



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2016-0149049  
(43) 공개일자 2016년12월27일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
A61K 36/899 (2006.01) A23L 1/30 (2006.01)  
(52) CPC특허분류  
A61K 36/899 (2013.01)  
A23L 33/105 (2016.08)  
(21) 출원번호 10-2015-0086038  
(22) 출원일자 2015년06월17일  
심사청구일자 2016년07월25일

(71) 출원인  
대한민국(농촌진흥청장)  
전라북도 전주시 완산구 농생명로 300 (중동)  
고려대학교 산학협력단  
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암  
동5가)  
(72) 발명자  
이성현  
전라북도 완주군 이서면 반교로 21 남양사이버  
107동 903호  
이성준  
서울특별시 강남구 도산대로96길 39, 104동 402호  
(청담동, 청담공원아파트)  
(뒷면에 계속)  
(74) 대리인  
이원희

전체 청구항 수 : 총 6 항

(54) 발명의 명칭 **흑미 호분층의 추출물을 유효성분으로 함유하는 골다공증 예방 및 치료용 약학적 조성물**

### (57) 요약

본 발명은 흑미(black rice) 호분층(aleurone layer)의 추출물을 유효성분으로 함유하는 골다공증(osteoporosis) 예방 및 치료용 약학적 조성물에 관한 것으로서, 구체적으로 본 발명의 흑미 호분층 추출물은 조골세포의 분화를 촉진하고, 흑미 현미의 추출물과 비교하여 현저하게 조골세포 분화를 촉진하며 조골세포 분화능을 증가시킴을 확인함으로써, 본 발명의 흑미 호분층 추출물이 골다공증 예방 및 치료용 약학적 조성물로 유용하게 사용할 수 있음을 확인하였다.

**대표도** - 도2



무처리

흑미 현미

흑미 호분층

(52) CPC특허분류

A23V 2200/306 (2013.01)

A61K 2236/33 (2013.01)

(72) 발명자

**안영재**

전라북도 김제시 요촌서길 30

**김연지**

서울특별시 동대문구 약령사로 25 안암벽산아파트  
106동 1201호

**이영민**

서울특별시 서대문구 통일로39가길 57 홍제현대아  
파트 108동 103호

**김정봉**

대전광역시 유성구 봉명로 94 금성백조예미지 708  
동 1602호

**김행란**

서울특별시 강남구 남부순환로 3032 미도아파트  
110동 504

**장환희**

전라북도 전주시 완산구 소태정로 1 휴먼시아아  
이 린 407동 402호

**남송이**

인천광역시 남동구 논고개로 10, 한화에코메트로  
1212동 804호

**김남석**

전라북도 전주시 덕진구 가리내로 550 한양아파트  
110동 708호

**최봉겸**

전라북도 전주시 완산구 물레방아3길 25-18

**이선혜**

전라북도 전주시 덕진구 태진로 101 우성아파트  
108동 1201호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 PJ01009001

부처명 농촌진흥청

연구관리전문기관 농촌진흥청

연구사업명 농축산물부가가치향상 기술개발

연구과제명 뼈 건강과 비만을 동시에 조절하는 건강기능성 원료 등록 연구(흑미의 invivo 뼈 건강과  
비만 동시조절 개선 기전 연구)

기 여 율 1/1

주관기관 국립농업과학원

연구기간 2014.02.01 ~ 2015.12.31

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

흑미(black rice) 호분층(aleurone layer)의 추출물을 유효성분으로 함유하는 골다공증(osteoporosis) 예방 및 치료용 약학적 조성물.

#### 청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 추출물은 물, C<sub>1</sub> 내지 C<sub>2</sub> 저급 알코올 또는 이들의 혼합물로 추출하는 것을 특징으로 하는 골다공증 예방 및 치료용 약학적 조성물.

#### 청구항 3

제 2항에 있어서, 상기 C<sub>1</sub> 내지 C<sub>2</sub> 저급 알코올은 에탄올 또는 메탄올인 것을 특징으로 하는 골다공증 예방 및 치료용 약학적 조성물.

#### 청구항 4

제 1항에 있어서, 상기 추출물은 조골세포 분화를 촉진하는 것을 특징으로 하는 골다공증 예방 및 치료용 약학적 조성물.

#### 청구항 5

흑미 호분층의 추출물을 유효성분으로 함유하는 골다공증 예방 및 개선용 건강식품.

#### 청구항 6

제 5항에 있어서, 상기 추출물은 조골세포 분화를 촉진하는 것을 특징으로 하는 골다공증 예방 및 개선용 건강식품.

### 발명의 설명

### 기술 분야

[0001] 본 발명은 흑미(black rice) 호분층(aleurone layer)의 추출물을 유효성분으로 함유하는 골다공증(osteoporosis) 예방 및 치료용 약학적 조성물에 관한 것이다.

### 배경 기술

[0003] 골은 석회화된 견고한 표면과 골수로 불리는 내부의 세포 성분이 결합된 특수조직이다. 생리적으로 상이한 이 두 구조의 결합은 일생을 두고 지속되는 골의 재형성(bone remodeling) 과정에 기인한 것인데, 이는 골에 가해지는 호르몬이나 물리적 자극에 의해 골수에 있는 파골세포(osteoclast)들의 골의 표면으로 모여 골을 파들어가면서 파괴하는 골흡수(bone resorption)가 일어난 자리에 모여든 조골세포(osteoblast)에 의한 골기질의 합성(bone formation)으로 설명된다(Park JS, *Natl. Nutr.*, 215, pp25-31, 2000). 또한 골은 신체의 물리적 지지

체로서 필요한 골량과 구조를 보존하는 역할을 하며, 칼슘( $\text{Ca}^{2+}$ ) 등의 보관고로서 칼슘 등의 혈중 농도 유지에 중요한 역할을 하고 있다. 이러한 기능을 수행하기 위하여 골은 항상 분해 작용과 재구축 작용이 조화롭게 진행되는 것이 필요하고, 이 과정에서 골흡수와 골형성이 함께 진행되는 동적인 상태를 이루게 된다. 이와 같은 골 흡수와 골 형성간의 평형 관계가 파괴되면 골흡수가 골형성에 상대적으로 상회하게 되어 골밀도 또는 골량이 감소 되고 골강도가 유지되지 못하는 상태인 골다공증(osteoporosis)이 나타날 수 있다.

- [0005] 골다공증은 골량이 전체적으로 감소되어 골이 구조적으로 약해짐으로 작은 충격에도 쉽게 골절 및 형태학적인 변형이 초래되는 질환으로서, 이 환자는 일차적으로 골원이 차지하는 공간과 피질의 두께가 감소하는 증상을 보인다(Reilly, D. T. and Burstein, A. H., *J. Bone Joint Surg.*, 56, 1001-1022, 1994).
- [0006] 골다공증은 그 형태와 원인에 따라 여러 가지 타입으로 나눌 수 있는데, 크게는 폐경에 의한 타입 I 골다공증과 노화로 인한 타입 II 골다공증 등을 들 수 있다(Dempster, D. W. and Lindsay, R., *Lancet*, 341, 797-801, 1993). 이러한 골다공증의 발생 원인에 대하여 많은 연구가 이루어지지는 못하였으나, 타입 I 및 타입 II 골다공증은 많은 경우 내분비 장애에 의하여 유발되고 이외에도 질병, 영양실조 또는 칼슘 이온의 흡수 감소로 인한 칼슘, 인산염 및 비타민 D 등의 결핍으로 생긴다고 알려져 있다(Sambrook, P. et al., *N. Engl. J. Med.*, 328, 1747-1752, 1993; Marie, P. J. et al., *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 69, 272-279, 1989; Krane, S. M. and Holick, M. F., in *Harrison's Principles of Internal Medicine*, vol. 2, 2172-2183, 1994).
- [0007] 상기 타입 I 및 타입 II 골다공증은 수십년에 걸쳐 일어나는 질병이므로 이를 치료하기 위하여 몇 가지의 단순 약물을 단 기간 동안 복용하는 것으로는 충분하지 않다. 지금까지 골다공증 치료제로서 에스트로겐 또는 테스토스테론 등이 일반적으로 사용되어 왔고, 이외에도 칼슘제제, 인산염, 불소제제, 이프리플라본(Ipriflavone), 비타민 D, 칼시토닌(calcitonin) 등이 치료제로 사용될 수 있다고 보고되었으나 이들을 장기 복용하는 경우 더 큰 부작용이 초래되므로 인체에 부작용이 없는 새로운 골다공증 치료제를 개발하는 것이 필요하다.
- [0008] 또한, 지금까지는 파골 세포의 기능을 저해하여 과다한 골흡수를 억제하는 골다공증 치료제가 주로 개발되어 왔으나 골흡수의 억제만으로는 골량의 감소에 의한 골절 위험성을 회복하기는 어려우므로 골흡수의 억제뿐만 아니라 골형성을 촉진시킬 수 있는 약제가 개발되어야 한다.
- [0010] 쌀(*Oryza sativa* L.)은 화본과에 속하는 작물로, 밀, 옥수수과 함께 세계 3대 곡물 중 하나이며 세계적으로 가장 중요한 식량 자원이다. 또한 수분 및 단백질의 함량이 적고 탄수화물의 함량이 많아 쉽게 부패 되지 않으므로 저장에 쉬운 중요한 열량원이다.
- [0011] 흑미(black rice)는 최근 이러한 쌀 중에서 천연색소인 안토시아닌(anthocyanin) 등이 매우 풍부하고 비타민 E를 비롯하여 철, 아연, 셀레늄 등 무기염류가 매우 풍부하여 활성산소의 소거기능이 우수한 것으로 알려져 있다. 흑미를 섭취하면 활성산소를 없애는 안토시아닌과 오리지놀과 같은 항산화 성분이 놀랄 만큼 많이 함유되어 있어 피부의 노화를 사전에 예방하는 효과를 기대할 수 있다는 것이다. 이러한 생리적, 약리적 효과를 가진 흑미는 그 이용 가치에서 관심의 대상이 되고 있다.
- [0012] 흑미는 풍부한 영양성분, 기능성 색소 및 약용효과를 가지고 있다. 흑미의 영양 성분으로는 단백질, 섬유소, 인체에 필수적인 무기질, 비타민 B군, 비타민 C, 니아신(Niacin) 및 카로틴(carotene) 등이 있으며, 약용효과로는 항산화 효과 및 항암 효과가 알려져 있다. 일반적으로 흑미는 백미에 소량씩 혼합하여 밥으로 조리함으로써 섭취하거나 술, 식혜, 국수, 과자 및 떡 등의 원료로 이용되고 있다.
- [0013] 호분층(aleurone layer)은 호분립(또는 단백질립)을 다량 함유한 세포층으로, 벼과, 대나무과의 종피 안쪽에 위치한다. 배유주변부의 세포로부터 분화한다. 쌀에서는 2-3개의 세포층으로 되어 있으며, 양분저장 외에 아밀라아제(amylase), 그 밖의 효소를 분비하여 배유내의 저장물질을 가용성 성분으로 분해하여 배아에 공급하는 기능을 한다. 현미를 도정할 때는 과피, 종피와 함께 거로 제거된다.
- [0015] 한편, 흑미 및 골다공증과 연관된 선행기술로서, 대한민국 공개특허 10-2004-0046600에는 골다공증 예방 및 치료에 효과적인 건강보조식품 조성물에 검정콩 분말, 검정참깨분말, 들깨분말 및 흑미분말 등이 구성되어 에스트로겐 투여에 의한 위험성을 보완하고 칼슘흡수율을 향상시켜 골다공증 예방 및 치료 효과를 상승시킬 수 있음에

관하여 개시하고 있고, 대한민국 공개특허 10-1079952에는 흑미와 흑콩을 이용한 춘장 및 제조방법에 관하여 개시하고 있으나, 흑미 호분층 추출물의 현저한 골다공증 예방 및 치료에 대한 효과에 관해서는 현재까지 알려진 바가 없다.

[0017] 이에, 본 발명자들은 골다공증 예방 및 치료에 효과적인 물질을 찾고자 노력하던 중, 흑미 호분층 추출물이 조골세포의 분화를 촉진하고, 흑미 현미의 추출물과 비교하여 현저하게 조골세포 분화를 촉진함을 확인함으로써, 상기 흑미 호분층 추출물을 골다공증 예방 및 치료에 유용하게 사용될 수 있음을 밝힘으로써 본 발명을 완성하였다.

## 발명의 내용

### 해결하려는 과제

[0019] 본 발명의 목적은 흑미(black rice) 호분층(aleurone layer)의 추출물을 유효성분으로 함유하는 골다공증(osteoporosis) 예방 및 치료용 약학적 조성물, 또는 골다공증 예방 및 개선용 건강기능 식품을 제공하는 것이다.

### 과제의 해결 수단

[0021] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 흑미(black rice) 호분층(aleurone layer)의 추출물을 유효성분으로 함유하는 골다공증(osteoporosis) 예방 및 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0022] 또한, 본 발명은 흑미 호분층의 추출물을 유효성분으로 함유하는 골다공증 예방 및 개선용 건강기능 식품을 제공한다.

### 발명의 효과

[0024] 본 발명은 흑미(black rice) 호분층(aleurone layer)의 추출물을 유효성분으로 함유하는 골다공증(osteoporosis) 예방 및 치료용 약학적 조성물에 관한 것으로, 흑미 호분층 추출물이 조골세포의 분화를 촉진하고, 흑미 현미의 추출물과 비교하여 현저하게 조골세포 분화를 촉진함을 확인함으로써, 본 발명의 흑미 호분층 추출물은 골다공증 예방 및 치료용 약학적 조성물로 유용하게 사용될 수 있다.

### 도면의 간단한 설명

[0026] 도 1은 흑미 호분층 추출물의 농도에 의존적인 조골세포 분화 증가를 나타낸 도이다.  
 도 2는 대조군, 흑미 현미 및 흑미 호분층 추출물의 조골세포 분화 정도를 나타낸 도이다.  
 도 3은 흑미 호분층 추출물의 조골세포 분화능을 평가하기 위한 RUNX2 및 Osteopotin 유전자의 발현 정도를 나타낸 도이다:

control: 대조군;

RUNX2: runt-related transcription factor 2;

Fold change: 0일을 기준으로 했을 때 발현 정도의 비율 값.

도 4는 흑미 호분층 추출물 10  $\mu$ g/ml 및 40  $\mu$ g/ml의 농도에서 조골세포의 분화 정도를 나타낸 도이다.

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0027] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.
- [0029] 본 발명은 흑미(black rice) 호분층(aleurone layer)의 추출물을 유효성분으로 함유하는 골다공증(osteoporosis) 예방 및 치료용 약학적 조성물을 제공한다.
- [0030] 상기 흑미 호분층의 추출물을 하기의 단계를 포함하는 제조방법으로 제조되는 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다:
- [0031] 1) 흑미 호분층에 추출 용매를 가하여 추출하는 단계;
- [0032] 2) 단계 1)의 추출물을 여과하는 단계;
- [0033] 3) 단계 2)의 여과한 추출물을 감압 농축한 후 건조하여 흑미 호분층의 추출물을 제조하는 단계.
- [0034] 상기 방법에 있어서, 단계 1)의 흑미 호분층은 재배한 것 또는 시판되는 것 등 제한 없이 사용할 수 있다.
- [0035] 상기 방법에 있어서, 단계 1)의 추출 용매는 물, 알코올 또는 이들의 혼합물 및 유기 용매를 사용하는 것이 바람직하다. 상기 알코올로는 C<sub>1</sub> 내지 C<sub>2</sub> 저급 알코올을 이용하는 것이 바람직하며, 저급 알코올로는 에탄올 또는 메탄올을 이용하는 것이 바람직하다. 추출방법으로는 진탕추출, Soxhlet 추출 또는 환류 추출을 이용하는 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다. 상기 추출용매를 건조된 흑미 호분층의 분량에 1 내지 10배 첨가하여 추출하는 것이 바람직하고, 4 내지 6배 첨가하여 추출하는 것이 더욱 바람직하다. 추출온도는 20℃ 내지 100℃ 인 것이 바람직하고, 20℃ 내지 40℃인 것이 더욱 바람직하고, 실온인 것이 가장 바람직하나, 이에 한정하지 않는다. 또한, 추출시간은 10 내지 48시간인 것이 바람직하며, 15 내지 30시간인 것이 더욱 바람직하고, 24시간인 것이 가장 바람직하나, 이에 한정하지 않는다. 아울러, 추출 횟수는 1 내지 5회인 것이 바람직하며, 3 내지 4 회 반복 추출하는 것이 더욱 바람직하고, 3회인 것이 가장 바람직하나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0036] 또한, 본 발명의 흑미 호분층 주정 추출물은 흑미 호분층 40 내지 80% 주정 추출물인 것이 바람직하고, 45 내지 55% 주정 추출물인 것이 보다 바람직하며, 50% 주정 추출물인 것이 가장 바람직하고, 상기 40% 이하 주정 추출물의 경우에는 추출 효율이 낮아져 목적으로 하는 현저한 조골세포 분화 효과를 나타내지 못하고, 80% 주정 추출물의 경우, 흑미 호분층 주정 추출물의 생산 단가를 높게 되며, 또한, 흑미 호분층 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 흑미 50% 주정 추출물을 이용하여 조골세포 분화 효과를 측정한 결과, 흑미 호분층 50% 주정 추출물이 40%, 60%, 70%, 80% 흑미 호분층 주정 추출물 및 흑미 50% 주정 추출물과 비교하여 현저한 조골세포 분화 효과를 나타냄을 확인함으로써, 본 발명의 흑미 호분층 45 내지 55% 주정 추출물인 것이 바람직하다.
- [0037] 상기 수득한 흑미 호분층의 추출물은 사용 시까지 급속 냉동 냉장고(deep freezer)에 보관할 수 있다.
- [0038] 상기 추출물은 조골세포 분화를 촉진하는 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다.
- [0040] 본 발명의 구체적인 실시예에서, 본 발명자들은 흑미 호분층 추출물을 제조한 다음, 흑미 호분층 추출물의 조골세포 분화 촉진 효과를 확인하기 위하여, 마우스 중간엽줄기세포(C3H10T1/2)에 흑미 호분층 추출물을 처리한 뒤, Alizarin S 염색을 통하여 조골세포 분화 정도를 확인한 결과, 흑미 호분층 추출물이 농도 의존적으로 조골세포 분화를 촉진하고, 또한 20  $\mu$ g/ml의 농도에서는 무처리 및 흑미 현미 추출물을 처리한 것보다 현저하게 조골세포 분화를 촉진하는 것을 확인하였다(도 1 및 도 2 참조).
- [0041] 또한, 흑미 호분층 추출물의 조골세포 분화능을 확인하기 위하여, 상기 세포에 흑미 호분층 추출물을 처리한 뒤, qRT-PCR을 통해 조골세포 분화 마커 유전자인 RUNX2 및 osteopontin의 발현정도를 확인한 결과, 흑미 호분층 추출물에 의해 세포의 분화 기간이 늘어남에 따라 상기 유전자의 발현 정도 또한 증가됨을 확인하였다(도 3 및 도 4 참조).
- [0042] 따라서 본 발명의 흑미 호분층 추출물은 조골세포 분화에 현저한 효과를 나타냄으로써, 골다공증 예방 및 치료용 약학적 조성물로 사용될 수 있다.
- [0044] 본 발명의 흑미 호분층의 추출물을 함유하는 조성물은 상기 성분에 추가로 동일 또는 유사한 기능을 나타내는 유효 성분을 1종 이상 함유할 수 있다.

- [0045] 본 발명의 조성물은 약제학적으로 허용 가능한 첨가제를 더 포함할 수 있으며, 이때 약제학적으로 허용 가능한 첨가제로는 홍삼, 전분, 젤라틴화 전분, 미결정셀룰로오스, 유당, 포비돈, 콜로이드실리콘디옥사이드, 인산수소칼슘, 락토스, 만니톨, 엿, 아라비아고무, 전호화전분, 옥수수전분, 분말 셀룰로오스, 히드록시프로필셀룰로오스, 오파드라이, 전분글리콜산나트륨, 카르나우바 납, 합성규산알루미늄, 스테아린산, 스테아린산마그네슘, 스테아린산알루미늄, 스테아린산칼슘, 백당, 텍스트로스, 소르비톨 및 탈크 등이 사용될 수 있다. 본 발명에 따른 약제학적으로 허용 가능한 첨가제는 상기 조성물에 대해 0.1 ~ 90 중량부 포함되는 것이 바람직하나 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0046] 즉, 본 발명의 조성물은 실제 임상 투여 시에 경구 및 비경구의 여러 가지 제형으로 투여될 수 있는데, 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충전제, 증량제, 결합제, 습윤제, 봉해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제될 수 있다. 경구투여를 위한 고형 제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형 제제는 흑미 호분층의 추출물에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트(Calcium carbonate), 수크로스(Sucrose), 락토오스(Lactose) 또는 젤라틴 등을 섞어 조제될 수 있다. 또한 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스티레이트 탈크 같은 윤활제들도 사용될 수 있다. 경구를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제 및 시럽제 등이 해당되는데 흔히 사용되는 단순희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조제, 좌제가 포함될 수 있다. 비수성용제, 현탁용제로는 프로필렌글리콜(Propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텡솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다.
- [0047] 본 발명의 조성물은 목적하는 방법에 따라 경구 투여하거나 비 경구 투여할 수 있으며, 비 경구 투여시 피부 외용 또는 복강내주사, 직장내주사, 피하주사, 정맥주사, 근육 내 주사 또는 흉부 내 주사 주입방식을 선택하는 것이 바람직하다. 투여량은 환자의 체중, 연령, 성별, 건강상태, 식이, 투여시간, 투여방법, 배설율 및 질환의 중증도 등에 따라 그 범위가 다양하다.
- [0048] 본 발명의 조성물의 투여량은 환자의 체중, 연령, 성별, 건강상태, 식이, 투여시간, 투여방법, 배설율 및 질환의 중증도에 따라 그 범위가 다양하며, 일일 투여량은 흑미 호분층의 추출물의 양을 기준으로 0.0001 내지 100 mg/kg이고, 바람직하게는 0.001 내지 10 mg/kg이며, 하루 1 ~ 6 회 투여될 수 있다.
- [0049] 본 발명의 조성물은 단독으로, 또는 수술, 방사선 치료, 호르몬 치료, 화학 치료 및 생물학적 반응 조절제를 사용하는 방법들과 병용하여 사용할 수 있다.
- [0051] 또한, 본 발명은 흑미 호분층 추출물을 유효성분으로 함유하는 골다공증 예방 및 개선용 건강식품을 제공한다.
- [0052] 본 발명의 흑미 호분층 추출물이 조골세포 분화를 현저하게 촉진함을 확인함으로써, 골다공증 예방 및 개선용 건강식품 조성물로 사용될 수 있음을 확인하였다.
- [0054] 본 명세서의 "건강기능식품"이란 일상 식사에서 결핍되기 쉬운 영양소나 인체에 유용한 기능을 가진 원료나 성분 (기능성 원료)을 사용하여 제조한 것으로, 인체의 정상적인 기능을 유지하거나 생리기능 활성화를 통하여 건강을 유지하고 개선하는 식품으로 식품의약품안전처장이 정한 것을 의미하나, 이에 한정되지 않으며 통상적인 의미의 건강식품을 배제하는 의미로 사용된 것이 아니다.
- [0055] 본 발명의 흑미 호분층 추출물은 식품에 그대로 첨가하거나 다른 식품 또는 식품 성분과 함께 사용될 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다. 유효 성분의 혼합량은 그의 사용 목적(예방 또는 개선용)에 따라 적합하게 결정될 수 있다. 일반적으로, 건강기능식품 중의 상기 화합물의 양은 전체 식품 중량의 0.01 내지 90 중량부로 가할 수 있다. 그러나 건강 및 위생을 목적으로 하거나 또는 건강 조절을 목적으로 하는 장기간의 섭취시에는 상기 양은 상기 범위 이하일 수 있으며, 안전성 면에서 아무런 문제가 없기 때문에 유효성분은 상기 범위 이상의 양으로도 사용될 수 있다.
- [0056] 본 발명의 건강 기능성 음료 조성물은 지시된 비율로 필수 성분으로서 상기 흑미 호분층을 함유하는 외에 다른 성분에는 특별한 제한이 없으며 통상의 음료와 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다. 상술한 천연 탄수화물의 예는 단당류, 예를 들어, 포도당, 과당 등; 이당류, 예를 들어 말

토스, 수크로스 등; 및 다당류, 예를 들어 텍스트린, 시클로텍스트린 등과 같은 통상적인 당, 및 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알콜이다. 상술한 것 이외의 향미제로서 천연 향미제{타우마틴, 스테비아 추출물(예를 들어 레바우디오시드 A, 글리시르히진 등)} 및 합성 향미제(사카린, 아스파르탐 등)를 유리하게 사용할 수 있다. 상기 천연 탄수화물의 비율은 본 발명의 조성물 100 g 당 일반적으로 약 1 내지 20 g, 바람직하게는 약 5 내지 12 g이다.

[0057] 상기 외에 본 발명의 흑미 호분층 추출물은 여러 가지 영양제, 비타민, 광물(전해질), 합성 풍미제 및 천연 풍미제 등의 풍미제, 착색제 및 증진제(치즈, 초콜릿 등), 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알코올, 탄산음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다. 그 밖에 본 발명의 흑미 호분층 추출물은 천연 과일 주스 및 과일주스 음료 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다.

[0058] 이러한 성분은 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있다. 이러한 첨가제의 비율은 그렇게 중요하진 않지만 본 발명의 흑미 호분층 추출물 100 중량부 당 0.1 내지 약 20 중량부의 범위에서 선택되는 것이 일반적이다.

[0060] 이하, 본 발명을 실시예 및 실험예에 의해서 상세히 설명한다.

[0061] 단, 하기 실시예 및 실험예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예 및 실험예에 의해서 한정되는 것은 아니다.

#### [0063] <실시예 1> 흑미 호분층의 추출물 제조

[0064] 흑미는 진도에 소재한 흑미 정미소에서 구입하였고, 도정기를 이용하여 흑미 현미를 10도미까지 절삭해서 흑미의 8.5% 되는 흑미 호분층을 분리하였다. 준비된 흑미 호분층을 50%와 70%의 주정 수용액에 40° C 조건에서 48시간 추출하였고, 50° C, 0.1 ~0.5 기압 조건에서 추출액의 10%로 감소될 때 까지 감압 농축하였다.

#### [0066] <비교예 1> 흑미 현미 추출물의 제조

[0067] 대조군으로 사용된 흑미 현미는 흑미 호분층을 분리하기 전의 것으로, 흑미 호분층과 같은 방법으로 50%와 70%의 주정 수용액에 40° C 조건에서 48시간 추출하였고, 50° C, 0.1 ~0.5 기압 조건에서 추출액의 10%로 감소될 때 까지 감압 농축하였다.

#### [0069] <실험예 1> 흑미 호분층 추출물의 조골세포 분화 촉진 효과 확인

[0070] 흑미 호분층의 추출물에 의한 조골세포 분화 촉진 효과를 확인하기 위하여 하기와 같이 실험하였다.

#### [0072] <1-1> 세포 배양 및 추출물의 처리

[0073] 본 발명에서 사용된 배양세포 마우스 중간엽 줄기세포인 C3H10T1/2 세포주는 한국세포주은행(Korea Cell Line Bank, KCLB)에서 분양 받아 실험을 진행하였으며, 세포 배양을 위하여 RPMI 배지에 10% 비활성화 우태아 혈청, 1% 페니실린-스트렙토마이신 용액을 첨가하여 37 °C, 5% 이산화탄소 조건에서 배양하였다. 세포 유지를 위해서 이틀마다 배지를 교체해 주었고 세포 밀도가 60%가 되기 전에 계대배양을 실시하여 분화 능력을 유지하도록 하였다.

[0074] 마우스 중간엽줄기세포인 C3H10T1/2 세포를 조골세포로 분화시키기 위하여 세포를 24-웰 플레이트(24-well plate)에 웰(well)당  $2 \times 10^5$  농도로 분주하여 24시간 배양한 후, 100 mM  $\beta$ -glycerophosphate( $\beta$ -glycerophosphate disodium hydrate, Sigma aldrich, 미국)와 50  $\mu$ g/mL ascorbic acid(L-ascorbic acid, Sigma aldrich, 미국), 0.1 mM dexamethasone(dexamethasone, Cayman, 미국)이 첨가된 분화 배지에 흑미 호분층 추출물을 농도별(10  $\mu$ g/ml, 20  $\mu$ g/ml, 40  $\mu$ g/ml, 80  $\mu$ g/ml)로 처리하여 분화를 유도하였으며 2일마다 배양액을 갈아주며 12일 동안 분화시켰다.

[0076] <1-2> 조골세포 분화 촉진 확인

[0077] 흑미 호분층 추출물에 의한 조골세포 분화 촉진 효과를 확인하기 위하여, 골세포로 분화되는 과정에서 세포질 내에 축적되는 칼슘에 Alizarin이 결합하여 Alizarin이 적색을 나타내는 원리를 이용하는 Alizarin red S 염색법을 수행하였다.

[0078] 구체적으로, <실험예 1-1>의 흑미 호분층의 추출물을 처리한 세포에서 배지를 건어낸 다음, 증류수로 2회 세척하였다. 70% 에탄올로 세포를 상온에서 10분간 고정하고 증류수로 2회 세척한 후, 2% Alizarin red S 용액(pH 4.2; Alizarin red S powder, Sigma aldrich, 미국)으로 상온에서 15분간 염색하였다. 염색 후, Alizarin red S 용액을 완전히 제거한 다음 증류수로 세척한 뒤 현미경으로 세포의 염색 상태를 확인하였다.

[0079] 그 결과, 도 1에 나타난 바와 같이, 흑미 호분층의 추출물을 10 µg/ml, 20 µg/ml, 40 µg/ml 및 80 µg/ml의 농도로 세포에 처리한 결과, 농도 의존적으로 조골세포 분화가 촉진함을 확인하였다(도 1).

[0080] 또한, 도 2에 나타난 바와 같이, 20 µg/ml의 농도에서 상기 흑미 호분층의 추출물이 무처리 및 흑미 현미의 추출물보다 현저하게 조골세포의 분화를 촉진함을 확인하였다(도 2).

[0082] <실험예 2> 흑미 호분층 추출물의 조골세포 분화능 평가

[0083] <2-1> 조골세포 분화 관련 유전자 발현 분석

[0084] 흑미 호분층 추출물에 의한 조골세포의 분화능을 확인하기 위하여 조골세포 분화 마커 유전자인 RUNX2 및 osteopontin의 발현 정도를 qRT-PCR로 확인하였다.

[0085] 구체적으로, 상기 <실험예 1>의 방법으로 C3H10T1/2 세포에 흑미 호분층 추출물을 0, 10 µg/ml 및 40 µg/ml로 처리한 뒤, 분화 1, 3, 6, 9일차에 각 웰(well)당 1 mL의 RNAiso Plus 시약을 첨가하여 추출된 RNA 2 µg과 상업적으로 판매하는 키트(TOYOBO, 일본)를 사용하여 cDNA를 합성하였다. 그 후 합성된 cDNA 1 µL, SYBR Green PCR Master Mix 10 µL(TOYOBO, 일본), 농도가 10 pmole인 순방향 프라이머(forward primer)와 역방향 프라이머(reverse primer) 각각 1 µL, 멸균된 증류수 8 µL를 섞고 qRT-PCR(Bio-Rad, 미국)을 실시하였다. PCR을 위한 마우스의 유전자 특정 프라이머는 생명정보센터(NCBI)의 nucleotide BLAST tool에 의해 디자인되었으며, 각 유전자의 발현은 GAPDH(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase)를 기준 유전자(reference gene)로 표준화하였고 iQ5 시스템 소프트웨어(Bio-Rad, 미국)를 사용하여 분석하였다.

표 1

| 유전자         | 종<br>(species) | 순방향(5'-3')                    | 역방향(5'-3')                      |
|-------------|----------------|-------------------------------|---------------------------------|
| GAPDH       | 마우스            | ACCTTTGGCATTGTGGAAGG(서열번호 1)  | ACACATTGGGGGTAGGAACA(서열번호 2)    |
| RUNX2       | 마우스            | GCCCAGGCGTATTTCAGA(서열번호 3)    | TGCCTGGCTCTTCTACTGAG(서열번호 4)    |
| Osteocalcin | 마우스            | ACCTGGCTGCGCTCTGTCTCT(서열번호 5) | GATGCGTTTGTAGGCGGTCTTCA(서열번호 6) |

[0088] 그 결과, 도 3에 나타난 바와 같이, 상기 RUNX2 및 osteopontin 유전자의 발현이 흑미 호분층 추출물에 의해, 세포의 분화 기간이 늘어남에 따라 유전자의 발현 정도 또한 증가 됨을 확인하였다(도 3).

[0090] <2-2> ALP(Alkaline phosphatase) 활성 측정

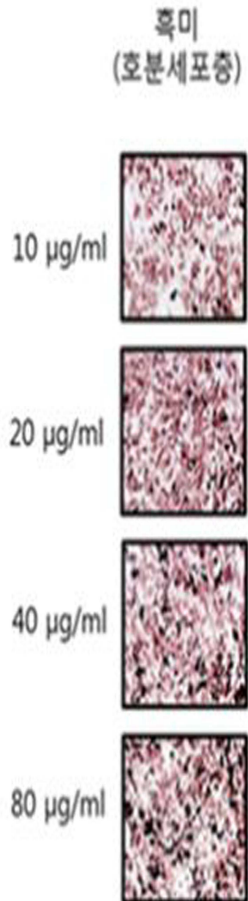
[0091] C3H10T1/2 세포주의 조골세포로의 분화는 생체 내 조골세포 증식, 분화, 석회화 등의 유사적 대사적 특징이 있으며, 특히 세포막에 당단백질인 ALP가 있어 조골 세포 분화능을 확인할 수 있다. 흑미 호분층 처리에 따른 세포 내 ALP 발현을 육안으로 관찰하기 위하여, 상기 <실험예 1>의 방법으로 C3H10T1/2 세포에 흑미 호분층 추출물을 0, 10 µg/ml 및 40 µg/ml로 처리한 뒤 TRACP & ALP double-stain Kit(Takara, 일본)를 이용하여 ALP 염색을 실시하였다.

[0092] 구체적으로, 분화 1, 3, 6, 9, 12일 차에 세포의 배지를 제거하고 키트 내 세포 고정액으로 5분간 배양한 뒤 D.W로 두 번 세척하고 알칼리성 기질(BCIP/ NBT)을 첨가한 뒤 37℃에서 30분 동안 반응시켰다. 이후 기질용액을 제거하여 반응을 종료시키고 도립현미경(Eclipse T i-s , Nikon, 일본)을 이용하여 관찰하였다.

[0093] 그 결과 도 4에 나타난 바와 같이, 현미경으로 관찰하였을 때에도 흑미 호분층 추출물의 처리 농도 및 분화 기간에 따라 조골세포의 분화 정도에 차이가 있음을 확인하였다(도 4).

## 도면

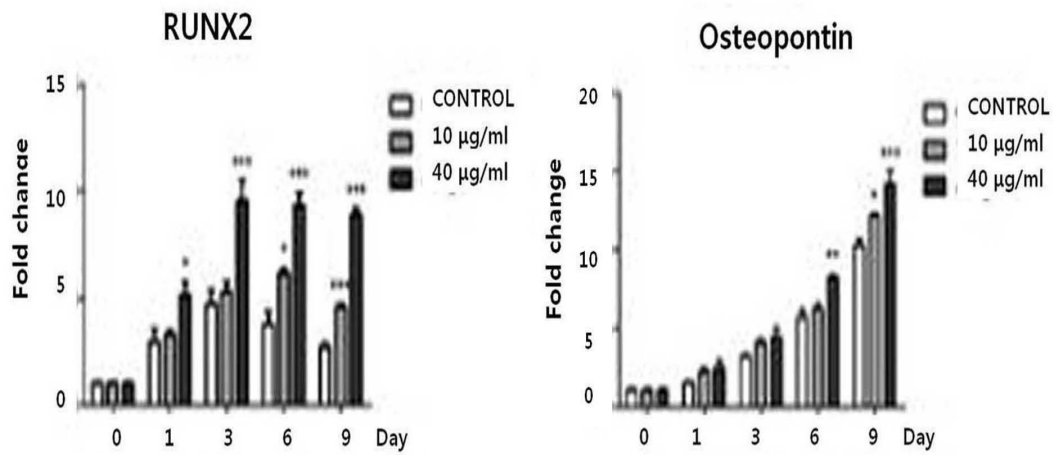
### 도면1



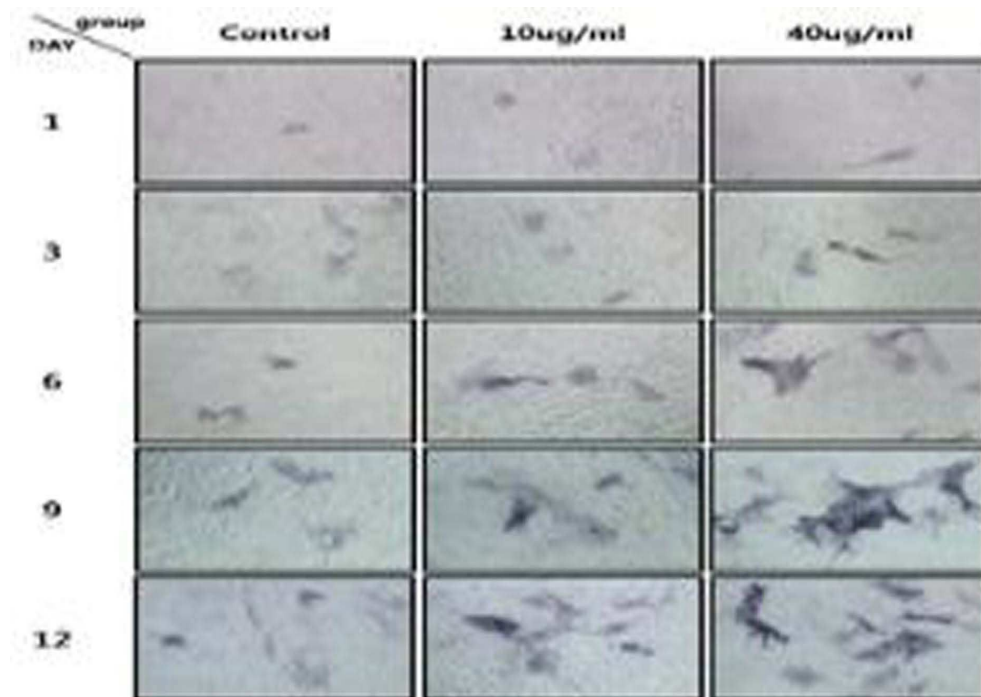
### 도면2



도면3



도면4



### 서열 목록

- <110> Foundation of Agri, Tech, Commercialization & Transfer
- <120> Pharmaceutical composition for preventing or treating osteoporosis comprising an extract of black rice aleurone layer
- <130> 2015P-04-046
- <160> 6
- <170> KoPatentIn 3.0
- <210> 1
- <211> 20

<212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> primer(s)  
 <400> 1  
 acctttggca ttgtggaagg 20  
 <210> 2  
 <211> 20  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
  
 <220><223> primer(as)  
 <400> 2  
 acacattggg ggtaggaaca 20  
 <210> 3  
 <211> 18  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> primer(s)  
 <400> 3  
 gcccgagcgt atttcaga 18  
 <210> 4  
 <211> 21  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> primer(as)  
 <400> 4  
 tgcctggctc ttcttactga g 21  
 <210> 5  
  
 <211> 22  
 <212> DNA  
 <213> Artificial Sequence  
 <220><223> primer(s)  
 <400> 5  
 accctggctg cgctctgtct ct 22

<210> 6  
<211> 23  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence  
<220><223> primer(as)  
<400> 6  
gatgcgtttg taggcggtct tca

23