(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2019-0098983
(43) 공개일자 2019년08월23일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A01N 37/10 (2006.01) *A01N 65/00* (2009.01)
A61K 36/87 (2006.01) *A61K 8/9789* (2017.01)
A61P 17/10 (2006.01) *A61Q 19/00* (2006.01)
(52) CPC특허분류
A01N 37/10 (2013.01)
A01N 65/00 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2019-7018674
(22) 출원일자(국제) 2017년12월21일
심사청구일자 없음
(85) 번역문제출일자 2019년06월27일
(86) 국제출원번호 PCT/EP2017/084116
(87) 국제공개번호 WO 2018/115296
국제공개일자 2018년06월28일
(30) 우선권주장
1663205 2016년12월22일 프랑스(FR)

(71) 출원인
안토페놀
프랑스, 34095 몽펠리에 세덱스 5, 유니베르시테 몽펠리에 2 비티 15 - 3 에따주, 플레이스 유진 바탈리옹
(72) 발명자
로렛 파니
프랑스, 34230 세인트 파르고레, 12 비스 뤼 데스 에콜레스
파브레 루도빅
프랑스, 34000 몽펠리에, 레지던스 파크 어 발룬 3 - 아파트 148, 94 뤼 데 라 크로익스 두 수드
(74) 대리인
손민

전체 청구항 수 : 총 23 항

(54) 발명의 명칭 **폴리페놀이 풍부한 건조 바이오매스 추출물의 제조**

(57) 요 약

본 발명은 특히 폴리페놀이 풍부한 덩굴의 부분으로부터 건조 식물 바이오매스 추출물을 제조하는 방법, 수득된 추출물 및 특히 수확 후 과일 및 식물에 대한 진균 감염의 예방 및 치료를 위한 항진균적 적용을 위한 이의 용도 뿐만 아니라 이의 항균 및 항산화 특성과 관련된 적용을 위한 용도에 관한 것이다.

(52) CPC특허분류
A61K 36/87 (2013.01)
A61K 8/9789 (2017.08)
A61P 17/10 (2018.01)
A61Q 19/00 (2013.01)

명 세 서

청구범위

청구항 1

(a) 건조 식물 바이오매스(dry plant biomass)를 수성 용매와 접촉시켜 건조 바이오매스를 추출하는 단계 및 (b) 폴리페놀이 풍부한 수성 상(polyphenol-enriched aqueous phase)을 회수하는 단계를 포함하는, 건조 식물 바이오매스의 폴리페놀이 풍부한 추출물의 제조 공정으로서, 추출 단계 (a)에서, 식물 바이오매스/수성 용매 혼합물은

(i) 915 MHz 내지 28 GHz 범위의 진동수를 갖는 전자기파 및

(ii) 혼합물의 교반 및/또는

(iii) 5,000 내지 95,000 Pa (50 내지 950 mbar)의 압력에 의해 동시에 또는 순차적으로 처리되는 것을 특징으로 하는 제조 공정.

청구항 2

제1항에 있어서, 수성 용매가 물이거나 또는 10 내지 70 용적%의 에탄올을 함유하는 에탄올/물 혼합물인 것을 특징으로 하는 제조 공정.

청구항 3

제2항에 있어서, 수성 용매가 30 내지 50%의 에탄올을 함유하는 에탄올/물 혼합물인 것을 특징으로 하는 제조 공정.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 건조 식물 바이오매스 대 수성 용매의 질량비가 1/5 내지 1/30인 것을 특징으로 하는 제조 공정.

청구항 5

제4항에 있어서, 건조 식물 바이오매스 대 수성 용매의 질량비가 1/10 내지 1/20인 것을 특징으로 하는 제조 공정.

청구항 6

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 있어서, 전자기파의 진동수가 915 MHz 내지 2.45 GHz 범위인 것을 특징으로 하는 제조 공정.

청구항 7

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서, 전자기파의 전력(power)이 300 W 내지 100 kW인 것을 특징으로 하는 제조 공정.

청구항 8

제7항에 있어서, 전자기파의 전력이 1 내지 75 kW인 것을 특징으로 하는 제조 공정.

청구항 9

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서, 추출단계 (a)가 25 kHz 내지 1 MHz 범위의 진동수를 갖는 초음파 처리(iv)를 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는 제조 공정.

청구항 10

제9항에 있어서, 초음파 전력이 200 내지 4000 W 인 것을 특징으로 하는 제조 공정.

청구항 11

제1항 내지 제10항 중 어느 한 항에 있어서, 식물 바이오매스가 비티스(Vitis) 종의 덩굴의 싹으로 이루어지는 것을 특징으로 하는 제조 공정.

청구항 12

제1항 내지 제11항 중 어느 한 항에 있어서, 수성 용매의 부분적 또는 전체 증발에 의해 폴리페놀을 농축시키는 단계 (c)를 포함하는 것을 특징으로 하는 제조 공정.

청구항 13

제12항에 있어서, 농축단계 (c)가 회수된 수성 상을 동결건조함으로써 달성되는 것을 특징으로 하는 제조 공정.

청구항 14

제1항 내지 제13항 중 어느 한 항에 따르는 공정에 의해 수득 가능한 폴리페놀이 풍부한 추출물.

청구항 15

제14항에 따르는 추출물 및 이의 용도에 적합한 담체를 포함하는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 16

식물에서 진균 감염의 예방 및 치료를 위한, 제14항에 따르는 추출물 또는 제15항에 따르는 조성물의 용도.

청구항 17

수확 후 과일 및 식물에서 진균 감염의 예방 및 치료를 위한, 제14항에 따르는 추출물 또는 제15항에 따르는 조성물의 용도.

청구항 18

식물에서 산화 스트레스의 예방 및/또는 치료를 위한, 제14항에 따르는 추출물 또는 제15항에 따르는 조성물의 용도.

청구항 19

화장품 또는 식품 조성물에서 항산화제로서의, 제14항에 따르는 추출물 또는 제15항에 따르는 조성물의 용도.

청구항 20

제14항; 또는 제15항에 있어서, 치료 용도를 위한, 추출물; 또는 조성물.

청구항 21

제14항; 또는 제15항에 있어서, 피부 감염의 치료 용도를 위한, 추출물; 또는 조성물.

청구항 22

제14항; 또는 제15항에 있어서, 피부 감염이 여드름인 것을 특징으로 하는, 제21항에 따르는 용도를 위한, 추출물; 또는 조성물.

청구항 23

제14항; 또는 제15항에 있어서, 인간 또는 동물에서 산화 스트레스의 치료 용도를 위한, 추출물; 또는 조성물.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 건조 식물 바이오매스(dry plant biomass), 특히 덩굴(vines) 부분의 폴리페놀이 풍부한 추출물(polyphenol-rich extract)의 제조 공정, 수득된 추출물 및 특히 수확 후 과일 및 식물에 대한 진균 감염의 예방 및 치료를 위한 이의 항진균적 적용을 위한 이의 용도뿐만 아니라 이의 항균 및 항산화 특성과 관련된 적용을 위한 용도에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 식물 바이오매스의 폴리페놀이 풍부한 추출물은 당업자에게 공지되어있다. 폴리페놀이 풍부한 추출물을 수득하기 위해 많은 작업이 바이오매스를 추출하는데 초점을 맞춰왔지만, 이들 모두 낮은 수율 또는 장시간의 추출 시간, 또는 추출 후 이들의 용도 제한, 및 특히 독성 유기 용매의 사용 같이, 공정의 경제성 측면에서 몇 가지 단점을 가지고 있다 (Goupil et al. 2012, Alexa et al. 2012, Sanchez et al. 2008, Pezet et al 2004).

[0003] 다양한 폴리페놀 추출 기술 및 용도가 특히 특허 및 특허 출원 제US 2012/0021080호, 제US 5,989,557호, 제US 2012/0142105호, 제JP 2016 102192호, 제CN 205 759 861호, 제CN 103 875 842호, 또는 Osorio et al. (2010), Luque-Rodriguez et al. (2006) 또는 Favaron and Lucchetta (2009)의 논문에 기재되어 있다.

[0004] 연구에 따르면, 마이크로파, 초음파 또는 고온 처리에 의해 바이오매스 추출 공정 (예를 들어 바이오디젤의 제조(CN 19 35 947))을 개선 할 수 있음이 밝혀졌다(Quan et al. 2006, CN 104 177 463, CN 104 435 135, CN 102 757 512, CN 104 256 432, CN 104 256 641, CN 103 783 506, CN 102 757 509, CN 101 816 349). 일부는 고압하에서의 고온 처리를 권장한다 (Casazza et al. 2010).

발명의 내용

해결하려는 과제

[0005] 그러나, 이러한 고온 처리는 수득된 추출물의 특성을 변화시킬 수 있고 대용량의 원료 및 용매에 대한 산업 공정의 실행에 적합하지 않을 수 있다.

[0006] 효율적이고 더욱 경제적이며 폴리페놀과 관련된 바이오매스의 특성에 영향을 주지 않는, 폴리페놀이 풍부한 추출물을 제조하기 위한 바이오매스 추출의 효율적인 공정이 필요하다.

과제의 해결 수단

[0007] **발명의 개시**

[0008] 본 발명은 (a) 건조 식물 바이오매스를 수성 용매와 접촉시켜 건조 바이오매스를 추출하는 단계 및 (b) 폴리페놀이 풍부한 수성 상(aqueous phase)을 회수하는 단계를 포함하는, 건조 식물 바이오매스의 추출물, 특히 비티스(Vitis) 종의 폴리페놀이 풍부한 추출물의 제조 공정에 관한 것으로서, 추출 단계 (a)에서 식물 바이오매스/수성 용매 혼합물은

[0009] (i) 915 MHz 내지 28 GHz 범위의 진동수를 갖는 전자기파, 및

[0010] (ii) 혼합물의 교반, 및/또는

[0011] (iii) 50 내지 950 mbar (5,000 내지 95,000 Pa)의 압력의 조합에 의해 동시에 또는 순차적으로 처리되는 것을 특징으로 하는 제조 공정에 관한 것이다.

[0012] 본 발명은 또한 상기 공정에 의해 수득할 수 있는 추출물 및, 특히 수확 후 과일 및 식물에 대한 진균 감염의 예방 및 치료를 위한, 항진균적 적용을 위한 이의 용도에 관한 것이다.

[0013] **발명의 상세한 설명**

[0014] 본 발명은 수성 용매로 건조 바이오매스를 추출하여 폴리페놀이 풍부한 추출물을 제조하는 것에 관한 것이다.

[0015] 본 발명에 따르면, 용어 "수성 용매"는 물 또는 지방족 알콜/물 혼합물, 특히 에탄올/물을 의미한다. 이 경우, 알코올/물 혼합물, 특히 에탄올/물은, 10 내지 70 용적%의 에탄올을 함유한다. 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 수성 용매는 15 내지 40%의 에탄올을 함유하는 에탄올/물 혼합물이다.

[0016] 본 발명에 따른 식물 바이오매스는 그 자체로 폴리페놀, 특히 트랜스-레스베라트롤(trans-resveratrol), 트랜스-ε-비니페린(trans-ε-viniferin), 트랜스-피세아타놀(trans-piceatannol) 및 트랜스-비티신(trans-

vitisin)을 함유하는 것으로 알려진 바이오매스이다. 당업자는 이러한 폴리페놀을 함유하는 것으로 공지된 식물, 예를 들어 덩굴, 차(tea) 및 일본 호장근(Japanese knotweed), 특히 덩굴과 같은 일반적으로 쌍떡잎 식물 유래의 바이오매스를 단독으로 또는 혼합물로 사용하는 것에 익숙하다. 본 발명에 따른 바이오매스를 위해, 전체 식물 또는 식물의 부분, 보다 특히 과일, 꽃, 잎, 줄기, 가지 또는 몸통 단편 (덩굴) 및 이들의 혼합물과 같은 식물의 지상부가 사용될 것이다. 필요할 경우, 바이오매스는 또한 식물 뿌리를 포함하거나 식물 뿌리로 구성될 수 있다.

[0017] 바이오매스는 건조한 것, 즉 상기 언급한 식물 또는 식물의 부분을 건조시켜 수득한 것이다. 건조는 당업자에게 공지된 임의의 방법으로 수행될 수 있다. 유리하게, 건조는 식물 또는 식물의 부분을 야외에서 건조시킴으로써 달성된다. 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 식물 또는 식물의 개별 부분을 1 개월 내지 4 년, 바람직하게는 1 내지 2 년 동안 야외에서 건조시킨다.

[0018] 바람직하게, 건조 바이오매스는 비티스(Vitis) 속의 식물, 특히 비티스 비니페라(Vitis vinifera), 비티스 라브라스카(Vitis labrusca), 비티스 리파리아(Vitis riparia), 비티스 루페스트리스(Vitis rupestris), 비티스 베를란디에리(Vitis berlandieri), 비티스 아무렌시스(Vitis amurensis), 비티스 코그네티아(Vitis coignetiae), 비티스 불파인(Vitis vulpine), 비티스 아세리폴리아(Vitis acerifolia), 비티스 애스티발리스(Vitis aestivalis), 비티스 로툰디폴리아(Vitis rotundifolia) 및 보다 특히 비티스 비니페라의 건조한 부분으로 구성된다. 본 발명의 유리한 구현예에 따르면, 상기 건조 바이오매스는 덩굴 싹(vine shoot)을 포함하거나 덩굴 싹으로 구성된다.

[0019] 유리하게, 상기 건조된 바이오매스는 식물 단편, 특히 분쇄된 식물 또는 식물 부분으로 구성된다. 바람직하게, 단편은 1 ㎝ 미만, 보다 바람직하게는 5 ㎜ 이하, 보다 바람직하게는 1 내지 5 ㎜ 범위의 입자 크기를 갖는다. 건조 물질 단편/분쇄된 건조 물질의 이러한 입자 크기는 당업자에게 공지된 종래의 방법에 따라 측정된다.

[0020] 건조 식물의 단편화는 당업자에게 공지된 종래의 방법에 따라 수행될 것이다. 본 발명의 특정 구현예에 따르면, 이러한 단편은 먼저 건조 물질을 파쇄하여 1 내지 20 ㎝ 의 단편을 수득 한 후, 이를 분쇄하여 추출하기에 바람직한 입자크기에 해당하는, 바람직하게는 1 내지 5 ㎜ 단편을 수득함으로써 수득된다.

[0021] 당업자는 바이오매스의 양과 관련하여 사용될 추출 용매의 양을 결정할 수 있을 것이다. 유리하게는, 건조 식물 바이오매스 대 수성 용매의 질량비는 1/5 내지 1/30, 바람직하게는 1/10 내지 1/20 범위이다.

[0022] 본 발명에 따른 공정은 추출 혼합물(바이오매스/용매) 상에서 동시에 또는 연속적으로 적용되는 적어도 2가지 스트레스(stress)의 조합을 특징으로 한다:

[0023] (i) 915 MHz 내지 28 GHz 범위의 진동수를 갖는 전자기파, 및

[0024] (ii) 교반, 및/또는

[0025] (iii) 50 내지 950 mbar의 압력.

[0026] 본 발명에 따르면, "동시 또는 순차적 교반"이라는 표현은 마이크로파 처리 및 적어도 교반 및/또는 950 mbar 이하의 압력이, 특히 시퀀스 (i) + (ii), 또는 (i) + (iii), 또는 (i) + (ii) + (iii), 또는 [(i), (ii)] + (iii), 또는 [(ii), (iii)] + (i)에 따라 임의의 순서로, 동시에 또는 차례로 수행되는 것을 의미한다. 순차적 처리의 경우, 당업자는 각 시퀀스를 여러번 반복하거나, 또는 임의로 하나 이상의 동시 처리 시퀀스와 임의로 조합된, 소정의 프로그램에 따라 상이한 시퀀스를 조합하는 것을 선택할 수 있다.

[0027] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 3개의 처리가 동시에 수행된다 [(i), (ii), (iii)].

[0028] 단계 a)는 또한 초음파 처리 (iv)를 포함할 수 있다. 이 처리는 상기 정의된 처리 (i), (ii) 및/또는 (iii)과 순차적으로 또는 동시에 적용될 수 있다.

[0029] 915 MH 내지 28 GHz 범위의 진동수를 가진 전자기파는 마이크로파 도메인 내의 파동에 해당한다. 당업자는 추출 공정을 최적화하기 위해, 특히 바이오매스에 따라 공정의 실행에 가장 적합한 진동수를 선택할 수 있을 것이다. 전자기파의 진동수는 915 MHz 내지 2.45 GHz 범위이다. 유리하게는, 전자기파의 진동수는 산업 규모, 특히 1500 MHz, 더 유리하게는 약 915 MHz 미만의 진동수의 발전기에서 전자기파를 발생시키기 위해 공지된 산업 장치에 따라 선택될 것이다.

[0030] 당업자는 또한 바이오매스 및 수득된 추출물에 가장 적합한 파력(wave power)을 선택할 수 있을 것이다. 전자기파의 전력(power)은 300 W 내지 100 kW, 보다 유리하게는 1 내지 75 kW 범위이다.

[0031] 상기 전력은 특히 처리될 용적 및 추출에 필요한 시간에 따라 선택될 것이다. 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 전자기파의 전력은 하기의 비율에 따라 선택된다: 1kg의 재료가 추출될 때, 전자기파의 전력은 1 내지 10 kW, 이상적으로는 2 내지 6 kW이다.

[0032] 유리하게는, 추출 시간은 적어도 20 분, 또는 심지어 적어도 30 분, 바람직하게는 125 분 미만일 것이고, 추출 시간이 너무 짧으면 바이오매스를 변화시킬 수 있는 과전력 조건과 관련될 수 있고, 반면 추출 시간이 너무 길면 추출된 산물의 분해로 이어질 수 있으며, 따라서 두 경우 모두 폴리페놀 손실의 위험이 있다는 것이 이해될 것이다.

[0033] 본 발명에 따른 공정은 상이한 용적, 특히 적어도 1 L, 바람직하게는 적어도 5 L의 바이오매스/용매 혼합물에 사용하기 적합하다. 본 발명에 따른 공정은 건조된 바이오매스의 산업적 추출에 특히 적합하다. 유리하게는, 상기 공정은 50 L 를 넘는 또는 심지어 100 L를 넘는 범위에 이를 수 있는, 적어도 30 L의 바이오매스/용매 혼합물 용적에 사용될 것이다. 당업자가 이용할 수 있는 추출 반응기에 따라, 본 발명에 따른 공정은 200 L 초과의 용적에서 사용될 수 있다.

[0034] 바이오매스/용매 혼합물은 교반 (ii)되고, 상기 교반 (ii)은 바람직하게 전자기파 처리 (i)와 동시에 수행된다. 상기 교반은 전자기파가 혼합물 전체에 도달하기 위해 중요하고, 그렇지 않으면 혼합물의 표면만이 전자기파의 작용을 받게된다.

[0035] 당업자는 처리될 혼합물의 용적에 따라 교반 작업을 수행할 적합한 수단을 알고 있다. 특히, 일반적으로 혼합물 내부의 회전 블레이드(rotating blade)에 의해, 또는 처리될 혼합물이 함유된 반응기의 회전에 의해, 처리될 혼합물을 회전시키는 공지된 수단이 있다. 당업자는 공기 또는 불활성 가스를 버블링(bubbling)함으로써 혼합물을 운동 상태로 설정하는 것과 같은, 다른 교반 수단을 고려할 수 있다. 바람직하게는, 혼합물을 분당 3 내지 20 회전 범위일 수 있는 회전 속도로 회전시킴으로써, 보다 바람직하게는 혼합물 내부의 회전 블레이드에 의해 교반을 수행한다.

[0036] 당업자는 전기 아크(electric arc)를 발생시키는 것과 같이, 전자기파 처리를 받는 환경에서 실행하기에 가장 적합한 회전 수단을 선택할 수 있을 것이다.

[0037] 또한 상기 공정은, 바람직하게 전자기파 처리 (i) 및 교반 (ii) 중에, 혼합물을 진공(iii)으로 처리하는 단계를 포함한다.

[0038] 당업자는 처리될 혼합물을 함유하는 밀폐체(enclosure)에서 진공(또는 부분적 진공)을 수득하기에 필요한 수단에 익숙하다. 상기 산업적 수단으로 50 내지 950 mbar (5,000 내지 95,000 Pa) 범위의 압력을 수득할 수 있다. 처리할 용적에 따라 적절한 압력을 선택할 수 있을 것이다. 특히, 상기 기재된 산업적 용적에 대하여, 50 내지 950 mbar (5,000 내지 95,000 Pa), 바람직하게는 50 내지 500 mbar (5,000 내지 50,000 Pa)의 압력으로 혼합물을 처리하는 것이 유리할 것이다.

[0039] 또한 상기 공정은 초음파처리를 포함하므로, 초음파의 진동수 뿐만 아니라 전력도 선택할 수 있을 것이다. 유리하게는, 초음파 진동수는 25 kHz 내지 1 MHz 범위이다. 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 초음파 전력은 200 내지 4000 W 범위이다.

[0040] 또한 본 발명은 수성 용매의 부분 또는 전체 증발에 의해 폴리페놀을 농축하는 추가 단계 (c)를 포함하는, 상기 및 실시예에서 정의된 공정에 관한 것이다.

[0041] 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 이 농축단계 (c)는 회수된 수상을 동결 건조시킴으로써 수행된다.

[0042] 본 발명의 특정 구현예에 따르면, 건조된 바이오매스는 추출 단계 (a) 이전에, 적절한 용매로 침출하여 당을 제거한다. 당업자는 건조된 바이오매스 및 이의 당 함량에 따라 상기 침출의 조건을 결정할 수 있을 것이다.

[0043] 처리된 바이오매스에 따라, 설탕을 제거하는 것이 항진균 특성을 지닌 폴리페놀이 풍부한 추출물을 수득하는 데 중요할 것이다. 실제로, 설탕의 존재는 진균 성장을 촉진시킴으로써 폴리페놀의 항진균 활성에 대해 길항 효과를 나타낼 수 있다는 것이 밝혀졌다.

[0044] 본 발명은 또한 본 발명에 따른 공정에 의해 수득 가능한 폴리페놀이 풍부한 바이오매스 추출물에 관한 것이다. 상기 추출물은, 유리하게는 스틸벤계의 폴리페놀인 4 개의 관심 분자를 갖는다. 상기 4 개의 분자는 트랜스-피세아타놀, 트랜스-레스베라트롤, 트랜스-ε-비니페린 및 트랜스-비티신이다. 바람직하게는, 추출물은 종래의 에탄올 추출물보다 트랜스-ε-비니페린을 적어도 2배 초과 (또는 적어도 2.5 배 초과), 트랜스-비티신을 적어도 3

배 초과 (또는 적어도 6 배 초과)하여 함유한다.

[0045] 본 발명은 또한 비티스 속의 식물, 특히 비티스 비니페라, 비티스 라브라스카, 비티스 리파리아, 비티스 루페스트리스, 비티스 베를란디에리, 비티스 아무렌시스, 비티스 코그네티아, 비티스 불파인, 비티스 아세리폴리아, 비티스 애스티발리스, 비티스 로툰디폴리아 및 보다 특히 비티스 비니페라의 건조 부분으로 이루어진 바이오매스에 대해 본 발명에 따른 공정에 의해 수득 가능한, 폴리페놀이 풍부한 바이오매스 추출물에 관한 것이다. 본 발명의 바람직한 구현예에 따르면, 상기 폴리페놀이 풍부한 추출물은 덩굴 싹, 보다 특히 비티스 비니페라 싹의 추출물이다.

[0046] 본 발명에 따른 추출물은 비티스 비니페라 싹의 추출물에 대해 실시예에 나타낸 바와 같이, 살진균성, 살균성 및 항산화 특성을 갖는다.

[0047] 본 발명에 따른 추출물, 특히 덩굴 싹 추출물은 과일 통조림 중의 오염 물질(비스오클라미스 니베아(Byssochlamys nivea)), 또는 과일 나무, 채소, 및 식물의 질병, 예컨대 사과 부란병(canker)(넥트리아 갈리게나(Nectria galligena)), 과일 나무의 갈색 부패병(brown rot)(모닐리니아 프럭티콜라(Monilinia fructicola), 모닐리니아 프럭티게나(Monilinia fructigena) 및 모닐리니아 락사(Monillinia laxa)), 당근 역병(blight)(알터나리아 다우실(Alternaria daucil)), 감자 은색무늬 썩음병(silver scurf)(헬민토스포리움 솔라니(Helminthosporium solani)), 푸사리움 이삭마름병(fusarium ear blight)(지베렐라 제아(Gibberella zeae)), 푸사리움 이삭마름병(head blight)(푸사리움 쿨모룸(Fhusarium culmorum)), 밀 중 셉토리아 잎 반점(septoria leaf blotch)(미코스파렐라 그라미니콜라(Mycosphaerella graminicola)), 또는 다양한 부패병(페니실리움 디지타툼(Penicillium digitatum), 페니실리움 이탈리쿰(Penicillium italicum), 파이토프토라 시링가에(Phytophthora syringae) 또는 리조푸스 스톨로니퍼(Rhizopus stolonifer) 포함) 같은, 식품 및 농업에서 유해한 진균의 발생을 조절(예방)하기 위한 살진균제로서의 활성이 있다.

[0048] 본 발명은 또한 상기 식물에서 병원성 진균의 발생을 예방 또는 조절하기 위한 식물의 살진균 처리 방법으로서, 상기 방법은 유효량의 본 발명에 따른 추출물, 특히 상기 및 실시예에 정의된 덩굴 싹 추출물을 상기 식물에 적용하는 것을 포함하는 방법에 관한 것이다.

[0049] 본 발명에 따른 추출물로 처리 가능한 식물은 유리하게는 인간 소비를 위해 재배된 식물, 예컨대 시장 원예(market gardening), 감자 작물, 곡류 작물, 특히 보리, 밀 및 옥수수와 같은 농작물, 또는 유채, 해바라기, 아마, 대마 또는 목화와 같은 대두 또는 유지 작물이다. 처리는 과일나무, 특히 사과, 배, 살구, 복숭아 및 포도나무에도 적용될 수 있다.

[0050] 식물에의 적용은 기후 조건이 진균의 발생에 적합할 때 예방적 조치(measure)로서, 또는 질병의 출현 후 치료적 조치로서, 필요에 따라 수행된다. 적용은 일반적으로 표준 분무 방법을 사용하여 수행될 것이다. 당업자는 단독으로 또는 황산구리, 보르도액(Bordeaux mixture), 또는 화학 비료 산업으로부터의 다른 식물 보호 제품과 같이, 살진균 특성으로 공지된 다른 제품과의 혼합물로 사용되는, 본 발명에 따른 추출물을 사용하여 식물을 언제, 어떻게 처리 할지를 결정할 수 있을 것이다. 유리하게는, 유기 또는 생물기능(biodynamic) 농업을 위해 화학 비료 산업으로부터의 식물 보호 제품을 사용하지 않고 처리가 수행된다.

[0051] 본 발명은 또한 수확 후 과일 및 식물의 분해, 특히 진균 부패의 발생을 예방 및/또는 치료하는 방법으로서, 상기 방법은 상기 및 실시예에서 정의된 본 발명에 따른 공정에 의해 수득 가능한 적절한 양의 추출물을 상기 과일 및 식물에 적용하는 것을 포함하는 방법에 관한 것이다.

[0052] 이러한 항산화 특성을 통해, 본 발명에 따른 추출물, 특히 덩굴 싹 추출물은 또한 식품 조성물 또는 화장품 조성물을 보존하는데 사용될 수 있다.

[0053] 본 발명에 따른 추출물, 특히 덩굴 추출물은 수확 후 과일의 산화를 지연시키는 능력 때문에, 이러한 식물 또는 식물의 일부, 특히 저온, 그들이 자연 환경에서 발견되는 것보다 낮은 온도에서 저장 시 산화 스트레스에 민감한 산화-민감성 과일, 예컨대 바나나 또는 망고, 패션푸르트 등과 같은 외래 또는 열대 과일에 적용함으로써, 식물에서 산화 스트레스를 예방 및/또는 치료하기 위해 사용될 수 있다. 본 발명은 또한 식물에서 산화 스트레스의 예방 및/또는 치료를 위한 본 발명에 따른 추출물, 특히 덩굴 싹 추출물, 또는 이를 함유하는 조성물의 용도에 관한 것이다.

[0054] 본 발명에 따른 추출물, 특히 덩굴 싹 추출물은 또한 인간 및 동물에서 산화 스트레스의 예방 및 치료를 위한 상기 추출물의 항산화 특성을 위해 사용될 수 있다.

[0055] 또한 추출물은 특히 인간 내의 공생균을 보존하면서, 병원성 그람 양성균에 대한 항균 활성을 가진다. 추출물은 특히 스테필로코커스(Staphylococcus), 리스테리아(Listeria), 스트렙토코커스(Streptococcus) 및 프로피오니박테리움 (Propionibacterium), 특히 여드름을 일으키는 병원균인 프로피오니박테리움 아크네(Propionibacterium acnes) 속(genus)의 세균에 대해 활성이다. 본 발명에 따른 추출물, 특히 덩굴 싹 추출물은 광범위한 항균 활성을 가지며, 피부 병원체에 대하여 보다 큰 효능을 갖는다.

[0056] 따라서 본 발명은 특히 세균 감염의 치료 및 예방, 보다 특히 세균성 피부 감염의 치료 및 예방을 위한, 더욱 특히 여드름의 치료 및 예방을 위한 요법에 사용하기 위한, 본 발명에 따른 추출물, 특히 덩굴 싹 추출물에 관한 것이다.

[0057] 또한 본 발명은 상기 및 실시예에서 정의된 본 발명에 따른 공정에 의해 수득 가능한 추출물 및 사용하기에 적합한 담체를 포함하는 조성물에 관한 것이다.

[0058] 이는 수확 전 또는 후의 식물에 적용하기 위한 항진균성 조성물, 또는 약학 조성물일 수 있다. 이러한 조성물은 공지되어 있고, 당업자는 이 용도에 적합한 담체를 결정할 수 있을 것이다.

[0059] 본 발명은 특히 적어도 상기 기재된 추출물 및 적어도 하나의 상용성 제형제(compatible formulating agent)를 포함하는 식물 건강 조성물에 관한 것이다. 상기 식물 건강 조성물은 건조 형태, 예를 들어 분말 형태 또는 과립 형태, 또는 액체 형태, 예를 들어 현탁액, 농축 또는 비농축 분산액, 겔, 에멀젼 등의 형태일 수 있다.

[0060] 제형제는 천연 제제 또는 합성 화학으로부터 유래된 것이며, 식물 건강 조성물에 통상적으로 사용된다.

[0061] 제형제는 분산제, 안정제, 계면활성제, 방부제, 습윤제, 점착제, 완충제, pH 조절제, 광 보호제 등일 수 있다. 이들은 단독으로 또는 혼합물로 사용될 수 있다.

발명의 효과

[0062] 본 발명에 따른 공정에 의해 수득 가능한 추출물뿐만 아니라 이를 함유하는 조성물은 특히 수확 후 과일 및 식물에서 진균 감염의 예방 및 치료에 사용하기에 적합하다.

[0063] 본 발명에 따른 공정은 동일한 추출 매질에 조합된 여러 기술의 실행을 포함한다. 각각의 기술 (전자기파, 초음파, 진공) 및 이들의 실행 수단은 공지되어 있다(WO 2012/045923, EP 2 530 059, FR 2 976 062). 당업자는 건조된 바이오매스를 이러한 관련 처리에 적용하도록 기존의 하이드로알콜 추출 시스템을 적용할 수 있을 것이다.

도면의 간단한 설명

[0064] **도 1**은 본 발명에 따른 공정에 의해 수득한 추출물 및 종래의 공정에 의해 수득한 추출물에 함유된 트랜스-피세아타놀, 트랜스-레스베라트롤, 트랜스-ε-비니페린 및 트랜스-비티신의 상대량의 비교를 나타낸다.

표시된 값은 HPLC 피크의 곡선 아래 영역으로부터 계산된, 4 개의 분자 각각의 상대 농도 (임의 단위)를 나타낸다.

도 2는 본 발명에 따른 공정에 의해 수득한 추출물 (동그라미) 및 종래의 공정에 의해 수득한 추출물 (사각형)의 항진균 활성의 비교를 나타낸다. 표시된 값은 3개의 동일한 조건에 대한, 추출물 농도의 함수로서, 접종 4일 후의, 효능 (0% = 진균 성장 정상; 100% = 진균 성장 없음)의 평균이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0065] **실시예**

[0066] **실시예 1, 비티스 비니페라 싹 에코-추출물(eco-extract)의 제조 :**

[0067] 시작 식물 재료는 비티스 비니페라 싹 (8월 싹)이다. 싹을 건조시킨다(야외에서 또는 오븐 속에서). 싹이 건조되면, 먼저 2 내지 10 cm의 단편으로 파쇄한 다음, 1 내지 5mm 사이의 입자 크기로 세밀하게 분쇄한다. 상기 수득된 비티스 비니페라 싹 분말을 30 % 수성 또는 에탄올 용액에서 추출한다. 추출 시간은 30 분 내지 1 시간 30 분, 바람직하게는 45 분 내지 60 분이다. 추출에 사용된 기술은 마이크로파, 초음파, 진공 및 동시 교반이다. 상기 수득된 추출물을 20 마이크론 필터로 진공 여과한다. 상기 수득된 추출물을 진공 하에 증발시키고 분무 건조 또는 동결 건조시킨다. 상기 수득된 건조 추출물을 실온에서 빛을 피해 저장한다.

[0068] **실시예 2, 실시예 1에 따라 제조된 비티스 비니페라 싹 추출물의 화학적 특성화:**

[0069] 실시예 1에 따라 수득된 동결 건조된 건조 비티스 비니페라 싹 에코-추출물 5mg을 1 ml의 50 % 에탄올에 용해시킨다. 상기 용액을 가용화한 다음 12000 RCF에서 10 분간 원심 분리 한 후, 하기 조건 하에서 고성능 액체 크로마토그래피/질량 분석기 (HPLC-MS) 시스템에 주입한다. 주입된 추출물의 용적은 25 μl이다. 이동 용매는 초순수 (0.1% 포름산) 및 아세토니트릴 (0.1% 포름산)이다. 분리는 하기 용매 구배에 따라 55 분 동안 1 ml/분으로 수행한다 :

시간 (분)	아세토니트릴 (%)	물 (%)
0	5	95
0.1	5	95.00
45	50	50.00
46	100	0.00
51	100	0.00
52	5	95.00
55	5	95.00

[0070]

[0071] 사용된 컬럼은 C18 함수가 접목된 고정 상을 함유한다. UV 검출은 200 내지 800 nm 사이에서 수행된다. 질량 검출은 네거티브-모드 ESI에 의해 수행된다. 4 가지 주요 화합물이 수득되며 이들의 체류 시간, 흡광도 및 분자량은 하기 표에 나타낸다.

화합물	체류 시간(분)	최대흡광도 (nm)	분자량 (g/mol)
트랜스-피세아타놀	19	306 – **323**	244
트랜스-레스베라트롤	23	**306** – 323	228
트랜스-ε-비니페린	30	306 – **323**	454
트랜스-비티신	36	306 – **327**	906

[0072]

[0073] 상기 4 가지 화합물의 함량과 종래의 에탄올 추출물의 비교는 도 1에 나타낸다.

[0074] **실시예 3, 보트리티스 시네레아 (Botrytis cinerea)에 대한 항진균 작용:**

[0075] 보트리티스 시네레아 포자를 한천 영양 배지가 미리 부어진 투명 96-웰 플레이트(well plate)의 웰 바닥에 침전시킨다.

[0076] 그 다음, 8% 에탄올 중 상이한 농도 (0 g/l, 2.5 g/l, 5 g/l, 10 g/l, 20 g/l 및 30 g/l)로 용해된, 실시예 1에 따라 수득된 동결 건조된 건조 비티스 비니페라 싹 에코-추출물을 웰에 침전시킨다.

[0077] 빛을 피해 21° C 에서 다양한 배양 시간으로 배양한 후, 각 웰에서의 균사체의 상대 밀도를 800 nm에서의 흡광도를 통해 측정한다. 그 다음 상기 흡광도 값으로부터 항진균 효능을 계산한다.

[0078] 본 발명에 따른 공정에 의해 수득된 추출물 및 종래의 공정에 의해 수득된 추출물의 배양 4 일에 관찰된 항진균 효능을 도 2에 나타낸다. 상기 결과는 도 2에서 적어도 15일까지 배양된 결과와 유사하다.

[0079] **실시예 4, 항진균 작용**

[0080] 240시간까지의 100% 효율에 대한 최소 억제 농도 (MIC)는 상이한 진균 균주에 대한 실시예 2에 따른 추출물을 사용하여 측정하였다. 결과는 하기 표에 자세히 나타낸다.

진균	MIC g/L
비스오클라미스 니베아	28
넥트리아 갈리게나	13
모닐리니아 락사	8
알터나리아 다우실	7
헬민토스포리움 솔라니	2
지베렐라 제아에	9
푸사리움 쿨모룸	9
미코스파렐라 그라미니콜라	1

[0081]

[0082] **실시예 5, 항균 작용**

[0083] 실시예 2의 추출물의 MIC는 상이한 세균 종에 대해 결정되었다. 시험은 하기 표에 열거된 27 가지 균주에 대해 수행된다. 연구는 $5 \cdot 10^5$ 내지 10^6 CFU/mL로 보정된, 시험된 콜로니(colony)의 농도와 함께 풍부한 영양 배지에서 수행된다.

세균	MIC mg/ML
바킬루스목(Bacillales)	
바실러스 세레우스(*Bacillus cereus*)	0.234
바실러스 섭틸리스(*Bacillus subtilis*)	0.938
스테필로코커스 아우레우스(*Staphylococcus aureus*)	0.469
에스. 아우레우스(*S. aureus*) MR (MRSA)	0.469
스테필로코커스 에피터미디스(*Staphylococcus epidermidis*)	0.234
리스테리아 모노키토게네스(*Listeria monocytogenes*)	0.469
락토바실러스목(Lactobacillus)	
엔테로코커스 히레(*Enterococcus hirae*)	0.469
락토바실러스 애시도필러스(*Lactobacillus acidophilus*)	7.5
락토바실러스 카제이(*Lactobacillus casei*)	7.5
락토바실러스 플란타럼(*Lactobacillus plantarum*)	> 7.5
스트렙토코커스 뮤탄스(*Streptococcus mutans*)	3.75
스트렙토코커스 파이오네게스(*Streptococcus pyogenes*)	0.234
스트렙토코커스 수이스(*Streptococcus suis*)	0.469
셀레노모나스목(Selenomonadales)	
베일로넬라 디스파(*Veillonella dispar*)	0.938
클로스트리디움목(Clostridiales)	
클로스트리디움 디피실리(*Clostridium difficile*)	0.938

[0084]

엔테로박테리아목(Enterobacteriales)	
살모넬라 엔테리카 티피뮤리움(*Salmonella enterica typhimurium*)	1.875
에스케리키아 콜라이(*Escherichia coli*)	7.5
여시니아 엔테로콜리티카(*Yersinia enterocolitica*)	3.75
비브리오목(Vibrionales)	
비브리오 콜레라(*Vibrio cholerae*)	0.938
비브리오 안귤라룸(*Vibrio anguillarum*)	> 7.5
캄필로박테리아목(Campylobacterales)	
캄필로박터 제주니(*Campylobacter jejuni*)	1.875
박테로이데스목(Bacteroidales)	
박테로이데스 프라길리스(*Bacteroides fragilis*)	3.75
비피도박테리움목(Bifidobacteriales)	
비피도박테리움 브레베(*Bifidobacterium breve*)	1.875
비피도박테리움 락티스(*Bifidobacterium lactis*)	1.875
비피도박테리움 롱검 롱검(*Bifidobacterium longum longum*)	0.938
엑티노마이세스목(Actinomycetales)	
엑티노마이세스 나이슬런디(*Actinomyces naeslundii*)	3.75
프로피오니박테리움 아크네(*Propionibacterium acnes*)	0.117

[0085]

[0086] 실시예 2의 추출물은 락토바실러스 플란타럼 및 비브리오 안귤라룸을 제외한 시험된 모든 균주에 대한 억제 활성을 나타낸다. 시험된 가장 민감한 균주는 여드름을 일으키는 병원균 피. 아크네(*P. acnes*)이다. 마지막으로, 바킬루스목, 엔테로코커스 종 및 특정 스트렙토코커스 종은 실시예 2에 따른 추출물에 가장 민감하다. 다른 한편으로, 시험된 다른 균주, 특히 유익한 세균인 비피도박테리움 종 및 락토바실러스 종뿐만 아니라 그람 음성균은 덜 민감하다.

[0087] 실시예 2의 추출물은 피부 병원균에 대해 보다 큰 효능을 갖는 광역 항균제이다.

[0088] **실시예 6, 항산화 활성**

[0089] 실시예 2의 추출물의 항산화 활성은 실시예 2의 추출물을 적용하거나 또는 적용하지 않고 7일 및 9일 후, 야외에서 보관된 바나나의 껍질 상태를 비교함으로써 연구된다.

[0090] 실시예 2의 추출물을 적용하지 않으면, 7 일에 바나나 산화의 특징인 갈색 반점이 덮힌 바나나 껍질이 관찰되는 반면, 처리된 바나나의 껍질은 약간 영향을 받는다 (1 개의 특징적인 반점).

[0091] 9 일에, 처리되지 않은 바나나의 껍질 산화는 7 일에 관찰된 반점의 덮힘으로부터 전체 부위가 검어지도록 계속된 반면, 처리된 바나나의 껍질은 7 일에 관찰된 것과 거의 달라지지 않았다.

[0092] 바나나에서 관찰된 상기 항산화 활성은 식물, 특히 외래 또는 열대 과일에서 산화 스트레스를 치료하기 위한 본 발명에 따른 추출물의 이점을 나타낸다.

[0093] **참고문헌**

[0094] - Alexa, E., Poiana, M. A. & Sumalan, R. M. Mycoflora and ochratoxin a control in wheat grain using natural extracts obtained from wine industry by-products. *Int. J. Mol. Sci.* **13,** 4949-4967 (2012).

[0095] - Casazza, A. a., Aliakbarian, B., Mantegna, S., Cravotto, G. & Perego, P. Extraction of phenolics from Vitis vinifera wastes using non-conventional techniques. *J. Food Eng.* **100,** 50-55 (2010).

[0096] - Favaron & Lucchetta, Role of grape polyphenols on trans-resveratrol activity against Botrytis Cinerea and of fungal Lacasse on the solubility of putatibe grapepr proteins *J. of Plant Pathology* vol 91, n° 23, 579-588 (2009)

[0097] - Goupil, P. *et al.* Grape marc extract acts as elicitor of plant defence responses. *Ecotoxicology* **21,** 1541-1549 (2012).

[0098] - Luque-Rodriguez & al. Extraction of polyphenols from Vine shoots of Vitis vinifera by Superheated Ethanol-Water Mixtures *J. of Agriculture and Food Chemistry* vol 54, n° 23, 8775-8781 (2006)

[0099] - Osorio & al Biological efficiency of polyphenolic extracts from pecan nuts shell (Carya Illinoensis), pomegranate husk (Punica granatum) and creosote bush leaves (Larrea tridentate Cov.) against plant pathogen fungi Industrial Crops and Products, col 31, n° 1, 153-157 (2010),

[0100] - Pezet, R., Gindro, K., Viret, O. & Spring, J. L. Glycosylation and oxidative dimerization of resveratrol are respectively associated to sensitivity and resistance of grapevine cultivars to downy mildew. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* **65,** 297-303 (2004).

[0101] - Quan, P. T., Hang, T. Van, Ha, N. H., De, N. X. & Tuyen, T. N. Microwave-assisted extraction of polyphenols from fresh tea shoot. *Sci. Technol. Dev.* **9,** 69-75 (2006).

[0102] - Sanchez, J. B. J., Orea, J. M., Gonzalvez, A. G. & Urena, A. G. On the Use of the Own Plant's Defence Compounds to Maintain the Post-Harvest Fruit Quality. *Open Agric. J.* 43-48 (2008).

[0103] - CN 104 177 463, CN 104 435 135, CN 102 757 512, CN 104 256 432, CN 104 256 641, CN 103 783 506, CN 102 757 509, CN 101 816 349, CN 19 35 947, CN 205 759 861, CN 103 875 842

[0104] - EP 2 530 059

[0105] - FR 2 976 062

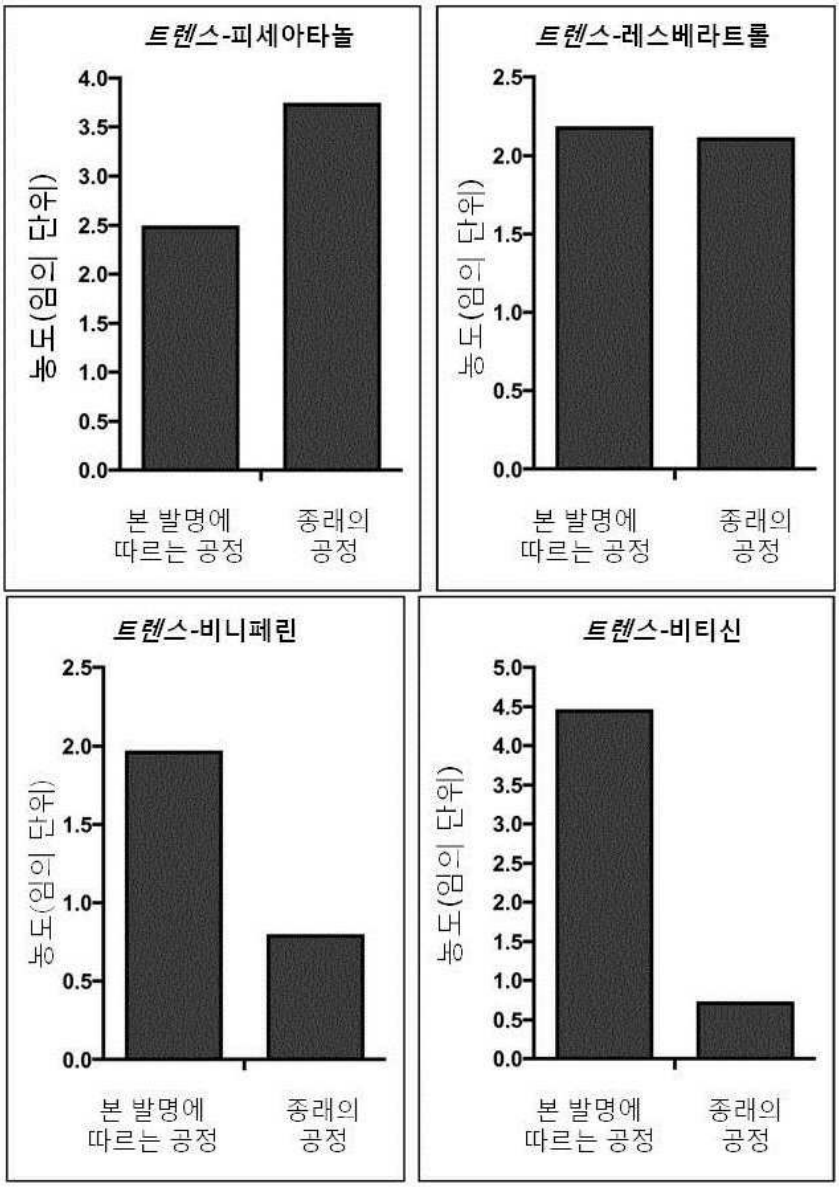
[0106] - JP 2016 102192

[0107] - WO 2012/045923,

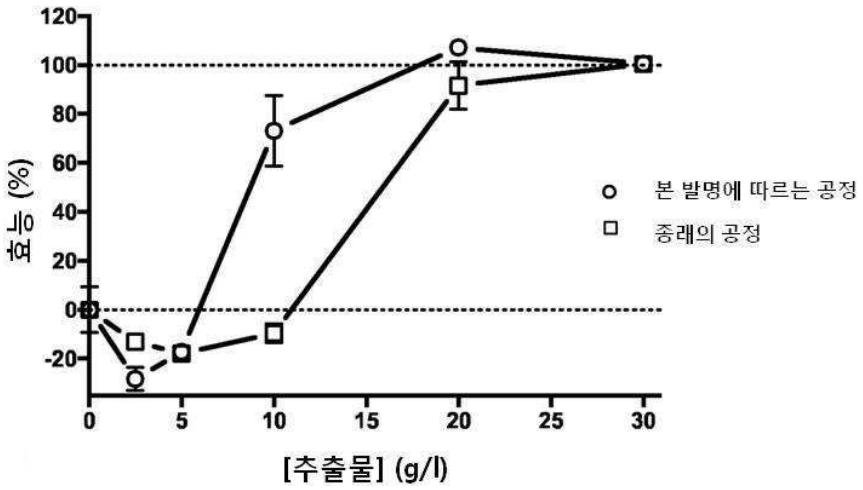
[0108] - US 5,989,557, US 2012/0142105.

도면

도면1


트렌스-피세아타놀
농도(임의 단위)
4.0
3.5
3.0
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
본 발명에 따르는 공정
종래의 공정
트렌스-레스베라트롤
농도(임의 단위)
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
본 발명에 따르는 공정
종래의 공정
트렌스-비니페린
농도(임의 단위)
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
본 발명에 따르는 공정
종래의 공정
트렌스-비티신
농도(임의 단위)
5.0
4.5
4.0
3.5
3.0
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
본 발명에 따르는 공정
종래의 공정

도면2


120
100
80
60
40
20
0
-20
효능 (%)
0
5
10
15
20
25
30
[추출물] (g/l)
본 발명에 따르는 공정
종래의 공정