

**(19) 대한민국특허청(KR)**
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2020-0046219

(43) 공개일자 2020년05월07일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 36/07 (2006.01) *A23L 31/00* (2016.01)*A23L 33/10* (2016.01) *A61K 8/9728* (2017.01)*A61P 3/04* (2006.01) *A61P 39/06* (2006.01)*A61Q 19/06* (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61K 36/07 (2013.01)*A23L 31/00* (2016.08)

(21) 출원번호 10-2018-0126851

(22) 출원일자 2018년10월23일

심사청구일자 2018년10월23일

(71) 출원인

한림대학교 산학협력단

강원도 춘천시 한림대학길 1, 한림대학교(옥천동)

김종관서울특별시 강남구 삼성로51길 10-8, 금성주택
201호 (대치동)

(72) 발명자

임순성강원도 춘천시 후석로 325, 105동 302호(후평동,
춘천더샵 아파트)**강범구**

강원도 춘천시 퇴계로 168 211동 1105호 (퇴계동, 주공2차아파트)

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

이정훈, 진현정

전체 청구항 수 : 총 10 항

(54) 발명의 명칭 **노루궁뎅이버섯 가수분해물을 유효성분으로 포함하는 항산화 및 항비만 조성물****(57) 요약**

본 발명은 노루궁뎅이버섯 가수분해물을 유효성분으로 포함하는 항산화 및 항비만 조성물에 관한 것으로, 보다 상세하게는 노루궁뎅이버섯 분쇄물을 알카라제 또는 뉴트라제 효소로 발효시킨 가수분해물을 유효성분으로 포함하는 항산화 및 항비만 조성물에 관한 것이다. 본 발명의 상기 조성물은 항산화 및 항비만 효능이 탁월하다.

(52) CPC특허분류

A23L 33/10 (2016.08)
A61K 8/9728 (2017.08)
A61P 3/04 (2018.01)
A61P 39/06 (2018.01)
A61Q 19/06 (2013.01)
A23V 2002/00 (2013.01)
A23V 2200/332 (2013.01)
A23V 2250/208 (2013.01)
A61K 2236/19 (2013.01)

(72) 발명자

이수경

강원도 춘천시 우석로85번길 1

김현용

강원도 춘천시 향교앞길 13-10 , 201호

조광래

강원도 춘천시 한림대학길 1

김종관

서울특별시 강남구 삼성로 51길 10-8

강근호

경기도 안양시 만안구 삼막로 12(주공그린빌)
 102-1407

정정희

서울특별시 송파구 문정로5길 17-4 202호 (문정동)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 C0530765

부처명 중소벤처기업부

연구관리전문기관 중소기업기술정보진흥원

연구사업명 산학협력기술개발사업(첫걸음기술개발사업)

연구과제명 생물전환 노루궁뎅이버섯 산물의 기능성 소재 개발

기 여 율 1/1

주관기관 네오팜

연구기간 2017.09.01 ~ 2018.08.31

명세서

청구범위

청구항 1

노루궁뎅이버섯 가수분해물을 유효성분으로 포함하는 향산화 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 노루궁뎅이버섯 가수분해물은 알칼라제(Alcalase), 뉴트라제(Neutrase) 및 이들의 혼합물로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종의 효소로 가수분해되는 것인 향산화 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 노루궁뎅이버섯 가수분해물은 0.1 내지 1.0% 농도의 알칼라제 또는 뉴트라제 효소로 가수분해되는 것인 향산화 조성물.

청구항 4

제2항 또는 제3항에 있어서,

상기 가수분해는 40 내지 60℃에서 3~5시간 동안 침출하여 수행되는 것인 향산화 조성물.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항의 조성물은 의약품, 건강보조제, 화장품, 식품 또는 식품 첨가제로 사용 가능한 향산화 조성물.

청구항 6

노루궁뎅이버섯 가수분해물을 유효성분으로 포함하는 향비만 조성물.

청구항 7

제6항에 있어서,

상기 노루궁뎅이버섯 가수분해물은 알칼라제, 뉴트라제 및 이들의 혼합물로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종의 효소로 가수분해되는 것인 향비만 조성물.

청구항 8

제6항에 있어서,

상기 노루궁뎅이버섯 가수분해물은 0.1 내지 1.0% 농도의 알칼라제 또는 뉴트라제 효소로 가수분해되는 것인 향비만 조성물.

청구항 9

제7항 또는 제8항에 있어서,

상기 가수분해는 40 내지 60℃에서 3~5시간 동안 침출하여 수행되는 것인 항비만 조성물.

청구항 10

제6항 내지 제9항 중 어느 한 항의 조성물은 의약품, 건강보조제, 피부외용제, 식품 또는 식품 첨가제로 사용 가능한 항비만 조성물.

발명의 설명

기술 분야

- [0001] 본 발명은 노루궁뎅이버섯 가수분해물을 유효성분으로 포함하는 항산화 및 항비만 조성물에 관한 것으로, 보다 상세하게는 노루궁뎅이버섯 분쇄물을 알카라제 또는 뉴트라제 효소로 발효시킨 가수분해물을 유효성분으로 포함하는 항산화 및 항비만 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

- [0003] 활성산소는 세포 구성 성분들인 지질, 단백질, 당, DNA 등에 대하여 비선택적, 비가역적인 파괴 작용을 함으로써 노화는 물론 암을 비롯하여 뇌졸중, 파킨슨병 등의 뇌혈관 심장질환, 허혈, 동맥경화, 피부질환, 소화기질환, 염증, 류마티스, 자기면역질환 등의 각종 질병을 일으키는 것으로 알려져 있다(Halliwell B. 1991. Drug antioxidant effects. Drugs 42: 596-605). 또한, 활성산소에 의한 지질과산화 결과 생성되는 지질과산화물을 비롯하여 여러가지 체내 과산화물도 세포에 대한 산화적 파괴로 인한 각종 기능장애를 야기함으로써 노화와 질병의 원인이 되기도 한다.
- [0004] 항산화제에 대한 연구는 1969년 McCord와 Fridovich가 수퍼옥사이드 라디칼을 소거하는 효소인 SOD를 발견한 것을 계기로 본격적으로 진행되었으며, 최근에는 노화나 성인병 등의 질환이 활성산소의 존재에 의한 것으로 알려져, 활성산소를 조절할 수 있는 항산화제에 관한 연구가 활발히 진행되고 있다.
- [0005] 항산화제로는 효소계인 SOD, 카탈레이즈 외에 BHT(tert-butylhydroxytoluene), BHA(tert-butylhydroxyanisol) 등과 같은 합성 항산화제 및 토코페롤(tocopherol), 아스코르브산(ascorbic acid), 탄닌, 카로테노이드(carotenoids), 플라보노이드(flavonoids) 등과 같은 일부 천연 항산화제가 있으며, 그 외에도 다양한 종류의 항산화제 개발이 이루어지고 있다(Kitahara K., Matsumoto Y., Ueda H.A. and Ueoka R. 1992. Chem. Pharm. Bull. 40: 2208-2209; Hatano T. 1995. Natural Medicines 49: 357-363).
- [0006] 그러나, 이들 항산화제는 독성, 저활성 및 용도의 한계성 등의 여러 가지 문제로 인하여 사용에 제한을 받고 있다.
- [0007] 한편, 비만은 과다한 체지방을 가진 상태를 의미하는데, 남성은 체지방이 체중의 25%, 여성은 체중의 30% 이상일 때, 임상학적으로는 BMI(body mass index: 체질량지수)가 30.1 이상일 경우, 현재의 체중이 이상 체중을 20% 초과하는 경우로 정의하고 있다.
- [0008] 이러한 비만의 주원인으로는 유전적 요인, 환경적 요인, 에너지 대사 이상 등이 있다. 비만의 종류에는 원인에 따라서는 단순 비만과 증후성 비만으로 구분할 수 있는데, 단순 비만은 과식과 운동 부족이 그 원인이며, 증후성 비만은 내분비, 시상하부성, 유전, 전두엽 및 대사성 등으로 발생한다.
- [0009] 따라서, 비만은 당뇨병 및 고지혈증 발생 가능성을 높이고, 성기능 장애, 관절염, 심혈관계 질환의 발병 위험을 높일 뿐만 아니라, 당뇨병, 암 등의 발생과도 연관이 있으므로 건강을 위해서는 비만 해결이 매우 시급한 문제라고 볼 수 있다.

- [0010] 이 같은 비만은 식이요법과 운동의 생활습관으로 해결하는 것이 가장 좋지만, 약물 또는 건강보조식품으로도 치료가 가능하다. 비만 치료에 사용되는 약물의 종류로는 크게 식욕억제제와 지방의 흡수를 저해하는 약물로 나눌 수 있고, 장기간 사용이 허가된 약물로는 시부트라민(sibutramine)과 오르리스타트(orlistat)가 있다.
- [0011] 시부트라민은 식욕억제제의 일종으로, 1년 정도 장기 복용할 경우 평균적으로 5 - 9%의 체중을 줄여줄 수 있다. 그러나, 지속적인 약물 복용으로 인한 두통, 구갈(심한 갈증), 불면증 및 변비 등의 부작용이 발생할 우려가 있고, 혈압과 맥박수가 증가할 수 있기 때문에 시부트라민을 장기 복용할 때는 주기적으로 혈압과 맥박수를 측정하여 건강을 체크해야 한다.
- [0012] 또한, 오르리스타트는 지방분해효소(lipolytic enzymes)의 억제제로서, 체내에서 지방이 소화되지 못하도록 하는 약물이다. 따라서 섭취한 지방의 약 30%는 소화와 흡수가 제대로 되지 않고 그대로 체외로 배출되는 문제점이 있다.
- [0013] 이에, 본 발명자들은 천연 추출물로 부작용과 독성이 없으며, 항산화 효능에 더불어 항비만 효능이 탁월한 조성물을 확인하고, 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0015] 본 발명은 전술한 문제점을 해결하기 위한 것으로, 노루궁뎅이버섯 가수분해물을 유효성분으로 포함하는 항산화 조성물을 제공하고자 한다.
- [0016] 본 발명은 또한, 노루궁뎅이버섯 가수분해물을 유효성분으로 포함하는 항비만 조성물을 제공하고자 한다.

과제의 해결 수단

- [0018] 상기한 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 노루궁뎅이버섯 가수분해물을 유효성분으로 포함하는 항산화 조성물을 제공한다.
- [0019] 본 발명에 따른 항산화 조성물에 있어서, 상기 노루궁뎅이버섯 가수분해물은 알칼라제(Alcalase), 뉴트라제(Neutrase) 및 이들의 혼합물로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종의 효소로 가수분해되는 것을 특징으로 한다.
- [0020] 본 발명에 따른 항산화 조성물에 있어서, 상기 노루궁뎅이버섯 가수분해물은 0.1 내지 1.0% 농도의 알칼라제 또는 뉴트라제 효소로 가수분해되는 것을 특징으로 하며, 바람직하게는 0.5 내지 1.0% 농도의 알칼라제 또는 뉴트라제 효소로 가수분해 되는 것을 특징으로 한다.
- [0021] 본 발명에 따른 항산화 조성물에 있어서, 상기 가수분해는 40 내지 60℃에서 3~5시간 동안 침출하여 수행되는 것을 특징으로 한다.
- [0022] 본 발명에 따른 항산화 조성물은 의약품, 건강보조제, 화장품, 식품, 또는 식품 첨가제로 사용 가능하다.
- [0023] 본 발명은 또한, 노루궁뎅이버섯 가수분해물을 유효성분으로 포함하는 항비만 조성물을 제공한다.
- [0024] 본 발명에 따른 항비만 조성물에 있어서, 상기 노루궁뎅이버섯 가수분해물은 알칼라제, 뉴트라제 및 이들의 혼합물로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종의 효소로 가수분해되는 것을 특징으로 한다.
- [0025] 본 발명에 따른 항비만 조성물에 있어서, 상기 노루궁뎅이버섯 가수분해물은 0.1 내지 1.0% 농도의 알칼라제 또는 뉴트라제 효소로 가수분해되는 것을 특징으로 하며, 바람직하게는 0.4 내지 0.8% 농도의 알칼라제 또는 뉴트라제 효소로 가수분해 되는 것을 특징으로 한다.
- [0026] 본 발명에 따른 항비만 조성물에 있어서, 상기 가수분해는 40 내지 60℃에서 3~5시간 동안 침출하여 수행되는 것을 특징으로 한다.
- [0027] 본 발명에 따른 항비만 조성물은 의약품, 건강보조제, 피부외용제, 식품, 또는 식품 첨가제로 사용 가능하다.

발명의 효과

[0029] 본 발명에 따른 노루궁뎅이버섯 가수분해물은 천연추출물로서 부작용 및 독성이 전혀 없으며, 항산화 및 항비만 효능이 탁월하다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0031] 이하, 본 발명에 대하여 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자가 용이하게 실시할 수 있도록 상세히 설명한다.

[0032] 노루궁뎅이버섯(*Hericium erinaceum*)은 산호버섯과에 속하는 버섯으로 가을철 활엽수의 고목이나 생목에서 발생하며, 분포는 한국, 일본, 중국, 동남아시아, 유럽, 북아메리카 등이다. 중국에서는 원숭이 머리버섯 및 곰머리버섯으로 알려져 있으며, 일본에서는 야마부시타케(Yamabushitake), 우리 나라에서는 노루궁뎅이의 털모양과 비슷하다고 하여 노루궁뎅이버섯으로 알려져 있다. 노루궁뎅이버섯에는 탄수화물, 단백질, 아미노산, 효소, 무기염류 및 비타민 등이 풍부하고, 항암 및 면역기능을 증대시키는 효능이 있다고 알려져 있으며, 최근에는 항암효과를 가진 성분을 비롯하여 다양한 생리 활성물질을 함유하고 있는 것으로 보고된 바 있다.

[0033] 본 발명의 노루궁뎅이버섯 가수분해물은 노루궁뎅이버섯을 가수분해 효소에 의하여 가수분해시킨 것일 수 있다.

[0034] 상기 노루궁뎅이버섯 가수분해물은 노루궁뎅이버섯 분쇄물 5g을 추출 용매(증류수, pH 7.0) 300 ml와 가수분해 효소(추출 용매 부피의 0.1%) 300 ul를 혼합한 후, 50℃에서 5시간 동안 침출을 수행하여 얻을 수 있다. 이와 같이 얻은 가수분해물을 100℃에서 5분간 가열하여 효소를 불활성화시킨 후, 동결 건조하고, 상기 건조물을 분말화하여 용이하게 사용할 수 있다.

[0035] 본 발명은 상기의 제법으로 얻어진 노루궁뎅이버섯 가수분해물을 함유하는 항산화 및 항비만 조성물을 제공한다.

[0036] 따라서, 본 발명의 노루궁뎅이버섯 가수분해 효소 추출물은 활성산소에 의해 생성되는 산화물들에 기인하는 노화 및 각종 질환의 예방 또는 치료, 및 비만 억제를 위한 의약품, 건강보조제, 화장품, 식품 또는 식품 첨가제 등에 유용하게 이용될 수 있다.

[0038] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 예시하기 위한 것으로서, 본 발명의 범위가 이들 실시 예에 의해 제한되는 것으로 해석되지는 않는 것은 당 업계에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

[0040] 준비예. 노루궁뎅이버섯 가수분해물의 효소 선정

[0041] 노루궁뎅이버섯 분쇄물을 가수분해시키기 위하여, 가수분해효소로서 당 가수분해 효소(비스코자임(Viscozyme), 아스퍼질러스 오리제(*Aspergillus oryzae*)) 및 단백질 가수분해 효소(뉴트라제(Neutrase), 알칼라제(Alcalase))를 선정하고, 선정된 효소 종류별 통상의 반응 조건을 하기 표 1에 정리하여 나타내었다.

표 1

효소	제조사(제품번호)	적정 온도	pH	효소 조성 및 가수분해 형태
Viscozyme	sigma aldrich(V2010)	50 ℃	4.5	Arabanase, cellulase, β -glucanase, hemi-cellulase and xylanase
Protease from <i>Aspergillus oryzae</i>	sigma aldrich(V2010)	50 ℃	7.0	An endo-protease
Neutrase	Novozymes(PWN10139)	50 ℃	7.0	An endo-protease
Alcalase	Novozymes(PLN05452)	50 ℃	7.0	A endo-protease

[0044] 실시예 1. 노루궁뎅이버섯 가수분해물

[0045] 노루궁뎅이버섯 분쇄물 5g에 완충액(증류수, pH 7.0) 300 ml와 가수분해효소 뉴트라제(0.1%) 300 μ l를 혼합하여, 50℃에서 5시간 동안 침출하여 가수분해반응을 진행하였다. 가수분해된 시료를 100℃에서 5분간 가열하여 효소를 불활성화시킨 후, 동결 건조 및 분말화하여 노루궁뎅이버섯 가수분해물을 제조하였다.

[0047] 실시예 2. 노루궁뎅이버섯 가수분해물

[0048] 상기 실시예 1에서 가수분해효소로 뉴트라제(0.1%)를 대신하여 알카라제(0.1%)를 사용하는 것을 제외하고는, 실시예 1과 동일한 방법으로 노루궁뎅이버섯 가수분해물을 제조하였다.

[0050] 비교예 1. 노루궁뎅이버섯 물 추출물

[0051] 상기 실시예 1에서 가수분해효소인 뉴트라제(0.1%)를 사용하지 않는 것을 제외하고는, 실시예 1과 동일한 방법으로 노루궁뎅이버섯 물 추출물을 제조하였다.

[0053] 비교예 2. 노루궁뎅이버섯 가수분해물

[0054] 상기 실시예 1에서 가수분해효소로 뉴트라제(0.1%)를 대신하여 비스코자임(0.1%)을 사용하는 것을 제외하고는, 실시예 1과 동일한 방법으로 노루궁뎅이버섯 가수분해물을 제조하였다.

[0056] 비교예 3. 노루궁뎅이버섯 가수분해물

[0057] 상기 실시예 1에서 가수분해효소로 뉴트라제(0.1%)를 대신하여 아스퍼질러스 오리제(0.1%)를 사용하는 것을 제외하고는, 실시예 1과 동일한 방법으로 노루궁뎅이버섯 가수분해물을 제조하였다.

[0058] 상기 실시예 1 내지 2, 및 비교예 1 내지 3에서 사용된 효소의 조성 및 반응 조건은 하기 표 2에 정리하여 나타내었다.

표 2

구분	효소	농도 (%)	Time (h)
비교예 1	No enzyme	-	5
비교예 2	Viscozyme	0.1	5
비교예 3	Protease from <i>Aspergillus oryzae</i>	0.1	5
실시예 1	Neutrase	0.1	5
실시예 2	Alcalase	0.1	5

[0061] 실험예 1. 항산화 효능 평가- ABTS 라디칼 소거능

[0062] 상기 일 실시예에서 제조된 노루궁뎅이버섯 가수분해물의 항산화 효능을 평가하기 위하여, ABTS [2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonate)]를 이용하여 라디칼 소거능을 측정하고, 그 결과를 하기 표 3에 나타내었다.

[0063] ABTS 라디칼 소거능은 과황산칼륨(Potassium persulfate)과의 반응에 의해 생성된 ABTS 유리 라디칼이 시료의 항산화 물질에 의해 제거되어 라디칼 특유의 청록색이 탈색되는 것을 이용한 방법으로 측정하였다.

[0064] 구체적인 방법은 다음과 같다. 상기 일 실시예에서 제조된 노루궁뎅이버섯 가수분해물 분말 10 mg에 증류수 1 ml를 넣어 10 mg/ml 농도로 준비하고, 이를 30배, 60배, 300배 희석하여 333.33 μ g/ml, 166.67 μ g/ml 및 33.33 μ g/ml 농도의 가수분해물 시료를 제조하였다. 이어, 상기 시료 10 μ l를 취하여 ABTS 라디칼 용액 290 μ l에 혼합한 후, 실온에서 10분간 반응시키고 750 nm에서 흡광도를 측정하였다.

[0065] 이 때, 상기 ABTS 라디칼 용액은 2 mM ABTS 용액에 3.5 mM 과황산칼륨을 혼합하여 3차 증류수에 30배 희석시킨

후, overnight하여 ABTS 라디칼 생성을 유도하여 제조한 것이다. 또한 항산화제인 상기 아스코르브산(Ascorbic acid)은 양성대조군으로서 사용하였다.

표 3

구분	효소	농도($\mu\text{g/mL}$)	Inhibition (%)	IC50($\mu\text{g/mL}$)
비교예 1	No enzyme	333.33	60.39 $\pm$ 1.33	253.08 $\pm$ 10.07
		166.67	32.14 $\pm$ 0.00	
		33.33	6.12 $\pm$ 0.17	
비교예 2	Viscozyme	333.33	57.18 $\pm$ 1.27	277.72 $\pm$ 10.71
		166.67	32.72 $\pm$ 0.29	
		33.33	6.50 $\pm$ 0.00	
비교예 3	Protease from <i>Aspergillus oryzae</i>	333.33	60.49 $\pm$ 0.34	248.96 $\pm$ 2.50
		166.67	33.30 $\pm$ 0.00	
		33.33	6.31 $\pm$ 0.17	
실시예 1	Neutrase	333.33	65.05 $\pm$ 0.50	210.09 $\pm$ 3.00
		166.67	37.48 $\pm$ 0.44	
		33.33	7.28 $\pm$ 0.34	
실시예 2	Alcalase	333.33	79.61 $\pm$ 0.50	145.07 $\pm$ 1.72
		166.67	46.21 $\pm$ 0.94	
		33.33	8.93 $\pm$ 0.61	
양성대조군	Ascorbic acid	2.08	68.16 $\pm$ 0.34	1.39 $\pm$ 0.004
		1.04	32.62 $\pm$ 0.17	
		0.52	14.66 $\pm$ 0.58	

표 3에서 볼 수 있는 바와 같이, 노루궁뎅이버섯 가수분해물의 ABTS 라디칼 소거능 실험 결과, 비교예 1 내지 3에 비하여 실시예 1 내지 2에서 제조된 가수분해물의 라디칼 소거능이 더 우수한 것을 확인할 수 있다.

아울러, 반응표면방법(Response surface methodology) 분석을 통해 가수분해물의 ABTS 라디칼 억제 활성의 최대값 예상 수준과 이에 대한 최적의 가수분해반응 조건을 예측한 결과, 알카라제로 가수분해 처리할 때 최적의 가수분해 반응조건은 효소 농도 0.967(%), 가수분해물 8.17(g/300ml) 및 추출 시간 7.5(h)일 때로 나타났으며, 이러한 조건으로 가수분해반응 시 81.35%의 ABTS 라디칼 억제 활성을 얻을 수 있는 것으로 예측되었다. 이에 따라, 상기의 가수분해반응 조건을 토대로 실험하여 그 항산화도를 평가한 결과, ABTS 억제 활성 실험치는 80.93%로, 상기 ABTS 억제활성 최대값 예측치와 ABTS 억제 활성 실험치가 유사한 수준으로 확인되었다.

실험예 2. 항비만 효능 평가 - 비만전구세포(3T3-L1)의 분화 억제능

상기 일 실시예에서 제조된 노루궁뎅이버섯 가수분해물의 항비만 효능을 평가하기 위하여, 비만전구세포(3T3-L1)의 분화 억제능을 분석하고, 그 결과를 하기 표 4에 나타내었다.

3T3-L1 지방 세포 배양은 10% FBS와 100unit/ml의 페니실린-스트렙토마이신(penicillin-streptomycin)이 함유된 DMEM 배지를 사용하였고, CO₂ 배양기에서 37℃, 5% CO₂ 조건에서 배양하였다. 3T3-L1 세포의 밀도가 최상에 도달한 이틀 후, 10% FBS, 10 $\mu\text{g/mL}$ 의 insulin, 0.5 mM의 3-이소부틸-1-메틸산틴(3-isobutyl-1-methylxanthine) 및 1 μM 의 덱사메타손(dexamethasone)을 포함하는 다른 배지로 변경하였다. 이에 대한 시기를 최초 배양 시기(day 0)로 하고, 이로부터 이틀 후(day 2), 10% FBS 및 10 $\mu\text{g/mL}$ 인슐린을 포함하여 지방세포의 분화 유도를 일으키는 DM 배지로 변경하였다. 이어서, 이틀 후(day 4), 10% FBS이 포함된 DMEM 배지로 변경하고, 상기 노루궁뎅이버섯 가수분해물을 농도별(10, 50 $\mu\text{g/mL}$)로 3T3-L1 세포에 처리하였다. 이후로 이틀에 한번씩 10% FBS이 포함된 DMEM 배지로 변경하여 배양하였다.

지방 생성의 억제 활성을 평가하기 위하여, 지방세포로 분화시킨 3T3-L1 세포의 지방축적량을ORO 염색법을 통해 정량 분석하였다. 상기 노루궁뎅이버섯 가수분해물 및 지방 분화 배지를 처리하여 8일 후 분화된 3T3-L1 세포의 배지를 버리고, PBS 사용하여 세척한 후, 10% 포르말린시약을 이용하여 세포를 고정하였다. 이후 0.5 $\mu\text{g/mL}$ Oil Red O 시약을 사용하여 세포를 염색하였다. 염색된 세포를 위상차 현미경으로 100X 배율로 촬영하였으며, 지질 방울은 이소프로판올에 용해시키고, microplate reader를 사용하여 540 nm에서 O.D값(흡광도)을 측정하였

다. 이 때, 지방 생성 억제율은 아래의 식으로 계산하였다.

$$* \text{ 지방생성 억제율(\%)} = \{1 - (\text{시료의 O.D값} - \text{대조군의 O.D값}) / (\text{음성대조군의 O.D} - \text{대조군의 O.D값})\} \times 100\%$$

표 4

구분	효소	Concentration (μg/mL)	Inhibition (%)
비교예 1	No enzyme	50	-
비교예 2	Viscozyme	50	23.88 ± 5.49
비교예 3	Protease from Aspergillus oryzae	50	5.23 ± 0.35
실시예 1	Neutrase	50	26.57 ± 6.75
실시예 2	Alcalase	50	30.66 ± 1.26

상기 표 4에서 보는 바와 같이, 노루궁뎅이버섯 가수분해물의 3T3-L1 지방분화 억제능 실험 결과, 비교예 1 내지 3에 비하여 실시예 1 내지 2에서 제조된 가수분해물의 지방분화 억제능이 더 우수한 것을 확인할 수 있다.

아울러, 반응표면방법 분석을 통해 가수분해물의 항비만 억제 활성의 최대값 예상 수준과 이에 대한 최적의 가수분해반응조건을 예측한 결과, 알카라제로 가수분해 처리할 때 최적의 가수분해 반응조건은 효소농도 0.504(%), 가수분해물 11.79(g/300ml) 및 추출 시간 4.98(h)일 때로 나타났으며, 이러한 조건으로 가수분해 시 90.48%의 항비만 억제활성을 얻을 수 있는 것으로 예측되었다. 이에 따라, 상기의 가수분해반응조건을 토대로 실험하고 그 항비만도를 평가한 결과, 항비만 억제 활성 실험치는 85.11%로 상기 예측치에 약간 못 미치지만, 높은 수준의 항산화 효능이 있는 것으로 확인되었다.

이제까지 본 발명에 대하여 그 바람직한 실시예들을 중심으로 살펴보았다. 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자는 본 발명이 본 발명의 본질적인 특성에서 벗어나지 않는 범위에서 변형된 형태로 구현될 수 있음을 이해할 수 있을 것이다.