



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2014-0146531

(43) 공개일자 2014년12월26일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A23L 2/52 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2014-0063706

(22) 출원일자 2014년05월27일

심사청구일자 2014년05월27일

(30) 우선권주장

1020130068836 2013년06월17일 대한민국(KR)

1020130068837 2013년06월17일 대한민국(KR)

(71) 출원인

세종대학교산학협력단

서울특별시 광진구 능동로 209 (군자동, 세종대학교)

(72) 발명자

심순미

경기도 용인시 기흥구 흥덕중앙로105번길 24 동원 로얄듀크아파트 1003동 1005호

박태식

경기도 성남시 수정구 복정로72번길 16, 203호

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

특허법인이상

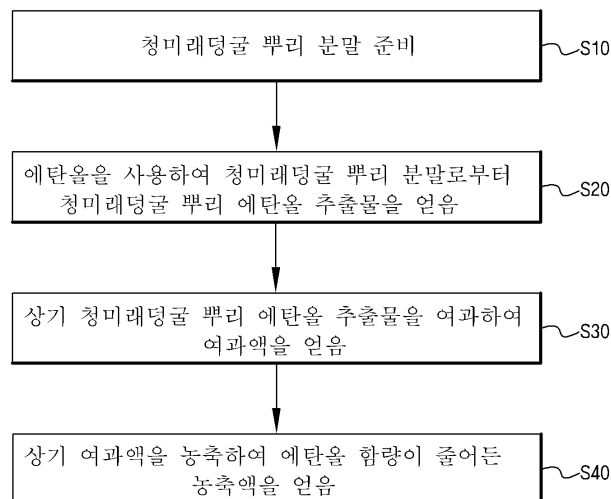
전체 청구항 수 : 총 18 항

(54) 발명의 명칭 유효성분 함량이 증대된 청미래덩굴 뿌리 추출물 제조방법 및 이 추출물을 함유하는 해독용 음료 조성물

(57) 요약

유효성분 함량이 증대된 청미래덩굴 뿌리 추출물 제조방법 및 이 추출물을 함유하는 해독용 음료 조성물을 제공한다. 청미래덩굴 뿌리 추출물 제조방법에서는 먼저, 청미래덩굴 뿌리 분말을 준비한다. 에탄올을 사용하여 청미래덩굴 뿌리 분말로부터 청미래덩굴 뿌리 에탄올 추출물을 얻는다. 상기 청미래덩굴 뿌리 에탄올 추출물을 여과하여 여과액을 얻는다. 상기 여과액을 농축하여 에탄올 함량이 줄어든 농축액을 얻는다.

대표도 - 도1



(72) 발명자

정재환

서울특별시 중랑구 용마산로115가길 11-1

김경무

서울특별시 송파구 백제고분로41길 12-10, 203호

윤소라

인천광역시 계양구 봉오대로691번길 10-2, 은영빌라 3동 403호

양의정

경기도 구리시 경춘로276번길 67-40 남양아이좋은 집아파트 104동 1103호

손유라

서울특별시 광진구 능동로15길 22, A동 402호

서주원

경기도 용인시 처인구 포곡읍 석성로850번길 84, 에버힐1단지 1호

양승환

경기도 용인시 기흥구 동백4로 72 어은목마을한라비발디아파트 4002동 1904호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 PJ009521

부처명 농림축산식품부

연구관리전문기관 농촌진흥청

연구사업명 차세대바이오그린21사업

연구과제명 청미래덩굴 잎 및 뿌리의 항비만 및 디톡스 기능성 소재 발굴 및 발효차와 발효주 제조 기술 개발

기 여 율 1/1

주관기관 세종대학교 산학협력단

연구기간 2013.02.01 ~ 2014.12.31

특허청구의 범위

청구항 1

청미래덩굴 뿌리 분말을 준비하는 단계;

에탄올을 사용하여 청미래덩굴 뿌리 분말로부터 청미래덩굴 뿌리 에탄올 추출물을 얻는 단계; 및

상기 청미래덩굴 뿌리 에탄올 추출물을 감압농축하여 에탄올 함량이 줄어든 농축액을 얻는 단계를 포함하는 해독용 조성물을 위한 청미래덩굴 뿌리 추출물 제조방법.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 청미래덩굴 뿌리 에탄올 추출물을 얻는 단계는

상기 청미래덩굴 뿌리 분말에 40% 내지 60 %의 에탄올 수용액을 혼합하고 40 내지 60℃의 온도에서 50 내지 100 rpm의 속도로 교반하는 것을 포함하는 청미래덩굴 뿌리 추출물 제조방법.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 감압농축은 40 내지 80℃의 온도에서 수행하는 청미래덩굴 뿌리 추출물 제조방법.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 청미래덩굴 뿌리 에탄올 추출물을 얻는 단계는

상기 청미래덩굴 뿌리 분말, 주정원료 분말, 누룩, 효모, 및 물을 혼합하여 혼합물을 얻는 단계; 및

상기 혼합물을 발효시켜 상기 청미래덩굴 뿌리 에탄올 추출물을 얻는 단계를 포함하는 청미래덩굴 뿌리 추출물 제조방법.

청구항 5

제4항에 있어서,

상기 주정원료 분말은 쌀 분말, 밀 분말, 보리 분말, 옥수수 분말, 수수 분말, 및 조 분말로 이루어진 군에서 선택되는 적어도 한 종류의 곡물 분말인 청미래덩굴 뿌리 추출물 제조방법.

청구항 6

제4항에 있어서,

상기 누룩은 아스퍼질러스 쿠아모리 (*Aspergillus qumori*), 아스퍼질러스 사이토이 (*Aspergillus saitoi*), 아스퍼질러스 우사미(*Aspergillus usami*), 및 아스퍼질러스 오리재(*Aspergillus oryzae*)로 이루어진 군에서 선택되는 적어도 한 종류의 누룩인 청미래덩굴 뿌리 추출물 제조방법.

청구항 7

제4항에 있어서,

상기 효모는 브레타노마이세스류(*Brettanomyces*), 칸디다(*Candida*), 클로에케라(*Kloeckera*), 사카로마이코데스(*Saccharomyces*), 자이고사카로마이세스(*Zygosaccharomyces*), 아우레오바시둠(*Aureobasidium*), 및 파리지엔느(*Ra parisiense*)로 이루어진 군에서 선택되는 적어도 한 종류의 효모인 청미래덩굴 뿌리 추출물 제조방법.

청구항 8

제4항에 있어서,

상기 혼합물은 상기 주정원료 분말을 100 중량부로 할 때, 상기 청미래덩굴 뿌리 분말을 1 내지 10 중량부, 상기 누룩을 0.5 내지 1.5 중량부, 상기 효모를 0.1 내지 1 중량부, 그리고 상기 물은 100 내지 300 중량부로 함유하는 청미래덩굴 뿌리 추출물 제조방법.

청구항 9

제4항에 있어서,

상기 발효는 상온에서 알코올 도수가 약 15 내지 30%가 될 때까지 진행되는 청미래덩굴 뿌리 추출물 제조방법.

청구항 10

제4항에 있어서,

상기 청미래덩굴 뿌리 에탄올 추출물은 옥시레스베라트롤, 레스베라트롤, 및 피세이드를 유효성분으로서 함유하는 청미래덩굴 뿌리 추출물 제조방법.

청구항 11

0.1 내지 0.25%(w/v)의 청미래덩굴 뿌리 추출물, 0.01 내지 0.15%(w/v)의 약산, 5.5 내지 8%(w/v)의 당알코올, 1 내지 2.6%(w/v)의 풍미제, 및 잔부의 물을 함유하는 해독용 음료 조성물.

청구항 12

제11항에 있어서,

상기 약산은 구연산 사과산, 주석산, 아세트산, 옥살산, 타닌산, 뷰티르산, 젖산, 빙초산 및 아스코르브산으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상을 포함하는 해독용 음료 조성물.

청구항 13

제11항에 있어서,

상기 당알코올은 자일리톨, 이소말트, 말티톨, 솔비톨, 에리스리톨, 만니톨, 락티톨 및 마나톨로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상을 포함하는 해독용 음료 조성물.

청구항 14

제11항에 있어서,

상기 풍미제는 과일 추출액 및 허브 추출액으로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상을 포함하는 해독용 음료 조성물.

청구항 15

제11항에 있어서,

상기 청미래덩굴 뿌리 추출물의 함량은 0.15 내지 0.21%(w/v)이고, 상기 약산의 함량은 0.05 내지 0.13%(w/v)이고, 상기 당알코올의 함량은 5.8 내지 7.8%(w/v)이고, 상기 풍미제는 1.4 내지 2.3%(w/v)인 해독용 음료 조성물.

청구항 16

제11항에 있어서,

상기 청미래덩굴 뿌리 추출물의 함량은 0.16 내지 0.2%(w/v)이고, 상기 약산의 함량은 0.07 내지 0.09%(w/v)이고, 상기 당알코올의 함량은 6.3 내지 6.8%(w/v)이고, 상기 풍미제는 1.6 내지 1.9%(w/v)인 해독용 음료 조성물.

청구항 17

제11항에 있어서,

상기 청미래덩굴 뿌리 추출물은 제1항 내지 제9항 중 어느 하나의 방법을 사용하여 제조된 추출물인 해독용 음료 조성물.

청구항 18

제11항에 있어서,

상기 해독용 음료 조성물은 니코틴 또는 알코올에 기인한 간세포 독성을 해독하는 해독용 음료 조성물.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 식물 추출물 제조방법 및 이 추출물을 함유하는 음료 조성물에 관한 것으로, 보다 상세하게는 청미래덩굴 뿌리 추출물 제조방법 및 이 추출물을 함유하는 해독용 음료 조성물에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 흡연은 여러가지 질병을 발생시키는 발병의 원인이 되며, 담배는 흡연시 약 4,000여종의 화학적 성분이 생산되어 인체로 흡입된다. 최근 흡연인구가 증가되고 특히 그 연령층이 점차 낮아지고 있고, 여성흡연자들의 인구가 빠른 속도로 증가되고 있는 실정이다. 이에 따른 피해사례들이 자주 발표되고 있는데 그 중 주된 원인 물질은 직간접적인 흡연에 의한 니코틴과 그 대사산물들이다. 이들 물질들은 상부위장관암, 요로계암, 췌장암 등 여러 장기의 암성질환의 원인이 되고 있고, 또한 이에 못지않은 나쁜 영향으로서는 폐조직 고유의 탄력성을 감소시켜 폐기종의 원인이 되고 있다. 또 심장질환의 원인이 되는 화학물질로서 니코틴이 주원인 물질로서 지목되고 있다. 또한 흡연시 발생하는 유리라디칼에 의한 항산화시스템의 약화로 인해 혈중콜레스테롤의 증가, 비타민 E와 비타민 C의 감소 등이 보고되고 있다.

[0003] 한편, 우리나라의 알코올 섭취량은 세계 4위를 기록하고 있을 정도로 알코올의 과다섭취가 문제되고 있다. 인체에 흡수된 알코올은 주로 알콜 탈수소효소(alcohol dehydrogenase; ADH)에 의해 세포질 내에서 아세트알데히드로 전환된 후, 알데히드 탈수소효소(aldehyde dehydrogenase; ALDH)에 의해 아세트-CoA로 바뀐 후, 아세테이트로 변환되어 분해되는데, 알코올의 과다섭취시 간에 손상을 주는 간 독성물질인 아세트알데히드가 다량으로 발생하게 되어 간에 손상을 주며, 알코올의 대사과정에서 비롯되는 NADH의 증가는 간의 산소소모를 항진시켜 간 조직에 손상을 입히게 된다.

[0004] 한편, 청미래덩굴(*Smilax china*) 뿌리는 우리나라 전역의 산지와 야산에 흔히 자라는 백합과(*Liliaceae*)의 덩굴성 낙엽관목이다. 청미래덩굴 뿌리는 여러가지 건강 기능성을 가진 천연식물 소재이지만, 식물의 줄기가 주변 수목이나 작물을 감고 올라가면서 다른 수목에 광합성작용 및 양분과 수분의 이동을 억제시키는 등 다른 수목에 피해를 줄 수 있어 숲 가꾸기 대상수목으로 지정되었다. 한편, 청미래덩굴의 뿌리는 한약재로 사용되고 있으나 그 활용방법이 제한적이며 효능에 대한 과학적인 연구가 부족한 실정이다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0005] 본 발명이 해결하고자 하는 기술적 과제는 다른 수목에 피해를 줄 수 있어 기피되고 있는 식물인 청미래덩굴 뿌리의 유효성분을 활용하여 고부가가치를 갖는 식품소재로 개발하는데 있다.

[0006] 본 발명의 기술적 과제들은 이상에서 언급한 기술적 과제로 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 기술적 과제들은 아래의 기재로부터 당업자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

과제의 해결 수단

[0007] 상기 기술적 과제를 이루기 위하여 본 발명의 일 측면은 청미래덩굴 뿌리 추출물 제조방법을 제공한다. 먼저, 청미래덩굴 뿌리 분말을 준비한다. 에탄올을 사용하여 청미래덩굴 뿌리 분말로부터 청미래덩굴 뿌리 에탄올 추출물을 얻는다. 상기 청미래덩굴 뿌리 에탄올 추출물을 감압농축하여 에탄올 함량이 줄어든 농축액을 얻는다.

[0008] 상기 청미래덩굴 뿌리 에탄올 추출물을 얻는 단계는 상기 청미래덩굴 뿌리 분말에 40% 내지 60 %의 에탄올 수용

액을 혼합하고 40 내지 60℃의 온도에서 50 내지 100 rpm의 속도로 교반하는 것을 포함할 수 있다. 상기 감압 농축은 40 내지 80℃의 온도에서 수행할 수 있다.

[0009] 다른 예에서, 상기 청미래덩굴 뿌리 에탄올 추출물을 얻는 단계는 상기 청미래덩굴 뿌리 분말, 주정원료 분말, 누룩, 효모, 및 물을 혼합하여 혼합물을 얻는 단계와 상기 혼합물을 발효시켜 상기 청미래덩굴 뿌리 에탄올 추출물을 얻는 단계를 포함하라 수 있다.

[0010] 상기 주정원료 분말은 쌀 분말, 밀 분말, 보리 분말, 옥수수 분말, 수수 분말, 및 조 분말로 이루어진 군에서 선택되는 적어도 한 종류의 곡물 분말일 수 있다. 상기 누룩은 아스퍼질러스 쿠아모리 (*Aspergillus qwamori*), 아스퍼질러스 사이토이 (*Aspergillus saitoi*), 아스퍼질러스 우사미(*Aspergillus usami*), 및 아스퍼질러스 오리재(*Aspergillus oryzae*)로 이루어진 군에서 선택되는 적어도 한 종류의 누룩일 수 있다. 상기 효모는 브레타노마이세스류(*Brettanomyces*), 칸디다(*Candida*), 클로에케라(*Kloeckera*), 사카로마이코테스(*Saccharomycodes*), 자이코사카로마이세스(*Zygosaccharomyces*), 아우레오바시디움(*Aureobasidium*), 및 파리지엔느(*Ra parisienne*)로 이루어진 군에서 선택되는 적어도 한 종류의 효모일 수 있다.

[0011] 상기 혼합물은 상기 주정원료 분말을 100 중량부로 할 때, 상기 청미래덩굴 뿌리 분말을 1 내지 10 중량부, 상기 누룩을 0.5 내지 1.5 중량부, 상기 효모를 0.1 내지 1 중량부, 그리고 상기 물은 100 내지 300 중량부로 함유할 수 있다.

[0012] 상기 발효는 상온에서 알코올 도수가 약 15 내지 30%가 될 때까지 진행될 수 있다. 이러한 청미래덩굴 뿌리 에탄올 추출물은 옥시레스베라트롤, 레스베라트롤, 및 피세이드를 유효성분으로서 함유할 수 있다.

[0013] 상기 기술적 과제를 이루기 위하여 본 발명의 다른 측면은 청미래덩굴 뿌리 추출물을 함유하는 해독용 음료 조성물을 제공한다. 상기 음료 조성물은 0.1 내지 0.25%(w/v)의 청미래덩굴 뿌리 추출물, 0.01 내지 0.15%(w/v)의 약산, 5.5 내지 8%(w/v)의 당알코올, 1 내지 2.6%(w/v)의 풍미제, 및 잔부의 물을 함유할 수 있다.

[0014] 상기 약산은 구연산 사과산, 주석산, 아세트산, 옥살산, 타닌산, 뷰티르산, 젖산, 빙초산 및 아스코르브산으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상을 포함할 수 있다. 상기 당알코올은 자일리톨, 이소말트, 말티톨, 솔비톨, 에리스리톨, 만니톨, 락티톨 및 마나톨로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상을 포함할 수 있다. 상기 풍미제는 과일 추출액 및 허브 추출액으로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상을 포함할 수 있다.

[0015] 상기 청미래덩굴 뿌리 추출물의 함량은 0.15 내지 0.21%(w/v)이고, 상기 약산의 함량은 0.05 내지 0.13%(w/v)이고, 상기 당알코올의 함량은 5.8 내지 7.8%(w/v)이고, 상기 풍미제는 1.4 내지 2.3%(w/v)일 수 있다. 나아가, 상기 청미래덩굴 뿌리 추출물의 함량은 0.16 내지 0.2%(w/v)이고, 상기 약산의 함량은 0.07 내지 0.09%(w/v)이고, 상기 당알코올의 함량은 6.3 내지 6.8%(w/v)이고, 상기 풍미제는 1.6 내지 1.9%(w/v)일 수 있다.

[0016] 상기 청미래덩굴 뿌리 추출물은 상기 청미래덩굴 뿌리 추출물 제조방법을 사용하여 제조된 추출물일 수 있다. 또한, 상기 해독용 음료 조성물은 니코틴 또는 알코올에 기인한 간세포 독성을 해독하는 해독용 음료 조성물일 수 있다.

발명의 효과

[0017] 상술한 바와 같이 본 발명에 따르면, 다량의 옥시레스베라트롤(oxyresveratrol)과 레스베라트롤(resveratrol)을 유효성분으로 함유하는 청미래덩굴 뿌리 추출물을 제조할 수 있다. 나아가, 상기 청미래덩굴 뿌리 에탄올 추출물은 옥시레스베라트롤과 레스베라트롤 외에도 유효성분으로서 피세이드(piceid)를 더욱 함유할 수 있다.

[0018] 또한, 청미래덩굴 뿌리 추출물을 포함하는 음료조성물은 상기 유효성분을 함유함에 따라 니코틴 또는 알코올에 기인한 간세포 독성에 대한 보호능 및 산화적 손상물 억제능이 뛰어날 수 있다. 나아가, 관능특성이 뛰어나 음료로 섭취하기에 적당하다

도면의 간단한 설명

[0019] 도 1은 본 발명의 일 실시예에 따른 청미래덩굴 뿌리 추출물 제조방법을 나타낸 순서도이다.

도 2은 본 발명의 다른 실시예에 따른 청미래덩굴 뿌리 추출물 제조방법을 나타낸 순서도이다.

도 3은 평가예 1에 따른 청미래덩굴 뿌리 추출물의 기능성 물질 분리 및 동정결과를 나타낸 그래프이다.

도 4는 평가예 2에 따른 실험군들 및 대조군에서의 세포 생존도를 나타낸 그래프이다.

도 5는 평가에 3에 따른 실험군들 및 대조군에서의 DCF 상대적 형광 정도(DCF relative fluorescence intensity)를 나타낸 그래프이다.

도 6은 평가에 4에 따른 실험군들 및 대조군의 배양시간에 대한 코티닌 함량을 나타낸 그래프이다.

도 7은 평가에 5에 따른 실험군들 및 대조군에서의 CYP2A6 효소 발현 정도를 나타낸 그래프이다.

도 8은 평가에 6에 따른 실험군들 및 대조군의 농도별 흡광도를 나타낸 그래프이다.

도 9는 평가에 7에 따른 실험군들 및 대조군에서의 상대적 DCF 형광 정도(relative DCF fluorescence intensity)를 나타낸 그래프이다.

도 10은 청미래덩굴 뿌리 추출물을 함유하는 음료 조성물 제조에 1에 따른 음료들의 관능정도를 나타낸 그래프이다.

도 11은 평가에 8에 따른 청미래덩굴 뿌리 추출물의 기능성 물질 분리 및 동정결과를 나타낸 그래프이다.

도 12는 평가에 9에 따른 청미래덩굴 뿌리 추출물의 기능성 물질 분리 및 동정결과를 나타낸 그래프이다.

도 13 및 도 14는 제조에 2, 제조에 3, 및 비교예에 따른 발효주들로부터 1, 3, 5, 7, 및 9일에 채취된 부분 내레스베라트를 및 옥시레스베라트의 함량 변화를 각각 분석한 그래프들이다.

도 15는 제조에 2, 제조에 3, 및 비교예에 따른 발효주들로부터 1, 3, 5, 7, 및 9일에 채취된 부분의 항산화용량 및 비타민 C 등가 항산화용량(vitamin C equivalent antioxidant capacity; VCEAC)를 각각 분석한 그래프들이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0020] 이하, 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위하여 본 발명에 따른 바람직한 실시예를 첨부된 도면을 참조하여 보다 상세하게 설명한다. 그러나, 본 발명은 여기서 설명되어지는 실시예에 한정되지 않고 다른 형태로 구체화될 수도 있다.

[0021] 본 명세서에서, 본 발명에서 '유효성분'의 의미는 생리기능을 조절할 수 있는 생리활성물질로서, 특히 생체 내에서 해독 효과 또는 간 손상 위험을 줄일 수 있는 성분을 의미한다. 본 명세서에서 추출물 또는 음료 조성물은 상기 유효성분 외에 첨가제를 함유할 수 있다.

[0022] 본 명세서에서, "청미래덩굴 뿌리 추출물"은 청미래덩굴 뿌리를 에탄올을 사용하여 추출한 추출물로서, 추출원액, 상기 추출원액을 농축하여 에탄올의 함량을 감소시킨 농축액, 상기 농축액의 회석액, 또는 상기 농축액을 가공한 고형 제제 중 어느 하나를 의미할 수 있다.

[0023] 청미래덩굴 뿌리 추출물 제조방법

[0024] 도 1은 본 발명의 일 실시예에 따른 청미래덩굴 뿌리 추출물 제조방법을 나타낸 순서도이다.

[0025] 도 1을 참조하면, 청미래덩굴 뿌리 분말을 준비한다(S10). 청미래덩굴은 한국의 산지와 야산 등에 흔히 자라는 백합과(Liliaceae)의 덩굴성 낙엽관목이다. 이러한 청미래덩굴로부터 뿌리를 채취하고, 채취된 뿌리를 세척한 후 건조하고 분쇄하여 청미래덩굴 뿌리 분말을 준비할 수 있다. 세척은 증류수를 사용할 수 있고 건조는 자연 건조, 열풍건조, 또는 동결건조법을 사용할 수 있다. 또한, 상기 청미래덩굴 뿌리 분말은 약 400 내지 약 600 메쉬 크기의 초미세 분말로 분쇄된 것일 수 있고, 영하의 온도에서 보관될 수 있다.

[0026] 이 후, 에탄올을 사용하여 청미래덩굴 뿌리 분말로부터 청미래덩굴 뿌리 에탄올 추출물을 얻는다(S20). 구체적으로, 상기 청미래덩굴 뿌리 분말에 에탄올 수용액을 혼합하여 교반함으로써, 유효성분이 함유된 청미래덩굴 뿌리 에탄올 추출물을 얻는다. 상기 에탄올 수용액은 중간 정도의 에탄올 함량 예를 들어 약 40% 내지 약 60%, 구체적으로는 약 45 내지 55 %의 에탄올 함량을 가질 수 있다. 또한, 상기 교반은 중온 예를 들어, 약 40 내지 약 60℃의 온도, 구체적으로 약 50 내지 60℃의 온도에서 수행할 수 있다. 이러한 온도범위에서는, 유효성분들이 열에 의해 파괴되지 않을 뿐 아니라 이보다 낮은 온도범위에 비해 추출효율이 높을 수 있다. 또한 교반 속도는 비교적 낮은 약 50 내지 약 100 rpm일 수 있다. 이러한 교반속도 범위에서는, 유효성분 파괴가 줄어들 수 있고 또한 유효성분 추출효율을 향상시킬 뿐 아니라 유효성분의 함량을 안정하게 유지할 수 있다.

- [0027] 또한, 상기 청미래덩굴 뿌리 분말은 상기 에탄올 수용액 100ml 당 약 1 내지 약 10 g의 비율로 함유될 수 있다. 이러한 비율에서 상기 유효성분의 함량이 증대될 수 있다.
- [0028] 이 후, 상기 청미래덩굴 뿌리 에탄올 추출물을 여과하여 여과액을 얻을 수 있다(S30). 이 여과액을 농축하여 에탄올 함량이 줄어든 농축액을 얻을 수 있다(S40). 상기 농축은 감압농축 구체적으로는 가열감압농축일 수 있다. 이 때, 가열감압농축은 약 40 내지 80℃의 온도에서 수행할 수 있다. 이는 에탄올의 끓는점을 고려한 온도범위로서, 감압 하에서 끓는점이 낮아져 상기 청미래덩굴 뿌리 에탄올 추출물이 농축기 배관으로 역류하는 것을 방지하기 위해 온도범위는 조절될 수 있다. 이 경우, 상기 농축액에서 에탄올 함량이 감소 또는 제거될 수 있다.
- [0029] 이러한 상기 청미래덩굴 뿌리 추출물의 여과액 및 농축액은 옥시레스베라트롤과 레스베라트롤을 유효성분으로 함유할 수 있다. 구체적으로, 상기 청미래덩굴 뿌리 추출물은 옥시레스베라트롤 100 중량부에 대해 레스베라트롤을 약 300 내지 약 480 중량부, 구체적으로 약 350 내지 약 430 중량부, 더 구체적으로는 약 370 내지 약 410 중량부를 포함할 수 있다. 일 예에서, 상기 청미래덩굴 뿌리 추출물은 옥시레스베라트롤을 약 10 내지 50 ppm 구체적으로 약 20 내지 40 ppm으로 포함하고, 레스베라트롤을 약 100 내지 200 ppm 구체적으로 약 100 내지 약 150ppm으로 포함할 수 있다.
- [0030] 이 후, 상기 농축액을 건조하여 추출물 분말을 만들거나 또는 상기 농축액을 물에 희석하여 적절한 추출물 희석액을 만들 수도 있다. 상기 건조는 동결건조 또는 분무건조일 수 있다. 한편, 상기 물은 증류수일 수 있다.
- [0031] 도 2은 본 발명의 다른 실시예에 따른 청미래덩굴 뿌리 추출물 제조방법을 나타낸 순서도이다. 본 실시예에 따른 제조방법은 후술하는 것을 제외하고는 도 1을 참조하여 설명한 제조방법과 유사할 수 있다.
- [0032] 도 2를 참조하면, 청미래덩굴 뿌리 분말을 준비한다(S10). 이와 관련하여서는 도 1을 참조하여 설명한 해당 부분을 참고하기로 한다.
- [0033] 이 후, 상기 청미래덩굴 뿌리 분말, 주정원료 분말, 누룩, 효모, 및 물을 혼합하여 혼합물을 얻는다(S22). 상기 물은 증류수일 수 있다. 상기 주정원료 분말은 곡물 분말 구체적으로 쌀 분말, 밀 분말, 보리 분말, 옥수수 분말, 수수 분말, 및 조 분말로 이루어진 군에서 선택되는 적어도 한 종류의 분말일 수 있다. 상기 누룩은 아스퍼질러스 쿠아모리 (*Aspergillus qumori*), 아스퍼질러스 사이토이 (*Aspergillus saitoi*), 아스퍼질러스 우사미(*Aspergillus usami*), 및 아스퍼질러스 오리재(*Aspergillus oryzae*)로 이루어진 군에서 선택되는 적어도 한 종류의 누룩일 수 있다. 상기 효모는 브레타노마이세스류(*Brettanomyces*), 칸디다(*Candida*), 클로에케라(*Kloeckera*), 사카로마이코테스(*Saccharomycodes*), 자이코사카로마이세스(*Zygosaccharomyces*), 아우레오바시둠(*Aureobasidium*), 및 파리지엔느(*Ra parisienne*)(사카로마이세스 세레비시아 (*Saccharomyces cerevisiae*)로도 불리워짐)로 이루어진 군에서 선택되는 적어도 한 종류의 효모일 수 있다.
- [0034] 이 때, 상기 혼합물 내에서 주정원료 분말을 100 중량부로 할 때, 청미래덩굴 뿌리 분말은 약 1 내지 약 10 중량부로 함유될 수 있다. 또한, 누룩은 약 0.5 내지 1.5 중량부, 효모는 약 0.1 내지 약 1 중량부, 그리고 증류수는 약 100 내지 300 중량부로 함유될 수 있다.
- [0035] 상기 혼합물을 발효시켜 청미래덩굴 뿌리 에탄올 추출물을 얻는다(S24). 상기 혼합물의 발효과정에서, 상기 주정원료 분말은 누룩에 의해 당화된 후, 효모에 의해 발효되어 에탄올을 생성할 수 있다. 이 에탄올로 인해 청미래덩굴 뿌리 분말로부터 유효성분이 추출될 수 있다. 상기 발효는 알코올 도수가 약 15 내지 30%, 구체적으로 약 17 내지 20%가 될 때까지 진행될 수 있으며, 또한 상온에서 진행될 수 있다. 이 과정에서 유효성분인 옥시레스베라트롤과 레스베라트롤의 함량이, 도 1을 참조하여 설명한 실시예에 비해 더욱 증가될 수 있다.
- [0036] 또한, 상기 청미래덩굴 뿌리 에탄올 추출물은 옥시레스베라트롤과 레스베라트롤 외에도 유효성분으로서 피세이드(piceid)를 더욱 포함할 수 있다. 피세이드는 레스베라트롤의 배당체로서, 최근 이슈가 되고 있는 심혈관계 질환, 노화 예방 등에 대한 기능이 보고된 생리활성 물질이다. 본 실시예에 따른 상기 청미래덩굴 뿌리 에탄올 추출액은 청미래덩굴 발효주로도 불리워질 수 있다.
- [0037] 이 후, 상기 청미래덩굴 뿌리 에탄올 추출물을 여과하여 여과액을 얻을 수 있다(S30). 상기 여과액을 얻는 과정은, 상기 발효주만을 채취하는 경우에는 생략될 수도 있다. 이 여과액 또는 발효주를 농축하여 에탄올 함량이 줄어든 농축액을 얻을 수 있다(S40). 이와 관련하여서는 도 1을 참조하여 설명한 해당 부분을 참고하기로 한다.

- [0038] 이 후, 상기 농축액을 건조하여 추출물 분말을 만들거나 또는 상기 농축액을 물에 희석하여 적절한 추출물 희석액을 만들 수도 있다. 상기 건조는 동결건조 또는 분무건조일 수 있다. 한편, 상기 물은 증류수일 수 있다.
- [0039] 청미래당굴 뿌리 추출물을 함유하는 해독용 음료 조성물
- [0040] 본 발명의 일 실시예에 따른 해독용 음료 조성물은 청미래당굴 뿌리 추출물, 약산, 당알코올, 풍미제, 및 용매를 포함할 수 있다
- [0041] 상기 청미래당굴 뿌리 추출물은 도 1 및 도 2를 참조하여 설명한 농축액, 상기 농축액을 가공한 고형 제제, 또는 상기 농축액을 희석한 희석액일 수 있다. 상기 청미래당굴 뿌리 추출물의 밀도는 약 10 내지 25 mg/ml일 수 있다.
- [0042] 상기 약산은 구연산 사과산, 주석산, 아세트산, 옥살산, 타닌산, 뷰티르산, 젖산, 빙초산 및 아스코르브산으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상을 포함할 수 있다. 당알코올은 자일리톨, 이소말트, 말티톨, 솔비톨, 에리스리톨, 만니톨, 락티톨 및 마나톨로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상을 포함할 수 있다. 상기 풍미제는 과일, 과일 추출액, 허브, 또는 허브 추출액일 수 있다. 과일은 사과, 레몬, 오렌지, 포도, 딸기, 복숭아 등일 수 있고, 허브는 페퍼민트, 로즈마리, 라벤더, 레몬밤 등일 수 있다. 상기 약산과 당알코올은 유효성분의 생체 흡수율을 향상시키기 위해 추가되고, 상기 풍미제는 사람이 섭취할 때 풍미감 예를 들어, 상큼하거나 깔끔한 향 또는 맛을 느낄 수 있도록 하기 위해 추가될 수 있다.
- [0043] 상기 해독용 음료 조성물에서, 상기 청미래당굴 뿌리 추출물은 약 0.1 내지 약 0.25%(w/v), 구체적으로 약 0.15 내지 약 0.21%(w/v), 더 구체적으로는 약 0.16 내지 약 0.2%(w/v); 상기 약산은 약 0.01 내지 약 0.15%(w/v), 구체적으로 약 0.05 내지 약 0.13%(w/v), 더 구체적으로는 약 0.07 내지 약 0.09%(w/v); 상기 당알코올은 약 5.5 내지 약 8%(w/v), 구체적으로 약 5.8 내지 약 7.8%(w/v), 더 구체적으로는 약 6.3 내지 약 6.8%(w/v); 상기 풍미제는 약 1 내지 2.6%(w/v), 구체적으로 약 1.4 내지 약 2.3%(w/v), 더 구체적으로는 약 1.6 내지 약 1.9%(w/v) 일 수 있고; 잔부는 물일 수 있다. 이러한 비율로 각 성분들이 첨가되는 경우, 청미래당굴 뿌리 추출물과 어우러져 음료로서 효과적인 관능특성을 나타낼 수 있다.
- [0044] 구체적으로, 상기 약산은 시고 상쾌한 맛이 있으며 물 또는 알코올에 잘 녹을 뿐 아니라 흡습성이 적고 안정한 구연산과 주석산 중 적어도 어느 하나일 수 있다. 더 구체적으로, 상기 약산은 구연산일 수 있다. 상기 당알코올은 설탕에 비해 60 내지 70% 낮은 당도를 나타내면서도 칼로리가 낮은 말티톨과 자일리톨 중 적어도 어느 하나일 수 있다. 더 구체적으로, 상기 당알코올은 자일리톨일 수 있다.
- [0045] 상기 풍미제는 레몬 농축액과 페퍼민트일 수 있다. 상기 풍미제가 레몬 농축액과 페퍼민트인 경우에, 상기 해독용 음료 조성물에서, 상기 레몬 농축액은 약 1 내지 2.5%(w/v), 구체적으로 약 1.4 내지 약 2.2%(w/v), 더 구체적으로는 약 1.6 내지 약 1.8%(w/v)일 수 있고; 상기 페퍼민트는 약 0.001 내지 0.1%(w/v), 구체적으로 약 0.01 내지 0.03%(w/v), 더 구체적으로 약 0.015 내지 0.02%(w/v)일 수 있다.
- [0046] 이와 같이, 청미래당굴 뿌리 추출물을 포함하는 음료조성물은 관능특성이 뛰어나 음료로 섭취하기에 적합하고 니코틴 또는 알코올에 기인한 간세포 독성에 대한 보호능 및 산화적 손상물 억제효능이 뛰어나다.
- [0047] 청미래당굴 뿌리 추출물을 함유하는 기타 식품 조성물 또는 약제 조성물
- [0048] 본 발명의 일 실시예에 따른 음료 외 기타 해독용 식품 조성물 또는 약제 조성물은, 후술하는 것을 제외하고는 상기 해독용 음료 조성물과 유사할 수 있다.
- [0049] 본 발명의 일 실시예에 따른 음료 외 기타 해독용 식품 조성물 또는 약제 조성물은 청미래당굴 뿌리 추출물, 약산 및 당알코올을 포함할 수 있다. 이에 더하여, 상기 조성물은 풍미제를 더 포함할 수 있다. 그 외에 다양한 종류의 계면활성제, 착색료, 향신료, 보존료, 안정제, 완충제, 현탁제 등의 부형제 또는 첨가제가 첨가될 수 있다.
- [0050] 이 때, 청미래당굴 뿌리 추출물 100 중량부에 대해 약산은 약 20 내지 80 중량부, 당알코올은 약 3000 내지 5000 중량부, 그리고 풍미제는 약 700 내지 1300 중량부로 함유될 수 있다.
- [0051] 이러한 조성물은 경구투여용으로 정제, 환제, 캡셀제, 과립제, 캐러멜, 티백 등의 여러 가지 제형으로 응용될

수 있다.

[0052] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 바람직한 실험예(example)를 제시한다. 다만, 하기의 실험예는 본 발명의 이해를 돕기 위한 것일 뿐, 본 발명이 하기의 실험예에 의해 한정되는 것은 아니다.

[0053] <청미래덩굴 뿌리 추출물 제조예 1>

[0054] 한국 충청북도 음성군 지역에서 청미래덩굴 뿌리를 채취하여 증류수로 세척한 후, 동결건조하고, 곱게 분쇄하여 -20℃에서 보관하였다. 상기 청미래덩굴 뿌리 분말 25g과 50% 알코올 수용액(50% 주정) 500mℓ를 혼합하고, 55℃의 배양기에서 70rpm으로 24시간 동안 교반하여 청미래덩굴 뿌리 추출물을 얻었다.

[0055] 상기 청미래덩굴 뿌리 추출물을 여과하여 여과액(옥시레스베라트롤(oxyresveratrol)의 농도는 31.03 ppm이었고, 레스베라트롤(resveratrol)의 농도는 120.48 ppm)을 수득한 후, 상기 여과액을 50℃에서 10배 감압농축하여 농축액(옥시레스베라트롤의 농도는 310.3 ppm이었고, 레스베라트롤의 농도는 1204.8 ppm)을 얻었다. 이 후, 상기 농축액을 증류수로 10배 희석하여 1.8mg/mℓ의 밀도를 갖는 희석액(옥시레스베라트롤의 농도는 31.03 ppm (2.1 μM)이었고, 레스베라트롤의 농도는 120.48 ppm(0.5 μM))을 얻었다.

[0056] <평가예 1: 제조예 1에 따른 청미래덩굴 뿌리 추출물의 기능성 물질 분리 및 동정>

[0057] 청미래덩굴 뿌리 추출물 제조예 1로부터 얻은 추출물(희석액) 내의 기능성 물질을 분리해내기 위해 C₁₈Hypersil GOLD Column(50×2.1mm, 1.9μm, Thermo scientific, USA)이 장착된 UPLC-PDA-ESI-MS/MSn(LCQ fleet, Thermo scientific, USA)를 사용하였다. 이 때, 이동상은 A(0.1% formic acid in water), B(acetonitrile)를 사용하였고, 유속은 0.2mℓ/min, 농도 구배는 0 min-82% A, 1.96 min-75% A, 5.21 min-60% A, 5.5 min-82%A, 8.5 min-82% A, 주입량은 1μℓ로 설정하였다. PDA 파장은 320nm로 하여 분석하였으며, 이온화는 ESI positive-ion mode를 사용하였고, 메스 레인지(mass range)는 50~800(m/z), 커필러리 온도(capillary temperature)는 275℃로 설정하여 검출하였다. 모든 샘플은 UPLC 분석기에 주입되기 전 0.2μm 필터로 여과한 후 분석하였다.

[0058] 도 3은 평가예 1에 따른 청미래덩굴 뿌리 추출물의 기능성 물질 분리 및 동정결과를 나타낸 그래프이다.

[0059] 도 3을 참조하면, 주요 기능성 물질인, 옥시레스베라트롤과 레스베라트롤은 3.58분과 4.9분에서 각각 검출되었다.

[0060] MS 분석에서는 m/z 245.13 [M-H]⁺, 229.02 [M-H]⁺가 검출되어 옥시레스베라트롤과 레스베라트롤을 검증하였다. 또한, 이들의 함량은 각각 31.03μg/mℓ, 120.48μg/mℓ로 레스베라트롤이 옥시레스베라트롤보다 약 3.88배 높은 함량을 나타내었다.

[0061] <평가예 2: 제조예 1에 따른 청미래덩굴 뿌리 추출물 내 기능성 지표물질의 니코틴에 기인한 간세포 독성에 대한 보호능 평가(MTT Assay)>

[0062] MTT(Microculture Tetrazolium) 시험법을 이용하여 청미래덩굴 뿌리 추출물의 주요 기능성 지표물질인 옥시레스베라트롤과 레스베라트롤의 니코틴에 기인한 간세포 독성에 대한 보호능을 평가하였다. Tetrazolium-based colorimetric(MTT) 시험법은, 세포에 의해 MTT로부터 생성되고 세포막을 투과한 물에 녹지 않는 포르마잔 크리스탈(formazan crystal)을 다이메틸 설펝사이드(dimethyl sulfoxide, DMSO)로 녹인 후, 이를 분광학적 방법을 통해 생성된 포르마잔 크리스탈의 양을 측정하는 방법으로, 이 방법을 통해 세포의 생존도(viability)를 측정할 수 있다.

[0063] 한국세포주은행에서 분주 받은 HepG2(passage # 99-100) 세포를 계대 배양한 후, 96 웰 플레이트(well plate)에 1×10⁴ cell의 밀도(density)로 분주하여 24시간 동안 5% CO₂, 37℃의 조건에서 배양하였다. 24시간이 지난 후, 50, 100, 및 250 μM의 옥시레스베라트롤(Sigma-Aldrich 사), 50, 100, 및 250 μM의 레스베라트롤(Sigma-

Aldrich 사), 50 및 100 μ M의 옥시레스베라트롤과 레스베라트롤의 혼합물(몰비=1:1), 및 제조예 1에 따른 청미래딩굴 뿌리 추출물(농도는 1.8mg/ml, 레스베라트롤 2.1 μ M, 옥시레스베라트롤 0.5 μ M)을 각각 처리한 실험군들을 2시간 동안 배양하였다. 한편, 옥시레스베라트롤 또는 레스베라트롤을 처리하지 않은 군을 대조군으로 하였다. 그 후, IC₅₀ 농도의 니코틴을 각 실험군들 및 대조군에 처리하고 24시간 동안 배양시킨후, 배지를 제거한 다음 MTT 시약(MTT, 3-4,5 dimethylthiazol-2,5 diphenyletrazolium bromide)을 처리하여 4시간 동안 배양하였다. 그 후, 배지를 제거하고 DMSO 시약을 처리하고, 570 nm 파장에서 흡광도를 멀티마이크로플레이트 리더(multimicroplate reader, Thermo scientific)로 측정하였다. 또한, 하기 수학적식을 이용하여 세포 생존도(cell viability)를 측정하였다.

[수학적식]

$$\% \text{ cell viability} = \frac{\text{Average of control(OD)} - \text{Average of test(OD)}}{\text{Average of test(OD)} - \text{Average of blank(OD)}} * 100$$

도 4는 평가예 2에 따른 실험군들 및 대조군에서의 세포 생존도를 나타낸 그래프이다. RES는 레스베라트롤을, OXY는 옥시레스베라트롤을, RES+OXY는 레스베라트롤과 옥시레스베라트롤의 혼합물을, 그리고 EESC는 청미래딩굴 뿌리 추출물을 나타낸다. 또한, +는 물질이 처리된 것을 -는 물질이 처리되지 않은 것을 나타낸다.

도 4를 참조하면, 니코틴으로만 처리된 대조군에 비해 옥시레스베라트롤(OXY, 도 4B), 레스베라트롤(RES, 도 4A), 옥시레스베라트롤과 레스베라트롤의 혼합물(RES+OXY, 도 4C)을 처리한 실험군들에서는 지표물질의 농도가 증가할수록 세포 생존도가 증가 즉, 세포독성 보호효과가 증가함을 확인할 수 있다. 또한, 니코틴으로만 처리된 대조군에 비해 청미래딩굴 뿌리 추출물(EESC)를 처리한 실험군(도 4D)에서도 역시 세포 생존도가 증가 즉, 세포독성 보호효과가 증가함을 확인할 수 있다. 한편, 청미래딩굴 뿌리 추출물(EESC) 내에 함유된 레스베라트롤과 옥시레스베라트롤의 농도가 각각 2.1 μ M과 0.5 μ M로 다른 실험군들에 비해 약 10배 이상 낮은 농도임에도 불구하고 세포독성 보호효과는 거의 유사하게 나타났다.

<평가예 3: 제조예 1에 따른 청미래딩굴 뿌리 추출물 내 기능성 지표물질의 니코틴에 기인한 산화적 손상물 생성 억제능 평가(DCFH-DA assay)>

DCFH-DA(dichlorofluorescein diacetate) 시험법을 이용하여 청미래딩굴 뿌리 추출물의 주요 기능성 지표물질인 옥시레스베라트롤과 레스베라트롤의 니코틴에 기인한 산화적 손상물 생성 억제능을 평가하였다. 비극성이고 전하를 띄지 않는 DCFH-DA는 세포막을 쉽게 통과하여 세포질로 들어가면 세포 내 효소인 에스테라아제(esterase)에 의해 형광을 내지 않는 2',7'-dichlorofluorescein(DCFH)이 되고, DCFH는 세포 내에서 발생하는 다양한 활성 산소에 의해 산화되어 형광을 내는 2',7'-dichlorofluorescein(DCF)로 된다. 측정된 형광의 수준은 세포 내 산화 정도와 비례하기 때문에, 상기 원리를 이용하여 상기 지표물질이 니코틴으로 인한 간세포의 산화적 손상에 미치는 영향을 평가하였다.

한국세포주은행에서 분주 받은 HepG2(passage # 99-100) 세포를 계대 배양한 후, 96 웰 플레이트에 1×10^5 cell의 밀도로 분주하여 24시간 동안 5% CO₂, 37℃의 조건에서 배양한 후, 배지를 제거하였다. 50, 100, 및 250 μ M의 옥시레스베라트롤(Sigma-Aldrich 사), 50, 100, 및 250 μ M의 레스베라트롤(Sigma-Aldrich 사), 50 및 100 μ M의 옥시레스베라트롤과 레스베라트롤의 혼합물(몰비=1:1), 및 제조예 1에 따른 청미래딩굴 뿌리 추출물(농도는 1.8mg/ml, 레스베라트롤 2.1 μ M, 옥시레스베라트롤 0.5 μ M)을 각각 처리한 실험군들을 2시간 동안 배양하였다. 한편, 옥시레스베라트롤 또는 레스베라트롤을 처리하지 않은 군을 대조군으로 하였다. 그 후, IC₅₀ 농도의 니코틴을 각 실험군들 및 대조군에 처리하고 24시간 동안 배양시키고, 트립신(trypsin) EDTA를 분주하여 세포를 떼어내고 5 μ M DCFH-DA 시약을 처리하였다. 30분 뒤, 488 nm(여기, excitation), 525 nm(발광, emission) 파장에서 형광을 멀티마이크로플레이트 리더(Thermo scientific)로 측정하였다.

도 5는 평가예 3에 따른 실험군들 및 대조군에서의 DCF 상대적 형광 정도(DCF relative fluorescence

intensity)를 나타낸 그래프이다. RES는 레스베라트롤을, OXY는 옥시레스베라트롤을, RES+OXY는 레스베라트롤과 옥시레스베라트롤의 혼합물을, 그리고 EESC는 청미래덩굴 뿌리 추출물을 나타낸다. 또한, +는 물질이 처리된 것을 -는 물질이 처리되지 않은 것을 나타낸다.

[0072]

도 5를 참조하면, 니코틴으로만 처리된 대조군에 비해 옥시레스베라트롤(OXY, 도 5B), 레스베라트롤(RES, 도 5A), 옥시레스베라트롤과 레스베라트롤의 혼합물(RES+OXY, 도 5C)을 처리한 실험군들에서는 지표물질의 농도가 증가할수록 DCF 상대적 형광 정도가 감소 즉, 니코틴으로 인한 산화적 손상물이 감소하는 경향을 보임을 확인할 수 있다. 또한, 니코틴으로만 처리된 대조군에 비해 청미래덩굴 뿌리 추출물(EESC)을 처리한 실험군(도 5D)에서도 역시 DCF 상대적 형광 정도가 감소 즉, 니코틴으로 인한 산화적 손상물이 감소함을 확인할 수 있다. 한편, 청미래덩굴 뿌리 추출물(EESC) 내에 함유된 레스베라트롤과 옥시레스베라트롤의 물농도가 각각 2.1 μ M과 0.5 μ M로 다른 실험군들에 비해 약 10배 이상 낮은 농도임에도 불구하고 산화적 손상을 감소효과는 거의 유사하게 나타났다.

[0073]

<평가예 4: 제조예 1에 따른 청미래덩굴 뿌리 추출물 내 기능성 지표물질의 니코틴에서 코티닌으로의 전환률 평가(코티닌 정량법)>

[0074]

청미래덩굴 뿌리 추출물의 주요 기능성 지표물질인 옥시레스베라트롤과 레스베라트롤에 의한 니코틴에서 코티닌으로의 전환률을 평가하였다.

[0075]

한국세포주은행에서 분주 받은 HepG2(passage # 99-100) 세포를 계대 배양한 후, 96 웰 플레이트에 분주하여 100% 컨플루언시(confluency)에 이르기까지 5% CO₂, 37℃의 조건에서 배양한 후, 배지를 제거 하였다. 그 후, HepG2 세포에 1 mM 니코틴이 함유된 배지를 사용하여 1일간 배양하였다. 그 후, 50, 100, 및 250 μ M의 옥시레스베라트롤(Sigma-Aldrich 사), 50, 100, 및 250 μ M의 레스베라트롤(Sigma-Aldrich 사), 50 및 100 μ M의 옥시레스베라트롤과 레스베라트롤의 혼합물(물비=1:1), 및 제조예 1에 따른 청미래덩굴 뿌리 추출물(농도는 1.8mg/ml, 레스베라트롤 2.1 μ M, 옥시레스베라트롤 0.5 μ M)을 각각 처리하여 실험군들을 구분하고, 옥시레스베라트롤 또는 레스베라트롤을 처리하지 않은 군을 대조군으로 하였다. 실험군들 및 대조군을, 니코틴의 반감기가 2시간 임을 고려하여, 10, 20, 30, 60, 90, 및 120분이 경과하는 시점에서 반응을 종료시켰다. 그 후, 트립신(trypsin) EDTA를 분주하여 세포를 떼어내고, 항원심분리를 이용하여 세포를 수거한 후, PBS 100 μ l를 넣고 초음파 분쇄기를 이용하여 30초간 파쇄하였다. 파쇄된 세포에 100 μ l의 4M 소듐 아세테이트 버퍼(sodium acetate buffer, pH 4.7), 40 μ l의 1.5M 시안화 칼륨(potassium cyanide), 40 μ l의 0.4M 클로라민 T(chloramine T), 200 μ l의 78 mM 바르비투르산(barbituric acid, in acetone/water(50/50))를 순서대로 넣고 10초 동안 혼합한 후, 상온에서 15분 동안 반응시켰다. 그 후, 40 μ l의 1M 메타중아황산나트륨(sodium metabisulfite)를 넣어 반응을 중지시키고, 490 nm의 파장에서 흡광도를 멀티마이크로플레이트 리더(Thermo scientific)로 측정하여 코티닌 시료의 표준곡선과 비교하여 정량하였다.

[0076]

도 6은 평가예 4에 따른 실험군들 및 대조군의 배양시간에 대한 코티닌 함량을 나타낸 그래프이다. RES는 레스베라트롤을, OXY는 옥시레스베라트롤을, RES+OXY는 레스베라트롤과 옥시레스베라트롤의 혼합물을, 그리고 EESC는 청미래덩굴 뿌리 추출물을 나타낸다.

[0077]

도 6을 참조하면, 니코틴으로만 처리된 대조군에 비해 옥시레스베라트롤(OXY, 도 6B), 레스베라트롤(RES, 도 6A), 옥시레스베라트롤과 레스베라트롤의 혼합물(RES+OXY, 도 6C), 및 청미래덩굴 뿌리 추출물(EESC)을 처리한 실험군들에서, 코티닌 전환률이 증가함을 확인할 수 있다. 그러나, 청미래덩굴 뿌리 추출물(EESC)을 처리한 실험군(도 6D)이 가장 높은 코티닌 전환률을 보임을 알 수 있다. 이에 더하여, 청미래덩굴 뿌리 추출물(EESC) 내에 함유된 레스베라트롤과 옥시레스베라트롤의 물농도가 각각 2.1 μ M과 0.5 μ M로 다른 실험군들에 비해 약 10배 이상 낮은 농도임에도 불구하고 코티닌 전환률은 오히려 더 높은 것으로 나타났다.

[0078]

<평가예 5: 제조예 1에 따른 청미래덩굴 뿌리 추출물 내 기능성 지표물질에 대한 CYP2A6 효소의 발현 정도 평가>

[0079]

CYP2A6 효소는 간에서 니코틴을 코티닌으로 전환시키는데 관여하는 효소로서, CYP2A6 효소의 발현정도로 기능성 지표물질이 코티닌 전환에 관여하는 정도를 평가할 수 있다.

- [0080] 한국세포주은행에서 분주 받은 HepG2(passage # 99-100) 세포를 계대 배양한 후, 96 웰 플레이트에 1×10^5 cell의 밀도로 분주하여 24시간 동안 5% CO₂, 37℃의 조건에서 배양한 후, 배지를 제거하였다. 평가에 4에 따른 코티닌 정량법 평가에서 높은 효능을 보인 250 μM의 레스베라트롤(Sigma-Aldrich 사), 250 μM의 옥시레스베라트롤(Sigma-Aldrich 사), 100 μM의 옥시레스베라트롤과 레스베라트롤의 혼합물(몰비=1:1), 및 제조예 1에 따른 청미래덩굴 뿌리 추출물(농도는 1.8mg/ml, 레스베라트롤 2.1 μM, 옥시레스베라트롤 0.5 μM)을 상기 HepG2 세포에 전처리 한 실험군들을 120분 동안 배양하였다. 한편, 옥시레스베라트롤 또는 레스베라트롤을 처리하지 않은 군을 대조군으로 하였다. 배양된 세포에 트립신 EDTA를 분주하여 세포를 떼어내고 1500g에서 5분 동안 원심분리한 후 상층액을 제거하였다. 원심분리를 통해 얻어진 세포에 트라이졸(Trizol)을 이용하여 총 RNA를 추출하고, iScript cDNA 합성 키트(iScript cDNA synthesis kit)를 이용하여 RNA와 상보적 결합을 하는 cDNA를 합성하였다. 합성된 cDNA를 Stratagene MX3005P를 이용하여 CYP2A6 효소의 발현 정도를 평가하였다.
- [0081] 도 7은 평가에 5에 따른 실험군들 및 대조군에서의 CYP2A6 효소 발현 정도를 나타낸 그래프이다. RES는 레스베라트롤을, OXY는 옥시레스베라트롤을, RES+OXY는 레스베라트롤과 옥시레스베라트롤의 혼합물을, 그리고 EESC는 청미래덩굴 뿌리 추출물을 나타낸다.
- [0082] 도 7을 참조하면, 니코틴으로만 처리된 대조군(Cont)에 비해 옥시레스베라트롤(OXY), 레스베라트롤(RES), 옥시레스베라트롤과 레스베라트롤의 혼합물(RES+OXY), 및 청미래덩굴 뿌리 추출물(EESC)을 처리한 실험군들 모두에서 CYP2A6 효소 발현 정도의 증가를 확인 할 수 있다. 구체적으로, 실험군들에서는 대조군에 비해 최소 2.9배에서 최대 10.4배까지 CYP2A6 효소 발현 정도가 증가하였으며, 특히 청미래덩굴 뿌리 추출물(EESC) 내에 함유된 레스베라트롤과 옥시레스베라트롤의 몰농도가 각각 2.1 μM과 0.5 μM로 다른 실험군들에 비해 약 10배 이상 낮은 농도임에도 불구하고 청미래덩굴 뿌리 추출물(EESC)을 처리한 실험군의 경우에는 가장 높은 효소 발현 정도를 보여준다. 이는 청미래덩굴 뿌리 추출물(EESC) 내의 옥시레스베라트롤과 레스베라트롤의 다른 여러 가지 생리활성 물질로 인해, 상승효과가 나타난 것으로 보인다. 이를 통해, 청미래덩굴 뿌리 추출물은 간에서 CYP2A6 효소의 발현 유도를 통해, 니코틴에서 코티닌으로의 대사에 중요한 역할을 하는 것을 확인할 수 있다.
- [0083] <평가에 6: 제조예 1에 따른 청미래덩굴 뿌리 추출물 내 기능성 지표물질의 알코올에 기인한 간세포 독성에 대한 보호능 평가(MTT Assay)>
- [0084] MTT 시험법을 이용하여 청미래덩굴 뿌리 추출물의 주요 기능성 지표물질인 옥시레스베라트롤과 레스베라트롤의 알코올에 기인한 간세포 독성 보호능을 평가하였다. MTT 시험법에 대한 일반적 설명은 평가에 2를 참조하기로 한다.
- [0085] 한국세포주은행에서 분주 받은 HepG2(passage # 16-20) 세포를 계대 배양한 후, 96 웰 플레이트에 1×10^4 cell의 밀도로 분주하여 24시간 동안 5% CO₂, 37℃의 조건에서 배양하였다. 24시간이 지난 후, 50, 100, 및 250 μM의 옥시레스베라트롤(Sigma-Aldrich 사), 50, 100, 및 250 μM의 레스베라트롤(Sigma-Aldrich 사), 및 50, 100, 및 250 μM의 옥시레스베라트롤과 레스베라트롤의 혼합물(몰비=1:1)을 각각 처리한 실험군들을 2시간 동안 배양하였다. 이 때, 옥시레스베라트롤 또는 레스베라트롤을 처리하지 않은 군을 대조군으로 하였다. 그 후, IC₅₀ 농도의 에탄올 수용액(50%)을 각 실험군들 및 대조군에 처리하고, 24시간 동안 배양시킨 후, 배지를 제거한 다음 MTT 시약(MTT, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-diphenyltetrazolium bromide)을 처리하여 4시간 동안 배양하였다. 그 후, 배지를 제거하고 DMSO 시약을 처리하고, 570nm 파장에서 흡광도를 멀티마이크로플레이트 리더(Thermo scientific)로 측정하였다. 또한, 상기 수확식을 이용하여 세포 생존도를 측정하였다.
- [0086] 도 8은 평가에 6에 따른 실험군들 및 대조군의 농도별 흡광도를 나타낸 그래프이다. RES는 레스베라트롤을, OXY는 옥시레스베라트롤을, 그리고 RES+OXY는 레스베라트롤과 옥시레스베라트롤의 혼합물을 나타낸다.
- [0087] 도 8을 참조하면, 알코올만 처리된 대조군(Control)에 비해 옥시레스베라트롤(OXY), 레스베라트롤(RES), 옥시레스베라트롤과 레스베라트롤의 혼합물(RES+OXY)을 처리한 실험군들에서는 지표물질의 농도가 증가할수록 흡광도가 증가하는 것으로 미루어보아, 알코올에 기인하는 세포독성에 대한 보호효과가 증가함을 확인할 수 있다.

- [0088] <평가에 7: 제조에 1에 따른 청미래당굴 뿌리 추출물 내 기능성 지표물질의 알코올에 기인한 산화적 손상물 생성 억제효능 평가(DCFH-DA assay)>
- [0089] DCFH-DA(dichlorofluorescein diacetate) 시험법을 이용하여 청미래당굴 뿌리 추출물의 주요 기능성 지표물질인 옥시레스베라트롤과 레스베라트롤의 알코올에 기인한 산화적 손상물의 생성 억제능을 평가하였다. DCFH-DA 시험법에 대한 일반적 설명은 평가에 3을 참조하기로 한다.
- [0090] 한국세포주은행에서 분주 받은 HepG2(passage # 16-20) 세포를 계대 배양한 후, 96 웰 플레이트에 1×10^5 cell의 밀도로 분주하여 24시간 동안 5% CO₂, 37℃의 조건에서 배양한 후, 배지를 제거하였다. 50, 100, 및 250 μM의 옥시레스베라트롤(Sigma-Aldrich 사), 50, 100, 및 250 μM의 레스베라트롤(Sigma-Aldrich 사), 50, 100, 및 250 μM의 옥시레스베라트롤과 레스베라트롤의 혼합물(물비=1:1)을 각각 처리한 실험군들을 2시간 동안 배양하였다. 이 때, 옥시레스베라트롤 또는 레스베라트롤을 처리하지 않은 군을 대조군으로 하였다. 그 후, IC₅₀ 농도의 에탄올을 각 실험군들 및 대조군에 처리하고 24시간 동안 배양하였다. 그 후, 트립신 EDTA를 분주하여 세포를 떼어내고 5 μM DCFH-DA 시약을 처리하였다. 30분 뒤, 488 nm(여기), 525 nm(발광) 파장에서 형광을 멀티마이크로플레이트 리더(Thermo scientific)로 측정하였다.
- [0091] 도 9는 평가에 7에 따른 실험군들 및 대조군에서의 상대적 DCF 형광 정도(relative DCF fluorescence intensity)를 나타낸 그래프이다. RES는 레스베라트롤을, OXY는 옥시레스베라트롤을, 그리고 RES+OXY는 레스베라트롤과 옥시레스베라트롤의 혼합물을 나타낸다.
- [0092] 도 9를 참조하면, 알코올로만 처리된 대조군에 비해, 옥시레스베라트롤(OXY), 레스베라트롤(RES), 옥시레스베라트롤과 레스베라트롤의 혼합물(RES+OXY)을 처리한 실험군들에서는 상대적 DCF 형광 정도가 감소 즉, 알코올으로 인한 산화적 손상물이 감소하는 것을 확인할 수 있다. 특히, 250 μM 농도에서 가장 높은 산화적 손상물 예방효과를 나타냄을 확인할 수 있다.
- [0093] <청미래당굴 뿌리 추출물을 함유하는 음료 조성물 제조에 1>
- [0094] 청미래당굴 뿌리 추출물 제조에 1로부터 얻은 추출물(농축액)(밀도 18mg/ml, 옥시레스베라트롤: 310.3 ppm, 레스베라트롤: 1204.8 ppm 함유), 6 brix 레몬 농축액, 자일리톨, 페퍼민트, 및 구연산을 하기 표 1에 나타난 비율로 혼합한 후, 나머지를 물로 채워 청미래당굴 뿌리 추출물을 함유하는 음료 조성물 100 ml를 제조하였다. 이와 같은 과정으로 통해 제조된 본 발명의 음료 조성물은 최종적으로 옥시레스베라트롤을 31.03 ppm의 농도로 포함하고, 레스베라트롤을 120.48 ppm의 농도로 포함하게 된다.

표 1

		청미래당굴 뿌리 추출물 (농도: 18mg/ml)	레몬 농축액	자일리톨	페퍼민트	구연산
음료 1	함유 질량	0.18g	1.4g	5.8g	0.01g	0.05g
	중량부	100 중량부	778 중량부	3222 중량부	5.56 중량부	27.78 중량부
	음료 내 농도 (wt/v)	0.18%	1.4%	5.8%	0.01%	0.05%
음료 2	함유 질량	0.18g	1.6g	6.3g	0.015g	0.07g
	중량부	100 중량부	889 중량부	3500 중량부	8.33 중량부	38.89 중량부
	음료 내 농도 (wt/v)	0.18%	1.6%	6.3%	0.015%	0.07%
음료 3	함유 질량	0.18g	1.8g	6.8g	0.02g	0.09g
	중량부	100 중량부	1000 중량부	3778 중량부	11.11 중량부	50 중량부
	음료 내 농도 (wt/v)	0.18%	1.8%	6.8%	0.02%	0.09%

음료 4	함유 질량	0.18g	2.0g	7.3g	0.025g	0.11g
	중량부	100 중량부	1111 중량부	4056 중량부	13.89 중량부	61.11 중량부
	음료 내 농도 (wt/v)	0.18%	2.0%	7.3%	0.025%	0.11%
음료 5	함유 질량	0.18g	2.2g	7.8g	0.03g	0.13g
	중량부	100 중량부	1222 중량부	4333 중량부	16.67 중량부	72.22 중량부
	음료 내 농도 (wt/v)	0.18%	2.2%	7.8%	0.03%	0.13%

[0096] 도 10은 청미래덩굴 뿌리 추출물을 함유하는 음료 조성물 제조에 1에 따른 음료들의 관능정도를 나타낸 그래프이다.

[0097] 관능정도는, 훈련된 관능요원 25명에게 음료 조성물 제조에 1에 따른 음료들 1 내지 5을 공급한 후, 달콤한 맛, 상큼한 맛, 신 맛, 상쾌한 맛, 청량감, 및 쓴 맛을 기준으로 매우 좋지 않음 (1 점)에서 매우 좋음 (7점)으로 7 점 척도법을 사용하여 평가한 후, 각 음료에 대한 평균 점수를 구하였다.

[0098] 도 10 및 표 1을 참조하면, 청미래덩굴 뿌리 추출물을 함유하는 음료 조성물 제조에 1에 따른 음료들 1 내지 5은 선택도 3 이상의 양호한 관능정도를 나타냄을 알 수 있다. 이로부터, 상기 음료 조성물에, 청미래덩굴 뿌리 추출물이 약 0.18%(w/v)로 첨가되고, 구연산이 약 0.05 내지 약 0.13%(w/v), 자일리톨이 약 5.8 내지 약 7.8%(w/v), 레몬 농축액이 약 1.4 내지 약 2.2%(w/v), 페퍼민트가 약 0.01 내지 0.03%(w/v), 그리고 잔부의 물이 함유될 때, 상기 음료 조성물은 양호한 관능정도를 나타냄을 알 수 있다.

[0099] 이에 더하여, 음료들 2와 3의 경우에는 다른 음료들에 비해 월등히 향상된 관능정도를 나타낸다. 이러한 결과로부터, 상기 음료 조성물에, 청미래덩굴 뿌리 추출물이 약 0.18%(w/v)로 첨가되고, 구연산이 약 0.07 내지 약 0.09%(w/v), 자일리톨이 약 6.3 내지 약 6.8%(w/v), 레몬 농축액이 약 1.6 내지 약 1.8%(w/v), 페퍼민트가 약 0.015 내지 0.02%(w/v), 그리고 잔부의 물이 함유될 때, 상기 음료 조성물은 관능정도는 더욱 향상됨을 알 수 있다.

[0100] 추가적으로, 선호하는 제품의 용량 및 가격을 조사한 결과 350ml에 1200원이 적절한 것으로 조사되었다.

[0101] <청미래덩굴 뿌리 추출물 제조에 2;

[0102] 분쇄미 100중량부에 대해 2중량부의 청미래덩굴 뿌리분말을 사용>

[0103] 한국 충청북도 음성군 지역에서 청미래덩굴 뿌리를 채취하여 증류수로 세척한 후, 동결건조하고, 곱게 분쇄하여 -20℃에서 보관하였다. 상기 청미래덩굴 뿌리 분말 6g, 분쇄 미 300g, 아스퍼질러스 우사미(*Aspergillus usami*) 2.5g, 파리지엔느(*Ra parisienne*) 1g, 및 증류수 600ml를 혼합하여, 분쇄 미 100중량부에 대해 상기 청미래덩굴 뿌리 분말이 2 중량부를 갖는 혼합물을 제조하였다. 이 혼합물을 알코올도수가 18%가 되도록 24℃에서 9일 동안 발효시켰다. 이 과정에서, 1, 3, 5, 7, 및 9일에 발효주를 채취하였다.

[0104] <청미래덩굴 뿌리 추출물 제조에 3:

[0105] 분쇄미 100중량부에 대해 4중량부의 청미래덩굴 뿌리분말을 사용>

[0106] 청미래덩굴 뿌리 분말 12g, 분쇄 미 300g, 아스퍼질러스 우사미(*Aspergillus usami*) 2.5g, 파리지엔느(*Ra parisienne*) 1g, 및 증류수 600ml를 혼합하여, 분쇄 미 100중량부에 대해 상기 청미래덩굴 뿌리 분말이 4 중량부를 갖는 혼합물을 제조한 것을 제외하고는 청미래덩굴 뿌리 추출물 제조에 2와 동일한 방법으로 발효주를 만들고 채취하였다.

[0107] <비교예>

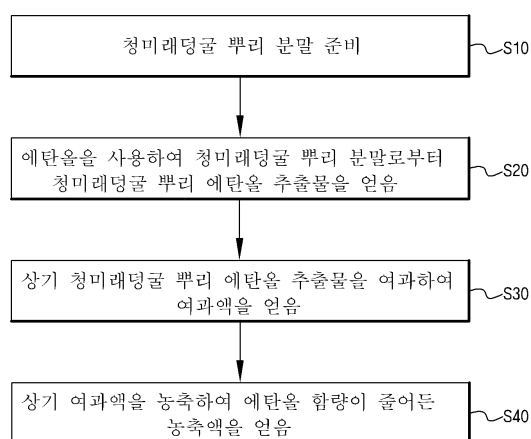
[0108] 청미래덩굴 뿌리 분말을 넣지 않은 것을 제외하고는 청미래덩굴 뿌리 추출물 제조에 2와 동일한 방법으로 발효주를 만들고 채취하였다.

- [0109] <평가에 8: 제조에 2에 따른 청미래덩굴 뿌리 추출물의 기능성 물질 분리 및 동정>
- [0110] 청미래덩굴 뿌리 추출물 제조에 2로부터 얻은 발효주(3 일차에 채취)를 평가에 1과 동일한 분석조건에서 분석하여 발효주 내의 기능성 물질을 분리하였다.
- [0111] 도 11은 평가에 8에 따른 청미래덩굴 뿌리 추출물의 기능성 물질 분리 및 동정결과를 나타낸 그래프이다.
- [0112] 도 11을 참조하면, 주요 기능성 지표물질인 옥시레스베라트롤과 레스베라트롤은 머무름 시간 2.72분과 3.96분에서 각각 분리되었다. MS 분석에서는 m/z 243.24 $[M-H]^-$, 227.24 $[M-H]^-$ 가 각각 검출되어 옥시레스베라트롤과 레스베라트롤을 검증하였다.
- [0113] <평가에 9: 제조에 2에 따른 청미래덩굴 뿌리 추출물의 기능성 물질 분리 및 동정>
- [0114] 청미래덩굴 뿌리 추출물 제조에 2로부터 얻은 발효주(9 일차에 채취)를 평가에 1과 동일한 분석조건에서 분석하여 발효주 내의 기능성 물질을 분리하였다.
- [0115] 도 12는 평가에 9에 따른 청미래덩굴 뿌리 추출물의 기능성 물질 분리 및 동정결과를 나타낸 그래프이다.
- [0116] 도 12를 참조하면, 주요 기능성 지표물질인 옥시레스베라트롤과 레스베라트롤(또는 피세이드(piceid))은 머무름 시간 3.6분과 5.0분에서 각각 분리되었다. MS 분석에서는 m/z 245.07 $[M-H]^+$, 229.44 $[M-H]^+$, 및 392.57 $[M-H]^+$ 가 각각 검출되어 옥시레스베라트롤, 레스베라트롤, 및 피세이드를 검증하였다.
- [0117] <평가에 9: 제조에 2, 제조에 3, 및 비교예에 따른 발효주 내 레스베라트롤과 옥시레스베라트롤의 함량 변화 분석>
- [0118] 제조에 2, 제조에 3, 및 비교예에 따른 발효주들로부터 1, 3, 5, 7, 및 9일에 채취된 부분을 상기 평가에 8의 분석을 통해 함량을 각각 분석하였고 그 결과를 도 13 및 도 14에 나타내었다.
- [0119] 도 13 및 도 14는 제조에 2, 제조에 3, 및 비교예에 따른 발효주들로부터 1, 3, 5, 7, 및 9일에 채취된 부분 내 레스베라트롤 및 옥시레스베라트롤의 함량 변화를 각각 분석한 그래프들이다.
- [0120] 도 13 및 도 14를 참조하면, 기능성 물질인 레스베라트롤 및 옥시레스베라트롤의 함량이 발효일 1일 이후부터 5일 사이에는 증가였다. 구체적으로, 제조에 2 (분쇄미 중량 대비 2%의 청미래덩굴 뿌리분말 사용; 2%로 표시됨) 및 제조에 3 (분쇄미 중량 대비 4%의 청미래덩굴 뿌리분말 사용; 4%로 표시됨)에 따른 발효주의 1일에서 5일 사이에 옥시레스베라트롤의 함량은 각각 3.98배와 6.16배가 증가되었으며, 제조에 2 및 제조에 3에 따른 발효주의 1일에서 5일 사이에 레스베라트롤의 함량은 각각 2.28배와 2.64배가 증가하였다.
- [0121] 그러나, 5일 이후부터는 레스베라트롤 및 옥시레스베라트롤의 함량의 변화에서 유의적 차이를 나타내지 않는 양상을 나타내었다. 그 대신, 상기 평가에 9에서와 같이 5일 이후부터는 피세이드가 검출되었다.
- [0122] 제조에 2 및 제조에 3의 발효 기간 9일 차에서 채취된 발효주 내 옥시레스베라트롤의 함량은 각각 0.59 $\mu\text{g/mL}$ 과 1.65 $\mu\text{g/mL}$ 이었다(도 13). 또한, 제조에 2 및 제조에 3의 발효 기간 9일 차에서 채취된 발효주 내 레스베라트롤의 함량은 각각 3.29 $\mu\text{g/mL}$ 과 4.6 $\mu\text{g/mL}$ 이었다(도 12). 제조에 3에 따른 발효주는 제조에 2에 따른 발효주에 비해 옥시레스베라트롤 함량이 1.5 내지 2.95배 더 높았고, 레스베라트롤 함량은 1.16 내지 1.47배 더 높았다. 이를 통해 누룩곰팡이(*Aspergillus usami*)와 효모(*Ra parisienne*)를 사용한 쌀 전분의 당화 및 발효로 인해 생성된 에탄올이 청미래 덩굴 뿌리의 주요 생리활성물질을 효율적으로 추출한 것을 알 수 있다.

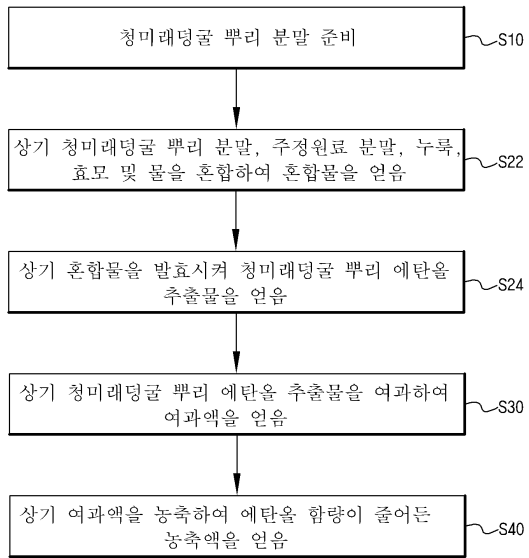
- [0123] <평가예 10: 제조예 2, 제조예 3, 및 비교예에 따른 발효주의 자유라디칼 소거활성 평가(ABTS Assay)>
- [0124] ABTS(2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid)) 시험법을 이용하여 자유라디칼 소거활성을 평가하였다.
- [0125] 0.1mM AAPH (2,2-azo-bis(2-methylpropion amidine) dihydrochloride)와 2.5mM ABTS를 100mM PBS (phosphate buffer solution)에 용해한 후, 70℃에서 60분간 반응시켜 ABTS 자유라디칼을 생성하였다. 이 후, 이를 실온에서 서서히 냉각시켰다. 그 후, 0.2 μ m로 필터한 ABTS 자유라디칼 용액을 734 nm에서 흡광도가 0.65 ± 0.02 가 되도록 PBS로 희석하였다. ABTS 자유라디칼 용액 980 μ l와 발효기간 1, 3, 5, 7, 및 9일에 채취한 제조예 2와 제조예 3에 따른 청미래 덩굴 뿌리 발효주들의 각각을 20 μ l 씩 혼합하여 37℃에서 10분간 반응시켜 734 nm에서 멀티마이크로플레이트 리더(multimicroplate reader_Thermo Scientific 사)를 사용하여 흡광도를 측정하여 검정하였다. 그 후, 기존의 항산화제인 비타민 C의 각 부분표본(20 μ l)을 ABTS 자유라디칼 용액 980 μ l에 반응시켜 대조군으로서 비교하였다.
- [0126] 도 15는 제조예 2, 제조예 3, 및 비교예에 따른 발효주들로부터 1, 3, 5, 7, 및 9일에 채취된 부분의 항산화용량 및 비타민 C 등가 항산화용량(vitamin C equivalent antioxidant capacity; VCEAC)를 각각 분석한 그래프들이다.
- [0127] 도 15를 참조하면, 항산화용량 및 비타민 C 등가 항산화용량은 발효기간 3일차부터는 더 이상 증가하지 않는 것으로 나타났다. 또한, 전체 항산화용량은 청미래덩굴 뿌리 함량이 높을수록 향상되는 것으로 나타났으나, 비타민 C 등가 항산화용량에서는 제조예 2(분쇄미 중량 대비 2%의 청미래덩굴 뿌리분말 사용; 2%로 표시됨)이 경우가 그 보다 청미래덩굴 뿌리 함유량이 많은 제조예 3(분쇄미 중량 대비 4%의 청미래덩굴 뿌리분말 사용; 4%로 표시됨)에 비해 높게 나타났다. 이로부터, 전체 항산화용량은 비타민 C외에 옥시레즈베라트롤과 레즈베라트롤에 의해 증가된 것을 알 수 있다.
- [0128] 이상, 본 발명을 바람직한 실시예를 들어 상세하게 설명하였으나, 본 발명은 상기 실시예에 한정되지 않고, 본 발명의 기술적 사상 및 범위 내에서 당 분야에서 통상의 지식을 가진 자에 의하여 여러가지 변형 및 변경이 가능하다.

도면

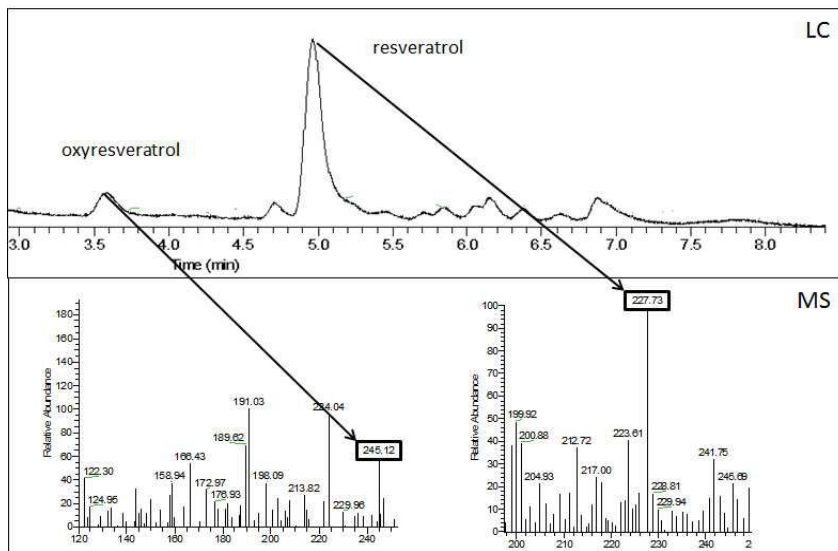
도면1



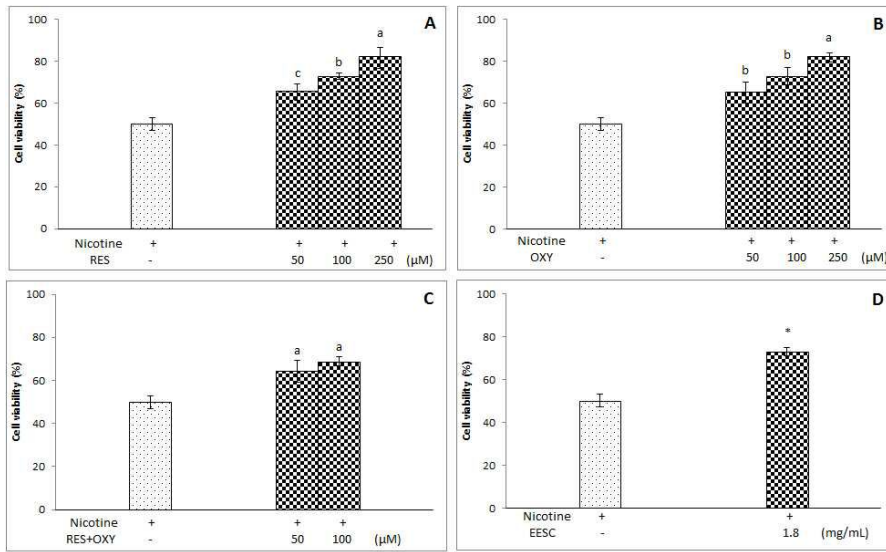
도면2



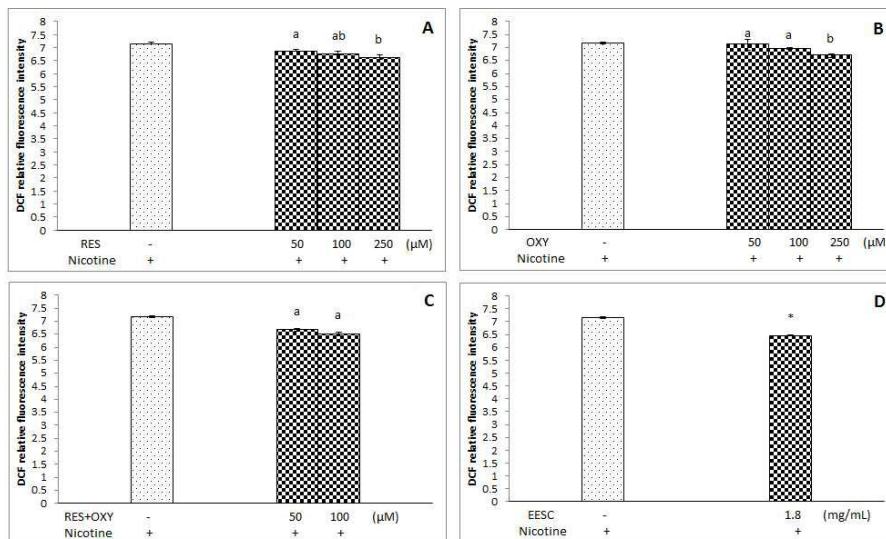
도면3



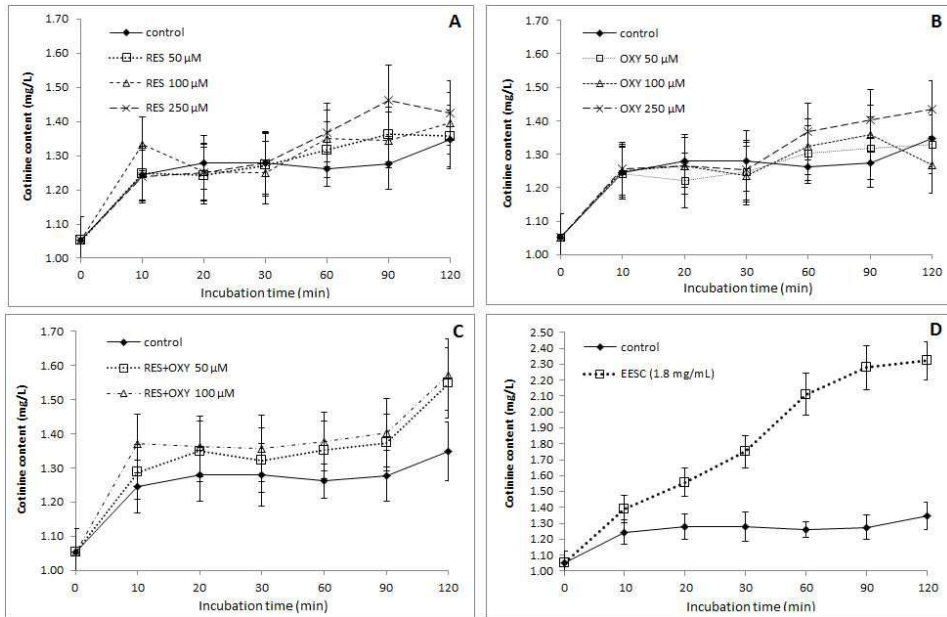
도면4



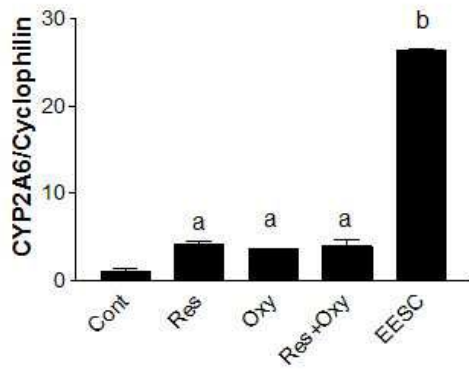
도면5



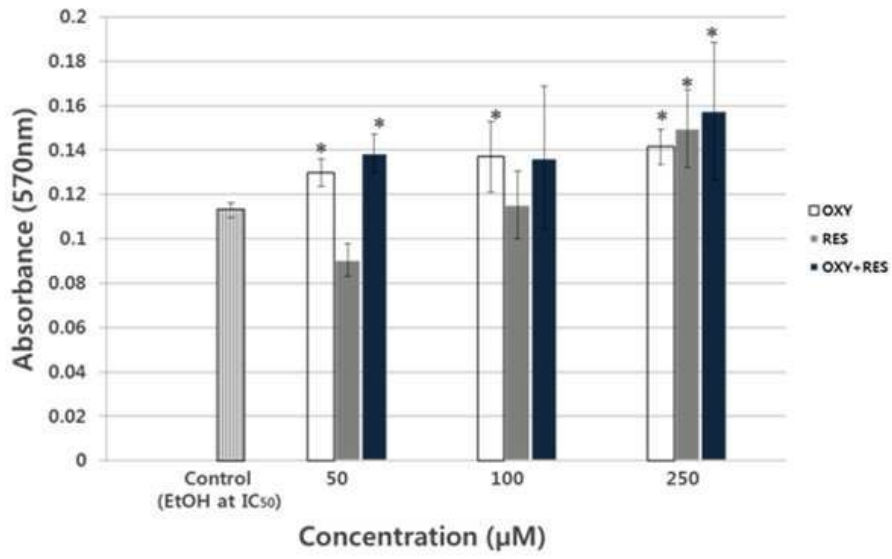
도면6



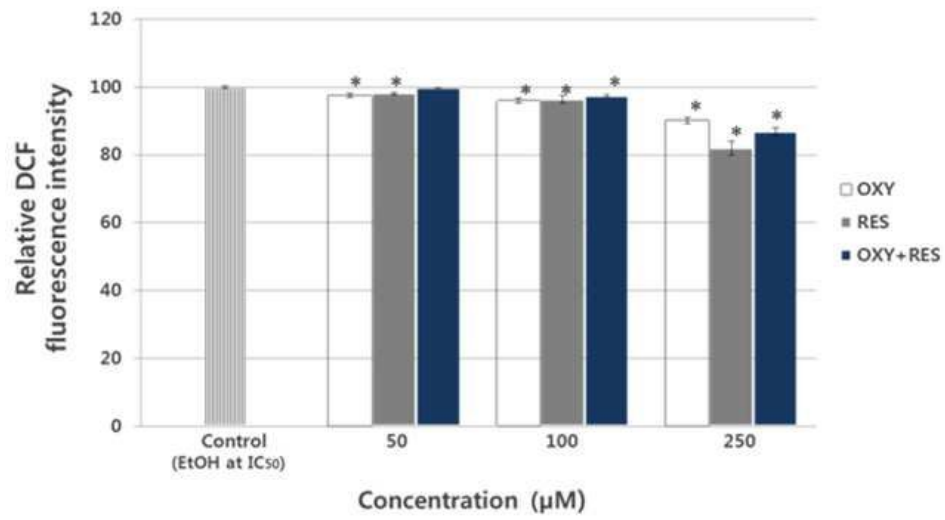
도면7



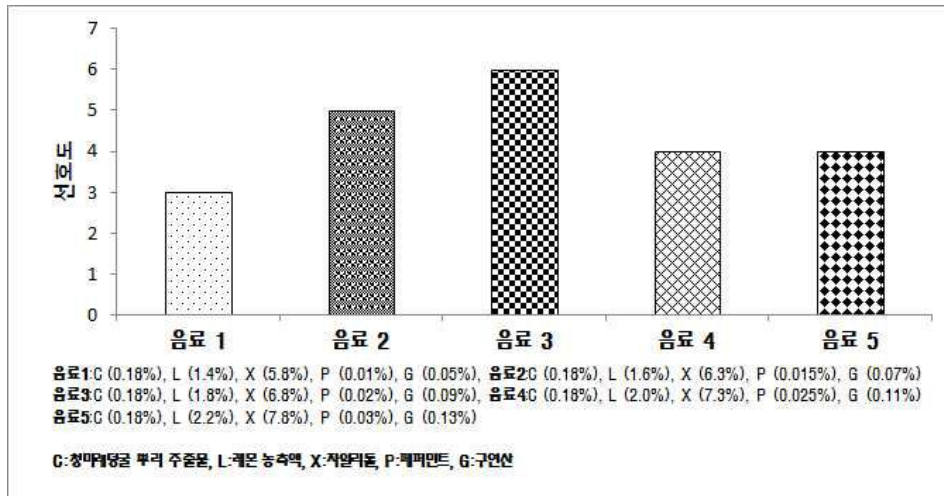
도면8



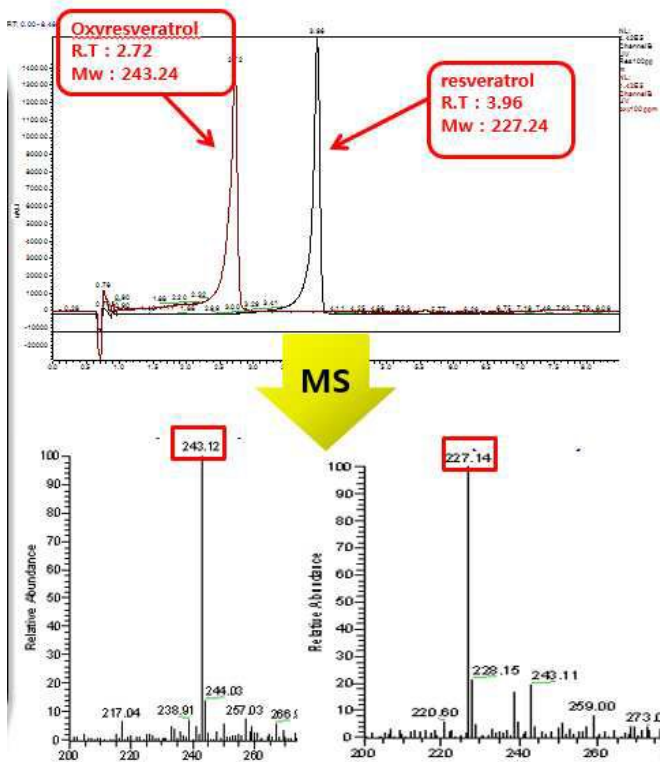
도면9



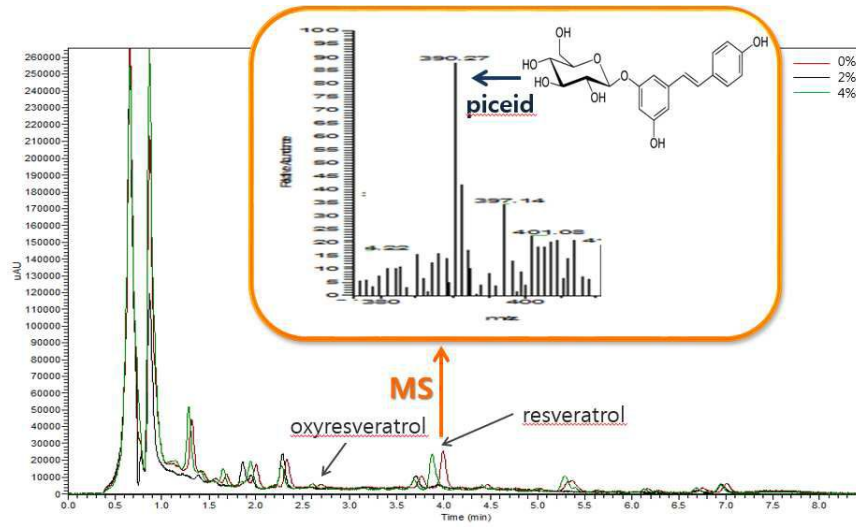
도면10



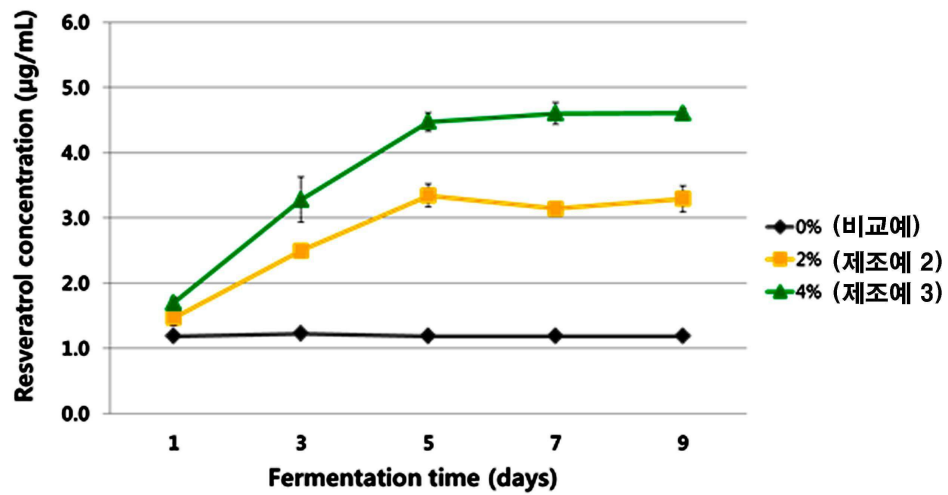
도면11



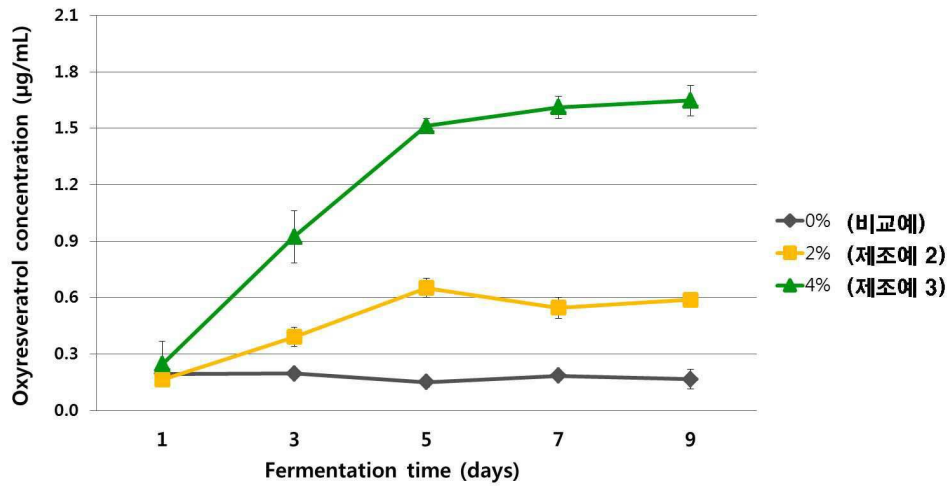
도면12



도면13



도면14



도면15

