



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2017-0064511
(43) 공개일자 2017년06월09일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A23L 33/00 (2016.01) A23L 17/60 (2016.01)
(52) CPC특허분류
A23L 33/00 (2016.08)
A23L 17/60 (2016.08)
(21) 출원번호 10-2017-0065451(분할)
(22) 출원일자 2017년05월26일
심사청구일자 2017년05월26일
(62) 원출원 특허 10-2015-0076181
원출원일자 2015년05월29일
심사청구일자 2015년05월29일
(30) 우선권주장
1020140065463 2014년05월29일 대한민국(KR)

(71) 출원인
한림대학교 산학협력단
강원도 춘천시 한림대학길 1, 한림대학교(옥천동)
(72) 발명자
임순성
강원도 춘천시 춘주로 174, 102동 401호 (퇴계동, 그린타운아파트)
장영수
강원도 횡성군 횡성읍 향교서로 1
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인 정안

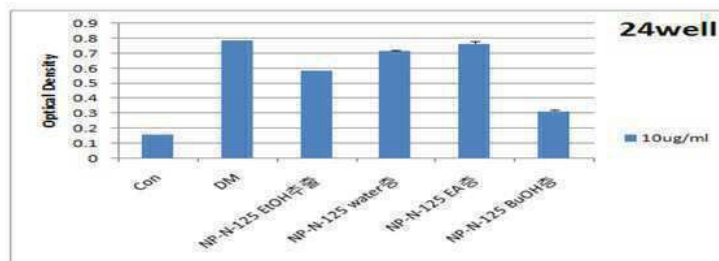
전체 청구항 수 : 총 9 항

(54) 발명의 명칭 미역취 추출물을 함유하는 항비만 식품 조성물 및 이의 제조방법

(57) 요약

본 발명은 미역취 추출물을 함유하는 항비만 식품 조성물 및 이의 제조방법에 관한 것이다. 보다 구체적으로, 본 발명은 항비만 효능이 우수한 미역취 추출물 또는 분획물을 함유하는 식품 조성물 및 이의 제조방법에 관한 것이다.

대표도 - 도3



(52) CPC특허분류

A23L 33/30 (2016.08)

A23V 2002/00 (2013.01)

A23V 2200/332 (2013.01)

A23V 2300/14 (2013.01)

(72) 발명자

이재용

강원도 춘천시 춘주로 174, 103동 1303호 (퇴계동,
그린타운아파트)

김채하

강원도 춘천시 서부대성로 33, 106동 506호 (소양
로2가, e편한세상 춘천)

이정민

강원도 춘천시 춘천로296번길 26(후평동)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 114066-3

부처명 농림수산식품부

연구관리전문기관 농림수산식품기술기획평가원

연구사업명 2014 농생명산업기술개발사업

연구과제명 미역취로부터 체지방감소 건강기능식품 개별인정 원료개발

기 여 율 1/1

주관기관 한림대학교 산학협력단

연구기간 2014.09.25 ~ 2017.09.24

명세서

청구범위

청구항 1

미역취 추출물 또는 분획물을 유효성분으로 함유하는 항비만용 기능성 식품 조성물.

청구항 2

제 1항에 있어서,

상기 항비만용 기능성 식품 조성물은 향미제, 풍미제, 착색제, 증진제, 안정화제, 천연 탄수화물, 영양제, 비타민제, 증점제, pH 조절제, 방부제 및 이들의 혼합물로 이루어지는 군으로부터 선택되는 첨가제를 추가로 포함하는 것인 항비만용 기능성 식품 조성물.

청구항 3

제 1항 내지 제 2항 중 어느 한 항의 기능성 식품 조성물을 포함하는 항비만용 기능성 식품.

청구항 4

- 1) 미역취를 분쇄하는 단계;
- 2) 상기 분쇄물을 추출시키는 추출 단계; 및
- 3) 상기 추출물을 감압 농축시켜 농축물을 수득하는 단계를 포함하는 항비만용 기능성 식품 조성물의 제조 방법.

청구항 5

제 4항에 있어서,

상기 1) 단계는 전초 및 꽃을 포함하는 미역취를 분쇄하는 단계인 항비만용 기능성 식품 조성물의 제조 방법.

청구항 6

제 4항에 있어서,

- 상기 2) 단계는 2-1) 유기 용매를 사용하여 상기 분쇄물을 침출시키는 단계;
- 2-2) 시료를 여과 후 건조시키는 단계;
- 2-3) 건조된 시료를 유기 용매를 사용하여 재 침출시키는 단계;
- 2-4) 시료를 여과 후 건조시키는 단계;
- 2-5) 물을 이용하여 침출시키는 단계; 및
- 2-6) 여과하는 단계를 포함하는 항비만용 기능성 식품 조성물의 제조 방법.

청구항 7

제 4항에 있어서,

상기 2) 단계의 추출은 초음파 추출법, 여과법 및 환류 추출법으로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나 이상의 추출법에 의한 것인 항비만용 기능성 식품 조성물의 제조방법.

청구항 8

제 4항에 있어서,

상기 2) 단계 이후, 3) 단계 이전에 유기 용매를 사용하여 추출한 미역취 추출물을 유기 용매를 사용하여 분획을 실시하는 단계를 추가로 포함하는 기능성 식품 조성물의 제조방법.

청구항 9

제 4항에 있어서,

상기 3) 단계의 추출물은 물, C₁₋₄ 알코올, 메틸렌클로라이드, 에틸아세테이트, 헥산 또는 이들의 혼합 용매로 추출한 추출물 또는 상기 용매들을 순차적으로 시료에 적용하여 추출한 추출물인 항비만용 기능성 식품 조성물의 제조방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 미역취 추출물을 함유하는 항비만 식품 조성물 및 이의 제조방법에 관한 것이다. 보다 구체적으로, 본 발명은 항비만 효능이 우수한 미역취 추출물 또는 분획물을 함유하는 식품 조성물 및 이의 제조방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 최근 경제 발전과 함께 과학기술의 고도성장을 통하여 선진국형 고령화로 접어드는 동시에 성인병이 급격히 증가하고 있다. 이의 원인으로서 현대인들의 스트레스 가중과 식생활 습관이 서구화되고 과도한 영양섭취, 신체 활동량의 감소를 들 수 있으며, 실제 비만을 동반한 합병증인 심장 및 뇌혈관성 질환 사망률이 1, 2위를 기록하고 있으며, 비만은 각종 성인병의 원인으로 제시되고 있다.

[0003] 이와 같이 비만과 함께 수반되는 대사증후군이 관심사로 집중되면서 지방조직은 지방 저장소로서의 역할 뿐 아니라, 대사조절을 하는 내분비기관으로써 연구 대상이 되고 있다. 지방조직에서 생성, 분비되는 아디포백틴, 렙틴, 레지스틴(resistin), 아딤신, 비스파틴(visfatin)과 같은 아디포사이토카인(adipokines)들이 속속 밝혀짐에 따라 이에 관한 많은 연구들이 이루어지고 있다.

[0004] 현재 국내 비만치료제 시장은 약 800억원 이상으로 추정되고 있는데 매년 10% 정도 성장하고 있다. 항비만 기능성 식품 시장에서 기능성에 대하여 과학적인 인정을 받은 물질로는 피루부산과 CLA(Conjugated Linolic Acid)가 있으며, CLA는 지방세포의 자살 기전 유도로서 지방세포 수, 크기를 감소시킨다. CLA의 특허 권한이 외국에 있어 시중에 판매되고 제품들은 외국에 로열티를 지불하여 생산, 판매하고 있다.

[0005] 한때, 제니칼(Xenical), 리덕틸(Reductil)등의 비만 치료제가 등장하면서 500억대 시장을 형성하기도 하였지만, 심혈관질환, 대장점막의 손상과 착색등 부작용이 발견되면서 판매가 금지되었다.

[0006] 판크레틱 리파아제(Pancreatic lipase)는 트리글리세라이드를 2-모노아실글리세롤과 지방산으로 분해하는 중요 효소(key enzyme)로서 작용한다. 대표적인 판크레틱 리파아제 억제제는 *Streptomyces toxytricini*로부터 유래된 립스타틴(lipstatin)의 유도체인 테트라하이드로립스타틴으로서 섭취된 지방의 약 30%를 저해할 정도로 효능이 우수하며, 현재 의약품으로 시판 중에 있지만, 위장장애, 파민증, 담즙분비장애 등의 부작용이 있다.

[0007] 따라서, 장기 복용하여도 안전하고 부작용이 없는 천연물이면서도 비만 예방 또는 체지방 감소 효능이 있는 항비만 의약 또는 식품 조성물의 개발 요구가 증대되고 있다.

[0008] 미역취(*Solidago virgaurea subsp. asiatica* Kitam. ex Hara)는 일지황화, 광과일지황화, 두메미역취, 돼지나물이라 불리기도 하는 국화과로 원산지는 한국과 일본이며, 전국의 산야에서 흔히 자생한다. 어린잎은 나물로 식용하고 민간에서 건위제, 이뇨제 따위로 쓴다.

[0009] 국내의 미역취 주요재배지로는 울릉도와 전남고흥이 국내 유통되는 대부분을 생산하는 생산지이며 그 중에서도 울릉도가 70ha면적에서 연평균 200M/T정도로 전남고흥에 비하여 월등하게 많이 재배되는 것으로 알려져 있다(출처: 울릉군농업기술센터, 고흥군농업기술센터). 전남고흥의 경우 취나물작목반에서 참취, 곰취등과 함께 재배하여 유통된다.

[0010] 현재 미역취의 대부분은 건조물 형태로 유통되고 일부는 간장절임 등의 식품의 형태로만 유통되어 지고 있으며, 멜라닌 생성 억제 효과, 항염증효과, 조골세포의 활성화 등에 관한 연구가 보고되어 있으나, 항비만 관련 효과에 대해서는 보고된 바가 없다.

[0011] 본 연구자들은 천연 미역취(*Solidago virgaurea subsp. asiatica* Kitam. ex Hara) 추출물 및 분획물로부터 비만 예방 또는 체지방 감소 효능을 확인하였으며, 항비만 활성 결과를 기반으로 미역취의 유효성분을 안정적으로 분리할 수 있도록 하는 최적의 미역취 추출조건을 확립하고자 연구한 결과 본 발명을 완성하게 되었다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0012] 본 발명의 목적은 미역취 추출물을 함유하는 항비만 식품 조성물 및 이의 제조방법을 제공하는 것이다.

[0013] 본 발명의 다른 목적은 미역취 추출물의 분획물을 함유하는 식품 조성물 및 이의 제조방법을 제공하는 것이다.

[0014] 본 발명의 또 다른 목적은 우수한 비만 예방 또는 체지방 감소 효능을 갖는 미역취 추출물의 분획물을 함유하는 식품 조성물 및 이의 제조방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0015] 상기 목적을 달성하기 위한 본 발명의 일 구현예에서, 미역취 추출물 또는 분획물을 유효성분으로 함유하는 항비만용 기능성 식품 조성물이 제공된다.

[0016] 본 발명의 일 구현예에서, 미역취를 분쇄하는 단계, 상기 분쇄물을 추출시키는 추출 단계, 및 상기 추출물을 감압 농축시켜 농축물을 수득하는 단계를 포함하는 항비만용 기능성 식품 조성물의 제조 방법이 제공된다.

[0017] 본 발명의 일 구현예에서, 전초 및 꽃을 포함하는 미역취를 분쇄하는 단계, 유기 용매를 사용하여 상기 분쇄물을 침출시키는 단계, 시료를 여과 후 건조시키는 단계, 건조된 시료를 유기 용매를 사용하여 재 침출시키는 단계, 시료를 여과 후 건조시키는 단계, 물을 이용하여 침출시키는 단계, 및 여과하는 단계를 포함하는 항비만용 기능성 식품 조성물의 제조 방법이 제공된다.

[0018] 본 발명의 일 구현예에서, 유기 용매를 사용하여 추출한 미역취 추출물을 유기 용매를 사용하여 분획을 실시하는 단계를 포함하는 항비만용 기능성 식품 조성물의 제조 방법이 제공된다.

[0019] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

[0020] 본 발명은 미역취 추출물 또는 분획물을 유효성분으로 함유하는 항비만용 기능성 식품 조성물을 제공한다.

[0021] 본 발명에서 용어, "추출물"은 천연물로부터 분리된 활성 성분을 의미하며, 여기서는 미역취로부터 분리된 물질을 의미한다.

[0022] 본 발명의 조성물의 항 비만 효과는 지방 축적 억제 기능 검증을 위한 3T3-L1세포의 분화억제 시험함으로써 확인할 수 있다.

[0023] 본 발명의 일 구체예에서, 상기 추출물을 제조하는 방법은 초음파 추출법, 여과법 및 환류 추출법 등 당업계의 통상적인 추출 방법일 수 있다. 바람직하게는 세척 및 건조로 이물질이 제거된 미역취를 물, C₁₋₄ 알코올, 메틸렌클로라이드, 에틸아세테이트, 헥산 또는 이들의 혼합 용매로 추출한 추출물일 수 있으며, 상기 용매들을 순차적으로 시료에 적용하여 추출한 추출물일 수도 있다.

[0024] 추출 용매는 시료의 중량 기준으로 2 내지 50배를 사용할 수 있으며, 바람직하게는 2 내지 20배이다. 추출을 위

해 시료는 추출 용매에서 침출을 위해 1 내지 72 시간 동안 방치될 수 있으며, 바람직하게는 24 내지 48 시간 동안 방치될 수 있다.

[0025] 추출 후, 추출물은 새로운 분획 용매를 순차적으로 적용하여 분획할 수 있다. 분획시 사용하는 분획 용매는 물, C₁₋₄ 알코올, 메틸렌클로라이드, 에틸아세테이트, 또는 헥산이며 에틸아세테이트 및 부탄올이 바람직하다.

[0026] 추출물 또는 분획물을 얻은 후에는 농축 또는 동결건조 등의 방법을 추가적으로 사용할 수 있다.

[0027] 본 발명의 일 구현예에서, 식품 조성물은 향미제, 풍미제, 착색제, 충전제, 안정화제, 천연 탄수화물, 영양제, 비타민제, 증점제, pH 조절제, 방부제 및 이들의 혼합물로 이루어지는 군으로부터 선택되는 첨가제를 추가로 포함할 수 있다.

[0028] 본 발명의 일 구현예에서, 본 발명의 기능성 식품 조성물은 정제, 환제, 과립제, 분말제, 액제, 경질캡슐제, 연질캡슐제 등과 같은 일반적인 제형으로 제조될 수 있으며, 죽, 빵, 음료, 바, 초콜릿, 쿠키, 차, 드링크제, 비타민 복합제, 육류, 소시지, 캔디, 면, 젤리 등과 같은 임의의 형태로 제조될 수 있다.

[0029] 상기와 같은 여러 제형 또는 형태를 제조하기 위해, 전술한 부형제들과 같은 식품학적으로 허용 가능한 담체 또는 첨가제를 사용할 수 있으며, 제조하고자 하는 제형 또는 형태의 제조에 당해 기술 분야에서 사용 가능한 것으로 공지되어 있는 임의의 담체 또는 첨가제가 이용될 수 있다.

발명의 효과

[0030] 본 발명에 의해 우수한 비만 예방 또는 체지방 감소 효능을 갖는 미역취 추출물 또는 분획물을 함유하는 식품 조성물 및 이의 제조방법이 제공된다.

도면의 간단한 설명

[0031] 도 1은 70% EtOH 추출물의 HPLC 결과이다.

도 2는 70% EtOH 추출물로부터 분획한 EtOAc 분획물 및 n-BuOH 분획물의 HPLC 결과이다.

도 3은 미역취 분획 후 확인한 효능을 비교한 도표이다.

도 4는 미역취 n-BuOH 분획물의 세포 독성 평가 (MTT) 를 도시한 그래프이다.

도 5는 C57BL/6 쥐 그룹에 고지방사료를 투여하고, 동시에 미역취 추출물을 8주간 투여한 것에 따른 체중 변화를 나타낸 그래프이다.

도 6은 C57BL/6 쥐 그룹에 고지방사료를 투여하고, 동시에 미역취 추출물을 8주간 투여한 것에 따른 체중 변화를 나타낸 도표이다.

도 7은 C57BL/6 쥐 그룹에 고지방사료를 투여하고, 동시에 미역취 추출물을 8주간 투여한 이후, 쥐 그룹에 대한 혈액 지표를 나타내는 그래프이다.

도 8은 C57BL/6 쥐 그룹에 고지방사료를 투여하고, 동시에 미역취 추출물을 8주간 투여한 이후, 쥐 그룹에 대한 주요 장기들의 무게 변화를 나타내는 그래프이다.

도 9는 체내(in vivo)에서의 지방 축적 억제 기능 검증을 위한 웨스턴 블롯(western blot) 결과 및 그 결과에 대한 그래프이다.

도 10은 3T3-L1 세포에서 배양액으로 교환 후 미역취 추출물을 처리하고 나서 오일 레드 O(oil red O)로 염색한 결과이다.

도 11은 3T3-L1 세포에서 분화기전으로 알려진 PPAR- γ 및 C/EBP- α 의 발현 여부에 대한 결과를 나타내는 것이다.

도 12는 3T3-L1 세포에서 분화기전으로 알려진 AMPK와 AMPK의 타겟 유전자로 알려진 ACC의 발현 여부에 대한 결과를 나타내는 것이다.

도 13은 3T3-L1 세포에서 분화기전으로 알려진 FAS 및 분화 마커(maker)로 쓰이는 FABP5(aP2)의 발현 여부에 대한 결과를 나타내는 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0032] 이하, 본 발명을 하기의 실시예에 의해 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.
- [0033] [실시예 1]
- [0034] 미역취 분획물의 제조
- [0036] 제조예 1: 추출 방법
- [0037] 전초 및 꽃을 포함하는 미역취를 분쇄한 뒤 디클로로메탄을 이용하여 48 시간 동안 상온에서 침출시킨 후 시료를 여과한 후 건조시켰다. 건조된 시료를 70% EtOH을 사용하여 상온에서 48 시간 동안 침출시킨 후 시료를 여과한 후 건조시키고 다시 물을 이용하여 상온에서 48 시간 동안 침출시킨 후 여과하여 농축하였다.
- [0039] 제조예 2: 분획 방법
- [0040] 70% EtOH로 추출한 미역취 15g을 DW 500ml에 녹인 후 EtOAc를 이용하여 5회 분획을 실시하고 분리된 물층을 다시 n-BuOH을 이용하여 3회 분획하였으며, 얻어진 용액을 농축하여 각 분획물을 확보하였다.
- [0042] [실시예 2]
- [0043] 지방 축적 억제 기능의 평가
- [0045] 실험예 1: 지방 축적 억제 기능 검증을 위한 3T3-L1세포의 분화억제
- [0046] 3T3-L1 지방전구 세포(pre-adipocyte cell)은 ATCC (American Type Culture Collection)에서 구입하여 사용한다. 세포배양은 10% 소태아혈청(fetal bovine serum, FBS), 페니실린(penicillin) (100U/ml), 스트렙토마이신(streptomycin) (100U/ml)을 포함한 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) 배지 (Gibco)를 사용하였고 CO₂배양기에 37, 5% CO₂조건에서 배양한다. 3T3-L1 세포(cell)을 24well plate에 시딩(seeding)하고 세포가 후 융합 세포(post-confluent) 할 때 호르몬 콕테일(rhormone cocktail)인 0.5 mM 덱사메타손(dexamethasone), 10 g/ml 인슐린(insulin), 0.5 mM IBMX를 처리하고 이틀에 한번 배지를 갈아주고 4일 후에 배지(media)은 인슐린(insulin) 5 g/ml로 바꿔주고 이틀 뒤에 다시 정상배지로 갈아주어 지방세포로 분화 유도한다. 시료를 지방세포 분화 시에 처리하였다. 각 시약들의 지방생성(adipogenesis) 억제를 확인하기 위하여 지방 분화 배지와 각 시약들을 동시에 처리하여 8일 후 분화된 세포(cell)의 배지들(media)을 버리고 1 X PBS에 워싱(washing) 3번 하여 10% 포르말린시약에 고정시킨다. 1시간 뒤 0.6% 오일 레드(Oil Red) O 시약에 염색시키고 다시 상대적인 TG의 OD값을 측정한다. (모든 시료의 final concentration은 10ug/ml이다.)
- [0047] 평가 결과, 도 3에서 볼 수 있듯이, 미역취 70%EtOH 추출물을 대상으로 용매분획하여 확보한 EtOAc와 n-BuOH 분획물들에 대한 항비만 효능 실험 결과 n-BuOH 분획물이 유효물질을 함유하고 있는 것으로 확인되었다.
- [0048] 또한, 도 4에서 볼 수 있듯이 상기 분획물에서는 유효 효능을 나타내는 유효효능을 나타내는 10ug/ml 은 물론 이의 5배에 해당하는 50ug/ml에서도 독성이 나타나지 않았다.
- [0050] 실험예 2: 동물 실험을 통한 항비만 효능 평가(체중 변화, 혈액지표 및 주요 장기 무게 변화)
- [0052] 5주령의 C57BL/6 마우스 70마리를 대한바이오링크에서 구입하여 1주간 순화시켰다. 이후, 매주 체중을 체크하였다. 6주령의 쥐를 무작위로 5그룹 (12마리) + 1그룹(10마리 정상식이)로 그룹을 나눈 후 정상대조군(10마리)은 일반 식이를 하고 나머지 5그룹(60마리)은 고지방사료를 8주간 투여하였다. 고지방사료를 투여한 그룹 중 하나의 그룹은 고지방사료 이외에 아무것도 투여하지 않았다(대조군). 다른 4개의 그룹 중 3개의 그룹은 미역취 추

출물의 각각 샘플농도(이전실험에서 증면된 유효성 있는 농도)를 결정하여, 매일(8주*7일=56일) 같은 시간(오후 2시경) 존테를 이용하여 위내에 투여하였다. 나머지 하나의 그룹은 가르시니아를 500gm/kg 투여하였다.

[0053] 8주간 상기와 같은 처리 후 쥐를 심마취를 시켜 심장 채혈하고, 간, 췌장, 비장, 심장, 근육 및 지방조직을 채취하였다. 간, 췌장, 비장, 심장, 근육, 지방조직 및 혈액에서 지방대사효소 활성 및 인자들을 분석하고, 혈액에서 혈장 지질 및 콜레스테롤 등 관련 바이오마커를 분석하였다.

[0055] 비만 유도하는 실험에서 주로 사용하는 60% 고지방 사료를 사용하지 않고, 45%를 사용하였다. 그 이유는 너무 과한 비만상태가 아니라 적정비만 상태에서 미역취 추출물을 포함하는 약물의 효과가 얼마나 일어나는지 보기 위해 낮은 조건의 고지방사료로 비만을 유도하면서 경구투여로 실험을 진행하였다.

[0057] 쥐들의 체중 변화에 대한 평가 결과인 도 5 및 도6에 따르면, 2 내지 3주차까지는 정상대조군과 비교하여 큰 차이가 없지만, 4주 이후부터는 정상대조군과 비교하여, 미역취 추출물을 위내에 투여한 그룹(S100mg/kg, S500mg/kg 및 S1000mg/kg)의 체중이 더욱 적게 나갔으며, 변화량도 감소하였다. 항비만에 효과가 있는 것으로 알려진 가르시니아(G500mg/kg)를 투여한 그룹과 비교하더라도 3주차 이후부터는 미역취 추출물을 투여한 그룹의 쥐들의 체중이 적게나가고, 체중 변화율도 적은 것으로 확인하였다.

[0059] 쥐들의 혈액 지표에 대한 평가 결과인 도 7에 따르면, ALT(alanine aminotransferase) 및 AST(aspartate aminotransferase)를 본 결과 대조군에 비해 미역취 추출물을 투여한 그룹(S100mg/kg, S500mg/kg 및 S1000mg/kg)의 수치가 높지 않아 간 독성이 없다. 또한, BUN(blood urea nitrogen) 및 CREA(creatinine)의 결과, 신장 독성이 없는 것으로 확인하였다. HDL-콜레스테롤 및 LDL-콜레스테롤에 대한 결과, 비록 HDL-콜레스테롤이 증가하는 현상을 보이지는 않았으나, LDL-콜레스테롤에서는 농도 의존적으로 감소하는 것을 확인하였다. TG(triglyceride)의 결과, 대조군(Con-Fat)과 비교할 때 미역취 추출물을 투여한 그룹(S1000mg/kg)의 값이 유의성 있게 떨어진 것으로 보아 지방억제에 효능이 있다고 할 것이다.

[0061] 쥐들의 주요 장기들의 무게 변화에 대한 평가 결과인 도 8 및 하기 표 1에 따르면,

표 1

[0062]

	심장	간	지라	신장	지방
정상 대조군	2.04	15.9	0.94	3.09	2.59
대조군	2.14	15.1	1.01	3.16	4.53
가르시니아	2.28	14.4	1.05	3.22	3.75
미역취 100	2.04	14.2	0.98	3.13	3.39
미역취 500	2.12	13.5	1.02	3.00	2.71
미역취 1000	2.18	13.6	1.059	3.05	2.57

[0064] 상기 표 1 및 도 8에 의하면 지방의 무게 비교시 대조군과 비교할 때 가르시니아군과 미역취군 모두 무게가 감소하였다. 하지만, 가르시니아군보다 미역취군을 농도별로 처리한 군이 농도의존적으로 지방의 무게가 감소되었다.

[0066] 실험예 3: 체내(in vivo)에서의 지방 축적 억제 기능 검증을 위한 웨스턴 블롯(western blot)

[0068] 지방 조직을 이용하여 단백질을 균질하게 한 후 4℃에서 13500rpm으로 15분간 원심 분리하여 상층액을 취하고 상층액의 단백질을 정량하였다. 단백질은 바이오-레드(Bio-Rad) 단백질 정량 시약(Bio-Rad, Hercules, CA, USA)을 사용하여 정량하고 라앰리 샘플 완충용액(Laemmli sample buffer)(Bio-Rad)와 머캅토메탄올(mercaptomethano

1)을 섞어 샘플(sample)을 만들었다. 이렇게 정량된 단백질 샘플을 SDS-폴리아크릴아미드 겔(polyacrylamide gel)을 이용하여 전기영동으로 분리한 후, 아크릴아미드 겔(acrylamide gel)을 나이트로셀룰로오스 막(nitrocellulose membrane)으로 전사시켰다. 5% skin milk를 함유한 TBS-T에 담귀 상온에서 1시간 동안 차단(blocking)하고 TBS-T로 5분마다 3번 세척하였다. 준비된 막(membrane)에 1차 안티바디(antibody)를 처리하여 상온에서 2시간 또는 4℃에서 하룻 밤 동안(overnight) 둔 이후, TBS-T로 분마다 3번 세척하였다. ECL 용액을 적용시킨 다음 암실에서 BioMax MR film에 감관시켜 단백질 발현을 분석하였다.

[0070] 평가 결과인 도 9에 따르면, 지방합성과 관련된 바이오마커에서 확인해본 결과 지방 조직에서 지방관련 바이오마커들이 유의성 있게 감소하였고, 상위 조절인자인 CREB의 단백질 발현이 미역취균에서 감소되어 있음을 확인하였다.

[0072] **실험예 4: 체외(in vitro)에서의 지방 축적 억제 기능 검증을 위한 웨스턴 블롯(western blot)**

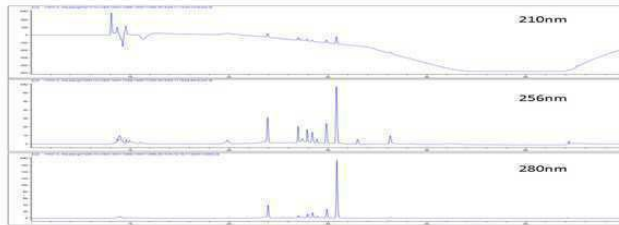
[0073] 3T3-L1 지방선구세포(pre adipocyte)는 미역취(*Solidago virga aurea* var. *gigantea*) 추출물을 처리하고 배양하였다. 처리된 세포를 PBS로 씻어내고 트립신(trypsin) 처리를 하여 부유시킨 다음 원심분리하여 세포를 수집하였다. 얻어진 세포에 루시스 완충용액(lysis buffer)를 첨가하여 스크레이퍼(scraper) 후 4℃에서 13500rpm으로 15분간 원심 분리하여 상층액을 취하고 상층액의 단백질을 정량하였다. 단백질은 바이오-래드(Bio-Rad) 단백질 정량 시약(Bio-Rad, Hercules, CA, USA)을 사용하여 정량하고 라엠리 샘플 완충용액(Laemmli sample buffer)(Bio-Rad)와 머캅토메탄올(mercaptomethanol)을 섞어 샘플(sample)을 만들었다. 이렇게 정량된 단백질 샘플을 SDS-폴리아크릴아미드 겔(polyacrylamide gel)을 이용하여 전기영동으로 분리한 후, 아크릴아미드 겔(acrylamide gel)을 나이트로셀룰로오스 막(nitrocellulose membrane)으로 전사시켰다. 5% skin milk를 함유한 TBS-T에 담귀 상온에서 1시간 동안 차단(blocking)하고 TBS-T로 5분마다 3번 세척하였다. 준비된 막(membrane)에 1차 안티바디(antibody)를 처리하여 상온에서 2시간 또는 4℃에서 하룻 밤 동안(overnight) 둔 후 TBS-T로 분마다 3번 세척하였다. ECL 용액을 적용시킨 다음 암실에서 BioMax MR film에 감관시켜 단백질 발현을 분석하였다.

[0075] 평가 결과인 도 10에 따르면, 3T3-L1세포에서 분화 배양액으로 교환 후 미역취 추출물을 처리하고 나서 오일 레드 O(oil red O)로 염색한 결과로, 대조군 및 가르시니아를 투여한 그룹에서는 염색이 된 것이 발견되었지만, 미역취 추출물을 투여한 그룹에서는 붉은 색으로 염색된 부분이 거의 발견되지 않음을 확인하였고, 정량적인 그래프를 통해서도 미역취 추출물을 투여한 그룹의 효과가 우수함을 확인하였다.

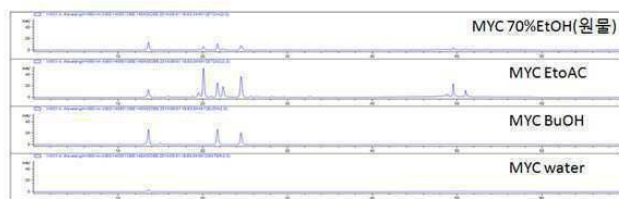
[0077] 평가 결과인 도 11에 따르면, 3T3-L1세포에서 분화기전으로 알려진 PPAR- γ 및 C/EBP- α 의 발현이 미역취 추출물에 의해 감소하였음을 확인하였으며, 도 12에 따르면, 3T3-L1세포에서 분화기전으로 알려진 AMPK 및 AMPK의 타겟(target) 유전자로 알려진 ACC의 발현이 미역취 추출물로 인해 감소하였고, 도 13에 따르면, 3T3-L1세포에서 분화기전으로 알려진 FAS와 분화 마커(marker)로 쓰이는 FABP4(aP2)의 발현이 미역취 추출물로 인해 감소하였음을 확인하였다.

도면

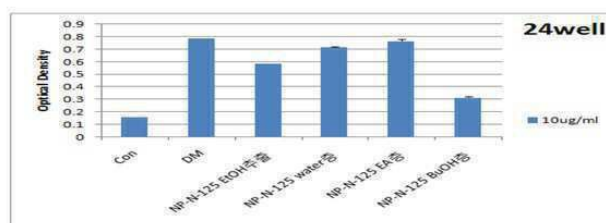
도면1



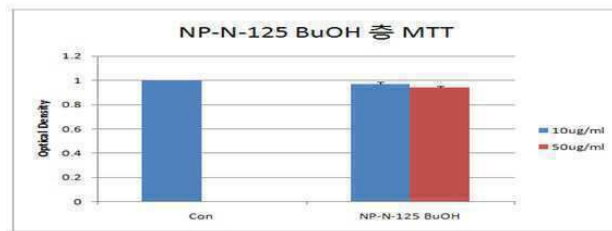
도면2



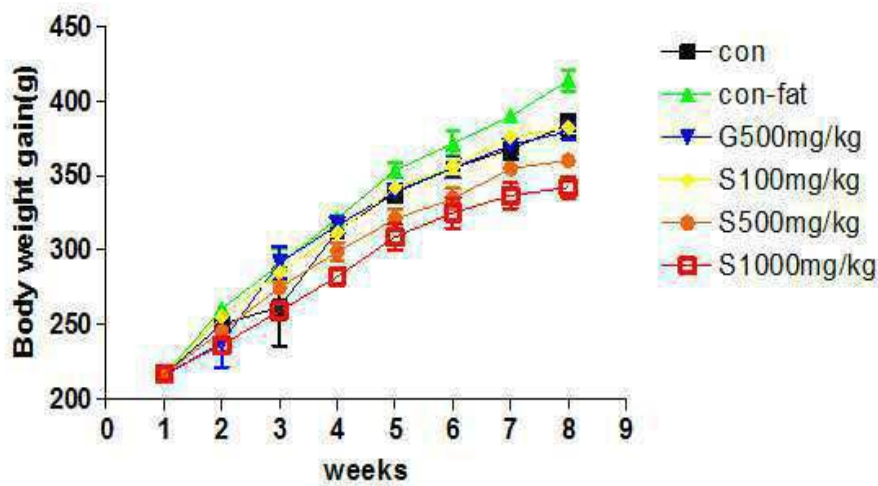
도면3



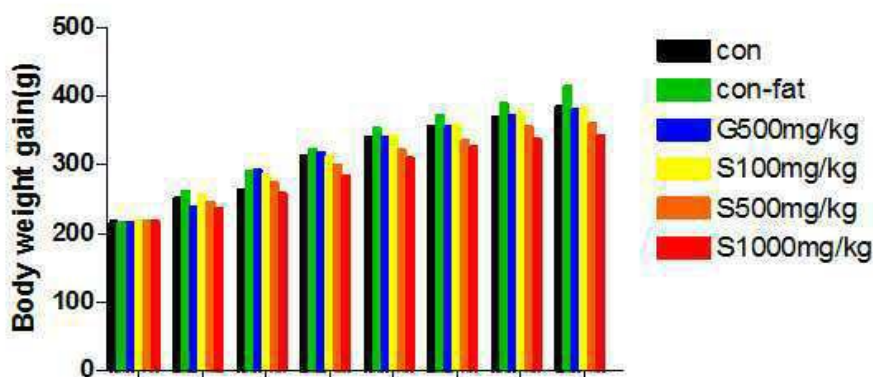
도면4



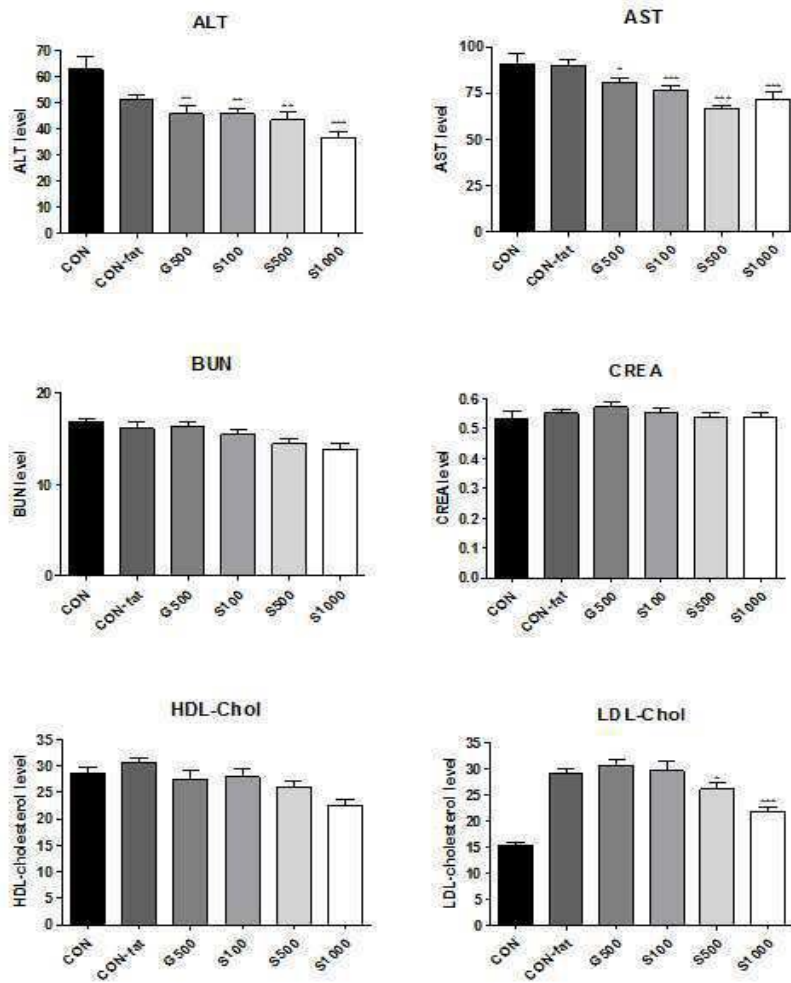
도면5



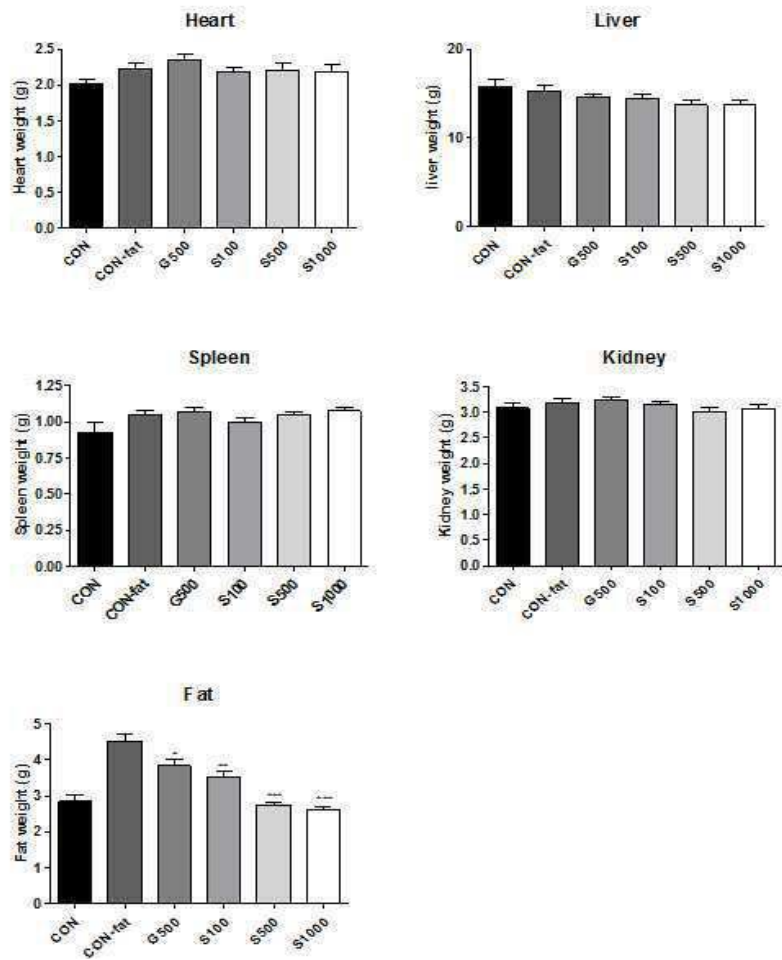
도면6



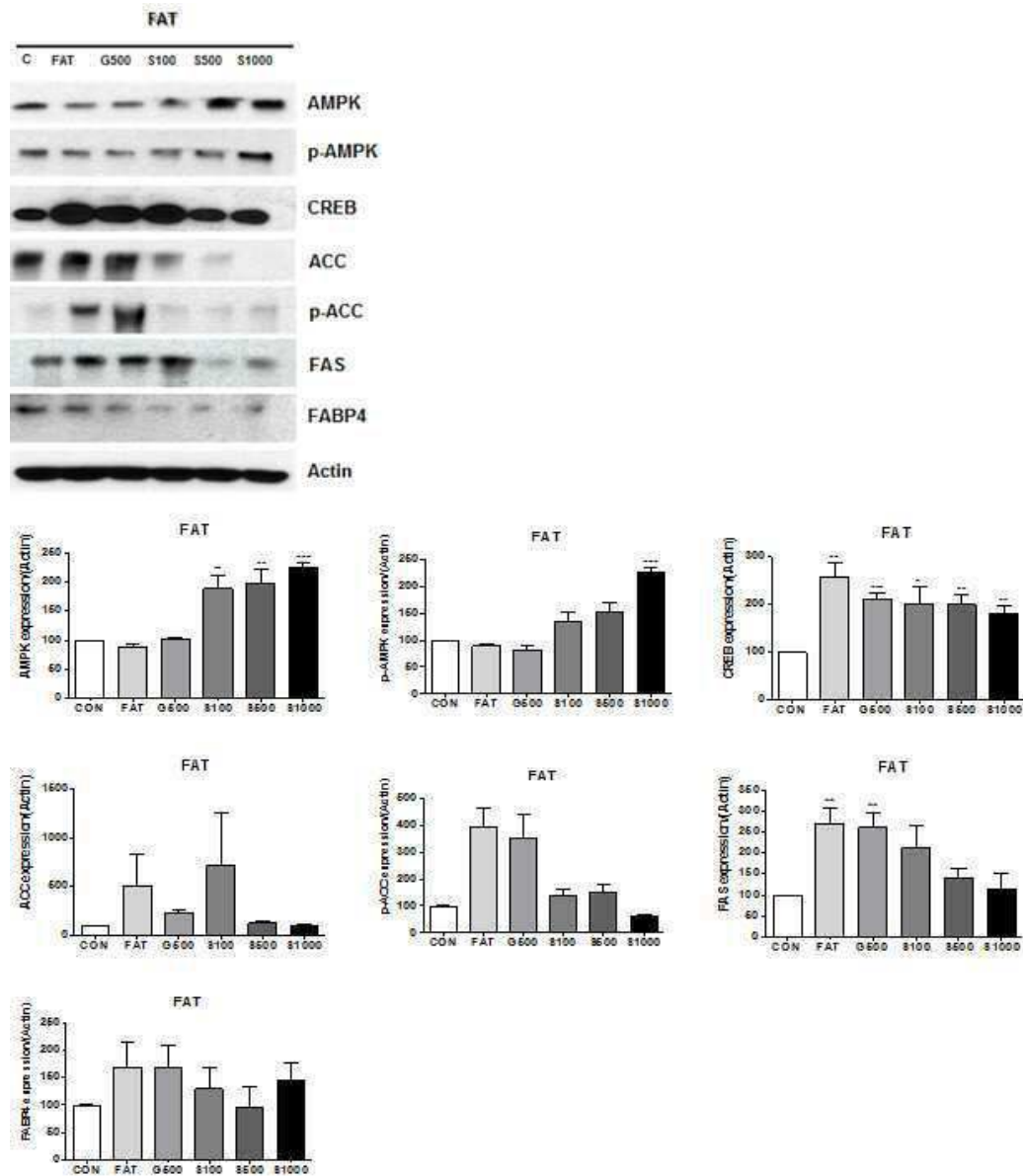
도면7



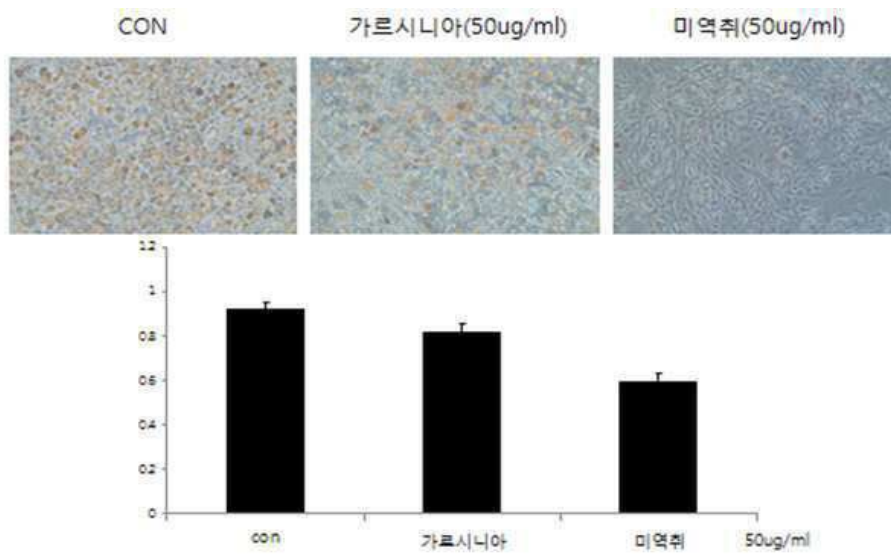
도면8



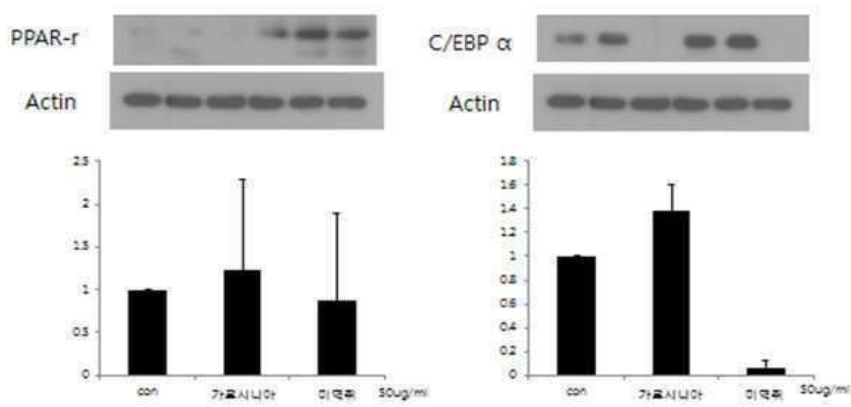
도면9



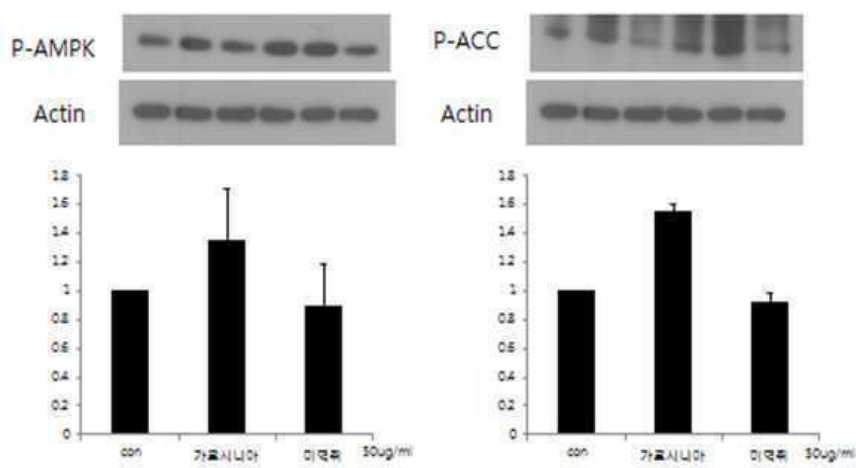
도면10



도면11



도면12



도면13

