(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2021-0122125
(43) 공개일자 2021년10월08일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A23L 33/17 (2016.01) *A23K 20/147* (2016.01)
A23K 20/153 (2016.01) *A23L 3/44* (2006.01)
A23L 35/00 (2016.01) *A61K 35/64* (2015.01)
A61K 38/01 (2006.01) *A61P 21/00* (2006.01)
(52) CPC특허분류
A23L 33/17 (2016.08)
A23K 20/147 (2016.05)
(21) 출원번호 10-2021-0038130
(22) 출원일자 2021년03월24일
심사청구일자 2021년03월24일
(30) 우선권주장
1020200038625 2020년03월30일 대한민국(KR)

(71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)
(72) 발명자
김유경
서울특별시 송파구 올림픽로35길 104, 10동 1308호 (신천동, 장미아파트)
오은영
서울특별시 영등포구 도신로53길 9-6, 1층 (신길동)
윤영균
서울특별시 강동구 천중로49길 11, 예다움아파트 동 803호 (길동, 예다움아파트)
(74) 대리인
특허법인 남앤남

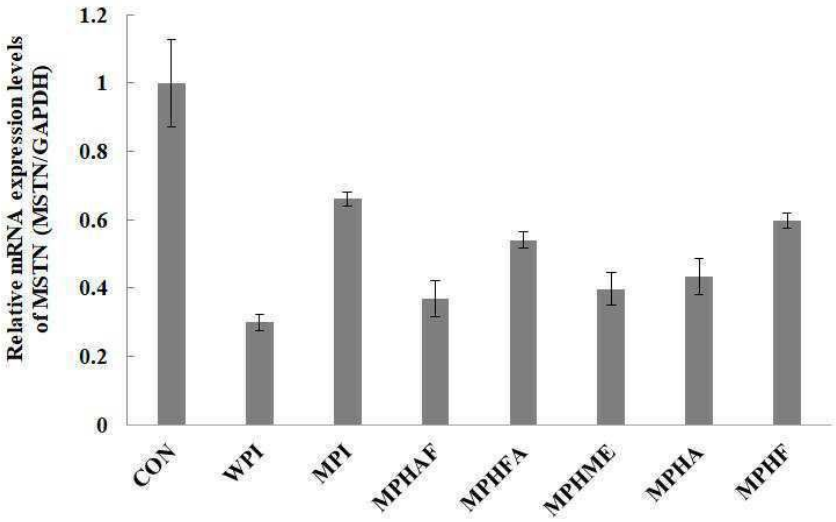
전체 청구항 수 : 총 10 항

(54) 발명의 명칭 **갈색거저리 유충 단백질 또는 이의 가수분해물을 유효성분으로 포함하는 근감소증의 예방, 개선 또는 치료용 조성물**

(57) 요 약

갈색거저리 유충 단백질 또는 이의 가수분해물을 유효성분으로 포함하는 근육 질환 예방, 개선 또는 치료용 약제학적 조성물; 식품 조성물; 건강기능식품; 및 사료조성물에 관한 것이다. 본 발명의 갈색거저리 유충 단백질 또는 이의 가수분해물은 마이오스타틴(Myostatin) 발현을 효과적으로 억제할 수 있는바, 이를 유효성분으로 포함하는 조성물은 근 기능 저하, 근육 감소, 근육 위축, 근육 소모 또는 근육 퇴화로 인하여 발생되는 다양한 근육 질환의 예방, 개선 또는 치료용 조성물로서 의약품, 식품 및 사료 산업에 유용하게 사용될 수 있다.

대 표 도 - 도3



(52) CPC특허분류
A23K 20/153 (2016.05)
A23L 3/44 (2013.01)
A23L 35/00 (2016.08)
A61K 35/64 (2013.01)
A61K 38/012 (2013.01)
A61P 21/00 (2018.01)
A23V 2002/00 (2013.01)
A23V 2200/316 (2013.01)
A23V 2300/31 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711083587
과제번호	2018R1A2B6002945
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	(이공)중견연구자지원(0.5억이상~3억이하)
연구과제명	콩과 갈색거저리 유충을 이용한 근감소증 개선 소재 개발
기 여 율	1/1
과제수행기관명	고려대학교
연구기간	2018.03.01 ~ 2021.02.28

명 세 서

청구범위

청구항 1

갈색거저리 유충 단백질 또는 이의 가수분해물을 유효성분으로 포함하는 근육 질환 예방 또는 개선용 식품 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 갈색거저리 유충 단백질은 a) 갈색거저리 유충 건조물을 분쇄하는 단계; b) 분쇄물에 에탄올을 첨가하여 탈지시키는 단계; c) 탈지된 갈색거저리 유충에 수산화나트륨을 첨가 혼합한 후 원심분리하여 침전물을 수득하는 단계; 및 d) 수득한 침전물을 탈염한 후 동결건조하는 단계를 포함하는 과정을 통해 제조되는 것을 특징으로 하는 식품 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 가수분해물은 갈색거저리 유충 단백질에 알칼라아제, 플라보르자임 또는 이의 혼합물을 처리하여 가수분해시켜 제조되는 것을 특징으로 하는 식품 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 갈색거저리 유충 단백질 또는 이의 가수분해물은 마이오스타틴(Myostatin) 발현을 억제시키는 것을 특징으로 하는 식품 조성물.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 근육 질환은 근 기능 저하, 근육 감소, 근육 위축, 근육 소모 또는 근육 퇴화로 인한 근육 질환인 것을 특징으로 하는 식품 조성물.

청구항 6

제5항에 있어서,

상기 근육 질환은 긴장감퇴증(atony), 근위축증(muscular atrophy), 근이영양증(muscular dystrophy), 근무력증, 악액질(cachexia), 경직성 척추 증후군(rigid spinesyndrome), 근위축성 측삭경화증(루게릭병, amyotrophic lateral sclerosis), 샤르코-마리-투스병(Charcot-Marie-Tooth disease) 및 근감소증(sarcopenia)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 식품 조성물.

청구항 7

갈색거저리 유충 단백질 또는 이의 가수분해물을 유효성분으로 포함하는 근육 질환 예방 또는 개선용 건강기능식품.

청구항 8

제7항에 있어서,

상기 건강기능식품은 음료류, 육류, 과자류, 면류, 떡류, 빵류, 껌류, 사탕류, 아이스크림류 및 주류로 이루어진 군으로부터 선택되는 건강기능식품.

청구항 9

갈색거저리 유충 단백질 또는 이의 가수분해물을 유효성분으로 포함하는 근육 질환 예방 또는 치료용 약제학적 조성물.

청구항 10

갈색거저리 유충 단백질 또는 이의 가수분해물을 유효성분으로 포함하는 근육 질환 예방 또는 개선용 사료첨가제 조성물.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 갈색거저리 유충 단백질 또는 이의 가수분해물을 유효성분으로 포함하는 근육 질환 예방, 개선 또는 치료용 약제학적 조성물; 식품 조성물; 건강기능식품; 및 사료조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 대한민국은 2000년 노인인구가 전체인구의 7.2%를 차지하여 고령화 사회에 진입하였으며, 2050년에는 초고령화 사회(20% 이상)에 진입할 것으로 예측된다(2013년 고령자 통계, 통계청). 사람의 근육양은 나이가 들면서 감소하고(50~70세에 10~15% 정도, 그리고 70세~80세에서 30% 이상 감소), 이에 따라 근력과 근기능도 약화되는데, 이를 노인성 근감소증(sarcopenia)이라 한다. 노인성 근감소증은 활동장애와 보행장애를 유발하여 노인들의 독립적인 생활을 제한하는 주요 원인이 된다. 또한, 근감소증은 기초대사율을 저하시켜 인슐린 저항성을 높이고 2형 당뇨병 발생을 촉진하며, 고혈압 및 심혈관계 질환 발생위험을 3-5배 증가시킨다.

[0003] 근감소증의 개념은 1989년 Irwin Rosenberg가 'sarcopenia'라는 용어를 도입하면서 시작된 것으로, 그리스어에서 기원을 보면 근육을 의미하는 “sarx”와 감소되어 있다는 뜻의 “penia”가 합성된 단어이다. 근감소증은 노화와 연관되어 근육량의 감소에 따른 근력의 저하를 의미한다. 여기에서 “근육(muscle)” 이란 골격근(skeletal muscle)을 의미하고 평활근(smooth muscle)과는 관계가 없다. 즉, 근감소증은 주로 사지에 분포한 골격근의 감소(loss of skeletal muscle mass)를 의미하며, 악성종양의 말기 등에서 나타나는 현저한 근육 소실 상태인 악액질(cachexia), 독감 등 급성질병으로 인한 근육소모(muscle wasting), 혹은 근육자체의 질병(primary muscle disease)과는 구별되는 것으로, 순전히 노화와 연관되어 나타나는 점진적인 골격근 감소의 결과로 보아야 한다.

[0004] 현재 근감소증 치료용도로 승인된 의약품은 전무한 실정이며, 마이오스타틴(myostatin) 억제물질 또는 기존 FDA 승인을 받은 타질환 치료제를 근감소증에 적용하는 약물재배치(drug repositioning) 기술이 개발 중에 있다.

[0005] 마이오스타틴(myostatin)은 TGF-β의 superfamily군에 속하는 폴리펩타이드(polypeptide) 성장인자이다. TGF-β는 다량의 이소폼(isoform)을 가지고 있으며, 이는 세포의 증식(proliferation), 세포사멸(apoptosis), 분화, 뼈의 형성 및 유지에 관여하는 것으로 알려져 있다(Massague & Chen, 2000). 마이오스타틴은 그 중 성장분화인자(growth differentiation factor, GDF) 8번에 속하며, 조직의 성장 및 발달에 관여하고, Smad 신호 전달계를 활성화시켜 작용한다. 또한, p21 유전자에 의해 세포주기 및 전구세포의 증식을 억제하여 골 형성 및 재생에도 영향을 미치는 것으로 보고되어 있다. 마이오스타틴은 주로 골격근세포에서 생성되어 자가분비 방식으로 근육 소실 및 근력감소를 야기하며, 근 비대에 관여하는 IGF-1이나 폴리스타틴(Follistatin)의 발현을 억제함으로써 근아세포(myoblast)에서의 단백질 합성 및 세포 증식을 억제한다는 것으로 알려져 있다.

[0006] 종래 근감소증 치료를 위하여 마이오스타틴의 기능만을 억제하기 위한 항체가 제조된바 있으나 부작용이 보고되었으며, 천연물을 이용한 항마이오스타틴 소재에 대한 연구도 활발히 진행되고 있는 실정이다.

[0007] 이러한 배경 하에, 본 발명자들은 근감소증을 효과적으로 치료할 수 있는 제제를 개발하기 위하여 예의 연구 노력한 결과, 갈색거저리 유충 단백질 및 이의 가수분해물이 마이오스타틴(Myostatin)의 발현을 효과적으로 억제시킴으로써 근감소증을 예방하거나 치료할 수 있음을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

선행기술문헌

특허문헌

[0008] (특허문헌 0001) 한국공개특허 제10-2019-0088393호

(특허문헌 0002) 한국공개특허 제10-2020-0009543호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009] 따라서 본 발명의 목적은 근육 질환을 효과적으로 예방 또는 치료할 수 있는 약제학적 조성물을 제공하는 것이다.

[0010] 본 발명의 다른 목적은, 근육 질환을 효과적으로 예방 또는 개선할 수 있는 식품 조성물을 제공하는 것이다.

[0011] 본 발명의 또 다른 목적은, 근육 질환을 효과적으로 예방 또는 개선할 수 있는 건강기능식품을 제공하는 것이다.

[0012] 본 발명의 또 다른 목적은, 근육 질환을 효과적으로 예방 또는 개선할 수 있는 사료첨가제 조성물을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0013] 상기와 같은 본 발명의 목적을 달성하기 위해서,

[0014] 본 발명은 갈색거저리 유충 단백질 또는 이의 가수분해물을 유효성분으로 포함하는 근육 질환 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공한다.

[0015] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 갈색거저리 유충 단백질은 a) 갈색거저리 유충 건조물을 분쇄하는 단계; b) 분쇄물에 에탄올을 첨가하여 탈지시키는 단계; c) 탈지된 갈색거저리 유충에 수산화나트륨을 첨가 혼합한 후 원심분리하여 침전물을 수득하는 단계; 및 d) 수득한 침전물을 탈염한 후 동결건조하는 단계를 포함하는 과정을 통해 제조될 수 있다.

[0016] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 가수분해물은 갈색거저리 유충 단백질에 알칼라아제, 플라보르자임 또는 이의 혼합물을 처리하여 가수분해시켜 제조될 수 있다.

[0017] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 갈색거저리 유충 단백질 또는 이의 가수분해물은 마이오스타틴(Myostatin) 발현을 억제시킬 수 있다.

[0018] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 근육 질환은 근 기능 저하, 근육 감소, 근육 위축, 근육 소모 또는 근육 퇴화로 인한 근육 질환일 수 있다.

[0019] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 근육 질환은 긴장감퇴증(atony), 근위축증(muscular atrophy), 근이영양증(muscular dystrophy), 근무력증, 악액질(cachexia), 경직성 척추 증후군(rigid spinesyndrome), 근위축성 측삭경화증(루게릭병, amyotrophic lateral sclerosis), 샤르코-마리-투스병(Charcot-Marie-Tooth disease) 및 근감소증(sarcopenia)으로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다.

[0020] 또한, 본 발명은 갈색거저리 유충 단백질 또는 이의 가수분해물을 유효성분으로 포함하는 근육 질환 예방 또는 개선용 건강기능식품을 제공한다.

[0021] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 건강기능식품은 음료류, 육류, 과자류, 면류, 떡류, 빵류, 껌류, 사탕류, 아이스크림류 및 주류로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다.

[0022] 또한, 본 발명은 갈색거저리 유충 단백질 또는 이의 가수분해물을 유효성분으로 포함하는 근육 질환 예방 또는 치료용 약제학적 조성물을 제공한다.

[0023] 또한, 본 발명은 갈색거저리 유충 단백질 또는 이의 가수분해물을 유효성분으로 포함하는 근육 질환 예방 또는 개선용 사료첨가제 조성물을 제공한다.

발명의 효과

[0024] 본 발명의 갈색거저리 유충 단백질 또는 이의 가수분해물은 마이오스타틴(Myostatin) 발현을 효과적으로 억제할

수 있는바, 이를 유효성분으로 포함하는 조성물은 근 기능 저하, 근육 감소, 근육 위축, 근육 소모 또는 근육 퇴화로 인하여 발생되는 다양한 근육 질환의 예방, 개선 또는 치료용 조성물로서 의약품, 식품 및 사료 산업에 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0025] 도 1은 본 발명에 따른 실시예 1, 2를 통해 제조한 갈색거저리 유충 단백질(MPI) 및 이의 가수분해물(MPH)의 제조 공정도를 나타낸 것이다.

도 2는 본 발명의 갈색거저리 유충 단백질(MPI) 및 이의 가수분해물(MPHAF, AF-LT, AF-TT, AF-MT)의 세포독성을 평가한 것이다.

도 3은 가수분해 조건을 다르게 설정하여 제조한 본 발명의 갈색거저리 유충 단백질 가수분해물(MPHAF, MPHFA, MPHME, MPHA, MPHF)을 C2C12 세포에 0.01 mg/mL 농도로 처리한 후 마이오스타틴(Myostatin)의 상대적인 mRNA 발현 수준을 측정한 결과이다.

도 4는 MPHAF의 크기별 가수분해물(AF-LT, AF-TT, AF-MT)을 C2C12 세포에 0.01 mg/mL 농도로 처리한 후 마이오스타틴(Myostatin)의 상대적인 mRNA 발현 수준을 측정한 결과이다.

도 5는 본 발명의 갈색거저리 유충 단백질(MPI) 및 이의 가수분해물(MPH)을 C2C12 세포에 0.01 mg/mL 농도로 처리한 후 상대적인 마이오스타틴(Myostatin) 프로모터 루시퍼다아제 활성을 측정한 것이다.

도 6은 LPS로 염증을 유발한 대식세포에 가수분해 조건을 다르게 설정하여 제조한 본 발명의 갈색거저리 유충 단백질 가수분해물(MPHAF, MPHFA, MPHME, MPHA, MPHF)을 처리한 후 염증성 사이토카인(IL-6, TNF-a, IL-1b) 발현 억제 정도를 평가한 결과이다.

도 7은 LPS로 염증을 유발한 대식세포에 MPHAF의 크기별 가수분해물(AFLT, AFTT, AFMT)을 처리한 후 염증성 사이토카인(IL-6, TNF-a, IL-1b) 발현 억제 정도를 평가한 결과이다.

도 8은 가수분해 조건을 다르게 설정하여 제조한 본 발명의 갈색거저리 유충 단백질 가수분해물(MPHAF, MPHFA, MPHME, MPHA, MPHF)의 available amino group 농도를 측정한 것이다.

도 9는 가수분해 조건을 다르게 설정하여 제조한 본 발명의 갈색거저리 유충 단백질 가수분해물(MPHAF, MPHFA, MPHME, MPHA, MPHF)의 단백질 농도를 측정한 것이다.

도 10은 MPHAF의 크기별 가수분해물(AF-LT, AF-TT, AF-MT)의 단백질 농도를 측정한 것이다.

도 11은 가수분해 조건을 다르게 설정하여 제조한 본 발명의 갈색거저리 유충 단백질 가수분해물의 SDS-PAGE 패턴을 나타낸 것이다.

도 12는 가수분해 조건을 다르게 설정하여 제조한 본 발명의 갈색거저리 유충 단백질 가수분해물(MPHAF, MPHFA, MPHME, MPHA, MPHF)의 항산화 활성을 평가한 결과이다.

도 13은 MPHAF의 크기별 가수분해물(AF-LT, AF-TT, AF-MT)의 항산화 활성을 평가한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0026] 본 발명은 갈색거저리 유충 단백질 또는 이의 가수분해물을 유효성분으로 포함하는 근육 질환 예방 또는 치료용 약제학적 조성물에 관한 것이다.

[0027] 본 발명에서 사용되는 용어 "예방"이란, 상기 조성물을 개체에 투여하여 근육 질환의 발병을 억제시키거나 지연시키는 모든 행위를 의미한다.

[0028] 본 발명에서 사용되는 용어 "치료"란, 상기 조성물에 의해 근육 질환의 증세가 호전되거나 이롭게 변경되는 모든 행위를 의미한다.

[0029] 본 발명에서 사용되는 용어 “갈색거저리 유충 단백질”은 갈색거저리의 유충으로부터 추출한 단백질을 의미한다.

[0030] 상기 갈색거저리 유충 단백질은 a) 갈색거저리 유충 건조물을 분쇄하는 단계; b) 분쇄물에 에탄올을 첨가하여 탈지시키는 단계; c) 탈지된 갈색거저리 유충에 수산화나트륨을 첨가 혼합한 후 원심분리하여 침전물을 수득하

는 단계; 및 d) 수득한 침전물을 탈염한 후 동결건조하는 단계를 포함하는 과정을 통해 제조될 수 있다.

[0031] 본 발명에서 사용되는 용어 "갈색거저리 유충 단백질의 가수분해물"은 갈색거저리 유충 단백질에 가수분해효소를 처리한 후 가수분해시켜 제조되는 물질을 의미한다.

[0032] 상기 가수분해물은 갈색거저리 유충 단백질에 가수분해효소로서 알칼라아제, 플라보르자임 또는 이의 혼합물을 처리하여 가수분해시켜 제조될 수 있다. 또는 상기 가수분해물은 갈색거저리 유충 단백질에 알칼라아제 및 플라보르자임을 순차적으로 처리하거나 또는 역순으로 처리하여 가수분해시킴으로써 제조될 수 있다.

[0033] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 가수분해물은 갈색거저리 유충 단백질을 기질로 하여 0.5%(w/v) 알칼라아제에 12시간 처리한 후 0.5%(w/v) 플라보르자임에 12시간 처리하여 수득한 가수분해물일 수 있다.

[0034] 본 발명의 다른 실시예에 있어서, 상기 가수분해물은 갈색거저리 유충 단백질을 기질로 하여 0.5%(w/v) 알칼라아제에 12시간 처리한 후 0.5%(w/v) 플라보르자임에 12시간 처리하여 수득한 가수분해물에서 분자량이 10 KDa 이상의 크기를 갖는 가수분해물일 수 있다.

[0035] 본 발명의 상기 갈색거저리 유충 단백질 또는 이의 가수분해물은 마이오스타틴(Myostatin) 발현을 억제시킴으로써 근육 질환을 예방하거나 또는 치료하는 효과를 나타낼 수 있다.

[0036] 본 발명에서 사용되는 용어 "마이오스타틴(Myostatin, MSTN)"은 근육성장을 조절하는 단백질로서 TGF-β (transforming growth factor-β) 계열에 속하고 성장분화 인자 (growth and differentiation factor-8, GDF-8)이다.

[0037] 본 발명에서 사용되는 용어 "근육 질환"은 근 기능 저하, 근육 감소, 근육 위축, 근육 소모 또는 근육 퇴화로 인해 유발되는 질환을 의미한다.

[0038] 본 발명에서 사용되는 용어 "근"은 심줄, 근육, 건을 포괄적으로 지칭하고, "근 기능"은 근육의 수축에 의해 힘을 발휘하는 능력을 의미하며, 근육이 저항을 이겨내기 위하여 최대한으로 수축력을 발휘할 수 있는 능력인 근력, 근육이 주어진 중량에 얼마나 오랫동안 또는 얼마나 여러 번 수축과 이완을 반복할 수 있는지를 나타내는 능력인 근지구력, 단시간 내에 강한 힘을 발휘하는 능력인 순발력을 포함한다. 이러한 "근 기능"은 근육량에 비례하고, "근 기능 개선"은 근 기능을 더 좋게 향상시키는 것을 의미한다.

[0039] 본 발명의 일구체예에서, 상기 근육 질환은 긴장감퇴증(atony), 근위축증(muscular atrophy), 근이영양증(muscular dystrophy), 근무력증, 악액질(cachexia), 경직성 척추 증후군(rigid spinesyndrome), 근위축성 측삭경화증(루게릭병, amyotrophic lateral sclerosis), 경직성 척추 증후군(rigid spinsesyndrome), 샤르코-마리-투스병(Charcot-Marie-Tooth disease) 및 근감소증(sarcopenia)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상인 것이 바람직하나, 이에 제한되지 않는다. 또한, 상기 근육 소모 또는 퇴화는 전적 요인, 후천적 요인, 노화 등을 원인으로 발생하며, 근육 소모는 근육량의 점진적 손실, 근육, 특히 골격근 또는 수의근 및 심장근육의 약화 및 퇴행을 특징으로 한다.

[0040] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 조성물에 포함되는 갈색거저리 유충 단백질 또는 이의 가수분해물은 특별히 이에 제한되지 않으나, 구체적으로는 조성물 총 중량에 대하여 0.001 중량% 내지 99 중량%, 더욱 구체적으로는 0.01 중량% 내지 50 중량%를 포함할 수 있다. 한편, 본 발명의 갈색거저리 유충 단백질 또는 이의 가수분해물은 조성물에 0.0001 내지 1000 μg/ml의 농도로 포함될 수 있다.

[0041] 본 발명의 조성물은 갈색거저리 유충 단백질 또는 이의 가수분해물을 유효성분으로 포함하는 약제학적 조성물로서 이러한 유효성분 이외에 약제학적으로 적합하고 생리학적으로 허용되는 보조제를 사용하여 제조될 수 있으며, 상기 보조제로는 부형제, 붕해제, 감미제, 결합제, 피복제, 팽창제, 윤활제, 활택제 또는 향미제 등을 사용할 수 있다.

[0042] 상기 약제학적 조성물은 투여를 위해서 상기 기재한 유효성분 이외에 추가로 약제학적으로 허용 가능한 담체를 1종 이상 포함하여 약제학적 조성물로 바람직하게 제제화할 수 있다.

[0043] 본 발명의 약학적 조성물은 경구 또는 비경구의 여러 가지 제형일 수 있다. 상기 조성물을 제형화할 경우에는 하나 이상의 완충제(예를 들어, 식염수 또는 PBS), 항산화제, 정균제, 킬레이트화제(예를 들어, EDTA 또는 글루타치온), 충진제, 증량제, 결합제, 아쥬반트(예를 들어, 알루미늄 하이드록사이드), 현탁제, 농후제 습윤제, 붕해제 또는 계면활성제, 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제될 수 있다.

[0044] 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 하나 이상

의 화합물에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분(옥수수 전분, 밀 전분, 쌀 전분, 감자 전분 등 포함), 칼슘카보네이트(calcium carbonate), 수크로스(sucrose), 락토오스(lactose), 덱스트로오스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨 말티톨, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 나트륨 카르복시메틸셀룰로오즈 및 하이드록시프로필 메틸-셀룰로즈 또는 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 예컨대, 활성성분을 고체 부형제와 배합한 다음 이를 분쇄하고 적합한 보조제를 첨가한 후 과립 혼합물로 가공함으로써 정제 또는 당의정제를 수득할 수 있다.

[0045] 또한, 단순한 부형제 이외에 스테아린산 마그네슘, 탈크 등과 같은 윤활제들도 사용된다. 경구투여를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제 또는 시럽제 등이 해당되는데, 흔히 사용되는 단순 희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제 또는 보존제 등이 포함될 수 있다. 또한, 경우에 따라 가교결합 폴리비닐피롤리돈, 한천, 알긴산 또는 나트륨 알기네이트 등을 붕해제로 첨가할 수 있으며, 항응집제, 윤활제, 습윤제, 향료, 유화제 및 방부제 등을 추가로 포함할 수 있다.

[0046] 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁용제, 유제, 동결건조제제 또는 좌제 등이 포함된다. 비수성용제 및 현탁용제로는 프로필렌글리콜(propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텝솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세롤, 젤라틴 등이 사용될 수 있다.

[0047] 본 발명의 약학적 조성물은 경구 또는 비경구로 투여될 수 있으며, 비경구 투여시 피부외용; 복강내, 직장, 정맥, 근육, 피하, 자궁내 경막 또는 뇌혈관내 주사하는 주사제; 경피 투여제; 또는 비강 흡입제의 형태로 당업계에 공지된 방법에 따라 제형화할 수 있다.

[0048] 상기 주사제의 경우에는 반드시 멸균되어야 하며 박테리아 및 진균과 같은 미생물의 오염으로부터 보호되어야 한다. 주사제의 경우 적합한 담체의 예로는 이에 한정되지는 않으나, 물, 에탄올, 폴리올(예를 들어, 글리세롤, 프로필렌 글리콜 및 액체 폴리에틸렌 글리콜 등), 이들의 혼합물 및/또는 식물유를 포함하는 용매 또는 분산매질일 수 있다. 보다 바람직하게는, 적합한 담체로는 행크스 용액, 링거 용액, 트리에탄올 아민이 함유된 PBS(phosphate buffered saline) 또는 주사용 멸균수, 10% 에탄올, 40% 프로필렌 글리콜 및 5% 덱스트로즈와 같은 등장 용액 등을 사용할 수 있다. 상기 주사제를 미생물 오염으로부터 보호하기 위해서는 파라벤, 클로로부탄올, 페놀, 소르빈산, 티메로살 등과 같은 다양한 항균제 및 항진균제를 추가로 포함할 수 있다. 또한, 상기 주사제는 대부분의 경우 당 또는 나트륨 클로라이드와 같은 등장화제를 추가로 포함할 수 있다.

[0049] 경피 투여제의 경우 연고제, 크림제, 로션제, 겔제, 외용액제, 파스타제, 리니멘트제, 에어롤제 등의 형태가 포함된다. 상기에서 경피 투여는 약학 조성물을 국소적으로 피부에 투여하여 약학 조성물에 함유된 유효한 양의 활성성분이 피부 내로 전달되는 것을 의미한다.

[0050] 흡입 투여제의 경우, 본 발명에 따라 사용되는 화합물은 적합한 추진제, 예를 들면, 디클로로플루오로메탄, 트리클로로플루오로메탄, 디클로로테트라플루오로에탄, 이산화탄소 또는 다른 적합한 기체를 사용하여, 가압 팩 또는 연무기로부터 에어로졸 스프레이 형태로 편리하게 전달 할 수 있다. 가압 에어로졸의 경우, 투약 단위는 계량된 양을 전달하는 밸브를 제공하여 결정할 수 있다. 예를 들면, 흡입기 또는 취입기에 사용되는 젤라틴 캡슐 및 카트리지는 화합물, 및 락토즈 또는 전분과 같은 적합한 분말 기제의 분말 혼합물을 함유하도록 제형화할 수 있다. 비경구 투여용 제형은 모든 제약 화학에 일반적으로 공지된 처방서인 문헌(Remington's Pharmaceutical Science, 15th Edition, 1975. Mack Publishing Company, Easton, Pennsylvania 18042, Chapter 87: Blaug, Seymour)에 기재되어 있다.

[0051] 본 발명의 약학적 조성물은 약제학적으로 유효한 양으로 투여한다. 본 발명에 있어서, “약제학적으로 유효한 양”은 의학적 치료에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료하기에 충분한 양을 의미하며, 유효용량 수준은 환자의 질환의 종류, 중증도, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 시간, 투여 경로 및 배출 비율, 치료기간, 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다.

[0052] 본 발명의 약학적 조성물은 개별 치료제로 투여하거나 다른 치료제와 병용하여 투여될 수 있고 종래의 치료제와는 순차적 또는 동시에 투여될 수 있으며, 단일 또는 다중 투여될 수 있다. 즉, 본 발명의 약학적 조성물의 총 유효량은 단일 투여량(single dose)으로 환자에게 투여될 수 있으며, 다중 투여량(multiple dose)으로 장기간 투여되는 분할 치료 방법(fractionated treatment protocol)에 의해 투여될 수 있다. 상기한 요소들을 모두 고려하여 부작용없이 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양을 투여하는 것이 중요하며, 이는 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다.

[0053] 본 발명의 약학적 조성물의 투여량은 환자의 체중, 연령, 성별, 건강상태, 식이, 투여시간, 투여방법, 배설율

및 질환의 중증도에 따라 그 범위가 다양하다.

[0054] 본 발명의 약학적 조성물은 단독으로, 또는 수술, 방사선 치료, 호르몬 치료, 화학 치료 및 생물학적 반응 조절제를 사용하는 방법들과 병용하여 사용할 수 있다.

[0055] 본 발명의 약학 조성물은 또한 갈색거저리 유충 단백질 또는 이의 가수분해물을 유효성분으로 포함하는 외용제의 제형으로 제공할 수 있다. 본 발명의 근육 질환 예방 및 치료용 약학 조성물을 피부외용제로 사용하는 경우, 추가로 지방 물질, 유기 용매, 용해제, 농축제 및 겔화제, 연화제, 항산화제, 현탁화제, 안정화제, 발포제(foaming agent), 방향제, 계면활성제, 물, 이온형 유화제, 비이온형 유화제, 충전제, 금속이온봉쇄제, 킬레이트화제, 보존제, 비타민, 차단제, 습윤화제, 필수 오일, 염료, 안료, 친수성 활성제, 친유성 활성제 또는 지질 소낭 등 피부 외용제에 통상적으로 사용되는 임의의 다른 성분과 같은 피부 과학 분야에서 통상적으로 사용되는 보조제를 함유할 수 있다. 또한 상기 성분들은 피부 과학 분야에서 일반적으로 사용되는 양으로 도입될 수 있다.

[0056] 본 발명의 근육 질환 예방 및 치료용 약학 조성물이 피부 외용제로 제공될 경우, 이에 제한되는 것은 아니나, 연고, 패취, 겔, 크림 또는 분무제 등의 제형일 수 있다.

[0057] 또한, 본 발명은 근육 질환의 예방 또는 치료용 의약의 제조를 위한 갈색거저리 유충 단백질 또는 이의 가수분해물을 유효성분으로 포함하는 조성물의 용도에 관한 것이다. 상기한 갈색거저리 유충 단백질 또는 이의 가수분해물을 유효성분으로 포함하는 본 발명의 조성물은 근육 질환의 예방 또는 치료용 의약의 제조를 위한 용도로 이용될 수 있다.

[0058] 또한, 본 발명은 포유동물에게 갈색거저리 유충 단백질 또는 이의 가수분해물을 치료상 유효량으로 투여하는 것을 포함하는, 근육 질환의 예방 또는 치료방법에 관한 것이다.

[0059] 본 발명에서 사용되는 용어 "포유동물"은 치료, 관찰 또는 실험의 대상인 포유동물을 말하며, 바람직하게는 인간을 말한다.

[0060] 본 발명에서 사용되는 용어 "치료상 유효량"은 연구자, 수의사, 의사 또는 기타 임상에 의해 생각되는 조직계, 동물 또는 인간에서 생물학적 또는 의학적 반응을 유도하는 유효 성분 또는 약제학적 조성물의 양을 의미하는 것으로, 이는 치료되는 질환 또는 장애의 증상의 완화를 유도하는 양을 포함한다. 본 발명의 유효 성분에 대한 치료상 유효 투여량 및 투여횟수는 원하는 효과에 따라 변화될 것임은 당업자에게 자명하다. 그러므로 투여될 최적의 투여량은 당업자에 의해 쉽게 결정될 수 있으며, 질환의 종류, 질환의 중증도, 조성물에 함유된 유효성분 및 다른 성분의 함량, 제형의 종류, 및 환자의 연령, 체중, 일반 건강 상태, 성별 및 식이, 투여 시간, 투여 경로 및 조성물의 분비율, 치료기간, 동시 사용되는 약물을 비롯한 다양한 인자에 따라 조절될 수 있다. 본 발명의 치료방법에 있어서, 성인의 경우, 본 발명의 갈색거저리 유충 단백질 또는 이의 가수분해물을 1일 1회 내지 수회 투여시, 0.0001mg/kg~1000mg/kg의 용량으로 투여할 수 있으나, 특별히 그 용량을 한정하는 것은 아니다.

[0061] 본 발명의 치료방법에서 본 발명의 약제학적 조성물은 경구, 직장, 정맥내, 동맥내, 복강내, 근육내, 흉골내, 경피, 국소, 안구내 또는 피내 경로를 통해 통상적인 방식으로 투여할 수 있다.

[0062] 본 발명에 있어서, 상기 약제학적 조성물은 갈색거저리 유충 단백질 또는 이의 가수분해물과 종래 알려진 근육 질환 치료제를 함께 제제화하거나 병용하여 사용할 수 있다.

[0063] 또한, 본 발명은 갈색거저리 유충 단백질 또는 이의 가수분해물을 유효성분으로 포함하는 식품 조성물을 제공한다.

[0064] 상기 식품 조성물은 유효성분인 갈색거저리 유충 단백질 또는 이의 가수분해물을 함유하는 것 외에 통상의 식품 조성물과 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다.

[0065] 상술한 천연 탄수화물의 예는 모노사카라이드, 예를 들어, 포도당, 과당 등; 디사카라이드, 예를 들어 말토스, 슈크로스 등; 및 폴리사카라이드, 예를 들어 덱스트린, 시클로덱스트린 등과 같은 통상적인 당, 및 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알콜이다. 상술한 향미제는 천연 향미제 (타우마틴), 스테비아 추출물(예를 들어 레바우디오시드 A, 글리시르히진 등) 및 합성 향미제 (사카린, 아스파르탐 등)를 유리하게 사용할 수 있다.

[0066] 본 발명의 식품 조성물은 상기 약제학적 조성물과 동일한 방식으로 제제화되어 기능성 식품으로 이용하거나, 각종 식품에 첨가할 수 있다. 본 발명의 조성물을 첨가할 수 있는 식품으로는 예를 들어, 음료류, 육류, 초코렛,

식품류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 사탕류, 아이스크림류, 알코올 음료류, 비타민 복합제 및 건강 보조식품류 등이 있다.

[0067] 또한 상기 식품 조성물은 유효성분(갈색거저리 유충 단백질 또는 이의 가수분해물) 외에 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, 알콜, 탄산음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다. 그밖에 본 발명의 식품 조성물은 천연 과일 쥬스 및 과일 쥬스 음료 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다.

[0068] 이러한 본 발명의 유효성분(갈색거저리 유충 단백질 또는 이의 가수분해물)은 천연물로부터 유래된 소재로서 화학약품과 같은 부작용은 거의 없으므로 근육 질환의 개선을 위한 기능성 부여를 목적으로 장기간 복용시에도 안심하고 사용할 수 있다.

[0069] 즉, 본 발명의 식품 조성물은 근육 질환의 예방 또는 개선을 위한 기능성 식품 조성물로서 유용하게 사용될 수 있다.

[0070] 또한, 본 발명은 갈색거저리 유충 단백질 또는 이의 가수분해물을 유효성분으로 포함하는 근육 질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품을 제공한다.

[0071] 본 발명의 건강기능식품은 근육 질환의 예방 또는 개선을 목적으로, 정제, 캅셀, 분말, 과립, 액상, 환 등의 형태로 제조 및 가공할 수 있다.

[0072] 본 발명에서 “건강기능식품”이라 함은 건강기능식품에 관한 법률 제6727호에 따른 인체에 유용한 기능성을 가진 원료나 성분을 사용하여 제조 및 가공한 식품을 말하며, 인체의 구조 및 기능에 대하여 영양소를 조절하거나 생리학적 작용 등과 같은 보건 용도에 유용한 효과를 얻을 목적으로 섭취하는 것을 의미한다.

[0073] 본 발명의 건강기능식품은 통상의 식품 첨가물을 포함할 수 있으며, 식품 첨가물로서의 적합 여부는 다른 규정이 없는 한, 식품의약품안전청에 승인된 식품 첨가물 공전의 총칙 및 일반시험법 등에 따라 해당 품목에 관한 규격 및 기준에 의하여 판정한다.

[0074] 상기 “식품 첨가물 공전”에 수재된 품목으로는 예를 들어, 케톤류, 글리신, 구연산칼슘, 니코틴산, 계피산 등의 화학적 합성물; 감색소, 감초추출물, 결정셀룰로오스, 고량색소, 구아검 등의 천연첨가물; L-글루타민산나트륨제제, 면류첨가알칼리제, 보존료제제, 타르색소제제 등의 혼합제제류 등을 들 수 있다.

[0075] 예를 들어, 정제 형태의 건강기능식품은 본 발명의 유효성분(갈색거저리 유충 단백질 또는 이의 가수분해물)을 부형제, 결합제, 붕해제 및 다른 첨가제와 혼합한 혼합물을 통상의 방법으로 과립화한 다음, 활택제 등을 넣어 압축성형하거나, 상기 혼합물을 직접 압축 성형할 수 있다. 또한 상기 정제 형태의 건강기능식품은 필요에 따라 교미제 등을 함유할 수도 있다.

[0076] 캅셀 형태의 건강기능식품 중 경질 캅셀제는 통상의 경질 캅셀에 본 발명의 유효성분(갈색거저리 유충 단백질 또는 이의 가수분해물)을 부형제 등의 첨가제와 혼합한 혼합물을 충진하여 제조할 수 있으며, 연질 캅셀제는 본 발명의 유효성분(갈색거저리 유충 단백질 또는 이의 가수분해물)을 부형제 등의 첨가제와 혼합한 혼합물을 젤라틴과 같은 캅셀기제에 충진하여 제조할 수 있다. 상기 연질 캅셀제는 필요에 따라 글리세린 또는 소르비톨 등의 가소제, 착색제, 보존제 등을 함유할 수 있다.

[0077] 환 형태의 건강기능식품은 본 발명의 유효성분(갈색거저리 유충 단백질 또는 이의 가수분해물)과 부형제, 결합제, 붕해제 등을 혼합한 혼합물을 기존에 공지된 방법으로 성형하여 조제할 수 있으며, 필요에 따라 백당이나 다른 제피제로 제피할 수 있으며, 또는 전분, 탈크와 같은 물질로 표면을 코팅할 수도 있다.

[0078] 과립 형태의 건강기능식품은 본 발명의 유효성분(갈색거저리 유충 단백질 또는 이의 가수분해물)과 부형제, 결합제, 붕해제 등을 혼합한 혼합물을 기존에 공지된 방법으로 입상으로 제조할 수 있으며, 필요에 따라 착향제, 교미제 등을 함유할 수 있다.

[0079] 본 발명의 갈색거저리 유충 단백질 또는 이의 가수분해물을 유효성분으로 포함하는 건강기능식품은 하기 실시예에서도 확인한 바와 같이 우수한 마이오스타틴(Myostatin) 발현을 억제 효과를 갖는바, 긴장감퇴증(atony), 근위축증(muscular atrophy), 근이영양증(muscular dystrophy), 근무력증, 악액질(cachexia), 경직성 척추 증후군(rigid spinesyndrome), 근위축성 측삭경화증(루게릭병, amyotrophic lateral sclerosis), 샤르코-마리-투스병(Charcot-Marie-Tooth disease) 및 근감소증(sarcopenia) 등과 같은 근육 질환의 예방 또는 개선에 효과적이

다.

[0080] 상기 건강기능식품은 음료류, 육류, 초코렛, 식품류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 사탕류, 아이스크림류, 알코올 음료류, 비타민 복합제 및 건강보조식품류 등일 수 있다.

[0081] 또한, 본 발명은 갈색거저리 유충 단백질 또는 이의 가수분해물을 유효성분으로 포함하는 근육 질환의 예방 또는 개선용 화장료 조성물을 제공한다. 상기 화장료 조성물은 특히 제한되는 것은 아니나, 피부 외용으로 사용하거나, 경구 섭취할 수 있다.

[0082] 본 발명의 화장료 조성물은 갈색거저리 유충 단백질 또는 이의 가수분해물을 유효성분으로 함유하며 피부학적으로 허용 가능한 부형제와 함께 기초 화장품 조성물(화장수, 크림, 에센스, 클렌징폼 및 클렌징 워터와 같은 세안제, 팩, 보디오일), 색조 화장품 조성물(화운데이션, 립스틱, 마스카라, 메이크업 베이스), 두발 제품 조성물(샴푸, 린스, 헤어컨디셔너, 헤어젤) 및 비누 등의 형태로 제조될 수 있다.

[0083] 상기 부형제로는 이에 한정되지는 않으나 예를 들어, 피부연화제, 피부 침투 증강제, 착색제, 방향제, 유화제, 농화제 및 용매를 포함할 수 있다. 또한, 향료, 색소, 살균제, 산화방지제, 방부제 및 보습제 등을 추가로 포함할 수 있으며, 물성개선을 목적으로 점증제, 무기염류, 합성 고분자 물질 등을 포함할 수 있다. 예를 들면, 본 발명의 화장료 조성물로 세안제 및 비누를 제조하는 경우에는 통상의 세안제 및 비누 베이스에 상기 갈색거저리 유충 단백질 또는 이의 가수분해물을 첨가하여 용이하게 제조할 수 있다. 크림을 제조하는 경우에는 일반적인 수중유적형(O/W)의 크림베이스에 갈색거저리 유충 단백질 또는 이의 가수분해물을 첨가하여 제조할 수 있다. 여기에 향료, 킬레이트제, 색소, 산화방지제, 방부제 등과 물성개선을 목적으로 한 단백질, 미네랄, 비타민 등 합성 또는 천연소재를 추가로 첨가할 수 있다.

[0084] 또한, 본 발명은 갈색거저리 유충 단백질 또는 이의 가수분해물을 유효성분으로 포함하는 근육 질환의 예방 또는 개선용 사료첨가제 조성물을 제공한다.

[0085] 구체적으로 본 발명의 갈색거저리 유충 단백질 또는 이의 가수분해물은 골근력량의 증가 또는 근기능의 향상으로 인하여 전체적인 근력 증가 효과를 나타내므로 동물이나 가축의 성장 촉진제로서 사료첨가제에 포함될 수 있다.

[0086] 본 발명에서 사용되는 용어 "사료첨가제" 란 영양소 보충 및 체중감소 예방, 사료 내 섬유소의 소화 이용성 증진, 육질 개선, 번식장애 예방 및 수태율 향상, 하절기 고온 스트레스 예방 등 다양한 효과를 목적으로 사료에 첨가하는 물질을 말한다. 본 발명의 사료첨가제는 사료관리법상의 보조사료에 해당하며, 탄산수소나트륨(중조), 벤토나이트 (bentonite), 산화마그네슘, 복합광물질 등의 광물질제제, 아연, 구리, 코발트, 셀레늄 등의 미량광물질인 미네랄제제, 케로틴, 비타민 E, 비타민 A, D, E, 니코틴산, 비타민 B 복합체 등의 비타민제, 메티오닌, 리이산 등의 보호아미노산제, 지방산 칼슘염 등의 보호지방산제, 생균제(유산균제), 효모배양물, 곰팡이 발효물 등의 생균, 효모제 등이 추가로 포함될 수 있다.

[0087] 본 발명에 따른 사료첨가제 조성물은 골격근량의 증가 또는 근기능의 향상, 골밀도 향상으로 인하여 전체적인 근력 증가 및 성장 촉진을 목적으로 하는 개체이면 특별히 한정되지 않고, 어떠한 것이든 적용 가능하다. 상기 개체는 동물, 예를 들어 비-영장류 (예를 들면, 소, 돼지, 말, 고양이, 개, 래트 및 마우스) 및 영장류 (예를 들면, 원숭이, 예를 들어 사이노몰구스 (cynomolgous) 원숭이 및 침팬지)를 비롯한 포유동물을 나타낸다. 또 다른 구체예에서, 상기 개체는 축산용 동물 (예를 들면, 말, 소, 돼지 등) 또는 애완용 동물 (예를 들면, 개 또는 고양이)이다.

[0088] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 보다 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0089] **<실시예 1>**

[0090] <u>갈색거저리 유충 단백질 추출</u>

[0091] 본 실험에서는 갈색거저리 유충 단백질을 추출하였다. 추출된 갈색거저리 유충 단백질(Mealworm Protein Isolate)은 'MPI'라 약칭하였다.

[0092] <u><1-1> 갈색거저리 유충 원료</u>

[0093] 갈색거저리 유충은 ㈜이더블 버그(Edible bug Co., Seoul, Korea)에서 건조물로 구입하였고, 분쇄 후 1.4mm의 체를 이용하여 가루 형태로 제조, 4℃에서 냉장 저장하며 사용하였다.

[0094] <1-2> 갈색거저리 유충 탈지

[0095] 갈색거저리 유충의 탈지 공정을 거쳐 단백질 추출의 효율성을 높인다. 즉, 갈색거저리 유충에 99.5% 에탄올을 1:5 비율로 넣은 후, 40℃에서 60분 동안 shaking bath(VS-1205SW1, Vision Scientific Co., Ltd, Daejeon, Korea)에서 추출하였다. 이 과정을 2번 반복한 후 12시간동안 에탄올을 휘발·건조하였다.

[0096] <1-3> 갈색거저리 유충 단백질 추출 공정

[0097] 탈지된 갈색거저리 유충에 0.25M NaOH을 1:15의 비율로 넣은 후, 40℃에서 60분 동안 hot plate & magnetic stirrer(Vision Science Co., Korea)를 이용하여 혼합하였다. 이후 원심분리기(VS-24SMTi, Vision Science Co., Ltd, Korea)를 이용하여 4℃에서 4200rpm으로 15분 동안 원심분리 후, 상층액을 모아 pH를 4.5로 조정하였다. 이후 4℃에서 4200rpm으로 15분 동안 원심분리하여 침전물을 획득하였다.

[0098] <1-4> 침전물 투석 및 동결건조

[0099] 획득한 침전물은 투석백(12KDa MWCO; Sigma-Aldrich Chemical Co., St. Louis, MO, USA)에 넣어 12시간동안 탈염하였다. 이후 36시간 동안 동결건조하여, 최종적인 본 발명의 갈색거저리 유충 단백질(Mealworm Protein Isolate, MPI)을 수득하였다.

[0100] **<실시예 2>**

[0101] **갈색거저리 유충 단백질 가수분해물**

[0102] 본 실험에서는 단백질 가수분해효소를 이용하여 갈색거저리 유충 단백질의 가수분해물을 제조하였다. 상기 갈색거저리 유충 단백질의 가수분해물(Mealworm Protein Hydrolysate)은 'MPH'라 약칭하였다.

[0103] <2-1> 원료 갈색거저리 유충 단백질

[0104] 상기 <실시예 1>을 통해 제조된 갈색거저리 유충 단백질(MPI)을 원료로 사용하였다.

[0105] <2-2> 갈색거저리 유충 단백질 가수분해 조건 설정

[0106] 갈색거저리 유충 단백질 가수분해물의 최적 제조 조건 확립을 위해 기질 농도, 효소 농도, pH, 반응 온도, 반응 시간의 조건을 기존 선행 연구를 참고하여 다음과 같이 설정하였다. 기질 농도 (1%), 효소 농도(알칼라아제, 플라보르자임, 알칼라아제+플라보르자임 1%), pH (8), 반응 온도 (55℃), 반응 시간 (12시간 또는 24시간)

[0107] <2-3> 갈색거저리 유충 단백질 자가 효소 불활성

[0108] 설정한 기질농도 조건에 맞게 단백질 파우더를 pH 8 버퍼에 분산시키고 water bath에서 85℃, 20분 동안 자가 효소를 불활성화하였다.

[0109] <2-4> 갈색거저리 유충 단백질 가수분해 pH 환경 조성

[0110] 자가 효소를 불활성화 한 단백질 용액을 각각의 조건에 맞는 반응온도에 맞춰 놓은 다른 water bath에 옮겨 냉각시키고 1N NaOH를 이용하여 설정한 pH로 조정하였다.

[0111] <2-5> 갈색거저리 유충 단백질의 가수분해물 수득

[0112] 각 기질에 해당하는 효소(알칼라아제(Novozymes A/S.Co., Ltd., Bagsvaerd, Denmark), 플라보르자임)농도를 1%(w/v)가 되도록 처리한 후 pH 8을 유지하며 가수분해를 실시하였다. 효소 처리 방법 및 반응시간은 하기 표 1에서 자세히 나타내었다. 이후 원심분리하여 상층액만 취하여 가수분해물을 수득하였으며, 이후 36시간 동결건조하여, 최종적인 본 발명의 갈색거저리 유충 단백질의 가수분해물을 수득하였다.

[0113] - MPHA: 1%(w/v) 알칼라아제 24시간 처리에 따른 가수분해물

[0114] - MPHF: 1%(w/v) 플라보르자임 24시간 처리에 따른 가수분해물

[0115] - MPHME: 복합효소(0.5%(w/v) 알칼라아제 & 0.5%(w/v) 플라보르자임) 24시간 처리에 따른 가수분해물

[0116] - MPHAF: 0.5%(w/v) 알칼라아제 12시간 처리 후 0.5%(w/v) 플라보르자임 12시간 처리에 따른 가수분해물

[0117] - MPHFA: 0.5%(w/v) 플라보르자임 12시간 처리 후 0.5%(w/v) 알칼라아제 12시간 처리에 따른 가수분해물

표 1

[0118] 갈색거저리 유충 단백질 가수분해물의 효소 처리 방법 및 반응시간

시료명	효소 처리 조건(기질 대비 %(w/v), 효소 종류, 반응 시간)
MPHA	(1%(w/v), alcalase, 24h)
MPHF	(1%(w/v), flavourzyme, 24h)
MPHME	(0.5%(w/v) alcalase + 0.5%(w/v) flavourzyme, 24h)
MPHAF	(0.5%(w/v), alcalase, 12h) → (0.5%(w/v), flavourzyme, 12h)
MPHFA	(0.5%(w/v), flavourzyme, 12h) → (0.5%(w/v), alcalase, 12h)

[0119] <2-6> MPHAF의 크기별 가수분해물 수득

[0120] MPHAF 조건으로 수득된 가수분해물을 Pierce ™ Protein Concentrator PES, 10K MWCO (Thermo Scientific ™, MA, USA)를 사용하여 Rcf 4200에서 25분간 원심분리하였다. 분리되지 않은 층은 분자량이 10kDa 보다 큰 가수분해물인 'AF-MT'을 수득하였다. 분리된 층은 다시 Pierce ™ Protein Concentrator PES, 3K MWCO (Thermo Scientific ™, MA, USA)으로 원심분리하여 분자량이 3kDa 보다 크고 10 kDa 보다 작은 가수분해물 'AF-TT' 및 3kDa 보다 작은 가수분해물 'AF-LT'를 수득하였다.

[0121] - AF-LT: MPHAF에서 분자량이 3 kDa 이하인 가수분해물

[0122] - AF-TT: MPHAF에서 분자량이 3~10 kDa인 가수분해물

[0123] - AF-MT: MPHAF에서 분자량이 10 kDa 이상인 가수분해물

[0124] **<실험예 1>**

[0125] **마이오스타틴 발현에 미치는 영향**

[0126] <1-1> 세포독성 평가(MTT Assay)

[0127] 마이오스타틴(Myostatin)의 발현 정도를 측정하기에 앞서 시료의 독성을 측정하기 위해 MTT 실험을 실시하였다.

[0128] DEME 배지에 근육아세포주인 C2C12 마우스 정상 세포를 24시간 배양 후 세포가 자란 배지에서 배지를 빼고 PBS로 세척 후 트립신을 주입하였다. 세포가 페트리 디쉬에서 분리되면, 10%의 FBS 시약 주입 후 원심분리하여 세포를 가라앉히고 상층액은 버린다. 이후 트리판 블루(tryphan blue) 시약을 10ul씩 주입 후 cell counting slide에 투입하여 Automated Cell Counting 기기를 사용하여 세포수를 세어주었다. 총 세포수 확인 후 배양할 만큼의 세포와 배지를 혼합한 후 웰 플레이트(well plate)에 주입하여 37℃ 배양기에서 24시간 이상 배양시킨 후 C2C12 세포의 배지를 제거한 후, 새로운 배지 1 mL로 교체하였다. 배지에 시료(WPI, MPI, MPHAF, AF-LT, AF-TT, AF-MT)는 증류수를 이용 1 mg/mL, 0.1 mg/mL, 0.01 mg/mL 농도로 단계별로 희석하여 넣어준 뒤 37℃ 배양기에 넣어두었다. 24시간이 지난 후 37℃에 배양되고 있는 C2C12 세포를 꺼내어 세포의 배지를 제거한 후 MTT 시약을 1 웰(well) 당 10 ul 주입하였다. 이를 37℃ 배양기에서 2시간 동안 반응시킨 후 웰(well)에서 배지와 MTT 시약을 제거한 후 DMSO 50 ul을 주입한 뒤 Microplate Spectrophotometer(Epoch, BioTek)기기를 이용하여 살아있는 세포 수를 세어주었다.

[0129] 그 결과 도 2 및 표 2에서 나타낸 바와 같이, 10mg/ml의 WPI를 제외한 모든 sample(MPI, MPHAF, AF-LT, AF-TT, AF-MT)이 각 농도에서 모두 control군 보다 높은 세포 생존율을 나타내었다.

표 2

[0130] 갈색거저리 유충 단백질 가수분해물의 세포독성 평가

샘플	처리농도	평균	표준편차
WPI	con	0.898	0.035
	1mg/ml	0.787	0.282
	0.1mg/ml	1.026	0.114
	0.01mg/ml	0.95	0.089
MPI	con	0.898	0.035
	1mg/ml	1.142	0.048
	0.1mg/ml	1.167	0.027
	0.01mg/ml	1.168	0.021
MPHAF	con	0.898	0.035

	1mg/ml	1.239	0.134
	0.1mg/ml	1.068	0.122
	0.01mg/ml	1.218	0.143
AF-LT	con	0.898	0.035
	1mg/ml	1.32	0.115
	0.1mg/ml	1.331	0.116
	0.01mg/ml	1.123	0.088
AF-TT	con	0.898	0.035
	1mg/ml	1.172	0.087
	0.1mg/ml	1.14	0.103
	0.01mg/ml	1.031	0.29
AF-MT	con	0.898	0.035
	1mg/ml	1.263	0.026
	0.1mg/ml	0.994	0.267
	0.01mg/ml	1.166	0.099

[0131] <1-2> 마이오스타틴의 상대적인 mRNA 발현 수준 측정

[0132] 갈색거저리 유충 단백질의 가수분해 조건과 가수분해물의 크기에 따른 근감소증 예방 및 개선 효과를 확인하기 위해 마이오스타틴 발현 정도를 측정하였다. 양성 대조군으로는 ㈜푸른빈(PUREUNBIN Co., Yeongcheon-si, Gyeongsangbuk-do, Korea)에서 구매한 WPI 분리유청단백분말을 사용하였다.

[0133] 상기 실험예 <1-1>을 통해 세포독성이 없는 시료의 농도를 확인한 후 C2C12 세포를 37℃ 배양기에서 24시간 이상 배양하였다. 24시간 이상 배양한 C2C12 세포의 배지를 제거하고, 배지 1 mL를 주입하였다. 이후 웰(well)에 증류수로 녹인 0.01 mg/mL 농도의 시료(MPI, MPH) 1 ul을 주입하고(대조군에는 PBS 주입), 혼합한 뒤 37℃ 배양기에 넣어 24시간 반응시켰다. 이후 배지를 제거해준 뒤 PBS로 총 2번 세척하였다. 세척이 끝난 후 웰(well)에 트리졸(TRIzol) 200 ul을 주입하여 상온에서 5분 방치 후 클로로포름 40 ul을 첨가하고 혼합하였다. 이후 13,200rpm, 4℃에서 15분간 원심분리 후, 상층액에 아이소프로판올 120 ul를 혼합하여 상온에서 10분간 방치하였다. 10분 후 13,200rpm, 4℃에서 15분간 원심분리하여 상층액을 제거한 뒤 70%의 차가운 에탄올 100 ul 주입 후, 13,200rpm, 4℃에서 2분간 원심분리를 진행하였다. 이때 70% 차가운 에탄올 주입 과정은 2번 반복하였다. 이후 70% 에탄올 제거 및 DEPC(Diethyl pyrocarbonate)주입 후 Microplate Spectrophotometer(Epoch, BioTek)를 이용, RNA의 농도를 측정하였다. 시료의 RNA 농도를 측정한 후 이에 따라 시료와 DEPC-water를 추가적으로 주입하고, TOPreal™ qPCR 2X PreMIX (SYBR Green with high ROX) 10ul을 주입하였다. 혼합된 시료를 Zipperstrip Strip PCR Tubes에 옮겨 담아 Thermal Cycler(Bio-Rad)기기를 이용, DNA를 증폭시켰다. 증폭 완료 후 microcentrifuge tube에 옮겨 담고 PCR plate에 시료 2 ul, 2X mastermix 5 ul, pure water 2.5 ul, primer 0.5 ul를 주입하였다. 이후 한 시료에 mGAPDH, mMSTN를 각각 주입하였다. 마지막으로 이를 밀봉하여 Real-Time PCR(Applied Biosystems, Quantstudio3)기기를 이용, 증폭되는 DNA를 검출하였다.

[0134] 그 결과 도 3 및 표 3에서 나타낸 바와 같이, MPI(갈색거저리 유충 단백질)와 비교하여 가수분해 조건별 MPH(갈색거저리 유충 단백질의 가수분해물)가 마이오스타틴 발현이 낮게 나타나 근감소 개선에 효과가 있음을 확인하였다. 그 중, MPHAF가 가장 낮은 마이오스타틴 발현량을 보였다.

[0135] 이후, 가장 낮은 마이오스타틴 발현량을 보인 MPHAF를 분자 크기별로 분획한 분획물의 마이오스타틴 발현량을 확인한 결과, 도 4 및 표 4에서 나타낸 바와 같이, 10 kDa 이상의 가수분해물(AF-MT)에서 가장 낮은 마이오스타틴 발현량을 보였고, 이는 양성대조군인 WPI 대비 더 낮은 것으로 나타나, 근감소 개선 효과가 가장 우수한 것을 확인하였다.

표 3

[0136] 가수분해 조건별 갈색거저리 유충 단백질 가수분해물의 근원세포(C2C12) 처리에 따른 상대적인 마이오스타틴 발현 수준(MSTN/GAPDH)

샘플	평균	표준편차
CON	1	0.223
WPI	0.299	0.04
MPI	0.661	0.036

MPHAF	0.369	0.093
MPHFA	0.54	0.041
MPHME	0.397	0.082
MPHA	0.434	0.091
MPHF	0.597	0.04

표 4

[0137] MPHAF의 분자 크기별 분획한 가수분해물의 근원세포(C2C12) 처리에 따른 상대적인 마이오스타틴 발현 수준(MSTN/GAPDH)

샘플	평균	표준편차
CON	1	0.16
WPI	0.299	0.189
MPI	0.638	0.094
MPHAF	0.389	0.238
AF-LT	0.594	0.429
AF-TT	0.452	0.219
AF-MT	0.118	0.096

[0138] <1-3> 상대적인 마이오스타틴 프로모터 활성 측정

[0139] MPI와 MPH의 마이오스타틴 프로모터 활성을 측정하기 위해 루시퍼다아제, 베타-갈락토시다아제 이중 발광 기반 유전자 분석법을 사용하였다. 루시퍼다아제 활성 분석을 먼저 시행한 후 베타-갈락토시다아제 정량분석으로 유전자 발현 분석의 정확성을 증가시켰다.

[0140] 자세하게는, pGL4.15 vector에 MSTN(Myostatin) promoter (-534 ~ +132, 667 bp)를 XhoI과 BglII를 이용하여 삽입시켰다. 12 well에 4×10^5 세포를 주입한 후 24시간 후에 PBS를 이용 세포를 세척한 후 Opti-MEM media 900 μl를 넣어주었다. 이후 Opti-MEM media 100 μl에 pGL4.15-MSTN promoter (1 μg, firfly luc) 와 pRL-TK (200ng, renilla luc)를 Lipofectamine 2000 (2 μl, Invitrogen)과 함께 동시에 섞어주었고, 세포에 100 μl씩 넣어 동시형질주입(co-transfection)시킨다. 이때 pGL4.15 공벡터는 음성 대조군으로 사용하였다. 4시간 후 배지를 갈아주었고, 12시간 후 Dual-Luciferase® Reporter Assay System (Promega)방법과 luminometer (EnSpire Multimode Plate Reader, PerkinElmer) 기기를 이용하여 luciferase activity (발광) 측정했다. pRL-TK는 loading control로 사용하였다.

[0141] 그 결과 도 5에서 나타낸 바와 같이, MPI는 대조군 보다 높은 마이오스타틴 프로모터 활성이 나타났고, MPH는 대조군 보다 낮은 마이오스타틴 프로모터 활성이 나타나, MPH가 근육합성에 방해가 되는 물질인 마이오스타틴의 활성을 낮춰줌으로써 근감소증에 대한 효과가 MPI보다 더 클 것으로 판단되었다.

[0142] 참고로, 도 5에서 나타낸 MPH는 기질에 알칼라아제 1%를 12시간 처리하여 제조되는 갈색거저리 유충 단백질의 가수분해물(처리 시간을 제외한 조건은 MPHA와 동일)을 사용하였다.

[0143] **<실험예 2>**

[0144] **염증세포 발현 억제(항염증 효과) 측정**

[0145] MPI와 가수분해 조건별, 크기별 MPH 시료의 염증 세포 발현 억제율을 알아보기 위해 대식세포에 LPS를 이용하여 혈중 염증 유발 사이토카인인 IL-6, TNF-a, IL-1b의 발현 정도를 관찰하였다. 양성 대조군으로는 WPI(Whey protein isolate)를 사용하였다. LPS(Lipopolysaccharide)와 증류수를 혼합한 것을 음성 대조군으로 사용하였다. 즉, 염증 유도를 위해 LPS를 이용하였고, 이에 시료를 농도별로 처리하여 혈중 염증 유발 사이토카인인 IL-6, IL-1b, TNF-a의 발현 정도를 관찰하였다. 참고로, 혈중 염증 유발 사이토카인은 근원섬유단백질의 분해를 촉진하여 단백질 합성을 감소하고, 결과적으로 직접적인 근육 소모를 유발한다.

[0146] 염증 사이토카인의 발현 수준 측정에 앞서 각 시료의 단백질 농도를 측정하기 위하여 Bradford assay를 실시하였다. 간략하게는, 10배 단위로 연속 희석한 시료 100 μl과 분석 시약 5 ml을 섞어 595nm에서 흡광도를 측정하였다. 검량선은 1 mg/mL γ-글로불린 표준 용액을 10-100 μl/100 μl의 농도로 희석하여 시료와 동일하게 분석

시약을 주입하여 흡광도를 측정하였다.

[0147] 그 결과 도 6 및 도 7에서 나타낸 바와 같이, 대식세포에 염증유발인자인 LPS를 처리하는 경우 염증성 사이토카인인 IL-6, TNF-a, IL-1b의 발현량이 증대되는 것으로 나타났으며, 반면에 LPS와 함께 각 시료를 처리한 모든 실험군에서 염증성 사이토카인이 농도 의존적으로 억제되는 것을 확인하였다. 이와 같은 결과를 통해 모든 시료가 염증성 사이토카인의 발현을 감소시키는 것을 알 수 있었다. 자세하게는, 모든 실험군에서 양성 대조군(WPI) 대비 IL-1b 억제 활성이 우수한 것으로 나타났으며, 특히, MPHME를 처리한 실험군의 경우 양성 대조군(WPI) 대비 TNF-a 억제 효과가 가장 우수한 것으로 나타났다. 한편, MPHA 또는 MPHAF를 처리한 실험군을 제외한 모든 실험군에서 양성 대조군(WPI) 대비 IL-6 억제 효과가 우수한 것으로 나타났다.

[0148] 상기 내용을 종합한 결과, 가수분해물로서 MPHME를 처리한 실험군에서 TNFa, IL-1b, IL-6 억제 활성이 모두 우수한 것으로 나타나, 항염증 효과가 가장 우수한 것을 확인할 수 있었다.

[0149] **<실험예 3>**

[0150] **갈색거저리 유충 단백질 가수분해물의 가수분해 정도, 구성아미노산 분석 및 분자량 측정**

[0151] <3-1> TNBS assay

[0152] 본 실험에서는 가수분해 조건을 다르게 설정하여 만든 가수분해물(상기 실시예 <2-5> 참조)의 가수분해 정도를 측정하기 위해, TNBS assay를 이용해 각 단백가수분해물의 가수분해도를 그 지표로 사용되는 available amino group의 농도를 측정하였다. 참고로, 단백질이 가수분해되면 가수분해도에 비례하여 available amino group이 증가하므로 이는 펩타이드의 함량을 나타내는 지표가 될 수 있다.

[0153] 자세하게는, TNBS(2,4,6-Trinitrobenzene Sμlfonic Acid)용액을 이용하여 조건별로 제조된 MPH의 가수분해도를 측정하였다. 0.1M sodium bicarbonate(pH 8.5) 용액(Reaction buffer, RB)과 L-Leucine을 이용하여 2-20 μg/ml 농도로 표준용액을 제조하였다. 이후 RB를 이용하여 0.01% (v/v) 의 농도로 TNBS 용액(Working reagent, WR)을 제조하였다. 250 μl의 WR을 각각 500 μl의 시료와 표준용액에 넣은 후 37℃에서 2시간 동안 반응시켜 주었다. 이후 250 μl의 10% SDS와 125 μl의 1N HCl을 넣어 반응을 정지시키고 335nm에서 흡광도를 측정하였다.

[0154] 그 결과 도 8 및 표 5에서 나타낸 바와 같이, 가수분해 조건별 가수분해물들 중 MPHF(1%, flavourzyme, 24h)가 가장 낮은 Available amino group 농도(31.283 mg/g)를 보여주었다. 반면에, MPHAF((0.5%, alcalase, 12h)→(0.5%, flavourzyme, 12h))에서 가장 높은 Available amino group 농도(50.323 mg/g)가 나타남에 따라 밀웜 가수분해시 MPHAF 조건의 효소처리가 가수분해도가 가장 높은 것을 확인할 수 있었다.

표 5

[0155] 가수분해 조건별 갈색거저리 유충 단백질 가수분해물의 available amino group 농도(mg/g)

샘플	available amino group 농도(mg/g)	표준편차
WPI	15.008	0.139
MPI	12.139	0.276
MPHAF	50.323	0.643
MPHFA	44.412	2.771
MPHME	47.912	0.96
MPHA	46.556	0.547
MPHF	31.283	2.355

[0156] <3-2> BCA assay

[0157] 가수분해 조건을 다르게 설정하여 만든 가수분해물(상기 실시예 <2-5> 참조)의 가수분해 정도를 측정하기 위해 BCA법을 이용하여 단백질 구조의 변화량을 측정하였다.

[0158] 자세하게는, BCA 시약을 A:B=50:1로 혼합하여 반응액(Working reagent, WR)과 농도별(0-2000μg/ml) BSA 표준용액을 제조하였다. 표준 용액 0.1 ml와 시료 0.1 ml에 WR를 2 ml씩 분주한 후 37℃에서 30분 동안 반응시켜 주었다. 반응 후 10분 동안 냉각시킨 후, 562nm에서 흡광도를 측정하였다.

[0159] 그 결과 도 9 및 표 6에서 나타낸 바와 같이, MPI(56.882 mg/g)가 MPH보다 단백질 함량이 높았고(MPHF: 19.84 mg/g, MPHFA: 14.02 mg/g, MPHME: 12.43 mg/g, MPHA: 11.88 mg/g, MPHAF: 10.52 mg/g), MPH 중 MPHAF가 가장 낮은 단백질 농도를 나타내어 MPHAF의 가수분해 조건이 가장 많은 가수분해가 되었음을 알 수 있었다.

[0160] 이후 가수분해도가 가장 높은 MPHAF를 분자 크기별로 분획한 분획물들의 단백질 함량을 확인한 결과, 도 10 및 표 7에서 나타낸 바와 같이, WPI(182.19 mg/g)가 단백질 함량이 가장 높았고, MPI(145.69 mg/g), MPHAF(123.66 mg/g), 분획물(AF-MT:113.97 mg/g, AF-TT:90.19 mg/g, AF-LT:20.45 mg/g) 순으로 낮아졌다.

표 6

[0161] 가수분해 조건별 갈색거저리 유충 단백질 가수분해물의 단백질 농도(mg/g)

sample	BCA 농도 (mg/g)
MPI	56.882
MPHAF	10.518
MPHFA	14.018
MPHME	12.427
MPHA	11.882
MPHF	19.836

표 7

[0162] MPHAF의 분자 크기별 분획한 가수분해물의 단백질 농도(mg/g)

샘플	평균	표준편차
WPI	182.19	2.107
MPI	145.69	1.157
MPHAF	123.66	2.258
AF-LT	20.45	1.637
AF-TT	90.19	2.332
AF-MT	113.97	3.388

[0163] <u><3-3> 구성 아미노산 분석</u>

[0164] 본 실험에서는 구성 아미노산의 근감소증에 대한 효과를 확인하기 위해 효소처리별 가수분해에서 가수분해도가 가장 높은 MPHAF를 이용하여 분자크기별로 분획한 분획물들의 아미노산 구성비 및 함량을 HPLC 아미노산 분석 실험을 이용하여 측정하였다.

[0165] 먼저, 시료 0.05g을 분해관에 넣고 6N HCl 2ml를 가하고 105℃의 진공상태에서 24시간 산가수분해 하였다. 이후 증류수에 100배 희석하여 0.45㎛의 nylon syringe filter로 여과한 여액을 분석 시료로 사용하였다. 아미노산 분석기기의 조건은 하기 표 8과 같다. 이후 실험결과에 대한 단위 보정 후 17개에 대한 아미노산의 함량을 측정하였으며, 그 결과는 표 9에서 자세히 나타내었다.

표 8

[0166] 아미노산 분석기기의 조건

Measurement	Condition
Instrument	YL9100 HPLC System, Young in Chromass Co. Anyang, Korea
Column	HPLC Column, 3.9 mm×150mm
Column temp.	37℃
Mobile phase	A: 10% Warters accq-tag Eluent A concentrate
	B: 60% ACN
Wave length	Ex: 250mm, Em: 395mm

표 9

[0167] MPHAF의 분자 크기별 분획한 가수분해물의 구성 아미노산

	WPI		MPI		AF-LT		AF-TT		AF-MT	
아미노산	평균	표준 편차	평균	표준 편차	평균	표준 편차	평균	표준 편차	평균	표준 편차
히스티딘	1.693	0.682	2.385	0.605	0.754	0.1	1.003	0.179	1.234	0.048
이소류신	3.908	0.364	4.086	0.112	1.343	0.033	1.852	0.052	1.871	0.062
류신	9.125	0.31	8.35	0.178	3	0.08	3.841	0.053	3.832	0.076
라이신	8.04	1.093	5.505	0.343	2.471	0.045	3.004	0.175	2.952	0.059
메티오닌	2.57	0.087	0.787	0.045	1.253	0.024	0.804	0.016	0.712	0.07
페닐알라닌	2.455	0.065	4.136	0.177	1.354	0.026	1.886	0.061	1.937	0.08
트립토판	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
트레오닌	6.528	0.546	3.653	0.185	1.02	0.067	1.483	0.05	1.555	0.105
발린	3.843	0.087	3.645	0.113	1.047	0.02	2.292	0.041	2.285	0.048
필수아미노산 총합	38.161	1.812	32.547	0.773	12.243	0.234	16.166	0.142	16.378	0.345
알라닌	4.504	0.059	7.194	0.278	3.012	0.153	3.48	0.153	3.362	0.102
아르기닌	1.26	0.096	4.63	0.608	2.226	0.135	2.288	0.074	2.334	0.082
아스파르트산	10.452	0.805	10.786	0.087	1.523	0.169	4.649	0.233	4.847	0.387
시스테인	0.177	0.001	0.607	0.032	0.255	0.007	0.311	0.004	0.299	0.009
글루타민산	16.425	1.371	12.459	0.839	2.743	0.052	5.827	0.107	5.889	0.25
글리신	1.673	0.353	7.559	0.544	2.715	0.025	3.348	0.018	3.324	0.113
프롤린	5.886	0.153	5.949	0.242	1.592	0.046	2.478	0.076	2.456	0.064
세린	5.483	0.369	6.059	0.246	1.644	0.022	2.648	0.034	2.587	0.102
티로신	2.493	0.009	8.536	0.445	3.59	0.105	4.375	0.062	4.208	0.121
아미노산 총합	86.514	3.864	96.325	1.81	31.543	3.88	45.57	2.014	45.684	2.252
소수성 아미노산	33.963	1.275	41.706	2.263	15.316	0.539	19.981	0.552	19.779	0.586
친수성 아미노산	41.558	3.084	42.1	1.019	10.775	0.349	19.294	0.275	19.385	0.843
BCAA	16.875	0.758	16.081	0.245	5.391	0.133	7.986	0.133	7.989	0.192

[0168] <3-4> SDS-PAGE

[0169] 가수분해 조건을 다르게 설정하여 만든 가수분해물(상기 실시예 <2-5> 참조)의 분해되어 생성된 저분자 펩타이드의 양을 SDS-PAGE 법을 이용하여 측정하였다.

[0170] 자세하게는, 시료의 단백질 함량을 50μg/10μl이 되도록 제조하기 위해 BCA 실험 결과를 참고하여 증류수 5 ml에 각 시료를 0.057g을 혼합하였다. 시료 10 μl와 2x laemmli buffer 10 μl을 혼합한 후 5μl의 mercaptoethanol을 주입하여 95℃에서 5분간 가열하였다. 이후 15% SDS gel에 전처리된 시료를 주입하여 80V-120V으로 전기영동 하였다. 전기영동이 모두 끝난 gel을 coomassie brilliant blue 용액을 사용하여 염색하고, acetic acid와 methanol이 함유된 coomassie brilliant blue R-250 destaining 용액을 사용하여 탈색하였다. 이후 polyacrylamide gel을 스캐닝한 후 이미지로 영상화시켰다.

[0171] 그 결과 도 11에서 나타낸 바와 같이, 패턴들을 보았을 때, 가수분해물 중 MPHF에 고분자량 펩타이드가 존재한 반면, MPHAF에는 가장 다량의 6kDa 이하의 저분자 펩타이드가 생성되는 것을 확인할 수 있었다.

[0172] **<실험예 4>**

[0173] **항산화능 측정**

[0174] 본 실험에서는 근감소증에 영향을 미칠 수 있는 산화적 스트레스에 대한 효소 처리별 생성된 가수분해물의 효과를 확인하기 위해 ABTS 라디칼 소거능 실험을 이용하여 측정하였다.

[0175] 자세하게는, 시약 내 라디칼의 형성을 위해 7.4mM ABTS 와 과황산 칼륨(Potassium persulfate)을 1:1 비율로

혼합 후 냉암소에서 24시간 동안 보관하였다. 이후 ABTS 시약을 분광광도계를 이용하여 734nm 파장에서 0.7±0.02의 흡광도가 측정되도록 증류수를 이용하여 희석하였다. 각 시료의 농도가 500ug/ml가 되도록 증류수에 희석하였고, 이를 ABTS 시약을 1:1의 비율로 혼합하여 10분간 냉암소에 보관한 후, 760nm에서 흡광도를 측정하였다. 이때, 공시료는 시료 추출 용액과 증류수를, 대조군은 ABTS 용액과 증류수를 1:1의 비율로 혼합하여 사용하였다. 흡광도 측정 결과를 이용하여 ABTS 라디칼 소거율(%)을 계산하였다.

[0176]

$$\text{소거율}(\%) = \left(1 - \frac{\text{시료 흡광도} - \text{공시료 흡광도}}{\text{대조군 흡광도}}\right) \times 100$$

[0177] 그 결과 도 12 및 표 10에서 나타낸 바와 같이, MPI와 비교하여 가수분해 조건별 MPH가 ABTS 라디칼 소거능이 높게 나타나 높은 항산화능이 있음을 확인하였다. 가수분해물들 중, MPHAF(93.55%)가 항산화능이 가장 높은 것으로 나타났다.

[0178] 이후, MPHAF를 분자 크기별로 분획한 분획물들의 ABTS 라디칼 소거능을 확인한 결과, 도 13 및 표 11에서 나타낸 바와 같이, 10kDa 이상의 분획물(AF-MT 97.24%)이 가장 항산화능이 높은 것을 확인할 수 있었다.

표 10

[0179] 가수분해 조건별 갈색거저리 유충 단백질 가수분해물의 ABTS 라디칼 소거율(%)

샘플	평균	표준편차
WPI	49.508	0.835
MPI	30.4	0.783
MPHAF	93.546	1.132
MPHFA	83.73	1.513
MPHME	84.983	0.673
MPHA	80.162	0.095
MPHF	34.443	0.72

표 11

[0180] MPHAF의 분자 크기별 분획한 가수분해물의 ABTS 라디칼 소거율(%)

샘플	평균	표준편차
WPI	49.508	0.835
MPI	30.4	0.783
MPHAF	93.546	1.132
AF-LT	51.887	0.287
AF-TT	65.779	1.282
AF-MT	97.241	0.989

[0181] 이제까지 본 발명에 대하여 그 바람직한 실시예들을 중심으로 살펴보았다. 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자는 본 발명이 본 발명의 본질적인 특성에서 벗어나지 않는 범위에서 변형된 형태로 구현될 수 있음을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 개시된 실시예들은 한정적인 관점이 아니라 설명적인 관점에서 고려되어야 한다. 본 발명의 범위는 전술한 설명이 아니라 특허청구범위에 나타나 있으며, 그와 동등한 범위 내에 있는 모든 차이점은 본 발명에 포함된 것으로 해석되어야 할 것이다.

부호의 설명

[0182] WPI: Whey protein isolate

MPI: Mealworm Protein Isolate

MPHA: 1% 알칼라아제 24시간 처리에 따른 가수분해물

MPHF: 1% 플라보르자임 24시간 처리에 따른 가수분해물

MPHME: 복합효소(0.5%(w/v) 알칼라아제 & 0.5%(w/v) 플라보르자임) 24시간 처리에 따른 가수분해물

MPHAF: 0.5%(w/v) 알칼라아제 12시간 처리 후 0.5%(w/v) 플라보르자임 12시간 처리에 따른 가수분해물

MPHFA: 0.5%(w/v) 플라보르자임 12시간 처리 후 0.5%(w/v) 알칼라아제 12시간 처리에 따른 가수분해물

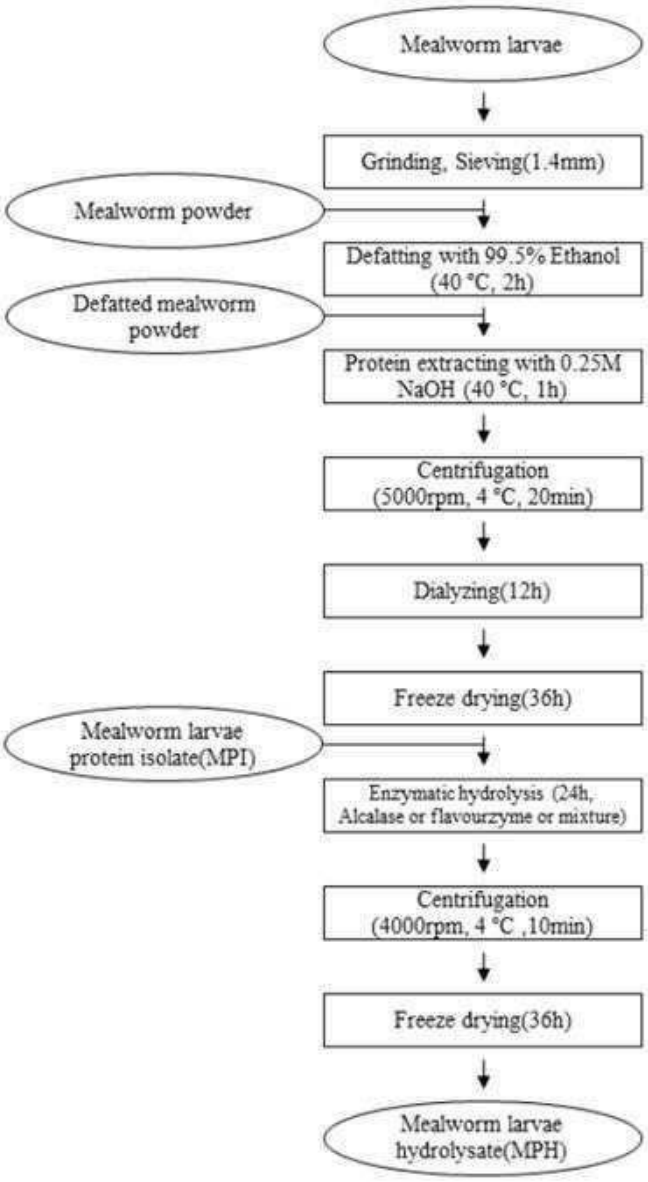
AF-LT: MPHAF에서 분자량이 3 KDa 이하인 가수분해물

AF-TT: MPHAF에서 분자량이 3~10 KDa인 가수분해물

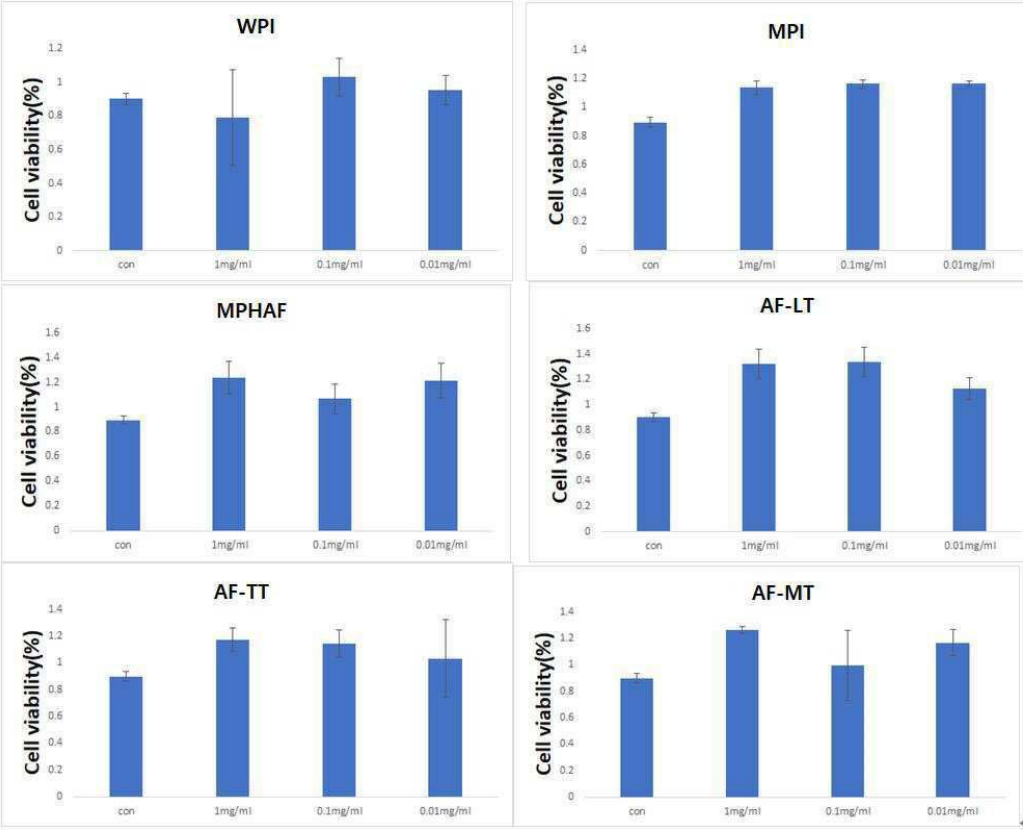
AF-MT: MPHAF에서 분자량이 10 KDa 이상인 가수분해물

도면

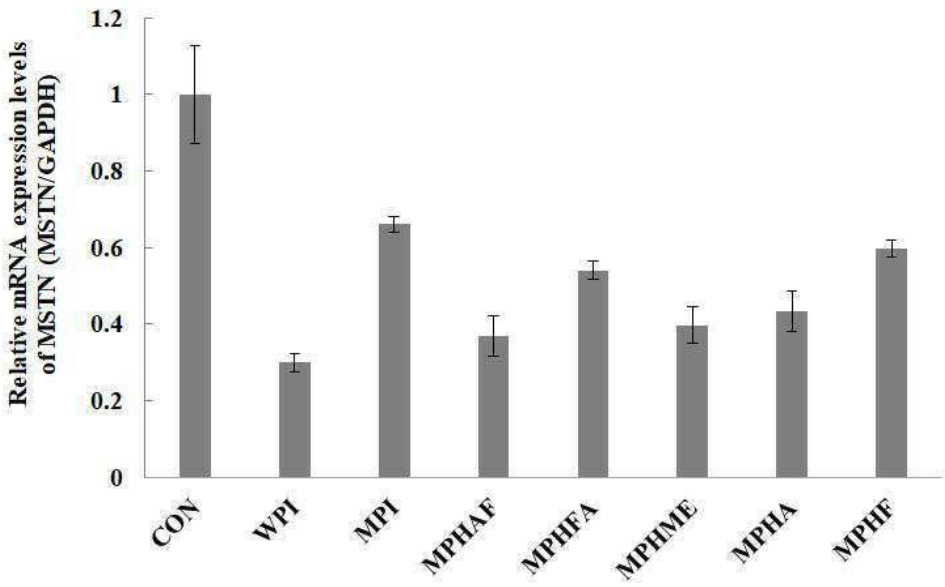
도면1



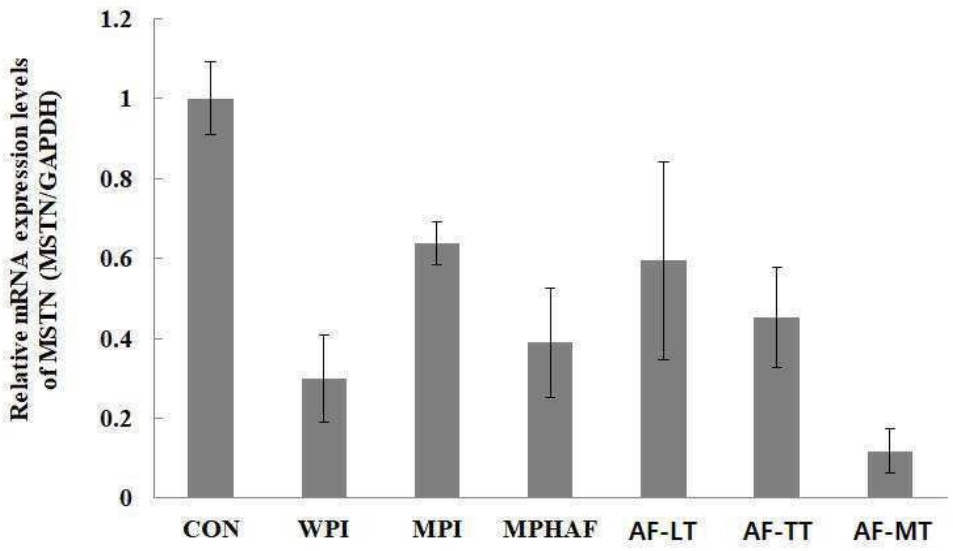
도면2


WPI
MPI
MPHAF
AF-LT
AF-TT
AF-MT
Cell viability(%)
con
1mg/ml
0.1mg/ml
0.01mg/ml

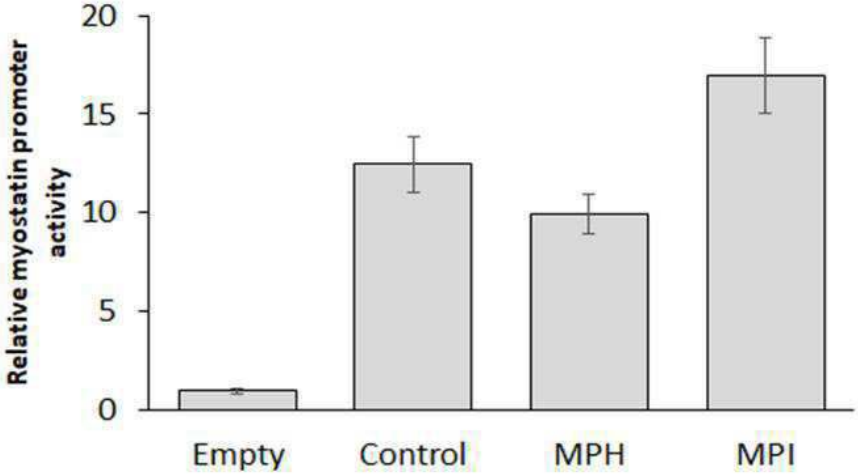
도면3


Relative mRNA expression levels of MSTN (MSTN/GAPDH)
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
CON
WPI
MPI
MPHAF
MPHFA
MPHME
MPHA
MPHF

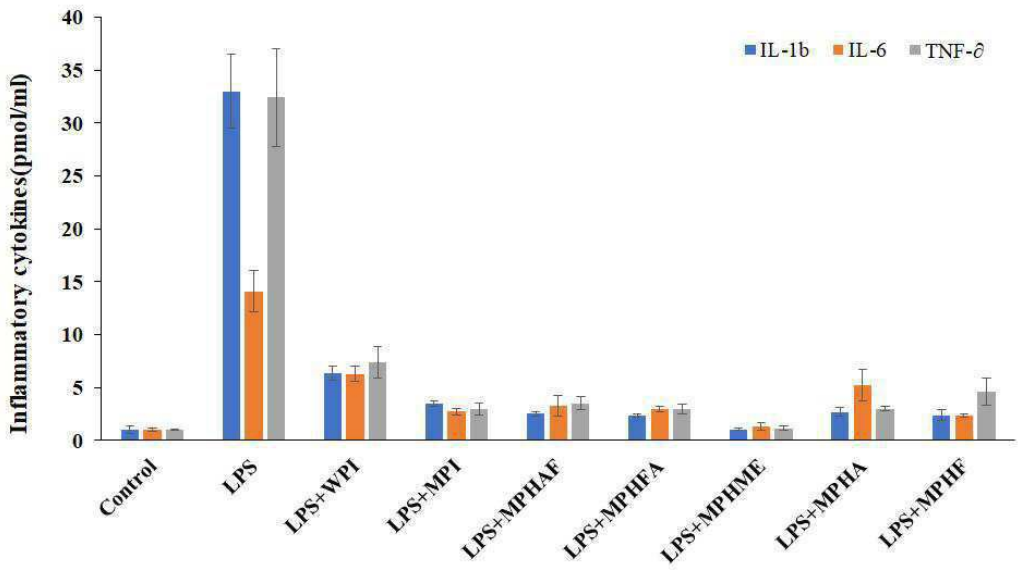
도면4


Relative mRNA expression levels of MSTN (MSTN/GAPDH)
1.2
1
0.8
0.6
0.4
0.2
0
CON
WPI
MPI
MPHAF
AF-LT
AF-TT
AF-MT

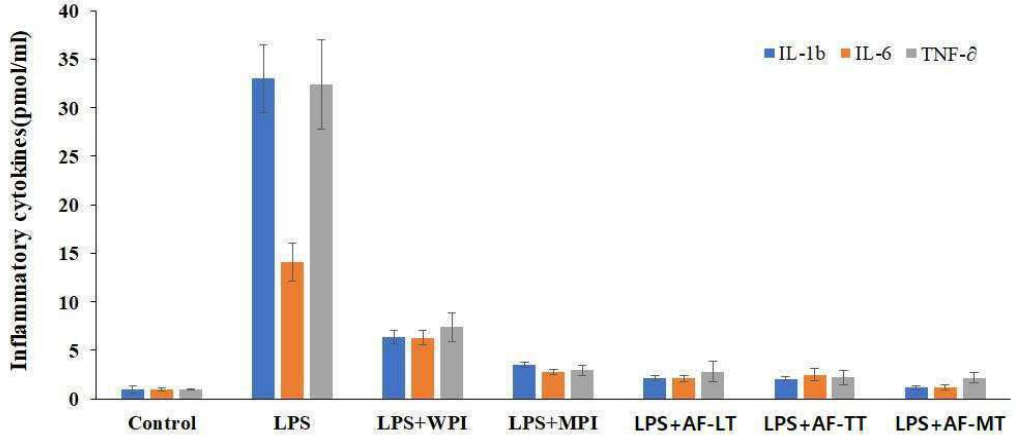
도면5


Relative myostatin promoter activity
20
15
10
5
0
Empty
Control
MPH
MPI

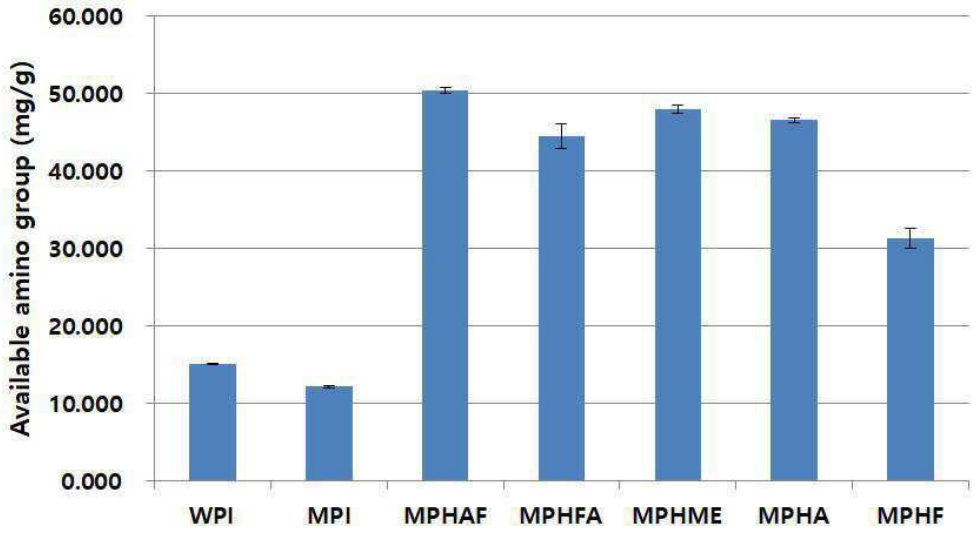
도면6


Inflammatory cytokines(pmol/ml)
40
35
30
25
20
15
10
5
0
IL-1b
IL-6
TNF-∂
Control
LPS
LPS+WPI
LPS+MPI
LPS+MPHAF
LPS+MPHFA
LPS+MPHME
LPS+MPHA
LPS+MPHF

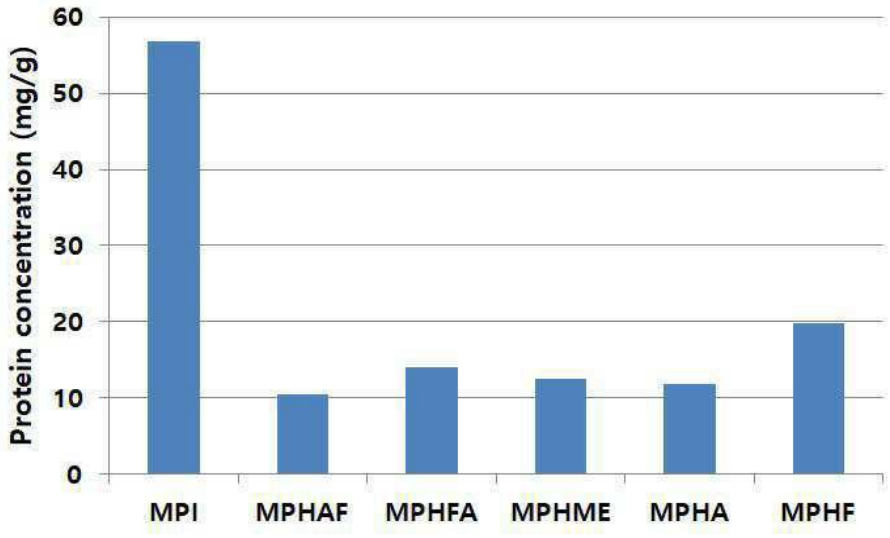
도면7


Inflammatory cytokines(pmol/ml)
40
35
30
25
20
15
10
5
0
IL-1b
IL-6
TNF-∂
Control
LPS
LPS+WPI
LPS+MPI
LPS+AF-LT
LPS+AF-TT
LPS+AF-MT

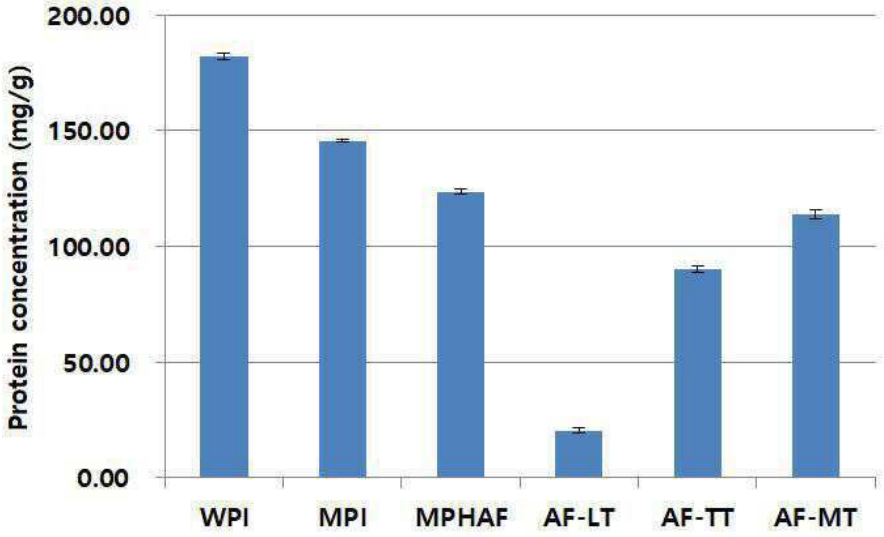
도면8


Available amino group (mg/g)
60.000
50.000
40.000
30.000
20.000
10.000
0.000
WPI
MPI
MPHAF
MPHFA
MPHME
MPHA
MPHF

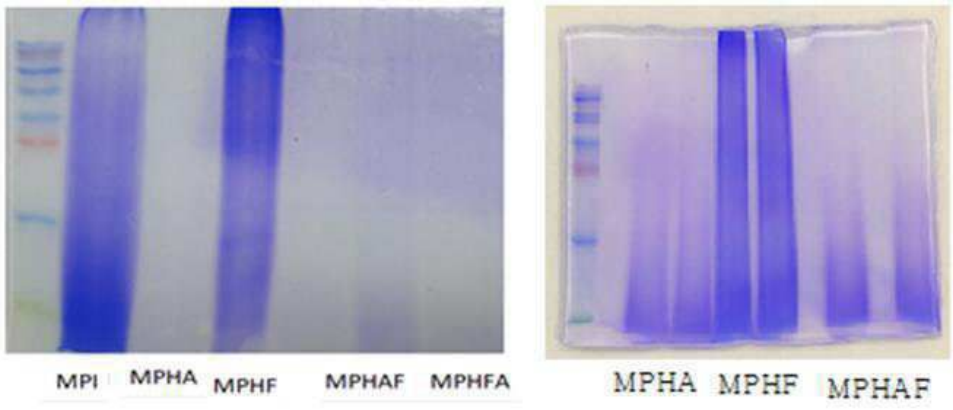
도면9



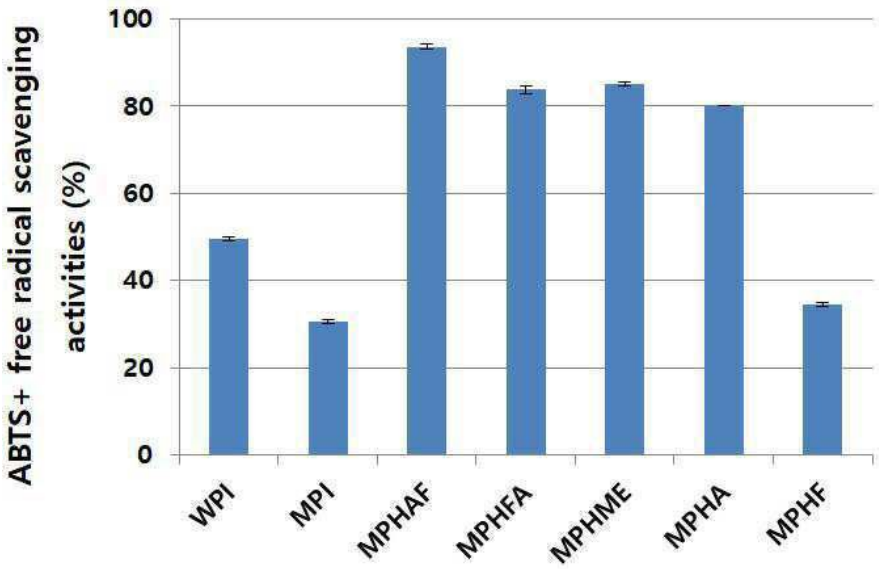
도면10



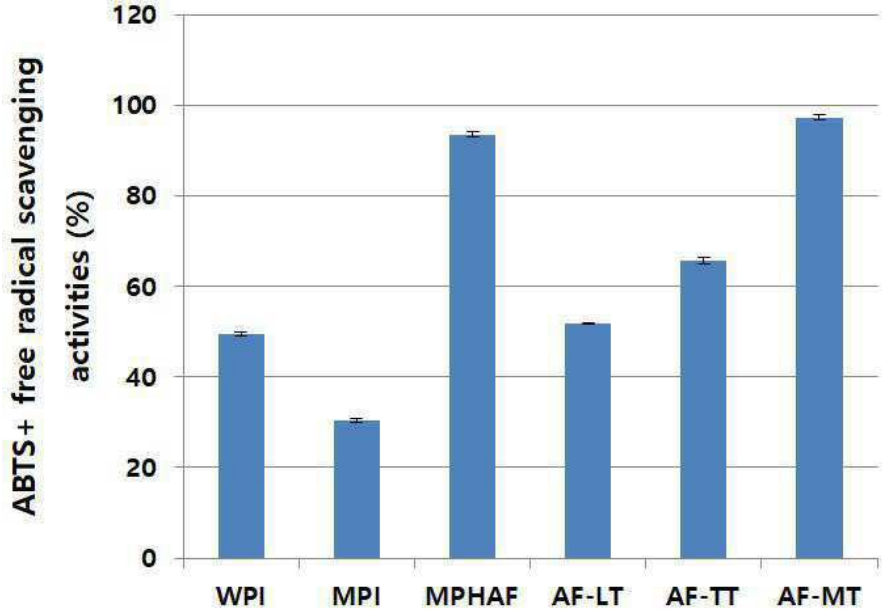
도면11



도면12


ABTS+ free radical scavenging activities (%)
100
80
60
40
20
0
WPI
MPI
MPHAF
MPHFA
MPHME
MPHA
MPHF

도면13


ABTS+ free radical scavenging activities (%)
120
100
80
60
40
20
0
WPI
MPI
MPHAF
AF-LT
AF-TT
AF-MT