(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2015-0014014
(43) 공개일자 2015년02월06일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 36/605 (2006.01) *A61K 36/258* (2006.01)
A61K 36/076 (2006.01) *A61P 39/06* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2013-0088475
(22) 출원일자 2013년07월26일
심사청구일자 2013년07월26일

(71) 출원인
경운대학교 산학협력단
경상북도 구미시 산동면 인덕리 55. 경운대학교내
농업회사법인주식회사오디세이
경상북도 김천시 지례면 율곡1길 217-3
(72) 발명자
이동섭
경상북도 구미시 산동면 인덕리 55
이고훈
경상북도 김천시 지례면 율곡1길 217-3
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
박원미

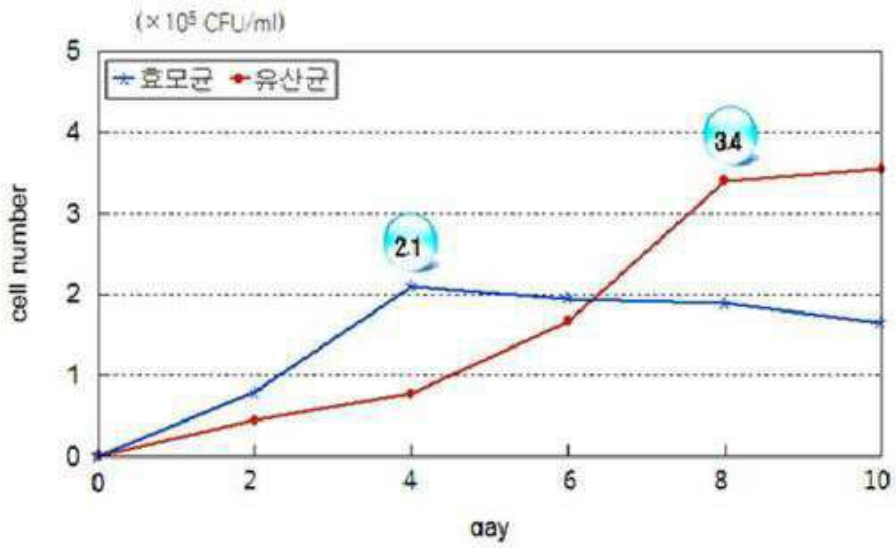
전체 청구항 수 : 총 10 항

(54) 발명의 명칭 **발효오디 또는 발효오디와 경옥고 혼합물을 포함하는 항산화 조성물 및 그 제조방법**

(57) 요 약

본원은 오디 발효물, 이를 포함하는 항산화 조성물 및 이의 제조방법을 개시한다. 본원의 오디 발효물은 발효로 인해 항산화 기능을 나타내는 생리활성 성분이 강화되어 항산화 기능이 요구되는 각종 의약품, 화장품 또는 건강기능 식품 등에 유용하게 사용될 수 있다.

대 표 도 - 도1a



(72) 발명자

김진희

대구 동구 국채보상로 829, 103동 1502호 (신천동, 신천두산위브)

한지훈

대구 북구 팔거천동로 70, 105동 803호 (구암동, 칠곡금빛타운)

한성욱

경상북도 구미시 산동면 인덕리 55

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	C0027194
부처명	중소기업청
연구관리전문기관	(사)한국산학연협회
연구사업명	산학연공동기술개발 지역사업
연구과제명	생리활성이 향상된 오디 발효액 제조 및 기능성 오디경옥고 제품개발
기 여 율	1/1
주관기관	경운대학교 산학협력단
연구기간	2012.06.01 ~ 2013.05.31

특허청구의 범위

청구항 1

a) 오디 발효물; 또는

b) 상기 오디 발효물과 인삼, 복령, 지황 및 꿀을 포함하는 항산화 조성물.

청구항 2

제 1 항에 있어서, 상기 발효는 효모 (*Saccharomyces cerevisiae*), 또는 락토바실러스 아시도필러스 (*Lactobacillus acidophilus*) 중 하나 이상을 이용한 것인 항산화 조성물.

청구항 3

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서, 상기 조성물 중의 상기 오디 발효물, 인삼, 복령, 지황 및 꿀은 중량 기준으로 각각 0.5~1.5 : 0.5~1.5 : 1.5~2.5 : 8.5~9.5 : 3.5~4.5 비로 혼합되는 것인, 항산화 조성물.

청구항 4

제 1 항 내지 제 3 항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 조성물은 의약품, 화장품, 건강보조식품, 기능성 식품, 또는 식품첨가제로 제공되는 것인, 항산화 조성물.

청구항 5

제 4 항에 있어서, 상기 의약품은 암 또는 염증성 질환 예방 또는 치료용이고, 상기 기능성 식품은 암 또는 염증성 질환 개선용인, 항산화 조성물.

청구항 6

제 5 항에 있어서, 상기 암 질환은 유방암, 자궁암 또는 폐암인, 항산화 조성물.

청구항 7

제 1 항에 있어서, 상기 오디 발효물과 인삼, 복령, 지황 및 꿀을 포함하는 항산화 조성물은 환 형태로 제조되는 것인, 항산화 조성물.

청구항 8

제 1 항에 따른 오디 발효물의 제조방법으로, 상기 방법은

1 내지 10%(w/v) 오디에 1 내지 10 중량%의 효모 또는 락토바실러스 아시도필러스를 접종하는 단계; 및

상기 효모는 각각 온도 28~30℃에서 25~45시간 배양하고, 상기 락토바실러스 아시도필러스는 온도 34~43℃에서 2일~10일 동안 발효시키는 단계를 포함하는 것인, 오디 발효물의 제조방법.

청구항 9

제 8 항에 있어서, 상기 접종 전단계에서 상기 오디는 열처리되지 않는 것인, 항산화 조성물의 제조방법.

청구항 10

하기의 단계를 포함하는 오디 발효 혼합물의 제조방법:

꿀은 달이고, 지황은 즙내고, 인삼 및 복령은 가루를 내는 단계;

상기 꿀, 지황, 인삼 및 복령을 혼합한 후 가열하는 단계;

가열 후 물을 첨가하며 물 중탕하는 단계; 및

상기 중탕 후 상기 혼합물의 온도 35~45℃에서 제 9 항에 따라 제조된 오디 발효물을 혼합한 후 이를 2주 내지 4주 동안, 차광 상태에서, 0℃ 내지 25℃에서 숙성시키는 단계.

명 세 서

기 술 분 야

[0001] 본원은 기능성 천연 발효물과 관련된 분야이다.

배 경 기 술

[0002] 최근 각종 질환을 예방 또는 치료하기 위해 기존의 합성물질 대신에 각종 식물을 포함하는 천연물에 대한 관심이 급증하고 있으며, 유용성분의 규명과 함께, 유용성분을 극대화시키기 위한 방법도 개발되고 있다.

[0003] 예를 들면 항산화 물질은 동, 식물계에 널리 분포되어 있는데, 과일과 채소에 많은 페놀성 화합물, 플라보노이드, 토코페롤, 비타민 C, 셀레늄과 같은 항산화 물질은 지방의 산화를 지연시키거나 방지하며, 암, 심장혈관계 질환 등을 예방, 지연시킴으로써 노화방지에도 중요한 역할을 한다. 식물계에 존재하는 천연 항산화 물질인 토코페롤과 비타민 C는 식품, 의약품 및 화장품 등에 널리 이용되고 있다.

[0004] 합성 항산화제로는 BHT(Butylated Hydroxy Toluene), BHA(Butylated Hydroxy Anisole), 프로필 갈레이트(Propyl Gallate) 등이 있다. 합성 항산화제는 항산화력이 뛰어나고 가격이 저렴하여 상업용 식품에 많이 사용되고 있으나, 인체 부작용 등 안전성에 대한 우려로 그 사용량이 법적으로 규제되어 있다. 토코페롤과 같은 천연 항산화제는 인체에 대하여 안전하기는 하나 단독으로는 산화 연쇄반응 저지 능력이 낮고, 가격이 비싼 단점이 있다.

[0005] 한편, 오디 (mulberry)는 뽕나무 또는 산뽕나무의 열매로 상실(桑)·오들개라고도 한다. 지름 약 2cm로서 처음에는 녹색이다가 검은빛을 띤 자주색으로 익는다. 익으면 즙이 풍부해지며, 맛은 당분이 들어 있어 새콤달콤하고 신선한 향기가 난다. 뽕나무는 예로부터 밭둑이나 산골짜기에 많이 심었고 한국(중부지방)과 중국에서 주로 재배한다. 성분으로는 포도당과 과당·시트르산·사과산·타닌·펙틴을 비롯하여 비타민(A·B1·B2·D)·칼슘·인·철 등이 들어 있다. 강장제로 알려져 있으며 내장, 특히 간장과 신장의 기능을 좋게 한다. 갈증을 해소하고 관절을 부드럽게 하며 알코올을 분해하고 마음을 편안하게 하여 불면증과 건망증에도 효과가 있는 것으로 알려져 있다.

[0006] 그러나, 지금까지 기존의 오디 가공제품 또는 단순발효 제품에 비하여 생리활성 기능성이 우수하거나, 경옥고 등의 약용식물 등과 혼합되어 질병의 예방 또는 치료에 도움이 되는 조성물에 대해서는 보고되어 있지 않다.

[0007] 한국 공개 특허공보 제2011-0051545호는 오디 발효 추출물을 유효성분으로 함유하는 통풍의 예방 및 치료용 조성물을 개시한다.

[0008] 한국 공개 특허공보 제2012-0139023호는 석이버섯 가수분해 효소 추출물 또는 이로로부터 분리된 화합물을 유효성분으로 함유하는 항산화 조성물을 개시한다.

[0009] 따라서, 기존 물질의 다양한 활성 개발뿐만 아니라, 다양하고 새로운 소재를 이용한 안전성이 뛰어나면서도 경제성이 있는 천연물질 유래의 항산화제 발굴이 지속적으로 요구되고 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0010] 본원은 항산화성 성분과 같은 기능성 성분이 강화된 천연 발효물을 제공하고자 한다.

과제의 해결 수단

[0011] 한 양태에서 본원은 오디 발효물 또는 오디 발효물 및 인삼, 복령, 지황, 및 꿀의 혼합물을 포함하는 항산화 조성물을 제공한다.

[0012] 본원에 따른 일 실시예에서 발효는 효모 (*Saccharomyces cerevisiae*), 또는 락토바실러스 아시도필러스 (*Lactobacillus acidophilus*) 중 하나 이상을 이용하여 수행될 수 있으나, 이로 제한하는 것은 아니다. 일 구현예에서는 락토바실러스 아시도필러스가 사용된다.

[0013] 본원에 따른 항산화 조성물은 항산화로 인해 효과가 있는 다양한 분야에 적용될 수 있으며, 예를 들면 의약품, 화장품, 건강보조식품, 기능성 식품, 식품첨가제로 제공될 수 있으나, 이로 제한하는 것은 아니다. 본원에 따른 일 구현예에서 상기 의약품은 암, 특히 자궁암, 폐암, 또는 유방암과 같은 암 또는 염증성 질환 예방 또는 치료용으로 사용될 수 있다. 다른 구현예에서는 암 또는 염증성 질환 개선용 건강기능식품 또는 기능성 식품으로 제조된다. 다른 구현예에서는 발효오디 경옥고 환으로 제조된다.

[0014] 다른 양태에서 본원은 상술한 본원에 따른 오디 발효물을 제조하는 방법에 관한 것으로, 상기 방법은 효모, 또는 락토바실러스 아시도필러스 중 하나 이상을 사용하는 것을 특징으로 한다. 본원에 따른 일 구현예에서 상기 방법은 오디에 효모, 또는 락토바실러스 아시도필러스를 접종하는 단계; 상기 효모는 온도 28~30℃에서 약 25~45시간 배양하고, 상기 락토바실러스 아시도필러스는 온도 약 34~43℃에서 약 2일~10일 발효시키는 단계를 포함한다.

[0015] 또 다른 양태에서 본원은 상기와 같이 제조된 오디 발효물에 추가로 인삼, 복령, 지황, 및 꿀을 포함하는 조성물에 첨가하고 숙성시켜 제조하는 혼합 항산화조성물을 제조하는 방법에 관한 것이다.

발명의 효과

[0016] 본원에 따른 오디 발효물, 및 상기 오디 발효물에 추가로 인삼, 복령, 지황, 및 꿀을 함유하는 발효오디 혼합조성물은 발효로 인해 항산화 기능이 월등히 강화되어 항산화 효과가 필요한 각종 질환 예를 들면 암의 치료 또는 예방, 또는 항산화를 기능이 요구되는 각종 건강기능성 식품으로 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0017] 도 1a는 본원의 한 예시적 방법에 따른 오디 배지에서 배양시간에 따른 효모와 유산균의 생육 특성(세포수)을 나타낸다.

도 1b는 본원의 일 실시예에 사용된 유산균 및 제조된 발효물을 나타낸다.

도 2는 본원의 일 실시예에 따라 제조된 RM 방식을 이용한 유산균 발효액 및 오디 열처리에 따른 발효특성을 분석한 그래프이다.

도 3은 본원의 일 실시예에 따라 제조된 오디 발효물에 있어서, 오디 첨가량에 따른 유산균의 생육 특성을 나타낸다.

도 4는 본원의 일 실시예에 따라 제조된 오디 발효물에 있어서, 종균 접종량에 따른 유산균의 생육 특성을 나타

낸다.

도 5는 본원의 일 실시예에 따라 제조된 오디 발효물에 있어서, 발효온도에 따른 유산균의 생육 특성을 나타낸다.

도 6은 본원의 일 실시예에 따라 제조된 오디 발효물에 있어서, 배양시간에 따른 유산균 생육 및 총 폴리페놀 함량 변화를 나타낸다.

도 7은 본원의 일 실시예에 따른 발효오디 혼합조성물(발효오디 경옥고)의 제조 공정을 나타낸다.

도 8은 본원의 일 실시예에 따른 오디발효물로 처리된 암세포의 생존율을 나타낸다.

도 9a 및 도 9b는 발효오디 혼합조성물(발효오디 경옥고)로 처리된 암세포의 생존율을 나타낸다.

도 10은 본원의 일 실시예에 따른 발효오디 혼합조성물(발효오디 경옥고)로 처리된 다양한 암세포주의 세포 생존능력을 비교하여 나타낸 것이다.

도 11은 본원의 일 실시예에 따라 제조된 발효오디 혼합조성물(발효오디 경옥고)의 시제품 사진이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0018] 본원은 오디(mulberry)가 발효를 통해 유용 성분이 극대화되어 유용한 기능성 물질로서 약효를 발휘할 수 있다는 발견에 기초한 것이다.

[0019] 한 양태에서 본원은 a) 오디 발효물; 또는 b) 상기 오디 발효물과 인삼, 복령, 지황 및 꿀을 포함하는 항산화 조성물에 관한 것이다.

[0020] 본원에 사용되는 오디 (학명: Morus Bombycis koidz)는 뽕나무 또는 산뽕나무의 열매로 상실(桑)·오들개라고도 한다. 뽕나무는 쌍떡잎식물 쐐기풀목 뽕나무과 뽕나무속에 속한 낙엽교목 또는 관목을 총칭하는 것으로, 이의 다양한 변종, 아종이 본원에 포함될 수 있다. 본원에는 생과, 건과, 분말 등 다양한 형태의 오디가 사용될 수 있다.

[0021] 본원의 조성물에 포함되는 효모 (*Saccharomyces cerevisiae*), 또는 락토바실러스 아시도필러스 (*Lactobacillus acidophilus*) 중 하나 이상을 이용하여 발효된 발효물이다.

[0022] 본원에서 발효물이란 본 발명에 따른 균주를 이용하여 발효과정을 거친 산물을 칭하는 것으로 발효 후 고형분이 제거 또는 제거되지 않은 것이 모두 본원에 포함된다. 한 구현예에서 발효 후 고형분은 체로 거른 후 사용된다. 본원의 발효에 사용될 수 있는 균주는 본원에 따른 효과를 나타낼 수 있는 다양한 균주가 포함될 수 있으며, 예를 들면 효모(*Saccharomyces cerevisiae*), 또는 락토바실러스 아시도필러스 (*Lactobacillus acidophilus*) 중 하나 이상을 사용하여 수행될 수 있으나, 이로 제한하는 것은 아니다. 한 구현예에서는 본원의 오디는 락토바실러스 아시도필러스를 이용하여 발효된다. 다른 구현예에서는 효모가 사용된다.

[0023] 다른 양태에서 본원은 또한 본원에 따른 오디 발효물에 인삼, 복령, 지황 및 꿀이 추가된 혼합조성물에 관한 것이다. 인삼은 두릅나무과의 인삼(Panax ginseng C. A. Meyer)의 뿌리로서 가는 뿌리와 코르크 층을 제거한 것으로, 본원에서는 인삼의 뿌리 뿐만 아니라 뿌리 줄기도 포함한다. 복령은 담자균류 민주름버섯목 구멍장이버섯과의 버섯으로 솔뿌리혹버섯이라고도 한다. 소나무 등의 나무뿌리에 자생한다. 자실체, 균핵 등으로 이루어져있으며, 전체 또는 일부가 사용될 수 있다. 지황은 쌍떡잎식물 통화식물목 현삼과의 지황(Rehmannia glutinosa)으로, 전체 또는 그 일부 예를 들어 잎, 줄기 또는 뿌리가 사용될 수 있으며, 특히 뿌리를 말려서 사용한다. 꿀은 벌꿀(자연꿀)과 당밀(인공꿀)이 있으며, 모두 본원에 포함되며 당밀은 담황색의 투명한 점조액(粘稠液)이며 보통 수분 20~30%, 당분 60~70%, 회분(灰分) 5~10%, 유기 비당분 23%의 비율로 함유되어 있다.

[0024] 본원의 혼합조성물에 포함되는 인삼, 복령, 지황, 꿀은 한의학상 보약의 하나인 경옥고의 재료로서, 본원의 혼합 조성물은 발효오디 경옥고 혼합 조성물로 칭할 수 있다.

[0025] 본원 혼합조성물을 구성하는 각 성분 즉 오디발효물: 인삼: 복령: 지황:꿀의 최적 혼합비는 중량기준으로 약 0.5~1.5 : 약 0.5~1.5 : 약 0.5~2.5 : 약 8.5 ~ 9.5 : 약 3.5 ~ 4.5이며, 특히 1:1:2:8.7:4이다.

[0026] 본원에 따른 오디 발효물은 발효공정을 통해 원료내의 유효성분들이 다양한 유용성 성분으로 전이되며, 특히 발효를 통해 다양한 항산화 성분들 예를 들면 폴리페놀의 함량이 강화되고, 아미노산, 및 미네랄의 함량이 증가한, 기능성 성분이 활성형태로 전이되어 그 유용성이 극대화되었다.

[0027] 따라서 한 양태에서 본원은 항산화 기능을 갖는 오디 발효물 또는, 오디 발효물과 인삼, 복령, 지황, 및 꿀을 포함하는 발효 오디 혼합 조성물, 또는 이를 포함하는 항산화 조성물에 관한 것이다.

[0028] 본원에서 사용된 용어 "항산화 기능" 또는 "항산화"는 함께 사용 시 생물학적 물질의 산화를 저해, 억제하는 기능을 말하는 것으로, 자유 라디칼기, 또는 기타 반응성 산소 (O_2^-, H_2O_2, OH, HOCL, ferryl, peroxyl, peroxynitrite, alkoxyl)를 제거하거나 또는 이의 형성을 억제하거나 또는 이들 물질을 반응성이 약한 물질로 전환하는 기능을 가지는 것을 의미하며, 항산화 기능이 있는 물질은 산화와 관련된 질환이 치료 또는 예방에 효과가 있다. 항산화성을 측정하는 방법은 공지되어 있으며, 예를 들면 전자공여능을 측정하는 Blois (Blois, M.S. 1958. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical, Nature, 181: 1199-1200) 이 사용될 수 있으나 이로 제한하는 것은 아니다.

[0029] 본원에서 "산화와 관련된 질환"은 자유 라디칼기, 특히 산소라디칼 (oxyradicals), 또는 반응성 산소 (reactive oxygen species, ROS)의 생산 또는 이에 노출되어 발생하는 병리적 증상, 질환을 일컫는 것으로, 기존의 자유라디칼 억제제 예를 들면 (e.g. desferroxamine), 스카벤저 (e.g. tocopherol, glutathione) 또는 촉매 (e.g. superoxide dismutase, catalase) 등의 투여로 증상이 개선되는 질환을 포함하는 것이다.

[0030] 산화와 관련된 질환은 예를 들면 자유 라디칼과 관련된 질환, 허혈성재관류손상, 염증성질환, 전신성 홍반성 낭창, 심근허혈 또는 경색, 뇌혈관 장애 (혈관색전증, 출혈성 뇌졸중), 척수외상, 크론병, 자가면역질환 (예를 들면 류마티스성 관절염, 당뇨병), 백내장, 포도막염 질병, 폐기종, 위궤양, 산소독성, 암 또는 종양, 과세포사멸, 방사선병 등을 포함한다.

[0031] 또한 항산화 물질은 동, 식물계에 널리 분포되어 있는데, 과일과 채소에 많은 페놀성 화합물, 플라보노이드, 토코페롤, 비타민 C와 같은 항산화 물질은 지방의 산화를 지연시키거나 방지하며, 암, 심장혈관계 질환 등을 예방, 지연시킴으로써 노화방지에도 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 따라서 폴리페놀과 같은 항산화 물질이 강화된 본원의 조성물은 암, 뇌심장혈관계 질환에 유용하게 사용될 수 있다. 일 구현예에서 본원의 조성물은 특히 유방암, 폐암, 자궁암 또는 뇌암의 예방 또는 치료 또는 증상 개선에 유용하게 사용될 수 있다.

[0032] 본원에서 사용된 용어 "치료"란 추출물 또는 이를 포함하는 조성물의 투여로 염증 또는 산화성 스트레스로 인한 다른 질환의 증세를 호전시키거나 이롭게 변경하는 모든 행위를 의미한다. 본원이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자라면, 대한의학협회 등에서 제시된 자료를 참조하여 본원의 조성물이 효과가 있는 질환의 정확한 기준을 알고, 개선, 향상 및 치료된 정도를 판단할 수 있을 것이다.

[0033] 본원에서 사용된 용어 "예방"은 추출물 또는 이를 포함하는 조성물의 투여로 본 조성물이 효과가 있는 질환의 발병을 억제 또는 지연시키는 모든 행위를 의미한다. 항염증, 항산화 효과가 있는 본원의 추출물은 염증의 초기 증상, 또는 나타나기 전에 복용할 경우 이러한 질환을 예방할 수 있다는 것은 당업자에게 자명할 것이다.

[0034] 본원의 오디 발효물 또는, 추가로 인삼, 복령, 지황, 및 꿀을 포함하는 혼합 조성물, 또는 이를 포함하는 항산화 조성물을 포함하는 의약품은 또는 약학 조성물은 동시에 또는 연속적으로 투여가능하며, 이들 혼합물을 단독으로 또는 염증의 치료를 위한 다른 약학적 활성성분과 병행하여 투여될 수 있다.

[0035] 본원의 오디 발효물 또는, 추가로 인삼, 복령, 지황, 및 꿀을 포함하는 혼합 조성물, 또는 이를 포함하는 항산화 조성물은 의약품 또는 약학 조성물의 제조에 있어 이의 제조에 통상적으로 사용되는 적절한 담체, 희석제, 보존제, 안정화제, 습윤제, 유화제, 용해제, 감미제, 착색제, 삼투압 조절제, 산화방지제 등의 부형제를 더 포함할 수 있다. 구체적으로는 락토즈, 덱스트로즈, 수크로스, 솔비톨, 만니톨 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸셀룰로즈, 미정질 셀룰로즈, 폴리비닐피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘, 스테아레이트, 광물유 등을 들 수 있다.

[0036] 본원의 오디 발효물 또는, 추가로 인삼, 복령, 지황, 및 꿀을 포함하는 혼합 조성물을 포함하는 염증성 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물의 투여방법은 제형에 따라 용이하게 선택될 수 있으며, 가축, 인간 등의 포유동물에 다양한 경로로 투여될 수 있다. 예를 들면, 산제, 정제, 환제, 과립제, 당의정, 경질 또는 연질의 캡슐제, 액, 에멀젼, 현탄액, 시럽제, 엘릭서, 외용제, 좌제, 멸균 주사용액 등의 형태로 제형화되어 전신 또는 국소적으로 경구 또는 비경구 투여될 수 있으며, 특히 경구 투여가 바람직하다.

[0037] 경구 투여를 위한 고형 제형에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 비경구 투여를 위한 제형에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조제제, 좌제가 포함된다. 비수성용제, 현탁용제로는 프로필렌글리콜, 폴

리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텝솔(witepsol), 마크로골, 트윈 (tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세롤, 또는 젤라틴 등이 사용될 수 있다.

[0038] 더 나아가 본원의 오디 발효물을 포함하는 약학 조성물은 당해 기술분야의 공지된 적절한 방법을 사용하여 또는 레밍턴의 문헌(Remington's pharmaceutical Science(최근판), Mack Publishing Company, Easton PA)에 개시되어 있는 방법을 이용하여 바람직하게 제형화될 수 있다.

[0039] 본원의 오디 발효물 또는, 추가로 인삼, 복령, 지황, 및 꿀을 포함하는 혼합 조성물을 포함하는 약학 조성물의 투여량은 환자의 체중, 연령, 성별, 건강상태, 식이, 투여시간, 투여방법, 배설률 및 질환의 중증도 등에 따라 그 범위가 다양할 수 있으나, 오디 발효물의 유효 투여량은 통상적으로 성인(60kg)의 경우, 약 1 내지 100 g/일, 특히 약 10 내지 50g/일, 더욱 바람직하게는 약 30g/일이다. 투여량은 여러 가지 조건에 따라 변동가능하기 때문에, 상기 투여량에 가감이 있을 수 있다는 사실은 당업자에게 자명하며, 따라서 상기 투여량은 어떠한 면으로든 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.

[0040] 투여횟수는 원하는 범위 내에서 하루에 1회, 또는 수회로 나누어 투여할 수 있으며, 투여 기간도 특별히 한정되지 않는다. 또한, 본원의 추출물을 포함하는 조성물은 그대로 경구투여하는 것 이외에, 임의의 음식물에 첨가하여 일상적으로 섭취할 수도 있다.

[0041] 본원의 오디 발효물 또는, 추가로 인삼, 복령, 지황, 및 꿀을 포함하는 혼합 조성물을 포함하는 약학 조성물은 우수한 항염증 및 항산화 효과를 제공할 뿐만 아니라, 약물에 의한 독성 및 부작용도 없어 장기간 복용시에도 안심하고 사용할 수 있다. 이에 따라, 상기 본원의 오디 발효물 또는, 추가로 인삼, 복령, 지황, 및 꿀을 포함하는 혼합 조성물은 식품의 주, 부원료 및 식품 첨가제로서 사용이 가능하다.

[0042] 따라서, 이러한 관점에서, 본 발명은 상기 기술한 본원의 오디 발효물 또는, 추가로 인삼, 복령, 지황, 및 꿀을 포함하는 발효 오디 혼합 조성물은 식품, 예를 들면, 건강보조식품, 기능성 식품, 식품첨가제 등으로 제공될 수 있다.

[0043] 본원에서 사용된 용어 "식품"이란 영양소를 한 가지 또는 그 이상 함유하고 있는 천연물 또는 가공품을 의미하며, 바람직하게는 어느 정도의 가공 공정을 거쳐 직접 먹을 수 있는 상태가 된 것을 의미하며, 통상적인 의미로서, 식품, 식품 첨가제, 기능성식품 및 음료를 모두 포함하는 의도이다.

[0044] 본원에서 사용된 용어 "기능성식품"이란 식품에 물리적, 생화학적, 생물공학적 방법 등을 이용하여 해당 식품의 기능을 특정 목적에 작용, 발현하도록 부가가치를 부여한 식품군이나 식품 조성이 갖는 생체방어리듬조절, 질병방지와 회복 등에 관한 체조절기능을 생체에 대하여 충분히 발현하도록 설계하여 가공한 식품을 의미하며, 특히 "건강기능식품"을 포함한다.

[0045] 본원에서 사용된 용어 "건강보조식품"이란 인체에 유용한 기능성을 가진 원료나 성분을 사용하여 제조 가공한 식품으로서, 인체의 구조 및 기능에 대하여 영양소를 조절하거나 생리학적 작용 등과 같은 보건 용도에 유용한 효과를 얻을 건강보조의 목적으로 특정성분을 원료로 하거나 식품원료에 들어있는 성분을 추출, 농축, 정제, 혼합 등의 방법으로 제조, 가공한 식품을 말한다.

[0046] 특히 본 발명에서 기능성식품 또는 건강보조식품은 상기 식품을 섭취하기 전과 비교하여 염증, 산화성 스트레스로 유발되는 질환의 증상을 개선하거나, 이의 경감 또는 해소에 도움을 줄 수 있는 효과가 있는 식품을 의미하며, 본원발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자라면, 대한의학협회 등에서 제시된 자료를 참조하여 이러한 질환의 정확한 기준을 알고, 개선된 정도를 판단할 수 있을 것이다.

[0047] 상기 기능성식품 및 건강보조식품에는 식품학적으로 허용 가능한 식품 보조 첨가제를 더욱 포함할 수 있으며, 기능성 식품의 제조에 통상적으로 사용되는 적절한 담체, 부형제 및 희석제를 더욱 포함할 수 있다.

[0048] 본원의 오디 발효물 또는, 추가로 인삼, 복령, 지황, 및 꿀을 포함하는 혼합 조성물을 첨가할 수 있는 식품으로는 예를 들어, 각종 식품류, 음료, 껌, 차, 비타민 복합제, 기능성 식품 등이 있다. 추가로, 본 발명에서 식품에는 특수영양식품(예, 조제유류, 영, 유아식 등), 식육가공품, 어육제품, 두부류, 묵류, 면류(예, 라면류, 국수류 등), 건강보조식품, 조미식품(예, 간장, 된장, 고추장, 혼합장 등), 소스류, 과자류(예, 스넥류), 유가공품(예, 발효유, 치즈 등), 기타 가공식품, 김치, 절임식품(각종 김치류, 장아찌 등), 음료(예, 과실, 채소류 음료, 두유류, 발효 음료류 등), 천연조미료(예, 라면 스프 등)을 포함하나 이에 한정되지 않는다. 상기 식품, 음료 또는 식품첨가제는 통상의 제조방법으로 제조될 수 있다.

[0049] 본원에서 음료란 갈증을 해소하거나 맛을 즐기기 위하여 마시는 것의 총칭을 의미하며 기능성 음료를 포함하는 의도이다. 상기 음료는 지시된 비율로 필수 성분으로서 상기 본원의 오디 발효물을 유효성분으로 포함하는 것 외에 다른 성분에는 특별한 제한이 없으며 통상의 음료와 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다. 상기의 천연 탄수화물의 예는 모노사카라이드, 예를 들어 포도당, 과당 등 디사카라이드, 예를 들어 말토스, 수크로스 등 및 폴리사카라이드, 예를 들어 덱스트린, 시클로덱스트린 등과 같은 통상적인 당, 및 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알코올이다. 상기한 것 이외의 향미제로서 천연 향미제(타우마틴, 스테비아 추출물(예를 들어 레바우디오시드 A, 글리세르히진 등) 및 합성 향미제(사카린, 아스파르탐 등)를 유리하게 사용할 수 있다. 상기 천연 탄수화물의 비율은 본 발명의 조성물 100㎖ 당 일반적으로 약 1 내지 20g, 바람직하게는 5 내지 12g이다. 그밖에 본 발명의 조성물은 천연과일 주스, 과일 쥬스 음료, 야채 음료의 제조를 위한 과육을 추가로 함유할 수 있다.

[0050] 본원에서 기능성 음료란 음료에 물리적, 생화학적, 생물공학적 방법 등을 이용하여 해당 음료의 기능을 특정 목적에 작용, 발현하도록 부가가치를 부여한 음료 군이나 음료 조성이 갖는 생체방어리듬조절, 질병방지와 회복 등에 관한 체조절기능을 생체에 대하여 충분히 발현하도록 설계하여 가공한 음료를 의미하며, 바람직하게는 항염증, 항산화 기능을 갖는 음료를 의미한다.

[0051] 상기 기능성 음료는 지시된 비율로 필수 성분으로서 본원의 오디 발효물 또는, 추가로 인삼, 복령, 지황, 및 꿀을 포함하는 혼합 조성물을 함유하는 외에는 다른 성분에는 특별한 제한이 없으며 통상의 음료와 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다. 상기 천연 탄수화물의 예는 모노사카라이드, 예를 들어 포도당, 과당 등 디사카라이드, 예를 들어 말토스, 수크로스 등 및 폴리사카라이드, 예를 들어 덱스트린, 시클로덱스트린 등과 같은 통상적인 당, 및 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알코올이다. 상기한 것 이외의 향미제로서 천연 향미제(타우마틴, 스테비아 추출물 (예를 들어 레바우디오시드 A, 글리시르히진 등) 및 합성 향미제(사카린, 아스파르탐 등)를 유리하게 사용할 수 있다. 상기 천연 탄수화물의 비율은 본 발명의 조성물 100㎖ 당 일반적으로 약 1 내지 20 g, 바람직하게는 약 5 내지 12 g이다.

[0052] 상기 외에 본원의 조성물은 여러 가지 영양제, 비타민, 광물(전해질), 합성 풍미제 및 천연 풍미제 등의 풍미제, 착색제, 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알코올, 탄산 음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다. 이러한 성분을 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있다. 이러한 첨가제의 비율은 그렇게 중요하지 않지만, 본 발명의 추출물 100 중량부 당 0.001 내지 20 중량부 범위에서 선택될 수 있다.

[0053] 염증성 질환의 개선 또는 항산화 기능을 목적으로 하는 식품에 있어서, 본원의 오디 발효물은 전체 식품 중량의 약 0.01 내지 90 중량%, 약 0.1 내지 80 중량%, 약 1% 내지 70%, 약 1% 내지 50%, 약 1% 내지 40%, 약 1% 내지 30%, 약 1% 내지 20%의 범위로 포함할 수 있으나, 상기 범위를 벗어나는 것을 제외하는 것은 아니다. 예를 들면 음료 조성물은 100㎖ 를 기준으로 0.02 내지 10 g, 바람직하게는 0.3 내지 1g의 비율로 포함할 수 있다.

[0054] 다른 양태에서 본원은 또한 본원의 오디 발효물 또는, 추가로 인삼, 복령, 지황, 및 꿀을 포함하는 혼합 조성물의 제조방법에 관한 것이다. 본원에서 발효는 이로 제한하는 것은 아니나, 효모(*Saccharomyces cerevisiae*), 또는 락토바실러스 아시도필러스 (*Lactobacillus acidophilus*) 중 하나 이상을 사용하여 수행될 수 있다. 한 구현예에서는 본원의 오디는 락토바실러스 아시도필러스를 이용한다.

[0055] 본원에 따른 방법은 일 구현예에서 오디에 효모, 또는 락토바실러스 아시도필러스를 접종하는 단계; 상기 효모는 각각 온도 약 28~30℃에서, 약 25~45시간 배양하고, 상기 락토바실러스 아시도필러스는 온도 약 34~43℃에서 약 2일 ~ 10일 발효시키는 단계를 포함한다. 본원에 따른 일 구현예에서 오디는 생과, 건과, 가루 등이 사용될 수 있으며, 특히 생과가 사용되며, 열처리 되지 않은 상태로 사용된다.

[0056] 본원에 따른 방법은 또한 일 구현예에서 꿀은 달이고, 지황은 즙내고, 인삼 및 복령은 가루를 내는 단계; 상기 꿀, 지황, 인삼 및 복령을 혼합하여 가열하는 단계; 물을 첨가하며 물 중탕하는 단계; 상기 중탕 후 상기 혼합물의 온도 35~45℃, 특히 38℃에서 본원에 따른 오디 발효물을 혼합한 후 이를 2주 내지 4주 동안, 차광 상태에서, 0℃ 내지 25℃에서 숙성시키는 단계.

[0057] 본원 방법에 의해 발효 제조된 오디는 발효시키지 않은 오디추출액과 비교하여 항산화 성분이 강화되고, 항암 효과에서도 비발효물과 비교하여 우수한 효과를 나타냈다.

[0058] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위해서 실시예를 제시한다. 그러나 하기의 실시예는 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐 본 발명이 하기의 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0059] **실시예 1 오디 발효물의 제조**

[0060] **1-1. 인체 유익균을 활용한 이용한 오디 발효**

[0061] 본 실시예에서 사용한 오디는 김천 소재 기업에서 재배한 생오디를 냉동보관하며 사용하였다. 오디 발효를 위해 식용미생물 중에서 감식초 종균에 사용되는 효모(*사카로미세스 세르비시아(Saccharomyces cerviciae)*)와 숙성된 김치로부터 분리한 유산균(*락토바실러스 종(Lactobacillus sp.)*)을 사용하였다.

[0062] 상기 균 중에서 최종 발효 균주를 선별하기 위하여 효모균은 YM배지(이스트 추출물 3g/L, 맥아(malt) 추출물 3g/L, 펩톤 5g/L, 덱스트로즈 10g/L)를 이용아혀 28℃에서, 30시간을 배양하고, 유산균은 MRS 배지(Proteose Peptone 10g/L, Beef Extract 10g/L, Yeast Extract 5g/L, Dextrose 20g/L, Ammonium Citrate 2g/L, Sodium Acetate 5g/L, Magnesium Sulfate 0.1g/L, Potassium Phosphate, Dibasic, 2g/L), 37℃에서 3일 배양한 후 도말하여 얻은 생균수가 효모 1.3 x 10^8 CFU, 유산균 0.9 x 10^8 CFU(colony forming unit)에 도달한 상태의 배양액 3%(v/v)을 오디 함유 배지에 각각 접종하였다. 오디 함유 배지는 전제수에 생오디만 5%(w/v)를 첨가하여 오디 발효 효능이 우수한 균주를 선별하였다.

[0063] 그 결과 도 1에 나타난 바와 같이 균체 생육 속도는 효모가 다소 빨랐지만, 배양액 1ml당 최고 생균수는 효모의 경우 배양 4일 이후 2.1 x 10^5 CFU, 유산균은 배양 8일 이후 3.4 x 10^5 CFU 로 유산균이 더 많게 측정되었다. 또한 효모 발효의 경우 배양이 진행됨에 따라 알콜 생성이 진행되는 점을 고려하여 최종 발효 균주는 유산균으로 결정하였다.

[0064] 유산균을 활용한 오디 발효 조건을 최적화하기 위하여 주원료인 오디 열처리에 따른 발효 특성을 검토하였다. 생오디 5% (w/v)를 생균수 증식을 위해 포도당 1%(w/v) 함유한 정제수와 함께 고온, 고압으로 멸균시킨 후 유산균을 접종하는 방식(HM)과 오디는 열처리하지 않고 멸균시킨 포도당 함유 배지에 혼합하는 방식(RM)으로 배지를 준비하고, 동일 조건에서 배양한 유산균 3% (v/v)를 접종하였다.

[0065] 생오디를 열처리시키지 않음을 특징으로 하는 RM 방식의 배지에서 다른 종류의 미생물인 효모를 배양한 경우 타 미생물의 증식이 활발하였지만, 도 2에서 보는 바와 같이 유산균의 경우 배양시간동안 거의 미생물 오염 양상이 관찰되지 않았다. 이는 유산균이 발효되면서 생성되는 유기산 등 여러 유용한 대사물질에 의한 작용으로 판단된다.

[0066] 상기 2가지 방식으로 처리한 오디 배지에서 유산균을 37℃에서 8일간 정치배양한 후 수득한 배양액을 MRS 한천 배지에 희석시켜 도말한 후 자라는 생균수를 측정한 결과, RM 방식으로 전처리한 경우 2.1 x 10^7 CFU로 HM 방식의 1.3 x 10^6 CFU 보다 높게 측정되었다.

[0067] RM 방식으로 제조한 오디 배지에서 유산균 발효를 최적화하기 위하여, 오디 첨가량, 종균 접종량 및 발효 시간을 달리하면서 검토하였다. 다른 발효조건은 동일시하고, 오디 첨가량을 1, 5, 및 10%(w/v)로 변화시키면서 유산균 발효를 시도한 결과, 도 3과 같이 5%(w/v) 첨가까지는 오디량이 늘어남에 따라 균체 생육이 증가하였으나, 그 이상 첨가에서는 거의 유사한 수준을 나타내었다.

[0068] 5%(w/v) 오디를 함유한 배지에서 유산균 발효를 최적화하기 위하여, 초기 유산균 접종량을 달리하면서 오디 배지에서 유산균 생육 특성을 검토하였다. MRS 배지에서 생균수가 1.6 x 10^8에 도달한 유산균을 대수증식기에서 배양액을 취하여 2, 4, 6, 8, 10%(v/v)로 변화시키면서 발효시킨 결과, 도 4에서 보는 바와 같이 종균접종량을 6%(v/v)로 결정하였다.

[0069] 5%(w/v) 오디 함유한 배지에 유산균을 6%(v/v) 접종한 후 배양 온도를 34℃, 37℃, 40℃, 43℃로 달리하면서 유산균 생육 특성을 검토하였다. 그 결과 34℃ 배양시는 도 5에서 보는 바와 같이 곰팡이에 의한 오염이 관찰되었으나 그 이상에서는 타 미생물 오염현상은 관찰되지 않았다. 37℃, 40℃, 43℃에서 발효시킨 경우, 도 5에서 보듯이 균체 생육이 거의 유사하게 유지되었고 43℃에서는 오히려 균체 생육이 다소 저하됨을 관찰하며, 최종적으로 발효 온도는 37℃로 결정하였다.

[0070] 5%(w/v) 오디 함유한 배지에 유산균을 6%(v/v) 접종한 후, 37℃에서 배양하 항산화 활성에 영향을 줄 수 있는 총 폴리페놀 함량을 측정하였다. 그 결과 표 1 및 도 6에서 보는 바와 같이 발효 8일 이후 얻어진 배양액의 경우 균체량 뿐만 아니라 총 폴리페놀 함량이 가장 높은 것으로 분석되어, 이를 최종 발효 시간으로 결정하였다.

표 1

[0071]

배양 시간에 따른 유산균 생육 및 총 폴리페놀 농도 변화		
배양시간 (일)	**건조 균체량 (g/L)**	**총 폴리페놀 (mg/100g)**
4	1.3	45.2±0.2
6	2.7	68.7±0.1
8	4.2	96.4±1.4
10	3.9	89.6±0.6

[0072] **1-2. 오디 발효액의 이화학적 특성 분석**

[0073] 오디 발효액의 이화학적 특성 평가는 발효액으로부터 고형분 제거 및 여과의 과정을 거치고 난 후, 감압농축기를 이용하여 3배 농축시킨 액상시료를 이용하여 pH, 당도, 색도를 측정하였으며, 그 결과는 표 2와 같다.

표 2

[0074]

오디 발효액의 이화학적 특성			
구 분		**오디 발효물**	**오디 추출액**
pH		4.02	4.93
색 도	명도(L)	1.2±0.02	8.96±0.02
	적색도(a)	3.73±0.01	6.35±0.02
	황색도(b)	0.68±0.03	5.14±0.03

[0075] 오디 유산균 발효액의 pH는 4.02로 발효시키지 않은 채 추출한 오디 추출액 pH 4.93에 비해 다소 낮았으며, 이는 유산균 발효에 의해 오디 배지에 포함된 각종 당류를 소비하여 유기산 등 유용 생리활성 물질을 생산해낸 결과에 의한 것으로 추축된다.

[0076] 오디 유산균 발효액의 색도는 색차계(모델 CR-200, 미놀타, 일본)를 사용하여 헌터(Hunter) L값(명도, lightness), a값(적색도, redness), b값(황색도, yellowness)의 색채값을 3회 반복 측정한 후 평균값을 이용하였다. 이때 표준 백판의 값은 L은 93.4371, a는 -0.2033, b는 -0.3215로 맞추었다. 그 결과 오디 유산균 발효액의 경우 L값, a,b값 모두 발효시키지 않은 오디 추출액에 비해 낮은 값을 보였다.

[0077] **실시예 2 오디 발효액의 생리활성 성분 분석**

[0078] **2-1. 오디 유산균 발효액에 포함된 총 폴리페놀 함량**

[0079] 오디 유산균 발효액에 포함된 총 폴리페놀 함량은 폴린-시오칼토(Folin-Ciocalteu) 페놀 방법에 준하여 측정하였다. 즉 시료 0.1ml에 증류수 1.9ml와 폴린-시오칼토 페놀 시약 0.2ml를 가하고 혼합한 후 실온에서 3분간 반응시켰다. 여기에 포화 Na_2CO_3 용액 0.4ml와 증류수 1.9ml를 가하여 혼합한 다음 분광광도계를 이용하여 725nm에서 흡광도를 측정하였다. 이대 총 폴리페놀 함량은 갈릭산(시그마, USA)을 이용한 표준곡선을 작성하여 계산한

후, 시료액의 총 폴리페놀 함량은 100g당 mg 갈릭산으로 나타내었다. 그 결과 오디 유산균 발효액과 발효시키지 않은 시료의 경우, 총 폴리페놀 함량은 각각 38.8mg/100g과 33.2mg/100g으로 발효에 의해 다소 증가되는 양상을 보였다.

[0080] 오디 발효액의 항산화 활성은 대표적인 항산화 효소인 SOD 활성을 SOD 분석 키트를 사용하여 측정하였다. 슈퍼옥시드 음이온 라디칼은 호기성 세포의 효소 및 비효소적 단계에서 생성되는 독성이 매우 강한 라디킬로서 노화와 관련된 산화 반응의 개시단계에 관여하고 있다. 또한 슈퍼옥시드 음이온 라디칼은 과산화수소 등 다른 활성산소종의 생성에 관여하여 지질, 단백질, DNA 등에 산화적 손상을 유도하는 것으로 알려져 있다. 슈퍼옥시드 음이온 라디칼은 NBT와 반응하여 청색을 띠게 되는데 시료 중 항산화 물질이 존재하면 슈퍼옥시드 음이온 라디칼-NBT 복합체 형성을 방해하여 청색이 탈색되게 된다. 반응 후 분과 광도계를 이용하여 560nm에서 흡광도를 측정 후 아래와 같이 SOD 활성을 계산하였다.

[0081] SOD(%) = (1-(A-B)/C)x100

[0082] A : 잔틴 옥시다아제 시약에 시료 첨가 후 흡광도를 측정

[0083] B : 잔틴 옥시다아제 시약 대신 블랭크 버퍼 첨가 후 흡광도 측정

[0084] C : 잔틴 옥시다아제 시약에 증류수 첨가 후 흡광도 측정

[0085] 하기 표 3에서 보듯이 오디 유산균 발효액의 경우 SOD 활성은 발효시키지 않은 오디 추출액에 비해 약 29.7% 높은 값을 보였으며, 이와 관련된 항산화 기능이 강화될 것으로 예상된다.

표 3

[0086]

오디 유산균 발효에 의한 총 폴리페놀 및 SOD 활성 변화		
구 분	**오디 발효물**	**오디 추출액**
총 폴리페놀 (mg/100g)	96.4±1.4	72.1±0.8
SOD 활성 (%)	37.1	28.6

[0087] **2-2. 오디 유산균 발효액에 포함된 주요 미네랄 성분**

[0088] 오디 유산균 발효액의 주요 미네랄 성분분석을 발효시키지 않은 오디 추출액과 동일한 조건에서 분석하였다. 주요 생리활성 미네랄 성분으로는 칼슘, 인, 철, 마그네슘을 식약청에서 지정한 식품 검사기관에 의뢰하여 성적서를 확보하였다 (표 4 참조). 오디를 유산균 발효시킨 경우 칼슘, 인, 철, 마그네슘 함량이 대부분 증가하는 양상을 보였으며, 특히 칼슘의 경우 14.4mg/100g으로 발효시키지 않은 11.2mg/100g에 비해 높게 나타났으며 28.5% 증가되었다.

표 4

[0089]

시험항목	**오디 발효물**	**오디 추출액**
칼슘(mg/100g)	14.4	11.2
인(mg/100g)	11.7	8.6
철(mg/100g)	0.2	0.1
마그네슘(mg/100g)	7.6	5.7

[0090] **2-3. 오디 유산균 발효액에 포함된 총 아미노산**

[0091] 오디 유산균 발효액의 구성 아미노산 18종에 대한 분석을 실시한 결과, 하기 표 5에서 보는 바와 같이 총아미노산 함량이 약 84.317mg/100g으로 발효시키지 않은 시료의 53.387/100g에 비해 약 1.57배정도 증가된 것으로 분석되었다.

표 5

[0092]

시험항목	오디 발효물	오디 추출액
Aspartic acid(mg/100g)	10.038	6.445
Threonine(mg/100g)	4.093	2.300
Serine(mg/100g)	4.936	3.535
Glutamic acid(mg/100g)	16.012	14.220
Proline(mg/100g)	0.000	0.000
Glycine(mg/100g)	4.744	3.029
Alanine(mg/100g)	5.678	2.871
Cystine(mg/100g)	0.000	0.000
Valine(mg/100g)	5.611	3.456
Methionine(mg/100g)	0.750	0.385
Isoleucine(mg/100g)	4.557	1.379
Leucine(mg/100g)	7.080	2.556
Tyrosine(mg/100g)	1.971	1.684
Phenylalanine(mg/100g)	4.073	3.129
Histidine(mg/100g)	2.494	1.922
Lysine(mg/100g)	6.508	4.054
Arginine(mg/100g)	5.773	2.424
Total(mg/100g)	84.317	53.387

[0093] **실시예 3 오디 발효액과 약용성분을 함유한 혼합 조성물의 제조**

[0094] **3-1. 혼합 조성물의 제조**

[0095] 오디 발효액을 이용한 경옥고를 제조하였다. 이를 위하여 인삼, 복령, 지황, 꿀로 제조되는 경옥고를 제조할 때 오디 발효액의 최적 첨가비를 색도, 점성도, 관능적 평가를 통해 검토하였으며, 그 결과 오디 발효 농축액: 인삼: 복령: 지황: 꿀의 최적 혼합비는 중량 기준 1: 1: 2: 8.7:4로 도출하였다.

[0096] 벌꿀은 100℃에서 1 시간 동안 달이고, 생지황은 압착한 후 즙을 추출하고, 인삼 및 복령은 분쇄한 후, 각각 1: 2: 8.7:4의 중량비로 각 9kg: 18kg: 78.3kg: 36kg씩 혼합하였다.

[0097] 이어 상기 각 성분을 혼합 한 후, 100℃ 물에서 72시간 중탕하면서 내용물 전체부피가 중탕을 위해 끓이는 물 수면에 완전히 잠길수 있도록증발하는 양만큼 부족한 물을 보충하였다.

[0098] 중탕 후, 냉각시키는 과정에서 혼합물의 온도 38℃에서 실시예 1에서 제조된 오디 발효물 9kg을 추가하였다.

[0099] **3-2. 경옥고 열처리 제조 전후 발효 오디액 혼합첨가를 통한 생리활성의 변화 조사**

[0100] 발효 오디 경옥고 제조시 제조공법을 확립하기 위하여 오디 발효액을 기존 경옥고 제조방식 중 초기에 혼합하여 장시간 열처리를 가하는 방식과, 최종 첨가하여 열처리를 가하지 않는 방식으로 제조한 후 항산화 활성을 검토한 결과 열처리하지 않고 경옥고 제조 마지막 단계인 식힘 과정에서 혼합할 경우 항산화 관련 SOD 활성이 열처리한 시료에 비해 약 1.4 배 높은 수치를 나타내었다.

표 6

[0101]

열처리에 따른 오디 발효 경옥고의 SOD 활성 변화	
구 분	SOD 활성 (%)

열처리하지 않은 경우	21.4
열처리 한 경우	15.6

[0102] 도 7에는 최적 비율에 따라 오디 경옥고를 제조하는 주요과정을 나타내었다. 특히 최종 혼합 후 3주 동안 빛이 들지 않는 서늘한 지하저장고에 숙성시키는 과정을 거친 후 최종 제품으로 완성하였다.

[0103] **실시예 4 오디 발효물과 약용식물을 함유한 발효 오디 혼합조성물의 성분 및 이화학적 특성 분석**

[0104] **4-1. 혼합 조성물의 성분 분석**

[0105] 상기 혼합조성물에 대한 열량, 탄수화물, 지방, 단백질, 수분, 회분, 나트륨, 당류, 포화지방, 트랜스 지방을 포함하는 주요 영양성분과 주요 미네랄 성분 분석을 식품 검사 기관에 의뢰하여 실시하였다.

[0106] 그 결과 하기 표 7에서 보는 바와 같이 혼합 조성물(발효 오디 경옥고)는 기존 경옥고에 비하여 탄수화물과 단백질 함량이 높게 나타났으며, 나트륨 함량은 다소 낮은 것으로 분석되었다.

표 7

[0107]

시험항목	발효 오디 경옥고	기존 경옥고
열량(kcal)	72	52
탄수화물(g/100g)	17.1	12.8
단백질(g/100g)	1.0	0.2
수분(g/100g)	81.8	87.0
화분(g/100g)	0.0	0.0
지방(g/100g)	0.1	0.0
나트륨(g/100g)	1.4	2.4
당류(g/100g)	15.8	12.6
포화지방(g/100g)	0.0	0.0
트랜스지방(g/100g)	0.0	0.0
콜레스테롤(mg100g)	0.0	0.0
칼슘(mg/100g)	12.60	4.16
철(mg/100g)	0.24	0.18
인(mg/100g)	28.61	14.75
마그네슘(mg/100g)	8.33	6.99

[0108] 상기 혼합조성물에 포함된 주요 미네랄인 칼슘, 철, 인, 마그네슘을 분석한 결과, 4종의 미네랄 함량 모두 기준 경옥고에 비해 각각 3.05배, 1.3배, 1.94배, 및 1.19배로 증가되었으며, 이로써 발효오디 경옥고에서 생리 활성 기능이 강화됨을 확인할 수 있다.

[0109] **4-2. 혼합 조성물의 생리활성 기능 성분 함량 분석**

[0110] 1) 상기 혼합조성물의 구성 아미노산 18종에 대한 분석을 실시한 결과, 하기 표 8에 나타나 있는 바와 같이 총 아미노산 함량이 약 537.765mg/100g으로 발효시키지 않은 시료의 163.473mg/100g에 비해 약 3.3배 증가된 것으로 분석되었다.

표 8

[0111]

시험항목	발효 오디 경옥고	기존 경옥고
Aspartic acid(mg/100g)	42.453	12.119
Threonine(mg/100g)	19.709	6.212
Serine	20.859	7.644
Glutamic acid(mg/100g)	121.866	48.058
Proline(mg/100g)	29.674	16.429

Glycine(mg/100g)	16.808	4.773
Alanine(mg/100g)	37.189	6.928
Cystine(mg/100g)	9.000	0.000
Valine(mg/100g)	33.272	20.143
Methionine(mg/100g)	6.585	2.797
Isoleucine(mg/100g)	19.241	5.458
Leucine(mg/100g)	28.188	9.777
Tyrosine(mg/100g)	80.804	0.000
Phenylalanine(mg/100g)	26.371	16.999
Histidine(mg/100g)	6.256	3.032
Lysine(mg/100g)	24.963	1.671
Arginine(mg/100g)	14.526	1.434
Total(mg/100g)	**537.765**	**163.473**

[0112] 2) 상기 혼합 조성물에 포함되어 항산화 활성에 영향을 줄 수 있는 총 폴리페놀 함량과 총 안토시아닌 함량을 분석하였다. 그 결과, 하기 표 9에서 보는 바와 같이 상기 발효 오디 경옥고의 경우 총 폴리페놀 함량이 181.4mg/100g, 총 안토시아닌 함량이 14.67mg/100g으로, 기존 경옥고의 총 폴리페놀 함량 169.64mg/100g, 총 안토시아닌 함량 7.08mg/100g에 비해 각각 높은 값으로 분석되엇다. 이로써, 상기 혼합조성물의 경우 일반 경옥고보다 항산화 활성이 높은 것을 나타낸다.

표 9

[0113]

시험항목	**발효 오디 경옥고**	**기존 경옥고**
총 안토시아닌 (mg/100g)	14.67	7.08
총 폴리페놀 (mg/100g)	181.40	169.64

[0114] 상기 혼합 조성물의 항산화 관련 SOD 활성을 오디 발효액 측정시와 동일한 SOD 분석 키트를 사용하여 측정하였다. 그 결과, 상기 혼합 조성물의 SOD 활성은 약 21.4%로 일반 경옥고의 10.7%에 비해 높은 값을 나타내었다.

[0115] **실험예 1. 오디 발효액 및 발효 오디 경옥고의 항암 활성 평가(*in vivo*)**

[0116] **1-1. 암 세포주를 이용한 오디 발효액의 항암 활성 평가**

[0117] 오디 유산균 발효액에 대한 항암 세포 활성 평가를 실시하였다. 이때 사용한 주요 시험방법은 다음과 같다. 동물세포 배양은 유방암 세포주인 MDAMB231 (ATCC HTB-26), 폐암 세포주인 A549 (ATCC CTL-185), 자궁경부암 세포주인 HeLa (ATCC CRM-CCL-2)를 배양하여 실험을 수행하였고 실험에 사용된 모든 세포주는 낮은 계대(passage) 상태에서 실험에 사용되었다.

[0118] 각 세포주에 해당하는 배지에 10% FBS(fetal bovine serum), 10 유닛/ml 페니실린, 10㎍/ml 스트렙토마이신을 첨가하여 배양용 배지를 만들었다. 동물 세포 배양에 사용된 모든 배지와 용액은 사용 전 37℃ 항온 수조에서 따뜻하게 하여 사용하였으며 37℃, 5% CO_2의 항온 항습 배양기에서 배양하였다. 세포가 80% 정도 자라면 100 mm 디쉬에 1/3의비율로 동일하게 계대하여 배양하였으며 2일 마다 새로운 배지로 갈아주었다. 모든 시료는 처리 전 배지를 PBS로 세척 후 배지를 교환하여 실험을 진행하였다.

[0119] 세포 생존 능력 측정을 위해 셀타이터 96아쿠아 원 솔루션 셀 프로피퍼레이션 어세이(CellTiter 96 AQueous One Solution Cell Proliferation Assay)를 수행하였다. 이는 세포 증식 능력이나 세포 생존 능력을 정량하기 위한 것으로 세포 내의 미토콘드리아 탈수 효소에 의해 MTS에서 포르마잔이라는 발색물질이 생성되는 양을 측정한다. 살아있는 세포에만 유효하며 발색 강도가 세포 수와 직선 상관 관계를 나타낸다. 96웰 플레이트에 웰 당 1 x 10^4개의 세포를 분주하여 200㎕의 배지에서 37℃, 5% CO_2 항온 항습 배양기에서 24시간 동안 배양 후 FBS를 포함하지 않는 배지에 오디와 발효 오디 시료를 농도별로 처리하여 24시간 배양하였다. 그 후 웰 당 100㎕의 FBS를 포함하지 않는 배지에 20㎕ MTS를 섞은 용액을 넣고 1시간 동안 반응시킨 후 의료용 효소 분석기(Labsystems,

FI/Multjskan MS)를 통하여 발색강도를 측정하였다.

[0120] 오디 및 오디 유산균 발효액의 경우 도 8에서 보는 바와 같이 3종의 암세포주 중 유방암 세포주와 자궁암 세포주에서 유의적으로 암세포주 생존율을 낮추는 경향성을 확인하였으며, 특히 오디 유산균 발효액의 경우 발효시키지 않은 오디 시료보다 억제 기능이 더 우수하였다. 유방암세포주인 MDAMB231의 경우 3배 농축시킨 오디 유산균 발효액을 2% 처리한 경우 생존율이 약 60% 감소함을 확인하였다. 이는 동일 농도의 발효시키지 않은 오디 추출액 처리시 약 40% 억제에 비해 더 효과적인 것으로 나타났다.

[0121] **1-2. 암 세포주를 이용한 발효오디 경옥고의 항암 활성 평가**

[0122] 상기 혼합 조성물(발효 오디 경옥고)이 유방암 세포주인 MDAMB231(ATCC HTB-26)과 MCF7 (ATCC HTB-22), 폐암 세포주인 A549 (ATCC CTL-185) 자궁경부암 세포주인 HeLa (ATCC CRM-CCL-2), 및 뇌 암세포주인 U87MG (ATCC HTB-14)를 포함하는 다양한 암세포주의 생존력에 미치는 영향을 상기와 같이 분석하였다. 경옥고 시료는 멸균 정제수를 이용하여 1g/ml 농도로 하여 0.25~2% 농도로 처리하였다.

[0123] 그 결과는 도 9와 같다. 발효 오디 경옥고에 대하여 유방암 세포주인 DAMB231과 MCF7, 폐암 세포주인 A549, 자궁경부암 세포주인 HeLa, 뇌 암세포주인 U87MG를 포함하는 다양한 암세포주에서 생존력을 비교한 그래프는 도 9a와 같다.

[0124] 또한 발효 오디경옥고에 대하여 유방암 세포주인 MDAMB231와 MCF7, 폐암 세포주인 A549, 자궁경부암 세포주인 HeLa, 뇌 암세포주인 U87MG를 포함하는 다양한 암세포주에서 생존력을 비교한 결과는 도 10과 같다.

[0125] 발효오디 경옥고의 경우 일반 경옥고에 비해 상기 5종의 암세포 중 특히 뇌암 관련 세포주인 U87MG의 생존율을 가장 현저히 감소시키는 경향이 있었으며, 이외에도 폐암 관련 A549, 및 유방암 관련 MDAMB231의 암세포 생존률을 유의성있게 감소시키는 경향성을 확인하였다. 하지만, 발효시키지 않은 일반 경옥고의 경우 동일 조건 처리시 유방암 세포주인 MDAMB231와 자궁경부암 세포주인 HeLa, 폐암 세포주인 A549에서 다소 암세포주 생존을 억제시키는 경향성이 관찰되었으나, 암세포주 생존 억제 효과는 발효 오디 경옥고에 비해서는 낮은 편으로 분석되었다.

[0126] **제제예 1. 발효 오디 경옥고 시제품의 생산**

[0127] 발효 오디 경옥고의 제품화를 위해 상기에서 제조한 발효 오디 경옥고를 이용하여 도 11과 같이 3 종류의 경옥고 환제품 300개를 제조하였다. 발효 오디 경옥고 환을 100개 제조하였으며, 비교를 위해 일반 경옥고 환 100개, 오디청을 혼합한 경옥고 환 100개를 제조하여, 관능평가와 저장 특성을 검토하였다.

[0128] 상기 3종의 경옥고환에 대하여 5단계 평점법으로 관능평가를 실시하였다. 색도, 맛, 향 등에 대하여 5점은 매우 좋음이고, 1점은 매우 나쁨으로 평가 점수가 높은 것이 기호도가 높은 것으로 평가하였다. 그 결과 색, 향, 맛, 전체적 기호도에서 발효 오디 경옥고환이 유의성 있게 비교적 높은 점수를 획득하였다.

표 10

[0129]

경옥고환 종류에 따른 관능검사					
종 류	**색**	**향**	**질감**	**맛**	**전체적 기여도**
발효오디 경옥고	3.2	3.7	3.5	3.8	3.5
경옥고	2.1	2.4	2.6	2.9	2.7
오디청 경옥고	3.3	3.5	2.9	3.4	3.1

[0130] ** 상기 데이타는 평균±SD(n=3)로 나타냄.

[0131] 발효 오디 경옥고환을 상온에서 2개월 저장하면서 제품의 보관상 특성을 검토한 결과 색과 맛에서 변화

가 거의 없었으며, 미생물 오염 양상도 관찰되지 않았다.

[0132] **제제예 2. 액제의 제조**

[0133]	오디 발효물	1000mg
[0134]	설탕	20mg
[0135]	이성화당	20mg
[0136]	레몬향	적량

[0137] 정제수를 가하여 전체 1000 ml로 맞추었다. 통상의 액제의 제조방법에 따라 상기의 성분을 혼합한 다음 갈색병에 충전하고 멸균시켜 액제를 제조하였다.

[0138] **제제예 3. 건강 음료의 제조**

[0139]	오디 발효물	1000mg
[0140]	구연산	1000mg
[0141]	올리고당	100g
[0142]	메실농축액	2g
[0143]	타우린	1g

[0144] 정제수를 가하여 전체 1000 ml로 맞추었다. 통상의 건강 음료 제조방법에 따라 상기의 성분을 혼합한 다음, 약 1시간 동안 85℃에서 교반 가열한 후 만들어진 용액을 여과하여 멸균된 2L 용기에 취득하여 밀봉 멸균한 뒤 냉장보관한 다음 본 발명의 건강 음료 조성물 제조에 사용하였다.

[0145] **제제예 4. 건강 식품의 제조**

[0146]	오디 발효물	1000mg
[0147]	비타민 혼합물	적량
[0148]	비타민 A 아세테이트	70mg
[0149]	비타민 E	1.0mg
[0150]	비타민 B1	0.13mg
[0151]	비타민 B2	0.15mg
[0152]	비타민 B6	0.5mg
[0153]	비타민 B12	0.2mg
[0154]	비타민 C	10mg
[0155]	비오틴	10mg
[0156]	니코틴산아미드	1.7mg
[0157]	엽산	50mg
[0158]	판토텐산칼슘	0.5mg
[0159]	비타민 E	1.0mg

[0160]	무기질 혼합물	적량	
[0161]	황산 제1철		1.75mg
[0162]	산화아연		0.82mg
[0163]	탄산 마그네슘	25.3mg	
[0164]	제1인산칼륨		15mg
[0165]	제2인산칼슘		55mg
[0166]	구연산칼륨		90mg
[0167]	탄산칼슘		100mg
[0168]	염화마그네슘	24.8mg	

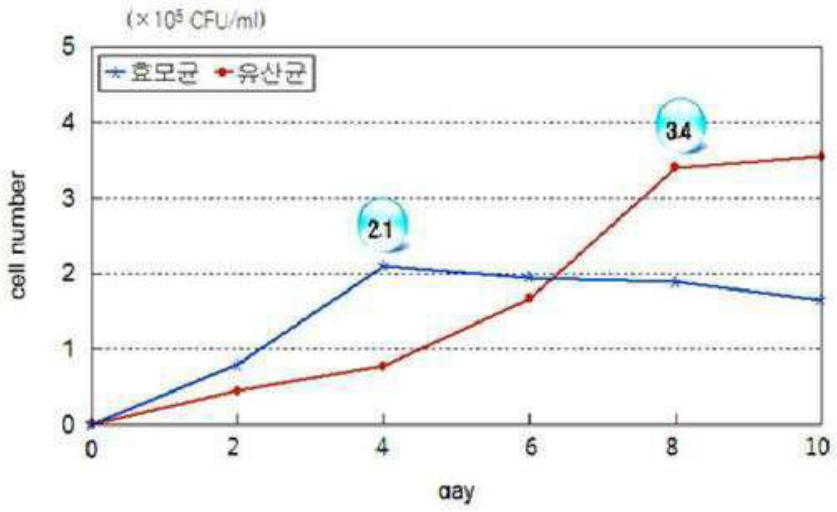
[0169] 상기의 비타민 및 미네랄 혼합물의 조성비는 비교적 건강식품에 적합한 성분을 바람직한 제조예로 혼합 조성하였지만, 그 배합비를 임의로 변형 실시하여도 무방하며 통상의 건강식품 제조방법에 따라 상기의 성분을 혼합한 다음, 과립 제형의 건강식품을 제조하였다.

[0170] 이상에서 본원의 예시적인 실시예에 대하여 상세하게 설명하였지만 본원의 권리범위는 이에 한정되는 것은 아니고 다음의 청구범위에서 정의하고 있는 본원의 기본 개념을 이용한 당업자의 여러 변형 및 개량 형태 또한 본원의 권리범위에 속하는 것이다.

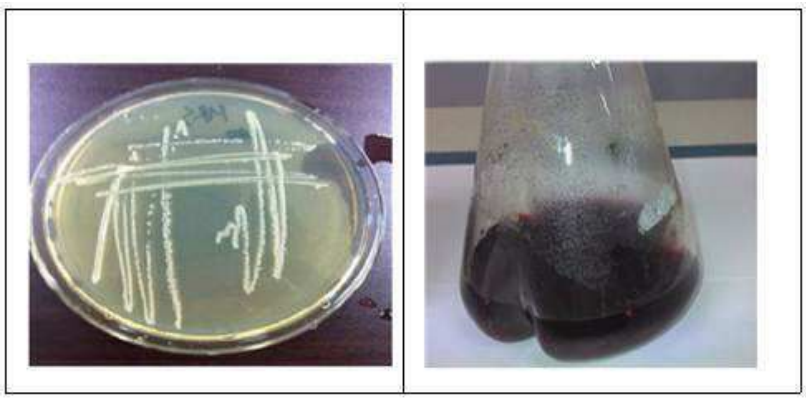
[0171] 본 발명에서 사용되는 모든 기술용어는, 달리 정의되지 않는 이상, 본 발명의 관련 분야에서 통상의 당업자가 일반적으로 이해하는 바와 같은 의미로 사용된다. 본 원에 참고문헌으로 기재되는 모든 간행물의 내용은 본 발명에 도입된다.

도면

도면1a



도면1b

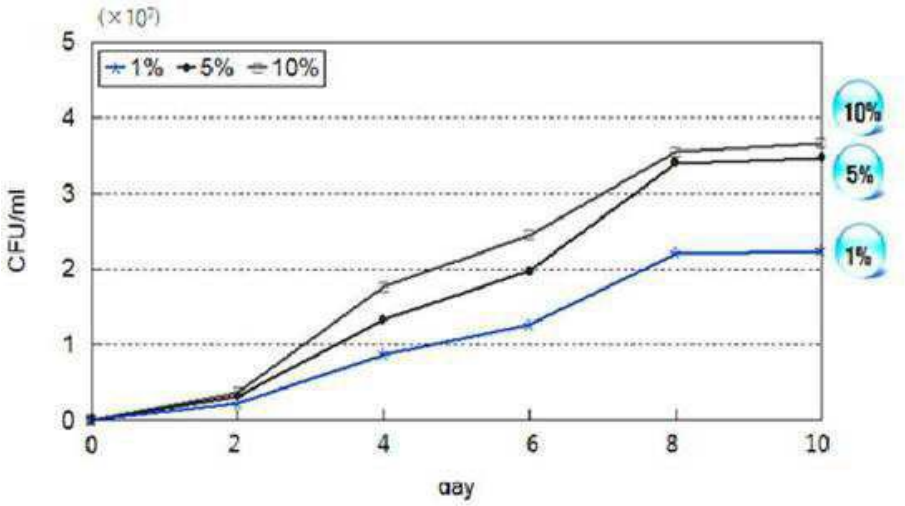


도면2

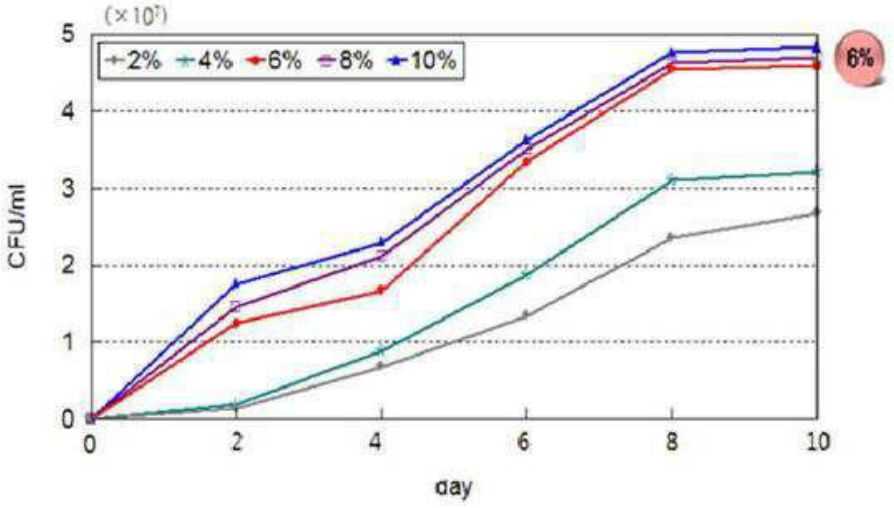


(RM방식을 이용한 유산균 발효액) (오디 열처리에 따른 발효특성분석)

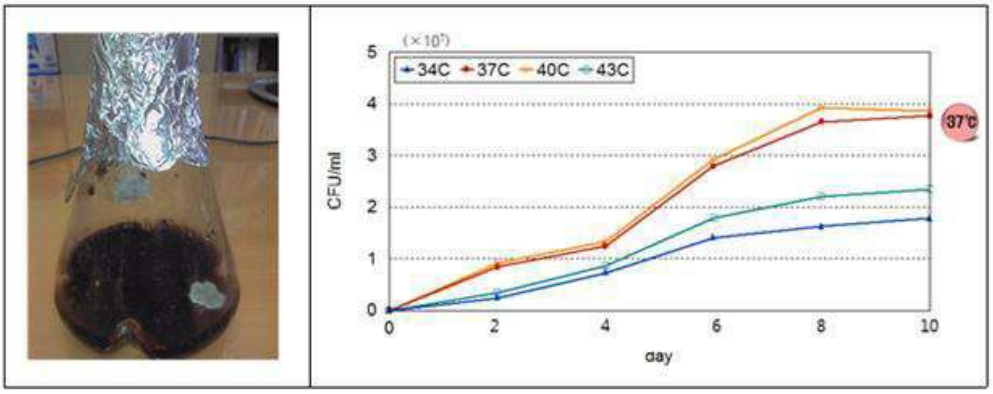
도면3



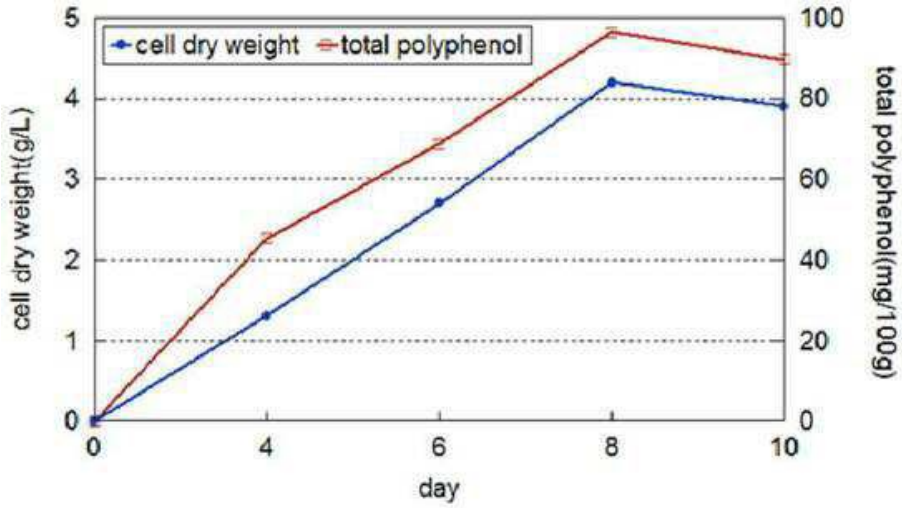
도면4


(×10⁷)
2%
4%
6%
8%
10%
6%
CFU/ml
day

도면5


(×10⁷)
34C
37C
40C
43C
37℃
CFU/ml
day

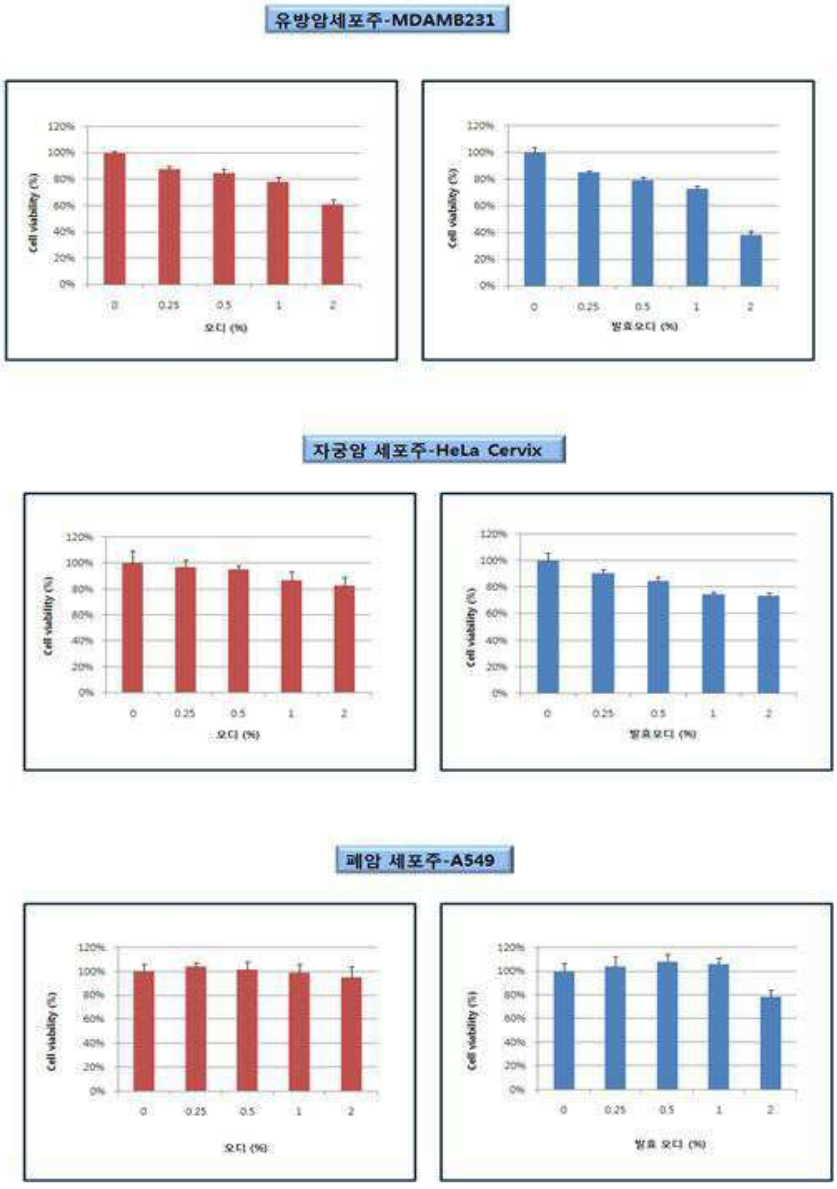
도면6


cell dry weight
total polyphenol
cell dry weight(g/L)
total polyphenol(mg/100g)
day

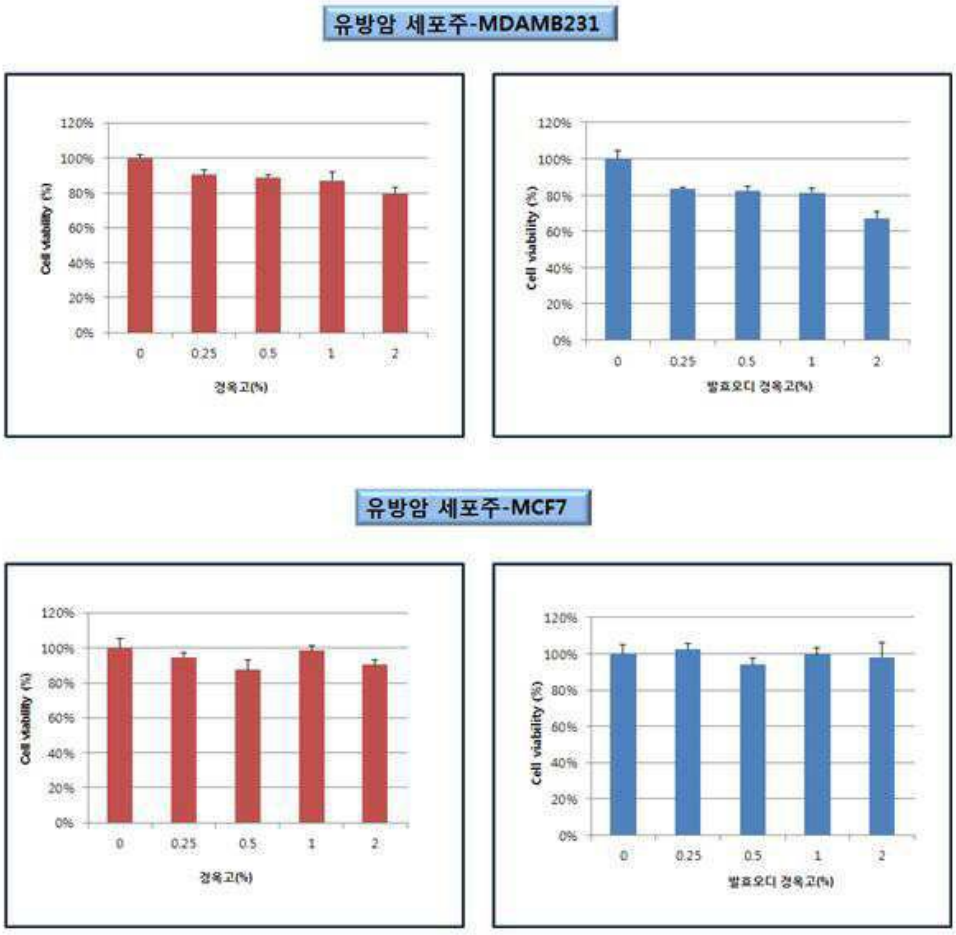
도면7


1
재료선별
2
재료가공
3
경옥고가공공정
4
포장
깨끗한 정소 선정
와욱 선정
준비된 재료 반죽
경옥고재료 가열
경옥고 완

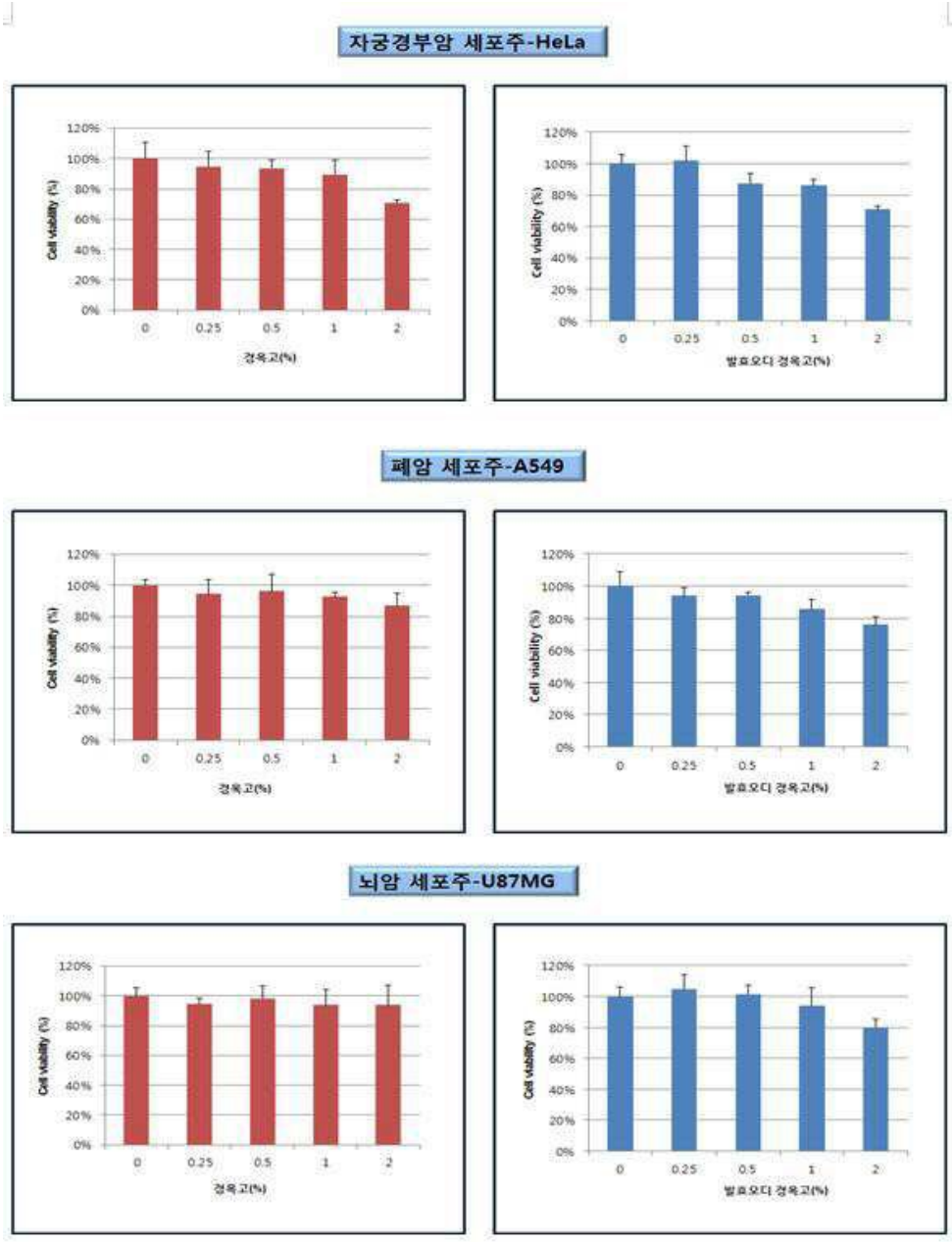
도면8


유방암세포주-MDAMB231
Cell viability (%)
120%
100%
80%
60%
40%
20%
0%
0
0.25
0.5
1
2
오디 (%)
발효오디 (%)
자궁암 세포주-HeLa Cervix
폐암 세포주-A549

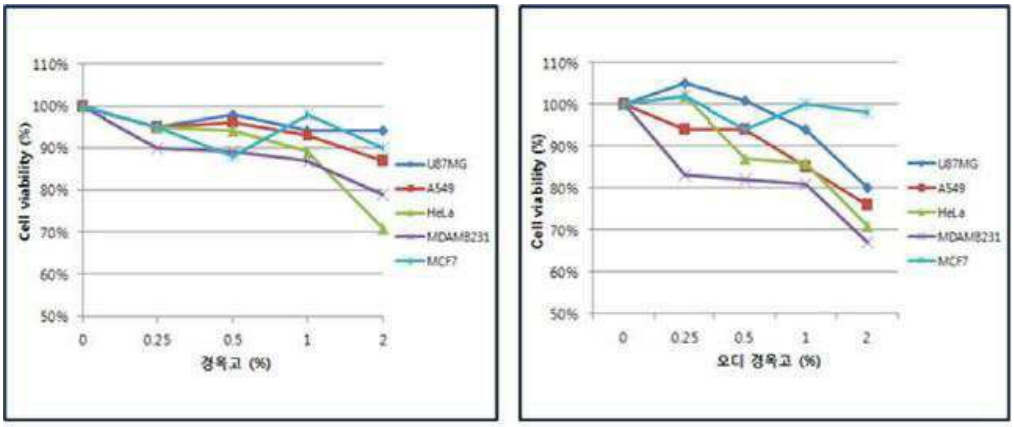
도면9a


유방암 세포주-MDAMB231
Cell viability (%)
120%
100%
80%
60%
40%
20%
0%
0
0.25
0.5
1
2
경옥고(%)
Cell viability (%)
120%
100%
80%
60%
40%
20%
0%
0
0.25
0.5
1
2
발효오디 경옥고(%)
유방암 세포주-MCF7
Cell viability (%)
120%
100%
80%
60%
40%
20%
0%
0
0.25
0.5
1
2
경옥고(%)
Cell viability (%)
120%
100%
80%
60%
40%
20%
0%
0
0.25
0.5
1
2
발효오디 경옥고(%)

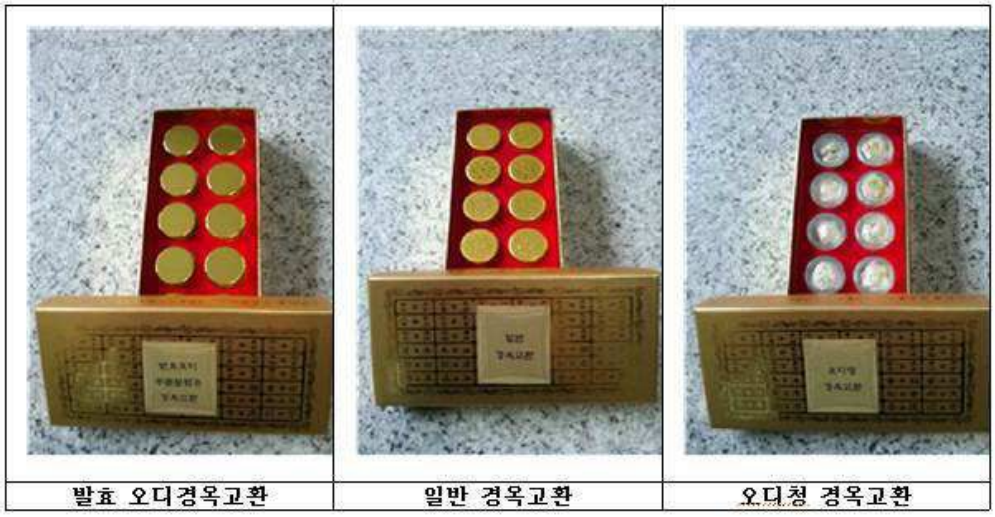
도면9b


자궁경부암 세포주-HeLa
Cell viability (%)
120%
100%
80%
60%
40%
20%
0%
0
0.25
0.5
1
2
경옥고(%)
발효오디 경옥고(%)
폐암 세포주-A549
뇌암 세포주-U87MG

도면10


110%
100%
90%
80%
70%
60%
50%
Cell viability (%)
0
0.25
0.5
1
2
경옥고 (%)
U87MG
A549
HeLa
MDAMB231
MCF7
오디 경옥고 (%)

도면11


발효 오디경옥고환
일반 경옥고환
오디청 경옥고환