

(19)대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(51) 。 Int. Cl. ⁷ A23K 1/00	(45) 공고일자 (11) 등록번호 (24) 등록일자	2005년09월07일 10-0513141 2005년08월31일
---	-------------------------------------	--

(21) 출원번호	10-2003-0016188	(65) 공개번호	10-2004-0081641
(22) 출원일자	2003년03월14일	(43) 공개일자	2004년09월22일

(73) 특허권자 (주)바이오토피아
경기 안성시 서운면 신기리 48번지

(72) 발명자 성수일
서울특별시강남구청담동134-21삼익아파트12-803호

김근
서울특별시서초구방배동725방배삼호아파트라동502호

황교열
경기도화성군봉담읍수기리1-64A-208

이재연
경기도화성군봉담읍와우리210-26수성효성아파트1-12

김현수
경기도성남시수정구양지동184(3/5)

(74) 대리인 신동인

심사관 : 박영관

(54) 1-데옥시노지리마이신을 함유하는 기능성 계란의 생산방법

요약

본 발명은 1-데옥시노지리마이신(1-deoxynojirimycin, 1-DNJ)을 함유하는 기능성 계란 및 그 생산방법에 관한 것이다.

본 발명의 생산방법은, 바실러스 서브틸리스 모리(*Bacillus subtilis* MORI)균에 의해 생산된 1-데옥시노지리마이신을 유효성분으로 포함하는 사료첨가제를 통상적인 산란계용 사료와 혼합하여 산란양계에 급여함으로써 본 발명에 따른 1-데옥시노지리마이신을 함유하는 기능성 계란을 생산하는 것을 특징으로 하며, 상기 생산방법에 의해 산란된 본 발명의 계란은 영양뿐만 아니라 혈당 강하, 항바이러스 및 암세포 전이방지 기능이 탁월하다.

색인어

1-데옥시노지리마이신, 기능성 계란, 바실러스 서브틸리스 모리균, 뽕나무, 누에가루, 혈당 강하, 항바이러스, 생산방법

명세서

발명의 상세한 설명

발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

본 발명은 혈당 강하, 항바이러스 및 암세포 전이방지 기능을 갖는 1-데옥시노지리마이신을 함유한 기능성 계란 및 그 생산방법에 관한 것이다.

1-데옥시노지리마이신(1-deoxynojirimycin, 1-DNJ)은 혈당 강하, 항바이러스 및 암세포 전이방지 기능이 있으며, 이의 화학적 유도체는 의약품으로 활용되고 있다. 천연적인 1-데옥시노지리마이신은 식물체 중에 다양하게 존재하며 최근에는 뽕나무(*Morus alba* L.)와 그 뽕나무를 섭식한 누에의 체내에 더 많은 양의 1-데옥시노지리마이신이 축적되어 있다는 보고가 있고, 또한 몇몇 종류의 미생물에서도 천연의 1-데옥시노지리마이신을 생산한다는 보고가 있다(Hardick D. J. and Hutchinson D. W., The biosynthesis of 1-deoxynojirimycin in *Bacillus subtilis var niger.*, *Biochem.* **49(30)**, pp6707-6716(1993)).

숙주세포의 소포체기구를 이용하여 당단백질을 합성하는 메커니즘 (mechanism)을 갖는 바이러스의 경우, 바이러스가 세포내에 감염하여 자기복제 (replication)와 당단백질 합성(glycoprotein synthesis)시 1-데옥시노지리마이신이 알파-글루코시다아제(α -glucosidase)의 활성을 억제하여 당단백질의 합성을 막게 됨으로서 최종적으로 바이러스 증식을 억제할 수 있는 것으로 알려져 있다(Shimizu, H., *et al.*, Inhibitory effect of novel 1-deoxynojirimycin derivatives on HIV-1 replication. *AIDS* **4(10)**, pp975-979, 1990). 1-데옥시노지리마이신에 의해 억제될 수 있는 바이러스의 종류로는 인간의 에이즈 바이러스(HIV virus), 간염 바이러스(Hepatitis virus), 인플루엔자 바이러스(Influenza A virus), 뎅기(Dengue) 바이러스, 일본뇌염(Japanese encephalitis) 바이러스 및 송아지 설사(Bovine viral diarrhea) 바이러스 등 여러 가지가 있다(Raymond A. Dwek, *et al.*, Zitmann, Targeting glycosylation as a therapeutic approach, *NATURE REVIEWS/DRUG DISCOVERY*, Vol 1, January 2002).

또한, 1-데옥시노지리마이신은, 소화기내에서 전분, 올리고당 및 말토오스를 분해하여 혈액으로 흡수할 수 있도록 작용하는 알파-글루코시다아제의 활성을 억제하여 식후에 급격한 혈당상승을 방지하는 기능을 가지고 있다. 특히, 1-데옥시노지리마이신은 포유동물의 소장내에 존재하는 알파-글루코시다아제에 대한 저해능력이 우수하여 소장내에서 혈액으로 포도당 유입을 저해함으로써, 오래전부터 식후 고혈당증을 유발하는 인슐린 비의존형 당뇨병(Insulin Independent Diabetes Mellitus)의 치료제로 주목을 받아왔다(Yagi et al., *Nippon Nogeikagaku kaishi*, **50**, pp571-572, 1976).

그러나, 1-데옥시노지리마이신은 고가의 천연 원료의약품이기 때문에 쉽게 생활에 이용되지 못하고 있는 실정이며, 일부 뽕잎차 또는 누에가루를 통하여 1-데옥시노지리마이신을 섭취함으로써 혈당강하 효과를 기대하고 있으나 1-데옥시노지리마이신은 뽕잎의 단단한 구조에서 쉽게 추출되지 않는 단점이 있고, 누에가루의 경우는 혐오감 또는 거부감으로 인하여 섭취가 어렵고, 일상적인 식단과는 별개로 섭취해야 하는 문제점이 존재하였다.

계란은 오래전부터 식단의 하나로 구성되어 있으며, 비타민 C를 제외한 13 종의 비타민, 아미노산, 무기질이 골고루 들어 있고, 지방도 소화 흡수되기 쉬운 형태로 들어 있어 성장기의 어린이에게는 양질의 영양소를 제공하는 완전식품이며, 간에 쌓이기 쉬운 지방을 제거해 주는 레시틴(lecithin)이 많이 들어 있어 성인에게는 성인병을 예방할 수 있도록 하는 건강식품이다. 최근 들어 계란에 기능성을 갖도록 생산하는 기능성계란이 다양하게 생산되고 있으나, 아직까지 1-데옥시노지리마이신을 함유한 기능성 계란에 대한 연구가 거의 없는 실정이다.

이에 본 발명자들은 1-데옥시노지리마이신을 계란에 이행시켜 본 계란을 섭취함으로써 1-데옥시노지리마이신의 유효한 효과를 얻고자, 바실러스 서브틸리스 모리균에 의해 생산된 1-데옥시노지리마이신을 유효성분으로 포함하는 사료첨가제를 산란양계에 급여한 결과, 산란된 계란에 1-데옥시노지리마이신이 다량 함유됨을 확인하고 본 발명을 완성하였다.

발명이 이루고자 하는 기술적 과제

본 발명의 목적은 혈당 강하, 항바이러스 및 암세포 전이 방지기능을 갖는 1-데옥시노지리마이신을 함유하는 기능성 계란 및 그의 생산방법을 제공하는 것이다.

발명의 구성 및 작용

상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 바실러스 서브틸리스 모리(*Bacillus subtilis* MORI)균(기탁기관: 한국미생물보존센터, 기탁일: 2002년 12월 02일, 수탁번호: KCCM-10450)에 의해 생산되는 1-데옥시노지리마이신(1-deoxynojirimycin, 1-DNJ)을 필수 유효성분으로 포함하는 사료첨가제를 통상적인 산란계용 사료에 혼합 및 일정기간 급여함을 특징으로 하는 1-데옥시노지리마이신을 함유하는 기능성 계란 생산방법을 제공한다.

이때, 상기 사료첨가제는 뽕나무, 그의 추출물 및 누에가루로 이루어진 균으로부터 선택된 1종 이상의 성분을 추가적으로 더 포함할 수 있다.

또한, 사료첨가제는 산란양계 사료 총 중량에 대해 0.1 내지 10중량%로 포함되는 것이 바람직하고, 보다 바람직하게는 0.5 내지 1.0 중량%로 포함된다.

상기 생산방법에 있어서, 사료의 급여기간은 7일 내지 21일간이 바람직하다.

이하 본 발명을 상세히 설명한다.

본 발명의 1-데옥시노지리마이신을 함유하는 기능성 계란은 바실러스 서브틸리스 모리균에 의해 생산된 고농도의 1-데옥시노지리마이신을 포함하는 사료첨가제를 통상적인 산란계용 사료와 혼합한 후 산란양계에 일정기간 급여함으로써 얻어질 수 있다.

또한, 본 발명의 1-데옥시노지리마이신을 함유하는 기능성 계란은 바실러스 서브틸리스 모리균에 의해 생산된 고농도의 1-데옥시노지리마이신을 포함하는 사료첨가제와 뽕나무, 그의 추출물 및 누에가루로 이루어진 균으로부터 선택된 1종 이상의 성분을 혼합한 후, 통상적인 산란계용 사료에 혼합하여 산란양계에 일정기간 급여함으로써 얻어질 수 있다.

본 발명은 또한 상기 생산방법에 의해 얻어진 1-데옥시노지리마이신을 함유하는 기능성 계란을 제공한다.

본 발명자들은 1-데옥시노지리마이신을 다량 함유하는 뽕나무, 누에, 바실러스 서브틸리스 모리균을 배양하여 생산한 사료첨가제 및 이들의 조합을 0.5 및 1.0 중량%씩 산란양계에 각각 급여한 결과, 1-데옥시노지리마이신을 포함한 몇몇 알칼로이드(polyhydroxylated alkaloids) 성분이 계란으로 이행됨을 확인하였다. 바실러스 서브틸리스 모리균에 의해 생산된 사료첨가제를 급여한 닭의 계란에는 높은 농도의 1-데옥시노지리마이신이 함유되어 있었으며, 특히 누에가루와 1-데옥시노지리마이신을 조합한 사료첨가제를 급여한 경우가 가장 높은 1-데옥시노지리마이신을 함유한 계란을 생산하였다.

이하 본 발명을 실시예에 의하여 상세히 설명한다.

단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것 일뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예 및 실험예에 한정되는 것은 아니다.

실시예 1. 사료의 제조

건조뽕잎(황원양잠농업협동조합에서 구입, 강원도 횡성 읍내리 소재)을 일반 산란양계 사료에 0.5 및 1.0 중량%로 혼합하여 본 발명의 사료로 각각 사용하였다.

실시예 2. 사료의 제조

열풍건조한 누에가루(황원양잠농업협동조합에서 구입, 강원도 횡성 읍내리 소재)를 일반 산란양계 사료에 0.5 및 1.0 중량%로 혼합하여 본 발명의 사료로 각각 사용하였다.

실시예 3. 사료의 제조

동결 건조한 누에가루(황원양잠농업협동조합에서 구입, 강원도 횡성 읍내리 소재)를 일반 산란양계 사료에 0.5 및 1.0 중량%로 혼합하여 본 발명의 사료로 각각 사용하였다.

실시예 4. 사료의 제조

바실러스 서브틸리스 모리균을 1% 포도당, 0.5% 대두분, 0.3% 효모추출물이 함유된 액상배지에서 37℃, 0.45 g(중력가속도)의 조건으로 5일간 진탕배양하여 생산한 사료첨가제(1-데옥시노지리마이신 함량: 8.9g/kg)를 일반 산란양계 사료에 0.5 및 1.0 중량%로 혼합하여 본 발명의 사료로 각각 사용하였다.

실시예 5. 사료의 제조

건조빵잎과 바실러스 서브틸리스 모리균을 상기 실시예 4에서와 동일한 방법으로 배양하여 생산한 사료첨가제(1-데옥시노지리마이신 함량: 8.9g/kg)가 동량으로 혼합한 후 일반 산란양계 사료에 0.5 및 1.0 중량%로 혼합하여 본 발명의 사료로 각각 사용하였다.

실시예 6. 사료의 제조

열풍건조한 누에가루와 바실러스 서브틸리스 모리균을 상기 실시예 4에서와 동일한 방법으로 배양하여 생산한 사료첨가제(1-데옥시노지리마이신 함량: 8.9g/kg)를 동량으로 혼합한 후 일반 산란양계 사료에 0.5 및 1.0 중량%로 혼합하여 본 발명의 사료로 각각 사용하였다.

실시예 7. 사료의 제조

동결 건조한 누에가루와 바실러스 서브틸리스 모리균을 상기 실시예 4에서와 동일한 방법으로 배양하여 생산한 사료첨가제(1-데옥시노지리마이신 함량: 8.9g/kg)를 동량으로 혼합한 후 일반 산란양계 사료에 0.5 및 1.0 중량%로 혼합하여 본 발명의 사료로 각각 사용하였다.

실험예 1. 알파 글루코시다제 효소활성 억제 실험

본 발명의 실시예 1 내지 실시예 7에서 제조된 각각의 사료를 산란양계에 급여하여 얻은 계란의 알파 글루코시다제 효소활성 억제능을 확인하기 위하여, 하기와 같이 실시하였다.

실시예 1 내지 실시예 7의 각 사료를 27주령의 산란양계에 급여하였으며, 닭 1마리당 하루에 각각 혼합된 사료 100g 정도를 매일 급여한 후 3주가 경과한 다음 산란된 계란을 모아 분석을 실시하였다. 각 사료첨가제가 포함된 사료를 급여한 계란과 급여하지 않은 계란의 난백을 제거한 다음 난황만을 얻고, 난황 100g에 증류수 400ml를 넣고 잘 저은 다음 호모게나이저(homogenizer)로 2000 g(중력가속도)로 5분간 교반하였으며, 이 시료를 1280 g로 20분간 원심분리하여 상등액을 취하고, 상등액 100ml를 취하여 진공농축기에서 10ml로 농축하였다. 농축된 시료에 메탄올 90ml를 넣고, 잘 흔들어 난백질 성분이 침전되도록 한 다음 1280 g로 2분간 원심분리하여 상등액을 취하고 상등액 50ml를 취하여 진공농축하여 최종 용량을 5ml로 조정하였다.

실험에 사용한 효소 및 기질은 시그마(Sigma)사에서 구입하였고, 알파-글루코시다아제는 12mM의 파라-니트로페닐-알파-D-글루코피라노시드를 기질 400μl와 시료 200μl 첨가하여 45분 동안 반응시킨 후, 400μl의 200mM 탄산나트륨으로 반응을 정지시킨 다음 405nm에서 흡광도를 측정하였다.

실험 결과, 바실러스 서브틸리스 모리균을 배양하여 생산한 사료첨가제를 급여하여 산란된 계란이 탁월한 알파-글루코시다아제 억제능을 나타냄을 확인할 수 있었으며, 빵잎, 누에가루 등의 단독 첨가시보다 각 성분들의 조합물을 급여하여 산란된 계란에서 효소 억제능이 농도의존적으로 증가함을 확인할 수 있었다(표 1 참조).

표 1.
알파-글루코시다아제 억제효과

실시예	알파-글루코시다아제 억제능 (%)	
실시예 1	무첨가	1.1
	0.5% 첨가	3.3
	1.0% 첨가	5.9

실시예 2	무첨가	1.9
	0.5% 첨가	4.7
	1.0% 첨가	7.9
실시예 3	무첨가	1.3
	0.5% 첨가	6.2
	1.0% 첨가	10.8
실시예 4	무첨가	1.5
	0.5% 첨가	15.7
	1.0% 첨가	24.5
실시예 5	무첨가	1.3
	0.5% 첨가	7.7
	1.0% 첨가	15.4
실시예 6	무첨가	1.7
	0.5% 첨가	8.3
	1.0% 첨가	17.9
실시예 7	무첨가	2.1
	0.5% 첨가	14.1
	1.0% 첨가	21.6

실험예 2. 1-데옥시노지리마이신(1-DNJ) 함량 실험

본 발명의 실시예 1 내지 실시예 7에서 제조된 각 사료를 급여하여 산란된 계란의 1-데옥시노지리마이신 함량을 확인하기 위하여, 하기와 같이 실시하였다.

실시예 1 내지 실시예 7의 각 사료를 27주령의 산란양계에 급여하였으며, 닭 1마리당 하루에 각각 혼합된 사료 100g 정도를 매일 급여한 후 3주가 경과한 다음 산란된 계란을 모아 분석을 실시하였다. 각 사료첨가제가 포함된 사료를 급여한 계란과 급여하지 않은 계란의 난백을 제거한 다음 난황만을 얻고, 난황 100g에 증류수 400ml를 넣고 잘 저은 다음 호모게나이저(homogenizer)로 2000 g(중력가속도)로 5분간 교반하였으며, 이 시료를 1280 g로 20분간 원심분리하여 상등액을 취하고, 상등액 100ml를 취하여 진공농축기에서 10ml로 농축하였다. 농축된 시료에 메탄올 90ml를 넣고, 잘 흔들어 난백질 성분이 침전되도록 한 다음 1280 g로 2분간 원심분리하여 상등액을 취한 후 50ml의 상등액을 취하여 진공농축하고, 최종 용량을 5ml로 조정하였다.

HPLC 분석을 위해 시료 10 μ l에 9-플루렌닐메틸 클로로포르메이트(9-fluorenylmethyl chloroformate, FMOC, Sigma) 10 μ l를 가해 20 $^{\circ}$ C에서 20분간 반응시킨 후 0.1M의 글리신을 넣어 반응을 정지시켰으며, 이 반응액에 0.1% 초산을 950 μ l 첨가하여 1ml로 맞춘 후 0.2 μ m 주사여과로 여과한 후 10 μ l씩 컬럼에 주입하였다. 사용한 컬럼 종류(Phenomenex Luna C₁₈, 4.60 \times 250mm I.D., 50 μ m), 용매는 아세트니트릴-0.1% 초산(1:1, v/v)에서 용출하였으며, 용출속도는 1ml/분, 검출은 FL3000 형광검출기(excitation 254nm, emission 322nm, FL3000, 휴렉팩커드, 미국), 분석 프로그램은 크롬퀘스트(ChromQuestTM, Version 2.51)를 각각 사용하였다.

난황 100g중의 1-데옥시노지리마이신 함량을 알아본 결과, 바실러스 서브틸리스 모리균에 의해 생산된 사료첨가제를 급여하여 산란된 계란에서 그 함량이 탁월함을 확인할 수 있었으며, 단독 첨가보다 빵잎, 누에가루 및 바실러스 서브틸리스 모리균에 의해 생산된 사료첨가제의 조합물을 급여하여 산란된 계란에서 훨씬 더 많은 양의 1-데옥시노지리마이신을 포함함을 알 수 있었다(표 2 참조).

표 2.
난황중의 1-데옥시노지리마이신의 함량분석

실시예	첨가	난황 100g중 1-DNJ 함량(μ g)
실시예 1	무첨가	0.3
	0.5% 첨가	10.8
	1.0% 첨가	25.7

실시예 2	무첨가	0.2
	0.5% 첨가	13.9
	1.0% 첨가	28.0
실시예 3	무첨가	0.1
	0.5% 첨가	25.5
	1.0% 첨가	31.5
실시예 4	무첨가	0.2
	0.5% 첨가	40.5
	1.0% 첨가	61.5
실시예 5	무첨가	0.2
	0.5% 첨가	24.2
	1.0% 첨가	39.3
실시예 6	무첨가	0.3
	0.5% 첨가	28.4
	1.0% 첨가	40.6
실시예 7	무첨가	0.1
	0.5% 첨가	37.4
	1.0% 첨가	50.9

발명의 효과

본 발명의 생산방법에 따라 바실러스 서브틸리스 모리(*Bacillus subtilis* MORI)균에 의해 생산되는 1-데옥시노지리마이신(1-deoxynojirimycin, 1-DNJ)을 필수 유효성분으로 포함하는 사료첨가제를 통상적인 산란계용 사료에 혼합하여 산란양계에 급여함으로써 생산된 본 발명의 기능성 계란은 높은 영양뿐만 아니라 혈당 강하 기능이 탁월하여 국민건강에 기여할 수 있다.

(57) 청구의 범위

청구항 1.

바실러스 서브틸리스 모리(*Bacillus subtilis* MORI)균에 의해 생산되는 1-데옥시노지리마이신(1-deoxynojirimycin, 1-DNJ)을 필수 유효성분으로 포함하는 사료첨가제를 통상적인 산란계용 사료에 혼합 및 7 내지 21일간 급여함을 특징으로 하는 1-데옥시노지리마이신을 함유하는 기능성 계란의 생산방법.

청구항 2.

제 1항에 있어서, 상기 사료첨가제가 뽕나무, 그의 추출물 및 누에가루로 이루어진 균으로부터 선택된 1종 이상의 성분을 추가적으로 더 포함하는 것을 특징으로 하는 생산방법.

청구항 3.

제 1항에 있어서, 상기 사료첨가제가 산란양계 사료 총 중량에 대해 0.1 내지 10 중량%로 포함되는 것을 특징으로 하는 생산방법.

청구항 4.

제 3항에 있어서, 상기 사료첨가제가 산란양계 사료 총 중량에 대해 0.5 내지 1.0 중량%를 포함되는 것을 특징으로 하는 생산방법.

청구항 5.

삭제

청구항 6.

제 1항에 기재된 생산방법으로 얻어진 1-테옥시노지리마이신을 함유하는 기능성 계란.