



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0055317
(43) 공개일자 2022년05월03일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A23L 33/105 (2016.01) A23L 19/00 (2022.01)
(52) CPC특허분류
A23L 33/105 (2016.08)
A23L 19/00 (2022.01)
(21) 출원번호 10-2020-0139626
(22) 출원일자 2020년10월26일
심사청구일자 2020년10월26일

(71) 출원인
한림대학교 산학협력단
강원도 춘천시 한림대학길 1, 한림대학교(옥천동)
고대원
강원도 춘천시 서면 월송길 425-120
(72) 발명자
고대원
강원도 춘천시 서면 월송길 425-120
김은지
강원도 춘천시 춘주로 176-22, 105동 1203호 (퇴계동 쌍용스윗닷홈아파트)
전영은
강원도 원주시 무실로 455, 107동 802호 (무실우미린)
(74) 대리인
특허법인명인

전체 청구항 수 : 총 5 항

(54) 발명의 명칭 **흰감국 발효액을 이용하여 발효시킨 흑초석잠 추출물의 제조방법 및 그 추출물, 그리고 이를 유용성분으로 포함하는 식품 조성물**

(57) 요약

본 발명은 흰감국 발효액을 이용하여 발효시킨 흑초석잠 추출물의 제조방법 및 그 추출물, 그리고 이를 유용성분으로 포함하는 식품 조성물에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 흰감국 발효액을 이용하여 발효시킨 흑초석잠 추출물은 생초석잠을 열풍건조하고 흰감국 발효액에 침지하고 증자 후 에탄올 추출하는 단계를 포함하고, 상기 제조방법에 의한 초석잠 추출물을 유용성분으로 포함하는 식품 조성물에 관한 것이다.

본 발명에 따른 제조방법에 의해 제조된 흰감국 발효액을 이용하여 발효시킨 흑초석잠 추출물, 그리고 이를 유용성분으로 포함하는 식품 조성물은 흰감국 발효액의 침지 후 증숙 공정에 의한 유용성분의 증가로 항산화 활성, 면역증진 효능, 저해활성 증가하는 등 유용성분의 함량이 높고, 흰감국 고유의 향미가 가미되어 풍미를 높이고, 흰감국의 유효성분을 섭취할 수 있는 이점이 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A23V 2002/00 (2013.01)

A23V 2300/08 (2013.01)

A23V 2300/14 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

생초석잠을 깨끗이 수세한 후 열풍건조하여 건조 초석잠을 제조하는 제1단계;
상기 건조 초석잠을 흰감국 발효액에 침지하고, 증자 후 건조하여 흑초석잠을 제조하는 제2단계;
상기 흑초석잠을 용매추출하여 흑초석잠 추출물을 제조하는 제3단계;
를 포함하는
흰감국 발효액을 이용하여 발효시킨 흑초석잠 추출물의 제조방법.

청구항 2

제 1항에 있어서,
상기 흰감국 발효액은,
흰감국꽃, 흰감국잎, 흰감국 줄기 가운데 선택된 1이상의 원료에 당류를 첨가하여 30 ~ 45 브릭스의 물에 침지한 후 고형을 분리하여 흰감국추출액을 제조하고,
상기 흰감국추출액을 저온에서 발효시킨 것을 특징으로 하는
흰감국 발효액을 이용하여 발효시킨 흑초석잠 추출물의 제조방법.

청구항 3

제 1항에 있어서,
흑초석잠을 제조하는 상기 2 단계는 2회 이상 반복하는 것을 특징으로 하는
흰감국 발효액을 이용하여 발효시킨 흑초석잠 추출물의 제조방법.

청구항 4

제 1항 내지 제 4항 가운데 어느 하나의 항에 의한 제조방법으로 제조되는 흰감국 발효액을 이용하여 발효시킨 흑초석잠 추출물.

청구항 5

제 1항 내지 제 4항 가운데 어느 하나의 항에 의한 제조방법으로 제조되는 흰감국 발효액을 이용하여 발효시킨 흑초석잠 추출물을 유용성분으로 포함하는 식품 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001]

본 발명은 흰감국 발효액을 이용하여 발효시킨 흑초석잠 추출물의 제조방법 및 그 추출물, 그리고 이를 유용성분으로 포함하는 식품 조성물에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 흰감국 발효액을 이용하여 발효시킨 흑초석잠 추출물은 생초석잠을 열풍건조하고 흰감국 발효액에 침지하고 증자 후 에탄올 추출하는 단계를 포함하고, 상기 제조방법에 의한 흑초석잠 추출물을 유용성분으로 포함하는 식품 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002]

초석잠(*Stachys sieboldii* Miq.)은 꿀풀과(Labiatae) 석잠풀속(*Stachy* Linne)에 속한 풀로서, 다년생 초본 식물로 식용 부위인 뿌리는 가을에 3~6cm로 자라며 누에 모양을 하고 있어 식물의 동충하초라고 불린다. 중국의 본초강목에 의하면 초석잠 뿌리는 기억력을 증진하고 뇌경색과 치매에 효과가 있으며 장을 강화하는 식물로 무

독하여 예부터 애용하였다고 기록되어 있다.

[0003] 초석잠은 여러 갈래로 뿌리가 퍼져 있고 그 끝에 누에 모양의 작은 구근(球根)이 달렸다. 초석잠 뿌리의 주성분은 탄수화물로 이는 전분이 아닌 올리고당으로 구성되어있으며, 스타키드리, 스타키오스, 아르긴산, 콜린, 페닐에타노이드 글리코사이드(phenylethanoid glycosides) 및 비타민 B4 성분이 함유되어있음이 보고되었다.

[0004] 초석잠에는 항균과 항암 효과 및 항산화 효과가 우수한 것으로 알려져 있으나 초석잠은 뇌에 신선한 산소를 공급하여 머리를 총명하게 하고, 치매와 뇌경색을 예방하는 신비의 약초로 알려졌다. 초석잠이 뇌를 활성화시키는 것은 콜린이라는 성분을 함유하고 있기 때문이며, 콜린은 비타민 B군에 속하는 물질로 간이나 담낭에 지방이 축적되지 않게 하고, 콜레스테롤 대사에 관여하여 콜레스테롤이 혈관에 쌓이는 것을 막아주는 작용을 한다. 또한, 콜린은 뇌 장벽을 뚫고 들어갈 수 있는 희귀 물질 중의 하나로, 콜린은 뇌세포를 뚫고 들어가 기억을 돕는 생화학 물질을 만들어 내기도 하고, 기억을 회생시키기 위해 뇌 속에서 생기는 신호에 작용하기도 하며, 신경의 진정을 돕는 작용을 하는 것으로 알려졌다. 이와 같은 다양한 생리활성 성분을 포함한 초석잠은 배변작용개선, 면역기능 강화, 항산화 활성, 항균, 항암 등의 효능이 보고되었다. 이처럼 초석잠은 다양한 생리활성 효과뿐만 아니라 맛이나 영양가 면에서도 기호도가 높아 새로운 건강 기능성 식품소재로의 개발 가능성이 큰 식물로 여겨지고 있다.

[0005] 기억력 증진 및 뇌기능 활성화에 탁월한 효과를 나타내는 초석잠은 일본, 중국에서는 약재 및 식품 소재로서 다양하게 이용되고 있다. 그러나 국내에서는 한국공개특허 제2013-0049792호에 초석잠을 감식초로 발효시킨 건강음료가 공개되어 있으나 국내에서의 연구는 극히 미진하고, 특히 최근 대량 생산되고 있는 초석잠을 이용한 다양한 제품개발과 산업화가 절실히 요구되고 있다.

[0006] 한편, 감국은 예로부터 술이나 차로 만들어 마시고 있으며, 동의보감에 따르면 감국은 몸을 가볍게 하고 늙지 않게 하며, 눈을 밝게 하고 풍현두통(風眼頭痛)을 치료하며, 술을 마시고 깨지 않을 때 이용한다고 소개하고 있다. 감국의 변종인 흰감국은 야생에서는 찾아보기 어려워 멸종위기식물 2급으로 지정되어 있으며, 예로부터 감국 중에 최고로 여겨 여러 문헌에 기록으로 남아 있고, 동의보감에서도 백국우가(白菊兪)라 하여 국화 중에서도 흰감국이 으뜸이라고 소개하고 있다. 한의학에서 감국이 기억력 증진, 해열, 소염 및 혈압저하 작용이 있다고 알려졌으며, 최근 국내 한의학계에서도 감국에 대한 연구논문을 다수 발표하고 유아 아토피 치료제를 개발하여 사용하고 있다. 흰감국에는 항산화 활성물질인 폴리페놀 및 플라보노이드 등의 페놀성 화합물이 다량 함유되어 있고, 감국에서 유망한 생체 활성을 가진 4가지 주요 플라보노이드로는 리나린(Linarin), 루테오닌(Luteolin), 클로로겐산(Chlorogenic acid), 아피제닌(Apigenin)이 있다. 감국 가운데 흰감국이 노란감국에 비해 치매예방, 피부노화방지 등의 효과가 뛰어난 것으로 알려지는 등, 흰감국의 효능에 대해 재발견에 힘입어 고급 화장품 원료로 사용되고 있고, 뇌질환 치료제로 개발하고 있는 등 활용범위가 넓고 있는 실정이다. 건강에 대해 이해와 관심이 높아짐에 따라 다양한 건강식품에 대한 수요가 급속도로 성장하고 있으나 국내에서의 흰감국에 대한 연구는 미진한 실정이다.

[0007] 최근 1차적 기능의 식품 소비보다는 초고압, 증숙, 열처리 공정 등의 새로운 가공기술을 접목한 건강지향형 식품을 구매하는 것으로 트렌드가 바뀌고 있으며, 일반적으로 많이 사용되는 열처리 공정은 식물의 조직성분을 연소시키며 활성성분을 파괴하여 수율 및 생리활성을 감소시키는 단점이 있다고 알려져 있다. 이러한 단점을 보완하기 위해 직접적 열처리가 아닌 간접적 열처리 방식인 증기를 이용하는 증숙 공정이 이용되고 있다.

[0008] 증숙 공정은 증기를 이용해 구성성분을 변화시켜 새로운 화합물을 만들어내고, 유용성분의 용출을 극대화하는 공정이다. 최근 도라지, 인삼 또는 마 등에 증숙 공정을 적용하여 원료의 쓴맛 성분을 제거 또는 감소시켜 기호성을 향상시키고, 유용성분의 변화를 유도하여 기능성을 향상키는 등 품질이 향상된 제품개발에 적용되고 있다. 따라서 본 출원인은 유용성분이 증가된 흑초석잠을 제조하기 위한 방법을 안출하여 본 발명을 완성하였다.

선행기술문헌

특허문헌

- [0009] (특허문헌 0001) 한국 등록특허 제10-1470820호
(특허문헌 0002) 한국 등록특허 제10-1814170호
(특허문헌 0003) 한국 특허공개 제10-2013-0049792호

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0010] 본 발명은 상기와 같은 문제점을 해결하기 위한 것으로, 초석잠의 유용성분의 용출을 극대화하기 위하여 초석잠을 증숙시켜 흑초석잠 추출물을 제조하는 방법을 제공하는데 그 목적이 있다.
- [0011] 또한, 초석잠의 유용성분의 용출을 극대화하기 위한 흰감국 발효액을 이용하고, 흰감국의 꽃과 줄기를 사용하여 흰감국의 활용성을 높이는 흑초석잠 추출물을 유용성분으로 포함하는 식품 조성물을 제공하는데 그 목적이 있다.

과제의 해결 수단

- [0012] 상기의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명의 흰감국 발효액을 이용하여 발효시킨 흑초석잠 추출물의 제조방법은 생초석잠을 깨끗이 수세한 후 열풍건조하여 건조 초석잠을 제조하는 제1단계; 상기 건조 초석잠을 흰감국 발효액에 침지하고, 증자 후 건조하여 흑초석잠을 제조하는 제2단계; 상기 흑초석잠을 용매추출하여 흑초석잠 추출물을 제조하는 제3단계;를 포함하는 것일 수 있다.
- [0013] 상기 흰감국 발효액은, 흰감국꽃, 흰감국잎, 흰감국 줄기 가운데 선택된 1이상의 원료에 당류를 첨가하여 30~45 브릭스의 물에 침지한 후 고형을 분리하여 흰감국추출액을 제조하고, 상기 흰감국추출액을 저온에서 6개월 이상 발효시킨 것을 특징으로 포함하는 것일 수 있다.
- [0014] 상기 흑초석잠을 제조하는 상기 2 단계는 2회 이상 반복하는 것을 특징으로 포함하는 것일 수 있다.
- [0015] 본 발명은 상기 제조방법으로 제조되는 흰감국 발효액을 이용하여 발효시킨 흑초석잠 추출물을 제공하는 것일 수 있다.
- [0016] 본 발명은 상기 제조방법으로 제조되는 흰감국 발효액을 이용하여 발효시킨 흑초석잠 추출물을 유용성분으로 포함하는 식품 조성물을 제공하는 것일 수 있다.

발명의 효과

- [0017] 본 발명에 따른 흰감국 발효액을 이용하여 발효시킨 흑초석잠 추출물의 제조방법 및 그 추출물, 그리고 이를 유용성분으로 포함하는 식품 조성물은 초석잠을 흰감국 발효액에 침지하고 증자 후 건조하여 흑초석잠을 제조하고, 흑초석잠을 증류 추출한 것으로, 흰감국 발효액의 침지 후 증숙 공정에 의한 유용성분의 증가로 항산화 활성, 면역증진 효능, 저해활성 증가하는 등 유용성분의 함량이 높은 이점이 있다.
- [0018] 또한, 본 발명에 따른 흰감국 발효액을 이용하여 발효시킨 흑초석잠 추출물은 흰감국 발효액에 침지하여 제조되는 것으로 흰감국 고유의 향미가 가미되어 풍미를 높이고, 흰감국의 유효성분을 섭취할 수 있는 이점이 있다.
- [0019] 아울러 본 발명에 따른 흰감국 발효액을 이용하여 발효시킨 흑초석잠 추출물을 유용성분으로 포함하는 식품 조성물을 제공하여 흰감국과 초석잠의 제품활용성을 높일 수 있는 이점이 있다.

도면의 간단한 설명

- [0020] 도 1은 본발명의 일실시예에 따른 흰감국 발효액을 이용하여 발효시킨 흑초석잠 추출물의 제조방법의 공정도,
- 도 2는 본발명의 일실시예에 따른 흰감국 발효액을 이용하여 발효시킨 흑초석잠 추출물의 총 페놀성 화합물 함량을 나타낸 표,
- 도 3은 본발명의 일실시예에 따른 흰감국 발효액을 이용하여 발효시킨 흑초석잠 추출물의 총 플라보노이드 함량을 나타낸 표,
- 도 4는 본발명의 일실시예에 따른 흰감국 발효액을 이용하여 발효시킨 흑초석잠 추출물의 DPPH radical 소거능을 나타낸 표,
- 도 5는 본발명의 일실시예에 따른 흰감국 발효액을 이용하여 발효시킨 흑초석잠 추출물의 ABTS radical 소거능을 나타낸 표
- 도 6은 본발명의 일실시예에 따른 흰감국 발효액을 이용하여 발효시킨 흑초석잠 추출물의 세포 생존율을 나타낸

표,

도 7은 본발명의 일실시예에 따른 흰감국 발효액을 이용하여 발효시킨 흑초석잠 추출물의 NO 생성 측정을 나타낸 표,

도 8은 본발명의 일실시예에 따른 흰감국 발효액을 이용하여 발효시킨 흑초석잠 추출물의 Cytokine (TNF- α 와 IL-6) 함량을 나타낸 표,

도 9는 본발명의 일실시예에 따른 흰감국 발효액을 이용하여 발효시킨 흑초석잠 추출물의 Acetylcholinesterase activity 저해활성을 나타낸 표이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0021] 이하, 도면을 이용하여 본 발명의 바람직한 실시예를 보다 상세하게 설명한다. 그러나, 본 발명에 따른 실시예들은 여러 가지 다른 형태로 변형될 수 있으며, 본 발명의 범위가 하기 실시예들에 한정되는 것으로 해석되어서는 안 된다. 본 발명의 실시예들은 당업계에서 평균적인 지식을 가진 자에게 본 발명을 보다 완전하게 설명하기 위해 제공되는 것이다.
- [0022] 본 발명은 상기와 같은 기술적 과제를 달성하기 위하여 안출된 것으로, 본 발명에 따른 흰감국 발효액을 이용하여 발효시킨 흑초석잠 추출물의 제조방법은 생초석잠을 깨끗이 수세한 후 열풍건조하여 건조 초석잠을 제조하는 제1단계; 상기 건조 초석잠을 흰감국 발효액에 침지하고, 증자 후 건조하여 흑초석잠을 제조하는 제2단계; 상기 흑초석잠을 용매추출하여 흑초석잠 추출물을 제조하는 제3단계; 를 포함한다.
- [0023] 도 1은 본발명의 일실시예에 따른 흰감국 발효액을 이용하여 발효시킨 흑초석잠 추출물의 제조방법의 공정도이다.
- [0024] 제 1 단계(S1)
- [0025] 생초석잠을 건조하여 건조 초석잠을 제조한다.
- [0026] 수확한 생초석잠은 흙이나 이물질이 부착되어 있으므로, 생초석잠을 깨끗이 수세한 후 30~ 60℃에서 12 ~ 36 시간 열풍건조하여 건조 초석잠을 얻는다.
- [0027] 제 2 단계(S2)
- [0028] 상기 제 1단계에 의해 제조된 건조 초석잠을 흰감국 발효액에 6시간 침지하고, 120℃에서 5시간 증자 후 45℃에서 건조하여 흑초석잠을 제조한다.
- [0029] 상기 흰감국 발효액은, 흰감국꽃, 흰감국잎, 흰감국 줄기 가운데 선택된 1이상의 원료에 당류를 첨가하여 30~ 45 브릭스의 물에 침지한 후 고형을 분리하여 흰감국추출액을 제조한다. 상기 흰감국추출액은 발효시켜 사용한다.
- [0030] 흰감국은 생체 활성을 지닌 플라보노이드 성분이 다량 함유된 것으로, 폴리페놀 및 플라보노이드 함량은 꽃 > 잎 > 줄기 순으로 높게 나타난다. 유효성분을 다량 함유하고 있는 흰감국꽃을 사용하는 것이 바람직하다.
- [0031] 흰감국원료를 수확하여 전처리한 다음 당류를 첨가한 물을 흰감국 원료에 부어 유효성분을 추출한다. 당류는 고과당, 설탕, 이소말토 올리고당, 벌꿀 및 폴리덱스트로스로서 이루어진 군에서 선택된 1종 이상이다. 당류를 첨가한 물은 30~ 45 브릭스(°Brix)로 당도를 맞추는 것이 유효성분 추출에 효과적이다. 가장 바람직하게는 35 브릭스(°Brix)로 맞춘 물에 침지하여 유효성분을 추출한다. 당류를 첨가함으로써 유효성분이 효과적으로 추출되며 당 침 추출로 흰감국꽃의 수용성 성분의 침출에 의한 당질 회석 효과에 따른 것이다. 당도가 높을 경우 당침투 속도가 빨라 유효성분 추출이 용이하나 과다한 당의 섭취에 따른 문제가 있다. 당도가 낮을 경우 효과적인 추출이 어렵다. 30~ 35 브릭스(°Brix)의 당농도일때 효과적이다. 30 브릭스(°Brix) 미만의 경우 알콜발효와 초산발효가 진행되어 신맛이 나고, 45 브릭스(°Brix)를 초과하면 흰감국꽃의 각종 미생물이나 유익균들이 활동할 수 없어 당이 분해되지 못한다.
- [0032] 흰감국원료가 물에 잠길 정도로 당류를 첨가한 물에 침지하는데, 물과 흰감국원료는 약 2 : 1 중량비로 혼합한다. 유효성분 추출을 촉진하기 위하여 끓인 물에 침지하는 것이 바람직하다. 물에 침지한 후 10 ~ 25 ℃ 에서 6 개월 이상 발효시킨다. 발효를 통해 흰감국원료의 세포벽을 자화하여 추출 수율을 증가시키고, 끓인 물을 부어

흰감국원료 내부온도보다 높아져 당 침투속도를 빠르게 하여 유효성분의 추출을 용이하게 하고, 식물 내 존재하는 불필요한 당을 제거하여 유용한 물질로 전환시킨다.

- [0033] 상기 제 1단계에 의한 건조 초석잠을 흰감국 발효액에 4~10 시간 침지한다. 상기 흰감국원료를 당침하여 유효성분을 추출함으로써 흰감국 추출액의 쓴맛을 중화시켜 건강 식품으로 섭취하는데 있어 적합한 향미를 부여하고, 상기 흰감국추출액을 저온에서 6개월 이상 발효시켜 흰감국 발효액은 사용한다. 발효과정을 통해 흰감국 추출액의 풍미가 더해서 흑초석잠에 흰감국 추출액의 향미가 풍부해진다.
- [0034] 상기 건조 초석잠을 흰감국 발효액에 침지하고, 100 ℃ ~ 120℃에서 4 ~ 6 시간 증자하고, 30℃ ~ 45℃에서 건조하여 흑초석잠을 제조한다.
- [0035] 건조 초석잠을 흰감국 발효액에 침지함으로써, 항산화 성분의 상승효과를 기대할 수 있으며, 흑초석잠 제조과정의 증숙 공정 횟수를 줄이고도 항산화 성분 함량이 높은 흑초석잠 추출물을 제조할 수 있다.
- [0036] 흑초석잠은 흰감국 발효액에 침지한 초석잠을 증숙하여 건조한 것으로, 증자과정을 1회 이상 하고 수분을 제거하고, 말리는 과정을 거친다. 2회 증숙을 통해 여러 영양소가 고르게 추출되어 바람직하며 그 이상으로 증숙하는 경우 비용이 증가하는 문제가 있다. 또한 생초석잠을 증숙함으로써 초석잠의 아린맛이 제거되어 기호성을 높인다.
- [0037] 열처리 공정은 식물의 조직성분을 연소시키며 활성성분을 파괴하여 수율 및 생리활성을 감소시키는 단점이 있으나, 간접적 열처리 방식인 증기를 이용하는 증숙 공정은 증기를 이용해 구성성분을 변화시켜 새로운 화합물을 만들어내고, 유용성분의 용출을 극대화할 수 있다. 또한 증숙 공정을 적용하여 초석잠 원료의 쓴맛 성분을 제거 또는 감소시켜 기호성을 향상시킨다.
- [0038] 상기 흑초석잠을 제조하는 상기 2 단계는 1회 이상 반복하는 것이 바람직하고 가장바람직하게는 2회 증숙과정을 거친다.
- [0039] 제 3 단계(S3)
- [0040] 상기 흑초석잠을 용매추출하여 흑초석잠 추출물을 제조한다. 상기 용매는 50% 에탄올로 추출하는 경우 효율이 높게 나타났다. 상기 흑초석잠의 중량 대비 10 ~ 25 배의 50% 에탄올을 첨가하고, 30℃ ~ 45℃ 에서 20 ~ 28 시간 가열하여 추출한다.
- [0041] 상기 추출된 용액을 필터한 후 진공회전농축기를 사용하여 에탄올을 증발시킨 후 동결건조하여 분말화하여 흰감국 발효액을 이용하여 발효시킨 흑초석잠 추출물을 제조한다.
- [0042] 또한 상기 제조방법으로 제조되는 흰감국 발효액을 이용하여 발효시킨 흑초석잠 추출물을 유용성분으로 포함하는 식품 조성물을 제조한다.
- [0043] 식품 조성물은 고체, 액상 등 형태에 관계없으며, 음료나 가공식품의 원료로 첨가될 수 있으며 이에 한정되는 것은 아니다.

실시예 1

- [0045] 생초석잠을 깨끗이 수세한 후 45℃에서 24시간 열풍건조하여 건조 초석잠을 얻었다. 그리고, 건조 초석잠을 비정제원당과 정제수를 혼합한 당도 37 Brix 정도 수용액에 흰감국 전초를 넣어 저온에서 6개월 이상 발효하여 얻어진 흰감국 발효액에 6시간 침지하였다. 상기 침지한 초석잠을 120℃에서 5시간 증자 후 45℃에서 건조하였고, 이 과정을 2번 반복하여 흑초석잠을 제조하였다. 흑초석잠 50 g을 50% 에탄올 (1 L)에 넣고 45℃에서 24시간 추출하였다. 추출된 용액을 필터한 후 진공회전농축기를 사용하여 에탄올을 증발시킨 후 동결건조하여 분말화하여 흰감국 발효액을 이용하여 발효시킨 흑초석잠 추출물을 제조하였다.
- [0046] 한편, 제조된 흑초석잠추출물은 17.4%의 수율을 나타내었다.
- [0047] [비교예]
- [0048] 생초석잠을 깨끗이 수세한 후 45℃에서 24시간 열풍건조하여 건조 초석잠을 얻었다. 상기 건조 초석잠 50 g을 50% 에탄올 (1 L)에 넣고 45℃에서 24시간 추출하였다. 추출된 용액을 필터한 후 진공회전농축기를 사용하여 에탄올을 증발시킨 후 동결건조하여 분말화하여 초석잠 추출물을 제조하였다.

- [0049] 한편, 제조된 초석잠추출물은 23.1%의 수율을 나타내었다.
- [0051] 실시예1에 의한 흰감국 발효액을 이용하여 발효시킨 흑초석잠 추출물과 비교예에 의한 초석잠 추출물을 사용하여 생리활성 성분 함량을 평가하기 위하여 총 페놀성 화합물 함량과 총 플라보노이드 함량을 측정하였다.
- [0053] **실험예 1: 총 페놀성 화합물 함량 측정**
- [0054] 총 페놀성 화합물 함량은 Folin-Ciocalteu 방법을 변형하여 측정하였다.
- [0055] 실시예1 및 비교예 각각의 시료 20 μ L에 Folin-Ciocalteu 'phenol reagent 50 μ L를 넣고, 증류수 780 μ L 넣어 3분간 정치 후, 10% Na_2CO_3 150 μ L 첨가하여 상온에서 1시간 동안 반응시켰다. 반응이 끝난 후, 750 nm에서 흡광도를 측표준물질 (gallic acid)의 측정값으로 표준검량선을 작성하여 시료의 총 페놀화합물을 함량을 계산하고 그 결과는 도 2에 나타내었다.
- [0056] 총 페놀함량은 gallic acid에 대한 상당량 (gallic acid equivalent, mg(GAE)/g)으로 나타내었다. 페놀성 화합물은 OH기를 가지기 때문에 단백질 및 기타 거대 분자들과 쉽게 결합하여 항산화, 항암 등의 다양한 생리활성을 가진다.
- [0057] 도 2에서와 같이, 초석잠추출물(a)과 본 발명의 일실시예에 따른 흑초석잠추출물(b)을 비교해 본 결과 각각 35.8 ± 1.3 , 37.6 ± 0.3 mg(GAE)/g으로 흑초석잠 추출물에서 페놀성 화합물이 증가하였다.
- [0059] **실험예 2: 총 플라보노이드 (flavonoid) 함량 측정**
- [0060] 총 플라보노이드 함량은 변형된 Moreno 등의 방법으로 측정하였다.
- [0061] 실시예1 및 비교예 각각의 시료 30 μ L에 10% aluminum nitrate 30 μ L와 95% 에탄올 1,410 μ L를 넣고 혼합하였다. 1M potassium acetate 30 μ L를 가해서 총 1.5 mL로 한 후 잘 혼합하여 상온에서 40분간 반응시킨 후 415 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준물질 (quercetin)의 측정값으로 표준검량선을 작성하여 시료의 총 플라보노이드 함량을 계산하고 그 결과는 도 3에 나타내었다.
- [0062] 총 플라보노이드 함량은 quercetin에 대한 상당량 (quercetin equivalent, mg(QUE)/g)으로 나타내었다.
- [0063] 플라보노이드는 활성산소종을 효과적으로 제어하여 항산화 활성을 나타내며, 항염 및 항암 활성을 나타낸다. 초석잠 추출물(a)의 총 플라보노이드 함량은 5.3 ± 1.3 mg(QUE)/g이었으나 본 발명에 따른 흑초석잠 추출물(b)의 총 플라보노이드 함량은 55.3 ± 6.8 mg(QUE)/g으로 유의적으로 증가하였다. 이는 증숙 공정에 의해 초석잠에 함유된 성분이 변화하여 총 플라보노이드 함량이 증가한 것으로 판단된다.
- [0065] 다음으로 항산화 활성을 평가하기 위하여 DPPH radical 소거능 및 ABTS radical 소거능 측정하였다.
- [0066] **실험예 3: DPPH radical 소거능 측정**
- [0067] 항산화 활성은 DPPH radical scavenging assay을 통하여 각 추출물의 항산화 활성을 평가하였다.
- [0068] 실시예1 및 비교예 각각의 추출물을 50% 에탄올에 녹인 후, 다양한 농도로 희석하여 추출물 100 μ L, 0.15 mM DPPH(2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) 용액 100 μ L를 넣고 잘 혼합하였다. 이 반응 혼합액을 실온에 30분간 방치한 후에 570 nm에서 spectrophotometer로 흡광도를 측정하였고, 결과 값은 시료를 첨가하지 않은 대조군과 비교하여 유리 라디칼의 제거활성을 나타냈으며, 양성대조군으로는 ascorbic acid를 사용하였다. DPPH radical 소거능은 아래식으로 산출하였다.
- [0069] DPPH radical 소거능 (%) = $(1-A/B) \times 100$
- [0070] A: 시료 첨가구의 흡광도,

[0071] B: 무처리구의 흡광도

[0073] DPPH와 ABTS 시약을 이용한 radical 소거활성 시험은 다양한 천연소재로부터 항산화 물질을 검색하는데 많이 이용되고 있는 실험법으로 초석잠 추출물(a)과 흑초석잠 추출물(b)의 항산화력을 비교분석하여 도 4에 나타내었다.

[0074] 도 4에서와 같이, DPPH radical 소거능은 1 mg/mL 농도에서 초석잠 추출물(a)은 $10.5 \pm 0.3\%$ 의 소거율을 나타내었으며, 흑초석잠 추출물(b)은 $16.3 \pm 0.6\%$ 로, 초석잠 추출물(a)과 비교하여 흑초석잠 추출물(b)이 5.8% 소거율이 증가하여 항산화 활성을 나타내었다. 2회 증속으로도 건조 초석잠을 흰감국 발효액에 침지함으로써 항산화 활성이 증가하였음을 제시하는 것으로 판단된다.

[0076] 실험예 4: ABTS radical 소거능 측정

[0077] 총 항산화력의 측정은 ABTS cation decolorization assay법에 따라 측정하였다.

[0078] 최종농도를 7.4 mM ABTS와 2.6 mM potassium persulfate로 혼합한 후 어두운 곳에서 24시간 방치시켜 ABTS+를 형성시키고 750nm에서 흡광도 값이 0.7~0.8이 되도록 phosphate-buffered saline(PBS, pH 7.4)로 희석하였다. 희석된 ABTS 용액 100 μ L에 시료를 농도별로 100 μ L씩 첨가한 후 30분 후에 750 nm에서 흡광도를 측정하였다. 소거효과의 비교를 위한 양성대조군으로는 trolox를 사용하였고, ABTS radical 소거능은 아래식으로 산출하였다.

[0079] $ABTS \text{ radical 소거능 } (\%) = (1-A/B) \times 100$

[0080] A: 시료 첨가구의 흡광도,

[0081] B: 무처리구의 흡광도

[0083] 항산화 물질을 검색하기 위하여 초석잠 추출물(a)과 흑초석잠 추출물(b)의 항산화력을 비교분석하여 도 5에 나타내었다.

[0084] ABTS radical 소거능은 0.5 mg/mL 농도에서 초석잠 추출물(a)이 $14.6 \pm 1.5\%$, 흑초석잠 추출물(b)이 $27.7 \pm 1.1\%$ 로 초석잠 추출물(a)과 비교하여 13.1% 더 높은 소거율을 보여 항산화활성을 나타내었다.

[0086] *In vitro* 체계에서 초석잠과 흑초석잠의 면역증진 효능 평가를 위해, 세포배양하고 세포 생존율 측정, Nitric Oxide (NO) 생성량 측정 및 Cytokines (TNF- α , IL-6) 분비량 측정을 하였다.

[0088] 세포배양

[0089] 생쥐에서 유래한 대식세포인 RAW 264.7 세포는 American Type Culture Collection에서 구입하여 사용하였으며, DMEM에 10% FBS, 1% P/S를 첨가한 세포배양액을 사용하여 37°C 습윤한 CO₂ 배양기 (5% CO₂/95% air)에서 배양하였다.

[0091] 실험예 5: 세포 생존율 측정

[0092] RAW 264.7 세포의 세포 생존율은 MTT assay 방법 (9)으로 측정하였다.

[0093] RAW 264.7 세포를 1×10^5 cells/well로 24-well plate에 분주하여 24시간 배양한 후 FBS가 함유되지 않은 serum-free medium (SFM)으로 배지를 교환하여 2시간 동안 serum starvation 하였다. 이후 시험물질인 초석잠과 흑초석잠을 다양한 농도 (0, 100, 250, 500 μ g/mL)로 처리한 SFM 또는 0.1 μ g/mL lipopolysaccharide (LPS, Sigma-aldrich)을 처리한 SFM으로 세포배양액을 교환하여 24시간 배양하였다. 시험물질을 처리하여 24시간 배양한 후 1 mg/mL MTT (Amresco) 용액으로 세포배양액을 교환하고 2시간 동안 세포를 추가 배양한 후 살

아있는 세포에서 형성된 formazan을 isopropanol로 용출하여 SpectraMaxM2 Microplate reader (Molecular Devices)를 사용하여 570 nm에서 흡광도를 측정하고 도 6에 나타내었다.

[0094] RAW 264.7 세포에서 초석잠과 흑초석잠의 세포독성을 평가하기 위해 각각의 시험물질을 다양한 농도 (0, 100, 250, 500 $\mu\text{g/mL}$)로 세포배양액에 처리하여 48시간 배양한 후 MTT assay를 실시하였다. 도 6에서와 같이, 초석잠추출물(a)과 흑초석잠추출물(b)은 48시간 모두 세포독성을 나타내지 않았다.

[0095] 위의 결과를 바탕으로 500 $\mu\text{g/mL}$ 이하로 2종의 시험물질 처리농도를 설정하였다.

[0097] 실험예 6: Nitric Oxide (NO) 생성량 측정

[0098] RAW 264.7 세포로부터 생성된 NO의 양은 Griess Reagent system (Promega)을 사용하여 제조회사가 제시한 방법에 따라 측정하였다. RAW 264.7 세포를 1×10^5 cells/well로 24-well plate에 분주하여 48시간 배양한 후 FBS가 함유되지 않은 SFM으로 배지를 교환하여 2시간 동안 serum starvation 하였다. 이후 다양한 농도 (0, 100, 250, 500 $\mu\text{g/mL}$)의 시험물질 또는 LPS (0.1 $\mu\text{g/mL}$)를 처리한 SFM으로 세포배양액을 교환하여 24시간 동안 배양하였다. 세포를 24시간 배양한 후, 배양 상등액과 동일한 양의 Griess reagent를 혼합하여 실온에서 10분간 반응시킨 후 SpectraMaxM2 Microplate reader (Molecular Devices)를 사용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였고, sodium nitrate로 표준 곡선을 작성하여 NO 함량을 산출하여 도 7에 나타내었다.

[0099] RAW 264.7 세포에서 2종의 시험물질이 NO 생성에 미치는 영향을 조사한 결과, 대조군 (0 $\mu\text{g/mL}$)과 비교하여 초석잠 추출물(a)은 NO 생성에 유의적인 영향을 미치지 않았으나, 흑초석잠 추출물(b)을 250, 500 $\mu\text{g/mL}$ 농도로 처리한 경우 NO 생성이 유의적으로 증가하여 본발명에 따른 흑초석잠 추출물(b)의 면역증진 효능이 확인되었다.

[0101] 실험예 7: Cytokines (TNF- α , IL-6) 분비량 측정

[0102] RAW 264.7 세포를 1×10^5 cells/well로 24-well plate에 분주하여 48시간 배양한 후 FBS가 함유되지 않은 SFM으로 배지를 교환하여 2시간 동안 serum starvation 하였다. 이후 LPS (0.1 $\mu\text{g/mL}$) 또는 시험물질을 처리한 SFM으로 세포배양액을 교환하여 24시간 동안 배양하였다. 세포를 24시간 배양한 후 세포배양액을 수거하여 5,000 rpm에서 10분 동안 원심분리한 후 상층액을 취하여 -70°C 에 보관하였다. 세포가 생성 분비한 TNF- α , IL-6 함량은 TNF- α , IL-6 측정 ELISA kit (R&D Systems)을 사용하여 측정하였다.

[0103] 외부의 자극에 의해 활성화된 대식세포는 TNF- α 와 IL-6 등의 다양한 사이토카인을 분비하여 면역계를 조절하는 다양한 세포를 활성화하고 적응면역반응을 유도함으로써 감염인자를 제거하는 염증반응을 활성화 하는 것으로 알려져 있다. 즉, 정상 범위 내에서 사이토카인의 생성 증가는 면역 활성이 증진됨을 나타낸다. RAW 264.7 세포에 다양한 농도 (0, 100, 250, 500 $\mu\text{g/mL}$)의 초석잠추출물(a)과 흑초석잠추출물(b)을 처리하여 세포를 배양한 후 수거한 배양액내의 TNF- α , IL-6 함량을 측정하고 도 8에 나타내었다.

[0104] 도 8에 나타난 바와 같이 RAW 264.7 세포에서 생성 분비된 TNF- α 함량은 대조군 (0 $\mu\text{g/mL}$)과 비교하여 흑초석잠추출물(b) 처리농도 250 $\mu\text{g/mL}$ 부터 유의적으로 증가하였고, IL-6 함량은 흑초석잠 추출물(b)처리농도 500 $\mu\text{g/mL}$ 에서 유의적인 증가를 나타내었다. 초석잠 추출물(a)의 처리는 TNF- α 와 IL-6 함량에 유의적인 차이를 나타내지 않았다.

[0106] 다음으로 Acetylcholinesterase 저해 활성에 미치는 영향을 평가하였다.

[0107] 실험예 8: Acetylcholinesterase 저해 활성에 미치는 영향

[0108] AChE 활성저해 측정 방법은 acetylthiocholine을 기질로 사용하는 Ellman's 방법)을 변형하여 사용하였으며, 효소는 전기뱀장어에서 분리한 acetylcholinesterase 500unit을 1 unit로 희석하여 사용하였다. 이 실험의 원리는 효소의 기질인 AChE가 가수분해되면 thiocholine이 생성되는데, 이 화합물이 dithiobisnitrobenzoic acid (DTNB)와 반응해 새로운 dithio 화합물과 2-nitro-benzoic acid의 thio 음이온을 만들게 되고, 이 음이온은 UV에 정확하게 검출되기 때문에 UV에 의해 이 음이온의 생성속도를 측정함으로써 효소의 활성 저해능을 확인할 수 있다.

[0109] 96-well plate에 0.1 M phosphate buffer(pH 8.0) 100 μ L와 시험물질 20 μ L을 첨가하고, AChE 효소 20 μ L를 첨가하여 36.5°C에서 10분 동안 pre-incubation을 실시하였다. 그 후 substrate solution 140 μ L (1 mM acetylthiocholine iodide, 1 mM DTNB)를 첨가하여 AChE 효소의 활성 저해 반응이 일어나도록 하였고, 405 nm에서 흡광도를 측정하고 도 9에 나타내었다. AChE 활성 저해능은 아래의 식으로 산출하였다.

[0110]
$$\text{AChE inhibition(\%)} = (1 - (\text{SR} - \text{SC}) / (\text{ER} - \text{EC})) \times 100$$

[0111] (SR=sample reaction, SC=sample control, ER=enzyme reaction, EC=enzyme control)

[0113] AChE는 대뇌피질의 신경전달물질인 아세틸콜린 함량을 급격하게 낮추어 알츠하이머병 환자의 기억력을 손상시키는 때문에 AChE 저해제를 사용하여 뇌에서 아세틸콜린의 분해를 억제함으로써 AChE의 함량이 급격하게 감소하는 것을 막아 환자의 기억력 감퇴를 막는 하나의 치료법으로, AChE 효소를 이용하여 시험물질의 효소 저해 활성을 살펴본 결과, 도 9에서와 같이, 초석잠 추출물(a)과 흑초석잠 추출물(b)에서 각각 $23.6 \pm 0.9\%$, $27.6 \pm 0.7\%$ 로 증속 공정을 통한 흑초석잠추출물(b)이 4% 더 높은 저해 활성을 나타내었다.

[0115] 본 발명에 따른 흑초석잠 추출물(b) 즉, 흰감국 발효액을 이용하여 발효시킨 흑초석잠 추출물(b)은 초석잠 추출물(a)과 비교 시, 총 페놀성 화합물 함량은 두 추출물 간에 차이가 미미하였으나 총 플라보노이드 함량은 초석잠 추출물(a)에 비해 흑초석잠 추출물(b)에서 현저히 증가하였다. 또한 DPPH radical 소거능 및 ABTS radical 소거능도 초석잠 추출물(a)에 비해 흑초석잠 추출물(b)에서 현저히 증가하였는데 이는 흰감국 발효액의 침지 후 증속 과정에 의해 총 플라보노이드 함량이 증가하고 이로 인해 항산화 활성이 증가하였음을 제시하는 것으로 판단된다. RAW264.7 세포에서 초석잠 추출물(a)과 흑초석잠 추출물(b)의 면역증진효능평가를 실시한 결과 세포에 독성이 없는 농도에서 NO 생성량이 흑초석잠추출물(b)에서 유의적으로 증가하였고, cytokine 함량 측정 결과 TNF- α 와 IL-6 함량 모두 흑초석잠 추출물(b)에서 유의적으로 증가하였다. AChE 효소를 이용한 시험물질의 효소 저해 활성을 살펴본 결과, 흑초석잠 추출물(b)에서 유의적으로 저해활성이 증가하였다. 이는 흰감국 발효액의 침지 후 증속 공정에 의한 유용성분의 증가로 초석잠 추출물(a)과 비교할 때 흰감국 발효액을 이용하여 발효시킨 흑초석잠 추출물(b)에서 더 높은 활성을 나타내는 것으로 판단된다.

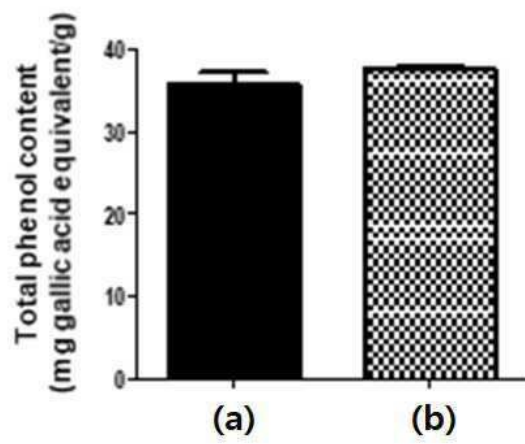
[0117] 이상에서 살펴본 바와 같이 본 발명은 바람직한 실시 예를 들어 도시하고 설명하였으나, 상기한 실시 예에 한정되지 아니하며 본 발명의 정신을 벗어나지 않는 범위 내에서 당해 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에 의해 다양한 변경과 수정이 가능하다 할 것이다.

도면

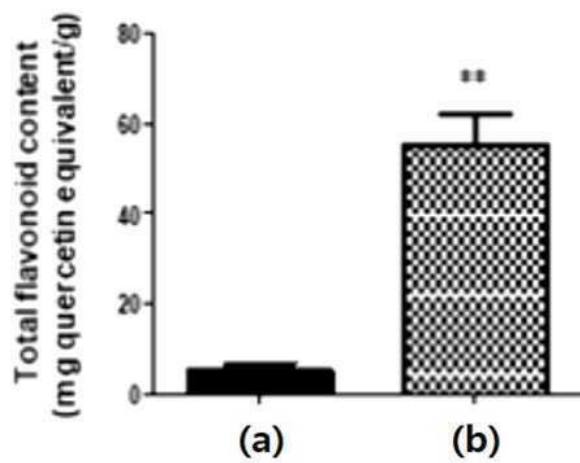
도면1



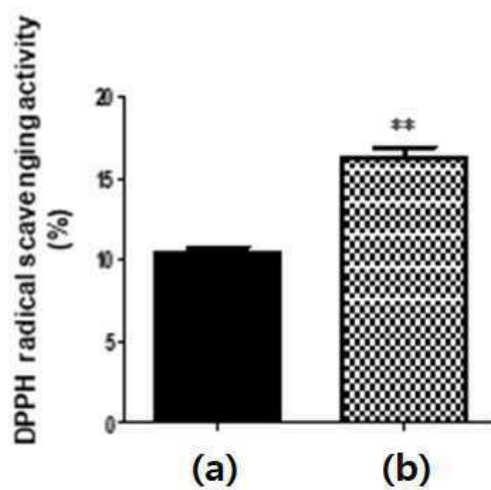
도면2



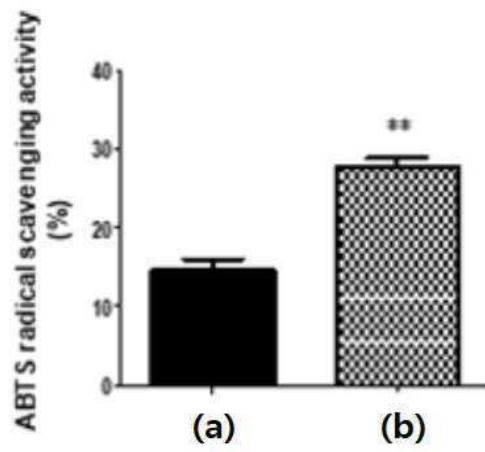
도면3



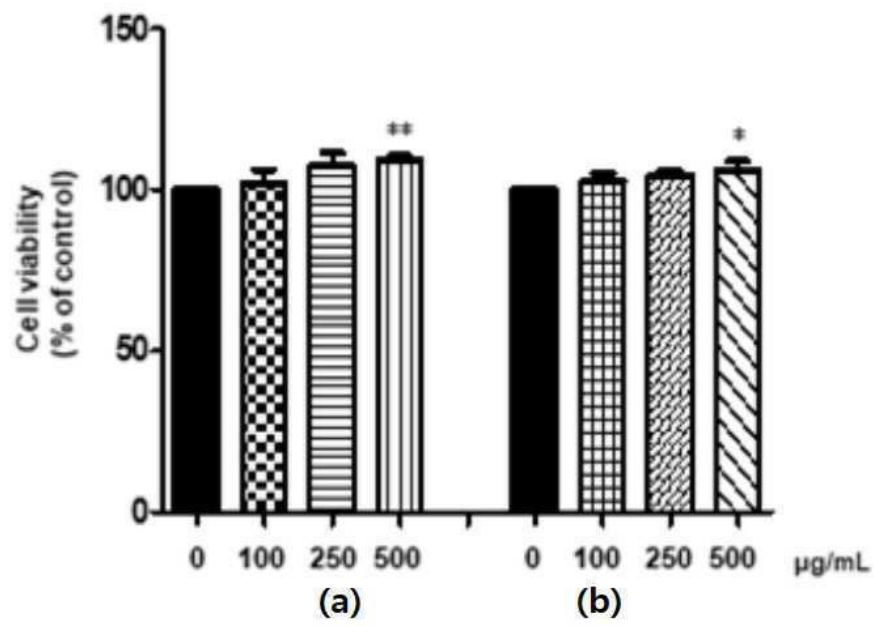
도면4



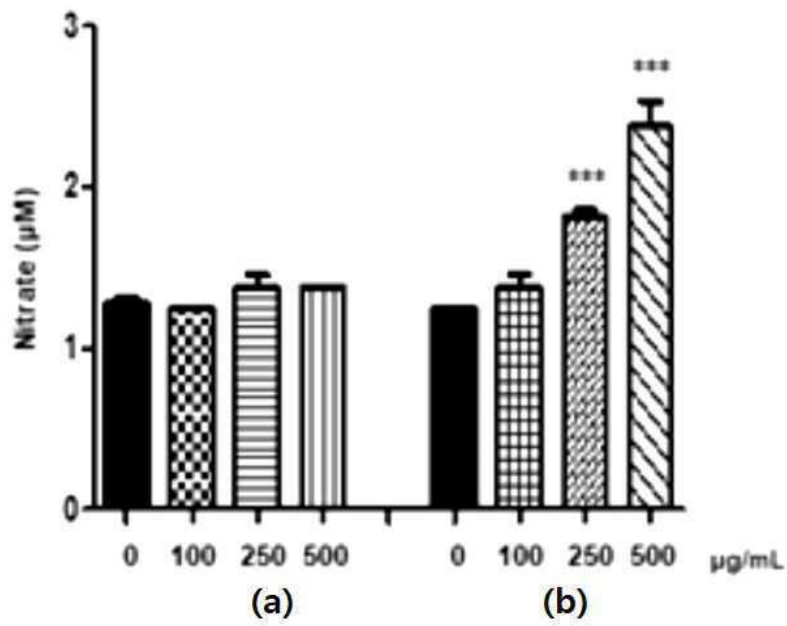
도면5



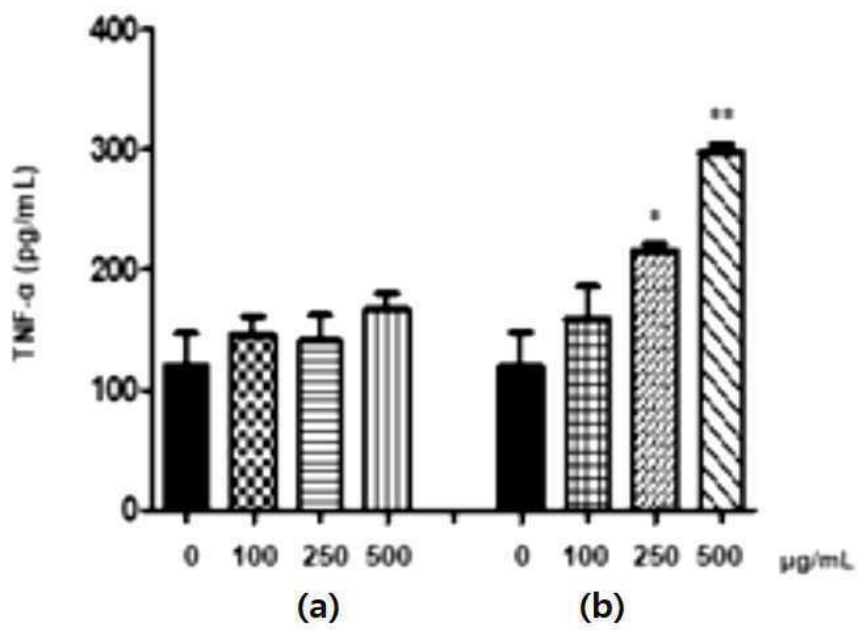
도면6



도면7



도면8



도면9

