



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2025년03월06일

(11) 등록번호 10-2776333

(24) 등록일자 2025년02월27일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 35/64 (2015.01) A23K 10/14 (2016.01)

A23L 33/10 (2022.01) A61K 38/01 (2006.01)

A61P 25/16 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61K 35/64 (2013.01)

A23K 10/14 (2016.05)

(21) 출원번호 10-2021-0179850

(22) 출원일자 2021년12월15일

심사청구일자 2021년12월15일

(65) 공개번호 10-2023-0090787

(43) 공개일자 2023년06월22일

(56) 선행기술조사문헌

KR101793552 B1*

KR1020050040124 A*

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자

대한민국(농촌진흥청장)

전라북도 전주시 덕진구 농생명로 300 (중동)

한림대학교 산학협력단

강원도 춘천시 한림대학길 1, 한림대학교(옥천동)

(72) 발명자

김남숙

전라북도 완주군 이서면 농생명로 166

강상국

전라북도 완주군 이서면 농생명로 166

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

특허법인정진

전체 청구항 수 : 총 9 항

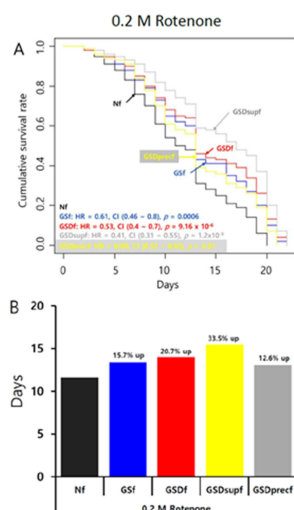
심사관 : 김미화

(54) 발명의 명칭 누에 효소분해물을 포함하는 파킨슨병 예방, 개선 또는 치료용 조성물

(57) 요약

본 발명은 홍잠 효소분해물을 유효성분으로 포함하는 파킨슨병 예방, 개선 또는 치료용 조성물에 대한 것으로, 본 발명에 따르면 홍잠 효소분해물을 급여한 초파리의 기대수명과 건강수명이 증대되었으며, 상기 홍잠 효소분해물은 파킨슨병 관련 신호전달경로에 연관된 유전자들의 발현에 영향을 미침을 확인하였다. 더불어 파킨슨병의 발병 원인으로 알려진 로테논이 처리된 초파리의 평균수명을 증대시켰고 미토콘드리아 복합체의 활성을 증대시켰으며, 그 효과가 홍잠 대비 월등히 우수함을 확인한 바, 본 발명에 따른 홍잠 효소분해물은 파킨슨병 예방, 개선 또는 치료를 위하여 유용하게 활용될 수 있다.

대표도 - 도5



(52) CPC특허분류

A23L 33/10 (2022.01)
A61K 38/012 (2013.01)
A61P 25/16 (2018.01)
A23V 2002/00 (2023.08)
A23V 2250/204 (2013.01)
A23V 2250/55 (2013.01)

(72) 발명자

김기영

전라북도 완주군 이서면 농생명로 166

조유영

전라북도 전주시 덕진구 농생명로 300

김성완

전라북도 완주군 이서면 농생명로 166

박종우

전라북도 완주군 이서면 농생명로 166

주완택

전라북도 완주군 이서면 농생명로 166

고영호

서울특별시 영등포구 버드나루로 55, 1005E호

김아영

서울특별시 영등포구 버드나루로 55, 1005E호

마이썬안린

서울특별시 영등포구 버드나루로 55, 1005E호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1395069285
과제번호	PJ015659032021
부처명	농촌진흥청
과제관리(전문)기관명	농촌진흥청
연구사업명	바이오그린연계농생명혁신기술개발(R&D)
연구과제명	홍삼의 노인성 근감소증 예방 및 개선 효능의 소재화 기술 개발(3공동)
기 여 율	1/1
과제수행기관명	국립농업과학원
연구기간	2021.01.01 ~ 2022.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

홍잠을 알칼리성 단백질분해효소 (Alkaline protease)로 분해하여 수득한 홍잠 효소분해물을 포함하는 파킨슨병 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 2

제 1항에 있어서,

상기 홍잠은 백옥잠 홍잠 및 골든실크(golden silk) 홍잠으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상의 홍잠인 것을 특징으로 하는, 약학적 조성물.

청구항 3

제 1항에 있어서,

상기 홍잠은 숙잠을 50 내지 130℃의 온도에서 5분 내지 40시간 동안 물에 넣어 익히거나 증기의 열로 익힌 것을 특징으로 하는, 약학적 조성물.

청구항 4

제 3항에 있어서,

상기 숙잠은 5령 8일된 누에인 것을 특징으로 하는, 약학적 조성물.

청구항 5

삭제

청구항 6

제 5항에 있어서,

상기 분해는 45℃ 내지 60℃에서 12시간 내지 48시간 수행되는 것을 특징으로 하는, 약학적 조성물.

청구항 7

제 1항에 있어서,

상기 홍잠 효소분해물은 상등액인 것을 특징으로 하는, 약학적 조성물.

청구항 8

홍잠을 알칼리성 단백질분해효소 (Alkaline protease)로 분해하여 수득한 홍잠 효소분해물을 포함하는 파킨슨병 예방 또는 개선용 식품 조성물.

청구항 9

홍잠을 알칼리성 단백질분해효소 (Alkaline protease)로 분해하여 수득한 홍잠 효소분해물을 포함하는 파킨슨병 예방 또는 개선용 건강기능식품.

청구항 10

홍잠을 알칼리성 단백질분해효소 (Alkaline protease)로 분해하여 수득한 홍잠 효소분해물을 포함하는 파킨슨병 예방 또는 개선을 위한 사료 첨가용 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 누에, 특히 홍잠을 식용효소로 분해한 효소분해물을 포함하는 파킨슨병 예방, 개선 또는 치료용 조성물에 대한 것이다.

배경 기술

[0003] 누에는 5000년 이전부터 인간이 사육해온 곤충으로 옷을 만들기 위한 실크 섬유, 고품질 단백질 및 지방의 공급원인 번데기를 공급해주고 있다. 이외에도 누에 유충 배설물인 잠변, 병에 걸린 유충인 백강잠, 난각, 탈피각 또는 누에 성충 등이 다양한 질환의 치료에 사용되어 왔다. 하지만 현재 화학섬유의 발달과 경제성장으로 실크에 대한 수요가 감소하고 인건비의 상승으로 양잠산업의 국제 경쟁력이 약화되었다. 이러한 문제를 해결하기 위하여 1990년대부터 입는 양잠에서 먹는 양잠에 초점을 맞추어 누에와 부산물들의 건강증진 효과에 대한 연구가 수행되어 왔다. 특히 누에의 경우 5령 3일이 지나 5령 4일부터는 견사단백질이 몸속에서 급속히 증가하여 누에의 강도가 강해지며 비대해져 식용으로 사용하기 매우 어려워지기 때문에 5령 3일 이후의 누에를 활용할 수 있는 연구가 많이 수행되고 있다. 견사단백질은 견사선의 형태로 누에 몸속에 저장되어 있다가 누에가 숙잠(grown-up silkworm)이 되면 이 견사단백질을 뱉어내면서 실크의 원료인 누에고치를 짓게 된다.

[0004] 이처럼 식용가능한 시기를 지난 숙잠은 실크의 생산을 위한 용도로서 사용되는 것 이외에는 특별하게 이용되지 못하고 있었으나, 현재 많은 연구가 수행되어 이의 위장관 보호 효과, 간기능 개선 효과, 피부 미백 효과 및 발모 효과 등 다양한 효과에 대해서 보고되었다.

[0005] 한편, 파킨슨병(Parkinson's disease)은 뇌의 흑질(substantia nigra)에 분포하는 도파민의 신경세포가 점차 소실되어 발생하며 안정떨림, 경직, 운동완만(운동느림) 및 자세 불안정성이 특징적으로 나타나는 신경계의 만성 진행성 퇴행성 질환이다. 파킨슨병 환자는 60세 이상에서 인구의 약 1% 정도로 추정된다. 파킨슨병의 원인은 아직까지 밝혀지지 않았으며, 현재 유전적 인자와 환경적 인자가 서로 상호작용을 일으킨다는 '다인성 가설'이 가장 보편적으로 받아들여지고 있다. 대부분의 파킨슨병 환자들은 가족력 없이 발병하지만 약 10% 정도에서는 가족성 파킨슨병이 나타나고 있다. 현재까지 여섯 개 유전자의 돌연변이가 가족성 파킨슨병의 원인으로 밝혀지고 있는데 이들 유전자의 돌연변이가 아니더라도 해당 유전자가 암호화하고 있는 단백질의 기능에 문제가 생기면 가족력이 없는 파킨슨병의 발병에 영향을 미칠 수 있다고 생각되고 있다. 또한 파킨슨병은 나이가 증가할수록 발생 빈도가 높아지고 있다. 파킨슨병은 도시 거주자보다 농촌 거주자에게서 많이 발생하는데, 이는 농약이나 오염된 우물물의 노출이 원인인 것으로 여겨지고 있다. 대부분의 파킨슨병 환자들은 60대에 이르러 임상 증상이 나타나기 시작한다. 10~15%의 환자는 50세 이전에 발병하는 경우도 있는데, 이를 조기발현 파킨슨병이라고 부른다. 파킨슨병을 의미하는 4대 주요 증상 및 징후들로는 안정떨림, 경직, 느린 운동 및 자세불안정성 등이 있다. 병이 더 진행되면 반사 능력이 떨어져 자주 넘어지게 되며, 이러한 전형적인 이상 운동증상 이외에 흔히 발생하는 파킨슨병의 임상적 증상으로는 자율신경계증상, 신경정신과적 증상, 인지기능장애, 수면장애, 통증, 피로, 후각장애 등이 있다. 일부에서 동반되는 자율신경계 이상 증상은 위장관 장애 현상을 포함하여 침흘림, 삼킴곤란, 변비, 기립저혈압, 다한증, 배뇨장애, 성기능장애 및 안구건조증 등이 있다.

[0006] 현재 파킨슨병 치료제는 증상을 완화시킬 뿐 완치시킬 수 있는 치료제는 개발되지 못한 실정이며, 상기 증상을 완화시킬 수 있는 치료제 또한 합성 화합물으로써 다양한 부작용이 보고된 바, 천연물 유래 효과적인 치료제의 개발이 요구되고 있다.

[0007] 삭제

선행기술문헌

특허문헌

(특허문헌 0001) 등록특허 10-1793552 (공고일: 2017.11.03.)

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0008] 본 발명자들은 천연물 유래의 파킨슨병에 대해 효과적인 치료 효과를 보이는 물질에 대하여 연구하던 중, 홍잠을 식용효소로 분해하여 제조한 홍잠 효소분해물이 초파리의 기대수명, 건강수명과 운동능력을 증대시키며, 파킨슨병 유발물질이 투여된 초파리의 평균수명을 증대시킴을 확인하여 본 발명을 완성하였다.
- [0009] 따라서 본 발명의 목적은 파킨슨병 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.
- [0010] 따라서 본 발명의 다른 목적은 파킨슨병 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공하는 것이다.
- [0011] 따라서 본 발명의 또 다른 목적은 파킨슨병 예방 또는 개선용 건강기능식품을 제공하는 것이다.
- [0012] 따라서 본 발명의 또 다른 목적은 파킨슨병 예방 또는 개선을 위한 사료 첨가용 조성물을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0014] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 홍잠 효소분해물을 포함하는 파킨슨병 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.
- [0015] 상기 다른 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 홍잠 효소분해물을 포함하는 파킨슨병 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공한다.
- [0016] 상기 또 다른 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 홍잠 효소분해물을 포함하는 파킨슨병 예방 또는 개선용 건강기능식품을 제공한다.
- [0017] 상기 또 다른 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 홍잠 효소분해물을 포함하는 파킨슨병 예방 또는 개선용 사료첨가용 조성물을 제공한다.

발명의 효과

- [0019] 본 발명은 홍잠 효소분해물의 파킨슨병 개선 또는 치료 효과를 확인한 것으로, 본 발명에 따르면, 홍잠 효소분해물을 급여한 초파리의 기대수명, 건강수명 및 운동능력이 증대되었으며, 상기 홍잠 효소분해물은 파킨슨병 관련 신호전달경로에 연관된 유전자들의 발현에 영향을 미치는 것을 확인하였다. 더불어 파킨슨병의 발병 원인으로 알려진 로테논이 처리된 초파리의 평균수명을 증대시켰고 미토콘드리아 복합체의 활성을 증대시켰으며, 그 효과가 홍잠 대비 월등히 우수함을 확인한 바, 본 발명에 따른 홍잠 효소분해물은 파킨슨병 예방, 개선 또는 치료를 위하여 유용하게 활용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0021] 도 1은 본 발명에 따른 홍잠 효소분해물이 초파리의 기대수명, 건강수명 및 운동능력에 미치는 영향을 확인한 결과이다.
- 도 2는 본 발명에 따른 홍잠 효소분해물이 파킨슨병 관련 신호전달경로에 미치는 효과를 초파리의 몸과 머리에 서 확인한 결과이다.
- 도 3은 상기 도 2에서 확인된 발현 변화를 보이는 유전자들의 연관성을 유전자의 상호작용 분석(gene to gene interaction analysis)을 수행하여 확인한 결과이다.

도 4는 본 발명에 따른 홍잠 효소분해물 또는 홍잠에 포함된 항산화 물질 및 항산화 활성을 비교한 결과이다.

도 5는 본 발명에 따른 홍잠 효소분해물이 파킨슨병 유발물질이 투여된 초파리에 미치는 영향을 확인한 결과이다.

도 6은 본 발명에 따른 홍잠 효소분해물이 미토콘드리아 복합체(Mitochondrial complex) 활성에 미치는 영향을 확인한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0022] 이하, 본 발명에 대해 상세히 설명한다.
- [0023] 본 발명은 홍잠 효소분해물을 포함하는 파킨슨병 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.
- [0024] 본 발명에 있어서, 상기 “홍잠”은 누에가 완전히 자라 고치를 짓기 직전의, 견사 단백질을 포함하는 누에인 숙잠을 물 또는 수증기로 찢 것을 의미한다.
- [0025] 본 발명에 있어서, 상기 홍잠은 백옥잠 홍잠 및 골든실크(gold silk)를 생산하는 골든실크 홍잠으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상의 홍잠인 것을 특징으로 한다.
- [0026] 더불어 상기 홍잠은 숙잠을 50 내지 130℃의 온도에서 5분 내지 40시간 동안 물에 넣어 익히거나 증기의 열로 익힌 것을 특징으로 한다. 바람직하게는 상압조건, 50 내지 60℃의 온도에서 20시간 내지 40시간, 120 내지 130℃의 온도에서 5분 내지 10분 또는 100 내지 104℃의 온도에서 110분 내지 130분 동안 증기의 열로 익힌 것일 수 있다. 보다 바람직하게는 55℃의 온도에서 30시간 증기의 열로 익힌 것일 수 있고, 125℃의 온도에서 7분 동안 증기의 열로 익힌 것일 수 있으며, 100℃의 온도에서 130분 동안 증기의 열로 익힌 것일 수 있다.
- [0027] 또한 본 발명에 있어서, 상기 숙잠은 5령 3일 이후의 누에인 것이 바람직하며, 5령 8일된 누에인 것이 보다 바람직하다. 상기 5령 8일된 누에는 숙잠기의 누에로, 고치를 짓기 전의 몸 속에 견사단백질이 가득 차 있는 누에를 의미한다.
- [0028] 즉, 본 발명은 증가된 견사단백질로 인해 식품으로 사용하기 어려운 주령의 누에를 식용 외의 용도로 활용할 수 있는 발명이다.
- [0029] 특히 본 발명은 홍잠을 단백질분해효소로 분해하여 수득한 것을 특징으로 한다.
- [0030] 상기 단백질분해효소는 식품에 사용될 수 있고, 단백질을 분해할 수 있는 식용효소인 것이 바람직하며, 보다 바람직하게는 알칼리성 단백질분해효소(Alkaline protease)이다. 상기 단백질분해효소는 예로서 FoodPro® Alphasase®(DuPont Industrial Biosciences, Brabrand, Denmark), Collupulin™ MG(DSM Food Specialties, Alexander Fleminglaan, Netherlands), Alcalase®, Neutrase®, Protamex®, Flavourzyme®(Novozymes A/S, Bagsvaerd, Denmark), Promod™ 192P, 279MDP, 278MDP(Biocatalysts Ltd., Wales, UK) 또는 Bromelain(PT Bromelain Enzyme, Lampung, Indonesia) 등이 있으나 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0031] 상기 분해는 45℃ 내지 60℃에서 12시간 내지 48시간 수행될 수 있고, 바람직하게는 50℃ 내지 60℃에서 12시간 내지 24시간 수행될 수 있으며, 보다 바람직하게는 55℃에서 24시간 수행될 수 있다.
- [0032] 본 발명의 일실시예에 따르면, 백옥잠 또는 골든실크 누에 유래 홍잠 및 상기 백옥잠 또는 골든실크 누에 유래 홍잠을 단백질분해효소인 FP® AP(FoodPro®Alkaline protease)로 분해하여 수득한 홍잠 효소분해물을 초파리에 급여하였을 때 초파리의 기대수명, 건강수명 및 운동능력이 증대됨을 확인하였다.
- [0033] 더불어 본 발명의 또다른 일실시예에 따르면, 골든실크 누에 유래 홍잠 및 상기 골든실크 누에 유래 홍잠을 FP® AP로 효소분해하여 수득한 홍잠 효소분해물은 파킨슨병 관련 신호전달경로에 연관된 유전자들의 발현에 유의미한 영향을 미침을 확인하였다.
- [0034] 특히 파킨슨병의 발병원인 중 하나로 알려진 로테논(rotenone)이 처리된 초파리의 평균수명을 증대시켰고 미토콘드리아 복합체의 활성을 증대시킴을 확인하였으며, 더욱이 본 발명의 홍잠 효소분해물의 효과가 홍잠 대비 월등히 우수함을 확인하였다.
- [0035] 따라서 본 발명에 따른 홍잠 효소분해물은 홍잠 자체보다 더 우수한 파킨슨병 예방, 개선 또는 치료 효과를 가진 조성물로 유용하게 활용될 수 있다.

- [0036] 본 발명에 따른 홍잠 효소분해물은 그 자체로 제공될 수 있고, 이를 원심분리하여 상등액 또는 침전물로 분리하여 제공될 수 있다.
- [0037] 본 발명의 일실시예에 따르면 본 발명에 따른 홍잠 효소분해물을 원심분리하여 수득한 상등액은 홍잠 효소분해물 및 상기 홍잠 효소분해물을 원심분리하여 수득한 침전물 대비 로테논이 처리된 초파리의 평균수명을 현저히 증가시켰다.
- [0038] 더불어 본 발명에 따른 홍잠 효소분해물은 그 자체로 사용할 수도 있으며, 공지의 여과, 농축 및 건조 과정을 수행하여 수득한 것일 수 있다. 상기와 같이 건조 과정을 거쳐 수분을 완전히 제거시킨 분말 형태로 사용하거나 상기 분말을 증류수 또는 통상의 용매에 녹여 사용할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0039] 상기의 공지의 여과 방법은 이에 제한되지는 않으나, 예를 들어 여과망, 마이크로필터를 이용한 여과, 원심분리 또는 분액깔대기를 이용한 여과 방법일 수 있다. 상기의 공지의 농축 방법은 이에 제한되지는 않으나, 예를 들어 침전농축, 증발농축, 감압농축, 한외여과법, 역삼투법 또는 원심분리법일 수 있다. 상기의 공지의 건조 방법은 이에 제한되지는 않으나, 예를 들어 동결 건조, 분무 건조 또는 열풍건조 방법일 수 있다.
- [0040] 본 발명의 약학적 조성물은 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 및 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용될 수 있다. 더불어 본 발명의 약학적 조성물은 약학적으로 허용되는 담체, 부형제 및 희석제로 이루어진 선택된 어느 하나 이상을 추가적으로 포함할 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, 칼슘 포스페이트, 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, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다. 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 본 발명의 홍잠 효소분해물에 적어도 하나 이상의 부형제, 예를 들면, 전분, 탄산칼슘, 수크로스 또는 락토오스, 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 또한 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트, 탈크 같은 윤활제들도 사용된다. 경구를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데 흔히 사용되는 단순 희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수용성제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제, 좌제가 포함된다. 비수용성제, 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, 글리세로젤라틴 등이 사용될 수 있다.
- [0041] 본 발명의 약학적 조성물의 투여량은 치료받을 대상의 연령, 성별, 체중과, 치료할 특정 질환 또는 병리 상태, 질환 또는 병리 상태의 심각도, 투여경로 및 처방자의 판단에 따라 달라질 것이다. 이러한 인자에 기초한 투여량 결정은 당업자의 수준 내에 있으며, 일반적으로 투여량은 0.01mg/kg/일 내지 대략 2000mg/kg/일의 범위이다. 더 바람직한 투여량은 0.1mg/kg/일 내지 1000mg/kg/일이다. 투여는 하루에 한번 투여할 수도 있고, 수회 나누어 투여할 수도 있다. 상기 투여량은 어떠한 면으로든 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.
- [0042] 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, 자궁내 경막 또는 뇌혈관내 주사에 의해 투여될 수 있다.
- [0043] 본 발명의 약학적 조성물은 본 발명에 따른 유효성분 이외에, 파킨슨병 예방 또는 치료를 위하여 이미 안전성이 검증되고 파킨슨병 예방 또는 치료 활성을 갖는 것으로 공지된 임의의 화합물이나 천연 추출물을 추가로 포함할 수 있다.
- [0044] 더불어 본 발명의 약학적 조성물은 파킨슨병 예방 또는 치료를 위하여 단독으로, 또는 수술, 방사선 치료, 호르몬 치료, 화학 치료 및 생물학적 반응 조절제를 사용하는 방법들과 병용하여 사용할 수 있다.
- [0045] 또한 본 발명은 홍잠 효소분해물을 포함하는 파킨슨병 예방 또는 개선용 식품 조성물 또는 건강기능식품을 제공한다.
- [0046] 본 발명의 식품 조성물 또는 건강기능식품에 있어서, 상기 홍잠 효소분해물은 앞서 설명한 바와 같다.
- [0047] 본 발명에 따른 식품 조성물은 기능성 식품(functional food), 영양 보조제(nutritional supplement), 건강식

품(health food) 및 식품 첨가제(food additives) 등의 모든 형태를 포함한다. 상기 유형의 식품 조성물은 당업계에 공지된 통상적인 방법에 따라 분말제, 정제, 캡슐제, 환제 및 액제로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나의 형태로 제형화 될 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 당 업계에 공지된 방법을 이용하여 다양한 형태로 제조할 수 있다.

[0048] 예를 들면, 건강식품으로는 본 발명의 홍삼 효소분해물 자체를 과립화, 캡슐화 및 분말화하여 섭취하거나 차, 주스 및 드링크의 형태로 제조하여 음용하도록 할 수 있다. 또한, 본 발명의 홍삼 효소분해물을 과민성예방 또는 치료 효과가 있다고 알려진 공지의 물질 또는 활성 성분과 함께 혼합하여 조성물의 형태로 제조할 수 있다.

[0049] 또한, 기능성 식품으로는 음료(알콜성 음료 포함), 과일 및 그의 가공식품(예: 과일통조림, 병조림, 잼, 마멀레이드 등), 어류, 육류 및 그 가공식품(예: 햄, 소시지콘비이프 등), 빵류 및 면류(예: 우동, 메밀국수, 라면, 스파게티, 마카로니 등), 과즙, 각종 드링크, 쿠키, 엿, 유제품(예: 버터, 치즈 등), 식용식물유지, 마아가린, 식물성 단백질, 레토르트 식품, 냉동식품, 각종 조미료(예: 된장, 간장, 소스 등) 등에 본 발명의 홍삼 효소분해물을 첨가하여 제조할 수 있다.

[0050] 본 발명의 식품 조성물 중 상기 본 발명의 홍삼 효소분해물의 바람직한 함유량으로는 이에 한정되지 않지만 예를 들어 최종적으로 제조된 식품 중 0.01 내지 80 중량%일 수 있으며, 바람직하게는 최종적으로 제조된 식품 중 0.01 내지 50 중량%일 수 있다. 또한, 본 발명의 홍삼 효소분해물을 식품 첨가제의 형태로 사용하기 위해서는 분말 또는 농축액 형태로 제조하여 사용할 수 있다.

[0051] 본 발명에 있어서 “건강기능식품”이란 식품에 물리적, 생화학적, 생물공학적 수법 등을 이용하여 해당 식품의 기능을 특정목적에 작용, 발현하도록 부가가치를 부여한 식품군이나 식품 조성이 갖는 생체방어리듬조절, 질병방지와 회복 등에 관한 체내조절기능을 생체에 대하여 충분히 발현하도록 설계하여 가공한 식품을 의미한다. 본 발명의 목적상 상기 건강기능식품은 과민성예방 또는 개선을 증진시키기 위한 건강기능식품을 의미한다.

[0052] 본 발명의 조성물을 건강기능식품 첨가물로 사용할 경우, 상기 조성물을 그대로 첨가하거나 다른 건강기능식품 성분과 함께 사용할 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용할 수 있다. 유효성분의 혼합량은 사용 목적에 따라 적합하게 결정될 수 있다. 일반적으로, 식품 또는 음료의 제조 시에 본 발명의 조성물은 원료에 대하여 바람직하게는 50 중량부 이하, 보다 바람직하게는 25 중량부 이하의 양으로 첨가할 수 있다. 그러나, 건강 조절 및 위생을 목적으로 하는 장기간의 섭취의 경우에는 상기 양은 상기 범위 이하일 수 있으며, 안정성 면에서 문제가 없기 때문에 유효성분은 상기 범위 이상의 양으로도 사용할 수 있다.

[0053] 더불어 본 발명은 홍삼 효소분해물을 유효성분으로 포함하는 과민성예방 또는 개선을 위한 사료 첨가용 조성물을 제공한다.

[0054] 본 발명의 용어 "사료"란, 동물이 먹는 임의의 천연 또는 인공 구정식, 한끼식 등 또는 상기 한끼식의 성분을 의미하며, 본 발명에 따른 과민성예방 또는 개선을 위한 사료 첨가용 조성물을 유효성분으로 포함하는 사료는 당업계에 공지된 다양한 형태의 사료로 제조가능하며, 바람직하게는 농후 사료, 조사료 및/또는 특수사료가 포함될 수 있으나, 이로 제한되는 것은 아니다.

[0055] 본 발명에서 용어, “사료첨가용 조성물”은 “사료첨가제”를 의미할 수 있으며, 이는 동물에 있어 질병 증상의 완화, 영양소 보충 및 체중감소 예방, 사료 내 섬유소의 소화 이용성 증진, 유질개선, 번식장애 예방 및 수태율 향상, 하절기 고온 스트레스 예방 등 다양한 효과를 목적으로 사료에 첨가하는 물질을 포함한다.

[0056] 본 발명의 사료첨가용 조성물은 사료관리법상의 보조사료에 해당하며, 탄산수소나트륨, 벤토나이트(bentonite), 산화마그네슘, 복합광물질 등의 광물질제제, 아연, 구리, 코발트, 셀레늄 등의 미량 광물질인 미네랄제제, 케로틴, 비타민 A D, E, 니코틴산, 비타민 B 복합체 등의 비타민제, 메티오닌, 라이신 등의 보호아미노산제, 지방산 칼슘염 등의 보호지방산제, 생균제(유산균제), 효모배양물, 곰팡이 발효물 등의 생균, 효모제 등이 추가로 포함될 수 있다.

[0057] 상기 사료 중 농후사료로는 밀, 귀리, 옥수수 등의 곡류를 포함하는 종자열매류, 곡물을 정제하고 얻는 부산물로서 쌀겨, 밀기울, 보릿겨 등을 포함하는 겨류, 콩, 유채, 깨, 아마인, 코코야자 등을 채유하고 얻는 부산물인 깻묵류와 고구마, 감자 등에서 녹말을 뺀 나머진인 녹말찌꺼기의 주성분인 잔존녹말질류 등의 찌꺼기류, 어분, 물고기찌꺼기, 어류에서 얻은 신선한 액상물(液狀物)을 농축시킨 것인 피시솔루블(fish soluble), 육분(肉粉), 혈분, 우모분, 탈지분유, 우유에서 치즈, 탈지유에서 카제인을 제조할 때의 잔액인 웨이(whey)를 건조한 건조웨이

이 등의 동물질사료, 효모, 클로렐라, 해조류가 있으나 이에 제한되지 않는다.

[0058] 상기 사료 중 조사료로는 야초, 목초, 풋베기 등의 생초(生草)사료, 사료용 순무, 사료용 비트, 순무의 일종인 루터베어거 등의 뿌리채소류, 생초, 풋베기작물, 곡실(穀實) 등을 사일로에 채워 놓고 젖산발효시킨 저장사료인 사일리지(silage), 야초, 목초를 베어 건조시킨 건초, 종축용(種畜用) 작물의 짚, 콩과 식물의 나뭇잎이 있으며, 이에 제한되지 않는다. 특수사료에는 굴껍데기, 암염 등의 미네랄 사료, 요소나 그 유도체인 디우레이드이소부탄 등의 요소사료, 천연사료원료만을 배합했을 때 부족하기 쉬운 성분을 보충하거나, 사료의 저장성을 높이기 위해서 배합사료에 미량으로 첨가하는 물질인 사료첨가물, 식이보조제가 있으나 이에 제한되지 않는다.

[0059] 본 발명에 따른 상기 사료첨가용 조성물은 당업계에 공지된 다양한 사료 제조방법에 따라 적절한 유효 농도 범위에서 본 발명에 따른 홍잠 효소분해물을 첨가하여 제조 가능하다.

[0060] 또한 본 발명에 따른 사료첨가용 조성물은 파킨슨병 예방 또는 개선을 목적으로 하는 개체라면 제한없이 적용 가능하다. 예를 들면, 원숭이, 개, 고양이, 토끼, 모르모트, 랫트, 마우스, 소, 양, 돼지, 염소 등과 같은 비인간 동물, 조류 및 어류 등 어느 개체에도 적용이 가능하다.

[0062] 상술한 본 발명의 내용은 상호 모순되지 않는 한, 서로 동일하게 적용되며, 당해 기술분야의 통상의 기술자가 적절한 변경을 가해 실시하는 것 또한 본 발명의 범주에 포함된다.

[0064] 이하 본 발명을 실시예를 통해 상세하게 설명하나 본 발명의 범위가 하기 실시예로만 한정되는 것은 아니다.

[0066] 실시예 1. 홍잠 조성물 준비

[0067] 1-1. 누에 사육 및 홍잠 생산

[0068] 전라북도 완주군 국립농업과학원에서 뽕나무잎을 급여하며 백옥잠(White jade)과 골든실크(Golden silk) 누에 품종을 사육하였다. 5령 8일된 비대해진 견사선을 포함하는 숙잠을 수확하고 물로 세척한 후, 압력을 가하지 않은 찢기에서 100℃로 130분간 찢고 바로 급속 냉동하였다. 이를 동결건조기를 이용해 건조하여 홍잠을 제조하고, 천연색채 물리 분쇄기를 이용하여 이를 분말화하였다.

[0070] 1-2. 홍잠 효소분해물 제조

[0071] 상기 1-1에서 준비한 150g의 백옥잠(Wj-HongJam, WJ)과 골든실크(GS-HongJam, GS) 홍잠 분말을 75 ml의 FP@AP(FoodPro@Alkaline protease, Genencor에서 구입)와 혼합한 후 증류수를 추가하여 1L의 용액으로 만들었다. 이를 회전교반기를 이용하여 55℃에서 24시간 동안 분해하여 WJ와 GS 효소분해물(HongJam-enzyme digest, WJD와 GSD)을 제조하였다. 그 후 FP@AP를 불활성화시키기 위해서 90℃로 10분동안 가열하였다.

[0072] 더불어 GSD에 있어서, 가열 후 4℃에서 10분간 13,000 rpm으로 원심분리하여 상등액(GSD-supernatants, GSDsup)과 침전물(GSD-precipitates, GSDprec)로 분리한 후 동결건조하였다. 이때 상등액과 침전물의 건조 중량 비율은 7:3이었다.

[0074] 실시예 2. 홍잠 효소분해물이 초파리의 기대수명, 건강수명 및 운동능력에 미치는 영향 확인

[0075] 초파리 Canton-S 계통을 이용하여 본 발명에 따른 홍잠 효소분해물이 초파리의 기대수명과 건강수명에 미치는 영향을 확인하였다. 이를 위하여 각 실험군 당 10개의 시험관(각 시험관당 태어난 일자가 동일한 5마리의 수컷 및 5마리의 암컷 포함)을 준비하였다(실험군 당, 태어난 일자가 동일한 100마리의 초파리로 수행).

[0076] 각 실험군은 정상사료 급여군[Normal food, Nf(1.0L dH₂O, 7.7g 아가(agar), 62.4g 건조 효모(dried yeast), 40.8g 옥수수 전분(corn starch), 84.0g 글루코오스(glucose), 13.0ml 당밀(molasses) 및 12.5ml 곰팡이 저해제(mold inhibitor) 포함]], GS를 포함한 사료 급여군(GSf (Nf + 6.24 g GS)), GS 효소분해물을 포함한 사료 급여군(GSDf (Nf + 6.24 g GSD)), WJ를 포함한 사료 급여군(WJf (Nf + 6.24g WJ)), WJ 효소분해물을 포함한 사료 급여군(WJdf (Nf + 6.24 g WJD))으로 분류하였다.

[0077] 각 실험군에 해당되는 배지를 담은 시험관에 수컷 5마리와 암컷 5마리를 넣은 후 28℃에서 사육하였고, 3일마다 새로운 배지를 담은 시험관으로 옮겨 주었다. 하나의 실험군당 10개의 시험관을 준비하여 각각 100마리의 초파리로 연구를 진행하였다. 초파리들의 운동능력은 볼텍스 혼합기(vortex mixer)로 20초간 진동을 주고 10초 후에 운동능력이 있는 초파리의 수를 확인하는 방법으로 3일마다 측정하였다. 더불어 각 실험군의 기대수명 및 건강수명은 카플란-마이어 평가(Kaplan-Meier estimation)로 생존분석을 수행하여 확인하였다. 통계 분석은 일원 또는 이원 분산 분석(One or two-way analysis of variance) 및 Tukey's HSD (Honest Significant Difference)

테스트를 이용하여 수행하였다.

- [0078] 그 결과 도 1에 나타난 바와 같이, WJf, WJdf, GSf 및 GSDf 실험군 모두 Nf 실험군(도 1A 내 붉은선) 대비 통계적으로 유의하게 위험지수(Hazard ratio, HR)가 감소한 것을 확인하였다(도 1A). 보다 구체적으로 Nf 실험군과 비교하여 GSf 실험군의 HR은 0.240이었고, GSDf 실험군의 HR은 0.296이었으며, WJf 실험군은 0.306이었고, WJdf 실험군의 HR은 0.258이었으며, 각 실험군 간에는 통계적인 차이가 없었다. 기대수명을 평균 수명으로 환산하여 비교한 결과, Nf 실험군의 평균수명은 16.56일인데 비하여 GSf 실험군은 25.14일로 51.8% 증가하였고, GSDf 실험군은 25.47일로 53.8% 증가하였다. 더불어 WJf 실험군의 평균수명은 23.91일로 44.4% 증가하였고, WJdf 실험군의 평균수명은 24.99일로 50.9% 증가하였다(도 1B).
- [0079] 또한 각 실험군의 운동능력(전위능력 비율(Locomotor ability rate)의 경우, Nf 실험군(도 1B 내 붉은선)과 비교하여 GSf 실험군의 운동능력은 0.527이었고, GSDf 실험군의 운동능력은 0.542였으며, WJf 실험군의 운동능력은 0.542이었고, WJdf 실험군의 운동능력은 0.553로, 각 실험군 모두 Nf 실험군 대비 운동능력이 현저히 증가되었음을 확인하였다(도 1C).
- [0080] 더불어 현재 당분야에서 초파리의 건강수명은 50%의 초파리가 운동능력을 가지고 있는 시점으로 규정되어 있다. 이를 기반으로 각 실험군의 건강수명을 확인한 바, Nf 실험군의 건강수명은 9.2일에 불과하였지만, GSf 실험군의 건강수명은 15.6일로 Nf 실험군 대비 69.6% 증가하였다. 더불어 GSDf 실험군은 18.2일로, Nf 실험군 대비 98.2% 증가하였다. 한편, WJf 실험군의 건강수명은 15.6일로 Nf 실험군 대비 69.6% 증가하였고, WJdf 실험군은 13.5일로 46.7% 증가하였다(도 1D 및 도 1E).
- [0081] 기대수명에서 건강수명의 비율이 높아질수록 질병으로 고통을 받는 기간이 줄어들므로, 이 비율은 건강증진을 확인하는 중요한 요소 중의 하나이다. Nf 실험군은 평균수명 대비 건강수명의 비율이 55.6%인데 반하여, GSf 실험군은 62.1%, GSDf 실험군은 71.6%, WJf 실험군은 65.2%로 증가한 것을 확인하였다. 하지만 WJdf 실험군의 경우, 54.0%로 1.6% 감소하였다(도 1E). 따라서 이를 통해 GS와 GSD가 WJ와 WJD 대비 기대수명과 건강수명 증대에 효과가 더 있을 것으로 판단되었다.
- [0083] **실시예 3. 홍잠 효소분해물이 파킨슨병 관련 신호전달경로에 미치는 영향 확인**
- [0084] GS와 GSD가 파킨슨병의 발병과 진행에 연관이 있는 것으로 알려진 신호전달경로(UPR(Unfolded protein response)-, AKT/PI3K/Tor- 및 자가포식)에 기여하는 유전자들과 단맛 등을 인지하는 맛감각 수용체(6개의 미각 수용기(Gustatory receptors), Gr64a부터 Gr64f까지) 유전자들의 발현에 미치는 영향을 확인하였다.
- [0085] Nf 실험군, GSf 실험군 또는 GSDf 실험군에 있어, 15일 후에 각 실험군 초파리의 머리와 몸통을 수득하였다. 트리졸(trizol)을 이용하여 이로부터 총 RNA를 수득하고, cDNA를 합성하여 하기 표 1 내지 표 3의 프라이머 및 조건을 이용해 RT-qPCR을 수행하였다. 이를 통해 확인된 UPR-, AKT/PI3K/Tor-, 자가포식 신호전달에 기여하는 유전자 및 맛감각 수용체 유전자의 발현 변화를 도 2에 나타내었다(이때 Nf 실험군 대비 통계적으로 유의하게 감소된 경우는 파란색으로 표시하였고, 유의하게 증가한 경우는 붉은 색으로 표시하였다).

표 1

Signaling	유전자	프라이머 서열 (F: forward/R: reverse)	PCR 증폭방법
Loading control	RP49	F CAGTCGGATCGATATGCTAAGCTG T	95°C-3 분. 1 회(cycle): 95°C-5초. 62 °C-10초. 72°C-10초. 40 회
		R TAACCGATGTTGGGCATCAGATAC T	
UPR	Hsc70-3	F GCTCAACCTGGATCTATTCC	
		R TGGATGGTGACGGTGTGCTGGTTA T	
	Hsc70-4	F AGGTGTACGAGGGAGAGCGT	
		R CCACTTGATGGTCTCGTTGC	
	Hsc70-5	F GAGCGTGAGATGGCTAACGA	
		R AGGTCGGCAAGTCTCCTTGTT	
	Irel	F GATCCAATGGAAGCACTGGCAGCA A	
		R TTGTGCTGAAGCTGATCTTGCCCA C	
	PEK	F TCTGGTCATTGAACGTCATGTGCC TG	
		R TGATTTGCTTGTCCAGGTGGGAAG C	
	Atf6	F AACGTAATTCCACGGAAGCCCAAC A	
		R GCGACGGTAGCTTGATTTCTAGAG CC	
	Xbp1 ^{Δ28bp}	F GCACAACACCAGATGCATCAGCCA A	
		R AGAGGGTCAGCTTTGGATGCTGCA GA	
	Xbp1 ^{Δ28bp}	F GCACAACACCAGATGCATCAGCCA A	
		R TGTTGTATACCTGCGGCAGATCC AA	
	erc	F TCGAGTCTCAGGCGTCTTCATCT T	
		R CTGCTCGATGGTTGTAGGAGCTGG	
	GP93	F TACCTGAGCTTCATTGCTGGCGTC G	
		R GCGGACCAGCTTCTTCTTGATCAC C	
	GRP170	F CAGTCTGGACGTGATCAACCAGGT G	
		R ACTGCACCCATAGTGGCGGATTCA T	

[0086]

표 2

Signaling	유전자	프라이머 서열 (F: forward/R: reverse)	PCR 증폭방법
Autophagy Signaling	Atg1	F GGATCATTGGGCTCGATTGGTTTCG G	95℃-3 분, 1 회(cycle): 95℃-5초, 62℃-10초, 72℃-10초, 40 회
		R GGCTCCTGTGTCCAGCAGACTATG	
	Atg2	F TTCACGCATGGACAAGTTCGGTGT C	
		R GATGGAGGCCTAAGCAGGTCCACT T	
	Atg3	F CAAGCCACTGACCGTGGAACAGAT G	
		R CACAGAGGCCATATTGGGACCTGG A	
	Atg4a	F CGACTTACATTTGGGACGCGACTG G	
		R ACTCTCCCATCTGGGCAATCTGGT G	
	Atg5	F TGGTGCCTCACCATTCACTTCTCC A	
		R TGCCTCCTTCAGGCAGGACATGTA G	
	Atg6	F CAGATCGCCTACTCGAAACAGCAG C	
		R AGTCCACGGATACAGAGGGCAATC G	
	Atg7	F CGACATGGCACTACGCGTAAGGAA G	
		R CGGTCTTTGAGCGAATTTCCAGGG G	
	Atg8a	F CTCAGCAACGCATCGATATTGGGC A	
		R CGAAGGCGTGCTCCTCTGTATT G	
	Atg8b	F CCGATGAGAACGTCTATGGACGGC A	
		R CTGGTTAGCTGGCTAGGAGCAGTC A	
	Atg9	F ACTGCTCTACGGACTCTGTGGTGT G	
		R GTGCAAATAGAGGGCACTGAGGCA C	
	Atg12	F ACAGTCGGCTGGATACAGACGTTT A	
		R TOCCATTGGTTCCATGGCACTCGT A	
	Atg13	F GTGGTGGGCTCCAAATGAGCAACT G	
		R GCCTCTCTCCATATTGACCGCCCT T	
	Atg18a	F TTGATTGCCTCGCAGGATGGGTAC T	
		R GCCGCAGGTCGTGCCTCTTTATTA G	

[0087]

표 3

Signaling	유전자	프라이머 서열 (F: forward/R: reverse)	PCR 증폭방법
AKT/P13K/ Tor signaling	AKT1	F CCGCAGTGCAGTAGGGAAAGCAAA	95°C-3 분, 1 회(cycle): 95°C-5초, 62 °C-10초, 72°C-10초, 40 회
		R GCGACCTAGCAGCGCAACATGT	
	O6K	F ACTGGGCGCTCTCATGTTTG	
		R TTGGCTTTCAGAATGGTC	
	Tor	F GAGTGAGTTCCTGGCTCCCCGG	
		R GGGCGAAATGCCCTTCTCTGGC	
	P13K	F GCTATAAAGGCGAGGGCTGGCC	
		R ACGCGGCACCGATGTCTCATC	
Gustatory receptors	Gr64a	F GTGTGCTACCAACTGCTAAATGTC	
		R ACCTCGTTTGGAAGCTCTCA	
	Gr64b	F CTATCGGTTCTACGGCGAGTAC	
		R ACTGGGTGCGCTCCATATTG	
	Gr64c	F CTCAGTGATCTTCTGGGTATCTAC	
		R ATCCGCATAGTTGCCCTTGG	
	Gr64d	F TGCTTCGCAATGAAACCTTTGC	
		R CTTGCATTTGCGGAACAGC	
	Gr64e	F ACCTTCGCCTGGAACCTTTAAG	
		R CCTGCACTGCATCCAATAGTCC	
	Gr64f	F CCGCAGTACAAGACACAGTTGAC	
		R TCCGCAAAGGACAGCATCATTC	

[0089]

[0090]

그 결과, 초파리의 머리와 몸통에서 발현되는 유전자들에 있어, 종류 및 패턴의 차이를 확인하였다. Nf 실험군 대비 GSf 실험군의 머리에서는 6개 유전자의 발현이 감소하였고 11개 유전자의 발현이 증가하였다. GSDf 실험군의 머리에서는 5개 유전자의 발현이 감소하였고 19개 유전자의 발현이 증가하였다. GSf 실험군의 경우, 몸통에서 13개의 유전자 발현이 감소하였고 9개 유전자의 발현이 증가하였으며, GSDf 실험군의 경우, 몸통에서 10개의 유전자 발현이 감소하였고 11개 유전자의 발현이 증가하였다. 즉, GSDf 실험군의 경우 초파리의 머리에 있어, 다양한 유전자의 발현을 변화시켰으며, 특히 증가되는 발현을 보이는 유전자가 많음을 확인하였다.

[0091]

상기에서 확인된 발현이 변화된 유전자들(differentially expressed genes, DEGs)의 연관성을 유전자의 상호작용 분석(gene to gene interaction analysis)을 수행하여 확인하였다, 이때 유전자의 상호작용 분석은 STRING DB (<https://string-db.org/>)를 이용하여 수행하였다.

[0092]

그 결과 도 3과 같이, 15일째 머리에서 발현이 변화된 유전자들을 확인하면, Nf 실험군 대비 GSf 실험군에서는 UPR과 연관된 유전자가 감소하였고, 물질대사(metablism)와 맛감각 수용체 유전자는 증가하였음을 확인하였다. 더불어 자가포식 관련 유전자는 5개가 증가하였고, 2개가 감소하였다(도 3 중 A. Nf vs GSf(Head) 참고). 이에 반해 GSDf 실험군의 머리에서는 발현이 변화된 12개의 자가포식 관련 유전자 중 10개가 증가하였고, 2개가 감소하였으며, 발현이 변화된 6개의 UPR 관련 유전자 중 4개가 증가하였고, 2개가 감소하였다. 또한 물질대사 관련

유전자인 S6k의 발현은 증가되었고 2개의 맛감각 수용체 유전자는 증가하였으며, 1개는 감소하였다(도 3 중 B. Nf vs GSDf(Head) 참고). GSf 실험군과 GSDf 실험군을 비교하면, 발현이 변화된 7개의 자가포식 관련 유전자 중 6개는 증가하였고, 1개는 감소하였다. 물질대사와 UPR 관련 유전자는 모두 증가하였고, 4개의 맛감각 수용체 유전자 중 1개는 증가하였으며, 3개는 감소하였다(도 3 중 C. GSf vs GSDf(Head) 참고).

[0093] 몸통에 있어서, Nf 실험군 대비 GSf 실험군에서는 물질대사 관련 S6k는 증가하였고, 6개의 발현이 변화된 UPR 관련 유전자 중 4개는 감소하였으며, 2개가 증가하였다. 그리고 9개의 발현이 변화된 자가포식 관련 유전자 중 4개는 감소하였고, 5개는 증가하였다. 더불어 3개의 맛감각 수용체 유전자 중, 2개는 증가하였고, 1개는 감소하였다(도 3 중 D. Nf vs GSf(Body) 참고). 또한 GSDf 실험군의 경우, 물질대사 관련 유전자 Tor과 Foxo의 발현이 감소되었고, 6개의 UPR 관련 유전자들 중에서 3개가 증가, 3개는 감소하였다. 이에 비하여 7개의 자가포식 유전자 중에서 6개는 증가하였고, 1개는 감소하였다. 또한 4개의 맛감각 수용체 유전자 중에서 3개가 증가하였고, 1개는 감소하였다(도 3 중 E. Nf vs GSDf(Body) 참고). GSf 실험군과 GSDf 실험군을 비교하면 발현이 변화된 2개의 자가포식 관련 유전자 중 1개가 증가, 1개는 감소하였다. 또한 물질대사 관련 유전자는 2개는 감소, 1개는 증가하였다. 또한 4개의 UPR 관련 유전자 중에서 3개는 증가, 1개는 감소하였으며, 3개의 맛감각 수용체 유전자는 모두 증가하였다(도 3 중 F. GSf vs GSDf(Body) 참고).

[0094] 따라서 이를 통해 GSf와 GSDf가 머리와 몸통에 서로 다른 영향을 미침을 명확히 확인하였다. 특히 GSf보다 GSDf가 파킨슨병의 원인이 되는 비정상적인 단백질 축적이나 소포체 기능을 보존할 수 있는 UPR, 자가포식 과정에 관여하는 더 다양한 유전자의 발현에 영향을 미치는 것으로 확인된 바, 홍잠 효소분해물인 GSDf에 기능성 물질이 더 많이 포함되어 있고 소포체스트레스와 관련된 파킨슨 병의 치료에 더 효과적일 것으로 예상되었다.

[0096] 실시예 4. 홍잠 효소분해물 또는 홍잠에 포함된 항산화 물질 및 항산화 활성 비교

[0097] GS, GSD 및 GSD 상등액(GSDsup)에 포함된 식물유래 화합물인 페놀 화합물(phenolic compounds)의 함량을 확인하였다. 이를 위하여 80% 메탄올(methanol) (vol/vol)에 각 시료를 첨가하고 150 rpm으로 1시간 30분간 회전시켜 추출한 후, 3,000 rpm으로 원심분리하여 상등액을 확보하였다. 주사기용 필터(0.2 mm 기공 크기(pore size), Sartorius AG, Gottingen, Germany)로 상등액의 불순물을 제거한 후 -80℃에 보관하였다. 각 추출물과 총 페놀 화합물 함량 측정을 위한 시약(Folin-Ciocalteu reagents) 및 Na₂CO₃를 혼합한 후, 750 nm에서의 흡광도를 측정하였다. 표준 물질인 다양한 농도의 갈산(gallic acid) 용액과 혼합한 후, 750 nm에서 흡광도를 측정하여 표준곡선을 만들어 각 추출액에 포함된 총 페놀 화합물의 함량을 측정하였다.

[0098] 더불어 FRAP(Ferric-reducing ability of plasma) 측정법을 수행하여 GS, GSD 및 GSDsup 추출물의 항산화 효과를 확인하였다. 먼저 아세트산염 버퍼(acetate buffer), 40 mM의 2,4,6-트립리딜-s-트리아진(2,4,6-tripryridyl-s-triazine (TPTZ, Merck))을 포함하는 HCl 용액과 20 mM의 FeCl₃·6H₂O 용액을 추출액과 혼합한 후, 30분간 반응시키고 593nm에서 흡광도를 확인하였다. 더불어 표준물질인 α-토코페놀(α-tocopherol)을 이용하여 표준곡선을 만들어 각 추출액의 항산화 효과를 측정하였다.

[0099] 그 결과, 도 4 중 A에 나타난 바와 같이, GS 대비 GSD 및 GSDsup에 통계적으로 유의하게 많은 양의 총 페놀 화합물이 존재함을 확인하였다[F(3,19) = 1229.14, $p < 4.0 \times 10^{-19}$]. 보다 구체적으로 GS의 페놀 화합물의 양은 $100.0 \pm 0.43\%$ 인데 비하여 GSD의 페놀 화합물의 양은 $278.7 \pm 2.25\%$ 이었고, GSDsup의 페놀 화합물의 양은 $295.0 \pm 4.06\%$ 인 바, 효소분해를 통해 유의하게 증가함을 확인하였다.

[0100] 더불어 FRAP 활성 확인 결과 도 4 중 B에 나타난 바와 같이, GS 대비 GSD 및 GSDsup이 더 우수한 항산화 활성을 보여주었다[F(3,19)=304.9, $p < 2.5 \times 10^{-14}$]. ($p < 10^{-18}$, 도 2B). 보다 구체적으로 GS의 FRAP 활성은 $100.0 \pm 2.49\%$ 이었고, GSD의 FRAP 활성은 $160.2 \pm 4.05\%$ 이었으며, GSDsup의 FRAP 활성은 $188.6 \pm 3.27\%$ 로, GS 대비 증가한 것을 확인하였다.

[0101] 따라서 효소분해에 의해 항산화 물질의 함량 및 항산화 효과가 증가되었음을 확인하였고, 특히 홍잠 효소분해물의 상등액(GSDsup)이 그 효과가 가장 우수하여, 파킨슨병 치료에 더 유의미한 효과를 보일 것으로 예측되었다.

[0103] 실시예 5. 초파리에 파킨슨병 유발 물질을 처리하고 홍잠 효소분해물을 투여한 후 효과 확인

[0104] 본 발명에 따른 GS, GSD, GSDsup 및 GSDprec가 파킨슨병에 미치는 효과를 확인하였다. 이를 위하여, 해충방제를 위하여 광범위하게 사용되는, 콩과에 속하는 식물들의 뿌리에서 추출되는 천연살충제인 0.2M의 로테논(rotenone)을 각 실험군에 해당하는 사료와 혼합하여 급여하였다. 상기 로테논은 장기간 노출시 인간을 비롯한

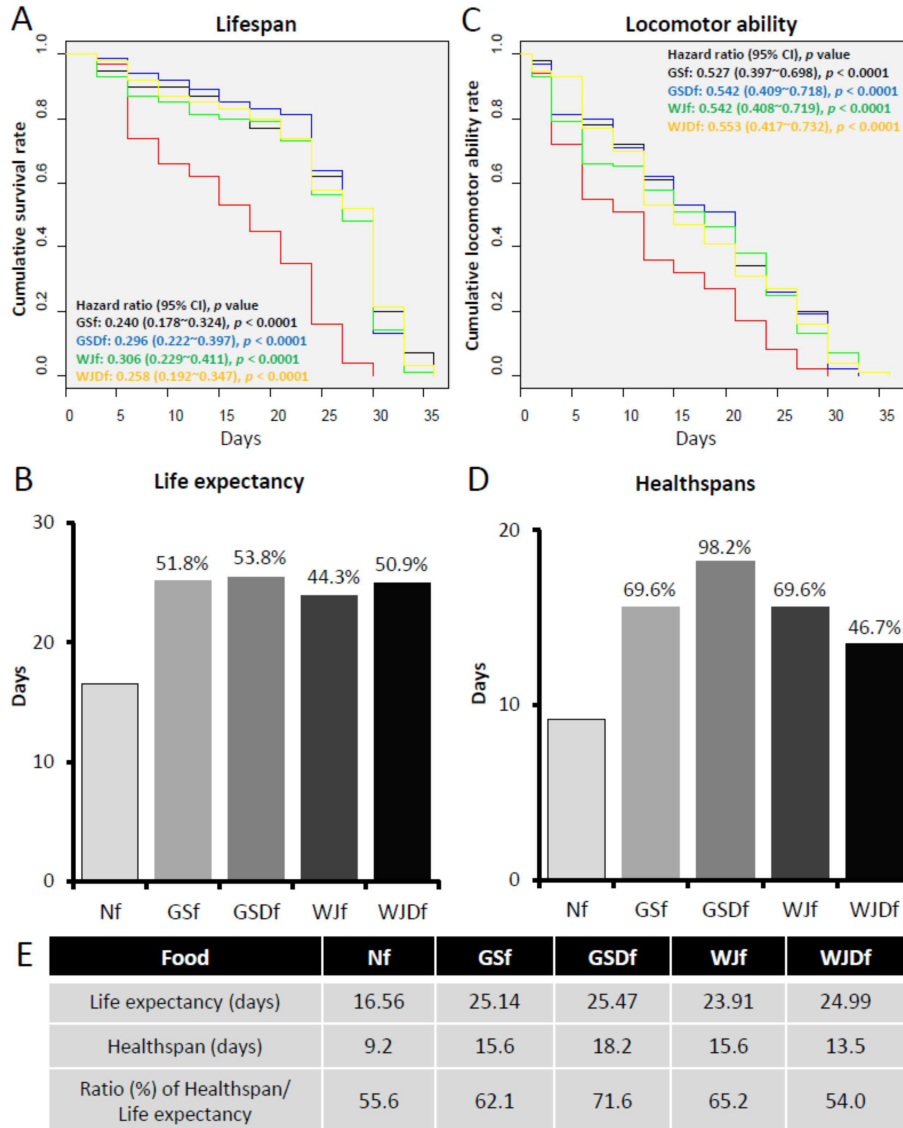
다양한 동물들에 파킨슨병을 발병시킨다고 알려져 있다.

- [0105] Nf 실험군과 비교하여 GSf 실험군, GSDf 실험군, GSDsupf 실험군 또는 GSDprecf 실험군별 초파리의 생존율을 비교하여 도 5에 나타내었다. 통계 분석은 일원 또는 이원 분산 분석(One or two-way analysis of variance) 및 Tukey's HSD (Honest Significant Difference) 테스트를 이용하여 수행하였다.
- [0106] Nf 실험군의 HR과 비교한 결과, GSf 실험군은 0.61, GSDf 실험군은 0.53, GSDsupf 실험군은 0.41, GSDprecf 실험군에서는 0.69로, 각 실험군 모두 HR이 통계적으로 유의하게 감소한 것을 확인하였다(도 5A). 또한 로테논 처리에 따른 평균수명을 비교한 결과, Nf 실험군의 평균수명은 11.58일인데 반해 GSf 실험군은 13.4일로 15.7% 증가되었다. 더불어 GSDf 실험군은 13.98일로 20.7% 증가하였으며, GSDsupf 실험군은 15.46일로 33.5% 증가하였고, GSDprecf 실험군은 13.04일로 12.6% 증가되었다(도 5B). 이를 통해 본 발명의 홍잠 효소분해물은 로테논에 의한 파킨슨병 발병 억제 효과가 있으며, 특히 홍잠 효소분해물 상등액(GSDsup)의 효과가 가장 높음을 확인하였다.
- [0108] **실시예 6. 미토콘드리아 복합체(Mitochondrial complex) 활성화에 미치는 영향 확인**
- [0109] 미토콘드리아의 활성화는 신경세포를 포함한 세포, 조직, 그리고 개체의 생존과 매우 밀접한 연관성이 있다. 그러므로 본 발명의 홍잠 효소분해물이 미토콘드리아 복합체(mitochondrial complex, MitoCom) I 내지 IV의 활성화에 미치는 영향을 확인하였다. 상기 MitoCom I ~ IV의 활성화는 다음과 같이 확인하였다
- [0110] 먼저 10마리의 초파리 성충에서 미토콘드리아를 추출하기 위하여 미토콘드리아 추출용액(250mM 수크로스(Sucrose), 5mM Tris-HCl, 2mM EGTA(ethylene glycol-bis(β -aminoethyl ether)-N, N, N', N'-tetraacetic acid), 1% BSA(Bovine Serum Albumin), pH 7.4)을 이용하여 분쇄한 후, 3중 메디칼 거즈를 이용하여 커다란 조직 파편을 제거하였다. 그 후 x 150 g에서 5분 동안 원심분리를 하여 작은 조직 파편을 제거하였다. 다시 2중 메디칼 거즈를 이용하여 한번 더 조직 파편을 제거한 후 x 900 g에서 10분 동안 원심분리하여 미토콘드리아를 침전시켰다. 침전된 미토콘드리아는 상기 미토콘드리아 추출용액에 다시 잘 혼합하여 미토콘드리아 추출액을 제조하였다
- [0111] 상기와 같이 준비한 미토콘드리아 추출액 10 μ l를 182 μ l의 활성화 검정용 완충용액(25mM PB(Phosphate buffer), 0.35% BSA, 0.06mM DCIP(dichloroindophenol), 0.07mM 데실유비퀴논(decylubiquinone), 1mM AA(Arachidonic acid) 포함)과 혼합하였다. 이를 8 ml의 NADH(Nicotinamide adenine dinucleotide)(5mM)와 혼합하고, 37 $^{\circ}$ C에서 30분간 반응시킨 후, 600nm에서 4분간 30초 간격으로 흡광도 변화를 측정하였다. 이때 5개의 반복시료에서 측정하였다.
- [0112] 더불어 미토콘드리아 복합체 II의 활성화 확인을 위해서 184 μ l의 활성화 검정용 완충용액(80mM PB pH 7.8, 0.1% BSA, 2mM EDTA(ethylenediaminetetraacetic acid), 0.2mM ATP(adenosine triphosphate), 80mM DCIP, 50 mM 데실유비퀴논, 1 mM AA, 3 mM 로테논 포함)에 1 μ l 말론산염(malonate)과 미토콘드리아 추출액 10 μ l를 추가한 후, 37 $^{\circ}$ C에서 30분간 반응시켰다. 그 후 600nm에서 4분간 30초 간격으로 흡광도 변화를 측정하였다. 이때 5개의 반복시료에서 측정하였다.
- [0113] 미토콘드리아 복합체 III의 활성화 확인을 위해서 80 μ l의 활성화 검정용 완충용액(50mM Tris-HCl pH 7.5, 4mM Na₃, 0.1mM 데실유비퀴논, 80 mM 석신산염(Succinate), 2mM KCN, 3 mM 로테논 포함)에 미토콘드리아 추출액 10 μ l과 40 mM 시토크롬 C(Cytochrome C) 10 μ l를 추가한 후, 25 $^{\circ}$ C에서 550nm로 30초 간격으로 3분간 흡광도를 측정하였다. 또한 미토콘드리아 복합체 IV의 활성화 확인을 위해서 188 μ l의 활성화 검정용 완충용액(10mM Tris-HCl pH 7.0, 120mM KCl)에 10 μ l 페로사이토크롬 C 기질(Ferrocycytochrome C substrate (0.22mM 페로사이토크롬과 0.5 mM DTT(dithiothreitol)) 포함)과 미토콘드리아 추출액 2 μ l를 추가한 후, 25 $^{\circ}$ C에서 550nm로 10초 간격으로 1분간 흡광도를 측정하였다. 이때 5개의 반복시료에서 측정하였다. 군집 간의 차이를 분산분석(analysis of variance, ANOVA)으로 확인하였고, 사후검정 분석(Tukey-Kramer post hoc)을 수행하였다.
- [0114] 그 결과 도 6에 나타난 바와 같이, 본 발명에 따른 홍잠 효소분해물을 처리한 GSDf 실험군은 Nf 실험군 대비 MitoCom I 내지 IV의 활성을 유의미하게 증가시킨 것을 확인하였다. 따라서 본 발명에 따른 홍잠 효소분해물은 MitoCom I 내지 IV의 활성을 증가시켜 줌으로써, 신경세포와 다른 조직의 활성을 증진시킬 수 있음을 확인하였다.
- [0116] 종합적으로, 본 발명에 따른 홍잠 효소분해물을 급여한 초파리의 기대수명과 건강수명이 증대되었으며, 상기 홍잠 효소분해물은 파킨슨병 관련 신호전달경로에 연관된 유전자들의 발현에 영향을 미치며, 특히 초파리 머리에

서 다양한 유전자의 발현 변화를 야기함을 확인하였다. 더불어 본 발명에 따른 홍잠 효소분해물은 파킨슨병의 발병 원인으로 알려진 로테논이 처리된 초파리의 평균수명을 증대시켰으며, 미토콘드리아 복합체의 활성을 증대시켰을 뿐만 아니라 그 효과가 홍잠 대비 월등히 우수함을 확인한 바, 본 발명에 따른 홍잠 효소분해물은 파킨슨병 예방, 개선 또는 치료를 위하여 유용하게 활용될 수 있다.

도면

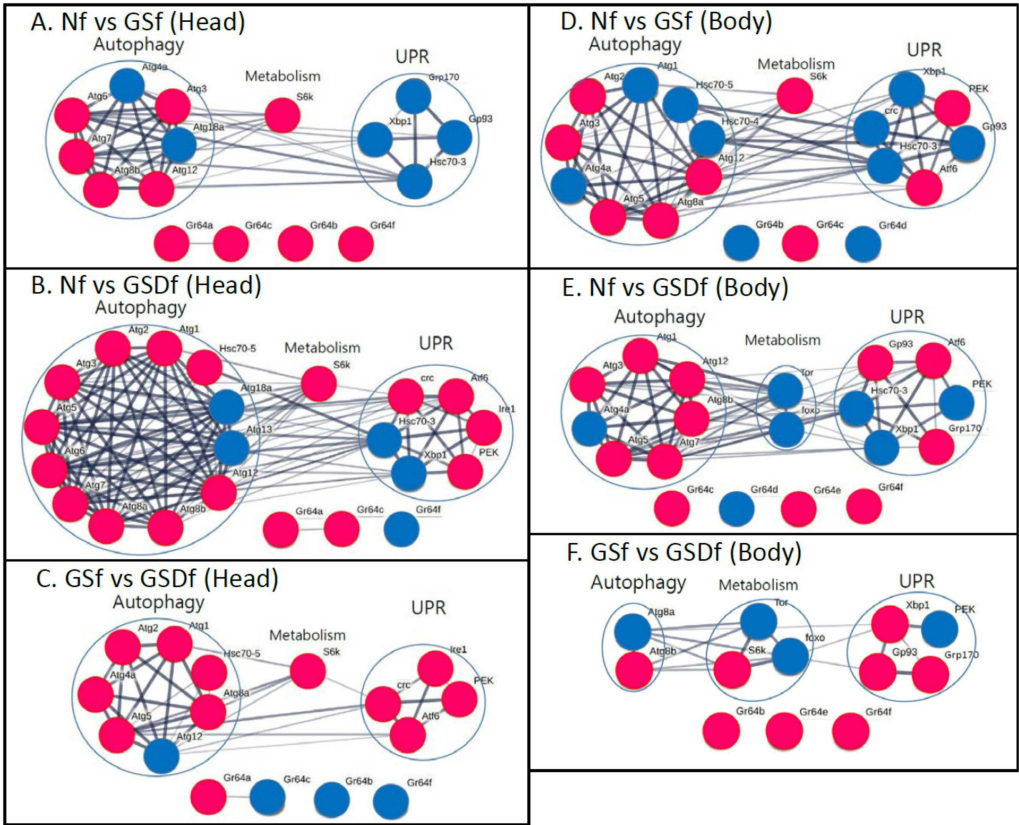
도면1



도면2

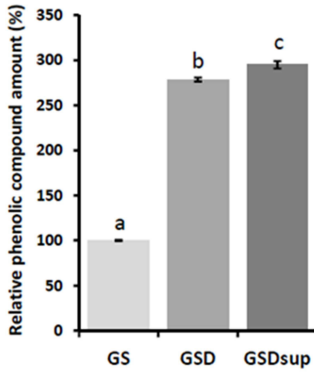
Genes	Head			Body			
	Nf	GSf	GSDf	Nf	GSf	GSDf	
UPR	Hsc70-3	1.0 ± 0.104 ^a	0.71 ± 0.048 ^b	0.68 ± 0.035 ^b	1.0 ± 0.113 ^a	0.48 ± 0.067 ^b	0.69 ± 0.044 ^b
	Irel	1.0 ± 0.062 ^a	1.20 ± 0.071 ^a	1.66 ± 0.060 ^b	1.0 ± 0.057 ^a	0.94 ± 0.197 ^a	1.38 ± 0.045 ^a
	PEK	1.0 ± 0.025 ^a	1.15 ± 0.124 ^a	1.74 ± 0.096 ^b	1.0 ± 0.110 ^a	1.52 ± 0.142 ^b	0.63 ± 0.070 ^b
	ATF6	1.0 ± 0.112 ^a	1.05 ± 0.156 ^a	1.98 ± 0.008 ^b	1.0 ± 0.016 ^a	1.24 ± 0.109 ^b	1.34 ± 0.059 ^a
	Xbp1 ^{Δ23bp}	1.0 ± 0.153 ^a	0.84 ± 0.104 ^a	0.92 ± 0.026 ^a	1.0 ± 0.120 ^a	0.35 ± 0.063 ^b	0.84 ± 0.018 ^a
	Xbp1 ^{Δ3bp}	1.0 ± 0.226 ^a	0.32 ± 0.032 ^b	0.37 ± 0.031 ^b	1.0 ± 0.049 ^a	0.35 ± 0.031 ^b	0.49 ± 0.144 ^b
	crc	1.0 ± 0.034 ^a	0.92 ± 0.012 ^a	1.27 ± 0.067 ^b	1.0 ± 0.007 ^a	0.81 ± 0.013 ^b	1.01 ± 0.028 ^a
	Grp-170	1.0 ± 0.024 ^a	0.76 ± 0.048 ^b	0.98 ± 0.040 ^a	1.0 ± 0.077 ^a	0.87 ± 0.038 ^a	1.39 ± 0.037 ^b
	Gp93	1.0 ± 0.089 ^a	0.57 ± 0.024 ^b	0.61 ± 0.005 ^b	1.0 ± 0.091 ^a	0.79 ± 0.044 ^b	1.35 ± 0.036 ^a
Autophagy	Hsc70-4	1.0 ± 0.087 ^a	0.83 ± 0.056 ^a	0.84 ± 0.018 ^a	1.0 ± 0.038 ^a	0.64 ± 0.064 ^b	0.68 ± 0.095 ^b
	Hsc70-5	1.0 ± 0.152 ^a	1.0 ± 0.097 ^a	1.46 ± 0.039 ^b	1.0 ± 0.079 ^a	0.73 ± 0.054 ^b	0.93 ± 0.071 ^a
	Atg1	1.0 ± 0.080 ^a	1.07 ± 0.101 ^a	2.03 ± 0.062 ^b	1.0 ± 0.050 ^a	0.44 ± 0.078 ^b	1.23 ± 0.024 ^a
	Atg2	1.0 ± 0.063 ^a	1.04 ± 0.143 ^a	1.54 ± 0.013 ^b	1.0 ± 0.060 ^a	1.60 ± 0.022 ^b	1.14 ± 0.081 ^a
	Atg3	1.0 ± 0.058 ^a	1.94 ± 0.142 ^b	1.56 ± 0.019 ^a	1.0 ± 0.012 ^a	1.24 ± 0.051 ^b	1.27 ± 0.010 ^b
	Atg4a	1.0 ± 0.082 ^a	0.62 ± 0.049 ^b	1.10 ± 0.069 ^a	1.0 ± 0.142 ^a	0.55 ± 0.050 ^b	0.64 ± 0.033 ^b
	Atg5	1.0 ± 0.012 ^a	1.17 ± 0.095 ^a	1.46 ± 0.058 ^b	1.0 ± 0.018 ^a	1.18 ± 0.018 ^b	1.26 ± 0.065 ^b
	Atg6	1.0 ± 0.046 ^a	1.34 ± 0.065 ^b	1.35 ± 0.101 ^b	1.0 ± 0.029 ^a	1.27 ± 0.105 ^a	0.94 ± 0.113 ^a
	Atg7	1.0 ± 0.009 ^a	1.26 ± 0.131 ^b	1.36 ± 0.042 ^b	1.0 ± 0.025 ^a	1.21 ± 0.142 ^b	1.38 ± 0.082 ^b
	Atg8a	1.0 ± 0.046 ^a	0.92 ± 0.035 ^a	1.16 ± 0.020 ^b	1.0 ± 0.033 ^a	1.46 ± 0.048 ^b	1.02 ± 0.105 ^a
	Atg8b	1.0 ± 0.078 ^a	1.84 ± 0.267 ^b	2.01 ± 0.063 ^b	1.0 ± 0.032 ^a	1.47 ± 0.085 ^b	1.73 ± 0.018 ^a
	Atg9	1.0 ± 0.028 ^a	0.98 ± 0.085 ^a	1.05 ± 0.035 ^a	1.0 ± 0.002 ^a	1.14 ± 0.086 ^a	1.20 ± 0.096 ^a
	Atg12	1.0 ± 0.041 ^a	1.43 ± 0.030 ^b	1.25 ± 0.044 ^a	1.0 ± 0.099 ^a	1.30 ± 0.071 ^b	1.39 ± 0.072 ^b
	Atg13	1.0 ± 0.042 ^a	0.98 ± 0.157 ^a	1.60 ± 0.030 ^b	1.0 ± 0.008 ^a	0.94 ± 0.106 ^a	1.06 ± 0.092 ^a
	Atg18a	1.0 ± 0.281 ^a	0.25 ± 0.022 ^b	0.07 ± 0.046 ^b	1.0 ± 0.053 ^a	0.98 ± 0.060 ^a	1.11 ± 0.047 ^a
AKT/PDK/Tor	AKT	1.0 ± 0.052 ^a	0.89 ± 0.061 ^a	1.06 ± 0.041 ^a	1.0 ± 0.088 ^a	1.12 ± 0.117 ^a	0.98 ± 0.166 ^a
	S6K	1.0 ± 0.131 ^a	1.50 ± 0.171 ^b	2.0 ± 0.126 ^a	1.0 ± 0.042 ^a	1.44 ± 0.087 ^b	1.15 ± 0.106 ^a
	PI3K	1.0 ± 0.092 ^a	0.87 ± 0.137 ^a	0.91 ± 0.094 ^a	1.0 ± 0.083 ^a	0.90 ± 0.041 ^a	0.77 ± 0.028 ^b
	Tor	1.0 ± 0.232 ^a	0.77 ± 0.175 ^a	0.56 ± 0.022 ^a	1.0 ± 0.041 ^a	0.82 ± 0.081 ^b	0.44 ± 0.029 ^a
	foxo	1.0 ± 0.065 ^a	1.02 ± 0.061 ^a	1.09 ± 0.015 ^a	1.0 ± 0.045 ^a	1.09 ± 0.022 ^a	0.82 ± 0.055 ^b
Gustatory receptors	Gr64a	1.0 ± 0.247 ^a	1.70 ± 0.086 ^b	2.29 ± 0.146 ^a	1.0 ± 0.085 ^a	1.72 ± 0.547 ^a	1.55 ± 0.213 ^a
	Gr64b	1.0 ± 0.089 ^a	2.94 ± 0.193 ^b	1.22 ± 0.291 ^a	1.0 ± 0.223 ^a	0.12 ± 0.044 ^b	0.64 ± 0.019 ^a
	Gr64c	1.0 ± 0.151 ^a	2.38 ± 0.147 ^b	1.91 ± 0.129 ^a	1.0 ± 0.212 ^a	0.28 ± 0.120 ^b	0.27 ± 0.082 ^b
	Gr64d	1.0 ± 0.082 ^a	0.70 ± 0.148 ^a	0.87 ± 0.045 ^a	1.0 ± 0.090 ^a	0.47 ± 0.075 ^b	0.62 ± 0.054 ^b
	Gr64e	1.0 ± 0.046 ^a	1.0 ± 0.136 ^a	1.37 ± 0.040 ^a	1.0 ± 0.090 ^a	0.98 ± 0.073 ^a	1.76 ± 0.068 ^b
	Gr64f	1.0 ± 0.108 ^a	1.39 ± 0.109 ^b	0.60 ± 0.072 ^b	1.0 ± 0.155 ^a	0.80 ± 0.088 ^a	1.39 ± 0.099 ^a

도면3

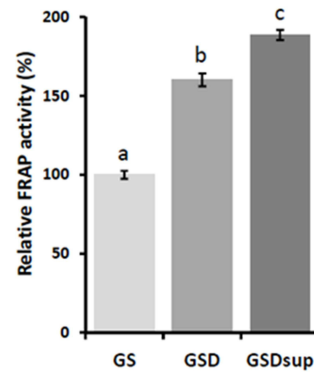


도면4

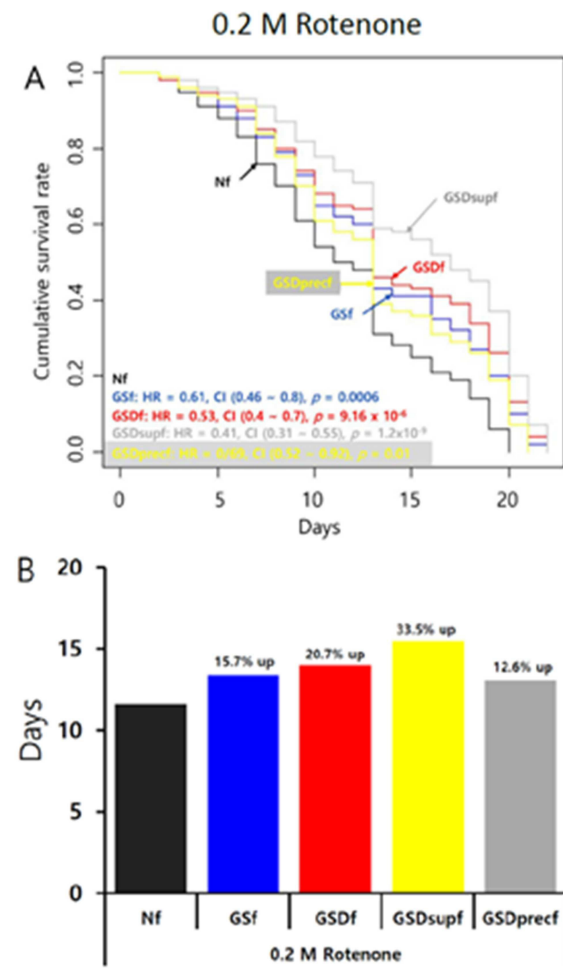
A Total phenolic compound



B FRAP activity



도면5



도면6

