



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2018년11월30일
 (11) 등록번호 10-1924159
 (24) 등록일자 2018년11월26일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 36/9066 (2006.01) *A23L 33/105* (2016.01)
A61K 31/12 (2006.01) *A61K 8/35* (2006.01)
A61K 8/97 (2017.01) *A61Q 19/00* (2006.01)

(52) CPC특허분류
A61K 36/9066 (2013.01)
A23L 33/105 (2016.08)

(21) 출원번호 10-2017-0049391

(22) 출원일자 2017년04월17일

심사청구일자 2017년04월17일

(65) 공개번호 10-2017-0118624

(43) 공개일자 2017년10월25일

(30) 우선권주장
 1020160046012 2016년04월15일 대한민국(KR)

(56) 선행기술조사문헌
 KR1020130014451 A*
 US20120329738 A1
 WO2013019049 A1

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
 서울대학교산학협력단
 서울특별시 관악구 관악로 1 (신림동)

(72) 발명자
김도만
 강원도 평창군 대화면 평창대로 1447-1, 서울대학교 평창캠퍼스 320동 101호

최상호
 경기도 양평군 양서면 옛재길 59-11
 (뒷면에 계속)

(74) 대리인
 김태선

전체 청구항 수 : 총 8 항

심사관 : 박수진

(54) 발명의 명칭 스테비올 배당체를 이용한 수용성이 증가된 커큐미노이드의 추출 방법 및 이에 의하여 추출된 수용성이 증가된 커큐미노이드

(57) 요약

본 발명은 스테비올 배당체를 이용한 수용성이 증가된 커큐미노이드의 추출 방법 및 이에 의하여 추출된 수용성이 증가된 커큐미노이드에 관한 것이다.

본 발명의 스테비올 배당체를 이용한 수용성이 증가된 커큐미노이드의 추출 방법에 의하여 추출된 수용성이 증가된 커큐미노이드는 본래 난용성 소재인 커큐미노이드의 수용성 용매에 대한 용해성이 개선될 뿐만 아니라, 수용성 용매에 용해된 커큐미노이드는 커큐미노이드의 원래 효과, 예를 들면 항산화 작용 및 혈당 상승 억제 작용을 효과를 충분히 얻을 수 있으므로, 식품, 의약품 그리고 화장품의 소재로서 유용하게 사용될 수 있다.

대표도 - 도1



- (52) CPC특허분류
A61K 31/12 (2013.01)
A61K 8/35 (2013.01)
A61K 8/97 (2013.01)
A61Q 19/00 (2013.01)
A23V 2002/00 (2013.01)
A23V 2200/30 (2013.01)
A23V 2250/2112 (2013.01)

시진범

대구광역시 달서구 상화북로43길 63 (상인동)

장태수

경기도 수원시 영통구 도청로 65, 5411동 3303호(이의동, 자연엔 힐스테이트)

(72) 발명자

탄한

강원도 평창군 대화면 평창대로 1447-1, 서울대학교 평창캠퍼스 302동 302호

유신혜

강원도 강릉시 원대로128번길 14, 101동 106호 (교동, 현대 하이빌 아파트)

임희정

경기도 성남시 분당구 미금일로 122, 601동 402호 (구미동, 까치마을건영빌라)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 015R1D1A1A01056929
 부처명 교육과학기술부
 연구관리전문기관 한국연구재단
 연구사업명 이공학개인지초연구사업
 연구과제명 난수용성 천연소재의 생물학적 수용화와 강화된 기능 개발 연구
 기여율 60/100
 주관기관 서울대학교
 연구기간 2016.11.01 ~ 2017.10.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 710002076HD230
 부처명 농림축산식품부
 연구관리전문기관 농림수산식품기술기획평가원
 연구사업명 농림축산식품연구센터지원사업
 연구과제명 전통식품 유래 미생물의 생물전환 기능 활용 식품 안전소재 개발 및 생산
 기여율 20/100
 주관기관 서울대학교
 연구기간 2016.09.01 ~ 2017.08.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 116013031HD020
 부처명 산업통상자원부
 연구관리전문기관 한국산업기술진흥원
 연구사업명 경제협력권산업육성사업 지역주도형 R&D
 연구과제명 천연물 소재를 활용한 심신안정 및 노인성 질환 완화를 위한 제품개발 및 헬스테인먼트 연
 동 프로그램 개발
 기여율 20/100
 주관기관 서울대학교
 연구기간 2016.10.01 ~ 2017.09.30

명세서

청구범위

청구항 1

- (i) 커큐민 포함 원재료에 에탄올을 혼합한 용액과 스테비올 배당체에 에탄올을 혼합한 용액을 혼합하는 단계;
 - (ii) 상기 혼합물을 에탄올에 용해시키는 단계;
 - (iii) 원심분리시키는 단계;
 - (iv) 상층액을 분리 제거하는 단계;
 - (v) 분리된 상층액에 포함된 에탄올을 제거하여 분말을 수득하는 단계; 및
 - (vi) 상기 수득한 분말을 증류수에 녹인 후, 원심분리하여 상층액으로부터 커큐미노이드를 추출하는 단계; 를 포함하는 스테비올 배당체를 이용한 수용성이 증가된 커큐미노이드의 추출 방법에 관한 것으로,
- 상기 스테비올 배당체는 스테비오사이드(stevioside), 리바우디오사이드 A, 리바우디오사이드 B, 리바우디오사이드 C, 리바우디오사이드 D, 리바우디오사이드 E, 루부소사이드, 돌코사이드 A, 스테비올사이드 및 이들의 혼합물로 이루어진 그룹에서 선택되는 것인,
- 스테비올 배당체를 이용한 수용성이 증가된 커큐미노이드의 추출 방법.

청구항 2

- 제 1 항에 있어서,
- 상기 커큐민 포함 원재료는 울금 또는 강황인 것인
- 스테비올 배당체를 이용한 수용성이 증가된 커큐미노이드의 추출 방법.

청구항 3

삭제

청구항 4

- 제 1 항에 있어서,
- 상기 커큐민 포함 원재료와 스테비올 배당체의 혼합물을 에탄올에 용해시 상기 스테비올 배당체의 농도는 5-10% (w/v)인 것인
- 스테비올 배당체를 이용한 수용성이 증가된 커큐미노이드의 추출 방법.

청구항 5

- 제 1 항에 있어서,
- 상기 커큐민 포함 원재료와 스테비올 배당체의 혼합물을 에탄올에 용해시 상기 스테비올 배당체는 정제된 것이거나 효소 반응산물인 것인
- 스테비올 배당체를 이용한 수용성이 증가된 커큐미노이드의 추출 방법.

청구항 6

제 1 항에 있어서,

상기 커큐민 포함 원재료와 스테비올 배당체의 혼합물을 에탄올에 용해시 상기 에탄올의 농도는 80 내지 90 % 인 것인

스테비올 배당체를 이용한 수용성이 증가된 커큐미노이드의 추출 방법.

청구항 7

삭제

청구항 8

제1항, 제2항, 및 제4항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 커큐미노이드의 입자 크기는 2 내지 120 nm 인 것인

스테비올 배당체를 이용한 수용성이 증가된 커큐미노이드의 추출 방법.

청구항 9

제1항, 제2항, 및 제4항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 커큐미노이드는 혈당 상승 저해 특성을 나타내는 것인

스테비올 배당체를 이용한 수용성이 증가된 커큐미노이드의 추출 방법.

청구항 10

제1항, 제2항, 및 제4항 내지 제6항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 커큐미노이드는 헵기열 바이러스의 활성 저해 특성을 나타내는 것인

스테비올 배당체를 이용한 수용성이 증가된 커큐미노이드의 추출 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 스테비올 배당체를 이용한 수용성이 증가된 커큐미노이드의 추출 방법 및 이에 의하여 추출된 수용성이 증가된 커큐미노이드에 관한 것이다. 본 발명의 스테비올 배당체를 이용한 수용성이 증가된 커큐미노이드의 추출 방법에 의하여 추출된 수용성이 증가된 커큐미노이드는 본래 난용성 소재인 커큐미노이드의 수용성 용매에 대한 용해성이 개선될 뿐만 아니라, 물에 용해된 커큐미노이드는 수용액 내에서 커큐미노이드의 원래 효과, 예를 들면 항산화 작용 및 혈당 상승 억제 작용을 효과를 충분히 얻을 수 있으므로, 식품, 의약품 그리고 화장품의 소재로서 유용하게 사용될 수 있다.

배경 기술

[0003] 커큐미노이드는 동인도산의 생강과에 속하는 식물인 *Curcuma longa* Linn(Zingiberaceae)의 뿌리에서 추출된 폴리페놀 성분의 노란색 향신료로 aromatic methoxy phenol groups, α , β -unsaturated β -diketo linker, 케토-엔올 상호변이성(keto-enol tautomerism) 등 세 가지 주요 화학기능으로 인하여 신경계 보호, 항당뇨, 항암, 심장계 보호 등 복합표적(multi-targeted) 생체기능성을 갖고 있어 다양한 만성질환에 대한 치료제나 예방제의 소재로서 식품뿐 아니라 의학계에서 활발한 연구개발이 진행되고 있다.

[0004] 그러나, 커큐민은 물을 기준으로 ml 당 0.1 mg 미만, 구체적으로는 11~600 ng/ml의 용해도를 갖는 난용성 물질로서, 일반적으로 물질은 용해되어 있는 상태에서 생리작용을 나타낼 수 있으므로 가용화는 그 효과에 밀접한 관계를 가지며, 이는 그 물질의 이용에 있어 중요한 성질이다. 그렇기에 커큐민과 같은 난용성 물질의 경우에는 가용화가 필수적이다.

[0005] 또한 일반적으로 커큐미노이드는 pH 7.2 이상의 알칼리 조건에서 매우 불안정하여 30분 가량 보관하면 90% 이상 분해되고(Stability of curcumin in buffer solutions and characterization of its degradation products. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 15, 1867-1876), 산성 조건에서는 물에 녹지를 얹으면서 쉽게 분해가 되는 것으로 알려져 있으며(Kinetics of alkaline degradation of the food pigments curcumin and curcuminoids. *Journal of Food Science*, 62, 267-269), pH 7.4에서 10분 뒤 90%의 커큐미노이드가 분해된다는 연구 결과도 있다.

[0006] 또한 일반적으로 커큐미노이드는 체내에서도 낮은 장내 투과도를 보인다. 커큐미노이드의 겔보기 세포 투과도는 약 3×10^{-6} cm/s로서 매우 낮은데 이러한 낮은 투과도는 10% 이상의 커큐미노이드가 세포투과 중 대사되어 분해되며 20% 이상이 세포 내에 축적되어 버리기 때문인 것으로 알려져 있다.

[0007] 이와 같은 이유로 인하여 구강 섭취의 경우, 커큐미노이드 생체 이용률 (bioavailability)은 1% 미만인 것으로 알려져 있어 이용성을 증가시키기 위한 다양한 방법이 연구 및 제시되고 있다. 대한민국 등록특허 10-1258537에서는 수용성 및 안정성을 개선한 신규 커큐민 유도체를 개시하고 있으나, 이는 여러 단계를 통한 화학적 합성을 거친다는 점에서 상업적 효율성에 한계가 있다고 할 수 있다.

[0008] 울금 (강황; *Curcuma longa* L.)은 생강과에 속하는 향신료 및 천연색소로서 전통적으로 안전하게 사용되어온 식품소재이다. 치매예방, 간질환, 우울증, 위장질환 치료, 숙취해소, 변비예방 목적으로 전통적으로 인도를 비롯한 아시아에서 널리 사용되어 왔으며 한약재의 주요 소재로서 사용되고 있다. 항염, 혈당상승억제, 항산화, 항균, 항암 작용을 하며, 심혈관 질환, 대사질환, 자가 면역질환 등 다양한 생리활성효과가 있는 것으로 알려져 있기 때문에 캡슐, 연고, 에너지 음료, 생활용품, 화장품 등 다양한 제품의 소재로 활용되고 있다. 또한, 최근에는 알츠하이머, 뇌손상 보호, 혈관성 치매, 당뇨 등에 효과가 있는 것으로 알려지는 등 기능성 소재로서 주목 받고 있다. 이러한 효능을 나타내는 이유는 울금의 노란색 색소성분인 커큐미노이드(curcuminoid) 때문이며, 그 주요 성분은 커큐민(curcumin)으로 알려져 있다.

[0009] 커큐미노이드(curcuminoid)는 강황(울금)의 뿌리에 2-6% 함유되어 있으며, 그 대부분은 커큐민으로 구성되어 있으나 약 17%의 디메톡시 커큐민(demethoxy curcumin)과 3%의 비스디메톡시 커큐민(bisdemethoxy curcumin) 형태로도 포함된다. 식약처에서는 커큐마 룡가의 뿌리 줄기를 강황, 덩이뿌리를 울금으로 규정하고 있다. 즉, 강황과 울금은 같은 식물의 뿌리이지만, 줄기와 이어져 있는 뿌리를 강황, 강황 아래쪽으로 이어져 작게 달려 있는 것을 울금이라고 한다.

[0010] 한편, 스테비올 배당체는 천연첨가물로 분류되는 감미료로, 국화과 스테비아의 잎에서 추출하여 제조된다. 감미도는 설탕의 약 200~300배이다. 스테비아는 남미의 파라과이 원산 식물로, 현지인들은 오래전부터 건조한 잎을 감미제로 이용하여 왔다. 현재 저칼로리식품, 탄산음료, 과자, 절임 식품 등에 사용되고 있다. JECFA(합동식품첨가물 전문가위원회)에서 안전성 평가 결과, 1일 섭취허용량(ADI)은 0~4mg/kg·체중/일(스테비올)로 설정되어 있다. 스테비올 배당체의 종류로는 스테비오사이드(stevioside), 리바우디오사이드(rebaudioside), 돌코사이드(dulcoside), 루부소사이드(rubusoside), 스테비올사이드(steviolside) 등이 존재한다.

[0011] 선행문헌

[0012] 1. 대한민국 등록특허 10-1258537

[0013] 2. 대한민국 공개특허 10-2015-64234

발명의 내용

[0015] 본 발명자들은 스테비올 배당체를 이용하여 커큐미노이드를 추출하는 경우 수용성 용매에 대한 커큐미노이드의 수용해성이 현저히 개선되어 직접 추출될 수 있음을 발견하고, 본 발명을 완성하였다.

[0017] 일 구현예에 따르면,

[0018] (a) 커큐민 포함 원재료와 스테비올 배당체를 혼합하는 단계;

- [0019] (b) 상기 혼합물을 에탄올에 용해시키고 교반하는 단계;
- [0020] (c) 상기 에탄올에 용해된 혼합물을 원심분리시키는 단계;
- [0021] (d) 상층액을 분리 제거하는 단계; 및
- [0022] (e) 분리된 상층액에 포함된 에탄올을 제거하여 커큐미노이드를 수득하는 단계; 를 포함하는 스테비올 배당체를 이용한 수용성이 증가된 커큐미노이드의 추출 방법이 개시된다.
- [0023] 본 발명에서 "용해"는 물에 완전히 녹는 상태뿐만 아니라 미셀 등에 의한 가용화 상태, 또는 수성 용매 중에 균일하게 분산되어 육안으로 투명한 액의 상태를 포함하며, 각 물질의 용해도 측정에 일반적으로 사용되는 시험 방법으로 측정되는 상태를 의미한다.
- [0024] 본 발명에서 "수용성이 증가된"의 의미는 증류수 등과 같은 수용성 용매에 대한 용해도가 증가되었다는 것을 의미한다. 본 발명에서 "수용성이 증가된" 커큐미노이드는 커큐미노이드와 스테비올 배당체의 복합체를 의미하며, 커큐미노이드와 스테비올 배당체의 복합체는 상기와 같이 에탄올에 스테비올 배당체와 혼합 후 원심분리하는 추출 과정을 통해 커큐미노이드와 스테비올 배당체 사이에 명확한 공유결합이 형성되지는 않으나, 분자간 결합에 의해 물리적으로 일정구조를 형성하는 상태를 의미한다.
- [0025] 본 발명에 따른 스테비올 배당체를 이용한 수용성이 증가된 커큐미노이드의 추출 방법에 의해서 상기 울금 또는 강황으로부터 추출되는 커큐미노이드는 소재는 15% 이상, 50% 이상, 60% 이상, 80% 이상 수용화되거나 실질적으로 전부 수용상태가 될 수 있다.
- [0026] 본 발명에 따른 스테비올 배당체를 이용한 수용성이 증가된 커큐미노이드의 추출 방법에 있어서, 상기 커큐민 포함 원재료는 울금 또는 강황 일 수 있다. 식약처에서는 커큐마 룡가의 뿌리 줄기를 강황, 덩이뿌리를 울금으로 규정하고 있다. 즉, 강황과 울금은 같은 식물의 뿌리이지만, 줄기와 이어져 있는 뿌리를 강황, 강황 아래쪽으로 이어져 작게 달려 있는 것을 울금이라고 한다.
- [0027] 본 발명에 따른 스테비올 배당체를 이용한 수용성이 증가된 커큐미노이드의 추출 방법에 있어서, 상기 울금 또는 강황은 분말 상태거나, 원재료 그대로의 상태를 모두 이용하는 것이 가능하다. 울금 또는 강황의 분말은 생울금 또는 강황을 분쇄시켜서 제조되며, 제조 방법이 특별히 제한되는 것은 아니다.
- [0028] 본 발명에 따른 스테비올 배당체를 이용한 수용성이 증가된 커큐미노이드의 추출 방법에 있어서, 에탄올에 용해되는 울금은 농도가 40% (w/v) 이하인 것이 바람직하다. 울금의 농도가 40% (w/v)를 초과하는 경우, 울금의 함량 증가에 따른 커큐미노이드의 추출량의 유의적인 차이가 존재하지 않는다.
- [0029] 본 발명에 따른 스테비올 배당체를 이용한 수용성이 증가된 커큐미노이드의 추출 방법에 있어서, 상기 스테비올 배당체는 스테비오사이드 (stevioside), 리바우디오사이드 A, 리바우디오사이드 B, 리바우디오사이드 C, 리바우디오사이드 D, 리바우디오사이드 E, 루부소사이드, 돌코사이드 A, 스테비올사이드 또는 이들의 혼합물일 수 있다.
- [0030] 본 발명에 따른 스테비올 배당체를 이용한 수용성이 증가된 커큐미노이드의 추출 방법에 있어서, 에탄올에 용해되는 스테비올 배당체의 농도는 5-10%(w/v)일 수 있다. 바람직하기는, 상기 스테비올 배당체의 농도는 8%(w/v)일 수 있다.
- [0031] 본 발명에 따른 스테비올 배당체를 이용한 수용성이 증가된 커큐미노이드의 추출 방법에 있어서, 상기 스테비올 배당체는 정제된 것이거나 효소 반응산물인 것일 수 있다. 즉, 본발명에 있어서, 스테비올 배당체 자체를 사용하거나, 스테비올 배당체 효소 반응액을 모두 사용하는 것이 가능하다. 일 구현예에 따르면, 상기 효소는 락타아제인 것이 가능하다.
- [0032] 본 발명에 따른 스테비올 배당체를 이용한 수용성이 증가된 커큐미노이드의 추출 방법에 있어서, 상기 에탄올은 80 내지 90 % 에탄올 용액을 나타내는 것일 수 있다.
- [0033] 본 발명에 따른 스테비올 배당체를 이용한 수용성이 증가된 커큐미노이드의 추출 방법에 있어서, 상기 혼합물을 에탄올에 용해시키고 교반하는 단계는 10분 내지 20분 동안 수행될 수 있다. 상기 혼합시간이 10분 이하일 경우 복합체 형성을 위한 충분한 반응이 일어나지 못하며, 상기 혼합 시간이 20분 이상일 경우 불필요한 혼합과정으로 반응효율이 저하될 수 있다.
- [0034] 본 발명은 또한, 본 발명에 따른 스테비올 배당체를 이용한 수용성이 증가된 커큐미노이드의 추출 방법에 의하

여 추출된 커큐미노이드를 제공한다.

- [0035] 본 발명에 따른 스테비올 배당체를 이용하여 추출된 수용성이 증가된 커큐미노이드는 의약품, 동물용 의약품, 의약부외품, 화장품 및 농약 중 어느 하나의 유효 성분이 되는 물질 또는 식품 첨가물일 수 있다.
- [0036] 본 발명에 의한 추출 방법에 의하여 추출된 수용성이 증가된 커큐미노이드는 항산화 작용 및/또는 혈당상승 억제 작용 효과를 가질 수 있다.
- [0037] 본 발명에 의한 추출 방법에 의하여 추출된 수용성이 증가된 커큐미노이드는 땀기열 바이러스의 활성 저해 특성을 가질 수 있다.
- [0038] 본 발명에 의한 추출 방법에 의하여 추출된 수용성이 증가된 커큐미노이드는 수용성 용매에 대한 용해성이 개선되어 원래 커큐미노이드가 발휘하지 못했던 효과를 충분히 얻을 수 있다. 또한, 본 발명의 커큐미노이드의 수용해성 개선 방법은 생산성, 비용의 측면에서 우위에 있으며, 작업자의 안전성이 우수하고, 공업적 이용가치가 높다.

도면의 간단한 설명

- [0040] 도 1은 본 발명의 일 실시예에서 추출된 커큐미노이드의 용해도를 측정한 결과를 나타낸다.
- 도 2는 본 발명의 일 실시예에서 추출된 커큐미노이드를 용해시킨 수용액에 대한 얇은 막크로마토그래피 결과를 나타낸다.
- 도 3은 본 발명의 일 실시예에서 에탄올 용액 중 물의 양에 따른 수용화된 커큐미노이드의 추출 효율을 나타낸다.
- 도 4는 본 발명의 일 실시예에서 첨가되는 스테비올 배당체의 농도에 따른 수용화된 커큐미노이드의 추출 효율을 나타낸다.
- 도 5 및 6은 본 발명의 일 실시예에서 첨가되는 울금의 농도에 따른 수용화된 커큐미노이드의 추출 효율을 나타낸다.
- 도 7 및 도 8은 본 발명의 일 실시예에서 추출된 커큐미노이드의 DPPH 활성을 측정한 결과를 나타낸다.
- 도 9는 본 발명의 일 실시예에 의하여 추출된 커큐미노이드 입자의 크기를 측정한 결과를 나타낸다.
- 도 10은 본 발명의 일 실시예에 의하여 추출된 커큐미노이드 투여 후 시간별 혈당의 변화를 나타낸다.
- 도 11은 본 발명의 일 실시예에 의하여 추출된 커큐미노이드의 땀기 바이러스의 활성 저해 정도를 측정한 결과를 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0041] 이하, 발명의 이해를 돕기 위해 다양한 실시예를 제시한다. 하기 실시예는 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐 발명의 보호범위가 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.
- [0043] **<실시예 1> 스테비올 배당체를 이용한 울금의 추출**
- [0044] 울금 가루 300 mg을 에탄올 1 ml 에 용해시켜서 30% 울금 에탄올 용액을 제조하고, 스테비올 배당체로서 스테비오사이드와 리바우디오사이드 각각 100 mg을 에탄올 1 ml 에 용해시켜서 10% w/v 농도의 스테비올 배당체 에탄올 용액을 제조하였다.
- [0045] 상기 용액을 혼합하여 스테비오 사이드와 울금 가루를 혼합한 경우(Tum-Ste), 및 리바우디오사이드와 울금 가루를 혼합한 경우(Tum-RebA)를 각각 에펜도르프 튜브에 넣고, 에탄올 용액을 넣어 충분히 교반하였다.
- [0046] 교반된 용액을 12,000 rpm에서 10 분 동안 원심분리하고, 상층의 맑은 액을 다른 에펜도르프 튜브에 옮긴 후, 에탄올을 증발시켜서 분말 상태로 수득하였다.
- [0047] 비교예로서 울금가루를 증류수로만 녹이는 경우(Tum-Water)와 울금 가루를 100% 에탄올만으로 녹이는 경우(Tum-Ethanol)를 같은 과정을 통해 준비하고, 상층의 맑은 액을 회수하여 에탄올을 증발시키고, 남은 것을 다시 물(Tum-Water의 경우) 혹은 에탄올(Tum-Ethanol의 경우)에 녹여 준비하였다.
- [0048] **<실험예 1> 추출된 커큐미노이드의 수용해도 측정**

[0049] 에탄올을 증발시키고 남은 울금 가루를 수용성 용매로서 1 ml 증류수(Tum-Ste, Tum-RebA, Tum-SG의 경우)에 녹이고, 12,000 rpm 으로 10 분 동안 원심분리하고, 맑은 상등액은 0.20 μm membrane 필터(Agilent, Santa clara, CA, USA)를 이용하여 상층의 용액만 회수 하여 울금의 용해 여부를 육안으로 확인하고 그 결과를 도 1에 나타내었다.

[0050] 도 1은 각각 다음과 같다.

[0051] Ste: Stevioside 수용액

[0052] RebA: Rebaudioside A 수용액

[0053] SG: Steviol glycoside(스테비올 배당체) 수용액

[0054] Tume-Ste: 울금 가루를 스테비오사이드와 함께 에탄올에 녹이고, 이후 에탄올을 증발시켜 얻은 추출물을 물에 녹인 시료

[0055] Tum-RebA: 울금 가루를 리바우디오사이드 A와 함께 에탄올에 녹이고, 이후 에탄올을 증발시켜 얻은 추출물을 물에 녹인 시료

[0056] Tume-SG: 울금 가루를 스테비올 배당체와 함께 에탄올에 녹이고, 이후 에탄올을 증발시켜 얻은 추출물을 물에 녹인 시료

[0057] Tum-water: 울금 가루를 에탄올로 추출하고 이후 에탄올을 증발시켜 얻은 추출물을 물에 녹인 시료

[0058] Tum-Ethanol: 울금가루를 에탄올로 추출하고 이후 에탄올을 증발시켜 얻은 추출물을 에탄올에 녹인 시료

[0059] 도 1에서 보는 바와 같이 울금이 물에서는 거의 용해되지 않으나, 에탄올에는 녹는 것이 있고(Tum-Ethanol), 스테비오사이드, 리바우디오사이드 및 스테비올 배당체를 처리하여 준비한 것은 물에 잘 용해됨이 관찰되었다. 특히, 도 1에서 보는 바와 같이 에탄올 만을 처리(Tum-Ethanol)한 경우에 비해 스테비오사이드(Tum-Ste), 리바우디오사이드(Tum-RebA) 및 스테비올 배당체(Tum-SG)를 혼합하여 에탄올과 함께 처리한 경우 수용성 용매인 물에 대한 울금의 용해가 잘 이루어졌음이 확인되었다.

[0060] <실험예 2> 크로마토그래피 측정

[0061] 에탄올을 증발시키고 남은 울금 가루를 수용성 용매로서 1 ml 증류수(Tum-Ste, Tum-RebA, Tum-SG의 경우)에 녹이고, 12,000 rpm 으로 10 분 동안 원심분리하고, 맑은 상등액은 0.20 μm membrane 필터(Agilent, Santa clara, CA, USA)를 이용하여 상층의 용액만 회수하여 용매를 증발시켜서 용해도가 증가된 커큐민을 수득하였다.

[0062] 상기와 같이 얻어진 커큐민이 수용액에 대한 용해도가 증가되었는지 여부를 관찰하기 위하여 얇은막 크로마토그래피(TLC)를 수행하였다. 전개용매로는 acetonitrile/water 85:15 (v/v)을 이용하여 UV254nm 파장에서 확인하고, TLC plate를 다시 메탄올에 0.5 (w/v) N-(1-Naphthyl) ethylenediamine dihydrochloride 와 5% (w/v) sulfuric acid 를 녹여 준비한 발색 시약에 담근 후 90℃에서 3 min 간 처리하였다.

[0063] 그 결과, 도 2에서 보는 바와 같이 에탄올 처리 후 수용성이 증가된 물질이 확인되었으며, 스테비올 배당체, 리바우디오사이드 A 또는 스테비오사이드를 에탄올과 함께 처리한 경우 에탄올 만을 처리한 경우에 비해 수용화가 더욱 증가한다는 것이 확인되었다 (도 2). (Lane 1: Tum-Ethanol, Lane2: Tum-Ste, Lane 3: Tum-RebA, Lane 4: Tum-SG)

[0064] <실시예 2> 용액 농도에 따른 커큐미노이드의 추출 효율 비교

[0065] 실시예 1에서 울금 가루와 같이 스테비오사이드, 리바우디오사이드 및 스테비올 배당체 혼합물에 넣어준 에탄올 용액의 농도에 따라서 최종 얻어진 수용화된 추출물에 들어 있는 커큐미노이드의 양과 추출 수율을 하기 식1을 통해 계산하고 그 결과를 표 1에 나타내었다.

[0066] 식 1

$$\text{커큐미노이드수율 (\%)} = \frac{\text{추출된 커큐미노이드 중량 (mg)}}{\text{사용한 울금 중량 (mg)}} \times 100$$

[0067]

표 1

[0068]

울금 추출 과정에서 물의 양* (%, v/v)	스테비오사이드 이용 수용 화 커큐미노이드 (mg/g turmeric extraction)	리바우디오사이드 이용 수 용화 커큐미노이드 (mg/g turmeric extraction)	스테비올 배당체 이용 수용 화 커큐미노이드 (mg/g turmeric extraction)
0	33.4±1.3	17.0±1.2	18.1±0.6
10	30.0±2.5	26.8±1.6	23.1±.9
20	29.8±2.0	25.5±1.0	23.0±1.8
30	28.9±1.7	24.3±1.6	17.3±0.8
40	25.1±2.5	19.7±0.6	16.2±0.6
50	24.0±1.4	18.1±1.7	16.1±0.8
60	19.2±0.9	11.2±1.2	14.2±0.5
80	14.6±0.7	13.5±0.6	8.7±0.2

[0069]

*: 울금 가루와 스테비올 배당체의 혼합물에 첨가되는 에탄올 용액 중 물의 양을 나타낸다 (예를 들면, 물 0%는 100% 에탄올을 사용하였고, 물 80%는 20% 에탄올을 사용하였다).

[0070]

그 결과, 스테비오사이드를 이용하여 커큐미노이드를 추출할 때는 사용되는 물의 함량을 최소화할수록 추출 수율이 높아지며, 리바우디오사이드는 10%의 물을 포함할 때(즉, 90% 에탄올 용액을 사용할 때), 및 스테비올 배당체도 10 내지 20%의 물을 포함할 때(즉, 80% 내지 90% 에탄올 용액을 사용하는 경우) 추출 수율이 가장 좋은 것으로 나타났다.

[0071]

울금의 추출을 위해 사용된 3가지 추출용 소재 중에서는 스테비오사이드가 가장 좋은 수율을 보여주는 것으로 나타났다(도 3).

[0072]

<실시예 3> 스테비올 배당체의 첨가농도에 따른 커큐미노이드의 추출 효율 비교

[0073]

실시예 1에서 울금 추출시 혼합되는 스테비올 배당체의 혼합 비율에 따른 수용화된 커큐미노이드의 양을 계산하고 그 결과를 표 2에 나타내었다.

표 2

[0074]

스테비올 배당체의 농도 (%, v/v)	스테비오사이드 이용 수용화 커큐미노이드 (mg/g turmeric extraction)	리바우디오사이드 이용 수용 화 커큐미노이드 (mg/g turmeric extraction)	스테비올 배당체 이용 수용 화 커큐미노이드 (mg/g turmeric extraction)
0.5	0.2	0.04	0.1
1	0.8	1.7	0.4
2	6.6±0.4	6.2±0.1	2.8±0.1
3	14.0±1.1	12.1±0.4	6.4±0.5
4	19.9±1.8	17.0±1.2	9.0±0.2
5	28.1±2.6	20.9±0.7	12.5±0.8
6	27.4±1.7	24.5±1.9	16.5±1.9
8	34.5±1.4	32.4±0.2	21.1±0.3
10	33.4±1.3	17.0±1.2	18.1±0.6

[0075]

그 결과, 스테비오사이드, 리바우디오사이드 및 스테비올 배당체 모두 동일 조건하에서 8%의 농도로 사용할 때 수용화 수율이 가장 좋은 것으로 확인되었다(도 4).

[0076]

<실시예 4> 울금의 농도에 따른 커큐미노이드의 추출 효율 비교

[0077]

실시예 1에서 울금 추출시 에탄올에 용해되는 울금의 농도에 따른 수용화된 커큐미노이드의 양을 계산하고 그 결과를 표 3에 나타내었다.

표 3

[0078]

울금 농도 (%, v/v)	스테비오사이드 이용 수용화 커큐미노이드		리바우디오사이드 이용 수용화 커큐미노이드		스테비올 배당체 이용 수용화 커큐미노이드	
	mg/g turmeric extraction	mg/ml	mg/g turmeric extraction	mg/ml	mg/g turmeric extraction	mg/ml
1	69.3±4.0	0.7	70.6±0.6	0.7	73.1±1.0	0.7
3	56.2±1.3	1.7	65.1±0.4	2.0	65.8±1.0	2.0
5	51.2±3.7	2.6±0.2	60.3±0.9	3.0	61.3±0.5	3.1
7.5	50.4±0.2	4.3	48.4±0.4	3.6	50.7±0.7	3.8±0.1
12.5	48.7±0.5	6.1±0.1	48.3±0.6	6.0±0.1	38.1±0.6	4.8±0.1
15	47.0±3.2	7.0±0.6	47.5±0.2	7.1	37.3±1.3	5.7±0.2
17.5	44.4±1.3	7.8±0.3	47.1±1.4	8.2±0.2	31.8±0.6	5.6±0.2
20	38.1±0.8	7.6±0.2	45.8±0.9	9.2±0.2	30.8±1.2	6.2±0.2
25	34.7±0.1	8.7	36.2±0.5	9.2±0.1	25.2±0.2	6.3
30	34.5±1.4	9.6±0.6	32.6±0.5	9.7±0.1	22.3±0.3	6.7±0.4
35	32.3±2.6	11.3±1.1	27.7±0.1	9.7	17.0±1.1	5.9±0.4
40	24.8±0.8	9.9±0.4	12.6±1.9	5.0±0.7	11.4±1.0	4.6±0.4

[0079]

다른 조건이 동일할 경우 스테비오사이드, 리바우디오사이드 및 스테비올 배당체 모두 에탄올에 첨가되는 울금의 농도가 1% 일 때 수용화 수율이 가장 좋은 것으로 나타났다(도 5).

[0080]

한편, 에탄올에 첨가되는 울금의 농도가 30-35%인 경우 가장 많은 양의 커큐미노이드가 추출되었으며, 에탄올에 첨가되는 울금의 농도가 35%를 넘는 경우 울금의 농도 증가에 따른 커큐미노이드의 추출량에 있어서 유의적인 차이가 존재하지 않았다(도 6).

[0081]

<실험예 3> 추출된 커큐미노이드의 항산화 특성

[0082]

상기 실시예를 통해 추출된 커큐미노이드의 생리적 특성을 확인하기 위하여 DPPH 라디칼 소거활성(DPPH radical-scavenging activity) 측정 실험을 수행하였다.

[0083]

DPPH 라디칼 소거활성은 업계에 공지된 방법에 따라 측정하였다. DPPH 용액(45µg/ml methanol)을 상기 실시예에서 얻어진 추출물과 혼합한 다음 515nm에서 30초 간격으로 3분간 흡광도의 감소를 측정하였다.

[0084]

라디칼 소거활성은 비타민-C의 흡광도 감소를 100% 로 기준하여 계산하였으며, DPPH의 흡광도가 50% 감소할 때 나타나는 시료의 농도를 IC₅₀으로 표시하여 아래 표 4 및 도 7에 나타내었다.

표 4

[0085]

	DPPH radical-scavenging activity (IC ₅₀ (µg/ml))
커큐민 시약(DMSO 처리)	36.24±2.55
Tum-Ste	33.25±1.29
Tum-Reb	47.50±2.18
Tum-SG	64.68±2.59

[0086]

상기 표 4에서 보는 바와 같이 일반적으로 커큐미노이드는 수용화가 거의 되지 않는 것과 달리 스테비오사이드, 리바우디오사이드 및 스테비올 배당체로 추출한 수용화된 커큐미노이드는 항산화 활성을 나타냈으며, 특히 도 7에서 보는 바와 같이 스테비오사이드로 추출한 커큐미노이드의 경우 DMSO에 녹인 커큐민보다 유사하거나 다소 향상된 수준의 항산화 특성을 나타낸다는 것이 확인되었다.

[0087]

<실험예 4> 수용성이 증가된 커큐미노이드의 항산화 특성 분석

[0088]

울금 분말에서 직접 추출한 수용성 울금 추출물의 항산화 활성은 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) 라디칼 소거능 방식으로 확인하였다. 각 시료는 100 µm(DPPH)에 최종 농도가 10 ~ 500 µg이 되도록 물에 녹였다. 25 ° C에서 30분간 암실 보관 후 517 nm 로 microplate reader (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA)를 이용하여 농도를 확인하였다. Curcuminoids (≥ 94%), α-tocopherol, trolox 를 양성표준물로 이용하였고, DPPH radical-scavenging activity 는 하기 식2로 결정하고 그 결과를 도 8에 나타내었다.

[0089] 식 2

DPPH radical-scavenging activity (%) =

$$\left(\frac{\text{Absorbance of control} - \text{Absorbance of test sample}}{\text{Absorbance of control}} \right) \times 100$$

[0090]

[0091] 도 8에서 Ste, RebA, 그리고 SG로 수용화한 커큐미노이드의 SC₅₀ 값은 각각 127.6 ± 4.9, 105.4 ± 1.8, 그리고 109.8 ± 3.2 μg/ml 로 측정되었고, 비교군으로 사용한 Curcuminoids (≥ 94%), α-tocopherol, 그리고 Trolox의 SC₅₀ 값은 36.2 ± 2.6 μg/ml, 3.5 ± 0.1, 그리고 8.4 ± 0.1 μg/ml로 측정되어 본 발명에 의하여 추출된 수용성 커큐미노이드의 항산화 활성이 크게 증가된 것을 알 수 있다.

[0092] <실험예 5> 추출된 수용성 커큐미노이드의 pH 안정성 확인

[0093] 상기 실시예 1에서 추출된 수용성 커큐미노이드의 pH에 따른 안정성을 pH 6 ~ 10 조건에서 확인하였다. (사용 완충액: 50 mM Na-P - pH 6.0, pH 7.0, pH 7.5; NaOH-glycin - pH 8.0 ~ pH 10.0). 상기 실시예 1에서 추출된 2 μg의 커큐미노이드를 각각 pH 6 ~ 10에 녹여 25 °C에서 1주일간 보관하고 12,000g로 10 분간 원심분리하여 상등액을 0.20 μm membrane으로 필터링하고, 수용성 커큐미노이드의 양을 확인하였다. 커큐미노이드 양은 425 nm 에서 흡광도를 측정하여 확인하거나 TLC method 를 이용하여 결정하였다.

표 5

[0094]

pH	수용성 커큐미노이드 잔량 (%)		
	스테비오사이드 (Ste)	리바우디오사이드 A (RebA)	스테비올글루코사이드 (SG)
6.0	80.3 ± 0.4	81.6 ± 0.9	82.3 ± 2.4
7.0	87.2 ± 4.1	84.2	91.0 ± 0.9
7.5	85.3 ± 2.7	84.8 ± 0.6	93.6 ± 2.8
8.0	99.2 ± 0.4	84.1 ± 3.3	90.9 ± 0.6
10.0	100	99.1 ± 0.6	85.0 ± 0.6

[0095] pH 6.0에서 남아 있는 양에 비례한 상대적 양은 각각 80.3 ± 0.4, 81.6 ± 0.9, 그리고 82.3 ± 2.4 % 였다.

[0096] 본 발명에 의하여 추출된 수용화된 커큐미노이드는 pH가 7이상 되어도 84% 이상 유지가 되고 있어 다양한 pH에서 안정함을 확인하였다. 또한, 본 발명에서 제조된 수용화된 커큐미노이드는 넓은 pH의 수용액 내에서 안정함을 확인하였다.

[0097] <실험예 6> 수용화한 커큐미노이드의 입자 크기 분석

[0098] 수용화한 커큐미노이드 복합체 (스테비오사이드 등과의 복합체)의 입자 크기를 분석하기 위해서 상기 실시예 1에서 제조된 스테비오사이드, 리바우디오사이드, 스테비올글루코사이드 커큐미노이드-스테비오사이드 복합체 (Tum-Ste), 커큐미노이드-리바우디오사이드 복합체 (Tum-RebA), 및 커큐미노이드-스테비올 글루코사이드 복합체 (Tum-SG) 10 mg 를 10 ml 물에 녹였다. Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments Ltd, Malvern, UK)를 이용하여 동적광산란(Dynamic light scattering, DLS)을 확인하여 각 소재들의 입자 크기를 결정하였다.

[0099] Ste, RebA, SG로 수용화된 울금분말 추출물과 에탄올로 추출한 울금 분말 추출물 그리고 스테비오사이드, 리바우디오사이드 그리고 스테비올 글루코사이드의 입자 크기 측정 결과는 도 9와 같았다.

[0100] 도 9 에서 보는 바와 같이 Ste, RebA, 그리고 SG 입자 크기는 각각 2.4 nm, 3.35 nm, 그리고 2.6 nm 이고, 에탄올만으로 추출한 추출물, Ste, RebA, 그리고 SG 로 추출한 추출물의 입자 크기는 각각 2.0 nm, 110.8 nm, 95.7 nm, 및 32.7 nm 로 측정되어 본 발명에 따라 수용화된 커큐미노이드는 입자 크기가 30 내지 120 nm 의 범위로 입자 사이즈가 나노 사이즈로 생체이용성이 증가될 것으로 판단된다.

[0101] <실험예 7> 수용화된 커큐미노이드의 혈당 상승 억제 특성

[0102] 실험동물은 6주령 수컷 Sprague-Dawley(SD) rat을 구입하여 습도 50%, 온도 22±1°C로 유지되는 동물실험실에서 1주일간 적응시켰으며, 실험 전 16시간 동안 절식시킨 후 체중 1kg을 기준으로 1g 말토오스를 주사로 복강 투여 후 체중 1kg을 기준으로 0.75 mg Tum-Ste, 10 mg 스테비오사이드를 투여하였으며 시간 별로 꼬리 정맥에서 채혈

된 전혈을 혈당측정기로 측정하였다. 대조군은 물을 투여하였다. 측정된 혈당의 변화를 확인하고 그 결과를 도 10에 나타내었다.

[0103] 도 10을 참조하면 말토오스가 투여되고 15 내지 30분간 혈당치가 급격히 상승하며, 스테비올 배당체를 투여한 경우에는 큰 변화는 나타나지 않았으나, 스테비올 배당체로 추출한 커큐미노이드(Tum-SG)가 투여된 군은 혈당치의 상승이 매우 완화되었으며 지속적으로 혈당을 일정수준으로 유지시키는 것으로 나타났다. 이를 통해 스테비오사이드로 추출한 커큐미노이드의 경우 수용화된 커큐민이 탁월한 수준의 혈당상승 억제 특성을 나타낸다는 것이 확인되었다.

[0104] <실험예 8> 수용화된 커큐미노이드의 뎅기열 바이러스(DENV4)의 NS2B-NS3^{pro} 활성 저해 특성

[0105] 재조합 DENV4 NS2B-NS3^{pro} 효소를 준비하고 (*In vitro* evaluation of novel inhibitors against the NS2B-NS3 protease of dengue fever virus type 4. *Molecules*, 18, 15600-15612) 수용성 울금 추출물의 농도를 1 ~ 200 µg/µl로 하여 NS2B-NS3^{pro}에 대한 활성 저해 특성을 확인하였다. 최종 효소반응기 100 µl에 0.04 U enzymes, 1.65 µM 형광 tetrapeptide substrate[benzoyl-norleucine-lysine-arginine-arginine-7-amino-4-methyl coumarin (AMC) (Bachem, Bubendorf, Switzerland)], 2 µl의 저해 시험 소재, 그리고 40 mM Tris buffer (pH 7.5)를 넣어주었다. 저해 시험에 따른 남은 효소의 최종 활성은 SpectraMax Gemini XPS apparatus (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA) (λ_{ex} = 380 nm, λ_{em} = 460 nm)를 이용하여 확인하였다. Curcuminoids (순도 ≥ 94%)를 positive control로 사용하였다.

[0106] 저해 정도는 하기 식 3으로 결정하였다.

[0107] 식 3

$$\text{남은 효소 활성 (\%)} = \frac{S - S_0}{C - C_0} \times 100$$

[0108] C - (enzyme, buffer, 효소 substrate 혼합액)의 20분 반응 후의 컨트롤,

[0110] C₀ - 0 시간에서의 컨트롤의 형광,

[0111] S - (enzyme, 테스트 시료, 효소 substrate 혼합액)의 20분 반응 후 형광,

[0112] S₀ - (enzyme, 테스트 시료, 효소 substrate 혼합액)의 반응 전 형광.

[0113] IC₅₀은 저해제 없을 때의 NS2B-NS3^{pro} 활성을 50% 낮출 수 있는 소재의 농도.

[0114] 도 11에서 보는 바와 같이 Ste, RebA와 SG로 준비한 수용화된 울금 추출물의 뎅기 바이러스의 NS2B-NS3^{pro} 단백질 분해 효소에 대한 저해 특성을 확인하였고, IC₅₀ 값은 각각 14.1 ± 0.2, 24.0 및 0.4, 그리고 15.3 ± 0.4 µg/ml로 확인되었다.

[0115] 비교예로 사용한 DMSO에 용해시킨 커큐미노이드 비교군은 IC₅₀ 값이 5.2 µg/ml로 본원 발명의 수용화된 울금 추출물의 뎅기 바이러스의 NS2B-NS3^{pro} 단백질 분해 효소에 대해 저해 활성을 나타내는 것을 확인할 수 있다.

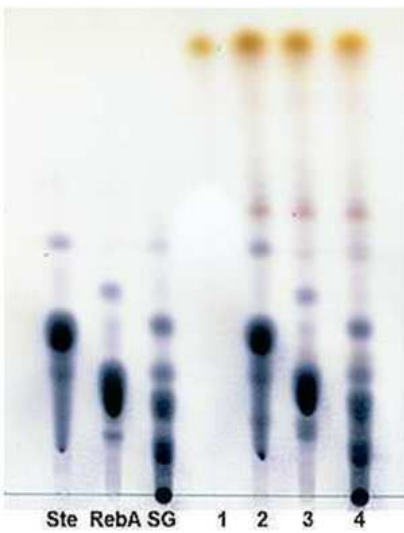
[0116] 이제까지 본 발명에 대하여 그 바람직한 실시예들을 중심으로 살펴보았다. 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자는 본 발명이 본 발명의 본질적인 특성에서 벗어나지 않는 범위에서 변형된 형태로 구현될 수 있음을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 개시된 실시예들은 한정적인 관점이 아니라 설명적인 관점에서 고려되어야 한다. 본 발명의 범위는 전술한 설명이 아니라 특허청구범위에 나타나 있으며, 그와 동등한 범위 내에 있는 모든 차이점은 본 발명에 포함된 것으로 해석되어야 할 것이다.

도면

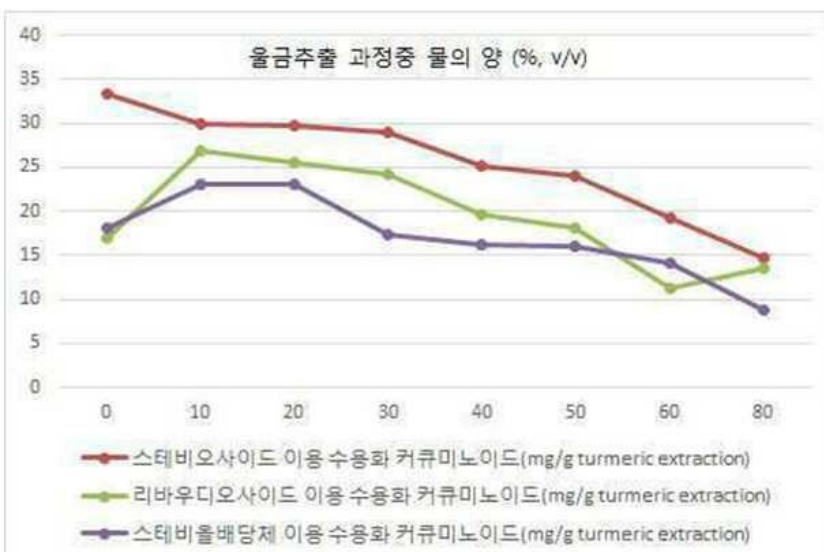
도면1



도면2



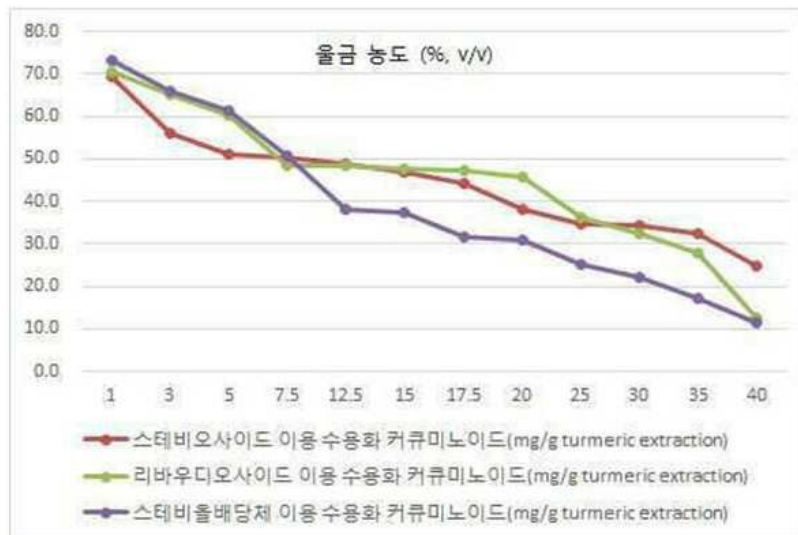
도면3



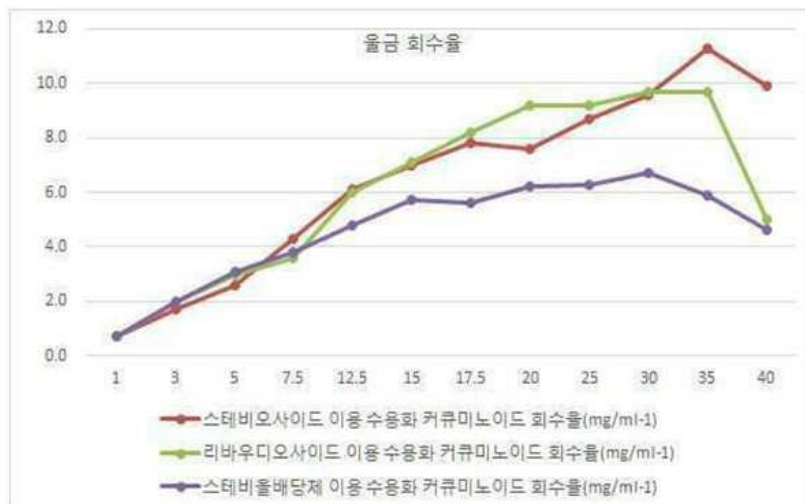
도면4



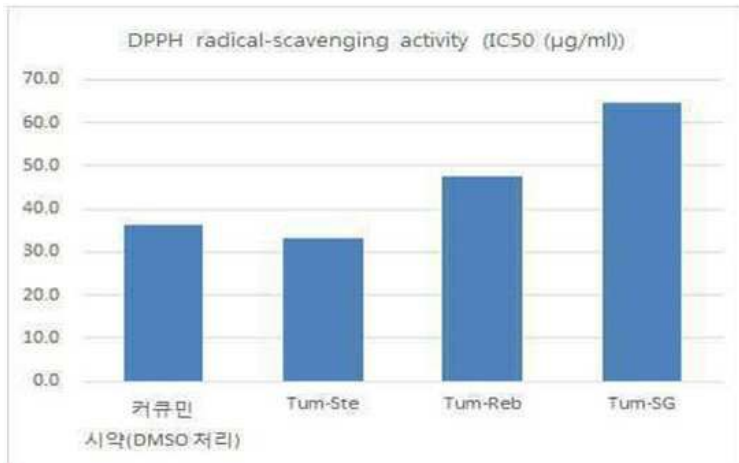
도면5



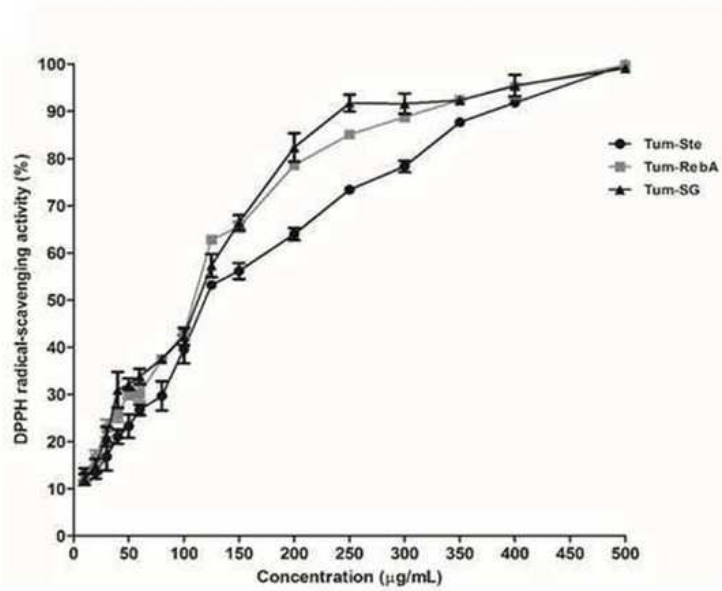
도면6



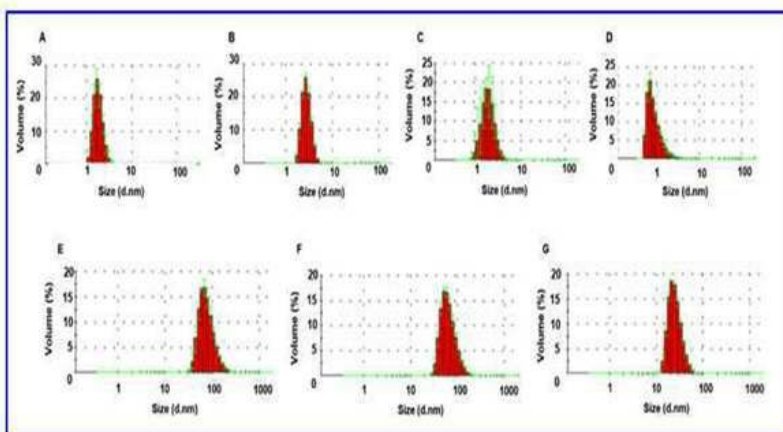
도면7



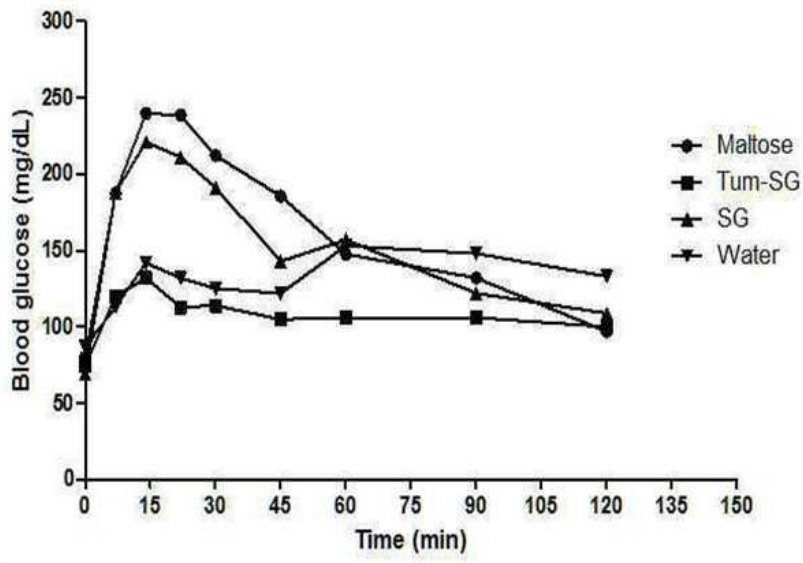
도면8



도면9



도면10



도면11

