



등록특허 10-2691618



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2024년08월08일

(11) 등록번호 10-2691618

(24) 등록일자 2024년08월02일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A23L 33/125 (2016.01)

(52) CPC특허분류

A23L 33/125 (2020.05)

A23V 2002/00 (2023.08)

(21) 출원번호 10-2023-0081869

(22) 출원일자 2023년06월26일

심사청구일자 2023년06월26일

(56) 선행기술조사문헌

KR1020220122264 A*

US20120322745 A1*

KR1020090095901 A

US20090297545 A1

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자

충남대학교산학협력단

대전광역시 유성구 대학로 99 (궁동, 충남대학교)

(주)서울에프엔비

강원도 횡성군 공근면 아이티밸리길 36

(72) 발명자

남명수

세종특별자치시 시청대로 210(보람동, 호려울마을10단지), 1023동 1402호

김기광

대전광역시 유성구 지족로 362(지족동, 반석마을 아파트3단지), 302동 1404호

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

특허법인 공간

전체 청구항 수 : 총 5 항

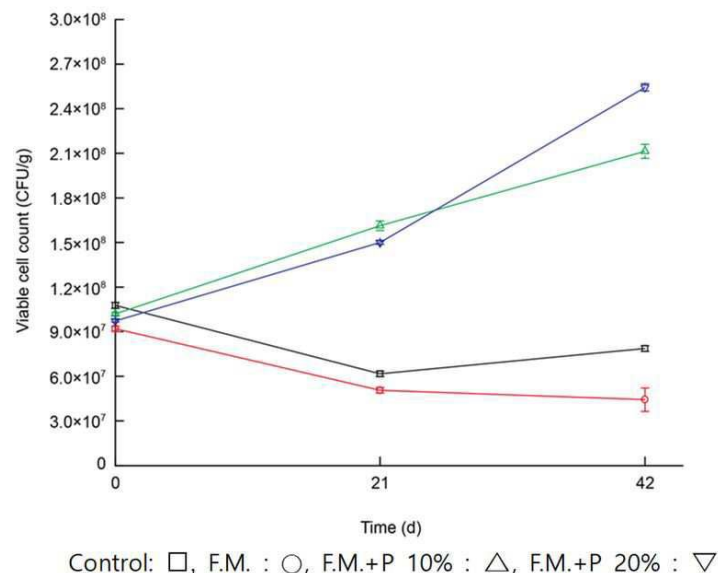
심사관 : 하혜경

(54) 발명의 명칭 발효유 및 유청단백질 가수분해물을 포함하는 프로바이오틱스 조성물

(57) 요약

본 발명은 발효유 및 유청단백질 가수분해물을 포함하는 프로바이오틱스 조성물에 관한 것으로, 장 내 유산균수를 증가시키고 혈중 HDL을 증가시키고 LDL을 감소시키며, 운동능력을 향상시키고 노화마커를 억제하여 국민건강에 이바지할 수 있다.

대표도 - 도8



(52) CPC특허분류

A23V 2200/30 (2013.01)

A23V 2250/54252 (2013.01)

(72) 발명자

오덕근

강원특별자치도 원주시 행구로 54, 101동 2001호
(개운동, 원주힐스테이트아파트)

김지연

강원특별자치도 원주시 장전길 36 (태장동)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2130990902

과제번호 G21S30990902

부처명 중소벤처기업부

과제관리(전문)기관명 충남대학교

연구사업명 산학연 Collabo RnD 사업

연구과제명 프로바이오틱스와 우유단백질 가수분해물소재를 이용한항노화 기능성 발효유제품 개

발 및 산업화

기 여 율 1/1

과제수행기관명 충남대학교

연구기간 2022.06.01 ~ 2023.05.31

명세서

청구범위

청구항 1

발효유 및 유청단백질 가수분해물을 포함하는 운동능력 향상용 프로바이오틱스 조성물에 있어서,
상기 유청 단백질 가수분해물은 VLVDTDYKK 또는 VGINYWLAHK 서열로 이루어지는 펩타이드를 포함하는 것을 특징으로 하는 운동능력 향상용 프로바이오틱스 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,
상기 유청 단백질 가수분해물은, 판크레아틴을 유청 단백질에 1:100의 비율로 첨가하여 50℃로 5시간 동안 반응시킨 것임을 특징으로 하는 운동능력 향상용 프로바이오틱스 조성물.

청구항 3

삭제

청구항 4

삭제

청구항 5

제1항에 있어서,
상기 프로바이오틱스 조성물은 피부세포의 노화 마커 p21의 발현을 억제하는 것을 특징으로 하는 운동능력 향상용 프로바이오틱스 조성물.

청구항 6

제1항에 있어서,
상기 프로바이오틱스 조성물은 혈중 총콜레스테롤양(Total cholesterol, T-Chol) 및 저밀도 지단백(Low Density Lipoprotein, LDL)의 농도를 저감시키고 혈중 고밀도 지단백(High Density Lipoprotein, HDL)를 증가시키는 것을 특징으로 하는 운동능력 향상용 프로바이오틱스 조성물.

청구항 7

제1항, 제2항, 제5항 및 제6항 중 어느 한 항의 운동능력 향상용 프로바이오틱스 조성물을 포함하는 운동능력 향상용 건강기능식품.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 발효유 및 유청단백질 가수분해물을 포함하는 프로바이오틱스 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 고령화는 전체 인구 중 노인의 비율이 높아지는 인구통계학적 변화이다. 우리나라의 경우 급속하게 고령화가 진행되고 있으며, 2026년에 우리나라의 65세 이상의 노인 인구의 비율은 전체 인구의 20.8%로 5명 중 1명이 노인이 되는 ‘초고령사회’에 도달할 것으로 전망된다. 고령자는 신체 노화에 의하여 여러 신체활동의 저하가 나타날 수 있으며, 특히 섭식장애 및 소화기관의 기능저하는 신체 기능 전반에 걸쳐 문제를 일으키게 된다. 고령자의 주요 섭식장애로는 저작장애, 연하장애, 소화장애를 꼽을 수 있다. 노화의 진행에 따라 타액 및 위, 췌장에

서의 소화효소 분비가 감소되며, 소화기 연동운동성 저하에 따라 소화장애가 수반된다. 고령자의 섭식, 소화장애는 영양부족으로 이어지며, 특히 단백질과 필수아미노산의 부족은 근육 감소 등의 문제를 일으켜 노화를 촉진할 수 있다. 이러한 문제를 해결하기 위한 방법 중 하나로 효소처리, 가압조리, 감압조리 등으로 이화학적으로 변화시켜 소화가 용이한 식품을 섭취하거나 장내균총 등을 개선하여 소화 흡수를 향상시킬 수 있다.

[0003] 단백질 보충제의 섭취는 섭식장애가 있는 고령자의 근육 손실을 억제하고, 영양을 보충하여 인체 활동을 유지하는데 도움이 된다. 소화가 용이한 단백질 보충제로 현재 가장 널리 사용되는 단백질은 우유에서 추출한 유청 단백질과 카제인 단백질이다. 유청은 보통 치즈나 카제인 제조 과정에서 부산물로 생성되며, 우수한 아미노산 조성과 카제인보다 빠른 흡수로 근육 성장을 촉진하여 노화에 따른 근육 손실과 운동 후 근육회복에 유용하다.

[0004] 한편, 소화장애를 돕기 위하여 장내 유산균총 프로바이오틱스(Probiotics)는 살아있는 건강에 유익한 미생물로써 작용하고 이들 미생물의 성장촉진 물질(prebiotics)을 만들며, 장내 감염 예방, 면역기능 증진, 장내 균총 균형 유지 등의 역할을 하는 것으로 알려져있으며, 감염균, 식중독균에 길항작용을 통하여 질병 발병 예방, 식중독 발생 방지에 기여한다는 것이 검증되었다. 건강기능식품 소재 프로바이오틱스 유산균종으로는 락토바실러스속(Lactobacillus), 락토코커스속(Lactococcus), 엔테로코커스속(Enterococcus), 스트렙토코커스속(Streptococcus) 및 비피도박테리움속(Bifidobacterium)이 고시되어 있다. 프로바이오틱스가 인체에 이로운 특정 미생물 그 자체라면, 포스트바이오틱스(postbiotics)는 효소나 펩타이드 등 특정 미생물이 만들어 내는 대사물질(metabolite)로 구성되어 인체에 이로운 작용을 한다. 또한 프리바이오틱스(prebiotics)는 섬유소와 같이 인체에 이로운 특정 미생물의 성장 및 활성을 강화할 수 있는 물질로, 비소화성 조합물이다. 그러나, 고령자의 경우, 섭식장애와 소화장애가 동반되므로 이를 위한 연구가 필요하다.

선행기술문헌

특허문헌

[0005] (특허문헌 0001) 한국공개특허 제10-2023-0021929호, 실크 및 유청단백질의 가수분해물을 유효성분으로 포함하며, 칼슘흡수촉진능이 우수한 복합펩타이드 조성물 및 그 제조방법, 2023년02월14일 공개.

(특허문헌 0002) 한국공개특허 제10-2018-0118520호, 마유(馬乳) 가수분해 유청 단백질(WPH)분말과 베타카제인을 함유한 근소실재활환자 근육강화용 마유 조제분유 조성물 및 조제유, 2018년10월31일 공개.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 본 발명의 목적은 발효유 및 유청단백질 가수분해물을 포함하는 프로바이오틱스 조성물을 제공하는 데 있다.

과제의 해결 수단

[0007] 상기 과제를 해결하기 위하여 본 발명은 발효유 및 유청단백질 가수분해물을 포함하는 프로바이오틱스 조성물을 제공한다.

[0008] 상기 유청 단백질 가수분해물은, 판크레아틴을 유청 단백질에 1:100의 비율로 첨가하여 50℃로 5시간 동안 반응시켜 얻을 수 있다. 상기 유청 단백질 가수분해물은 판크레아틴을 유청 단백질에 1:1~200 바람직하게는 1:50~100, 더욱 바람직하게는 1:100의 비율로 첨가하여 50℃로 5시간 동안 반응시킨 유청 단백질 가수분해물일 수 있으며, 이를 다중 분취 HPLC를 통해 아세트니트릴 31%(w/w) 농도에서 얻은 낮은 극성 펩타이드를 포함하는 분획물을 포함할 수 있다.

[0009] 상기 유청 단백질 가수분해물은 VLVLDTYKK 또는 VGINYWLAHK 서열을 갖는 펩타이드를 포함할 수 있다.

[0010] 상기 VLVLDTYKK 또는 VGINYWLAHK 서열을 갖는 펩타이드는 유청 단백질 가수분해물로부터 HPLC를 수행하여 분리할 수 있으며, 통상의 방법으로 합성하여 사용하거나, 상기 펩타이드를 코딩하는 핵산 분자가 삽입된 발현 벡터로부터 제조된 것을 사용할 수 있다.

[0011] 상기 유청단백질 가수분해물(펩타이드) 내의 VLVLDTYKK(P1), VGINYWLAHK(P2) 등의 펩타이드가 발효유 내의 유산균의 장내 생존과 활성을 증가시킴으로써 발효유 또는 유청단백질 가수분해물 단독을 투여한 경우보다 프로바

이오티스로서의 기능과 근력향상 등의 생리활성을 증가시킬 수 있다.

- [0012] 본 발명의 발효유 및 유청단백질 가수분해물을 포함하는 프로바이오틱스 조성물은 약학 조성물로 제공될 수 있다.
- [0013] 상기 발효유 및 유청단백질 가수분해물을 포함하는 프로바이오틱스 조성물은 전체 약학 조성물 총 중량에 대하여 바람직하게는 0.001~50중량%, 더 바람직하게는 0.001~40중량%, 가장 바람직하게는 0.001~30중량%로 하여 첨가될 수 있다.
- [0014] 상기 약학적 조성물은, 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽, 액제, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 및 멸균주사용액의 형태로 제형화하여 사용될 수 있다. 상기 약학적 조성물에 포함될 수 있는 담체, 부형제 및 희석제로는 락토즈, 텍스트로즈, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로즈, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 들 수 있다. 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 봉쇄제, 계면활성제, 감미제, 산미제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다. 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 본 발명의 가용화된 데커시놀에 적어도 하나 이상의 부형제, 예를 들면, 전분, 탄산칼슘, 수크로스 또는 락토즈, 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 또한 단순한 부형제 이외에 스테아린산 마그네슘, 탈크 같은 윤활제들도 사용된다. 경구를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데 흔히 사용되는 단순희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제, 산미제 등이 포함될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조제, 좌제가 포함된다. 비수성용제, 현탁제로는 프로필렌글리콜, 폴리에틸렌글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텟솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween)-61, 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다.
- [0015] 본 발명의 약학적 조성물의 투여량은 치료받을 대상의 연령, 성별, 체중과, 치료할 특정 질환 또는 병리 상태, 질환 또는 병리 상태의 심각도, 투여 경로 및 처방자의 판단에 따라 달라질 것이다. 이러한 인자에 기초한 투여량 결정은 당업자의 수준 내에 있으며, 일반적으로 투여량은 0.01mg/kg/일 내지 대략 500mg/kg/일의 범위이다. 바람직한 투여량은 0.1mg/kg/일 내지 200mg/kg/일이며, 더 바람직한 투여량은 1mg/kg/일 내지 200mg/kg/일이다. 투여는 하루에 한번 투여할 수도 있고, 수회 나누어 투여할 수도 있다. 상기 투여량은 어떠한 면으로든 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.
- [0016] 본 발명의 약학적 조성물은 쥐, 가축, 인간 등의 포유동물에 다양한 경로로 투여될 수 있다. 투여의 모든 방식은 예상될 수 있는데, 예를 들면, 경구, 직장 또는 정맥, 근육, 피하, 자궁 내 경막 또는 뇌혈관 내 주사 및 피부 도포에 의해 투여될 수 있다. 본 발명의 발효유 및 유청단백질 가수분해물을 포함하는 프로바이오틱스 조성물은 독성 및 부작용이 거의 없으므로 예방 목적으로 장기간 복용시에도 안심하고 사용할 수 있는 약제이다.
- [0017] 본 발명의 발효유 및 유청단백질 가수분해물을 포함하는 프로바이오틱스 조성물은 건강기능식품으로 제공될 수 있다.
- [0018] 상기 발효유 및 유청단백질 가수분해물을 포함하는 프로바이오틱스 조성물을 포함하는 기능성 조성물은 전체 건강기능식품 총 중량에 대하여 0.001~990중량%로 사용할 수 있으며, 건강 유지를 목적으로 하거나 또는 건강 조절을 목적으로 하는 장기간의 섭취의 경우에는 상기 양은 상기 범위 이하일 수 있으며, 안전성 면에서 아무런 문제가 없기 때문에 상기 범위 이상의 양으로도 사용될 수 있다.
- [0019] 본 발명의 발효유 및 유청단백질 가수분해물을 포함하는 프로바이오틱스 조성물을 포함하는 건강기능식품은 식품의 종류에는 특별한 제한은 없으며, 본 발명의 유청 단백질 가수분해물, 또는 이의 분획물 또는 유청 단백질 가수분해물 유래 펩타이드를 첨가할 수 있는 식품의 예로는 드링크제, 육류, 소시지, 빵, 비스킷, 떡, 초콜릿, 캔디류, 스낵류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류를 포함한 낙농제품, 각종 스프, 음료수, 알코올 음료 및 비타민 복합제, 유제품 및 유가공 제품 등이 있으며, 통상적인 의미에서의 건강기능식품 및 건강식품 조성물을 모두 포함한다.
- [0020] 본 발명에 따른 발효유 및 유청단백질 가수분해물을 포함하는 프로바이오틱스 조성물을 함유하는 건강기능식품은 식품에 그대로 첨가하거나 다른 식품 또는 식품 성분과 함께 사용될 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다. 다른 성분에는 특별한 제한이 없으며 통상의 음료와 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수

화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다. 상술한 천연 탄수화물의 예는 모노사카라이드, 예를 들어, 포도당, 과당 등; 디사카라이드, 예를 들어 말토스, 슈크로스 등; 및 폴리사카라이드, 예를 들어 텍스트린, 시클로텍스트린 등과 같은 통상적인 당, 및 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알코올이다. 상술한 것 이외의 향미제로서 천연 향미제(타우마틴, 스테비아 추출물(예를 들어 레바우디오시드 A, 글리시리히진등) 및 합성 향미제(사카린, 아스파르탐 등)를 유리하게 사용할 수 있다. 상기 천연 탄수화물의 비율은 본 발명의 건강기능식품 및 건강식품 조성물 100당 일반적으로 약 1 내지 20 g, 바람직하게는 약 5 내지 12 g이다.

[0021] 상기 외에 본 발명의 발효유 및 유청단백질 가수분해물을 포함하는 프로바이오틱스 조성물을 포함하는 건강기능식품은 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 함유할 수 있다. 그 밖에 본 발명의 건강기능식품은 천연 과일주스 및 과일주스 음료 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있으며 이러한 성분은 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있다

발명의 효과

[0022] 본 발명은 발효유 및 유청단백질 가수분해물을 포함하는 프로바이오틱스 조성물에 관한 것으로, 장 내 유산균수를 증가시키고 혈중 HDL을 증가시키고 LDL을 감소시키며, 운동능력을 향상시키고 노화마커를 억제하여 국민건강에 이바지할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0023] 도 1은 본 발명에 따른 발효유 및 유청단백질 가수분해물을 포함하는 프로바이오틱스 조성물을 8주간 급여한 마우스의 체중 변화를 나타낸 그래프이다.

도 2는 본 발명에 따른 발효유 및 유청단백질 가수분해물을 포함하는 프로바이오틱스 조성물을 8주간 급여한 마우스의 체중 변화를 나타낸 그래프이다.

도 3은 본 발명에 따른 발효유 및 유청단백질 가수분해물을 포함하는 프로바이오틱스 조성물을 8주간 급여한 마우스의 혈중 aspartate transaminase (AST) 효소 활성, 신장 독성 수치인 blood urea nitrogen (BUN) 변화를 나타낸 그래프이다.

도 4는 본 발명에 따른 발효유 및 유청단백질 가수분해물을 포함하는 프로바이오틱스 조성물을 8주간 급여한 마우스의 혈중 총콜레스테롤, HDL, LDL 및 중성지방의 수치변화를 나타낸 그래프이다.

도 5는 본 발명에 따른 발효유 및 유청단백질 가수분해물을 포함하는 프로바이오틱스 조성물을 4주간 급여한 마우스의 트레드밀 테스트 후 마우스의 탈진까지의 거리 및 시간의 변화를 나타낸 그래프이다.

도 6은 본 발명에 따른 발효유 및 유청단백질 가수분해물을 포함하는 프로바이오틱스 조성물을 6주간 급여한 마우스의 트레드밀 테스트 후 마우스의 탈진까지의 거리 및 시간의 변화를 나타낸 그래프이다.

도 7은 본 발명에 따른 발효유 및 유청단백질 가수분해물을 포함하는 프로바이오틱스 조성물을 8주간 급여한 마우스의 노화마커 p21의 mRNA 변화를 나타낸 그래프이다.

도 8은 본 발명에 따른 발효유 및 유청단백질 가수분해물을 포함하는 프로바이오틱스 조성물을 급여한 마우스의 분변 내 유산균 수의 변화를 나타낸 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0024] 이하 본 발명의 바람직한 실시예를 상세히 설명한다. 그러나, 본 발명은 여기서 설명되는 실시예에 한정되지 않고 다른 형태로 구체화될 수도 있으며, 여기서 소개되는 내용은 본 발명의 사상을 충분히 전달하기 위해 제공하는 것이다.

[0025] <실시예 1. 발효유의 제조>

[0026] 충남대학교 동물자원연구센터에서 제공받은 원유 940g을 85℃에서 10분간 반응(살균처리)시키고 냉각 후, 10%[w/v] 탈지유(서울우유, Korea)에서 배양한 유산균 배양액 60g을 첨가하여 37℃, 8시간 동안 발효하였다. 상기 유산균으로는 Chrischan-Hansen사에서 제조한 비피도 박테리움 비피더스(Bifidobacterium bifidus), 스트렙토코쿠스 테르모필루스(Streptococcus thermophilus) 및 락토바실러스 아시도필루스(Lactobacillus

acidophilus)가 혼합된 제품(Hoersholm, Denmark)을 사용하였다.

[0027] <실시예 2. 유청 단백질 가수분해물의 제조>

[0028] 유청 단백질 가수분해물 제조

[0029] 먼저, 유청 단백질 가수분해를 위해 판크레아틴(Bision Co. Ltd., 경기도, 한국)을 유청 단백질에 1:100의 비율로 첨가하였다. 판크레아틴은 탄수화물, 지질 및 단백질 소화 효소의 혼합물이며, 구체적으로 트립신, 키모트립신, 엘라스타제, 카르복시펩티다제 A 및 B를 비롯한 다양한 프로테아제를 함유하고 있다(Rothenbuhler & Kinsella, 1986). 이러한 판크레아틴 효소의 복잡한 작용으로 인해 다양한 유형의 분해산물이 생성된다. 상기 유청 단백질과 판크레아틴 혼합물을 진탕 인큐베이터(130rpm)에서 50℃로 5시간 동안 반응시킨 다음, 상기 반응시킨 가수분해물을 4℃에서 20분 동안 12,000g로 원심분리하여 상정액을 취하였다. 그 다음, 상기 가수분해물을 용매 A(0.1% 탈이온수 중 트리플루오로아세트산[TFA])로 평형시킨 C18 column (4.6 × 250 mm, Vydac, Hesperia, CA., USA)을 구비한 역상 HPLC 시스템(Waters Associates, Milford, MA, USA)을 이용하여 40분 동안 용매 B(아세트니트릴 중 0.1% TFA)의 선형 구배로 용리하였다. 상기 HPLC는 25℃에서 1 ml/min의 유속으로 수행하였으며, 컬럼 용출액의 흡광도를 214 nm에서 측정였다. 그 결과, 다중 분취 HPLC를 통해 펩타이드의 극성에 따라 여러 피크가 관찰되었다. 이에 따라 반복된 실험을 통하여 6개의 재현 가능한 피크를 선택하고, 각각의 검출된 아세트니트릴 농도에서 분획을 얻었다(F1, 1%; F2, 3%; F3, 15%; F4, 20%; F5, 25%; 및 F6, 31%). 이 중 F1 분획물은 극성이 높은 펩타이드를, F6 분획물은 낮은 극성의 펩타이드를 포함한다.

[0030] 유청 단백질 가수분해물 유래 활성 펩타이드의 분리

[0031] 상기 가수분해된 유청 단백질 F6 분획물로부터 활성 펩타이드를 분리하였다. 상기 F6 분획물을 EASY-nLC 1000 시스템(Thermo Fisher Scientific Inc., MA, USA)에서 액체 크로마토그래피-질량 분석기(LC MS)를 사용하여 분석한 결과, 18종의 펩타이드를 확인하였으며, 이때 수득한 펩타이드 서열을 단백질 서열 데이터(NCBI)에서 확인한 결과, 가수분해된 유청 단백질의 F6에서 확인된 펩타이드는 β-lactoglobulin에서 유래한 VLVDTDYKK(P1)가 17.57%, α-lactalbumin에서 유래한 VGINYWLAK(P2)가 16.22%를 차지하였다.

[0032] <실시예 3. 발효유 및 유청 단백질 가수분해물의 in vivo 평가>

[0033] 마우스 식이 테스트

[0034] 5주령 C57BL/6 수컷 마우스를 구매 후 1주일 동안 안정기를 제공한 뒤 표준 환경에서 충분한 물과 함께 기능성 발효유 및 발효유에 펩타이드를 10 중량% 또는 20 중량% 첨가한 배합사료를 3일에 1번 50 g씩 8주간 급여하였다(n=10).

[0035] 8주간 마우스의 사료 평균 섭취량은 하기 표 1과 같다.

표 1

그룹	마우스 한마리당 하루 사료 섭취량 (g)	마우스 한마리당 하루 사료 발효유 섭취량 (mg)	마우스 한마리당 하루 사료 펩타이드 섭취량 (mg)
대조군	2.83	0	0
발효유	2.78	178	0
발효유 + 펩타이드 10%	2.83	255	28
발효유 + 펩타이드 20%	3.00	240	60

[0037] 상기 표 1에서 보는 바와 같이 대조군(Control), 발효유(FM, fermented milk), 발효유 + 펩타이드(유청 단백질 가수분해물, P) 10%(FM+P 10%), 발효유 + 펩타이드 20%(FM+P 20%) 그룹 모두 섭취량은 각각 2.83, 2.78, 2.83, 3.00 g으로 큰 차이는 보이지 않았으며, 사료에 함유된 펩타이드의 섭취량은 각각 0, 0, 28, 60 mg으로 확인되었다.

[0038] 마우스 체중 및 장기 무게 변화

[0039] 상기 8주간 발효유 및 발효유와 펩타이드(10 중량% 또는 20 중량%) 혼합물 첨가한 기능성 발효유 배합사료 급여한 후, 마우스의 체중 변화를 도 1에 나타내었다. 또한, 상기 8주간 기능성 발효유 및 발효유와 펩타이드(10 중량% 또는 20 중량%) 기능성 발효유 사료를 섭취한 마우스를 희생시키고 내장지방, 비복근 및 비장을 적출 후 그 무게를 측정하고 그 결과를 도 2에 나타내었다. 도 1 및 도 2에서 보는 바와 같이, 기능성 발효유 사료 섭취에

따라 그룹간의 체중, 내장지방, 비복근 및 비장 무게는 유의미한 변화는 없었다.

[0040] **간독성 및 신장독성 확인**

[0041] 상기 8주간 발효유 및 발효유와 펩타이드(10 중량% 또는 20 중량%) 혼합물 첨가한 기능성 발효유 배합사료 급여한 후, 마우스의 혈청으로부터 간 독성 수치 지표인 aspartate transaminase (AST) 효소 활성, 신장 독성 수치인 blood urea nitrogen (BUN)의 혈중 농도, 그리고 혈당 수치를 확인하여 도 3에 나타내었다. 도 3에서 보는 바와 같이, AST, BUN 및 혈당 수치 모두 정상 범위 내였으며 그룹 간 유의적인 차이가 나타나지 않았다. 이러한 결과는 본 발명에 따른 기능성 발효유가 간독성 및 신장독성을 유발하지 않으며, 혈당수치에 영향을 주지 않음을 시사한다. 따라서 기능성 발효유의 우수한 안전성을 확인하였다.

[0042] **콜레스테롤 및 지질 대사 분석**

[0043] 상기 8주간 발효유 및 발효유와 펩타이드(10 중량% 또는 20 중량%) 혼합물 첨가한 기능성 발효유 배합사료 급여한 후, 마우스의 혈청으로부터 마우스 혈청을 이용하여 기능성 발효유 섭취에 따른 혈중 총콜레스테롤양(Total cholesterol, T-Chol), 고밀도 지단백(High Density Lipoprotein, HDL), 저밀도 지단백(Low Density Lipoprotein, LDL) 및 중성지방(Triglyceride, TG)의 농도를 확인하고 그 결과를 도 4에 나타내었다. LDL(Low Density Lipoprotein, 저밀도 지단백)과 HDL(High Density Lipoprotein, 고밀도 지단백)은 체내 콜레스테롤 이동에 관여하는 지질단백질의 종류이다. LDL은 간에서 말초 장기로 콜레스테롤을 운반하고, HDL은 말초 장기에서 간으로 콜레스테롤을 운반한다. 따라서 LDL이 높을수록 장기로 보내지는 콜레스테롤 양이 많아지고, 적절하게 이용되지 못할 경우 혈관의 대식세포에 흡수돼 동맥경화를 유발하는데 반대로 HDL이 높으면 간으로의 이동이 증가해 혈관합병증 발생 위험이 줄어든다.

[0044] 도 4에서 보는 바와 같이, 발효유 단독 섭취 그룹의 HDL, 중성지방, 총콜레스테롤 수치 모두 일반 사료 섭취 그룹과 유의미한 차이는 없는 반면, LDL의 수치는 감소되는 경향을 나타내었다. 발효유 + 펩타이드 섭취 그룹의 경우, 중성지방의 수치에는 차이가 없었으나, 총 콜레스테롤 수치가 유의하게 감소하였으며, HDL이 발효유 + 펩타이드 20% 섭취 그룹에서 현저히 증가하였다. 혈중 LDL 농도는 발효유 + 펩타이드 섭취 그룹 모두에서 유의적으로 감소하였다. 이러한 결과로 본 발명에 따른 기능성 발효유가 인간의 혈중 콜레스테롤 및 지질 조절에 효과가 있음을 확인하였다.

[0045] **<실시예 4. 발효유 및 유청 단백질 가수분해물의 섭취 마우스의 운동 기능 평가>**

[0046] 상기 실시예 3과 유사하게 5주령 C57BL/6 수컷 마우스를 1주일 동안 안정시킨 후, 상기의 기능성 발효유 사료를 섭취토록 하고 트레드밀 테스트를 통해 운동 기능을 평가하였다.

[0047] **운동 기능 1차 평가**

[0048] 상기 기능성 발효유 사료를 4주간 섭취시킨 후, 10 cm/s로 운동 테스트를 시작하여, 3분마다 3 cm/s씩 속도를 증가시켰고, 9분 이후로 5 cm/s씩 속도를 증가시켰으며, 마우스가 탈진하여 더 이상 뛰지 못할 때까지의 이동한 거리 및 시간을 확인하여 도 5에 나타내었다.

[0049] **운동 기능 2차 평가**

[0050] 상기 기능성 발효유 사료를 6주간 섭취시킨 후, 상기와 동일한 방법으로 운동 기능 2차 평가를 수행하여 그 결과를 도 6에 나타내었다.

[0051] 도 5 및 6에서 보는 바와 같이, 운동 기능 1차 및 2차 평가 모두에서 일반 사료를 섭취한 마우스보다 발효유 배합 사료를 섭취한 마우스 그룹의 운동 능력이 향상되었으며, 발효유 + 펩타이드 함유 사료를 섭취한 마우스의 경우 발효유 단독 배합 사료를 섭취한 마우스보다 운동능력이 현저하게 촉진되었다. 특히 발효유 + 펩타이드 20% 함유 사료를 섭취한 마우스는 탈진시까지의 시간과 이동거리를 증가시켰으므로 운동능력을 가장 향상시켰다.

[0052] **<실시예 5. 발효유 및 유청 단백질 가수분해물의 섭취 마우스의 항노화 활성 평가>**

[0053] 상기 실시예 3과 동일한 방법으로 마우스에게 상기의 기능성 발효유 사료를 8주간 섭취토록 하고 8주 후, 상기 마우스의 등 피부조직을 일부 떼어내어 p21의 mRNA 발현을 qRT-PCR로 항노화 효과를 확인하였다. 세포분열 정지의 결과로 세포는 노화되거나 암세포로 변형되거나 세포자멸사가 발생하게 되는데, p53은 손상된 세포 및 노화 세포에서 축적됨으로 노화마커로 보고되었으며, p21은 p53에 의존한 세포자멸사의 마커로서 노화를 촉진시키는 노화마커로 알려져 있다. 특히 p21은 CDK (cyclin dependent kinase) 억제제로서 세포 주기를 정지시키고, 노화

를 유도하는 기능을 가지고 있다. 8주간 기능성 발효유 사료를 섭취한 마우스 조직 내 p21의 mRNA 발현을 qRT-PCR로 분석한 결과, 도 7과 같이, p21의 mRNA 발현량은 일반 사료를 섭취한 마우스 또는 발효유 단독 함유 사료를 섭취한 마우스보다 현저히 낮았다. 이와 비교하여 발효유 + 펩타이드(10% 또는 20%) 함유 사료를 섭취한 마우스의 p21의 mRNA 발현량은 현저히 감소한 것을 확인하였다. 이를 통하여 본 발명의 기능성 발효유의 섭취는 항노화 활성 특히 피부 노화 억제에 효과가 있음을 알 수 있다.

[0054] <실시예 6. 마우스 분변의 유산균수 측정>

[0055] 유산균은 소장과 대장에서 유해 미생물의 성장을 억제하여 설사를 일으키는 질환을 예방 또는 치료하며 대장 내 pH 저하와 장운동을 증가시켜 변비를 개선하고, 대장암의 발암기전에 기여할 것으로 생각되는 여러 가지 효소, 기질의 생성을 억제하는 것으로 알려졌다. 따라서 유산균을 대량 포함하고 있는 발효유 등의 섭취가 장려되어 왔으나, 실제 경구 섭취한 유산균은 산성 위액, 장운동, 대장 세균총의 보호작용 등으로 사람의 소장이나 대장에서 쉽게 안정화되기 어렵다. 이에 따라 본 발명의 기능성 발효유의 섭취가 장내 세균총 내 유산균수를 증가시킬 수 있는지 확인하였다.

[0056] 상기 실시예 3과 같이 표준 환경에서 충분한 물과 함께 기능성 발효유 및 발효유에 펩타이드를 10 중량% 또는 20 중량% 첨가한 배합사료를 6주간 급여하면서 마우스의 분변을 수집하여 유산균 수를 측정하여 도 8에 나타내었다. 대조구인 일반사료 섭취구(control), 발효유 첨가 섭취구(FM), 발효유 + 유청단백질 가수분해물(펩타이드)10% (FM+P10%) 첨가구, 발효유 + 유청단백질 가수분해물(펩타이드) 20% (FM+P20%) 첨가구로 나누어 섭취시켰으며, 분변은 0일, 21일, 42일에 취하여 3회 수행하였다. 도 8에서 보는 바와 같이, 대조구인 일반사료 섭취구(control)와 발효유 첨가 섭취구(FM)는 발효시작 시점에는 각각 1.07×10^8 CFU/mL과 9.2×10^7 CFU/mL이었고, 21일째는 6.1×10^7 CFU/mL과 5.0×10^7 CFU/mL, 42일째는 7.8×10^7 CFU/mL과 4.4×10^7 CFU/mL로 대조구가 높게 나타났다. 발효유 + 유청단백질 가수분해물(펩타이드) 10% (FM+P10%) 첨가구와 발효유 + 유청단백질 가수분해물(펩타이드) 20% (FM+P20%) 첨가구는 발효시작 시점에는 각각 1.02×10^8 과 9.2×10^7 이었고, 21일째는 1.6×10^8 CFU/mL과 1.5×10^8 CFU/mL, 42일째는 2.1×10^8 CFU/mL과 2.5×10^8 CFU/mL으로 나타나 대조구와 발효유 첨가 섭취구(FM)에 비해 마우스 분변에서 유산균 수가 5~6배 높게 나타났다. 또한 발효유 + 유청단백질 가수분해물(펩타이드) 20% (FM+P20%) 첨가구가 발효유 + 유청단백질 가수분해물(펩타이드) 10% (FM+P10%) 첨가구에 비해 4배 정도 높게 나타났다.

[0057] 상기 실험에서 유청단백질 가수분해물(펩타이드) 만을 하루 30 또는 60 mg 투여한 마우스는 발효유만을 투여한 마우스와 유사한 결과를 보였으며, 이는 발효유와 펩타이드 혼합물이 장내 유산균 증식에 상승적인 작용을 함으로써 장내 유익한 유산균을 증가시킬 수 있음을 확인하였다. 이는 유청단백질 가수분해물(펩타이드) 내의 VLVDITYKK(P1), VGINYWLAKH(P2) 등의 펩타이드가 발효유 내의 유산균의 장내 생존과 활성을 증가시킴으로써 발효유 또는 유청단백질 가수분해물 단독을 투여한 경우보다 프로바이오틱스로서의 기능과 근력향상 등의 생리활성이 증가된 것으로 사료된다.

[0058] <제제예 1. 약학적 제제>

[0059] 제제예 1-1. 정제의 제조

[0060] 본 발명의 발효유 및 유청단백질 가수분해물 200mg을 락토즈 175.9g, 감자전분 180g 및 콜로이드성 규산 32g과 혼합하였다. 이 혼합물에 10% 젤라틴 용액을 첨가시킨 후, 분쇄하여 14 메쉬체를 통과시켰다. 이것을 건조시키고 여기에 감자전분 160g, 활성 50g 및 스테아린산 마그네슘 5g을 첨가해서 얻은 혼합물을 정제로 만들었다.

[0061] 제제예 1-2. 주사액제의 제조

[0062] 본 발명의 발효유 및 유청단백질 가수분해물 100mg, 염화나트륨 0.6g 및 아스코르브산 0.1g을 증류수에 용해시켜서 100mL를 만들었다. 이 용액을 병에 넣고 20℃에서 30분간 가열하여 멸균시켰다.

[0063] <제제예 2. 건강기능식품의 제조>

[0064] 제제예 2-1. 건강기능식품의 제조

[0065] 본 발명의 발효유 및 유청단백질 가수분해물 2g, 비타민 혼합물 적량, 비타민 A 아세테이트 70 μ g, 비타민 E 1.0 mg, 비타민 B1 0.13mg, 비타민 B2 0.15mg, 비타민 B6 0.5mg, 비타민 B12 0.2 μ g, 비타민 C 10mg, 비오틴 10 μ g, 니코틴산아미드 1.7mg, 엽산 50 μ g, 판토텐산 칼슘 0.5mg, 무기질 혼합물 적량, 황산제1철 1.75mg, 산화아연

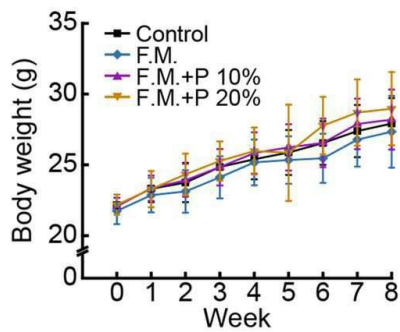
0.82mg, 탄산 마그네슘 25.3mg, 제1인산칼륨 15mg, 제2인산칼슘 55mg, 구연산칼륨 90mg, 탄산칼슘 100mg, 염화 마그네슘 24.8mg을 섞어 과립으로 제조하였으나, 용도에 따라 다양한 제형으로 변형시켜 제조할 수 있다. 또한, 상기의 비타민 및 미네랄 혼합물의 조성비를 임의로 변형 실시하여도 무방하며, 통상의 건강기능식품 제조방법에 따라 상기의 성분을 혼합하여 제조할 수 있다.

[0066] **제제예 2-2. 건강기능성 음료의 제조**

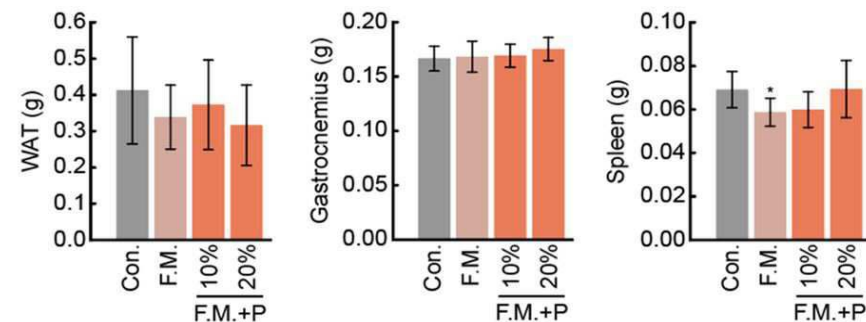
[0067] 본 발명의 발효유 및 유청단백질 가수분해물 1g, 구연산 0.1g, 프락토올리고당 100g, 정제수 900g을 섞어 통상의 음료 제조방법에 따라 교반, 가열, 여과, 살균, 냉장하여 음료를 제조하였다.

도면

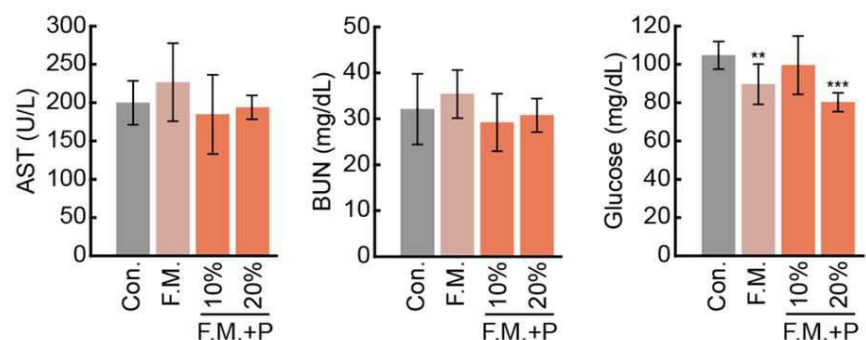
도면1



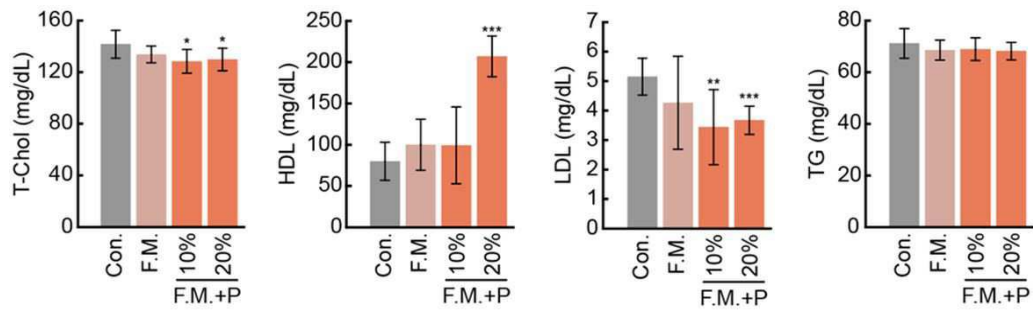
도면2



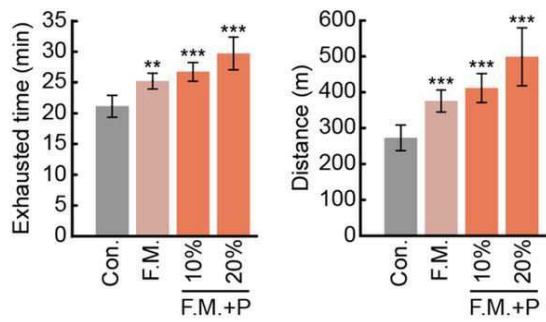
도면3



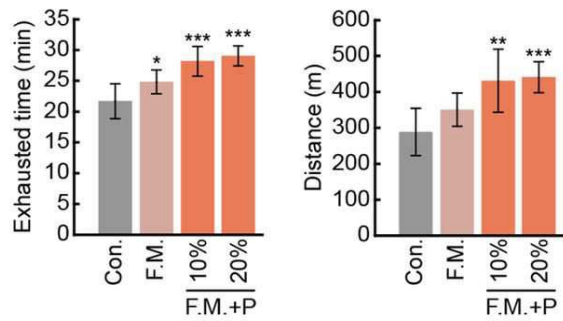
도면4



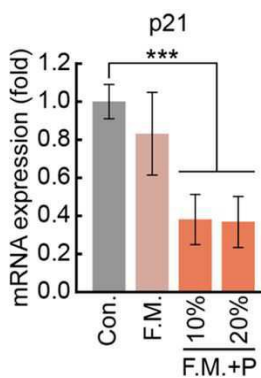
도면5



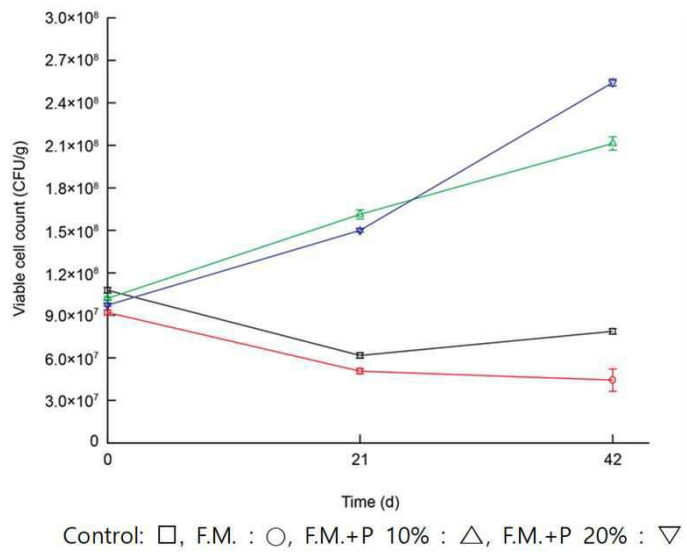
도면6



도면7



도면8



서 열 목 록 (첨부)



아이콘을 클릭하시면 서열목록 파일이 열립니다.

본 공보 PDF는 첨부파일을 가지고 있습니다. Acrobat Reader PDF뷰어를 제공하지 않는 브라우저(크롬, 파이어폭스, 사파리 등)의 경우 첨부파일 열기가 제한되어 있으므로 Acrobat Reader PDF뷰어 설치 후 공보 PDF를 다운로드 받아 해당 뷰어에서 조회해주시기 바랍니다.