(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2021-0019051
(43) 공개일자 2021년02월19일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 36/605 (2006.01) *A23L 29/00* (2016.01)
A23L 33/105 (2016.01) *A61P 3/04* (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 36/605 (2013.01)
A23L 29/06 (2016.08)
(21) 출원번호 10-2021-0019439(분할)
(22) 출원일자 2021년02월10일
심사청구일자 2021년02월10일
(62) 원출원 특허 10-2018-0136851
원출원일자 2018년11월08일
심사청구일자 2018년11월08일

(71) 출원인
충남대학교산학협력단
대전광역시 유성구 대학로 99 (궁동, 충남대학교)
(72) 발명자
강종성
대전광역시 유성구 어은로 57, 118동 801호(어은동, 한빛아파트)
김영호
대전광역시 유성구 봉명로 48, 801동 302호(원신흥동, 인스빌리베라)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인 공간

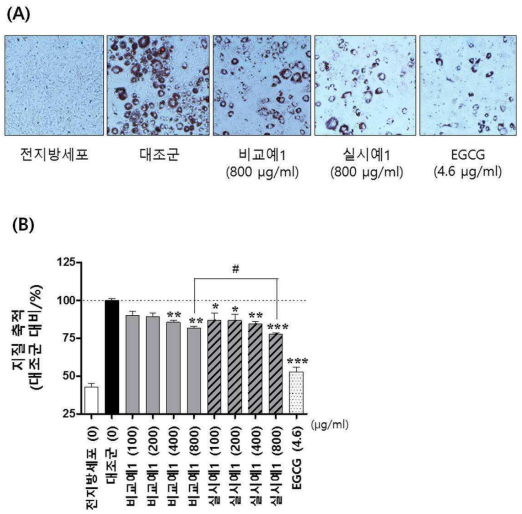
전체 청구항 수 : 총 3 항

(54) 발명의 명칭 **펙티넥스를 처리한 뽕나무 잎 추출물을 유효성분으로 포함하는 비만 예방 또는 치료용 약학 조성물**

(57) 요 약

본 발명은 펙티넥스(pectinex)를 처리하여 생물전환된 뽕나무 잎 추출물을 유효성분으로 포함하는 비만의 예방 또는 치료용 약학 조성물에 관한 것이다. 상기 추출물을 지방세포에 처리하는 경우 지방축적을 저해하는 효과가 우수하며, 비만이 유도된 동물모델에 투여하는 경우 비만 동물의 간, 부고환지방 및 신장후지방의 무게를 감소시키는 효과가 우수하므로, 비만의 예방 또는 치료용 약학 조성물로 유용하게 사용될 수 있다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류
A23L 33/105 (2016.08)
A61P 3/04 (2018.01)
A23V 2002/00 (2013.01)
A23V 2200/332 (2013.01)
A61K 2236/19 (2013.01)

(72) 발명자
명창선
대전광역시 유성구 대학로 59, 1212호(봉명동)
조정원
세종특별자치시 시청대로 236, 새샘마을3단지 316동 1101호
윤민호
대전광역시 서구 계룡로583번길 12, 리가아파트 101동 204호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	3150243
과제번호	315024-3
부처명	농림축산식품부
과제관리(전문)기관명	농림수산식품기술기획평가원
연구사업명	농생명산업기술개발사업
연구과제명	뽕나무 산물의 기능성 식,의약 소재물질 개발
기 여 율	1/1
과제수행기관명	충남대학교 산학협력단
연구기간	2015.08.14 ~ 2018.08.13

명 세 서

청구범위

청구항 1

펙티넥스(pectinex) 처리한 뽕나무 잎 추출물을 유효성분으로 포함하고,

상기 펙티넥스 처리한 뽕나무 잎 추출물은, 뽕나무 잎을 물로 40~121℃에서 1~5시간 동안 추출하여 얻은 뽕나무 잎 추출물에 펙티넥스를 1~3중량%로 더하고 40~60℃에서 10~24시간 동안 처리한 것을 특징으로 하는 비만 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 2

펙티넥스(Pectinex) 처리한 뽕나무 잎 추출물을 유효성분으로 포함하고,

상기 펙티넥스 처리한 뽕나무 잎 추출물은, 뽕나무 잎을 물로 40~121℃에서 1~5시간 동안 추출하여 얻은 뽕나무 잎 추출물에 펙티넥스를 1~3중량%로 더하고 40~60℃에서 10~24시간 동안 처리한 것을 특징으로 하는 비만 예방 또는 개선용 건강기능식품.

청구항 3

(1공정) 뽕나무 잎에 뽕나무 잎 중량 대비 5~100배 부피의 물을 더하는 단계;

(2공정) 상기 1공정의 혼합물을 40~121℃에서 1~5시간 동안 추출하여 뽕나무 잎 추출물을 얻는 단계; 및

(3공정) 상기 2공정의 뽕나무 잎 추출물에 펙티넥스를 1~3중량%로 더하고 40~60℃에서 10~24시간 동안 처리하는 단계;를 포함하는 것을 특징으로 하는 생물전환된 뽕나무 잎 추출물의 제조방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 펙티넥스(pectinex)를 처리하여 생물전환된 뽕나무 잎 추출물을 유효성분으로 포함하는 비만 예방 또는 치료용 약학 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 최근 급속한 산업화와 소득 수준의 향상, 식습관 및 식생활 등의 생활패턴이 빠르게 서구화가 진행됨에 따라 암, 당뇨병, 심혈관계 질환, 비만 등으로 대표되는 각종 성인병 환자가 급격히 증가하고 있는 추세이다.

[0003] 일반적으로, 비만(obesity)은 섭취한 에너지중 소비하고 남은 것이 중성지방으로 전환되어 주로 복부와 피하지방조직의 지방세포(adipocyte)에 축적되는 일종의 질병으로서, 성인 남성의 경우 체지방지수(BMI, body mass index) 25kg/m^2 이상, 성인 여성의 경우 30kg/m^2 이상을 말하였다.

[0004] 비만은 유전적, 영양학적, 환경적, 사회적 요인 등 다양한 원인들에 의해 나타나는 복잡한 증후군으로, 그 자체가 일상생활의 지장을 초래하는 질병이기도 하지만, 질병 자체의 의미보다는 비만으로 인해 여러 가지 합병증을 유발하게 된다는 것에 더욱 문제의 심각성이 있다.

[0005] 비만으로 인하여, 혈액 내의 콜레스테롤 또는 중성지방의 양이 증가되는 고지혈증을 유발하여 고혈압, 심혈관계 질환 및 뇌졸중 등의 치명적인 질병으로 발전할 수 있고, 말초조직(Kelley, D. E. et al., Diabetes, 49(5), 677-683, 2000)과 복부지방조직에서의 중성지방 축적(Kelley, D. E. et al., Am J Physiol Endocrinol Metab., 278(5), E941-948, 2000)의 증가로 인슐린 저항성이 유발되어 제2형 당뇨병을 발생시킬 수도 있으므로, 장기적인 관리와 치료가 절대적으로 필요하다. 또한, 동양인의 경우, 서양인에 비해 체질량 지수는 적어도 복부 비만이 심하여 고혈압, 당뇨병, 고지혈증과 같은 동맥관련 질환으로 인한 합병증에 대한 감수성이 높기 때문에 비만 관리가 더욱 중요시된다.

[0006] 비만을 치료하기 위해 식이요법, 운동요법, 잘못된 식습관과 생활습관을 교정해 주는 행동수정요법, 외과에서

장이나 위의 용적을 줄이는 수술요법, 식욕 억제제, 이뇨제, 설사제 혹은 포만감을 주기 위한 섬유질 등을 사용하는 약물요법 등 다양한 방법이 제공되고 있다.

[0007] 현재까지 개발된 비만치료제 계열은 식욕억제제, 열 대사 촉진제, 소화억제제, 호르몬조절제 등이 알려져 있다. 식욕억제제 계열들은 작용기작에 따라 중추성 아드레랄린 수용체 흥분제(예. 벤즈페타민(benzphetamine), 펜터민(phentermine)), 세로토닌 재흡수 억제제(예. 펜플루라민(fenfluramine)), 아드레랄린 및 세로토닌 재흡수억제제(예. 시부트라민(sibutramine)) 등으로 나누어진다. 열대사촉진제(예. 에페드린/카페인 혼합제(ephedrine/caffeine combination))는 아드레날린성 β3 수용체의 효능을 증대시켜서 체내의 발열작용과 에너지 소비량을 증가시키면 비만억제 효과를 나타내어 정상인보다 단기적인 체중감소 효능은 뛰어나게 나타난다. 그러나, 중추신경계에 작용하여 식욕을 감소시키는 작용기전 특성 상 장기간 사용 시 지속적인 효과는 떨어지는 반면 심장질환, 혈압상승, 심장마비 증가, 우울증 및 자살 증가 등 심각한 부작용을 유발하였다는 문제가 있다.

[0008] 한편, 지방분해 저해제 계열 비만치료제로는 오를리스타트(orlistat)는 중성지방을 분해하는 췌장의 지방분해효소인 리파아제(pancreatic lipase)에 비가역적인 결합을 하여 불활성화 시킴으로써 중성지방 및 콜레스테롤의 흡수를 감소시킴과 동시에 배설을 촉진시키는 기작으로 항비만 작용을 하였다. 그러나 오를리스타트 또한 복통, 설사, 지용성 비타민 흡수 억제 등의 부작용들이 있으며, 장기 복용 시 심각한 간 손상 유발 등이 알려져 있어, 현재는 이에 대한 안전성 재검토가 진행 중에 있다.

[0009] 따라서 시판 중인 합성 비만치료제의 대부분은 심각한 부작용이 있는 것으로 알려져 있기 때문에, 부작용이 없으면서 비만을 효과적으로 치료할 수 있는 비만치료제의 개발이 절실한 실정이다.

[0010] 뽕나무(*Morus alba*)는 뽕나무과 뽕나무속에 속한 낙엽 교목 또는 관목을 총칭하며, 원산지는 온대, 아열대 지방이다. 뽕나무는 잎, 줄기, 가지, 뿌리, 열매 등 각 부위별로 약용 및 양잠용, 식용, 그리고 산업의 제지용으로도 다양하게 사용되고 있다(Bandna Devi, et al., International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, 5(2), 14-18, 2013; Shail Bala Sanghi, et al., Asian Journal of Pharmaceutical Education and Research, 6(4), 10-19, 2017).

[0011] 특히 뽕나무 잎은 항암, 항고혈압, 항당뇨, 항고지혈증, 항산화 및 중금속 제거 능력, 항비만 등 여러 가지 생리활성이 알려져 있다. 또한 전염병, 면역 및 항염증 활성, 위장관련 질병에 대한 치료 효과 등 다양한 활성이 밝혀져 있어서 이를 활용한 기능성 제품 개발 등이 활발히 연구되고 있다(김선여, Korean journal of sericultural science, 41(2), 21-42, 1999; 이경환, 상주대학교 석사학위논문, 2007; 주민정 등, Korean J. Food Preserv., 16(3), 442-448, 2009).

[0012] 한편, 펙티넥스를 처리한 뽕나무 잎 추출물을 포함하는 비만 치료용 조성물과 관련된 종래기술로서, 선행문헌[김영욱, 부산대학교 의학석사학위논문, 2017]에는 Viscozyme L을 이용한 뽕잎 분말의 생물전환에 대해 개시되었으며, 한국공개특허 제10-2009-0099974호에는 상엽 추출물을 유효성분으로 함유하는 고지혈증 또는 비만의 예방 및 치료용 조성물이 개시되었고, 한국공개특허 제10-2015-0083622호에는 오갈피나무와 뽕나무를 이용한 항비만 조성물이 개시되었으며, 한국등록특허 제10-0645385호에는 멜리사엽 추출물, 인진쑥 추출물, 뽕나무잎 추출물을 유효성분으로 하는 비만 억제용 조성물이 개시된 바 있다.

[0013] 그러나, 본 발명과 같이 뽕나무 잎 추출물에 펙티넥스를 처리하여 생물전환된 뽕나무 잎 추출물의 항비만 효과에 대해서는 언급된 바가 없다.

선행기술문헌

특허문헌

[0014] (특허문헌 0001) 한국공개특허 제10-2009-0099974호, 상엽 추출물을 유효성분으로 함유하는 고지혈증 또는 비만의 예방 및 치료용 조성물, 2009년 09월 23일, 공개.

(특허문헌 0002) 한국공개특허 제10-2015-0083622호, 오갈피나무와 뽕나무를 이용한 항비만 조성물, 2015년 07월 20일, 공개.

(특허문헌 0003) 한국등록특허 제10-0645385호, 비만 억제용 조성물, 2006년 11월 06일, 등록.

비특허문헌

[0015] (비특허문헌 0001) 김선여, 뽕잎의 기능성 효과구명, Korean journal of sericultural science, 41(2), 21-42, 1999.

(비특허문헌 0002) 이경환, 뽕잎추출물의 생리활성물질 탐색과 정제, 상주대학교 석사학위논문, 2007.

(비특허문헌 0003) 주민정 등, 용매에 따른 뽕잎과 오디의 생리활성 효과, Korean J. Food Preserv., 16(3), 442-448, 2009.

(비특허문헌 0004) Bandna Devi, et al., Morus alba Linn: A phytopharmacological review, International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, 5(2), 14-18, 2013.

(비특허문헌 0005) Katsube, T. et al., Effect of flavonol glycoside in mulberry (Morus alba L.) leaf on glucose metabolism and oxidative stress in liver in diet-induced obese mice, J Sci Food Agric., 90(14), 2386-2392, 2010.

(비특허문헌 0006) Kelley, D. E. et al., Fuel selection in human skeletal muscle in insulin resistance: a reexamination, Diabetes, 49(5), 677-683, 2000.

(비특허문헌 0007) Kelley, D. E. et al., Subdivisions of subcutaneous abdominal adipose tissue and insulin resistance, Am J Physiol Endocrinol Metab., 278(5), E941-948, 2000.

(비특허문헌 0008) Ki, S. H. et al., Anti-obesity Effects of Galgeun-tang in High Fat Diet Induced Obese Mice Model, Korean Med Rehab., 26(2), 13-28, 2016.

(비특허문헌 0009) Shail Bala Sanghi, et al., phytopharmacological activity of morus alba linn. extracts-a review, Asian Journal of Pharmaceutical Education and Research, 6(4), 10-19, 2017.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0016] 본 발명의 목적은 펙티넥스(pectinex)를 처리하여 생물전환된 뽕나무 잎 추출물을 유효성분으로 포함하는 비만의 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공하는데 있다.

과제의 해결 수단

[0017] 본 발명은 펙티넥스(pectinex) 처리한 뽕나무 잎 추출물을 유효성분으로 포함하는 비만의 예방 또는 치료용 약학 조성물에 관한 것이다.

[0018] 상기 펙티넥스(pectinex) 처리한 뽕나무 잎 추출물은 뽕나무 잎 추출물에 펙티넥스를 1~3중량%로 더하고 40~60℃에서 10~24시간 동안 처리하였다. 상기 조건을 벗어나서 펙티넥스를 뽕나무 잎 추출물에 처리하는 경우 효소반응이 충분히 일어나지 않거나 과도하게 일어나 항비만 활성이 낮아지므로 바람직하지 않거나 또는 항비만 활성 상승 폭이 크지 않아 경제적이지 않으므로 바람직하지 않다.

[0019] 상기 펙티넥스(pectinex)는 상용 효소로서, 펙틴 리아제(pectin lyase), 폴리갈락투로나아제(polygalacturonase)의 복합효소이며, 소량의 헤미셀룰라아제(hemicellulase)와 셀룰라아제(cellulase) 등이 포함되어 있다.

[0020] 상기 뽕나무 잎 추출물은 뽕나무 잎을 물, C1 내지 C4 알코올 또는 이들의 혼합 용매로 추출한 추출물이며, 상기 C1 내지 C4의 알코올은 메탄올, 에탄올, 프로판올, 이소프로판올, 부탄올 및 이소부탄올로 이루어진 군에서 선택될 수 있고, 바람직하게는 뽕나무 잎을 물로 추출한다.

[0021] 상기 뽕나무 잎 추출물의 제조 시 사용되는 물, C1 내지 C4의 알코올 또는 이들의 혼합용액은 사용되는 뽕나무 잎의 중량 대비 5~100배 부피(뽕나무 잎 1kg 기준 5~100ℓ)를 사용할 수 있으며 바람직하게는 5~50배를 사용하며, 또한 상기 과정을 1~4회 반복하는 것도 가능하다.

[0022] 추출물의 추출시간은 특별히 제한되는 것은 아니나, 10분 내지 1일 이내에 추출하는 것이 바람직하고, 추출방법은 통상적으로 사용되는 모든 추출방법, 예컨대, 가압 추출, 침지(냉침, 온침), 초음파 추출, 환류 추출법 등을

사용할 수 있으나, 바람직하게는 1~5시간 동안 40~121℃에서 가압 추출하였다.

[0023] 상기 과정으로부터 얻은 펙티넥스를 처리한 뽕나무 잎 추출물은 감압건조, 분무건조, 또는 동결건조 등의 통상적인 건조 방법을 이용하여 건조한 다음, 약 50~70메시로 분쇄하여 사용할 수 있다.

[0024] 본 발명에 따른 약학 조성물은 일반적으로 사용되는 약학적으로 허용 가능한 담체와 함께 적합한 형태로 제형화될 수 있다. "약학적으로 허용 가능"이란 생리학적으로 허용되고 인간에게 투여될 때, 통상적으로 위장 장애, 현기증 등과 같은 알레르기 반응 또는 이와 유사한 반응을 일으키지 않는 조성물을 말하였다.

[0025] 또한, 상기 약학 조성물은 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀젼, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 및 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용될 수 있다. 상기 약학 조성물에 포함될 수 있는 담체, 부형제 및 희석제로는 락토오스, 덱스트로즈, 수크로스, 소르비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아라비아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로오스, 메틸 셀룰로오스, 미결정셀룰로오스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 파라옥시벤조산메틸, 파라옥시벤조산프로필, 탈크, 스테아르산마그네슘 및 광물유를 포함할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충진제, 안정화제, 결합제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다. 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 본 발명의 추출물에 적어도 하나 이상의 부형제, 예를 들면, 전분, 탄산칼슘, 수크로스 또는 락토오스, 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 또한 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트, 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. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제, 좌제가 포함된다. 비수성용제, 현탁제로는 프로필렌글리콜, 폴리에틸렌글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텝솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다.

[0026] 본 발명에 개시된 추출물을 유효성분으로 포함하는 약학 조성물은 쥐, 가축, 인간 등의 포유동물에 다양한 경로로 투여될 수 있다. 투여의 모든 방식은 예상될 수 있는데, 예를 들면, 경구, 직장 또는 정맥, 근육, 피하, 자궁내 경막 또는 뇌혈관내 주사에 의해 투여될 수 있다. 투여량은 치료받을 대상의 연령, 성별, 체중, 치료할 특정 질환 또는 병리 상태, 질환 또는 병리 상태의 심각도, 투여시간, 투여경로, 약물의 흡수, 분포 및 배설률, 사용되는 다른 약물의 종류 및 처방자의 판단 등에 따라 달라질 것이다. 이러한 인자에 기초한 투여량 결정은 당업자의 수준 내에 있으며, 일반적으로 투여량은 0.001㎎/㎏/일 내지 2000㎎/㎏/일의 범위이다. 더 바람직한 투여량은 0.01㎎/㎏/일 내지 500㎎/㎏/일이다. 투여는 하루에 한번 투여할 수도 있고, 수회 나누어 투여할 수도 있다. 상기 투여량은 어떠한 면으로든 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.

[0027] 또한, 본 발명은 추출물 및 식품학적으로 허용 가능한 식품보조 첨가제를 포함하는 비만의 예방 또는 개선용 건강기능식품을 제공하였다. 상기 건강기능식품은 유용한 기능성을 가진 원료나 성분을 사용하여 제조 또는 가공한 식품을 지칭하는 것으로, 예를 들어 건강보조식품, 기능성 식품, 영양제, 보조제 등을 모두 포함하였다.

[0028] 상기 추출물은 전체 식품 총 중량에 대하여 바람직하게는 0.001중량% 내지 50중량%, 더 바람직하게는 0.001중량% 내지 30중량%, 가장 바람직하게는 0.001중량% 내지 10중량%로 하여 첨가될 수 있다. 본 발명의 건강기능식품은 정제, 캡슐제, 환제 또는 액제 등의 형태를 포함하며, 본 발명의 추출물을 첨가할 수 있는 식품으로는, 예를 들어, 각종 식품류, 음료, 껌, 차, 비타민 복합제 등이 있다.

[0029] 또 다른 일면에 있어서, 본 발명은

[0030] (1공정) 뽕나무 잎 중량 대비 5~100배 부피의 추출용매를 더하는 단계;

[0031] (2공정) 상기 1공정의 혼합물을 40~121℃에서 1~5시간 동안 추출하여 뽕나무 잎 추출물을 얻는 단계; 및

[0032] (3공정) 상기 2공정의 뽕나무 잎 추출물에 펙티넥스를 1~3중량%로 더하고 40~60℃에서 10~24시간 동안 처리하는 단계; 를 포함하는 펙티넥스 처리하여 생물전환된 뽕나무 잎 추출물의 제조방법에 관한 것이다.

발명의 효과

[0033] 본 발명은 펙티넥스(pectinex)를 처리하여 생물전환된 뽕나무 잎 추출물을 유효성분으로 포함하는 비만의 예방 또는 치료용 약학 조성물에 관한 것이다. 상기 추출물을 지방세포에 처리하는 경우 지방축적을 저해하는 효과가

우수하며, 비만이 유도된 동물모델에 투여하는 경우 비만 동물의 간, 부고환지방 및 신장후지방의 무게를 감소시키는 효과가 우수하므로, 비만의 예방 또는 치료용 약학 조성물로 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0034] 도 1A는 지방세포에서의 본 발명 실시예 및 비교예의 처리에 따른 지방축적 억제능을 오일 레드 오 염색법으로 확인한 결과이며, 도 1B는 오일 레드 오 염색법으로 확인한 결과를 수치화한 그래프이다.

도 2A는 비만이 유도된 동물모델에서의 본 발명 실시예의 처리에 따른 체중 변화를 나타낸 그래프이며, 도 2B는 비만이 유도된 동물모델에서의 본 발명 실시예 및 비교예의 처리에 따른 사료섭취량의 변화를 나타낸 그래프이다.

도 3은 비만이 유도된 동물모델에서의 본 발명 실시예 및 비교예의 처리에 따른 간 무게 변화를 측정한 그래프이다.

도 4A는 비만이 유도된 동물모델에서의 본 발명 실시예 및 비교예의 처리에 따른 부고환지방의 무게 변화를 나타낸 그래프이며, 도 4B는 비만이 유도된 동물모델에서의 본 발명 실시예 및 비교예의 처리에 따른 신장후지방의 무게 변화를 나타낸 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0035] 이하 본 발명의 바람직한 실시예를 상세히 설명하기로 하였다. 그러나 본 발명은 여기서 설명되는 실시예에 한정되지 않고 다른 형태로 구체화될 수도 있다. 오히려, 여기서 소개되는 내용이 철저하고 완전해지고, 당업자에게 본 발명의 사상을 충분히 전달하기 위해 제공하는 것이다.

[0036] **<실시예 1. 펙티넥스 처리한 뽕나무 잎 추출물의 제조>**

[0037] 뽕나무 잎 100kg에 물 1800ℓ를 더하여 121℃에서 3시간 동안 가압 추출함으로써 뽕나무 잎 추출물 19kg(수율 19%)을 얻었다. 상기 과정을 반복하여 얻은 뽕나무 잎 추출물 100kg에 묽은 염산을 사용하여 pH를 5로 조절한 다음, 펙티넥스(Pectinex Ultra Pulp, Novozymes A/S, Denmark) 1kg을 처리하고 45℃에서 15시간 동안 반응하여 본 발명 실시예 1의 펙티넥스 처리한 뽕나무 잎 추출물을 얻었다.

[0038] **<비교예 1. 비교대상 뽕나무 잎 추출물의 제조①-뽕나무 잎 분말에 펙티넥스 처리>**

[0039] 뽕나무 잎 100g에 물 1ℓ를 더하여 현탁한 다음, 5% 펙티넥스를 처리하고 45℃에서 48시간 동안 150rpm의 조건으로 반응한 후 3배 부피의 메탄올로 추출하여, 비교예 1의 펙티넥스 처리한 뽕나무 잎 추출물을 얻었다.

[0040] **<비교예 2. 비교대상 뽕나무 잎 추출물의 제조②-셀루클라스트 처리>**

[0041] 또 다른 가수분해 효소인 셀루클라스트(Celluclast 1.5L, Novozymes)을 실시예 1의 조건과 동일하게 펙티넥스 대신 뽕나무 잎 추출물을 효소처리하여 비교예 2의 뽕잎 추출물을 얻었다.

[0042] **<비교예 3. 비교대상 뽕나무 잎 추출물의 제조③-펙티넥스 무처리>**

[0043] 실시예 1의 조건과 동일하게 뽕나무 잎 추출물을 제조하되 펙티넥스를 처리하지 않은 비교예 3의 뽕나무 잎 추출물을 얻었다.

[0044] **<실험예 1. 지방세포의 지방축적 억제능 평가>**

[0045] 3T3-L1 세포의 배양과 유지를 위해 4.5g/ℓ의 D-글루코스 DMEM 배지(Dulbecco's modified Eagle's medium)에 10% BS(bovine serum)와 1% 페니실린/스트렙토마이신(1% penicillin/streptomycin)을 첨가하여 사용하였다. 이를 37℃ 및 5% CO_2 조건의 CO_2 세포배양기(Heracell 150i, thermo)에서 배양하였으며, 2~3일 간격으로 계대 배양하여, 계대 번호 9~10까지의 세포를 사용하였다.

[0046] 3T3-L1 지방세포가 세포배양접시(cell culture dish)에 약 80~90%의 컨퓨런스를 이루면 0.25% trypsin-EDTA로 세포를 분리한 다음, 원심분리기를 사용하여 세포를 가라앉히고 10% BS DMEM 배지를 사용하여 1mℓ에 6만 개가 되도록 희석하였다. 이를 세포배양용 96웰 플레이트에 200㎕씩 넣고 플레이트가 가득 찰 때까지 배양한 다음, 10% FBS 배지에 1㎍/mℓ 인슐린, 0.5mM 3-이소부틸-1-메틸크산틴(3-isobutyl-1-methylxanthine, IBMX), 1μM 덱사메타손(1μM dexamethasone)을 사용하여 분화 배지를 제조한 뒤 실시예 1 또는 비교예 1의 뽕나무 잎 추출물을 섞고 세포 배지를 교체하는 방법으로 추출물을 처리하였다.

[0047] 3일 뒤 10% FBS 배지에 10㎍/㎖ 인슐린 배지를 제조한 뒤 실시예 1 또는 비교예 1의 뽕나무 잎 추출물을 섞고 세포 배지를 교체하는 방법으로 추출물을 처리하였다. 2일 뒤 10% FBS 배지를 제조한 뒤 실시예 1을 섞고 세포 배지를 교체하는 방법으로 실시예 1 또는 비교예 1의 뽕나무 잎 추출물을 처리하였다. 2일 후 PBS로 세척하고 10% 포름알데히드로 10분 동안 세포를 고정한 다음, 10% 포름알데히드를 새로 만들어 1시간 이상 추가 고정시키고, 60% 이소프로판올로 세포를 세척하였다. 오일 레드 오 용액(Oil red O solution)을 제조하여 필터를 한 뒤 20분간 실온에서 방치하였다. 각 웰에 오일 레드 오 용액(Oil red O solution)을 100㎕씩 넣고 10분 동안 염색한 다음 멸균 증류수로 4회 세척하였다. 멸균수를 넣은 뒤 TIRF 현미경을 사용하여 염색된 지방 사진을 찍었으며, 이후 100% 이소프로판올로 오일 레드 오 염료(Oil Red O Dye)를 녹이고 분광기(spectrophotometer)를 사용해 520㎚의 흡광도에서 지방 생성 억제능을 평가하였다.

[0048] 도 1A 및 1B를 살펴보면, 본 발명 실시예 1의 뽕나무 잎 추출물은 비교예 1의 뽕잎 분말에 펙티넥스를 처리한 뽕나무 잎 추출물에 비해 지방세포에서의 지방 축적 억제 효과가 우수한 것임을 확인하였다.

[0049] **<실험예 2. 동물실험을 통한 비만 치료 효과 확인>**

[0050] **실험예 2-1. 비만 동물 구축**

[0051] 비만 동물 구축을 위해 5주령 C57BL/6 생쥐를 일주일간 순화시켰으며, 이때 생쥐의 사육 환경은 적절한 온도(22±2℃)와 습도(50±5%)를 유지하고 12시간 주기로 명암을 조절하였다. 6주령 째부터 고지방식이(60% Kcal)를 급여하고, 비교군에는 일반식이를 급여하였다. 8주간 고지방식이와 일반식이를 급여한 후 선행문헌[Katsube, T. et al., J Sci Food Agric., 90(14), 2386-2392, 2010; Ki, S. H. et al., Korean Med Rehab., 26(2), 13-28, 2016]을 참고하여 비만을 유도하였다.

[0052] **실험예 2-2. 비만 동물의 체중 및 사료섭취량 변화 확인**

[0053] 상기 실험예 2-1에서 비만이 유도된 생쥐를 고지방식이군, 고지방식이와 실시예 투여군, 고지방식이와 비교예 투여군 및 고지방식이와 양성대조군인 오를리스타트(orlistat) 투여군으로 나누어 사육하였다. 매일 오전 9시에 존데를 사용하여 7주간 경구투여하였으며, 실시예 1의 추출물은 300 및 600㎎/㎏으로 각각 투여하였고 오를리스타트는 40㎎/㎏으로 투여하였다. 체중과 사료섭취량 변화를 확인하기 위해 고지방식이 급여후 1주일에 한 번씩 미량저울로 측정한 뒤 도 2A 및 2B에 나타내었다.

[0054] 도 2A 및 2B를 살펴보면, 본 발명 실시예의 추출물을 투여한 경우, 비만이 유도된 동물 체중이 일반식이군과 동등한 정도로 감소되었으나, 사료섭취량의 변화는 없는 것으로 나타나, 식이량 감소를 통한 체중 감소가 아닌 것을 알 수 있었다. 따라서, 이러한 결과로부터 본 발명의 추출물은 비만을 관리하는데 유용한 조성물임을 알 수 있었다.

[0055] **실험예 2-3. 간 무게 변화 확인**

[0056] 상기 실험예 2-1에서 비만이 유도된 동물에 실시예, 비교예 및 양성대조군을 7주간 경구투여하고, 7주간의 실험 중 실험 종료 16시간 전에 실험동물을 절식시켰다. 16시간 후 동물을 희생시킨다음 간 조직을 적출하여, 미량저울로 무게 측정한 결과를 도 3에 나타내었다.

[0057] 도 3을 참고하면, 고지방식이에 의해 증가된 간 무게는 본 발명 실시예 1의 투여에 의해 감소되는 것을 확인할 수 있었다. 특히 실시예 1을 600㎎/㎏로 투여한 경우 비교예 1 내지 3과는 다르게 양성대조군인 오를리스타트 40㎎/㎏ 투여군과 유사한 간 무게 측정값을 나타내어, 본 발명 실시예 1의 펙티넥스 처리한 뽕나무 잎 추출물은 비만 환자의 간 무게를 정상화시키는 효과가 있을 것으로 예상된다.

[0058] **실험예 2-4. 부고환지방과 신장후지방 무게 변화 확인**

[0059] 상기 실험예 2-1에서 비만이 유도된 동물에 실시예, 비교예 및 양성대조군을 7주간 경구투여하고, 7주간의 실험 중 실험 종료 16시간 전에 실험동물을 절식시켰다. 16시간 후 동물을 희생시킨다음 부고환지방과 신장후지방을 적출한 뒤, 미량저울로 각각의 무게 측정한 결과를 도 4A 및 4B에 나타내었다.

[0060] 도 4를 살펴보면, 본 발명 실시예 1은 비교예 1 내지 3에 비해 부고환지방과 신장후지방 무게가 현저하게 감소되는 것을 확인할 수 있었고, 특히 실시예 1을 600㎎/㎏로 투여한 경우에는 부고환지방과 신장후지방의 무게가 양성대조군인 오를리스타트와 유사한 정도로 감소됨을 확인할 수 있었다.

[0061] 이에, 본 발명 실시예 1의 펙티넥스 처리한 뽕나무 잎 추출물은 추출 방법이 다른 비교예 1 내지 3에 비해 항비

만 효과가 보다 더 우수한 조성물임을 확인할 수 있었다.

[0062] **<제제예 1. 정제의 제조>**

[0063] 본 발명 실시예 1의 펙티넥스 처리한 뽕나무 잎 추출물 20g을 각각 락토오스 175.9g, 감자전분 180g 및 콜로이드성 규산 32g과 혼합하였다. 이 혼합물에 10% 젤라틴 용액을 첨가시킨 후, 분쇄해서 14 메쉬체를 통과시켰다. 이것을 건조시키고 여기에 감자전분 160g, 활석 50g 및 스테아린산 마그네슘 5g을 첨가해서 얻은 혼합물을 정제로 만들었다.

[0064] **<제제예 2. 캡슐제의 제조>**

[0065] 본 발명 실시예 1의 펙티넥스 처리한 뽕나무 잎 추출물 100㎎, 옥수수전분 100㎎, 유당 100㎎ 및 스테아린산 마그네슘 2㎎을 혼합한 후 통상의 캡슐제 제조방법에 따라 상기의 성분을 혼합하고 젤라틴 캡슐에 충전하여 캡슐제를 제조하였다.

[0066] **<제제예 3. 주사제의 제조>**

[0067] 본 발명 실시예 1의 펙티넥스 처리한 뽕나무 잎 추출물 1g, 염화나트륨 0.6g 및 아스코르브산 0.1g을 증류수에 용해시켜서 100㎖를 만들었다. 이 용액을 병에 넣고 20℃에서 30분간 가열하여 멸균시켰다.

[0068] **<제제예 4. 건강기능식품의 제조>**

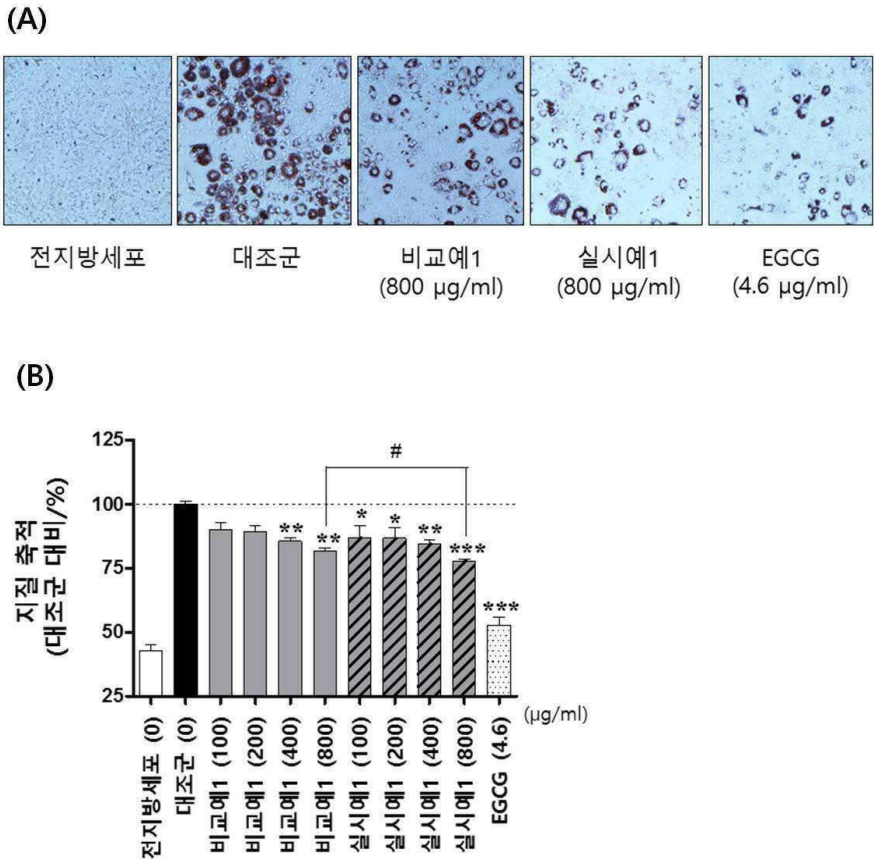
[0069] 본 발명 실시예 1의 펙티넥스 처리한 뽕나무 잎 추출물 20g, 비타민 혼합물 적량, 비타민 A 아세테이트 70㎍, 비타민 E 1.0㎎, 비타민 B1 0.13㎎, 비타민 B2 0.15㎎, 비타민 B6 0.5㎎, 비타민 B12 0.2㎍, 비타민 C 10㎎, 비오틴 10㎍, 니코틴산아미드 1.7㎎, 엽산 50㎍, 판토텐산 칼슘 0.5㎎, 무기질 혼합물 적량, 황산제1철 1.75㎎, 산화아연 0.82㎎, 탄산 마그네슘 25.3㎎, 제1인산칼륨 15㎎, 제2인산칼슘 55㎎, 구연산칼륨 90㎎, 탄산칼슘 100㎎, 염화마그네슘 24.8㎎을 섞어 과립으로 제조하였으나, 용도에 따라 다양한 제형으로 변형시켜 제조할 수 있다. 또한, 상기의 비타민 및 미네랄 혼합물의 조성비를 임의로 변형 실시하여도 무방하며, 통상의 건강기능식품 제조방법에 따라 상기의 성분을 혼합하여 제조할 수 있다.

[0070] **<제제예 5. 건강기능성 음료의 제조>**

[0071] 본 발명 실시예 1의 펙티넥스 처리한 뽕나무 잎 추출물 1g, 구연산 0.1g, 프락토올리고당 100g, 정제수 900g을 섞어 통상의 음료 제조방법에 따라 교반, 가열, 여과, 살균, 냉장하여 음료를 제조하였다.

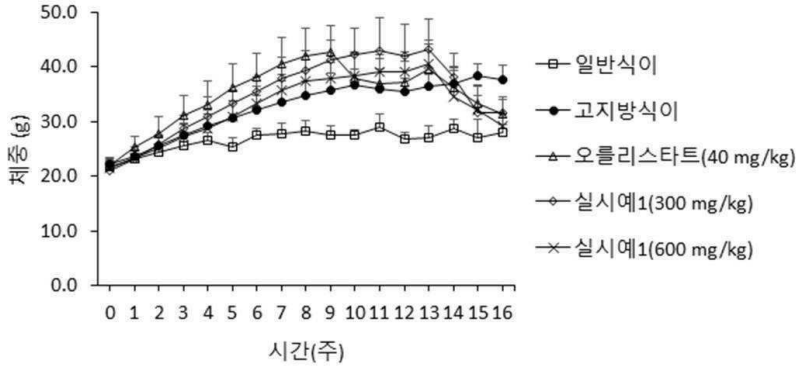
도면

도면1

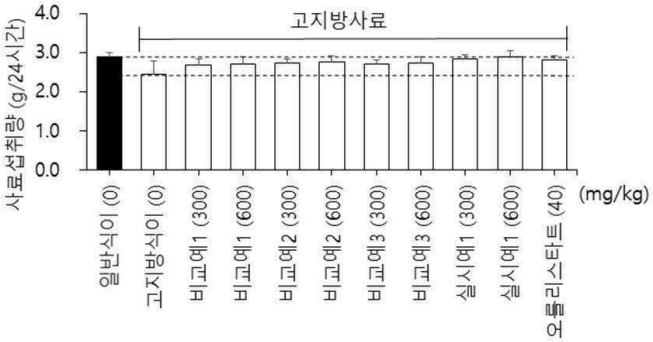

(A)
전지방세포
대조군
비교예1
(800 μg/ml)
실시예1
(800 μg/ml)
EGCG
(4.6 μg/ml)
(B)
지질 축적
(대조군 대비/%)
125
100
75
50
25
#
*
**
***
(μg/ml)
전지방세포 (0)
대조군 (0)
비교예1 (100)
비교예1 (200)
비교예1 (400)
비교예1 (800)
실시예1 (100)
실시예1 (200)
실시예1 (400)
실시예1 (800)
EGCG (4.6)

도면2

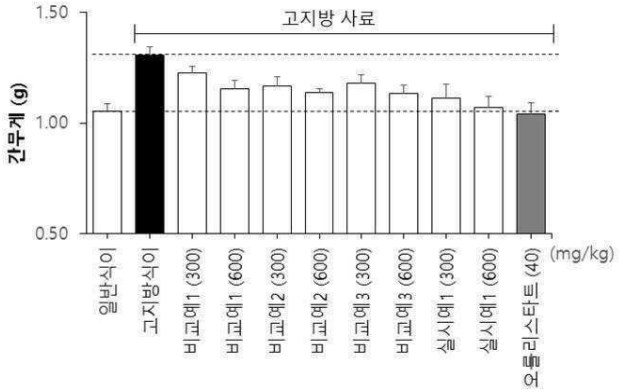
(A)


50.0
40.0
30.0
20.0
10.0
0.0
체중 (g)
0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16
시간(주)
일반식이
고지방식이
오를리스타트(40 mg/kg)
실시예1(300 mg/kg)
실시예1(600 mg/kg)

(B)

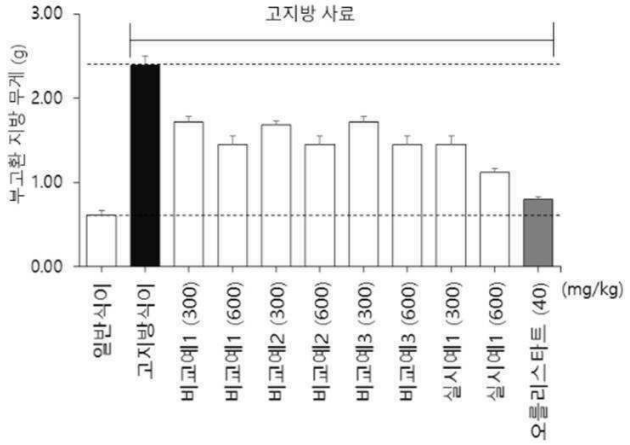

4.0
3.0
2.0
1.0
0.0
사료섭취량 (g/24시간)
고지방사료
(mg/kg)
일반식이 (0)
고지방식이 (0)
비교예1 (300)
비교예1 (600)
비교예2 (300)
비교예2 (600)
비교예3 (300)
비교예3 (600)
실시예1 (300)
실시예1 (600)
오를리스타트 (40)

도면3

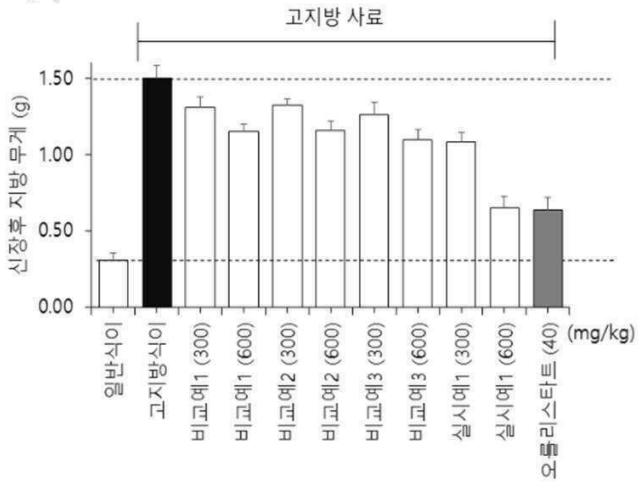

1.50
1.00
0.50
간무게 (g)
고지방 사료
(mg/kg)
일반식이
고지방식이
비교예1 (300)
비교예1 (600)
비교예2 (300)
비교예2 (600)
비교예3 (300)
비교예3 (600)
실시예1 (300)
실시예1 (600)
오를리스타트 (40)

도면4

(A)


고지방 사료
부고환 지방 무게 (g)
3.00
2.00
1.00
0.00
일반식이
고지방식이
비교예1 (300)
비교예1 (600)
비교예2 (300)
비교예2 (600)
비교예3 (300)
비교예3 (600)
실시예1 (300)
실시예1 (600)
오롤리스타트 (40)
(mg/kg)

(B)


고지방 사료
신장후 지방 무게 (g)
1.50
1.00
0.50
0.00
일반식이
고지방식이
비교예1 (300)
비교예1 (600)
비교예2 (300)
비교예2 (600)
비교예3 (300)
비교예3 (600)
실시예1 (300)
실시예1 (600)
오롤리스타트 (40)
(mg/kg)