(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2023년11월15일
(11) 등록번호 10-2602347
(24) 등록일자 2023년11월10일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 38/06 (2006.01) *A23L 33/17* (2016.01)
A61K 36/06 (2006.01) *A61K 36/28* (2006.01)
A61K 36/8962 (2006.01) *A61P 1/00* (2006.01)
A61P 1/16 (2006.01) *A61P 17/00* (2006.01)
A61P 19/02 (2006.01) *A61P 3/10* (2006.01)
A61P 9/12 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 38/063 (2013.01)
A23L 33/17 (2016.08)
(21) 출원번호 10-2022-0056809
(22) 출원일자 2022년05월09일
심사청구일자 2022년05월09일
(56) 선행기술조사문헌
KR102129038 B1
(뒷면에 계속)

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

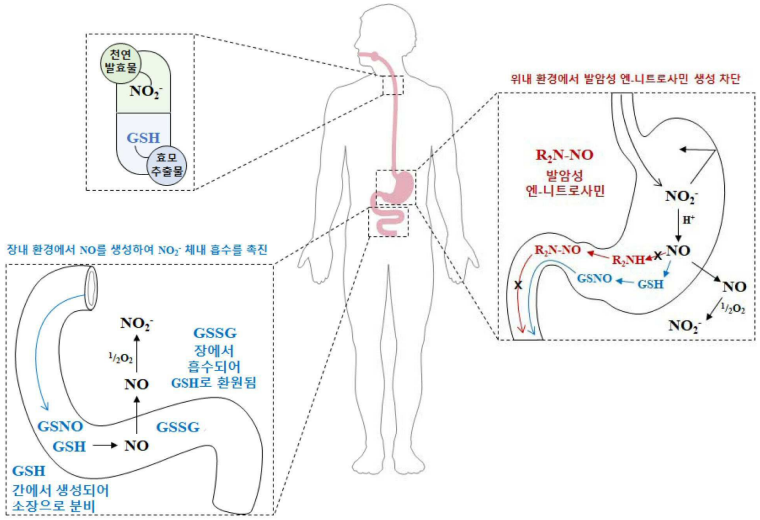
전체 청구항 수 : 총 4 항 심사관 : 이동욱

(54) 발명의 명칭 **위장내 발암성 엔-니트로사민 생성 억제 및 장내 산화질소 생성 촉진용 천연 조성물 및 이의 용도**

(57) 요 약

본 발명은 위장내 발암성 엔-니트로사민 생성 억제 및 장내 산화질소 생성 촉진용 천연 조성물 및 이의 용도에 관한 것으로, 본 발명의 천연 조성물은 아질산나트륨($NaNO_2$) 또는 산화질소 대사체가 고정화 및 안정화된 천연발효물과 글루타치온(glutathione) 함유 효모 추출물을 유효성분으로 포함하며, 위장의 위액(강산 조건)에 의해 에스-니트로소글루타치온을 생성하고, 소장이나 대장으로 전달된 다음 일정시간 동안 일정농도의 산화질소를 생성할 수 있어, 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 36/06 (2013.01)
A61K 36/28 (2013.01)
A61K 36/8962 (2013.01)
A61P 1/00 (2018.01)
A61P 1/16 (2018.01)
A61P 17/00 (2018.01)
A61P 19/02 (2018.01)
A61P 3/10 (2018.01)
A61P 9/12 (2018.01)

(56) 선행기술조사문헌
KR1020110118492 A
KR1020130015134 A
KR1020180012755 A
CHA ET AL., JOURNAL OF LIFE SCIENCE., 18(8), 1053~1058, 2008.08.30
BAE ET AL., KOREAN JOURNAL OF FOOD SCIENCE AND TECHNOLOGY., 42(5), 549~553, 2010.10.31
JP2004123707 A
US6350467 B1
SALAH AHMED SHEWEITA., JOURNAL OF TAIBAH UNIVERSITY MEDICAL SCIENCES., 1(1), 72~81, 2006.12.31

명 세 서

청구범위

청구항 1

아질산나트륨($NaNO_2$) 또는 산화질소 대사체가 고정화 및 안정화된 상추 발효물; 및 글루타치온(glutathione) 함유 효모 추출물;을 유효성분으로 포함하는, 당뇨병, 고혈압, 장염, 스트레스성 장 증후군, 관절염, 급성 간손상 또는 아토피 피부염의 예방 또는 치료용 약학 조성물로서,

상기 산화질소 대사체가 고정화 및 안정화된 상추 발효물은 상추에 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 제조되는 것을 특징으로 하는 약학 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 유효성분은 위장내 발암성 엔-니트로사민 생성을 억제하고 장내 산화질소 생성을 촉진하는 것을 특징으로 하는 약학 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 글루타치온 함유 효모 추출물은 추출물 총중량에 대해 글루타치온 함유량이 7 내지 15 중량%인 것을 특징으로 하는 약학 조성물.

청구항 4

삭제

청구항 5

삭제

청구항 6

삭제

청구항 7

아질산나트륨($NaNO_2$) 또는 산화질소 대사체가 고정화 및 안정화된 상추 발효물; 및 글루타치온(glutathione) 함유 효모 추출물;을 유효성분으로 포함하는, 당뇨병, 고혈압, 장염, 스트레스성 장 증후군, 관절염, 급성 간손상 또는 아토피 피부염의 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물로서,

상기 산화질소 대사체가 고정화 및 안정화된 상추 발효물은 상추에 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 제조되는 것을 특징으로 하는 건강기능식품 조성물.

청구항 8

삭제

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 위장내 발암성 엔-니트로사민 생성 억제 및 장내 산화질소 생성 촉진용 천연 조성물 및 이의 용도에 관한 것으로, 보다 상세하게는 위장과 같은 강산성 조건에서 발암성 엔-니트로사민 생성을 차단하고, 장내 환경에서는 일정량의 산화질소를 생성하여 체내 산화질소 대사체 흡수가 가능한 천연 조성물에 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(L-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 상태[예: 정맥 혈액 조건]에서 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).

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

$$NO_2^- + H^+ \rightleftharpoons HNO_2 \qquad \text{반응식 2-2)}$$

$$2HNO_2 + Asc \longrightarrow 2NO + dehydroAsc + H_2O \qquad \text{반응식 2-3)}$$

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

[0005] 주3) 비타민 C는 혈액 또는 체액에서 ascorbate로 존재함

[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 소변 또는 땀을 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] 반응식 1-1) 또는 2-1)에서 생성된 NO는 표적 세포의 세포질에 도달하여 세포질 내에 풍부하게 존재하는 글루타치온(glutathione, 이하 GSH로 표기)과 화학적으로 결합하여 에스-니트로소글루타치온(*S*-nitrosoglutathione, 이하 GSNO로 표기)을 생성한 다음 일정 시간동안 GSNO 형태로 세포 내부에 NO를 보관한다(반응식 3-1) 참조). 세포는 NO가 필요할 경우 보관된 GSNO와 GSH를 결합시켜 NO와 글루타치온 이황화물(glutathione disulfide, 이하 GSSG로 표기함)을 생성한다(반응식 3-2) 참조). 한편 세포내부에 GSNO가 과량으로 존재할 경우, GSNO 환원효소(GSNO reductase, 이하 GSNOR로 표기)에 의해 과량의 GSNO는 GSH와 NH_3로 환원됨으로서 잠재적 NO의 독성이 감소한다.

$$NO + GSH \xrightarrow{-H^+} GSNO \quad \text{반응식 3-1)}$$

$$GSNO + GSH \xrightarrow{-H^+} GSSG + NO \quad \text{반응식 3-2)}$$

$$GSNO \xrightarrow{GSNOR} GSH + NH_3 \quad \text{반응식 3-3)}$$

주1) GSH; glutathione, GSNO; *S*-nitrosoglutathione, GSNOR; GSNO reductase

주2) 반응식 3-1)과 3-2)은 세포내부 및 세포외부에서 각각의 농도에 의존하여 자발적으로 발생함

주3) 반응식 3-3)은 세포내부에서 GSNO의 농도에 의존하여 자발적으로 발생함

[0008]

[0009] 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(Kina-Tanada *et al.*, Diabetologia. 2017, 60(6): 1138-1151).

[0010] 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 4 참조).

$$NO_2^- + H^+ \rightleftharpoons HNO_2 \quad \text{반응식 4-1)}$$

$$2HNO_2 \longrightarrow N_2O_3 \quad \text{반응식 4-2)}$$

$$N_2O_3 \longrightarrow NO + NO_2 \quad \text{반응식 4-3)}$$

주1) 반응식 4-1)에서 역반응이 잘 일어나지 않는 이유는 강산 조건이기 때문임

주2) 반응식 4-2)에서 정반응이 잘 일어나는 이유는 N_2O_3가 소수성이기 때문임

주3) 반응식 4-3)에서 N_2O_3는 불안정한 반응중간체로 자발적으로 분해되어 NO를 생성함

[0011]

[0012] 한편, 섭취한 NO_3^- (또 다른 NO 대사체)는 NO_2^-와 다르게 소장과 대장에서 공생하는 박테리아의 NO_3^- 환원효소(nitrate reductase, 이하 NaRase로 표기)에 의해 NO_2^-로 환원된 다음 박테리아의 외막과 세포막 사이의 주변세포질(periplasm)에 존재하는 NO_2^- 환원효소(nitrite reductase, 이하 NiRase로 표기)에 의해 NO로 환원되고, 환원된 일부 NO가 체내로 흡수되고, 일부 NO는 여러 단계의 환원과정을 거쳐 N_2로 전환되어 장내에서 제거된다(반응식 5 참조). 따라서 NO_3^-를 이용하여 충분한 량의 NO를 생성하기 위해서는 다량의 NO_3^- 섭취가 필요하다.

$$NO_3^- \xrightarrow{NaRase} NO_2^- \quad \text{반응식 5-1)}$$

$$NO_2^- \xrightarrow{NiRase} NO \quad \text{반응식 5-2)}$$

$$NO \xrightarrow{NoRase} N_2O \quad \text{반응식 5-3)}$$

$$N_2O \xrightarrow{NioRase} N_2 \quad \text{반응식 5-4)}$$

주1) NaRase, nitrate reductase; NiRase, nitrite reductase; NoRase, nitric oxide reductase; NioRase, nitrous oxide reductase

주2) 반응식 5-2)에 의해 생성된 NO의 일부가 체내로 흡수됨

주3) 반응식 5-3)과 5-4)에 의해 NO의 일부가 체내로 흡수되지 못함

주4) 반응식 5-1)에서 5-4)까지는 탈질소화(denitrification) 반응으로 알려짐

[0013]

[0014] 낮은 혈중 NO (또는 NO_2^-) 농도를 높이기 위해, 구강으로 NO 대사체를 섭취할 경우 다음과 같은 건강에 해로운 3가지 문제가 발생할 수 있다.

[0015] 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.

[0016] 둘째, 위액의 강산 조건 때문에 구강으로 섭취된 NO_2^-는 이차아민(secondary amine, 이하 R_2N-H로 표기)과 반응하여 발암물질로 알려진 엔-니트로사민(*N*-nitrosamine, 이하 R_2N-NO로 표기)을 생성할 수 있다(반응식 6 참조).

[0017] 셋째, 구강으로 섭취된 NO_3^-는 위장에서 환원되지 못하고 소장 및 대장에서 NO로 환원되어 체내로 흡수되지만, NO 환원 정도가 개인의 장내 박테리아 환경과 식습관에 따라 다르고, 또한 NO_2^- 량보다 많은 량의 NO_3^-를 섭취해야한다. 따라서 NO_3^- 섭취로는 일정량의 유효한 NO 체내 흡수를 기대할 수 없다(반응식 5 참조).

$$NO_2^- + H^+ \rightleftharpoons HNO_2 \qquad \text{반응식 6-1)}$$

$$HNO_2 + R_2N\text{-}H \longrightarrow R_2N\text{-}NO + H_2O \qquad \text{반응식 6-2)}$$

주1) 반응식 6-1)에서 역반응이 잘 일어나지 않는 이유는 위액의 강산 조건이기 때문임
주2) 반응식 6-2)에서 piperidine, pyrrolidine 등과 같은 2차 아민은 어류, 육류, 치즈, 향신료 등에서 발견되고, dimethylamine, diethylamine 등과 같은 2차 아민은 곡류, 차 등에서 발견됨

[0018]

[0019] 강산성 조건인 위장에서 NO_2^-에 의한 잠재적 발암물질 엔-니트로사민(R_2N-NO) 생성을 억제시키려는 여러 가지 연구가 수행되었다. 많은 연구들 중에서 특히 한 연구(Shenoy et al., Cancer Lett. 1992; 65(3): 227-232)에서 식재료에 포함되어 있는 폴리페놀(polyphenol, 이하 PhOH로 표기)과 시스테인(cysteine, 이하 Cys로 표기) 및 시스테인을 포함한 글루타치온(GSH)이 이차아민(R_2N)보다 우세하게 NO_2^-와 결합하여 R_2N-NO 생성을 차단할 수 있음이 밝혀졌다(반응식 7-2) 및 반응식 7-3) 참조).

$$NO_2^- + R_2NH + H^+ \longrightarrow R_2N\text{-}NO + H_2O \qquad \text{반응식 7-1)}$$

$$NO_2^- + R_2NH + PhOH + H^+ \longrightarrow PhO\text{-}NO + R_2NH + H_2O \qquad \text{반응식 7-2)}$$

$$NO_2^- + R_2NH + GSH + H^+ \longrightarrow GSNO + R_2NH + H_2O \qquad \text{반응식 7-3)}$$

주1) 상기 기술된 모든 반응식은 위장과 같은 강산 조건에서만 관찰됨
주2) 반응식 7-2)에서 PhOH가 R_2NH보다 NO_2^-에 대해 반응성 우세하여 PhO-N=O가 주로 생성됨
주3) 반응식 7-3)에서 GSH가 R_2NH보다 NO_2^-에 대해 반응성 우세하여 GSNO가 주로 생성됨
주4) 상기 기술된 반응으로 인해 NO_2^-에 의한 NO가 생성될 수 없음

[0020]

[0021] 반응식 7-2)와 반응식 7-3)은 엔-니트로사민 생성을 차단한다는 점에서 좋은 면이 있을 수 있으나, 섭취한 NO_2^-로부터 NO 생성이 억제되어, 결국 NO 체내 흡수가 잘 되지 않는다는 점에서 좋지 않은 면이 있을 수 있다. 그러나 반응식 7-2)에서 볼 수 있는 PhO-NO 또는 반응식 7-3)에서 볼 수 있는 GSNO가 소장 및 대장과 같은 장내 환경에서 NO를 생성한다면, 체내 NO 흡수가 가능하다. 위장에서 생성되어 장에 도달한 GSNO의 경우, 소장에 풍부하게 존재하는 GSH와 반응하여 NO를 생성할 수 있다(반응식 8) 참조). 반응식 7-3)과 반응식 8-1)을 살펴보면, NO_2^- 섭취할 때 GSH를 함께 섭취할 경우 위장에서는 엔-니트로사민 생성이 차단되고 장에서는 NO가 생성되어, 결국 체내 NO 흡수가 잘 일어날 수 있다.

$$\text{소장: GSNO + GSH} \xrightarrow{-H^+} \text{GSSG + NO(체내로 흡수됨)} \quad \text{반응식 8-1)}$$

$$\text{소장: GSNO + GSNO} \longrightarrow \text{GSSG + 2NO(체내로 흡수됨)} \quad \text{반응식 8-2)}$$

$$\text{체내 : 2NO + O}_2 \longrightarrow 2NO_2^- \quad \text{반응식 8-3)}$$

주1) 반응식 8-1)에서 GSH는 간에서 생성되어 담즙관을 통해 소장으로 분비된 것임
주2) 반응식 8-2)은 GSNO 농도가 높을 경우 발생할 수 있는 자발적 반응으로 추정됨
주3) NO가 소수성이기 때문에 체내 흡수가 일어나고, 반응성이 크고 존재 시간이 짧기 때문에 산소와 반응하여 NO_2^-로 산화됨
주4) 산화된 NO_2^-는 친수성이기 때문에 혈액을 통해 몸의 여러 곳으로 이동할 수 있음

[0022]

[0023] 우리 몸에서 NO 대사체는 산소가 부족한 조건 또는 산성인 조건에서 NO로 환원되어 혈관을 확장시키거나 모세혈관 생성을 촉진하여 혈액 순환(blood circulation)을 조절한다(Lundberg et al., Nat Rev Drug Discov. 2008, 7:156-167). 혈액 순환의 중요한 4대 생리적 기능은 ① 산소 및 영양물질 공급, ② 이산화탄소 및 노폐물 배설, ③ 체온 유지, ④ 면역기능 수행으로 볼 수 있다. 따라서 NO는 영양물질의 흡수 기능에 영향을 미치고, 노폐물 배설 기능에 영향을 주고, 체온 및 면역기능을 조절한다고 볼 수 있다. 예를 들어, NO는 혈관을 확장하여 혈액 흐름을 조절함으로써 높은 혈압을 정상 혈압으로 되돌릴 수 있다(Amaral et al., Redox Biol. 2015, 5:340-346). 그러므로 NO로 전환할 수 있는 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 여러 질병에 대한 치료의 목적으로, NO 대사체를 구강으로 섭취할 경우 위에서 언급한 것과 같은 건강에 해로운 3가지 문제가 있을 수 있다.

[0024] 한편, 한국등록특허 제2256793호에는 '고정된 산화질소 전구물질을 함유한 천연발효 조성물의 제조방법 및 이 방법으로 제조된 천연발효 조성물'이 개시되어 있고, 한국공개특허 제2019-0084592호에는 '천연 발효물질 내에 산화질소를 고정화하는 천연 발효 조성물의 제조 방법 및 이 방법으로 제조된 천연 발효 조성물'이 개시되어 있으나, 본 발명의 '위장내 발암성 엔-니트로사민 생성 억제 및 장내 산화질소 생성 촉진용 천연 조성물 및 이의 용도'에 대해서는 기재된 바가 없다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0025] 본 발명은 상기와 같은 요구에 의해 도출된 것으로서, 본 발명자들은 아질산나트륨과 글루타치온(glutathione) 함유 효모 추출물의 혼합물; 또는 산화질소 대사체가 고정화 및 안정화된 천연발효물과 글루타치온 함유 효모 추출물의 혼합물을 당뇨, 혈압, 장염, 스트레스성 장 증후군, 관절염, 간질환 및 아토피 피부염 실험동물 모델에 구강투여한 결과, 아질산나트륨 단독 또는 천연발효물 단독 실험군 대비 글루타치온 함유 효모 추출물의 혼합물에서 혈당, 혈압, 장염, 스트레스성 장 증후군, 관절염, 간질환 및 아토피 피부염의 개선 효과가 우수한 것을 확인함으로써, 본 발명을 완성하였다.

과제의 해결 수단

[0026] 상기 과제를 해결하기 위해, 본 발명은 아질산나트륨($NaNO_2$) 또는 산화질소 대사체가 고정화 및 안정화된 천연발효물; 및 글루타치온(glutathione);을 유효성분으로 포함하며, 위장내 발암성 엔-니트로사민 생성을 억제하고 장내 산화질소 생성을 촉진하는 조성물을 제공한다.

[0027] 또한, 본 발명은 상기 조성물을 유효성분으로 포함하는 약학 조성물을 제공한다.

[0028] 또한, 본 발명은 상기 조성물을 유효성분으로 포함하는 건강기능식품 조성물을 제공한다.

발명의 효과

[0029] 본 발명의 조성물은 산화질소 대사체와 글루타치온이 혼합되어 위장의 위액(강산 조건)에서 발암성 엔-니트로사민 생성을 차단하고, 소장이나 대장에서는 일정량의 산화질소를 생성하여 체내 산화질소 대사체 흡수가 가능하

도록 개발된 것으로, 산화질소에 의해 개선 가능한 질병으로 알려진 고혈압, 당뇨, 장염, 관절염, 간질환, 아토피 등의 치료 및 증상 개선 등 관련분야에서 널리 적용될 수 있을 것으로 기대된다.

도면의 간단한 설명

[0030] 도 1은 위장내 환경에서 산화질소 대사체(NO_2^-)와 글루타치온(GSH)이 위산에 의해 에스-니트로소글루타치온(GSNO)을 생성하여 발암성 물질 생성을 차단하고, 장내 환경에서는 산화질소(NO)를 생성하여 산화질소 대사체가 체내로 흡수되는 과정을 기술한 그림이다.

도 2은 산화질소 대사체(NO_2^-) 함유 천연발효물과 글루타치온(GSH) 함유 효모 추출물이 강산 조건에서 에스-니트로소글루타치온(GSNO)이 생성되는 것을 보이는 흡수 스펙트럼이다.

도 3은 당뇨 실험동물 모델이 산화질소 대사체(NO_2^-) 함유 천연발효물과 글루타치온(GSH) 함유 효모 추출물을 혼합한 시료를 섭취할 경우 체내 혈중 산화질소 대사체 총량(NO_x)이 증가하는 것을 보여주는 결과이다.

도 4는 당뇨 실험동물 모델에 산화질소 대사체(NO_2^-) 함유 천연발효물과 글루타치온(GSH) 함유 효모 추출물을 혼합한 시료를 4주간 처리할 경우 공복혈당이 감소하는 항당뇨 효과를 보여주는 결과이다.

도 5는 궤양성 대장염 모델에서 시료 투여에 따른 질병활성화정도를 분석한 그래프이다. *: $p<0.05$ (대조군 대비), #: $p<0.05$ (상추발효액과 상추발효액+GSH 실험군).

도 6은 궤양성 대장염 모델에서 시료 투여에 따른 장 길이 변화를 분석한 그래프이다. *: $p<0.05$ (대조군 대비), #: $p<0.05$.

도 7은 궤양성 대장염 모델에서 시료 투여에 따른 혈청 내 TNF-α 수준을 분석한 그래프이다. *: $p<0.05$ (대조군 대비), #: $p<0.05$.

도 8은 궤양성 대장염 모델에서 시료 투여에 따른 혈청 내 IL-1β 수준을 분석한 그래프이다. *: $p<0.05$ (대조군 대비), #: $p<0.05$.

도 9는 스트레스성 장 증후군 개선 효과를 확인하기 위한 실험의 모식도이다. WAS는 water avoidance stress를 의미하며, 처리된 시료(sample)는 표 3과 같다.

도 10은 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 11은 고혈압 모델에서 시료 투여 전과 투여 후의 혈압 변화를 측정한 결과이다.

도 12는 MIA (monosodium iodoacetate)를 이용한 관절염 유발 모델에서 시료 투여 후 관절 부종 두께 변화를 측정한 결과이다. *: $p<0.05$ (대조군 대비).

도 13은 MIA를 이용한 관절염 유발 모델에서 관절염 지수를 평가한 결과이다. *: $p<0.05$ (대조군 대비).

도 14는 급성 간 손상 모델에서 시료를 투여한 후 혈청 내 ALT 및 AST 수준을 측정한 결과이다. *: $p<0.05$ (대조군 대비).

도 15는 아토피 피부염 모델에서 시료를 투여한 후 오른쪽 귀 부위를 관찰하여 병변의 형태학적 변화를 분석한 결과이다. *: $p<0.05$ (대조군 대비).

도 16은 아토피 피부염 모델에서 시료를 투여한 후 오른쪽 귀 부위의 두께 변화를 측정한 결과이다.

도 17은 아토피 피부염 모델에서 시료를 투여한 후 각 실험군별로 실험 종료 시점의 비장 지수를 나타낸 결과이다. *: $p<0.05$ (대조군 대비).

도 18은 아토피 피부염 모델에서 시료를 투여한 후 각 실험군별로 실험 종료 시점의 혈청 내 TNF-α의 수준을 측정한 결과이다. *: $p<0.05$ (대조군 대비).

도 19는 아토피 피부염 모델에서 시료를 투여한 후 각 실험군별로 실험 종료 시점의 혈청 내 IL-4의 수준을 측정한 결과이다. *: $p<0.05$ (대조군 대비).

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0031] 본 발명의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 아질산나트륨($NaNO_2$) 또는 산화질소 대사체가 고정화 및 안정화된 천연발효물; 및 글루타치온(glutathione);을 유효성분으로 포함하며, 위장내 발암성 엔-니트로사민 생성을 억제하고 장내 산화질소 생성을 촉진하는 조성물을 제공한다.

[0032] 본 발명에 따른 위장내 발암성 엔-니트로사민 생성을 억제하고 장내 산화질소 생성을 촉진하는 조성물에 있어서, 상기 글루타치온은 순수한 글루타치온 또는 글루타치온을 함유하는 추출물일 수 있으며, 바람직하게는 글루타치온 함유 효모 추출물일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0033] 또한, 본 발명에서 상기 글루타치온 함유 효모 추출물은 추출물 총중량에 대해 글루타치온 함유량이 7 내지 15 중량%인 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 글루타치온 함유 효모 추출물에는 글루타치온뿐만 아니라 여러 종류의 건강에 유익한 성분들이 함께 들어있다.

[0034] 본 명세서에서 용어 "글루타치온(GSH)"은 글루탐산, 시스테인, 글리신의 세 가지 아미노산으로 구성된 작은 크기의 펩타이드(peptide)이며 식물, 동물, 균류 및 일부 세균과 고균에서 생성되는 내재성 환원물질이다. 체내 또는 세포내에서 글루타티온은 자유 라디칼, 과산화물, 독성물질, 중금속 등과 결합하여 세포 손상을 방지한다. 또한, GSH는 산화질소(NO)와 반응하여 에스-니트로소글루타티온(GSNO)을 생성할 수 있다. 이런 과정으로 생성된 GSNO는 체내에서 혈관을 통해 필요한 곳에 NO를 전달하고, 세포내에서는 NO를 일정 시간 저장하여 필요시에는 NO로 분해되어 NO의 약리 작용을 나타낸다.

[0035] 본 발명에서 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, 상세한 제조방법은 한국등록특허 제2129038호를 참고할 수 있다.

[0036] 본 발명에 따른 위장내 발암성 엔-니트로사민 생성을 억제하고 장내 산화질소 생성을 촉진하는 조성물은 산화질소 대사체가 고정화 및 안정화된 천연발효물과 글루타치온 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.

[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, 뽕잎, 여주, 복분자, 어성초, 아로니아, 율초, 황련, 톳, 삼채, 버섯류, 창포, 섬초, 배추, 다시마, 연어이리, 전복껍질(석결명), 갑각류 껍질, 귀뚜라미, 사과, 쑥, 귤, 누에, 명목지황 및 십전대보탕으로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상일 수 있다.

[0044] 인체의 산화질소 농도는 아질산 이온(NO_2^-)과 질산 이온(NO_3^-)의 합산에 의한 총량으로 예측할 수 있으나, 실제 활용 가능한 산화질소 농도는 산화질소(NO)로 전환될 수 있는 NO_2^- 농도에 의해 혈중 NO 농도를 예측할 수 있다. 산화질소 대사체로서 NO_2^-는 친수성이며 비교적 안정한 이온 물질이며, 혈액 및 체액에 용해되어 신체 모든 곳으로 이동할 수 있으나, 장기장벽, 혈관장벽, 세포막 등을 통과할 수 없다. 그러나 NO_2^-가 아질산 환원효소 또는 산성 조건에 의해 지용성 NO로 환원될 경우 장기장벽, 혈관장벽, 세포막 등을 통과할 수 있다. 따라서 NO_2^-가 표적 세포에 도달하여 특정 약리 효과를 나타내거나 위장 또는 장에서 체내로 흡수되기 위해서는 반드시 NO로 환원되어져야한다.

[0045] 낮은 혈중 산화질소 대사체의 농도를 높이기 위해 또는 산화질소의 약리 효과를 얻기 위해, 구강으로 산화질소 대사체(특히 NO_2^-)를 섭취할 경우 다음과 같은 건강에 해로운 2가지 문제가 발생할 수 있다. 첫째, 구강으로 섭취한 NO_2^-는 위액의 강산 조건 때문에 짧은 시간에 과량의 NO가 체내에 흡수되어, 급격한 혈압 감소, 저혈당증, 청색증 등이 나타날 수 있다. 둘째, 위액의 강산 조건 때문에 구강으로 섭취된 NO_2^-는 이차 아민과 반응하여 발암성 엔-니트로사민을 생성할 수 있다.

[0046] 본 발명에 따른 조성물은 천연발효물 내에 포함되어 있는 산화질소 대사체(NO_2^-)와 효모추출물에 포함된 글루타치온(GSH)이 위장의 강산 조건에서 화학 반응하여 에스-니트로소글루타치온(GSNO)을 형성함으로서 엔-니트로사민(R_2N-NO) 생성을 차단하고 장내 환경에서 일정량의 산화질소(NO)를 생성함으로서 산화질소 대사체 체내 흡수가 가능한 조성물로 개발된 것이다.

[0047] 또한, 본 발명에 따른 조성물에 있어서, 상기 산화질소 대사체가 고정화 및 안정화된 천연발효물은 바람직하게는 NO_2^-를 기준으로 0.1 내지 10 mM을 함유하는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0048] 본 명세서에서 용어 "산화질소 대사체"란 아질산염(NO_2^-), R-NO_2^-, R-NO, RO-NO, 질산염(NO_3^-), R-NO_3^-, GS-NO(또는 GSNO), GS-NO_2 등을 총칭하는 말로, 여기에서 R-은 폴리페놀류(polyphenol), 지방산(fatty acid) 등의 탄소사슬(carbon chain)에서 H 원자가 하나가 제거된 것을 의미하고, RO-는 ROH에서 H 원자가 하나가 제거된 것을 의미하며, GS-의 경우 글루타치온(GSH)의 시스테인 잔기에서 H 원자가 하나가 제거된 것을 의미한다. 즉, 산화질소 또는 아질산 이온이 결합할 수 있는 기능기를 의미한다. 산화질소 대사체는 산성 및 환원조건에서 산화질소로 전환된다. 위장과 같은 강산성 조건에서 수소이온(H^+)에 의해 산화질소 대사체가 환원되어 산화질소가 발생되고, 장(소장, 대장)과 같은 약산성 조건에서는 폴리페놀류, 글루타치온, 비타민 C, 박테리아 산화질소 환원효소와 같은 환원 물질들에 의해 산화질소 대사체가 산화질소로 환원될 수 있다.

[0049] 특히, 산화질소 대사체 또는 산화질소 결합체로 알려진 GSNO는 담관(bile duct)을 통해 간에서 분비된 글루타치온(GSH) 또는 장내 박테리아에 의해 분비된 GSH과 반응하여 산화질소를 안전하게 생성할 수 있다(반응식 8-1) 참조). 이와 같이 장내 환경에서 생성된 산화질소(NO)는 장내 환경에서 체내로 침투하여 산화질소 대사체(NO_2^-)로 산화됨으로서 체액 또는 혈관에 도달하게 된다(반응식 8-3) 참조). 상기 과정을 그림으로 요약하면 도 1과

같다.

[0050] 본 발명은 또한, 본 발명의 위장내 발암성 엔-니트로사민 생성을 억제하고 장내 산화질소 생성을 촉진하는 조성물을 유효성분으로 함유하는 약학 조성물을 제공한다.

[0051] 본 발명에 따른 약학 조성물에 있어서, 상기 위장내 발암성 엔-니트로사민 생성을 억제하고 장내 산화질소 생성을 촉진하는 조성물은 아질산나트륨($NaNO_2$) 또는 산화질소 대사체가 고정화 및 안정화된 천연발효물; 및 글루타치온(glutathione);을 유효성분으로 포함하는 조성물로서, 상세 내용은 전술한 것과 같다.

[0052] 본 발명의 상기 약학 조성물은 당뇨병, 고혈압, 장염, 스트레스성 장 증후군, 관절염, 간질환 또는 아토피 피부염의 예방 또는 치료용일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0053] 본 발명의 약학 조성물은 약학적 조성물의 제조에 통상적으로 사용하는 적절한 담체, 부형제 또는 희석제를 더 포함할 수 있다.

[0054] 또한, 본 발명의 약학 조성물은 통상의 방법에 따라 과립제, 정제, 캡슐제 등의 경구형 제제 형태로 제형화하여 사용될 수 있으나, 이로 한정되는 것은 아니다.

[0055] 본 발명의 아질산나트륨 또는 산화질소 대사체가 고정화 및 안정화된 천연발효물; 및 글루타치온;을 유효성분으로 포함하는 조성물을 포함하는 약학 조성물에 포함될 수 있는 담체, 부형제 및 희석제로는 락토즈, 덱스트로즈, 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. 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다. 경구 투여를 위한 고형 제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형 제제는 상기 발효굼벵이 추출물에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트, 수크로오스 또는 락토오스, 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 또한 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트, 탈크 같은 윤활제들도 사용된다. 경구를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데 흔히 사용되는 단순 희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제, 좌제가 포함된다. 비수성용제, 현탁제로는 프로필렌글리콜, 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텝솔, 마크로골, 트윈 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로젤라틴 등이 사용될 수 있다.

[0056] 본 발명의 약학 조성물은 쥐, 생쥐, 가축, 인간 등의 포유동물에 다양한 경로로 투여될 수 있으며, 투여의 모든 방식은 예상될 수 있는데, 바람직하게는 경구 또는 직장 경로로 투여될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0057] 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.

[0058] 구체적으로, 본 발명에 따른 아질산나트륨 또는 산화질소 대사체가 고정화 및 안정화된 천연발효물과 글루타치온 함유 효모추출물을 포함하는 약학 조성물의 약제학적으로 유효한 양은 환자의 나이, 성별, 체중에 따라 달라질 수 있으며, 일반적으로는 체중 kg당 2 mg 내지 4 mg, 바람직하게는 3 mg을 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.

[0059] 본 발명은 또한, 본 발명에 따른 위장내 발암성 엔-니트로사민 생성을 억제하고 장내 산화질소 생성을 촉진하는 조성물을 유효성분으로 함유하는 건강기능식품 조성물을 제공한다.

[0060] 본 발명에 따른 건강기능식품 조성물에 있어서, 상기 위장내 발암성 엔-니트로사민 생성을 억제하고 장내 산화질소 생성을 촉진하는 조성물은 아질산나트륨($NaNO_2$) 또는 산화질소 대사체가 고정화 및 안정화된 천연발효물; 및 글루타치온(glutathione);을 유효성분으로 포함하는 조성물로서, 상세 내용은 전술한 것과 같다.

[0061] 본 발명의 상기 건강기능식품 조성물은 당뇨병, 고혈압, 장염, 스트레스성 장 증후군, 관절염, 간질환 또는 아

토피 피부염의 예방 또는 개선용일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0062] 상기 건강기능식품의 종류에는 특별한 제한은 없다. 상기 아질산나트륨 또는 산화질소 대사체가 고정화 및 안정화된 천연발효물; 및 글루타치온;을 유효성분으로 포함하는 조성물을 함유하는 건강기능식품의 예로는 육류, 소시지, 빵, 초콜릿, 캔디류, 스낵류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 떡류, 아이스크림류를 포함한 낙농제품, 각종 스프, 음료수, 차, 드링크제, 알콜 음료 및 비타민 복합제 등이 있으며, 통상적인 의미에서의 건강기능식품을 모두 포함한다.

[0063] 상기 건강기능식품은 분말, 과립, 환, 정제, 캡슐, 캔디, 시럽, 발포정 및 음료 중에서 선택된 어느 하나의 제형으로 제조될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0064] 본 발명의 아질산나트륨 또는 산화질소 대사체가 고정화 및 안정화된 천연발효물; 및 글루타치온;을 유효성분으로 포함하는 조성물을 식품첨가물로 사용하는 경우, 상기 산화질소 대사체가 고정화 및 안정화된 천연발효물; 및 글루타치온;을 유효성분으로 포함하는 조성물을 그대로 첨가하거나 다른 식품 또는 식품성분과 함께 사용될 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다. 유효성분은 그의 사용 목적(예방 또는 개선)에 따라 적절하게 사용될 수 있다. 일반적으로, 식품 또는 음료의 제조시에 본 발명의 아질산나트륨 또는 산화질소 대사체가 고정화 및 안정화된 천연발효물; 및 글루타치온;을 유효성분으로 포함하는 조성물은 원료에 대하여 15 중량부 이하, 바람직하게는 10 중량부 이하의 양의로 첨가된다. 그러나 건강 조절을 목적으로 하는 장기간의 섭취의 경우에는 안전성 면에서 아무런 문제가 없는 범위의 양으로 사용될 수 있다.

[0065] 본 발명의 건강기능식품은 식품 제조 시에 통상적으로 첨가되는 성분을 포함하며, 예를 들어, 단백질, 탄수화물, 지방, 영양소 및 조미제를 포함한다. 예컨대, 드링크제로 제조되는 경우에는 유효성분 이외에 천연탄수화물 또는 향미제를 추가 성분으로서 포함시킬 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. 상기 건강기능식품 조성물 외에 여러 가지 영양제, 비타민, 전해질, 풍미제, 착색제, 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알콜, 탄산음료에 사용되는 탄산화제 등을 더 함유할 수 있다.

[0066] 본 명세서에서 용어 "발효액"은 "산화질소 대사체가 고정화 및 안정화된 천연발효물"을 의미하는 것으로 사용되었다.

[0068] 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0070] **1. 실험 방법**

[0071] **1-1) 시약 및 시료 제작**

[0072] 본 발명에 사용된 아질산나트륨($NaNO_2$), 질산염 환원효소(nitrate reductase), 염산(HCl), 스트렙토조토신(streptozotocin, 이하 STZ로 표기)은 Sigma 사(USA)에서 구입하였고, 분말 형태의 7% 내지 15% 글루타치온 함유 효모 추출물은 (주)비전바이오캠(제조국 중국)에서 구입하였다. (유)휴먼에노스에서 제조한 상추 또는 마늘 발효액에 글루타치온 함유 효모 추출물의 분말을 혼합하여 조성물 시료(sample)를 제조할 수 있다. 본 실시의 예에서 사용된 시료는 아질산나트륨($NaNO_2$) 1 mM, 함유된 산화질소 대사체 NO_2^- 농도를 기준으로 1 mM의 마늘 또는 상추 발효액, 및 함유된 글루타치온(GSH) 농도를 기준으로 1 mM의 효모 추출물을 상기 아질산나트륨과 1:1의 비율로 혼합하거나 또는 상기 마늘 또는 상추 발효액과 1:1의 비율로 혼합한 혼합물이다. 상기 상추 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] **1-2) 산화질소 대사체 농도 측정**

[0075] 발효액 또는 혈액에 함유된 산화질소 대사체 총량(NO_2^-와 NO_3^-의 농도를 합한 농도를 의미하며, 이하 NO_x로 표기함)은 질산염 환원효소를 첨가하여 농축액에 포함된 NO_3^-를 모두 NO_2^-로 환원시키고, 총 NO_2^-의 농도를 측정하여 산화질소 대사체의 총 함량 또는 농도를 결정하였다.

[0076] 보다 구체적으로 기술하면, 발효액의 경우 총 NO_2^- 함량은 먼저 질산염 환원효소를 첨가하여 1시간 동안 환원시킨 발효액을 증류수로 1,000배 희석하고 3,000 rpm에서 3분간 원심분리하여 불용성 폴리페놀과 식이섬유를 제거한 다음 맑은 상층액 50 ㎕를 취하여 측정 시료로 사용하였다. 혈액의 경우, 채취한 혈액을 3,000 rpm에서 3분간 원심분리하여 혈구를 침전시킨 다음 상층액 혈장 40 ㎕를 취하여 질산염 환원효소를 포함한 완충용액 10 ㎕와 혼합하고 1시간 반응시킨 후에 측정 시료로 사용하였다. 50 ㎕의 NO_2^- 표준용액, 50 ㎕의 측정 시료를 96-웰 플레이트에 각각 분주하고 100 ㎕의 시험용액 [1% sulfanilamide가 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. 이어서 멀티-플레이트 리더(multi-plate reader)를 사용하여 570 nm 파장에서 각 웰의 흡광도 값을 측정한 다음 표준용액의 흡광도 값과 시료의 흡광도 값을 비교하여 NO_x 농도를 계산하였다.

[0078] **1-3) 흡광도 분석**

[0079] 상기 실험 방법 1-1)에서 제조된 시료(NO_2^- + GSH)가 위장과 같은 강산성 조건에서 에스-니트로소글루타치온(GSNO)을 생성할 수 있는지 조사하기 위해, 시료의 고유한 흡수 스펙트럼(absorption spectrum)을 분석하였다. 측정 과정을 간단하게 기술하면, 먼저 발효액에 0.1 mM HCl 용액을 첨가하여 NO_2^-를 모두 제거한 다음 글루타치온(GSH) 함유 효모 추출물을 혼합하여 reference cell 시료 R1을 제조하였다. 두 번째로, 발효액과 효모 추출물이 혼합된 조성물 시료를 증류수에 용해시켜 sample cell 시료 S1을 제조하고, 여기에 0.1 mM HCl를 첨가하고 5분 동안 실온에서 반응시켜 sample cell 시료 S2을 제조하였다. 자외-가시광선 분광광도계(UV-Vis spectrophotometer)의 reference cell에 R1을 넣고, sample cell에 S1 또는 S2을 넣은 다음 300 nm ~ 700 nm 파장에서 S1 및 S2 시료가 나타내는 고유한 스펙트럼을 얻어 각 시료의 최대흡수 파장(λ_{max})을 비교함으로서 GSNO의 생성 여부를 판정하였다.

[0081] **1-4) 실험동물 혈액에서 산화질소 대사체 총량 분석**

[0082] 본 동물실험에 사용된 6주령 수컷 Balb/c 마우스는 샘타코(Korea)에서 구입하여 일주일 동안의 순화기간을 거친 다음 실험에 사용하였다. 실험동물은 5마리씩 4군으로 구분하였으며, 각 군은 시료를 처리하지 않은 대조군, 발효액 시료(NO_2^- 농도를 기준으로 1 mM)를 처리한 실험군 1, 효모 추출물 시료(GSH 농도를 기준으로 1 mM)를 처리한 실험군 2 및 발효액과 효모 추출물을 혼합한 시료(1 mM NO_2^- + 1mM GSH)를 처리한 실험군 3으로 각각 구분하였다. 각각의 시료는 3일 동안 1일 3회 일정 시간 간격으로 구강 투여하였다. 실험 마지막 날에 실험에 참여한 모든 실험동물을 에테르를 이용하여 흡입 마취시킨 다음 주사기로 심장에서 혈액을 채취하였다. 채취한 혈액에서 산화질소 대사체 총량(NO_x)은 상기 실험 방법 1-2)에 기술된 실험방법으로 산출하였다.

[0084] **2. 통계 분석**

[0085] 각 실험에서 얻어진 결과는 평균 ±표준편차(SD)로 나타내었다. 두 실험군의 사이의 유의성은 t-검정(test)을 통해 분석하였고, 두 실험군 이상의 경우 유의성은 일원배치분산(one-way ANOVA)을 통해 분석한 다음 Duncan 사후검정을 실시하였다. P-값이 0.05보다 크지 않을 경우($p < 0.05$) 통계적으로 유의한 것으로 판단하였다.

[0087] **실시예 1. 강산 조건에서 산화질소 대사체 함유 발효액과 글루타치온 함유 효모 추출물의 혼합 시료에 의한 GSNO 생성**

[0088] 상기 기술한 실험방법 1-1)에서 제조된 조성물 시료(마늘발효액[NO_2^-로서 0.1 mM]과 효모 추출물[GSH로서 0.1 mM]의 혼합 시료)가 위장과 같은 강산 조건에서 GSNO를 생성하는지 조사하기 위해 상기 기술한 실험방법 1-3)에 따라 실험을 수행한 결과 도 2와 같은 결과를 얻었다.

[0089] 도 2의 결과를 살펴보면, 강산이 아닌 중성 또는 약산성 조건에서 조성물 시료는 NO_2^-의 고유의 흡수띠 스펙트럼(λmax = 354 nm)을 보이지만 위산과 같은 강산의 조건에서는 GSNO 생성을 나타내는 고유의 흡수띠 스펙트럼(λmax = 334 nm)을 나타낸다. 이러한 실험결과가 의미하는 바는 산화질소 대사체 함유 발효액과 글루타치온 함유 효모 추출물의 혼합으로 구성된 시료는 위장과 같은 강산 조건에서 GSNO를 생성한다는 것을 의미한다.

[0091] **실시예 2. 산화질소 대사체 함유 발효액과 글루타치온 함유 효모 추출물의 혼합 시료에 의한 산화질소 대사체 체내 흡수**

[0092] 상기 기술한 실험방법 1-1)에서 제조된 조성물 시료(마늘발효액[NO_2^-로서 0.1 mM]과 효모 추출물[GSH로서 0.1 mM]의 혼합 시료)를 실험동물이 섭취할 경우, 산화질소 대사체가 체내로 흡수되는지 조사하기 위해 실험방법 1-4)에 따라 실험을 수행한 결과 도 3과 같은 결과를 얻었다.

[0093] 도 3의 결과를 살펴보면, 발효액만으로 구성된 시료를 섭취한 실험군과 발효액과 효모 추출물을 혼합으로 구성된 시료를 섭취한 실험군에서 혈액 내의 산화질소 대사체 총량(NO_x)이 시료를 처리하지 않은 대조군보다 유의하게 증가하였다. 그러나 효모 추출물만으로 구성된 시료를 섭취한 실험군에서는 NO_x의 유의한 변화가 관찰되지 않았다. 이러한 결과로부터, 산화질소 대사체는 위장에서 GSNO로 바뀌어도 소장에서 분해되어 결국 산화질소 대사체 흡수가 이루어진다고 볼 수 있다(반응식 8-1) 및 8-3) 참조). 바꾸어 정리하면, 산화질소 대사체 함유 발효액으로만 구성된 시료와 동일하게, 산화질소 대사체 함유 발효액과 글루타치온 함유 효모 추출물의 혼합으로 구성된 시료도 체내 산화질소 대사체 흡수가 가능하다는 것을 알 수 있었다.

[0095] **실시예 3. 산화질소 대사체 함유 발효액과 글루타치온 함유 효모 추출물의 혼합 시료에 의한 항당뇨 효과**

[0096] 상기 기술한 실험방법 1-1)에서 제조된 조성물 시료(마늘발효액[NO_2^-로소 0.1 mM]과 효모 추출물[GSH로서 0.1 mM]의 혼합 시료)를 실험동물이 섭취할 경우, 산화질소 대사체 체내 흡수가 가능하다는 것을 알 수 있었다(실시예 2 참조).

[0097] 본 발명은 선행 발명(출원번호 10-2021-0035653)에서 체내로 흡수된 산화질소 대사체가 고혈압, 당뇨, 장염, 스트레스성 장 증후군, 관절염, 간질환, 아토피 피부염에 대해 예방 및 개선 효과가 있음을 보였다.

[0098] 본 발명의 '실시예 3'에서는 산화질소 함유 발효액과 글루타치온 함유 효모 추출물을 혼합한 시료의 섭취에 의해 체내로 흡수된 산화질소 대사체가 선행 발명에서 주장한 약리 효과가 있는지 조사하기 위해, 여러 약리 효과들 중에서 하나의 대표적인 질병으로 알려진 당뇨를 선택하여 실험방법 1-1)따라 제조된 시료의 항당뇨 효과를 조사하였다.

[0099] 본 실험의 목적을 달성하기 위해, 하기 실험방법에 따라 당뇨 실험동물을 제작한 다음 4주간 1일 3회 발효액만으로 구성된 시료, 효모 추출물만으로 구성된 시료 및 발효액과 효모 추출물의 혼합으로 구성된 시료를 각각 처리하고 각 시료의 항당뇨 효과를 조사하였다.

[0101] **3-1. 당뇨 실험동물 제작 및 시료 투여**

[0102] 당뇨 실험동물 모델로 사용된 6주령 수컷 Balb/c 마우스는 샘타코(Korea)에서 구입하여 일주일 동안의 순화기간을 거친 다음 실험목적에 맞게 사용하였다. 실험동물의 복강에 당뇨 유발 물질 STZ를 주사하여 당뇨 실험동물을 제작하였다. 구체적으로, 실험동물의 복강에 0.1 M 구연산염 버퍼(citrate buffer, pH 4.5)에 용해시킨 120 mg/kg STZ를 1회 주사여 당뇨를 유발하고, 2주 후에 공복상태의 실험동물의 꼬리 정맥에서 소량의 혈액을 채취한 다음 독일 로체사(Roche)의 글루코트렌드(Glucotrend™) 혈당측정기를 사용하여 측정하였다. 측정한 혈당이 200 mg/dL 이하인 실험동물은 제외하였고, 1주일 후에 공복혈당을 다시 측정하여 혈당이 200 mg/dL 이상 유지된 실험동물을 선별하여 당뇨 실험동물로 사용하였다.

[0103] 당뇨 실험동물은 5마리씩 4군으로 구분하였으며, 각 군은 시료를 처리하지 않은 당뇨 실험군, 발효액 시료(NO_2^- 농도를 기준으로 1 mM)를 처리한 실험군 1, 효모 추출물 시료(GSH 농도를 기준으로 1 mM)를 처리한 실험군 2 및 발효액과 효모 추출물을 혼합한 시료(1 mM NO_2^- + 1 mM GSH)를 처리한 실험군 3으로 각각 구분하였다. 각각의 시료는 4주 동안 1일 3회 일정 시간 간격으로 구강 투여하였다. 1주 단위로 16시간 절식시킨 후에 당뇨 실험동물의 꼬리 정맥에서 소량의 혈액을 채취한 다음 글루코트렌드 혈당측정기를 사용하여 공복혈당(fasting blood glucose)을 측정하였다.

[0104] 또한, 실험 마지막 날에 실험에 참여한 모든 실험동물을 에테르를 이용하여 흡입 마취시킨 다음 주사기로 심장에서 혈액을 채취하였다. 채취한 혈액에서 산화질소 대사체 총량(NO_x)은 상기 실험 방법 1-2)에 기술된 실험방법으로 산출하였다.

[0106] **3-2. 항당뇨 효과 분석**

[0107] 도 4의 결과를 살펴보면, 효모 추출물만으로 구성된 시료를 섭취한 실험군에서는 공복혈당의 유의한 변화가 관찰되지 않았으나, 발효액만으로 구성된 시료를 섭취한 실험군과 발효액과 효모 추출물을 혼합으로 구성된 시료를 섭취한 실험군에서 4주째 공복혈당이 시료를 처리하지 않은 대조군보다 유의하게 감소한 것을 확인하였다. 또한, 발효액과 효모 추출물을 혼합으로 구성된 시료를 섭취한 실험군의 공복혈당이 발효액만으로 구성된 시료를 섭취한 실험군의 공복혈당에 비해 유의성 수준에서 보다 낮은 것을 관찰할 수 있었다. 이러한 결과로부터, 발효액과 효모 추출물을 혼합으로 구성된 시료는 항당뇨 효과가 우수하고, 발효액 단독에 비해 보다 효과적인 것을 알 수 있었다.

[0109] **실시예 4. 산화질소 대사체 함유 발효액과 글루타치온 함유 효모 추출물의 혼합 시료에 의한 장염 개선 효과**

[0110] 본 실험에서 사용한 실험동물은 6주령 수컷 Balb/c 마우스를 샘타코(Korea)에서 구입하여 일주일 간 순화기간을 거친 다음 사용하였다. Balb/c 마우스의 평균 무게는 21.40±1.20 g으로, 시료를 매일 1회 3주간 경구 투여하였다. 실험동물 사육실은 12시간 간격으로 명암을 조절하였고, 온도는 23±2℃, 습도는 50~60%를 유지하였다.

[0112] **4-1. 군 구성 및 궤양성 대장염의 유발**

[0113] 실험동물은 6개 군으로 분류되었으며 아무 처리도 하지 않고 증류수(D.W)를 투여한 정상군, 장염을 유발하고 D.W를 투여한 대조군, 장염을 유발하고 아질산나트륨($NaNO_2$) 1 mM 투여군, 장염을 유발하고 상추발효액 1 mM 투여군, 장염을 유발하고 $NaNO_2$ + 글루타치온 함유 효모 추출물(이하, GSH) 1 mM 투여군, 장염을 유발하고 상추발효액 + GSH 1 mM 투여군으로 분류하였다(표 1). 궤양성 대장염의 유도는 정상군을 제외한 모든 실험군에 3.0% DSS (Dextran sulfate sodium)를 5일간 자유 섭취시켜 제조하였다. 군 구성 마리수의 산정은 3R의 원칙에 준하여 통계적 의미를 가리는 최소수를 사용하였다.

표 1

[0114] 궤양성 대장염 실험군 구성

Group		DSS[1)]	Material	Dose	n
1	정상군	No	distilled water	-	5
2	대조군	Yes	distilled water	-	5
3	$NaNO_2$	Yes	Sodium nitrite	1 mM	5
4	상추발효액	Yes	Lettuce fermented extract	1 mM	5
5	$NaNO_2$ + GSH[2)]	Yes	Sodium nitrite + GSH	1 mM	5
6	상추발효액 + GSH	Yes	Lettuce fermented extract + GSH	1 mM	5

[1)] DSS : Dextran sulfate sodium

[2)] GSH : Yeast extract containing glutathione

[0116] **4-2. 질병활성화정도 측정**

[0117] 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.

[0118] DAI = (weight loss score) + (diarrhea score) + (rectal bleeding score)

[0119] 여기서 사용된 의학적 변수는 인체에서 궤양성 대장염이 생겼을 때의 의학적 증상과 유사한 포괄적인 기능측정이다(표 2).

표 2

[0120] 질병활성화정도(Disease activity index)

Score	weight loss (%)	Diarrhea	Rectal bleeding
0	none	None	Normal
1	1-5	Mild	Occult
2	6-10		
3	11-15		
4	16-20		
5	>20	Severe watery	Gross bleeding

[0122] **4-3. 장 길이 측정 및 혈청 내 사이토카인 측정**

[0123] 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.

[0125] **4-4. 궤양성 대장염 모델에서 천연발효물과 글루타치온 혼합물의 효과**

[0126] 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, 상추발효액 투여군과 상추발효액 + GSH 혼합 투여군에서 유의적인 차이를 보였다(도 5).

[0127] 또한, DSS 투여 후 5일째 되는 날 희생시킨 마우스의 대장을 적출하여 그 길이를 확인한 결과 시료를 투여한 모든 군에서 장 길이가 대조군에 비해 길었으며 $NaNO_2$ 투여군, 상추발효액 투여군, $NaNO_2$ + GSH 혼합 투여군, 상추발효액 + GSH 혼합 투여군의 순으로 확인되었다(도 6).

[0128] 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, 상추발효액 + GSH 혼합 투여군에서 가장 낮은 수치가 관찰되었다(도 7 및 도 8).

[0130] **실시예 5. 산화질소 대사체 함유 발효액과 글루타치온 함유 효모 추출물의 혼합 시료에 의한 스트레스성 장 증후군 개선 효과**

[0131] 본 실험에서 사용한 실험동물은 8주령 암컷 Wistar 랫트(rat)를 샘타코에서 구입하여 일주일 간 순화기간을 거친 다음 사용하였다. Wistar 랫트의 평균 무게는 180.5±0.5 g으로, 시료는 1일 1회 경구투여 하였다. 실험동물 사육실은 12시간 간격으로 명암을 조절하였고, 온도는 23±2℃, 습도는 50~60%를 유지하였다.

[0133] **5-1. 군 구성 및 Water Avoidance Stress (WAS)**

[0134] 산화질소 대사체 함유 천연발효물과 글루타치온 함유 효모 추출물에 의한 대장 운동 변화를 관찰하고자 정상군을 제외한 나머지 그룹에 WAS 수조에 각각 물을 채운 후 도피대에 동물을 올려두어 간헐적 스트레스를 준 후 변 개수를 측정하였다. 실험은 각 시료별로 투여하는 동안 매일 음수, 사료 섭취량을 측정한다. 또한, WAS는 매일 60분씩 중간 교체시간을 고려해서 1시간에 15마리씩 2 세션으로 나누어 총 8일간 진행하였으며(도 9), 이때 변의 개수를 측정하였다.

[0135] 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 $NaNO_2$ + GSH 혼합 투여군, WAS 수행하며 상추발효액 + GSH 혼합 투여군으로 구성하였다(표 3). WAS에 노출시켜 설사형 과민성장증후군 유사증상(배변 증가)과 점막면역의 항진을 유발하고 각 시료별 투여가 이를 감소시킬 수 있는지 관찰하였다.

표 3

[0136] 스트레스성 장 증후군 실험군 구성

Group		WAS	Material	Dose	n
1	정상군	NO	distilled water	-	6
2	대조군	Yes	distilled water	-	6
3	$NaNO_2$	Yes	Sodium nitrite	1 mM	6
4	상추발효액	Yes	Lettuce fermented extract	1 mM	6
5	$NaNO_2$ + GSH	Yes	Sodium nitrite + GSH	1 mM	6
6	상추발효액 + GSH	Yes	Lettuce fermented extract + GSH	1 mM	6

[0138] **5-2. 스트레스성 장 증후군 모델에서 천연발효물과 글루타치온 혼합물의 효과**

[0139] WAS를 통한 스트레스 유발 시 각각의 시료별 변 개수 측정 결과는 도 10과 같다. 시료 투여군 모두에서 변 개수가 대조군에 비해 감소하였으며 $NaNO_2$ 투여군, $NaNO_2$ + GSH 혼합 투여군, 상추발효액 투여군, 상추발효액 + GSH 혼합 투여군의 순으로 감소를 보였다.

[0141] **실시예 6. 산화질소 대사체 함유 발효액과 글루타치온 함유 효모 추출물의 혼합 시료에 의한 혈압 개선 효과**

[0142] 본 실험에서 사용한 실험동물은 7주령 수컷 Sprague Dawley 랫트(이하, SD 랫트)를 샘타코에서 구입하여 일주일간 순화기간을 거친 다음 사용하였다. SD 랫트의 평균 무게는 198.95±2.10 g으로 시료는 실험 전 경구투여 하였다. 실험동물 사육실은 12시간 간격으로 명암을 조절하였고, 온도는 23±2℃, 습도는 50~60%를 유지하였다.

[0144] **6-1. DOCA-Salt 고혈압 rat 모델 제작 및 군 구성**

[0145] 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 시료를 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. 실험동물의 혈압측정은 그룹별로 시료를 투여하여 마리 당 55분 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.

[0146] 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 $NaNO_2$ 투여군, 상추발효액 투여군, $NaNO_2$ + GSH 혼합 투여군, 상추발효액 + GSH 혼합 투여군으로 분리하였다(표 4).

표 4

[0147] 혈압 실험군 구성

Group		Treatment				n
		DOCA-injection	DOCA dose	material	Dose	
1	대조군	○	25 mg/kg	distilled water	-	5
2	$NaNO_2$	○	25 mg/kg	Sodium nitrite	1 mM	5
3	상추발효액	○	25 mg/kg	Lettuce fermented extract	1 mM	5
4	$NaNO_2$ + GSH	○	25 mg/kg	Sodium nitrite + GSH	1 mM	5
5	상추발효액 + GSH	○	25 mg/kg	Lettuce fermented extract + GSH	1 mM	5

[0149] **6-2. DOCA 유발 고혈압 모델에서 천연발효물과 글루타치온 혼합물의 효과**

[0150] DOCA-salt로 고혈압이 유발된 랫트에서 각각의 발효액 투여 전과 투여 후 혈압을 측정한 결과는 도 11과 같다. 시료의 경구 투여 후 10분에서 20분 사이에 혈압 감소를 확인할 수 있었으며, 특히 상추발효액 및 상추발효액 + GSH 혼합 투여군에서 높은 혈압 감소를 나타내었으며, 상추발효액 투여군에서 낮은 혈압이 유지되었다. GSH 혼합 투여군에서는 혈압이 상승했다 다시 낮아지는 특징을 보였다.

[0152] **실시예 7. 산화질소 대사체 함유 발효액과 글루타치온 함유 효모 추출물의 혼합 시료에 의한 관절염 개선 효과**

[0153] 본 실험에서 사용한 실험동물은 7주령 수컷 SD 랫트를 샘타코에서 구입하여 일주일 간 순화기간을 거친 다음 사용하였다. 시료는 매일 1회 4주간 경구로 투여하였다. 실험동물 사육실은 12시간 간격으로 명암을 조절하였고, 온도는 23±2℃, 습도는 50~60%를 유지하였다.

[0155] **7-1. 관절염의 유발 및 군 구성**

[0156] 관절염의 유발은 정상군을 제외한 나머지 실험군에 각 군별로 실험동물을 마취시킨 후 SD 랫트의 왼쪽 무릎 주변을 깨끗이 제모하고 골관절염 유발물질인 Monosodium iodoacetate (MIA)를 31G의 인슐린 주사기(0.25 ×8, BD Medical-Diabetes Care, USA)를 사용하여 왼쪽 무릎 관절 내에 50 ㎕ (60~80 ㎎/㎖) 씩 투여하였다. MIA 희석 시에는 0.9% saline을 사용하며 MIA 주사 7일 후 실험 군별 각각의 실험 시료를 투여하였다.

[0157] 실험동물은 6개 군으로 분류되었으며 아무 처리도 하지 않고 증류수를 투여한 정상군, MIA를 통해 골관절염을 유발하고 증류수를 투여한 대조군, $NaNO_2$ 1 mM 투여군, 상추발효액 1 mM 투여군, $NaNO_2$ + GSH 1 mM 투여군, 상추발효액 + GSH 1 mM 투여군으로 분류하였으며, 4주간 경구투여하였다(표 5). 군 구성 마리수의 산정은 3R의 원칙에 준하여 통계적 의미를 가리는 최소수를 사용하였다.

표 5

[0158] 관절염 실험군 구성

Group		MIA	Meterial	Dose	n
1	정상군	No	distilled water	-	5
2	대조군	Yes	distilled water	-	5
3	$NaNO_2$	Yes	Sodium nitrite	1 mM	5
4	상추발효액	Yes	Lettuce fermented extract	1 mM	5
5	$NaNO_2$ + GSH	Yes	Sodium nitrite + GSH	1 mM	5
6	상추발효액 + GSH	Yes	Lettuce fermented extract + GSH	1 mM	5

[0160] **7-2. 다리 부종 두께 측정**

[0161] MIA를 통해 관절염 유발 후 다리 부종 두께 변화를 측정하기 위해 랫트의 왼쪽 무릎관절 부위를 측정하였다. 다리 부종 두께는 버니어 캘리퍼스(vernier calipers; Mitutoyo Co., Japan)를 사용하여 마취 후 측정하였다.

[0163] **7-3. 관절염 지수 평가(severity score) 측정**

[0164] 관절염 지수의 평가는 동물모델을 희생하기 전에 각각의 동물을 사진 촬영한 후 육안으로 3명의 실험자가 평가하였다. 평가는 Kim 등(Korean J Orient Physiol Pathol, Effects of Acanthopanax senticosus and onion mixture extract on the collagen-induced arthritis in rat model. 2011, 25;1000-1007)의 방법을 변형하여 3명의 실험자가 3회 독립 관찰하여 각각 1점에서 5점으로 점수를 배점하여 평균값으로 표시하였다(표 6).

표 6

[0165] 관절염의 임상 평가

등급	임상 증상
1	No change
2	Mild erythema of the ankle joint
3	Mild swelling and erythema of the ankle joint
4	Moderate swelling and erythema of the ankle joint through the metatarsal bone
5	Severe swelling and erythema of the ankle joint through the digit

[0167] **7-4. 혈청 내 염증성 사이토카인 및 염증 매개 인자 생성 측정**

[0168] 혈청 내 사이토카인은 ELISA 키트(R&D Systems, USA)를 이용하여 TNF-α, Metallopeptidase-9 (MMP-9)의 생성을 측정하였다. 항체가 붙어있는 각 웰에 각 ADS (assay diluent solution) 50 ㎕를 첨가한 후 시료 50 ㎕를 각각 첨가하여 실온에 2시간 방치한 후, 세척 버퍼 300 ㎕로 4회 세척하였다. 세척 후 각 웰에 항체로 mouse TNF-α, MMP-9 100 ㎕를 넣고 상온에서 2시간 배양한 후, 이를 제거하고 4회 세척하였다. 각 웰에 기질용액 100 ㎕를 넣고 30분간 상온에 방치한 후, 반응정지액 100 ㎕를 첨가하여 Molecular Devices사의 ELISA reader (SPECTRA max M2, USA)로 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

[0170] **7-5. 혈청 내 PGE_2 (Prostaglandin E_2) 측정**

[0171] 혈청 내 PGE_2 생성량은 ELISA 키트를 이용하여 측정하였다. 항체가 붙어있는 각 웰에 ADS 50 ㎕를 첨가한 후 시료 50 ㎕를 각각 첨가하여 실온에 2시간 방치한 후, 세척 버퍼 300 ㎕로 4회 세척하였다. 세척 후 각 웰에 항체로 Proteoglycan E2 conjugate 50 ㎕를 넣고 상온에서 2시간 배양한 후, 제거하고 4회 세척하였다. 각 웰에 기질용액 200 ㎕를 넣고 30분간 상온에서 방치한 후, 반응정지액 100 ㎕를 첨가하여 Molecular Devices사의 ELISA reader로 450 nm에서 흡광도를 측정하였다.

[0173] **7-6. 관절염 모델에서 천연발효물과 글루타치온 혼합물의 효과**

[0174] 실험 종료 후 각 실험군별 왼쪽 무릎관절 부위를 관찰하여 관절염 완화 정도의 형태학적 변화를 확인하였다. MIA만 처리한 대조군에서는 아무것도 처리하지 않은 정상군의 다리에 비해 다리 부종에 의한 두께 변화가 확인되었으며, 시료 처리에 따라 두께가 감소하는 것을 확인하였다(도 12).

[0175] 또한, MIA를 통해 골관절염 유발 동물모델에서 나타나는 퇴행성관절염에 대한 각 그룹별 관절염 정도 평가 결과는 도 13에 개시된 바와 같이, MIA를 주사하지 않은 정상군에서는 부종과 같은 특이한 증상이 관찰되지 않았으며, MIA를 통해 관절염을 유발한 대조군(MIA)에서는 퇴행성관절염을 유도한 왼쪽 다리에서 부종을 동반한 증상이 관찰되었으며, 시료 처리에 따라 부종이 완화된 것을 알 수 있었다.

[0176] 실험 종료 후 혈청을 분리하여 염증 주요 지표인 TNF-α, MMP-9, PGE_2 수치를 측정한 결과 대조군에 비해 시료 투여군 모두 감소하였으며, $NaNO_2$ 투여군, 상추발효액, $NaNO_2$ + GSH 혼합 투여군, 상추발효액 + GSH 혼합 투여군의 순으로 많은 감소를 보였다(표 7).

표 7

[0177] MIA를 이용한 관절염 유발 모델에서 시료 처리에 따른 TNF-α, MMP-9 및 PGE_2의 변화

Measurement	Group					
	정상군	대조군	$NaNO_2$	상추발효액	$NaNO_2$ + GSH	상추발효액 + GSH
TNF-α (pg/mL)	15.42±0.65	65.15±5.45	54.48±2.85	49.65±4.22	50.22±2.15	46.38±2.12
MMP-9 (ng/mL)	0.25±0.03	0.82±0.04	0.58±0.04	0.54±0.07	0.46±0.03	0.45±0.03
PEG_2 (ng/mL)	0.71±0.03	1.08±0.03	0.97±0.02	0.91±0.03	0.89±0.03	0.85±0.03

[0179] **실시예 8. 산화질소 대사체 함유 발효액과 글루타치온 함유 효모 추출물의 혼합 시료에 의한 간 보호 효과**

[0180] 본 실험에서 사용한 실험동물은 7주령 수컷 Sprague Dawley 랫트(SD 랫트)를 샘타코에서 구입하여 일주일 간 순화기간을 거친 다음 사용하였다. SD 랫트의 평균 무게는 210.45±1.65 g으로 실험동물 사육실은 12시간 간격으로 명암을 조절하였고, 온도는 23±2℃, 습도는 50~60%를 유지하였다.

[0182] **8-1. 간 손상 유발 및 군 구성**

[0183] 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 1 mM의 시료를 CCl_4 주사 전에 경구투여로 격일로 3회 전처리하였으며, 정상군은 D.W(distilled water)만을 경구

투여 하였다. 군 구성 마리수의 산정은 3R의 원칙에 준하여 통계적 의미를 가리는 최소수를 사용하였다.

표 8

[0184] CCl_4 유도 간 손상 실험군 구성

Group		CCl_4	Meterial	Dose	n
1	정상군	-	distilled water	-	
2	대조군	o	distilled water	-	5
3	$NaNO_2$	o	Sodium nitrite	1 mM	5
4	상추발효액	o	Lettuce fermented extract	1 mM	5
5	$NaNO_2$ + GSH	o	Sodium nitrite + GSH	1 mM	5
6	상추발효액 + GSH	o	Lettuce fermented extract + GSH	1 mM	5

[0186] **8-2. 혈청 채취 및 혈청 검사**

[0187] 실험에 사용된 렛트를 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.

[0189] **8-3. 급성 간 손상 모델에서 천연발효물과 글루타치온 혼합물의 효과**

[0190] 혈청 내 ALT 및 AST 수준은 일반적으로 간 건강을 위한 바이오 마커로서 임상적으로 측정된다. CCl_4에 의한 간 독성 유발 실험모델에서 각각의 시료 투여 후 ALT, AST 측정한 결과 시료 투여군 모두에서 대조군에 비해 혈청 내 ALT 및 AST 수준이 감소하였으며 특히, $NaNO_2$ 투여군, 상추발효액 투여군, $NaNO_2$ + GSH 혼합 투여군, 상추발효액 + GSH 혼합 투여군의 순으로 감소를 보였다(도 14).

[0192] **실시예 9. 산화질소 대사체 함유 발효액과 글루타치온 함유 효모 추출물의 혼합 시료에 의한 접촉성 피부염 개선 효과**

[0193] 본 실험에서 사용한 실험동물은 5주령 수컷 Balb/c 마우스를 샘타코에서 구입하여 일주일 간 순화기간을 거친 다음 사용하였다. Balb/c 마우스의 평균 무게는 20.80 ±0.82 g이고, 시료를 매일 1회 12일간 경구투여 하였다. 실험동물 사육실은 12시간 간격으로 명암을 조절하였고, 온도는 23±2℃, 습도는 50~60%를 유지하였다.

[0195] **9-1. DNFB 제조 및 아토피 피부염 유발 및 군 구성**

[0196] 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 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.

[0197] 실험동물은 6개 군으로 분류되었으며 아무 처리도 하지 않은 군을 정상군으로 설정하고 오른쪽 귀에 DNFB를 도포하고 DW를 투여한 대조군, 오른쪽 귀에 DNFB를 도포하고 $NaNO_2$ 1 mM 투여군, 오른쪽 귀에 DNFB를 도포하고 상추발효액 1 mM 투여군, 오른쪽 귀에 DNFB를 도포하고 $NaNO_2$ + GSH 1 mM 투여군, 오른쪽 귀에 DNFB를 도포하고 상추발효액 + GSH 1 mM 투여군으로 분류하였다(표 9). 군 구성 마리수의 산정은 3R의 원칙에 준하여 통계적 의미를 가리는 최소수를 사용하였다. 정상군(CON)과 대조군은 각각 D.W를 투여하였고, 나머지 그룹은 각 시료를 1일 1회씩 경구투여 하였다.

표 9

[0198] 아토피 피부염 실험군 구성

Group		Left	Right	Meterial	Dose	n
1	정상군	Normal	Normal	distilled water	-	5

2	대조군	Normal	0.3% DNFB	distilled water	-	5
3	$NaNO_2$	Normal	0.3% DNFB	Sodium nitrite	1 mM	5
4	상추발효액	Normal	0.3% DNFB	Lettuce fermented extract	1 mM	5
5	$NaNO_2$+GSH	Normal	0.3% DNFB	Sodium nitrite + GSH	1 mM	5
6	상추발효액+GSH	Normal	0.3% DNFB	Lettuce fermented extract + GSH	1 mM	5

[0200] **9-2. 육안 평가**

[0201] 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.

[0203] **9-3. 귀 두께(ear swelling) 및 비장 지수 측정**

[0204] DNFB 도포 후 피부조직의 변화를 측정하기 위해 마우스의 양쪽 귀를 측정하였다. 귀 두께는 vernier calipers (Mitutoyo Co.)를 사용하여 3일 동안 12시간, 24시간, 48시간 간격으로 두께 변화를 측정 하였다.

[0205] 귀 두께 측정 후 Balb/c 마우스를 희생시켜 비장을 적출하고 무게를 측정하였다. 비장 지수(spleen index)는 Balb/c mice의 비장 무게(mg)를 체중(g)으로 나누어 산출하였다.

[0207] **9-4. 접촉성 피부염 모델에서 천연발효물의 효과**

[0208] 실험 종료 후 각 실험군별 시료를 처리한 오른쪽 귀 부위를 관찰하여 아토피 피부염 병변의 형태학적 변화를 확인하였다. DNFB만 처리한 대조군에서는 아무것도 처리하지 않은 왼쪽 귀에 비해 홍반, 피부건조, 짓무름, 부종과 혈종 등의 아토피성 피부 변화가 확인되었다(도 15).

[0209] 또한, 실험 종료 후 각 실험군별 시료를 처리한 오른쪽 귀 부위를 관찰하여 아토피 피부염 병변의 형태학적 변화를 확인한 결과, 대조군에 비해 시료투여군에서 모두 귀 두께가 감소하였으며 $NaNO_2$ 투여군, 상추발효액 투여군, $NaNO_2$ + GSH 혼합 투여군, 상추발효액 + GSH 혼합 투여군의 순으로 감소를 보였다(도 16).

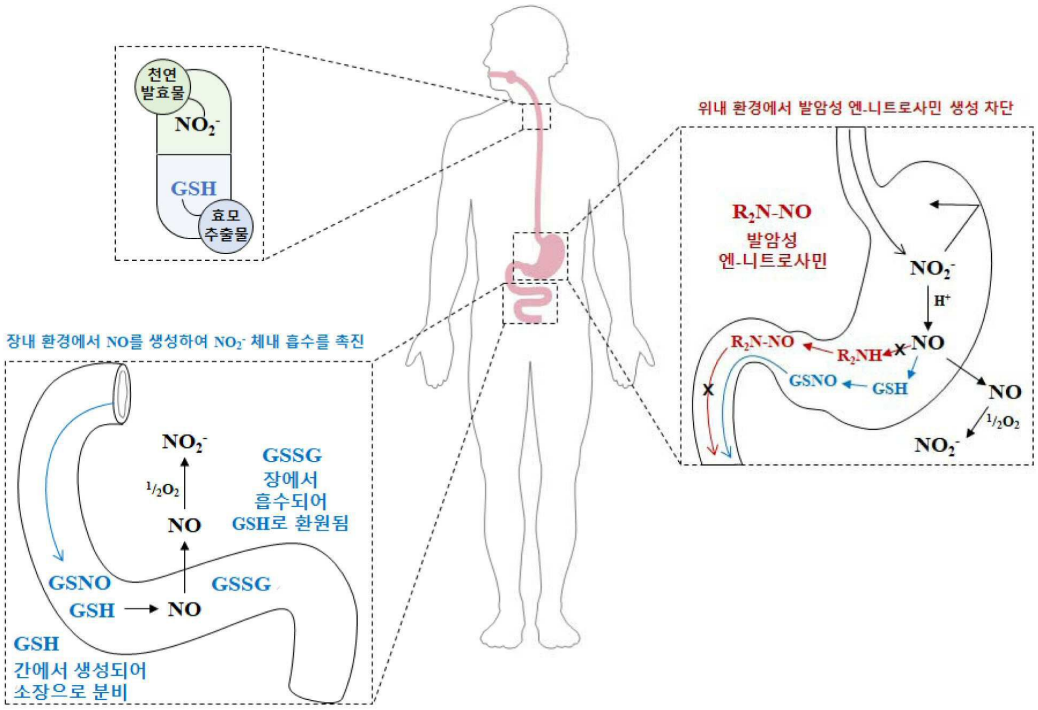
[0210] 또한, 실험 종료 후 각 실험군별 체중별 비장 무게를 측정한 결과 대조군에 비해 시료 투여군에서 모두 비장 지수가 감소하였으며 $NaNO_2$ 투여군, 상추발효액 투여군, $NaNO_2$ + GSH 혼합 투여군, 상추발효액 + GSH 혼합 투여군의 순으로 감소를 보였다(도 17).

[0211] 또한, 혈청 내 TNF-α 및 IL-4 수준을 측정한 결과 대조군에 비해 시료 투여군에서 모두 TNF-α 및 IL-4의 수준이 감소하였으며 $NaNO_2$ 투여군, 상추발효액 투여군, $NaNO_2$ + GSH 혼합 투여군, 상추발효액 + GSH 혼합 투여군의 순으로 감소를 보였다(도 18 및 도 19).

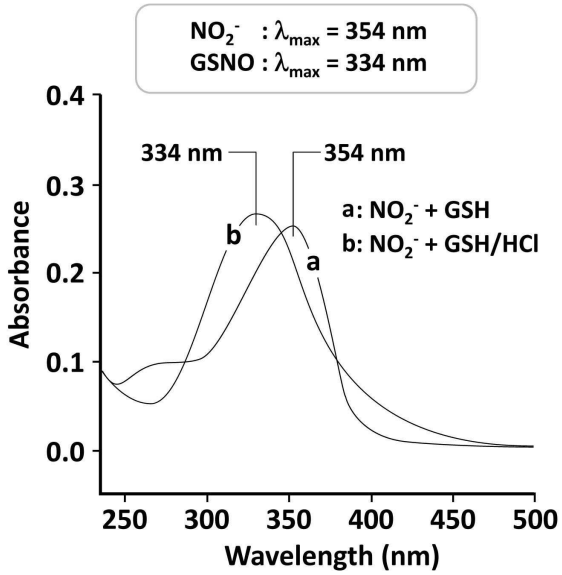
[0212] 종합적으로, 실험방법 1-1)에 따라 아질산나트륨과 글루타치온 함유 효모 추출물의 혼합물; 또는 산화질소 함유 발효액과 글루타치온 함유 효모 추출물의 혼합물;로 구성된 본 발명의 조성물은 항당뇨 효과뿐만 아니라 고혈압, 장염, 스트레스성 장 증후군, 관절염, 간질환, 아토피 피부염 등에 대해 예방 및 개선 효과가 있으므로, 관련 산업 분야에 유용하게 이용될 수 있을 것이다.

도면

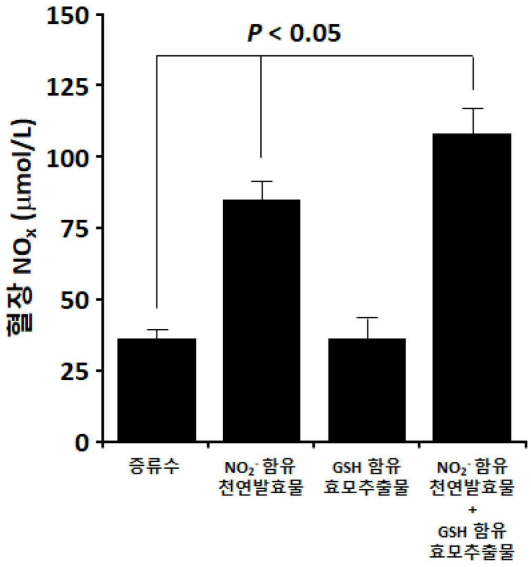
도면1


천연
발효물
NO_2^-
GSH
효모
추출물
위내 환경에서 발암성 엔-니트로사민 생성 차단
R_2N-NO
발암성
엔-니트로사민
NO_2^-
H^+
R_2N-NO
R_2NH
X-NO
GSNO
GSH
X
NO
$^1/_2O_2$
NO_2^-
장내 환경에서 NO를 생성하여 NO_2^- 체내 흡수를 촉진
NO_2^-
$^1/_2O_2$
NO
GSSG
장에서
흡수되어
GSH로 환원됨
GSNO
GSSG
GSH → NO
GSH
간에서 생성되어
소장으로 분비

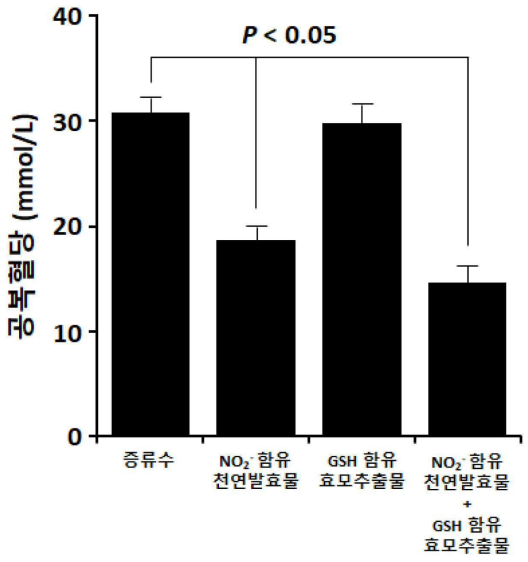
도면2


NO_2^- : λ_{max} = 354 nm
GSNO : λ_{max} = 334 nm
334 nm
354 nm
a: NO_2^- + GSH
b: NO_2^- + GSH/HCl
b
a
Absorbance
0.4
0.3
0.2
0.1
0.0
250
300
350
400
450
500
Wavelength (nm)

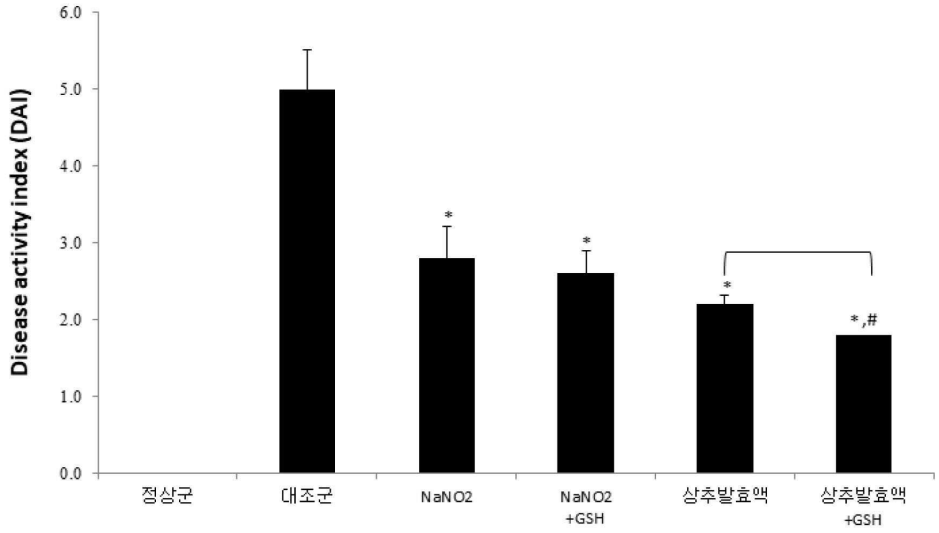
도면3


P < 0.05
150
125
100
75
50
25
0
혈장 NOx (μmol/L)
증류수
NO2- 함유 천연발효물
GSH 함유 효모추출물
NO2- 함유 천연발효물 + GSH 함유 효모추출물

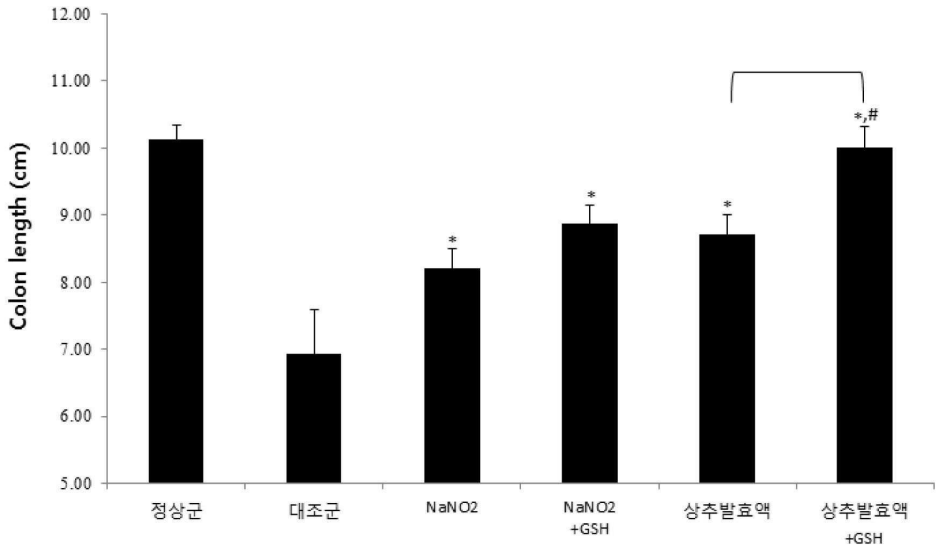
도면4


P < 0.05
40
30
20
10
0
공복혈당 (mmol/L)
증류수
NO2- 함유 천연발효물
GSH 함유 효모추출물
NO2- 함유 천연발효물 + GSH 함유 효모추출물

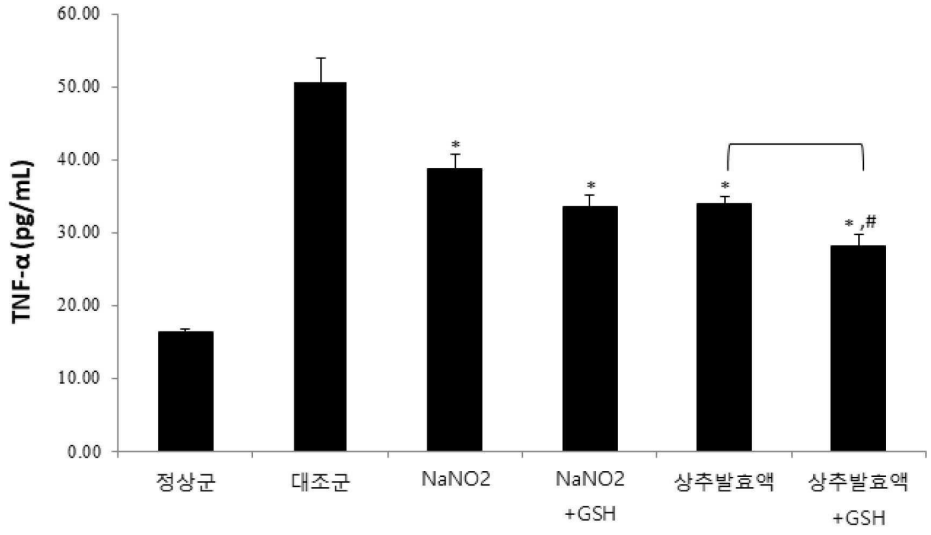
도면5


Disease activity index (DAI)
6.0
5.0
4.0
3.0
2.0
1.0
0.0
*
*
*
*,#
정상군
대조군
NaNO2
NaNO2 +GSH
상추발효액
상추발효액 +GSH

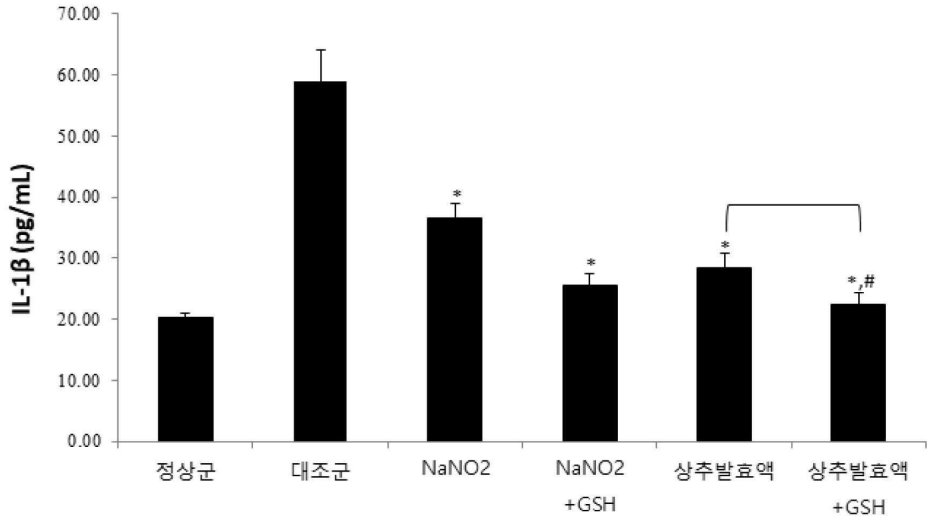
도면6


Colon length (cm)
12.00
11.00
10.00
9.00
8.00
7.00
6.00
5.00
*
*
*
*,#
정상군
대조군
NaNO2
NaNO2 +GSH
상추발효액
상추발효액 +GSH

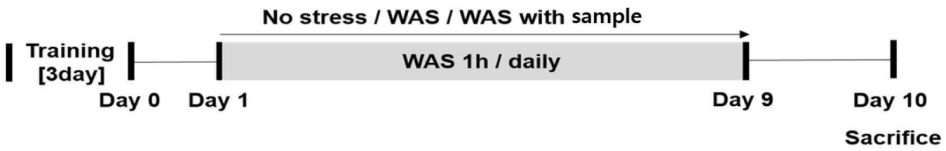
도면7


60.00
50.00
40.00
30.00
20.00
10.00
0.00
TNF-α (pg/mL)
*
*
*
*,#
정상군
대조군
NaNO2
NaNO2 +GSH
상추발효액
상추발효액 +GSH

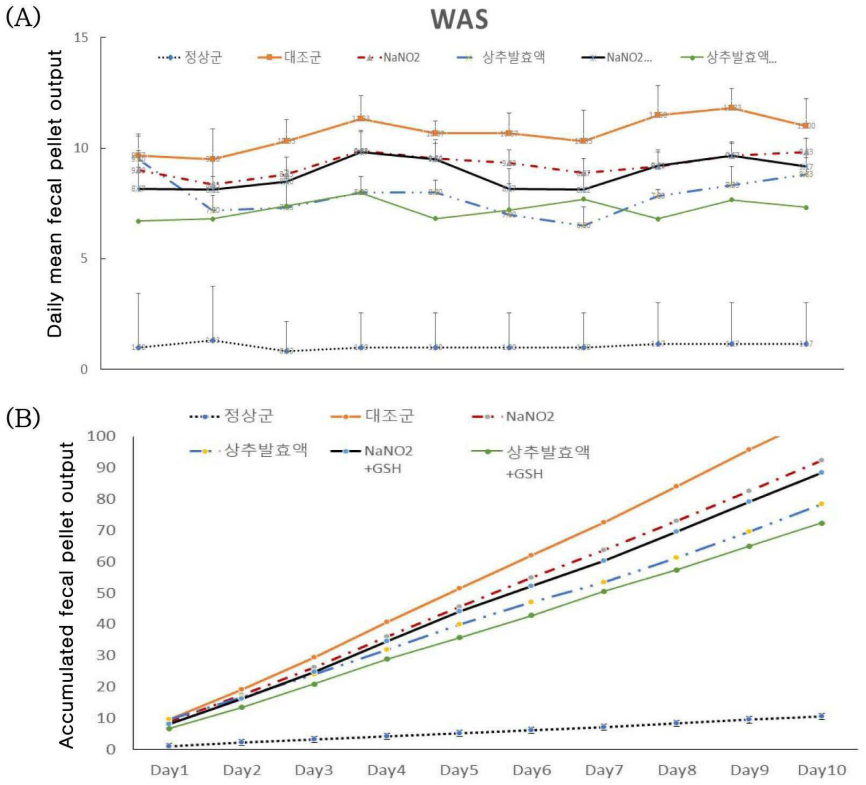
도면8


70.00
60.00
50.00
40.00
30.00
20.00
10.00
0.00
IL-1β (pg/mL)
*
*
*
*,#
정상군
대조군
NaNO2
NaNO2 +GSH
상추발효액
상추발효액 +GSH

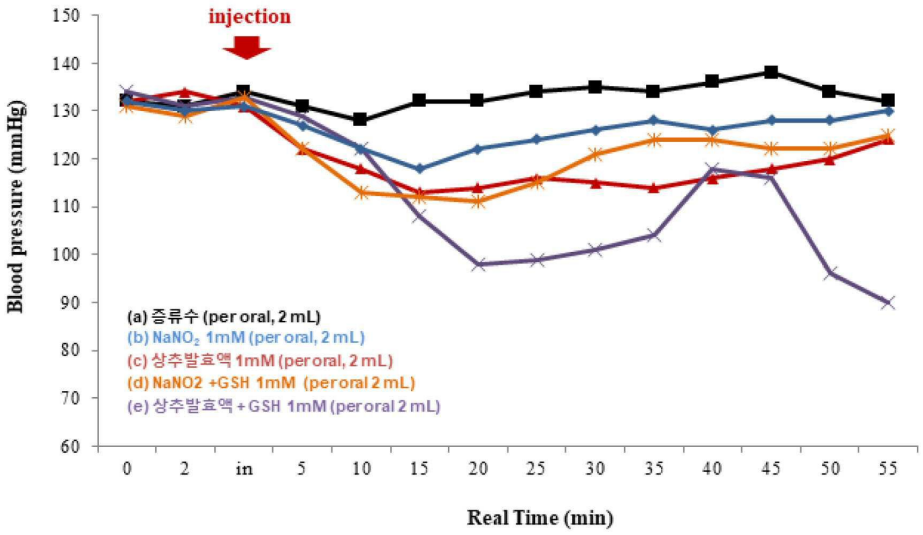
도면9


No stress / WAS / WAS with sample
Training [3day]
WAS 1h / daily
Day 0
Day 1
Day 9
Day 10
Sacrifice

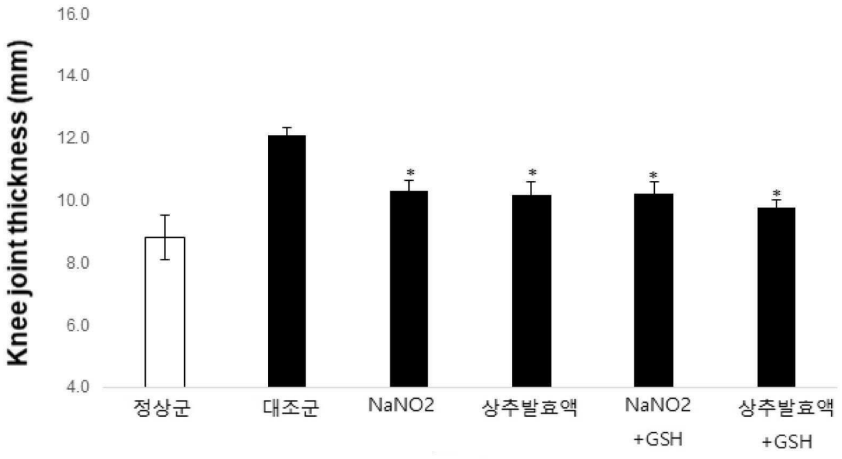
도면10


(A)
WAS
정상군
대조군
NaNO2
상추발효액
NaNO2...
상추발효액...
Daily mean fecal pellet output
(B)
정상군
대조군
NaNO2
상추발효액
NaNO2 +GSH
상추발효액 +GSH
Accumulated fecal pellet output
Day1
Day2
Day3
Day4
Day5
Day6
Day7
Day8
Day9
Day10

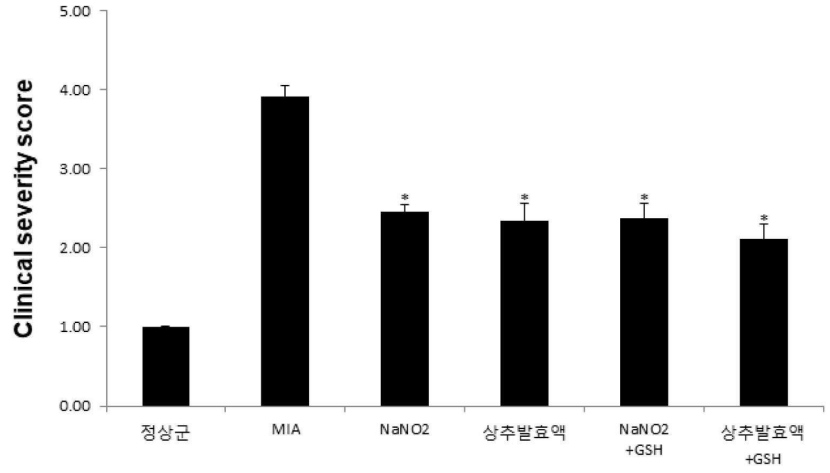
도면11


injection
Blood pressure (mmHg)
(a) 증류수 (per oral, 2 mL)
(b) NaNO2 1mM (per oral, 2 mL)
(c) 상추발효액 1mM (per oral, 2 mL)
(d) NaNO2 +GSH 1mM (per oral 2 mL)
(e) 상추발효액 + GSH 1mM (per oral 2 mL)
Real Time (min)

도면12

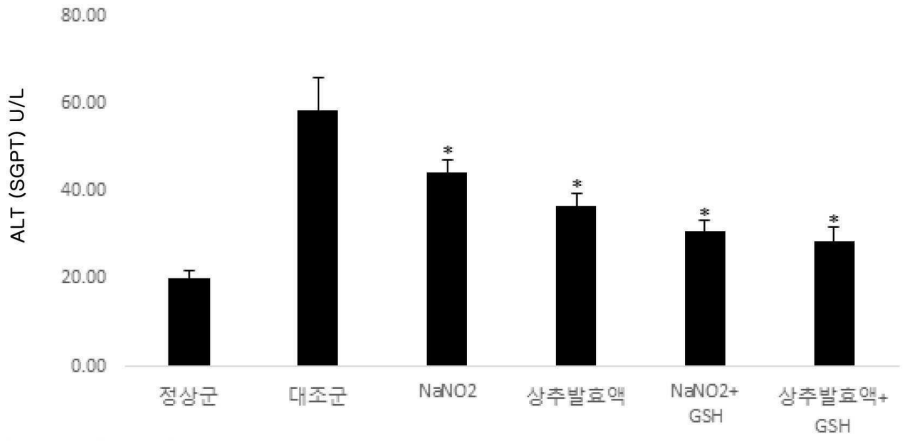

Knee joint thickness (mm)
16.0
14.0
12.0
10.0
8.0
6.0
4.0
정상군
대조군
NaNO2
상추발효액
NaNO2 +GSH
상추발효액 +GSH

도면13

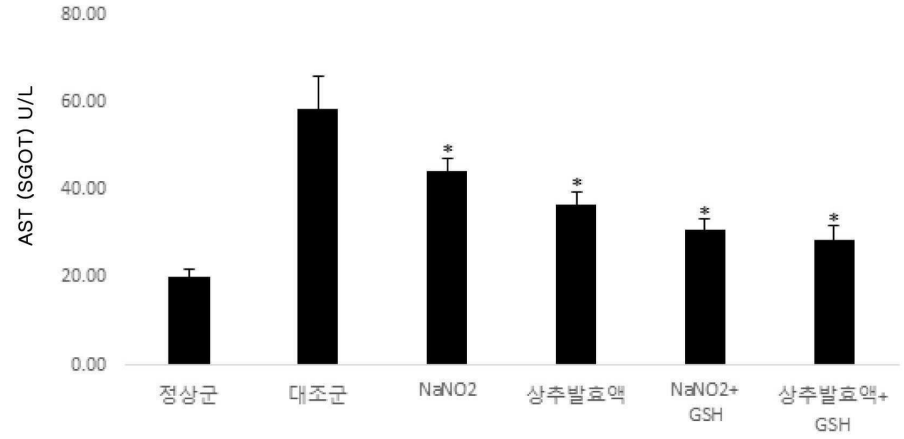

Clinical severity score
5.00
4.00
3.00
2.00
1.00
0.00
정상군
MIA
NaNO2
상추발효액
NaNO2 +GSH
상추발효액 +GSH

도면14

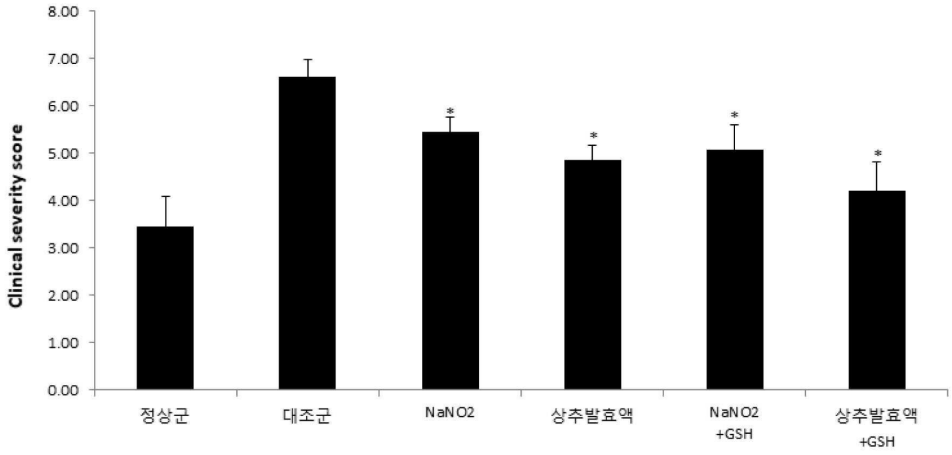
(A) ALT (SGPT)



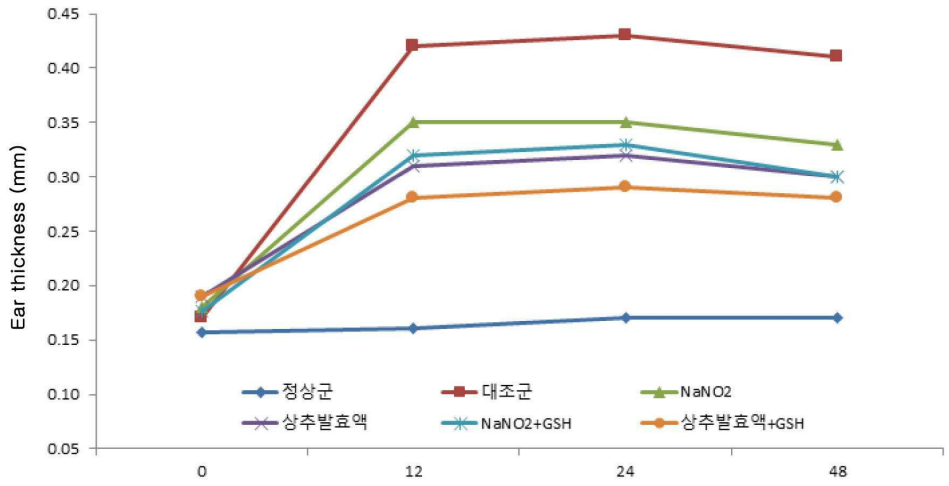
(B) AST (SGOT)



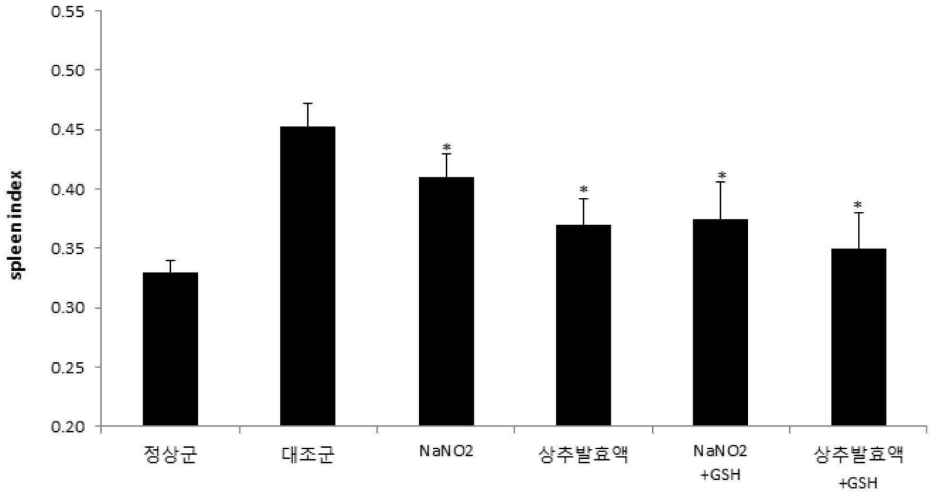
도면15



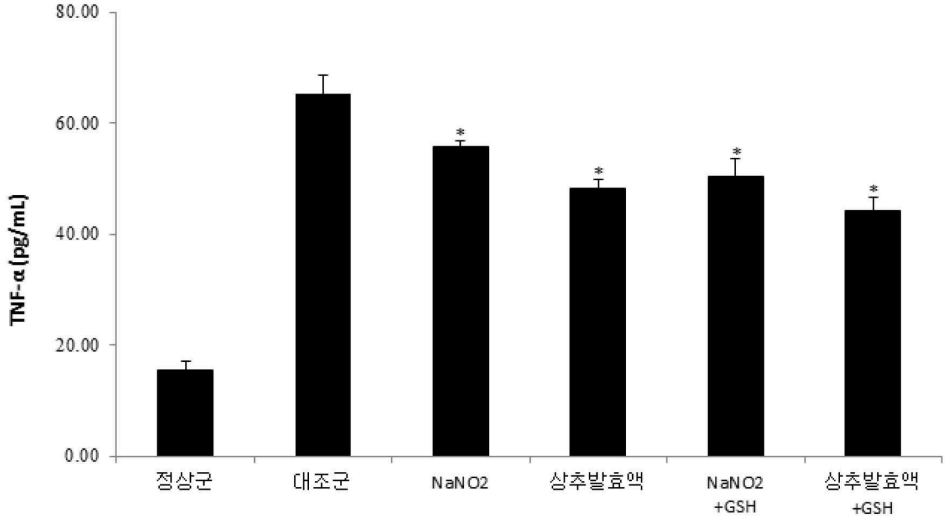
도면16



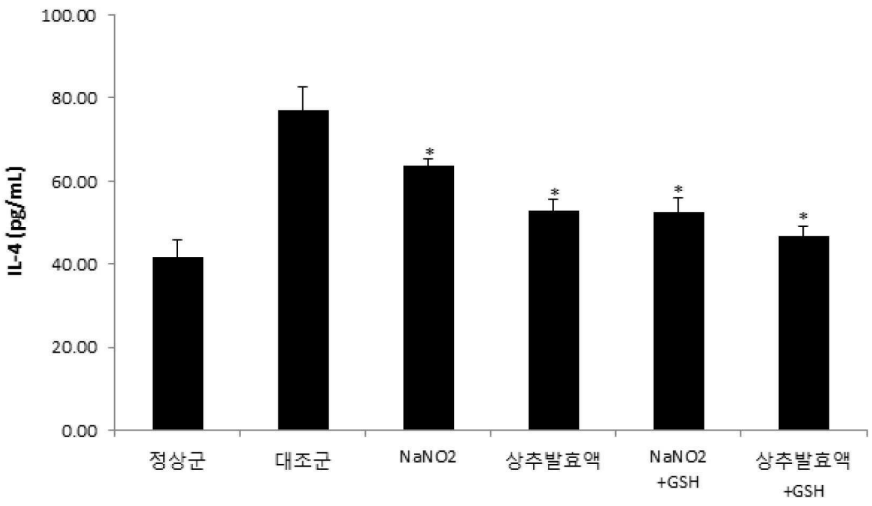
도면17



도면18



도면19


100.00
80.00
60.00
40.00
20.00
0.00
IL-4 (pg/mL)
*
*
*
*
정상군
대조군
NaNO2
상추발효액
NaNO2 +GSH
상추발효액 +GSH