



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2011-0029317
(43) 공개일자 2011년03월23일

(51) Int. Cl.
A61K 36/488 (2006.01) *A23L 1/30* (2006.01)
A61P 3/04 (2006.01) *A61P 3/06* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2009-0086941
(22) 출원일자 2009년09월15일
심사청구일자 2009년09월15일

(71) 출원인
경희대학교 산학협력단
경기도 용인시 기흥구 서천동 1 경희대학교 국제 캠퍼스내
(72) 발명자
김동현
서울특별시 강남구 압구정동 356-1번지 현대아파트 20-902
한명주
서울특별시 강남구 압구정동 356-1번지 현대아파트 20-902
민성원
서울특별시 마포구 창전동
신촌태영데시앙아파트101-701
(74) 대리인
리앤목특허법인

전체 청구항 수 : 총 10 항

(54) 비만 또는 고지혈증의 예방 또는 치료용 약학 조성물

(57) 요약

본 발명은 갈근이나 갈화, 또는 갈근이나 갈화의 물 또는 C₁-C₃ 알코올 추출물을 호기적 조건에서 배양 가능한 유산균으로 발효시킨 발효물을 활성성분으로서 포함하는 비만 또는 고지혈증의 예방, 개선 또는 치료용 약학 조성물 또는 건강기능식품용 조성물을 제공한다.

상기 유산균으로 발효시킨 발효물은 시간 및 비용의 측면에 있어서 경제적으로 대량 제조할 수 있으며, 고지혈증 및 비만에 대한 예방 또는 치료에 있어서 우수한 효과를 가져, 종래의 혐기성 조건에서만 배양 가능한 유산균에 의한 갈근 또는 갈화의 발효물을 활성성분으로서 함유할 경우에 비해 보다 유리하게 약학 조성물 또는 건강기능식품용 조성물로서 사용될 수 있는 장점이 있다.

특허청구의 범위

청구항 1

갈화, 또는 갈화의 물 또는 C₁-C₃ 알코올 추출물을 호기적 조건에서 배양 가능한 유산균으로 발효시킨 발효물을 활성성분으로서 포함하는 비만 또는 고지혈증의 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 2

갈화, 또는 갈화의 물 또는 C₁-C₃ 알코올 추출물을 호기적 조건에서 배양 가능한 유산균으로 발효시킨 발효물을 활성성분으로서 포함하는 비만 또는 고지혈증의 예방 또는 개선용 건강기능식품용 조성물.

청구항 3

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 유산균은 Bifidobacterium adolescentis(KCTC3352), Lactobacillus brevis K-1(KCCM10968P), Lactobacillus acidophilus(KCTC3171), Leuconostoc mesenteroides(KCTC 3505), Lactobacillus acidophilus K-1, Leuconostoc mesenteroides K-1 또는 Lactobacillus plantarum K-1인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 4

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 갈화는 한국산 또는 중국산인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 5

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 발효물은 이리솔리돈 또는 텍토리제닌을 비발효물보다 다량 함유하고 있는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 6

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 발효물은 갈화 100 중량부에 대해 유산균 1 내지 5 중량부로 발효시킨 것임을 특징으로 하는 조성물.

청구항 7

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 발효는 30 내지 40℃에서 2 내지 7일간 발효시킨 것임을 특징으로 하는 조성물.

청구항 8

제1항 또는 제2항에 있어서, 항산화 활성 또는 대장염의 예방, 치료 또는 개선에 더욱 효과가 있는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 9

제1항에 있어서, 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽제, 액제, 에어로졸, 또는 엑스제인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 10

제2항에 있어서, 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽제, 액제, 엑스제, 차, 젤리, 엑스, 또는 음료인 것을 특징으로 하는 조성물.

명 세 서

발명의 상세한 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 비만 또는 고지혈증의 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것으로, 보다 구체적으로는 갈근이나 갈화 또

는 갈근이나 갈화의 추출물의 유산균 발효물을 활성성분으로서 함유하는 비만 또는 고지혈증을 예방, 치료, 또는 개선하기 위한 약학 조성물 및 건강기능식품용 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

- [0002] 인체 내에는 약 200 억개 이상의 지방세포가 존재하며, 인체 내에 에너지의 수요보다 공급이 월등히 많을 경우에는 지방세포 내에 중성지방으로 저장되었다가 에너지가 고갈될 경우에 유리 지방산과 포도당으로 분해되어 에너지원으로서 이용된다. 현대인의 약 30~40% 정도가 가지고 있는 비만은 이러한 과정의 불균형으로 인해 과도한 에너지의 축적이 일어날 때 발생되며, 지방세포의 크기가 커지거나 그 수가 증가하는 현상으로 나타난다. 이러한 비만은 각종 성인병의 발병과 매우 깊은 관련이 있어, 비만도가 높아질수록 고지혈증, 당뇨병, 담석증, 암, 고혈압, 심장 질환 및 뇌졸중의 유병률이 증가된다. 또한, 수면 무호흡증, 당뇨병, 및 골관절염 등을 유발하는 것으로 알려져 있다. 따라서, 비만을 치료하기 위한 노력이 다양하게 이루어지고 있다.
- [0003] 비만을 치료하기 위한 방법으로서 대개 식이요법과 운동요법이 행해지고 있다. 식이요법은 에너지 총 섭취량을 제어하는 방법이나, 환자가 실천하기 쉽지 않고 안정 시 대사가 저하되기 때문에 충분한 효과를 얻기 어렵다. 운동요법 또한 1 회에 20 분간의 유산소 운동을 주 3 회 이상 행하는 필요하므로 계속적으로 행하는 것이 쉽지 않다. 그리하여, 비만을 치료하기 위해, 식욕 억제제, 소화흡수 저해제, 비만축적 방해제 또는 대사 촉진제 등의 약물요법이 많이 이용되고 있으나, 약물 의존성 등의 부작용을 일으킬 위험성이 있으며, 투여한 환자에게 단기간에 내성이 생겨버리는 경우도 있어 장기간 연속하여 사용할 수 없는 문제점이 있다. 따라서, 인체에 부담을 주지 않으면서 장기간 연속하여 사용할 수 있는 약물의 개발이 필요하다.
- [0004] 한편, 콩과 식물의 다년생 초본인 쑥(Pueraria lobata Ohwi)은 한국, 중국, 및 일본의 각 지역에서 자생하며, 주피를 제거한 뿌리를 갈근, 완전히 개화하지 않은 봉오리를 갈화라고 하여 널리 사용되고 있는 생약이다. 예로부터 갈근 및 갈화는 과음으로 인한 두통, 발열 및 가슴 속이 답답하고 편치 않아서 팔다리를 가만히 두지 못하는 증상, 갈증, 식욕부진, 복부팽만, 구토증을 다스리기 위해 사용되어 왔다. 갈근 및 갈화의 함유 성분으로는 6"-크실로실-텍토리딘, 6"-크실로실-글리시틴, 텍토리딘, 글리시틴, 카칼리돈, 카칼라이드, 카이카사포닌 I, 카이카사포닌 III등이 알려져있다. 갈화의 약리효과로는 마우스에서 물추출물, 알콜 추출물, 함유 성분인 카칼라이드, 텍토리딘, 카이카사포닌 III의 간장 보호효과, 혈중 알콜 농도 저하효과, 텍토리딘, 글리시틴 등 플라보노이드의 항염증, 항산화효과, 항당뇨 효과 등이 보고되었다(Jongwon Choi et al., Effect of Kaikasaponin III Obtained from Pueraria thunbergiana Flowers on Serum and Hepatic Lipid Peroxides and Tissue Factor Activity in the Streptozotocin-Induced Diabetic Rat, J Med Food 7 (1) 2004, 31-37).
- [0005] 또한, 갈화의 성분인 카칼라이드 및 이리솔리돈은 HMG-CoA 리덕타아제 활성 억제 효과를 가져 고지혈증 등의 치료에 효과적이며, 이리솔리돈이 카칼라이드에 비해 더 높은 HMG-CoA 리덕타아제 억제 활성을 갖는 것으로 나타났다(Dong-Hyun Kim et. al., Kakkalide and Irisolidone: HMG-CoA Reductase Inhibitors isolated from the flower of Pueraria thunbergiana, Biol. Pharm. Bull. 30(10) 2007, 1965-1968).
- [0006] 한국특허등록 0733336은 갈근 또는 갈화 추출물을 유산균으로 발효시켜 유효성분을 전환시킴으로써 고지혈증에 대한 예방 또는 치료 효과를 높인 갈근 또는 갈화의 발효물을 유효성분으로 함유하는 비만 또는 고지혈증의 예방 또는 치료용 조성물을 개시하였다. 상기 특허문헌에서는 갈근 또는 갈화의 추출물의 유산균 발효물을 제조하기 위해, 구체적으로는 호기적 조건에서 배양될 수 없는 혐기성 균주인 비피도박테리움 브레브 K-111, 비피도박테리움 브레브 K-110(KCCM 10097), 또는 스트렙토코커스 패시움(KCTC 3077) 균주를 이용한 발효물만을 예시하고 있을 뿐이다. 그러나, 이러한 혐기성 균주는 호기적 조건에서는 증식이 이루어지지 않고, 공기에 대한 노출 및 갈화의 추출물에 의한 항균력 때문에 사멸된다. 또한, 유산균 중의 발효 효소가 존재한다고 하더라도 실온에서 보관하는 사이에 급격하게 실활된다. 따라서, 실질적으로 갈근 또는 갈화의 추출물을 발효시키기 위해서는 이식하는 유산균의 양이 추출물의 양보다 많아야 하고, 혐기적 조건에서 배양해야 하며, 갈화의 추출물의 함량이 발효 반응액의 1%를 넘으면 발효 및 그 발효에 의한 유효성분의 전환이 일어나지 않아, 비용 및 시간이 많이 소요되는 단점이 있다.

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

- [0007] 이에 본 발명자들은 시간 및 비용의 측면에 있어서 경제적으로 대량 제조할 수 있으며, 고지혈증 및 비만에 대한 예방 또는 치료에 있어서 우수한 효과를 갖는 갈근 또는 갈화의 유산균 발효물을 개발하기 위해 연구한

결과, 본 발명을 완성하게 되었다.

[0008] 따라서, 본 발명의 목적은 고지혈증 및 비만에 대한 예방 또는 치료에 있어서 우수한 효과를 가지며 경제적으로 제조될 수 있는 갈근 또는 갈화의 유산균 발효물을 포함하는 약학 조성물을 제공하는 것이다.

[0009] 본 발명의 다른 목적은 고지혈증 및 비만에 대한 예방 또는 개선에 있어서 우수한 효과를 가지며 경제적으로 제조될 수 있는 갈근 또는 갈화의 유산균 발효물을 포함하는 건강기능식품용 조성물을 제공하는 것이다.

과제 해결수단

[0010] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은

[0011] 갈근이나 갈화, 또는 갈근이나 갈화의 물 또는 C₁-C₃ 알코올 추출물을 호기적 조건에서 배양 가능한 유산균으로 발효시킨 발효물을 활성성분으로서 포함하는 비만 또는 고지혈증의 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.

[0012] 또한, 본 발명은 갈근이나 갈화, 또는 갈근이나 갈화의 물 또는 C₁-C₃ 알코올 추출물을 호기적 조건에서 배양 가능한 유산균으로 발효시킨 발효물을 활성성분으로서 포함하는 비만 또는 고지혈증의 예방 또는 개선용 건강기능식품용 조성물을 제공한다.

[0013] 이하, 본 발명을 보다 상세하게 설명한다.

[0014] 본 발명에서 사용되는 모든 기술용어는, 달리 정의되지 않는 이상, 본 발명의 관련 분야에서 통상의 당업자가 일반적으로 이해하는 바와 같은 의미로 사용된다. 또한, 본 명세서에는 바람직한 방법이나 시료가 기재되나, 이와 유사하거나 동등한 것들도 본 발명의 범주에 포함된다. 본 명세서에 참고문헌으로 기재되는 모든 간행물의 내용은 전체가 참고로 본 명세서에 통합된다.

[0015] 본 발명자들은 갈근이나 갈화, 또는 갈근이나 갈화의 추출물을 호기성 조건에서 배양 가능한 유산균으로 발효시킬 경우 다량을 짧은 시간 내에 보다 경제적으로 발효시킬 수 있으며, 갈근이나 갈화 중의 활성성분인 카칼라이드 또는 텍토리딘이 각각 약리활성이 더 우수한 이리솔리돈 또는 텍토리제닌으로 더 빨리 전환되어 보다 우수한 항고지혈증 활성 및 항비만 효과를 갖는다는 것을 밝혀냈다.

[0016] 따라서, 본 발명의 일 측면에 있어서, 갈근이나 갈화, 또는 갈근이나 갈화의 물 또는 C₁-C₃ 알코올 추출물을 호기적 조건에서 배양 가능한 유산균으로 발효시킨 발효물을 활성성분으로서 포함하는 비만 또는 고지혈증의 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다.

[0017] 상기 유산균은 호기적 조건에서 갈화를 발효시킬 수 있는 임의의 유산균일 수 있으며, 유산균 중에서도 특히 호기적 조건에서 갈근 또는 갈화를 발효시킬 수 있으며, 갈화의 추출물에 의한 항균력을 극복할 수 있을 뿐만 아니라, 갈근 또는 갈화의 활성성분인 카칼라이드 또는 텍토리딘을 이리솔리돈 또는 텍토리제닌으로 전환시킬 수 있는 유산균이 바람직하다. 일 구현예에 따르면, 본 발명자들은 유산균을 김치로부터 분리한 100 개의 호기성 조건에서 배양할 수 있는 100 개의 유산균과 한국생명공학연구원 유전자 은행(KCTC) 및 한국미생물보존센터(KCCM)으로부터 분양받은 호기성 조건에서 배양할 수 있는 발효식품 유래의 유산균 균주들에 대해 실험한 결과, Bifidobacterium adolescentis (KCTC3352), Lactobacillus brevis K-1(KCCM10968P), Lactobacillus acidophilus(KCTC3171), Leuconostoc mesenteroides(KCTC 3505), 및 김치로부터 동정된 Lactobacillus acidophilus K-1, Leuconostoc mesenteroides K-1, 및 Lactobacillus plantarum K-1이 특히 상기 조건을 만족시키며, 그중에서도 특히 Lactobacillus brevis K-1(KCCM10968P), Leuconostoc mesenteroides K-1, Leuconostoc mesenteroides(KCTC 3505), 또는 Lactobacillus plantarum K-1의 생육이 매우 활발하다는 것을 확인하였다. 따라서, 본 발명에 따른 약학 조성물에서 유산균은 Bifidobacterium adolescentis(KCTC3352), Lactobacillus brevis K-1(KCCM10968P), Lactobacillus acidophilus(KCTC3171), Leuconostoc mesenteroides(KCTC 3505), Lactobacillus acidophilus K-1, Leuconostoc mesenteroides K-1 또는 Lactobacillus plantarum K-1이 바람직하고, Lactobacillus brevis K-1(KCCM10968P), Leuconostoc mesenteroides K-1, Leuconostoc mesenteroides(KCTC 3505), 또는 Lactobacillus plantarum K-1이 특히 바람직하나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0018] 상기 갈근이나 갈화는 한국산 또는 중국산을 사용할 수 있다. 한국산 갈근이나 갈화는 활성성분으로서 카칼라이드를 함유하며, 상기 발효에 의해 카칼라이드가 항고지혈 활성 및 항비만 활성이 더 우수한 이리솔리돈으로 전환될 수 있다. 중국산 갈근이나 갈화는 활성성분으로서 텍토리딘을 함유하며, 상기 발효에 의해 텍토리딘이 항고지혈 활성 및 항비만 활성이 더 우수한 텍토리제닌으로 전환될 수 있다. 따라서, 상기 발효물은 비발효물

에 비해 이리솔리돈 또는 텍토리제닌을 다량 함유하고 있음을 특징으로 한다.

- [0019] 상기 발효물은 갈근 또는 갈화 100 중량부에 대해 유산균 1 내지 5 중량부로 발효시켜 얻어질 수 있다. 이는 상기 유산균이 갈근 또는 갈화를 호기성 조건에서 갈근 또는 갈화의 향균활성을 극복하고 발효시킬 수 있기 때문에 가능한 것이며, 종래에 개시된 갈화 또는 갈근의 유산균 발효물은 갈근 또는 갈화의 추출물의 함량이 발효 반응액의 1% 이하여야 제조될 수 있었던 문제점이 해소한 것이라고 할 수 있다.
- [0020] 상기 발효는 갈근이나 갈화에 직접 유산균을 접종하여 발효시킬 수도 있고, 갈근이나 갈화의 추출물에 유산균을 접종하여 발효시켜 발효물을 제조할 수 있다. 갈근이나 갈화에 직접 유산균을 접종할 경우에는, 김치를 담그는 것과 같이 증류수 중에 갈근이나 갈화를 넣고 멸균한 다음 유산균을 접종한 다음 배양시킬 수 있다. 그런 다음, 얻어진 배양물을 물 또는 C₁-C₃ 알코올로 추출하여 압압 농축하여 사용할 수 있다. 갈근이나 갈화의 추출물에 유산균을 접종하여 발효할 경우에는, 갈근이나 갈화를 물 또는 C₁-C₃ 알코올로 추출한 추출액에 유산균을 접종하여 배양함으로써 발효물을 얻을 수 있다. 상기 발효는 유산균이 배양할 수 임의의 호기성 조건에서 수행할 수 있으며, 예를 들어 30 내지 40℃에서 2 내지 7일간 발효시킬 수 있다.
- [0021] 상기 갈근이나 갈화, 또는 갈근이나 갈화의 물 또는 C₁-C₃ 알코올 추출물을 호기적 조건에서 배양 가능한 유산균으로 발효시킨 발효물은 항고지혈 활성 및 항비만 활성을 가질 뿐만 아니라, 항산화 활성 및 대장염 활성을 갖는 것으로 나타났다. 따라서, 상기 본 발명에 따른 약학 조성물은 고지혈증 및 비만뿐만 아니라, 항산화 효과에 의한 노화방지, 대장염의 예방 또는 치료에도 유용하게 사용될 수 있다.
- [0022] 상기 약학 조성물은 약제학적으로 허용 가능한 담체 또는 첨가제를 함께 포함하여 당해 기술분야에 공지되어 있는 통상적인 약제학적 제형으로 제제화될 수 있다. 상기 약제학적 제형은 경구투여제제, 주사제, 좌제, 경피투여제제, 및 경비투여제제를 포함하지만, 이에 한정되지 않는 임의의 제형으로 제제화되어 투여될 수도 있으며, 필요에 따라 적절한 제형으로 제제화할 수 있다. 바람직하게는 경구 제형으로 제제화할 수 있다. 상기 각각의 제형으로 제제화 시, 각각의 제형의 제조에 필요한 약제학적으로 허용 가능한 담체 또는 첨가제를 부가하여 제조할 수 있다. 상기 약학 조성물은 성인 남성을 기준으로 상기 갈근 또는 갈화의 유산균 발효물을 경구 투여시 0.3-9g/kg/일로 1일 수회 나누어 투여할 수 있다. 상기 투여량은 투여 경로, 질병의 진행 정도, 성별, 나이, 체중 등에 따라 적절히 증감될 수 있다.
- [0023] 상기 경구 제형으로는 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁제, 에멀전, 시럽제, 액제, 환제, 또는 엑스제로서 제제화될 수 있으며, 경구 투여용 제형으로 제제화 시 상기 담체로서 희석제, 활택제, 결합제, 붕해제, 감미제, 안정제, 및 방부제 중에서 1 종 이상을 선택하여 사용할 수 있으며, 첨가제로는 향료, 비타민류, 및 항산화제 중에서 1 종 이상을 선택하여 사용할 수 있다.
- [0024] 상기 담체 및 첨가제는 약제학적으로 허용 가능한 것은 모두 가능하며, 구체적으로 희석제로는 유당, 옥수수 전분, 대두유, 미정질 셀룰로오스, 또는 만니톨, 활택제로는 스테아린산 마그네슘 또는 탈크, 결합제로는 폴리비닐피롤리돈 또는 히드록시프로필셀룰로오스가 바람직하다. 또한, 붕해제로는 카르복시메틸셀룰로오스 칼슘, 전분글리콜산나트륨, 폴라크릴린칼륨, 또는 크로스포비돈, 감미제로는 백당, 과당, 솔비톨, 또는 아스파탐, 안정제로는 카르복시메틸셀룰로오스나트륨, 베타-사이클로덱스트린, 백납, 또는 잔탄검, 방부제로는 파라옥시안식향산메틸, 파라옥시안식향산프로필, 또는 솔빈산칼륨이 바람직하다.
- [0025] 또한, 상기 성분 이외에도 공지의 첨가제로서 미각을 돋구기 위하여, 매실향, 레몬향, 과인애플향, 허브향 등의 천연향료, 천연과즙, 클로로필린, 플라보노이드 등의 천연색소, 과당, 벌꿀, 당알코올, 설탕과 같은 감미성분, 또는 구연산, 구연산 나트륨과 같은 산미제를 혼합하여 사용할 수도 있다.
- [0026] 상기 제형화 방법 및 이에 사용되는 담체 및 첨가제에 대해서는 Remington's Pharmaceutical Sciences (19th ed., 1995)에 상세하게 기재되어 있다.
- [0027] 본 발명은 또 다른 일 측면에 있어서, 갈근이나 갈화, 또는 갈근이나 갈화의 물 또는 C₁-C₃ 알코올 추출물을 호기적 조건에서 배양 가능한 유산균으로 발효시킨 발효물을 활성성분으로서 포함하는 비만 또는 고지혈증의 예방 또는 개선용 건강기능식품용 조성물을 제공한다.
- [0028] 본원발명에서 “건강기능식품”이란 건강기능식품에 관한 법률 제3727호에 따른 인체에 유용한 기능성을 가진 원료나 성분을 사용하여 제조 및 가공한 식품을 의미하며, “기능성”이라 함은 인체의 구조 및 기능에 대하여 영양소를 조절하거나 생리학적 작용 등과 같은 보건 용도에 유용한 효과를 얻을 목적으로 섭취하는 것을 의미한다.

다.

[0029] 상기 건강기능식품용 조성물에서 활성성분으로 함유된 유산균 발효물은 상기 앞서 설명한 약학 조성물에서의 유산균 발효물에 대한 설명이 그대로 적용된다.

[0030] 이러한 건강기능식품은 식품학적으로 허용 가능한 담체를 이용하여 당해 기술분야에 공지되어 있는 통상적인 건강기능식품의 제형으로 제제화될 수 있다. 상기 건강기능식품은 예를 들어 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽제, 액제, 엑스제, 차, 젤리, 또는 음료 등으로 제조될 수 있다. 상기 식품학적으로 허용 가능한 담체 또는 첨가제로는 제조하고자 하는 제형의 제조에 당해 기술분야에서 사용 가능한 것으로 공지되어 있는 임의의 담체 또는 첨가제가 이용될 수 있다. 이와 같이 다양한 형태로 가공된 본 발명의 건강기능식품용 조성물은 복용이 매우 간편하여 유용하게 이용될 수 있다. 본 발명의 건강기능식품용 조성물은 비만 또는 고지혈증의 예방 또는 개선에 사용될 수 있을 뿐만 아니라, 항산화 활성도 가지므로 노화, 심혈관계 질환, 당뇨, 파킨슨 질환 등과 같이 항산화 활성에 의해 예방 또는 개선이 가능한 것으로 알려져 있는 질병의 예방 또는 개선에도 사용될 수 있다. 또한, 상기 건강기능식품용 조성물은 대장염의 예방 또는 개선에도 이용될 수 있다.

[0031] 갈근 또는 갈화는 오랫동안 한약재 또는 식품으로서 널리 이용되어 왔던 것이어서, 독성 또는 부작용의 문제가 거의 없다고 볼 수 있으므로, 본 발명에 따른 약학 조성물 및 건강기능식품용 조성물은 질병의 예방, 개선 또는 치료 목적으로 장시간 사용 시에도 안심하고 사용할 수 있는 장점이 있다.

효 과

[0032] 앞서 설명한 바와 같이, 본 발명에 따른 약학 조성물 또는 건강기능식품용 조성물은 시간 및 비용의 측면에 있어서 경제적으로 대량 제조할 수 있으며, 고지혈증 및 비만에 대한 예방 또는 치료에 있어서 우수한 효과를 가져, 종래의 혐기성 조건에서만 배양 가능한 유산균에 의한 갈근 또는 갈화의 발효물을 활성성분으로서 함유할 경우에 비해 보다 유리하게 약학 조성물 또는 건강기능식품용 조성물로서 사용될 수 있는 장점이 있다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

[0033] 이하, 본 발명을 하기 실시예에 의해 더욱 구체적으로 설명한다. 그러나, 이들 실시예는 본 발명에 대한 이해를 돕기 위한 것일 뿐, 어떤 의미로든 본 발명의 범위가 이들에 의해 제한되는 것은 아니다.

[0034] <발효 균주의 선택>

[0035] 김치로부터 분리한 100 개의 호기성 조건에서 배양할 수 있는 유산균과 KCTC(한국생명공학연구원 유전자은행) 및 KCCM (한국미생물보존센터)으로부터 분양받은 미생물로부터 Bifidobacterium adolescentis (KCTC3352), Lactobacillus brevis K-1(KCCM10968P), Lactobacillus acidophilus(KCTC3171), Leuconostoc mesenteroides(KCTC 3505), Lactobacillus acidophilus K-1, Leuconostoc mesenteroides K-1, 및 Lactobacillus plantarum K-1을 선택하였다.

[0036] 실시예 1 - 4: 갈화 추출물의 발효물 제조(1)

[0037] 국산 갈화 100 g에 물 1 L를 넣어 100℃에서 2 시간 동안 수욕상에서 가온하여 추출하는 것을 2 회 반복하여 추출물을 얻은 다음, 여과하여 얻어진 여액을 감압농축하여 엑스를 획득하였다. 그 엑스 0.1 g(실시예 1), 0.5 g(실시예 2), 1 g(실시예 3), 또는 5 g(실시예 4)을 물 100 ml에 넣고 여기에 트립틱 소이 브로쓰(Difco 사, 미국)에서 24시간 미리 배양한 Bifidobacterium adolescentis(KCTC3352)균주를 습중량 5 g을 이식하고 3일간 호기적 조건에서 발효시켰다.

[0038] 실시예 5 - 8: 갈화 추출물의 발효물 제조(2)

[0039] 국산 갈화 100 g에 물 1 L를 넣어 100℃에서 2 시간 동안 수욕상에서 가온하여 추출하는 것을 2 회 반복하여 추출물을 얻은 다음, 여과하여 얻어진 여액을 감압농축하여 엑스를 획득하였다. 그 엑스 0.1 g(실시예 5), 0.5 g(실시예 6), 1 g(실시예 7), 또는 5 g(실시예 8)을 물 100 ml에 넣고 여기에 트립틱 소이 브로쓰(Difco 사, 미국)에서 24시간 미리 배양한 Lactobacillus brevis K-1(KCCM10968P)균주를 습중량 5g을 이식하고 3일간 호기적 조건에서 발효시켰다.

[0040] 실시예 9 - 12: 갈화 추출물의 발효물 제조(3)

[0041] 국산 갈화 100 g에 물 1 L를 넣어 100℃에서 2 시간 동안 수욕상에서 가온하여 추출하는 것을 2 회 반복하여 추출물을 얻은 다음, 여과하여 얻어진 여액을 감압농축하여 엑스를 획득하였다. 그 엑스 0.1 g(실시예 9), 0.5

g(실시예 10), 1 g(실시예 11), 또는 5 g(실시예 12)을 물 100 ml에 넣고 여기에 트립틱 소이 브로쓰(Difco 사, 미국)에서 24시간 미리 배양한 *Lactobacillus acidophilus* K-1 균주를 습중량 5 g을 이식하고 3일간 호기적 조건에서 발효시켰다.

[0042] 실시예 13 - 16: 갈화 추출물의 발효물 제조(4)

국산 갈화 100 g에 물 1 L를 넣어 100℃에서 2 시간 동안 수욕상에서 가온하여 추출하는 것을 2 회 반복하여 얻어진 추출물을 얻은 다음, 여과하여 얻어진 여액을 감압농축하여 엑스를 획득하였다. 그 엑스 0.1 g(실시예 13), 0.5 g(실시예 14), 1 g(실시예 15), 또는 5 g(실시예 16)을 물 100 ml에 넣고 여기에 트립틱 소이 브로쓰(Difco 사, 미국)에서 24시간 미리 배양한 *Lactobacillus acidophilus* KCTC3171 균주를 습중량 5 g을 이식하고 3일간 호기적 조건에서 발효시켰다.

[0044] 실시예 17 - 20: 갈화 추출물의 발효물 제조(5)

국산 갈화 100 g에 물 1 L를 넣어 100℃에서 2 시간 동안 수욕상에서 가온하여 추출하는 것을 2 회 반복하여 얻어진 추출물을 얻은 다음, 여과하여 얻어진 여액을 감압농축하여 엑스를 획득하였다. 그 엑스 0.1 g(실시예 17), 0.5 g(실시예 18), 1 g(실시예 19), 또는 5 g(실시예 20)을 물 100 ml에 넣고 여기에 트립틱 소이 브로쓰(Difco 사, 미국)에서 24시간 미리 배양한 *Leuconostoc mesenteroides* K-1 균주를 습중량 5 g을 이식하고 3일간 호기적 조건에서 발효시켰다.

[0046] 실시예 21 - 24: 갈화 추출물의 발효물 제조(6)

국산 갈화 100 g에 물 1 L를 넣어 100℃에서 2 시간 동안 수욕상에서 가온하여 추출하는 것을 2 회 반복하여 얻어진 추출물을 얻은 다음, 여과하여 얻어진 여액을 감압농축하여 엑스를 획득하였다. 그 엑스 0.1 g(실시예 21), 0.5 g(실시예 22), 1 g(실시예 23), 또는 5 g(실시예 24)을 물 100 ml에 넣고 여기에 트립틱 소이 브로쓰(Difco 사, 미국)에서 24시간 미리 배양한 *Leuconostoc mesenteroides* KCTC3505 균주를 습중량 5 g을 이식하고 3일간 호기적 조건에서 발효시켰다.

[0048] 실시예 25 - 28: 갈화 추출물의 발효물 제조(7)

국산 갈화 100 g에 물 1 L를 넣어 100℃에서 2 시간 동안 수욕상에서 가온하여 추출하는 것을 2 회 반복하여 얻어진 추출물을 얻은 다음, 여과하여 얻어진 여액을 감압농축하여 엑스를 획득하였다. 그 엑스 0.1 g(실시예 25), 0.5 g(실시예 26), 1 g(실시예 27), 또는 5 g(실시예 28)을 물 100 ml에 넣고 여기에 트립틱 소이 브로쓰(Difco 사, 미국)에서 24시간 미리 배양한 *Lactobacillus plantarum* K-1 균주를 습중량 5 g을 이식하고 3일간 호기적 조건에서 발효시켰다.

[0050] 실험예 1: 갈화 추출물의 발효물에 대한 발효 효과 시험

상기 실시예 1 내지 28에서 제조된 발효물에 대해 유산균의 성장능 및 가스 생산성에 대해 평가하였다. 유산균의 성장능은 육안으로 탁도가 증가하는지 유무에 의해 평가하였으며, 가스 생산성은 드럼판이 들어있는 액체배지에 배양하여 가스가 차있는지 여부로 평가하였다. 또한, 발효물에서 카칼라이드가 이리솔리돈으로 전환된 비율을 각각의 성분을 발효 전후의 카칼라이드와 이리솔리돈의 함량을 측정하여, 평가하였다. 카칼라이드 및 이리솔리돈 각각의 함량은 HPLC(일본 미쯔비시사)을 이용하여 측정하였다. 구체적으로는, 칼럼, Develosil C30-UG-5 (250 x 4.6 mm i.d., 5 mm, 100 ; Nomura Chemical, Japan); 용매, 30% 메탄올; 유속 1 ml/min; 검출기 264 nm의 조건에서 측정하였다. 그리하여 얻어진 결과를 하기 표 1에 나타내었다.

[0052] [표 1]

갈화 추출물 발효물의 함유성분 전환 및 유산균의 성장, 가스생산효과

	카칼라이드의 이리솔리돈으로의 전환율(%)	유산균성장능	가스생산성
실시예 1	12	-	x
실시예 2	7	-	x
실시예 3	5	--	x
실시예 4	2	--	x
실시예 5	17	+	o
실시예 6	11	+	x
실시예 7	7	+	x
실시예 8	4	-	x
실시예 9	8	-	x
실시예 10	5	-	x
실시예 11	3	--	x
실시예 12	1	--	x
실시예 13	7	-	x
실시예 14	5	-	x
실시예 15	2	--	x
실시예 16	1	--	o
실시예 17	4	+++	o
실시예 18	2	++	o
실시예 19	1	++	o
실시예 20	<1	++	o
실시예 21	2	+++	o
실시예 22	1	++	o
실시예 23	1	++	o
실시예 24	<1	++	o
실시예 25	6	++	o
실시예 26	4	++	o
실시예 27	2	++	o
실시예 28	1	+	o

0, 자라지않음; -, 약하게 죽음; --, 많이 죽음; ---, 모두 죽음; +, 약간자람; ++, 적당히 자람; +++, 매우 잘자람

[0053]

[0054]

상기 표 1의 결과에 따르면, 김치에서 분리한 균주 중 7개의 균주가 모두 갈화의 수추출물을 발효시켜 카칼라이드를 이리솔리돈으로 전환시키는 것으로 나타났다. 균주 *Leuconostoc mesenteroides*가 가장 강하게 가스를 생산했으며, 그 다음 순으로 *Lactobacillus plantarum*이 가스를 다량 생산하였으며, *Lactobacillus acidophilus*는 생산했지만 그 양은 아주 미약하였다.

[0055]

비교예 1 및 2

[0056]

김치 담그는 것과 같이 증류수 1000 ml에 국산 갈화 100 g(비교예 1) 또는 200 g(비교예 2)을 넣고 100℃로 가열하여 멸균하고 37℃에서 호기적으로 배양하고 2 배량의 메탄을 가하여 2 회 추출한 다음 감압농축하였다.

[0057]

실시예 29 - 30: 국산 갈화의 발효(1)

[0058]

김치 담그는 것과 같이 증류수 1000 ml에 국산 갈화 100 g(실시예 29) 또는 200 g(실시예 30)을 넣고 100℃로 가열하여 멸균하고 여기에 유산균 *Leuconostoc mesenteroides* (KCTC3505) 3 g을 이식하고 5일간 37℃에서 호기적으로 배양하고 2 배량의 메탄올을 넣어 2 회 추출하여 감압농축하였다.

[0059]

실시예 31 - 32: 국산 갈화의 발효(2)

- [0060] 김치 담그는 것과 같이 증류수 1000 ml에 국산 갈화 100 g(실시예 31) 또는 200 g(실시예 32)을 넣고 100℃로 가열하여 멸균하고 여기에 유산균 *Bifidobacterium adolescentis* (KCTC3352) 3 g을 이식하고 5일간 37℃에서 호기적으로 배양하고 2배량의 메탄올을 넣어 2회 추출하여 감압농축하였다.
- [0061] **실시예 33 - 34: 국산 갈화의 발효(3)**
- [0062] 김치 담그는 것과 같이 증류수 1000 ml에 국산 갈화 100 g(실시예 33) 또는 200 g(실시예 34)을 넣고 100℃로 가열하여 멸균하고 여기에 유산균 *Lactobacillus brevis* K-1 (KCCM10968P) 3 g을 이식하고 5일간 37℃에서 호기적으로 배양하고 2배량의 메탄올을 넣어 2회 추출하여 감압농축하였다.
- [0063] **실시예 35 - 36: 국산 갈화의 발효(4)**
- [0064] 김치 담그는 것과 같이 증류수 1000 ml에 국산 갈화 100 g(실시예 35) 또는 200 g(실시예 36)을 넣고 100℃로 가열하여 멸균하고 여기에 유산균 *Leuconostoc mesenteroides* (KCTC3505)와 *Bifidobacterium adolescentis*(KCTC3352)을 각각 1.5 g을 이식하고 5일간 37℃에서 호기적으로 배양하고 2배량의 메탄올을 넣어 2회 추출하여 감압농축하였다.
- [0065] **실시예 37 - 38: 국산 갈화의 발효(5)**
- [0066] 김치 담그는 것과 같이 증류수 1000 ml에 국산 갈화 100 g(실시예 35) 또는 200 g(실시예 36)을 넣고 100℃로 가열하여 멸균하고 여기에 유산균 *Leuconostoc mesenteroides* (KCTC3505)와 *Lactobacillus brevis* K-1 (KCCM10968P)을 각각 1.5 g을 이식하고 5일간 37℃에서 호기적으로 배양하고 2배량의 메탄올을 넣어 2회 추출하여 감압농축하였다.
- [0067] **실시예 39 - 40: 국산 갈화의 발효(6)**
- [0068] 김치 담그는 것과 같이 증류수 1000 ml에 국산 갈화 100 g(실시예 39) 또는 200 g(실시예 40)을 넣고 100℃로 가열하여 멸균하고 여기에 유산균 *Leuconostoc mesenteroides*(KCTC3505), *Lactobacillus brevis* K-1(KCCM10968P), 및 *Bifidobacterium adolescentis* (KCTC3352)을 각각 1 g을 이식하고 5일간 37℃에서 호기적으로 배양하고 2배량의 메탄올을 넣어 2회 추출하여 감압농축하였다.
- [0069] **비교예 3 및 4**
- [0070] 김치 담그는 것과 같이 증류수 1000 ml에 중국산 갈화 100 g(비교예 3) 또는 200 g(비교예 4)을 넣고 100℃로 가열하여 멸균하고 37℃에서 호기적으로 배양하고 2배량의 메탄올 가하여 2회 추출한 다음 감압농축하였다.
- [0071] **실시예 41 - 42: 중국산 갈화의 발효(1)**
- [0072] 김치 담그는 것과 같이 증류수 1000 ml에 중국산 갈화 100 g(실시예 41) 또는 200 g(실시예 42)을 넣고 100℃로 가열하여 멸균하고 여기에 유산균 *Leuconostoc mesenteroides* (KCTC3505) 3 g을 이식하고 5일간 37℃에서 호기적으로 배양하고 2배량의 메탄올을 넣어 2회 추출하여 감압농축하였다.
- [0073] **실시예 43 - 44: 중국산 갈화의 발효(2)**
- [0074] 김치 담그는 것과 같이 증류수 1000 ml에 중국산 갈화 100 g(실시예 43) 또는 200 g(실시예 44)을 넣고 100℃로 가열하여 멸균하고 여기에 유산균 *Bifidobacterium adolescentis* (KCTC3352) 3 g을 이식하고 5일간 37℃에서 호기적으로 배양하고 2배량의 메탄올을 넣어 2회 추출하여 감압농축하였다.
- [0075] **실시예 45 - 46: 중국산 갈화의 발효(3)**
- [0076] 김치 담그는 것과 같이 증류수 1000 ml에 중국산 갈화 100 g(실시예 45) 또는 200 g(실시예 46)을 넣고 100℃로 가열하여 멸균하고 여기에 유산균 *Lactobacillus brevis* K-1 (KCCM10968P) 3 g을 이식하고 5일간 37℃에서 호기적으로 배양하고 2배량의 메탄올을 넣어 2회 추출하여 감압농축하였다.
- [0077] **실시예 47 - 48: 중국산 갈화의 발효(4)**
- [0078] 김치 담그는 것과 같이 증류수 1000 ml에 중국산 갈화 100 g(실시예 47) 또는 200 g(실시예 48)을 넣고 100℃로 가열하여 멸균하고 여기에 유산균 *Leuconostoc mesenteroides*(KCTC3505), *Lactobacillus brevis* K-1(KCCM10968P), 및 *Bifidobacterium adolescentis* (KCTC3352)을 각각 1 g을 이식하고 5일간 37℃에서 호기적으로 배양하고 2배량의 메탄올을 넣어 2회 추출하여 감압농축하였다.

[0079] **실시예 49: 국산 갈화의 발효(7)**

[0080] 김치 담그는 것과 같이 증류수 990 ml 및 초산(시그마사) 10 mL에 국산 갈화 200 g을 넣고 100℃로 가열하여 멸균하고 1N NaOH로 중화하고 여기에 유산균 *Leuconostoc mesenteroides*(KCTC3505), *Lactobacillus brevis* K-1(KCCM10968P), 및 *Bifidobacterium adolescentis* (KCTC3352)을 각각 1 g을 이식하고 5일간 37℃에서 호기적으로 배양하고 2 배량의 메탄올을 넣어 2 회 추출하여 감압농축하였다.

[0081] **실시예 50: 국산 갈화의 발효(8)**

[0082] 김치 담그는 것과 같이 증류수 950 ml 및 1N 초산 50 mL에 국산 갈화 200 g을 넣고 100℃로 가열하여 멸균하고, 1 N NaOH 50 mL를 가하여 중화하고 여기에 2 배량의 메탄올을 넣어 2 회 추출하여 감압농축하였다.

[0083] **실험예 2: 갈화 추출물의 발효물에 대한 발효 효과 시험(2)**

[0084] 상기 실시예 29 내지 50에서 제조된 발효물에 대해 유산균의 성장능 및 가스 생산성에 대해 평가하였다. 유산균의 성장능 및 가스 생산성에 대해서는 상기 실험예 1과 같은 방법으로 평가하였다. 또한, 발효물에서 카칼라이드가 이리솔리돈으로 전환된 비율을 상기 실험예 1과 같은 방법으로 측정하여, 평가하였다. 또한, 발효물에서 텍토리딘이 텍토리제닌으로 전환된 비율을 각각의 성분을 발효 전후의 텍토리딘과 텍토리제닌의 함량을 측정하여, 평가하였다. 텍토리딘 및 텍토리제닌 각각의 함량은 HPLC(일본 미쯔비시사)을 이용하여 측정하였다. 구체적으로는, 칼럼, Develosil C30-UG-5 (250 x 4.6 mm i.d., 5 mm, 100 ; Nomura Chemical, Japan); 용매, 30% 메탄올; 유속 1 ml/min; 검출기 264 nm의 조건에서 측정하였다.

[0085] 그러하여 얻어진 결과를 하기 표 2에 나타내었다.

[0086] [표 2]

갈화 추출물 발효물의 함유성분 전환 및 유산균의 성장, 가스생산효과

	카칼라이드의 이리솔리돈으로의 전환율(%)	텍토리딘의 텍토리제닌 으로의 전환율(%)	유산균성장능	가스생산성
비교예 1	0	-	/	/
비교예 2	0	-	/	/
실시예 29	9	-	+++	+++
실시예 30	7	-	+++	+++
실시예 31	12	-	-	-
실시예 32	9	-	-	-
실시예 33	45	-	+	-
실시예 34	38	-	+	-
실시예 35	32	-	+++	+++
실시예 36	22	-	+++	+++
실시예 37	82	-	+++	+++
실시예 38	78	-	+++	+++
실시예 39	91	-	+++	+++
실시예 40	85	-	+++	+++
비교예 3	-	0	/	/
비교예 4	-	0	/	/
실시예 41	-	8	+++	+++
실시예 42	-	7	+++	+++
실시예 43	-	12	-	-
실시예 44	-	9	-	-
실시예 45	-	21	+	+++
실시예 46	-	18	+	+++
실시예 47	-	74	+++	+++
실시예 48	-	65	+++	+++
실시예 49	94	-	+++	+++
실시예 50	35	-	+++	+++

0, 자라지않음; -, 약하게 죽음; --, 많이 죽음; ---, 모두 죽음; +, 약간자람; ++, 적당히 자람; +++, 매우 잘자람

[0087]

[0088]

상기 표 2의 결과에 따르면, 사용된 모든 발효 균주가 국산 갈화의 카칼라이드를 이리솔리돈으로 전환시키고, 중국산 갈화의 텍토리딘을 텍토리제닌으로 전환시키는 것으로 확인되었다. 그중에서도 특히, 가스를 다량 생산하는 *Leuconostoc mesenteroides*를 단독으로 배양하거나, *Leuconostoc mesenteroides*와 함께 *Bifidobacterium adolescentis* 및 *Lactobacillus brevis*를 조합하여 갈화를 발효시킬 경우, 국산 갈화의 카칼라이드를 이리솔리돈으로 전환시키는 비율, 및 중국산 갈화의 텍토리딘을 텍토리제닌으로 전환시키는 비율이 현저히 증가되는 것으로 확인되었다. 이는 *Leuconostoc mesenteroides*의 가스 생산에 의해 다른 유산균주에게 호기적 조건 하에서도 혐기적 조건을 조성하여 유산균의 배양을 더욱 활발하게 하기 때문인 것으로 보여진다.

[0089]

실험예 3: 항산화 활성 측정

[0090]

실시예 29 내지 50, 비교예 1 내지 4에서 제조한 발효물에 대해 DPPH(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl)의 라디칼 소거능을 측정하여 항산화 활성을 평가하였다.

[0091]

60 μ M DPPH(용매: EtOH) 500 μ l에 시료 500 μ l를 넣어 상온에서 30분 동안 반응시킨 후 520 nm에서 흡광도를 측정하였다. 블랭크로서 DPPH 대신 에탄올을사용하였으며 대조군으로서 시료 대신 물을 사용하였을 때를 100%로 하여 DPPH 라디칼 제거 정도를 %로 구했다. 대조약물로는 카페인산(caffeic acid)을 사용하였다. 각각의 시료에 대한 IC₅₀(50% 저해 농도, μ g/ml)을 계산한 결과를 하기 표 3에 나타내었다.

[0092] [표 3]

갈화 추출물 발효물의 항산화 효과

군	IC ₅₀ (μg/ml)
비교예 1	43
비교예 2	41
실시예 29	36
실시예 30	37
실시예 31	33
실시예 32	32
실시예 33	28
실시예 34	27
실시예 35	23
실시예 36	22
실시예 37	22
실시예 38	21
실시예 39	15
실시예 40	14
비교예 3	45
비교예 4	43
실시예 41	33
실시예 42	34
실시예 43	31
실시예 44	32
실시예 45	27
실시예 46	26
실시예 47	19
실시예 48	21
실시예 49	14
실시예 50	31
카페인산	5

[0093]

[0094]

실험예 4: Triton WR-1339 유도 고지혈증 마우스에서 항고지혈증 활성 측정

[0095]

마우스를 한 군에 6마리로 하여 실험 검체들을 50 mg/kg/일로 5일간 경구투여 하였고, 대조군에는 갈화 추출물의 발효물 대신 생리 식염수를 경구 투여 하였다. 최종 투여 후 16시간동안 절식 시킨 후, triton WR-1339 250 mg/kg를 멸균한 증류수에 녹여 꼬리 정맥에 주사하고, 정상군에는 triton WR-1339 대신 생리 식염수를 주사하여, 18시간이 경과한 후 심장에서부터 채혈하였다. 대조 약물로는 로바스타틴 10 mg/kg/일을 경구투여 하여 비교관찰 하였다.

[0096] [표 4]

갈화 발효 추출물의 급성 고지혈증에 대한 효과

	용량 (mg/kg)	혈중 농도 (mg/L)	
		트리글리세라이드	총콜레스테롤
정상군	-	45±4	78±7
대조군	-	150±9	168±12
비교예 1	50	119±6	147±11
비교예 2	50	118±7	146±9
실시예 29	50	109±5	143±10
실시예 30	50	110±7	146±8
실시예 31	50	88±4	130±11
실시예 32	50	87±7	128±10
실시예 33	50	102±5	140±7
실시예 34	50	106±7	138±8
실시예 35	50	82±11	118±12
실시예 36	50	79±6	117±7
실시예 37	50	90±9	130±13
실시예 38	50	95±4	126±14
실시예 39	50	75±5	95±7
실시예 40	50	69±9	98±8
비교예 3	50	109±11	155±7
비교예 4	50	105±12	157±14
실시예 41	50	110±12	147±11
실시예 42	50	105±10	148±13
실시예 43	50	95±12	141±7
실시예 44	50	90±9	137±10
실시예 45	50	100±14	143±14
실시예 46	50	98±12	142±7
실시예 47	50	89±9	127±8
실시예 48	50	82±12	123±9
실시예 49	50	85±9	98±12
실시예 50	50	105±5	128±7
로바스타틴	10	92±12	115±11

[0097]

[0098] 상기 표 4의 결과에 따르면, 갈화 발효 추출물은 트리글리세라이드 및 총콜레스테롤 농도에 있어서 대조군에 비해 현저히 낮은 농도를 나타내었으며, 로바스타틴을 투여할 경우와 유사하거나 더 우수한 항고지혈 효과를 나타내었다.

[0099] **실험예 5: 고지질식이 유도 비만 마우스에서 항비만 효과 측정**

[0100] 4주령 ICR계 마우스 수컷(18-20g)을 오리엔트사(한국)에서 분양 받아 사육하였으며 사료는 미국 다이어트사에서 구입하여 사용하였다. 온도는 23±2 °C, 습도는 50±5 %에서 사육하였다.

[0101] 하기 표 5의 실험 식이 조성물과 같은 AiN-76 fat-diet 식이를 주문하여 마우스 한 군을 6마리로 하여 5주간 자유롭게 섭취하면서 사육하였다. 각각의 마우스에 상기 실시예에서 제조한 시료를 50 mg/kg/일로 5주간 매일 경구투여 하였고 대조군에는 식염수를 경구투여하였다. 대조약물로는 오를리스타트(Xenical, Roche) 10 mg/kg/일을 경구투여하였다. 검체 약물 최종 투여 후 16시간동안 절식시킨 후에 심장으로부터 채혈하여 TG(triglyceride), TC(total cholesterol), HDL 콜레스테롤, 렙틴(leptin), 그레린(ghrelin), 및 인슐린을 측정하였으며 또한 체중 및 부고환의 지방 무게를 측정하였다.

[0102] [표 5]

실험 식이 조성물(단위: g/kg)

함유성분	정상 식이	고지질식이
카제인	200	200
옥수수 전분	450	200
셀룰로오스	50	50
미네랄 혼합물	35	35
비타민 혼합물	10	10
콜린 바이타르트레이트	2	2
메티오닌	3	3
수크로오스	200	200
우지	-	250
옥수수유	50	50
콜레스테롤	-	-
염화콜린	-	-

[0103]

[0104] 채혈한 혈액은 3000 rpm에서 30분간 원심분리하여 혈청을 분리하였다. 이 혈청을 이용하여 혈청 지질 성분 TG, TC, 및 HDL을 각각의 측정용 키트(아산제약, 한국)를 사용하여 측정하였고, 렙틴, 그레린, 및 인슐린은 ELISA 키트(Cell signaling, 미국)로 측정하였다. 그 결과를 하기 표 6에 나타내었다.

[0105]

[표 6]

갈화 발효 추출물의 비만 치료 효과

군	용량 mg/kg	혈중 농도						체중 (g)
		트리글레세 라이드 (mg/dl)	총콜레스 테롤(mg/d l)	HDL 콜레스테 롤 (mg/dl)	렙틴 (ng/ml)	그레린 (ng/ml)	인슐린 (ng/ml)	
정상군	-	51±6	81±6	38±3	2.1±0.3	0.5±0.1	0.3±0.1	36
고지방식 투여군	-	131±12	183±14	28±2	14.2±0.3	2.8±0.1	2.5±0.2	43
비교예 1	50	118±6	157±14	30±2	8.5±0.2	2.7±0.1	1.8±0.2	41
비교예 2	50	115±5	152±15	29±3	7.9±0.3	2.5±0.1	1.5±0.1	41
실시예 29	50	105±5	139±6	30±4	7.5±0.1	2.5±0.1	1.3±0.3	40
실시예 30	50	104±2	126±8	32±3	7.8±0.1	2.3±0.2	1.2±0.3	38
실시예 31	50	95±4	113±14	32±2	6.5±0.3	2.4±0.1	1.3±0.3	39
실시예 32	50	93±11	118±4	32±4	6.3±0.4	2.5±0.2	1.2±0.2	40
실시예 33	50	104±6	137±5	31±2	6.0±0.2	2.4±0.2	1.2±0.1	39
실시예 34	50	109±5	127±5	30±3	6.3±0.3	2.6±0.1	1.1±0.1	39
실시예 35	50	92±5	109±6	32±4	5.8±0.2	2.5±0.2	1.2±0.1	38
실시예 36	50	90±7	106±8	33±3	5.5±0.1	2.6±0.2	1.0±0.1	38
실시예 37	50	99±4	103±4	33±4	5.3±0.1	2.2±0.1	0.8±0.1	38
실시예 38	50	100±7	108±11	30±2	5.5±0.3	2.3±0.2	1.0±0.3	39
실시예 39	50	85±6	97±5	35±3	4.5±0.1	2.5±0.3	0.8±0.3	37
실시예 40	50	82±7	98±9	34±4	4.8±0.5	2.5±0.2	0.7±0.2	38
비교예 3	50	107±5	139±6	30±3	9.5±0.3	2.3±0.1	1.9±0.1	40
비교예 4	50	109±7	134±4	31±2	10.1±0.2	2.5±0.1	1.8±0.1	41
실시예 41	50	111±9	132±6	31±2	8.5±0.1	2.4±0.1	1.5±0.1	39
실시예 42	50	116±4	133±12	30±4	7.8±0.4	2.5±0.2	1.4±0.0	38

[0106]

실시예 43	50	99±4	111±9	32±2	6.8±0.4	2.3±0.2	1.2±0.1	38
실시예 44	50	97±4	109±12	33±4	6.9±0.3	2.5±0.2	1.2±0.1	38
실시예 45	50	105±6	137±5	30±2	6.8±0.1	2.3±0.2	1.2±0.3	40
실시예 46	50	109±7	127±5	31±3	6.5±0.2	2.4±0.1	1.1±0.1	39
실시예 47	50	92±5	104±6	34±2	5.7±0.2	2.5±0.1	1.0±0.0	38
실시예 48	50	95±7	106±8	33±3	5.8±0.4	2.3±0.1	1.1±0.1	39
실시예 49	50	86±6	100±5	34±3	5.5±0.1	2.5±0.3	1.0±0.3	38
실시예 50	50	104±7	108±9	32±4	6.7±0.5	2.6±0.2	1.4±0.2	40
오를리스 타트 (Xenical)	10	101±8	111±12	34±2	8.8±0.3	2.5±0.3	1.9±0.3	38
로바스타 틴	10	106±10	109±9	33±1	-	-	-	40

[0107]

[0108]

실험예 6: 대장염 치료효과 측정

[0109]

대장염 동물모델은 실험동물인 마우스를 에테르로 가볍게 마취하여 끝이 둥근 1ml 시린지를 항문을 통해 3.5-4cm정도 깊이로 대장 내 투여하였다. 투여 물질은 2,4,6-트리니트로벤젠 술폰산(TNBS) 2.5mg/50% 에탄올을 100 μ l를 천천히 투여한 후 대장 내에 잘 퍼질 수 있도록 수직으로 30-60초간 유지시켜 주었다. 실험은 한 군을 10 마리로 하였다. 그리고 3일 후 실험동물을 해부하여 대장염 지표들을 측정하였다. 실험 검체는 모델 동물을 제 작하기 3일전부터 매일 1회씩 실험이 끝날 때까지 50 mg/kg으로 경구 투여하였다. 양성 대조약물로는 설파살라 진(sulfasalazine)을 사용하였다.

[0110]

사망률 측정은 실험기간동안 사망한 동물의 비율을 사망률(%)로 나타냈다.

[0111]

대장 길이는 맹장 끝에서부터 항문까지를 잘라내 측정하였다.

[0112]

염증지표인 MPO(Myeloperoxidase) 활성 측정은 먼저 대장을 잘 갈아 계면활성제인 차가운 0.5% 헥사데실트리메 틸암모늄 브로마이드(hexadecyltrimethylammonium bromide)를 50 mM 인산 완충액(pH 6.0) 1 ml에 현탁한 것을 가하여 초음파 처리하여 녹이고 얼리는 과정을 3회 실시한 후 원심 분리하여 상층액을 효소액으로 사용하였다. 효소액 100 μ l에 o-디아니시딘(0.129mg/ml) 398 μ l를 가한 후 H₂O₂를 최종농도 0.0005% 되게 가하여 25℃, 492nm 에서 시간의 경과에 따라 변화된 흡광도로부터 활성을 나타냈다. MPO 활성 1 유닛(unit)은 25℃에서 과산화수 소 1mmole/분을 분해하는 것을 뜻한다. 단백질량은 소혈청알부민을 표준(standard)으로 하여 브래드포드법 (Bradford method)으로 측정하였다.

[0113]

염증성 사이토카인의 측정은 대장 조직의 분쇄물을 차가운 용해 완충액(lysis buffer) (0.5% Nonidet P40, 0.5% Triton X100, 10% glycerol, 50mM TRIS(pH 7.5), 5mM EDTA, 0.1M NaCl, 10mM K₂HPO₄, 0.5% deoxycholic acid, 20mM NaF, 0.1mM PMSF, 20mM glycerol-2-phosphate, 1mM Na₃VO₄ 및 프로테아제 억제제 콕테일) 1 ml을 넣어 균질화하고 14,000 rpm에서 15분간 원심분리한 후 상등액에 대해 Endogen Elisa kit (U.S.A.)를 사용하여 측정하였다.

[0114] [표 7]

갈화 발효 추출물의 대장염 치료 효과

군	용량(mg/kg)	사망율	대장길이	장관막 MPO 활성	장관막 IL-1 β
정상군(생리식염수)	-	0	8.5	0.23	0.49
실험군(TNBS)	-	30	6.3	1.62	2.1
비교예 1	50	10	6.5	0.79	0.94
비교예 2	50	20	6.6	0.80	0.95
실시예 29	50	10	6.5	0.71	0.90
실시예 30	50	10	6.6	0.75	0.92
실시예 31	50	0	6.8	0.63	0.85
실시예 32	50	0	6.8	0.62	0.84
실시예 33	50	10	6.7	0.65	0.88
실시예 34	50	10	6.6	0.67	0.87
실시예 35	50	0	7.0	0.51	0.69
실시예 36	50	0	7.1	0.54	0.70
실시예 37	50	0	6.9	0.59	0.75
실시예 38	50	0	7.0	0.60	0.80
실시예 39	50	0	7.3	0.43	0.62
실시예 40	50	0	7.4	0.42	0.63
비교예 3	50	10	6.5	0.80	0.95
비교예 4	50	10	6.6	0.82	0.97
실시예 41	50	20	6.7	0.73	0.90
실시예 42	50	10	6.8	0.72	0.91
실시예 43	50	0	6.9	0.68	0.79
실시예 44	50	0	7.0	0.69	0.80
실시예 45	50	0	6.7	0.71	0.85
실시예 46	50	0	6.8	0.70	0.84
실시예 47	50	0	7.1	0.58	0.85
실시예 48	50	0	7.2	0.56	0.74
실시예 49	50	0	7.1	0.85	0.93
실시예 50	50	10	6.5	0.11	1.12
절과살라진	50	20	7.0	0.95	0.88

[0115]