(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2023-0109992
(43) 공개일자 2023년07월21일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
*A61K 36/82* (2006.01) *A23L 33/105* (2016.01)
*A61P 25/22* (2006.01) *A61P 25/24* (2006.01)
(52) CPC특허분류
*A61K 36/82* (2013.01)
*A23L 33/105* (2016.08)
(21) 출원번호 10-2022-0005940
(22) 출원일자 2022년01월14일
심사청구일자 2022년01월14일
기술이전 희망 : 기술양도

(71) 출원인
**경상국립대학교산학협력단**
경상남도 진주시 진주대로 501 (가좌동)
(72) 발명자
**허호진**
경상남도 진주시 초장로 120, 504동 501호(초전동, 이지더원 아파트)
**김종민**
경상남도 진주시 진주역로 116, 811호(가좌동, 더퍼스트웰가시티)
(74) 대리인
**위병갑**

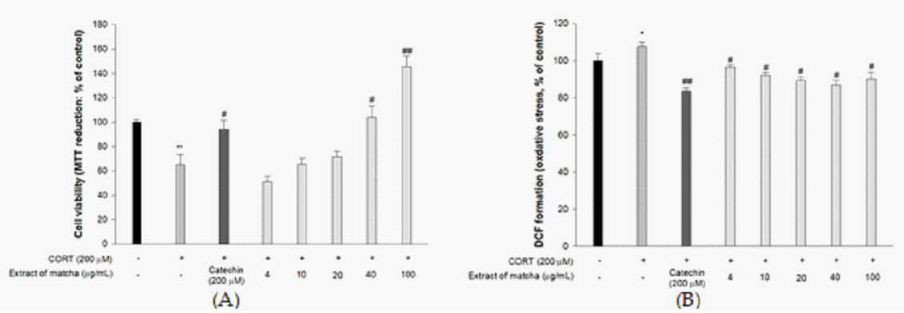
전체 청구항 수 : 총 6 항

(54) 발명의 명칭 **말차 추출물을 유효성분으로 포함하는 만성스트레스로 인한 우울증 및 불안장애의 예방, 개선 또는 치료용 조성물**

## (57) 요 약

본 발명은 말차 추출물을 유효성분으로 포함하는 만성스트레스로 인한 우울증 및 불안장애의 예방, 개선 또는 치료용 조성물에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 만성 스트레스에 노출된 동물모델에서의 긴장 완화 유도성 소재에 관한 것으로 말차 추출물이 만성 스트레스로 인한 뇌신경 장애에 대한 개선 및 치료 효과가 뛰어나고, 해마 조직에서의 p-CERB, BDNF와 BDNF 단백질 발현량을 증가시키는 효과가 있으므로, 만성스트레스로 인한 우울증 또는 불안장애를 개선하거나 치료하는 건강기능식품 또는 의약품으로 개발하는데 유용하게 사용될 수 있다.

*대 표 도* - 도1



(52) CPC특허분류
***A61P 25/22*** (2018.01)
***A61P 25/24*** (2018.01)
*A23V 2002/00* (2013.01)
*A23V 2200/322* (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 1545023916
과제번호 617072055HD130
부처명 농림축산식품부
과제관리(전문)기관명 농림수산식품기술기획평가원
연구사업명 수출전략기술개발(R&D)
연구과제명 가루녹차의 최적저장조건확립 및 이를이용한 고지방식이로 유도된 동물모델에서의 비만개선효과확인
기 여 율 1/1
과제수행기관명 경상국립대학교 산학협력단
연구기간 2021.01.01 ~ 2021.12.31

# 명 세 서

## 청구범위

### 청구항 1

말차 추출물을 유효성분으로 포함하는 만성스트레스로 인한 우울증 또는 불안장애의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

### 청구항 2

제1항에 있어서,

상기 추출물은 물 또는 유기용매 추출법으로 추출되는 것을 특징으로 하는, 만성스트레스로 인한 우울증 또는 불안장애의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

### 청구항 3

제1항에 있어서,

상기 불안장애는 분리 또는 격리 불안증, 편집증, 범공포증, 범강박증, 신경불안증 및 공황장애 중에서 선택된 하나 이상인 것을 특징으로 하는, 만성스트레스로 인한 우울증 또는 불안장애의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

### 청구항 4

제1항에 있어서,

상기 유효성분 이외에 추가로 담체, 부형제 또는 희석제를 포함하는 것을 특징으로 하는, 만성스트레스로 인한 우울증 또는 불안장애의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

### 청구항 5

말차 추출물을 유효성분으로 포함하는 만성스트레스로 인한 우울증 또는 불안장애의 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물.

### 청구항 6

제5항에 있어서,

상기 유효성분 이외에 추가로, 영양제, 비타민, 전해질, 풍미제, 착색제, 증진제, 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알코올 및 탄산음료에 사용되는 탄산화제 중에서 선택된 하나 이상을 더 함유하는 것을 특징으로 하는, 만성스트레스로 인한 우울증 또는 불안장애의 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물.

## 발명의 설명

### 기 술 분 야

[0001] 본 발명은 말차(Matcha) 추출물을 유효성분으로 포함하는 만성스트레스로 인한 우울증 및 불안장애의 예방, 개선 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.

### 배 경 기 술

[0002] 우울증은 만성 정신질환 중 가장 만연한 질환 중 하나로 현대사회에 부정적인 영향을 미치고 있다. 임상적으로 다양한 항우울제가 개발되고 있지만, 현재 개발된 항우울제는 완전한 개선을 보이지 않고 다양한 부작용으로 인해 사용이 제한적이다. 우울증은 지속적으로 우울한 기분과 무감각, 중독 및 신경 퇴행을 동반하는 등 다양한 장애와 관련이 있다.

[0003] 불안장애는 다양한 형태의 비정상적, 병적인 불안과 공포로 인하여 일상 생활에 장애를 일으키는 정신 질환을 통칭한다. 불안과 공포는 정상적인 정서 반응이지만, 정상적 범위를 넘어서면 정신적 고통과 신체적 증상을 초래한다. 불안으로 교감신경이 흥분되어 두통, 심장 박동 증가, 호흡수 증가, 위장관계 이상 증상과 같은 신체적 증상이 나타나 불편하고 가정생활, 직장생활, 학업과 같은 일상 활동을 수행하기 어려운 경우 불안장애로 진단할 수 있다. 이러한 불안장애에는 다양한 진단이 있으며, 각각 특징적인 정의와 진단 기준이 마련되어 있다. 불안장애에 해당하는 질환으로는 공황 장애, 특정 공포증(고소 공포증, 혈액 공포증, 뱀 공포증 등), 사회 공포증, 강박 장애, 외상 후 스트레스 장애, 범 불안장애, 급성 스트레스 장애가 포함된다. 불안장애에는 각기 다른 성격의 여러 정신질환이 속해 있어, 복합적이라 원인을 한마디로 규정하기는 어렵다. 일반적으로 불안이나 우울 등의 정서적인 부분을 담당하는 뇌신경 내의 신경전달물질의 부족 또는 과다, 유전적으로 타고난 소인, 뇌영상 연구에서 밝혀진 뇌의 기능적 또는 구조적 변화를 포함하여, 사회심리학적인 측면, 과거의 경험과 현재의 받아들인 정보를 해석하고 판단하는 인지행동적인 부분까지도 병적인 불안을 일으키는 원인이 될 수 있다. 특히 외상 후 스트레스 장애나 급성 스트레스 장애는 극심한 정신적 충격을 일으키는 사고나 재해 등이 원인으로 주로 발병한다.

[0004] 특히 만성 스트레스는 우울증 및 불안장애의 주요 원인으로 보고되고 있다. 만성 스트레스는 체내 염증성 사이토카인의 분비를 자극하고 수용체의 증가를 통해 염증 반응을 나타낸다. 지속적인 스트레스 자극 및 염증 반응은 시상하부-뇌하수체-부신(HPA)의 피드백 조절을 손상시킨다. 따라서 호르몬 피드백의 손상은 호르몬 대사의 불균형과 염증 반응의 증가를 통해 뇌 조직에 손상을 일으키고, 이는 궁극적으로 인지 장애로 이어진다.

[0005] 선택적 5-HT 재흡수 억제제(SSRI)와 같은 합성 약물은 현재 우울증 치료에 사용되지만, 이들 약물은 정신장애, 불면증 등의 심각한 부작용이 있어 완전한 치료가 어렵다. 따라서 우울증 발병률 개선 효과가 있는 천연화합물 연구를 통해 부작용이 적은 안정한 물질에 관한 연구가 필요한 실정이다.

[0006] 가루녹차 형태인 말차(Matcha)는 녹차(Green tea)의 분말 형태로 탄닌, 페놀산 및 카테킨과 같은 다양한 생리활성 화합물을 함유하는 것으로 알려져 있다. 특히 (-)-epicatechin (EC), (-)-epigallocatechin (EGC), (-)-epicatechin-3-gallate (ECG), (-)-epigallocatechin-3-gallate (EGCG)와 같은 카테킨이 다량 함유되어 있다. 이러한 카테킨 화합물은 호지차(hojicha), 우롱차(oolong tea), 홍차(black tea)와 같은 다양한 녹차 가공품과 비교하였을 때 우수한 함량을 나타내며, 향과 맛이 우수한 것으로 알려져 있다. 말차 카테킨은 항염증 효과, 신장 및 신경 보호 효과, 콜레스테롤 축적 억제 효과 및 항당뇨병 효과와 같은 다양한 생리 활성을 가진다. 또한, 말차는 클로로겐산(chlorogenic acid), 갈릭산(gallic acid), 퀘르세틴(quercetin), 캠퍼롤(kaempferol)과 같은 폴리페놀성 화합물을 함유하고 있으며, 이들 화합물은 인지기능 개선 효과, 비알코올성 지방간질환 억제 효과, 항균 효과를 나타낸다.

[0007] 따라서 본 연구에서는 만성 스트레스 노출에 의한 동물모델을 우선 개발하여 실험에 적용하여 말차 추출물이 예측 불가능한 만성 스트레스 노출 자극으로 인한 스트레스성 행동 변화 및 인지기능 손상을 유의적으로 개선시킴을 확인하였다. 또한, 혈청 및 시상하부에서의 호르몬 변화를 조절하고 뇌 조직에서 만성스트레스성 뇌 손상 기작을 개선하여 만성스트레스성 긴장 완화에 도움을 준 것을 확인하고 말차 추출물을 유효성분으로 포함하는 만성스트레스로 인한 우울증 및 불안장애의 예방, 개선 또는 치료용 조성물을 완성하였다.

## 선행기술문헌

### 특허문헌

[0008] (특허문헌 0001) KR-10-2020-0102156

## 발명의 내용

### 해결하려는 과제

[0009] 본 발명은 상기와 같은 문제를 해결하기 위해, 말차 추출물을 유효성분으로 포함하는 만성스트레스로 인한 우울증 및 불안장애의 예방, 개선 또는 치료용 조성물을 제공하는 것을 목적으로 하며, 더욱 상세하게는 만성 스트레스에 노출된 동물모델에서의 긴장 완화 유도성 소재에 관한 것으로 말차 추출물이 만성 스트레스로 인한 뇌신경 장애에 대한 예방, 개선 또는 치료 효과가 뛰어남을 검증함으로써 본 발명을 완성하였다.

## 과제의 해결 수단

[0010] 상기한 과제를 해결하기 위하여, 본 발명은 말차 추출물을 유효성분으로 포함하는 만성스트레스로 인한 우울증 및 불안장애의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0011] 또한, 본 발명은 말차 추출물을 유효성분으로 포함하는 만성스트레스로 인한 우울증 및 불안장애의 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물을 제공한다.

## 발명의 효과

[0012] 본 발명은 말차 추출물을 유효성분으로 포함하는 만성스트레스로 인한 우울증 및 불안장애의 예방, 개선 또는 치료용 조성물에 관한 것으로, 만성 스트레스에 노출된 동물모델에서의 긴장 완화 유도성 소재에 관한 것으로 말차 추출물이 만성 스트레스로 인한 뇌신경 장애에 대한 개선 및 치료 효과가 있으며, 해마 조직에서의 p-CERB, BDNF와 BDNF 단백질 발현량을 증가시키는 효과가 있다.

## 도면의 간단한 설명

[0013] 도 1은 본 발명인 말차 추출물의 코르티코스테론(corticosterone)으로 유도된 해마세포(HT22)에서 세포 생존율 및 세포 내 활성산소종(ROS) 함량 개선 효과를 나타낸 도이다.

도 2는 본 발명인 말차 추출물의 코르티코스테론(corticosterone)으로 유도된 해마세포 (HT22)에서 스트레스성 쾌감상실 개선 효과를 나타낸 도이다.

도 3 및 도 4는 본 발명인 말차 추출물의 코르티코스테론(corticosterone)으로 유도된 해마세포(HT22)에서 스트레스성 우울증 유사 행동장애 개선 효과를 나타낸 도이다.

도 5는 본 발명인 말차 추출물의 코르티코스테론(corticosterone)으로 유도된 해마세포(HT22)에서 스트레스성 탐색행동 및 일반 활동 개선 효과를 나타낸 도이다.

도 6은 본 발명인 말차 추출물의 공간 학습 및 기억 능력 개선 효과를 나타낸 도이다.

도 7은 본 발명인 말차 추출물의 장기 학습 및 기억능력 개선 효과를 나타낸 도이다.

도 8은 본 발명인 말차 추출물의 뇌 조직에서의 항산화 시스템 개선 효과를 나타낸 도이다.

도 9는 본 발명인 말차 추출물의 미토콘드리아 활성 개선 효과를 나타낸 도이다.

도 10은 본 발명인 말차 추출물이 혈청 및 시상하부에서의 호르몬 변화에 미치는 영향을 나타낸 도이다.

도 11은 본 발명인 말차 추출물의 뇌 조직에서의 스트레스 관련 기작 개선 효과를 나타낸 도이다.

도 12는 본 발명인 말차 추출물의 뇌 조직에서의 세포 사멸 개선 효과를 나타낸 도이다.

도 13은 본 발명인 말차 추출물의 뇌 조직에서의 BDNF 개선 효과를 나타낸 도이다.

도 14는 본 발명인 말차 추출물의 뇌 조직에서의 신경 염증 개선 효과를 나타낸 도이다.

## 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0014] 이하, 첨부된 도면을 참조하여 본 발명의 구현예로 본 발명을 상세히 설명하기로 한다. 다만, 하기 구현 예는 본 발명에 대한 예시로 제시되는 것으로, 당업자에게 주지 저명한 기술 또는 구성에 대한 구체적인 설명이 본 발명의 요지를 불필요하게 흐릴 수 있다고 판단되는 경우에는 그 상세한 설명을 생략할 수 있고, 이에 의해 본 발명이 제한되지는 않는다. 본 발명은 후술하는 특허 청구범위의 기재 및 그로부터 해석되는 균등 범주 내에서 다양한 변형 및 응용이 가능하다.

[0015] 또한, 본 명세서에서 사용되는 용어(terminology)들은 본 발명의 바람직한 실시 예를 적절히 표현하기 위해 사용된 용어들로서, 이는 사용자, 운용자의 의도 또는 본 발명이 속하는 분야의 관례 등에 따라 달라질 수 있다. 따라서 본 용어들에 대한 정의는 본 명세서 전반에 걸친 내용을 토대로 내려져야 할 것이다. 명세서 전체에서, 어떤 부분이 어떤 구성요소를 “포함”한다고 할 때, 이는 특별히 반대되는 기재가 없는 한 다른 구성요소를 제외하는 것이 아니라 다른 구성 요소를 더 포함할 수 있는 것을 의미한다.

[0016] 본 명세서 전체에 걸쳐, 특정 물질의 농도를 나타내기 위하여 사용되는 '%'는 별도의 언급이 없는 경우, 고체/

고체는 (w/w) %, 고체/액체는 (w/v) %, 그리고 액체/액체는 (v/v) %이다.

[0018] 일 측면에서, 본 발명은 말차 추출물을 유효성분으로 포함하는 만성스트레스로 인한 우울증 및 불안장애의 예방 또는 치료용 약학적 조성물에 관한 것이다.

[0019] 본 발명에서 상기 불안장애는 분리 또는 격리 불안증, 편집증, 범공포증, 범강박증, 신경불안증 및 공황장애 중 어느 하나인 것일 수 있다.

[0020] 본 발명에 따른 추출물은 당업계에 공지된 추출 및 분리방법을 사용하여 천연으로부터 추출 및 분리하여 수득한 것을 사용할 수 있으며, 본 발명에서 정의된 "추출물"은 적절한 용매를 이용하여 말차로부터 추출한 것이며, 예를 들어, 조추출물, 극성용매 가용 추출물 또는 비극성용매 가용 추출물을 모두 포함한다. 상기 말차로부터 추출물을 추출하기 위한 적절한 용매로는 식품학/약학/화장품학적으로 허용되는 유기용매라면 어느 것을 사용해도 무방하며, 물 또는 유기용매를 사용할 수 있으며, 이에 제한되지는 않으나, 예를 들어, 정제수, 메탄올(methanol), 에탄올(ethanol), 프로판올(propanol), 이소프로판올(isopropanol), 부탄올(butanol) 등을 포함하는 탄소수 1 내지 4의 알코올, 아세톤(acetone), 에테르(ether), 벤젠(benzene), 클로로포름(chloroform), 에틸아세테이트(ethyl acetate), 메틸렌클로라이드(methylene chloride), 헥산(hexane) 및 시클로헥산(cyclohexane) 등의 각종 용매를 단독으로 혹은 혼합하여 사용할 수 있다. 추출 방법으로는 열수추출법, 냉침추출법, 환류냉각추출법, 용매추출법, 수증기증류법, 초음파추출법, 용출법, 압착법 등의 방법 중 어느 하나를 선택하여 사용할 수 있다. 또한, 목적하는 추출물은 추가로 통상의 분획 공정을 수행할 수도 있으며, 통상의 정제 방법을 이용하여 정제될 수도 있다.

[0021] 본 발명의 추출물의 제조방법에는 제한이 없으며, 공지되어 있는 어떠한 방법도 이용될 수 있다. 예를 들면, 본 발명의 조성물에 포함되는 추출물은 상기한 열수 추출 또는 용매 추출법으로 추출된 1차 추출물을, 감압 증류 및 동결 건조 또는 분무 건조 등과 같은 추가적인 과정에 의해 분말상태로 제조할 수 있다. 또한 상기 1차 추출물을 실리카겔 컬럼 크로마토그래피(silica gel column chromatography), 박층 크로마토그래피(thin layer chromatography), 고성능 액체 크로마토그래피(high performance liquid chromatography) 등과 같은 다양한 크로마토그래피를 이용하여 추가로 정제된 분획을 얻을 수도 있다. 따라서 본 발명에 있어서 추출물은 추출, 분획 또는 정제의 각 단계에서 얻어지는 모든 추출액, 분획 및 정제물, 그들의 희석액, 농축액 또는 건조물을 모두 포함하는 개념이다.

[0022] 본 발명의 약학 조성물에는 유효성분 이외에 보조제(adjuvant)를 추가로 포함할 수 있다. 상기 보조제는 당해 기술분야에 알려진 것이라면 어느 것이나 제한 없이 사용할 수 있다.

[0023] 본 발명에 따른 약학 조성물은 유효성분을 약학적으로 허용된 담체에 혼입시킨 형태로 제조될 수 있다. 여기서, 약학적으로 허용된 담체는 제약 분야에서 통상 사용되는 담체, 부형제 및 희석제를 포함한다. 본 발명의 약학 조성물에 이용할 수 있는 약학적으로 허용된 담체는 이들로 제한되는 것은 아니지만, 락토스, 덱스트로스, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로스, 메틸 셀룰로스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 들 수 있다.

[0024] 본 발명의 약학 조성물은 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 또는 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용될 수 있다.

[0025] 제제화할 경우에는 통상 사용하는 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제될 수 있다. 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 그러한 고형 제제는 유효성분에 적어도 하나 이상의 부형제, 예를 들면 전분, 칼슘 카르보네이트, 수크로스, 락토오스, 젤라틴 등을 섞어 조제될 수 있다. 또한, 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트, 탈크 같은 윤활제들도 사용될 수 있다. 경구투여를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데, 일반적으로 사용되는 희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수용성용제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제 및 좌제가 포함된다. 비수용성용제, 현탁제로는 프로필렌 글리콜, 폴리에틸렌 글리콜, 올리브유와 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텝솔(witepsol), 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로젤라틴 등이 사용될 수 있다.

[0026] 본 발명에 따른 약학 조성물은 개체에 다양한 경로로 투여될 수 있다. 투여의 모든 방식이 예상될 수 있는데,

예를 들면 경구, 정맥, 근육, 피하, 복강내 주사에 의해 투여될 수 있다.

[0027] 상기 약학 조성물은 다양한 경구 또는 비경구 투여 형태로 제형화될 수 있다.

[0028] 경구 투여용 제형으로는 예를 들면 정제, 환제, 경질, 연질 캅셀제, 액제, 현탁제, 유화제, 시럽제, 과립제 등이 있는데, 이들 제형은 유효성분 이외에 희석제(예: 락토즈, 덱스트로즈, 수크로즈, 만니톨, 솔비톨, 셀룰로즈 및/또는 글리신), 활택제(예: 실리카, 탈크, 스테아르산 및 그의 마그네슘 또는 칼슘염 및/ 또는 폴리에틸렌 글리콜)를 추가로 포함할 수 있다. 또한, 상기 정제는 마그네슘 알루미늄 실리케이트, 전분 페이스트, 젤라틴, 트라가칸스, 메틸셀룰로즈, 나트륨 카복시메틸셀룰로즈 및/또는 폴리비닐피롤리딘과 같은 결합제를 함유할 수 있으며, 경우에 따라 전분, 한천, 알긴산 또는 그의 나트륨 염과 같은 붕해제 또는 비등 혼합물 및/또는 흡수제, 착색제, 향미제 및 감미제를 함유할 수 있다. 상기 제형은 통상적인 혼합, 과립화 또는 코팅 방법에 의해 제조될 수 있다.

[0029] 또한, 비경구 투여용 제형의 대표적인 것은 주사용 제제이며, 주사용 제제의 용매로서 물, 링거액, 등장성 생리식염수 또는 현탁액을 들 수 있다. 상기 주사용 제제의 멸균 고정 오일은 용매 또는 현탁 매질로서 사용할 수있으며 모노-, 디-글리세라이드를 포함하여 어떠한 무자극성 고정오일도 이러한 목적으로 사용될 수 있다.

[0030] 또한, 상기 주사용 제제는 올레산과 같은 지방산을 사용할 수 있다.

[0032] 일 측면에서, 본 발명은 말차 추출물을 유효성분으로 포함하는 만성스트레스로 인한 우울증 및 불안장애의 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물에 관한 것이다.

[0033] 본 발명의 건강기능식품 조성물은 유효성분인 추출물을 함유하는 것 외에 통상의 식품 조성물과 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다.

[0034] 상술한 천연 탄수화물의 예는 모노사카라이드, 예를 들어, 포도당, 과당 등; 디사카라이드, 예를 들어 말토스, 슈크로스 등; 및 폴리사카라이드, 예를 들어 덱스트린, 시클로덱스트린 등과 같은 통상적인 당, 및 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알콜이다. 상술한 향미제는 천연 향미제(타우마틴), 스테비아 추출물(예를 들어 레바우디오시드 A, 글리시르히진 등) 및 합성 향미제(사카린, 아스파르탐 등)를 유리하게 사용할 수 있다. 본 발명의 식품 조성물은 상기 약학적 조성물과 동일한 방식으로 제제화되어 기능성 식품으로 이용하거나, 각종 식품에 첨가할 수 있다. 본 발명의 조성물을 첨가할 수 있는 식품으로는 예를 들어, 음료류, 육류, 초코렛, 식품류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 사탕류, 아이스크림류, 알코올 음료류, 비타민 복합제 및 건강보조식품류 등이 있다.

[0035] 또한, 상기 식품 조성물은 유효성분인 추출물 외에 여러 가지 영양제, 비타민, 광물(전해질), 합성 풍미제 및 천연 풍미제 등의 풍미제, 착색제 및 중진제(치즈, 초콜릿 등), 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알콜, 탄산음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다. 그밖에 본 발명의 식품 조성물은 천연 과일 쥬스 및 과일 쥬스 음료 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다.

[0036] 본 발명의 기능성 식품 조성물은, 정제, 캅셀, 분말, 과립, 액상, 환 등의 형태로 제조 및 가공될 수 있다. 본 발명에서 '건강기능식품 조성물'이라 함은 건강기능식품에 관한 법률 제6727호에 따른 인체에 유용한 기능성을 가진 원료나 성분을 사용하여 제조 및 가공한 식품을 말하며, 인체의 구조 및 기능에 대하여 영양소를 조절하거나 생리학적 작용 등과 같은 보건용도에 유용한 효과를 얻을 목적으로 섭취하는 것을 의미한다. 본 발명의 건강기능성식품은 통상의 식품 첨가물을 포함할 수 있으며, 식품 첨가물로서의 적합 여부는 다른 규정이 없는 한, 식품의약품안전처에 승인된 식품 첨가물 공전의 총칙 및 일반시험법 등에 따라 해당 품목에 관한 규격 및 기준에 의하여 판정한다. 상기 '식품 첨가물 공전'에 수재된 품목으로는 예를 들어, 케톤류, 글리신, 구연산칼슘, 니코틴산, 계피산 등의 화학적 합성물; 감색소, 감초추출물, 결정셀룰로오스, 고량색소, 구아검 등의 천연첨가물; L-글루타민산나트륨 제제, 면류첨가알칼리제, 보존료 제제, 타르색소제제 등의 혼합제제류 등을 들 수 있다. 예를 들어, 정제 형태의 건강기능성식품은 본 발명의 유효성분을 부형제, 결합제, 붕해제 및 다른 첨가제와 혼합한 혼합물을 통상의 방법으로 과립화한 다음, 활택제 등을 넣어 압축성형하거나, 상기 혼합물을 직접 압축 성형할 수 있다. 또한 상기 정제 형태의 건강기능성식품은 필요에 따라 교미제 등을 함유할 수도 있다. 캅셀 형태의 건강기능성식품 중 경질 캅셀제는 통상의 경질 캅셀에 본 발명의 유효성분을 부형제 등의 첨가제와 혼합한 혼합물을 충진하여 제조할 수 있으며, 연질 캅셀제는 본 발명의 유효성분을 부형제 등의 첨가제와 혼합한 혼합물을 젤라틴과 같은 캅셀기제에 충진하여 제조할 수 있다. 상기 연질 캅셀제는 필요에 따라 글리세린 또는 소

르비톨 등의 가소제, 착색제, 보존제 등을 함유할 수 있다. 환 형태의 건강기능성식품은 본 발명의 유효성분과 부형제, 결합제, 붕해제 등을 혼합한 혼합물을 기존에 공지된 방법으로 성형하여 조제할 수 있으며, 필요에 따라 백당이나 다른 제피제로 제피할 수 있으며, 또는 전분, 탈크와 같은 물질로 표면을 코팅할 수도 있다. 과립 형태의 건강기능성식품은 본 발명의 유효성분의 부형제, 결합제, 붕해제 등을 혼합한 혼합물을 기존에 공지된 방법으로 입상으로 제조할 수 있으며, 필요에 따라 착향제, 교미제 등을 함유할 수 있다.

[0038] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 보다 자세히 설명한다. 다만, 상기 실시예 및 실험예는 본 발명에 대한 예시로 제시되는 것으로, 당업자에게 주지 저명한 기술 또는 구성에 대한 구체적인 설명이 본 발명의 요지를 불필요하게 흐릴 수 있다고 판단되는 경우에는 그 상세한 설명을 생략할 수 있고, 이에 의해 본 발명이 제한되지는 않는다. 본 발명은 후술하는 특허청구범위의 기재 및 그로부터 해석되는 균등 범주 내에서 다양한 변형 및 응용이 가능하다.

[0040] **[준비예]**

[0041] **준비예 1. 말차 추출물의 제조**

[0042] 본 실험에 사용된 말차는 수확 직전 3주간 차광재배 한 것을 사용하였고, 재배된 녹차를 250℃에서 1분 이내로 가열한 뒤, 급속 냉각 시켰다(900K-1; Kawasaki Tea Machinery, Kakegawa, Japan). 이를 맷돌 비즈밀(회전수 50-55 rpm, 입경 13-14 μm) (Kawasaki Tea Machinery)을 이용하여 말차를 제조하였고, 말차는 -80℃에서 동결건조하였다(Operon, Gimpo, Korea). 말차 추출물은 2 g의 동결건조된 말차를 40℃의 증류수에서 2시간 동안 환류냉각 추출하였으며, 이를 동결건조하여 실험에 사용하였다.

[0044] **준비예 2. 실험에 사용된 세포 배양**

[0045] 본 실험에 사용된 해마세포(HT22)는 한국세포주은행(Seoul, Korea)로부터 구입하였고, 10% FBS, 50 unit/mL 페니실린 및 100 μg/mL 스트렙토마이신을 함유하는 DMEM 배지에서 배양했다. 세포는 5% $CO_2$ 및 37℃로 유지되는 인큐베이터에서 배양되었다.

[0047] **준비예 3. 세포 내 ROS 생성 함량 측정 방법**

[0048] 해마세포(HT22)를 96 well plate($1x10^4$ cells/well)에 도말하였고, 배양 24시간 후 시료를 처리하고 30분 후 corticosterone을 처리하여 24시간 동안 배양시켰다. DCF-DA를 처리하고, 30분 후, 세포를 DMSO에 용해시키고 fluorescence microplate reader (Infinite 200, Tecan Co., San Jose, CA, USA)에서 570 nm에서 분석하였다.

[0050] **준비예 4. 세포 생존율 측정 방법**

[0051] 해마세포(HT22)를 96 well plate($1x10^4$ cells/well)에 도말하였고, 배양 24시간 후 시료를 처리하고 30분 후 corticosterone을 처리하여 24시간 동안 배양시켰다. MTT를 처리하고 3시간 후, 세포를 DMSO에 용해시키고 microplate reader (Epoch 2, BioTek Instruments, Inc., Winooski, VT, USA)에서 570 nm에서 분석하였다.

[0053] **준비예 5. in vivo 실험 디자인**

[0054] 본 실험에 사용된 C57BL/6 마우스(수컷, 6주)는 Samtako(Osan, Korea)로부터 구입했다. 실험 마우스를 케이지당 4마리로 무작위로 나누었고 55% 습도 및 22 ± 2℃의 표준 실험실 조건에서 사육하였다. 각 그룹은 4개의 그룹으로 나뉘었고, normal control (NC) 그룹, 만성 스트레스 노출 (chronic unpredictable mild stress, CUMS) 그룹, CUMS 노출 및 시료 섭취 (EM 50) 그룹 (50 mg/kg of body weight), CUMS 노출 및 시료 섭취 (EM 40) 그룹 (40 mg/kg of body weight)으로 구분하였다. 말차 추출물은 식수에 녹인 후 위관을 이용하여 12주 동안 1일 1회 경구투여하였다. 만성 스트레스는 cage swap (24 h), wet bedding (24 h), empty bedding (24 h),

restraint (2 h), water or food deprivation (12 h), cage tilting (24 h), overnight illumination (24 h)의 방법을 일주일간 무작위로 수행하였고, 총 기간은 4주간 진행하였다. 모든 동물실험 방법은 경상국립대학교 동물실험실 운영위원회(인증번호: GNU-200803-M0048)와 보건복지부 윤리위원회의 정책에 따라 수행되었다.

[0056] **준비예 6. Sucrose preference test**

[0057] 첫날에 모든 동물에게 1% 자당 용액 2병을 노출 시켰으며, 24시간 후, 1% 자당 1병을 식수로 교체했다. 다시 24시간 후 마우스를 24시간 동안 금식시켰고, 각 케이지에는 1% 설탕물과 식수가 제공되었으며 12시간 간격으로 두 물병의 위치를 교체하였다. 자당선호도를 측정하기 위해 마우스를 12시간 동안 용액과 음식에 자유롭게 접근할 수 있게 하였고, 섭취한 자당 용액과 식수의 섭취량을 측정하였다.

[0059] **준비예 7. Tail suspension test**

[0060] Strain gauge에 연결된 후크에 마이크로포어 테이프를 사용하여 마우스를 꼬리로 매달았다. 6분 동안 마우스의 부동시간과 높은 활동 시간을 SMART 비디오 추적 시스템(Smart 3.0, Panlab, Barcelona, Spain)을 이용하여 측정하였다.

[0062] **준비예 8. Forced swim test**

[0063] 마우스는 22-24℃의 물로 10cm 깊이로 채워진 투명한 실린더(13(높이) cm × 24(직경) cm)에서 6분 동안 수영을 하도록 하였고, 부동시간과 높은 활동 시간은 SMART 비디오 추적 시스템(Smart 3.0, Panlab)을 이용하여 기록했다.

[0065] **준비예 9. Open field test**

[0066] 자발적인 운동 활동을 평가하기 위해 마우스를 50 × 50 × 50 cm 아크릴 투명 상자 중앙에 놓고 SMART 비디오 추적 시스템(Smart 3.0, Panlab)을 이용하여 실험동물의 행동을 5분 동안 기록했다.

[0068] **준비예 10. Y-maze test**

[0069] Y-maze는 33(길이) cm × 15(높이) cm × 10(너비) cm으로 구성되어 있으며, 마우스는 지정된 팔의 끝에 위치시키고 8분 동안 팔에서 자유롭게 움직일 수 있도록 하였다. 이동 및 경로 추적은 비디오 시스템(Smart 3.0, Panlab)을 사용하여 기록하였다.

[0071] **준비예 11. 수중 미로 실험(Morris water maze test)**

[0072] 수중 미로 실험에 사용된 풀은 원형 수조(90(직경) cm × 30(깊이) cm)로 구성되어 있으며 N, S, E, W의 4개 구역으로 무작위로 분리하였다. W 사분면의 중앙에는 수면 아래에 잠긴 플랫폼을 위치시켰고, 마우스는 자유롭게 헤엄칠 수 있도록 하여 마우스의 움직임을 비디오 시스템(Smart 3.0, Panlab)을 이용하여 기록되었다. Prove trial 실험에서 플랫폼 없이 테스트를 수행하였고 W 영역에서의 머무름시간을 측정했다.

[0074] **준비예 12. 조직 전처리**

[0075] in vitro 실험 후, SOD 및 malondialdehyde (MDA) 함량 분석을 위해 phosphate buffered saline (PBS, pH 7.4)에서 bullet blender (Next Advance Inc., Averill Park, NY, USA)를 사용하여 뇌 조직을 균질화했다. 환원형 glutathione (GSH) 함량 분석을 위해 phosphate buffer (pH 6.0)에서 bullet blender (Next Advance Inc., Averill Park, NY, USA)를 사용하여 뇌 조직을 균질화했다.

[0077] **준비예 13. 뇌 조직에서의 환원형 GSH 활성 측정**

[0078] 환원형 glutathione (GSH) 분석을 위해 인산염 완충액에 균질화된 조직을 4℃에서 10,000 × g에서 15분 동안 원심분리하고 상등액을 분석에 사용하였다. 상등액을 5% metaphosphoric acid과 반응시켰고 2,000 × g에서 원심분리하였고, 상등액을 0.26 M tris-HCl (pH 7.8), 0.65 N NaOH 및 1 mg/mL의 o-phthaldialdehyde와 실온에서 15분 동안 반응시켰다. 그런 다음 fluorescence microplate reader (Infinite 200, Tecan Co., Männedorf, Switzerland)를 사용하여 320 nm (excitation) 및 420 nm (emission)의 파장에서 형광 강도를 측정했다.

[0080] **준비예 14. 뇌 조직에서의 SOD 활성 측정**

[0081] SOD 함량을 확인하기 위해 PBS에서 균질화된 조직을 4℃에서 10분 동안 400 × g에서 원심분리하고, pellet을 SOD 분석에 사용하였다. 1×cell extraction buffer [10% SOD buffer, 0.4% (v/v) triton X-100, and 200 μM phenylmethane sulfonylfluoride]과 pellet을 4℃에서 10분 동안 10,000 × g에서 원심분리했다. SOD 함량은 상용 SOD kit(Dojindo Molecular Technologies, Kumamoto, Japan)를 사용하여 측정하였다.

[0083] **준비예 15. 뇌 조직에서의 MDA 함량 측정**

[0084] MDA 함량을 측정하기 위해 PBS에서 균질화된 조직을 4℃에서 5,000 rpm으로 10분 동안 원심분리하였다. 상등액을 95℃ water bath에서 1% phosphoric acid 및 0.67% TBA와 함께 1시간 동안 배양하였다. 반응물을 600 × g에서 10분 동안 회전시키고 상층액을 532 nm에서 측정했다.

[0086] **준비예 16. 미토콘드리아 추출**

[0087] 뇌 조직을 1 mM EGTA가 포함된 10배 부피의 mitochondrial isolation (MI) buffer (215 mM mannitol, 75 mM sucrose, 0.1% BSA, 20 mM HEPES sodium salt, pH 7.2)으로 균질화했다. 균질액을 4℃에서 1,300 × g에서 10분간 원심분리시키고, 상층액을 다시 4℃에서 13,000 × g에서 10분간 원심분리하였다. 미토콘드리아 pellet을 0.1% digitonin을 포함하는 MI 완충액과 혼합하였다. 5분 후, 혼합물을 1 mM EGTA가 포함된 MI buffer와 반응시키고 4℃에서 15분 동안 13,000 × g에서 원심분리하였다.

[0089] **준비예 17. 미토콘드리아 내 ROS 생성 함량 측정**

[0090] 분리된 미토콘드리아는 KCl-based respiration buffer [125 mM potassium chloride, 2 mM potassium phosphate monobabic, 20 mM HEPES, 1 mM magnesium chloride, 500 μM EGTA, 2.5 mM malate and 5 mM pyruvate] 및 25 μM DCF-DA와 20분 동안 반응시켰다. DCF 형광은 fluorescence microplate reader (Infinite 200, Tecan Co.)를 사용하여 485 nm (excitation) 및 530 nm (emission)에서 형광을 측정했다.

[0092] **준비예 18. 미토콘드리아 내 MMP 측정**

[0093] 5 mM pyruvate와 5 mM malate가 포함된 MI buffer와 분리된 미토콘드리아를 black 96 well plate에서 1 μM JC-1과 반응시켰다. 혼합물을 암실에서 20분 동안 실온에서 배양한 후 fluorescence microplate reader (Infinite 200, Tecan Co.)를 사용하여 530 nm (excitation) 및 590 nm (emission)에서 형광을 측정했다.

[0095] **준비예 19. 미토콘드링라 내 ATP 함량 측정**

[0096] ATP 함량은 제조업체의 프로토콜에 따라 ATP bioluminescence assay kit (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)를 사용하였다. 추출된 미토콘드리아의 ATP 함량은 luciferasse에 의해 촉매될 때 산화되는 luciferin의 값을 사용하여 측정하고, ATP 함량은 동일한 방법으로 수행된 표준 곡선에 따라 계산되었다.

[0098] **준비예 20. 호르몬 측정**

[0099] 혈청 및 시상하부의 호르몬 대사 산물을 UPLC 시스템(Waters Corp., Milford, MA, USA)으로 분석했다. 샘플을 0.1% formic acid을 포함하는 distilled water로 Acquity UPLC BEH C18 컬럼(2.1 mm × 100 mm, 1.7 μm; Waters Corp.)에 주입하고 0.5 mL의 유속에서 0.1% formic acid을 포함하는 acetonitrile의 gradient로 분리했다. 대사 산물은 positive ESI 모드를 이용하였고, UPLC Q-TOF MSE(Waters Corp.)를 사용하여 분석했다. Voltages of the capillary는 2.78kV로 하였고, MS/MS 스펙트럼은 10-30 eV의 충돌 에너지 램프에 의해 m/z 50-1,000로 하였다. MS data는 MassLynx 소프트웨어(Waters Corp.)를 이용하여 분석했다.

[0101] **준비예 21. 웨스턴블롯팅**

[0102] 조직을 1% PI를 함유한 extraction solution (GeneAll Biotechnology, Seoul, Korea)에서 10분 동안 균질화하였다. 4℃에서 13,000 × g에서 10분간 원심분리한 후 상등액을 단백질 분석에 사용하였다. 단백질을 SDS-PAGE 겔로 분리하고 PVDF 막으로 transfer 하였다. membrane을 4℃에서 1차 항체에서 반응시키고, 2차 항체와 실온에서 1시간 동안 반응시켰다. 면역 복합체는 Western blot imager (iBright Imager, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)를 사용하여 검출되었고 단백질의 밀도는 ImageJ 소프트웨어(National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA)를 이용하여 계산했다.

[0104] **준비예 22. 통계처리**

[0105] 모든 실험 결과는 평균±표준편차로 나타냈으며, Duncan의 다중범위검정법(Duncan's multiple range test)으로 각 시료 간의 유의차를 5% 수준($p < 0.05$)와 1% 수준($p < 0.01$)에서 검증하였다.

[0107] **[실시예]**

[0108] **실시예 1. 말차 추출물의 코르티코스테론(corticosterone) 유도 산화 스트레스에 대한 세포 생존율 및 세포 내 활성산소종(ROS) 함량 개선 효과**

[0109] 대조군(100%)과 비교하였을 때, corticosterone 처리군은 65.09%의 세포 생존율이 감소했고, catechin (200 μM) 투여군 처리군은 94.34%의 세포 생존율이 감소했다 (도 1A). 100 μg/mL 농도의 말차 추출물을 투여한 세포의 생존율은 145.28%, 50 μg/mL의 농도에서는 103.77%로 우수한 세포 생존율을 나타냈다. 정상 대조군(100%)과 비교하였을 때, corticosterone 처리군(107.60%)은 ROS 함량이 증가했고, catechin 투여군(200 μM) 처리군은 ROS 함량이 감소했다 (83.79%) (도 1B). 말차 추출을 투여한 세포 내 ROS 함량은 100 μg/mL 농도에서 90.12%, 50 μg/mL 농도에서 87.02%로 우수한 ROS 억제 활성을 보였다. in vitro 평가를 통해 말차 추출물은 corticosterone으로 유도된 독성에 대한 우수한 보호효과를 가지는 것을 확인했다.

[0111] **실시예 2. 말차 추출물의 스트레스성 쾌감상실 개선 효과**

[0112] 만성 스트레스로 유도된 쾌감상실(anhedonia) 개선 효과는 sucrose preference test를 이용하여 측정하였다(도 2). EM 50 및 EM 100 그룹(53.74%, 60.46%)의 자당선호도는 CUMS 그룹(49.23%)보다 증가했다. 따라서 말차 추출물의 섭취는 만성 스트레스로 유도된 무기력 및 쾌감상실에 대한 우수한 보호효과를 가지는 것을 확인했다.

[0114] **실시예 3. 말차 추출물의 스트레스성 우울증 유사 행동장애 개선 효과**

[0115] 만성 스트레스로 유도된 우울증 유사 행동장애 및 무기력 개선 효과는 forced swim test를 이용하여 측정하였다(도 3). EM 50 및 EM 100 그룹(33.60%, 29.40%)의 부동시간은 CUMS 그룹(45.40%)보다 감소했다(도 3A). 반면, EM 50 및 EM 100 그룹(66.40%, 70.60%)의 high activity time은 CUMS 그룹(54.60%)보다 증가했다(도 3B).

[0116] 만성 스트레스로 유도된 우울증 유사 행동장애 및 무기력 개선 효과는 tail suspension test를 이용하여 측정하였다(도 4). EM 50 및 EM 100 그룹(40.90%, 34.55%)의 부동시간은 CUMS 그룹(48.39%)보다 감소했다(도 4A). 반면, EM 50 및 EM 100 그룹(59.10%, 65.45%)의 high activity time은 CUMS 그룹(51.61%)보다 증가했다(도 4B).

[0118] **실시예 4. 말차 추출물의 스트레스성 탐색행동 및 일반 활동 개선 효능**

[0119] 만성 스트레스로 유도된 탐색행동 및 일반 활동 변화에 대한 개선 효과는 open field test를 이용하여 측정하였다(도 5). EM 50 및 EM 100 그룹(14.22%, 14.33%)의 center zone에 머무르는 시간은 CUMS 그룹(11.89%)보다 감소했다(도 5A). 반면, EM 50 및 EM 100 그룹(85.78%, 85.78%)의 periphery zone에 머무르는 시간은 CUMS 그룹(88.11%)보다 증가했다(도 5B). 또한 EM의 농도가 증가할수록 탐색행동 및 일반 활동이 유의적으로 개선되었다(도 5C).

[0121] **실시예 5. 말차 추출물의 공간 학습 및 기억 능력 개선 효과**

[0122] 공간 학습 및 기억 기능은 Y-maze test를 이용하여 측정하였다(도 6). Number of arm entries (도 6A), mean speed (도 6B) and total distance (도 6C)는 모든 군에서 유의한 차이가 없었다. EM 50 및 EM 100 그룹(54.72%, 56.18%)의 alternation behavior는 CUMS 그룹(37.11%)보다 증가했다(도 6D). 또한 EM의 농도가 증가할수록 공간학습과 기억기능이 유의적으로 개선되었다(도 6E). 따라서 말차 추출물의 섭취는 만성 스트레스로 유도된 공간 학습 및 기억 기능 손상에 대한 우수한 보호효과를 가지는 것을 확인했다.

[0124] **실시예 6. 말차 추출물의 장기 학습 및 기억능력 개선 효과**

[0125] 장기 학습 및 기억 능력은 Morris water maze 실험을 이용하여 측정하였다(도 7). Prove trial에서 EM 그룹(16.89 s, 10.03 s)의 탈출 지연 시간이 CUMS 그룹보다 유의적으로 감소하였다(31.22 s) (도 7A). EM 그룹(37.52%, 46.07%)의 W 영역의 머무름 시간은 CUMS 그룹(23.17%)에 비해 증가했다(도 7B). 타겟까지의 거리 측정 결과에서 EM 그룹(1,666.83 mm, 1,338.60 mm)은 CUMS 그룹(1,722.53 mm)에 비해 체류 시간이 증가하는 것으로 나타났다(도 7C). Target crossing 결과에서 EM 그룹(2.4, 4.4)은 CUMS 그룹(1.00)에 비해 증가했다(도 7D). Tracing path를 비교하였을 때, EM 그룹에서 장기 학습 및 기억 능력이 상당히 개선되었다(도 7E). 따라서 말차 추출물의 섭취는 만성 스트레스로 유도된 장기 학습 및 기억 능력 손상에 대한 우수한 보호효과를 가지는 것을 확인했다.

[0127] **실시예 7. 말차 추출물의 뇌 조직에서의 항산화 시스템 개선 효과**

[0128] 뇌 조직의 환원형 GSH 활성을 측정한 결과는 도 8A와 같다. CUMS 그룹의 뇌 조직의 환원형 GSH 활성(19.26 μg GSH/mg of protein)은 NC 그룹(26.29 μg GSH/mg of protein)에 비해 유의적으로 감소했다. 반면, EM 그룹(EM 50, 24.76 μg GSH/mg of protein; EM 100, 27.07 μg GSH/mg of protein)은 CUMS 그룹보다 개선된 환원형 GSH 활성을 나타냈다.

[0129] 뇌 조직의 SOD 활성을 측정한 결과는 도 8B와 같다. CUSM 그룹의 뇌 조직의 SOD 활성(73.34%)은 NC 그룹(86.28%)에 비해 유의적으로 감소하였다. 반면, EM 그룹(EM 50, 83.78%; EM 100, 37.36%)은 CUMS 그룹보다 개선된 SOD 활성을 나타냈다.

[0130] 뇌 조직의 MDA 함량을 측정한 결과는 도 8C와 같다. CUMS 그룹의 뇌 조직의 MDA 함량(14.13 mmole/mg of protein)은 NC 그룹(12.40 mmole/mg of protein)에 비해 유의적으로 증가하였다. 반면, EM 그룹(EM 50, 13.84 mmole/mg of protein; EM 100, 12.16 mmole/mg of protein)은 CUMS 그룹보다 개선된 MDA 함량을 나타냈다. 따라서 말차 추출물의 섭취는 만성 스트레스로 유도된 독성에 대한 뇌 조직 내에서의 항산화 시스템에 대한 우수한 보호효과를 가지는 것을 확인했다.

[0132] **실시예 8. 말차 추출물의 미토콘드리아 활성 개선 효과**

[0133] 뇌 조직의 미토콘드리아 ROS 수준은 도 9A와 같다. CUMS 그룹의 미토콘드리아 ROS 함량(112.84%)은 NC 그룹(100.00%)에 비해 유의적으로 증가하였다. 반면, EM 그룹(105.30%, 95.51%)은 CUMS 그룹보다 유의적으로 개선되었다.

[0134] MMP 수준은 도 9B와 같다. CUMS 그룹의 MMP 수준(78.01%)은 NC 그룹(100.00%)에 비해 유의적으로 감소하였다. 반면, EM 그룹(86.30%, 93.07%)은 CUMS 그룹보다 유의적으로 개선되었다.

[0135] 뇌 조직의 ATP 함량은 도 9C와 같다. CUMS 그룹의 ATP 함량(0.57 nmole/mg of protein)은 NC 그룹(1.05 nmole/mg of protein)에 비해 유의적으로 감소하였다. 반면, EM 그룹(0.80 nmole/nmole/mg of protein, 0.89 nmole/mg of protein)은 CUMS 그룹보다 유의적으로 개선되었다. 따라서 말차 추출물의 섭취는 만성 스트레스로 유도된 독성에 대한 뇌 조직 내에서의 신경세포에 에너지를 공급하는 미토콘드리아의 기능 보호를 통해 우수한 보호효과를 가지는 것을 확인했다.

[0137] **실시예 9. 말차 추출물의 혈청 및 시상하부에서의 호르몬 변화**

[0138] 만성 스트레스로 유도된 호르몬 변화는 도 10과 11에 나타내었다. CUMS 그룹의 혈청 tryptophan(0.59), 5-HT(0.48), melatonin(0.60), norepinephrine(0.76) 수준은 NC 그룹(1.00)에 비해 유의적으로 감소했다(도 11). EM 그룹의 혈청 tryptophan(0.55, 0.74), 5-HT(0.58, 0.99), melatonin(0.63, 1.08), norepinephrine(0.84, 1.00) 수준은 CUMS 그룹에 비해 유의적으로 개선되었다. 반면, CUMS 그룹의 혈청 5-HIAA(3.91), cortisol(10.98), cortisone(1.43) 수준은 NC 그룹(1.00)에 비해 유의적으로 증가했다. CUMS 그룹의 혈청 5-HIAA(0.58, 0.44), cortisol(8.77, 3.84), cortisone(0.65, 0.54) 수준은 CUMS 그룹에 비해 유의적으로 개선되었다.

[0139] CUMS 그룹의 시상하부 5-HT(0.55), dopamine(0.69), melatonin(0.71) 수준은 NC 그룹(1.00)에 비해 유의적으로 감소했다(도 12). EM 그룹의 시상하부 5-HT(1.27, 1.22), dopamine(1.26, 1.31), melatonin(1.01, 0.99) 수준은 CUMS 그룹에 비해 유의적으로 개선되었다. 반면, CUMS 그룹의 시상하부 5-HIAA(1.82), glutamate(1.75), cortisol(1.28) 수준은 NC 그룹(1.00)에 비해 유의적으로 증가했다. CUMS 그룹의 시상하부 5-HIAA(1.53, 0.95), glutamate(0.98, 0.84), cortisol(1.11, 1.11) 수준은 CUMS 그룹에 비해 유의적으로 개선되었다. 따라서 말차 추출물의 섭취는 만성 스트레스로 유도된 독성에 대한 혈청과 시상하부 조직 내에서의 스트레스 호르몬 및 신경전달 호르몬 대사체 변화에 대한 우수한 보호효과를 가지는 것을 확인했다.

[0141] **실시예 10. 말차 추출물의 뇌 조직에서의 스트레스 관련 기작 개선 효과**

[0142] 만성 스트레스로 유도된 스트레스 관련 단백질 발현은 도 12에 나타냈다. CUMS 그룹의 뇌 조직에서의 GR(128.54%), CYP11B1(141.03%), ACTH(143.15%)의 발현 수준은 NC 그룹(100%)에 비해 유의적으로 증가했다. EM 100 그룹의 단백질 발현은 CUMS 그룹에 비해 GR(113.49%), CYP11B1(114.28%), ACTH(102.98%)의 발현이 유의적으로 개선되었다. 따라서 말차 추출물의 섭취는 만성 스트레스로 유도된 독성에 대한 뇌 조직 내에서의 스트레스 관련 기작 개선을 통해 우수한 보호효과를 가짐으로써 스트레스로 인한 기능 저하를 억제하는 것을 확인했다.

[0144] **실시예11. 말차 추출물의 뇌 조직에서의 세포 사멸 개선 효과**

[0145] 만성 스트레스로 유도된 세포 사멸 단백질 발현은 도 13에 나타냈다. CUMS 그룹의 뇌 조직에서의 BAX(139.70%), cas-1(165.03%), cas-3(146.15%), Aβ(119.13%), p-tau(184.32%)의 발현 수준은 NC 그룹(100%)에 비해 유의적으로 증가했다. EM 100 그룹의 단백질 발현은 CUMS 그룹에 비해 BAX(118.42%), cas-1(134.60%), cas-3(118.77%), Aβ(102.68%), p-tau(115.24%)의 발현이 유의적으로 개선되었다. 따라서 말차 추출물의 섭취는 만성 스트레스로 유도된 독성에 대한 인지기능과 관련 있는 뇌 조직 내에서의 세포 사멸 관련 기작 개선을 통해 우수한 보호효과를 가짐으로써 세포 사멸을 억제하는 것을 확인했다.

[0147] **실시예 12. 말차 추출물의 뇌 조직에서의 BDNF 개선 효능**

[0148] 만성 스트레스로 유도된 신경 염증 단백질 발현은 도 14에 나타냈다. 그룹 간의 COX-2 발현은 유의적인 차이가 나타나지 않았다. 반면, CUMS 그룹의 뇌 조직에서의 BDNF(40.87%)의 발현 수준은 NC 그룹(100%)에 비해 유의적으로 감소했다. EM 100 그룹의 단백질 발현은 CUMS 그룹에 비해 BDNF(62.55%)의 발현이 유의적으로 개선되었다. 따라서 말차 추출물의 섭취는 만성 스트레스로 유도된 독성에 대한 인지기능과 관련 있는 뇌 조직 내에서의

BDNF관련 기작 개선을 통해 우수한 보호효과를 가짐으로써 스트레스를 억제하는 것을 확인했다.

[0150] **실시예 13. 말차 추출물의 뇌 조직에서의 신경 염증 개선 효능**

[0151] 만성 스트레스로 유도된 신경 염증 단백질 발현은 도 15에 나타냈다. CUMS 그룹의 뇌 조직에서의 TNF-α(146.01%), p-JNK(157.81%), p-IκB(134.26%), p-CREB(52.57%)의 발현 수준은 NC 그룹(100%)에 비해 유의적으로 증가했다. EM 100 그룹의 단백질 발현은 CUMS 그룹에 비해 TNF-α(107.95%), p-JNK(120.01%), p-IκB(101.25%), p-CREB(71.12%)의 발현이 유의적으로 개선되었다. 따라서 말차 추출물의 섭취는 만성 스트레스로 유도된 독성에 대한 인지기능과 관련 있는 뇌 조직 내에서의 신경 염증 관련 기작 개선을 통해 우수한 보호효과를 가짐으로써 신경 염증을 억제하는 것을 확인했다.

[0153] **실시예 14. 말차 추출물의 추출시간 및 추출온도에 따른 효과**

[0154] 말차 추출물의 추출시간별 수율과 항산화활성 효과를 실험한 결과 수율은 표 1과 같고 항산화활성 효과 차이는 도 16과 같다.

표 1

[0156]

| | 0.5 h | 1 h | 2 h | 6 h |
|---|---|---|---|---|
| 20℃ | $25.88 \pm 0.63^{b}$ | $26.53 \pm 2.52^{b}$ | $26.75 \pm 1.61^{b}$ | $29.48 \pm 2.27^{a}$ |
| 40℃ | $28.17 \pm 2.10^{ab}$ | $30.55 \pm 1.52^{a}$ | $30.07 \pm 1.32^{a}$ | $29.02 \pm 1.48^{a}$ |
| 80℃ | $27.65 \pm 1.80^{ab}$ | $30.62 \pm 1.83^{a}$ | $32.92 \pm 2.09^{a}$ | $31.79 \pm 2.08^{a}$ |

[0158] 이러한 결과를 바탕으로 본 발명의 말차 추출물의 추출시간 및 추출온도를 준비예 1에서와 같이 40℃의 증류수에서 2시간으로 설정하였다.

[0160] **실시예 15. 말차 추출물과 녹차 잎 추출물의 비교실험**

[0161] **15-1. 실험방법**

[0162] 말차의 활성을 평가하기 위해 40 g의 말차와 가공 전의 잎 녹차를 50배의 증류수를 이용하여 40℃ 에서 환류 냉각하여 2시간 동안 추출한 후, 추출액을 No. 2 여과지(Whatman PLC, Kent, UK)로 여과하여 진공농축기(N-N series, Eyela Co., Tokyo, Japan)로 농축하였다. 농축된 시료는 동결건조기 (Operon, Gimpo, Korea)를 이용하여 동결건조하였고, 이를 -70℃에서 보관하여 실험에 사용하였다.

[0164] **15-2. 실험결과**

[0165] **15-2-1. 카테킨 함량 비교**

[0166] catechin의 함량을 HPLC 분석을 이용하여 나타내었다 (표 2). 잎 녹차 추출물에 함유되어 있는 catechin (EGC, EC, ECGC, ECG) 함량은 각각 39.27, 5.22, 38.18, 10.57 mg/g extract 으로 나타났으며, 말차 추출물에 함유되어 있는 catechin (EGC, EC, ECGC, ECG) 함량은 각각 49.49, 8.74, 50.24, 13.75 mg/g extract으로 확인되어 잎 녹차 추출물에 비해 말차 추출물의 catechin 함량이 각각 1.2, 1.6, 1.3, 1.3배 우수한 것을 확인하였다.

표 2

[0168]

| | EGC | EC | EGCG | ECG | Total catechin |
|---|---|---|---|---|---|
| 녹차잎 추출물 | 39.27±0.58[b] | 5.22±0.21[b] | 38.18±0.08[b] | 10.57±0.07[b] | 93.24±0.33[b] |
| 말차 추출물 | 49.49±0.12[a] | 8.74±0.06[a] | 50.24±0.57[a] | 13.75±0.11[a] | 122.22±0.21[a] |

[0170] **15-2-2. 항산화 활성 비교**

[0171] 말차와 녹차 잎 추출물의 항산화 활성을 비교해 보고자 총 페놀성 화합물 함량, 총 플라보노이드 화합물 함량, ABTS 및 DPPH 라디칼 소거활성 및 말론다이알데하이드 (Malondialdehyde, MDA) 저해활성을 평가하였다 (표 3). 말차 추출물의 총 페놀성 화합물 함량은 325.00 mg of GAE/g로 녹차 잎 추출물(235.92 mg of GAE/g)보다 우수한 함량을 나타내었으며, 총 플라보노이드 함량 역시 말차 추출물 (104.24 mg of RE/g)이 녹차 잎 추출물(83.87 mg of RE/g)보다 우수한 함량을 보였다. 항산화 활성을 평가하고자 ABTS 및 DPPH 라디칼 소거 활성을 확인하였으며, 말차 추출물[ABTS ($IC_{50}$=276.56 μg/mL) / DPPH ($IC_{50}$=321.05 μg/mL) 라디칼 소거활성]이 녹차 잎 추출물[ABTS ($IC_{50}$=310.48 μg/mL) / DPPH ($IC_{50}$=380.98 μg/mL) 라디칼 소거활성] 보다 우수한 항산화 활성을 나타내었다. 또한, 말차 추출물($IC_{50}$=59.98 μg/mL)이 녹차 잎 추출물($IC_{50}$=68.15 μg/mL)보다 우수한 지질과산화물 억제 활성을 나타내었다.

표 3

[0173]

| | TPC[1] | TFC[2] | ABTS[3] | DPPH[4] | MDA[5] |
|---|---|---|---|---|---|
| Catechin | - | - | 157.25±3.57 | 128.21±5.18 | 22.78±1.01 |
| 녹차 잎 추출물 | 235.92±1.25[b] | 83.87±1.03[b] | 310.48±2.48[a] | 380.98±5.15[a] | 68.15±3.57[a] |
| 말차 추출물 | 325.00±7.35[a] | 104.24±5.17[a] | 276.56±4.25[b] | 321.05±3.24[b] | 59.98±2.48[b] |

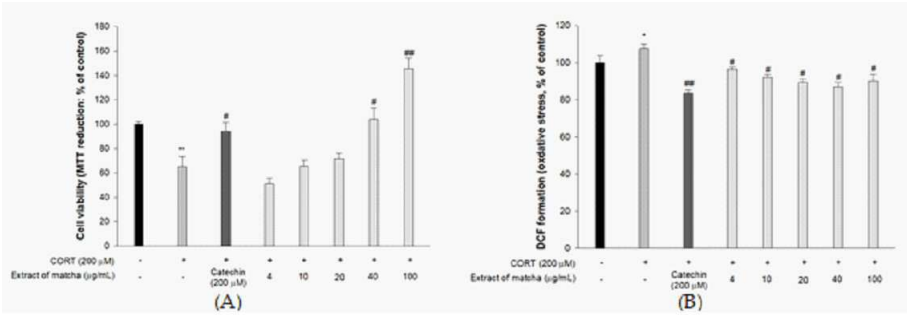
[0174] [1]TPC, 총 페놀성 화합물 함량; [2]TFC, 총 플라보노이드 화합물 함량; [3]ABTS, ABTS 라디칼 소거 활성; [4]DPPH, DPPH 라디칼 소거 활성; [5]MDA, malondialdehyde (MDA) 억제 활성.

[0176] 이제까지 본 발명에 대하여 그 바람직한 실시 예들을 중심으로 살펴보았다.

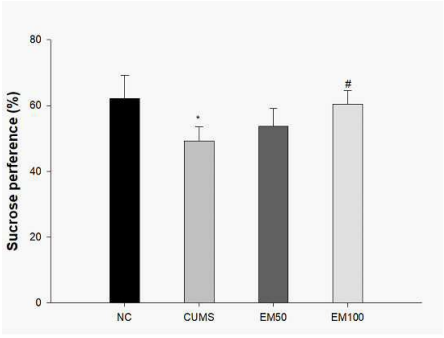
[0177] 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자는 본 발명이 본 발명의 본질적인 특성에서 벗어나지 않는 범위에서 변형된 형태로 구현될 수 있음을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 개시된 실시 예들은 한정적인 관점이 아니라 설명적인 관점에서 고려되어야 한다. 본 발명의 범위는 전술한 설명이 아니라 특허청구 범위에 나타나 있으며, 그와 동등한 범위 내에 있는 모든 차이점은 본 발명에 포함된 것으로 해석되어야 할 것이다.

## 도면

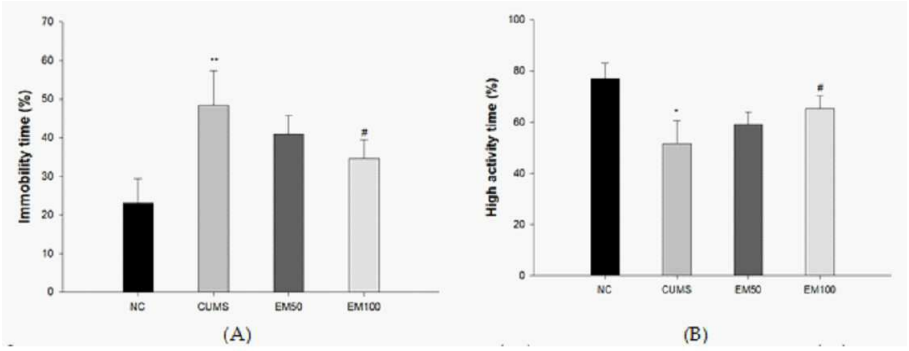
### 도면1



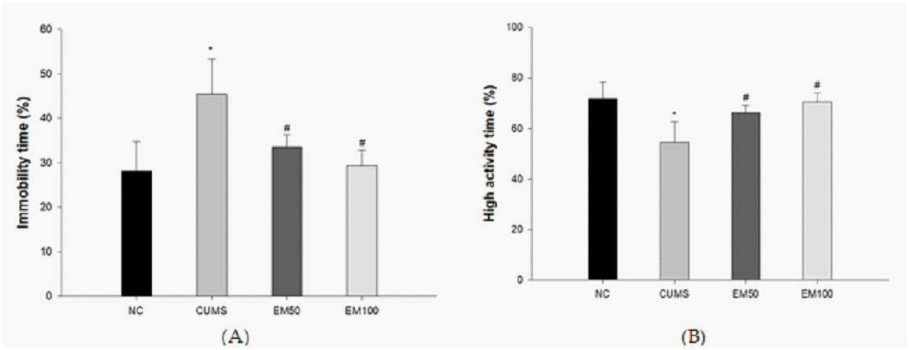

### 도면2



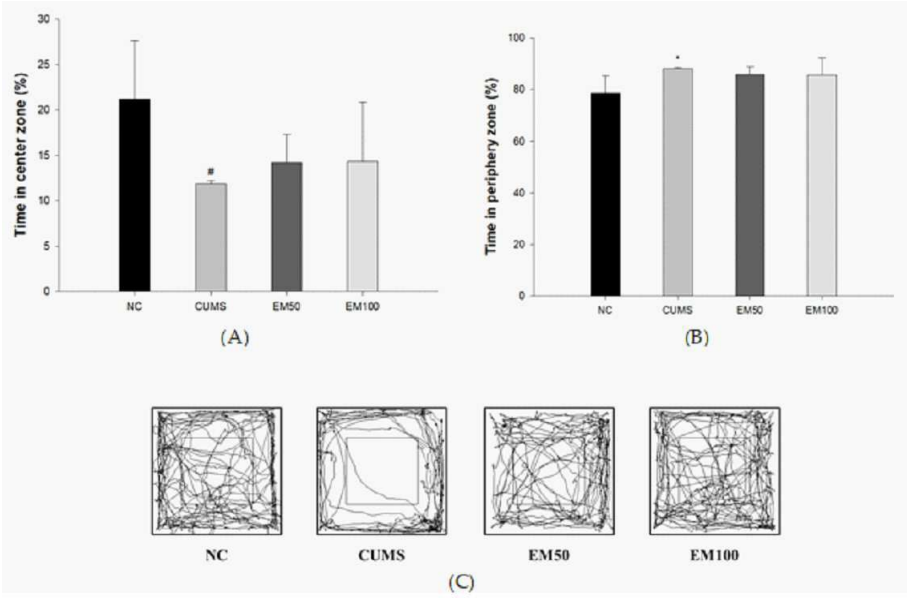

### 도면3



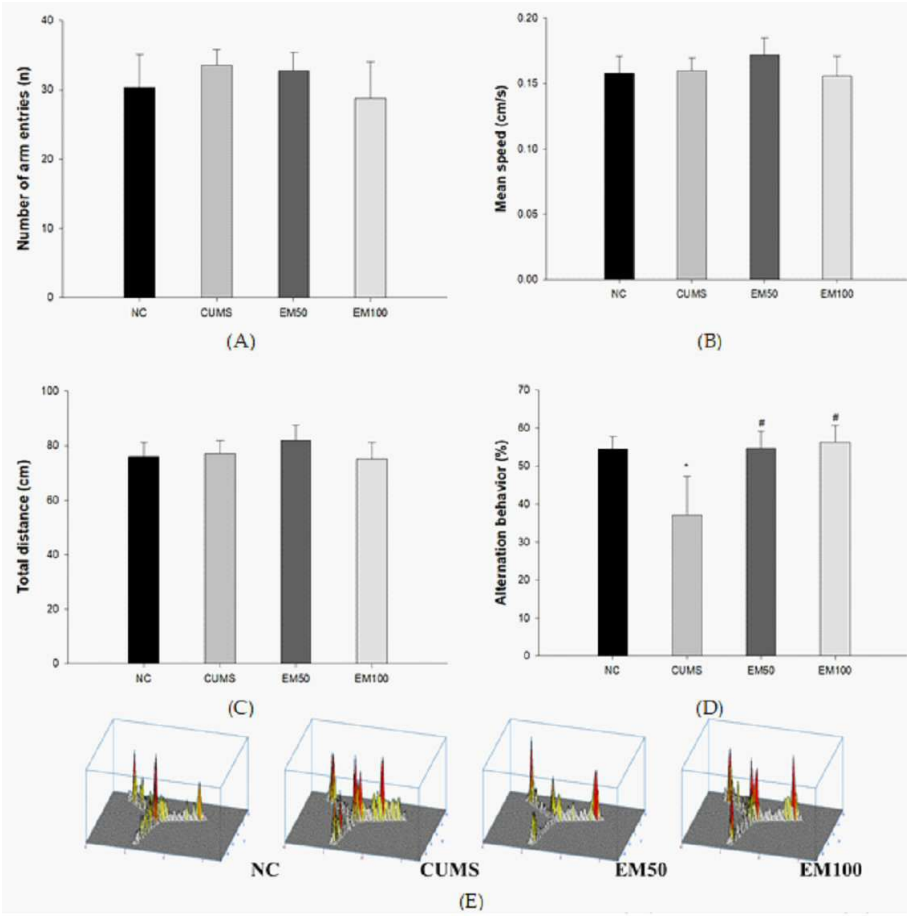
도면4


Immobility time (%)
NC
CUMS
EM50
EM100
(A)
High activity time (%)
NC
CUMS
EM50
EM100
(B)

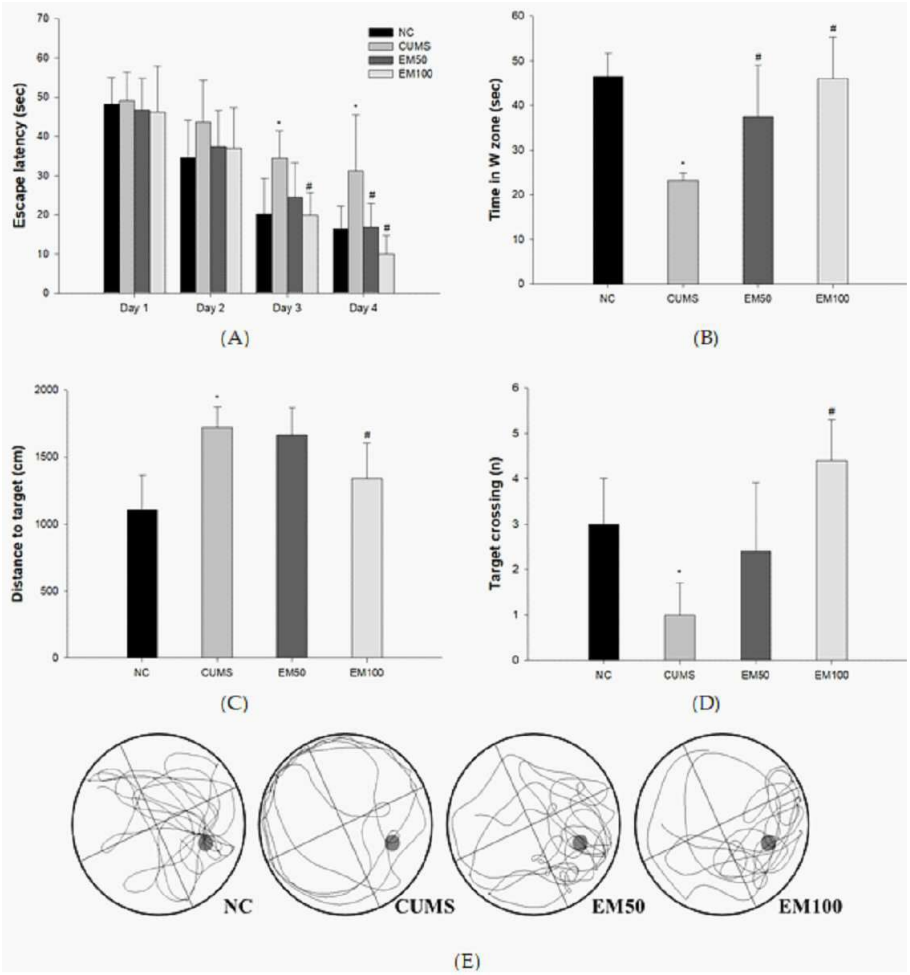
도면5


Time in center zone (%)
NC
CUMS
EM50
EM100
(A)
Time in periphery zone (%)
NC
CUMS
EM50
EM100
(B)
NC
CUMS
EM50
EM100
(C)

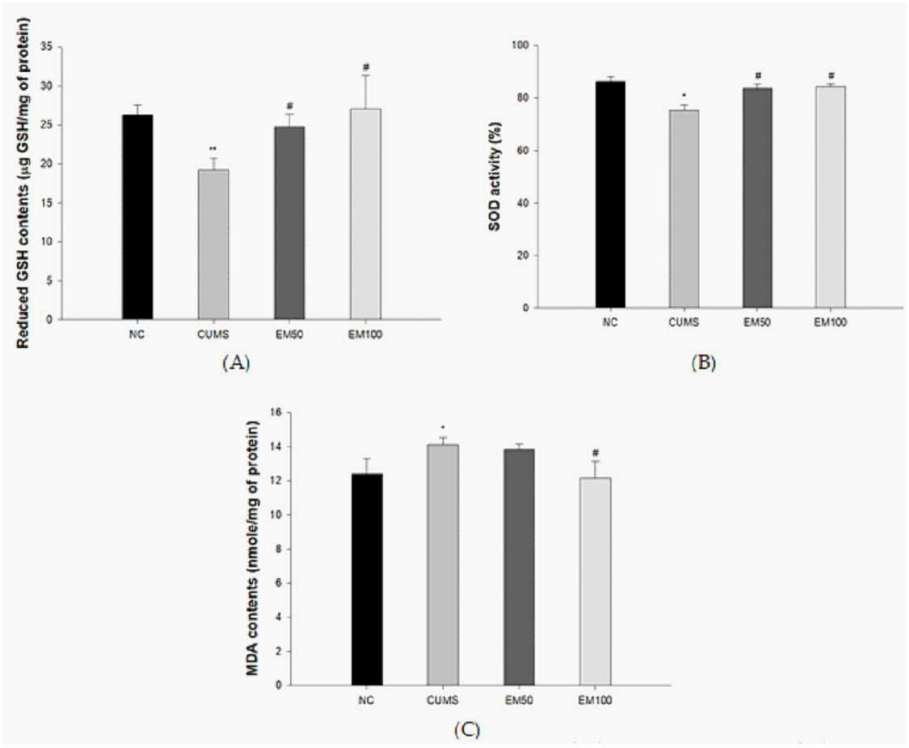
도면6


Number of arm entries (n)
NC
CUMS
EM50
EM100
(A)
Mean speed (cm/s)
(B)
Total distance (cm)
(C)
Alternation behavior (%)
(D)
NC
CUMS
EM50
EM100
(E)

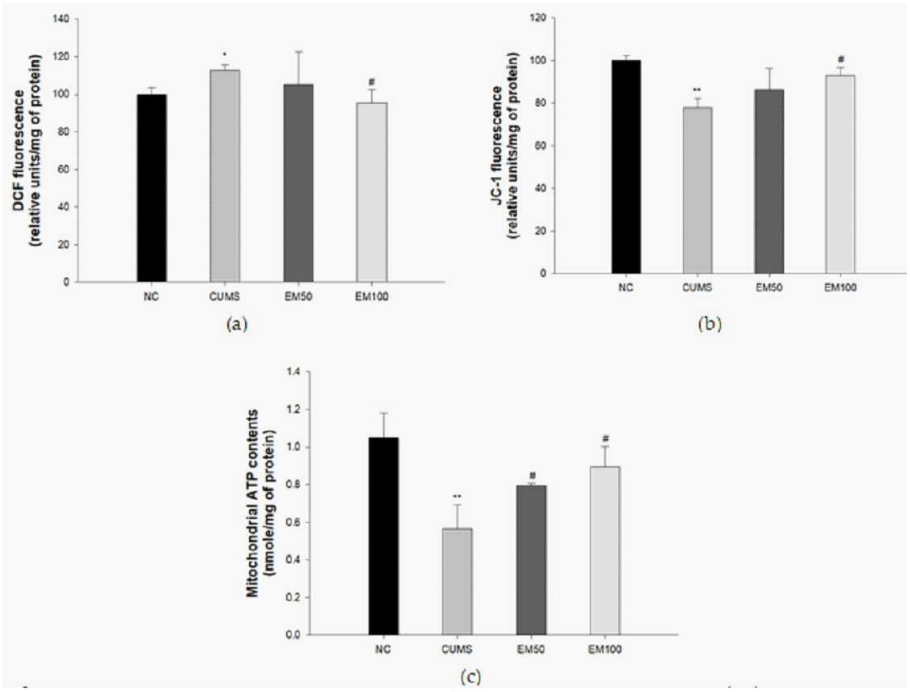
도면7


Escape latency (sec)
NC
CUMS
EM50
EM100
Day 1
Day 2
Day 3
Day 4
(A)
Time in W zone (sec)
NC
CUMS
EM50
EM100
(B)
Distance to target (cm)
(C)
Target crossing (n)
(D)
NC
CUMS
EM50
EM100
(E)

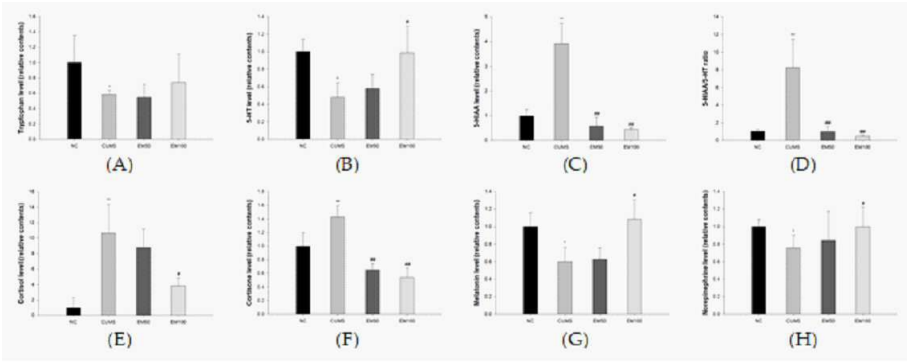
도면8


Reduced GSH contents (μg GSH/mg of protein)
NC
CUMS
EM50
EM100
(A)
SOD activity (%)
(B)
MDA contents (nmole/mg of protein)
(C)

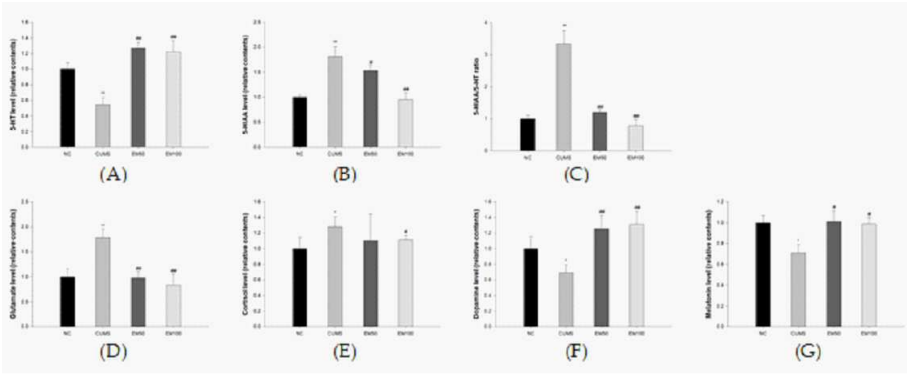
도면9


DCF fluorescence (relative units/mg of protein)
NC
CUMS
EM50
EM100
(a)
JC-1 fluorescence (relative units/mg of protein)
(b)
Mitochondrial ATP contents (nmole/mg of protein)
(c)

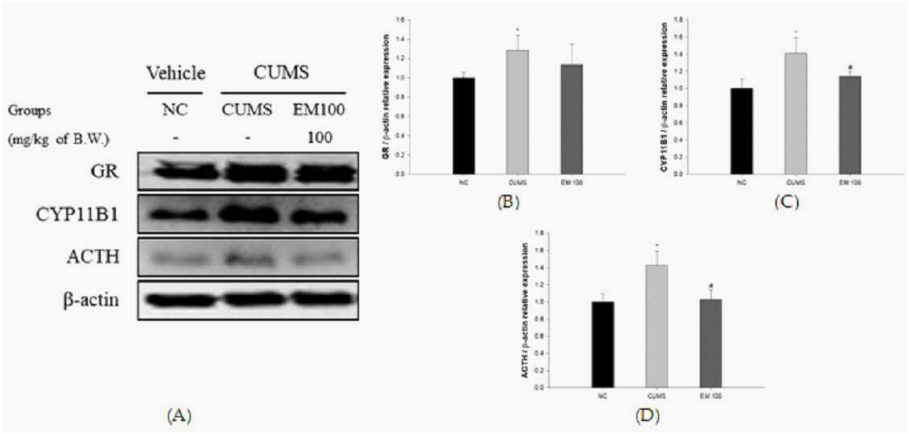
도면10



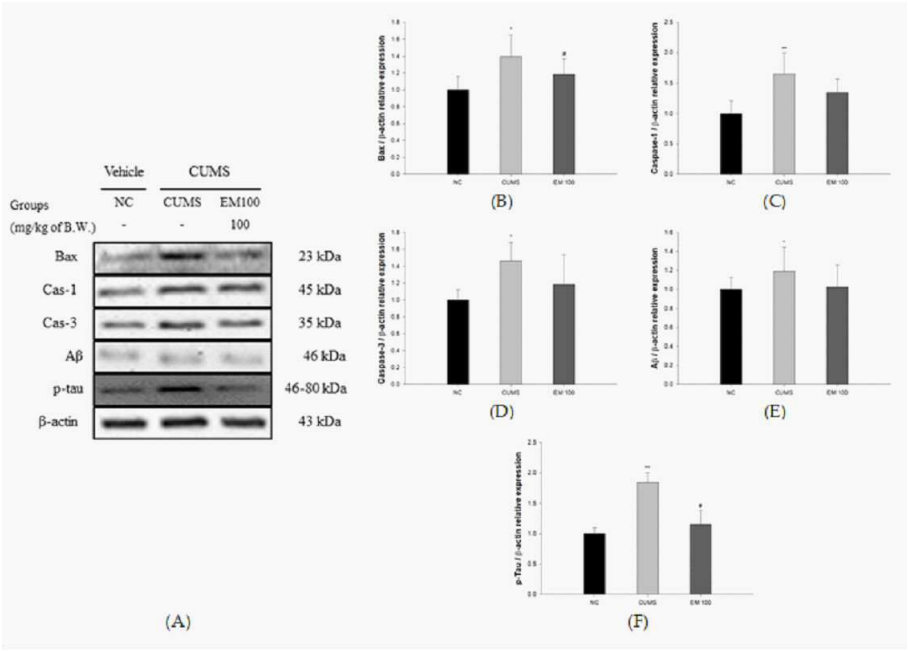

도면11



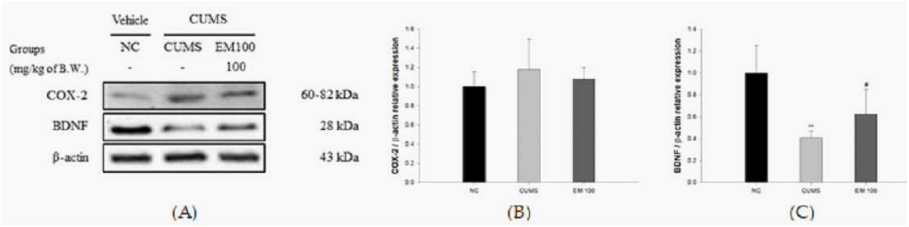

도면12



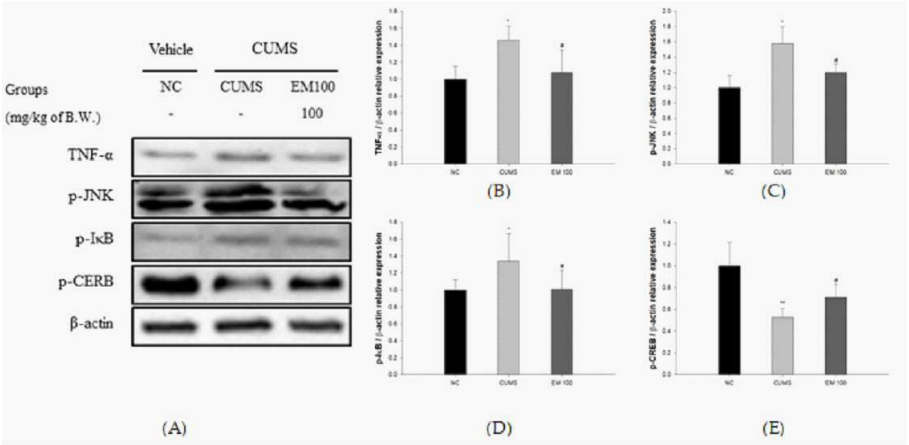
도면13



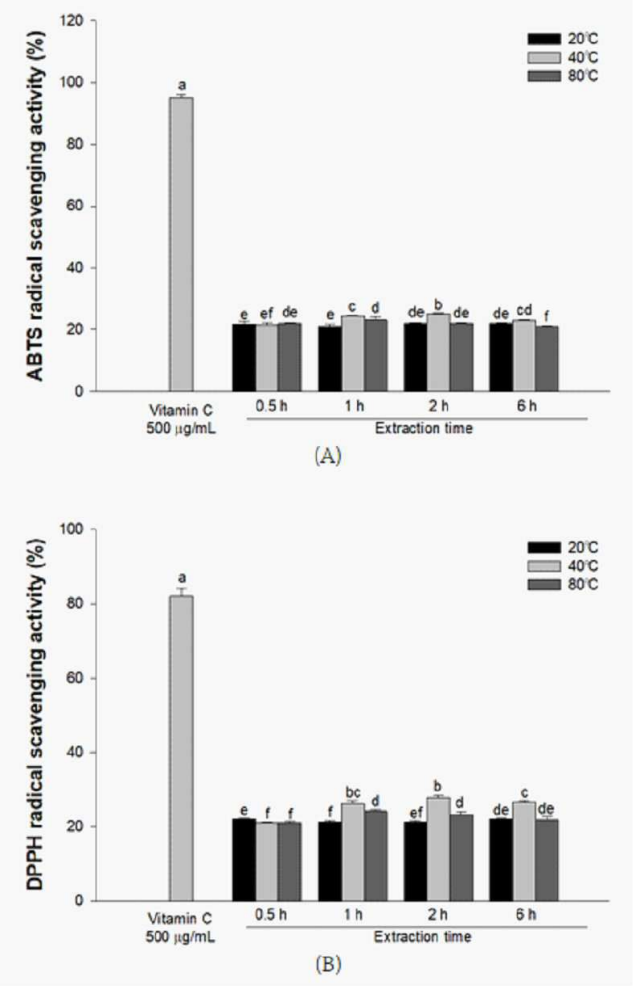

도면14




도면15



도면16


ABTS radical scavenging activity (%)
120
100
80
60
40
20
0
20℃
40℃
80℃
a
e ef de e c d de b de de cd f
Vitamin C
500 μg/mL
0.5 h
1 h
2 h
6 h
Extraction time
(A)
DPPH radical scavenging activity (%)
100
80
60
40
20
0
20℃
40℃
80℃
a
e f f f bc d ef b d de c de
Vitamin C
500 μg/mL
0.5 h
1 h
2 h
6 h
Extraction time
(B)