



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2018년03월16일
(11) 등록번호 10-1838588
(24) 등록일자 2018년03월08일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 36/82 (2006.01) A61K 36/44 (2006.01)
A61K 36/48 (2006.01) C12P 1/04 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2010-0125468
(22) 출원일자 2010년12월09일
심사청구일자 2015년11월30일
(65) 공개번호 10-2012-0064299
(43) 공개일자 2012년06월19일
(56) 선행기술조사문헌
KR1020100122296 A*
KR1020100059719 A*
KR1020100091393 A
KR1020100124519 A
*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
(주)아모레퍼시픽
서울특별시 용산구 한강대로 100(한강로2가)
(72) 발명자
김수경
경기도 의왕시 보석골로 13 202동 1602호 (오전동, 성원이화아파트)
신현정
서울특별시 금천구 시흥대로130길 17 (독산동) (뒷면에 계속)
(74) 대리인
김영철, 임희택, 김 순 영

전체 청구항 수 : 총 17 항

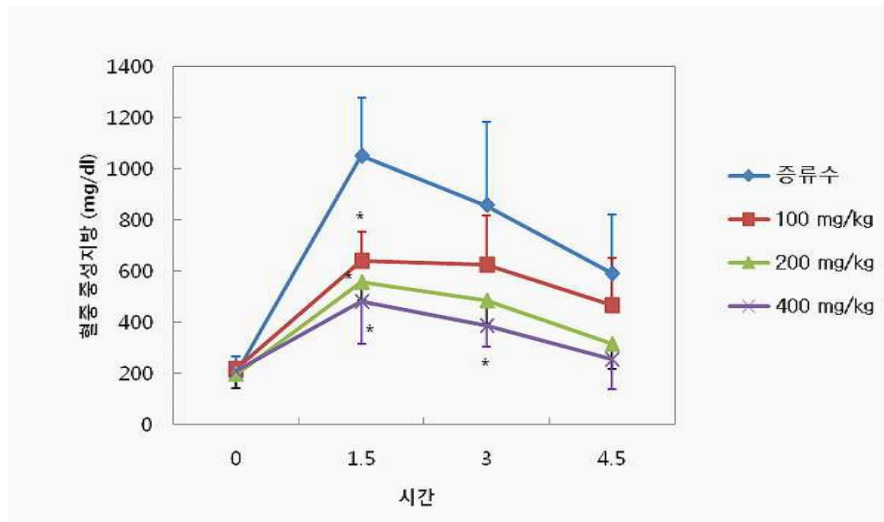
심사관 : 김미화

(54) 발명의 명칭 발효차 추출물을 포함하는 지질 수준 감소용 조성물

(57) 요약

본 발명은 차(tea)에 장류 유래 균주를 접종하여 얻은 발효차 추출물을 유효 성분으로 포함하는 체내 지질 수준 감소용, 섭취 지질 분해 억제용 및 섭취 지질 배출 촉진용 조성물을 개시한다.

대표도 - 도1



(72) 발명자

라찬수

경기도 용인시 기흥구 동백5로 79, 백현마을롯데캐슬아파트 2003동 1804호 (중동)

오유진

경기도 성남시 분당구 금곡로 39, 113동 203호 (구미동, 화이트빌)

이범진

서울특별시 송파구 충민로6길 14, 송파파인타운아파트 602동 902호 (장지동)

김채욱

경기도 용인시 기흥구 용구대로 1842, 현대모닝사이드아파트 101동 1703호 (보라동)

서대방

경기도 용인시 기흥구 금화로11번길 10, 금화마을주공아파트 308동 1503호 (상갈동)

정진오

경기도 성남시 분당구 정자로 143, 202동 702호 (정자동, 한솔마을)

이상준

경기도 성남시 분당구 정자로 143, 205동 702호 (정자동, 한솔마을)

명세서

청구범위

청구항 1

녹차에 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*)를 접종하여 얻은 발효차 추출물을 유효 성분으로 포함하는 체내 지질 수준 감소용 식품 조성물로서, 상기 조성물은 식후 고중성지방혈증을 개선하는 것인, 체내 지질 수준 감소용 식품 조성물.

청구항 2

녹차에 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*)를 접종하여 얻은 발효차 추출물을 유효 성분으로 포함하는 섭취 지질 분해 억제용 식품 조성물로서, 상기 조성물은 식후 고중성지방혈증을 개선하는 것인, 섭취 지질 분해 억제용 식품 조성물.

청구항 3

녹차에 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*)를 접종하여 얻은 발효차 추출물을 유효 성분으로 포함하는 섭취 지질 배출 촉진용 식품 조성물로서, 상기 조성물은 식후 고중성지방혈증을 개선하는 것인, 섭취 지질 배출 촉진용 식품 조성물.

청구항 4

삭제

청구항 5

삭제

청구항 6

제 1 항에 있어서,

발효차 추출물은 발효차를 알코올로 추출한 추출물인 조성물.

청구항 7

제 1 항에 있어서,

지질은 중성 지방(triglyceride)인 조성물.

청구항 8

제 1 항에 있어서,

조성물은 비만 예방 또는 개선용인 조성물.

청구항 9

제 1 항에 있어서,
조성물은 심혈관계 질환 예방 또는 개선용인 조성물.

청구항 10

녹차에 바실러스 서브틸러스(*Bacillus subtilis*)를 접종하여 얻은 발효차 추출물을 유효 성분으로 포함하는 비만 예방 또는 치료용 약학적 조성물로서, 상기 조성물은 식후 고중성지방혈증을 개선하는 것인, 비만 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 11

녹차에 바실러스 서브틸러스(*Bacillus subtilis*)를 접종하여 얻은 발효차 추출물을 유효 성분으로 포함하는 심혈관계 질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물로서, 상기 조성물은 식후 고중성지방혈증을 개선하는 것인, 심혈관계 질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 12

제 2 항에 있어서,
발효차 추출물은 발효차를 알코올로 추출한 추출물인 조성물.

청구항 13

제 2 항에 있어서,
지질은 중성 지방(triglyceride)인 조성물.

청구항 14

제 2 항에 있어서,
조성물은 비만 예방 또는 개선용인 조성물.

청구항 15

제 2 항에 있어서,
조성물은 심혈관계 질환 예방 또는 개선용인 조성물.

청구항 16

제 3 항에 있어서,
발효차 추출물은 발효차를 알코올로 추출한 추출물인 조성물.

청구항 17

제 3 항에 있어서,

지질은 중성 지방(triglyceride)인 조성물.

청구항 18

제 3 항에 있어서,

조성물은 비만 예방 또는 개선용인 조성물.

청구항 19

제 3 항에 있어서,

조성물은 심혈관계 질환 예방 또는 개선용인 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 발효차 추출물을 포함하는 체내 지질 수준 감소용 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 녹차를 예로 들 수 있는 여러 종류의 차들은, 예로부터 기호 식품으로 널리 알려져 있다. 그 중에서 녹차는 잎 상태의 엽차 형태로 음용하기도 하지만, 보다 깊은 향취를 느끼기 위해 발효 상태의 차로 음용하기도 한다. 예를 들어, 발효 녹차는 발효 형태 및 정도에 따라, 녹차, 우롱차, 홍차, 보이차 등과 같은 다양한 명칭으로 불리워진다. 발효 상태의 차는 엽차와 비교할 때, 향취에 있어 차이를 나타낼 뿐만 아니라 발효 과정에서 다양한 정도로 변화된 유효 성분을 가질 수 있다.

[0003] 한편, 현대인들은 지방질의 섭취 기회 및 섭취량은 많아졌음에 반해 운동량은 부족하고, 각종 다양한 스트레스를 받으며 살아가고 있다. 이러한 생활 패턴의 변화는 다양한 종류의 성인병을 유발하며, 특히 비만, 심혈관계 질환을 예로 들 수 있는 다양한 질환을 일으킨다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0004] 본 발명은 체내 지질 수준 감소용, 섭취 지질 분해 억제용 및 섭취 지질 배출 촉진용 조성물을 제공하여, 비만 또는 심혈관계 질환을 예방 또는 치료하는 조성물을 제공하고자 한다.

과제의 해결 수단

[0005] 본 발명의 일측면은 차(tea)에 장류 유래 균주를 접종하여 얻은 발효차 추출물을 유효 성분으로 포함하는 체내 지질 수준 감소용 조성물을 제공한다.

[0006] 본 발명의 다른 일측면은 차(tea)에 장류 유래 균주를 접종하여 얻은 발효차 추출물을 유효 성분으로 포함하는 섭취 지질 분해 억제용 조성물을 제공한다.

[0007] 본 발명의 또 다른 일측면은 차(tea)에 장류 유래 균주를 접종하여 얻은 발효차 추출물을 유효 성분으로 포함하는 섭취 지질 배출 촉진용 조성물을 제공한다.

발명의 효과

[0008] 본 발명에 따른 조성물은 차에 장류 유래 균주를 접종하여 얻은 발효차 추출물을 유효 성분으로 포함함으로써,

체내 지질 수준 감소, 섭취 지질 분해 억제 및 섭취 지질 배출 촉진 효과를 가진다. 이는 일반적인 녹차나 우롱차를 예로 들 수 있는 발효차에 비해 그 효과가 현저히 우수하다. 또한 본 발명에 따른 조성물은 상기 효과를 가짐으로써, 비만 및 심혈관계 질환을 예방 또는 치료할 수 있으며, 약학 또는 식품 분야를 예로 들 수 있는 다양한 분야에서 널리 활용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0009] 도 1은 동물 모델의 발효차 추출물 100, 200 및 400 mg/kg 단회 투여군에 있어 고지방 부하 후 혈중 중성 지방 수치 변화를 증류수 투여군과 비교하여 나타낸 그래프이다.
- 도 2는 동물 모델의 발효차 추출물 100 및 200 mg/kg 단회 투여군에 있어, 변중 지질 배설량(mg/g)을 증류수 투여군과 비교하여 나타낸 그래프이다.
- 도 3은 동물 모델의 발효차 추출물 200mg/kg 장기간 투여군에 있어 고지방 부하 후 혈중 중성 지방 수치 변화를 증류수 투여군과 비교하여 나타낸 그래프이다.
- 도 4는 동물 모델의 발효차 추출물 200 mg/kg 장기간 투여군에 있어, 변중 지질 배설량(mg/g)을 증류수 투여군과 비교하여 나타낸 그래프이다.
- 도 5는 사람의 발효차 추출물 투여군에 있어 고지방 부하 후 혈중 중성 지방 수치 변화량(ΔTG)을 물 투여군과 비교하여 나타낸 그래프이다.
- 도 6은 도 5 그래프의 직선 아래 면적(AUC)을 나타낸 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0010] 체내에 소화, 흡수되는 물질 중 지방은 인체의 필수 구성 성분인 동시에 탄수화물, 단백질과 같은 영양소(4 kcal/g)에 비해 높은 에너지(9 kcal/g)를 내는 에너지원으로, 서구화된 식단에서는 대개 하루 칼로리 섭취량의 30~40%(하루 60~120g)를 차지한다. 이 중 음식물로 섭취하는 지방의 95%가 중성 지방 형태이다.
- [0011] 중성 지방의 흡수는 대부분 소장에서 이루어지는데, 위에서 일부 소화된 음식물 덩어리와 함께 소장에 도달하면 분비된 담즙에 포함된 pancreatic lipase 및 colipase에 의해 분해되어 소장 세포를 통해 쉽게 흡수된다. 이러한 지방을 비롯한 지질의 소화, 흡수 과정을 조절한다면 과다 지질 섭취로 인한 각종 부작용을 최소화할 수 있을 것이다.
- [0012] 지금까지 대부분의 연구는 심혈관계 질환의 독립적인 요인으로 알려진 공복 상태에서의 혈중 중성 지방 농도에 초점을 맞추었지만, 최근 높은 식후 중성 지방 수준 역시 심혈관계 질환의 예측 인자로 작용한다고 알려진 이후 체내 식후 중성 지방 수준에 대한 연구가 상당히 진행되고 있다. 한편 대부분의 사람들이 일상 생활 속에서 지속적, 규칙적으로 음식물을 섭취함에 따라, 아침 식사 전 공복 상태를 제외하면 혈중 중성 지방 농도가 기저값 수준 이상으로 계속 유지된다. 따라서 중성 지방의 소화, 흡수를 조절하여 식후 중성 지방 수준을 정상으로 유지한다면, 지질 과다 섭취로 인한 각종 질환을 예방 또는 치료할 수 있을 것으로 생각된다.
- [0013] 본 명세서에서 "발효차"는 발효된 상태의 차(tea)를 의미하는 것으로, 그 원료 또는 발효 정도가 다른 다양한 차를 모두 포괄하는 개념이다. 구체적으로 상기 "발효차"는 차나무 잎 차 또는 감잎차를 예로 들 수 있는 엽차, 국화차 또는 장미차를 예로 들 수 있는 꽃잎차 등 다양한 원료의 차를 발효한 것을 모두 포함한다. 또한 그 발효 정도에 따른 부분 발효차, 강발효차 및 후발효차 등을 모두 포함한다.
- [0014] 본 명세서에서, "지질"은 지방, 지방산, 납, 스테로이드, 테르페노이드, 인지질, 당지질, 지방 단백질 등을 모두 포함하는 개념이다. 그 구체적인 예로는 중성 지방, 콜레스테롤 등을 들 수 있다.
- [0015] 이하, 본 발명을 상세하게 설명한다.
- [0016] 본 발명의 일측면에 따른 조성물은 차(tea)에 장류 유래 균주를 접종하여 얻은 발효차 추출물을 유효 성분으로 포함한다.

- [0017] 본 발명의 일측면에 따른 조성물은 장류 유래 균주로 발효시킨 발효차 성분을 함유함으로써, 이자의 리파아제(pancreatic lipase) 효소 활성을 감소시켜 섭취한 지질의 분해를 억제함에 의해 소장 세포에 의한 지질 흡수를 저하시킬 수 있다. 또한, 상기 조성물은 식사 등을 통해 지질을 섭취한 후 급격하게 증가하는 혈중 지질 농도를 감소시키고 그 체외 배출을 촉진시킬 수 있다. 따라서, 상기 조성물은 체내 지질의 분해 및 흡수를 억제하고 배출을 촉진하여 체내 지질 농도 및 양을 감소시키므로, 고지혈 증상을 호전시키는 효과가 있다. 구체적으로 상기 지질은 중성 지방(triglyceride)일 수 있으며, 음식물 등으로 섭취한 지질일 수 있다. 본 발명의 다른 일측면에서, 상기 조성물은 음식물을 통해 섭취한 지질의 분해를 억제하고 배출을 촉진하는 조성물일 수 있다. 본 발명의 또 다른 일측면에서, 상기 조성물은 식후 고중성지방혈증 개선용 조성물일 수 있다.
- [0018] 본 발명의 일측면에 따른 차에 장류 유래 균주를 접종하여 얻은 발효차 추출물을 유효 성분으로 포함하는 조성물은 비만 예방 또는 치료 효과를 가질 수 있다. 본 발명의 다른 일측면에 따른 차에 장류 유래 균주를 접종하여 얻은 발효차 추출물을 유효 성분으로 포함하는 조성물은 고혈압, 고지혈증, 심근경색, 협심증, 부정맥, 관상동맥 질환 또는 동맥경화를 예로 들 수 있는 심혈관계 질환을 예방 또는 치료하는 효과를 가질 수 있다. 본 발명의 또 다른 일측면에 따른 차에 장류 유래 균주를 접종하여 얻은 발효차 추출물을 유효 성분으로 포함하는 조성물은 음식물 등으로 섭취한 지질을 바로 배출시켜 체내에 쌓이지 않게 하므로 지질이 쌓일 경우 발생할 수 있는 지방간, 간염, 간경화 또는 간암 등을 예방 또는 치료하는 효과를 가질 수 있다.
- [0019] 본 발명의 일측면에 따른 조성물은 차에 장류 유래 균주를 접종하여 얻은 발효차 추출물을 전체 조성물 중량을 기준으로 1 내지 99 중량%로 포함할 수 있다. 본 발명의 다른 일측면에 따른 조성물은 차(tea)에 장류 유래 균주를 접종하여 얻은 발효차 추출물을 전체 조성물 중량을 기준으로 30 내지 90 중량%로 포함할 수 있다. 본 발명의 또 다른 일측면에 따른 조성물은 차에 장류 유래 균주를 접종하여 얻은 발효차 추출물을 전체 조성물 중량을 기준으로 50 내지 70 중량%로 포함할 수 있다.
- [0020] 본 발명의 일측면에서, 상기 차(tea)는 그 종류에 있어 특별히 제한되지 않으며, 녹차, 백차, 우롱차, 홍차, 보이차, 흑차, 감잎차 등과 다양한 종류의 허브차 등을 포함한다. 본 발명의 다른 일측면에서, 상기 차는 녹차, 백차, 우롱차, 홍차, 보이차, 흑차 및 감잎차로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 차일 수 있다. 본 발명의 또 다른 일측면에서, 상기 차는 녹차일 수 있다. 본 발명의 또 다른 일측면에서, 상기 차는 녹차를 후 발효한 차일 수 있다.
- [0021] 본 발명의 일측면에서, 상기 장류 유래 균주는 메주를 이용하여 제조하는 된장, 고추장 또는 간장에서 유래한 균주이거나 콩을 이용하여 제조하는 청국장 유래 균주일 수 있다. 본 발명의 다른 일측면에서, 상기 장류 유래 균주는 예를 들어, 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*), 바실러스 리철티포르미스(*Bacillus licheniformis*), 바실러스 메가테리움(*Bacillus megaterium*), 바실러스 나토(*Bacillus natto*), 바실러스 시트레우스(*Bacillus citreus*), 바실러스 시르쿠란스(*Bacillus circulans*), 바실러스 메센트리쿠스(*Bacillus mesentericus*) 및 바실러스 푸미리스(*Bacillus pumilus*)로 구성된 군으로부터 선택되는 하나 이상의 균주를 포함한다. 본 발명의 또 다른 일측면에서, 상기 장류 유래 균주는 고초균이라고도 불리는 바실러스 서브틸리스(*Bacillus subtilis*)일 수 있다. 바실러스 서브틸리스는 아밀라제, 프로테아제, 아미노산, 항미생물 제제(antibacterial compound) 또는 계면활성제 등의 생산에 이용된다. 특히, 이는 사람, 동물 및 식물 등에서 독성을 나타내지 않기 때문에, 식품 미생물로 널리 이용될 수 있다.
- [0022] 본 발명의 일측면에 따른 발효차는 다음과 같은 방법으로 제조될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0023] 배양한 장류 유래 균주를 발효액에 접종한다. 상기 발효액은 미생물에 대한 수분과 에너지 공급원으로 작용하며, 예를 들어, 발효액 총 중량을 기준으로 2 내지 5 중량%의 설탕 또는 과당 등을 혼합하고 대두 분말 등을 첨가하여 제조할 수 있다. 이후, 접종한 균주의 원활한 발효 대사를 위하여 균주를 접종한 발효액을 배양기에서 배양하는 과정을 거칠 수 있다. 그런 다음, 녹차 잎과 균주를 접종한 발효액을 혼합한 후 발효시킨다. 혼합하는 발효액은 녹차 건엽 중량을 기준으로 10~80 중량%가 적절할 수 있다. 발효는 20~70℃의 항온 발효조에서 24시간 내지 28일간 실시할 수 있다. 발효 온도가 40℃를 넘으면, 장류 유래 균주, 예를 들어 바실러스 서브틸리스 균을 제외한 나머지 균들의 생장이 억제 내지 사멸되는 효과가 있다. 그러나 발효 온도가 지나치게 높으면 장류 유래 균주의 성장 역시 저해될 수 있다. 상기와 같은 발효 과정은 후발효라고 지칭될 수 있다. 또한 발효 완료 후 열풍 건조를 통해 건조하는 과정을 더 거칠 수 있다.

- [0024] 본 발명의 일측면에 따른 발효차 추출물은 다양한 방법으로 추출될 수 있다. 본 발명의 다른 일측면에 따른 발효차 추출물은 예를 들어, 열수 추출물 또는 C₁ 내지 C₅의 저급 알코올 추출물일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 본 발명의 또 다른 일측면에서, 발효차 추출물은 에탄올 추출물일 수 있다.
- [0025] 본 발명의 일측면은 차에 장류 유래 균주를 접종하여 얻은 발효차 추출물을 유효 성분으로 포함하는 약학 조성물을 제공한다.
- [0026] 본 발명에 따른 조성물을 의약품에 적용할 경우에는, 상기 조성물을 유효 성분으로 하여 상용되는 무기 또는 유기 담체를 가하여 고체, 반고체 또는 액상의 형태로 제제화 할 수 있다. 본 발명의 유효 성분을 상법에 따라서 실시하면 용이하게 제제화할 수 있으며, 계면활성제, 부형제, 착색제, 향신료, 안정화제, 방부제, 보존제, 수화제, 유화 촉진제, 현탁제, 삼투압 조절을 위한 염 및/또는 완충제, 기타 상용하는 보조제를 적당히 사용할 수 있다.
- [0027] 상기 경구 투여를 위한 제제로서는 정제(錠劑), 환제(丸劑), 과립제(顆粒劑), 연질 및 경질 캡셀제, 산제, 세립제, 분제, 액제, 현탁제, 유탁제(乳濁濟), 시럽제, 펠렛제 등을 들 수 있다. 이들 제형은 유효 성분 이외에 희석제(예: 락토즈, 텍스트로즈, 수크로즈, 만니톨, 솔비톨, 셀룰로오스 및 글리신), 활택제(예: 실리카, 탈크, 스테아르산 및 그의 마그네슘 또는 칼슘염 및 폴리에틸렌 글리콜)를 함유할 수 있다. 정제는 또한 마그네슘 알루미늄 실리케이트, 전분 페이스트, 젤라틴, 트라가칸스, 메틸셀룰로오스, 나트륨 카르복시메틸셀룰로오스 또는 폴리비닐피롤리돈과 같은 결합제를 함유할 수 있으며, 경우에 따라 전분, 한천, 알긴산 또는 그의 나트륨 염과 같은 붕해제, 흡수제, 착색제, 향미제 또는 감미제 등의 약제학적 첨가제를 함유할 수 있다. 상기 정제는 통상적인 혼합, 과립화 또는 코팅 방법에 의해 제조될 수 있다.
- [0028] 본 발명에 따른 상기 약학 조성물은 경구, 비경구, 직장, 국소, 경피, 정맥 내, 근육 내, 복강 내, 피하 등으로 투여될 수 있다.
- [0029] 또한, 상기 유효 성분의 투여량은 치료 받을 대상의 연령, 성별, 체중 또는 치료할 특정 질환 또는 병리 상태, 질환 또는 병리 상태의 심각도, 투여 경로 또는 처방자의 판단에 따라 달라질 것이다. 이러한 인자에 기초한 투여량 결정은 당업자의 수준 내에 있다. 일반적인 투여량은 0.001mg/kg/일 내지 3000mg/kg/일, 보다 구체적으로는 100 mg/kg/일 내지 400 mg/kg/일이 될 수 있으나, 상기 투여량은 어떠한 방법으로도 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.
- [0030] 본 발명의 일측면은 차에 장류 유래 균주를 접종하여 얻은 발효차 추출물을 유효 성분으로 포함하는 식품 조성물을 제공한다. 상기 식품 조성물은 건강 식품 조성물일 수 있다.
- [0031] 상기 식품 또는 건강 식품 조성물의 제형은 특별히 한정되지 않으나, 예를 들어, 정제, 과립제, 드링크제, 캐러멜, 다이어트바, 티백 등으로 제형화될 수 있다. 특히 본 발명의 일측면에 따른 차에 장류 유래 균주를 접종하여 얻은 발효차 추출물을 유효 성분으로 포함하는 식품 조성물은 식후 음식물로 섭취된 지질을 분해하고, 그 배출을 촉진하는 효과가 뛰어나며, 나아가 체내 지질 수준을 감소시키는 효과를 나타내는 드링크제, 보다 구체적으로 식후 지질 억제 음료를 포함한다. 이는 식후 음식물로 섭취된 지질을 바로 배출되도록 하여 체내에 지질이 쌓이는 것을 방지하므로 지질이 쌓일 경우 발생할 수 있는 지방간, 간경화, 비만 등의 예방 또는 치료 효과를 가진다. 각 제형의 식품 조성물은 유효 성분 이외에 해당 분야에서 통상적으로 사용되는 성분들을 제형 또는 사용 목적에 따라 당업자가 어려움 없이 적의 선정하여 배합할 수 있으며, 다른 원료와 동시에 적용할 경우 상승 효과가 일어날 수 있다.
- [0032] 상기 유효 성분의 투여량 결정은 당업자의 수준 내에 있으며, 이의 1일 투여 용량은 예를 들어 0.1mg/kg/일 내지 5000mg/kg/일, 보다 구체적으로는 50 mg/kg/일 내지 500 mg/kg/일이 될 수 있으나, 이에 제한되지 않으며, 투여하고자 하는 대상의 연령, 건강 상태, 합병증 등의 다양한 요인에 따라 달라질 수 있다.
- [0033] 이하, 실시예 및 실험예를 들어 본 발명의 구성 및 효과를 보다 구체적으로 설명한다. 그러나 아래 실시예 및 실험예는 본 발명에 대한 이해를 돕기 위해 예시의 목적으로만 제공된 것일 뿐 본 발명의 범주 및 범위가 그에 의해 제한되는 것은 아니다.

- [0034] [실시예 1] 발효차의 제조
- [0035] 진동 배양기를 이용하여 30℃에서 72시간 배양된 균주인 바실러스 서브틸리스(*Bacillus Subtilis*)를 회수하여 1차로 원심 분리기에서 균주와 활성 배지를 분리한다. 1.0%의 생리 식염수를 이용하여 균주를 3회 세척해 준 다음, 적절한 미생물의 대사를 위해 발효액을 공급한다. 상기 발효액은, 발효액 총 중량에 대하여, 설탕 2.5 중량%를 혼합하여 제조한다. 그런 다음, 27 psi(pounds per square inch)의 압력, 120℃ 온도에서 15분간 고온가압 멸균한다. 멸균이 완료된 다음, 상온에서 25℃까지 냉각시킨다. 상기 세척 과정에서 손상을 입은 균주의 원활한 발효 대사를 위해, 발효액에서 균주를 안정화시키는 과정을 거친다. 구체적으로는, 대두 분말을 넣기 전 상태의 발효액 300 ml에 식염수로 3회 세척한 균주를 혼합하고, 배양기에서 24시간 배양하면서 안정화시킨다.
- [0036] 멸균된 반응 탱크 내에서, 소포장 단위별로 준비된 녹차 성분을, 발효액에 바실러스 서브틸리스가 접종된 발효 균액과 혼합하며, 발효 균주의 수가 $10^3 \sim 10^8$ CFU/ml가 되도록 조절한다. 녹차건엽 중량대비, 발효액의 비율은 30~60 중량%가 되도록 혼합한다. 또한, 급속한 온도 증가로 인해 균주가 손상을 받지 않도록 발효 균액을 혼합한 후에도 차잎을 계속 교반하여 차 내부 온도가 급속히 올라가지 않도록 한다. 20분 후, 반응이 완료되고 온도가 떨어진 녹차 발효 균액 혼합물은 입구를 막아 외기의 유입을 막고, 발효 공정을 거친다. 발효 공정은, 60℃의 항온 발효조에서 7일간 실시한다. 발효 공정이 완료된 후에는, 80~120℃에서 5시간 열풍 건조함으로써, 발효차를 제조한다.
- [0037] 상기의 방법으로 제조된 발효차는, 병원성 미생물들이 검출되지 않으며, 최종 제품 내 총균수(Total microbial account)가 10^2 CFU/g 이하인 규격 범위의 제품을 얻을 수 있다.

[0038] [실시예 2] 추출물의 제조

[0039] 상기 실시예 1에서 제조한 발효차 1 kg을 20% 에탄올 용액 15 L에 침지하여 70℃에서 3시간 동안 역류(reflux)한 후 상온에서 12시간 추출한다. 추출액을 여과하고 감압 농축한 다음 동결 건조한다. 이에 다시 95% 에탄올 용액 1.6L를 가하고 믹서를 사용하여 30분간 섞어 준 뒤 여과하여 여과액과 잔류물을 따로 분획한다. 잔류물을 건조하여 분말 시료로 제조한다. 수율은 15 내지 25% 정도이며, 조제한 분말은 사용 전까지 저온에서 보관한다.

[0040] [실험예 1] 리파아제 저해 활성 평가

- [0041] 리파아제 활성은 시료를 첨가하였을 때 4-메틸우베리페론의 올레산 에스테르(4-UMO)가 돼지 췌장 리파아제에 의해 변환되는 4-메틸우베리페론의 양을 형광 강도 측정함으로써 평가하였다.
- [0042] 피험 시료로는 실시예 2의 발효차 추출물을 실험군으로 하고 일반 녹차 추출물 및 일반 보이차 추출물을 양성 대조군으로 하였으며, 증류수를 음성 대조군으로 사용하였다. 기질로 0.1M DMSO 용액으로 조제한 4-UMO(Sigma 사 제조)를 사용하고, 반응 효소로는 150mM NaCl, 1.3mM CaCl₂를 함유한 13mM Tris-HCl(pH8.0) 완충액에 조제한 50U/ml의 돼지 췌장 리파아제(Sigma 사 제조)를 사용하였다.
- [0043] 효소 반응은 25℃ 조건 하에 96 웰 마이크로 플레이트에 50 μ l의 4-UMO 완충액 용액, 25 μ l의 증류수(또는 시료 수용액)를 첨가하여 혼합한 후에, 25 μ l의 리파아제 완충액 용액을 첨가하여 30분간 반응시킴으로써 행하였다. 이후 100 μ l의 0.1M 시트르산 완충액(pH 4.2)을 첨가함으로써 반응을 정지시키고, 반응을 통해 생성된 4-메틸우베리페론의 형광 강도(여기 파장 355nm, 형광 방출 파장 460nm)를 형광 플레이트 리더(Molecular Devices 사 제조 FlexStation 3 Benchtop MultiMode Microplate Reader)를 사용하여 측정하였다.
- [0044] 피험 시료들의 저해 활성은 음성 대조군의 활성에 비해 50%가 저감된 활성을 나타내는 시료량으로서의 IC₅₀ (μ g/ml) 값을 구하였다. 그 결과를 아래 표에 나타내었다.

표 1

시료	IC ₅₀ (μ g/ml)
실시예 2의 발효차 추출물	0.32
녹차 추출물	0.63

보이차 추출물	1.23
---------	------

[0046] 상기 결과에서 볼 수 있듯이, 실시예 2의 발효차 추출물은 IC₅₀ (μg/ml) 값이 0.32로 일반 녹차 추출물의 IC₅₀ (μg/ml) 값인 0.63 및 일반 발효차의 일종인 보이차 추출물의 1.23 보다 더 작은 값을 나타내었다. 즉, 본 발명에 따른 발효차 추출물이 가장 작은 값을 나타냈다. 본 발명에 따른 발효차 에탄올 추출물의 리파아제 저해 활성이 가장 우수하므로 지질 분해를 억제하는 기능이 가장 뛰어난 것을 확인할 수 있다.

[0047] [실험예 2] 동물 모델에서 발효차 추출물의 단회 투여 후 혈중 중성 지방 감소 효과 평가

[0048] 마우스를 피실험 동물로 하고, 실시예 2의 발효차 추출물에 대한 고지방 부하 실험을 실시하였다. 8주령의 C57BL/6 마우스(1군당 5마리)를 12시간 동안 절식시키고, 지방으로서 콩기름을 5ml/kg의 양으로 경구 투여하여 부하시켰다. 대조군(증류수), 실시예 1의 발효차 추출물 100, 200 및 400mg/kg 군으로 나누어 시료를 투여하였으며, 투여 전, 투여 후 1.5, 3, 4.5 시간에 안구 정맥으로부터 채혈하여 혈장을 분리한 후, 혈중 중성 지방 농도를 측정하였다. 그 결과를 도 1에 나타내었다.

[0049] 도 1에서 볼 수 있듯이, 대조군으로서 증류수만을 투여한 경우와 발효차 추출물 100mg/kg, 200mg/kg 및 400mg/kg을 투여한 경우 모두 혈중 중성 지방 수준은 고지방 부하 후 시간이 지남에 따라 상승하여 1.5시간 후 가장 높은 값이 되었다가 그 후 저하하는 패턴을 나타내었다. 모든 시간대에서 증류수를 투여한 경우의 혈중 중성 지방 수준이 가장 높았으며, 발효차 추출물의 투여량이 많을수록 혈중 중성 지방 수준이 낮아 발효차 추출물 400mg/kg을 투여한 경우 혈중 중성 지방 수준이 가장 낮았다. 즉, 발효차 추출물은 모든 시간대에서 고지방 부하 후 혈중 중성 지방 수준 상승을 유의적으로 저하시켰다. 또한 중성 지방의 시간에 따른 변화를 나타내는 곡선 하 면적치를 산출하였을 때, 투여한 발효차 함량이 높을수록 낮은 값을 나타냈다.

[0050] 상기 결과에서 발효차 추출물은 지질 섭취 후 상승하는 혈중 중성 지방치를 억제하는 효과를 가지며, 그 효과는 발효차 추출물 투여량에 비례함을 확인할 수 있다.

[0051] [실험예 3] 동물 모델에서 발효차 추출물의 지질 배설 촉진 효과 평가

[0052] 마우스를 피실험 동물로 하고, 실시예 2의 추출물을 투여한 후 변중 지질 배설량(mg/g)을 확인하였다. 고지방 식이를 3주간 실시한 8주령의 C57BL/6 마우스(1군당 5마리)를 대조군(증류수), 실시예 2의 발효차 추출물 100 및 200 mg/kg 투여취군으로 나누어 10일간 해당 시료를 투여하고 마지막 3일 동안 변을 수거하여 변으로 배설된 총 지질량을 비교하였다. 그 결과를 표 2 및 도 2에 나타내었다.

표 2

그룹	변중 지질 배설량 (mg/g)
대조군	10.5
발효차 추출물 100 mg/kg	13.2
발효차 추출물 200 mg/kg	15.4

[0054] 상기 결과에서, 발효차 추출물을 투여한 경우 대조군에 비해 지질 배설량이 증가하며, 이는 농도 의존적이라는 것을 통계적으로 유의한 수준(5%)에서 확인할 수 있다.

[0055] [실험예 4] 동물 모델에서 발효차 추출물의 장기간 투여 후 혈중 중성 지방 감소 효과 평가 및 지질 배설 촉진 효과 평가

[0056] 고지방 식이를 3주간 실시하여 고지혈증을 유발시킨 8주령의 C57BL/6 마우스(1군당 5마리)를 피실험 동물로 하여, 8주간 고지방 식이와 함께 매일 아침 10시 실시예 2의 발효차 추출물 200mg/kg을 매일 경구 투여하였다. 마지막 8주가 되는 시점에, 실시예 2의 발효차 추출물에 대한 고지방 부하 실험을 실시하였다. 대조군(증류수), 실시예 2의 발효차 추출물 200mg/kg 군으로 나누어 시료를 투여하였으며, 고지방 부하 실험 방법은 실험예 2와 같다. 그 결과는 도 3에 나타내었다.

[0057] 한편, 발효차 추출물을 투여한 후 2, 4, 6, 8주가 되는 시점의 3일 전부터 2, 4, 6, 8주 투여 시점까지 3일간의 배변을 수거하여 변으로 배설된 총 지질량을 비교하였다. 그 결과를 도 4 및 표 3에 나타내었다.

표 3

주(wks)	변중 지질 배설량 (mg/g)	
	대조군	발효차 추출물 200 mg/kg
0	11.3	11.5
2	10.6	13.2
4	12.6	14.1
6	11.2	16.2
8	10.4	17.0

[0059] 도 3에서 같이, 발효차 추출물을 8주간 고지방 식이와 함께 장기간 투여한 경우 대조군(증류수) 투여군에 비해 전 시점의 식후 혈중 중성 지방 수준 상승이 지연됨을 확인할 수 있다. 또한 발효차 추출물을 투여한 후 2, 4, 6, 8주 뒤 지질의 배변 배출량을 확인한 도 4 및 표 3의 결과에서 볼 수 있듯이, 발효차 추출물 투여 기간이 길 수록 변중 지질 배출량이 유의적으로 증가함을 확인할 수 있다.

[0060] [실험예 5] 발효차 추출물의 인체 내 섭취 중성 지방 저감 효과 평가

[0061] 건강한 성인남녀 10명을 대상으로 고지방 식사 부하 크로스오버 실험을 실시하였다. 실험 실시 전날 21시부터 물 이외의 음식 섭취를 금지하여 절식시키고, 아침 9시에 실험식을 섭취시켰다. 실험식은 도너츠 2개, 우유 50ml이고, 그 영양 성분치는 열량 655kcal, 단백질 10.5g, 지방 40g, 탄수화물 77.5g이었다. 피험 시료로서 앞선 동물 실험에서 사용한 양에 대응하여 발효차 추출물 488 mg이 포함된 음료를 섭취시켰다. 실험식의 섭취 전, 섭취 2, 4 및 6시간 후에 상완 정맥으로부터 약 3ml을 채혈하여 중성 지방을 분석하였다.

[0062] 본 실험은 크로스오버 실험으로, 10일 간의 워시 아웃 기간을 두고 일인당 2회 실시하였다. 구체적으로, 각각 피험 시료를 포함하지 않는 음료(물, 대조군) 또는 피험 시료를 포함하는 음료를 섭취하는 실험을 1회씩 실시하였다. 실험 순서를 피험자에게 알리지 않고 무작위로 실시하였다. 실험 결과는 고지방 부하 후 혈중 중성 지방치의 변화량 (ΔTG)의 경시 변화(도 5) 및 그 직선 아래 면적(AUC) 변화(도 6)를 비교하여 평균값±표준 오차로 나타내었고, 대응 t-검증을 수행하여 양측 검정에서 위험률 5% 이하를 유의로 하였다. 그 결과를 도 5 및 도 6에 나타내었다.

[0063] 상기 도면에서 보듯이, 실시예 2의 발효차 추출물을 섭취하는 경우 고지방 부하 후 혈중 중성 지방값의 상승을 억제할 수 있음을 확인할 수 있다.

[0064] 이하 본 발명의 일측면에 따른 발효차 추출물을 포함하는 조성물의 제형예를 보다 상세하게 설명하나, 상기 조성물은 여러 가지 제형으로 응용 가능하고, 이는 본 발명을 한정하고자 함이 아닌 단지 구체적으로 설명하고자 함이다.

[0065] [제형예 1] 연질 캡셀제

[0066] 발효차 추출물 100 mg, 대두 추출물 50 mg, 대두유 180 mg, 홍삼 추출물 50 mg, 팜유 2 mg, 팜경화유 8 mg, 황납 4 mg 및 레시틴 6 mg을 혼합하고, 통상의 방법에 따라 1 캡슐당 400 mg씩 충전하여 연질 캡셀을 제조하였다.

[0067] [제형예 2] 정제

[0068] 발효차 추출물 100 mg, 대두 추출물 50 mg, 포도당 100 mg, 홍삼 추출물 50 mg, 전분 96 mg 및 마그네슘 스테아레이트 4 mg을 혼합하고 30% 에탄올을 40 mg 첨가하여 과립을 형성한 후, 60℃에서 건조하고 타정기를 이용하여 정제로 타정하였다.

[0069] [제형예 3] 과립제

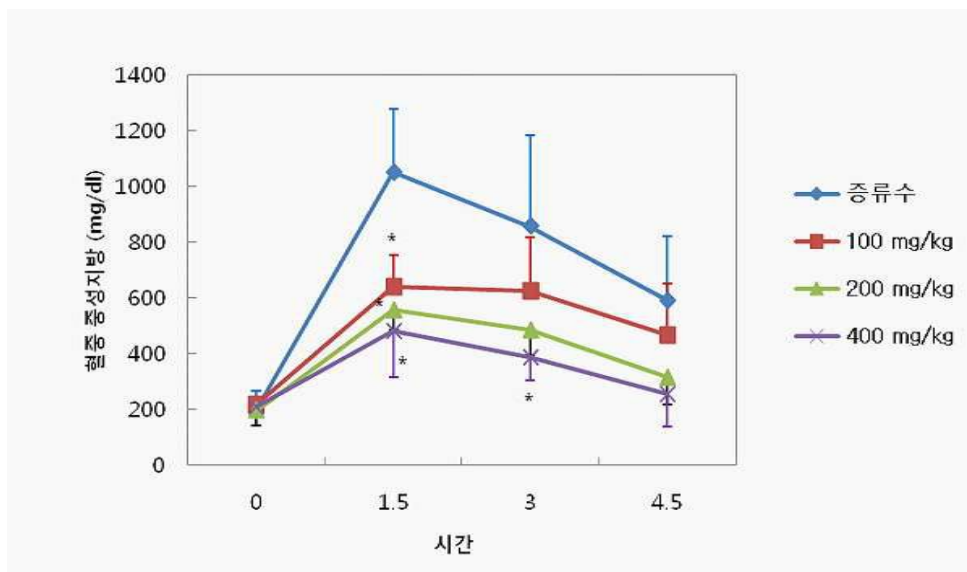
[0070] 발효차 추출물 100 mg, 대두 추출물 50 mg, 포도당 100 mg, 홍삼 추출물 50 mg 및 전분 600 mg을 혼합하고 30% 에탄올을 100 mg 첨가하여 과립을 형성한 후, 60°C에서 건조하여 과립을 형성한 다음 포에 충전하였다. 내용물의 최종 중량은 1 g으로 하였다.

[0071] [제형예 4] 드링크제

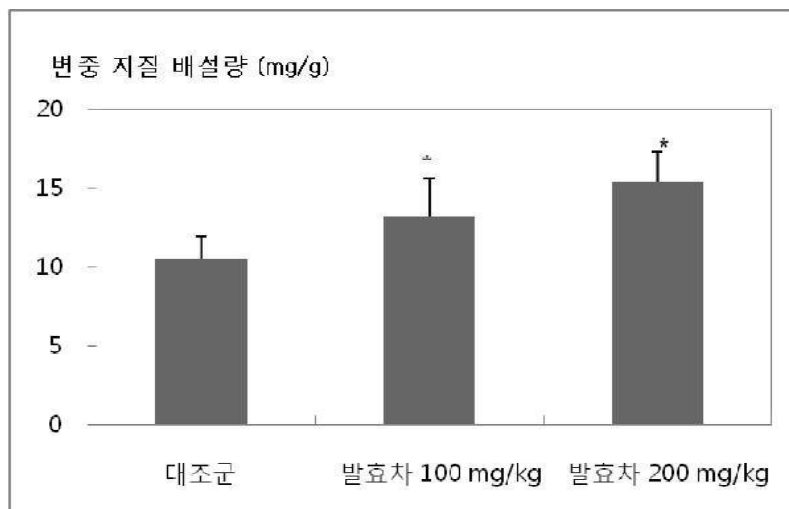
[0072] 발효차 추출물 100 mg, 대두 추출물 50 mg, 포도당 10 g, 홍삼 추출물 50 mg, 구연산 2 g 및 정제수 187.8 g을 혼합하여 드링크제를 제조한 후 병에 충전하였다. 내용물의 최종 용량은 200 ml로 하였다.

도면

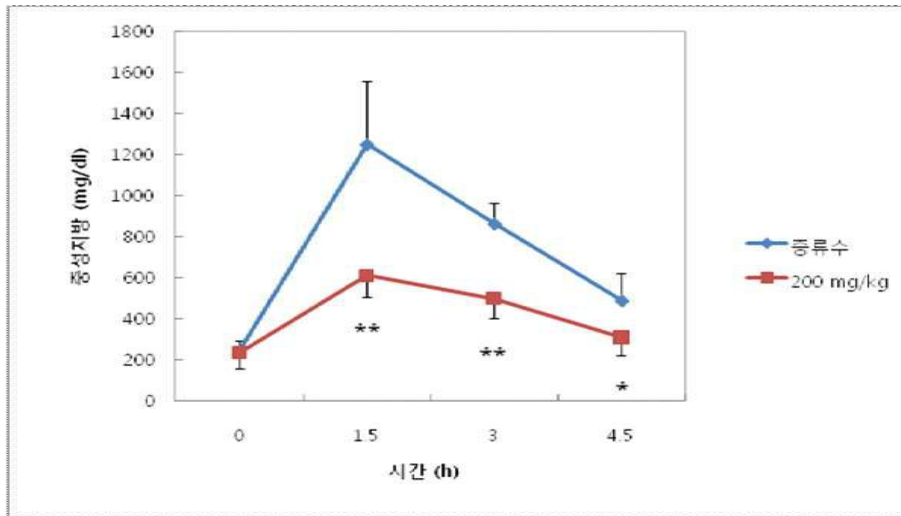
도면1



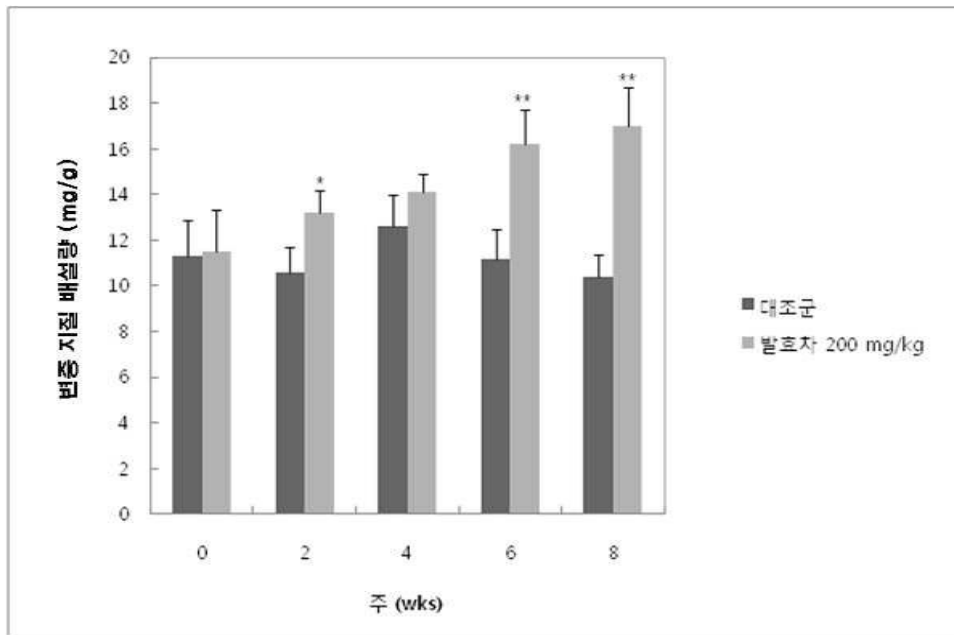
도면2



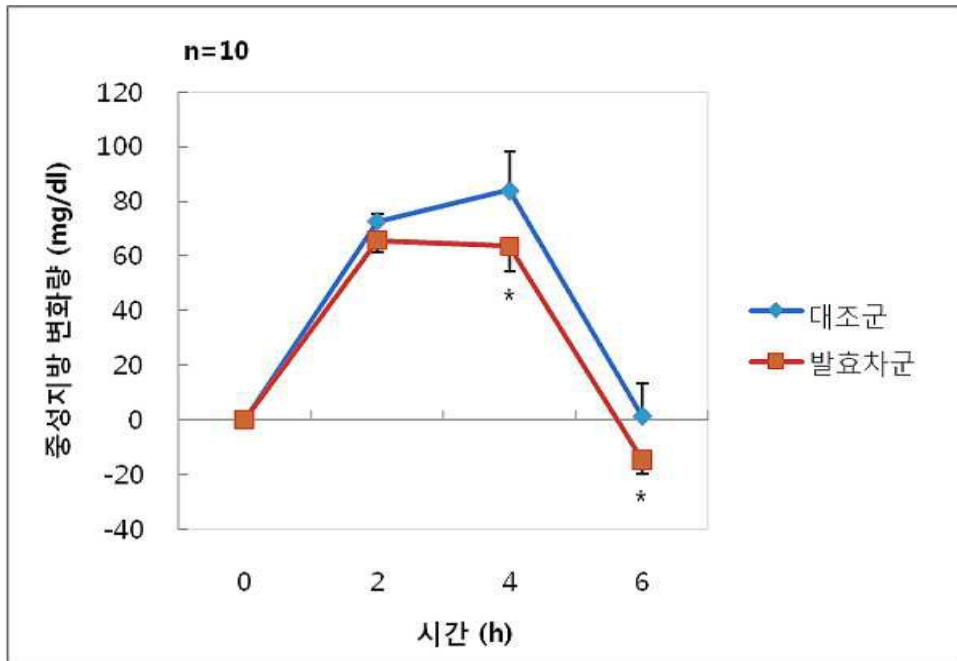
도면3



도면4



도면5



도면6

