



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2017년05월04일
(11) 등록번호 10-1732146
(24) 등록일자 2017년04월25일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A23L 1/30 (2006.01) A61K 36/75 (2006.01)
A61K 36/899 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A23L 33/105 (2016.08)
A61K 36/75 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2016-0006580
(22) 출원일자 2016년01월19일
심사청구일자 2016년01월19일
(56) 선행기술조사문헌
KR1020110127454 A*
KR1020090025638 A*
KR1020130047778 A
KR1020090113554 A*
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
강원대학교 산학협력단
강원도 춘천시 강원대학길 1 (효자동)
(72) 발명자
최면
강원도 춘천시 동면 만천로 107 102동 502호 (만천리, 한일유엔아파트)
김경곤
강원도 춘천시 백령로138번길 66-3 201호 (효자동)
(74) 대리인
특허법인태동

전체 청구항 수 : 총 2 항

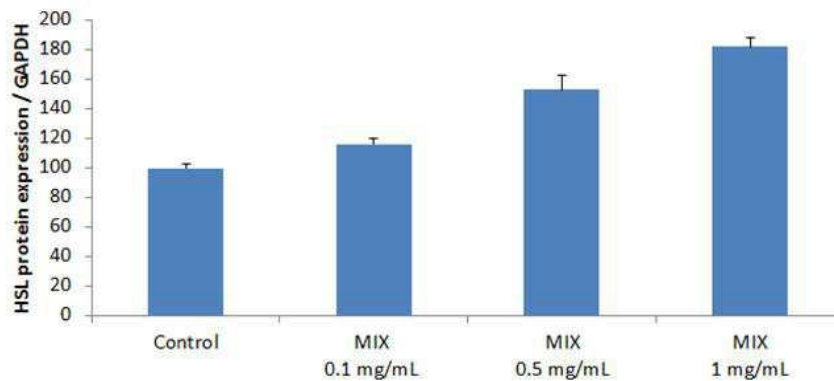
심사관 : 신현일

(54) 발명의 명칭 옥수수수염 및 탱자 복합추출물을 함유하는 항비만용 조성물

(57) 요약

본 발명은 옥수수수염 및 탱자 복합추출물을 유효성분으로 함유하는 항비만용 조성물에 관한 것이다. 본 발명의 옥수수수염 및 탱자 복합추출물은, 단일추출물보다 더 적은 옥수수수염 및 탱자를 사용함에도, 옥수수수염과 탱자의 시너지 효과로 인해, 옥수수 단일추출물 또는 탱자 단일추출물보다 우수한 항비만 효과를 발휘한다.

대표도 - 도10



(52) CPC특허분류

A61K 36/899 (2013.01)

A23V 2002/00 (2013.01)

A23V 2200/332 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 C1012264-01-01

부처명 교육부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 산학협력 선도대학 육성사업 강원대학교 LINC사업단 산학공동기술개발(R&BD)

연구과제명 지질대사조절 기능이 있는 천연소재를 이용한 환제품 기술개발 및 항비만 효능검증

기 여 율 1/1

주관기관 강원대학교 산학협력단

연구기간 2015.07.01 ~ 2016.01.31

명세서

청구범위

청구항 1

삭제

청구항 2

삭제

청구항 3

삭제

청구항 4

옥수수수염 및 탱자를 1 : 7의 중량비로 혼합하는 단계 (A);

옥수수수염 및 탱자의 혼합물을 60℃에서 24시간 동안 열수추출하여 옥수수수염 및 탱자 복합추출물을 제조하는 단계 (B); 및

상기 옥수수수염 및 탱자 복합추출물을 함유하는 항비만용 조성물을 제조하는 단계 (C);를 포함하여,

호르몬감수성지질가수분해효소(HSL, Hormone sensitive lipase), 아실코에이합성효소(ACS, acyl-CoA synthetase) 및 카르니틴팔미토일전이효소-1(CPT-1, carnitine palmitoyl-trasnferase-1)의 단백질 발현 증대 효과가 있는 것을 특징으로 하는 항비만용 식품 조성물의 제조방법.

청구항 5

옥수수수염 및 탱자를 1 : 7의 중량비로 혼합하는 단계 (A);

옥수수수염 및 탱자의 혼합물을 60℃에서 24시간 동안 열수추출하여 옥수수수염 및 탱자 복합추출물을 제조하는 단계 (B); 및

상기 옥수수수염 및 탱자 복합추출물을 함유하는 항비만용 조성물을 제조하는 단계 (C);를 포함하여,

호르몬감수성지질가수분해효소(HSL, Hormone sensitive lipase), 아실코에이합성효소(ACS, acyl-CoA synthetase) 및 카르니틴팔미토일전이효소-1(CPT-1, carnitine palmitoyl-trasnferase-1)의 단백질 발현 증대 효과가 있는 것을 특징으로 하는 항비만용 약학 조성물의 제조방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 옥수수수염(corn silk) 및 탱자(*Poncirus trifoliata*) 복합추출물을 유효성분으로 함유하는 항비만용 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 비만은 섭취하는 음식과, 소비하는 에너지 사이에서 생겨나는 잉여의 에너지가 과도하게 세포에 축적되어 지방 조직이 비정상적으로 증가된 상태를 말한다.

[0004] 영국, 미국, 오스트리아 국민의 2/3가 과체중이고, 1/4이 비만으로 보고될 정도로 세계의 비만이 위험 수준에 이르고 있다. 우리나라도 최근 생활환경의 변화 및 식생활의 서구화 등으로 인하여 국내 비만 인구가 급증하고 있어, 2008년 비만 인구가 30.7%를 차지한 것으로 보고되었다 (Kim BW, et al. Antiadipogenic effect of Vitis amurensis root methanol extract and its solvent fraction in 3t3-L1 preadipocytes, 생명과학회지

23(1):69-78(2913)).

- [0005] 비만이 발생하여 그 상태가 지속되면 여러 질환을 유발하는데, 고혈압, 혈중 콜레스테롤 상승, 당뇨병, 신장 질환, 뇌졸중, 동맥경화증, 지방간, 관절염, 암, 수면, 무호흡증 등을 유발하는 것으로 알려져 있다.
- [0006] 이를 치료하기 위해, 현재까지 사용된 비만 치료제는 작용 기작에 따라 크게 포만감 항진제, 지방 흡수 억제제, 항정신성 식욕 억제제로 나뉜다.
- [0007] 포만감 항진제는 뇌에서 식욕을 조절하는 신경 호르몬의 재흡수를 억제해 식욕을 저해한다. 리덕틸(Reductil)이 대표적이며, 이 제품의 성분인 시부트라민(Sibutramine)을 1년 동안 복용할 경우 평균적으로 약 5~9%의 체중이 주는 것으로 보고되어 있다. 그러나 약으로 인해 두통, 구갈(심한 갈증), 불면증 및 변비 등의 부작용이 발생할 수 있고, 혈압과 맥박수가 증가할 수 있는 문제점이 있어 현재 시장에서 퇴출된 상태이다.
- [0008] 지방 흡수 억제제는 지방을 체내로 흡수하는 소화효소인 리파아제(lipase)의 기능을 억제해 섭취한 지방을 몸 밖으로 배출하는 기능을 한다. 이러한 지방 흡수억제제로는 올리스타트(Orlistat) 성분으로 제니칼(Xenical)이 대표적이며, 부작용으로 대변이 자주 마렵거나, 지방변 등이 나타날 수 있으며, 지방 흡수율의 감소로 인해 장에서의 지용성비타민의 흡수율이 떨어질 수 있다.
- [0009] 항정신성 식욕 억제제는 뇌에서 식욕을 조절하는 신경 호르몬 노르에피네프린(norepinephrine)과 도파민(dopamine)의 생성을 촉진해 식욕 자체를 감소시킴으로써 비만을 치료한다. 그 성분으로는 펜디메트라진(phendimetrazine), 펜터민(phentermine)이 있다. 그러나, 약을 복용함으로써, 경미하게는 어지러움, 두통, 손 떨림이 발생하며, 정신이 각성돼 불면증이 올수 있고, 꾸준히 복용하면 중독성을 갖게되는 문제를 야기한다.
- [0010] 위와 같이 합성 항비만 치료제들이 여러 부작용을 나타내며 한계를 보임에 따라 상대적으로 부작용이 없어 안정성이 확보되는 천연 항비만용 조성물이 주목받고 있다.

선행기술문헌

특허문헌

- [0012] (특허문헌 0001) 대한민국 등록특허 제10-1177380호 (등록일자: 2012.08.21)에는, 옥수수수염 추출물, 표고버섯 추출물, 청고추 추출물 및 팔삭 추출물을 유효성분으로 함유하는 것을 특징으로 하는 항비만용 조성물에 대해 기재되어 있다.
- (특허문헌 0002) 대한민국 등록특허 제10-0878331호(등록일자: 2009.01.06)에는, 포도나무 수피 추출물 또는 이로부터 분리된 활성성분을 포함하는 항비만 조성물에 대해 기재되어 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0013] 본 발명은 옥수수수염 및 탱자 복합추출물을 유효성분으로 함유하는 항비만용 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

- [0015] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 옥수수수염 및 탱자 복합추출물을 유효성분으로 함유하는 것을 특징으로 하는 항비만용 조성물을 제공한다. 본 발명의 옥수수수염 및 탱자 복합추출물은 호르몬 감수성 지질가수분해 효소(Hormone sensitive lipase, HSL), ACS(acyl-CoA synthetase), CPT-1(carnitine palmitoyl-trasnferase-1)의 단백질 발현을 향상시킬 수 있다.
- [0016] 상기 호르몬 감수성 지질가수분해효소(Hormone sensitive lipase, HSL)는 세포내 축적되어 있는 중성지방을 분해하여 유리지방산(free fatty acid)으로 만드는 역할을 하고, ACS(acyl-CoA synthetase)는 유리지방산(free fatty acid)을 'acyl-CoA'로 전환시키며, CPT-1(carnitine palmitoyl-trasnferase-1)은 미토콘드리아 내부에서 'acyl-CoA'의 베타-산화(β -oxidation)를 유도하여 에너지로 소모하게 함으로, 비만을 개선하는 효과를 발휘한다.

- [0017] 본 발명의 항비만용 조성물에 있어서, 상기 복합추출물은 바람직하게, 옥수수수염 및 탱자를 1:3~10의 중량비로 혼합하여 추출된 것이 좋다. 더욱 바람직하게는 옥수수수염 및 탱자를 1:6~8의 중량비로 혼합하여 추출된 것이 좋다. 상기 범위를 만족할 경우, 단일추출물보다 더 적은 옥수수수염 및 탱자를 사용함에도, 옥수수수염과 탱자의 시너지 효과로 인해, 옥수수 단일추출물 또는 탱자 단일추출물보다 우수한 항비만 효과를 나타낼 수 있다.
- [0018] 본 발명의 항비만용 조성물에 있어서, 상기 복합추출물은 바람직하게, 추출용매로 에탄올, 에틸아세테이트, n-부탄올 및 물로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나의 용매인 것이 좋다. 이때, 용매는 바람직하게, 옥수수수염 및 탱자의 혼합물 건조무게 대비 10~11배 가해지는 것이 좋다. 상기 범위를 만족할 경우, 유효성분의 추출수율이 우수할 수 있다.
- [0019] 본 발명의 항비만용 조성물에 있어서, 상기 복합추출물은 바람직하게, 추출 후, 여과하여 감압 농축 또는 진공 농축하여 수득된 농축물을 포함하며, '동결 건조, 열풍 건조 또는 분무 건조'를 통해 수득된 분말 형태인 것이 좋다.
- [0020] 본 발명의 항비만용 조성물에 있어서, 상기 옥수수수염(corn silk)은 꽃가루가 달라붙는 암술로, 비단 실(silk hair)이 다발로 뭉쳐자라난 모습을 지니며, 옥수수(*Zea mays*)의 끝에 서로 엉켜 붙어있는 가는 실을 의미한다.
- [0021] 본 발명의 항비만용 조성물에 있어서, 상기 탱자(*Poncirus trifoliata*)는 감귤류에 속하는 과일로, 비타민 C와 칼륨, 베타카로틴이 풍부해 호흡기 보호에 좋다. 또한, 탱자에는 단백질과 지방질, 탄수화물의 대사 작용을 돕는 구연산 성분과, 항산화 효과를 발휘하는 헤스페리딘 성분이 포함되어 있다고 알려져 있다.
- [0023] 한편, 본 발명의 항비만용 조성물은 식품 조성물일 수 있다.
- [0024] 본 발명의 식품 조성물에 있어서, 상기 복합추출물은 바람직하게, 식품 조성물 전체 중 0.01~90중량% 포함되는 것이 좋다. 0.01중량% 미만이면 항비만 효과가 미미하며, 90중량%를 초과하면 사용량 대비 효과 증가가 미미하여 경제적이지 못하다.
- [0025] 본 발명의 식품 조성물은, 바람직하게, 육류, 곡류, 카페인 음료, 일반음료, 초콜렛, 빵류, 스낵류, 과자류, 피자, 젤리, 면류, 껌류, 아이스크림류, 비타민 복합제 및 그 밖의 건강보조식품류 중 선택되는 어느 하나인 것이 좋으나, 반드시 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0026] 본 발명의 식품 조성물은, 바람직하게, 식품 제조에 통상적으로 사용하는 적절한 담체, 부형제 및 희석제를 더 포함하는 것이 좋다. 일 예로, 락토즈, 텍스트로즈, 수크로즈, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로즈, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 꿀, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시 벤조에이트, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유일 수 있다. 제제화할 경우 보통 사용하는 충전제, 중량제, 결합제, 습윤제, 봉해제, 계면활성제 중 선택되는 하나 이상의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제될 수 있다.
- [0027] 한편, 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 중 선택되는 하나 이상이 포함되며, 이러한 고형제제는 일 예로, 전분, 칼슘카보네이트, 수크로즈 또는 락토오즈, 젤라틴 중 선택되는 하나 이상의 부형제가 섞여 조제된다. 또한, 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트 같은 윤활제가 사용될 수 있다.
- [0028] 또한, 경구투여를 위한 액상제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 중 선택되는 하나 이상이 사용될 수 있으며, 단순 희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보조제가 추가로 더 포함될 수 있다.
- [0029] 본 발명의 식품 조성물은 첨가제를 추가로 함유할 수 있으며, 일 예로, 영양제, 비타민, 광물(전해질), 합성 풍미제 및 천연 풍미제, 착색제 및 충전제(치즈, 초콜렛), 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알코올, 탄산 음료에 사용되는 탄산화제 중 선택되는 하나 이상을 함유할 수 있다. 그 밖에도, 천연 과일 주스 및 과일 음료 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다. 이러한 성분은 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있다. 이러한 첨가제의 비율은 본 발명의 복합추출물 100중량부 대비 0~50중량부의 범위에서 선택되는 것이 일반적이나, 반드시 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0031] 한편, 본 발명의 항비만용 조성물은 약학 조성물일 수 있다.
- [0032] 본 발명의 약학 조성물에 있어서, 상기 복합추출물은 바람직하게, 약학 조성물 전체 중 0.01~90중량% 포함되는 것이 좋다. 0.01중량% 미만이면 항비만 효과가 미미하며, 90중량%를 초과하면 사용량 대비 효과 증가가 미미하

여 경제적이지 못하다.

[0033] 본 발명의 약학 조성물은 유효성분 이외에 약제학적으로 허용 가능한 담체, 희석제 또는 부형제를 더욱 포함할 수 있다. 사용 가능한 담체, 부형제 또는 희석제로는, 락토즈, 텍스트로즈, 수크로즈, 솔비톨, 만니톨, 자이리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로즈, 폴리비닐피롤리돈, 물, 메틸하이드록시벤조에이트, 프로필하이드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유가 있으며, 이중 선택되는 하나 이상을 사용할 수 있다. 또한, 항비만용 약학 조성물이 약제인 경우 충전제, 향응집제, 윤활제, 습윤제, 향료, 유화제 또는 방부제 중 선택되는 하나 이상을 추가적으로 포함할 수 있다.

[0034] 본 발명의 약학 조성물의 제형은 사용방법에 따라 바람직한 형태일 수 있으며, 특히 포유동물에 투여된 후 활성 성분의 신속, 지속 또는 지연된 방출을 제공할 수 있도록 당업계에 공지된 방법을 채택하여 제형화 하는 것이 좋다. 구체적인 제형의 예로는 경고제(PLASTERS), 과립제(GRANULES), 로션제(LOTIONS), 리니멘트제(LINIMENTS), 리모나데제(LEMONADES), 방향수제(AROMATIC WATERS), 산제(POWDERS), 시럽제(SYRUPS), 안연고제(OPHTHALMIC OINTMENTS), 액제(LIQUIDS AND SOLUTIONS), 에어로솔제(AEROSOLS), 엑스제(EXTRACTS), 엘릭실제(ELIXIRS), 연고제(OINTMENTS), 유동엑스제(FLUIDEXTRACTS), 유제(EMULSIONS), 현탁제(SUSPENSIONS), 전제(DECOCTIONS), 침제-INFUSIONS), 점안제(OPHTHALMIC SOLUTIONS), 정제(TABLETS), 좌제(SUPPOSITORIES), 주사제(INJECTIONS), 주정제(SPIRITS), 카타플라스마제(CATAPLASMA), 캡셀제(CAPSULES), 크림제(CREAMS), 트로키제(TROCHES), 턴크제(TINCTURES), 파스타제(PASTES), 환제(PILLS), 연질 또는 경질 젤라틴 캡셀 중 선택되는 어느 하나일 수 있다.

[0035] 한편, 본 발명의 약학 조성물의 투여량은 투여방법, 복용자의 연령, 성별, 체중, 및 질환의 중증도 등을 고려하여 결정하는 것이 좋다. 일 예로, 본 발명의 항비만용 약학 조성물은 유효성분을 기준으로 하였을 때 1일 0.00001 내지 100 mg/kg(체중)으로 1회 이상 투여가능하다. 그러나 상기의 투여량은 예시하기 위한 일 예에 불과하며, 복용자의 상태에 따라 의사의 처방에 의해 변화될 수 있다.

발명의 효과

[0037] 본 발명의 옥수수수염 및 탱자 복합추출물은, 단일추출물보다 더 적은 옥수수수염 및 탱자를 사용함에도, 옥수수수염과 탱자의 시너지 효과로 인해, 옥수수 단일추출물 또는 탱자 단일추출물보다 우수한 항비만 효과를 발휘한다.

도면의 간단한 설명

[0039] 도 1은 옥수수수염 단일추출물('OSS'로 표기) 및 탱자 단일추출물('TJ'로 표기) 처리 시, 세포생존율 실험 결과 그래프이다.

도 2는 옥수수수염 및 탱자 복합추출물 처리 시, 세포생존율 실험 결과 그래프이다.

도 3은 지방세포 내 지질대사와 관련된 효소의 작용기전을 나타낸 그림이다.

도 4는 옥수수수염 단일추출물('OSS'로 표기) 및 탱자 단일추출물('TJ'로 표기)이 3T3-L1 세포에서 HSL 효소의 mRNA 발현에 미치는 영향을 나타내는 그래프이다.

도 5는 옥수수수염 단일추출물('OSS'로 표기) 및 탱자 단일추출물('TJ'로 표기)이 3T3-L1 세포에서 ACS 효소의 mRNA 발현에 미치는 영향을 나타내는 그래프이다.

도 6은 옥수수수염 단일추출물('OSS'로 표기) 및 탱자 단일추출물('TJ'로 표기)이 3T3-L1 세포에서 CPT-1 효소의 mRNA 발현에 미치는 영향을 나타내는 그래프이다.

도 7은 옥수수수염 단일추출물('OSS'로 표기) 및 탱자 단일추출물('TJ'로 표기)이 3T3-L1 세포에서 HSL 효소의 단백질 발현에 미치는 영향을 나타내는 그래프이다.

도 8은 옥수수수염 단일추출물('OSS'로 표기) 및 탱자 단일추출물('TJ'로 표기)이 3T3-L1 세포에서 ACS 효소의 단백질 발현에 미치는 영향을 나타내는 그래프이다.

도 9는 옥수수수염 단일추출물('OSS'로 표기) 및 탱자 단일추출물('TJ'로 표기)이 3T3-L1 세포에서 CPT-1 효소의 단백질 발현에 미치는 영향을 나타내는 그래프이다.

도 10은 옥수수수염 및 탱자 복합추출물('MIX'로 표기)이 3T3-L1 세포에서 HSL 효소의 단백질 발현에 미치는 영향을 나타내는 그래프이다.

도 11은 옥수수수염 및 탱자 복합추출물('MIX'로 표기)이 3T3-L1 세포에서 ACS 효소의 단백질 발현에 미치는 영향을 나타내는 그래프이다.

도 12는 옥수수수염 및 탱자 복합추출물('MIX'로 표기)이 3T3-L1 세포에서 CPT-1 효소의 단백질 발현에 미치는 영향을 나타내는 그래프이다.

도 13은 옥수수수염 및 탱자 복합추출물을 함유하는 환 제조공정을 나타낸 도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

이하, 본 발명의 내용을 하기 실시예를 통해 더욱 상세히 설명하고자 한다. 다만, 본 발명의 권리범위가 하기 실시예에만 한정되는 것은 아니고, 그와 등가의 기술적 사상의 변형까지를 포함한다.

[실시예 1: 옥수수수염 및 탱자 복합추출물의 제조]

옥수수수염 5 g과 탱자 35 g을 건조하고, 혼합하여 분쇄한 후, 건조된 무게의 10.7배의 증류수를 혼합하여 60℃의 진탕배양기(shaking incubator)에서 24시간 동안 열수추출하였다. 그 후, 원심분리 및 감압필터 하여 불순물을 제거하고, 동결건조하여 옥수수수염 및 탱자 복합추출물을 제조하였다.

[비교예 1 내지 2: 옥수수수염 단일추출물 및 탱자 단일추출물의 제조]

옥수수수염 40 g을 건조하고, 분쇄한 후, 건조된 무게의 10.7배의 증류수를 혼합하여 60℃의 진탕배양기에서 24시간 동안 열수추출하였다. 그 후, 원심분리 및 감압필터 하여 불순물을 제거하고, 동결건조하여 옥수수수염 단일추출물을 제조하였다. 하기 실험예에서는 비교예 1로 지칭하여 사용하였다.

또한, 탱자 40 g을 건조하고, 분쇄한 후, 건조된 무게의 10.7배의 증류수를 혼합하여 60℃의 진탕배양기에서 24시간 동안 열수추출하였다. 그 후, 원심분리 및 감압필터하여 불순물을 제거하고, 동결건조하여 탱자 단일추출물을 제조하였다. 하기 실험예에서는 비교예 2로 지칭하여 사용하였다.

[실험예 1: 세포생존율 측정]

본 실험예에서는 옥수수수염 및 탱자 복합추출물(실시예 1)이 세포에 독성을 나타내는지 확인하고자 하였다.

이를 위해, 3T3-L1 세포로 한국세포주은행(Korean cell line bank, KCLB)으로부터 분양받아 실험실에서 배양하였다. 3T3-L1 세포주는 DMEM(dulbecco's modified eagle medium)'에 10% 'fetal calf serum(FCS)', 1% 페니실린-스트렙토마이신(penicillin-streptomycin, PEST)이 첨가된 배지를 사용하여, 37℃, 5% CO₂ 조건의 배양기에서 배양하였다.

그 후, 하기와 같이 'MTT assay'를 실시하였으며, 세포생존율은 MTT(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide) 환원 방법을 이용하여 측정하였다.

10% FBS를 함유한 DMEM을 이용하여 3T3-L1 세포의 수를 1×10^4 cell/ml로 맞추고, 96 웰 플레이트에 100 μ l씩 분주하여, 5% CO₂와 37℃ 조건에서 24시간 동안 배양하였다. 그 후, 배지를 제거하고, FCS를 함유하지 않은 DMEM에 옥수수수염 및 탱자 복합추출물, 옥수수수염 단일추출물, 탱자 단일추출물을 각각 0.1 mg/ml, 0.25 mg/ml, 0.5 mg/ml, 1 mg/ml, 2.5 mg/ml 농도별로 희석하여 100 μ l씩 첨가한 후, 다시 24시간 동안 배양하였다.

24시간 후, 옥수수수염 및 탱자 복합추출물을 함유하고 있는 배지를 제거하고, MTT를 pH 7.4의 PBS(phosphate-buffered saline)에 5 mg/ml로 용해시키고, 0.45 μ m 시린지 필터를 사용하여 여과하였다. 여과된 용액을 DMEM을 이용하여, 10배 희석하고, 100 μ l씩 각 웰(well)에 분주하고, 37℃에서 4시간 더 배양한 후, 배지를 제거하였다. 플레이트(plate)의 완전한 건조를 위해, 배지 제거 후, 30분간 실온에서 배치하였다. DMSO를 이용하여 플레이트(plate)에 남아있는 적자색의 포르마잔(formazan)을 용해하여, 570 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이를 이용한 세포의 생존율은 하기 수학적 식 1에 따라 계산하였으며, 그 결과는 도 1 내지 2에 그래프로 나타내었다.

수학적식 1

$$\text{세포생존율}(\%) = \left[\frac{\text{시료처리군의흡광도}}{\text{대조군의흡광도}} \right] \times 100$$

실험결과, 탱자 단일추출물을 2.5 mg/ml, 5 mg/ml의 경우에서 독성을 보여 세포생존율이 감소하였다. 본 발명의 옥수수수염 및 탱자 복합추출물(실시에 1)의 경우, 모든 농도에서 높은 세포생존율을 보였다 (도 1 내지 2). 도 1은 옥수수수염 단일추출물('OSS'로 표기) 및 탱자 단일추출물('TJ'로 표기) 처리 시, 세포생존율 실험 결과 그래프이고, 도 2는 옥수수수염 및 탱자 복합추출물 처리 시, 세포생존율 실험 결과 그래프이다.

[실험예 2: 세포 내 지질대사조절 효소의 mRNA 발현 측정]

본 실험예에서는 옥수수수염 단일추출물(비교예 1) 및 탱자 단일추출물(비교예 2)이 HSL, ACS, CPT-1의 mRNA 발현에 영향을 미치는지 확인하고자 하였다.

HSL(Hormone sensitive lipase)는 세포 내 축적되어 있는 중성지방을 분해하여 유리지방산(free fatty acid)으로 만드는 역할을 하고, ACS(acyl-CoA synthetase)는 유리지방산(free fatty acid)을 'acyl-CoA'로 전환시키며, CPT-1(carnitine palmitoyl-transferase-1)은 미토콘드리아 내부에서 'acyl-CoA'의 베타-산화(β -oxidation)를 유도하여 에너지로 소모하게 함으로, 비만을 개선하는 효과를 발휘한다 (도 3 참조). 도 3은 지방 세포 내 지질대사와 관련된 효소의 작용기전을 나타낸 그림이다.

(1) 세포 내 총 RNA 추출 및 cDNA 합성

3T3-L1 지방전구세포의 지방 세포로의 분화를 위해, 6 웰 플레이트에 5×10^5 cell/well의 세포를 분주하여 세포가 100% 'confluent' 상태가 되도록 배양하였다. 2일 후, 0.5 mM IBMX, 0.25 μ M 덱사메타손(dexamethasone), 10 μ g/ml 인슐린 (MDI solution) 및 10% FBS를 포함하는 DMEM을 이용하여, 2일 동안 배양함으로써, 분화를 개시하였다.

그 후, 10 μ g/ml 인슐린 및 10% FBS를 포함하는 DMEM으로 교환하면서, 3T3-L1 세포의 분화유도를 진행하였다. 분화가 완료된 후, 옥수수수염 및 탱자 복합추출물(실시에 1)을 DMEM에 농도별로 희석하고 세포에 처리하여 배양하였다.

24시간 세포를 배양한 후, 배지를 제거하고, QIAzol 라이시스 시약을 각 웰(well)에 1 ml 씩 분주하여 세포를 용해시켰다. 그 후, 클로로포름(chloroform) 200 μ l를 분주하여, 15초간 섞고 3분간 실온에서 반응시켰다. 12,000 $\times$ g 10분간 원심분리하고 상층액을 이소프로판올(isopropanol) 500 μ l이 들어있는 튜브에 옮겨 담고 섞었다. 10분간 실온에서 반응시킨 후, 다시 12,000 $\times$ g 10분간 원심분리하고 상층액을 제거하였다.

상층액 제거 후, 100% 에탄올(ethanol)과 0.1% 디에틸피로카보네이트(diethyl pyrocabonate, DEPC)를 75:25로 섞어 만든 75% 에탄올(ethanol)을 각 튜브에 1 ml씩 분주하였다. 12,000 $\times$ g 10분간 원심분리한 후, 상층액을 제거하고 실온에서 건조시켰다.

건조가 완료되면, 'nuclease free water'를 20 μ l씩 분주하여 녹인 후, RNA 5 μ l에 0.1% DEPC를 995 μ l 첨가하였다. 그 후, 260 nm에서 흡광도를 측정하여 총 RNA 양을 정량하였다.

정량이 완료된 총 RNA를 'nuclease free water'를 이용하여 2 μ g으로 희석하고, 'amfirivert platinum cDNA synthesis master mix'를 이용하여 cDNA로 합성하였다.

(2) RT-PCR

PCR 튜브에 'Go Tag Green Master' 10 μ l, 정방향 프라이머 10 pM과 역방향 프라이머 15 pM을 각각 1 μ l, 'nuclease free water' 7 μ l, 합성한 first-stand cDNA 1 μ l를 첨가하여 잘 섞은 후, PCR을 진행하였다. 각 PCR 조건은 하기 표 1에 나타내었다.

표 1

Gene	Primer	Sequence(5 $\rightarrow$ 3)
HSL	Forward	CTC CTC ATG GCT CAA CTC CTT CC

ACS	Reverse	AGG GGT TCT TGA CTA TGG GTG
	Forward	CAA CCC AGA ACC ATG GAA GT
	Reverse	CTG ACT GCA TGG AGA GGT CA
CPT-1	Forward	CCT GGG CAT GAT TGC AAA G
	Reverse	ACA GAC TCC AGG TAC CTG CTC AC
β -actin	Forward	TGC TGT CCC TGT ATG CCT CT
	Reverse	AGG TCT TTA CGG ATG TCA ACG

[0075] PCR 산물은 0.002% 브롬화 에티듐(ethidium bromide)을 첨가한 1.2% 아가로스 겔에 100 V에서 30분간 전기영동 후, 자외선 광으로 유전자 발현 정도를 확인하였다. 그 밴드의 강도를 image j(National institutes of health, USA) 소프트웨어 의해 분석 정량하였다.

[0076] 실험결과, 옥수수수염 단일추출물(비교예 1) 및 탱자 단일추출물(비교예 2)은 대조군보다 우수한 HSL, ACS, CPT-1의 mRNA 발현능을 보이는 것으로 나타났다 (도 4 내지 6). 도 4는 옥수수수염 단일추출물('OSS'로 표기)물 및 탱자 단일추출물('TJ'로 표기)이 3T3-L1 세포에서 HSL 효소의 mRNA 발현에 미치는 영향을 나타내는 그래프이고, 도 5는 옥수수수염 단일추출물('OSS'로 표기) 및 탱자 단일추출물('TJ'로 표기)이 3T3-L1 세포에서 ACS 효소의 mRNA 발현에 미치는 영향을 나타내는 그래프이며, 도 6은 옥수수수염 단일추출물('OSS'로 표기) 및 탱자 단일추출물('TJ'로 표기)이 3T3-L1 세포에서 CPT-1 효소의 mRNA 발현에 미치는 영향을 나타내는 그래프이다.

[0078] [실험예 3: 세포 내 지질대사조절 효소의 단백질 발현 측정]

[0079] 본 실험예에서는 옥수수수염 단일추출물(비교예 1), 탱자 단일추출물(비교예 2) 및 본 발명의 옥수수수염 및 탱자 복합추출물(실시예 1)이 HSL, ACS, CPT-1의 단백질 발현에 영향을 미치는지 확인하고자 하였다.

[0081] (1) 세포 내 단백질 추출 및 정량

[0082] 3T3-L1 세포로 한국세포주은행(Korean cell line bank, KCLB)으로부터 분양받아 실험실에서 배양하였다. 3T3-L1 세포주는 DMEM(dulbecco's modified eagle medium)에 10% FCS(fetal calf serum), 1% 페니실린-스트렙토마이신(penicillin-streptomycin, PEST)이 첨가된 배지를 사용하여, 37℃, 5% CO₂ 조건의 배양기에서 배양하였다.

[0083] 배양이 완료된 3T3-L1 세포에 옥수수수염 단일추출물(비교예 1), 탱자 단일추출물(비교예 2) 및 본 발명의 옥수수수염 및 탱자 복합추출물(실시예 1)을 각각 0.1 mg/ml, 0.5 mg/ml, 1 mg/ml 농도별로 24시간 처리하였다.

[0084] 그 후, 배지를 제거하고 세포 스크레이퍼(cell scraper)로 웰 바닥에 붙어있는 세포를 모두 회수하여 1.5 ml 튜브로 옮겼으며, 'protein extraction kit'를 사용하여 단백질을 추출하여 80℃에서 보관하였다.

[0085] 추출한 단백질 5 μ l에 증류수 795 μ l를 넣고 희석하였다. 그 후, 브래드포드(bradford) 시약 200 μ l를 넣어 5초간 볼텍싱(vortexing)하여 섞어주고, 5분간 배양시켰다. 595 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 표준물질로 BSA 용액을 이용하여 정량하였다.

[0087] (2) 전기영동

[0088] 정량이 완료된 단백질을 SDS와 베타-메르캅토-에탄올(β -mercapto-ethanol)을 포함한 샘플 완충액(sample buffer)에 3:1로 혼합한 후, 100℃에서 3분간 가열하여 단백질 샘플을 준비하였다. 단백질 샘플은 SDS-gel을 이용하여 전기영동하여 단백질 크기별로 구분한 후, PVDF 멤브레인(membrane)으로 옮겼다.

[0090] (3) 블로킹(blocking)과 항원반응(antibody reaction)

[0091] 단백질 이외의 부분에 항원(antibody)이 반응하지 않도록, 5% 'skim milk solution'로 2시간 동안 처리한 후, 멤브레인(membrane)을 TBS-T 완충액(buffer)를 이용하여 세척하였다. 표적 단백질에 반응하는 프라이머리 항원(primary antibody)(1% BSA solution)을 2시간 동안 처리하고, 2차 항원(secondary antibody)(5% skim milk solution)을 40분 동안 처리한 후, TBS-T 완충액(buffer)을 이용하여 세척하였다. 1차 및 2차 항원(antibody)은 'Acris', 'Santa cruz', 'Cell signaling' 제품을 사용하였다.

[0093] (4) 화학발광 탐지(Chemiluminescence detection)

[0094] 멤브레인 상에서 항원 결합 유무를 확인하기 위하여 멤브레인에 웨스턴 탐지용액(western detection solution)(substrate, engancer 각 1 ml)을 도포한 후, 암실에서 멤브레인을 감광시켜, 밴드를 확인하였다. 단백질 발현 정도를 확인한 후, 그 밴드의 강도를 Image J(National institutes of health, USA) 소프트웨어에

의해 분석 정량하고, 내부 표준물로써, GAPDH를 사용하였다.

[0095] 실험결과, 본 발명의 옥수수수염 및 탱자 복합추출물(실시에 1)은 HSL 단백질 발현에서 탱자 단일추출물보다 모든 농도에서 우수한 발현 증가효과를 나타내었다.

[0096] 또한, 본 발명의 옥수수수염 및 탱자 복합추출물(실시에 1) 1 mg/ml 농도에서는 옥수수수염 단일추출물(비교예 1) 및 탱자 단일추출물(비교예 2)보다 우수한 HSL, ACS, CPT-1의 단백질 발현능을 보이는 것으로 나타났다 (도 7 내지 12). 도 7은 옥수수수염 단일추출물('OSS'로 표기) 및 탱자 단일추출물('TJ'로 표기)이 3T3-L1 세포에서 HSL 효소의 단백질 발현에 미치는 영향을 나타내는 그래프이고, 도 8은 옥수수수염 단일추출물('OSS'로 표기) 및 탱자 단일추출물('TJ'로 표기)이 3T3-L1 세포에서 ACS 효소의 단백질 발현에 미치는 영향을 나타내는 그래프이며, 도 9는 옥수수수염 단일추출물('OSS'로 표기) 및 탱자 단일추출물('TJ'로 표기)이 3T3-L1 세포에서 CPT-1 효소의 단백질 발현에 미치는 영향을 나타내는 그래프이다.

[0097] 한편, 도 10은 옥수수수염 및 탱자 복합추출물('MIX'로 표기)이 3T3-L1 세포에서 HSL 효소의 단백질 발현에 미치는 영향을 나타내는 그래프이고, 도 11은 옥수수수염 및 탱자 복합추출물('MIX'로 표기)이 3T3-L1 세포에서 ACS 효소의 단백질 발현에 미치는 영향을 나타내는 그래프이며, 도 12는 옥수수수염 및 탱자 복합추출물('MIX'로 표기)이 3T3-L1 세포에서 CPT-1 효소의 단백질 발현에 미치는 영향을 나타내는 그래프이다.

[실시에 2: 항비만용 식품 조성물]

[0100] 본 실시예에서는 하기와 같이 항비만용 식품 조성물을 제조하였다.

[0102] (1) 선식 제조

[0103] 현미, 보리, 찹쌀, 울무를 공지의 방법으로 알파화시켜 건조시킨 것을 배전한 후 분쇄기로 입도 60메쉬의 분말로 준비하였다. 검정콩, 검정깨 및 들깨 각각을 공지의 방법으로 찌서 건조시킨 후 배전 및 분쇄하여 입도 60메쉬의 분말로 준비하였다. 이후, 현미 30중량%, 울무 15중량%, 보리 20중량%, 찹쌀 9중량%, 들깨 7중량%, 검정콩 8중량%, 검정깨 7중량%, 옥수수수염 및 탱자 복합추출물 (실시에 1) 3중량%, 영지 0.5중량% 및 지황 0.5중량%을 혼합하여 선식을 제조하였다.

[0105] (2) 휴잉껌 제조

[0106] 껌 베이스 20중량%, 설탕 76.9중량%, 향료 1중량%, 물 2중량% 및 옥수수수염 및 탱자 복합추출물 (실시에 1) 0.1중량%를 배합하여 통상의 방법으로 휴잉껌을 제조하였다.

[0108] (3) 캔디 제조

[0109] 설탕 60중량%, 물엿 39.8중량%, 향료 0.1중량% 및 옥수수수염 및 탱자 복합추출물 (실시에 1) 0.1중량%를 배합하여 통상의 방법으로 캔디를 제조하였다.

[0111] (4) 비스킷 제조

[0112] 박력 1급 25.59중량%, 중력 1급 22.22중량%, 정백당 4.80중량%, 식염 0.73중량%, 포도당 0.78중량%, 팜쇼트닝 11.78중량%, 암모니움 1.54중량%, 중조 0.17중량%, 중아황산나트륨 0.16중량%, 쌀가루 1.45중량%, 비타민 B 0.0001중량%, 비타민 B 0.0001중량%, 밀크향 0.04중량%, 물 20.6998중량%, 전지분유 1.16중량%, 대용분유 0.29중량%, 제일인산칼슘 0.03중량%, 살포염 0.29중량% 및 분무유 7.27중량%와 옥수수수염 및 탱자 복합추출물 (실시에 1) 1중량%를 배합하여 통상의 방법으로 비스킷을 제조하였다.

[0114] (5) 건강음료 제조

[0115] 꿀 0.26중량%, 치옥토산아미드 0.0002중량%, 니코틴산아미드 0.0004중량%, 엽산리보플라빈나트륨 0.0001중량%, 엽산피리독신 0.0001중량%, 이노시톨 0.001중량%, 오르탄산 0.002중량%, 물 98.7362중량% 및 옥수수수염 및 탱자 복합추출물 (실시에 1) 1중량%를 배합하여 통상의 방법으로 건강 음료를 제조하였다.

[0117] (6) 소시지 제조

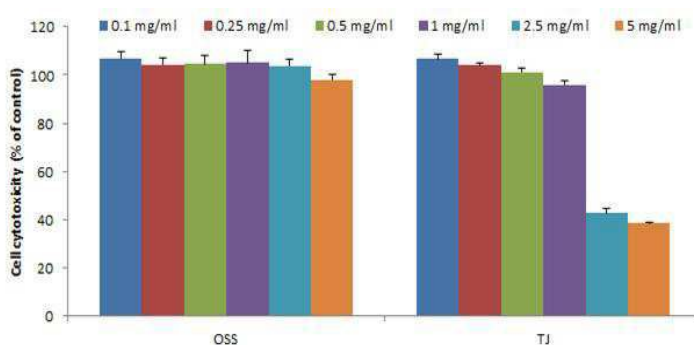
[0118] 돈육 65.18중량%, 계육 25중량%, 전분 3.5중량%, 대두단백 1.7중량%, 식염 1.62중량%, 포도당 0.5중량% 및 글리세린 1.5중량%와 옥수수수염 및 탱자 복합추출물 (실시에 1) 1중량%를 배합하여 통상의 방법으로 소시지를 제조하였다.

[0120] (7) 건강보조식품 제조

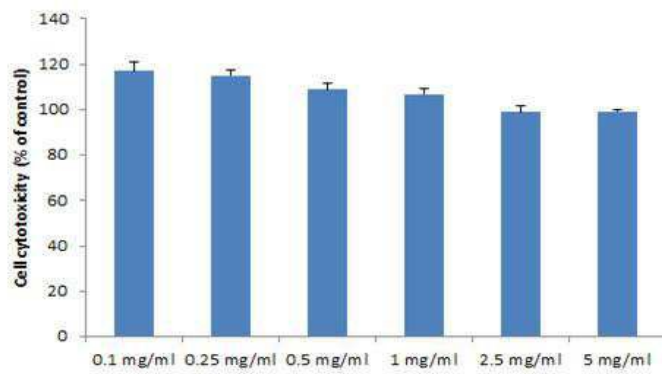
- [0121] 스피루리나 55중량%, 구아검효소 분해물 10중량%, 비타민 B엽산염 0.01중량%, 비타민 B6 엽산염 0.01중량%, DL-메티오닌 0.23중량%, 스테아린산 마그네슘 0.7중량%, 유당 22.2중량% 및 옥수수전분 1.85중량%와 옥수수수염 및 탱자 복합추출물 (실시예 1) 10중량%를 배합하여 통상의 방법으로 정제형 건강보조식품을 제조하였다.
- [0123] (8) 주류 제조
- [0124] 옥수수수염 및 탱자 복합추출물 0.5중량%를 소주, 맥주, 양주 또는 과일주와 혼합하여 에멀전 상태로 만든 후, 진공상태에서 7,000 rpm으로 15분간 원심분리하거나 고속믹서기로 9,000rpm에서 혼합하여 옥수수수염 및 탱자 복합추출물 (실시예 1)이 함유된 주류를 제조하였다.
- [0126] (9) 환 제조
- [0127] 옥수수수염 5 g과 탱자 35 g을 건조하고, 혼합하여 분쇄한 후, 건조된 무게의 10.7배의 증류수를 혼합하여 60℃의 진탕배양기에서 24시간 동안 열수추출하였다. 그 후 40 brix로 농축하였다. 부형제로 전분 6.8 g을 혼합한 후, 물 8 g을 넣어, 주걱형 혼합기로 반죽하였다.
- [0128] 반죽물은 5 mm로 제환하고 60℃에서 24시간 동안 건조한 후, 4% HPMC 용액을 사용하여, 코팅하여 환을 제조하였다 (도 13 참조). 도 13은 옥수수수염 및 탱자 복합추출물을 함유하는 환 제조공정을 나타낸 도이다.
- [0130] [실시예 2: 항비만용 약학 조성물 제조]
- [0131] 본 실시예에서는 하기와 같이 항비만용 약학 조성물을 제조하였다.
- [0133] (1) 산제 제조
- [0134] 옥수수수염 및 탱자 복합추출물 (실시예 1) 1 g에 유당 2 g을 혼합하고, 기밀포에 충전하여 산제를 제조하였다.
- [0136] (2) 정제 제조
- [0137] 옥수수수염 및 탱자 복합추출물 (실시예 1) 100 mg, 옥수수전분 100 mg, 유당 100 mg 및 스테아린산 마그네슘 2 mg을 혼합한 후 통상의 정제 제조방법에 따라 타정하여 정제를 제조하였다.
- [0139] (3) 캡슐제 제조
- [0140] 옥수수수염 및 탱자 복합추출물 (실시예 1) 100 mg, 옥수수전분 100 mg, 유당 100 mg 및 스테아린산 마그네슘 2 mg을 혼합한 후 젤라틴 캡슐에 충전하여 캡슐제를 제조하였다.
- [0142] (4) 주사제 제조
- [0143] 옥수수수염 및 탱자 복합추출물 (실시예 1) 100 mg에 주사용 증류수 적량을 가하여 용해시키고, pH를 약 7.5로 조절한 다음 2 ml 용량의 앰플에 충전 및 멸균시켜 주사제를 제조하였다.

도면

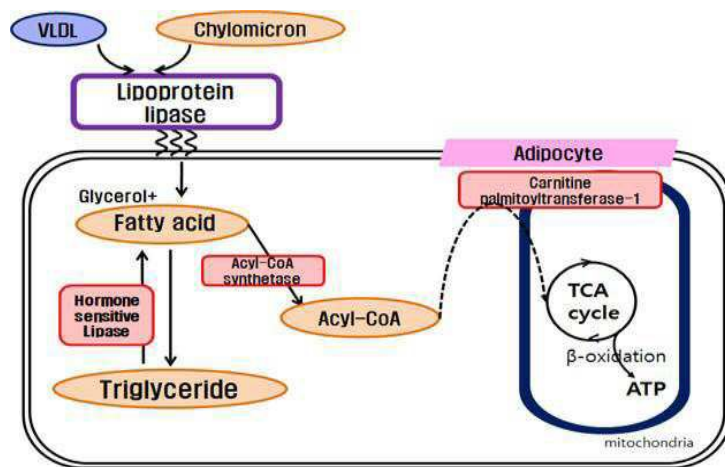
도면1



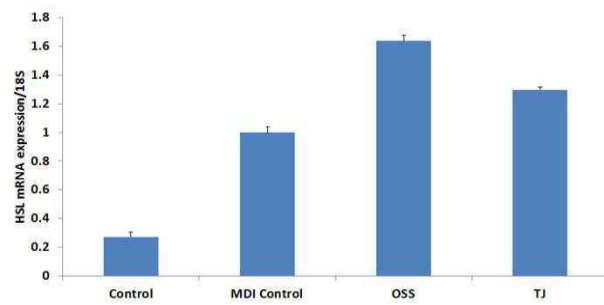
도면2



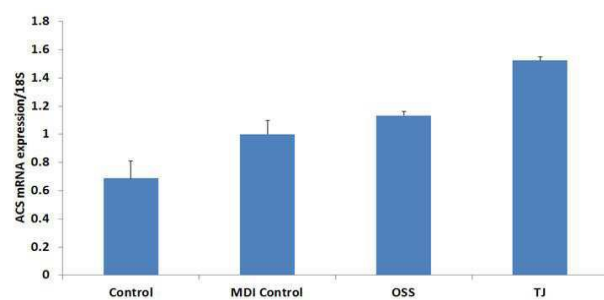
도면3



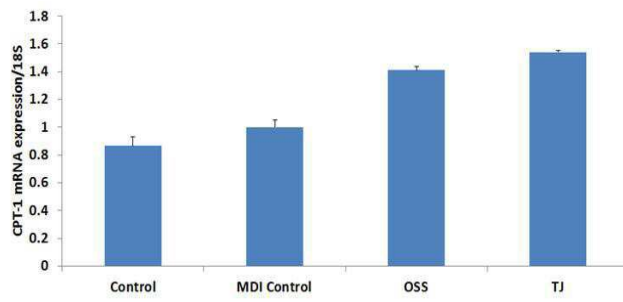
도면4



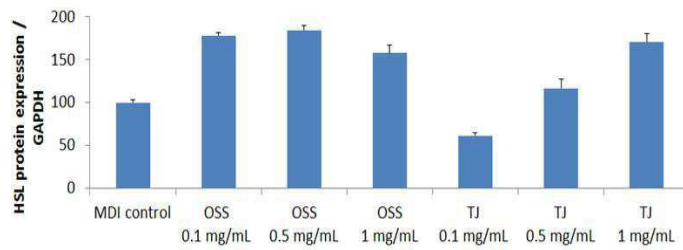
도면5



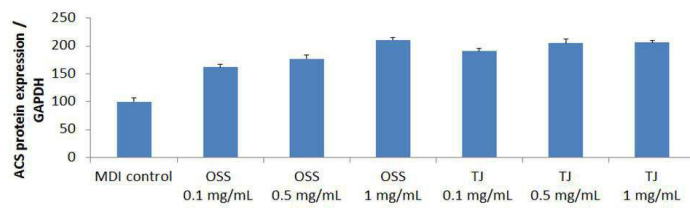
도면6



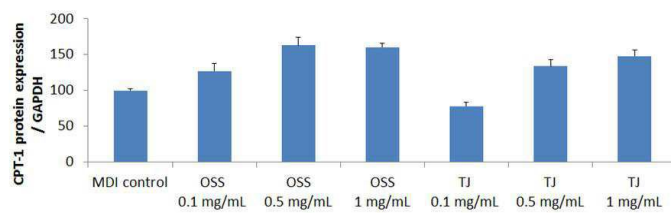
도면7



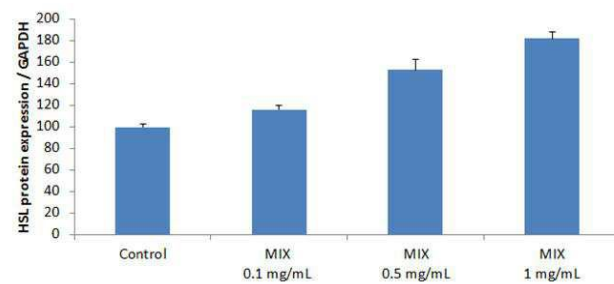
도면8



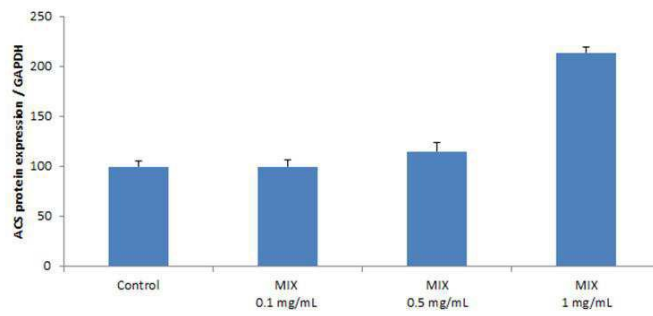
도면9



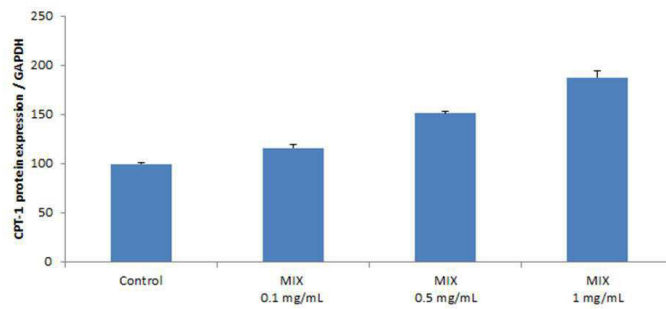
도면10



도면11



도면12



도면13

