(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2009-0116219
(43) 공개일자 2009년11월11일

(51) Int. Cl.
A23K 1/00 (2006.01) *A23K 1/10* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2008-0042025
(22) 출원일자 2008년05월06일
심사청구일자 2008년05월06일

(71) 출원인
경상대학교산학협력단
경상남도 진주시 가좌동 900
(72) 발명자
서한극
경상남도 진주시 신안동 주공2차아파트 204동 706호
송혁
충청북도 충주시 연수동 힐스테이트아파트 106동 402호
김진희
경기도 용인시 수지구 죽전동 한라신영프로방스 602동 401호
(74) 대리인
김순웅

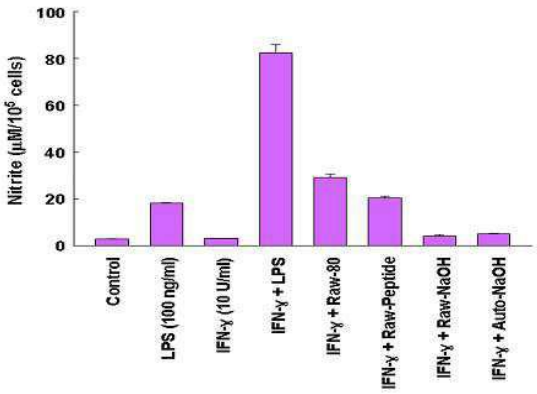
전체 청구항 수 : 총 10 항

(54) 열처리를 이용한 태반 추출물의 제조 방법

(57) 요 약

본 발명은 태반을 열처리하는 공정, 보다 구체적으로 40 내지 110℃에서 10 내지 180분간 진탕하는 공정을 포함하는 것을 특징으로 하는 태반 추출물 제조 방법에 관한 것으로, 본 발명의 방법으로 제조된 태반 추출물은 기존의 산 또는 알칼리 가수분해 추출법보다 수율이 높고 우수한 면역증강 효과를 가진다.

대 표 도 - 도7



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	107094-3
부처명	농림기술관리센타
연구사업명	농림기술개발사업
연구과제명	돼지태반 추출물의 생리활성 탐색 및 면역증강사료첨가제의 개발
주관기관	경상대학교
연구기간	2007년 05월 30일 ~ 2010년 05월 29일

특허청구의 범위

청구항 1

(i) 태반을 절단하고 균질화시키는 공정; 및

(ii) 상기 공정으로 얻은 태반 시료를 40 내지 110℃에서 10 내지 180분간 가열하여 추출하는 공정;을 포함하는, 태반 추출물의 제조 방법.

청구항 2

제 1 항에 있어서, 공정 (i)과 공정 (ii) 사이에 공정 (i)에서 얻은 태반 시료를 건조시키고 분말 형태의 태반 시료를 현탁제로 현탁시키는 공정을 추가로 포함하는 제조 방법.

청구항 3

제 1 항에 있어서, 공정 (ii)에서 얻은 태반 시료를 원심분리 공정 및 여과 공정 중에서 선택되는 1 이상의 공정을 1회 내지 5회 추가로 수행하는 제조 방법.

청구항 4

제 1 항에 있어서, 태반은 돼지 유래 태반인 것인 제조 방법.

청구항 5

제 1 항의 방법으로 제조된 동물 사료 또는 음수 첨가제용 태반 추출물.

청구항 6

(i) 태반을 절단하고 균질화시키는 공정;

(ii) 상기 공정으로 얻은 태반 시료를 40 내지 110℃에서 10 내지 180분간 가열하여 추출하는 공정; 및

(iii) 상기 공정으로 얻은 태반 시료를 바로 급속 냉각시키는 공정을 포함하는, 태반 추출물의 제조 방법.

청구항 7

제 6 항에 있어서, 공정 (i)과 공정 (ii) 사이에 공정 (i)에서 얻은 태반 시료를 건조시키고 분말 형태의 태반 시료를 현탁제로 현탁시키는 공정을 추가로 포함하는 제조 방법.

청구항 8

제 6 항에 있어서, 공정 (iii) 에서 얻은 태반 시료를 원심분리 공정 및 여과 공정 중에서 선택되는 1 이상의 공정을 1회 내지 5회 추가로 수행하는 제조 방법.

청구항 9

제 6 항에서, 태반은 돼지 유래 태반인 것인 제조 방법.

청구항 10

제 6 항의 방법으로 제조된 동물 사료 또는 음수 첨가제용 태반 추출물.

명 세 서

발명의 상세한 설명

기 술 분 야

<1> 본 발명은 태반을 열처리하는 공정, 구체적으로 40 내지 110℃에서 10 내지 180분간 가열하는 방법으로 면역증강태반성분을 포함하는 추출물을 추출하는 방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

<2> 태반은 필수 아미노산외에 펩타이드, 단백질, 비타민, 핵산, 미네랄등 다양한 약리활성 물질을 포함하고 있어, 예로부터 동의보감 등에 자하거(紫河車)라 불리며 한방 약재로 이용되어 왔다. 뿐만 아니라 HGF (Epatocyte Growth Factor), FGF (Fibroblast Growth Factor) 등과 같은 성장인자를 가지고 있어 성장 촉진과 피로 회복에 유용하며, 특히 여러 종류의 사이토카인을 가지고 있기 때문에 면역 증강 작용에 효과적인 것으로 알려져 있다.

<3> 면역 활성에 대한 지시 물질(indicator)들은 여러 종류가 있으며, 그 지시 물질의 생성정도에 따라서 체내 면역의 활성 정도를 가늠해 볼 수 있다. 그 중 대표적인 물질이 Nitric Oxide (NO)이다. NO는 L-아르기닌과 산소분자로부터 효소(Nitric Oxide Synthase: NOS)에 의해 합성된다.

<4> 이 때 관여하는 효소는 크게 세 종류로 나뉘며, 일반 생리적인 기전에 관여하는 효소는 NOS-1과 NOS-2로, 칼슘이온 및 칼모듈린에 의해서 활성화되어 혈관 상피세포를 이완시키거나 혹은 신경 전달에 있어서 중요한 역할을 하는 체내의 항상성유지에 필수 불가결한 효소로, 구성적(constitutive)으로 신경조직(NOS-1) 및 혈관내피세포(NOS-2)에 발현되어 있다. 한편, NOS-3는 앞에서 논한 NOS-1, 2와는 달리 LPS (lipopolysaccharide)와 체내 사이토카인(예를 들어, IL-1, TNF-α, INF-γ)에 의해 발현이 전사단계에서 유도되는 효소로 주로 면역과 관련된 NO을 생성하는 효소이다.

<5> NOS-3에 의해서 합성되는 NO는 슈퍼옥사이드 이온 (Superoxide anion: O_2^-)과 반응함으로서 퍼옥시나이트리트 이온(Peroxynitrite anion: $ONOO^-$)이 생성되는데, 이것은 높은 산화력을 가지고 있는 라디칼(Radical)로 ROS (Reactive Oxygen Species, 활성 산소종)의 일종으로 분류할 수 있다.

<6> 일반적인 생리 기전에서는 NO의 체내 반감기는 3-5초 정도로 짧고 생성량도 적지만, 면역 자극에 의해 발현이 유도된 NOS-3에 의해 생성되는 NO는 생성량이 많고, NOS-3의 발현유도가 없어질 때까지 지속적으로 NO을 생성함으로서 외부로부터의 감염원을 제거하기 위한 방어 면역시스템의 일종이다.

<7> 면역 활성으로 인해 합성된 이러한 NO는 항원을 직접 분해(Degradation)하는 작용을 가지고 있으며, 또한 체내 전체적인 면역 기능을 조절하는 역할을 수행하는 것으로 알려져 있다. 따라서 면역기능의 활성화 정도를 NO와 ROS의 생성분비량을 측정함으로서 평가지표로 이용할 수 있다.

<8> 자돈시기 특히 이유자돈의 경우 모유(습식)에서 사료(건식)로의 갑작스런 사료 형태의 변화는 돼지에 있어서 과도한 스트레스를 야기한다. 따라서 스트레스에 기인한 사료 섭취량의 감소는 필수 영양소의 체내 공급량 부족 및 면역력 저하를 야기할 수 있다. 특히 소화기관의 발달이 충분하지 않은 자돈의 경우, 1차 면역 체계인 위의 위산 분비량이 건식 사료의 완충능(Buffering Capacity)에 비해 적기 때문에, 물리적 면역 기능을 충분히 소화해 내지 못한다. 더불어 면역 기능의 활성화에 필요한 위 내 단백질 소화가 불충분하기 때문에 질병에 대한 항병력이 더욱 감소되는 악순환이 발생한다.

<9> 태반은 포유류 유래의 동물성 단백질로서, 자돈 등의 동물에게 양질의 단백질원을 제공할 뿐 아니라 태반에 함유되어 있는 여러 종류의 사이토카인을 통해 동물의 면역 기능을 활성화시킬 수 있다.

<10> 종래, 양돈 등의 동물 사료 또는 음수용의 태반 유래 면역 증강 물질을 추출하고자, 기존에는 산 또는 알칼리 가수분해 추출법을 이용하였으나, 본 발명자는 상기 방법보다 추출물 수율이 높으면서도 공정 과정에서 태반 내 유효성분의 파괴를 최소화하여 우수한 면역증강 효과를 가지게 하는 추출법에 관한 연구를 계속한 결과 본 발명에 이르게 되었다.

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

<11> 양돈 등의 동물 사료 또는 음수용의 태반 유래 면역 증강 물질을 추출하기 위하여, 본 발명은 기존의 산 또는 알칼리 가수분해 추출법보다 추출물 수율이 높으면서도 공정 과정에서 태반 내 유효성분의 파괴를 최소화하여 우수한 면역증강 효과를 가지게 하는 추출법을 제공하고자 한다.

과제 해결수단

<12> 본 발명은 산 또는 알칼리 가수분해 추출법 대신 40 내지 110℃의 온도에서 진탕 추출하는 방법으로 태반 추출

물을 제조하고자 하였다.

<13> 이하, 본 발명을 자세히 설명한다.

<14> 본 발명은 40 내지 110℃의 온도에서 진탕 추출하는 것을 특징으로 하는 태반 추출물의 제조 방법에 관한 것이다.

<15> 상기 본 발명의 열처리를 통한 태반 추출물의 제조 방법에 사용될 수 있는 태반은 특정 포유동물의 것으로 한정되지 않고 포유동물의 태반이면 모두 사용될 수 있으나, 바람직하게는 돼지의 태반이다.

<16> 하나의 양태로서, 본 발명은 (i) 태반을 절단하고 균질화시키는 공정; 및 (ii) 상기 공정으로 얻은 태반 시료를 40 내지 110℃에서 10 내지 180분간 가열하여 추출하는 공정을 포함하는, 태반 추출물의 제조 방법에 관한 것이다.

<17> 상기 태반 추출물의 제조 공정에서 공정 (i)과 공정 (ii) 사이에 공정 (i)에서 얻은 태반 시료를 건조시키고 분말 형태의 태반 시료를 현탁제로 현탁시키는 공정을 추가할 수 있다. 또한, 상기 공정 (ii)에서 얻은 태반 시료를 원심분리 공정 및 여과 공정 중에서 선택되는 1 이상의 공정을 1회 내지 5회 추가로 수행할 수 있다.

<18> 본 발명의 태반 추출물 제1 제조 방법의 각 공정들을 구체적으로 살펴보면 다음과 같다.

<19> 공정(i)은 물 또는 PBS 등의 용액으로 세척하여 혈액, 이물질, 불순물 등을 제거한 태반을 절단 및 균질화시키는 공정으로, 구체적으로 가위, 육륙 파쇄기 등을 이용하여 약 2cm 크기로 절단하고 믹서기 등을 이용하여 균질화시킨다.

<20> 공정 (i)에서 균질화시켜 얻은 시료는 바로 사용하거나, 또는 시료를 건조시키고 분말 형태의 태반 시료를 현탁제로 현탁시킨 후, 다음의 추출 공정에 사용할 수 있다. 상기 건조 방법은 특별히 제한되지 않으며, 동결건조, 진공건조, 열풍건조, 분무건조, 감압건조, 분무건조, 포말건조, 고주파건조, 적외선건조 등을 예로 들 수 있으며, 바람직하게는 동결 건조이다. 본 발명의 구체적인 실시에서는 액체질소에 넣어 급속 동결시키고 동결된 시료는 동결건조기에서 3일간 동결건조(-50℃, 50AMT)하였다.

<21> 공정 (ii)는 상기 공정 (i)에서 얻은 태반 시료를 열추출하는 공정으로 40 내지 110℃에서 10 내지 180분간 가열한다. 추출에 사용되는 용매는 당업계에서 태반의 추출에 사용될 수 있는 용매라면, 특별히 한정되지 않으며, 단일 성분 또는 2 성분 이상의 혼합 용매도 사용 가능하다. 본 발명의 실시예에서는 PBS를 사용하였다. 가열 온도에 따라 시간은 적절한 조절이 필요하다. 구체적으로, 높은 온도에서 추출할 경우, 가열 시간은 단축하도록 한다.

<22> 상기 공정 (ii)에서 얻은 추출물은 부유하는 잔여물을 제거하기 위한 공정을 추가할 수 있다. 구체적으로, 1회 내지 5회의 원심 분리 공정만을 수행하거나 1회 내지 5회의 여과 공정만을 수행할 수 있다. 또는, 원심 분리 공정 및 여과 공정을 1회 내지 5회 병행하여 수행할 수도 있다. 보다 구체적으로, 원심분리 공정은 4℃, 7,000rpm, 30분간 이루어지며, 여과 공정은 면, 나일론 등을 이용하여 부유 잔여물을 걸러내거나 한외여과, 냉동여과 등의 방법으로 수행할 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

<23> 본 발명의 또 다른 태반 추출물 제조 방법은, 상기 제1 제조 방법에서 공정 (ii)의 추출공정에서 얻은 열 추출한 태반 시료를 바로 급속 냉각시키는 공정을 필수적으로 포함하는 것을 특징으로 한다.

<24> 따라서, 또 다른 양태로서, 본 발명은 (i) 태반을 절단하고 균질화시키는 공정; (ii) 상기 공정으로 얻은 태반 시료를 40 내지 110℃에서 10 내지 180분간 가열하여 추출하는 공정; 및 (iii) 상기 공정으로 얻은 태반 시료를 바로 급속 냉각시키는 공정을 포함하는, 태반 추출물의 제조 방법에 관한 것이다.

<25> 본 발명의 상기 제1 또는 제2 제조 방법으로 제조된 태반 추출물은 그대로 사용하거나, 동결감압 등의 방법으로 건조하여 분말 형태로 추가 제조할 수 있다.

<26> 기존의 알카리 가수분해 또는 유기용매에 의한 방법에 따른 추출물에서는 약 3-5% 내외의 낮은 수율을 나타내는데 비하여, 본 발명의 상기 제1 또는 제2 제조 방법으로 제조된 태반 추출물은 본 발명의 방법으로 추출한 최종 산물은 약 36 내지 48%의 높은 수율을 보였다.

<27> 또한, 각 추출방법에 따른 아미노산 조성을 분석한 결과, 본 발명의 제조 방법에 따라 제조된 추출물의 아미노산 조성은 기존의 방법에 따라 제조된 추출물과 차이가 크게 났다. 이로부터, 제조 공정에 따라 추출물 내 유효성분의 조성이 크게 차이가 나게 되고 그에 따라, 추출물 내 유효성분 및 활성도도 영향을 받게 된다는 것을

알 수 있다. 본 발명의 방법으로 제조된 태반 추출물은 태반 내 유효성분의 파괴가 최소화되어 기존의 방법으로 제조된 추출물보다 우수한 면역 활성 및 면역증강 효과를 가지는 것을 NO 어세이 및 ROS 생성능 분석으로 확인할 수 있었다.

<28> 따라서, 상기 본 발명의 태반 추출 방법으로 제조된 태반 추출물은 돼지뿐만 아니라 다양한 동물의 사료나 음수의 원료 및 첨가제로 사용할 수 있다. 또한, 화장품, 의약 및 수의약 등의 다양한 분야에서 태반 추출물을 원료 및 첨가제로 사용하는 제품에 폭넓게 사용될 수 있다.

<29> 상기한 제1의 제조 방법에 따라, 80℃, 30분간 추출하는 공정으로 제조한 태반 추출물을 본 명세서에서 Raw-80 또는 PPE80으로 기재하였다. 또한, 상기한 제2의 제조 방법에 따라 100℃에서 10분간 가열한 시료를 바로 급속 냉각시키는 공정으로 제조한 태반 추출물을 본 명세서에서 Raw-peptide 또는 PPE100으로 기재하였다.

효 과

<30> 본 발명의 방법으로 제조된 태반 추출물은 수율이 높을 뿐만 아니라 NO 어세이 및 ROS 생성능으로 확인한 결과, 기존의 추출법에 따라 제조된 태반 추출물보다 우수한 면역활성 및 면역증강 효과를 가진다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

<31> 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하기로 한다. 실시예는 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이하의 실시예에 의해 제한되지 않는다.

<32> **<실시예 1: 재료 및 방법>**

<33> 본 실험에 사용된 돼지 태반은 (주)다비육종의 대월종돈장으로부터 입수하였다.

<34> **1. 태반의 추출**

<35> **1-1: 추출을 위한 태반의 전처리**

<36> (1) 감압멸균 태반시료(autoclaved placenta)의 준비

<37> 감압멸균 태반시료의 전처리 공정은 다음과 같다. 태반을 PBS로 세척하여 불순물을 제거하고, 실험용 가위로 약 2cm 크기로 절단한 다음, 가정용 믹서기를 이용하여 균질화시켰다. 다음, 시료를 121℃에서 15분간 오토글레이브 (autoclave)하여 멸균시켰다. 다음 시료를 액체질소에 넣어 급속 동결시키고 동결된 시료는 동결건조기에서 3일간 동결건조(-50℃, 50AMT)하였다. 상기 공정으로 얻은 시료를 감압멸균 태반시료로 사용하였다.

<38> (2) 비감압멸균 태반시료(raw placenta)의 준비

<39> 비감압멸균 태반시료의 전처리 공정은 다음과 같다. 태반을 PBS로 세척하여 불순물을 제거하고, 실험용 가위로 약 2cm 크기로 절단한 다음, 가정용 믹서기를 이용하여 균질화시켰다. 다음 시료를 액체질소에 넣어 급속 동결시키고 동결된 시료는 동결건조기에서 3일간 동결건조(-50℃, 50AMT)하였다. 상기 공정으로 얻은 시료를 비감압멸균 태반시료로 사용하였다.

<40> **1-2: 전 태반(total placenta) 성분의 추출**

<41> 상기 1-1 (1) 또는 (2)의 전처리 공정으로 얻은 동결건조 태반시료 0.5g 을 PBS 100 ml에 재현탁(resuspend)하여 얼음위에서 2분동안 균질화시켰다. 4℃, 7,000 rpm에서 30분간 원심분리하고 여과지를 사용하여 여과 후, 액체질소에 넣어 급속 동결하였다. 동결된 시료는 동결건조기에서 3일간 동결건조(-50℃, 50AMT)하여 배지(media)에 녹여 전 태반 추출물(total placenta)로 사용하였다.

<42> **1-3: 가수 분해에 의한 태반성분의 추출**

<43> (1) 알카리 처리에 의해 가수분해된 태반 추출물(Raw 또는 Auto-NaOH)의 제조

<44> 기존의 태반 추출 방법인, 알칼리 처리에 의해 가수분해된 태반 추출물을 제조하고자, 상기 1-1 (1) 또는 (2)의 전처리 공정으로 얻은 동결건조 태반시료 0.5g 을 5N NaOH 100 ml에 재현탁시키고, 100℃에서 3시간 가온처리하였다. 다음, 4℃, 7,000 rpm에서 30분간 원심분리하고 여과지를 사용하여 여과 후, HCl를 사용하여 pH을 7.0으로 조정하였다. 다음 액체질소에 넣어 급속 동결시키고 ,동결된 시료는 동결건조기에서 3일간 동결건조(-50℃, 50AMT)한다. 이를 배지에 녹여 알카리 가수분해 추출물로 사용하였다.

<45> (2) 열처리에 의해 가수분해된 태반 추출물(Raw 또는 Auro-Peptide)의 제조

<46> 열처리에 의해 가수분해된 태반 추출물을 제조하고자, 상기 1-1 (1) 또는 (2)의 전처리 공정으로 얻은 동결건조 태반시료 0.5g 을 PBS 100 ml에 재현탁시켰다. 다음 각각의 정해진 온도와 시간으로 [4℃, 16시간 (Raw-4 or Auto-4); 37℃, 3시간 (Raw-37 or Auto-37); 60℃, 1시간 (Raw-60 or Auto-60); 80℃, 30분(Raw-80 or Auto-80)]에서 교반시켰다. 다음, 시료를 여과지를 사용하여 여과시킨 다음, 액체질소에 넣어 급속 동결하였다. 동결된 시료는 동결건조기에서 3일간 동결건조(-50℃, 50AMT)하여 배지(media)에 녹여 열처리 가수분해 추출물로 사용하였다.

<47> **1-4: 열수에 의한 펩타이드의 추출**

<48> 열수에 의한 펩타이드 추출물을 얻고자, 상기 1-1 (1) 또는 (2)의 전처리 공정으로 얻은 동결건조 태반시료 0.5g 을 PBS 100 ml에 재현탁하여, 100℃에서 10분간 가열한 후, 얼음에서 급속 냉각시키고, 4℃, 7,000 rpm에서 30분간 원심분리하였다. 다음, 시료를 여과지를 사용하여 여과한 후, 액체질소에 넣어 급속 동결하였다. 동결된 시료는 동결건조기에서 3일간 동결건조(-50℃, 50AMT)하고, 배지에 녹여 태반 펩타이드 추출물로 사용하였다.

<49> **2. 추출방법에 따른 아미노산 구성 성분의 비교 분석**

<50> 각 공정으로 추출한 태반 시료 각 50 mg씩을 6 N HCl 2 ml에 녹인 후 밀봉하였다. 110 ℃에서 24 h 가열 후, 잔여 액체를 증발시키고 건조시켰다. 추출물을 로딩버퍼 (lithium citrate pH 2.2) 1 ml로 정용하였다. 다음 0.2 μm 필터를 이용하여 여과시키고, 이 중 40 μl 를 Biochrom 20 Plus Amino Analyzer (Biochrom)에 로딩하여 아미노산을 분석하였다.

<51> **3: NO 어세이**

<52> 돼지 태반 추출물(Porcine Placenta Extract, 이하 PPE)에 의한 면역 활성 정도를 NO (Nitric Oxide) 어세이로 분석하였다. 이를 위하여, 생쥐 대식세포(macrophage) 유래 세포주인 J774A.1 세포를 12-웰 플레이트에 웰당 1×10^5 세포로 플레이팅하고 하룻밤 배양한 후, 신선한 배지로 교환하고, 각 태반 추출물을 처리하였다. 48 시간 배양후에, NO 정량을 위하여 각 웰에서 배양배지를 1.5 ml 튜브에 회수하였다. 상기 회수한 배양 배지를 96-웰 플레이트에 분주하고, 또한, 표준곡선을 만들고자 NO_2^-를 물에 녹여 적절한 농도로 96-웰 플레이트에 분주하였다. 다음, 0.1% N-(1-나프틸)에틸렌 디아민 1%와 술파닐산(sulfanilic acid)을 각각 1:1로 혼합한 그리스 용액(Griess reagent)을 100 μl씩 첨가하여 상온에서 5분간 배양하였다. 540 nm 흡광도에서 측정하여 배양배지 중의 NO를 정량하였다.

<53> **4: 활성산소 생성능 분석**

<54> 태반 추출물에 의한 면역 활성 정도를 활성산소(reactive oxygen species: ROS) 생성으로 측정하였다. 이를 위하여, J774A.1 세포를 60-mm 디쉬에 디쉬 당 5×10^5 세포로 플레이팅하였다. 하룻밤 배양한 후 신선한 배지로 교환하여 각 태반 추출물을 처리하고 48시간 배양하였다. 세포를 15ml 코니컬 튜브에 회수한 후, 1,000g에서 3분간 원심분리하였다. 배지를 제거한 후 1 ml의 PBS을 첨가하여 세척을 두 번 반복하고 1,000g에서 3분간 원심분리하였다. 상등액을 제거한 후 10 μM H_2DCFDA을 첨가하여 30분간 배양하였다. FACS로 생성된 ROS를 측정하였다.

<55> **5: MTT 어세이**

<56> 세포 (J774A.1)를 24-웰 플레이트에 웰당 0.5×10^5 세포로 플레이팅하였다. 하룻밤 배양한 후 신선한 배지로 교환하여 각 태반 추출물을 처리하여 24 혹은 48 시간 배양하였다. MTT 용액 (0.1 mg/ml) 100 μl을 첨가하여 4시간 배양하였다. 배지를 제거한 후, 산성 이소프로판올을 첨가하여 미토콘드리아 탈수소효소(dehydrogenase)에 의해 생성된 포마잔(Formazan)을 용해하였다. 다음, 570 nm에서 OD 측정하였다.

<57> **6: LDH 방출 어세이 (LDH Release Assay)**

<58> 세포 (J774A.1)를 24-웰 플레이트에 웰당 0.5×10^5 세포로 플레이팅하였다. 하룻밤 배양한 후 신선한 배지로 교환하여 각 태반 추출물을 처리하여 48 시간 배양하였다. 각 배양한 배지를 1.5 ml 튜브에 회수하였다. 96 웰 플레이트에 회수한 배지를 각각 50 μl 씩 분주하였다. Cyto 96 Non-radioactive Cytotoxicity Assay

(Promega) 키트를 사용하여 방출된 LDH을 490 nm에서 흡광도로 측정하였다.

<59> **<실시예 2: 추출 방법에 따른 최종 추출물의 수율>**

<60> 태반을 PBS로 세척한 후, 감압 멸균한 시료(Autoclaved Placenta)과 멸균을 생략한 시료 (Raw Placenta)를 사용하여 위에서 열거한 가수분해법, 열수추출법, 유기용매추출법등으로 추출한 최종산물의 수율을 검토한 결과, 표 1과 2에서 보여주고 있는 것처럼, 열처리에 의한 가수분해 및 열수에 의한 추출물은 약 36 내지 48%로 높은 수율(yeild)을 보여주고 있으나, 알카리 가수분해 및 유기용매에 의한 추출물에서는 3-5% 내외의 낮은 수율을 보였다.

표 1

Extraction method (designation)	Sample (g) wet /dry	Extraction weight (g)	Extraction ratio (%)	Sample conc.(mg/ml)
4℃ (Auto-4)	25 /0.5	0.190	38.0	200
37℃ (Auto-37)	25 /0.5	0.181	36.0	200
60℃ (Auto-60)	25 /0.5	0.210	42.0	200
80℃ (Auto-80)	25 /0.5	0.240	48.0	200
Homogenization (Auto-Total)	25 /0.5	0.240	48.0	200
NaOH hydrolysis (Auto-NaOH)	25 /0.5			100
Boiling (Auto-Peptide)	25 /0.5	0.190	38.0	200
Chloroform : MeOH extraction (Auto-TFA)	50 /1.0	0.054	5.4	0.7
Phenol extraction (Auto-ECP)	50 /1.0	0.03	3	0.1

<61>

<62> - 감압멸균 태반을 사용한 각 추출물의 최종수율

표 2

Extraction method (Designation)	Sample (g) wet /dry	Extraction weight (g)	Extraction ratio (%)	Sample conc.(mg/ml)
4℃ (Raw-4)	25 /0.5	0.230	46.0	200
37℃ (Raw-37)	25 /0.5	0.249	49.8	200
60℃ (Raw-60)	25 /0.5	0.219	43.8	200
80℃ (Raw-80)	25 /0.5	0.200	40.0	200
Homogenization (Raw-Total)	25 /0.5	0.270	54.0	200
NaOH hydrolysis (Raw-NaOH)	25 /0.5			100
Boiling (Raw-Peptide)	25 /0.5	0.270	54.0	200
Chloroform : MeOH extraction (Raw-TFA)	50 /1.0	0.0484	4.84	0.6
Phenol extraction (Raw-ECP)	50 /1.0	0.03	3	0.1

<63>

<64> - 비감압멸균 태반을 사용한 각 추출물의 최종 수율

<65> **<실시예 3: 추출방법에 따른 아미노산 성분의 비교분석>**

<66> 아미노산은 단백질을 구성하고 있는 성분으로 각각의 추출방법에 따라 추출되어지는 단백질의 차이를 나타내는 지표이며, 이것은 매번 동일한 방법에 의해 추출된 동일한 추출물의 성분지표로써 활용이 가능하다. 면역증강 효능이 뛰어난 Raw 태반을 가열하여 추출한 Raw-Peptide(PPE100) 추출물, Raw Placenta을 80℃에서 30분간 가온하여 추출한 Raw-80(PPE80)추출물, Raw Placenta을 NaOH로 추출한 Raw-NaOH 추출물에 대하여 아미노산 분석을 수행한 결과 (도 1), Raw-Peptide 추출물과 Raw-80 추출물의 아마노산 조성은 대단히 유사함을 보여주고 있으나, 두 추출물과 비교하여 Raw-NaOH 추출물의 아미노산 조성은 큰 차이를 보이고 있음 (표 3). 따라서, 각추출물의 특이적인 지표성분으로서 활용이 가능한 것을 알 수 있다. 태반 추출물은 표 3에서 확인할 수 있는 바와 같이, 일반적으로 곡류 위주인 자돈 사료에 부족하기 쉬운 제한 아미노산 (Lysine, Methionine, Threonine)

을 충분히 공급할 수 있다

표 3

<67> 각 추출물의 아미노산 조성

아미노산	Raw-Peptide 추출물 (PPE100)	Raw-80 추출물 (PPE80)	Raw-NaOH 추출물
Alanine	7.278	7.499	8.424
Leucine	6.156	5.733	5.441
Arginine	5.008	4.812	0.216
Serine	4.977	4.749	2.720
Threonine	4.496	4.705	0.965
Lysine	4.375	4.660	7.532
Valine	4.052	4.326	3.658
Phenylalanine	3.753	4.375	2.053
Isoleucine	3.565	3.626	1.280
Histidine	3.259	3.529	1.142
Tyrosine	2.589	2.055	1.131
Methionine	2.337	2.165	0.394
Cystein	1.466	1.838	0.721
Proline	0.810	1.139	0.332
Glycine	-	8.569	13.062
Glutamic acid	-	-	8.169
Aspartic acid	-	-	6.690

<68> **<실시예 4: NO 어세이로 살펴본 돼지 태반 추출물의 면역증강 효과 분석>**

<69> 생쥐유래 대식세포 세포주인 J774A.1세포를 사용하여 면역활성화에 의해서 생성분비되는 NO의 생성에 미치는 각 태반 추출물의 효과를 비교 검토하였다. 먼저, 잘 알려진 면역증강제인 LPS (Lipopolysaccharide) 및 IFN-γ (Interferon-gamma)을 사용하여 J774A.1세포의 면역활성화에 의한 반응을 검토하였다 . 면역증강제를 단독 혹은 병합하여 투여한 후, NO가 생성되어 배양액중에 축적된 Nitrite을 아질산나트륨(Sodium Nitrite)을 표준물질로 하여 그리스 용액(Griess reagent)을 사용하여 정량하였다. NO의 생성과 아질산나트륨의 농도사이에 r=0.9994의 선형성(correlation)이 형성되어 정량이 이루어지고 있음을 보여 주었다(도 2). 이러한 선형성을 바탕으로 LPS (1 μg/ml) 및 IFN-γ (100 U/ml)을 단독 혹은 병합하여 세포에 처리한후, 경시적인 NO의 생성량을 분석한 결과, LPS 단독처리에 의해 유의하게 NO의 생성이 증가되었지만, IFN-γ 단독에 의해서는 NO의 유의한 생성은 관찰되지 않았다(도 3). 한편, 체내에서 생성되어 분비되는 IFN-γ와 LPS을 병합하여 처리한 결과 LPS 단독과 비교하여 5배이상 NO 생성량이 증가하였다. 이러한 병합효과는 처리 48시간 이후에 최대에 도달하였으므로 각각의 태반 추출물의 면역증강 효과를 처리 48시간째에 생성된 NO의 양을 정량함으로써 면역증강활성을 스크리닝하였다.

<70> 먼저 1×10^5 개의 세포를 각각의 추출물 1 mg/ml의 농도로 처리하여 48시간후에 배양액중에 축적된 NO을 분석한 결과, LPS 단독처리 만큼의 NO 생성효과를 나타내는 태반 추출물은 없었다 (도 4). 한편, 앞선 결과에서 우리 체내에서 생성되어 분비되는 IFN-γ와 LPS을 병합하여 처리한 결과 LPS 단독과 비교하여 5배이상 NO생성량이 증가하였다. 이러한 병합효과는 처리 48시간이후에 최대에 도달하였으므로 각각의 태반 추출물의 면역증강효과를 IFN-γ와의 병합처리에 의해 스크리닝을 수행하였다. 놀랍게도 단독처리에 의해서는 면역증강효과가 나타나지 않았던 모든 태반 추출물에서 IFN-γ와의 병합처리에 의해 가열에 의해 추출한 Peptide 추출물과 80℃에서 30분간 처리하여 추출한 추출물 및 알카리 추출물 (NaOH)에서 유의하게 NO 생성량이 증가하고 있음이 감압멸균한 태반(Autoclaved Placenta)과 비 감압멸균 태반(Raw Placenta)모두에서 관찰되었다 (도 5).

<71> 위에서 스크리닝된 면역활성화 태반 추출물들을 대상으로 최종적으로 NO 생성촉진능력을 재검토한 결과, Raw-Peptide(PPE100) 분획과 Raw-80(PPE80)분획에서 재현성 있는 결과가 도출되었고, 농도의존적으로 NO의 생성량을 증가시킴으로써 J774A.1 세포에 대한 면역증강효과를 나타내었다(도 6).

<72> 최종적으로 가장 면역활성화 성분을 많이 포함하는 태반 추출물을 선정하기 위하여 N=5의 실험군을 가지고 J774A.1세포에서의 NO의 생성량에 대한 효과를 검토분석한 결과, Raw-80(PPE80) 및 Raw-Peptide(PPE100) 분획이 면역활성화능력에서 가장 뛰어난 추출물임이 증명되었다 (도 7). 따라서, 이후의 모든 실험은 위의 두가지 태반 추출물에 음성 대조구(Negative control)로서 Raw-NaOH 분획을 사용하여 실험을 수행하였다.

<73> **<실시예 5: ROS 생성능으로 살펴본 돼지 태반 추출물의 면역증강 효과 분석>**

<74>

<75> 인체가 여러 가지 병원성 미생물(pathogen)에 의해 감염되면, 감염원을 제거하기 위하여 체내의 면역시스템이 작동하게 되는데, 그중의 하나로 대식세포가 유해한 ROS을 대량으로 생성하여 병원성 미생물을 죽이는 살상무기로 사용되고 있는 것이 잘 알려져 있다. 따라서, 본 실험에서는 이러한 앞선 연구결과에서 면역활성화 능력이 뛰어난 태반 추출물인 Raw-80(PPE80) 및 Raw-Peptide(PPE100) 분획이 대식세포주인 J774A.1세포에서 ROS의 생성에 효과가 있는지를 분석하였다.

<76> ROS의 생성을 증가시키는 것이 잘 알려진 LPS(Lipopolysaccharide)와 면역활성화능이 알려진 IFN-γ (Interferon-gamma) 및 Raw-80 및 Raw-Peptide을 J774A.1세포에 처리하여 ROS의 생성량을 FACSCalibur로 분석하였다 (도 8). LPS (100 ng/ml) 및 IFN-γ (10 U/ml)을 단독 혹은 병합하여 세포에 처리한 결과, LPS단독처리에 의해 유의하게 ROS의 생성이 증가되었지만, IFN-γ 단독에 의해서는 ROS의 유의한 생성은 관찰되지 않았다 (도 8).

<77> 한편, IFN-γ와 LPS을 병합하여 처리한 결과 LPS을 단독으로 처리한 정도의 ROS가 생성되는 것으로 보아 IFN-γ는 ROS 생성에는 영향을 미치지 않는 결과를 나타내었다. 하지만, IFN-γ와 Raw-80(PPE80) 및 Raw-Peptide(PPE100)를 병합처리한 결과, 유의한 ROS의 생성이 관찰되었으나, 음성대조구로 사용된 Raw-NaOH에서는 ROS가 거의 생성되고 있지 않음을 관찰할 수 있었다 (도 9).

<78> **<실시예 6: 돼지 태반 추출물의 세포독성>**

<79> 생쥐 대식세포 유래 J774A.1세포의 면역을 활성화시킨 Raw-80(PPE80) 및 Raw-Peptide(PPE100)의 세포독성에 미치는 영향을 알아보고자 MTT 및 LDH 방출 어세이를 수행하였다.

<80> Raw-80의 농도를 면역증강효과가 있는 0.5 ~ 1.0 mg/ml의 농도를 기준으로 단독으로 J774A.1세포에 처리하여 48시간 배양후에 MTT 및 LDH 방출 어세이로 분석한 결과, 0.5 ~ 1.0 mg/ml의 농도에서는 큰 영향을 미치지 않았으나, 1 mg/ml 이상의 농도에서는 약간의 세포독성을 나타내었다(도 10A). 한편, 인터페론과의 병합처리에 의해서도 LDH의 유리에 미치는 영향은 태반 추출물 단독처리와 유사한 결과를 나타내었으나 (도 10B), MTT 어세이에서는 유의하게 영향을 미치고 있는 것으로 보였으나, 이는 인터페론이라는 사이토카인의 특성이 세포분화를 유도하는 물질로 아마도 세포분화로 인한 증식정지에 의해 나타난 현상이라고 사료된다. 따라서, 1 mg/ml이하의 농도를 사용하여 세포의 면역력을 증강시킬 수 있었기 때문에 세포독성은 문제가 되지 않는 것으로 볼 수 있다.

<81> 세포생존(cell viability)에 대한 Raw-Peptide의 효과를 Raw-Peptide의 농도를 면역증강효과가 있는 0.5-1.0 mg/ml의 농도를 기준으로 단독으로 J774A.1세포에 처리하여 48시간 배양후에 MTT 및 LDH 방출 어세이로 분석한 결과, 0.5-1.0 mg/ml의 농도에서는 큰 영향을 미치지 않았으나, 5 mg/ml 농도에서는 약간의 세포독성을 나타내었다 (도 11A). 한편, 인터페론과의 병합처리에 의해서도 LDH의 유리에 미치는 영향은 태반 추출물 단독처리와 유사한 결과를 나타내었으나 (도 11B), MTT 어세이에서는 유의하게 영향을 미치고 있는 것으로 보였으나, 이것도 위의 Raw-80과 같이 인터페론의 세포분화 활성으로 인한 증식정지에 의해 나타난 현상이라고 사료된다. Raw-Peptide(PPE100)가 Raw-80(PPE80) 분획보다도 세포독성에 있어서는 더욱더 안전한 결과를 나타내었다.

산업이용 가능성

<82> 본 발명의 제조 방법으로, 높은 수율로 우수한 면역활성 기능을 가지는 태반 추출물을 제조할 수 있으므로,동물의 사료나 음수의 원료 및 첨가제로 사용할 수 있을 뿐만 아니라, 화장품, 의약 및 수의약 등의 다양한 분야에서 태반 추출물을 원료 및 첨가제로 사용하는 제품에 폭넓은 활용이 기대된다.

도면의 간단한 설명

<83> 도 1은 각 추출물의 아마노산을 분석한 그래프이다. (a: Raw-펩타이드 추출물, b: Raw-80 추출물, c:Raw-NAOH

추출물)

<84> 도 2는 그리스 시약으로 NO를 정량한 결과이다.

<85> 도 3은 LPS 및 IFN-γ처리에 의한 NO 생성량을 살펴본 결과이다.

<86> 도 4는 면역활성화 분획을 스크리닝한 결과이다.

<87> 도 5는 각 태반 추출물(0.5 mg/ml)의 NO 생성량 측정한 결과이다. (a: Raw Placenta, b:Autoclaved Placenta)

<88> 도 6는 각 태반 추출물의 NO생성에 대한 농도 의존적인 효과를 살펴본 결과이다.

<89> 도 7은 면역활성화 성분을 많이 포함하는 태반 추출물을 최종 선정한 결과이다.

<90> 도 8은 Raw-80과 Raw-펩타이드 추출물이 ROS 생성에 미치는 효과를 살펴본 결과이다.

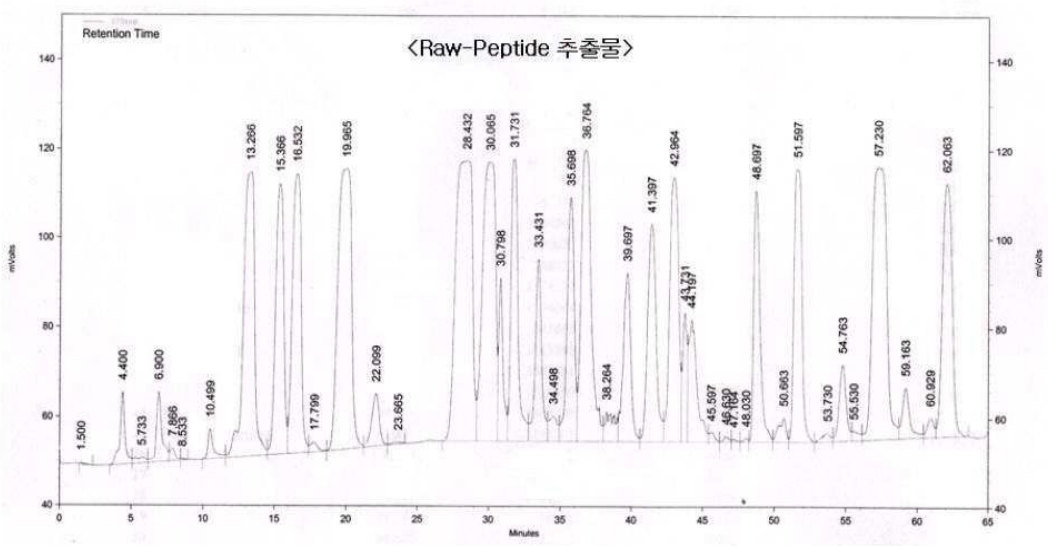
<91> 도 9는 ROS 생성을 정량분석한 결과이다.

<92> 도 10은 Raw-80이 세포 생존에 미치는 효과를 살펴본 결과이다.

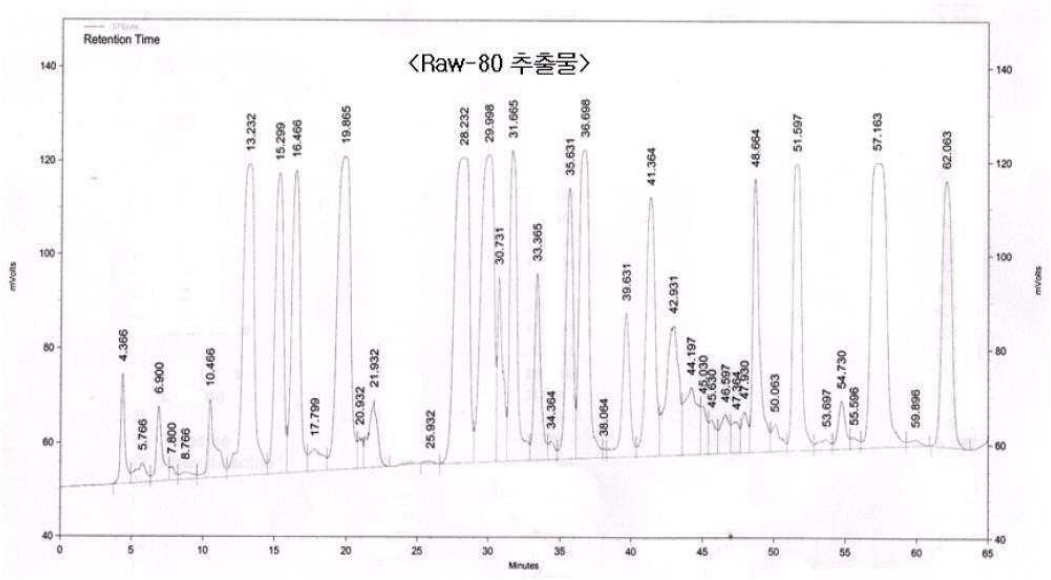
<93> 도 11은 Raw-peptide가 세포 생존에 미치는 효과를 살펴본 결과이다.

도면

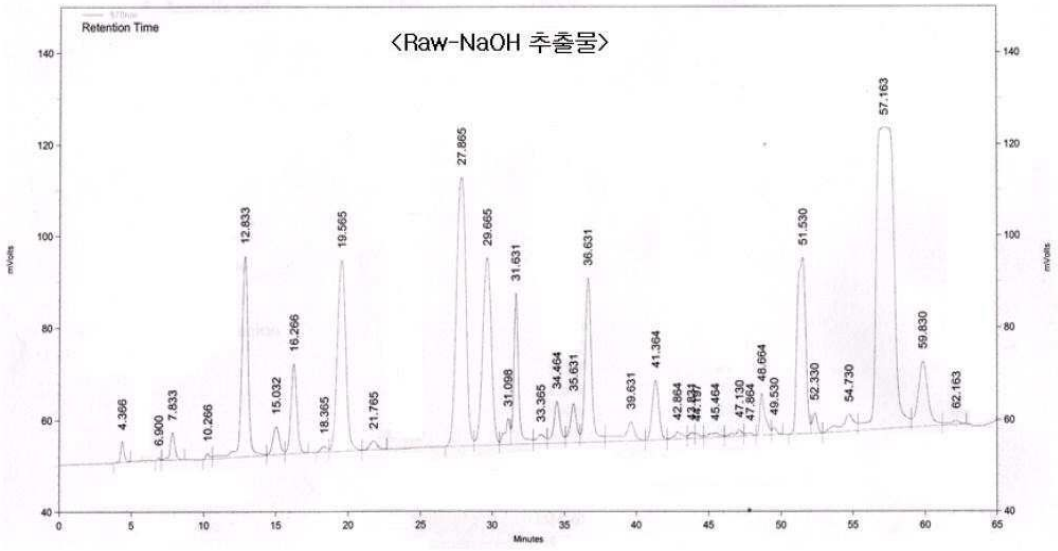
도면1a



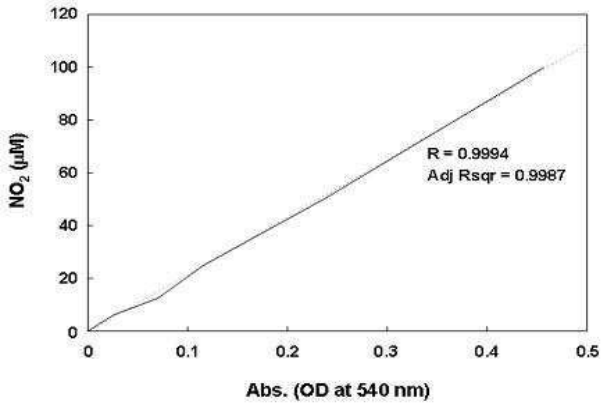
도면1b


Retention Time
<Raw-80 추출물>
mVolts
Minutes
4.366
5.766
6.900
7.800
8.766
10.466
13.232
15.299
16.466
17.799
19.865
20.932
21.932
25.932
28.232
29.998
30.731
31.665
33.365
34.364
35.631
36.698
38.064
39.631
41.364
42.931
44.197
45.530
46.697
47.364
47.930
48.664
50.063
51.597
53.697
54.730
55.596
57.163
59.896
62.063

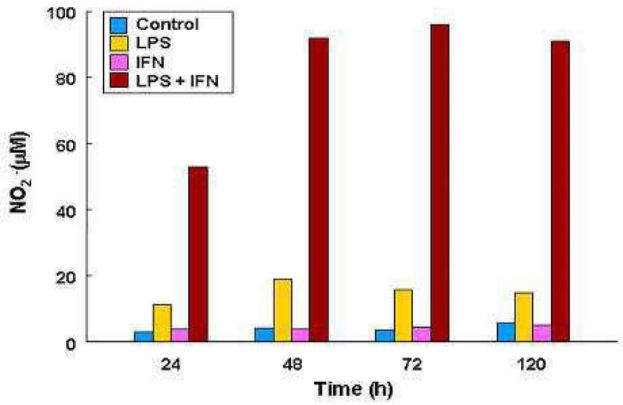
도면1c


Retention Time
<Raw-NaOH 추출물>
mVolts
Minutes
4.366
6.900
7.833
10.266
12.833
15.032
16.266
18.365
19.565
21.765
27.865
29.665
31.098
31.631
33.365
34.464
35.631
36.631
39.631
41.364
42.864
45.464
47.130
47.864
48.664
49.530
51.530
52.330
54.730
57.163
59.830
62.163

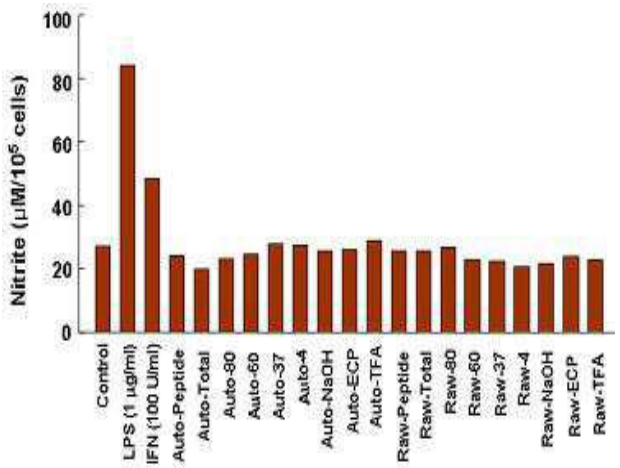
도면2


120
100
80
60
40
20
0
NO_2 (μM)
R = 0.9994
Adj Rsqr = 0.9987
0
0.1
0.2
0.3
0.4
0.5
Abs. (OD at 540 nm)

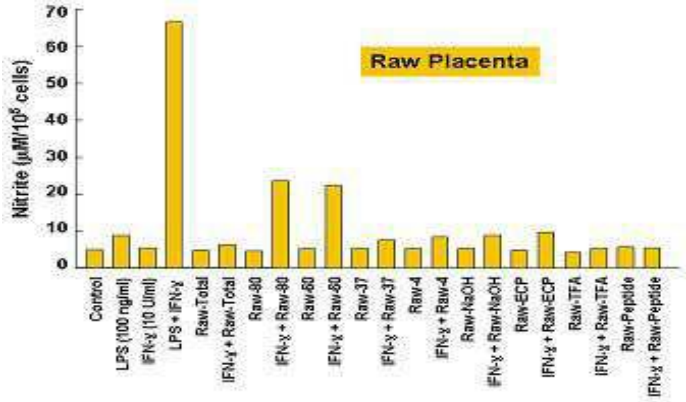
도면3


100
80
60
40
20
0
NO_2 (μM)
Control
LPS
IFN
LPS + IFN
24
48
72
120
Time (h)

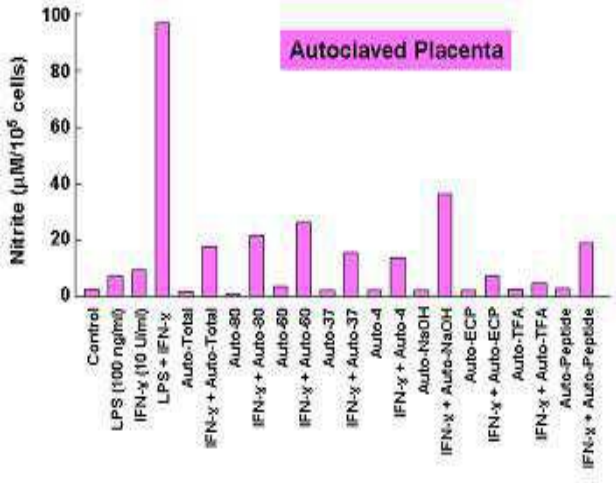
도면4


100
80
60
40
20
0
Nitrite (μM/10^5 cells)
Control
LPS (1 μg/ml)
IFN (100 U/ml)
Auto-Peptide
Auto-Total
Auto-80
Auto-60
Auto-37
Auto-4
Auto-NaOH
Auto-ECP
Auto-TFA
Raw-Peptide
Raw-Total
Raw-80
Raw-60
Raw-37
Raw-4
Raw-NaOH
Raw-ECP
Raw-TFA

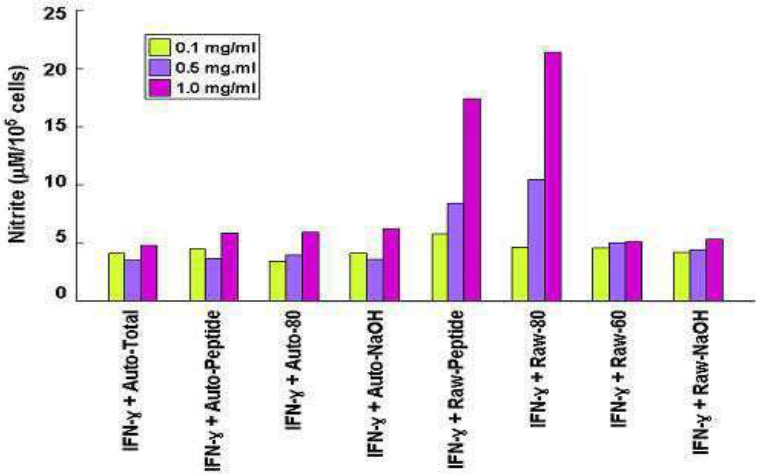
도면5a



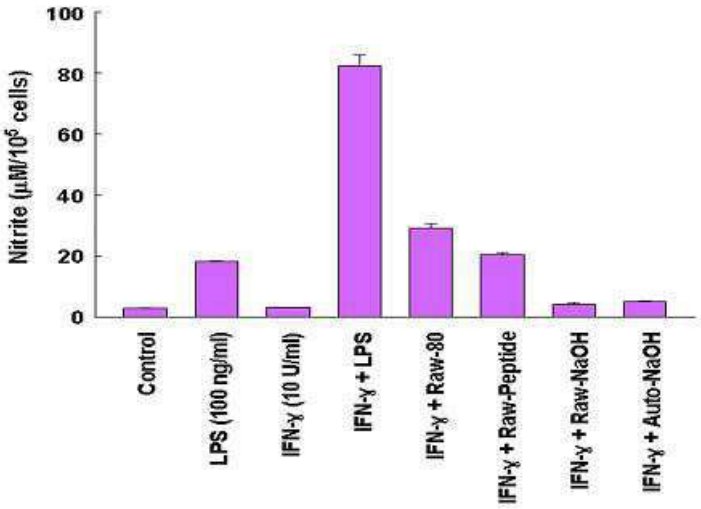
도면5b



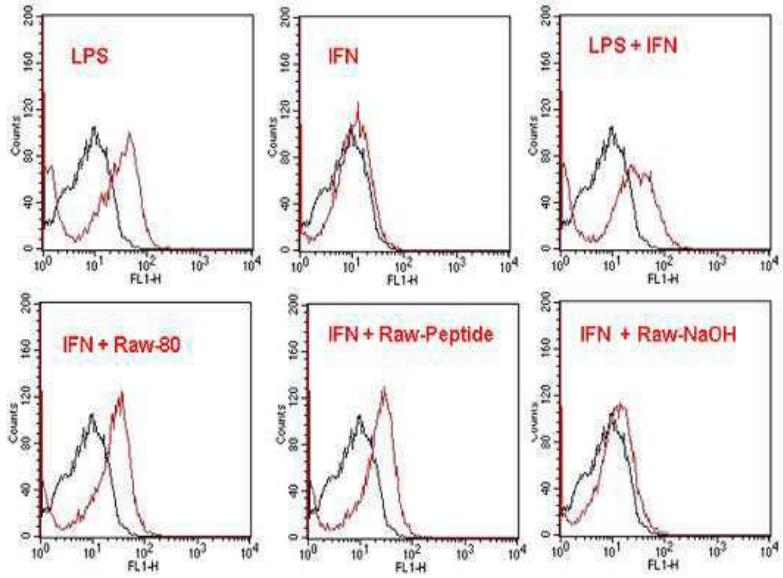
도면6



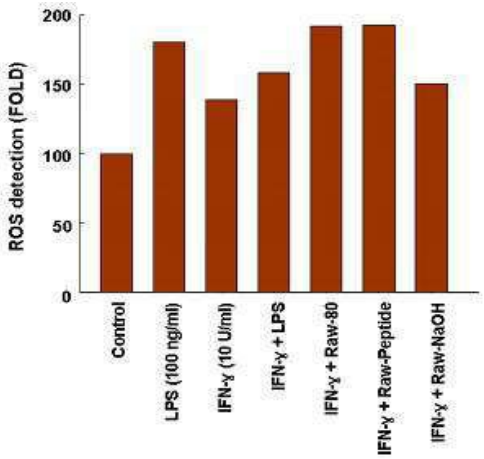
도면7


Nitrite (μM/10^5 cells)
100
80
60
40
20
0
Control
LPS (100 ng/ml)
IFN-γ (10 U/ml)
IFN-γ + LPS
IFN-γ + Raw-80
IFN-γ + Raw-Peptide
IFN-γ + Raw-NaOH
IFN-γ + Auto-NaOH

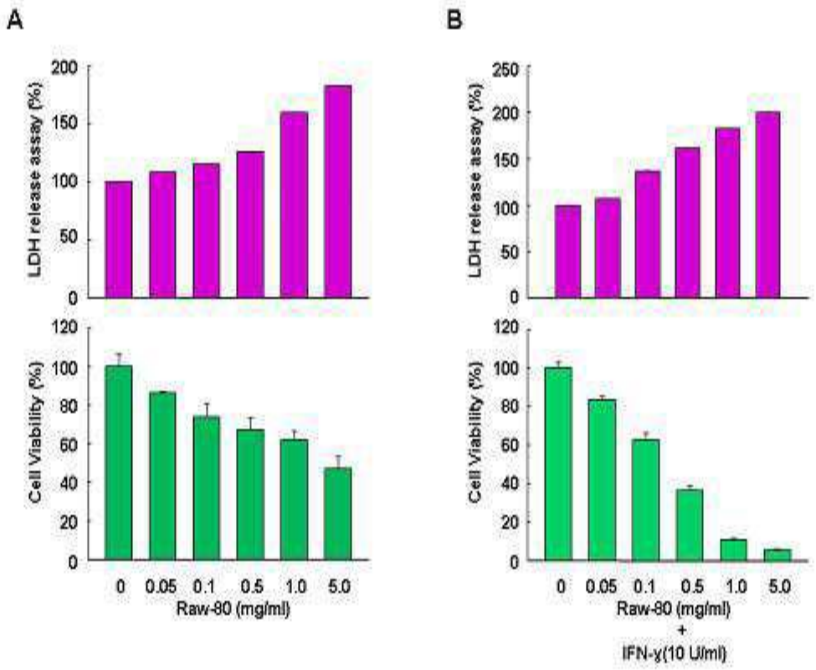
도면8


LPS
IFN
LPS + IFN
IFN + Raw-80
IFN + Raw-Peptide
IFN + Raw-NaOH
Counts
FL1-H

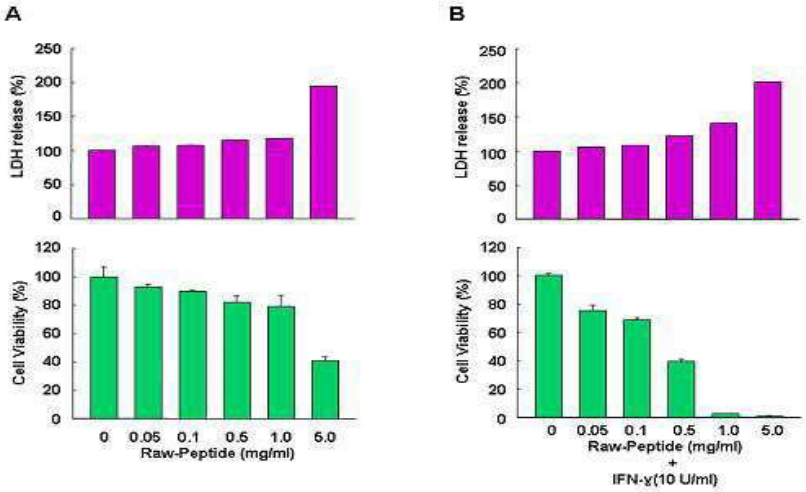
도면9


ROS detection (FOLD)
200
150
100
50
0
Control
LPS (100 ng/ml)
IFN-γ (10 U/ml)
IFN-γ + LPS
IFN-γ + Raw-80
IFN-γ + Raw-Peptide
IFN-γ + Raw-NaOH

도면10


A
B
LDH release assay (%)
Cell Viability (%)
0 0.05 0.1 0.5 1.0 5.0
Raw-80 (mg/ml)
Raw-80 (mg/ml)
+
IFN-γ(10 U/ml)

도면11


A
LDH release (%)
250
200
150
100
50
0
Cell Viability (%)
120
100
80
60
40
20
0
0 0.05 0.1 0.5 1.0 5.0
Raw-Peptide (mg/ml)
B
LDH release (%)
250
200
150
100
50
0
Cell Viability (%)
120
100
80
60
40
20
0
0 0.05 0.1 0.5 1.0 5.0
Raw-Peptide (mg/ml)
+
IFN-γ(10 U/ml)