(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2020-0065170
(43) 공개일자 2020년06월09일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 36/07 (2006.01) *A23L 23/00* (2016.01)
A23L 29/00 (2016.01) *A23L 33/10* (2016.01)
A61P 19/10 (2006.01) *A61P 3/04* (2006.01)
A61P 3/10 (2006.01) *C12N 1/20* (2006.01)
C12R 1/225 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 36/07 (2013.01)
A23L 23/00 (2016.08)
(21) 출원번호 10-2018-0151024
(22) 출원일자 2018년11월29일
심사청구일자 없음

(71) 출원인
교촌 에프 앤 비(주)
경상북도 칠곡군 가산면 송신로 78
(72) 발명자
이중복
경상북도 안동시 강남5길 92 현진1차 APT 103동 805호
김병혁
경상북도 안동시 길주길 101-12, 용상현대아파트 206동 303호
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
이철희

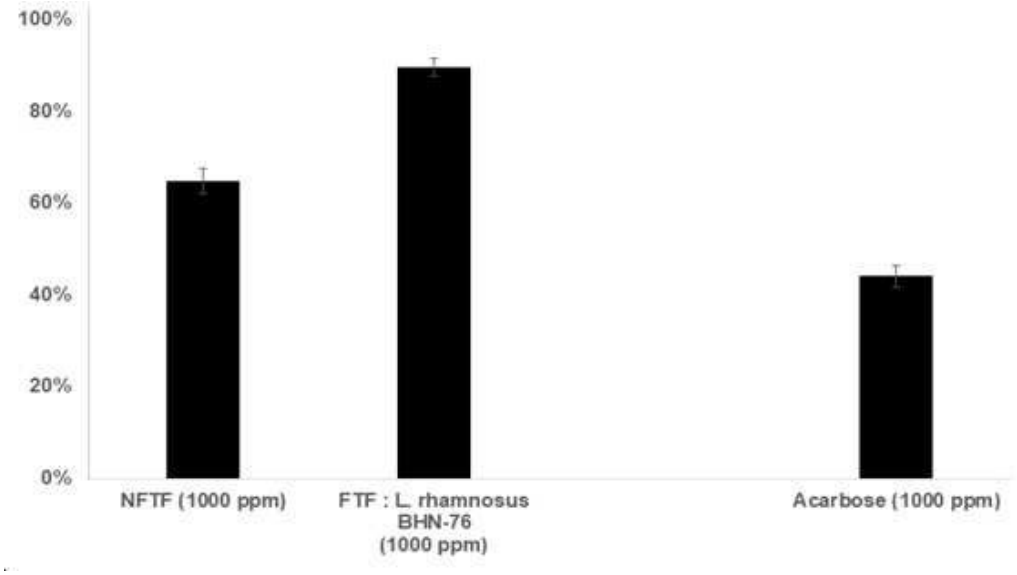
전체 청구항 수 : 총 7 항

(54) 발명의 명칭 **흰목이버섯 발효물을 유효성분으로 함유하는 골다공증, 당뇨 및 비만의 예방 및 치료용 조성물**

(57) 요 약

본 발명은 오랫동안 약용 및 식용으로 사용되어온 소재를 가공하여, 부작용없이 안전하게 사용할 수 있는 골다공증, 당뇨 및 비만의 예방 및 치료 또는 증상개선용 조성물과, 상기 조성물의 제조에 유용하게 사용할 수 있는 새로운 균주에 관한 것으로, 보다 상세하게는 흰목이버섯을 유산균으로 발효한 흰목이버섯 발효물을 유효성분으로 함유하는 것을 특징으로 하는 골다공증, 당뇨 및 비만의 예방 및 치료 또는 증상개선용 조성물과, 상기 조성물의 제조에 유용하게 사용할 수 있는 새로운 균주에 관한 것이다.

대 표 도 - 도3



(52) CPC특허분류
A23L 29/065 (2016.08)
A23L 33/10 (2016.08)
A61P 19/10 (2018.01)
A61P 3/04 (2018.01)
A61P 3/10 (2018.01)
C12N 1/20 (2013.01)
A23V 2002/00 (2013.01)
A61K 2236/19 (2013.01)
C12R 1/225 (2013.01)

(72) 발명자
윤여초
경상북도 예천군 호명면 행복로 229 우방아이유쉘 센트럴 501동 1503호
김중규
경상북도 상주시 남상주로 1455(양촌동)
이준형
경상북도 안동시 강남1길 108, 108동 903호(정하동,
박예은
경기도 광주시 초월읍 경충대로 923, 대주파크빌 106동 207호
권기석
경상북도 안동시 길주길 101-12, 현대아파트 203동 1006호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 C0563692
부처명 중소벤처기업부
연구관리전문기관 중소기업기술정보진흥원
연구사업명 산학연협력 기술개발사업
연구과제명 발효흰목이버섯을 이용한 미백, 항당뇨 및 골다공증 예방 식품 소재 개발
기 여 율 1/1
주관기관 ㈜비에이치앤바이오 안동공장
연구기간 2017.12.01 ~ 2018.11.30

명 세 서

청구범위

청구항 1

흰목이버섯을 유산균으로 발효한 흰목이버섯 발효물을 유효성분으로 함유하는 것을 특징으로 하는 골다공증, 당뇨 및 비만의 예방 및 치료용 약학 조성물.

청구항 2

제 1 항에 있어서,

상기 유산균은 락토바실러스(Lactobacillus), 락토코쿠스(Lactococcus), 로이코노스톡(Leuconostoc), 페디오코쿠스(Pediococcus) 또는 비피도박테리움(Bifidobacterium) 속의 균주로로부터 선택되는 하나 이상인 것을 특징으로 하는 골다공증, 당뇨 및 비만의 예방 및 치료용 약학 조성물.

청구항 3

제 2 항에 있어서,

상기 유산균은 락토바실러스 람노서스(Lactobacillus rhamnosus) BHN-LAB 76 (수탁번호 : KCTC13647BP)인 것을 특징으로 하는 골다공증, 당뇨 및 비만의 예방 및 치료용 약학 조성물.

청구항 4

제 1 항 내지 제 3 항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 흰목이버섯 발효물은 유산균으로 발효된 흰목이버섯의 분말 또는 물과 C1~C4의 알콜로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 용매를 사용하여 추출한 추출물인 것을 특징으로 하는 골다공증, 당뇨 및 비만의 예방 및 치료용 약학 조성물.

청구항 5

흰목이버섯을 유산균으로 발효한 흰목이버섯 발효물을 유효성분으로 함유하는 것을 특징으로 하는 골다공증, 당뇨 및 비만의 예방 및 증상 개선용 건강기능식품 조성물.

청구항 6

제 5 항에 의한 건강기능식품 조성물을 함유하는 불고기 소스.

청구항 7

흰목이버섯의 발효에 사용되어 골다공증, 당뇨 및 비만에 대한 효능을 증가시키는 것을 특징으로 하는 락토바실러스 람노서스(Lactobacillus rhamnosus) BHN-LAB 76(기탁번호 KCTC13647BP).

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 오랫동안 약용 및 식용으로 사용되어온 소재를 가공하여, 부작용없이 안전하게 사용할 수 있는 골다공증, 당뇨 및 비만의 예방 및 치료 또는 증상개선용 조성물과, 상기 조성물의 제조에 유용하게 사용할 수 있는 새로운 균주에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 골다공증은 뼈의 강도가 약해져서 작은 충격에 의해서도 쉽게 골절되는 골격계 질환이다. 우리 몸의 뼈는 일생에 걸쳐 흡수(파괴)되고 다시 형성되는 과정을 반복하게 되는데, 새로운 조골세포(osteoblast)의 골 기질 형성과 파골세포(osteoclast) 흡수작용의 균형에 의해 뼈의 항상성이 유지된다. 뼈의 항상성은 여러 호르몬과 기타

몸의 화학성분에 의해 조절되는데, 생체 내의 호르몬 이상, 스트레스 등의 원인으로 조골세포와 파골세포의 상호작용에 불균형이 생기면 골대사 질환이 발생하게 된다.

[0003] 골다공증은 원발성과 속발성으로 분류되며, 원발성은 폐경 후 골다공증(제1형 골다공증)과 노인성 골다공증(제2형 골다공증)으로 나뉜다. 제1형 골다공증은 폐경 이후 여성에서 에스트로겐 결핍에 의해 일어나는 골다공증으로, 주로 소주골이 줄어든다. 골밀도는 폐경 이후 매년 5% 씩 감소하며, 70세까지 폐경 전 수준의 50%까지 줄어들 수 있다. 동양 여성의 경우 골밀도가 서양 여성에 비해 낮고, 육체적 활동이 서양 여성에 비해 적기 때문에 서양보다 골다공증이 더 큰 문제로 대두되고 있다. 제2형 골다공증은 노화로 인하여 파골세포 분화 인자의 이상으로 파골세포의 과도한 활성이 유도되어 뼈의 손실이 일어나는 것으로 남성과 여성 모두에게서 일어나고 서서히 오래 진행된다.

[0004] 원발성 골다공증이 나이가 들어감에 따라 자연적으로 발생하는 질환인 것에 비하여, 속발성 골다공증은 질환이나 약물등에 의해 발생하는 골다공증이다. 예를 들면, 원발성 골다공증은 류마티스 관절염, 신부전, 내분비 질환(성선 기능 저하증, 갑상선 기능 항진증, 쿠싱 증후군, 부갑상선 기능 항진증 등의 질환)이 있을 때나 스테로이드, 제산제, 갑상선 치료제 등을 장기간 복용했을 때 이차적으로 발생한다.

[0005] 골밀도가 골절 한계치 이하로 줄어들면 조그마한 충격에도 골절을 일으킬 수 있고, 고령의 노인환자는 골절이 사망의 주요 원인이 된다. 그러나 대부분의 골다공증 환자는 골절이 일어날 때까지 뚜렷한 증상이 없이 서서히 진행되기 때문에 효과적인 치료시기를 놓치는 경우가 많다.

[0006] 골다공증 치료제는 전통적으로 폐경기 여성에게 많이 사용되는 여성 호르몬 제제, 비스포스네이트 제제, 부갑상선 호르몬제로 나눌 수 있다. 여성호르몬 제제는 골절감소에 효과가 있지만 혈전증과 유방암의 위험을 높이기 때문에 주의해서 사용하여야 한다. 비스포스포네이트 제제는 가장 널리 사용되는 치료제로, 파골세포의 기능을 억제하고 그 수를 줄여 뼈의 파괴를 막는다. 부갑상선 호르몬제는 조골세포를 활성화시켜 새로운 뼈를 만들기 때문에 다른 골다공증 치료제와는 달리 실제로 골조직의 증가를 가져온다. 그러나 가격이 비싸고 주사로 투여해야 하는 불편이 있다. 이에 부작용 없이 안전하게 사용할 수 있으면서도, 골다공증에 효과적인 예방 및 치료제에 대한 많은 관심이 쏠리고 있다.

[0007] 한편, 폐경과 함께 에스트로겐과 같은 여성호르몬이 급격히 감소되면 인체는 부족한 호르몬을 보충하기 위해 체지방을 많이 저장하는 생리현상이 강화된다. 이로인해 갱년기 여성은 골다공증과 더불어 복부에 지방이 축적되면서 복부비만의 위험에 노출된다. 성균관대 의대 강북삼성병원 내분비내과 이은정 교수는 복부비만과 골밀도의 상관 관계를 살펴본 결과 복부비만이 높아질수록 골밀도가 통계적으로 유의하게 낮아졌다고 보고한 바 있다.

[0008] 흰목이버섯(Tremella fuciformis Berk.)은 담자균문 흰목이과에 속하는 식물로 한국, 중국, 일본, 대만, 열대지방에 분포한다. 자체 중량의 500배에 이르는 수분을 함유할 수 흰목이버섯은 적은양으로도 포만감을 주어 다이어트에도 효과가 탁월하며 기미, 주근깨, 피부노화 개선에 좋은 콜라겐과 베타글루칸, 폴리사카라이드 등이 함유되어 있어 피부미용에도 좋다. 특히 칼슘의 흡수 효율을 높여주어 골다공증 예방에 큰 도움을 주는 비타민 D가 식품 중에 가장 많이 함유되어 있으며, 칼슘을 비롯한 철분 등 무기질도 다량 함유되어 있다.

[0009] 흰목이버섯과 관련된 특허 문헌으로는 등록특허 제10-1297349호의 흰목이버섯을 포함하는 돈육 패티 및 이의 제조방법과, 등록특허 제10-1516384호의 흰목이버섯 추출물의 제조방법 및 이를 포함하는 화장료 조성물 등이 있다. 그러나, 흰목이버섯을 가공하여 골다공증이나 당뇨, 비만의 예방 및 치료에 사용하고자 한 종래기술은 보고된 바 없다.

선행기술문헌

특허문헌

[0010] (특허문헌 0001) 등록특허 제10-1297349호

(특허문헌 0002) 등록특허 제10-1516384호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0011] 본 발명은 오랫동안 약용 및 식용으로 사용되어온 소재를 가공하여, 부작용없이 안전하게 사용할 수 있는 골다공증, 당뇨 및 비만의 예방 및 치료 또는 증상개선용 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.

[0012] 본 발명의 다른 목적은 상기 조성물의 제조에 유용하게 사용할 수 있는 신규 균주를 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0013] 전술한 목적을 달성하기 위한 본 발명은 흰목이버섯을 유산균으로 발효한 흰목이버섯 발효물을 유효성분으로 함유하는 것을 특징으로 하는 골다공증, 당뇨 및 비만의 예방 및 치료용 약학 조성물에 관한 것이다.

[0014] 본 발명에서 흰목이버섯 발효물은 흰목이버섯을 유산균으로 발효한 것으로, 흰목이버섯은 생것, 냉동 보관되었던 것 또는 건조된 것 어느 것을 사용하여도 무방하다. 발효에 사용되는 유산균으로는 락토바실러스(Lactobacillus), 락토코쿠스(Lactococcus), 로이코노스톡(Leuconostoc), 페디오코쿠스(Pediococcus) 또는 비피도박테리움(Bifidobacterium) 속의 균주로로부터 선택된 하나 이상일 수 있다. 발효 온도나 시간 등의 최적의 발효 조건은 사용하는 균주에 따라 적절히 선택될 수 있을 것이다. 특히 본 발명에서는 김치, 된장, 젓갈 등에서 흰목이버섯의 발효에 의해 흰목이버섯의 골다공증, 당뇨 및 비만에 대한 효능을 강화할 수 있는 새로운 유산균을 분리하여 동정하였으며, 이를 락토바실러스 람노서스(*Lactobacillus rhamnosus*) BHN-LAB 76으로 명하고, 2018년 9월 20일자로 한국생명공학연구원 생물자원센터에 기탁하였다(기탁번호 KCTC13647BP).

[0015] 본 발명의 흰목이버섯 발효물은 발효된 그 상태 그대로 사용하거나, 혹은 건조나 분쇄, 추출과 같은 추가의 가공 공정을 거친 후 사용할 수 있다. 발효물을 추출하여 사용할 때에는 추출물은 통상의 식물 추출물의 제조방법에 의해 제조할 수 있다. 효율적인 추출을 위해서는 흰목이버섯을 분쇄 또는 마쇄 후 추출하는 것이 더욱 바람직하다. 추출은 당업계에서 천연물의 추출에 사용되는 방법 중 어느 것을 사용하여도 무방하며, 예를 들면 냉침, 열추출, 추음파추출 등을 사용할 수 있으나 이에 한정되는 것은 아니다. 용매를 사용하여 추출하는 경우, 상기 용매는 물 또는 C1~C4의 알콜 또는 이들의 혼합물을 사용하는 것이 바람직하다. 또한 유효성분을 더욱 농축하기 위하여 상기 추출물에 대해 추가로 분획을 실시할 수 있다. 추출물은 그 자체로 사용하거나, 농축하거나 건조하여 사용할 수 있다. 건조방법 역시 분무건조, 열건조, 동결건조 등 통상의 방법을 사용할 수 있음은 당연하다.

[0016] 본 발명의 흰목이버섯 발효물은 α-Glucosidase 저해 활성을 나타내며, 지방세포분화와 지방의 축적을 효과적으로 억제하여 항당뇨 및 항비만 효과를 나타내는 것을 확인할 수 있었다. 흰목이버섯은 유산균을 사용하여 발효함에 따라, 흰목이버섯의 골다공증, 당뇨 및 비만에 대한 효능이 더욱 강화되었다.

[0017] 본 발명의 조성물은 골다공증, 당뇨 및 비만의 예방 및 치료용 약제로 이용하기 위하여, 약제학적 분야에서 공지의 방법에 의하여 제조될 수 있으며, 그 자체 또는 약학적으로 허용되는 담체(carrier), 부형제(forming agent), 희석제 등과 혼합하여 사용될 수 있다. 본 발명의 조성물은 경구 또는 비경구 투여용 제제로 제형화하여 골다공증, 당뇨 및 비만의 예방 및 치료용 약제로 사용할 수 있다. 본 발명에 따른 유효성분의 투여량은 체내에서 활성성분의 흡수도, 제제의 형태, 환자의 연령, 성별 및 상태, 증상의 정도 등에 따라 적절히 선택될 수 있으며, 투여는 하루에 한번 투여할 수도 있고 수회 나누어 투여할 수도 있다. 일반적인 투여량은 0.001mg/kg·일~10g/kg·일이다. 본 발명의 조성물은 독성 및 부작용이 없이 안전하게 사용할 수 있으므로 예방 목적으로 장기간 복용 시에도 안심하고 사용할 수 있다.

[0018] 본 발명은 또한 흰목이버섯을 유산균으로 발효한 흰목이버섯 발효물을 유효성분으로 함유하는 것을 특징으로 하는 골다공증, 당뇨 및 비만의 예방 및 증상개선용 건강기능식품 조성물에 관한 것이다. 상기 흰목이버섯 발효물은 본 발명의 건강기능식품 조성물에 바람직하게는 0.01~100 중량%로 하여 첨가될 수 있다. 본 발명의 건강기능식품 조성물의 유효용량은 상기 약학적 조성물의 유효용량에 준해서 사용할 수 있으나, 건강 및 위생을 목적으로 하거나 또는 건강 조절을 목적으로 하는 장기간의 섭취의 경우에는 상기 범위 이하일 수 있으며, 유효성분은 안전성 면에서 아무런 문제가 없기 때문에 상기 범위 이상의 양으로도 사용될 수 있다. 본 발명의 건강기능식품은 각종 식품류의 첨가제, 정제, 캡슐제, 환제 또는 액제 등의 형태를 포함하며, 본 발명의 조성물을 첨가할 수 있는 식품으로는, 예를 들어, 각종 식품류, 음료, 껌, 차, 과자, 주류, 초콜릿, 비타민 복합제, 건강기능성식품류 등이 있다.

[0019] 본 발명은 또한 흰목이버섯의 발효에 사용되어 골다공증, 당뇨 및 비만에 대한 효능을 증가시키는 것을 특징으로 하는 락토바실러스 람노서스(*Lactobacillus rhamnosus*) BHN-LAB 76(기탁번호 KCTC13647BP)에 관한 것이다. BHN-LAB 76은 흰목이버섯 이외에도 과일류, 채소류, 한약재류, 해조류 또는 이들의 잉여부산물의 발효에 사용되

어 골다공증, 당뇨 및 비만에 대한 효능을 증가시킬 수 있을 것으로 기대된다.

발명의 효과

[0020] 이상과 같이 본 발명의 흰목이버섯 발효물을 함유한 조성물은 유산균 발효에 의해 흰목이버섯에 비해 골다공증, 당뇨 및 비만에 대한 효능이 더욱 현저하게 향상되어 골다공증, 당뇨 및 비만의 예방 및 치료 또는 증상개선을 위한 조성물로 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0021] 도 1은 락토바실러스 람노서스 BHN-LAB 76의 상동성 분석결과를 보여주는 계통도.

도 2는 본 발명의 일실시예에 의한 흰목이버섯 추출물의 세포독성 평가 결과를 보여주는 그래프.

도 3은 본 발명의 일실시예에 의한 흰목이버섯 추출물의 α-Glucosidase 저해 활성을 보여주는 그래프.

도 4는 시험관 내에서 본 발명의 일실시예에 의한 흰목이버섯 추출물의 지방세포분화 억제 활성을 보여주는 현미경 이미지.

도 5는 시험관 내에서 본 발명의 일실시예에 의한 흰목이버섯 추출물의 지방세포분화 억제 활성을 보여주는 그래프.

도 6은 시험관 내에서 본 발명의 일실시예에 의한 흰목이버섯 추출물의 지방분화유도 단백질에 대한 활성을 보여주는 전기영동 사진.

도 7은 동물실험에서 본 발명의 일실시예에 의한 흰목이버섯 추출물의 지방축적 억제 효과를 보여주는 그래프.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0022] 이하 첨부된 실시예를 들어 본 발명을 보다 상세히 설명한다. 그러나 이러한 실시예는 본 발명의 기술적 사상의 내용과 범위를 쉽게 설명하기 위한 예시일 뿐, 이에 의해 본 발명의 기술적 범위가 한정되거나 변경되는 것은 아니다. 이러한 예시에 기초하여 본 발명의 기술적 사상의 범위 안에서 다양한 변형과 변경이 가능함은 당업자에게는 당연할 것이다.

[0024] **실시예**

[0025] **실시예 1 : 신균주의 분리**

[0026] 김치, 된장, 젓갈 등의 전통 발효 식품 1 g을 증류수 10 ml로 희석하여 다단희석법을 통해 유산균 선택배지인 BCP(Brom Cresol Purple) 평판 배지(Difco, USA)에 도말하고, 37℃에서 정치 배양한 후 노란색 콜로니를 분리하였다.

[0027] 분리된 콜리니들의 내산성, 내담즙성 실험을 통해 내산성, 내담즙성, 췌장효소에 대한 내성을 가진 우수한 균주를 선발하였다.

[0028] 구체적으로 내산성은 0.3% 펩신(pepsin) 수용액의 인공 위액 배지(pH 2.5)에 접종하여 3 시간 동안 정치배양한 후, 배양액 1 mL을 회수하여 10배씩 희석하였으며, 희석된 미생물을 평판배지에 도말하고 37℃에서 48 시간동안 배양한 다음, 생성된 콜로니 수로부터 확인하였다.

[0029] 췌장효소에 대한 내성은 췌장에서 분비되는 담즙에 대한 내성으로 확인하였다. 내담즙성은 동일한 방법에 의해 0.4% 옥스갈(oxgall) 배지에서 24시간 정치배양한 후, 내산성과 마찬가지로 도말된 평판배지에 생성된 콜로니를 계수하여 확인하였다.

[0030] 상기 실험에 의해 내산성, 내담즙성 및 췌장효소에 대한 내성을 갖는 균주를 선발하였으며, BHN-LAB 76으로 명명하였다.

[0032] **실시예 2 : 신균주의 동정**

[0033] 실시예 1에서 선별된 BHN-LAB 76의 확인을 위하여 바이오팩트(대전)에 의뢰하여 16S rRNA 유전자의 염기서열(서

열번호 1)을 분리하였으며, 상동성 분석을 통해 신규주를 동정하였다. 도 1은 상동성 분석을 통한 BHN-LAB 33의 계통도를 나타낸 것이다. 신균주는 동정결과 락토바실러스 람노서스(Lactobacillus rhamnosus)와 상동성을 나타내어 Lactobacillus rhamnosus BHN-LAB 76로 명명하였으며, 2018년 9월 20일자로 한국생명공학연구원 생물자원센터에 기탁하였다(기탁번호 KCTC13647BP).

[0035] **실시예 3 : 발효 흰목이버섯 추출물의 제조**

[0036] 90~120℃에서 15분~60분간 멸균한 흰목이버섯에 실시예 1에서 선발한 Lactobacillus rhamnosus BHN-LAB 76(이하, 'BHN-LAB 76'으로 약칭함)을 108~1011 cfu/mL이 되도록 접종한 후 37℃ 배양기에서 72시간 동안 발효하였다. 발효가 끝나면 흰목이버섯 무게의 10배의 DI수 또는 70% 에탄올을 가하여 80℃에서 3회 반복 추출하였다. 추출한 시료를 여과하고 감압 농축기(Eyela, Japan)로 60℃에서 감압 농축한 후, 동결 건조하였다(FTF, 열수 추출물 수율 45.7%, 70% 에탄올 추출물 수율 14.5%).

[0037] 비교를 위하여 발효되지 않은 건조된 흰목이버섯을 사용하여 상기와 동일한 방법에 의해 추출한 후 동결건조(열수 추출물 수율 22.8%, 70% 에탄올 추출물 수율 12.5%)하여 비교군 시료(NFTF)로 사용하였다.

[0038] 이하에서, 별도의 언급이 없는 경우에는 70% 에탄올 추출물을 실시예의 실험에 사용하였다.

[0040] **실시예 4 : 발효 흰목이버섯 추출물의 세포독성 평가**

[0041] 흰 목이버섯의 3T3-L1 전지방세포에 대한 독성을 세포에 의해 생성되는 formazan 측정을 통한 tetrazolium bromide salt (MTT) assay를 이용하여 평가하였다.

[0042] 전지방세포인 3T3-L1 세포는 한국세포주은행으로부터 분양받았으며, 10% Bovine calf serum (BCS)과 1% penicillin/streptomycin (P/S)이 첨가되어 있는 Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)을 사용하여 37℃, 5% CO2 환경에서 배양하였다.

[0043] 24-well plate에 3T3-L1 세포를 well 당 0.5 x 105개씩 분주하고, confluent 된 상태에서 실시예 4에서 제조한 발효 또는 발효되지 않은 흰목이버섯 추출물을 100, 250, 500, 1000 ug/ml의 농도로 37℃, 5% CO2 조건에서 24시간 동안 처리하였다. 24시간 후, 흰목이버섯 추출물이 포함된 배지를 완전히 제거하고 phosphate-buffered saline(PBS)에 5 mg/ml의 농도로 용해된 MTT 시약을 Serum-free 배지에 0.5 mg/ml 농도로 희석하여 처리한 후, 4시간 동안 반응시켰다. 반응 후, 배지를 완전히 제거하고 200 ul 의 DMSO를 첨가하여 살아있는 3T3-L1 세포에서 생성된 formazan을 용해시켰다. 용해된 formazan을 96-well plate에 각 well 당 90 ul씩 넣어 microplate reader(TECAN, Mannedorf, Swizerland)를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포생존율은 흰목이버섯 추출물을 처리하지 않은 3T3-L1 세포를 대조군으로 하여 계산하였다.

[0044] 도 2는 그 결과를 보여주는 그래프로, 흰목이버섯 추출물은 유산균 발효 유무와 상관없이 독성이 없음을 확인하였다.

[0046] **실시예 5 : 발효 흰목이버섯 추출물의 항당뇨 활성 평가**

[0047] α-Glucosidase 저해 활성은 Tibbot과 Skadsen의 방법에 따라 기질인 pNPG (p-nitrophenyl β-D-glucoside)와 α-Glucosidase의 반응 결과 유리되어 나오는 반응 생성물(p-nitrophenol)의 양을 측정하여 평가하였다.

[0048] 구체적으로, 50 mM sodium succinate 완충액(pH 4.2)에 pNPG를 2.5 mM의 농도로 용해시켜 기질 용액을 제조하였다. 상기 기질 용액 50 ㎕에 0.2 unit/ml α-glucosidase 용액 25 ㎕를 혼합하고, 시료를 4000ppm의 농도로 증류수에 녹여 제조한 시료용액 25 ㎕를 넣어 37℃에서 20분간 반응시켰다. 시료로는 실험군(FTF)에는 상기 실시예 3에서 제조한 발효 흰목이버섯 추출물(FTF)을, 양성대조군에는 acarbose를, 비교군에는 발효되지 않은 흰목이버섯 추출물(NFTF)을 사용하였으며, 음성대조구에는 α-glucosidase 용액 및 시료 대신 0.1 M sodium phosphate buffer (pH 6.8)를 50 ㎕ 분주하였다. 또한 비교군에는 발효되지 않은 건조 흰목이버섯을 사용하여 실시예 3과 동일한 방법에 의해 추출하여 제조한 시료를 사용하였다. 반응 20분 후, 0.1 M NaOH 50 ㎕를 넣어 반응을 정지시키고, 반응액 중 p-nitrophenol의 생성량을 microplate reader(TECAN, Mannedorf, Swizerland)를 사용하여 405 nm에서의 흡광도를 측정하였다. α-glucosidase 저해 활성을 각 시험군과 음성대조군 간의 흡광

도 차이의 백분율로부터 계산하고 그 결과를 도 3에 도시하였다. 도 3으로부터 본 발명에 의한 발효흰목이버섯 추출물은 흰목이버섯 추출물 및 α-glucosidase 계열의 혈당강하제인 acarbose에 비해 항당뇨 활성이 매우 우수함을 확인할 수 있다.

[0050] **실시예 6 : 발효 흰목이버섯 추출물의 항비만 활성 평가**

[0051] **1) 발효 흰목이버섯 추출물의 시험관 내 지방세포분화 억제 활성 평가**

[0052] 전지방세포인 3T3-L1 세포를 6-웰 플레이트에 각 웰 당 2x105개씩 분주하고 1% 페니실린-스트렙토마이신(penicillin-streptomycin), 10% 우아혈청(BCS, bovine calf serum)이 첨가된 DMEM 배지를 사용하여 37℃, 5% CO2 배양기에서 컨플루언트(confluent)한 상태로 자랄 때까지 배양시켰다. 배양된 3T3-L1 세포를 1% 페니실린-스트렙토마이신(penicillin-streptomycin), 10% 우태혈청(FBS, fetal bovine serum)이 포함된 DMEM 배지에 MDI [0.5 mM 이소부틸-메틸잔틴 (isobutyl- methylxanthine), 0.25 uM 덱사메타손(dexamethason) 및 10 ㎍/ml 인슐린(insulin)]을 첨가한 배양액으로 이틀간 배양하여 분화된 지방세포(differentiation adipocyte)로 만든 후, 10 ㎍/ml 인슐린을 포함하는 DMEM 배양액에서 이틀 간격으로 2번 더 배양시키면서 성숙한 지방세포(mature adipocyte) 분화 및 완전히 분화된 지방세포(fully differentiated adipocyte)를 형성시켰다. 발효 흰목이버섯 추출물 시료 또는 발효하지 않은 흰목이버섯 추출물 시료는 MDI 및 Insulin 처리 시 각각 0.25, 0.5, 1 mg/mℓ의 농도로 처리하였다.

[0053] 분화가 완료되면 배양액을 제거하고 분화된 지방세포에 생성된 지방구를 염색하였다. 이를 위해 분화 완료된 세포를 PBS(phosphate buffered saline)로 2회 세척한 후, 10% 완충 중성 포르말린(buffered neutral formalin)으로 세포를 4℃ 에서 1시간 동안 고정시켰다. 고정된 세포를 PBS로 2회 세척한 후, 지방을 특이적으로 붉게 염색 시키는 오일-레드-오(Oil-red-O) 염색제 0.5 mL를 6-웰 플레이트에 가하여 호일로 감싸 빛을 차단시킨 상태의 실온에서 30분 동안 반응시켜 지방구를 염색하고 60% isopropyl alcohol 로 2회 세척하였다. 도 4는 오일-레드-오에 의해 염색된 세포내 지방구를 보여주는 현미경 사진이다. 도 4에서 'Normal'은 미분화 지방세포, MDI는 분화된 지방세포에 대해 시료를 첨가하지 않은 실험 결과이다.

[0054] 분화된 3T3-L1 세포에 형성된 염색된 지방구의 양을 정량적으로 측정하기 위해, 염색된 지방구를 0.3 mL의 이소프로필알코올(isopropyl alcohol)에 녹인 후 500 nm 에서 O.D 값을 측정하여 분석하였다. 도 5는 정량분석 결과를 분석한 결과 그래프이다.

[0055] 도 4와 도 5의 결과로부터 발효 흰목이버섯 추출물은 발효되지 않은 흰목이버섯의 추출물보다 지방세포분화 억제활성이 더욱 우수함을 확인할 수 있었다.

[0057] **2) 발효 흰목이버섯 추출물의 시험관 내 지방분화유도 단백질에 대한 활성 평가**

[0058] 지방분화유도 단백질에 대한 발효 흰목이버섯 추출물의 활성을 확인하기 위하여, 상기 1)에 기재된 것과 동일한 방법에 의해 분화가 완료된 지방세포로부터 배양액을 제거하고 cold PBS로 세척하여 분화된 지방세포를 수거하였다. 수거한 세포에 protease inhibitor cocktail(Roche, Basel, Swizerland)과 phosphatase inhibitor cocktail(Roche)을 첨가한 RIPA buffer(150mM Sodium chloride, 1% Triton X-100, 1% sodium deoxycholate, 0.1% SDS, 50mM Tris-HCl, pH 7.5, and 2mM EDTA.) (Bioseang, Seongnam-si, Korea)를 넣고 5분 간격으로 voltex하여 얼음에 30분 간 방치하였다. 그 후 12,000 rpm, 4℃ 에서 30분 동안 원심분리하고 상등액을 취하여 SMARTTM bicinchoninic assay (BCA) protein assay kit(iNtRON Biotechnology, Seongnam-si, Korea)를 사용하여 단백질 양을 정량 하였다. 정량한 각 단백질 lysate 100 ug을 취하여 SDS loading buffer와 섞고 95℃ 에서 3분간 반응시킨 후, 얼음에 넣고 10분 간 방치하였다. 각 단백질은 10% sodium dodecyl sulfate (SDS)-polyacrylamide gel에 loading을 하고 80 V에서 30분, 120 V에서 1시간 30분 동안 전기영동을 통해 단백질을 분리시키고 PVDF (polyvinylidendifluoride) membrane (Amersham, Little Chalfont, UK)에 1 시간 동안 전이시킨 후, 5% skim milk를 처리하여 상온에서 1 시간 동안 반응시켜 비 특이적인 단백질을 blocking하였다. 이후 각각의 1차 항체를 4℃에서 12시간 이상 반응시키고 PBS-T로 세척한 후, 1차 항체에 따른 2차 항체를 처리하여 상온에서 2시간 동안 반응시켰다. 반응이 완료되면 Enhanced Chemiluminoesence (ECL) solution을 처리하고, Chemidoc을 이용하여 특정 단백질의 발현 양을 분석하였다.

[0059] 도 6은 그 결과를 보여주는 전기영동 사진으로 발효 흰목이버섯 추출물은 p-AMPK, p-Akt 활성을 농도 의존적으

로 증진시키고, p-JNK는 농도 의존적으로 감소 시켰다. 이는 발효 흰목이버섯 조성물의 항비만 효능이 우수함을 의미한다.

[0061] **3) 발효 흰목이버섯 추출물의 동물실험에서의 항비만 활성 평가**

[0062] (1) 실험동물의 준비

[0063] 5주령의 C57BL/6N종 수컷 mice를 ㈜오리엔트바이오에서 구입하여 7일간 순화시킨 뒤 실험에 사용하였다. 실험동물은 온도 23±3℃, 상대습도 55±15% 및 12시간 명암주기로 조절되는 환경에서 사육하였으며, 실험동물은 케이지당 1마리로 배치하여 사육하였다. 물과 식이는 자유롭게 섭취하도록 하였다

[0064] 비만의 유발을 위하여 두열바이오텍사(DooYeol Biotech, Seoul, Korea)에서 구매한 고지방 식이사료(HFD, 45% AIN-76 diet 45% fat calorie)를 8주간 섭취시켰다. 정상군에는 표준식이(ND, AIN-76 diet 10% fat calorie)를 섭취시켰다.

[0065] 고지방식이(HFD)군을 표준식이(ND)군에 비교하여 체중 30% 이상, 공복혈당이 126 mg/dL 이상인 mice 만을 선별하여 하기 실험에 사용하였다.

[0067] (2) 실험군의 배정

[0068] 실험군은 C57BL/6N mice 각 군당 8마리씩 정상군(ND), 대조군(HFD), 5.0% 비교군(5% TF), 2.5% 시험군(2.5% FTF), 5.0% 시험군(5.0% FTF), 제1양성대조군(1% PG) 및 제2양성대조군(1% PM)으로 나누었다. 정상군의 실험동물은 (1)에서 표준식이를 급이한 mice를 대상으로 하였으며, 나머지 실험군들은 (1)에서 고지방 식이사료를 급이한 mice를 평균 체중 및 공복혈당값이 균등하도록 군분리하였다.

[0069] 정상군(ND)과 대조군(HFD)은 각각 표준식이사료와 고지방식이사료를, 나머지 시험군에는 고지방식이사료에 유용물질을 혼합하여 8주간 급이하였다. 구체적으로, 시험군에는 실시예 3에서 제조한 발효 흰목이버섯 추출물을 사료에 중량비로 2.5%(2.5% FTF)) 또는 5.0%(5% FTF) 혼합하여 급이하였으며, 비교군에는 발효하지 않은 흰목이버섯 추출물 5.0% 중량비로 혼합하여 급이하였다. 제1양성대조군에는 1% 중량비의 가르시니아 추출물(PG)을, 제2양성대조군에는 1% 중량비의 상백피 에탄올 추출물을 첨가하여 급이하였다. 가르시니아 추출물과 상백피 추출물은 ㈜이에스기술연구소로부터 구매하였다. 발효 흰목이버섯 추출물이 첨가된 사료의 농도 설정은 14일 반복예비독성시험을 수행하여 최대내성용량(MTD, Maxiumum Tolerated Dose)을 구하여 독성이 나타나지 않는 농도를 최고농도로 설정하였다. 모든 동물 실험 과정은 안동대학교 동물실험윤리 위원회의 승인을 받았다(No. 2018-3-0501-01-01).

[0071] (3) 체중, 식이 섭취량, 식이섭취효율 측정

[0072] 체중은 실험시작일에 최초로 측정한 다음 매주 1회 실험 종료일까지 8주에 걸쳐 측정하였고 식이 섭취량은 투여기간 동안 매주 1회 측정하였다. 식이섭취량은 이전 사료 공급량에서 잔량을 감하여 계산하였으며 식이섭취효율은 실험 전 기간 동안 체중증가량을 같은 기간 동안에 섭취한 식이 섭취량으로 나누어 계산하여 표 1에 나타냈다.

[0073] 실험 전 ND를 제외한 모든 mice의 평균 체중은 약 40g으로 실험군 사이에 유의한 차이가 없었다. 그러나, 실험식이 급여 8주 후 5% TF, 2.5% FTF, 5% FTF는 HFD에 비해 각각 5.3%, 8.3%, 9.2% 평균 체중이 감소되어 모든 군에서 HFD에 비해 유의적으로 낮아졌고($p<0.01$), 그 중 5% FTF가 가장 큰 감소를 보였다. 이에 비해, 양성대조군인 PG, PM은 각각 12.8%, 13.2% 체중이 감소되었다($p<0.01$). 식이섭취량은 ND와 HFD는 유의한 차이가 없으며, HFD와 실험군의 식이 섭취량을 비교했을 때도 모든 군에서 유의한 차이가 없었다. HFD와 실험군의 식이섭취효율 비교 시 모든 실험군에서 HFD보다 낮아졌고 2.5% FTF, 5% FTF, PG, PM군에서 유의적으로 낮은 결과를 보였다($p<0.05$, $p<0.01$).

[0074] 이는 흰목이버섯이 체중감소와 식이섭취효율의 감소에 효과적인 것을 의미하며, 발효한 흰목이버섯이 발효하지 않은 흰목이 버섯보다 체중감소 및 식이섭취효율에 더 효과적으로 항비만 효과가 현저함을 나타낸다.

표 1

[0075]

	초기체중 (g)	최종체중 (g)	식이섭취량 (g/8주)	식이섭취량 (g/일)	식이섭취효율 (%)
ND	31.29±2.47	33.13±2.51	177.01±6.33	3.16±0.11	1.04±0.75
HFD	40.86±2.46	47.43±1.43	171.11±11.00	3.06±0.20	3.79±1.04
5.0% NRM	40.18±2.14	44.91±1.07**	165.86±8.10	2.96±0.14	2.87±1.11
2.5% FRM	40.60±2.01	43.48±2.21**	172.38±13.74	3.08±0.25	2.56±1.15*
5.0% FRM	40.98±1.62	43.08±2.22**	173.00±9.38	3.09±0.17	1.99±0.88**
PG	42.23±2.74	41.34±1.62**	173.03±13.95	3.09±0.25	0.60±1.62**
PM	39.99±4.48	41.19±3.48**	174.11±22.77	3.11±0.41	0.60±0.92**

[0077] (4) 부고환 지방조직 및 간 무게 측정

[0078] 실험 식이의 종류에 따른 간과 부고환 지방의 무게를 측정하고 그 결과를 도 7에 도시하였다. 실험 식이의 경우 간의 무게는 5% TF, 2.5% FTF, PG는 HFD와 유의한 차이가 없었으나, 5% FTF와 PM은 HFD에 비하여 각각 19.5%, 28.1% 감소하며 유의하게 낮았다($p<0.01$). 부고환지방의 무게는 HFD에 비하여 5% TF, 2.5% FTF, 5% FTF, PG, PM은 각각 22.4%, 29.4%, 30.6%, 27.4%, 12.0% 감소하며 모든 군에서 유의하게 낮았다($p<0.05$, $p<0.01$).

[0079] 본 실시예에서도 간 무게 측정 시 발효한 5% FTF에서는 HFD에 비해 유의하게 낮아졌으며($p<0.01$), 부고환지방 무게 또한 모든군에서 유의적으로 감소함($p<0.01$)은 물론 발효한 5% FTF에서 부고환지방 무게가 가장 적게 측정되는 것으로 보아 발효 흰목이버섯의 추출물은 간의 지방 무게를 크게 감소하는 효과가 있는 것을 확인하였다.

[0081] **실시예 8 : 발효 흰목이버섯을 이용한 불고기 소스**

[0082] 1) 발효 흰목이버섯을 이용한 불고기 소스의 제조

[0083] 상기 실시예 3에서 제조한 발효 흰목이버섯 추출물 분말과 간장 및 식품첨가제, 주정 및 청주를 표 2의 배합 중량비로 혼합하여 90℃에서 20~60분간 가열 처리 후 급속 냉각시켜 불고기 소스를 제조하였다.

표 2

[0084]

재 료	소스 100 중량부 중
삼화맛간장	23.45
저당	10.00
고과당	14.00
배퓨레	6.00
사과퓨레	6.00
파앤애플농축액	0.50
마늘쵸핑	3.90
생강즙	0.38
MF00	0.80
백설탕	18.50
정제염	1.95
발효흰목이버섯 분말	0.50
후추	0.35
잔탄검	0.05
구아검	0.04
바이오핵산IG	0.06
청주	0.30
주정	1.90

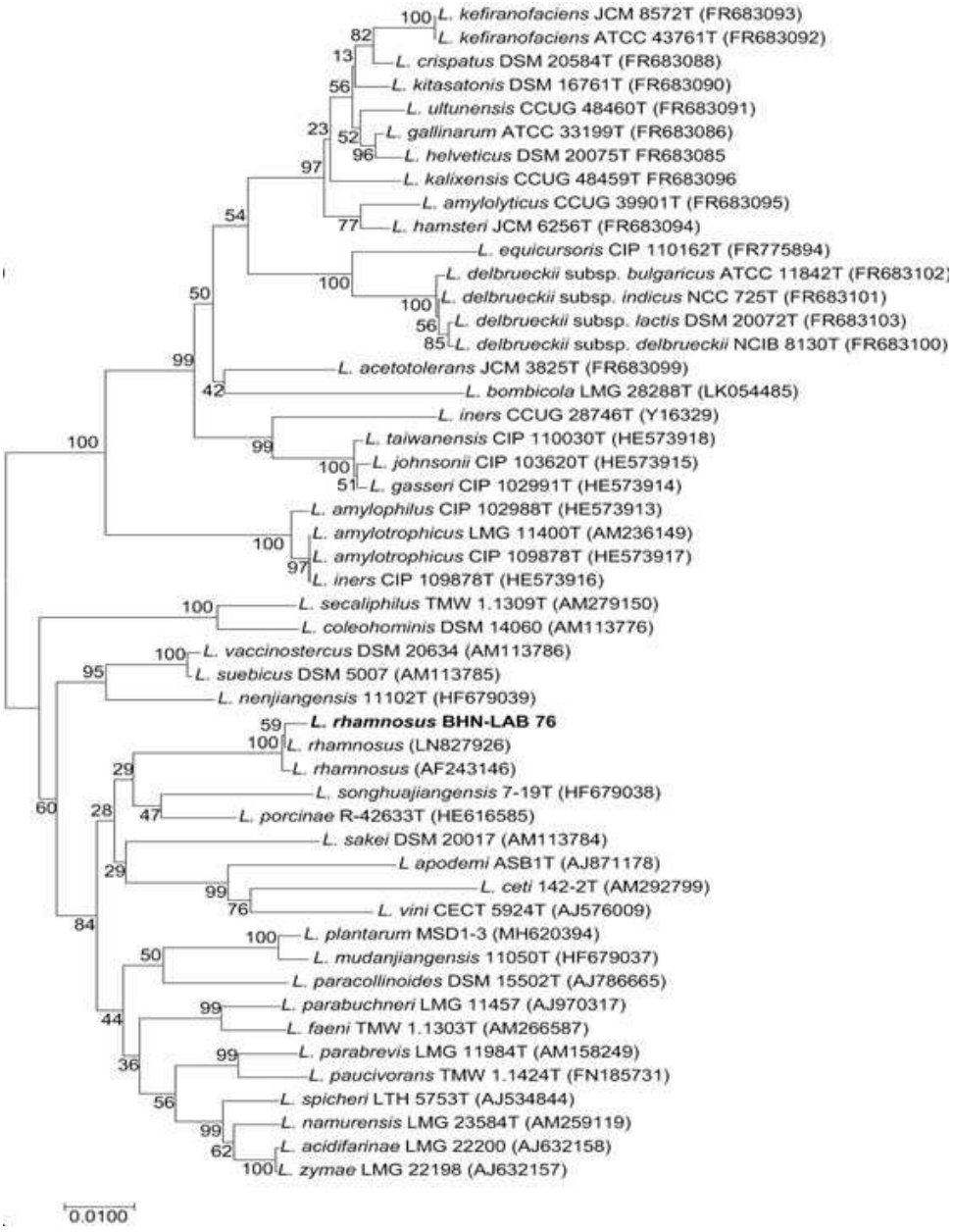
정제수	11.32

[0086] 2) 발효 흰목이버섯을 이용한 불고기 소스의 관능평가

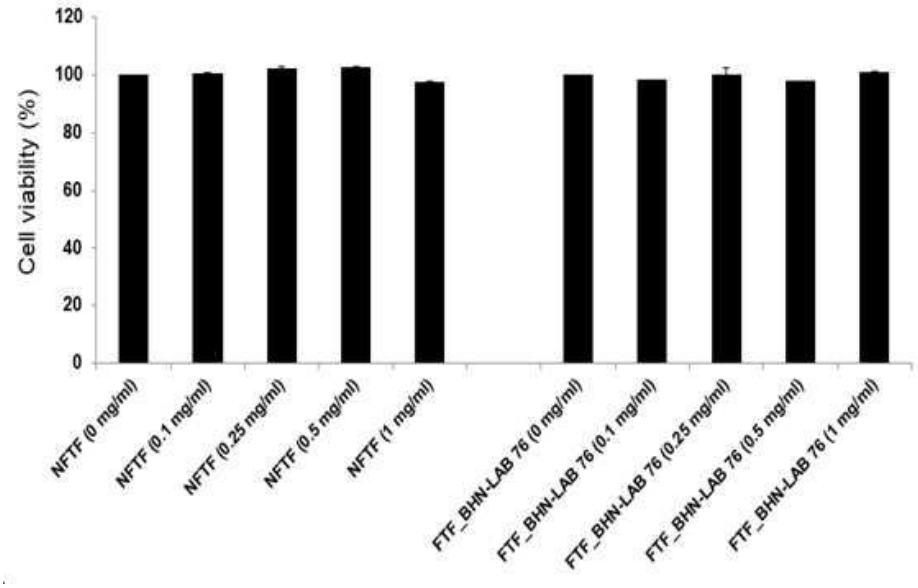
[0087] 불고기용 소고기 200g에 1)에서 제조한 발효 흰목이버섯 불고기 소스 40 ㎖를 혼합하여 후라이팬에 익힌 후, 총 9명(20대 1명, 30대 6명, 50대 2명)을 대상으로 관능평가를 수행하였다. 비교 제품은 C사의 불고기 양념소스를 사용하였다. 관능평가는 5점 평점법으로 감칠맛, 짠맛, 단맛, 향, 색, 식감, 외형 및 기호도를 평가하였다. 그 결과 비교 제품에 비해 발효 흰목이버섯 조성물을 포함한 불고기소스가 전반적인 기호가 높았으며, C사 소스보다 더 담백하고 짠맛이 적으며 소고기의 잡냄새가 적다고 평가되었다.

도면

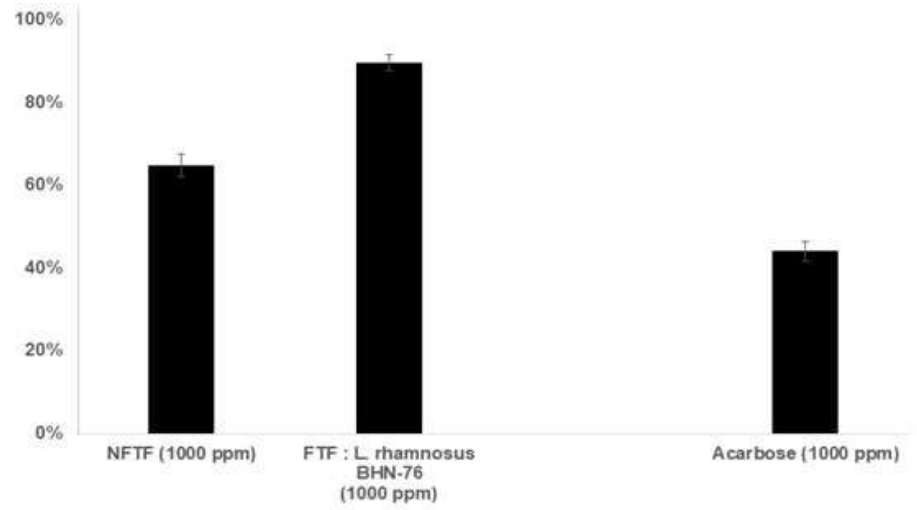
도면1



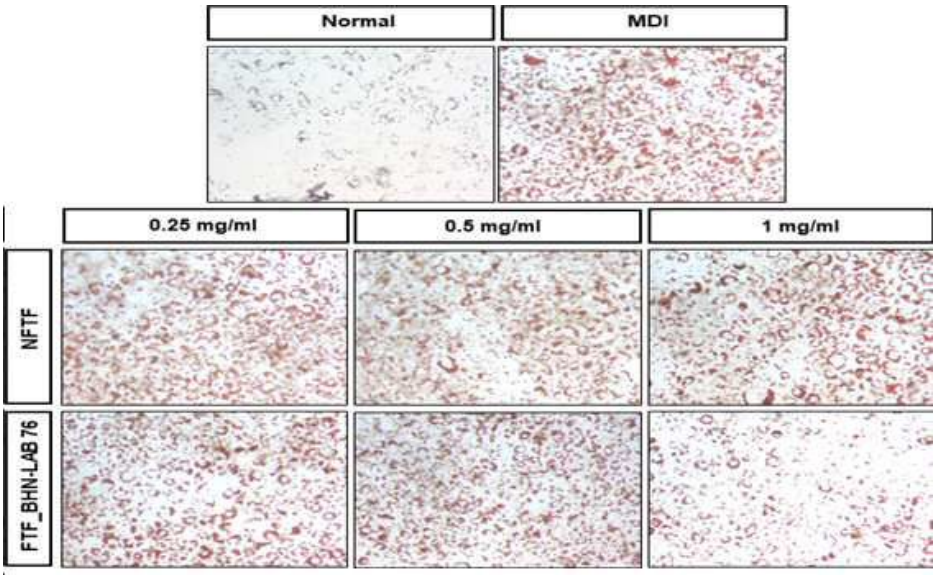
도면2


Cell viability (%)
120
100
80
60
40
20
0
NFTF (0 mg/ml)
NFTF (0.1 mg/ml)
NFTF (0.25 mg/ml)
NFTF (0.5 mg/ml)
NFTF (1 mg/ml)
FTF_BHN-LAB 76 (0 mg/ml)
FTF_BHN-LAB 76 (0.1 mg/ml)
FTF_BHN-LAB 76 (0.25 mg/ml)
FTF_BHN-LAB 76 (0.5 mg/ml)
FTF_BHN-LAB 76 (1 mg/ml)

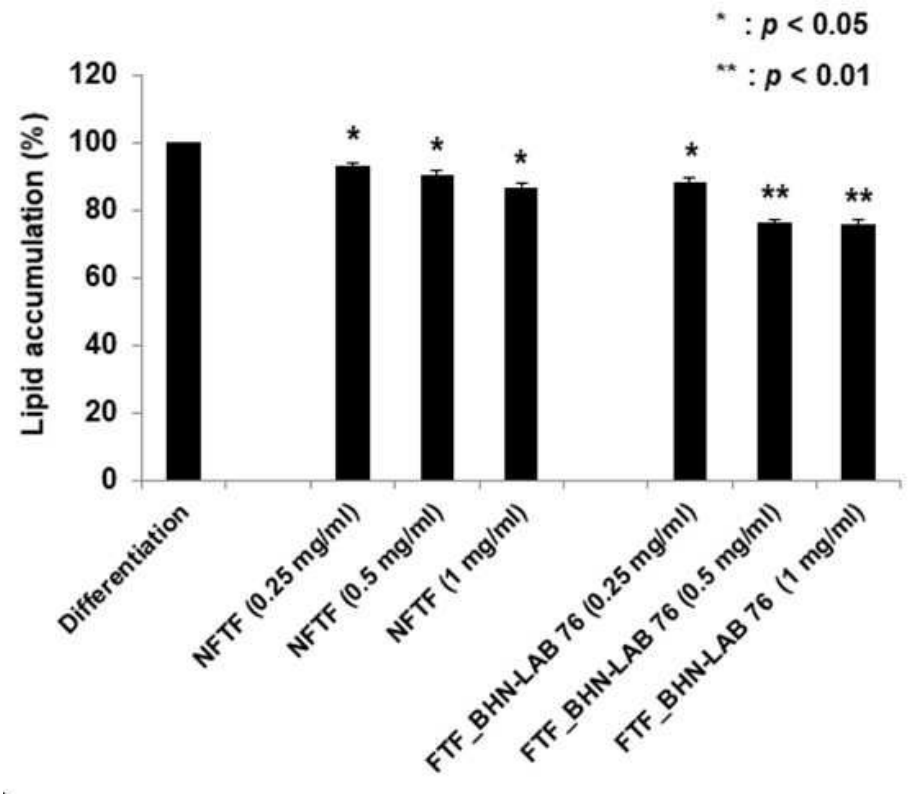
도면3


100%
80%
60%
40%
20%
0%
NFTF (1000 ppm)
FTF : L. rhamnosus BHN-76 (1000 ppm)
Acarbose (1000 ppm)

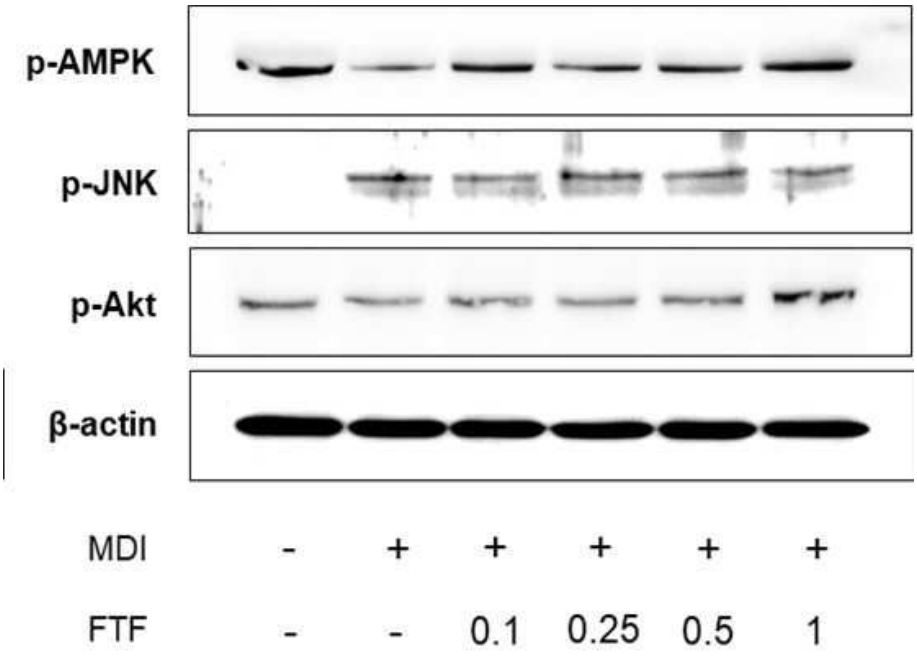
도면4


Normal
MDI
0.25 mg/ml
0.5 mg/ml
1 mg/ml
NFTF
FTF_BHN-LAB 76

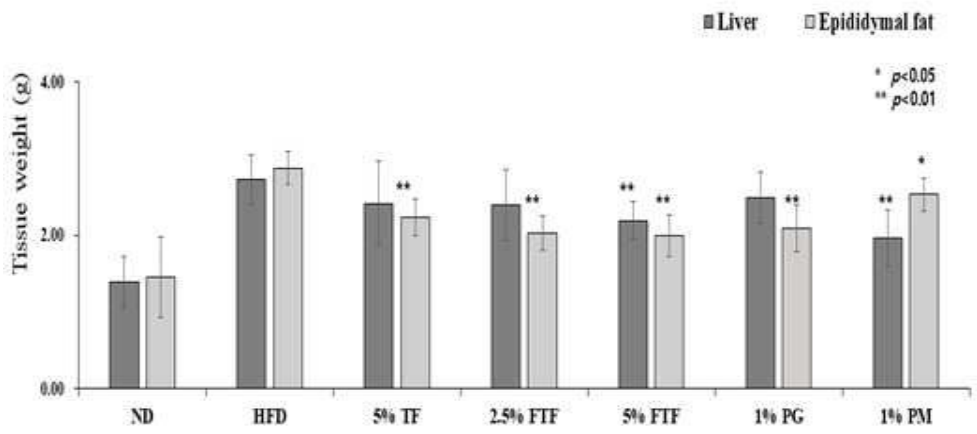
도면5


* : p < 0.05
** : p < 0.01
Lipid accumulation (%)
120
100
80
60
40
20
0
Differentiation
NFTF (0.25 mg/ml)
NFTF (0.5 mg/ml)
NFTF (1 mg/ml)
FTF_BHN-LAB 76 (0.25 mg/ml)
FTF_BHN-LAB 76 (0.5 mg/ml)
FTF_BHN-LAB 76 (1 mg/ml)

도면6



도면7



서 열 목 록

<110> BHNBIO CO.,LTD

<120> Composition for Prophylaxis and Treatment of Osteoporosis, Diabetes and Obesity Comprising Fermented Tremella fuciformis Berk.

<130> P-7586

<160> 1

<170> KopatentIn 2.0

<210> 1

<211> 1565

<212> RNA

<213> Tremella fuciformis

<400> 1

agagtttgat catggctcag gatgaacgct ggcggcgtgc ctaatacatg caagtcgaac 60

gagttctgat tattgaaagg tgcttgcatc ttgatttaat tttgaacgag tggcggacgg 120

gtgagtaaca cgtgggtaac ctgcccttaa gtgggggata acatttggaa acagatgcta 180

ataccgcata aatccaagaa ccgcatggtt cttggctgaa agatggcgta agctatcgct 240

tttggatgga cccgcggcgt attagctagt tggtgaggta acggctcacc aaggcaatga 300

tacgtagccg aactgagagg ttgatcggcc acattgggac tgagacacgg cccaaactcc 360

tacgggaggc agcagtaggg aatcttccac aatggacgca agtctgatgg agcaacgccg 420

cgtgagtgaa gaaggctttc gggtcgtaaa actctgttgt tggagaagaa tggtcggcag 480

agtaactgtt gtcggcgtga cggtatccaa ccagaaagcc acggctaact acgtgccagc 540

agccgcggta atacgtaggt ggcaagcgtt atccggattt attgggcgta aagcgagcgc 600

aggcggtttt ttaagtctga tgtgaaagcc ctcggcttaa ccgaggaagt gcatcggaag 660

ctggaaaact tgagtgcaga agaggacagt ggaactccat gtgtagcggt gaaatgcgta 720

gatatatgga agaacaccag tggcgaacgc ggctgtctgg tctgtaactg acgctgaggc 780

tcgaaagcat gggtagcgaa caggattaga taccctggta gtccatgccg taaacgatga 840

atgctaggtg ttggagggtt tccgcccttc agtgccgcag ctaacgcatt aagcattccg 900

cctggggagt acgaccgcaa ggttgaaact caaaggaatt gacggggcc cgcacaagcg 960

gtggagcatg tggtttaatt cgaagcaacg cgaagaacct taccaggtct tgacatcttt 1020

tgatcacctg agagatcagg tttcccctcc gggggcaaaa tgacaggtgg tgcatggttg 1080

tcgtcagctc gtgtcgtgag atgttgggtt aagtcccgca acgagcgcaa cccttatgac 1140

tagttgccag catttagttg ggcactctag taagactgcc ggtgacaaac cggaggaagg 1200

tggggatgac gtcaaatcat catgcccctt atgacctggg ctacacacgt gctacaatgg 1260

atggtacaac gagttgcgag accgcgaggt caagctaatc tcttaaagcc attctcagtt 1320

cggactgtag gctgcaactc gcctacacga agtcggaatc gctagtaatc gcggatcagc 1380

acgccgcggt gaatacgttc ccgggccttg tacacaccgc ccgtcacacc atgagagttt 1440

gtaacacccg aagccggtgg cgtaaccctt ttagggagcg agccgtctaa ggtgggacaa 1500

atgattaggg tgaagtcgta acaaggtagc cgtaggagaa cctgcggctg gatcacctcc 1560

tttct 1565