



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호

10-2014-0056364

(43) 공개일자

2014년05월09일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12Q 1/68 (2006.01)

(21) 출원번호

10-2014-7008052(분할)

(22) 출원일자(국제)

2003년07월03일

심사청구일자

2014년04월25일

(62) 원출원

특허 10-2013-7003640

원출원일자(국제)

2003년07월03일

심사청구일자

2013년03월15일

(85) 번역문제출일자

2014년03월26일

(86) 국제출원번호

PCT/NZ2003/000140

(87) 국제공개번호

WO 2004/004450

국제공개일자

2004년01월15일

(30) 우선권주장

NZ 520016 2002년07월03일 뉴질랜드(NZ)

(71) 출원인

에이2 코퍼레이션 리미티드

뉴질랜드 오클랜드 쇼트랜드 스트리트 88 레벨 27

씨/- 심슨 그리어슨

(72) 발명자

모리스, 크리스토퍼 앤써니

뉴질랜드 해밀턴 쿠퍼 플레이스 5

타테, 마이클 루이스

뉴질랜드 두넨 맥크레아 스트리트 4

(74) 대리인

특허법인 남앤드남

전체 청구항 수 : 총 12 항

(54) 발명의 명칭 **우유의 지방산 조성을 변경시키는 방법**

(57) 요약

본 발명은 우유 중의 불포화 지방산의 수준에 대한 포화 지방산의 수준을 감소시키는 방법에 관한 것이다. 특히, 젖소의 우유에서 생성되는 베타-카제인의 67번 위치에 위치하는 아미노산 잔기를 기초로 하는 이들 젖소의 유전자형판별 및/또는 표현형판별에 관한 것이다. 본 발명은 우유 중의 포화 지방산 대 불포화 지방산의 비 및 우유 중의 베타-카제인 변이체 사이에 상관관계가 있다는 발견을 기초로 한다.

특허청구의 범위

청구항 1

- (a) 67번 위치에 프롤린 잔기를 지니는 β -카제인을 엔코딩하는 DNA 또는 67번 위치에 히스티딘 잔기를 지니는 β -카제인을 엔코딩하는 DNA의 존재에 대해 한 마리 이상의 젖소의 유전 물질을 시험하는 단계;
- (b) 젖소 또는 젖소들이 (i) 67번 위치에 프롤린 잔기를 지니는 β -카제인을 엔코딩하는 DNA에 대해 동종접합성인지에 기반하여 우유 중 더 낮은 비율의 포화 지방산 및 더 높은 비율의 불포화 지방산을 지닐 지, 또는 (ii) 67번 위치에 히스티딘 잔기를 지니는 β -카제인을 엔코딩하는 DNA에 대해 동종접합성인지에 기반하여 우유 중 더 높은 비율의 포화 지방산 및 더 낮은 비율의 불포화 지방산을 지닐 지의 여부를 확인하는 단계; 및
- (c) 상기 단계 (b) 후에 한 마리 이상의 젖소들 중 한 마리 이상으로부터 우유를 수득하는 단계를 포함하는, 한 마리 이상의 젖소로부터 수득된 우유 중의 포화 지방산 및 불포화 지방산의 상대적인 수준을 결정하는 방법.

청구항 2

- (a) 67번 위치에 프롤린 잔기를 지니는 β -카제인의 존재 및 67번 위치에 히스티딘 잔기를 지니는 β -카제인의 존재에 대해 한 마리 이상의 젖소의 우유 또는 이러한 우유로부터 생산된 생성물을 시험하는 단계;
- (b) 젖소 또는 젖소들이 (i) 우유 또는 이러한 우유로부터 생산된 생성물 중 67번 위치에 프롤린 잔기를 지니는 β -카제인의 존재 및 67번 위치에 히스티딘 잔기를 지니는 β -카제인의 부재에 기반하여 우유 중 더 낮은 비율의 포화 지방산 및 더 높은 비율의 불포화 지방산을 지닐 지, 또는 (ii) 우유 또는 이러한 우유로부터 생산된 생성물 중 67번 위치에 히스티딘 잔기를 지니는 β -카제인의 존재 및 67번 위치에 프롤린 잔기를 지니는 β -카제인의 부재에 기반하여 우유 중 더 높은 비율의 포화 지방산 및 더 낮은 비율의 불포화 지방산을 지닐 지의 여부를 확인하는 단계; 및
- (c) 상기 단계 (b) 후에 한 마리 이상의 젖소들 중 한 마리 이상으로부터 우유를 수득하는 단계를 포함하는, 한 마리 이상의 젖소로부터 수득된 우유 중의 포화 지방산 및 불포화 지방산의 상대적인 수준을 결정하는 방법.

청구항 3

- (a) 67번 위치에 프롤린 잔기를 지니는 β -카제인을 엔코딩하는 DNA 또는 67번 위치에 히스티딘 잔기를 지니는 β -카제인을 엔코딩하는 DNA의 존재에 대해 젖소의 유전 물질을 시험하는 단계; 및
- (b) 젖소가 (i) 67번 위치에 프롤린 잔기를 지니는 β -카제인을 엔코딩하는 DNA에 대해 동종접합성인지에 기반하여 우유 중 더 낮은 비율의 포화 지방산 및 더 높은 비율의 불포화 지방산을 지닐 지, 또는 (ii) 67번 위치에 히스티딘 잔기를 지니는 β -카제인을 엔코딩하는 DNA에 대해 동종접합성인지에 기반하여 우유 중 더 높은 포화 지방산 및 더 낮은 비율의 불포화 지방산을 지닐 지의 여부를 확인하는 단계를 포함하는, 불포화 지방산에 비해 감소된 수준의 포화 지방산을 지니는 우유를 생산할 지를 확인할 목적으로 젖소를 시험하는 방법.

청구항 4

- (a) 67번 위치에 프롤린 잔기를 지니는 β -카제인의 존재 및 67번 위치에 히스티딘 잔기를 지니는 β -카제인의 존재에 대해 젖소의 우유 또는 이러한 우유로부터 생산된 생성물을 시험하는 단계; 및
- (b) 젖소가 (i) 67번 위치에 프롤린 잔기를 지니는 β -카제인의 존재 및 67번 위치에 히스티딘 잔기를 지니는 β -카제인의 부재에 기반하여 우유 중 더 낮은 비율의 포화 지방산 및 더 높은 비율의 불포화 지방산을 지닐 지, 또는 (ii) 우유 또는 이러한 우유로부터 생산된 생성물 중 67번 위치에 히스티딘 잔기를 지니는 β -카제인의 존재 및 67번 위치에 프롤린 잔기를 지니는 β -카제인의 부재에 기반하여 우유 중 더 높은 비율의 포화 지방산 및 더 낮은 비율의 불포화 지방산을 지닐 지의 여부를 확인하는 단계를 포함하는, 불포화 지방산에 비해 감소된 수준의 포화 지방산을 지니는 우유를 생산할 지를 확인할 목적으로 젖소를 시험하는 방법.

청구항 5

- (a) 67번 위치에 프롤린 잔기를 지니는 β -카제인을 엔코딩하는 DNA 또는 67번 위치에 히스티딘 잔기를 지니는 β -카제인을 엔코딩하는 DNA의 존재에 대해 한 마리 이상의 젖소의 유전 물질을 시험하는 단계;
- (b) 젖소 또는 젖소들이 (i) 67번 위치에 프롤린 잔기를 지니는 β -카제인을 엔코딩하는 DNA에 대해 동종접합성

인지에 기반하여 우유 중 더 낮은 비율의 포화 지방산 및 더 높은 비율의 불포화 지방산을 지닐 지, 또는 (ii) 67번 위치에 히스티딘 잔기를 지니는 β -카제인을 엔코딩하는 DNA에 대해 동종접합성인지에 기반하여 우유 중 더 높은 비율의 포화 지방산 및 더 낮은 비율의 불포화 지방산을 지닐 지의 여부를 확인하는 단계;

(c) 상기 단계 (b)에서 확인된 한 마리 이상의 젖소들 중 한 마리 이상으로부터 우유를 수득하는 단계; 및

(d) 상기 단계 (c)에서 수득된 우유를 포화 지방산과 불포화 지방산의 비율을 변경시킬 목적으로 식품에 첨가하는 단계를 포함하며, 상기 식품이 우유인, 식품 중 포화 지방산과 불포화 지방산의 비율을 변경시키는 방법.

청구항 6

(a) 67번 위치에 프롤린 잔기를 지니는 β -카제인의 존재 및 67번 위치에 히스티딘 잔기를 지니는 β -카제인의 존재에 대해 한 마리 이상의 젖소의 우유 또는 이러한 우유로부터 생산된 생성물을 시험하는 단계;

(b) 젖소 또는 젖소들이 (i) 67번 위치에 프롤린 잔기를 지니는 β -카제인의 존재 및 67번 위치에 히스티딘 잔기를 지니는 β -카제인의 부재에 기반하여 우유 중 더 낮은 비율의 포화 지방산 및 더 높은 비율의 불포화 지방산을 지닐 지, 또는 (ii) 우유 또는 이러한 우유로부터 생산된 생성물 중 67번 위치에 히스티딘 잔기를 지니는 β -카제인의 존재 및 67번 위치에 프롤린 잔기를 지니는 β -카제인의 부재에 기반하여 우유 중 더 높은 비율의 포화 지방산 및 더 낮은 비율의 불포화 지방산을 지닐 지의 여부를 확인하는 단계;

(c) 상기 단계 (b)에서 확인된 한 마리 이상의 젖소들 중 한 마리 이상으로부터 우유를 수득하는 단계; 및

(d) 상기 단계 (c)에서 수득된 우유를 포화 지방산과 불포화 지방산의 비율을 변경시킬 목적으로 식품에 첨가하는 단계를 포함하며, 상기 식품이 우유인, 식품 중 포화 지방산과 불포화 지방산의 비율을 변경시키는 방법.

청구항 7

제 1항 내지 제 6항 중 어느 한 항에 있어서, 67번 위치에 프롤린을 지니는 β -카제인이 β -카제인 A2, A3, D 및 E 중 하나 이상을 포함하는, 방법.

청구항 8

제 7항에 있어서, 67번 위치에 프롤린을 지니는 β -카제인이 β -카제인 A2인, 방법.

청구항 9

제 1항 내지 제 6항 중 어느 한 항에 있어서, 67번 위치에 히스티딘을 지니는 β -카제인이 β -카제인 A1, B 및 C 중 하나 이상을 포함하는, 방법.

청구항 10

제 9항에 있어서, 67번 위치에 히스티딘을 지니는 β -카제인이 β -카제인 A1인, 방법.

청구항 11

제 1항, 제 3항 또는 제 5항 중 어느 한 항에 있어서, 젖소의 유전 물질이 유핵 세포를 함유하고 있거나 함유했던 어떠한 조직일 수 있는, 방법.

청구항 12

제 11항에 있어서, 유전 물질이 혈액, 체모 또는 우유로부터 수득되는, 방법.

명세서

기술분야

본 발명은 우유 중의 불포화 지방산의 수준에 대한 포화 지방산의 수준을 감소시키는 방법에 관한 것이다. 특히, 본 발명은 젖소의 우유에서 생성되는 β -카제인의 67번 위치에 위치하는 아미노산 잔기를 기초로 하는 젖소의 유전자형판별 및/또는 표현형판별에 관한 것이다.

배경기술

[0001]

- [0002] 식이성 포화 지방산 섭취는 인간, 특히 국민이 충분한 영양을 섭취하는 국가에서 심장병의 주요 위험 인자인 것으로 공지되어 있다. 유제품 (특히 우유)과 같은 동물 생산물은 인간의 식이 섭취에 주된 기여를 한다. 우유에서 발견되는 포화 지방산, 특히 탄소 원자수가 18개 미만인 사슬 길이를 지닌 포화 지방산의 수준이 관상동맥 심장병의 위험 인자라는 것은 공지되어 있다. 대조적으로, 불포화 지방산은 유익한 것으로 간주된다. 이로 인해, 동물성 생산물과 반대로 식물 유래된 오일의 소비가 선호되어 왔다.
- [0003] 또한, 의학계는 죽종형성성인 것으로 여겨지는 포화 지방산 C:14:0이 풍부하게 존재한다는 이유로 우유에서 발견되는 지방의 소비에 대해 염려를 하고 있다. 낙농 업계는 화학적 분리 및 추출 기술을 이용한 "저지방" 우유 대체품의 생산으로 부분적으로 대응해오고 있다.
- [0004] 지방 이외에, β -카제인 단백질의 A^1 변이체를 포함하는 우유의 특정 단백질 성분이 건강 위험 인자이다. 인간에 의한 β -카제인 A^1 의 소비가 특정 질병, 구체적으로는 당뇨병 (Elliott *et al.* 1999 *Diabetologia* 42:292-6; Wasmuth *et al.* 1999 *Diabetologia* 42 (Suppl. 1):A88 Proceedings of the Kongress der Europäischen Diabetesgesellschaft vom 28.-30.09.1999 in Brussels/Belgium) 및 관상동맥 심장병 (McLachlan, C.N., *Med. Hypotheses* 56(2):262-72, 2001)의 높은 발병률과 연관되어 있다는 다수의 보고가 있다.
- [0005] 젖소의 우유에서 생성된 β -카제인 변이체(들)을 확인함으로써 젖소를 표현형판별하는 것 이외에, 젖소가 우유에서 생성하게 될 β -카제인 변이체(들)을 결정하기 위해 특정 단일 뉴클레오티드 다형 (SNP)에 대해 젖소가 유전자형판별될 수 있다는 것은 널리 공지되어 있다. 이러한 유전자형판별 방법을 기초로 하여 β -카제인 A^1 변이체가 없고, 바람직하게는 단지 β -카제인 A^2 변이체를 함유하는 우유를 생산하는 젖소떼를 제공하기 위해 젖소를 선택하는 방법은 PCT/NZ96/00039 (WO 96/36239로서 공개됨)에 기재되어 있다.
- [0006] 본 출원인은 우유 중의 포화 지방산 대 불포화 지방산의 비 및 우유 중의 β -카제인 변이체 사이에 상관관계가 있음을 발견하였다. 동물 생산물의 지방산 조성을 변경시키는 방법은 공지되어 있지만, 이들 방법은 전형적으로 화학적 추출, 특정 사료공급 및 관리 시스템, 및 우유 중의 특정 지방산의 수준에 대한 정량적 유전적 선택을 포함한다. 각각의 방법은 고가이고, 일반적으로 비효율적이다.
- [0007] 따라서, 본 발명의 목적은 불포화 지방산에 대한 포화 지방산의 수준이 감소된 우유 또는 이러한 우유로부터 수득된 제품을 제공하거나, 적어도 대중에게 유용한 대체품을 제공하는 데에 있다.
- 발명의 내용**
- [0008] 본 발명의 첫 번째 양태는 우유 중의 불포화 지방산의 수준에 대한 포화 지방산의 수준을 감소시키는 방법으로서,
- [0009] (a) 67번 위치에 프롤린을 지니는 β -카제인을 함유하는 우유를 생산하는 젖소 및 67번 위치에 히스티딘을 지니는 β -카제인을 함유하는 우유를 생산하는 젖소를 포함하는 젖소떼로부터, 67번 위치에 프롤린 잔기를 지니는 β -카제인을 엔코딩하는 DNA의 존재에 대해 젖소떼의 개개의 젖소의 유전 물질을 시험하거나 67번 위치에 프롤린을 지니는 β -카제인의 존재에 대해 젖소떼의 개개의 젖소에 의해 생산된 우유 (또는 이러한 우유로부터 생성된 생성물)를 시험함으로써, 67번 위치에 프롤린을 지니는 β -카제인을 함유하는 우유를 생산하는 젖소를 결정하고;
- [0010] (b) 67번 위치에 프롤린 잔기를 지니는 β -카제인을 엔코딩하는 DNA를 지닌 젖소 또는 67번 위치에 프롤린을 지니는 β -카제인을 함유하는 우유를 생산하는 젖소를 선택하고;
- [0011] (c) 선택된 젖소에서 착유(milking)하여, 젖소떼로부터 수득한 우유와 비교하여 불포화 지방산의 수준에 대한 포화 지방산의 수준이 감소된 우유를 제공하는 것을 포함하는 방법을 제공한다
- [0012] 67번 위치에 프롤린을 지니는 β -카제인이 β -카제인 A^2 , A^3 , D, E 및 F 중 하나 이상을 포함하는 것이 바람직하다. 또한, 67번 위치에 히스티딘을 지니는 β -카제인이 β -카제인 A^1 , B 및 C 중 하나 이상을 포함하는 것이 바람직하다.
- [0013] 본 발명의 바람직한 구체예에 있어서, 67번 위치에 프롤린을 지니는 β -카제인은 β -카제인 A^2 이고, 67번 위치에 히스티딘을 지니는 β -카제인은 β -카제인 A^1 이다.

- [0014] 또한, 젖소떼에 의해 생산된 우유 중의 불포화 지방산의 수준에 대한 포화 지방산의 수준을 감소시키는 것 이외에, 각각의 사슬에 6개 내지 14개의 탄소 원자를 지닌 짧은 사슬 및 중간 사슬 포화 지방산 (C6:0-C14:0)의 수준이 또한 감소되는 것이 바람직하다.
- [0015] 본 발명의 또 다른 바람직한 구체예에 있어서, 젖소떼 중에서 67번 위치에 프롤린을 지니는 β -카제인을 함유하는 우유를 생산하는 젖소를 결정하는 것은 67번 위치에 프롤린 잔기를 지니는 β -카제인을 엔코딩하는 DNA의 존재에 대해 젖소의 유전 물질을 시험함으로써 이루어진다. 또 다른 구체예에 있어서, 젖소떼 중에서 67번 위치에 프롤린을 지니는 β -카제인을 함유하는 우유를 생산하는 젖소를 결정하는 것은 67번 위치에 프롤린을 지니는 β -카제인의 존재에 대해 젖소에 의해 생산된 우유 (또는 이러한 우유로부터 생성된 생성물)을 시험함으로써 이루어진다.
- [0016] 젖소의 유전 물질은 유핵 세포를 함유하고 있거나 함유했던 임의의 조직일 수 있지만, 유전 물질은 바람직하게는 혈액, 체모 또는 우유로부터 수득된다.
- [0017] 본 발명의 두 번째 양태에 있어서, 본 발명의 첫 번째 양태의 방법에 의해 수득된 우유가 제공된다.
- [0018] 본 발명의 세 번째 양태에 있어서, 본 발명의 첫 번째 양태의 방법에 의해 수득된 우유로 제조된 유제품이 제공된다.
- [0019] 본 발명의 네 번째 양태에 있어서, 67번 위치에 프롤린을 지니는 일정량의 β -카제인을 식품에 첨가함으로써 식품 중의 포화 지방산 대 불포화 지방산의 비율을 변경시키는 방법이 제공된다.
- [0020] 바람직하게는, 포화 지방산 대 불포화 지방산의 비율은 식품 중의 포화 지방산의 수준을 감소시킴으로써 변경된다.
- [0021] 바람직하게는, 식품은 우유 또는 우유로부터 제조된 유제품이다. 또한, 본 발명의 첫 번째 양태의 방법에 의해 수득된 우유 (또는 우유 추출물)를 첨가함으로써 67번 위치에 프롤린을 지니는 β -카제인이 식품에 첨가되는 것이 바람직하다.
- [0022] 동물의 유전학이 생산 수준 및 생산물 품질, 및 보건, 환경 및 동물 복지 문제에 대해 상당한 영향을 미친다는 것은 널리 공지되어 있다. 유전학 시험을 이용함으로써 동물의 표현형을 결정할 수 있는 능력은 유익한 특성을 지닌 동물 및 동물 생산물을 신속히 확인해주고, 향상된 생산 및/또는 생산물 품질을 지닌 동물의 군을 형성하기 위한 유용한 도구이다. 동물은 경제적으로 관심을 끄는 동물 또는 동물 생산물 형질과 관련된 유전적 차이를 기초로 하여 군이 형성될 수 있다.
- [0023] 동물의 특정 물리적 형질을 담당하는 유전자 (또는 이러한 유전자의 변이체)는 일부의 경우에 단일 뉴클레오타이드 다형 (SNP)에 의해 확인될 수 있다. SNP는 동물의 게놈내의 특정 위치에 있는 DNA 서열이 또 다른 동물의 게놈내의 동일한 위치에 있는 DNA 서열과 하나의 뉴클레오타이드만이 상이한 DNA 서열이다. 이와 같은 작은 차이가 어떤 동물은 특정한 물리적 형질을 나타내는 반면 또 다른 동물은 그렇지 않음을 의미할 수 있다.
- [0024] 우유의 카제인 함량 및 지방 함량 사이의 관련성이 확인되었지만, 이러한 관련성은 상관관계의 크기 및 방향에 있어서 가변적이었다. 따라서, 결과는 확정적이지 않다. 보벤히우스(Bovenhuis) 및 웰러(Weller)는 문헌 [Genetics;137(10):267-80, 1994]에서 관련성은 이것이 존재하는 경우에 동일한 축우 염색체 (6번 염색체)상의 지방 QTL과의 연관 (종모우(sire) 혈통에서) 또는 연관 불균형 (개체군에서)으로 인한 것으로 결론내렸다. 공개된 자료로부터 얻어지는 전반적인 결론은 우유 중의 지방의 전체량이 β -카제인 유전자형과 관련이 없고, β -카제인이 인간 건강에 미칠 수 있는 영향(들)이 지방 섭취량과 관련이 없다는 것이다. 그러나, 현재 본 출원인은 축우 6번 염색체상의 β -카제인 유전자의 유전자형과 우유의 지방산 조성 사이의 의외의 관계를 확인하였다.
- [0025] 본 출원인은 β -카제인 A^1 을 함유하는 우유 (A^1 우유)가 β -카제인 A^1 이 없는 우유 (A^2 우유)와 비교하여 유사한 전체 지방 비율을 지닌다는 종래의 결과를 확인하였다. 놀랍게도 종래의 결과와 대조적으로, 본 출원인은 A^1 우유가 A^2 우유와 비교하여 포화 지방산 비율이 높고 불포화 지방산 비율이 낮다는 것을 발견하였다. 또한, 놀라운 것은 C6, C8, C10, C12 및 C14 지방산의 수준이 β -카제인 A^2 에 대해 동종접합성인 젖소로부터 수득된 우유에서 감소되었다는 것이다. 이러한 유의할 만한 결과는 β -카제인 A^1 가 실질적으로 없는 우유가 낮은 수준의 포화 지방산 및 중간 사슬 지방산 (C6 내지 C14) 및 높은 수준의 불포화 지방산을 지니는 우유 지방을 또한 생성시킴을 보여준다. 따라서, 이러한 우유는 포화 지방산의 많은 섭취와 관련된 질병, 예를 들어 죽상경화증, 비만, 관상동맥 심장병, 및 당뇨병의 위험이 감소되어 건강에 유익하다.

- [0026] 전형적으로, 젖소는 이의 우유에서 β -카제인을 생성시킬 것이다. 그러나, A^1 , A^2 , A^3 , B, C, D, E 및 F를 포함하는 다양한 β -카제인 변이체가 존재한다. 이들 단백질 간의 차이는 β -카제인 유전자에서의 서열 변이에 의해 결정된다. 예를 들어, 한 가지 차이는 A^2 , A^3 , D, E 및 F 변이체가 67번 위치에 프롤린 잔기를 지니는 반면, A^1 , B 및 C 변이체는 67번 위치에 히스티딘 잔기를 지닌다는 것이다. 이러한 차이점은 β -카제인 유전자의 코딩 영역의 200번 위치에서 뉴클레오타이드 시토신에 의한 뉴클레오타이드 아데닌의 치환에 의해 결정된다. 젖소의 β -카제인 변이체 표현형은 이들 변이체 유형을 구별짓게 하는 SNP를 유전자형판별함으로써 간접적으로 결정될 수 있다.
- [0027] 본 출원인은 β -카제인 변이체 유형 또는 β -카제인 유전자에서의 유전자 변이를 기초로 하여 동물을 선택하는 것이 우유 지방산 조성에서의 유의할 만한 차이를 지닌 동물의 군을 확인할 수 있게 해준다는 것을 발견하였다. 예를 들어, β -카제인 유전자의 코딩 영역의 200번 위치에 있는 아데닌 뉴클레오타이드에 대해 동종접합성인 동물의 우유(A1)는 이러한 위치에 있는 아데닌 및 시토신 뉴클레오타이드에 대해 이종접합성인 동물의 우유(A1/A2)와 지방산 조성이 상이하며, 이러한 위치에 있는 시토신에 대해 동종접합성인 동물의 우유(A2)와 또한 상이하다.
- [0028] 더욱 상세하게는, β -카제인 유전자의 200번 위치에 있는 아데닌은 포화 지방산 C6:0, C8:0, C10:0, C12:0 및 C14:0의 수준을 증가시키고, 불포화 지방 C18:1을 필적하는 양만큼 감소시킨다. 젖소때, 젖소때 중의 몸(mob), 품종, 연령 2-8+, 우유의 일수, 메틸화 그룹, 및 종모우의 효과를 고려하지 않을시, β -카제인 유전자형은 동물 간의 이러한 특정 지방산 프로파일의 변이 중 15 내지 20%를 차지한다.
- [0029] β -카제인의 67번 위치에 히스티딘이 존재하면 β -카소모르핀-7의 효소적 형성을 가능하게 한다. β -카소모르핀-7은 β -카제인 A^1 , B 및 C로만 형성된 7개의 아미노산 펩티드이다. 카소모르핀 펩티드는 아편유사제로서 작용하는 것으로 알려져 있다. 린(Lin) 등의 자료 (1988, *Peptides* 19(2):325-31)에는 β -카소모르핀-7이 식이성 지방의 섭취를 조절할 수 있다고 제시되어 있다. β -카소모르핀은 래트에서 식이성 지방의 섭취를 자극하지만 엔테로스타틴(enterostatin)은 섭취를 억제한다. 또한, 티로실 말단 잔기를 지닌 카제인 가수분해물로부터의 펩티드 (예를 들어, β -카소모르핀-7)은 인간 LDL (저밀도 지질단백질)의 퍼옥시다제 의존성 산화를 촉진시키는 것으로 밝혀졌다. 따라서, 인간 건강에 유해한 인자에 대한 관계에 있어서 β -카제인 A^1 는 소비자의 지방 대사에 대한 카제인 및 이로부터 유래되는 펩티드의 작용과 관련이 있고, 상이한 β -카제인 유전자형을 지닌 동물의 우유의 지방 조성의 차이와는 관련이 없는 것으로 현재 이해된다.
- [0030] β -카제인이 우유의 지방산 조성에 영향을 미치는 메커니즘은 연관된 유전자로 인한 것으로 여겨지지 않는다. 이는 종모우를 넘어서 관찰되는 효과의 크기 및 일관성으로 인한 것이다. 본 발명을 임의로 제한하고자 하는 것은 아니지만, 이러한 발견은 유방 조직에서의 지질의 생합성에 대한 β -카제인의 직접적인 효과와 관련된다. 대안적으로, 이러한 발견은 우유 중의 카제인과 지질의 상호작용의 직접적인 결과일 수 있다. 후자가 맞는 경우, 생산물의 지방산 프로파일을 변경시키는 것이 가능할 수 있다. 따라서, 규정된 처리 조건하에서 선택된 카제인 변이체 유형 (예를 들어, β -카제인 A^1 이 없는)의 동물로부터 수득된 β -카제인을 생산물에 첨가하는 것은 생산물의 지방산 프로파일을 유리하게 변경시킬 수 있다.
- [0031] β -카제인에 대한 시험은 착유를 위해 젖소때에 포함시킬 동물을 선택하기 위해 사용될 수 있거나, 착유를 위해 젖소때에 포함시키려는 동물의 후속 세대를 번식시키기 위해 인공 번식 또는 클로닝용의 종모우, 댐(dam) 또는 조직 공여체로서 사용하려는 동물을 선택하기 위해 사용될 수 있다. 이러한 방식으로, 우유의 단백질 분획에 β -카제인 A^1 단백질이 없고 (또는 존재하는 유일한 β -카제인이 β -카제인 A^2 임), 우유의 지방 분획에서 특정 포화 지방산의 수준이 감소하고 특정 불포화 지방산의 수준이 증가된 우유를 생산하는 착유용 젖소때가 형성될 수 있다. β -카제인 A^1 변이체가 없고, 바람직하게는 β -카제인 A^2 변이체만을 지니는 우유를 생산하는 착유용 젖소때를 형성하기 위해 이러한 유전자형판별을 기초로 하여 젖소를 선택하는 방법은 PCT/NZ96/00039 (WO 96/36239로서 공개됨)에 기재되어 있다.
- [0032] 본 발명의 또 다른 특징은 특정 유전자형을 지닌 동물이 선택되고 이러한 동물로부터 우유가 생산되는 경우, 우유 또는 기타 제품, 예를 들어 분유 및 우유 가공품의 기원은 선택된 동물로부터 생산된 것으로서 입증될 수 있다. 이는 이러한 유제품의 지방산 조성을 결정함으로써 달성된다. 따라서, 소비자는 우유가 실제로 요망되는 유전자형을 지닌 동물로부터 유래된 것임을 확인할 수 있다.
- [0033] 본 발명의 우유의 이점은 상당히 크다:

- [0034] (1) β -카제인 A¹ 단백질의 부재 및 단지 β -카제인 A²의 존재는 관상동맥 심장병 및 1형 당뇨병의 위험을 감소시킨다.
- [0035] (2) 포화 지방을 불포화 지방으로 대체시키면 관상동맥 심장병, 비만 및 기타 질병의 위험을 감소시킨다.
- [0036] (3) 중중형성성인 것으로 여겨지는 C14:0의 소비가 감소된다.
- [0037] 카제인이 우유의 지방산 조성에 영향을 미치는 메커니즘은 불명확하지만, 이러한 메커니즘은 카제인으로부터의 카소모르핀 펩티드의 형성을 통해 매개되는 것이 가능하다. 이와 인간에 의한 β -카제인 A¹의 소비의 영향 사이에는 기계적인 관계가 존재할 수 있다. 그러나, 우유의 지방산 프로파일에 대한 카제인 유전자형의 직접적 효과는 소비자의 대사에 대해 카제인 및 카제인 대사산물의 직접적 효과와는 매우 별개인 유용성을 지닌다. β -카제인 (또는 특정 변이체)가 우유의 지방산 조성을 직접적으로 변형시킬 수 있는 직접적 효과가 또한 존재할 수 있다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0038] 실시예
- [0039] β -카제인 유전자의 200번 위치의 누클레오타이드에서 이중접합 A/C인 6마리의 종모우로부터 유래된 1114개의 프로제니(progeny)로부터의 우유로부터 DNA를 추출하고, 지방산 조성을 결정하였다.
- [0040] DNA를 다음과 같은 방식으로 우유로부터 추출하였다. 우유를 역위(inversion)에 의해 철저히 혼합하고, 1.0ml를 1.5ml 미세원심분리 튜브내로 피펫팅하였다. 튜브를 8,000rpm에서 10분간 원심분리시키고, 상층액 중 100 μ l 분액 (미정제 DNA를 함유함)을 각각의 샘플로부터 새로운 1.5ml 튜브내로 피펫팅하였다. 미정제 DNA 추출물을 -20℃에서 동결시킨 채로 저장하고, 1 내지 5 μ l를 추가 정제없이 유전자형판별을 위해 사용하였다.
- [0041] 사용된 유전자형판별 방법은 PCT/NZ96/00039 (WO 96/36239로서 공개됨)에 상세히 기재되어 있다.
- [0042] 지방산 분석용 샘플을 15,000rpm에서 15분간 원심분리시켰다. 지질의 상층의 분액을 각각의 샘플로부터 분리하였다. 이러한 지질 샘플을 60.0℃로 가열하고, 용해된 지질을 분리하고, 동결된 채로 저장하였다. 그 후, 샘플을 메틸화시키고, 가스 크로마토그래피에 의해 분석하였다. 크로마토그래프상의 피크 면적을 적분하여 각각의 지방산의 수준을 정량하였다. 각각의 지방산의 식별은 각각의 피크의 유지 시간을 공지된 표준과 비교함으로써 결정되었다.
- [0043] 분석된 샘플 중에서, 동물들은 200번 위치에서 CC (A2), AC (A1/A2) 또는 AA (A1)인 것으로 시험되었다. 유전자형 간의 차이는 원래의 데이터가 지방산 조성에 영향을 미칠 수 있는 그 밖의 인자에 대해 조정되는 일반화된 선형 모델 분석을 이용하여 비교되었다. 사전 조정이 다음과 같은 인자에 대해 이루어졌다: 젖소떼, 젖소떼 중의 몸, 품종, 연령 2-8+, 우유의 일수, 및 젖소떼 내의 메틸화 그룹. 최종적으로, 종모우, 유전자형 및 종모우 x 유전자형 상호작용을 맞추었다.
- [0044] 이러한 실험으로부터의 결과는 표 1에 제공되어 있고, 이는 A2 유전자형이 지방산 조성에 대해 유의할 만한 효과를 지님을 보여준다. 통계적 유의성의 수준은 개개의 지방산마다 달랐다 (* =p<0.05, ** =p<0.1 *** =p<0.001). A1과 비교하여, A2 유전자형을 지닌 동물의 우유는 현저하게 높은 비율의 긴사슬 불포화 지방산 (C18:1) 및 낮은 비율의 중간 사슬 포화 지방산 (C6:0-C14:0)을 지니는 반면, A1/A2 개체는 이들 값에 대해 중간정도였다.
- [0045] 전체 C18:1의 비율로서, A2 유래된 우유는 A1 유래된 우유 보다 약 3% 많은 C18:1을 지녔다. C18:1은 우유 지방의 약 15%를 구성하므로, 전체 우유 지방의 비율로서의 전체 효과는 대략 절반 더 많은 C18:1였다. 포화 지방산 비율의 감소는 불포화 지방산의 증가와 유사하였다. 젖소떼, 젖소떼 중의 몸, 품종, 연령 2-8+, 우유의 일수, 메틸화 그룹 및 종모우의 효과가 모델에 의해 제거된 경우, β -카제인 유전자형은 동물 간의 이러한 특정 지방산 조성의 변이의 15 내지 20%를 차지하였다.

표 1: 우유 지방 중의 지방산 %에 대한 β -카제인 유전자형 분석의 요약

루아쿠라(Ruakura) 유전자형 실험의 모든 동물들을 포함하는 실험(run)으로부터 수득된 지방산 형질에 대한 잔차(residual) (전체 지방산 중의 %로서 측정됨).						
사전-조정은 젖소때, 젖소때 중의 몸, 품종, 연령 2-8+, 우유 일수, 젖소때 중의 메틸화 그룹에 대해 이루어졌다.						
n=3760	C4:0	C6:0	C8:0	C10:0	C12:0	C14:0
평균(%)	2.67	2.24	1.56	3.79	4.31	12.63
rsd(%)	0.29	0.19	0.12	0.42	0.52	0.81
adjR ²	0.44	0.48	0.47	0.40	0.40	0.24
모델: 종모우, β -카제인 유전자형 (A1; A1A2; A2), 유전자형 X 종모우 상호작용. 형질은 표준화된 잔차임.						
	C4:0	C6:0	C8:0	C10:0	C12:0	C14:0
n=1114						
종모우	**	*	**	***	***	***
유전자형	ns	*	**	**	*	**
유전자형 X 종모우	ns	ns	+	ns	ns	ns
대조 A2-A1	-	-	-	-	-	-
	0.03±0.10	0.25±0.09	0.29±0.10	0.26±0.09	0.21±0.10	0.24±0.10
	(ns)	(**)	(**)	(**)	(*)	(*)
대조 A2-A1A2	-	-	-	-	-	-
	0.13±0.09	0.16±0.09	0.11±0.09	0.06±0.09	0.05±0.09	0.03±0.09
	(ns)	(+)	(ns)	(ns)	(ns)	(ns)
대조 A1-A1A2	-	0.09±0.07	0.18±0.07	0.20±0.07	0.16±0.07	0.20±0.07
	0.10±0.08					
	(ns)	(ns)	(*)	(**)	(*)	(**)

[0046]

표 1 (계속)

루아쿠라(Ruakura) 유전학 실험의 모든 동물들을 포함하는 실행(run)으로부터 수득된 지방산 형질에 대한 잔차(residual) (전체 지방산 중의 %로서 측정됨).							
사전-조정은 젖소때, 젖소때 중의 몸, 품종, 연령 2-8+, 우유 일수, 젖소때 중의 메틸화 그룹에 대해 이루어졌다.							
C15:0	C16:0	C16:1	C18:0	C18:1	C18:1 트랜스	C18:2	CLA
1.36	30.48	1.33	9.45	15.69	3.48	1.36	0.84
0.16	2.71	0.29	1.37	1.85	0.87	0.20	0.27
0.26	0.22	0.26	0.28	0.27	0.34	0.60	0.36
모델: 종모우, β-카제인 유전자형 (A1; A1A2; A2), 유전자형 X 종모우 상호작용. 형질은 표준화된 잔차임.							
C15:0	C16:0	C16:1	C18:0	C18:1	C18:1 트랜스	C18:2	CLA
***	***	***	***	***	***	***	***
ns	ns	ns	ns	*	ns	ns	ns
ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
0.01 ±0.10	- 0.07±0.10	0.04 ±0.10	0.01 ±0.09	0.26 ±0.10	0.08 ±0.10	0.09 ±0.11	0.16 ±0.10
(ns)	(ns)	(ns)	(ns)	(**)	(ns)	(ns)	(ns)
- 0.01±0.09	- 0.09±0.09	- 0.02±0.09	0.09 ±0.09	0.12 ±0.09	0.07 ±0.10	0.001 ±0.10	0.10 ±0.09
(ns)	(ns)	(ns)	(ns)	(ns)	(ns)	(ns)	(ns)
- 0.02±0.08	- 0.02±0.08	- 0.06±0.08	0.08 ±0.07	- 0.14±0.07	- 0.003±0.08	- 0.09±0.08	- 0.06±0.08
(ns)	(ns)	(ns)	(ns)	(+)	(ns)	(ns)	(ns)

[0047]

[0048]

이상 본 발명을 예로서 설명하였지만, 본 발명의 범위를 벗어남이 없이 변화 및 변형이 이루어질 수 있다는 것이 인식되어야 한다. 또한, 공지된 균등물이 특정한 특징에 대해 존재하는 경우, 이러한 균등물은 본 명세서에 구체적으로 언급된 바대로 포함된다.

[0049]

불포화 지방산에 비해 포화 지방산의 수준이 낮은 우유는 특정한 질병 및 질환의 예방에 유용하다. 식이성 지방산 섭취는 심장병의 주된 위험 인자이며, 식이성 지방산 섭취의 대부분은 우유 및 유제품의 소비로부터 이루어진다. 67번 위치에 히스티딘 대신 프롤린을 지닌 β-카제인 변이체를 생성하는 능력을 기초로 하여 유전자형 판별 또는 표현형판별된 젖소만을 착유함으로써 불포화 지방산에 비해 포화 지방산이 낮은 우유를 수득하는 능력은 인간 건강에 유익한 우유를 생산하는 유용한 방법을 제공한다.