(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2015-0055670
(43) 공개일자 2015년05월22일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 38/01 (2006.01) *A61K 38/08* (2006.01)
A61P 29/00 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2013-0137711
(22) 출원일자 2013년11월13일
심사청구일자 2013년11월13일

(71) 출원인
충남대학교산학협력단
대전광역시 유성구 대학로 99 (궁동, 충남대학교)
(72) 발명자
남명수
대전광역시 유성구 지족동 열매마을4단지아파트 102동 402호
유재민
충북 제천시 장락로 62, 101동 11-2호 (장락동, 장락e-편한세상)
(74) 대리인
백경업

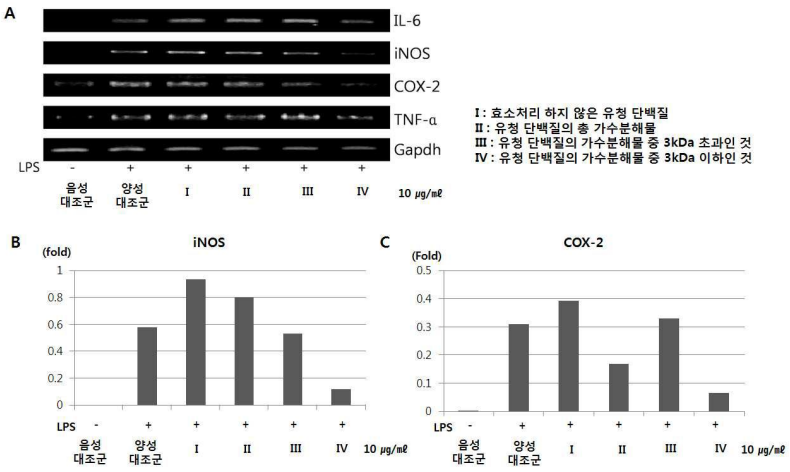
전체 청구항 수 : 총 10 항

(54) 발명의 명칭 **알칼리 단백분해효소를 이용한 유청 단백질의 가수분해물을 함유하는 염증 질환의 예방 또는 치료용 조성물**

(57) 요 약

본 발명은 세라티아 마르세센스 S3-R1(*Serratia marcescens* S3-R1) 유래 알칼리 단백분해효소를 이용한 유청 단백질의 가수분해물을 함유하는 염증 질환의 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것으로서, 상기 유청 단백질의 가수분해물 중 분자량 3kDa 이하인 것을 선택적으로 추출한 가수분해물이 특히 염증 억제 효과가 우수하여, 알레르기성 질환, 염증성 장질환, 전신성 홍반성 낭창, 염증성 콜라겐 혈관 질환, 사구체신염, 염증성 피부 질환, 유육종증, 망막염, 위염, 간염, 장염, 관절염, 편도선염, 인후염, 기관지염, 폐렴, 췌장염, 패혈증, 신장염 등과 같은 각종 질환의 치료제로 유용하게 이용될 수 있다.

대 표 도 - 도9



이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 PJ907176032013
부처명 농림부
연구관리전문기관 충남대학교 산학협력단
연구사업명 FTA 대응 경쟁력 향상 기술개발
연구과제명 유청단백질의 분리기술 및 면역활성 기능연구
기 여 율 1/1
주관기관 국립축산과학원
연구기간 2013.01.01 ~ 2013.12.31

명 세 서

청구범위

청구항 1

세라티아 마르세센스 S3-R1(*Serratia marcescens* S3-R1) 유래의 알칼리 단백분해효소(alkaline protease)를 이용한 유청 단백질의 가수분해물을 함유하는 것을 특징으로 하는 염증 질환의 예방 또는 치료용 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 세라티아 마르세센스 S3-R1 유래의 알칼리 단백분해효소는, 50.3kDa(kiloDalton)의 분자량, Ala-Val-Thr-Ile-Glu-Asp-Ala-Val-Asp-Asp의 N-말단 아미노산을 가지며, pH 7.0~9.0 및 30~40℃에서 효소활성을 갖는 것을 특징으로 하는 염증 질환의 예방 또는 치료용 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 유청 단백질은 치즈 제조 후 남은 부산물인 총 유청(whole whey)을 투석을 이용하여 단백질만을 농축한 총 유청 단백질인 것을 특징으로 하는 염증 질환의 예방 또는 치료용 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 유청 단백질의 가수분해물은 분자량 3kDa 이하인 것만 선택적으로 추출한 가수분해물인 것을 특징으로 하는 염증 질환의 예방 또는 치료용 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 염증 질환은 알레르기성 질환, 염증성 장질환, 전신성 홍반성 낭창, 염증성 콜라겐 혈관 질환, 사구체신염, 염증성 피부 질환, 유육종증, 망막염, 위염, 간염, 장염, 관절염, 편도선염, 인후염, 기관지염, 폐렴, 췌장염, 패혈증 및 신장염으로 이루어진 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 염증 질환의 예방 또는 치료용 조성물.

청구항 6

세라티아 마르세센스 S3-R1(*Serratia marcescens* S3-R1) 유래의 알칼리 단백분해효소(alkaline protease)를 이용한 유청 단백질의 가수분해물을 함유하는 것을 특징으로 하는 염증 질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품.

청구항 7

제6항에 있어서,

상기 세라티아 마르세센스 S3-R1 유래의 알칼리 단백분해효소는, 50.3kDa(kiloDalton)의 분자량, Ala-Val-Thr-Ile-Glu-Asp-Ala-Val-Asp-Asp의 N-말단 아미노산을 가지며, pH 7.0~9.0 및 30~40℃에서 효소활성을 갖는 것을 특징으로 하는 염증 질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품.

청구항 8

제6항에 있어서,

상기 유청 단백질은 치즈 제조 후 남은 부산물인 총 유청(whole whey)을 투석을 이용하여 단백질만을 농축한 총 유청 단백질인 것을 특징으로 하는 염증 질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품.

청구항 9

제6항에 있어서,

상기 유청 단백질의 가수분해물은 분자량 3kDa 이하인 것만 선택적으로 추출한 가수분해물인 것을 특징으로 하는 염증 질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품.

청구항 10

제6항에 있어서,

상기 염증 질환은 알레르기성 질환, 염증성 장질환, 전신성 홍반성 낭창, 염증성 콜라겐 혈관 질환, 사구체신염, 염증성 피부 질환, 유육종증, 망막염, 위염, 간염, 장염, 관절염, 편도선염, 인후염, 기관지염, 폐렴, 췌장염, 패혈증 및 신장염으로 이루어진 군에서 선택되는 것을 특징으로 하는 염증 질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 알칼리 단백분해효소를 이용한 유청 단백질의 가수분해물을 함유하는 염증 질환의 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 우유는 건강에 유익한 효과를 나타내는 기능성 식품이며(Gill *et al.*, 2000), 기능성 식품과 건강음료의 첨가제로서의 가치가 있는 것으로 알려져 있다(Huth *et al.*, 2004). 또한 우유에 함유된 유청 단백질은 대사활동에서 폭 넓게 생리활성 기능을 가지고 있는 것으로 알려져 있다. 유청은 치즈제조공정에서 얻어지는 부산물로 버려지는 산물로 여겨졌지만, 근래에 영양학적으로 응용가치를 높일 수 있는 기능성 식품으로서 재발견되면서 이에 대한 연구가 급증하고 있다(Walzem *et al.*, 2002).

[0003] 유청(whey)은 우유를 치즈로 가공할 때 형성되는 부산물이다. 우유에는 수분, 단백질, 지방, 탄수화물, 무기질, 비타민, 효소 등이 포함되어 있다. 지방은 가장 중요한 성분이며 이것을 제외한 것을 탈지유라고 한다. 탈지유에 산 또는 응유효소를 첨가하면 응고물이 생기는데 이것을 응유(curd)라 하며 우유의 주단백질인 카세인이 주성분이다. 응유를 제외한 수용액을 유청이라 하고 전 단백질의 20%를 포함한다. 유청에는 유당, 무기질, 각종 유청 단백질 등이 포함되어 있다. 유청에 포함된 유청 단백질은 β-락토글로불린(β-lactoglobulin), α-락타알부민(α-lactalbumin), BSA(bovine serum albumin), 락토페린(lactoferrin), 면역글로불린(immunoglobulin), 효소(enzyme), GMP(glycomacropeptide) 등이 있으며, 면역글로불린은 특히 초유에 다량 함유되어 있다. 유청은 다양한 필수아미노산을 함유하고 있으며, 면역 증진 효과가 있다고도 보고된 바 있다(Marshall, 2004).

[0004] 우유 단백질의 가수분해물에 대한 생리활성 기능연구는 많이 진행되어 왔는데 지금까지 가장 잘 알려진 것은 면역조절 펩티드로서 β-카세인(β-casein, f1-28) 유래 CPP(casein phosphopeptide)이다. CPP는 마우스 비장과 토끼 Peyer's patch 세포에서 세포분열물질 촉진제(mitogen)로서의 활성을 나타내고 IgA 생산을 활성화한다고 보고된 바 있다(Hata *et al.*, 1998). 또한 β-카세인 유래의 β-카소케모타이드-1(β-casochemotide-1)이라는 펩티드가 단핵구(monocyte)와 대식세포(macrophage)에서의 주화성을 높인다고 보고되기도 하였다(Kitazawa *et al.*, 2007).

[0005] 염증(inflammation)은 어떤 자극에 대한 생체조직의 방어반응의 하나로, 조직 변질, 순환장애와 삼출(滲出), 조직 증식의 세 가지를 병발하는 복잡한 병변(病變)을 일컫는다. 원인은 기계적 상해작용, 온도, 방사선 등의 물리적 인자, 독물 등의 화학적 인자, 세균감염 등의 기생체에 의한 것 등이며 이 중 세균에 의한 것이 가장 많다. 이러한 주요 원인 외에도, 여러 부수적 요인과 개체의 소인(素因)이나 면역 등에 의하여 그 발생은 복잡하다.

[0006] 한편, 본 발명자들은 치즈 제조시 생성되는 부산물인 유청 단백질을 세라티아 마르세센스 S3-R1(*Serratia marcescens* S3-R1) 유래의 알칼리 단백분해효소(Nam *et al.*, 2013)로 분해한 가수분해물이 염증을 억제하는 효과가 있음을 확인하고, 상기 가수분해물이 다양한 염증질환의 치료제로 이용될 수 있음을 밝힘으로서, 본 발명

을 완성할 수 있었다.

[0007] 유청 단백질을 효소분해한 가수분해물에 대해 분석된 선행문헌으로서, 효소가수분해에 의한 초유 유청으로부터 철-결합 펩티드(iron-binding peptide)의 생성에 관한 연구에서는 알칼라아제(alcalase)를 이용한 가수분해는 유청 단백질의 주요 성분들을 가수분해시켰으나 펩신(pepsin)은 그렇지 않음이 개시된 바 있다(Kim *et al.*, 2010). 여기에서 열처리된 초유 유청을 120분 동안 가수분해한 가수분해도는 알칼라아제(alcalase) 25.31%, 펩신(pepsin) 12.42%, 파파인(papain) 10.66%, 트립신(trypsin) 10.83%로 확인된다. 다른 단백질 분해효소에 비해 알칼라아제에 의한 유청 단백질의 가수분해가 우수하다고 보고된 바 있다(Smyth 및 Fitz-Gerald, 1998); Kim *et al.*, 2007). 이러한 선행기술에서는 기능성 식품들과 의약품 소재로서 유청 단백질 가수분해물이 산업적으로 응용 가능함을 제시하고 있다. 그러나, 본 발명에서처럼, 세라티아 마르세센스 유래의 효소를 이용하여 유청 단백질을 가수분해하는 것이 개시된 선행기술이나, 세라티아 마르세센스 유래의 효소를 이용하여 가수분해된 유청 단백질을 이용하여 항염증 조성물로 이용하는 것이 개시된 선행기술은 확인되지 않는다.

선행기술문헌

비특허문헌

[0008] (비특허문헌 0001) Alder-Nissen. 1979. Determination of the degree of hydrolysis of food protein hydrolysates by trinitrobenzenesulfonic acid. J. Agric. Food Chem. 27:1256.

(비특허문헌 0002) Gill HS, Rutherford KJ, Cross ML. 2000. Bovine milk : a unique source of immunomodulatory ingredients for functional foods. In Buttriss J, Saltmarsh M, eds. Functional Food II-Claims and Evidence. Cambridge, England: Royal Society of Chemistry Press pp. 82-90. Royal Society of Chemistry Press, Cambridge, England.

(비특허문헌 0003) Hata I, Higashiyama S, Otani H. 1998. identification of a phosphopeptide in bovine alpha s1-casein digest as a factor influencing proliferation and immunoglobulin production in lymphocyte cultures. J. Dairy Res. 65:569-578.

(비특허문헌 0004) Huth PJ, Layman DK, Brown PH. 2004. The emerging role of dairy proteins and bioactive peptides in nutrition and health. J. Nutr. 134: 961S.

(비특허문헌 0005) Kwak J, Lee K, Shin D, Maeng J, Park D, Oh HW. 2007. Biochemical and genetic characterization of arazyme, an extracellular metalloprotease produced from Serratia proteamaculans HY-3. J Microbiol Biotechnol 17: 761-768.

(비특허문헌 0006) Kim SB, Ku MJ, Cho WM, Ki KS, Kim HS, Nam MS. 2010. Production of Iron-Binding Peptides from Colostral Whey by Enzymatic Hydrolysis. Kor. J. Animal Food Sci. Resour. 20: 566-577.

(비특허문헌 0007) Kim SB, Seo IS, Khan MA, Ki KS, Nam MS, Kim HS. 2007. Separation of iron-binding protein whey through enzymatic hydrolysis. Internat.Dairy J. 17: 625-631.

(비특허문헌 0008) Kitazawa H, Yonezawa K, Tohno M, Shimosato T, Kawai Y, saito T, Wang JM. 2007. Enzymatic digestion of the milk protein β-casein releases potent chemotactic peptide(s) for monocytes and macrophages. Inter. Immunopharmac. 7: 1150-1159.

(비특허문헌 0009) Kunitz M. 1947. Crystalline soybean trypsin inhibitor. II. General properties. J. Gen. Physiol. 30: 291-297.

(비특허문헌 0010) Laemmli UK. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head bacteriophage T4. Nature 227: 680-685.

(비특허문헌 0011) Marshall K. 2004. Therapeutic applications of whey protein. Alternative Medicine Review. 9: 136-156.

(비특허문헌 0012) Nam MS, Whang KS, Choi SH, Bae HC, Kim YK, Park YW. 2013. Purification, characterization, and properties of an alkaline protease produced by Serratia marcescens S3-R1 inhabiting in Korean Ginseng Rhizosphere. J. Sci. Food Agric. Published online in Wiley Online

Library: 30 September 2013.

(비특허문헌 0013) Romero F, Garcia LA, Salas JA, Diaz M, Quiros LM. 2001. Production purification and partial characterization of two extracellular proteases from Serratiamarcescens grown inwhey. Process Biochem 36:501-515 (2001).

(비특허문헌 0014) Salamone PR and Wodzinski RJ. 1997. Production, purification and characterization of a 50-kDa extracellular metalloprotease from Serratiamarcescens. Appl Microbiol Biotechnol 48:317-324.

(비특허문헌 0015) Smyth M, Fitz-Gerald RJ. 1998. Relationship between some characteristics of WPC hydrolysates and the enzyme complement in commercially available proteinase preparations. Internat. Dairy J. 8: 819-827.

(비특허문헌 0016) Tao K, Long Z, Liu K, Tao Y, Liu S. 2006. Purification and properties of a novel insecticidal protein from the locust pathogen Serratia marcescens HR-3. Curr Microbiol 52:45-49.

(비특허문헌 0017) Walzem RL, Dillard CJ, German JB. 2002. Whey components: millennia of evolution create functionalities for mammalian nutrition: what we know and what we may be overlooking. Crit. Rev. Food Sci. Nutr. 42: 353-375.

(비특허문헌 0018) Wan M-H, Wu B, Ren W and He BF. 2010. Screening, characterization, and cloning of solvent-tolerant protease from Serratia marcescens MH6. J. Microbiol Biotechnol 20: 881-888.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009] 본 발명의 목적은 알칼리 단백분해효소를 이용한 유청 단백질의 가수분해물을 함유하는 염증 질환의 예방 또는 치료용 조성물을 제공하는 데에 있다.

과제의 해결 수단

[0010] 본 발명은 세라티아 마르세센스 S3-R1(*Serratia marcescens* S3-R1) 유래의 알칼리 단백분해효소(alkaline protease)를 이용한 유청 단백질의 가수분해물을 함유하는 염증 질환의 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.

[0011] 상기 세라티아 마르세센스 S3-R1 유래의 알칼리 단백분해효소는, 50.3kDa(kiloDalton)의 분자량, Ala-Val-Thr-Ile-Glu-Asp-Ala-Val-Asp-Asp의 N-말단 아미노산을 가지며, pH 7.0~9.0 및 30~40℃에서 효소활성을 갖는 것을 특징으로 한다.

[0012] 상기 유청 단백질은 치즈 제조 후 남은 부산물인 총 유청(whole whey)을 투석을 이용하여 단백질만을 농축한 총 유청 단백질이다.

[0013] 상기 유청 단백질의 가수분해물은 분자량 3kDa 이하인 것만 선택적으로 추출한 가수분해물일 수 있다.

[0014] 상기 염증 질환은 알레르기성 질환, 염증성 장질환, 전신성 홍반성 낭창, 염증성 콜라겐 혈관 질환, 사구체신염, 염증성 피부 질환, 유육종증, 망막염, 위염, 간염, 장염, 관절염, 편도선염, 인후염, 기관지염, 폐렴, 췌장염, 패혈증 및 신장염으로 이루어진 군에서 선택되는 질환일 수 있다.

[0015] 또한, 본 발명은 세라티아 마르세센스 S3-R1 유래의 알칼리 단백분해효소를 이용한 유청 단백질의 가수분해물을 함유하는 염증 질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품을 제공한다.

[0016] 이하, 본 발명을 상세하게 설명한다.

[0017] 본 발명에서 이용하는 유청 단백질은 상기 유청 단백질은 치즈 제조 후 남은 부산물인 총 유청(whole whey)을, 투석을 이용하여 유청에 함유되어 있는 단백질 이외의 다른 성분들을 제거한 것으로서, 상기 단백질만을 농축한 총 유청 단백질이다.

[0018] 본 발명은 알칼리 단백분해효소를 이용한 유청 단백질의 가수분해물을 함유하는 염증 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물을 제공한다. 상기 알칼리 단백분해효소를 이용한 유청 단백질의 가수분해물을 포함하는 약학 조성물은, 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀젼, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 및 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용될 수 있다. 상기 약학 조성물에 포함될 수 있는 담체, 부형제 및 희석제로는 락토즈, 덱스트로즈, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 들 수 있다. 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다. 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 본 발명의 알칼리 단백분해효소를 이용한 유청 단백질의 가수분해물을 함유하는 조성물에 적어도 하나 이상의 부형제, 예를 들면, 전분, 탄산칼슘, 수크로스 또는 락토오스, 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 또한 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트, 탈크 같은 윤활제들도 사용된다. 경구를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데 흔히 사용되는 단순희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제, 좌제가 포함된다. 비수성용제, 현탁제로는 프로필렌글리콜, 폴리에틸렌글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텝솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다.

[0019] 본 발명의 약학 조성물의 투여량은 치료받을 대상의 연령, 성별, 체중과, 치료할 특정 질환 또는 병리 상태, 질환 또는 병리 상태의 심각도, 투여경로 및 처방자의 판단에 따라 달라질 것이다. 이러한 인자에 기초한 투여량 결정은 당업자의 수준 내에 있으며, 일반적으로 투여량은 0.01㎎/㎏/일 내지 대략 2000㎎/㎏/일의 범위이다. 더 바람직한 투여량은 1㎎/㎏/일 내지 500㎎/㎏/일이다. 투여는 하루에 한번 투여할 수도 있고, 수회 나누어 투여할 수도 있다. 상기 투여량은 어떠한 면으로든 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.

[0020] 본 발명의 약학 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, 자궁내 경막 또는 뇌혈관내 주사에 의해 투여될 수 있다. 본 발명의 화합물은 독성 및 부작용이 거의 없으므로 예방 목적으로 장기간 복용시에도 안심하고 사용할 수 있는 약제이다.

[0021] 또한, 본 발명은 알칼리 단백분해효소를 이용한 유청 단백질의 가수분해물 및 식품학적으로 허용 가능한 식품보조 첨가제를 포함하는 염증 질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품을 제공한다. 상기 알칼리 단백분해효소를 이용한 유청 단백질의 가수분해물은 본 발명의 건강기능식품에 0.001~100 중량%로 하여 첨가될 수 있다. 본 발명의 건강기능식품은 정제, 캡슐제, 환제 또는 액제 등의 형태를 포함하며, 본 발명의 추출물을 첨가할 수 있는 식품으로는, 예를 들어, 각종 식품류, 음료, 껌, 차, 비타민 복합제, 건강기능성식품류 등이 있다.

발명의 효과

[0022] 본 발명은 세라티아 마르세센스 S3-R1(*Serratia marcescens* S3-R1) 유래 알칼리 단백분해효소를 이용한 유청 단백질의 가수분해물을 함유하는 염증 질환의 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것으로서, 상기 유청 단백질의 가수분해물 중 분자량 3kDa 이하인 것을 선택적으로 추출한 가수분해물이 특히 염증 억제 효과가 우수하여, 알레르기성 질환, 염증성 장질환, 전신성 홍반성 낭창, 염증성 콜라겐 혈관 질환, 사구체신염, 염증성 피부 질환, 유육종증, 망막염, 위염, 간염, 장염, 관절염, 편도선염, 인후염, 기관지염, 폐렴, 췌장염, 패혈증, 신장염 등과 같은 각종 질환의 치료제로 유용하게 이용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0023] 도 1은 실시예 1에서 Mono Q HR 5/5 컬럼으로 최종 정제된 본 발명의 세라티아 마르세센스 S3-R1 유래의 단백분해효소에 대한 RP-HPLC(reverse-phase-HPLC) 분석 결과이다.

도 2는 실시예 1에서 Mono Q HR 5/5 컬럼을 이용하여 최종 정제된 알칼리 단백분해효소를 SDS-PAGE(Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis)로 분석한 결과이다.

도 3은 실시예 1에서 Mono Q HR 5/5 컬럼을 이용하여 최종 정제된 알칼리 단백분해효소를 MALDI-TOF-MS(Matrix-assisted laser desorption ionization time of flight mass spectroscopy)로 분석한 결과이다.

도 4는 실시예 1에서 Mono Q HR 5/5 컬럼을 이용하여 최종 정제된 알칼리 단백분해효소의 pH 적합성(도 4A) 및 pH 안정성(도 4B)을 확인한 결과이다.

도 5는 실시예 1에서 Mono Q HR 5/5 컬럼을 이용하여 최종 정제된 알칼리 단백분해효소의 온도 적합성(도 5A) 및 온도 안정성(도 5B)을 확인한 결과이다.

도 6은 실시예 1에서 Mono Q HR 5/5 컬럼을 이용하여 최종 정제된 알칼리 단백분해효소를 이용하여 유청 단백질을 5분(도 6A), 60분(도 6B), 120분(도 6C) 또는 240분(도 6D) 동안 반응시킨 총 가수분해물의 RP-HPLC(reverse-phase-HPLC) 분석 결과이다.

도 7은 실시예 1에서 Mono Q HR 5/5 컬럼을 이용하여 최종 정제된 알칼리 단백분해효소를 이용한 유청 단백질의 가수분해도를 나타낸다.

도 8은 실시예 1에서 Mono Q HR 5/5 컬럼을 이용하여 최종 정제된 알칼리 단백분해효소를 이용하여 얻은 유청 단백질의 가수분해물을 SDS-PAGE(Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis)로 분석한 결과이다.

도 9A는 실시예 1에서 Mono Q HR 5/5 컬럼을 이용하여 최종 정제된 알칼리 단백분해효소를 이용하여 얻은 유청 단백질의 가수분해물 10㎍/㎖ 및 LPS(lipopolysaccharide) 1㎍/㎖를 RAW 264.7 세포에 처리하여 염증 관련 사이토카인의 발현을 분석한 결과이고, 도 9B 및 도 9C는 상기 사이토카인의 발현량을 그래프로 표현한 것이다.

도 10은 RAW 264.7 세포에 상기 유청 단백질 가수분해물 50㎍/㎖ 및 LPS 1㎍/㎖을 처리하여 염증 관련 사이토카인의 발현을 분석한 결과이다.

도 11은 세라티아 마르세센스 S3-R1 균주(S3-R1)의 분류학적 위치를 나타내는 계통수이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0024] 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.

[0025] **<실시예 1. 세라티아 마르세센스 S3-R1 균주로부터 알칼리 단백분해효소의 정제>**

[0026] 한국의 인삼 재배 토양에서 분리된 세라티아 마르세센스 S3-R1(*Serratia marcescens* S3-R1)(균주의 분류학적 위치 도 11 참조)을 뉴트리언트 액체배지(nutrient broth, Difco, Becton Dickinson, MD, USA)에서 37℃의 온도로 24시간 동안 배양하였다. 이 후 상기 균주 배양액의 상청액(supernatant)을 20~80%(w/v)의 포화 상태까지의 황산암모늄 용액으로 침천시킨 후, 이를 4000×*g*, 20분, 4℃ 조건에서 원심분리하였다. 이렇게 원심분리하여 얻은 침전물을 투석(molecular cut of 10kDa dialysis tubing, Sigma Chemical Co.)하여 알칼리 단백분해효소의 조추출물을 얻었고 이를 동결건조하였다. 상기 알칼리 단백분해효소의 조추출물을 순수한 효소로 정제하기 위해, 동결건조된 조추출물을 인산나트륨 완충액(sodium phosphate buffer, pH 6.0)에 0.005mol/ℓ로 녹인 후, DEAE-세파로오스 컬럼(DEAE-Sepharose column, Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden, 5.0×20cm)으로 정제하여 0.3~0.7mol/ℓ의 NaCl 용액으로 순차적으로 용출시켰다(flow rate:50㎖/h). 각각의 용출 분획물은 0.005mol/ℓ의 인산나트륨 완충액(pH 6.0)으로 투석(시그마, 투석막, 12kDa, D-9527; 12kDa 이하의 것들만 선택적으로 얻음)한 뒤, 동일한 인산나트륨 용액 및 Mono Q HR 5/5 컬럼을 이용한 FPLC 시스템(AKTA fast protein liquid chromatography system, Amersham Pharmacia Biotech)으로 정제하여, 0.10, 0.20, 0.25, 0.30 및 1.0mol/ℓ의 NaCl 용액으로 용출하였다(flow rate:0.7㎖/min). 단백분해효소는 1.0mol/ℓ NaCl 피크(peak)에서 확인되었고, 증류수에서 48시간 동안 4℃에서 투석(시그마, 투석막, 12kDa, D-9527)하여 동결건조하였다. 이 때, 단백분해효소의 존재는 280nm에서 확인하였다. 그리고, 하기의 조건의 RP-HPLC 시스템(reverse-phase-HPLC system)을 이용하여 Mono Q HR 5/5 컬럼으로 정제된 단백분해효소가 순수한 1종의 단백질임을 확인하였다(도 1 참조).

[0027] The reverse-phase (RP)-HPLC system

[0028] Waters model 600E multisolvent delivery system

[0029] Rheodyne model 7725i injector

[0030] Infection volume : 20㎕ sample loop

[0031] Waters model 2487 dual absorbance detector

[0032] Absorbance of the elute column : 280 nm

[0033] C18 column(Vydac Co., Hesperia, CA, USA)

[0034] flow rate : 1.5㎖/min.

[0035] Elution solution: solution A - 0.1% trifluoroacetic acid (TFA) solution in water

[0036] solution B - 0.1% TFA in 95% acetonitrile (AcN) solution

[0037] Elution condition: 20% of solution A → 80% solution B

[0038] The separation time : 20min

[0039] Detector output record : Autochro-WIN 2.0 plus software package (Young Lin Instrument Co. Ltd, Seoul, Korea).

[0040] **<실시예 2. 알칼리 단백분해효소의 활성 및 특성 확인>**

[0041] **실시예 2-1. 알칼리 단백분해효소의 활성 측정**

[0042] 실시예 1에서 정제된 알칼리 단백분해효소의 활성 측정은 Kunitz(1947)의 방법을 변형하여 실시하였다. 상기 알칼리 단백분해효소로는 실시예 1의 효소의 각 정제단계에서 이용된 것들을 모두 이용하였다. 기질로 사용될 카제인(bovine milk casein)은 50mM Tris-HCl(pH7.0)에 0.6%(w/v)의 농도로 녹여 40℃에서 10분 동안 전반응시켰다. 상기 카제인 액상에 0.5㎖의 알칼리 단백분해효소 용액을 넣어 가수분해시켰다. 정제된 효소나 정제 단계의 조효소 추출물은 동결건조한 것들을 20㎎/㎖ 농도로 증류수에 녹인 후, 이 중에서 0.5㎖씩을 각각의 반응에 사용하였다. 10분 후, 2.5㎖ TCA 혼합액(50%[w/v] TCA 36㎖, 1M CH_3COONa 220㎖, CH_3COOH 330㎖/ℓ)을 넣고 효소반응을 중지시켰다. 효소반응이 정지된 상기 액상을 실온에서 와트만 No.2 여과지(Whatman International Ltd., Maidstone, England)로 여과하였다. 상기 여과액 1㎖을 튜브(tube)에 넣고, 0.55M Na_2CO_3 2.5㎖과 폴린 용액(Folin reagent) 0.5㎖을 혼합하고, 1/3 농도로 희석하였다. 상기 희석된 혼합액을 30℃에서 30분간 반응시킨 후, 이의 흡광도를 660㎚에서 측정하였다. 단백질 효소 활성 1유닛(unit)은 1분 동안 폴린에 염색된 1㎍의 아미노산 또는 펩티드가 요구하는 효소의 양으로서, 티로신(tyrosine)을 표준아미노산으로 사용하였다. 각 정제단계별로 얻은 정제된 효소나 정제 단계의 조효소 추출물의 총량이나 이 값을 이용한 결과는 단백질 측정용 브레드포드(bread ford) 시약을 이용한 방법으로 단백질의 총량을 측정하여 나타내었다.

표 1

[0043]

정제 단계 (Purification step)	총 단백질 (Total protein, mg)	총 효소 활성 (Total enzyme activity, units)	특이적 활성 (Specific activity, units/mg)	정제도 (Purification, fold)	수율 (Yield, %)
배양액의 상청액	2008.0	102000.0	51.0	1.0	100.0
50%(w/v) 황산암모늄을 이용한 침전물	403.8	35500.0	88.0	1.7	35.0
DEAE-세파로오즈 정제물	27.4	7650.0	279.0	5.5	7.5
Mono Q HR 5/5 컬럼 정제물	18.3	5304.0	289.0	5.8	5.2

[0044] 상기 표 1을 참고하면, 본 발명의 알칼리 단백분해효소가 순차적으로 잘 정제되었음을 알 수 있다. 즉, 각각의 결과값은 조효소에서 시작하여 효소정제 단계를 순차적으로 거치면서 정제 순도와 활성은 높아지고 최종 효소양은 감소하는 것을 나타낸다. 결과적으로, 배양액에서 얻은 2008㎎의 단백질로부터 최종적으로 18.3㎎의 정제 단백질을 얻음을 알 수 있으며, 이 때의 수율은 5.2%이다. 정제도(purification fold)는 5.8로서 고순도로 정제되었음을 의미한다(MALDI-TOF-MS 분석 가능한 순도). 상기 표 1의 결과값들은 상기 알칼리 단백분해효소만의 고유의 특성을 나타낸다.

[0045] **실시예 2-2. 단백분해효소 활성에 대한 저해제의 효과 확인**

[0046] 하기 표 2의 조건의 각 저해제와 본 발명의 정제된 단백분해효소(Mono Q HR 5/5 컬럼 정제물)를 1시간 동안 4℃에서 동안 전반응시켰다. 이 때의 단백분해효소의 활성은 저해제가 없는 무처리군의 활성을 비교하여 나타내었다. 단백분해과정은 실시예 2-1과 동일한 과정을 이용하여 확인하였다. 각각의 저해제는 증류수에 용해된 것을 이용하였다.

표 2

[0047]

저해제(inhibitor)	농도	단백분해활성 (%, 가수분해정도)
무처리군	-	100
EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid)	5.0mmol/ℓ	52.6
Urea	5.0mmol/ℓ	99.3
β-Mercaptoethanol	5.0mmol/ℓ	2.52
SDS (sodium dodecyl sulfate)	1% (w/v)	0
Tween-80	1% (v/v)	106.2

[0048] 상기 표 2의 결과는 본 발명의 단백분해효소는 EDTA와 같은 금속킬레이터(metal chelators)에 대해 대략 50% 정도의 활성이 억제되어, 이를 통해 상기 단백분해효소가 금속 단백분해효소(metalloproteinase family)에 속하는 것임을 알 수 있다.

[0049] **실시예 2-3. SDS-PAGE를 이용한 알칼리 단백분해효소의 분석**

[0050] Laemmli(1970)의 방법을 따른 SDS-PAGE(Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis)를 이용하여 실시예 1에서 Mono Q HR 5/5 컬럼으로 최종 정제된 본 발명의 알칼리 단백분해효소(본 발명의 세라티아 마르세센스 S3-R1 균주 유래의 알칼리 단백분해효소)의 분자량을 확인하였으며, 전기영동 사진은 도 2에 나타내었다. 단백질 분자량의 마커(Lane M)로는 포스포릴라아제 *b*(phosphorylase *b*, 97.4kDa), 혈청 알부민(serum albumin, 66.2kDa), 오발부민(ovalbumin, 45kDa), 탄산무수화효소(carbonic anhydrase, 31kDa), 트립신 저해제(trypsin inhibitor, 21.5kDa), 라이소자임(lysozyme, 14.4kDa)을 이용하였다.

[0051] 도 2를 참고하면, SDS-PAGE 분석결과, 실시예 1에서 Mono Q HR 5/5 컬럼을 이용하여 최종 정제된 본 발명의 알칼리 단백분해효소(Lane 1)는 45~56kDa 사이의 분자량을 갖는 것으로 확인된다.

[0052] **실시예 2-4. MALDI-TOF-MS를 이용한 알칼리 단백분해효소의 분석**

[0053] MALDI-TOF-MS(Matrix-assisted laser desorption ionization time of flight mass spectroscopy)를 이용해서 도 세라티아 마르세센스 S3-R1 균주 유래의 알칼리 단백분해효소의 분자량을 확인하였는데(Microflex TOF mass spectrometer, Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Germany, pulsed nitrogen laser : 337nm, 3ns pulse duration), 이를 위해 실시예 1에서 Mono Q HR 5/5 컬럼을 이용하여 최종 정제된 알칼리 단백분해효소 0.1%(w/v) 용액을 0.1% TFA(trifluoroacetic acid) 용액(w/v)에 1:100(v:v)으로 희석하여 녹였다. 아세토니트릴과 물의 혼합 용액(acetonitrile-water, 1:1, v:v)에 포화된 시나핀산(sinapinic acid)이 매트릭스(matrix)로 사용되었다. 0.1%(w/v) TFA 용액에 희석된 5㎕의 알칼리 단백분해효소 희석액을 동량의 매트릭스 용액과 혼합하고 이를 분석판에 부착시킨 후 잘 말려 분석하였다. 외부 질량의 교정(external mass calibration)은 단백질 교정 기준 I(protein calibration standard I, Bruker Daltonik GmbH, Bremen, Germany)을 이용하여 수행하였다. MALDI-TOF-MS 분석결과는 도 3에 나타내었다.

[0054] 도 3을 참고하면, MALDI-TOF-MS 분석결과, 본 발명의 알칼리 단백분해효소는 50.3kDa의 분자량을 가지는 효소이다.

[0055] 다른 종류의 세라티아 균주들이 생성하는 단백분해효소로서, 세라티아 마르세센스 MH6에서는 52kDa의 단백분해효소가 분리된 바 있으며(Wan *et al.*, 2010), Salamone 및 Wodzinski(Salamone *et al.* 1997)가 발견한 세라티아 마르세센스 균주에서는 50kDa의 외부 금속단백효소(extracellular metalloprotease)가 확인되었다. 거미의 소화관에서 분리된 세라티아 프로테아마쿨란스 HY-3(*Serratia proteamaculans*)의 단백분해효소인 아라자임(arazyme)은 분자량 51.5kDa이며(Kwak *et al.*, 2007), 유청에서 배양된 세라티아 마르세센스 ATCC 25419 균주가 갖는 금속 단백분해효소는 분자량이 53.5kDa이었고, 세린 단백분해효소는 분자량이 66.5kDa이었다(Romero *et al.*, 2001). 세라티아 마르세센스 HR-3로부터 분리된 단백분해효소의 분자량은 61kDa이었다(Tao *et al.*, 2006).

[0056] 따라서, 본 발명의 세라티아 마르세센스 S3-R1 균주로부터 분리한 알칼리 단백분해효소는 기존의 세라티아 마르세센스 균주 또는 다른 균주로부터 분리된 단백분해효소와는 전혀 다른 것임을 알 수 있다.

[0057] **실시예 2-5. 알칼리 단백분해효소의 N-말단 아미노산 분석**

[0058] SDS-PAGE를 이용하여 정제된 효소임을 확인한 후, 이를 Immobilon-P^{SQ} 멤브레인(Immobilon-P^{SQ} 0.45㎛ polyvinylidene fluoridememembrane, Millipore, Billerica, MA, USA)에 블로팅(electroblot)하였다. 상기 멤브레인을 40%(v/v) 메탄올 수용액에 녹인 0.025%(w/v) 코마시 브릴리언트 블루 R-250(Coomassie Brilliant Blue R-250)으로 염색하고, 50%(v/v) 메탄올 수용액으로 세척하였다. 염색된 단백질 밴드를 잘라서, N-말단 아미노산 분석(N-terminal amino acid sequence analysis)을 하였다(Applied Biosystems 476A-01-120 protein sequencer, Weiterstadt, Germany). 분석된 N-말단 아미노산 서열은 Ala-Val-Thr-Ile-Glu-Asp-Ala-Val-Asp-Asp인 것으로 확인된다.

[0059] **실시예 2-6. 알칼리 단백분해효소의 활성에 적합한 pH 확인**

[0060] 알칼리 단백분해효소의 활성에 적합한 pH를 확인하기 위해, pH 4.0~11.0 사이에 있는 0.1mol/ℓ 농도의 완충액(citrate phosphate buffer, pH range 4.0~7.0; sodium phosphate buffer, pH range 7.0~8.0; Tris buffer, pH range 8.0~9.0; carbonate bicarbonate buffer, pH range 9.0~11.0)에서 실시예 2-1의 가수분해활성 방법을 이용하여 알칼리 단백분해효소의 활성을 확인하였다.

[0061] 또한, 적정 pH에서의 안정성은 알칼리 단백분해효소를 각 완충액에서 5℃, 16시간 동안 반응시킨 후, pH를 8.0으로 조절하여 실시예 2-1의 가수분해활성 방법을 이용하여 확인하였다.

[0062] 상기 결과들은 도 4에 나타내었는데, 도 4를 참고하면, 알칼리 단백분해효소는 pH 7.0~9.0에서 적합한 효소 활성을 나타내며(도 4A), pH 7.0~11.0에서 pH 안전성을 갖는 것을 알 수 있다(도 4B). 따라서 상기 알칼리 단백분해효소는 pH 7.0~9.0에서 적절한 효소활성을 나타내는 것으로 판단하였다.

[0063] 다른 종류의 세라티아 균주들이 생성하는 단백분해효소로서, 세라티아 마르세센스 SMP 6.1(Salamone *et al.* 1997)은 pH 10에서 적절한 활성을 가졌다. 세라티아 프로테아마쿨란스(*S. proteamaculans* HY-3, Kwak *et al.*, 2007)는 보다 넓은 pH 범위에서 적절한 활성을 갖는 것으로 확인되었다(pH 6~10).

[0064] 따라서, 상기 pH 7.0~9.0의 활성 조건은 본 발명의 단백분해효소가 갖는 고유한 특성임을 알 수 있다.

[0065] **실시예 2-7. 알칼리 단백분해효소의 활성에 적합한 온도 확인**

[0066] 알칼리 단백분해효소의 활성에 적합한 온도를 확인하기 위해, 0.1mol/ℓ의 트리스 완충액(Tris-HCl, pH 8.0)에서 카세인(casein)을 기질로 하여 30~60℃ 조건에서 실시예 2-1의 가수분해활성 방법을 이용하여 알칼리 단백분해효소의 활성을 확인하였다. 또한, 온도 안정성은 같은 조건에서 0~60분 동안 20분의 간격을 두고 실시예 2-1의 가수분해활성 방법을 이용하여 확인하였다.

[0067] 상기 결과들은 도 5에 나타내었는데, 도 5를 참고하면, 알칼리 단백분해효소는 30~50℃에서 적합한 효소 활성을 나타내며(도 5A), 30~40℃에서 온도 안전성을 갖는 것을 알 수 있다(도 5B).

[0068] 따라서 상기 알칼리 단백분해효소는 30~40℃에서 적절한 효소활성을 나타내는 것으로 판단하였다.

[0069] **<실시예 3. 알칼리 단백분해효소를 이용한 유청 단백질 가수분해물의 제조>**

[0070] 치즈 제조 후 얻은 총 유청(whole whey)에서 유청에 함유되어 있는 단백질 이외의 다른 성분들(유당 등)을 제거하기 위해 투석막(시그마, 투석막, 12kDa, D-9527)으로 투석시킨 후 유청 단백질(총 유청 단백질)을 얻었고, 이를 동결건조하여 유청 단백질 분말을 수득하였다. 상기 유청 단백질 분말을 물에 20mg/mℓ로 녹여 유청 단백질 용액을 제조한 후, 0.5M NaOH을 사용하여 pH를 8.0으로 조정하였다. 실시예 1에서 정제한 알칼리 단백분해효소를 증류수에 1%(w/v)로 녹여 알칼리 단백분해효소 용액을 만들고, 상기 알칼리 단백분해효소 용액과 상기 유청 단백질 용액을 1:100의 부피비로 혼합하였다. 유청 단백질의 효소반응(가수분해)은 40℃에서 시간별로(5, 60, 120, 240분) 수행하였고, 효소반응을 마친 후에는 90℃에서 10분간 가열하여 효소활성을 실활시켰으며, 상등액을 유청 단백질의 총 가수분해물로 취하였고 침전물은 버렸다. 한편, 상기 가수분해물의 일부를 분자량 3kDa 용 비바스핀 농축기 20(Vivaspin concentrator 20, GE Healthcare, Sweden)을 이용하여 3kDa 초과하는 것과 3kDa 이하인 것으로 선택적으로 분리추출하였다. 상기 유청 단백질의 가수분해물들은 모두 동결건조하여 보관하였다.

[0071] **<실시예 4. 알칼리 단백분해효소를 이용한 유청 단백질 가수분해물의 특성 확인>**

[0072] **실시예 4-1. RP-HPLC를 이용한 유청 단백질의 가수분해물의 특성 확인**

[0073] 실시예 3의 유청 단백질의 총 가수분해물을 RP-HPLC 시스템(Waters 2487 Dural Dector, 600 Controller, 2410 Refractive index Detector, Milford, MA, USA)으로 분석하였다. 이를 위해, 용매 A(solvent A, 0.1% TFA[trifluoroacetic acid] in H_2O)로 평형화시킨 C18 컬럼(4.6×250㎜, Vydac, Hesperia, CA. U.S.A)을 사용하였고 용매 B(solvent B, 0.1% TFA in acetonitrile)로 40분 동안 평형농도차(linear gradient)로 용출시켰다. RP-HPLC 시스템 작동은 실온에서 1㎖/min 유속으로, 흡광도는 214nm로 작동시켰다. 시료(유청 단백질의 총 가수분해물) 주입량은 10㎕로서, 상기 시료의 단백질 농도는 0.5㎎/㎖이었다. 모든 시료는 필터(0.22㎛ Acrodisc Syringe Filters, Gelman Laboratory, Ann Arbor, MI, USA)로 C18 컬럼에 주입하기 전에 여과 후 사용하였고, 분석결과는 도 6에 나타내었다.

[0074] 도 6을 참고하면, 세라티아 마르세센스 S3-R1 유래의 알칼리 단백분해효소를 이용하여 유청 단백질을 5분(도 6A), 60분(도 6B), 120분(도 6C) 또는 240분(도 6D) 동안 반응시킨 총 가수분해물에, 다양한 펩티드가 생성되어 있음을 알 수 있다. 따라서 상기 세라티아 마르세센스 S3-R1 유래의 알칼리 단백분해효소는 유청 단백질을 가수분해시켜 저분자 펩티드를 생성할 수 있는 능력이 있는 것으로 확인된다.

[0075] **실시예 4-2. 유청 단백질의 가수분해도 확인**

[0076] 가수분해도(degree of hydrolysis)는 Alder-Nissen 방법(1979)을 이용하여 수행하였고 아래 수식을 이용하여 계산하였다.

$$DH(\text{degree of hydrolysis})\ (\%) = \left(\frac{h}{h_{tot}}\right) \times 100$$

h : 가수분해 되는 동안 생성된 alph-amino group protein의 농도 (milliequivalent/g protein)

h_{tot} : 단백질 1g 당 각각 아미노산의 농도(milliequivalent/g)

[0077]

[0078] 실시예 3의 조건으로 세라티아 마르세센스 S3-R1 유래의 알칼리 단백분해효소를 이용하여 유청 단백질을 5, 15, 30, 60, 90, 120, 180 및 240분 동안 가수분해하였으며, 이 때의 가수분해 정도를 도 7에 나타내었다.

[0079] 도 7을 참고하면, 유청 단백질의 총 가수분해물은 시간에 따라, 가수분해도가 39.5%에서 63.0%로 증가함을 알 수 있다.

[0080] **실시예 4-3. SDS-PAGE를 이용한 유청 단백질의 가수분해도 확인**

[0081] 실시예 4-2에서 효소반응이 된 유청 가수분해물을 실시예 2-3에 개시된 SDS-PAGE를 이용하여 분석하였고, 분석결과는 도 8에 나타내었다. 도 8에서, Lane M은 단백질 마커를 나타낸다. Lane 1은 효소반응을 하지 않은 유청 단백질을 나타내며, Lane 2~9는 세라티아 마르세센스 S3-R1 유래의 알칼리 단백분해효소를 이용하여 유청 단백질을 각각 5, 15, 30, 60, 90, 120, 180 및 240분 동안 효소반응시킨 총 가수분해물을 나타낸다.

[0082] 도 8을 참고하면, RP-HPLC를 이용하였을 때와 마찬가지로, 세라티아 마르세센스 S3-R1 유래의 알칼리 단백분해효소가 유청 단백질의 주요 성분들을 가수분해시켜 분자량이 작은 다양한 펩티드가 생성되었음을 알 수 있다.

[0083] **<실시예 5. 유청 단백질 가수분해물의 염증 억제 효과 확인>**

[0084] RAW 264.7 세포(대식세포주)를 KRIBB(Daejeon, Korea)에서 분양받아 DMEM(Dulbecco's modified Eagle's medium)에 10% FBS(fetal bovine serum)와 1% 페니실린/스트렙토마이신(penicillin/streptomycin, 100U/㎎)을 첨가하여 배양하였다. 배양기는 37℃, 5% CO_2와 대기습도가 유지되는 조건에서 배양하였다. 12-웰(well) 세포배양접시(Nunc, Denmark)에 세포 수를 5×10^5/웰로 조정하여 12시간 배양한 후, LPS(lipopolysaccharide) 1㎍/㎖을 처리하고, 다시 30분 후에 실시예 3에서 준비한 각각의 시료로서, 유청 단백질, 유청 단백질의 총 가수분해물, 유청 단백질의 가수분해물 중 3kDa 초과인 것, 유청 단백질의 가수분해물 중 3kDa 이하한 것(상기 가수분해물은 모두 세라티아 마르세센스 S3-R1 유래의 알칼리 단백분해효소를 이용함, 4시간 반응)을 각각 10 및 50㎍/㎖의 농도로 처리하여 3시간 동안 반응시켰다. 음성 대조군에는 LPS와 시료를 모두 처리하지 않았으며, 양성대조군에는 LPS만 처리하였다.

[0085] 시료 처리 3시간이 지나면, 각각의 시료처리 세포에서 TRIzol 용액(Invitregon, USA)을 이용하여 총 RNA를 추출

하였으며, Promega사(USA)의 cDNA 합성 키트(oligo dT, dNTP, M-MLV RT, RNAs inhibitor)를 이용하여 cDNA를 합성하였다. 합성된 cDNA를 이용하여 RAW 264.7 세포에서 IL-6(interleukin-6), iNOS(inducible NO synthase), COX-2(cyclooxygenase-2), TNF-α(tumor necrosis factor-α) 유전자를 RT-PCR로 분석하였으며 이에 대한 결과는 도 9 및 10에 나타내었다. RT-PCR 조건은 94℃에서 5분(1 cycle), 94℃에서 30초; 58℃에서 30초; 72℃에서 30초(22~23 cycle 반복), 72℃에서 7분(1 cycle)로 하였고 사용한 PCR용 프라이머(primer)는 하기 표 3에 나타난 것을 이용하였다.

표 3

[0086]

타겟 유전자	Size (bp)	Forward	Reverse
GAPDH	346	CCATCACCATCTTCCAGGAG	ACAGTCTTCTGGGTGGCAGT
TNF-α	354	TTCTGTCTACTGAACTTCGGGGTGATCGGTCC	GTATGAGATAGCAAATCGGCTGACGGTGTGGG
IL-6	139	TCCAGTTGCCTTCTTGGGAC	GTGTAATTAAGCCTCCGACTTG
COX-2	583	TTGAAGACCAGGAGTACCGC	GGTACAGTCCCATGACATCG
iNOS	311	CTGCAGCACTTGGATCAGGAACCTG	GGGAGTAGCCTGTGTGCACCTGGAA

[0087] 도 9A는 유청 단백질 가수분해물 10㎍/㎖을 RAW 264.7 세포에 처리하고 30분 후에 LPS(lipopolysaccharide) 1㎍/㎖을 처리한 상태로 세포를 12시간 배양하여 각 사이토카인(cytokine)의 발현을 분석한 결과이고, 도 9B 및 도 9C는 상기 사이토카인의 발현량을 그래프로 표현한 것이다.

[0088] 도 10은 유청 단백질 가수분해물 50㎍/㎖을 도 9와 동일한 조건으로 RAW 264.7 세포에 처리한 결과이다.

[0089] 도 9A 내지 도 9B를 참고하면, LPS만을 처리한 군과 비교하여, 유청 단백질, 유청 단백질의 총 가수분해물의 TNF-α, IL-6, iNOS, COX-2는 거의 비슷하거나 오히려 증가되는 것처럼 확인된다. 그러나, 유청 단백질의 가수분해물 중 3kDa 초과인 것도 iNOS나 COX-2에서 억제 효과가 있는 것으로 나타나며, 특히 유청 단백질의 가수분해물 중 3kDa 이하인 것이 처리된 군에서는 상기 TNF-α, IL-6, iNOS, COX-2의 발현이 현저하게 저하되는 것을 알 수 있다. 이는 도 10에서 각 단백질을 50㎍/㎖으로 처리한 결과에서 보다 뚜렷하게 대비되어 나타나며, 상기 도 10의 결과를 통해서도 상기 유청 단백질의 가수분해물 중 3kDa 이하인 것이 우수한 염증 억제 효과가 있음을 알 수 있다.

[0090] 따라서, 상기 결과들을 통해, 세라티아 마르세센스 S3-R1 유래의 알칼리 단백분해효소를 이용하여 얻은 유청 단백질의 가수분해물 중 3kDa 이하인 것이 항염증용 조성물로서 이용되기에 적절함을 알 수 있다.

[0091] **<실시예 6. 독성실험>**

[0092] **실시예 6-1. 급성독성**

[0093] 본 발명의 유청 단백질 가수분해물 중 3kDa 이하인 가수분해물을 단기간에 과량을 섭취하였을 때 급성적(24시간 이내)으로 동물체내에 미치는 독성을 조사하고, 치사율을 결정하기 위하여 본 실험을 수행하였다. 일반적인 마우스인 ICR 마우스 계통 20마리를 대조군과 실험군에 각각 10마리씩 배정하였다. 대조군에는 PEG-400:tween-80:에탄올(8:1:1, v:v:v) 만을 투여하고, 실험군은 본 발명의 유청 단백질 가수분해물 중 3kDa 이하인 가수분해물을 상기 PEG-400:tween-80:에탄올(8:1:1, v:v:v)에 녹여 각각 경구투여하였다. 투여 24시간 후에 각각의 치사율을 조사한 결과, 대조군과 2g/kg/day 농도의 본 발명의 유청 단백질 가수분해물 중 3kDa 이하인 가수분해물을 투여한 실험군에서 마우스가 모두 생존하는 것으로 확인되었다.

[0094] **실시예 6-2. 실험군 및 대조군의 장기 및 조직 독성 실험**

[0095] 장기 독성 실험은 본 발명의 유청 단백질 가수분해물 중 3kDa 이하인 가수분해물을 각 농도로 8주 동안 C57BL/6J 마우스(각 군당 10마리)에 투여하여 실험하였다. 동물의 각 장기(조직)에 미치는 영향을 조사하기 위하여 본 발명의 유청 단백질 가수분해물 중 3kDa 이하인 가수분해물을 투여한 실험군과 PEG-400:tween-80:에탄올(8:1:1, v:v:v)만을 투여한 대조군의 동물들로부터 8주 후 혈액을 채취하여 GPT(glutamate-pyruvate transferase) 및 BUN(blood urea nitrogen)의 혈액 내 농도를 Select E(Vital Scientific NV, Netherland) 기기를 이용하여 측정하였다. 그 결과, 간독성과 관계있는 것으로 알려진 GPT와 신장독성과 관계있는 것으로 알려진 BUN의 경우, 대조군과 비교하여 실험군은 별다른 차이를 보이지 않았다. 또한, 각 동물로부터 간과 신장을 절취하여 통상적인 조직절편 제작과정을 거쳐 광학현미경으로 조직학적 관찰을 시행하였으며 모든 조직에서 특

이한 이상이 관찰되지 않았다.

[0096] **<제제예 1. 약학적 제제>**

[0097] **제제예 1-1. 정제의 제조**

[0098] 본 발명의 실시예 3의 유청 단백질의 3kDa 이하의 가수분해물 200g을 락토오스 175.9g, 감자전분 180g 및 콜로이드성 규산 32g과 혼합하였다. 이 혼합물에 10%(v/w) 젤라틴 용액을 첨가시킨 후, 분쇄해서 14 메쉬체를 통과시켰다. 이것을 건조시키고 여기에 감자전분 160g, 활석 50g 및 스테아린산 마그네슘 5g을 첨가해서 얻은 혼합물을 정제로 만들었다.

[0099] **제제예 1-2. 주사액제의 제조**

[0100] 본 발명의 실시예 3의 유청 단백질의 3kDa 이하의 가수분해물 1g, 염화나트륨 0.6g 및 아스코르브산 0.1g을 증류수에 용해시켜서 100㎖를 만들었다. 이 용액을 병에 넣고 20℃에서 30분간 가열하여 멸균시켰다.

[0101] **<제제예 2. 식품 제조>**

[0102] **제제예 2-1. 조리용 양념의 제조**

[0103] 본 발명의 실시예 3의 유청 단백질의 3kDa 이하의 가수분해물을 조리용 양념에 1 중량%로 첨가하여 건강 증진용 조리용 양념을 제조하였다.

[0104] **제제예 2-2. 밀가루 식품의 제조**

[0105] 본 발명의 실시예 3의 유청 단백질의 3kDa 이하의 가수분해물을 밀가루에 0.1 중량%로 첨가하고, 이 혼합물을 이용하여 빵, 케이크, 쿠키, 크래커 및 면류를 제조하여 건강 증진용 식품을 제조하였다.

[0106] **제제예 2-3. 스프 및 육즙(gravies)의 제조**

[0107] 본 발명의 실시예 3의 유청 단백질의 3kDa 이하의 가수분해물을 스프 및 육즙에 0.1 중량%로 첨가하여 건강 증진용 수프 및 육즙을 제조하였다.

[0108] **제제예 2-4. 유제품(dairy products)의 제조**

[0109] 본 발명의 실시예 3의 유청 단백질의 3kDa 이하의 가수분해물을 우유에 0.1 중량%로 첨가하고, 상기 우유를 이용하여 버터 및 아이스크림과 같은 다양한 유제품을 제조하였다.

[0110] **제제예 2-5. 야채주스 제조**

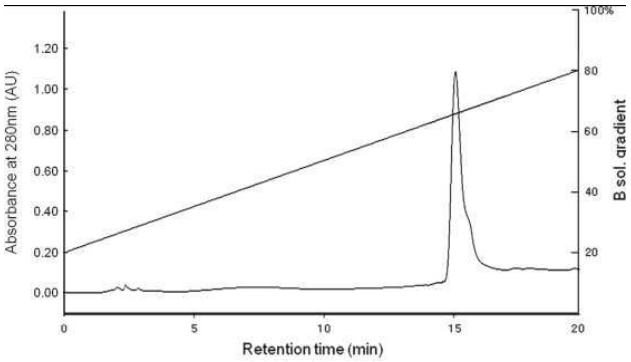
[0111] 본 발명의 실시예 3의 유청 단백질의 3kDa 이하의 가수분해물 0.5g을 토마토주스 또는 당근주스 1,000㎖에 가하여 건강 증진용 야채주스를 제조하였다.

[0112] **제제예 2-6. 과일주스 제조**

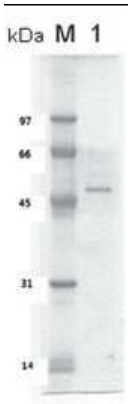
[0113] 본 발명의 실시예 3의 유청 단백질의 3kDa 이하의 가수분해물 0.1g을 사과주스 또는 포도주스 1,000㎖에 가하여 건강 증진용 과일주스를 제조하였다.

도면

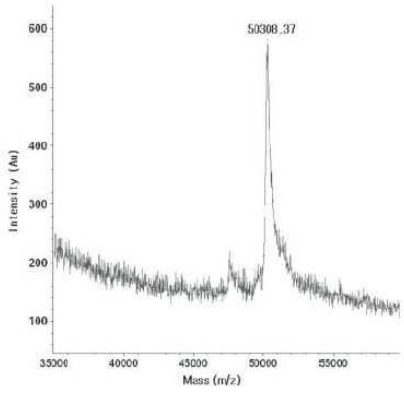
도면1



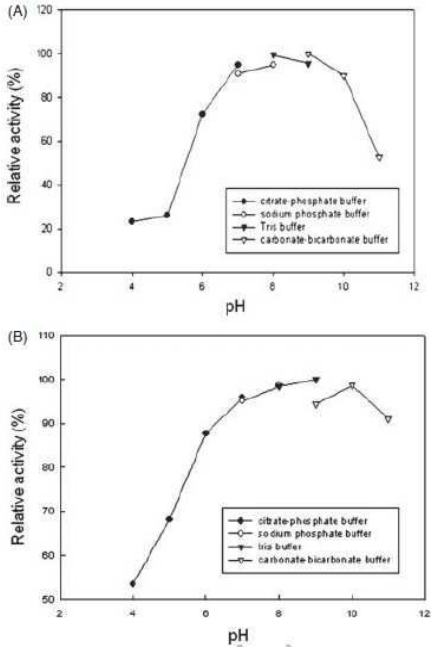
도면2



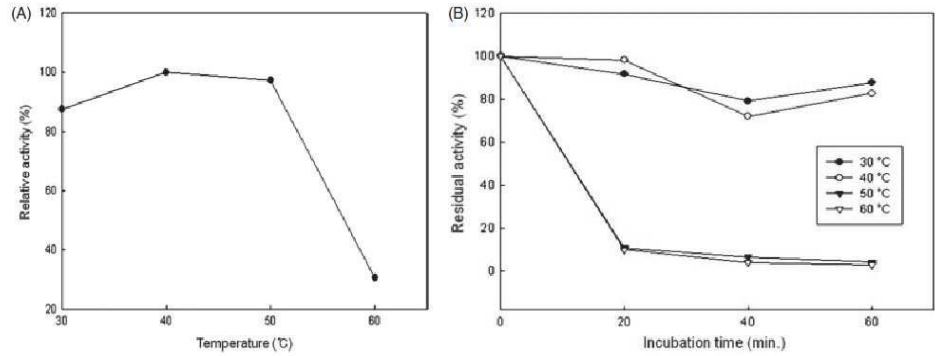
도면3



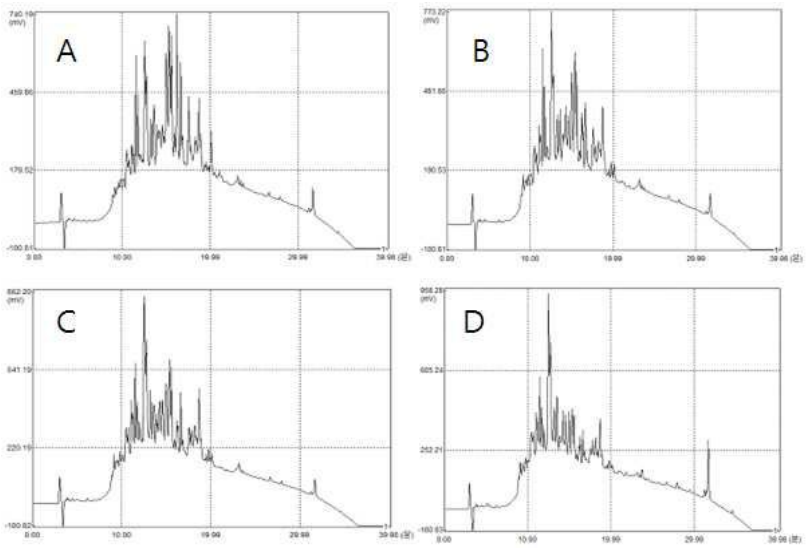
도면4


(A)
Relative activity (%)
pH
citrate-phosphate buffer
sodium phosphate buffer
Tris buffer
carbonate-bicarbonate buffer
(B)
Relative activity (%)
pH
citrate-phosphate buffer
sodium phosphate buffer
tris buffer
carbonate-bicarbonate buffer

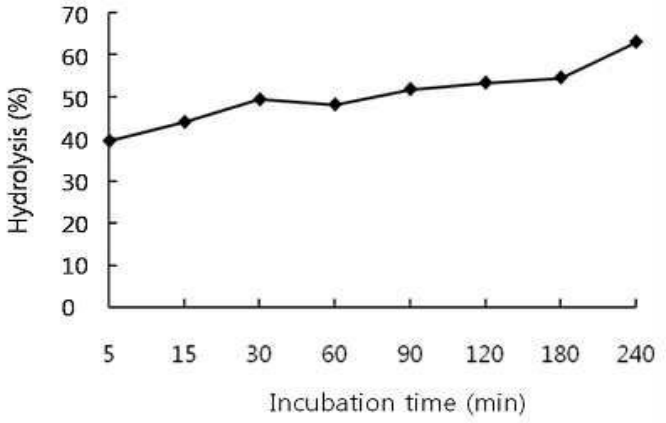
도면5


(A)
Relative activity (%)
Temperature (℃)
(B)
Residual activity (%)
Incubation time (min.)
30 °C
40 °C
50 °C
60 °C

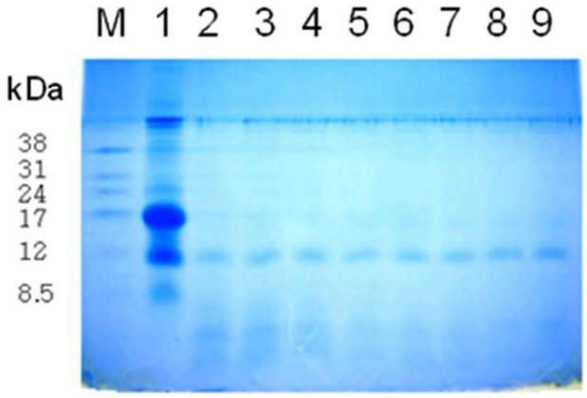
도면6


A
B
C
D

도면7

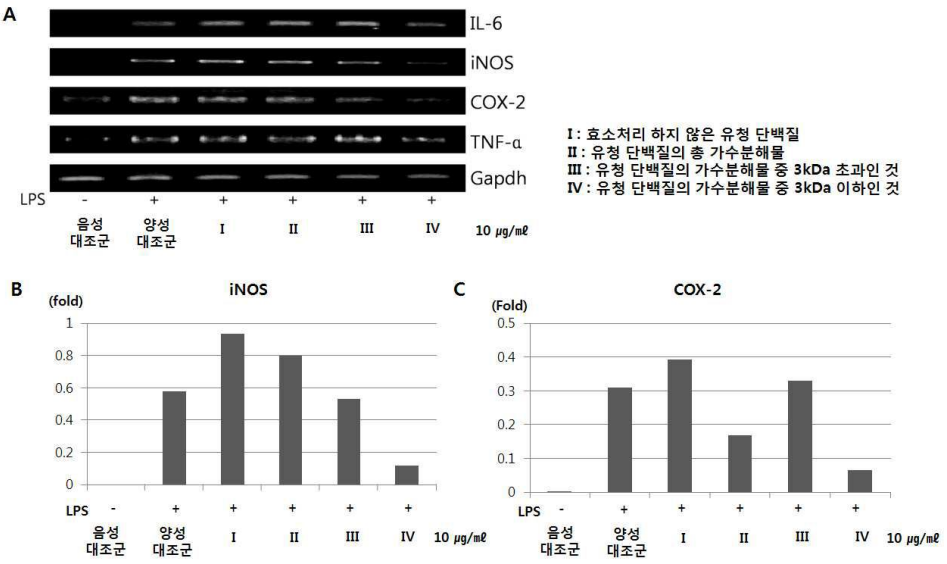

Hydrolysis (%)
70
60
50
40
30
20
10
0
5
15
30
60
90
120
180
240
Incubation time (min)

도면8

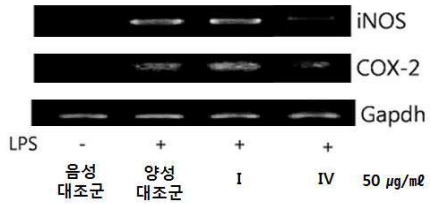


Lane M : 단백질 마커
Lane 1 : 유청단백질 (효소처리하지 않음)
Lane 2 : 유청단백질을 알칼라아제로 5분 동안 효소반응시킨 총 가수분해물
Lane 3 : 유청단백질을 알칼라아제로 15분 동안 효소반응시킨 총 가수분해물
Lane 4 : 유청단백질을 알칼라아제로 30분 동안 효소반응시킨 총 가수분해물
Lane 5 : 유청단백질을 알칼라아제로 60분 동안 효소반응시킨 총 가수분해물
Lane 6 : 유청단백질을 알칼라아제로 90분 동안 효소반응시킨 총 가수분해물
Lane 7 : 유청단백질을 알칼라아제로 120분 동안 효소반응시킨 총 가수분해물
Lane 8 : 유청단백질을 알칼라아제로 180분 동안 효소반응시킨 총 가수분해물
Lane 9 : 유청단백질을 알칼라아제로 240분 동안 효소반응시킨 총 가수분해물

도면9



도면10



I : 효소처리 하지 않은 유청 단백질
IV : 유청 단백질의 가수분해물 중 3kDa 이하인 것

도면11

