



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2012-0138554
(43) 공개일자 2012년12월26일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 38/07 (2006.01) *A61K 38/08* (2006.01)

C07K 7/06 (2006.01) *A61P 39/06* (2006.01)

(21) 출원번호 10-2011-0058118

(22) 출원일자 2011년06월15일

심사청구일자 2011년06월15일

(71) 출원인

부경대학교 산학협력단

부산광역시 남구 신선로 365 (용당동,
부경대학교)

(72) 발명자

김세권

부산광역시 동래구 사직로 80, 쌍용예가아파트
125동 1402호 (사직동)

류보미

부산광역시 수영구 남천바다로9번길 5, 협성애크
이어 아파트 101동 2703호 (광안동, 광안)

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

이덕록

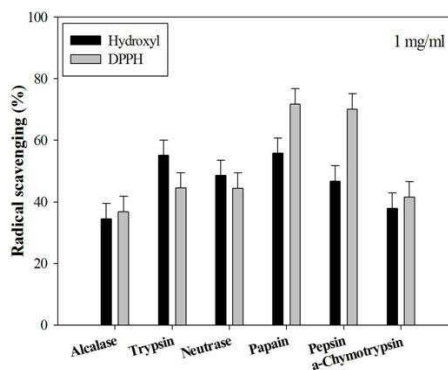
전체 청구항 수 : 총 3 항

(54) 발명의 명칭 대구 껍질로부터 추출한 펩티드 및 이를 함유하는 향산화 조성물

(57) 요약

본 발명은 대구 껍질 젤라틴을 효소 가수분해하여 제조한 향산화 펩티드 및 이를 포함하는 향산화 조성물에 관한 것이다.

대표도 - 도1



(72) 발명자

다이-홍 엔고

부산광역시 남구 용소로 45, 대연캠퍼스 해양바이오프로세스연구단 (대연동, 부경대학교)

에스.더블유.에이. 히마야

부산광역시 남구 용소로 45, 대연캠퍼스 해양바이오프로세스연구단 (대연동, 부경대학교)

탄-상 보

부산광역시 남구 용소로 45, 대연캠퍼스 해양바이오프로세스연구단 (대연동, 부경대학교)

이수루 위제세카라

부산광역시 남구 용소로 45, 대연캠퍼스 해양바이오프로세스연구단 (대연동, 부경대학교)

특허청구의 범위

청구항 1

대구 껍질 젤라틴을 효소 가수분해하여 제조한, 서열번호 1의 Thr-Cys-Ser-Pro 또는 서열번호 2의 Thr-Gly-Gly-Gly-Asn-Val의 아미노산 서열을 갖는 항산화 펩티드.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 효소 가수분해는 파파인에 의한 것임을 특징으로 하는 항산화 펩티드.

청구항 3

제1항 또는 제2항의 항산화 펩티드를 유효성분으로 함유하는 항산화 조성물.

명세서

기술 분야

[0001] 본 발명은 대구 껍질로부터 추출한 펩티드 및 이를 함유하는 항산화 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 최근 들어, 대구(*Gadus macrocephalus*)는 전세계적으로 중요한 어류자원 중 하나로 각광받고 있다. 대구는 주로 몸통 전체가 필렛 제품으로서 사용되나, 대구의 껍질은 널리 이용되지 못하고 폐기되고 있어 환경오염을 일으키고 있다. 최근 연구에 따르면, 어류 껍질이 유용성이 높고, 오염을 감소시키며, 질병 전이 위험이 없고 종교적 문제가 없으며 고수육의 콜라겐을 수득할 수 있는 장점으로 인해 젤라틴의 가장 우수한 원재료로서 제공될 수 있다고 보고되었다.

[0003] 고혈압은 관상심장질환, 말초동맥질환 및 뇌졸중을 포함하는 심혈관질환의 주요한 위험 요소 중 하나이다. 안지오텐신-I 전환 효소(angiotensin-I converting enzyme; ACE)는 안지오텐신-I를 잠재적인 혈관수축물질인 안지오텐신-II로 전환시켜 혈압을 조절하는 물리학적 중추 역할을 한다.

[0004] 항산화제는 활성산소종(reactive oxygen species; ROS)에 의한 손상으로부터 신체를 보호할 수 있어 인간의 건강에 유용한 효과를 나타낸다. ROS는 중요한 모든 세포 성분에 산화 손상을 야기하며 고혈압, 신경퇴행성질환, 염증, 당뇨병, 암 및 노화를 포함하는 다양한 질환의 발병에 관련되어 있다.

[0005] 나일 틸라피아 비늘, 명태, 호키 피쉬(hoki fish) 껍질 및 날새기(cobia)와 같은 다양한 물고기종으로부터의 젤라틴 가수분해물의 자유 라디칼 소거능이 이미 보고되었다.

[0006] 대한민국 등록특허 제10-0580332호에서는 민태 껍질에서 유래한 항산화 펩티드 및 이를 포함하는 항산화 조성물에 대해 기재하고 있고, 대한민국 공개특허 제10-2009-0107779호에서는 어류 비늘로부터 추출된 콜라겐 펩티드를 포함하는 항산화 조성물에 대해 기재하고 있으나, 자유 라디칼-유도 산화 손상에 대한 대구(*Gadus macrocephalus*) 껍질 유래 펩티드의 보호 효과에 대한 연구는 없었다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명은 상기와 같은 점들을 감안하여 안출된 것으로, 대구 껍질 젤라틴을 효소 가수분해하여 제조한 항산화 펩티드 및 이를 함유하는 항산화 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

[0008] 본 발명의 상기 목적은 대구 껍질 젤라틴을 효소 가수분해하여 펩티드를 추출하고 이의 항산화 활성을 조사하여 펩티드를 선정하고, 이의 분자량 및 아미노산 서열을 결정하고, 이의 ROS 소거능 및 ACE-저해 활성을 측정함으로써 달성하였다.

발명의 효과

[0009] 본 발명은 지금까지 보고되지 않았던 대구 껍질 젤라틴 유래의 펩티드의 항산화 활성을 확인하고 이 펩티드를 포함하는 항산화 조성물을 제공함으로써, 새로운 자원으로부터 용이하게 제조할 수 있는 우수한 항산화 펩티드 및 항산화 조성물을 제공하는 효과가 있다.

도면의 간단한 설명

[0010] 도 1은 대구 껍질 젤라틴 유래 효소 가수분해물(알칼라아제, 트립신, 누트라아제, 파파인, 펩신 및 α -키모트립신)의 소거능 활성을 ESR 분광기로 측정한 결과이다.

도 2a는 HiPrep 16/10 DEAE FF 이온 교환 크로마토그래피에 의한 파파인 가수분해물의 FPLC 크로마토그램(하부 패널), 및 ESR 분광기로 측정한 자유 라디칼 소거능(상부 패널)을 나타낸 것이다.

도 2b는 FPLC로부터의 활성 분획(분획 I)의 추가 정제에 대한 RP-HPLC 크로마토그램(하부 패널) 및 ESR 분광기로 측정한 이의 자유 라디칼 소거능(상부 패널)을 나타낸 것이다.

도 3a는 분획 I-5(펩티드 5)의 분자량 및 아미노산 서열을 나타낸 것이고, 도 3b는 분획 I-7(펩티드 7)의 분자량 및 아미노산 서열을 나타낸 것이다.

도 4a는 RAW 264.7 세포에서의 정제된 펩티드의 MTT 검정을 이용한 세포 생존도를 나타낸 것이고, 도 4b는 DNA 보호 효과를 나타낸 것이다.

도 5는 RAW 264.7 세포에서의 정제된 펩티드의 세포내 자유 라디칼 소거능을 나타낸 것이다.

도 6은 정제된 펩티드의 ACE-저해 활성을 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0011] 이하, 본 발명을 실시예를 들어 보다 구체적으로 설명한다. 그러나, 실시예는 본 발명을 예시하기 위한 것일 뿐이므로, 본 발명을 이에 한정하는 것으로 해석해서는 안 된다.

[0012] 대구(*Gadus macrocephalus*) 껍질을 한국, 부산의 자갈치 시장으로부터 입수하였다. 형광 프로브 2', 7'-디클로로플루오레신 디아세테이트(2',7'-dichlorofluorescein diacetate; DCFH-DA)는 Molecular Probes Inc. (Eugene, OR, USA)로부터 구입하였으며, ACE, 1,1-디페닐-2-피크릴히드라질(DPPH) 및 5,5-디메틸-1-피롤리딘 N-옥사이드(DMPO)의 기질로서 hippuryl-histidyl-leucine(HHL), 파파인, α -키모트립신, 펩신, 트립신, ACE (토끼 폐 유래)를 Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA)로부터 구입하였다. 알칼라아제 및 뉴트라아제는 Novozymes Co. (Bagsvaerd, Denmark)로부터 구입하였으며, 마우스 대식세포(RAW 264.7) 세포주는 American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA)로부터 입수하였다. 모든 화학물질은 상업적으로 구입 가능한 가장 높은 준위의 것을 구입하였다.

[0013] 데이터를 3회의 독립 측정의 평균 $\pm$ 표준편차로서 나타냈다. 두 시료 사이의 유의차를 Student's t-test를 사용하여 분석하였으며, <0.05의 P-수치는 통계학적 유의성 수준으로서 간주하였다.

실시예 1. 젤라틴 추출물 및 가수분해

[0015] 껍질의 점액을 제거하기 위해 대구 껍질을 초기 세척하고, 작은 조각(1x 2cm²)으로 절단한 후, 1:4 (w/v)의 껍

질/용액 비율로 1% Ca(OH)_2 에 첨가하였다. 상기 용액을 24시간마다 3 회 교체하여 비콜라겐 단백질을 제거하였다. 그 후, 염기 처리된 껍질을 세척액이 중성 또는 약염기성 pH (pH 7-7.5)가 될 때까지 수돗물로 세척하였다. 충분히 세척된 대구 껍질을 60℃에서 30시간 동안 pH 6이 되도록 1:4 (w/v)의 껍질/물의 비율로 증류수에 첨가한 후 계속 교반하여 껍질로부터 젤라틴을 추출하였다. 상기 젤라틴 추출 용액을 3000 rpm에서 10분간 원심분리한 후 상청액을 바로 수집하여 동결건조기를 사용하여 동결건조시켰다. 상기 건조물을 '젤라틴 분말'로 명명하였다. 상기 젤라틴 분말을 최적 조건 하에서 다양한 효소(알칼라아제, 뉴트라아제, 파파인, α -키모트립신 및 트립신)으로 순차적으로 가수분해시켜 생활성 펩티드를 수득하였다. 1/100 (w/w)의 효소 대 기질 비율로, 1% 기질(분말상태) 및 상기 효소 각각과 혼합하였다(분말상태의 젤라틴과 효소를 혼합). 상기 혼합물을 각 최적 온도(알칼라아제, 뉴트라아제, 파파인; 50℃ α -키모트립신 트립신; 37℃)에서 4시간 동안 교반한 후 열수조에서 10분 동안 가열하여 효소를 불활성화시켰다. 효소 불활성화 후 효소로부터 가수분해물을 분리한 후 동결건조한다. 동결건조된 가수분해물을 사용 전까지 -80℃에서 보관하였다.

[0016] 실시예 2. 전자 스핀 공명(Electron spin resonance(ESR)분광 검정

[0017] 25℃에서 JES-FA ESR 분광분석기(JEOL Ltd., Tokyo, Japan)를 사용하여 상이한 라디칼을 생성하고 스핀 부가물을 기록하였다. 하기와 같이 장비를 세팅하였다: 자기장 336 ± 5 mT; 스위프 시간(sweep time) 30 s; 스위프 폭(sweep width) 10 mT; 조절 폭(modulation width) 0.1 mT 및 조절 주파수 100 kHz. 실험 시료의 라디칼 소거능을 $S = (H_0 - H)/H_0 \times 100\%$ 에 따라 소거능 백분율로 계산하였다; 상기에서, H 및 H_0 은 각각 실험 시료 존재 및 부재시의 ESR 시그널 강도이다.

[0018] DPPH 라디칼 소거능을 Alvarez-Parrilla 등의 문헌 (Alvarez-Parrilla, E., Rosa, L.A., Amarowicz, R., Shahidi, F., 2011. Antioxidant Activity of Fresh and Processed Jalapeno and Serrano Peppers. J. Agric. Food Chem. 59, 163-173)에 기재된 방법을 약간 변형하여 측정하였다. 30 μl 의 시료용액(또는 대조군으로서 증류수)을 메탄올 용액에 용해된 30 μl DPPH (60 μM)에 첨가하였다. 10분 동안 조심스럽게 혼합한 후, 용액을 50 mW 석영 모세관 튜브로 옮겼다. 2분 후, 5 mW 마이크로파 전압 및 진폭 1000에서 ESR 스펙트럼을 기록하였다.

[0019] 히드록시 라디칼을 Fenton 반응으로 생성하고 약간 변형된 DMPO 니트론 스핀 트랩(nitron spin trap) (Alvarez-Parrilla et al., 2011)을 사용하여 포획하였다. 결과적으로 생성된 $\text{DMPO}^{\bullet}\text{OH}$ 부가물을 ESR 분광분석기로 검출하였다. 시료 용액(15 μl)을 인산염 완충 식염수(PBS, pH 7.4)에 용해된 DMPO (0.3 M, 15 μl), FeSO_4 (10 mM, 15 μl) 및 H_2O_2 (10 mM, 15 μl)와 혼합한 후 50 μl 석영 모세관 튜브로 옮겼다. 2.5 분 후, 1 mW 마이크로파 전압 및 진폭 200에서 ESR 스펙트럼을 기록하였다.

[0020] 상기 가수분해물의 항산화 활성을 ESR 기술을 사용하여 히드록시 및 DPPH에서의 자유라디칼 소거능을 측정하여 평가하였다. 도 1에서 나타난 바와 같이, DPPH 라디칼에서의 가수분해물의 소거능은 히드록시 라디칼에서의 소거능보다 더 우수하였다. 다양한 효소에 의한 가수분해물 중에서, 파파인 가수분해물이 다른 가수분해물에 비해 가장 우수한 항산화 활성을 나타냈다. DPPH 및 히드록시 라디칼에 대한 파파인 가수분해물의 소거능은 1 mg/ml에서 각각 약 72% 및 56%이었다.

[0021] 실시예 3. 항산화 펩티드의 정제

[0022] FPLC(Fast protein liquid chromatography)

[0023] HiPrep 16/10 DEAE FF(diethylaminoethyl fast flow) 이온 교환 수지 상의 FPLC (AKTA, Amersham Bioscience Co., Uppsala, Sweden)를 사용하여 상기 파파인 가수분해물로부터 항산화 펩티드를 정제하였다. 상기 가수분해물을 20 mM 아세트산나트륨 완충용액(pH 4.0)으로 평형화시킨 HiPrep 16/10 DEAE FF 이온교환 수지 상에 로딩하고 동일 완충용액에 용해된 NaCl의 선형 구배(0-2 M)로 2 ml/min의 유속으로 용출시켰다. 각 분획을 280 nm에서 확인하고, 4 ml 부피로 수집하고 이를 세 부분으로 분획화하였다. 각 분획을 폴딩하고 회전 증발기를 사용하여 농축시킨 후 직접 자유라디칼 소거능에 대한 항산화 활성을 측정하고 그 결과를 도 2의 A에 나타냈다. 시료 용액(또는 대조군으로서 증류수)과 동등한 양의 radical을 첨가한 후 10초간 강하게 혼합하여, 용액을 50 μl 석영 모세관으로 옮겨 가수분해물의 소거능을 JES-FA ESR 분광계(JEOL Ltd., Tokyo, Japan)를 사용하여 측정하였다. 라디칼 소거능을 하기 식에 따라 계산하였다. H 및 H_0 은 각각 시료 존재 및 시료 부재시의 라디칼 시그널의 상대적

피크높이를 나타낸다. H 및 H₀은 각각 시료 존재 및 시료 부재시의 라디칼 시그널의 상대적 피크 높이를 나타낸다.

[0024] 라디칼 소거능 (%) = (H₀-H)/H₀ * 100%

[0025] 모든 분획 중에서, 분획 I가 75% at 500 µg/ml에서 75%의 가장 높은 히드록시 라디칼 소거능을 나타냈다. 가장 높은 항산화 활성을 나타내는 분획 I를 동결건조하고 다음 단계 사용을 위해 고성능 액체 크로마토그래피로 정제하였다.

[0026] 고성능 액체 크로마토그래피 (HPLC)

[0027] 2 ml/min 의 유속으로 0.1% 트리플루오로아세트산(trifluoroacetic acid; TFA)를 함유하는 아세토니트릴의 선형 구배(40분간 0-40%)로 Primesphere 10 C₁₈ (10 mm x 50 mm, Phenomenex, Cheshire, England) 컬럼 상의 역상 HPLC (Dionex Korea Ltd., Sunnyvale, CA, USA)를 사용하여 상기 가장 높은 항산화 활성을 갖는 분획 I를 추가 정제하였다. 용출 피크를 215 nm에서 검출하고, 활성 피크를 회전 증발기를 사용하여 농축시켰다. 유력한 피크를 수집하여 이의 항산화 활성을 평가한 후(도 2의 B) 동결건조시켰다. 2 ml/min 의 유속으로 0.1% TFA 함유 아세토니트릴의 선형 구배(20분간 15%, v/v)로 SynChropak RP-P-100 컬럼(4.6 mm x 250 mm)상에 분석 컬럼으로부터의 분획을 적용시켰다. 최종적으로, 대구 껍질 젤라틴의 파파인-분해로부터의 정제 펩티드를 아미노산 서열 분석하였다.

[0028] **실시예 4. 아미노산 서열 분석**

[0029] ESI(electrospray ionization) 소스를 구비한 Q-TOF 질량 분석기(Micromass, Altrincham, UK)를 사용하여 상기 정제 펩티드의 정확한 분자량 및 아미노산 서열을 측정하였다. 메탄올/물(1:1, v/v)에 용해시킨 정제된 펩티드를 ESI 소스에 분리하여 주입시키고, 이의 분자량을 질량 스펙트럼에서의 이중 전하 (M+2H)⁺2 상태에 의해 측정하였다. 분자량 측정 후, 펩티드가 분절화를 위해 자동적으로 선택되고 서열정보를 탠덤 질량분석기 분석(tandem mass spectrometry analysis)에 의해 획득하였다.

[0030] 정제된 두 펩티드의 아미노산 서열을 Q-TOF ESI 질량분석기를 사용하여 Thr-Gly-Gly-Gly-Asn-Val (485.5 Da, 펩티드 5) (도 3a, 서열번호 2) 및 Thr-Cys-Ser-Pro (388 Da, 펩티드 7)(도 3b, 서열번호 1)로 결정하였다. 펩티드 5의 구조는 1개의 트레오닌, 3개의 글리신, 1개의 아스파라긴 및 1개의 발린 잔기로 구성되어 있다. 펩티드 7의 구조는 1개의 트레오닌, 1개의 시스테인, 1개의 세린 및 하나의 프롤린으로 구성되어 있다. 또한, 펩티드 5의 서열에서, 글리신 및 발린과 같은 소수성 아미노산을 가지고 있으며, 펩티드 7의 서열에서는 시스테인 및 프롤린과 같은 소수성 잔기를 갖고 있다. 서열분석 결과는 정제된 펩티드가 유효산 전자 공여자로서 작용하여 자유 라디칼의 소거에 실질적으로 기여하는 소수성 아미노산(글리신, 프롤린)이 풍부함을 나타낸다. 시스테인 잔기는 자유 라디칼과 직접적으로 상호작용할 수 있기 때문에 항산화 활성에 독립적으로 중요하다. 게다가, 시스테인의 티올기가 산화 스트레스로부터 세포 및 세포내 생체활성물질을 보호하는 중요한 역할을 한다. 트레오닌은 단백질, 콜라겐 및 엘라스틴의 형성에 중요한 성분이다. 트레오닌은 간에 유용하며 신체 단백질의 균형을 유지한다. 생활성 펩티드는 일반적으로 3-20개 아미노산 잔기를 포함하며 저분자량 펩티드는 고분자량 펩티드에 비해 생체활성 펩티드로서 유용하다.

[0031] **실시예 5. 세포독성의 평가**

[0032] RAW 264.7 세포주를 5% CO₂ 환경하, 37°C에서 5% (v/v) 우태아혈청(FBS) 및 100 µg/ml 페니실린-스트렙토마이신을 포함하는 돌베코 변형 이글스 배지 (DMEM, GIBCO, New York, USA)에서 배양하고 유지시켰다. 그리고 각각의 배양한 세포에 다양한 농도(50, 500 및 1000 µg/ml)의 펩티드 5 및 펩티드 7을 처리하였다(세포를 5 x 10³ 세포/웰의 밀도로 96-웰 플레이트에 배양하였다. 24 시간 후에 세포를 신선한 배지로 세척하고 다른 농도의 시료를 처리하였다). Vo 등의 문헌 (Vo, T.S., Kong, C.S., Kim, S.K., 2011. Inhibitory effects of chitoooligosaccharides on degranulation and cytokine generation in rat basophilic leukemia RBL-2H3 cells. Carbohydr. Polym. 84, 649-655)에 기재된 바와 같이 MTT (3-(4,5-dimethyl-2-yl)-2,5-

diphenyltetrazolium bromide) 방법을 사용하여 세포에서의 시료의 세포독성 수준을 측정하였다. 48시간 배양 후에 세포를 제세척하고 50 μ l MTT (5 mg/ml)를 첨가하고 4시간 동안 배양하였다. 마지막으로 200 μ l DMSO를 첨가하여 형성된 포르마잔 염을 용해시키고 포르마잔 염의 양을 GENios 마이크로플레이트 리더(TECAN Austria GmbH, Grodig/Salzburg, Austria)를 사용하여 540 nm에서 흡광도(OD)를 측정하여 확인하였다.

[0033] MTT 검정에 따르면, RAW 264.7 세포에서 정제된 펩티드는 세포독성을 나타내지 않았다 (도 4a).

[0034] 실시예 6. DNA 손상의 평가

[0035] 게놈 DNA를 RAW 264.7로부터 AccuPrep^R genomic DNA extraction kit (Bioneer, Daejeon, South Korea)를 제조업자의 프로토콜에 따라 사용하여 추출하였다. 과산화수소 매개 DNA 산화를 Rajapakse 등의 문헌(Rajapakse, N., Kim, M.M., Mendis, E., Kim, S.K., 2007. Inhibition of free radical-mediated oxidation of cellular biomolecules by carboxylated chitooligosaccharides. Bioorg. Med. Chem. 15, 997-1003)에 기재된 방법에 따라 측정하였다. RAW 264.7 세포로부터 분리된 게놈 DNA로부터 분리된 완전한 게놈 DNA 상에서 200 μ M Fe (II) 및 2 mM H₂O₂의 결합에 의해 DNA 산화를 평가하였다(40 μ l DNA 반응 혼합물을 동일한 순서로 미리 결정된 농도의 실험 시료 (또는 대조로서 동일 부피의 증류수), 100 μ M 최종 농도의 FeSO₄, 0.1 mM 최종 농도의 H₂O₂ 및 5 μ l의 분리된 게놈 DNA를 첨가하여 준비하였다. 혼합물을 실온에서 10분 동안 배양하고 10 mM 최종 농도의 EDTA를 첨가하여 반응을 종결시켰다. 약 1 μ g의 DNA를 포함하는 분취량(20 μ l)의 반응 혼합물을 100 V에서 1% 아가로스 겔에 40분 동안 전기영동시켰다. 그런 다음 겔을 1 mg/ml Et-Br(ethidium bromide)로 염색하고 AlphaEase gel image analysis software (Alpha Innotech, St. San Leandro, CA, USA)를 사용하여 UV광 하에서 시각화시켰다.

[0036] 고반응성의 히드록시 라디칼은 DNA 분자의 모든 성분과 쉽게 반응할 수 있어 DNA를 손상시킨다. 이 병변은 염증, 암, 돌연변이 및 노화와 같은 다양한 질환에 관련된 세포성 DNA에 대한 자유 라디칼의 공격을 증가시킨다. RAW 264.7 세포로부터 분리된 게놈 DNA로부터 분리된 완전한 게놈 DNA 상에서 200 μ M Fe (II) 및 2 mM H₂O₂의 결합에 의해 DNA 산화를 평가하였다. DNA 손상에 대한 본원의 정제된 펩티드의 보호 활성을 DNA 전기영동으로 평가하였다. 반응 후에, H₂O₂-Fe(II) 단독으로 처리한 대조군에서는 모든 DNA 대부분이 분해되었다 (도 4b). 그러나, 정제된 펩티드는 투여량 의존 방식으로 자유 라디칼-매개 DNA 손상에 보호 효과를 나타냈다. 정제된 펩티드의 낮은 농도(50 μ g/ml)에서도, DNA 손상은 DNA 밴드의 강도에 기초하여 90% 이상 저해하였다.

[0037] 실시예 7. 세포내 ROS 소거능 평가

[0038] ROS의 세포내 형성을 기질로서 산화 민감성 염료 DCFH-DA를 사용하여 Qian 등의 문헌(Qian, Z.J., Jung, W.K., Byun, H.G., Kim, S.K., 2008. Protective effect of an antioxidative peptide purified from gastrointestinal digests of oyster, *Crassostrea gigas* against free radical induced DNA damage. Bioresour. Technol. 99, 3365-3371)에 기재된 방법에 따라 평가하였다. RAW 264.7 세포를 블랙 미량역가 (black microtiter) 96-웰 플레이트에 배양한 후 HBSS(hanks balanced salt solution)에 용해된 20 μ M DCFH-DA로 표지하고 암실에서 20분간 유지시켰다. 세포 내로 자유롭게 투과되는 비-형광 DCFH-DA 염료는 세포내 에스테라아제에 의해 2',7'-디클로로디하이드로플루오레스세인(DCFH)로 가수분해되어 세포 내부에 포획된다. 그런 다음 세포에 다른 농도의 시료들을 처리하고 1시간 동안 배양하였다. 세포를 PBS로 3회 세척한 후에 500 μ M H₂O₂(HBSS에 용해)를 첨가하였다. 다양한 ROS의 존재시에 DCFH의 산화에 의한 형광 디클로로플루오레스세인(DCF)의 형성을 485 nm의 여기 파장 및 528 nm의 방출파장에서 매 30분 마다 판독하였다(GENios microplate reader, Tecan Austria GmbH, Grodig/Salzburg, Austria). 처리의 투여량-의존 및 시간-의존 효과를 플롯팅한 후 처리되지 않은 시료의 대조군의 형광 밀도와 비교하였다.

[0039] 세포내 ROS를 형광 프로브 DCFH-DA를 사용하여 측정하였다. 표지화 동안, 세포 내로 쉽게 침투하는 비-형광 DCFH-DA 염료가 세포내 에스테라아제에 의해 가수분해되어 DCFH가 되며, 이 화합물은 세포 내에 포획되어 H₂O₂에 의해 산화된다. 항온 시간 동안 라디칼-매개 산화가 증가되는 3시간 동안 30분 간격으로 DCF 형광 강도를 확인하였다. 도 5에 나타난 바와 같이, 정제된 펩티드의 처리는 투여량 및 시간 의존 방식으로 DCF 형광 강도를 감소시켰다. 이러한 결과는 본원의 정제된 두 정제 펩티드가 RAW 264.7 세포에서 자유 라디칼을 소거하여 라디칼-

매개 산화를 저해하였음을 확인해준다.

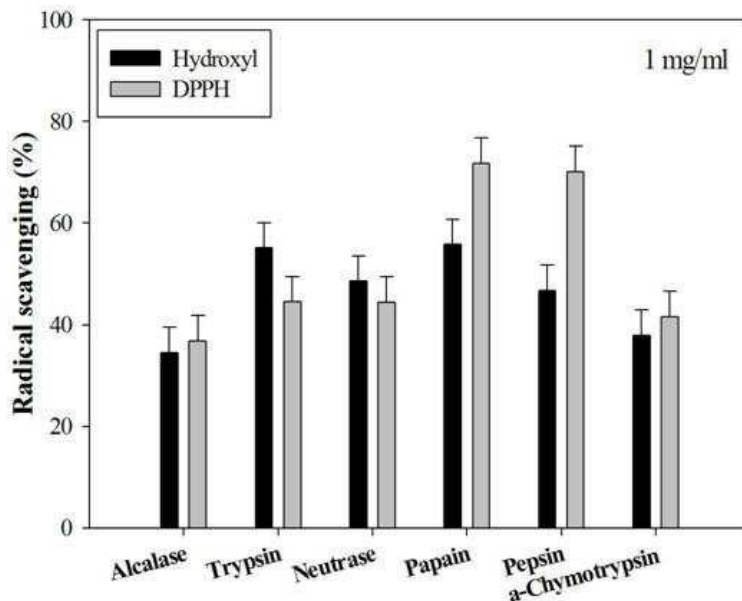
[0040] 실시예 8. ACE저해 활성의 평가

[0041] ACE 저해 활성 검정을 Cushman 및 Cheung의 문헌 (Cushman, D.W., Cheung, H.S., 1971. Spectrophotometric assay and properties of the angiotensin I-converting enzyme of rabbit lung. Biochem. Pharmacol. 20, 1637-1648)에 기재된 방법을 약간 변형시켜 실시하였다. A sample solution (50 μl) with 50 μl of ACE 용액 (25 mU/ml)과 시료 용액(50 μl 의 본원의 정제 펩티드)을 37 $^{\circ}\text{C}$ 에서 5분 동안 항온한 후 150 μl 의 기질(pH 8.3에서 0.5 M NaCl 함유 50 mM 소듐 보레이트 완충용액 내의 8.3 mM HHL)과 동일 온도에서 30분 동안 예비-항온하였다. 250 μl 1 M HCl을 첨가하여 반응을 종료시키고, 결과적으로 생성된 히푸르산을 500 μl 아세트산에틸로 추출하였다. 원심분리(3000 rpm, 10 min) 후, 200 μl 의 상층액을 유리판으로 옮기고 진공 하, 60 $^{\circ}\text{C}$ 에서 2시간 동안 증발시켰다. 히푸르산을 1 ml 증류수에 용해시키고 UV-분광광도계 (GENios microplate reader, Tecan Austria GmbH, Grodig/Salzburg, Austria)를 사용하여 228 nm에서 흡광도를 측정하였다. IC₅₀ 수치를 50% ACE 활성 저해에 필요한 저해제의 농도로서 결정하였다.

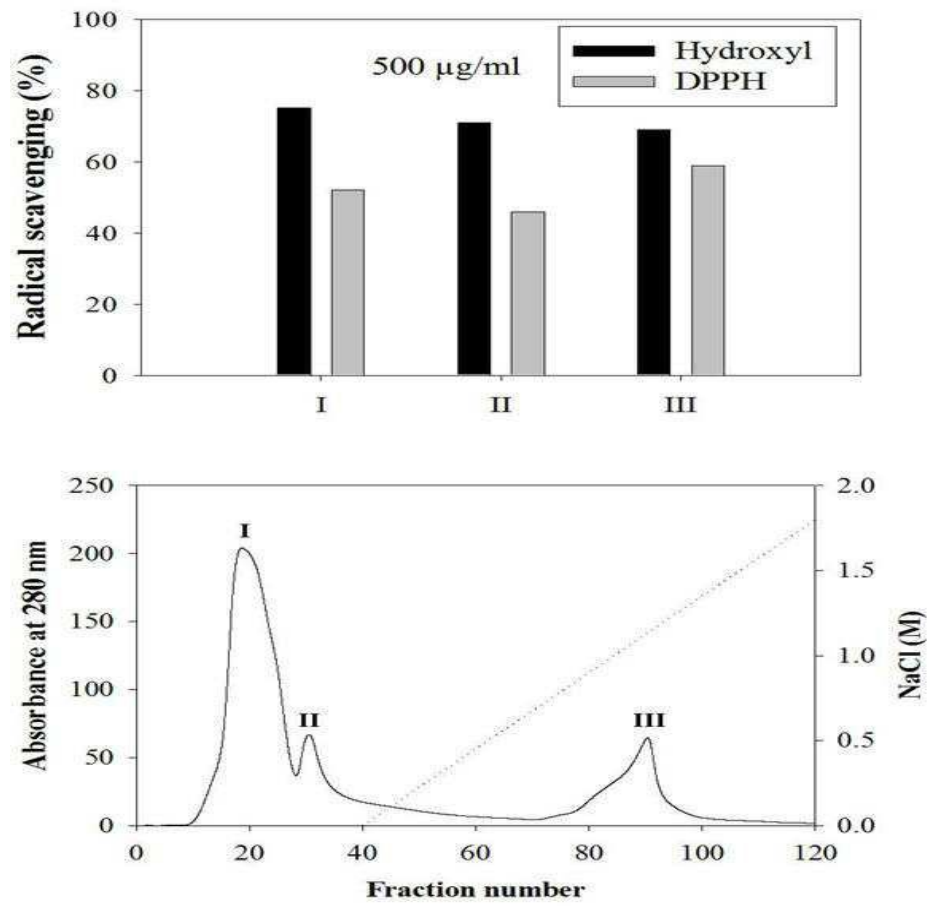
[0042] 생활성 펩티드는 일반적으로 3-20개 아미노산 잔기를 포함하며 저분자량 펩티드는 고분자량 펩티드에 비해 생체 활성 펩티드로서 유용하다. ACE 저해 펩티드의 활성 및 구조 사이의 관계에 대하여, 본원의 펩티드가 C-말단에 티로신, 프롤린 또는 페닐알라닌을 가지고 있으며 N-말단에 이소루신 또는 발린을 가지고 있어 높은 저해 활성을 나타낸다. 보고된 ACE 저해 펩티드 대부분은 C-말단에 프롤린 잔기를 갖는 짧은 펩티드이다. 짧은 단백질 서열의 프롤린은 효소의 분해를 예방하고 혈액의 순환으로 모세관을 통해 통과한다. 도 6에서 보여지는 바와 같이, 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 에서 다른 펩티드 Thr-Gly-Gly-Gly-Asn-Val (485.5 Da) (68%)보다 정제된 펩티드 Thr-Cys-Ser-Pro (388 Da)가 가장 우수한 ACE 저해 활성(81%)을 나타냈다. 그러므로, 이러한 펩티드들은 신규한 ACE 저해제로서 기능성 식품에 첨가될 수 있을 것으로 보인다.

도면

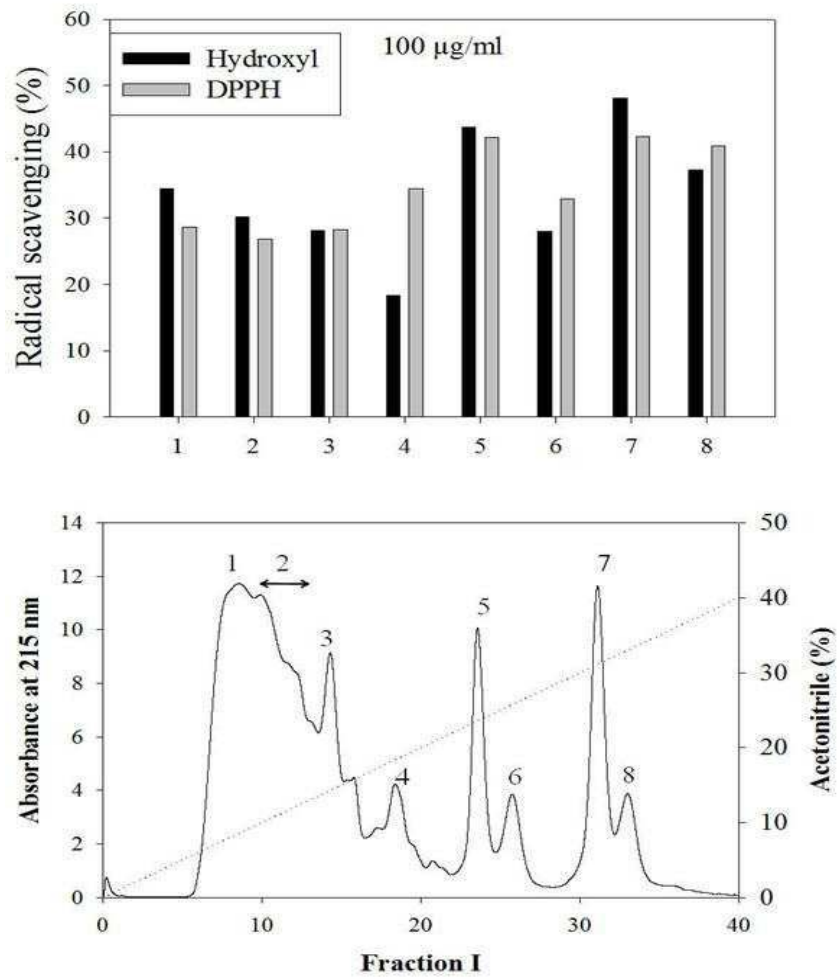
도면1



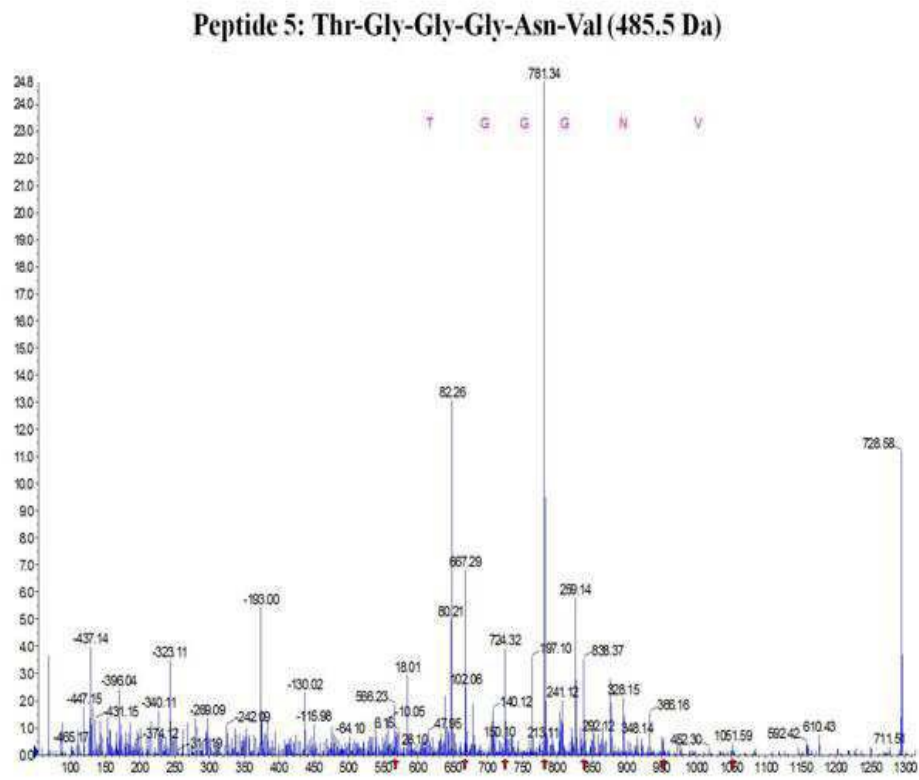
도면2a



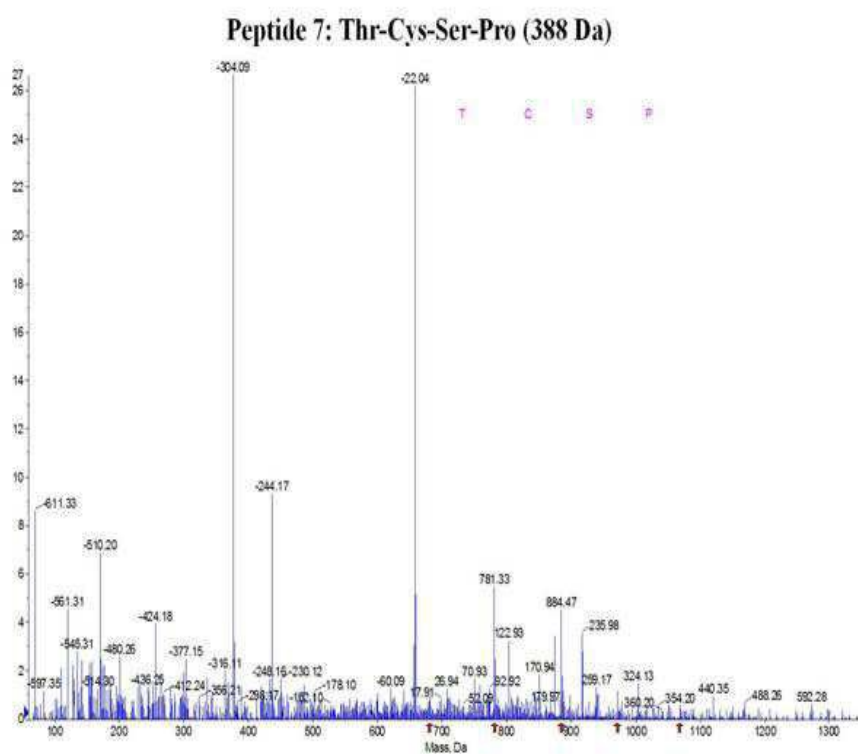
도면2b



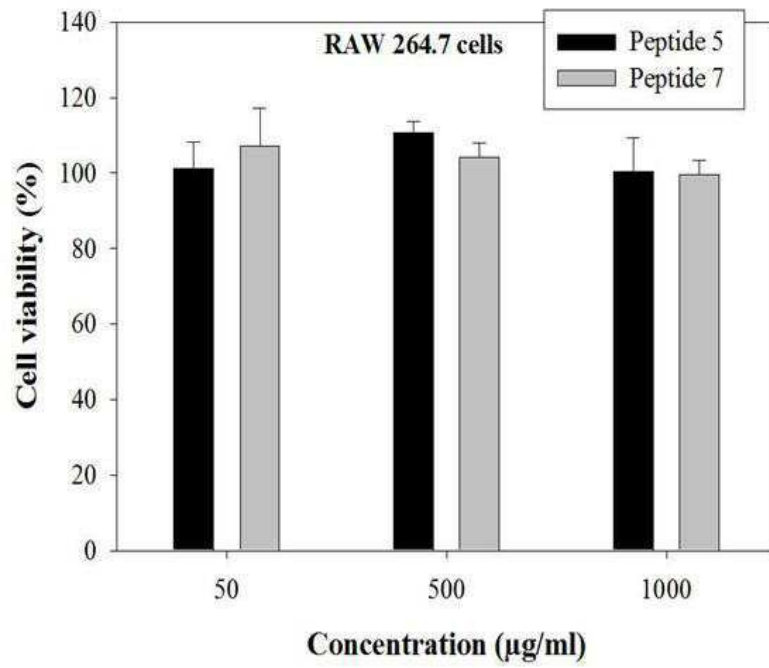
도면3a



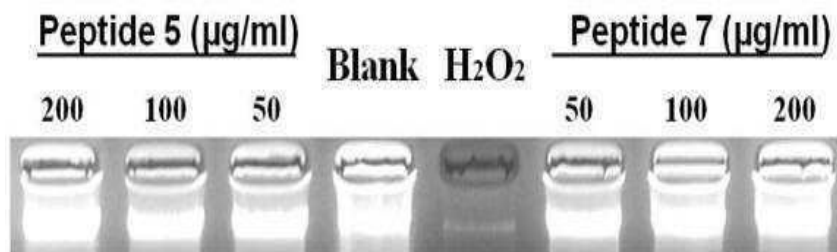
도면3b



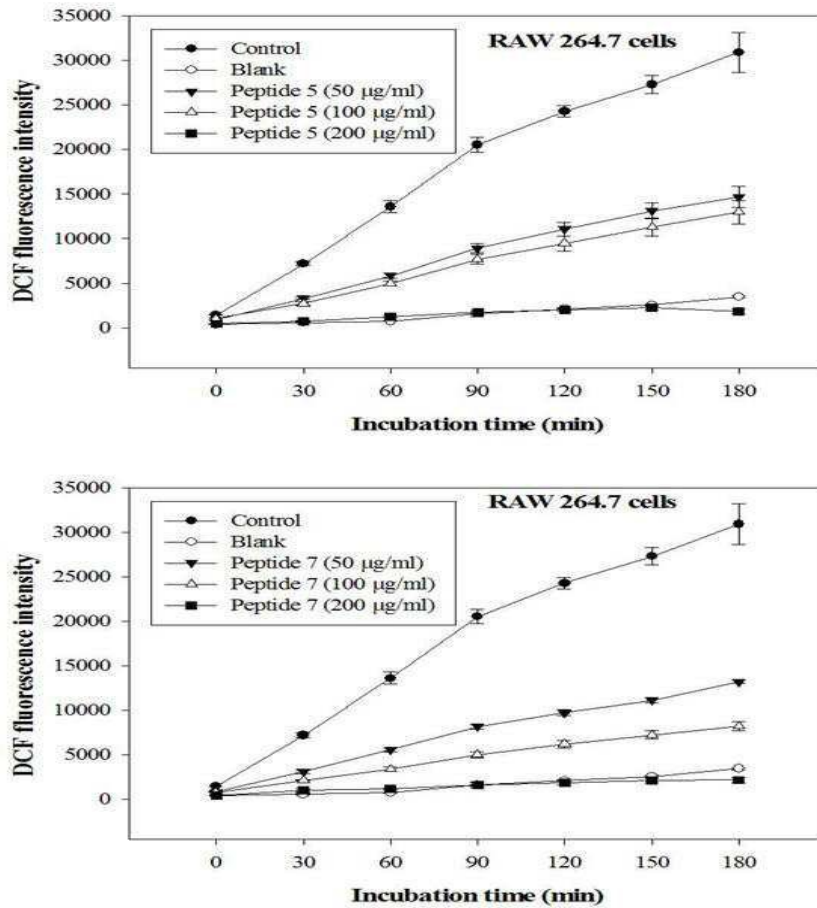
도면4a



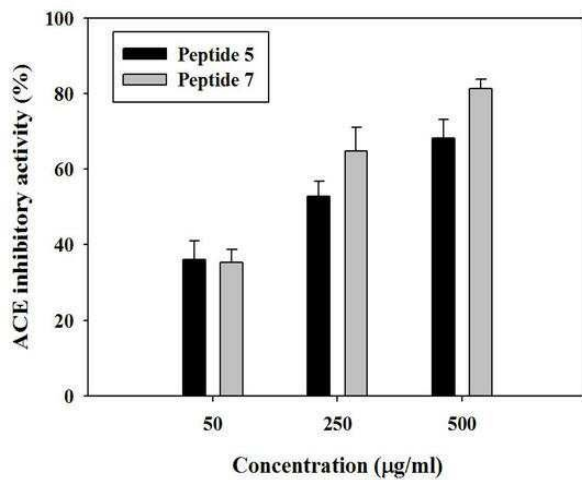
도면4b



도면5



도면6



서열 목록

<110> Pukyong National University Industry-University Cooperation Foundation

<120> PEPTIDE FROM PACIFIC COD AND ANTI-OXIDANT COMPOSITION CONTAINING
THE SAME

<130> 0000
 <160> 2
 <170> Kopatent In 2.0
 <210> 1
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> peptide from pacific cod
 <400> 1
 Thr Cys Ser Pro
 1
 <210> 2
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> peptide from pacific cod
 <400> 2
 Thr Gly Gly Gly Asn Val
 1 5