



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2012-0090140
(43) 공개일자 2012년08월17일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A23L 1/29 (2006.01) A23L 1/212 (2006.01)

A61P 25/28 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2011-0003712

(22) 출원일자 2011년01월13일

심사청구일자 없음

(71) 출원인

한림대학교 산학협력단

강원도 춘천시 한림대학길 1, 한림대학교(옥천동)

하이트진로 주식회사

서울특별시 강남구 영동대로 714 (청담동)

(72) 발명자

신현경

서울특별시 강남구 학동로44길 18-5 (논현동)

김은지

강원도 춘천시 춘주로 176-22, 쌍용스윗닷홈 아파트 105동 1203호 (퇴계동)

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

특허법인 대아, 특허법인 천지

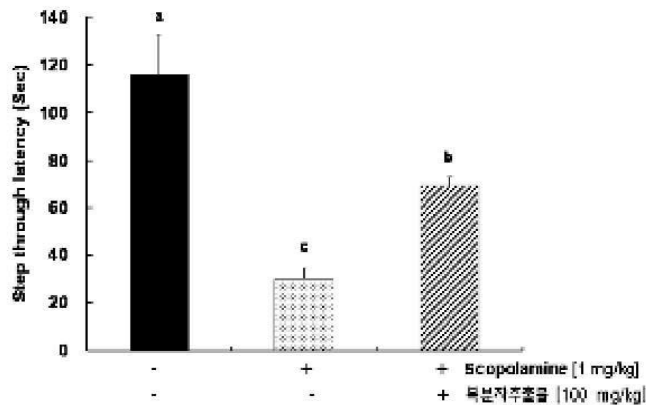
전체 청구항 수 : 총 4 항

(54) 발명의 명칭 복분자 추출물을 포함하는 기억력 개선용 식품 조성물

(57) 요약

본 발명은 복분자 추출물을 유효성분으로 포함하는 기억력 개선용 식품 조성물에 관한 것으로, 보다 상세하게는 기억력 감소의 원인이 되는 아세틸콜린에스테라제(acetylcholinesterase) 활성을 저해할 수 있고, 신경세포를 보호할 수 있으며, 항콜린제인 스코폴라민을 투여하여 기억력을 감퇴시킨 실험동물의 기억력을 개선시킬 수 있을 뿐만 아니라, 식용으로 오랫동안 사용하여 인체에 무해하고 부작용이 문제되지 아니한 복분자 추출물을 유효성분으로 포함하는 기억력 개선용 식품 조성물에 관한 것이다.

대표도 - 도2



(72) 발명자

이연실

강원도 춘천시 후석로 325, 포스코더?아파트 10
3동 805호 (후평동)

최미란

강원도 춘천시 후석로326번길 13, 현대2차아파트
201동 208호 (후평동)

홍지은

강원도 춘천시 삭주로 46, 클래식하우스 302호 (교동)

박용흠

경상남도 창원시 마산합포구 산호북1길 15, 101동
1310호 (산호동, 삼성타운)

전장우

강원도 춘천시 석사동 현진에버빌2차 208동 905호

김태환

강원도 홍천군 홍천읍 갈마로 16, 108동 904호 (주공1차아파트)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 B0008864

부처명 지식경제부

연구사업명 지역혁신센터사업

연구과제명 식의약품의 효능평가 및 기능성 소재개발센터

주관기관 한림대학교 산학협력단

연구기간 2001.03.01 ~ 2014.02.28

특허청구의 범위

청구항 1

복분자(*Rubus coreanus Miquel*) 추출물을 유효성분으로 포함하는 기억력 개선용 식품 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 복분자 추출물은 복분자 열수 추출물인 기억력 개선용 식품 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 식품 조성물은 건강 기능성 식품 조성물인 것을 특징으로 하는 기억력 개선용 식품 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 식품 조성물은 아세틸콜린에스터라제(acetylcholinesterase) 활성을 저해능 및 항콜린제 투여에 의한 기억력 감소 개선능을 가진 것을 특징으로 하는 기억력 개선용 식품 조성물.

명세서

기술 분야

[0001] 본 발명은 복분자 추출물을 유효성분으로 포함하는 기억력 개선용 식품 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 최근 통계청이 발표한 2005년 총인구 중에서 65세 이상 노령인구의 비율은 9.1%를 차지하고 있고, 14세 이하 유년인구의 비중은 점차 줄어들고 있으며, 65세 이상 인구의 비중은 지난 2000년에 7.2%를 기록하여 우리 사회는 이미 고령화 사회로 진입한 것으로 평가된다. 또한, 2003년 기준으로 우리나라 국민의 평균수명은 77.5세로 노령인구가 급격하게 증가되고 있는 추세이다. 한편, 통계청이 발표한 우리나라 1인당 GNI는 2004년 14,162 달러였으며, 매년 10% 이상 증가하고 있어 삶의 질은 점차 나아지고 있다고 할 수 있다.

[0003] 상기와 같이 과학의 발달로 인해 생활의 질이 높아지고 의학의 발달로 평균 수명이 증가되는 현대 사회에서 인지 능력과 기억력은 학습이 중요한 청소년에서부터 노인에 이르기까지 중요한 관심 대상이 되고 있다.

[0004] 기억력은 이전의 인식이나 경험 등을 의식 속에 간직해 두는 능력을 의미한다. 일반적으로, 기억은 세 가지 단계로 수행된다고 보고되고 있다. 우선, 새로운 정보 또는 지식을 외워서 뇌에 입력하는 입력단계, 두 번째 상기 뇌에 입력된 정보 또는 지식을 뇌에 저장하는 저장단계 및 세 번째 상기 저장된 정보 또는 지식을 다시 생각하는 회상단계이며, 상기 세 단계 중에 어느 하나라도 이상이 생기면 정보 또는 지식을 정확하게 기억할 수 없게 되는 현상 즉, 기억력 저하가 일어난다고 한다.

[0005] 상기 기억력의 저하는 현대 사회를 살고 있는 모든 연령층에서 다양한 문제를 일으킬 수 있으며, 특히 노인층에서는 치매와 같은 퇴행성 질환에 의한 기억력 저하는 그 정도가 심해 사회생활 자체를 불가능하게 할 수 있을 뿐만 아니라, 가족이나 주변 사람들에 미치는 영향을 고려하면 엄청난 사회적 비용이 요구되고 있는 실정이다.

[0006] 상기 기억력의 저하 즉, 기억력 감퇴는 뇌조직의 콜린계의 활성 감소가 원인인 것으로 보고되고 있다(Kasa P *et al.*, Neuroscience 101: 89-100(2000)). 뇌조직의 신경세포에서 콜린(choline)과 아세틸코에이(acetylCoA)는 아세틸트랜스퍼라제(acetyltransferase: ChAT)에 의해 아세틸콜린(acetylcholine: ACh)으로 전환되고, 상기 아세틸콜린은 아세틸콜린에스터라제(acetylcholinesterase: AChE)에 의해 아세테이트(acetate)와 콜린으로 분해되는 과정이 반복된다. 상기 과정에서 계속적인 아세틸콜린에스터라제의 작용으로 아세틸콜린의 양의 일정 정도 이하로 감소되는 경우 기억력 저하가 일어날 수 있다(Davies P *et al.*, Lancet

2: 1457-1459(1976); Francis PT *et al.*, J Neurol Neurosurg Psychiatry 54:137-147(1999)).

- [0007] 이와 관련하여, 항무스카린성 효과가 있는 스코폴라민(scopolamine)은 무스카린성 아세틸콜린 수용체(muscarinic acetylcholine receptor), 특히 M1 receptor의 길항제(antagonist)로서 작용할 수 있는 것으로 보고되어 있다. 상기 스코폴라민은 아세틸콜린에스터라제의 활성을 증가시켜 신경접합부에 있는 아세틸콜린(acetylcholine: ACh)을 분해하여 기억력을 감소시키는 약물이다. 이런 특성 때문에 스코폴라민을 이용한 실험이 기억력 평가를 위한 실험모델로 많이 사용되고 있다(Bartus RT, Exp Neurol 163: 495-529(2000)).
- [0008] 상기한 바와 같이, 학습능력의 향상 뿐만 아니라 현저한 사회적 비용이 요구되는 치매와 같은 퇴행성 질환에 의한 기억력 저하를 개선하고, 기억력 저하를 예방하기 위한 연구의 중요성은 나날이 증가하고 있다.
- [0009] 기억력 개선 또는 저하 예방의 경우에는 뇌조직과 관련된 것으로, 수술적 치료 등에 의한 치료가 용이하지 아니한 측면이 있으므로, 상기 기억력 저하는 치매 등의 질병이 발생된 이후에 치료하기보다는 그에 대한 예방이 강조되고 있는 경향이며, 기억력을 개선할 수 있는 물질을 지속적으로 섭취하여 이러한 기억력 저하를 예방하는 것의 필요성이 새롭게 인식되고 있다.
- [0010] 이러한 필요성에 따라, 기억력 개선 또는 기억력 저하 예방에 효능이 있는 천연식물 유래의 물질에 관한 연구가 다양하게 진행 중에 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0011] 본 발명은 스코폴라민 등의 항콜린제에 의해 유도된 실험동물을 이용한 생체내 실험(*in vivo test*) 및 시험관내 실험(*in vitro test*)을 통하여 기억력의 개선 및 기억력 저하의 예방이 가능할 뿐만 아니라 인체에도 무해한 천연식물의 추출물을 유효성분으로 포함하는 기억력 개선용 식품 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

- [0012] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 복분자 추출물을 유효성분으로 포함하는 기억력 개선용 조성물을 제공한다.
- [0013] 상기 복분자 추출물은 아세틸콜린에스터라제(acetylcholinesterase: AChE) 활성을 저해할 수 있고, 신경세포를 보호할 수 있으며, 항콜린제인 스코폴라민을 투여하여 유도된 기억력이 감소된 실험동물을 이용하여 확인한 결과, 기억력 감퇴를 억제할 수 있는 것으로 확인되었다. 따라서, 상기 복분자 추출물은 기억력 개선, 기억력 감퇴 또는 저하의 예방 및 치매나 알츠하이머 병 등의 기억력 감퇴 또는 저하와 관련된 질환의 예방 또는 개선과 관련된 용도로 사용될 수 있을 것으로 예상된다.
- [0014] 또한, 복분자 추출물은 식품으로 오랜 기간 사용되어온 천연 식물의 추출물을 유효성분으로 포함하는 것이어서, 장기 복용의 경우에도 부작용이나 독성 등의 위험성이 문제되지 아니하므로, 이러한 관점에서 본 발명은 복분자 추출물을 유효성분으로 포함하는 기억력 개선용 식품 조성물을 제공한다.
- [0015] 이하, 본 발명을 보다 상세하게 설명한다.
- [0016] 본 발명의 발명자들은 기억력 개선 또는 기억력 감퇴 또는 저하의 예방을 목적으로 하는 기능성 식품의 유효성분을 인체 안전성이 확보된 천연식물 유래의 물질로부터 연구하던 중, 복분자 추출물이 생체내 실험(*in vivo test*) 및 시험관내 실험(*in vitro test*)을 통해 확인한 결과, 기억력 감소의 원인이 되는 아세틸콜린에스터라제를 억제할 수 있고, 부신피질 유래 PC12 신경세포를 통하여 확인한 결과, 신경세포 보호능이 인정되며, 항콜린제인 스코폴라민을 투여하여 기억력 저하를 유도시킨 실험동물을 이용하여 확인한 결과, 기억력 감퇴를 억제할 수 있는 것으로 확인하였으며, 이를 토대로 본 발명을 완성하게 되었다.
- [0017] 본 발명은 복분자 추출물을 유효성분으로 포함하는 기억력 개선 또는 기억력 저하 예방용 조성물을 제공한다.
- [0018] 또한, 본 발명은 복분자 추출물을 유효성분으로 포함하는 기억력 개선용 식품 조성물을 제공한다.
- [0019] 상기 복분자(*Rubus coreanus Miquel*)는 장미과의 낙엽관목으로 복분자 딸기라고도 불리우고, 주로 산록 양지에서 자라고, 우리나라에서는 주로 남부지방에서 자란다. 복분자는 높이 약 3 m 정도까지 자라고, 끝이 휘어져서 땅에 닿으면 뿌리가 내리며, 줄기는 자줏빛이 도는 붉은색이고, 새로 나는 가지에는 흰 가루가 있다. 상기 복분자의 열매는 6월 내지 8월에 수확되고, 음력 5월 즉, 6월 또는 7월 초에 익은 열매가 주로 검붉은색

을 띠고 있다.

- [0020] 상기 복분자는 열매, 꽃, 잎, 줄기 및 뿌리로 이루어진 군 중에서 선택된 1종 이상일 수 있고, 바람직하게는 복분자 열매일 수 있다. 상기 복분자 열매는 복분자, 오포자, 대맥매, 삽전표, 재양표, 결분 또는 서국초라고 불리운다. 상기 복분자 열매는 작은 단과가 여러 개 모여서 덩어리를 이룬 것으로, 원추형이나 눌려진 구형을 이루고 있다. 상기 복분자는 다량의 폴리페놀을 함유하고 있고, 항암효과, 동맥경화예방, 혈전 예방, 항염증 효과, 헬리코박터 파이로리에 대한 항균효과 및 항산화 효과가 있는 것으로 보고되고 있다. 또한, 한방에서 상기 복분자 열매는 냄새가 없고, 맛은 시고 달며, 성질은 따뜻하고, 신기능을 복돋아 유정, 몽정 등에 사용되고, 시력약화도 사용된다고 알려져 있다.
- [0021] 본 발명의 추출물은 추출용매로 추출하거나 추출용매로 추출하여 제조한 추출물에 분획용매를 가하여 분획하여 제조할 수 있다.
- [0022] 상기 추출용매는 물 및 유기용매로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상일 수 있고, 바람직하게는 물일 수 있다. 상기 유기용매는 메탄올, 에탄올 등의 탄소수 1 내지 5의 알코올, 에틸아세테이트 또는 아세톤 등의 극성용매와 헥산 또는 디클로로메탄의 비극성용매 또는 이들의 혼합용매일 수 있으며, 바람직하게는 30 내지 80%의 에탄올 등의 탄소수 1 내지 5의 알코올 수용액, 더욱 바람직하게는 40 내지 70% 에탄올 수용액일 수 있다.
- [0023] 상기 분획용매는 물, 부탄올, 에틸아세테이트, 클로로포름, 헥산 또는 이들의 혼합물일 수 있다.
- [0024] 본 발명의 복분자 추출물은 통상의 식물 추출물의 제조방법에 따라 제조된 것일 수 있다. 보다 구체적으로는 불순물을 제거한 복분자, 바람직하게는 복분자 열매에 추출용매를 가하고 추출과정을 수행하는 방법으로 수행할 수 있다. 상기 추출과정은 냉침추출법, 온침추출법, 가압추출법 또는 초음파 분쇄 추출법일 수 있다. 또한, 상기 추출법으로 제조한 추출물 즉, 조추출액에 분획용매를 가한 후에, 예를 들어 헥산, 클로로포름, 에틸아세테이트, 부탄올 및 물 순서로 가한 후에 층분리한 헥산 분획물, 클로로포름 분획물, 에틸아세테이트 분획물, 부탄올 분획물 및 물 분획물을 수득하는 방법을 수행할 수 있다.
- [0025] 또한, 상기 추출물은 추출 또는 분획과정을 수행한 이후, 감압 여과 과정을 수행하거나 추가로 농축 및/또는 동결건조를 수행하여 농축하거나 용매를 제거할 수 있다. 상기 수득한 복분자 추출물은 사용 시까지 급속 냉동 냉장고(deep freezer)에 보관할 수 있다.
- [0026] 기억력이란 어떤 자극(학습)에 의해 주어진 정보를 받아들여 뇌 속에 저장했다가, 자극이 없어지고 나서 필요한 때에 그 정보를 다시 상기할 수 있는 정신 기능을 말한다. 상기 기억력은 대상 정보에 따라 정보가 감각기관을 통하여 저장되는 감각기억, 현재의 정보들을 처리하는 짧은 기간 동안의 단기기억, 나중에 재생되도록 비교적 영구히 저장되는 장기기억으로 구분될 수 있다.
- [0027] 일반적으로, 기억은 세 가지 단계로 수행될 수 있다. 첫 번째 단계는 새로운 정보 또는 지식을 외워서 뇌에 입력하는 입력단계이고, 두 번째 단계는 상기 뇌에 입력된 정보 또는 지식을 뇌에 저장하는 저장단계이며, 세 번째 단계는 상기 저장된 정보 또는 지식을 다시 생각하는 회상단계이다. 상기 세 단계 중에 어느 한 단계라도 이상이 생기면 정보 또는 지식을 정확하게 기억할 수 없게 되는 현상 즉, 기억력 저하가 일어날 수 있다.
- [0028] 본 발명의 복분자 추출물은 시험관내 실험에서 아세틸콜린에스테라제 활성을 저해할 수 있고, 신경세포를 보호할 수 있으며, 항콜린제인 스코폴라민을 투여하여 유도된 기억력이 감소된 실험동물을 이용하여 확인한 결과, 기억력 감퇴를 억제할 수 있는 것으로 확인되었다.
- [0029] 본 발명은 복분자 추출물을 유효성분으로 포함하는 기억력 개선 또는 기억력 저하 예방용 조성물에 관한 것이다.
- [0030] 본 발명의 기억력 개선 또는 기억력 저하 예방용 조성물은, 조성물 총 중량에 대하여 상기 복분자 추출물을 0.001 내지 99.99중량%, 바람직하게는 0.1 내지 99 중량%로 포함할 수 있다.
- [0031] 상기 조성물은 복분자 추출물 외에 영양제, 비타민, 전해질, 풍미제, 착색제, 증진제, 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알코올, 탄산음료에 사용되는 탄산화제 등을 추가로 함유할 수 있다. 상기 조성물에는 상기 성분들이 독립적으로 또는 조합하여 추가될 수 있다. 상기 추가성분의 함량은 바람직하게는 상기 복분자 추출물 100 중량부 당 0.1 내지 20 중량부 범위에서 추가할 수 있다.
- [0032] 또한, 본 발명은 복분자 추출물을 유효성분으로 포함하는 기억력 개선용 식품 조성물에 관한 것이다.

- [0033] 본 명세서에서 식품이란 함은 영양소를 한 가지 또는 그 이상 함유하고 있는 천연물 또는 가공품을 의미하며, 바람직하게는 어느 정도의 가공 공정을 거쳐 직접 먹을 수 있는 상태가 된 것을 의미하며, 통상적인 의미로서, 건강기능식품, 음료, 식품 첨가제 및 음료 첨가제를 모두 포함하는 의도이다.
- [0034] 본 발명의 식품은 예를 들어, 각종 식품류, 음료, 껌, 차, 비타민 복합제, 건강기능식품 등이 있다. 추가로, 본 발명에서 식품에는 특수영양식품(예, 조제유류, 영, 유아식 등), 식육가공품, 어육제품, 두부류, 묵류, 면류(예, 라면류, 국수류 등), 건강보조식품, 조미식품(예, 간장, 된장, 고추장, 혼합장 등), 소스류, 과자류(예, 스낵류), 유가공품(예, 발효유, 치즈 등), 기타 가공식품, 김치, 절임식품(각종 김치류, 장아찌 등), 음료(예, 과일, 채소류 음료, 두유류, 발효음료류 등), 천연조미료(예, 라면스프 등)를 포함하나 이에 한정되지 않는다. 상기 식품, 건강기능식품, 음료, 식품 첨가제 및 음료 첨가제는 통상의 제조방법으로 제조될 수 있다.
- [0035] 본 발명에서 건강기능식품이란 식품에 물리적, 생화학적, 생물공학적 수법 등을 이용하여 해당 식품의 기능을 특정 목적에 작용, 발현하도록 부가가치를 부여한 식품군이나 식품 조성이 갖는 생체방어리듬조절, 질병방지와 회복 등에 관한 체조절기능, 구체적으로 기억력 개선 효과를 생체에 대하여 충분히 발현하도록 설계하여 가공한 식품을 의미한다.
- [0036] 상기 건강기능식품에는 식품학적으로 허용 가능한 식품 보조 첨가제를 포함할 수 있으며, 건강기능식품의 제조에 통상적으로 사용되는 적절한 담체, 부형제 및 희석제를 더욱 포함할 수 있다.
- [0037] 본 발명에서 음료란 갈증을 해소하거나 맛을 즐기기 위하여 마시는 것의 총칭을 의미하며 건강기능음료를 포함하는 의도이다. 상기 음료는 지시된 비율로 필수 성분으로서 상기 복분자 추출물을 유효성분으로 포함하는 것 외에 다른 성분에는 특별한 제한이 없으며, 통상의 음료와 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다.
- [0038] 상기의 천연 탄수화물의 예는 모노사카라이드, 예를 들어 포도당, 과당 등 디사카라이드, 예를 들어 말토스, 수크로스 등 및 폴리사카라이드, 예를 들어 텍스트린, 시클로텍스트린 등과 같은 통상적인 당, 및 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알코올이다. 상기한 것 이외의 향미제로서 천연 향미제(타우마틴, 스테비아 추출물(예를 들어 레바우디오시드 A, 글리시르히진 등) 및 합성 향미제(사카린, 아스파르탐 등)를 유리하게 사용할 수 있다. 상기 천연 탄수화물의 비율은 본 발명의 식품 조성물 100ml 당 일반적으로 약 1 내지 20g, 바람직하게는 5 내지 12g일 수 있다. 그밖에 본 발명의 조성물은 천연 과일 주스, 과일 주스 음료, 야채 음료의 제조를 위한 과육을 추가로 함유할 수 있다.
- [0039] 상기 외에 본 발명의 식품 조성물은 여러 가지 영양제, 비타민, 광물(전해질), 합성 풍미제 및 천연 풍미제 등의 풍미제, 착색제 및 증진제(치즈, 초콜릿 등), 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알코올, 탄산 음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다. 이러한 성분을 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있다. 이러한 첨가제의 비율은 그렇게 중요하지 않지만, 본 발명의 복분자 추출물 100 중량부 당 0 내지 20 중량부 범위에서 선택될 수 있다.
- [0040] 본 발명에서 건강기능음료란 음료에 물리적, 생화학적, 생물공학적 수법 등을 이용하여 해당 음료의 기능을 특정 목적에 작용, 발현하도록 부가가치를 부여한 음료 군이나 음료 조성이 갖는 생체방어리듬조절, 질병방지와 회복 등에 관한 체조절기능, 구체적으로 기억력 개선 효과를 생체에 대하여 충분히 발현하도록 설계하여 가공한 음료를 의미한다.
- [0041] 상기 건강기능음료는 지시된 비율로 필수 성분으로서 본 발명의 복분자 추출물을 함유하는 외에는 다른 성분에는 특별한 제한이 없으며 통상의 음료와 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다.
- [0042] 상기 천연 탄수화물의 예는 모노사카라이드, 예를 들어 포도당, 과당 등 디사카라이드, 예를 들어 말토스, 수크로스 등 및 폴리사카라이드, 예를 들어 텍스트린, 시클로텍스트린 등과 같은 통상적인 당, 및 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알코올이다. 상기한 것 이외의 향미제로서 천연 향미제(타우마틴, 스테비아 추출물(예를 들어 레바우디오시드 A, 글리시르히진 등) 및 합성 향미제(사카린, 아스파르탐 등)를 유리하게 사용할 수 있다. 상기 천연 탄수화물의 비율은 본 발명의 조성물 100ml 당 일반적으로 약 1 내지 20 g, 바람직하게는 5 내지 12 g이다.
- [0043] 또한, 기억력의 개선 또는 기억력 저하 또는 감퇴의 예방 효과를 목적으로 하는 식품 조성물에 있어서, 상기 복분자 추출물의 양은 전체 식품 중량의 0.01 내지 15 중량%로 포함할 수 있으며, 음료 조성물은 100 ml를 기

준으로 0.02 내지 5 g, 바람직하게는 0.3 내지 1g의 비율로 포함할 수 있다.

[0044] 본 발명의 복분자 추출물을 유효성분으로 포함하는 조성물 및 식품은 시험관내 실험에서 아세틸콜린에스터라제 활성을 저해할 수 있고, 신경세포를 보호할 수 있으며, 향콜린제인 스코폴라민을 투여하여 유도된 기억력이 감소된 실험동물을 이용하여 확인한 결과, 기억력 감퇴를 현저하게 억제할 수 있을 뿐만 아니라, 오래전부터 식용 또는 약용으로 사용하던 복분자로부터 제조된 것이므로 부작용 또는 내성이 문제되지 아니하여, 장기간 복용하여야 하는 식품으로서 요구되는 안전성도 만족할 수 있다.

발명의 효과

[0045] 상술한 바와 같이, 본 발명의 복분자 추출물은 시험관내 실험에서 확인된 바와 같이 기억력 감퇴의 원인이 아세틸콜린에스터라제 활성을 저해할 수 있고, 신경세포를 보호할 수 있으며, 동물실험에 의해 확인된 바와 같이 향콜린제인 스코폴라민을 투여한 실험동물의 기억력 감퇴를 저해할 수 있으므로, 기억력 개선과 관련된 효과가 인정될 뿐만 아니라, 인체에 부작용을 발생시키지 않으므로 식품 조성물 특히, 건강기능식품으로 널리 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0046] 도 1은 본 발명의 일실시예에 따른 염화코발트(CoCl_2)와 복분자 추출물의 첨가에 따른 신경세포주인 PC12 세포의 생존율을 확인한 그래프로, 세로축은 세포생존율을 나타낸 것이고, 가로축은 염화코발트 및 복분자 추출물의 첨가여부를 나타낸 것이다.

도 2는 본 발명의 일실시예에 따른 실험동물을 이용하여 수동회피실험을 수행한 결과를 나타낸 그래프로, 세로축은 밝은 구간에서 어두운 구간으로 회피하는데 걸린 시간(step through latency, sec)을 나타낸 것이고, 가로축은 스코폴라민(Scopolamine) 및 복분자 추출물의 첨가여부를 나타낸 것이다.

도 3은 본 발명의 일실시예에 따른 실험동물을 이용하여 수중미로실험을 수행한 결과를 나타낸 그래프로, 세로축은 탈출하는데 소요된 시간(Escape latency, sec)을 나타낸 것이고, 가로축은 실험개시일로부터 경과된 시간을 나타내며, Control은 아무런 시약을 투여하지 않은 대조군을 나타하고, Scopolamine은 스코폴라민만 투여한 비교군을 나타내며, Scopolamine+복분자 추출물은 스코폴라민과 복분자 추출물을 함께 투여한 실험군을 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0047] 이하, 본 발명의 바람직한 실시예를 기재한다. 하기의 실시예는 본 발명을 예시하기 위한 것일 뿐 본 발명의 권리범위가 하기 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.

[0048] 실시예 1: 복분자 추출물의 제조

[0049] 미숙과 상태로 구입한 복분자 열매 즉, 복분자(대광약업사, 강원도, 대한민국) 300 g을 완전히 건조시킨 후, 분쇄기(pin mill, MYPM-0.1, 명우분체시스템(1.5 cm mesh), 대한민국)로 분쇄하고, 3 L의 둥근 플라스크에 넣었다. 상기 복분자 분쇄물이 있는 둥근 플라스크에 2 L의 증류수를 가한 후, 95℃에서 180분 동안 환류냉각기를 이용하여 열수 추출하였다. 상기 추출물을 여과지(Filter paper No 10, 300mm, Advantec, USA)를 이용하여 여과한 후, 잔사에 다시 증류수를 넣고 상기 방법을 반복하여 상기 과정을 총 2회 반복추출하였다.

[0050] 상기 총 3회에 걸쳐 수득한 추출액을 모아 감압농축하고, 동결건조하여 분말상태의 복분자 추출물(61.5 g, 20.5%)을 확보하였다.

[0051] 실시예 2. 복분자 추출물의 아세틸콜린에스터라제 활성억제효과

[0052] 상기 실시예 1에서 제조된 복분자 추출물의 아세틸콜린에스터라제(acetylcholinesterase: AChE) 활성 억제 효과는 Ellman's coupled enzyme assay 방법(Ellman GL *et al.*, Biochem Pharmacol 7: 88-95(1961))을 응용하여 측정하였다. 보다 구체적으로, 완충용액(0.1 M phosphate buffer)에 상기 실시예 1에서 제조된 복분자 추출물을 상기 완충용액을 이용하여 각 농도별(0.001 mg/mL 내지 10 mg/mL)로 희석하여 제조한 시료 90 와 0.02 M DNTB 용액 20 을 첨가하였다. 상기 복분자 추출물 및 DNTB 용액을 혼합한 혼합액에 아세틸콜린에스터라제 10

와 0.01 M 아세틸티오콜린(acetylthiocholine: ATCh) 20을 넣어 반응시켰다. 상기 반응액으로부터 아세틸콜린에스터라제 활성은 스펙트로미터(Spectrophotometer)를 사용하여 412 nm에서 4 분간 측정하였다. 상기 측정결과로부터 아세틸콜린에스터라제 억제율은 하기 계산식 1에 의해 계산하여, 표 1에 나타내었다. 상기 표 1에 나타낸 결과는 각 농도별 3회 측정한 결과를 평균한 값이다. 비교예는 갈란타민(galanthamine)을 0.001 mg/mL 농도로 복분자 추출물 대신에 시료로 사용한 것을 이용하였다.

[계산식 1]

Inhibition(억제율, %) = $100 - (S/C \times 100)$

상기 계산식 1에서 S는 시료를 넣은 경우의 흡광도 값을 의미하고, C는 시료 대신 상기 완충 용액을 넣은 경우(대조군)의 흡광도 값을 의미한다.

표 1

시료	억제율(%)
복분자 추출물(1 mg/mL)	9.2 ± 0.4
galanthamine(0.001 mg/mL)	29

상기 표 1에 나타낸 바와 같이, 복분자 추출물은 1 mg/mL의 농도에서 $9.2 \pm 0.4\%$ 의 아세틸콜린에스터라제 억제율을 나타내었다. 상기 복분자 추출물의 농도가 0.1 mg/mL 이하의 농도에서는 유효적으로 억제하지는 못하였다. 비교예로 사용된 갈란타민은 현재 알츠하이머병의 치료제로 사용되는 물질로, 특정 화합물(compound)임을 고려하면, 조추출물 단계인 상기 복분자 추출물의 아세틸콜린에스터라제 억제효능은 우수한 것으로 확인되었다.

실시예 3. 복분자 추출물의 신경세포 보호능

상기 실시예 1에서 제조된 복분자 추출물의 신경세포 보호능은 부신피질에서 유래한 PC12 세포를 이용하여 측정하였다.

보다 구체적으로, 상기 PC12 세포의 배양은 DMEM/F12 배지에 10% fetal bovine serum, 5% horse serum, 100 units/mL penicillin과 100 g/mL streptomycin을 첨가한 세포 배양액을 사용하여, 37°C에서 습윤한 CO₂ 배양기(incubator, 5% CO₂/95% air)를 이용하여 수행하였다. 상기 세포가 80% 정도 배양접시를 덮으면 PBS(pH 7.4)로 세포의 단층을 씻어낸 후, 0.25% trypsin-2.65 mM EDTA로 처리하여 계대 배양하였다.

상기 배양한 PC12 세포를 상기 배양배지로 희석하여, 24 well-plate에 분주하였다. 분주한 다음 48시간이 지난 후, 1% FBS를 포함하는 serum-deprivation medium(SDM)으로 배지를 교환하였다. 24시간동안 serum-deprivation한 후, 일부 세포는 DMSO에 녹인 상기 실시예 1에서 제조한 복분자 추출물 50 /mL이 들어 있는 SDM으로 배지를 교환하고, 일부 세포는 SDM으로 배지를 교환하였다. 30분 후, 신경세포인 PC12 세포의 세포사를 유도하기 위해 150 염화코발트(CoCl₂)를 첨가하였다. 상기 염화코발트를 첨가하고 24시간이 경과한 후, MTT assay(Denizot F and Lang R, J Immunol Methods 89: 271-277(1986))로 살아있는 세포수를 측정하여, 그 결과를 도 1에 나타내었다.

상기 도 1에 나타낸 바와 같이, 복분자 추출물을 첨가한 경우 신경세포사를 억제하는 것이 확인되어, 복분자 추출물은 신경세포 보호능이 있는 것으로 확인되었다. 보다 구체적으로, 염화코발트를 처리하지 않은 대조예의 세포수를 100%로 하여 각 실험결과를 나타낸 결과, 염화코발트를 처리한 비교예의 경우에는 대조예 대비 약 36%의 세포 생존율을 나타내어 염화코발트는 신경세포 즉, PC12에 대한 세포 독성을 갖는 것으로 확인되었다. 그러나, 염화코발트 처리 30분 전에 복분자추출물을 처리한 군에서는 세포 생존율이 54%로 확인되어, 염화코발트에 의해 유도되는 신경세포사가 억제될 수 있는 것이 확인되었다. 상기 사실로부터 복분자 추출물은 현저하게 우수한 신경세포 보호능을 갖는 것으로 확인되었다.

실시예 4: 동물실험을 통한 복분자 추출물의 기억력 개선효과 확인

체중 20g 내지 25g인 4주령의 수컷 생쥐(ICR, 오리엔트바이오, 대한민국)를 이용하여 수동회피실험, 수중미로

시험 및 아세틸콜렌에스터라제 저해효과를 확인하여 기억력 개선효과를 확인하였다.

[0065] 4-1. 실험동물의 사육

[0066] 체중 20 내지 25g의 4주령 수컷 생쥐(ICR, 오리엔트바이오, 대한민국) 30마리를 오전 7시부터 오후 7시까지 빛을 가하는 일정한 명암주기 조건, 22℃ 내지 25℃의 온도조건 및 45% 내지 65%의 상대습도 조건에서 사육하였다. 실험동물의 사료는 AIN-76(Research Diets, Inc., USA)을 사용하였고, 사료와 물은 상시로 자유롭게 섭취할 수 있게 하였다.

[0067] 실험군에 대한 복분자 추출물의 투여는 실험 4주전부터 매일 실험동물의 체중 1 kg 당 100 mg의 함량으로 복분자 추출물을 사료에 혼합하여 공급하였다.

[0068] 4-2. 수동회피 시험(Passive avoidance test)

[0069] 상기 실시예 4-1의 실험동물에 대해 수동회피상자(Shuttle box)를 이용하여 수동회피검사를 수행하여 학습 및 기억력을 평가하였다.

[0070] 보다 구체적으로, 아무런 시료를 투여하지 않은 대조군, 훈련 30분 전에 스코폴라민(1 mg/kg body weight, S.C.)을 투여한 비교군 및 복분자 추출물을 사료와 함께 섭취시킨 후, 훈련 30분 전에 스코폴라민(1 mg/kg body weight)을 투여한 실험군에 대해 수동회피상자를 이용한 수동회피검사를 수행하였다. 상기 수동회피상자는 밝은 방과 어두운 방으로 나누어지고, 바닥에는 전기충격을 줄 수 있는 장치가 구비된 상자이다. 상기 수동회피검사는 다음과 같은 방법으로 수행하였다.

[0071] 우선, 칸막이로 나누어진 구획의 한쪽에 조명을 켜고 동물을 넣어주면 주변을 살피다가 어두운 구획으로 들어가게 되는데, 동물이 어두운 구획으로 넘어가는 즉시 0.30 mA의 전류를 바닥의 그리드(stainless grid)를 통해 2초 동안 흘려 전기충격(electric foot shock)을 주었다.

[0072] 상기 실험을 수행한 동물을 24시간 후 다시 동일한 수동회피상자에 위치시키고, 조명이 켜진 구획에서 어두운 구획으로 들어가기까지의 시간(step through latency)을 측정하였다. 상기 측정결과는 각 군의 10마리의 실험동물의 평균값을 구하여 도 2에 나타내었다.

[0073] 상기 도 2에 나타난 바와 같이, 스코폴라민을 주사하지 않은 대조군에 비하여 스코폴라민을 주사한 비교군에서 기억력이 현저하게 감소되는 것이 확인되었다. 한편, 복분자 추출물을 섭취시킨 실험군의 경우에는 스코폴라민에 의해 유도된 손상된 기억력이 상당 부분 회복되어, 대조군 수준으로까지 기억력이 회복되지는 아니하였으나, 스코폴라민을 투여한 비교군에 비하여 산술적으로 약 250%의 기억력이 개선되는 것이 확인되었다. 상기 결과로부터 복분자 추출물은 기억력 손상의 예방 및 기억력 개선에 효과적인 것으로 확인되었다.

[0074] 4-3. 수중미로시험(Water maze test)

[0075] 상기 실시예 4-1의 실험동물에 대해 Morris R(Morris R. J. Neurosci Methods, 11:47-60(1984))의 방법에 따라 수중미로 실험을 수행하여 기억력 개선 효과를 평가하였다.

[0076] 보다 구체적으로, 상기 실시예 4-2의 실험동물 즉, 아무런 시료를 투여하지 않은 대조군, 훈련 30분 전에 스코폴라민을 투여한 비교군 및 복분자 추출물을 사료와 함께 섭취시킨 후, 훈련 30분 전에 스코폴라민을 투여한 실험군에 대해 수중미로 실험을 수행하였다.

[0077] 상기 수중미로 실험에 사용된 실험장치는 원형의 물 탱크(지름 150 cm, 높이 45 cm)에 23℃ 정도의 물로 채워 구성하였다. 플랫폼(platform, 지름 10 cm, 높이 30 cm)을 전체 물 탱크를 4 등분한 중 하나의 부채꼴 중앙에 놓아 플랫폼 상단이 수면 0.5 cm 밑에 위치하도록 하였다.

[0078] 상기 실시예 4-2의 실험동물을 물 탱크에 집어넣고, 실험동물이 감춰진 플랫폼을 찾아 풀(pool)로부터 탈출하기까지의 시간을 기록하였다. 상기 실험동물이 플랫폼을 찾아 풀로부터 탈출하는 경우, 약 10초간 플랫폼에 머무르도록 하였다. 만일 생쥐가 120 초 이내에 플랫폼을 찾지 못하면 이를 플랫폼에 10초간 두었다가 시험을 끝내었다.

[0079] 상기 실험(Training trial)은 1일 2회씩 총 4일간 연속적으로 실시하였고, 상기 1일 2회 수행하는 실험은 각

실험당 20분의 간격을 두고 수행하였다. 매 실험마다 실험동물이 감춰진 플랫폼을 찾아 플로부터 탈출하기까지 소요된 시간을 기록하였고, 그 결과를 도 3에 나타내었다.

[0080] 상기 도 3에 나타낸 바와 같이, 스코폴라민을 주사하지 않은 대조군의 경우에는 실험이 진행되면서 점차적으로 플랫폼을 찾아 탈출하는데 소요되는 시간(Escape latency)이 감소되었으나, 스코폴라민을 주사한 비교군의 경우에는 실험이 진행되는 것과 상관없이 플랫폼을 찾아 탈출하는데 소요되는 시간(Escape latency)이 거의 일정한 것으로 확인되었다. 이는 스코폴라민에 의해 기억력이 손상되고, 상기 손상된 기억력이 회복되지 않기 때문인 것으로 해석되었다.

[0081] 한편, 복분자 추출물을 섭취시킨 실험군의 경우에는 실험개시일 1일부터 3일까지는 스코폴라민을 처리한 비교군과 경미한 수준의 차이를 나타내었으나, 4일째에는 탈출하는데 소요되는 탈출시간(Escape latency)이 비교군에 비하여 현저하게 감소되는 것이 확인되었다. 이는 복분자 추출물에 의해 스코폴라민에 의해 저하된 기억력이 개선되었기 때문인 것으로 해석되었다.

[0082] 4-4. 뇌조직에서 아세틸콜린에스터라제 활성 저해능 측정

[0083] 상기 실시예 1에서 제조된 복분자 추출물의 뇌조직에서의 아세틸콜린에스터라제 활성 억제 효과는 상기 실시예 2와 같이 Ellman's coupled enzyme assay 방법을 응용하여 측정하였다. 보다 구체적으로, 상기 실시예 4-3의 수중미로실험 중 4일째 실험을 종료한 실험동물을 희생시켜, 대뇌피질(cortex)과 해마(hippocampus)를 적출하였다.

[0084] 상기 적출된 대뇌피질과 해마를 0.1 M 인산나트륨 완충용액(0.1 M sodium phosphate buffer)에 넣고 균질화하여, 1000Xg의 조건에서 10분 동안 원심분리한 후, 상등액을 효소원으로 사용하였다.

[0085] 완충용액(0.1 M phosphate buffer)에 단백질 정량으로 확인한 일정량의 효소원 100 와 0.02 M DNTB 용액 20을 첨가하였다. 상기 효소원 및 DNTB 용액을 혼합한 혼합액에 0.01 M 아세틸티오콜린 20을 넣어 반응시켰다. 상기 반응액으로부터 아세틸콜린에스터라제 활성은 스펙트로미터(Spectrophotometer)를 사용하여 412 nm에서 4 분간 측정하였다. 상기 효소원의 활성은 unit/mg protein으로 표현하였다.

[0086] 상기 측정결과로부터 아세틸콜린에스터라제 억제율은 상기 실시예 2의 계산식 1에 의해 계산하여, 표 2에 나타내었다. 상기 표 1에 나타낸 결과는 각 실험군 별로 실험동물 3마리를 희생하여 실험한 후 측정된 결과를 평균한 값이다.

표 2

분류	unit/mg protein	
	대뇌피질(cortex)	해마(hippocampus)
대조군(control)	0.42±0.01	0.26±0.02
비교군(scopolamine)	0.47±0.02	0.29±0.01
실험군(scopolamine+복분자 추출물)	0.34±0.04	0.28±0.02

[0088] 상기 표 2에 나타낸 바와 같이, 스코폴라민을 처가한 비교군에서는 대뇌피질과 해마 양쪽 모두에서 가장 높은 아세틸콜린에스터라제 활성이 확인되었다. 상기 높은 아세틸콜린에스터라제 활성은 아세틸콜린의 분해에 따른 기억력 감퇴가 유도될 것으로 예상되었다. 한편, 복분자 추출물을 첨가한 경우에는 아세틸콜린에스터라제 활성이 억제되었고, 특히 대뇌피질에서는 오히려 대조군보다 낮은 활성이 나타났다. 상기 결과로부터, 대뇌피질과 해마 조직 모두에서 아세틸콜린에스터라제 활성의 억제에 의해 아세틸콜린의 분해가 억제되어 기억력 저하를 억제하고, 기억력을 개선할 수 있는 것으로 확인되었다. 상기 결과는 상기 실시예 4-2 및 실시예 4-3의 결과와 유사한 것으로 확인되었다.

[0089] 상기 결과로부터, 복분자 추출물이 아세틸콜린에스터라제의 활성을 억제할 수 있음을 생체내 실험 및 시험관내 실험 모두에서 확인하였고, 추가로 스코폴라민 등의 항콜린제에 의해 유도된 실험동물의 기억력 감퇴를 억제하고 기억력을 개선할 수 있음이 확인되었다.

[0090] 따라서, 상기 기억력 저하 예방 및 기억력 개선에 효과적인 복분자 추출물은 오랜 기간 식품 및 의약으로 사용되었던 것으로, 인체에 부작용을 발생시키지도 않으므로, 이를 포함하는 조성물은 기억력 감퇴 예방 및/또는 개선을 위한 식품 조성물로 유용하게 사용될 수 있을 것으로 예상된다.

[0091] **제조예: 복분자 추출물을 포함하는 기능성 식품의 제조**

[0092] **제조예 1. 건강기능식품의 제조**

[0093] 복분자 추출물 분말 1000 mg

[0094] 비타민 혼합물 적량

[0095] 비타민 A 아세테이트 70 μ g

[0096] 비타민 E 1.0 mg

[0097] 비타민 B1 0.13 mg

[0098] 비타민 B2 0.15 mg

[0099] 비타민 B6 0.5 mg

[0100] 비타민 B12 0.2 μ g

[0101] 비타민 C 10 mg

[0102] 비오틴 10 μ g

[0103] 니코틴산아미드 1.7 mg

[0104] 엽산 50 μ g

[0105] 판토텐산 칼슘 0.5 mg

[0106] 무기질 혼합물 적량

[0107] 황산제1철 1.75 mg

[0108] 산화아연 0.82 mg

[0109] 탄산마그네슘 25.3 mg

[0110] 제1인산칼륨 15 mg

[0111] 제2인산칼슘 55 mg

[0112] 구연산칼륨 90 mg

[0113] 탄산칼슘 100 mg

[0114] 염화마그네슘 24.8 mg

[0115] 상기의 비타민 및 미네랄 혼합물의 조성비는 비교적 건강기능식품에 적합한 성분을 바람직한 실시예로 혼합 조성하였지만, 그 배합비를 임의로 변형 실시하여도 무방하며, 통상의 건강기능식품 제조방법에 따라 상기의 성분을 혼합한 다음, 과립을 제조하고, 통상의 방법에 따라 건강기능식품 제조에 사용할 수 있다.

[0116] **제조예 2. 기능성 음료의 제조**

[0117] 복분자 추출물 분말 20 mg

[0118] 이성화당 10 g

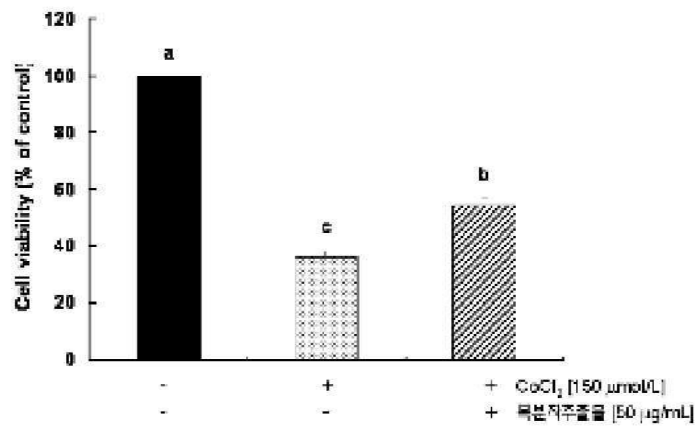
[0119] 만니톨 5 g

[0120] 정제수 적량

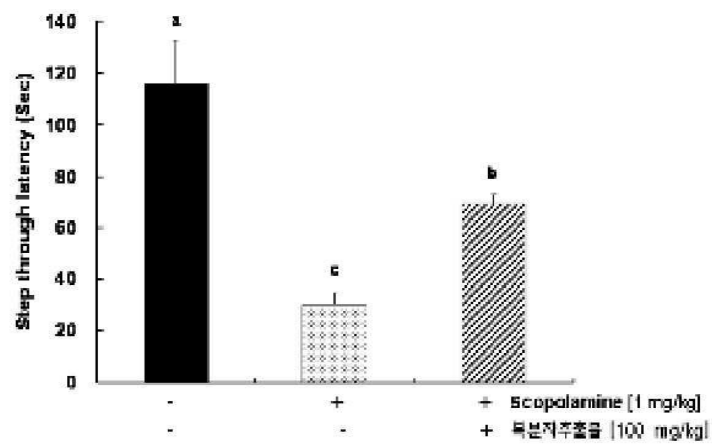
[0121] 통상의 음료 제조방법에 따라 정제수에 각각의 성분을 가하여 용해시키고 레몬향을 적량 가한 다음, 상기 각각의 성분을 용해시킨 용액을 혼합하고, 상기 혼합액에 정제수를 가하여 전체 부피를 100ml로 조절한 후, 멸균시켜 기능성 음료를 제조하였다.

도면

도면1



도면2



도면3

