(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2018-0132325
(43) 공개일자 2018년12월12일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 14/435 (2006.01) *A23L 33/18* (2016.01)
A61K 38/00 (2006.01) *C07K 1/12* (2006.01)
(52) CPC특허분류
C07K 14/43563 (2013.01)
A23L 33/18 (2016.08)
(21) 출원번호 10-2017-0069110
(22) 출원일자 2017년06월02일
심사청구일자 2017년06월02일

(71) 출원인
계명대학교 산학협력단
대구광역시 달서구 달구벌대로 1095, 계명대학교 산학협력관 201호(신당동)
(72) 발명자
이승욱
대구광역시 달성군 다사읍 대실역북로 26, 207동 102호 (대실역청아람2단지아파트)
이효선
경상북도 포항시 남구 송림로56번길 17-7 (송도동)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인태백

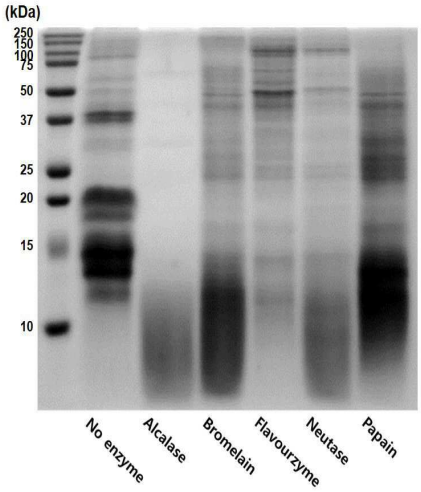
전체 청구항 수 : 총 11 항

(54) 발명의 명칭 **장수풍뎅이(Allomyrina dichotoma) 유충의 단백 가수분해물, 이의 제조방법 및 이를 포함하는 조성물**

(57) 요 약

본 발명은 단백질 가수분해효소인 알칼라아제(Alcalase)를 처리하여 가수분해된 장수풍뎅이(*Allomyrina dichotoma*) 유충의 단백 가수분해물, 이를 포함하는 약학 조성물 또는 건강기능식품 조성물, 또는 이의 제조방법에 관한 것으로, 특정한 효소를 사용함으로써, 다양한 생리 활성 및 기능성을 나타내는 저분자 펩타이드가 포함된 단백 가수분해물을 제조할 수 있고, 본 발명에 따른 장수풍뎅이 유충의 단백 가수분해물은 항산화 효과, 세포 스트레스 감소 효과, 간세포 보호효과 내지는 지방 전구세포 분화 억제 효과를 나타내므로, 다양한 용도의 조성물로 활용될 수 있다.

대 표 도 - 도2



(52) CPC특허분류
A61K 38/00 (2013.01)
C07K 1/12 (2013.01)
C12Y 304/21062 (2013.01)
A23V 2002/00 (2013.01)
A23V 2200/322 (2013.01)
(72) 발명자
류희정
대구광역시 달서구 월배로34길 27, 101동 1403호
(상인동, 상인삼미아파트)

송현지
경상북도 칠곡군 북삼읍 외율4길 2

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 PJ012284012017
부처명 농촌진흥청
연구관리전문기관 국립농업과학원
연구사업명 공동연구사업
연구과제명 곤충 단백질로부터 비소세포폐암에 대한 표적 항암 펩타이드 개발
기 여 율 1/1
주관기관 계명대학교
연구기간 2017.01.01 ~ 2017.12.31

명 세 서

청구범위

청구항 1

단백질 가수분해효소인 알칼라아제(Alcalase)를 처리하여 가수분해된 장수풍뎅이(*Allomyrina dichotoma*) 유충의 단백 가수분해물.

청구항 2

제 1 항에 있어서, 상기 단백 가수분해물은 단백질 가수분해효소인 뉴트라아제(Neutrase) 또는 플라보르자임(Flavourzyme)이 더 처리된 것을 특징으로 하는 장수풍뎅이 유충의 단백 가수분해물.

청구항 3

제 1 항에 있어서, 상기 단백 가수분해물은 0.11 kDa 이상 3 kDa 이하의 펩타이드를 포함하는 것을 특징으로 하는 장수풍뎅이 유충의 단백 가수분해물.

청구항 4

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서, 상기 단백 가수분해물은 항산화 효과, 간세포 보호 효과, 스트레스 감소 효과 또는 지방 전구세포 분화 억제 효과를 나타내는 것을 특징으로 하는 장수풍뎅이 유충의 단백 가수분해물.

청구항 5

제 1 항 또는 제 2 항에 따른 장수풍뎅이 유충의 단백 가수분해물을 포함하는 건강기능식품 조성물.

청구항 6

제 5 항에 있어서, 상기 건강기능식품 조성물은 항산화용, 간 보호용 또는 스트레스 감소용으로 사용되는 것을 특징으로 하는 건강기능식품 조성물.

청구항 7

제 1 항 또는 제 2 항에 따른 장수풍뎅이 유충의 단백 가수분해물을 포함하는 비만 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 8

제 1 항 또는 제 2 항에 따른 장수풍뎅이 유충의 단백 가수분해물을 포함하는 비만 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물.

청구항 9

(a) 기질인 건조된 장수풍뎅이(*Allomyrina dichotoma*) 유충의 분말을 물 또는 완충용액에 1 내지 10%(w/v)로 혼합하여 기질 용액을 제조하는 단계; (b) 상기 기질 용액을 가열하여 기질 용액에 포함된 자가 효소를 불활성화하는 단계; (c) 상기 기질 용액에 단백질 가수분해효소를 장수풍뎅이 유충 분말 대비 0.1 내지 5%(w/v)가 되도록 혼합하고 반응시켜 반응 혼합액을 제조하는 단계; (d) 상기 반응 혼합액을 가열함으로써 단백질 가수분해효소를 불활성화시켜 반응이 완료된 혼합액을 얻는 단계; (e) 상기 단계 (d)에서 얻어진 혼합액을 원심분리하여 상등액을 취하는 단계; 및 (f) 상기 상등액으로부터 중량 평균 분자량이 0.11 kDa 이상 3 kDa 이하인 펩타이드가 포함된 단백 가수분해물을 분리하는 단계;를 포함하는 장수풍뎅이 유충의 단백 가수분해물 제조방법.

청구항 10

제 9 항에 있어서, 상기 단백질 가수분해효소는 알칼라아제(Alcalase)인 것을 특징으로 하는 장수풍뎅이 유충의 단백 가수분해물 제조방법.

청구항 11

제 10 항에 있어서, 상기 단백질 가수분해효소는 뉴트라아제(Neutrase) 또는 플라보르자임(Flavourzyme)을 더 포함하는 것을 특징으로 하는 장수풍뎅이 유충의 단백 가수분해물 제조방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 장수풍뎅이 유충의 단백 가수분해물, 이의 제조방법 및 이를 포함하는 약학 조성물 또는 건강기능식품 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 최근 국제식량농업기구(FAO)에서는 질병이나 환경오염으로 인한 식량부족 문제를 해결하기 위한 정책으로 미래 식량자원으로서의 식용곤충의 활성화방안을 발표한 바 있고, 이에 대한 관심이 전 세계적으로 증대되고 있다. 이와 발맞추어 국내에서는 농림수산식품부가 "곤충산업육성 5개년 종합계획"을 발표하였고, 그에 따라 곤충 산업에 대한 지원이 이루어져 왔다.

[0003] 곤충은 약 100만 종 이상 보고되었음에도 100만 종 이상이 아직 보고되지 않은 상태로 남아있다고 예측될 정도로 지구상에서 가장 다양성이 풍부한 종이다. 예로부터 곤충은 약용으로 사용해 왔으며, 그 중 누에, 메뚜기, 흰점박이꽃무지 유충(굼벵이), 지네 등은 당뇨, 염증성 질환, 간질환 및 동맥경화 등의 만성 질환 치료에 효과적이라는 연구결과가 보고되었다.

[0004] 상기 식용곤충의 하나인 장수풍뎅이는 장수풍뎅이(학명: *Allomyrina dichotoma*)는 딱정벌레목(Coleoptera), 장수풍뎅이과(Family Dynastidae)에 속하는 곤충으로 장수풍뎅이의 애벌레인 장수애가 간 질환에 효과가 있다는 민간요법이 알려지면서 이를 건강보조용 약재로 이용하는 예가 늘어나고 있다. 또한, 장수풍뎅이에서 분리한 단백질이 세균에 대해 강한 활성 억제를 보이며, 장수풍뎅이에서 추출한 렉틴은 강력한 항암능력을 보여 항암효과를 기대할 수 있다고 보고되었고, 사염화탄소로 간독성을 유발한 쥐에 대한 간 보호 효과를 확인한 논문이 보고되었다.

[0005] 한편, 생리활성 펩타이드는 일반적으로 생리적 활성을 가지는 분자량이 작은 펩타이드로 정의되며, 보통 3-20개의 아미노산으로 구성된 저분자이고 아미노산의 조성이나 서열에 따라 그 활성이 다양하다. 특히 1 kDa 이하로 크기가 아주 작은 펩타이드는 생체 내로 쉽게 흡수될 뿐만 아니라 생체 내 다양한 소화 효소들에 대한 저항성이 높아 기능성 펩타이드로서의 가치 및 활용 가능성이 높다. 지금까지 연구된 생리활성 펩타이드의 효과로는 우유 단백질 가수분해물의 체내 항산화 기능 향상과 가공 식품에서의 산화 반응 방지, 달걀흰자 가수분해물의 새로운 항균 펩타이드 등이 있으며, 그 외에도 항 고혈압, 항 혈전, 면역 조절 등의 생리활성 펩타이드의 기능성 연구가 활발하게 진행되고 있다.

[0006] 그러나 아직까지 장수풍뎅이 유충에서 얻을 수 있는 생리활성 펩타이드에 대한 연구는 미비한 실정이다.

선행기술문헌

특허문헌

[0007] (특허문헌 0001) 한국등록특허 제10-1480158호(2014.12.31 등록).

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명의 목적은 다양한 생리활성을 나타내는 저분자량 펩타이드가 포함된 단백 가수분해물을 제공하는 것이다.

[0009] 본 발명의 다른 목적은 다양한 생리활성을 나타내는 저분자량 펩타이드가 포함된 단백 가수분해물을 유효성분으로 함유하는 조성물을 제공하는 것이다.

[0010] 본 발명의 또 다른 목적은 다양한 생리활성을 나타내는 저분자량 펩타이드가 포함된 단백 가수분해물의 제조방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0011] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 단백질 가수분해효소인 알칼라아제(Alcalase)를 처리하여 가수분해된 장수풍뎅이(*Allomyrina dichotoma*) 유충의 단백 가수분해물을 제공한다.

[0012] 상기 다른 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 상기 장수풍뎅이 유충의 단백 가수분해물을 포함하는 건강기능식품 조성물을 제공한다.

[0013] 또한, 본 발명은 상기 장수풍뎅이 유충의 단백 가수분해물을 포함하는 비만 예방 또는 치료용 약학 조성물 또는 비만 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물을 제공한다.

[0014] 상기 또 다른 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 (a) 기질인 건조된 장수풍뎅이(*Allomyrina dichotoma*) 유충의 분말을 물 또는 완충용액에 1 내지 10%(w/v)로 혼합하여 기질 용액을 제조하는 단계; (b) 상기 기질 용액을 가열하여 기질 용액에 포함된 자가 효소를 불활성화하는 단계; (c) 상기 기질 용액에 단백질 가수분해효소를 장수풍뎅이 유충 분말 대비 0.1 내지 5%(w/v)가 되도록 혼합하고 반응시켜 반응 혼합액을 제조하는 단계; (d) 상기 반응 혼합액을 가열함으로써 단백질 가수분해효소를 불활성화시켜 반응이 완료된 혼합액을 얻는 단계; (e) 상기 단계 (d)에서 얻어진 혼합액을 원심분리하여 상등액을 취하는 단계; 및 (f) 상기 상등액으로부터 중량 평균 분자량이 0.11 kDa 이상 3 kDa 이하인 펩타이드가 포함된 단백 가수분해물을 분리하는 단계;를 포함하는 장수풍뎅이 유충의 단백 가수분해물 제조방법을 제공한다.

발명의 효과

[0015] 본 발명의 장수풍뎅이 유충 단백 가수분해물은 특정 효소를 처리함으로써 3 kDa 이하의 생리활성 펩타이드를 다량 포함하고 있어, 항산화 효과가 뛰어나고, 지방 전구세포의 분화를 억제하는 효과를 나타내며, 활성 산소로부터 간 세포를 보호할 수 있으므로, 다양한 용도의 조성물로 유용하게 활용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0016] 도 1은 본 발명의 하나의 실시예에 따른 장수풍뎅이 유충의 처리 효소별 단백질 가수분해도를 나타낸 그래프이다.

도 2는 도 1의 실시예에 따른 장수풍뎅이 유충의 처리 효소별 단백질 가수 분해 패턴을 나타낸 결과이다.

도 3은 본 발명의 다른 하나의 실시예에 따른 장수풍뎅이 유충의 알칼라아제, 뉴트라아제 및 플라보르자임 처리 단백 가수분해물의 간세포에서 과산화수소(H_2O_2) 제거 활성을 확인한 결과이다.

도 4는 본 발명의 또 다른 하나의 실시예에 따른 장수풍뎅이 유충의 알칼라아제 처리 단백 가수분해물의 지방 전구세포 분화 억제 활성을 확인한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0017] 이하, 본 발명을 보다 상세히 설명한다.

[0018] 본 발명은 단백질 가수분해효소인 알칼라아제(Alcalase)를 처리하여 가수분해된 장수풍뎅이(*Allomyrina dichotoma*) 유충의 단백 가수분해물을 제공한다.

[0019] 본 발명에서 "알칼라아제(Alcalase)"는 박테리아나 진균에서 생성되는 단백질 가수분해 효소로, pH 7-9 부근의 조건에서 강한 단백질 분해능을 나타낼 수 있다.

[0020] 본 발명의 일 실시예에서, 장수풍뎅이 유충에 알칼라아제를 처리하여 얻은 단백 가수분해물은 가용 아미노기(available amino group)들을 가장 많이 함유하여, 즉, 가수분해도가 가장 높아, 3 kDa 이하의 펩타이드 중에서도 특히 상대적으로 저분자 펩타이드의 양을 가장 많이 함유하고 있었고, 또한 3 kDa 이하의 총 펩타이드 제조 수율이 가장 우수했으므로, 알칼라아제는 다양한 기능을 나타내는 단백 가수분해물을 제조하는 데에 필수적이다.

[0021] 상기 단백 가수분해물은 단백질 가수분해효소인 뉴트라아제(Neutrase) 또는 플라보르자임(Flavourzyme)이 더 처

리될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0022] 본 발명에서 "뉴트라아제(Neutrase)"는 바실러스 균에서 얻을 수 있는 단백질 가수분해 효소로, pH 5.5-7.5 부근의 조건에서 단백질 내부의 펩타이드 결합을 가수분해함으로써 단백질 분해능을 나타낼 수 있다.

[0023] 본 발명에서 "플라보르자임(Flavourzyme)"은 진균류에서 얻을 수 있는 단백질 가수분해 효소로, pH 6-7 부근의 조건에서 단백질 분해능을 나타낼 수 있다.

[0024] 상기와 같이, 여러 가지의 단백질 분해효소가 장수풍뎅이 유충에 처리됨으로써 저분자 펩타이드의 수율뿐만 아니라 가수분해도 자체를 높이고 가수분해물 제조수율을 향상시킬 수 있으므로 바람직하다.

[0025] 이때, 상기 단백 가수분해물은 0.11 kDa 이상 3 kDa 이하의 펩타이드를 포함할 수 있고, 더욱 바람직하게는 0.11 kDa 이상 1 kDa 이하의 펩타이드를 포함할 수 있는 바, 상기 펩타이드는 생리활성 펩타이드로도 불릴 수 있다.

[0026] 이와 같이 생리활성 펩타이드를 포함하고 있으므로, 상기 단백 가수분해물은 항산화 효과, 간세포 보호 효과, 스트레스 감소 효과 또는 지방 전구세포 분화 억제 효과를 나타낼 수 있다. 즉, 본 발명의 일 실시예에서 알칼라아제의 단백 가수분해물은 항산화 효과, 세포의 스트레스 감소 효과 내지 지방 전구세포 분화 억제 활성을 나타내었고, 본 발명의 다른 일 실시예에서 알칼라아제, 뉴트라아제 및 플라보르자임의 단백 가수분해물은 간세포 보호 효과를 나타낸 바, 특히 우수한 보호 효과를 나타낸 플라보르자임을 더 처리함으로써 상기 항산화 효과, 지방 전구세포 분화 억제 효과 외에 간세포를 보호하는 기능을 효과적으로 나타낼 수 있다.

[0027] 더욱이, 본 발명은 상기 장수풍뎅이 유충의 단백 가수분해물을 포함하는 건강기능식품 조성물을 제공한다.

[0028] 이때, 상기 건강기능식품 조성물은 항산화용, 간 보호용 또는 스트레스 감소용으로 사용될 수 있다.

[0029] 또한, 본 발명은 상기 장수풍뎅이 유충의 단백 가수분해물을 포함하는 비만 예방 또는 치료용 약학 조성물 내지는 비만 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물을 제공한다.

[0030] 즉, 상기 단백 가수분해물이 생리활성 펩타이드를 포함하고 있으므로, 이를 유효성분으로 포함하는 상기 조성물들은 뛰어난 항산화 효과, 활성 산소로부터의 간 보호 효과, 세포의 스트레스를 감소시키는 효과 또는 지방 전구세포의 분화를 억제하는 효과를 나타내는 바, 다양한 용도의 건강기능식품 조성물로 활용될 수 있고, 또한 보다 안전하고 효율적으로 비만을 예방, 개선 또는 치료할 수 있다.

[0031] 상기 약학 조성물은 투여를 위하여, 상기 기재한 유효성분 이외에 약학적으로 허용 가능한 담체, 부형제 또는 희석제를 포함할 수 있다. 상기 담체, 부형제 및 희석제로는 락토오스, 덱스트로오스, 수크로오스, 소르비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로오스, 메틸 셀룰로오스, 미정질 셀룰로오스, 폴리비닐피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 들 수 있다.

[0032] 본 발명의 약학 조성물은 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀젼, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 또는 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용할 수 있다. 상세하게는 제형화할 경우 통상 사용하는 충진제, 중량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제될 수 있다.

[0033] 경구투여를 위한 고형 제제로는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다. 이러한 고형 제제는 상기 장수풍뎅이 유충의 단백 가수분해물에 적어도 하나 이상의 부형제, 예를 들면, 전분, 칼슘 카보네이트, 수크로오스, 락토오스, 젤라틴 등을 섞어 조제될 수 있다. 또한, 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트, 탈크 같은 윤활제들도 사용될 수 있다. 경구를 위한 액상물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등을 첨가하여 조제될 수 있다.

[0034] 비경구 투여를 위한 제제는 멸균된 수용액, 비수성 용제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제 및 과제를 포함한다. 비수성 용제 및 현탁제로는 프로필렌글리콜, 폴리에틸렌글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 오일, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텝솔, 마크로솔, 트윈 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로젤라틴 등이 사용될 수 있다.

[0035] 상기 약학 조성물의 적합한 투여량은 환자의 상태 및 체중, 질병의 정도, 약물형태, 시간에 따라 다르지만, 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다.

[0036] 상기 건강기능식품 조성물은 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 더 함유할 수 있고, 그밖에 천연 과일 주스, 합성 과일 주스 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 더 함유할 수 있다. 이러한 성분은 독립적으로 또는 조합하여 사용될 수 있다.

[0037] 또한, 건강기능식품 조성물은 식품첨가물을 추가로 포함할 수 있으며, "식품첨가물"로서의 적합 여부는 다른 규정이 없는 한 식품의약품 안정청에 승인된 식품첨가물공전의 총칙 및 일반 시험법 등에 따라 해당 품목에 관한 규격 및 기준에 의하여 판정한다.

[0038] 상기 "식품첨가물공전"에 수재된 품목으로 예를 들어, 케톤류, 글리신, 구연산 칼륨, 니코틴산, 계피산 등의 화학적 합성품, 감색소, 감초추출물, 결정셀룰로오스, 고랭색소, 구아검 등의 천연첨가물, L-글루타민산나트륨 제제, 면류 첨가 알칼리제, 보존료제제, 타르색소 제제 등의 혼합 제제류 등을 들 수 있다.

[0039] 상기 건강기능식품 조성물은 육류, 소세지, 빵, 초콜릿, 캔디류, 스넥류, 과자류, 피자, 라면, 껌류, 아이스크림류, 스프, 음료수, 차, 기능수, 드링크제, 알코올 및 비타민 복합제 중 어느 하나의 형태일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0040] 이때, 건강기능식품 조성물을 제조하는 과정에서 식품에 첨가되는 본 발명에 따른 장수풍뎅이 유충의 단백 가수분해물은 필요에 따라 그 함량을 적절히 가감할 수 있다.

[0041] 더불어, 본 발명은 (a) 기질인 건조된 장수풍뎅이(*Allomyrina dichotoma*) 유충의 분말을 물 또는 완충용액에 1 내지 10%(w/v)로 혼합하여 기질 용액을 제조하는 단계; (b) 상기 기질 용액을 가열하여 기질 용액에 포함된 자가 효소를 불활성화하는 단계; (c) 상기 기질 용액에 단백질 가수분해효소를 장수풍뎅이 유충 분말 대비 0.1 내지 5%(w/v)가 되도록 혼합하고 반응시켜 반응 혼합액을 제조하는 단계; (d) 상기 반응 혼합액을 가열함으로써 단백질 가수분해효소를 불활성화시켜 반응이 완료된 혼합액을 얻는 단계; (e) 상기 단계 (d)에서 얻어진 혼합액을 원심분리하여 상등액을 취하는 단계; 및 (f) 상기 상등액으로부터 중량 평균 분자량이 0.11 kDa 이상 3 kDa 이하인 펩타이드가 포함된 단백 가수분해물을 분리하는 단계;를 포함하는 장수풍뎅이 유충의 단백 가수분해물 제조방법을 제공한다.

[0042] 이때, 바람직하게는 상기 단계 (a)에서 건조된 장수풍뎅이 유충 분말을 물 또는 완충용액에 3 내지 7%(w/v)로 혼합하여 기질 용액을 제조할 수 있고, 보다 바람직하게는 4%(w/v)로 혼합하여 기질 용액을 제조할 수 있다.

[0043] 상기 완충용액은 바람직하게는 인산 나트륨 버퍼일 수 있다.

[0044] 또한, 바람직하게는 상기 단계 (c)에서 단백질 가수분해효소를 장수풍뎅이 유충 분말 대비 0.5 내지 3%(w/v)가 되도록 혼합하여 혼합액을 제조할 수 있고, 보다 바람직하게는 1%(w/v)로 혼합하여 혼합액을 제조할 수 있다.

[0045] 이때, 상기 단백질 가수분해효소는 알칼라아제(Alcalase)일 수 있는 바, 상기 알칼라아제를 처리함으로써 기능성이 뛰어난 저분자량 펩타이드를 얻거나, 또는 높은 제조 수율의 가수분해물을 얻을 수 있으므로 바람직하다.

[0046] 또한, 상기 단백질 가수분해효소는 뉴트라아제(Neutrase) 또는 플라보르자임(Flavourzyme)을 더 포함할 수 있는 바, 여러 가지의 단백질 가수분해효소를 장수풍뎅이 유충에 처리함으로써 저분자 펩타이드의 수율뿐만 아니라 가수분해도 자체를 높이고 가수분해물 제조 수율을 향상시킬 수 있다.

[0047] 더욱이, 상기 단계 (b) 또는 단계 (d)에서 상기 반응 혼합액을 60℃ 내지 120℃에서 가열함으로써 자가 효소 또는 단백질 가수분해 효소를 불활성화시킬 수 있고, 바람직하게는 75℃ 내지 110℃, 보다 바람직하게는 90℃ 내지 100℃에서 가열함으로써 자가 효소 또는 단백질 가수분해 효소를 불활성화시킬 수 있다.

[0048] 또한, 상기 단계 (f)에서, 상기 펩타이드는 한외여과막을 이용하여 분리되거나, 원심분리를 통해 분리될 수 있다.

[0049] 더욱 바람직하게는 상기 단계 (f)에서 분리된 상기 단백 가수분해물은 중량 평균 분자량이 0.11 kDa 이상 1 kDa 이하인 펩타이드를 포함할 수 있다.

[0051] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 실시예를 들어 상세하게 설명하기로 한다. 다만 하기의 실시예는 당업계에서 평균적인 지식을 가진 자에게 본 발명을 보다 완전하게 설명하기 위해 제공되는 것이며 본 발명의 내용을 예

시하는 것일 뿐이므로 본 발명의 범위가 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0053] **<준비예 1> 시료의 준비**

[0054] 실험을 위해, 경북 고령의 한 농장으로부터 구입한 장수풍뎅이 유충을 동결건조한 후 동결고에 보관하며 실험에 사용하였다. 또한, 모든 실험 데이터는 최소 3번 반복하여 평균과 표준오차(평균±표준오차)로 나타내었으며, 통계 분석을 위해 SPSS Statistics 23(Version 23.0, Inc, Chicago, IL, USA)가 사용되었다. 그룹 간의 유의성 차이 검증에는 일원 배치 분산 분석(One-way ANOVA)을 사용하였으며, Scheffe의 다중 범위 검정 방법을 통한 사후 검증을 시행하였다. 유의확률(P-value)이 0.05 미만인 경우 통계적으로 유의한 것으로 판단하였다.

[0056] **<실시예 1> 장수풍뎅이 유충 단백질 가수분해물의 제조**

[0057] 상기 준비예 1에서 준비한 동결 건조된 장수풍뎅이 유충 분말을 10 mM 인산나트륨 버퍼(pH 7.0)에 용해하여 4%(w/v)의 기질 용액으로 제조한 후, 90℃에서 20분 동안 자가 효소를 불활성화시켰다. 다음 기질 대비 단백질 가수분해 효소들(알칼라아제(alcalase), 뉴트라아제(neutrase), 플라보르자임(flavourzyme), 브로멜라인(bromelain), 파파인(papain))이 1%(w/v)이 되도록 각 효소들을 처리하고, 각 효소별 최적온도인 55℃에서 24시간 반응시켰다. 이때, 각 펩타이드들을 대상으로 트리니트로벤젠설폰산(Trinitrobenzenesulfonic acid, TNBS) 방법 및 SDS-전기영동을 수행하기 위해 시간별로 반응혼합액 5 mL씩 채취하였다. 24시간 이후, 최종 반응혼합액을 90℃에서 20분간 가열시켜 효소를 불활성화시켰다. 그 후 반응액을 13,000 xg에서 20분 동안 원심분리하여 상등액을 얻었으며, 상등액을 추가적으로 원심분리용 한외여과막이 설치되어 있는 원심분리기를 이용하여 2시간 동안 원심분리(5,000 xg)함으로써 최종적으로 분자량 3 kDa 이하의 단백 가수분해물을 얻었다. 이렇게 얻어진 단백 가수분해물은 동결건조한 후 -80℃에 보관하면서 실험에 사용되었다.

[0059] **<실시예 2> 장수풍뎅이 유충 단백질 가수분해물의 물리적 특성 확인**

[0060] **(1) 단백질의 가수분해도 측정**

[0061] 상기 효소들에 의해 얼마만큼의 장수풍뎅이 유충 단백질이 가수분해 되는지를 확인하기 위해, 트리니트로벤젠설폰산(Trinitrobenzenesulfonic acid, TNBS) 방법(G-Biosciences Co.)을 이용하여 시간에 따른 장수풍뎅이 유충 단백 가수분해물에서 펩타이드의 함량을 측정하였다. 단백질이 가수분해되면 가수분해도에 비례하여 가용성 아미노기의 농도가 증가하는 원리를 이용하였다.

[0062] 구체적으로, 상기 실시예 1과 같이 다섯 종류의 효소 및 기질 혼합액을 제조한 후 0, 2, 4, 6, 8 및 12시간마다 시간에 따른 장수풍뎅이 유충 단백질의 가수분해도를 측정하였다. 즉, 10 mM 중탄산나트륨(sodium bicarbonate; pH 8.5) 990 ㎕와 1% TNBS 10 ㎕를 혼합(v/v)하여 0.01% TNBS를 제조하고, TNBS 50 ㎕와 시간별로 취한 반응혼합액 100 ㎕를 섞어 37℃에서 2시간 반응시킨 후 반응을 정지시키기 위해 10% 도데실 황산나트륨(sodium dodecylsulfate; 10% SDS)과 1N 염화수소(hydrogen chloride; 1N HCl)를 첨가하였다. 그리고 마이크로플레이트 분광 광도계(microplate spectrophotometer)를 이용하여 335 nm에서 각 혼합액들의 흡광도를 측정하였다. 이후 각 시간별/효소별 가수분해도를 타이로신을 표준물질로 사용하여 작성한 표준곡선으로부터 환산하였다.

[0063] 그 결과, 도 1에 나타난 바와 같이, 알칼라아제가 월등히 우수한 가수분해도를 나타냈고, 다음으로 뉴트라아제 및 플라보르자임이 그 뒤를 이었으며, 브로멜라인과 파파인의 경우에는 효소를 처리하지 않은 대조군과 유사할 정도로 가수분해도가 현저히 낮았다.

[0064] 따라서, 이러한 결과로부터 장수풍뎅이 유충으로부터 저분자 펩타이드를 제조하기 위해서는 알칼라아제가 사용하기에 가장 적합한 단백분해효소이며, 그 다음으로 뉴트라아제 및 플라보르자임 효소가 이용될 수 있고, 또한 상기 세 가지 효소를 병용하여 가수분해도를 더 높일 수 있을 것임을 알 수 있었다.

[0065] **(2) 나트륨 도데실 설폰산염 폴리아크릴아미드 겔 전기영동(Sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)**

[0066] 단백질 가수분해효소 종류에 따른 장수풍뎅이 유충의 펩타이드를 확인하기 위해, 단백질의 SDS-PAGE 패턴을 측정하여 각각의 가수분해물에서 나타난 단백질의 분해 패턴을 조사하였다. SDS-PAGE은 Laemmli(Laemmli, UK.

1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. nature 227: 680-685.)의 방법으로 실시하였으며, 사용된 분리 겔은 15%를 사용하였고, 가수분해된 단백질에서 12000 rpm, 4℃, 10분 원심분리 후 상등액 20 ㎕을 겔에 로딩하여 80V에서 약 2시간 전기 영동하였다. 이후, 쿠마시 브릴리언트 블루(coomassie brilliant blue)를 사용하여 밴드들을 염색하고 10% 아세트산이 함유된 30% 메탄올을 이용하여 탈색하였다. 대조군으로는 효소를 처리하지 않은 기질용액을 사용하였고, 단백질 패턴의 분석은 Gel Logic 2200 PRO를 이용하여 폴리아크릴아미드 겔을 스캐닝한 후 이미지로 영상화시켜 수행하였다. 이때, 분자량 마커(molecular weight marker)는 BIO-RAD(Bio-Rad Laboratories, CA, USA)의 제품을

[0067] 이용하였다.

[0068] 그 결과, 도 2에 나타난 바와 같이, 효소를 처리하지 않은 대조군(도 2의 No enzyme)에 비해, 세 가지 알칼라아제, 뉴트라아제, 플라보르자임 효소들 모두 장수풍뎅이 유충의 단백질을 효과적으로 분해시킴을 확인할 수 있었다. 반면에, 브로멜라인과 파파인 단백 가수분해물의 경우, 10 kDa 주변의 분자량보다 상대적으로 큰 단백질 분해 산물이 많이 존재하는 것을 볼 수 있는데, 이를 토대로 저분자 펩타이드 생산 효율이 낮다는 것을 알 수 있었고, 이는 상기에서 수행한 가수분해도 측정 실험과 일치하는 결과였다.

[0069] **(3) 가수분해물의 수율 측정**

[0070] 가수분해물의 제조 수율을 확인하기 위해, 상기 실시예 1에 개시된 바와 같이, 효소를 이용해 최적 분해 조건하에서 6시간까지 장수풍뎅이 유충의 효소 분해를 실시하였다. 즉, pH 7.0의 완충 용액을 혼합한 장수풍뎅이 유충 시료와 알칼라아제, 플라보르자임, 뉴트라아제를 첨가하여 24시간 효소 분해하였고, 효소를 불활성화하기 위해 90℃에서 20분간 반응시켜 이를 원심 분리기를 이용해 상등액을 채취하였으며, 상기 실시예 1에서 수행한 바와 같이, 4℃의 5,000 xg의 조건에서 2시간 한외여과막을 이용하여 원심분리하여 3 kDa 이하의 펩타이드들을 분리하였다. 그 후, 동결건조하여 장수풍뎅이 유충 단백질의 가수분해물을 제조하였는 바, 10 mM 인산나트륨 버퍼에 의한 염을 고려하여 하기 식 1에 나타난 바와 같이 장수풍뎅이 유충 단백질의 가수분해물을 장수풍뎅이 유충의 고형분에 대한 비로 나타내어, 각 효소 별 3 kDa 이하 펩타이드가 포함된 가수분해물의 수율을 계산하였다.

[0071] [식 1]

[0072] $$\text{수율}(\%) = \left(\frac{\text{3 kDa의 고형분 함량} - \text{10 mM Sodium phosphate buffer의 salt 함량}}{\text{가수분해물 함량} - \text{10 mM Sodium phosphate buffer의 salt 함량}}\right) * 100$$

[0073] 그 결과, 하기 표 1에 나타난 바와 같이, 알칼라아제의 수율이 총 기질 대비 약 48%로, 뉴트라아제나 플라보르자임에 비해 단백가수분해물 제조 수율이 월등히 높은 것으로 나타난 바, 이는 상기 가수분해도 확인 실험에서 얻은 결과와 일치하는 결과이다.

표 1

[0074]

가수분해효소	Yields of protein hydrolysates(%)
Alcalase	47.86
Flavourzyme	24.89
Neutrase	31.88
No enzyme	16.09

[0075] 따라서 장수풍뎅이 유충으로부터 3 kDa 이하의 저분자 펩타이드를 제조할 경우 알칼라아제를 사용하는 것이 적합할 것으로 판단되며, 1 kDa 이하의 저분자 펩타이드가 특히 생리활성, 흡수율, 생체 이용률 및 안정성이 높은 것으로 알려져 있으므로 장수풍뎅이 유충을 이용하여 펩타이드성 식·의약품을 개발하는 경우 알칼라아제의 활용이 필수적이 것으로 사료된다. 또한, 필요에 따라 플라보르자임 및 뉴트라아제의 병용 처리도 가능할 것이다.

[0077] **<실시예 3> 획득한 가수분해물의 항산화 활성 측정**

[0078] **1) DPPH 및 ABTS 라디칼 소거활성 측정**

[0079] DPPH 라디칼은 항산화 물질이 수소 원자나 전자를 공여할 수 있는 능력을 평가할 때 사용되는 물질로서 수소 혹은 전자를 받음으로써 안정한 형태의 화합물로 전환되어 라디칼 특유의 보라색이 옅은 노란색으로 변한다. 이러

한 원리를 이용하여, 단백 가수분해물의 α,α-디페닐-β-피크릴히드라질(α,α-diphenyl-βpicryhydrazyl, DPPH)에 대한 환원력을 측정함으로써 DPPH 자유 라디칼 소거 활성을 확인하였다.

[0080] 구체적으로, 99% 메탄올을 이용하여 상기 실시예 1에서 얻은 알칼라아제 단백 가수분해물 시료를 다양한 농도로 희석하여 96 웰 플레이트에 160 ㎕ 분주하였다. 그 다음, 메탄올에 녹인 0.2 mM DPPH 용액 40 ㎕를 시료가 분주된 웰에 분주하여 실온에 30분간 방치한 후, 마이크로플레이트 분광광도계를 이용하여 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. 그리고 하기 [식 2]를 이용하여 알칼라아제를 처리하여 얻은 장수풍뎅이 유충 단백 가수분해물의 흡광도를, 1/2로 환원시키는데 필요한 시료의 농도인 RC_{50}값으로 나타내었다. 이때 활성 비교를 위하여 양성대조군으로서 트롤록스(Trolox)를 사용하였다.

[0081] [식 2]

[0082] $$\text{DPPH radical scavenging activity (\%)} = \left(1 - \frac{\text{Samle 흡광도} - \text{Blank 흡광도}}{\text{control 흡광도}}\right) * 100$$

[0084] 또한, ABTS 라디칼 소거활성 측정법은 표준물질인 트롤록스의 값과 비교하여 나타낼 수 있으며, in vivo에서의 항산화능 측정뿐만 아니라 in vitro에서 항산화능을 측정하기 위한 방법으로 널리 이용되고 있다. ABTS와 과황화칼륨(potassium persulfate)을 암소에 방치하면 ABTS 라디칼이 생성되며, 시료 속 항산화물질로 인해 라디칼이 소거되면 짙은 청록색의 ABTS 라디칼이 탈색되는데 이를 흡광도로 측정하는 방법이다.

[0085] 구체적으로, 최종 농도가 7 mM인 ABTS와 2.45 mM 과황화칼륨을 각각 혼합한 후 실온인 암소에서 24시간 동안 방치하여 라디칼을 형성시켰다. 이후, ABTS 용액의 농도가 734 nm에서 흡광도 값이 0.70±0.02가 되도록 인산 완충 생리 식염수(PBS, pH 7.4)로 희석하였다. 희석된 ABTS 용액 180 ㎕에 단백 가수분해물 20 ㎕를 가하여 1분 동안 30℃에 방치한 후 734 nm에서 흡광도를 측정하였다. 그리고 하기 [식 3]을 이용하여 이렇게 측정된 장수풍뎅이 유충 단백 가수분해물의 흡광도를, 1/2로 환원시키는데 필요한 시료의 농도인 RC_{50}값으로 나타내었다. 이때 활성 비교를 위하여 양성대조군으로서 트롤록스를 사용하였다.

[0086] [식 3]

[0087] $$\text{ABTS radical scavenging activity (\%)} = \left(1 - \frac{\text{Samle 흡광도} - \text{Blank 흡광도}}{\text{control 흡광도}}\right) * 100$$

[0088] 알칼라아제의 단백 가수분해물의 DPPH 라디칼 및 ABTS 라디칼에 대한 소거 활성을 측정한 결과, 하기 표 2에 나타난 바와 같이, DPPH 라디칼 및 ABTS 라디칼에 대한 RC_{50}값이 각각 757.30 ㎍/mL와 44.54 ㎍/mL로 나타나 두 가지 라디칼에 대한 소거활성이 있음을 확인할 수 있었다.

표 2

[0089]

	DPPH radicals		ABTS radicals	
	RC_{50} (㎍/mL)[1]	TEAC (mg TE/g)[2]	RC_{50} (㎍/mL)[1]	TEAC (mg TE/g)[2]
Alcalase hydrolysates	757.30 ±14.88	3.12 ±0.96	44.54 ±0.18	170.89 ±17.46
Trolox	1.77 ±0.06	-	5.56 ±0.09	-

[0090] **2) 과산화수소(Hydrogen peroxide, H_2O_2) 소거활성 측정**

[0091] 산소의 환원 대사물질인 과산화수소(hydrogen peroxide, H_2O_2)는 다양한 외부요소에 자극받아 정상세포의 미토콘드리아와 퍼록시좀에서 형성되는데, DNA 및 단백질 손상을 유발하거나 불포화지방산과 같은 생체막의 구성성분을 공격하여 과산화지질을 생성함으로써 생체 기능의 저하나 노화 및 성인병을 유발하는 것으로 알려져 있다.

본 발명에서는 퍼록시다아제의 기질인 ABTS를 이용하여 장수풍뎅이 유충 단백 가수분해물의 H_2O_2 소거활성을 측정하였다.

[0092] 구체적으로, Muller HE 등(1985. Detection of hydrogen peroxide produced by microorganisms on an ABTS peroxidase medium. Zentralblatt fur Bakteriologie, Mikrobiologie und Hygiene. Series A: Medical Microbiology, Infectious Diseases, Virology, Parasitology 259(2): 151-154.)의 방법에 따라 증류수에 희석한 알칼라아제 단백 가수분해물 20 ㎕, PBS 100 ㎕, 1 mM H_2O_2 20 ㎕를 96 웰 플레이트에 가한 후 37℃ 인큐베이터에서 5분간 반응시켰다. 이후, 1.25 mM ABTS 30 ㎕와 1 U/mL 퍼록시다아제 30 ㎕를 가하고 37℃에서 10분간 반응시킨 후, 마이크로플레이트 분광 광도계를 이용하여 405 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이때 활성비교를 위하여 양성대조군으로서 트롤록스를 사용하였다.

[0093] 그 결과, 하기 표 3에 나타난 바와 같이, 알칼라아제 단백 가수분해물의 RC_{50}값은 129.64 ㎍/mL였다.

표 3

[0094]

	H_2O_2	
	RC_{50} (㎍/mL)[1)]	TEAC (mg TE/g)[2)]
Alcalase hydrolysates	46.96 ±0.38	295.39 ±26.29
Trolox	4.88 ±0.12	-

[0096] 이러한 결과를 지금까지 수행된 연구 결과와 비교해보면, Hwang 등(2014. 건조방법에 따른 아로니아(Aronia melancocarpa) 열수 추출물의 항산화 성분 함량 및 항산화 활성. 한국식품과학회지 46(3): 303-308.)은 아로니아 추출물의 H_2O_2 소거능을 RC_{50}값으로 나타낸 결과 172.05 ㎍/mL로 개재하고 있는 바, 천연물인 아로니아 추출물보다 장수풍뎅이 유충 단백 가수분해물의 H_2O_2 소거능이 우수한 것으로 나타났다.

[0097] 따라서, 본 발명에 따른 장수풍뎅이 유충 단백 가수분해물은 항산화용 조성물 또는 스트레스 감소용 조성물로 유용하게 활용될 수 있다.

[0099] **<실시예 4> 활성 산소(ROS, H_2O_2)로부터의 간 세포 보호 효과 확인**

[0100] **(1) 세포 배양**

[0101] 마우스 유래의 정상 간세포인 AML-12 세포는 American Type Culture Collection(Manassas, VA, USA)에서 분양받아 사용하였으며, 분양받은 후 10% 소태아혈청(Fetal Bovine Serum, FBS), 1% 인슐린-트랜스퍼린-셀레늄(insulin-transferrin-selenium; ITS), 1% 항생제(페니실린/스트렙토마이신) 및 덱사메타손(40 ng/mL)을 함유하는 DMEM/F-12 배지를 사용하여 5% CO_2, 37℃ 조건에서 배양하였다.

[0102] **(2) 세포생존율 측정**

[0103] 활성산소로 인한 세포독성으로부터 장수풍뎅이 유충 단백 가수분해물의 간세포 보호효과를 알아보기 위하여, AML-12 세포를 2×10^4 cells/웰의 밀도로 96-웰 플레이트에 분주하고 24시간 배양 후, 알칼라아제, 뉴트라아제 및 플라보르자임 처리 단백 가수분해물을 각 농도 별로 24시간 처리하였다. 이후 7 mM의 H_2O_2를 1시간 처리하고, MTT 시약(2.5 mg/mL)을 각 웰에 20 μL씩 첨가하여 3시간 배양한 다음, 상층액을 제거하고 각 웰에 생성된 포르마잔(formazan) 결정을 다이메틸설폭사이드(Dimethyl sulforxide, DMSO)로 용해시켜 550 nm에서 흡광도를 측정하였다. 간세포 보호 효과는 H_2O_2 무처리군(대조군)의 생존율을 기준으로 각 처리군의 상대적인 세포생존율(cell viability)을 평가하여 계산하였다.

[0104] 그 결과, 도 3에 나타난 바와 같이, 7 mM H_2O_2에 의해 AML-12 세포의 생존율은 28% 정도로 낮아졌으나, 각 단백 가수분해물을 처리한 세포의 경우 세 가지 효소 처리군 모두 유의적인 세포생존율의 증가를 보였다. 특히, 그중

플라보르자임 처리 단백 가수분해물은 다른 두 효소 가수분해물에 비해 유의적($P < 0.05$)으로 높은 세포 보호효과를 보였다. 즉 플라보르자임 처리 단백 가수분해물은 0.5, 0.75, 1 mg/mL의 농도에서 각각 60, 77 및 80%의 세포생존율을 보여 활성산소에 의한 세포독성으로부터 간세포를 보호하는 효과가 가장 큰 것으로 나타났다.

[0105] 따라서, 알칼라아제, 뉴트라아제 및 플라보르자임 처리 단백 가수분해물, 특히 플라보르자임 처리 단백 가수분해물을 효과적인 간세포 보호용 조성물로 활용할 수 있다.

[0107] **<실시예 5> 지방 전구세포 분화 억제 활성 확인**

[0108] **(1) 세포 배양 및 시료 처리**

[0109] 지방 전구세포인 3T3-L1 세포를 ATCC (Manassas, VA, USA)에서 분양 받아 사용하였다. DMEM 배지(Dulbeccos modified Eagles medium high glucose; Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)에 10% 우아혈청(bovine calf serum; BCS) 및 항생제를 첨가하여 배양 및 분화 배지로 사용하고, 5% CO_2 및 37℃ 인큐베이터에서 세포를 배양하고 세포가 융합된(confluent) 상태가 되면 트립신/EDTA를 처리하였다. 이후, 트립신이 처리된 세포를 원심분리(L-70, Bekman Coulter, Fullerton, CA, USA)하여 세포를 수집하고 3×10^5 cells/well의 밀도로 6-웰에 분주하였고, 100% 밀도(confluency) 상태에서 48시간 방치한 후 10% BCS, 23 mg/mL IBMX(Sigma-Aldrich, Chem. Co., St. Louis, MO, USA), 5 mg/mL 인슐린(Sigma-Aldrich, Chem. Co.) 및 1 mM 덱사메타손(dexamethasone; Sigma-Aldrich, Chem. Co.)이 첨가된 DMEM 배지(MDI)를 처리하여 48시간 동안 분화를 유도하였다. 분화유도 후 2일마다 10% FBS, 5 mg/mL 인슐린이 첨가된 배지로 교체하였으며, 0.5 mg/mL 농도의 알칼라아제의 단백 가수분해물을 분화유도 배지 첨가 시점부터 함께 처리하였다.

[0110] **(2) 오일-레드-O 염색을 통한 지방 전구세포 분화 억제 효과 확인**

[0111] 상기와 같이, 3T3-L1 전구지방세포를 6일 동안 분화시킨 후 배지를 제거한 다음, PBS(phosphate buffered saline)로 세척하고, 10% 포름알데하이드 용액으로 세포를 고정시켰다. 다시 PBS로 세척 후, 오일-레드-O(oil-red-O) 용액을 첨가하여 30분간 실온에서 염색하였고, 오일-레드-O 용액을 제거한 후 증류수로 세척하여 건조시킨 다음 위상차 현미경으로 관찰하였으며, 100% 이소프로필 알콜(isopropyl alcohol)로 염색된 지방구를 용해시켜 510 nm에서 흡광도를 측정하였다.

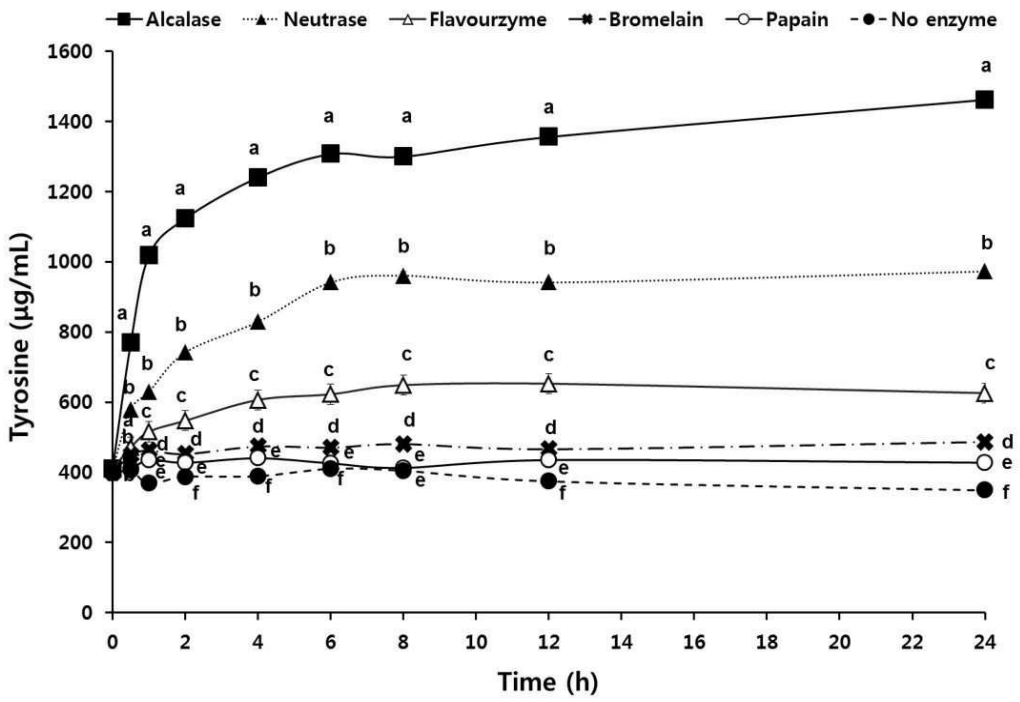
[0112] 그 결과, 도 4A에 나타난 바와 같이, 200~800 ㎍/ml로 알칼라아제의 단백 가수분해물을 처리한 경우에는 육안으로 나타날 정도로 지방세포의 분화가 억제된 것을 확인할 수 있었고, 도 4B에 나타난 바와 같이, 알칼라아제의 단백 가수분해물을 800 ㎍/ml 처리한 경우, 지질 축적률이 약 50%로 대조군(약 100%)에 비해 현저하게 억제되는 것을 확인할 수 있었다.

[0113] 따라서, 본 발명에 따른 장수풍뎅이 유충의 단백 가수분해물은 비만 또는 비만에 동반하는 다양한 합병증을 예방, 개선 내지 치료할 수 있는 약학 조성물 또는 건강기능식품 조성물로 유용하게 활용될 수 있다.

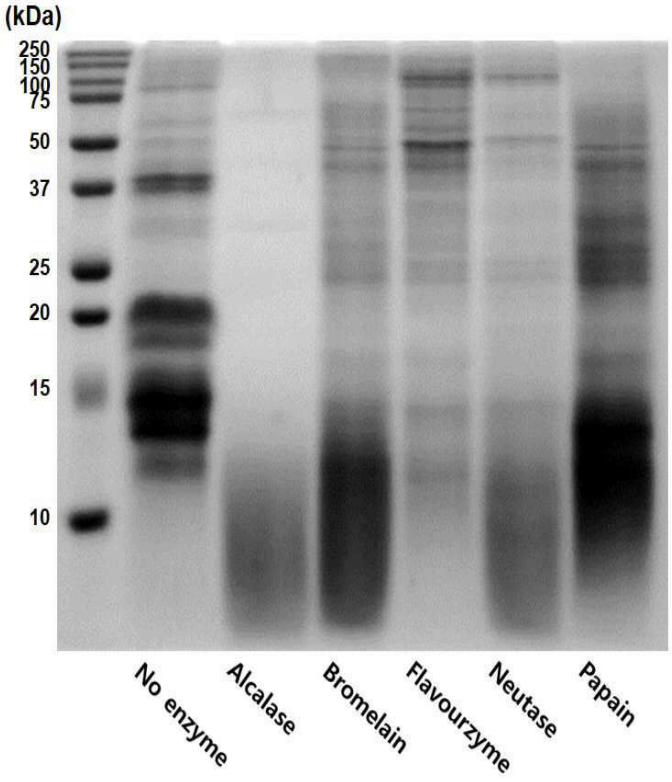
[0115] 이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는 바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시양태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백하다. 즉, 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다.

도면

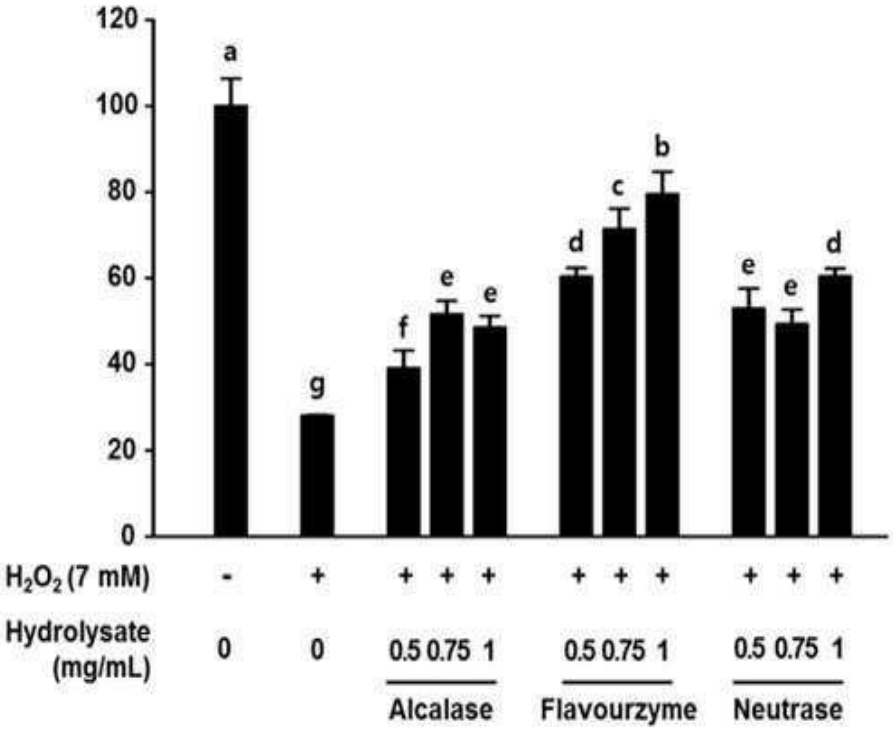
도면1


Alcalase
Neutrase
Flavourzyme
Bromelain
Papain
No enzyme
Tyrosine (μg/mL)
Time (h)
0
200
400
600
800
1000
1200
1400
1600
0
2
4
6
8
10
12
14
16
18
20
22
24

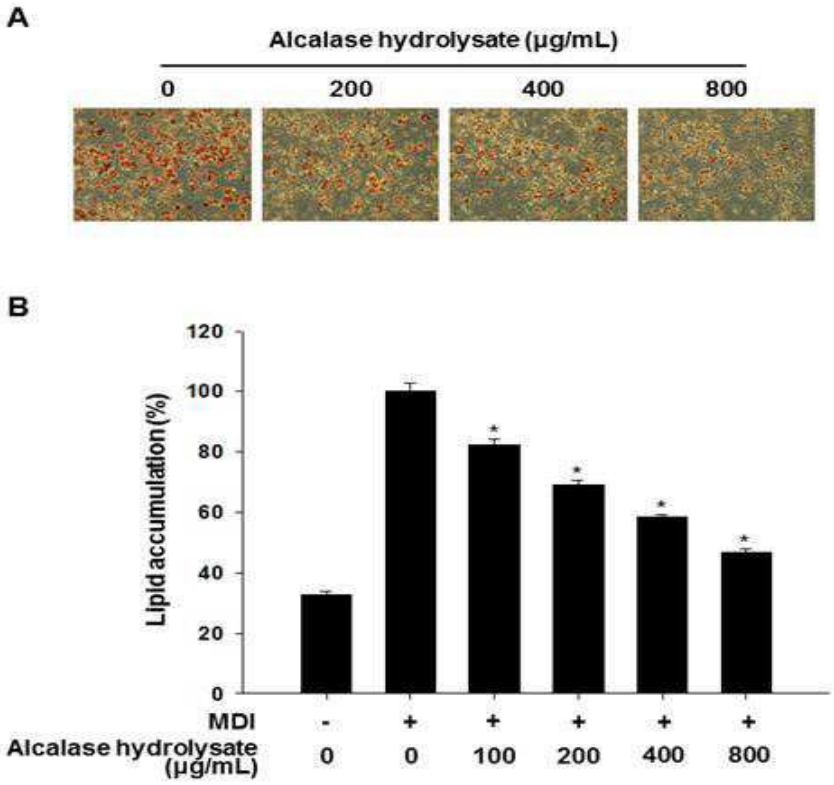
도면2


(kDa)
250
150
100
75
50
37
25
20
15
10
No enzyme
Alcalase
Bromelain
Flavourzyme
Neutase
Papain

도면3


120
100
80
60
40
20
0
a
g
f
e
e
d
c
b
e
e
d
H2O2 (7 mM) - + + + + + + + + +
Hydrolysate (mg/mL) 0 0 0.5 0.75 1 0.5 0.75 1 0.5 0.75 1
Alcalase
Flavourzyme
Neutrase

도면4


A
Alcalase hydrolysate (μg/mL)
0
200
400
800
B
Lipid accumulation (%)
120
100
80
60
40
20
0
MDI - + + + + +
Alcalase hydrolysate (μg/mL) 0 0 100 200 400 800