(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2018년04월16일
(11) 등록번호 10-1849119
(24) 등록일자 2018년04월10일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 36/899 (2006.01) *A23K 10/12* (2016.01)
A23L 33/105 (2016.01) *A61K 8/97* (2017.01)
A61Q 19/00 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 36/899 (2013.01)
A23K 10/12 (2016.05)
(21) 출원번호 10-2017-0037646
(22) 출원일자 2017년03월24일
심사청구일자 2017년03월24일
(56) 선행기술조사문헌
KR1020160024243A*
(뒷면에 계속)
전체 청구항 수 : 총 1 항

(73) 특허권자
조선대학교산학협력단
광주광역시 동구 필문대로 309 (서석동)
(72) 발명자
신현재
전라남도 화순군 도곡면 원화길 32
조한교
전라남도 여수시 신월로 561-8, 17동 404호(신월동, 금호아파트단지)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인 남앤드남

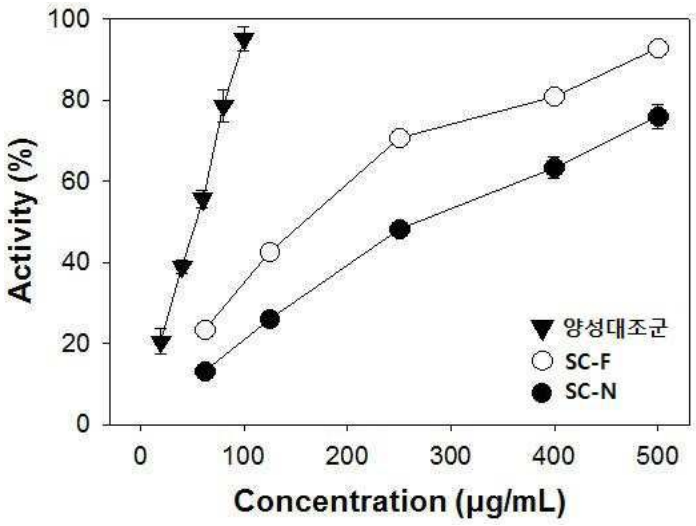
심사관 : 홍수민

(54) 발명의 명칭 **대나무 잎 발효물을 유효성분으로 포함하는 항산화 조성물**

(57) 요 약

본 발명은 항산화 활성을 갖는 조성물에 관한 것으로, 더욱 자세하게는 대나무 잎 발효물을 유효성분으로 포함하는 의약용도, 식품용도 또는 화장용도의 항산화 조성물 및 건강기능식품에 관한 것이다. 본 발명의 대나무 잎 발효물은 신이대 잎을 특정 미생물로서 바실러스 섭틸리스 균주를 이용하여 발효시킴으로써 페놀 화합물 및 플라보노이드 화합물의 함량이 증대되며, 이러한 파이토케미칼의 증대를 통해 항산화 활성이 우수한바, 상기 대나무 잎 발효물을 유효성분으로 포함하는 조성물은 의약품, 건강기능식품 및 화장품 기술 분야에 있어서 항산화제로서 유용하게 사용될 수 있다.

대 표 도 - 도3



(52) CPC특허분류
A23L 33/105 (2016.08)
A61K 8/97 (2013.01)
A61Q 19/00 (2013.01)
A61K 2236/19 (2013.01)
A61K 2800/85 (2013.01)

(72) 발명자
최문희
전라남도 여수시 망마로 82-10, 28동 406호(신기동, 대림산업제2사택)
김다송
전라남도 여수시 새터로 6, 10동 102호(신기동, 롯데첨단소재(주))

(56) 선행기술조사문헌
Mi-Jung Kim et al, 'Physiological and Antibacterial Activity of Bamboo(Sasa coreana Nakai) Leaves', J. Korean Soc. Food Nutr. 1996, Vol.25, No.1, 135-142*
KR1020160024243 A*
KR1020140086434A
KR1020140103633A
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1345247095
부처명 교육부
연구관리전문기관 조선대학교 산학협력단
연구사업명 지역혁신창의인력양성사업
연구과제명 대나무 유래 플라보노이드와 폴리페놀을 함유한 고부가가치 미용식품 소재 개발
기 여 율 1/1
주관기관 한국연구재단
연구기간 2016.05.01 ~ 2017.04.30

명 세 서

청구범위

청구항 1

항산화 활성을 갖는 화장료 조성물로서,

상기 조성물은 신이대(*Sasa coreana Nakai*) 잎 발효물을 유효성분으로 포함하고;

상기 신이대 잎 발효물은 건조된 신이대 잎에 바실러스 섭틸리스를 접종하고 15일동안 37℃에서 발효시키는 과정을 통해 제조되며;

상기 신이대 잎 발효물은 총 폴리페놀 함량이 35.34±0.91 GAE* mg/g이고, 총 플라보노이드 함량이 80.57±0.22 QE* mg/g이며;

상기 신이대 잎 발효물은 (+)-카테킨 함량이 19.88±0.91mg/L이고, (-)-에피갈로카테킨-3-갈레이트 함량은 0.47±0.07 mg/L이며, (-)-에피카테킨 함량은 20.72±1.04mg/L이고, (-)-갈로카테킨-3-갈레이트 함량은 5.51±0.23 mg/L이며, (-)-에피카테킨-3-갈레이트 함량은 3.42±0.20mg/L이고, (-)-카테킨-3-갈레이트 함량은 8.23±0.69mg/L인 것을 특징으로 하는, 항산화 활성을 갖는 화장료 조성물.

청구항 2

삭제

청구항 3

삭제

청구항 4

삭제

청구항 5

삭제

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 항산화 활성을 갖는 조성물에 관한 것으로, 더욱 자세하게는 대나무 잎 발효물을 유효성분으로 포함하는 의약용도, 식품용도 또는 화장용도의 항산화 조성물 및 건강기능식품에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 우리나라에 분포하는 대나무는 5속에 10종이 있으며 주로 남부에서 잘 자라며 *Phyllostachys*와 *Sasa* 종이 주를 이루고 있다. 대나무는 실생활의 전반에 걸쳐 활용도가 높은 산림자원으로, 건축재로 쓰이기도 하며 가구와 죽세공품 등 그 용도가 매우 다양하다. 대나무의 여러 부위 중에서, 대나무 잎은 우리나라 뿐만 아니라 중국, 일본 등 아시아권역에서 주로 댓잎차, 댓잎환, 댓잎소금 등의 가공식품으로 활용되고 있다.

[0003] 대나무 잎에는 영양성분으로서 탄수화물, 미네랄, 아미노산 등이 함유되어 있으며, 오리엔틴(orientin), 호모오리엔틴(homoorientin), 비텍신(vitexin), 이소비텍신(isovitexin), 리놀레산(linoleic acid) 등 다양한 파이토케미칼이 포함되어 있어 다양한 생리활성을 나타낸다. 최근 이러한 영양성분과 파이토케미칼 성분이 풍부한 대나무 잎을 가공하여 식품 소재로 활용하고, 그 추출물을 활용하기 위한 여러 시도가 보고되고 있다. 그러나 대나무 잎은 높은 셀룰로스 함량과 낮은 포만감, 독특한 향 때문에 대나무 잎 자체를 섭취하는 것 보다는 차나 음료의 형태로 추출하여 섭취하는 경우가 많다.

[0004] 한편, 발효는 식품의 맛과 풍미에 영향을 미치며 저장성을 높일 수 있는 가공 방법 중 하나로, 발효 미생물로부

터 유래한 효소작용에 의하여 식품의 영양소가 쉽게 소화될 수 있는 형태로 분해되면서 성분 함량에 변화를 줄 수 있다. 전통 발효식품 제조 방법은 지역, 제조방법, 원료 등에 의해 미생물이 동일하지 않아 균일한 품질을 갖기 힘들며, 고품질의 발효식품의 생산을 위해서는 고기능의 미생물을 선별하여 사용하는 것이 무엇보다 중요하다.

[0005] 상기와 같이 다양한 생리활성 물질을 포함하는 대나무 잎 자체의 영양성분 연구에 비하여 발효 공정을 적용했을 때, 발효 전후의 성분의 변화와 생리활성의 변화를 확인한 연구는 부족한 실정이며, 특히 신이대 잎을 특정 미생물로 발효하여 성분변화 및 항산화 활성 변화에 대한 연구는 전혀 이루어진바 없다.

[0006] 이에, 본 발명자는 다양한 생리활성 물질을 포함하는 대나무 잎으로서 국내 자생하는 신이대(*Sasa coreana Nakai*) 잎을 특정 미생물로서 바실러스 섭틸리스를 이용하여 발효시킨 후, 발효 전·후에 따른 일반성분(당, 미네랄, 아미노산) 분석, 페놀 화합물 및 플라보노이드 화합물의 함량 분석 및 항산화 활성 변화를 분석하였다. 그 결과, 바실러스 섭틸리스를 이용하여 발효시킨 신이대 잎 발효물에서 항산화 활성이 두드러지게 증대되는 것을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

선행기술문헌

특허문헌

[0007] (특허문헌 0001) 한국공개특허 제10-2014-0086434호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 따라서 본 발명의 목적은 항산화 활성이 우수한 의약품 용도, 식품 용도, 화장품 용도, 동물사료 용도의 항산화 조성물을 제공하는 것이다.

[0009] 본 발명의 또 다른 목적은, 항산화 활성이 우수한 건강기능식품을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0010] 상기와 같은 본 발명의 목적을 달성하기 위해서,

[0011] 본 발명은 대나무 잎 발효물을 유효성분으로 포함하는 항산화 조성물을 제공한다.

[0012] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 대나무는 신이대(*Sasa coreana Nakai*)일 수 있다.

[0013] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 대나무 잎 발효물은 대나무 잎에 바실러스 섭틸리스 균주를 접종하여 발효시킴으로써 제조될 수 있다.

[0014] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 조성물은 의약품용, 식품용, 화장품용 또는 사료용일 수 있다.

[0015] 또한, 본 발명은 대나무 잎 발효물을 유효성분으로 포함하는 건강기능식품을 제공한다.

발명의 효과

[0016] 본 발명의 대나무 잎 발효물은 신이대 잎을 특정 미생물로서 바실러스 섭틸리스 균주를 이용하여 발효시킴으로써 페놀 화합물 및 플라보노이드 화합물의 함량이 증대되며, 이러한 파이토케미칼의 증대를 통해 항산화 활성이 우수한바, 상기 대나무 잎 발효물을 유효성분으로 포함하는 조성물은 의약품, 건강기능식품 및 화장품 기술 분야에 있어서 항산화제로서 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0017] 도 1은 바실러스 섭틸리스 균주를 이용하여 발효시키는 동안 신이대 잎의 색깔 변화를 나타내는 사진이다.

도 2는 신이대 잎의 발효 전(SC-N)·후(SC-F) 추출물의 총 폴리페놀, 총 플라보노이드 및 카테킨의 함량을 측정하여 나타낸 그래프이다.

도 3은 신이대 잎의 발효 전(SC-N)·후(SC-F) 추출물의 항산화 활성을 나타낸 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0018] 본 발명은 대나무 잎 발효물을 유효성분으로 포함하는 항산화 조성물을 제공함에 그 특징이 있다.

[0019] 본 명세서에서 언급하는 '대나무 잎 발효물'은 대나무 잎에 발효 미생물을 접종시켜 대나무 잎을 발효시킨 물질로서, 대나무 잎의 발효물 자체, 여기에 용매를 가하여 추출한 대나무 잎 발효 추출물 및 기타 정제 등의 가공 공정을 통해 수득될 수 있는 모든 추출물, 분획물, 정제물 등을 포함하는 개념이다.

[0020] 본 발명에서 정의된 '추출물'은 적절한 용매를 이용하여 대나무 잎 발효물로부터 추출한 것이며, 예를 들어, 대나무 잎 발효물의 조추출물, 극성용매 가용 추출물 또는 비극성용매 가용 추출물을 모두 포함한다.

[0021] 상기 대나무 잎 발효물로부터 추출물을 추출하기 위한 적절한 용매로는 약학적으로 허용되는 유기용매라면 어느 것을 사용해도 무방하며, 물 또는 유기용매를 사용할 수 있으며, 이에 제한되지는 않으나, 예를 들어, 정제수, 메탄올(methanol), 에탄올(ethanol), 프로판올(propanol), 이소프로판올(isopropanol), 부탄올(butanol) 등을 포함하는 탄소수 1 내지 4의 알코올, 아세톤(acetone), 에테르(ether), 벤젠(benzene), 클로로포름(chloroform), 에틸아세테이트(ethyl acetate), 메틸렌클로라이드(methylene chloride), 헥산(hexane) 및 시클로헥산(cyclohexane) 등의 각종 용매를 단독으로 혹은 혼합하여 사용할 수 있다. 바람직하게는 에탄올(주정)을 사용할 수 있으며, 보다 바람직하게는 에탄올을 사용하는 것이 좋다.

[0022] 추출 방법으로는 열수추출법, 냉침추출법, 환류냉각추출법, 용매추출법, 수증기증류법, 초음파추출법, 용출법, 압착법 등의 방법 중 어느 하나를 선택하여 사용할 수 있다. 또한, 목적하는 추출물은 추가로 통상의 분획 공정을 수행할 수도 있으며, 통상의 정제 방법을 이용하여 정제될 수도 있다. 본 발명의 추출물의 제조방법에는 제한이 없으며, 공지되어 있는 어떠한 방법도 이용될 수 있다.

[0023] 예를 들면, 본 발명의 조성물에 포함되는 대나무 잎 발효 추출물은 대나무 잎 발효물을 대상으로 상기한 열수추출 또는 용매 추출법으로 추출된 1차 추출물을, 감압 증류 및 동결 건조 또는 분무 건조 등과 같은 추가적인 과정에 의해 분말 상태로 제조할 수 있다. 또한, 상기 1차 추출물을 실리카겔 컬럼 크로마토그래피(silica gel column chromatography), 박층 크로마토그래피(thin layer chromatography), 고성능 액체 크로마토그래피(high performance liquid chromatography) 등과 같은 다양한 크로마토그래피를 이용하여 추가로 정제된 분획을 얻을 수도 있다.

[0024] 따라서 본 발명에 있어서 '대나무 잎 발효물'이란 대나무 잎의 발효물 자체와 더불어 발효물을 추출, 분획 또는 정제하는 과정을 통해 얻을 수 있는 모든 추출액, 분획 및 정제물, 그들의 희석액, 농축액 또는 건조물을 모두 포함하는 개념이다.

[0025] 본 발명의 일 구체예에서 상기 대나무 잎은 신이대(*Sasa coreana Nakai*) 잎을 사용할 수 있다.

[0026] 본 명세서에서 언급하는 '신이대'는 학명이 *Sasa coreana Nakai*이며 피자식물문, 단자엽식물강, 화본목, 벼과, 조릿대속으로 함경북도 화대군, 명천군, 칠보산 등 지역의 산기슭에서 자라는 한국산 대나무이다. 지하경(地下莖)은 끝에서 갈라진다. 줄기는 4년 정도 사는데 보통 2년이 지나면 윗부분에서는 가지를 친다. 1년생 줄기는 높이 25~80㎝이고 마디 사이 길이는 30~70㎜, 직경은 3㎜이며 둥글고 거꿀털이 있다. 마디는 비교적 도드라지고 잔 거꿀털이 있다. 대순껍질의 길이는 35~75㎜이고 오랫동안 남아 붙으며 종맥(縱脈) 사이에는 거꿀털이 있으나 위의 것에는 털이 없다. 잎은 줄기 끝에서 5~8개가 2줄로 붙으며 길이 2~7㎜의 엽병(葉柄)이 있다. 엽신(葉身)은 난상(卵狀)의 장타원형(長楕圓形) 또는 장타원형이며 길이 25~190㎜, 너비 8~50㎜이고 끝은 길게 뾰족하며 앞면에는 털이 없고 녹색이며 뒷면에는 보통 견모(絹毛)가 덮여 있고 변두리에는 자상모(刺狀毛)가 배게 나 있다. 잎줄거리 양쪽에는 세로간 6~10개의 엽맥(葉脈)이 있다. 엽설(葉舌)은 길이 0.8~2㎜이며 털이 많다. 마디 사이와 마디에는 모두 거꿀털이 있다. 2년생 가지에서 생기는 잎은 길이 180㎝, 너비 30㎝ 미만이고 밑은 빠르게 뾰족하며 뒷면 중륵(中肋) 위에만 잔털이 있다. 3년생 가지에서 생기는 잎은 길이 125㎜, 너비 30㎜이며 뒷면에는 털이 없거나 또는 중륵 맨 밑에는 약간한 거꿀털이 있기는 하나 금방 없어지고 마디 밑에는 흰가루가 있을 뿐 마디에는 털이 없다. 4년생 가지에 생기는 잎은 보통 길이 57~120㎜, 너비 12~20㎜이나 드물게는 그보다 작은 것도 있으며 밑은 길게 뾰족하고 변두리에는 강모(剛毛)가 있다. 관상용으로 하며 잎은 약으로 쓴다.

[0027] 본 발명의 다른 구체예에서 상기 대나무 잎 발효물은 대나무 잎에 바실러스 섭틸리스 균주를 접종하여 발효시킴으로써 제조될 수 있다.

[0028] 본 명세서에서 언급하는 '바실러스 섭틸리스(*Bacillus subtilis*)'는 바실루스속에 속하는 대표적인 세균종의 일종으로 토양, 건초, 먼지 등 자연계에 널리 분포하는 그람 양성 간균이며, 길이 2~3㎛, 호기성으로 내생포자를 형성하며 고초균이라고도 불린다. 포자는 열, 방사선, 화학약품에 대하여 강한 내성을 보이며, 오랫동안 휴면상태를 유지한다. 일찍이 형질전환 현상을 발견하였으며, 간단한 배지에서 생육할 수 있으므로 분자유전학, 재조합 DNA실험 등의 연구에 널리 이용되었다. 고초균은 세포외효소의 아밀라아제나 프로테아제 등의 생산균으로서 응용미생물학상 중요하며, 최근에는 유전자공학의 재료로서도 주목받고 있다.

[0029] 본 명세서에서 언급하는, '항산화 조성물'이란 산소가 불안정한 상태에 있는 활성산소를 억제 또는 제거하는 작용을 통해 산화를 방지하는 물질을 의미한다.

[0030] 본 발명의 상기 항산화 조성물은 항산화 활성이 요구되는 다양한 목적 및 용도로 사용될 수 있으며, 구체적으로는 의약품, 화장품, 식품 및 동물 사료 등 다양한 산업분야에서 적용되는 물품에 항산화 활성을 부여할 수 있는 기능성 소재로 사용할 수 있으며, 또한 의약품 보존제, 화장품 보존제, 식품 보존제, 의약품 첨가제, 화장품 첨가제, 식품첨가제 및 사료첨가제 등의 소재로도 사용될 수 있다.

[0032] 아래에서는 본 발명의 항산화 조성물이 적용될 수 있는 의약품, 화장품, 식품, 동물사료 형태로 자세히 살펴보았다.

[0034] 본 발명의 항산화 조성물은 대나무 잎 발효물을 유효성분으로 포함하는 산화관련 질환의 예방 또는 치료용 약제학적 조성물일 수 있다.

[0035] 본 발명의 약제학적 조성물은 상기 유효성분 이외에 약제학적으로 적합하고 생리학적으로 허용되는 보조제를 사용하여 제조될 수 있으며, 상기 보조제로는 부형제, 붕해제, 감미제, 결합제, 피복제, 팽창제, 윤활제, 활택제 또는 향미제 등을 사용할 수 있다.

[0036] 상기 약제학적 조성물은 투여를 위해서 상기 기재한 유효성분 이외에 추가로 약제학적으로 허용 가능한 담체를 1종 이상 포함하여 약제학적 조성물로 바람직하게 제제화할 수 있다.

[0037] 상기 약제학적 조성물의 제제 형태는 과립제, 산제, 정제, 피복정, 캡슐제, 좌제, 액제, 시럽, 즙, 현탁제, 유제, 점적제 또는 주사 가능한 액제 등이 될 수 있다. 예를 들어, 정제 또는 캡슐제의 형태로의 제제화를 위해, 유효 성분은 에탄올, 글리세롤, 물 등과 같은 경구, 무독성의 약제학적으로 허용 가능한 불활성 담체와 결합될 수 있다. 또한, 원하거나 필요한 경우, 적합한 결합제, 윤활제, 붕해제 및 발색제 또한 혼합물로 포함될 수 있다. 적합한 결합제는 이에 제한되는 것은 아니나, 녹말, 젤라틴, 글루코스 또는 베타-락토오스와 같은 천연 당, 옥수수 감미제, 아카시아, 트래커캔스 또는 소듐올레이트와 같은 천연 및 합성 검, 소듐 스테아레이트, 마그네슘 스테아레이트, 소듐 벤조에이트, 소듐 아세테이트, 소듐 클로라이드 등을 포함한다. 붕해제는 이에 제한되는 것은 아니나, 녹말, 메틸 셀룰로스, 아가, 벤토니트, 잔탄 검 등을 포함한다. 액상 용액으로 제제화되는 조성물에 있어서 허용 가능한 약제학적 담체로는, 멸균 및 생체에 적합한 것으로서, 식염수, 멸균수, 링거액, 완충 식염수, 알부민 주사용액, 덱스트로즈 용액, 말토 덱스트린 용액, 글리세롤, 에탄올 및 이들 성분 중 1 성분 이상을 혼합하여 사용할 수 있으며, 필요에 따라 항산화제, 완충액, 정균제 등 다른 통상의 첨가제를 첨가할 수 있다. 또한 희석제, 분산제, 계면활성제, 결합제 및 윤활제를 부가적으로 첨가하여 수용액, 현탁액, 유탁액 등과 같은 주사용 제형, 환약, 캡슐, 과립 또는 정제로 제제화할 수 있다. 더 나아가 해당분야의 적절한 방법으로 Remington's Pharmaceutical Science, Mack Publishing Company, Easton PA에 개시되어 있는 방법을 이용하여 각 질환에 따라 또는 성분에 따라 바람직하게 제제화 할 수 있다.

[0038] 본 발명의 일실시예에 있어서, 본 발명의 대나무 잎 발효물은 조성물 총 중량에 대하여 0.00001 ~ 40 중량%로 포함될 수 있다.

[0039] 본 발명의 다른 일실시예에 있어서, 본 발명의 대나무 잎 발효물은 조성물에 대해 0.1 내지 10000㎍/ml의 농도로 포함될 수 있다.

[0040] 본 발명의 약제학적 조성물이 치료효과를 나타낼 수 있는 산화관련 질환으로는, 비염, 천식, 급성통증, 만성통증, 치주염, 치은염, 염증성 장질환, 통풍, 심근경색, 동맥경화, 울혈성 심부전, 고혈압, 협심증, 위궤양, 알츠하이머병, 뇌경색, 다운증후군, 다발성 경화증, 비만, 당뇨, 치매, 우울증, 정신분열증, 결핵, 수면장애, 패혈증, 화상, 췌장염 또는 안과질환 등을 들 수 있되, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0042] 본 발명의 조성물은 또한 식품 조성물일 수 있는데, 이러한 식품 조성물은 유효성분인 대나무 잎 발효물을 함유하는 것 외에 통상의 식품 조성물과 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할

수 있다.

[0043] 상술한 천연 탄수화물의 예는 모노사카라이드, 예를 들어, 포도당, 과당 등; 디사카라이드, 예를 들어 말토스, 슈크로스 등; 및 폴리사카라이드, 예를 들어 덱스트린, 시클로덱스트린 등과 같은 통상적인 당, 및 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알콜이다. 상술한 향미제는 천연 향미제 (타우마틴), 스테비아 추출물(예를 들어 레바우디오시드 A, 글리시르히진 등) 및 합성 향미제 (사카린, 아스파르탐 등)를 유리하게 사용할 수 있다.

[0044] 본 발명의 식품 조성물은 상기 약제학적 조성물과 동일한 방식으로 제제화되어 기능성 식품으로 이용하거나, 각종 식품에 첨가할 수 있다. 본 발명의 조성물을 첨가할 수 있는 식품으로는 예를 들어, 음료류, 육류, 초코렛, 식품류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 사탕류, 아이스크림류, 알코올 음료류, 비타민 복합제 및 건강보조식품류 등이 있다.

[0045] 또한, 상기 식품 조성물은 유효성분인 대나무 잎 발효물 외에 여러 가지 영양제, 비타민, 광물 (전해질), 합성 풍미제 및 천연 풍미제 등의 풍미제, 착색제 및 중진제 (치즈, 초콜릿 등), 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알콜, 탄산음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다. 그밖에 본 발명의 식품 조성물은 천연 과일 쥬스 및 과일 쥬스 음료 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다.

[0046] 이러한 본 발명의 유효성분인 대나무 잎 발효물은 천연물질로서 화학약품과 같은 부작용은 거의 없으므로 항산화 기능성 부여를 목적으로 장기간 복용시에도 안심하고 사용할 수 있다.

[0048] 본 발명은 또한 대나무 잎 발효물을 유효성분으로 포함하는 산화관련 질환 예방 또는 개선용 건강기능식품일 수 있다.

[0049] 본 발명의 건강기능식품은 산화관련 질환 예방 또는 개선용을 목적으로, 정제, 캅셀, 분말, 과립, 액상, 환 등의 형태로 제조 및 가공할 수 있다.

[0050] 본 발명에서 “건강기능식품”이라 함은 건강기능식품에 관한 법률에 따른 인체에 유용한 기능성을 가진 원료나 성분을 사용하여 제조 및 가공한 식품을 말하며, 인체의 구조 및 기능에 대하여 영양소를 조절하거나 생리학적 작용 등과 같은 보건 용도에 유용한 효과를 얻을 목적으로 섭취하는 것을 의미한다.

[0051] 본 발명의 건강기능식품은 통상의 식품 첨가물을 포함할 수 있으며, 식품 첨가물로서의 적합 여부는 다른 규정이 없는 한, 식품의약품안전청에 승인된 식품 첨가물 공전의 총칙 및 일반시험법 등에 따라 해당 품목에 관한 규격 및 기준에 의하여 판정한다.

[0052] 상기 “식품 첨가물 공전”에 수재된 품목으로는 예를 들어, 케톤류, 글리신, 구연산칼슘, 니코틴산, 계피산 등의 화학적 합성물; 감색소, 감초추출물, 결정셀룰로오스, 고량색소, 구아검 등의 천연첨가물; L-글루타민산나트륨제제, 면류첨가알칼리제, 보존료제제, 타르색소제제 등의 혼합제제류 등을 들 수 있다.

[0053] 예를 들어, 정제 형태의 건강기능식품은 본 발명의 유효성분인 대나무 잎 발효물을 부형제, 결합제, 붕해제 및 다른 첨가제와 혼합한 혼합물을 통상의 방법으로 과립화한 다음, 활택제 등을 넣어 압축성형하거나, 상기 혼합물을 직접 압축 성형할 수 있다. 또한 상기 정제 형태의 건강기능식품은 필요에 따라 교미제 등을 함유할 수도 있다.

[0054] 캅셀 형태의 건강기능식품 중 경질 캅셀제는 통상의 경질 캅셀에 본 발명의 유효성분인 대나무 잎 발효물을 부형제 등의 첨가제와 혼합한 혼합물을 충진하여 제조할 수 있으며, 연질 캅셀제는 본 발명의 유효성분인 대나무 잎 발효물을 부형제 등의 첨가제와 혼합한 혼합물을 젤라틴과 같은 캅셀기제에 충진하여 제조할 수 있다. 상기 연질 캅셀제는 필요에 따라 글리세린 또는 소르비톨 등의 가소제, 착색제, 보존제 등을 함유할 수 있다.

[0055] 환 형태의 건강기능식품은 본 발명의 유효성분인 대나무 잎 발효물과 부형제, 결합제, 붕해제 등을 혼합한 혼합물을 기존에 공지된 방법으로 성형하여 조제할 수 있으며, 필요에 따라 백당이나 다른 제피제로 제피할 수 있으며, 또는 전분, 탈크와 같은 물질로 표면을 코팅할 수도 있다.

[0056] 과립 형태의 건강기능식품은 본 발명의 유효성분인 대나무 잎 발효물과 부형제, 결합제, 붕해제 등을 혼합한 혼합물을 기존에 공지된 방법으로 입상으로 제조할 수 있으며, 필요에 따라 착향제, 교미제 등을 함유할 수 있다.

[0057] 본 발명의 대나무 잎 발효물을 유효성분으로 포함하는 건강기능식품은 하기 실시예에서도 확인한 바와 같이 우수한 항산화 효과를 실험적으로 입증하였는바, 산화관련 질환의 예방 또는 개선에 효과적이다.

[0058] 상기 건강기능식품은 음료류, 육류, 초코렛, 식품류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 사탕류, 아이스크림류, 알코올 음료류, 비타민 복합제 및 건강보조식품류 등일 수 있다.

[0060] 또한, 본 발명의 조성물은 약제학적 조성물 또는 식품 조성물 외에 화장료 조성물일 수 있다.

[0061] 본 발명의 대나무 잎 발효물은 산화질소 소거활성 뿐만 아니라 활성산소종 중 가장 높은 반응성을 가진 히드록시 라디칼에 대한 소거능이 우수하여 항산화활성이 탁월함으로, 이러한 대나무 잎 발효물을 유효성분으로 포함하는 조성물은 인간 세포의 손상을 야기하여 노화를 촉진하고 산화 관련 질환을 매개하는 활성산소종(ROS)으로부터 피부보호 및 피부치료에도 효과적이므로 화장료 조성물로 유용하게 사용될 수 있다.

[0062] 본 발명의 조성물이 화장료 조성물로 제조되는 경우, 본 발명의 조성물은 상술한 대나무 잎 발효물 뿐만 아니라, 화장료 조성물에 통상적으로 이용되는 성분들을 포함할 수 있으며, 예컨대 항산화제, 안정화제, 용해화제, 비타민, 안료 및 향료와 같은 통상적인 보조제, 그리고 담체를 포함할 수 있다.

[0063] 또한, 본 발명의 조성물은 상술한 대나무 잎 발효물 이외에, 대나무 잎 발효물과 반응하여 피부보호 효과를 손상시키지 않는 한도에서 종래부터 사용되어오던 항산화제를 혼합하여 사용할 수도 있다.

[0064] 본 발명의 화장료 조성물을 첨가할 수 있는 제품으로는, 예를 들어, 수렴화장수, 유연화장수, 영양화장수, 각종 크림, 에센스, 팩, 파운데이션 등과 같은 화장품류와 클렌징, 세안제, 비누, 트리트먼트, 미용액 등이 있다.

[0065] 본 발명의 화장료 조성물의 구체적인 제형으로서는 스킨로션, 스킨 소프너, 스킨토너, 아스트린젠트, 로션, 밀크로션, 모이스처 로션, 영양로션, 맛사지크림, 영양크림, 모이스처 크림, 핸드크림, 에센스, 영양에센스, 팩, 비누, 샴푸, 클렌징폼, 클렌징로션, 클렌징크림, 바디로션, 바디클렌저, 유액, 립스틱, 메이컵 베이스, 파운데이션, 프레스파우더, 루스파우더, 아이섀도 등의 제형을 포함한다.

[0066] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 본 발명의 대나무 잎 발효물의 함량은 조성물 총 중량에 대하여 0.00001-40중량%이며, 바람직하게는 0.1-20%이며, 보다 바람직하게는 1.0-20중량%이다. 상기 대나무 잎 발효물의 함량이 0.00001중량% 미만이면 상기 추출물 및 이의 분획물에 의한 항산화 효과가 크게 감소되고, 40중량%를 초과하는 경우에는 피부 자극을 초래할 수 있으며, 제형상의 문제점이 발생할 수 있다.

[0067] 한편, 본 발명에 따른 상기 화장료 조성물은 대나무 잎 발효물을 나노리포좀 내부에 함유시켜 안정화하여 제형화할 수도 있다. 상기 추출물(또는 이의 분획물)을 나노리포좀 내부에 함유시키면, 추출물(또는 이의 분획물)의 성분이 안정화되어 제형화시 침전형성, 변색, 변취 등의 문제점을 해결할 수 있으며, 성분의 용해도 및 경피흡수율을 높일 수 있어 상기 추출물(또는 이의 분획물)로부터 기대되는 효능을 최대로 발현시킬 수 있다.

[0068] 본 발명에서 나노리포좀은 통상적인 리포좀의 형태를 갖는 것으로서 평균 입자 지름이 10~500㎚인 리포좀을 의미한다. 본 발명의 바람직한 구현 예에 따르면, 나노리포좀의 평균 입자 지름은 50~300㎚이다. 나노리포좀의 평균 입자 지름이 300㎚를 초과하는 경우에는 본 발명에서 달성하고자 하는 기술적 효과 중 피부침투의 개선 및 제형 안정성의 개선이 매우 미약하다.

[0069] 본 발명에 따라 상기 추출물(또는 이의 분획물)을 안정화하는데 사용되는 나노리포좀은 폴리올, 유성성분, 계면활성제, 인지질, 지방산 및 물을 포함하는 혼합물에 의해 제조될 수 있다.

[0070] 본 발명의 나노리포좀에 이용되는 폴리올은 특히 제한되지 않으며, 바람직하게는 프로필렌글리콜, 디프로필렌글리콜, 1,3-부틸렌글리콜, 글리세린, 메틸프로판디올, 이소프로필렌글리콜, 펜틸렌글리콜, 에리스리톨, 자일리톨, 솔비톨 및 이의 혼합물로 구성된 군으로부터 선택된 1종 이상이다. 그 사용량은 나노리포좀 총 중량에 대하여 10~80중량%, 바람직하게는 30~70중량%이다.

[0071] 본 발명의 나노리포좀의 제조에 이용되는 유성(oil) 성분은 당업계에 공지된 다양한 오일이 이용될 수 있으며, 바람직하게는 헥사데칸 및 파라핀 오일과 같은 하이드로카본계 오일, 에스테르계의 합성오일, 디메치콘 및 사이크로메치콘계와 같은 실리콘 오일, 해바라기유, 옥수수유, 대두유, 아보카도유, 참깨유 및 어유와 같은 동식물성 오일, 에톡시레이티드 알킬에테르계오일, 프로폭시레이티드 알킬에테르계오일, 피토스핑고신, 스핑고신 및 스핑가닌과 같은 스핑고노이드 지질, 세레브로사이드 콜레스테롤, 시토스테롤 콜레스테릴설페이트, 시토스테릴설페이트, C_{10-40} 지방알콜 및 이의 혼합물이다. 그 사용량은 나노리포좀 총 중량에 대하여1.0~30.0중량%일 수 있으며, 바람직하게는 3.0~20.0중량%이다.

[0072] 본 발명의 나노리포좀의 제조에 이용되는 계면활성제는 당업계에 공지된 어떠한 것도 사용할 수 있다. 예를 들어, 음이온성 계면활성제, 양이온성 계면활성제, 양성 계면활성제 및 비이온성 계면활성제가 사용될 수 있다.

바람직하게는 음이온성 계면활성제 및 비이온성 계면활성제이다. 음이온성 계면활성제의 구체적인 예는 알킬아실글루타메이트, 알킬포스페이트, 알킬락틸레이트, 디알킬포스페이트 및 트리알킬포스페이트를 포함한다. 비이온성 계면활성제의 구체적인 예는 알콕시레이티드 알킬에테르, 알콕시레이티드 알킬에스테르, 알킬폴리글리코사이드, 폴리글리세릴에스테르 및 슈가에스테르를 포함한다. 특히 바람직한 계면활성제는 비이온성 계면활성제에 속하는 폴리솔베이트류이다. 그 사용량은 나노리포좀 총 중량에 대하여 0.1~10중량%일 수 있으며, 바람직하게는 0.5~5.0중량%이다.

[0073] 본 발명의 나노리포좀의 제조에 이용되는 또 다른 성분인 인지질은 양쪽친화성 지질이 이용되며, 천연 인지질(예를 들어, 난황 레시틴 또는 대두 레시틴, 스핑고마이엘린) 및 합성 인지질(예를 들어, 디팔미토일포스파티딜콜린 또는 수첨 레시틴)을 포함하며, 바람직하게는 레시틴이다. 특히, 대두 또는 난황에서 추출한 천연 유래의 불포화 레시틴 또는 포화 레시틴이 바람직하다. 통상적으로 천연 유래의 레시틴은 포스파티딜콜린의 양이 23~95%, 그리고 포스파디딜에탄올아민의 양이 20% 이하이다. 본 발명의 나노리포좀의 제조에 있어서, 인지질의 사용량은 나노리포좀 총 중량에 대하여 0.5~20.0중량%이며, 바람직하게는 2.0~8.0중량%이다.

[0074] 본 발명의 나노리포좀 제조에 이용되는 지방산은 고급 지방산으로서, 바람직하게는 C_{12-22} 알킬 체인의 포화 또는 불포화 지방산으로서, 예컨대, 라우린산, 미리스트산, 팔미트산, 스테아린산, 올레산 및 리놀레산을 포함한다. 그 사용량은 나노리포좀 총 중량에 대하여 0.05~3.0중량%일 수 있으며, 바람직하게는 0.1~1.0중량%이다.

[0075] 본 발명의 나노리포좀의 제조에 이용되는 물은 일반적으로 탈이온화된 증류수이며, 그 사용량은 나노리포좀 총 중량에 대하여 5.0~40중량%일 수 있다.

[0076] 나노리포좀의 제조는 당업계에 공지된 다양한 방법을 통해 이루어질 수 있으나, 가장 바람직하게는 상기 성분들을 포함하는 혼합물을 고압 호모게나이저에 적용하여 제조된다. 고압 호모게나이저에 의한 나노리포좀의 제조는 소망하는 입자 크기에 따라 다양한 조건(예: 압력, 횟수 등)으로 실시할 수 있으며, 바람직하게는 600~1200bar의 압력 하에서 1~5회 고압 호모게나아저를 통과하도록 하여 나노리포좀을 제조할 수 있다.

[0077] 본 발명에 따른 화장료 조성물은 상기 대나무 잎 발효물을 나노리포좀 충 중량 기준으로 0.1~20.0중량%, 제형 안정화를 위하여 보다 바람직하게 1.0~10.0중량%로 함유할 수 있다.

[0078] 본 발명의 일 구체예에서 상기 대나무 잎 발효물은 화장물 조성물에 0.1㎍/ml 내지 10000㎍/ml의 농도로 포함될 수 있다.

[0080] 또한, 본 발명의 조성물은 항산화 기능성을 부여할 수 있는 사료용 조성물 또는 사료첨가제일 수 있다.

[0081] 본 발명에 따른 사료 조성물은 상기 대나무 잎 발효물을 조성물 충 중량 기준으로 0.1~50중량%, 보다 바람직하게는 1~20중량%로 포함할 수 있으나, 특별히 이러한 범위를 한정하는 것은 아니다. 한편, 사료첨가제로 사용되는 경우 대나무 잎 발효물을 사료 조성물에 배합하여 사용할 수 있다.

[0083] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 보다 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0085] **<실시예 1>**

[0086] **신이대 잎 발효물 제조**

[0087] 본 실험에서는 식품의 발효에 주로 사용되는 바실러스 섭틸리스를 이용하여 국내산 신이대 잎을 발효하였다.

[0088] 발효에 사용된 공시균주는 바실러스 섭틸리스(KCCM 11315)로 한국미생물보존센터(KCCM, Seoul)에서 분양 받아 사용하였다. 상기 미생물 배양에는 TSB 배지(tryptic soy broth)를 사용하였으며, 37℃에서 150 rpm으로 쉐이킹하며 배양하였다. 대나무 잎은 전라남도 담양군 담양읍에서 2016년 8월 초순에 채취한 신이대(Sasa coreana Nakai) 잎을 자연 건조하여 사용하였다. 건조된 신이대 잎을 입구가 넓은 유리병에 담고 8시간 액체배양한 바실러스 섭틸리스(KCCM 11315)를 멸균된 0.9% NaCl을 사용하여 OD600 nm 0.50±0.02로 맞춘 후 접종하였고, 입구를 막아 15일 동안 37℃ 인큐베이터에서 발효시켰다.

[0089] 그 결과 도 1에서 나타낸 바와 같이, 신이대 잎을 바실러스 섭틸리스(KCCM 11315) 균주로 발효시킨 경우 거칠었던 표면과 선명하게 구분되던 잎맥이 발효 후 연화에 의해 표면이 부드러워지고 잎맥이 보이지 않았으며, 발효가 진행될수록 갈색을 띄는 것을 확인할 수 있었다. 특히 페놀성 화합물 (polyphenols)의 경우 발효과정을 통하여 추출 효율에 향상이 이루어졌으며, 이외에 다양한 성분의 변화가 발생하였다.

[0090] 본 발명에서 발효 과정을 거친 신이대 잎은 간략하게 'SC-F (*S. coreana Nakai* fermented)' 로 명명하였으며, 대조군으로 사용한 발효 과정을 거치지 않은 신이대 잎은 'SC-N (*S. coreana Nakai* non-fermented)' 로 명명하였다.

[0091] 이들 각각은 자연 건조 후 분쇄하여 보관하였고, 일부는 80% 에탄올을 사용하여 추출 후 농축하여 사용하였다.

[0093] **<실시예 2>**

[0094] **신이대 잎 발효에 따른 일반성분 변화**

[0095] 본 실험에서는 신이대 잎 발효에 따른 당, 미네랄, 아미노산과 같은 일반성분의 함량 변화를 분석하였다.

[0097] <2-1> 구성당 분석

[0098] 구성당 분석을 위해 분쇄한 SC-N과 SC-F를 각각 72% 황산과 1:10 (w/v)으로 혼합 후 30℃에서 2시간 동안 쉐이킹 인큐베이터에서 추출하였다. 추출물에 증류수를 가한 후 121℃에서 1시간 동안 산 가수분해를 진행하여 시료를 전처리 하였다. 유리당 분석을 위해 분쇄한 SC-N과 SC-F를 각각 증류수와 1:50 (w/v)으로 혼합 후 70℃에서 5시간 동안 추출하여 시료를 전처리 하였다. 반응액은 0.45 μm 멤브레인 필터로 여과 후 사용하였다. 당분석은 HPAEC (ICS-5000, Dionex co., USA)를 이용하였고, 컬럼은 카보하이드레이트 컬럼 (250×4 mm, CarboPac PA-1, Dionex Co., USA)을 사용하였다. 18 mM 수산화타르륨를 이동상로 사용하였고 유속(flow rate) 1.0 mL/min, 컬럼 온도 25℃, 주입용량 25 μL, 검출기는 PAD를 사용하여 추출물의 구성당과 유리당을 분석하였다.

[0099] 자세한 결과는 하기 표 1에 나타내었다.

표 1

[0101] SC-N과 SC-F의 구성당 및 유리당 함량 (mg/g)

당	람노스	아라비노스	갈락토스	글루코스	자일로스	프럭토스	총
유리당							
SC-N	N. D.	0.15±0.01	1.66±0.03	15.60±0.89	0.26±0.05	10.45±1.05	28.12±2.03
SC-F	N. D.	0.13±0.03	0.06±0.01	N. D.	1.21±0.10	N. D.	1.4±0.14
구성당							
SC-N	1.44±0.04	32.13±0.52	18.27±0.27	283.39 ±1.99	96.86±2.56	N. D.	432.09±5.38
SC-F	1.90±0.12	33.76±0.93	16.85±0.12	291.17 ±3.07	114.74±3.15	N. D.	458.42±7.39

[0102] N. D.: Not detected

[0104] 상기 표 1에 나타낸 바와 같이, SC-N과 SC-F의 포도당 (glucose) 함량이 각각 283.39±1.99 mg/g, 291.17±3.07 mg/g으로 가장 높았으며, 자일로스, 아라비노스, 갈락토스, 람노오스 순서대로 당 함량이 높은 것을 확인할 수 있었다. 구성당의 총 함량은 SC-N이 432.09±5.38 mg/g, SC-F가 458.42±7.39 mg/g으로 나타나 발효 전에 비하여 발효 후 구성당이 증가한 것을 확인하였다. 유리당 분석 결과 SC-N은 글루코스, 프럭토스, 갈락토스, 자일로스, 아라비노스 순서로 높은 함량을 가지고 있었으며, SC-F의 유리당은 아라비노스, 갈락토스, 자일로스만 검출되었다. 총 유리당 함유량은 SC-N이 28.12±2.03 mg/g, SC-F가 1.4±0.14 mg/g으로 발효 전에 비하여 감소하였고 자일로스만 유일하게 발효 후에 증가한 것으로 나타났다.

[0105] 한편, 이전 연구에서 약쑥과 인진쑥을 바실러스 섭틸리스를 이용하여 발효하였을 경우, 약쑥과 인진쑥 모두 발효 후 총 당 함량이 감소한 것으로 보고된 바 있으며(Song, H. N. (2013) Quality properties of fermented mugworts and the rapid pattern analysis of their volatile flavor components via surface acoustic wave (SAW) based electronic nose sensor in the GC system. Korean J Food Preserv 20(4): 554-563.), 또 다른 연구에서는 사카로마이세스 세레비지애(Saccharomyces cerevisiae) 균주로 홍차를 발효할 시에는 글루코스와 프럭토스를 비롯하여 총 당 함량이 감소한다고 보고된 있다(Reis, B. A. D., A. Kosiska-Cagnazzo, R. Schmitt, and W. Andlauer (2014) Fermentation of Plant Material-Effect on Sugar Content and Stability of Bioactive Compounds. PJFNS 64(4): 235-241.). 이러한 이전 연구 결과는 본 발명의 실험 결과와 상이한 결과를 보여주는데, 이러한 차이는 원료로 사용한 잎, 접종한 미생물의 종류와 발효조건의 차이로 판단되며, 당 조성이 변하는 이유는 접종한 미생물이 대사과정에서 당분을 생육촉진 인자로 이용하였을 가능성이 크다.

[0107] <2-2> 미네랄 분석

[0108] 0.5 g의 분쇄한 SC-N과 SC-F에 7 mL 65% 질산(HNO_3)과 1 mL 30% 과산화수소를 각각 가한 후 마이크로웨이브 시료 용해장치(microwave digestion system: ETHOS TC, Milestone, Sorisole, Italy)을 사용하여 산 분해를 하였다. 산 분해 반응액을 냉각시킨 후 1% 질산을 이용하여 50 mL로 정용한 후 0.45 μm 멤브레인 필터로 여과하여 미네랄 분석을 실시하였다. 미네랄 분석은 ICP-OES (OPTIMA 7300 DV, Perkin Elmer, USA)를 이용하였으며, Rf 파워 1400 W, 가스 유속 15 L/min, 네뷸라이저 가스 유량(nebulizer gas flow) 0.65 L/min, 옥실러리 가스 유량(auxillary gas flow) 0.2 L/min 조건에서 분석하였다.

[0109] 미네랄 분석은 총 9종 Fe, Zn, P, Na, K, Ca, Mg, Cu, Mn에 대하여 실시하였다. 자세한 결과는 하기 표 2에서 나타내었다.

표 2

[0111] SC-N과 SC-F의 미네랄 함량 (μg/mL)

Minerals	SC-N	SC-F
Fe	90.1±2.8	78.3±4.7
Zn	13.3±2.0	17.2±2.3
P	3782.3±26.0	2541.0±58.1
Na	23.2±0.9	203.3±8.9
K	11680.7±386.2	12332.7±316.7
Ca	3435.3±34.1	4136.3±32.0
Mg	1534.3±38.1	1403.0±115.2
Cu	4.1±0.1	3.5±0.6
Mn	240.6±7.2	272.3±42.4
Total	20804.1±364.6	20987.5±345.1

[0113] 상기 표 2에서 나타낸 바와 같이, 미네랄 총 함량은 SC-N 20804.1±364.6 μg/mL, SC-F 20987.5±345.1 μg/mL로 발효 후 미네랄 총 함량이 증가하였으나 유의적인 차이는 없었다. 발효 후 미네랄 성분에 따른 함량의 변화는 K의 경우 12332.7±316.7 μg/mL로 가장 높았고 다음으로 Ca, P, Mg의 함량이 높았으며, Ca은 증가하였으나 P와 Mg은 감소하였다. Na의 경우 약 8.76배 (180.1 μg/mL) 증가하였는데 이는 발효에 사용한 바실러스 섭틸리스 균주의 접종량 조절 시 삼투압 유지를 위해 사용한 0.95% NaCl (saline water)의 영향으로 사료된다.

[0114] 이러한 미네랄 성분의 함량 변화는 발효에 이용된 바실러스 섭틸리스 균주 발효에 의해 잎의 연화가 진행되면서 미네랄의 확산이 더 용이해진 것으로 판단되었다.

[0116] <2-3> 아미노산 분석

[0117] 구성 아미노산은 분쇄한 SC-N과 SC-F에에 염산을 가하여 110℃에서 24시간 동안 가수분해하여 추출하였다. 유리아미노산은 80% 에탄올로 추출한 추출물을 이용하였다. 각각 추출물을 메탄올을 이용하여 10,000ppm으로 제조한 후 30 μL를 새로운 바이알(vial)에 옮겨 완전히 건조시키고, 20 mL의 유도체화 용액(MeOH:H2O:TEA:PITC=7:1:1:1)을 넣고 상온에서 30분 동안 유도체화 하였다. 유도체화한 시료를 다시 건조한 후 200 μL의 140 mM 아세트산나트륨(sodium acetate, NaHAc), 0.1 % 트리에틸아민(triethylamine, TEA), 6% 아세토니트릴(CH_3CN)에 녹이고 0.45 μm 멤브레인 필터로 여과하여 분석에 사용하였다. HPLC는 Hewlett Packard 1100 Series (Agilent Co., USA)를 이용하였고, 컬럼은 Nove-Pak (300 × 3.9 mm, 4.0 μm, C18, Waters Co., USA)을 사용하였다. 이동상으로는 140 mM NaHAc, 0.1 % TEA, 6% CH_3CN (solution A)와 60% CH_3CN (solution B)를 사용하였고, gradient program을 이용하여 용액 B를 0-12 분 8%, 12-13 분 12%, 13-15.2 분 20%, 15.2-22.5 분 46%, 22.5-22.72 분 100%, 22.72-25.7 분 100%, 25.7-26 분 0%, 26-30 분 0%로 설정하였다. 유속 1.0 mL/min, 컬럼온도 46℃, 주입용량 10 μL, UV 검출기 254 nm 파장에서 아미노산을 분석하였다.

[0118] 구성아미노산과 유리아미노산에 대한 분석은 총 20종의 아미노산에 대하여 실시하였으며, 자세한 결과는 하기 표 3 및 표 4에서 나타내었다.

표 3

[0120] SC-N과 SC-F의 총 아미노산 함량 (mg/100 g)

	SC-N	SC-F
시스테인 & 시스틴	1133.84±6.81	3648.61±5.12
아스파라긴 & 아스파트산	6013.94±11.62	7260.32±14.53
글루타민 & 글루탐산	7727.87±17.57	8396.07±22.83
세린	3513.73±8.10	3695.28±4.58
글라이신	1089.43±10.05	4385.75±8.01
히스티딘	N. D.	N. D.
아르기닌	835.56±1.90	2586.01±5.94
트레오닌	927.69±2.06	2903.74±8.71
알라닌	6417.36±23.04	4316.11±12.52
프롤린	3125.70±9.33	4465.65±7.50
티로신	684.59±4.13	1543.56±3.87
발린	3344.51±17.30	3958.34±8.41
메틴오닌	N. D.	50.46±0.46
이소류신	2331.91±15.39	2967.57±3.42
류신	1334.09±5.24	4941.49±11.00
페닐알라닌	13019.00±23.52	11841.05±51.85
트립토판	3703.35±16.66	4754.50±12.49
라이신	3268.60±14.93	2217.90±6.00
총 필수 아미노산	27922.49±66.63	33635.05±79.65
총 아미노산	58464.51±109.12	73932.41±137.13

[0121] N. D.: Not detected

표 4

[0123] SC-N과 SC-F의 유리 아미노산 함량 (mg/100 g)

	SC-N	SC-F
아스파트산	2368.37±18.89	357.67±2.08
글루탐산	450.17±5.03	1447.17±8.25
아스파라긴	1885.33±4.51	N. D.
세린	2915.67±17.21	N. D.
글루타민	3194.67±18.23	N. D.
글라이신	356.01±4.39	N. D.
히스티딘	N. D.	N. D.
아르기닌	448.70±3.6	N. D.
트레오닌	713.17±3.25	686.33±8.5
알라닌	5986.67±27.23	150.17±4.19
프롤린	2722.33±22.5	N. D.
티로신	2058.33±17.56	271.33±8.08
발린	2650.33±9.7	N. D.
메티오닌	139.33±2.52	N. D.
시스테인	1926.83±7.29	N. D.
이소류신	1445.33±8.08	N. D.
류신	1082.33±10.5	N. D.
페닐알라닌	1755.33±6.43	1915.17±13.42
트립토판	476.67±3.06	N. D.
라이신	207.10±1.65	N. D.
총 필수 아미노산	8469.60±24.59	2601.50±8.79
총 유리 아미노산	32782.67±92.49	4827.83±19.76

[0124] N. D.: Not detected

[0126] 상기 표 3 및 표 4에서 나타낸 바와 같이, SC-N의 구성아미노산 총 함량은 58464.51±109.12 mg/100 g이었고, 그 중 필수아미노산 총 함량은 27922.49±66.63 mg/100 g이었다. 이에 반해, SC-F의 구성아미노산 총 함량은

73881.94±137.59 mg/100 g 이었고, 필수아미노산 총 함량은 33584.59±80.11 mg/100 g이었다. 발효 전과 발효 후 모두 페닐알라닌의 함량이 가장 높았으며, 다음으로 글루타민, 글루탐산과 아스파라긴, 아스파트산의 함량이 높았다. SC-N의 유리아미노산 총 함량은 32782.67±92.49 mg/100 g이었고, 그 중 필수아미노산 총 함량은 8469.60±24.59 mg/100 g이었다. 이에 반해, SC-F의 유리아미노산 총 함량은 4827.83±19.76 mg/100 g 이었고, 필수아미노산 총 함량은 2601.50±8.79 mg/100 g이었다. 유리아미노산의 경우 발효 후 아미노산 함량이 85% 이상 감소하였으며, 글루탐산과 페닐알라닌은 발효 전에 비해 증가하였다. 식품의 발효에 사용되는 바실러스(Bacillus sp.)와 아스퍼질러스(Aspergillus sp.)는 강력한 단백질 분해효소를 생성하여 식품에 포함된 단백질을 저분자 펩티드와 아미노산으로 분해하는 것으로 알려져 있다(Kim, J. I., M. J. Kang, and T. W. Kwon (2003) Antidiabetic effect of soybean and chongkukjang. Korea Soybean Digest 20: 44- 52.). 발효 후 유리아미노산이 증가하였다는 보고가 많으나, 본 실험 결과는 상반되는 결과를 보였다. 이는 접종한 바실러스 섭틸리스 (KCCM 11315)가 단백질 분해효소를 분비함과 동시에 아미노산을 질소원으로 소비하기 때문으로 판단된다.

[0128] **<실시예 3>**

[0129] **신이대 잎 발효에 따른 폴리페놀 및 카테킨 변화**

[0130] 본 실험에서는 신이대 잎 발효에 따른 총 폴리페놀 함량, 총 플라보노이드 함량 및 총 카테킨 함량 변화를 분석하였다.

[0132] <3-1> 총 폴리페놀 및 총 플라보노이드 함량

[0133] 식물의 대표적인 항산화 성분은 플라보노이드, 카로티노이드, 페놀 화합물과 더불어 비타민 A, C, E가 있으며, 라디칼 제거 효과가 뛰어나 항암, 항산화 활성 등의 생리활성을 가진다. 가장 많은 함량을 차지하는 폴리페놀은 플랄보노이드, 탄닌과 같이 2개 이상의 방향족 고리를 가지는 페놀 화합물을 말하며, 식물이 자라면서 극한 환경으로부터 스스로를 보호하기 위해 생산하는 물질로 알려져 있다. 이러한 페놀 화합물은 항산화 물질이며 인체 내에 존재하는 활성산소종(ROS) 조절, 산화적 손상 예방, 염증 활성 저해 등 다양한 질병으로부터 보호할 수 있으며 식물의 잎이나 열매에 많이 존재한다.

[0134] 본 실험에서는 바실러스 섭틸리스로 균주로 발효한 신이대 잎 발효물의 항산화 활성을 보기 앞서, 항산화활성을 나타낼 수 있는 화합물로서 폴리페놀과 플라보노이드 함량 변화를 조사하였다.

[0135] 총 폴리페놀 함량 (TPC)은 수정된 Folin-Denis법을 사용하여 측정하였다 (Kahkonen, M. P., A. I. Hopia, H. J. Vuorela, J. P. Rauha, K. Pihlaja, T. S. Kujala, and M. Heinonen (1999) Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds. J. Agric. Food Chem. 47: 39543962.). 농축한 추출물을 메탄올을 사용하여 1,000ppm 농도로 제조하여 사용하였다. 추출물 1,000ppm과 0.2 N Folin & Ciocalteu's phenol reagent, 2% 탄산나트륨을 모두 동일한 양을 혼합 후 실온에서 30분간 반응시켰다. UV-VIS 스펙트로포토미터을 사용하여 750 nm 파장에서 반응시킨 용액의 흡광값을 측정하였다. TPC는 표준물질인 gallic acid 기준 농도 GAE*mg/g로 나타내었다.

[0136] 총 플라보노이드 함량 (TFC)은 Chang (2002)의 방법을 변형하여 측정하였다 (Chang, C. C., M. H. Yang, H. M. Wen, and J. C. Chern (2002) Estimation of Total Flavonoid Content in Propolis by Two Complementary Colorimetric Methods. J Food Drug Anal 10(3): 178-182.). 농축한 추출물을 메탄올을 사용하여 1,000ppm 농도로 제조하여 사용하였다. 0.5 mL 추출물 1000ppm과 1.5 mL 메탄올, 0.1 mL 10% 알루미늄클로라이드, 0.1 mL 1 M 포타슘 아세테이트, 2.8 mL 증류수를 혼합 후 실온에서 1시간 동안 반응시켰다. UV-VIS 스펙트로포토미터를 사용하여 415 nm 파장에서 반응시킨 용액의 흡광값을 측정하였다. TFC는 표준물질인 퀘르세틴(quercetin) 기준 농도 QE*mg/g로 나타내었다.

[0137] 그 결과 도 2에서 나타낸 바와 같이, SC-N과 SC-F의 총 폴리페놀 함량 (TPC) 측정 결과 각각 25.51±1.04 GAE* mg/g, 35.34±0.91 GAE* mg/g으로 확인되었고, 총 플라보노이드 함량 (TFC)은 각각 69.64±0.26 QE* mg/g, 80.57±0.22 QE* mg/g으로 나타나, 바실러스 섭틸리스 균주 발효 후 신이대 잎의 TPC와 TFC가 증가된 것을 확인할 수 있었다. 발효 전후의 이러한 변화는 바실러스 섭틸리스 균주가 생성하는 가수분해 효소에 기인한 것으로 판단된다.

[0139] <3-2> 총 카테킨 함량

[0140] 플라보노이드 중 대표적인 카테킨은 찻잎에 다량으로 함유되어 있으며, 폴리페놀과 함께 반응성 산소 종을 효과

적으로 제거하는 역할을 하며 항산화 물질로 작용할 수 있다. 본 실험에서는 항산화활성을 나타낼 수 있는 화합물로서 카티킨 함량 변화를 조사하였다.

[0141] 총 카테킨 함량 (TCC)은 HPLC (SPD-20A, SIMADZU Co., Japan)를 사용하여 분석하였다. 농축한 추출물을 메탄올을 사용하여 1,000ppm 농도로 제조하여 분석하였고, 케테킨은 (+)-catechin, (-)-epicatechin, (-)-epigallocatechin-3-gallate, (-)-gallocatechin-3-gallate, (-)-epicatechin-3-gallate, (-)-catechin-3-gallate의 혼합 형태의 제품(Cerilliant Co., USA)을 구입하여 사용하였다. 컬럼은 Shim-pack GIS-ODS (C18, 4.6x250 mm, 5.0μm, SIMADZU Co., Japan)을 사용하였다. 이동상으로는 3% (v/v) 아세트산 (solution A)과 메탄올 (solution B)을 사용하였고, gradient program을 사용하여 solution B를 0-1 분 0%, 1-45 분 63%, 45-50 분 0%, 50-60 분 0%로 설정하였다. 유속 1.0 mL/min, 컬럼 온도 30℃, 주입용량 30 μL, UV 검출기의 파장은 280 nm로 하여 카테킨을 분석하였다. TCC는 카테킨 혼합물의 모든 카테킨 함량을 합한 함량으로 나타내었다.

[0142] 자세한 결과는 하기 표 5에 나타내었다.

표 5

[0144] SC-N과 SC-F의 카테킨 함량 (mg/L)

	SC-N	SC-F
(+)-Catechin	9.59±0.46	19.88±0.91
(-)-Epigallocatechin-3-gallate	0.39±0.12	0.47±0.07
(-)-Epicatechin	34.10±0.87	20.72±1.04
(-)-Gallocatechin-3-gallate	3.62±0.21	5.51±0.23
(-)-Epicatechin-3-gallate	10.43±0.56	3.42±0.20
(-)-Catechin-3-gallate	11.50±0.58	8.23±0.69
Total	69.64±0.94	58.23±0.76

[0146] 상기 표 5에서 나타낸 바와 같이, SC-N과 SC-F의 (+)-catechin, (-)-epicatechin, (-)-gallocatechin-3-gallate의 함량은 증가하였고, (-)-epigallocatechin-3-gallate, (-)-epicatechin-3-gallat, (-)-catechin-3-gallate의 함량은 감소하였다. 한편, 총 카테킨 함량 (TCC)는 발효 전 SC-N 69.64±0.94 mg/L에서 발효 후 SC-F 58.23±0.76 mg/L로 나타나 바실러스 섭틸리스 균주 발효 후 감소한 것을 확인할 수 있었다.

[0147] 이렇게 발효 후 카테킨 함량이 감소하는 이유는 발효가 진행되는 동안 카테킨이 폴리페놀 옥시다아제 (polyphenol oxidase)에 의해 테아플라빈(theaflavin)과 테아루비긴(thearubigins)과 같은 이합체 화합물 (dimeric compounds)을 생성하기 때문으로 사료된다 (Tan, J., W. Dai, M. Lu, H. Lv, L. Guo, Y. Zhang, Y. Zhu, Q. Peng, and Z. Lin (2016) Study of the dynamic changes in the non-volatile chemical constituents of black tea during fermentation processing by a non-targeted metabolomics approach. Food Res Int 79: 106-113.). 인체 대사반응에서 쉽게 작용할 수 있는 아글리콘 형태의 폴리페놀의 증가는 더욱 높은 기능성을 기대할 수 있다.

[0149] **<실시예 4>**

[0150] **신이대 잎 발효에 따른 항산화 활성 분석**

[0151] 식물의 총 폴리페놀 함량의 변화는 항산화와 연관성이 있기 때문에 발효 후 대나무 잎의 총 폴리페놀 함량 변화에 대한 항산화 효과를 확인하는 것이 필수적이다. 따라서 대표적인 라디칼인 ABTS 라디칼에 대한 소거능을 확인하였다.

[0152] ABTS 라디칼 소거 활성 분석은 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid (ABTS, Sigma, USA)로 Jeong et al. (2009)의 방법을 변형하여 측정하였다 (Jeong, C. H., G. Choi, J. Kim, J. Kwak, H. Heo, K. H. Shim, B. R. Cho, Y. I. Bae, and J. S. Choi (2009) In vitro Antioxidative Activities and Phenolic Composition of Hot Water Extract from Different Parts of Cudrania tricuspidata. J Food Sci Nutr 14(4): 283-289.). ABTS 스톡 솔루션(stock solution)은 7 mM의 ABTS 용액과 2.45 mM 과황산칼륨 용액(potassium persulfate solution)을 동량 혼합 후 PBS (pH 7.4)로 희석하여 730 nm 파장에서 흡광값이 0.80±0.02이 되도록 제조하였다. 농축한 추출물은 methanol을 이용하여 50-500ppm 농도로 희석하여 사용하였다. 농도별로 제조한 추출물 200 μL와 1,000 μL ABTS 스톡 솔루션을 혼합하여 15분간 암실에서 반응 후 UV-VIS 스펙트로포토미터 (SCINCO, Seoul, Korea)을 사용하여 730 nm 파장에서 흡광값을 측정하였다. 양성 대조군으로 DPPH 방법과 동일

한 갈산(gallic acid)을 사용하였다. 추출물의 IC_{50}는 ABTS 라디칼에 대한 소거능을 나타내며 라디칼을 50% 제거하는데 상응하는 농도로 나타내었다.

[0153] 그 결과 도 3에서 나타낸 바와 같이, SC-N과 SC-F의 DPPH 라디칼과 ABTS 라디칼 소거능을 확인한 결과, 추출물의 농도가 증가함에 따라서 라디칼 소거능도 증가하는 것을 확인할 수 있었다. 즉, SC-N과 SC-F의 ABTS 라디칼 소거능의 IC_{50}는 발효 전 301.24±8.96 μg/mL에서 발효 후 187.26±4.78 μg/mL로 바실러스 섭틸리스 균주 발효 후 라디칼 소거능이 증가하였다. 양성대조군으로 사용한 갈산(gallic acid)의 두 가지 라디칼 소거능의 IC_{50} 값은 51.77±1.28 μg/mL로 측정되었다. 이러한 신이대 잎의 발효 후 항산화 활성의 증가는 총 폴리페놀 함량 증가에 기인한 것으로 판단되었다.

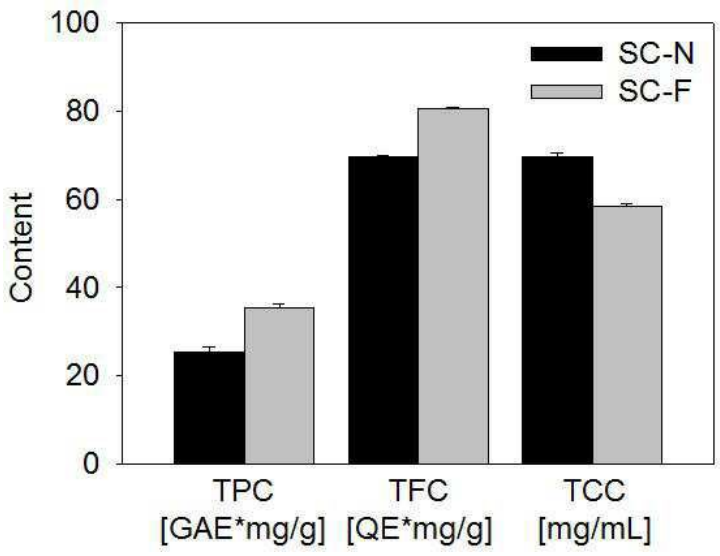
[0155] 이제까지 본 발명에 대하여 그 바람직한 실시예들을 중심으로 살펴보았다. 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자는 본 발명이 본 발명의 본질적인 특성에서 벗어나지 않는 범위에서 변형된 형태로 구현될 수 있음을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 개시된 실시예들은 한정적인 관점이 아니라 설명적인 관점에서 고려되어야 한다. 본 발명의 범위는 전술한 설명이 아니라 특허청구범위에 나타나 있으며, 그와 동등한 범위 내에 있는 모든 차이점은 본 발명에 포함된 것으로 해석되어야 할 것이다.

도면

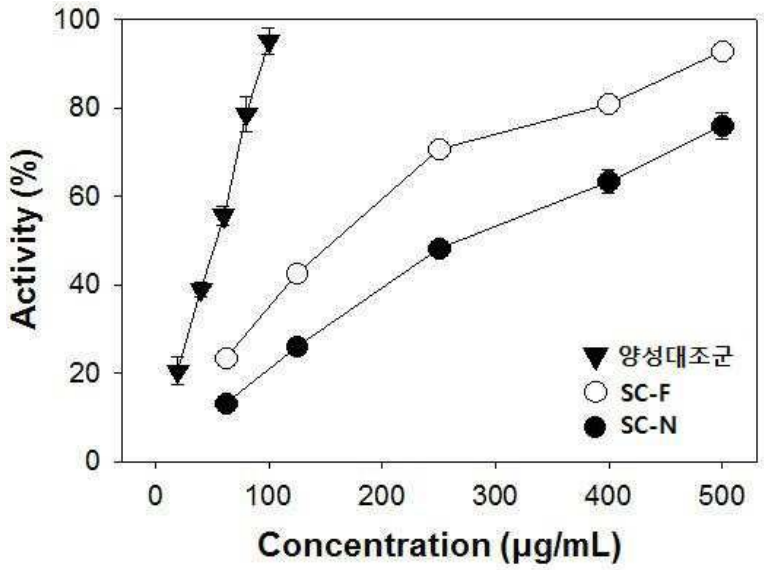
도면1



도면2



도면3


100
80
60
40
20
0
Activity (%)
0
100
200
300
400
500
Concentration (μg/mL)
양성대조군
SC-F
SC-N