(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2022년05월31일
(11) 등록번호 10-2403429
(24) 등록일자 2022년05월25일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 33/00 (2006.01) *A61K 31/05* (2006.01)
A61K 31/352 (2006.01) *A61K 31/357* (2006.01)
A61K 36/00 (2006.01) *A61K 9/20* (2006.01)
A61P 1/00 (2006.01) *A61P 1/16* (2006.01)
A61P 17/00 (2006.01) *A61P 3/10* (2006.01)
A61P 9/12 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 33/00 (2013.01)
A61K 31/05 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2021-0035653
(22) 출원일자 2021년03월19일
심사청구일자 2021년03월19일
(56) 선행기술조사문헌
KR1020160030995 A
KR102129038 B1

(73) 특허권자
천현수
서울특별시 동대문구 홍릉로 13, 801호 (청량리동, 청량리현대코아동관)
(72) 발명자
천현수
서울특별시 동대문구 홍릉로 13, 801호 (청량리동, 청량리현대코아동관)
(74) 대리인
최규환

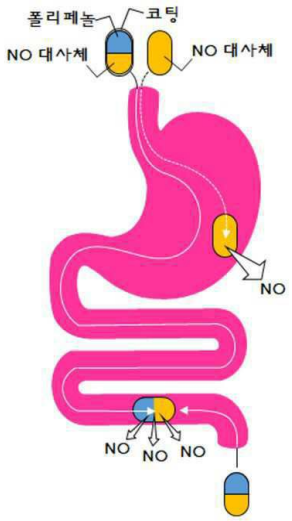
전체 청구항 수 : 총 9 항 심사관 : 양웅철

(54) 발명의 명칭 **산화질소 대사체가 고정화 및 안정화된 천연발효물을 유효성분으로 포함하며 장내 환경에서 산화질소를 생성하는 장용정**

(57) 요 약

본 발명은 산화질소 대사체가 고정화 및 안정화된 천연발효물을 유효성분으로 포함하며 장내 환경에서 산화질소를 생성하는 장용정에 관한 것으로, 본 발명의 장용정은 산화질소 대사체를 위장의 위액(강산 조건)에 노출시키지 않고, 소장이나 대장으로 전달한 다음 일정시간 동안 일정농도의 산화질소를 생성할 수 있도록 개발된 것으로, 고혈압, 당뇨병, 장염 스트레스성 장 증후군, 관절염 또는 아토피 치료와 관련한 분야에서 널리 적용될 수 있을 것으로 기대된다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류
A61K 31/352 (2013.01)
A61K 31/357 (2013.01)
A61K 36/00 (2013.01)
A61K 9/20 (2013.01)
A61P 1/00 (2018.01)
A61P 1/16 (2018.01)
A61P 17/00 (2018.01)
A61P 3/10 (2018.01)
A61P 9/12 (2018.01)

명 세 서

청구범위

청구항 1

아질산나트륨($NaNO_2$) 또는 산화질소 대사체가 천연발효물 내에 고정화 및 안정화된 천연발효물을 유효성분으로 포함하며, 장내 환경에서 산화질소를 생성하는 장용정으로서,

상기 천연발효물은 질소 함유 천연물에 발효균주를 첨가하여 18 내지 35℃의 온도, 0.03 내지 0.1 mg/L의 용존산소 농도로 2 내지 30일 동안 발효하는 단계를 포함하는 제조방법에 의해 제조된 것을 특징으로 하는 장용정.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 아질산나트륨 또는 천연발효물 외에 폴리페놀을 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는 장용정.

청구항 3

제2항에 있어서, 상기 폴리페놀은 레스베라트롤, 퀘세틴, 실리마린, 안토시아닌 또는 카테킨산인 것을 특징으로 하는 장용정.

청구항 4

삭제

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 질소 함유 천연물은 상추, 돈나물, 시금치, 블루베리, 민들레, 석류, 양배추, 마늘, 노니, 양파, 콩, 콩나물, 땅콩, 땅콩나물, 벨벳콩, 뽕잎, 여주, 복분자, 어성초, 아로니아, 율초, 황련, 황금, 황백, 톳, 삼채, 버섯류, 창포, 섬초, 배추, 다시마, 연어이리, 전복껍질(석결명), 갑각류 껍질, 귀뚜라미, 라벤다, 캐모마일, 그라비올라, 바질, 사과, 쑥, 귤, 누에, 명목지황 및 십전대보탕으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상인 것을 특징으로 하는 장용정.

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 발효균주는 바실러스 속(*Bacillus* sp.), 비피도박테리움 속(*Bifidobacterium* sp.), 엔테로코쿠스 속(*Enterococcus* sp.), 락토바실러스 속(*Lactobacillus* sp.), 락토코커스 속(*Lactococcus* sp.) 또는 웨이셀라 속(*Weissella* sp.) 균주인 것을 특징으로 하는 장용정.

청구항 7

제1항의 장용정 또는 산화질소 대사체가 천연발효물 내에 고정화 및 안정화된 천연발효물을 유효성분으로 포함하는 고혈압, 당뇨, 장염, 스트레스성 장 증후군, 관절염, 간질환, 아토피 피부염, 수면 장애 또는 뇌혈관 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물로서,

상기 산화질소 대사체가 천연발효물 내에 고정화 및 안정화된 천연발효물은 질소 함유 천연물에 발효균주를 첨가하여 18 내지 35℃의 온도, 0.03 내지 0.1 mg/L의 용존산소 농도로 2 내지 30일 동안 발효하는 단계를 포함하는 제조방법에 의해 제조된 것을 특징으로 하는 약학 조성물.

청구항 8

제7항에 있어서, 상기 산화질소 대사체가 천연발효물 내에 고정화 및 안정화된 천연발효물은 폴리페놀 화합물을 함유하는 식물을 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는 약학 조성물.

청구항 9

삭제

청구항 10

제1항의 장용정 또는 산화질소 대사체가 천연발효물 내에 고정화 및 안정화된 천연발효물을 유효성분으로 포함하는 고혈압, 당뇨, 장염, 스트레스성 장 증후군, 관절염, 간질환, 아토피 피부염, 수면 장애 또는 뇌혈관 질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물로서,

상기 산화질소 대사체가 천연발효물 내에 고정화 및 안정화된 천연발효물은 질소 함유 천연물에 발효균주를 첨가하여 18 내지 35℃의 온도, 0.03 내지 0.1 mg/L의 용존산소 농도로 2 내지 30일 동안 발효하는 단계를 포함하는 제조방법에 의해 제조된 것을 특징으로 하는 건강기능식품 조성물.

청구항 11

제10항에 있어서, 상기 산화질소 대사체가 천연발효물 내에 고정화 및 안정화된 천연발효물은 폴리페놀 화합물을 함유하는 식물을 추가로 포함하는 것을 특징으로 하는 건강기능식품 조성물.

청구항 12

삭제

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 산화질소 대사체가 고정화 및 안정화된 천연발효물을 유효성분으로 포함하며 장내 환경에서 산화질소를 생성하는 장용정에 관한 것으로, 보다 상세하게는 미생물 발효를 통해 얻은 산화질소 대사체가 고정화 및 안정화된 천연발효물과 폴리페놀을 포함하고, 강산성 조건과 다른 약 산성 또는 약 알칼리 조건인 장내 환경에서도 인체에 흡수가 가능한 산화질소를 일정시간 동안 생성할 수 있는 장용정에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 산화질소(nitric oxide, 이하 NO로 표기)는 박테리아, 식물, 동물 등에 존재하는 NOS (NO synthase)가 아미노산으로 알려진 아르기닌(arginine)을 분해하여 생성되는 기체성 물질로서 반응성이 큰 라디칼이며(반응식 1-1 참조), 소수성이고, 빠르게 산화되어 친수성 NO 대사체(아질산 이온[NO_2^-], 질산 이온[NO_3^-] 등을 말함)로 변화하는 화학적 성질을 가진 불안전한 물질이다(반응식 1-2 및 1-3 참조). NO는 크기가 매우 작으며 소수성이기 때문에 혈액 또는 체액과 같은 수용액 상태에서 빠르게 이동이 가능하고, 특히 혈관 장벽, 세포의 막 등을 주어진 존재시간 (약 1초 이하로 추정됨) 동안에 통과하여 이동할 수 있다. 또한, 생성된 NO는 반응성이 크기 때문에 혈액 또는 체액에 용해된 산소 또는 적혈구에 결합된 산소와 반응하여, 수용성이고 존재시간이 보다 긴 NO 대사체(반응식 1-2 및 1-3 참조)로 변형(산화)되어 수용성 혈액에 용해됨으로써, 신체 모든 곳으로 이동할 수 있고, 신체 밖으로 배설될 수 있다.

$$\text{L-Arginine} \xrightarrow{\text{NOS}} \text{NO} + \text{L-Citrulline} \qquad \text{반응식 1-1)}$$

$$4NO + O_2 + 2H_2O \longrightarrow 4NO_2^- + 4H^+ \qquad \text{반응식 1-2)}$$

$$NO + Hb(II)O_2 \longrightarrow NO_3^- + Hb(III) \qquad \text{반응식 1-3)}$$

[0003] 주) $Hb(II)O_2$; oxy-hemoglobin, Hb(III); deoxy-hemoglobin

[0004] NO 대사체로서 NO_2^-는 친수성이며 비교적 안정한 이온성 물질이며, 혈액 및 체액에 용해되어 신체 모든 곳으로 이동할 수 있으나, 장기장벽, 혈관장벽, 세포막 등을 통과할 수 없다. 그러나 NO_2^-는 산성 조건과 산소가 부족한 상태에서 소수성 NO로 환원됨으로써 장기장벽, 혈관장벽, 세포막 등을 통과하여 NO의 고유의 생리적 기능과 약리적 효과를 나타낸다(반응식 2-1 참조). 또한, NO_2^-는 혈액 또는 체액에 용해된 비타민 C (ascorbic acid/ascorbate, 이하 Asc로 표기)와 반응함으로써 NO로 환원될 수 있다(반응식 2-2 및 2-3 참조).

$NO_2^- + Hb(II) + H^+ \longrightarrow NO + Hb(III) + OH^-$ 반응식 2-1)

$NO_2^- + H^+ \rightleftharpoons HNO_2$ 반응식 2-2)

$2HNO_2 + Asc \longrightarrow 2NO + dehydroAsc + H_2O$ 반응식 2-3)

주1) Hb(II); deoxy-hemoglobin, Asc; ascorbate, dehydroAsc; deoxyhyro-ascorbate

주2) 반응식 2-1)과 2-2)에서 H^+는 CO_2 용해에 의해 생성된 탄산에서 제공됨

주3) 비타민 C는 혈액 또는 체액에서 ascorbate로 존재함

[0005]

[0006] 인체에서 NO는 주로 혈관내피세포에서 반응식 1-1)의 과정에 의해 생성되어 근접한 혈관을 이완시키는 생리기능 조절에 사용되고, 생성된 NO의 일부는 반응식 1-2)의 과정에 의해 NO_2^-로 산화되어 혈액에 용해됨으로써 인체 모든 장소로 이동하여 NO가 필요한 장소에서 반응식 2-1) 또는 반응식 2-2)의 과정에 의해 NO로 환원됨으로써 NO의 생리적 기능과 약리 효과가 나타난다. NOS에 의해 과량으로 생성된 NO 또는 과량의 NO_2^-의 환원에 생성된 NO는 반응식 1-3)의 과정에 의해 NO_3^-로 산화됨으로써 소변을 통해 인체 밖으로 배출된다. 따라서 과량의 NO 또는 NO_2^-에 의한 큰 인체독성은 없다고 볼 수 있다. 다만, 반응식 1-3)의 과정에서 적혈구가 산소를 상실하면서 청색증이 나타날 수 있으나, 이 증상은 적혈구가 다시 산소와 결합됨으로써 빠르게 해소된다.

[0007] 인체의 NO 량은 NO_2^-와 NO_3^-의 합산 량에 의해 총량으로 예측할 수 있으나, 실제 활용 가능한 NO 농도는 NO로 전환될 수 있는 NO_2^- 농도에 의해 혈중 NO 농도를 예측할 수 있다. 질병이 없는 정상인의 혈액에는 약 100-500 nM (평균 300 nM)의 NO_2^-가 존재하는 것으로 알려졌지만, 당뇨병과 같은 질병이 있는 사람의 경우 혈중 NO_2^- 농도는 정상인보다 낮게 관찰되는 경우가 다수 있다. 감소된 NO_2^-의 농도를 정상 범위로 올리는 방법에는 여러 가지가 있을 수 있으나, 음식 또는 식품을 통해 NO 대사체를 섭취하여 혈중 NO_2^- 농도를 정상 범위로 유지시키는 것이 가장 합리적인 방법이라 생각된다. 실제로, 인간과 동물은 음식을 통해 자신의 혈중 NO_2^- 농도를 정상 범위로 유지하고 있다. 또한, 실험동물에서 NO 대사체 효과를 연구한 여러 보고서를 분석해 보면, NO 대사체 섭취를 제한시키는 경우 실험동물에 당뇨병 증상이 나타났으나, 반대로 당뇨병 실험동물에 NO 대사체를 경구로 투여할 경우 당뇨병이 개선되었다.

[0008] 인간과 실험동물은 직접적으로 NO 대사체를 체내로 흡수할 수 없다. 인간이 NO 대사체를 섭취할 경우, NO 대사체의 NO_2^-는 위장에서 위액의 강산 조건에 의해 NO로 환원된 후에, 환원된 NO가 위벽을 통과하여 혈액 또는 체액에 도달하여 NO_2^-로 산화됨으로써 체내 흡수가 완결된다(반응식 3 참조).

$NO_2^- + H^+ \rightleftharpoons HNO_2$ 반응식 3-1)

$2HNO_2 \longrightarrow N_2O_3$ 반응식 3-2)

$N_2O_3 \longrightarrow NO + NO_2$ 반응식 3-3)

주1) 반응식 3-1)에서 역반응이 잘 일어나지 않는 이유는 강산 조건이기 때문임

주2) 반응식 3-2)에서 정반응이 잘 일어나는 이유는 N_2O_3가 소수성이기 때문임

[0009] 주3) 반응식 3-2)에서 N_2O_3는 불안정한 반응중간체로 자발적으로 분해되어 NO를 생성함

[0010] 한편, 섭취한 NO_3^- (또 다른 NO 대사체)는 NO_2^-와 다르게 소장과 대장에서 공생하는 박테리아의 NO_3^- 환원효소 (nitrate reductase, 이하 NRase로 표기)에 의해 NO_2^-로 환원된 다음 장내 풍부하게 존재하는 폴리페놀 (polyphenol, 이하 Ph-OH로 표기함)과 반응하여 NO로 환원됨으로써 체내 흡수가 가능하다(반응식 4 참조).

$$NO_3^- + 2H^+ \xrightarrow{NRase} NO_2^- + H_2O \quad \text{반응식 4-1)}$$

$$NO_2^- + H^+ \longrightarrow HNO_2 \quad \text{반응식 4-2)}$$

$$Ph\text{-}OH + HNO_2 \rightleftharpoons Ph\text{-}O\text{-}N{=}O + H_2O \quad \text{반응식 4-3)}$$

$$Ph\text{-}O\text{-}N{=}O \longrightarrow Ph\text{-}O^* + NO \quad \text{반응식 4-4)}$$

주1) 반응식 4-1)에서 NRase는 3 종류가 있음; 세포질 동화 NRase, 막결합 호흡 NRase, 세포질 가장자리 이화 NRase

주2) 반응식 4-2)에서 H^+는 장내 박테리아(예, 유산균) 대사과정에 의해 발생한 것으로 추정됨

주3) 반응식 4-3)에서 Ph-O-N=O는 NO 공여체(donor)로 작용함

주4) 반응식 4-4)에서 Ph-O-N=O는 HNO_2/NO_2^- 농도가 감소할 경우 자발적으로 NO와 Ph-O* 라디칼로 분해되나, Ph-O*는 공명효과에 의해 비교적 안정함; 따라서 정반응이 역반응보다 우선적으로 진행됨

주5) Ph-O-N=O는 순수하게 분리하기 힘든 반응 중간체 물질

[0011]

[0012] 낮은 혈중 NO (또는 NO_2^-) 농도를 높이기 위해 또는 높은 혈당을 낮추기 위해, 구강으로 NO 대사체를 섭취할 경우 다음과 같은 건강에 해로운 3가지 문제가 발생할 수 있다.

[0013] 첫째, 구강으로 섭취한 NO_2^-는 위액의 강산 조건 때문에 짧은 시간에 과량의 NO가 인체에 흡수되어, 급격한 혈압 감소, 저혈당증, 청색증 등이 나타날 수 있다.

[0014] 둘째, 위액의 강산 조건 때문에 구강으로 섭취된 NO_2^-는 이차아민(secondary amine, 이하 R2N-H로 표기)과 반응하여 발암물질로 알려진 엔-니트로사민(N-nitrosamine, 이하 R2N-N=O로 표기)을 생성할 수 있다(반응식 5 참조).

[0015] 셋째, 구강으로 섭취된 NO_3^-는 위장에서 환원되지 못하고 소장 및 대장에서 NO로 환원되어 체내로 흡수되지만, NO 환원 정도는 개인의 장내 박테리아 환경뿐만 아니라 채소(폴리페놀) 식습관에 따라 다르다. 따라서 일정량의 유효한 NO 흡수를 기대할 수 없다.

$$NO_2^- + H^+ \rightleftharpoons HNO_2 \quad \text{반응식 5-1)}$$

$$HNO_2 + R_2N\text{-}H \longrightarrow R_2N\text{-}N{=}O + H_2O \quad \text{반응식 5-2)}$$

주1) 반응식 5-1)에서 역반응이 잘 일어나지 않는 이유는 위액의 강산 조건이기 때문임

주2) 반응식 5-2)에서 piperidine, pyrrolidine 등과 같은 2차 아민은 어류, 육류, 치즈, 향신료 등에서 발견되고, dimethylamine, diethylamine 등과 같은 2차 아민은 곡류, 차 등에서 발견됨.

[0016]

[0017] 우리 몸에서 NO 대사체는 산소가 부족한 조건 또는 산성인 조건에서 NO로 환원되어 혈관을 확장시키거나 모세혈관 생성을 촉진하여 혈액 흐름을 조절한다(Lundberg et al., Nat Rev Drug Discov. 2008, 7:156-167). 이러한 NO 대사체의 혈액 흐름의 조절 작용은 높은 혈압을 정상 혈압으로 되돌림으로써 고혈압에 의해서 나타나는 혈관 손상을 억제한다(Amaral et al., Redox Biol. 2015, 5:340-346). 그러므로 NO 대사체는 부작용이 적은 고혈압 치료제의 하나로 개발될 수 있을 것이다. 또한, 최근 여러 연구 보고서에서 NO 대사체의 혈당 감소 효과(Khalifi et al., Nitric Oxide. 2015, 44:24-30), 베타 세포의 인슐린 분비 촉진 효과(Nystrom et al., Free Radic Biol Med. 2012, 53:1017-1023), 인슐린 저항성 해소 효과(Ohtake et al., Nitric Oxide. 2015, 44:31-38), 당뇨합병증 개선 효과(Bahadoran et al., Nutr Metab (Lond). 2015, 12:16. doi:10.1186/ s12986-015-0013-6) 등이 보고되어, NO 대사체를 당뇨병 및 당뇨합병증 치료제로 개발하려는 다양한 연구가 진행되고 있다(Ghasemi et al., Nitric Oxide. 2017, 70:9-24). 그러나 고혈압 또는 당뇨병 치료의 목적으로, NO 대사체를 구강으로 섭취할 경우 위에서 언급한 것과 같은 건강에 해로운 3가지 문제가 있을 수 있다.

[0018] 한편, 한국공개특허 제2015-0118160호에는 다량의 약효성분을 함유하고, 피막을 두껍게 하지 않고 충분한 내충격성을 갖는 '장용정'이 개시되어 있고, 한국공개특허 제2010-0063059호에는 '마이폴틱 장용정을 함유하는 서방출형 조성물 및 이의 조제방법'이 개시되어 있으나, 본 발명의 산화질소 대사체가 고정화 및 안정화된 천연발효

물을 유효성분으로 포함하며 장내 환경에서 산화질소를 생성하는 장용정에 대해서는 기재된 바가 없다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0019] 본 발명은 상기와 같은 요구에 의해 도출된 것으로서, 본 발명자는 소장 및 대장의 환경에서 혈압 강하 또는 혈당 강하에 유효한 농도의 산화질소를 일정시간 동안 생성할 수 있도록 산화질소 대사체가 고정화 및 안정화된 천연발효물, 또는 상기 천연발효물과 폴리페놀의 혼합물을 포함하는 장용정 조성물을 개발하였고, 상기 조성물이 실험 동물의 장내 환경에서 산화질소를 서서히 생산하여 고혈압, 당뇨, 장염, 스트레스성 장 증후군, 관절염, 간질환, 아토피 피부염 등을 개선할 수 있음을 확인함으로써, 본 발명을 완성하게 되었다.

과제의 해결 수단

[0020] 상기 과제를 해결하기 위해, 본 발명은 아질산나트륨($NaNO_2$) 또는 산화질소 대사체가 고정화 및 안정화된 천연발효물을 유효성분으로 포함하며, 장내 환경에서 산화질소를 생성하는 장용정을 제공한다.

[0021] 또한, 본 발명은 상기 장용정 또는 산화질소 대사체가 고정화 및 안정화된 천연발효물을 유효성분으로 포함하는 약학 조성물을 제공한다.

[0022] 또한, 본 발명은 상기 장용정 또는 산화질소 대사체가 고정화 및 안정화된 천연발효물을 유효성분으로 포함하는 건강기능식품 조성물을 제공한다.

발명의 효과

[0023] 본 발명의 장용정은 산화질소 대사체를 위장의 위액(강산 조건)에 노출시키지 않고, 소장이나 대장으로 전달한 다음 일정시간 동안 일정농도의 산화질소를 생성할 수 있도록 개발된 것으로, 고혈압, 당뇨, 장염, 스트레스성 장 증후군, 관절염, 간질환, 아토피 피부염 치료와 관련한 분야에서 널리 적용될 수 있을 것으로 기대된다.

도면의 간단한 설명

[0024] 도 1은 산화질소 대사체와 폴리페놀이 혼합된 발효물을 포함하는 장용정의 장내 산화질소 생성을 위내 산화질소 생성과 비교한 그림이다.

도 2는 스트레스성 장 증후군 개선 효과를 확인하기 위한 실험의 모식도이다. WAS는 water avoidance stress를 의미하며, 처리된 시료(sample)는 표 3과 같다.

도 3은 궤양성 대장염 모델에서 시료 투여에 따른 질병활성화정도를 분석한 그래프이다.

도 4는 궤양성 대장염 모델에서 시료 투여에 따른 장 길이 변화를 분석한 그래프이다.

도 5는 궤양성 대장염 모델에서 시료 투여에 따른 혈청 내 TNF-α 및 IL-1β 수준을 분석한 그래프이다.

도 6은 스트레스성 장 증후군 모델에서 시료 투여에 따른 실험군별 변 개수 측정 결과로, (A)는 일일 평균 변 개수이고, (B)는 실험 종료일까지의 누적된 변 개수를 보여준다.

도 7은 고혈압 모델에서 시료 투여 전과 투여 후의 혈압 변화를 측정한 결과이다.

도 8은 당뇨 모델에서 시료 투여에 따른 혈당 변화를 측정한 결과이다.

도 9는 관절염 모델에서 시료를 투여한 후 혈청 내 TNF-α, IL-1β 및 PGE2의 수준을 측정한 결과이다.

도 10은 급성 간 손상 모델에서 시료를 투여한 후 혈청 내 ALT 및 AST 수준을 측정한 결과이다.

도 11은 아토피 피부염 모델에서 시료를 투여한 후 오른쪽 귀 부위를 관찰하여 병변의 형태학적 변화를 분석한 결과이다.

도 12는 아토피 피부염 모델에서 시료를 투여한 후 오른쪽 귀 부위의 두께 변화를 측정한 결과이다.

도 13은 아토피 피부염 모델에서 시료를 투여한 후 각 실험군별로 실험 종료 시점의 비장 무게를 측정한 결과이다.

도 14는 아토피 피부염 모델에서 시료를 투여한 후 각 실험군별로 실험 종료 시점의 혈청 내 TNF-α 및 IL-4의

수준을 측정한 결과이다.

도 15는 천연발효물 시료를 투여한 후 각 실험군별로 체온 변화를 측정한 결과이다.

도 16은 창상 유발 후 각 실험군별 상처 면적 변화를 확인한 결과이다. WHD: 창상 유발 후 창상 부위에 증류수를 도포한 대조군, WHN: 창상 부위에 1 mM의 아질산염 도포액 처리군, WHNCA: 창상 부위에 1 mM의 아질산염 및 1 mM의 구연산 도포액 처리군, WHCA: 창상 부위에 1 mM의 구연산 도포액 처리군, WHNP: 창상 부위에 1 mM의 구연산 및 시료(양배추 발효액) 도포액 처리군, WHP: 창상 부위에 시료(양배추 발효액) 도포액 처리군.

도 17은 EEG (electroencephalogram) 기록용 전극이 삽입·고정된 실험 동물의 모습이다.

도 18은 대뇌피질 뇌파 검사 결과로, LFPs (local field potentials) 기록을 보여준다. Bofore: 시료 투여 전, After: 시료 투여 후.

도 19는 마늘 발효액의 장내 투여 30분 후 측정된 실험동물의 뇌 혈류 변화 분석 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0025] 본 발명의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 아질산나트륨($NaNO_2$) 또는 산화질소 대사체가 고정화 및 안정화된 천연발효물을 유효성분으로 포함하며, 장내 환경에서 산화질소를 생성하는 장용정을 제공한다.

[0026] 본 발명에 따른 장용정은 상기 아질산나트륨($NaNO_2$) 또는 산화질소 대사체가 고정화 및 안정화된 천연발효물 외에, 폴리페놀을 추가로 포함할 수 있다. 상기 폴리페놀은 천연발효물 내의 산화질소 대사체의 산화질소로의 환원을 촉진하는 기능을 하는 것으로, 이에 한정되는 것은 아니나, 레스베라트롤, 퀘세틴, 실리마린, 안토시아닌 또는 카테킨산 등일 수 있다. 상기 폴리페놀은 화합물(compound)의 형태 또는 각 폴리페놀 화합물을 함유하는 천연소재의 분말 형태(예컨대, 아로니아 분말, 새싹보리 분말 등)로 사용될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0027] 본 발명에 따른 장용정에 있어서, 상기 산화질소 대사체가 고정화 및 안정화된 천연발효물은 질소 함유 천연물에 발효균주를 첨가하여 18 내지 35℃의 온도, 0.03 내지 0.1 mg/L의 용존산소 농도로 2 내지 30일 동안 발효하는 단계를 포함하는 제조방법에 의해 제조된 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0028] 본 발명에 따른 상기 산화질소 대사체가 고정화 및 안정화된 천연발효물의 제조방법은 한국등록특허 제2129038호를 참고할 수 있다.

[0029] 본 명세서에서 용어 "장용정(enteric-coated tablet)"이란 산성인 위(stomach)에서의 붕괴를 방지하고 알칼리성의 장내에서 붕괴되도록 정제에 제피(劑皮)를 씌운 것으로, 위점막이 자극되고, 구토를 일으키며, 소화효소를 장해하는 위산으로 분해되는 것 등을 방지하고, 장에서의 작용을 기대하기 위한 정제를 의미한다.

[0030] 정제 및 캡슐의 장용 코팅에 사용되는 물질들로는 지방, 지방산, 왁스, 쉘락, 초산프탈산셀룰로오스(Cellulose acetate phthalate) 또는 프탈산히드록시메틸셀룰로오스(Hydroxypropylmethylcellulose phthalate, HPMCP) 등이 사용될 수 있으나, 이에 제한되지 않으며, 장용정 제조에 사용되는 통상의 코팅 물질을 선택하여 사용할 수 있다.

[0031] 본 발명의 일 구현 예에 따른 장용정은, 바람직하게는 산화질소 대사체가 고정화 및 안정화된 천연발효물을 스테아린산, 글리세린, 글리세린지방산에스테르(장용 코팅), HPMCP(장용 코팅)로 순차적으로 코팅하여 제조한 것일 수 있으나, 이로 한정되는 것은 아니다. 상기 산화질소 대사체가 고정화 및 안정화된 천연발효물은 발효물 또는 농축액의 형태로, 또는 발효액을 농축한 후 동결건조 또는 열풍건조를 통해 분말화한 형태로 사용될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0032] 인체의 산화질소 양은 NO_2^-와 NO_3^-의 합산에 의한 총량으로 예측할 수 있으나, 실제 활용 가능한 산화질소 농도는 산화질소로 전환될 수 있는 NO_2^- 농도에 의해 혈중 NO 농도를 예측할 수 있다. 산화질소 대사체로서 NO_2^-는 친수성이며 비교적 안정한 이온성 물질이며, 혈액 및 체액에 용해되어 신체 모든 곳으로 이동할 수 있으나, 장기장벽, 혈관장벽, 세포막 등을 통과할 수 없다. 낮은 혈중 산화질소 대사체(NO_2^-)의 농도를 높이기 위해 또는 높은 혈당을 낮추기 위해, 구강으로 산화질소 대사체를 섭취할 경우 다음과 같은 건강에 해로운 3가지 문제가 발생할 수 있다.

[0033] 첫째, 구강으로 섭취한 NO_2^-는 위액의 강산 조건 때문에 짧은 시간에 과량의 산화질소가 인체에 흡수되어, 급격한 혈압 감소, 저혈당증, 청색증 등이 나타날 수 있다. 둘째, 위액의 강산 조건 때문에 구강으로 섭취된 NO_2^-는 이차 아민(secondary amine, 이하 R_2N-H로 표기함)과 반응하여 발암물질로 알려진 엔-니트로사민(N-nitrosamine, 이하 R_2N-N=O로 표기함)을 생성할 수 있다. 셋째, 구강으로 섭취된 NO_3^-는 위장에서 환원되지 못하고 소장 및 대장에서 산화질소로 환원되어 체내로 흡수되지만, 산화질소 환원 정도는 개인의 장내 박테리아 환경뿐만 아니라 채소(폴리페놀) 식습관에 따라 다르기 때문에, 일정량의 유효한 산화질소 흡수를 기대할 수 없다.

[0034] 본 발명에 따른 장용정은 천연발효물 내에 포함되어 있는 산화질소 대사체를 위장의 위액 강산 조건에 노출시키지 않고, 소장이나 대장으로 전달한 다음 일정시간 동안 일정한 농도의 산화질소를 생성할 수 있는, 산화질소 대사체와 폴리페놀을 혼합한 조성물을 캡슐화하여 개발된 것일 수 있다.

[0035] 또한, 본 발명에 따른 장용정에 있어서, 상기 산화질소 대사체가 고정화 및 안정화된 천연발효물은 바람직하게는 NO_2^-를 기준으로 100 ppm 이상을 함유하는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0036] 본 명세서에서 용어 "산화질소 대사체"란 아질산염(NO_2^-), R-NO_2^-, R-NO, 질산염(NO_3^-), R-NO_3^-를 총칭하는 말로, 여기는 R은 폴리페놀류(polyphenols), 지방산(fatty acid) 등을 포함하며, 산화질소 또는 아질산 이온이 결합할 수 있는 기능기를 의미한다. 산화질소 대사체는 산성 및 환원조건에서 산화질소로 전환된다. 위(stomach), 피부 등과 같은 산성조건에서 수소이온(H^+)이 산화질소 대사체를 산화시켜 산화질소를 발생시키고, 장(소장, 대장)과 같은 환원조건에서는 폴리페놀류 또는 비타민 C와 같은 환원 물질들이 산화질소 대사체를 환원시켜 산화질소가 발생된다.

[0037] 본 발명에 따른 상기 천연발효물은 질소 함유 천연물과 물의 혼합물 100 중량부에 대하여, 발효균주를 0.01 내지 3 중량부로 첨가하여 발효할 수 있으며, 바람직하게는 질소 함유 천연물과 물을 1:0.5~1의 중량비로 혼합한 후, 상기 혼합물 100 중량부에 대하여 발효균주를 0.01 내지 3 중량부로 첨가하여 발효한 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0038] 또한, 상기 발효는 10 내지 40℃의 온도, 바람직하게는 18 내지 35℃의 온도, 더욱 바람직하게는 20 내지 33℃의 온도, 더 더욱 바람직하게는 25 내지 33℃의 온도에서 수행되는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0039] 또한, 상기 발효는 0.01 내지 0.1 mg/L, 바람직하게는 0.03 내지 0.1 mg/L의 용존산소 농도 조건에서 수행되는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0040] 또한, 상기 발효는 2 내지 30일 동안 수행되는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0041] 또한, 상기 발효는 화학적 산소요구량이 200~700 mg/L일 때 종료하는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0042] 또한, 상기 발효균주는 바실러스 속(*Bacillus* sp.), 비피도박테리움 속(*Bifidobacterium* sp.), 엔테로코쿠스 속(*Enterococcus* sp.), 락토바실러스 속(*Lactobacillus* sp.), 락토코커스 속(*Lactococcus* sp.) 또는 웨이셀라 속(*Weissella* sp.) 균주일 수 있으며, 바람직하게는 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*), 바실러스 아밀로리퀴파시엔스(*B. amyloliquefaciens*), 바실러스 나토(*B. natto*), 바실러스 리케니포르미스(*B. licheniformis*), 비피도박테리움 비피덤(*Bifidobacterium bifidum*), 비피도박테리움 인팬티스(*B. infantis*), 비피도박테리움 롱검(*B. longum*), 엔테로코쿠스 패시움(*Enterococcus faecium*), 엔테로코쿠스 패칼리스(*E. faecalis*), 락토바실러스 애시도필러스(*Lactobacillus acidopilus*), 락토바실러스 알리멘타리우스(*L. alimentarius*), 락토바실러스 불가리쿠스(*L. bulgaricus*), 락토바실러스 카세이(*L. casei*), 락토바실러스 쿠르바투스(*L. curvatus*), 락토바실러스 델브루키이(*L. delbrukii*), 락토바실러스 존소니(*L. johnsonii*), 락토바실러스 파르시미누스(*L. farciminus*), 락토바실러스 가세리(*L. gasseri*), 락토바실러스 헬베티쿠스(*L. helveticus*), 락토바실러스 람노서스(*L. rhamnosus*), 락토바실러스 루테리(*L. reuteri*), 락토바실러스 사케이(*L. sakei*), 락토코커스 락티스(*Lactococcus lactis*) 및 웨이셀라 시바리아(*Weissella cibaria*)로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나를 사용할 수 있으며, 바람직하게는 기탁번호가 KCTC12501BP인 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*) - Chun Hyun Su일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0043] 또한, 상기 질소 함유 천연물은 이에 한정되지 않으나, 상추, 돈나물, 시금치, 블루베리, 민들레, 석류,

양배추, 마늘, 노니, 양파, 콩, 콩나물, 땅콩, 땅콩나물, 벨벳콩, 뽕잎, 여주, 복분자, 어성초, 아로니아, 율초, 황련, 황금, 황백, 톳, 삼채, 버섯류, 창포, 섬초, 배추, 다시마, 연어이리, 전복껍질(석결명), 갑각류 껍질, 귀뚜라미, 라벤다, 캐모마일, 그라비올라, 바질, 사과, 쑥, 귤, 누에, 명목지황 및 십전대보탕으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상일 수 있다.

[0044] 본 발명은 또한, 상기 장용정 또는 산화질소 대사체가 고정화 및 안정화된 천연발효물을 유효성분으로 포함하는 약학 조성물을 제공한다.

[0045] 본 발명에 따른 약학 조성물에 있어서, 상기 산화질소 대사체가 고정화 및 안정화된 천연발효물은, 질소 함유 천연물에 발효균주를 첨가하여 18 내지 35℃의 온도, 0.03 내지 0.1 mg/L의 용존산소 농도로 2 내지 30일 동안 발효하는 단계를 포함하는 제조방법에 의해 제조된 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않으며, 질소 함유 천연물 및 발효균주는 전술한 것과 같다.

[0046] 또한, 상기 약학 조성물에 있어서, 상기 산화질소 대사체가 고정화 및 안정화된 천연발효물은 폴리페놀 화합물을 함유하는 식물을 추가로 포함할 수 있고, 상기 폴리페놀 화합물을 함유하는 식물은 이에 한정되는 것은 아니나, 아로니아 또는 새싹보리일 수 있다. 상기 식물은 분말 또는 추출물의 형태로 포함될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0047] 본 발명에 따른 약학 조성물은 고혈압, 당뇨, 장염, 스트레스성 장 증후군, 관절염, 간질환, 아토피 피부염, 수면 장애 또는 뇌혈관 질환의 예방 또는 치료용일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 상기 수면 장애는 비기질적 불면증, 악몽, 몽유병 등이 있는 비기질적 수면 장애와 기질적 불면증, 기면증, 수면 무호흡증이 속한 기질적 수면 장애 등일 수 있고, 상기 뇌혈관 질환은 뇌혈류 흐름 장애 질환으로 바람직하게는 뇌졸중일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0048] 또한, 본 발명에 따른 약학 조성물에 있어서, 상기 천연발효물을 농축액 형태 또는 고형화물 형태로 사용할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 또한, 천연발효물의 농축액 또는 고형화물은 이에 한정되는 것은 아니나, 코팅화하여 사용하는 것이 더욱 바람직할 수 있다.

[0049] 본 발명의 약학 조성물에 있어서, 상기 산화질소 대사체가 고정화 및 안정화된 천연발효물이 NO_2^-를 기준으로 5 ppm 이상 10 ppm 미만의 산화질소 대사체를 함유할 경우 질병의 예방 효과가 있고, 상기 산화질소 대사체가 고정화 및 안정화된 천연발효물이 NO_2^-를 기준으로 10 ppm 이상 40 ppm 미만의 산화질소 대사체를 함유할 경우 질병의 치유 효과가 있으며, 상기 산화질소 대사체가 고정화 및 안정화된 천연발효물이 NO_2^-를 기준으로 40 ppm 이상의 산화질소 대사체를 함유할 경우 질병의 치료 효과를 볼 수 있다.

[0050] 본 발명에 따른 약학 조성물에 있어서, 상기 천연발효물은 약학 조성물 총량기준 40mg/g 내지 140mg/g의 함량으로 포함되는 것이 바람직할 수 있고, 60mg/g 내지 120mg/g의 함량으로 포함되는 것이 보다 바람직하며, 90 mg/g 내지 110 mg/g의 함량으로 포함되는 것이 더욱 바람직하다.

[0051] 또한, 상기 약학 조성물은 사용 목적에 맞게 통상의 방법에 따라 과립제, 정제, 캡슐제 등의 경구 제형의 형태로 제형화하여 사용할 수 있으며, 이에 한정되는 것은 아니나 경구 투여하거나 직장 투여될 수 있다.

[0052] 본 발명의 약학 조성물은 당해 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자가 용이하게 실시할 수 있는 방법에 따라, 약학적으로 허용되는 담체 또는 부형제를 이용하여 제제화할 수 있다. 이러한 약학 조성물에 포함될 수 있는 적합한 담체, 부형제 및 희석제의 예로는 락토오스, 덱스트로스, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 비정질 셀룰로즈, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸하이드록시벤조에이트, 프로필하이드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유 등을 들 수 있다. 또한, 상기 약학 조성물은 충전제, 항응집제, 윤활제, 습윤제, 향료, 유화제, 방부제 등을 추가로 포함할 수 있다.

[0053] 또한, 본 발명에 따른 상기 약학 조성물은 약제학적으로 유효한 양을 고혈압, 당뇨, 장염, 스트레스성 장 증후군, 관절염, 간질환, 아토피 피부염, 수면 장애 또는 뇌혈관 질환 환자에게 투여함으로써 고혈압, 당뇨, 장염, 스트레스성 장 증후군, 관절염, 간질환, 아토피 피부염, 수면 장애 또는 뇌혈관 질환을 예방 및 치료할 수 있다. 또한, 본 발명에 따른 장용정 또는 천연발효물을 포함하는 약학 조성물은 피부 세포 재생 효과가 우수하여 창상 및 화상 치료에도 효과적으로 이용될 수 있다.

[0054] 본 발명의 약학 조성물은 개별 치료제로 투여하거나 다른 치료제와 병용하여 투여될 수 있고 종래의 치료제와는 순차적 또는 동시에 투여될 수 있으며, 단일 또는 다중 투여될 수 있다. 상기한 요소들을 모두 고려하여 부작용이 없이 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양을 투여하는 것이 중요하며, 이는 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다.

[0055] 구체적으로, 본 발명에 따른 장용정 또는 산화질소 대사체가 고정화 및 안정화된 천연발효물을 포함하는 약학 조성물의 약제학적으로 유효한 양은 환자의 나이, 성별, 체중에 따라 달라질 수 있으며, 일반적으로는 체중 ㎏당 2 ㎎ 내지 4 ㎎, 바람직하게는 3 ㎎을 매일 또는 격일로 투여하고, 1일 1회 내지 3회로 나누어 투여할 수 있다. 그러나 투여 경로, 질병의 중증도, 성별, 체중, 연령 등에 따라서 증감될 수 있으므로 상기 투여량이 어떠한 방법으로도 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.

[0056] 본 발명은 또한, 상기 장용정 또는 산화질소 대사체가 고정화 및 안정화된 천연발효물을 유효성분으로 포함하는 건강기능식품 조성물을 제공한다.

[0057] 본 발명에 따른 건강기능식품 조성물에 있어서, 상기 산화질소 대사체가 고정화 및 안정화된 천연발효물은, 질소 함유 천연물에 발효균주를 첨가하여 18 내지 35℃의 온도, 0.03 내지 0.1 ㎎/L의 용존산소 농도로 2 내지 30일 동안 발효하는 단계를 포함하는 제조방법에 의해 제조된 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않으며, 질소 함유 천연물 및 발효균주는 전술한 것과 같다.

[0058] 또한, 상기 건강기능식품 조성물에 있어서, 상기 산화질소 대사체가 고정화 및 안정화된 천연발효물은 폴리페놀 화합물을 함유하는 식물을 추가로 포함할 수 있고, 상기 폴리페놀 화합물을 함유하는 식물은 이에 한정되는 것은 아니나, 아로니아 또는 새싹보리일 수 있다. 상기 식물은 분말 또는 추출물의 형태로 포함될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0059] 본 발명에 따른 건강기능식품 조성물은 고혈압, 당뇨, 장염, 스트레스성 장 증후군, 관절염, 간질환, 아토피 피부염, 수면 장애 또는 뇌혈관 질환의 예방 또는 개선용일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0060] 본 발명의 건강기능식품 조성물은 건강기능식품, 건강보조식품 등을 모두 포함하는 것으로, 상기 건강기능식품 조성물은 분말, 과립, 환, 정제, 캡슐, 캔디, 시럽 또는 음료의 제형으로 제조될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0061] 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.

[0062] 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 포함 시킬 수 있다. 상기 천연 탄수화물은 모노사카라이드(예컨대, 글루코오스, 프럭토오스 등), 디사카라이드(예컨대, 말토스, 수크로오스 등), 올리고당, 폴리사카라이드(예컨대, 덱스트린, 시클로덱스트린 등) 또는 당알코올(예컨대, 자일리톨, 소르비톨, 에리쓰리톨 등)인 것이 바람직하다. 상기 향미제는 천연 향미제(예컨대, 타우마틴, 스테비아 추출물 등)와 합성 향미제(예컨대, 사카린, 아스파르탐 등)를 이용할 수 있다.

[0063] 예를 들어, 본 발명의 건강기능식품 조성물이 기능성 음료 등의 식품 조성물인 경우 상기 식품 조성물에는 그 유효성분 이외에 감미제, 풍미제, 생리활성 성분, 미네랄 등이 포함될 수 있다.

[0064] 감미제는 식품이 적당한 단맛을 나게 하는 양으로 사용될 수 있으며, 천연의 것이거나 합성된 것일 수 있다. 바람직하게는 천연 감미제를 사용하는 경우인데, 천연 감미제로서는 옥수수 시럽 고형물, 꿀, 수크로오스, 프룩토오스, 락토오스, 말토오스 등의 당 감미제를 들 수 있다.

[0065] 풍미제는 맛이나 향을 좋게 만들기 위해 사용될 수 있는데, 천연의 것과 합성된 것 모두 사용될 수 있다. 바람직하게는 천연의 것을 사용하는 경우이다. 천연의 것을 사용할 경우에 풍미 이외에 영양 강화의 목적도 병행할 수 있다. 천연 풍미제로서는 사과, 레몬, 감귤, 포도, 딸기, 복숭아 등에서 얻어진 것이거나 녹차잎, 둥굴레, 대잎, 계피, 국화 잎, 재스민 등에서 얻어진 것일 수 있다. 또 인삼(홍삼), 죽순, 알로에 베라, 은행 등에서 얻

어진 것을 사용할 수 있다. 천연 풍미제는 액상의 농축액이나 고형상의 추출물일 수 있다. 경우에 따라서 합성 풍미제가 사용될 수 있는데, 합성 풍미제는 에스테르, 알콜, 알데하이드, 테르펜 등이 이용될 수 있다.

[0066] 생리 활성 물질로서는 카테킨, 에피카테킨, 갈로가테킨, 에피갈로카테킨 등의 카테킨류나, 레티놀, 아스코르브산, 토코페롤, 칼시페롤, 티아민, 리보플라빈 등의 비타민류 등이 사용될 수 있다. 미네랄로서는 칼슘, 마그네슘, 크롬, 코발트, 구리, 불소화물, 게르마늄, 요오드, 철, 리튬, 마그네슘, 망간, 몰리브덴, 인, 칼륨, 셀레늄, 규소, 나트륨, 황, 바나듐, 아연 등이 사용될 수 있다.

[0067] 또한 본 발명의 건강기능식품 조성물은 상기 감미제 등 이외에도 필요에 따라 보존제, 유화제, 산미료, 점증제 등을 포함할 수 있다. 이러한 보존제, 유화제 등은 그것이 첨가되는 용도를 달성할 수 있는 한 극미량으로 첨가되어 사용되는 것이 바람직하다. 극미량이란 수치적으로 표현할 때 식품 조성물 전체 중량을 기준으로 할 때 0.0005중량% 내지 약 0.5중량% 범위를 의미한다. 상기 보존제로서는 소듐 소르브산칼슘, 소르브산나트륨, 소르브산칼륨, 벤조산칼슘, 벤조산나트륨, 벤조산칼륨, EDTA(에틸렌디아민테트라아세트산) 등을 들 수 있고, 상기 유화제로서는 아카시아검, 카르복시메틸셀룰로스, 잔탄검, 펙틴 등을 들 수 있으며, 상기 산미료로서는 연산, 말산, 푸마르산, 아디프산, 인산, 글루콘산, 타르타르산, 아스코르브산, 아세트산, 인산 등을 들 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 이러한 산미료는 맛을 증진시키는 목적 이외에 미생물의 증식을 억제할 목적으로 식품 조성물이 적정 산도로 되도록 첨가될 수 있다. 또한, 상기 점증제로서는 현탁화 구현제, 침강제, 겔형성제, 팽화제 등을 들 수 있다.

[0069] 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0071] **1. 실험 재료**

[0072] 본 실험에 사용된 재료는 아질산나트륨($NaNO_2$)과, (유)휴먼에노스에서 제조한 콩 발효액, 상추 발효액, 양배추 발효액, 마늘 발효액에 폴리페놀을 풍부하게 함유하는 아로니아와 새싹보리 분말을 각각 혼합하여, 산화질소 대사체 함량은 NO_2^- 농도를 기준으로 동일하게 맞춘 후 실험에 사용하였다.

[0073] 상기 콩, 상추, 양배추 또는 마늘 발효액은 한국등록특허 제2129038호에 개시된 제조방법을 통해 제조된 각각의 발효물을 20 내지 30℃에서 24 내지 48 시간동안 100 내지 300 rpm의 교반속도로 농축한 것을 의미한다.

[0074] 발효액에 함유된 NO_2^-와 NO_3^-는 아연 분말(zinc powder, 고체 상태로 액체의 부피 변화를 초래하지 않아 농도 감소가 없음)을 첨가하여 농축액에 포함된 NO_3^-를 모두 NO_2^-로 환원시키고, 총 NO_2^-의 농도를 측정하여 산화질소 대사체의 총 함량을 결정하였다.

[0075] 보다 구체적으로 기술하면, 총 NO_2^- 함량은 먼저 아연 분말을 첨가하여 1시간 동안 환원시킨 농축액을 증류수로 1,000배 희석하고 3,000 rpm에서 원심분리하여 불용성 폴리페놀과 식이섬유를 제거한 다음 맑은 상층액 50 ㎕를 취하여 측정 시료로 사용하였다. 50 ㎕의 NO_2^- 표준용액, 50 ㎕의 측정 시료를 96-웰 플레이트에 각각 분주하고 100 ㎕의 시험용액 [1% 설마닐아미드(sulfanilamide)가 함유된 30% 아세트산 용액과 0.1% N-(1-naphthyl)ethylenediamine가 함유된 60% 아세트산 용액을 1:2의 비율로 혼합한 용액]을 첨가하고, 실온에서 10분간 방치하여 발색반응을 유도하였다. 이어, 멀티-플레이트 리더(multi-plate reader)를 사용하여 570nm 파장에서 각 웰의 흡광도 값을 측정한 다음 표준용액의 흡광도 값과 시료의 흡광도 값을 비교하여 NO_2^- 농도를 계산하였다.

[0076] 본 발명에 있어서, 상기 한국등록특허의 방법에 따라 제조된 산화질소 대사체 함유 천연발효물의 종류 및 각 발효물 내의 산화질소 대사체 생산성을 정리하면 하기 표 1과 같다.

표 1

천연물 소재 및 발효균주에 따른 산화질소 대사체 생산성

균주명	원재료	산화질소 대사체 생산성 (mg/L/Day)	균주명	원재료	산화질소 대사체 생산성 (mg/L/Day)
Bacillus subtilis (KCTC12501BP)	상추	28.0	*Lactobacillus bulgaricus*	상추	25
	콩나물	16.0		콩나물	13
	마늘	30.0		마늘	26
	콩	27.5		콩	19.4
	양배추	23.4		양배추	22
	양파	22.0		양파	20.3
	귀뚜라미	12.8		귀뚜라미	8.8
	쑥	26.0		쑥	21.4
	사과	22.0		사과	20.7
Bacillus amyloliquefaciens	상추	26.0	*Lactobacillus rhamnosus*	상추	22.6
	콩나물	15.0		콩나물	11.5
	마늘	23.0		마늘	23
	콩	18.5		콩	16.8
	양배추	25.4		양배추	21.8
	양파	18.5		양파	19.7
	귀뚜라미	10.4		귀뚜라미	9.6
	쑥	18.0		쑥	22.1
	사과	17.3		사과	16.8
Bacillus natto	상추	20.8	*Bifidobacterium bifidum*	상추	16.0
	콩나물	14.2	*Bifidobacterium longum*	상추	17.8
	마늘	25.0	*Bifidobacterium infantis*	양파	20.4
	콩	28.0	*Enterococcus faecium*	상추	20.0
	양배추	19.5	*Enterococcus faecalis*	콩	16.2
	양파	16.4	*Lactobacillus helveticus*	양배추	13.7
	귀뚜라미	9.8	*Lactobacillus gasseri*	땅콩	22.1
	쑥	22.0	*Lactococcus lactis*	시금치	20.9
	사과	15.5	*Weissella cibaria*	상추	18.3

[0077]

[0079] **2. 통계처리**

[0080] 각 실험에서 얻어진 결과는 평균±표준편차 (mean ± SD)로 나타내었다. 각 시험군의 유의성에 대한 통계는 대조군과 실험군 간의 통계학적 비교를 위해 One-way Anova SPSS v.12를 사용하여 분석하였으며, Duncan's 사후검정을 실시하여 $p < 0.05$일 때 통계적으로 유의한 것으로 판단하였다.

[0082] **실시예 1. 산화질소 대사체 함유 천연발효물의 장염 개선 효과**

[0083] 본 실험에서 사용한 실험동물은 6주령 수컷 Balb/c 마우스를 샘타코(Korea)에서 구입하여 일주일 간 순화기간을 거친 다음 사용하였다. Balb/c 마우스의 평균 무게는 20.25±1.51 g으로, 시료를 매일 1회 장내로 직접 투여(직장투여)하였다. 실험동물 사육실은 12시간 간격으로 명암을 조절하였고, 온도는 23±2℃, 습도는 50~60%를 유지하였다.

[0085] **1-1. 군 구성 및 궤양성 대장염의 유발**

[0086] 실험동물은 6개 군으로 분류되었으며 아무 처리도 하지 않고 증류수(D.W)를 투여한 정상군, 장염을 유발하고 D.W를 투여한 대조군, 장염을 유발하고 아질산나트륨($NaNO_2$) 235 ppm 투여군, 장염을 유발하고 콩발효액 235 ppm 투여군, 장염을 유발하고 콩발효액 + 아로니아 혼합액 235 ppm 투여군, 장염을 유발하고 콩발효액 + 새싹보리 혼합액 235 ppm 투여군으로 분류하였다(표 2). 궤양성 대장염의 유도는 정상군을 제외한 모든 실험군에 3.0% DSS(Dxtran sulfate sodium)를 5일간 자유 섭취시켜 제조하였다. 군 구성 마리수의 산정은 3R의 원칙에 준하여 통계적 의미를 가리는 최소수를 사용하였다.

표 2

[0087] 궤양성 대장염 실험군 구성

Group		DSS[1]	Material	Dose	n
1	정상군	No	DW[2]	-	5
2	대조군	Yes	DW	-	5
3	$NaNO_2$	Yes	sodium nitrogen dioxide	235 ppm	5
4	콩발효액	Yes	soybean fermented extract	235 ppm	5
5	콩발효액 + 아로니아	Yes	soybean fermented extract + Aronia	235 ppm	5
6	콩발효액 + 새싹보리	Yes	soybean fermented extract + Barley Sprout	235 ppm	5

[1] DSS : Dxtran sulfate sodium

[2] DW: distilled water

[0089] **1-2. 질병활성화정도 측정**

[0090] 장 질환은 체중감소, 출혈과 점액을 동반하는 설사 등의 징후로 측정되고, 결장을 짧게 한다. 이전의 연구결과에 의하면 질병활성화정도(Disease activity index; DAI)에는 3가지 주요한 임상 징후가 있는데, 체중감소, 설사, 직장출혈이다. 체중 감소는 초기와 현재의 체중 차이로 산출된다. 설사는 직장에 배설물의 알갱이 형성물이 없고, 직장에 지속적으로 부드러운 배설물이 있는 것으로 정의된다. 직장 출혈이 보이는 것은 출혈을 동반한 설사나 총 직장출혈, 그 밖의 설사와는 별개의 것이다. 본 발명에서 DAI는 다음과 같이 산출하였다.

[0091] DAI = (weight loss score) + (diarrhea score) + (rectal bleeding score)

[0092] 여기서 사용된 의학적 변수는 인체에서 궤양성 대장염이 생겼을 때의 의학적 증상과 유사한 포괄적인 기능측정이다(표 3).

표 3

[0093] 질병활성화정도(Disease activity index)

Score	weight loss (%)	Diarrhea	Rectal bleeding
0	none	None	Normal
1	1-5	Mild	Occult
2	5-10		
3	11-15		
4	15-20		
5	>20	Severe watery	Gross bleeding

[0095] **1-3. 장 길이 측정 및 혈청 내 사이토카인 측정**

[0096] 실험군 모두를 실험 종료 후 호흡 마취하에 안와정맥 채혈하여 혈청분리 후 복부 절개하여 대장의 말단에서 맹장 부분까지 절제하여 적출하여 장 길이를 측정하였다. 혈청 내 사이토카인은 ELISA 키트 (R&D Systems, USA)를 이용하여 TNF-α, IL-1β의 생성을 측정하였다. 항체가 붙어있는 각 웰에 각 ADS (assay diluent solution) 50 ㎕를 첨가 후 시료 50 ㎕를 각각 첨가하여 실온에 2시간 방치한 후, 세척 버퍼 300 ㎕로 4회 세척하였다. 세척 후 각 웰에 항체로 mouse TNF-α, IL-1β 100 ㎕를 넣고 상온에서 2시간 배양 후, 제거하고 4회 세척하였다. 각 웰에 기질용액 100 ㎕를 넣고 30분 상온에 방치 후, 반응 정지액(Stop solution) 100 ㎕를 첨가하여 Molecular Devices사의 ELISA reader (SPECTRA max M2, USA)로 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

[0098] **1-4. 궤양성 대장염 모델에서 천연발효물의 효과**

[0099] DSS 대장염 모델은 체중 감소, 설사, 혈변을 특징으로 하는 임상 증후가 나타난다. 이러한 임상 증상에 미치는 영향을 DAI를 이용하여 측정한 결과는 다음과 같다. 정상군에서는 아무런 증상이 측정되지 않았으며, 정상군을 제외한 나머지 군에서 질병활성도 지수가 증가하였다. 시료 투여군은 DSS군에 비해 전체적으로 감소하는 것을 확인하였다. 특히, 콩발효액 + 아로니아 혼합액 투여군과 콩발효액 + 새싹보리 혼합액 투여군에서 대조군에 비해 유의적인 차이를 보였다(도 3).

[0100] 또한, DSS 투여 후 5일째 되는 날 희생시킨 마우스의 대장을 적출하여 그 길이를 확인한 결과 시료를 투여한 모든 군에서 장 길이가 대조군에 비해 길었으며 특히, 콩발효액 + 아로니아 혼합액 투여군과 콩발효액 + 새싹보리 혼합액 투여군에서 대조군에 비해 유의적인 차이를 보였다(도 4).

[0101] 또한, 대장염 유발 동물 모델에서 혈액 내 염증성 사이토카인을 측정한 결과, 염증 수치를 나타내는 지표인 TNF-α 및 IL-1β 수준이 대조군에 비해 시료 투여군 모두에서 감소하였으며 특히, 콩발효액 + 아로니아 혼합액 투여군과 콩발효액 + 새싹보리 혼합액 투여군에서 대조군에 비해 유의적인 차이를 보였다(도 5). 이상의 결과들을 통해 장내로 직접 투여된 천연발효물이 산화질소 대사체로부터 산화질소를 생성하여 대장염의 개선 효과를 유도하였음을 알 수 있었고, 본 발명에 따른 산화질소 대사체 함유 천연발효물의 장용정으로서의 활용가능성을 직접적으로 확인할 수 있었다.

[0103] **실시예 2. 산화질소 대사체 함유 천연발효물의 스트레스성 장 증후군 개선 효과**

[0104] 본 실험에서 사용한 실험동물은 8주령 암컷 Wistar 랫트(rat)를 샘타코에서 구입하여 일주일 간 순화기간을 거친 다음 사용하였다. 실험동물 사육실은 12시간 간격으로 명암을 조절하였고, 온도는 23±2℃, 습도는 50~60%를 유지하였다.

[0106] **2-1. 군 구성 및 Water Avoidance Stress (WAS)**

[0107] 산화질소 대사체 함유 천연발효물에 의한 대장 운동 변화를 관찰하고자 위산 억제제인 파모티딘(Famotidine) 40 mg을 1 ㎖ 투여하고 30분 후 각 그룹별로 시료 1 ㎖을 경구 투여한다. 정상군을 제외한 나머지 그룹에 WAS 수조에 각각 물을 채운 후 도피대에 동물을 올려두어 간헐적 스트레스를 준 후 변 개수를 측정한다. WAS는 매일 60분씩 총 8일간 진행하였다(도 2).

[0108] 군 구성은 각 군당 6마리씩 6개의 군으로, WAS에 노출시키지 않은 정상군(No-stress), WAS를 수행하며 스트레스를 가한 대조군, WAS 수행하며 아질산나트륨($NaNO_2$) 투여군, WAS 수행하며 상추발효액 투여군, WAS 수행하며 상추발효액 + 아로니아 혼합액 투여군, WAS 수행하며 상추발효액 + 새싹보리 혼합액 투여군으로 구성하였다. WAS에 노출시켜 설사형 과민성장증후군 유사증상(배변 증가)과 점막면역의 항진을 유발하고 각 시료별 투여가 이를 감소시킬 수 있는지 관찰하였다.

표 4

[0109] 스트레스성 장 증후군 실험군 구성

Group		WAS	Material	Dose	n
1	정상군	NO	D.W.	-	6
2	대조군	Yes	D.W.	-	6
3	$NaNO_2$	Yes	sodium nitrogen dioxide	135 ppm	6
4	상추발효액	Yes	*Lactuca sativa* fermented extract	135 ppm	6
5	상추발효액 + 아로니아	Yes	*Lactuca sativa* fermented extract + Aronia	135 ppm	6
6	상추발효액 + 새싹보리	Yes	*Lactuca sativa* fermented extract + Barley Sprout	135 ppm	6

[0111] **2-2. 스트레스성 장 증후군 모델에서 천연발효물의 효과**

[0112] WAS를 통한 스트레스 유발 시 각각의 시료별 변 개수 측정 결과는 도 6과 같다. 시료 투여군 모두에서 변 개수가 대조군에 비해 감소하였으며 특히, 상추발효액 + 아로니아 혼합액 투여군과 상추발효액 + 새싹보리 혼합액 투여군에서 대조군에 비해 유의적인 차이를 보였다.

[0114] **실시예 3. 산화질소 대사체 함유 천연발효물의 혈압 개선 효과**

[0115] 본 실험에서 사용한 실험동물은 7주령 수컷 Sprague Dawley 랫트(이하, SD 랫트)를 샘타코에서 구입하여 일주일 간 순화기간을 거친 다음 사용하였다. SD 랫트의 평균 무게는 250~300g이고, 실험동물 사육실은 12시간 간격으로 명암을 조절하였고, 온도는 23±2℃, 습도는 50~60%를 유지하였다.

[0117] **3-1. DOCA-Salt 고혈압 rat 모델 제작 및 군 구성**

[0118] 고혈압 모델의 제작은 8주령 수컷 SD 랫트에 DOCA (Deoxycorticosterone acetate; TCI, Japan)를 주 2회 25 mg/kg의 농도로 4주간 복강 내 투여하고 1% 염화나트륨 수용액을 각각 음수로 사용하여 고혈압을 유도하는 동시에 대조군은 증류수(DW)를, 실험군에는 각각의 발효물을 투여하였다. 고혈압의 유발을 확인하기 위해 mouse tail blood pressure system (MK-2000STS, MUROMACHI KIKAI, Japan)을 이용하여 혈압을 측정하였으며, 수축기 혈압 130 mmHg 이상인 동물을 선발하여 사용하였다.

[0119] 실험동물의 혈압의 측정은 그룹별로 시료를 투여하여 마리 당 50분 동안 실시간으로 측정하였다. 랫트를 보정틀에 넣어 고정시킨 후 꼬리에 piezo electricpulse sensor와 occlusion cuff를 넣어 고정시킨 다음 컴퓨터에 연결된 pulse signal이 적당한 정도로 관찰하며 이때 기기를 작동시켜 수축기 혈압을 관찰하였다.

[0120] 실험동물은 5개군으로 분리하였으며 DOCA를 복강 투여하고 일반사료와 1% 염화나트륨 수용액을 식이한 혈압 모델에 증류수를 투여한 대조군, 대조군과 동일하게 DOCA를 복강 투여하고 일반사료와 1% 염화나트륨 수용액을 식이한 혈압 모델에 아질산나트륨($NaNO_2$) 투여군, 대조군과 동일하게 DOCA를 복강 투여하고 일반사료와 1% 염화나트륨 수용액을 식이한 혈압 모델에 상추 발효액 투여군, 대조군과 동일하게 DOCA를 복강 투여하고 일반사료와 1% 염화나트륨 수용액을 식이한 혈압 모델에 상추발효액 + 아로니아 혼합액 투여군, 대조군과 동일하게 DOCA를 복강 투여하고 일반사료와 1% 염화나트륨 수용액을 식이한 혈압 모델에 상추발효액 + 새싹보리 혼합액 투여군으로 분리하였다. 위산 억제제인 파모티딘(Famotidine) 40 mg을 1 ㎖ 투여하고 30분 후 각 그룹별로 시료 1 ㎖을 경구 투여하였다. 본 발명의 실험에서 상기 파모티딘은 이전의 많은 보고들을 통해 위산 분비를 억제하는 것으로 알려진 약으로, 파모티딘의 전처리를 통해 위 점막에서의 위산 분비를 사전에 차단하여 후처리되는 시료가 위(stomach)에서 산성의 조건에 노출되지 않도록 도와준다. 따라서, 상기와 같이 파모티딘을 전처리하는 실험 조건은 간접적으로 장용정으로서의 시료의 효과를 검증하는 방법으로 사용될 수 있는 것이다.

표 5

[0121] 혈압 실험군 구성

Group		Treatment				n
		DOCA-injection	Dose	material	Dose	
1	대조군	○	25 mg/kg	DW	-	5
2	상추발효액	○	25 mg/kg	*Lactuca sativa* fermented extract	135 ppm	5
3	$NaNO_2$	○	25 mg/kg	sodium nitrogen dioxide	135 ppm	5
4	상추발효액 +아로니아	○	25 mg/kg	*Lactuca sativa* fermented extract + Aronia	135 ppm	5
5	상추발효액 + 새싹보리	○	25 mg/kg	*Lactuca sativa* fermented extract + Barley Sprout	135 ppm	5

[0123] **3-2. DOCA 유발 고혈압 모델에서 천연발효물의 효과**

[0124] DOCA-salt로 고혈압이 유발된 랫트에서 각각의 발효액 투여 전과 투여 후 혈압을 측정한 결과는 도 7과 같다. 특히 천연발효물 시료의 경구 투여 후 10분에서 20분 사이에 혈압 감소를 확인할 수 있었으며, 특히 상추발효액 + 아로니아 혼합액 투여군과 상추발효액 + 새싹보리 혼합액 투여군은 투여 후 55분 까지도 혈압 감소가 유지되는 것을 확인할 수 있었다. 상기 결과는 본 발명에 따른 천연발효물이 장내 환경에서 산화질소 대사체로부터 산화질소를 생성하여 유도된 효과로 유추될 수 있으며, 특히 약효의 지속 효과를 통해 천연발효물로부터 산화질소가 서서히 방출되는 것으로 판단할 수 있었다.

[0126] **실시예 4. 산화질소 대사체 함유 천연발효물의 당뇨 개선 효과**

[0127] 본 실험에서 사용한 실험동물은 8주령 수컷 C57BL/6 마우스를 샘타코에서 구입하여 일주일 간 순화기간을 거친 다음 사용하였다. 실험동물 사육실은 12시간 간격으로 명암을 조절하였고, 온도는 23±2℃, 습도는 50~60%를 유지하였다.

[0129] **4-1. 제2형 당뇨병 유도 및 군 구성**

[0130] 실험동물에게 0.1 M 구연산염 버퍼(citrate buffer, pH 4.5)에 용해시킨 STZ (streptozotocin; Sigma, USA) 120 mg/kg을 복강에 1회 주사하여 당뇨를 유발시켰다. STZ를 투여하고 2주 후 공복상태 실험동물의 꼬리 정맥으로부터 채혈하여 간이혈당계(Glucotrend, Roche, Germany)로 측정한 혈당이 200 mg/dL 이하인 동물은 제외하였

다. 1 주일 후 혈당을 재측정하여 혈당 200 mg/dL 이상 유지된 동물을 선별하여 사용하였다.

[0131] 실험군은 하기 표 5와 같이 구성하였으며, 당부하검사(glucose tolerance test)를 수행하여 혈당 강하 효과를 분석하였다. 구체적으로, 당부하검사는 실험 전 12시간 이상 절식시킨 후 실험동물의 꼬리정맥에서 채혈하여 공복 시 혈당 수준을 측정하였다. 각 군별로 시료를 경구와 장내로 각각 투여한 후 30분 후 2 g/kg의 포도당을 경구 투여하고 0, 30, 60, 90, 120분에 꼬리정맥으로부터 채혈한 혈액을 이용하여 혈당측정기(Accu-check, Roche, Berlin, Germany)로 혈당을 측정하였다. 경구 투여의 경우 위산 억제제인 파모티딘(Famotidine) 40 mg을 1 ㎖ 투여하고 30분 후 각각의 시료를 투여하였다.

표 6

[0132] 당뇨 실험군 구성

Group		Meterial	Dose	Meterial	Dose	n
1	정상군	D.W	-	Glucose	2 g/kg	5
2	약물대조군	metformin	200 mg/kg	Glucose	2 g/kg	5
3	$NaNO_2$	sodium nitrogen dioxide	235 ppm	Glucose	2 g/kg	5
4	콩발효액	Soybean fermented extract	235 ppm	Glucose	2 g/kg	5
5	콩발효액+아로니아	Soybean fermented extract + Aronia	235 ppm	Glucose	2 g/kg	5
6	콩발효액+새싹보리	Soybean fermented extract + Barley Sprout	235 ppm	Glucose	2 g/kg	5

[0134] **4-2. 당뇨 모델에서 천연발효물의 효과**

[0135] 당부하검사(glucose tolerance test) 결과, STZ으로 당뇨병을 유발시킨 마우스에서 천연발효물을 투여하였을 때 모든 발효액 투여군에서 혈당 감소 효과가 나타났으며 특히, 콩발효액 + 아로니아 혼합액 투여군과 콩발효액 + 새싹보리 혼합액 투여군에서 보다 우수한 혈당 감소 효과가 나타났다(도 8).

[0137] **실시예 5. 산화질소 대사체 함유 천연발효물의 관절염 개선 효과**

[0138] 본 실험에서 사용한 실험동물은 5주령 수컷 Balb/c 마우스를 샘타코에서 구입하여 일주일 간 순화기간을 거친 다음 사용하였다. Balb/c 마우스의 평균 무게는 22.78±1.25 g이었고, 시료를 매일 1회 경구로 투여하였다. 실험동물 사육실은 12시간 간격으로 명암을 조절하였고, 온도는 23±2℃, 습도는 50~60%를 유지하였다.

[0140] **5-1. 실험적 관절염의 유발 및 군 구성**

[0141] 실험적 관절염의 유발은 정상군을 제외한 나머지 3개의 실험군에 각 군별로 실험동물을 마취시킨 후 Balb/c 마우스의 무릎 주변을 제모하고 골관절염 유발물질인 LPS(Lipopolysaccharide)를 증류수에 희석한 후 각각 300 ㎍/kg씩 무릎관절에 주사하였다. 약물 주사 3일 후에 관절와 발 부위 부종 정도와 실험동물의 걷는 상태를 관찰하여 관절염 유발 확인 후 실험을 진행하였다.

[0142] 실험동물은 6개 군으로 분류되었으며 아무 처리도 하지 않고 증류수를 투여한 정상군, 증류수를 투여하고 LPS를 통해 관절염을 유발한 대조군, 아질산나트륨($NaNO_2$) 235 ppm 투여군, 상추발효액 235 ppm 투여군, 상추발효액 + 아로니아 혼합액 235 ppm 투여군, 상추발효액 + 새싹보리 혼합액 235 ppm 투여군으로 각각 시료별로 분류하였으며, 4주간 매일 경구투여하였다. 경구 투여의 경우 위산 억제제인 파모티딘(Famotidine) 40 mg을 1 ㎖ 투여하고 30분 후 각각의 시료를 투여하였다. 군 구성 마리수의 산정은 3R의 원칙에 준하여 통계적 의미를 가리는 최소수를 사용하였다.

표 7

[0143] 관절염 실험군 구성

Group		LPS	Meterial	Dose	n
1	정상군	No	D.W	-	5
2	대조군	Yes	D.W	-	5
3	$NaNO_2$	Yes	sodium nitrogen dioxide	235 ppm	5

4	상추발효액	Yes	*Lactuca sativa* fermented extract	235 ppm	5
5	상추발효액+아로니아	Yes	*Lactuca sativa* fermented extract + Aronia	235 ppm	5
6	상추발효액+새싹보리	Yes	*Lactuca sativa* fermented extract + Barley Sprout	235 ppm	5

[0145] **5-2. 혈청 내 사이토카인 및 PGE2 (Prostaglandin E_2) 측정**

[0146] 혈청 내 TNF-α 및 IL-1β의 수준 및 PGE2 생성량은 ELISA 키트 (R&D Systems, USA)를 이용하여 측정하였으며, 구체적인 방법은 전술한 실시예 1-3.과 같다.

[0148] **5-3. 관절염 모델에서 천연발효물의 효과**

[0149] LPS를 통해 관절염 유발모델에서 각각의 시료를 투여한 후 혈청 내 TNF-α, IL-1β 및 PGE2을 측정한 결과, TNF-α, IL-1β 및 PGE2 모두 발효액 투여군에서 LPS만 처리한 대조군(LPS)에 비해 유의적인 감소를 나타내었으며 특히, 상추발효액 + 아로니아 혼합액 투여군과 상추발효액 + 새싹보리 혼합액 투여군에서 대조군에 비해 유의적인 차이를 보였다(도 9).

[0151] **실시예 6. 산화질소 대사체 함유 천연발효물의 간 보호 효과**

[0152] 본 실험에서 사용한 실험동물은 7주령 수컷 Sprague Dawley 랫트(SD 랫트)를 샘타코에서 구입하여 일주일 간 순화기간을 거친 다음 사용하였다. SD 랫트의 평균 무게는 250~300g으로 실험동물 사육실은 12시간 간격으로 명암을 조절하였고, 온도는 23±2℃, 습도는 50~60%를 유지하였다.

[0154] **6-1. 간 손상 유발 및 군 구성**

[0155] 사염화탄소(CCl_4)에 의한 간독성 유발 실험모델은 CCl_4를 올리브유와 동량 혼합액으로 체중 100 g 당 0.1 ㎖을 복강투여하여 간에 급성 손상을 유발시켰으며, 정상군은 CCl_4 대신 올브리유만 복강주사하였다. 각 그룹별로 235 ppm 용량의 시료를 CCl_4 주사 전에 경구투여로 격일로 3회 전처리하였으며, 정상군은 증류수만을 경구투여하였다. 경구 투여의 경우 위산 억제제인 파모티딘(Famotidine) 40 mg을 1 ㎖ 투여하고 30분 후 각각의 시료를 투여하였다. 군 구성 마리수의 산정은 3R의 원칙에 준하여 통계적 의미를 가리는 최소수를 사용하였다.

표 8

[0156] CCl_4 유도 간 손상 실험군 구성

Group		Meterial	n
1	정상군	D.W	5
2	대조군	D.W	5
3	$NaNO_2$	sodium nitrogen dioxide	5
4	상추발효액	*Lactuca sativa* fermented extract	5
5	상추발효액 +아로니아	*Lactuca sativa* fermented extract + Aronia	5
6	상추발효액 +새싹보리	*Lactuca sativa* fermented extract + Barley Sprout	5

[0158] **6-2. 혈청 채취 및 혈청 검사**

[0159] 실험에 사용된 마우스를 12시간 절식시킨 후 아이소플루레인(isoflurane)으로 마취시킨 후 복대정맥에서 채혈하였고, 3,000 rpm으로 20분간 원심분리하여 혈청을 분리하였다. 혈중 AST (Aspartic acid transaminase)와 ALT (Alanine transaminase)의 측정은 Reitman-Frankel의 효소법을 응용한 AST, ALT 측정용 시약(Asan pharmaceutical)을 사용하여 측정하였다.

[0161] **6-3. 급성 간 손상 모델에서 천연발효물의 효과**

[0162] 혈청 내 ALT 및 AST 수준은 일반적으로 간 건강을 위한 바이오 마커로서 임상적으로 측정된다. CCl_4에 의한 간독성 유발 실험모델에서 각각의 시료 투여 후 ALT, AST 측정한 결과 시료 투여군 모두에서 대조군에 비해 혈청

내 ALT 및 AST 수준이 감소하였으며 특히, 상추발효액 + 아로니아 혼합액 투여군과 상추발효액 + 새싹보리 혼합액 투여군에서 대조군에 비해 유의적인 차이를 보였다(도 10).

[0164] **실시예 7. 산화질소 대사체 함유 천연발효물의 접촉성 피부염 개선 효과**

[0165] 본 실험에서 사용한 실험동물은 5주령 수컷 Balb/c 마우스를 샘타코에서 구입하여 일주일 간 순화기간을 거친 다음 사용하였다. 시료를 매일 1회 경구 투여한다. 경구 투여의 경우 위산 억제제인 파모티딘(Famotidine) 40 mg을 1 ㎖ 투여하고 30분 후 각각의 시료를 투여하였다. 실험동물 사육실은 12시간 간격으로 명암을 조절하였고, 온도는 23±2℃, 습도는 50~60%를 유지하였다.

[0167] **7-1. DNFB 제조 및 아토피 피부염 유발 및 군 구성**

[0168] Balb/c 마우스를 일주일간 순화 후 등(back) 부위를 제모하여 3일간 적응 시켰다. DNFB(1-fluoro-2,4-dinitrobenzene; sigma, USA) 시약은 아세톤:올리브유가 4:1의 비율로 혼합된 용액에 0.5% DNFB를 희석시켜서 준비하였다. 제모 후 4일째 되는 날 등(back) 부위에 0.5% DNFB 40 ㎕를 4일간 도포하여 피부 감작(sensitization)을 유도하였다. 피부 감작 후 시료 투여 12일째 되는 날 0.3%의 DNFB를 귀(ear)에 20 ㎕ 도포하여(challenge) 접촉성 피부염을 유발시켰다.

[0169] 실험동물은 6개 군으로 분류되었으며(표 9), 정상군(CON)과 대조군은 각각 증류수를 투여하였고, 나머지 그룹은 각 시료를 1일 1회씩 경구투여 하였다. 경구 투여의 경우 위산 억제제인 파모티딘(Famotidine) 40 mg을 1 ㎖ 투여하고 30분 후 각각의 시료를 투여하였다. 군 구성 마리수의 산정은 3R의 원칙에 준하여 통계적 의미를 가리는 최소수를 사용하였다.

표 9

[0170] 아토피 피부염 실험군 구성

Group		Left ear	Right ear	Material	n
1	정상군	Normal	Normal	D.W	5
2	대조군	Normal	0.3% DNFB	D.W	5
3	$NaNO_2$	Normal	0.3% DNFB	sodium nitrogen dioxide	5
4	양배추발효액	Normal	0.3% DNFB	cabbage fermented extract	5
5	양배추발효액 + 아로니아	Normal	0.3% DNFB	cabbage fermented extract + Aronia	5
6	양배추발효액 + 새싹보리	Normal	0.3% DNFB	cabbage fermented extract + Barley Sprout	5

[0172] **7-2. 육안 평가**

[0173] 육안 평가는 아토피 피부염에서 일반적으로 사용되는 임상적 평가방법으로써 아토피 피부염 증상의 심각성 정도를 측정하기 위해 5가지 항목을 각각 평가한 점수의 총 합으로 나타내었다. 평가 항목은 홍반(erythema), 가려움과 피부건조(pruritus & dry skin), 부종과 혈종(edema & excoriation), 짓무름(erosion) 그리고 태선화(lichenification)이며 각각의 항목에 대해 증상 없음(0점), 약함(1점), 보통(2점), 심함(3점)으로 채점한 후, 합산하여 최소 0점에서 최고 15점 사이의 점수를 부여하였다.

[0175] **7-3. 귀 두께(ear swelling) 및 비장 수치 측정**

[0176] 귀 두께 측정 후 Balb/c 마우스를 희생시켜 비장을 적출하고 무게를 측정하였다. 비장 수치(spleen index)는 Balb/c mice의 비장 무게(mg)를 체중(g)으로 나누어 산출 하였다.

[0178] **7-4. 접촉성 피부염 모델에서 천연발효물의 효과**

[0179] 실험 종료 후 각 실험군별 시료를 처리한 오른쪽 귀 부위를 관찰하여 아토피 피부염 병변의 형태학적 변화를 확인하였다. 그 결과, DNFB만 처리한 대조군에서는 아무것도 처리하지 않은 왼쪽 귀에 비해 홍반, 피부건조, 짓무름, 부종과 혈종 등의 아토피성 피부 변화가 확인되었다(도 11).

[0180] 또한, 실험 종료 후 각 실험군별 시료를 처리한 오른쪽 귀 부위를 관찰한 결과, 대조군에 비해 시료 투여군에서 모두 귀 두께가 감소하였으며 특히, 양배추발효액 + 아로니아 혼합액 투여군과 양배추발효액 + 새싹보리 혼합액 투여군에서 대조군에 비해 유의적인 차이를 보였다(도 12).

[0181] 또한, 실험 종료 후 각 실험군별 체중별 비장 무게를 측정한 결과, 대조군에 비해 시료 투여군에서 모두 비장 지수가 감소하였으며 특히, 양배추발효액 + 아로니아 혼합액 투여군과 양배추발효액 + 새싹보리 혼합액 투여군에서 대조군에 비해 유의적인 차이를 보였다(도 13).

[0182] 또한, 실험 종료 후 각 실험군별 혈청 내 TNF-α 및 IL-4의 수준을 측정한 결과, 대조군에 비해 시료 투여군에서 모두 TNF-α 및 IL-4의 수준이 감소하였으며 특히, 양배추발효액 + 아로니아 혼합액 투여군과 양배추발효액 + 새싹보리 혼합액 투여군에서 대조군에 비해 유의적인 차이를 보였다(도 14).

[0184] **실시예 8. 산화질소 대사체 함유 천연발효물의 체온 변화에 대한 영향**

[0185] 본 실험에서 사용한 실험동물은 7주령 수컷 Sprague Dawley 랫트 (SD 랫트)을 샘타코에서 구입하여 일주일 간 순화기간을 거친 다음 사용하였다. SD 랫트의 평균 무게는 250~300g으로 실험동물 사육실은 12시간 간격으로 명암을 조절하였고, 온도는 23±2℃, 습도는 50~60%를 유지하였다.

[0187] **8-1. 군 구성 및 체온 변화 측정**

[0188] 체온 변화 측정은 실험 전 각 그룹별 시료 투여 전 마취 후 빛을 차단하고 열화상 카메라를 이용하여 체온 및 열 변화를 측정하며, 각 군별로 시료를 경구로 투여한 후 0, 10, 20, 30분에 각각 체온 변화를 측정한다. 경구 투여의 경우 위산 억제제인 파모티딘(Famotidine) 40 mg을 1 ㎖ 투여하고 30분 후 각각의 시료를 투여하였다.

표 10

[0189] 체온 변화 측정 실험군 구성

Group		material	Dose	n
1	대조군	DW	-	5
2	$NaNO_2$	sodium nitrogen dioxide	235 ppm	5
3	마늘발효액	Garlic fermented extract	235 ppm	5
4	마늘발효액 + 아로니아	Garlic fermented extract + Aronia	235 ppm	5
5	마늘발효액 + 새싹보리	Garlic fermented extract + Barley Sprout	235 ppm	5

[0191] **8-2. 천연발효물 투여에 따른 체온 변화 분석**

[0192] 각 군별로 시료를 경구로 투여한 후 0, 10, 20, 30분에 각각 체온 변화를 측정한 결과, 대조군에 비해 시료 투여군에서 모두 체온이 상승 하였으며 특히, 마늘발효액 + 아로니아 혼합액 투여군과 마늘발효액 + 새싹보리 혼합액 투여군에서 유의적인 차이를 보였다(도 15).

[0194] **실시예 9. 산화질소 대사체 함유 천연발효물의 피부세포 재생 효과**

[0195] 5주령 수컷 Balb/c 마우스를 샘타코에서 구입하여 일주일 간 순화기간을 거친 다음 사용하였다. 실험동물 사육실은 12시간 간격으로 명암을 조절하였고, 온도는 23±2℃, 습도는 50~60%를 유지하였다. 순화 일주일 후 실험동물은 아이소플루레인(isoflurane) 흡입 마취하에 등(back) 부위를 제모한 다음 피혁용 펀치(4 ㎜, KaiMedical, China)를 이용하여 좌우대칭의 원형 결손창을 2개소 만들어 창상을 유발하였다. 실험동물은 6개 군으로 분류되었으며 창상 유발 후 창상 부위에 증류수를 도포한 대조군(WHD), 창상 부위에 1 mM의 아질산나트륨 도포액 처리군(WHN), 창상 부위에 1 mM의 아질산나트륨 및 1 mM의 구연산 도포액 처리군(WHNCA), 창상 부위에 1 mM의 구연산 도포액 처리군(WHCA), 창상 부위에 1 mM의 구연산 및 양배추 발효액 도포액 처리군(WHNP), 창상 부위에 양배추 발효액 도포액 처리군(WHP)으로 분류하였다.

[0196] 창상 유발 후 21일 경과시점까지 창상 유발군에서 무작위 선택한 개체의 창상부위 면적 변화를 관찰한 결과, 창상 염증 부위에는 삼출액 양이 많이 발생하고 상처 부위에 깔짚 등 이물질이 붙었으며, 창상 유발 2주 후 염증 부위에 딱지가 생기기 시작하였으며, 3주 후부터 시료에 따라 재생되는 면적의 차이가 발생하였으며, 대조군에 비하여 시료(양배추 발효액) 도포군 모두 유의적으로 창상 면적이 감소하였다(도 16).

[0198] **실시예 10. 산화질소 대사체 함유 천연발효물의 뇌 혈류 개선 및 수면 효과**

[0199] 본 실험에서 사용한 산화질소 대사체 함유 천연발효물은 (유)휴먼에노스에서 제조한 상추 발효액과 마늘 발효액이다. 상기 발효액은 NO_2^- 농도를 기준으로 산화질소 대사체 함량을 동일하게 맞춘 후 실험에 사용하였다.

[0200] 또한, 실험동물은 7주령 수컷 SD 랫트를 샘타코(Korea)에서 구입하여 일주일 간 순화기간을 거친 다음 사용하였다. SD 랫트의 평균 무게는 195.5±1.51 g으로, 시료를 매일 1회 장내로 직접 투여(직장투여)하였다. 실험동물 사육실은 12시간 간격으로 명암을 조절하였고, 온도는 23±2℃, 습도는 50~60%를 유지하였다.

[0202] **10-1. 실험군 구성**

[0203] 실험동물은 4개 군으로 분류하였으며, 아이소플루레인(isoflurane) 1% 투여군(대조군-1), 아이소플루레인 3% 투여군(대조군-2), 상추발효액 300 ppm 투여군, 마늘발효액 200 ppm 투여군으로 분류하였다(표 11). 군 구성 마리수의 산정은 3R의 원칙에 준하여 통계적 의미를 가리는 최소수를 사용하였다.

표 11

[0204] 뇌 혈류 개선 실험군 구성

Group	Material	Dose	n
대조군-1	isoflurane	1%	5
대조군-2	isoflurane	3%	5
상추발효액	*Lactuca sativa* fermented extract	300 ppm	5
마늘발효액	Garlic fermented extract	200 ppm	5

[0206] **10-2. 대뇌피질 뇌파 검사**

[0207] SD 랫트를 주사마취제(20% Urethane)로 마취한 후 뇌정위기(stereotaxic instrument)에 머리를 고정시키고 두피 피하 결합조직을 절개하여 두개골을 드러낸 후 intan 기록용 회로의 레퍼런스와 연결할 나사 하나를 두개골 앞 부위에 고정하여 그라운드에 연결한 후, EEG (electroencephalogram) 기록용 전극을 두개골을 제거한 뒤 경뇌막에 위치시킨 후 덴탈 시멘트로 고정시킨다(도 17). Intan 기록 회로에 데이터 연결선을 연결한 후 각성상태의 자유롭게 움직이는 SD 랫트에서 EEG 기록 장치 (RHD2000, Intan Technologies)로부터 1KHz의 샘플링 레이트로 측정된 신호 데이터는 60Hz notch 필터로 전원부의 노이즈를 제거하고 내부 소프트웨어 주파수 필터를 이용하여 0.2 ~ 1,000Hz 사이의 신호 데이터를 기록하였다.

[0209] **10-3. 대뇌피질 뇌파 분석 결과**

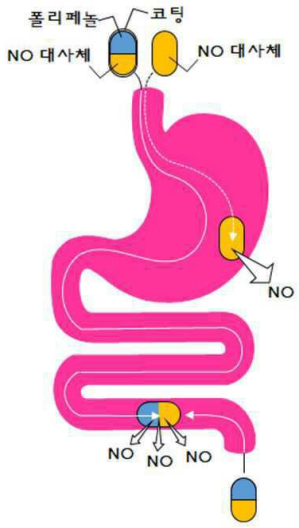
[0210] 아이소플루레인 마취제 농도를 1%으로 투여했을 때 파장 발생하였으며, 3% 농도로 증가하면 파장 발생이 현저하게 관찰되었으며, 200 ppm의 마늘 발효액과 300 ppm의 상추 발효액을 2 ㎖ 용량으로 장내 투여하였을 때 발효액 투여 후 3분 이후부터 파장이 발행하였으며 이러한 파장이 15분 이상 지속되는 것이 관찰되었다(도 18). 3% 아이소플루레인 투여군에서 대뇌피질의 단일 신경세포의 자발 활동성이 유의하게 감소되었음이 확인되었고, 상추 및 마늘 발효액 투여군에서도 파장이 지속되는 동안 신경세포의 자발 활동성의 빈도가 감소한 것이 확인되었다. 상기 결과는 본 발명의 산화질소 대사체 함유 천연발효물이 수면장애 개선 또는 예방에 활용될 수 있음을 시사하였다.

[0212] **10-4. 뇌 혈류 분석 결과**

[0213] 실험동물을 대상으로 200 ppm의 마늘 발효액 2 ㎖을 장내 투여한 후 30분 후에 열화상카메라로 측정한 뇌 혈류 역학 검사에서, 발효액 투여에 따라 뇌 혈류의 면적이 증가된 것이 육안으로 관찰되었다(도 19). 이를 통해, 본 발명의 산화질소 대사체 함유 천연발효물은 뇌졸중과 같은 뇌혈류 흐름 장애 질환의 개선 또는 치료에 사용될 수 있을 것으로 예상되었다.

도면

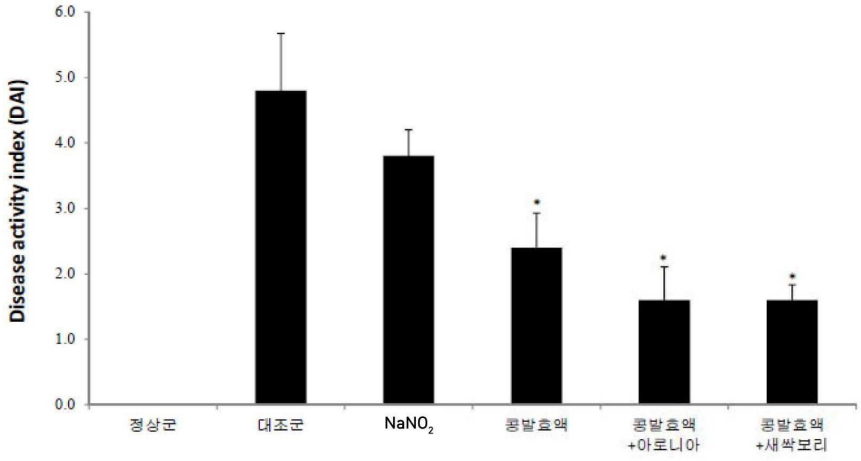
도면1



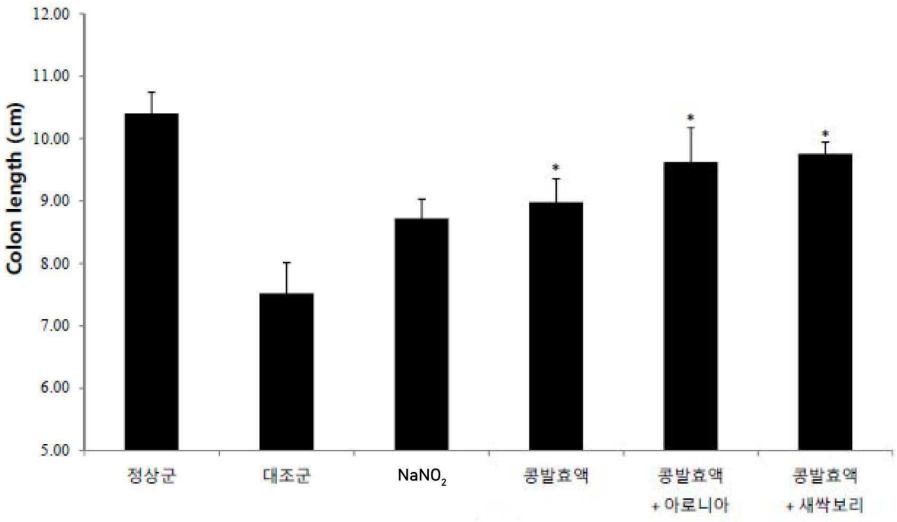
도면2



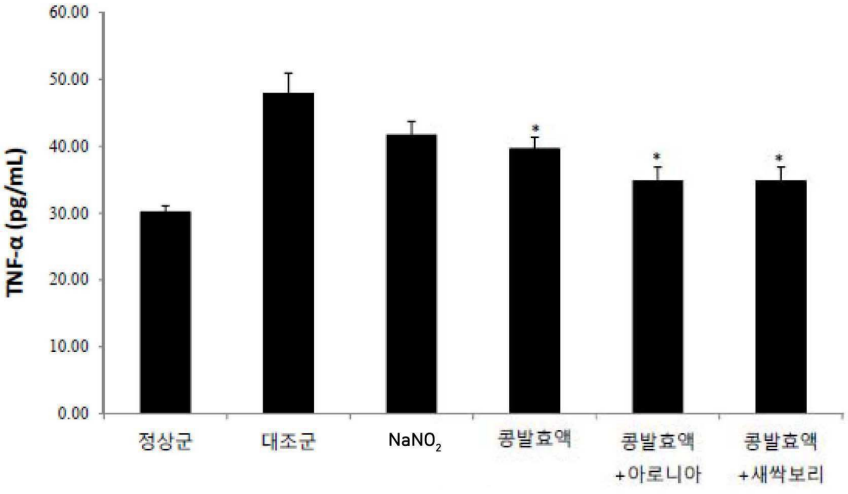
도면3

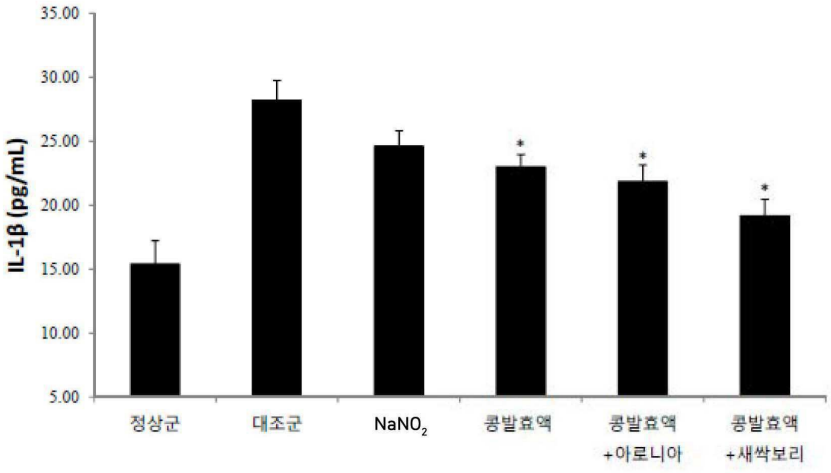


도면4


Colon length (cm)
12.00
11.00
10.00
9.00
8.00
7.00
6.00
5.00
정상군
대조군
NaNO2
콩발효액
콩발효액 + 아로니아
콩발효액 + 새싹보리

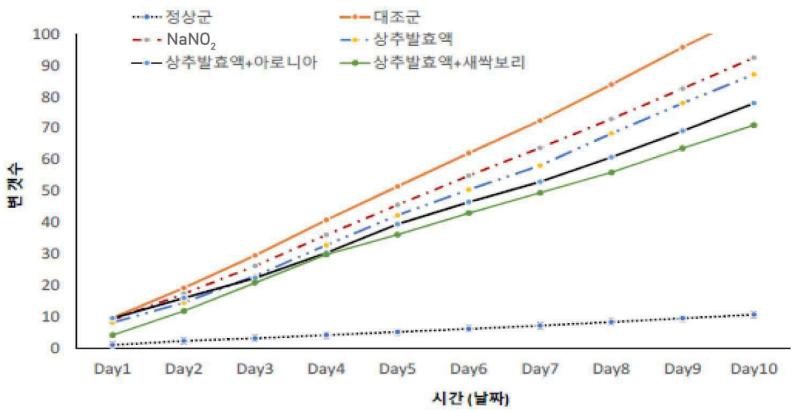
도면5


TNF-α (pg/mL)
60.00
50.00
40.00
30.00
20.00
10.00
0.00
정상군
대조군
NaNO2
콩발효액
콩발효액 +아로니아
콩발효액 +새싹보리

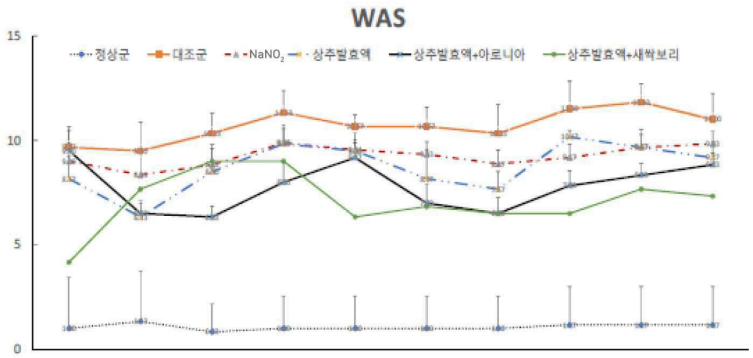

IL-1β (pg/mL)
35.00
30.00
25.00
20.00
15.00
10.00
5.00
정상군
대조군
NaNO2
콩발효액
콩발효액 +아로니아
콩발효액 +새싹보리

도면6

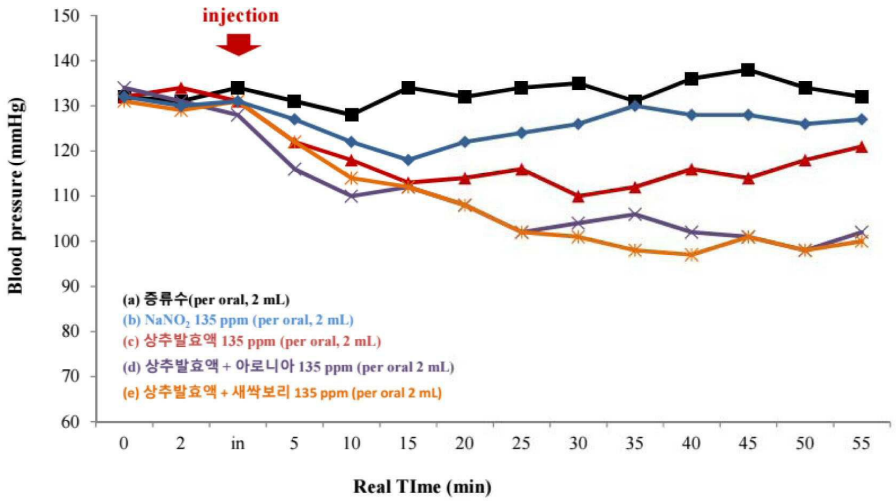
(A)


정상군
대조군
NaNO2
상추발효액
상추발효액+아로니아
상추발효액+새싹보리
변 갯수
시간 (날짜)
Day1
Day2
Day3
Day4
Day5
Day6
Day7
Day8
Day9
Day10

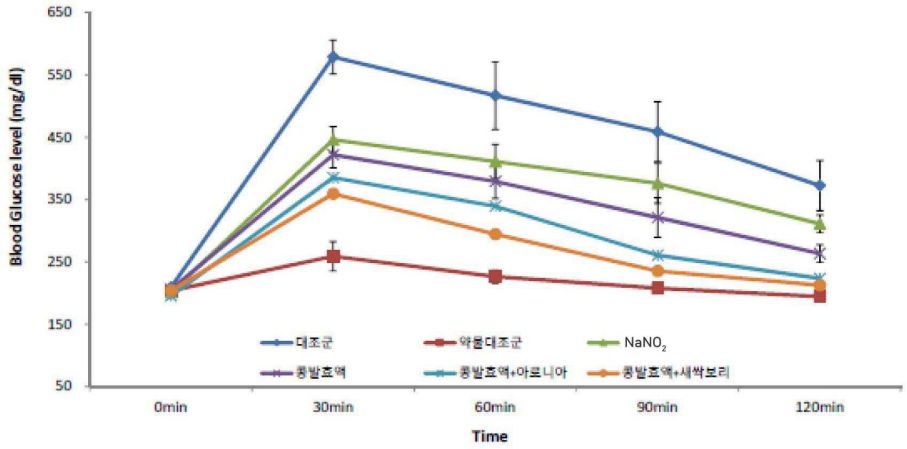
(B)


WAS
정상군
대조군
NaNO2
상추발효액
상추발효액+아로니아
상추발효액+새싹보리

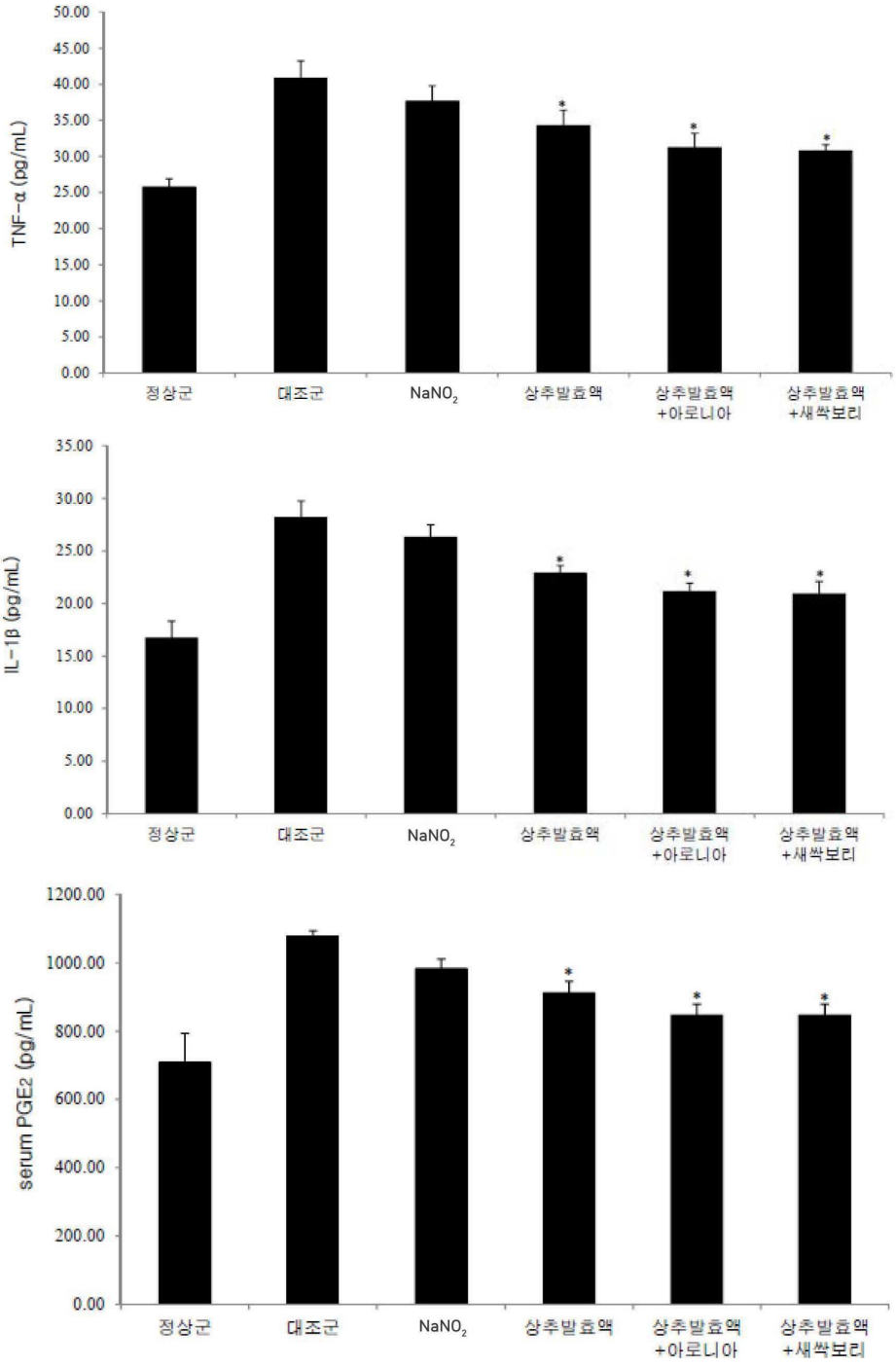
도면7


injection
Blood pressure (mmHg)
Real TIme (min)
(a) 증류수(per oral, 2 mL)
(b) NaNO2 135 ppm (per oral, 2 mL)
(c) 상추발효액 135 ppm (per oral, 2 mL)
(d) 상추발효액 + 아로니아 135 ppm (per oral 2 mL)
(e) 상추발효액 + 새싹보리 135 ppm (per oral 2 mL)

도면8

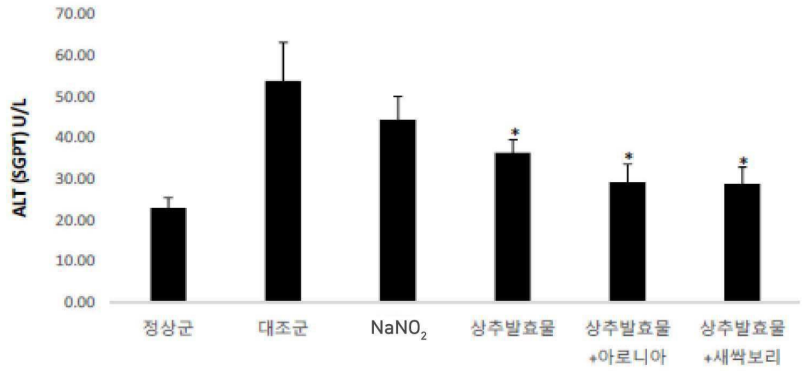

650
550
450
350
250
150
50
Blood Glucose level (mg/dl)
0min
30min
60min
90min
120min
Time
대조군
약물대조군
NaNO2
콩발효액
콩발효액+아르니아
콩발효액+새싹보리

도면9

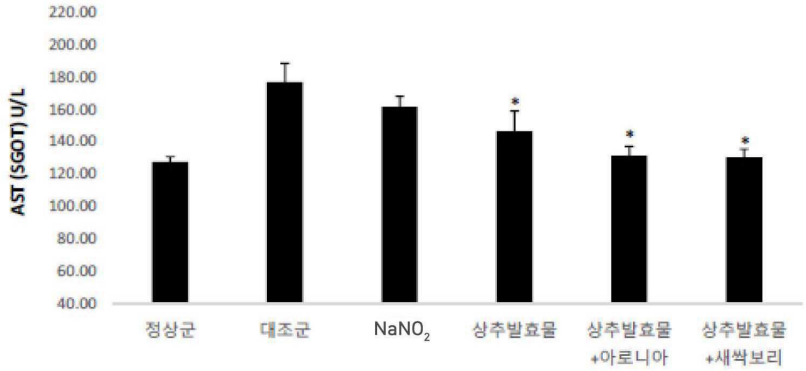

TNF-α (pg/mL)
50.00
45.00
40.00
35.00
30.00
25.00
20.00
15.00
10.00
5.00
0.00
정상군
대조군
NaNO2
상추발효액
상추발효액 +아로니아
상추발효액 +새싹보리
IL-1β (pg/mL)
35.00
30.00
25.00
20.00
15.00
10.00
5.00
0.00
정상군
대조군
NaNO2
상추발효액
상추발효액 +아로니아
상추발효액 +새싹보리
serum PGE2 (pg/mL)
1200.00
1000.00
800.00
600.00
400.00
200.00
0.00
정상군
대조군
NaNO2
상추발효액
상추발효액 +아로니아
상추발효액 +새싹보리

도면10

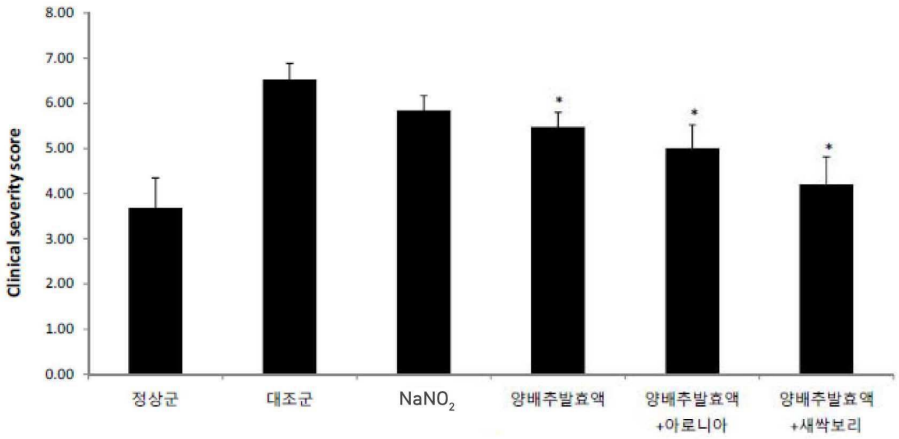
(A) ALT (SGPT)



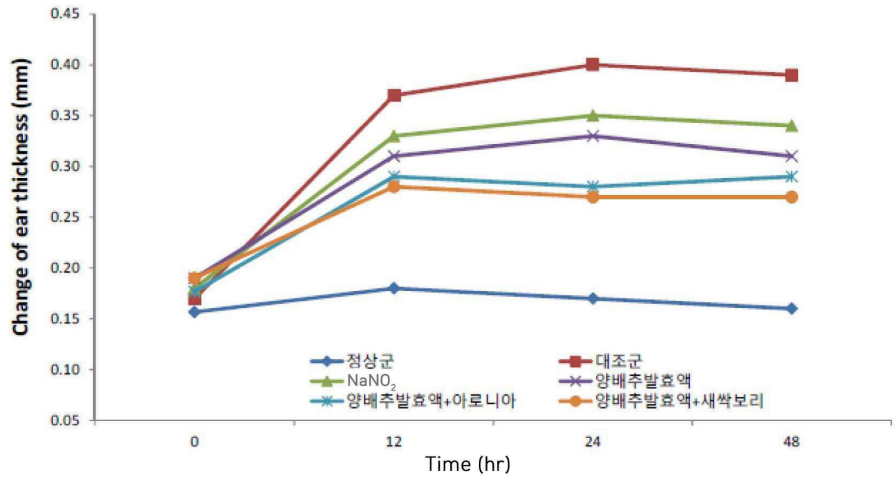
(B) AST (SGOP)



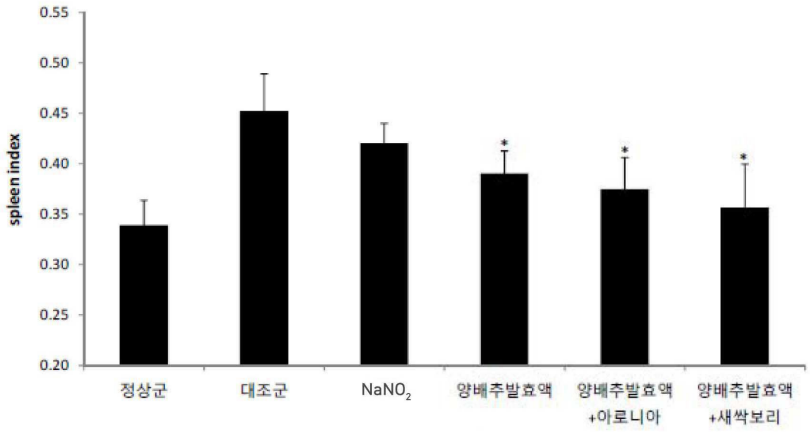
도면11



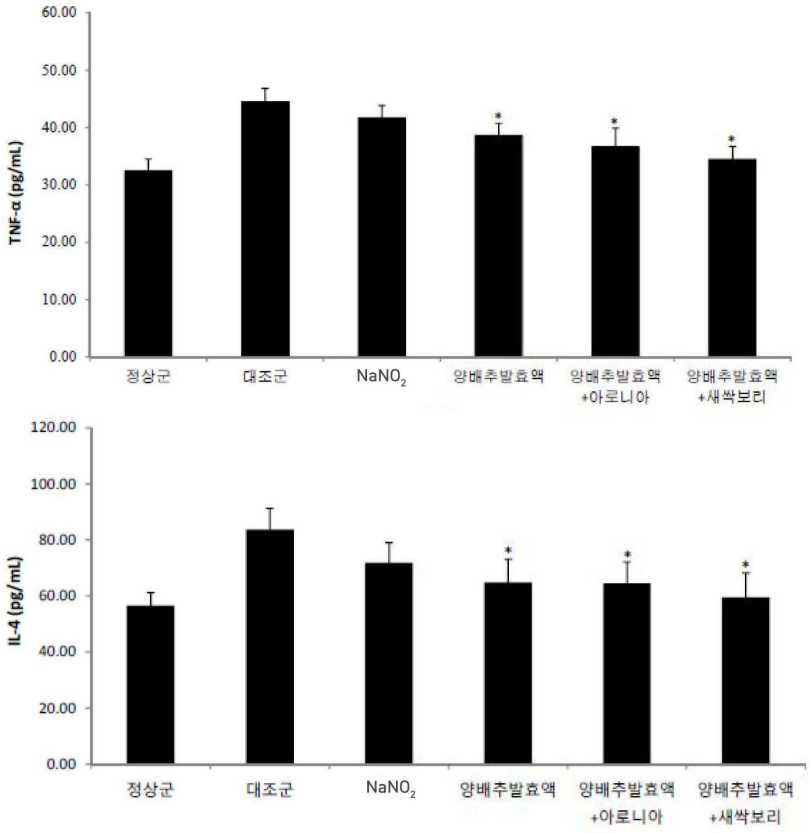
도면12


Change of ear thickness (mm)
0.45
0.40
0.35
0.30
0.25
0.20
0.15
0.10
0.05
0
12
24
48
Time (hr)
정상군
대조군
NaNO2
양배추발효액
양배추발효액+아로니아
양배추발효액+새싹보리

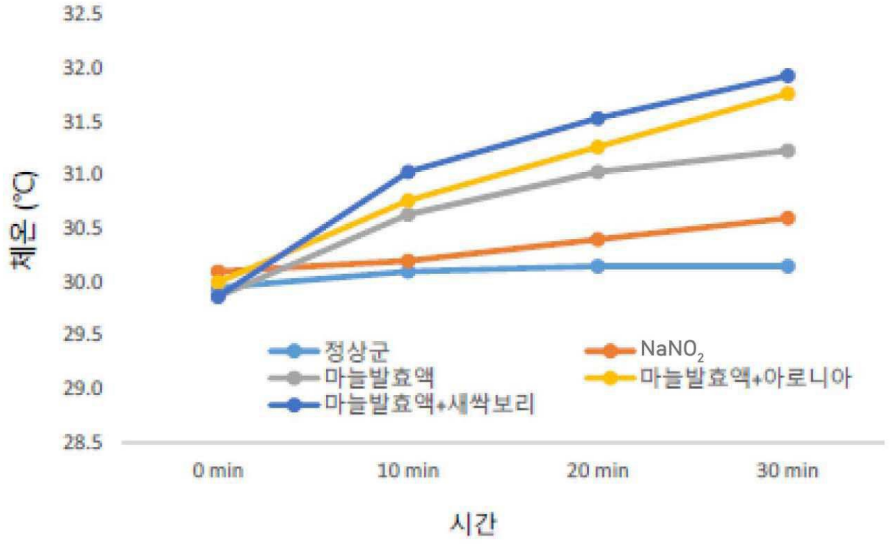
도면13


spleen index
0.55
0.50
0.45
0.40
0.35
0.30
0.25
0.20
*
*
*
정상군
대조군
NaNO2
양배추발효액
양배추발효액 +아로니아
양배추발효액 +새싹보리

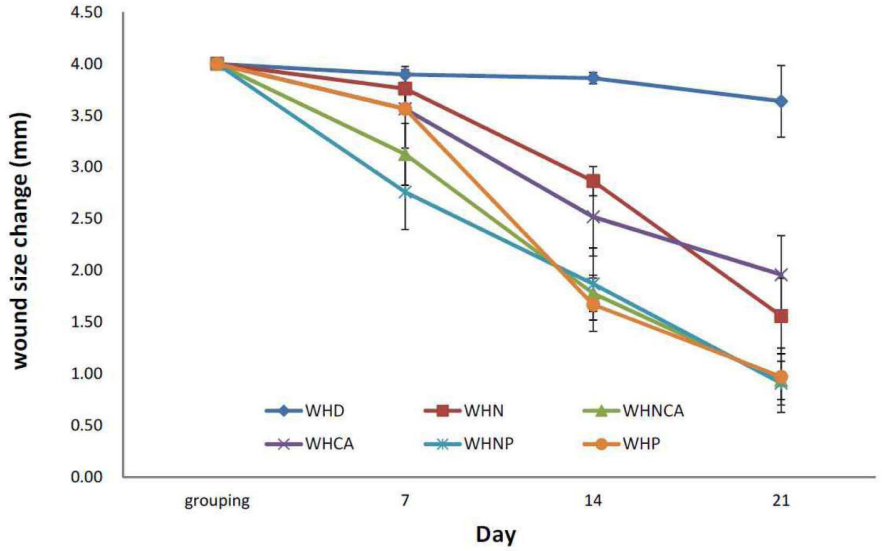
도면14


TNF-α (pg/mL)
60.00
50.00
40.00
30.00
20.00
10.00
0.00
정상군
대조군
NaNO2
양배추발효액
양배추발효액 +아로니아
양배추발효액 +새싹보리
IL-4 (pg/mL)
120.00
100.00
80.00
60.00
40.00
20.00
0.00
정상군
대조군
NaNO2
양배추발효액
양배추발효액 +아로니아
양배추발효액 +새싹보리

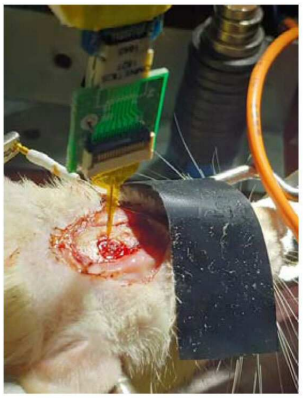
도면15


체온 (℃)
32.5
32.0
31.5
31.0
30.5
30.0
29.5
29.0
28.5
정상군
마늘발효액
마늘발효액+새싹보리
NaNO2
마늘발효액+아로니아
0 min
10 min
20 min
30 min
시간

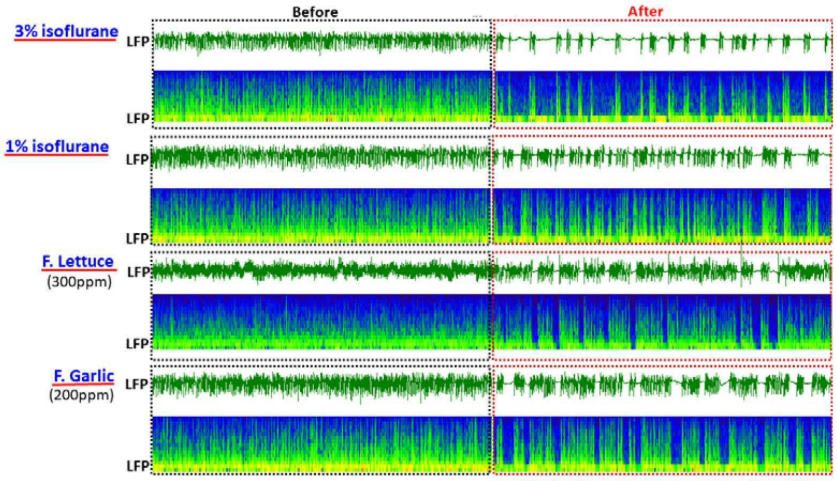
도면16



도면17



도면18



도면19

