또는 인산 등을 사용할 수 있고, 유기산으로는 구연산, 초산, 말레인산, 푸마산, 글루콘산, 메탄술폰산 등을 사용할 수 있다. 또한, 금속염으로는 알칼리 금속염 또는 알칼리 토금속염, 나트륨, 칼륨 또는 칼슘염을 사용할 수 있다. 그러나 이로 제한되는 것은 아니다.
- [0077] 본 발명의 식품 조성물은 환제, 분말, 과립, 침제, 정제, 캡슐 또는 액제 등의 형태를 포함하며, 상기 조성물을 첨가할 수 있는 식품으로는, 예를 들어, 각종 식품류, 예를 들어, 음료, 껌, 차, 비타민 복합제, 건강보조 식품류 등이 있다.
- [0078] 본 발명의 식품 조성물에 포함할 수 있는 성분으로는, 필수 성분으로 유효성분을 함유하는 외에 다른 성분에는 특별히 제한이 없으며 통상의 식품과 같이 여러 생약 추출물, 식품 보조 첨가제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다. 상기 식품 조성물에서 유효성분의 함량은 사용 목적(예방, 개선 또는 치료적 처

치)에 따라 적합하게 결정될 수 있다. 이때, 상기 조성물에 포함되는 유효성분의 함량은 특별히 이에 제한되지 않으나, 조성물 총 중량에 대하여 0.0001 중량% 내지 10 중량%로, 바람직하게는 0.001 중량% 내지 1 중량%를 포함할 수 있다.

- [0079] 또한, 상기 식품 보조 첨가제는 당업계에서 통상적인 식품 보조 첨가제, 예를 들어 향미제, 풍미제, 착색제, 증진제, 안정화제 등을 포함할 수 있다.
- [0080] 상기 천연 탄수화물의 예는 모노사카라이드, 예를 들어, 포도당, 과당 등; 디사카라이드, 예를 들어 말토스, 슈크로스 등; 및 폴리사카라이드, 예를 들어 텍스트린, 시클로텍스트린 등과 같은 통상적인 당, 및 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알콜이다. 상술한 것 이외에 향미제로서 천연 향미제(예를 들어 레바우디오시드 A, 글리시르히진 등) 및 합성 향미제(사카린, 아스파르트름 등)를 유리하게 사용할 수 있다.
- [0081] 상기 외에 본 발명의 식품 조성물은 여러 가지 영양제, 비타민, 광물(전해질), 합성 풍미제 및 천연 풍미제 등의 풍미제, 착색제 및 증진제(치즈, 초콜릿 등), 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알코올, 탄산 음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다. 그밖에 천연 과일주스 및 과일 주스 음료 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다. 이러한 성분은 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있다.
- [0082] 본 발명에서 상기 건강보조식품은 건강기능식품 및 건강식품 등을 포함할 수 있다.
- [0083] 상기 건강 기능(성) 식품(functional food)이란, 특정보건용 식품(food for special health use, FoSHU)과 동일한 용어로, 영양 공급 외에도 생체조절기능이 효율적으로 나타나도록 가공된 의학, 의료효과가 높은 식품을 의미한다. 여기서 "기능(성)"이라 함은 인체의 구조 및 기능에 대하여 영양소를 조절하거나 생리학적 작용 등과 같은 보건용도에 유용한 효과를 얻는 것을 의미한다.
- [0084] 본 발명의 식품 조성물을 포함하는 식품은 당업계에서 통상적으로 사용되는 방법에 의하여 제조가능하며, 상기 제조시에는 당업계에서 통상적으로 첨가하는 원료 및 성분을 첨가하여 제조할 수 있다. 또한 상기 식품의 제형 또한 식품으로 인정되는 제형이면 제한 없이 제조될 수 있다. 본 발명의 식품 조성물은 다양한 형태의 제형으로 제조될 수 있으며, 일반 약품과는 달리 식품을 원료로 하여 약품의 장기 복용 시 발생할 수 있는 부작용 등이 없는 장점이 있고, 휴대성이 뛰어나다.

발명의 효과

- [0086] 본 발명에 따라 제조된 단메밀 새싹 추출물에 포함된 플라보노이드 배당체는 위에서는 안정성이 높고, 장에서는 소화를 통해 분해 및 흡수되어 체내 이용율이 향상되는 바, 식품 산업 등에 활용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0088] 도 1은 단메밀 새싹 추출물(FSE)과 사이클로텍스트린 글리코실트랜스퍼레이즈를 처리한 추출물(CFSE)의 제조 공정을 나타낸 모식도이다.
- 도 2는 FSE의 주요 생리활성 표준성분 혼합용액 (A), FSE (B), CFSE (C)의 HPLC 크로마토그램(UV 360 nm) 결과를 나타낸 도이다.
- 도 3은 FSE의 주요 생리활성성분을 나타낸 도이다.
- 도 4는 FSE 대조군(A), 모사 위액(SGF) 처리 후(B)와 모사 장액(SIF) 처리 후(C)의 HPLC 분석 크로마토그램(UV 360 nm) 결과를 나타낸 도이다.
- 도 5는 CFSE 대조군(A), SGF 처리 후(B)와 SIF 처리 후(C)의 HPLC 분석 크로마토그램(UV 360 nm) 결과를 나타낸 도이다.
- 도 6은 FSE(A)와 CFSE(B)의 *in vitro* 소화 모사 반응 후 주요 생리활성성분 정량 분석 결과를 나타낸 도이다 (Ch.A: chlorogenic acid; Ori: orientin; IO: isoorientin; Vit: vitexin; IV: isovitexin; Rut: rutin; Que: quercetin; IO-g1: isoorientin-glycoside-1; IO-g2: isoorientin-glycoside-2; IO-g3: isoorientin-glycoside-3; IO-g4: isoorientin-glycoside-4; VIT-g1: vitexin-glycoside-1; IV-g1: isovitexin-glycoside-

1; IV-g2: isovitexin-glycoside-2; IV-g3: isovitexin-glycoside-3; RUT-dg: deglycosylated rutin).

도 7은 인체 소화 모사 모델에서 플라보노이드 배당체와 플라보노이드 다당체의 안정성 차이를 나타낸 도이다.

도 8은 FSE와 CFSE의 대장 모사 발효 후 생리활성성분을 정량분석한 결과이다.

도 9는 FSE와 CFSE의 대장 모사 발효 후 단쇄지방산 함량을 나타낸 도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0089] 이하, 하기 실시예에 의하여 본 발명을 보다 상세하게 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하기 위한 것일 뿐 본 발명의 범위가 이들로 한정되는 것은 아니다.

[0091] 실시예 1. 메밀 새싹 추출물의 제조

[0092] 단메밀 종자를 50 g씩 균질하게 취해 8시간 침지 후 발아기를 이용하여 25℃에서 6일간 암조건에서 발아시켰다. 발아시작 후 약 35시간이 지나면 싹이 트고, 6일이 지나면 약 15-20 cm까지 자랐다. 이때 광원에 노출되면 줄기 부분이 붉게 변하면서 안토시아닌이 생성되므로 단메밀 새싹 추출물의 유효성분을 균일하게 얻기 위해서 암조건을 확보하였다. 발아가 완료된 단메밀 새싹을 수확하여 초저온 냉동고에서 보관 후 동결 건조해 수분을 제거하고 분쇄하였을 때 무게의 차이를 통해 산출한 결과 메밀 건조 종자 기준 메밀 새싹이 가지는 중량은 평균 87.75%가 수분이었다.

[0093] 단메밀 새싹 추출물(Fagopyrum esculentum sprouts extract; FSE)을 제조하기 위해, 앞서 제조한 단메밀 새싹 분말을 90%(v/v) 메탄올(methanol)로 상온에서 30분간 40 KHz 세기로 초음파 추출하였다. 추출액은 2,230 Xg에서 10분간 원심분리한 후 상층액을 필터(PVDF, 0.45 µm, Millipore)를 사용해 여과한 뒤 HP-20 레진 흡착제에서 증류수와 메탄올로 당과 플라보노이드를 분리하였다. 분리한 메탄올은 40℃에서 감압 농축 후 -80℃에서 동결 건조하여 FSE를 제조하였다. 건조된 새싹을 추출 및 동결건조하여 얻은 분말은 평균 25.2%의 수율을 보였다.

[0094] 단메밀 새싹 추출물의 효소 반응물(CGTase-treated Fagopyrum esculentum sprouts extract; CFSE)을 제조하기 위해, 상기 제조한 FSE와 사이클로덱스트린 글리코실트랜스퍼레이즈(cyclodextrin glycosyltransferase; CGTase) 효소의 반응은 50 mM 인산 나트륨(sodium phosphate) 버퍼에서 CGTase : FSE 을 1 : 10 (w/w)로 첨가하고 pH 5, 45℃ 조건에서 48 시간 동안 진행하였다. 완료된 반응물은 -80℃에서의 동결 및 40 KHz 초음파 처리 과정을 통해 효소 활성을 제거하고 HP-20 레진 흡착제에서 증류수와 메탄올로 당과 플라보노이드를 분리하였다. 분리된 메탄올은 40℃에서 감압 농축 후 -80℃에서 동결 건조하여 CFSE를 제조하였다(도 1). FSE를 CGTase 효소를 이용하여 당전이 시킨 결과물인 CFSE은 FSE 분말 무게 대비 평균 46.0%의 수율을 보였다.

[0096] 실시예 2. FSE와 CFSE의 생리활성성분 분석

[0097] 실시예 1에서 제조한 FSE와 CFSE의 생리활성성분을 정성 및 정량하기 위해 HPLC 분석을 수행하였다. 이때 HPLC 분석 조건은 하기 표 1과 같다.

표 1

[0099]	Instrument	Waters Alliance e2998
	Detector	PDA 2695 (210~400 nm)
	Column	ProntoSIL ACE-EPS C ₁₈ (250 x 4.6 mm, 5 µm)
	Injection volume	5 µL
	Flow rate	1.0 mL/min
	Temperature	40℃
	Solvent	Water with 0.1 %(v/v) formic acid (Solvent A)Acetonitrile (Solvent B)

[0101] 단메밀 새싹의 대표적인 생리활성성분인 클로제닉산(chlorogenic acid, Ch.A), 오리엔틴(orientin, Ori)(표 2의 peak no. 5), 이소오리엔틴(isoorientin, IO)(표 2의 peak no. 7), 비텍신(vitexin, Vit)(표 2의 peak no. 9), 이소비텍신(isovitexin, IV)(표 2의 peak no. 13), 루틴(rutin, Rut)(표 2의 peak no. 15), 및 퀘르세틴(quercetin, Que)(표 2의 peak no. 18)을 포함하는 표준성분 혼합물을 동시에 분석한 결과를 나타낸 도 2A와 도 2의 피크에 해당하는 플라보노이드 배당체 조성물의 질량분석 결과를 나타낸 하기 표 2를 통해, 모든 성분이 75 분 이내에 각각 머무름 값 30초 이상으로 분리되는 것을 확인하였다.

표 2

[0103]

Peak No.	t _R ^a (min)	λ _{max} (nm) Band I, II	[M-H] ⁻ (m/z) ^b	Aglycone	Number of monosaccharides	Compound ^c
1	28.9	340.0, 270.7	771.1	Luteolin	3	L-glc ₃
2	33.3	346.0, 268.3	771.1	Luteolin	3	L-glc ₃ '
3	35.3	348.4, 268.3	609.1	Luteolin	2	L-glc ₂
4	36.0	347.2, 268.3	609.1	Luteolin	2	L-glc ₂ '
5	36.5	348.4, 265.9	447.1	Luteolin	1	Orientein
6	37.0	348.4, 268.3	609.1	Luteolin	2	L-glc ₂ ''
7	37.8	347.2, 268.3	447.1	Luteolin	1	Isoorientin
8	40.9	334.0, 267.1	593.1	Apigenin	2	A-glc ₂
9	42.4	335.2, 267.1	431.1	Apigenin	1	Vitexin
10	43.3	336.4, 268.3	755.1	Apigenin	3	A-glc ₃
11	46.0	338.8, 269.5	593.1	Apigenin	2	A-glc ₂ '
12	46.9	337.6, 269.5	593.1	Apigenin	2	A-glc ₂ ''
13	48.0	335.2, 269.5	431.1	Apigenin	1	Isovitexin
14	51.0	349.6, 254.0	609.1	Quercetin	2	Q ₃ R
15	52.2	350.8, 257.6	609.1	Quercetin	2	Rutin
16	53.3	346.0, 255.2	771.1	Quercetin	3	Q-glc ₃
17	55.6	346.0, 256.4	463.2	Quercetin	1	Q-glc (or Q-gal)
18	62.2	363.7, 254.0	301.2	Quercetin	0	Quercetin

[0105] FSE와 CFSE의 생리활성성분을 HPLC 분석한 결과, FSE의 경우 도 2B 및 표 2와 같이 주요 생리활성성분 7종이 모두 검출되는 것을 확인할 수 있었으며, Vit과 Rut 사이에 Rut의 이성질체인 퀘르세틴-3-로비노바이오사이드(quercetin-3-robinobioside, Q₃R)(표 2의 peak no. 14) 성분이 머무름 값 50.6분에서 추가로 확인되는 것을 알 수 있었다.

[0106] 도 2A에 표기된 FSE의 주요 생리활성성분들에 대한 정보를 도 3에 나타내었다. HPLC에서 검출된 각 성분의 머무름 값과 스펙트럼(spectrum)을 기준으로 구조와 분자량 등의 특성을 나타내었다. Ch.A는 324 nm에서 최대흡광도(λ_{max})를 보이는 것으로 알려져 있어 동시 분석은 360 nm에서, 정량은 325 nm에서 수행하였다. Ori와 IO는 각각 최대흡광도 값이 255/347 nm와 268/348 nm이기 때문에 작은 머무름 값의 차이(1.4분)를 가짐에도 불구하고 흡광 형태를 이용해서 두 성분을 각각 작성하였다. Vit와 IV는 최대 흡광도 값이 각각 267/335 nm와 269/335 nm로 유사하지만 머무름 값이 5분 이상이기 때문에 단일 표준성분을 이용해 정성을 진행하였다. 이를 토대로 도 2C에서 CGTase 반응을 통해 생성된 당전이 성분의 모체를 추측하였다.

[0107] CFSE의 경우 도 2C 및 표 2와 같이 머무름 값 33.3, 35.3, 43.3, 46.9분 등에서 기존 새싹 추출물 대비 새로 생성된 당전이 산물이 검출되는 것을 확인하였다. CFSE에서 확인된 생리활성성분은 표 2에 개시된 peak no. 1 내지 18에 해당하는 성분이었다. 또한 CFSE에서는 Rut과 Q₃R이 줄어드는 대신 Que의 함량이 증가하는 것을 확인

하였다.

[0108] 상기의 결과를 토대로 CGTase 효소는 단메일의 생리활성물질에 당을 전이시키는 작용과 더불어 Que를 모체로 하는 성분의 당을 유리시키는 작용도 동시에 수행하는 것을 알 수 있다.

[0110] 실시예 3. FSE와 CFSE의 소화기관 안정성 평가

[0111] 인체 소화기관에서 FSE 및 CFSE이 소화액에 분해되는지를 *in vitro* 조건에서 평가하였다. 위 및 소장 조건과 유사한 pH 및 염도 환경에서(표 3) 다양한 효소들을 포함하는 인체 소화액을 모사한 모사 위액(simulated gastric fluid, SGF; pH 2.0) 및 모사 장액(simulated intestinal fluid, SIF; pH 7)에 FSE 또는 CFSE를 혼합하여 각각 2시간, 6시간 경과 후 HPLC 분석을 통해 생리활성성분의 변화를 분석하였다. 구체적으로, 도 2의 조건(Minekus, M. et al., (2014) A standardised static *in vitro* digestion method suitable for food - an international consensus. Food and Function, 5, 1113-1124.)을 수정하여 실험하였다.

표 3

Constituent	Concentration (mM)	
	SGF	SIF
K ⁺	7.8	7.6
Na ⁺	72.2	123.4
Cl ⁻	70.2	55.5
H ₂ PO ₄	0.9	0.8
HCO ₃ ⁻ , CO ₃ ²⁻	25.5	85
Mg ²⁺	0.1	0.33
NH ⁴⁺	1	-
Ca ²⁺	0.15	0.6

[0115] 그 결과, FSE의 생리활성성분은 SGF와 SIF 조건 모두에서 비교적 안정한 것을 확인하였다(도 4). SGF 조건의 특징이 펩신(pepsin) 효소가 존재하고 pH 2.0의 산성 조건인 것에 비추어 볼 때 FSE의 주요 생리활성성분은 낮은 pH 에서 안정하고 펩신에 의한 분해에도 영향이 적다고 생각할 수 있다. 인체 소장을 모사한 SIF는 SGF와는 다르게 pH 7.0의 약염기 조건과 판크레아틴(pancreatin), BBMV(brush border membrane vesicles) 효소 복합물 등의 영향을 받는다. FSE에 아무런 처리를 하지 않은 대조군인 도 6A(FSE 대조군)와 FSE를 SIF로 처리 후 HPLC 분석을 수행한 도 6C를 볼 때 FSE의 주요 생리활성성분의 함량과 그 비율이 비교적 유사하므로, FSE가 포함하는 주요 생리활성 성분은 인체 소장 모사 조건에서 안정한 것으로 확인되었다,

[0116] CFSE의 주요 생리활성성분은 SGF 조건에서는 비교적 안정하였으나, SIF 조건에서는 생성된 당전이 성분과 Que 등이 분해되는 것을 확인하였다(도 5). 이는 SIF의 pH 조건과 BBMV 효소 복합물 등에 포함된 β-글루코시다제(β-glucosidase)의 효과로 인해 CGTase에 의해 결합됐던 당전이 성분이 소장 조건에서 분해된 것으로 분석되었다. 더불어, CGTase의 부수 효과로 생성된 Que 또한 소장 조건에서 분해되었다. 하지만 이외에 Ori, Vit 등 CFSE의 주요 생리활성성분은 아무런 처리를 하지 않은 대조군과 비교해볼 때 상대적으로 안정한 것을 확인하였다.

[0117] 상기 결과로부터 CGTase는 FSE의 주요 생리활성성분에 당을 전이시켜 위 조건에서는 안정성을 높일 수 있고 소장 조건에서는 전이됐던 당이 분해되어 다시 모체로 돌아가는 과정을 통해 단메일 새싹의 주요 생리활성성분의 안정성 확보에 도움을 줄 수 있을 것으로 분석된다.

[0118] 또한, 도 6 내지 도 7과 같이 FSE와 CFSE를 *in vitro* 소화 모사 반응시킨 후 HPLC를 이용하여 분석한 값을 정량

분석한 결과, FSE의 주요 유효성분(Ch.A, Ori, IO, Vit, IV, Rut 및 Que)의 총량은 아무런 처리를 하지 않은 대조군(8.23 mg/g)에 비해 위 조건에서(8.72 mg/g) 5.93% 증가하였고 소장 조건에서는(7.06 mg/g) 14.26% 감소하였다(도 6A 및 도 7A). CFSE의 기존 유효성분(Ch.A, Ori, IO, Vit, IV, Rut 및 Que)의 총량은 대조군(4.39 mg/g)에 비해 위 조건에서(4.72 mg/g) 7.44% 증가하였고 소장 조건에서는(3.69 mg/g) 15.94% 감소하였다(도 6B 및 도 7B).

[0119] 구체적으로, FSE의 경우 Ch. A는 소장 조건에서 대조군에 비해 73.47% 감소하였다. Ori, Vit와 Q3R은 소장 조건에서 각각 대조군에 비해 8.27, 2.71 및 12.99% 감소했고, IO, IV와 Rut은 각각 16.62, 10.42 및 13.11% 감소하였다. 도 3을 보면 IO와 IV는 각각 Ori와 Vit의 구조 이성질체로 *O*-글루코시드(*O*-glucoside)의 결합 위치가 8번과 6번인 구조적 차이가 있다.

[0120] 따라서 소장 모사 조건에서 판크레아틴, BBMV효소 복합체에 의한 분해 및 대사 과정에서 안정성의 차이를 보이는 것은 이와 같은 당이 결합된 구조적인 차이에서 기인한 것으로 분석된다.

[0121] CFSE의 소화 모사 결과(도 6B) Ch.A는 FSE와 마찬가지로 위 조건에서는 안정하지만 소장 조건에서는 대부분 분해되었다. 나머지 성분 중 IO, Vit 및 IV의 경우 소장 조건에서 아무런 처리를 하지 않은 대조군 대비 각각 19.58, 29.55, 30.73% 증가하는 결과를 보였다. 이는 효소 반응으로 생성된 배당체가 Ori는 없고 IO, Vit, IV는 존재하는 것과 관계가 있는 것으로 분석된다.

[0122] CFSE에서만 발견되는 성분인 탈글리코실화된 루틴(deglycosylated rutin, Rut-dg)은 소화 모사 조건에서 모두 안정한 것을 알 수 있다. 또한, 도 6B와 같이 효소반응 후 생성되었던 피크들이 소장 단계에서 대부분 사라진 것을 확인하였다. 배당체 형태의 플라보노이드는 소화과정에서 장내세균이 분비하는 효소의 작용을 받아 당이 유리된 후 아글리콘(aglycone) 형태로 전환되어 흡수되고 그 후 혈액, 뇨, 혈구 등으로 이동되어 검출된다고 알려져 있는 바, CFSE는 소장 단계에서 효소 반응으로 생성된 당전이 산물이 분해되어 감소하는 결과이다. 따라서 효소 반응을 통해 당이 결합된 추출물이 위에서는 안정성이 확보되고 소장에서는 소화를 통해 분해 및 흡수될 수 있음을 알 수 있다.

[0124] 실시예 4. FSE와 CFSE의 *in vitro* 대장 모사 발효 후 생리활성성분 변화량 측정

[0125] *in vitro* 대장 모사 발효기를 이용하여 주요 생리활성성분이 장내 미생물에 의해 생물 전환되는 과정을 조사하였다. *in vitro* 대장 모사 발효기에 사용되는 배지는 영양 배지(nutrient medium) (brain heart infusion 17.5 g/L, peptone 10.0 g/L, sodium chloride 5.0 g/L, disodium phosphate 2.5 g/L)였으며 혐기 조건을 조성하고자 반응하는 동안 N₂(15 mL/min)을 공급했다. 온도는 순환식 항온수조를 이용하여 37℃로 설정하고, pH 자동조절 펌프를 이용하여 pH 6.8을 유지하면서 24시간 동안 진행하였다. 접종원으로 이용할 분변 샘플(1:10, w/v)은 각각 1% 접종하고 기질인 FSE와 CFSE를 750 mg/mL 농도로 5mL씩 각각 투입하였다. 배양 중 0, 12, 24시간에 각 10 mL씩 채취하여 분석에 사용하였다.

[0126] 채취한 *in vitro* 대장 모사 발효물 시료 5 mL에 초산에틸(ethyl acetate; EA) 10 mL을 혼합하고 1분간 흔들어진 후 5분간 정지시켰다. 이후 상층의 EA를 취해 모으는 과정을 총 3회 반복해서 모은 EA층을 감압농축기를 이용해서 37℃에서 완전히 농축했다. 농축이 완료된 플라스크 안의 건조물은 10%(v/v) 디메틸설폭사이드/메탄올(dimethyl sulfoxide/methanol) 용액 5 mL로 재용해 후 그 중 1.0 mL를 필터(PVDF, 0.45 μm, Pall)로 여과하였다. 대장 모사 발효 후 생리활성성분의 HPLC 분석 조건은 상기 표 1과 같다.

[0127] 그 결과, 도 8과 같이 FSE는 *in vitro* 대장 모사 발효가 진행되는 동안 Ori, Vit 및 IV의 함량 변화가 유의적이지 않았고 IO, Q3R, Rut 및 Que는 발효가 진행됨에 따라 함량이 감소하는 결과를 확인할 수 있었다. 특히 Rut의 경우 발효가 시작되면서 0시간에서는 발견되지 않았던 Rut-dg1 성분이 발견되는 것으로 보아 대장 모사 발효 조건에서 Rut의 당이 가수분해 되는 것을 알 수 있다.

[0128] CFSE는 *in vitro* 대장 모사 발효가 진행되는 동안 Ori, Vit, IV와 Que의 함량이 유의적으로 증가했고, Q3R와 Rut-dg2의 함량은 감소하였다. CGTase에 의해 당이 전이된 CFSE의 특성 상 대장 모사 조건에서 발효가 진행됨에 따라 전이됐던 당이 다시 가수분해 되면서 특정 성분의 함량이 증가했을 가능성이 있다. Que의 경우 FSE는 발효가 진행됨에 따라 Rut과 함께 함량이 감소하였으나 CFSE에서는 특이적으로 함량이 증가하였다. 이는 Rut의 아글리콘이 Que인 것을 고려할 때 배당체 등의 형태인 Rut으로 존재하던 성분이 분해 및 대사되어 Que 형태가 됨으로써 결론적으로 Que의 함량이 증가한 것을 알 수 있다.

[0130] 실시예 5. FSE와 CFSE의 *in vitro* 대장 모사 발효 후 장내 미생물 대사산물 변화량 측정

[0131] 실시예 4에서 채취한 *in vitro* 대장 모사 발효물 시료 1.0 ml을 필터로 여과 후 단쇄지방산(short chain fatty acids; SCFAs) 증감량을 분석하였다. 분석 조건은 하기 표 4와 같다.

표 4

[0133] Instrument	Waters Alliance e2695
Detector	PDA 2996 (210~400 nm)
Column	YMC Triart C18 (150 X 4.6 mm, 2.7 μ m)
Injection volume	4 μ L
Flow rate	0.8~1.2 mL/min
Temperature	40°C
Solvent	Water with 0.1 %(v/v) phosphoric acid (Solvent A)Acetonitrile (Solvent B)

[0135] 그 결과, 도 9와 같이 FSE를 시료로 사용했을 때의 SCFAs는 12시간까지 증가했다가 24시간에 유지되거나 감소하는 경향을 주로 보였으며 이에는 개미산(formic acid), 젖산(lactic acid) 및 프로피온산(propionic acid)이 해당되었다. 초산(acetic acid)은 발효가 진행되는 동안 함량이 지속적으로 증가하여 반응이 종료되는 24시간에는 반응 시작 시간 대비 약 914%까지 증가했다. 부티르산(butyric acid)은 발효 과정 동안 함량이 감소하여 반응이 종료될 때에는 반응 시작 시 대비 약 59%로 감소하였다.

[0136] CFSE를 시료로 사용했을 때의 SCFAs 함량 또한 FSE와 마찬가지로 발효가 진행되는 동안 12시간까지 증가했다가 24시간에 감소하는 경향을 주로 보였으며 이에는 개미산, 젖산, 부티르산이 해당되었다. 하지만 피로피온산은 반응이 종료되는 시점에서 반응 시작 시간 대비 5.8%로 크게 감소하였다. 초산은 FSE와 마찬가지로 발효가 진행됨에 따라 함량이 증가했지만 그 폭이 195%로 FSE에 비해 높지 않았다.

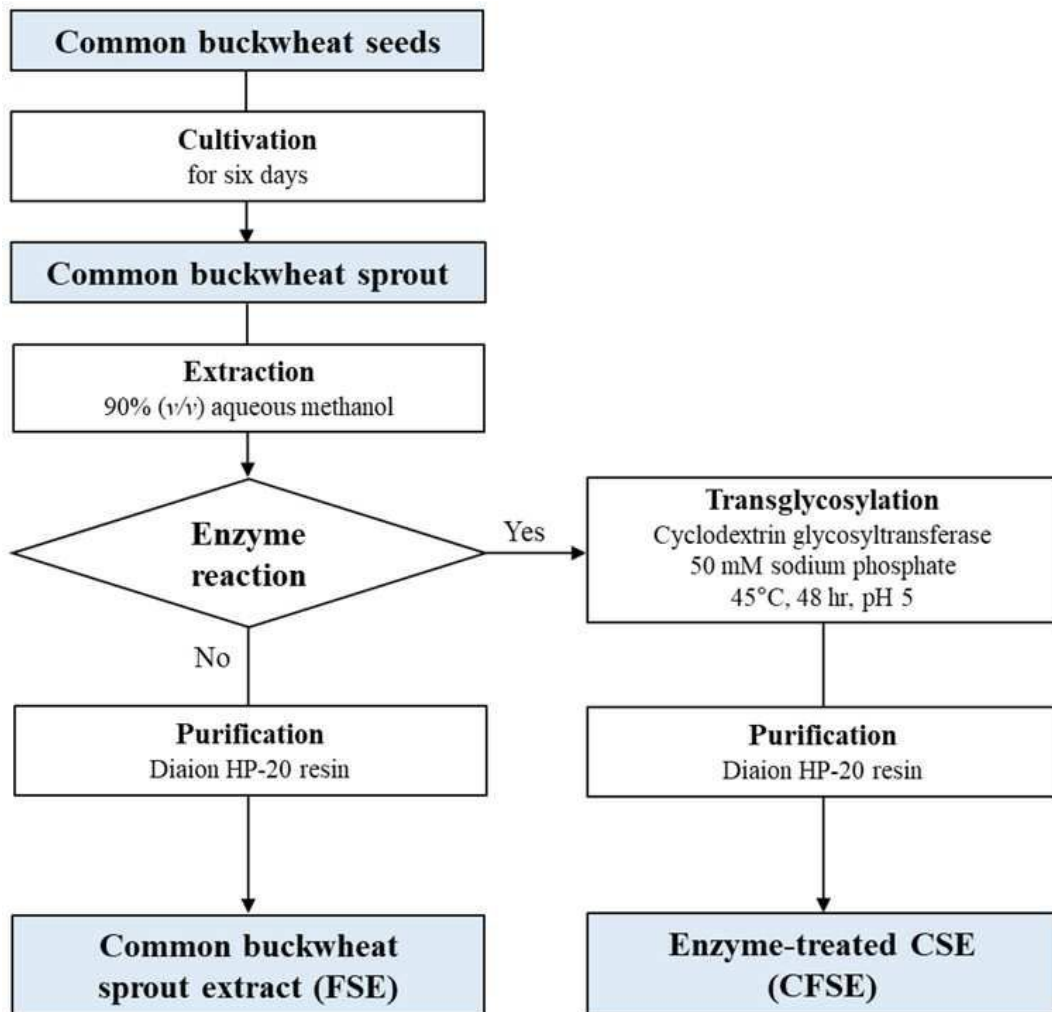
[0137] FSE와 CFSE는 동일 중량 대비 이에 포함되어 있는 배당체의 비율이 다르기 때문에 당 분자가 차지하고 있는 비율도 달라지므로, 미생물 대사와 생육에 다른 영향을 줄 수 있으며 그 결과로 상기 실시예의 결과와 같이 장내 미생물 대사산물인 SCFAs의 함량도 달라진 것으로 판단된다.

[0139] 본 실시예의 결과로부터 CFSE 단메밀 새싹 추출물은 플라보노이드 배당체의 소화안정성이 향상되어 장내 미생물 군총에서 당전이 반응시키지 않은 단메밀 새싹 추출물과 다른 영향을 줄 수 있음을 확인하였다. 본 발명은 단메밀의 대중적 기능성 식품 소재로서의 가능성을 확인한 바, 기존 단메밀 식품 소재의 한계점을 완화하고 부가가치를 높일 수 있는 기술로써 활용될 수 있다.

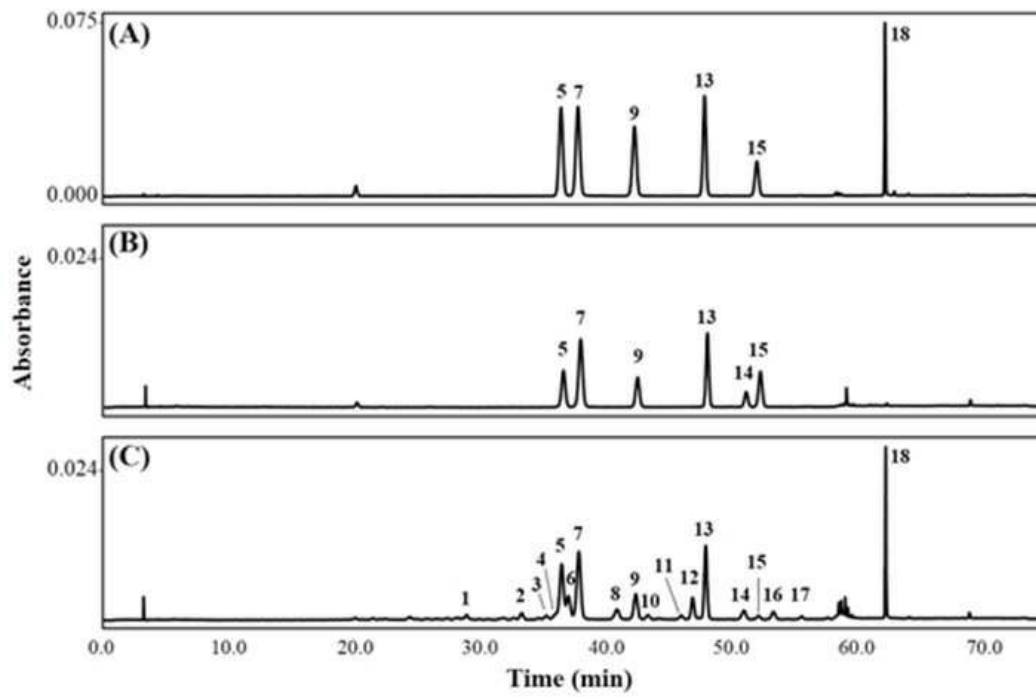
[0141] 이상의 설명으로부터, 본 발명이 속하는 기술분야의 당업자는 본 발명이 그 기술적 사상이나 필수적 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 실시될 수 있다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 이와 관련하여, 이상에서 기술한 실시 예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적인 것이 아닌 것으로서 이해해야만 한다. 본 발명의 범위는 상기 상세한 설명보다는 후술하는 특허 청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 등가 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

도면

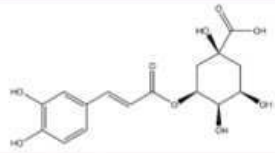
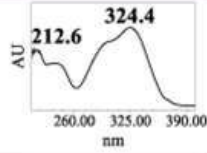
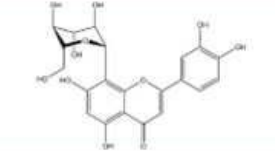
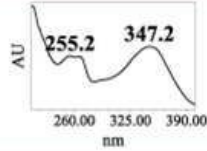
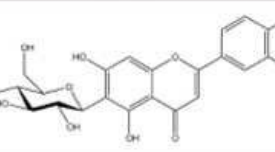
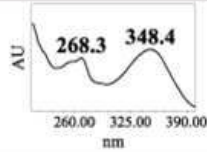
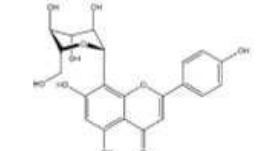
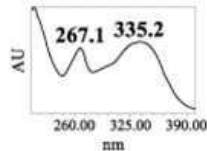
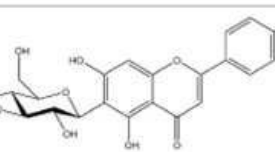
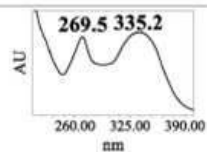
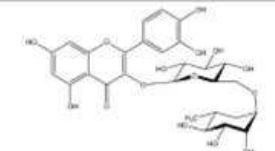
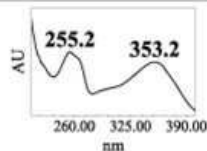
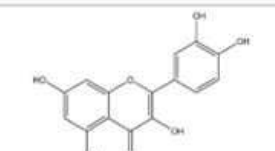
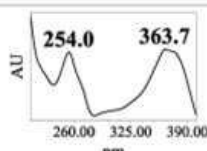
도면1



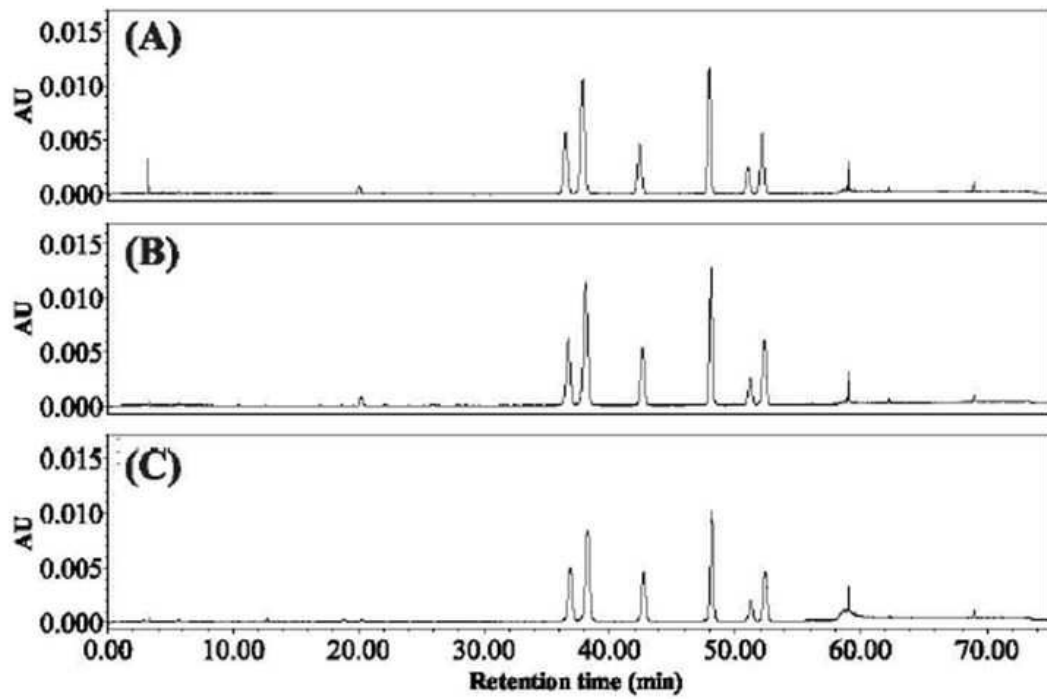
도면2



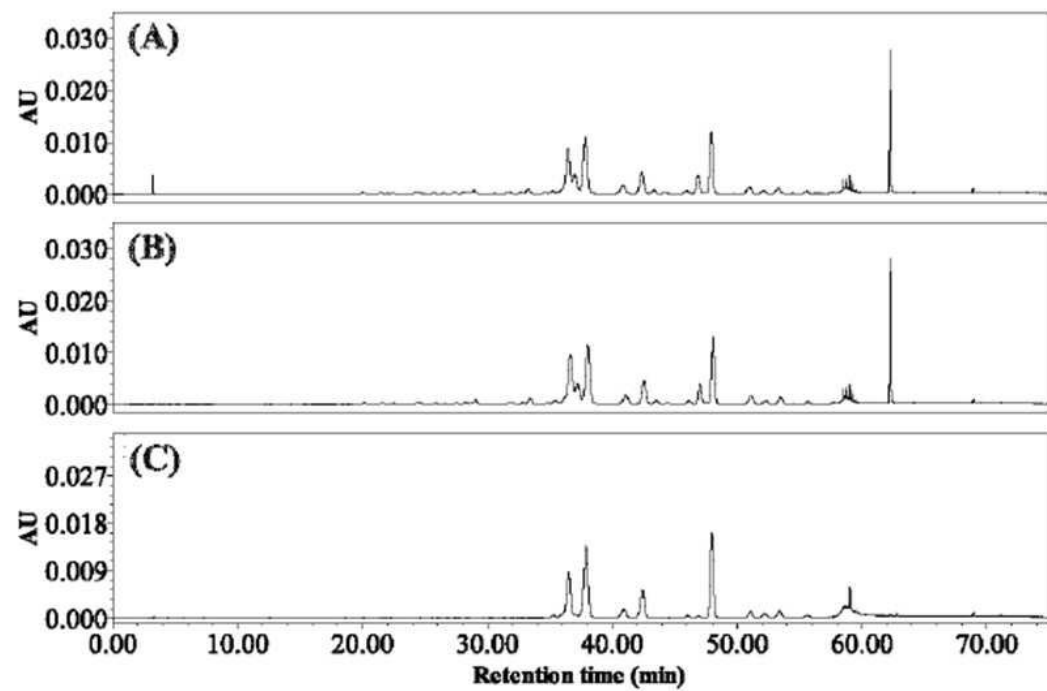
도면3

성분명 (Retention time)	구조	UV spectrum	화학식
Chlorogenic acid (20.08 min)			$C_{16}H_{18}O_9$
Orientin (36.37 min)			$C_{21}H_{20}O_{11}$
Isoorientin (37.77 min)			$C_{21}H_{20}O_{11}$
Vitexin (42.24 min)			$C_{21}H_{20}O_{10}$
Isovitexin (47.86 min)			$C_{21}H_{20}O_{10}$
Rutin (52.02 min)			$C_{27}H_{30}O_{16}$
Quercetin (62.18 min)			$C_{15}H_{10}O_7$

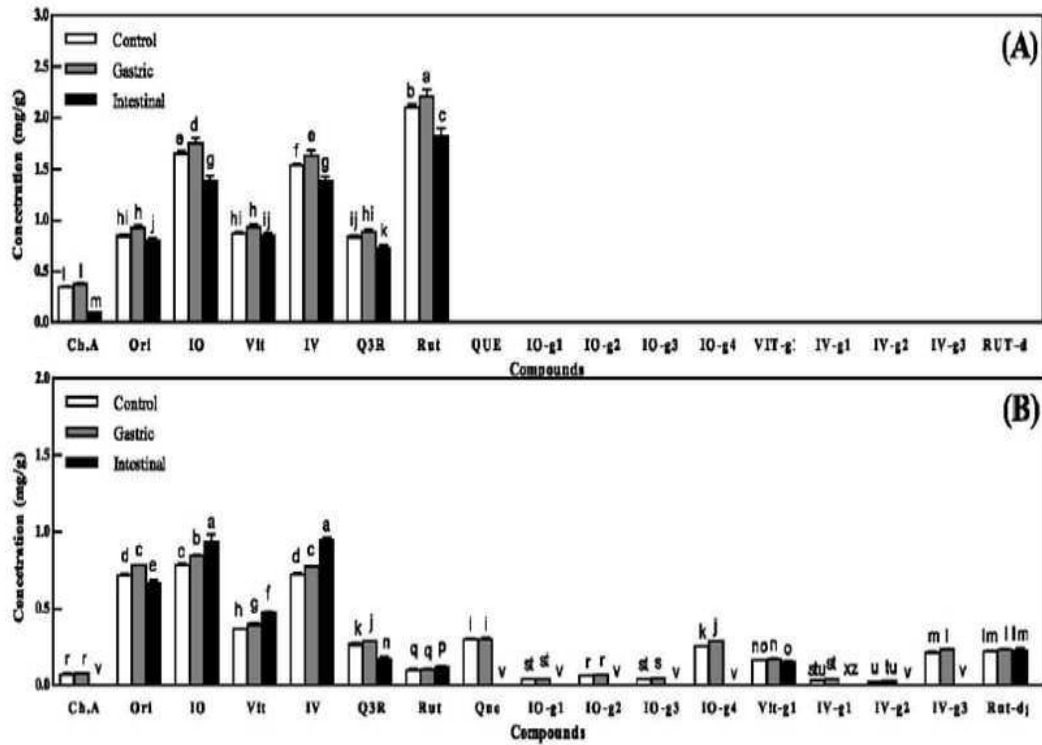
도면4



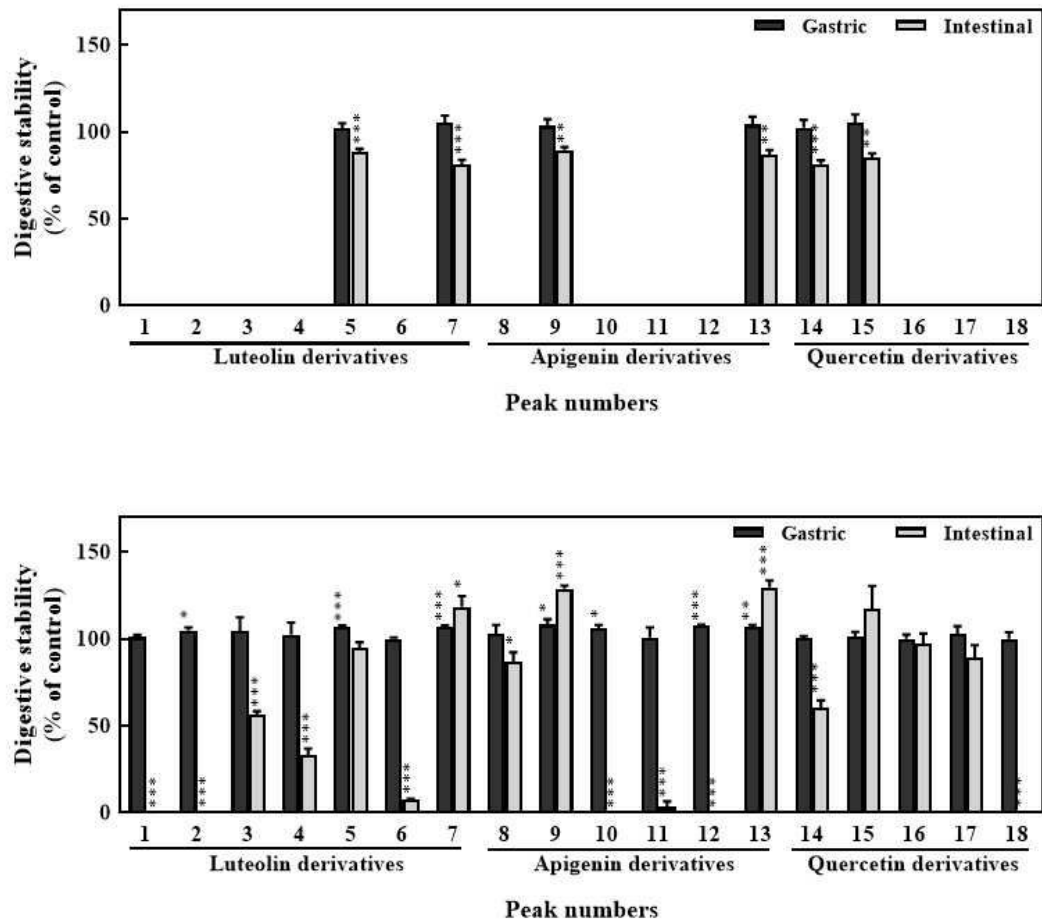
도면5



도면6



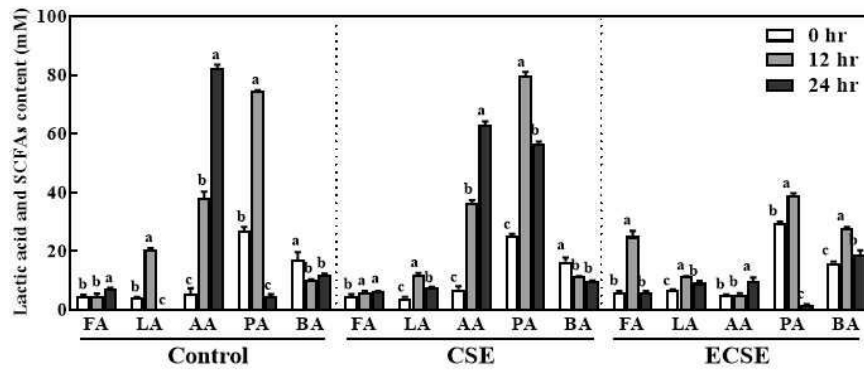
도면7



도면8

Compounds	CSE			ECSE		
	0 hr	12 hr	24 hr	0 hr	12 hr	24 hr
Orientin	21.2 ± 0.6	19.3 ± 0.7	19.7 ± 0.9	45.8 ± 1.7	44.9 ± 7.6	53.5 ± 2.9
Isoorientin	25.1 ± 0.8	21.5 ± 0.9	21.3 ± 0.9	51.5 ± 1.7	53.0 ± 9.1	55.0 ± 3.0
Vitexin	26.4 ± 0.8	28.1 ± 0.9	28.4 ± 1.3	46.1 ± 1.9	52.1 ± 8.7	69.6 ± 3.6
Isovitexin	41.3 ± 1.2	42.8 ± 1.5	42.2 ± 1.8	86.7 ± 3.1	81.9 ± 13.8	100.6 ± 5.4
Q3R	6.0 ± 0.4	3.9 ± 0.1	2.8 ± 0.1	4.1 ± 0.2	3.4 ± 0.5	2.3 ± 0.3
Rutin	12.0 ± 0.2	6.6 ± 0.1	3.7 ± 0.1	3.2 ± 0.1	5.4 ± 0.9	3.8 ± 0.1
Quercetin	3.5 ± 0.1	11.8 ± 0.4	17.8 ± 0.7	37.3 ± 1.3	33.3 ± 5.8	57.5 ± 3.2
IO-glc ₁	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
IO-glc ₂	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
IO-glc ₃	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
IO-glc ₄	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
VIT-glc ₁	n.d.	n.d.	n.d.	0.9 ± 0.1	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
IV-glc ₁	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
IV-glc ₂	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
IV-glc ₃	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
Que-glc ₁	0.8 ± 0.1	1.4 ± 0.1	1.9 ± 0.2	n.d.	n.d.	n.d.
Que-glc ₂	2.7 ± 0.1	3.5 ± 0.3	2.8 ± 0.4	9.8 ± 0.4	2.2 ± 0.3	5.9 ± 0.7

도면9



Compounds	Control			CSE			ECSE		
	0 hr	12 hr	24 hr	0 hr	12 hr	24 hr	0 hr	12 hr	24 hr
Formic acid (FA)	4.8 ± 0.4	4.7 ± 0.8	7.1 ± 0.4	4.7 ± 0.6	6.0 ± 0.4	6.1 ± 0.0	6.1 ± 0.4	25.1 ± 1.8	5.8 ± 0.5
Lactic acid (LA)	4.2 ± 0.3	20.4 ± 0.7	0.0 ± 0.0	4.0 ± 0.4	12.0 ± 0.6	7.7 ± 0.1	6.7 ± 0.2	11.3 ± 0.1	9.1 ± 0.8
Acetic acid (AA)	5.5 ± 1.8	38.1 ± 2.2	82.4 ± 1.1	7.0 ± 1.0	36.4 ± 0.9	63.1 ± 1.2	4.9 ± 0.3	4.9 ± 0.7	9.9 ± 1.1
Propionic acid (PA)	27.0 ± 1.3	74.6 ± 0.2	4.6 ± 0.7	25.3 ± 0.5	79.8 ± 1.3	56.7 ± 0.7	29.6 ± 0.5	38.9 ± 0.9	1.7 ± 0.3
Butyric acid (BA)	17.2 ± 2.5	10.2 ± 0.2	11.9 ± 0.4	16.4 ± 1.5	11.3 ± 0.1	9.7 ± 0.1	16.0 ± 0.4	27.7 ± 0.6	18.9 ± 1.4