



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2024년01월10일
(11) 등록번호 10-2622616
(24) 등록일자 2024년01월04일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 8/64 (2006.01) A23L 33/18 (2016.01)
A23L 33/19 (2016.01) A61Q 19/00 (2006.01)
A61Q 19/08 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61K 8/64 (2013.01)
A23L 33/18 (2016.08)

(21) 출원번호 10-2022-0118776

(22) 출원일자 2022년09월20일

심사청구일자 2022년09월20일

(56) 선행기술조사문헌

KR101464592 B1
KR1020090095902 A
KR1020150055666 A
KR1020150055670 A

(73) 특허권자

충남대학교산학협력단

대전광역시 유성구 대학로 99 (궁동, 충남대학교)

(주)서울에프엔비

강원도 횡성군 공근면 아이티밸리길 36

(72) 발명자

남명수

세종특별자치시 시청대로 210(보람동,
호려울마을10단지), 1023동 1402호

김기광

대전광역시 유성구 지족로 362(지족동, 반석마을
아파트3단지), 302동 1404호

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

특허법인 공간

전체 청구항 수 : 총 8 항

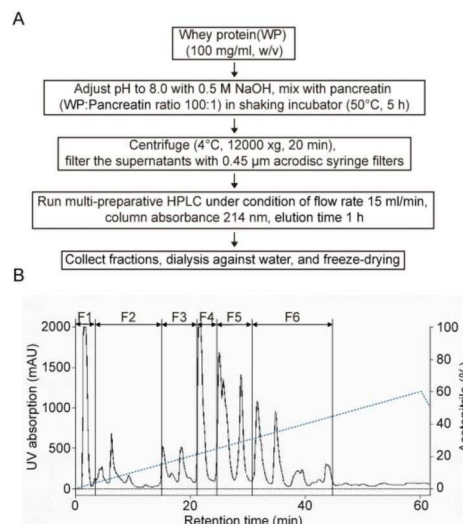
심사관 : 이동욱

(54) 발명의 명칭 유청 단백질 가수분해물 유래 활성 펩타이드를 포함하는 항산화, 항염 또는 노화억제용 조성물

(57) 요약

본 발명은 유청 단백질 가수분해물 또는 이의 분획물 또는 유청 단백질 가수분해물 유래 펩타이드를 포함하는 항산화, 항염 또는 노화억제용 조성물에 관한 것으로, 구체적으로는 유청 단백질 가수분해물 유래 VLVLDTDYKK 또는 VGINYWLAHK 서열을 갖는 펩타이드 또는 이를 포함하는 분획물은 미토콘드리아 기능을 증가시키고, 활성산소종을 감소시키며 염증성 사이토카인을 억제하고 항노화 활성을 나타내어 노화억제를 위한 조성물로 사용할 수 있을 것으로 기대된다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A23L 33/19 (2016.08)

A61Q 19/00 (2013.01)

A61Q 19/08 (2013.01)

A23V 2002/00 (2023.08)

A23V 2200/318 (2013.01)

A23V 2200/324 (2013.01)

A61K 2800/522 (2013.01)

(72) 발명자

오덕근

강원특별자치도 원주시 행구로 54, 101동 2001호
(개운동, 원주힐스테이트아파트)

김지연

강원특별자치도 원주시 장전길 36 (태장동)

명세서

청구범위

청구항 1

유청 단백질 가수분해물 또는 이의 분획물을 포함하는 향염, 향산화 및 향노화 조성물에 있어서,

상기 유청 단백질 가수분해물은, 판크레아틴을 유청 단백질에 1:100의 비율로 첨가하여 50℃로 5시간 동안 반응시킨 것이며, 유효 성분으로 서열번호 1의 VLVLDTDYKK 서열 펩타이드 및 서열번호 2의 VGINYWLAHK 서열 펩타이드를 포함하는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 2

삭제

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 유청 단백질 가수분해물의 분획물은 판크레아틴을 유청 단백질에 1:100의 비율로 첨가하여 50℃로 5시간 동안 반응시킨 유청 단백질 가수분해물을 다중 분취 HPLC를 통해 아세토니트릴 1~31%(w/w) 농도 분획 중 31%(w/w) 농도에서 얻은 분획물이며, 서열번호 1의 VLVLDTDYKK 및 서열번호 2의 VGINYWLAHK 서열을 갖는 펩타이드의 합을 30~40 %(w/w) 포함하는 분획물인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 유청 단백질 가수분해물의 분획물은 서열번호 1의 VLVLDTDYKK 서열 펩타이드를 17 %(w/w), 서열번호 2의 VGINYWLAHK 서열 펩타이드를 16 %(w/w)로 포함하는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 조성물은 미토콘드리아 활성 유도, 활성산소종 감소, 염증성사이토카인인 IL-1 β , IL-6, TNF α 의 발현 억제, NOS 발현 억제 및 노화 관련 β -갈락토사다제 활성 억제로부터 선택되는 하나 이상의 활성을 갖는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 6

유청 단백질 가수분해물 또는 이의 분획물을 포함하는 향염, 향산화 및 향노화용 화장료 조성물에 있어서,

상기 유청 단백질 가수분해물은, 판크레아틴을 유청 단백질에 1:100의 비율로 첨가하여 50℃로 5시간 동안 반응시킨 것이며, 유효 성분으로 서열번호 1의 VLVLDTDYKK 서열 펩타이드 및 서열번호 2의 VGINYWLAHK 서열 펩타이드를 포함하는 것을 특징으로 하는 화장료 조성물.

청구항 7

유청 단백질 가수분해물 또는 이의 분획물을 포함하는 향염, 향산화 및 향노화용 건강기능식품에 있어서,

상기 유청 단백질 가수분해물은, 판크레아틴을 유청 단백질에 1:100의 비율로 첨가하여 50℃로 5시간 동안 반응시킨 것이며, 유효 성분으로 서열번호 1의 VLVLDTDYKK 서열 펩타이드 및 서열번호 2의 VGINYWLAHK 서열 펩타이드를 포함하는 것을 특징으로 하는 건강기능식품.

청구항 8

서열번호 2의 VGINYWLAHK 서열을 갖는 펩타이드를 포함하는 것을 특징으로 하는 향염, 향산화 및 향노화용 화장

료 조성물.

청구항 9

서열번호 2의 VGINYWLAHK 서열을 갖는 펩타이드를 포함하는 것을 특징으로 하는 항염, 항산화 및 항노화용 건강 기능식품.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 유청 단백질 가수분해물 유래 펩타이드를 포함하는 항산화, 항염 또는 노화억제용 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 모든 생명체의 기본 기능 단위인 세포는 다양한 내외부 스트레스 요인에 노출되어 있으며, 환경 변화에 따라 다양한 생리적 반응을 조절하여 항상성을 유지하고 있다. 그리고 이것이 파괴되면 다양한 질병이 발생하게 된다 (Ishikawa et al., 2008). 예를 들어, 미토콘드리아에서는 생명유지에 필수적인 ATP를 생산하는데, 이 과정에서 세포 산화 스트레스를 유발하는 자유 라디칼과 활성산소종(ROS)이 생성된다. 이러한 ROS는 세포내 시스템에 의해 처리되는데, 적절하게 처리하지 못하거나 그 생성량이 과도한 경우 다양한 생체 분자와의 비가역적 화학 반응을 통해 생체 분자의 변성을 유도하여 염증 반응 및 노화 가속화와 관련된 질병과 같은 다양한 질병의 발생을 초래하게 된다. 따라서 음식을 통해 외부에서 공급되는 항산화제는 과도한 자유 라디칼과 ROS 생성을 제거하는 데에 도움이 된다.

[0003] 한편, 우유는 단백질, 칼슘, 미네랄 등 신체에 필수적인 영양소를 함유하고 있는 영양학적으로 중요한 식품으로 알려져 있다. 우유에 함유된 칼슘과 필수 아미노산의 지속적인 섭취는 비만, 제2형 당뇨병, 고혈압을 예방한다는 사실도 잘 알려져 있다. 또한 우유의 단백질은 위장 활동, 기능 및 면역 강화에 효과적인 것으로 알려져 있다(Maldonado Galdeano et al., 2011). 우유의 단백질은 카제인 단백질 80% 및 유청 단백질(whey protein) 20%로 구성되는데, 이 중 카제인 단백질은 소화를 통해 분해된 후 흡수된 아미노산은 근육량을 증가시키고 공복감을 억제하며(Scognamiglio et al., 2004), 주로 α -락트알부민(α -LA), β -락토글로불린(β -LG), 이뮤노글로불린(Ig)으로 구성된 유청 단백질은 섭취 후 카제인 단백질보다 더 빨리 소화되어 아미노산으로 전환된다(Koopman et al., 2009).

[0004] 유청 단백질은 필수 아미노산인 시스테인과 메티오닌뿐만 아니라 분지쇄 아미노산과 트립토판이 풍부하며, 콜레스테롤 조절 및 면역 체계 강화와 같은 다양한 생리학적 활성 기능을 나타낸다(Badr et al., 2012; Bell et al., 2020; Niitsu et al., 2016). 구체적으로 시스테인은 글루타치온의 구성아미노산 중 하나로 체내 항산화 및 면역체계에 관여하며, 불충분한 단백질 섭취로 근육량과 근력이 저하된 노인에게 중요한 역할을 하는 것으로 보고되고 있다(Iyer et al., 2009).

[0005] 최근 이러한 우유 단백질의 다양한 생리 활성 기능을 향상시키고 새로운 기능을 발견하기 위해 가수 분해 효소를 사용하여 우유 단백질에서 저분자 펩타이드를 식별하는 여러 연구가 수행되고 있다. 대표적인 예로 버팔로의 카제인에서 유래한 생리활성 펩타이드인 VLPVPQK는 노화방지 및 골감소증 효과를 나타내는 것으로 보고되었다(Mada et al., 2017). 또한 유청 단백질의 가수분해물은 유청 단백질과 동일한 아미노산 조성을 가지고 있으나 유청 단백질보다 혈장 아미노산으로 더 빨리 흡수되며, 인슐린 분비를 촉진하고, 혈당 수치를 낮추며, 근육 성장을 향상시키는 것으로 알려져 있다(Moro et al., 2019).

[0006] 종래선행기술인 한국등록특허 제10-1974405호에는 초유 유청 단백질 가수분해물을 유효성분으로 포함하는 피부 재생용 화장료 조성물이 개시되어 있으며, 한국공개특허 제10-2018-0118520호에는 마유(馬乳) 가수분해 유청 단백질(WPH)분말과 베타카제인을 함유한 근소실재활환자 근육강화용 마유 조제분유 조성물 및 조제유가 개시되어 있다. 그러나, 유청 단백질 유래 펩타이드를 이용한 항염, 항산화 또는 항노화에 대한 연구는 아직 미진한 실정이다.

선행기술문헌

특허문헌

- [0007] (특허문헌 0001) 한국등록특허 제10-1974405호, 초유 유청 단백질 가수분해물을 유효성분으로 포함하는 피부 재생용 화장품 조성물, 2019년04월25일 등록.
- (특허문헌 0002) 한국공개특허 제10-2018-0118520호, 마유(馬乳) 가수분해 유청 단백질(WPH)분말과 베타카제인을 함유한 근소실재활환자 근육강화용 마유 조제분유 조성물 및 조제유, 2018년10월31일 공개.

비특허문헌

- [0008] (비특허문헌 0001) Maldonado Galdeano C, Novotny Nunez I, de Moreno de LeBlanc A, Carmuega E, Weill R, Perdigon G. 2011. Impact of a probiotic fermented milk in the gut ecosystem and in the systemic immunity using a non-severe protein-energy-malnutrition model in mice. BMC Gastroenterol 11:64.
- (비특허문헌 0002) Scognamiglio R, Avogaro A, Negut C, Piccolotto R, de Kreutzenberg SV, Tiengo A. 2004. The effects of oral amino acid intake on ambulatory capacity in elderly subjects. Aging Clin Exp Res 16:443-447.
- (비특허문헌 0003) Koopman R, Crombach N, Gijzen AP, Walrand S, Fauquant J, Kies AK, Lemosquet S, Saris WH, Boirie Y, van Loon LJ. 2009. Ingestion of a protein hydrolysate is accompanied by an accelerated in vivo digestion and absorption rate when compared with its intact protein. Am J Clin Nutr 90:106-115.
- (비특허문헌 0004) Badr G, Ebaid H, Mohany M, Abuelsaad AS. 2012. Modulation of immune cell proliferation and 289 chemotaxis towards CC chemokine ligand (CCL)-21 and CXC chemokine ligand (CXCL)-12 in undenatured whey protein-treated mice. J Nutr Biochem 23:1640-1646.
- (비특허문헌 0005) Bell KE, Snijders T, Zulyniak M, Kumbhare D, Parise G, Chabowski A, Phillips SM. 2020. Correction: A whey protein-based multi-ingredient nutritional supplement stimulates gains in lean body mass and strength in healthy older men: A randomized controlled trial. PLoS One 15:e0243876.
- (비특허문헌 0006) Niitsu M, Ichinose D, Hirooka T, Mitsutomi K, Morimoto Y, Sarukawa J, Nishikino S, Yamauchi K, Yamazaki K. 2016. Effects of combination of whey protein intake and rehabilitation on muscle strength and daily movements in patients with hip fracture in the early postoperative period. Clin Nutr 35:943-949.
- (비특허문헌 0007) Iyer SS, Accardi CJ, Ziegler TR, Blanco RA, Ritzenthaler JD, Rojas M, Roman J, Jones DP. 2009. Cysteine redox potential determines pro-inflammatory IL-1beta levels. PLoS One 4:e5017.
- (비특허문헌 0008) Rothenbuhler E, Kinsella JE. 1986. Disulfide Reduction and Molecular Dissociation Improves the Proteolysis of Soy Glycinin by Pancreatin in vitro Journal of Food Science 51:1479-1510.
- (비특허문헌 0009) Moro T, Brightwell CR, Velarde B, Fry CS, Nakayama K, Sanbongi C, Volpi E, Rasmussen BB. 2019. Whey Protein Hydrolysate Increases Amino Acid Uptake, mTORC1 Signaling, and Protein Synthesis in Skeletal Muscle of Healthy Young Men in a Randomized Crossover Trial. J Nutr 149:1149-1158.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0009] 본 발명의 목적은 유청 단백질 가수분해물 또는 이의 분획물 또는 유청 단백질 가수분해물 유래 펩타이드를 포함하는 항산화, 항염 또는 노화억제용 조성물을 제공하는 데 있다.
- [0010] 본 발명의 또다른 목적은 유청 단백질 가수분해물 또는 이의 분획물 또는 유청 단백질 가수분해물 유래 펩타이드를 포함하는 항산화, 항염 또는 노화억제용 화장품 조성물을 제공하는 데 있다.

[0011] 본 발명의 또다른 목적은 유청 단백질 가수분해물 또는 이의 분획물 또는 유청 단백질 가수분해물 유래 펩타이드를 포함하는 항산화, 항염 또는 노화억제용 건강기능식품을 제공하는 데 있다.

과제의 해결 수단

[0012] 본 발명은 우유의 유청 단백질 가수분해물 또는 이의 분획물 또는 우유의 유청 단백질 가수분해물 유래 펩타이드를 포함하는 항산화, 항염 또는 노화억제용 조성물을 제공한다.

[0013] 상기 유청 단백질 가수분해물은, 판크레아틴을 유청 단백질에 1:100의 비율로 첨가하여 50℃로 5시간 동안 반응시켜 얻을 수 있다. 상기 유청 단백질 가수분해물의 분획물은 판크레아틴을 유청 단백질에 1:1~200 바람직하게는 1:50~100, 더욱 바람직하게는 1:100의 비율로 첨가하여 50℃로 5시간 동안 반응시킨 유청 단백질 가수분해물을 다중 분취 HPLC를 통해 아세토니트릴 31%(w/w) 농도에서 얻은 낮은 극성 펩타이드를 포함하는 분획물일 수 있다.

[0014] 상기 유청 단백질 가수분해물의 분획물은 판크레아틴을 유청 단백질에 1:100의 비율로 첨가하여 50℃로 5시간 동안 반응시킨 유청 단백질 가수분해물을 다중 분취 HPLC를 통해 아세토니트릴 1~31%(w/w) 농도 분획 중 31%(w/w) 농도에서 얻은 분획물이며, 서열번호 1의 VLVLDTYKK 및 서열번호 2의 VGINYWLAHK 서열을 갖는 펩타이드의 합을 30~40 %(w/w) 포함하는 분획물이다.

[0015] 상기 유청 단백질 가수분해물의 분획물은 서열번호 1의 VLVLDTYKK 서열 펩타이드를 17 %(w/w), 서열번호 2의 VGINYWLAHK 서열 펩타이드를 16 %(w/w)로 포함하는 것일 수 있다.

[0016] 상기 VLVLDTYKK 또는 VGINYWLAHK 서열을 갖는 펩타이드는 유청 단백질 가수분해물로부터 HPLC를 수행하여 분리할 수 있으며, 통상의 방법으로 합성하여 사용하거나, 상기 펩타이드를 코딩하는 핵산 분자가 삽입된 발현 벡터로부터 제조된 것을 사용할 수 있다.

[0017] 상기 조성물은 미토콘드리아 활성 유도, 활성산소종 감소, 염증성사이토카인인 IL-1 β , IL-6, TNF α 의 발현 억제, NO합성효소(NOS) 발현 억제 및 노화 관련 β -갈락토사다제 활성 억제로부터 선택되는 하나 이상의 활성을 가질 수 있다.

[0018] 본 발명의 유청 단백질 가수분해물, 또는 이의 분획물 또는 유청 단백질 가수분해물 유래 펩타이드를 포함하는 항산화, 항염 또는 노화억제용 조성물은 약학 조성물로 제공될 수 있다.

[0019] 상기 유청 단백질 가수분해물, 또는 이의 분획물 또는 유청 단백질 가수분해물 유래 펩타이드는 전체 약학 조성물 총 중량에 대하여 바람직하게는 0.001~50중량%, 더 바람직하게는 0.001~40중량%, 가장 바람직하게는 0.001~30중량%로 하여 첨가될 수 있다.

[0020] 상기 약학적 조성물은, 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽, 액제, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 및 멸균주사용액의 형태로 제형화하여 사용될 수 있다. 상기 약학적 조성물에 포함될 수 있는 담체, 부형제 및 희석제로는 락토즈, 텍스트로즈, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로즈, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 들 수 있다. 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제, 감미제, 산미제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다. 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 본 발명의 가용화된 데커시놀에 적어도 하나 이상의 부형제, 예를 들면, 전분, 탄산칼슘, 수크로스 또는 락토즈, 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 또한 단순한 부형제 이외에 스테아린산 마그네슘, 탈크 같은 윤활제들도 사용된다. 경구를 위한 액상 제제로는 현탁액, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데 흔히 사용되는 단순희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제, 산미제 등이 포함될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조제, 좌제가 포함된다. 비수성용제, 현탁제로는 프로필렌글리콜, 폴리에틸렌글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위템솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween)-61, 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다.

[0021] 본 발명의 약학적 조성물의 투여량은 치료받을 대상의 연령, 성별, 체중과, 치료할 특정 질환 또는 병리 상태, 질환 또는 병리 상태의 심각도, 투여 경로 및 처방자의 판단에 따라 달라질 것이다. 이러한 인자에 기초한 투여량 결정은 당업자의 수준 내에 있으며, 일반적으로 투여량은 0.01mg/kg/일 내지 대략 500mg/kg/일의 범위이다.

바람직한 투여량은 0.1mg/kg/일 내지 200mg/kg/일이며, 더 바람직한 투여량은 1mg/kg/일 내지 200mg/kg/일이다. 투여는 하루에 한번 투여할 수도 있고, 수회 나누어 투여할 수도 있다. 상기 투여량은 어떠한 면으로든 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.

- [0022] 본 발명의 약학적 조성물은 쥐, 가축, 인간 등의 포유동물에 다양한 경로로 투여될 수 있다. 투여의 모든 방식은 예상될 수 있는데, 예를 들면, 경구, 직장 또는 정맥, 근육, 피하, 자궁 내 경막 또는 뇌혈관 내 주사 및 피부 도포에 의해 투여될 수 있다. 본 발명의 유청 단백질 가수분해물, 또는 이의 분획물 또는 유청 단백질 가수분해물 유래 펩타이드는 독성 및 부작용이 거의 없으므로 예방 목적으로 장기간 복용시에도 안심하고 사용할 수 있는 약제이다.
- [0023] 본 발명의 유청 단백질 가수분해물, 또는 이의 분획물 또는 유청 단백질 가수분해물 유래 펩타이드를 포함하는 향산화, 항염 또는 노화억제용 조성물은 화장품 조성물로 제공될 수 있다.
- [0024] 상기 유청 단백질 가수분해물, 또는 이의 분획물 또는 유청 단백질 가수분해물 유래 펩타이드는 전체 화장품 조성물 총 중량에 대하여 바람직하게는 0.001~50중량%, 더 바람직하게는 0.001~40중량%, 가장 바람직하게는 0.001~30중량%로 하여 첨가될 수 있다.
- [0025] 본 발명의 화장품 조성물의 제형으로는 특별히 한정되는 것은 아니지만 피부외용제의 제형인 것이 바람직하며, 상기 피부 외용제 제형의 하나의 바람직한 형태는 유연화장수, 영양화장수, 에센스, 마사지크림, 영양크림, 팩, 클렌저, 젤 또는 피부 점착타입 화장료의 제형을 갖는 화장품 조성물을 들 수 있고, 다른 바람직한 형태로는 로션, 연고, 젤, 크림, 패치 또는 분무제와 같은 경피 투여형의 제형을 들 수 있다. 또한, 각 제형의 화장품 조성물에 있어서, 상기한 필수 성분 이외의 다른 성분들은 기타 외용제의 제형 또는 사용 목적 등에 따라 당업자가 어려움 없이 적의 선정하여 배합할 수 있다.
- [0026] 본 발명의 화장품 조성물은 바람직하게는 화장품학적으로 허용가능한 매질 또는 기제를 함유한다. 이는 국소적 용에 적합한 모든 제형으로, 예를 들면 용액, 젤, 고체 또는 반죽 무수 생성물, 수상에 유상을 분산시켜 얻은 에멀전, 현탁액 마이크로 에멀전, 마이크로캡슐, 미세과립구 또는 이온형(리포솜) 및/또는 바이온형의 소낭 분
- [0027] 산제의 형태로, 또는 크림, 스킨, 로션, 파우더, 연고, 스프레이 또는 콘실 스틱의 형태로 제공될 수 있다. 또한, 포말(foam)의 형태 또는 압축된 추진체를 더 함유한 에어로졸 조성물의 형태로도 제조될 수 있다. 또한, 본 발명의 화장품 조성물은 피부과학적으로 허용가능한 매질 또는 기제를 함유함으로써 피부과학분야에서 통상적으로 사용되는 국소적용 또는 전신적용할 수 있는 보조제 형태로 제조될 수 있으며, 이들 조성물은 당해 분야의 통상적 방법에 따라 제조될 수 있다.
- [0028] 본 발명의 제형이 페이스트, 크림 또는 젤인 경우에는 담체 성분으로서 동물성유, 식물성유, 왁스, 파라핀, 전분, 트라칸트, 셀룰로오스 유도체, 폴리에틸렌 글리콜, 실리콘, 벤토나이트, 실리카, 탈크 또는 산화아연 등이 이용될 수 있다.
- [0029] 본 발명의 제형이 파우더 또는 스프레이인 경우에는 담체 성분으로서 락토스, 탈크, 실리카, 알루미늄 히드록시드, 칼슘 실리케이트 또는 폴리아미드 파우더가 이용될 수 있고, 특히 스프레이인 경우에는 추가적으로 클로로플루오로히드로카본, 프로판/부탄 또는 디메틸 에테르와 같은 추진체를 포함할 수 있다.
- [0030] 본 발명의 제형이 용액 또는 유탁액의 경우에는 담체 성분으로서 용매, 용매화제 또는 유탁화제가 이용되고, 예컨대 물, 에탄올, 이소프로판올, 에틸 카보네이트, 에틸 아세테이트, 벤질 알코올, 벤질 벤조에이트, 프로필렌 글리콜, 1,3-부틸글리콜 오일, 글리세롤 지방족 에스테르, 폴리에틸렌 글리콜 또는 소르비탄의 지방산 에스테르가 있다.
- [0031] 본 발명의 제형이 현탁액인 경우에는 담체 성분으로서 물, 에탄올 또는 프로필렌 글리콜과 같은 액상 희석제, 에톡실화 이소스테아릴 알코올, 폴리옥시에틸렌소르비톨 에스테르 및 폴리옥시에틸렌 소르비탄 에스테르와 같은 현탁제, 미소결정성 셀룰로오스, 알루미늄 메타히드록시드, 벤토나이트, 아가 또는 트라칸트 등이 이용될 수 있다.
- [0032] 본 발명의 제형이 계면-활성제 함유 클렌징인 경우에는 담체 성분으로서 지방족 알코올 설페이트, 지방족 알코올 에테르설페이트, 설포숙신산 모노에스테르, 이세티오네이트, 이미다졸리늄 유도체, 메틸타우레이트, 사르코시네이트, 지방산 아미드 에테르 설페이트, 알킬아미도베타인, 지방족 알코올, 지방산 글리세리드, 지방산 디에탄올아미드, 식물성 유, 리놀린 유도체 또는 에톡실화 글리세롤 지방산에스테르 등이 이용될 수 있다.
- [0033] 본 발명의 제형은 향광물질, 살진균제, 굴수성 유발물질, 보습제, 방향제, 방향제 담체, 단백질, 용해화제, 당

유도체, 일광차단제, 비타민, 식물 추출물 등을 포함하는 부형제를 추가로 함유할 수 있다.

[0034] 본 발명의 유청 단백질 가수분해물, 또는 이의 분획물 또는 유청 단백질 가수분해물 유래 펩타이드를 포함하는 향산화, 항염 또는 노화억제용 조성물은 건강기능식품으로 제공될 수 있다.

[0035] 상기 유청 단백질 가수분해물, 또는 이의 분획물 또는 유청 단백질 가수분해물 유래 펩타이드는 전체 건강기능식품 총 중량에 대하여 0.001~990중량%로 사용할 수 있으며, 건강 유지를 목적으로 하거나 또는 건강 조절을 목적으로 하는 장기간의 섭취의 경우에는 상기 양은 상기 범위 이하일 수 있으며, 안전성 면에서 아무런 문제가 없기 때문에 상기 범위 이상의 양으로도 사용될 수 있다

[0036] 본 발명의 유청 단백질 가수분해물, 또는 이의 분획물 또는 유청 단백질 가수분해물 유래 펩타이드를 포함하는 건강기능식품은 식품의 종류에는 특별한 제한은 없으며, 본 발명의 유청 단백질 가수분해물, 또는 이의 분획물 또는 유청 단백질 가수분해물 유래 펩타이드를 첨가할 수 있는 식품의 예로는 드링크제, 육류, 소시지, 빵, 비스킷, 떡, 초콜릿, 캔디류, 스낵류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류를 포함한 낙농제품, 각종 스프, 음료수, 알코올 음료 및 비타민 복합제, 유제품 및 유가공 제품 등이 있으며, 통상적인 의미에서의 건강기능식품 및 건강식품 조성물을 모두 포함한다.

[0037] 본 발명에 따른 유청 단백질 가수분해물, 또는 이의 분획물 또는 유청 단백질 가수분해물 유래 펩타이드를 함유하는 건강기능식품은 식품에 그대로 첨가하거나 다른 식품 또는 식품 성분과 함께 사용될 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다. 다른 성분에는 특별한 제한이 없으며 통상의 음료와 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다. 상술한 천연 탄수화물의 예는 모노사카라이드, 예를 들어, 포도당, 과당 등; 디사카라이드, 예를 들어 말토스, 슈크로스 등; 및 폴리사카라이드, 예를 들어 텍스트린, 시클로텍스트린 등과 같은 통상적인 당, 및 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알코올이다. 상술한 것 이외의 향미제로서 천연 향미제(타우마틴, 스테비아 추출물(예를 들어 레바우디오시드 A, 글리시르히진 등) 및 합성 향미제(사카린, 아스파르트 등)를 유리하게 사용할 수 있다. 상기 천연 탄수화물의 비율은 본 발명의 건강기능식품 및 건강식품 조성물 100당 일반적으로 약 1 내지 20 g, 바람직하게는 약 5 내지 12 g이다.

[0038] 상기 외에 본 발명의 유청 단백질 가수분해물, 또는 이의 분획물 또는 유청 단백질 가수분해물 유래 펩타이드를 포함하는 건강기능식품은 여러 가지 영양제, 비타민, 광물(전해질), 합성 풍미제 및 천연 풍미제 등의 풍미제, 착색제 및 중진제(치즈, 초콜릿 등), 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 본 발명의 건강기능식품은 천연 과일주스 및 과일주스 음료 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있으며 이러한 성분은 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있다

발명의 효과

[0039] 본 발명은 유청 단백질 가수분해물 또는 이의 분획물 또는 유청 단백질 가수분해물 유래 펩타이드를 포함하는 향산화, 항염 또는 노화억제용 조성물에 관한 것으로, 구체적으로는 유청 단백질 가수분해물 유래 VLVDLDYKK 또는 VGINYWLAKH 서열을 갖는 펩타이드 또는 이를 포함하는 분획물은 미토콘드리아 기능을 증가시키고, 활성산소종을 감소시키며 염증성 사이토카인을 억제하고 항노화 활성을 나타내어 노화억제를 위한 조성물로 사용할 수 있을 것으로 기대된다.

도면의 간단한 설명

[0040] 도 1은 (A) 유청 단백질의 가수분해 과정 및 (B) 유청 단백질(WP) 가수분해물의 HPLC 크로마토그램을 나타낸 것이다.

도 2는 유청 단백질 가수분해물 분획물이 미토콘드리아 활성에 미치는 영향을 나타낸 그래프이다. (A) A549, (B) HepG2 및 (C) RAW 264.7 세포 (* $p < 0.05$)

도 3은 유청 단백질 가수분해물 분획물의 ABTS⁺ 라디칼 소거 활성을 나타낸 그래프이다. (Res. : Resveratrol)

도 4는 유청 단백질 가수분해물 분획물의 LPS 유도된 RAW 264.7 세포에서 (A) IL-1 β , (B) IL-6, (C) iNOS 및 (D) TNF- α 의 mRNA 발현 수준에 미치는 영향을 나타낸 그래프이다. (* $p < 0.05$)

도 5는 유청 단백질 가수분해물 분획물의 SA- β -갈락토시다아제 활성(SA- β -gal)에 미치는 효과를 나타낸 그래프이다. (A) 유청 단백질 가수분해물 분획물로 처리 또는 무처리된 HDF 세포를 H₂O₂ 처리 후 염색한 광학 현미경

사진. (B) SA-β-gal 양성 세포의 백분율. (* $p < 0.05$)

도 6은 그림 6 유청 단백질 가수분해물 유래 펩타이드(P1 및 P2)의 생리활성을 나타낸 그래프이다. (A) HepG2 및 (B) RAW 264.7 세포에서 표시된 농도의 P1 및 P2가 미토콘드리아 활성화에 미치는 영향 (*** $p < 0.001$), (C) P1 및 P2가 ABTS⁺ 라디칼 소거 활성에 미치는 영향 (Res. : Resveratrol), (D-E) LPS 유도 RAW 264.7 세포에서 P1 및 P2가 (D) IL-1β, (E) IL6의 mRNA 발현 수준에 미치는 영향 (* $p < 0.05$, *** $p < 0.001$), (F) P1 및 P2로 처리 또는 무처리된 HDF 세포를 H₂O₂ 처리 후 염색한 광학 현미경 사진, (G) SA-β-gal 양성 세포의 백분율. (* $p < 0.05$)

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0041] 이하 본 발명의 바람직한 실시예를 상세히 설명하기로 한다. 그러나 본 발명은 여기서 설명되는 실시예에 한정되지 않고 다른 형태로 구체화될 수도 있다. 오히려, 여기서 소개되는 내용이 철저하고 완전해지고, 당업자에게 본 발명의 사상을 충분히 전달하기 위해 제공하는 것이다.

[0042] <실시예 1. 유청 단백질 가수분해물 및 분획물 제조>

[0043] 유청 단백질 가수분해물 및 이로부터 분리한 펩타이드의 제조방법을 도 1A에 나타내었다. 먼저, 유청 단백질 가수분해를 위해 판크레아틴(Bision Co. Ltd., 경기도, 한국)을 유청 단백질에 1:100의 비율로 첨가하였다. 판크레아틴은 탄수화물, 지질 및 단백질 소화 효소의 혼합물이며, 구체적으로 트립신, 키모트립신, 엘라스타제, 카르복시펩티다제 A 및 B를 비롯한 다양한 프로테아제를 함유하고 있다(Rothenbuhler & Kinsella, 1986). 이러한 판크레아틴 효소의 복잡한 작용으로 인해 다양한 유형의 분해 산물이 생성된다. 상기 유청 단백질과 판크레아틴 혼합물을 진탕 인큐베이터(130rpm)에서 50℃로 5시간 동안 반응시킨 다음, 상기 반응시킨 가수분해물을 40℃에서 20분 동안 12,000g로 원심분리하였다. 그 다음, 상기 가수분해물을 용매 A(0.1% 탈이온수 중 트리플루오로아세트산(TFA))로 평형시킨 C18 column (4.6 × 250 mm, Vydac, Hesperia, CA., USA)을 구비한 역상 HPLC 시스템(Waters Associates, Milford, MA, USA)을 이용하여 40분 동안 용매 B(아세트오니트릴 중 0.1% TFA)의 선형 구배로 용리하였다. 상기 HPLC는 25℃에서 1 ml/min의 유속으로 수행하였으며, 컬럼 용출액의 흡광도를 214 nm에서 측정하고 그 결과를 도 1B에 나타내었다. 도 1B에서 보는 바와 같이, 다중 분취 HPLC를 통해 펩타이드의 극성에 따라 여러 피크가 관찰되었다. 이에 따라 반복된 실험을 통하여 6개의 재현 가능한 피크를 선택하고, 각각의 검출된 아세트오니트릴 농도에서 분획을 얻었다(F1, 1%; F2, 3%; F3, 15%; F4, 20%; F5, 25%; 및 F6, 31%). 이 중 F1 분획물은 극성이 높은 펩타이드를, F6 분획물은 낮은 극성의 펩타이드를 포함한다.

[0044] <실시예 2. 유청 단백질 가수분해물 분획물의 미토콘드리아 활성 유도 확인>

[0045] 상기 실시예 1에서 얻은 유청 단백질 가수분해물의 분획물 F1-F6의 미토콘드리아 활성화에 미치는 효과를 확인하였다. 미토콘드리아 활성화는 MTS 분석을 통해 확인하였다. 인간 폐 선암종 세포주 A549, 인간 간세포 암종 세포주 HepG2 및 쥐 대식세포 세포주 RAW 264.7 세포(Cell Applications, San Diego, CA, USA)를 96웰 플레이트에 웰당 3,000개 세포로 시딩하고 24시간 동안 인큐베이션한 다음, 각 세포를 0.05, 0.25 및 1.25 mg/mL 농도의 가수분해된 유청 단백질 분획물 F1-F6 및 가수분해되지 않은 유청 단백질(WP)로 처리한 후 36시간 동안 배양하였다. 이 후, 세포 타이터 96R Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay(Promega, Madison, WA, USA)를 사용하여 분석하고 마이크로플레이트 판독기(Molecular Devices)를 사용하여 490 nm에서 흡광도를 측정하였다. 상기 측정된 흡광도는 하기 [식]을 통하여 미토콘드리아 활성을 계산하여 도 2에 나타내었다.

[0046] [식] 미토콘드리아 활성 (%) = $[1 - (A_{\text{sample}}/A_{\text{blank of sample}})/A_{\text{blank}}] \times 100$

[0047] 도 2에서 보는 바와 같이, 가수분해되지 않은 전체 유청 단백질(WP) 및 F1, F2, F3를 처리한 경우, HepG2, RAW 264.7 및 A549 각 세포주에서 미토콘드리아 활성의 변화는 관찰되지 않았다. 그러나 F6를 처리한 경우, 처리된 모든 세포주에서 미토콘드리아 활성이 증가되었다. F5를 처리한 경우 1.25 mg/mL 농도에서 HepG2 및 RAW 264.7 세포주에서만 미토콘드리아 활성을 향상시켰다으며, F4를 처리한 경우, 1.25 mg/mL 농도에서 HepG2 세포주에서만 미토콘드리아 활성을 향상시켰다. 이러한 결과는 미토콘드리아 활성 강화 펩티드가 WP의 가수분해를 통해 생성될 수 있음을 시사한다. 또한, 이러한 미토콘드리아 활성 강화 펩티드는 일정 농도 이상에서 미토콘드리아 활성을 유도하는 것을 알 수 있어, 효과적인 활성을 위하여는 유청 단백질 가수분해물에서 분획물 또는 단일 물질로 농축할 필요가 있음을 확인하였다.

[0048] <실시예 3. 유청 단백질 가수분해물 분획물의 항산화 활성 확인>

- [0049] ROS는 산소 원자와 짝을 이루지 않은 전자를 포함하는 불안정한 고에너지 및 반응성 분자로, 그 수준이 세포의 특정 역할을 초과하면 DNA, RNA, 단백질, 지질과 같은 생체 분자를 공격하여 세포 항상성을 억제하고 ROS 유도된 세포 기능 감소는 노화를 포함한 다양한 질병을 유발한다. 따라서 상기 실시예 1에서 수득한 가수분해된 유청 단백질 분획물의 자유 라디칼 소거 활성에 대한 항산화 활성을 조사하였다.
- [0050] 가수분해된 유청 단백질 분획물의 항산화 활성은 2,2'-azino-bis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid(ABTS) 분석을 사용하여 측정하였다. 구체적으로, ABTS⁺ 라디칼 용액은 7mM ABTS 용액과 2.4mM 과황산칼륨 용액을 25℃에서 24시간 동안 반응시켜 제조하였다. 가수분해되지 않은 전체 유청 단백질(WP) 및 상기 가수분해된 유청 단백질 분획물 F1-F6 각 2.5 및 5.0 mg/ml을 제조된 ABTS⁺ 라디칼 용액과 4분간 반응시킨 후, 마이크로 플레이트 리더(Molecular Devices, San Jose, CA, USA)를 이용하여 650 nm에서 흡광도를 측정하고, 상기 [식]을 통하여 항산화 활성을 계산하여 도 3에 나타내었다. 이때 항산화 활성을 나타내는 것으로 알려진 레스베라트롤을 양성 대조군으로 사용하였다.
- [0051] 도 3에서 보는 바와 같이, 2.5 및 5.0 mg/mL 농도에서 가수분해된 유청 단백질 분획물의 항산화 활성이 각각 25 및 50 μ M 농도에서 레스베라트롤의 항산화 활성과 유사함을 관찰하였다. 또한, 5.0 mg/mL의 농도에서 F1, F2 및 F3은 우수한 라디칼 소거 활성을 나타내었다(각각 95.7 ± 1.60 , 93 ± 0.98 및 $76.9 \pm 4.36\%$). F4 및 F5의 경우, 다른 분획에 비해 낮은 항산화 활성을 나타내었으며, F6 분획은 F4 및 F5보다 F3보다는 낮은 라디칼 소거 활성을 나타내었다.
- [0052] <실시예 4. 유청 단백질 가수분해물 분획물의 항염 활성 확인>
- [0053] 세포의 염증에서 ROS의 역할을 고려할 때 가수분해된 유청 단백질 분획물의 항산화 활성 증가는 염증 반응을 억제할 수 있다. 이에 따라 가수분해된 유청 단백질 분획물이 LPS로 자극된 RAW 264.7 세포에서 대표적인 염증성 사이토카인인 IL-1 β , IL-6, TNF- α 및 산화질소 생성 효소인 iNOS의 mRNA 발현에 미치는 영향을 조사하였다.
- [0054] RAW 264.7 세포를 6웰 플레이트에 웰당 1×10^5 개 세포가 되도록 시딩하고 24시간 동안 인큐베이션했다. 그 후, 세포를 가수분해되지 않은 전체 유청 단백질(WP) 및 가수분해된 유청 단백질 분획물 F1-F6로 처리하고 30시간 동안 배양한 후 6시간 동안 1 μ g/mL 농도에서 지질다당류(LPS) 처리하였다. 이 후, GeneA11 Hybrid-R RNA Purification Kit(GeneA11, Seoul, Korea)를 사용하여 RAW 264.7 세포에서 총 RNA를 분리한 후, 랜덤 헥사머와 M-MLV 역전사효소(Promega)를 이용하여 cDNA를 합성하고, AriaMx 실시간 PCR 시스템(Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA)을 이용하여 qRT-PCR을 수행하고 그 결과를 도 4에 나타내었다.
- [0055] 도 4에서 보는 바와 같이, 가수분해되지 않은 전체 유청 단백질(WP)을 처리하는 경우, LPS에 의하여 유도된 염증성 사이토카인의 mRNA 발현 수준을 오히려 상향 조절한다는 것을 관찰했다. 그러나 가수 분해를 통해 얻은 모든 유청 단백질 분획물은 염증성 사이토 카인의 발현을 효과적으로 하향 조절했다. 특히, HepG2, RAW 264.7 및 A549의 상이한 세포주 모두에서 미토콘드리아 활성 유도 효과가 가장 높았던 F6 분획물은 모든 염증성 사이토카인의 발현을 효과적으로 억제하였다. 이러한 결과는 가수분해를 통해 WP로부터 항염증성 펩타이드를 함유하는 분획물을 얻을 수 있음을 시사한다.
- [0056] <실시예 5. 유청 단백질 가수분해물 분획물의 세포 노화 억제 활성 확인>
- [0057] 가수분해를 통해 얻은 유청 단백질 분획물의 세포 노화에 영향을 미치는지 여부를 조사하였다. 이를 위하여 노화 및 노화 세포를 감지하고 세포 노화 수준의 확인하기 위해 잘 알려진 노화 마커인 노화 관련 베타-갈락토시다아제(Senescence-associated beta-galactosidase SA- β -gal, SA- β -gal)를 사용하였다.
- [0058] 인간 피부 섬유아세포(HDF)를 6웰 플레이트에 웰당 2×10^5 개의 세포로 시딩하고 24시간 동안 인큐베이션했다. 그 후, HDF 세포에 가수분해되지 않은 전체 유청 단백질(WP) 및 가수분해된 유청 단백질 분획물 F1-F6를 1.25 mg/mL로 전처리하고 24시간 동안 인큐베이션하였다. 이 후 600 μ M H₂O₂를 2시간 동안 처리하여 노화를 유도한 후, 4일 동안 세포를 회복시켰다. 이 후, PBS로 2회 세척한 다음, 1×고정액으로 세포를 고정하고 노화- β -갈락토시다제 염색 키트(Cell Signaling Technology)를 이용하여 SA- β -gal 염색을 수행하였다. 염색된 HDF 세포를 광학현미경(Nikon, Tokyo, Japan)을 사용하여 촬영하고, 전체 HDF 세포수에 대해 X-gal 염색된 세포의 수를 백분율로 표시하여 도 5에 나타내었다.
- [0059] 도 5에서 보는 바와 같이, HDF 세포에 H₂O₂ 처리하는 경우, β -gal-양성 세포의 수를 증가시켜 HDF의 노화를 급

격히 유도하였다. HDF 세포에 유청 단백질 및 F1-F5으로 처리하는 경우 β -gal-양성 세포의 비율은 약 25%에서 12.5%로 감소되었으며, F6를 처리하는 경우, β -gal-양성 세포의 비율은 감소는 5%로, H_2O_2 를 처리하지 않은 HDF 세포 대조군보다도 낮은 β -gal-양성 세포 비율을 나타내었다. 즉, 유청 단백질이 세포 노화를 억제하며, 특히 가수분해된 유청 단백질 F6 분획물은 매우 뛰어난 노화 억제 효과를 나타내는 것을 확인하였다.

[0060] <실시예 6. 유청 단백질 가수분해물 분획물 유래 활성 펩타이드의 분리>

[0061] 상기 실시예에서 가수분해된 유청 단백질 F6 분획물은 높은 미토콘드리아 활성 유도 효과, 항산화 활성, 항염 활성 및 뛰어난 노화 억제 활성을 나타내었다. 이에 따라 상기 가수분해된 유청 단백질 F6 분획물로부터 구체 활성 물질을 분리하였다.

[0062] 가수분해된 유청 단백질 중에서 유의한 항산화 및 항노화 활성을 나타내는 F6의 펩타이드를 확인하기 위해 LC-MS 분석을 수행하였다. HPLC 결과를 통해 F6이 두 개의 주요 피크를 포함하는 것을 확인했다. 각 피크의 면적을 백분율로 계산한 결과 극성이 높은 피크는 40.62%, 두 번째 피크는 28.94%를 차지하였다. 이어 F6 분획물을 EASY-nLC 1000 시스템(Thermo Fisher Scientific Inc., MA, USA)에서 액체 크로마토그래피-질량 분석기(LC MS)를 사용하여 분석한 결과, 18종의 펩타이드를 확인하였다. 이때 수득한 펩타이드 서열의 단백질 서열 데이터(NCBI)에서 존재여부는 MASCOT(Matrix Science, London, UK; version 2.2.04)를 사용하여 확인하였다. MASCOT 점수 값을 사용하여 유의미한 펩타이드를 고려, 분석하고, 가수분해된 유청 단백질의 F6에서 확인된 펩타이드는 하기 표 1과 같았다. 표 1과 같이, β -lactoglobulin에서 유래한 서열번호 1 VLVLDTYKK(P1)가 17.57%, α -lactalbumin에서 유래한 서열번호 2 VGINYWLAHK(P2)가 16.22%의 중량을 차지하였으며, 기타 펩타이드는 미량이 포함되어 상기 두 펩타이드가 F6 분획물의 주요 펩타이드임을 확인하였다. 상기 두 펩타이드의 합은 F6 분획물 중량의 30~40 %를 차지하였다. 이에 따라 상기 2종의 펩타이드를 Pepton, Inc.(대전, 한국)에 의뢰하여 표 1의 서열대로 합성하여 이후 실험에 사용하였다.

표 1

No.	Protein name	Sequence	Molecular weight (Da)	% (w/w) in F6
1	β -Lactoglobulin	VLVLDTYKK	1193	17.57
2	α -Lactalbumin	VGINYWLAHK	1200	16.22

[0064] <실시예 7. 유청 단백질 가수분해물 분획물 유래 활성 펩타이드의 활성 확인>

[0065] 유청 단백질 가수분해물 유래 F6 분획물의 미토콘드리아 활성 유도 효과, 항산화 활성, 항염 활성 및 노화 억제 다양한 생리 활성이 서열번호 1 P1(VLVLDTYKK) 및 서열번호 2 P2(VGINYWLAHK)에 기인하는지 상기 실시예 2 내지 5와 동일한 방법으로 수행한 후, 그 결과를 도 6에 나타내었다. 도 6에서 보는 바와 같이, F6에 의해 미토콘드리아 활성이 매우 크게 증가한 HepG2와 RAW 264.7 세포에서, P2가 가장 높은 활성을 보인 반면, P1은 HepG2 세포에서만 미토콘드리아 활성을 증가시켰다. 또한 P1과 P2의 라디칼 소거 활성은 F6의 농도 의존적 증가와 유사하였다.

[0066] 한편, F6의 항염 활성에 대한 P1 및 P2의 기여를 확인하기 위해 IL-1 β 및 IL-6에 대한 P1 및 P2의 억제 활성을 조사한 결과, P1은 LPS에 의해 유도된 염증성 사이토카인 IL-1 β 및 IL-6의 발현을 억제하지 않은 반면, P2는 IL-1 β 및 IL-6의 발현에 유의한 억제 활성을 보였다. 또한, P1과 P2 모두에서 현저한 세포노화 억제 활성을 확인하였다(도 6F, 6G). 이러한 결과는 가수분해된 유청 단백질의 F6 분획물의 항세포 노화를 포함한 다양한 생리적 활성이 P1 및 P2에서 주요하게 유래함을 시사한다.

[0067] 유청 단백질 가수분해물의 생리학적 활성은 아미노산 공급, 인슐린 분비 촉진, 혈당 수치 개선, 근육 성장 향상 등이 알려져왔다. 그러나, 상기 유청 단백질의 가수분해물의 생리적 활성을 충분히 이용하고 그의 긍정적인 효과를 최대화하기 위해서는 본 연구에서 확인된 바와 같이 분획을 통한 생리 활성 성분의 농축이 필수적이다.

[0068] 이를 위하여 구체적으로, 생리 활성의 효능을 최대화하기 위해 효소 판크레아틴의 작용을 통해 유청 단백질을 가수분해하고 구성 펩타이드를 기준으로 하여 유청 단백질분획물을 얻었으며, 이 중 낮은 펩타이드 극성을 갖는 분획, 특히 가장 낮은 극성을 갖는 F6 분획물이 조사된 모든 세포주에서 미토콘드리아 활성을 유의하게 향상시킴을 확인하였다. 특히 상기 극성이 가장 낮은 분획인 F6은 유청 단백질보다 5배 더 효과적으로 세포 노화를 억제하였다. 이러한 결과는 가수분해가 유청 단백질을 구성하는 단백질을 분해하는 과정에서 낮은 극성의 펩타이

드를 생성하며, 극성이 낮은 펩타이드 분자가 세포의 미토콘드리아 활성을 촉진하고 세포 노화를 현저히 저하시킬 수 있음을 확인한 것이다. 이때 가수분해 과정에서 생성되어 미토콘드리아 활성 증가 및 세포 노화 억제 활성의 높은 생리활성을 갖는 서열번호 1 및 서열번호 2의 펩타이드를 확인하였다. 이는 상기 가장 낮은 극성을 갖는 F6 분획물에 포함된 주요 펩타이드 P1(VLVLDTDYKK) 및 P2(VGINYWLAHK)가 F6 분획물에 30%(w/w) 이상 포함됨으로써 전체적으로 미토콘드리아 활성 증가, 항산화, 항염 및 노화 억제에 높은 생리활성을 나타내는 것으로 판단할 수 있으며, 이들 펩타이드를 합성, 농축하여 사용할 수 있음을 확인하였다.

<제제예 1. 약학적 제제>

제제예 1-1. 정제의 제조

본 발명의 유청 단백질 가수분해물의 저극성 펩타이드 분획물 또는 이로부터 분리한 펩타이드 P1(VLVLDTDYKK) 또는 P2(VGINYWLAHK) 200mg을 락토즈 175.9g, 감자전분 180g 및 콜로이드성 규산 32g과 혼합하였다. 이 혼합물에 10% 젤라틴 용액을 첨가시킨 후, 분쇄하여 14 메쉬체를 통과시켰다. 이것을 건조시키고 여기에 감자전분 160g, 활성 50g 및 스테아린산 마그네슘 5g을 첨가해서 얻은 혼합물을 정제로 만들었다.

제제예 1-2. 주사액제의 제조

본 발명의 유청 단백질 가수분해물의 저극성 펩타이드 분획물 또는 이로부터 분리한 펩타이드 P1(VLVLDTDYKK) 또는 P2(VGINYWLAHK) 100mg, 염화나트륨 0.6g 및 아스코르브산 0.1g을 증류수에 용해시켜서 100mL를 만들었다. 이 용액을 병에 넣고 20℃에서 30분간 가열하여 멸균시켰다.

<제제예제제예 2. 건강기능식품의 제조>

제제예 2-1. 건강기능식품의 제조

본 발명의 유청 단백질 가수분해물의 저극성 펩타이드 분획물 또는 이로부터 분리한 펩타이드 P1(VLVLDTDYKK) 또는 P2(VGINYWLAHK) 2g, 비타민 혼합물 적량, 비타민 A 아세테이트 70μg, 비타민 E 1.0mg, 비타민 B1 0.13mg, 비타민 B2 0.15mg, 비타민 B6 0.5mg, 비타민 B12 0.2μg, 비타민 C 10mg, 비오틴 10μg, 니코틴산아미드 1.7mg, 엽산 50μg, 판토텐산 칼슘 0.5mg, 무기질 혼합물 적량, 황산제1철 1.75mg, 산화아연 0.82mg, 탄산 마그네슘 25.3mg, 제1인산칼륨 15mg, 제2인산칼슘 55mg, 구연산칼륨 90mg, 탄산칼슘 100mg, 염화마그네슘 24.8mg을 섞어 과립으로 제조하였으나, 용도에 따라 다양한 제형으로 변형시켜 제조할 수 있다. 또한, 상기의 비타민 및 미네랄 혼합물의 조성비를 임의로 변형 실시하여도 무방하며, 통상의 건강기능식품 제조방법에 따라 상기의 성분을 혼합하여 제조할 수 있다.

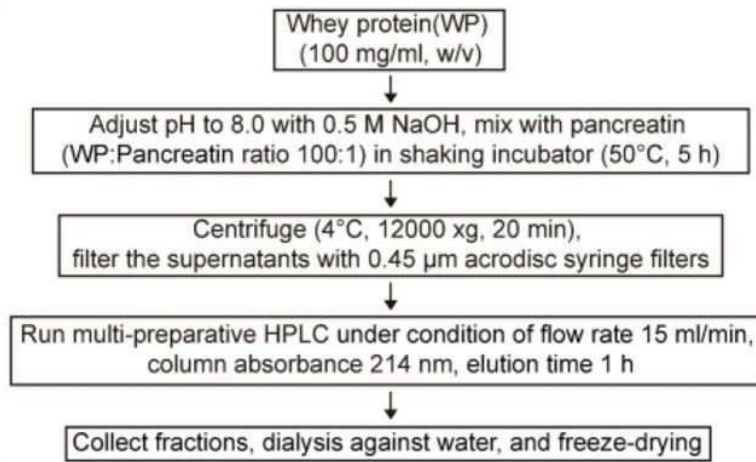
제제예 2-2. 건강기능성 음료의 제조

본 발명의 유청 단백질 가수분해물의 저극성 펩타이드 분획물 또는 이로부터 분리한 펩타이드 P1(VLVLDTDYKK) 또는 P2(VGINYWLAHK) 1g, 구연산 0.1g, 프락토올리고당 100g, 정제수 900g을 섞어 통상의 음료 제조방법에 따라 교반, 가열, 여과, 살균, 냉장하여 음료를 제조하였다.

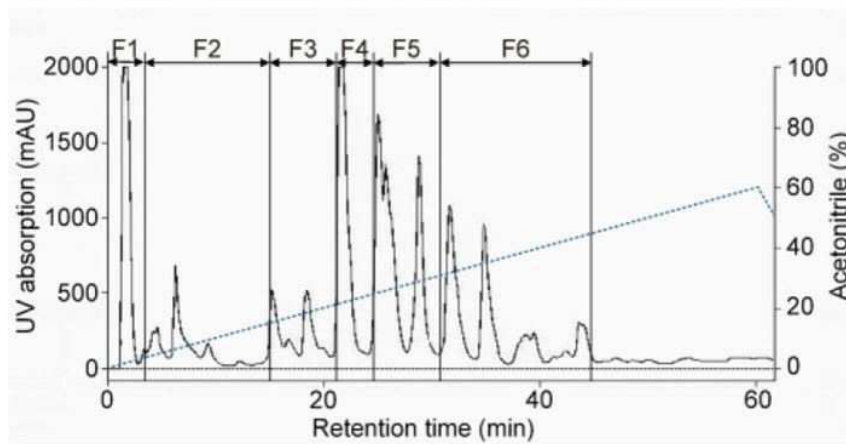
도면

도면1

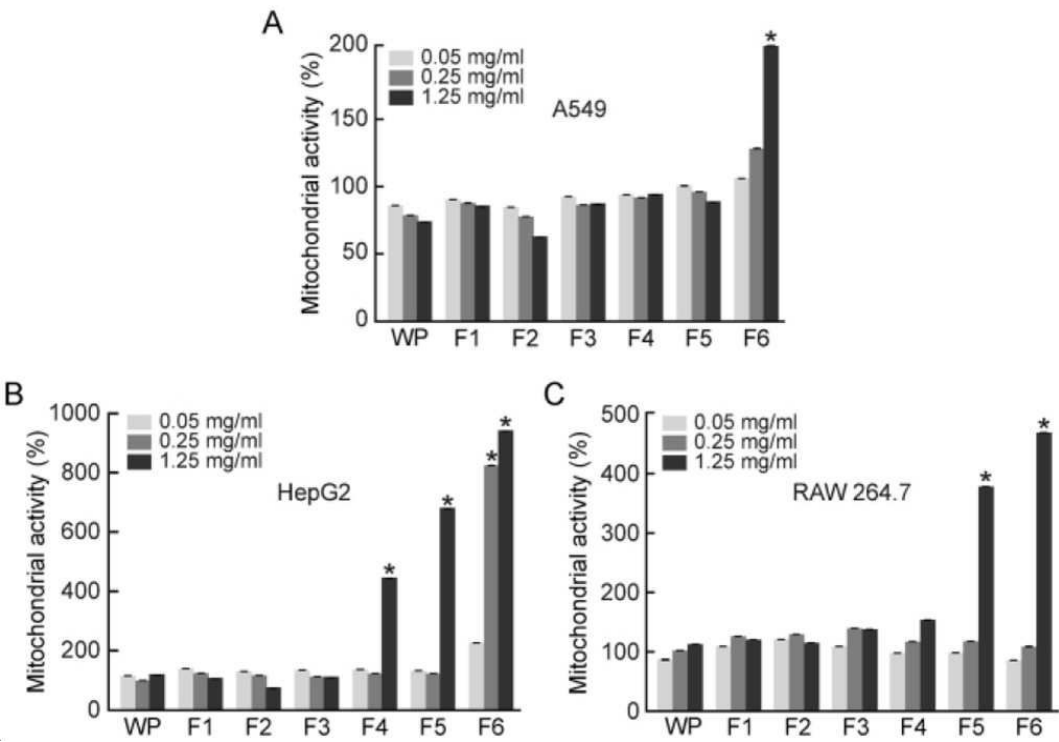
A



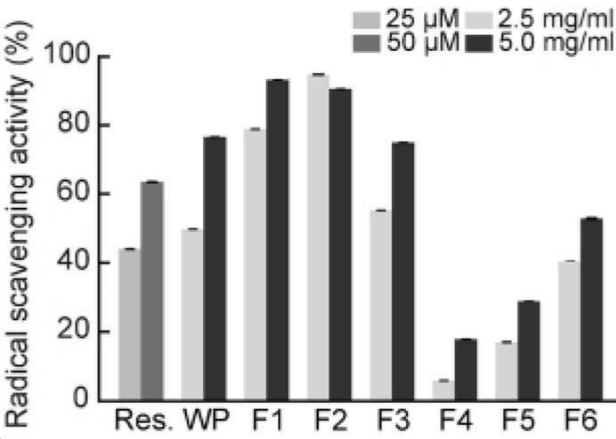
B



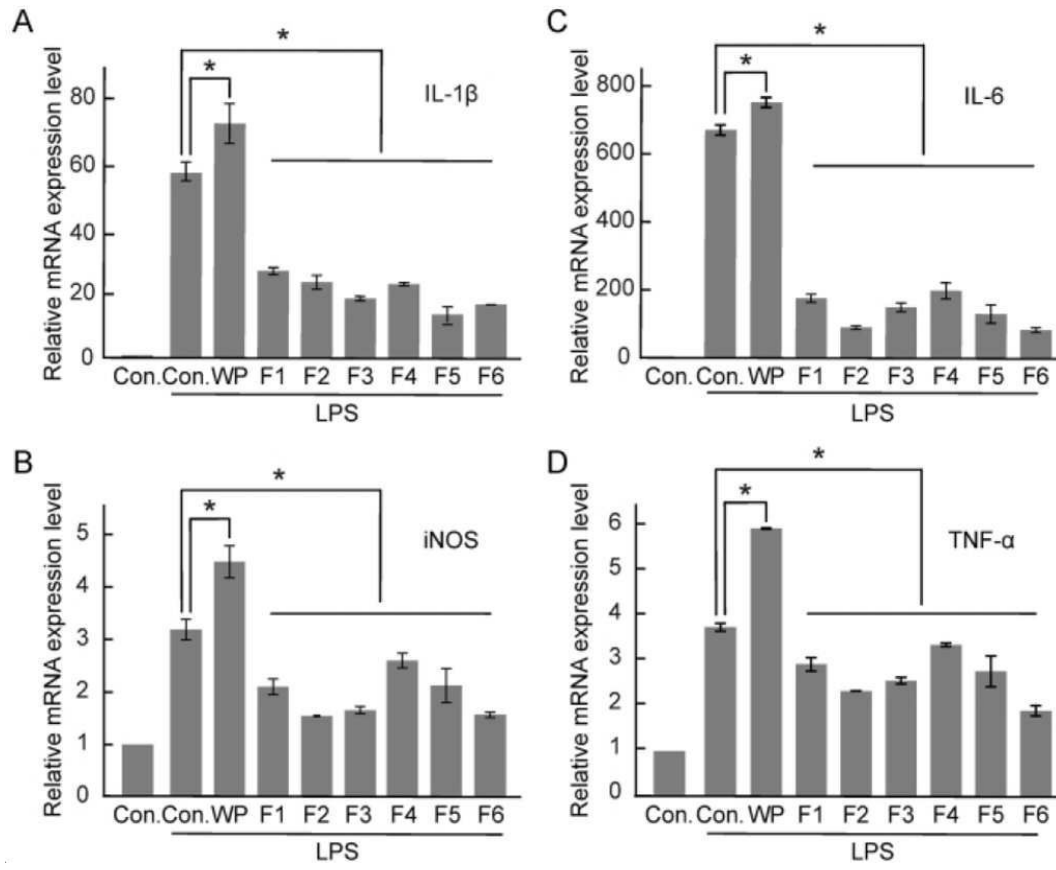
도면2



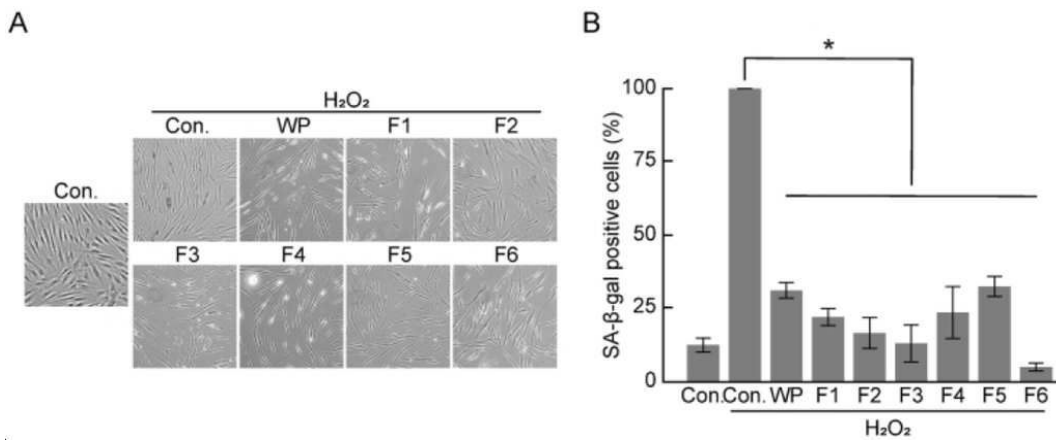
도면3



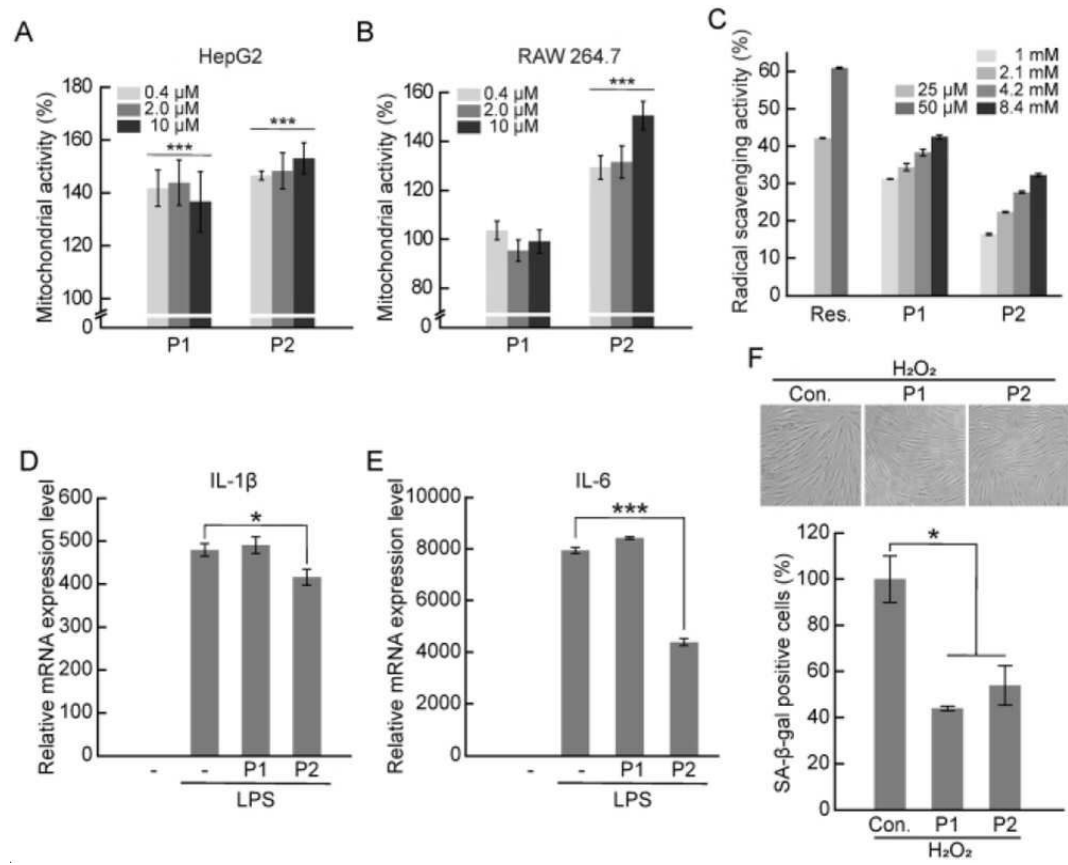
도면4



도면5



도면6



서 열 목 록 (첨부)



아이콘을 클릭하시면 서열목록 파일이 열립니다.

본 공보 PDF는 첨부파일을 가지고 있습니다. Acrobat Reader PDF뷰어를 제공하지 않는 브라우저(크롬, 파이어폭스, 사파리 등)의 경우 첨부파일 열기가 제한되어 있으므로 Acrobat Reader PDF뷰어 설치 후 공보 PDF를 다운로드 받아 해당 뷰어에서 조회해주시기 바랍니다.