



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2015-0145440

(43) 공개일자 2015년12월30일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 36/48 (2006.01) A61K 35/74 (2015.01)

A61P 27/14 (2006.01) A61P 29/00 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2014-0074841

(22) 출원일자 2014년06월19일

심사청구일자 2014년06월19일

(71) 출원인

농업회사법인(주)산들촌

전라남도 담양군 담양읍 예코길 11-9

경희대학교 산학협력단

경기도 용인시 기흥구 덕영대로 1732 (서천동, 경희대학교 국제캠퍼스내)

(72) 발명자

이정민

경기도 용인시 기흥구 흥덕중앙로 105번길 16

1009동 401호

김옥경

광주광역시 북구 안산로 76 102동 401호

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

신동인

전체 청구항 수 : 총 11 항

(54) 발명의 명칭 발효 작두콩 추출물을 유효성분으로 함유하는 염증 또는 알레르기 질환의 예방 및 치료용 조성물

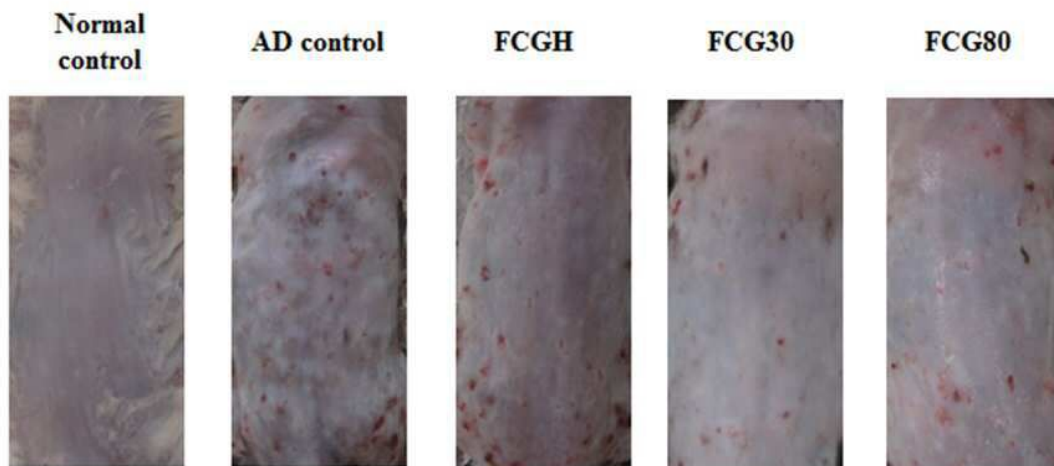
(57) 요약

본 발명은 발효작두콩 추출물을 유효성분으로 포함하는 염증 또는 알레르기 질환의 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다. 본 발명에 따른 본 발명에 따른 발효작두콩 추출물은 아토피유발 동물에서의 식이효율 및 장기 무게에 미치는 영향실험 (실험예 1), 아토피유발 동물에서의 피부 형태학적 변화 관찰실험 (실험예 2), 아토피유발

(뒷면에 계속)

대표도 - 도1

NC/Nga mice



동물에서의 가려움에 대한 행동학적 분석실험 (실험예 3), 아토피유발 동물에서의 경표피 수분 증발량에 미치는 영향 실험 (실험예 4), 등을 통하여 강력한 아토피 피부치료 및 개선효과를 확인하였고, 아토피유발 동물에서의 비장세포 배양 및 T세포 및 B세포 증식능에 미치는 영향 실험 (실험예 5), 아토피유발 동물에서의 Th1 type cytokines인 IL-2와 IFN- γ 등의 시토킨 생성수준에 미치는 영향 실험 (실험예 6), 아토피유발 동물에서의 혈중 면역 글로불린들인 IgG2a, IgG1과 IgE 수준에 미치는 영향 실험 (실험예 7), 및 아토피유발 동물에서의 혈중 히스타민 수준에 미치는 영향 실험 (실험예 8) 등의 동물 모델실험 등을 통하여 염증 및 알러지 질환, 특히, 아토피 피부염 및 알레르기성 피부염에 탁월한 효능이 있음을 확인되어 염증 또는 알러지 질환의 예방 또는 치료용 약학조성물, 건강기능식품 또는 건강보조식품으로 유용하다.

(72) 발명자

남다운

서울특별시 노원구 동일로 1356 404동 709호

차민석

전라남도 담양군 담양읍 예코길 11-9

김진영

광주광역시 서구 화정로 96 중흥광명아파트 105동 1501호

전우진

광주광역시 북구 설죽로 595 롯데아파트 106동 1703호

유양희

광주광역시 북구 호동로 100 현대A 103-1503

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 113022-02-1-HD030

부처명 농림축산식품부

연구관리전문기관 농림수산식품기술기획평가원

연구사업명 고부가가치기술개발사업

연구과제명 친환경 작두콩 소재를 활용한 에너지증진 및 피부과민반응개선 소재개발과 제품화

기 여 율 1/1

주관기관 농업회사법인 (주)산들촌

연구기간 2013.07.16 ~ 2015.07.15

명세서

청구범위

청구항 1

발효작두콩 추출물을 유효성분으로 포함하는 염증 또는 알레르기 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 2

제 1항에 있어서,

상기 발효작두콩은 건조 상태의 황국균(*Aspergillus* 속 곰팡이)을 건조 및 멸균 단계를 거친 작두콩 시료에 황국 균주를 분말대비 0.1~20%(v/v%)로 접종하고, 발효 온도 1~50℃에서 수분함유 상대습도 2090%로, 발효시간 1시간 내지 1주일 동안 발효하고 멸균한 후 건조하고 분말화하는 단계를 포함하는 공정을 통하여 수득한 발효작두콩임을 특징으로 하는 약학 조성물.

청구항 3

제 1항에 있어서,

상기 발효 작두콩은 한국산, 미얀마산, 필리핀산, 태국산, 인도네시아산, 인도산, 일본산, 중국산 등의 수입산임을 특징으로 하는 약학 조성물.

청구항 4

제 1항에 있어서,

상기 추출물은 물, 주정, 메탄올, 에탄올, 부탄올 등의 저급 알콜 또는 이들의 혼합용매에 가용한 추출물인 약학 조성물.

청구항 5

제 1항에 있어서,

상기 염증은 결막염, 치주염, 비염, 중이염, 인후염, 편도염, 폐렴, 위궤양, 위염, 크론병, 대장염, 치질, 통풍, 강직성 척추염, 류마티스 열, 루푸스, 섬유근통 (fibromyalgia), 건선관절염, 골관절염, 류마티스관절염, 건관절주위염, 건염, 건초염, 건주위염, 근육염, 간염, 방광염, 신장염, 쇼그렌 증후군(sjogren's syndrome), 다발성 경화증, 및 급성 및 만성 염증 질환으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 질환인 약학 조성물.

청구항 6

제 1항에 있어서,

상기 알레르기는 과민증, 알러지성 비염, 천식, 알러지성 결막염, 알러지성 피부염, 아토피성 피부염, 접촉성 피부염, 두드러기, 곤충 알러지, 식품알러지 또는 약품 알러지, 바람직하게는 알러지성 비염, 천식, 알러지성 피부염, 아토피성 피부염, 접촉성 피부염, 두드러기, 식품 알러지 또는 약품 알러지로부터 선택되는 질환인 약학 조성물.

청구항 7

발효작두콩 추출물을 유효성분으로 포함하는 염증 또는 알레르기 질환의 예방 또는 개선을 위한 건강기능식품.

청구항 8

제 7항에 있어서,

상기 건강기능식품은 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 환제, 현탁액, 에멀전, 시럽 등의 약학 투여형태 또는 티백

제, 침출차, 건강 음료 등의 형태인 건강기능식품.

청구항 9

염증 또는 알레르기 질환의 예방 및 개선효과를 갖는 발효작두콩 추출물을 유효성분으로 함유하는 건강보조식품.

청구항 10

염증 또는 알레르기 질환의 예방 및 개선효과를 갖는 발효작두콩 추출물을 유효성분으로 함유하는 식품.

청구항 11

염증 또는 알레르기 질환의 예방 및 개선효과를 갖는 발효작두콩 추출물을 유효성분으로 함유하는 식품첨가물.

발명의 설명

기술 분야

본 발명은 발효작두콩 추출물을 유효성분으로 함유하는 염증 또는 알레르기 질환의 예방 및 치료용 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[문헌 1] Robert C. & Kupper T. S Inflammatory skin disease, T cells, and immune surveillance. N Engl. J. Med 341, 1817-1828, 1999

[문헌 2] Hwang, S. T. Mechanisms of T cell homing to skin. Adv. Dermatol. 17, 211-241, 2001

[문헌 3] Akidis, C.A et al., T cell and T cell derived cytokines as pathologic factors in the non-allergic form of atopic dermatitis J Invest Dermatol 113, 628-634, 1999

[문헌 4] Leung D. Y. & Bieber, T. Atopic dermatitis Lancet 361, 151-160, 2003

[문헌 5] Dillon S. R et al., Interleukin 31, a cytokine produced by activated T cells, induces dermatitis in mice. Nat Immunol. 5:752-759, 2004

[문헌 6] Dieveu C. et al., GPL, a novel cytokine receptor related GP130 and leukemia inhibitory factor receptor. J Biol Chem. 278, 49850-49859, 2003

[문헌 7] Neis M.M et al., Enhanced expression levels of IL-31 correlated with IL-4 and IL-31 in atopic and allergic contact dermatitis, J Allergy Clin Immunol 118:930-937, 2006

[문헌 8] Matsuda, H et al., Development of atopic dermatitis like skin lesions with IgE hyperproduction in NC/Nga mice. Int Immunol. 9, 461-466, 1997

[문헌 9] Takaoka, A., Arai, I et al., Involvement of IL-31 on scratching behavior in NC/Nga mice with atopic like dermatitis. Exp Dermatol 15:161, 2006

[문헌 10] Cheung P.F et al., Activation of human eosinophil and epidermal keratinocytes by Th2 cytokine IL-31: Implication for the immunopathogenesis of atopic dermatitis. Int Immunol 22(6):453-467, 2010

[문헌 11] Asnis L.A et al., Cutaneous reaction to recombinant cytokine therapy J Am Acad Dermatol 24:915-926, 1995

[문헌 12] Matsuda H et al., Development of atopic dermatitis-like skin lesion with IgE hyperproduction in NC/Nga mice. Int Immunol. 9(3):461-466, 1997

[문헌 13] Ha H et al., Artemisia capillaris inhibits atopic dermatitis-like skin lesions in Dermatophagoides farinae-sensitized Nc/Nga mice. BMC Complement Altern Med. 14:14:100, 2014

[문헌 14] Kim JP et al., Chemical Properties and DPPH Radical Scavenging Ability of Sword Bean

(*Canavalia gladiata*) Extract, Korean J. Food sci. Technol. 44:441-446, 2012

- [0016] [문헌 15] Joo SJ et al., Characteristics of yogurt prepared with 'Jinpum' bean and sword bean (*Canavalia gladiata*), Korean J. Postharv. Sci. Technol., 8:308-312, 2001
- [0017] [문헌 16] Cho YS et al., Chemical components in different parts of Korean sword bean (*Canavalia gladiata*). Korean J. Postharv. Sci. Technol., 6:475-480, 1999
- [0018] [문헌 17] 한국특허등록 제 10-0563329호
- [0019] [문헌 18] Seino S et al., Atopic dermatitis causes lipid accumulation in the liver of NC/Nga mouse. J Clin Biochem Nutr. 50(2):152-7, 2012;
- [0020] [문헌 19] Nam Y et al., Inhibitory effects of polysaccharide-rich extract of Phragmites rhizoma on atopic dermatitis-like skin lesions in NC/Nga mice. Life Sci. 2;92(14-16):866-872, 2013
- [0021] [문헌 20] Rittie L et al., UV-light-induced signal cascades and skin aging. Ageing research reviews 1: 705-720, 2002;
- [0022] [문헌 21] Yanaba K et al., CD19 expression in B cells regulates atopic dermatitis in a mouse model. Am J Pathol. 182(6):2214-2222, 2013;
- [0023] [문헌 22] Grewe M et al., A role for Th1 and Th2 cells in the immunopathogenesis of atopic dermatitis. Immunol Today. 19(8):359-61, 1998;
- [0024] [문헌 23] Sumimoto S et al., Increased plasma tumour necrosis factor-alpha concentration in atopic dermatitis. Arch Dis Child. 67(3):277-279, 1992
- [0025] [문헌 24] Yanaba K et al., CD19 expression in B cells regulates atopic dermatitis in a mouse model. Am J Pathol. 182(6):2214-2222, 2013
- [0026] [문헌 25] Lee TY et al., Oral administration of poly-γ-glutamate ameliorates atopic dermatitis in Nc/Nga mice by suppressing Th2-biased immune response and production of IL-17A. J Invest Dermatol. 134(3):704-701, 2014
- [0027] [문헌 26] Lee TY et al., Oral administration of poly-γ-glutamate ameliorates atopic dermatitis in Nc/Nga mice by suppressing Th2-biased immune response and production of IL-17A. J Invest Dermatol. 134(3):704-701, 2014

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0028] 본 발명은 발효작두콩 추출물을 유효성분으로 함유하는 알러지 질환의 예방 및 치료용 약학조성물 및 건강기능 식품에 관한 것이다.
- [0029] 일반적으로 염증 반응은 생체의 세포나 조직에 어떠한 기질적 변화를 가져오는 침습이 가해질 때 그 손상부위를 수복 재생하려고 하는 생체의 방어 반응과정이다. 따라서 이러한 일련의 반응에는 국소의 혈관, 체액의 각종 조직세포, 면역관련 세포 등이 포함된다. 최근 분자생물학의 발달과 더불어 염증성 질환이 사이토카인(cytokine)이라는 분자 수준에서의 이해가 시도되고 있으며, 이러한 질환에 영향을 주는 인자들도 하나씩 규명되고 있다.
- [0030] 알레르기 반응은 그 반응 형태에 의해 I형, II형, III형 및 IV형의 4 가지 유형으로 분류될 수 있고, 또는 항원에 의한 재감작(感作) 후 발증까지의 시간에 의해서 I형, II형 및 III형 알레르기는 즉시형 알레르기라고 불리며, IV형 알레르기는 지연형 알레르기로 분류될 수 있다.
- [0031] 이 중, I형 알레르기는 IgE 항체가 관여하는 반응으로서, 아나필락시형 알레르기라고 불리우며, 여기에는 기관지 천식, 아토피성 질환(피부염, 장염 등), 화분증 등의 알레르기성 비염, 알레르기성 결막염, 음식물 알레르기 등이 포함된다.
- [0032] 외부로부터의 자극과 항원에 대항하기 위하여 피부에는 다양한 면역세포가 존재하며 서로간의 복잡한 네트워크

를 형성하며 항상성을 유지한다 (Robert C. & Kupper T. S Inflammatory skin disease, T cells, and immune surveillance. N Engl. J. Med 341, 1817-1828, 1999). 상피조직은 주로 케라티노사이트로 구성되어있고 랑거한스 세포, T 세포와 대식 세포가 존재한다 (Hwang, S. T. Mechanisms of T cell homing to skin. Adv. Dermatol. 17, 211-241, 2001). 대부분의 피부질환은 면역 세포에 의한 염증 반응을 특징으로 하며, 가려움, 부종, 홍반, 습진, 비늘화와 같은 임상 증상을 동반한다. 항원제시세포가 외부로부터 침입한 항원을 인지하면 화학유주인자가 분비되고 호산구와 비만세포가 유입되며, T 세포가 활성화되어 손상 조직으로 모여든다. 활성화된 T 세포로부터 분비되는 특정 사이토카인들이 과 발현되는 것은 피부염의 병리인자로서 작용한다는 것이 알려져 있다 (Akidis, C.A et al., T cell and T cell derived cytokines as pathologic factors in the non-allergic form of atopic dermatitis J Invest Dermatol 113, 628-634, 1999). 이들은 가려움을 유발하고 염증 세포의 유입을 증가시켜 아토피성 피부염, 접촉성 피부염뿐만 아니라 건선과 같은 알러지성 혹은 비알러지성 피부 질환을 일으킨다 (Leung DY et al., Atopic dermatitis Lancet 361, 151-160, 2003). IL-31은 활성화된 T 세포 (Th2 세포에서 더 많이 발현됨) 에서 생산되는데 IL-6 사이토카인 가족 (family)에 속한다 (Dillon S. R et al., Interleukin 31, a cytokine produced by activated T cells, induces dermatitis in mice. Nat Immunol. 5:752-759, 2004). IL-31수용체는 gp-130수용체 (GPL, or IL-31RA) 와 oncostatin M receptor (OSMR)로 구성되며, 상피세포와 케라티노사이트에 상시 존재한다 (Dieveu C. et al., GPL, a novel cytokine receptor related GP130 and leukemia inhibitory factor receptor. J boil Chem. 278, 49850-49859, 2003). 아토피 피부염 환자의 피부조직에서는 IL-31의 발현이 현저히 증가되어 있으며 IL-4 와 IL-13 같은 Th2 사이토카인 증가를 유도한다고 여겨진다 (Neis M.M et al., Enhanced expression levels of IL-31 correlated with IL-4 and IL-13 in atopic and allergic contact dermatitis, J Allergy Clin Immunol 118:930-937, 2006) 이들 Th2 사이토카인은 B 세포에 작용하여 IgE의 생산을 증가 시킬 수 있으며, IgE는 비만세포에 존재하는 수용체에 결합하여 히스타민등의 유리를 매개 함으로서 염증 반응과 가려움증을 일으킨다 (Matsuda, H et al., Development of atopic dermatitis like skin lesions with IgE hyperproduction in NC/Nga mice. Int Immunol. 9, 461-466, 1997). 더불어 아토피 피부염 환자의 상피와 케라티노사이트, 환자에서 분리된 대식세포에서 IL-31수용체의 발현이 증가한다고 알려졌다. 또한 IL-31을 생쥐의 피부에 주입하거나 IL-31을 계속 발현하는 transgenic 생쥐는 심한 가려움증을 나타내며 호산구, 비만 세포의 피부 조직으로의 현저한 유입이 관찰되는바, 피부염을 심화시키는 주요 병리 인자임을 알 수 있다 (Takaoka, A et al., Involvement of IL-31 on scratching behavior in NC/Nga mice with atopic like dermatitis. Exp Dermatol 15:161, 2006; Cheung P.F et al., Activation of human eosinophil and epidermal keratinocytes by Th2 cytokine IL-31: Implication for the immunopathogenesis of atopic dermatitis. Int Immunol 22(6):453-467, 2010). 한편 T 세포로부터 분비되는 IL-2은 T 세포의 증식을 자극하고 활성화시킨다. IL-2로 치료 받는 암환자의 경우 심한 피부 소양증을 나타내며, 피부 조직의 부종, 홍반, 괴사, 두드러기, 수포등을 형성한다는 것이 알려져 있다 (Asnis L.A et al., Cutaneous reaction to recombinant cytokine therapy J Am Acad Dermatol 24:915-926, 1995).

[0033] 아토피피부염은 환경적인 요인과 유전적인 요인이 모두 관여하는 복합적인 만성적인 염증성 질환으로 피부과민 반응 습진이라고도 한다. 가려움, 홍반, 피부균열, 염증진행 등의 증상이 장시간 동안 회복과 재 발생이 반복되는 만성 소모성 질환이다. 대개 1세 이하의 소아에서 시작하여 장기간 지속되며 90% 정도 자연치유 되는 경향이 있으나 성인이 된 이후에도 지속될 수 있는 만성적인 염증성 피부 질환이다.

[0034] 과거 1970년 아토피피부염 발생 빈도가 6세 이하 어린이의 3% 정도 보고되었으나 최근 20%이상으로 발생률이 증가하였다. 유아 및 소아에게 흔하게 일어나지만 최근 성인에게도 아토피피부염 발생이 증가하고 있으며 이러한 요인으로서는 대기 오염, 핵가족화, 모유 수유 감소, 주거환경 변화, 새로운 항원 물질의 등장, 서구화된 식생활 등이 관여하는 것으로 알려져 있다. 아토피피부염에서는 다양한 면역세포들의 복잡한 기전에 의해 알레르기 반응을 일으키게 된다. 특히 IgE와 연관된 면역기전에 의해 발생되는데 특정 알레르겐에 대한 즉시형 면역반응보다 T세포 이상에 의한 지연형 면역반응이 관여한다고 알려져 보고되고 있다 (Grewe M et al., A role for Th1 and Th2 cells in the immunopathogenesis of atopic dermatitis. Immunol Today. 19(8):359-61, 1998).

[0035] Th1 과 Th2 세포의 불균형으로 사이토카인 분비가 비정상적인 면역반응을 일으키게 되는데, Th1의 IL-2, IFN- γ 등의 사이토카인 분비 감소가 일어나고 Th2의 IL-4, IL-5, IL-10 등의 사이토카인 분비의 증가가 일어나 B 세포의 isotype switching을 유도하여 IgE의 발현은 증가시킨다. IgE에 의해 비만세포의 활성화가 이루어져 히스타민 등의 화학물질을 분비시켜 혈관과 피부를 자극시켜 증상을 악화시키게 된다. 아토피피부염 환자 80% 이상에서 혈청 IgE가 증가되어 있으며 이는 질병의 정도와 상관관계가 있다고 알려져 있다 (Matsuda H et al., Development of atopic dermatitis-like skin lesion with IgE hyperproduction in NC/Nga mice. Int

Immunol. 9(3):461-466, 1997).

[0036] 아직까지 아토피피부염의 정확한 원인을 규명하지 못하고 있으며 복합적인 인자가 함께 관련되어 있어 치료법에 관한 연구에서도 어려움을 겪고 있다. 치료는 국소 스테로이드제, 항히스타민제, 면역조절제 등의 약물로 일시적인 치료가 일반적으로 되고 있으며 이러한 치료제의 장기적인 사용은 부작용의 위험성이 있으며 근본적인 치료를 기대하기 어렵다. 따라서 대체 의학적 보완요법에 대한 관심이 증가하고 있으며 부작용이 적은 천연물로부터 기능성을 찾는 연구가 활발하게 진행되고 있다 (Ha H et al., *Artemisia capillaris* inhibits atopic dermatitis-like skin lesions in *Dermatophagoides farinae*-sensitized Nc/Nga mice. *BMC Complement Altern Med.* 14:14:100, 2014).

[0037] 작두콩은 콩과의 한해살이 덩굴성식물로서 남쪽지방에 잘 자라며 한방에서는 도두(刀豆) 또는 협검두(挾劍豆)라고 한다 (Kim JP et al., *Chemical Properties and DPPH Radical Scavenging Ability of Sword Bean(Canavalia gladiata) Extract*, *Korean J. Food sci. Technol.* 44:441-446, 2012). 중국의 <본초강목>이나 <본초비요> 같은 의학책에는 장, 위를 보하고 속을 따뜻하게 하며 신장의 기능을 돕고 원기를 보하는 약효가 있다고 기록되어 있다 (Joo SJ et al., *Characteristics of yougurt prepared with 'Jinpum' bean and sword bean (Canavalin gladiata)*, *Korean J. Postharv. Sci. Technol.*, 8:308-312, 2001; Cho YS et al., *Chemical components in different parts of Korean sword bean (Canavalia gladiata)*, *Korean J. Postharv. Sci. Technol.*, 6:475-480, 1999).

[0038] 한국특허등록 제 10-0563329호에는 작두콩을 유효성분으로 하는 알러지 및 염증 치료용 조성물이 개시되어 있으나, 작두콩 자체에 존재하는 콩단백질은 면역반응을 유발할 수 있는 문제점이 있는 것으로 알려져 있다 (Akaogi J et al., *Role of non-protein amino acid L-canavanine in autoimmunity*. *Autoimmun Rev.* 5(6):429-35, 2005).

[0039] 그러나 상기 문헌의 어디에도 발효 작두콩 추출물을 이용한 염증, 또는 알레르기 질환 치료제, 아토피 치료 효능에 대한 내용이 개시되거나 교시된 바는 없다.

[0040] 이에, 본 발명자들은 발효를 통하여 면역반응을 일으키기 쉬운 작두콩 추출물 대신에 작두콩에 존재하는 콩 단백질들을 분해하여 얻은 발효 작두콩을 이용함으로써, 기존 면역작용 등의 부작용 문제를 해결하고 또한, 발효 작두콩 추출물을 대상으로 한, 아토피유발 동물에서의 식이효율 및 장기 무게에 미치는 영향실험 (실험예 1), 아토피유발 동물에서의 피부 형태학적 변화 관찰실험 (실험예 2), 아토피유발 동물에서의 가려움에 대한 행동학적 분석실험 (실험예 3), 아토피유발 동물에서의 경표피 수분 증발량에 미치는 영향 실험 (실험예 4), 등을 통하여 강력한 아토피 피부치료 및 개선효과를 확인하였고, 아토피유발 동물에서의 비장세포 배양 및 T세포 및 B세포 증식능에 미치는 영향 실험 (실험예 5), 아토피유발 동물에서의 Th1 type cytokines인 IL-2와 IFN- γ 등의 시토킨 생성수준에 미치는 영향 실험 (실험예 6), 아토피유발 동물에서의 혈중 면역 글로불린들인 IgG2a, IgG1과 IgE 수준에 미치는 영향 실험 (실험예 7), 및 아토피유발 동물에서의 혈중 히스타민 수준에 미치는 영향 실험 (실험예 8) 등의 동물 모델실험 등을 통하여 염증 및 알러지 질환, 특히, 아토피 피부염 및 알레르기성 피부염에 탁월한 효능이 있음을 확인하여 본 발명을 완성하였다.

과제의 해결 수단

[0041] 본 발명의 일 양태에 따르면, 본 발명은 발효작두콩 추출물을 유효성분으로 포함하는 염증 또는 알레르기 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.

[0042] 본원에서 정의되는 발효작두콩은 건조 상태의 황국균(*Aspergillus* 속 곰팡이), 바람직하게는, 황국균 *Aspergillus oryzae*을, 건조 및 멸균 단계를 거친 작두콩 시료에 황국 균주를 분말대비 0.1~20%, 바람직하게는, 1~10%, 보다 바람직하게는, 1~5%(v/v%)로 접종하고, 발효 온도 1~50℃, 바람직하게는, 10~40℃, 보다 바람직하게는, 20~30℃에서 수분함유 상대습도 20~90%, 바람직하게는, 40~80%, 보다 바람직하게는, 50~70%로, 발효시간 1시간 내지 1주일간, 바람직하게는 2일 내지 5일간, 보다 바람직하게는, 약 30 내지 50시간동안 발효하고 멸균한 후 건조하고 분말화하는 단계를 포함하는 공정을 통하여 수득한 발효 발효작두콩을 포함한다.

[0043] 본원에서 정의되는 상기 발효 작두콩은 한국산, 미얀마산, 필리핀산, 태국산, 인도네시아산, 인도산, 일본산, 중국산 등의 수입산을 포함하고, 바람직하게는, 한국산, 또는 중국산을 포함한다.

- [0044] 본원에서 정의되는 상기 추출물은 물, 주정, 메탄올, 에탄올, 부탄올 등의 저급 알콜 또는 이들의 혼합용매, 바람직하게는, 물 또는 물 및 주정 또는 에탄올 혼합용매에 가용한 추출물을 포함한다.
- [0045] 본원에서 정의되는 "염증"이란 피부염, 아토피, 결막염, 치주염, 비염, 중이염, 인후염, 편도염, 폐렴, 위궤양, 위염, 크론병, 대장염, 치질, 통풍, 강직성 척추염, 류마티스 열, 루푸스, 섬유근통 (fibromyalgia), 건선관절염, 골관절염, 류마티스 관절염, 건관절주위염, 건염, 건초염, 건주위염, 근육염, 간염, 방광염, 신장염, 쇼그렌 증후군(sjogren's syndrome), 다발성 경화증, 및 급성 및 만성 염증 질환으로 이루어지는 군으로부터 선택되는 어느 하나일 수 있으며, 이에 한정되지 않는다.
- [0046] 본원에서 정의되는 "알레르기"는 과민증, 알러지성 비염, 천식, 알러지성 결막염, 알러지성 피부염, 아토피성 피부염, 접촉성 피부염, 두드러기, 곤충 알러지, 식품알러지 또는 약물 알러지, 바람직하게는 알러지성 비염, 천식, 알러지성 피부염, 아토피성 피부염, 접촉성 피부염, 두드러기, 식품 알러지 또는 약물 알러지, 보다 바람직하게는 아토피성 피부염 또는 접촉성 피부염을 포함한다.
- [0047] 이하, 구체적으로 본 발명의 추출물을 수득하는 제조방법을 설명한다.
- [0048] 예를 들어, 본 발명의 추출물은 발효 작두콩을 세척 및 건조시킨 후, 시료 부피의 약 1배 내지 30배, 바람직하게는 약 5배 내지 25배 (v/v) 부피의 물, 주정, C₁ 내지 C₄의 저급 알코올 또는 이들의 혼합용매로, 바람직하게는 물 또는 물 및 주정 또는 에탄올 혼합용매를 추출용매로 하여, 약 10 내지 120℃, 바람직하게는 20 내지 110℃의 반응온도에서 약 30분 내지 6일, 바람직하게는 1시간 내지 48시간 동안 상온 추출법, 가열추출법, 초음파 추출법, 환류 추출법 등의 통상적인 추출방법, 바람직하게는 상온 추출법 또는 환류 추출법으로 1 내지 10회, 바람직하게는 2 내지 7회 반복 추출하는 제 2단계; 상기 단계에서 수득한 추출액을 여과하여 감압 농축하는 제 3단계; 상기 농축된 추출물을 약 -50℃ 내지 -30℃에서 약 24 내지 72시간 동결 건조하는 제 4단계의 제조방법을 포함하는 단계를 통하여 본 발명의 발효 추출물을 수득가능하다.
- [0049] 따라서 본 발명은 상기의 제조방법 및 상기 제조방법으로 얻어진 발효작두콩 추출물을 유효성분으로 함유하는 염증 또는 알레르기 질환의 예방 및 치료를 위한 약학조성물 및 건강기능식품을 제공한다.
- [0050] 본 발명의 발효작두콩 추출물을 대상으로 한, 아토피유발 동물에서의 식이효율 및 장기 무게에 미치는 영향실험 (실험예 1), 아토피유발 동물에서의 피부 형태학적 변화 관찰실험 (실험예 2), 아토피유발 동물에서의 가려움에 대한 행동학적 분석실험 (실험예 3), 아토피유발 동물에서의 경표피 수분 증발량에 미치는 영향 실험 (실험예 4), 등을 통하여 강력한 아토피 피부치료 및 개선효과를 확인하였고, 아토피유발 동물에서의 비장세포 배양 및 T세포 및 B세포 증식능에 미치는 영향 실험 (실험예 5), 아토피유발 동물에서의 Th1 type cytokines인 IL-2와 IFN- γ 등의 시토킨 생성수준에 미치는 영향 실험 (실험예 6), 아토피유발 동물에서의 혈중 면역 글로불린들인 IgG2a, IgG1과 IgE 수준에 미치는 영향 실험 (실험예 7), 및 아토피유발 동물에서의 혈중 히스타민 수준에 미치는 영향 실험 (실험예 8) 등의 동물 모델실험 등을 통하여 염증 및 알러지 질환, 특히, 아토피 피부염 및 알레르기성 피부염에 탁월한 효능이 있음을 확인하여 염증 또는 알러지 질환의 치료 및 예방에 유용함을 확인하였다.
- [0051] 본 발명의 조성물은, 조성물 총 중량에 대하여 상기 생약 추출물을 0.1 내지 50% 중량으로 포함한다.
- [0052] 그러나 상기과 같은 조성은 반드시 이에 한정되는 것은 아니고, 환자의 상태 및 질환의 종류 및 진행 정도에 따라 변할 수 있다.
- [0053] 본 발명의 추출물을 포함하는 조성물은 약학적 조성물의 제조에 통상적으로 사용하는 적절한 담체, 부형제 및 희석제를 더 포함할 수 있다.
- [0054] 본 발명에 따른 추출물을 포함하는 조성물은, 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 및 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용될 수 있으며, 이에 포함될 수 있는 담체, 부형제 및 희석제로는 락토즈, 텍스트로즈, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 들 수 있다. 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다. 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 상기 화합물에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트(calcium carbonate), 수크로스(sucrose) 또는 락토오스(lactose), 젤

라틴 등을 섞어 조제된다. 또한 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테레이트 탈크 같은 윤활제들도 사용된다. 경구를 위한 액상제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데 흔히 사용되는 단순회색제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조제, 좌제가 포함된다. 비수성용제, 현탁제로는 프로필렌글리콜(propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텟솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다.

[0055] 본 발명의 추출물의 바람직한 투여량은 환자의 상태 및 체중, 질병의 정도, 약물형태, 투여경로 및 기간에 따라 다르지만, 담당자에 의해 적절하게 선택될 수 있다. 그러나 바람직한 효과를 위해서, 추출물은 1일 0.01 mg/kg 내지 10 g/kg으로, 바람직하게는 1 mg/kg 내지 1 g/kg으로 투여하는 것이 좋다. 투여는 하루에 한번 투여할 수도 있고, 수회 나누어 투여할 수 있다. 그러므로 상기 투여량은 어떠한 면으로든 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.

[0056] 본 발명의 조성물은 쥐, 생쥐, 가축, 인간 등의 포유동물에 다양한 경로로 투여될 수 있다. 투여의 모든 방식은 예상될 수 있는데, 예를 들면, 경구 및 직장, 또는 정맥 등의 방법을 통하여 투여 할 수 있다.

[0057] 또한 본 발명은 발효작두콩 추출물을 유효성분으로 포함하는 염증 또는 알레르기 질환의 예방 및 개선용 건강기능식품을 제공한다.

[0058] 본 발명의 추출물을 포함하는 건강기능식품은 염증 또는 알레르기 질환의 예방 및 개선을 위한 약제, 식품 및 음료 등에 다양하게 이용될 수 있다. 본 발명의 추출물을 첨가할 수 있는 식품으로는, 예를 들어, 각종 식품류, 음료, 껌, 차, 비타민 복합제, 건강보조 식품류 등이 있고, 분말, 과립, 정제, 캡슐 또는 음료인 형태로 사용할 수 있다.

[0059] 본원에서 정의되는 "건강기능식품"은 건강기능식품에 관한 법률 제6727호에 따른 인체에 유용한 기능성을 가진 원료나 성분을 사용하여 제조 및 가공한 식품을 의미하며, "기능성"이라 함은 인체의 구조 및 기능에 대하여 영양소를 조절하거나 생리학적 작용 등과 같은 보건 용도에 유용한 효과를 얻을 목적으로 섭취하는 것을 의미한다.

[0060] 본 발명의 염증 또는 알레르기 질환의 예방 또는 개선을 위한 건강기능식품은, 조성물 총 중량에 대하여 상기 정제물을 0.01 내지 95%, 바람직하게는 1 내지 80% 중량백분율로 포함한다.

[0061] 또한, 염증 또는 알레르기 질환의 예방 또는 개선을 위한 목적으로 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 환제, 현탁액, 에멀전, 시럽 등의 약학 투여형태 또는 티백제, 침출차, 건강 음료 등의 형태인 건강기능식품으로 제조 및 가공이 가능하다.

[0062] 또한, 본 발명은 염증 또는 알레르기 질환의 예방 및 개선효과를 갖는 발효작두콩 추출물을 유효성분으로 함유하는 건강보조식품을 제공한다.

[0063] 또한, 본 발명은 염증 또는 알레르기 질환의 예방 및 개선효과를 갖는 발효작두콩 추출물을 유효 성분으로 함유하는 식품 또는 식품첨가물을 제공한다.

[0064] 또한 상기 건강기능식품은 식품첨가물을 추가로 포함할 수 있으며, "식품첨가물"로서의 적합여부는 다른 규정이 없는 한 식품의약품안전처에 승인된 식품첨가물공전의 총칙 및 일반시험법 등에 따라 해당 품목에 관한 규격 및 기준에 의하여 판정한다.

[0065] 상기 "식품첨가물공전"에 수재된 품목으로 예를 들어, 케톤류, 글리신, 구연산칼륨, 니코틴산, 계피산 등의 화학적 합성품, 감색소, 감초추출물, 결정셀룰로오스, 구아검 등의 천연첨가물, L-글루타민산나트륨제제, 면류첨가알칼리제, 보존료제제, 타르색소제제 등의 혼합 제제류들을 들 수 있다.

[0066] 본 발명의 추출물이 포함된 기능성 식품으로는 빵, 떡류, 건과류, 캔디류, 초콜릿류, 휴잉껌, 껌류와 같은 과자류 아이스크림류, 빙과류, 아이스크림 분말류와 같은 아이스크림 제품류 우유류, 저지방 우유류, 유당분해우유, 가공우유, 산양유, 발효유류, 버터유류, 농축유류, 유크림류, 버터유, 자연치즈, 가공치즈, 분유류, 유청류와 같은 유가공품류 식육가공품, 알가공품, 햄버거와 같은 식육제품류 어묵, 햄, 소세지, 베이컨 등의 어육가공품과 같은 어육제품류 라면류, 건면류, 생면류, 유당면류, 호화건면류, 개량숙면류, 냉동면류, 파스타류와 같은 면류 과일음료, 채소류음료, 탄산음료, 두유류, 요구르트 등의 유산균음료, 혼합음료와 같은 음료 간장, 된장, 고추장, 춘장, 청국장, 혼합장, 식초, 소스류, 토마토케첩, 카레, 드레싱과 같은 조미식품 마가린, 쇼트닝 및

피자를 들 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

- [0067] 본 발명의 건강 기능성 음료 조성물은 지시된 비율로 필수 성분으로서 상기 추출물을 함유하는 외에는 다른 성분에는 특별한 제한이 없으며 통상의 음료와 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다. 상술한 천연 탄수화물의 예는 모노사카라이드, (예를 들어, 포도당, 과당 등); 디사카라이드, (예를 들어 말토스, 슈크로스 등); 및 폴리사카라이드, (예를 들어 텍스트린, 시클로텍스트린 등)과 같은 통상적인 당, 및 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알콜이다. 상술한 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 100ml 당 일반적으로 약 1~20g, 바람직하게는 약 5~12g 이다.
- [0068] 상기 외에 본 발명의 조성물은 여러 가지 영양제, 비타민, 광물(전해질), 합성 풍미제 및 천연 풍미제 등의 풍미제, 착색제 및 증진제(치즈, 초콜릿 등), 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알콜, 탄산 음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다. 그밖에 본 발명의 조성물들은 천연 과일 주스 및 과일 주스 음료 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다. 이러한 성분은 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있다. 이러한 첨가제의 비율은 그렇게 중요하진 않지만 본 발명의 조성물 100 중량부 당 0 내지 약 20 중량부의 범위에서 선택되는 것이 일반적이다.
- [0069] 또한, 본 발명의 추출물은 목적 질환의 예방 효과를 목적으로 식품 또는 음료에 첨가될 수 있다. 이 때, 식품 또는 음료 중의 상기 추출물의 양은 전체 식품 중량의 0.01 내지 15 중량%로 가할 수 있으며, 건강 음료 조성물은 100ml 을 기준으로 0.02 내지 5g, 바람직하게는 0.3 내지 1g 의 비율로 가할 수 있다.
- [0070] 상기 건강기능식품을 제조하는 과정에서 음료를 포함한 식품에 첨가되는 본 발명에 따른 추출물은 필요에 따라 그 함량을 적절히 가감할 수 있다.

발명의 효과

- [0071] 본 발명에 따른 발효작두콩 추출물은 아토피유발 동물에서의 식이효율 및 장기 무게에 미치는 영향실험 (실험예 1), 아토피유발 동물에서의 피부 형태학적 변화 관찰실험 (실험예 2), 아토피유발 동물에서의 가려움에 대한 행동학적 분석실험 (실험예 3), 아토피유발 동물에서의 경표피 수분 증발량에 미치는 영향 실험 (실험예 4), 등을 통하여 강력한 아토피 피부치료 및 개선효과를 확인하였고, 아토피유발 동물에서의 비장세포 배양 및 T세포 및 B세포 증식능에 미치는 영향 실험 (실험예 5), 아토피유발 동물에서의 Th1 type cytokines인 IL-2와 IFN- γ 등의 시토킨 생성수준에 미치는 영향 실험 (실험예 6), 아토피유발 동물에서의 혈중 면역 글로불린들인 IgG2a, IgG1과 IgE 수준에 미치는 영향 실험 (실험예 7), 및 아토피유발 동물에서의 혈중 히스타민 수준에 미치는 영향 실험 (실험예 8) 등의 동물 모델실험 등을 통하여 염증 및 알러지 질환, 특히, 아토피 피부염 및 알레르기성 피부염에 탁월한 효능이 있음을 확인되어 염증 또는 알러지 질환의 치료 및 예방에 활용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0072] 도 1: 시료의 아토피 유발 동물의 피부 형태학적 변화를 나타내는 도이며;
- 도 2: 시료의 아토피 유발 동물의 긁는 횟수에 미치는 영향을 나타내는 그래프이며(여기에서, 결과는 평균(means) $\pm$ SD으로 표기하고 서로 상이한 기호는 시험법(Duncan's multiple range test)으로 측정시 $p < 0.05$ 에서 유의적으로 상이함을 의미함);
- 도 3: 시료의 아토피 유발 동물의 경표피 수분 증발량에 미치는 영향을 나타내는 그래프이며(여기에서, 결과는 평균(means) $\pm$ SD으로 표기하고 서로 상이한 기호는 시험법(Duncan's multiple range test)으로 측정시 $p < 0.05$ 에서 유의적으로 상이함을 의미함);
- 도 4: 시료의 아토피 유발 동물의 T세포 및 B세포 증식능에 미치는 영향을 나타내는 그래프이며(여기에서, 결과는 평균(means) $\pm$ SD으로 표기하고 서로 상이한 기호는 시험법(Duncan's multiple range test)으로 측정시 $p < 0.05$ 에서 유의적으로 상이함을 의미함);
- 도 5: 시료의 아토피 유발 동물의 Th1 cytokines 생성에 미치는 영향을 나타내는 그래프이며(여기에서, 결과는

평균(means) $\pm$ SD으로 표기하고 서로 상이한 기호는 시험법(Duncan's multiple range test)으로 측정시 $p < 0.05$ 에서 유의적으로 상이함을 의미함);

도 6: 시료의 아토피 유발 동물의 Th2 cytokines 생성에 미치는 영향을 나타내는 그래프이며(여기에서, 결과는 평균(means) $\pm$ SD으로 표기하고 서로 상이한 기호는 시험법(Duncan's multiple range test)으로 측정시 $p < 0.05$ 에서 유의적으로 상이함을 의미함);

도 7: 시료의 아토피 유발 동물의 전염증성 시토킨 생성에 미치는 영향을 나타내는 그래프이며(여기에서, 결과는 평균(means) $\pm$ SD으로 표기하고 서로 상이한 기호는 시험법(Duncan's multiple range test)으로 측정시 $p < 0.05$ 에서 유의적으로 상이함을 의미함);

도 8: 시료의 아토피 유발 동물의 혈중 면역글로불린 농도에 미치는 영향을 나타내는 그래프이며(여기에서, 결과는 평균(means) $\pm$ SD으로 표기하고 서로 상이한 기호는 시험법(Duncan's multiple range test)으로 측정시 $p < 0.05$ 에서 유의적으로 상이함을 의미함);

도 9: 시료의 아토피 유발 동물의 혈중 히스타민 농도에 미치는 영향을 나타내는 그래프이다(여기에서, 결과는 평균(means) $\pm$ SD으로 표기하고 서로 상이한 기호는 시험법(Duncan's multiple range test)으로 측정시 $p < 0.05$ 에서 유의적으로 상이함을 의미함).

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0073] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 바람직한 실시예를 제시한다. 그러나 하기의 실시예는 본 발명을 더욱 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐, 실시예에 의하여 본 발명의 내용이 한정되는 것은 아니다.

[0074] <실시예 1> 발효 작두콩 추출물 제조

[0075] 광주광역시에서 재배한 작두콩을 분말화시킨 후 분말 500 g에 황국균(*Aspergillus oryzae*, 충무발효(주), Ulsan, Korea)을 15 g로 접종하고 $25 \pm 2^\circ \text{C}$, 습도 $50 \pm 5\%$ 에서 36시간 동안 발효장치에서(이노바이오텍, 한국) 발효시켰다.

[0076] 발효된 분말 상태 시료에 다양한 용매(정제수, 30% 에탄올, 80% 에탄올)를 각각 첨가하고, 열수 추출물 제조는 100°C 에서 4시간 추출, 30% 주정 추출물 및 80% 주정 추출물 제조는 상온에서 12 시간 추출 후, 감압여과 장치에서 여과한 후 감압농축기를 사용하여 추출용매를 제거한 후 동결 건조하여 실험에 사용하였다.

[0077] 상기 실험결과, 황국균 발효 작두콩 추출물의 수득률은 각각 물 추출물(이하, FCGH라 함)은 10.2%, 30% 주정 추출물(이하, FCG30라 함)은 6.1%, 및 80% 주정 추출물(이하, FCG80라 함)은 3.0%이었다.

[0078] <실험예 1> 아토피유발 동물에서의 식이효율 및 장기 무게에 미치는 영향

[0079] 상기 실시예 시료들의 아토피 유발 동물에서의 식이효율 및 아토피관련 장기인 비장 및 간 등의 장기무게에 미치는 영향을 확인하기 위하여, 문헌에 기재된 방법을 응용하여 하기와 같이 실험하였다 (Seino S et al., Atopic dermatitis causes lipid accumulation in the liver of NC/Nga mouse. J Clin Biochem Nutr. 50(2):152-7, 2012).

[0080] 1.1. 실험 준비

[0081] 실험동물인 수컷 6주령의 NC/Nga mice($20 \pm 3 \text{ g}$)와 정상대조군에 사용할 Balb/c mice($20 \pm 3 \text{ g}$)를 중앙실험동물(주)(seoul, korea)에서 공급 받아 동물 사육실에서 일정한 조건(온도: $23 \pm 2^\circ \text{C}$, 상대습도: $50 \pm 5\%$, 명암: 12시간 light/dark cycle)으로 1주일 동안 주위 환경에 적응시킨 후 사용하였다.

[0082] 적응기간 중 건강하다고 판정된 동물에 대하여 평균체중에 가까운 개체를 선택하여 무작위법을 이용하여 각 군당 8마리의 마우스를 이용하여 군 분리를 하였다.

[0083] 정상대조군(Normal control), 아토피대조군(AD control), 발효 작두콩 열수 300 mg/kg b.w 식이 투여군(FCGH), 발효 작두콩 주정 30% 300 mg/kg b.w 식이 투여군(FCG30), 발효 작두콩 80% 300 mg/kg b.w 식이 투여군(FCG80)

0)으로 분리하여 정상대조군을 제외한 모든 군의 마우스는 아토피 피부염을 유발하였다.

[0084] 모든 식이는 AIN93G를 기본으로 제작하였으며, 식이와 음수는 자유공급 하였다. 아토피 동물모델인 NC/Nga mice는 specific pathogen free(SPF) 환경에서는 정상이지만, 일반 환경에서는 3-4주 후 가려움증을 수반하며 아토피 피부염이 유발된다. 따라서 아토피 피부염을 유발하기 위하여 NC/Nga mice는 여과시설이 없는 일반 환경에 노출시켰고 10주 후 모든 동물을 희생시켰다.

[0085] 본 실험 결과 표 1에 나타난 바와 같이, 식이효율 면에서는 모든 군간의 유의적인 차이가 없었음을 확인하였다. 면역세포가 밀집되어 있어 면역체계에서 가장 중요한 림프기관인 비장의 무게 변화를 관찰한 결과에서는 아토피 대조군에서 정상대조군과 유의적으로 무게가 증가되었음을 확인하였다($P<0.05$). 비장은 항원이 제시되거나 면역반응이 급속하게 진행되면 이에 반응하여 크기가 증가하여 비장 비대증이 유발되므로 아토피 유발에 의하여 무게가 유의적으로 증가되었음을 확인하여 면역반응이 증가되었음을 확인하였다($P<0.05$). 반면 FCG30, FCG80에서는 아토피대조군과 비교하여 유의적으로 감소되었음을 확인하였다($P<0.05$). 또한 간의 무게의 변화에서도 아토피대조군에서 정상대조군과 비교하여 유의적으로 무게가 증가되었음을 확인하였다($P<0.05$). 아토피 유발에 의하여 활성산소가 증가되어 산화적 스트레스가 급격히 증가하는 것으로 알려져 있으며 이로 인하여 간세포의 염증이 유발될 수 있다 (Seino S et al., Atopic dermatitis causes lipid accumulation in the liver of NC/Nga mouse. J Clin Biochem Nutr. 50(2):152-7, 2012). 아토피 유발에 의하여 증가된 간의 무게가 FCG30에서 아토피대조군과 비교하여 유의적으로 감소되었음을 확인하였다($P<0.05$) (표 1).

표 1

[0086] 식이효율 및 장기무게 변화

Groups	Normal control	NC/Nga mice			
		AD control	FCGH	FCG30	FCG80
FER ¹⁾	0.037±0.009 ^{NS}	0.035±0.006	0.036±0.003	0.034±0.002	0.033±0.005
Spleen (g)	0.13±0.03 ^b	0.18±0.01 ^a	0.16±0.05 ^{ab}	0.12±0.03 ^b	0.13±0.03 ^b
Kidney (g)	0.49±0.04 ^{NS}	0.48±0.09	0.52±0.05	0.53±0.08	0.49±0.04
Liver (g)	1.33±0.09 ^c	1.62±0.11 ^a	1.49±0.06 ^{ab}	1.47±0.11 ^{bc}	1.49±0.09 ^{ab}
¹⁾ FER = weight gain (g)/food intake calories (g) The results were presented means ± SD. Different letters show a significantly difference at $p<0.05$ as determined by Duncan's multiple range test.					

[0087] <실험예 2> 아토피유발 동물에서의 피부 형태학적 변화 관찰실험

[0088] 상기 실시예 시료들의 아토피 유발 동물에서의 피부 형태학적 변화를 확인하기 위하여, 문헌에 기재된 방법을 응용하여 하기와 같이 실험하였다 (Ha H et al., Artemisia capillaris inhibits atopic dermatitis-like skin lesions in Dermatophagoides farinae-sensitized Nc/Nga mice. BMC Complement Altern Med. 14:14:100, 2014)

[0089] 상기 실험예 1의 아토피 유발 동물에서의 피부 형태학적 변화를 확인한 결과, 아토피 유발이 자연적으로 진행되는 NC/Nga mice의 피부를 정상군과 비교하여 살펴보았을 때, 홍반, 부종, 건조, 혈종, 짓무름, 발진 등의 증상이 나타났음을 확인할 수 있었다. 이러한 아토피 피부염의 형태학적인 변화는 욕안으로 살펴보았을 때 발효 작두콩의 식이투여가 아토피 피부염 증상을 완화하였음을 살펴볼 수 있었다. 특히 FCG30, FCG80에서 아토피 피부염의 증상이 약화되었다(도 1).

[0090] <실험예 3> 아토피유발 동물에서의 가려움에 대한 행동학적 분석실험

[0091] 상기 실시예 시료들의 아토피 유발 동물에서의 가려움에 대한 행동학적 변화를 확인하기 위하여, 문헌에 기재된 방법을 응용하여 하기와 같이 실험하였다 (Ha H et al., Artemisia capillaris inhibits atopic dermatitis-like skin lesions in Dermatophagoides farinae-sensitized Nc/Nga mice. BMC Complement Altern

Med. 14:14:100, 2014).

[0092] 상기 실험에 1의 아토피 유발 동물에서의 가려움에 대한 행동학적 변화를 20분간 카메라(automatic video camera; Sony TRV, Tokyo, Japan)를 이용하여 촬영하고 얼굴, 귀, 목을 비롯한 전신을 긁는 횟수를 측정하여 기록하였다. NC/Nga mice의 소양증에 대한 유형은 개체 간에 다양하므로 긁는 횟수를 20분 동안 측정하여 군 간의 유의성을 통계학적으로 분석하였다.

[0093] 아토피 피부염의 대표적인 증상은 가려움에 대한 반응을 확인함으로써 아토피 피부염 유발 정도를 평가하였다. 정상대조군 1.5 ± 0.6 회와 비교하여 아토피대조군에서는 57 ± 12.5 회로 유의적으로 크게 긁는 횟수가 증가되었다($P < 0.05$). 추출물 식이투여 군에서는 각각 FCGH 58.5 ± 4.5 회, FCG30 33 ± 10.4 회, FCG80 30 ± 10.7 회이었다. 아토피대조군과 비교하여 유의적으로 감소된 군은 FCG30와 FCG80이었음을 확인하였다($P < 0.05$)(도 2).

[0094] <실험에 4> 아토피유발 동물에서의 경표피 수분 증발량에 미치는 영향 실험

[0095] 상기 실험에 시료들의 아토피 유발 동물에서의 경표피 수분 증발량에 미치는 영향을 확인하기 위하여, 문헌에 기재된 방법을 응용하여 하기와 같이 실험하였다 (Nam Y et al., Inhibitory effects of polysaccharide-rich extract of Phragmites rhizoma on atopic dermatitis-like skin lesions in NC/Nga mice. Life Sci. 2;92(14-16):866-872, 2013).

[0096] 상기 실험에 1의 아토피 유발 동물에서의 경표피 수분 증발량에 미치는 영향을 확인하기 위하여, 피부 측정 기기인 CM825(Courage & Khazaka GmbH, Cologne, Germany)을 이용하여 아토피 피부염 상태에서 변화하는 피부수 분지수를 측정 및 분석하였다. 희생 전 동물의 귀 부위 피부를 5회 연속 측정하여 평균값을 얻었으며 측정 장소는 실내온도 $21 \sim 23^\circ\text{C}$, 습도 $50 \sim 60\%$ 가 유지되는 조건에서 계속하였다.

[0097] 피부는 표피, 진피 및 피하지방의 세 개의 층으로 구성되어있으며, 표피는 각질세포(keratinocyte), 멜라닌세포(melanocyte), 랑게한스 섬(Langerhans) 세포 등으로 구성되어 각질층을 형성하며 진피를 보호하는 역할을 한다. 진피는 섬유아세포로부터 만들어지는 결합조직인 콜라겐 섬유(collagen fiber), 엘라스틴 섬유(elastin fiber)와 기질(derma matrix)로 구성되어 피부의 탄력을 유지하는 기능을 한다고 알려져 있다 (Rittie L et al., UV-light-induced signal cascades and skin aging. Ageing research reviews 1: 705-720, 2002).

[0098] 표피의 가장 외층인 각질(stratum corneum)층은 외부의 침범에 대한 방어벽으로 작용할 뿐만 아니라, 피부내 수분량을 적절하게 유지시키는 역할을 한다. 각질은 지질성분들로 이루어져 있으며 이러한 지질성분들의 감소는 피부건조를 유발하여 각질생성을 일으킨다. 아토피 피부염 환자의 피부의 표피에서 각질의 지질성분이 감소되며 이러한 결과로 피부건조와 각질생성이 증가되고 가려움에 의하여 긁음으로서 표피층 손상이 일어나 더욱 그 현상이 악화된다. 따라서 피부의 수분 함량은 아토피 피부염 유발 정도를 평가하는 지표로 사용된다(Nam Y et al., Inhibitory effects of polysaccharide-rich extract of Phragmites rhizoma on atopic dermatitis-like skin lesions in NC/Nga mice. Life Sci. 2;92(14-16):866-872, 2013).

[0099] 본 실험 결과, 정상대조군은 39.2 ± 2.8 A.U.(arbitrary units)인 반면, 아토피대조군은 25.3 ± 0.4 A.U.으로 표피 수분함량이 유의적으로 감소되었음을 확인하였다($P < 0.05$). 반면 모든 추출물의 식이투여군에서 유의적으로 수분함량이 증가되었으며, 특히 FCG30, FCG80 에서 각각 34.0 ± 2.0 A.U.와 36.3 ± 0.8 A.U.으로 나타나 추출물 식이투여군 중에서 유의적으로 높게 나타났다($P < 0.05$)(도 3).

[0100] <실험에 5> 아토피유발 동물에서의 비장세포 배양 및 T세포 및 B세포 증식능에 미치는 영향 실험

[0101] 상기 실시예 시료들의 아토피 유발 동물에서의 비장세포 배양 및 T세포 및 B세포 증식능에 미치는 영향을 확인하기 위하여, 문헌에 기재된 방법을 응용하여 하기와 같이 실험하였다 (Yanaba Ket al., CD19 expression in B cells regulates atopic dermatitis in a mouse model. Am J Pathol. 182(6):2214-2222, 2013).

- [0102] 상기 실험에 1의 아토피 유발 동물에서의 비장세포 배양 및 T세포 및 B세포 증식능에 미치는 영향을 확인하기 위하여, 동물에서 분리한 비장은 PBS로 세척한 후 0.45 μm cell strainer(BD Falcon 352340, BD Biosciences, San Jose, CA, USA)를 사용하여 단일 세포 부유액을 만들었다. 단일 세포 부유액을 10% fetal bovine serum(Hyclone Laboratories, Logan, Utah, USA), 2 mmol L-glutamine(Hyclone Laboratories, Logan, Utah, USA), 100 mg/L penicillin-streptomycin(Hyclone Laboratories, Logan, Utah, USA)를 첨가한 RPMI-1640(Hyclone Laboratories, Logan, Utah, USA)으로 세척 후 red blood cell lysing buffer(R7757, Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA)로 적혈구를 용혈시켜 비장세포 부유액을 만들어 96 well plate에 각 well 당 1×10^6 cells/well을 200 μL 씩 분주 하였다. T 세포 증식능 측정을 위하여 concanavalin A(ConA)(C0412, Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA) 5 $\mu\text{g/mL}$ 를 처리하였고, B세포 증식능 측정을 위하여 lipopolysaccharide(LPS)(L2880, Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA) 5 $\mu\text{g/mL}$ 를 처리한 후 48시간 동안 37° C에서 배양하였다. 48시간 후, EZ-Cytox(DLS1212, Deilab INC, Korea)를 20 μL 씩 분주하고 4시간 동안 37° C에서 배양시킨 뒤 450nm에서 흡광도를 측정하였다.
- [0103] 상기 실험 결과, 아토피 대조군은 정상군과 비교하여 T세포의 증식능($83.0 \pm 1.4\%$)은 유의적으로 감소하였고 B세포의 증식능($121.0 \pm 10.5\%$)은 유의적으로 증가하였다($P < 0.05$). T세포 증식능은 FCG30 ($91.9 \pm 6.7\%$)에서 아토피 대조군과 비교하여 유의적으로 증가하고 다른 실험군에서는 유의적인 차이를 보이지 않았다($P < 0.05$). 또한 B세포의 증식능에서도 FCG30($107.9 \pm 8.5\%$)군에서만 아토피대조군과 유의적인 차이를 보였고 다른 실험군에서는 유의적인 차이를 보이지 않았다($P < 0.05$)(도 4).
- [0104] 본 연구에서 아토피에 의하여 T세포의 증식능이 감소한 것으로 확인함으로써 T세포의 정상적인 기능이 상실되었음을 예측할 수 있었으며, B세포의 증가로 면역글로불린의 과생성에 의하여 IgE의 증가로 비만세포(mast cell)가 활성화되어 히스타민(histamine)생성을 촉진시켜 가려움을 유발하고 염증을 유발시킨 것으로 보인다. FCG30은 이러한 T세포와 B세포의 비정상적인 증식능을 억제시켜 아토피 피부염을 악화시킨 것으로 보인다.
- [0105] <실험예 6> 아토피유발 동물에서의 시토킨 생성수준에 미치는 영향 실험
- [0106] 상기 실시예 시료들의 아토피 유발 동물에서의 시토킨(cytokines) 생성수준에 미치는 영향을 확인하기 위하여, 문헌에 기재된 방법을 응용하여 하기와 같이 실험하였다 (Grewe M et al., A role for Th1 and Th2 cells in the immunopathogenesis of atopic dermatitis. Immunol Today. 19(8):359-61, 1998).
- [0107] 상기 실험에 1의 아토피 유발 동물에서의 시토킨 생성수준에 미치는 영향을 확인하기 위하여, 비장세포를 96 well plate에 각 well당 1×10^6 cells/well을 200 μL 씩 분주 후, ConA(C0412, Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA) 5 $\mu\text{g/mL}$ 를 처리하여 IL-2, IL-4, IL-10, IFN- γ 의 생성을 자극시켰고, LPS(L2880, Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA) 5 $\mu\text{g/mL}$ 를 처리하여 TNF- α , IL-6의 생성을 자극시켰다. IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IFN- γ 은 24시간 배양 후에, IFN- γ 은 72시간 배양 후에 상층액을 수집하였다. 상층액의 시토킨(cytokine)의 양은 DuoSet sandwich ELISA mouse kit(R&D System, McKinley Place NE, MN, USA)를 이용하여 측정하였다. ELISA용 96-well plate에 각 cytokine 측정에 특성화 된 1차 항체를 PBS에 희석 후 100 μL 씩 분주해 하루 동안 처리한 후, 그 다음날, washing buffer (R&D System, McKinley Place NE, MN, USA), PBST, 0.05% Tween 20 in PBS)로 1차 항체를 씻어낸 뒤, 항체가 붙지 않은 plate의 다른 공간을 매워주기 위해 assay buffer (R&D System, McKinley Place NE, MN, USA) 1% BSA in PBS (IL-4, -6, -10, TNF- α) 또는 0.1% BSA in TBST (IL-2, IFN- γ)를 넣어 2시간 동안 처리한 뒤 washing buffer로 씻어낸다. Standard curve를 위한 용액과 위에서 seeding한 비장세포의 배양액을 100 μL 씩 각 well에 넣어 2시간 동안 반응시킨 후, 반응이 끝난 뒤 washing buffer로 씻어내고 assay buffer에 2차 항체를 희석시켜 준비한 뒤 각 well에 100 μL 씩 분주하고 2시간 동안 처리한다. 이 과정이 끝나면 washing buffer를 이용해 plate를 씻어내고 발색을 도와주는 substrate시약(R&D System, McKinley Place NE, MN, USA)을 100 μL 씩 넣어 반응 시킨 뒤 570 nm에서 흡광도를 측정하고 Standard curve를 이용해 세포에서 생성된 cytokine의 양을 계산했다.
- [0108] CD4^+ Th 세포에는 Th1 type cytokines을 생성하는 Th1 세포와 Th2 type cytokines을 생성하는 Th2 세포가 있다. Th1 type cytokines은 주로 대식세포의 활성을 증가시켜 탐식작용을 자극하며, Th2 type cytokines은 B

세포의 활성을 자극시켜 항체생산을 증가시키는 역할을 한다. 이러한 Th1/Th2 type cytokines의 상호보완적인 조절에 의하여 면역 균형을 유지시키는데 아토피 상태에서는 Th1 type cytokines을 감소되어있고 Th2 type cytokines을 증가되어 있다고 보고되고 있다. 이러한 cytokines 불균형은 면역 조절 능력을 떨어뜨리게 되어 아토피 현상을 만성으로 발전시키게 된다 (Grewe M et al., A role for Th1 and Th2 cells in the immunopathogenesis of atopic dermatitis. Immunol Today. 19(8):359-61, 1998).

[0109] 상기 실험 결과, Th1 type cytokines인 IL-2와 IFN- γ 의 생성을 비교하였을 때 정상대조군에 비하여 아토피대조군에서 유의적으로 감소되었음을 확인하였다($P<0.05$). IL-2 생성은 FCG30군과 FCG80군에서 유의적으로 증가되었으며, IFN- γ 의 생성은 FCG30군, FCG80군에서 유의적으로 증가되었다($P<0.05$)(도 5). 정상대조군과 비교하여 아토피대조군에서 Th2 type cytokines인 IL-4와 IL-10 모두 생성량이 유의적으로 증가되었음을 확인하였다($P<0.05$). 이러한 결과는 아토피 대조군에서 Th1 type cytokines의 감소와 연관시켜 보았을 때 아토피가 Th1/Th2 type cytokines불균형을 일으킨 것을 확인할 수 있는 것이다. IL-4 생성은 FCG30과 FCG80에서 유의적으로 아토피대조군에 비교하여 감소되었으며, IL-10 생성은 모든 실험군에서 아토피대조군에 비교하여 모두 유의적으로 감소되었다($P<0.05$)(도 6). 이러한 Th2 type cytokines 감소 결과는 Th1 type cytokines 감소를 억제 시킴으로서, Th1/Th2의 불균형을 감소시켜 면역 항상성 유지에 도움을 주는 것으로 해석된다.

[0110] TNF- α 는 주로 활성화된 대식세포에 의해 분비되며, 다른 전염증성 시토킨(pro-inflammatory cytokine)의 생성을 증가시켜 염증반응을 유도하고 apoptosis를 일으키므로 면역세포 활성 조절에 중요한 cytokine이다. 아토피 피부염 환자들에게서 TNF- α 의 발현이 증가되어 있음이 보고된 바 있다 (Sumimoto S et al., Increased plasma tumour necrosis factor-alpha concentration in atopic dermatitis. Arch Dis Child. 67(3):277-279, 1992).

[0111] 본 실험 결과, TNF- α 의 생성은 정상대조군(84.8 ± 26.9 pg/mL)에 비교하여 아토피대조군(578.1 ± 32.4 pg/mL)에서 7배 정도 유의적으로 증가되었다. 증가된 TNF- α 의 생성은 FCGH에서 429.2 ± 44.0 pg/mL, FCG30에서 398.1 ± 29.1 pg/mL, FCG80에서 372.6 ± 65.0 pg/mL으로 유의적으로 감소되었다($P<0.05$). IL-6는 아토피대조군에서 정상대조군과 비교하여 약 2배 증가되었으나 FCG30, FCG80에서 아토피대조군과 비교하여 유의적으로 감소되었다($P<0.05$)(도 7).

[0112] <실험예 7> 아토피유발 동물에서의 혈중 면역 글로불린수준에 미치는 영향 실험

[0113] 상기 실시예 시료들의 아토피 유발 동물에서의 혈중 면역 글로불린수준에 미치는 영향을 확인하기 위하여, 문헌에 기재된 방법을 응용하여 하기와 같이 실험하였다 (Yanaba Ket al., CD19 expression in B cells regulates atopic dermatitis in a mouse model. Am J Pathol. 182(6):2214-2222, 2013).

[0114] 상기 실험예 1의 아토피 유발 동물에서의 혈중 면역 글로불린수준에 미치는 영향을 확인하기 위하여, 동물을 희생시켜 얻은 혈액을 16,000rpm에서 20분간 원심분리하여 혈청을 얻은 후 mouse immunoglobulin E(IgE, ab157718), mouse immunoglobulin G1(IgG1, ab133045), mouse immunoglobulin G2a(IgG2a, ab133046) ELISA kit(abcam, USA)를 이용하여 IgE, IgG1, IgG2a를 측정하였다.

[0115] 알레르겐에 노출되게 되면 B 세포가 IL-4에 의하여 IgM이 IgG1과 IgE으로 isotype switching이 일어나게 되어 mast cell과 결합하여 자극시킴으로서 활성화시킨다. 반면 IFN- γ 의 분비감소로 IgG2a로의 isotype switching은 감소하게 된다(Lee TY et al., Oral administration of poly- γ -glutamate ameliorates atopic dermatitis in Nc/Nga mice by suppressing Th2-biased immune response and production of IL-17A. J Invest Dermatol. 134(3):704-701, 2014). 본 연구에서는 IgG1과 IgE, IgG2a의 혈중 농도를 비교하여 알레르겐 반응을 확인하였다.

[0116] 상기 실험 결과, IgG2a의 농도는 정상대조군과 비교하여 아토피대조군에서 6배정도 유의적으로 감소되었으며, IgG1과 IgE는 유의적으로 증가되었고 특히 IgE의 농도가 6배정도 크게 증가되었다($P<0.05$). FCG80군에서만 IgG2a의 농도가 아토피대조군과 비교하여 유의적으로 감소되었으며 다른 실험군에서는 유의적인 차이를 보이지 않았다($P<0.05$). IgG1의 농도 변화는 모든 실험군과 아토피대조군과 유의적인 차이를 보이지 않았지만, IgE의 농도는 FCG30과 FCG80에서 유의적으로 감소되었음을 확인하였다($P<0.05$)(도 8).

- [0117] <실험예 8> 아토피유발 동물에서의 혈중 히스타민 수준에 미치는 영향 실험
- [0118] 상기 실시예 시료들의 아토피 유발 동물에서의 혈중 히스타민수준에 미치는 영향을 확인하기 위하여, 문헌에 기재된 방법을 응용하여 하기와 같이 실험하였다(Lee TY et al., Oral administration of poly-γ-glutamate ameliorates atopic dermatitis in Nc/Nga mice by suppressing Th2-biased immune response and production of IL-17A. J Invest Dermatol. 134(3):704-701, 2014).
- [0119] 상기 실험예 1의 아토피 유발 동물에서의 혈중 히스타민 수준에 미치는 영향을 확인하기 위하여, 동물을 희생시켜 얻은 혈액을 16,000rpm에서 20분간 원심분리하여 혈청을 얻은 후 mouse histamine ELISA kit(BA E-1000, LDN, Nordhorn, Germany)를 이용하여 측정하였다.
- [0120] 히스타민은 mast cell안에 저장되어 있다가 mast cell이 자극되어 손상되면 방출되어 혈관의 이완과 투과성의 증가시켜 혈구와 여러 혈장단백질들이 세균이 침입한 부위로 빨리 이동할 수 있도록 하여 염증반응을 일으키게 된다. 과도한 면역반응으로 인한 히스타민의 과다 분비는 알러지 반응과 아나필락시스를 일으키기도 한다. B세포에서 생성된 과다한 IgE가 mast cell을 자극시켜 히스타민의 방출을 증가시키게 되므로, IgE와 함께 알레르기 증상을 평가하는 중요한 지표이다 (Lee TY et al., Oral administration of poly-γ-glutamate ameliorates atopic dermatitis in Nc/Nga mice by suppressing Th2-biased immune response and production of IL-17A. J Invest Dermatol. 134(3):704-701, 2014).
- [0121] 상기 실험 결과, 정상대조군에서 혈중 히스타민의 농도는 65.2 ± 4.1 nmol/L인 반면, 아토피대조군은 100.6 ± 15.4 nmol/L으로 유의적으로 증가되었다($P < 0.05$). 실험군 중에서 아토피대조군과 유의적으로 차이가 있는 군은 FCG30(77.2 ± 10.8 nmol/L)과 FCG80(82.4 ± 12.3 nmol/L)이었다($P < 0.05$)(도 9).
- [0122] 따라서 본 연구의 결과에서는 황국균 발효 작두콩 추출물에서 아토피 피부염 억제효능이 나타났음을 확인하였으며 특히 30%주정 추출물과 80% 주정 추출물에서 효능이 좋았음을 확인하였다. 이러한 결과는 발효에 의하여 알레르기 유발 감소에 유익한 아미노산의 증가에 의한 결과라고 예상되며 아토피 피부염 억제 효능을 지닌 국내 기능성 소재로서의 활용을 기대할 수 있다.
- [0123] 상기에 본 발명의 추출물을 포함하는 조성물의 제제예를 설명하나, 본 발명은 이를 한정하고자 함이 아닌 단지 구체적으로 설명하고자 함이다.
- [0124] **제제예 1. 산제의 제조**
- [0125] FCGH ----- 20 mg
- [0126] 유당 ----- 100 mg
- [0127] 탈크 ----- 10 mg
- [0128] 상기의 성분들을 혼합하고 기밀포에 충전하여 산제를 제조한다.
- [0129] **제제예 2. 정제의 제조**
- [0130] FCG30 ----- 10 mg
- [0131] 옥수수전분 ----- 100 mg
- [0132] 유당 ----- 100 mg
- [0133] 스테아린산 마그네슘 ----- 2 mg
- [0134] 상기의 성분들을 혼합한 후 통상의 정제 제조방법에 따라서 타정하여 정제를 제조한다.

제제예 3. 캡슐제의 제조

FCG80 ----- 10 mg

결정성 셀룰로오스 ----- 3 mg

락토오스 ----- 14.8 mg

마그네슘 스테아레이트 ----- 0.2 mg

통상의 캡슐제 제조방법에 따라 상기의 성분을 혼합하고 젤라틴 캡슐에 충전하여 캡슐제를 제조한다.

제제예 4. 주사제의 제조

FCGH ----- 10 mg

만니톨 ----- 180 mg

주사용 멸균 증류수 ----- 2974 mg

Na2HP04, 12H2O ----- 26 mg

통상의 주사제의 제조방법에 따라 1 앰플당(2ml) 상기의 성분 함량으로 제조한다.

제제예 5. 액제의 제조

FCG30 ----- 20 mg

이성화당 ----- 10 g

만니톨 ----- 5 g

정제수 ----- 적량

통상의 액제의 제조방법에 따라 정제수에 각각의 성분을 가하여 용해시키고 레몬향을 적량 가한 다음 상기의 성분을 혼합한 다음 정제수를 가하여 전체를 정제수를 가하여 전체 100ml로 조절한 후 갈색병에 충전하여 멸균시켜 액제를 제조한다.

제제예 6. 건강 식품의 제조

FCG80 ----- 1000 mg

비타민 혼합물 ----- 적량

비타민 A 아세테이트 ----- 70 μ g

비타민 E ----- 1.0 mg

비타민 B1 ----- 0.13 mg

비타민 B2 ----- 0.15 mg

비타민 B6 ----- 0.5 mg

비타민 B12 ----- 0.2 μ g

비타민 C ----- 10 mg

비오틴 ----- 10 μ g

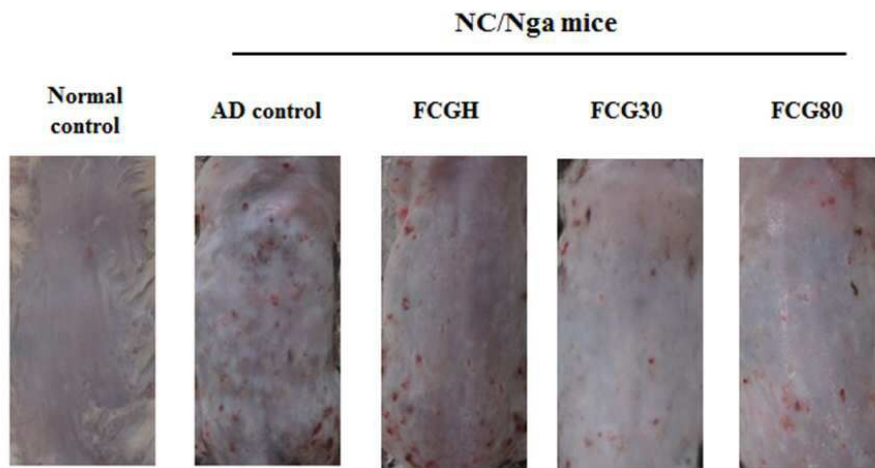
니코틴산아미드 ----- 1.7 mg

엽산 ----- 50 μ g

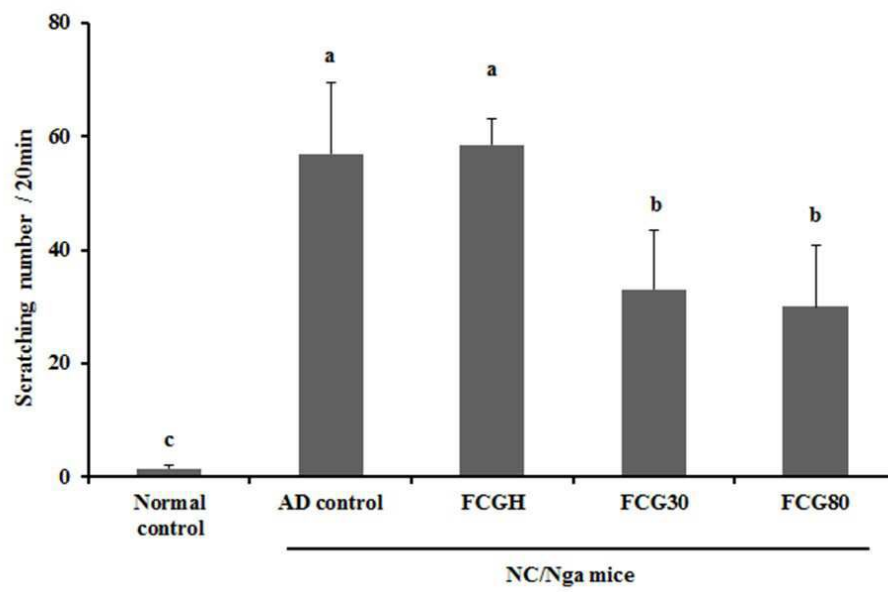
[0166]	판토텐산 칼슘 -----	0.5 mg
[0167]	무기질 혼합물 -----	적량
[0168]	황산제1철 -----	1.75 mg
[0169]	산화아연 -----	0.82 mg
[0170]	탄산마그네슘 -----	25.3 mg
[0171]	제1인산칼륨 -----	15 mg
[0172]	제2인산칼슘 -----	55 mg
[0173]	구연산칼륨 -----	90 mg
[0174]	탄산칼슘 -----	100 mg
[0175]	염화마그네슘 -----	24.8 mg
[0176]	상기의 비타민 및 미네랄 혼합물의 조성비는 비교적 건강식품에 적합한 성분을 바람직한 실시예로 혼합 조성하였지만, 그 배합비를 임의로 변형 실시하여도 무방하며, 통상의 건강식품 제조방법에 따라 상기의 성분을 혼합한 다음, 과립을 제조하고, 통상의 방법에 따라 건강식품 조성물 제조에 사용할 수 있다.	
[0177]	제제예 7. 건강 음료의 제조	
[0178]	FCG80 -----	1000 mg
[0179]	구연산 -----	1000 mg
[0180]	올리고당 -----	100 g
[0181]	매실농축액 -----	2 g
[0182]	타우린 -----	1 g
[0183]	정제수를 가하여 -----	전체 900 ml
[0184]	통상의 건강음료 제조방법에 따라 상기의 성분을 혼합한 다음, 약 1시간동안 85℃에서 교반 가열한 후, 만들어진 용액을 여과하여 멸균된 2ℓ 용기에 취득하여 밀봉 멸균한 뒤 냉장 보관한 다음 본 발명의 건강음료 조성물 제조에 사용한다.	
[0185]	상기 조성비는 비교적 기호음료에 적합한 성분을 바람직한 실시예로 혼합 조성하였지만, 수요계층, 수요국가, 사용용도 등 지역적, 민족적 기호도에 따라서 그 배합비를 임의로 변형 실시하여도 무방하다.	

도면

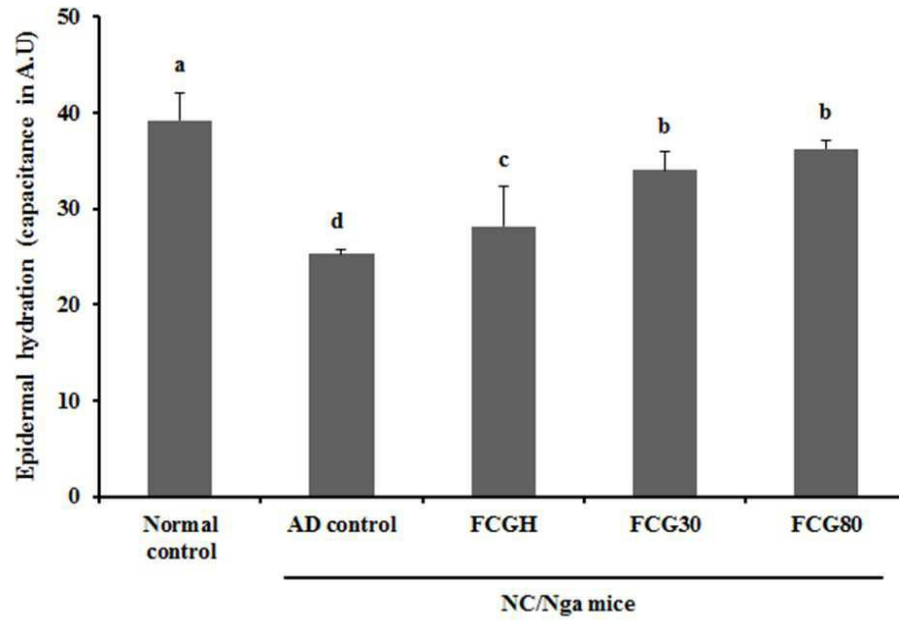
도면1



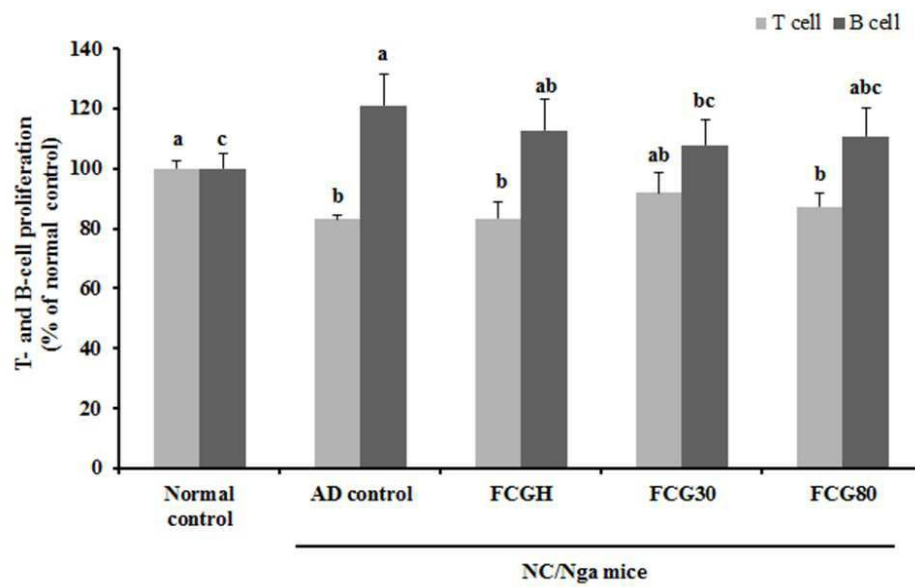
도면2



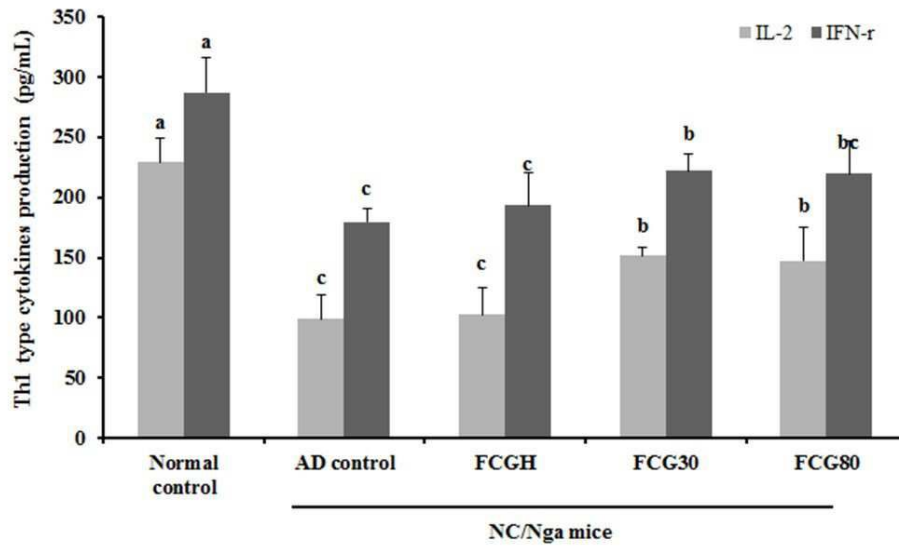
도면3



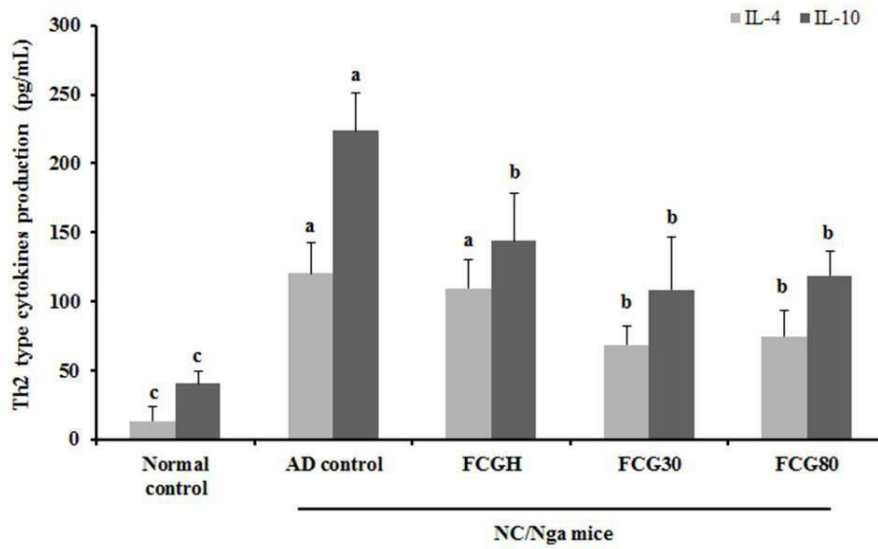
도면4



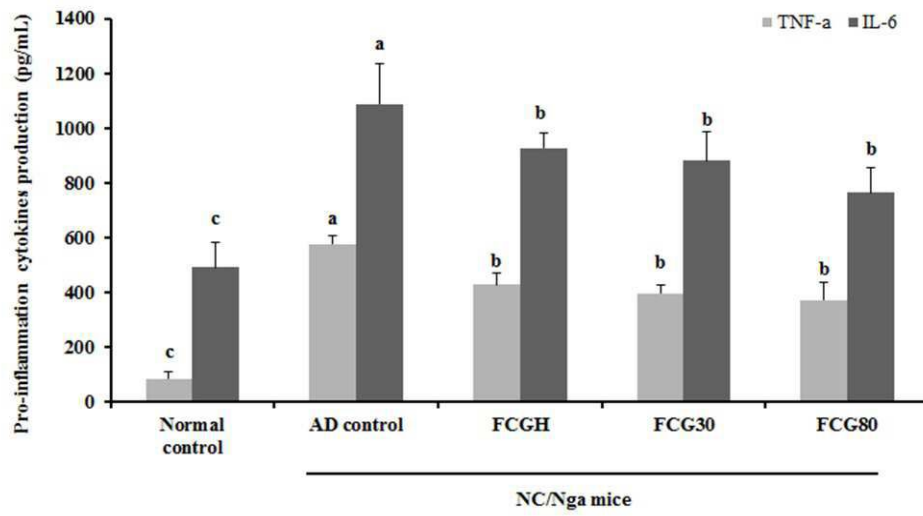
도면5



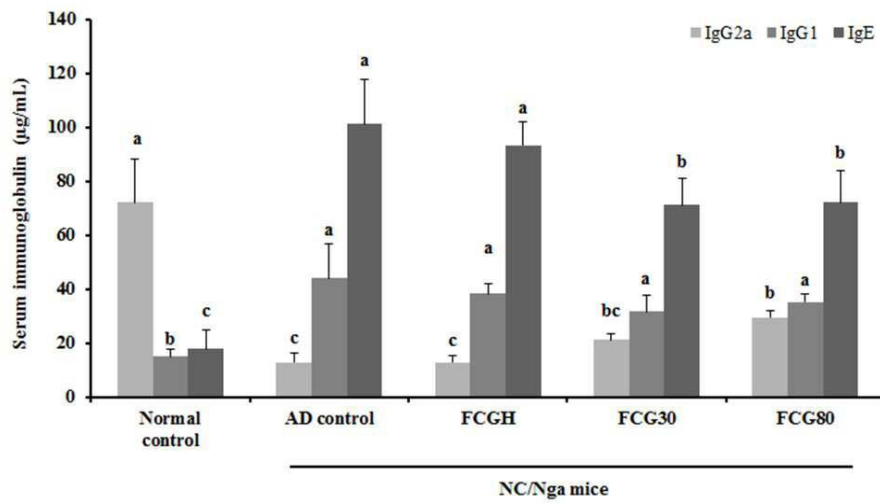
도면6



도면7



도면8



도면9

