



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2015년01월29일

(11) 등록번호 10-1487302

(24) 등록일자 2015년01월22일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 36/899 (2006.01) A61P 31/16 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2013-0059961

(22) 출원일자 2013년05월27일

심사청구일자 2013년05월27일

(65) 공개번호 10-2014-0139376

(43) 공개일자 2014년12월05일

(56) 선행기술조사문헌

이상진 외 4명, 한국식품영양과학회지 제42권 제 4호, 2013.4, 550-555*

서고운 외 5명, 한국식품영양과학회지 제42권 제 4호, 2013.4, 505-511*

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

기술이전 희망 : 기술양도, 실시권허여, 기술지도

(73) 특허권자

한국식품연구원

경기도 성남시 분당구 안양관교로1201번길 62 (백현동)

(72) 발명자

김영진

서울특별시 송파구 문정2동 중대로 24 웨밀리아파트 303동 802호

홍희도

경기 성남시 분당구 느티로 70, 413동 701호 (정자동, 느티마을아파트)

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

이희숙, 김석만

전체 청구항 수 : 총 3 항

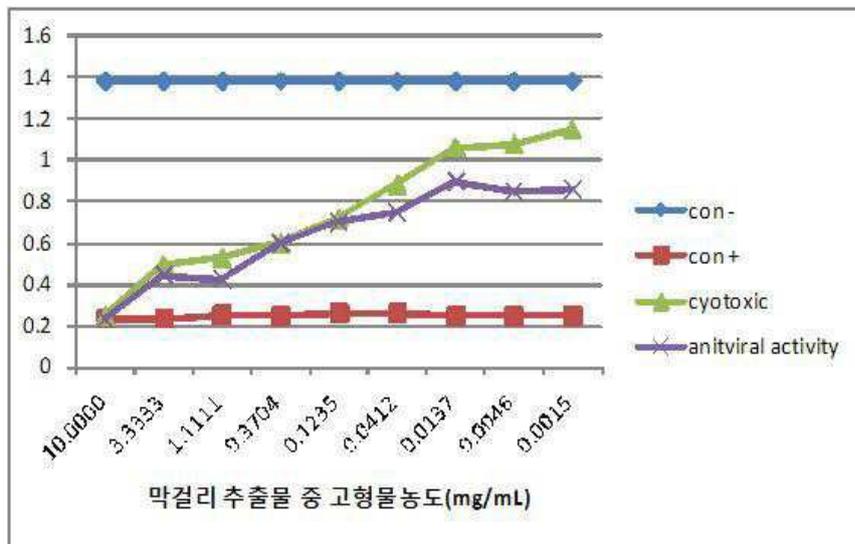
심사관 : 최영희

(54) 발명의 명칭 **막걸리 추출물을 유효 성분으로 포함하는 인플루엔자 바이러스 감염 및 염증성 질환 예방, 개선용 조성물**

(57) 요약

본 발명은 막걸리 추출물의 항인플루엔자 바이러스 및 항염증 효과에 대한 것으로, 더욱 상세하게는 막걸리 추출물을 유효 성분으로 포함하는 인플루엔자 바이러스 감염 및 염증 예방 및 치료용 약학적 조성물 및 건강기능성 식품 조성물에 대한 것이다. 본 발명은 막걸리 추출물의 항바이러스 및 항염증 효과를 이용하여 인플루엔자 바이러스 감염 및 염증을 예방, 개선 및 치료하는데 탁월한 효과가 있다.

대표도 - 도1



(72) 발명자

이민재

경기 성남시 분당구 불정로 361, 508동 404호 (서현동, 효자촌삼환아파트)

이근식

강원도 춘천시 동면 만천로 69-1 (스위첸아파트) 105동 701호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 E0132104

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 한국식품연구원

연구사업명 한국식품연구원 주요사업

연구과제명 전통식품 유래성분의 인플루엔자 억제효능 구명

기 여 율 1/1

주관기관 한국식품연구원

연구기간 2013.01.01 ~ 2013.12.31

특허청구의 범위

청구항 1

막걸리 추출물을 유효 성분으로 포함하는 H1N1 인플루엔자 바이러스 감염 예방 및 치료용 약학적 조성물.

청구항 2

막걸리 추출물을 유효 성분으로 포함하는 H1N1 인플루엔자 바이러스 감염 예방 및 개선용 건강기능성 식품 조성물.

청구항 3

삭제

청구항 4

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 H1N1 인플루엔자 바이러스 감염으로 인한 질환은 독감, 감기, 인후염, 기관지염 및 폐렴인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 5

삭제

청구항 6

삭제

청구항 7

삭제

명세서

기술분야

[0001]

본 발명은 막걸리 추출물의 항인플루엔자 바이러스 및 항염증 효과에 대한 것으로, 더욱 상세하게는 막걸리 추출물을 유효 성분으로 포함하는 인플루엔자 바이러스 감염 및 염증성 질환 예방, 개선 및 치료용 조성물에 관한 것이다.

배경기술

[0002]

인플루엔자는 orthomyxoviridae과 인플루엔자바이러스속에 속하는 바이러스로 호흡기질환을 일으킨다. 바이러스 입자에는 피막이 있고, 지름 80~120nm의 구상이지만 사상형 입자 등 다형성을 띤다. 바이러스입자는 V항원, 즉 13종류의 적혈구응집소(HA) 및 9종류의 뉴라미다아제(NA)로 규정되는 표면항원과 S항원(주로 리보핵단백질 NP로 규정하는 항원)을 갖고 S항원의 혈청학적 특이성에 의해 A, B, C의 3형으로 나뉜다. A형은 돌연변이(drift)나 유전체분절교환(shift)에 의해 새로운 V항원(HA 또는 NA) 변이주가 출현하기 쉽고 이때 인간집단 속에서 변이항원에 대한 항체보유율이 낮으면 세계적으로 대유행을 일으킨다. 분리주의 명명은 형, 자연숙주, 아형, 분리지, 분리번호, 분리년도(HA 및 NA의 항원형)의 순서로 기재한다. 사람 외에 돼지, 말, 오리 등에서도 분리된다. 동물체 내에 서도 증식하고 분절교환이 일어난다. B형은 새로운 변이주가 출현하더라도 항원의 변이는 연속적이며, 유행은 주로 국지적이다. 원숭이, 소 등의 신장 및 태아배양세포로 증식하는 C형은 1개의 긴 유전체가 있고 표면항원의 변화는 가장 적다.

- [0003] 현재까지 개발된 항바이러스들은 심한 부작용을 나타내고 있으며 그 응용에 대한 많은 주의가 필요하다. 또한, 백신의 개발은 유행하는 바이러스의 형과 백신의 바이러스가 맞지 않으면 효과가 낮은 문제점이 있다.
- [0004] 따라서 감염 억제 효과가 뛰어나고 안정성이 우수한 새로운 인플루엔자 바이러스제의 개발의 필요성이 증가하고 있다.
- [0005] 염증 반응은 손상이나 박테리아, 곰팡이, 바이러스 등 외부 물질에 의해 자극되어 각종 염증 매개 인자 및 면역 세포에 의한 효소의 활성화, 염증 매개물질 분비, 체액 침윤, 세포의 이동, 조직 파괴 등 일련의 복합적인 생리적 반응이 일어나는 것을 말하며, 이로 인해 홍반, 부종, 발열, 통증 등과 같은 증상이 수반된다. 염증 반응은 외부 감염원을 제거하고 손상된 조직을 재생하여 생명체의 기능을 회복시키는 작용을 하지만, 항원이 제거되지 않거나, 내부 물질이 원인이 되는 등 염증 반응이 과도하거나 지속적으로 일어나면 오히려 점막 손상, 조직 파괴 등이 일어나고, 압, 염증성 피부 질환, 관절염 등을 초래하기도 한다.
- [0006] 현재까지는 상기 염증성 질환의 치료를 위하여 주로 항 히스타민제, 비타민 연고, 부신피질호르몬제가 사용되어 왔으나, 이러한 약물은 그 효과가 일시적인 것이 대부분이고, 부작용이 심하여 염증성 질환의 치료 효과가 있는 새로운 물질의 개발이 요구되고 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0007] 이에 본 발명자들은 항인플루엔자 바이러스 및 항염증 효능이 뛰어난 전통 재래 식품 추출물에 관하여 연구하던 중, 막걸리 추출물이 항인플루엔자 바이러스 및 항염증 활성이 뛰어나 인플루엔자 바이러스 감염 및 염증성 질환의 예방 및 치료하는데 효과가 있는 것을 발견하여 본 발명을 완성하였다.
- [0008] 따라서, 본 발명의 목적은 막걸리 추출물을 유효 성분으로 포함하는 인플루엔자 바이러스 감염 예방 및 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.
- [0009] 본 발명의 또 다른 목적은, 막걸리 추출물을 유효 성분으로 포함하는 인플루엔자 바이러스 감염 예방 및 개선용 건강기능성 식품 조성물을 제공하는 것이다.
- [0010] 본 발명의 또 다른 목적은, 막걸리 추출물을 유효 성분으로 포함하는 염증성 질환 예방 및 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.
- [0011] 본 발명의 또 다른 목적은, 막걸리 추출물을 유효 성분으로 포함하는 염증성 질환 예방 및 개선용 건강기능성 식품 조성물을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0012] 상기의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 막걸리 추출물을 유효 성분으로 포함하는 인플루엔자 바이러스 감염 예방 및 치료용 약학적 조성물을 제공한다.
- [0013] 본 발명의 다른 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 막걸리 추출물을 유효 성분으로 포함하는 인플루엔자 바이러스 감염 예방 및 개선용 건강기능성 식품 조성물을 제공한다.

- [0014] 본 발명의 다른 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 막걸리 추출물을 유효 성분으로 포함하는 염증성 질환 예방 및 치료용 약학적 조성물을 제공한다.
- [0015] 본 발명의 다른 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 막걸리 추출물을 유효 성분으로 포함하는 염증성 질환 예방 및 개선용 건강기능성 식품 조성물을 제공한다.
- [0016] 이하 본 발명을 상세히 설명한다.
- [0017] 본 발명의 약학적 조성물은 막걸리 추출물을 유효 성분으로 포함하여 인플루엔자 바이러스 감염 및 염증성 질환 예방 및 치료에 효과적이다.
- [0018] 막걸리는 탁주(濁酒) · 농주(農酒) · 재주(滓酒) · 회주(灰酒)라고도 하며, 한국에서 역사가 가장 오래된 술로, 빗갈이 뜨물처럼 희고 탁하며, 6~7도로 알코올 성분이 적은 술이다. 주로 찹쌀 · 멥쌀 · 보리 · 밀가루 등을 쪄 다음 수분을 건조시켜(이것을 지에밥이라고 한다) 누룩과 물을 섞고 일정한 온도에서 발효시킨 것을 청주를 떠내지 않고 그대로 걸러 짜낸다. 이때 찹쌀을 원료로 한 것을 찹쌀막걸리, 거르지 않고 그대로 밥풀이 담긴 채 뜬 것을 동동주라고 한다. 좋은 막걸리는 단맛 · 신맛 · 쓴맛 · 뽀은맛이 잘 어울리고 감칠맛과 시원한 맛이 있는 것으로서, 땀 흘리고 일한 농부들의 갈증을 덜어주어 농주로서 애용되어 왔다.
- [0019] 본 발명의 막걸리 추출물은 공지의 천연물 추출방법에 의하여 추출될 수 있으며, 바람직하게는 물, 탄소수 1 내지 6개의 유기용매 및 아임계 또는 초임계 유체로 이루어진 균에서 선택된 하나 이상의 용매로 추출될 수 있으며, 상기 탄소수 1 내지 6개의 유기용매는 탄소수 1 내지 6개의 알코올(alcohol), 아세톤(acetone), 에테르(ether), 벤젠(benzene), 클로로포름(chloroform), 에틸아세테이트(ethyl acetate), 메틸렌클로라이드(methylene chloride), 헥산(hexane), 시클로헥산(cyclohexane) 및 석유에테르(petroleum ether)로 이루어진 균 중에서 선택된 것일 수 있다.
- [0020] 본 발명의 추출물 추출온도는 특별히 제한되지 아니하며, 예를 들어 0℃ 내지 90℃일 수 있으며, 바람직하게는 상온 내지 50℃일 수 있다. 본 발명의 추출물 추출시간은 특별히 제한되지 아니하며, 예를 들어 1시간 내지 10일일 수 있으며, 바람직하게는 10시간 내지 24시간 일 수 있다.
- [0021] 본 발명 추출물은 공지의 천연물 추출법으로 추출될 수 있다. 예를 들어 냉침추출, 열수추출, 초음파 추출, 환류냉각 추출, 가열 추출법으로 추출할 수 있으며, 바람직하게는 열수추출 또는 환류 냉각 추출법으로 추출할 수 있다.
- [0022] 본 발명의 추출물은 여과하여 액상으로 사용할 수 있으며, 바람직하게는 분무건조 또는 동결건조의 건조 공정을 통하여 고형화하여 사용할 수 있다. 더욱 바람직하게는 분무건조 또는 동결건조 전 텍스트린을 혼합하여 건조할 수 있다.
- [0023] 인플루엔자는 orthomyxoviridae과 인플루엔자바이러스속에 속하는 바이러스로 호흡기질환을 일으킨다. 인플루엔자 바이러스입자에는 피막이 있고, 지름 80~120nm의 구상이지만 사상형 입자 등 다형성을 띤다. 바이러스입자는 V형원, 즉 13종류의 적혈구응집소(HA) 및 9종류의 뉴라미다아제(NA)로 규정되는 표면항원과 S항원(주로 리보핵단백질 NP로 규정하는 항원)을 갖고 S항원의 혈청학적 특이성에 의해 A, B, C의 3형으로 나뉜다. A형은 돌연변이(drift)나 유전체분절교환(shift)에 의해 새로운 V형원(HA 또는 NA) 변이주가 출현하기 쉽고 이때 인간집단 속

에서 변이항원에 대한 항체보유율이 낮으면 세계적으로 대유행을 일으킨다. 사람 외에 돼지, 말, 오리 등에서도 분리되며, 동물체 내에 서도 증식하고 분절교환이 일어난다. B형은 새로운 변이주가 출현하더라도 항원의 변이는 연속적이며, 유행은 주로 국지적이다. 원숭이, 소 등의 신장 및 태아배양세포로 증식하는 C형은 1개의 긴 유전체가 있고 표면항원의 변화는 가장 적다.

[0024] 본 발명의 인플루엔자 바이러스는 바람직하게는 A형 인플루엔자일 수 있으며, 더욱 바람직하게는 A형 인플루엔자의 아형 중의 하나인 H1N1 바이러스 일 수 있다.

[0025] 본 발명의 인플루엔자 바이러스 감염으로 인한 질환은 독감, 감기, 인후염, 기관지염, 폐렴, 발열, 오한, 두통 및 기침, 인후통, 콧물, 호흡곤란 등의 상기도증상, 근육통, 관절통, 피로감, 구토 및 설사일 수 있으나, 바람직하게는 독감, 감기, 인후염, 기관지염 및 폐렴일 수 있다.

[0026] 본 발명의 일실시예에서는 막걸리 추출물의 농도별 인플루엔자 바이러스 억제 효과를 세포독성과 함께 실험하였다. 그 결과 막걸리 추출물은 농도 0.3704mg/mL 이하에서 세포독성이 낮으며, 농도 0.0137mg/mL에서는 항 인플루엔자 바이러스 효과가 탁월한 것으로 나타났다(도 1 참조).

[0027] 한편 본 발명의 염증성 질환은 이에 제한되지는 않으나, 부종 등과 같은 일반적인 염증 증상을 포함하여 염증성 장 질환, 복막염, 골수염, 봉소염, 췌장염, 외상 유발 쇼크, 기관지 천식, 알러지성 비염, 낭포성 섬유증, 급성 기관지염, 만성 기관지염, 급성 세기관지염, 만성 세기관지염, 골관절염, 통풍, 척추관절병증, 강직성 척추염, 라이터 증후군, 건선성 관절병증, 장질환 척추염, 연소자성 관절병증, 연소자성 강직성 척추염, 반응성 관절병증, 감염성 관절염, 후-감염성 관절염, 임균성 관절염, 결핵성 관절염, 바이러스성 관절염, 진균성 관절염, 매독성 관절염, 라임 병, '혈관염 증후군'과 관련된 관절염, 결절성 다발동맥염, 과민성 혈관염, 루게릭 육아종증, 류마티스성 다발성근육통, 관절 세포 동맥염, 칼슘 결정 침착 관절병증, 가성 통풍, 비-관절 류마티즘, 점액낭염, 건초염, 상과염(테니스 엘보), 신경병증성 관절 질환(neuropathic joint disease; 또는 'charcot joint'이라고도 함), 출혈성 관절증(hemarthrosic), 헤노흐-웬라인 자반병, 비후성 골관절병증, 다중심성 세막조직구증, 척추측만증(scoliosis), 혈색소증, 혈색소병증, 고지단백혈증, 저감마글로불린혈증, 가족성 지중해열(familial Mediterranean fever), 베체트 병, 전신성 홍반성 루푸스, 재귀열, 다발성 경화증, 패혈증, 패혈성 쇼크, 급성 호흡곤란 증후군, 다발성 장기부전, 만성 폐쇄성 폐질환(chronic obstructive pulmonary disease), 류마티스성 관절염(rheumatoid arthritis), 급성 폐손상(acute lung injury), 기관지 폐 형성장애(broncho-pulmonary dysplasia), 제2형 당뇨병, 동맥경화, 알츠하이머성 치매, 가족성 한랭 자가염증 증후군(familial cold autoinflammatory syndrome), 머클-웰스 증후군(Muckle-Wells syndrome), 신생아발병다발염증성질환(neonatal multisystem inflammatory disease), 만성유아신경피부관절증후군(chronic infantile neurologic cutaneous articular syndrome), 성인발증형 스틸병(adult-onset Still's disease), 접촉성 피부염, 포상기태(hydatidiform mole), PAPA 증후군(syndrome of pyogenic arthritis, pyoderma gangrenosum, and acne), 고면역글로불린 D 증후군(hyperimmunoglobulin d syndrome) 및 크리오피린 관련 주기적 증후군(cryopyrin-associated periodic syndromes)등을 포함할 수 있고, 바람직하게는 가족성 지중해열, 고면역글로불린 D 증후군, PAPA 증후군(syndrome of pyogenic arthritis, pyoderma gangrenosum, and acne) 및 크리오피린 관련 주기적 증후군(cryopyrin-associated periodic syndromes)으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상의 질환일 수 있다.

[0028] 본 발명의 일실시예에서는 막걸리 추출물의 항염증 효과를 알아보기 위해 염증조절복합체인 인플라마솜(inflammasome) 활성 억제시험을 하였다. 그 결과, 본 발명의 막걸리 추출물은 농도가 2.5mg/mL 이상 일 때 인플라마솜을 효과적으로 억제하는 것으로 나타났다(도 3, 도 4 및 도 5 참조).

[0029] 인플라마솜은 골수성세포(Myeloid cells)의 세포질에 존재하며 선천적면역수용체(NOD-like receptor), 어댑터 단백질(ASC) 및 caspase-1로 이루어진 단백질복합체로써 염증반응에 관여하는 사이토카인의 전구체인 pro-

Interleukin-1 β (pro-IL-1 β)를 활성형인 IL-1 β (p17)으로 전환 시키는데 관여한다. 본 발명의 막걸리 추출물은 이러한 인플라마좀의 활성을 억제함으로써, 염증성 사이토카인 IL-1 β 의 분비 양을 효과적으로 조절할 수 있어 염증성 질환의 예방 및 치료에 탁월한 효과를 갖는다.

- [0030] 따라서 막걸리 추출물을 유효성분으로 포함하는 본 발명의 약학적 조성물은 인플루엔자 바이러스 감염으로 인한 질환의 예방 및 치료에 효과적이며, 염증으로 인한 염증성 질환의 예방 및 치료에도 효과적이다.
- [0031] 본 발명에 따른 약학적 조성물은 약학적으로 유효한 양의 막걸리 추출물을 단독으로 포함하거나 하나 이상의 약학적으로 허용되는 담체, 부형제 또는 희석제를 추가로 포함할 수 있다. 상기에서 "약학적으로 허용되는"이란 생리학적으로 허용되고 인간에게 투여될 때, 활성성분의 작용을 저해하지 않으며 통상적으로 위장 장애, 현기증과 같은 알레르기 반응 또는 이와 유사한 반응을 일으키지 않는 비독성의 조성물을 말한다.
- [0032] 상기 담체, 부형제 및 희석제의 예로는, 락토즈, 텍스트로즈, 수크로즈, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 폴리비닐피롤리돈, 물, 메틸하이드록시벤조에이트, 프로필하이드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 들 수 있다. 또한 상기 약학 조성물은 충전제, 향응집제, 윤활제, 습윤제, 향료, 유화제 및 방부제 등을 추가로 포함할 수 있다.
- [0033] 상기에서 "약학적으로 유효한 양"이란 음성 대조군에 비해 그 이상의 반응을 나타내는 양을 말하며 바람직하게는 인플루엔자 바이러스 감염에 의해 유발되는 질환 또는 증상 예방 및 치료의 효과를 나타내기에 충분한 양을 말한다. 본 발명에 따른 막걸리 추출물의 약학적으로 유효한 양으로는 0.01 내지 100 mg/day/kg 체중이다. 그러나 상기 약학적으로 유효한 양은 질환의 종류 및 이의 중증정도, 환자의 연령, 체중, 건강상태, 성별, 투여 경로 및 치료기간 등과 같은 여러 인자에 따라 적절히 변화될 수 있다.
- [0034] 또한, 본 발명의 약학적 조성물은 포유동물에 투여된 후 활성 성분의 신속, 지속 또는 지연된 방출을 제공할 수 있도록 당업계에 공지된 방법을 사용하여 제형화될 수 있다. 제형은 분말, 과립, 정제, 에멀전, 시럽, 에어로졸, 연질 또는 경질 젤라틴 캡슐, 멸균 주사용액, 멸균 분말의 형태일 수 있다.
- [0035] 본 발명 조성물의 투여 경로로는 이에 한정되지는 않으나 경구적 또는 비경구적으로 투여 될 수 있다. 비경구적 투여 경로로는 예를 들면, 경피, 비강, 복강, 근육, 피하 또는 정맥 등의 여러 경로가 포함된다.
- [0036]
- [0037] 본 발명의 약학적 조성물은 인플루엔자 바이러스 감염으로 인한 질환의 예방 및 치료의 효과를 가지는 공지의 화합물과 병행하여 투여할 수 있다.
- [0038] 한편 본 발명은 막걸리 추출물을 유효성분으로 포함하는 인플루엔자 바이러스 감염 예방 및 개선용 건강 기능성 식품 조성물을 제공한다.
- [0039] 본 발명의 건강 기능성 식품 조성물은 막걸리 추출물을 유효성분으로 포함하여 인플루엔자 바이러스 감염 예방 및 개선에 효과적이다.
- [0040] 또한, 본 발명은 막걸리 추출물을 유효성분으로 포함하는 염증성 질환 예방 및 개선용 건강 기능성 식품 조성물을 제공한다.

- [0041] 본 발명의 건강 기능성 식품 조성물은 막걸리 추출물을 유효성분으로 포함하여 염증성 질환 예방 및 개선에 효과적이다.
- [0042] 본 발명의 "건강기능식품"은 건강기능식품에 관한 법률 제6727호에 따른 인체에 유용한 기능성을 가진 원료나 성분을 사용하여 제조 및 가공한 식품을 의미하며, "기능성"이라 함은 인체의 구조 및 기능에 대하여 영양소를 조절하거나 생리학적 작용 등과 같은 보건 용도에 유용한 효과를 얻는 목적으로 섭취하는 것을 의미한다.
- [0043] 본 발명의 식품조성물은 기능성 식품(functional food), 영양 보조제(nutritional supplement), 건강식품(health food) 및 식품 첨가제(food additives) 등의 모든 형태를 포함한다. 상기 유형의 식품 조성물은 당업계에 공지된 통상적인 방법에 따라 다양한 형태로 제조할 수 있다.
- [0044] 예를 들면, 건강식품으로는 막걸리 추출물 자체를 차, 주스 및 드링크의 형태로 제조하여 음용하도록 하거나, 과립화, 캡슐화 및 분말화하여 섭취할 수 있다. 또한, 본 발명의 건강기능식품은 막걸리 추출물과 인플루엔자 바이러스 감염에 의해 유발되는 질환 또는 증상의 예방 또는 개선의 효과가 있다고 알려진 공지의 활성 성분과 함께 혼합하여 조성물의 형태로 제조할 수 있다.
- [0045] 또한, 기능성 식품으로는 음료(알콜성 음료 포함), 과일 및 그의 가공식품(예: 과일통조림, 병조림, 잼, 마아말레이드 등), 어류, 육류 및 그 가공식품(예: 햄, 소시지 콘비이프 등), 빵류 및 면류(예: 우동, 메밀국수, 라면, 스파게티, 마카로니 등), 과즙, 각종 드링크, 쿠키, 엿, 유제품(예: 버터, 치즈 등), 식용식물유지, 마아가린, 식물성 단백질, 레토르트 식품, 냉동식품, 각종 조미료(예: 된장, 간장, 소스 등) 등에 막걸리 추출물을 첨가하여 제조할 수 있다. 또한, 본 발명의 막걸리 추출물을 식품 첨가제의 형태로 사용하기 위해서는 분말 또는 농축액 형태로 제조하여 사용할 수 있다.
- [0046] 본 발명의 식품 조성물 중 막걸리 추출물의 바람직한 함량은 식품 조성물 총 중량에 대하여 0.001 내지 50 중량%일 수 있으며, 바람직하게는 0.1 내지 30 중량% 범위로 함유될 수 있다.

발명의 효과

- [0047] 본 발명은 막걸리 추출물의 항인플루엔자 바이러스 및 항염증 효과에 대한 것으로, 더욱 상세하게는 막걸리 추출물을 유효 성분으로 포함하는 인플루엔자 바이러스 감염 및 염증성 질환 예방 및 치료용 조성물에 관한 것이다. 본 발명은 막걸리 추출물의 항바이러스 효과를 이용하여 인플루엔자 바이러스 감염을 예방, 개선 및 치료에 효과적이며 또한 항염증 효과를 이용하여 염증성 질환을 예방, 개선 및 치료하는데 효과적이다.

도면의 간단한 설명

- [0048] 도 1은 막걸리 추출물의 농도별 인플루엔자 억제효능을 나타낸 것이다. (가로축: 막걸리 추출물의 고형물농도 (mg/mL), 세로축: 세포활성도(O.D), con - : 인플루엔자 바이러스 없음, con + : 인플루엔자 바이러스 포함, cytotoxic : 막걸리 추출물의 세포독성, antiviral activity : 인플루엔자 억제효능)
- 도 2는 타미플루의 농도별 인플루엔자 억제효능을 나타낸 것이다. (가로축: 타미플루 농도(mg/mL), 세로축: 세포활성도(O.D), con - : 인플루엔자 바이러스 없음, con + : 인플루엔자 바이러스 포함, cytotoxic : 타미플루의 세포독성, antiviral activity : 인플루엔자 억제효능)
- 도 3는 막걸리 추출물의 인플라마좀 억제 효능을 나타낸 것으로, 인플라마좀 억제 효과는 세포 배양으로 배출된 활성형 IL-1 β 의 양을 western blot으로 검출하였다. (Sup. : 세포 배양액, Lys. : 세포내 단백질 추출물, IL-1 β : 활성형 사이토카인, pro-IL-1 β : 전구체 사이토카인.) 이때, LPS->Non은 ATP를 처리하지 않은 negative control을 의미한다.

도 4은 막걸리 추출물의 농도(0mg/mL 내지 10mg/mL)에 따른, 도2의 세포배양액(Sup.)에서 검출된 IL-1 β (활성형)의 양을 수치화한 그래프이다. 그래프의 검은색 막대는 ATP단독처리를 의미하며, 흰색 막대는 ATP와 막걸리 추출물을 복합투여했다는 의미이다.

도 5는 막걸리 추출물의 농도(0mg/mL 내지 5mg/mL)에 따른, 도2의 세포배양액(Sup.)에서 검출된 IL-1 β (활성형)의 양을 수치화한 그래프이다. 그래프의 검은색 막대는 ATP단독처리를 의미하며, 흰색 막대는 ATP와 막걸리 추출물을 복합투여했다는 의미이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

이하 본 발명을 상세히 설명한다.

단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.

<실시예 1>

막걸리 추출물 제조

시료로 사용한 막걸리(상품명:서울 장수 생막걸리)의 원료는 국내산 백미 90%, 전분당 10%를 원료로 발효시킨 것이며, 서울탁주제조협회에서 2011년 3월 제조한 것으로 10℃이하에서 냉장한 것으로, 알콜농도 6% 이었다.

시료 막걸리 1 kg에 에탄올(99.99% v/v)를 1,000 mL를 가하여 혼합하고 정치하여, 실온에서 하룻밤 추출하였다. 거친 여과지(Advantec No. 1)을 사용하여 여과하여, 여액을 모아서 55~65 ℃에서 감압농축하였다. 에탄올이 완전히 제거되면 농축액을 모아서 미세 여과지 (Advantec No. 2)로 여과하였다. 여액을 모아 pH를 측정후, 1.0 또는 0.1 mol/L의 수산화나트륨 용액(NaOH)을 사용하여 pH 7.4로 조절하였다. pH가 조정된 여액의 일부를 취하여 105℃ 증발건조법을 사용하여 고형물함량을 측정후, 증류수를 추가하여 막걸리추출물의 최종 고형물 함량이 100 mg/mL로 조정하였다.

<실시예 2>

막걸리 추출물의 세포독성 (cytotoxicity) 및 인플루엔자 바이러스 억제효과

<실시예 2-1> 세포의 분주

세포주로서 Madin-Darby Canine kidney epithelial cell (MDCK Line)을 사용하였다. 96-well plate의 각 well 에 배양액(cell growth media; MEM + 10% FSB + 100 U/mL penicillin + 0.1 mg/mL streptomycin) 100 μ L 를 넣고, 세포주(MDCK cell)을 1.5 x 10⁵ cells/ml 농도로 96-well plate에 분주한 후 세포밀도(cell confluence)가 70% - 80% 되면 사용하였다.

<실시예2-1> 세포독성 평가

세포독성을 평가하기 위해 막걸리 추출물을 10.000 mg/mL 내지 0.0015mg/mL 사이의 농도별로 처리한 후, 37℃에서 48시간 동안 5% CO₂ 배양기로 세포주를 배양하고, 생존하는 세포주를 MTT 법으로 염색하고 흡광도를 측정하였다.

막걸리 추출물의 세포독성 평가 결과는 [도 1]에서 나타내고 있다. 세포주에 막걸리 추출물을 첨가한 경우, 막걸리 추출물의 고형물함량이 희석되어 감소할수록 흡광도는 완만하게 상승하였다. 따라서 막걸리 추출물은 고형물 0.3704 mg/mL 이하에서는 세포독성이 낮은 것으로 나타났다.

<실시예 2-2> 인플루엔자 바이러스 억제 효과

[0063] 항인플루엔자 효과를 보기 위해, [도 1]과 같이 막걸리 추출물을 10.000 mg/mL 내지 0.0015mg/mL 사이의 농도별로 처리하고 H1N1(PR8) 인플루엔자 바이러스를 접종하였다. 이에 대한 대조구 실험으로 [도 2]와 같이 타미플루 (TAMIFLU, oseltamivir phosphate) 를 농도별로 처리하고 인플루엔자 바이러스를 접종하였다. 이들을 37°C에서 48시간 동안 5% CO₂ 배양기로 세포주를 배양하고, 생존하는 세포주를 MTT 법으로 염색하고 흡광도를 측정하였다.

[0064] 막걸리 추출물의 항인플루엔자 효과는 [도 1]에서 나타내고 있다. 막걸리 추출물의 농도 10.000 mg/mL 에서는 흡광도가 낮아서 살아있는 세포수가 적은 것으로 나타났다. 반면 막걸리 추출물의 고형물이 희석된 농도에서는 살아있는 세포수에 의한 흡광도가 상승하였으며, 막걸리 추출물의 고형물 농도 0.0137 mg/mL에서 흡광도는 최대치 0.9에 도달하여 인플루엔자 바이러스를 최대로 억제하는 효능을 보였다. 또한 [도 2]의 타미플루를 처리한 대조구 실험과 비교했을때, 타미플루 농도 0.0137 mg/mL에서 살아있는 세포수에 의한 흡광도는 1.2 를 보임으로서, 막걸리 추출물은 타미플루 효능의 약 75% (막걸리 추출물의 흡광도 0.9 /타미플루의 흡광도 1.2)를 보였다.

[0065] <실시예 3>

[0066] 막걸리 추출물의 항염증 효과

[0067] <실시예 3-1> 마우스 골수유래 대식세포 분리 및 배양

[0068] 마우스(C57BL/6, orient bio)를 안락사 시킨 후, 대퇴골과 경골을 분리한다. 분리된 뼈를 구멍 내어 주사기로 골수를 추출한다. 추출된 골수는 RBC lysis buffer (intron biotech, Seoul, Korea) 5ml을 넣어 적혈구를 파괴시켰다. 적혈구가 제거된 골수 세포를 L929 (한국세포주은행) 배양약 30%가 첨가된 DMEM (10% FBS)에서 1주일간 대식세포로 분화시켰다. 대식세포 (10⁶ cells)를 12-well-plate에 후 배양후, 인플라마좀 활성 실험을 수행하였다.

[0069] <실시예 3-2> 인플라마좀 활성 평가

[0070] 대표적 염증 매개 단백질인 인플라마좀 활성 억제 효과를 관찰하기 위해 인위적인 인플라마좀 (NLRP3 inflammasome) 활성제인 Adenosine triphosphate (ATP, invivogen, Sandiego, CA, USA) 2mM를 골수유래대식세포 (Bone Marrow Derived Macrophages, BMDM) 에 처리한 후, 막걸리 추출물에 의한 인플라마좀 활성제인 IL-1β의 세포 배출량을 측정하여 평가하였다.

[0071] 골수유래 대식세포에 LPS (10ug/ml, Sigma-aldrich)를 3시간 처리하여 IL-1β 전구체 (pro-IL-1β)를 생성시켰다. 그 후 RMP1 (Wellgene, Seoul, Korea)에 인플라마좀 활성 약물인 ATP (2mM) 및 막걸리 추출물을 동시에 1시간 처리한 후, 그 배양액을 수집한다. 또한 세포내 단백질을 추출하였다.

[0072] 수집된 배양액과 세포내 단백질을 PAGE-gel (16% or 10%)에서 전기 영동하였다. 그 후, PVDF membrane (Pall Corporation, USA)로 단백질을 옮긴다. Membrane을 3% 탈지분유에 항체가 (IL-1β [R&D system] 또는 Actin [Santa cruz biotech], 1:1000)들어 있는 용액에서 하루 저녁 교반 배양하였다. 다음 날, PBS를 이용하여 세척한 후, HRP가 붙어 있는 이차항체 (Santa cruz biotech, 1: 10,000) 용액에서 3시간 배양하였다. 반응이 끝난 후, membrane은 PBS를 이용하여 세척하고 ECL solution (Philekore)과 반응시켜 발광분석장치 (Ez-Capture, Atto)를 이용하여 분석하였다.

[0073] [도 3],[도 4]및[도 5]에서 보는 바와 같이, 본 발명의 막걸리 추출물은 농도가 2.5mg/ml 이상 일때 인플라마좀을 효과적으로 억제하는 것으로 나타났다.

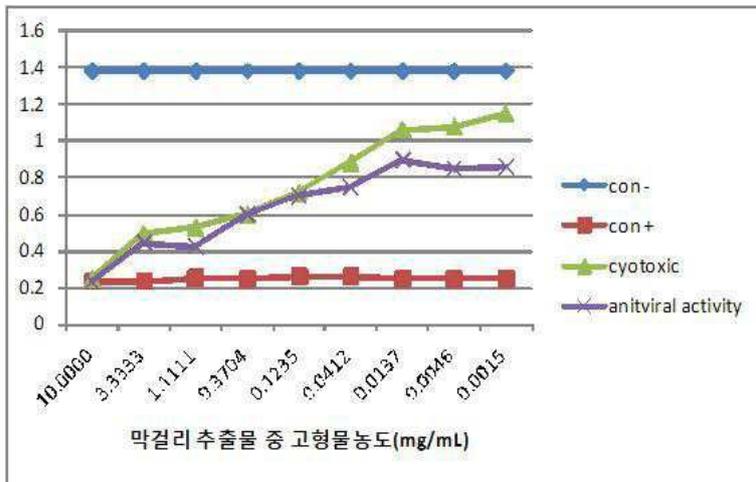
산업상 이용가능성

[0074]

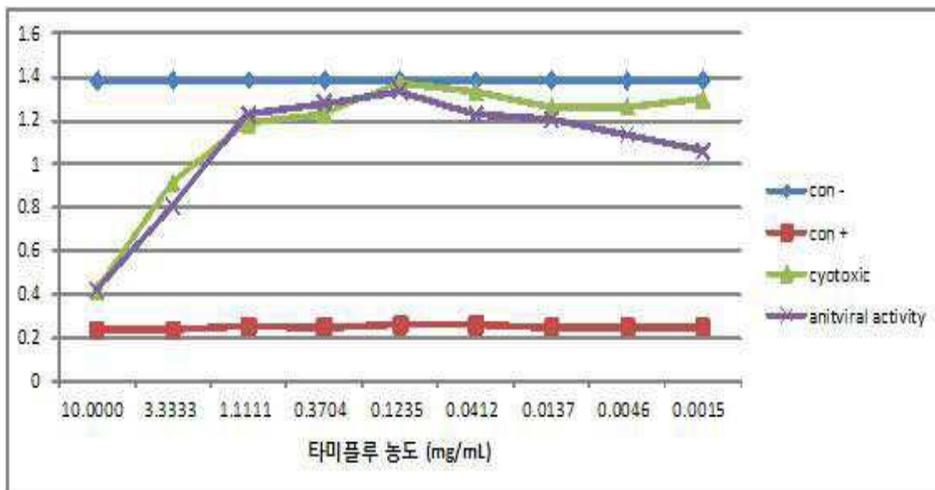
이에 따라 본 발명은 막걸리 추출물의 항인플루엔자 바이러스 및 항염증 효과에 대한 것으로, 더욱 상세하게는 막걸리 추출물을 유효 성분으로 포함하는 인플루엔자 바이러스 감염 및 염증성 질환 예방 및 치료용 약학적 조성물 및 건강 기능성 식품 조성물을 제공한다. 본 발명은 막걸리 추출물의 항바이러스 및 항염증 효과를 이용하여 인플루엔자 바이러스 감염 및 염증성 질환을 예방, 개선 및 치료하는데 탁월한 효과가 있어 산업상 이용 가능성이 높다.

도면

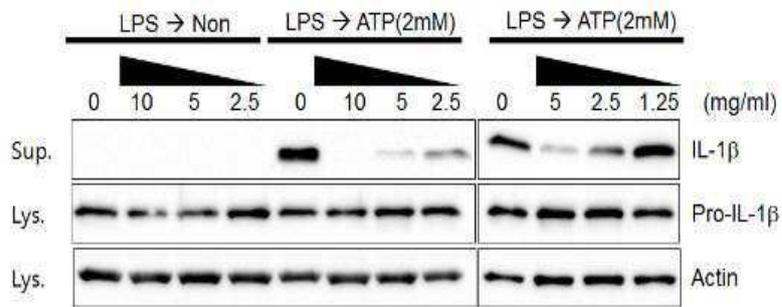
도면1



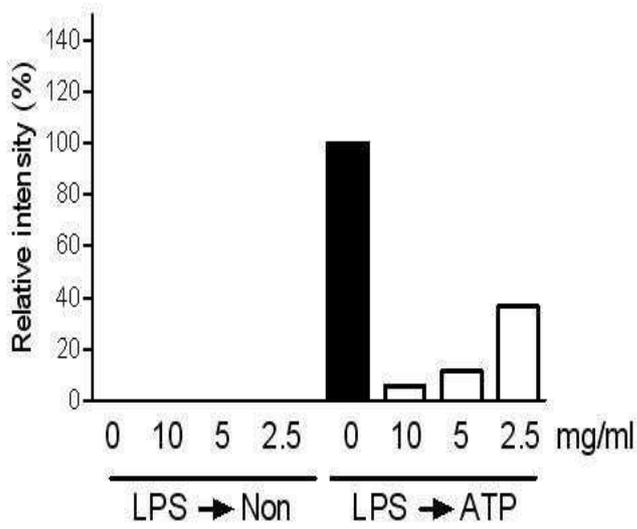
도면2



도면3



도면4



도면5

