



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2019년11월15일
(11) 등록번호 10-2044934
(24) 등록일자 2019년11월08일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A01N 25/22 (2006.01)

(52) CPC특허분류
A01N 25/22 (2013.01)
A01N 31/08 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2017-0102441

(22) 출원일자 2017년08월11일

심사청구일자 2018년07월09일

(65) 공개번호 10-2019-0018109

(43) 공개일자 2019년02월21일

(56) 선행기술조사문헌

J. Pharm. Sci. 2011, Vol.100, No.8,
pp.3139-3145*

“환형아미로스를 이용한 기능성 포접복합체 개발
및 물리화학적 특성 연구”, 서울대학교 박사학위
논문, 2014*

US6436414 B1

JP2003535911 A

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자

서울대학교 산학협력단

서울특별시 관악구 관악로 1 (신림동)

(72) 발명자

김용노

경기도 안양시 동안구 흥안대로 223번길 47, 102
동 1601호(호계동, 샘마을대우아파트)

박지운

서울시 관악구 관악로14길 60, 502호(봉천동, 무풍
아스빌)

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

특허법인태동

전체 청구항 수 : 총 4 항

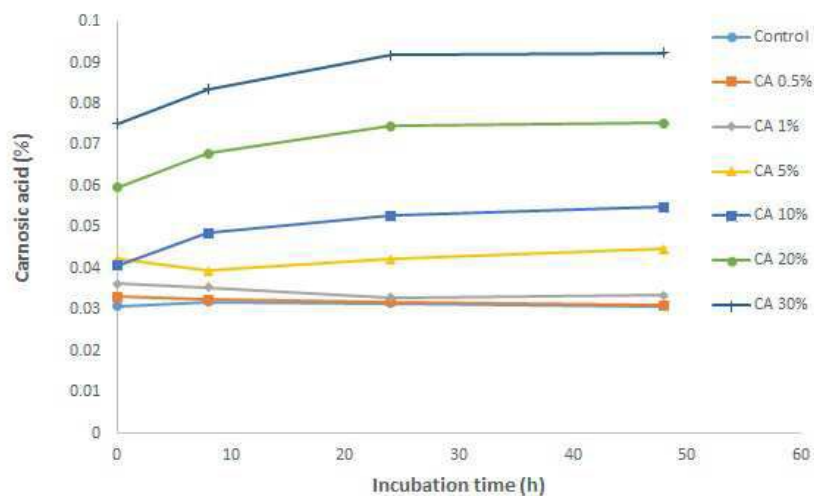
심사관 : 박범용

(54) 발명의 명칭 카르노스산 내포 환형 아미로오스 복합체 및 그 제조방법

(57) 요약

본 발명은 카르노스산의 용해도 향상 및 구조 안정성이 향상된 카르노스산 내포 환형 아미로오스 복합체 및 그 제조방법에 관한 것으로, 본 발명의 카르노스산 내포 환형 아미로오스는 수용액에서 카르노스산의 용해도 및 안정성을 증가시켜 주며, 이는 그동안 액상 식품 및 화장품, 의약품 등에 적용하지 못했던 카르노스산의 활용도를 높여주는 효과를 발휘한다. 또한, 본 발명의 카르노스산 내포 환형 아미로오스는 과격한 환경에서도 카르노스산의 활성을 보호해주어 카르노스산의 안정성을 증가시켜 주는 효과도 발휘한다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

- A61K 31/192 (2013.01)
- A61K 47/36 (2013.01)
- A61K 47/6949 (2017.08)
- A61K 8/0204 (2013.01)
- A61K 8/36 (2013.01)
- A61K 8/60 (2013.01)
- A23V 2002/00 (2013.01)
- A23V 2200/10 (2013.01)
- A23V 2250/5104 (2013.01)

박신제

경기도 성남시 분당구 양현로 272 304동 1503호
(야탑동, 탑마을타워빌)

(72) 발명자

노신정

인천 서구 율도로107번길 4-1(가정동 526-24)

문세훈

경기도 고양시 일산서구 후곡로 60 303동 1206호
(일산동, 후곡마을3단지아파트)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	315065-03-1-CG000
부처명	농림축산식품부
연구관리전문기관	농림식품기술기획평가원
연구사업명	고부가가치식품기술개발사업
연구과제명	식품 산업 현장의 나노기술 적용확대를 위한 천연 보존 소재 및 제품 개발(총괄)
기여율	1/1
주관기관	(주)다인소재
연구기간	2015.10.12 ~ 2018.10.11
공지예외적용	: 있음

명세서

청구범위

청구항 1

삭제

청구항 2

삭제

청구항 3

삭제

청구항 4

카르노스산 또는 카르노스산이 함유된 로즈마리추출물을 함유하는 용액과 5~30%(w/v) 농도의 환형 아밀로오스를 함유하는 용액을 혼합한 후, 빛을 차단한 상태로 교반하면서 20~40℃의 온도로 12~48시간 동안 반응시켜 카르노스산 내포 환형 아밀로오스 복합체를 제조하는 과정을 포함하며,

상기 카르노스산 내포 환형 아밀로오스 복합체는 카르노스산에 비해 수용액 상에서 용해도가 증가되어 있는 것을 특징으로 하는 항균제의 제조방법.

청구항 5

제4항에 있어서,

상기 카르노스산 또는 카르노스산이 함유된 로즈마리추출물을 함유하는 용액은,

카르노스산 분말 또는 카르노스산이 함유된 로즈마리추출물 분말을 에탄올, 메탄올, DMSO 중 선택되는 어느 하나의 용매에 용해시켜 제조한 것을 특징으로 하고,

상기 환형 아밀로오스를 함유하는 용액은,

환형 아밀로오스를 정제수, 에탄올, 메탄올, DMSO 중 선택되는 어느 하나의 용매에 용해시켜 제조한 것을 특징으로 하는 항균제의 제조방법.

청구항 6

제4항에 있어서,

상기 환형 아밀로오스는,

중합도가 7~41인 것을 특징으로 하는 항균제의 제조방법.

청구항 7

카르노스산 또는 카르노스산이 함유된 로즈마리추출물을 함유하는 용액과 5~30%(w/v) 농도의 환형 아밀로오스를 함유하는 용액을 혼합한 후, 빛을 차단한 상태로 교반하면서 20~40℃의 온도로 12~48시간 동안 반응시켜 카르노스산 내포 환형 아밀로오스 복합체를 제조하는 과정을 포함하며,

상기 카르노스산 내포 환형 아밀로오스 복합체는 카르노스산에 비해 수용액 상에서 용해도가 증가되어 있는 것을 특징으로 하는 항산화제의 제조방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 카르노스산이 내포되어 있는 환형 아밀로오스 복합체 및 그 제조방법에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 카르노스산의 용해도 및 안정성이 향상된 카르노스산 내포 환형 아밀로오스 복합체 및 그 제조방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 로즈마리는 허브의 한 종류로서 특유의 향을 가지고 있어 냄새를 제거하는 소취제, 향을 내는 방향제로 사용되어 왔으며, 항균 및 항산화, 항바이러스 활성 등 생리활성을 갖는 것으로 알려져 있다.

[0004] 과학적 문헌에 따르면 로즈마리추출물의 항산화 활성은 카르노스산 (carnosic acid), 카르노솔 (carnosol), 로즈마린산 (rosmarinic acid)과 관련되어 있음이 밝혀졌으며, 이 중 카르노스산은 강력한 항산화 작용뿐만 아니라 항균 작용을 가지는 것으로도 알려져 있다.

[0005] 하지만, 이러한 활성 물질들은 극성이 낮고 물에 대한 용해도가 현저히 낮아 수용성 액상 식품 또는 화장품에 적용하는 데 한계가 있으며, 용액에 녹아있는 상태에서는 안정성이 매우 낮아 기능성의 유지 기간이 짧은 단점이 있다.

[0006] 환형 아밀로오스(cycloamylose)는 6개 내지 50개의 글루칸이 α-1,4 결합으로 연결되어 고리화 구조를 이루고 있는 당류이다. 환형 아밀로오스는 내부 공동이 상대적으로 소수성이며, 외부 표면은 친수성인 분자로서 물에 대한 용해도가 높은 특징이 있다. 이러한 이유로 난용성 또는 휘발성 게스트 분자를 내포하여 복합체를 형성할 수 있으며, 게스트 분자의 수용액 내 용해도 및 안정성을 증대시키는 용도로 사용될 수 있다.

[0007] 한편, 로즈마리추출물 활성 성분의 수용액 내 용해도 향상과 빠른 산화를 방지하기 위해 고안된 방법으로, 베타 환형 텍스트린 (β-cyclodextrin)을 이용한 연구가 있으며, 활성 성분 중 로즈마린산을 베타 환형 텍스트린에 캡슐화한 시스템에서 로즈마린산의 용해도가 향상되고 저장 안정성이 증가한 것으로 보고한 바 있다.

[0008] 베타 환형 텍스트린은 산업적으로 대량 생산이 가능하여 비용이 저렴한 장점이 있지만, 수용액에서 낮은 용해도를 가지므로 사용량에 제한이 있어 이를 해결하기 위한 대체 물질이 요구된다.

[0009] 한편, 로즈마린산보다 높은 항균 및 항산화 활성을 가지는 카르노스산과 카르노솔의 기능성 및 안정성 향상에 관한 연구는 현재까지 보고된 바 없으며, 난용성 게스트 물질의 용해도 및 안정성 향상을 위해 환형 아밀로오스를 호스트 물질로 사용한 예 또한 미비한 실정이다.

선행기술문헌

특허문헌

[0011] (특허문헌 0001) 대한민국 공개특허 제10-2011-0011365호 (공개일자 : 2011.02.08.)에는, 카카오 분말에서 추출한 폴리페놀을 함유하는 천연 항산화제를 베타 사이클로 텍스트린에 포접시킨다는 내용이 기재되어 있다.

비특허문헌

[0012] (비특허문헌 0001) "Bruno Medronho et al., Inclusion complexes of rosmarinic acid and cyclodextrin: stoichiometry, association constants, and antioxidant potential, Colloid Polym Sci (2014) 292:885-894. DOI 10.1007/s00396-013-3124-5"에는, β-환형텍스트린(β-CD)과 폴리페놀 화합물인 로즈마린산 간의 상호 작용을 분석한 결과, β-환형텍스트린(β-CD)이 항산화제의 활성을 향상시키는 것으로 기재되어 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0013] 본 발명은 난용성인 카르노스산의 수용액 내 용해도 및 안정성을 향상시킬 수 있는 복합체 제조 기술을 개발하여 제공하고자 한다.

과제의 해결 수단

- [0015] 본 발명은 카르노스산(carnosic acid)이 내포되어 있는 환형 아밀로오스 복합체를 제공한다.
- [0016] 본 발명의 환형 아밀로오스 복합체에 있어서, 상기 카르노스산이 내포되어 있는 환형 아밀로오스 복합체는, 바람직하게 카르노스산에 비해 수용액 상에서 용해도가 증가되어 있다.
- [0017] 본 발명은 카르노스산이 내포되어 있는 환형 아밀로오스 복합체를 포함하는 항균제를 제공한다.
- [0018] 본 발명은 카르노스산 또는 카르노스산이 함유된 로즈마리추출물을 함유하는 용액과 환형 아밀로오스를 함유하는 용액을 혼합한 후, 빛을 차단한 상태로 교반하면서 반응시키는 것을 특징으로 하는 카르노스산 내포 환형 아밀로오스 복합체의 제조방법을 제공한다.
- [0019] 본 발명의 카르노스산 내포 환형 아밀로오스 복합체의 제조방법에 있어서, 상기 카르노스산 또는 카르노스산이 함유된 로즈마리추출물을 함유하는 용액은, 바람직하게 카르노스산 분말 또는 카르노스산이 함유된 로즈마리추출물 분말을 에탄올, 메탄올, DMSO 중 선택되는 어느 하나의 용매에 용해시켜 제조한 것일 수 있고, 상기 환형 아밀로오스를 함유하는 용액은, 바람직하게 환형 아밀로오스를 정제수, 에탄올, 메탄올, DMSO 중 선택되는 어느 하나의 용매에 용해시켜 제조한 것일 수 있다.
- [0020] 본 발명의 카르노스산 내포 환형 아밀로오스 복합체의 제조방법에 있어서, 상기 환형 아밀로오스는, 바람직하게 중합도가 7~41일 수 있다.
- [0021] 본 발명의 카르노스산 내포 환형 아밀로오스 복합체의 제조방법에 있어서, 상기 반응은, 바람직하게 20~40℃의 온도로 12~48시간 동안 수행하는 것이 좋다.

발명의 효과

- [0023] 본 발명은 카르노스산 내포 환형 아밀로오스 복합체가 수용액에서 카르노스산의 용해도 및 안정성을 증가시켜 준다.
- [0024] 또한, 이는 그동안 액상 식품 및 화장품, 의약품 등에 적용하지 못했던 카르노스산의 활용도를 높여주는 효과를 발휘한다.
- [0025] 또한, 본 발명의 카르노스산 내포 환형 아밀로오스 복합체는 과격한 환경에서도 카르노스산의 안정성을 증가시켜 카르노스산의 기능성을 보호해 주는 효과도 발휘한다.

도면의 간단한 설명

- [0028] 도 1은 환형 아밀로오스의 농도에 따라 로즈마리추출물과의 복합체 내에 포함되는 카르노스산의 함량을 측정한 그래프이다. 또한, 환형 아밀로오스의 각 농도에 따라 카르노스산이 복합체 내에 포함되는 데 걸리는 반응 시간을 나타낸다. 이때, 대조군은 환형 아밀로오스를 포함하지 않는 단일 로즈마리추출물의 카르노스산의 함량을 나타낸 것이다.
- 도 2는 환형 아밀로오스의 농도에 따라 로즈마리추출물과의 복합체를 제조하였을 때 수용액에 용해되어 있는 카르노스산의 용해도를 나타낸 그래프이다. 비교물질로 베타 환형 텍스트린과 말토텍스트린을 사용한 결과를 포함한다. 대조군인 호스트 물질 0%는 호스트 물질이 포함되지 않은 단일 로즈마리추출물에 존재하는 카르노스산의 용해도를 나타낸 것이다.
- 도 3은 로즈마리추출물과 환형 아밀로오스 복합체에서 환형 아밀로오스가 항산화 물질의 열안정성에 기여하는 바를 확인한 결과를 나타낸 그래프이다. 이때, 대조군은 환형 아밀로오스를 포함하지 않는 단일 로즈마리추출물을 나타낸다. 또한, 각 조성물에 열을 가하기 전의 항산화 활성을 100%로 나타내고 열을 가한 후의 항산화 활성을 상대적으로 측정하여 나타낸 것이다.
- 도 4는 '로즈마리추출물과 환형 아밀로오스의 복합체'와 '로즈마리추출물과 말토텍스트린 복합체'의 열안정성을 비교한 그래프이다. 농도별 환형 아밀로오스를 사용한 것과 비교물질로 농도별 말토텍스트린을 사용한 복합체에 열을 가한지 24시간 쯤 항산화 활성을 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0029] 본 발명은 카르노스산(carnosic acid)이 내포되어 있는 환형 아밀로오스 복합체를 제공한다. 본 발명은 카르노스산이 내포되어 있는 환형 아밀로오스 복합체를 포함하는 항균제를 제공한다. 또한, 본 발명은 카르노스산 또는 카르노스산이 함유된 로즈마리추출물을 함유하는 용액과 환형 아밀로오스를 함유하는 용액을 혼합한 후, 빛을 차단한 상태로 교반하면서 반응시키는 것을 특징으로 하는 카르노스산 내포 환형 아밀로오스 복합체의 제조 방법을 제공한다.
- [0030] 이상과 같이 제조한 본 발명의 카르노스산 내포 환형 아밀로오스 복합체는 카르노스산에 비해 수용액 상에서 용해도가 증가되어 있다. 또한, 복합체 내 카르노스산의 안정성도 증가되어 있는 특징도 있다.
- [0031] 본 발명에서는 시판중인 환형 아밀로오스를 사용할 수 있는데, 바람직하게 중합도가 7~41인 것을 사용하는 것이 좋다. 또한, 필요에 따라 전분으로부터 환형 아밀로오스를 제조하여 사용할 수도 있다. 환형 아밀로오스를 제조하기 위해서는 일 예로 쌀전분, 고구마전분 또는 옥수수전분을 사용할 수 있다. 바람직하게는 아밀로오스 함량이 높은 전분을 사용하는 것이며, 가장 바람직하게는 아밀로오스 함량이 60% 이상인 고아밀로오스 옥수수전분을 사용하는 것이다. 상기의 전분으로부터 환형 아밀로오스를 제조하는 구체적인 방법은 당업계에 알려진 공지 기술을 사용할 수 있으므로, 이에 관한 구체적 기재는 생략하기로 한다.
- [0032] 한편, 본 발명에서는 카르노스산 또는 카르노스산이 함유된 로즈마리추출물을 사용하는데, 카르노스산이 함유된 로즈마리추출물의 경우 바람직하게 카르노스산을 50~70% 정도 함유되어 있는 것을 사용할 수 있다.
- [0033] 본 발명의 카르노스산 내포 환형 아밀로오스 복합체 제조 시, 카르노스산 또는 로즈마리추출물 용액의 제조를 위해 사용되는 용매는 일 예로 에탄올, 메탄올, DMSO 등을 사용할 수 있다. 가장 바람직하게는 80% 이상의 에탄올을 사용하는 것이다. 또한, 환형 아밀로오스 용액의 제조를 위해 사용되는 용매는 일 예로, 정제수, 에탄올, 메탄올, DMSO 등을 사용할 수 있다. 바람직하게는 50% 이하의 에탄올이며, 가장 바람직하게는 정제수이다.
- [0034] 본 발명에서 일 예로 에탄올에 녹인 카르노스산 함유 로즈마리추출물의 농도는 건조 중량 기준으로 10% 이상부터 최대 용해될 수 있는 양까지 용해시킬 수 있으며, 바람직하게는 20% 이상부터 최대 용해될 수 있는 양까지 용해시킬 수 있다. 또한, 일 예로 정제수에 녹인 환형 아밀로오스의 농도는 건조 중량 기준으로 0.5~30% 용해시켜 사용할 수 있으며 바람직하게는 5~30% 용해시켜 사용할 수 있다. 이상과 같이 제조한 에탄올에 녹인 카르노스산 함유 로즈마리추출물과 정제수에 녹인 환형 아밀로오스를 혼합하여 5~20% 에탄올에 카르노스산 함유 로즈마리추출물과 환형 아밀로오스가 포함되도록 제조된다. 이후, 빛을 차단한 상태로 교반하면서 반응시키면 카르노스산이 내포된 환형 아밀로오스 복합체가 제조된다. 교반은 항온 수조에서 일정하게 교반하는 것이 좋다.
- [0035] 한편, 본 발명에서 카르노스산 내포 환형 아밀로오스 복합체의 제조 시, 반응시간은 12~48시간인 것이 바람직하다. 가장 바람직하게는 24~48시간 반응시키는 것이 좋다. 또한, 반응온도는 20~40℃ 사이인 것이 좋고, 바람직하게는 25~37℃인 것이 좋다.
- [0036] 한편, 이상과 같이 제조한 본 발명의 카르노스산 내포 환형 아밀로오스 복합체는 동결건조하여 분말화할 수 있다.
- [0038] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위해 바람직한 실시예 및 실험예를 제시한다. 다만, 하기 실시예 및 실험예는 본 발명의 이해를 돕기 위하여 제시되는 것일 뿐 본 발명이 하기 실시예 및 실험예로 한정되는 것은 아니다.
- [0040] **[실시예 1: 본 발명의 고아밀로오스 옥수수전분으로부터 환형 아밀로오스 제조]**
- [0041] 환형 아밀로오스를 제조하기 위하여, 건조 중량 1%의 고아밀로오스 옥수수전분 (Hylon VII, National Starch and Chemical Company) 을 50mM 소듐 아세테이트 완충액 (sodium acetate buffer, pH 4.5) 에 완전히 용해시켜 호화 과정을 거친 후 이소아밀레이즈 (*Pseudomonas sp.*, 280U/mg, Megazyme) 5U/g을 40℃에서 8시간 반응시켰다.
- [0042] 반응이 끝난 후 10분간 끓여 효소를 불활성화시키고, 5배가량의 95% 에탄올을 첨가하여 원심분리하고 탈분지화된 전분을 회수한 후 건조시켰다. 탈분지화된 전분 1% (w/v) 를 소량의 90% (v/v) 다이메틸설폭사이드 (dimethyl sulfoxide, DMSO) 에 완전히 용해시킨 후 50mM 트리스-염산 완충액 (Tris-HCl buffer, pH 7.5) 을 첨가하여 테르무스 아쿠아티쿠스 (*Thermus aquaticus*) 유래의 4- α -글루카노트랜스퍼레이즈 (TA α GTase) 10U/g 을 가해 75℃에서 14시간 반응시켰다. 반응이 끝난 후 10분간 끓여 효소를 불활성화시키고 5배 가량의 95% 에탄올을 첨가하여 원심분리하였다.
- [0043] 침전된 반응물을 50mM 소듐 아세테이트 완충액 (pH 4.5) 에 용해시키고 50U/g의 글루카노트랜스퍼레이즈

(*Hormoconis resinae*, 64 U/mg, Megazyme) 를 가하여 40℃에서 10시간 이상 반응시켰다. 반응이 끝난 후, 10분 간 끓여 효소를 불활성화시키고, 5배가량의 95% 에탄올과 80% 에탄올을 차례로 첨가하여 원심분리하여 침전된 환형 아밀로오스를 회수하고, 소량의 증류수에 녹인 후 동결건조하여 분말 제형의 환형 아밀로오스를 제조하였다.

[0045] [실시예 2: 본 발명 '로즈마리추출물과 환형 아밀로오스 복합체'의 제조]

[0046] 로즈마리추출물 분말 0.5g을 95% 에탄올 2.5mL에 완전히 용해시키고, 환형 아밀로오스는 농도별로 각각 0.25g, 0.5g, 2.5g, 5g, 10g, 15g을 증류수 47.5mL에 용해시켜 각각 준비하였다 (이들 환형 아밀로오스의 농도별 샘플들이 도 1 내지 도 4에 기재한 CA 0.5, 1, 5, 10, 20, 30% 샘플을 각각 의미함).

[0047] 이상과 같이 준비한 로즈마리추출물 용액과 환형 아밀로오스 용액을 1:19의 부피 비율로 혼합한 후 빛을 차단한 상태로 25℃에서 48시간 동안 교반하였다. 48시간 후, 로즈마리추출물과 환형 아밀로오스 복합 조성물을 0.45μm 필터로 여과한 후 72시간 동안 동결건조하여 분말화된 복합체를 제조하였다.

[0049] [실험예 1: 본 발명의 로즈마리추출물과 환형 아밀로오스 복합체 제조 조건]

[0050] 실시예 2의 방법에 따라 각 조성물의 복합체를 제조하고 8시간, 24시간, 48시간에 각 샘플을 취하여 0.45μm 필터로 여과한 후 285nm에서 흡광도를 측정하여 로즈마리추출물과 환형 아밀로오스 복합체에 존재하는 카르노스산의 농도를 정량하였다.

[0051] 로즈마리추출물에 존재하는 카르노스산을 정량화하기 위해 카르노스산 표준물질 (Sigma, USA) 을 95% 에탄올에 녹인 후 200~600nm 범위에서 분광광도계를 이용하여 흡광도 스펙트럼을 측정하였다. 측정된 흡광 파장 범위에서 카르노스산 표준물질의 농도별 (0~0.015 wt.%) 흡광도를 측정하여 표준곡선을 그린 후, 로즈마리추출물 내의 카르노스산 또는 복합체 내의 카르노스산의 흡광도 값을 표준곡선으로부터 얻은 수식에 대입하여 역으로 계산하여 정량하였다.

[0052] 도 1은 환형 아밀로오스 농도와 교반 시간에 따른 복합체에 포함된 카르노스산의 농도를 구한 결과를 나타낸다. 단일 카르노스산인 대조구는 수용액에서 존재하는 농도가 가장 낮았으며, 환형 아밀로오스의 농도가 증가할수록 복합체를 형성하는 카르노스산의 농도도 증가하였다. 또한, 10% 이상의 환형 아밀로오스와 카르노스산이 복합체를 형성하기 위해서는 24시간 이상의 시간이 소요되는 것으로 나타났다.

[0054] [실험예 2: 본 발명의 로즈마리추출물과 환형 아밀로오스 복합체의 수용액에서의 용해도 평가]

[0055] 실시예 2에 따라 로즈마리추출물과 환형 아밀로오스 복합체를 제조하고, 48시간 후, 각 샘플을 0.45μm 필터로 여과한 후 분광광도계를 이용하여 285nm에서 흡광도를 측정하여 복합체 용액에 존재하는 카르노스산의 농도를 구하였다. 이때, 환형 아밀로오스의 비교물질로 베타 환형 텍스트린과 중합도 8~12를 가지는 말토덱스트린 (maltodextrin, MD)을 사용하여 같은 조건으로 복합체를 제조하였다. 카르노스산의 농도는 상기 실험예 1의 방법으로 측정하였다.

[0056] 도 2는 환형 아밀로오스의 농도가 증가함에 따라 수용액에 용해되어 있는 카르노스산의 함량이 증가한 결과를 나타낸다. 난용성의 카르노스산이 환형 아밀로오스와 복합체를 형성함으로써 물에 대한 용해도가 향상된 것으로 보여진다.

[0057] 비교물질로 사용된 베타 환형 텍스트린은 낮은 농도에서 카르노스산의 용해도를 증가시키는 역할을 하나, 높은 농도에서는 자체의 낮은 용해도로 인해 카르노스산의 용해도를 오히려 감소시키는 결과를 나타내었다.

[0058] 또 다른 비교물질로 사용된 말토덱스트린은 농도가 증가할수록 카르노스산의 용해도를 증가시켜 주었으나, 환형 아밀로오스와 비교해서 더 높은 용해도를 나타내지는 못하였다. 즉, 카르노스산의 물에 대한 용해도는 환형 아밀로오스, 말토덱스트린, 베타 환형 텍스트린 순으로 기여도가 높았다.

[0060] [실험예 3: 본 발명 로즈마리추출물과 환형 아밀로오스 복합체의 수용액에서 항균력 측정]

[0061] 실시예 2에서 제조한 로즈마리추출물과 환형 아밀로오스 복합체의 미생물에 대한 항균력을 평가하였다. 항균력 시험에 사용된 미생물은 그람 양성균인 바실러스 서브틸리스 (*Bacillus subtilis* ATCC 6633) 균주이고, 항균력을 평가하는 방법은 미생물의 최소생육저해농도 (MIC, Minimal Inhibitory Concentration) 를 측정하는 방법을 사용하였다.

[0062] 미생물은 영양 배지 (Nutrient broth, DifcoTM, USA) 에서 30℃ 온도에서 24시간 전배양하여 활성화시킨 후,

이를 10^{5-6} CFU/ml 의 농도가 되도록 희석하여 준비하였다. 각 농도별 환형 아밀로오스와 로즈마리추출물 복합체에 포함된 카르노스산의 농도를 분광광도계를 이용하여 정량화하였고, 각 샘플을 96 웰 플레이트 (96 well plate) 에 $200\mu\text{l}$ 씩 분주한 후 배지를 이용하여 단계희석하였다. 준비한 미생물을 각 well에 $100\mu\text{l}$ 씩 분주하고 30°C 에서 24시간 배양한 후 MIC 결과를 확인하였다. 그 결과는 하기 표 1에 나타내었다.

표 1

로즈마리추출물과 환형 아밀로오스 복합체의 항균력 평가

환형 아밀로오스 농도 (%)	MIC (ppm)/ <i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633
0	42.68 ±3.58
1	46.86 ±7.16
5	21.93 ±8.54
10	18.81 ±2.35
20	11.79 ±0.04
30	7.42 ±3.30

[0063]

[0065]

[0066]

[0068]

[0069]

[0070]

[0071]

[0072]

[0073]

[0075]

[0076]

상기 표 1에 나타난 바와 같이, 로즈마리추출물과 환형 아밀로오스 복합체의 항균 활성을 측정된 결과, 환형 아밀로오스의 농도가 증가할수록 항균 활성이 향상되는 것을 확인할 수 있다.

이는 수용액에서 불안정한 카르노스산이 환형 아밀로오스와 복합체를 형성함으로써 안정성이 증대되어 항균 활성에 영향을 미치는 것으로 보여진다.

[실험예 4: 로즈마리추출물과 환형 아밀로오스 복합체의 열 안정성 측정을 위한 열 가속실험]

실시에 2에서 제조한 로즈마리추출물과 환형 아밀로오스 복합체의 열 안정성을 평가하였다. 이때, 비교 물질로 8~12의 중합도를 가지는 말토덱스트린 (MD)을 사용하여 복합체를 제조하였다.

각 조성물 (실시에 2 및 말토덱스트린을 사용한 비교 물질)을 90°C 항온수조에서 24시간 동안 열처리하였고, 2시간 간격으로 샘플링하여 복합체의 항산화 활성을 평가하였다. 항산화 활성 측정은 ABTS 라디칼 소거능 측정 방법을 이용하였고, 이 방법은 ABTS가 포타슘 펄설페이트 (potassium persulfate) 와의 반응에 의해 생성된 ABTS 양이온이 시료 내의 항산화 물질에 의해 제거되어 탈색되는 것을 이용한 항산화능 측정 방법이다.

7mM ABTS와 2.45mM 포타슘 펄설페이트를 혼합하고, 상온에서 24시간 반응시킨 후 ABTS 양이온을 형성시켰다. ABTS 양이온이 포함된 용액을 증류수로 희석하여 734nm에서 흡광도 값이 0.7이 되도록 준비하였다. ABTS 양이온 용액 1ml에 샘플 $10\mu\text{l}$ 를 가하여 상온에서 20분 동안 방치 후에 흡광도를 측정하였다. 항산화 활성은 샘플을 녹인 용매인 5% 에탄올을 대조군으로 사용하여 다음의 수학적 식 1로 라디칼 소거능을 상대적인 백분율로 나타내었다.

[수학적 식 1]

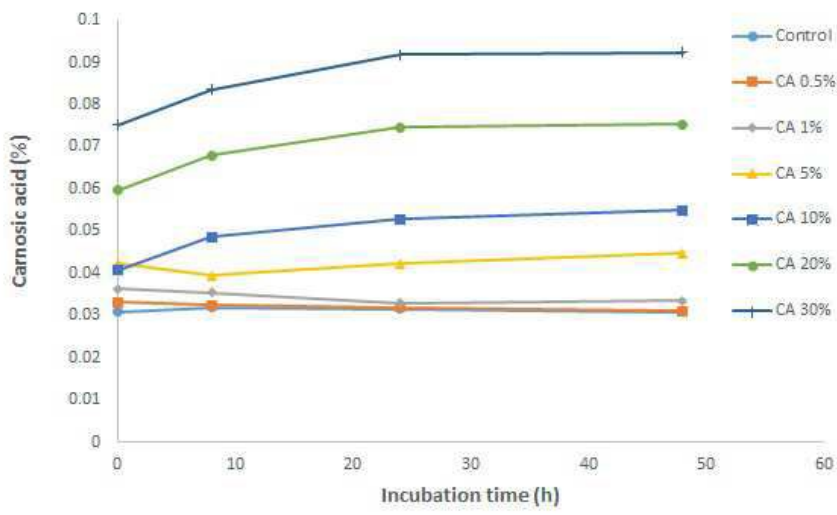
$$\text{ABTS radical scavenging activity} = (1 - A_{\text{test}} / A_{\text{control}}) \times 100$$

도 3은 열을 가해 항산화 활성을 감소시키는 환경에서 환형 아밀로오스가 항산화 물질의 안정성에 영향을 주는 결과를 나타낸 것이다. 환형 아밀로오스가 포함되어 있지 않은 단일 로즈마리추출물은 열을 가하는 24시간 동안 항산화 활성이 크게 감소하는 반면, 환형 아밀로오스와 복합체는 항산화 활성이 덜 감소하는 것을 확인할 수 있으며, 특히 환형 아밀로오스의 농도가 5% 이상에서는 항산화 활성에 큰 차이가 없는 것을 확인할 수 있다. 이 결과는 환형 아밀로오스가 로즈마리추출물과 복합체를 형성하여 항산화 물질의 열안정성에 기여하는 것으로 보여진다.

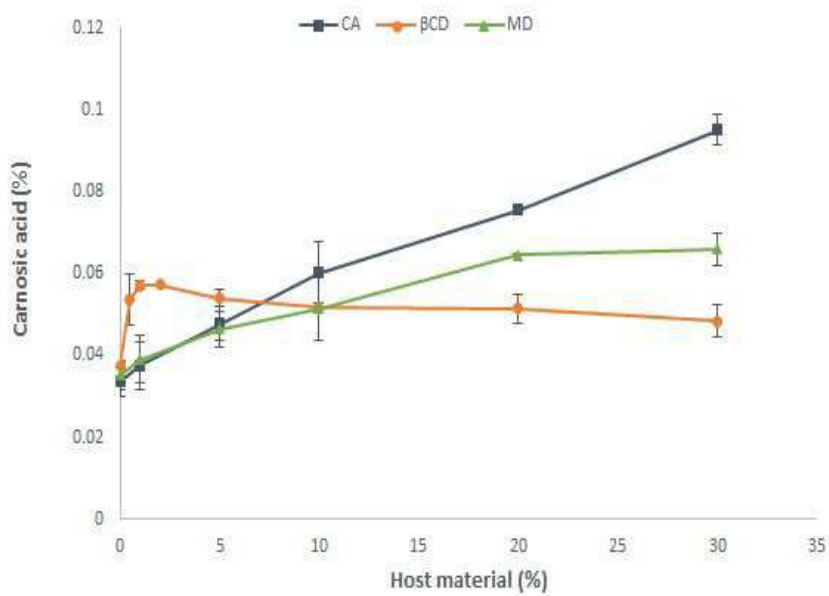
도 4는 환형 아밀로오스의 비교물질로 말토덱스트린을 사용하여 열을 가해준 지 24시간 쯤의 복합체의 항산화 활성을 측정하여 나타낸 것이다. 그 결과, 0.5~1%의 환형 아밀로오스와 말토덱스트린 사이에는 큰 차이가 없으나, 5% 이상의 환형 아밀로오스와 말토덱스트린의 경우 큰 차이가 있음을 확인할 수 있었다. 말토덱스트린은 높은 농도에서도 항산화 활성이 크게 감소한 것으로 보아 항산화 물질의 열안정성에 크게 기여하지 않는 것으로 보여진다.

도면

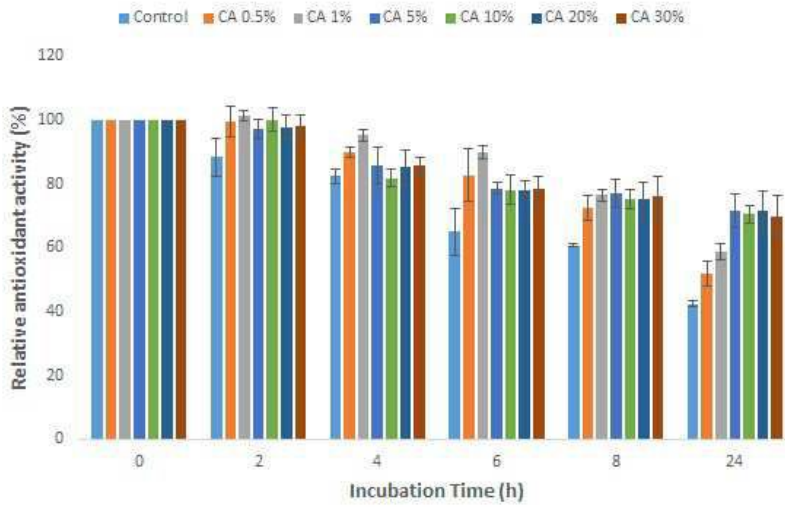
도면1



도면2



도면3



도면4

