



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2020년02월24일

(11) 등록번호 10-2080719

(24) 등록일자 2020년02월18일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
A61K 36/48 (2006.01) A23L 29/00 (2016.01)  
A23L 33/105 (2016.01) A61P 21/00 (2006.01)
- (52) CPC특허분류  
A61K 36/48 (2013.01)  
A23L 29/065 (2016.08)
- (21) 출원번호 10-2019-0086630
- (22) 출원일자 2019년07월17일  
심사청구일자 2019년07월17일
- (65) 공개번호 10-2020-0008977
- (43) 공개일자 2020년01월29일
- (30) 우선권주장  
1020180083146 2018년07월17일 대한민국(KR)
- (56) 선행기술조사문헌  
KR1020170124473 A  
KR1020180048416 A  
KR1020190009093 A

- (73) 특허권자  
서울대학교산학협력단  
서울특별시 관악구 관악로 1 (신림동)  
광동제약 주식회사  
서울특별시 서초구 서초중앙로 85 (서초동)
- (72) 발명자  
양승희  
서울특별시 관악구 청룡1길 27, 305호(봉천동)  
양희  
서울특별시 송파구 송이로15길 31(가락동, 가락2차쌍용아파트)  
(뒷면에 계속)
- (74) 대리인  
리앤목특허법인

전체 청구항 수 : 총 12 항

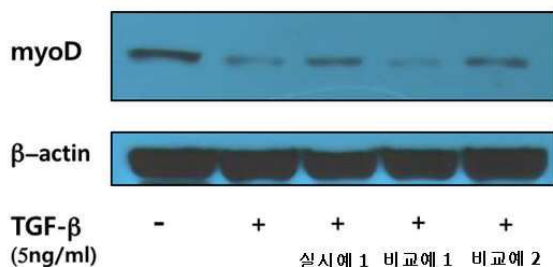
심사관 : 윤동준

(54) 발명의 명칭 약콩 발효물을 포함하는 근감소증의 예방, 치료용, 근력 개선 또는 근육량 증대용 조성물

(57) 요약

일 양상에 따른 조성물은 한국인 영유아 유산균으로 발효한 약콩 발효물을 포함하고 있는 것으로, 근육분해를 촉진하고 근육 단백질을 분해를 억제함으로써 근육 질환을 예방 또는 치료할 수 있다.

대표도 - 도1a



(52) CPC특허분류

A23L 33/105 (2016.08)  
 A61P 21/00 (2018.01)  
 A23V 2002/00 (2013.01)  
 A23V 2200/316 (2013.01)  
 A61K 2236/19 (2013.01)

(72) 발명자

**허지현**

서울특별시 양천구 목동서로 340, 932동 602호(신정동, 목동신시가지아파트9단지)

**허철성**

경기도 용인시 기흥구 용구대로2394번길 27, 106동 901호(마북동, 삼성래미안1차아파트)

**이기원**

서울특별시 관악구 난곡로 66, 107동 1504호(신림동, 대우신림2차푸르지오아파트)

**이태경**

경기도 의정부시 통일로466번길 3, 101동 401호(신곡동, 서해아파트)

**구영태**

경기도 의왕시 내손로 57, 1401동 1202호(내손동, 의왕내손이편한세상)

**김진수**

경기도 용인시 수지구 진산로 90, 511동 403호(풍덕천동, 진산마을삼성래미안5차아파트)

**이선주**

서울특별시 영등포구 문래로26길 6, 105동 1502호(문래동3가, 문래동메가트리움)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2015R1A2A1A10053567  
 부처명 과학기술정보통신부  
 연구관리전문기관 서울대학교  
 연구사업명 도약연구지원사업(전략)  
 연구과제명 한국 유아 장내 유래 유산균을 이용한 고기능성 식품소재 개발  
 기여율 1/2  
 주관기관 서울대학교  
 연구기간 2015.11.01 ~ 2018.10.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2018R1A2A1A05078707  
 부처명 과학기술정보통신부  
 연구관리전문기관 서울대학교  
 연구사업명 도약연구지원사업(전략)  
 연구과제명 한국 유아 장내 유래 유산균 발효 기술 기반 고기능성 발효 식품소재 개발  
 기여율 1/2  
 주관기관 서울대학교  
 연구기간 2018.09.01 ~ 2021.08.31

**명세서**

**청구범위**

**청구항 1**

약콩에 비티도박테리움 애니멀리스 서브스페시스 락티스(*Bifidobacterium animalis subsp. Lactis*.) LDTM 8102 (KCTC13392BP) 균주를 접종하여 발효시킨, 약콩발효물을 유효성분으로 함유하는 근육 질환의 예방 또는 개선용 식품 조성물로서, 상기 근육 질환은 근 기능 저하, 근육 감소, 근육 소모 또는 근육 퇴화로 인한 근육 질환인 것인 식품 조성물.

**청구항 2**

청구항 1에 있어서, 상기 발효물은 발효 여과물 또는 발효 추출물을 포함하는 것인 식품 조성물.

**청구항 3**

삭제

**청구항 4**

청구항 1에 있어서, 상기 근육 질환은 긴장감퇴증(atony), 근위축증(muscular atrophy), 근이영양증(muscular dystrophy), 근무력증, 악액질(cachexia), 경직성 척추 증후군(rigid spinesyndrome), 근위축성 측삭경화증(루게릭병, amyotrophic lateral sclerosis), 경직성 척추 증후군(rigid spinesesyndrome), 샤르코-마리-투스병(Charcot-Marie-Tooth disease) 및 근감소증(sarcopenia)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것인 식품 조성물.

**청구항 5**

청구항 4에 있어서, 상기 근감소증은 노인성 근감소증인 것인 식품 조성물.

**청구항 6**

청구항 1에 있어서, 근육 분화를 촉진하는 것인 식품 조성물.

**청구항 7**

청구항 1에 있어서, 근육 단백질의 분해를 억제하는 것인 식품 조성물.

**청구항 8**

청구항 1에 있어서, 상기 약콩은 전처리된 것인 식품 조성물.

**청구항 9**

청구항 8에 있어서, 상기 전처리는 로스팅(roasting) 또는 분쇄를 수행하여 처리된 것인 식품 조성물.

**청구항 10**

약콩에 비피도박테리움 애니멀리스 서브스페시스 락티스(*Bifidobacterium animalis subsp. Lactis*) LDTM 8102 (KCTC13392BP) 균주를 접종하여 발효시킨, 약콩 발효물을 유효성분으로 함유하는 근육 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물로서, 상기 근육 질환은 근 기능 저하, 근육 감소, 근육 소모 또는 근육 퇴화로 인한 근육 질환인 것인 약학적 조성물.

**청구항 11**

약콩에 비피도박테리움 애니멀리스 서브스페시스 락티스(*Bifidobacterium animalis subsp. Lactis*) LDTM 8102 (KCTC13392BP) 균주를 접종하여 발효시킨, 약콩 발효물을 유효성분으로 함유하는 근육 분화 촉진, 근육 재생 또

는 근육 강화용 조성물.

**청구항 12**

약콩에 비피도박테리움 애니멀리스 서브스페시스 락티스(*Bifidobacterium animalis subsp. Lactis*) LDTM 8102 (KCTC13392BP) 균주를 접종하여 발효시키는 단계를 포함하는 약콩 발효물을 제조하는 방법.

**청구항 13**

청구항 12에 있어서, 발효시키는 단계 전, 약콩을 100 내지 300℃에서 5 내지 30분 동안 로스팅하는 단계를 포함하는 것인 약콩 발효물을 제조하는 방법.

**발명의 설명**

**기술 분야**

[0001] 약콩 발효물을 함유하는 근육 질환의 예방, 치료용 또는 근육 증강용 조성물에 관한 것이다.

**배경 기술**

[0002] 최근 고령인구가 전세계적으로 급증하는 추세에 있는 가운데, UN에 따르면 2050년에는 60세 이상 인구가 20억 명이 넘을 것으로 예측되고 있다. 근육 감소와 근력 약화는 노화로 인해 일어나는 주요 신체 변화증상 중 하나로서, 40세 이상부터 단계적으로 진행되는 것으로 알려져 있다. 골격근은 전체 몸무게의 50%에 달하는 가장 큰 기관이며, 근감소증(sarcopenia)은 신체능력을 저하시키고 낙상과 골절의 위험을 높이는 등 삶의 질에 큰 영향을 미치기 때문에 근감소증에 대한 연구는 앞으로 더 활발해 질 것으로 예상된다.

[0003] 그러나, 근 감소에 효과적인 대안이 아직까지 나오지 않은 실정이다. 근 감소 치료에 호르몬 치료가 대표적으로 행해지고 있으나 그다지 효과적이지 않고 부작용들이 속속들이 보고되고 있는 시점에서 새로운 대안이 필요한 때이다. 한편 많은 연구들이 단백질 섭취와 근육 생성은 떼놓을 수 없는 관계임을 입증해 왔음에도 불구하고 우리나라 65세 이상의 인구 중 50%가 한국인 영양섭취 기준 미만으로 단백질을 섭취하고 있다(2015 국민영양통계). 콩은 양질의 단백질을 함유하고 있으며, 다른 식재료보다 경제적이라는 이점도 갖고 있다. 또한 소비자들 사이에서 선호도가 높은 식품이며 많은 건강 기능성을 포함하고 있는데, 대두 단백질뿐만 아니라 이소플라본(isoflavone)과 같은 파이토케미컬(Phytochemical)은 항산화, 항염증, 그리고 다른 생리 활성능에 의해 만성질환의 위험을 낮춘다는 사실이 보고된 바 있다. 그 중에서도 검정콩은 예로부터 약초로서 사용되어 왔고, 몇몇 연구는 검정콩이 노란콩보다 항산화 효과가 높다는 것을 밝히기도 하였다. 또한 검정콩은 일반 대두와 달리 이소플라본 외에도 껍질에 안토시아닌(Anthocyanins)과 프로안토시아니딘(Proanthocyanidins)를 포함하고 있어, 다양한 기능성이 존재한다

[0004] 근육의 재료가 되는 단백질을 섭취할 때에는 일일 권장량을 충족하여 섭취했는지 여부뿐만 아니라, 단백질의 체내 흡수 정도를 따져야 하는데 최근 미국 식품의약국(FDA)은 발효해서 나온 콩 단백질이 소화흡수율이 최고에 이른다고 발표한바 있다. 발효는 소화 흡수를 용이하게 할 뿐만 아니라 많은 대사체(metabolites)들이 생성되어 건강 기능성이 배로 증가한다. 따라서 발효를 거친 콩 단백질 혹은 콩 안토시아닌, 프로시아니딘, 이소플라본 등은 근육 생성과 근육 분화에 더 효과적인 도움을 줄 수 있을 것으로 예상된다.

**발명의 내용**

**해결하려는 과제**

[0005] 일 양상은 약콩에 비피도박테리움 애니멀리스 서브스페시스 락티스(*Bifidobacterium animalis subsp. Lactis*.) LDTM 8102 (KCTC13392BP) 균주를 접종하여 발효시킨, 약콩 발효물을 유효성분으로 함유하는 근육 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공하는 것이다.

[0006] 다른 양상은 약콩에 비피도박테리움 애니멀리스 서브스페시스 락티스(*Bifidobacterium animalis subsp. Lactis*.) LDTM 8102 (KCTC13392BP) 균주를 접종하여 발효시킨, 약콩 발효물을 유효성분으로 함유하는 근육 질환의 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공하는 것이다.

[0007] 다른 양상은 약콩에 비피도박테리움 애니멀리스 서브스페시스 락티스(*Bifidobacterium animalis subsp. Lactis*) LDTM 8102 (KCTC13392BP) 균주를 접종하여 발효시킨, 약콩 발효물을 유효성분으로 함유하는 근육 분화

촉진, 근육 재생 또는 근육 강화용 조성물을 제공하는 것이다.

[0008] 다른 양상은 약콩에 비피도박테리움 애니멀리스 서브스페시스 락티스(*Bifidobacterium animalis subsp. Lactis*) LDTM 8102 (KCTC13392BP) 균주를 접종하여 발효시키는 단계를 포함하는 약콩 발효물을 제조하는 방법을 제공하는 것이다.

**과제의 해결 수단**

[0009] 일 양상은 약콩에 비피도박테리움 애니멀리스 서브스페시스 락티스(*Bifidobacterium animalis subsp. Lactis*.) LDTM 8102 (KCTC13392BP) 균주를 접종하여 발효시킨, 약콩 발효물을 유효성분으로 함유하는 근육 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다. 다른 양상은 약콩에 비피도박테리움 애니멀리스 서브스페시스 락티스(*Bifidobacterium animalis subsp. Lactis*.) LDTM 8102 (KCTC13392BP) 균주를 접종하여 발효시킨, 약콩 발효물을 개체에 투여하는 단계를 포함하는 근육 질환을 치료하는 방법을 제공한다.

[0010] 본 명세서 내 용어, “약콩”은 껍질이 까맣고 크기는 보통 검은콩보다 작은 소립 검정콩을 말하며, 쥐눈이콩, 소청자, 약선콩, 다원콩, 소청 2호 등이 있으며 보통 검은콩보다 훨씬 작지만, 이소플라본 계열 유용성분인 제니스테인(genistein)과 다이드제인(daidzein)이 다른 검은 콩 보다 월등히 많이 포함되어 있다.

[0011] 본 명세서 내 용어, "비피도박테리움 애니멀리스 서브스페시스 락티스(*Bifidobacterium animalis subsp. Lactis*.) LDTM 8102 (KCTC13392BP) 균주"는 한국인 영유아의 분변으로부터 분리된 것으로서, 베타-글루코시다아제( $\beta$ -glucosidase)의 생산 능력이 우수한 바, 쌀, 보리, 우유, 콩, 인삼 등과 해조류, 목질계 등을 포함하는 바이오매스 천연물에 대해 미생물 대사를 통해 유용물질로 생물 전환하는데 효과적으로 이용될 수 있다.

[0012] 본 명세서 내 용어, "발효물"은 유산균을 이용하여 원재료를 물리적, 화학적인 방법으로 변성 또는 변형시키는 것을 의미하며, 자연 하에서는 몇 만년이 걸려야 바뀔 수 있는 것을 단 며칠 또는 몇 개월 만에 원하는 결과물을 얻을 수 있는 분해 과정을 의미한다. 구체적으로, 상기 발효물은 약콩을 유산균 배양매지에 혼합하고 유산균을 접종 및 발효시켜 생산된 발효산물로서, 상기 유산균은 비피도박테리움 애니멀리스 서브스페시스 락티스(*Bifidobacterium animalis subsp. Lactis*.) LDTM 8102 (KCTC13392BP) 균주인 것일 수 있다. 또한, 상기 발효물은 상기 유산균에 의해 발효된 산물을 의미할 뿐만 아니라 약콩을 유산균으로 발효시킨 후 여과한 발효 여과물 또는 발효물을 용매로 추출한 발효 추출물을 포함하는 것일 수 있다.

[0013] 상기 약콩은 발효 전, 전처리된 것일 수 있다. 구체적으로, 상기 약콩은 로스팅(roasting), 또는 분쇄를 수행하여 전처리된 것일 수 있다. 일 구체예에서, 상기 전처리가 로스팅인 경우, 상기 로스팅은 100 내지 300℃의 온도 조건에서, 5 내지 30 분 동안 수행된 것일 수 있다. 구체적으로, 상기 로스팅은 100 내지 300℃, 100 내지 250℃, 100 내지 200℃, 100 내지 150℃, 150 내지 300℃, 150 내지 250℃, 150 내지 200℃, 200 내지 300℃, 160 내지 300℃ 또는 160 내지 250℃의 조건에서 수행된 것일 수 있다. 또한, 상기 로스팅은 5 내지 30 분, 5 내지 25 분, 5 내지 20 분, 5 내지 15 분, 5 내지 10 분, 7 내지 30 분, 7 내지 20 분, 또는 10 내지 30 분 동안 수행된 것일 수 있다. 이때, 로스팅 온도가 상기 범위 미만인 경우, 약콩의 향미가 유지되지 못하고, 근육 질환의 예방 또는 치료 효능이 저하되는 문제점이 있으며, 상기 범위를 초과하는 경우, 약콩의 쓴맛이 강해지는 바, 소비자 선호도가 감소하는 문제점이 있다. 또한, 로스팅 시간이 상기 범위 미만인 경우, 식품조성물로 적용할 경우 맛의 안정성이 유지되지 못하는 문제점이 있으며, 상기 범위를 초과하는 경우, 약콩이 탄화되는 문제점이 있다.

[0014] 상기 추출은 상기 균주로 발효된 약콩을 물, C1 내지 C4 저급알코올 또는 이들의 혼합물로 추출한 것일 수 있다. 예를 들어, 상기 약콩의 추출에 사용되는 저급 알코올은 에탄올 또는 메탄올인 것일 수 있다. 추출시 약콩을 세절한 후 물, 알코올 또는 이의 혼합물을 약콩 무게의 2배 내지 20배를 첨가하여 추출하는 것일 수 있다. 예를 들어, 3배 내지 10배를 첨가하여 추출하는 것일 수 있다. 추출온도는 30℃ 내지 100℃, 60℃ 내지 100℃, 30℃ 내지 90℃, 30℃ 내지 80℃, 60℃ 내지 90℃, 또는 60℃ 내지 80℃인 것일 수 있다. 추출시간은 1시간 내지 10시간, 2시간 내지 8시간, 2 내지 5시간, 3 내지 7시간 또는 4 내지 6시간인 것일 수 있다. 추출방법은 냉침, 초음파 추출 또는 환류 냉각 추출방법이 모두 이용 가능하다. 추출 횟수는 1회 내지 5회, 2회 내지 4회, 3 내지 5회 반복 추출하는 것일 수 있다.

[0015] 일 구체예에서, 상기 발효물의 용량은 총 조성물에 대하여 1 내지 30 $\mu$ g/mL의 농도로 포함되는 것일 수 있다. 상기 발효물의 용량은 예를 들어, 1 내지 30  $\mu$ g/mL, 1 내지 25  $\mu$ g/mL, 1 내지 20  $\mu$ g/mL, 3 내지 30  $\mu$ g/mL, 5 내지 25  $\mu$ g/mL, 5 내지 20  $\mu$ g/mL, 또는 10 내지 20  $\mu$ g/mL의 농도로 포함된 것일 수 있다. 이때, 약콩 발효물이 상기 중량부 미만인 경우, 근육 분화가 저하되고 근육 단백질의 분해가 촉진되어, 근육 질환의 예방 또는 치료 효

과를 발휘하기 어려운 문제점이 있고, 약콩 발효물이 상기 중량부를 초과하는 경우, 신체 내 독성 등의 문제점이 있을 수 있다.

- [0016] 상기 조성물은 근육 질환의 예방 또는 치료에 이용될 수 있다. 상기 근육 질환을 예를 들어, 긴장감퇴증(atony), 근위축증(muscular atrophy), 근이영양증(muscular dystrophy), 근무력증, 악액질(cachexia), 경직성 척추 증후군(rigid spinesyndrome), 근위축성 측삭경화증(루게릭병, amyotrophic lateral sclerosis), 경직성 척추 증후군(rigid spinesyndrome), 샤르코-마리-투스병(Charcot-Marie-Tooth disease) 또는 근감소증(sarcopenia)인 것일 수 있다. 일 구체예에서 상기 근감소증은 노인성 근감소증인 것일 수 있다. 구체적으로, 상기 발효물은 근육 분화 초기 및 후기 인자의 발현을 증가시킴으로써 노인성 근감소증의 예방 또는 치료에 이용될 수 있다. 또한, 상기 발효물은 근육 단백질 분화 인자의 발현을 감소시킴으로써 근육 질환의 예방 또는 치료에 이용될 수 있다.
- [0017] 일 구체예에 따른 근육 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물은 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽, 에어로졸 등의 경구제 제형, 외용제, 좌제 및 멸균 주사용액의 형태로 제형화되어 사용할 수 있고, 제형화를 위하여 약학 조성물의 제조에 통상적으로 사용되는 적절한 담체, 부형제 또는 희석제를 포함할 수 있다.
- [0018] 상기 담체 또는, 부형제 또는 희석제로는 락토즈, 텍스트로즈, 수크로오스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리게이트, 셀룰로즈, 메틸셀룰로즈, 미정질 셀룰로즈, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유 등을 포함한 다양한 화합물 혹은 혼합물을 들 수 있다.
- [0019] 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 제조할 수 있다.
- [0020] 경구 투여를 위한 고형제제는 상기 약콩 발효물에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 칼슘보네이트, 수크로스 또는 락토오스, 젤라틴 등을 섞어 제조할 수 있다. 또한 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트, 탈크 같은 윤활제들도 사용할 수 있다.
- [0021] 경구를 위한 액상 제제로는 현탁액, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데 흔히 사용하는 단순 희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등을 포함할 수 있다.
- [0022] 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수용성제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제, 좌제가 포함된다. 비수용성제, 현탁제로는 프로필렌글리콜, 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등을 사용할 수 있다. 좌제의 기제로는 위텡솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세롤젤라틴 등을 사용할 수 있다.
- [0023] 일 구체예에 따른 근육 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물의 바람직한 투여량은 환자의 상태, 체중, 질병의 정도, 약물형태, 투여경로 및 기간에 따라 다르지만, 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다. 그러나, 바람직한 효과를 위해서는 1일 0.0001 내지 2,000 mg/kg으로, 바람직하게는 0.001 내지 2,000 mg/kg으로 투여할 수 있다. 투여는 하루에 한 번 투여할 수도 있고, 수회 나누어서 투여할 수도 있다. 다만, 상기 투여량에 의해서 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.
- [0024] 일 구체예에 따른 근육 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물은 쥐, 생쥐, 가축, 인간 등의 포유 동물에 다양한 경로로 투여할 수 있다. 투여의 모든 방식은 예를 들면, 경구, 직장 또는 정맥, 근육, 피하, 자궁 내 경막 또는 뇌혈관내(intracerebroventricular) 주사에 의해서 투여할 수 있다.
- [0026] 다른 양상은 약콩에 비피도박테리움 애니멀리스 서브스페시스 락티스(*Bifidobacterium animalis subsp. Lactis* LDTM 8102 (KCTC13392BP) 균주를 접종하여 발효시킨, 약콩 발효물을 유효성분으로 함유하는 근육 분화 촉진, 근육 재생 또는 근육 강화용 조성물을 제공한다. 상기 조성물의 구체적인 내용은 전술한 바와 같다. 일 구체예에서, 상기 조성물은 근육 양 증가 또는 근육 생성을 촉진하는 것일 수 있다. 상기 근육 분화 촉진, 근육 재생 또는 근육 강화 용도에 있어서, 근육의 성장은 섬유크기(fiber size)의 증가에 의해 및/또는 섬유수의 증가에 의해 일어날 수 있다. 또한, 근육 양의 증가는 신체 성분 중에서도 특히 근육의 성장을 향상시키는 것으로 육체적 운동 및 지구력 향상을 통해 근육량을 증가시킬 수 있고 근육 증가 효과를 가지는 물질을 체내에 투여하는 방식으로 근육량을 증가시킬 수 있다. 또한, 근육 재생은 근육 모세포로부터 새로운 근섬유가 형성되는 것일 수 있다.



- [0027] 다른 양상은 약콩에 비피도박테리움 애니멀리스 서브스페시스 락티스(*Bifidobacterium animalis subsp. Lactis*) LDTM 8102 (KCTC13392BP) 균주를 접종하여 발효시킨, 약콩 발효물을 유효성분으로 함유하는 근육 질환의 예방 또는 개선용 식품 조성물을 제공한다. 상기 조성물의 구체적인 내용은 전술한 바와 같다.
  - [0028] 일 구체예에 따른 근육 질환의 예방 또는 개선용 식품 조성물에 있어서, 상기 약콩 발효물을 식품 조성물의 첨가물로 사용하는 경우 이를 그대로 첨가하거나 다른 식품 또는 식품성분과 함께 사용할 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용할 수 있다. 유효 성분의 혼합양은 예방, 건강 또는 치료 등의 각 사용 목적에 따라 적절하게 결정할 수 있다.
  - [0029] 식품 조성물의 제형은 산제, 과립제, 환, 정제, 캡슐제의 형태뿐만 아니라 일반 식품 또는 음료의 형태 어느 것이나 가능하다.
  - [0030] 상기 식품의 종류에는 특별히 제한은 없고, 상기 물질을 첨가할 수 있는 식품의 예로는 육류, 소세지, 빵, 초콜렛, 캔디류, 스넥류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류를 포함한 낙농제품, 각종 스프, 음료수, 차, 드링크제, 알콜 음료 및 비타민 복합제 등이 있으며, 통상적인 의미에서의 식품을 모두 포함할 수 있다.
  - [0031] 일반적으로, 식품 또는 음료의 제조시에 상기 약콩 발효물은 원료 100 중량부에 대하여 15 중량부 이하, 바람직하게는 10 중량부 이하의 양으로 첨가할 수 있다. 그러나, 건강 및 위생을 목적으로 하거나 또는 건강 조절을 목적으로 하는 장기간의 섭취의 경우에는 상기 양은 상기 범위 이하일 수 있으며, 또한 본 발명은 천연물로부터의 분획물을 이용하는 점에서 안전성 면에서 문제가 없으므로 상기 범위 이상의 양으로도 사용할 수 있다.
  - [0032] 일 구체예에 따른 식품 조성물 중 음료는 통상의 음료와 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로 함유할 수 있다. 상술한 천연 탄수화물은 포도당, 과당과 같은 모노사카라이드, 말토스, 슈크로스과 같은 디사카라이드 및 텍스트린, 사이클로텍스트린과 같은 폴리사카라이드, 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알콜일 수 있다. 감미제로서는 타우마틴, 스테비아 추출물과 같은 천연 감미제나, 사카린, 아스파르탐과 같은 합성 감미제 등을 사용할 수 있다. 상기 천연 탄수화물의 비율은 본 발명에 따른 음료 100 mL당 약 0.01 ~ 0.04 g, 바람직하게는 약 0.02 ~ 0.03 g일 수 있다.
  - [0033] 상기 외에 일 구체예에 따른 근육 질환의 예방 또는 개선용 식품 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, 알콜, 탄산음료에 사용되는 탄산화제를 함유할 수 있다. 그 밖에 본 발명의 수면 개선용 조성물은 천연 과일주스, 과일주스 음료 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다. 이러한 성분은 독립적으로 또는 혼합하여 사용할 수 있다. 이러한 첨가제의 비율은 제한되지 않으나 상기 식품 조성물 100 중량부 대비 0.01 ~ 0.1 중량부의 범위에서 선택되는 것이 일반적이다.
  - [0034] 다른 양상은 약콩에 비피도박테리움 애니멀리스 서브스페시스 락티스(*Bifidobacterium animalis subsp. Lactis*) LDTM 8102 (KCTC13392BP) 균주를 접종하여 발효시키는 단계를 포함하는 약콩 발효물을 제조하는 방법을 제공한다. 일 구체예에서, 상기 방법은 발효시키는 단계 전, 약콩을 100 내지 300℃에서 5 내지 30분 동안 로스팅하는 단계를 포함할 수 있다. 상기 로스팅 온도 및 시간에 대한 구체적인 내용은 전술한 바와 같다. 상기 제조된 약콩 발효물은 물, C1 내지 C4 저급알코올 또는 이들의 혼합물로 추출하여 추출물을 제조하는 단계를 추가로 포함할 수 있다. 상기 추출물을 제조하는 단계에 대한 구체적인 내용은 전술한 바와 같다.
  - [0035] 상기한 바와 같이, 본 발명에 따른 조성물은 영유아, 구체적으로 한국인의 영유아로부터 유래된 비피도박테리움 애니멀리스 서브스페시스 락티스(*Bifidobacterium animalis subsp. Lactis*) LDTM 8102 (KCTC13392BP) 균주로 발효시킨, 약콩의 발효물을 포함하는 발효 단계를 거치지 않은 약콩 발효물과 비교하여 근육세포에서의 근육 분화를 촉진시키고 근육 단백질의 분해를 억제하는 것을 확인하였다. 따라서, 상기 발효물을 포함하는 조성물은 인체의 근육 분화를 촉진하고 근 감소를 억제함으로써 근육 질환의 예방 또는 치료에 이용될 수 있다.
- 발명의 효과**
- [0036] 일 양상에 따른 조성물은 근육세포에서 근육분화를 촉진하고 근육 단백질의 분해를 억제함으로써 근육 질환의 예방 또는 치료에 이용될 수 있다. 또한, 근육 분화, 근육 재생, 근육량 증가를 통해 근력 강화 효과를 나타낼 수 있는바 근육 생성 촉진 또는 근 기능 개선에 이용될 수 있다. 또한, 상기 조성물은 약콩을 포함하고 있어 인체에 무해하며 정상세포에 부작용을 유발하지 않아 장기간 사용하는데 인체에 무리가 없다는 이점이 있다.

**도면의 간단한 설명**

- [0037] 도 1a는 실시예 1 및 비교예 1~2를 처리한 마우스 근육세포에서 근육분화 초기 인자의 발현여부를 확인한 사진이다.
- 도 1b는 실시예 1 및 비교예 1~2를 처리한 마우스 근육세포에서 발현되는 근육분화 초기인자의 발현량을 정량화한 그래프이다.
- 도 2a는 실시예 1 및 비교예 1~2를 처리한 마우스 근육세포에서 근육분화 후기 인자의 발현여부를 확인한 사진이다.
- 도 2b는 실시예 1 및 비교예 1~2를 처리한 마우스 근육세포에서 발현되는 근육분화 후기인자의 발현량을 정량화한 그래프이다.
- 도 3a는 실시예 1 및 비교예 1~2를 처리한 마우스 근육세포에서의 근육분화 촉진 효능을 IF 염색을 통해 확인한 사진이다.
- 도 3b는 실시예 1 및 비교예 1~2를 처리한 마우스 근육세포에서의 전체 핵 수 대비 근관세포 내 핵의 수를 정량화(fusion index)한 그래프이다.
- 도 4a는 실시예 1 및 비교예 1~2를 처리한 마우스 근육세포에서의 근육 단백질 분해 인자의 발현을 확인한 사진이다.
- 도 4b는 실시예 1 및 비교예 1~2를 처리한 마우스 근육세포에서의 MuRF-1의 발현을 정량화한 그래프이다.
- 도 4c는 실시예 1 및 비교예 1~2를 처리한 마우스 근육세포에서의 Atrogin-1 발현을 정량화한 그래프이다.
- 도 5a는 실시예 1을 처리한 마우스 근육세포에서의 myhc 발현을 웨스턴 블랏으로 확인한 사진이다.
- 도 5b는 실시예 1을 처리한 마우스 근육세포에서의 myhc 발현을 정량화한 그래프이다.
- 도 6a는 실시예 2를 처리한 마우스 근육세포에서의 myhc 발현을 웨스턴 블랏으로 확인한 사진이다.
- 도 6b는 실시예 2를 처리한 마우스 근육세포에서의 myhc 발현을 정량화한 그래프이다.
- 도 7a는 노화를 유도하지 않은 마우스의 근육 세포에 실시예 1을 처리한 후 myhc 발현을 웨스턴 블랏으로 확인한 사진이다.
- 도 7b는 노화를 유도하지 않은 마우스의 근육 세포에 실시예 1을 처리한 후 myhc 발현을 정량화한 그래프이다.

**발명을 실시하기 위한 구체적인 내용**

[0038] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 바람직한 실시예를 제시한다. 그러나 하기의 실시예는 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐, 하기 실시예에 의해 본 발명의 내용이 한정되는 것은 아니다.

[0040] **[실시예]**

[0041] **실시예 1. 약콩 발효물의 제조**

[0042] 한국인 유아의 분변에서 분리한 비티도박테리움 애니멀리스 서브스페시스 락티스(*Bifidobacterium animalis subsp. Lactis*.) LDTM 8102(수탁번호: KCTC13392BP)를 이용하여 약콩 발효물을 제조하였다. 구체적으로, 글리세롤과 혼합하여 -80℃에서 냉동 보관 중인 비티도박테리움 애니멀리스 서브스페시스 락티스(*Bifidobacterium animalis subsp. Lactis*.) LDTM 8102(수탁번호: KCTC13392BP) 보존액을 MRSC 배지에 접종하여 37℃, 혐기 조건에서 20 내지 24시간 동안 정치하는 전 배양 과정을 수행하였다. 이후, 50 g/L의 약콩 분말에 전 배양 과정을 수행하여 활성을 높은 상기 균주 배양액을 접종한 후, 37℃로 유지된 혐기 조건에서 진탕배양 하였다. 발효 과정에서 수집된 시료들을 열처리 공정을 거쳐 동결건조 하였고, 상기 시료를 0.5 g 당 10ml의 비율로 0, 5, 10, 30, 50, 및 70% 발효주정(식물성 알코올)을 각각 첨가하여 75℃에서 2시간 동안 증탕한 후, 각각 추출하였다. 이후, 상온에서 1시간 정도 방치하여 식힌 뒤, 5000 rpm으로 10분 간 원심분리하여 상층액을 분리하였다. 분리된 상층액을 0.2 μm syringe filter를 이용하여 여과하고, 40℃ 감압농축기에서 주정을 모두 제거한 후 동결건조하여 분말화 하였다. 이후, 상기 동결건조된 분말을 50% DMSO에 용해하여 약콩 발효 물로 사용하였다.

[0044] **실시예 2. 전처리를 거친 약콩 발효물의 제조**



- [0045] 160 내지 230℃에서 15 내지 25분 로스팅한 50 내지 100 g/L의 약콩 분말에 전 배양 과정을 수행하여 활성을 높은 상기 균주 배양액을 접종한 후, 37℃로 유지된 혐기 조건에서 진탕배양 하였다는 점을 제외하고는, 상기 실시예 1과 동일한 방법으로 약콩 발효물을 제조하였다.
- [0047] **[비교예]**
- [0048] **비교예 1. 약콩 발효물의 제조**
- [0049] 락토바실러스 람노시스 GG(*Lactobacillus rhamnosus* GG, LGG) 유산균을 이용하여 약콩을 발효하였다는 점을 제외하고는, 상기 실시예 1과 동일한 방법으로 약콩 발효물을 제조하였다.
- [0051] **비교예 2. 약콩 발효물의 제조**
- [0052] 비피도박테리움 애니멀리스 락티스 (*Bifidobacterium animalis subsp. Lactis*) KCTC 5854 유산균을 이용하여 약콩을 발효하였다는 점을 제외하고는, 상기 실시예 1과 동일한 방법으로 약콩 발효물을 제조하였다.
- [0054] **[실험예]**
- [0055] **약콩 발효물의 근 감소 완화 효능 확인**
- [0056] 상기 실시예 1 및 비교예 1~2의 노인성 근 감소 완화 효능을 확인하기 위하여, 근육분화와 관련된 바이오마커인 myoD 및 myhc의 발현량을 웨스턴 블랏 분석을 수행하였다. 구체적으로, 마우스 근육세포 C2C12를 6cm dish에 분주(seeding)한 후, 10% 소태아혈청(Fetal Bovine Serum)과 1% 안티바이오틱-안티마이코틱(Antibiotic-antimycotic)이 첨가된 DMEM(Dulbecco-modified Eagle medium)을 사용하여 37℃, 10% CO<sub>2</sub> 배양기(Forma Scientific Co., Marjetta, OH, USA)에서 72시간 동안 배양하였다. 이후, 2% 말혈청(Horse Serum)과 1% 안티바이오틱-안티마이코틱(Antibiotic-antimycotic)이 첨가된 DMEM(Dulbecco-modified Eagle medium)로 배지를 갈아주면서 TGF-beta로 노화를 유도함과 동시에 상기 실시예 1 및 비교예 1~2의 발효물을 각각 처리해 주어 약콩 발효물이 TGF-beta로 인해 노화된 근육세포를 회복시키는지 여부를 확인하였다. 바이오마커마다 발현 시기가 다르기 때문에 초기 분화 인자인 myoD 발현량 확인 시에는 세포에 약콩 발효물을 처리 한 후 24시간 후, 후기 분화 인자인 myhc 발현량 확인 시에는 96시간 이후 RIPA 버퍼를 이용해 단백질을 끊어내었다. 이후, 13000g 조건으로 10분 동안 원심분리 하여 순수 단백질을 추출한 후 protein assay reagent kits (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA)를 사용하여 단백질을 정량 하였다. 추출한 단백질을 SDS 폴리 아크릴아마이드 겔을 이용하여 전기영동 한 후 니트로셀룰로오스 블롯팅 멤브레인(GE Healthcare Life Science, Amersham, UK)에 트랜스퍼 하였다. 이후, 멤브레인을 5% 스킵밀크로 1시간 블락킹 한 뒤 4℃ 냉장고에서 16시간 동안 1:1000으로 희석한 myoD 및 myhc의 1차 항체를 처리하였다. 1차 항체를 TBS-T 버퍼로 10분 동안 3번 반복하여 세척한 후, 5% 스킵밀크에 1:5000 농도로 희석시킨 2차 항체를 1시간 동안 처리하였다. 이후, 2차 항체를 TBS-T 버퍼로 8분 동안 5번 반복하여 세척하였다. 이후, ECL detection kit를 사용하여 근육분화 바이오마커 단백질의 발광 정도를 암실에서 확인하고 디벨로핑 버퍼를 이용하여 단백질 밴드를 필름에 현상하였다. Image J software (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA)을 이용하여 단백질의 발현 정도를 정량하였다.
- [0057] 도 1a는 실시예 1 및 비교예 1~2를 처리한 마우스 근육세포에서 근육분화 초기 인자의 발현여부를 확인한 사진이다.
- [0058] 도 1b는 실시예 1 및 비교예 1~2를 처리한 마우스 근육세포에서 발현되는 근육분화 초기인자의 발현량을 정량화한 그래프이다.
- [0059] 도 2a는 실시예 1 및 비교예 1~2를 처리한 마우스 근육세포에서 근육분화 후기 인자의 발현여부를 확인한 사진이다.
- [0060] 도 2b는 실시예 1 및 비교예 1~2를 처리한 마우스 근육세포에서 발현되는 근육분화 후기인자의 발현량을 정량화한 그래프이다.
- [0061] 도 1a 및 도 1b에 나타난 바와 같이, 비교예 1~2를 처리한 마우스 근육세포에서와 비교하여 실시예 1을 처리한 마우스 근육세포에서 근육분화 초기인자인 myoD의 발현량이 높은 것을 확인할 수 있었다. 또한, 도 2a 및 2b에 나타난 바와 같이, 비교예 1~2를 처리한 마우스 근육세포에서와 비교하여 실시예 1을 처리한 마우스 근육세포에서 근육분화 후기인자인 myhc의 발현량이 높은 것을 확인할 수 있었다. 즉, 일 양상에 따른 약콩 발효물은 근육분화의 초기뿐만 아니라 후기에서도 근육분화를 촉진하는바, 노인성 근감소증의 예방 또는 치료에 이용될 수 있다.

[0062] **약콩 발효물의 근육분화 촉진 효능 확인**

[0063] 상기 실시예 1 및 비교예 1~2의 근육분화 촉진 효능을 확인하기 위하여, 면역형광염색법을 수행하였다. 구체적으로, 마우스 근육세포 C2C12를 8 well chamber slide(Thermo Scientific)에 분주(seeding)한 후, 10% 소태아 혈청(Fetal Bovine Serum)과 1% 안티바이오틱-안티마이코틱(Antibiotic-antimycotic)이 첨가된 DMEM(Dulbecco-modified Eagle medium)을 사용하여 37℃, 10% CO<sub>2</sub> 배양기(Forma Scientific Co., Marjetta, OH, USA)에서 72 시간 동안 배양하였다. 이후, 2% 말 혈청(Horse Serum)과 1% 안티바이오틱-안티마이코틱(Antibiotic-antimycotic)이 첨가된 DMEM(Dulbecco-modified Eagle medium)로 배지를 갈아주면서 TGF-beta로 노화를 유도함과 동시에 상기 실시예 1 및 비교예 1~2의 발효물을 각각 처리하여 약콩 발효물이 TGF-beta로 인해 노화된 근육세포를 회복시키는지 여부를 확인하였다. 96시간 동안 TGF-beta와 약콩 발효물이 포함된 2% 말 혈청(Horse Serum)과 1% 안티바이오틱-안티마이코틱(Antibiotic-antimycotic)이 첨가된 DMEM(Dulbecco-modified Eagle medium)로 배지에서 배양한 후, 배지를 석션(suction) 하고 PBS로 세척한 뒤 4% 포름알데히드로 20분간 고정하였다. 이후, 세포 내에 염색약이 잘 들어가게 하기 위해서 0.2% Triton X 100으로 10분간 세포 투과 작업을 하였다. PBS로 세척한 후, 20% 염소 혈청(normal goat serum)으로 1시간 동안 블락킹 하였다. 이후, myhc 1차 항체를 처리하고 16시간 동안 4℃ 냉장고에서 보관하였다. 이후, 2차 항체를 처리하고 DAPI로 핵을 염색한 뒤 confocal microscope로 근관세포 내의 myhc 단백질과 핵을 확인하였다. 하기 수학적 식 1에 따라 마우스 근아세포의 근관세포로의 분화를 확인하였다.

[0064] [수학적 식 1]

[0065] Fusion Index= 근관세포 내의 핵 수/근육세포 전체 핵의 수

[0067] 도 3a는 실시예 1 및 비교예 1~2를 처리한 마우스 근육세포에서의 근육분화 촉진 효능을 IF 염색을 통해 확인한 사진이다.

[0068] 도 3b는 실시예 1 및 비교예 1~2를 처리한 마우스 근육세포에서의 전체 핵 수 대비 근관세포 내 핵의 수를 정량화(fusion index)한 그래프이다.

[0069] 도 3a에 나타난 바와 같이, TGF-beta로 노화를 유도하지 않은 대조군에 비해 TGF-beta로 노화를 유도한 비교예 1~2에서 myhc의 발현이 줄어들었다. 반면, 실시예 1을 처리할 경우 myhc의 발현이 증가함을 확인하였다. 또한, 근관세포 내 핵의 수가 증가한 것으로 보아 근육세포 분화가 증가되었음을 알 수 있었다. 또한, 도 3b에 나타난 바와 같이, 비교예 1~2를 처리한 마우스 근육세포에서와 비교하여 실시예 1을 처리한 마우스 근육세포에서 전체 핵 수 대비 근관세포 내 핵의 수가 높은 것을 확인할 수 있었다. 즉, 일 양상에 따른 조성물은 근관세포 형성을 촉진함으로써 근육세포의 분화를 촉진시킬 수 있다.

[0070] **약콩 발효물의 근육 단백질 분해 관련 인자의 발현 확인**

[0071] 근육 단백질 분해 효소 복합체 및 유비퀴틴 효소의 증가는 근감소증과 밀접한 연관이 있는바, 상기 실시예 1 및 비교예 1~2의 근육 단백질 분해 관련 인자의 발현 여부를 웨스턴 블랏을 통해 확인하였다. 구체적으로, 마우스 근원 세포를 96 시간 동안 분화시켜 근섬유다발을 형성하게 한 뒤, TGFb-beta로 노화유도 함과 동시에 실시예 1 및 비교예 1~2의 발효물을 처리 하였다. 24 시간 후, RIPA 버퍼를 이용해 단백질을 끊어내어 13000 x g 조건으로 10분 동안 원심분리 하여 순수 단백질을 추출하였다. 이후, protein assay reagent kits (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA)를 사용하여 단백질을 정량하고 추출한 단백질을 SDS 폴리 아크릴아마이드 겔을 이용하여 전기영동한 후 니트로셀룰로오스 블롯팅 멤브레인(GE Healthcare Life Science, Amersham, UK)에 트랜스퍼 하였다. 멤브레인을 5% 스킵밀크로 1시간 블락킹 한 뒤, 1차 항체로써 근육 단백질 분해 효소 복합체 및 유비퀴틴 효소인 Murf-1, Atrogin-1을 1:1000 희석하여 4℃ 냉장고에서 16시간 동안 처리하였다. TBS-T 버퍼로 10분 동안 1차 항체를 3번 반복하여 세척한 뒤, 5% 스킵밀크에 1:5000 농도로 희석시킨 2차 항체를 1시간 동안 처리하였다. 이후, TBS-T 버퍼로 8분 동안 5번 반복하여 2차 항체를 세척 하였다. 이후, ECL detection kit를 사용하여 근육 단백질 분해 효소 복합체 및 유비퀴틴 효소의 발광 정도를 암실에서 확인하고 디벨로핑 버퍼를 이용하여 단백질 밴드를 필름에 현상하였다. Image J software (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA)을 이용하여 단백질의 발현 정도를 정량 하였다.

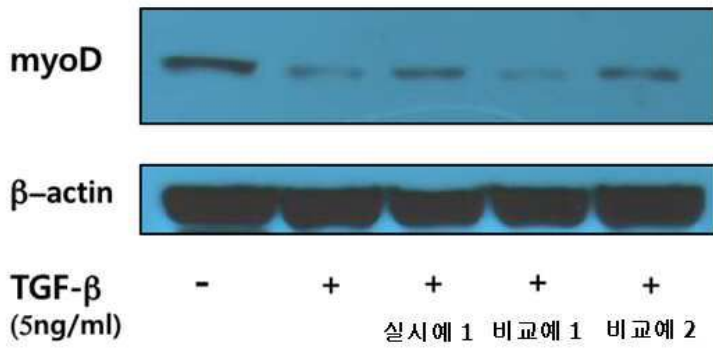
[0072] 도 4a는 실시예 1 및 비교예 1~2를 처리한 마우스 근육세포에서의 근육 단백질 분해 인자의 발현을 확인한 사진이다.

[0073] 도 4b는 실시예 1 및 비교예 1~2를 처리한 마우스 근육세포에서의 MuRF-1의 발현을 정량화한 그래프이다.

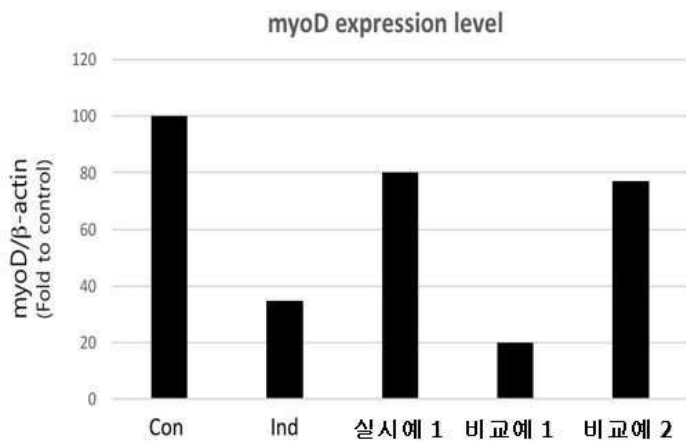
- [0074] 도 4c는 실시예 1 및 비교예 1-2를 처리한 마우스 근육세포에서의 Atrogin-1 발현을 정량화한 그래프이다.
- [0075] 도 4a 내지 4c에 나타난 바와 같이, 비교예 1-2를 처리한 마우스 근육세포에서와 비교하여 실시예 1을 처리한 마우스 근육세포에서 근육 단백질 분해 인자(MURF-1, Atrogin-1)의 발현량이 낮은 것을 확인할 수 있었다. 즉, 일 양상에 따른 약콩 발효물은 근육 단백질의 분해를 억제함으로써 근감소증의 예방 또는 치료에 이용될 수 있다.
- [0076] **전처리에 따른 근육 단백질 분해 관련 인자의 발현 확인**
- [0077] 전처리된 약콩 발효물의 노화된 근육세포에 대한 회복 효과를 확인하기 위하여 전처리를 하지 않은 실시예 1과 전처리를 수행한 실시예 2에서의 myhc 발현량을 웨스턴 블랏으로 분석하였다. 구체적으로, 마우스 근육세포 C2C12를 6cm dish에 분주(seeding)한 후, 10% 소태아혈청(Fetal Bovine Serum)과 1% 안티바이오틱-안티마이코틱(Antibiotic-antimycotic)이 첨가된 DMEM(Dulbecco-modified Eagle medium)을 사용하여 37°C, 10% CO<sub>2</sub> 배양기(Forma Scientific Co., Marjetta, OH, USA)에서 72시간 동안 배양하였다. 이후, 2% 말혈청(Horse Serum)과 1% 안티바이오틱-안티마이코틱(Antibiotic-antimycotic)이 첨가된 DMEM(Dulbecco-modified Eagle medium)로 배지를 갈아주면서 TGF-beta로 노화를 유도함과 동시에 실시예 1과 실시예 2를 각각 (용량) 씩 처리하였다. 96시간 이후 RIPA 버퍼를 이용해 단백질을 끊어내고 13000g 조건으로 10분 동안 원심분리 하여 순수 단백질을 추출한 후 protein assay reagent kits (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA)를 사용하여 단백질을 정량 하였다.
- [0078] 도 5a는 실시예 1을 처리한 마우스 근육세포에서의 myhc 발현을 웨스턴 블랏으로 확인한 사진이고, 도 5b는 상기 myhc의 발현을 정량화한 그래프이다.
- [0079] 도 6a는 실시예 2를 처리한 마우스 근육세포에서의 myhc 발현을 웨스턴 블랏으로 확인한 사진이고, 도 6b는 상기 myhc의 발현을 정량화한 그래프이다.
- [0080] 도 5 및 도 6에 나타난 바와 같이, 전처리를 수행한 실시예 2에서 myhc의 발현이 증가한 것을 확인할 수 있다.
- [0081] **약콩 발효물의 근육 증강, 근육 분화 효과 확인**
- [0082] 상기 실시예 1의 근육 증강, 근육 분화 촉진 효과를 확인하기 위하여, 근육분화 후기 바이오마커인 myhc(myosin heavy chain)의 발현량을 웨스턴 블랏 분석으로 측정하였다. 구체적으로, 마우스 근육세포 C2C12를 6cm 디쉬에 분주(seeding)한 후, 10% 소태아혈청(Fetal Bovine Serum)과 1% 안티바이오틱-안티마이코틱(Antibiotic-antimycotic)이 첨가된 DMEM(Dulbecco-modified Eagle medium)을 사용하여 37°C, 10% CO<sub>2</sub> 배양기(Forma Scientific Co., Marjetta, OH, USA)에서 72시간 동안 배양하였다. 이후, 2% 말혈청(Horse Serum)과 1% 안티바이오틱-안티마이코틱(Antibiotic-antimycotic)이 첨가된 DMEM(Dulbecco-modified Eagle medium)로 배지를 갈아주는 동시에, 상기 실시예 1의 발효물을 24시간마다 한번씩 총 96 시간 동안 처리해 주어 약콩 발효물이 근육세포의 분화를 촉진시키는지 여부를 확인하였다. 96 시간 이후 RIPA 버퍼를 이용해 단백질을 끊어낸 후, 13000g 조건으로 10분 동안 원심분리 하여 순수 단백질을 추출하고 protein assay reagent kits (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA)를 사용하여 단백질을 정량 하였다. 추출한 단백질을 SDS 폴리 아크릴아마이드 겔을 이용하여 전기영동 한 후 니트로셀룰로오스 블롯팅 멤브레인(GE Healthcare Life Science, Amersham, UK)에 트랜스퍼 하였다. 이후, 멤브레인을 5% 스킵밀크로 1시간 블락킹 한 뒤 4°C냉장고에서 16시간 동안 1:1000으로 희석한 myhc의 1차 항체를 처리하였다. 1차 항체를 TBS-T 버퍼로 10분 동안 3번 반복하여 세척한 후, 5% 스킵밀크에 1:5000 농도로 희석시킨 2차 항체를 1시간 동안 처리하였다. 이후, 2차 항체를 TBS-T 버퍼로 8분 동안 5번 반복하여 세척하였다. 이후, ECL detection kit를 사용하여 근육분화 바이오마커 단백질의 발광 정도를 암실에서 확인하고 디벨로핑 버퍼를 이용하여 단백질 밴드를 필름에 현상하였다. Image J software (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA)을 이용하여 단백질의 발현 정도를 정량하였다.
- [0083] 도 7a는 노화를 유도하지 않은 마우스의 근육 세포에 실시예 1을 처리한 후 myhc 발현을 웨스턴 블랏으로 확인한 사진이다.
- [0084] 도 7b는 노화를 유도하지 않은 마우스의 근육 세포에 실시예 1을 처리한 후 myhc 발현을 정량화한 그래프이다.
- [0085] 도 7에 나타난 바와 같이, 마우스 근육 세포에 실시예 1을 처리한 경우, myhc 발현이 대조군 대비 현저하게 증가한 것으로 보아, 근육 분화가 촉진되는 것을 확인할 수 있다.

도면

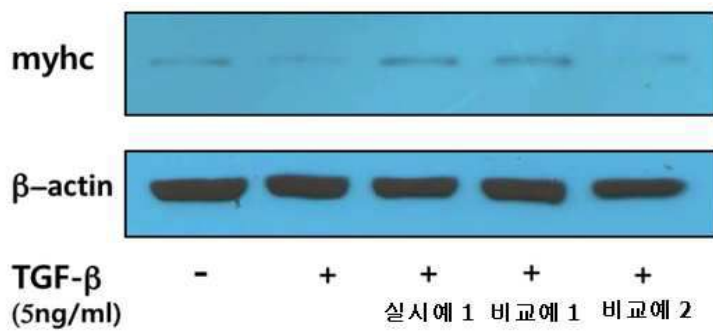
도면1a



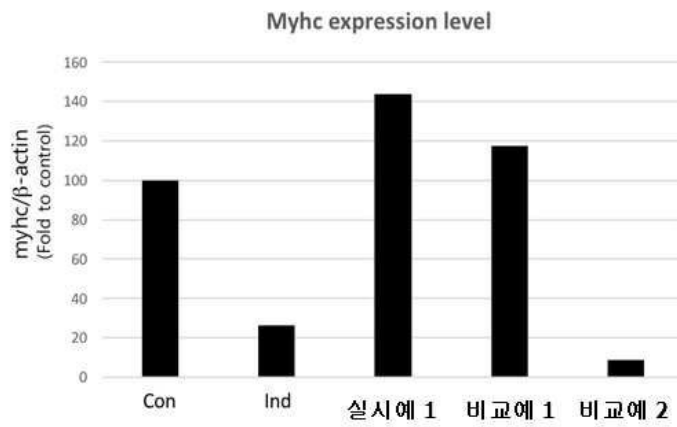
도면1b



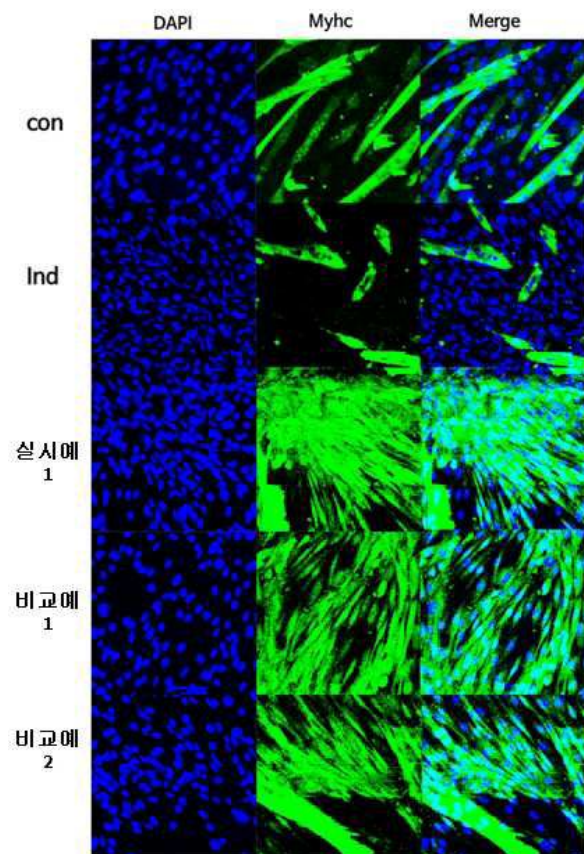
도면2a



도면2b

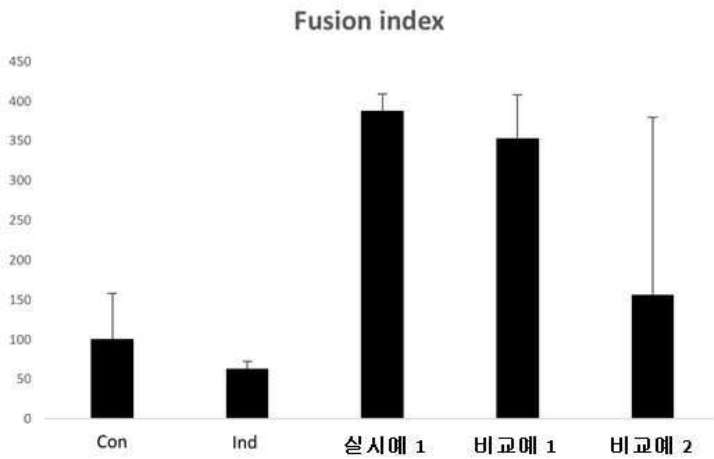


도면3a

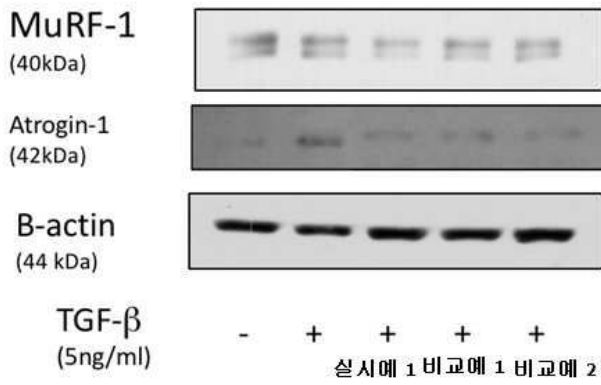




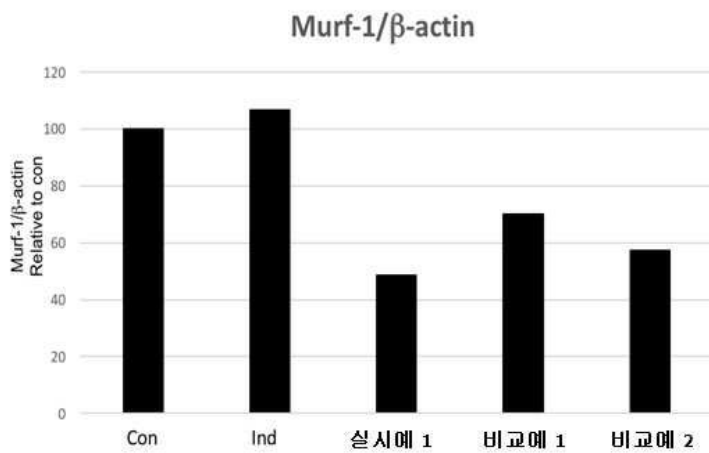
도면3b



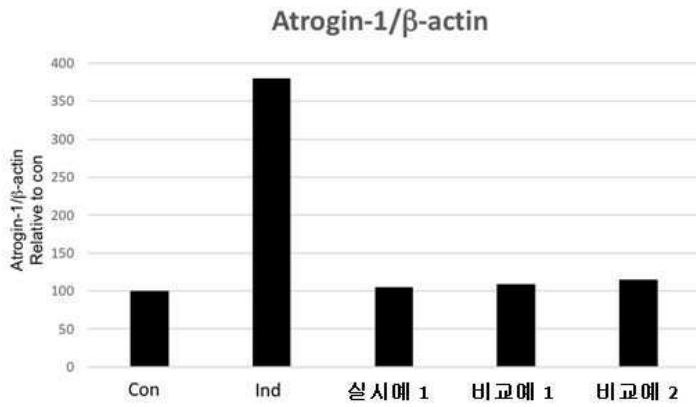
도면4a



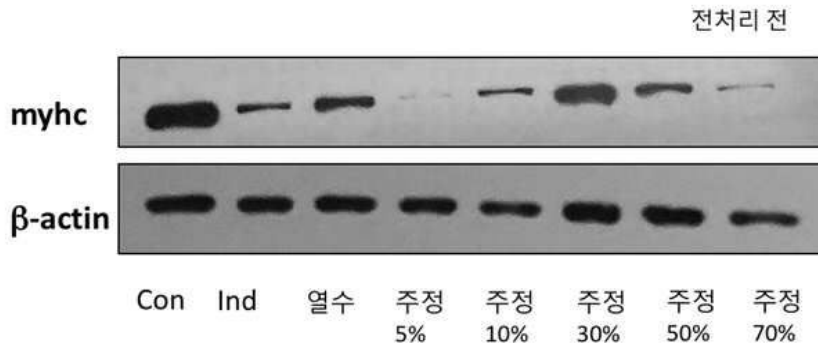
도면4b



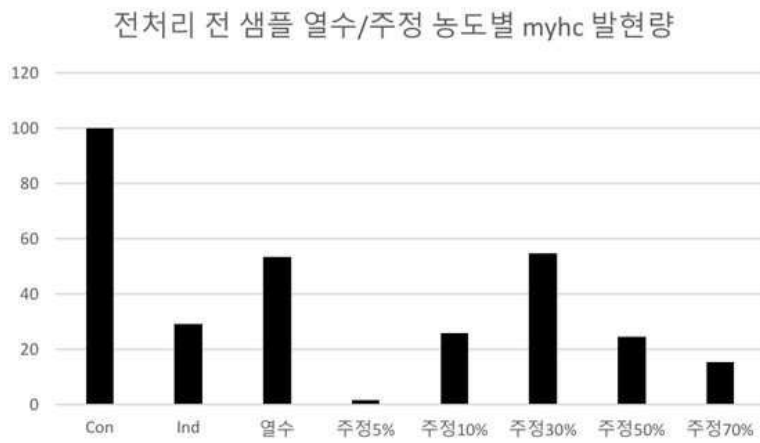
도면4c



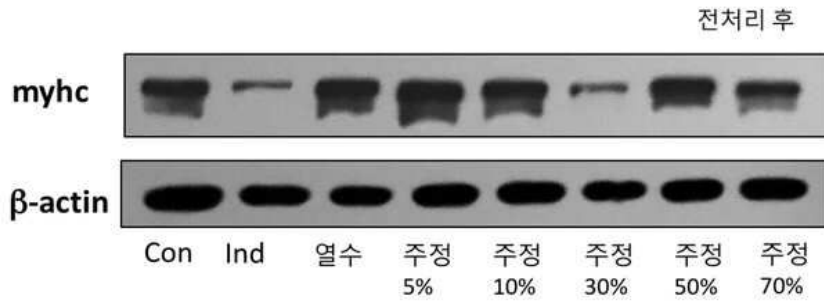
도면5a



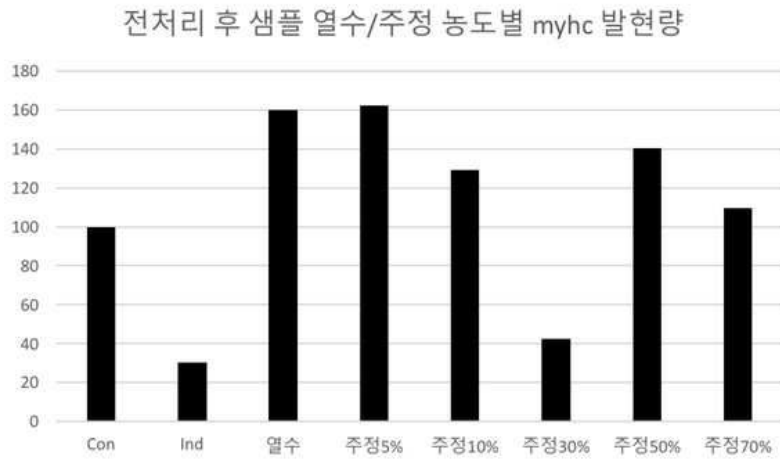
도면5b



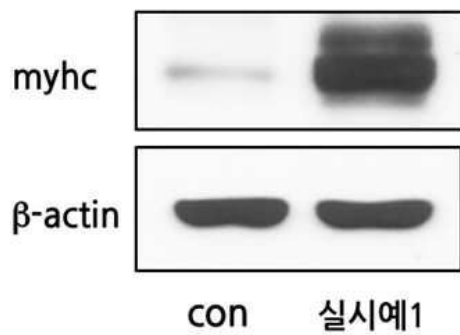
도면6a



도면6b



도면7a



도면7b

