



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2016-0025071

(43) 공개일자 2016년03월08일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 36/49 (2006.01) A61K 35/74 (2015.01)

A61P 3/10 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2014-0110765

(22) 출원일자 2014년08월25일

심사청구일자 2014년08월25일

(71) 출원인

고려대학교 산학협력단

서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)

(72) 발명자

조홍연

서울특별시 성북구 정릉로 388, 103동 1002호(돈암1동, 동부센트레빌아파트)

김중현

인천 계양구 효서로 287

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

특허법인다나

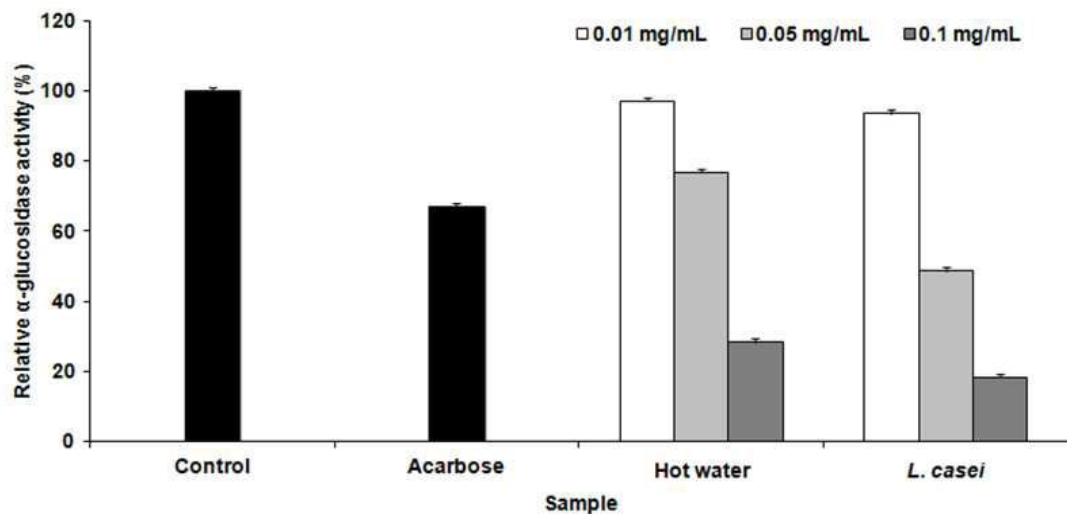
전체 청구항 수 : 총 10 항

(54) 발명의 명칭 발효 율피 추출물을 유효성분으로 포함하는 항당뇨 조성물

(57) 요약

본 발명은 본 발명은 율피 효소 분해액의 발효물을 유효성분으로 포함하는 항당뇨 조성물을 제공한다. 본 발명에 따른 율피 효소 분해액의 발효물은 우수한 포도당 흡수 조절능을 나타내 당뇨의 예방, 개선 또는 치료에 효과적일 뿐만 아니라, 천연소재로서 인체 안전성 또한 매우 높아 활용가치가 매우 높다.

대표도 - 도1



(72) 발명자

이희섭

충남 보령시 웅천읍 방축길 76, 303호 (목화아파트)

유희중

경기도 성남시 분당구 미금로 68, 402동 1305호(구미동, 무지개마을아파트)

이승현

경기도 시흥시 역전로 427, 107동 1002호(정왕4동, 세종1차아파트)

서장원

충청남도 부여군 부여읍 성왕로328번길 18-7, 107동 201호(홍선금동아파트)

명세서

청구범위

청구항 1

유피 효소 분해액의 발효물을 유효성분으로 포함하는 당뇨 예방 또는 치료용 의약 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 유피 효소 분해액의 발효물은 의약 조성물 100 중량부 대비 0.0001 내지 10 중량부로 포함되는 당뇨 예방 또는 치료용 의약 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 유피 효소 분해액은 유피를 당분해효소, 단백질분해효소, 섬유소분해효소, 펙틴분해효소, 셀룰라아제 및 크실라아제로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 효소에 의해 분해하여 얻은 것인 당뇨 예방 또는 치료용 의약 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서, 유피 효소 분해액의 발효물은 유피 효소 분해액에 바실러스, 유산균 또는 효모를 접종하여 발효시킨 것인 당뇨 예방 또는 치료용 의약 조성물.

청구항 5

제4항에 있어서, 바실러스는 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*)이고, 유산균은 스트렙토코커스 써모필러스(*Streptococcus thermophilus*), 락토바실러스 불가리쿠스(*Lactobacillus bulgaricus*), 락토바실러스 에시도필러스(*Lactobacillus acidophilus*), 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*), 락토바실러스 카세이(*Lactobacillus casei*), 락토바실러스 퍼멘텀(*Lactobacillus fermentum*) 및 페디오코쿠스 펜토사세우스(*Pediococcus pentosaceus*)으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상이며, 효모는 사카로마이세스 세레비세(*Saccharomyces cerevisiae*)인 당뇨 예방 또는 치료용 의약 조성물.

청구항 6

유피 효소 분해액의 발효물을 유효성분으로 포함하는 당뇨 개선용 식품 조성물.

청구항 7

제6항에 있어서, 유피 효소 분해액의 발효물은 식품 조성물 100 중량부 대비 0.01 내지 50 중량부로 포함되는 당뇨 개선용 식품 조성물.

청구항 8

제6항에 있어서, 상기 유피 효소 분해액은 유피를 당분해효소, 단백질분해효소, 섬유소분해효소, 펙틴분해효소, 셀룰라아제 및 크실라아제로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상의 효소에 의해 분해하여 얻은 것인 당뇨 개선용 식품 조성물.

청구항 9

제6항에 있어서, 유피 효소 분해액의 발효물은 유피 효소 분해액에 바실러스, 유산균 또는 효모를 접종하여 발효시킨 것인 당뇨 개선용 식품 조성물.

청구항 10

제9항에 있어서, 바실러스는 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*)이고, 유산균은 스트렙토코커스 써모필러스(*Streptococcus thermophilus*), 락토바실러스 불가리쿠스(*Lactobacillus bulgaricus*), 락토바실러스 에시도필러스(*Lactobacillus acidophilus*), 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*), 락토바실러스 카세이

(*Lactobacillus casei*), 락토바실러스 퍼멘텀(*Lactobacillus fermentum*) 및 페디오코코스 펜토사세우스(*Pediococcus pentosaceus*)으로 이루어진 균으로부터 선택된 하나 이상이며, 효모는 사카로마이세스 세레비세(*Saccharomyces cerevisiae*)인 당노 개선용 식품 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 발효율과 추출물을 유효성분으로 포함하는 항당노 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 당뇨병은 혈액 내에 존재하는 포도당이 소변을 통해 배출되는 질환으로, 근본적인 치유가 되지 않는 만성 성인병 중의 하나이다. 급속한 경제발전으로 인한 생활의 변화로 평균수명은 연장되는 현상에 반하여 당뇨병 등의 만성 질환은 증가하는 현상을 보이고 있다. 국내에서 당뇨병의 유병율은 약 5~10%에 달하는 것으로 조사되어 있으며, 2007년 당뇨병 환자는 400만 명을 넘어서 인구 100명 중 8.3명이 당뇨병 환자지만 2025년에는 당뇨병 환자가 약 680만 명으로 늘어날 것으로 예측되고 있다. 당뇨병은 다양한 합병증으로 인해 환자의 수명이 5~10년 정도 단축되며, 합병증을 포함하여 현재 우리나라의 경우 사망원인 중 5순위에 있다(2010년 사망원인통계결과, 통계청, 2011).

[0003] 당뇨병 치료는 식이요법, 운동요법 및 약물요법으로 대별되며 환자의 병태에 따라 결정되고 있다. 당뇨병은 질환 그 자체보다 합병증의 예방 및 치료가 매우 중요하므로 관리의 목적은 정상 혈당 유지와 합병증을 예방하는 데 있다고 할 수 있다. 한편 당뇨병 치료제는 크게 ① 당의 소장 내 소화를 저해하는 당질분해효소 저해제 ② 소화된 당의 흡수를 저해하는 흡수 저해제, ③인슐린의 작용을 도와주는 인슐린 저항 개선제, ④ 인슐린 분비 촉진제 등 4 그룹으로 구분하고 있다. 그 동안 수많은 약제들이 개발되어 왔으나, 대부분은 부작용이나, 유효성 혹은 안전성이 문제되어 현재 임상에 사용되고 있는 약제는 소수에 불과하다. 이에 따라, 섭취가 용이하고 부작용이 없는 항당노 천연물 소재의 탐색 및 개발 연구가 진행되고 있다.

[0004] 2000년 이상의 재배역사를 가진 것으로 추정되는 밤(*Castanea crenata*)은 참나무과에 속하는 밤나무의 열매로서 과육의 대부분 전분이고 소량의 단백질과 지방으로 이루어져 있다. 속껍질 중 밤의 내피에는 ellagic acid, syringic acid 및 protocatechuic acid 등의 phenolic acid가 다량 함유되어 있으며, coumarin, gallic acid, catechin이 주로 함유되어 있다(J. Korean Soc. Food Sci. Nutr., 2008:37(9), 1095~1100). 이러한 밤은 우리 기호 생활과 밀접한 관련이 있고 식품의 원료로 가공하기도 하며 직접 삶거나 구워먹는 기호식품이다. 지금까지 보고된 밤에 관한 연구로는 밤 전분의 물리·화학적 특성에 관한 연구, 동결건조에 관한 성분변화, 저장 온도에 따른 품질 변화, 밤 부위별 추출물의 항균활성에 관한 연구 등이 진행되어 왔다.

[0005] 식물 추출물 발효제품은 건강기능식품 32개 품목 중의 한 가지 제품 유형으로서 건강기능 식품공전에 등재되어 있으며(Korea Food & Drug Administration, 2004), 일반적으로 여러 가지 식물성 원료에 당을 첨가하여 자연 발효시키거나 유산균 등의 미생물을 첨가하여 발효시킨다. 식물체에는 다양한 효소가 함유되어 있으며, 식물 추출액을 발효시키면 많은 효소들이 활성화되어 여러 가지 생화학반응을 일으킴으로써, 식물체의 영양성분이 소화, 흡수되기 쉬운 형태로 변환될 수 있다. 효소작용으로 생성된 성분들에 의해 새로운 생리조절기능을 발현할 수 있을 것으로 기대되어, 현재 다양한 발효 식물 추출물들을 대상으로 연구가 이루어지고 있다(Kim et al., 2003; Kim & Lee, 2003). 그러나 유효 효소 분해액의 발효물에 대한 항당노 효과는 아직까지 보고된 바 없다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 이에, 본 발명은 부작용 혹은 안전성에 대한 문제가 없으면서 당노에 악리·생리 활성을 나타내는 천연식물 소재를 발굴하고, 이를 유효성분으로 포함하는 당뇨병의 예방, 개선 및 치료용 조성물을 제공하고자 한다.

과제의 해결 수단

- [0007] 이를 위해, 본 발명은 율피 효소 분해액의 발효물을 유효성분으로 포함하는 당뇨 예방 또는 치료용 의약 조성물, 치료상 유효량의 율피 효소 분해액의 발효물을 이를 필요로 하는 대상체에 투여하는 것을 포함하는 당뇨의 예방 또는 치료 방법, 항당뇨 의약 조성물의 제조를 위한 율피 효소 분해액의 발효물의 신규 용도를 제공한다. 하기 실시예에서 확인할 수 있는 바와 같이, 본 발명에 따른 율피 효소 분해액의 발효물은 기존의 율피 열수 추출물과 비교할 때, 당뇨에 차별적이고 더욱 우수한 항당뇨 효과를 나타낸다.
- [0008] 본 발명에서 율피는 밤 외피를 제외한 밤 과육을 둘러싸고 있는 밤 내피를 의미한다.
- [0009] 본 명세서에 있어서, 발효 율피 추출물은 율피 효소 분해액의 발효물과 상호 교환적으로 사용된다.
- [0010] 본 발명에 있어서 율피 효소 분해액의 발효물은 율피 효소 분해액을 발효시켜 얻은 액체뿐만 아니라 이의 가용물도 포함한다. 예를 들어, 율피 효소 분해액의 발효물은 율피 효소 분해액의 발효 후 감압 증류 및 동결 건조 또는 분무 건조 등과 같은 추가적인 과정에 의해 분말 상태로 제조될 수 있다.
- [0011] 본 발명의 조성물에서 유효성분으로 사용하는 율피 효소 분해액의 발효물은 율피 효소 분해액을 발효시켜 제조된다.
- [0012] 먼저, 율피 효소 분해액은 율피에 효소를 첨가하고 효소 분해를 수행함으로써 제조할 수 있다.
- [0013] 이때, 효소로는 당분해효소, 단백질분해효소, 섬유소분해효소, 펙틴분해효소, 셀룰라아제 및 크실라아제로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상을 사용할 수 있다.
- [0014] 상기 율피 효소 분해액의 발효물은 율피 효소 분해액에 상기 율피 효소 분해액에 바실러스, 유산균 또는 효모를 접종하여 발효시켜 얻을 수 있다. 상기 바실러스, 유산균 또는 효모는 종래 일반적으로 이용되는 것을 제한없이 사용할 수 있다.
- [0015] 한 구체예에서, 바실러스로는 예를 들어, 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*)를 사용할 수 있다.
- [0016] 또한, 유산균으로는 예를 들어, 스트렙토코커스 써모필러스(*Streptococcus thermophilus*), 락토바실러스 불가리쿠스(*Lactobacillus bulgaricus*), 락토바실러스 에시도필러스(*Lactobacillus acidophilus*), 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*), 락토바실러스 카세이(*Lactobacillus casei*), 락토바실러스 퍼멘텀(*Lactobacillus fermentum*) 및 페디오코커스 펜토사세우스(*Pediococcus pentosaceus*)으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상을 사용할 수 있다.
- [0017] 한편, 효모로는 사카로마이세스 세레비세(*Saccharomyces cerevisiae*)를 사용할 수 있다.
- [0018] 한 구체예에서, 율피 효소 분해액의 발효물은
- [0019] a) 율피를 열처리하는 단계;
- [0020] b) 율피에 효소를 첨가하여 효소분해하는 단계;
- [0021] c) 율피 효소 분해액을 멸균하는 단계;
- [0022] d) 율피 효소 분해액에 바실러스, 유산균 또는 효모를 접종하여 발효하는 단계;
- [0023] e) 발효된 발효물을 살균하는 단계; 및
- [0024] f) 여과, 농축, 건조하는 단계를 통해 제조될 수 있다.
- [0025] 단계 a)는 율피를 열처리하는 단계로, 율피 중량 대비 10 내지 20배의 물을 첨가하고, 90℃ 이상에서 1 내지 3 시간 동안 열처리한 후, 45 내지 55℃까지 냉각할 수 있다.
- [0026] 단계 b)는 율피에 효소를 첨가하여 효소분해하는 단계로, 상기 단계 a)에서 열처리된 율피에 효소를 율피 고형분 대비 1 내지 5 중량%를 가하고, 50℃에서 14 내지 18시간 동안 효소 분해할 수 있다.
- [0027] 상기 단계에 사용되는 효소의 종류는 특별히 제한되지 않으며, 전술한 종류를 사용할 수 있고, 구체적으로, 셀룰라아제 및 아밀라아제를 사용할 수 있다.
- [0028] 상기 단계에 의해 율피 효소 분해액이 제조된다.
- [0029] 단계 c)는 율피 효소 분해액을 멸균하는 단계로, 상기 단계 b)에서 제조된 효소분해액을 100 내지 150℃, 구체적으로 120 내지 130℃에서 30 내지 60 분간 멸균할 수 있다.

- [0030] 단계 d)는 율피 효소 분해액에 바실러스, 유산균 또는 효모를 접종하는 단계로, 상기 단계 c)에서 멸균된 효소 분해액에 바실러스, 유산균 또는 효모 배양액을 접종하여, 각 미생물(바실러스, 유산균, 효모)의 최적 배양조건으로 1 내지 3 일간 배양할 수 있다.
- [0031] 상기 바실러스, 유산균 또는 효모는 종래 일반적으로 이용되는 것을 제한없이 사용할 수 있으며, 구체적으로, 전술한 종류를 사용할 수 있다.
- [0032] 상기 단계에 의해 율피 효소 분해액의 발효물이 제조된다.
- [0033] 단계 e)는 발효물을 살균하는 단계로, 상기 d) 단계에서 제조된 발효물을 90℃ 이상, 50 내지 100 rpm에서 1 내지 2 시간 동안 살균할 수 있다.
- [0034] 또한, 단계 f)는 여과, 농축 및 건조하는 단계로, 상기 단계 e)에 의해 멸균된 발효액을 여과하고, 농축 및 건조하여, 율피 효소 분해액의 발효물의 분말을 최종 제조할 수 있다.
- [0035] 상기 단계에서 여과시, 여과 보조제를 추가로 첨가하여 여과할 수 있다. 여과에는 여과지를 사용할 수 있으며, 감압 여과 또는 가압여과 등의 방법을 사용할 수 있다.
- [0036] 농축은 발효액을 5 내지 10 vol%로 감압농축할 수 있으며, 건조는 건조는 분무건조 또는 동결건조를 이용할 수 있다.
- [0037] 본 발명에 따른 율피 효소 분해액의 발효물 분말의 예시적인 제조방법에 대해 상세히 설명하면 다음과 같다.
- [0038] 단계 a)
- [0039] 건조상태의 율피(밤 내피) 2 kg에 20 kg의 상수를 첨가하여 30 L 발효조에서 혼합하고, 95℃ 및 100 rpm에서 1 시간 열처리하고 50℃까지 냉각하였다.
- [0040] 단계 b)
- [0041] 단계 a)의 냉각액에 셀룰라아제 및 아밀라아제를 각각 율피 고형분 대비 1 중량%씩 가하여 50℃에서 16 시간 동안 효소분해하여 율피 효소 분해액을 얻었다.
- [0042] 단계 c)
- [0043] 단계 b)에서 얻어진 효소 분해액을 회수하여, 121℃에서 30 분간 멸균하였다.
- [0044] 단계 d)
- [0045] 단계 c)에서 멸균된 효소 분해액에 바실러스, 유산균 또는 효모를 2% 농도로 접종하고, 37℃에서 2 일간 배양하여 발효물을 얻었다.
- [0046] 단계 e)
- [0047] 단계 d)에서 얻어진 발효물을 95℃에서 100 rpm으로 1시간 동안 살균하였다.
- [0048] 단계 f)
- [0049] 단계 e)의 살균된 율피 발효액을 여과($\leq 1\mu\text{m}$)하였다. 상기 여과된 율피 발효액은 여과액 부피의 5 내지 10 vol%로 감압농축하고, 농축액은 건조하여 율피 효소 분해액의 발효물을 얻었다. 건조는 분무건조 또는 동결건조를 사용할 수 있다.
- [0050] 상기 조성물 내의 상기 율피 효소 분해액의 발효물의 함량은 질환의 증상, 증상의 진행 정도, 환자의 상태, 투여 방법 및 제제의 형태 등에 따라서 적절히 조절 가능하며, 예컨대, 전체 조성물 100 중량부에 대하여, 0.0001 내지 10 중량부 또는 0.001 내지 1 중량부로 포함될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 상기 함량비는 용매를 제거한 건조량을 기준으로 한 값이다.
- [0051] 본 발명에 따른 의약 조성물은 율피 효소 분해액의 발효물 외에, 약학적으로 허용 가능한 담체를 더 포함할 수 있다. 상기 담체는 완충액, 주사용 멸균수, 일반 식염수 또는 인산염 완충식염수, 슈크로스, 히스티딘, 염 및 폴리솔베이트 등과 같은 여러 성분을 함유할 수 있다.
- [0052] 상기 의약 조성물은 경구 또는 비경구로 투여할 수 있으며, 일반 의약품 제제의 형태, 예를 들어, 임상 투여 시 경구 및 비경구의 여러 가지 제형으로 투여될 수 있다. 상기 의약 조성물을 제제화할 경우에는 보통 사용하는

충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 봉해제 및 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제될 수 있다.

[0053] 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 본 발명의 의약 조성물에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트(Calcium carbonate), 수크로스(Sucrose) 또는 락토오스(Lactose), 젤라틴 등을 섞어 조제될 수 있다.

[0054] 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스티레이트 탈크 같은 윤활제들도 사용된다. 경구를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데 흔히 사용되는 단순희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다.

[0055] 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조제, 좌제가 포함된다. 비수성용제, 현탁용제로는 프로필렌 글리콜(Propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텟솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다.

[0056] 더 나아가 해당분야의 적절한 방법으로 Remington's Pharmaceutical Science, Mack Publishing Company, Easton PA에 개시되어 있는 방법을 이용하여 각 질환에 따라 또는 성분에 따라 바람직하게 제제화 할 수 있다.

[0057] 또한 본 발명은 치료상 유효량의 율피 효소 분해액의 발효물을 이를 필요로 하는 대상체에게 투여하는 것을 포함하는 당뇨의 예방 또는 치료 방법을 제공한다.

[0058] 여기에서 사용된 용어 "대상체"는 치료, 관찰 또는 실험의 대상인 포유동물을 말하며, 바람직하게는 인간을 말한다.

[0059] 여기에서 사용된 용어 "치료상 유효량"은 연구자, 의사, 의사 또는 기타 임상의로 의해 생각되는 조직계, 동물 또는 인간에서 생물학적 또는 의학적 반응을 유도하는 유효 성분 또는 약학적 조성물의 양을 의미하는 것으로, 이는 치료되는 질환 또는 장애의 증상의 완화를 유도하는 양을 포함한다. 본 발명의 유효 성분에 대한 치료상 유효량 및 투여횟수는 원하는 효과에 따라 변화될 것임은 당업자에게 자명하다. 그러므로, 투여될 최적의 투여량은 당업자에 의해 쉽게 결정될 수 있으며, 질환의 종류, 질환의 중증도, 조성물에 함유된 유효성분 및 다른 성분의 함량, 제형의 종류, 및 환자의 연령, 체중, 일반 건강 상태, 성별 및 식이, 투여 시간, 투여 경로 및 조성물의 분비율, 치료기간, 동시 사용되는 약물을 비롯한 다양한 인자에 따라 조절될 수 있다. 본 발명의 치료방법에 있어서, 성인의 경우, 본 발명의 율피 효소 분해액의 발효물을 1일 1회 내지 수회 투여시, 0.01 mg/kg~200 mg/kg의 용량으로 투여하는 것이 바람직하다.

[0060] 한 구체예에서, 본 발명은 율피 효소 분해액의 발효물을 유효성분으로 포함하는 당뇨 개선용 식품 조성물을 제공한다.

[0061] 본 발명에 따른 식품 조성물은 상기 약제학적 조성물과 동일한 방식으로 제제화되어 기능성 식품으로 이용하거나, 각종 식품에 첨가할 수 있다.

[0062] 예를 들어, 율피 효소 분해액의 발효물은 식품 조성물 100 중량부 대비 0.01 내지 50 중량부로 포함될 수 있다.

[0063] 본 발명의 조성물을 첨가할 수 있는 식품으로는 예를 들어, 음료류, 알코올 음료류, 과자류, 다이어트바, 유제품, 육류, 초코렛, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류, 비타민 복합제, 건강보조식품류 등이 있으며, 특별히 제한되지 않는다.

[0064] 상기 식품 조성물은, 율피 효소 분해액의 발효물 외에, 추가로 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 함유할 수 있다. 상술한 천연 탄수화물은 포도당, 과당과 같은 모노사카라이드, 말토오스, 슈크로오스와 같은 이당류, 텍스트린, 사이클로텍스트린과 같은 다당류 또는 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알콜이다. 감미제로서는 타우마틴, 스테비아 추출물과 같은 천연 감미제, 사카린 또는 아스파르탐과 같은 합성 감미제 등을 사용할 수 있다. 상기 외에 본 발명에 따른 식품 조성물은 여러 가지 영양제, 비타민, 전해질, 풍미제, 착색제, 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알콜, 탄산 음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다. 그 밖에 본 발명의 식품 조성물은 천연 과일주스, 과일주스 음료 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다. 이러한 성분은 독립적으로 또는 혼합하여 사용할 수 있다. 이러한 첨가제의 비율은 크게 중요하진 않지만 본 발명의 식품 조성물 100 중량부에 대하여, 0.01 내지 0.1 중량부의 범위에서 선택되는 것이 일반적이다.

[0065] 예컨대, 본 발명의 식품 조성물이 드링크제와 같은 음료류로 제조되는 경우 율피 효소 분해액의 발효물 이외에

도 구연산, 액상과당, 설탕, 포도당, 초산, 사과산, 과즙, 각종 식물 추출액 등을 추가로 포함할 수 있다.

[0066]

본 발명은 상기 당노 개선용 조성물을 포함하는 건강기능식품을 제공한다. 건강기능식품이란, 유효 효소 분해액의 발효물을 음료, 차류, 향신료, 껌, 과자류 등의 식품소재에 첨가하거나, 캡슐화, 분말화, 현탁액 등으로 제조한 식품으로, 이를 섭취할 경우 건강상 특정한 효과를 가져오는 것을 의미하나, 일반 약품과는 달리 식품을 원료로 하여 약품의 장기 복용시 발생할 수 있는 부작용 등이 없는 장점이 있다. 이와 같이 하여 얻어지는 본 발명의 건강기능식품은, 일상적으로 섭취하는 것이 가능하기 때문에 매우 유용하다. 이와 같은 건강식품에 있어서의 유효 효소 분해액의 발효물 의 첨가량은, 대상인 건강식품의 종류에 따라 달라 일률적으로 규정할 수 없지만, 식품 본래의 맛을 손상시키지 않는 범위에서 첨가하면 되며, 대상 식품에 대하여 통상 0.01 내지 50 중량%, 바람직하기로는 0.1 내지 20 중량%의 범위이다. 또한, 과립, 정제 또는 캡슐형태의 식품의 경우에는 통상 0.1 내지 100 중량% 바람직하기로는 0.5 내지 80 중량%의 범위에서 첨가하면 된다. 한 구체예에서, 본 발명의 건강기능식품은 음료의 형태일 수 있다.

발명의 효과

[0067]

본 발명에 따른 유효 효소 분해액의 발효물은 우수한 알파-글루코시데이즈 저해 활성, 우수한 포도당 흡수 조절과 관련되는 GLUT4, SGLT1 유전자 발현을 통해 당뇨의 예방, 개선 또는 치료를 위한 유효성분으로서 활용가치가 뛰어나다.

도면의 간단한 설명

[0068]

도 1은 유효 효소 분해액의 발효물의 알파-글루코시데이즈 저해활성을 나타내는 도표이다.

도 2는 유효 효소 분해액의 발효물의 포도당 흡수 촉진활성을 나타내는 도표이다.

도 3은 유효 효소 분해액의 발효물의 포도당 흡수 저해활성을 나타내는 도표이다.

도 4는 유효 효소 분해액의 발효물의 GLUT4 mRNA 발현 촉진활성을 나타내는 도표이다.

도 5는 유효 효소 분해액의 발효물의 SGLT1 mRNA 발현 억제활성을 나타내는 도표이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0069]

본 발명은 이들의 이점 및 특징, 그리고 그것들을 달성하는 방법을 상세하게 후술되어 있는 실시예들을 참조하면 명확해질 것이다. 그러나 본 발명은 이하에서 개시되는 실시예들에 한정되는 것이 아니라 서로 다른 다양한 형태로 구현될 것이며, 단지 본 실시예들은 본 발명의 개시가 완전하도록 하고, 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 발명의 범주를 완전하게 알려주기 위해 제공되는 것이며, 본 발명의 청구항의 범위에 의해 정의될 뿐이다.

[0070]

비교예 1: 유효 열수 추출물의 제조

[0071]

부여밤 영농조합으로부터 구입한 유효를 건조한 후, 건조 유효 2 kg에 20 kg의 상수를 첨가하여 30 L 발효조에 서 95℃, 100 rpm으로 1 시간 열처리하고 50℃까지 냉각하였다. 추출액을 여과한 후 농축, 분무건조하여 340 g을 얻었다.

[0072]

실시예 1: 락토바실러스 카제이(*Lactobacillus casei*)를 이용한 유효 효소 분해액의 발효물 제조

[0073]

부여밤 영농조합으로부터 구입한 유효를 건조한 후, 유효 2 kg에 20 kg의 상수를 첨가하여 30 L 발효조에서 혼합하고 95℃, 100 rpm으로 1시간 열처리하고 50℃까지 냉각하였다. 셀룰라아제와 아밀라아제를 각각 20 g을 200 ml에 용해 후 유효 용해액에 첨가하여 50℃에서 16시간 동안 반응시킨 후 121℃에서 30분간 멸균하였다. 37℃로 냉각한 후에 락토바실러스 카제이(*Lactobacillus casei*)를 배양한 배양액을 400 ml 첨가하여 50 rpm에서 36시간 동안 배양하였다. 배양 종료 후 95℃에서 1시간 동안 살균하였다. 50℃로 냉각하여 여과한 후 농축, 분무건조하

여 율피 효소 분해액의 발효물 630 g을 얻었다.

실험예 1: 율피 효소 분해액의 발효물의 알파-글루코시데이즈 저해 활성

알파-글루코시데이즈 저해활성 측정용 실험방법은 기질인 400 mM *p*NPG(*p*-nitrophenyl- α -D-glucopyranoside)와 1 유닛 알파-글루코시데이즈(α -glucosidase, *Saccharomyces cerevisiae* 기원)를 이용하여 수행하였다. 증류수 750 μ l, 1 M KPB (pH 7.5) 50 μ l, 알파-글루코시데이즈 50 μ l, 시료 (0.1, 0.5, 1.0 mg/ml) 100 μ l로 구성된 반응액을 실온에서 1분간 반응시켰다. 이 반응액에 *p*NPG 50 μ l를 첨가하여 5분 후의 흡광도를 분광광도계(spectrophotometer, 405nm)로 측정하였다.

<환산식 1>

$$\text{저해능 (Inhibitory effect, \%)} = [(Cc - Cs) / Cc] \times 100$$

Cs: 시료를 처리한 실험구의 흡광도

Cc: 시료를 처리하지 않은 실험구의 흡광도

본 발명에서 도 1은 율피 효소 분해액의 발효물의 알파-글루코시데이즈 저해활성을 나타내는 그래프이다. 상기 도 1에서 대조군은 증류수를 첨가한 무처리 대조군, 아카보스(acarbose)는 0.5 mg/mL 아카보스를 첨가한 양성 대조군, 열수(hot water)는 율피 열수 추출물 첨가군, *L.casei*는 락토바실러스 카제이를 이용한 율피 효소 분해액의 발효물 첨가군을 나타낸다.

상기 도 1에 나타난 바와 같이, 비교예 1과 실시예 1의 추출물을 0.01, 0.05, 0.1 mg/mL 농도로 처리하였다. 비교예 1의 율피 열수 추출물은 각각 약 3%, 23%, 72%의 알파-글루코시데이즈 저해효과를 나타내었고, 실시예 1의 율피 효소 분해액의 발효물은 약 6%, 51%, 82%의 알파-글루코시데이즈 저해효과가 관찰되었다.

즉, 실시예 1의 율피 효소 분해액의 발효물은 율피 추출물보다 높은 알파-글루코시데이즈 저해효과를 나타낼 수 있다(도 1).

실험예 2: 율피 효소 분해액의 발효물의 포도당 흡수 활성

혈액에서 근육으로의 포도당 흡수 활성 측정용 실험방법은 L6 세포주와 2-NBDG (2-(*N*-(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)amino-2-deoxyglucose)를 이용하여 측정하였다. 즉, 율피 효소 분해액의 발효물에 대한 포도당 흡수 실험을 위해 L6를 5×10^3 cells/well 농도로 96 웰 플레이트를 사용하여 37°C, CO₂ 인큐베이터에서 8일 동안 배양, 분화시켰다. PBS로 2회 세척 후 시료를 농도에 따라 37°C에서 4시간 처리하였다. PBS로 세척 후, 100 μ M 2-NBDG를 첨가하고 37°C에서 1시간 반응시켰다. 이 반응액을 제거하고 세포를 아이스-콜드 PBS로 2회 세척 후 2-NBDG의 형광세기를 형광분광광도계(spectrophotofluorometer, 여기: 485nm, 발광: 535nm)로 측정하였다. 포도당 흡수 저해활성 측정에 미치는 세포농도의 영향을 보정해 주기 위해 MTT 어세이를 다음과 같이 실시하였다. 형광세기 측정이 끝난 웰 플레이트에 MTT 용액(5 mg/ml)을 가하여 37°C에서 2시간 반응시킨 후 570 nm에서 흡광도를 측정하였다. 시료에 의한 포도당 흡수 활성은 아래 식에 따라 환산하였다.

<환산식 2>

$$\text{흡수율 (Absorptive effect, \%)} = [(Fs / Fc) \times 100]$$

Fs : 시료를 처리한 실험구의 형광세기

Fc : 시료를 처리하지 않은 실험구의 형광세기

*양성표준물질로는 인슐린을 사용하였음.

[0090] 본 발명에서 도 2는 율피 효소 분해액의 발효물의 포도당 흡수율을 나타내는 그래프이다. 상기 도 2에서 대조군은 율피 추출물 대신 증류수를 첨가한 무처리 대조군, insulin은 율피 추출물 대신 인슐린을 첨가한 양성 대조군, *L.casei*는 *Lactobacillus casei*를 이용한 율피 효소 분해액의 발효물 첨가군을 나타낸다.

[0091] 상기 도 2에 나타난 바와 같이, 무처리 대조군을 기준으로 포도당 흡수율을 비교하였을 때, 500 nM insulin은 19% 포도당 흡수율이 촉진되었으며, 실시예 1의 율피 효소 분해액의 발효물은 약 19%, 24%, 28%의 포도당 흡수율이 촉진되었음을 확인하였다(도 2).

[0092] 실험예 3: 소장에서 각 추출물의 포도당 흡수 저해 활성

[0093] 소장에서 혈액으로 포도당 흡수의 저해활성 측정용 실험방법은 Caco-2 세포주와 2-NBDG (2-(*N*-(7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl)amino-2-deoxyglucose)를 이용하여 측정하였다.

[0094] 우선, Caco-2를 6×10^4 cells/well 농도로 24 well plate를 사용하여 37℃, CO₂ 인큐베이터에서 14일 동안 배양하였다. PBS로 2회 세척한 다음 PBS 400 μ l, 100 μ M 2-NBDG 500 μ l, 시료 (1 mg/ml) 100 μ l를 첨가하고 37℃에서 2시간 반응시켰다. 이 반응액을 제거하고 세포를 아이스-콜드 PBS로 2회 세척한 후 2-NBDG의 형광세기를 형광분광광도계(spectrophotofluorometer, 여기: 485nm, 발광 : 535nm)로 측정하였다. 포도당 흡수 저해활성 측정에 미치는 세포농도의 영향을 보정해 주기 위해 MTT 어세이를 다음과 같이 실시하였다. 형광세기 측정이 끝난 웰 플레이트에 MTT 용액(5 mg/ml)을 가하여 37℃에서 2시간 반응시킨 후 570 nm에서 흡광도를 측정하였다. 시료에 의한 포도당 흡수 저해 활성은 아래 식에 따라 환산하였다.

[0095] <환산식 3>

[0096] 저해능 (Inhibitory effect, %) = [(Fc - Fs) / Fc] × 100

[0097] Fs : 시료를 처리한 실험구의 형광세기

[0098] Fc : 시료를 처리하지 않은 실험구의 형광세기

[0099] *양성표준물질로는 phlorizin을 사용하였음.

[0100] 본 발명에서 도 3는 율피 효소 분해액의 발효물의 포도당 흡수 저해율을 나타내는 그래프이다. 상기 도 3에서 대조군은 율피 추출물 대신 증류수를 첨가한 무처리 대조군, phlorizin은 율피 추출물 대신 첨가한 양성 대조군, *L.casei*는 *Lactobacillus casei*를 이용한 율피 효소 분해액의 발효물 첨가군을 나타낸다.

[0101] 상기 도 3에 나타난 바와 같이, 대조군(control)을 기준으로 포도당 흡수 저해율을 비교하였을 때, 0.5 mg/ml phlorizin은 18% 포도당 흡수 저해 활성을 나타내었으며, 실시예 1의 율피 효소 분해액의 발효물은 약 17%, 17%, 24%의 포도당 흡수 저해 활성이 관찰됨으로써 시판 포도당흡수 저해물질인 phlorizin과 유사한 효과를 나타내었다(도 3).

[0102] 실험예 4 : 율피 효소 분해액의 발효물의 GLUT4 발현 촉진

[0103] 실시예 1에서와 같이, 락토바실러스 카제이(*Lactobacillus casei*)를 이용한 율피 효소 분해액의 발효물을 농도별로 처리 및 배양하여 얻은 세포로부터 RNA를 추출한 후, 근육으로의 흡수에 관여하는 핵심전사인자인 GLUT4를 대상으로 역전사효소-PCR(RT-PCR)을 아래와 같이 실시하고, 아가로스(agarose) 전기영동에 의해 발현 정도를 비교하였다.

[0104] 구체적으로, 분화된 세포의 RNA를 추출하기 위해 배양세포를 PBS로 두 번 세척한 후, Easyblue와 클로로포름을 가하여 혼합하고 원심분리하였다. 가장 위층인 RNA를 분리한 후 이소프로필 알코올로 RNA를 침전시키고 원심분리하여 얻은 침전물을 75% DEPC-에탄올로 용해시켰다. 다시 원심분리한 다음 침전 RNA를 0.1% DEPC 증류수로 용해시켜 RNA를 추출하였다.

[0105] cDNA 합성하기 위해, 동일량의 Oligo(dT)15 프라이머와 랜덤 헥사머(random hexamers), 추출한 RNA, RNase-

free 증류수를 혼합한 후 가열 냉각한 다음, 5X first-strand 완충액, dNTP mix, DTT 및 역전사효소를 첨가하고 42℃에서 90 분, 70℃에서 15 분간 반응시켜 합성하였다. 합성한 first-strand cDNA(DNA template), Taq DNA 폴리머라아제, dNTP, 10XPCR 버퍼, 전방향 프라이머(forward primer) 및 역방향 프라이머(reverse primer)를 PCR 튜브에 넣고 혼합하였다. 95℃에서 5분간 pre-denature시킨 후, 95℃에서 30 초간 denaturing과 50 내지 65℃에서 30 초간 annealing을 30 사이클 실시한 다음, 최종적으로 72℃에서 30 분간 extension시켰다. PCR 산물은 0.002% 에티듐 브로마이드(ethidium bromide)가 첨가된 2.0% 아가로스겔 에서 100 V로 일정시간 전기영동한 후, 자외선광으로 발현 정도를 확인하고, 밴드의 강도를 Gelpro 소프트웨어에 의해 분석 정량하였다. 이때 내부 표준물질로써 β -액틴을 사용하였다.

[0106] 본 발명에서 도 4는 락토바실러스 카제이(*Lactobacillus casei*)를 이용한 율피 효소 분해액의 발효물의 SGLT1 mRNA 발현 억제 활성을 나타낸다.

[0107] 추출물을 처리하지 않은 대조군(control) 대비, insulin의 GLUT4의 발현률은 121%를 나타내었으며, 실시예 1의 율피 효소 분해액의 발효물은 약 159.6%, 181.7%, 198.7%의 발현률이 관찰되었다.

[0108] 이 결과로부터 락토바실러스 카제이(*Lactobacillus casei*)를 이용한 율피 효소 분해액의 발효물은 GLUT4 발현에 관련된 전사인자들을 농도의존적으로 상향조절시킴을 유전자 발현 수준에서 확인할 수 있다.

[0109] 실험예 5 : 율피 효소 분해액의 발효물의 SGLT1 발현 억제

[0110] 실시예 1에서와 같이, 락토바실러스 카제이(*Lactobacillus casei*)를 이용한 율피 효소 분해액의 발효물을 농도 별로 처리 및 배양하여 얻은 세포로부터 RNA를 추출한 후, 소장흡수에 관여하는 핵심전사인자인 SGLT1을 대상으로 역전사효소-PCR(RT-PCR)을 아래와 같이 실시하고, 아가로스(agarose) 전기영동에 의해 발현 정도를 비교하였다.

[0111] 구체적으로, 분화된 세포의 RNA를 추출하기 위해 배양세포를 PBS로 두 번 세척한 후, Easyblue와 클로로포름을 가하여 혼합하고 원심분리하였다. 가장 위층인 RNA를 분리한 후 이소프로필 알코올로 RNA를 침전시키고 원심분리하여 얻은 침전물을 75% DEPC-에탄올로 용해시켰다. 다시 원심분리한 다음 침전 RNA를 0.1% DEPC 증류수로 용해시켜 RNA를 추출하였다.

[0112] cDNA 합성하기 위해, 동일량의 Oligo(dT)15 프라이머와 랜덤 헥사머, 추출한 RNA, RNase-free 증류수를 혼합한 후 가열 냉각한 다음, 5X first-strand 완충액, dNTP mix, DTT 및 역전사효소를 첨가하고 42℃에서 90 분, 70℃에서 15 분간 반응시켜 합성하였다. 합성한 first-strand cDNA(DNA template), Taq DNA 폴리머라아제, dNTP, 10XPCR 버퍼, 전방향 프라이머 및 역방향 프라이머를 PCR 튜브에 넣고 혼합하였다. 95℃에서 5분간 pre-denature시킨 후, 95℃에서 30 초간 denaturing과 50 내지 54℃에서 30 초간 annealing을 35 사이클 실시한 다음, 최종적으로 72℃에서 30 분간 extension시켰다. PCR 산물은 0.002% 에티듐 브로마이드가 첨가된 2.0% 아가로스겔에서 100 V로 일정시간 전기영동한 후, 자외선광으로 발현 정도를 확인하고, 밴드의 강도를 Gelpro 소프트웨어에 의해 분석 정량하였다. 이때 내부 표준물질로써 β -액틴을 사용하였다.

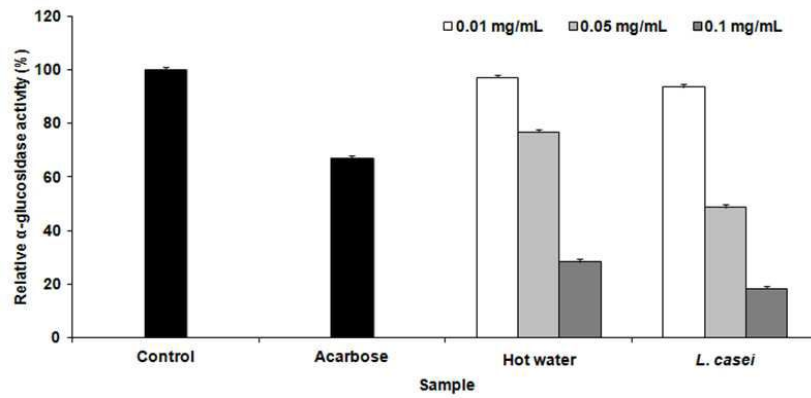
[0113] 본 발명에서 도 5는 락토바실러스 카제이(*Lactobacillus casei*)를 이용한 율피 효소 분해액의 발효물의 SGLT1 mRNA 발현 억제 활성을 나타낸다.

[0114] 추출물을 처리하지 않은 대조군(control) 대비, phlorizin의 SGLT1의 발현률은 52%를 나타내었으며, 실시예 1의 율피 효소 분해액의 발효물은 약 92%, 66%, 36%의 발현률이 관찰되었다.

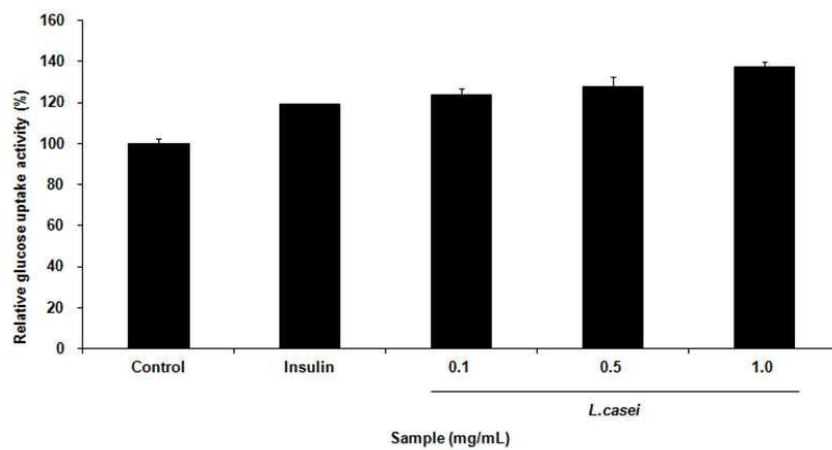
[0115] 이 결과로부터 락토바실러스 카제이(*Lactobacillus casei*)를 이용한 율피 효소 분해액의 발효물은 SGLT1 발현에 관련된 전사인자들을 농도의존적으로 하향조절시킴을 유전자 발현 수준에서 확인할 수 있다.

도면

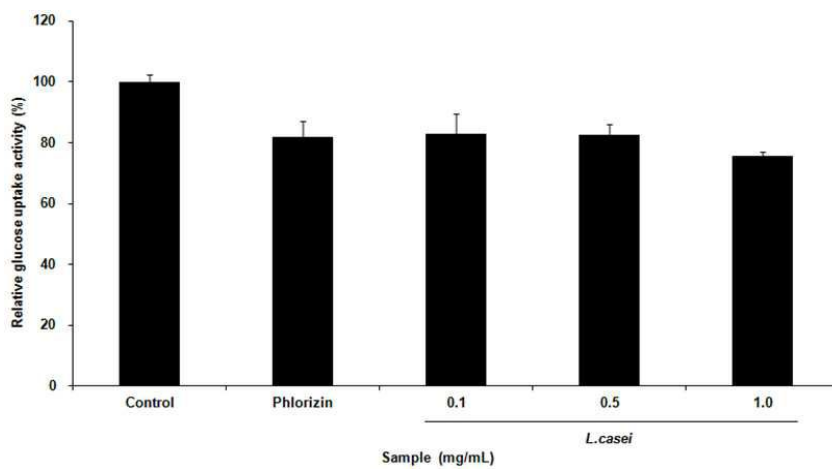
도면1



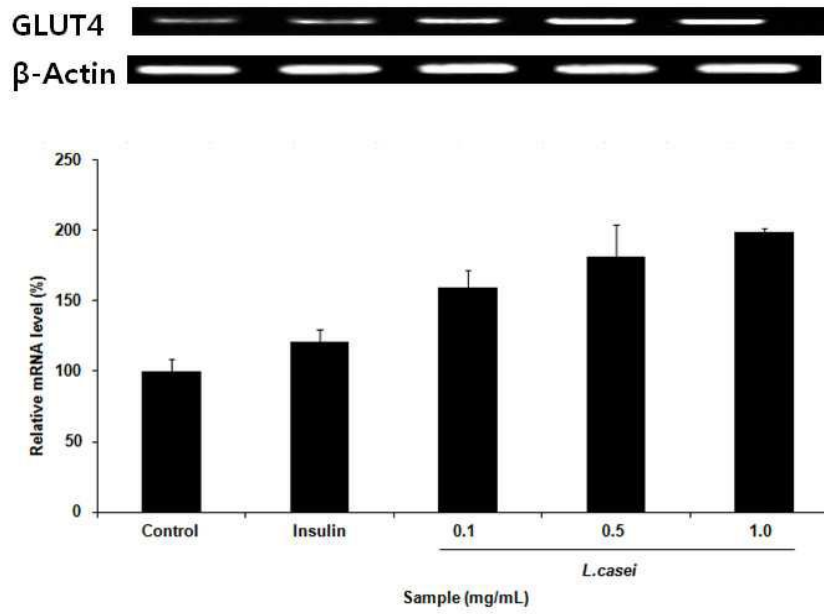
도면2



도면3



도면4



도면5

