



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2015-0065124

(43) 공개일자 2015년06월12일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A23K 1/06 (2006.01) A23K 1/18 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2014-0037217

(22) 출원일자 2014년03월28일

심사청구일자 2014년03월28일

(30) 우선권주장

1020130150179 2013년12월04일 대한민국(KR)

(71) 출원인

고려대학교 산학협력단

서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)

(72) 발명자

김영준

서울특별시 서초구 효령로77길 20, 현대ESA아파트 1107호 (서초동)

김태균

세종특별자치시 조치원읍 충현로 159 옥일아파트 108동 1606호

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

유미특허법인

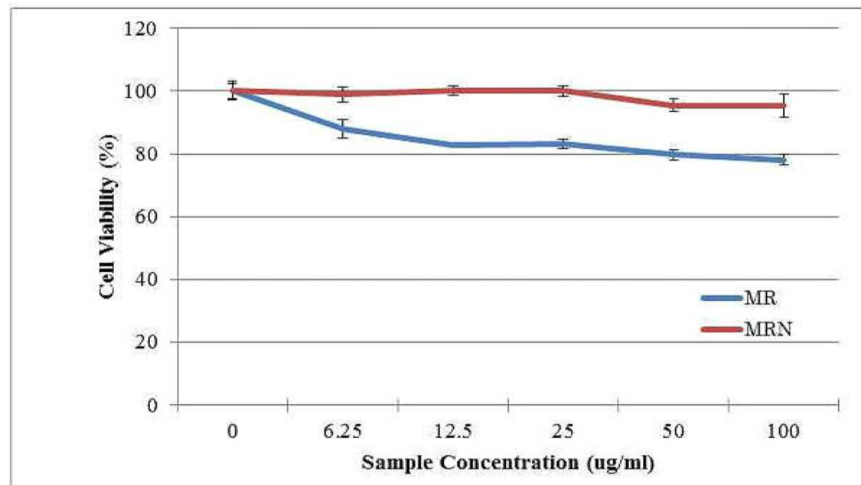
전체 청구항 수 : 총 5 항

(54) 발명의 명칭 막걸리박 추출물의 나노솜을 포함하는 젓소용 사료 첨가제

### (57) 요약

본 발명은 막걸리박 추출물의 나노솜(nanosome)을 포함하는, 젓소용 사료 첨가제 및 이의 제조방법에 관한 것이다.

대표도 - 도1



(72) 발명자

**김형민**

울산광역시 동구 남목7길 36, 3동 108호 (서부동,  
남목우주아파트)

**판정훈**

세종특별자치시 조치원읍 섭골길 45-4

**허완**

세종특별자치시 조치원읍 섭골길 45-4

**정완식**

경기 평택시 평남로 865(비전동)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 PJ008993

부처명 농림수산식품부

연구관리전문기관 농촌진흥청

연구사업명 국제경쟁력 강화를 위한 젖소 전환기 영양조절 및 번식장애 제어를 통한 생산성 향상 기술  
개발

연구과제명 반추위 발효조절 및 사료효율 개선을 통한 젖소의 생산능력 최적화

기 여 율 1/1

주관기관 고려대학교 산학협력단

연구기간 2012.05.01 ~ 2014.12.21

---

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

막걸리박 추출물의 나노솜(nanosome)을 포함하는, 젖소용 사료 첨가제.

#### 청구항 2

제1항에 있어서, 상기 막걸리박 추출물의 나노솜은 막걸리박 추출물을 10,000psi 내지 30,000psi 압력 하에서 나노화 반응을 수행하여 제조한, 첨가제.

#### 청구항 3

제2항에 있어서, 상기 막걸리박 추출물에 레시틴을 첨가하여 나노화 반응을 수행하여 제조한, 첨가제.

#### 청구항 4

제3항에 있어서, 상기 레시틴은 콩, 대두, 대두박, 검정콩, 두부, 낫토, 땅콩, 콩기름, 난황 및 달걀로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상으로부터 유래된 것인, 첨가제.

#### 청구항 5

막걸리박 추출물을 10,000psi 내지 30,000psi 압력 하에서 나노화하여 나노솜을 형성하는 단계를 포함하는, 제1항의 젖소용 사료 첨가제의 제조방법.

### 발명의 설명

#### 기술 분야

[0001] 본 발명은 막걸리박 추출물의 나노솜(nanosome)을 포함하는, 젖소용 사료 첨가제 및 이의 제조방법에 관한 것이다.

#### 배경 기술

[0002] 축산물의 주요 기능은 일반 생명 활동에 필요한 영양소의 공급과 맛, 질감, 향을 통한 미각적 만족이라고 할 수 있으며, 최근 건강관련 생명 기능의 향상을 위한 축산물의 역할과 이를 위한 축산물의 개발에 관심이 증대되고 있다. 구체적으로, 면역 반응의 강화, 질병의 예방, 질병의 치료, 바이오토크의 균형회복 및 노화지연 측면에서의 관심이 증대되고 있으며, 이러한 관점에서 기능성 축산물은 우선 "일반적인 영양소로서의 기능 이외에 건강 관련 기능을 하나 이상 나타낼 수 있는 축산물"로 정의된다. 따라서 영양소와 관련된 건강기능 향진이나 질병 예방뿐만 아니라 건강 기능 저하나 심지어 질병 유발의 가능성을 모두 고려한다면 기능성 축산물은 특정 기능성 성분이나 영양소가 강화된 축산물 뿐만 아니라, 역기능성 성분의 저하를 통해서도 개발될 수 있다.

[0003] 많은 영양소를 포함하고 있는 것으로 알려진 우유의 단백질 함량 증가여부는 여러 요인들에 의해 좌우되는 것으로 알려져 있다. 특히, 우유의 단백질 중 카세인(casein)은 치즈, 단백질 강화식품, 제과/제빵, 요구르트 등의 발효유 및 커피크리머, 아이스크림 믹스 및 케익 토핑 등의 원료로 광범위하게 사용되고 있으며, 젖소의 나이, 비유기간, 계절, 착유시간, 젖소의 생리조건 및 사료 등에 따라 카세인의 함량이 달라지고 이에 따라 생산되는

우유의 품질이 달라지게 된다(식품안전총서 8., 「우유의 카제인과 안전성」, 이광원 지음).

- [0004] 따라서, 우유의 품질을 높이기 위하여 사료 단백질의 소장 내 이용성 즉, 소장에서 흡수되는 아미노산의 양과 필수아미노산의 비율을 개선하는 방안이 보고된 바 있으나, 막걸리박 추출물을 나노화하여 형성된 나노솜(nanosome)을 첨가하는 방안에 대해서는 보고된 바 없다.

## 발명의 내용

### 해결하려는 과제

- [0005] 본 발명의 목적은 막걸리박 추출물의 나노솜(nanosome)을 포함하는, 젖소용 사료 첨가제를 제공하는 것이다.
- [0006] 본 발명의 또 다른 목적은 막걸리박 추출물을 10,000psi 내지 30,000psi 압력 하에서 나노화하여 나노솜을 형성하는 단계를 포함하는, 젖소용 사료 첨가제의 제조방법을 제공하는 것이다.

### 과제의 해결 수단

- [0007] 상기 목적을 달성하기 위한 본 발명의 일구현에는 막걸리박 추출물의 나노솜(nanosome)을 포함하는, 젖소용 사료 첨가제에 관한 것이다.
- [0008] 본 발명에서, '막걸리박'이란, 탁주(막걸리)를 빚은 후 술을 걸러내는 과정에서 나오는 부산물로, 술지게미, 주박 등으로 불린다. 누룩 및 고두밥에 효모를 넣으면 효모가 번식하면서 생성한 효소에 의하여 녹말과 단백질이 분해됨과 동시에 효모에 의하여 알코올 발효가 일어난다. 알코올 발효가 끝난 후 술과 찌꺼기를 분리하는데, 이 때 분리된 술이 막걸리이고, 찌꺼기가 막걸리박이다.
- [0009] 본 발명자들은 막걸리박 추출물을 나노화하여 첨가함으로써 소의 유선세포인 MAC-T 세포주에서의 카제인 생산능력이 증대된 것을 확인하였으며(도 2 및 도 3), 이를 이용하여 우유 생산성을 증가시킬 수 있도록 하였다.
- [0010] 구체적으로, 상기 사료 첨가제에 있어서, 막걸리박 추출물의 나노솜(nanosome)을 0.1중량% 내지 100중량% 포함할 수 있으며, 사료 첨가제에 포함되는 나노솜의 함량은 당해 분야의 통상의 기술자가 용도에 맞게 적절히 조절하여 사용할 수 있다.
- [0011] 또한, 구체적으로 막걸리박 추출물의 나노솜(nanosome)은 막걸리박 추출물을 10,000 psi 내지 30,000 psi 압력 하에서 나노화 반응을 수행하여 제조한 것일 수 있다. 보다 구체적으로, 15,000 psi 내지 25,000 psi의 압력 하에서 나노화 반응을 수행하여 제조할 수 있다. 예를 들어, 막걸리박 추출물을 미세유동기를 이용하여 나노화 반응을 수행할 수 있고, 10,000psi 내지 30,000 psi의 압력 하에서 2회 내지 5회 반응시킬 수 있으며, 바람직하게는 15,000psi 내지 25,000 psi의 압력 하에서 반응시킬 수 있다.
- [0012] 본 발명에서, '나노화 반응'이란, 막걸리박으로부터 추출한 물질에 고압, 고속을 가하여 추출물의 입자를 초미세 나노크기의 입자로 변형시키는 반응을 의미한다.
- [0013] 더욱 구체적으로, 본 발명의 사료 첨가제를 제조함에 있어서, 상기 막걸리박 추출물에 레시틴을 첨가하여 나노화 반응을 수행하여 제조할 수 있으며, 상기 레시틴은 콩, 대두, 대두박, 검정콩, 두부, 낫토, 땅콩, 콩기름, 난황 및 달걀로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상으로부터 유래된 것일 수 있다. 바람직하게 대두박 유래의 레시틴일 수 있다.
- [0014] 본 발명에서, '레시틴'이란, 글리세린 인산을 포함하고 있는 인지질의 하나로서, 생체막을 구성하는 주요 성분이기도 하다. 한 쪽에는 친유성이 강한 지방산기를 가지고 있고 한 쪽에는 친수성이 강한 인산, 콜린 부분을 가지고 있어, 물과 유지의 혼합물을 안정화시켜주는 유화제로서 널리 사용된다. 본 발명 실시예에서는 막걸리박 추출물에 콩을 분쇄하여 기름을 추출하고 남은 부산물인 대두박 유래의 레시틴을 첨가하여 나노화 반응을 수행하여 사료 첨가제를 제조하였으며, 상기 사료 첨가제를 처리하였을 때 카제인 단백질의 발현이 증가하는 것을 확인하였다(도 2 및 도 3).
- [0015] 본 발명의 또 다른 일구현에는, 상기 막걸리박 추출물의 나노솜을 포함하는 사료 첨가제를 전체 사료 중 2 내지 6중량% 포함하는, 젖소용 사료 조성물에 관한 것이다. 상기 사료 첨가제를 전체 사료 중 2중량% 미만으로 포함하는 경우, 카제인 단백질의 생산이 미미하여 품질향상의 효과가 거의 나타나지 않는 문제가 생길 수 있고, 6중

량% 초과로 포함되는 경우, 소화장애 등의 문제가 생길 수 있다.

[0016] 본 발명의 또 다른 일구현예는, 막걸리박 추출물을 10,000psi 내지 30,000psi 압력 하에서 나노화하여 나노솜을 형성하는 단계를 포함하는, 젖소용 사료 첨가제의 제조방법에 관한 것이다.

### 발명의 효과

[0017] 본 발명은 막걸리박 추출물의 나노솜(nanosome)을 포함하는 사료첨가제로서, 유단백 구성요소인  $\alpha$ -카세인(casein)과  $\kappa$ -카세인의 함량을 높여 젖소로부터 생산되는 우유의 품질을 향상시킬 수 있다.

### 도면의 간단한 설명

[0018] 도 1은 소 유래 유선세포인 MAC-T 세포주에 대한 세포 생존율(cell viability)이 나노화 기술을 통해 MR(막걸리박 추출물)의 MRN(막걸리박 추출물 나노솜)에서 세포생존능력이 증대된 것을 나타낸 것이다.

도 2는 소 유래 유선세포인 MAC-T 세포주에 대한 막걸리박 추출물 나노솜의  $\alpha$ -카세인의 생산능력 증대효과를 mRNA 발현량을 통해 나타낸 것이다.

도 3은 소 유래 유선세포인 MAC-T 세포주에 대한 막걸리박 추출물 나노솜의  $\kappa$ -카세인의 생산능력 증대효과를 mRNA 발현량을 통해 나타낸 것이다.

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0019] 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명이 하기 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.

### [0020] 제조예. 막걸리박 추출물 및 이의 나노솜의 준비

[0021] 이물질이 제거된 막걸리박을 5배수의 증류수에 넣고 실온에서 6시간 동안 교반추출한 후, 동결건조기를 이용하여 분말건조화하여 막걸리박 추출물을 준비하였다.

[0022] 또한, 상기 준비된 막걸리박 추출물을 미세유동화기(microfluidizer)를 이용하여 20,000psi의 압력에서 3회 반응시켜서 나노화 반응을 실시하여 나노솜으로 제조하였다. 이 때 반응물의 조성은 막걸리박 추출물 10중량%, 대두박 레시틴 5중량%, 증류수 85중량%이었다.

### [0023] 실험예 1. 소 유래 유선 세포인 MAC-T 세포주에서의 세포 생존율(cell viability) 측정

[0024] MAC-T 세포주는 소 유래 유선 세포로서 젖소에서 우유의 성분을 생산하는 세포이다. 따라서 MAC-T 세포주를 이용한 유단백 생성능 확인 실험에 앞서, 막걸리박 추출물 및 막걸리박 추출물 나노솜을 처리할 경우 MAC-T 세포주의 세포 생존율(cell viability)을 실험하였다.

[0025] 상기 제조예에서 준비한 막걸리박 추출물 및 막걸리박 추출물 나노솜은 증류수로 희석하여 준비하였다. MAC-T 세포주는 96 웰 플레이트에  $1 \times 10^4$  cell/100uL의 세포 농도로 분주하여 24시간을 배양한 후, 각 농도로 준비된 샘플을 6.25, 12.5, 25, 50 및 100 ug/mL의 최 중 농도로 처리한 후 24시간을 반응시켰다. 24시간 반응 후, MTT(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide)용액을 3시간 동안 처리하여 540nm의 파장과 655nm의 reference 파장에서 관찰하였다. 그 결과 소 유래 유선세포인 MAC-T 세포주에 대한 세포 생존율(cell viability)이 막걸리박 추출물의 나노솜을 처리한 경우 향상된 것을 확인할 수 있었다(도 1).

[0026] **실험예 2. 소유래 유선 세포인 MAC-T 세포주에서의 유단백 생성 측정**

[0027] MAC-T 세포주는 우유의 핵심성분 중 하나인 카세인 단백질(casein protein)을 합성한다. 이에 따라  $\alpha$ -카세인(casein)과  $\kappa$ -카세인(casein)의 발현량을 mRNA의 발현량을 분석하여 측정하였다.

[0028] 상기 제조예에서 준비한 막걸리박 추출물과 막걸리박 추출물의 나노솜을 100 ug/mL의 최종농도로 MAC-T 세포주에 처리하여 24시간을 반응시킨 후, 인트론 바이오테크놀로지사의 Easy-BLUE 시약 및 프로토콜(protocol)을 이용한 페놀(phenol)법을 이용하여 mRNA를 추출하였다. 추출된 mRNA는 random primer를 이용한 Applied Biosystems사의 High Capacity cDNA Reverse Transcriptase Kit 이용하여 cDNA를 합성하였다. 합성된 cDNA를 이용하여 real-time PCR(SYBR master mix(Mbiotech사 제)을 이용하여, 50° C에서 2분 반응 후, 95° C에서 10분 반응시키고, 95° C에서 15초 동안 40회 반응시켰다. RT-PCR 후,  $\Delta \Delta C_t$  방법을 이용하여 정량하였다.

[0029] 상기 real-time PCR의 프라이머 염기서열은 다음과 같다.

[0030]  $\alpha$ -카세인 forward primer(서열번호 1): 5' -CTGAGCGTTACCTGGGTATC-3'

[0031]  $\alpha$ -카세인 reverse primer(서열번호 2): 5' -GAAGTCGTTCTCAGCACTATT-3'

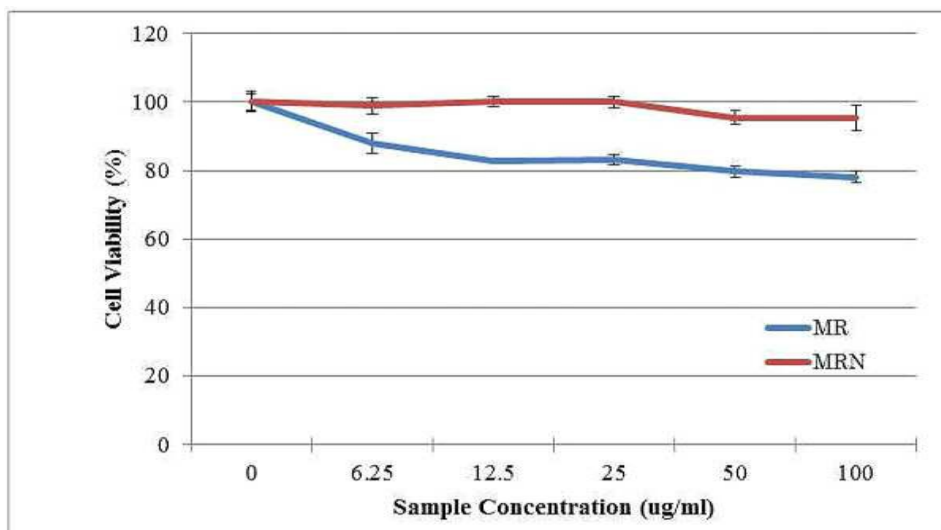
[0032]  $\kappa$ -카세인 forward primer(서열번호 3): 5' -GAAAGGCCAACTGAACCTACT-3'

[0033]  $\kappa$ -카세인 reverse primer(서열번호 4): 5' -CAGGGTTAATGCCAGGATAGTC-3'

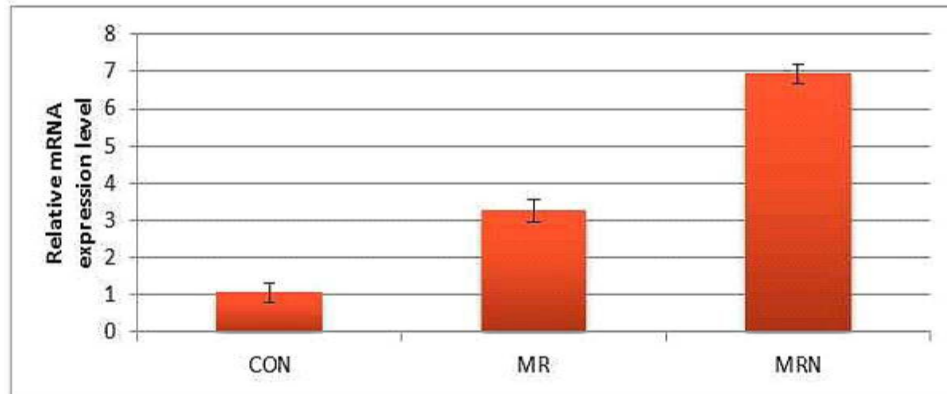
[0034] 상기 real-time PCR을 이용하여  $\alpha$ -카세인과  $\kappa$ -카세인의 발현량을 분석하였다. 항존유전자(Housekeeping gene)로는 GAPDH 유전자(forward primer(서열번호 5) : 5'-GATGCTGGTGCTGAGTATGT-3', reverse primer(서열번호 6): 5'-GCAGAAGGTGCAG AGATGAT-3')를 사용하였다. 그 결과 막걸리박 추출물의 나노솜을 처리한 경우,  $\alpha$ -카세인의 생산이 증가하는 것을 확인하였으며(도 2),  $\kappa$ -카세인의 생산 역시 증가하는 것을 확인하였다(도 3).

**도면**

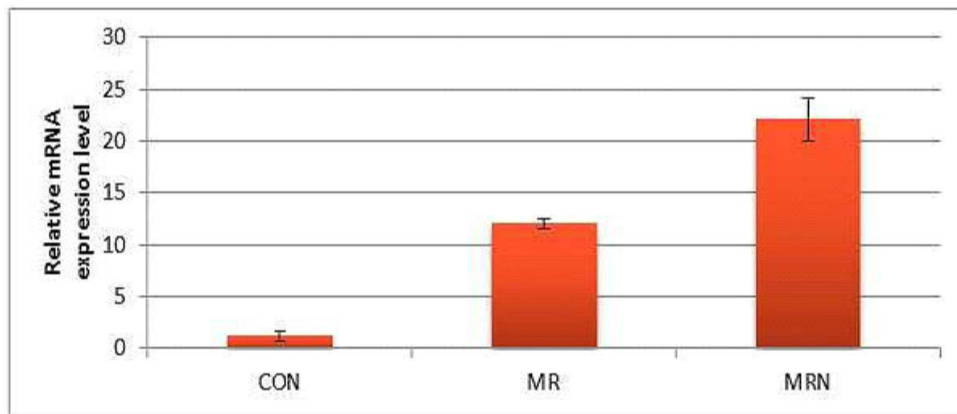
**도면1**



도면2



도면3



## 서열 목록

- <110> KOREA UNIVERSITY RESEARCH AND BUSINESS FOUNDATION
- <120> Animal feed additive for milk cow comprising nanosome of  
makgeolli byproduct extracts
- <130> DPP20141311KR
- <160> 6
- <170> KopatentIn 1.71
- <210> 1
- <211> 21
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence
- <220><223> alpha-casein forward primer
- <400> 1  
ctgagcgtta cctgggttat c
- <210> 2

|            |                             |    |
|------------|-----------------------------|----|
| <211>      | 22                          |    |
| <212>      | DNA                         |    |
| <213>      | Artificial Sequence         |    |
| <220><223> | alpha-casein reverse primer |    |
| <400>      | 2                           |    |
|            | gaagtcgttc ctcagcacta tt    | 22 |
| <210>      | 3                           |    |
| <211>      | 21                          |    |
| <212>      | DNA                         |    |
| <213>      | Artificial Sequence         |    |
| <220><223> | kappa-casein forward primer |    |
| <400>      | 3                           |    |
|            | gaaaggccaa ctgaacctac t     | 21 |
| <210>      | 4                           |    |
| <211>      | 22                          |    |
| <212>      | DNA                         |    |
| <213>      | Artificial Sequence         |    |
| <220><223> | kappa-casein reverse primer |    |
| <400>      | 4                           |    |
|            | cagggttaat gccaggatag tc    | 22 |
| <210>      | 5                           |    |
| <211>      | 20                          |    |
| <212>      | DNA                         |    |
| <213>      | Artificial Sequence         |    |
| <220><223> | GAPDH forward primer        |    |
| <400>      | 5                           |    |
|            | gatgctggtg ctgagtatgt       | 20 |
| <210>      | 6                           |    |
| <211>      | 20                          |    |
| <212>      | DNA                         |    |
| <213>      | Artificial Sequence         |    |
| <220><223> | GAPDH reverse primer        |    |
| <400>      | 6                           |    |

gcagaaggtg cagagatgat

20