



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2013년07월17일  
(11) 등록번호 10-1284718  
(24) 등록일자 2013년07월04일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
A61K 36/31 (2006.01) A61P 1/04 (2006.01)  
A61P 1/00 (2006.01)  
(21) 출원번호 10-2010-0114576  
(22) 출원일자 2010년11월17일  
심사청구일자 2010년11월17일  
(65) 공개번호 10-2012-0053352  
(43) 공개일자 2012년05월25일  
(56) 선행기술조사문헌  
G. Sivakumar 외 2명. Food Chemistry. 2007년,  
Vol. 104, No. 4, 제1761면 내지 제1764면.\*  
Jed W. Fahey 외 7명. PNAS. 2002년 5월 28일,  
Vol. 99, No. 11, 제7610면 내지 제7615면.\*  
\*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자  
주식회사한국야쿠르트  
서울특별시 서초구 강남대로 577 (잠원동)  
(72) 발명자  
김태열  
서울특별시 영등포구 여의나루로 7, 광장아파트  
7동 102호 (여의도동)  
허건  
경기도 수원시 장안구 경수대로976번길 22, 한일  
타운 124동 1802호 (조원동)  
(74) 대리인  
경일호  
(뒷면에 계속)

전체 청구항 수 : 총 3 항

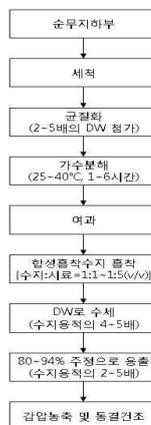
심사관 : 김미화

(54) 발명의 명칭 헬리코박터 파이로리 억제 효능을 가지는 강화순무 추출물의 제조방법

(57) 요약

본 발명은 헬리코박터 파이로리 억제 효능을 가지는 강화순무 추출물의 제조방법 및 이를 유효성분으로 포함하는 헬리코박터 파이로리로 인한 위염, 위궤양 및 십이지장궤양의 예방 및 치료에 효과적인 약학조성물, 발효유, 음료 및 건강기능식품 제품에 관한 것으로서, a)강화순무(*Brassica Rapa. L.*)의 지하부를 세척하고 증류수를 첨가하여 균질화하는 단계; b)상기 균질화된 강화순무를 25-40℃에서 1~6시간 동안 가수분해시키는 단계; c)상기 강화순무 가수분해물을 0.45~1 μm의 여과막으로 여과하는 단계; d)상기 강화순무 여과액을 합성흡착수지에 흡착시키는 단계; e)상기 강화순무 여과액이 흡착된 합성흡착수지를 합성흡착수지 용적의 4~5배의 물로 수세하는 단계; f)상기 합성흡착수지에 합성흡착수지 용적의 2~5배에 해당하는 에탄올 농도 80~94%의 주정으로 흡착되어 있던 활성성분들을 용출시키는 단계; 및 g)상기 용출물들을 감압농축시킨 후 동결건조하여 분말화하는 단계를 포함하여 제조된 강화순무 추출물은 헬리코박터 파이로리에 대한 항균활성 및 헬리코박터 파이로리 우레아제(*H. pylori* urease) 활성 억제효과, 위상피세포 정착성 억제효과, 인터튜킨-8 생성 억제효과를 나타냄으로써 기존의 추출물에 비하여 헬리코박터 파이로리(*H. pylori*) 억제효과가 우수할 뿐만 아니라 일반식품에 적용 가능한 제조공정을 사용하기 때문에 적용분야를 극대화시킬 수 있는 장점이 있다.

대표도 - 도1



(72) 발명자

**박세훈**

서울특별시 성북구 화랑로48길 16, 108동 1203호  
(석관동, 두산아파트)

**안영태**

경기도 수원시 권선구 정조로 432, 109동 312호 (세류동, 미영아파트)

**허철성**

충청남도 천안시 동남구 터미널9길 59, 201동 204호 (신부동, 대림한들아파트)

## 특허청구의 범위

### 청구항 1

- a)강화순무(*Brassica Rapa. L.*)의 지하부를 세척하고 증류수를 첨가하여 균질화하는 단계;
- b)상기 a)단계의 균질화된 강화순무를 25~40℃에서 1~6시간 동안 가수분해시키는 단계;
- c)상기 b)단계의 강화순무 가수분해물을 0.45~1 $\mu$ m의 여과막으로 여과하는 단계;
- d)상기 c)단계의 강화순무 여과액을 합성흡착수지에 흡착시키는 단계;
- e)상기 d)단계의 강화순무 여과액이 흡착된 합성흡착수지를 합성흡착수지 용적의 4~5배의 물로 수세하는 단계;
- f)상기 e)단계의 합성흡착수지에 합성흡착수지 용적의 2~5배에 해당하는 에탄올 농도 80~95%의 주정으로 흡착되어 있는 헬리코박터 파이로리(*Helicobacter pylori*) 억제활성 성분들을 용출시키는 단계; 및
- g)상기 f)단계의 용출된 헬리코박터 파이로리(*Helicobacter pylori*) 억제활성 성분들을 감압농축시킨 후 동결건조하여 분말화하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 헬리코박터 파이로리(*Helicobacter pylori*) 억제 효능을 갖는 강화순무 추출물의 제조방법.

### 청구항 2

제1항에 있어서,

상기 d)단계의 합성흡착수지:강화순무 여과액의 부피비율은 1:1~5임을 특징으로 하는 헬리코박터 파이로리(*Helicobacter pylori*) 억제 효능을 갖는 강화순무 추출물의 제조방법.

### 청구항 3

제1항에 있어서,

상기 d)단계의 합성흡착수지는 Diaion-HP20임을 특징으로 하는 헬리코박터 파이로리(*Helicobacter pylori*) 억제 효능을 갖는 강화순무 추출물의 제조방법.

### 청구항 4

삭제

### 청구항 5

삭제

### 청구항 6

삭제

### 청구항 7

삭제

### 청구항 8

삭제

## 명세서

**기술분야**

[0001] 본 발명은 헬리코박터 파이로리 억제 효능을 가지는 강화순무 추출물의 제조방법 및 이를 유효성분으로 포함하는 제품에 관한 것으로, 보다 상세하게는 강화순무 지하부를 균질화하여 가수분해시킨 후 합성흡착수지를 이용하여 불필요한 성분을 제거하고 활성성분을 효과적으로 농축시킨 헬리코박터 파이로리 억제 효능이 뛰어난 강화순무 추출물의 제조방법 및 이를 유효성분으로 하여 포함하는 헬리코박터 파이로리로 인한 위염, 위궤양 및 십이지장궤양의 예방 및 치료에 효과적인 약화조성물, 발효유, 음료 및 건강기능식품에 관한 것이다.

**배경기술**

[0002] 복잡한 경쟁사회를 살아가는 현대인들은 불규칙한 식생활과 과중한 스트레스를 받음으로써 위장질환을 얻기가 매우 쉽다. 더구나 한국인은 자극성이 강한 음식을 섭취하는 경우가 많기 때문에 미국, 유럽, 일본 등 선진국 등에 비해 위궤양, 위염, 위암 등의 위장 질환의 발생 빈도가 매우 높다.

[0003] 일반적으로 위장 내에는 산성도가 높아 세균이 살지 못하는 것으로 알려졌으나, 1983년 호주의 워렌(Warren)과 마샬(Marshall)은 위 내시경을 통한 생검조직을 검사한 결과 최초로 B형 위염환자의 위 점막을 덮고 있는 점액층에서 만곡성 세균을 발견하고, 상기 세균을 배양하여 캄필로박터 중(campylobacter genus)과 연관된 새로운 종임을 규명하였다(Lancet, 1983, 1, 1273-1275). 이후, 이 헬리코박터 파이로리(*Helicobacter. pylori*)는 위염 및 십이지장궤양의 원인균으로 밝혀졌으며(J. infect. Dis., 1990, 161, 626-633 ; Am. J. Med., 1991, 91, 566-572), 현재는 위궤양, 위암 및 위염 발병 인자의 하나로 인정되고 있다.

[0004] 상기 헬리코박터 파이로리(*H. pylori*)는 위점막 상피 세포간 접합부에 서식하는 그람 음성의 간균으로서 최적 pH는 7.0 내지 7.4이며 온도는 30 내지 37℃의 미호기적 조건에서 성장한다. 또한, 상기 균은 이러한 성장 조건이 충족되지 못하거나, 환경의 변화가 생기면 바실러리(bacillary) 형태에서 코코이드(cocoid) 형태로의 변화가 관찰된다. 헬리코박터 파이로리(*H. pylori*)에 의한 감염은 식품 등과 함께 경구적으로 침입한 균이 위, 십이지장 점막에 부착함에 의해 시작되는데, 헬리코박터 파이로리(*H. pylori*)의 병독 인자를 살펴보면 위에서 분비되는 강산의 위액에서 생존하기 위해 분비되는 우레아제(urease), 운동성을 유지하기 위해 있는 편모, 위 상피세포에 쉽게 부착하도록 도와주는 세포 표면의 외막단백질 등이 알려져 있다. 이중 우레아제는 위점막 조직 내의 요소를 암모니아와 이산화탄소로 분해하여 균체 주위를 산성에서 알칼리로 변화시킴으로서 위에서 분비되는 강산의 위액을 중화시킬 수 있는 특성을 갖는다.

[0005] 현재까지 상기 헬리코박터 파이로리(*H. pylori*) 감염의 치료는 항생제 또는 백신의 사용에 의존하고 있고, 현재에 이르러 다양한 천연물 소재인 마늘(Antimicrob. Agents and Chemother., 1999, 43, 1811-1812) 및 녹차를 이용해 헬리코박터 파이로리(*H. pylori*)를 억제하는 것이 확인된 바 있다. 또한, 최근에는 다양한 천연물 소재로부터 헬리코박터 파이로리(*H. pylori*)를 억제할 수 있는 활성 성분을 찾기 위한 노력이 지속되고 있다. 오오타(Ohta) 등은 마늘 추출물(garlic extract)로부터 다양한 활성물질을 분리 보고하였고(Antimicrob. Agents and Chemother., 1999, 43, 1811-1812), 마브(Mabe) 등은 녹차 내의 카테킨(catechin)류 화합물에 대하여 시험관 내(in vitro)에서 뿐만 아니라 생체 내(in vivo) 수준에서 헬리코박터 파이로리(*H. pylori*) 억제능을 확인한 바 있다(Antimicrob. Agents and Chemother., 1999, 43, 1788-1791). 이 외에도 백리향(J. Appl. Bacteriol., 1996, 80, 667-672)이나 다양한 후라보노이드(Arzneim.-Forsch./Drug Res., 1995, 45, 697-700)로부터도 강력한 활성이 보고되고 있다.

[0006] 한편, 강화순무(*Brassica Rapa. L.*)의 매운 맛을 내는 이소타이오사이안산염(Isothiocyanate)은 오래 전부터 항암 성분으로 알려져 왔다. 동물실험에선 식도암·간암·폐암·대장암을 예방하는 효과가 입증되기도 했다. 역시 항암물질로 알려진 인돌(indole), 설폰라페인(sulforaphane) 성분도 들어있다. 당질의 비율이 상대적으로 높고(7%) 변비를 없애주는 식이섬유(3.8%)도 풍부하다. 항산화작용을 하고 피부에 좋은 비타민 C(1백g당 18mg), 비타민 E 미량, 비타민 B1 (0.03mg), 비타민 B2(0.03mg), 니아신(0.6mg)이 많이 들어있다. 칼슘과 철분도 풍부하며 또한 간암 유발물질인 아플라톡신(곰팡이 독의 일종)을 해독하는 글루코시노레이트가 들어있다.

[0007] 그런데, 강화순무로부터 헬리코박터 파이로리(*Helicobacter pylori*) 억제 성분을 추출하는 기존의 방법들은 디클로로메탄(dichloromethane)이나 에틸아세테이트(ethylacetate) 등의 유해한 유기용매들을 사용하기 때문에 일

반식품에는 적용하지 못하고 제약이나 건강기능식품에 한정하여 사용할 수밖에 없는 문제점이 있다.

[0008] 이에 본 발명자들은 위궤양 예방과 치료에 약용 및 식용으로 동시에 사용되는 강화순무(*Brassica Rapa. L.*)를 일반식품으로 사용 가능한 제조공정을 이용하여 그 활용범위를 제약, 건강기능식품 뿐만 아니라 일반식품에까지 넓힐 수 있는 헬리코박터 파이로리(*Helicobacter pylori*) 생육 저해 추출물 제조방법을 개발하여 본 발명을 완성하였다.

### 발명의 내용

#### 해결하려는 과제

[0009] 본 발명은 강화순무(*Brassica Rapa. L.*)로부터 헬리코박터 파이로리(*Helicobacter pylori*) 억제 성분을 효과적으로 추출 및 농축하여 헬리코박터 파이로리 억제 효능이 뛰어난 강화순무 추출물의 제조방법 및 상기의 추출물을 유효성분으로 함유하는 약학조성물, 발효유, 음료 및 건강기능식품을 제공하는 것을 목적으로 한다.

#### 과제의 해결 수단

[0010] 상기와 같은 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 a)강화순무(*Brassica Rapa. L.*)의 지하부를 세척하고 증류수를 첨가하여 균질화하는 단계; b)상기 균질화된 강화순무를 25~40℃에서 1~6시간 동안 가수분해시키는 단계; c)상기 강화순무 가수분해물을 0.45~1μm의 여과막으로 여과하는 단계; d)상기 강화순무 여과액을 합성흡착수지에 흡착시키는 단계; e)상기 강화순무 여과액이 흡착된 합성흡착수지를 합성흡착수지 용적의 4~5배의 물로 수세하는 단계; f)상기 합성흡착수지에 합성흡착수지 용적의 2~5배에 해당하는 에탄올 농도 80~94%의 주정으로 흡착되어 있던 활성성분들을 용출시키는 단계; g)상기 용출물들을 감압농축시킨 후 동결건조하여 분말화하는 단계를 포함하여 이루어진 헬리코박터 파이로리(*Helicobacter pylori*) 억제 효능을 가지는 강화순무 추출물의 제조방법, 그 제조방법에 의해 제조된 강화순무 추출물, 상기 강화순무 추출물을 유효성분으로 함유하는 약학적 조성물, 발효유, 음료 및 건강기능식품을 제공하는 것을 특징으로 한다.

[0011] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

[0012] 강화순무로부터 헬리코박터 파이로리(*Helicobacter pylori*) 억제 성분을 효과적으로 추출하는 방법은 강화순무의 지하부를 세척하고 증류수를 가하여 균질화한 뒤 이를 합성흡착수지에 통과시켜 활성성분을 흡착시키는 과정과 상기 흡착된 성분을 식품에 사용 가능한 주정으로 용출시킨 후 이를 농축 및 분말화하는 과정으로 이루어진다.

[0013] 상기 제조과정을 각 단계별로 상세히 설명하면 다음과 같다.

[0014] a)강화순무의 지하부를 세척하고 증류수를 첨가하여 균질화하는 단계

[0015] 본 단계에서는 강화순무(*Brassica Rapa. L.*)의 지하부만을 세척한 후 단위 질량당(kg)당 2~5배의 증류수(L)를 가해준 뒤 균질화시킨다. 순무 지하부에는 항암성분으로 알려진 설폰라판(sulforaphane)이 지상부보다 많이 존재하기 때문에 지하부를 주로 사용하였다.

[0016] 상기 증류수를 사용하는 것은 중성 조건 하에서 가수분해하는 것이 순무 내에 존재하는 글루코시놀레이트(glucosinolate)가 가수분해 되면서 중성조건에서 항암효과가 있다고 알려진 이소티오시아네이트(isothiocyanate) 형태의 화학구조가 가장 많이 생성되기 때문이다.

[0017] b)상기 균질화된 강화순무를 25~40℃에서 1~6시간 동안 가수분해시키는 단계

[0018] 본 단계에서는 상기 균질화된 강화순무를 25~40℃에서 1~6시간 동안 가수분해시킨다.

- [0019] 상기 가수분해 온도와 시간의 범위를 벗어나면 분리하고자 하는 물질의 수득량이 미비하고, 장시간 가수분해의 경우 항암성이 밝혀지지 않거나 그 효과가 없는 니트릴(nitrile)이나 에피티오니트릴(epithionitrile) 등으로 가수분해 되어 항암효과가 알려져 있는 이소티오시아네이트의 회수율이 급격히 줄어드는 문제가 있다.
- [0020] c)상기 강화순문 가수분해물을 0.45~1 $\mu$ m의 여과막으로 여과하는 단계
- [0021] 본 단계에서는 상기 b)단계의 강화순무 가수분해물을 0.45~1 $\mu$ m의 여과막을 이용하여 여과시킨다. 이때 여과공의 크기를 0.45~1 $\mu$ m 범위로 하는 것은 여과공의 크기가 0.45 $\mu$ m 미만일 경우에는 여과막이 쉽게 막혀 여과작업이 힘들어질 수 있고, 1 $\mu$ m 초과일 경우에는 미세한 입자들이 남아 다음단계인 수지흡착과정에서 효율을 떨어뜨릴 수 있기 때문이다.
- [0022] d)상기 강화순무 여과액을 합성흡착수지에 흡착시키는 단계
- [0023] 본 단계에서는 상기 c)단계의 강화순무 여과액을 컬럼이 충전된 합성흡착수지에 통과시켜 흡착시킨다.
- [0024] 상기 합성흡착수지:강화순무 여과액의 부피비율은 1:1~5 범위인 것이 바람직한데, 상기 범위를 벗어나는 경우에는 목표로 하는 활성성분들이 흡착수지의 흡착능력에 비하여 너무 미량이거나 과량이 될 수 있어 흡착수지를 낭비하거나 흡착되지 못한 활성성분들을 손실할 우려가 있기 때문이다.
- [0025] 상기 합성흡착수지는 스티렌(Styrene)과 디비닐벤젠(Divinyl benzene)의 공중합체의 고다공성 합성흡착제(Synthetic Adsorbent)인 Diaion-HP20을 사용하는 것이 바람직하다. Diaion-HP20은 다수의 세공(細孔)이 분포하며 비표면적(Surface Area)이 높아 흡착능력이 우수하며, 세공이 비교적 크기 때문에 큰 분자의 흡착에 적합하며(MW 1,500이상) 흡착물질의 용출(Elution)이 용이하다. 특히, 입자의 표면이 소수성(Hydrophobic)을 띠고 있어서 유기물이 합성흡착제에 흡착될 때 유기분자 중의 소수성기가 흡착된다. 따라서 소수기의 소수정도가 큰 유기물(예: 지방산의 알킬기)이 흡착이 잘 된다. 흡착된 유기물의 용리는 산, 알칼리, 극성용매 등이 사용된다.
- [0026] 또한, 합성흡착수지 Diaion-HP20은 식품첨가물공전에서 이온교환수지로 분류되어 일반식품의 제조과정에 무리없이 사용이 가능하기 때문에 본 발명에 의한 헬리코박터 파이로리(*H. pylori*) 억제 소재를 제약이나 건강기능식품 뿐만 아니라 일반 식품에도 적용할 수 있어 그 응용범위를 극대화시킬 수 있는 장점이 있다.
- [0027] e)상기 강화순무 여과액이 흡착된 합성흡착수지를 합성흡착수지 용적의 4~5배의 물로 수세하는 단계
- [0028] 본 단계에서는 상기 d)단계의 강화순무 여과액이 흡착된 합성흡착수지를 합성흡착수지 용적의 4~5배의 물로 수세하여 흡착되지 않은 비활성 성분을 제거한다.
- [0029] 강화순무 여과액이 흡착된 합성흡착수지를 합성흡착수지 용적의 4~5배의 물로 수세하는 것은 혹시 남아있을지 모르는 비흡착 불순물들을 충분히 제거하기 위함이다.
- [0030] f)상기 합성흡착수지에 합성흡착수지 용적의 2~5배에 해당하는 에탄올 농도 80~94%의 주정으로 흡착되어 있는 헬리코박터 파이로리(*H. pylori*) 억제활성 성분들을 용출시키는 단계
- [0031] 본 단계에서는 합성흡착수지에 흡착되어 있는 헬리코박터 파이로리(*H. pylori*) 억제 활성성분을 상기의 비활성 성분이 제거된 합성흡착수지 용적의 2~5배에 해당하는 에탄올 농도 80~94%의 주정(酒精)으로 용출시키는 것이다.
- [0032] 상기 주정은 합성흡착수지에 흡착되어 있는 헬리코박터 파이로리(*H. pylori*) 억제 활성성분들을 효과적으로 용출시키기 위하여 80~94%의 에탄올 농도로 사용하는 것이 바람직하다.
- [0033] g)상기 용출된 헬리코박터 파이로리(*H. pylori*) 억제활성 성분들을 감압농축시킨 후 동결건조하여 분말화 하는 단계

- [0034] 본 단계에서는 상기 f)단계의 용출된 헬리코박터 파이로리(*H. pylori*) 억제활성 성분들을 42℃에서 감압농축하여 알코올 성분을 제거하고 -70~-80℃로 동결건조하여 분말화하는 것이다.
- [0035] 본 발명의 헬리코박터 파이로리(*Helicobacter pylori*) 억제 효능을 갖는 강화순무 추출물을 유효성분으로 함유하는 위궤양 치료용 약학조성물은 경구, 경피, 피하, 정맥 또는 근육을 포함한 여러 경로를 통해 투여될 수 있으며, 여러가지 제형으로 제제화 할 수 있는데 제제화 할 경우에는 통상적으로 사용하는 충전제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제 및 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 제제화 할 수 있다. 경구투여를 위한 고형 제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제 및 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형 제제는 헬리코박터 파이로리(*Helicobacter pylori*) 억제 효능을 갖는 강화순무 추출물에 적어도 하나 이상의 부형제(예를 들면, 전분, 수크로스, 락토오스 및 젤라틴) 등이 섞여 조제된다. 또한 단순한 부형제 이외에 윤활제들도 사용될 수 있다. 경구투여를 위한 액상제제로는 현탁제, 내용액제, 유제 및 시럽제 등을 들 수 있는데, 흔히 사용되는 단순 희석제인 물, 액체 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제 및 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수용성 용제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제 및 좌제가 포함된다. 비수용성 용제와 현탁용제로는 프로필렌글리콜, 폴리에틸렌글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다.
- [0036] 사람의 경우 통상적인 1일 투여량은 1~30mg/kg 체중의 범위일 수 있고, 1회 또는 수회로 나누어 투여할 수 있다. 그러나 실제 투여량은 투여경로, 연령, 성별 및 체중, 건강 상태 등의 여러 관련 인자에 비추어 결정되어야 한다.
- [0037] 본 발명의 헬리코박터 파이로리(*Helicobacter pylori*) 억제 효능을 갖는 강화순무 추출물은 식용 또는 약용으로 사용되는 강화순무를 원료로 하여 독성 및 부작용이 거의 없으므로 위궤양 치료의 목적으로 장기간 복용 시에도 안심하고 사용할 수 있는 제제이다.
- [0038] 한편, 본 발명의 헬리코박터 파이로리(*Helicobacter pylori*) 억제 효능을 갖는 강화순무 추출물은 발효유, 음료 및 건강기능식품으로 사용가능하다.
- [0039] 헬리코박터 파이로리(*Helicobacter pylori*) 억제 효능을 갖는 강화순무 추출물을 유효성분으로 함유하는 발효유는 탈지분유로 무지유고형분 함량을 조정된 원료유를 살균하고, 살균된 원료유를 냉각시킨 후 락토바실러스 카제이 HY 2782[*Lactobacillus casei* HY 2782; 기탁기관: 한국 중균 협회, 기탁번호 KFCC-10813, 기탁일자 1993년 12월 7일, 특허등록 제0125219호(발명의 명칭:프로파이지가 제거된 락토바실러스카제이 HY 2782 및 이를 이용한 제품)]를 접종한 배양액에 과즙 농축액, 식이섬유, 포도당, 올리고당, 갈슘, 비타민을 녹여 제조된 시럽을 일정 비율로 혼합, 교반하여 균질화한 뒤 용기에 포장하여 제조한다.
- [0040] 헬리코박터 파이로리(*Helicobacter pylori*) 억제 효능을 갖는 강화순무 추출물을 유효성분으로 함유하는 음료는 헬리코박터 파이로리(*Helicobacter pylori*) 억제 효능을 갖는 강화순무 추출물이 유효성분으로 포함되는 것 이외에 대추엑기스, 당귀농축액, 액상과당, 정제수 등을 첨가 혼합하여 드링크용 병에 충전하여 살균한 후 실온으로 냉각하여 제조한다.
- [0041] 헬리코박터 파이로리(*Helicobacter pylori*) 억제 효능을 갖는 강화순무 추출물을 유효성분으로 함유하는 건강기능식품은 헬리코박터 파이로리 억제 효능을 갖는 강화순무 추출물에 영양보조성분(비타민 B1, B2, B5, B6, E 및 초산에스테르, 니코틴산 아미드), 올리고당, 50% 에탄올, 정제수를 첨가 혼합하여 과립상으로 성형하여 진공건조기에서 건조시킨 후, 12~14메쉬(mesh)를 통과시켜 균일하게 과립을 제조하여 적당량씩 압출 성형하여 정제 또는 분말로 하거나 경질캡슐에 충전하여 경질캡슐제품으로 제조한다.

### 발명의 효과

- [0042] 본 발명의 헬리코박터 파이로리 억제효능을 가지는 강화순무 추출물은 헬리코박터 파이로리에 대한 항균활성,

헬리코박터 파이로리 уре아제(*H. pylori* urease) 활성 억제효과, 위상피세포 정착성 억제효과 및 인터루킨-8 생성 억제효과를 나타냄으로써 기존의 추출물에 비하여 헬리코박터 파이로리(*H. pylori*) 억제효과가 우수할 뿐만 아니라 일반식품에 적용 가능한 제조공정을 사용하기 때문에 적용분야를 극대화시킬 수 있는 장점이 있다.

**도면의 간단한 설명**

- [0043] 도 1은 헬리코박터 파이로리 억제 활성을 갖는 강화순무 추출물을 합성흡착수지를 사용하여 제조하는 방법에 대한 흐름도이다.
- 도 2는 헬리코박터 파이로리 억제 활성을 갖는 강화순무 추출물의 헬리코박터 파이로리 성장 억제환의 반지름을 그래프로 나타낸 것이다.
- 도 3은 헬리코박터 파이로리 억제 활성을 갖는 강화순무 추출물의 헬리코박터 파이로리 уре아제 활성억제 효과를 나타낸 그래프이다.
- 도 4는 헬리코박터 파이로리 억제 활성을 갖는 강화순무 추출물에 의한 헬리코박터 파이로리 부착능 억제 효과를 나타낸 그래프이다.
- 도 5는 헬리코박터 파이로리 억제 활성을 갖는 강화순무 추출물에 의한 헬리코박터 파이로리 IL-8 분비억제 효과를 나타낸 그래프이다.

**발명을 실시하기 위한 구체적인 내용**

[0044] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 보다 상세하게 설명한다. 그러나 다음의 실시예는 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니며, 본 발명의 기술적 사상의 범위 내에서 당업자에 의한 통상적인 변화가 가능하다.

[0045] <실시예 1>

[0046] 헬리코박터 파이로리 억제 활성을 갖는 강화순무 추출물의 제조

[0047] 1-1. 강화순무 세척, 균질화 및 가수분해

[0048] 강화순무 지하부를 물로 세척하여 불순물들을 제거한 뒤 순무의 단위 중량(kg)당 3배의 증류수(L)를 혼합하여 믹서기를 이용하여 균질화하였다. 상기의 강화순무 균질액은 30℃에서 3시간 동안 가수분해 반응을 실시하였다. 상기의 가수분해 반응물은 No.1의 여과종이로 1차 여과시킨 후 공경(pore size) 0.45 μm의 여과막을 이용하여 2차 여과하여 맑은 용액을 얻었다.

[0049] 1-2. 강화순무 추출물로 합성흡착제 처리

[0050] 상기 실시예 1-1의 강화순무 여과액의 부피의 2/5에 해당하는 부피의 합성흡착수지 Diaion HP-20을 유리컬럼에 충전시킨 후 알코올과 물을 이용하여 순차적으로 세척하였다. 그런 다음, 상기 실시예 1-1의 강화순무 여과액을 상기의 합성흡착수지 Diaion HP-20이 충전된 유리컬럼에 통과시켰다. 합성흡착수지에 흡착되지 않은 비활성 성분들을 제거하기 위하여 합성흡착수지 부피의 4배의 증류수를 컬럼에 흘려주었다. 흡착된 활성성분들은 합성흡착수지 부피의 3배에 해당하는 에탄올 농도 85%의 주정을 흘려주어 용출시켰다. 상기의 활성성분 용출액은 42℃에서 감압농축시켜 에탄올을 제거한 후 동결건조시켜 최종적으로 분말화하였다.

[0051] 이상의 강화순무로부터 헬리코박터 파이로리 생육 억제 추출물을 제조하는 과정을 도 1에 나타내었다.

[0052] <실시예 2>

[0053] 헬리코박터 파이로리 억제 효능을 갖는 강화순무 추출물을 유효성분으로 함유하는 약학적 조성물

[0054] 캡슐제의 제조

[0055] 상기 실시예 1의 강화순무추출물 분말 100mg, 옥수수 전분 100mg, 유당 100mg, 스테아린산 마그네슘 2mg을 완전

히 혼합한 후 통상의 캡슐제의 제조방법에 따라서 경질 젤라틴 캡슐에 충전하여 캡슐제를 제조하였다.

[0056] 산제의 제조

[0057] 상기 실시예 1의 강화순무추출물 분말 2g, 유당 1g을 완전히 혼합한 후 기밀포에 충전하여 통상의 산제의 제조방법에 따라 산제를 제조하였다.

[0058] <실시예 3>

[0059] 헬리코박터 파이로리 억제 효능을 갖는 강화순무 추출물을 유효성분으로 함유하는 발효유

[0060] 헬리코박터 파이로리(*H. pylori*) 억제 효능을 갖는 강화순무 추출물 및 혼합과즙시럽으로 구성된 발효유를 제조하는 방법은 다음과 같다.

[0061] 먼저, 유산균 배양액은 원유 95.36중량%와 탈지분유(또는 혼합분유) 4.6중량%를 교반하여 15℃에서의 비중은 1.0473~1.0475, 적정산도는 0.200~0.220%, pH는 6.65~6.70, 20℃에서의 Brix<sup>o</sup>는 16.3~16.5%정도가 되도록 혼합하였다. 후에 이를 UHT 열처리(135℃에서 2초간 살균)하고 40℃로 냉각한 뒤, 스트렙토코커스 써모필러스균과 유당분해효소(Valley Laboratory, USA)를 각기 0.02중량%씩 첨가하고 6시간 동안 배양하여, BCP 배지에서의 총 유산균수가  $1.0 \times 10^9$  cfu/ml 이상, 적정산도가 0.89~0.91%, pH는 4.55~4.65가 되도록 하여 제조하였다.

[0062] 그 다음, 혼합과즙시럽은 액상과당 13중량%, 백설탕 5중량%, 혼합과즙농축액 56 Brix<sup>o</sup> 10.9중량%, 펙틴 1.0중량%, 후레쉬 후르츠 믹스 에센스 0.1중량% 및 정제수 70중량%를 30~35℃에서 교반하여 혼합한 후 UHT 열처리(135℃에서 2초간 살균)한 후 냉각하여 제조하였다.

[0063] 그리고 상기의 방법으로 제조된 유산균배양액 69.5중량%와 상기 실시예 1의 강화순무추출물 분말 0.1중량% 및 상기 혼합과즙시럽 30.4중량%를 조합하여 150bar에서 균질한 후 10℃ 이하로 냉각하여 헬리코박터 파이로리 억제 효능을 갖는 강화순무 추출물을 유효성분으로 함유하는 발효유를 제조하였다.

[0064] <실시예 4>

[0065] 헬리코박터 파이로리 억제 효능을 갖는 강화순무 추출물을 유효성분으로 함유하는 기능성 음료

[0066] 상기의 헬리코박터 파이로리(*H. pylori*) 억제 효능을 갖는 강화순무 추출물 분말 및 혼합과즙시럽으로 구성된 기능성 음료를 제조하는 방법은 다음과 같다.

[0067] 혼합과즙시럽은 액상과당 13중량%, 백설탕 2.5중량%, 갈색설탕 2.5중량%, 혼합과즙농축액 56Brix<sup>o</sup> 10.9중량%, 펙틴 1.0중량%, 후레쉬 후르츠 믹스 에센스 0.1중량% 및 정제수 70중량%를 30~35℃에서 교반하여 혼합한 후 UHT 열처리(135℃에서 2초간 살균)한 후 냉각하여 제조하였다.

[0068] 상기의 방법으로 제조된 혼합과즙시럽 30.4중량%와 상기 실시예 1의 강화순무 추출물 분말 0.1중량% 및 나머지 물 69.5중량%를 조합하여 150bar에서 균질한 후 10℃ 이하로 냉각한 후 이를 유리병, 팩트병 등 소포장 용기에 포장하여 헬리코박터 파이로리(*H. pylori*) 억제 효능을 갖는 강화순무 추출물을 유효성분으로 함유하는 기능성 음료를 제조하였다.

[0069] <실시예 5>

[0070] 헬리코박터 파이로리 억제 효능을 갖는 강화순무 추출물을 유효성분으로 함유하는 건강기능식품

[0071] 상기 실시예 1의 강화순무 추출물 분말 0.1중량%에 영양보조성분(비타민 B1, B2, B5, B6, E 및 초산에스테르, 니코틴산 아미드) 및 올리고당을 상기의 실시예 1의 헬리코박터 파이로리 억제 효능을 갖는 강화순무 추출물 분말 100중량부에 대하여 10중량부가 되도록 첨가하여 고속회전 혼합기에서 혼합하였다. 상기 혼합물에 멸균 정제수 10중량부를 첨가, 혼합하고 직경 1~2mm의 과립상으로 성형하였다. 상기 성형된 과립은 40~50℃의 진공건조기에서 건조시킨 후 12~14 메쉬(mesh)를 통과시켜 균일하게 과립을 제조하였다. 상기와 같이 제조된 과립은 적당

양씩 압출 성형되어 정제 또는 분말로 되거나 경질캡슐에 충전되어 경질캡슐제품으로 제조하였다.

[0072] <시험예 1>

[0073] 헬리코박터 파이로리에 대한 항균활성 측정

[0074] 상기 실시예 1의 강화순무 추출물을 웰확산분산법을 이용하여 헬리코박터 파이로리에 대해 항균활성을 측정하였다. 이때 대조군으로는 시료가 포함되지 않은 물을 사용하여 동일한 방법으로 측정하였다.

[0075] 상기 강화순무 추출물과 대조군의 항균활성은 배양 후 웰주위에 형성된 저지환(clear zone)의 반지름(mm)으로 비교하였다.

[0076] 그 결과를 도 2에 나타내었다.

[0077] 도 2에서 확인할 수 있는 바와 같이, 웰확산분산법에 의해 항균활성을 측정한 결과 대조군인 물은 시료의 저지환의 크기에 변화가 없어 헬리코박터 파이로리에 영향을 미치지 않은 반면에 본 발명의 강화순무 추출물은 시료의 저지환 크기가 농도 의존적으로 감소하여 강한 항균활성을 가짐을 알 수 있었다.

[0078] <시험예 2>

[0079] 헬리코박터 파이로리 우레아제 생성억제 측정

[0080] 상기 실시예 1의 강화순무 추출물의 헬리코박터 파이로리 우레아제(*H. pylori* urease) 저해활성을 페놀레드 방법을 이용하여 측정하였다(Uesato S. et al., Chem Pharm Bull., 50, pp1280-1282, 2002; Kobashi K. et al., Biochem Biophys Acta, 65, pp380-383, 1962).

[0081] 먼저, 우레아제를 0.1유닛/ $\mu$ l로 희석하여 20 $\mu$ l(2 유닛) 사용하였다. 실시예 1의 강화순무 추출물을 농도별로 희석하여 100 $\mu$ l씩을 준비한 후, DDW(distilled deionized water) 380 $\mu$ l씩 첨가하여 부피를 0.5ml로 맞추었다. 우레아제 용액(2% urea in 0.1M Tris-HCl pH 6.8) 0.5ml을 상기 용액에 첨가한 다음, 37 $^{\circ}$ C에서 30분간 교배하면서 인큐베이션(incubation) 하였다. 이후, 각 시료에 대하여 560nm에서 흡광도를 측정하였다.

[0082] 우레아제(urease) 활성측정은 배지(well)당 100 $\mu$ l를 취하여 1.0ml의 우레아 알 브로스(urea R broth)에 첨가하고 이를 10% CO<sub>2</sub> 인큐베이터(incubator)에서 6시간 배양한 뒤 560nm에서 흡광도를 측정하였다.

[0083] 강화순무 추출물을 처리하지 않은 것을 대조군으로 하여 상기와 동일하게 실험하였다.

[0084] 그 결과를 도 3에 나타내었다.

[0085] 도 3에서 확인할 수 있는 바와 같이, 본 발명의 강화순무 추출물이 대조군에 비하여 헬리코박터 파이로리 우레아제 활성이 농도 의존적으로 현저하게 감소되는 것을 알 수 있었다.

[0086] <시험예 3>

[0087] 강화순무 추출물에 의한 헬리코박터 파이로리의 생육저해 효과

[0088] 상기 실시예 1의 강화순무 추출물에 의한 헬리코박터 파이로리(*H. pylori*)의 생육 저해효과를 측정하였다

[0089] 헬리코박터 파이로리를 0.9% 생리식염수에 10<sup>8</sup>cfu/ml이 되도록 현탁시킨 후, 멸균증류수로 10배 희석하여 균주 희석액을 제조하였다. 상기 실시예 1의 강화순무 추출물을 1mg/ml의 농도부터 1/2 농도로 순차적으로 희석(serial dilution)한 것을 첨가하여 멸균한 100mM 인산완충용액(pH 7) 9ml에, 상기 균주 희석액 1ml를 첨가하여 30분 동안 배양한 후, 배양액을 멸균 생리식염수로 연속 희석하였다. 상기 희석액 0.1ml을 브루셀라 한천배지(10% FBS)에 접종하고, 37 $^{\circ}$ C에서 72시간 동안 미호기성 상태에서 배양한 후, 콜로니수로부터 생존균수를 계산하였다. 대조군은 상기 실시예 1의 강화순무 추출물을 포함하지 않은 인산 완충용액을 사용하였다.

[0090] 그 결과를 하기 표 1에 나타내었다

표 1

구 분	생균수(cfu/ml)
강화순무 추출물 1mg/ml	10 미만
강화순무 추출물 0.5mg/ml	$3 \times 10^2$
강화순무 추출물 0.25mg/ml	$1 \times 10^4$
강화순무 추출물 0.125mg/ml	$9 \times 10^4$
대조군	$3 \times 10^6$

[0092] 상기 표 1에서 확인할 수 있는 바와 같이, 본 발명의 강화순무 추출물을 처리한 균이 대조군에 비하여 헬리코박터 파이로리의 생균수를 농도 의존적으로 감소시키는 것으로 보아 본 발명의 강화순무 추출물이 헬리코박터 파이로리 균의 생육을 저해시킴을 알 수 있었다.

[0093] <시험예 4>

[0094] 헬리코박터 파이로리의 부착능억제

[0095] AGS 세포(AGS cell,  $10^6$  cfu/well)를 6-배지 판(6-well plate)에 RPMI1640(10% FBS)에 넣어 24시간 배양시켜 바닥에 부착시킨 후 헬리코박터 파이로리를  $10^7$  cells/well과 상기 실시예 1의 강화순무 추출물을 최고 2mg/ml부터 2배씩 희석하여 최저 0.12mg/ml 농도가 되도록 첨가하여 90분간 인큐베이션(incubation)하였다. PBS로 3번 세척(washing) 한 뒤 우레아 알-브로스(Urea R broth) 1.0ml을 넣고 37도에서 1시간 동안 반응시켜 O.D. 560nm에서 측정하였다. 이는 아직 AGS 세포에 떨어지지 않고 부착하여 있는 헬리코박터 파이로리의 우레아제 활성으로 인한 우레아 알-브로스(Urea R broth)의 pH 색깔 변화를 통하여 부착된 헬리코박터 파이로리의 수를 간접적으로 측정하는 것이다.

[0096] 그 결과를 도 4에 나타내었다.

[0097] 도 4에서 확인할 수 있는 바와 같이, 본 발명의 강화순무 추출물에 대하여 농도의존적으로 AGS 세포에 대한 헬리코박터 파이로리 부착능이 감소한 것으로 보아 본 발명의 강화순무 추출물은 헬리코박터 파이로리 부착능을 억제시킴으로써 헬리코박터 파이로리의 생육을 억제함을 알 수 있었다.

[0098] <시험예 5>

[0099] 헬리코박터 파이로리균의 IL-8 억제

[0100] 헬리코박터 파이로리가 위점막의 상피세포와 상호작용할 때, 다양한 사이토카인(cytokine)의 생성을 촉진하게 되는데 이 중에서도 IL-8(interleukin-8)의 분비가 가장 현저하게 나타난다. 그리고 IL-8은 위염의 직접적인 원인이 되는 뉴트로필(neutrophil) 또는 매크로파지(macrophge)까지 유도하게 된다. 따라서 헬리코박터 파이로리 감염에 의해 유도되는 IL-8의 생성을 억제하는 것이 위염발생을 억제하는 한 방법이 될 수 있다. 따라서, 본 발명의 강화순무 추출물이 IL-8의 생성을 억제하는지 시험하였다.

[0101] 먼저, 한천배지에서 배양된 헬리코박터 파이로리를 10ml의 PBS 완충액(buffer)으로 씻어낸 후, 4°C, 9000rpm에서 10분간 원심분리하였다. 침전된 세포를 1ml의 RPMI1640 배지에 현탁하고 현탁액의 소량을 취하여 1:50으로 희석한 뒤 660nm에서 현탁도를 재어 실험을 하였다.

[0102] Mock은 AGS 세포(AGS cell,  $10^6$  cfu/well)만을 배양하였으며, 대조군은 AGS 세포에 헬리코박터 파이로리만을 처리하였다. 실험군은 AGS 세포에 헬리코박터 파이로리를 처리한 후 배지에 녹인 상기 실시예 1의 강화순무 추출

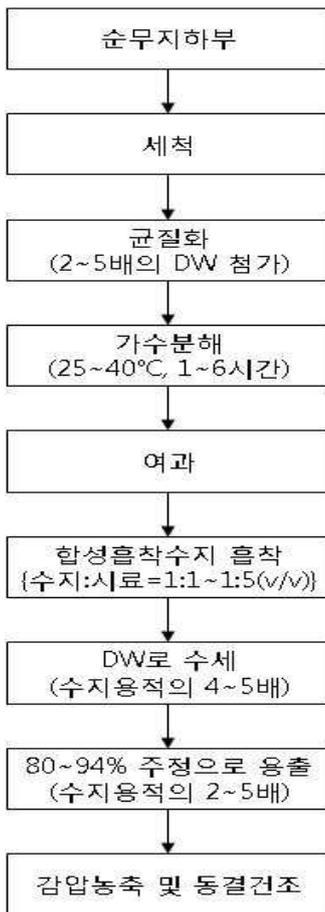
물을 농도별로 각각 처리하였다. 18시간 뒤 각각 배지를 취하여 4℃, 12,000rpm에서 3분간 원심분리하고 그 상등액을 취한 후 ELISA 방법(Human IL-8 Immunoassay kit, BD)으로 IL-8의 생성량 변화를 측정하였다.

[0103] 그 결과를 도 5에 나타내었다.

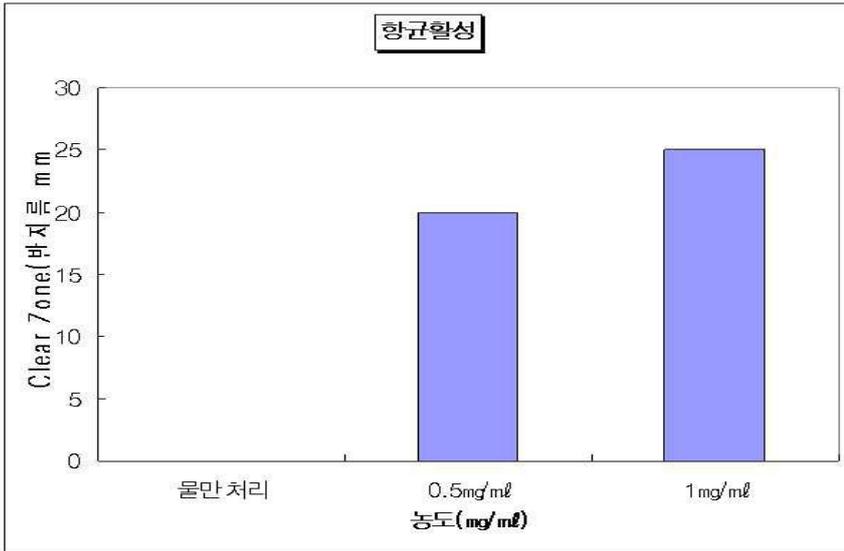
[0104] 도 5에서 확인할 수 있는 바와 같이, 헬리코박터 파이로리에 감염되지 않은 군(Mock)에서는 IL-8의 생성이 거의 없었고, 대조군에서는 약 450pg/ml 수준에서 IL-8의 양이 유지된 반면, 본 발명의 강화순무 추출물과 헬리코박터 파이로리를 감염시킨 실험군에서는 IL-8의 생성량이 농도의존적으로 현저히 감소하였다. 따라서 본 발명의 강화순무 추출물이 헬리코박터 파이로리 감염에 의해 유도, 생성되는 IL-8의 생성량을 감소시킴으로써 위염의 발생률도 감소시킨다는 것을 확인할 수 있었다.

**도면**

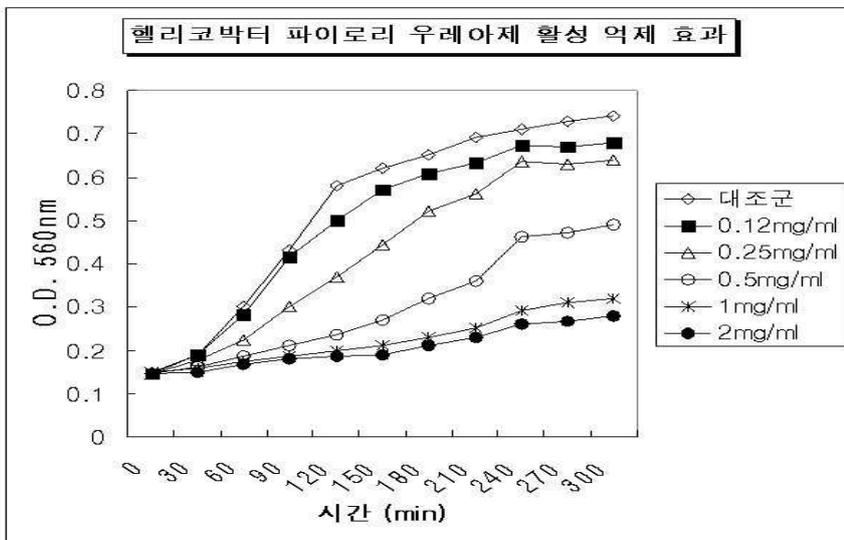
**도면1**



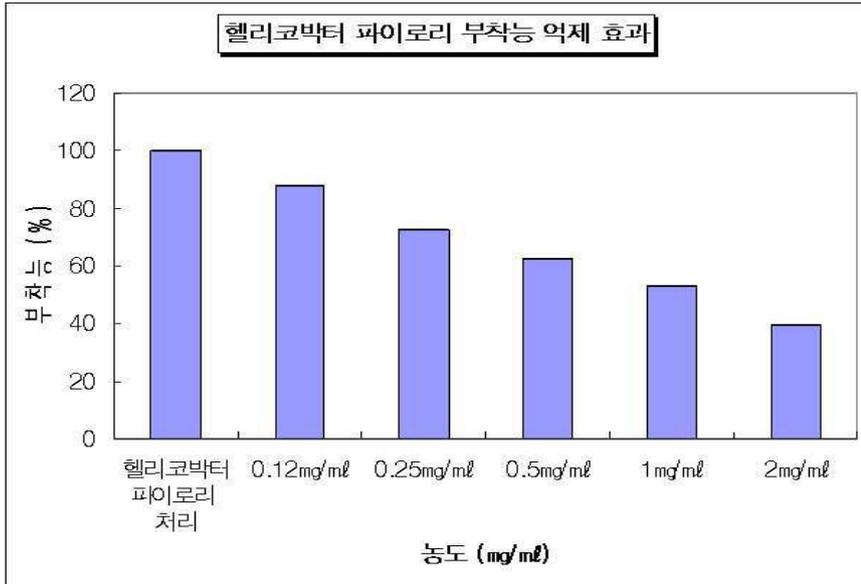
도면2



도면3



도면4



도면5

