



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2014-0005443
(43) 공개일자 2014년01월15일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12J 1/04 (2006.01) C12R 1/225 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2012-0072619

(22) 출원일자 2012년07월04일

심사청구일자 2012년07월04일

(71) 출원인

전북대학교산학협력단

전라북도 전주시 덕진구 백제대로 567 (덕진동1가)

남마을민들레영농조합법인

전라북도 임실군 신덕면 불재로 54-50

(뒷면에 계속)

(72) 발명자

백상호

전라북도 전주시 완산구 세내로 241 (효자동2가, 효자1차엘드수목토아파트) 104동 1102호

신남식

전라북도 임실군 신덕면 불재로 54-50

송영란

전라북도 전주시 완산구 온고을로 119 (서신동, 신일아파트) 101동 1205호

(74) 대리인

김순웅

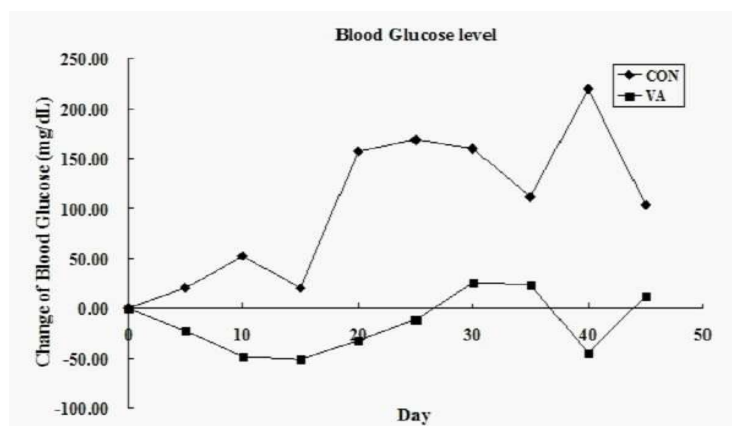
전체 청구항 수 : 총 6 항

(54) 발명의 명칭 고추잎 발효식초 및 이의 제조방법

(57) 요약

본 발명은 본 발명은 고추잎 발효액을 유효성분으로 포함하는 고추잎 발효식초 및 이의 제조방법에 관한 것이다. 본 발명의 고추잎 발효액을 포함하는 고추잎 발효식초는 폐기되는 고추잎 자원을 원료로 이용하여 고추잎 자원의 활용도가 높고, 특히 본 발명의 고추잎을 주원료로 한 고추잎 발효액을 포함하는 고추잎 발효식초는 AGI 활성이 뛰어나 탄수화물의 소화 흡수율을 저하시킴으로써, 혈당치의 상승을 억제하며 항산화 능력이 우수하여 당뇨병, 비만증, 과당증 등의 성인병 예방 또는 치료에 유용하게 사용할 수 있다.

대표도 - 도7



(71) 출원인

임실군

전라북도 임실군 임실읍 중동1길 14

재단법인 전라북도생물산업진흥원

전라북도 전주시 덕진구 혁신로 399 (장동)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2011001106

부처명 임실군

연구사업명 2011농산물가공기술개발 및 시제품제작지원사업

연구과제명 당뇨병 예방 및 치료를 위한 AGI 고함유 고추잎(원기1호)을 활용한 발효식초의 개발

기 여 율 1/1

주관기관 남마을민들레영농조합법인

연구기간 2011.09.21 ~ 2012.07.20

특허청구의 범위

청구항 1

- (a) 고추잎 발효액을 정제수와 6:4 내지 8:2의 중량비로 혼합하는 단계;
- (b) 상기 혼합물 1톤당 효모 15 내지 25g을 접종하여 15~20℃ 에서 15 내지 25일간 알코올 발효시키는 단계;
- (c) 상기 알코올 발효산물에 민들레 종초를 알코올 발효산물 대비 10~20% (v/v)의 농도로 접종한 후 15 내지 25일간 초산 발효시키는 단계;
- (d) 상기 초산 발효산물을 실온에서 5~6개월 동안 발효 및 숙성시켜 여과하는 단계;
- (e) 상기 (d) 단계에서 얻은 여과액을 6~7℃ 에서 5~6개월 동안 정지 및 숙성하는 단계; 및
- (f) 상기 (e)단계에서 얻은 발효액을 60~80℃에서 살균하는 단계; 를 포함하는 AGI(α -glucosidase inhibitor) 활성이 증가된 고추잎 발효식초의 제조방법.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 (a)단계에서 고추잎 발효액은

- (i) 고추잎을 세척하고 건조하는 단계;
- (ii) 상기 건조된 고추잎을 설탕 및 정제수와 혼합하여 8~12일간 저장하는 단계; 및
- (iii) 상기 혼합물에 *Lactobacillus homohiochii* 1 배양액 및 *Lactobacillus homohiochii* 2 배양액을 6:4 내지 8:2의 중량비로 접종하고 25~35℃ 에서 25 내지 35일간 발효시키는 단계; 를 포함하여 제조되는 것을 특징으로 하는, AGI 활성이 증가된 고추잎 발효식초의 제조방법.

청구항 3

제2항에 있어서,

상기 (iii)단계 이후, (iv) 고추잎 발효액을 실온에서 3개월 내지 6개월 동안 발효시키는 단계; 를 더 포함하는 것을 특징으로 하는, AGI 활성이 증가된 고추잎 발효식초의 제조방법.

청구항 4

제3항에 있어서,

상기 (iv)단계 이후, (v) 고추잎 발효액을 5~10℃ 에서 5개월 내지 7개월간 숙성시키는 단계를 더 포함하는 것을 특징으로 하는, AGI 활성이 증가된 고추잎 발효식초의 제조방법.

청구항 5

제2항에 있어서,

상기 (ii) 단계에서 고추잎, 설탕 및 정제수의 혼합비율은 고추잎 100 중량부를 기준으로, 설탕 90~110 중량부 및 정제수 90~110 중량부인 것을 특징으로 하는, AGI 활성이 증가된 고추잎 발효식초의 제조방법.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항의 방법에 의하여 제조된 AGI 활성이 증가된 고추잎 발효식초.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 고추잎 발효액을 유효성분으로 포함하는 AGI(α -glucosidase inhibitor) 활성이 증가된 고추잎 발효식초 및 이의 제조방법에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 최근, 급속한 경제발전으로 인한 국민들의 식생활의 서구화와 편의생활에 따른 활동량 감소 및 체중증가는 동맥 경화, 고혈압, 암, 비만 및 당뇨병 등과 같은 성인병의 급증으로 이어지고 있다. 그 중 당뇨병은 매우 빠른 속도로 증가하고 있으며, 동시에 그 유병 연령이 점차 낮아지고 있어 그 심각성이 매우 크다. 우리나라의 당뇨병 환자는 대부분 인슐린 비의존형 당뇨병 환자이며, 그 치료 약물에 대한 연구로는 당의 소화 및 흡수에 관여하는 알파-글루코시다아제(α -glucosidase) 및 알파-아밀라아제(α -amylase) 저해제에 대한 연구가 진행되고 있다. 그러나, 현재까지 당뇨병 치료를 위해 사용되고 있는 혈당강하제(설폰닐요소제, 메크포르민 등)는 많은 약물 부작용으로 인해 제한적으로만 이용되고 있는 실정이다. 한편, 식품유래 AGI(α -glucosidase inhibitor)는 십이지장을 비롯한 장의 상부에서 탄수화물의 소화흡수율을 직접적으로 저하시킴으로써 식후 혈당치의 상승을 억제하므로, 부작용 없이 당뇨병, 비만증, 과당증 등의 성인병 예방과 치료 목적에 이용될 수 있을 것이라고 기대되고 있다.

[0003] 고추는 많은 양의 조지방, 조섬유 이외에도 포도당, 자당 등의 당과 아미노산, 무기질, 비타민 C, 카로티노이드 등을 풍부하게 함유하고 있으며, 식품의 관능적 품질에 기여하는 캡산틴, 베타카로틴, 캅소루빈 등의 색소성분, 알킬 메톡시 피라진(alkyl methoxy pyrazine) 등의 향미성분, 캡사이신, 디하이드로 캡사이신 등의 매운맛 성분이 포함되어 있음이 알려져 있고, 최근에는 당뇨병성 신경증이나 관절염, 대상포진 후 신경통, 피부건선 등 여러 질병의 치료 효과가 있다고 보고되었다. 한편, 고추잎은 수분 79.4%, 단백질 4.1%, 지질 1%, 섬유소 3.8%, 당질 8.2%, 회분 3.5%로 구성되어 있고, 풍부한 비타민A, 비타민C, 폴리페놀, 플라보노이드 등을 함유하고 있으며, DPPH 라디칼 소거능, 과산화수소 소거능 및 높은 항산화능을 가지고 있다는 것이 보고되었다. 또한 유방암, 대장암 및 위암 등의 암세포 증식 억제 효과, 보체계 활성화효과 등 항암효과와 면역증진, 항균활성 및 티로시나아제(tyrosinase) 저해활성 등을 가진다고 알려져, 고추열매에 못지 않게 중요한 기능성식품소재로 주목받고 있다. 그러나, 고추 열매의 가공 및 저장에 대한 제품개발과 연구자료에 비해 고추잎을 이용한 가공 및 식품 개발은 거의 전무하며, 특히 고추잎을 주재료로 한 기능성식품의 개발은 이루어진 바 없다. 고추는 중국을 비롯한 세계 각지에서 최근 10년간 2배 이상의 생산량 증가율을 나타내는 작물로, 인구기준으로 볼 때 우리나라는 세계에서 고추를 가장 많이 소비하는 국가 중 하나로 알려져 있으며, 그 생산량 또한 높다. 그럼에도 불구하고, 고추잎을 식품으로 섭취하는 국가는 한국을 제외하고는 크게 알려진 바가 없으며, 국내에서도 어린잎에 한하여 나물로 식용되고 있어, 대부분의 고추잎이 폐기되고 있는 실정이다.

[0004] 한편, 예로부터 식초는 살균작용, 호흡기병, 옴 등과 관련된 건강과 미용을 위해 음용되었으며, 민간의약으로도 널리 사용되었다. 한방에서 식초는 ‘안으로 기운을 거두어들이는 성질’이 있는 맛이 있다고 하여 식욕 증진, 소화액 분비 촉진, 피로 회복, 비타민과 철분의 흡수 증가 및 변비 예방 등의 효과를 가지므로 암환자에게 식이요법으로 권해지고 있는 발효식품이다. 또한 식초는 혈중 콜레스테롤 수치를 낮추며 과산화 지질을 제거하기 때문에 비만 방지 작용뿐만 아니라 고혈압, 동맥경화, 고지혈증 등의 증상을 개선하는 효과를 가진다는 여러 연구가 보고된바 있다. 또한, 식초는 K, Ca 등 무기질이 풍부한 알칼리성 식품으로 신맛은 단순히 요리의 조미용도뿐 아니라 기호성을 향상시키고, 생체조절을 위한 목적으로 사용되는 경우가 많다. 신맛을 내는 초산, 구연산 등 식초에 포함된 유기산은 당류의 에너지 대사 중간물질로서 에너지 대사를 원활하게 촉진시킬 뿐만 아니라 에너지 대사에 직접 참여하여 에너지원으로 이용되기도 한다. 최근, 식생활의 다양화와 더불어 품질이 우수하고 안전성이 확보된 양조식초에 대한 소비자의 관심이 크게 높아지고 있어 사과, 감, 배, 매실 등의 새로운 과일이나 야채 등을 이용하여 독특한 풍미를 가진 양조식초를 개발하고자 하는 시도가 활발하게 이루어지고 있으며,

특히 향후 식초시장은 일본에서와 같이 향암, 항돌연변이, 항노화, 면역 등의 기능성을 가진 다양한 제품이 출시될 것으로 전망되고 있다. 현재 고추를 주재료로 하는 고추식초 (대한민국 등록특허공보 제10-0559074호, 대한민국 특허공개공보 제 10-2010-0082446호, 및 제 10-2010-0133720호) 에 관하여는 개발 및 생산된 바 있으나, 고추잎을 이용한 기능성 가공식품은 개발 및 생산되고 있지 않은바, 따라서 고추잎 유래의 식품의 개발은 천연소재의 이용 및 부산물의 이용이라는 두가지 관점에서 당뇨병을 예방하는 식품소재로서 기대가 크다고 할 수 있다. 고추잎을 이용한 발효식초의 개발 및 연구의 필요성이 절실히 요구되고 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0005] 본 발명자들은 고추잎을 이용한 발효식초에 대해 연구하던 중, 고추잎을 유산균 발효 및 초산 발효시켜 발효액을 제조한 후 이를 이용하여 고추잎 발효식초를 제조하였으며, 상기 제조된 고추잎 발효식초의 항산화 효능, 알파-글루코시다아제 억제활성(α -glucosidase inhibitor, AGI), 및 면역증강효과가 우수하게 나타남을 확인하고, 본 발명을 완성하였다.

[0006] 따라서, 본 발명은 고추잎 발효액을 유효성분으로 포함하는 AGI(α -glucosidase inhibitor) 활성이 증가된 고추잎 발효식초 및 이의 제조방법을 제공하고자 한다.

과제의 해결 수단

[0007] 본 발명은 고추잎 발효액을 유효성분으로 포함하는 AGI(α -glucosidase inhibitor) 활성이 증가된 고추잎 발효식초 및 이의 제조방법을 제공한다.

발명의 효과

[0008] 본 발명의 고추잎 발효식초는 폐기되는 고추잎 자원을 원료로 이용하여 고추잎 자원의 활용도가 높고, 특히 본 발명의 고추잎을 주원료로 한 고추잎 발효액을 포함하는 고추잎 발효식초는 AGI활성이 뛰어나 탄수화물의 소화 흡수율을 저하시킴으로써, 혈당치의 상승을 억제하며 항산화 능력이 우수하여 당뇨병, 비만증, 과당증 등의 성인병 예방 또는 치료 목적에 유용하게 사용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0009] 도 1은 고추잎 발효액의 제조공정을 나타낸 도이다.

도 2는 고추잎 발효식초의 제조공정을 나타낸 도이다.

도 3은 고추잎 발효액 및 고추잎 발효식초를 나타낸 도이다.

도 4는 고추잎 발효액 및 고추잎 발효식초의 알파-글루코시다아제(α -glucosidase) 저해능을 나타낸 도이다.

도 5는 고추잎 발효액 및 고추잎 발효식초의 DPPH 라디칼 소거 활성능을 나타낸 도이다.

도 6은 고추잎 발효액 및 고추잎 발효식초의 SOD 유사 활성능을 나타낸 도이다.

도 7은 고추잎 발효식초의 당뇨개선 효과를 나타낸 도이다.

도 8은 고추잎 발효식초를 처리한 생쥐의 당내성에 미치는 결과를 나타낸 도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0010] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

- [0011] 본 발명의 고추잎 발효식초는 하기와 같은 방법으로 제조될 수 있다. 먼저, 고추잎 발효액을 정제수와 6:4 내지 8:2의 중량비로 혼합한 후, 상기 혼합물 1톤당 효모 15 내지 25g을 접종하여 15~20℃ 에서 15 내지 25일간 알코올 발효시킨다. 상기 알코올 발효산물에 민들레 종초를 알코올 발효산물 대비 10~20% (v/v)의 농도로 접종한 후 15 내지 25일간 초산 발효시킨다. 상기 초산 발효산물을 실온에서 5~6개월 동안 발효 및 숙성시켜 여과한 다음, 6~7℃ 에서 5~6개월 동안 정치 및 숙성한 후에 발효식초를 60~80℃에서 살균한다.
- [0012] 상기 고추잎 발효식초의 종초인 민들레 종초는 재단법인 민들레 영농조합에서 제조한 민들레 식초를 구입하여 사용하였다.
- [0013] 상기 발효 및 숙성 과정은 대부분 초산 발효가 완료된 시기에 발효가 완료되지 않은 잔여성분에 대한 발효를 유도하는 과정이며, 상기 정치 및 숙성 과정은 각종 향미성분의 변화가 일어나는 과정이다.
- [0014] 본 발명의 고추잎 발효액은 하기와 같은 방법으로 제조될 수 있다. 먼저, 고추잎을 깨끗이 세척한 다음 건조한다. 세척, 건조된 고추잎을 설탕 및 정제수와 각각 고추잎 100 중량부를 기준으로, 설탕 90~110 중량부, 및 정제수 90~110 중량부, 바람직하게는 설탕 100 중량부 및 정제수 100 중량부와 혼합하여 8~12일간 저장한다. 상기 저장된 혼합물에 *Lactobacillus homohiochii* 1 배양액 및 *Lactobacillus homohiochii* 2 배양액을 6:4 내지 8:2의 중량비로, 바람직하게는 7:3의 중량비로 접종하여 25~35℃ 에서 25 내지 35일간 발효시킨 다음, 실온에서 3개월 내지 6개월 동안 발효시킨다.
- [0015] 본 발명의 고추잎 발효액은 고추잎을 주재료로 사용하였으며, 고추잎 이외에 고추를 부재료로 사용할 수 있다.
- [0016] 본 발명의 고추잎 발효액의 제조방법에 있어서, 상기 정제수는 시중에 유통되는 일반 정수기를 이용하여 정수한 물을 의미한다.
- [0017] 또한 상기 고추잎, 설탕, 정제수 혼합물의 저장기간은 고추잎에 삼투압 작용이 일어나도록 유도하는 기간이다.
- [0018] 또한, 상기 “*Lactobacillus homohiochii* 1” 은 16S rDNA 서열 분석 결과 *L. homohiochii* strain(Accession NO; AJ621552)의 유전자와 99%(1331/1340)의 상동성을 나타내는 균주이다. 상기 “*Lactobacillus homohiochii* 2” 는 16S rDNA 서열 분석 결과, *L. homohiochii* strain(Accession NO; AM113780)의 유전자와 99%(1331/1340)의 상동성을 나타내는 균주이다. 상기 각각 유산균의 배양액은 MRS(Difco co.) 액상배지에 유산균을 접종한 후 30~37℃ 에서 배양한 액체이다. 상기 유산균은 고추잎을 발효시켜 풍미를 더하는 유리 아미노산을 증가시키는 효과가 있다.
- [0019] 상기 *Lactobacillus homohiochii* 1 배양액 및 *Lactobacillus homohiochii* 2 배양액을 고추잎, 설탕, 정제수 혼합물에 접종하여 25~35℃ 에서 25 내지 35일간 발효시키는 기간은 유산균에 의한 발효가 활발히 일어나 대부분 종료되기까지의 기간이다. 상기 발효 이후, 실온에서 3개월 내지 6개월 발효시키는 기간은 남아있는 잔여물을 발효시키는 기간이다. 상기 고추잎 발효액의 제조방법은 상기 고추잎 발효액을 여과하는 과정이나 5~10℃ 에서 5개월 내지 7개월간 숙성시키는 과정을 더 포함할 수 있다. 고추잎 발효액은 숙성기간을 통하여 맛이 부드러워지며, 향미가 개선된다.
- [0020] 본 발명의 고추잎 발효액을 포함하는 고추잎 발효식초는 유리 아미노산 함량이 풍부하고 특히 GABA(gamma-aminobutyric acid)의 함량이 높다. 그 외에도 항산화 효능이 뛰어나다고 알려진 폴리페놀과 플라보노이드를 풍부하게 함유하고 있으며, 농도의존적으로 DPPH 라디칼 소거능, SOD 유사활성능이 매우 우수하게 나타난다. 또한, 본 발명의 고추잎 발효식초를 투여한 마우스와 랫트에서 당뇨개선 효과 및 당내성을 매우 우수하게 나타낸다.
- [0021] 상기한 바와 같이, 본 발명에 따른 고추잎 발효액을 포함하는 고추잎 발효식초는 항산화 효과, AGI 활성을 우수하게 나타냄으로써, 당뇨병, 비만증, 과당증 등의 성인병을 예방하는 식품소재로서 유용하게 사용될 수 있다.
- [0022]
- [0023] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 바람직한 실시예를 제시한다. 그러나 하기의 실시예는 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐, 실시예에 의해 본 발명의 내용이 한정되는 것은 아니다.

[0024] **실시예 1: 고추잎 발효액 및 고추잎 발효식초의 제조방법**

[0025] **1. 고추잎 발효액의 제조방법**

[0026] 본 실험에 사용된 고추잎(*Capsicum annuum* Leaves)은 농촌진흥청에서 개발한 원기 1호 고추잎 종자를 가지고, 임실 신흥리에서 재배한 고추잎을 주재료로 사용하였다. 먼저 고추잎은 깨끗이 씻어 자연건조 한 후, 고추잎 1kg과 동량의 설탕과 정제수를 투입한 후 *Lactobacillus homohiochii* 1과 *Lactobacillus homohiochii* 2의 유산균 배양액을 각각 7:3의 비율로 고추잎, 설탕, 정제수의 혼합물의 10% (v/v) 농도로 접종하여 30°C에서 30일 동안 정치 발효시킨 후, 실온에서 약 5개월 동안 자연 발효시켰다. 발효종료 후 얻어진 여과액을 고추잎 발효액으로 하였다.

[0027] **2. 고추잎 발효식초의 제조방법**

[0028] 상기 1에서 제조한 고추잎 발효액을 정제수와 7:3의 중량비로 혼합한 후 여기에 효모를 1톤당 20g 접종하여 18°C에서 20일간 알코올 발효하였다. 상기 알코올 발효산물에 종초 (민들레식초 15%, v/v)를 접종하여 18°C에서 20일간 초산 발효시킨 다음, 다시 실온에서 약 6개월 동안 발효 및 숙성시켰다. 초산 발효 종료 후 얻어진 여과액을 7°C에서 약 6 개월간 정치 및 숙성한 후 70°C에서 살균시켜 고추잎 발효식초를 제조하였다.

[0029] 본 발명에 사용된 고추잎을 원료로 하여 발효액을 만드는 과정 및 본 발효액을 가지고 고추잎 발효식초를 제조하는 과정은 각각 도 1 과 도 2에 나타내었다.

[0030] **실험예 1: 고추잎 발효액 및 고추잎 식초의 품질 특성**

[0031] 최종당도는 굴절당도계 (Refractometer PLA-1 ATAGO, Japan)를 사용하였으며, 환원당 함량은 시료를 원심분리한 후 상등액을 취하여 DNS(3,5-dinitrosalicylic acid

[0032])법으로 측정하였다. 총 당 함량은 시료액 5mL를 취하여 증류수 45mL에 넣고 25% HCl 1.5mL를 가하여 65±1°C에서 20분 동안 가수분해한 후, 급냉하여 10% NaOH 용액으로 중화하고 100mL로 정용한 다음 DNS법으로 정량하였다.

[0033] pH는 pH meter (Thermo Orion, US/710A)로 측정하였으며, 총 산도는 0.1N NaOH 용액으로 중화 적정하여 초산으로 환산하였다.

[0034] 시료 상등액 100mL에 3차 증류수 100mL를 가하고 가열 증류한 증류액 20mL를 시료로 가스 크로마토그래피 (GC, gas chromatography)를 이용하여 분석하였다. 표준물질로 사용한 에탄올(Ethanol)의 검량선에 근거하여 알코올 함량을 산출하였다. 분석조건은 표1 에 나타내었다.

[0035] 본 실험결과는 각 시료마다 독립적으로 3회 이상 반복 실시하여 얻은 결과를 평균 ± 표준편차로 나타내었다. 실험군 간의 유의성을 검정하기 위하여 SPSS 12.0 for windows program을 이용하여 ANOVA(The Analysis Of Variance) test를 실시한 후 유의성이 있는 경우, $p < 0.05$ 수준에서 Duncan's multiple range test를 실시하였다.

표 1

[0036] 알코올 함량 분석을 위한 가스 크로마토그래피 분석 조건

	분석 조건
분석장치	가스크로마토그래피 (Waters)
검출기	Flame ionization detector (FID)
컬럼	DB-5

이동상	N2
검출기 온도	250℃
오븐 온도 설정	70℃ 에서 3분간, 225℃까지 분당 25℃ 증온
시료 주입량	1.0 μ l

[0037] 결과는 표 2에 나타내었다.

표 2

[0038] 고추잎 발효액 및 고추잎 발효식초의 당도, 환원당 및 총 당 함량, pH 및 총산도, 알코올함량 분석 결과

	고추잎 발효액	고추잎 발효식초
당도 (° Brix)	57.5	29.2
환원당 함량 (mg%)	1208.5	804.2
총당 함량 (mg%)	2129.8	1073.5
pH	4.14	3.14
총산도 (%)	0.46	6.23
알코올 함량 (%)	3.70	0.21

[0039] 표2에 나타난 바와 같이, 최종적으로 제조된 고추잎 발효액은 총산도 0.46%, 최종 pH 4.14, 당도 57.5° Brix, 환원당 1208.5mg%, 총 당 2129.8mg%, 알코올 3.7%의 엑기스를 얻을 수 있었다. 또한 제조된 고추잎 발효식초는 총산도 6.23%, 최종 pH 3.14, 당도 29.2° Brix, 환원당 804.2mg%, 총 당 1073.5mg%, 알코올 0.21%의 제품을 얻을 수 있었다.

[0040] 실험예 2: 유리당 및 유리아미노산 함량 분석

[0041] 1. 유리당 함량 분석

[0042] 유리당은 1ml 의 시료를 원심분리(8,000 rpm, 20 min)하여 얻은 상등액을 0.45 μ m 막여과기(membrane filter)로 여과 후 분석하였다. 이때 유리당 분석은 글루코오스, 프럭토오스, 만노오스, 아라비노오스, 갈락토오스, 말토오스, 슈크로오스, 락토오스를 표준용액으로 사용하였다.

[0043] 분석 조건은 표 3에 나타내었으며, 유리당 함량의 분석 결과는 표4에 나타내었다.

표 3

HPLC 조작 조건

분석조건	
	유리당
기구	HPLC (Waters co.)
컬럼	NH2
컬럼온도	30℃
이동상	75% 아세토니트릴
유속(flow rate)	분당 1.0mL
검사기	ELSD (Waters co.)
검사기 온도	60℃
주입되는 부피량	20 μ l

표 4

[0045]

고추잎 발효액 및 고추잎 발효식초의 유리당 함량

유리당 (mg%)	고추잎 발효액	고추잎 발효식초
프럭토오스	198.1±32.4	79.9±1.1
글루코오스	238.0±23.9	164.4±13.1
말토오스	44.2±12.0	1.37±0.3
슈크로오스	99.7±10.8	1.20±0.1

[0046]

표4에 나타난 바와 같이, 고추잎 발효액과 발효식초의 유리당 성분은 프럭토오스, 글루코오스, 말토오스, 슈크로오스로 확인되었다. 즉, 고추잎 발효액은 프럭토오스 198.1mg%, 글루코오스 238.0mg%, 말토오스 44.2mg%, 슈크로오스 99.7mg%의 함량을 나타내었고, 고추잎 발효식초는 프럭토오스 79.9mg%, 글루코오스 164.4mg%, 말토오스 1.37mg%, 슈크로오스 1.20mg%의 함량을 나타내었다.

[0047]

2. 유리 아미노산 함량 분석

[0048]

유리아미노산은 5ml의 시료를 취해 70% 에탄올을 가하여 균질화하고 80°C에서 15분간 전자파 시료 전처리장치(MARS, USA)를 이용하여 추출하였다. 여과지(Advantec, No 2)로 감압여과 후, 추출액을 45°C 이하에서 감압 농축하여 에탄올을 제거하고 분액깔때기에 옮겨 에테르 20 mL 를 가하고 지방층을 제거하였다. 상기 지방층을 제거하여 얻어진 물 층을 45°C 이하에서 감압 농축하여 여액을 완전히 제거한 후, pH 2.2 시트르산 나트륨 완충용액(sodium citrate buffer)에 용해하여 0.45 µm 막 여과기 (Millipore Co., Ireland)로 여과한 다음, 아미노산분석 시스템 (Sykam S-4300, Germany)을 이용하여 분석하였다.

[0049]

유리 아미노산 함량의 분석 결과는 표 5에 나타내었다.

표 5

[0050]

고추잎 발효액 및 고추잎 발효식초의 유리아미노산 함량

유리아미노산 (µg/g)	고추잎 발효액	고추잎 발효식초
포스포세린	3.60±0.10	5.90±0.85
타우린	N.D	Trace
포스포에탄올아민	Trace	Trace
우레아	N.D	N.D
아스파르트산	69.97±0.60	3.20±0.80
히드록시프롤린	N.D	N.D
트레오닌	80.97±0.29	12.97±3.00
세린	67.40±0.10	4.23±0.49
아스파라긴	67.87±0.84	N.D
글루탐산	27.67±0.59	9.80±1.91
알파-아미노아디핀산	N.D	N.D
프롤린	92.60±2.19	N.D
글리신	52.27±0.23	13.13±2.62
알라닌	108.93±0.86	N.D
시트룰린	N.D	79.27±15.79
알파-아미노부티르산	N.D	0.57±0.12
발린	81.43±0.47	10.83±1.22
시스틴	N.D	0.97±0.40
메티오닌	12.63±0.12	1.67±0.45
아이소루신	58.53±0.06	6.13±1.30
류신	113.63±0.31	12.93±2.72
타이로신	73.23±0.45	15.90±3.42
페닐알라닌	75.60±4.40	10.50±2.17
베타-알라닌	N.D	N.D
베타-아미노이소부틴	16.47±0.31	5.27±1.81
감마-아미노부티르산	236.00±0.56	89.83±17.18

히스티딘	19.00±0.20	13.27±2.61
3-메틸히스티딘	0.50±0.00	N.D
1-메틸히스티딘	0.73±0.06	N.D
트립토판	N.D	N.D
카르노신	9.67±0.72	N.D
오르니틴	5.97±1.15	6.77±1.26
라이신	99.63±2.66	40.40±7.03
암모니아	21.40±0.62	8.53±1.60
아르기닌	55.43±4.37	23.07±4.52

[0051] 표5에 나타난 바와 같이, 제조된 고추잎 발효액의 유리아미노산 성분은 포스포세린(phosphoserine) 3.60 μ g/g, 아스파르트산(aspartic acid) 70.0 μ g/g, 트레오닌(threonine) 81.0 μ g/g, 세린(serine) 67.4 μ g/g, 아스파라긴(asparagine) 67.9 μ g/g, 글루탐산(glutamic acid) 27.7 μ g/g, 프롤린(proline) 92.6 μ g/g, 글리신(glycine) 52.3 μ g/g, 알라닌(alanine) 108.9 μ g/g, 발린(valine) 81.4 μ g/g, 메티오닌(methionine) 12.6 μ g/g, 아이소루신(isoleucine) 58.5 μ g/g, 류신(leucine) 113.6 μ g/g, 타이로신(tyrosine) 73.2 μ g/g, 페닐알라닌(phenylalanine) 75.6mg/g, 베타-아미노이소부틴(β -aminoisobutyric acid) 16.5 μ g/g, 감마-아미노부티르산(γ -aminobutyric acid) 236.0 μ g/g, 히스티딘(histidine) 19.0 μ g/g, 3-메틸히스티딘(3-methylhistidine) 0.50 μ g/g, 1-메틸히스티딘(1-methylhistidine) 0.73 μ g/g, 카르노신(carnosine) 9.67 μ g/g, 오르니틴(ornithin) 5.97 μ g/g, 라이신(lysine) 99.6 μ g/g, 암모니아(ammonia) 21.4 μ g/g, 아르기닌(arginine) 55.4 μ g/g의 함량을 나타내었으며, 반면 포스포에탄올아민(phosphoethanolamine)은 미량 검출되었으며 타우린(taurine), 우레아(urea), 히드록시프롤린(hydroxyproline), 알파-아미노아디핀산(α -aminoadipic acid), 시트룰린(citrulline), 알파-아미노부티르산(α -aminobutyric acid), 시스틴(cystine), 베타-알라닌(β -alanine), 트립토판(tryptophane)은 분석되지 않았다.

[0052] 또한, 고추잎 발효식초의 유리아미노산 성분은 포스포세린 5.90 μ g/g, 아스파르트산 3.20 μ g/g, 트레오닌 13.0 μ g/g, 세린 4.23 μ g/g, 글루탐산 9.80 μ g/g, 글리신 13.1 μ g/g, 시트룰린 79.3 μ g/g, 알파-아미노아디핀산 0.57 μ g/g, 발린 10.8 μ g/g, 시스틴 0.97 μ g/g, 메티오닌 1.67 μ g/g, 아이소루신 6.13 μ g/g, 류신 12.9 μ g/g, 타이로신 15.9 μ g/g, 페닐알라닌 10.5 μ g/g, 베타아미노이소부틴 5.27 μ g/g, 감마-아미노부티르산 89.8 μ g/g, 히스티딘 13.3 μ g/g, 오르니틴 6.77 μ g/g, 라이신 40.4 μ g/g, 암모니아 8.53 μ g/g, 아르기닌 23.1 μ g/g의 함량을 나타내었으나, 타우린, 포스포에탄올아민은 미량 검출되었으며 우레아, 히드록시프롤린, 아스파라긴, 프롤린, 알라닌, 알파-아미노부티르산, 베타-알라닌, 3-메틸히스티딘, 1-메틸히스티딘, 트립토판, 카르노신은 분석되지 않았다.

[0053] 실험예 3: 총 폴리페놀(polyphenol), 총 플라보노이드(flavonoid) 함량 분석

[0054] 고추잎 발효액 및 고추잎 발효식초 각각 20 mL에 각각 80 mL의 물을 가한 후, 40 $^{\circ}$ C에서 24시간 동안 진탕 추출하였다. 원심분리 (10,000 rpm, 10 min, 4 $^{\circ}$ C)를 통하여 회수된 상등액은 여과지 (whatman No.1)로 2번 여과한 후, 각각의 시료 추출액은 4 $^{\circ}$ C에 보관하면서 폴리페놀, 플라보노이드 함량 분석과 알파-글루코시다아제(α -glucosidase) 저해능 및 항산화 분석시 사용하였다.

[0055] 1. 총 페놀 함량 측정 방법

[0056] 총 페놀 함량은 Folin-Denis 변법에 따라 추출된 시료를 4, 8, 12, 16, 20% (v/v)가 되도록 농도별로 희석한 후 측정하였다. 각 농도별 시료 4 mL에 Folin-Ciocalteu 시약0.25 mL를 혼합하여 교반한 뒤, 120분 동안 상온에서 방치하여 반응시켰다. 반응액의 흡광도 값은 UV-Vis 분광광도계 (DU 800, Beckman coulter, Fullerton, CA, USA)를 사용하여 750 nm에서 분석하였다. 총 페놀 함량은, 갈산(gallic acid)을 분석시료와 동일한 방법으로 분석하여 얻은 표준 검량선으로부터 시료 추출물의 총 페놀 함량을 산출하였고, 총 폴리페놀 함량은 1 L 중의 갈산 mg 당량 (mg gallic acid equivalent)으로 나타내었다.

2. 총 플라보노이드 함량 측정 방법

총 플라보노이드 함량은 Davis 변법에 따라 추출된 시료를 4, 8, 12, 16, 20% (v/v) 가 되도록 농도별로 희석한 후 측정하였다. 각 농도별 시료 0.5 mL에 10% 질산 알루미늄 0.1 mL, 1M 아세트산 칼륨 0.1 mL 및 에탄올 4.3 mL를 차례로 가하여 혼합한 후 상온에서 40분간 방치하여 반응시킨 다음 분광광도계를 사용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하였다. 총 플라보노이드 함량은, 카테킨을 시료와 동일한 방법으로 분석하여 얻은 표준 검량선으로부터, 시료 추출물의 총 플라보노이드 함량을 산출하였고, 총 플라보노이드 함량은 1 L 중의 카테킨 mg 당량 (mg catechin equivalent)으로 나타내었다.

고추잎 발효액 및 고추잎 발효식초의 총 페놀 함량과 총 플라보노이드 함량을 측정한 결과를 표 6에 나타내었다.

표 6

고추잎 발효액 및 고추잎 발효식초의 총 폴리페놀 및 플라보노이드 함량

	고추잎 발효액	고추잎 발효식초
총 폴리페놀 함량 (mg/L)	3770.9±21.2	3692.0±38.9
총 플라보노이드 함량 (mg/L)	2678.4±19.1	2586.5±10.5

표 6에 나타난 바와 같이, 고추잎 발효액의 폴리페놀 함량은 3770.9 mg/L, 고추잎 발효식초에서는 3692.0 mg/L를 나타내었다. 고추잎 발효액의 플라보노이드 함량은 2678.4 mg/L, 고추잎 발효식초의 경우 2586.5 mg/L의 함량을 나타내었다.

실험예 4: 알파-글루코시다아제(α -Glucosidase) 저해능 분석

알파-글루코시다아제 저해능(이하 “AGI (α -glucosidase inhibitory)”라 함)은 다음과 같은 방법으로 측정하였다. 즉, 시료 0.1 mL에 0.5 U/mL 알파-글루코시다아제(α -glucosidase) 효소액 0.1 mL (50mM PBS, pH 7.0)과 인산완충액(200 mM, pH 7.0) 0.2 mL을 혼합하여 37℃에서 10분 동안 항온수조에서 전처리(pre-incubation)하였다. 100 mM PBS(phosphate buffered saline, pH 7.0)에 녹인 3 mM p-NPG (p-nitro-phenyl- α -glucopyranoside) 0.2 mL을 가하여 37℃에서 10분간 반응시킨 후 분광광도계를 사용하여 405 nm에서 흡광도의 변화를 측정하였다. 이때 대조군으로는 아카보오스(acarbose)를 사용하여 동일한 조건에서 분석하였다. 각 시료의 라디칼 소거능은 하기 수식 1에 의해 시료 첨가구 및 무 첨가구간의 흡광도 차이를 백분율로 나타내었다.

본 발명의 고추잎 발효액 및 발효식초가 지닌 AGI 활성 측정 결과는 도 4에 나타내었다.

수식식 1

$$\text{효소저해능(\%)} = \left[1 - \left(\frac{\text{반응구의 } p\text{-니트로페놀 생성량}}{\text{무처리구의 } p\text{-니트로페놀 생성량}} \right) \right] \times 100$$

도 4에 나타난 바와 같이, 고추잎 발효액의 알파-글루코시다아제 억제활성은 65.9%, 고추잎 발효식초의 경우 75.9%를 나타내었다. 이러한 결과로부터 표준물질인 아카보오스(acarbose)가 5 mg/mL 기준에서 51.8%를 저해하는 효과와 비교하여 상대적으로 저농도에서도 뛰어난 AGI 활성을 나타내는 것을 확인할 수 있었다. 또한, 본

발명의 고추잎 발효식초는 고추잎 발효액보다 30% 정제수로 희석되었음에도 불구하고 더 높은 수준의 알파-글루코시다아제 억제활성을 나타내어 고추잎 발효식초의 알파-글루코시다아제의 억제활성이 월등히 향상되었음을 알 수 있었다.

실험예 5: 항산화 활성 측정

1. DPPH 라디칼 소거능 측정

DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) 라디칼 소거능은 Blois (1958)의 방법을 변형하여 전자공여작용 (electron donating abilities, EDA)에 대한 효과로 각 시료의 환원력을 측정하였다. 즉, 시료 0.1 mL에 0.2 mM DPPH 용액 (99% MeOH에 용해) 0.4 mL을 가하여 30분간 상온에서 방치한 후 분광광도계를 사용하여 흡광도 517 nm에서 흡광도의 변화를 측정하였다. 고추잎 발효액 및 고추잎 발효식초의 항산화 활성을 측정하는 방법으로 DPPH 라디칼이 감소하는 정도를 분광광도계로 측정하였다.

각 시료의 라디칼 소거능은 하기 수식 2에 의해 시료 첨가구 및 무첨가구 간의 흡광도 차이를 백분율로 나타내었다.

결과는 도 5에 나타내었다.

수식 2

$$\text{라디칼소거능(\%)} = [1 - (\frac{\text{시료첨가구의흡광도}}{\text{무처리구의흡광도}})] \times 100$$

도5에 나타난 바와 같이, 고추잎 발효액 추출물의 DPPH 라디칼 소거능은 84.6%, 고추잎 발효식초 추출물의 경우 78.8%를 나타내었다. 또한 추출물의 공여량이 증가함에 따라 실험구내에서 DPPH 소거능 또한 비례하여 증가함으로써 용량 의존적인 결과를 나타내었다.

2. SOD (Superoxide dismutase) 유사활성능 측정

고추잎 발효액 및 고추잎 발효식초의 SOD(Superoxide dismutase) 유사활성능은 초과산화물(superoxide) 라디칼 소거능을 분석하는 방법으로서, Marklund 와 Marklund (1974)의 방법을 변형하여 실시하였다. 즉, 시료 0.3 mL을 취하여 0.9 mL의 Tris-HCl 완충액 (pH 8.2)과 60 μ L의 7.2 mM 피로갈롤(pyrogallol)을 잘 섞어 준 후 25 $^{\circ}$ C에서 10분간 방치하여 반응시켰다. 반응을 정지시키기 위하여 0.2 mL의 1 N HCl을 첨가한 후, 분광광도계를 사용하여 420 nm에서 흡광도를 측정하였다. 각 시료의 SOD 유사활성능은 하기 수식3에 의해 시료 첨가 및 무첨가구간의 흡광도 차이를 백분율로 나타내었다. 기준물질로는 SOD와 유사한 역할을 하여, 초과산화 음이온 (superoxide anion)의 활성을 억제시킬 수 있는 유사물질인 아스코르브산을 사용하였다.

결과는 도 6에 나타내었다.

수학식 3

$$SOD\text{유사활성능}(\%) = [1 - (\frac{\text{시료첨가구의흡광도}}{\text{무처리구의흡광도}})] \times 100$$

[0077]

[0078]

도 6에 나타난 바와 같이, 고추잎 발효액 추출물에서는 90.8%, 고추잎 발효식초에서는 99.1% 수준의 SOD 유사활성능을 나타내어 동일 농도 수준에서 대표적인 항산화물질인 아스코르브산(ascorbic acid)과 거의 동일한 정도의 매우 뛰어난 항산화능을 보였으며, 이러한 항산화능은 농도에 의존적인 결과를 보였다. 또한, 본 발명의 고추잎 발효식초는 고추잎 발효액보다 30% 정제수로 희석되었음에도 불구하고 더 높은 수준의 SOD 유사활성능을 나타내어 고추잎 발효식초의 항산화능이 월등히 향상되었음을 알 수 있었다.

[0079]

실험예 6: 제II형 당뇨병모델 마우스와 SD 랫트를 이용한 고추잎 식초의 당뇨개선 효능 및 Balb/c 마우스를 이용한 당내성 평가

[0080]

1. 실험동물

[0081]

고추잎 식초의 당뇨개선 효과를 관찰하기 위하여 실험에 사용한 제II형 당뇨병모델[C57BLKS/J lar(+Lepr^{db}/+Lepr^{db})] 마우스(Japan SLC, Inc.)는 중앙실험동물로부터 구입하여 사용하였다.

[0082]

스트렙토조토신(Streptozotocin)을 주입하여 인위적으로 당뇨를 유발시킨 SD(Sprague Dawley) 랫트는 다물사이언스(대전)에서 구입하여 온도 20±2℃, 습도 55±5%, 명/암(12 시간)조건 하에서 1주일간 적응시킨 후에 사용하였으며, 사료와 물은 자유롭게 섭취하도록 하였다.

[0083]

고추잎 식초의 당뇨개선 효과를 관찰하기 위하여 제II형 당뇨병모델 마우스 (♂, 6wks)와 SD(Sprague Dawley)(♂, 6wks) 랫트 14마리를 각각 7마리씩 대조군과 실험군으로 나누었고, 스트렙토조토신 50mg/kg 을 복강내 주입하여 인위적으로 당뇨를 유발시켰다. 사료는 2개군 모두 기본사료를 급여하였다.

[0084]

당내성 검사를 위하여 실험에 사용한 Balb/c 마우스는 KIRBB(Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology, Daejeon, Korea)로부터 구입하여 사용하였다. Balb/c 마우스 20마리를 각각 10마리씩 대조군과 실험군으로 나누었고, 사료는 사료제조회사인 피드랩(경기도 이천)에 의뢰, 열량을 분석하여 AIN76 기본사료를 제조 및 자유 급여하였다. AIN76 기본사료의 배합비는 하기 표 7에 나타내었다.

표 7

실험동물용 기본사료의 배합비

[0085]

성분	AIN76(g)
카제인	200
슈크로오스	500
옥수수 전분	150
셀룰로오스	50
옥수수 기름	50
AIN-76 미네랄 혼합물 ¹⁾	35
비타민 혼합물	10
DL-메티오닌	3
콜린 비타르테이트	2
총 계	1000

[0086] **2. 당뇨개선 효능 검사**

[0087] 실험군에는 고추잎 발효식초를 45일간 스트렙토조토신으로 인위적으로 당뇨를 유발한 SD 랫트에 경구투여 한 후 5일 간격으로 혈당의 변화를 관찰하였고, 대조군에는 고추잎 발효식초 대신 생리식염수를 동량 투여하였다.

[0088] 실험동물 분석의 통계처리는 student's t-test로 하였으며, $p < 0.05$ 이하를 유의성이 있는 것으로 판정하였다.

[0089] 결과는 도 7에 나타내었다.

[0090] 도 7에 나타난 바와 같이, 고추잎 발효식초를 투여한 실험군(VA)이 생리식염수만 투여한 대조군(CON)에 비하여 현저히 혈당이 감소하였다.

[0091] **3. 당내성 검사**

[0092] 고추잎 식초의 당내성 검사를 위하여 1차적으로 대조군과 고추잎 발효식초를 1주일 투여한 실험군으로 나누어 12시간 절식시킨 후 공복시 혈당을 측정하였다. 그 후 포도당 50mg/kg 을 복강주사하고, 30, 60, 90, 120, 180 분 경과 후에 랫트의 발에서 혈액을 채취하여 혈당측정기(Accu-Check, Germany)와 혈당측정키트로 혈당농도를 측정하여 당내성검사를 실시하였다. 2차적으로는 대조군과 고추잎 식초를 1주간 투여한 식초군으로 나누어 12시간 절식시킨 후 공복시 혈당을 측정하였다. 그 후 포도당(50mg/kg body weight)과 고추잎 식초를 1/2.5로 물에 희석하여(10ml/kg body weight)를 복강주사하고, 1차와 같은 방법으로 혈당농도를 측정하여 당내성 검사를 실시하였다.

[0093] 결과는 도 8에 나타내었다.

[0094] 도 8에 나타난 바와 같이, 대조군에서는 30분 후 $96.3 \pm 4.5 \text{ mg/dl}$, 60분 후 $105.0 \pm 4.3 \text{ mg/dl}$, 90분 후 $91.3 \pm 3.6 \text{ mg/dl}$, 120분 후에는 $83.0 \pm 4.2 \text{ mg/dl}$ 로 감소하였으나, 실험군에서는 30분 후 $91.8 \pm 3.3 \text{ mg/dl}$, 60분 후 $79.3 \pm 3.5 \text{ mg/dl}$, 90분 후 $74.5 \pm 4.2 \text{ mg/dl}$, 120분 후에는 $74.0 \pm 3.6 \text{ mg/dl}$ 로 감소하여 대조군에 비하여 감소하는 경향을 나타내는 것을 확인할 수 있었다(도 8).

[0095] **실험예 9: 정상 Balb/c 마우스를 이용한 고추잎 발효식초의 면역능 개선 효과**

[0096] **1. 실험동물 및 실험군**

[0097] 고추잎 발효식초의 면역능 개선효과를 관찰하기 위하여 실험에 사용한 Balb/c계통의 마우스(♂, 6주령, $20 \pm 2 \text{ g}$)는 다물사이언스에서 구입하여 온도 $20 \pm 2^\circ\text{C}$, 습도 $55 \pm 5\%$, 명/암(12 시간)조건 하에서 1주일간 적응시킨 후 사용하였으며, 고형 펠릿사료와 물은 자유롭게 섭취하도록 하였다. 고추잎 식초의 면역능 개선효과를 관찰하기 위하여 Balb/c계통의 마우스(♂, 6주령, $20 \pm 2 \text{ g}$) 14마리를 2개군으로 나누어, AIN76 기본사료를 4주간 자유급여하였다. AIN76 기본사료는 표 7에 나타난 사료를 이용하였다.

[0098] **2. 흉선 및 비장세포의 림프구 아집단(Subpopulation) 분석**

[0099] Balb/c 마우스에 기본사료를 4주간 자유 급여한 후 희생시켜 비장 및 흉선을 적출하였다. 적출한 비장과 흉선에서 세포를 채취하여 완전 RPMI-1640배지에 배양하였다. 부유한 비장 및 흉선세포를 PBS로 2회 세척한 후 1×10^6 세포/well에 PE/FITC B세포를 구분하기 위한 항-마우스 B220 항체(phycoerythrin/fluorescein isothiocyanate conjugated-anti mouse B220) 및 T세포를 구분하기 위한 Thy-1 단일클론항체(Thy-1 monoclonal antibody)와 PE-항 CD4/FITC-항 CD8 단일클론항체(PE-anti CD4/FITC-anti CD8 monoclonal antibody), (1:30 dilution)로 형광염색하여 4°C 차광하에서 30분간 반응시키고 0.5% 파라포름알데히드로 고정한 후 세포분류기(flow cytometer) (excitation: 488 nm, emission: 525 nm/FITC, 575 nm/PE)를 이용하여 림프구의 아집단을 분석하였다(Shortman K, 1974).

[0100] 결과는 표 8에 나타내었다.

표 8

[0101] 고추잎 식초(VA)를 투여한 후 정상 마우스에서의 림프구 아집단의 변화

처리된 세포타입	비장세포(%)			흉선세포(%)	
	B 세포	T 세포		T _H	T _C
		T _H	T _C		
대조군	29.3±0.8	33.4±0.7		14.4±0.3	7.2±0.3
		26.3±0.8	14.2±0.1		
고추잎 식초(VA)군	32.9±0.5**	26.3±0.6		17.2±0.2***	11.0±0.4***
		23.2±0.3	13.1±0.8		

; 대조군과 유의적인 차이가 있음 ($p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$)

[0102] 표 8에 나타난 바와 같이, 고추잎 식초를 투여한 정상 마우스(Balb/c)의 비장 및 흉선세포에서 림프구 아집단의 변화를 살펴본 결과, 비장세포는 대조군과 비교해 B세포가 유의적으로 증가하였으며, 흉선세포에서는 T_H(보조 T 세포)와 T_C(세포독성 T세포)세포 모두 대조군에 비해 고추잎 식초 투여군에서 약 52%가 증가해 유의성을 나타내었다.

[0103] 3. 혈중 림포카인(IL-2, IL-4, IFN- γ) 측정

[0104] 고추잎 식초를 경구투여한 후 마우스의 혈액에서 혈청을 분리하여 혈중 림포카인(IL-2, IL-4, IFN- γ)을 측정하였다. IL-2의 측정은 샌드위치 ELISA 방법을 이용한 마우스 IL-2 ELISA Ready-Set-Go(eBioscience사) 키트를 사용하여 혈청 내 IL-2의 농도를 측정하였다. ELISA 마이크로플레이트(microplate, 96well)에 항마우스 IL-2 항체를 (100 μ l/well) 4℃에서 하루 동안 코팅시켰다. 다음에 각 웰을 PBS-T(0.05% Tween 20)(300 μ l/well)로 5회 세척하고, 희석완충액(assay diluent buffer)으로 실온에서 1 시간 동안 반응시켜 비특이적인 항원 결합을 제거하였다. 각 웰에 혈청 및 희석완충액으로 희석한 IL-2 표준용액(recombinant mouse IL-2, 1 μ g/ml)을 웰당 100 μ l씩 가하여 실온에서 2 시간 동안 반응시킨 다음 5회 세척하였다. 그 후 희석완충액으로 희석한 비오틴 접합 항 마우스 IL-2 항체(biotin conjugated anti mouse IL-2 antibody)를 well 당 100 μ l씩 주입하고 실온에서 1 시간 동안 반응시켰다. 다시 5회 세척 후, Avidin-HRP를 각 웰 당 100 μ l씩 넣어 실온에서 30분 동안 반응시켰다. 다시 7회 세척한 후 TMB (tetramethylbenzidine)기질용액을 각 웰 당 100 μ l씩 가하여 차광 하에 15분간 발색시켰다. 50 μ l의 2 N H₂SO₄를 가하여 반응을 정지시키고, ELISA 리더기로 450 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다. 또한, 혈중 IL-4와 IFN- γ 의 측정은 IL-2의 측정방법에 준하였다(Nakano T. et al 2007, Zhang C. et al. 2007).

[0105] 결과는 표 9에 나타내었다.

표 9

[0106] Balb/c 마우스에서 혈중 림포카인(IL-2, IL-4, IFN- γ)의 변화

림포카인(pg/ml)	IL-2 ¹⁾	IL-4 ²⁾	IFN- γ ³⁾
대조군	0.7±0.2	47.2±0.4	39.8±0.5
고추잎식초(VA)군	2.2±0.3***	45.1±0.4	39.7±0.6

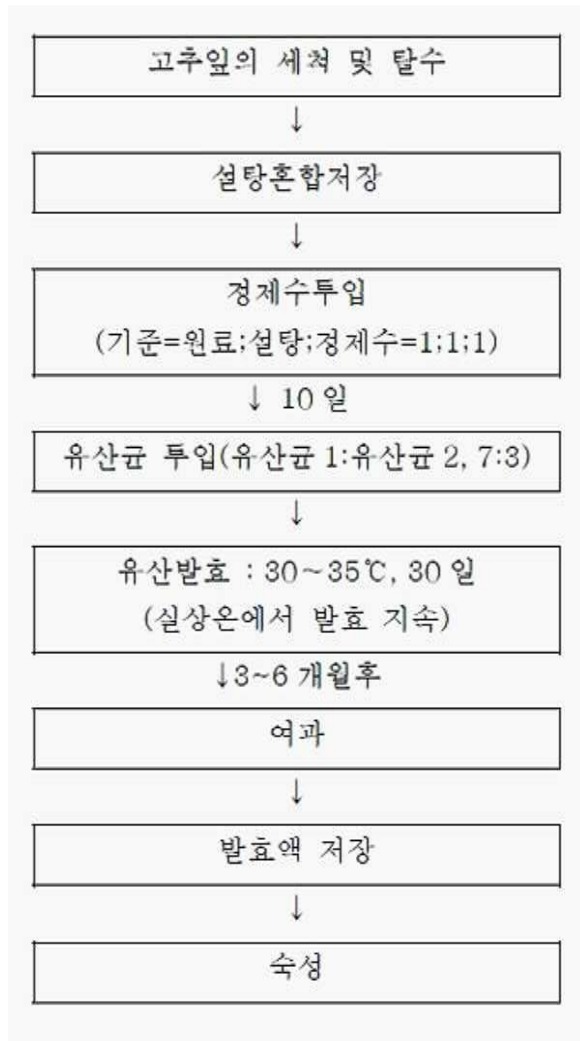
; 대조군과 유의적인 차이가 있음 ($p<0.05$)

¹⁾ interleukin-2 ²⁾ interleukin-4 ³⁾ interferon- γ

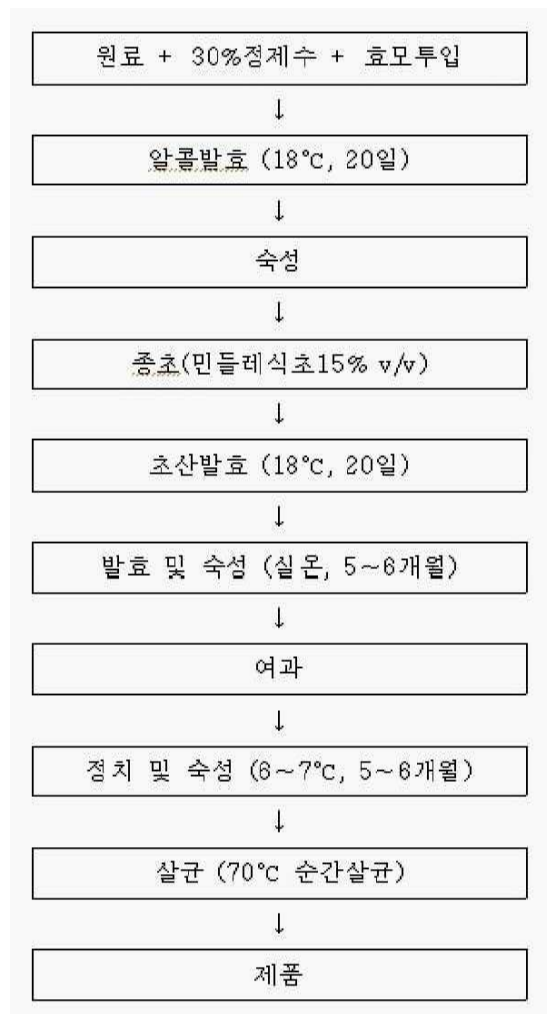
[0107] 표 9에 나타난 바와 같이, IL-2는 고추잎 식초를 투여한 군에서 유의성 있게 증가하였으며 IL-4와 IFN- γ 는 대조군과 유사하게 나타났다.

도면

도면1



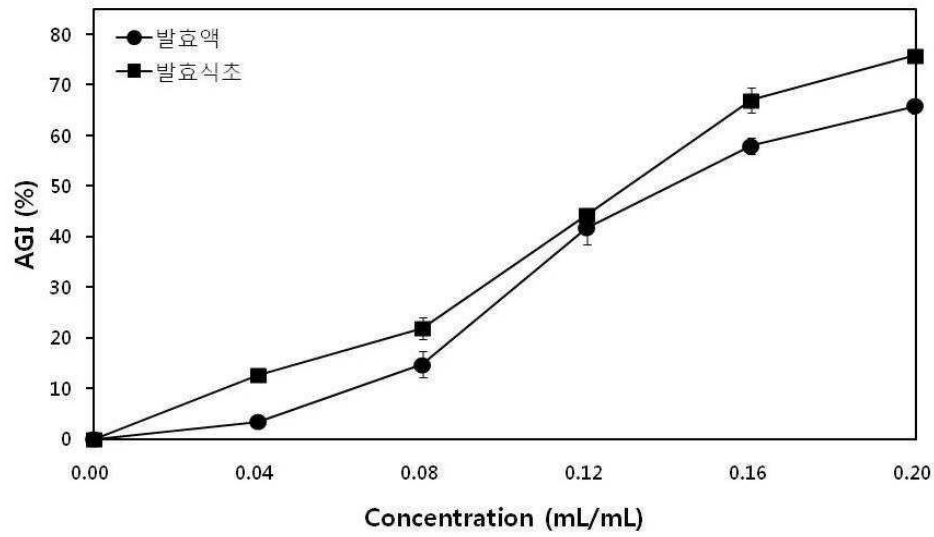
도면2



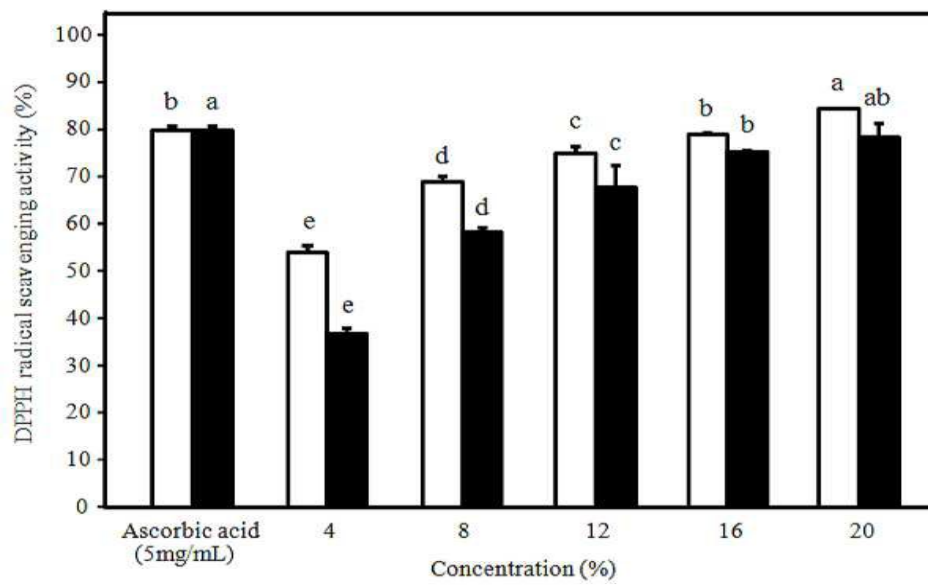
도면3



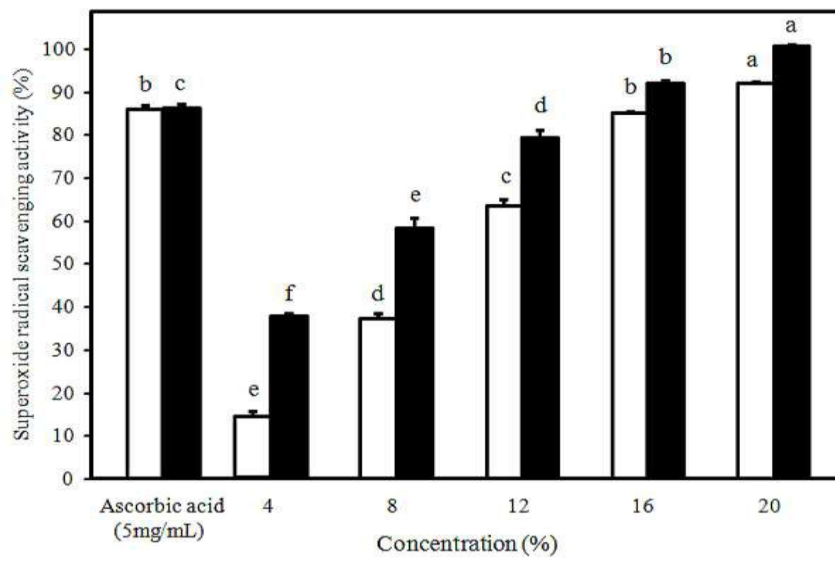
도면4



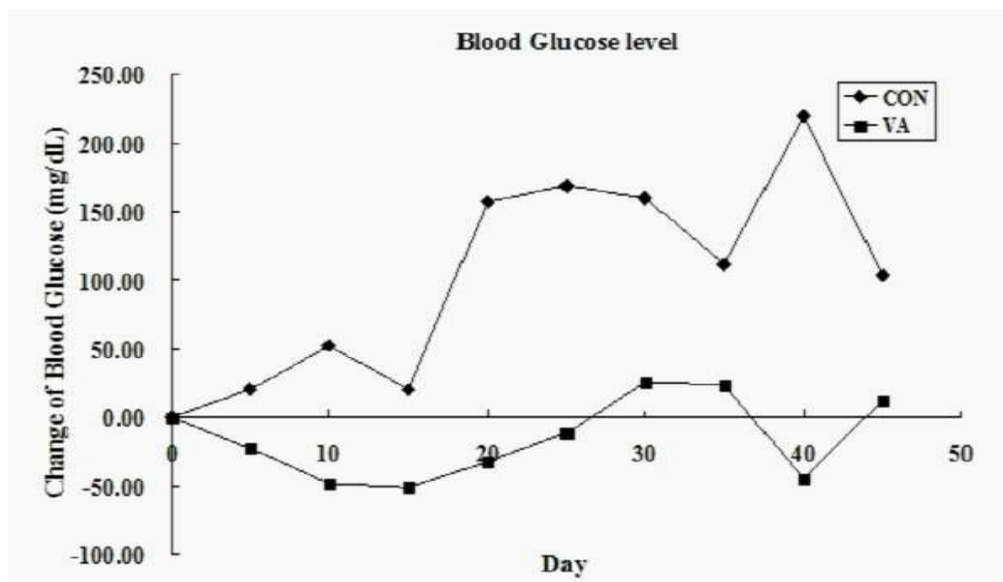
도면5



도면6



도면7



도면8

