



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2017-0073974
(43) 공개일자 2017년06월29일

- | | |
|---|--|
| (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A23L 1/28 (2006.01) A23L 1/305 (2006.01)
A61K 36/07 (2006.01) A61K 38/08 (2006.01)
B01D 15/26 (2006.01) B01D 15/32 (2006.01) | (71) 출원인
경기도
경기도 수원시 팔달구 효원로 1 (매산로3가) |
| (52) CPC특허분류
A23L 31/00 (2016.08)
A23L 33/18 (2016.08) | (72) 발명자
정윤경
경기도 성남시 분당구 수내로192번길 25, 402-202
김정한
경기도 성남시 분당구 서판교로 29, 908-602
(뒷면에 계속) |
| (21) 출원번호 10-2015-0182862
(22) 출원일자 2015년12월21일
심사청구일자 2015년12월21일 | (74) 대리인
특허법인태동 |

전체 청구항 수 : 총 8 항

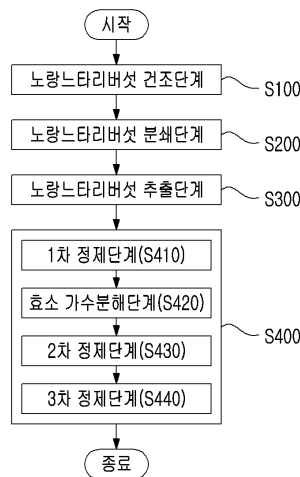
(54) 발명의 명칭 노랑느타리버섯 유래 항당뇨성 추출물 및 이의 추출방법

(57) 요약

본 발명은 노랑느타리버섯 유래 항당뇨성 추출물에 관한 것으로, 노랑느타리버섯(*Pleurotus Cornucopiae*)으로부터 열수 추출된 항당뇨성 물질을 유효성분으로 함유하고, 상기 항당뇨성 물질은 트레오닌(Thr, Threonine)-아이소루신(Ile, Isoleucine)-알라닌(Ala, Alanine)-페닐알라닌(Phe, Phenylalanine)-아이소루신(Ile, Isoleucine)-아스파르트산(Asp, Aspartic acid)로 이루어진 제1올리고펩타이드(Oligopeptide)를 포함한다.

이를 통해, 본 발명의 노랑느타리버섯 유래 항당뇨성 추출물은 항당뇨성능을 제공함에 따라 당뇨와 같은 각종 성인병 예방 혹은 치료에 큰 도움을 줄 수 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61K 36/07 (2013.01)

A61K 38/08 (2013.01)

B01D 15/26 (2013.01)

B01D 15/325 (2013.01)

A23V 2002/00 (2013.01)

A23V 2200/328 (2013.01)

A23V 2300/14 (2013.01)

(72) 발명자

백일선

경기도 수원시 영통구 봉영로 1526, 710-201

지정현

경기도 용인시 기흥구 동백죽전대로 283

명세서

청구범위

청구항 1

노랑느타리버섯(*Pleurotus Cornucopiae*)으로부터 열수 추출된 항당뇨성 물질을 유효성분으로 함유하고, 상기 항당뇨성 물질은 티로신(Tyr, Tyrosine)-티로신(Tyr, Tyrosine)-알라닌(Ala, Alanine)-아이소루신(Ile, Isoleucine)-글리신(Gly, Glycine)-아스파르트산(Asp, Aspartic acid)로 이루어진 제1올리고펩타이드(Oligopeptide)를 포함하는 것을 특징으로 하는 노랑느타리버섯 유래 항당뇨성 추출물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 항당뇨성 물질은 트레오닌(Thr, Threonine)-아이소루신(Ile, Isoleucine)-알라닌(Ala, Alanine)-페닐알라닌(Phe, Phenylalanine)-아이소루신(Ile, Isoleucine)-아스파르트산(Asp, Aspartic acid)로 이루어진 제2올리고펩타이드(Oligopeptide)를 유효성분으로 더 포함하는 것을 특징으로 하는 노랑느타리버섯 유래 항당뇨성 추출물.

청구항 3

제2항에 있어서, 상기 제1올리고펩타이드 및 제2올리고펩타이드는 2.0kDa 이하의 분자량을 가지는 것을 특징으로 하는 노랑느타리버섯 유래 항당뇨성 추출물.

청구항 4

노랑느타리버섯(*Pleurotus Cornucopiae*)을 건조하는 건조단계; 상기 건조단계를 통해 건조된 노랑느타리버섯을 분쇄하여 분말 상태로 마련하는 분쇄단계; 상기 분쇄단계를 통해 분쇄된 분말 상태의 노랑느타리버섯을 열수 추출하여 추출물을 획득하는 추출단계;를 포함하며, 상기 추출단계는 분말 상태의 노랑느타리버섯 1 중량부에 물 20 내지 40 중량부를 첨가하고 25 내지 35℃의 온도 환경에서 1 내지 12 시간동안 추출을 수행하는 단계인 것을 특징으로 하는 노랑느타리버섯 유래 항당뇨성 추출물 추출방법.

청구항 5

제4항에 있어서, 노랑느타리버섯 유래 항당뇨성 추출물 추출방법은, 상기 추출단계를 통해 획득된 노랑느타리버섯의 열수 추출물을 정제하는 정제단계;를 더 포함하는 것을 특징으로 하는

노랑느타리버섯 유래 항당뇨성 추출물 추출방법.

청구항 6

제5항에 있어서,

상기 정제단계는,

친수성 분자체를 정지상으로 사용하는 겔 크로마토그래피(Gel Chromatography)를 이용해 상기 추출단계를 통해 획득된 노랑느타리버섯의 열수 추출물을 정제하는 1차 정제단계;를 포함하는 것을 특징으로 하는

노랑느타리버섯 유래 항당뇨성 추출물 추출방법.

청구항 7

제6항에 있어서,

상기 정제단계는,

상기 1차 정제단계를 통해 획득된 활성분획물에 펩신(Pepsin)을 첨가하는 효소 가수분해단계; 및

상기 효소 가수분해 단계를 통해 획득된 가수분해물을 친수성 분자체를 정지상으로 사용하는 겔 크로마토그래피(Gel Chromatography)를 이용해 정제하는 2차 정제단계;를 포함하며,

상기 2차 정제단계는 상기 1차 정제단계에 이용된 겔 크로마토그래피의 정지상으로 사용된 친수성 분자체에 비해 물 재흡수값이 낮은 친수성 분자체를 겔 크로마토그래피의 정지상으로 사용하는 단계인 것을 특징으로 하는

노랑느타리버섯 유래 항당뇨성 추출물 추출방법.

청구항 8

제7항에 있어서,

상기 정제단계는,

상기 2차 정제단계를 통해 획득된 활성분획물을 역상고속액체크로마토그래피(RP-HPLC, Reversed Phase High Performance Liquid Chromatography)를 이용해 정제하는 3차 정제단계;를 더 포함하는 것을 특징으로 하는

노랑느타리버섯 유래 항당뇨성 추출물 추출방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 노랑느타리버섯 유래 항당뇨성 추출물 및 추출방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 진균류(眞菌類)의 자실체(子實體)를 의미하는 버섯 중 표고, 느타리, 팽이버섯, 양송이, 새송이 등 약 14,000종의 버섯은 식용이 가능한 버섯으로 분류되고, 이러한 식용버섯들은 다양한 생리활성물질들을 함유하고 있어 이를 이용한 다양한 건강식품 또는 약학재료로서의 개발이 지속적으로 요구되고 있는 실정이다.

[0003] 이 중에서도 버드나무와 같은 활엽수 고막 그루티기에서 자생하는 노랑느타리버섯은 맛이 우수할 뿐만 아니라, 영양소 역시 풍부하며 혈관세포의 노화 억제 및 면역 강화의 효과가 있어 다양한 기능성 물질 개발에 좋은 소재로 주목받고 있다.

[0004] 이와 관련하여 노랑느타리버섯을 이용해 기능성 조성물을 제조하기 위해 마련된 종래기술에 대한 선행문헌에는 대한민국 등록특허공보 제10-1429209호의 "노루궁뎅이버섯, 노랑느타리버섯 및 새송이버섯 추출물을 함유하는

뇌기능 및 인지 기능 개선용 조성물"(이하, '종래기술1'이라고 함)이 있다.

[0005] 종래기술1과 같이 노랑느타리버섯을 비롯한 각종 식용버섯을 이용해 각종 기능성 건강식품으로 활용 가능한 기능성 물질들을 다양한 측면에서 개발되고 있으나, 최근 기능성 건강식품의 개발 방향성은 잘못된 식습관과 사회적으로 과도하게 집중 부과되는 각종 스트레스 등에 의해 중장년층에서 빈번히 발생하며, 각종 복합적인 합병증을 유발하는 만성적 당뇨와 같은 성인병 예방 및 치료에 집중되어 있다.

[0006] 이와 관련하여, 항당뇨 성능을 제공하는 약학 조성물을 마련하기 위해 마련된 종래기술에 대한 선행문헌에는 대한민국 공개특허공보 제10-1996-0003807호의 "알파-할로겐화 된 디카르복실산을 함유하는 지질저하 또는 항당뇨성 약제 조성물"(이하, '종래기술2'이라고 함)이 있다.

[0007] 하지만 종래기술2와 같이 화학적으로 제조된 약학 조성물의 경우, 부작용이 발생할 수 있는 가능성이 있으며, 이를 복용하는 사용자의 심리적 불안을 유발할 수 있는 문제점이 있어, 자연친화적이고 부작용이 없으며 대중성이 높은 식용버섯을 활용한 항당뇨 성능의 제공이 가능한 기능성 물질의 개발이 지속적으로 요구되고 있다.

[0008]

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009] 본 발명은 상기 문제점을 해결하기 위해 창작된 것으로서, 본 발명의 목적은 노랑느타리버섯으로부터 높은 항당뇨성을 갖추며, 친환경적이며 부작용이 없는 물질을 추출하는 방법 및 이와 같은 방법을 통해 추출된 기능성 물질을 제공하는데 있다.

과제의 해결 수단

[0010] 상기 목적을 달성하기 위하여 본 발명에 따른 노랑느타리버섯 유래 항당뇨성 추출물은, 노랑느타리버섯 (*Pleurotus Cornucopiae*)으로부터 열수 추출된 항당뇨성 물질을 유효성분으로 함유하고, 상기 항당뇨성 물질은 트레오닌(Thr, Threonine)-아이소루신(Ile, Isoleucine)-알라닌(Ala, Alanine)-페닐알라닌(Phe, Phenylalanine)-아이소루신(Ile, Isoleucine)-아스파르트산(Asp, Aspartic acid)로 이루어진 제1올리고펩타이드(Oligopeptide)를 포함한다.

[0011] 여기서, 상기 항당뇨성 물질은 티로신(Tyr, Tyrosine)-티로신(Tyr, Tyrosine)-알라닌(Ala, Alanine)-아이소루신(Ile, Isoleucine)-글리신(Gly, Glycine)-아스파르트산(Asp, Aspartic acid)로 이루어진 제2올리고펩타이드(Oligopeptide)를 유효성분으로 더 포함한다.

[0012] 아울러, 상기 제1올리고펩타이드 및 제2올리고펩타이드는 2.0kDa 이하의 분자량을 가지는 것이 바람직하다.

[0013] 한편, 상기 목적을 달성하기 위하여 본 발명에 따른 노랑느타리버섯 유래 항당뇨성 추출물 추출 방법은, 노랑느타리버섯(*Pleurotus Cornucopiae*)을 건조하는 건조단계; 상기 건조단계를 통해 건조된 노랑느타리버섯을 분쇄하여 분말 상태로 마련하는 분쇄단계; 상기 분쇄단계를 통해 분쇄된 분말 상태의 노랑느타리버섯을 열수 추출하여 추출물을 획득하는 추출단계;를 포함하며, 상기 추출단계는 분말 상태의 노랑느타리버섯 1 중량부에 물 20 내지 40 중량부를 첨가하고 25 내지 35℃의 온도 환경에서 1 내지 12 시간동안 추출을 수행하는 단계이다.

[0014] 여기서, 노랑느타리버섯 유래 항당뇨성 추출물 추출방법은, 상기 추출단계를 통해 획득된 노랑느타리버섯의 열수 추출물을 정제하는 정제단계;를 더 포함한다.

[0015] 또한, 상기 정제단계는, 친수성 분자체를 정지상으로 사용하는 겔 크로마토그래피(Gel Chromatography)를 이용해 상기 추출단계를 통해 획득된 노랑느타리버섯의 열수 추출물을 적어도 한번 이상 정제하는 1차 정제단계;를 포함할 수 있다.

[0016] 아울러, 상기 정제단계는, 상기 1차 정제단계를 통해 획득된 활성분획물에 펩신(Pepsin)을 첨가하는 효소 가수분해 단계; 및 상기 효소 가수분해단계를 통해 획득된 가수분해물을 친수성 분자체를 정지상으로 사용하는 겔 크로마토그래피(Gel Chromatography)를 이용해 정제하는 2차 정제단계;를 포함하며, 상기 2차 정제단계는 상기 1차 정제단계에 이용된 겔 크로마토그래피의 정지상으로 사용된 친수성 분자체에 비해 물 재흡수능이 낮은 친수성 분자체를 겔 크로마토그래피의 정지상으로 사용하는 단계이다.

[0017] 여기서, 상기 정제단계는, 상기 2차 정제단계를 통해 획득된 활성분획물을 역상고속액체크로마토그래피(RP-

HPLC, Reversed Phase High Performance Liquid Chromatography)를 이용해 정제하는 3차 정제단계;를 더 포함한다.

발명의 효과

- [0018] 본 발명에 의하면 다음과 같은 효과가 있다.
- [0019] 첫째, 식용 버섯인 노랑느타리버섯으로부터 높은 수준의 항당뇨성을 갖춘 추출물을 획득할 수 있다.
- [0020] 둘째, 노랑느타리버섯 유래 항당뇨성 추출물을 다양한 기능성 건강 식품의 소재로 활용하여 식용버섯의 소비 촉진 및 시장 내 상업 부가가치를 향상시킬 수 있다.
- [0021] 셋째, 자연적으로 얻어진 노랑느타리버섯의 항당뇨성을 갖춘 생리활성물질을 추출함으로써, 부작용 없이 당뇨와 같은 각종 성인병의 예방 및 치료가 가능하다.

[0022]

도면의 간단한 설명

- [0023] 도1은 본 발명의 노랑느타리버섯 유래 항당뇨성 추출물 추출방법을 도시한 순서도이다.
- 도2는 본 발명의 추출단계를 통해 획득된 추출물을 세파덱스(Sephadex) G-100 칼럼(Column) 크로마토그래피(Chromatography)를 이용해 1차 정제한 결과 및 활성분획물들의 알파-글루코시다제(α -glucosidase) 저해활성을 측정된 결과도이다.
- 도3은 본 발명의 효소 가수분해단계를 통해 획득된 가수분해물을 세파덱스(Sephadex) G-50 칼럼(Column) 크로마토그래피(Chromatography)를 이용해 2차 정제한 결과 및 활성분획물들의 알파-글루코시다제(α -glucosidase) 저해활성을 측정된 결과도이다.
- 도4는 본 발명의 2차 정제단계를 통해 획득된 활성분획물을 역상고속액체크로마토그래피(RP-HPLC, Reversed Phase High Performance Liquid Chromatography)를 이용해 3차 정제한 결과 및 활성분획물들의 알파-글루코시다제(α -glucosidase) 저해활성을 측정된 결과도이다.
- 도5는 본 발명의 1차 정제단계를 통해 획득된 제1활성분획물의 아미노산 서열을 분석한 결과도이다.
- 도6은 본 발명의 1차 정제단계를 통해 획득된 제2활성분획물의 아미노산 서열을 분석한 결과도이다.
- 도7은 본 발명의 3차 정제단계를 통해 획득된 활성분획물에 대한 저해 패턴(경쟁적 저해 또는 비경쟁적 저해)을 라인웨버-버크도면(Lineweaver-Burk plot)을 통해 분석한 결과도이다.
- 도8은 본 발명의 3차 정제단계를 통해 획득된 활성분획물에 대한 혈당상승억제 효과 검증을 위한 동물실험 결과를 나타낸 결과도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0024] 본 발명의 바람직한 실시예에 대하여 첨부된 도면을 참조하여 더 구체적으로 설명하되, 이미 주지된 기술적 부분에 대해서는 설명의 간결함을 위해 생략하거나 압축하기로 한다.
- [0025] **1. 노랑느타리버섯 유래 항당뇨성 추출물 및 이의 추출방법에 관한 설명**
- [0026] 먼저, 본 발명의 노랑느타리버섯 유래 항당뇨성 추출물의 추출방법이 어떠한 과정으로 이루어지는지에 대해 도1의 순서도를 참조하여 상세하게 설명한다.
- [0027] (1) 노랑느타리버섯 건조단계<S100>
- [0028] 본 단계에서는 노랑느타리버섯(*Pleurotus Cornucopiae*)을 건조하는 과정(S100)이 이루어진다.
- [0029] 재배한 노랑느타리버섯을 열풍 건조기 내에 투입하여 내부 온도 환경을 40℃로 설정한 뒤, 3일(72시간) 가량 건조시켜 결과적으로 최종 수분 함량의 수준이 6% 내외로 건조될 수 있도록 한다.
- [0030] (2) 노랑느타리버섯 분쇄단계<S200>
- [0031] 본 단계에서는 상기 단계(S100)를 통해 건조된 노랑느타리버섯을 분쇄기를 이용해 입자 크기 1mm이하의 분말 상태로 분쇄하는 과정(S200)이 이루어진다. 이는 건조된 노랑느타리버섯의 분말화를 통해 용매와의 접촉면을 넓히

고 추출 효율을 높이기 위함이다.

[0032] (3) 노랑느타리버섯 추출단계<S300>

[0033] 본 단계에서는 상기 단계(S200)를 통해 분말 상태로 마련된 노랑느타리버섯을 열수 추출하여 추출물을 획득하는 과정(S300)이 이루어진다.

[0034] 열수 추출 과정에 대해 좀 더 구체적으로 설명하면, 분말 상태의 노랑느타리버섯 1중량부를 물 20 내지 40 중량부에 첨가한 뒤, 25 내지 30℃의 온도 환경에서 1 내지 12시간가량 추출을 수행한다. 바람직하게는, 하기 표1을 참조하면 30℃의 온도 환경에서 12시간동안 열수 추출을 수행할 경우, 추출물이 알파-글루코시다제(α -glucosidase)의 저해활성을 최적으로 갖추게 된다.

[0035] 또한, 열수 추출과정에서 분말 상태의 노랑느타리버섯 1 중량부를 기준으로 물이 20 중량부 미만으로 첨가될 경우 용매가 용질인 노랑느타리버섯 분말에 충분히 침투되지 못해 추출이 제대로 이루어지지 못하고, 추출시간이 길어지며, 추출물의 수율이 낮아지는 문제점이 발생하였으며, 40 중량부를 초과할 경우 유효성분 외의 무효 성분 역시 과량을 추출되어 해당노성 추출물로 사용함에 이상이 발생하고, 알파-글루코시다제(α -glucosidase)의 저해활성이 증가폭이 미비한 수준에 그치기 때문에 본 단계에서 분말 상태의 노랑느타리버섯 1중량부를 물 20 내지 40 중량부에 첨가함이 바람직하다.

[0036] (4) 정제단계<S400>

[0037] 본 단계에서는 상기 단계(S300)를 통해 추출된 열수 추출물을 여러 형태의 크로마토그래피(Chromatography)를 이용해 순차적으로 적어도 한번 이상의 정제를 거치도록 하여 유효성분을 포함한 활성분획물을 획득하는 과정(S400)이 이루어진다.

[0038] (4-1) 1차 정제단계<S410>

[0039] 우선, 상기 단계(S300)를 통해 추출된 열수 추출물을 세파덱스(Sephadex)와 같은 친수성 분자체를 정지상으로 사용하는 세파덱스(Sephadex) G-100 칼럼(Column) 크로마토그래피(Chromatography)를 이용해 정제한 뒤 알파-글루코시다제(α -glucosidase)의 저해활성(Inhibitory Activity) 및 수율(Solid yield)을 측정하여, 알파-글루코시다제(α -glucosidase)의 저해활성 및 수율이 높은 활성분획물을 분획 농축하여 획득한다.

[0040] 이와 같이 정제를 통해 획득된 활성분획물을 LC-MS/MS를 통해 구조 분석을 실시한 결과, 도2에 도시된 바와 같이 활성분획물에 해당하는 두 종류의 올리고 펩타이드의 아미노산 배열 구조를 확인할 수 있었다.

[0041] 여기서, 제1올리고펩타이드(Oligopeptide)는 티로신(Tyr, Tyrosine)-티로신(Tyr, Tyrosine)-알라닌(Ala, Alanine)-아이소루신(Ile, Isoleucine)-글리신(Gly, Glycine)-아스파르트산(Asp, Aspartic acid)로 이루어지며, 제2올리고펩타이드(Oligopeptide)는 트레오닌(Thr, Threonine)-아이소루신(Ile, Isoleucine)-알라닌(Ala, Alanine)-페닐알라닌(Phe, Phenylalanine)-아이소루신(Ile, Isoleucine)-아스파르트산(Asp, Aspartic acid)로 이루어진다.

[0042] (4-2) 효소 가수분해단계<S420>

[0043] 다음으로, 상기 단계(S410)를 통해 획득된 활성분획물에 단백질 분해 효소인 펩신(Pepsin)을 첨가하여 효소가수 분해(Enzyme Hydrolysis) 처리하여 펩신 가수분해물을 획득한다.

[0044] (4-3) 2차 정제단계<S430>

[0045] 다음으로, 상기 단계(S420)를 통해 획득된 가수분해물을 세파덱스(Sephadex)와 같은 친수성 분자체를 정지상으로 사용하는 세파덱스(Sephadex) G-50 칼럼(Column) 크로마토그래피(Chromatography)를 이용해 정제한 뒤 알파-글루코시다제(α -glucosidase)의 저해활성(Inhibitory Activity) 및 수율(Solid yield)을 측정하여, 알파-글루코시다제(α -glucosidase)의 저해활성 및 수율이 높은 활성분획물을 분획 농축하여 획득한다.

[0046] 여기서, 본 단계에서 이용되는 겔 크로마토그래피(Gel Chromatography)는 앞서 1차 정제단계(S410)에서 이용된 겔 크로마토그래피와 비교하여 물 재흡수값이 낮은 친수성 분자체를 정지상으로 사용함이 바람직한데, 이에 대해 좀 더 구체적으로 설명하면 1차 정제과정(S410)에서는 겔 크로마토그래피의 정지상으로 사용되는 세파덱스의 물 재흡수값이 G-100으로 표시되며, 2차 정제과정(S420)에서는 세파덱스의 물 재흡수값이 G-50으로 표시되어진다.

[0047] 다시 말해, 겔 크로마토그래피의 정지상으로 사용되는 분자체(Molecular sieve)는 세파덱스 겔(Gel)과 같이 물

을 흡수할 수 있고 팽윤되는 친수성을 갖춘 분자체로써, 이러한 물 흡수성능 또는 팽윤성능의 정도에 따라 특성이 달라지고 앞서 G-100 또는 G-50과 같이 표시되는 유형 번호는 물의 재흡수값에 관계된 값이다. 예를 들어, 세파텍스 G-10은 마른 겔 1g당 1ml의 물을 흡수함을 의미한다.

[0048] (4-4) 3차 정제단계<S440>

[0049] 마지막으로, 상기 단계(430)를 통해 획득된 활성분획물을 역상고속액체크로마토그래피(RP-HPLC, Reversed Phase High Performance Liquid Chromatography)를 이용해 정제한 뒤 알파-글루코시다제(α -glucosidase)의 저해활성(Inhibitory Activity) 및 수율(Solid yield)을 측정하여, 알파-글루코시다제(α -glucosidase)의 저해활성 및 수율이 높은 활성분획물을 분획 농축하여 획득한다.

[0050] **2. 노랑느타리버섯 유래 항당뇨성 추출물의 항당뇨성 분석에 관한 설명**

[0051] 본 발명의 일 실시예에 따른 노랑느타리버섯 유래 항당뇨성 추출물은 아래와 같은 함량 및 일정 조건 하에서 제조되어 전체 조성물의 항당뇨성능을 비롯해 조성물 아미노산 구성 형태 및 수율 상태를 확인하였으며, 당업계의 기술자들에게 자명한 수단에 의한 성질 등을 정의하기 위한 목적으로 하기 실험 방법들을 이용하였다.

[0052] (1)주요 버섯류 유래 추출물의 알파-글루코시다제(α -glucosidase)의 저해활성(Inhibitory Activity) 시험

[0053] 우선, 아래와 같은 방법을 통해 2종류로 추출된 각각의 실시예들(실시예1, 비교예1 내지 비교예3)의 알파-글루코시다제(α -glucosidase) 저해활성(Inhibitory Activity) 정도를 측정하였으며, 그 결과는 하기 표1에 나타난 바와 같다.

[0054] <실시예1 : 노랑느타리버섯(*Pleurotus Cornucopiae*) 유래 추출물>

[0055] 재배한 노랑느타리버섯을 열풍 건조기 내에 투입하여 40℃의 온도 환경에서 3일(72시간) 가량 건조시켜 최종 수분 함량의 수준이 6% 내외로 만든 뒤, 분쇄기를 통해 1mm로 분말화하였다. 그리고 이와 같이 마련된 분말상태의 노랑느타리버섯 1kg을 물 및 95% 에탄올 30kg에 각각 넣고 30℃의 온도 환경에서 12시간 및 24시간가량 각각 추출하였다.

[0056] <비교예1 : 느타리버섯(*Pleurotus ostreatus*) 유래 추출물>

[0057] 재배한 느타리버섯을 열풍 건조기 내에 투입하여 40℃의 온도 환경에서 3일(72시간) 가량 건조시켜 최종 수분 함량의 수준이 6% 내외로 만든 뒤, 분쇄기를 통해 1mm로 분말화하였다. 그리고 이와 같이 마련된 분말상태의 느타리버섯 1kg을 물 및 95% 에탄올 30kg에 각각 넣고 30℃의 온도 환경에서 12시간 및 24시간가량 각각 추출하였다.

[0058] <비교예2 : 큰느타리버섯(*Pleurotus eryngii*) 유래 추출물>

[0059] 재배한 큰느타리버섯을 열풍 건조기 내에 투입하여 40℃의 온도 환경에서 3일(72시간) 가량 건조시켜 최종 수분 함량의 수준이 6% 내외로 만든 뒤, 분쇄기를 통해 1mm로 분말화하였다. 그리고 이와 같이 마련된 분말상태의 큰느타리버섯 1kg을 물 및 95% 에탄올 30kg에 각각 넣고 30℃의 온도 환경에서 12시간 및 24시간가량 각각 추출하였다.

[0060] <비교예3 : 분홍느타리버섯(*Pleurotus salmoneostramineus*) 유래 추출물>

[0061] 재배한 분홍느타리버섯을 열풍 건조기 내에 투입하여 40℃의 온도 환경에서 3일(72시간) 가량 건조시켜 최종 수분 함량의 수준이 6% 내외로 만든 뒤, 분쇄기를 통해 1mm로 분말화하였다. 그리고 이와 같이 마련된 분말상태의 분홍느타리버섯 1kg을 물 및 95% 에탄올 30kg에 각각 넣고 30℃의 온도 환경에서 12시간 및 24시간가량 각각 추출하였다.

표 1

[0062]

주요 버섯류	12h 추출		24h 추출	
	D.W	95% EtOH	D.W	95% EtOH
실시예1	48.5±0.4	41.7±0.1	42.3±0.7	42.3±0.1
비교예1	Not Detected	Not Detected	Not Detected	Not Detected
비교예2	Not Detected	Not Detected	Not Detected	Not Detected
비교예3	39.1±0.1	36.5±0.7	Not Detected	37.3±0.7

[0063] 표1에 나타난 바와 같이, 노랑느타리버섯 유래 추출물은 다른 주요 버섯류에 비해 알파-글루코시다제 저해활성이 더 우수하여 항당뇨성 추출물로서 이용가치가 높고, 알파-글루코시다제 저해활성이 더 우수할 뿐 만 아니라 기능성 건강식품에 활용되어 질 수 있도록 소재의 측면에서 인체의 영향을 고려할 때 열수 추출을 통해 추출물이 획득됨이 바람직하다.

[0064] (2)추출시간에 따른 노랑느타리버섯 유래 항당뇨성 추출물의 알파-글루코시다제(α -glucosidase)의 저해활성(Inhibitory Activity) 시험

[0065] 본 시험에서는 재배한 노랑느타리버섯을 열풍 건조기 내에 투입하여 40℃의 온도 환경에서 3일(72시간) 가량 건조시켜 최종 수분 함량의 수준이 6% 내외로 만든 뒤, 분쇄기를 통해 1mm로 분말화하여 이와 같이 마련된 분말상태의 노랑느타리버섯 1kg을 물 30kg에 넣고 30℃의 온도 환경에서 추출시간을 변화시켜가며 추출물을 획득하여 각각의 알파-글루코시다제(α -glucosidase)의 저해활성을 측정하였으며, 그 결과는 하기 표2에 나타난바와 같다.

표 2

[0066]	추출시간(hr)	0.5	1.0	3.0	6.0	12.0	24.0
	α -glucosidase의 저해활성(%)	27.8±0.1	39.8±0.8	55.7±0.6	64.9±0.1	77.9±0.8	48.5±0.4

[0067] 표2에 나타난바와 같이 노랑느타리버섯 유래 항당뇨성 추출물의 알파-글루코시다제의 저해활성, 즉 항당뇨성능은 분말상태의 노랑느타리버섯 1kg을 물 30kg에 넣고 30℃의 온도 환경에서 12시간가량 추출하여 획득된 추출물이 가장 뛰어났으며, 추출시간이 12시간을 넘어서는 순간부터는 오히려 저해활성이 저해되는 결과를 확인할 수 있다.

[0068] (3)노랑느타리버섯 유래 항당뇨성 추출물의 정제 결과

[0069] 먼저, 재배한 노랑느타리버섯을 열풍 건조기 내에 투입하여 40℃의 온도 환경에서 3일(72시간) 가량 건조시켜 최종 수분 함량의 수준이 6% 내외로 만든 뒤, 분쇄기를 통해 1mm로 분말화하여 이와 같이 마련된 분말상태의 노랑느타리버섯 1kg을 물 30kg에 넣고 30℃의 온도 환경에서 12시간동안 열수 추출하여 추출물을 획득하였다.

[0070] 다음으로, 획득된 추출물을 세파텍스 G-100 칼럼 크로마토그래피를 이용해 정제한 뒤 알파-글루코시다제(α -glucosidase)의 저해활성 및 수율을 측정하였으며, 그 결과는 도2에 도시된 바와 같이, 알파-글루코시다제(α -glucosidase)의 저해활성 및 수율이 높은 활성분획물(P-1, P-2)이 2개로 확인된다.

[0071] 이 중 P-1은 알파-글루코시다제의 저해활성(IC₅₀)이 18.2 mg/ml, 수율이 2.13 % 수준으로 나타나고, P-2는 알파-글루코시다제의 저해활성(IC₅₀)이 17.3 mg/ml, 수율이 37.4 % 수준으로 나타난다.

[0072] 그리고 1차 정제를 통해 분획된 활성분획물 중 알파-글루코시다제의 저해활성 및 수율이 상대적으로 더 높은 P-2에 단백질 분해효소와 전분 분해효소를 첨가하여 효소 가수분해 처리를 수행하였으며, 그 결과는 하기 표3에 나타난 바와 같다.

표 3

[0073]	α -glucosidase의 저해활성(IC ₅₀ : mg/ml)	
	Control(non-treated)	17.3
	Protease	Pepsin 12.88±0.3
		Trypsin Not Detected
		Pancreatin 15.9±0.9
	Amylase	maltase 17.9±0.8
		α -Amylase 18.4±0.3

[0074] 표3에 나타난 바와 같이 활성분획물 P-2는 펩신을 이용해 효소 가수분해를 수행 시 IC₅₀값이 급격히 낮아져 알파-글루코시다제의 저해활성이 증가함을 알 수 있으며, 이를 통해 활성분획물 P-2는 단백질(혹은 펩타이드), 전분 또는 당단백질 중 단백질(혹은 펩타이드) 구조체라는 것을 알 수 있다.

[0075] 다음으로 이와 같이 펩신을 첨가하여 가수분해된 활성분획물 P-2를 세파덱스 G-50 칼럼 크로마토그래피를 이용해 2차 정제한 뒤 알파-글루코시다제(α -glucosidase)의 저해활성 및 수율을 측정하였으며, 그 결과는 도3에 도시된 바와 같이, 알파-글루코시다제(α -glucosidase)의 저해활성 및 수율이 높은 활성분획물(P-2-1)이 확인된다.

[0076] 이와 같은 활성분획물 P-2-1은 알파-글루코시다제의 저해활성(IC₅₀)이 10.72 mg/ml, 수율이 12.5 % 수준으로 나타난다.

[0077] 마지막으로, 2차 정제를 통해 분획된 활성분획물 P-2-1을 이동상으로 아세토나이트릴/아세트산 (Acetonitrile/Acetic acid, 20/0.1 Vol%) 상태의 이성분계를 사용하는 FORTIS C18 칼럼 역상고속액체크로마토그래피(RP-HPLC)를 이용해 3차 정제한 뒤 알파-글루코시다제(α -glucosidase)의 저해활성 및 수율을 측정하였으며, 그 결과는 도4에 도시된 바와 같이, 알파-글루코시다제(α -glucosidase)의 저해활성 및 수율이 높은 활성분획물(P-2-1-1)이 확인된다.

[0078] 이와 같은 활성분획물 P-2-1-1은 알파-글루코시다제의 저해활성(IC₅₀)이 10.70 mg/ml, 수율이 12.2 % 수준으로 나타난다.

[0079] 아울러, 이와 같은 각 추출 및 정제 단계 별 알파-글루코시다제(α -glucosidase)의 저해활성 및 수율 변화 현상은 하기 표4에 도시된 바와 같다.

표 4

추출 단계	α -glucosidase의 저해활성 (IC ₅₀ : mg/ml)	수율 (Solid yield, %)
노랑느타리버섯 (분말 상태)	-	100
열수 추출	18.20	42.7
1차 정제	17.30	37.4
효소 가수분해	12.88	30.0
2차 정제	10.72	12.5
3차 정제	10.70	12.2

[0081] (4)노랑느타리버섯 유래 항당뇨성 추출물 내 유효성분의 아미노산 서열 분석 결과

[0082] 노랑느타리버섯 유래 항당뇨성 추출물의 유효성분인 2종류의 올리고 펩타이드의 아미노산 서열을 분석하기 위해 앞서 설명한 정제과정을 거쳐 획득된 2종류의 활성분획물을 C-MS/MS를 이용해 분석한 결과, 도6에 도시된 바와 같이 제1올리고펩타이드(Oligopeptide)는 티로신(Tyr, Tyrosine)-티로신(Tyr, Tyrosine)-알라닌(Ala, Alanine)-아이소루신(Ile, Isoleucine)-글리신(Gly, Glycine)-아스파르트산(Asp, Aspartic acid)로 이루어지며, 도5에 도시된 바와 같이 제2올리고펩타이드(Oligopeptide)는 트레오닌(Thr, Threonine)-아이소루신(Ile, Isoleucine)-알라닌(Ala, Alanine)-페닐알라닌(Phe, Phenylalanine)-아이소루신(Ile, Isoleucine)-아스파르트산(Asp, Aspartic acid)로 이루어짐을 확인하였다.

[0083] 또한, 더 나아가 인위적인 화학적 합성을 통해 앞서 설명한 바와 같은 아미노산 서열 구조를 가지는 올리고 펩타이드를 각각 마련하였고, 이와 같이 화학적 합성으로 마련된 2종류의 올리고 펩타이드를 이용해 알파-글루코시다제(α -glucosidase)의 저해활성 및 분자량을 분석하였으며, 그 결과는 하기 표5에 나타난 바와 같다.

표 5

화학적 합성된 올리고 펩타이드	아미노산 서열	분자량 (Da)	α -glucosidase 저해활성 (IC ₅₀ : mg/ml)
제1올리고 펩타이드	Tyr-Tyr-Ala-Ile-Gly-Asp	1,115.53	11.01
제2올리고 펩타이드	Thr-Ile-Ala-Phe-Ile-Asp	1,823.92	10.98

[0085] (5)노랑느타리버섯 유래 항당뇨성 추출물 내 유효성분의 저해패턴 및 혈당상승 억제효과 분석 결과

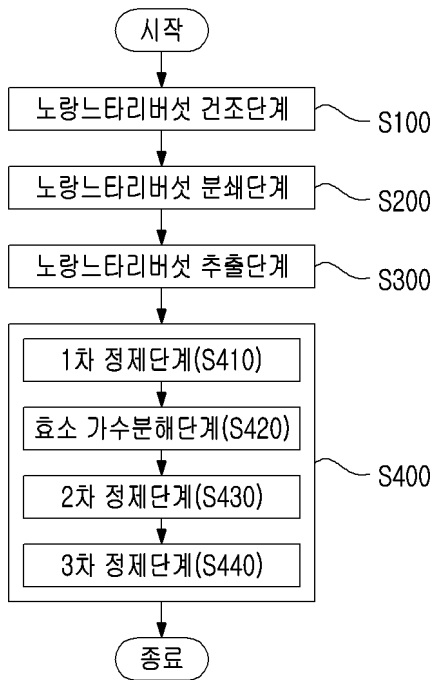
[0086] 노랑느타리버섯 유래 항당뇨성 추출물 내 유효성분에 해당하며, 앞서 설명한 과정을 통해 정제 후 분획되어진 활성분획물 중 P-2를 이용하여 유효성분이 알파-글루코시다제(α -glucosidase)를 저해하는 방식이 경쟁적 저해

를 띠는지, 비경쟁적 저해를 띠는지 혹은 혼합형태를 띠는지를 확인하기 위해 분석한 결과로써, 해당 결과를 라인웨버-버크도면(Lineweaver-Burk plot)을 통해 도7에 도시된 바와 같이 나타냈다.

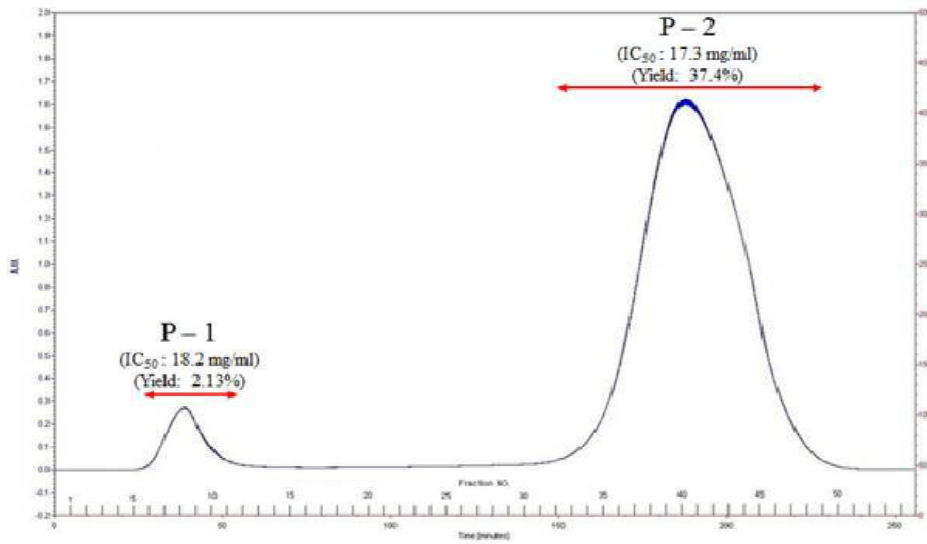
- [0087] 해당 도7의 그래프는 효소의 기질친화성(K_m)과 최대반응속도(V_{max}) 등을 이용한 효소 저해 방식을 나타내는 것으로, X축은 최대반응속도의 역수를 의미하고, Y축은 저해활성 측정에 사용하는 화학적 기질인 PNPG의 농도 역수를 의미한다.
- [0088] 또한, 도7의 그래프에 표시된 ●은 활성분획물 무첨가 대조군(Control)을 이용한 저해패턴 분석 결과를, ▼은 1.0mg 농도의 활성분획물 P-2를 이용한 저해패턴 분석결과를, ○은 0.5mg 농도의 활성분획물 P-2를 이용한 저해패턴 분석결과를 의미한다.
- [0089] 그리고 당뇨 유발 SD쥐(Diabetic-SD rat, Diabetic-Sprague rat)에 가용성 전분(Soluble starch)과 함께 실시 형태에 따라 D.W, 활성분획물 P-2 및 시판용 혈당제를 각각 경구 투여(Oral administration)하여 시간에 따른 혈당량의 변화를 확인하였고, 그 결과는 도8에 도시된 그래프와 같다.
- [0090] 여기서, 도8의 그래프에 표시된 ○(대조군)은 가용성 전분과 D.W를 당뇨 유발 SD쥐에 투여한 경우의 혈당량 변화를, ▼은 가용성 전분과 추출 및 정제 과정을 거친 활성분획물 P-2를 투여량이 50mg/kg이 되도록 당뇨 유발 SD쥐에 투여한 경우의 혈당량 변화를, △는 가용성 전분과 추출 및 정제 과정을 거친 활성분획물 P-2를 투여량이 100mg/kg이 되도록 당뇨 유발 SD쥐에 투여한 경우의 혈당량 변화를, ■는 가용성 전분과 추출 및 정제 과정을 거친 활성분획물 P-2를 투여량이 300mg/kg이 되도록 당뇨 유발 SD쥐에 투여한 경우의 혈당량 변화를, □는 가용성 전분과 시판용 혈당제 Acarbose를 투여량이 15mg/kg이 되도록 당뇨 유발 SD쥐에 투여한 경우의 혈당량 변화를 의미한다.
- [0091] 그 결과 도8에 나타난 바와 같이 노랑느타리버섯 유래 항당뇨성 추출물 내에 포함된 유효성분(활성분획물)은 시판 혈당제와 비슷한 수준의 혈당상승 억제 효과를 보임과 동시에 무처리 대조군에 비해서는 보다 농도 의존적으로 식후 혈당상승을 억제하고 있음을 알 수 있다.
- [0092] 본 발명에 개시된 실시예는 본 발명의 기술 사상을 한정하기 위한 것이 아니라 설명하기 위한 것이고, 이러한 실시예에 의해서 본 발명의 기술 사상의 범위가 한정되는 것은 아니다. 보호범위는 아래 청구범위에 의하여 해석되어야 하며, 그와 동등한 범위 내에 있는 모든 기술 사상은 본 발명의 권리 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 할 것이다.

도면

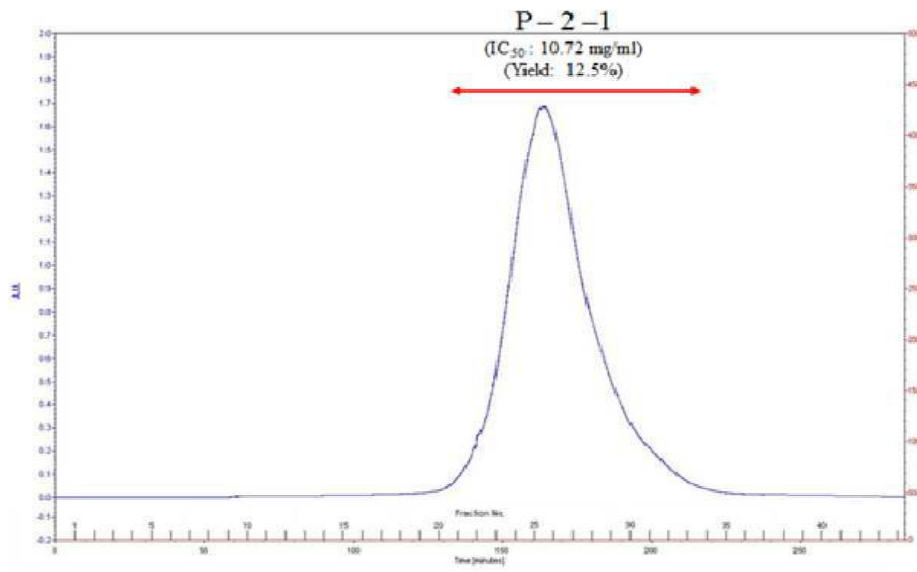
도면1



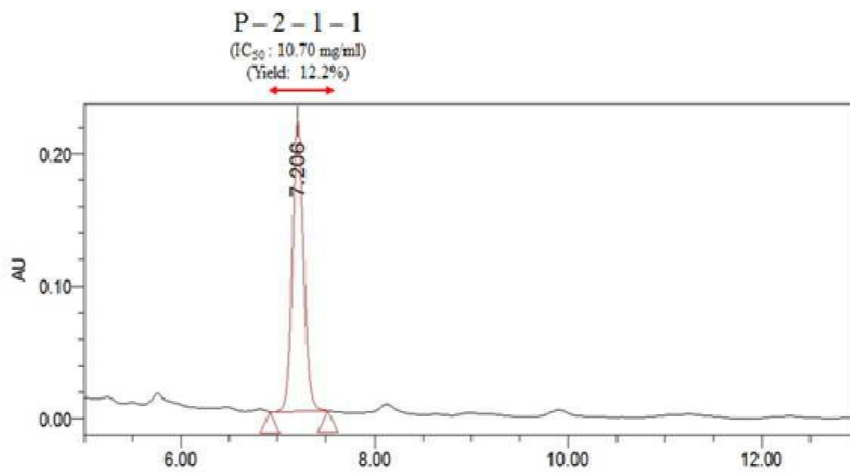
도면2



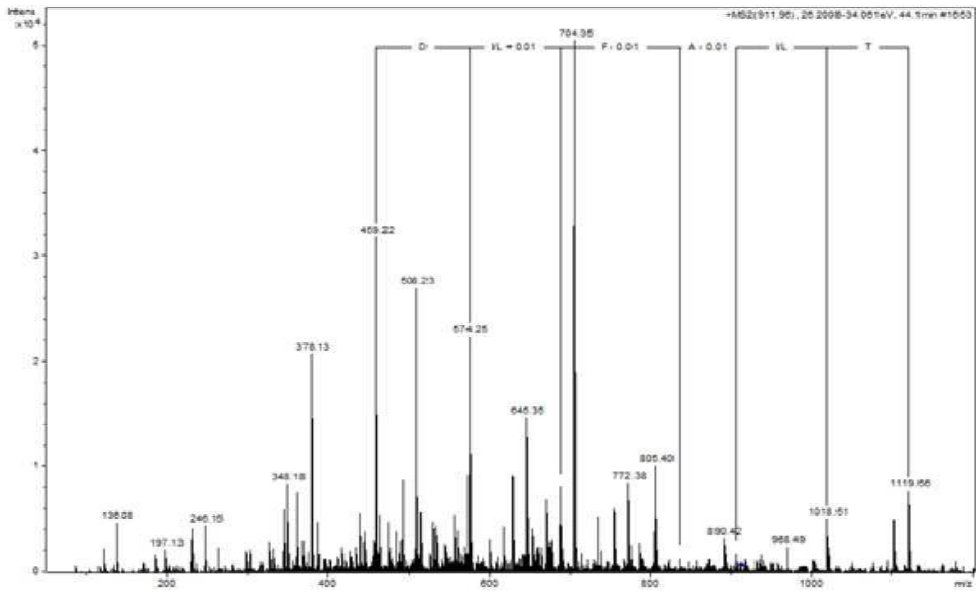
도면3



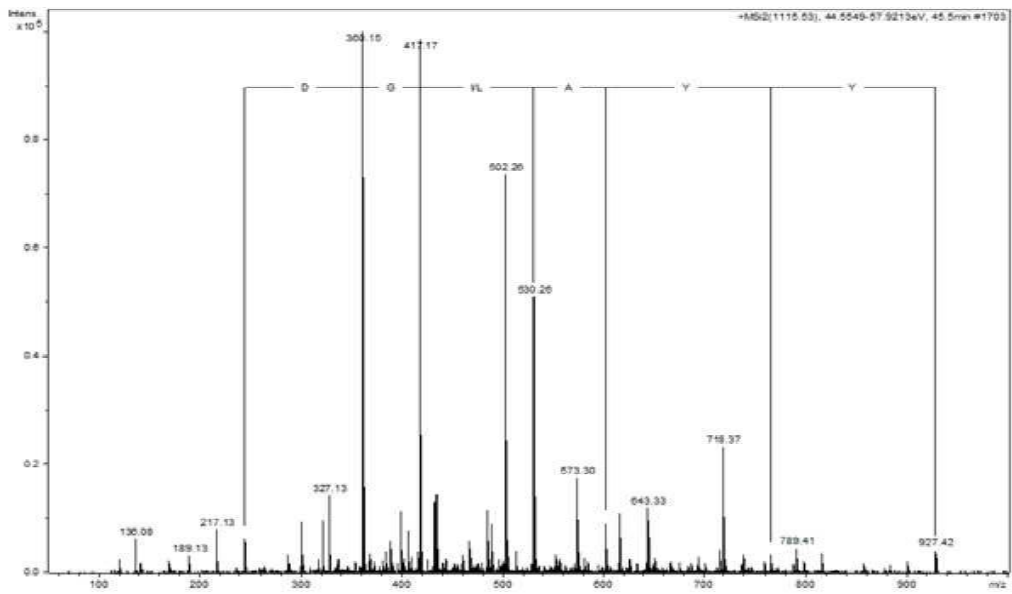
도면4



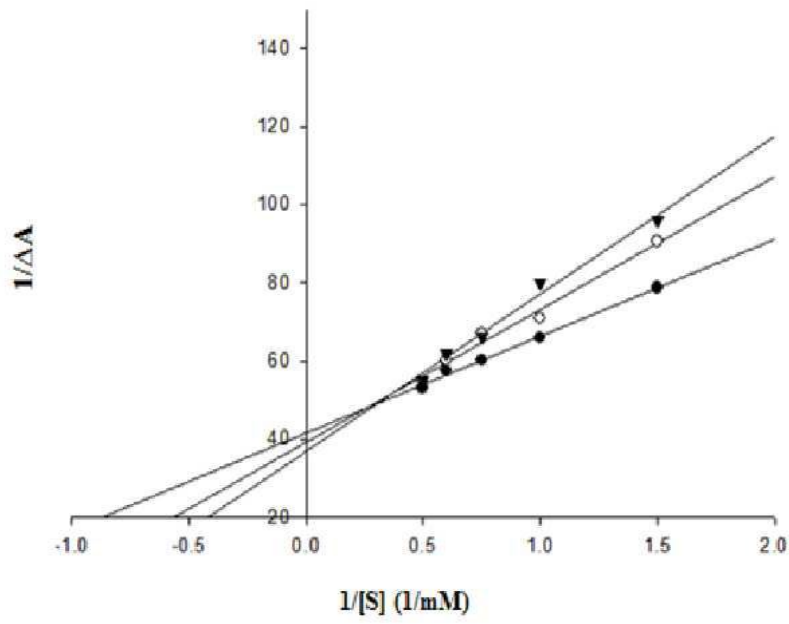
도면5



도면6



도면7



도면8

