

특허증

CERTIFICATE OF PATENT



특허

Patent Number

제 10-2173591 호

출원번호

Application Number

제 10-2019-0006152 호

출원일

Filing Date

2019년 01월 17일

등록일

Registration Date

2020년 10월 28일

발명의 명칭 Title of the Invention

효소처리 로얄젤리 분말을 유효성분으로 포함하는 면역기능 증진용 약학적 조성물

특허권자 Patentee

(주) 바이텍(210111-*****)

전라북도 완주군 이서면 안전로 141, 602호(기연빌딩)

발명자 Inventor

등록사항란에 기재

위의 발명은 「특허법」에 따라 특허등록원부에 등록되었음을 증명합니다.

This is to certify that, in accordance with the Patent Act, a patent for the invention has been registered at the Korean Intellectual Property Office.



특허청

Korean Intellectual
Property Office

2020년 10월 28일



QR코드로 현재기준
등록사항을 확인하세요

특허청장

COMMISSIONER,
KOREAN INTELLECTUAL PROPERTY OFFICE

김응래





(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2019-0091198
(43) 공개일자 2019년08월05일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 35/644 (2014.01) *A23L 21/20* (2016.01)
A23L 33/10 (2016.01) *A61P 37/00* (2006.01)
- (52) CPC특허분류
A61K 35/644 (2013.01)
A23L 21/20 (2016.08)
- (21) 출원번호 10-2019-0006152
 (22) 출원일자 2019년01월17일
 심사청구일자 2019년01월17일
- (30) 우선권주장
 1020180010121 2018년01월26일 대한민국(KR)

- (71) 출원인
 (주) 바이텍
 전라북도 완주군 이서면 안전로 141, 602호(기연빌딩)
- (72) 발명자
 이도행
 서울특별시 중구 다산로 32, 3동 706호(신당동, 남산타운)
- 손연경
 경기도 성남시 분당구 미금로 177, 304동 704호(구미동, 까치마을신원아파트)
 (뒷면에 계속)
- (74) 대리인
 김순용

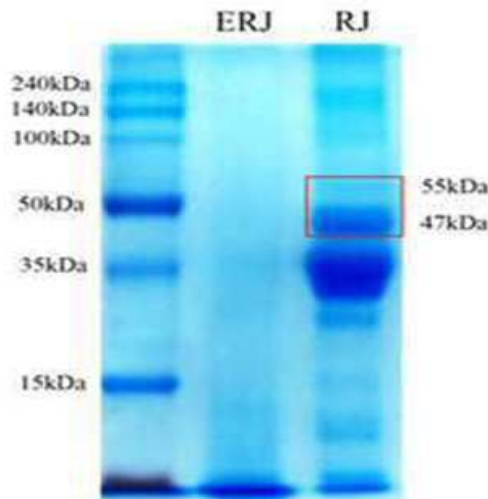
전체 청구항 수 : 총 8 항

(54) 발명의 명칭 효소처리 로얄젤리 분말을 유효성분으로 포함하는 면역기능 증진용 약학적 조성물

(57) 요약

본 발명은 효소처리 로얄젤리(Enzyme treated royal jelly, ERJ) 분말을 유효성분으로 함유하는 면역기능 증진용 약학적 조성물에 관한 것이다. 본 발명의 효소처리 로얄젤리(ERJ) 분말은 알러지 반응을 일으키는 단백질을 포함하지 않고, 항산화 및 항염증 활성이 우수하며, 면역세포를 활발하게 증식시키고, 자연살해세포의 우수한 활성을 유도하여 탁월한 면역기능 증진 효과를 나타내므로, 면역기능 증진을 위한 의약품 또는 건강기능식품으로 유용하게 이용할 수 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A23L 33/10 (2016.08)

A61P 37/00 (2018.01)

A23V 2002/00 (2013.01)

A23V 2200/324 (2013.01)

(72) 발명자

차지윤

전라북도 전주시 완산구 황강서원로 16, 401호(효자동3가)

이나영

전라북도 군산시 수송로 71, 205동 704호(나운동, 금호타운아파트)

김아름찬

전라북도 전주시 완산구 배학1길 15, 301호(효자동3가)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 C0453904

부처명 중소기업청

연구관리전문기관 중소기업기술정보진흥원

연구사업명 산학연협력기술개발

연구과제명 로알젤리의 면역기능 증진 개선을 위한 효소공법 개발 및 제품화

기 여 율 1/1

주관기관 (주)바이텍

연구기간 2016.12.01 ~ 2017.11.30

명세서

청구범위

청구항 1

효소처리 로알젤리 분말을 유효성분으로 포함하는 면역기능 증진용 약학적 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 효소는 단백분해효소인 것을 특징으로 하는, 면역기능 증진용 약학적 조성물.

청구항 3

제2항에 있어서, 상기 단백분해효소는 진균성 엔도 및 엑소형 단백분해효소, 진균성 엑소형 단백분해효소 및 세균성 엔도형 단백분해효소로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상인 것을 특징으로 하는, 면역기능 증진용 약학적 조성물.

청구항 4

제3항에 있어서, 상기 세균성 엔도형 단백분해효소는 세균성 알칼리성 엔도형 단백분해효소인 것을 특징으로 하는, 면역기능 증진용 약학적 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 효소는 로알젤리 100 중량부에 대하여 1 내지 10 중량부로 처리되는 것을 특징으로 하는, 면역기능 증진용 약학적 조성물.

청구항 6

효소처리 로알젤리 분말을 유효성분으로 포함하는 면역기능 증진용 식품 조성물.

청구항 7

효소처리 로알젤리 분말을 유효성분으로 포함하는 면역기능 증진용 건강기능식품.

청구항 8

효소처리 로알젤리 분말을 인간을 제외한 면역기능 증진이 필요한 동물에 유효량 투여하는 단계;를 포함하는 동물의 면역기능을 증진시키는 방법.

발명의 설명

기술분야

[0001] 본 발명은 효소처리 로알젤리(Enzyme treated royal jelly, ERJ) 분말을 유효성분으로 함유하는 면역기능 증진용 약학적 조성물에 관한 것이다.

배경기술

[0003] 현대인들의 건강과 삶의 질 향상에 대한 관심이 높아지고 암, 면역부전, 아토피 자가 면역 등과 같은 면역계와 관련된 질환이 지속적으로 늘어남에 따라 면역증강을 위한 건강기능식품 연구와 제품이 증가하는 추세이다. 따라서 국내외 경기침체에도 불구하고 2013년 국내 건강기능식품 시장 규모는 1조 7,920억원으로 전년에 비해 5.2% 성장하였으며, 최근 5년간 연평균성장률은 11.5%로 지속적인 성장세를 나타내고 있다.

[0004] 또한, 건강기능식품의 기능성 별로 홍삼, 클로레라 등 면역기능 개선 관련 제품의 점유율이 25%로 가장 높은 비중을 차지하였으며, 다양한 계층의 소비자 욕구가 반영되면서 더욱 다양한 면역기능 개선 관련 건강기능식품 원

료 및 제품이 지속적으로 성장할 것으로 분석되었다.

[0005] 로알젤리는 꿀과 화분을 일벌들이 소화 흡수한 뒤, 인두부를 경유해서 만들어진 물질로, 봉군 내 어린 유충 및 여왕벌 유충의 먹이로 사용된다. 로알젤리는 신맛이 강하고 향이 있는 하얀 젤리 모양을 하고 있으며, 단백질이 풍부하고 특히 지방산 10-hydroxy-2-decenoic acid (10-HDA)를 포함하는 것 외에 비타민 및 판토텐산 등이 함유되어 있다. 로알젤리의 효능으로는 고지혈증, 동맥경화, 노화, 면역 등에 효과가 있는 것으로 보고되어 있으며, 식품공전에서는 로알젤리 원료 및 제품 기준 규격으로 10-HDA 함량을 기준으로 삼고 있다. 젊은 일벌이 꿀과 꽃가루를 먹고 체내에서 분해 및 합성한 성분으로 왕유(王乳)라고도 하여 예부터 영양보조 식품 또는 의약품으로 사용되고 있으며, 로알젤리의 성분 중 10-HDA는 면역력 향상, 골다공증 예방, 피부미용 등에 예방 및 개선 효과가 있다고 알려져 있고 전 세계적으로 건강기능식품으로 섭취되고 있다. 한편, 국내에서 2010년 건강기능식품 기능성 원료 재검토에서 과학적 효능/기능성평가의 자료 부족으로 건강기능식품 기능성 원료 품목에서 삭제되어 건강기능식품으로 판매되지 못하고 있다. 로알젤리는 해외 뿐 아니라 국내에서도 로알젤리의 기능성 원료에 대한 소비자의 지속적인 요구는 높으나 기능성이 인정된 로알젤리 제품이 없는 실정으로 식품의약품안전처에서 기능성을 인정한 로알젤리 제품의 연구개발이 필요하다.

[0006] 효소처리 로알젤리는 로알젤리 동결건조 분말에 단백분해효소를 처리하여 효소처리물을 얻는 효소처리단계를 포함하고, 여기에 사용되는 단백분해효소는 엔도 및 엑소형 단백분해효소, 엑소형 단백분해효소 및 엔도형 단백분해효소를 포함한다. 기존 로알젤리는 생체에 알레르기 반응을 일으키는 여러 가지 알레르기성 물질이 함유되어 있으나, 본 발명에 사용된 효소처리 로알젤리는 알레르기성 물질의 구조를 파괴 또는 변형하여 알레르기성을 감소시켰으며, 총 유리 아미노산 함량은 증가되었고, 식품공전상의 지표성분인 10-HDA의 함량은 일정하게 유지되었다.

[0007] 상기한 바와 같이 로알젤리에 대한 다양한 약리 효과에 대해 알려져 있지만, 효소처리 로알젤리 분말이 면역기능 증진 효능을 갖는지에 대해서는 아직까지 규명되지 않았고, 이에 대한 연구도 전무한 상태이다.

[0008] 이에 본 발명자들은 새로운 약물을 개발하기 위해 효소처리 로알젤리 분말에 대해서 면역기능 증진 연구를 수행한 결과, 효소처리 로알젤리 분말이 면역기능 증진 효과가 있음을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0010] 본 발명의 목적은 효소처리 로알젤리 분말을 유효성분으로 포함하는 면역기능 증진용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.

[0011] 본 발명의 또 다른 목적은 효소처리 로알젤리 분말을 유효성분으로 포함하는 면역기능 증진용 식품 조성물을 제공하는 것이다.

[0012] 본 발명의 또 다른 목적은 효소처리 로알젤리 분말을 유효성분으로 포함하는 면역기능 증진용 건강기능식품을 제공하는 것이다.

[0013] 본 발명의 또 다른 목적은 효소처리 로알젤리 분말을 인간을 제외한 면역기능 증진이 필요한 동물에 유효량 투여하는 단계;를 포함하는 동물의 면역기능을 증진시키는 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0015] 상기 목적을 달성하기 위해, 본 발명은 효소처리 로알젤리 분말을 유효성분으로 포함하는 면역기능 증진용 약학적 조성물을 제공한다.

[0016] 또한, 본 발명은 효소처리 로알젤리 분말을 유효성분으로 포함하는 면역기능 증진용 식품 조성물을 제공한다.

[0017] 또한, 본 발명은 효소처리 로알젤리 분말을 유효성분으로 포함하는 면역기능 증진용 건강기능식품을 제공한다.

[0018] 또한, 본 발명은 효소처리 로알젤리 분말을 인간을 제외한 면역기능 증진이 필요한 동물에 유효량 투여하는 단계;를 포함하는 동물의 면역기능을 증진시키는 방법을 제공한다.

발명의 효과

[0020] 본 발명의 효소처리 로얄젤리(ERJ) 분말은 알러지 반응을 일으키는 단백질을 포함하지 않고, 항산화 및 항염증 활성이 우수하며, 면역세포를 활발하게 증식시키고, 자연살해세포의 우수한 활성을 유도하여 탁월한 면역기능 증진 효과를 나타내므로, 면역기능 증진을 위한 의약품 또는 건강기능식품으로 유용하게 이용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0022] 도 1은 효소처리 로얄젤리 분말의 알러젠 제거를 나타낸 도이다.
- 도 2는 효소처리 로얄젤리 분말이 비장세포 증식에 미치는 영향을 나타낸 도이다.
- 도 3은 효소처리 로얄젤리 분말이 대식세포 증식에 미치는 영향을 나타낸 도이다.
- 도 4a는 효소처리 로얄젤리 분말이 항산화 지표인 α -diphenyl- β -picrylhydrazyl(DPPH) 활성에 미치는 영향을 나타낸 도이다.
- 도 4b는 효소처리 로얄젤리 분말이 항산화 지표인 Reactive oxygen synthesis(ROS) 활성에 미치는 영향을 나타낸 도이다.
- 도 4c는 효소처리 로얄젤리 분말이 항산화 지표인 Superoxide dismutase(SOD) 활성에 미치는 영향을 나타낸 도이다.
- 도 4d는 효소처리 로얄젤리 분말이 항산화 지표인 Glutathione(GSH) 활성에 미치는 영향을 나타낸 도이다.
- 도 4e는 효소처리 로얄젤리 분말이 복강 대식세포에서의 Nitric oxide(NO) 발현량에 미치는 영향을 나타낸 도이다.
- 도 5a는 효소처리 로얄젤리 분말이 복강 대식세포에서의 세포 내 염증에 관여하는 Tumor necrosis factor- α (TNF- α) 생성에 미치는 영향을 나타낸 도이다.
- 도 5b는 효소처리 로얄젤리 분말이 복강 대식세포에서의 세포 내 염증에 관여하는 Interferon- γ (IFN- γ) 생성에 미치는 영향을 나타낸 도이다.
- 도 6은 효소처리 로얄젤리 분말을 섭취한 실험동물의 복강 대식세포에서의 Nitric oxide(NO) 발현량에 미치는 영향을 나타낸 도이다.
- 도 7은 효소처리 로얄젤리 분말이 비장세포에서의 자연살해 세포 활성에 미치는 영향을 나타낸 도이다.
- 도 8a는 동물모델 식이량 측정에 관해 나타낸 도이다.
- 도 8b는 동물모델 체중 변화량 측정에 관해 나타낸 도이다.
- 도 9a는 효소처리 로얄젤리 분말이 체내 염증 발생 지표인 IL-1 β 의 활성에 미치는 영향을 나타낸 도이다.
- 도 9b는 효소처리 로얄젤리 분말이 체내 염증 발생 지표인 IL-6의 활성에 미치는 영향을 나타낸 도이다.
- 도 9c는 효소처리 로얄젤리 분말이 체내 염증 발생 지표인 TNF- α 의 활성에 미치는 영향을 나타낸 도이다.
- 도 9d는 효소처리 로얄젤리 분말이 체내 염증 발생 지표인 IL-10의 활성에 미치는 영향을 나타낸 도이다.
- 도 9e는 효소처리 로얄젤리 분말이 체내 염증 발생 지표인 IL-2의 활성에 미치는 영향을 나타낸 도이다.
- 도 9f는 효소처리 로얄젤리 분말이 체내 염증 발생 지표인 IFN- γ 의 활성에 미치는 영향을 나타낸 도이다.
- 도 10은 효소처리 로얄젤리 분말이 동물 모델에서의 비장세포 증식에 미치는 영향을 나타낸 도이다.
- 도 11은 효소처리 로얄젤리 분말이 동물 모델에서의 자연살해세포 활성에 미치는 영향을 나타낸 도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0023] 이하, 본 발명의 이점 및 특징, 그리고 그것들을 달성하는 방법은 첨부되는 도면과 함께 상세하게 후술되어 있

는 실시예들을 참조하면 명확해질 것이다. 그러나 본 발명은 이하에서 개시되는 실시예들에 한정되는 것이 아니라 서로 다른 다양한 형태로 구현될 것이며, 단지 본 실시예들은 본 발명의 개시가 완전하도록 하며, 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 발명의 범주를 완전하게 알려주기 위해 제공되는 것일 뿐, 본 발명은 청구항의 범주에 의해 정의될 뿐이다.

- [0024] 명세서 전체에 걸쳐 동일 참조 부호는 동일 구성 요소를 지칭한다. 또한, "및/또는"은 언급된 구성요소의 각각 및 하나 이상의 모든 조합을 포함한다.
- [0025] 본 명세서에서 사용된 용어는 실시예들을 설명하기 위한 것이며, 본 발명을 제한하고자 하는 것은 아니다. 본 명세서에서, 단수형은 문구에서 특별히 언급하지 않는 한 복수형도 포함한다. 명세서에서 사용되는 "포함한다(comprises)" 및/또는 "포함하는(comprising)"은 언급된 구성요소, 단계, 동작 및/또는 소자는 하나 이상의 다른 구성요소, 단계, 동작 및/또는 소자의 존재 또는 추가를 배제하지 않는다.
- [0026] 이하, 실시예 및 실험예에서 사용한 시약은 시중에서 구할 수 있는 것으로, 최상품을 사용하였으며, 별도의 언급이 없는 한, Sigma-Aldrich사에서 구입한 것을 사용하였다. 이하의 실험결과에 대해서는 필요시, 평균과 표준편차를 구하였고 통계적인 유의성을 검증하였다.
- [0027] 본 발명은 효소처리 로얄젤리 분말을 유효성분으로 포함하는 면역기능 증진용 약학적 조성물을 제공한다.
- [0028] 본 명세서에서, 용어 “효소”는 생명체 내 화학 반응의 촉매가 되는 것으로, 생체 세포가 생산하는 단백질성의 고분자 유기 촉매를 의미한다. 동물, 식물 등 모든 생물의 세포 속에는 여러 종류의 효소가 존재하며, 생명체의 화학적 반응에 관여한다.
- [0029] 상기 효소처리 로얄젤리 분말은 동결건조 로얄젤리에 단백분해효소(Protease 또는 Peptidase)를 처리하여 효소 처리물을 얻는 효소처리단계를 포함하여 이루어질 수 있다.
- [0030] 이 때, 상기 단백분해효소는 엔도 및 엑소형 단백분해효소, 엑소형 단백분해효소 및 엔도형 단백분해 효소로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상일 수 있고, 바람직하게는 진균성 엔도 및 엑소형 단백분해효소, 진균성 엑소형 단백분해효소 및 세균성 엔도형 단백분해효소로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상일 수 있고, 보다 바람직하게는 진균성 엔도 및 엑소형 단백분해효소, 진균성 엑소형 단백분해효소 및 세균성 알칼리성 엔도형 단백분해효소로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상일 수 있다. 본 발명의 일 실시예에서는, 동결건조 로얄젤리 100중량부에 대하여 진균성 엔도 및 엑소형 단백분해효소, 진균성 엑소형 단백분해효소 및 세균성 알칼리성 엔도형 단백분해효소를 각각 1중량부의 함량이 되도록 혼합하여 처리하였다.
- [0031] 진균성 엔도 및 엑소형 단백분해효소는 예를 들어, 아미노펩티다아제(aminopeptidase)와 카르복시펩티다아제(carboxypeptidase) 혼합효소일 수 있으며, 시판에는 Probeef 2000P, Sumizyme FP-G 등일 수 있다. 아미노펩티다아제와 카르복시펩티다아제 혼합효소는 진균에서 유래된 것일 수 있으며, 이와 같은 진균은 아스페르질루스 오리자에(*Aspergillus oryzae*)일 수 있다. 시판에는 아스페르질루스 오리자에(*Aspergillus oryzae*)로부터 유래된 아미노펩티다아제(aminopeptidase)와 카르복시펩티다아제(carboxypeptidase) 혼합효소를 포함한다.
- [0032] 또한, 진균성 엑소형 단백분해효소는 예를 들어, 루신아미노펩티다아제(leucyl aminopeptidase)일 수 있으며, 시판에는 Prozyme 2000P 등일 수 있다. 루신아미노펩티다아제는 진균에서 유래된 것일 수 있으며, 이와 같은 진균은 아스페르질루스 오리자에(*Aspergillus oryzae*)일 수 있다. 시판에는 아스페르질루스 오리자에(*Aspergillus oryzae*)로부터 유래된 루신아미노펩티다아제(leucyl aminopeptidase)를 포함한다.
- [0033] 또한, 세균성 엔도형 단백분해효소는 예를 들어, 메탈로엔도펩티다아제(metalloendopeptidase) 또는 세린프로테아제(serineprotease)일 수 있다. 메탈로엔도펩티다아제는 예를 들어, 바실로라이신(bacillolysin)일 수 있으며, 시판에는 Alphasase NP 등일 수 있다. 또한, 세린프로테아제(serinprotease)는 예를 들어, 서브틸리신(subtilisin)일 수 있으며, 시판에는 Foodpro alkaline protease 등일 수 있다. 이와 같은 메탈로엔도펩티다아제는 세균성 중성 엔도형 단백분해효소의 일종일 수 있다. 또한, 세린프로테아제는 세균성 알칼리성 엔도형 단백분해효소의 일종일 수 있다.
- [0034] 세균은 바실러스 아밀로리퀘파시엔스(*Bacillus amyloliquefaciens*) 또는 바실러스 리케니포르미스(*Bacillus licheniformis*)일 수 있다.
- [0035] 즉, 세균성 엔도형 단백분해효소는 바실러스 아밀로리퀘파시엔스(*Bacillus amyloliquefaciens*) 또는 바실러스 리케니포르미스(*Bacillus licheniformis*)로부터 유래된 것일 수 있다.

- [0036] 보다 바람직하게는, 세균성 중성 엔도형 단백질분해효소는 바실러스 아밀로리퀘파시엔스(*Bacillus amyloliquefaciens*)로부터 유래된 것(예, 바실로라이신)일 수 있다.
- [0037] 또한, 세균성 알칼리성 엔도형 단백질분해효소는 바실러스 리케니포르미스(*Bacillus licheniformis*)로부터 유래된 것(예, 서브틸리신)일 수 있다.
- [0038] 이 때, '로부터 유래된'은 '배양액으로부터 얻어진'을 포함하는 의미이다.
- [0039] 상기 단백질분해효소는 로알젤리 100중량부에 대하여 1 내지 10중량부로 처리할 수 있으며, 보다 바람직하게는 3중량부로 처리할 수 있다. 이와 같은 범위 미만에서 효소활성이 불충분할 염려가 있고, 초과시 효소량 대비 분해율이 감소할 염려가 있다. 이 때, 로알젤리 100중량부에 대하여 단백질분해효소 3중량부는 중량기준으로 로알젤리 100에 대하여, 단백질분해효소 3의 비율임을 의미한다. 이하, '중량부' 역시 이와 동일한 방식으로 해석될 수 있다. 또한, 이 때 상기 단백질분해효소 3중량부는, 진균성 엔도 및 엑소형 단백질분해효소 1중량부에 대하여, 진균성 엑소형 단백질분해효소 1중량부 및 세균성 엔도형 단백질분해효소 1중량부가 혼합된 것일 수 있다. 즉, 단백질분해효소는 로알젤리 100중량부에 대하여 3종류의 단백질분해효소가 각각 1중량부의 동량으로 혼합하여 처리됨이 바람직하다.
- [0040] 단백질분해효소로 처리 시, 처리는 용매 중에서 이루어질 수 있으며, 로알젤리 100 중량부에 대하여 용매는 100 내지 1000 중량부일 수 있다. 이 때, 용매는 물일 수 있다. 이와 같이, 로알젤리의 양에 따라 용매의 비율을 달리할 수 있다. 즉, 상대적으로 다량의 로알젤리에는 용매의 비율을 낮추고, 상대적으로 소량의 로알젤리에는 용매의 비율을 높일 수 있다. 예를 들어, 상대적으로 다량인 로알젤리에는 로알젤리 100중량부에 대하여 용매는 500중량부일 수 있고, 상대적으로 소량인 로알젤리에는 로알젤리 100중량부에 대하여 용매는 1000중량부일 수 있다. 이와 같이, 상대적으로 소량인 로알젤리에는 상대적으로 높은 비율의 용매를 첨가하여 단백질분해효소가 로알젤리와 충분히 접촉되도록 할 수 있다. 또한, 상대적으로 다량인 로알젤리에는 상대적으로 낮은 비율의 용매를 첨가하여도 절대적인 용매량 면에서 단백질분해효소가 로알젤리와 접촉하기에 충분하게 된다. 로알젤리에 대한 용매의 비율을 줄임으로써, 처리장치의 규모를 줄일 수 있고, 에너지 소모 역시 줄일 수 있게 된다.
- [0041] 또한, 로알젤리 분말을 단백질분해효소로 처리 시, 로알젤리 분말에 단백질분해효소를 혼합한 후 상기 혼합물을 40 내지 60℃의 온도조건에서 반응시킬 수 있으며, 바람직하게는 50 내지 60℃에서 1차 처리, 40 내지 50℃에서 2차 처리, 45 내지 55℃에서 3차 처리, 50 내지 60℃에서 4차 처리할 수 있고, 보다 바람직하게는 55℃에서 1차 처리, 45℃에서 2차 처리, 50℃에서 3차 처리, 55℃에서 4차 처리하는 온도조건에서 반응시키는 것일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0042] 효소처리물은 단백질분해효소가 불활성된 불활성화효소처리물일 수도 있다. 즉, 과잉의 단백질분해효소를 가열 등의 방법에 의해 불활성화시킨 상태일 수 있는 것이다. 불활성화는 가열에 의할 수 있으며, 가열은 예를 들어, 바람직하게는 70 내지 90℃에서 실시할 수 있다. 또한, 가열시간은 바람직하게는 15 내지 30분일 수 있다.
- [0043] 즉, 불활성화는 15 내지 30분간, 70 내지 90℃로 가열처리하여 이루어지는 것일 수 있다. 보다 바람직하게는, 로알젤리 100중량부에 대하여 용매 1000중량부일 때, 15분간 섭씨 90℃로 가열할 수 있다. 또한, 로알젤리 100중량부에 대하여 용매 500중량부일 때, 30분간 섭씨 70℃로 가열할 수 있다. 이와 같이, 로알젤리에 대한 용매의 비율에 따라 가열 조건을 달리할 수 있다. 용매의 비율이 클 경우 보다 높은 온도에서 단시간 처리하고, 용매의 비율이 작을 경우 보다 낮은 온도에서 장시간 처리하여 효소를 불활성화할 수 있다. 또한, 상대적으로 낮은 온도에서 불활성화되는 경우, 탄화현상 또는 열변성 등도 보다 효과적으로 방지될 수 있다.
- [0044] 동결건조단계는 농축물을 동결건조하여 동결건조물을 얻는 단계로, 동결건조기 등으로 실시할 수 있다. 동결건조는 예를 들어, 동결건조기로 특정 조건(선반온도 -40℃ 이하, 트랩냉동 -65℃ 이하, 진공도 250mTorr, 건조온도 23℃)에서 실시할 수 있다.
- [0045] 본 발명자들은 효소처리 로알젤리 분말의 면역기능 증진 효과가 있음을 확인하였으며, 구체적으로 본 발명의 효소처리 로알젤리는 SDS 겔 전기영동 염색결과를 통해 알리지 반응을 일으키는 단백질(47 kDa~55 kDa)을 포함하지 않는 것을 확인하였으며 항산화(DPPH, ROS, SOD, GSH, NO)와 염증 지표(TNF- α , IFN- γ) 분석을 통해 비 효소처리 로알젤리(RJ)에 비해 효소처리 로알젤리(ERJ)의 활성도가 높은 것을 확인하였다. 그리고 RJ에 비해 ERJ가 비장세포로부터 면역세포인 B cell과 T cell이 활발하게 증식되는 경향도 확인하였다. 또한, 체내 면역반응과 관련이 있는 자연살해세포의 활성을 확인하였고, ER에서 농도의존적으로 유의성 있게 LDH의 수치가 증가함을 확인하였다.

- [0046] 상기한 바와 같이, 본 발명에 따른 효소처리 로얄젤리는 면역기능 증진 효과가 우수하므로, 면역 질환의 예방에 유용한 건강기능식품 또는 의약품으로 이용될 수 있다.
- [0047] 본 발명의 조성물은 약학적 조성물의 제조에 통상적으로 사용하는 적절한 담체, 부형제 및 희석제를 더 포함할 수 있다. 또한 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 및 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용될 수 있다. 당해 기술 분야에 알려진 적합한 제제는 문헌(Remington's Pharmaceutical Science, 최근, Mack Publishing Company, Easton PA)에 개시되어 있는 것을 사용하는 것이 바람직하다. 포함될 수 있는 담체, 부형제 및 희석제로는 락토오스, 텍스트로오스, 수크로오스, 소르비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로오스, 메틸 셀룰로오스, 미정질 셀룰로오스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시 벤조에이트, 프로필히드록시 벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유 등이 있다. 상기 조성물을 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충전제, 증량제, 결합제, 습윤제, 봉해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다. 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 상기 조성물에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트 (calcium carbonate), 수크로오스, 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, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제, 좌제가 포함된다. 비수성용제, 현탁제로는 프로필렌글리콜 (propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텝솔 (witpsol), 마크로골, 트윈 (tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다.
- [0048] 본 발명에서 사용되는 용어 "투여"는 임의의 적절한 방법으로 개체에게 소정의 본 발명의 조성물을 제공하는 것을 의미한다.
- [0049] 본 발명의 약학적 조성물의 바람직한 투여량은 환자의 상태 및 체중, 질병의 정도, 약물형태, 투여경로 및 기간에 따라 다르지만, 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다. 바람직한 효과를 위해서, 본 발명의 효소처리 로얄젤리 분말의 일일투여량은 1 mg/ kg 내지 10000 mg/kg의 양으로 투여할 수 있으며 하루에 한번 투여할 수도 있고, 수 회 나누어 투여할 수도 있다.
- [0050] 본 발명의 약학적 조성물은 개체에게 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 주사에 의해 투여될 수 있다.
- [0051] 본 발명의 조성물은 면역기능 증진 또는 면역 질환의 예방을 위하여 단독으로, 또는 수술, 방사선 치료, 호르몬 치료, 화학 치료 및 생물학적 반응 조절제를 사용하는 방법들과 병용하여 사용할 수 있다.
- [0052] 또한, 본 발명은 효소처리 로얄젤리 분말을 유효성분으로 포함하는 면역기능 증진용 식품 조성물 및 건강기능식품을 제공한다.
- [0053] 본 발명의 효소처리 로얄젤리 분말을 식품 조성물 또는 건강기능식품으로 사용할 경우, 상기 효소처리 로얄젤리 분말을 그대로 첨가하거나 다른 식품 또는 식품 성분과 함께 사용될 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다. 유효성분의 혼합량은 사용 목적(예방, 건강 또는 치료적 처치)에 따라 적절하게 결정될 수 있다. 일반적으로, 식품 또는 음료의 제조 시에 본 발명의 효소처리 로얄젤리 분말을 원료에 대하여 15중량 % 이하, 바람직하게는 10 중량 % 이하의 양으로 첨가된다. 그러나, 건강 및 위생을 목적으로 하거나 또는 건강 조절을 목적으로 하는 장기간의 섭취의 경우에는 상기 범위 이하일 수 있으며, 안전성 면에서 아무런 문제가 없기 때문에 유효성분은 상기 범위 이상의 양으로도 사용될 수 있다.
- [0054] 상기 식품의 종류에는 특별한 제한은 없다. 상기 물질을 첨가할 수 있는 식품의 예로는 육류, 소시지, 빵, 초콜릿, 젠디류, 스낵류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류를 포함한 낙농제품, 각종 수프, 음료수, 차, 드링크제, 알코올 음료 및 비타민 복합제 등이 있으며, 통상적인 의미에서의 건강식품을 모두 포함한다.
- [0055] 본 발명의 건강음료 조성물은 통상의 음료와 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 포함할 수 있다. 상술한 천연 탄수화물은 포도당, 과당과 같은 모노사카라이드, 말토오스, 수크로오스와 같은 디사카라이드, 및 텍스트린, 사이클로텍스트린과 같은 천연 감미제나, 사카린, 아스파르탐과 같은 합성 감미제

등을 사용할 수 있다. 상기 천연 탄수화물의 비율은 본 발명의 조성물 100 ml 당 일반적으로 약 0.01 내지 10 g, 바람직하게는 약 0.01 내지 0.1 g 이다.

[0056] 상기 외에 본 발명의 조성물은 여러 가지 영양제, 비타민, 전해질, 풍미제, 착색제, 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알코올, 탄산음료에 사용되는 탄산화제 등을 포함할 수 있다. 그 밖에 본 발명의 조성물은 천연 과일주스, 과일주스 음료 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 포함할 수 있다. 이러한 성분은 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있다. 이러한 첨가제의 비율은 크게 중요하진 않지만 본 발명의 조성물 100중량부 당 0.01 내지 0.1 중량부의 범위에서 선택되는 것이 일반적이다.

[0057] 또한, 본 발명은 효소처리 로얄젤리 분말을 인간을 제외한 면역기능 증진이 필요한 동물에 유효량 투여하는 단계;를 포함하는 동물의 면역기능을 증진시키는 방법을 제공한다.

[0059] 이하 본 발명의 이해를 돕기 위하여 바람직한 실시예, 실험예를 제시한다. 그러나 하기의 실시예, 실험예는 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐, 실시예, 실험예 및 제조예에 의해 본 발명의 내용이 한정되는 것은 아니다.

[0061] **실시예 1. 효소처리 로얄젤리 분말 제조**

[0062] 1kg 동결건조 로얄젤리 분말{10-HDA(10-hydroxy-2-decenoic acid) 5.0% 이상; ZHEJIANG JIANGSHAN BEE ENTERPRISE CO., LTD} 100 중량부에 대하여 정제수 1000 중량부를 가하여 혼합한 후, 진균성 엔도 및 엑소형 단백질분해효소인 probeef 2000P, 진균성 엑소형 단백질분해효소인 Prozyme 2000P 및 세균성 알칼리성 엔도형 단백질분해효소인 Foodpro Alkaline protease를 함께 혼합하였다. 각 단백질분해효소는 ㈜비전바이오켐(대한민국)에서 구매하였고, 상기 로얄젤리 분말 100중량부에 대하여 각각 1중량부(총 3중량부)의 함량이 되도록 혼합하였다. 그 후, 55℃에서 1차 처리, 45℃에서 2차 처리, 50℃에서 3차 처리, 55℃에서 4차 처리하는 온도조건에서 반응시키고 70℃에서 30분간 열처리하여 단백질분해효소의 불활성화를 진행하였다. 열처리 종료 후, 동결건조기(PVTE300KL, ㈜일신랩)로 동결건조(조건: 선반온도 -40℃ 이하, 트랩냉동 -65℃ 이하, 진공도 250mTorr, 건조온도 23℃)하여, 분말형태의 효소처리 로얄젤리를 제조하였다. 한편, 본 발명에 따른 효소처리 로얄젤리 분말은 단백질분해효소 혼합 후 동결건조 전, 감압농축과정의 유무에 따른 염증성 사이토카인 발현량에 유의한 차이가 없음을 확인하고, 자사 등록특허(KR 10-1900258 B1)의 제조방법과 달리 감압농축과정을 생략하고 제조한 것에 또 다른 특징이 있다.

[0064] **실험예 1. 단백질 전기영동법(SDS-PAGE)를 이용한 알러젠(allergen) 유무 확인**

[0065] 상기 실시예 1에서 수득한 효소처리 로얄젤리 분말에 알러지 반응을 일으키는 단백질이 존재하는지 여부를 분석하기 위하여 단백질 농도를 측정하여 10% 젤 농도의 SDS-PAGE를 통해 단백질을 분자량대로 분리하였다. 전기영동을 끝낸 후 젤을 1% 쿠마시 블루(Coomassie Blue G-250)를 이용하여 염색시킨 후 비염색 부분을 탈색 용액(45% 메탄올, 10% 아세트산)에서 탈색시켜 측정하고 그 결과를 도 1에 나타내었다. 비교를 위해 실시예 1과 같이 효소처리를 거치지 않은 비 효소처리 로얄젤리(RJ)를 함께 실험에 이용하였다.

[0066] 도 1에 나타난 바와 같이, RJ에서는 47~55kDa 크기의 단백질 발현이 확인되지만, ERJ 에서는 나타나지 않았다. 이를 통해, ERJ는 알러지 반응을 일으키는 47~55kDa 크기의 단백질의 제거뿐 아니라 큰 분자의 단백질이 저분자화 되었다는 것을 확인하였다.

[0068] **실험예 2. 효소처리 로얄젤리 분말에 의한 비장세포 및 대식세포 증식 효과**

[0069] **2-1. 효소처리 로얄젤리 분말의 비장세포 증식 효과**

[0070] 상기 실시예 1에서 수득한 효소처리 로얄젤리 분말의 비장세포 증식능을 분석하기 위하여 정상 BALB/c 마우스로부터 얻은 비장세포를 48-웰 플레이트에 5×10^5 cells/웰이 되도록 분주하고 시료를 각각 농도별로 처리한 뒤 24시간, 48시간 배양하였다. 그 후 250 µg/mL 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2-5-diphenyltetrazolium

bromide(MTT) 용액을 첨가하여 4시간 동안 배양한 다음 배양액을 제거하고 200 μL의 DMSO(dimethyl sulfoxide)를 가하여 10분간 실온에서 반응 후 570nm에서 흡광도를 측정하고 그 결과를 도 2에 나타내었다.

[0071] 도 2에 나타난 바와 같이, 본 발명에 따른 효소처리 로얄젤리 분말 처리 시 비장세포 증식능이 유의성 있게 증가하였다. 또한, 효소처리 로얄젤리 분말(ERJ) 처리 후 24시간 및 48시간 경과 후 비장세포의 증식능 확인 결과 ERJ는 24시간에 비해 48시간에서 높은 증식능을 나타냈다. 특히, 동일 농도 (100 μg/ml)에서 효소처리 로얄젤리 분말과 비 효소처리 로얄젤리(RJ)를 비교하였을 때, ERJ의 증식능이 RJ보다 유의성 있게 증가하였다.

[0073] **2-1. 효소처리 로얄젤리 분말의 대식세포 증식 효과**

[0074] 복강 대식 세포에서의 증식 효과를 확인하기 위해, 96-웰 플레이트에 복강 대식 세포를 5×10^4 cells/웰이 되도록 분주하고 시료들을 각각의 농도별로 처리한 뒤 RJ를 제외한 나머지 처리군에 1 μg/mL LPS를 처리하고 24시간 배양하였다. 그 후, 250 μg/mL MTT 용액을 첨가하여 4시간동안 배양한 다음 배양액을 제거하고 200 μL의 DMSO를 가하여 10분간 실온에서 반응 후 570nm에서 흡광도를 측정하였다.

[0075] 도 3에 나타난 바와 같이, 효소처리 로얄젤리 분말 단독처리 및 LPS 자극시 모두 유의성 있게 세포 증식이 증가하였고, 동일한 농도 (100 μg/ml)에서 RJ에 비해 ERJ에서 유의성 있게 세포 증식이 증가함을 확인하였다.

[0077] **실험예 3. 효소처리 로얄젤리 분말의 항산화 활성**

[0078] **3-1. 효소처리 로얄젤리 분말의 α-diphenyl-β-picrylhydrazyl(DPPH) 활성 증가 분석**

[0079] 상기 실시예 1에서 수득한 효소처리 로얄젤리 분말의 DPPH 활성을 분석하기 위하여 대표적인 항산화 지표로 널리 알려진 ascorbic acid (비타민C)와 함께, 양성대조군인 RJ와 ERJ의 시료 농도를 모두 1mg/mL로 맞추고 샘플 10 μL와 DPPH 용액(126 μg/mL) 90 μL를 섞은 후 상온에서 10분간 방치한 후 517nm에서 흡광도를 측정하고 그 결과를 도 4a에 나타내었다.

[0080] 도 4a에 나타난 바와 같이, 동일한 농도 (100 μg/ml)에서 RJ에 비해 ERJ와 Vc에서 DPPH 자유 라디칼 소거능이 유의성 있게 증가하였다. 특히, ERJ는 RJ에 비해 약 30% 정도 DPPH 자유 라디칼 소거능이 증가함을 확인하였다.

[0082] **3-2. 효소처리 로얄젤리 분말의 Reactive oxygen synthesis(ROS) 활성 분석**

[0083] 상기 실시예 1에서 수득한 효소처리 로얄젤리 분말의 ROS 활성을 분석하기 위하여 복강 대식세포를 96-웰 플레이트에 1×10^4 cell/웰이 되도록 분주하였다. 48시간 후, 시료를 각 농도별로 처리하고, Vehicle을 제외한 나머지 처리군에 LPS를 1 μg/ml의 농도로 처리하고 15분 동안 배양하였다. 15분 후 PBS : DCFDA (2',7'-Dichlorofluorescein diacetate) = 5000 : 1로 희석시킨 용액을 배지와 동량으로 섞어 각 웰에 처리하고 실온에서 20분간 반응 후, 형광 발광량을 측정하고 그 결과를 도 4b에 나타내었다.

[0084] 도 4b에 나타난 바와 같이, 대조군은 Vehicle에 비해 ROS의 활성이 증가하였고, ERJ는 대조군에 비해 ROS의 활성이 농도 의존적으로 유의성 있게 감소하였다. 특히, 동일한 농도 (100 μg/ml)에서 ERJ가 RJ에 비해 현저히 ROS 활성을 감소시킴을 확인하였다.

[0086] **3-3. 효소처리 로얄젤리 분말의 Superoxide dismutase (SOD) 활성 분석**

[0087] 상기 실시예 1에서 수득한 효소처리 로얄젤리 분말의 SOD 활성을 분석하기 위하여 Superoxide Dismutase Assay kit(Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA)를 사용하여 측정하였다. 복강에서 분리한 대식세포를 페트리 디쉬 (100cm²)에서 24시간 배양한 뒤 시료와 LPS 1 μg/mL을 처리하고 24시간 더 배양하였다. 그 후 세포 분쇄액이 희석된 완충액을 샘플로 하여 샘플 10 μL에 radical detector 200 μL, Xanthine oxidase 20 μL를 넣고 상온에서 30분 방치 후 440-460 nm에서 흡광도를 측정하고 그 결과를 도 4c에 나타내었다.

[0088] 도 4c에 나타난 바와 같이, 대조군은 Vehicle에 비해 SOD 활성이 감소하였고, ERJ는 대조군에 비해 SOD의 활성이 농도 의존적으로 유의성 있게 증가하였다. 특히, 동일한 농도 (100 μg/ml)에서 ERJ가 RJ에 비해 SOD 활성이

증가함을 확인하였다.

[0090] **3-4. 효소처리 로알젤리 분말의 Glutathione(GSH) 활성 분석**

[0091] 상기 실시예 1에서 수득한 효소처리 로알젤리 분말의 GSH 활성을 분석하기 위하여 Glutathione Assay kit(Cayman Chemical, Ann Arbor, MI, USA)를 사용하여 측정하였다. 복강 대식세포를 24시간 배양한 후, 시료를 각 농도별로 처리하고, Vehicle을 제외한 나머지 처리군에 LPS(Lipopolysaccharide)를 1µg/ml의 농도로 처리한 다음 24시간을 더 배양하였다. 그리고 세포 분쇄액이 희석된 완충액을 샘플로 하여 샘플 50 µL, MES 버퍼, cofactor mixture, enzyme mix, DTNB를 혼합한 reaction buffer 150 µL를 분주하고 차광하여 30분 후에 405~414nm에서 흡광도를 측정하고 그 결과를 도 4d에 나타내었다.

[0092] 도 4d에 나타난 바와 같이, 대조군은 Vehicle에 비해 GSH 활성이 감소하였고, ERJ는 대조군에 비해 GSH의 활성이 농도 의존적으로 유의성 있게 증가하였다. 특히, 동일한 농도 (100 µg/ml)에서 ERJ가 RJ에 비해 GSH 활성이 증가함을 확인하였다.

[0094] **3-5. 효소처리 로알젤리 분말의 Nitric oxide(NO) 발현량 분석**

[0095] 상기 실시예 1에서 수득한 효소처리 로알젤리 분말의 NO 발현량을 분석하기 위하여 Griess reagent system (Promega, Madison, WI)를 사용하여 측정하였다. 복강 대식세포를 96-웰 플레이트에 5×10^4 cell/웰로 분주하여 4시간 동안 부착시킨 후 시료를 각 농도별로 처리하고, Vehicle을 제외한 나머지 처리군에 LPS를 1µg/ml의 농도로 처리하여 24시간 동안 배양시켰다. 그 후, 배양액 100 µL에 동량의 Griess reagent를 혼합하여 실온에서 10분간 반응시키고 550nm에서 흡광도를 측정하고 그 결과를 도 4e에 나타내었다.

[0096] 도 4e에 나타난 바와 같이, 대조군은 Vehicle에 비해 NO의 생성이 증가하였고, ERJ는 대조군에 비해 NO의 생성이 농도 의존적으로 유의성 있게 감소하였다. 특히, 동일한 농도 (100 µg/ml)에서 ERJ가 RJ에 비해 NO의 생성이 감소함을 확인하였다.

[0098] **실험예 4. 효소처리 로알젤리 분말의 항염증 활성 평가**

[0099] **4-1. Tumor necrosis factor-α (TNF-α) 활성**

[0100] 복강 대식세포에서의 세포 내 염증에 관여하는 Tumor necrosis factor-α (TNF-α) 생성을 분석하기 위하여 마우스 TNF-α ELISA kit (Abcam, Cambridge, MA)를 사용하여 측정하였다. 복강 대식세포를 24시간 동안 배양시킨 후 시료를 각 농도별로 처리하고, Vehicle을 제외한 나머지 처리군에 LPS를 1µg/ml의 농도로 처리한 다음 24시간 배양하였다. 그리고, 96-웰 플레이트에 배양액(샘플) 100 µL를 넣고, 실온에서 2시간 30분 반응시킨 다음 비오틴화된(biotinylated) TNF-α 검출 항체를 100 µL 넣고, 실온에서 1시간, HRP-streptavidin 용액 100 µL를 넣고 실온에서 45분, TMB one step substrate reagent 100 µL를 넣고 실온에서 30분간 방치한 후 50 µL의 종결 용액(stop solution)을 넣고 450nm에서 흡광도를 측정하고 그 결과를 도 5a에 나타내었다.

[0101] 도 5a에 나타난 바와 같이, 대조군은 Vehicle에 비해 TNF-α의 생성이 증가하였으며, ERJ는 대조군에 비해 TNF-α의 생성이 농도 의존적으로 유의성 있게 감소하였다. 특히, 동일한 농도(100 µg/ml)에서 ERJ가 RJ에 비해 TNF-α의 생성이 감소함을 확인하였다.

[0103] **4-2. Interferon-γ (IFN-γ) 활성**

[0104] 복강 대식세포에서의 세포 내 염증에 관여하는 Interferon-γ (IFN-γ) 생성을 분석하기 위하여 마우스 IFN-γ ELISA kit (Thermo Scientific, MA, USA)를 사용하여 측정하였다. 복강 대식세포를 24시간 동안 배양시킨 후, 시료를 각 농도별로 처리하고, Vehicle을 제외한 나머지 처리군에 LPS를 1µg/ml의 농도로 처리하고 24시간 배양하였다. 그리고 96-웰 플레이트에 배양액(샘플) 100 µL를 넣고, 실온에서 2시간 30분 반응, 비오틴화된 IFN-γ 검출 항체를 100 µL 넣고, 실온에서 1시간, HRP-streptavidin 용액 100 µL를 넣고 실온에서 45분, TMB one step substrate reagent 100 µL를 넣고 실온에서 30분간 방치한 후 50 µL의 종결 용액을 넣고 450 nm에서 흡광

도를 측정하고 그 결과를 도 5b에 나타내었다.

[0105] 도 5b에 나타난 바와 같이, 대조군은 Vehicle에 비해 IFN- γ 의 생성이 증가하였으며, ERJ는 대조군에 비해 IFN- γ 의 생성이 농도 의존적으로 유의성 있게 감소하였음을 확인하였다.

[0107] **실험예 5. 효소처리 로알젤리 분말의 면역 활성 평가**

[0108] 효소처리 로알젤리 분말이 면역 활성 단백질의 발현에 미치는 영향을 확인하기 위하여 복강 대식세포에서의 Nitric oxide(NO)생성을 분석하였으며, 이를 Griess reagent system(Promega, Madison, WI)를 사용하여 측정하였다. 복강 대식세포를 96-웰 플레이트에 5×10^4 cell/웰로 분주하여 4시간 동안 부착 시키고 시료를 각 농도별로 처리하고 24시간 배양시켰다. 그 후 배양액 100 μ L에 동량의 Griess reagent를 혼합하여 실온에서 10분간 반응한 다음 550 nm에서 흡광도를 측정하고 그 결과를 도 6에 나타내었다.

[0109] 도 6에 나타난 바와 같이, ERJ는 Vehicle에 비해 NO의 생성이 증가하였다. 특히, 동일한 농도(100 μ g/ml)에서 ERJ가 RJ에 비해 NO의 생성이 증가함을 확인하였다.

[0111] **실험예 6. 효소처리 로알젤리 분말의 자연 살해 세포 활성(Natural killer cell activity, NK cell activity)**

[0112] 효소처리 로알젤리 분말이 비장세포에서의 자연살해 세포 활성에 미치는 영향을 분석하기 위해 LDH cytotoxicity detection kit를 이용하여 평가하였다. 비장세포에 시료를 각 농도별로 처리하여 24시간 배양시킨 후, YAC-1 세포 개수가 1×10^4 cell/웰일 때, 비장세포 : YAC-1 = 200 : 1이 되도록 96-웰 플레이트에 분주하고 4시간 동안 배양시켰다. 그 다음 96-웰 플레이트에 배양액 100 μ L와 reaction mixture 100 μ L를 넣고 37 $^{\circ}$ C 인큐베이터에서 30분간 반응시킨 후 490nm에서 흡광도를 측정하고 그 결과를 도 7에 나타내었다.

[0113] 도 7에 나타난 바와 같이, ERJ 50 및 ERJ 100 μ g/ml은 Vehicle에 비해 유의성 있게 세포독성이 증가함을 확인하였다. 특히, ERJ 100 μ g/ml은 RJ에 비해 세포독성이 유의하게 높음을 확인하였다.

[0115] **실험예 7. 동물모델 식이량 및 체중 변화량 측정**

[0116] 실험동물의 식이량 및 체중을 측정하기 위하여 BALB/c 마우스(25 g)를 다물 사이언스(대전, 한국)에서 구입하여 일정한 습도(40~60%)와 일정한 온도(22 \pm 2 $^{\circ}$ C) 및 12시간 주기로 명암이 조절되는 실험 환경에 1주간 적응시켰다. 사육기간 동안 사육실 온도, 습도는 24시간 단위로 확인하였다. ERJ 처리군(50, 150, 300, 500mg/kg) 및 RJ 처리군 (500mg/kg) 으로 나누었다. ERJ 및 RJ는 고품사료로 제작하여 사용하였으며, 하루 식이량을 4g으로 한 개의 군에 10마리씩 4주 동안 총 1.2 kg을 섭취한다고 가정하였을 때 사료에 들어갈 양을 계산하여 조제하였다. 조제한 ERJ 사료는 자유식으로 섭취 시켰다. 자유식이기간은 4주간으로 하였으며, 각각의 그룹이 식이 섭취량(food intake)은 매주 체크하였다. 각 군의 개체 수는 각 농도마다 10마리로 정한 뒤 반복 실험을 실시하고 그 결과를 도 8에 나타내었다.

[0117] 도 8a에 나타난 바와 같이, 모든 실험군에서 시간이 지날수록 전반적으로 식이섭취량이 증가하는 경향을 보이는데, 이는 주령이 높아지는 과정에서 일어나는 자연스러운 현상으로 판단된다. 또한, 도 8b에 나타난 바와 같이, 모든 실험군에서 시간이 지날수록 체중이 다소 증가하는 경향을 보이는데, 이는 주령이 높아지는 과정에서 일어나는 자연스러운 현상으로 판단된다.

[0119] **실험예 8. 사이토카인 (IL-1 β , IL-6, TNF- α , IL-10, IL-2, IFN- γ) 분비능 측정**

[0120] **8-1. IL-1 β 의 활성**

[0121] 상기 실험예 7-1의 BALB/c 정상 마우스 모델의 혈청과 대식세포의 배양액에서 분비되는 사이토카인의 양을 ELISA kit을 이용하여 측정하였다. 배양액을 샘플로 하여 준비된 96-웰 플레이트에 차례대로 샘플 100 μ L를 넣고 실온에서 2시간 30분, 비오틴화된 IL-1 β 검출 항체를 100 μ L 넣고 실온에서 1시간, HRP-streptavidin 용액 100 μ L를 넣고 실온에서 45분, TMB one step substrate reagent 100 μ L를 넣고 실온에서 30분간 방치시킨 후 50 μ L의 종결 용액을 넣고 450nm에서 흡광도를 측정하였으며, 그 결과를 도 9a에 나타내었다.

[0122] 도 9a에 나타난 바와 같이, IL-1 β 염증 지표는 대식세포 배양액과 혈청에서 유사한 경향을 나타냈다. ERJ 처리 후 대식세포 배양액에서 측정된 IL-1 β 함량과 혈청에서 측정된 IL-1 β 모두 유의성 있게 감소하는 것으로 나타났다. 동일 농도 (500mg/kg)에서 ERJ는 RJ보다 유의성 있게 IL-1 β 의 낮은 생성량을 나타냄을 확인하였다.

[0124] **8-2. IL-6의 활성**

[0125] 상기 실험예 7-1의 BALB/c 정상 마우스 모델의 혈청과 대식세포의 배양액에서 분비되는 사이토카인의 양을 ELISA kit을 이용하여 측정하였다. 배양액을 샘플로 하여 준비된 96-웰 플레이트에 차례대로 샘플 50 μ L를 넣고 실온에서 2시간, Ms IL-6 biotin-conjugate solution을 100 μ L 넣고 실온에서 30분, streptavidin-HRP 100 μ L를 넣고 실온에서 30분, Stabilized Chromagen 100 μ L를 넣고 실온에서 30분간 방치시킨 후 100 μ L의 종결 용액을 넣고 450nm에서 흡광도를 측정하였으며, 그 결과를 도 9b에 나타내었다.

[0126] 도 9b에 나타난 바와 같이, IL-6 염증 지표는 대식세포 배양액과 혈청에서 유사한 경향을 나타냈다. ERJ 처리 후 대식세포 배양액에서 측정된 IL-6 함량과 혈청에서 측정된 IL-6은 모두 유의성 있게 감소하는 것으로 나타났으며, 동일 농도 (500mg/kg)에서 ERJ는 RJ보다 유의성 있게 IL-6의 낮은 생성량을 나타냄을 확인하였다.

[0128] **8-3. TNF- α 의 활성**

[0129] 상기 실험예 7-1의 BALB/c 정상 마우스 모델의 혈청과 대식세포의 배양액에서 분비되는 사이토카인의 양을 ELISA kit을 이용하여 측정하였다. 배양액을 샘플로 하여 준비된 96-웰 플레이트에 차례대로 샘플 100 μ L를 넣고 실온에서 2시간 30분, 비오틴화된 TNF- α 검출 항체를 100 μ L 넣고, 실온에서 1시간, HRP-streptavidin 용액 100 μ L를 넣고 실온에서 30분, TMB one step substrate reagent 100 μ L를 넣고 실온에서 30분간 방치시킨 후 50 μ L의 종결 용액을 넣고 450nm에서 흡광도를 측정하였으며, 그 결과를 도 9c에 나타내었다.

[0130] 도 9c에 나타난 바와 같이, TNF- α 염증 지표는 대식세포 배양액과 혈청에서 유사한 경향을 나타냈다. 특히, ERJ 처리 후 대식세포 배양액에서 측정된 TNF- α 함량과 혈청에서 측정된 TNF- α 모두 유의성 있게 감소하는 것으로 나타났으며 동일 농도(500mg/kg)에서 혈청 시료는 ERJ는 RJ보다 유의성 있게 TNF- α 의 낮은 생성량을 나타냈다.

[0132] **8-4. IL-10의 활성**

[0133] 상기 실험예 7-1의 BALB/c 정상 마우스 모델의 혈청과 대식세포의 배양액에서 분비되는 사이토카인의 양을 ELISA kit을 이용하여 측정하였다. 배양액을 샘플로 하여 준비된 96-웰 플레이트에 차례대로 샘플 50 μ L와 분석 버퍼 50 μ L를 넣고 실온에 3시간, 비오틴화된 IL-10 항체 시약(biotinylated antibody reagent)을 50 μ L 넣고 실온에서 1시간, streptavidin-HRP 100 μ L를 넣고 실온에서 30분, TMB substrate solution 100 μ L를 넣고 실온에서 30분간 방치시킨 후, 100 μ L의 종결 용액을 넣고 450nm에서 흡광도를 측정하였으며, 그 결과를 도 9d에 나타내었다.

[0134] 도 9d에 나타난 바와 같이, IL-10 염증 지표는 대식세포 배양액과 혈청에서 유사한 경향을 나타냈다. 특히, ERJ 처리 후 대식세포 배양액에서 측정된 IL-10 함량과 혈청에서 측정된 IL-10 모두 유의성 있게 감소하는 것으로 나타났으며, 동일 농도(500mg/kg)에서 혈청 시료는 ERJ는 RJ보다 유의성 있게 IL-10의 낮은 생성량을 나타냄을 확인하였다.

[0136] **8-5. IL-2의 활성**

[0137] 상기 실험예 7-1의 BALB/c 정상 마우스 모델의 혈청과 대식세포의 배양액에서 분비되는 사이토카인의 양을 ELISA kit을 이용하여 측정하였다. 배양액을 샘플로 하여 준비된 96-웰 플레이트에 차례대로 샘플 50 μ L와 분석 버퍼 50 μ L를 넣고 실온에 3시간, 비오틴화된 IL-2 항체 시약을 50 μ L 넣고 실온에서 1시간, streptavidin-HRP 100 μ L를 넣고 실온에서 30분, TMB substrate solution 100 μ L를 넣고 실온에서 30분간 방치시킨 후, 100 μ L의 종결 용액을 넣고 450nm에서 흡광도를 측정하였으며, 그 결과를 도 9e에 나타내었다.

[0138] 도 9e에 나타난 바와 같이, IL-2 염증 지표는 대식세포 배양액과 혈청에서 유사한 경향을 나타냈다. 특히, ERJ

처리 후 대식세포 배양액에서 측정된 IL-10 함량과 혈청에서 측정된 IL-2 모두 유의성 있게 감소를 나타냈으며, 동일 농도(500mg/kg)에서 혈청 시료는 ERJ는 RJ보다 유의성 있게 IL-2의 낮은 생성량을 나타냄을 확인하였다.

[0140] **8-6. IFN- γ 의 활성**

[0141] 상기 실험에 7-1의 BALB/c 정상 마우스 모델의 혈청과 대식세포의 배양액에서 분비되는 사이토카인의 양을 ELISA kit을 이용하여 측정하였다. 배양액을 샘플로 하여 준비된 96-웰 플레이트에 차례대로 샘플 50 μ L를 넣고 실온에 2시간, 비오틴화된 IFN- γ 항체 시약을 50 μ L 넣고 실온에서 1시간, streptavidin-HRP 100 μ L을 넣고 실온에서 30분, TMB substrate solution 100 μ L를 넣고 실온에서 30분간 방치시킨 후, 100 μ L의 종결 용액을 넣고 450nm에서 흡광도를 측정하였으며, 그 결과를 도 9f에 나타내었다.

[0142] 도 9f에 나타난 바와 같이, IFN- γ 염증 지표는 대식세포 배양액과 혈청에서 유사한 경향을 나타냈다. 특히, ERJ 처리 후 대식세포 배양액에서 측정된 IFN- γ 함량과 혈청에서 측정된 IFN- γ 모두 유의성 있게 감소를 나타냈으며 동일 농도(500mg/kg)에서 혈청 시료는 ERJ는 RJ보다 유의성 있게 IFN- γ 의 낮은 생성량을 나타냄을 확인하였다.

[0144] **실험예 9. 비장세포 증식 효과**

[0145] **9-1. 비장세포 증식능**

[0146] 상기 실험예7-1의 BALB/c 정상 마우스 모델에서 분리한 비장세포 현탁액을 5×10^6 cell/웰로 96-웰 플레이트에 분주하고 면역세포 증식을 활성화하는 Mitogen (LPS, ConA)을 처리한 다음 44시간 후에 세포 생존능(cell viability)을 측정하고 그 결과를 도 10에 나타내었다.

[0147] 도 10에 나타난 바와 같이, Mitogen 처리 전후 모든 ERJ는 Vehicle에 비해 세포 증식 효과가 있음을 확인하였다. 특히, 동일 용량(500mg/kg)에서 ERJ가 RJ에 비해 유의성 있게 비장세포 증식 효과가 있음을 확인하였다.

[0149] **실험예 10. 자연살해세포 활성 측정 (Natural killer cell activity, NK cell activity)**

[0150] 상기 실험예 7-1의 BALB/c 정상 마우스 모델에서 분리한 비장세포를 LDH cytotoxicity detection kit을 이용하여 평가하였다. ERJ를 섭취한 마우스의 비장세포를 동일 농도로 seeding하고 24시간 후, YAC-1 세포 개수가 1×10^4 cell/웰 일 때, 비장세포 : YAC-1 = 200 : 1이 되도록 96-웰 플레이트에 분주한 다음 4시간 동안 배양시킨다. 그 후 96-웰 플레이트에 배양액 100 μ L와 reaction mixture 100 μ L를 넣고 37 $^{\circ}$ C 인큐베이터에 30분간 반응시키고 490nm에서 흡광도를 측정하였으며, 그 결과를 도 11에 나타내었다.

[0151] 도 11에 나타난 바와 같이, ERJ 섭취시 농도 의존적으로 LDH가 증가하였으며, 이를 통해 NK세포 활성이 증가함을 확인하였다. 특히, 동일 용량(500mg/kg)에서 ERJ가 RJ에 비해 NK세포 활성이 증가함을 확인하였다.

[0153] 상기와 같이, 본 발명에 따른 효소처리 로얄젤리(ERJ) 분말을 사용하여 시험관내 실험 및 ERJ 식이를 통한 실험 동물에서의 면역기능 증진 효능을 평가한 결과, SDS 겔 전기영동 염색결과에서 ERJ가 알러지 반응을 일으키는 단백질(47kDa~55 kDa)을 포함하지 않는 것을 확인하였으며 항산화(DPPH, ROS, SOD, GSH, NO)와 염증 지표(TNF- α , IFN- γ) 분석을 통해 비 효소처리 로얄젤리(RJ)에 비해 동결건조 로얄젤리(ERJ)의 활성도가 높음을 확인하였다. 그리고 RJ에 비해 ERJ가 비장세포로부터 면역세포인 B cell과 T cell을 활발하게 증식시키는 경향도 확인하였다. 또한, 체내 면역반응과 관련이 있는 자연살해세포가 활성화됨을 확인하였고, ERJ 처리군에서 농도의존적으로 유의성 있게 LDH의 수치가 증가함을 확인하여 우수한 면역기능 증진 효과가 나타남을 확인하였다.

[0155] 이하 본 발명의 효소처리 로얄젤리 분말을 유효성분으로 포함하는 면역기능 증진용 약학적 조성물 및 식품 조성물의 제제예를 설명하나, 본 발명을 한정하고자 함이 아닌 단지 구체적으로 설명하고자 함이다.

- [0157] **제제예 1. 약학적 제제**
- [0158] **1-1. 산제의 제조**
- | | | |
|--------|-----------|--------|
| [0159] | 효소처리 로얄젤리 | 20mg |
| [0160] | 유당 | 100 mg |
| [0161] | 탈크 | 10 mg |
- [0162] 상기의 성분들을 혼합하고 기밀포에 충전하여 산제를 제조한다.
- [0164] **1-2. 정제의 제조**
- | | | |
|--------|------------|--------|
| [0165] | 효소처리 로얄젤리 | 10 mg |
| [0166] | 옥수수전분 | 100 mg |
| [0167] | 유당 | 100 mg |
| [0168] | 스테아린산 마그네슘 | 2 mg |
- [0169] 상기의 성분들을 혼합한 후 통상의 정제의 제조방법에 따라서 타정하여 정제를 제조한다.
- [0171] **1-3. 캡슐제의 제조**
- | | | |
|--------|-------------|---------|
| [0172] | 효소처리 로얄젤리 | 10 mg |
| [0173] | 결정성 셀룰로오스 | 3 mg |
| [0174] | 락토오스 | 14.8 mg |
| [0175] | 마그네슘 스테아레이트 | 0.2 mg |
- [0176] 통상의 캡슐제 제조방법에 따라 상기의 성분을 혼합하고 젤라틴 캡슐에 충전하여 캡슐제를 제조한다.
- [0178] **1-4. 주사제의 제조**
- | | | |
|--------|---|---------|
| [0179] | 효소처리 로얄젤리 | 10 mg |
| [0180] | 만니톨 | 180 mg |
| [0181] | 주사용 멸균 증류수 | 2974 mg |
| [0182] | Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O | 26 mg |
- [0183] 통상의 주사제의 제조방법에 따라 1 앰플당 (2 ml) 상기의 성분 함량으로 제조한다.
- [0184] **1-5. 액제의 제조**
- | | | |
|--------|-----------|-------|
| [0185] | 효소처리 로얄젤리 | 20 mg |
| [0186] | 이성화당 | 10 g |
| [0187] | 만니톨 | 5 g |
| [0188] | 정제수 적량 | |
- [0189] 통상의 액제의 제조방법에 따라 정제수에 각각의 성분을 가하여 용해시키고 레몬향을 적량 가한 다음 상기의 성분을 혼합한 다음 정제수를 가하여 전체를 정제수를 가하여 전체 100 ml로 조절한 후 갈색병에 충전하여 멸균시켜 액제를 제조한다.

[0191] **제제예 2. 식품 제제**

[0192] **2-1. 건강식품의 제조**

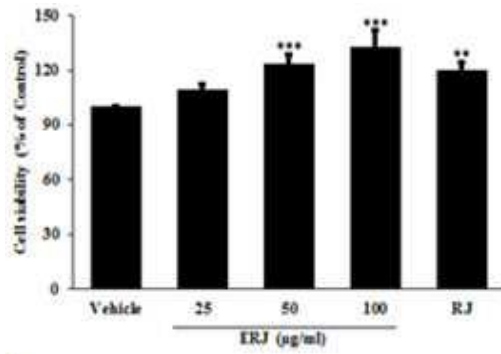
[0193]	효소처리 로얄젤리	100 mg
[0194]	비타민 혼합물 적량	
[0195]	비타민 A 아세테이트	70 μg
[0196]	비타민 E	1.0 mg
[0197]	비타민 B1	0.13 mg
[0198]	비타민 B2	0.15 mg
[0199]	비타민 B6	0.5 mg
[0200]	비타민 B12	0.2 μg
[0201]	비타민 C	10 mg
[0202]	비오틴	10 μg
[0203]	니코틴산아미드	1.7 mg
[0204]	엽산	50 μg
[0205]	판토텐산 칼슘	0.5 mg
[0206]	무기질 혼합물 적량	
[0207]	황산제1철	1.75 mg
[0208]	산화아연	0.82 mg
[0209]	탄산마그네슘	25.3 mg
[0210]	제1인산칼륨	15 mg
[0211]	제2인산칼슘	55 mg
[0212]	구연산칼륨	90 mg
[0213]	탄산칼슘	100 mg
[0214]	염화마그네슘	24.8 mg

[0215] 상기의 비타민 및 미네랄 혼합물의 조성비는 비교적 건강식품에 적합한 성분을 바람직한 실시예로 혼합 조성하였지만, 그 배합비를 임의로 변형 실시하여도 무방하며, 통상의 건강식품 제조방법에 따라 상기의 성분을 혼합한 다음, 과립을 제조하고, 통상의 방법에 따라 건강식품 조성물 제조에 사용할 수 있다.

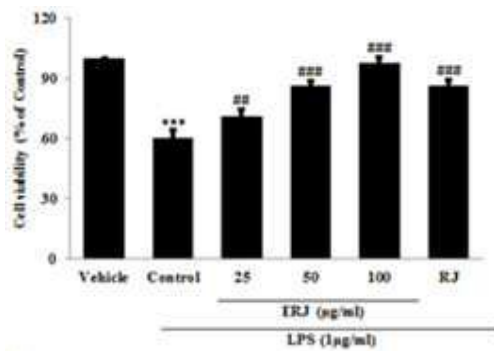
[0217] **2-2. 건강음료의 제조**

[0218]	효소처리 로얄젤리	100 mg
[0219]	비타민 C	15 g
[0220]	비타민 E(분말)	100 g
[0221]	젓산철	19.75 g
[0222]	산화아연	3.5 g
[0223]	니코틴산아미드	3.5 g

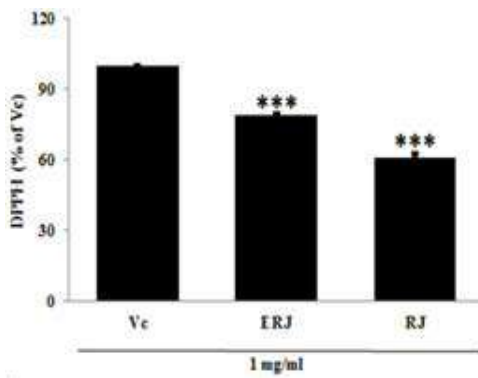
도면3a



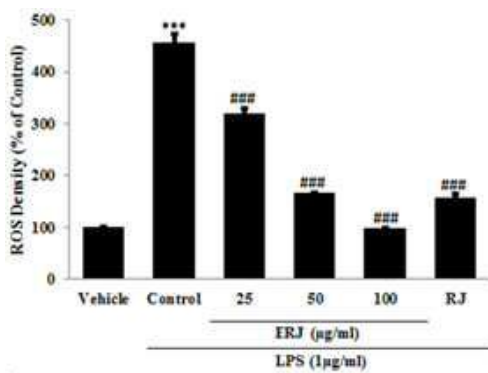
도면3b



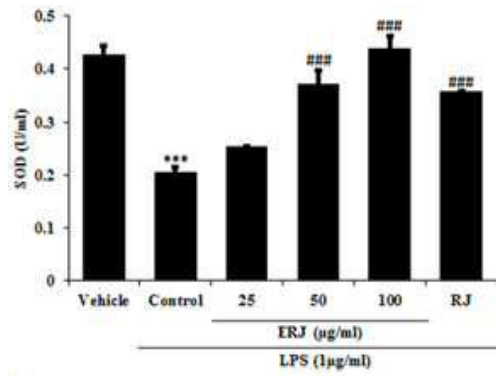
도면4a



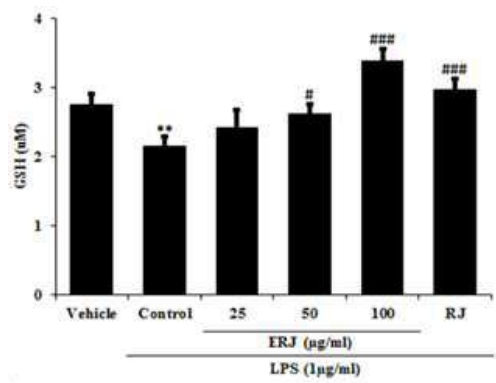
도면4b



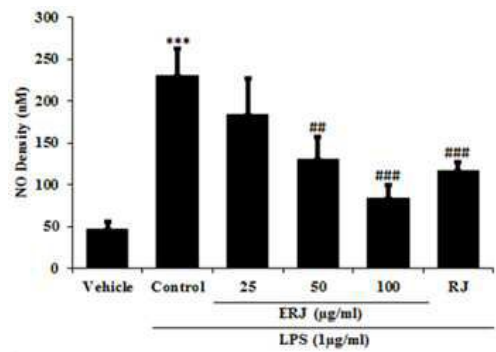
도면4c



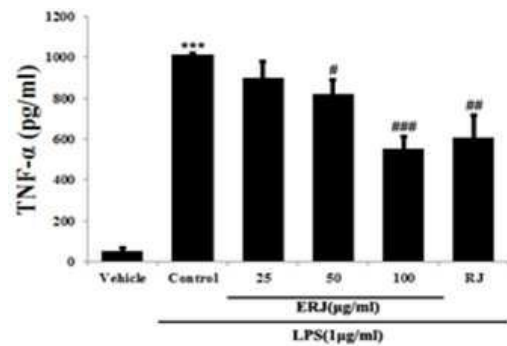
도면4d



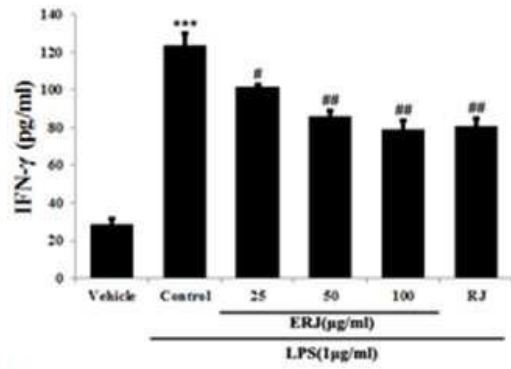
도면4e



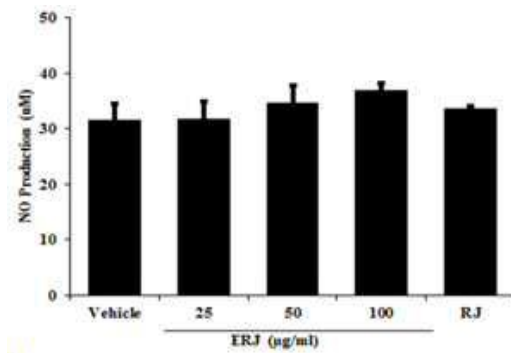
도면5a



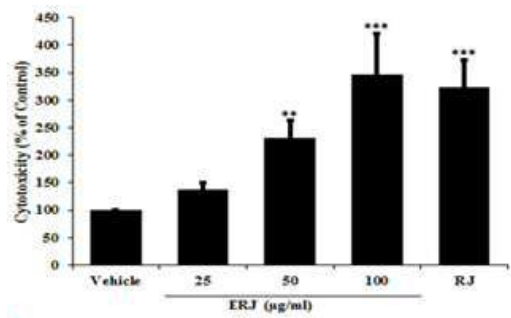
도면5b



도면6



도면7



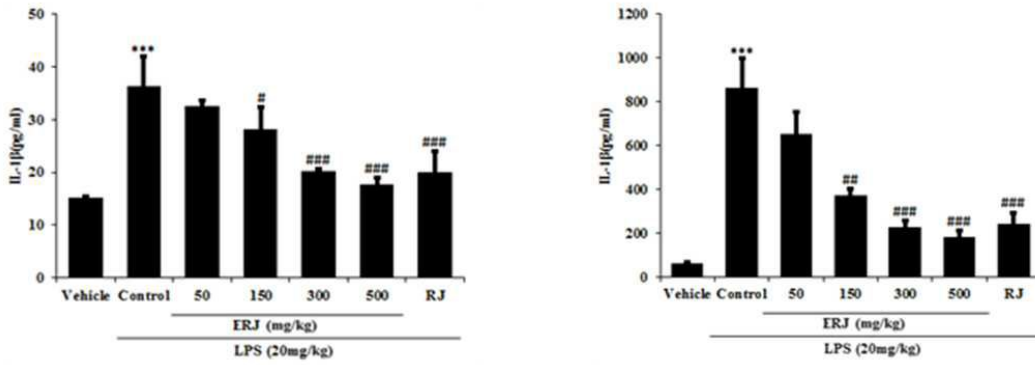
도면8a

Food intake (g/day)					
Group (mg/kg)	Week				
	1	2	3	4	
Normal	3.33±0.14	3.89±0.30	3.92±0.15	4.07±0.08	
ERJ	50	3.33±0.00	3.83±0.14	3.73±0.27	4.00±0.40
	150	3.19±0.31	3.94±0.28	3.93±0.20	4.34±0.30
	300	3.24±0.44	3.89±0.46	3.72±0.60	4.16±0.56
	500	3.14±0.27	3.99±0.36	3.58±0.09	4.32±0.45
RJ	3.10±0.50	3.88±0.33	3.85±.28	4.37±0.11	

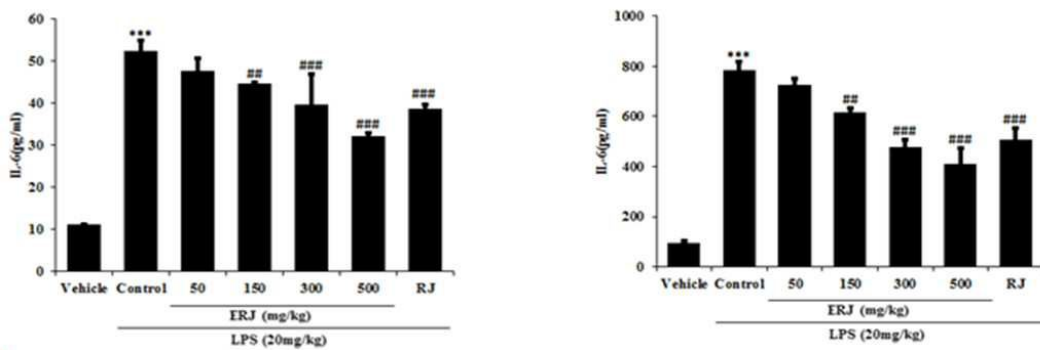
도면8b

Body weight (g)							
Group (mg/kg)	Week						
	0	1	2	3	4	weight change	
Normal	24.6±0.37	25.56±0.45	25.96±0.54	26.22±0.79	26.6±0.72	2	
ERJ	50	23.87±.72	24.48±03.5 3	25.02±0.64	25.71±.73	25.77±0.55	1.9
	150	23.65±0.73	24.15±.81	24.69±0.72	25.29±0.87	25.66±0.71	2.01
	300	23.93±0.41	24.49±.50	25.0±0.61	25.85±0.98	25.87±0.73	1.94
	500	24.08±0.64	23.9±0.61	24.77±0.83	25.9±0.86	26.10±0.25	2.02
RJ	23.08±0.61	23.81±0.83	24.25±0.89	24.98±0.97	25.14±1.18	2.06	

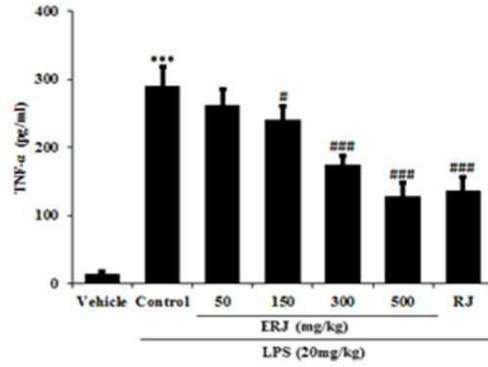
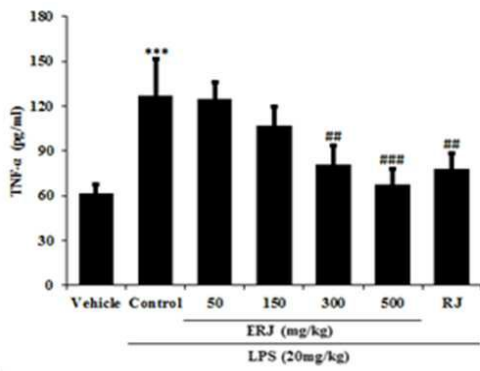
도면9a



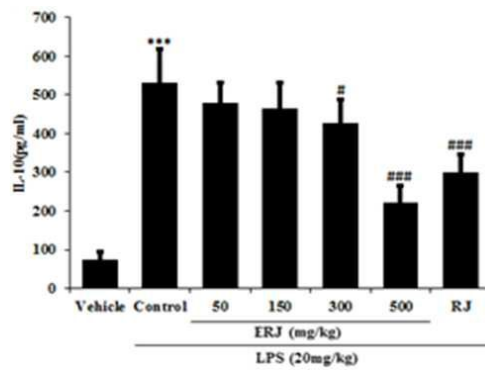
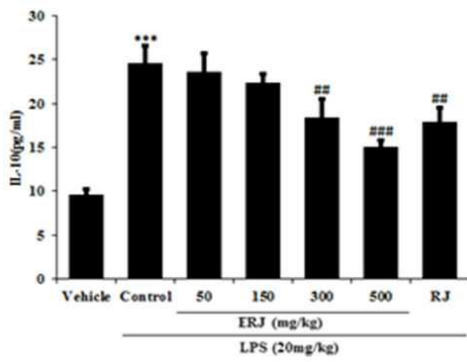
도면9b



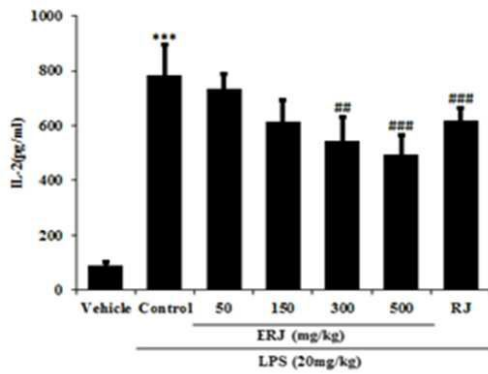
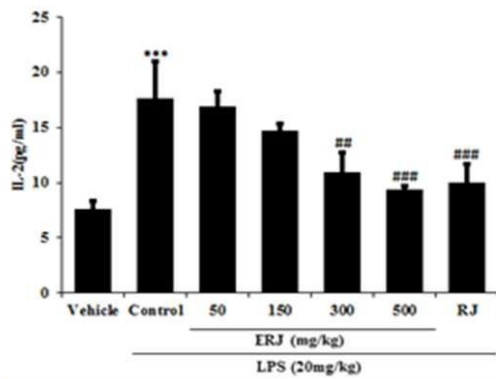
도면9c



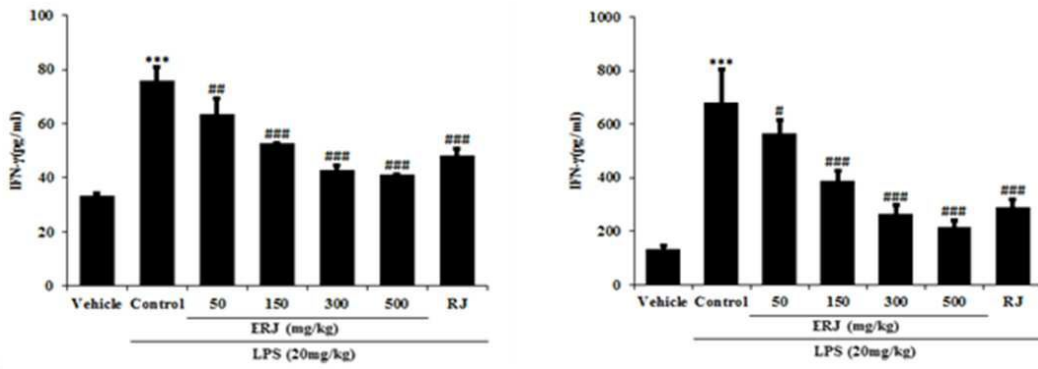
도면9d



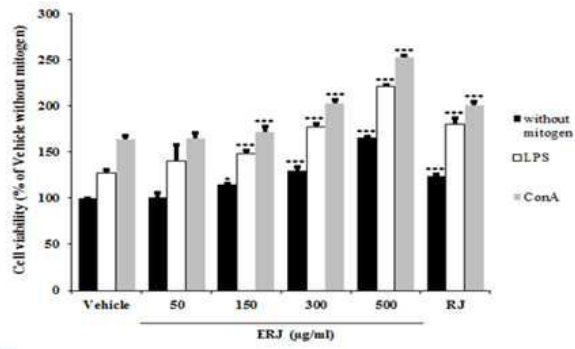
도면9e



도면9f



도면10



도면11

