



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2016-0063552
(43) 공개일자 2016년06월07일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A23L 1/30 (2006.01) A23L 19/00 (2016.01)

A61K 36/60 (2006.01) A61P 25/20 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2014-0166845

(22) 출원일자 2014년11월26일

심사청구일자 2014년11월26일

(71) 출원인

고려대학교 산학협력단

서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)

(주)네오크레마

서울특별시 송파구 법원로11길 11, 에이동 714호 (문정동, 문정현대지식산업센터1-1)

(72) 발명자

서형주

서울 양천구 목동서로 70, 233동 504호 (목동, 목동신시가지아파트2단지)

홍기배

대전 동구 성동로 74, 102동 506호 (자양동, 동아아파트)

(74) 대리인

특허법인 대아

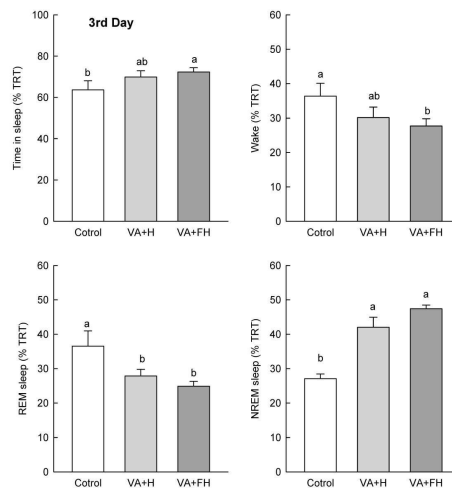
전체 청구항 수 : 총 10 항

(54) 발명의 명칭 호프 추출물을 포함하는 수면 촉진용 조성물

(57) 요약

본 발명은 호프 추출물을 포함하는 수면 촉진용 식품 조성물 및 호프 추출물을 포함하는 수면 장애 예방 및 치료용 약학적 조성물에 대한 것이다.

대표도 - 도15



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	C0148614
부처명	경기지방중소기업청
연구관리전문기관	(사)한국산학연합회
연구사업명	2013년 산학협력 기술개발사업
연구과제명	천연물 기원의 불면증 개선 기능 제품 개발
기 여 율	1/1
주관기관	고려대학교산학협력단
연구기간	2013.12.01 ~ 2014.11.30

명세서

청구범위

청구항 1

호프 추출물을 포함하는 수면 촉진용 식품 조성물.

청구항 2

제 1항에 있어서,

상기 호프는 카스케이드, 할러타우 및 사즈로 구성되는 군으로부터 선택되는 하나 이상인 것을 특징으로 하는 수면 촉진용 식품 조성물.

청구항 3

제 1항에 있어서,

상기 호프 추출물은 호프 알코올 추출물인 것을 특징으로 하는 수면 촉진용 식품 조성물.

청구항 4

제 1항에 있어서,

상기 호프 추출물은 호프를 유산균으로 발효시킨 후, 상기 유산균으로 발효된 호프를 유기용매로 추출하여 제조하는 것을 특징으로 하는 수면 촉진용 식품 조성물.

청구항 5

제 1항에 있어서,

쥐오줌풀 추출물을 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는 수면 촉진용 식품 조성물.

청구항 6

제 5항에 있어서,

상기 쥐오줌풀은 쥐오줌풀의 뿌리 또는 근경인 것을 특징으로 하는 수면 촉진용 식품 조성물.

청구항 7

제 1항에 있어서,

상기 수면 촉진용 식품 조성물은 수면 시간 증진능 또는 숙면 시간 증진능을 갖는 것을 특징으로 하는, 수면 촉진용 식품 조성물.

청구항 8

호프 추출물을 포함하는 수면장애 예방 및 개선용 식품 조성물.

청구항 9

호프 추출물을 포함하는 수면장애 예방 및 치료용 약학적 조성물.

청구항 10

제 9항에 있어서,

귀오줌풀 추출물을 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는 수면장애 예방 및 치료용 약학적 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 호프 추출물을 포함하는 수면 촉진용 조성물에 대한 것이다.

배경 기술

[0002] 수면은 인간 수명의 1/3을 차지하고 있으며 가장 근본적이고 필수적인 생리현상으로 건강 유지 및 정신적 안정에 있어 매우 중요한 요소이다. 만성적인 수면 부족 및 장애는 심혈관 질환, 고혈압, 기억, 학습, 대사조절, 체중, 면역력, 암 저항력, 당뇨병, 안전사고 및 기분 등 전반적인 신체적 및 정신적 건강에 부정적인 영향을 끼친다. 현재, 세계 인구의 30% 정도가 불면증을 경험하고 있으며 10%는 만성적으로 겪고 있을 만큼 수면장애로 인한 문제가 최근 크게 대두되고 있다.

[0003] 불면증의 평생 유병율이 지난 수년간 36%에서 49%로 증가되고 있다고 한다. 이로 인한 문제도 심각해서 국제보건기구에서 실시한 공동연구에 의하면 지난 한달 동안에 일을 할 수 없었던 날이 신체질환이 있는 환자의 경우는 평균 4.4일인 반면에 수면장애가 있는 사람들의 경우는 평균 5.2일로, 수면장애가 우리의 생활에 끼치는 영향이 매우 심각함을 보여주었다. 또한 1995년 미국에서 실시한 껌조사에 의하면 조사대상 성인의 52%는 지난 한해 동안에 졸음운전을 한 경험이 있다고 하였고 수면장애가 있다고 보고한 성인 10명중 3명만이 자신들의 문제를 의료인과 상의하였다고 하였다. 설령 불면증 환자들이 자신의 증상을 의사에게 호소하더라도, 대부분의 의사들은 수면장애에 대한 지식이 단편적이어서 결국 의사들은 수면제를 부적절하게 사용하는 경우가 많다.

[0004] 수면제는 일반적으로 불면증의 단기적 치료에 효과적이나 약물의존성, 인지기능저하 등 각종 부작용이 있다 하여 초기에는 비약물적 치료를 권고하며 심한 경우 수면제를 처방하는 것이 일반적인 불면증의 치료법이다. 치료약물로는 benzodiazepine계열의 약물, non-benzodiazepine계열의 약물, benzodiazepine receptor agonists와 진정작용이 있는 항우울약 등이 사용되고 있으나, 이러한 약물들은 장기간 사용하였을 때 내성 및 의존성이 형성되는 부작용과 더불어 불안, 흥분 및 금단현상과 유사한 증상이 나타날 수 있어, 일상생활의 어려움뿐만 아니라 인지적 장애나 우울 등 다른 질병을 일으키는 위험요인이 되기도 한다(Waldman, S.A., Terzic, A. Pharmacology and Therapeutics. Saunders, pp 849-855, 2009). 따라서 부작용이 적으면서 불안과 불면을 치료할 수 있는 약물을 개발하는 것이 시급한 실정이다.

[0005] 한편, 호프(hop)은 삼과(Cannabinaceae)의 덩굴성 여러해살이식물로, 황록색 꽃이 맥주 원료로 쓰인다. 꽃만을 홉이라고도 부르는데, 다양한 종류의 기름과 수지가 들어 있는 작은 샘이 있다. 호프는 맥주의 중요한 첨가물로서 맥주 특유의 향기와 쓴맛을 내며, 방부의 효능이 있어 단백질의 혼탁을 방지하고, 맥주의 거품을 잘 일어나게 하며 저장성을 높여주는 작용도 한다. 쓴맛의 주성분은 후물론(humulon)과 루폴론(lupulon)이고, 향기의 주성분은 후물렌(humulene)과 미르센(myrcene)으로 방부 효과도 있고, 거품을 잘 일게도 한다.

[0006] 본 발명자들은 호프의 효능에 대하여 연구하던 중 호프 추출물이 수면 촉진 효과를 갖는 것을 확인하였으며, 나아가 호프를 발효시키거나 쥐오줌풀 추출물과 혼합함으로써 상기 수면 촉진 효과가 유의하게 증진되는 것을 확인하고 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명의 목적은 수면 촉진용 조성물을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0008] 상기 목적을 달성하기 위하여 본 발명은 호프 추출물을 포함하는 수면 촉진용 식품 조성물을 제공한다.

[0009] 또한 본 발명은 호프 추출물을 포함하는 수면장애 예방 및 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

발명의 효과

[0010] 본 발명의 식품 조성물 및 약학적 조성물은 수면 시간 증진 및 숙면 촉진 효과를 갖는다.

도면의 간단한 설명

[0011] 도 1은 SD 래트의 뇌파를 측정하는 모습을 나타낸다.

도 2는 SD 래트의 뇌파 측정을 위한 전극 삽입 수술을 나타낸다.

도 3은 SD 래트의 뇌전도 패턴 분석을 나타낸다.

도 4는 수면구조 분석을 위한 FFT(fast Fourier transform) 알고리즘을 나타낸다.

도 5는 호프 추출물 내 총 당, 플라보노이드 및 총 폴리페놀을 나타낸다.

도 6은 호프 추출물 첨가에 따른 초파리의 Actogram을 나타낸다.

A 행: Cascade 호프 추출물 및 대조군(control)의 actogram이다(C: Cascade 호프 추출물을 표준시료와 함께 2, 5, 10 mg 투여).

B 행: Hallertau 호프 추출물 및 대조군의 actogram이다(H: Hallertau 호프 추출물을 표준시료와 함께 2, 5, 10 mg 투여)).

C 행: Saaz 호프 추출물의 및 대조군의 actogram이다(Saaz 호프 추출물을 표준시료와 함께 2, 5, 10 mg 투여)).

Control: 표준시료(5% 수크로스 1% agar).

도 7은 호프 추출물 첨가에 따른 초파리의 운동 능력 차이를 나타낸다.

Control: 표준시료(5% 수크로스 1% agar),

C 2, 5, 10 mg: 표준시료 + 2, 5, 10 mg의 Cascade 호프 추출물,

H 2, 5, 10 mg: 표준시료 + 2, 5, 10 mg의 Hallertau 호프 추출물,

S 2, 5, 10 mg: 표준시료 + 2, 5, 10 mg의 Saaz 호프 추출물.

도 8은 Cascade 호프의 발효 전/후의 성분 변화를 나타낸다.

도 9는 쥐오줌풀 추출물의 첨가에 따른 초파리의 Actogram이다(V: 쥐오줌풀(Valerian) 추출물) (Control: 표준시료 (5% 수크로스 1% agar), V: 쥐오줌풀 추출물을 표준시료와 함께 2, 5, 10, 20 mg 투여).

도 10은 쥐오줌풀 추출물의 첨가에 따른 초파리의 운동 능력(locomotor) 차이를 나타낸다(Control: 표준시료(5% 수크로스과 1% agar), V: 쥐오줌풀 추출물을 표준시료와 함께 1, 5, 10, 20 mg 투여).

도 11은 호프 추출물 및 쥐오줌풀 추출물의 혼합물의 이용 시 초파리의 Actogram이다(V: 쥐오줌풀(Valerian) 추출물) (Control: 표준시료(5% 수크로스과 1% agar), V: 쥐오줌풀 추출물을 표준시료와 함께 투여, V + C: 쥐오줌풀 추출물(V) 및 호프 추출물(C)의 혼합물 투여)

도 12는 호프 발효 전/후 추출물 및 쥐오줌풀 추출물의 혼합물의 이용 시 초파리의 운동 능력(locomotor) 차이를 나타낸다(Control: 표준시료(5% 수크로스과 1% agar), Valerian: 쥐오줌풀 추출물을 표준시료와 함께 투여, VA + H: 쥐오줌풀 추출물(VA) 및 cascade 호프 추출물(H)의 혼합물 투여)

도 13 내지 도 15는 쥐오줌풀 추출물 및 호프 추출물의 혼합물을 투여 시 SD 래트에서의 수면 촉진 효과를 나타낸다(도 13: 경구투여 1일, 도 14: 경구투여 2일, 도 15: 경구투여 3일).

Control: 식염수 투여군,

VA+H: 쥐오줌풀 추출물(VA) 및 Cascade 호프 추출물(H) 혼합물 투여군,

VA+FH: 쥐오줌풀 추출물(VA) 및 발효 Cascade 호프 추출물(FH) 혼합물 투여군

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0012] 본 발명은 호프 추출물을 포함하는 수면 촉진용 식품 조성물에 대한 것이다.

[0013] 또한 본 발명은 호프 추출물을 포함하는 수면장애 예방 및 개선용 식품 조성물에 대한 것이다.

[0014] 또한 본 발명은 호프 추출물을 포함하는 수면장애 예방 및 치료용 약학적 조성물에 대한 것이다.

[0015] 이하, 본 발명을 자세히 설명한다.

[0016] 호프

[0017] 본 발명의 호프는 일반적으로 통용되는 호프이다. 본 발명에서는 호프의 품종을 단일 품종으로 사용하거나 또는 둘 이상의 품종을 혼합하여 사용할 수 있다. 본 발명의 호프는 카스케이드(Cascade), 할러타우(Hallertau) 및 사즈(Saaz)로 구성되는 군으로부터 선택되는 하나 이상일 수 있으며, 바람직하게는 카스케이드이다.

[0018] 호프 추출물

[0019] 본 발명의 호프 추출물은 호프의 유기용매 추출물 또는 발효 호프의 유기용매 추출물일 수 있다.

[0020] 상기 유기용매는 물 또는 알코올일 수 있으며, 바람직하게는 물 또는 탄소 수 5 이하의 저가 알코올이고, 더욱 바람직하게는 물, 메탄올 또는 에탄올이고, 가장 바람직하게는 에탄올이다.

[0021] 상기 발효 호프는 호프에 유산균을 접종하여 발효시켜 제조할 수 있다. 상기 유산균은 락토바실러스(Lactobacillus), 락토코커스(Lactococcus), 류코노스톡(Leuconostoc), 페디오코커스(Pediococcus), 비피도박테리움(Bifidobacterium) 등이 될 수 있으며, 바람직하게는 락토바실러스 브레비스(Lactobacillus brevis)이나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0022] 예컨대, 상기 호프의 유기용매 추출물은 호프를 유기용매로 추출하여 제조할 수 있다. 또한 상기 발효 호프의

유기용매 추출물은, 예컨대, 호프를 유산균으로 발효시킨 후, 상기 유산균으로 발효된 호프를 유기용매로 추출하여 제조할 수 있다.

[0023] 귀오즙 추출물

[0024] 본 발명의 식품 조성물 및 약학적 조성물은 호프 추출물 외 귀오즙 추출물을 추가로 포함할 수 있다. 상기 귀오즙은 귀오즙의 뿌리 또는 근경을 이용할 수 있으며, 바람직하게는 귀오즙의 뿌리를 이용한다.

[0025] 상기 귀오즙 추출물은 귀오즙의 유기용매 추출물이다. 상기 유기용매는 물 또는 알코올일 수 있으며, 바람직하게는 물 또는 탄소 수 5 이하의 저가 알코올이고, 더욱 바람직하게는 물, 메탄올 또는 에탄올이고, 가장 바람직하게는 물이다.

[0026] 수면 촉진용 조성물

[0027] 본 발명은 호프 추출물을 포함하는 수면 촉진용 조성물에 대한 것이다. 상기 수면 촉진용 조성물은 잠드는 데 걸리는 시간의 단축능(즉, 수면 유도능, sleep latency), 수면 시간의 증진능 또는 숙면 시간의 증진능 등을 갖는다.

[0028] 수면장애 예방, 개선 또는 치료용 조성물

[0029] 본 발명은 호프 추출물을 포함하는 수면장애 예방, 개선 또는 치료용 조성물에 대한 것이다. 상기 수면장애는 충분한 수면 또는 숙면을 취하지 못하여 만성피로를 느끼거나 낮에 졸리거나 두통을 느끼는 등 일상 생활에 지장이 되는 것을 의미한다. 본 발명의 수면장애는 불면증 등이 될 수 있으며, 또한 잠이 쉽게 들지 못하거나 잠이 들더라도 얇게 잠이 들고 숙면을 취하지 못하는 경우 등을 가리킨다.

[0030] 식품 조성물

[0031] 본 발명은 호프 추출물 또는 호프 추출물/귀오즙 추출물을 포함하는 수면 촉진용 식품 조성물에 대한 것이다. 또한 본 발명은 호프 추출물 또는 호프 추출물/귀오즙 추출물을 포함하는 수면장애 예방 및 개선용 식품 조성물에 대한 것이다.

[0032] 상기 식품 조성물은 일반 식품, 건강보조식품, 건강기능식품, 기능성 식품, 운동 보조제 등이나 이에 제한되는 것은 아니며, 천연식품, 가공식품, 일반적인 식자재 등에 본 발명의 호프 추출물 또는 호프 추출물/귀오즙 추출물을 첨가한 것도 포함된다. 바람직하게는 본 발명의 식품 조성물은 수면 유도 식품, 숙면 유도 식품, 수면 촉진 식품 등이 될 수 있으며, 더욱 바람직하게는 건강기능식품, 기능성 식품 등이다.

[0033] 본 발명의 호프 추출물 또는 호프 추출물/귀오즙 추출물을 포함하는 식품 조성물은, 상기 호프 추출물 또는 호프 추출물/귀오즙 추출물을 그대로 첨가하거나 다른 식품 또는 식품 조성물과 함께 사용될 수 있으며, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다. 유효 성분의 혼합량은 그의 사용 목적(예방 또는 건강 유지 목적)에 따라 적합하게 결정될 수 있다. 일반적으로, 본 발명의 호프 추출물 또는 호프 추출물/귀오즙 추출물을 식품 또는 음료의 제조시에 원료에 대하여 0.01 내지 70.00 중량%, 바람직하게는 0.01 내지 30.00 중량%의 양으로 첨가할 수 있으며, 더욱 바람직하게는 0.01 내지 10.00 중량%의 양으로 첨가할 수 있다.

[0034] 상기 식품의 종류에는 특별한 제한은 없다. 상기 호프 추출물 또는 호프 추출물/귀오즙 추출물을 포함하는 식품 조성물은 정제, 경질 또는 연질 캡셀제, 액제, 현탁제 등과 같은 경구투여용 제제의 형태로 이용될 수 있으며, 이들 제제는 허용 가능한 통상의 담체, 예를 들어 경구투여용 제제의 경우에는 부형제, 결합제, 붕해제, 환

택제, 가용화제, 현탁화제, 보존제 또는 증량제 등을 사용하여 조제할 수 있다.

[0035] 상기 호프 추출물 또는 호프 추출물/쥐오줌풀 추출물을 첨가할 수 있는 식품의 예로는 육류, 소세지, 빵, 초코렛, 캔디류, 스낵류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류를 포함한 낙농제품, 각종 스프, 음료수, 차, 드링크제, 알콜 음료, 파우더 제제 및 비타민 복합제 등을 들 수 있으나 이들 종류의 식품으로 제한되는 것은 아니다.

[0036] 약학적 조성물

[0037] 본 발명은 호프 추출물 또는 호프 추출물/쥐오줌풀 추출물을 포함하는 수면장애 예방 및 치료용 약학적 조성물에 대한 것이다. 상기 약학적 조성물은 수면장애로 고통받는 환자에게 처방할 수 있다.

[0038] 본 발명의 약학적 조성물은 경구 또는 비경구로 투여가 가능하며 일반적인 의약품 제제의 형태로 사용될 수 있다. 바람직한 약제학적 제제는 정제, 경질 또는 연질 캡셀제, 액제, 현탁제 등과 같은 경구투여용 제제가 있으며 이들 약제학적 제제는 약제학적으로 허용 가능한 통상의 담체, 예를 들어 경구투여용 제제의 경우에는 부형제, 결합제, 붕해제, 활택제, 가용화제, 현탁화제, 보존제 또는 증량제 등을 사용하여 조제할 수 있다.

[0039] 본 발명의 약학적 조성물의 투여 용량은, 환자의 상태, 연령, 성별 및 합병증 등의 다양한 요인에 따라 전문가에 의해 결정될 수 있지만 일반적으로는 성인 1 kg 당 0.1 mg 내지 10 g, 바람직하게는 10 mg 내지 1 g의 용량으로 투여될 수 있다. 또, 단위 제형당 상기 약학적 조성물의 1일 용량 또는 이의 1/2, 1/3 또는 1/4의 용량이 함유되도록 하며, 하루 1 내지 6 회 투여될 수 있다. 그러나 건강 및 위생을 목적으로 하거나 또는 건강 조절을 목적으로 하는 장기간의 섭취의 경우에는 상기 양은 상기 범위 이하일 수 있으며, 유효성분은 안전성 면에서 아무런 문제가 없기 때문에 상기 범위 이상의 양으로도 사용될 수 있다.

[0040] 본 발명의 이점 및 특징, 그리고 그것들을 달성하는 방법은 첨부되는 도면과 함께 상세하게 후술되어 있는 실시예들을 참조하면 명확해질 것이다. 그러나, 본 발명은 이하에서 개시되는 실시예들에 한정되는 것이 아니라 서로 다른 다양한 형태로 구현될 것이며, 단지 본 실시예들은 본 발명의 개시가 완전하도록 하며, 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 발명의 범주를 완전하게 알려주기 위해 제공되는 것이며, 본 발명은 청구항의 범주에 의해 정의될 뿐이다.

[0041] <재료 및 방법>

[0042] 재료

[0043] 호프는 Cascade, Hallertau 및 Saaz의 3가지 품종을 사용하였으며, 쥐오줌풀은 아마존(Amazon.com)에서 구입하여 사용하였다. 그 외 분석용 시약은 일급 이상의 시약을 시중에서 구매하여 사용하였다.

[0044] 호프 추출물의 제조

[0045] 호프 추출물은 세계 각지에서 재배되는 대표적인 품종인 Cascade, Hallertau 및 Saaz를 이용하여 70% 에탄올로 환류추출하였다. 구체적으로는 호프 50 g에 70% 에탄올을 500 mL 가한 후 90 °C에서 4시간 환류추출하고, 상기 환류 추출액을 원심분리(2,800 g, 20 min)한 후 농축기를 이용하여 용매를 모두 휘발시켰다. 그 후 동결건조를 통해 호프 추출물을 획득하여 실험에 사용하였다.

[0046] 호프 추출물의 성분 분석

[0047] 호프 추출물의 총 당 함량은 페놀-황산법을 이용하여 측정하였으며, 시료를 5% 페놀 용액과 진한 황산으로 반응시킨 후 UV spectrophotometer(TECAN Infinite M200 systems INC., Seestrasse 103 CH-8708 Mannedorf

Switzerland)를 이용하여 파장 490 nm에서 흡광도를 측정하여 포도당(glucose)을 표준 시약으로 작성한 표준곡선으로부터 총당의 함량을 계산하였다.

[0048] 플라보노이드 함량의 측정은 DMACA (p-dimethylaminocinnamaldehyde)를 이용하여 측정하였다. 이는 0.1% DMACA를 1 N HCl이 들어있는 메탄올에 희석하여 DMACA 용액을 제조한 후 호프 추출물과 표준 시약 catechin을 각각 섞어 실온에서 10분간 방치한 후 640 nm에서 표준곡선 및 함량을 측정하였다.

[0049] 총 페놀 함량의 측정은 Folin-Denis법을 변형하여 실험하였다. 96 well plate에 시료와 Folin-Ciocalteu's phenol 시약을 넣고 혼합하였으며, 실온에서 3분 동안 반응시킨 후 포화 sodium carbonate 용액을 넣고 20분 동안 반응시킨 뒤, 반응용액을 750 nm에서 흡광도를 측정하였다. 호프 추출물의 페놀 함량은 gallic acid을 표준 시약으로 작성한 표준곡선으로부터 계산하였다.

[0050] 호프 발효물의 제조

[0051] 유산균으로 락토바실러스 브레비스 M-2(Lactobacillus brevis M-2)를 이용하고, 또한 Cascade 호프를 이용하여 호프 발효물을 제조하였다. 락토바실러스 브레비스 M-2는 MRS broth에 2% 접종하여 37℃ 배양기에 18시간 배양하여 준비하였다. 호프 발효물을 제조하기 위하여 Cascade 호프를 100 g씩 배양용기에 분취하였다. 이후 121℃에서 15분간 가압 멸균하고 실온으로 냉각시킨 다음 L. brevis 배양액을 5% (v/w)로 접종 한 후 37℃에서 5일간 발효하였다. 발효가 완료된 후 70% 에탄올을 5 배(부피 기준) 양으로 가하여 환류 추출 후 농축하였다. 농축한 호프 추출물은 동결 건조한 후 분쇄하여 냉동보관 하면서 실험에 필요한 시료로 사용하였다.

[0052] 초파리 배양

[0053] 하기 실험을 위하여 Bloomington Drosophila Stock Center(BDSC) 에서 제공받은 wild type의 Canton S 라인을 사용하였다. 어린 수컷 성체의 초파리를 24℃ 온도에서 12시간 간격(12:12LD) 으로 낮과 밤 상태를 조절한 환경에서 초파리 먹이(8% yeast, 10% sucrose, 5% corn meal and 1% agar)를 공급하여 2~5일간 체내의 일주기 리듬이 안정화시킨 후 실험을 진행하였다.

[0054] 초파리 운동능력 측정기(Drosophila Activity Monitor & Locomotor Activity Monitor)

[0055] 초파리의 운동 능력(Locomotor ability)을 측정하기 위하여 Drosophila Activity Monitor 2 및 Locomotor Activity Monitor(TriKinetics) 하드웨어와 DAMSystem(TriKinetics) 소프트웨어를 이용하여 각 그룹별 초파리의 운동 능력을 기록하였다. 대조군 초파리 시료는 증류수에 5% sucrose와 1% agar를 넣어 사용하는 sucrose-agar media를 표준시료로 이용하고, 실험군 초파리 시료는 표준시료에 호프 추출물 2, 5 그리고 10 mg/mL을 넣어 제조 후 사용하였다. Drosophila Activity Monitor(DAM) 와 Locomotor Activity Monitor(LAM) 의 원리는 다음과 같다. DAM system에서는 총 32개의 독립된 튜브에 한 마리씩 투입된 초파리가 튜브의 앞쪽과 뒤쪽으로 몇 차례 움직였는지 가운데 설치된 센서가 감지하여 기록하게 된다. 초파리의 수면유도를 관찰하기 위해 튜브 한쪽에 대조군 초파리 시료 및 실험군 초파리 시료를 제공하여, 24℃ 배양기에서 24시간 동안 추적측정을 수행하였다. 불빛 조절은 24시간 모두 밤 환경으로 설정하여 제공한 시료에 의한 체내의 일주기리듬 및 행동의 변화를 관찰하였다.

[0056] SD 래트 모델에서의 수면 구조 분석

[0057] 6주령의 SD 래트(200-250 g, 웅성)를 1 주일간 사육케이지 (20×26×13 cm)에 온도 22-24℃, 습도 60±5%가 유지되며 밤낮 주기(12:12LD) 가 자동 조절되는 실험실에서 순화 및 적응을 거친 후 뇌파(Electroencephalogram, EEG) 측정을 위해 전극 삽입 수술을 실시하였다. 실험동물 SD rat을 isoflurane (Troikaa Pharmaceuticals Ltd, Gujarat, India)로 호흡 마취시키고, 정위고정기(stereotaxic instrument)에 두부를 고정시켰다(도 1). 두부 피하 결합조직을 절개한 후 노출된 두개골의 bregma 봉합을 확인한 후 뇌정위적 지표로써 이용하였으며,

표면전극의 말단을 너 피질 표면에 위치하도록 미세 천공기를 사용하였다. 천공 부위에서의 출혈이 멈춘 후 전극을 삽입하였으며 치과용 시멘트(dental cement)로 고정시킨 후 피부를 봉합하였다(도 2). 수술부위의 소독 및 항생제 투여를 3일 동안 실시하여 수술로 인한 염증을 예방하였으며, 일주일간 회복기간으로 두며 행동, 몸무게, 식이상태를 확인하였다.

[0058] SD 래트들을 측정환경에 적응시키기 위하여 측정 4일 전부터 대조군에 사용하는 0.5% Saline용액을 경구투여한 후 레코딩 장치(transmitter)를 연결하여 본 실험과정에 순응하도록 유도하였으며, 기준기록(baseline recording)과 대조기록(control recording)을 먼저 실시한 후 수면속진 관련 기능성을 측정을 위한 실험기록(experimental recording)을 실시하였다. 호프 추출물 및 쥐오줌풀 추출물을 경구투여 후 5분간 안정화 시킨 다음 iox2(emka Technologies, Paris, France)를 이용하여 10:00부터 18:00까지 8시간동안 뇌전도(Electroencephalogram, EEG)를 측정하였다(도 3). EEG 샘플링 레이트(Sampling Rate)는 500 Hz로 설정하고 15 mm/sec으로 EEG는 0.1-25 Hz의 필터 영역을 설정하여 데이터를 기록하였다. 수면구조 분석은 FFT(fast Fourier transform) 알고리즘에 의해 수행 하였으며, ecgAUTO3 프로그램(Ver. 3.3, emka Technologies, Paris, France)을 이용하였다(도 4). 분석결과는 각성(Awake), 램수면(REM sleep, rapid eye movement, theta band: 6-15 Hz), 논램수면(NREM sleep, non-rapid eye movement, delta band: 0.5-3 Hz)으로 구분하여 나타내었다. 또한 두개골의 connector와 결합되어 있는 transmitter의 움직임을 측정하여 뇌전도와 비교하여 분석하였다.

[0059] 통계 처리

[0060] 실험에서 얻은 결과는 통계프로그램인 SPSS (SPSS Inc., Chicago, USA)를 사용하여, 3회 반복 분석한 평균값과 표준오차(Mean $\pm$ Standard error)를 계산하였다. 호프 추출물의 일반분석 측정값들의 차이는 $p < 0.05$ 수준에서 one-way ANOVA와 Turkey range test를 이용하여 유의성을 검증하였으며, 초파리 행동 분석과 뇌전도 분석은 실험군과 대조군의 평균값에 대한 p-value를 t-test로 구하여 유의성을 검증하였다.

[0061] <실험 결과>

[0062] <실험예 1> 호프 추출물의 일반분석

[0063] 호프 추출물의 일반 성분(즉, 총 당 함량, 플라보노이드, 폴리페놀 함량)의 함량을 측정하였다.

[0064]

[0065] 그 결과는 도 5와 같다. 구체적으로는 Cascade 호프 추출물의 총당은 $163.66 \pm 10.96 \mu\text{g/mL}$ 로 가장 낮은 함량을 보였으며, Hallertau 호프 추출물 및 Sazz 호프 추출물은 각각 $297.25 \pm 2.64 \mu\text{g/mL}$ 과 $310.59 \pm 14.80 \mu\text{g/mL}$ 로 높은 함량을 보였다.

[0066] 총 플라보노이드 함량은 역시 Sazz 호프 추출물이 $16.26 \pm 0.19 \mu\text{g/mL}$ 로 가장 높은 함량이 존재하였으며, 다음으로 Hallertau 호프 추출물($11.59 \pm 0.08 \mu\text{g/mL}$), Cascade 호프 추출물($3.68 \pm 0.08 \mu\text{g/mL}$) 순으로 낮은 함량을 보였다.

[0067] 총 폴리페놀 함량 역시 Sazz 호프 추출물($144.27 \pm 0.52 \mu\text{g/mL}$)이 가장 높은 함량으로 존재하였으며, 다음으로 Hallertau 호프 추출물($104.21 \pm 0.49 \mu\text{g/mL}$), Cascade 호프 추출물($75.58 \pm 0.05 \mu\text{g/mL}$)로 유의적으로 적은 함량이 존재하였다.

[0068] 그러므로 Sazz 호프 추출물의 총 당 함량, 총 플라보노이드 및 총 폴리페놀 함량이 가장 높았다.

[0069] <실험예 2> 호프 추출물의 수면활성 평가

[0070] 초파리 수면행동의 변화 측정

[0071] 호프의 품종에 따라 각각의 호프 추출물들을 2, 5, 10 mg/mL로 수크로스 agar(한천) 배지에 첨가하여 초파리의 수면행동의 변화를 분석하였다. 상기 초파리의 수면행동의 변화 분석에는 Actogram J 프로그램을 이용하였다.

대조군과 호프 추출물 실험군의 Actogram은 22:00시부터 시작하여 24시간 측정한 초파리의 행동의 변화를 나타내며, 5일간 측정한 수면행동의 변화를 모두 나타내었다. 초파리는 22:00부터 10:00까지 수면을 취하며 움직임이 적어지는 것을 확인할 수 있으며, 대조군 초파리의 행동의 변화를 통하여 일주기 리듬이 형성되어 있음을 확인하였다(도 6). 모든 호프 품종에서 공통적으로, 호프 추출물 2 mg/mL을 섭취한 초파리 실험군에서는 대조군보다 밤과 낮의 행동의 변화가 높아진 것으로 확인되었으며, Saaz 호프 추출물을 섭취한 초파리 실험군에서는 농도와 관계없이 5일 동안 가장 많은 행동의 변화를 나타내었다(도 6). 밤시간의 초파리 행동의 합은 22:00부터 10:00로 설정하였으며, 낮시간의 초파리의 행동은 합은 10:00부터 22:00로 설정하여 그래프로 나타내었다. 호프 Cascade 추출물 10 mg/mL을 섭취한 초파리 실험군에서 밤시간의 초파리 행동의 변화가 유의적으로 적게 나타나는 것을 확인하였으며, 즉, 호프 Cascade 추출물의 10 mg/mL에서 수면유도 활성을 확인할 수 있었다(도 7).

[0072] 낮시간에서는 Hallertau 호프 추출물 5 mg/mL에서 유의적으로 행동의 변화가 적게 나타내었지만, 수면유도 물질 섭취에 따른 행동의 감소는 밤시간에 존재해야 하며 밤시간의 행동의 감소가 유의적으로 차이가 없으므로 수면유도 물질이라는 함유되어 있다고 판단하기 어려웠다. 이를 통하여 호프의 여러 품종들 중 Cascade 호프 추출물에 수면유도 물질이 함유되어 있을 것으로 확인되었으며, 그 함량은 10 mg/mL 이상이 필요하다는 사실을 확인하였다.

[0073] <실험예 3> Cascade 호프의 발효물의 성분 분석

[0074] 상기 실험예 2에서 초파리 locomotor test를 통해 수면 촉진 활성이 있는 것으로 확인된 Cascade 호프의 유산균 발효 전과 후의 성분 변화를 측정하였다.

[0075] 그 결과, 총당의 경우 발효 전 163.2 $\mu\text{g/mL}$ 의 함량을 보인 반면 발효 후 104.3 $\mu\text{g/mL}$ 으로 감소하였으며, 활성 성분으로 알려진 플라보노이드들과 폴리페놀들의 함량은 발효 전 각각 16.26 과 144.27 $\mu\text{g/mL}$ 이었으나 발효 후 21.3과 179.3 $\mu\text{g/mL}$ 으로 증가하였다(도 8).

[0076] 그러므로 발효를 통해 활성 성분으로 추정되는 성분들이 증가하는 것으로 확인되었다.

[0077] <실험예 4> 귀오줌폴의 수면 촉진 활성 평가

[0078] 귀오줌폴(Valerian)의 뿌리를 10배 중량의 열수로 추출하여, 귀오줌폴 열수 추출물(이하, 귀오줌폴 추출물이라 한다)을 수득하였다. 그리고 상기 귀오줌폴 추출물 2, 5, 10, 20 mg/mL을 수크로스 아가 배지에 첨가하여 초파리의 수면행동의 변화를 분석하다. 이 때 상기 분석에는 ActogramJ 프로그램을 이용하였다.

[0079] 그 결과는 도 9와 같다. 대조군과 귀오줌폴 추출물 실험군의 Actogram은 22:00부터 시작하여 24시간 측정한 초파리의 행동의 변화를 나타내며, 5일간 측정한 수면행동의 변화를 모두 나타내었다. 대조군 초파리의 행동의 변화를 통하여 일주기 리듬이 형성되어 있음을 확인하였지만, 귀오줌폴 추출물을 이용한 실험군에서는 귀오줌폴 추출물의 특유의 향과 맛에 의하여 초파리의 행동의 변화가 일주기리듬과는 다른 형태가 나타내었다. 하지만 귀오줌폴 추출물의 함량이 높아질수록 밤과 낮 시간의 초파리의 행동이 적어짐이 확인되었으며, 이를 통하여 향과 맛에 따라 거부 반응이 존재함에도 불구하고 함량이 높아 섭취되는 양이 많아질수록 수면시간의 연장 또는 진정 효과를 나타내었다. 특히 가장 높은 농도인 20 mg/mL에서 밤과 낮 시간 모두 행동의 총합이 유의적으로 감소되었다(도 10).

[0080] <실험예 5> 발효 호프 추출물 및 귀오줌폴 혼합 사용에 따른 수면 촉진 활성 평가

[0081] 상기 실험예 2 및 실험예 4에서 호프 및 귀오줌폴 추출물에 대한 수면 효과를 확인하였다. 특히 호프 품종 중 Cascade 호프 추출물의 수면활성이 우수하였으므로, 이 후 실험에서는 수면활성 증진을 위해 Cascade 호프 유산균 발효물을 제조하여 이용하였으며, 발효 전후의 Cascade 호프 추출물과 귀오줌폴 추출물을 혼합하여 수면 증

진 활성을 평가하였다.

[0082] <5-1> 초파리 모델을 이용한 호프추출물/ 쥐오줌풀 추출물의 혼합 사용시 수면 증진능 평가

[0083] 초파리 행동분석을 통하여 호프 추출물과 쥐오줌풀 추출물의 비율에 따른 행동의 변화를 분석, 측정하였다. 이때, Cascade 호프 발효 전/후 추출물 6, 12, 18 mg/mL 및 쥐오줌풀 추출물 50 mg/mL을 수크로스 아가 배지에 첨가하여 초파리의 수면행동의 변화를 분석하였으며, 상기 분석에는 ActogramJ 프로그램을 이용하였다.

[0084] 그 결과는 도 11과 같다. 대조군과 호프 Cascade 추출물 및 쥐오줌풀 추출물의 혼합물을 실험한 실험군의 Actogram은 22:00부터 시작하여 24시간 동안 측정한 초파리의 행동의 변화를 나타내며, 3일간 측정한 수면행동의 변화를 모두 나타내었다. 대조군 초파리의 행동의 변화를 통하여 일주기 리듬이 형성되어 있음을 확인하였지만, 호프 Cascade 추출물 및 쥐오줌풀 추출물 혼합물 실험군에서는 특유의 향과 맛에 의하여 첫째날 밤시간의 행동이 줄어들지 않았으며, 낮시간부터 행동이 유의적으로 감소하였다.

[0085] 밤과 낮 시간의 행동 변화의 합을 기준으로 볼 때, 낮 시간대 호프 Cascade 추출물 18 mg/mL 과 쥐오줌풀 추출물 50 mg/mL의 혼합물을 제외한 모든 그룹에서 유의적($p < 0.01$)으로 행동 변화의 합이 감소하는 것이 확인되었다.

[0086] 밤시간의 행동 변화의 합에서는 유의적인 차이는 없었지만, 첫 째날을 제외하고는 대조군에 비교하여 행동의 변화가 감소하였으며 이를 통해 두 추출물의 혼합이 수면을 유도하는 것을 확인하였다. 또한 발효 전 호프 추출물에 비하여 발효 후의 호프 추출물의 수면 유도 효과가 큰 것을 확인하였다. 아울러, 발효 전과 발효 후의 호프 Cascade 추출물 12 mg/mL 과 쥐오줌풀 추출물 50 mg/mL의 혼합물에서 수면유도 효과가 가장 높은 것을 확인하였다. 특히 발효 후의 호프 추출물 첨가시 locomotor activity가 발효 전에 비해 유의적인 감소를 보였다. 그러므로, 발효 후의 호프 추출물과 쥐오줌풀 추출물을 혼합하여 사용할 때 수면 촉진 활성이 큰 것으로 확인하였다(도 12).

[0087] <5-2> SD rat 모델을 이용한 호프 추출물/쥐오줌풀 추출물의 혼합 사용시 수면 증진능 평가

[0088] 초파리 행동 분석을 통하여 확인된, 발효 전/후 Cascade 호프 추출물 12 mg/mL와 쥐오줌풀 추출물 50 mg/mL 혼합물의 수면유도 효과를 SD 래트를 이용하여 다시 한 번 분석하였다. 상기 분석은 SD 래트를 이용하여, 뇌파(Electroencephalogram, EEG) 측정을 실시함으로써 수행하였다. 대조군은 식염수를 경구 투여하였고 실험군은 발효 전/후 Cascade 호프 추출물 12 mg/mL과 쥐오줌풀 추출물 50 mg/mL의 혼합물을 경구 투여하여 10:00부터 18:00까지 총 8시간의 뇌파를 측정하였다. 실험동물 SD 래트는 대조군 및 실험군 각각 4마리를 사용하였으며, 3일 동안 경구투여를 하여 수면 시간의 증진과 수면의 질의 변화를 측정하였다.

[0089] 그 결과, Cascade 호프 추출물 12 mg/mL과 쥐오줌풀 추출물 50 mg/mL을 경구 투여한 1일과 2일 동안 실험군과 대조군에서의 총수면 시간과 각성 시간 모두 유의적인 차이가 없었으며, 수면의 질을 측정하는 NREM 수면과 REM 수면에서도 유의적인 차이가 없었다(도 13 및 도 14).

[0090] 그러나 둘째 날부터 수면의 질을 나타내는 NREM 수면이 증가하는 경향을 나타내었다. 특히 Cascade 발효 호프 추출물을 첨가한 경우 쥐오줌풀 추출물을 단독 투여한 경우보다 NREM 수면이 유의적으로 증가하였다(도 14). 또한 총 수면 시간도 증가는 경향을 보였으나 쥐오줌풀 추출물 첨가군과는 유의적인 차이는 없었다.

[0091] 경구 투여한지 셋째 날에는 발효 전/후의 호프추출물 첨가에 따라 수면시간의 연장의 경향을 보였으며, 특히 발효 후 호프 추출물의 첨가 경우 쥐오줌풀 추출물을 단독 사용한 경우보다 총 수면 시간이 연장되었다. 그러나 발효 전 호프 추출물은 총 수면시간이 늘어나는 경향은 보였으나 쥐오줌풀 추출물을 단독 사용한 경우와 유의적인 차이가 없었다. 그러나 발효 전/후의 호프 추출물은 양자 모두 쥐오줌풀 추출물을 단독 사용 시보다 NREM시간이 유의적으로 증가하는 것을 나타냈다(도 15).

[0092] 이상의 결과에 의하면 호프 12 mg/mL과 쥐오줌풀 추출물 50 mg/mL을 혼합하여 사용할 경우 2일 차부터 수면 시

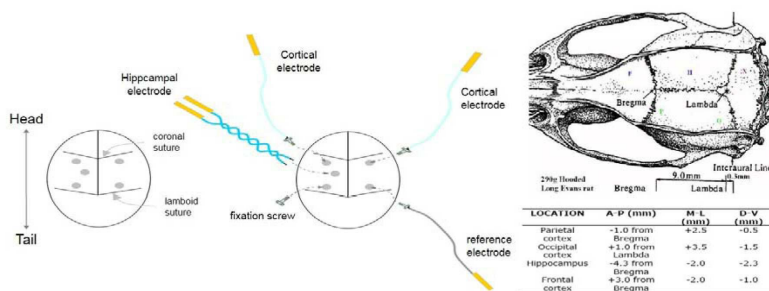
간이 증가하는 경향을 보였다. 또한 3일째 되는 날 발효 전과 발효 후의 호프 추출물을 투여 시 NREM이 증가함에 따라 숙면을 취할 수 있는 시간이 증감하였고, 이에 따라 수면의 질이 증가하는 효과를 기대할 수 있었다. 또한 발효 호프 추출물을 쥐오줌풀 추출물과 함께 사용시 수면시간의 증가와 더불어 NREM이 증가함에 따라 수면의 질도 증가하는 것을 알 수 있었다.

도면

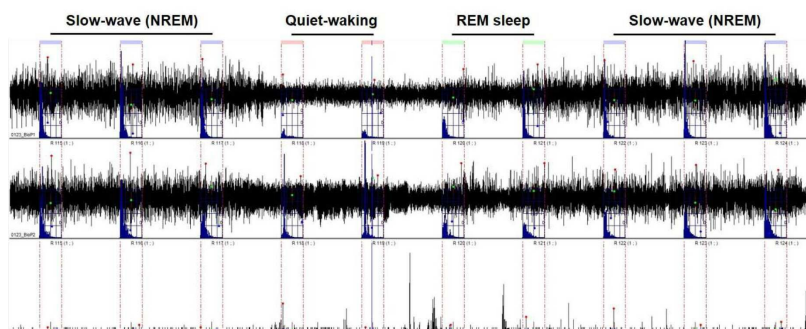
도면1



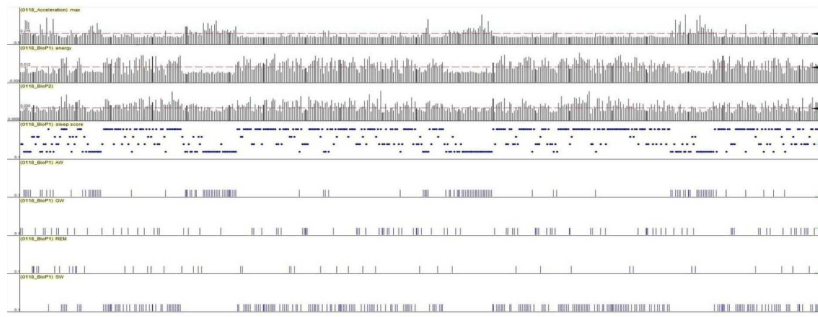
도면2



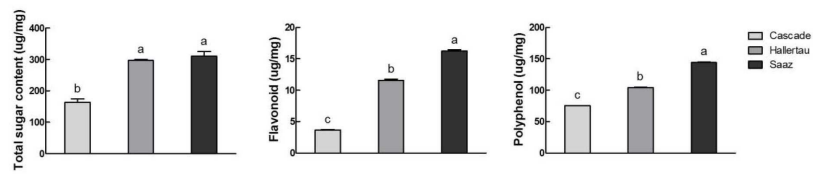
도면3



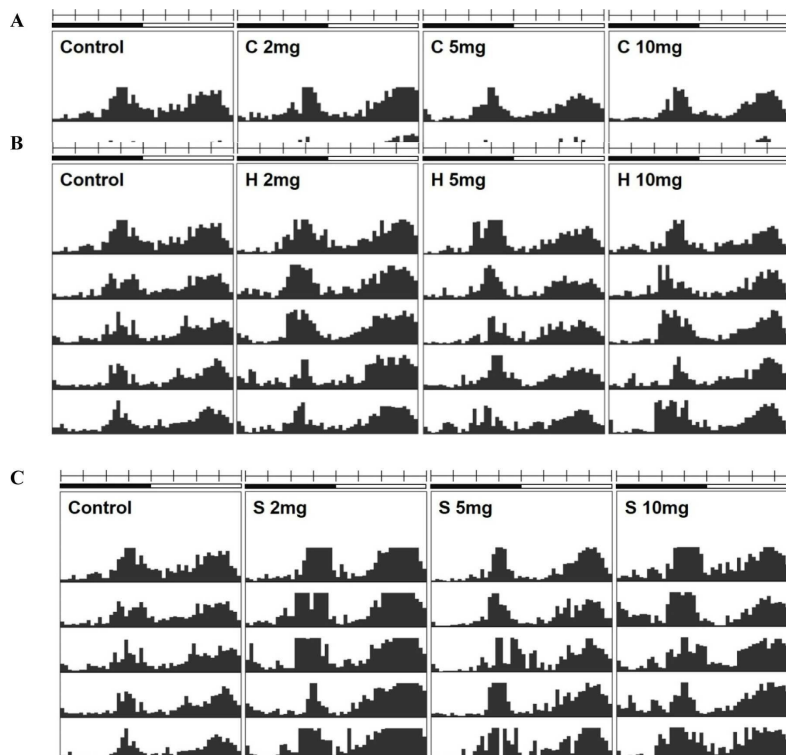
도면4



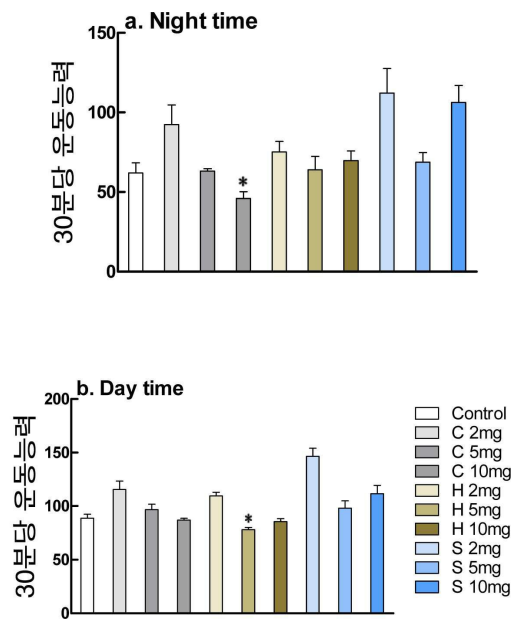
도면5



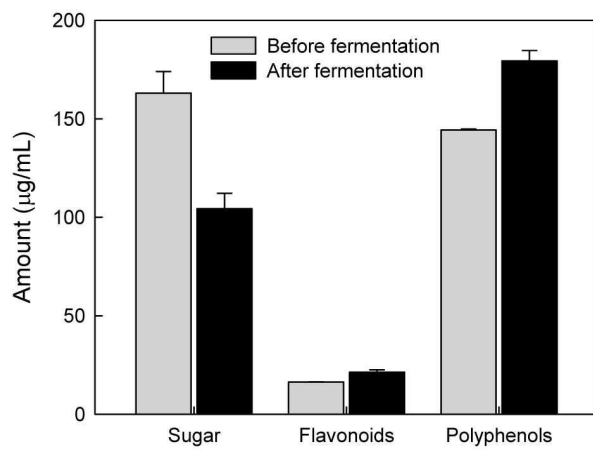
도면6



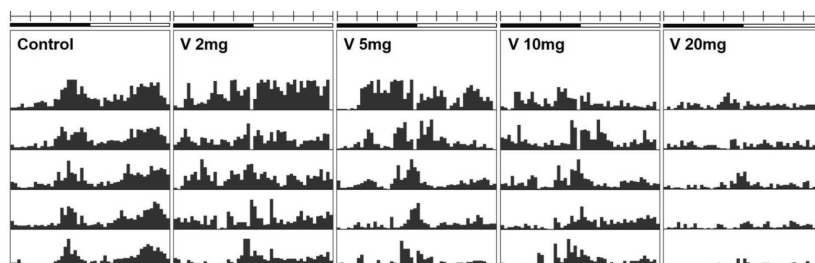
도면7



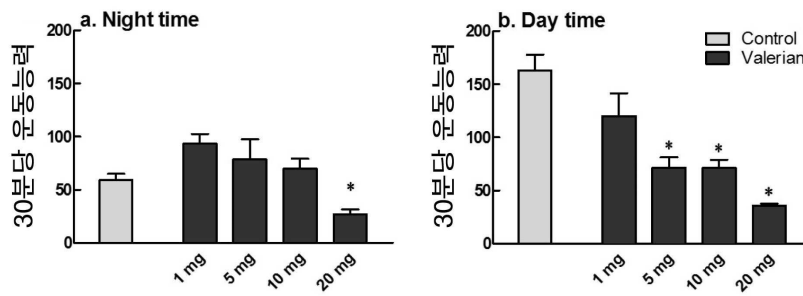
도면8



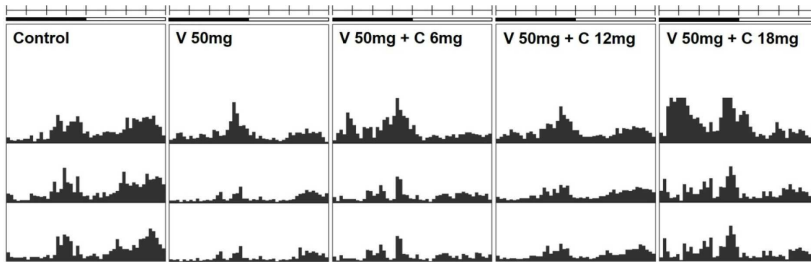
도면9



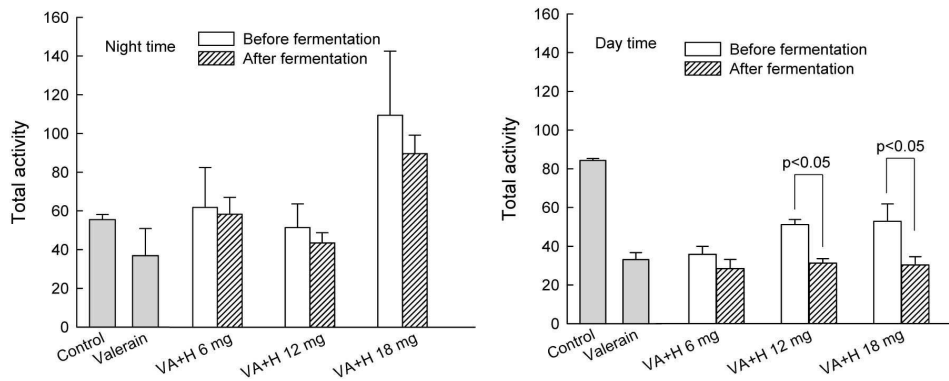
도면10



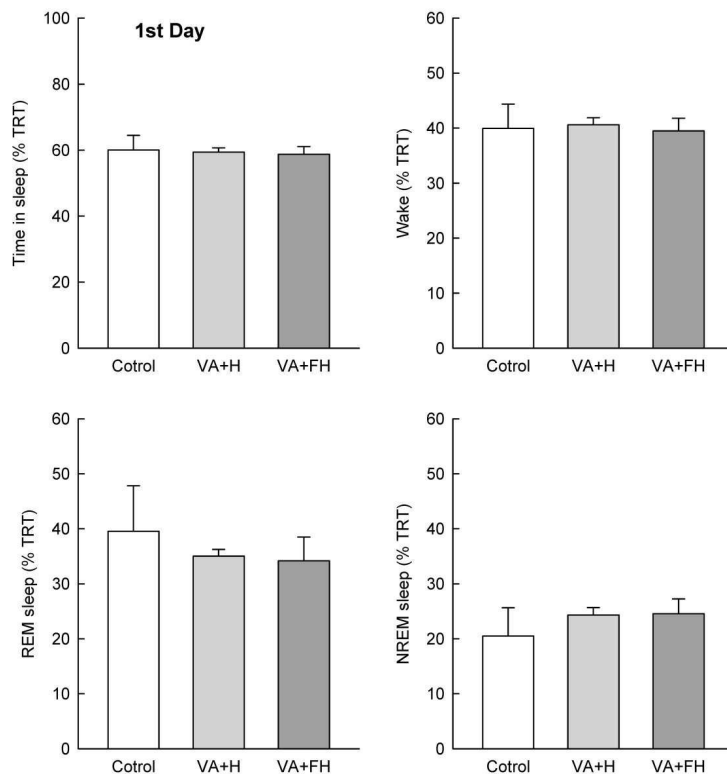
도면11



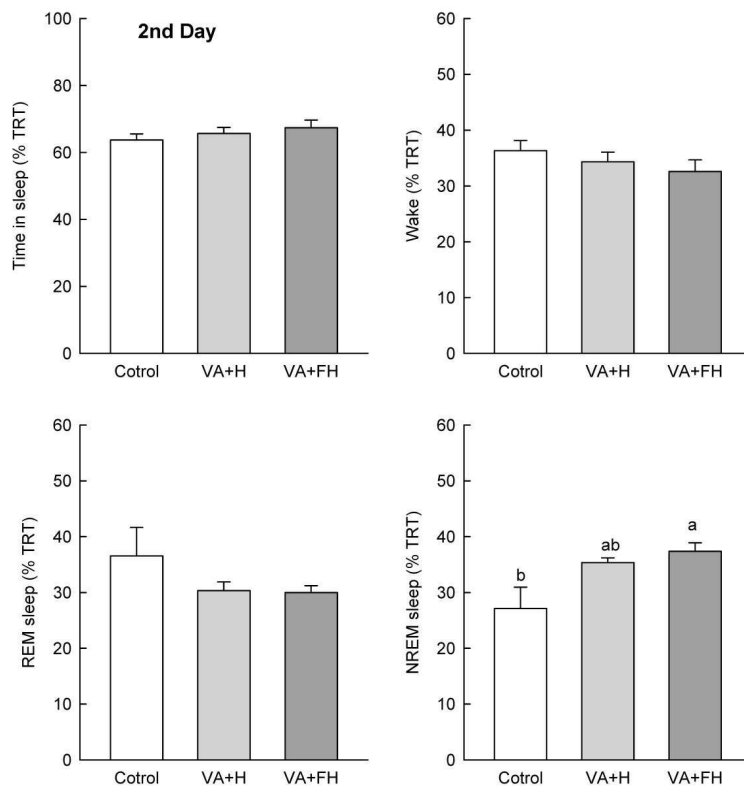
도면12



도면13



도면14



도면15

