



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2016년08월23일
 (11) 등록번호 10-1650298
 (24) 등록일자 2016년08월17일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 36/23 (2006.01) *A23L 1/30* (2006.01)
A61K 35/747 (2014.01) *C12N 1/20* (2006.01)
C12R 1/25 (2006.01)
 (21) 출원번호 10-2014-0126417
 (22) 출원일자 2014년09월23일
 심사청구일자 2014년09월23일
 (65) 공개번호 10-2016-0035218
 (43) 공개일자 2016년03월31일
 (56) 선행기술조사문헌
 생명과학회지 제24권 제5호, 2014.5, 476-484
 KR1020100063459 A

(73) 특허권자
배재대학교 산학협력단
 대전광역시 서구 배재로 155-40 (도마동)
 (72) 발명자
김세창
 대전광역시 유성구 상대남로 26, 903동 1801호 (상대동, 도안신도시9블록 트리폴시티아파트)
고지훈
 대전광역시 유성구 가정로 266, 14-304 (가정동, 과기원교수아파트)
 (뒷면에 계속)
 (74) 대리인
특허법인 플러스

전체 청구항 수 : 총 8 항

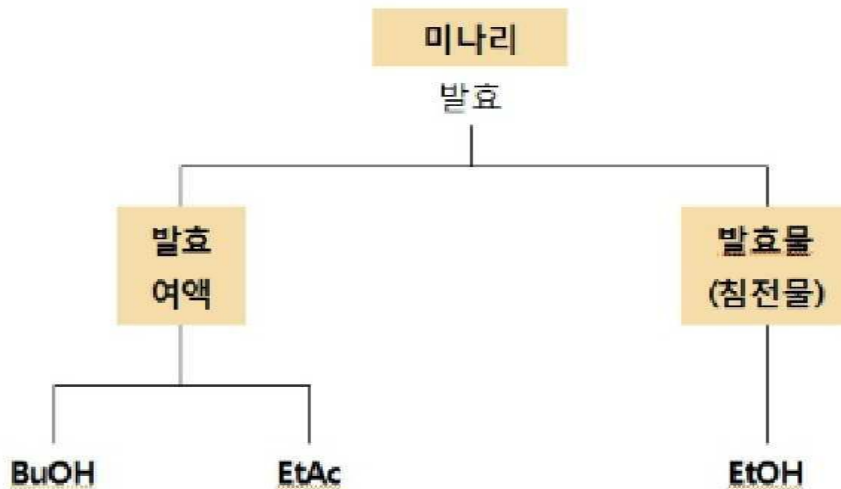
심사관 : 김미화

(54) 발명의 명칭 **미생물 발효에 의한 미나리 추출물을 함유하는 항비만용 조성물 제조 방법**

(57) 요약

본 발명은 천연 물질인 미나리를 *Lactobacillus plantarum* 균주로 발효하여 항비만 효과가 획기적으로 향상된 미나리 발효 추출물을 함유하는 항비만용 조성물에 관한 것이다.

대표도 - 도1



(72) 발명자

강누리

대전광역시 유성구 상대남로 26, 904동 1201호 (상대동, 도안신도시9블록 트리폴시티아파트)

유병희

충청남도 금산군 추부면 승무재로 56

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 C0134610

부처명 중소기업청

연구관리전문기관 한국산학연합회

연구사업명 도약기술개발사업

연구과제명 비만 억제 소재 개발

기여율 1/1

주관기관 배재대학교 산학협력단

연구기간 2013.09.01 ~ 2014.08.31

명세서

청구범위

청구항 1

S1) 락토바실러스 플란타룸(*Lactobacillus plantarum*)을 배지에 배양하여 배양액을 제조하는 단계;
S2) 상기 배양액에 미나리 파쇄물을 첨가한 후 발효하여 발효 미나리 발효액을 제조하는 단계;
S3) 상기 미나리 발효액을 발효 여액과 침전물로 분리하는 단계; 및
S4) 상기 침전물을 에틸알코올 수용액으로 추출하여 발효 미나리 추출물을 제조하는 단계;
를 포함하는 항비만용 조성물 제조 방법.

청구항 2

제 1항에 있어서,
상기 S1) 단계는 32 내지 42℃의 온도에서 60 내지 84 시간 동안 배양하는 것을 포함하는 항비만용 조성물 제조 방법.

청구항 3

제 1항에 있어서,
상기 S2) 단계는 32 내지 42℃의 온도에서 36 내지 60 시간 동안 발효하는 것을 포함하는 항비만용 조성물 제조 방법.

청구항 4

제 1항에 있어서,
상기 S2) 단계는 배양액 100 중량부에 대하여 상기 미나리 파쇄물 5 내지 20 중량부를 첨가하는 것을 포함하는 항비만용 조성물 제조 방법.

청구항 5

제 1항에 있어서,
상기 S3) 단계는 밀도 차를 이용하여 분리하는 것을 포함하는 항비만용 조성물 제조 방법.

청구항 6

제 1항 내지 제 5항 중에서 선택된 어느 한 항에 따른 항비만용 조성물 제조 방법으로 제조된 항비만용 조성물.

청구항 7

제 6항의 상기 항비만용 조성물을 유효성분으로 함유하는 항비만용 건강식품 조성물.

청구항 8

제 6항의 상기 항비만용 조성물을 유효성분으로 함유하는 항비만용 약학적 조성물.

발명의 설명

기술 분야

본 발명은 미나리 추출물을 유효성분으로 함유하는 항비만용 조성물 제조 방법에 관한 것이다.

[0001]

배경 기술

- [0002] 기술의 발전과 교통수단의 발달로 육체적 노동이 감소하여 열량 소모가 급격히 감소하고, 고열량 식품의 증가로 열량 섭취는 증가하여, 열량의 섭취 및 소모 불균형이 발생하게 되었다.
- [0003] 이로 인한 비만으로 인한 다양한 질병을 유발하게 되는데, 이는 인간의 삶의 질을 저하시키며 막대한 공공 의료비의 증가를 수반하게 된다. 통계적 자료에 따르면 최근 5년간의 비만 유병률은 남성이 35% 정도가 유지되고 있으며 여성은 30%에 육박하고 있다.
- [0004] 때문에 이를 해결하기 위한 수많은 연구가 활발히 진행되고 있으며, 비만 억제 방법으로는 크게 열량의 소모를 증가시키는 방안과 열량의 섭취를 제한하는 방법이 있다. 열량의 소모를 증가시키는 방법으로는 규칙적인 운동이 최선의 방법이나 현실적인 어려움이 있으며, 열량의 섭취를 억제하는 방안으로 포만감을 유지시키는 난소화성 당을 섭취하는 방안, 장내의 당 흡수를 억제하는 방안 및 장내 지방의 흡수를 억제하는 하는 방안 등 다양한 방안이 제시되고 있다.
- [0005] 일반적으로 인간이 섭취한 과도한 당은 필요한 열량을 사용한 후 지질의 형태로 저장된다. 또한 장내의 고열량의 지방은 췌장에서 분비되는 lipase에 의해서 체내로 흡수되어 지방세포 등에 축적되게 된다.
- [0006] 또한 현재 상용화되어 있는 비만치료제는 Orlistat 및 Sibutramin 등이 있으며, Orlistat은 pancreatic lipase를 억제하여 장내로 지방이 흡수되는 것을 억제시키는 약리 작용이 있으나 설사 등의 부작용이 발생하는 문제가 있다. sibutramine은 신경전달물질인 norepinephrine, serotonin 및 dopamin의 재흡수를 억제하여 비만을 억제하는 방식을 취하고 있으나 두통, 변비, 불면증, 혈압 증가 및 심박 증가 등의 부작용이 따른다.
- [0007] 이러한 단점을 극복할 수 있는 항비만성 조성물로서, 미나리에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다. 미나리 추출물, 특히 발효 식초를 이용한 미나리 발효액이 간접적으로 항비만 효과가 있다는 연구(J. Life Sci. 2014 vol 24, pp. 476-484)가 보고되었지만, 이는 지방세포 분화 억제에 대한 정도로서 기술되어 있고, 실제 동물 또는 인체에 미치는 정량적 효과에 대해서는 언급되어 있지 않다.

선행기술문헌

특허문헌

- [0008] (특허문헌 0001) 한국공개특허 제10-2014-0047335호

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0009] 본 발명은 천연의 물질인 미나리를 미생물에 의해 발효하여 항비만 효과가 획기적으로 향상된 미나리 발효 추출물을 함유하는 항비만용 조성물 제조 방법을 제공하는 것이다.
- [0010] 본 발명은 상기 항비만용 조성물을 함유하는 항비만용 건강식품 조성물을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0011] 본 발명은 미생물에 의한 발효, 침전물의 분리 및 유기용매를 이용한 추출에 의하여 미나리 추출물을 제조하는 것으로서, 기존의 기술에 의한 미나리 추출물보다 항비만성이 매우 향상된 효과를 갖는 발효 미나리 추출물의 항비만용 조성물 제조 방법에 관한 것이다. 상세하게, 상기 발효 미나리 추출물은 발효 여액과 침전물로 분리하는 과정을 통하여, 항비만 효과가 현저하게 증가한 항비만용 조성물 및 이의 제조방법에 관한 것이다.
- [0012] 본 발명은 S1) *Lactobacillus plantarum*를 배지에 배양하여 배양액을 제조하는 단계; S2) 상기 배양액에 미나리 과쇄물을 첨가한 후 발효하여 발효 미나리 발효액을 제조하는 단계; S3) 상기 미나리 발효액을 발효 여액과 침

전물로 분리하는 단계; 및 S4) 상기 침전물을 에틸알코올 수용액으로 추출하여 발효 미나리 추출물을 제조하는 단계; 를 포함할 수 있다.

- [0013] 본 발명의 일 실시예에 있어서, *Lactobacillus plantarum* 균주는 기존의 연구에서 사용한 효모 또는 초산균과는 다른 특성 또는 효과를 보이는 균주로서, 미나리 발효에 특히 효과적인 균주이다. 상기 효모 또는 초산균은 발효를 위한 준비 단계 또는 스크리닝(Screening) 단계에서 과쇄하는 과정을 거쳐야 하는 단점이 있고, 초산균의 경우 발효 자체가 제대로 진행되지 않는 단점이 있다. 특히 미나리를 발효하는 과정에 있어서, 까다로운 환경 조건들이 많아 발효 정도를 제어하기 어렵고, 무엇보다 발효 자체가 잘 진행되지 않는 효모 또는 초산균과는 달리, *Lactobacillus plantarum* 균주는 미나리 발효 정도의 편차가 크지 않고, 세균 또는 곰팡이와 같은 잡균 등으로 부터의 오염을 최소화할 수 있다.
- [0014] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 S1) 단계는 32 내지 42℃의 온도에서 60 내지 84 시간 동안 배양하는 것을 포함할 수 있다.
- [0015] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 S2) 단계는 32 내지 42℃의 온도에서 36 내지 60 시간 동안 배양하는 것을 포함할 수 있다.
- [0016] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 S2) 단계는 배양액 100 중량부에 대하여 상기 미나리 과쇄물 5 내지 20 중량부를 첨가하는 것을 포함할 수 있다.
- [0017] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 S3) 단계는 밀도 차를 이용하여 분리하는 것을 포함할 수 있다. 특히 원심분리기를 이용하면 빠른 시간 내에 효율적으로 발효 여액 및 침전물로 분리할 수 있다. 이러한 분리 과정을 더 거치면 항비만 효과가 향상될 수 있다.
- [0018] 본 발명의 일 실시예에 있어서, S4) 단계에서 침전물을 에틸알코올을 사용하여 추출할 수 있다. 일반적으로 추출하는 과정에서 쓰이는 유기용매는 부틸알코올, 에틸알코올 및 에틸아세테이트 등 수많은 종류가 있지만, 특히 에틸알코올은 발효 미나리 추출물을 침전물에서 추출하는 데에 있어 매우 효과적이다. 상세하게, 발효 미나리 침전물에서 항비만 효과가 보다 뛰어난 성분 또는 이를 포함한 화합물을 얻기 위해서는 에틸알코올을 사용하는 것이 매우 효과적임을 본 발명의 연구를 통하여 확인하였다. 이는 발효여액 및 침전물의 분리로 얻은 침전물을 에틸알코올로 추출할 경우, 다른 유기용매의 추출로 얻은 추출물보다 항비만 효과가 현저하게 증가하는 시너지 효과로 볼 수 있다.
- [0019] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 에틸알코올 수용액은 에틸알코올 및 물을 포함할 수 있고, 에틸알코올 100 중량부에 대하여 물 35 내지 50 중량부일 수 있다. 에틸알코올을 사용하여 추출하는 것도 좋지만, 항비만 효과에 보다 효과적인 발효 미나리 추출물을 얻기 위해서는, 에틸알코올 100 중량부에 대하여 물 35 내지 50 중량부를 포함하는 에틸알코올 수용액을 사용하는 것이 바람직하다.
- [0020] 본 발명에 따른 항비만용 조성물 제조 방법으로 제조된 항비만용 조성물은 이를 유효성분으로 함유하는 항비만용 건강식품 조성물 및 약학적 조성물로 제조될 수 있다.
- [0021] 본 발명의 항비만용 조성물을 유효성분으로 함유하는 항비만용 건강식품 및 약학적 조성물은 추가로 동일 또는 유사한 기능을 나타내는 유효성분을 1종 이상 함유할 수 있다.
- [0022] 본 발명의 항비만용 조성물은 다른 식품 또는 식품 성분과 함께 항비만용 건강식품조성물로 사용될 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다. 상기 건강식품 조성물의 종류로서 특별한 제한은 없으나, 예컨대 육류, 소시지, 빵, 초콜릿, 캔디류, 스낵류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류를 포함한 낙농제품, 각종 스프, 음료수, 차, 드링크제, 알코올음료 및 비타민 복합제 등을 예시할 수 있으며, 통상적인 의미에서의 건강식품을 모두 포함할 수 있다. 또한 항비만용 건강식품 조성물로서 한정되는 것이 아니라, 본 발명의 항비만용 조성물을 포함한 건강식품 모두를 포함할 수 있다.
- [0023] 본 발명의 항비만용 건강식품 조성물은 상기 이외에 여러 가지 영양제, 비타민, 전해질, 풍미제, 착색제, 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알코올, 탄산음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다. 그 밖에 천연 과일주스, 과일주스 음료 및 야채음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다. 이러한 성분은 독립적으로 또는 혼합하여 사용할 수 있다. 이러한 첨가제의 함량은 크게 중요하진 않지만 본 발명의 건강식품 조성물 100 중량부당 0.01 내지 0.5 중량부의 범위에서 선택되는 것이 일반적이다.
- [0024] 본 발명의 약학적 조성물은 약학적으로 허용 가능한 첨가제를 더 포함할 수 있다. 상기 첨가제는 예컨대 전분,

젤라틴화 전분, 미결정셀룰로오스, 포비돈, 콜로이드알실리콘디옥사이드, 인산수소칼슘, 락토오스, 만니톨, 엷, 아라비아고무, 전호화전분, 옥수수전분, 분말셀룰로오스, 히드록시프로필셀룰로오스, 오파드라이(opary), 전분글리콜산나트륨, 카르나우바 납, 합성규산알루미늄, 스테아린산, 스테아린산마그네슘, 스테아린산알루미늄, 스테아린산칼슘, 백당, 텍스트로스, 소르비톨 및 탈크 등을 예시할 수 있다.

- [0025] 본 발명의 약학적 조성물은 실제 임상 투여 시에 경구 및 비경구의 여러 가지 제형으로 투여될 수 있다. 제제화할 경우에는 통상적으로 사용하는 충전제, 증량제, 결합제, 습윤제, 봉해제 및 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제될 수 있다. 경구 투여를 위한 고형제에는 정제, 환제, 산제, 과립제 및 캡슐제 등이 포함될 수 있으며, 이러한 고형제에는 발효 미나리 추출물에 적어도 하나 이상의 부형제가 혼합될 수 있다. 상기 부형제는 예컨대 전분, 탄산칼슘, 수크로스, 락토오스 및 젤라틴 등을 예시할 수 있다. 또한 단순 부형제 이외에 마그네슘 스티레이트 탈크 같은 윤활제들도 더 사용될 수 있다. 경구 투여를 위한 액상제제로는 현탁제, 내용액제, 유제 및 시럽제 등이 포함될 수 있으며, 통상적으로 사용되는 단순 희석제인 물 및 액상과라핀 이외에 여러 가지 부형제가 혼합될 수 있다. 상기 부형제는 예컨대, 습윤제, 감미제, 방향제 및 보존제 등을 예시할 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수용성제, 현탁제, 유제, 동결건조제 및 좌제가 포함될 수 있다. 상기 비수용성제 및 상기 현탁제로는 프로필렌글리콜, 폴리에틸렌 글리콜 및 올리브 오일과 같은 식물성 기름과 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텝솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지 및 글리세로젤라틴 등이 사용될 수 있다.
- [0026] 본 발명의 약학적 조성물은 목적하는 방법에 따라 경구 투여 및 비경구 투여가 가능하며, 비경구 투여 시 피부 외용 또는 복강 내 주사, 직장 내 주사, 피하주사, 정맥주사, 근육내 주사 또는 흉부내 주사 주입방식으로 투여될 수 있다.
- [0027] 본 발명의 약학적 조성물의 투여량은 환자의 체중, 연령, 성별, 건강상태, 식이, 투여시간, 투여방법, 배설물 및 질환의 중증도에 따라 그 범위가 다양하다.
- [0028] 본 발명의 약학적 조성물은 단독으로, 또는 수술, 방사선 치료, 호르몬 치료, 화학 치료 및 생물학적 반응 조절제를 사용하는 방법들과 병용하여 사용할 수 있다.

발명의 효과

- [0029] 본 발명의 항비만용 조성물 제조 방법은 천연 물질인 미나리를 *Lactobacillus plantarum* 균주로 발효하여 분리 및 추출한 것으로, 생체 내 지방흡수와 관련이 있는 체장 리파아제에 대한 저해 활성을 보다 향상시켜 비만 억제 효과를 보다 향상시킬 수 있다.
- [0030] 본 발명의 항비만용 조성물 제조 방법으로 제조된 항비만용 조성물은 복용 시 설사, 두통, 변비, 불면증, 혈압 증가 및 심박 증가 등과 같은 부작용이 없는 장점이 있다.

도면의 간단한 설명

- [0031] 도 1은 미생물 발효에 의한 미나리 추출물을 함유하는 항비만용 조성물 제조 방법을 모식화한 도면이다.
 도 2 내지 도 5는 지질 부위의 염색정도를 400 배율의 현미경으로 관찰한 결과를 나타낸 도면이다. 도 2 내지 도 4는 실시예 2에 따른 것이고, 도 5는 비교예 4에 따른 것이다.
 도 6 내지 도 9는 실시예 3에 따른 처리군과, 비교예 5에 따른 비처리군의 해부한 것을 나타낸 도면이다.
 도 10은 실시예 3에 따른 항비만용 조성물이 동물에 영향을 미치는 효과를 나타낸 것으로, 생화학적 지표(혈당 및 Tryglyceride)를 검사하여 그 결과를 나타낸 그래프이다.(단위 mg/dL)

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0032] 이하 첨부한 도면들을 참조하여 본 발명의 미생물 발효에 의한 미나리 추출물을 함유하는 항비만용 조성물 제조 방법을 상세히 설명한다. 다음에 소개되는 도면들은 당업자에게 본 발명의 사상이 충분히 전달될 수 있도록 하기 위해 예로서 제공되는 것이다. 따라서 본 발명은 이하 제시되는 도면들에 한정되지 않고 다른 형태로 구체화될 수도 있으며, 이하 제시되는 도면들은 본 발명의 사상을 명확히 하기 위해 과장되어 도시될 수 있다. 이때,

사용되는 기술 용어 및 과학 용어에 있어서 다른 정의가 없다면, 이 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자가 통상적으로 이해하고 있는 의미를 가지며, 하기의 설명 및 첨부 도면에서 본 발명의 요지를 불필요하게 흐릴 수 있는 공지 기능 및 구성에 대한 설명은 생략한다.

- [0033] (제조예 1)
- [0034] 미나리 1 kg을 분쇄기로 파쇄하여 미나리 파쇄물을 제조하였다.
- [0035] 멸균한 MRS(de Man, Rogosa and Sharpe)(DIFCO, USA) 배지에 락토바실러스 플란타룸(Lactobacillus plantarum) KACC 11451 균주를 37℃의 온도에서 72 시간 동안 배양한 후, 배양액 500 g의 10%에 해당하는 상기 미나리 파쇄물 50 g을 첨가하고 37℃의 온도에서 48 시간 동안 배양하여 발효 미나리 파쇄물을 제조하였다.
- [0036] 그 다음 상기 발효 미나리 파쇄물을 원심분리기를 사용하여 발효 여액과 침전물로 분리하였다. 상기 침전물에 70%의 에틸알코올 수용액을 사용하여 혼합한 후, 상등액을 증류하여 추출 및 분리하여 스피드 베큘(Speed vacuum)(Speed-Vacuum Concentrator 5301, Eppendorf)을 사용하여 건조한 후, 침전물 분리액을 얻었다.
- [0037] (제조예 2)
- [0038] 70%의 에틸알코올 수용액 대신 부틸알코올을 사용한 것을 제외하고, 제조예 1에 따라 침전물 분리액을 얻었다.
- [0039] (제조예 3)
- [0040] 70%의 에틸알코올 수용액 대신 에틸아세테이트를 사용한 것을 제외하고, 제조예 1에 따라 침전물 분리액을 얻었다.
- [0041] (실시예 1)
- [0042] 제조예 1 내지 제조예 3의 침전물 분리액 시료가 리파아제(lipase) 활성에 미치는 영향을 평가하기 위하여 돼지 췌장 리파아제를 이용하여 리파아제 저해 활성의 활성도를 측정하였다.
- [0043] 효소원은 돼지 췌장에서 분리한 리파아제(Sigma # L3126)를 1 mM 에틸렌디아민테트라아세트산(Ethylene diamine tetraacetic acid; EDTA)가 포함된 10 mM MOPS(3-(n-Morpholino)propanesulfonic acid)(pH 6.8) 완충액에 녹여 사용하였으며, 완충액은 5 mM CaCl₂가 포함된 100 mM Tris HCl (pH 7.0)로 하였고, 기질은 10 mM pNPB(p-Nitrophenyl butyrate)로 하였다. 37℃의 온도에서 15 분 동안 반응시킨 후, 405 nm 파장의 흡광도를 측정하였다. 저해 활성은 시료 처리군과 무처리군의 흡광도 차이로 계산하였다. 즉, 저해 활성은 시료처리군 흡광도/무처리군 흡광도로 계산하였다.
- [0044] (실시예 2)
- [0045] 3T3-L1 세포를 전구지방세포로 사용하여 지방세포로 분화되는 과정을 관찰하는 것으로, Lise MADSEN의 방법(Biochem. J. 2003, 375, 539-549)을 이용하여 실시예 1에 따른 침전물 분리액 시료의 지질 억제 능력을 조사하였다.
- [0046] 기본 배지로 DMEM(Dulbecco's modified Eagle's medium), 10% FBS(Fetal bovine serum), 1% 페니실린 스트렙토마이신(Penicillin streptomycin), 25 mM NaHCO₃ 및 25 mM HEPES(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid) 완충액을 사용하여 12 well plate에 1×10⁵ cells/ml의 세포의 양으로 처리하였다. 그리고 각각 침전물 분리액 시료 1 mg/ml, 10 mg/ml 및 100 mg/ml를 투입하여, 5% CO₂ 환경 및 37℃의 온도에서 융합(confluence)될 때까지 배양하여 각각 실험하였다.
- [0047] 텍사메타손(Dexamethasone) 1, 이소부틸메틸크산틴(Isobutylmethylxanthine) 0.5mM, 인슐린 1/ml이 첨가된 배지로 교체하고 2일 동안 분화를 유도하였다. 지방세포로 분화된 것을 확인하고 1/ml 인슐린이 첨가된 배지로 교체하여 2 일 동안 더 배양하였다.
- [0048] 배양 종료 후 배지를 제거하고 인산완충식염수(Phosphate buffered saline, PBS) 2 ml로 세척하였다. 이 후 세포의 고정을 위하여 10% 포르말린 2 ml 첨가하고 상온에서 30 분 동안 처리하고 증류수 2 ml로 세척하였다. 60% 이소프로판올(isopropanol) 2 ml 첨가하고 5분 후 세척하고, 오일 레드 오 용액(oil red o solution) 2 ml 첨가하여 5 분 동안 상온에서 방치하였다. 비 지질 부위의 염색을 제거하기 위하여 증류수로 세척한 후, 400 배율

의 현미경으로 관찰하였다. 또한 염색정도를 정량적으로 측정하기 위하여 99% 이소프로판올 2 ml를 용해한 후, 540 nm 파장으로 흡광도를 측정하였다.

- [0049] (실시에 3)
- [0050] 사육 조건은 온도 22 ± 2 도, 습도는 $55 \pm 5\%$ 로 유지하였으며 12시간 명암주기 (오전 9시 ~ 오후 9시)로 하였다.
- [0051] 실험동물(ICR mice, ♂, 23g)은 각 군별로 10 마리 씩 4 개군(25 mg/ml 처리군, 50 mg/ml 처리군, 100 mg/ml 처리군)으로 하였다.(실시에 1에 따른 침전물 분리액을 사용하였다.)
- [0052] 실험동물에게는 고지방식이(조성 : 카제인(Casein) 200g, L-시스틴(L-Cystine) 3g, 말토덱스트린(Maltodextrin) 125g, 자당(sucrose) 68.8g, 셀룰로오스(Cellulose) 50g, 콩기름(Soybean) Oil 25g, 라드(Lard) 245g, 미네랄믹스(Mineral mix) 10g, 인산이칼슘(DiCalcium phosphate) 13g, 탄산칼슘(Calcium carbonate) 5.5g, 칼륨시트르산(Potassium citrate) 16.5g, 비타민믹스(Vitamin Mix) 10g, 콜린바이탈레이트(Choline bitartrate) 2g 및 FD&C Blue Dye 0.05g)를 섭취시켰다.
- [0053] 각 시험군은 실시에 1에 따른 침전물 분리액의 농도를 0.5 ml로 맞추어 25 일 동안 경구 투여한 후, 매일 체중을 측정하였으며, 25일 후 채혈하여 생화학적 지표(혈당, Triglyceride)를 확인하였고, 해부하여 지방 세포 정도를 관찰하였다.
- [0054] (비교예 1)
- [0055] 제조예 1에 따른 미나리 과쇄물과 에틸알코올 2 kg을 혼합하여 추출 및 분리한 후, 스피드 베큘으로 건조하여 미나리 추출물을 제조하였다. 침전물 분리액 시료 대신 상기 미나리 추출물을 첨가한 것을 제외하고, 실시에 1과 동일하게 실험을 실시하였다.
- [0056] (비교예 2)
- [0057] 제조예 1에 따른 미나리 과쇄물과 부틸알코올 2 kg을 혼합하여 추출 및 분리한 후, 스피드 베큘으로 건조하여 미나리 추출물을 제조하였다. 침전물 분리액 시료 대신 상기 미나리 추출물을 첨가한 것을 제외하고, 실시에 1과 동일하게 실험을 실시하였다.
- [0058] (비교예 3)
- [0059] 제조예 1에 따른 미나리 과쇄물과 에틸아세테이트 2 kg을 혼합하여 추출 및 분리한 후, 스피드 베큘으로 건조하여 미나리 추출물을 제조하였다. 침전물 분리액 시료 대신 상기 미나리 추출물을 첨가한 것을 제외하고, 실시에 1과 동일하게 실험을 실시하였다.
- [0060] (비교예 4)
- [0061] 제조예 1에 따른 발효 미나리 과쇄물과 에틸알코올 2 kg을 혼합하여 추출 및 분리한 후, 스피드 베큘으로 건조하여 미나리 추출물을 제조하였다. 침전물 분리액 시료 대신 상기 미나리 추출물을 첨가한 것을 제외하고, 실시에 1과 동일하게 실험을 실시하였다.
- [0062] (비교예 5)
- [0063] 제조예 1에 따른 발효 미나리 과쇄물과 부틸알코올 2 kg을 혼합하여 추출 및 분리한 후, 스피드 베큘으로 건조하여 미나리 추출물을 제조하였다. 침전물 분리액 시료 대신 상기 미나리 추출물을 첨가한 것을 제외하고, 실시에 1과 동일하게 실험을 실시하였다.
- [0064] (비교예 6)
- [0065] 제조예 1에 따른 발효 미나리 과쇄물과 에틸아세테이트 2 kg을 혼합하여 추출 및 분리한 후, 스피드 베큘으로 건조하여 미나리 추출물을 제조하였다. 침전물 분리액 시료 대신 상기 미나리 추출물을 첨가한 것을 제외하고, 실시에 1과 동일하게 실험을 실시하였다.
- [0066] (비교예 7)
- [0067] 침전물 분리액 시료를 첨가하지 않은 것을 제외하고, 실시에 2와 동일하게 실험을 실시하였다.
- [0068] (비교예 8)

[0069] 실험동물(ICR mice, ♂, 23g)을 10 마리 씩 1 개군(0 mg/ml, 비처리군)으로 한 것을 제외하고, 실시예 3와 동일하게 실험하였다.

[0070] <리파아제 활성에 미치는 효과>

[0071] 하기 표 1은 실시예 1 및 비교예 1 내지 비교예 3에 따른 항비만용 조성물이 리파아제 활성에 미치는 영향에 대한 결과를 나타낸 표이다. 분리 형태는 밀도차를 이용한 발효 여액 및 침전물 분리의 유무를 나타낸다.

표 1

	발효 상태	분리 상태	유기용매	저해 활성(Inhibition) (%)
실시예 1	발효 함	침전물	에틸알코올 층	65.82
			부틸알코올 층	55.14
			에틸아세테이트 층	52.53
비교예 1	발효 안함	분리 안함	에틸알코올 층	8.74
비교예 2			부틸알코올 층	9.81
비교예 3			에틸아세테이트 층	9.41
비교예 4	발효 함	분리 안함	에틸알코올 층	47.9
비교예 5			부틸알코올 층	43.3
비교예 6			에틸아세테이트 층	45.8

[0072]

[0073] 발효 여액 및 침전물의 분리를 한 경우, 시너지 효과로 인하여 리파아제 저해 활성이 보다 향상됨을 확인하였다.

[0074] 또한 발효 여액 및 침전물의 분리를 한 경우에 있어서, 부틸알코올 및 에틸아세테이트에 의한 분리 및 추출한 경우보다 에틸알코올로 분리 및 추출한 경우가 리파아제 저해 활성에 큰 효과가 있음을 확인하였다.

[0075] <배양 세포에서의 지질 형성 억제 효과>

[0076] 도 2 내지 도 5는 지질 부위의 염색정도를 400 배율의 현미경으로 관찰한 결과이다. 도 2 내지 도 4는 실시예 2에 따른 것이고, 도 5는 비교예 7에 따른 것이다. 도 2, 도 3, 도 4 및 도 5는 각각 1 mg/ml, 10 mg/ml 100 mg/ml 및 0 mg/ml의 침전물 분리액 시료를 첨가한 것으로, 시료의 양이 증가할수록 지방 세포로 분화가 감소하는 효과가 있음을 확인할 수 있다.

[0077] 하기 표 2는 실시예 2 및 비교예 7에 따른 시료가 배양 세포에서 지질 형성 억제 효과에 대한 결과를 나타낸 표이다. 오일 레드 오 용액을 이용하여 3T3-L1 지방세포의 분화를 정량적으로 분광광도계(Spectrophotometer)를 이용하여 540 nm에서 측정하였다.

표 2

	시료 양 (mg/ml)	흡광도
실시예 2	1	90.80
	10	72.20
	100	44.72
비교예 7	0	100

[0078]

[0079]

마찬가지로 첨가한 시료의 양이 증가할수록 지방 세포로의 분화의 감소 효과가 현저하게 나타남을 확인할 수 있다.

[0080]

<동물에 대한 비만 억제 효과>

[0081]

도 6 내지 도 9는 실시예 3에 따른 처리군과, 비교예 8에 따른 비처리군의 해부 사진이다. 침전물 분리액의 양이 증가할수록 지방세포가 감소하는 것을 확인할 수 있다.

[0082]

도 10은 실시예 3 및 비교예 8에 따른 항비만용 조성물이 동물에 영향을 미치는 효과를 나타낸 것으로, 생화학적 지표(혈당 및 중성지방(Tryglyceride))를 검사하여 그 결과를 나타낸 그래프이다.(단위 mg/dL) 25일 후 채혈하여 생화학적 지표를 확인하였다. 혈당은 비처리군에 비해 처리군이 약 10% 감소하였으며, 중성지방은 비처리군에 비해 처리군이 약 60% 감소하였다.

[0083]

또한 25일 동안 매일 비처리군 및 처리군의 체중을 측정된 결과, 25일 후 비처리군에 비해 처리군의 체중이 약 10% 감소한 것을 확인할 수 있었다.

[0084]

<보존 안정성>

[0085]

하기 표 3은 미나리 발효 침전물 분리액을 직사광선이 비치지 않은 상온의 무균 환경에서 6 개월 동안 방치하여 안정성을 평가한 것으로, 초기 시료 상태와 6 개월 후의 시료 상태를 비교 분석하여 측정하였다. 향 및 색은 5 점법(5-변하지 않음, 4-거의 변하지 않음, 3-변함, 2-조금 변함, 1-매우 변함)을 적용하여 관능검사를 실시하였다. 관능검사에 참여한 실험자는 일반인 남녀로 구성된 총 50명으로, 실시예 1 및 비교예 1 내지 6에 따른 시료 총 20 개에 대하여 실험을 실시하였다. 그 후 각 자료를 취합하여 평균을 내어 1 내지 5의 자연수 값으로 평가하였다. 저해 활성 또한 실시예 1의 실험 방법을 통하여 상기 시료 20 개에 대하여 실험을 실시하였다.

표 3

	발효 상태	분리 상태	향	색	저해 활성(Inhibition) (%)의 변화(%)
실시예 1	발효 함	침전물	5	4	20.7
비교예 1	발효 안함	분리 안함	2	2	87.8
비교예 2					
비교예 3					
비교예 4	발효		1	2	65.3
비교예 5					
비교예 6					

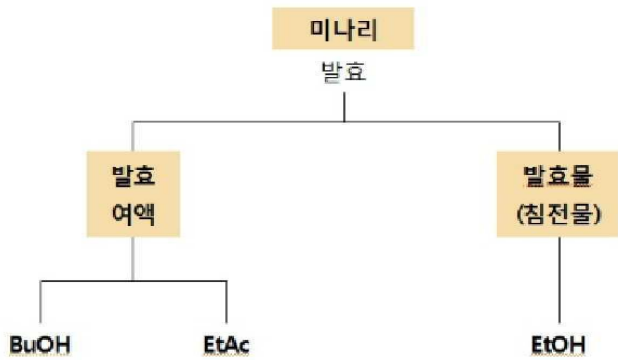
[0086]

[0087] 분리 과정을 거치지 않은 미나리 발효 추출물의 경우 6 개월이 지난 후에는 물리적 또는 화학적 구조(향, 색, 및 리파아제 저해 활성)가 상당히 변한 것을 직간접적으로 확인할 수 있었지만, 분리 과정을 거쳐 추출한 본 발명의 미나리 발효 침전물 분리액의 경우 거의 변하지 않은 것을 직간접적으로 확인할 수 있었다.

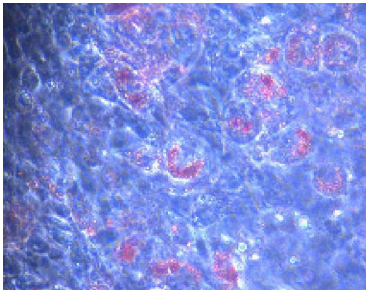
[0088] 본 발명의 사상은 설명된 실시예에 국한되어 정해져서는 안 되며, 후술하는 특허청구범위뿐 아니라 이 특허청구범위와 균등하거나 등가적 변형이 있는 모든 것들은 본 발명 사상의 범주에 속한다고 할 것이다.

도면

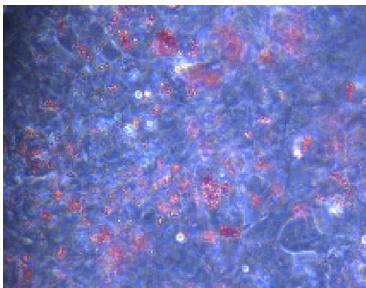
도면1



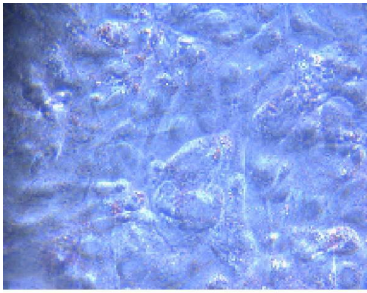
도면2



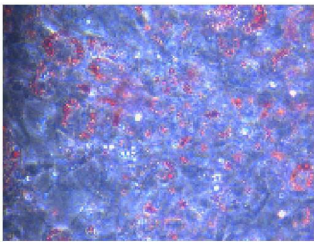
도면3



도면4



도면5



도면6



도면7



도면8



도면9



도면10

