



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2020-0064249
(43) 공개일자 2020년06월08일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 36/185 (2006.01) A23L 33/105 (2016.01)
A61K 31/37 (2006.01) A61K 31/7048 (2006.01)
A61P 25/28 (2006.01) B01D 11/04 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61K 36/185 (2013.01)
A23L 33/105 (2016.08)

(21) 출원번호 10-2018-0149807

(22) 출원일자 2018년11월28일
심사청구일자 2018년11월28일

(71) 출원인

전남대학교산학협력단
광주광역시 북구 용봉로 77 (용봉동)

(72) 발명자

남승희
광주광역시 북구 저불로 21, 105동 1102호 (용봉동, 모아미래도아파트)

이방희

전라남도 화순군 화순읍 광덕로 202, 504동 1216호 (화순 부영아파트)

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

최규환

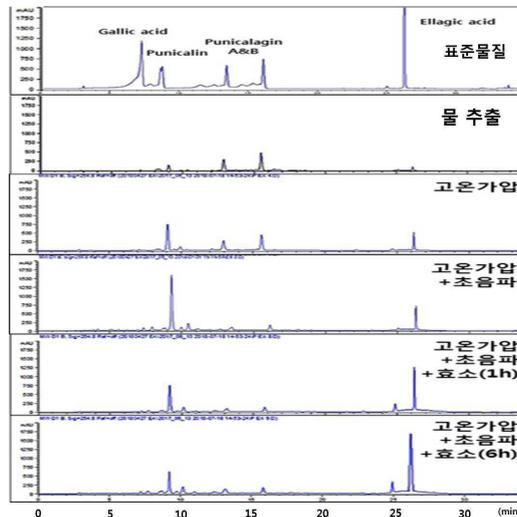
전체 청구항 수 : 총 10 항

(54) 발명의 명칭 석류로부터 푸니칼린 또는 엘라그산을 효율적으로 추출하는 방법

(57) 요약

본 발명은 석류로부터 푸니칼린 또는 엘라그산을 효율적으로 추출하는 방법에 관한 것이다. 본 발명은 푸니칼린 및 엘라그산의 함량이 우수한 품종을 선별하고, 버려지는 과피를 이용하여 고체 상태에서 고온가압처리한 후 초음파 처리하고, 추가로 효소를 처리함으로써, 물 추출, 고온가압 단독 처리에 비해 고함량의 푸니칼린 또는 엘라그산을 획득하였다. 또한, 본 발명의 방법으로 추출된 엘라그산 함량이 증진된 석류 추출액은 항스트레스 또는 퇴행성 뇌질환의 개선효과가 있으므로, 스트레스성 질환 및 퇴행성 뇌질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물로 사용할 수 있다.

대표도 - 도4



(52) CPC특허분류

A61K 31/37 (2013.01)
A61K 31/7048 (2013.01)
A61P 25/28 (2018.01)
B01D 11/0423 (2013.01)
A23V 2002/00 (2013.01)
A23V 2200/322 (2013.01)
A23V 2300/48 (2013.01)
A61K 2236/19 (2013.01)
A61K 2236/30 (2013.01)

김수현

광주광역시 북구 설죽로 416, 101동 1001호 (삼각동, 신일곡골드클래스)

(72) 발명자

양광열

광주광역시 북구 용봉로 77 전남대학교 농생대 4호관 210호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 NRF-2017R1D1A1B03936148

부처명 교육부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 이공학 개인기초연구지원사업, 기본사업

연구과제명 석류 유래 미백성분인 탄닌유도체, 갈릭산과 엘라직산 추출 및 생물전환 합성을 통한 기능성 향상

기여율 1/1

주관기관 전남대학교

연구기간 2016.11.01 ~ 2019.10.30

명세서

청구범위

청구항 1

- 1) 석류 과피 분말을 고온가압 처리하는 단계; 및
- 2) 상기 단계 1)의 고온가압 처리된 석류 과피 분말을 용매에 용해한 후 초음파 처리하는 단계;를 포함하는 석류로부터 푸니칼린 또는 엘라그산을 효율적으로 추출하는 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 단계 1)의 고온가압처리는 110~130℃에서 10~200분 동안 처리하는 것을 특징으로 하는 석류로부터 푸니칼린 또는 엘라그산을 효율적으로 추출하는 방법.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 단계 2)의 용매는 물, C₁~C₄의 저급 알코올 또는 이들의 혼합물인 것을 특징으로 하는 석류로부터 푸니칼린 또는 엘라그산을 효율적으로 추출하는 방법.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 단계 2)의 초음파 처리는 600~800W, 15~25kHz 강도로 3~7초 조사 후, 0.5~1.5초 정지하는 과정을 총 10~30분 동안 진행하여 처리하는 것을 특징으로 하는 석류로부터 푸니칼린 또는 엘라그산을 효율적으로 추출하는 방법.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 단계 2) 이후에, 효소를 처리하는 단계;를 추가로 더 포함하는 것을 특징으로 하는 석류로부터 푸니칼린 또는 엘라그산을 효율적으로 추출하는 방법.

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 효소는 아스퍼질러스 나이거(*Aspergillus niger*) 유래 글루카나아제(glucanase) 및 아라비나아제(arabinanase)인 것을 특징으로 하는 석류로부터 푸니칼린 또는 엘라그산을 효율적으로 추출하는 방법.

청구항 7

제1항에 있어서,

- 1) 석류 과피 분말을 110~130℃에서 10~200분 동안 고온가압처리하는 단계; 및
- 2) 상기 단계 1) 이후에, 고온가압처리된 석류 과피 분말을 물에 용해한 후 600~800W, 15~25kHz 강도로 3~7초 조사 후, 0.5~1.5초 정지하는 과정을 총 10~30분 동안 진행하여 초음파 처리하는 단계;를 포함하는 석류로부터 푸니칼린을 효율적으로 추출하는 방법.

청구항 8

제1항에 있어서,

- 1) 석류 과피 분말을 110~130℃에서 10~200분 동안 고온가압처리하는 단계;
- 2) 상기 단계 1) 이후에, 고온가압처리된 석류 과피 분말을 물에 용해한 후 600~800W, 15~25kHz 강도로 3~7초 조사 후, 0.5~1.5초 정지하는 과정을 총 10~30분 동안 진행하여 초음파 처리하는 단계; 및
- 3) 상기 단계 2)의 고온가압 및 초음파 처리물에 아스퍼질러스 나이거(*Aspergillus niger*) 유래 글루카나아제(glucanase) 및 아라비나아제(arabinanase)를 1~6시간 동안 처리하는 단계;를 포함하는 석류로부터 엘라그산

을 효율적으로 추출하는 방법.

청구항 9

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항의 방법에 의해 추출된 엘라그산 함량이 증진된 식료 추출액을 유효성분으로 함유하는 스트레스성 질환 및 퇴행성 뇌질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물.

청구항 10

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항의 방법에 의해 추출된 엘라그산 함량이 증진된 식료 추출액을 유효성분으로 함유하는 스트레스성 질환 및 퇴행성 뇌질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 식료 과피로부터 푸니칼린 또는 엘라그산을 효율적으로 추출하는 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 식료(*Punica granatum* Linne)는 식료과(Punicaceae)에 속하는 낙엽활엽으로, 예로부터 약용으로 수렴제나, 이질, 구충제 또는 궤양 등의 질환에 널리 이용되어 왔다. 특히 식료 과피는 과일의 30%를 차지하며, 호흡기 질환이나 피부질환에 효과를 보이는 것으로 알려져 있다.

[0003] 식료 껍질에는 특히 탄닌이 많아 수렴성 건위약으로 많이 사용되어 왔는데, 이들은 주로 엘라지탄닌(ellagitannin)으로 헥사히드록시디펜산(hexahydroxydiphenic acid, HHDP)이 글루코스나 퀴산(quinic acid) 구조와 에스터 결합으로 연결되어 있다. 강산에 노출시 가수분해되며, 고분자 크기의 수용성 페놀 구조인 푸니칼라진(punicalagin)으로 나뉘며, 상기 푸니칼라진은 다시 푸니칼린(4,6-(S-S)-gallagyl D-glucose)과 폴리페놀 4개의 링으로 구성된 엘라그산 또는 헥사히드록시디펜산(hexahydroxydiphenic acid)로 나누어진다. 특히 엘라그산(ellagic acid)은 딸기, 포도, 식료, 나무딸기(라즈베리), 월귤나무(블루베리), 호두 같은 약 45가지의 과일과 견과에 함유되어 있는데, 그램당 식료 껍질은 1.78~12.8mg, 붉은 나무딸기는 1.50mg, 딸기에는 0.64mg, 호두에는 0.59mg가 함유되어 있다.

[0004] 푸니칼린 및 엘라그산은 다양한 효과가 있지만, 식료로부터 대량 추출하기에는 어려움이 있다. 따라서 식료로부터 푸니칼린 또는 엘라그산을 더욱 효율적으로 추출하여 동량의 원료로부터 대량의 푸니칼린 또는 엘라그산을 획득하는 방법에 대한 연구가 필요하다. 또한, 식료 과피는 산업과정에서 버려지는 물질로, 이를 활용하면 환경 보호 및 새로운 소득원으로 이용될 수 있다.

[0005] 한편, 한국공개특허 제2011-0037347호에는 산가수분해를 통해 식료로부터 엘라그산을 효율적으로 분리하는 방법 및 이를 함유한 기능성 화장품이 개시되어 있지만, 고온가압 및 초음파를 이용하여 식료 과피로부터 푸니칼린 또는 엘라그산을 효율적으로 추출하는 방법에 관한 본 발명은 개시된 바 없다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 본 발명은 상기와 같은 요구에 의해 도출된 것으로, 식료 품종 및 부위별 비교를 통해 푸니칼린 또는 엘라그산의 함량이 높은 품종 및 부위를 선별하고, 고온가압, 초음파 처리 및 효소처리를 통해 선별된 식료 품종의 부위로부터 푸니칼린 또는 엘라그산을 효율적으로 추출하는 방법을 제공하고, 상기 제조방법으로 제조된 엘라그산 함량이 증진된 식료 추출액의 항스트레스 또는 퇴행성 뇌질환 개선효과를 확인함으로써, 본 발명을 완성하였다.

과제의 해결 수단

[0007] 상기 과제를 해결하기 위하여, 본 발명은

[0008] 1) 식료 과피 분말을 고온가압 처리하는 단계; 및

[0009] 2) 상기 단계 1)의 고온가압 처리된 식료 과피 분말을 용매에 용해한 후 초음파 처리하는 단계;를 포함하는 식료로부터 푸니칼린 또는 엘라그산을 효율적으로 추출하는 방법을 제공한다.

[0010] 또한, 본 발명은 상기 방법에 의해 추출된 엘라그산 함량이 증진된 석류 추출액을 유효성분으로 함유하는 스트레스성 질환 및 퇴행성 뇌질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물을 제공한다.

[0011] 또한, 본 발명은 상기 방법에 의해 추출된 엘라그산 함량이 증진된 석류 추출액을 유효성분으로 함유하는 스트레스성 질환 및 퇴행성 뇌질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.

발명의 효과

[0012] 본 발명은 석류로부터 푸니칼린 또는 엘라그산을 효율적으로 추출하는 방법에 관한 것이다. 본 발명은 꽃향, 레드향, 외도 1 및 외도 2의 과피, 과씨 및 과즙 추출물의 푸니칼라진, 푸니칼린, 엘라그산, 갈락산 함량을 비교하여, 푸니칼린 및 엘라그산의 함량이 우수하고, 총 함량이 높은 레드향 과피를 푸니칼린 또는 엘라그산을 효율적으로 추출하기 위한 원료로 선정하였다.

[0013] 또한, 레드향 과피를 물 추출, 메탄올 추출, 초음파 추출 또는 고온가압 추출하여 고온가압 추출물의 푸니칼린 또는 엘라그산 함량이 높은 것을 확인하였고, 고온가압 레드향 과피 원료에 다시 초음파 처리를 하였을 경우, 푸니칼린 또는 엘라그산 함량이 더욱 증진되는 것을 확인하였다.

[0014] 또한, 상기 초음파 처리물에 추가로 아스퍼질러스 나이거(*Aspergillus niger*) 유래 글루카나아제(glucanase) 및 아라비나아제(arabinanase)와 반응시켜 엘라그산 함량을 더욱 증진시키는 효과를 확인하였다.

[0015] 또한, 본 발명의 방법으로 추출된 엘라그산 함량이 증진된 석류 추출액이 항산화 효과, 글루타메이트(glutamate) 자극으로부터 신경아세포종인 SH-SY5Y 세포의 생존율을 향상, 글루타메이트(glutamate) 자극에 의해 증가된 코티졸(cortisol)의 분비량 감소 및 글루타메이트(glutamate) 자극에 의해 증가된 아세틸콜린 분해효소(acetylcholinesterase)의 활성을 감소시키는 효과가 있으므로, 상기 추출방법으로 추출된 엘라그산 함량이 증진된 석류 추출액을 유효성분으로 함유하는 본 발명의 조성물은 스트레스성 질환 및 퇴행성 뇌질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물; 또는 스트레스성 질환 및 퇴행성 뇌질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물;로 사용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0016] 도 1은 본 발명의 1차 추출방법에 따른 C18-역상 컬럼 분석결과이다.
- 도 2는 본 발명의 물 추출, 고온가압 또는 고온가압 후 초음파 처리하는 추출방법에 따른 C18-역상 컬럼 분석결과이다.
- 도 3은 고온가압 처리된 석류 시료에 8가지 상업효소(SPL, Viscozyme, CL, CP, PR, UF, TH, BG2)를 처리한 후 엘라그산의 생성정도를 TLC 분석한 결과이다. EA는 엘라그산, GA는 갈락산, PC는 푸니칼린, PCG는 푸니칼라진, EX는 석류 시료를 로딩한 것이다.
- 도 4는 본 발명의 물 추출, 고온가압, 고온가압 후 초음파 처리 또는 고온가압 후 초음파 처리한 다음 효소처리하는 추출방법에 따른 C18-역상 컬럼 분석결과이다.
- 도 5는 ESI(-)-MS/MS 분석에 의해 푸니칼린(A) 및 엘라그산(B)의 분자량을 확인한 결과이다.
- 도 6은 석류 과피 함량, 고온가압 시간 및 초음파 처리 시간에 따른 중심합성계획법에 의해 반응한 푸니칼린 생성물의 반응표면분석 3차원 모식도이다.
- 도 7은 석류 과피 함량, 초음파 처리 시간 및 효소처리 농도에 따른 중심합성계획법에 의해 반응한 엘라그산 생성물의 반응표면분석 3차원 모식도이다.
- 도 8은 본 발명의 엘라그산 함량이 증진된 석류 추출액의 DPPH 라디칼 소거능을 확인한 결과이다. VitC는 비타민 C이고, EA는 엘라그산이다.
- 도 9는 본 발명의 엘라그산 함량이 증진된 석류 추출액의 뇌신경세포 보호효과를 확인한 결과이다. 글루타메이트는 뇌신경세포 사멸 유도 물질이다. 테아닌은 양성대조군이고, Buffer는 시료의 용매 처리군이다.
- 도 10은 본 발명의 엘라그산 함량이 증진된 석류 추출액의 코티졸 분비 억제효과를 확인한 것으로, 글루타메이트는 코티졸 분비 유도 물질이다. 테아닌은 양성대조군이고, Buffer는 시료의 용매 처리군이다.
- 도 11은 본 발명의 엘라그산 함량이 증진된 석류 추출액의 아세틸콜린에스테라아제 활성 억제효과를 확인한 것

으로, 글루타메이트는 아세틸콜린에스테라아제 활성 유도 물질이다. 타크린(tacrine)은 양성 대조군이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0017] 본 발명은
- [0018] 1) 석류 과피 분말을 고온가압 처리하는 단계; 및
- [0019] 2) 상기 단계 1)의 고온가압 처리된 석류 과피 분말을 용매에 용해한 후 초음파 처리하는 단계;를 포함하는 석류로부터 푸니칼린 또는 엘라그산을 효율적으로 추출하는 방법에 관한 것이다.
- [0020] 본 발명의 석류 과피 분말은 석류 품종이라면 어느 것이든 상관없고, 바람직하게는 레드향 품종을 사용하는 것이지만, 이에 한정하는 것은 아니다.
- [0021] 상기 단계 1)의 고온가압처리는 110~130℃에서 10~200분 동안 처리하는 것일 수 있으며, 바람직하게는 121℃에서 20~170분 동안 처리하는 것이며, 더 바람직하게는 121℃에서 165분 동안 처리하는 것이지만, 이에 한정하는 것은 아니다.
- [0022] 상기 고온가압처리에서 가압은 1.1~2.0 기압의 압력을 가하는 것이고, 바람직하게는 1.3~1.7 기압의 압력을 가하는 것이며, 더 바람직하게는 1.5기압의 압력을 가하는 것이지만, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0023] 상기 단계 2)의 용매는 물, C₁~C₄의 저급 알코올 또는 이들의 혼합물인 것일 수 있고, 바람직하게는 물 또는 에탄올을 용매로 사용하는 것이며, 더 바람직하게는 물을 용매로 사용하여 용해하는 것이지만, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0024] 상기 단계 2)의 초음파 처리는 600~800W, 15~25kHz 강도로 3~7초 조사 후, 0.5~1.5초 정지하는 과정을 총 10~30분 동안 진행하여 처리할 수 있으며, 바람직하게는 700W, 20kHz 강도로 5초 조사 후, 1초 정지하는 과정을 총 20분 동안 진행하여 처리하는 것이지만, 이에 한정하는 것은 아니다.
- [0025] 본 발명은 상기 단계 2) 이후에, 효소를 처리하는 단계;를 추가로 더 포함할 수 있고, 바람직하게는 상기 단계 2) 이후에, 글루카나아제(glucanase) 및 아라비나아제(arabinanase)를 처리하는 단계;를 추가로 더 포함할 수 있으며, 더 바람직하게는 상기 단계 2) 이후에, 글루카나아제(glucanase) 및 아라비나아제(arabinanase)를 0.5~10시간 동안 처리하는 단계;를 추가로 더 포함하는 것이지만, 이에 한정하는 것은 아니다.
- [0026] 본 발명의 글루카나아제(glucanase) 및 아라비나아제(arabinanase)는 아스퍼질러스 나이거(*Aspergillus niger*)에서 유래한 효소이다.
- [0027] 글루카나아제(glucanase) 및 아라비나아제(arabinanase)는 0.5~10시간 동안 처리할 수 있고, 바람직하게는 1~7시간 동안 처리하는 것이며, 더 바람직하게는 6시간 동안 처리하는 것이지만, 이에 한정하는 것은 아니다.
- [0028] 본 발명의 일 구현 예에서, 석류로부터 푸니칼린을 효율적으로 추출하는 방법은
- [0029] 1) 석류 과피 분말을 110~130℃에서 10~200분 동안 고온가압처리하는 단계; 및
- [0030] 2) 상기 단계 1) 이후에, 고온가압처리된 석류 과피 분말을 물에 용해한 후 600~800W, 15~25kHz 강도로 3~7초 조사 후, 0.5~1.5초 정지하는 과정을 총 10~30분 동안 진행하여 초음파 처리하는 단계;를 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0031] 본 발명의 일 구현 예에서, 석류로부터 엘라그산을 효율적으로 추출하는 방법은
- [0032] 1) 석류 과피 분말을 110~130℃에서 10~200분 동안 고온가압처리하는 단계;
- [0033] 2) 상기 단계 1) 이후에, 고온가압처리된 석류 과피 분말을 물에 용해한 후 600~800W, 15~25kHz 강도로 3~7초 조사 후, 0.5~1.5초 정지하는 과정을 총 10~30분 동안 진행하여 초음파 처리하는 단계; 및
- [0034] 3) 상기 단계 2)의 고온가압 및 초음파 처리물에 아스퍼질러스 나이거(*Aspergillus niger*) 유래 글루카나아제(glucanase) 및 아라비나아제(arabinanase)를 1~6시간 동안 처리하는 단계;를 포함할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0035] 상기 푸니칼린 또는 엘라그산은 상기 고온가압 및 초음파 처리 단계 또는 효소처리 단계 이후에 통상적인 방법에 의해 분리 및 정제될 수 있다. 예를 들어, HPLC(High Performance Liquid Chromatography)를 이용하여 각

화합물들을 분리할 수 있다. 사용된 컬럼은 C18-역상 컬럼이나 Hypersil APS-2 NH2 컬럼 등을 이용할 수 있다.

- [0036] 또한, 중심합성계획법 및 표면반응분석법을 통한 푸니칼린 최적 수율 조건은 5~15%(w/v) 함량의 석류 과피를 110~130℃에서 100~200분 동안 고온가압한후 650~750W, 15~25kHz의 강도로 4~6초 조사 후, 0.5~1.5초 정지하는 과정을 총 15~25분 동안 초음파 처리하는 것일 수 있고, 바람직하게는 10%(w/v) 함량의 석류 과피를 121℃에서 165분 동안 고온가압한후 700W, 20kHz의 강도로 5초 조사 후, 1초 정지하는 과정을 총 20분 동안 초음파 처리하는 것이지만, 이에 한정하는 것은 아니다.
- [0037] 석류 과피 함량, 초음파 처리 조건 및 효소처리 조건에 대한 중심합성계획법 및 표면반응분석법을 통한 엘라그산 최적 수율 조건은 석류 과피 함량은 5~15%(w/v), 초음파 처리 조건은 650~750W, 15~25kHz의 강도로 4~6초 조사 후, 0.5~1.5초 정지하는 과정을 총 15~25분 동안 처리하는 것이고, UF 효소(1.25U/ml)는 1~2%(v/v) 농도로 처리하는 것일 수 있고, 바람직하게는 석류 과피 함량은 10%(w/v), 초음파 처리 조건은 700W, 20kHz의 강도로 5초 조사 후, 1초 정지하는 과정을 총 20분 동안 처리하는 것이고, UF 효소(1.25U/ml)는 1.65%(v/v) 농도로 처리하는 것이지만, 이에 한정하는 것은 아니다.
- [0038] 또한, 본 발명은 상기 방법에 의해 추출된 엘라그산 함량이 증진된 석류 추출액을 유효성분으로 함유하는 스트레스성 질환 및 퇴행성 뇌질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물에 관한 것이다.
- [0039] 상기 퇴행성 뇌질환은 아세틸콜린 분해에 의해 유발되는 것으로, 치매(dementia), 알츠하이머 질환(Alzheimer's disease) 및 파킨슨 질환(Parkinson disease)으로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나인 것일 수 있고, 바람직하게는 치매 또는 알츠하이머 질환일 수 있지만, 이에 한정하는 것은 아니다.
- [0040] 상기 스트레스성 질환은 코티졸 분비의 증가에 의해 발생하는 우울증(depressive disorder), 수면장애(sleep disturbance) 및 불안장애(anxiety disorder)로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상인 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0041] 본 발명의 건강기능식품 조성물을 식품첨가물로 사용하는 경우, 상기 건강기능식품 조성물을 그대로 첨가하거나 다른 식품 또는 식품성분과 함께 사용될 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다. 유효성분의 양은 그의 사용 목적(예방 또는 개선)에 따라 적절하게 사용될 수 있다. 일반적으로, 식품 또는 음료의 제조시 본 발명의 건강기능식품 조성물은 총 원료에 대하여 15 중량부 이하, 바람직하게는 10 중량부 이하의 양으로 첨가된다. 그러나 건강을 목적으로 하는 장기간의 섭취인 경우에는 상기 양은 상기 범위 이하일 수 있으며, 안전성 면에서 아무런 문제가 없기 때문에 유효성분은 상기 범위 이상의 양으로 사용될 수 있다.
- [0042] 상기 건강기능식품의 종류에 특별한 제한은 없다. 상기 건강기능식품 조성물을 첨가할 수 있는 식품의 예로는 육류, 소시지, 빵, 초콜릿, 캔디류, 스낵류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류를 포함한 낙농제품, 각종 스프, 음료수, 차 드링크제, 알콜 음료 및 비타민 복합제 등이 있으며, 통상적인 의미에서의 건강식품을 모두 포함한다.
- [0043] 또한, 본 발명의 건강기능식품 조성물은 식품, 특히 기능성 식품으로 제조될 수 있다. 본 발명의 기능성 식품은 식품 제조 시에 통상적으로 첨가되는 성분을 포함하며, 예를 들어, 단백질, 탄수화물, 지방, 영양소 및 조미제를 포함한다. 예컨대, 드링크제로 제조되는 경우에는 유효성분 이외에 천연 탄수화물 또는 향미제를 추가 성분으로서 포함할 수 있다. 상기 천연 탄수화물은 모노사카라이드(예컨대, 글루코오스, 프럭토오스 등), 디사카라이드(예컨대, 말토스, 수크로스 등), 올리고당, 폴리사카라이드(예컨대, 텍스트린, 시클로텍스트린 등) 또는 당알코올(예컨대, 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등)인 것이 바람직하다. 상기 향미제는 천연 향미제(예컨대, 타우마틴, 스테비아 추출물 등)와 합성 향미제(예컨대, 사카린, 아스파르탐 등)를 이용할 수 있다.
- [0044] 상기 건강기능식품 조성물 이외에 여러 가지 영양제, 비타민, 전해질, 풍미제, 착색제, 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알코올, 탄산음료에 사용되는 탄산화제 등을 더 함유할 수 있다. 이러한 상기 첨가되는 성분의 비율은 크게 중요하진 않지만 본 발명의 건강기능식품 조성물 100 중량부에 대하여, 0.01 내지 0.1 중량부의 범위에서 선택되는 것이 일반적이다.
- [0045] 또한, 본 발명은 상기 방법에 의해 추출된 엘라그산 함량이 증진된 석류 추출액을 유효성분으로 함유하는 스트레스성 질환 및 퇴행성 뇌질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물에 관한 것이다.
- [0046] 본 발명에 따른 상기 약학 조성물은 각각 통상의 방법에 따라 캡슐제, 산제, 과립제, 정제, 현탁액, 에멀전, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 및 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용될 수 있다.

- [0047] 본 발명에 따른 상기 약학 조성물은 약학적으로 허용 가능한 담체, 부형제 또는 희석제를 더 포함할 수 있다.
- [0048] 본 발명의 약학 조성물에 포함될 수 있는 담체, 부형제 및 희석제로는 락토즈, 텍스트로즈, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로오스, 메틸 셀룰로오스, 미정질 셀룰로오스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유 등을 포함한 다양한 화합물 혹은 혼합물을 들 수 있다.
- [0049] 본 발명의 약학 조성물의 적합한 투여량은 제제화 방법, 투여 방식, 환자의 연령, 체중, 성, 병적 상태, 음식, 투여 시간, 투여 경로, 배설 속도 및 반응 감응성과 같은 요인들에 의해 다양하게 처방될 수 있다.
- [0050] 본 발명의 약학 조성물은 경구 또는 비경구로 투여할 수 있으며, 비경구 투여의 경우, 피부에 국소적으로 도포, 정맥 내 주입, 피하 주입, 근육 주입, 복강 주입, 경피 투여 등으로 투여할 수 있다.
- [0051] 이하, 실시예를 이용하여 본 발명을 더욱 상세하게 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들에 의해 제한되지 않는다는 것은 당해 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어 자명한 것이다.

[0052] **실시예 1. 석류 품종 및 부위별 푸니칼린 또는 엘라그산 함량 확인**

- [0053] 푸니칼린 또는 엘라그산의 함량이 높은 품종 및 부위를 선별하기 위해 꽃향, 레드향, 외도 1호 및 외도 2호의 과피, 과씨 및 과즙을 동결건조한 후 분쇄하였다. 그 후 50%(v/v) 에탄올에 최종 함량이 4%(w/v)가 되도록 용해하고, 0.05M HCl을 첨가한 후 30분 동안 초음파 추출하였다. 그 후 추출한 시료는 10000rpm에서 15분 동안 원심 분리한 후 상등액을 0.22 μM 멤브레인 필터로 필터한 후 HPLC 분석 시료로 사용하였다.
- [0054] 상기 분석을 위해 HPLC on an PDA-MD2015 instrument(JASCO, Kyoto, Japan)에 순수분리를 위해 시료를 로딩하였다. 컬럼은 C18-역상 컬럼(300x19mm i.d., Waters)을 사용하였고, A 용매(0.1%(v/v) 포름산이 함유된 물)와 B 용매(0.1%(v/v) 포름산이 함유된 메탄올)를 이용하여 B 용매 대비 A 용매를 5%-20%까지 5분간, 20%-50%까지 10분간, 50%-10%까지 10분간 흘려보냈다. 유속은 0.9ml/min, 상기 시료는 254nm에서 MD 2015 model PDA detector(JASCO)를 사용해서 분석하였고, 컬럼온도의 온도는 40℃였다.
- [0055] 분석에 사용된 엘라그산, 갈릭산, 푸니칼린, 푸니칼라진 표준용액은 메탄올을 이용하여 농도비에 맞게 희석하여 사용하였다.
- [0056] 그 결과, 표 1에 개시된 바와 같이 레드향 품종의 레드향 과피의 푸니칼라진, 푸니칼린, 엘라그산 및 갈릭산을 포함하는 총 함량이 우수하였고, 부위별 비교에서는 과피, 과씨, 과즙 순으로 총 함량이 우수하였다. 따라서 레드향 과피의 푸니칼라진, 푸니칼린, 엘라그산 및 갈릭산을 포함하는 총 함량이 가장 높고, 푸니칼린 및 엘라그산의 함량 또한 우수하므로, 실험의 원료로 레드향 과피를 선정하였다.

표 1

[0057]

품종	부위	Punicalagin	Punicalin	Ellagic acid	Gallic acid	Total
		contents (mg/g 건조중량)				
꽃향	과피	47.99 ^c ± 0.53	1.17 ^c ± 0.03	2.20 ^d ± 0.15	0.26 ^c ± 0.01	311.40 ^d ± 0.09
	과씨	1.14 ^a ± 0.09	0.79 ^a ± 0.06	0.31 ^a ± 0.12	0.09 ^a ± 0.01	77.05 ^b ± 0.74
	과즙	0.94 ^b ± 0.03	1.90 ^b ± 0.03	0.17 ^a ± 0.02	0.08 ^b ± 0.01	66.03 ^c ± 0.08
레드향	과피	60.11 ^b ± 0.48	2.77 ^a ± 0.02	4.89 ^a ± 0.11	0.47 ^a ± 0.03	354.47 ^a ± 0.31
	과씨	0.88 ^b ± 0.04	0.11 ^b ± 0.01	0.22 ^b ± 0.03	0.07 ^b ± 0.01	80.41 ^a ± 0.24
	과즙	0.94 ^b ± 0.05	5.31 ^a ± 0.06	0.05 ^b ± 0.05	0.17 ^a ± 0.03	73.48 ^b ± 0.07
외도 1	과피	72.72 ^a ± 0.07	2.10 ^b ± 0.00	4.03 ^b ± 0.53	0.55 ^a ± 0.05	339.43 ^b ± 0.63
	과씨	0.86 ^b ± 0.00	0.04 ^c ± 0.01	0.03 ^d ± 0.01	0.07 ^b ± 0.00	71.77 ^c ± 0.32
	과즙	1.14 ^a ± 0.09	0.74 ^c ± 0.04	0.01 ^c ± 0.01	0.10 ^c ± 0.02	63.08 ^d ± 0.04
외도 2	과피	27.22 ^d ± 0.10	0.65 ^d ± 0.02	2.77 ^c ± 0.17	0.38 ^b ± 0.03	327.09 ^c ± 0.03

과씨	1.18 ^a ±0.14	0.73 ^a ±0.03	0.05 ^c ±0.05	0.10 ^a ±0.01	69.76 ^d ±0.04
과즙	0.73 ^c ±0.03	0.04 ^d ±0.01	0.03 ^b ±0.02	0.07 ^c ±0.02	75.04 ^a ±0.21

[0058] 열 내의 문자 a~d는 서로 유의미한 차이가 있다는 것을 의미하며, p<0.05이다.

[0059] **실시예 2. 1차 추출방법에 따른 폴리페놀류 함량 조사**

[0060] 상기 실시예 1에서 선정된 원료인 레드향 과피를 물, 50%(v/v) 에탄올 추출, 초음파 추출 또는 고온가압추출하여 추출방법에 따른 폴리페놀류 함량을 조사하였다.

[0061] 물 추출물은 동결건조한 석류 과피 분말 1g에 대하여 50ml의 물을 혼합하여 100℃에서 3시간 동안 열수 추출하여 제조하였다.

[0062] 50%(v/v) 에탄올 추출물은 동결건조한 석류 과피 분말 1g에 대하여 50ml의 50%(v/v) 에탄올을 혼합한 후 80℃에서 3시간 동안 추출하여 제조하였다.

[0063] 초음파 처리물은 동결건조한 석류 과피 분말 1g에 대하여 50ml의 물을 혼합한 후 50%(700W, 20kHz) 강도로 설정한 후 5초 조사 후, 1초 정지하는 과정을 10분 동안 진행하여 제조하였다.

[0064] 고온가압 처리물은 동결건조한 석류 과피 분말을 121℃에서 30분 동안 고상처리하여 제조하였다. 이후 분석을 위해 상기 분말 1g에 대하여 50ml의 물을 혼합하였다.

[0065] 상기 제조방법에 의한 추출물 또는 처리물은 실시예 1의 방법으로 분석하였고, 상기 분석 결과, 도 1 및 하기 표 2에 개시된 바와 같이, 4가지 제조방법을 비교한 결과, 고온가압 처리하였을 때 푸니칼린 및 엘라그산 함량이 현저히 증진되는 것을 확인하였다.

표 2

[0066]

	Punicalagin	Punicalin	Ellagic acid	Gallic Acid
	(mg/g 건조중량)			
물	2.93 ^d ±0.25	0.30 ^d ±0.1	0.73 ^d ±0.16	0.04 ^b ±0.03
50%(v/v) 에탄올	54.62 ^b ±0.33	0.68 ^c ±0.03	2.34 ^c ±0.10	0.04 ^b ±0.02
초음파	66.61 ^a ±0.92	3.18 ^b ±0.13	6.8 ^b ±0.20	0.04 ^b ±0.01
고온가압	25.52 ^c ±0.7	31.52 ^a ±0.07	9.48 ^a ±0.25	0.14 ^a ±0.08

[0067] 열 내의 문자 a~d는 서로 유의미한 차이가 있다는 것을 의미하며, p<0.05이다.

[0068] **실시예 3. 고온가압 및 초음파 처리물의 폴리페놀류 함량 조사**

[0069] 상기 실시예 2에서 가장 높은 푸니칼린 및 엘라그산 함량을 나타낸 제조방법인 고온가압 처리방법 이후에 초음파 처리를 추가한 후 푸니칼린 및 엘라그산의 함량을 분석하였다.

[0070] 물 추출물은 동결건조한 석류 과피 분말 5g에 대하여 50ml의 물을 혼합하여 100℃에서 3시간 동안 열수 추출하여 제조하였다.

[0071] 고온가압 처리물은 동결건조한 석류 과피 분말을 121℃에서 30분 동안 고상처리하여 제조하였다. 이후 분석을 위해 상기 분말 5g에 대하여 50ml의 물을 혼합하였다.

[0072] 고온가압 및 초음파 처리물은 상기 고온가압한 석류 과피 분말 5g에 대하여 50ml의 물을 혼합한 후 50%(700W, 20kHz) 강도로 설정한 후 5초 조사 후, 1초 정지하는 과정을 20분 동안 진행하여 제조하였다.

[0073] 상기 제조방법으로 제조된 추출물 및 처리물의 폴리페놀류 함량은 실시예 1의 방법으로 분석하였고, 그 결과, 하기 표 3 및 도 2에 개시된 바와 같이 고온가압처리 후 초음파 처리를 추가한 경우 푸니칼린 및 엘라그산 함량이 증가하는 것을 확인하였다.

표 3

	Punicalagin	Punicalin	Ellagic acid	Gallic Acid
	(mg/g 건조중량)			
물 추출	4.13 ^c ±0.25	2.00 ^c ±0.1	1.83 ^c ±0.16	0.08 ^b ±0.03
고온가압	28.31 ^a ±0.44	30.18 ^b ±0.13	10.28 ^b ±0.20	0.14 ^a ±0.01
고온가압 + 초음파	12.52 ^b ±0.71	60.93 ^a ±0.07	21.18 ^a ±0.55	0.12 ^a ±0.08

열 내의 문자 a~c는 서로 유의미한 차이가 있다는 것을 의미하며, p<0.05이다.

실시예 4. 효소 분해물의 폴리페놀류 함량 조사

시중에 판매되는 8가지 상업용 효소를 사용하여 푸니칼린 중합체를 분해시켰다.

상업 효소의 효소명 및 유래균은 하기 표 4에 개시된 바와 같다.

표 4

No	1	2	3	4
효소명	SPL	VICOSOZYME	CL	CP
유래균	<i>Aspergillus aculeatus</i> Polygalactronase	<i>Aspergillus aculeatus</i> arabanase, cellulase, hemicellulase, xylanase	<i>Trichoderma reesei</i> glucanase, cellulase	<i>Aspergillus niger</i> pectinlyase polygalacturonase pectinmethyl- esterase
No	5	6	7	8
효소명	PR	UF	TH	BG2
유래균	<i>Aspergillus niger</i> Pectinlyase pectinmethylesterase	<i>Aspergillus niger</i> glucanase arabinanase	<i>Aspergillus oryzae</i> Tannin-acylhydrolase	<i>Trichoderma reesei</i> glucanase cellulase

고온가압처리된 석류 시료에 상기 효소들을 처리한 후 TLC 분석을 통해 엘라그산 생성 정도를 확인하였다.

TLC 분석은 상기 시료를 Whatman K5 TLC plate(silica gel 60 F254 TLC plate(Merck Co.))에 1μl씩 점적한 후, TLC 챔버에서 전개 용매 부탄올/포름산(3:1, v/v)에서 1번 또는 에틸 아세테이트/아세트산/물(3:1:1, v/v/v)을 이용하여 용매계(solvent system)에서 2번 전개하였다. 발색은 황산 발색 용매(0.3%(v/v) N-1-나프틸-에틸렌디아민 및 5%(v/v) 황산이 함유된 메탄올)에 5초간 담근 후 121℃ 오븐에서 10분 동안 구워서 확인하였고, 비극성 물질은 황산 발색 대신에 UV 245nm에 조사해 확인하였다.

그 결과, 도 3에 개시된 바와 같이 비스코자임, PR 및 UF에서 엘라그산의 생성이 가장 효과적인 것을 확인하였고, 시간별로 상기 3가지 효소를 처리한 결과, UF를 1~6시간 처리한 경우 엘라그산 생성 효율이 가장 우수하였다. 따라서 이후 실험에서는 푸니칼린 또는 엘라그산 생성에 UF 효소를 이용하였다.

실시예 5. 고온가압, 초음파 처리 및 효소 분해물의 폴리페놀류 함량 조사

상기 실시예 3에서 푸니칼린 및 엘라그산의 함량이 가장 우수했던 제조방법인 고온가압 후 초음파 처리하는 단계 이후에 상기 실시예 4의 효소처리 과정을 추가하여 푸니칼린 또는 엘라그산의 함량을 분석하였다.

물 추출물은 동결건조한 석류 과피 분말 5g에 대하여 50ml의 물을 혼합하여 100℃에서 3시간 동안 열수 추출하여 제조하였다.

고온가압 처리물은 동결건조한 석류 과피 분말을 121℃에서 30분 동안 고상처리하여 제조하였다. 이후 분석을 위해 상기 분말 5g에 대하여 50ml의 물을 혼합하였다.

- [0087] 고온가압 및 초음파 처리물은 상기 고온가압한 석류 과피 분말 5g에 대하여 50ml의 물을 혼합한 후 50%(700W, 20kHz) 강도로 설정한 후 5초 조사 후, 1초 정지하는 과정을 20분 동안 진행하여 제조하였다.
- [0088] 고온가압, 초음파 처리 및 효소처리물은 상기 고온가압 및 초음파 처리물에 UF 효소(1.25U/ml)를 1%(v/v) 첨가한 후 50℃에서 1시간 또는 6시간 동안 반응시켜 제조하였다.
- [0089] 그 후 상기 제조방법으로 제조된 추출물 및 처리물의 폴리페놀류 함량은 실시예 1의 방법으로 분석하였고, 그 결과, 하기 표 5 및 도 4에 개시된 바와 같이 푸니칼린은 고온가압처리 후 초음파 처리를 추가한 경우 함량이 가장 우수하였고, 효소처리에 의해 함량이 감소하지만, 고온가압 단독 또는 물 추출물에 비해서는 증가되어 있는 것을 확인하였다.
- [0090] 엘라그산 함량은 고온가압, 초음파 및 효소처리 후 더욱 증가하였고, 1시간 동안 효소를 처리하는 것에 비해 6시간 동안 효소를 처리한 경우 현저한 엘라그산 함량 증가를 나타냈다.

표 5

	Punicalagin	Punicalin	Ellagic acid	Gallic Acid
	(mg/g 건조중량)			
물 추출	4.13 ^d ±0.25	2.00 ^d ±0.1	1.83 ^e ±0.16	0.08 ^c ±0.03
고온가압	28.31 ^a ±0.44	30.18 ^c ±0.13	10.28 ^d ±0.20	0.14 ^a ±0.01
고온가압+초음파	12.52 ^b ±0.71	60.91 ^a ±0.25	21.12 ^c ±0.55	0.12 ^b ±0.08
고온가압+초음파+효소처리 (1h)	9.22 ^{bc} ±0.71	45.93 ^b ±0.09	61.53 ^b ±0.55	0.11 ^b ±0.12
고온가압+초음파+효소처리 (6h)	8.52 ^{bc} ±0.71	25.64 ^c ±0.21	109.98 ^a ±0.55	0.11 ^b ±0.09

[0092] 열 내의 문자 a~e는 서로 유의미한 차이가 있다는 것을 의미하며, p<0.05이다.

실시예 6. 물질 동정

- [0094] 천연물은 분해과정에서 성분의 변화가 크게 나타나는 경우가 있으므로, 목적물질의 확인을 위해 LC/MS/MS 분석을 통해 물질을 동정하였다.
- [0095] LC/MS/MS 분석을 위해 ESI-MS/MS(electrospray ionization tandem mass spectrometry)를 사용하여 분석하였으며, Positive ESI-MS 분석은 Synapt HDMS system(Waters)을 사용(조건: 2.8kV, 35V, 소스 온도 100℃, 탈용매화 온도 300℃ 및 탈용매화 가스 유속 400L/Hr)하여 로크 스프레이 인터페이스가 있는 전기 스프레이 이온화 소스(electrospray ionization source with lock spray interface)로 분석하였다.
- [0096] 푸니칼린은 함량이 가장 높은 고온가압 및 초고압 처리물로부터 동정하였고, 엘라그산은 고온가압, 초고압 및 6시간 효소처리물로부터 동정하였다.
- [0097] 그 결과, 도 5A에 개시된 바와 같이 푸니칼린은 780이 분자량으로 Positive mode LC/MS/MS를 통해 1이 추가된 781.1로 나타났고, 도 5B에 개시된 바와 같이 엘라그산은 300이 분자량으로 Positive mode로 LC/MS/MS를 통해 1이 추가된 301.1로 나타났다.

실시예 7. 중심합성계획법 및 표면반응분석법을 통한 최적 수율 조사

- [0099] 1) 푸니칼린
- [0100] 통계적으로 푸니칼린 최적 수율을 조사하기 위해 중심합성계획을 이용하여 3가지 중요 요인인 석류 과피 함량(%, w/v), 고온가압 시간(분) 및 초음파 처리시간(분)의 20가지 조합을 이용해 조사하였다.
- [0101] 상기 3가지 독립변수에 대한 실험계획은 하기 표 6과 같다.

표 6

푸니칼린	-1.682	-1	0	1	1.682
과피 함량(% w/v)	1	5	10	15	20
고온가압 시간(분)	60	90	180	240	300
초음파 처리시간(분)	5	10	20	30	40

[0102]

[0103]

중심합성계획 20가지 조합은 하기 표 7과 같다.

표 7

Run No.	Coded value			Actual value		
	과피 함량 (%, w/v)	고온가압 시 간 (분)	초음파 처리시 간 (분)	과피 함량 (%, w/v)	고온가압 시 간 (분)	초음파 처리시 간 (분)
1	-1	-1	-1	5.0	90.0	10.0
2	1	-1	-1	15.0	90.0	10.0
3	-1	1	-1	5.0	240.0	10.0
4	1	1	-1	15.0	240.0	10.0
5	-1	-1	1	5.0	90.0	30.0
6	1	-1	1	15.0	90.0	30.0
7	-1	1	1	5.0	240.0	30.0
8	1	1	1	15.0	240.0	30.0
9	-1.682	0	0	1.6	165.0	20.0
10	1.682	0	0	18.4	165.0	20.0
11	0	-1.682	0	10.0	38.9	20.0
12	0	1.682	0	10.0	291.1	20.0
13	0	0	-1.682	10.0	165.0	3.2
14	0	0	1.682	10.0	165.0	36.8
15	0	0	0	10.0	165.0	20.0
16	0	0	0	10.0	165.0	20.0
17	0	0	0	10.0	165.0	20.0
18	0	0	0	10.0	165.0	20.0
19	0	0	0	10.0	165.0	20.0
20	0	0	0	10.0	165.0	20.0

[0105]

또한, 도 6에 개시된 반응표면분석법에 의한 3차원 그래프 3개로부터 유출된 공식은 하기 식 1과 같으며, F 값은 6.842, R²은 798.7로, Prob>F는 0.0014로 통계적으로 유의적인 모델임을 증명하였다.

[0106]

[식 1]

[0107]

$$Y = -135.06 + 11.96X_1 + 0.63X_2 + 5.91X_3 - 0.007X_1^2 - 0.06X_2^2 - 0.003X_3^2 - 3.22X_1X_2 - 0.0013X_1X_3 - 0.09X_2X_3$$

[0108]

Y= 푸니칼린(mM)

[0109]

X₁= 과피 함량(% w/v)

[0110]

X₂= 고온가압 시간(분)

[0111]

X₃= 초음파 처리시간(분)

[0112]

상기 결과를 바탕으로, 푸니칼린 생성 최적 조건은 10%(w/v) 함량의 석류 과피를 121℃에서 165분 동안 고온가압한후 50%(700W, 20kHz)의 강도로 5초 조사 후, 1초 정지하는 과정을 총 20분 동안 초음파 처리하는 것이며, 상기 조건에서 65.93mg/g의 푸니칼린이 생성되는 것을 확인하였다.

[0113]

2) 엘라그산

[0114] 통계적으로 엘라그산 최적 수율을 조사하기 위해 중심합성계획을 이용하여 3가지 중요 요인인 석류 과피 함량(% , w/v), 초음파 처리시간(분) 및 효소처리 농도(% , v/v)의 20가지 조합을 이용해 조사하였다.

[0115] 상기 3가지 독립변수에 대한 실험계획은 하기 표 8과 같다.

표 8

[0116]	엘라그산	-1.682	-1	0	1	1.682
	과피 함량(% , w/v)	1	5	10	15	20
	초음파 처리시간(분)	5	10	20	30	40
	효소처리 농도(% , v/v)	0.06	0.3	1	3	4

[0117] 중심합성계획 20가지 조합은 하기 표 9과 같다.

표 9

Run No.	Codded value			Actual value		
	과피 함량(% , w/v)	초음파 처리시간(분)	효소처리 농도(% , v/v)	과피 함량(% , w/v)	초음파 처리시간(분)	효소처리 농도(% , v/v)
1	-1	-1	-1	5.0	10.0	0.30
2	1	-1	-1	15.0	10.0	0.30
3	-1	1	-1	5.0	30.0	0.30
4	1	1	-1	15.0	30.0	0.30
5	-1	-1	1	5.0	10.0	3.00
6	1	-1	1	15.0	10.0	3.00
7	-1	1	1	5.0	30.0	3.00
8	1	1	1	15.0	30.0	3.00
9	-1.682	0	0	1.6	20.0	1.65
10	1.682	0	0	18.4	20.0	1.65
11	0	-1.682	0	10.0	3.2	1.65
12	0	1.682	0	10.0	36.8	1.65
13	0	0	-1.682	10.0	20.0	0.62
14	0	0	1.682	10.0	20.0	3.92
15	0	0	0	10.0	20.0	1.65
16	0	0	0	10.0	20.0	1.65
17	0	0	0	10.0	20.0	1.65
18	0	0	0	10.0	20.0	1.65
19	0	0	0	10.0	20.0	1.65
20	0	0	0	10.0	20.0	1.65

[0119] 또한, 도 7에 개시된 반응표면분석법에 의한 3차원 그래프 3개로부터 유출된 공식은 하기 식 2와 같으며, F valuesms 9.72, Prob>F는 0.0014로 통계적으로 유의적인 모델임을 증명하였다.

[0120] [식 2]

[0121]
$$Y = -138.96 + 19.25X_1 + 7.88X_2 + 52.21X_3 - 0.01X_1^2 - 1.18X_2^2 - 0.03X_3^2 - 0.69X_1X_2 - 0.16X_1X_3 - 10.40X_2X_3$$

[0122] Y=엘라그산(mM)

[0123] X₁= 과피 함량(% , w/v)

[0124] X₂= 초음파 처리시간(분)

[0125] X₃= 효소처리 농도(% , v/v)

[0126] 상기 결과를 바탕으로, 엘라그산 생성 최적 조건은 10%(w/v) 함량의 석류 과피를 사용하고, 50%(700W, 20kHz)의 강도로 5초 조사 후, 1초 정지하는 과정을 총 20분 동안 초음파 처리하며, 효소(1.25U/ml)를 1.65%(v/v) 농도로

처리하는 경우, 110mg/g의 엘라그산이 생성되는 것을 확인하였다.

[0127] 실시예 8. 엘라그산 함량이 증진된 석류 추출액의 기능성 확인

[0128] 1) 추출 조건별 총 페놀, 플라보노이드, 프로안토시아닌 함량 분석

[0129] 본 발명의 각각의 제조방법에 의한 석류 추출액 내의 총 페놀, 플라보노이드, 프로안토시아닌 함량 변화를 분석하였다. 플라보노이드 함량은 루틴을 기준으로, 총 페놀 함량은 탄닌을 기준으로, 프로안토시아닌 함량은 카테킨을 기준으로 측정하였다.

[0130] 측정 결과, 표 10에 개시된 바와 같이 각 성분들은 처리과정이 추가될수록 증가하였으며, 특히 프로안토시아닌 함량은 고온가압 처리시 열수 추출에 비해 2~3배 가량 증가하였다. 초음파 처리를 추가한 경우 처리전에 비해 성분 함량이 소폭 상승하였으며, 효소처리를 추가한 경우, 가장 우수한 함량의 증진을 확인하였다.

표 10

	총페놀	플라보노이드	프로안토시아닌
	(mg/g 건조중량)		
물 추출	121 ^d ± 9.25	63.8 ^d ± 9.1	23.77 ^e ± 2.16
고온가압	237.7 ^c ± 20.44	102.9 ^c ± 9.13	51.3 ^d ± 3.20
고온가압+초음파	291.1 ^c ± 10.71	120.4 ^{bc} ± 12.25	61.4 ^c ± 3.55
고온가압+ 초음파+ 효소처리(1h)	308.9 ^{bc} ± 11.71	132.9 ^b ± 11.09	80.1 ^b ± 7.55
고온가압+ 초음파+ 효소처리(6h)	337.0 ^a ± 21.71	152.2 ^a ± 12.21	91.8 ^a ± 9.55

[0132] 열 내의 문자 a~e는 서로 유의미한 차이가 있다는 것을 의미하며, p<0.05이다.

[0133] 2) 항산화 효과

[0134] 총 페놀, 플라보노이드, 프로안토시아닌 함량이 가장 우수한 고온가압 후 초음파 처리한 다음 6시간 동안 효소 처리한 엘라그산 함량이 증진된 석류 추출액의 항산화 효능은 DPPH(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl)를 이용하여 라디칼 소거능(radical scavenging effect)을 측정하여 확인하였다.

[0135] 그 결과, 도 8에 개시된 바와 같이 본 발명의 엘라그산 함량이 증진된 석류 추출액은 항산화 효과가 우수한 것을 확인하였다.

[0136] 3) 뇌신경 세포 보호효과

[0137] 본 발명의 고온가압 후 초음파 처리한 다음 6시간 동안 효소처리한 엘라그산 함량이 증진된 석류 추출액의 글루타메이트에 의한 뇌신경 세포 손상에서의 뇌신경 세포 보호효과를 확인하였다.

[0138] 신경세포 보호 효과를 확인하기 위하여 SH-SY5Y 세포(KCLB 22266, Korean Cell Line Bank, Seoul, Korea)를 실험에 사용하였다. 세포의 생존율은 MTT(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) 분석을 이용하여 측정하였다.

[0139] 뇌신경 세포(SH-SY5Y)(neuroblastoma, human dopaminergic neuronal cell)는 1%(v/v) 항진균제/항생제와 10%(v/v) FBS를 함유한 RPMI-1640 배지에서 배양하였고, 96-웰 플레이트에 세포수가 10⁴~10⁶ cell/ml가 되도록 분주한 후, 24시간 후에 엘라그산 함량이 증진된 석류 추출액을 농도별로 처리하였다. 그 후 100mM 글루타메이트를 처리해 스트레스를 유발시킨 후 MTT 분석을 이용하여 570nm 파장으로 흡광도를 측정하여 세포독성을 확인하였다. 양성 대조군으로는 뇌 진정작용이 알려진 1~10 μM 테아닌(theanine)을 사용하였다.

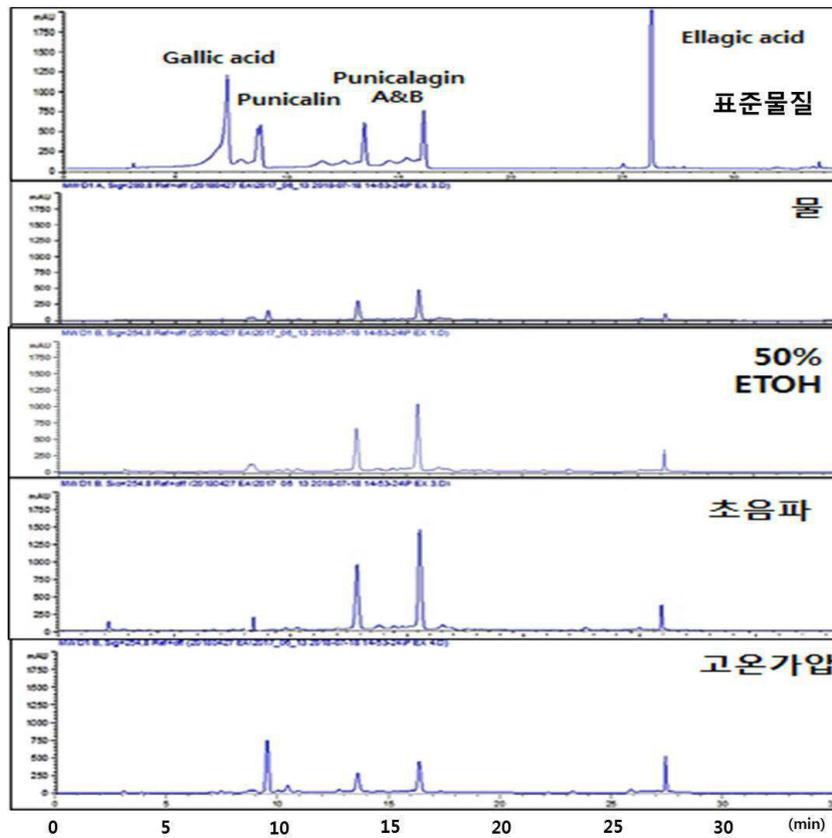
[0140] 그 결과, 도 9에 개시된 바와 같이 본 발명의 엘라그산 함량이 증진된 석류 추출액은 글루타메이트에 의한 세포

독성으로부터 뇌신경세포를 보호하는 효과가 있다는 것을 확인하였다.

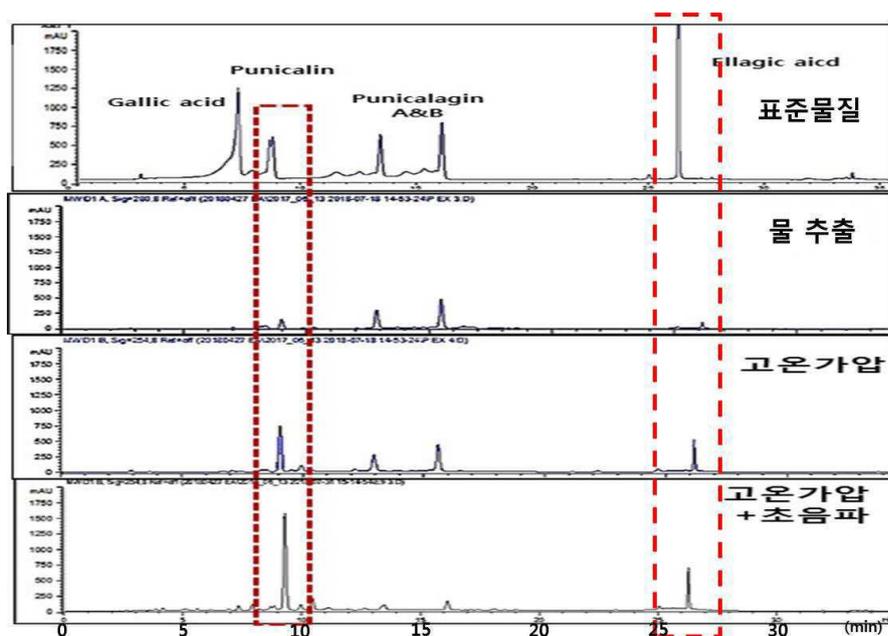
- [0141] 4) 글루타메이트에 의해 증가된 코티졸의 분비 억제효과
- [0142] 고온가압 후 초음파 처리한 다음 6시간 동안 효소처리한 엘라그산 함량이 증진된 석류 추출액의 항스트레스 효과를 확인하기 위해 스트레스 호르몬인 코티졸의 함량을 측정하였다.
- [0143] 세포배양액을 4℃, 10,000×g에서 10분 동안 원심분리한 후 상등액을 취하여 실험에 사용하였다. 상등액의 단백질 함량은 BCA 키트로 조사하였으며, 코티졸 엘라이자 키트(Calbiotech)를 제조사의 프로토콜에 따라 사용하여 코티졸 함량을 분석하였다.
- [0144] 그 결과, 도 10에 개시된 바와 같이 본 발명의 엘라그산 함량이 증진된 석류 추출액은 글루타메이트에 의해 증가된 코티졸 함량을 농도의존적으로 감소시키는 것을 확인하였다.
- [0145] 5) 글루타메이트에 의해 증가된 AChE 활성 억제효과
- [0146] AChE는 뇌신경 전달물질인 아세틸콜린(Acetylcholin)을 분해하며, 아밀로이드반(amyloid plaque)이나 신경세포 섬유매듭(neurofibrillary tangles)의 생성을 유발한다고 알려져 있다. 따라서 뇌신경 세포(SH-SY5Y)에 100mM 글루타메이트를 처리해 스트레스가 유발된 세포에 본 발명의 고온가압 후 초음파 처리한 다음 6시간 동안 효소 처리한 엘라그산 함량이 증진된 석류 추출액을 농도별로 처리한 후 세포배양액을 10,000×g에서 10분 동안 원심 분리한 다음 상등액을 취하였고, 상등액을 이용하여 AChE 억제 정도를 AChE 억제 분석 키트를 제조사의 프로토콜에 따라 측정하여 항치매 개선효과를 확인하였다.
- [0147] 그 결과, 도 11에 개시된 바와 같이 글루타메이트에 의해 감소된 AChE의 활성 억제율이 본 발명의 엘라그산 함량이 증진된 석류 추출액 처리시 증가하는 것을 확인하였다.

도면

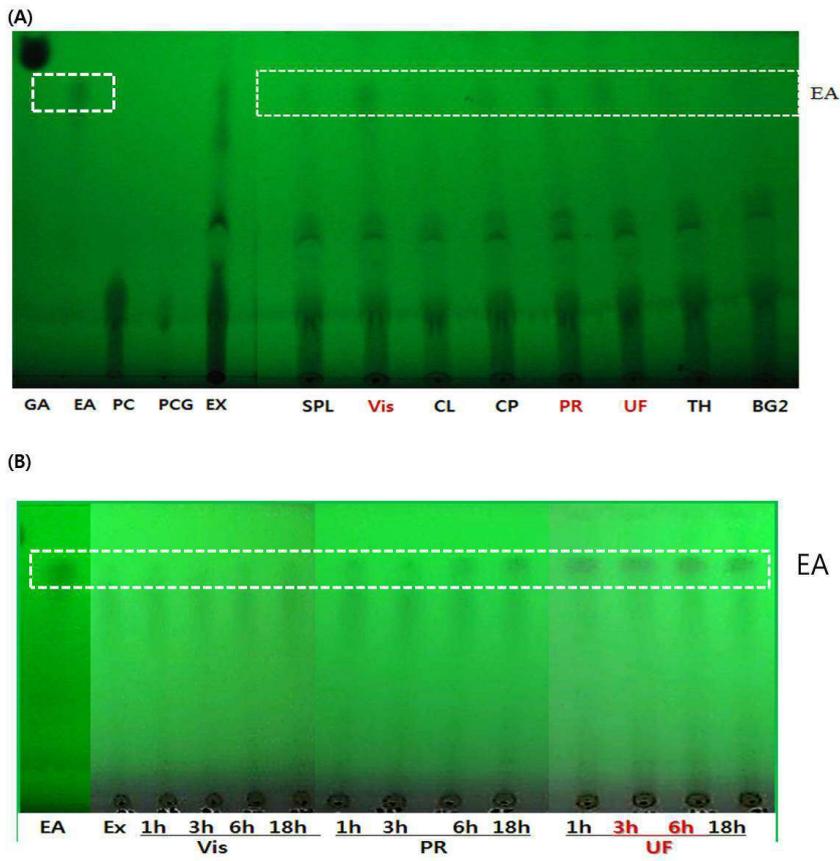
도면1



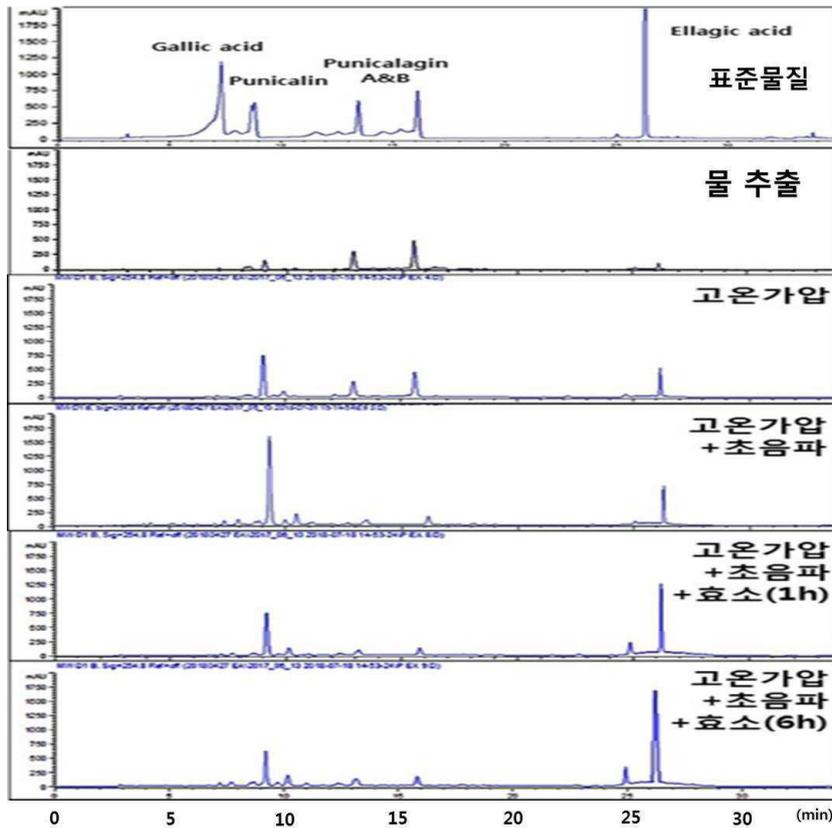
도면2



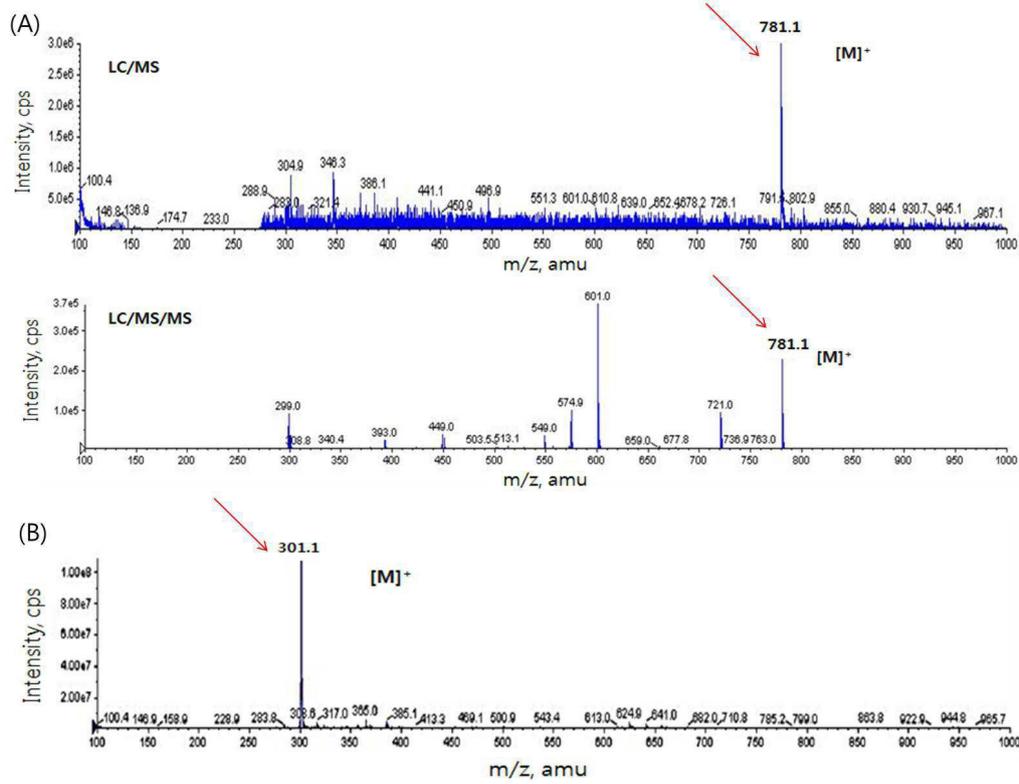
도면3



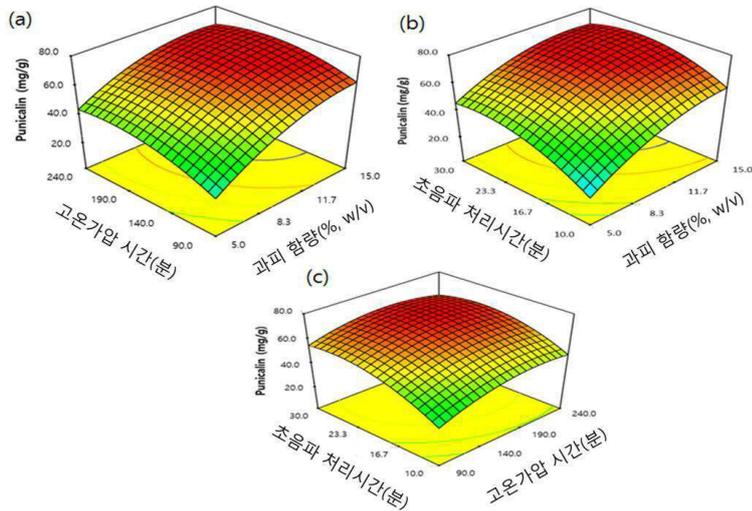
도면4



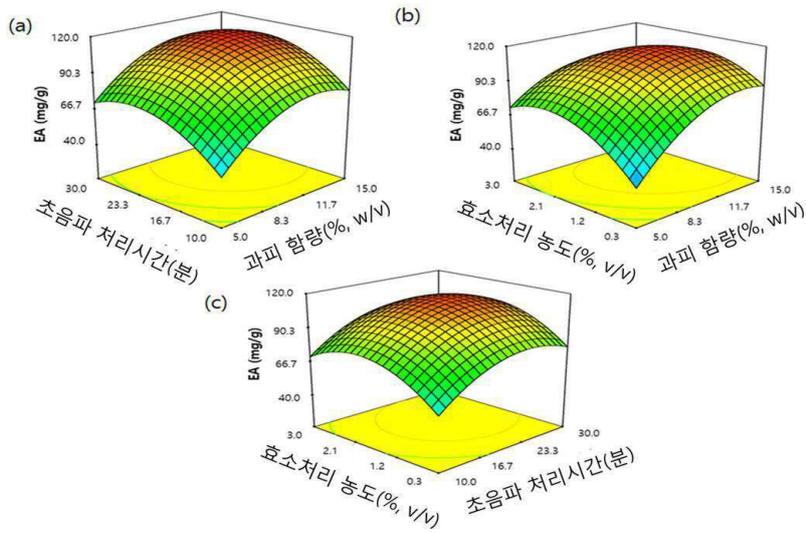
도면5



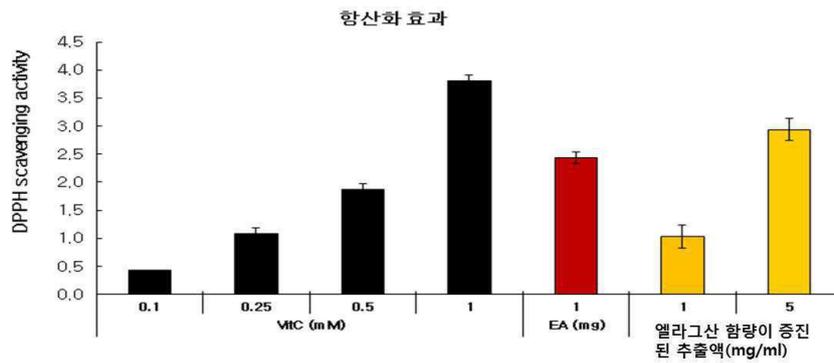
도면6



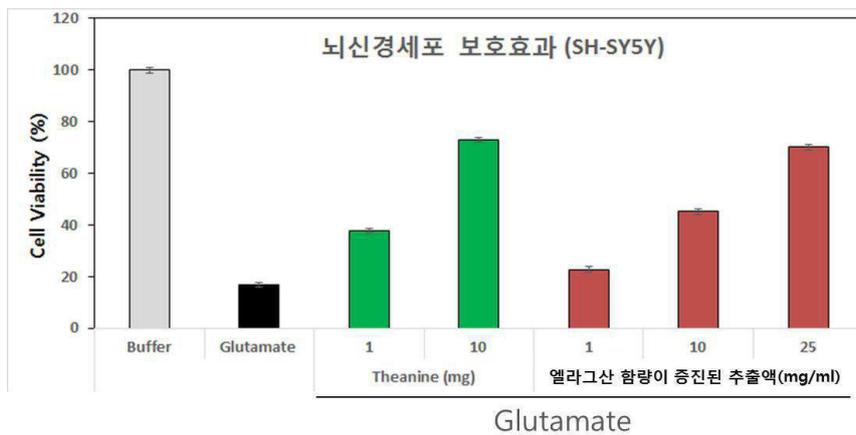
도면7



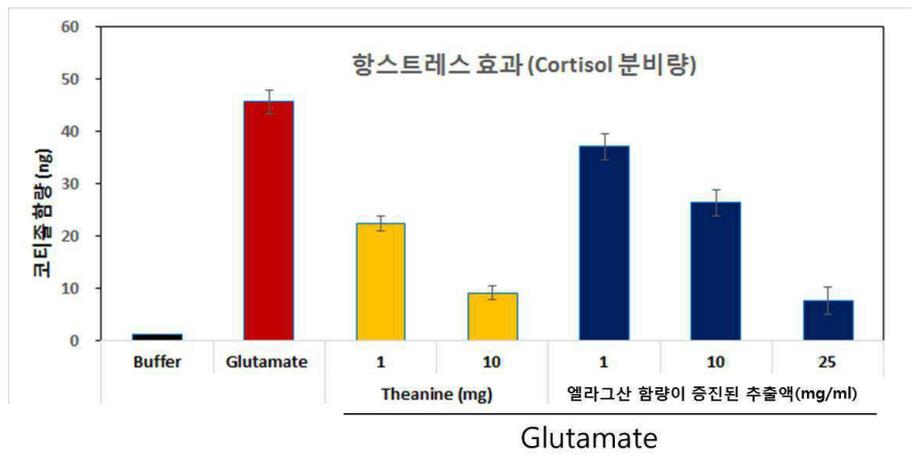
도면8



도면9



도면10



도면11

