



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2016년09월22일
 (11) 등록번호 10-1656535
 (24) 등록일자 2016년09월05일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
 A23L 1/305 (2006.01) A23J 1/08 (2006.01)
 A23J 3/34 (2006.01) A23L 2/66 (2006.01)
 (21) 출원번호 10-2010-7026513
 (22) 출원일자(국제) 2009년04월09일
 심사청구일자 2014년04월01일
 (85) 번역문제출일자 2010년11월26일
 (65) 공개번호 10-2010-0135317
 (43) 공개일자 2010년12월24일
 (86) 국제출원번호 PCT/EP2009/054315
 (87) 국제공개번호 WO 2009/132951
 국제공개일자 2009년11월05일
 (30) 우선권주장
 08155387.7 2008년04월29일
 유럽특허청(EPO)(EP)
 (56) 선행기술조사문헌
 KR1020040031688 A*
 David Benton 외 1명, 'Carbohydrate, Memory,
 and Mood', Nutrition Reviews 제61권, 제5호,
 S61~S67쪽, 2003년 5월 1일 공개.*
 *는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
 디에스엠 아이피 어셋츠 비.브이.
 네덜란드 엔엘-6411 티이 헤르렌 헤트 오버룬 1
 (72) 발명자
 반 베크호벤 루돌프 프란시스쿠스 더블유 엠
 네덜란드 엔엘-4854 이제이 바벨 자코바 반 하인
 스페르그스트라트 2
 두카테우 알렉산더 루시아 레오나르두스
 벨기에 비-3620 라나켄 스피츠스트라트 83
 (뒷면에 계속)
 (74) 대리인
 제일특허법인, 장성구

전체 청구항 수 : 총 11 항

심사관 : 엄금희

(54) 발명의 명칭 **트립토판을 포함하는 펩티드 및 탄수화물을 포함하는 조성물**

(57) 요약

본 발명은 트립토판이 풍부한 펩티드를 포함하는 식용 조성물로서, 신속히 이용가능한 글루코스 조성물 및 천천히 이용가능한 글루코스 조성물을 추가로 포함하는 식용 조성물에 관한 것이다.

(72) 발명자

에덴스 루포

네덜란드 엔엘-3062 제이엘 로테르담 호프라안 118

클라인헤렌브링크 프란시쿠스 안토니우스 엠

네덜란드 엔엘-3133 에이티 블라르딘겐 올리비에르
반 누르트라안 120 유니레버 알 앤드 디 블라르딘
겐

클로엑 조리스

네덜란드 엔엘-2803 알케이 가우다 텀가르테 1

루스 안드레 레오나르두스

네덜란드 엔엘-2614 티비 델프트 호프 반 아주르
33

명세서

청구범위

청구항 1

2개 이상의 상이한 수용성 트립토판-함유 펩티드를 포함하는 제형으로서, 제형의 트립토판/거대 중성 아미노산(LNAA) 비가 0.15 이상이고, 트립토판-함유 펩티드가 알라닌-트립토판(AW) 또는 글리신-아스파라긴-트립토판(GNW)를 포함하고, 제형이 신속히 이용가능한 글루코스(RAG) 조성물 및 천천히 이용가능한 글루코스(SAG) 조성물을 추가로 포함하되, RAG 조성물 및 SAG 조성물이 1:0.5 내지 1:4의 RAG 조성물:SAG 조성물의 건조 중량 비로 제형에 존재하고, RAG 조성물이 글루코스, 수크로스, 말토덱스트린, 전분, 전분 가수분해물, 텍스트로스 또는 이들의 혼합물중 하나 이상을 포함하며 SAG 조성물이 1,000 내지 45,000달톤의 수 평균 분자량을 갖는 풀루란, 이소말톨로스, 트레할로스 또는 이들의 혼합물중 하나 이상을 포함하는 제형.

청구항 2

제 1 항에 있어서,

트립토판-함유 펩티드:RAG 조성물의 중량 비가 1:2 내지 1:20인 제형.

청구항 3

삭제

청구항 4

제 1 항에 있어서,

트립토판-함유 펩티드가 펩티드 AW 및 GNW를 포함하고, AW:GNW의 몰 비가 1:2 내지 10:1인 제형.

청구항 5

다이- 또는 트라이펩티드인 2개 이상의 상이한 트립토판-함유 펩티드를 포함하는 제형으로서, 상기 2개 이상의 상이한 트립토판-함유 펩티드가 각각 제형에 함유된 다이- 및 트라이펩티드의 총량의 5몰% 이상의 양으로 존재하고, 총 트립토판의 30몰% 초과가 펩티드-결합된 트립토판으로서 존재하고, 트립토판-함유 펩티드가 펩티드 알라닌-트립토판(AW) 또는 글리신-아스파라긴-트립토판(GNW)를 포함하고, 제형이 신속히 이용가능한 글루코스(RAG) 조성물 및 천천히 이용가능한 글루코스(SAG) 조성물을 추가로 포함하되, RAG 조성물 및 SAG 조성물이 1:0.5 내지 1:4의 RAG 조성물:SAG 조성물의 건조 중량 비로 제형에 존재하고, RAG 조성물이 글루코스, 수크로스, 말토덱스트린, 전분, 전분 가수분해물, 텍스트로스 또는 이들의 혼합물중 하나 이상을 포함하며 SAG 조성물이 1,000 내지 45,000달톤의 수 평균 분자량을 갖는 풀루란, 이소말톨로스, 트레할로스 또는 이들의 혼합물중 하나 이상을 포함하는 제형.

청구항 6

제 5 항에 있어서,

트립토판-함유 펩티드:RAG 조성물의 중량 비가 1:2 내지 1:20인 제형.

청구항 7

제 1 항에 있어서,

트립토판-함유 펩티드가 리소자임의 가수분해에 의해 수득되는 제형.

청구항 8

삭제

청구항 9

삭제

청구항 10

제 1 항에 있어서,
신속히 이용가능한 글루코스 및 천천히 이용가능한 글루코스의 총량이 총 제형의 5 내지 20중량%인 제형.

청구항 11

제 1 항에 있어서,
즉석 소비제 제형을 기준으로 0.5 내지 5%의 건조 중량의 트립토판-함유 펩티드 조성물을 포함하는 제형.

청구항 12

제 1 항, 제 2 항, 제 4 항 내지 제 7 항, 제 10 항 및 제 11 항중 어느 한 항에 따른 제형을 포함하는 식품.

청구항 13

제 11 항에 있어서,
즉석 음료 액체의 형태인 제형.

청구항 14

제 12 항에 있어서,
1 내지 20중량%의 제형을 포함하는 식품.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 신속히 이용가능한 글루코스 및 천천히 이용가능한 글루코스(즉, "패스트(fast)" 및 "슬로우(slow)" 탄수화물)와 함께 트립토판-함유 펩티드를 포함하는 제형에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 최근에, 트립토판이 뇌에 흡수되는 경우, 이러한 트립토판이 인간 거동, 기분, 뇌 기능, 뇌 발달의 수개의 양상에 대해 갖는 것으로 여겨지는 이익에 대한 다양한 보고서가 존재한다. 이러한 보고서의 예는 국제특허공개 제 WO 99/55174호, 제WO 00/42868호, 제WO 2005/023017호이다.

[0003] 트립토판은 많은 단백질, 예를 들어, 유장 단백질에 존재하는 아미노산일 뿐만 아니라, 동물 단백질도 트립토판을 함유한다. 트립토판은 트립토판을 함유하는 단백질의 섭취 후에 혈액내에 흡수될 수 있고, 혈액으로부터 뇌에 흡수될 수 있다. 그러나, 트립토판은 흡수되는 유일한 아미노산이 아니고, 사실 평균적인 동물 단백질 조성물이 섭취되는 경우, 뇌에 흡수되는 트립토판의 수준은 다른 아미노산의 경쟁적인 흡수에 기인하여 매우 낮아서, 통상적으로 트립토판에 의한 유의한 효과가 전혀 관찰될 수 없다. 따라서, 상기 언급된 대부분의 보고서는 트립토판이 풍부한 단백질 또는 단백질-분획, 또는 유리 아미노산 트립토판(후자는 임의적으로 (optionally) 다른 유리 아미노산 및/또는 단백질과 조합됨)을 사용한다.

[0004] 유리 아미노산으로서 트립토판의 사용은 많은 국가의 식품 법률이 식료품내 유리 아미노산으로서의 트립토판의 사용을 제한한다는 점에서 불리하다.

[0005] 트립토판-풍부 단백질은 트립토판의 수준 및 거대 중성 아미노산에 대한 이의 비에 대한 자연적인 제한을 가지고, 이는 뇌에 의한 트립토판의 흡수와 관련이 있다.

[0006] 최근에, 트립토판이 풍부한 펩티드가 목적 효과를 위해 뇌에서 충분한 트립토판을 얻을 수 있는 양호한 공급원일 수 있고, 유리 아미노산보다 식료품에 보다 용이하게 적용될 수 있는 것으로 이해된다. 이러한 트립토판이 풍부한 펩티드는 바람직하게는 아미노산이 적고, 뇌로의 흡수의 경쟁이 높은 것으로 여겨진다: 소위 거대 중성

아미노산(LNAA), 예를 들어 류신, 이소류신, 발린, 티로신, 페닐알라닌(또한, LNAA의 정의에 따라서 메티오닌이 사용됨). 따라서, 높은 수준의 트립토판을 함유하고, 높은 비의 트립토판/LNAA를 갖는 펩티드 제제를 제공하는 것이 바람직하다. 메티오닌은 본 발명의 맥락에서 어떠한 이로운 대사 효과도 갖지 않는 것으로 간주되고, 이에 따라, 본 발명의 목적을 위한 LNAA중 하나로서 간주되지 않는다.

[0007] 유럽특허 제661004호는, 예를 들어 텍스트린과 함께 트립토판을 포함하는 동물 사료를 개시한다. 상기 조성물은 동물이 식욕이 없는 경우에 높은 환경 온도에서 체중의 증가 및 성장을 유지하기 위한 것이다.

[0008] 국제특허공개 제WO 2004/112803호는 신속히 소화가능한 탄수화물과 함께 높은 트립토판/LNAA 비를 갖는 단백질을 함유하는 조성물을 제공함으로써, 월경 전 증후군의 증상을 관리하는 방법을 개시한다.

[0009] 국제특허공개 제WO 2006/130567호는 최소 단백질 함량을 갖는 탄수화물-풍부 조성물, 또는 트립토판 또는 트립토판-풍부 단백질 또는 펩티드를 함유하는 탄수화물-풍부 조성물을 대상에게 투여함으로써, 겨울 우울증, 계절적 정서 장애(SAD) 및 우울 장애; 및 탄수화물 갈망, 체중 증가 및 이와 관련된 기분 증후군을 치료하는 방법을 개시한다.

[0010] 미국특허공개 제US2003039739호에서, 위산 과다증 또는 위식도 역류에 걸리기 쉬운 개인에 적합한 조성물 및 체중 감소 방법이 기술된다. 상기 조성물은 2개 이상의 신속히 소화가능한 탄수화물을 갖는 스낵 식품을 부분적으로 포함하고, 이때 식료품, 또는 식료품 및 물의 수성 혼합물은 약 6 이상의 pH를 갖고, 상기 스낵은 실질적으로 단백질이 없다. 상기 발명의 실험/시험 계획은 단백질 및 탄수화물의 양을 각각의 식사 및 스낵에서 상이하게 할당함으로써, 점심 및 저녁 식사 후 순환하는 거대 중성 아미노산에 대한 혈장 트립토판의 비가 감소하지 않도록 하여, 상기 비가 탄수화물-풍부 스낵의 소비에 따라 상당히 증가되도록 하는 것이다.

[0011] 국제특허공개 제WO 02/46210호에서, 유장 단백질 가수분해물내의 트립토판의 수준을 증가시키는 방법이 기술된다. 사용된 방법에서, 유장은 먼저 산성 pH에서 하나 이상의 산 프로테아제, 바람직하게는 펩신, 레닌, 산 곰팡이 프로테아제, 키모신, 파파인, 브로멜라인, 키모파파인 또는 피신에 의해 가수분해된다. 바람직한 항온처리 조건은 pH 1.5 내지 3.5이고, 소수성 성질을 갖는 펩티드를 생성하도록 선택된다. 가수분해는 트립토판 잔기가 거대 소수성 펩티드에 혼입되는 방식으로 조심스럽게 수행된다. 트립토판이 상대적으로 거대한 펩티드에 존재하는 사실에 기인하여, 혈액내로의 트립토판-흡수가 저지되어, 특히 다른 단백질과 조합되는 식품 또는 음료 성분인 제제의 적용 가능성을 제한한다. 이러한 거대 펩티드의 사용의 다른 단점은 이러한 펩티드가 알러지성 반응을 일으킬 수 있다는 점이다. 유장 단백질에 대한 이러한 반응은 널리 공지되어 있다.

[0012] 국제특허공개 제WO 2008/052995호는 추가로 탄수화물을 함유할 수 있는 트립토판-함유 펩티드에 관한 것이다.

[0013] 인슐린은 다양한 조직에 의한 LNAA의 흡수를 선택적으로(selectively) 촉진할 수 있고, 이에 따라 보다 많은 트립토판이 뇌에서의 흡수에 이용가능하도록 한다(LNAA가 뇌에서의 흡수에 대해 트립토판과 경쟁하기 때문에). 따라서, 상당한 수준의 혈장 인슐린은 뇌에 대한 트립토판의 목적 효과에 이로울 수 있다. 이러한 목적 효과는 뇌 기능, 기민성, 수면, 기분, 집중 및 관련 문제에 관한 것이다. 높은 혈장 인슐린 수준은 신속히 소화가능한 탄수화물 및 트립토판-함유 조성물의 존재에 의해 증진될 수 있지만, 섭취 후 약 2시간에 혈당의 급강하를 야기하고/하거나, 뇌가 트립토판의 최대 이익을 갖도록 하고/하거나 최적 뇌 기능, 기민성, 수면, 기분, 집중, 일반적인 인지 및 관련 문제를 위하여, 상당한 수준의 혈당을, 예를 들어 3 내지 4시간 동안 유지할 수 없게 할 수 있다.

[0014]

발명의 내용

[0015] 따라서, 뇌에서의 양호한 흡수를 가능하게 하고, 산업적으로-광범위하게 이용가능한 공급원으로부터 유래하고, 높은 트립토판/LNAA 비, 낮은 알러지유발성을 갖고, 뇌 기능, 기민성, 수면, 기분, 집중, 인지 및 관련 분야중 하나 이상에 이로울 수 있는 제형(예를 들어, 인간, 예컨대 어린이를 위한)에 사용될 수 있는 형태의 트립토판을 제공하는 조성물에 대한 요구가 존재한다.

[0016] 이러한 요구는 이제 2개 이상의 상이한 수용성 트립토판-함유 펩티드(또는 펩티드 조성물)를 포함하는 제형(이때 제형내의 트립토판/LNAA 비는 0.15 이상, 바람직하게는 0.15 내지 1.8임)으로서, 신속히 이용가능한 글루코스(rapidly available glucose: RAG) 조성물 및 천천히 이용가능한 글루코스(slowly available glucose: SAG) 조성물을 추가로 포함하되, RAG 조성물 및 SAG 조성물이 1:0.5 내지 1:4, 바람직하게는 1:0.8 내지 1:3, 더욱 바람직하게는 1:1 내지 1:3의 RAG 조성물:SAG 조성물의 건조 중량 비로 식용 조성물에 존재하는 제형에 의해

(적어도 부분적으로) 달성된다. 이러한 범위는 또한 수시간에 걸쳐 트립토판-흡수 및 뇌 기능 둘다에 이로운 것으로 여겨진다.

- [0017] 바람직하게는, 본 발명에 따른 제형에서, 트립토판-함유 펩티드:RAG 조성물의 중량 비는 1:2 내지 1:20, 바람직하게는 1:3 내지 1:15, 더욱 바람직하게는 1:3 내지 1.8이다. 이러한 범위는 또한 수시간에 걸쳐 트립토판-흡수 및 뇌 기능 둘다에 이로운 것으로 여겨진다.
- [0018] 본 발명에 따른 제형이 즉석 소비재 제품(ready to consume product)을 기준으로 0.5 내지 5%(바람직하게는 0.8 내지 3%)의 건조 중량의 트립토판-함유 펩티드 조성물을 포함하는 것이 또한 본원에서 바람직하고, 이에 따라, 허용가능한 부피 및 트립토판 농도를 갖는 소비재 제품, 예컨대 음료의 용이한 제형화를 가능하게 한다.
- [0019] 본 발명의 추가의 양태는 다이- 및 트라이펩티드인 2개 이상의 상이한 트립토판-함유 펩티드를 포함하는 제형이 되, 상기 2개 이상의 트립토판-함유 펩티드는 각각 제형에 함유된 다이- 및 트라이펩티드의 총량의 5몰% 이상의 양으로 존재하고, 총 트립토판의 30몰% 초과는 펩티드-결합된 트립토판으로서 존재하고, 바람직하게는 40몰% 초과, 더욱 바람직하게는 50몰% 초과, 더욱 더 바람직하게는 60몰% 초과, 더욱 더 바람직하게는 70몰% 초과, 가장 바람직하게는 80몰% 초과, 바람직하게는 0.15 내지 1.8의 트립토판/LNAA 비를 갖고, 제형은 신속히 이용가능한 글루코스(RAG) 조성물 및 천천히 이용가능한 글루코스(SAG) 조성물을 추가로 포함하되, RAG 조성물 및 SAG 조성물은 1:0.5 내지 1:4, 바람직하게는 1:0.8 내지 1:3, 더욱 바람직하게는 1:1 내지 1:3의 RAG 조성물:SAG 조성물의 건조 중량 비로 제형에 존재한다. 이때, 트립토판-함유 펩티드:RAG 조성물의 (건조) 중량 비가 1:2 내지 1:20, 바람직하게는 1:3 내지 1:15, 더욱 바람직하게는 1:3 내지 1.8인 것이 더욱 바람직할 수 있다. 이러한 양 및 범위는 또한 수시간에 걸쳐 트립토판-흡수 및 뇌 기능 둘다에 이로운 것으로 여겨진다.
- [0020] 신속히 이용가능한 글루코스(RAG) 조성물 및 천천히 이용가능한 글루코스(SAG) 조성물은 "발명을 실시하기 위한 구체적인 내용"에 정의된다.
- [0021] 본 발명에 따른 제형이 즉석 소비재 제품을 기준으로 0.5 내지 5%(바람직하게는 0.8 내지 3%)의 건조 중량의 트립토판-함유 펩티드 조성물을 포함하는 것이 또한 본원에서 바람직하다.
- [0022] 본 발명에 따른 제형에서, 트립토판-함유 펩티드 조성물은 바람직하게는 수용성 트립토판-함유 펩티드, 바람직하게는 2개 이상의 수용성 트립토판-함유 펩티드를 포함하고, 바람직하게는 0.15 초과, 바람직하게는 0.15 내지 1.8의 트립토판/LNAA 비를 갖는 조성물을 제조하는 방법으로서, 리소자임, 바람직하게는 달걀 리소자임을 가수분해하여 5 내지 45의 가수분해도(DH)를 갖는 가수분해물을 제조하는 단계, 및 임의적으로 아르기닌-함유 펩티드 또는 리신-함유 펩티드를 제거하는 단계를 포함하는 방법에 의해 획득될 수 있는 트립토판-함유 펩티드를 포함한다. 바람직하게는, 본 발명에 따른 제형에 사용하기 위한 이러한 트립토판-함유 펩티드는 알라닌-트립토판(AW) 또는 글리신-아스파라긴-트립토판(GNW), 더욱 바람직하게는 AW 및 GNW를 포함한다. 상기 가수분해물은 바람직하게는 10 내지 40의 DH를 갖는다. 이러한 양 및 범위는 또한 수시간에 걸쳐 트립토판-흡수 및 뇌 기능 둘다에 이로운 것으로 여겨진다.
- [0023] 본 발명에 따른 제형에서, 트립토판-함유 펩티드 조성물은 바람직하게는 2개 이상의 상이한 수용성 펩티드를 포함하되, 조성물의 몰 트립토판/LNAA 비가 0.15 이상, 바람직하게는 0.15 내지 1.8인 조성물의 형태이다. 바람직하게는, 이러한 트립토판-함유 펩티드 조성물은 AW 또는 GNW, 바람직하게는 AW 및 GNW, 가장 바람직하게는 AW 및 GNW를 1:2 내지 10:1, 바람직하게는 1:2 내지 5:1의 AW:GNW의 몰 비로 포함한다. 따라서, 본 제형에서, 트립토판-함유 펩티드 조성물은 바람직하게는 트립토판이 풍부한 수용성 펩티드의 조성물의 형태이다. 유리하게는, 본 제형에서, 트립토판-함유 펩티드 조성물은 바람직하게는 다이- 또는 트라이펩티드인 2개 이상의 상이한 트립토판-함유 펩티드를 포함하되, 상기 2개 이상의 트립토판-함유 펩티드는 제형에 함유된 다이- 및 트라이펩티드의 총량의 5몰% 이상의 양으로 존재하고, 트립토판-함유 펩티드 조성물에서, 30몰% 초과, 바람직하게는 40몰% 초과, 더욱 바람직하게는 50몰% 초과, 더욱 더 바람직하게는 60몰% 초과, 더욱 더 바람직하게는 70몰% 초과, 가장 바람직하게는 80몰% 초과, 바람직하게는 0.15 초과, 바람직하게는 0.15 내지 1.8의 트립토판/LNAA 비를 갖는다. 펩티드-결합된 트립토판은 펩티드내의 아미노산으로서 존재하는 트립토판을 의미한다. 이러한 양 및 범위는 또한 수시간에 걸쳐 트립토판-흡수 및 뇌 기능 둘다에 이로운 것으로 여겨진다.
- [0024] 본 발명에 따른 제형에 바람직하게 사용되는 트립토판-함유 펩티드 조성물은 바람직하게는 리소자임 가수분해물 또는 정제된 리소자임 가수분해물이다. 바람직하게는, 상기 리소자임 가수분해물은 특히 아르기닌 잔기가 풍부

하다. 아르기닌은 거대 중성 아미노산(LNAA)에 속하지 않지만, 이의 인슐린 자극 효과는 공지되어 있다. 본원에 개시된 가수분해물이 생체내에서 높은 혈장 트립토판/LNAA 비를 초래할 수 있음이 밝혀졌다. 혈장에서 검출된 트립토판/LNAA 비는 가수분해물의 트립토판/LNAA 비보다 높은 것으로 밝혀졌다. 본원에 기술된 트립토판-함유 펩티드 조성물의 또 다른 이점은 트립토판-함유 펩티드가 매우 작아서, 보다 덜 선호되는 트립토판/LNAA 비를 갖는 단백질-풍부 생성물과 조합되는 경우에도, 가수분해물이 높은 혈장 트립토판/LNAA 비를 즉시 초래하는 것이다. 이에 따라, 이러한 트립토판-함유 펩티드 조성물은 본 발명의 제형에 매우 적합하게 된다. 본 발명의 제형에 사용되는 트립토판-함유 펩티드 조성물은 유리 트립토판을 추가로 포함할 수 있다. 바람직하게는, 트립토판-함유 펩티드 조성물의 가수분해물은 (건조물을 기준으로) 1중량% 초과인 유리 트립토판을 함유하지 않는다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0025] 천천히 이용가능한 글루코스(SAG)에 관하여: 이는 아마도 소장에서 완전히 소화되지만, 예를 들어 글루코스 또는 수크로스보다 느린 속도로 소화되어, 보다 긴 시간 동안 유지되는 보다 낮은 혈당 수준을 야기하는 탄수화물을 지칭한다. 반면에, 신속히 이용가능한 글루코스(RAG)는 신속하게 가수분해되고, 높은 혈당 농도를 야기하고, 단지 비교적 짧은 시간 동안 유지되는 탄수화물이다.
- [0026] 엔글리스트 등은 생체내 글루코스 곡선과 상당히 밀접한 연관성이 있는 시험관내 시험을 사용하였다(문헌 [Englyst KN, Englyst HN, Hudson GJ, Cole TJ, Cummings JH. Rapidly available glucose in foods: an in vitro measurement that reflects the glycaemic response. American Journal of Clinical Nutrition (1999) 69:448-54]). RAG 및 SAG의 시험관내 측정은 인간 연구에서 측정되는 혈당 반응을 예측할 수 있다. 엔글리스트 등은 시험관내 상황에서의 RAG를 20분 후에 글루코스로 가수분해된 탄수화물의 양(G_{20} 으로 지칭함)으로 정의한다. 또한, 가수분해된 양을 120분 후에 측정하였다(G_{120} 으로 지칭함). 이러한 120분 동안 가수분해된 양은 소장에서의 흡수에 이용가능한 것으로 간주되었다. 120분 후에 가수분해된 어떠한 물질도 흡수에 이용가능하지 않는 것으로 간주하고, 저항성이 있는 것으로 간주하였다. 20 내지 120분(즉, $G_{120} - G_{20}$)에 가수분해된 탄수화물의 양을 SAG로서 정의하였다. 본 발명의 목적을 위해서, RAG 및 SAG는 엔글리스트 등에 의해 정의된 바와 동일한 방식으로 본원에서 이해된다.
- [0027] 표준화된 조건하에 소화 효소와 함께 지정된 시간의 항온처리중에 시험 식품으로부터 방출되는 글루코스의 HPLC에 의한 측정에 기초하여, RAG 및 SAG의 정의가 본원에 기술된 바와 같은 RAG 및 SAG 분석의 측정을 위해 엔글리스트 등에 의해 사용된 시험관내 기술은 하기에 더욱 상세히 기술된다.
- [0028] 물질 RAS/SAG 측정
- [0029] 사용된 폴리에틸렌관(50ml)을 팔콘(Falcon: 영국 옥스퍼드 소재)으로부터 입수하였다. 유리 볼(1.5-cm 직경)을 마그넷 홀세일(Magnet Wholesale: 영국 홀스워스 소재)로부터 입수하였다. 진탕 수 욕은 그랜트 인스트루먼트 리미티드(Grant Instruments Ltd: 영국 캠브리지 소재) 모델 SS-40-2였다. 욕을 클립으로 고정하여 50-ml 관을 정확히 수평으로 유지하고, 물에 완전히 잠김시키고, 각각의 관의 장축을 운동 방향에 위치시켰다. HPLC 시스템을 다이오넥스 (유케이) 리미티드(Dionex (UK) Ltd: 영국 캠벌리 소재)로부터 입수하였고, 하기에 상세히 기술한다. 시약은, 달리 언급되지 않는 한, 시그마(Sigma: 영국 폴 소재) 또는 메르크(Merck: 영국 폴 소재)로부터 입수하였다.
- [0030] 내부 표준 용액은 50% 포화 벤조산을 갖는 물중 40g 아라비노스/l였다. 저장(stock) 당(sugar) 혼합물은 50% 포화 벤조산을 갖는 물중 50g 글루코스/l 및 25g 프룩토스/l였다. 당을 사용하기 전에 감압하에 인 펜톡사이드상에서 일정한 중량으로 건조하였다.
- [0031] 사용된 효소는 시그마(미국 세인트루이스 소재)로부터의 펩신(카탈로그 번호 P-7000), 노보 노르디스크(Novo Nordisk)(덴마크 바그스바에르드 소재)로부터의 아밀로글루코시다제(AMG 400 L 유형 LP), 시그마로부터의 판크레아틴((카탈로그 번호 P-7545)), 및 메르크로부터의 인버타제(카탈로그 번호 390203D)이었다. 효소 혼합물을 사용 당일에 제조하였다. 18개의 샘플의 경우, 판크레아틴(3.0g)을 칭량하여 6개의 원심분리관에 각각 위치시키고, 자석 교반 바 및 물(20ml)을 각각에 첨가하였다. 판크레아틴을 와동 혼합함으로써 현탁시킨 후, 자석 교반기에서 10분 동안 혼합하였다. 관을 10분 동안 1500xg에서 원심분리하고; 각각의 관으로부터 15ml의 탁한 상청액(총 90ml)을 제거하여 플라스크에 위치시키고, 아밀로글루코시다제(4ml) 및 인버타제(6ml)를 첨가하고, 완전히 혼합하였다.

- [0032] RAG, SAG, 총 글루코스 및 전분 분획의 시험관내 측정
- [0033] 식품의 샘플(0.6g 미만의 탄수화물을 함유함)을 가장 가까운 mg까지 칭량하여 50-ml 폴리프로필렌 원심분리관에 위치시켰다. 내부 표준 용액(5ml의 40g 아라비노스/ℓ) 및 10ml의 새로 제조된 펩신-구아 검 용액(0.05몰 HCl/ℓ 중 5g 펩신/ℓ 및 5g 구아 검/ℓ)을 첨가하였다. 관을 막고, 내용물을 와동 혼합하고, 30분 동안 37°C에서 수 욕에 위치시켜, 펩신에 의해 단백질을 가수분해시켰다. 5ml의 0.5몰 나트륨 아세테이트/ℓ (37°C로 평형이 유지됨)를 각각의 관에 첨가하여 pH 5.2의 완충액을 형성하였다. 5개의 유리 볼을 첨가하고, 관을 막고, 서서히 진탕하여 내용물을 분산시킨 후, 37°C 수 욕에 위치시켜 수분 동안 평형을 유지하였다. 진탕 수 욕에서, 유리 볼은 주된 향온처리중에 샘플의 물리적인 구조를 기계적으로 분쇄하는 기능을 한다. 구아 검은 점도를 표준화시키고, 현탁액내의 샘플을 유지하고, 유리 볼에 의한 과도한 분쇄 및 이의 침전을 예방한다.
- [0034] 하나의 샘플 관을 37°C 수 욕으로부터 제거하고, 5ml 효소 혼합물을 첨가하였다. 관을 즉시 막고, 내용물을 거꾸로 해 서서히 혼합한 후, 37°C 진탕 수 욕에서 수평하게 보관하였다. 수 욕의 진탕 작동을 이때 개시하고, 이를 향온처리에 대한 시간 0으로서 취하고, 모든 G₁₂₀ 분량이 수집될 때까지(하기 참고) 중단하지 않았다. 효소 혼합물을 1-분 간격으로 나머지 샘플에 첨가하여 향온처리의 시기 조절에 도움을 주고, 진탕 수 욕에 위치시켰다. 각각의 관을 효소 혼합물을 첨가한 후 정확히 20분에 욕으로부터 제거하고, 0.2ml의 내용물을 4ml의 순수한 에탄올에 첨가하고, 와동 혼합하여 가수분해를 중단하였다(이것이 G₂₀ 분량임). 샘플을 취한 직후, 관을 진탕 수 욕으로 돌려보냈다. 추가로 100분(120-분 향온처리) 후, 추가로 0.2ml를 4ml 순수한 에탄올에 첨가하고, 와동 혼합하였다(이것이 G₁₂₀ 분량임).
- [0035] 감자 전분 및 백색 밀가루를 분석되는 샘플의 각각의 회분에 참고 물질로서 포함시키고, 하나가 4ml 저장 당 혼합물을 함유하는 2개의 시약 블랭크를 포함시켜 효소 제제의 당 함량을 보정하였다. 가수분해 조건을 감자 전분, 백색 밀가루 및 콘 플레이크 참고 물질로 교정하였다(참고 물질 및 효소는 엔글리스트 카보하이드레이트 서비시즈 리미티드(Englyst Carbohydrate Services Ltd; 영국 소재)에서 시판중이다). 감자 전분(공기-건조됨; 카르토펠멜 센트랄렌(Kartoffelmel Centralen); 덴마크 헤르닝 소재)은 높은 저항 전분 함량을 갖고, 진탕 수 욕의 최적 속도를 확정하는데 사용되었다. 감자 전분에 대한 G₁₂₀ 값이 너무 높은 경우, 행정(stroke)-속도는 감소하고, 역도 또한 같다.
- [0036] 당의 HPLC 측정
- [0037] 2개의 당 표준물을 교정을 위해 사용하였다. 표준물 1은 1ml이고, 표준물 2는 10ml의 저장 당 혼합물이었고, 각각을 물로 20ml가 되게 하고, 5ml의 내부 표준 용액을 첨가하고, 완전히 혼합한 후; 0.2ml의 상기 혼합물을 제거하고, 4ml의 순수한 에탄올을 함유하는 관에 첨가하였다.
- [0038] HPLC 분석 전에, 모든 에탄올 분획을 실온에서 5분 동안 1500xg로 원심분리하였다. 당 표준물 및 G₂₀ 및 G₁₂₀ 분량의 분석을 위해 취해진 양은 70μl이었다. 샘플을 HPLC 바이알에 위치시키고, 탈이온수(1ml)를 첨가하고, 와동 혼합하였다.
- [0039] 자기주입기(모델 AS3500; 다이오넥스)를 희석된 에탄올 분획(20μl)을 주입하는데 사용하였다. 구배 펌프(모델 GP40; 다이오넥스)를 사용함으로써, 음이온-교환 분석 컬럼(카보팩(Carbopac) PA100; 다이오넥스) 및 가드 컬럼(카보팩 PA10; 다이오넥스)에 의해 당을 분리하였다. 컬럼 스위칭 및 음이온-교환 가드 컬럼(아미노트랩(Aminotrap); 다이오넥스)을 사용하여 아미노산 및 펩티드가 분석 컬럼에 도달하는 것을 예방한다. 용리액, 고-순도 물 및 200몰 NaOH/ℓ (16ml 50% NaOH 용액/ℓ 고-순도 탈기수)를 탈기하였다. 유속은 0.8ml/분이었고, 용리 조건은 하기 표에 제시된다.

[0040] 당의 HPLC 측정을 위한 용리 조건의 시퀀스

| 스위치 위치 ¹ | NaOH (mmol/ℓ) | 시간 (분) |
|---------------------|---------------|-------------|
| A | 10 | 0 - 3.5 |
| B | 70 | 3.6 - 14.0 |
| B | 200 | 14.1 - 15.0 |
| B | 10 | 15.1 - 20.0 |

¹ 스위치 위치 A에서, 유동은 아미노트랩(다이오넥스 유케이 리미티드; 영국 캠벌리 소재)으로부터 가드 컬럼, 이어서 분리 컬럼을 향한다. 스위치 위치 B에서, 유동은 가드 컬럼으로부터 분리 컬럼, 이어서 아미노트랩을 향한다. 샘플 주입은 시간 0.1분이다.

[0041]

[0042] 하기 펄스 전위(E) 및 계속기간(t)을 사용하는 전기화학적 검출기(모델 ED40; 다이오넥스)에 의해 단당류를 검출하였다: E_1 , 0.05V; t_1 , 400ms; E_2 , 0.75V; t_2 , 200ms; E_3 , 0.15V; 및 t_3 , 400ms. 반응 시간은 1s이었고, 검출기상의 출력은 300nA로 설정되었다. 결과를 통합하고 도시하는데 데이터-취급 시스템(DX-500; 다이오넥스)을 사용하였다.

[0043] RAG 및 SAG에 대한 값을 측정된 G_{20} 및 G_{120} 값으로부터 하기한 바와 같이 계산하였다:

[0044] $RAG = G_{20}$

[0045] $SAG = G_{120} - G_{20}$

[0046] 본 발명에 따른 제형내의 바람직한 천천히 이용가능한 글루코스(SAG)는 1,000 내지 45,000달톤(바람직하게는 5,000 내지 40,000달톤)의 수 평균 분자량을 갖는 폴루란, 이소말톨로스, 트레할로스 및/또는 이들의 혼합물중 하나 이상을 포함한다. 이소말톨로스가 시판중인 공급원이므로 천천히 이용가능한 글루코스 공급원으로서 바람직하다.

[0047] 본 발명에 따른 제형내의 바람직한 신속히 이용가능한 글루코스(RAG) 조성물은 식품 분야에 널리 공지되어 있고, 용이한 가공을 가능하게 하는 글루코스, 수크로스, 말토덱스트린, 전분, 전분 가수분해물, 텍스트로스 및/또는 이들의 혼합물중 하나 이상을 포함한다.

[0048] 본 발명에 따른 제형에서, 제형이 소비를 위해 준비된 최종 제형인 경우, 신속히 이용가능한 글루코스 및 천천히 이용가능한 글루코스의 총량은, 예를 들어 제형화의 용이함 및 최종 제품의 품질(예를 들어, 과도하게 달지 않음)을 위해, 소비를 위해 준비된 총 제형의 5 내지 20중량%, 바람직하게는 7 내지 15중량%인 것이 바람직하다.

[0049] 본 발명은 또한 1 내지 20중량%의 본 발명에 따른 제형을 포함하는 즉석 음료 액체의 형태인 제품에 관한 것이고, 따라서 허용되는 부피 및 트립토판 농도를 갖는 소비재 제품, 예를 들어 음료의 용이한 제형화를 가능하게 한다.

[0050] 본 제형내의 펩티드가 AW 또는 GNW, 바람직하게는 AW 및 GNW를 포함하는 것이 바람직하다. 이러한 경우에, AW:GNW의 몰 비는 바람직하게는 1:2 내지 10:1, 더욱 바람직하게는 1:2 내지 5:1이다. 이러한 비가 또한 수시간에 걸쳐 트립토판-흡수 및 뇌 기능 둘다에 이로운 것으로 여겨진다.

[0051] 본 발명에 따른 제형에서, 트립토판-함유 펩티드는 리소자임, 바람직하게는 달걀 리소자임의 가수분해에 의해 바람직하게 수득가능하다.

[0052] 추가의 양태에서, 본 발명은 본 발명에 따른 제형을 포함하는 식품, 애완동물용 먹이, 사료, 음료, 식이 보충제 또는 기능식품 조성물에 관한 것이다.

[0053] 본 발명의 트립토판-함유 펩티드 부분의 상세한 내용 및 이의 제조 방법은 국제특허공개 제W0 2008/052995호에 추가로 제시되어 있다.

[0054] 본 발명의 제형에 바람직하게 사용되는 트립토판-함유 펩티드 조성물은 매우 짧은 시간 간격으로 혈장내의 트립토판/LNAA 비의 효과적인 증가를 제공하기에 매우 적합한 펩티드 형태로 존재하는 트립토판을 포함하는 조성물을 제공한다. 트립토판을 포함하는 다이- 및 트라이펩티드는 이러한 증가에 유리하게 공헌한다. 본 발명의 제형내의 트립토판-함유 펩티드 조성물에 대한 한 양태에서, 리소자임, 바람직하게는 달걀 리소자임은 산업적인

방법에서 효소에 의해 (예비-)가수분해된다(즉, (달걀) 리소자임은 가수분해물의 형태로 바람직하게 제공된다). 가수분해물의 형태로 제공되는 경우, 트립토판-함유 펩티드의 위장관 흡수가 상당히 촉진된다. 다른 양태에서, 본원의 제형을 위한 트립토판-함유 펩티드 조성물의 경우, 달걀 리소자임은 양으로 하전된 아르기닌 및 리신 잔기를 포함하는 펩티드의 수준이 저하된 가수분해물로 전환된다. 후자의 가수분해물은 0.15 초과 분자 트립토판/LNAA 비에 의해 특징지어진다. 바람직한 트립토판-함유 펩티드 조성물을 포함하는 본원의 RTD 제형의 또 다른 양태에서, 달걀 리소자임은 존재하는 펩티드의 50% 초과, 바람직하게는 60% 초과, 더욱 바람직하게는 75% 초과가 500Da 미만의 분자량을 갖는 펩티드 집단을 포함하는 가수분해물로 전환된다. 이는 가수분해물에 존재하는 펩티드의 분자량 분포가 본원의 재료 및 방법 부분에 기술된 바와 같이 수행되는 것을 조건으로 한다. 바람직한 (0.15 이상의) 트립토판/LNAA 비에 관하여: 가수분해물의 아미노산 분석은 본원의 재료 및 방법 부분에 기술된 바와 같이 수행된다.

- [0055] "단백질" 또는 "폴리펩티드"는 30개 초과 아미노산 잔기를 포함하는 쇠로서 본원에 정의된다.
- [0056] "펩티드" 또는 "올리고펩티드"는 펩티드 결합을 통해 연결된 2개 이상(바람직하게는 2 내지 30개)의 아미노산의 쇠로서 본원에 정의된다. 용어 "펩티드" 및 "올리고펩티드"는 동의어로서 간주되고(통상적으로 인식되는 바와 같음), 각각의 용어는 내용상 필요하면 상호교환적으로 사용될 수 있다.
- [0057] "수용성" 펩티드는 pH 5.0의 물에 가용성인 펩티드이다.
- [0058] 본원의 모든 (올리고)펩티드 및 폴리펩티드 구조식 또는 서열은 일반적인 관행에 따라 아미노 말단에서 카복시 말단의 방향으로 왼쪽에서 오른쪽으로 기술된다. 본원에서 사용되는 아미노산의 1-문자 코드는 당해 분야에 공지되어 있고, 문헌[Sambrook, et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989]에서 발견될 수 있다.
- [0059] 단백질 가수분해물, 가수분해물 또는 가수분해된 단백질은 단백질의 효소 가수분해에 의해 형성된 생성물을 의미하고, 풍부화된 가수분해물은, 예를 들어 선택된 펩티드가 풍부하거나, 펩티드 또는 폴리펩티드가 가수분해물에서 제거된 단백질 가수분해물의 분획이다. 따라서, 풍부화된 가수분해물은 바람직하게는 펩티드의 혼합물(또는 펩티드 혼합물)이다. 따라서, 본 발명에 사용된 펩티드 혼합물은 2개 이상, 바람직하게는 3개 이상, 더욱 바람직하게는 4개 이상의 트립토판-함유 펩티드의 혼합물이다. 더욱 바람직하게는, 혼합물은 존재하는 펩티드의 50% 초과, 더욱 바람직하게는 60% 초과, 가장 바람직하게는 75% 초과가 500Da 미만의 분자량을 갖는 펩티드 집단을 포함한다. 트립토판-함유 펩티드는 1개 이상의 L-트립토판 아미노산 잔기를 포함하는 펩티드를 의미한다. 트립토판/LNAA 비는 다른 거대 중성 아미노산(LNAA, 즉, 티로신, 페닐알라닌, 류신, 이소류신 및 발린의 합)의 수준에 대한 트립토판의 몰 비를 나타낸다. 혈장 트립토판/LNAA 비를 제외하고는, 트립토판/LNAA 비는 단지 펩티드-결합된 아미노산에만 관련된다. 따라서, 유리 트립토판, 티로신, 페닐알라닌, 류신, 이소류신 및 발린은 트립토판/LNAA 비에서 고려되지 않는다.
- [0060] 펩티드-결합된 아미노산은 펩티드의 일부인 아미노산으로서, 유리 아미노산이 아니다.
- [0061] Tyr/BCAA 비는 분지쇄 아미노산(BCAA; 즉, 류신, 이소류신 및 발린의 합)의 수준에 대한 티로신의 몰 비를 나타낸다. 바람직한 Tyr/BCAA 비는 0.1 초과, 바람직하게는 0.12 초과이다.
- [0062] 본 발명의 제형에 바람직하게 사용되는 트립토판-함유 펩티드 조성물은 본원에 개시된 방법에 의해 제조될 수 있고, 단백질 트립토판을 기준으로 30% 초과 트립토판 수율을 갖고, 트립토판을 포함하는 수용성 펩티드 조성물을 생성시킨다. 트립토판 잔기의 보다 큰 부분이 다이- 및 트라이펩티드에 포함된다는 사실은 혈류로의 즉각적인 흡수를 의미한다. 본 발명의 제형에 바람직하게 사용되는 상기 트립토판-함유 펩티드 조성물은 또한 실제 가수분해물의 트립토판/LNAA 비보다 높은 혈장 트립토판/LNAA 비를 야기할 수 있다. 최종적으로, 본 발명의 제형에 바람직하게 사용되는 트립토판-함유 펩티드 조성물은 또한 매우 낮은 항원성에 의해 특징지어진다.
- [0063] 본 발명의 제형에 바람직하게 사용되는 트립토판-함유 펩티드 조성물에서, 달걀 리소자임은 제제에 높은 트립토판/LNAA 비를 제공하기 위한 적절한 기질로서 바람직하게 사용된다. 리소자임은 달걀 흰자위에 3 내지 4%의 농도로 존재한다. 이의 예외적으로 높은 등전점을 이용함으로써, 리소자임은 간단한 양이온 크로마토그래피 정제 단계에 의해 달걀 흰자위로부터 산업적으로 분리된다. 생성된 생성물은 거의 순수하고, 이의 산업적으로 이용 가능한 제품은 7.8%의 분자 트립토판 함량 및 0.15 이상의 분자 트립토판/LNAA 비를 가진다. 따라서, 순수한 리소자임은 순수한 알파-락트알부민 및/또는 베타-락토글로불린보다 상당히 높은 트립토판/LNAA 비를 가진다. 따라서, 본 발명의 제형에 바람직하게 사용되는 트립토판-함유 펩티드 조성물을 위한 리소자임 가수분해물(및 이에 따라 제형에 바람직하게 사용되는 트립토판-함유 펩티드 조성물 자체)은 0.15 초과 분자 트립토판/LNAA

비, 더욱 바람직하게는 0.20 초과와 트립토판/LNAA 비, 더욱 더 바람직하게는 0.23 초과와 트립토판/LNAA 비, 더욱 더 바람직하게는 0.25 초과와 트립토판/LNAA 비, 가장 바람직하게는 0.30 초과와 트립토판/LNAA 비를 가질 수 있다. 일반적으로, 몰 트립토판/LNAA 비는 3.0 미만이다. 이와 같이, 리소자임이 트립토판-함유 펩티드 또는 조성물을 위한 바람직한 출발점을 제공한다. 리소자임(EC3.2.1.17)은 박테리아 세포 벽에서 특정 펩티도글리칸 결합을 가수분해하여 세포 용해를 야기할 수 있는 효소이다. 이러한 비는 또한 수시간에 걸쳐 트립토판-흡수 및 뇌 기능 둘다에 이로운 것으로 여겨지고, 또한 달성될 수 있다.

[0064] 본 발명에 따른 제형내의 트립토판-함유 펩티드 조성물에 바람직하게 사용되는 가수분해물은 또한, 예를 들어 낙농 제품에 의해 제공된 고 단백질-함유 식품 매트릭스에 혼입되는 경우에 효과적이다. 이는 단백질-함유 식품 매트릭스가 높은 LNAA 적제를 나타내고, 이에 따라 높은 트립토판/LNAA 비를 갖는 제품의 효과를 감소시키는 것으로 기대될 수 있으므로 매우 놀랍다. 이러한 예기치 않은 현상에 대한 가능한 설명은 통상적인 식품 제품이 광범위하게 가수분해된 단백질보다는 손상되지 않은 단백질을 혼입하는 것이다. 바람직한 트립토판-함유 펩티드 조성물의 다수의 트립토판 및 티로신을 혼입하는 펩티드는 500Da 미만의 분자량을 갖는다. 트립토판(MW = 186) 및 티로신(MW = 163)의 매우 높은 분자량, 및 단지 매우 낮은 수준의 유리 트립토판이 존재한다는 사실의 관점에서, 이러한 의미는 다수의 상기 펩티드가 트라이- 또는 다이펩티드일 것이라는 것이다.

[0065] 바람직한 방법에서, 리소자임, 바람직하게는 달걀 리소자임은 산업적인 방법에서 효소에 의해 (예비-)가수분해된다(즉, (달걀) 리소자임은 가수분해물 또는 풍부화된 가수분해물의 형태로 바람직하게 제공된다). 이러한 (풍부화된) 가수분해물의 형태로 제공되는 경우, 트립토판-함유 펩티드의 창자 흡수는 상당히 촉진된다. 본원의 다른 양태에서, 달걀 리소자임은 존재하는 펩티드의 50% 초과, 바람직하게는 60% 초과, 더욱 바람직하게는 75% 초과가 500Da 미만의 분자량을 갖는 트립토판-함유 펩티드 집단을 포함하는 가수분해물 또는 풍부화된 가수분해물로 전환된다. 바람직하게는, 이러한 (풍부화된) 가수분해물은 (건조물을 기준으로) 1중량% 초과와 유리 트립토판을 함유하지 않는다. 가수분해물에 존재하는 트립토판-함유 펩티드의 분자량 분석은 재료 및 방법 부분에 기술된 바와 같이 수행된다.

[0066] 본 발명의 제형에 바람직하게 사용되는 트립토판-함유 펩티드 조성물의 경우, (달걀) 리소자임 가수분해물이 가수분해물의 분획의 트립토판 함량을 증가시키기 위하여 분별증류되는 것이 더욱 바람직할 수 있다. 이러한 분획 또는 풍부화된 가수분해물은 바람직하게는 분별증류 전의 가수분해물에 비해 증가된 트립토판/LNAA 비를 갖는다. 부가적인 유리 트립토판에 의한 가수분해물 또는 풍부화된 가수분해물의 풍부화가 또한 본 발명의 일부를 형성한다. 이러한 풍부화된 가수분해물을 제조하기 위한 바람직한 옵션에서, 리소자임이 특별히 많은 양의 염기성 아르기닌 및 리신 잔기를 혼입한다는 관찰이 사용된다. 놀랍게도, 선택된 효소 항온처리 조건의 결과로서, 즉 트립토판을 혼입하는 다이- 및 트라이펩티드의 많은 양을 생산하지만 아르기닌 또는 리신 잔기를 거의 생산하지 않는 항온처리 조건과의 조합으로 옳은 분열 선호도를 갖는 엔도프로테아제(예컨대, 서브틸리신)를 선택한 결과로서, 본 발명에 따른 풍부화된 리소자임 가수분해물이 제조될 수 있다. 따라서, 아르기닌 또는 리신 잔기를 혼입하는 LNAA-함유 펩티드가 이러한 염기성 잔기를 갖지 않는 트립토판-함유 펩티드로부터 분리될 수 있다. 예를 들어, 가수분해물의 pH를 4 내지 6, 더욱 바람직하게는 5.0 내지 5.5의 값으로 조정함으로써, 이러한 염기성 잔기가 없는 펩티드가 전하를 갖지 않고, 이에 따라 감소된 친수성을 갖는다. 이러한 특징은, 예를 들어 큰 비율의 아르기닌 또는 리신을 함유하는 펩티드를 선택적으로 제거하는 크로마토그래피 또는 다른 분리 공정에 사용될 수 있다. 따라서, 트립토판-함유 펩티드의 함량 및 임의적으로 이러한 풍부화된 가수분해물의 트립토판/LNAA 비는 극적으로 증가된다. 하전된 아르기닌 또는 리신을 혼입하는 펩티드는 공지된 기술, 예컨대 이온 크로마토그래피, 소수성 상호작용 크로마토그래피 또는 전기투석에 의해 제거될 수 있다. 관련된 펩티드의 크로마토그래피 분리에서의 이러한 특징의 사용에 대한 실질적인 배경은 문헌[a.o. the Protein Purification Handbook, issued by Amersham Pharmacia Biotech, nowadays GE Healthcare Bio-Sciences, Diegem, Belgium]에서 찾을 수 있다. 높은 트립토판 함량을 높은 트립토판/LNAA 비와 조합하는 제제를 향한 더욱 더 진보한 정제 경로에서, 산 측기(side group)를 갖는 아미노산의 존재, 예컨대 리소자임내의 글루탐아이트(Glu) 및 아스파르테이트(Asp) 잔기의 존재가 유리하게 사용된다. 이러한 접근법에서, 본 발명에 따른 리소자임 가수분해물의 pH는 먼저 3.0으로 조정되고, 이어서 양이온 수지상에서 크로마토그래피된다. 이러한 pH 값에서, Glu 또는 Asp를 혼입하는 펩티드가 컬럼을 통해 진행하고, 다른 펩티드가 결합한다. pH 5 완충액에 의한 후속 용리는 상기한 바와 같은 리신 또는 아르기닌 잔기가 없는 모든 결합된 펩티드를 탈리한다. 다수의 트립토판-함유 펩티드가 이러한 탈리된 분획에 존재한다. 이어서, 잔류하는 결합된 펩티드가 더욱 높은 pH 값을 갖는 완충액을 사용하는 용리에 의해 컬럼으로부터 제거될 수 있다.

[0067] 본 발명의 제형에 바람직하게 사용되는 트립토판-함유 펩티드 조성물의 제조를 위하여, 바람직하게는 이온 교환

크로마토그래피 및/또는 소수성 상호작용 크로마토그래피가 사용되지만, 다른 적합한 크로마토그래피 분리 방법, 예컨대 친화성 크로마토그래피 및 크기 배제 크로마토그래피가 또한 이용가능하다. 생성된 수성 분획으로부터의 트립토판-풍부화된 펩티드의 회수는 당해 분야에 공지된 방법에 의해 수행될 수 있다. 농축된 저장 안정성 제품을 수득하기 위하여, 회수는 바람직하게는 증발 및 (분무) 건조 단계를 포함한다. 또한, 유기 용매를 포함하는 나노여과 및 추출 공정, 및 이어지는 증발/침전 단계는 목적하는 정제를 위한 옵션을 제공한다. 유기 용매로부터의 트립토판-풍부화된 펩티드의 회수는 바람직하게는 용매의 증발에 의해 수행된다.

[0068] 리소자임이 생리적인 조건하에, 즉 산성 pH에서 프로테아제로서 펩신, 트립신 및 키모트립신을 사용하는 단백질 분해성 가수분해에 매우 저항적인 것으로 증명된 사실에도 불구하고, 본 발명의 제형에 바람직하게 사용되는 리소자임 가수분해물이 또한 이러한 덜 우호적인 산성 조건하에 수득될 수 있다. 그러나, 이러한 조건하에서, 비교적 엄격한 항온처리 조건, 예컨대 훨씬 높은 효소 농도, 보다 높은 온도 및 임의적인 추가의 엔도프로테아제가 요구된다. 서브틸리신과 함께 알칼리성 pH에서 리소자임을 항온처리함으로써 수득된 리소자임 가수분해물은 Ala-Trp(AW) 다이펩티드가 특히 풍부한 것으로 밝혀졌다.

[0069] 본 발명에 따른 조성물에서, 트립토판-함유 펩티드 조성물은 바람직하게는 0.1 이상, 바람직하게는 0.15 이상, 더욱 바람직하게는 0.15 내지 1.8의 LNAA에 대한 트립토판의 (중량) 비를 갖는 펩티드 조성물을 포함하고, 바람직하게는 리소자임, 더욱 바람직하게는 달걀 리소자임을 가수분해하여 5 내지 45의 DH를 갖는 가수분해물을 제조하는 단계, 및 임의적으로 아르기닌 또는 리신을 함유하는 펩티드의 부분을 제거하는 단계를 포함하는 방법에 의해 수득된다. 이때, 트립토판-함유 펩티드 조성물은 바람직하게는 AW 또는 GNW, 바람직하게는 AW 및 GNW(이때, AW:GNW의 몰 비는 바람직하게는 1:2 내지 10:1, 더욱 바람직하게는 1:2 내지 5:1임)를 포함하고, 상기 조성물은 신속히 이용가능한 글루코스(RAG) 조성물(바람직하게는 1,000 내지 45,000달톤(바람직하게는 5,000 내지 40,000달톤)의 수 평균 분자량을 갖는 풀루란, 이소말톨로스, 트레할로스 및/또는 이들의 혼합물중 하나 이상, 가장 바람직하게는 이소말톨로스를 포함함) 및 천천히 이용가능한 글루코스(SAG) 조성물(바람직하게는 글루코스, 수크로스, 말토덱스트린, 전분, 전분 가수분해물, 텍스트로스 및/또는 이들의 혼합물중 하나 이상을 포함함)을 추가로 포함하고, RAG 조성물 및 SAG 조성물은 1:0.5 내지 1:4, 바람직하게는 1:0.8 내지 1:3, 더욱 바람직하게는 1:1 내지 1:3의 RAG 조성물:SAG 조성물의 건조 중량 비로 제형내에 존재하고, 임의적으로 또한 트립토판-함유 펩티드:RAG 조성물의 중량 비는 1:2 내지 1:20, 바람직하게는 1:3 내지 1:15, 더욱 바람직하게는 1:3 내지 1:8이다. 이때, 제형이 소비를 위해 준비가 된 경우, 신속히 이용가능한 글루코스 및 천천히 이용가능한 글루코스의 총량이 소비를 위해 준비된 총 제형의 5 내지 20%(중량 단위), 바람직하게는 7 내지 15%인 것이 바람직하다. 본 발명에 따른 제형이 즉석 소비제 제품을 기준으로 0.5 내지 5%(바람직하게는 0.8 내지 3%)의 건조 중량의 트립토판-함유 펩티드 조성물을 포함하는 것이 또한 본원에서 바람직하다. 이러한 양, 비 및 범위는 또한 수시간에 걸쳐 트립토판-흡수 및 뇌 기능 둘다에 이로운 것으로 여겨지고, 또한 달성될 수 있다.

[0070] 본 발명에 따른 제형에서, 트립토판-함유 펩티드 제형이 다이- 및 트라이펩티드인 2개 이상의 상이한 트립토판-함유 펩티드를 포함하는 것이 바람직할 수 있고, 따라서, 상기 2개 이상의 트립토판-함유 펩티드는 각각 제형에 함유된 다이- 및 트라이펩티드의 총량의 5몰% 이상의 양으로 존재하고, 총 트립토판의 30몰% 초과가 펩티드-결합된 트립토판으로서 존재하고, 바람직하게는 40몰% 초과, 더욱 바람직하게는 50몰% 초과, 더욱 더 바람직하게는 60몰% 초과, 더욱 더 바람직하게는 70몰% 초과, 가장 바람직하게는 80몰% 초과인 펩티드-결합된 트립토판이 다이- 또는 트라이펩티드의 형태로 존재하고, 바람직하게는 조성물은 0.15 초과, 바람직하게는 0.15 내지 1.8의 트립토판/LNAA 비를 갖고, 조성물은 신속히 이용가능한 글루코스(RAG) 조성물(바람직하게는 1,000 내지 45,000 달톤(바람직하게는 5,000 내지 40,000달톤)의 수 평균 분자량을 갖는 풀루란, 이소말톨로스, 트레할로스 및/또는 이들의 혼합물중 하나 이상, 가장 바람직하게는 이소말톨로스를 포함함) 및 천천히 이용가능한 글루코스(SAG) 조성물(바람직하게는 글루코스, 수크로스, 말토덱스트린, 전분, 전분 가수분해물, 텍스트로스 및/또는 이들의 혼합물중 하나 이상을 포함함)을 추가로 포함하되, RAG 조성물 및 SAG 조성물은 1:0.5 내지 1:4, 바람직하게는 1:0.8 내지 1:3, 더욱 바람직하게는 1:1 내지 1:3의 RAG 조성물:SAG 조성물의 건조 중량 비로 제형내에 존재하고, 임의적으로 또한 트립토판-함유 펩티드:RAG 조성물의 중량 비는 1:2 내지 1:20, 바람직하게는 1:3 내지 1:15, 더욱 바람직하게는 1:3 내지 1:8이다. 이때, 제형이 소비를 위해 준비된 경우, 신속히 이용가능한 글루코스 및 천천히 이용가능한 글루코스의 총량이 소비를 위해 준비된 총 제형의 5 내지 20%(중량 단위), 바람직하게는 7 내지 15%인 것이 바람직하다. 본 발명에 따른 제형이 즉석 소비제 제품을 기준으로 0.5 내지 5%(바람직하게는 0.8 내지 3%)의 건조 중량의 트립토판-함유 펩티드 조성물을 포함하는 것이 또한 본원에서 바람직하다. 이러한 양, 비 및 범위는 또한 수시간에 걸쳐 트립토판-흡수 및 뇌 기능 둘다에 이로운 것으로 여겨지고, 또한 달성될 수 있다.

- [0071] 본 발명은 또한 즉석 소비재 제품을 기준으로 0.5 내지 5%(바람직하게는 0.8 내지 3%)의 건조 중량의 트립토판-함유 펩티드 조성물을 포함하는 것이 바람직한 제형에 관한 것이다.
- [0072] 본 발명은 또한 본원에 개시된 제형을 포함하는 식품, 애완동물용 먹이, 사료, 식이 보충제 또는 기능식품 조성물에 관한 것이다. 이러한 제품은, 예를 들어 즉석 음료 액체의 형태일 수 있다. 이러한 제품은 전형적으로 1 내지 20중량%, 더욱 바람직하게는 2 내지 15중량%의 본 발명에 따른 제형(즉, 펩티드, RAG 및 SAG를 포함함)을 포함할 수 있다.
- [0073] **재료 및 방법**
- [0074] **재료**
- [0075] 상표명 "프로텍스(Protex) 6L"의 서브틸리신은 제넨커(Genencor; 네덜란드 라이덴 소재)에서, 펩신은 시그마에서, 트립신/키모트립신(돼지 PEM)의 혼합물은 노보자임스(Novozymes; 덴마크 베그스바에르드 소재)에서 입수하였다. 리소자임은 디에스엠 푸드 스페셜티즈(DSM Food Specialties; 네덜란드 델프트 소재)에서 델보자임(Delvozyme) L(22% 건조물)로서 획득하였다.
- [0076] **SDS-PAGE**
- [0077] 사용된 리소자임 제제의 순도를 SDS-PAGE에 의해 확인하였다. SDS-PAGE 및 염색에 이용된 모든 재료를 인비트로젠(Invitrogen; 미국 캘리포니아주 칼스배드 소재)에서 구입하였다. 제조자의 지시에 따른 SDS 완충액을 이용하여 샘플을 제조하고, 제조자의 지시에 따라 MES-SDS 완충 시스템을 이용하여 12% 비스-트리스 겔상에서 분리하였다. 심플리 블루 세이프 스테인(Simply Blue Safe Stain)(콜로이드성 쿠마시(Coomassie) G250)을 이용하여 염색하였다. 가수분해 전에, 리소자임은 겔상에서 약 14kDa의 분자량을 갖는 단일 밴드로 나타났다.
- [0078] **LC/MS/MS 분석**
- [0079] P4000 펌프(써모 일렉트론(Thermo Electron; 네덜란드 브레다 소재))에 커플링된 이온 트랩 질량 분광계(써모 일렉트론, 네덜란드 브레다 소재)를 이용한 HPLC를 이용하여 본 발명에 따른 방법에 의해 생성된 효소적 단백질 가수분해물중에서 트립토판-함유 펩티드(주로 다이- 및 트라이펩티드)의 존재를 측정하였다. 형성된 펩티드를 용리를 위한 밀리(Milli)Q 물(밀리포어(Millipore; 미국 매사추세츠주 베드포드 소재))중 0.1% 폼산(용액 A) 및 아세트나이트릴중 0.1% 폼산(용액 B)의 구배와 조합된 인에르트실(Inertsil) 3 ODS 3, 3 μ m, 150x2.1mm 컬럼(베리언 벨지움(Varian Belgium; 벨기에 소재))을 이용하여 분리하였다. 100%의 용액 A에서 구배를 시작하여, 이를 10분 동안 유지시키고, 25분 동안 20% B로 선형 증가시키고, 직후에 출발 조건으로 돌아가고, 안정화를 위해 15분 동안 유지시켰다. 사용된 주입 부피는 50 μ l이고, 유속은 분 당 200 μ l이고, 컬럼 온도는 55 $^{\circ}$ C에서 유지되었다. 주입된 샘플의 단백질 농도는 약 50 μ g/ml이었다. 해당 펩티드의 확인은 체류 시간, 양성자화된 분자에 근거하고, 약 30%의 최적 충돌 에너지를 이용한 해당 펩티드에 대한 전용 MS/MS를 이용하였다. 특정한 트립토판-함유 펩티드의 정량을 외부 표준 방법을 이용하여 수행하였다.
- [0080] 테트라펩티드인 VVPP(M=410.2)를 이용하여 MS 방식에서의 최적의 민감성에 대해, 그리고 MS/MS 방식에서의 최적 단편화를 위해 조정하고, 5 μ g/ml의 일정한 주입을 수행하여, MS 방식에서 양성자화된 분자를 획득하고, MS/MS 방식에서 약 30%의 최적 충돌 에너지를 이용하여 B- 및 Y-이온 시리즈를 생성하였다.
- [0081] LC/MS/MS 전에, 효소적 단백질 가수분해물을 상온 및 13,000rpm에서 10분 동안 원심분리하고, 상청액을 밀리포어 물 여과 장치를 통해 여과된 탈염수(밀리Q 물)로 1:100으로 희석하였다.
- [0082] **가수분해도**
- [0083] 다양한 양성자분해 혼합물과의 항온처리중에 획득된 가수분해도(DH)를 신속한 OPA 시험(문헌[Nielsen, P.M.; Petersen, D.; Dambmann, C. Improved method for determining food protein degree of hydrolysis. *Journal of Food Science* 2001, 66, 642-646])을 이용하여 모니터링하였다.
- [0084] **켈달 질소**
- [0085] 총 켈달 질소를 유동 주입 분석에 의해 측정하였다. TKN 방법 카세트 5000-040이 장착된 테케이터 피아스타(Tecator FIASTAR) 5000 유동 주입 시스템, 소피아(SOFIA) 소프트웨어가 있는 펜티엄 4 컴퓨터 및 테케이터 5027 오토샘플러(Autosampler)를 이용하여, 단백질-함유 용액으로부터 방출된 암모니아를 590nm에서 정량하였다. 방법의 동적 범위에 상응하는 샘플 양(0.5 내지 20mg N/ℓ)을 95 내지 97% 황산과 함께 소화 튜브에 위치시키고 켈탭(Kjeltab)이 200 $^{\circ}$ C에서 30분 및 이어서 360 $^{\circ}$ C에서 90분의 소화 프로그램을 거치게 하였다.

피아스타 5000 시스템에 주입한 후, 질소 피크를 측정하고, 이로부터 측정된 단백질의 양을 추정할 수 있다.

[0086]

가수분해물에 존재하는 펩티드 및 단백질의 분자량 분포

[0087]

프로테아제-처리된 단백질 샘플의 펩티드 크기 분포를 고압 펌프, 10 내지 100 μ l의 샘플을 주입할 수 있는 주입 장치 및 컬럼 용리액을 214nm에서 모니터링할 수 있는 자외선(UV) 검출기가 장착된 자동화된 HPLC 시스템상에서 분석하였다.

[0088]

이 분석에 사용된 컬럼은 20mM 인산 나트륨/250mM 염화 나트륨 pH 7.0 완충액으로 평형화된 슈퍼덱스 펩티드 (Superdex Peptide) HR 10/300 GL(아머삼(Amersham))이었다. 샘플(전형적으로 50 μ l)을 주입한 후, 0.5ml/분의 유속에서 90분 동안 완충액을 이용하여 컬럼으로부터 다양한 성분을 용리하였다. 분자량 마커로서 사이토크롬 C(분자량: 13,500Da), 아프로티닌(분자량: 6,510Da) 및 테트라글리신(분자량: 246Da)의 혼합물을 이용하여 시스템을 보정하였다.

[0089]

하기 실시예가 본 발명을 추가로 예시한다.

[0090]

실시예

[0091]

실시예 1

[0092]

프로텍스를 이용한 리소자임 가수분해 및 형성된 펩티드의 확인

[0093]

10%(w/w)의 순수한 리소자임을 함유하는 용액을 NaOH를 이용하여 pH 8.2로 조정하고, 52 $^{\circ}$ C까지 가열하였다. 존재하는 단백질 1g 당 25 μ l의 프로텍스를 첨가함으로써 가수분해를 시작하였다. 연속적으로 교반하고, pH를 8.2로 유지하면서, 5.5시간 동안 계속 가수분해하여 보이는 침전물이 없는 거의 투명한 용액을 수득하였다. 프로텍스 활성을 불활성화시키기 위한 가열 단계 후에, DH 분석을 위해 샘플을 취하였다. 용액의 DH는 약 30%로 밝혀졌다. 열-처리된 용액을 10kDa 필터상에서 한외여과하여 완전히 투명한 용액을 수득하였다. 이러한 투명한 용액을 LC/MS 분석, 존재하는 펩티드와 단백질의 분자량 분포, 및 이온 교환 크로마토그래피에 이용하였다.

[0094]

존재하는 펩티드와 단백질의 분자량 분포에 대한 결과를 얻기 위해서, 투명한 용액이 재료 및 방법 부분에 기술된 분자량 크기 분석을 거치게 하였다. 수득된 결과는 방향족 측쇄를 갖는 아미노산(즉, 트립토판, 티로신 및 페닐알라닌)이 혼입된 거의 모든 펩티드가 500kDa 미만의 분자량을 가짐을 명확하게 나타냈다. 이러한 아미노산의 고 분자량을 고려하면, 결과는 이러한 작은 펩티드가 대부분 트라이펩티드 또는 다이펩티드임을 의미한다.

[0095]

재료 및 방법 부분에 기술된 과정에 따라 LC/MS 분석을 수행하였다. 트립토판("W")을 함유하는 펩티드를 선택함으로써, 펩티드 AW, GNW, WIR, NAW, WVA, VAW, AWR, SLGNW 및 소량의 WW 및 SRWW가 검출될 수 있다. 항온처리 후의 가수분해물중 유리 트립토판의 수준은 존재하는 전체 (리소자임) 트립토판의 1% 미만을 나타내는 것이 입증되었다.

[0096]

다이- 및 트라이펩티드가 창자 벽에 존재하는 펩티드 전달자에 의해 쉽게 흡수되기 때문에, 이러한 펩티드에 존재하는 트립토판 잔기가 신속하게 흡수되고, 본 발명의 리소자임 가수분해물의 경우 흡수 시 증가된 혈장 트립토판 수준을 야기할 것이라는 것은 의심할 여지가 없다.

[0097]

실시예 2

[0098]

가수분해물의 트립토판 함량 증가

[0099]

리소자임에는 매우 많은 양의 염기성 아르기닌 및 리신 잔기가 혼입되어 있다. 또한, 리소자임 분자에는 상당한 수의 산성 글루타메이트 및 아스파테이트 잔기가 혼입되어 있다. 이러한 데이터를 이용하여 높은 트립토판/LNAA 비를 특징으로 하는 가수분해물에 대한 혁신적이고 우아한 정제 경로를 고안하여 왔다. 그러나, 이러한 정제 경로에 대한 본질적인 요건은 아르기닌 또는 리신 잔기나 글루타메이트 또는 아스파테이트 잔기를 또한 함유하는 펩티드에 단지 매우 소수의 트립토판 잔기가 나타난다는 것이다. 실시예 1에 제시된 바와 같이, 여기에 이용되는 특정한 가수분해 경로는 아르기닌 잔기를 함유하는 트립토판-함유 펩티드를 매우 적게 생성하고, 리신, 글루타메이트 또는 아스파테이트 잔기를 함유하는 펩티드를 생성하지 않는다.

[0100]

이론은 글루타메이트 또는 아스파테이트 잔기가 있는 펩티드와 없는 펩티드 사이의 최대 전하 차이가 약 pH 3에서 달성될 수 있다고 예측한다. 아르기닌 또는 리신 잔기가 있는 펩티드와 없는 펩티드 사이의 최대 전하 차이는 약 pH 5에서 달성될 수 있다.

[0101] 이 접근법의 선별력을 예증하기 위해, 리소자임 가수분해물을 실시예 1에 특정된 과정에 따라 제조하였다. 이어서, 상기 가수분해물의 pH를 아세트산을 이용하여 pH 3.1로 조정하였고, 약 0.5g의 단백질을 20mM 나트륨 시트레이트 pH 3.1로 평형화된 15ml 베드 부피의 SP 세파로스 FF(지이 헬스케어(GE Healthcare; 벨기에 디에켄 소재))에 적용하였다. 컬럼을 1 컬럼 부피의 나트륨 시트레이트 완충액으로 세척하여, 글루타메이트 또는 아스파테이트가 혼입되어 있는 펩티드 대부분을 제거한 후, 용리 완충액을 20mM 나트륨 시트레이트 완충액 pH 5.1로 변화시켰다. 컬럼을 3 컬럼 부피의 후자의 완충액으로 세척하는 동안, 일정 범위의 트립토판-함유 펩티드가 용리되었다. LC/MS 분석에 따르면, 다이펩티드 AW, 및 트라이펩티드 GNW, NAW, WVA, VAW가 다량으로 존재하고, 소량의 펜타펩티드 SLGNW가 존재한다. 다양한 pH 5.1 분획의 아미노산 분석은 선택적인 통합(pooling)이 1.75의 분자 트립토판/LNAA 비 및 약 30%의 트립토판 수율을 갖는 용액을 생성하였음을 보여주었다. 덜 선택적인 통합은 0.4의 분자 Trp/LNAA 비 및 70%의 트립토판 수율을 갖는 용액을 생성하였다. 후속적으로, 컬럼을 3 컬럼 부피의 20mM 나트륨 시트레이트 pH 7.1로 세척하였다. LC/MS 데이터에 따르면, 이러한 단계는 아르기닌-함유 펩티드인 WIR, AWIR 및 놀랍게도 펩티드 WW를 용리하였다. 컬럼을 1M의 NaOH, 물 및 1M의 아세트산으로 최종 세척함으로써, 후속 단계를 위해 컬럼을 준비시켰다.

[0102] 실시예 3

[0103] 대규모 리소자임 가수분해

[0104] 대규모 리소자임 가수분해 과정에서, 본질적으로 실시예 1에 개시된 과정을 일부 사소하게 변화시켜 수행하였다. 7.3%(w/w) 순수한 리소자임을 함유한 용액을 65°C로 가열시킨 후, NaOH를 이용하여 pH를 8.2로 조정하였다. 건조물 1g 당 25µl의 프로텍스 6L을 첨가함으로써 가수분해를 시작하였다. 연속적으로 교반하고, pH 8.2 및 온도 53°C를 유지하면서, 2시간 동안 계속 가수분해하였다. 이어서, pH 값을 9.0으로 증가시키고, 추가로 3.5시간 동안 항온처리하여 일부 침전물이 있는 용액을 수득하였다. 이어서, 용액의 pH를 4.5로 낮추고, 용액을 4°C 미만으로 냉각시켰다. 완전히 투명한 생성물을 수득하기 위해서, 액체를 Z 2000 필터(폴(Pa11))상에서 여과한 후, 과량의 물과 염을 나노여과를 통해 제거하였다. 이어서, 생성된 농축액을 120°C에서 7초 동안 UHT 처리하고, 증발시키고, 최종적으로 분무 건조하여 건조 형태의 리소자임 가수분해물을 수득하였다. 이렇게 수득된 생성물은 약 0.19의 물 트립토판/LNAA 비를 가졌다.

[0105] 실시예 4

[0106] 트립토판을 갖는 펩티드를 포함하는 펩티드 조성물을 실시예 3에 설명된 바와 같이 제조하였다. 수득된 제품은 약 83%의 펩티드 수준, 약 5.5%의 펩티드-결합된 트립토판 함량, 및 약 0.19의 TRP/LNAA 비를 갖는 수성 액체이었다. 상기 제품은 연황색 분말의 외관을 가졌고, 물중에 1% 용해 시 약 4.3의 pH를 갖는 용액을 제공하였다.

[0107] 상기 펩티드 제제를 사용하여, 하기 표 1의 조성(수성 기제내의 성분의 건조 중량%. 나머지는 물일 수 있음)을 갖는 음료를 제조할 수 있다. 이러한 조성물의 제조 방법은 다음과 같았다:

- [0108] - 물중 모든 성분의 프리-믹스를 제조하는 단계;
- [0109] - 이를 10분 동안 교반하고, 필요에 따라 교반의 끝무렵에 pH를 조정하는 단계; 및
- [0110] - 임의적으로 고압 균질화기에 의해 균질화하는 단계.

표 1

| | 실시예 4a | 실시예 4b |
|------------------------|--------|--------|
| 트립토판을 함유하는 펩티드 제제(중량%) | 1.14 | 1.14 |
| 탈지 분유(%) | 2.1 | 2.1 |
| 카라기난(중량%) | 0.02 | 0.02 |
| 말토덱스트린(중량%) | 1.0 | 1.0 |
| 수크로스(중량%) | 4.6 | 4.6 |
| 이소말톨로스(중량%) | 6 | 10 |

【심사관 직권보정사항】

【직권보정 1】

【보정항목】 청구범위

【보정세부항목】 청구항 제1항 및 제5항

【변경전】

AW 또는 GNW

【변경후】

알라닌-트립토판(AW) 또는 글리신-아스파라긴-트립토판(GNW)