



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2014-0040610
(43) 공개일자 2014년04월03일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A23F 3/10 (2006.01) A23F 3/14 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2013-0044584
(22) 출원일자 2013년04월23일
심사청구일자 2013년04월23일
(30) 우선권주장
1020120106944 2012년09월26일 대한민국(KR)

(71) 출원인
명지대학교 산학협력단
경기도 용인시 처인구 명지로 116 (남동, 명지대학교)
(72) 발명자
서주원
경기 용인시 처인구 포곡읍 석성로850번길 84, 에버힐 1단지 1호
김순동
대구광역시 수성구 명덕로 455 108동 1691호
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
임상엽, 고영갑, 권정기

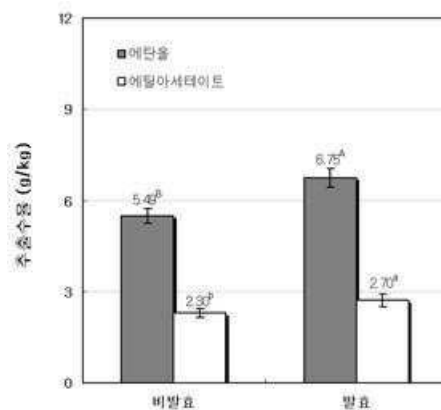
전체 청구항 수 : 총 20 항

(54) 발명의 명칭 발효 청미래당굴 잎, 이의 제조방법 및 이의 용도

(57) 요약

본 발명의 일 측면은 청미래당굴 잎을 아스퍼질러스속 미생물로 발효시켜 얻은 산물인 발효 청미래당굴 잎을 제공한다. 또한, 본 발명의 다른 측면은 청미래당굴 잎을 아스퍼질러스속 미생물로 발효시켜 얻은 산물인 발효 청미래당굴 잎으로부터 추출한 발효 청미래당굴 잎 추출물을 제공한다. 본 발명에 따른 발효 청미래당굴 잎은 아스퍼질러스속 미생물로 발효되어 발효 전보다 향상된 잔틴 옥시다아제(Xanthine oxidase) 억제 활성 또는 알데하이드 옥시다아제(aldehyde oxidase) 억제 활성을 나타낸다. 또한, 본 발명에 따른 발효 청미래당굴 잎은 발효 전보다 향상된 관능적 특성을 나타낸다. 따라서, 본 발명에 따른 발효 청미래당굴 잎으로 제조한 발효 차나 기능성 음료는 상업적 품질이 우수하고 시음자의 건강을 유지시키거나 개선하는데에 유리하다. 또한, 본 발명에 따른 발효 청미래당굴 잎의 추출물 또는 이의 분획물은 통풍, 간 손상, 비만, 고지혈증, 지방간 등을 예방, 개선 또는 치료하기 위한 의약품 소재 또는 기능성 식품 소재로 매우 유용하다.

대표도 - 도5



(72) 발명자

이상일

대구 달서구 구마로36길 20, 208동 1005호 (본동, 그린멘션)

이예경

경북 경산시 진량읍 봉황길 31, 103동 2022호 (삼주봉황1차)

양승환

경기 용인시 기흥구 동백4로 72, 4002동 1904호 (중동, 어은목마을한라비발디)

심순미

서울 광진구 능동로 209, 영실관 313호 (군자동, 세종대학교)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 PJ00952101

부처명 농촌진흥청

연구사업명 차세대바이오그린21사업

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

기 여 율 1/1

주관기관 명지대학교 산학협력단

연구기간 2013.02.01 ~ 2014.12.31

특허청구의 범위

청구항 1

아스퍼질러스속 미생물로 청미래덩굴 잎을 발효시켜 얻은 산물로서,
상기 발효에 의해 발효 전보다 향상된 잔틴 옥시다아제(Xanthine oxidase) 억제 활성 또는 알데하이드 옥시다아제(aldehyde oxidase) 억제 활성을 나타내는 것을 특징으로 하는 발효 청미래덩굴 잎.

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 아스퍼질러스속 미생물은 아스퍼질러스 카와치(*Aspergillus kawachii*), 아스퍼질러스 아와모리(*Aspergillus awamori*), 아스퍼질러스 오리재(*Aspergillus oryzae*), 아스퍼질러스 소재(*Aspergillus sojae*) 또는 아스퍼질러스 우사미(*Aspergillus usamii*)에서 선택된 하나 이상으로 구성된 것을 특징으로 하는 발효 청미래덩굴 잎.

청구항 3

제 2항에 있어서, 상기 아스퍼질러스 오리재(*Aspergillus oryzae*)는 *Aspergillus oryzae* KACC 40247 균주, *Aspergillus oryzae* KFRI 995 균주, *Aspergillus oryzae* var. *brunneus* KACC 44823 균주 또는 *Aspergillus oryzae* var *effuses* KACC 44990 균주에서 선택되는 하나 이상으로 구성된 것을 특징으로 하는 발효 청미래덩굴 잎.

청구항 4

제 1항에 있어서, 상기 발효 청미래덩굴 잎은 분말 형태인 것을 특징으로 하는 발효 청미래덩굴 잎.

청구항 5

제 4항에 있어서, 상기 분말은 입도 크기가 20~100 메쉬(mesh)인 것을 특징으로 하는 발효 청미래덩굴 잎.

청구항 6

(a) 청미래덩굴 잎에 아스퍼질러스속 미생물 배양액을 접종하고 청미래덩굴 잎을 발효시키는 단계; 및

(b) 발효된 청미래덩굴 잎을 건조하는 단계를 포함하고,

상기 발효된 청미래덩굴 잎은 발효 전보다 향상된 잔틴 옥시다아제(Xanthine oxidase) 억제 활성 또는 알데하이드 옥시다아제(aldehyde oxidase) 억제 활성을 나타내는 것을 특징으로 하는 발효 청미래덩굴 잎의 제조방법.

청구항 7

제 6항에 있어서, 상기 아스퍼질러스속 미생물은 아스퍼질러스 카와치(*Aspergillus kawachii*), 아스퍼질러스 아와모리(*Aspergillus awamori*), 아스퍼질러스 오리재(*Aspergillus oryzae*), 아스퍼질러스 소재(*Aspergillus sojae*) 또는 아스퍼질러스 우사미(*Aspergillus usamii*)에서 선택된 하나 이상으로 구성된 것을 특징으로 하는 발효 청미래덩굴 잎의 제조방법.

청구항 8

제 7항에 있어서, 상기 아스퍼질러스 오리제(*Aspergillus oryzae*)는 *Aspergillus oryzae* KACC 40247 균주, *Aspergillus oryzae* KFRI 995 균주, *Aspergillus oryzae* var. *brunneus* KACC 44823 균주 또는 *Aspergillus oryzae* var. *effuses* KACC 44990 균주에서 선택되는 하나 이상으로 구성된 것을 특징으로 하는 발효 청미래덩굴 잎의 제조방법.

청구항 9

제 6항에 있어서, 상기 (a) 단계 이전에 청미래덩굴 잎을 건조 후 분쇄하는 단계를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 발효 청미래덩굴 잎의 제조방법.

청구항 10

제 9항에 있어서, 상기 청미래덩굴 잎은 입도 크기가 20~100 메쉬(mesh)인 분말 형태로 분쇄되는 것을 특징으로 하는 발효 청미래덩굴 잎의 제조방법.

청구항 11

제 10항에 있어서, 상기 (a) 단계 이전에 청미래덩굴 잎의 분말을 멸균하는 단계를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 발효 청미래덩굴 잎의 제조방법.

청구항 12

제 6항에 있어서, 상기 아스퍼질러스속 미생물 배양액의 미생물 농도는 10^6 cells/ml 내지 10^{10} cells/ml이고 접 종량은 청미래덩굴 잎 건조 중량 대비 1~15 부피%인 것을 특징으로 하는 발효 청미래덩굴 잎의 제조방법.

청구항 13

제 6항에 있어서, 상기 청미래덩굴 잎은 총 수분 함량이 50~75%인 상태에서 고상 발효되는 것을 특징으로 하는 발효 청미래덩굴 잎의 제조방법.

청구항 14

제 6항에 있어서, 상기 발효 온도는 20~35℃이고, 발효 시간은 5~30일인 것을 특징으로 하는 발효 청미래덩굴 잎의 제조방법.

청구항 15

제 6항에 있어서, 상기 (a) 단계 및 (b) 단계 사이에 발효된 청미래덩굴 잎을 멸균하는 단계를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 발효 청미래덩굴 잎의 제조방법.

청구항 16

제 1항 내지 제 5항 중 어느 한 항의 발효 청미래덩굴 잎 또는 제 6항 내지 제 15항 중 어느 한 항의 제조방법으로 제조된 발효 청미래덩굴 잎을 포함하는 발효 차.

청구항 17

제 16항에 있어서, 상기 발효차는 티백 및 이에 수용된 발효 청미래덩굴 잎으로 구성된 것을 특징으로 하는 발효 차.

청구항 18

제 16항에 있어서, 상기 발효차는 옥수수 뿌리 분말, 옥수수 줄기 분말, 꾸지뽕 분말 또는 가시오가피 분말에서 선택되는 하나 이상을 더 포함하는 것을 특징으로 하는 발효 차.

청구항 19

제 1항 내지 제 5항 중 어느 한 항의 발효 청미래덩굴 잎 또는 제 6항 내지 제 15항 중 어느 한 항의 제조방법으로 제조된 발효 청미래덩굴 잎의 물 추출액을 포함하는 기능성 음료.

청구항 20

제 19항에 있어서, 상기 기능성 음료는 옥수수 뿌리 추출액, 옥수수 줄기 추출액, 흑삼 추출액, 사양별꿀, 비타민 또는 가시오가피 추출액에서 선택되는 하나 이상을 더 포함하는 것을 특징으로 하는 기능성 음료.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 청미래덩굴 잎으로부터 유래하는 유용한 기능성 소재 등에 관한 것으로서, 더 상세하게는 특정 미생물에 의해 발효된 청미래덩굴 잎, 이의 제조방법 및 이의 용도에 관한 것이다.

[0002] 또한, 본 발명은 특정 미생물에 의해 발효된 청미래덩굴 잎의 추출물 내지 분획물, 이의 제조방법 및 이의 용도에 관한 것이다.

배경기술

[0003] 경제개발로 인한 공업화와 더불어 식생활의 서구화로 공기, 수질을 포함한 환경오염 등 물리, 화학적 환경변화와 운동부족, 대사의 불균형, 각종 스트레스의 증가 등으로 다양한 생활 습관병이 급격히 증가하고 있다 (Carr 2003). 이 같은 병리적 상태에서는 체내에 반응성 산소종(reactive oxygen species; 이하 ROS라 함) 생성계 효소인 XO(xanthine oxidase)와 AO(aldehyde oxidase) 활성이 증가하고(Halliwell 2006) 체내에 산화를 촉진하는 H_2O_2 (hydrogen peroxide), $O_2^{\cdot -}$ (superoxide anion radical), $^1O_2$ (singlet oxygen), $\cdot OH$ (hydroxyl radical) 등과 같은 반응성이 높은 반응성 산소종(reactive oxygen species; 이하 ROS라 함)의 생성이 촉진 된다(Halliwell 2006). 이들 ROS는 생체막의 불포화지방산을 산화시켜 조직 내에 과산화지질을 축적시키고 조직의 산화적 손상을 초래하며 효소의 불활성화, 세포 노화, 동맥경화, 당뇨병, 뇌졸중 및 암과 같은 질병을 일으킨다 (Halliwell 2006). 생명체는 ROS의 공격을 방어하는 아스코브산(ascorbic acid), 글루타치온(glutathione), 셀레늄(selenium), 토코페롤(tocopherol), 리보플라빈(riboflavin) 등과 같은 비단백성 항산화 물질과 슈퍼옥사이드 디스퍼타아제(superoxide dismutase), 카탈라아제(catalase), 글루타치온 페록시다아제(glutathione peroxidase), 글루타치온 S-전이효소(glutathione S-transferase, GST) 등과 같은 항산화계 효소들이 존재하여 ROS로 인한 독성을 경감시키며, 각종 질병의 예방과 노화를 지연시키는 것으로 알려져 있으나 (Jeon 등 2001; Moon 등 2001; De Haan 등 1995), 과잉의 산화적 스트레스에 의한 다양한 질병들로부터 생체를 보호하기 위하여 항산화 시스템을 강화시킬 수 있는 새로운 생리활성물질의 끊임없는 개발이 요구되고 있다.

[0004] 통풍은 관절염의 원인이 되는 대사성질환의 일종으로 요산(uric acid)의 과잉생성 또는 배설저하로 유발된 고요산 혈증으로 인하여 관절부위에 요산의 결정체가 축적되어 발생하는 염증으로 통증을 일으키는 질환이다(Chena

등 2011). 또한 요산은 퓨린(purine)의 최종 대사산물로 XO(xanthine oxidase)에 의하여 잔틴(xanthine)으로부터 생성된다. XO는 체내 스트레스 등 병리적인 상태에서 크게 활성화하여 작용한다(Oei 등 1982; Urano 등 1991; Ham과 Kim 2004). 과요산증의 90%는 신장의 불충분한 배설작용에 의하여 일어나며 10%정도는 요산의 과도한 생성 때문에 일어난다(Wortmann 2002). 요산의 불충분한 배설은 신장내 요산염(urate) 수송계의 이상으로 일어나는 반면 과도한 요산은 식이 퓨린(purine) 또는 XO의 활성증가로 생성된다(Anzai 등 2005; Caulfield 등 2008). 이에 따라 최근 항과요산증제 또는 XO 저해제들이 많이 개발되고 있으나 소화기 장애, 골수생성억제, 신장장애, 과민성 증후군 등을 동반하는 등 부작용이 알려져 있다 (Horiuchi 등 2000; Zhu 등 2004; Robert와 Terkeltaub 2003). AO(aldehyde oxidase) XO와 분자량이 유사하고 플라빈 아데닌 디뉴클레오티드(flavin adenine dinucleotide, FAD), 몰리브덴(molybdenum) 및 철-유황과 같은 보결분자단을 가지고 있으며 생체 내 작용에 있어서 상호 밀접한 관련이 있으나 기질의 특이성에는 차이가 있는 것으로 보고되고 있다(Beedham 1987). AO는 간, 폐 및 신장 등의 세포질에 다량으로 존재하는 효소(Critchley 등 1992; Al-Salmy 2001)로 항암제(methotrexate)와 항바이러스제(famciclovir)와 같은 약물을 포함한 알데하이드(aldehyde) 및 질소함유 헤테로고리 화합물의 산화를 촉진하며(Beedham 1987; Clarke 등 1995; Jordan 등 1999; Kawashima 등 1999; Kitamura 등 1999), 전자공여체의 존재 하에서는 황산화물(sulfoxides), 질소산화물(N-oxides), 니트로사민(nitrosamines), 히드록삼산(hydroxamic acids), 아조(azo) 염료, 옥심(oximes), 에폭사이드(epoxides), 방향족 니트로 화합물 및 1,2-벤즈이소자졸(1,2-benzisoxazole) 유도체와 같은 다양한 화합물을 환원시킴으로써 이들 약물에 대한 해독(Jordan 등 1999; Tatsumi 등 1983, 1986; Hirao 등 1994; Sugihara 등 1996)과 다중약물의 저항성을 극복하는데도 관여한다(McCrystal 등 1999). 한편 AO는 체내에서 내외인성 기질들의 산화 과정 중에 슈퍼옥사이드(superoxide)와 같은 ROS를 생성(Mira 등 1995; Kundu 등 2007)하는 것으로 알려져 있으며, 알코올성 간 손상을 유도(Shaw와 Jayatileke, 1990)할 뿐만 아니라 고지방 식이에 의한 지방간의 생성에도 관여한다는 보고(Conklin 등 2007; Weigert 등 2008)가 있다. 이러한 사실들을 고려해 볼 때 ROS와 관련된 질병의 발생에도 XO와 더불어 상당한 영향을 미칠 것으로 생각된다. 최근 AO의 mRNA는 내장 지방 조직(visceral adipose tissue)에서 피하 지방 조직(subcutaneous adipose tissue)에 비해 높게 발현되며(Vohl 등 2004; Weigert 등 2008), 비타민 A(vitamin A)의 알데하이드(aldehyde)로부터 지방세포(adipocyte)의 분화(Huang과 Ichikawa 1994; Mercader 등 2006)뿐만 아니라 간의 섬유화를 억제 (Neumeier 등 2006)하는 레티노산(retinoic acid)를 생성하는 것으로 알려져 있어, 비만의 조절과 간 손상의 예방 및 항암제 개발에 대한 표적효소 (Pryde 등 2010; Garattini와 Terao 2011)로 관심이 집중되고 있다. 즉, AO는 체내 독성물질의 해독에 관여하나 환자들이 복용중인 다양한 약물에 대하여는 그 효과를 감소시킬 수 있으며 특히, 음주로 인한 간 손상과 복부 비만을 유도하는데 관여할 뿐만 아니라 ROS 생성을 촉진하는데 관여함을 시사한다.

[0005] 청미래덩굴(*Smilax china* L.)은 우리나라 산야에 널리 분포하는 활엽덩굴성 관목으로서, 이의 뿌리인 토복령은 트리테르페노이드 사포닌(triterpenoid saponins), 플라본(flavones), 스틸벤(stilbenes) 및 유기산(organic acids) 등이 주성분으로(Cheng과 Hua 2006) 한의학에서는 통풍치료(Song 등 2006; Shu 등 2006; Chen 등 2008; Wu 등 2010)에 쓰이며, 그 외에도 해독(Cheng과 Hua 2006), 항염, 항암 및 항산화 (Shu 등 2006; Li 등 2007) 효과가 있는 것으로 알려져 있다. 그러나 청미래덩굴의 잎은 예로부터 망개떡 제조에 사용해 왔으나 이에 대한 연구는 항균 및 항산화능 등 단편적인 연구(Choi 2004; Song 등 2006)가 있을 뿐이며 토복령이 가지는 통풍 예방효과 등 다양한 의약적 기능성에 대한 연구는 보이지 않는다. 예를 들어, 최근에 청미래덩굴 잎 추출물이 강한 항균력과 항산화력을 나타낸다는 보고가 있었고, 그 지표물질로 캠페롤-7-O- α -L-람노피라노사이드(kaempferol-7-O- α -L-rhamnopyranoside)와 캠페롤-3,7-O- α -L-다이람노피라노사이드(kaempferol-3,7-O- α -L-dirhamnopyranoside)가 분리된 바 있다(Cha & Lee 2007). 또한, 청미래덩굴 잎의 의약적 기능성과 관련하여 대한민국 등록특허공보 제10-1156636호에 청미래덩굴 잎 추출물을 유효성분으로 포함하는 혈관질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물이 개시되어 있을 뿐이다. 청미래덩굴의 잎과 줄기 및 뿌리에는 폴리페놀(polyphenol) 화합물 중에서 특히 플라보노이드(flavonoid) 성분과 사포닌(saponin) 성분들이 풍부하게 함유되어 있으며 이들 성분들이 상기에서 언급한 바와 같은 청미래 덩굴이 가지고 있는 다양한 기능성과 최근에 발표되고 있는 항바이러스, 항비만, 청혈, 뇌신경보호 작용 등에도 관여하는 것으로 알려져 있다. 청미래덩굴의 잎, 줄기 및 뿌리에 함유되어 있는 플라보노이드(flavonoid) 류와 사포닌(saponin) 류는(Ruan 등 2002; Xu 등 2008) 대부분이 당류와 결합한 배당체(glycoside)의 형로 존재하나, 유리의 아글리콘(aglycone) 형태의 것이 우수한 기능성을 가지는 것으로 보고되어 있으며 이는 결합한 당류 부분이 반응에 장애를 주는 때문으로 알려져 있다(Hamzeh-Mivehroud 2013). 또한, 퀘라세틴(queretin), 루틴(rutin)과 같은 플라보노이드는 XO의 활성을 억제함으로써 통풍을 예방하는 효과가 알려져 있다(Zhu 등 2004).

[0006] 그러나, 청미래덩굴 잎은 특유의 신맛 등 관능적 특성이 떨어져 차와 같은 식품으로 대중화되기에는 한계가 있

다. 또한, 청미래덩굴 잎의 추출물은 청미래덩굴 뿌리 추출물에 비해 일반적으로 생리활성이 매우 낮아 이를 기능성 식품 용도 내지 의약적 용도로 이용하기에는 한계가 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명은 이러한 배경하에 도출된 것으로서, 본 발명의 일 목적은 기능성 식품 내지 의약품 용도로 사용될 수 있도록 생리활성이 향상된 발효 청미래덩굴 잎, 이의 제조방법 및 이의 용도를 제공하는데에 있다.

[0008] 또한, 본 발명의 다른 목적은 기능성 식품 내지 의약품 용도로 사용될 수 있는 발효 청미래덩굴 잎의 추출물, 이의 제조방법 및 이의 구체적인 용도를 제공하는데에 있다.

과제의 해결 수단

[0009] 본 발명의 발명자는 청미래덩굴 잎을 다양한 미생물로 발효시켜 발효 청미래덩굴 잎을 제조하고, 특정 미생물로 발효시킨 청미래덩굴 잎에서 관능적 특성이 개선되고, 이의 추출물이 향상된 생리활성을 가진다는 점을 발견하고 본 발명을 완성하였다.

[0010] 본 발명의 일 목적을 해결하기 위하여, 본 발명은 아스퍼질러스속 미생물로 청미래덩굴 잎을 발효시켜 얻은 산물로서, 상기 발효에 의해 발효 전보다 향상된 잔틴 옥시다아제(Xanthine oxidase) 억제 활성 또는 알데하이드 옥시다아제(aldehyde oxidase) 억제 활성을 나타내는 것을 특징으로 하는 발효 청미래덩굴 잎을 제공한다. 또한, 본 발명은 (a) 청미래덩굴 잎에 아스퍼질러스속 미생물 배양액을 접종하고 청미래덩굴 잎을 발효시키는 단계; 및 (b) 발효된 청미래덩굴 잎을 건조하는 단계를 포함하고, 상기 발효된 청미래덩굴 잎은 발효 전보다 향상된 잔틴 옥시다아제(Xanthine oxidase) 억제 활성 또는 알데하이드 옥시다아제(aldehyde oxidase) 억제 활성을 나타내는 것을 특징으로 하는 발효 청미래덩굴 잎의 제조방법을 제공한다. 또한, 본 발명은 발효 청미래덩굴 잎의 용도로서 아스퍼질러스속 미생물에 의해 발효된 청미래덩굴 잎을 포함하는 발효 차를 제공한다. 또한, 본 발명은 발효 청미래덩굴 잎의 다른 용도로서 아스퍼질러스속 미생물에 의해 발효된 청미래덩굴 잎의 물 추출액을 포함하는 기능성 음료를 제공한다.

[0011] 본 발명의 다른 목적을 해결하기 위하여, 본 발명은 아스퍼질러스속 미생물에 의해 발효된 청미래덩굴 잎으로부터 추출되고, 잔틴 옥시다아제(Xanthine oxidase) 억제 활성 또는 알데하이드 옥시다아제(aldehyde oxidase) 억제 활성을 나타내는 발효 청미래덩굴 잎 추출물을 제공한다. 또한, 본 발명은 (a) 청미래덩굴 잎에 아스퍼질러스속 미생물 배양액을 접종하고 청미래덩굴 잎을 발효시키는 단계; (b) 발효된 청미래덩굴 잎을 건조하는 단계; 및 (c) 상기 건조된 발효 청미래덩굴 잎으로부터 추출물을 추출하는 단계를 포함하는 발효 청미래덩굴 잎 추출물의 제조방법을 제공한다. 또한, 본 발명은 발효 청미래덩굴 잎 추출물의 용도로서 발효 청미래덩굴 잎 추출물 또는 이의 분획물을 포함하는 통풍, 요통, 과요산혈증 또는 과요산뇨증의 예방 또는 치료용 조성물을 제공한다. 또한, 본 발명은 발효 청미래덩굴 잎 추출물의 용도로서 발효 청미래덩굴 잎 추출물 또는 이의 분획물을 포함하는 간 손상 예방 또는 치료용 조성물을 제공한다. 또한, 본 발명은 발효 청미래덩굴 잎 추출물의 용도로서 발효 청미래덩굴 잎 추출물 또는 이의 분획물을 포함하는 중성지방 또는 콜레스테롤 저하용 조성물을 제공한다. 이때, 상기 조성물은 약학 조성물 또는 식품 조성물에서 선택된 어느 하나인 것을 특징으로 한다.

발명의 효과

[0012] 본 발명에 따른 발효 청미래덩굴 잎은 아스퍼질러스속 미생물로 발효되어 발효 전보다 향상된 잔틴 옥시다아제(Xanthine oxidase) 억제 활성 또는 알데하이드 옥시다아제(aldehyde oxidase) 억제 활성을 나타낸다. 또한, 본 발명에 따른 발효 청미래덩굴 잎은 발효 전보다 향상된 관능적 특성을 나타낸다. 따라서, 본 발명에 따른 발효 청미래덩굴 잎으로 제조한 발효 차나 기능성 음료는 상업적 품질이 우수하고 시음자의 건강을 유지시키거나 개선하는데에 유리하다. 또한, 본 발명에 따른 발효 청미래덩굴 잎의 추출물 또는 이의 분획물은 통풍, 간 손상, 비만, 고지혈증, 지방간 등을 예방, 개선 또는 치료하기 위한 의약품 소재 또는 기능성 식품 소재로 매우 유용하다.

도면의 간단한 설명

[0013] 도 1은 *Aspergillus oryzae* KFRI 995로 청미래덩굴 잎을 발효하여 얻은 발효 청미래덩굴 잎의 발효 시간에 따른

총 폴리페놀(TP) 함량 및 총 플라보노이드(TF) 함량 측정 결과를 나타낸 그래프이다. 도 1은 *Aspergillus oryzae* KFRI 995로 청미래덩굴 잎을 발효하여 얻은 발효 청미래덩굴 잎의 발효 시간에 따른 총 폴리페놀(TP) 함량 및 총 플라보노이드(TF) 함량 측정 결과를 나타낸 그래프이다. 데이터는 3회 측정 평균값과 표준편차로 나타내었으며, 서로 다른 문자(A~D, a~d)는 5% 수준에서 유의성이 있음을 나타낸다.

도 2는 *Aspergillus oryzae* KFRI 995로 청미래덩굴 잎을 발효하여 얻은 발효 청미래덩굴 잎의 발효 시간에 따른 전자공여능(Electron donating ability, EDA) 측정 결과를 나타낸 그래프이고, 도 3은 *Aspergillus oryzae* KFRI 995로 청미래덩굴 잎을 발효하여 얻은 발효 청미래덩굴 잎의 발효 시간에 따른 철 환원력(Ferric reducing antioxidant power, FRAP) 측정 결과를 나타낸 그래프이다. 데이터는 3회 측정 평균값과 표준편차로 나타내었으며, 서로 다른 문자(A~C)는 5% 수준에서 유의성이 있음을 나타낸다.

도 4는 *Aspergillus oryzae* KFRI 995로 청미래덩굴 잎을 발효하여 얻은 발효 청미래덩굴 잎의 발효 시간에 따른 지질과산화 억제활성(Lipid peroxidation inhibitory activity, LPOIA) 측정 결과를 나타낸 그래프이다. 데이터는 3회 측정 평균값과 표준편차로 나타내었으며, 서로 다른 문자(A~B)는 5% 수준에서 유의성이 있음을 나타낸다.

도 5는 발효 청미래덩굴 잎 및 비발효 청미래덩굴 잎을 에탄올로 추출하고 에탄올 추출물을 에틸아세테이트로 분획하였을 때의 추출 수율을 나타낸 그래프이다.

도 6은 발효 청미래덩굴 잎 및 비발효 청미래덩굴 잎의 에탄올 추출물 및 이의 에틸아세테이트 가용성 분획물에 존재하는 총 폴리페놀 함량을 나타낸 그래프이고, 도 7은 발효 청미래덩굴 잎 및 비발효 청미래덩굴 잎의 에틸아세테이트 가용성 분획물에 존재하는 총 플라보노이드 함량 : 총 폴리페놀 함량의 비를 백분율로 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0014] 이하, 본 발명에서 사용한 용어를 설명한다.
- [0015] 본 발명에서 사용되는 용어 "예방"은 본 발명의 조성물의 투여로 특정 질환의 증상을 억제시키거나 진행을 지연시키는 모든 행위를 의미한다.
- [0016] 본 발명에서 사용되는 용어 "치료"는 본 발명의 조성물의 투여로 특정 질환의 증상을 호전 또는 이롭게 변경시키는 모든 개선 행위를 의미한다.
- [0017] 본 발명에서 사용되는 용어 "투여"는 임의의 적절한 방법으로 개체에 소정의 본 발명의 조성물을 제공하는 것을 의미한다. 이때, 개체는 본 발명의 조성물을 투여하여 특정 질환의 증상이 호전될 수 있는 질환을 가진 인간, 원숭이, 개, 염소, 돼지 또는 쥐 등 모든 동물을 의미한다.
- [0018] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.
- [0019] 본 발명의 일 측면은 유용한 생리활성을 나타내는 발효 청미래덩굴 잎, 이의 제조방법 및 이의 용도를 제공하는 데에 있다.
- [0020] 본 발명에 따른 발효 청미래덩굴 잎은 아스퍼질러스속 미생물로 청미래덩굴 잎을 발효시켜 얻은 산물로서 상기 발효에 의해 발효 전보다 향상된 잔틴 옥시다아제(Xanthine oxidase) 억제 활성 또는 알데하이드 옥시다아제(aldehyde oxidase) 억제 활성을 나타낸다. 이때, 아스퍼질러스속 미생물은 아스퍼질러스 카와치(*Aspergillus kawachii*), 아스퍼질러스 아와모리(*Aspergillus awamori*), 아스퍼질러스 오리재(*Aspergillus oryzae*), 아스퍼질러스 소재(*Aspergillus sojae*) 또는 아스퍼질러스 우사미(*Aspergillus usamii*)에서 선택된 하나 이상으로 구성될 수 있고, 청미래덩굴 잎의 생리활성을 극대화하는 측면에서 아스퍼질러스 오리재(*Aspergillus oryzae*)인 것이 바람직하다. 또한, 상기 아스퍼질러스 오리재(*Aspergillus oryzae*)는 *Aspergillus oryzae* KACC 40247 균주, *Aspergillus oryzae* KFRI 995 균주, *Aspergillus oryzae* var. *brunneus* KACC 44823 균주 또는 *Aspergillus oryzae* var. *effuses* KACC 44990 균주에서 선택되는 하나 이상으로 구성될 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 예를 들어, 아스퍼질러스 오리재(*Aspergillus oryzae*)는 기탁번호가 KCCM 12042, KCCM 12089, KCCM 12698, KCCM 32345, KCCM 60166, KCCM 60241 등에서 선택되는 하나 이상으로도 구성될 수 있다. 또한, 아스퍼질러스속 미생물의 발효 기질로 이용되는 청미래덩굴 잎은 발효 효율 등을 고려할 때 분말 형태인 것이 바

람직하고, 이때 상기 분말의 입도 크기는 입도 크기가 20~100 메쉬(mesh)인 것이 바람직하고 40~80 메쉬(mesh)인 것이 더 바람직하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 또한, 발효 청미래당굴 잎이 후술하는 발효 차로 이용되거나 추출 등에 의해 기능성 음료의 소재로 이용될 때 사용의 편의성 및 추출 효율 등을 고려하는 측면에서 아스퍼질러스속 미생물에 의해 발효된 청미래당굴 잎도 분말 형태인 것이 바람직하다.

[0021]

본 발명에 따른 발효 청미래당굴 잎의 제조방법은 (a) 청미래당굴 잎에 아스퍼질러스속 미생물 배양액을 접종하고 청미래당굴 잎을 발효시키는 단계; 및 (b) 발효된 청미래당굴 잎을 건조하는 단계를 포함한다. 이때, 상기 발효된 청미래당굴 잎은 발효 전보다 향상된 잔틴 옥시다아제(Xanthine oxidase) 억제 활성 또는 알데하이드 옥시다아제(aldehyde oxidase) 억제 활성을 나타낸다. 본 발명에 따른 발효 청미래당굴 잎의 제조방법에서 사용되는 아스퍼질러스속 미생물은 아스퍼질러스 카와치(*Aspergillus kawachii*), 아스퍼질러스 아와모리(*Aspergillus awamori*), 아스퍼질러스 오리재(*Aspergillus oryzae*), 아스퍼질러스 소재(*Aspergillus sojae*) 또는 아스퍼질러스 우사미(*Aspergillus usami*)에서 선택된 하나 이상으로 구성될 수 있고, 청미래당굴 잎의 생리활성을 극대화하는 측면에서 아스퍼질러스 오리재(*Aspergillus oryzae*)인 것이 바람직하다. 또한, 상기 아스퍼질러스 오리재(*Aspergillus oryzae*)는 *Aspergillus oryzae* KACC 40247 균주, *Aspergillus oryzae* KFRI 995 균주, *Aspergillus oryzae* var. *brunneus* KACC 44823 균주 또는 *Aspergillus oryzae* var. *effuses* KACC 44990 균주에서 선택되는 하나 이상으로 구성될 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 예를 들어, 아스퍼질러스 오리재(*Aspergillus oryzae*)는 기탁번호가 KCCM 12042, KCCM 12089, KCCM 12698, KCCM 32345, KCCM 60166, KCCM 60241 등에서 선택되는 하나 이상으로도 구성될 수 있다. 또한, 본 발명에 따른 발효 청미래당굴 잎의 제조방법은 바람직하게는 상기 (a) 단계 이전에 청미래당굴 잎을 건조 후 분쇄하는 단계를 더 포함할 수 있다. 예를 들어, 청미래당굴 잎은 아스퍼질러스속 미생물에 의한 청미래당굴 잎의 발효 효율 등을 고려할 때 바람직하게는 입도 크기가 20~100 메쉬(mesh)인 분말 형태로 분쇄될 수 있고, 더 바람직하게는 입도 크기가 40~80 메쉬(mesh)인 분말 형태로 분쇄될 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 또한, 본 발명에 따른 발효 청미래당굴 잎의 제조방법은 청미래당굴 잎의 발효시 오염 등을 방지하기 위해 상기 (a) 단계 이전에 청미래당굴 잎의 분말을 멸균하는 단계를 더 포함할 수 있다. 상기 멸균 방법은 공지의 다양한 방법에서 선택될 수 있으며, 예를 들어 청미래당굴 잎의 분말에 소정의 물을 첨가하고 혼합한 후, 소정의 온도로 가열하는 것으로 구성될 수 있다. 이때, 물의 첨가량은 크게 제한되지 않으나, 청미래당굴 잎의 분말과의 혼합 용이성 및 멸균의 효율성 등을 고려할 때 청미래당굴 잎 분말 중량 대비 1~3배인 것이 바람직하고, 1.5~2.5배인 것이 더 바람직하다. 또한, 멸균 시 가열 온도는 100~125℃인 것이 바람직하고, 110~125℃인 것이 더 바람직하다. 또한, 멸균 시 가열 시간은 청미래당굴 잎 분말의 상태 변화 및 멸균 효과를 담보하는 측면에서 10~120분인 것이 바람직하고, 30~90분인 것이 더 바람직하며, 40~80분인 것이 가장 바람직하다. 다만, 본 발명에 따른 청미래당굴 잎의 발효가 고상 발효에 의해 이루어지는 경우 청미래당굴 잎의 발효 이전에 청미래당굴 잎을 멸균하는 단계를 생략할 수 있다.

[0022]

본 발명에 따른 발효 청미래당굴 잎의 제조방법에서 청미래당굴 잎에 접종되는 아스퍼질러스속 미생물 배양액은 아스퍼질러스속 미생물을 액체 배지에 배양한 것으로서, 통상적으로 사용되는 종균액에 해당하는 개념이다. 이때, 상기 아스퍼질러스속 미생물 배양액의 미생물 농도는 적정 수준으로 조정되는 것이 바람직한데, 예를 들어 10^6 cells/ml 내지 10^{10} cells/ml로 조정될 수 있고, 더 바람직하게는 10^7 cells/ml 내지 10^9 cells/ml로 조정될 수 있다. 또한, 본 발명에 따른 발효 청미래당굴 잎의 제조방법에서 청미래당굴 잎에 접종되는 아스퍼질러스속 미생물 배양액의 접종량은 크게 제한되지 않으나 발효 공정의 경제성 및 청미래당굴 잎의 생리활성을 극대화하는 측면을 고려할 때 청미래당굴 잎 건조 중량 대비 1~15 부피%인 것이 바람직하고, 2~12 부피%인 것이 더 바람직하며, 4~10 부피%인 것이 가장 바람직하다. 또한, 청미래당굴 잎을 아스퍼질러스속 미생물로 발효시키는 단계에서 청미래당굴 잎은 총 수분 함량이 50~75%인 것이 바람직하고 60~75 중량%인 것이 더 바람직하며, 65~70%인 것이 가장 바람직하다. 청미래당굴 잎의 총 수분 함량이 75%를 초과하는 경우 액상 발효에 가까워 발효 과정 중에 오염될 염려가 있고, 청미래당굴 잎의 총 수분 함량이 50% 미만인 경우 아스퍼질러스속 미생물에 의한 발효가 원활하지 않을 수 있다. 청미래당굴 잎의 총 수분 함량은 청미래당굴 잎에 접종되는 아스퍼질러스속 미생물 배양액과 추가로 첨가되는 물 등에 의해 조정될 수 있다. 또한, 본 발명에 따른 발효 청미래당굴 잎의 제조방법에서 청미래당굴 잎의 발효는 발효 공정의 경제성 등 및 오염의 최소화 등을 고려할 때 고상 발효에 의해 이루어지는 것이 바람직하다. 또한, 본 발명에 따른 발효 청미래당굴 잎의 제조방법에서 발효 온도는 사용되는 아스퍼질러스속 미생물의 종류 등에 따라 다양한 범위를 가질 수 있으며, 아스퍼질러스속 미생물의 최적 배양 온도 등을 고려할 때 20~35℃인 것이 바람직하고, 25~35℃인 것이 더 바람직하며, 25~32℃인 것이 가장 바람직하다. 또한, 본 발명에 따른 발효 청미래당굴 잎의 제조방법에서 발효 시간은 청미래당굴 잎의 발효 시 사용되는 아스

퍼질러스속 미생물의 종류, 아스퍼질러스속 미생물 배양액의 접종량, 발효 온도 등에 따라 다양한 범위를 가질 수 있으며, 발효 청미래당굴 잎의 관능적 특성, 발효 공정의 경제성 또는 청미래당굴 잎의 생리활성을 극대화하는 측면을 고려할 때 5~30일인 것이 바람직하고, 5~20일 것이 더 바람직하며, 7~15일인 것이 가장 바람직하다.

[0023] 본 발명에 따른 발효 청미래당굴 잎의 제조방법에서 아스퍼질러스속 미생물에 의해 발효된 청미래당굴 잎은 열풍 건조 등 다양한 방법에 의해 건조되어 건조된 형태로 제공된다. 이때, 본 발명에 따른 발효 청미래당굴 잎의 제조방법은 바람직하게는 발효된 청미래당굴 잎을 건조하기 전에 멸균하는 단계를 더 포함할 수 있다. 발효된 청미래당굴 잎을 건조하기 전에 멸균함으로써 추후의 오염을 방지할 수 있고 제품의 안전성을 도모할 수 있다. 상기 멸균 방법은 공지의 다양한 방법에서 선택될 수 있으며, 예를 들어 청미래당굴 잎을 아스퍼질러스속 미생물로 발효시켜 얻은 산물을 오토클레이브 등을 이용하여 소정의 압력 및 소정의 온도로 가열하는 것으로 구성될 수 있다. 이때, 멸균 시 가열 온도는 100~125℃인 것이 바람직하고, 110~125℃인 것이 더 바람직하다. 또한, 멸균 시 가열 시간은 멸균 효과를 확보하는 측면에서 10~120분인 것이 바람직하고, 30~90분인 것이 더 바람직하며, 40~80분인 것이 가장 바람직하다.

[0024] 본 발명은 전술한 발효 청미래당굴 잎의 일 용도로 발효 청미래당굴 잎을 포함하는 발효 차를 제공한다. 상기 발효 청미래당굴 잎을 포함하는 발효 차는 비발효 청미래당굴 잎에 비해 향상된 관능적 특성, 잔틴 옥시다아제(Xanthine oxidase) 억제 활성 또는 알데하이드 옥시다아제(aldehyde oxidase) 억제 활성을 나타낸다. 또한, 본 발명에 따른 발효 차는 발효 청미래당굴 잎 외에 상업적 제품 수준의 관능적 특성을 확보하는 측면에서 옥수수 뿌리 분말, 옥수수 줄기 분말, 꾸지뽕 분말 또는 가시오가피 분말에서 선택되는 하나 이상을 더 포함할 수 있다. 또한, 본 발명에 따른 발효 차는 사용의 편의성 측면에서 티백 형태로 제공될 수 있다. 상기 티백에는 발효 청미래당굴 잎이 수용될 수 있고, 선택적으로 옥수수 뿌리 분말, 옥수수 줄기 분말, 꾸지뽕 분말 또는 가시오가피 분말에서 선택되는 하나 이상이 더 수용될 수도 있다.

[0025] 또한, 본 발명은 전술한 발효 청미래당굴 잎의 다른 용도로 발효 청미래당굴 잎의 물 추출액을 포함하는 기능성 음료를 제공한다. 이때, 발효 청미래당굴의 추출 용매인 물은 추출 효율을 고려할 때 열수인 것이 바람직하다. 또한, 본 발명에 따른 기능성 음료는 발효 청미래당굴 잎의 물 추출액 외에 상업적 제품 수준의 관능적 특성을 확보하는 측면에서 옥수수 뿌리 추출액, 옥수수 줄기 추출액, 흑삼 추출액, 사양별꿀, 비타민 또는 가시오가피 추출액에서 선택되는 하나 이상을 더 포함할 수 있다. 본 발명에 따른 기능성 음료는 통풍, 간 손상, 비만, 고지혈증, 지방간 등을 예방 또는 개선하는 효과가 있으므로, 시음자의 건강을 유지시키거나 개선하는데에 유리하다.

[0026] 본 발명의 다른 측면은 유용한 생리활성을 나타내는 발효 청미래당굴 잎 추출물, 이의 제조방법 및 이의 용도를 제공하는데 있다. 이하, 전술한 발효 청미래당굴 잎 추출물, 이의 제조방법 및 이의 용도와 동일한 내용은 기재 생략한다.

[0027] 본 발명에 따른 발효 청미래당굴 잎 추출물은 아스퍼질러스속 미생물에 의해 발효된 청미래당굴 잎으로부터 추출된 것으로서, 잔틴 옥시다아제(Xanthine oxidase) 억제 활성 또는 알데하이드 옥시다아제(aldehyde oxidase) 억제 활성을 나타낸다. 이때, 발효 청미래당굴 잎 추출물은 바람직하게는 비발효 청미래당굴 잎 추출물에 비해 향상된 잔틴 옥시다아제(Xanthine oxidase) 억제 활성 또는 알데하이드 옥시다아제(aldehyde oxidase) 억제 활성을 나타낸다. 또한, 본 발명에 따른 발효 청미래당굴 잎 추출물은 아스퍼질러스속 미생물에 의해 청미래당굴 잎이 발효되는 과정에서 생성된 다양한 생리활성 물질을 포함하고, 이로 인해 다양한 기능성을 가진다.

[0028] 본 발명에 따른 발효 청미래당굴 잎 추출물의 제조방법은 (a) 청미래당굴 잎에 아스퍼질러스속 미생물 배양액을 접종하고 청미래당굴 잎을 발효시키는 단계; (b) 발효된 청미래당굴 잎을 건조하는 단계; 및 (c) 상기 건조된 발효 청미래당굴 잎으로부터 추출물을 추출하는 단계를 포함한다. 이 중 (a) 단계 및 (b) 단계는 발효 청미래당굴 잎의 제조방법에서 서술한 내용과 동일하므로 설명을 생략한다. 본 발명에 따른 발효 청미래당굴 잎 추출물은 당업계에 공지된 통상의 추출 방법, 예를 들어 용매 추출법을 사용하여 제조될 수 있다. 용매 추출법을 이용한 발효 청미래당굴 잎 추출물 제조시 사용되는 추출 용매는 물, 탄소 수가 1 내지 4인 저급 알코올(예를 들면, 메탄올, 에탄올, 프로판올 및 부탄올) 또는 함수 저급 알코올, 프로필렌글리콜, 1,3-부틸렌글리콜, 글리세린, 아세톤, 디에틸에테르, 에틸아세테이트, 부틸아세테이트, 디클로로메탄, 클로로포름, 헥산 및 이들의 혼합물로 구성된 군으로부터 선택될 수 있고, 이중 물, 알코올 또는 이들의 혼합물에서 선택되는 것이 바람직하다. 추출

용매로 물을 사용하는 경우 물은 열수인 것이 바람직하다. 예를 들어 본 발명에 따른 발효 청미래당굴 잎 추출물은 발효 청미래당굴 잎에 발효 청미래당굴 잎 중량 대비 5~200배 부피의 물을 가하고 80~120℃에서 5분 내지 1시간 동안 환류 추출 후 여과하고 동결건조하여 얻을 수 있다. 또한, 추출 용매로 알코올을 사용하는 경우 알코올은 탄소 수가 1 내지 4인 저급 알코올인 것이 바람직하고, 저급 알코올은 메탄올 또는 에탄올에서 선택되는 것이 더 바람직하다. 또한, 추출 용매로 함수 저급 알코올을 사용하는 경우 함수 저급 알코올은 에탄올 농도가 60~90%인 것이 바람직하다. 또한, 본 발명의 발효 청미래당굴 잎 추출물은 발효 청미래당굴 잎의 열수, 알코올 또는 함수 알코올 추출물에서 에틸아세테이트 가용성 성분만을 분획한 분획 추출물을 포함한다. 한편, 본 발명의 발효 청미래당굴 잎 추출물은 상기한 추출 용매뿐만 아니라, 다른 추출 용매를 이용하여도 실질적으로 동일한 효과를 나타내는 추출물이 얻어질 수 있다는 것은 당업자에게 자명한 것이다.

[0029]

본 발명에 따른 발효 청미래당굴 잎 추출물 또는 이의 분획물은 통풍, 요통, 과요산혈증 또는 과요산뇨증의 예방 또는 치료용 조성물의 유효성분으로 사용될 수 있다. 또한, 본 발명에 따른 발효 청미래당굴 잎 추출물 또는 이의 분획물은 간 손상 예방 또는 치료용 조성물의 유효성분으로 사용될 수 있다. 이때, 상기 간 손상은 알코올 등 다양한 간 독성 물질에 유발되는 것으로서 간의 비대, 간의 기능 저하 등을 포함한다. 또한, 본 발명에 따른 발효 청미래당굴 잎 추출물 또는 이의 분획물은 중성지방 또는 콜레스테롤 저하용 조성물의 유효성분으로 사용될 수 있다. 본 발명에 따른 발효 청미래당굴 잎 추출물 또는 이의 분획물을 포함하는 중성지방 또는 콜레스테롤 저하용 조성물은 구체적으로 지방간, 고지질혈증, 고중성지방혈증, 고콜레스테롤혈증, 지질 관련 대사 증후군과 같은 지질 관련 대사성 질환, 비만 등을 예방 또는 치료하는데에 사용될 수 있다. 이때, 본 발명에 따른 상기 조성물 들은 사용 목적 내지 양상에 따라 약학 조성물 또는 식품 조성물 등으로 구체화될 수 있다.

[0030]

본 발명의 발효 청미래당굴 잎 추출물(예를 들어 청미래당굴 잎의 열수 추출물 또는 함수 알코올 추출물) 또는 이의 분획물(예를 들어 청미래당굴 잎의 열수 추출물 또는 함수 알코올 추출물의 에틸아세테이트 가용성 분획물)을 유효성분으로 포함하는 약학 조성물에서 발효 청미래당굴 잎 추출물 또는 이의 분획물의 함량은 크게 제한되지 않으며, 예를 들어 조성물 총 중량을 기준으로 0.1~99 중량%, 바람직하게는 0.5~50 중량%, 더 바람직하게는 1~30 중량%일 수 있다. 또한, 본 발명에 따른 약학 조성물은 발효 청미래당굴 잎 추출물 또는 이의 분획물 외에 약학적으로 허용가능한 담체, 부형제 또는 희석제와 같은 첨가제를 더 포함할 수 있다. 발명의 약학 조성물에 포함될 수 있는 담체, 부형제 및 희석제로는 락토즈, 텍스트로즈, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로스, 메틸 셀룰로스, 미정질 셀룰로스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 들 수 있다. 또한, 본 발명의 약학적 조성물은 발효 청미래당굴 잎 추출물 또는 이의 분획물 외에 항산화 활성, 콜레스테롤 저하 활성, 지질 저하 활성 또는 중성지방 저하 활성을 갖는 공지의 유효 성분을 1종 이상 더 함유할 수 있다. 본 발명의 약학 조성물은 통상의 방법에 의해 경구 투여를 위한 제형 또는 비경구 투여를 위한 제형으로 제제화될 수 있고, 제제화할 경우 보통 사용하는 충전제, 증량제, 결합제, 습윤제, 봉해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제될 수 있다. 경구 투여를 위한 고형 제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형 제제는 발효 청미래당굴 잎 추출물 또는 이의 분획물에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트(Calcium carbonate), 수크로스(Sucrose), 락토오스(Lactose) 또는 젤라틴 등을 섞어 조제될 수 있다. 또한, 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트 탈크 같은 윤활제들도 사용될 수 있다. 경구 투여를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제 및 시럽제 등이 해당되는데 흔히 사용되는 단순희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조제, 좌제가 포함될 수 있다. 비수성용제, 현탁용제로는 프로필렌글리콜(Propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위템솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로세라틴 등이 사용될 수 있다. 더 나아가 당 분야의 적절한 방법으로 또는 Remington's Pharmaceutical Science(최근판), Mack Publishing Company, Easton PA에 개시되어 있는 방법을 이용하여 각 질환에 따라 또는 성분에 따라 바람직하게 제제화할 수 있다. 본 발명의 약학 조성물은 목적하는 방법에 따라 인간을 포함한 포유류에 경구 투여되거나 비경구 투여될 수 있으며, 비경구 투여 방식으로는 피부 외용, 복강내 주사, 직장내주사, 피하주사, 정맥주사, 근육내 주사 또는 흉부내 주사 주입방식 등이 있다. 본 발명의 약학 조성물의 투여량은 환자의 체중, 연령, 성별, 건강상태, 식이, 투여시간, 투여방법, 배설율 및 질환의 중증도에 따라 그 범위가 다양하다. 본 발명의 약학 조성물의 통상적인 1일 투여량은 크게 제한되지 않으나 바람직하게는 유효성분인 발효 청미래당굴 잎 추출물 또는 이의 분획물을 기준으로 할 때 0.1 내지 1000 mg/kg이고, 더 바람

직하게는 1 내지 500 mg/kg이며, 하루 1회 또는 수회로 나누어 투여될 수 있다.

[0031] 본 발명의 발효 청미래덩굴 잎 추출물 또는 이의 분획물을 유효 성분으로 포함하는 식품 조성물은 환제, 분말, 과립, 침제, 정제, 캡슐, 또는 액제 등의 형태를 포함하며, 구체적인 식품의 예로는 육류, 소시지, 빵, 초콜릿, 캔디류, 스낵류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류를 포함한 낙농제품, 각종 스프, 음료수, 차, 기능수, 드링크제, 알코올음료 및 비타민 복합제 등이 있으며, 통상적인 의미에서의 건강식품을 모두 포함한다. 본 발명의 식품 조성물에서 발효 청미래덩굴 잎 추출물 또는 이의 분획물의 함량은 조성물 총 중량을 기준으로 0.01~50 중량%, 바람직하게는 0.1~25 중량%, 더 바람직하게는 0.5~10 중량%이나, 이에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 식품 조성물은 발효 청미래덩굴 잎 추출물 또는 이의 분획물 외에 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다. 또한, 본 발명의 식품 조성물은 여러 가지 영양제, 비타민, 전해질, 풍미제, 착색제, 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알코올, 탄산음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다. 그 밖에 본 발명의 식품 조성물은 천연 과일주스, 과일주스 음료 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다. 이러한 성분들은 독립적으로 또는 혼합하여 사용할 수 있다. 상술한 천연 탄수화물은 포도당, 과당과 같은 모노사카라이드, 말토스, 슈크로스 및 같은 디사카라이드, 및 텍스트린, 사이클로텍스트린과 같은 폴리사카라이드, 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알코올이다. 향미제로는 타우마틴, 스테비아 추출물과 같은 천연 향미제나 사카린, 아스파르탐과 같은 합성 향미제 등을 사용할 수 있다.

[0032] 이하, 본 발명을 실시예를 통하여 보다 구체적으로 설명한다. 다만, 하기 실시예는 본 발명을 기술적 특징을 명확하게 예시하기 위한 것 일뿐, 본 발명의 보호범위를 한정하는 것은 아니다.

[0033] I. 제 1차 실험 : 청미래덩굴 잎 발효용 균주의 선별 및 발효방법 확립

[0034] 1. 청미래덩굴 잎 분말의 준비

[0035] 2012년 10월 대구광역시 양령 시장에서 구입한 청미래덩굴(*Smilax china* L.) 잎을 수돗물로 깨끗이 세척한 후 열풍 건조기를 이용하여 40℃에서 충분히 건조시켰다. 이후 건조된 청미래덩굴(*Smilax china* L.) 잎을 분쇄기(모델명 : HNF-1710; 공급자 : Hanil Electric Co Ltd, Seoul, Korea)를 사용하여 약 40 메쉬(mesh) 정도의 입도 크기로 분쇄한 후 폴리에틸렌 필름으로 밀봉하여 4℃에서 보관하면서 후술하는 발효 시료로 사용하였다.

[0036] 2. 발효용 균주의 입수

[0037] 하기 표 1은 본 발명의 실험에서 사용한 균주의 종류를 나타낸 것이다. 하기 표 1 중 *Aspergillus* 속 미생물은 한국미생물배양센터(Korean Culture Center for Microorganisms, KCCM, Seoul, Korea)에서 구입하였으며 나머지 균주들은 한국식품연구원(Korea Food Research Institute, KFRI, Sungnam, Korea) 및 명지대학교 미생물학 교실에서 분양받았다.

표 1

발효용 균주 종류	균주 약어
<i>Aspergillus oryzae</i> KACC 40247	AO
<i>Aspergillus oryzae</i> KFRI 995	AO9
<i>Aspergillus oryzae</i> var. <i>brunneus</i> KACC 44823	AOB
<i>Aspergillus oryzae</i> var. <i>effuses</i> KACC 44990	AOE
<i>Bacillus</i> 속 혼합 균주*	BS
<i>Bifidobacterium bifidus</i> ATCC 29521	BB
<i>Monascus pilosus</i> KCCM 60084	MP
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> **	SC

[0039] * : 바실러스속 혼합 균주로는 전통청국장으로부터 분리한 바실러스 서큘란스(*B. circulans*), 바실러스 브레비스(*B. brevis*), 바실러스 리케니포르미스(*B. licheniformis*), 바실러스 아라비탄(*B. arabitane*), 바실러스 코

아굴란스(*B. coagulans*), 바실러스 스테아로써모필루스(*B. stearothermophilus*) 및 바실러스 서브틸리스(*B. subtilis*)의 혼합 균주를 사용하였다.

[0040] **: 사카로마이세스 세레비지애(*Saccharomyces cerevisiae*)는 상업적으로 판매하고 있는 활성 건조효모(Premier Cuvee, Red Star Co, France)를 구입하여 사용하였다.

[0041] 3. 발효용 균주 배양액의 제조

[0042] (1) 아스퍼질러스 오리제(*Aspergillus oryzae*) 배양액의 준비

[0043] 아스퍼질러스 오리제(*Aspergillus oryzae*) KACC 40247 균주를 Bacto™ malt extract(Becton, Dickinson and Company, Sparks, MD, USA)에 이식하고 25℃에서 10일 동안 진탕 배양하였다. 이후, 동일한 배지로 배양액 내 아스퍼질러스 오리제 농도를 10^8 cells/ml로 조정하여 아스퍼질러스 오리제(*Aspergillus oryzae*) KACC 40247 배양액을 준비하였다.

[0044] *Aspergillus oryzae* KFRI 995 균주, *Aspergillus oryzae* var. *brunneus* KACC 44823 균주, *Aspergillus oryzae* var *effuses* KACC 44990 균주 각각에 대해서도 동일한 방법을 사용하여 발효용 균주 배양액을 준비하였다.

[0045] (2) 바실러스속 혼합 균주 배양액의 준비

[0046] 진통청국장으로부터 분리한 바실러스 서큘란스(*B. circulans*), 바실러스 브레비스(*B. brevis*), 바실러스 리케니포르미스(*B. licheniformis*), 바실러스 아라비탄(*B. arabitane*), 바실러스 코아굴란스(*B. coagulans*), 바실러스 스테아로써모필루스(*B. stearothermophilus*) 및 바실러스 서브틸리스(*B. subtilis*)를 Bacto™ Tryptic Soy Broth(Becton, Dickinson and Co, Sparks, MD, USA)에 각각 이식하고 25℃에서 10일 동안 진탕 배양한 후 각각의 배양액을 동일량으로 혼합하였다. 이후, 동일한 배지로 혼합 배양액 내 바실러스속(*Bacillus*) 미생물의 농도를 10^8 cells/ml로 조정하여 바실러스속(*Bacillus*) 혼합 균주 배양액을 준비하였다.

[0047] (3) 비피도박테리움 비피더스 배양액의 준비

[0048] 비피도박테리움 비피더스(*Bifidobacterium bifidus*) ATCC 29521 균주를 Bacto™ MRS broth(Becton, Dickinson and Co, Sparks, MD, USA)에 이식하고 25℃에서 10일 동안 진탕 배양하였다. 이후, 동일한 배지로 배양액 내 비피도박테리움 비피더스 농도를 10^8 cells/ml로 조정하여 비피도박테리움 비피더스(*Bifidobacterium bifidus*) 배양액을 준비하였다.

[0049] (4) 모나스쿠스 필로서스 배양액의 준비

[0050] 모나스쿠스 필로서스(*Monascus pilosus*) KCCM 60084 균주를 Bacto™ Tryptic Soy Broth(Becton, Dickinson and Co, Sparks, MD, USA)에 이식하고 25℃에서 10일 동안 진탕 배양하였다. 이후, 동일한 배지로 배양액 내 모나스쿠스 필로서스 농도를 10^8 cells/ml로 조정하여 모나스쿠스 필로서스 배양액을 준비하였다.

[0051] (5) 사카로마이세스 세레비지애 배양액의 준비

[0052] 상업적으로 판매하고 있는 활성 건조효모(Premier Cuvee, Red Star Co, France)를 Bacto™ malt extract(Becton, Dickinson and Company, Sparks, MD, USA)에 이식하고 25℃에서 10일 동안 진탕 배양하였다. 이후, 동일한 배지로 배양액 내 효모의 농도를 10^8 cells/ml로 조정하여 사카로마이세스 세레비지애(*Saccharomyces cerevisiae*) 배양액을 준비하였다.

[0053] 4. 발효 청미래덩굴 잎의 제조

- [0054] 앞에서 준비한 청미래덩굴 잎 분말 1.5kg에 종균액과 물의 혼합액 3ℓ를 첨가하고 골고루 혼합하여 총 수분 함량을 약 67%가 되게 조정하였다. 이때, 종균액으로는 앞에서 준비한 발효용 균주 배양액을 사용하였다. 또한, 종균액과 물의 혼합액은 청미래덩굴 잎 분말 중량을 기준으로 5%(v/w)에 해당하는 종균액에 살균수를 혼합하여 총 3ℓ가 되도록 조정한 것이다. 이후, 청미래덩굴 잎 분말, 종균액 및 물의 혼합물을 플라스틱 발효 상자(가로 50cm, 세로 70cm, 높이 18cm)에 약 5cm의 두께로 담고 플라스틱 발효 상자의 상부를 폴리에틸렌 필름으로 덮은 후 약 30℃에서 10일간 발효시켰다. 발효가 완료된 청미래덩굴 잎을 폴리프로필렌 백(polypropylene bag)에 담고 오토클레이브(Autoclave) 안으로 옮겨 121℃에서 60분간 처리하여 살균하고, 40℃에서 건조하여 발효 청미래덩굴 잎을 제조하였다.
- [0055] 5. 비발효 청미래덩굴 잎의 제조
- [0056] 앞에서 준비한 청미래덩굴 잎 분말 1.5kg에 물 3ℓ를 첨가하고 골고루 혼합하여 수분을 평형화시킨 후 이를 폴리프로필렌 백(polypropylene bag)에 담고 오토클레이브(Autoclave) 안으로 옮겨 121℃에서 60분간 처리하여 살균하였다. 이후, 살균된 청미래덩굴 잎 분말을 40℃에서 건조하여 비발효 청미래덩굴 잎을 제조하였다.
- [0057] 6. 발효 청미래덩굴 잎의 주요 기능성 지표 항목 측정 방법
- [0058] (1) 열수 추출액의 제조
- [0059] 차 추출기(Tea Extractor; Damian Tea Co, Anyang, Gyeonggi-Do, Korea)에 열수(약 90℃의 물)를 넣고 여기에 앞에서 제조한 발효 청미래덩굴 잎 또는 비발효 청미래덩굴 잎을 각각 열수 부피 대비 1 중량%(w/v)로 첨가한 후 5분간 우려내어 열수 추출액을 제조하였다. 제조한 열수 추출액을 후술하는 주요 기능성 지표 항목 측정의 시료로 사용하였다.
- [0060] (2) 관능 검사에 의한 기호도 측정
- [0061] 추출액 시료를 약 50℃의 보온 통에 보관하면서 관능 검사용 시료로 사용하였다. 훈련된 관능 요원 25명을 대상으로 종합적인 기호도(overall acceptability)를 5점 척도법으로 평가하였다(Herbert & Jeol 1993). 5점 척도법의 평가 점수 기준은 아주 나쁘다 : 1점; 나쁘다 : 2점; 보통이다 : 3점; 좋다 : 4점; 아주 좋다 : 5점으로 하였다.
- [0062] (3) 색상 측정
- [0063] 분광 광도계(spectrophotometer; Cary Winuv, Varian, Seoul, Korea)를 이용하여 추출액 시료에 대한 200~700 nm에서의 흡광도를 조사하고, 475nm에서의 흡광도 값을 기준으로 색상을 비교하였다.
- [0064] (4) 총 폴리페놀 함량 및 총 플라보노이드 함량 측정
- [0065] Minussi 등 (2003)의 방법에 따라 추출액 시료 100μℓ에 2% 탄산나트륨(sodium carbonate) 용액 2 ml와 50% Folin-Ciocalteu reagent 100μℓ를 가한 후 실온에서 약 1시간 동안 정치시키고, 720 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 표준 물질인 갈산(gallic acid; Sigma-Aldrich Co, USA)의 표준 검량선에 의하여 총 폴리페놀(Total polyphenol, TP) 함량을 산출하였다. 또한, Meda 등 (2005)의 방법에 따라 추출액 시료 1 ml에 2% 염화알루미늄(aluminum chloride) 용액 1 ml와 50% 에탄올 수용액 1 ml를 첨가하고 혼합한 후 실온에서 10분간 반응시킨 다음 415 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 표준 물질인 퀘르세틴(quercetin; Sigma-Aldrich Co, USA)의 표준 검량선에 의하여 총 플라보노이드(Total flavonoid, TF) 함량을 산출하였다.
- [0066] (5) XOIA(Xanthine oxidase inhibitory activity) 및 AOIA(aldehyde oxidase inhibitory activity)의 측정
- [0067] XOIA(Xanthine oxidase inhibitory activity) 및 AOIA(aldehyde oxidase inhibitory activity)의 측정을 위한 효소원은 Rajagopalan 등(1962) 및 Maia 등(2002)의 방법에 따라 토끼의 간 조직으로부터 추출→황산암모늄

(ammonium sulfate) 분획→투석→원심분리를 행하여 부분 정제한 후 -70℃에서 보관하면서 공시하였다. XOIA(Xanthine oxidase inhibitory activity)는 Stirpe & Della Corte(1969)의 방법에 따라 기질인 잔틴(xanthine)을 우릭산(uric acid)으로 전환하였을 때, 대조구(추출액 시료를 첨가하지 않은 것)와 비교하여 억제 정도를 %로 나타내었다. AOIA(aldehyde oxidase inhibitory activity)는 Rajagopalan 등(1962)의 방법에 따라 기질 NMN(N^1 -methylnicotinamide)으로부터 산화된 피리돈(pyridone)을 300 nm에서 측정한 다음 대조구(추출액 시료 대신 증류수를 첨가한 것)와 비교하여 억제 정도를 %로 나타내었다.

[0068] 7. 발효 청미래덩굴 잎의 주요 기능성 지표 항목 측정 결과

[0069] 하기 표 2에 발효 청미래덩굴 잎과 비발효 청미래덩굴 잎의 주요 기능성 지표 항목 측정 결과를 나타내었다.

표 2

[0070]

발효용 균주의 종류	색상(O.D. at 475nm)	총 플라보노이드 함량(TF) : 총 폴리페놀 함량(TP)	관능 검사에 의한 종합적인 기호도	XOIA(대조구에 대한 %)	AOIA(대조구에 대한 %)
비발효	0.16	0.65	2.37	4.21	31.71
AO	0.61	0.76	3.98	4.62	42.55
AO9	0.66	0.89	4.12	5.78	48.52
AOB	0.67	0.71	3.57	4.38	41.05
AOE	0.65	0.83	4.03	5.16	47.94
BS	0.21	0.62	2.58	0.55	13.27
BB	0.23	0.60	2.41	1.24	10.14
MP	0.28	0.57	2.55	1.52	16.17
SC	0.20	0.55	2.18	0.76	9.20

[0071] 표 2에서 보이는 바와 같이 아스퍼질러스속 미생물로 발효시킨 청미래덩굴 잎은 다른 미생물로 발효시킨 청미래덩굴 잎 또는 비발효 청미래덩굴 잎에 비해 플라보노이드의 흡수 파장으로 사료되는 475nm 파장에서의 피크 값이 높게 나타났다. 이러한 결과는 아스퍼질러스속 미생물에 의한 청미래덩굴 잎의 발효에 의하여 청미래덩굴 잎에 존재하는 폴리페놀 성분들이 플라보노이드 성분으로 변화됨과 동시에 발효에 의하여 추출 수율이 높아진 결과로 판단된다. 총 플라보노이드 함량 : 총 폴리페놀 함량의 비도 아스퍼질러스속 미생물로 발효시킨 청미래덩굴 잎에서 다른 미생물로 발효시킨 청미래덩굴 잎 또는 비발효 청미래덩굴 잎보다 높게 나타나 플라보노이드의 비율이 높은 것으로 확인되었다. 또한, 아스퍼질러스속 미생물로 발효시킨 청미래덩굴 잎은 다른 미생물로 발효시킨 청미래덩굴 잎 또는 비발효 청미래덩굴 잎에 비해 관능 검사에 의한 종합적인 기호도가 현저하게 우수한 것으로 평가되었다. 이러한 결과는 아스퍼질러스속 미생물에 의한 발효 과정에서 청미래덩굴 잎의 신맛이 중화되고 구감(Mouth feel)이 향상된 것에 기인한 것으로 판단된다. 또한, 아스퍼질러스속 미생물로 발효시킨 청미래덩굴 잎은 다른 미생물로 발효시킨 청미래덩굴 잎 또는 비발효 청미래덩굴 잎에 비해 XOIA(Xanthine oxidase inhibitory activity) 및 AOIA(aldehyde oxidase inhibitory activity)가 매우 높은 것으로 나타났고 그 차이는 AOIA(aldehyde oxidase inhibitory activity)에서 현저하였다. XO는 체내에서 ROS를 생성할 뿐만 아니라 요통의 원인물질인 요산을 생성하는 효소이며, AO 역시 ROS를 생성함과 동시에 알코올성 간 손상의 유도 및 고지방 식이에 의한 지방간 생성에 깊이 연관되어 있는 효소로 알려져 있다.

[0072] II. 제 2차 실험 : 아스퍼질러스속 미생물에 의한 청미래덩굴 잎의 적정 발효기간 확립

[0073] 1. 청미래덩굴 잎 분말의 준비

[0074] 2012년 10월 대구광역시의 양령 시장에서 구입한 청미래덩굴(*Smilax china* L.) 잎을 수돗물로 깨끗이 세척한 후 열풍 건조기를 이용하여 40℃에서 충분히 건조시켰다. 이후 건조된 청미래덩굴(*Smilax china* L.) 잎을 분쇄기(모델명 : HNF-1710; 공급자 : Hanil Electric Co Ltd, Seoul, Korea)를 사용하여 약 40 메쉬(mesh) 정도의 입도 크기로 분쇄한 후 폴리에틸렌 필름으로 밀봉하여 4℃에서 보관하면서 후술하는 발효 시료로 사용하였다.

- [0075] 2. 발효용 균주 배양액의 제조
- [0076] 발효용 균주로는 이전의 실험에서 청미래당굴 잎 발효용으로 가장 적합한 것으로 나타난 *Aspergillus oryzae* KFR1 995 균주를 사용하였다.
- [0077] *Aspergillus oryzae* KFR1 995 균주를 Bacto™ malt extract(Becton, Dickinson and Company, Sparks, MD, USA)에 이식하고 25℃에서 10일 동안 진탕 배양하였다. 이후, 동일한 배지로 배양액 내 아스퍼질러스 오리제 농도를 10^8 cells/ml로 조정하여 *Aspergillus oryzae* KFR1 995 배양액을 준비하였다.
- [0078] 3. 발효 청미래당굴 잎의 제조
- [0079] 앞에서 준비한 청미래당굴 잎 분말 1.5kg에 종균액과 물의 혼합액 3ℓ를 첨가하고 골고루 혼합하여 총 수분 함량을 약 67%가 되게 조정하였다. 이때, 종균액으로는 앞에서 준비한 발효용 균주 배양액을 사용하였다. 또한, 종균액과 물의 혼합액은 청미래당굴 잎 분말 중량을 기준으로 5%(v/w)에 해당하는 종균액에 살균수를 혼합하여 총 3ℓ가 되도록 조정한 것이다. 이후, 청미래당굴 잎 분말, 종균액 및 물의 혼합물을 플라스틱 발효 상자(가로 50cm, 세로 70cm, 높이 18cm)에 약 5cm의 두께로 담고 플라스틱 발효 상자의 상부를 폴리에틸렌 필름으로 덮은 후 약 30℃에서 각각 10일, 20일 및 30일간 발효시켰다. 발효 시간별로 발효가 완료된 청미래당굴 잎을 폴리프로필렌 백(polypropylene bag)에 담고 오토클레이브(Autoclave) 안으로 옮겨 121℃에서 60분간 처리하여 살균하고, 40℃에서 건조하여 발효 청미래당굴 잎을 제조하였다.
- [0080] 4. 비발효 청미래당굴 잎의 제조
- [0081] 앞에서 준비한 청미래당굴 잎 분말 1.5kg에 물 3ℓ를 첨가하고 골고루 혼합하여 수분을 평형화시킨 후 이를 폴리프로필렌 백(polypropylene bag)에 담고 오토클레이브(Autoclave) 안으로 옮겨 121℃에서 60분간 처리하여 살균하였다. 이후, 살균된 청미래당굴 잎 분말을 40℃에서 건조하여 비발효 청미래당굴 잎을 제조하였다.
- [0082] 5. 발효 청미래당굴 잎의 주요 기능성 지표 항목 측정 방법
- [0083] (1) 열수 추출액의 제조
- [0084] 차 추출기(Tea Extractor; Damian Tea Co, Anyang, Gyeonggi-Do, Korea)에 열수(약 90℃의 물)를 넣고 여기에 앞에서 제조한 발효 청미래당굴 잎 또는 비발효 청미래당굴 잎을 각각 열수 부피 대비 1 중량%(w/v)로 첨가한 후 5분간 우려내어 열수 추출액을 제조하였다. 제조한 열수 추출액을 후술하는 주요 기능성 지표 항목 측정의 시료로 사용하였다.
- [0085] (2) 관능 검사
- [0086] 추출액 시료를 약 50℃의 보온 통에 보관하면서 관능 검사용 시료로 사용하였다. 훈련된 관능 요원 25명을 대상으로 향(aroma), 맛(taste), 색상(color), 밝기(brightness), 입에 닿는 감각(mouth feel) 및 종합적인 기호도(overall acceptability)를 5점 척도법으로 평가하였다(Herbert & Jeol 1993). 5점 척도법의 평가 점수 기준은 아주 나쁘다 : 1점; 나쁘다 : 2점; 보통이다 : 3점; 좋다 : 4점; 아주 좋다 : 5점으로 하였다.
- [0087] (3) 총 폴리페놀 함량 및 총 플라보노이드 함량 측정
- [0088] Minussi 등 (2003)의 방법에 따라 추출액 시료 100μℓ에 2% 탄산나트륨(sodium carbonate) 용액 2 ml와 50% Folin-Ciocalteu reagent 100μℓ를 가한 후 실온에서 약 1시간 동안 정치시키고, 720 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 표준 물질인 갈산(gallic acid; Sigma-Aldrich Co, USA)의 표준 검량선에 의하여 총 폴리페놀(Total polyphenol, TP) 함량을 산출하였다. 또한, Meda 등 (2005)의 방법에 따라 추출액 시료 1 ml에 2% 염화알루미늄(aluminum chloride) 용액 1 ml와 50% 에탄올 수용액 1 ml를 첨가하고 혼합한 후 실온에서 10분간 반응시킨 다

음 415 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 표준 물질인 퀘르세틴(quercetin; Sigma-Aldrich Co, USA)의 표준 검량선에 의하여 총 플라보노이드(Total flavonoid, TF) 함량을 산출하였다.

(4) 전자공여능(Electron donating ability) 측정

Blois(1958)의 방법에 따라 DPPH(1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl) 어세이를 이용하여 전자공여능(Electron donating ability, 이하 EDA로 표기함)을 측정하였다. 추출액 시료 0.2ml에 0.4mM DPPH(1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl) 용액 0.8ml를 가하고 10분간 방치한 다음, 525 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 전자공여능은 다음과 같은 식으로 계산하였다.

$$EDA(\%) = (1-A_1/A_0) \times 100$$

* A_1 : 시료 첨가구의 흡광도

* A_0 : 시료 무첨가구의 흡광도

(5) 철 환원력(Ferric reducing antioxidant power, FRAP) 측정

Benzie & Strani(1996)의 방법에 따라 추출액 시료 0.05 ml에 증류수 0.05 ml를 가하고 혼합한 후, 여기에 0.3M 아세트산 나트륨 버퍼(sodium acetate buffer, pH 3.60), 10 mM 2,4,6-tris (2-pyridyl)-s-triazine을 함유하는 40 mM HCl 용액 및 20 mM $FeCl_3$ 용액을 10:1:1의 부피 비로 혼합한 혼합용액 1.90 ml를 가하고 37℃에서 30분간 반응시킨 후 593 nm에서 흡광도를 측정하였다. FRAP(Ferric reducing antioxidant power)는 추출액 시료 제조를 위해 사용된 추출원료 건조 무게(g) 당 Fe^{3+} 이 Fe^{2+} 로 환원된 양을 $\mu mole$ 로 나타내었다.

(6) 지질과산화 억제활성(Lipid peroxidation inhibitory activity, LPOIA) 측정

지질과산화 억제활성(LPOIA)은 Banerjee 등(2005)의 방법을 일부 변형하여 측정하였다. 신선한 계란 노른자 10%(w/v)를 함유하는 50 mM Na-phosphate buffer(pH 7.4) 0.25ml에 추출액 시료 0.20ml와 증류수 0.55ml를 가하였다. 여기에 70 mM $FeSO_4$ 용액 0.05ml를 가하고 37℃에서 30분간 반응시킨 후, pH를 3.5로 조정한 20% 아세트산(acetic acid) 용액 1.5ml, 0.8% TBA(thiobabituric acid)를 함유하는 도데실황산나트륨(sodium dodecyl sulfate) 1.5ml 및 20% 트리클로로아세트산(trichloroacetic acid) 0.05 ml를 가하고 95℃에서 1시간 동안 가열한 다음 냉각하였다. 여기에 n-부탄올(n-butanol) 5ml를 가하고 3,000 rpm으로 10분간 원심분리하여 얻은 상층액의 흡광도를 532 nm에서 측정하였으며, 지질과산화 억제활성(LPOIA)은 다음과 같은 식으로 계산하였다.

$$LPOIA(\%) = (1-A_1/A_0) \times 100$$

* A_1 : 시료 첨가구의 흡광도

* A_0 : 시료 무첨가구의 흡광도

(7) XOIA(Xanthine oxidase inhibitory activity) 및 AOIA(aldehyde oxidase inhibitory activity)의 측정

XOIA(Xanthine oxidase inhibitory activity) 및 AOIA(aldehyde oxidase inhibitory activity)의 측정을 위한 효소원은 Rajagopalan 등(1962) 및 Maia 등(2002)의 방법에 따라 토끼의 간 조직으로부터 추출→황산암모늄(ammonium sulfate) 분획→투석→원심분리를 행하여 부분 정제한 후 -70℃에서 보관하면서 공시하였다. XOIA(Xanthine oxidase inhibitory activity)는 Stirpe & Della Corte(1969)의 방법에 따라 기질인 잔틴(xanthine)을 우릭산(uric acid)으로 전환하였을 때, 대조구(추출액 시료를 첨가하지 않은 것)와 비교하여 억제 정도를 %로 나타내었다. AOIA(aldehyde oxidase inhibitory activity)는 Rajagopalan 등(1962)의 방법에 따라 기질 NMN(N^1 -methylnicotinamide)으로부터 산화된 피리돈(pyridone)을 300 nm에서 측정한 다음 대조구(추출액 시료 대신 증류수를 첨가한 것)와 비교하여 억제 정도를 %로 나타내었다.

[0103] 6. 발효 청미래덩굴 잎의 주요 기능성 지표 항목 측정 결과

[0104] *Aspergillus oryzae* KFRI 995로 청미래덩굴 잎을 발효하여 얻은 발효 청미래덩굴 잎의 발효 시간에 따른 주요 기능성 지표 항목 측정 결과에서 "NF"는 비발효 청미래덩굴 잎의 열수 추출액을, "F10"은 10일 동안 발효하여 얻은 발효 청미래덩굴 잎의 열수 추출액을, "F20"은 20일 동안 발효하여 얻은 발효 청미래덩굴 잎의 열수 추출액을, "F30"은 30일 동안 발효하여 얻은 발효 청미래덩굴 잎의 열수 추출액을 각각 나타낸다.

[0105] (1) 관능 검사 결과

[0106] 하기 표 3은 *Aspergillus oryzae* KFRI 995로 청미래덩굴 잎을 발효하여 얻은 발효 청미래덩굴 잎의 발효 시간에 따른 관능 검사 결과를 나타낸 것이다. 하기 표 3에서 보이는 바와 같이 향에 대한 기호도는 비발효 청미래덩굴 잎 및 발효 청미래덩굴 잎 모두에서 유의적인 차이를 보이지 않았다. 맛에 대한 기호도는 10일 내지 30일간 발효시킨 F10, F20, F30 상호 간에는 유의적인 차이를 보이지 않았으나 발효시킨 경우가 발효시키지 않은 NF에 비하여는 양호한 것으로 나타났다. 이러한 현상은 발효시키지 않은 청미래덩굴 잎은 비교적 강한 신맛과 뚝은맛을 띠는데 비하여 발효시킨 경우는 이러한 맛이 없거나 감소하고 이들 맛에 덮여 있던 감미가 비교적 뚜렷하게 나타난 때문이라 사료된다. 차의 밝기에 대한 기호도는 NF, F10, F20 및 F30 간에 유의적인 차이가 없었다. NF의 경우는 연한 황색을 띠는 반면 F10, F20 및 F30은 맑은 적색을 띠어 발효에 의하여 밝기에 대한 기호도가 낮아질 것으로 예상한 바와는 다른 결과를 나타내었다. 이러한 결과는 발효에 의하여 청미래덩굴 잎에 존재하는 청색을 띠는 엽록소(chlorophyll)이 소실되면서 F10, F20 및 F30에 해당하는 열수 추출액이 맑고 깨끗해 보이는 색상으로 변화된 때문으로 판단된다. 또한, 입에 닿는 감각과 종합적인 기호도도 맛에 대한 기호도와 동일하게 발효시킨 청미래덩굴 잎이 발효시키지 않은 청미래덩굴 잎에 비하여 유의적으로 높은 값을 나타내었다. 향(aroma), 맛(taste), 밝기(brightness) 및 입에 닿는 감각(mouth feel)에 대한 기호도는 특히 발효 차의 주요 품질평가 항목으로 알려져 있다(Owuor 등 2006; Chen 등 2000). 일반적으로 생엽에 존재하는 엽록소가 발효에 의하여 분해되어 소실되지 않으면 이들이 어두운 색상을 띠게 되어 밝기에 대한 기호도를 떨어트리게 된다. 또한, 차 잎 발효의 중요한 특징은 차 잎의 주요 성분인 카테킨(catechin)을 비롯한 폴리페놀(polyphenol) 성분을 폴리페놀 옥시다아제(polyphenol oxidase)에 의하여 산화, 중합시킴으로써 새로운 기능성 성분인 차 플라빈(tea flavins) 또는 차 루비진(tea rubigins)을 생성하고 이로 인해 적색계의 아름다운 색상을 띄게 함과 동시에 부드러운 맛을 갖게 하고 소화성을 향상시키는데에 있다(Lee 등 2012).

표 3

[0107]

추출액 시료 구분	관능검사 항목				
	향	맛	밝기	입에 닿는 감각	종합 기호도
NF	2.75	2.15	3.16	2.19	2.37
F10	2.89	3.76	3.08	3.83	4.12
F20	2.84	3.65	3.04	3.45	3.90
F30	2.52	3.59	2.94	3.38	3.78

[0108] (2) 총 폴리페놀(TP) 함량 및 총 플라보노이드(TF) 함량 측정 결과

[0109] 도 1은 *Aspergillus oryzae* KFRI 995로 청미래덩굴 잎을 발효하여 얻은 발효 청미래덩굴 잎의 발효 시간에 따른 총 폴리페놀(TP) 함량 및 총 플라보노이드(TF) 함량 측정 결과를 나타낸 그래프이다. 도 1에서 보이는 바와 같이 발효 시간이 길어짐에 따라 TP 함량 및 TF의 함량이 점진적으로 감소함을 알 수 있다. 그러나, 발효 시간에 따라 TP의 감소율이 TF의 감소율에 비하여 상대적으로 커서 F20과 F30에서 TF:TP의 비율(%)은 각각 97.76% 및 89.38%로 나타났고, 이는 폴리페놀(polyphenol)의 대부분이 플라보노이드(flavonoid)임을 의미한다. 발효에 의한 폴리페놀(polyphenol) 성분의 감소는 발효도, 발효기간 및 발효방법에 따라 차이를 보이는 것으로 알려져 있으며 발효시에 비수용성 폴리페놀(polyphenol) 성분들이 수용성의 플라보노이드(flavonoid)로 전환한다는 보고도 있다 (Lee 등 2012).

[0110] 전통 메주발효균인 아스퍼질러스 오리재(*Aspergillus oryzae*)를 포함한 아스퍼질러스속 미생물은 발효시 아밀라아제(α-amylase), 프로테아제(protease)와 같은 효소를 강력하게 분비할 뿐만 아니라 펙티나아제(pectinase)와 같은 식물체 세포벽 성분의 분해에 관여하는 효소를 분비함으로써 세포벽과 강하게 결합하여 용출되기 어려

은 기능성 성분들을 쉽게 가용화되게 하는 효과가 있다(Angayarkanni 등 2002). 또한, 아스퍼질러스속 미생물은 발효시 탄나아제(tannase)를 분비함으로써(Garcia-Conesa 등 2001) 식물체에 널리 분포하는 떫은맛의 원인이 되는 갈로탄닌(galloannins) 등을 분해시켜 떫은맛을 감소시키고 폴리페놀 함량을 감소시키는 효과가 있다. 식물체에 존재하는 폴리페놀(polyphenol) 성분은 항산화 작용을 비롯한 다양한 생리활성을 나타내며(Osawa 1994), 그 함량에 비례하여 항산화력이 높아지는 것으로 보고되고 있다(Holasova 등 2002). 그러나 한편으로는 폴리페놀(polyphenol) 성분의 함량이 높을수록 활성산소를 생성하는 과산화수소의 함량이 높다는 보고가 있으며(Arakawa 등 2004), 또한 폴리페놀 성분들은 소화작용을 억제하고 떫은맛을 나타내어 기호도를 떨어뜨리는 것으로 알려져 있다 (Lee 등 2012).

[0111] (3) 전자공여능(Electron donating ability, EDA) 및 철 환원력(Ferric reducing antioxidant power, FRAP) 측정 결과

[0112] 도 2는 *Aspergillus oryzae* KFRI 995로 청미래덩굴 잎을 발효하여 얻은 발효 청미래덩굴 잎의 발효 시간에 따른 전자공여능(Electron donating ability, EDA) 측정 결과를 나타낸 그래프이고, 도 3은 *Aspergillus oryzae* KFRI 995로 청미래덩굴 잎을 발효하여 얻은 발효 청미래덩굴 잎의 발효 시간에 따른 철 환원력(Ferric reducing antioxidant power, FRAP) 측정 결과를 나타낸 그래프이다.

[0113] EDA는 체내에서 생성되는 ROS에 전자를 공여하여 산화를 막는 작용을 하며(Choi 등 2003), FRAP는 철 산화물을 원래의 상태로 환원시키는 힘을 의미한다. EDA와 FRAP는 모두 항산화를 나타내는 중요한 지표로 활용되며(Song 등 2006), EDA가 높을수록 FRAP도 높아지는 것으로 알려져 있다(Kang 등 1995). 도 2 내지 도 3에서 보이는 바와 같이 발효 시간이 길어짐에 따라 추출물 시료의 EDA 및 FRAP는 점진적으로 감소하였으나, 큰 차이를 보이지 않았다. Ko와 Yang(2011)은 청미래덩굴 잎 열수 추출 농축물의 EDA는 33.6%라 보고한바 있으며, 본 실험에서 비발효 청미래덩굴 잎의 1% 열수 추출액의 EDA는 29.01%로 이들의 결과와 유사하였다. 한편, EDA와 같은 항산화능은 폴리페놀(polyphenol)의 함량이 높을수록 높은 것으로 알려져 있으나(Torel 등 1986), 본 실험에서는 발효 시간이 늘어남에 따라 발효 청미래덩굴 잎의 폴리페놀(polyphenol)의 함량이 발효 10일째는 24.91%, 20일째는 56.92%, 30일째는 64.41%로 감소함에도 불구하고 EDA와 FRAP의 감소율은 폴리페놀(polyphenol)의 감소율에는 미치지 않을 정도로 비교적 낮았다. 이러한 결과는 아스퍼질러스속 미생물에 의한 청미래덩굴 잎의 발효에 의해 항산화능을 지니는 새로운 물질이 생성된 것에 기인한 것으로 판단된다. 다른 차 잎의 발효에서도 카테킨(catechin)과 같은 항산화성 물질이 감소하는 대신에 새로운 항산화 물질인 차 플라빈(teaflavins)나 차 루비진(tharubigins)가 생성되는 것으로 보고되고 있다 (Lee 등 2012).

[0114] (4) 지질과산화 억제활성(Lipid peroxidation inhibitory activity, LPOIA) 측정 결과

[0115] 도 4는 *Aspergillus oryzae* KFRI 995로 청미래덩굴 잎을 발효하여 얻은 발효 청미래덩굴 잎의 발효 시간에 따른 지질과산화 억제활성(Lipid peroxidation inhibitory activity, LPOIA) 측정 결과를 나타낸 그래프이다.

[0116] 도 4에서 보이는 바와 같이 발효 시간이 길어짐에 따라 추출물 시료의 LPOIA는 점진적으로 감소하였으나, 큰 차이를 보이지 않았다. LPOIA는 생체막에 존재하는 불포화지방산이 산화, 분해되어 독성을 나타내는 알데하이드(aldehyde), 케톤(ketone) 및 락톤(lactone)과 같은 물질이 생성(Hur 등 2004)되는 것을 차단하는 힘을 의미한다. 도 4에서 보이는 결과에 의할 때, 청미래덩굴 잎을 아스퍼질러스속 미생물로 발효하여도 LPOIA의 잔존 활성이 비교적 높게 유지되었고, 산화적 스트레스로 인한 세포조직의 손상을 경감시킬 수 있는 기능성 소재로서 발효 청미래덩굴 잎의 활용성이 기대된다.

[0117] (5) XOIA(Xanthine oxidase inhibitory activity) 및 AOIA(aldehyde oxidase inhibitory activity)의 측정 결과

[0118] 하기 표 4는 *Aspergillus oryzae* KFRI 995로 청미래덩굴 잎을 발효하여 얻은 발효 청미래덩굴 잎의 발효 시간에 따른 XOIA 및 AOIA 측정 결과를 나타낸 것이다.

표 4

추출액 시료의 구분	XOIA(대조구에 대한 %)	AOIA(대조구에 대한 %)
NF	4.21	31.71
F10	5.78	48.52
F20	5.16	47.34
F30	4.48	40.14

상기 표 4에서 보이는 바와 같이 비발효 청미래덩굴 잎과 발효 청미래덩굴 잎의 XOIA는 약 4~6%로 낮게 나타났으나, AOIA는 약 30~50%로 높게 나타났고, XOIA 및 AOIA는 발효에 의해 증가하는 것으로 나타났다. 이러한 결과는 청미래덩굴 뿌리인 토복령 추출물이 XO의 활성을 억제함으로써 통풍과 관련이 있는 요산의 생성을 억제한다는 보고(Chena 등 2011)와 차이를 보였으나, 발효 청미래덩굴 잎은 비교적 높은 AO 억제 활성을 보여 이와 관련되는 기능적인 효과가 크게 기대된다. XO와 AO는 동식물계에 널리 분포하며 종에 따라 특성적 차이를 나타내는 것으로 알려져 있다(Yasuhabara 등 2002). XO와 AO는 기질 특이성에서는 약간의 차이를 보이지만 생화학적으로는 대단히 유사한 특성을 가진 효소(Yamaguchi 등 2007)로 피리미딘(pyrimidine), 퓨린(purine), 프테리딘(pteridine) 유도체와 같은 N-헤테로고리 화합물(Garattini 등 2008)이나 친유성 방향족 화합물의 산화에 관여한다(Krenitsky 1978). 또한, 아조(azo) 염료(Stoddart & Levine, 1992), 항암제(Itoh 2009) 및 항고혈압제(Dambrova 등 1998)의 환원에 관여하여 때로는 생체 내에서 이들 약물의 효과를 감소시키기도 하지만 치료 후 체내에 잔존하는 약성을 해독하는 작용도 한다. AO는 XO가 결핍된 경우에 알로퓨리놀(allopurinol)과 피라진아마이드(pyrazinamide) 등의 대사에 관여하며(Moriwaki 등 1993), 두 효소 모두 분자 상의 산소를 전자수용체로 이용하여 슈퍼옥사이드(superoxide)와 과산화수소(hydrogen peroxide) 등과 같은 ROS를 생성하는 효소이다(Kundu 등 2007). 특히, AO는 에탄올에 의한 간 손상(Shaw와 Jayatilleke, 1990), 티오아세트아마이드(thioacetamide) 및 클로로포름(chloroform)에 의한 간 손상(Ali 등 2008)을 촉진하고 지방세포(adipocyte)의 분화와 지질의 저장 및 지방세포 내의 단백질(adiponectin) 분비에 관여하는 등 비만과 관련이 있는 것으로 보고되고 있다(Johanna 등 2008). 또한, AO는 고지방식이 및 알코올성 지방간 생성에 관여(Shaw와 Jayatilleke 1990) 할 뿐만 아니라 항비만 아디포카인(adipokine)인 아디포넥틴(adiponectin)에 의해 AO의 활성이 저하된다는 보고도 있다(Neumeier 등 2006). 일반적으로 식물체에 함유된 플라보노이드(flavonoid)는 AO의 활성을 억제하며 그 억제 정도는 플라보노이드(flavonoid)의 글리코시드(glycoside) 형태에 비하여 아글리콘(aglycone) 형태에서 현저하다(Rashidi와 Nazemiyeh 2010). 본 실험에서 아스퍼질러스속 미생물에 의해 청미래 덩굴 잎이 발효되었을 때 TP와 TF의 함량이 감소함에도 AO 억제 활성은 오히려 증가하였으며, 이러한 결과는 발효에 의하여 청미래덩굴 잎에 존재하는 글리코시드(glycoside) 형태의 플라보노이드(flavonoid)가 아글리콘(aglycone) 형태로 분해됨을 시사한다.

III. 제 3차 실험 : 발효 청미래덩굴 잎의 열수 추출물이 알코올 급여 마우스의 혈청 및 간 조직에 미치는 영향

1. 청미래덩굴 잎 분말의 준비

2012년 10월 대구광역시의 양령 시장에서 구입한 청미래덩굴(*Smilax china* L.) 잎을 수돗물로 깨끗이 세척한 후 열풍 건조기를 이용하여 40℃에서 충분히 건조시켰다. 이후 건조된 청미래덩굴(*Smilax china* L.) 잎을 분쇄기(모델명 : HNF-1710; 공급자 : Hanil Electric Co Ltd, Seoul, Korea)를 사용하여 약 40 메쉬(mesh) 정도의 입도 크기로 분쇄한 후 폴리에틸렌 필름으로 밀봉하여 4℃에서 보관하면서 후술하는 발효 시료로 사용하였다.

2. 발효용 균주 배양액의 제조

발효용 균주로는 이전의 실험에서 청미래덩굴 잎 발효용으로 가장 적합한 것으로 나타난 *Aspergillus oryzae* KFR1 995 균주를 사용하였다.

Aspergillus oryzae KFR1 995 균주를 Bacto™ malt extract(Becton, Dickinson and Company, Sparks, MD, USA)에 이식하고 25℃에서 10일 동안 진탕 배양하였다. 이후, 동일한 배지로 배양액 내 아스퍼질러스 오리제 농도를 10^8 cells/ml로 조정하여 *Aspergillus oryzae* KFR1 995 배양액을 준비하였다.

[0127] 3. 발효 청미래덩굴 잎 및 이의 열수 추출물의 제조

[0128] 앞에서 준비한 청미래덩굴 잎 분말 1.5kg에 종균액과 물의 혼합액 3ℓ를 첨가하고 골고루 혼합하여 총 수분 함량을 약 67%가 되게 조정하였다. 이때, 종균액으로는 앞에서 준비한 발효용 균주 배양액을 사용하였다. 또한, 종균액과 물의 혼합액은 청미래덩굴 잎 분말 중량을 기준으로 5%(v/w)에 해당하는 종균액에 살균수를 혼합하여 총 3ℓ가 되도록 조정한 것이다. 이후, 청미래덩굴 잎 분말, 종균액 및 물의 혼합물을 플라스틱 발효 상자(가로 50cm, 세로 70cm, 높이 18cm)에 약 5cm의 두께로 담고 플라스틱 발효 상자의 상부를 폴리에틸렌 필름으로 덮은 후 약 30℃에서 각각 10일, 20일 및 30일간 발효시켰다. 발효 시간별로 발효가 완료된 청미래덩굴 잎을 폴리프로필렌 백(polypropylene bag)에 담고 오토클레이브(Autoclave) 안으로 옮겨 121℃에서 60분간 처리하여 살균하고, 40℃에서 건조하여 발효 청미래덩굴 잎을 제조하였다. 차 추출기(Tea Extractor; Damian Tea Co, Anyang, Gyeonggi-Do, Korea)에 열수(약 100℃의 물)를 넣고 여기에 앞에서 제조한 발효 청미래덩굴 잎을 각각 열수 부피 대비 2 중량%(w/v)로 첨가한 후 5분간 우려내어 열수 추출물 제조하였다. 이후, 열수 추출물을 121℃에서 20분간 살균한 후 냉각하고 4℃에서 보관하면서 후술하는 동물실험의 시료로 사용하였다.

[0129] 4. 비발효 청미래덩굴 잎 및 이의 열수 추출물의 제조

[0130] 앞에서 준비한 청미래덩굴 잎 분말 1.5kg에 물 3ℓ를 첨가하고 골고루 혼합하여 수분을 평형화시킨 후 이를 폴리프로필렌 백(polypropylene bag)에 담고 오토클레이브(Autoclave) 안으로 옮겨 121℃에서 60분간 처리하여 살균하였다. 이후, 살균된 청미래덩굴 잎 분말을 40℃에서 건조하여 비발효 청미래덩굴 잎을 제조하였다. 차 추출기(Tea Extractor; Damian Tea Co, Anyang, Gyeonggi-Do, Korea)에 열수(약 100℃의 물)를 넣고 여기에 앞에서 제조한 비발효 청미래덩굴 잎을 각각 열수 부피 대비 2 중량%(w/v)로 첨가한 후 5분간 우려내어 열수 추출물을 제조하였다. 이후, 열수 추출물을 121℃에서 20분간 살균한 후 냉각하고 4℃에서 보관하면서 후술하는 동물실험의 시료로 사용하였다.

[0131] 5. 발효 청미래덩굴 잎의 열수 추출물을 이용한 동물실험

[0132] (1) 동물실험 방법

[0133] 평균 체중이 20~23g인 4주령의 ICR(Crljori: CD-1), SPF/VAF outbred mice(Orient Ltd., Sungnam-si, Korea)에 기본사료인 5L79 diets(PMI Nutrition, Brentwood, LA)를 급여하여 1주일간 환경에 적응시킨 후, 하기 표 5에서와 같이 4개군(5마리/군)으로 나누어 4주간 사육하였다. 하기 표 5에서 보이는 바와 같이 실험군을 기본사료만을 공급하고 음용수로는 증류수를 급여한 정상대조군(NC), 기본사료만을 급여하고 증류수 대신에 3% 알코올을 대신 급여한 알코올 급여대조군 (AC), 기본사료만을 급여하면서 증류수 대신에 3% 알코올을 함유하는 비발효 청미래덩굴 잎의 열수 추출물을 급여한 군(AC+SC), 기본사료만을 급여하면서 증류수 대신에 3% 알코올을 함유하는 발효 청미래덩굴 잎의 열수 추출물을 급여한 군(AC+FSC)으로 구분하였다.

[0134] 기본사료는 4℃에서 보관하면서 매일 신선한 식이를 공급하였고, 음용수로 사용한 알코올은 99.98%의 알코올 (Sigma Co USA)를 희석하여 사용하였다. 사육장은 stainless steel cage를 사용하였으며, 온도 및 습도는 각각 23℃, 60%로 조정하였다. 명암 주기는 12시간 간격으로 설정하였으며 음용수와 식이는 자유 섭취시켰다.

표 5

식이 및 음용수 조성		실험군			
		NC	AC	AC+SC	AC+FSC
기본사료	5L79 다이어트	100	100	100	100
음용수	증류수	○	-	-	-
	3% 알코올	-	○	○	○
	SC	-	-	○	-
	FSC	-	-	-	○

[0136] * SC : 비발효 청미래덩굴 잎의 2% 열수 추출물

- [0137] * FSC : 발효 청미래덩굴 잎의 2% 열수 추출물
- [0138] (2) 측정 항목 및 측정 방법
- [0139] 1) 체중, 식이 섭취량, 음용수 섭취량
- [0140] 체중, 식이 섭취량 및 음용수 섭취량은 전 실험기간을 통하여 매일 일정한 시간에 측정하였다. 식이효율(feed efficiency ratio, FER)은 같은 기간 동안의 체중 증가량을 동일 기간의 식이 섭취량으로 나눈 값으로 하였다.
- [0141] 2) 분석용 시료의 채취
- [0142] 실험 식이로 4주간 사육한 흰쥐를 물만 주고 24시간 동안 금식시킨 후 에테르(ether) 마취 하에서 복부 대동맥 으로부터 채혈한 다음, 빙냉의 생리식염수로 간을 관류하고 장기를 적출 한 후 습기를 제거하여 무게를 측정하였다. 채취한 혈액은 실온에서 응고시킨 다음 4℃, 2,500rpm의 조건으로 15분간 원심분리하여 혈청을 분리한 후 -70℃에서 보관하면서 분석용 시료로 사용하였다.
- [0143] 3) 혈청 지질(lipid) 함량 측정
- [0144] 혈청의 중성지질(triglyceride, TG) 함량, 총 콜레스테롤(total cholesterol) 함량 및 HDL-콜레스테롤(HDL-cholesterol) 함량은 kit 시약(AM 157S-K, AM 202-K, AM 203-K, Asanpharm Co., Seoul, Korea)으로 측정하였고, LDL-콜레스테롤(LDL-cholesterol) 함량은 Friedewald 등(1972)의 방법에 준하여 다음과 같은 식으로 계산하였다.
- [0145] $LDL\text{-cholesterol} = total\ cholesterol - (triglyceride/5 + HDL\text{-cholesterol})$ 로 계산하였다.
- [0146] 4) 간 조직의 지질(lipid) 함량 측정
- [0147] Folch 등(29)의 방법에 따라 클로로포름(chloroform) : 메탄올(methanol)의 비가 2 : 1인 혼합액에 간 조직의 마쇄액 일정량을 가해 잘 혼합한 다음 방치한 후, 유기용매에 의해 분리된 부분 일정량을 취해 질소가스 존재 하에서 휘발시킨 후 중성지질(triglyceride, TG) 함량은 kit 시약(AM 157S-K, Asanpharm Co., Korea)으로 측정하였고, 총 콜레스테롤(total cholesterol) 함량은 kit 시약(AM 202-K, Asanpharm Co., Korea)으로 측정하였고, 총 지질(total lipid) 함량은 Frings 등(1972)의 방법에 따라 측정하였다.
- [0148] 5) 간 조직의 ADH 및 ALDH의 활성측정
- [0149] 알코올 디하이드로게나제(alcohol dehydrogenase: ADH) 및 아세트알데하이드 디하이드로게나제(acetaldehyde dehydrogenase: ALDH)의 활성 측정용 효소원으로 적출한 동물의 간 조직 일정량에 4배량의 빙냉의 0.25M 설탕 용액을 가하여 균질화한 다음 10,000×g로 20분간 원심분리하여 나온 상정액(postmitochondrial fraction, PMF) 및 미토콘드리아 분획을 사용하였다. 알코올 디하이드로게나제의 활성은 Bernet & Bergermeyer의 방법(Bernet 1983)에 따라 기질인 에탄올과 NAD(nicotinamide adenine dinucleotide)를 첨가하여 반응시키는 동안 생성된 NADH(reduce NAD)의 함량을 340nm에서 측정하였으며 활성도는 분당 단백 1mg이 생성시킨 NADH의 양을 nmole로 나타내었다. 아세트알데하이드 디하이드로게나제의 활성은 Lundquist의 방법(Bernet 1983)에 따라 기질인 아세트알데하이드와 NAD를 첨가하여 반응시키는 동안 생성된 NADH의 함량을 파장 340nm에서 측정하였으며, 활성도는 분당 단백 1mg이 생성시킨 NADH의 양을 nmole로 나타내었다.
- [0150] 6) 간 조직의 XO(Xanthine oxidase) 및 AO(aldehyde oxidase)의 활성 측정
- [0151] 간 조직으로부터 추출한 PMF를 효소원으로 하여, XO 활성도는 Stirpe와 Della Corte(1969)의 방법에 따라 기질 잔틴(xanthine)을 우릭산(uric acid)로 전환하는 정도를 정상대조군에 대한 %로 나타내었으며, AO 활성도는 Rajagopalan 등(1962)의 방법에 따라 기질 NMN (N¹-methyl nicotinamide)으로부터 산화된 피리돈(pyridone)을

300 nm에서 측정된 다음 정상대조군에 대한 %로 나타내었다.

[0152] 7) ALT(alanine aminotransferase) 활성 측정

[0153] ALT 활성은 kit 시약(Asan Pharm Co., Seoul Korea)으로 측정하였으며 Karmen unit로 나타내었다.

[0154] (3) 측정 결과

[0155] 1) 체중, 식이 섭취량, 음용수 섭취량 등

[0156] 하기 표 6은 발효 청미래덩굴 잎의 열수 추출물이 알코올 섭취 실험동물의 체중, 식이 섭취량, 음용수 섭취량 등에 미치는 영향을 나타낸 것이다.

표 6

[0157]

측정 항목	실험군 구분			
	NC	AC	AC+SC	AC+FSC
초기중량(g)	29.71	29.64	29.40	29.05
체중증가량(g/주)	2.25	1.21	1.71	2.08
최종중량(g)	38.70	34.49	36.22	37.35
식이 섭취량(g/주)	42.55	39.47	40.61	41.13
음용수 섭취량(ml/주)	67.22	103.52	90.18	83.85
식이효율	0.05	0.03	0.04	0.05

[0158] 상기 표 6에서 보이는 바와 같이 체중증가량은 알코올을 섭취한 AC, AC+SC, AC+FSC군 모두가 정상군(NC) 보다는 보다 유의적으로 낮았으나 청미래덩굴 잎 열수 추출물을 급여한 군에서는 체중증가량이 알코올만을 섭취한 군에 비해 높아지는 경향을 나타내었으며 이러한 경향은 비발효 청미래덩굴 잎에 비하여 발효 청미래덩굴 잎에서 컸다. 음용수 섭취량은 3% 알코올을 급여한 군들(AC, AC+SC, AC+FSC)에서 증류수를 급여한 NC군에 비하여 높은 경향을 보였으나 발효 청미래덩굴 잎 열수 추출물을 급여한 군은 비발효 청미래덩굴 잎 열수 추출물을 급여한 군 및 알코올만을 급여한 군보다 낮게 나타났다. 이러한 현상은 사육 초기에는 큰 차이를 보이지 않았으나 3% 알코올을 증류수 대신에 급여한 군들에서는 식이 20일 후부터 섭취량의 급격한 증가를 나타내는 것으로 미루어 만성적인 알코올의 식이로 인한 증독현상으로 사료되며, 발효 청미래덩굴 잎 열수 추출물을 급여한 군에서는 그 정도가 크게 완화됨을 알 수 있다.

[0159] 알코올은 탄수화물이나 단백질에 비하여 칼로리 밀도가 높아 체내 신진대사가 활성화되어 높은 칼로리를 내며, 체내 산소 소비량이 증가하며 호기성 대사의 장애를 유발하고 이로 인한 식욕부진과 영양소 부족현상을 초래하게 되며 체중이 감소하는 현상이 나타난다(Pikaar et al 1897; Gruchow et al 1985; Luciana et al 2009). 만성적인 알코올 섭취는 이러한 현상이 더욱 심하게 나타나며 알코올 대사의 부진으로 알코올 분해물인 아세트알데하이드(acetaldehyde)가 잔류하여 숙취나 소화관 점막의 손상을 유발하며(Cederbaum 1991; Lieber 1997) 식이 섭취량이 감소하는 동시에 체중감소량이 더욱 높아진다.

[0160] 2) 장기 중량

[0161] 하기 표 7은 발효 청미래덩굴 잎의 열수 추출물이 알코올 섭취 실험동물의 장기 중량에 미치는 영향을 나타낸 것이다.

표 7

[0162]

실험군 구분	장기 구분(g/마우스)			
	간	신장	심장	고환
NC	1.15	1.04	0.12	0.07
AC	1.26	1.09	0.12	0.08
AC+SC	1.19	1.08	0.11	0.07
AC+SFC	1.16	1.06	0.12	0.07

[0163] 상기 표 7에서 보이는 바와 같이 모든 실험군에서 신장, 심장 및 고환의 중량은 차이를 보이지 않았으나 간의 경우는 알코올만 급여한 군(AC)에서 현저한 비대현상을 나타내었다. 그리고 비발효 청미래당굴 잎 열수 추출물과 발효 청미래당굴 잎 열수 추출물을 급여한 군은 모두 정상군에는 미치지 못하나 AC군에 비하여는 간의 중량이 뚜렷하게 낮았으며 발효 청미래당굴 잎 열수 추출물을 급여한 군에서 비발효 청미래당굴 잎 열수 추출물을 급여한 군에 비하여 더욱 낮은 수치를 나타내었다

[0164] 일반적으로 고지방식이나 고콜레스테롤 식이 또는 만성적으로 음주를 지속하면 체내 영양소대사의 불균형을 초래하게 되며 면역기능이 저하되거나 알코올에 의한 독성 및 이로 인하여 생성된 활성산소종에 의하여 특히 간 조직의 손상과 함께 지질함량의 누적으로 간이 비대해 진다(Cederbaum 1991; Lieber CS 1992; Lieber 1997; Mantle과 Preedy 1999; Das 등 2005). 따라서, 상기 표 7에서 나타난 결과는 발효 청미래당굴 잎 열수 추출물이 만성적인 음주시에도 알코올에 의한 간 조직의 손상을 크게 완화함을 시사한다.

[0165] 3) 혈청 지질 함량

[0166] 하기 표 8은 발효 청미래당굴 잎의 열수 추출물이 알코올 섭취 실험동물의 혈청 지질 함량에 미치는 영향을 나타낸 것이다. 하기 표 8에서 각 측정 항목 값은 정상대조군에 대한 %로 나타내었다.

표 8

실험군 구분	혈청 지질 구분(NC군 기준 백분율)			
	중성지질	총 콜레스테롤	HDL-콜레스테롤	LDL-콜레스테롤
NC	100	100	100	100
AC	124.6	162.6	78.4	329.3
AC+SC	118.7	144.8	88.8	256.3
AC+SFC	107.0	129.1	94.2	202.1

[0168] 상기 표 8에서 보이는 바와 같이 중성지질, 총 콜레스테롤 및 LDL-콜레스테롤 함량은 NC군에 비하여 알코올을 급여한 AC, AC+SC 및 AC+FSC군에서 현저하게 높았다. 그러나 AC+SC 및 AC+FSC군에서는 알코올 섭취로 증가한 지질 성분들의 함량이 뚜렷하게 감소하는 경향을 나타내었으며 그 감소율은 발효 청미래당굴 잎 열수 추출물을 급여한 군에서 비발효 청미래당굴 잎 열수 추출물을 급여한 군에 비하여 크게 나타났다. 한편 몸에 이로운 HDL-콜레스테롤 함량은 AC군이 NC군에 비하여 유의적으로 감소하였고 AC+SC군은 AC군과의 유의차를 보이지 않는 반면 AC+FSC군은 AC군과 비교하였을 때 유의적인 증가를 보였다.

[0169] 4) 간 조직의 지질 함량

[0170] 하기 표 9는 발효 청미래당굴 잎의 열수 추출물이 알코올 섭취 실험동물의 간 조직 지질 함량에 미치는 영향을 나타낸 것이다. 하기 표 9에서 각 측정 항목 값은 정상대조군에 대한 %로 나타내었다.

표 9

실험군 구분	간 조직의 지질 구분(NC군 기준 백분율)			
	총 지질	총 중성지질	총 콜레스테롤	ALT 활성
NC	100	100	100	100
AC	137.2	181.6	131.5	183.3
AC+SC	134.9	138.2	117.9	150.3
AC+SFC	130.2	116.2	104.0	122.3

[0172] 상기 표 9에서 보이는 바와 같이 총 중성지방 및 총 콜레스테롤의 함량은 청미래당굴 잎 열수 추출물을 급여한 군에서 알코올만 급여한 군(AC)에 비하여 낮은 함량을 나타내었으며, 특히 발효 청미래당굴 잎 열수 추출물을 급여한 군에서 비발효 청미래당굴 잎 열수 추출물을 급여한 군에 비하여 유의적으로 낮았다. 알코올을 만성적으로 섭취하는 경우 알코올 분해효소인 ADH와 ALDH에 의해 NAD가 NADH로 환원되면서 NADH가 과잉으로 축적된다.

축적된 NADH는 지방산의 합성을 촉진시켜 간 조직 내에 지방을 축적하게 하고 지방간이 되게 한다(Cederbaum 1991; Lieber 1991; Lieber 1992; Lieber 1997; Lands 등 1999; Mantle과 Preedy 1999; Das 등 2005). 한편, 간 손상의 지표 효소로 알려진 ALT 활성은 AC군이 NC군에 비하여 현저하게 높았으나 발효 청미래덩굴 잎 열수 추출물 급여군인 AC+FSC군은 AC군에 비하여 ALT 활성이 매우 낮아 간 손상을 예방하거나 지연하는 것으로 나타났다. 이러한 결과로부터 발효 청미래덩굴 잎 열수 추출물이 만성적인 알코올 섭취로 유발할 수 있는 지방간의 발생을 예방하거나 치유하는 효과가 있음을 알 수 있고, 발효 청미래덩굴 잎 열수 추출물의 의약품 소재나 다양한 기능성 식품 소재로의 활용성이 높음을 시사한다.

[0173] 5) 간 조직에서의 알코올 대사관련 효소 활성

[0174] 하기 표 10은 발효 청미래덩굴 잎의 열수 추출물이 알코올 섭취 실험동물의 간 조직에서의 알코올 대사관련 효소 활성에 미치는 영향을 나타낸 것이다. 하기 표 10에서 각 측정 항목 값은 정상대조군에 대한 %로 나타내었다.

표 10

[0175]

실험군 구분	알코올 대사효소 구분(NC군 기준 백분율)	
	ADH 활성	ALDH 활성
NC	100	100
AC	61.2	77.0
AC+SC	76.0	85.9
AC+FSC	96.8	93.5

[0176] 상기 표 10에서 보이는 바와 같이 청미래덩굴 잎 열수 추출물을 급여한 군의 알코올 디하이드로게나제(alcohol dehydrogenase: ADH) 활성 및 아세트알데하이드 디하이드로게나제(acetaldehyde dehydrogenase: ALDH)의 활성은 AC군 및 AC+SC군에 비해 유의적으로 높은 값을 나타내었고, 정상대조군인 NC군의 값과 큰 차이를 보이지 않았다. 일반적으로 체내에 섭취된 에탄올은 ADH에 의해 아세트알데하이드(acetaldehyde)로 전환되고, 아세트알데하이드는 ALDH에 의해 아세트산(acetic acid)으로 산화되며, 궁극적으로 아세틸 조효소(acetyl CoA)로 전환되어 에너지를 생성한다(Lieber 1997). 아세트알데하이드는 에탄올 대사의 중간생성물로 알코올 대사가 원활하지 않는 경우 체내에 잔존하여 조직 손상과 숙취를 유발하며 조직 내 각종 활성산소종을 생성한다(Lieber 1991). 한편, 본 실험에서는 측정하지 않았으나 CYP2E1 효소도 알코올을 아세트알데하이드로 전환시키는 보조적인 역할을 하며 알코올의 만성적 섭취에 의해 간 조직이 손상되면 이 효소의 활성이 높아지는 것으로 알려져 있다(Salmela 등 1998; Albano 2002; Lieber 2008). 상기 표 10에서 나타난 결과로부터 발효 청미래덩굴 잎 열수 추출물은 비발효 청미래덩굴 잎 열수 추출물에 비해 ADH 활성 및 ALDH의 활성을 더 많이 증가시켜 만성적인 음주에서 나타날 수 있는 아세트알데하이드로 인한 숙취와 간 조직 손상을 예방 또는 완화하는데에 큰 효과가 있음을 알 수 있다.

[0177] 6) 간 조직에서의 XO 활성 및 AO 활성

[0178] 하기 표 11은 발효 청미래덩굴 잎의 열수 추출물이 알코올 섭취 실험동물의 간 조직에서의 XO 활성 및 AO 활성에 미치는 영향을 나타낸 것이다. 하기 표 11에서 각 측정 항목 값은 정상대조군에 대한 %로 나타내었다.

표 11

[0179]

실험군 구분	옥시다아제 구분(NC군 기준 백분율)	
	XO 활성	AO 활성
NC	100	100
AC	142.6	162.6
AC+SC	130.7	140.6
AC+FSC	118.4	125.6

[0180] 상기 표 11에서 보이는 바와 같이 청미래덩굴 잎 열수 추출물을 급여한 군의 XO(Xanthine oxidase) 활성 및

AO(aldehyde oxidase)의 활성은 AC군 및 AC+SC군에 비해 유의적으로 작은 값을 나타내었다. 이러한 결과는 발효 청미래덩굴 잎 열수 추출물이 비발효 청미래덩굴 잎 열수 추출물에 비하여 알코올 급여시 XO 억제 활성 및 AO 억제활성이 큼을 나타내며, 알코올의 만성적 섭취로 인한 체내 활성산소의 생성을 차단하여 알코올로 인한 간 조직 손상을 예방함과 동시에 알코올에 의하여 발생할 수 있는 지방의 축적을 경감시키는 효과가 높음을 시사한다.

[0181] **IV. 제 4차 실험 : 발효 청미래덩굴 잎의 에탄올 추출물, 이의 에틸아세테이트 가용성 분획물의 제조 및 주요 기능성 지표항목의 측정**

[0182] 1. 청미래덩굴 잎 분말의 준비

[0183] 2012년 10월 대구광역시의 양령 시장에서 구입한 청미래덩굴(*Smilax china* L.) 잎을 수돗물로 깨끗이 세척한 후 열풍 건조기를 이용하여 40℃에서 충분히 건조시켰다. 이후 건조된 청미래덩굴(*Smilax china* L.) 잎을 분쇄기(모델명 : HNF-1710; 공급자 : Hanil Electric Co Ltd, Seoul, Korea)를 사용하여 약 40 메쉬(mesh) 정도의 입도 크기로 분쇄한 후 폴리에틸렌 필름으로 밀봉하여 4℃에서 보관하면서 후술하는 발효 시료로 사용하였다.

[0184] 2. 발효용 균주 배양액의 제조

[0185] 발효용 균주로는 이전의 실험에서 청미래덩굴 잎 발효용으로 가장 적합한 것으로 나타난 *Aspergillus oryzae* KFRI 995 균주를 사용하였다.

[0186] *Aspergillus oryzae* KFRI 995 균주를 Bacto™ malt extract(Becton, Dickinson and Company, Sparks, MD, USA)에 이식하고 25℃에서 10일 동안 진탕 배양하였다. 이후, 동일한 배지로 배양액 내 아스퍼질러스 오리제 농도를 10^8 cells/ml로 조정하여 *Aspergillus oryzae* KFRI 995 배양액을 준비하였다.

[0187] 3. 발효 청미래덩굴 잎, 에탄올 추출물 및 이의 에틸아세테이트 가용성 분획물의 제조

[0188] 앞에서 준비한 청미래덩굴 잎 분말 1.5kg에 종균액과 물의 혼합액 3ℓ를 첨가하고 골고루 혼합하여 총 수분 함량을 약 67%가 되게 조정하였다. 이때, 종균액으로는 앞에서 준비한 발효용 균주 배양액을 사용하였다. 또한, 종균액과 물의 혼합액은 청미래덩굴 잎 분말 중량을 기준으로 5%(v/w)에 해당하는 종균액에 살균수를 혼합하여 총 3ℓ가 되도록 조정한 것이다. 이후, 청미래덩굴 잎 분말, 종균액 및 물의 혼합물을 플라스틱 발효 상자(가로 50cm, 세로 70cm, 높이 18cm)에 약 5cm의 두께로 담고 플라스틱 발효 상자의 상부를 폴리에틸렌 필름으로 덮은 후 약 30℃에서 각각 10일, 20일 및 30일간 발효시켰다. 발효 시간별로 발효가 완료된 청미래덩굴 잎을 폴리프로필렌 백(polypropylene bag)에 담고 오토클레이브(Autoclave) 안으로 옮겨 121℃에서 60분간 처리하여 살균하고, 40℃에서 건조하여 발효 청미래덩굴 잎을 제조하였다. 발효 청미래덩굴 잎 100g을 냉각관이 구비된 추출 장치에 넣고, 여기에 80% 에탄올 수용액 500ml를 첨가한 후 3시간 동안 가열 추출하였다. 추출액을 여과지(Whatman No 2 filter paper; Whatman International Ltd, Maidstone, England)로 3회 반복해서 여과한 후, 여과액을 40℃에서 감압 농축하고 건조 및 고형화하여 발효 청미래덩굴 잎 분말의 에탄올 추출물을 수득하였다. 이후, 발효 청미래덩굴 잎 분말의 에탄올 추출물에 증류수 500ml를 가하고 현탁시킨 후, 여기에 에틸아세테이트 500ml를 가하고 진탕 방치하여 물 가용성 분획층과 에틸아세테이트 가용성 분획층을 분리하였다. 에틸아세테이트 가용성 분획층을 취하고 남은 물 가용성 분획층에 동일한 과정을 2회 반복하여 에틸아세테이트 가용성 분획층을 추가로 획득하였다. 이후, 에틸아세테이트 가용성 분획층을 40℃에서 감압 농축하고 건조 및 고형화하여 발효 청미래덩굴 잎 분말의 에틸아세테이트 가용성 분획물을 수득하였다.

[0189] 4. 비발효 청미래덩굴 잎, 에탄올 추출물 및 이의 에틸아세테이트 가용성 분획물의 제조

[0190] 앞에서 준비한 청미래덩굴 잎 분말 1.5kg에 물 3ℓ를 첨가하고 골고루 혼합하여 수분을 평형화시킨 후 이를 폴리프로필렌 백(polypropylene bag)에 담고 오토클레이브(Autoclave) 안으로 옮겨 121℃에서 60분간 처리하여 살균하였다. 이후, 살균된 청미래덩굴 잎 분말을 40℃에서 건조하여 비발효 청미래덩굴 잎을 제조하였다. 비발효

청미래덩굴 잎 100g을 냉각관이 구비된 추출 장치에 넣고, 여기에 80% 에탄올 수용액 500ml를 첨가한 후 3시간 동안 가열 추출하였다. 추출액을 여과지(Whatman No 2 filter paper; Whatman International Ltd, Maidstone, England)로 3회 반복해서 여과한 후, 여과액을 40℃에서 감압 농축하고 건조 및 고형화하여 비발효 청미래덩굴 잎 분말의 에탄올 추출물을 수득하였다. 이후, 비발효 청미래덩굴 잎 분말의 에탄올 추출물에 증류수 500ml를 가하고 현탁시킨 후, 여기에 에틸아세테이트 500ml를 가하고 진탕 방치하여 물 가용성 분획층과 에틸아세테이트 가용성 분획층을 분리하였다. 에틸아세테이트 가용성 분획층을 취하고 남은 물 가용성 분획층에 동일한 과정을 2회 반복하여 에틸아세테이트 가용성 분획층을 추가로 획득하였다. 이후, 에틸아세테이트 가용성 분획층을 40℃에서 감압 농축하고 건조 및 고형화하여 비발효 청미래덩굴 잎 분말의 에틸아세테이트 가용성 분획물을 수득하였다.

5. 발효 청미래덩굴 잎의 에탄올 추출물 및 이의 에틸아세테이트 가용성 분획물의 주요 기능성 지표항목의 측정

(1) 추출 수율

도 5는 발효 청미래덩굴 잎 및 비발효 청미래덩굴 잎을 에탄올로 추출하고 에탄올 추출물을 에틸아세테이트로 분획하였을 때의 추출 수율을 나타낸 그래프이다. 일반적으로 플라보노이드를 포함한 폴리페놀성 물질은 상 분리(phase separation)시 주로 에틸아세테이트 분획에 모이는 것으로 알려져 있다 (Kim 등 1974). 도 5에서 보이는 바와 같이 청미래덩굴 잎을 아스퍼질러스속 미생물로 발효시킨 후 함수 에탄올로 추출하고 이를 에틸아세테이트로 분획한 결과 비발효 청미래덩굴 잎으로 추출한 경우보다 추출 수율이 높게 나타났다. 이러한 결과는 세포벽과 결합한 상태로 존재하거나 세포질 내에 존재하는 폴리페놀 성분이 발효에 의하여 용출되기 쉬운 상태로 변화되기 때문인 것으로 판단된다. 따라서, 아스퍼질러스속 미생물에 의한 발효는 청미래덩굴 잎에 존재하는 유효성 물질의 이용성을 높일 수 있는 좋은 방법임이 확인되었다.

(2) 총 플라보노이드 함량 및 총 폴리페놀 함량

발효 청미래덩굴 잎의 에탄올 추출물 및 이의 에틸아세테이트 가용성 분획물의 총 플라보노이드 함량 및 총 폴리페놀 함량을 제 1차 실험의 분석방법과 동일한 방법으로 측정하였다.

도 6은 발효 청미래덩굴 잎 및 비발효 청미래덩굴 잎의 에탄올 추출물 및 이의 에틸아세테이트 가용성 분획물에 존재하는 총 폴리페놀 함량을 나타낸 그래프이고, 도 7은 발효 청미래덩굴 잎 및 비발효 청미래덩굴 잎의 에틸아세테이트 가용성 분획물에 존재하는 총 플라보노이드 함량 : 총 폴리페놀 함량의 비를 백분율로 나타낸 것이다. 도 6 내지 도 7에서 보이는 바와 같이 발효 청미래덩굴 잎의 에탄올 추출물은 비발효 청미래덩굴 잎의 에탄올 추출물에 비해 총 폴리페놀 함량이 낮았으나, 발효 청미래덩굴 잎의 에틸아세테이트 가용성 분획물은 비발효 청미래덩굴 잎의 에틸아세테이트 가용성 분획물에 비해 총 폴리페놀 함량이 높았고, 총 플라보노이드 대 총 폴리페놀의 비율은 약 2.88배 정도 증가하였다. 이와 같은 결과는 아스퍼질러스속 미생물에 의한 청미래덩굴 잎의 발효에 의해 청미래덩굴 잎에 존재하는 폴리페놀 성분의 일부가 플라보노이드로 전환됨과 동시에 글리코사이드(glycoside) 형태의 플라보노이드에서 당류 부분이 분해 또는 제거되었기 때문인 것으로 사료되며 그로 인해 발효 청미래덩굴 잎의 기능성이 향상된 것으로 판단된다(Hamzeh-Mivehroud 2013).

(3) XOIA(Xanthine oxidase inhibitory activity) 및 AOIA(aldehyde oxidase inhibitory activity)

발효 청미래덩굴 잎의 에틸아세테이트 가용성 분획물의 XO 억제 활성 및 AO 억제 활성을 제 1차 실험의 분석방법과 동일한 방법으로 측정하였다.

하기 표 12는 발효 청미래덩굴 잎의 에틸아세테이트 가용성 분획물의 XO 억제 활성 및 AO 억제 활성을 각각 비발효 청미래덩굴 잎의 에틸아세테이트 가용성 분획물의 XO 억제 활성 및 AO 억제 활성에 대한 백분율로 나타낸 것이다.

표 12

에틸아세테이트 가용성 분획물 유래	옥시다아제 구분	
	XO 억제 활성	AO 억제 활성
비발효 청미래덩굴 잎	100	100

발효 청미래당굴 잎	190.3	237.1
------------	-------	-------

[0201] 상기 표 12에서 보이는 바와 같이 발효 청미래당굴 잎의 에틸아세테이트 가용성 분획물은 비발효 청미래당굴 잎의 에틸아세테이트 가용성 분획물에 비해 XO 억제 활성은 약 1.90배, AO 억제 활성은 약 2.37배 정도 높은 것으로 나타났다. 상기 결과로부터 발효 청미래당굴 잎 또는 이의 추출물은 활성산소 생성계 효소인 XO와 AO를 효과적으로 억제하여 요산의 과다 생성 방지에 의한 요통의 예방 내지 완화 기능, 더 나아가 알코올 및 고지방 섭취에 의한 간 손상의 예방 내지 치유 기능이 비발효 청미래당굴 잎 또는 이의 추출물에 비하여 현저하게 증진됨을 알 수 있다.

[0202] V. 제 5차 실험 : 발효 청미래당굴 잎의 에틸아세테이트 가용성 분획물의 간 손상 개선 효과 평가

[0203] 1. 동물실험 방법

[0204] 평균 체중이 20~23g인 4주령의 ICR(Crljori: CD-1), SPF/VAF outbred mice(Orient Ltd., Sungnam-si, Korea)에 기본사료인 5L79 diets(PMI Nutrition, Brentwood, LA)를 급이하여 1주일간 환경에 적응시킨 후, 4개군(5마리/군)으로 나누어 4주간 사육하였다. 구체적으로 실험군을 올리브오일로 처리한 후 기본사료를 급여한 정상대조군(NC), 사염화탄소로 처리하여 간 손상을 유도한 후 기본사료를 급여한 군(CB), 사염화탄소로 처리하여 간 손상을 유도한 후 제 4차 실험에서 수득한 비발효 청미래당굴 잎의 에틸아세테이트 가용성 분획물을 기본사료에 0.5% 혼합하여 급여한 군(CNS) 및 사염화탄소로 처리하여 간 손상을 유도한 후 제 4차 실험에서 수득한 발효 청미래당굴 잎의 에틸아세테이트 가용성 분획물을 기본사료에 0.5% 혼합하여 급여한 군(CFS)으로 구분하여 실험하였다. 사육장은 stainless steel cage를 사용하였으며, 온도 및 습도는 각각 $20 \pm 2^{\circ}\text{C}$, $60 \pm 5\%$ 로 조정하였다. 명암 주기는 12시간 간격으로 설정하였으며 음용수와 식이는 자유 섭취시켰다.

[0205] CB군, CNS군 및 CFS군의 경우 50% 사염화탄소와 올리브오일의 1:1로 혼합물을 실험 개시일부터 쥐 무게 100g 당 0.1ml의 용량으로 매일 1회씩 2일 동안 복강에 주사하여 간 손상을 유도하였다. 반면, NS군은 올리브오일만 복강에 주사하였다.

[0206] 2. 측정 항목 및 측정 방법

[0207] (1) 체중, 식이 섭취량, 식이효율

[0208] 체중, 식이 섭취량 및 음용수 섭취량은 전 실험기간을 통하여 매일 일정한 시간에 측정하였다. 식이효율(feed efficiency ratio, FER)은 같은 기간 동안의 체중 증가량을 동일 기간의 식이 섭취량으로 나눈 값으로 하였다.

[0209] (2) 분석용 시료의 채취

[0210] 실험 식이로 4주간 사육한 흰쥐를 물만 주고 24시간 동안 금식시킨 후 에테르(ether) 마취 하에서 복부 대동맥으로부터 채혈한 다음, 빙냉의 생리식염수로 관류하고 간 조직을 적출하였다. 적출한 간 조직 일정량에 4배량의 빙냉의 0.25M 설탕 용액을 가하고 마쇄하여 균질화한 다음 $10,000 \times g$ 로 20분간 원심분리하여 나온 상정액(postmitochondrial fraction, PMF)을 취해 효소 활성도 측정에 이용하였다.

[0211] (3) ALT 활성 측정

[0212] ALT 활성은 kit 시약(Asan Pharm Co., Seoul Korea)으로 측정하였으며 Karmen unit로 나타내었다.

[0213] (4) XO(Xanthine oxidase) 활성 및 AO(aldehyde oxidase)의 활성 측정

[0214] 간 조직으로부터 추출한 PMF를 효소원으로 하여, XO 활성도는 Stirpe와 Della Corte(1969)의 방법에 따라 기질 잔틴(xanthine)을 우릭산(uric acid)로 전환하는 정도를 정상대조군에 대한 %로 나타내었으며, AO 활성도는

Rajagopalan 등(1962)의 방법에 따라 기질 NMN (N^1 -methyl nicotinamide)으로부터 산화된 피리돈(pyridone)을 300 nm에서 측정한 다음 정상대조군에 대한 %로 나타내었다.

(5) 글루타치온(glutathione, GSH) 함량 및 과산화지질(lipid peroxide, LPO) 함량 측정

간 조직의 GSH 함량 및 LPO의 함량은 Ellman(1959) 및 Satho(14)의 방법에 따라 각각 측정하였다. 단백질의 함량은 Lowry(1951)법에 따라 표준품으로 bovine serum albumin을 사용하여 측정하였다.

3. 측정 결과

하기 표 13은 발효 청미래덩굴 잎의 에틸아세테이트 가용성 분획물이 간 손상이 유도된 실험동물의 체중, 식이 섭취량, ALT 활성, XO 활성 등에 미치는 영향을 나타낸 것이다.

표 13

측정 항목	실험군			
	NC	CB	CNS	CFS
초기 체중(g)	26.45	26.17	26.88	26.08
최종 체중(g)	33.41	23.98	26.40	29.25
체중 증가량(g/주)	1.74	-0.55	-0.12	0.79
식이 섭취량(g/주)	4.47	4.91	4.75	4.58
식이효율	0.33	-0.11	0.03	0.17
간 중량(g/마우스)	0.84	1.34	1.02	0.96
ALT 활성(Karmen unit)	22.07	63.93	52.58	45.61
GSH(μ M/g)	5.09	5.14	5.35	5.12
LPO(MDA nM/g)	15.93	25.17	20.30	17.51
XO 활성(%)	100	131.0	121.6	92.1
AO 활성(%)	100	129.0	117.5	108.2

1) 체중, 식이 섭취량 및 식이효율

NC군의 체중 증가량은 주당 1.74g을 나타내었으나 CB군과 CNS군은 체중이 감소하는 결과를 나타내었으며, CFS군은 NC군에는 미치지 않으나 체중이 증가하는 경향을 보였다. 식이 섭취량은 CB군이 NC군에 비하여 다소 높았으나 사염화탄소 처리군 간의 차이는 없었다. CB군과 CNS군은 사염화탄소의 독성에 의하여 간 조직이 손상되고 그로 인해 체중이 감소한 것으로 보이나 CFS군은 CNS군에 비하여 사염화탄소에 대한 해독 효과가 커서 체중이 감소하지 않은 것으로 판단된다.

2) 간 중량과 ALT 활성

간의 중량은 CB군이 NC군에 비하여 59.52%가 증가하였으나, CNS군은 CB군에 비하여 23.89%가 감소하였고, CFS군은 CB군에 비하여 28.36%가 감소하였으며, 발효 청미래덩굴 잎의 에틸아세테이트 가용성 분획물을 급여한 군에서 간의 중량이 NC군과 비슷한 값을 나타내었다. ALT 활성에서도 CB군은 NC군에 비하여 2.90배가 높았으나 CNS군과 CFS군은 CB군에 비하여 각각 17.76% 및 28.66% 정도가 유의적으로 감소하여, 발효 청미래덩굴 잎의 에틸아세테이트 가용성 분획물을 급여한 군에서 상대적으로 낮은 ALT 활성을 보였다. 간이 손상되면 ALT의 활성이 높아지며, ALT의 활성도는 간 손상의 지표로 활용되고 있다. 이러한 결과로부터 발효 청미래덩굴 잎의 에틸아세테이트 가용성 분획물은 사염화탄소와 같은 물질들의 간 독성을 해독 효과가 매우 크고 사염화탄소 등에 의한 간 손상을 효과적으로 예방하거나 치료할 수 있음을 알 수 있다.

3) 간 조직의 GSH 함량 및 LPO 함량과 XO 활성 및 AO 활성

GSH 함량은 사염화탄소를 투여한 모든 실험군에서 뚜렷한 변화가 없었다. 과산화지질(LPO)의 함량은 사염화탄소를 투여한 모든 실험군에서 전반적으로 NC군에 비하여 높은 함량을 나타내었으나, CFS군에서 유의적으로

낮았다. 또한, XO 활성 및 AO의 활성은 CB군 및 CNS군에서 NC군보다 높았으나 CFS군은 NC군과 비슷한 값을 나타내어 유의적으로 낮았다. 사염화탄소와 같은 약물에 의하여 간 손상이 발생하면 활성산소계 효소인 XO와 AO의 활성이 높아지며(Nishino & Tamura 1991), 이 결과 생성된 활성산소종(ROS)은 체내 지질을 산화시켜 지질과산화물(LPO)을 생성한다. 일반적으로 LPO의 생성이 많아지면 ROS 소거제로 작용하는 GSH와 같은 물질이 작용하게 된다. 이상의 결과로부터 발효 청미래덩굴 잎의 에틸아세테이트 가용성 분획물은 비발효 청미래덩굴 잎의 에틸아세테이트 가용성 분획물보다 XO 활성 및 AO 활성을 크게 억제하여 사염화탄소와 같은 간 손상을 일으키는 독성물질의 해독효과가 높고, 간 손상을 감소시키는 효과가 큼을 알 수 있다.

VI. 제 6차 실험 : 발효 청미래덩굴 잎을 이용한 발효 차 및 기능성 음료의 제조

1. 발효 차의 제조 및 관능 검사

(1) 발효 차의 제조

제조예 1.

제 2차 실험에서 *Aspergillus oryzae* KFRI 995 균주로 10일간 발효시켜 제조한 발효 청미래덩굴 잎을 200℃의 덩음솔에서 약 40초간 덩은 후 2g씩 티백에 담아 발효 차를 제조하였다.

제조예 2.

제 2차 실험에서 *Aspergillus oryzae* KFRI 995 균주로 10일간 발효시켜 제조한 발효 청미래덩굴 잎을 200℃의 덩음솔에서 약 40초간 덩은 후 1g씩 티백에 담았다. 옥수수 줄기 분말 및 꾸지뽕 분말을 각각 떡음 처리한 후 1:1의 중량비로 혼합하고, 발효 청미래덩굴 잎이 담긴 티백에 이를 1g씩 담아 발효 차를 제조하였다.

(2) 발효 차의 관능검사

제조예 1 및 제조예 2에서 제조한 발효 차를 95~100℃의 열수로 약 3분간 침출하여 관능검사용 시료로 사용하였다. 침출 차에 대해 훈련된 관능 요원 25명을 대상으로 종합적인 기호도(overall acceptability)를 5점 척도법으로 평가하였다(Herbert & Jeol 1993). 5점 척도법의 평가 점수 기준은 아주 나쁘다 : 1점; 나쁘다 : 2점; 보통이다 : 3점; 좋다 : 4점; 아주 좋다 : 5점으로 하였다. 관능검사 결과 제조예 1에서 제조한 발효 차의 종합적인 기호도는 3.54인 것으로 나타났고, 제조예 2에서 제조한 발효 차의 종합적인 기호도는 3.91인 것으로 나타났다.

2. 기능성 음료의 제조 및 관능 검사

(1) 기능성 음료의 제조

제조예 3.

제 2차 실험에서 *Aspergillus oryzae* KFRI 995 균주로 10일간 발효시켜 제조한 발효 청미래덩굴 잎을 200℃의 덩음솔에서 약 40초간 덩은 후 여기에 물을 가하여 발효 청미래덩굴 잎의 농도가 1%(w/v)인 현탁액을 제조하였다. 이후, 발효 청미래덩굴 잎 현탁액을 약 90~100℃로 가열하고 약 10분 동안 추출하였다. 추출액을 살균 면포로 여과하여 기능성 음료를 제조하였다.

제조예 4.

제 2차 실험에서 *Aspergillus oryzae* KFRI 995 균주로 10일간 발효시켜 제조한 발효 청미래덩굴 잎을 200℃의 덩음솔에서 약 40초간 덩은 후 여기에 물을 가하여 발효 청미래덩굴 잎의 농도가 1%(w/v)인 현탁액을 제조하였다. 이후, 발효 청미래덩굴 잎 현탁액을 약 90~100℃로 가열하고 약 5~10분간 유지하여 추출하였다. 추출액을

살균 면포로 여과하여 베이스 원액을 제조하였다. 또한, 옥수수 뿌리, 흑삼에 각각 약 90~100℃의 열수를 첨가하여 2%(w/v) 농도로 조정하고 약 2시간 동안 추출하였다. 이후, 베이스 원액 91ml, 옥수수 뿌리 추출액 4ml, 흑삼 추출액 4ml, 사양벌꿀 3g, 비타민 혼합액(비타민 B1 1g, 비타민 B12 1g, 니코틴아마이드 1g, 비타민 C 1g, 이노시톨 1g 및 타우린 1g을 증류수 99ml에 녹인 용액) 1ml을 혼합하여 기능성 음료를 제조하였다.

[0241] (2) 기능성 음료의 관능검사

[0242] 제조예 3 및 제조예 4에서 제조한 기능성 음료에 대해 훈련된 관능 요원 25명을 대상으로 종합적인 기호도(overall acceptability)를 5점 척도법으로 평가하였다(Herbert & Jeol 1993). 5점 척도법의 평가 점수 기준은 아주 나쁘다 : 1점; 나쁘다 : 2점; 보통이다 : 3점; 좋다 : 4점; 아주 좋다 : 5점으로 하였다. 관능검사 결과 제조예 3에서 제조한 기능성 음료의 종합적인 기호도는 3.52인 것으로 나타났고, 제조예 4에서 제조한 기능성 음료의 종합적인 기호도는 4.07인 것으로 나타났다.

[0243] 이상에서와 같이 본 발명을 상기의 실시예를 통해 설명하였지만 본 발명이 반드시 여기에만 한정되는 것은 아니며 본 발명의 범주와 사상을 벗어나지 않는 범위 내에서 다양한 변형실시가 가능함은 물론이다. 따라서, 본 발명의 보호범위는 본 발명에 첨부된 특허청구의 범위에 속하는 모든 실시 태양을 포함하는 것으로 해석되어야 한다.

[0244] [참고 문헌]

- [0245] 1. Albano E. 2002. Free-radicals and alcohol-induced liver injury. In: Sherman, CDIN, Preedy VR, Walson RR Eds., Ethanol and Liver. Taylor and Francis, London, pp. 153190.
- [0246] 2. Ali S, Pawa S, Naime M, Prasad R, Ahmad T, Farooqui H, Zafar H. 2008. Role of mammalian cytosolic molybdenum Fe-S flavin hydroxylases in hepatic injury. *Life Sci* 82: 780-788.
- [0247] 3. Al-Salmy HS. 2001. Individual variation in hepatic aldehyde oxidase activity. *IUBMB Life* 51(4): 249-253.
- [0248] Angayarkanni J, Palaniswamy M, Murugesan S, Swaminathan K. 2002. Improvement of tea leaves fermentation with *Aspergillus* spp. pectinase. *J Biosci Bioeng* 94(4): 299-303.
- [0249] 4. Anzai N, Enomoto A, Endou H. 2005. Renal urate handling: clinical relevance of recent advances. *Current Rheumatology Reports* 7: 22734.
- [0250] 5. Arakawa H, Maeda M, Okubo S, Shimamura T. 2004. Role of hydrogen peroxide in bactericidal action of catechin. *Biol Pharm Bull* 27: 277-281.
- [0251] 6. Banerjee A, Dasgupta N, De B. 2005. In vitro study of antioxidant activity of *Syzygium cumini* fruit. *Food Chem* 90: 727-733.
- [0252] 7. Beedham C. 1987. Molybdenum hydroxylases: biological distribution and substrate- inhibitor specificity. *Prog Med Chem* 24: 85-121.
- [0253] 8. Benzie IF, Strain JJ. 1996. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of antioxidant power: the FRAP assay. *Anal Biochem* 239: 7076.
- [0254] 9. Bernet E. 1983. Methods of enzymatic analysis. Vch Pub; 3rd edition pp. 1506-1509.
- [0255] 10. Blois MS. 1958. Antioxidant determination by the use of a stable free radical. *Nature* 181: 1199-1200.
- [0256] 11. Carr MC (2003) The emergence of the metabolic syndrome with menopause. *J Clin Endocrinol Metab* 88(6): 2404-2411.
- [0257] 12. Caulfield MJ, Munroe PB, OD, Witkowska K, Charchar FJ, Doblado M, Evans S, Eyheramendy S, Onipinla

A, Howard P, Shaw-Hawkins S, Dobson RJ, Wallace C, Newhouse SJ, Brown M, Connell JM, Dominiczak A, Farrall M, Lathrop GM, Samani NJ, Kumari M, Marmot M, Brunner E, Chambers J, Elliott P, Kooner J, Laan M, Org E, Veldre G, Viigimaa M, Cappuccio FP, Ji C, Iacone, R, Strazzullo P, Moley KH, Cheeseman C. 2008. SLC2A9 is a high-capacity urate transporter in humans. *PLoS Medicine* 5: 197.

- [0258] 13. Cederbaum AI. 1991. Microsomal generation of reactive oxygen species and their possible role in alcohol hepatotoxicity. *Alcohol and Alcoholism Suppl* 1: 291296.
- [0259] 14. Cha BC, Lee EH. 2007. Antioxidant activities of flavonoids from the leaves of *Smilax china* Linne. *Kor J Pharmacogn* 38(1): 31-36.
- [0260] 15. Chena L, Yina H, Lanb Z, Maa S, Zhanga C, Yanga Z, Li P, Linc B. 2011. Anti- hyperuricemic and nephroprotective effects of *Smilax china* L. *J Ethnopharmacology* 135: 399405.
- [0261] 16. Chen CH, Chan HC, Chang YN, Liu BL, Chen YS. 2000. Effects of bacterial strains on sensory quality of *Pu-erh* tea in an improved pile-fermentation process. *J Sens Stud* 24: 534553.
- [0262] 17. Cheng DS, Hua XL. 2006. Todayresearch of *Smilax china*. *J Chin Med Mater* 29: 9093.
- [0263] 18. Chen Y, Wang Q, Li B, Li L, Pan LN, Huang Y. 2008. Study on identification and quality for *Smilax china* L. of compound gout granules. *Asia-Pacific Traditional Medicine* 4: 23739.
- [0264] 19. Choi CH, Song ES, Kim SJ, Kang MH. 2003. Antioxidative activities of *Castanea crenata* Flos. methanol extracts. *Korean J Food Sci Technol* 35: 1216-1220.
- [0265] 20. Choi HY. 2004. Antimicrobial effect of ethanol extract of *Smilax china* leaf. *Korean J Sanitation* 19: 22-30.
- [0266] 21. Clarke SE, Harrell AW, Chenery RJ. 1995. Role of aldehyde oxidase in the in vitro conversion of famciclovir to penciclovir in human liver. *Drug Metab Dispos* 23: 251254.
- [0267] 22. Conklin, D., Prough, R. and Bhatanagar, A. 2007. Aldehyde metabolism in the cardiovascular system. *Mol Biosyst* 3: 136150.
- [0268] 23. Critchley DJ, Rance DJ, Beedham C. 1992. Subcellular localisation of guinea pig hepatic molybdenum hydroxylases. *Biochem Biophys Res Commun* 185(1): 54-59.
- [0269] 24. Dambrova M, UhleS, Welch CJ, Wikberg JES. 1998. Identification of an N-hydroxyguanidine reducing activity of xanthine oxidase. *Eur J Biochem* 257: 178184.
- [0270] 25. Das SK, Nayak P, Vasudevan DM. 2005. Consequences of ethanol consumption. *J Indian Soc Toxicol* 1: 110.
- [0271] 26. De Haan JB, Cristiano F, Iannello RC, Kola I (1995) Cu/Zn-superoxide dismutase and glutathione peroxidase during aging. *Biochem Mol Biol Int* 35: 1281-1297.
- [0272] 27. Ellman GL (1959) Tissue sulfhydryl group. *Arch Biochem Biophys* 82: 7077.
- [0273] 28. Franke WW, Denk H, Schmid E, Osborn M, and Weber K. 1979. Ultrastructural, biochemical and immunological characterization of Mallory bodies in livers of griseofulvin-treated mice: Fimbriated rods of filaments containing prekeratin- like polypeptides. *Lab Invest* 40: 207220.
- [0274] 29. Friedewald WT, Levy RI, and Fredrickson DS (1972) Estimation of the concentration of low-density lipoprotein cholesterol in plasma, without use of the preparative ultracentrifuge. *Clin Chem* 18: 499502.
- [0275] 30. Frings CS, Fendley TW, Dunn RT, Queen CA. 1972. Improved determination of total serum lipids by the sulfo-phospho-vanillin reaction. *Clin Chem* 18: 673-674.
- [0276] 31. Garattini E, Fratelli M, Terao M. 2008. Mammalian aldehyde oxidases: genetics, evolution and biochemistry. *Cell Mol Life Sci* 65: 10191048.

- [0277] 32. Garattini E, Terao M. 2011. Increasing recognition of the importance of aldehyde oxidase in drug development and discovery. *Drug Metab Rev* 43: 374386.
- [0278] 33. Garcia-Conesa MT, P, Kauppinen S, Williamson G. 2001. Hydrolysis of diethyl diferulates by a tannase from *Aspergillus oryzae*. *Carbohydrate Polymers* 44: 319324.
- [0279] 34. Gruchow HW, Sobocinski KA Barboriac JJ, Scheller JG. 1985. Alcohol consumption, nutrient intake and relative body weight among *US adults*. *Am Clin Nutr* 42: 289-595.
- [0280] 35. Halliwell B. 2006. Reactive oxygen species and the central nervous system. *J Neurochem* 59: 1609-1623.
- [0281] 36. Ham YK and Kim SW. 2004. Protective effects of plant extract on the hepatocytes of rat treated with carbon tetrachloride. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 33: 12461251.
- [0282] 37. Hamzeh-Mivehroud M, Rahmani S, Rashidi MR, Hosseinpour Feizi MA, Dastmalchi S. 2013. Structure-based investigation of rat aldehyde oxidase inhibition by flavonoids. *Xenobiotica* Jan 3.
- [0283] 38. Herbert A, Jeol LS. 1993. Sensory evaluation practices. 2nd ed. Academic Press, New York, USA. p 68-94.
- [0284] 39. Hirao Y, Kitamura S, Tatsumi, K. 1994. Epoxide reductase activity of mammalian liver cytosols and aldehyde oxidase. *Carcinogenesis* 15: 739743.
- [0285] 40. Holasova, M., Fiedlerova, V., Smrcinova, H., Orsak, M., Lachman, J. and Vavreinova, S. 2002. Buckwheat the source of antioxidant activity in functional foods. *Food Res Int* 35: 207-211.
- [0286] 41. Horiuchi H, Ota M, Nishimura S, Kaneko H, Kasahara Y, Ohta T, Komoriya K. 2000. Allopurinol induces renal toxicity by impairing pyrimidine metabolism in mice. *Life Sci* 66(21): 2051-2070.
- [0287] 42. Huang DY. and Ichikawa Y. 1994. Two different enzymes are primarily responsible for retinoic acid synthesis in rabbit liver cytosol. *Biochem Biophys Res Commun* 205: 12781283.
- [0288] 43. Hur SJ, Ye BW, Lee JL, Ha YL, Park GB, Joo ST. 2004. Effect of conjugated linoleic acid on color and lipid oxidation of beef patties during cold storage. *Meat Sci* 66: 771-775.
- [0289] 44. Itoh K. 2009. Individual and strain differences of aldehyde oxidase in the rat. *Yakugaku Zasshi* 129: 1487-1493.
- [0290] 45. Johanna W, Markus N, Sabrina B, Wolfgang M, Andreas A, Aiman O, Benedikt G, Arndt H, Andreas S, Charalarmpos A, Jurgen S, Christa B. 2008. Small-interference RNA-mediated knock-down of aldehyde oxidase 1 in 3T3-L1 cells impairs adipogenesis and adiponectin release. *FEBS letters* 582: 2965-2972.
- [0291] 46. Jordan CGM, Rashidi MR, Laljee H, Clarke SE, Brown JE, Beedham C. 1999. Aldehyde oxidase-catalyzed oxidation of methotrexate in the liver of guinea- pig, rabbit and man. *J Pharm Pharmacol* 51: 411-418.
- [0292] 47. Kang YH, Park YK, Oh SR, Moon KD. 1995. Studies on the physiological functionality of pine needle and mugwort extracts. *Korean J Food Sci Technol* 27: 978-984.
- [0293] 48. Kawashima K, Hosoi K, Naruke T, Shiba T, Kitamura M, Watabe T. 1999. Aldehyde oxidasedependent marked species difference in hepatic metabolism of the sedativehypnotic, zeleplon, between monkeys and rats. *Drug Metab Dispos* 27: 422-428.
- [0294] 49. Kitamura S, Nakatani K, Sugihara K, Ohta S. 1999. Strain differences of the ability to hydroxylate methotrexate in rats. *Comp Biochem Physiol* 122C: 331-336.
- [0295] 50. Ko MS, Yang JB. 2011. Antioxidant and antimicrobial activities of *Smilax china* leaf extracts. *Korean J Food Preserv* 18(5): 764-772.
- [0296] 51. Krenitsky TA (1978) Aldehyde oxidase and xanthine oxidase-functional and evolutionary

relationships. *Biochem Pharmacol* 27: 2763-2764.

- [0297] 52. Kundu TK, Hille R, Velayutham M, Zweier JL. 2007. Characterization of superoxide production from aldehyde oxidase: an important source of oxidants in biological tissues. *Arch Biochem Biophys* 460: 113-121.
- [0298] 53. Lee YK, Lee SI, Kim JS, Yang SH, Lee IA, Kim SD, Suh JW. 2012. Antioxidant activity of green tea fermented with *Monascus pilosus*. *J Appl Biol Chem* 55(1): 19-25.
- [0299] 54. Lieber CS. 1991. Hepatic, metabolic and toxic effects of ethanol. *Alcohol Clin Exp Res* 15: 573-592.
- [0300] 55. Lieber CS. 1992. Medical and Nutritional Complications of Alcoholism: Mechanisms and Management. New York, Plenum Press.
- [0301] 56. Lieber CS. 1997. Ethanol metabolism, cirrhosis and alcoholism. *Clinica Chimica Acta* 257: 59-84.
- [0302] 57. Lieber CS. 2008. Alcoholic fatty liver : its pathogenesis and mechanism of progression to inflammation and fibrosis. *Alcohol* 34:9-19 2004; Lu Y, Ce derbaum AI: CYP2E1 and oxidative liver injury by alcohol. *Free Radic Biol Med* 44: 723-738.
- [0303] 58. Li YL, Gan GP, Zhang HZ, Wu HZ, Li CL, Huang YP, Liu YW, Liu JW. 2007. A flavonoid glycoside isolated from *Smilax china* L. rhizome *in vitro* anticancer effects on human cancer cell lines. *J Ethnopharmacol* 113: 115124.
- [0304] 59. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, and Randall RL (1951) Protein measurement by folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193: 265275.
- [0305] 60. Luciana GDO, Francisca MB, Cybelle RDL. 2009. Effects of different concentrations of sugarcane alcohol on food intake and nutritional status of male and female periadolescent rats *Alcohol* 43: 137-146.
- [0306] 61. Maia L, Mira L. 2002. Xanthine oxidase and aldehyde oxidase: A simple procedure for the simultaneous purification from rat liver. *Arch Biochem Biophys* 400: 48-53.
- [0307] 62. McCrystal M, Evans B, Harvey V, Thompson P, Porter D, Baguley B. 1999. Phase 1 study of the cytotoxic agent *N*-w2-(dimethylamino)ethylxacridine-4- carboxamide. *Cancer Chemother Pharmacol* 44: 3944.
- [0308] 63. Meda A, Lamien CE, Romito M, Millogo J, Nacoulma OG. 2005. Determination of the total phenolic, flavonoid and proline contents in burkina fasan honey, as well as their radical scavenging activity. *Food Chem* 91: 571577.
- [0309] 64. Mercader J, Ribot J, Murano I, Felipe F, Cinti S, Bonet ML. and Palou A. 2006. Remodeling of white adipose tissue after retinoic acid administration in mice. *Endocrinology* 147: 53255332.
- [0310] 65. Minussi RC, Rossi M, Bologna L, Cordi L, Rotilio D, Pastore GM, Duran N. 2003. Phenolic compounds and total antioxidant potential of commercial wines. *Food Chem* 82: 409416.
- [0311] 66. Mira L, Maia L, Barreira L, Manso CF. 1995. Evidence for free radical generation due to NADH oxidation by aldehyde oxidase during ethanol metabolism. *Arch Biochem Biophys* 318: 53-58.
- [0312] 67. Moon SH, Lee MK, Chae KS. 2001. Inhibitory effects of the solvent fractions from persimmon leaves on xanthine oxidase activity. *Kor J Food Nutr* 14: 120-125.
- [0313] 68. Moriwaki Y, Yamamoto T, Nasako Y, Takahashi S, Suda M, Hiroishi K, Hada T, Higashino K. 1993. In vitro oxidation of pyrazinamide and allopurinol by rat liver aldehyde oxidase. *Biochem Pharmacol* 46: 975-981.
- [0314] 69. Neumeier M, Weigert J, SchA, Weiss TS, Schmidl C, BR, Bollheimer C, Aslanidis C, SchJ, Buechler C. 2006. Aldehyde oxidase 1 is highly abundant in hepatic steatosis and is downregulated by adiponectin

and fenofibric acid in hepatocytes *in vitro*. *Biochem Biophys Res Commun* 350: 731-735.

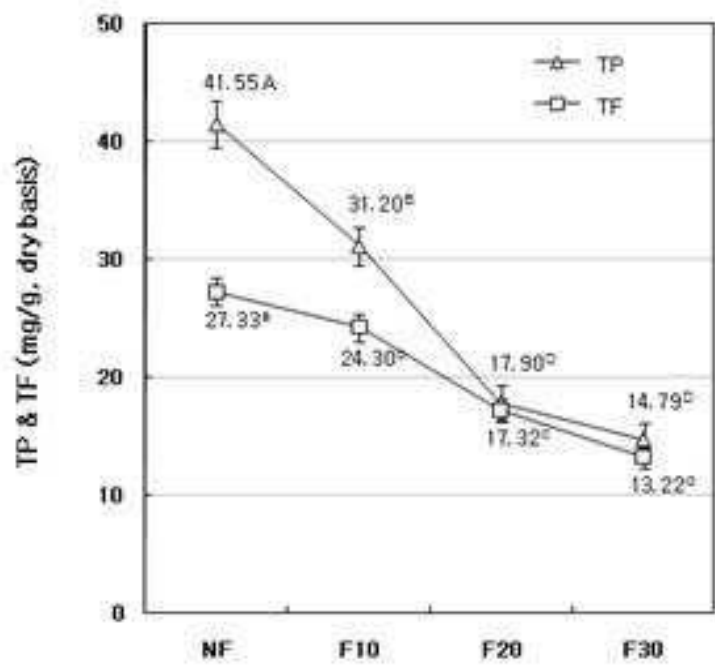
- [0315] 70. Nishino T, Tamura I. 1991. The mechanism of conversion of xanthine dehydrogenase to oxidase and the role of the enzyme in the reperfusion injury. *Adv Exp Med Biol* 309: 327-337.
- [0316] 71. Oei HH, Kentroo WE, Burton KP, and Schaffer SW. 1982. A possible role of xanthine oxidase in producing oxidative stress in the heart of chronically ethanol treated rats. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol* 38: 453-461.
- [0317] 72. Osawa T. 1994. Novel natural antioxidant for utilization in food and biological system. In *Postharvest Biochemistry of Plant Food Material in the Tropics*. Uritani I, Garcia VV, Mendoza EM, eds. Japan Scientific Societies Press, Tokyo, Japan. p. 241-251.
- [0318] 73. Owuor PO, Obanda M, Nyirenda HE, Mphangwe NIK, Wright LP, Apostolides Z. 2006. The relationship between some chemical parameters and sensory evaluations for plain black tea (*Camellia sinensis*) produced in Kenya and comparison with similar teas from Malawi and South Africa. *Food Chem* 97: 644-653.
- [0319] 74. Pikaar NA, Wedel M, Vander BEJ, Van DW and Hermus RJ. 1987. Effects of moderate alcohol consumption on platelet aggregation fibrinolysis and blood lipids. *Metabolism* 36: 538-548.
- [0320] Pryde DC, Dalvie D, Hu Q, Jones P, Obach RS, Tran TD. 2010. Aldehyde oxidase: an enzyme of emerging importance in drug discovery. *J Med Chem* 53: 8441-8460.
- [0321] 75. Rajagopalan KV, Fridovich I, Handler P. 1962. Hepatic aldehyde oxidase. . Purification and properties. *J Biol Chem* 237: 922-928.
- [0322] 76. Ruan HL, Zhang YH, Zhao W, Tan YF, Sun ZL, Wu JZ. 2002. Studies on the chemical constituents of *Smilax china* L. *Natural Product Research and Development* 14: 3536.
- [0323] 77. Rashidi MR, Nazemiyeh H. 2010. Inhibitory effects of flavonoids on molybdenum hydroxylases activity. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 6(2): 133-152.
- [0324] 78. Robert A, Terkeltaub, M.D. 2003. Gout. *N Engl J Med* ;349:1647-1655.
- [0325] Salmela KS, Kessova IG, Tsyroly IB, Lieber CS. 1998. Respective roles of cytochrome P450 2E1, 1A2, and 3A4 in the hepatic microsomal ethanol oxidizing system. *Alcoholism, Clinical and Experimental Research* 22: 2125-2132.
- [0326] 79. Shaw S, Jayatilake E. 1990. The physiological role of aldehyde oxidase in ethanol-induced hepatic lipid peroxidation in the rat. *Biochem J*. 268(3): 579-583.
- [0327] 80. Shaw S, Jayatilake E. 1990. The role of aldehyde oxidase in ethanol-induced hepatic lipid peroxidation in the rat. *Biochem J* 268: 579-583.
- [0328] 81. Shu XS, Gao ZH, Yang XL. 2006. Anti-inflammatory and anti-nociceptive activities of *Smilax china* L. aqueous extract. *J Ethnopharmacol* 103: 327-332.
- [0329] 82. Song HS, Park YH, Jung SH, Kim DP, Jung YH, Lee MK, Moon KY. 2006. Antioxidant activity of extracts from *Smilax china* root. *J Korean Soc Food Sci Nutr* 35(9): 1133-1138.
- [0330] 83. Stirpe F, Della Corte E. 1969. The regulation of rat liver xanthine oxidase. Conversion in vitro of the enzyme activity from dehydrogenase (type D) to oxidase (type O). *J Biol Chem* 244: 3855-3863.
- [0331] 84. Stoddart AM, Levine WG. 1992. Azoreductase activity by purified rabbit liver aldehyde oxidase *Biochem Pharmacol* 43: 2227-2235.
- [0332] 85. Sugihara K, Kitamura S, Tatsumi K. 1996. Involvement of mammalian liver cytosols and aldehyde oxidase in reductive metabolism of zonisamide. *Drug Metab Dispos* 24: 199-202.
- [0333] 86. Lee SW, Kim KS, Kim SD. 1974. Studies on the compositional changes of pomegranate fruit during maturity. II. Changes in polyphenol compounds and anthocyan pigments. *J Korean Soc Hort Sci* 15(1) 64-

67.

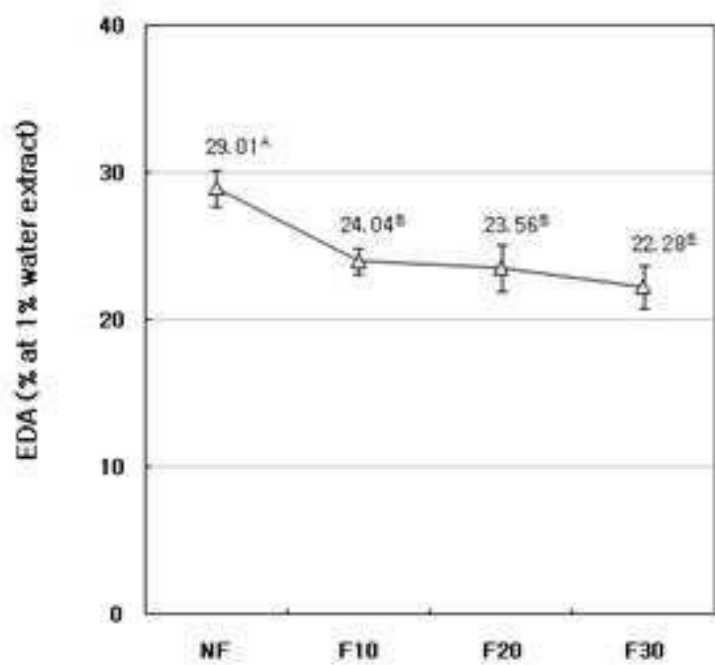
- [0334] 87. Tatsumi K, Kitamura S, Yamada H. 1983. Sulfoxide reductase activity of liver aldehyde oxidase. *Biochim Biophys Acta* 747: 86-92.
- [0335] 88. Tatsumi K, Kitamura S, Narai N. 1986. Reductive metabolism of aromatic nitro compounds including carcinogens by rabbit liver preparations. *Cancer Res* 46: 10891093.
- [0336] 89. Torel J, Gillard J, Gillard P. 1986. Antioxidant activity of flavonoids and reactivity with peroxy radical. *Phytochem* 25: 383-385.
- [0337] 90. Urano S, Midori H, Tochihi N, Matsuo M, Shiraki M, and Ito H. 1991. Vitamin E and the susceptibility of erythrocytes and reconstituted liposome to oxidative stress in aged diabetics. *Lipids* 26: 5862.
- [0338] 91. Vohl MC, Sladek R, Robitaille J, Gurd S, Marceau P, Richard D, Hudson TJ. and Tchernof A. 2004. A survey of genes differentially expressed in subcutaneous and visceral adipose tissue in men. *Obes Res* 12: 12171222.
- [0339] 92. Weigert J, Neumeier M, Bauer S, Mages W, Schnitzbauer AA, Obed A, GrB, Hartmann A, SchA, Aslanidis C, SchJ, Buechler C. 2008. Small-interference RNA-mediated knock-down of aldehyde oxidase 1 in 3T3-L1 cells impairs adipogenesis and adiponectin release. *FEBS Lett* 582: 2965-2972.
- [0340] 93. Wortmann RL. 2002. Gout and hyperuricemia. *Current Opinion in Rheumatology* 14: 281286.
- [0341] 94. Wu LS, Wang, XJ, Wang H, Yang HW, Jia AQ, Ding Q. 2010. Cytotoxic polyphenols against breast tumor cell in *Smilax china* L. *J Ethnopharmacol* 130: 46064.
- [0342] 95. Xu Y, Liang JY, Zou ZM. 2008. Studies on chemical constituents of rhizomes of *Smilax china* L. *China J Chinese Materia Medica* 21: 119121.
- [0343] 96. Yamaguchi Y, Matsumura T, Ichida K, Okamoto K, Nishino T. 2007. Human xanthine oxidase changes its substrate specificity to aldehyde oxidase type upon mutation of amino acid residues in the active site: roles of active site residues in binding and activation of purine substrate. *J Biochem* 141: 513-524.
- [0344] 97. Yasuhara A, Akiba-Goto M, Fujishiro K, Uchida H, Uwajima T, Aisaka K. 2002. Production of aldehyde oxidases by microorganisms and their enzymatic properties. *J Biosci Bioengineering* 94(2): 124-129.
- [0345] 98. Zhu JX, Wang Y, Kong LD, Yang C, Zhang X. 2004. Effects of *Biota orientalis* extract and its flavonoid constituents, quercetin and rutin on serum uric acid levels in oxonate-induced mice and xanthine dehydrogenase and xanthine oxidase activities in mouse liver. *J Ethnopharm* 93: 133-140.

도면

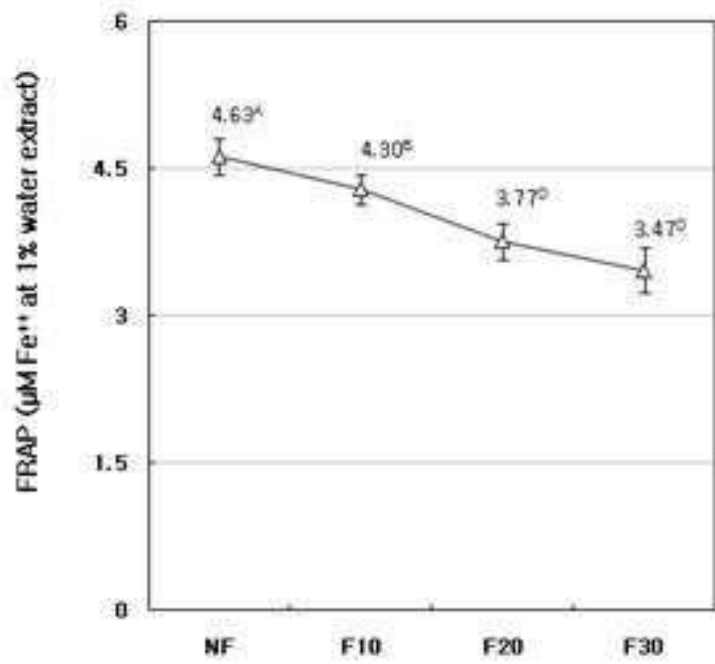
도면1



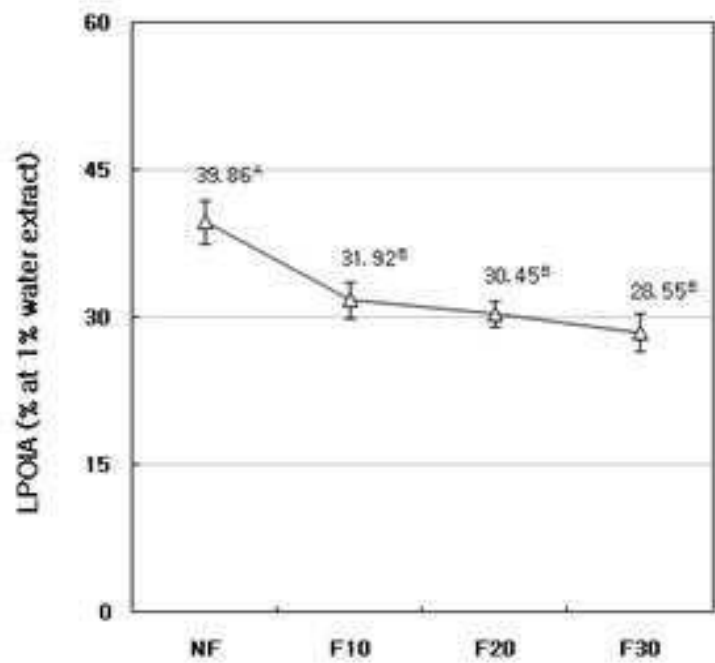
도면2



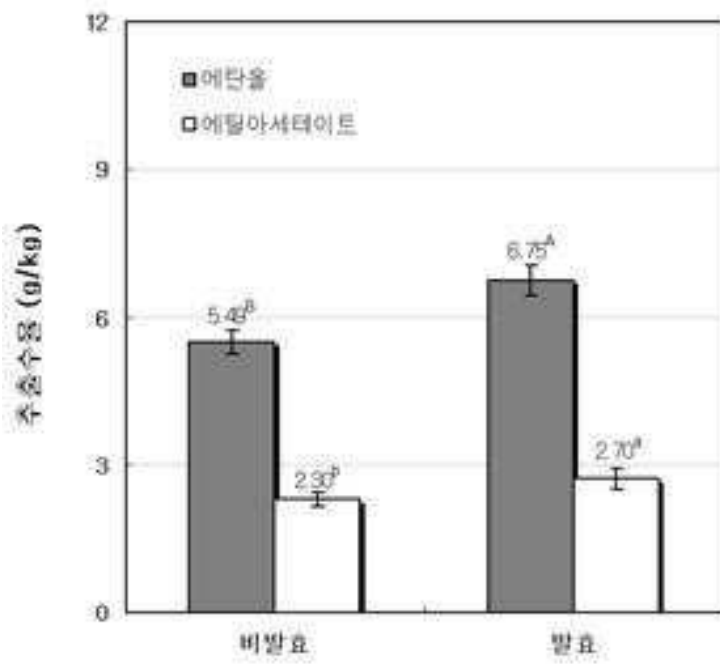
도면3



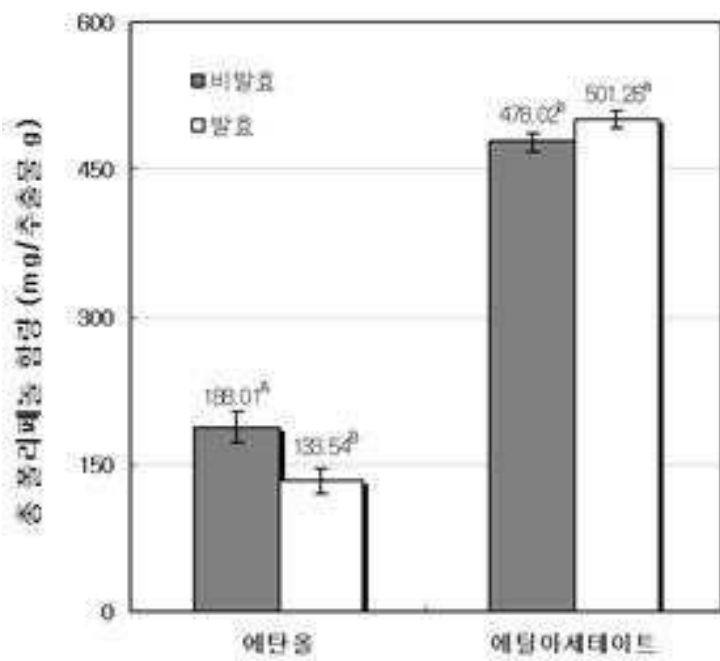
도면4



도면5



도면6



도면7

