



**(19) 대한민국특허청(KR)**  
**(12) 등록특허공보(B1)**

(45) 공고일자 2018년03월30일  
(11) 등록번호 10-1843358  
(24) 등록일자 2018년03월23일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
A23L 1/30 (2006.01) A23L 1/28 (2006.01)  
A23L 17/00 (2016.01) A61K 35/616 (2014.01)  
A61K 36/07 (2006.01) A61K 8/97 (2017.01)  
A61K 8/98 (2006.01) A61Q 19/00 (2006.01)

(52) CPC특허분류  
A23L 33/10 (2016.08)  
A23L 17/65 (2016.08)

(21) 출원번호 10-2016-0019199  
(22) 출원일자 2016년02월18일  
심사청구일자 2016년02월18일  
(65) 공개번호 10-2017-0097822  
(43) 공개일자 2017년08월29일  
(56) 선행기술조사문헌  
KR101338788 B1\*  
KR101336804 B1\*  
KR101121570 B1  
KR1020030015662 A  
\*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자  
건국대학교 글로벌산학협력단  
충청북도 충주시 충원대로 268 (단월동, 건국대학교글로벌캠퍼스)

(72) 발명자  
박표잠  
충북 충주시 안림동 샘골길 43 남산그린캐슬 201-201  
김학주  
부산광역시 해운대구 대천로103번길 61 113동 401호  
김연숙  
충청북도 충주시 칠금중앙로 30 208동 408호 (칠금동, 부영2차아파트)

(74) 대리인  
이은철, 이우영

전체 청구항 수 : 총 3 항

심사관 : 한지혜

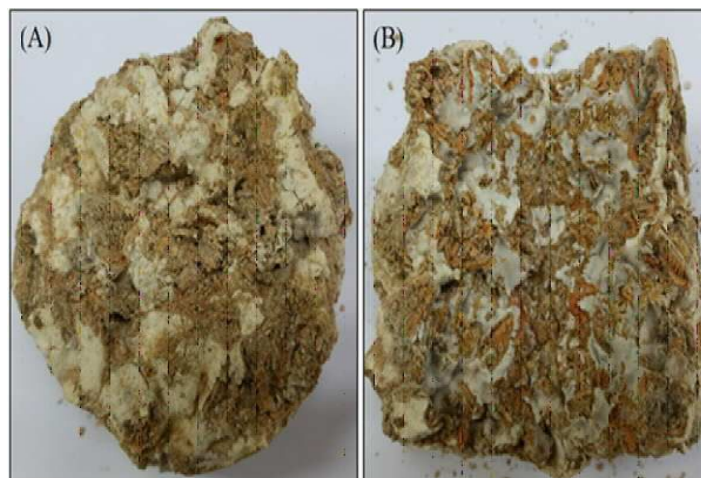
(54) 발명의 명칭 **버섯 균사체로 발효한 불가사리 추출물을 유효성분으로 함유하는 향산화 조성물.**

**(57) 요약**

본 발명은 버섯 균사체로 발효한 불가사리 추출물을 유효성분으로 함유하는 향산화 조성물에 관한 것이다. 상기와 같은 본 발명에 따르면, 버섯 균사체로 발효한 불가사리 추출물을 제공함으로써, 발효하지 않은 불가사리 추출물보다 향산화 활성을 증진시키는 효과가 있다.

또한, 불가사리의 유용한 성분인 탄산칼슘, 콜라겐 및 Astersaponin을 함유한 식품학적 조성물, 약제학적 조성물 또는 화장품 조성물을 제공하는 효과가 있으며, 연안 해역에서 해양 생태계 및 어업에 피해를 주는 불가사리를 기능성 소재로써 활용하는 방안을 제공한다.

**대표도**



(52) CPC특허분류

- A23L 31/00 (2016.08)
- A61K 35/616 (2013.01)
- A61K 36/07 (2013.01)
- A61K 8/9706 (2017.08)
- A61K 8/987 (2013.01)
- A61Q 19/00 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	20140134
부처명	해양수산부
연구관리전문기관	한국해양과학기술진흥원
연구사업명	미래해양산업기술개발사업
연구과제명	불가사리 동충하초 발효추출물 유래 생체방어조절 소재 개발 및 산업화
기여율	1/1
주관기관	건국대학교글로벌산학협력단
연구기간	2014.08.01 ~ 2017.07.31
공지예외적용	: 있음

---

**명세서**

**청구범위**

**청구항 1**

동충하초 균사체와 곡류를 혼합하여 발효한 불가사리 추출물을 유효성분으로 함유하는 향산화 조성물.

**청구항 2**

삭제

**청구항 3**

제 1 항에 있어서,

상기 향산화 조성물은 동충하초 균사체로 발효한 불가사리 추출물 31.25 내지 4000 μg/ml을 포함하는 것을 특징으로 하는 향산화 조성물.

**청구항 4**

- (1) 불가사리에 동충하초 균사체 접종 및 곡류를 혼합하여 15 내지 20일간 발효하는 단계; 및
  - (2) 상기 단계 (1)에서 수득한 불가사리 발효물로부터 불가사리 추출물을 추출하는 단계;
- 를 포함하는 동충하초 균사체로 발효한 불가사리 추출물의 제조방법.

**청구항 5**

삭제

**발명의 설명**

**기술분야**

[0001] 본 발명은 버섯 균사체로 발효한 불가사리 추출물 및 그 제조방법에 관한 것으로서, 더욱 상세하게는 버섯 균사체로 발효한 불가사리 추출물을 유효성분으로 함유하는 향산화 기능성 식품학적, 약제학적 또는 화장품 조성물에 관한 것이다.

**배경기술**

[0003] Starfish 또는 Seastar로 불리는 불가사리는 대표적인 극피동물로 세계적으로 1,800여종, 국내에는 100여종이 서식하고 있다. 불가사리는 극피동물 문 중 번식력이 좋은 생물이며, 무차별적인 불가사리 개체수의 증가는 연안 해역 산호초의 개체수를 감소시켜, 해양생태계 및 어업에 해를 끼친다. 특히, 아무르 불가사리 및 별 불가사리는 수온 15 내지 20℃의 범위인 연안해역의 조개류를 무차별 포식함으로써, 연안 패류자원을 감소시켜 양식 어업에 막대한 피해를 주고 있다. 연안해역에 대량 번식한 불가사리는 수거하는 방법 외에 다른 방제 방법이 없으며, 수거한 불가사리를 비료로 사용하는 방안이 추진되었으나 활용가치가 낮은 실정이다.

[0004] 일본의 북해도에서 예로부터 불가사리 가루를 이용하여 발의 해충이나 화장실의 구더기를 방제하였으며, 삶은 불가사리를 먹은 개나 고양이가 중독을 일으켰다는 보고가(Park HY, 2003, Development of industrialization technology with starfish, *Food Ind. and Nutr.*, 8, p. 18-22)있으며, 이에 불가사리를 식용 또는 약용으로 이용하기 위한 연구에 관심이 모아지고 있다.

[0005] 불가사리의 구성성분은 수분을 제외하면 20 내지 30%가 회분으로 이루어져 있으며, 회분의 주성분은 탄산칼슘

(Calcium carbonate)이며(Burkenroad MD, 1945, General discussion of problems involved in starfish utilization. *Bingham Oceanographic Collection Bull.*, B83-5689, p. 44-58), 콜라겐을 다량 함유하고 있다 (Kimura S, Omura Y, Ishida M, Shirai H, 1993, Molecular characterization of fibrillar collagen from the body wall of starfish *Asterias amurensis*, *Com. Biochem. Physiol.*, 104B, p. 663-668). 또한, 최근 연구에서 불가사리에 함유 된 7종의 saponin을 분리하였으며, 그 중 새로 발견 된 3종의 Asterosaponin은 NMR spectroscopy 및 MS analyse로 구조를 밝혔다.(Hwang, I. H., Kim, D. W., Kim, S. J., Min, B. S., Lee, S. H., Son, J. K., ... & Na, M. (2011). Asterosaponins isolated from the starfish *Asterias amurensis*. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 59(1), 78-83.) 또한, 불가사리에서 추출한 Aasterosaponin은 소염, 진통작용(Findlay, J. A., Agarwal, V. K., & Moharir, Y. E. (1984). On the Saponins of the Starfish *Asterias vulgaris*. *Journal of Natural Products*, 47(1), 113-116.)이 있다. 이외에도, 불가사리 추출물의 적혈구 응집작용, 항균·항산화성 및 근수축 활성화에 대한 연구가 진행 되었다.

[0006] 불가사리를 이용 가공면에서 보았을 때, 상기와 같은 연구 결과를 바탕으로 불가사리는 특정 무기질, 아미노산 및 신물질에 대한 연구를 통하여 기능성 소재로써의 가능성이 대두되고 있다.

### 선행기술문헌

#### 특허문헌

[0007] (특허문헌 0001) 한국 등록특허공보 제10-1338788호  
(특허문헌 0002) 한국 등록특허공보 제10-0945587호

### 발명의 내용

#### 해결하려는 과제

[0008] 본 발명의 목적은, 버섯 균사체로 발효한 불가사리 추출물을 유효성분으로 함유함으로써, 불가사리 자체의 성분인 탄산칼슘, 콜라겐 및 Astersaponin을 포함하고 항산화 활성이 증가 된 항산화 기능성 식품학적, 약제학적 또는 화장료 조성물을 제공함에 있다.

#### 과제의 해결 수단

[0010] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명의 일 형태에 따른 항산화 조성물은 버섯 균사체로 발효한 불가사리 추출물을 유효성분으로 포함한다.

[0011] 상기 버섯 균사체는 동충하초 균사체, 영지버섯 균사체, 상황버섯 균사체 또는 노루궁뎅이버섯 균사체 일 수 있다.

[0012] 또한, 본 발명의 또 다른 형태에 따른 버섯 균사체로 발효한 불가사리 추출물의 제조방법은 (1) 불가사리에 버섯 균사체를 접종 및 발효하는 단계; 및 (2) 상기 단계 (1)에서 수득한 불가사리 발효물에서 불가사리 추출물을 추출하는 단계;를 포함하는 버섯 균사체로 발효한 불가사리 추출물의 제조방법을 포함한다.

[0013] 상기 단계(2)에서 상기 버섯 균사체는 동충하초 균사체, 영지버섯 균사체, 상황버섯 균사체 또는 노루궁뎅이버섯 균사체 일 수 있다.

### 발명의 효과

[0014] 상기와 같은 본 발명에 따르면, 버섯 균사체로 발효한 불가사리 추출물을 제공함으로써, 발효하지 않은 불가사리추출물 보다 항산화 활성을 증진시키는 효과가 있다.

[0015] 또한, 불가사리의 유용한 성분인 탄산칼슘, 콜라겐 및 Astersaponin을 함유한 식품학적 조성물, 약제학적 조성물 또는 화장료 조성물을 제공하는 효과가 있으며, 연안 해역에서 해양생태계 및 어업에 피해를 주는 불가사리를 기능성 소재로써 활용하는 방안을 제공한다.

### 도면의 간단한 설명

- [0016] 도 1은 (A)동충하초 균사체로 20일간 발효한 불가사리 발효물 및 (B)상기 불가사리 발효물을 반으로 쪼갠 사진으로 동충하초 균사체가 내부 및 외부에서 고르게 성장한 것을 나타낸다.
- 도 2는 전자스핀공명기기(ESR)를 이용한 불가사리 추출물, 동충하초 추출물 및 동충하초 균사체로 발효한 불가사리 추출물의 각 농도별 DPPH radical 소거활성 측정결과를 도시한 것이다.
- 도 3은 전자스핀공명기기(ESR)를 이용한 불가사리 추출물, 동충하초 추출물 및 동충하초 균사체로 발효한 불가사리 추출물의 각 농도별 Alkyl radical 소거활성 측정결과를 도시한 것이다.
- 도 4는 전가스핀공명기기(ESR)를 이용한 불가사리 추출물, 동충하초 추출물 및 동충하초 균사체로 발효한 불가사리 추출물의 각 농도별 Superoxide radical 소거활성을 측정 결과를 도시한 것이다.
- 도 5은 FTC(Ferric thiocyanate)법을 이용한 지질 과산화 억제활성 측정 결과를 도시한 것이다.
- 도 6은 TBA(Thiobarbituric acid)법을 이용한 지질 과산화 억제활성 측정 결과를 도시한 것이다.

**발명을 실시하기 위한 구체적인 내용**

- [0017] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.
- [0018] 본 발명의 일 형태에 따른 향산화 조성물은 버섯 균사체로 발효한 불가사리 추출물을 유효성분으로 포함한다.
- [0019] 미생물 발효는 크게 두 가지로 나눌 수 있다. 상기 미생물 발효는 고초균, 효모, 나토균과 같은 세균을 이용한 발효(bacterial fermentation) 및 버섯, 곰팡이와 같은 균(fungi)을 이용한 발효가 있다.
- [0020] 상기 세균을 이용한 발효(bacterial fermentation)는 세균의 증식이 빠르고, 발효의 대상으로 다양한 것을 이용할 수 있다는 장점이 있다. 상기 세균을 이용한 발효는 발효 과정에서 변이주(mutant)의 발생 및 오염이 쉽고, 발효물의 분리 및 정제가 어렵다는 단점이 있다. 따라서, 세균을 이용한 발효는 발효물의 품질을 유지하는 것이 어렵다는 한계가 있다.
- [0021] 상기 세균을 이용한 발효(bacterial fermentation)와 비교하여, 균(fungi)를 이용한 발효 중 버섯 균사체를 이용한 발효는 버섯 균사체 발효물에 버섯 균사체 자체의 생리활성 성분을 함유하게 할 수 있고, 버섯균사체 발효물의 유효성분의 추출 및 우량균주의 선발이 용이하다는 장점이 있다. 따라서, 버섯 균사체 발효는 버섯 균사체 발효물의 품질을 유지하는 것이 가능하다.
- [0022] 상기 버섯 균사체는 동충하초 균사체, 영지버섯 균사체, 상황버섯 균사체 또는 노루궁뎅이버섯 균사체를 사용하는 것이 바람직하다. 상기 버섯 균사체 외에도 생물분류학 상 담자균문에 속한 버섯 균사체를 사용할 수 있으나, 이에 한정하는 것은 아니다.
- [0023] 상기 향산화 조성물은 버섯 균사체로 발효한 불가사리 추출물을 바람직하게는 31.25 내지 4000 µg/ml, 보다 바람직하게는 62.5 내지 4000 µg/ml을 포함한다.
- [0024] 본 발명의 다른 형태에 따르면, 버섯 균사체로 발효한 추출물을 유효성분으로 함유하는 향산화 기능성 식품학적 조성물을 제공한다. 상기 식품학적 조성물은 분말, 과립, 정제, 캡슐, 시럽 또는 음료 등의 형태로 제공 할 수 있다. 또한, 본 발명에 따른 버섯 균사체로 발효한 불가사리 추출물 외에 다른 식품 또는 식품 첨가물과 함께 사용되고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용 될 수 있다.
- [0025] 본 발명의 또 다른 형태에 따르면, 버섯 균사체로 발효한 추출물을 유효성분으로 함유하는 향산화 기능성 약제학적 조성물을 제공한다. 상기 약제학적 조성물은 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽 또는 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 및 멸균 주사용액의 형태로 제형화 하여 사용할 수 있다.
- [0026] 본 발명의 또 다른 형태에 따르면, 버섯 균사체로 발효한 추출물을 유효성분으로 함유하는 향산화 기능성 화장품 조성물을 제공한다. 상기 화장품 조성물은 유효성분으로 버섯 균사체로 발효한 불가사리 추출물 외에 안정화제, 용해화제, 비타민, 안료 및 향료와 같은 통상적인 보조제 및 담체를 포함할 수 있다. 상기 화장품 조성물은 당업계에서 통상적으로 제조되는 제형으로도 제조될 수 있으며, 예를 들어 용액, 현탁액, 유탁액, 페이스트, 겔, 크림, 로션, 파우더, 오일, 분말 파운데이션, 유탁액 파운데이션, 왁스 파운데이션 또는 스프레이 등으로 제형화 할 수 있으나, 이에 한정하는 것은 아니다.
- [0027] 본 발명의 또 다른 형태에 따른 버섯 균사체로 발효한 불가사리 추출물의 제조방법은 하기 (1) 내지 (2) 단계를

포함한다.

- [0028] 상기 불가사리 추출물의 제조방법은 (1) 불가사리에 버섯 균사체를 접종 및 발효하는 단계; 및 (2) 상기 단계 (1)에서 수득한 불가사리 발효물에서 불가사리 추출물을 추출하는 단계;를 포함하는 버섯 균사체로 발효한 불가사리 추출물의 제조방법을 포함한다.
- [0029] 상기 불가사리 추출물의 제조방법에 있어서, 단계(1)의 불가사리는 세척하고, 상기 세척 된 불가사리를 1 내지 2cm 크기로 자른 후, 자른 불가사리와 곡류를 혼합하여 준비 될 수 있다.
- [0030] 상기 세척 된 불가사리를 1 내지 2cm 크기로 자르는 것이 바람직하나 이에 한정하는 것은 아니다. 상기 불가사리를 자르는 것은 서로 완전히 동일한 크기로 자르는 것을 의미하는 것은 아니며, 대략 유사한 크기로 자르면 족하다. 상기 불가사리를 자름으로써 버섯 균사체와 불가사리가 접촉하는 면적을 증대시켜 발효의 효율을 증진시킬 수 있다.
- [0031] 또한, 상기 자른 불가사리와 곡류를 혼합 하는 것에 있어서, 상기 첨가 할 수 있는 곡류는 쌀겨, 쌀, 현미, 미강 등이 있으나 이에 한정하는 것은 아니다. 상기 자른 불가사리에 곡류를 혼합하는 것은 발효 과정 중 버섯 균사체의 증식을 위한 영양분을 공급함으로써, 발효 효율을 향상시키는 효과가 있다. 상기 버섯 균사체의 증식을 위한 영양분 공급은 버섯 균사체의 증식량, 증식속도 및 증식 기간을 결정한다.
- [0032] 상기 단계(1)에서 상기 버섯 균사체는 동충하초 균사체, 영지버섯 균사체, 상황버섯 균사체 또는 노루궁뎅이버섯 균사체를 접종하여 발효하는 것이 바람직하다. 상기 버섯 균사체 외에도 생물분류학 상 담자균문에 속한 버섯 균사체를 사용할 수 있으나, 이에 한정하는 것은 아니다.
- [0033] 또한, 상기 단계(1)의 발효의 배양 온도 및 시간은 당업자가 적절히 조절할 수 있으나, 온도 25℃에서 15 내지 20일간 이루어지는 것이 바람직하다. 발효 온도가 상기 발효 온도의 범위보다 너무 높거나 낮을 경우 또는 발효 기간이 상기 발효기간보다 너무 길거나 짧을 경우, 원활한 발효공정이 일어나지 않고 시간적, 비용적인 면에서 효율성이 떨어지며 부패하거나 버섯 균사체가 활성화되지 않는 문제가 발생하므로, 버섯 균사체를 이용하여 불가사리를 발효시켜 향산화 효과를 극대화하기 위해서는 상기 범위 내에서 발효하는 것이 바람직하다.
- [0034] 상기 단계(2)에서 불가사리 추출물은 용매 추출법, 초임계 추출법 또는 초음파 추출법 등의 방법으로 추출 될 수 있으며, 냉침추출법 또는 열수추출법으로 추출하는 것이 바람직하다. 용매추출법은 물, 탄수소 1 내지 4의 저급 알코올, 프로필렌글리콜, 부틸렌글리콜, 글리세린, 아세톤, 에틸아세테이트, 클로로포름, 메틸렌클로라이드, 부틸아세테이트, 디에틸에테르, 디클로로메탄 및 헥산을 포함하는 군에서 선택되는 1 이상의 추출용매를 이용하는 것이 바람직하나 이에 한정하는 것은 아니다.
- [0035] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 예시하기 위한 것으로서, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되는 것으로 해석되지는 않는 것은 당업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.
- [0037] **실시예 1. 버섯 균사체로 발효한 불가사리 추출물 제조**
- [0038] 동충하초 균사체를 이용하여 불가사리를 발효 하였다.
- [0039] 버섯 균사체로 발효한 불가사리 추출물을 제조하기 위하여 불가사리를 흐르는 물에 수회 깨끗하게 세척하였다. 발효의 효율을 증진시키기 위하여 상기 세척한 불가사리를 1cm 크기로 잘랐다.
- [0040] 또한, 동충하초 균사체의 증식속도를 증가시켜 발효 효율을 높이기 위해서 상기 자른 불가사리의 100중량부 대비 10중량부의 쌀겨를 혼합하여 온도 121.1℃에서 60분간 멸균하였다. 상기 멸균 된 불가사리 및 쌀겨 혼합물의 100중량부 대비 10중량부의 동충하초 균사체를 상기 멸균 된 혼합물에 접종하였으며, 배양온도 25℃에서 20일간 발효하여 불가사리 발효물을 제조 하였다.
- [0041] 상기 발효 후 불가사리 발효물에 있어서, 동충하초 균사체가 내부 및 외부에서 고르게 성장한 것을 시각적으로 확인 하였다.(도 1)
- [0042] 상기 불가사리 발효물을 동결건조 한 후, 건조 된 불가사리 발효물을 증류수로 2시간동안 끓여 열수추출 하였다. 상기 추출물을 Whatman No.41 여과지로 여과한 후, 감압동결건조 시켜 동충하초 균사체로 발효한 불가사리 추출물을 제조 하였다.
- [0043] 또한, 상기 동충하초 균사체로 발효한 불가사리 추출물과 향산화 활성을 비교하기 위하여, 상기와 같은 열수추

출범으로 불가사리 추출물 및 동충하초 추출물을 제조하였다.

- [0044] 상기 불가사리 추출물, 동충하초 추출물 및 동충하초 균사체로 발효한 불가사리 추출물의 수득률(% , w/w)은 각각 13.94%, 2.15% 및 21.35%였다. 특히, 동충하초 균사체로 발효한 불가사리 추출물의 수득률이 가장 높았다.
- [0045] **실시예 2. 전자스핀공명기기(Electron spin resonance, ESR)를 이용한 free radical 소거활성 측정**
- [0046] **2-1 전자스핀공명기기(ESR)를 이용한 DPPH radical 소거활성 측정**
- [0047] DPPH(2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) radical 소거활성은 Nanjo등의 방법(Scavenging effects of tea catechins and their derivatives on 1, 1-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical. *Free Radical Biology and Medicine*. 21: 890-895, 1996)으로 측정하였다.
- [0048] 상기 실시예1에서 제조한 불가사리 추출물, 동충하초 추출물, 동충하초 균사체로 발효한 불가사리 추출물을 각각 60 µl씩 DPPH 용액(60 µM) 60 µl와 혼합하였다. 상기 혼합액을 100 µL Teflon capillary tube에 옮기고, 전자스핀공명기기(ESR)를 이용하여 DPPH radical 소거활성을 측정하였다. 상기 DPPH radical 소거활성은 실시예1에서 제조한 각 추출물의 농도를 다르게 하여 측정하였다.
- [0049] DPPH radical이 50% 소거되었을 때의 상기 실시예1에서 제조한 추출물의 농도(IC<sub>50</sub>) 측정하였다. 상기 DPPH radical 결과는 DPPH radical이 50% 소거되었을 때의 상기 실시예1에서 제조한 추출물의 농도(IC<sub>50</sub>)를 나타내었다.
- [0050] 전자스핀공명기기(ESR)를 이용한 상기 실시예1에서 제조한 추출물의 DPPH radical 소거활성 측정 결과는 표 1에 도시하였다. 상기 결과는 DPPH radical이 50% 소거되었을 때의 상기 실시예1에서 제조한 추출물의 농도(IC<sub>50</sub>)를 나타내었다.
- [0051] DPPH radical이 50% 소거되었을 때, 불가사리 추출물의 농도는 313.4 µg/mL, 동충하초 추출물의 농도는 318 µg/mL인 것을 확인하였다. 또한, DPPH radical이 50% 소거되었을 때 동충하초 균사체로 발효한 불가사리 추출물의 농도는 10.06 µg/mL임을 확인하였다.
- [0052] 상기 결과에 따르면, 동충하초 균사체로 발효한 불가사리 추출물의 DPPH radical 소거활성은 불가사리 추출물 또는 동충하초 추출물보다 약 30배 높은 것을 확인할 수 있다.
- [0053] 또한, 전자스핀공명기기(ESR)를 이용한 상기 실시예1에서 제조한 추출물의 각 농도별 DPPH radical 소거활성 측정결과는 도 2에 도시하였다. 상기 결과에 따르면 상기 실시예1에서 제조한 동충하초 균사체로 발효한 불가사리 추출물은 31.25 µg/ml 내지 4000 µg/ml에서 현저한 DPPH radical 소거활성을 나타내었다.
- [0055] **2-2 전자스핀공명기기(ESR)를 이용한 Alkyl radical 소거활성 측정**
- [0056] Alkyl radical 소거활성은 Vajragupta등의 방법으로 측정하였다.
- [0057] 10mM AAPH(2,2-azobis(2-amidinopropane) hydrochloride), 10mM 4-POBN((4-pyridyl-1-oxide)-N-tert-butylnitron)를 각각 0.1mL씩 혼합하였다. 상기 혼합액에 실시예1에서 제조한 불가사리 추출물, 동충하초 추출물, 동충하초 균사체로 발효한 불가사리 추출물을 각각 0.1mL씩 첨가하여, PBS(pH 7.4) 반응용액을 제조하였다.
- [0058] 상기 제조 된 PBS 반응용액을 37°C에서 30분간 반응 시켰다. 상기 PBS 반응용액을 100 µL Teflon capillary tube에 옮기고, 전자스핀공명기기(ESR)를 이용하여 Alkyl radical 소거활성을 측정하였다. 상기 Alkyl radical 소거활성은 실시예1에서 제조한 각 추출물의 농도를 다르게 하여 측정하였다.
- [0059] 전자스핀공명기기(ESR)를 이용한 Alkyl radical 소거활성 측정 결과는 표1에 도시하였다. 상기 결과는 Alkyl radical이 50% 소거되었을 때의 상기 실시예1에서 제조한 추출물의 농도(IC<sub>50</sub>)를 나타내었다.
- [0060] Alkyl radical이 50% 소거되었을 때, 불가사리 추출물의 농도는 416.7 µg/mL, 동충하초 추출물의 농도는 372 µg/mL인 것을 확인하였다. 또한, Alkyl radical이 50% 소거되었을 때 동충하초 균사체로 발효한 불가사리 추출물의 농도는 71.38 µg/mL임을 확인하였다.
- [0061] 상기 결과에 따르면, 동충하초 균사체로 발효한 불가사리 추출물의 Alkyl radical 소거활성은 불가사리 추출물보다 약 6배, 동충하초 추출물보다 약 5배 높은 것을 확인할 수 있다.
- [0062] 또한, 전자스핀공명기기(ESR)를 이용한 상기 실시예1에서 제조한 추출물의 각 농도별 Alkyl radical 소거활성

측정결과는 도 3에 도시하였다. 상기 결과에 따르면 상기 실시예1에서 제조한 동충하초 균사체로 발효한 불가사리 추출물은 62.5 µg/ml 내지 4000 µg/ml에서 현저한 Alkyl radical 소거활성을 나타내었다.

[0064] **2-3 전자스핀공명기기(ESR)를 이용한 Hydroxyl radical 소거활성 측정**

[0065] Hydroxyl radical 소거활성은 펜톤반응(Fenton-driven Haber-Weiss reation)으로 측정하였다.

[0066] 상기 실시예1에서 제조한 불가사리 추출물, 동충하초 추출물, 동충하초 균사체로 발효한 불가사리 추출물을 각각 0.2ml씩,

[0067] 0.3M DMP0(5,5-dimethyl-1-pyrroline N-oxide), 10 mM FeSO4 및 10 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>(pH 7.4, 0.1 M phosphate buffer)를 각각 0.2 ml씩 혼합하였다. 상기 혼합액에 실시예1에서 제조한 불가사리 추출물, 동충하초 추출물, 동충하초 균사체로 발효한 불가사리 추출물을 각각 0.2ml씩 첨가하였다.

[0068] 상기 각 추출물이 첨가 된 혼합액을 100 µL Teflon capillary tube에 옮기고, 전자스핀공명기기(ESR)를 이용하여 Hydroxyl radical 소거활성을 측정하였다.

[0069] 전자스핀공명기기(ESR)를 이용한 Hydroxyl radical 소거활성 측정 결과는 표1에 도시하였다. 상기 결과는 Hydroxyl radical이 50% 소거되었을 때의 상기 실시예1에서 제조한 추출물의 농도(IC<sub>50</sub>)를 나타내었다. 상기 Hydroxyl radical 소거활성은 실시예1에서 제조한 각 추출물의 농도를 다르게 하여 측정하였다.

[0070] Hydroxyl radical이 50% 소거되었을 때, 불가사리 추출물의 농도는 3468.9 µg/mL, 동충하초 추출물의 농도는 515 µg/mL인 것을 확인하였다. 또한, Hydroxyl radical이 50% 소거되었을 때 동충하초 균사체로 발효한 불가사리 추출물의 농도는 863.12 µg/mL임을 확인하였다.

[0071] 상기 결과에 따르면, 동충하초 균사체로 발효한 불가사리 추출물의 Hydroxyl radical 소거활성은 불가사리 추출물보다 약 4배 높았으나, 동충하초 추출물보다는 약 1.6배 낮은 것을 확인할 수 있다.

[0073] **2-4 전자스핀공명기기(ESR)를 이용한 Superoxide radical 소거활성 측정**

[0074] Superoxide radical은 riboflavin/EDTA용액에 UV를 쬐어 생성된다.

[0075] 상기 riboflavin/EDTA용액은 0.8mM riboflavin 0.1ml, 1.6mM EDTA 0.1ml, 800mM DMP0(5, 5-dimethyl-1-pyrroline N-oxide) 0.1ml을 혼합하여 제조하였다. 상기 riboflavin/EDTA용액에 실시예1에서 제조한 동충하초 추출물, 동충하초 균사체로 발효한 불가사리 추출물을 각각 0.1ml씩 첨가하였다.

[0076] 상기 용액을 365nm의 UV 램프에서 1분간 노출시킨 후, 100 µl quartz capillary tube에 옮겨 전자스핀공명기기(ESR)를 이용하여 Superoxide radical 소거활성을 측정하였다. 상기 Superoxide radical 소거활성은 실시예1에서 제조한 각 추출물의 농도를 다르게 하여 측정하였다.

[0077] 전자스핀공명기기(ESR)를 이용한 Superoxide radical 소거활성 측정 결과는 표1에 도시하였다. 상기 결과는 Superoxide radical이 50% 소거되었을 때의 상기 실시예1에서 제조한 추출물의 농도(IC<sub>50</sub>)를 나타내었다.

[0078] Superoxide radical이 50% 소거되었을 때, 동충하초 추출물의 농도는 866 µg/mL인 것을 확인하였다. 또한, Superoxide radical이 50% 소거되었을 때, 동충하초 균사체로 발효한 불가사리 추출물의 농도는 12.4 µg/mL임을 확인하였다.

[0079] 상기 결과에 따르면, 동충하초 균사체로 발효한 불가사리 추출물의 Superoxide radical 소거활성은 동충하초 추출물보다 약 70배 높은 것을 확인할 수 있다.

[0080] 또한, 전자스핀공명기기(ESR)를 이용한 상기 실시예1에서 제조한 추출물의 각 농도별 Superoxide radical 소거활성 측정결과는 도 4에 도시하였다. 상기 결과에 따르면 상기 실시예1에서 제조한 동충하초 균사체로 발효한 불가사리 추출물은 15.625 µg/ml 내지 4000 µg/ml에서 현저한 Superoxide radical 소거활성을 나타내었다.

**표 1**

[0081] **전자스핀공명기기(ESR)를 이용한 free radical 소거활성(IC<sub>50</sub>, µg/mL)**

Samples	DPPH radical	Alkyl radical	Hydroxyl radical	Superoxide radical
불가사리 추출물	313.4	416.7	3468.9	-
동충하초 추출물	318	372	515	866

동충하초 균사체로 발효한 불가사리 추출물	10.06	71.38	863.12	12.4
------------------------	-------	-------	--------	------

[0083] \* IC<sub>50</sub> : free radical이 50%감소 되었을 때 추출물의 농도.

[0085] 실시예 3. 흡광도 측정법을 이용한 총 항산화력 측정

[0086] 3-1 FRAP(Ferric reducing antioxidant power)를 이용한 총 항산화력 측정

[0087] FRAP(Ferric reducing antioxidant power)법은 철이온의 전자공여 능력을 이용하여, 산화제로 작용하는 Fe<sup>3+</sup>와 항산화제와의 반응을 통해 생성된 Fe<sup>2+</sup>을 흡광도를 정량하여 총 항산화력을 측정하는 방법이다.

[0088] FRAP시약은 0.3M acetate buffer : 40mM HCl에 용해한 10mM TPTZ(2,4,6-Tris(2-pyridyl)-s-triazine) : 20mM ferric chloride를 10:1:1의 부피비로 혼합하여 제조하였다.

[0089] 상기 제조한 FRAP시약 3ml과 실시예1에서 제조한 불가사리 추출물, 동충하초 추출물, 동충하초 균사체로 발효한 불가사리 추출물을 각각 1ml씩 첨가하여 반응시킨 후, 상기 각 추출물을 첨가한 혼합액의 흡광도를 측정하였다.

[0090] 상기 FRAP법으로 총 항산화력을 측정한 결과는 표 2에 도시하였다. 상기 흡광도 측정 결과는 FeSO<sub>4</sub>를 표준물질로 하여 mM FeSO<sub>4</sub> eq./mg extract로 나타내었다.

[0091] FRAP법으로 흡광도를 측정한 결과, 불가사리 추출물은 0.054mM FeSO<sub>4</sub> eq./mg extract, 동충하초 추출물은 0.053mM FeSO<sub>4</sub> eq./mg extract인 것을 확인하였다. 또한, 동충하초 균사체로 발효한 불가사리 추출물은 0.875mM FeSO<sub>4</sub> eq./mg extract임을 확인하였다.

[0092] 상기 결과에 따르면, 동충하초 균사체로 발효한 불가사리 추출물이 불가사리 추출물 또는 동충하초 추출물보다 총 항산화력이 약 16배 높은 것을 확인 할 수 있다.

[0093] 3-2 ABTS(2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid)) radical을 이용한 총 항산화력 측정

[0094] ABTS radical을 이용한 총 항산화력 측정은 potassium persulfate(K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub>)의 반응으로 생성된 ABTS radical이 추출물 내의 항산화 성분에 의해 제거되어, 상기 ABTS radical 특유의 색인 청록색이 탈색되는 것을 이용한 방법이다.

[0095] ABTS radical cation(ABTS<sup>+</sup>) 용액은 7mM ABTS에 2.45mM potassium persulfate(K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub>)를 첨가하여 제조하였다. 또한, 상기 ABTS radical cation 용액은 상온의 암실에서 15 내지 18시간(overnight) 반응시켰다. 상기 15 내지 18시간(overnight) 반응시키는 것은 가능한 한 최대의 ABTS radical을 생성하기 위한 것이다.

[0096] 실시예1에서 제조한 불가사리추출물, 동충하초 추출물, 동충하초 균사체로 발효한 불가사리 추출물 각각 0.1ml과 상기 ABTS radical cation용액 0.9ml 혼합하였고, 상기 용액을 상온에서 6분간 반응 시켰다. 상기 용액의 총 항산화력은 에탄올을 대조군으로 하여, 734nm에서 흡광도를 측정하여 확인하였다.

[0097] 상기 ABTS radical을 이용하여 총 항산화력을 측정 결과는 표2에 도시하였다. 상기 측정한 총 항산화력은 TEAC(Trolox equivalents antioxidant capacity)로 나타냈으며, 상기 TEAC의 단위는 mM Trolox eq./mg extract이다.

[0098] 실시예1에서 제조한 불가사리 추출물의 총 항산화력은 0.182mM Trolox eq./mg extract, 동충하초 추출물의 총 항산화력은 0.116mM Trolox eq./mg extract인 것을 확인하였다. 또한, 실시예1에서 제조한 동충하초 균사체로 발효한 불가사리 추출물의 총 항산화력은 0.530mM Trolox eq./mg extract임을 확인하였다.

[0099] 상기 결과에 따르면, 동충하초 균사체로 발효한 불가사리 추출물의 총 항산화력은 불가사리 추출물 또는 동충하초 추출물보다 약 3.74배 높은 것을 확인 할 수 있다.

**표 2**

**불가사리 추출물, 동충하초 추출물 및 동충하초 균사체로 발효한 불가사리 추출물의 총 항산화력**

samples	FRAP (mM FeSO4 eq./mg extract)	TEAC (mM Trolox eq./mg extract)
불가사리 추출물	0.054	0.182
동충하초 추출물	0.053	0.116
동충하초 균사체로 발효한 불가사리 추출물	0.875	0.530

[0102]

\* FRAP : Ferric reducing antioxidant power

[0103]

\* TEAC : Trolox equivalent antioxidant capacity

[0105]

**실시예 4. 흡광도 측정법을 이용한 지질 과산화 억제활성 측정**

[0106]

**4-1 FTC(Ferric thiocyanate)법을 이용한 지질 과산화 억제활성 측정**

[0107]

지질 과산화 억제활성은 Kikuzaki 와 Nakatani(Antioxidant effects of some ginger constituents. Journal of Food Science. 58: 1407-1410, 1993)의 FTC법을 이용하여 linoleic acid의 과산화 억제 효과 측정하였다. 또한, 상기 FTC법은 지질 산화의 단계 중 초기단계의 과산화물을 측정한다.

[0108]

FTC법은 하기의 단계(i) 내지 (iv)를 포함한다.

[0109]

(i) 실시예1에서 제조한 불가사리 추출물, 동충하초 추출물, 동충하초 균사체로 발효한 불가사리 추출물 각각 1mg/mL의 농도로 99.5%의 에탄올에 혼합하는 단계;

[0110]

(ii) 상기 단계(i)에서 제조한 용액과 99.5% 에탄올에 용해 된 2.51% linoleic acid 4.1ml, 0.05M phosphate buffer(pH7.0) 8ml 및 증류수 3.9ml을 혼합하여 40℃의 암실에서 반응시키는 단계;

[0111]

(iii) 상기 단계(ii)에서 반응한 용액 0.1ml, 75% ethanol 9.7ml 및 30% ammonium thiocyanate 0.1ml을 혼합하여 반응시키는 단계; 및

[0112]

(iv)상기 단계(iv)의 용액 및 3.5% HCl에 용해 된 0.02M ferrous chloride 0.1ml을 혼합하여 500nm에서 흡광도를 측정하는 단계.

[0114]

FTC법으로 실시예1에서 제조한 추출물의 지질과산화 억제효과를 비교하기 위하여, 양성대조군으로 1.0mg/ml 비타민C 및  $\alpha$ -tocopherol을 사용하였다. 또한, 음성대조군으로 상기 제조 된 용액에 추출물을 첨가하지 않은 것을 사용하였다. 수용성인 비타민C 및 지용성인  $\alpha$ -tocopherol은 항산화 실험의 양성대조군으로 널리 사용된다.

[0115]

상기 FTC법으로 지질산화의 초기단계에서 지질 과산화 억제 활성을 측정한 결과는 도 5과 같다.

[0116]

도 5에 있어서, 추출물을 첨가하지 않은 음성대조군(도 5. control)은 과산화물이 점진적으로 증가하여 2일차에서 지질 과산화물의 흡광도가 급격히 증가하였으며, 4일차에는 최고 수준에 도달하였고, 6일차에는 점차 감소하는 양상을 보였다. 또한, 양성대조군 중 하나인 Vitamin C는 수용성이므로, 지질과 반응이 쉽게 이루어지지 않아, 지질 과산화물의 흡광도는 음성대조군(도 5. control)과 비슷한 양상을 보였다. 또한, 실시예 1에서 제조한 불가사리 추출물 및 동충하초 추출물은 지질 과산화물의 흡광도가 2일차에서 급격히 증가 하였으며, 4일차에는 최고수준에 도달하였고 6일차에는 점차 감소하는 양상을 보였다.

[0117]

그러나, 또 다른 양성대조군으로 사용 된 지용성 Vitamin E의 한 형태인  $\alpha$ -tocopherol은 지질과 반응하여, 실험 전체 기간에서 지질 과산화물의 흡광도가 낮은 양상을 보였다. 또한, 실시예 1에서 제조한 동충하초 균사체로 발효한 불가사리 추출물은 실험 전체 기간에서 지질 과산화물의 흡광도가 낮았으며, 양성대조군인  $\alpha$ -tocopherol과 비슷한 양상을 보였다.

[0118]

상기 결과에 따르면, 동충하초 균사체로 발효한 불가사리 추출물 및  $\alpha$ -tocopherol은 현저한 지질산화 억제 활성을 확인하였다. 또한, 동충하초 균사체로 발효한 불가사리 추출물은 불가사리 추출물 및 동충하초 추출물보다 현저한 지질과산화 억제 활성이 있었으며, linoleic acid의 자기산화 기간이 연장되는 것을 확인하였다.

[0119]

**4-2 TBA(Thiobarbituric acid)법을 이용한 지질 과산화 억제활성 측정**

[0120]

Ottolenghi(Interaction of ascorbic acid and mitochondria lipids. Archives of Biochemistry and Biophysics. 79: 355 (1959))의 TBA법을 이용하여 지질 과산화 억제활성을 측정 하였다. 또한, 상기 TBA법은

지질 산화의 단계 중 후기 단계의 과산화물을 측정한다.

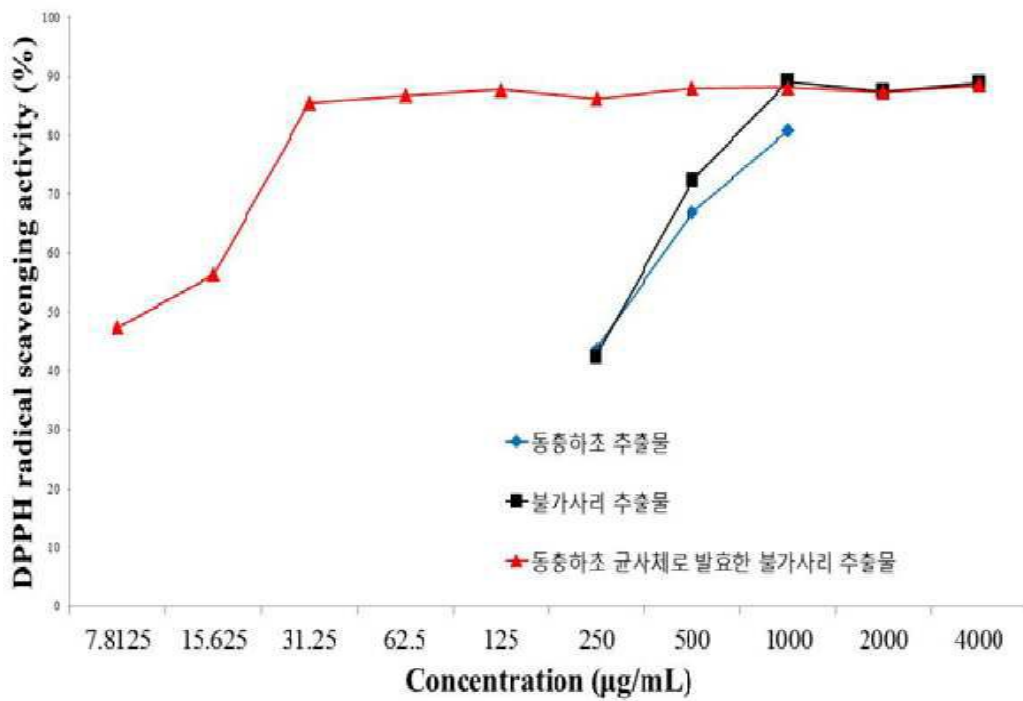
- [0121] 농도가 20%인 trichloroacetic acid 2ml 및 0.67% thiobarbituric acid(TBA) 2ml을 혼합하여 TCA/TBA용액을 제조한다. 상기 제조한 TCA/TBA용액에 불가사리 추출물, 동충하초 추출물, 동충하초 균사체로 발효한 불가사리 추출물 각각 1ml씩 혼합한 후, 100℃의 물에서 10분간 반응시킨다. 상기 반응시킨 용액을 식힌 후, 3000rpm으로 20분간 원심 분리한다. 원심분리 후 상층액을 532nm에서 흡광도를 측정하였다.
- [0122] TBA법으로 실시예1에서 제조한 추출물의 지질과산화 억제효과를 비교하기 위하여, 양성대조군으로 1.0mg/ml 비타민C 및  $\alpha$ -tocopherol을 사용하였다. 또한, 음성대조군으로 상기 제조된 용액에 추출물을 첨가하지 않은 것을 사용하였다. 수용성인 비타민C 및 지용성인  $\alpha$ -tocopherol은 항산화 실험의 양성대조군으로 널리 사용된다.
- [0123] 상기 TBA법으로 지질 산화의 후기단계에서 지질 과산화 억제 활성을 측정한 결과는 도 6과 같다.
- [0124] 도 6에 있어서, 추출물을 첨가하지 않은 음성대조군(도 6. control)은 지질 과산화물의 흡광도가 점진적으로 증가하였으며, 8일차에서 최고 수준에 도달하였다. 또한, 양성대조군 중 하나인 Vitamin C는 수용성이므로, 지질과 반응이 쉽게 이루어지지 않아, 지질 과산화물의 흡광도는 음성대조군(도 6. control)과 비슷한 양상을 보였다. 또한, 실시예 1에서 제조한 불가사리 추출물 및 동충하초 추출물은 지질 과산화물의 흡광도가 4일차에서 급격히 증가 하였으며, 8일차에는 최고 수준에 도달하였다.
- [0125] 그러나, 또 다른 양성대조군으로 사용된 지용성 Vitamin E의 한 형태인  $\alpha$ -tocopherol은 지질과 반응하여, 실험 전체 기간에서 지질 과산화물의 흡광도가 낮은 양상을 보였다. 또한, 실시예 1에서 제조한 동충하초 균사체로 발효한 불가사리 추출물은 8일차까지 음성대조군(도 6. control), Vitamin C, 실시예 1에서 제조한 불가사리 추출물 및 동충하초 추출물과 비교하여 지질 과산화물의 흡광도가 낮았으며, 10일차부터 지질 과산화물의 흡광도가 증가하는 양상을 보였다.
- [0126] 상기 결과에 따르면, 실시예 1에서 제조한 동충하초 균사체로 발효한 불가사리 추출물은 불가사리 추출물 및 동충하초 추출물과 비교하여, 반응 시작부터 8일차까지 현저한 지질산화 억제활성이 있다는 것을 확인하였다. 또한, 실시예 1에서 제조한 동충하초 균사체로 발효한 불가사리 추출물의 항산화 활성은 지질산화의 기간을 연장 및 억제하였다.
- [0127] 이상, 본 발명내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 실시양태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의해 정의된다고 할 것이다.

도면

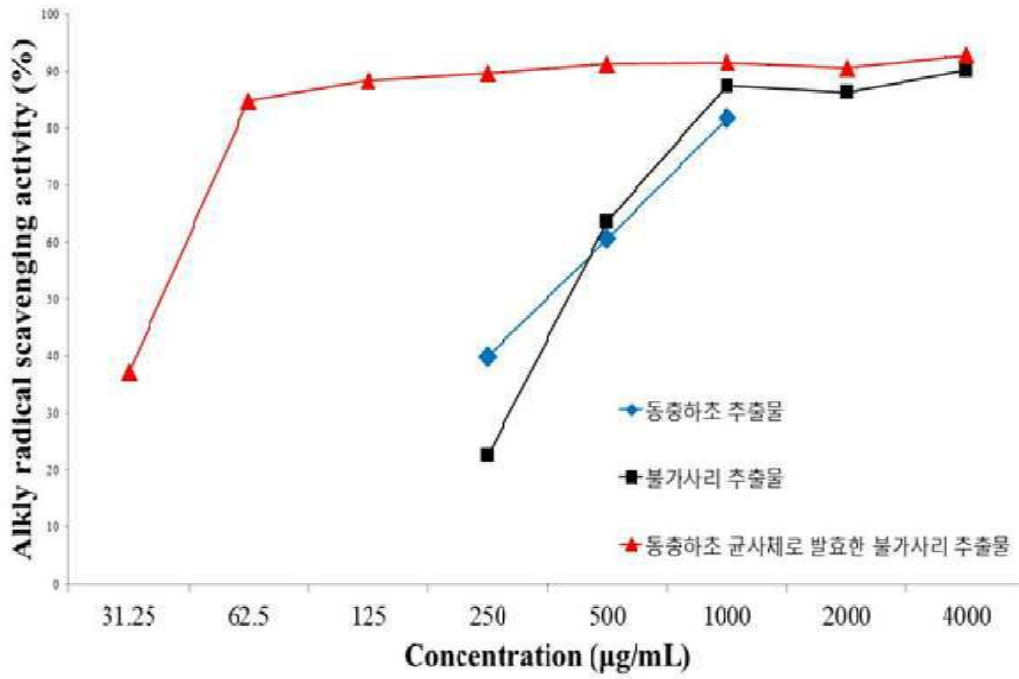
도면1



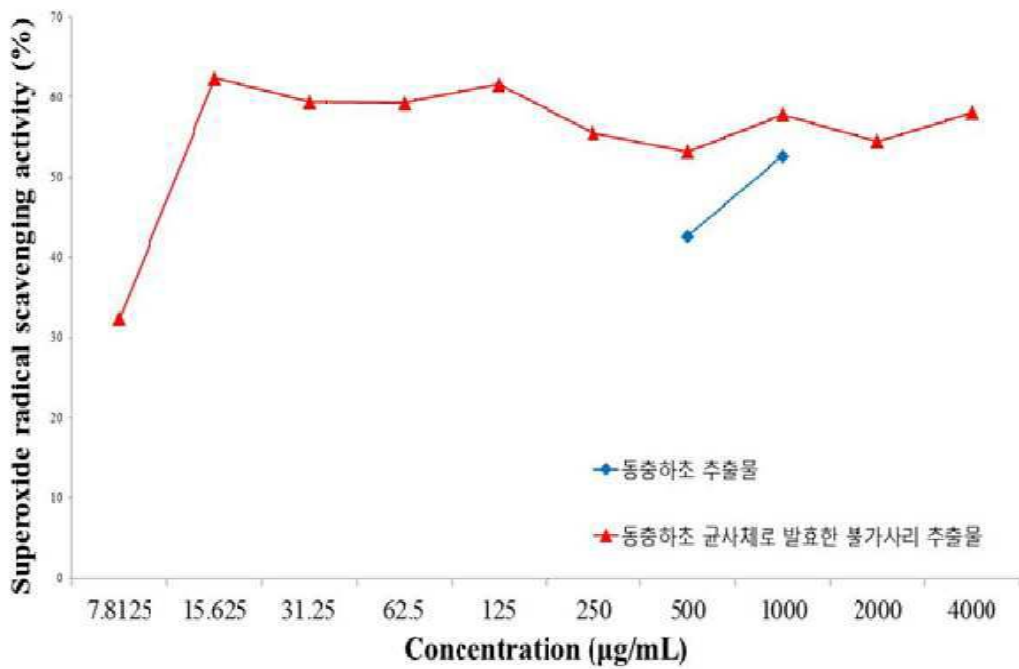
도면2



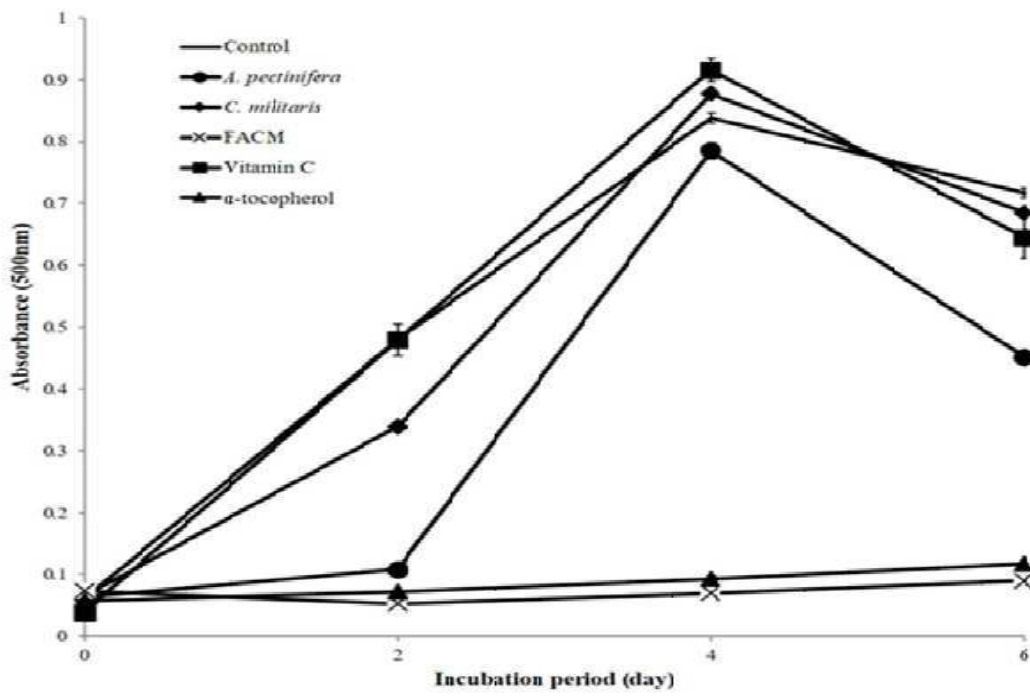
도면3



도면4



도면5



도면6

