(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2023-0126468
(43) 공개일자 2023년08월30일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A23L 33/105 (2016.01) *A23L 31/00* (2016.01)
A23P 10/20 (2016.01) *A23P 10/30* (2016.01)
(52) CPC특허분류
A23L 33/105 (2016.08)
A23L 31/00 (2020.05)
(21) 출원번호 10-2022-0023673
(22) 출원일자 2022년02월23일
심사청구일자 2022년02월23일

(71) 출원인
건양대학교산학협력단
충청남도 논산시 대학로 121 (내동)
(72) 발명자
조영호
세종특별자치시 마음안1로 139, 1801동 1503호 (고운동, 가락마을18단지)
이계원
대전광역시 서구 둔산북로 215, 15동 1106호(둔산동, 가람아파트)
안소희
경기도 시흥시 시흥대로 1119-3, 103동 803호 (신천동, 경남아너스빌아파트)
(74) 대리인
강성혜

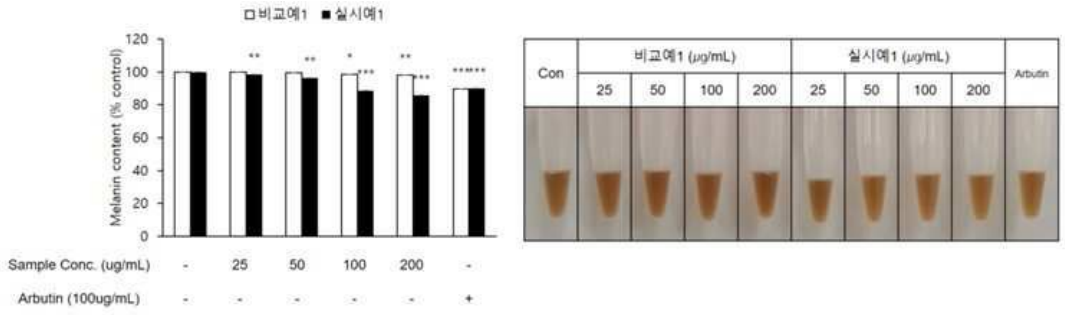
전체 청구항 수 : 총 8 항

(54) 발명의 명칭 **나한과 추출물 생물전환물을 유효성분으로 함유하는 이너뷰티용 식품 조성물**

(57) 요 약

본 발명은 찹쌀떡버섯(*Bovista plumbea*) 균사체에 의해 생물전환된 나한과추출물을 유효성분으로 함유하는 이너뷰티용 조성물에 관한 것으로, 더욱 구체적으로 나한과(*Siraitia grosvenorii*)로부터 추출물을 추출하는 단계; 상기 추출물에 찹쌀떡 균사체 또는 찹쌀떡버섯 균사체의 전 배양액을 혼합한 후, 본 배양하는 단계; 상기 본 배양 후 찹쌀떡버섯 균사체를 제거하는 단계;로부터 수득된 여과액을 유효성분으로 함유하는 것을 특징으로 하는 이너뷰티용 조성물에 관한 것으로, 자유라디칼 소거활성, 세포내 티로시나제 저해활성, 멜라닌 생성 억제 및 TRP-1, TRP-2 발현 억제에 의한 피부 미백효과를 나타낸다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류
A23P 10/20 (2016.08)
A23P 10/30 (2016.08)
A23V 2002/00 (2023.08)
A23V 2200/302 (2013.01)
A23V 2200/318 (2013.01)
A23V 2250/208 (2013.01)
A23V 2250/21 (2013.01)
A23V 2300/14 (2013.01)
A23V 2300/50 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711133086
과제번호	2017H1D8A1029990
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	현장맞춤형 이공계 인재양성 지원사업
연구과제명	의료공학 실전문제연구단
기 여 율	1/1
과제수행기관명	건양대학교 산학협력단
연구기간	2017.05.01 ~ 2022.02.28

명 세 서

청구범위

청구항 1

나한과 (*Siraitia grosvenorii*)로부터 추출물을 추출하는 단계;

상기 나한과 추출물에 찹쌀떡버섯 (*Bovista plumbea*) 균사체 또는 찹쌀떡버섯 균사체의 전 배양액을 혼합한 후, 본 배양하는 단계; 및

상기 본 배양 후, 본 배양액으로부터 찹쌀떡버섯 (*Bovista plumbea*) 균사체를 제거하여 여과액을 얻는 단계;로부터 수득된 나한과 추출물 생물전환물을 유효성분으로 함유하며,

상기 나한과 추출물 생물전환물은 모그로사이드 V (mogroside V) 함량이 700 ㎍/㎖ 이하이고, 모그롤 (mogrol) 함량이 800 ㎍/㎖ 이상임을 특징으로 하는 이너뷰티용 식품 조성물.

청구항 2

청구항 1에 있어서,

상기 이너뷰티용 식품 조성물은 건강기능식품 조성물임을 특징으로 하는 이너뷰티용 식품 조성물.

청구항 3

청구항 1에 있어서,

상기 나한과 추출물 생물전환물의 함량이 이너뷰티용 식품 조성물 전체에 대해 0.001~30.0중량%인 것을 특징으로 하는 이너뷰티용 식품 조성물.

청구항 4

청구항 1항에 있어서,

상기 추출 단계에서 추출용매로 주정 알코올이 40~95%(v/v) 함유된 수용액을 사용하는 것을 특징으로 하는 이너뷰티용 식품 조성물.

청구항 5

청구항 1에 있어서,

상기 추출물은 추출 후 감압농축 또는 동결건조된 것을 특징으로 하는 이너뷰티용 식품 조성물.

청구항 6

청구항 5에 있어서,

상기 감압농축 또는 동결건조된 추출물은 정제수 및 주정 알코올 중 선택되는 어느 하나 이상의 용매에 0.001~30.0중량%로 용해된 것을 특징으로 하는 이너뷰티용 식품 조성물.

청구항 7

청구항 1에 있어서,

상기 본 배양단계는 배양액의 pH를 5.0~7.0으로 조정하고, 참쌀떡버섯 (*Bovista plumbea*) 균사체를 4~6%(v/v) 되도록 접종한 후, 온도 22~32℃, 회전수 120~180rpm, 통기량 1.2~1.8vm 조건에서 5~10일간 배양하는 것을 특징으로 하는 이너뷰티용 식품 조성물.

청구항 8

청구항 1에 있어서,

상기 이너뷰티용 식품 조성물은 정제, 경질 또는 연질 캅셀제, 액제, 현탁제, 구강 점막용 필름, 과립, 분말 중에서 선택되는 것을 특징으로 하는 이너뷰티용 식품 조성물.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 나한과(*Siraitia grosvenorii*) 추출물의 생물전환물을 함유하여 피부 미백효과 및 항산화 효과를 나타내는 이너뷰티용 조성물에 관한 것으로, 상세하게는 나한과 추출물을 참쌀떡버섯(*Bovista plumbea*) 균사체로 생물전환시켜 수득한 여과액을 유효성분으로 함유하는 이너뷰티용 식품 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 이너뷰티(inner beauty)는 화장품과 식품의 중간 형태로 내면의 아름다움을 의미하며, 기존의 바르는 화장품처럼 인위적인 방법으로 피부 표면만을 일시적으로 좋게 만드는 것이 아니라 생활습관과 식습관 개선을 통해 근본적인 피부 문제를 해결하는 "먹는 화장품"을 의미한다. 기존의 이너뷰티는 건강기능식품 중 하나로 인식되었으나 최근 고령화에 따른 미용에 대한 사람들의 관심이 커지면서 천연재료의 미용효과를 강조한 다양한 이너뷰티 제품 시장이 확대되고 있다.

[0003] 한편, 이너뷰티와 관련된 선행기술로서, 한국 공개특허 제10-2020-0098287호에 '천연추출물복합물을 유효성분으로 함유하는 이너뷰티용 조성물'이 개시되어 있다. 상기 기술은, 미선나무, 블랙베리, 들깨잎추출물로 구성된 천연추출복합물을 유효성분으로 하는 이너뷰티 조성물에 관한 것으로, 건강한 피부를 유지하기 위해 다양한 섭취 가능한 형태로 이루어진 것이 특징이다.

[0004] 그러나 본 발명은 상기 공개 특허와는 별개의 생약 소재에 대하여 생물전환 기술을 적용하여 장내 흡수율이 증진된 소재이며, 상기 기술은 피부 주름개선, 미백효과, 항산화 및 항염증 효과가 구체적으로 어떠한 기전에 의하여 발휘되는지 상세히 나타나 있지 않아 기능성에 대한 규명이 미진한 실정이다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 따라서, 본 발명은 기능성이 우수한 생약 소재를 선정하고, 선정된 생약 추출물을 우수한 효율로 생물전환하여 장내 흡수율이 우수하고, 피부 미백효과 및 항산화 효과가 우수한 이너뷰티용 식품 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

[0008] 이에 본 발명자들은 천연에서 자생하는 식물 중에서 피부 미백효과 및 항산화 효과를 가진 성분을 탐색하던 중 자유라디칼 소거활성과 멜라닌 생성 억제작용이 우수한 나한과를 선정하였고, 나한과 추출물의 미백효능과 체내 흡수율을 더욱 증대시킬 수 있는 방법에 대하여 연구한 결과, 나한과 추출물을 참쌀떡버섯 (*Bovista plumbea*)

균사체로 생물전환시킨 나한과 추출물 생물전환물이 나한과 추출물에 비하여 기능성이 뛰어남을 확인하고 본 발명을 완성하게 되었다.

[0009] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명자들은 나한과로부터 추출물을 추출하는 단계; 상기 추출물에 찹쌀떡 균사체 또는 찹쌀떡 균사체의 전 배양액을 혼합한 후, 본 배양하는 단계; 상기 본 배양 후 찹쌀떡 균사체를 제거하는 단계;로부터 수득된 여과액을 유효성분으로 함유하는 것을 특징으로 하는 이너뷰티용 식품 조성물을 제공한다.

[0010] 이하 본 발명의 나한과 추출물 생물전환물을 유효성분으로 함유하는 이너뷰티용 식품 조성물에 대해 자세히 설명하고자 한다.

[0011] 나한과를 용매로 단순 추출한 추출물의 경우 생체 외에서는 유효한 효능을 나타내지만, 이를 이너뷰티용 식품 조성물에 적용한 경우에는 장관 또는 점막을 통한 체내 흡수율이 낮아 실질적으로 그 효과가 만족스럽지 못한 문제점이 있다.

[0012] 한편, 본 발명자들은 상기 나한과 추출물에서 이너뷰티 효능을 나타내는 주요 성분이 플라보노이드임을 확인하였다. 식물에 풍부한 페놀성 화합물인 플라보노이드류, 탄닌, 테르터펜노이드 및 안토시아닌 등은 자외선으로 인해 손상된 피부를 보호할 수 있는 우수한 항산화 후보물질이다 (T. Shibamoto, *American Chem Soc*, 1994, 564:247-256).

[0013] 한편, 나한과 추출물에 존재하는 플라보노이드류 및 트리터펜노이드계는 대부분 당이 한 분자 이상 결합된 배당체 형태로 존재하게 되는데, 배당체는 분자량이 크고 체내 흡수율이 상대적으로 낮기 때문에 이를 배당체 형태보다 소화 흡수가 빠른 비배당체로 전환하는 생물학적 연구가 진행되고 있다.

[0014] 본 발명자는 장관이나 점막을 통하여 체내 흡수율이 용이하여 이너뷰티로서의 효과적인 역할을 하는 이너뷰티용 식품 조성물을 제공하기 위해 나한과 추출물에 대하여 찹쌀떡버섯 균사체로 생물전환 (bioconversion)을 실시한 결과, 나한과 추출물에 존재하는 배당체 형태의 모그로사이드 (mogrosides)가 나한과 추출물 생물전환물에서 소화 흡수가 빠른 비배당체 형태의 모그롤 (mogrol)로 전환되는 것을 본 실험에서 확인하였다.

[0015] 본 발명의 나한과 추출물 생물전환물은 나한과로부터 추출물을 추출하는 단계; 상기 추출물에 찹쌀떡버섯 균사체 또는 찹쌀떡버섯 균사체의 전 배양액을 혼합한 후 본 배양하는 단계; 상기 본 배양 후 찹쌀떡버섯 균사체를 제거하는 단계;로 부터 수득된 여과액을 유효성분으로 함유하는데, 상기 단계를 통해 수득된 여과액은 나한과로부터 추출한 나한과 추출물, 영지버섯 균사체와 배양하여 생물전환한 나한과 추출물 영지버섯 생물전환물보다 총 폴리페놀, 총 플라보노이드 함량, 비배당체 함량 및 α-글루코시데이즈 (α-glucosidase)의 활성이 증가한 것을 본 발명에서 확인하였다.

[0016] 본 발명의 나한과 추출물 생물전환물은 모그로사이드 V (mogroside V) 함량이 700 ㎍/㎖ 이하이고, 모그롤 (mogrol) 함량이 800 ㎍/㎖ 이상임을 특징으로 한다. 본 발명의 나한과 추출물 생물전환물은 α-글루코시데이즈 활성이 현저히 높은 찹쌀떡버섯 균사체를 이용하여 생물전환함으로써 모그로사이드 V가 대조군에 비하여 현저히 낮아지고, 생물전환에 의해 생성되는 모그롤 함량이 현저히 높아지는 특성을 나타낸다.

[0017] 또한, 본 발명의 나한과 추출물 생물전환물은 나한과 추출물의 감압 농축물 및 동결 건조물이 10.0중량% 함유된 나한과 추출물에 찹쌀떡버섯 균사체가 5%(v/v) 되도록 배양배지에 접종한 후 온도 20~30℃, pH 6.5~7.5의 조건으로 5~10일간 배양하였을 때 5일째 이후 측정한 α-글루코시데이즈 활성이 9 units/㎖ 이상인 것을 특징으로 한다. α-글루코시데이즈 활성이 9 units/㎖ 이상일 때 배당체의 비배당체로의 전환률이 높아지며, 미백, 항산화 효과가 현저히 높아진다.

[0018] 또한, 본 발명에서 유효성분으로 함유되는 나한과 추출물 생물전환물 여과액은 자유라디칼 소거효과, 티로시나제 관련 단백질 (tyrosinase related protein-1, -2; TRP-1, TRP-2)의 발현 억제를 통한 멜라닌 생성 억제 효과 등의 미백효과가 나한과 추출물이나 나한과 추출물 영지버섯 생물전환물과 비교하여 우수한 것을 특징으로 한다.

[0019] 또한, 본 발명은 나한과 추출물 생물전환물 여과액의 함량이 이너뷰티용 식품 조성물 전체에 대해 0.001~30.0 중량%인 것을 특징으로 하는 나한과 추출물 생물전환물을 함유하는 이너뷰티용 식품 조성물에 관한 것이다. 상기 나한과 추출물 생물전환물이 0.001중량% 미만으로 포함되는 경우에는 항산화 효과 및 미백효과가 거의 없으며, 30.0중량% 이상인 경우에는 함량 증가에 대한 효과 증대 정도가 미미하여 경제적이지 못하다.

[0020] 또한, 본 발명은 상기 추출시 추출용매로 주정 알코올이 40~95% (v/v) 함유된 수용액을 사용하는 것을 특징으로

하는 이너뷰티용 식품 조성물에 관한 것이다.

[0021] 또한, 본 발명은 상기 나한과 추출물 생물전환물이 여과 후 감압농축 또는 동결건조된 것을 특징으로 하는 이너뷰티용 식품 조성물에 관한 것이다.

[0022] 또한, 본 발명은 상기 감암농축 또는 동결건조된 생물전환물이 정제수, 주정 알코올 중 선택된 1종 이상의 용매에 0.001~30.0중량%로 용해된 것을 특징으로 하는 이너뷰티용 식품 조성물에 관한 것이다.

[0023] 또한, 본 발명은 상기 본 배양시 배양액의 pH를 5.0~7.0으로 조정하고, 참쌀떡버섯 균사체를 4.0~6.0%(v/v) 되도록 접종한 후, 온도 22~32℃, 회전수 120~180rpm, 통기량 1.2~1.8vm 조건에서 5~10일간 배양하는 것을 특징으로 하는 이너뷰티용 식품 조성물에 관한 것이다.

[0024] 본 발명에서 사용된 용어 "식품"이란 영양소를 한 가지 또는 그 이상 함유하고 있는 천연물 또는 가공품을 의미하며, 바람직하게는 어느 정도의 가공 공정을 거쳐 직접 먹을 수 있는 상태가 된 것을 의미하며, 통상적인 의미로서, 식품, 식품 첨가제, 기능성식품, 건강기능식품, 건강보조식품 및 음료 등을 모두 포함할 수 있다. 본 발명의 식품 조성물은 비제한적으로 각종 음료, 차, 과자, 비타민 복합체, 건강 보조식품 등의 형태로 제조될 수 있다. 본 발명의 식품 조성물의 바람직한 섭취량은 섭취하는 사람의 상태, 체중, 증상의 정도, 식품 형태, 섭취 기간에 따라 다르며, 적절하게 선택될 수 있다. 본 발명의 식품 조성물은 유효 성분이 1일 0.1mg/kg 내지 500mg/kg으로 섭취되도록 하는 것이 최적의 효과를 위해 바람직하다.

[0025] 또한, 본 발명의 나한과 추출물 생물전환물을 함유하는 이너뷰티용 식품 조성물은 부형제로서 비타민, 무기질, 락토오스, 덱스트로스, 전분, 수크로스 또는 이들의 혼합물을 더 포함할 수 있는 것을 특징으로 한다.

[0026] 또한, 본 발명의 이너뷰티용 식품 조성물은 정제, 경질 또는 연질 캅셀제, 액제, 현탁제, 구강 점막용 필름, 과립, 분말 중에서 선택된 어느 하나 이상의 제형으로도 조제할 수 있다.

발명의 효과

[0028] 본 발명의 나한과 추출물 생물전환물을 함유하는 이너뷰티용 식품 조성물은 자유라디칼 소거활성, 세포내 티로시나제 저해활성, 멜라닌 생성 억제 및 TRP-1, TRP-2 발현 억제에 의한 피부 미백효과를 나타낸다. 일반 나한과 추출물과 비교하여 본 발명의 나한과 추출물 생물전환물은 미백 효과 및 항산화 효과가 현저히 높아졌으며, 특히 항산화 활성이 2배 이상 높아졌다.

[0029] 또한, 본 발명의 나한과 추출물 생물전환물을 함유하는 이너뷰티용 식품 조성물은 높은 α-글루코시데이즈 활성을 나타내어 흡수가 어려운 배당체를 비배당체로 전환할 수 있으며, 실제로 생물전환되지 않은 나한과 추출물과 비교하여 배당체인 모그로사이드 V (mogroside V) 함량이 700 ㎍/㎖ 이하로 현저히 낮아지고, 생물전환된 비배당체인 모그롤 (mogrol) 함량이 800 ㎍/㎖ 이상으로 현저히 높아졌다.

도면의 간단한 설명

[0031] 도 1은 나한과 추출물 생물전환물을 유효성분으로 함유하는 이너뷰티용 조성물의 멜라닌 생성 억제효과를 나타낸 그래프이다.

도 2는 나한과 추출물 생물전환물을 유효성분으로 함유하는 이너뷰티용 조성물의 세포내 티로시나제 저해활성을 나타낸 그래프이다.

도 3은 나한과 추출물 생물전환물을 유효성분으로 함유하는 이너뷰티용 조성물의 멜라닌 생성에 관여하는 단백질 발현 억제효과를 나타낸 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0032] 이하, 실시예를 통해 본 발명을 좀 더 구체적으로 설명한다. 단, 이들 실시예는 본 발명의 예시적인 기재일 뿐이며, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 국한되는 것은 아니다.

[0034] **비교예 1: 나한과 추출물 제조**

[0035] 세절하여 음건한 나한과 500g을 뜨거운 70%(V/V) 주정 알코올 수용액으로 2시간씩 3회 환류추출하고 냉침한 후, 와트만(Whatman) #5 여과지로 여과하였다. 여과된 추출물을 50℃ 이하에서 감압농축 및 동결건조한 후 148.15 g의 주정 알코올 추출물을 얻었다. 감압 농축물 및 동결 건조물이 10.0중량% 함유되게 정제수, 주정 에탄올 중에서 선택된 1종 이상의 용매를 사용하여 나한과 추출물을 제조하였다.

[0037] **실시예 1: 나한과 추출물 생물전환물 제조**

[0038] 참쌀떡버섯 균사체를 포테이토덱스트로즈 한천배지가 든 시험관에 사면배양하여 4℃에 보관하고 1개월마다 계대배양하여 사용하였다. 상기 사면배지에서 계대배양된 균사체를 무균적으로 균질화하여, 비교예 1에서 수득한 나한과 추출물과 효모-맥아즙이 혼합된 배지에 참쌀떡버섯 균사체가 5%(v/v) 되도록 접종한 후 발효조 내에서 온도 25℃, 회전수 150 rpm, 통기량 1.5 vm, pH 7.0의 조건으로 7일간 배양하였다. 배양 후 배양액으로부터 참쌀떡버섯 균사체를 제거한 다음 나한과 추출물 생물전환물을 수득하였다.

[0040] **비교예 2: 나한과 추출물 영지버섯 생물전환물 제조**

[0041] 영지버섯 균사체를 포테이토덱스트로즈 한천배지가 든 시험관에 사면배양하여 4℃에 보관하고 1개월마다 계대배양하여 사용하였다. 상기 사면배지에서 계대배양된 균사체를 무균적으로 균질화하여, 비교예 1에서 수득한 나한과 추출물과 효모-맥아즙이 혼합된 배지에 영지버섯 균사체가 5%(v/v) 되도록 접종한 후 발효조 내에서 온도 25℃, 회전수 150 rpm, 통기량 1.5 vm, pH 7.0의 조건으로 7일간 배양하였다. 배양 후 배양액으로부터 영지버섯 균사체를 제거한 다음 나한과 추출물 영지버섯 생물전환물을 수득하였다.

[0043] **실험예 1: 나한과 추출물 생물전환물에 함유된 유효성분 및 함량변화 측정**

[0044] 본 실험예 1에서는 상기 비교예 1 내지 2에서 제조된 나한과 추출물, 나한과 추출물 영지버섯 생물전환물과 실시예 1에서 제조된 나한과 추출물 생물전환물의 주요 성분 중 총 페놀, 총 플라보노이드, 배당체 (glycoside) 및 비배당체 (aglycone)의 함량을 비교하였다.

[0045] 또한, 생물전환기술에서 가장 중요한 핵심은 미생물이 분비하는 효소의 활성인데, 이 효소의 활성은 사용되는 기질인 생약 추출물에 따라 균사체가 분비하는 효소의 활성이 달라진다는 점이다. 본 발명에서는 생물전환에 사용할 최적의 균사체를 선별하기 위하여 배당체를 비배당체로 전환시키는 효소인 α-글루코시데이즈의 활성을 측정하여 균사체를 선별하였다.

[0047] **(1) 총 페놀 함량 측정**

[0048] 실시예 1과 비교예 1 내지 2의 시료에 95% 에탄올과 증류수를 첨가하고 1 N Folin-Ciocalteu's reagent를 넣어 5분간 방치한 후, 10% Na_2CO_3를 가해 725 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이때 폴리페놀 함량은 탄닌산 표준곡선을 이용하여 구하였다.

[0050] **(2) 총 플라보노이드 함량 측정**

[0051] 실시예 1과 비교예 1 내지 2의 시료를 10% 질산 알미늄 (aluminum nitrate)과 1 μM 아세트산 칼륨 (potassium acetate)이 함유된 80% 에탄올에 혼합하여 40분 정치한 뒤 415 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이때 총 플라보노이드 함량은 퀘르세틴 (quercetin) 표준곡선을 이용하여 구하였다.

표 1

[0053]

시료명	총 페놀 함량 (mg/g of extract)	총 플라보이드 함량 (mg/g of extract)
실시예 1	46.97±2.13	13.12±0.09
비교예 1	41.41±1.84	4.71±0.12
비교예 2	43.27±1.12	8.21±0.11

[0055] 총 페놀 함량 및 총 플라보노이드 함량을 측정한 결과 (표 1), 실시예 1의 시료가 비교예 1 내지 2의 시료보다 총 페놀 함량과 총 플라보노이드 함량이 높은 것을 확인할 수 있었는데, 특히 플라보노이드 함량은 비교예 1, 2 대비 각각 2.79배, 1.6배 이상 증가한 것을 확인할 수 있었다.

[0056] 상기 결과로부터 단순 추출에 의해 제조된 나한과 추출물을 참쌀떡버섯 균사체로 생물전환시킴으로써 총 페놀 및 총 플라보노이드 함량을 증가시킬 수 있다는 사실과, 버섯 균사체의 종류에 따라 총 페놀 및 총 플라보노이드 함량이 달라지는 것을 확인할 수 있었다.

[0058] **(3) α-글루코시데이즈 활성 측정**

[0059] 실시예 1과 비교예 2의 배양 일자별 배양물을 기질 용액인 4-니트로페닐-α-D-글루코피라노시드와 혼합한 다음 40℃에서 10분간 항온시킨 후 10% 탄산나트륨 용액을 가하고 5분간 냉각하여 420 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이때 효소의 활성은 p-나이트로페놀 표준곡선을 이용하여 구하였다.

표 2

[0061]

시료명	α-글루코시데이즈 활성 (units/㎖)			
	배양 전	배양 3일 후	배양 5일 후	배양 7일 후
실시예 1	2.91	6.49	9.86	10.92
비교예 2	2.87	4.66	7.63	8.66

[0063] 버섯 균사체의 배양에 따른 α-글루코시데이즈의 활성을 측정한 결과 (표 2), 실시예 1의 참쌀떡버섯 균사체에 의한 생물전환물이 비교예 2의 영지버섯 균사체에 의한 생물전환물보다 α-글루코시데이즈 활성이 높은 것을 확인할 수 있었다.

[0064] 상기 결과로부터 생물전환에 사용되는 버섯 균사체의 종류에 따라 효소의 활성이 달라짐을 알 수 있으며, 이는 나한과 추출물의 주요 성분인 배당체를 비배당체로 전환하는 공정에도 영향을 미칠 수 있음을 의미한다.

[0066] **(4) HPLC를 이용한 트리테르펜계 배당체 함량 분석**

[0067] 비교예 1과 실시예 2에 존재하는 트리테르펜계 배당체 (mogroside V)와 비배당체 성분 (mogrol)의 변화를 확인하기 위하여 HPLC 분석을 실시하였다. 분석장비는 Shimazu사의 LC-20AT, SIL-20A와 Agilent Zorbax XDB C18 (4.6×250 mm, 5μm) 칼럼을 사용하였으며, 배당체와 비배당체 성분의 함량은 SPD-M20A DAD 검출기로 분석하였다. 이동상 용매로는 0.1% 포름산이 함유된 물과 메탄올을 농도구배로 사용하였으며, 유속은 1.0 ㎖/min에서 시료 20 ㎕를 주입하여 분석하였다.

[0068]

표 3

[0069]

시료명	Mogroside V 함량 (㎍/㎖)		Mogrol 함량 (㎍/㎖)	
	생물전환 전	생물전환 후	생물전환 전	생물전환 후

실시예 1	1,394.56±13.8	614.56±8.45	390.45±15.8	890.53±13.5
비교예 2	1,394.56±13.8	956.87±9.35	390.45±15.8	505.35±15.4

[0071] 나한과의 주요 활성성분 중의 하나가 트리테르펜계 배당체인 Mogroside V라는 것은 문헌을 통해 잘 알려져 있으며, 본 발명에서도 나한과 추출물 내 Mogroside V가 존재함을 표준품과의 비교를 통하여 확인하였다.

[0072] 버섯 균사체의 종류에 따른 나한과 추출물 내 주요 활성성분 중 하나인 배당체 모그로사이드 V (mogroside V)가 비배당체인 모그롤 (mogrol)로 전환되는 것을 HPLC로 측정한 결과 (표 3), 실시예 1의 균사체 배양물이 비교예 2의 균사체 배양물보다 배당체를 비배당체로 전환시키는 효율이 현저히 높음 (약 1.7배)을 확인할 수 있었다.

[0073] 상기 결과로부터 생물전환에 사용되는 버섯 균사체의 종류에 따라 생물전환 효율이 달라짐을 알 수 있으며, 이는 나한과 추출물의 주요 성분인 배당체를 비배당체로 전환시킴에 있어서 본 발명과 같이 참쌀떡버섯 균사체를 이용함으로써 소화흡수율을 높일 수 있음을 의미한다.

[0075] **실험예 2: 항산화 효과**

[0076] 본 실험예는 실시예 1에서 수득한 시료의 항산화 효과를 평가하기 위하여 DPPH 및 ABTS 라디칼 소거능을 측정하였다. DPPH 라디칼 소거활성 측정은 96 well plate에 시료를 농도별로 취한 다음 실험군에는 DPPH를, 대조군에는 메탄올을 첨가하여 20분간 shaking한 후 560 nm에서 흡광도를 측정하였다. ABTS 라디칼 소거활성 측정은 7 mM ABTS와 2.45 mM 과황산칼륨 (potassium persulfate)을 암소에서 24시간 반응하여 라디칼을 형성시켜 ABTS stock solution을 제조하였다. 이후 증류수로 희석시키고 시료를 첨가하여 10분간 반응시킨 후 415 nm에서 흡광도를 측정하였다. 아스코빅산을 양성 대조군으로 사용하였다. 시료의 라디칼 소거활성은 라디칼을 50% 저해하는 시료의 농도인 SC_{50} 값으로 비교하였다.

표 4

[0077]

시료명	SC_{50}(㎍/㎖)	
	DPPH 라디칼 소거활성	ABTS 라디칼 소거활성
비교예 1	404.74±2.63	64.89±0.53
실시예 1	190.77±5.09	28.23±0.34
L-ascorbic acid	3.57±0.01	0.95±0.00

[0079] DPPH 라디칼과 ABTS 라디칼 소거활성을 통하여 시료의 항산화 효과를 특정한 결과 (표 4), 실시예 1의 생물전환물 시료가 비교예 1의 일반 추출물 시료보다 항산화 활성이 2배 이상으로 현저히 높은 것을 확인할 수 있었다.

[0081] **실험예 3: 멜라닌 생성 억제효과**

[0082] 본 실험예는 실시예 1에서 수득한 시료가 멜라닌 합성에 미치는 영향을 측정하기 위해서 melan-a 세포를 6 웰 플레이트에 5×10^4 cells/well의 농도로 분주한 후, 37℃, 5% CO_2 하에서 24시간 동안 배양하고 시료를 농도별로 처리해 72시간 동안 재배양하였다. 그 후 1% triton X-100이 들어있는 PBS 용액을 통해 세포를 용해시켜 e-tube에 옮겨 담고 4℃, 13,000 rpm에서 15분간 원심분리하였다. 상등액을 제거하고 펠렛에 1 N NaOH 수용액을 첨가하여 65℃에서 1시간 동안 반응시킨 후 405 nm에서 흡광도를 측정하였다. 알부틴 (Arbutin)을 양성 대조군으로 사용하였다.

[0083] 도 1에 나타난 바와 같이 비교예 1의 경우 200 ㎍/㎖에서 멜라닌 합성을 억제하지 못한 반면, 실시예 1의 경우 200 ㎍/㎖에서 약 15%의 멜라닌 합성을 억제하는 것으로 나타났다. 이는 양성 대조군으로 사용된 알부틴과 동등한 효과를 나타내는 결과이다.

[0085] **실험예 4: 세포내 티로시나제 저해 활성**

[0086] 본 실험예는 실시예 1에서 수득한 시료의 세포 내 티로시나제 저해활성을 측정하기 위해서 6 웰 플레이트에 5×10^4 cells/well의 농도로 분주하고 37℃, 5% CO_2 배양기에서 하루 동안 배양 후, 시료를 농도별로 처리하고 72시간 동안 재배양하였다. 그 후 배지를 제거하고 1% triton X-100이 들어있는 PBS 용액을 이용하여 세포를 회수하고 4℃, 13,000 rpm에서 15분간 원심분리하여 상등액을 취하여 티로시나제 용액으로 사용하였다. 96 웰 플레이트에 단백질 농도를 맞춘 시료와 L-DOPA (2 mg/mℓ)를 넣고 37℃에서 1시간 동안 반응시킨 후 405 nm에서 흡광도를 측정하였다. 알부틴을 양성대조군으로 사용하였다.

[0087] 도 2에 나타난 바와 같이 실시예 1 및 비교예 1에서 수득한 시료 처리 농도에 의존적으로 티로시나제의 활성을 저해하는 것으로 나타났으며, 상대적으로 비교예 1에 비하여 실시예 1의 시료가 티로시나제 저해 활성이 더 높은 것으로 나타났다.

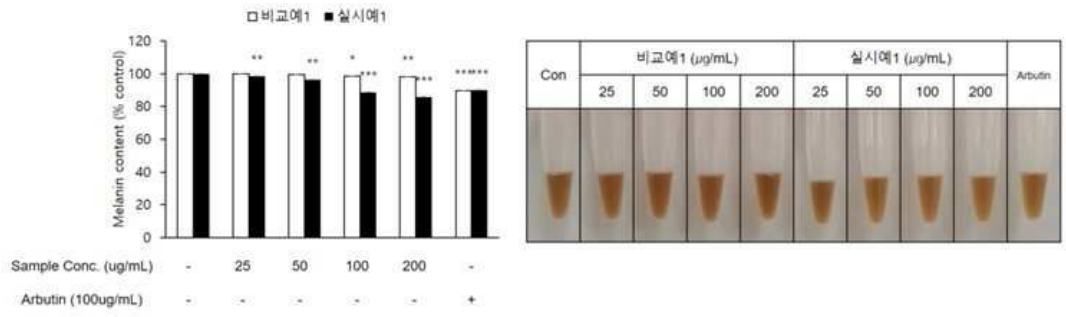
[0089] **실험예 5: 멜라닌 생성 관련 단백질 발현 억제효과**

[0090] 본 실험예는 실시예 1에서 수득한 시료가 멜라닌 생성에 관여하는 단백질의 발현에 미치는 영향을 측정하기 위하여 멜라닌 생성에 관여하는 효소인 티로시나제, TRP-1 및 TRP-2와 전사인자인 MITF (microphthalmiaassociated transcription factor)의 발현량 변화를 웨스턴 블롯으로 분석한 것이다. 먼저 시료를 농도별로 처리해 72시간 동안 배양한 melan-a 세포 내 단백질을 수동 용해 완충액 (passive lysis buffer)으로 추출한 후, 세포용해물의 단백질 농도는 BSA (bovine serum albumin)를 표준물질로 하고, BCA 단백질 분석 킷트를 사용하여 측정하였다. 단백질 30 μg을 10% SDS-PAGE로 분리한 후, 나이트로셀룰로스 막에 분리된 단백질을 블롯팅하였다. 그 후 막을 마우스 단일클론 항-MITF (1:1000 희석), 마우스 단일클론 항-티로시나제 (1:1000 희석), 토끼 단일클론 항-TRP-1 (1:5000 희석)과 토끼 단일클론 항-TRP-2 (1:5000 희석) 항체와 4℃에서 반응시켰다. 그 후 막을 세척하고 HRP-결합 2차 항체와 1시간 동안 실온에서 반응시켰다. 단백질 발현은 ECL (enhanced chemiluminescence) detection system (AI680, GE healthcare, Uppsala, Sweden)을 이용하여 분석하였다. 양성대조군으로 알부틴을 사용하였다.

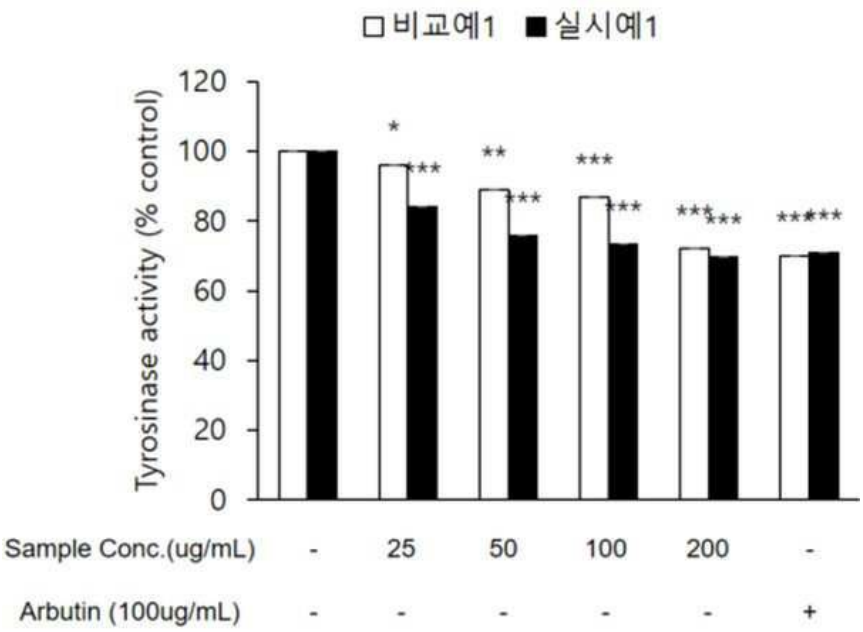
[0091] 실시예 1에서 수득한 시료가 멜라닌 합성을 저해시켰을 뿐만 아니라 티로시나제 활성도 억제시키는 것으로 확인됨에 따라 실시예 1 생물전환물의 멜라닌 합성 억제 기전을 확인하기 위하여 멜라닌 합성의 각 단계별 핵심적인 단백질 중 멜라닌 형성 세포 특이적 전사인자인 MITF와 그 타겟 유전자인 티로시나제, TRP-1 및 TRP-2의 발현정도를 측정한 결과, 도 3에 나타난 바와 같이 TRP-1과 TRP-2의 발현에 영향을 미치는 것으로 나타났다. 따라서 본 발명에 따른 나한과 추출물 생물전환물은 멜라닌 합성에 관여하는 핵심적인 단백질 중 TRP-1과 TRP-2의 발현을 억제하여 멜라닌 합성을 저해하는 것으로 확인되었다.

도면

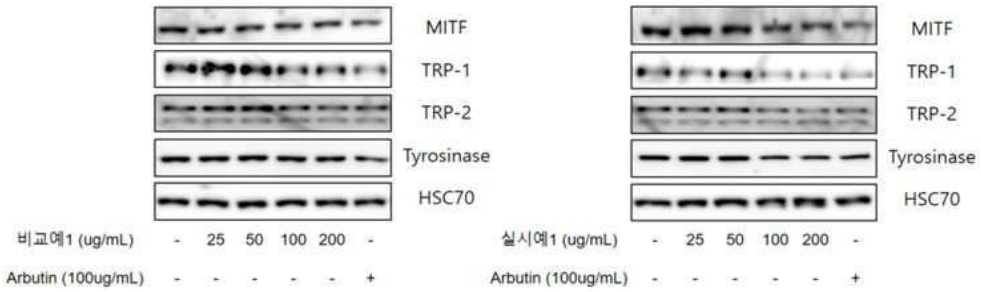
도면1



도면2


□비교예1 ■실시예1
Tyrosinase activity (% control)
120
100
80
60
40
20
0
*
**
***
Sample Conc.(ug/mL) - 25 50 100 200 -
Arbutin (100ug/mL) - - - - - +

도면3


MITF
TRP-1
TRP-2
Tyrosinase
HSC70
비교예1 (ug/mL) - 25 50 100 200 -
Arbutin (100ug/mL) - - - - - +
실시예1 (ug/mL) - 25 50 100 200 -
Arbutin (100ug/mL) - - - - - +