



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2022년07월14일

(11) 등록번호 10-2421111

(24) 등록일자 2022년07월11일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A23L 33/10 (2022.01) A23L 33/105 (2016.01)

(52) CPC특허분류

A23L 33/10 (2022.01)

A23L 33/105 (2016.08)

(21) 출원번호 10-2021-0090504

(22) 출원일자 2021년07월09일

심사청구일자 2021년07월09일

(56) 선행기술조사문헌

JP2008088187 A*

Sut S., et al. J Sci Food Agric

99:1046~1054(2018.10.04.)*

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자

주식회사 비엔지

강원도 춘천시 소양강로 32 ,BI01동313호(후평동, 바이오타운)

(72) 발명자

황명오

경기도 안양시 동안구 별말로102번길 42, 402호(관양동)

(74) 대리인

유미특허법인

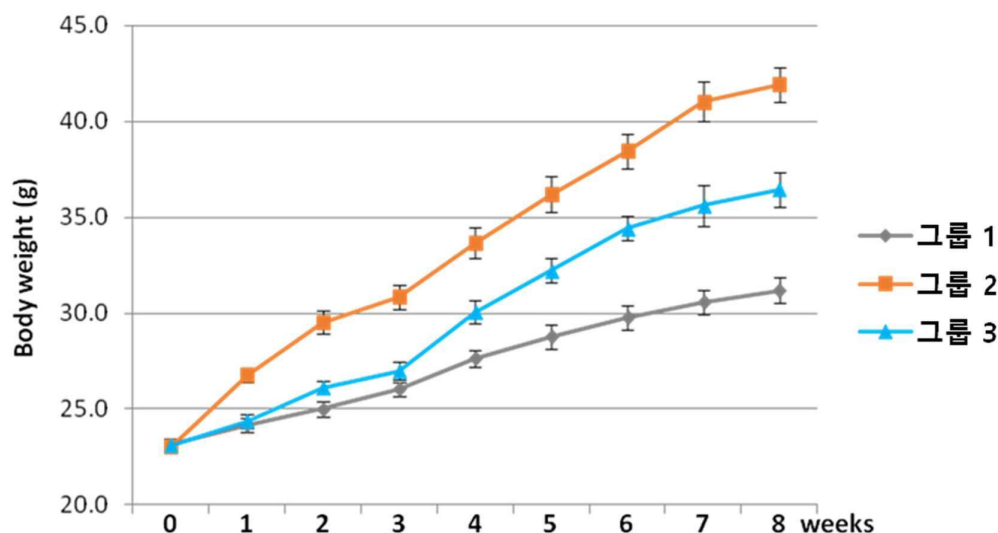
전체 청구항 수 : 총 8 항

심사관 : 장은경

(54) 발명의 명칭 마르멜로 추출물을 포함하는 체중 또는 체지방 감소용 식품 조성물

(57) 요약

마르멜로 (marmelo) 추출물을 유효성분으로 포함하고, 체중 및/또는 체지방 감소, 혈당 강하, 혈중 콜레스테롤 강하 등의 관련 질환을 예방, 개선 및/또는 치료에 사용할 수 있는 치료용 및/또는 식품 조성물 및 이의 제조방법에 관한 것이다.

대표도 - 도2

(52) CPC특허분류

A23V 2002/00 (2013.01)
A23V 2200/3262 (2013.01)
A23V 2200/328 (2013.01)
A23V 2200/332 (2013.01)
A23V 2250/028 (2013.01)
A23V 2300/14 (2013.01)
A23V 2300/24 (2013.01)
A23V 2300/31 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

마르멜로 (marmelo) 추출물을 포함하는, 체중 또는 체지방 감소용 식품 조성물로,

상기 마르멜로는 마르멜로 열매이고,

상기 추출물은 마르멜로 압착 후 마르멜로 주스를 제거하고 남은 고형물 형태의 마르멜로를 추출 용매로 추출하여 제조한 것이고,

상기 추출 용매는 30 내지 50 (v/v)%의 에탄올이고,

상기 추출은 65 내지 80℃에서 에탄올을 4 내지 6 부피배로 가하여, 5 내지 6시간동안 추출하는 것인, 식품 조성물.

청구항 2

삭제

청구항 3

삭제

청구항 4

삭제

청구항 5

삭제

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 추출물은 10 내지 100 brix의 당도를 가지는 것인, 체중 또는 체지방 감소용 식품 조성물.

청구항 7

제1항에 있어서, 상기 식품은 건강기능식품인, 체중 또는 체지방 감소용 식품 조성물.

청구항 8

제1항에 있어서, 상기 식품은 비만 예방 또는 개선효과가 있는, 체중 또는 체지방 감소용 식품 조성물.

청구항 9

마르멜로 (marmelo) 추출물을 포함하는, 비만 예방 또는 개선용 식품 조성물로,

상기 마르멜로는 마르멜로 열매이고,

상기 추출물은 마르멜로 압착 후 마르멜로 주스를 제거하고 남은 고형물 형태의 마르멜로를 추출 용매로 추출하여 제조한 것이고,

상기 추출 용매는 30 내지 50 (v/v)%의 에탄올이고,

상기 추출은 65 내지 80℃에서 에탄올을 4 내지 6 부피배로 가하여, 5 내지 6시간동안 추출하는 것인, 식품 조성물.

청구항 10

삭제

청구항 11

삭제

청구항 12

삭제

청구항 13

삭제

청구항 14

제9항에 있어서, 상기 추출물은 10 내지 100 brix의 당도를 가지는 것인, 비만 예방 또는 개선용 식품 조성물.

청구항 15

제9항에 있어서, 상기 식품은 건강기능식품인, 비만 예방 또는 개선용 식품 조성물.

청구항 16

제9항에 있어서, 상기 식품은 체중 또는 체지방 감소 효과가 있는, 비만 예방 또는 개선용 식품 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 마르멜로 (marmelo) 추출물을 유효성분으로 포함하는 체중 및/또는 체지방 감소용 조성물, 혈당 강하용 조성물, 혈중 콜레스테롤 강하용 조성물 및/또는 비만 및/또는 대사성 질환의 예방, 개선, 및/또는 치료용 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 인스턴트 음식물의 잦은 섭취와 육식 위주의 식생활에 의하여 체내에 과다한 에너지 축적 유발 및 운동부족으로 인한 에너지 소모의 감소 등의 이유로 비만 인구의 빠른 증가를 보이고 있다.

[0003] 이처럼, 체내에 과다하게 축적된 에너지는 비만뿐 아니라 다양한 질병 형태로 나타나는데, 비만, 당뇨병, 고지혈증, 대사증후군 (Metabolic syndrome) 등과 같은 질병을 포함한 대사성 질환이 대표적이다.

[0004] 클로로겐산 (chlorogenic acid)은 인간의 식단에서 가장 많이 섭취되는 페놀 화합물 중 하나로 클로로겐산의 생리 활성에 대한 다양한 연구가 진행되었으며, 이러한 연구결과들에 의해 클로로겐산의 항산화, 항염증, 항당뇨, 항비만과 같은 다양한 생리 활성이 확인되었다.

[0005] 지금까지 개발된 항비만제 및 대사성 질환의 치료제는 교감신경 또는 호르몬에 작용하여 부작용을 발생시키나, 부작용이 적은 생약 성분의 경우 그 효과가 미미하다는 문제가 있다.

[0006] 이에, 부작용이 적으면서 효과가 우수한 약물의 개발이 요구된다.

선행기술문헌

특허문헌

[0007] (특허문헌 0001) 대한민국 특허공개 제10-2015-0057119호 (2015.05.28)

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0008] 상기와 같은 배경하에서, 본 발명자들은 클로로겐산의 항비만 효과에 대한 연구를 거듭하였다. 그 결과, 마르멜로 추출물 내 클로로겐산의 함유를 확인하였고, 클로로겐산을 포함하는 마르멜로 추출물의 체중 증가 억제, 지질대사 개선, 비만 관련 호르몬 수치 개선, 혈당 감소, 혈중 콜레스테롤 감소 등을 확인하여, 본 발명을 완성하였다.
- [0009] 일 예는 마르멜로 (marmelo) 추출물을 유효성분으로 포함하는 체중 및/또는 체지방 감소용 조성물을 제공한다.
- [0010] 다른 예는 마르멜로 추출물을 유효성분으로 포함하는 혈당 강하용 조성물을 제공한다.
- [0011] 다른 예는 마르멜로 추출물을 유효성분으로 포함하는 혈중 콜레스테롤 강하용 조성물을 제공한다.
- [0012] 다른 예는 마르멜로 추출물을 유효성분으로 포함하는 비만의 예방, 개선, 및/또는 치료용 조성물을 제공한다.
- [0013] 다른 예는 마르멜로 추출물을 유효성분으로 포함하는 대사성 질환의 예방, 개선, 및/또는 치료용 조성물을 제공한다.
- [0014] 상기 조성물은 약학적 조성물 또는 식품 조성물 (예컨대, 건강기능식품)일 수 있다.
- [0015] 다른 예는 마르멜로 추출물의 약학적 유효량을 체중 및/또는 체지방 감소를 필요로 하는 대상에게 투여하는 단계를 포함하는 체중 감소 방법을 제공한다.
- [0016] 다른 예는 마르멜로 추출물의 약학적 유효량을 혈당 강하를 필요로 하는 대상에게 투여하는 단계를 포함하는 혈당 강하 방법을 제공한다.
- [0017] 다른 예는 마르멜로 추출물의 약학적 유효량을 혈중 콜레스테롤 강하를 필요로 하는 대상에게 투여하는 단계를 포함하는 혈중 콜레스테롤 강하 방법을 제공한다.
- [0018] 다른 예는 마르멜로 추출물을 비만의 예방, 개선, 및/또는 치료를 필요로 하는 대상에게 투여하는 단계를 포함하는, 비만의 예방, 개선, 및/또는 치료 방법을 제공한다.
- [0019] 다른 예는 마르멜로 추출물을 대사성 질환의 예방, 개선, 및/또는 치료를 필요로 하는 대상에게 투여하는 단계를 포함하는, 대사성 질환의 예방, 개선, 및/또는 치료 방법을 제공한다.

과제의 해결 수단

- [0020] 본 명세서에서는 고지방식이와 함께 투여한 마르멜로 추출물이 고지방식이에 의해 유도된 체중 및/또는 체지방 및 지방조직 무게, 혈당, 혈중 콜레스테롤, 혈중 insulin과 leptin 함량 증가를 효과적으로 억제하고, 지방세포의 크기 증가를 억제함을 확인하여, 마르멜로 추출물의 항비만, 체중 및/또는 체지방 감소, 혈당 감소, 혈중 콜레스테롤 감소, 대사성 질환의 예방, 개선, 및/또는 치료 용도를 제공한다.
- [0021] 이에, 일 예는 마르멜로 (marmelo) 추출물을 유효성분으로 포함하는 체중 및/또는 체지방 감소용 조성물을 제공한다.
- [0022] 다른 예는 마르멜로 추출물을 유효성분으로 포함하는 혈당 강하용 조성물을 제공한다.
- [0023] 다른 예는 마르멜로 추출물을 유효성분으로 포함하는 혈중 콜레스테롤 강하용 조성물을 제공한다.
- [0024] 다른 예는 마르멜로 추출물을 유효성분으로 포함하는 비만의 예방, 개선, 및/또는 치료용 조성물을 제공한다.
- [0025] 다른 예는 마르멜로 추출물을 유효성분으로 포함하는 대사성 질환의 예방, 개선, 및/또는 치료용 조성물을 제공한다.
- [0026] 상기 조성물은 약학적 조성물 또는 식품 조성물 (예컨대, 건강기능식품)일 수 있다.
- [0027] 다른 예는 마르멜로 추출물의 약학적 유효량을 체중 감소를 필요로 하는 대상에게 투여하는 단계를 포함하는 체중 및/또는 체지방 감소 방법을 제공한다.
- [0028] 다른 예는 마르멜로 추출물의 약학적 유효량을 혈당 강하를 필요로 하는 대상에게 투여하는 단계를 포함하는 혈당 강하 방법을 제공한다.
- [0029] 다른 예는 마르멜로 추출물의 약학적 유효량을 혈중 콜레스테롤 강하를 필요로 하는 대상에게 투여하는 단계를 포함하는 혈중 콜레스테롤 강하 방법을 제공한다.
- [0030] 다른 예는 마르멜로 추출물을 비만의 예방, 개선, 및/또는 치료를 필요로 하는 대상에게 투여하는 단계를 포함

하는, 비만의 예방, 개선, 및/또는 치료 방법을 제공한다. 다른 예는 마르멜로 추출물을 대사성 질환의 예방, 개선, 및/또는 치료를 필요로 하는 대상에게 투여하는 단계를 포함하는, 대사성 질환의 예방, 개선, 및/또는 치료 방법을 제공한다.

[0032] 이하, 본 출원을 보다 상세히 설명한다.

[0034] 마르멜로 추출물

[0035] 본 명세서에서, 체중 및/또는 체지방 감소, 혈당 감소, 혈중 콜레스테롤 감소, 비만 및/또는 대사성 질환의 예방, 개선, 및/또는 치료를 위한 유효성분으로서 마르멜로 추출물이 제공된다.

[0036] 마르멜로 (Marmelo; *Cydonia oblonga*)는 장미과의 과일나무로서, 퀸스 (quince), 아이바 (Aiva) 또는 유럽모과라고도 불리며, 모과와 사과의 열매를 닮은 생김새를 갖지만 이들과 구별된다.

[0037] 마르멜로 추출물은 마르멜로의 전부 또는 일부 (예컨대, 열매, 종자, 과육, 껍질, 잎, 줄기, 뿌리 등으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상)를 생약 그대로 또는 건조 및/또는 가열된 상태로 추출 용매를 이용하여 추출한 용매 추출물일 수 있다.

[0038] 상기 마르멜로 추출물은 마르멜로 압착 후 마르멜로 주스를 제거하고 남은 고형물 형태의 마르멜로를 추출 용매로 추출하여 제조될 수 있고, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0039] 본 명세서에서 “마르멜로 주스”는 마르멜로 열매를 압착하여 발생하는 즙 형태의 액체를 의미한다.

[0040] 상기 추출 용매는 물 및 탄소수 1 내지 4의 직쇄 또는 분쇄 알코올 (예컨대, 에탄올, 발효주정)로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상일 수 있다. 일 구체예에서, 상기 추출 용매는 물, 및 탄소수 1 내지 4의 직쇄 또는 분쇄 알코올 수용액 (예컨대, 에탄올 수용액, 발효주정)으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상일 수 있으며, 상기 탄소수 1 내지 4의 직쇄 또는 분쇄 알코올 수용액은, 예컨대, 10 내지 70 (v/v)%, 15 내지 70 (v/v)%, 20 내지 70 (v/v)%, 25 내지 70 (v/v)%, 30 내지 70 (v/v)%, 10 내지 65 (v/v)%, 15 내지 65 (v/v)%, 20 내지 65 (v/v)%, 25 내지 65 (v/v)%, 30 내지 65 (v/v)%, 10 내지 60 (v/v)%, 15 내지 60 (v/v)%, 20 내지 60 (v/v)%, 25 내지 60 (v/v)%, 30 내지 60 (v/v)%, 10 내지 55 (v/v)%, 15 내지 55 (v/v)%, 20 내지 55 (v/v)%, 25 내지 55 (v/v)%, 30 내지 55 (v/v)%, 10 내지 50 (v/v)%, 15 내지 50 (v/v)%, 20 내지 50 (v/v)%, 25 내지 50 (v/v)% 또는 30 내지 50 (v/v)%의 탄소수 1 내지 4의 직쇄 또는 분쇄 알코올 (예컨대, 에탄올, 주정, 발효주정)일 수 있다.

[0041] 상기 추출에 사용되는 추출용매의 양은, 마르멜로의 1 내지 10 부피배, 2 내지 10 부피배, 3 내지 10 부피배, 4 내지 10 부피배, 1 내지 9 부피배, 2 내지 9 부피배, 3 내지 9 부피배, 4 내지 9 부피배, 1 내지 8 부피배, 2 내지 8 부피배, 3 내지 8 부피배, 4 내지 8 부피배, 1 내지 7 부피배, 2 내지 7 부피배, 3 내지 7 부피배, 4 내지 7 부피배, 1 내지 6 부피배, 2 내지 6 부피배, 3 내지 6 부피배 또는 4 내지 6 부피배일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0042] 추출 시간은, 이에 한정되지 않지만, 유효성분의 충분한 추출을 위하여, 1 내지 24시간, 1 내지 12시간, 1 내지 6시간, 1 내지 5시간, 3 내지 24시간, 3 내지 12시간, 3 내지 6시간, 3 내지 5시간, 5 내지 24시간, 5 내지 12시간 또는 5 내지 6시간으로 할 수 있다. 추출 온도는, 이에 한정되지 않지만, 유효성분의 효과적인 추출을 위하여, 실온 내지 추출용매의 끓는점까지 중에서 선택된 온도 범위, 예컨대, 50 내지 100℃, 55 내지 100℃, 60 내지 100℃, 65 내지 100℃, 50 내지 95℃, 55 내지 95℃, 60 내지 95℃, 65 내지 95℃, 50 내지 90℃, 55 내지 90℃, 60 내지 90℃, 65 내지 90℃, 50 내지 85℃, 55 내지 85℃, 60 내지 85℃, 65 내지 85℃, 50 내지 80℃, 55 내지 80℃, 60 내지 80℃ 또는 65 내지 80℃로 할 수 있다.

[0043] 상기 추출물을 얻기 위한 추출방법은 본 발명이 속하는 기술분야의 통상적으로 사용되는 모든 공지된 추출방법 중에서 선택된 것일 수 있다. 예를 들어, 환류추출법, 침지추출법, 가열 추출법, 냉침법, 열수 추출법, 초음파 추출법, 여과법, 가압추출법, 초임계 추출법, 전기적 추출법 등 통상적으로 사용되는 추출법을 사용할 수 있다.

[0044] 상기 추출은 1회 수행되거나, 동일 또는 상이한 추출 용매 및/또는 조건으로 2회 이상 (예컨대, 2회, 3회, 4회, 또는 5회) 수행될 수 있다. 상기 추출이 2회 이상 진행되는 경우, 각 회에서 사용된 추출 용매, 각 회당 추출 시간, 온도 등의 추출 조건은 앞서 설명한 범위에서 동일하거나 상이하게 조절할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0045] 일 구체예에서, 상기 추출물은 10 내지 100 brix, 20 내지 100 brix, 30 내지 100 brix, 40 내지 100 brix, 50

내지 100 brix, 60 내지 100 brix, 70 내지 100 brix, 80 내지 100 brix, 90 내지 100 brix, 10 내지 90 brix, 20 내지 90 brix, 30 내지 90 brix, 40 내지 90 brix, 50 내지 90 brix, 60 내지 90 brix, 70 내지 90 brix, 80 내지 90 brix, 10 내지 80 brix, 20 내지 80 brix, 30 내지 80 brix, 40 내지 80 brix, 50 내지 80 brix, 60 내지 80 brix, 70 내지 80 brix, 10 내지 70 brix, 20 내지 70 brix, 30 내지 70 brix, 40 내지 70 brix, 50 내지 70 brix 또는 60 내지 70 brix의 당도를 가질 수 있고, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0046] 본 명세서에서, 상기 마르멜로 추출물은 앞서 설명한 용매 추출물뿐 아니라, 상기 용매 추출물을 통상적인 방법으로 농축 (예컨대, 감압농축, 진공농축 등), 건조 (예컨대, 분무건조, 동결건조 등), 및/또는 분쇄 (분말화)한 농축물, 건조물, 및/또는 분쇄물을 포함할 수 있다.

[0047] 본 명세서에서 유효성분으로 제공되는 마르멜로 추출물은, HPLC로 측정된 클로로젠산 (Chlorogenic acid) 함량이, 추출물 총 중량 (예컨대, 농축물 중량) 기준으로, 0.2mg/g 이상, 0.3mg/g 이상, 0.4mg/g 이상, 0.5mg/g 이상, 0.6mg/g 이상 또는 0.7mg/g 이상, 예를 들어, 0.2 내지 2 mg/g, 0.3 내지 2 mg/g, 0.4 내지 2 mg/g, 0.5 내지 2 mg/g, 0.6 내지 2 mg/g, 0.7 내지 2 mg/g, 0.8 내지 2 mg/g, 0.2 내지 1.5 mg/g, 0.3 내지 1.5 mg/g, 0.4 내지 1.5 mg/g, 0.5 내지 1.5 mg/g, 0.6 내지 1.5 mg/g, 0.7 내지 1.5 mg/g, 0.2 내지 1.2 mg/g, 0.3 내지 1.2 mg/g, 0.4 내지 1.2 mg/g, 0.5 내지 1.2 mg/g, 0.6 내지 1.2 mg/g, 0.7 내지 1.2 mg/g, 0.2 내지 1.0 mg/g, 0.3 내지 1.0 mg/g, 0.4 내지 1.0 mg/g, 0.5 내지 1.0 mg/g, 0.6 내지 1.0 mg/g, 0.7 내지 1.0 mg/g, 0.2 내지 0.8 mg/g, 0.3 내지 0.8 mg/g, 0.4 내지 0.8 mg/g, 0.5 내지 0.8 mg/g, 0.6 내지 0.8 mg/g 또는 0.7 내지 0.8 mg/g 일 수 있다.

[0049] 의약 용도

[0050] 일 예는 마르멜로 (marmelo) 추출물을 유효성분으로 포함하는 체중 및/또는 체지방 감소용 약학적 조성물을 제공한다.

[0051] 다른 예는 마르멜로 추출물을 유효성분으로 포함하는 혈당 강하용 약학적 조성물을 제공한다.

[0052] 다른 예는 마르멜로 추출물을 유효성분으로 포함하는 혈중 콜레스테롤 강하용 약학적 조성물을 제공한다.

[0053] 다른 예는 마르멜로 추출물을 유효성분으로 포함하는 비만의 예방, 개선, 및/또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0054] 다른 예는 마르멜로 추출물을 유효성분으로 포함하는 대사성 질환의 예방, 개선, 및/또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0055] 다른 예는 마르멜로 추출물의 약학적 유효량을 체중 및/또는 체지방 감소를 필요로 하는 대상에게 투여하는 단계를 포함하는 체중 감소 방법을 제공한다.

[0056] 다른 예는 마르멜로 추출물의 약학적 유효량을 혈당 강하를 필요로 하는 대상에게 투여하는 단계를 포함하는 혈당 강하 방법을 제공한다.

[0057] 다른 예는 마르멜로 추출물의 약학적 유효량을 혈중 콜레스테롤 강하를 필요로 하는 대상에게 투여하는 단계를 포함하는 혈중 콜레스테롤 강하 방법을 제공한다.

[0058] 다른 예는 마르멜로 추출물의 약학적 유효량을 비만의 예방, 개선, 및/또는 치료를 필요로 하는 대상에게 투여하는 단계를 포함하는, 비만의 예방, 개선, 및/또는 치료 방법을 제공한다.

[0059] 다른 예는 마르멜로 추출물의 약학적 유효량을 대사성 질환의 예방, 개선, 및/또는 치료를 필요로 하는 대상에게 투여하는 단계를 포함하는, 대사성 질환의 예방, 개선, 및/또는 치료 방법을 제공한다.

[0060] 상기 마르멜로 추출물의 약학적 유효량을 (1) 체중 및/또는 체지방 감소, (2) 혈당 강하, (3) 혈중 콜레스테롤 강하 및/또는 (4) 비만 및/또는 대사성 질환의 예방, 개선, 및/또는 치료를 필요로 하는 대상에게 투여하는 단계는 상기 마르멜로 추출물의 함량이 투여하는 대상의 체중 기준으로 1 내지 400 mg/kg (body weight; BW), 50 내지 400 mg/kg, 100 내지 400 mg/kg, 150 내지 400 mg/kg, 200 내지 400 mg/kg, 1 내지 300 mg/kg (body weight; BW), 50 내지 300 mg/kg, 100 내지 300 mg/kg, 150 내지 300 mg/kg, 200 내지 300 mg/kg, 1 내지 200 mg/kg (body weight; BW), 50 내지 200 mg/kg, 100 내지 200 mg/kg, 150 내지 200 mg/kg이 되도록 투여할 수 있고, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0061] 상기 마르멜로 추출물의 약학적 유효량을 (1) 체중 및/또는 체지방 감소, (2) 혈당 강하, (3) 혈중 콜레스테롤

강하 및/또는 (4) 비만 및/또는 대사성 질환의 예방, 개선, 및/또는 치료를 필요로 하는 대상에게 투여하는 단계에서 상기 대상이 인간인 경우, 인체전환계수 (0.08)를 적용하여 계산하여 투여량을 결정할 수 있다. 이에 따라, 상기 비만 및/또는 대사성 질환의 예방, 개선, 및/또는 치료를 필요로 하는 인간에게 투여하는 단계는 상기 마르멜로 추출물의 함량이 투여하는 인간의 체중 60kg을 기준으로, 0.0048 내지 1.92 g/일, 0.24 내지 1.92 g/일, 0.48 내지 1.92 g/일, 0.72 내지 1.92 g/일, 0.96 내지 1.92 g/일, 0.0048 내지 1.44 g/일, 0.24 내지 1.44 g/일, 0.48 내지 1.44 g/일, 0.72 내지 1.44 g/일, 0.96 내지 1.44 g/일, 0.0048 내지 0.96 g/일, 0.24 내지 0.96 g/일, 0.48 내지 0.96 g/일 또는 0.72 내지 0.96 g/일이 되도록 투여할 수 있고, 이에 제한되는 것은 아니다.

- [0062] 상기 마르멜로 추출물은 앞서 설명한 바와 같다.
- [0063] 상기 혈당 강하는 혈액 내 포도당 농도의 감소, 혈중 인슐린 함량 감소, 인슐린 저항성의 감소 및/또는 인슐린 민감성의 증가를 포함하는 개념을 의미한다. 인슐린 저항성은 하기 실시예 6.3의 수학적 2, 인슐린 민감성은 하기 실시예 6.3의 수학적 3으로 계산할 수 있다.
- [0064] 상기 혈중 콜레스테롤 강하는 혈액 내 총 콜레스테롤 함량 또는 LDL (저밀도지단백; low-density lipoprotein) 콜레스테롤 함량의 감소를 의미한다.
- [0065] 상기 비만은 체지방이 비정상적으로 많은 상태를 총괄하는 것으로, 많은 양의 칼로리를 섭취했지만 이를 소비하지 않아 체내에 지방이란 형태로 저장을 하고 있는 상태를 의미한다.
- [0066] 일 예에서, 비만은 체질량지수 (BMI; 체중을 신장의 제곱으로 나눈 값; kg/m^2)가 약 25kg/m^2 이상인 상태를 의미할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0067] 상기 대사성 질환은 호르몬 또는 대사에 관여하는 체내 기관의 장애 또는 기능 이상에 의하여 대사 물질이 전신 또는 체내 특정 기관에 축적되면서 각 기관에 이상을 일으키는 질병을 총칭하는 것일 수 있다.
- [0068] 일 예에서, 상기 대사성 질환은 혈액, 또는 이들 모두에서의 포도당, 콜레스테롤, 중성지방으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 축적에 의하여 유발되는 질병일 수 있다. 예를 들어, 상기 대사성 질환은 당뇨병, 고지혈증, 동맥경화, 고인슐린혈증 또는 대사증후군일 수 있다.
- [0069] 당뇨병은 유전적 또는 환경적 요인으로 발병되는 전신적 대사질환의 일종으로, 체내에 인슐린의 절대적 또는 상대적으로 부족으로 인하여 야기되는 질병으로 혈중의 당 농도가 비정상적으로 높아진 상태를 말한다. 본 명세서에서, 당뇨병은 제1형 당뇨병, 제2형 당뇨병, 및 임심성 당뇨병을 모두 포괄할 수 있으며, 특히 인슐린 저항성과 관련된 제2형 당뇨병일 수 있다.
- [0070] 고지혈증은 필요 이상의 지방성분 물질이 혈액에 존재하거나 이로 인하여 염증을 일으키는 상태를 의미할 수 있다. 예컨대, 공복시 혈청 콜레스테롤이 220 mg/dl 이상이거나 중성지방이 150 mg/dl 이상인 경우 고지혈증으로 진단할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 고지혈증은 고콜레스테롤혈증, 고중성지방혈증, 또는 이들 모두를 의미할 수 있다.
- [0071] 동맥경화는 동맥에 혈전이 생기는 등의 이유로 동맥의 혈관이 좁아지는 질병을 총칭하는 것으로, 본 명세서에서는 혈중 높은 콜레스테롤 및/또는 중성지방 함량과 관련된 것일 수 있다.
- [0072] 고인슐린혈증은 혈중 인슐린 수치가 높은 상태를 의미하고, 랑게르한스섬의 증식 (선종, 비대)에 의해 발생하는 기질적 고인슐린혈증, 랑게르한스섬 선종 등이 없이 자율신경, 소화기관의 기능장애에 의해 발생하는 기능적 고인슐린혈증으로 나뉠 수 있다.
- [0073] 대사증후군 (Metabolic syndrome)이란 고지혈증, 고혈압, 당대사 이상, 비만과 같은 위험인자가 함께 나타나는 증후군을 지칭한다. 대사증후군은 인슐린 저항성이 원인인 것으로 추정되는 질환으로 콜레스테롤, 혈압, 혈당치 중 2개 이상의 수치에 이상이 생기는 증상을 의미할 수 있다.
- [0074] 본 명세서에서, '치료'는 질병 상태 또는 증상의 개선, 경감 또는 안정화, 부분적 또는 완전한 회복, 생존의 연장, 질환 범위의 감소, 질병 진행의 지연 또는 완화, 기타 다른 이로인 치료 결과 등을 모두 포함하는 의미로 사용된다. '예방'은 특정 질병을 갖지 않는 대상에게 작용하여 상기 특정 질병이 발병하지 않도록 하거나, 그 발병 시기를 늦추거나, 발병 빈도를 낮추는 모든 기작 및/또는 효과를 포함하는 의미로 사용된다.
- [0075] 본 명세서에서 제공되는 약학적 조성물 내의 유효성분으로 사용된 마르멜로 추출물의 함량은 사용 형태 및 목적, 사용 대상의 상태, 증상의 종류 및 경중 등에 의하여 적절하게 조절할 수 있으며, 고형분 (추출물에서 용

매를 제거한 고형성분) 중량 기준으로 0.001 내지 99.9 중량%, 0.001 내지 90 중량%, 0.001 내지 75 중량%, 0.001 내지 50 중량%, 0.01 내지 99.9 중량%, 0.01 내지 90 중량%, 0.01 내지 75 중량%, 0.01 내지 50 중량%, 0.1 내지 99.9 중량%, 0.1 내지 90 중량%, 0.1 내지 75 중량%, 0.1 내지 50 중량%, 1 내지 99.9 중량%, 1 내지 90 중량%, 1 내지 75 중량%, 1 내지 50 중량%, 5 내지 99.9 중량%, 5 내지 90 중량%, 5 내지 75 중량%, 5 내지 50 중량%, 10 내지 99.9 중량%, 10 내지 90 중량%, 10 내지 75 중량%, 또는 10 내지 50 중량% 일 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.

[0076] 상기 약학적 조성물 또는 유효성분인 마르멜로 추출물은 인간, 원숭이 등의 영장류, 마우스, 래트, 토끼 등의 설치류, 이외의 개, 고양이, 소, 돼지, 양, 말, 염소 등을 포함하는 포유류, 닭, 오리, 거위 등을 포함하는 조류, 뱀, 도마뱀, 거북, 악어 등을 포함하는 파충류, 양서류, 및 어류 등의 척추동물에서 선택된 투여 대상에 다양한 경로로 투여될 수 있다. 상기 약학적 조성물의 투여 방식은 통상적으로 사용되는 모든 방식일 수 있으며, 예컨대, 경구 투여, 또는 정맥, 근육, 피하, 또는 복강 주사 등의 비경구 투여의 경로로 투여될 수 있다. 일 예에서, 상기 약학적 조성물은 경구 투여를 위한 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0077] 상기 약학적 조성물은 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 또는 멸균 주사용액의 형태의 비경구 제형 등으로 제형화하여 사용될 수 있다.

[0078] 상기 약학적 조성물은 앞서 설명한 유효성분 이외에도, 일반적으로 투여방식과 표준 약제학적 관행 (Standard pharmaceutical practice)을 고려하여 선택된 약제학적 및/또는 생리학적으로 허용되는 담체, 부형제, 및 희석제 등으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상의 보조제와 혼합되어 투여될 수 있다. 예컨대, 상기 약제학적 및/또는 생리학적으로 허용되는 담체는 락토즈, 텍스트로즈, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로스, 메틸셀룰로스, 미정질 셀룰로스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유 등으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상을 포함하는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니며, 약제학 분야에서 통상적으로 사용되는 모든 담체일 수 있다.

[0079] 상기 약제학적 및/또는 생리학적으로 허용되는 희석제 및/또는 부형제는 약학적 조성물의 적절한 제제화에 통상적으로 사용되는 모든 충전제, 증량제, 결합제, 습윤제, 봉해제, 윤활제, 계면활성제 등으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상일 수 있다.

[0080] 예컨대, 정제, 환제, 산제, 과립제, 또는 캡슐제 등의 경구투여를 위한 고형 제제의 경우, 상기 부형제는 이러한 고형 제제의 제제화를 위한 적어도 1종 이상의 물질, 예컨대, 전분, 칼슘카보네이트 (Calcium carbonate), 수크로스 (Sucrose), 락토오스 (Lactose), 젤라틴 등으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상일 수 있다. 이외에도, 마그네슘 스테아레이트 탈크 등과 같은 윤활제들도 사용될 수 있다. 또한, 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등의 경구투여를 위한 액상제제의 제제화의 경우, 통상적으로 사용되는 단순희석제인 물, 리퀴드 파라핀 등으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상이 사용될 수 있고, 이외에, 통상적으로 사용되는 여러 가지 부형제, 예를 들면, 습윤제, 감미제, 방향제, 및/또는 보존제 등이 포함될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0081] 예컨대, 상기 약학적 조성물은 전분 또는 락토오스를 함유하는 정제 형태로, 또는 적절한 부형제를 함유하는 캡슐 형태로, 또는 맛을 내거나 색을 띄게 하는 화학 약품을 함유하는 엘릭시르 또는 현탁제 형태로 경구, 구강내 또는 혀 밑 투여될 수 있다. 이러한 액체 제제는 현탁제 (예를 들면, 메틸셀룰로오스, 위텟솔 (Witepsol)과 같은 반합성 글리세라이드 또는 행인유 (Apricot kernel oil)와 PEG-6 에스테르의 혼합물 또는 PEG-8과 카프릴릭/카프릭 글리세라이드의 혼합물과 같은 글리세라이드 혼합물)와 같은 약제학적으로 허용 가능한 첨가제와 함께 제형화 될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0083] 식품 조성물

[0084] 일 예는 마르멜로 (marmelo) 추출물을 유효성분으로 포함하는 체중 및/또는 체지방 감소용 식품 조성물을 제공한다.

[0085] 다른 예는 마르멜로 추출물을 유효성분으로 포함하는 혈당 강하용 식품 조성물을 제공한다.

[0086] 다른 예는 마르멜로 추출물을 유효성분으로 포함하는 혈중 콜레스테롤 강하용 식품 조성물을 제공한다.

[0087] 다른 예는 마르멜로 추출물을 유효성분으로 포함하는 비만의 예방 및/또는 개선용 식품 조성물을 제공한다.

[0088] 다른 예는 마르멜로 추출물을 유효성분으로 포함하는 대사성 질환의 예방 및/또는 개선용 식품 조성물을 제공한다.

다.

[0089] 다른 예는 마르멜로 추출물을 유효성분으로 포함하는 식품 조성물을 (1) 체중 및/또는 체지방 감소, (2) 혈당 강하, (3) 혈중 콜레스테롤 강하 및/또는 (4) 비만 및/또는 대사성 질환의 예방, 개선 및/또는 치료를 필요로 하는 대상에게 투여하는 단계를 포함하는 체중 감소 방법을 제공한다.

[0090] 상기 식품 조성물을 (1) 체중 및/또는 체지방 감소, (2) 혈당 강하, (3) 혈중 콜레스테롤 강하 및/또는 (4) 비만 및/또는 대사성 질환의 예방, 개선 및/또는 치료를 필요로 하는 대상에게 투여하는 단계는 상기 마르멜로 추출물의 함량이 투여하는 대상의 체중 기준으로 1 내지 400 mg/kg (body weight; BW), 50 내지 400 mg/kg, 100 내지 400 mg/kg, 150 내지 400 mg/kg, 200 내지 400 mg/kg, 1 내지 300 mg/kg (body weight; BW), 50 내지 300 mg/kg, 100 내지 300 mg/kg, 150 내지 300 mg/kg, 200 내지 300 mg/kg, 1 내지 200 mg/kg (body weight; BW), 50 내지 200 mg/kg, 100 내지 200 mg/kg, 150 내지 200 mg/kg이 되도록 투여할 수 있고, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0091] 상기 식품 조성물을 (1) 체중 및/또는 체지방 감소, (2) 혈당 강하, (3) 혈중 콜레스테롤 강하 및/또는 (4) 비만 및/또는 대사성 질환의 예방, 개선 및/또는 치료를 필요로 하는 대상에게 투여하는 단계에서 상기 대상이 인간인 경우, 인체전환계수 (0.08)를 적용하여 계산하여 투여량을 결정할 수 있다. 이에 따라, 상기 비만 및/또는 대사성 질환의 예방, 개선, 및/또는 치료를 필요로 하는 인간에게 투여하는 단계는 상기 마르멜로 추출물의 함량이 투여하는 인간의 체중 60kg을 기준으로, 0.0048 내지 1.92 g/일, 0.24 내지 1.92 g/일, 0.48 내지 1.92 g/일, 0.72 내지 1.92 g/일, 0.96 내지 1.92 g/일, 0.0048 내지 1.44 g/일, 0.24 내지 1.44 g/일, 0.48 내지 1.44 g/일, 0.72 내지 1.44 g/일, 0.96 내지 1.44 g/일, 0.0048 내지 0.96 g/일, 0.24 내지 0.96 g/일, 0.48 내지 0.96 g/일 또는 0.72 내지 0.96 g/일이 되도록 투여할 수 있고, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0092] 상기 마르멜로 추출물, 혈당 강하, 혈중 콜레스테롤 강하, 및 대사성 질환은 앞서 설명한 바와 같다.

[0093] 본 명세서에서 제공되는 식품 조성물에서, 용어 "식품"은 영양소를 한 가지 이상 함유하고 있는 식품의 천연물 또는 가공품을 의미하며, 통상적인 의미로서, 각종 일반 식품, 건강기능식품, 음료, 식품 첨가제, 음료 첨가제 등으로 이루어진 군에서 선택된 하나 이상을 의미하기 위하여 사용될 수 있다. 용어 "식품 조성물"은 상기 식품을 제조하기 위한 재료의 조합을 의미할 수 있다. 일 예에서, 상기 식품은 건강기능식품을 의미할 수 있다.

[0094] 상기 식품 조성물 내의 상기 마르멜로 추출물의 함량은 식품사용 형태, 목적 등에 의하여 적절하게 조절할 수 있으며, 예컨대, 고형분 중량 기준으로 0.00001 내지 99.9 중량%, 0.0001 내지 99.9 중량%, 0.001 내지 99.9 중량%, 또는 0.001 내지 50 중량%일 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.

[0095] 상기 식품 조성물의 투여 '대상'은 인간, 원숭이 등의 영장류, 마우스, 래트, 토끼 등의 설치류, 이외의 개, 고양이, 소, 돼지, 양, 말, 염소 등을 포함하는 포유류, 닭, 오리, 거위 등을 포함하는 조류, 뱀, 도마뱀, 거북, 악어 등을 포함하는 파충류, 양서류, 및 어류 등의 척추동물 중에서 선택된 개체, 상기 개체로부터 분리된 세포, 조직, 또는 세포 배양물 등일 수 있다.

발명의 효과

[0096] 본 명세서에서 제공되는 마르멜로 추출물은 체중 및/또는 체지방 및 지방조직 무게, 혈당, 혈중 콜레스테롤, 혈중 insulin과 leptin를 감소시키거나 이의 증가를 효과적으로 억제함으로써 식이성 비만에 대한 항비만 효과 및 지질 개선 효과가 있고 더 나아가 대사성 질환에 예방, 치료, 및/또는 개선 효과가 있음을 제시하며, 향후 항비만 효능 및/또는 대사성 질환에 예방, 치료, 및/또는 개선 효과를 갖는 건강기능성 소재로의 개발 가능성을 제시한다.

도면의 간단한 설명

[0097] 도 1a 및 1b는 마르멜로 추출물 내 chlorogenic acid 함량을 HPLC 크로마토그래피로 분석한 결과를 보여주는 그래프이다. 도 1a는 chlorogenic acid 표준품, 도 1b는 시료 c (실시예 2.2의 표 4)의 결과를 나타낸다.

도 2는 식이 종류에 따른 주별 체중 변화를 보여주는 그래프다. 그룹 1은 대조식이군, 그룹 2는 고지방식이군, 그룹 3은 mdB-44를 같이 투여한 고지방식이군을 의미한다.

도 3은 부고환 지방조직의 조직학적 변화를 광학현미경 (Carl Zeiss)을 사용하여 관찰한 사진이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0098] 이하, 본 발명을 실시예에 의하여 보다 구체적으로 설명하고자 한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하기 위한 것일 뿐이며, 본 발명의 범위가 하기 실시예에 의하여 제한되는 것은 아니다.

[0100] **실시예 1. 마르멜로 추출물의 준비**

[0101] 마르멜로 열매 (LICORICE EXTRACT (Tashkent, Republic of Uzbekistan))를 칭량하고 선별, 세척 및 이물을 제거하였다. 그 후 마르멜로를 압착기로 $1 \sim 5 \text{ kg/cm}^2$ 의 압력으로 압착하여 마르멜로 주스 (마르멜로 열매를 압착하여 발생하는 즙 형태의 액체)를 제거하고, 고형물을 분리하였다. 고형물은 4 ~ 6 부피배의 30 ~ 50 (v/v)% 주정으로 65 ~ 80℃에서 5 ~ 6시간동안 2회 추출하였다. 상기 추출물을 10 μm 규격 필터로 여과하고, 진공 농축기 (vacuum evaporator) (EYELA, 도쿄, 일본)을 이용하여 65 brix 이상으로 진공 농축시켜 마르멜로 농축액을 수득하였다. 상기 농축액을 분무건조기를 통해 분말화 하였다. 상기와 같이 준비된 추출물 또는 분말 상태의 마르멜로 추출물을 하기 실시예에 사용하였다.

[0103] **실시예 2. 마르멜로 추출물의 chlorogenic acid 함량 분석**

[0104] **2.1 HPLC 분석방법**

[0105] 상기 실시예 1에서 준비된 마르멜로 추출물의 chlorogenic acid (CGA) 함량을 LC-20A 고성능 액체 크로마토그래프 (high-performance liquid chromatography, HPLC) 시스템 (Shimadzu, 일본)을 사용하여 분석하였다. HPLC 분석 조건은 하기 표 1 (분석조건), 표 2 (이동상 기울기 조건 (gradient condition))에 나타내었다.

표 1

| 항목 (Items) | 조건 (Conditions) |
|--------------------|---|
| Column | Capcell Pak C ₁₈ column (Shiseido, 5 μm, 250 x 4.6mm) |
| Column Temperature | 40℃ |
| Flow | 1.4 mL/min |
| Detector | Diode Array Detector(DAD) 330 nm |
| Injection Volumn | 5 μL |
| Mobile Phase | A : phosphoric acid : water = 0.5 : 99.5(v/v), B : phosphoric acid : AcN = 0.5 : 99.5(v/v) |
| Run time | 40 min |

표 2

| 시간 (Min) | A 용매 (%) | B 용매 (%) |
|----------|----------|----------|
| 0 | 95 | 5 |
| 7 | 95 | 5 |
| 27 | 70 | 30 |
| 28 | 10 | 90 |
| 30 | 10 | 90 |
| 31 | 95 | 5 |
| 40 | 95 | 5 |

[0108] Chlorogenic acid 표준품 5mg을 칭량하여 메탄올 50mL에 용해시켰다. 이 용액에서 5mL를 취하여 부피플라스크로 옮기고 5mL의 메탄올을 넣고 20mL의 증류수를 넣어 표준용액 원액으로 사용하였다. 원액의 용액을 표준원액으로 하여 단계별로 희석하여 검량선을 작성하여 chlorogenic acid 표준액을 만들었고 (최종농도: 0.00833, 0.00416, 0.00208, 0.00104, 0.01666 mg/mL), 해당 정보를 하기 표 3에 나타내었다. 또한, 상기 실시예 1의 분말 상태의 마르멜로 추출물 30 mg을 칭량하여 30% 메탄올 5mL를 넣어 용해시키고 0.45um 필터로 여과하여 시험용액으로 사용하였다 (최종농도 30mg/5mL) (마르멜로 추출물). 해당 정보를 하기 표 3에 나타내었다.

표 3

| 시료 | 전처리 농도 (Concentration) |
|----------------------|---|
| Chlorogenic acid 표준액 | 0.00833, 0.00416, 0.00208, 0.00104, 0.01666 mg/mL in 30% MeOH |
| 마르멜로 추출물 | 30mg/5mL in 30% MeOH (HPLC grade) |

[0110] 2.2 실험 결과

[0111] 상기 2.1의 HPLC 분석 방법으로 실험을 3회 수행하였으며, 얻어진 값들을 표 4, 도 1a (chlorogenic acid 표준품) 및 1b (시료 c)에 나타내었다.

표 4

| 검체명 | 함량 (mg/g) |
|------|-----------|
| 시료 a | 0.82 |
| 시료 b | 0.7 |
| 시료 c | 0.73 |

[0113] (상기 시료 a, b 및 c는 상기 실험을 3회 수행할 때, 각각 실험에서 사용된 마르멜로 추출물이 포함된 시험용액을 의미한다)

[0114] 표 4, 도 1a 및 도 1b에 나타낸 바와 같이, 실시예 1에서 준비된 마르멜로 추출물 내 chlorogenic acid 함량은 시료 a의 경우 0.82mg/g, 시료 b의 경우 0.7mg/g, 시료 c의 경우 0.73mg/g인 것으로 나타나, chlorogenic acid 함량이 중간 값인 시료 c의 경우를 기준으로 $\pm 20\%$ 범위의 분포를 보이는 것으로 확인되었다. 상기 결과는 상기 실시예 1에서 얻어진 마르멜로 추출물은 일정 범위 (예컨대, 0.75(mg/g) $\pm 20\%$)의 chlorogenic acid를 포함하고, 이러한 결과는 추출을 여러 번 수행하여도 추출물에 포함된 chlorogenic acid 함량이 균등 범위임을 보여준다.

[0116] 실시예 3. 시험물질 및 실험동물 준비

[0117] 3.1 시험물질 준비 및 동물실험 승인

[0118] 시험물질로 상기 실시예 1에서 준비된 분말 상태의 마르멜로 추출물 (분말; 이하, 'mdB-44')을 사용하였고, 하기 실시예에서의 모든 동물실험은 한림대학교 동물실험윤리위원회의 승인 아래 동물실험 규정에 따라 수행하였다 (Hallym 2019-67).

[0120] 3.2 시험군 및 시험물질 투여

[0121] 특정병원체 (specific pathogen free)가 없는 5주령, 수컷 C57BL/6 생쥐를 (주)두얼 바이오텍에서 구입하여 사용하였다. 1주일간의 검역 및 적응과정을 거친 뒤 체중 감소 없는 건강한 동물을 선별하여 실험에 사용하였다. 실험동물은 온도 $23 \pm 3^\circ\text{C}$, 상대습도 $50 \pm 10\%$, 환기회수 10~15회/시간, 조명시간 12시간 (08:00~20:00), 조도 150~300Lux로 설정된 사육환경에서 사육하였다. 적응 기간 실험동물은 실험동물 용 고형사료 ((주) 카길에그리퓨리나)와 음수를 자유 섭취 하도록 하였다. 1주간의 적응 기간을 거친 후 건강한 동물을 선별하여 난괴법 (randomized block design)에 의거하여 대조식이군 (CD) (그룹 1), 고지방식이 (HFD) 대조군 (그룹 2), 고지방식이 + 200mg/kg body weight (BW) mdB-44 (상기 실시예 3.1의 시험물질) 투여군 (그룹 3)으로 분류하였다. 시험 전 기간 동안 대조식이의 에너지 비율 (kcal%) (단백질 : 탄수화물 : 지방)은 20:70:10이고, 고지방식이의 에너지 비율 (kcal%) (단백질 : 탄수화물 : 지방)은 20:20:60이고, 두 식이 모두 Research Diets, Inc. (New Brunswick, NJ, USA)에서 구입하였다. 상기 대조식이군 및 고지방식이의 조성을 표 5에, 상기 실험 설계를 표 6에 나타내었다.

표 5

| | 대조식이 (CD) (10 kcal% fat) 각 조성 함량 (g) | 대조식이 (CD) (10 kcal% fat) 각 조 성 칼로리 함량 (kcal) | 고지방식이 (HFD) (60 kcal% fat) 각 조성 함량 (g) | 고지방식이 (HFD) (60 kcal% fat) 각 조성 칼로리 함량 (kcal) |
|------------------|--|---|--|--|
| Casein, 80 Mesh | 200 | 800 | 200 | 800 |
| L-Cystine | 3 | 12 | 3 | 12 |
| Corn starch | 315 | 1260 | 0 | 0 |
| Maltodextrin 10 | 35 | 140 | 125 | 500 |
| Sucrose | 350 | 1400 | 68.8 | 275.2 |
| Cellulose, BW200 | 50 | 0 | 50 | 0 |
| Soybean oil | 25 | 225 | 25 | 225 |

| | | | | |
|--------------------------------------|---------|------|--------|------|
| Lard* | 20 | 180 | 245 | 2205 |
| Mineral mix | 10 | 0 | 10 | 0 |
| Dicalcium phosphate | 13 | 0 | 13 | 0 |
| Calcium carbonate | 5.5 | 0 | 5.5 | 0 |
| Potassium citrate, 1H ₂ O | 16.5 | 0 | 16.5 | 0 |
| Vitamin mix V10001 | 10 | 40 | 10 | 40 |
| Choline bitartrate | 2 | 0 | 2 | 0 |
| 합계 | 1055.05 | 4057 | 773.85 | 4057 |

(*Lard: 콜레스테롤을 0.95mg/g로 계산함)

표 6

| | 그룹 1 | 그룹 2 | 그룹 3 |
|--------------------|---------|-------|------------|
| | 대조군(정상) | 음성대조군 | 실험군 |
| 실험식이 | CD | HFD | HFD |
| 시험물질 (mg/kg BW) | - | - | mdB-44 200 |
| 동물수(마리) | 10 | 10 | 10 |

시험 전 기간 동안 음수는 자유로이 섭취하도록 하였고, 상기 실시예 3.1의 시험물질을 음수에 실험동물 1kg당 200mg을 녹여 8주동안 일정 시간에 경구 투여하였다(그룹 3). 해당 실험동물을 이용한 하기 실시예에서 통계처리하는 평균 \pm 표준오차로 나타내었다. 수집된 결과는 GraphPad Prism 5.0 (GraphPad software) 프로그램을 이용하여 분석하였다. 시험물질 투여군과 대조군의 차이를 비교하기 위하여 Student's t-test 및 one-way analysis variance (ANOVA)를 이용하였다. $p < 0.05$ 이상일 때만 통계적으로 유의성 있는 것으로 판단하였다.

실시예 4. 체중 및 식이 섭취량 측정

상기 실시예 3에서 준비한 실험동물의 0주차 및 8주차의 체중을 측정하였고, 식이 섭취량은 8주 동안 2일 간격으로 측정하였다. 시험 전 기간 섭취한 양을 계산하여 1일 식이섭취량 및 1일 에너지섭취량을 산출하였다. 식이 효율 (Food Efficiency Ratio, FER)은 시험기간 동안의 체중 증가량을 동일기간 섭취한 식이의 양으로 나누어 다음 수학적 식 1과 같이 계산하였다.

[수학적 식 1]

식이효율 = 체중 증가량 (g) / 식이 섭취량 (g)

측정한 체중 결과 및 그에 따른 총 체중 증가량 및 일일 체중 증가량을 표 7에, 8주 동안 측정한 식이 섭취량 및 식이효율을 표 8에 나타내었고, 특히 체중 결과를 도 2에 나타내었다.

표 7

| | 그룹 1 | 그룹 2 | 그룹 3 |
|-----------------|-------------------|----------------------------------|---------------------------------|
| 실험식이 | CD | HFD | HFD |
| 시험물질 (mg/kg BW) | - | - | mdB-44 200 |
| 0주 | 23.14 \pm 0.35 | 23.06 \pm 0.24 | 23.10 \pm 0.27 |
| 8주 | 31.20 \pm 0.67 | 41.91 \pm 0.91 ^{***} | 36.45 \pm 0.91 ^{###} |
| 총 체중 증가량 (g) | 8.1 \pm 0.7 | 18.9 \pm 0.9 ^{***} | 13.4 \pm 1.1 ^{##} |
| 일일 체중 증가량 (g/일) | 0.146 \pm 0.013 | 0.343 \pm 0.016 ^{***} | 0.243 \pm 0.020 ^{##} |

(표 8의 결과는 평균 \pm 표준오차로 표시된 것이고, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$, ### $p < 0.001$ 을 의미한다; 그룹 1 (정상 대조군); 그룹 2 (음성 대조군); 그룹 3: 실험군, (mdB-44 투여군)

표 8

| | 그룹 1 | 그룹 2 | 그룹 3 |
|----------------------|---------------|------------------------------|-----------------------------|
| 실험식이 | CD | HFD | HFD |
| 시험물질 (mg/kg BW) | - | - | mdB-44 200 |
| 총 식이섭취량 (g) | 145.4 ± 1.4 | 129.1 ± 1.2 ^{***} | 112.7 ± 1.5 ^{###} |
| 일일 식이섭취량 (g/day) | 2.64 ± 0.03 | 2.35 ± 0.02 ^{***} | 2.05 ± 0.03 ^{###} |
| 일일 에너지섭취량 (kcal/day) | 10.18 ± 0.10 | 12.30 ± 0.11 ^{***} | 10.73 ± 0.15 ^{###} |
| 식이효율 (체중증가량/식이섭취량) | 0.055 ± 0.005 | 0.146 ± 0.007 ^{***} | 0.119 ± 0.009 [#] |

(상기 수치는 평균 ± 표준오차로 표시된 것이고, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$, ### $p < 0.001$ 을 의미한다)

상기 표 7 및 8에 나타난 바와 같이, 시험 기간 동안 모든 시험군의 실험동물은 지속적으로 체중이 증가하여 정상적인 체중 변화를 나타내었다. 대조식이군 (그룹 1)과 비교하여 고지방 식이 대조군 (그룹 2)의 체중은 유의적으로 더 증가하였다. 반면, 마르멜로 추출물을 투여한 시험군인 그룹 3에서는, 고지방식이 대조군 (그룹 2)과 비교하여, 고지방식이 공급에 의해 증가된 실험동물의 체중이 (체중 증가량) 유의적으로 감소하였다. 이를 통해, 고지방 식이를 하더라도 마르멜로 추출물을 병행하여 섭취하면 체중의 증가가 억제되는 것을 확인할 수 있었다.

또한, 마르멜로 추출물을 투여한 시험군인 그룹 3의 식이섭취량이 음성 대조군 (그룹 2) 대비 유의적으로 감소하였으나, 식이효율 (체중증가량/식이섭취량) 역시 감소하였고, 이는 식이섭취량의 감소만으로 체중이 감소한 것이 아니라는 것을 의미한다.

실시예 5. 체지방 (body fat) 측정

실시예 3.2의 실험동물 시험 종료 1일 전에 실험동물을 마취한 후 dual-energy X-ray absorptiometry (DEXA, PIXImusTM, GE Lunar)를 사용하여 체구성 성분을 측정하여 체지방률을 평가하였고, 그 결과를 표 9에 나타내었다.

표 9

| | 그룹 1 | 그룹 2 | 그룹 3 |
|-----------------|--------------|-----------------------------|---------------------------|
| 실험식이 | CD | HFD | HFD |
| 시험물질 (mg/kg BW) | - | - | mdB-44 200 |
| Fat (%) | 29.58 ± 0.84 | 42.84 ± 1.66 ^{***} | 37.97 ± 1.46 [#] |

(상기 수치는 평균 ± 표준오차로 표시된 것이고, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$, ### $p < 0.001$ 을 의미한다)

체지방률은 대조식이군 (그룹 1)의 29.58 ± 0.84%와 비교하여 고지방식이 대조군 (그룹 2)은 42.84 ± 1.66%로 체지방률이 현저히 증가하였고, 고지방식이 대조군 (그룹 2)과 비교하여 mdB-44 200mg/kg BW 투여군 (그룹 3)에서 체지방률이 유의적으로 감소하였다.

실시예 6. 혈액 및 지방 분석

실시예 6.1 채혈 및 조직 적출

상기 실시예 3의 실험동물의 시험 종료 후 실험동물을 희생하였다. 희생 전 트리브로모에탄올 (tribromoethanol)을 tert-아밀알코올 (tert-amyl alcohol)로 희석하여 만든 마취제를 사용하여 마취한 후 안와채혈을 하였다. 혈액은 serum separate tube (Becton Dickinson)에 담아 30분간 실온에서 방치한 후 5,000 rpm에서 10분간 원심 분리하여 혈청을 분리하였고, 분석 전까지 -70℃에 보관하였다. 채혈 후 실험동물을 희생하여 백색지방조직 (부고환지방, 내장지방, 후복강지방, 서혜부지방)을 적출한 후 차가운 생리식염수로 행구어

여과지로 여분의 물기를 제거한 후 무게를 측정하였다. 부고환 지방조직을 삼등분하여 일부는 4% paraformaldehyde (PFA)에 고정한 후 파라핀에 포매를 하여 조직염색을 수행하였고, 일부는 total RNA를 분리한 후 real-time RT-PCR을 수행하였으며, 일부는 단백질을 분리한 후 Western blot을 수행하였고, 향후 추가 분석을 위해 -70℃에 보관하였다.

[0150] 6.2 조직 (지방조직) 무게 측정

[0151] 상기 실시예 6.1에서 지방조직의 무게를 측정하였고 그 결과를 표 10에 나타내었다.

표 10

[0152]

| | 그룹 1 | 그룹 2 | 그룹 3 |
|-----------------|---------------|------------------------------|------------------------------|
| 실험식이 | CD | HFD | HFD |
| 시험물질 (mg/kg BW) | - | - | mdB-44 200 |
| 부고환지방 | 1.030 ± 0.070 | 2.471 ± 0.079 ^{***} | 2.023 ± 0.109 ^{##} |
| 후복강지방 | 0.447 ± 0.037 | 1.184 ± 0.063 ^{***} | 0.954 ± 0.074 [#] |
| 내장지방 | 0.603 ± 0.050 | 1.603 ± 0.114 ^{***} | 0.975 ± 0.073 ^{###} |
| 서혜부지방 | 0.210 ± 0.031 | 0.544 ± 0.033 ^{***} | 0.490 ± 0.052 |
| 백색지방 총 무게 | 2.29 ± 0.14 | 5.80 ± 0.21 ^{***} | 4.44 ± 0.21 ^{###} |

[0153] (상기 수치는 평균 ± 표준오차로 표시된 것이고, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$, ### $p < 0.001$ 을 의미한다)

[0154] 체지방은 형태나 작용에 따라 백색지방조직과 갈색지방조직으로 구분 되며, 백색지방조직은 주로 체내 잉여 에너지를 지방으로 저장하고, 갈색지방조직은 열을 생산하는 기능을 하며, 백색지방의 중량이 증가할수록 체중이 증가한다. 백색 지방조직인 부고환지방, 후복강지방, 내장지방 및 서혜부지방의 무게는 대조식이군 (그룹 1)과 비교하여 고지방식이 대조군 (그룹 2)에서 모두 유의적으로 증가하였다. 반면, 마르멜로 추출물을 투여한 그룹 3은 고지방식이 대조군 (그룹 2)과 비교하여 시험된 모든 항목의 체지방이 감소하였다.

[0156] 6.3 혈당 관련 수치 분석

[0157] 상기 실시예 6.1에서 채혈한 혈액 내 포도당 (glucose)의 함량을 혈액생화학분석기 (KoneLab 20 XT, Thermo Fisher Scientific)를 이용하여 측정하였고, insulin 함량을 Millipore Corporation에서 구입한 측정 kit을 사용하여 제조사에서 제시한 방법에 따라 측정하였다.

[0158] 인슐린 저항성은 대사증후군의 가장 핵심 요소이기 때문에, 혈중 인슐린 농도의 측정이 인슐린 감수성 및 저항성을 측정하는데 매우 유용하며, 본 연구에서도 혈중 인슐린 농도와 공복혈당을 이용하여 인슐린 저항성 (HOMA-IR)과 인슐린 민감성 (QUICKI)을 산출하였다. 인슐린저항성 (homeostatic model assessment for insulin resistance, HOMA-IR)과 인슐린민감성 (quantitative insulin sensitivity check index, QUICKI)을 공복혈당과 혈중 인슐린 함량을 이용하여 하기 수학적 2 및 3을 이용하여 계산하였고, 상기 측정 결과를 표 11에 나타내었다.

[0159] [수학적 2]

[0160] 인슐린저항성 (HOMA-IR) = [insulin (mU/L) × glucose (mg/dL)] / 405

[0161] [수학적 3]

[0162] 인슐린민감성 (QUICKI) = 1 / [log insulin (mU/L) + log glucose (mg/dL)]

표 11

[0163]

| | 그룹 1 | 그룹 2 | 그룹 3 |
|-----------------|--------------|---------------------------|-------------|
| 실험식이 | CD | HFD | HFD |
| 시험물질 (mg/kg BW) | - | - | mdB-44 200 |
| Glucose (mg/dL) | 149.0 ± 10.8 | 196.8 ± 7.8 ^{**} | 185.2 ± 7.5 |

| | | | |
|-----------------|---------------|------------------------------|----------------------------|
| Insulin (ng/mL) | 2.62 ± 0.21 | 9.12 ± 0.97 ^{***} | 5.67 ± 0.81 [#] |
| HOMA-IR | 22.9 ± 2.2 | 107.1 ± 12.4 ^{***} | 62.3 ± 9.3 ^{##} |
| QUICKI | 0.253 ± 0.002 | 0.218 ± 0.004 ^{***} | 0.230 ± 0.003 [#] |

[0164] Glucose는 대조식이군 (그룹 1)과 비교하여 고지방식이 대조군 (그룹 2)에서 유의적으로 증가하였고, 그룹 3에서는 고지방식이 대조군 (그룹 2)에 비해 감소하였다.

[0165] 혈중 insulin 함량은 대조식이군 (그룹 1)의 2.62 ± 0.21ng/mL과 비교하여 고지방식이 대조군 (그룹 2)에서 9.12 ± 0.97ng/mL로 현저히 증가한 반면, mdB-44 투여군 (그룹 3)에서는 5.67 ± 0.81ng/mL로 고지방식이 대조군 대비 유의적으로 감소하였다.

[0166] 인슐린 저항성은 대조식이군 (그룹 1)의 22.9 ± 2.2와 비교하여 고지방식이 대조군 (그룹 2)에서 107.1 ± 12.4로 현저히 증가한 반면, mdB-44 투여군 (그룹 3)에서 고지방식이 대조군 대비 감소하였다. 인슐린 민감성은 대조식이군 (그룹 1)의 0.253 ± 0.002와 비교하여 고지방식이 대조군 (그룹 2)에서 0.218 ± 0.004로 유의적으로 감소한 반면, mdB-44 투여군 (그룹 3)에서 고지방식이 대조군 대비 증가하였다. 이를 통해, 마르멜로 추출물 투여군의 경우 고지방식으로 인해 유발되는 인슐린 저항성을 억제하여 내당능 장애를 개선하고 있다는 것을 확인하였다.

[0168] 6.4 지방 관련 수치 분석

[0169] 상기 실시예 6.1에서 채혈한 혈액 내 중성지방 (triglyceride, TG), 총 콜레스테롤 (total cholesterol, CHOL), HDL-콜레스테롤 (HDL-CHOL) 함량을 혈액생화학분석기 (KoneLab 20 XT, Thermo Fisher Scientific)를 이용하여 측정하였고, 혈중 콜레스테롤 함량과 HDL-콜레스테롤 함량을 이용하여 동맥경화지수를 하기 수학적 4를 통해 계산하였다.

[0170] [수학적 4]

[0171] 동맥경화지수 = 총 콜레스테롤 함량 / HDL-콜레스테롤 함량

[0172] 상기 얻어진 결과를 표 12에 나타내었다.

표 12

| | 그룹 1 | 그룹 2 | 그룹 3 |
|------------------|-------------|---------------------------|---------------------------|
| 실험식이 | CD | HFD | HFD |
| 시험물질 (mg/kg BW) | - | - | mdB-44 200 |
| TG (mg/dL) | 77.1 ± 3.3 | 90.4 ± 3.4 [*] | 77.3 ± 3.2 [#] |
| CHOL (mg/dL) | 165.7 ± 8.4 | 188.4 ± 4.7 [*] | 171.8 ± 5.3 [#] |
| HDL-CHOL (mg/dL) | 151.6 ± 6.2 | 126.9 ± 5.8 ^{**} | 150.9 ± 6.1 [#] |
| 동맥경화지수 | 1.09 ± 0.04 | 1.52 ± 0.11 ^{**} | 1.15 ± 0.04 ^{##} |

[0174] 일반적으로 고지방식이 섭취 시 지방산의 공급이 증가하여 혈중 중성지방, 총 콜레스테롤의 농도가 증가하는 반면, HDL-콜레스테롤의 혈중 농도는 감소하는 경향을 나타내는데, 이는 심혈관 및 관상 혈관질환의 원인이 된다.

[0175] 혈중 중성지방 및 혈중 총콜레스테롤 함량은 대조식이군 (그룹 1)과 비교하여 고지방식이 대조군 (그룹 2)에서 유의적으로 증가한 반면, mdB-44를 투여한 그룹 3에서는 그룹 2에 비해 유의적으로 감소하였고, 특히 혈중 중성지방 수치의 경우 대조식이군 (그룹 1)과 매우 유사하게 측정되었다. 혈중 HDL-콜레스테롤 함량은 대조식이군 (그룹 1)과 비교하여 고지방식이 대조군 (그룹 2)에서 유의적으로 감소한 반면, mdB-44를 투여한 그룹 3에서는 그룹 2에 비해 유의적으로 증가하였고, 대조식이군 (그룹 1)과 매우 유사하게 측정되었다. 관상동맥질환 발생의 가장 유효한 예측인자인 동맥경화지수 (수학적 4 참조)를 혈중 콜레스테롤 함량과 HDL-콜레스테롤 함량을 이용하여 산출한 결과, 대조식이군 (그룹 1)의 1.09±0.04와 비교하여 고지방식이 대조군 (그룹 2)은 1.52±0.11로 유의하게 증가한 반면, mdB-44 200mg/kg BW 투여군 (그룹 3)에서 1.15 ± 0.04 (그룹 3)으로 그룹 2에 비해 유

의적으로 감소하였다.

[0177] 6.5 혈청 leptin 및 adiponectin 함량 분석

[0178] 지방조직은 잉여에너지를 저장하는 장소일 뿐 아니라 생리학적으로 매우 중요한 역할을 하는 다양한 adipokines을 합성 분비함으로써 전신의 대사과정에 영향을 미치는 내분비 기관으로 인식되고 있다. 지방조직에서 분비되는 대표적인 adipokines의 하나인 leptin은 에너지 섭취와 저장, 인슐린 민감도, 대사속도 등을 조절하는 중요한 물질로 비만의 경우 leptin의 분비량이 증가하는 것으로 알려져 있다. 또 다른 주요 adipokines인 adiponectin은 근육에서 지방산화를 증가시키는 동시에 항염증성 사이토카인의 역할을 통하여 당뇨병 및 대사증후군 등의 만성질환을 예방하는 중요 호르몬으로 알려져 있다.

[0179] 상기 실시예 6.1에서 채혈한 혈액의 혈청 내 leptin 및 adiponectin 함량을 R&D Systems에서 구입한 측정 kit을 사용하였고, 제조사에서 제시한 방법에 따라 측정하였고, 그 결과를 하기 표 13에 나타내었다.

표 13

[0180]

| | 그룹 1 | 그룹 2 | 그룹 3 |
|---------------------|--------------|------------------------------|-----------------------------|
| 실험식이 | CD | HFD | HFD |
| 시험물질 (mg/kg BW) | - | - | mdB-44 200 |
| Adiponectin (ng/mL) | 10.45 ± 0.26 | 9.45 ± 0.25 [*] | 10.84 ± 0.37 ^{##} |
| Leptin (ng/mL) | 21.14 ± 2.96 | 116.04 ± 9.49 ^{***} | 69.53 ± 5.13 ^{###} |

[0181] 혈중 leptin 함량은 대조식이군 (그룹 1)과 비교하여 고지방식이 대조군 (그룹 2)에서 현저히 증가하였고, 이는 mdB-44 투여군 (그룹 3)에서 그룹 2에 비해 유의적으로 감소하였다. 혈중 adiponectin 함량은 대조식이군 (그룹 1)과 비교하여 고지방식이 대조군 (그룹 2)에서 유의적으로 감소하였고, 고지방식이 대조군 (그룹 2)과 비교하여, mdB-44 투여군 (그룹 3)에서 증가하였다. 내장지방조직의 지방세포의 크기, 수, 및 양의 증가는 leptin의 분비량과 양의 상관관계가 있고, adiponectin 분비량은 음의 상관관계가 있다고 알려져 있는바, 상기 결과로 mdB-44 투여군은 비만 마우스에서 증가한 혈중 leptin을 유의적으로 감소시켰고, adiponectin 분비량을 증가시켜 항비만 효과를 나타냈다.

[0183] 6.6 부고환 지방조직의 조직학적 분석

[0184] 상기 실시예 6.1에서 실험동물에서 적출하여 고정된 부고환지방조직을 파라핀에 포매하고, 포매된 조직들로부터 5 μm의 조직 절편을 제작하였다. 파라핀 제거 후, 100% 알코올에서 시작하여 0% 알코올 (H₂O)까지 순차적으로 알코올의 %를 낮춰 조직을 수화하였다. 이후 Accustain® Hematoxylin and Eosin Stains (Sigma-Aldrich Co.)을 사용하여 제조회사가 제시한 방법에 따라 조직을 염색하였고 (hematoxylin & eosin 염색, H&E 염색), 광학현미경 (Carl Zeiss)을 사용하여 각 조직의 조직학적 변화를 관찰하였다. 또한, H&E 염색하여 얻은 부고환 지방조직 사진을 AxioVision Imaging analysis System을 이용하여 지방세포 크기 및 세포수를 측정하였다. 상기 부고환 지방조직의 조직학적 변화를 도 3에 나타내었고, 상기 측정한 지방조직의 지방세포 크기에 따른 세포 수를 표 14에 나타내었다.

표 14

[0185]

| | 그룹 1 | 그룹 2 | 그룹 3 |
|-----------------|-------------|----------------------------|---------------------------|
| 실험식이 | CD | HFD | HFD |
| 시험물질 (mg/kg BW) | - | - | mdB-44 200 |
| <80 μm | 161.0 ± 7.1 | 1.0 ± 1.0 ^{***} | 41.7 ± 2.2 ^{###} |
| 80~100 μm | 16.0 ± 1.7 | 9.3 ± 1.5 [*] | 45.0 ± 3.5 ^{###} |
| 100~120 μm | 0.0 ± 0.0 | 28.0 ± 4.0 [*] | 12.7 ± 1.2 [#] |
| >120 μm | 0.0 ± 0.0 | 12.7 ± 1.2 ^{**} | 0.0 ± 0.0 ^{##} |
| 동일 면적 지방 세포 수 | 177.0 ± 8.7 | 51.0 ± 5.7 ^{***} | 99.3 ± 5.2 ^{##} |
| 평균 지방구 크기 (μm) | 80.9 ± 0.1 | 108.5 ± 1.0 ^{***} | 88.3 ± 0.4 ^{###} |

[0186] (상기 수치는 평균 \pm 표준오차로 표시된 것이고, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$, ### $p < 0.001$ 을 의미한다)

[0187] 도 3에 나타난 바와 같이, 대조식이군 (그룹 1)과 비교하여 고지방식이 대조군 (그룹 2)의 부고환 지방조직에서 지방세포의 크기가 현저히 증가하였으며, mdB-44 투여군 (그룹 3)에서는 지방세포 크기가 감소하는 경향을 나타내었다.

[0188] 또한, 부고환 지방조직의 지방세포 크기에 따른 세포수를 측정된 결과를 보여주는 표 14에 나타난 바와 같이, 대조식이군 (그룹 1)은 지방세포 크기가 $<80 \mu\text{m}$ 인 세포수가 161.0 ± 7.1 개인 반면, 크기가 $>100 \mu\text{m}$ 인 지방세포 수는 관찰되지 않아 대체로 지방세포의 크기가 작음을 확인하였다. 고지방식이 대조군 (그룹 2)의 지방세포 크기가 $100 \sim 120 \mu\text{m}$ 인 세포수는 28.0 ± 4.0 개, 크기가 $>120 \mu\text{m}$ 인 세포수는 12.0 ± 2.1 개로 지방세포의 크기가 큰 것을 확인하였다. 고지방식이 대조군 (그룹 2)과 비교하여, 시험물질 투여군 (그룹 3)의 지방세포 크기 별 세포수를 비교한 결과, 크기가 $<80 \mu\text{m}$ 인 것과 $80 \sim 100 \mu\text{m}$ 크기의 지방세포수는 유의적으로 증가하였고, 크기가 $100 \sim 120 \mu\text{m}$ 인 세포수는 유의적으로 감소하였다. $>120 \mu\text{m}$ 크기의 지방세포수는 mdB-44 200mg/kg BW 투여군 (그룹 3)에서는 관찰되지 않았다.

[0189] 동일 면적 대비 총 지방세포수는 대조식이군 (그룹 1)의 177.0 ± 8.7 개와 비교하여 고지방식이 대조군 (그룹 2)은 51.0 ± 5.7 개로 유의적으로 감소하였고, mdB-44 200mg/kg BW 투여군 (그룹 3)에서 유의적으로 증가하였다. 평균 지방 구 크기는 대조식이군 (그룹 1)의 $80.9 \pm 0.1 \mu\text{m}$ 와 비교하여 고지방식이 대조군 (그룹 2)은 $108.5 \pm 1.0 \mu\text{m}$ 로 유의적으로 지방구 크기가 증가하고, mdB-44 200mg/kg BW 투여군 (그룹 3)은 $88.3 \pm 0.4 \mu\text{m}$ (그룹 3)로 지방구 크기가 유의적으로 감소하였다.

[0190] 상기 결과로부터 마르멜로 추출물 투여가 항비만 효과를 나타낼 뿐 아니라, 특히 고지방식으로 인해 유발되는 백색지방조직의 비대증을 억제하는 효과가 있다는 것을 확인할 수 있었다.

[0192] 6.6 지방조직 내 에너지 대사 관련 유전자 mRNA 발현 분석

[0193] 실시예 6.1에서 얻은 부고환지방조직에 TRIzol® Reagent (Thermo Fisher Scientific)을 사용하여 total RNA를 분리한 후, micro-volume spectrophotometer (BioSpec-nano, SHIMADZU)을 사용하여 정량하였고, OD260/280 값이 1.8 이상인 RNA를 실험에 사용하였다. Total RNA ($2 \mu\text{g}$)로부터 HyperScript™ RT master mix kit (GeneAll Biotechnology)을 이용하여 cDNA를 얻은 후, Rotor-Gene 300 PCR (Corbett Research)와 Rotor-Gene™ SYBR Green kit (QIAGEN)를 사용하여 real-time PCR을 수행하였다. 실험에 사용한 primer 정보는 표 15에 나타내었다. 유전자의 발현의 정량 분석은 Rotor-Gene 6000 Series System Software program (Corbett Research)을 이용하여 수행하였다.

표 15

[0194]

| mRNA | 염기서열(5' → 3') | Genebank No. | 서열번호 |
|----------------------------|-------------------------|----------------|------|
| C/EBP α -FOR primer | TGGACAAGAACAGCAACGAGTAC | XM_021168520.2 | 1 |
| C/EBP α -REV primer | GCAGTTGCCCATGGCCTTGAC | XM_021168520.2 | 2 |
| PPAR γ -FOR primer | CAAAACACCAGTGTGAATTA | XM_021164279.2 | 3 |
| PPAR γ -REV primer | ACCATGGTAATTTCTTGTA | XM_021164279.2 | 4 |
| SREBP-1c-FOR primer | CACTTCTGGAGACATCGAAAC | NM_011480.4 | 5 |
| SREBP-1c-REV primer | ATGGTAGACAACAGCCGCATC | NM_011480.4 | 6 |
| CPT1 β -FOR primer | GTGCTGGAGGTGGCTTTGGT | NM_009948.2 | 7 |
| CPT1 β -REV primer | TGCTTGACGGATGTGGTTCC | NM_009948.2 | 8 |
| FAS-FOR primer | AGGGTCGACCTGGTCCTCA | NM_007988.3 | 9 |
| FAS-REV primer | GCCATGCCAGAGGGTGGTT | NM_007988.3 | 10 |
| aP2-FOR primer | GGATTGGTCACCATCCGGT | NM_024406.3 | 11 |
| aP2-REV primer | TTCACCTTCCTGTCGTCTGC | NM_024406.3 | 12 |
| HSL-FOR primer | CCGTTCTGCAGACTCTCTC | XM_030242181.1 | 13 |
| HSL-REV primer | CCACGCAACTCTGGGTCTAT | XM_030242181.1 | 14 |
| GAPDH-FOR primer | AGGTTGTCTCTCGCACT | XM_029478683.1 | 15 |
| GAPDH-REV primer | TGCTGTAGCCGTATTCATTGTCA | XM_029478683.1 | 16 |
| ACC1-FOR primer | GGAGATGTACCTGACCGAGAA | AY451393.1 | 17 |
| ACC1-REV primer | ACCCGACGCATGGTTTCA | AY451393.1 | 18 |

| | | | |
|----------------|----------------------|------------|----|
| ACL-FOR primer | TGGATGCCACAGCTGACTAC | BC056378.1 | 19 |
| ACL-REV primer | GGTTCAGCAAGGTCAGCTTC | BC056378.1 | 20 |

[0195] 시험물질이 부고환 지방조직의 지방합성, 분해 및 에너지 대사 관련 mRNA 발현에 미치는 영향을 분석하였고, 그 결과를 표 16에 나타내었다.

표 16

| | 그룹 1 | 그룹 2 | 그룹 3 |
|-----------------|-----------------|--------------------|--------------------------------|
| 실험식이 | CD | HFD | HFD |
| 시험물질 (mg/kg BW) | - | - | mdB-44 200 |
| C/EBP α | 1.00 \pm 0.36 | 4.10 \pm 0.05*** | 2.20 \pm 0.48 ^{##} |
| PPAR γ | 1.00 \pm 0.12 | 2.25 \pm 0.20** | 1.11 \pm 0.06 ^{##} |
| SREBP-1c | 1.00 \pm 0.12 | 2.41 \pm 0.23** | 1.51 \pm 0.17 [#] |
| CPT1 | 1.00 \pm 0.19 | 0.37 \pm 0.07* | 2.28 \pm 0.14 ^{###} |
| FAS | 1.00 \pm 0.52 | 2.90 \pm 0.39* | 0.25 \pm 0.10 ^{###} |
| aP2 | 1.00 \pm 0.11 | 1.98 \pm 0.38* | 0.94 \pm 0.13 [#] |
| HSL | 1.00 \pm 0.07 | 0.45 \pm 0.04*** | 0.78 \pm 0.07 ^{##} |
| ACC1 | 1.01 \pm 0.08 | 3.66 \pm 0.42*** | 2.82 \pm 0.35 |
| ACL | 0.96 \pm 0.14 | 1.49 \pm 0.15* | 0.75 \pm 0.16 [#] |

[0197] (상기 결과는 GAPDH 발현량 대비 각 물질의 발현량으로, (각 물질의 발현량 / GAPDH의 발현량)으로 계산하였고, 평균 \pm 표준오차로 표시된 것이고, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$, ### $p < 0.001$ 을 의미한다)

[0198] 지방세포 유전자 조절부위에 전사활성 인자가 활성화되어야 지방전구세포에서 성숙한 지방세포로의 분화가 이루어지며, 지방세포의 분화를 조절하는 전사인자에는 SREBPs (sterol-regulatory element-bindingprotein), PPARs (Peroxisome Proliferator-Activated Receptor), C/EBPs (CCAAT/enhancer binding protein) 등이 있다. SREBPs는 SREBP-1과 SREBP-2가 있으며, 그 중 SREBP-1은 전구지방세포 분화 초기에 빠르게 유도되어 adipocyte 분화를 촉진시키고, 지방 대사에 관련된 유전자의 발현을 증가시켜 지방 대사를 촉진하는 역할을 한다.

[0199] 표 16에 나타난 바와 같이, 부고환 지방조직에서 SREBP-1c mRNA 발현은 대조식이군 (그룹 1)과 비교하여 고지방식이 대조군 (그룹 2)에서 유의적으로 증가하였고, 고지방식이 대조군 (그룹 2)과 비교하여 mdB-44 200mg/kg BW 투여군 (그룹 3)에서 유의적으로 감소하였다. 지방세포 분화 초기 호르몬 유도에 의해 (insulin, dexamethasone 등) C/EBP β 가 발현되고 C/EBP β 가 활성화되면 분화 후기에 지방세포의 전사인자인 C/EBP α 와 PPAR γ 의 발현이 유도된다. C/EBP α 는 PPAR γ 와 상호 작용하여 영향을 미치는데 C/EBP α 는 adipose tissue의 특이적 유전자들의 발현 전에 증가하여 에너지 항상성을 조절하고 PPAR γ 는 adipogenesis의 주요 조절자로 백색지방조직에서 많이 발현된다. 부고환 지방조직에서 C/EBP α 와 PPAR- γ mRNA 발현은 대조식이군 (그룹 1)과 비교하여 고지방식이 대조군 (그룹 2)에서 유의적으로 증가하였고, 고지방식이 대조군 (그룹 2)과 비교하여 mdB-44 200mg/kg BW 투여군 (그룹 3)에서 유의적으로 감소하였다.

[0200] FAS (fatty acid synthase)는 fatty acid 생합성에 관여하는 효소로 지방산이 간에서 합성되면 중성지방으로 전환되어 VLDL의 형태로 혈관을 돌아다니며 지방조직에 중성지방을 전달하는 역할을 한다. 부고환 지방조직 내 FAS mRNA 발현은 대조식이군 (그룹 1)과 비교하여 고지방식이 대조군 (그룹 2)에서 유의적으로 증가하였고, 고지방식이 대조군 (그룹 2)과 비교하여 mdB-44 200mg/kg BW 투여군 (그룹 3)에서 유의적으로 감소하였다.

[0201] 지방합성의 target gene으로 알려진 aP2는 지방세포와 대식세포에서 발현되며 염증과 대사반응에 관여하는 것으로 알려져 있다. 부고환 지방조직 내 aP2 mRNA 발현은 대조식이군 (그룹 1)과 비교하여 고지방식이 대조군 (그룹 2)에서 유의적으로 증가 하였고, 고지방식이 대조군 (그룹 2)과 비교하여 mdB-44 200mg/kg BW 투여군 (그룹

3)에서 aP2 mRNA 발현이 유의적으로 감소하였다 (표 16).

[0202] CPT-1 (Carnitine palmitoyl transferase-1)은 지방산을 미토콘드리아 내부로 유입시키는 속도 제한 단계 효소로, 지방산이 세포 내로 유입되어 산화되기 위해서는 막 내부의 transferase를 필요로 하는데 CPT-1은 이러한 transferase의 하나로 지질 이용의 주요한 역할을 한다. 부고환 지방조직 내 CPT-1 mRNA 발현은 대조식이군 (그룹 1)과 비교하여 고지방식이 대조군 (그룹 2)에서 유의적으로 감소하였고, mdB-44 투여군 (그룹 3)에서 CPT-1 mRNA 발현이 고지방식이 대조군 (그룹 2)에 비해 유의적으로 증가하였다.

[0203] HSL (hormone-sensitive lipase)은 다양한 장기에 분포하지만 주로 지방조직에서 활성화되며, 에피네프린이나 글루카곤과 같은 호르몬 분비에 의해 활성형 HSL이 되며, 활성형 HSL은 지단백질의 중성지방을 한 개의 글리세롤과 세 개의 지방산으로 분해하는 작용을 한다. 부고환 지방조직 내 HSL mRNA 발현은 대조식이군 (그룹 1)과 비교하여 고지방식이 대조군 (그룹 2)에서 유의적으로 감소하였다. 고지방식이 대조군 (그룹 2)에 비교하여 mdB-44 200mg/kg BW 투여군 (그룹 3)에서 HSL mRNA 발현이 유의적으로 증가하였다 (표 16).

[0204] ACC1은 주로 지방산 합성이 중요한 지방 조직에 존재하고 ACC2는 주로 골격근 및 심장과 같은 산화 조직에 존재하여 지방산 합성 및 산화를 조절한다. 부고환 지방조직 내 ACC1 mRNA 발현은 대조식이군 (그룹 1)과 비교하여 고지방식이 대조군 (그룹 2)에서 유의적으로 증가하였고, 고지방식이 대조군 (그룹 2)과 비교하여 mdB-44 200mg/kg BW 투여군 (그룹 3)에서 ACC1 mRNA 발현은 감소하였다

[0205] ACL은 citrate를 acetyl-CoA로 전환하여 세포질 acetyl-CoA의 합성에 관여하는 효소이며, 지방산 및 콜레스테롤과 같은 중요한 생합성 경로에 사용된다. 부고환 지방조직 내 ACL mRNA 발현은 대조식이군 (그룹 1)과 비교하여 고지방식이 대조군 (그룹 2)에서 유의적으로 증가하였고, 고지방식이 대조군 (그룹 2)과 비교하여 mdB-44 200mg/kg BW 투여군 (그룹 3)에서 ACL mRNA 발현이 유의적으로 감소하였다.

[0207] 6.7 지방조직 내 단백질 발현 분석

[0208] 부고환 지방조직 내 단백질 발현을 조사하기 위해 부고환지방에 lysis buffer (Pierce® IP Lysis buffer, Thermo Scientific)를 첨가한 후 homogenizer로 균질화하였다. 균질화한 용액을 12,000 rpm에서 10분간 원심분리한 후 상층액을 취해 부고환 지방조직 lysates 얻었다. 조직 lysate의 단백질 양은 BCA protein assay kit (Thermo Scientific)을 사용하여 측정하였다.

[0209] 단백질 (50µg)을 10% sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)로 분리한 후, polyvinylidene difluoride membrane (Millipore)에 이동시켰다. Membrane을 5% skim milk-TBST (20 mmol/L Tris·HCl, pH 7.5, 150 mmol/L NaCl, 0.1% Tween 20)에서 1시간 동안 blocking 한 후, 측정하고자 하는 antibody를 각각 첨가하여 4℃에서 16시간 동안 또는 상온에서 1시간 동안 교반하였다. 실험에 사용한 antibody 정보는 표 17에 나타내었다. 그 후 horseradish peroxidase (HRP)-linked anti-rabbit IgG 또는 HRP-linked anti-mouse IgG를 첨가하여 1시간 교반하였고, 각 단백질 밴드는 Luminata™ Forte Western HRP Substrate (Millipore)를 사용하여 enhanced chemiluminescence 방법으로 가시화하였다. 단백질 발현 수준은 ImageQuant™ LAS 500 imaging systems (GE Healthcare Bio-Sciences AB)을 사용하여 정량하였다.

표 17

| 항체명 | 세부정보 | 제조회사 |
|---------|-------------------------|---------------------------|
| p-AMPK | Phospho-AMPK α (Thr172) | #2535 |
| AMPK | AMPK α | #2532 |
| β-actin | Beta-actin | #3700 |
| | | Cell Signaling Technology |

[0211] AMP-activated protein kinase (AMPK)는 인슐린 저항성을 개선하는 인자로서, 활성화된 AMPK는 지방과 콜레스테롤 합성과 같은 ATP 소비경로를 차단하면서, 당 분해나 지방산 산화와 같은 ATP 생성경로를 활성화시키는 것으로 알려져 있다. 특히 지질대사와 관련하여 단백질 인산화를 통해 acetyl-CoA carboxylase (ACC) 효소의 활성을 억제함으로써 지방산 산화 증가에 따른 체지방 감소에 중요한 역할을 하는 것으로 보고되고 있다.

[0212] 시험물질이 부고환 지방조직 내 AMPK 활성화에 미치는 영향을 조사하기 위해 부고환 지방조직 lysate를 사용하여 Western blot을 실시 및 정량하고 그 결과를 표 18에 나타내었다.

표 18

| | 그룹 1 | 그룹 2 | 그룹 3 |
|-------------------|------------|--------------------------|--------------------------|
| 실험식이 | CD | HFD | HFD |
| 시험물질(mg/kg BW) | - | - | mdB-44 200 |
| p-AMPK/AMPK Ratio | 1.00 ± 0.0 | 0.64 ± 0.04 [*] | 1.50 ± 0.22 [#] |

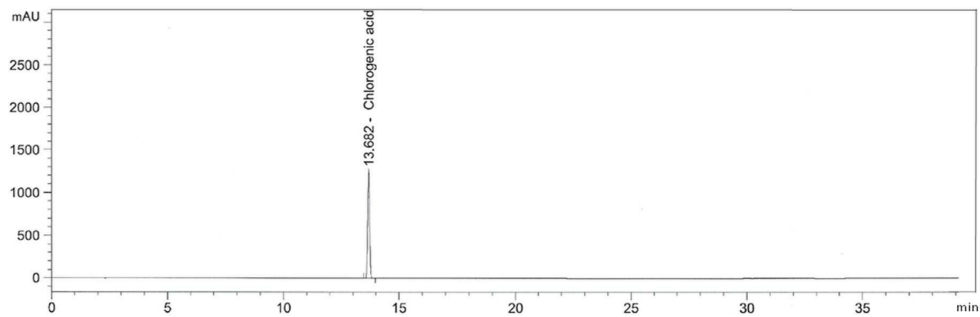
(상기 수치는 평균 ± 표준오차로 표시된 것이고, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$, ### $p < 0.001$ 을 의미한다)

표 18에 나타난 바와 같이, p-AMPK/AMPK의 비율을 통해 AMPK 활성을 평가한 결과, 고지방식이 대조군 (그룹 2)에서 감소한 AMPK의 활성이 mdB-44 200mg/kg BW 투여군 (그룹 3)에서 유의적으로 증가하였다.

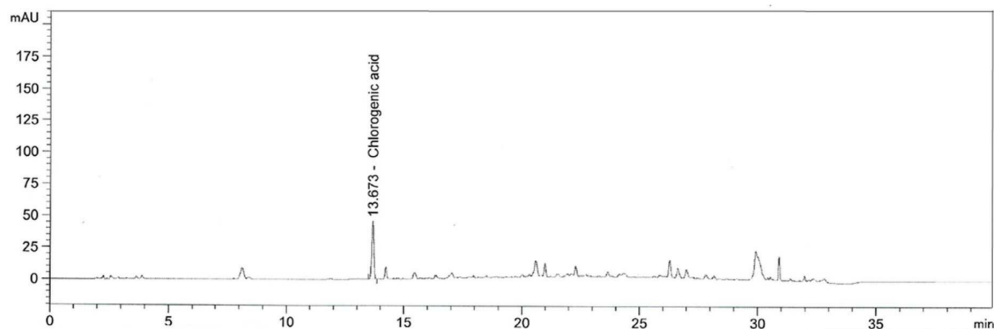
이상 확인된 바와 같이, 고지방식사와 함께 투여한 마르멜로 추출물이 고지방식이에 의해 유도된 체중, 간 및 지방조직 무게, 혈중 콜레스테롤, 혈중 insulin과 leptin 함량 증가를 효과적으로 억제함과, 지방세포의 크기 증가를 억제함을 확인하였다. 이는 마르멜로가 식이성 비만에 대한 항비만 효과 및 지질 개선 효과가 있고 더 나아가 대사성 질환에 예방, 치료, 및/또는 개선 효과가 있음을 제시하며, 향후 항비만 효능 및/또는 대사성 질환에 예방, 치료, 및/또는 개선 효과를 갖는 건강기능성 소재로의 개발 가능성을 제시한다.

도면

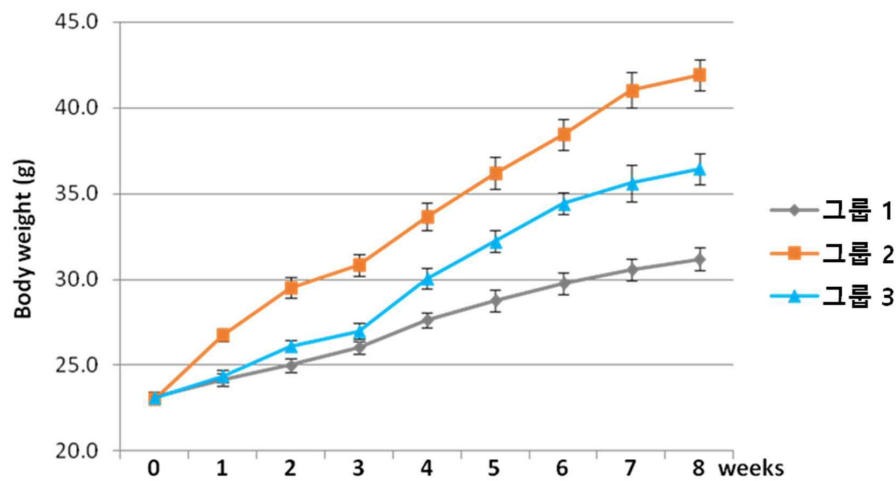
도면1a



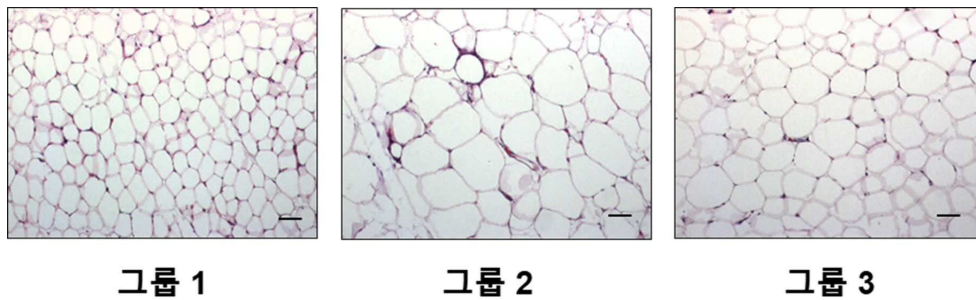
도면1b



도면2



도면3



서열 목록

- <110> BnG Inc.
- <120> Food Composition Comprising Marmelo Extract for Reducing Body Weight or Body Fat
- <130> DPP20205966KR
- <160> 20
- <170> koPatentIn 3.0
- <210> 1
- <211> 23
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence
- <220><223> C/EBPalpha-FOR primer
- <400> 1
- tggacaagaa cagcaacgag tac
- <210> 2

<211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> C/EBPalpha-REV primer
 <400> 2

gcagttgcc atggccttga c 21

<210> 3
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> PPARgamma-FOR primer
 <400> 3

caaaacacca gtgtgaatta 20

<210> 4
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> PPARgamma-REV primer
 <400> 4

accatggtaa tttcttgtga 20

<210> 5
 <211> 22

<212>

> DNA

<213> Artificial Sequence
 <220><223> SREBP-1c-FOR primer
 <400> 5

cacttctgga gacatcgcaa ac 22

<210> 6
 <211> 21
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> SREBP-1c-REV primer
 <400> 6

| | |
|--------------------------------|----|
| atggttagaca acagccgcat c | 21 |
| <210> 7 | |
| <211> 20 | |
| <212> DNA | |
| <213> Artificial Sequence | |
| <220><223> CPT1beta-FOR primer | |
| <400> 7 | |
| gtgctggagg ttgcttttgt | 20 |
| <210> 8 | |
| <211> 20 | |
| <212> DNA | |
| <213> Artificial Sequence | |
| <220><223> CPT1beta-REV primer | |
| <400> 8 | |
| tgcttgacgg atgtggttcc | 20 |
| <210> 9 | |
| <211> 20 | |
| <212> DNA | |
| <213> Artificial Sequence | |
| <220><223> FAS-FOR primer | |
| <400> 9 | |
| aggggtcgac ctggtcctca | 20 |
| <210> 10 | |
| <211> 20 | |
| <212> DNA | |
| <213> Artificial Sequence | |
| <220><223> FAS-REV primer | |
| <400> 10 | |
| gccatgccca gaggttggtt | 20 |
| <210> 11 | |
| <211> 20 | |
| <212> DNA | |
| <213> Artificial Sequence | |

<220><223> aP2-FOR primer
 <400> 11
 ggatttggtc accatccgt 20
 <210> 12
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> aP2-REV primer
 <400> 12
 ttcaccttcc tgcgtctgc 20
 <210> 13
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> HSL-FOR primer
 <400> 13
 ccgttcctgc agactctctc 20
 <210> 14
 <211> 20
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> HSL-REV primer
 <400> 14
 ccacgcaact ctgggtctat 20
 <210> 15
 <211> 18
 <212> DNA
 <213> Artificial Sequence
 <220><223> GAPDH-FOR primer
 <400> 15
 aggttgctctc ctgcgact 18
 <210> 16
 <211> 23

| | | |
|------------|---------------------------|----|
| <212> | DNA | |
| <213> | Artificial Sequence | |
| <220><223> | GAPDH-REV primer | |
| <400> | 16 | |
| | tgctgtagcc gtattcattg tca | 23 |
| <210> | 17 | |
| <211> | 22 | |
| <212> | DNA | |
| <213> | Artificial Sequence | |
| <220><223> | ACC1-FOR primer | |
| <400> | 17 | |
| | ggagatgtac gctgaccgag aa | 22 |
| <210> | 18 | |
| <211> | 19 | |
| <212> | DNA | |
| <213> | Artificial Sequence | |
| <220><223> | ACC1-REV primer | |
| <400> | 18 | |
| | acccgacgca tggttttca | 19 |
| <210> | 19 | |
| <211> | 20 | |
| <212> | DNA | |
| <213> | Artificial Sequence | |
| <220><223> | ACL-FOR primer | |
| <400> | 19 | |
| | tggatgccac agctgactac | 20 |
| <210> | 20 | |
| <211> | 20 | |
| <212> | DNA | |
| <213> | Artificial Sequence | |
| <220><223> | ACL-REV primer | |
| <400> | 20 | |
| | ggttcagcaa ggtcagcttc | 20 |