



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2013-0029598
(43) 공개일자 2013년03월25일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 35/60 (2006.01) A61P 9/12 (2006.01)

A61P 9/00 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2011-0092952

(22) 출원일자 2011년09월15일

심사청구일자 2011년09월15일

(71) 출원인

조선대학교산학협력단

광주광역시 동구 서석동 375 조선대학교 내

(72) 발명자

정원교

광주광역시 서구 풍암동 현대삼환아파트 104동 302호

천충길

전라남도 완도군 신지면 명사십리61번길 220, 조선대학교 해양생물연구교육센터

(74) 대리인

이덕록

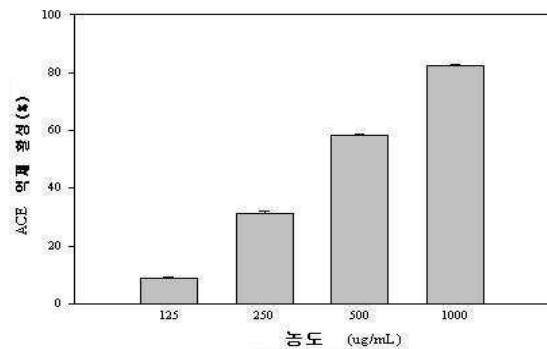
전체 청구항 수 : 총 4 항

(54) 발명의 명칭 항산화 및 안지오텐신전환효소 억제 효과를 갖는 전복 추출물 및 이를 함유하는 기능성 조성물

(57) 요약

본 발명은 전복을 가공하는 과정에서 발생하는 부산물인 전복 삶은 물의 항산화 및 ACE 억제 효과를 밝히고, 이를 함유한 약학 조성물 및 기능성 건강식품 조성물을 제공하는 발명에 관한 것으로, 합성 의약품의 부작용을 갖지 않으므로 장기 복용이 가능하고, 가공 부산물을 사용하므로 원가비 절감이라는 유익한 효과를 갖는다.

대표도 - 도5



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 109201-3

부처명 농림수산식품부

연구사업명 수산기술개발사업 (현 수산실용화개발사업)

연구과제명 전복 소화분해시스템을 활용한 천연 항알러지 제품 개발

주관기관 농림수산식품기술기획평가원(IPET)

연구기간 2009.06.01 ~ 2012.05.31

특허청구의 범위

청구항 1

항산화 효과 및 안지오텐신전환효소 억제 효과를 가짐을 특징으로 하는 전복 열수 추출물.

청구항 2

제1항에 있어서, 전복 삶은 물을 탈염하고 한외여과기에 의해 1kDa 이상만을 분류한 후에 동결 건조한 것을 특징으로 하는, 항산화 효과 및 안지오텐신전환효소 억제 효과를 가짐을 특징으로 하는 전복 열수 추출물.

청구항 3

제1항 또는 제2항의 전복 열수 추출물을 유효성분으로 함유하는 것을 특징으로 하는, 고혈압 예방 또는 치료용 약학 조성물.

청구항 4

제1항 또는 제2항의 전복 열수 추출물을 유효성분으로 함유하는 것을 특징으로 하는, 고혈압 증상 개선을 위한 기능성 건강식품용 조성물.

명세서

기술분야

[0001]

본 발명은 항산화 및 안지오텐신전환효소(Angiotensin I Converting Enzyme: ACE) 억제 효과를 갖는 전복 추출물 및 이를 함유하는 기능성 조성물에 관한 것으로, 보다 구체적으로는 전복을 가공하는 과정에서 발생하는 부산물인 전복 열수 추출물의 항산화 및 ACE 억제 효과를 밝히고, 이를 함유한 고혈압 증상 개선 효과를 갖는 약학 조성물 및 건강식품용 조성물을 제공하는 발명에 관한 것이다.

배경기술

[0002]

전복(*Haliotis discus hannai*)은 전세계적으로 상업적으로 높은 가치와 효능을 갖는 해양 복족류이다. 한국에서 전복은 특히 중요한 고부가가치 양식 종이다. 특히, 그의 대부분이 분포 및 양식되는 한국 남서부 해안 지역에서 전복은 경제적으로 중요한 종으로 인식되고 있다. 전복은 제조 과정에서 가열 및 증숙하는 조리 과정을 거친 다양한 가공 제품으로 개발되어 판매되고 있다. 이 과정에서 발생하는 전복 끓인 물은 대부분 폐기되는 실정이다. 전복을 끓이는 과정에서 발생된 부산물인 전복 열수 추출물(boiled abalone by-products: 이하, 'BABs'라 함)에는 20% 정도의 염이 포함되어 있고, 상당한 농도의 단백질, 탄수화물, 미네랄 및 지질이 포함되어 있다. 이러한 BABs로부터 유효 단백질을 회수하는 방법중 하나는 단백질의 기능적 및 영양적 특성을 개선하여 상향 조절하는 것이다.

[0003]

반응성 산소 종(Reactive Oxygen Species: ROS)은 생명의 기원 및 생물학적 진화에서 중요한 역할을 한다. 생체내에서 이들 ROS의 일부는 에너지 생산, 식세포 작용(phagocytosis), 세포 증식 조절 및 세포내 신호로서 긍정적인 역할을 한다. 반면, ROS는 지질, 단백질, 효소, 탄수화물 및 DNA를 공격할 수 있고, ROS와 항산화시스템의 방어 및 복구 간의 균형을 깨뜨릴 수 있다. 유리 라디칼 및 다른 ROS는 수퍼옥사이드 음이온 라디칼($O_2^{\cdot-}$), 하이드록실 라디칼($\cdot OH$) 및 비-유리 라디칼, 예컨대 일중항 산소($^1O_2$) 및 과산화수소(H_2O_2)를 포함한다. 하이드록실 라디칼 및 수퍼옥사이드 음이온 라디칼과 같은 유리 라디칼이 형성되는 것은 호기성 생물에서는 호흡

으로 인해 피할 수 없다. 유리 라디칼은 많은 질환에서 중요한 역할을 한다. 유리 라디칼 발생의 제어장에는 당뇨병, 암, 신경퇴행성 및 염증성 질환과 같은 많은 질환에 관련되어 있다. 이를 위해 많은 합성 항산화제가 개발되었으나, 발암과 같은 부작용으로 인해 그 사용이 제한되고 있으므로, 이를 대체할 천연 항산화제를 개발하기 위한 연구가 크게 증가하였다.

[0004] 고혈압은 세계 성인 인구의 약 20 %가 앓고 있는 것으로 추산되는 주요 질환의 하나이며, 궁극적으로는 심혈관 질환, 뇌졸중 및 신장 질환과 같은 다양한 질병을 초래한다.

[0005] 안지오텐신 I 전환 효소(ACE I; 다이펩티딜 카복시의 펩티다제, EC 3.4.15.1)는 혈압을 조절하는 중요한 생리적 역할을 한다. 이는 다양한 올리고펩타이드 C 말단으로부터 다이펩타이드를 절단한 엑소펩티다아제(exopeptidase)의 기능을 한다. ACE는 혈관수축신경 안지오텐신 II를 생성시키고 혈관확장신경 브래디키닌(bradykinin)을 분해함으로써 고혈압을 유발한다. 고혈압 치료를 위한 연구의 대부분은 캡토프릴(captopril), 에날라프릴(enalapril), 알라세프릴(alacepril) 및 리시노프릴(lisinopril)과 같은 ACE 억제제를 개발 및 합성하는 것을 목적으로 한다. 그러나, 이러한 합성 의약품은 기침, 미각 장애 및 피부 발진과 같은 소정의 부작용을 갖는 문제점이 있다.

[0006] 안지오텐신 저해제와 관련하여, 대한민국 등록특허 제1001566780000호 '안지오텐신 전환효소 저해제', 대한민국 등록특허 제1005949800000호 '해조식물로부터 추출한 안지오텐신 전환효소 활성 억제제를 함유하는 고혈압 개선제 및 이를 포함하는 제품' 및 대한민국 등록특허 제1009234740000호 '안지오텐신 I 변환효소 저해 활성을 갖는 아미노에틸 키토올리고당 화합물'이 알려져 있으나, 이들은 본 발명처럼 천연물로부터 유래되어 부작용을 갖지 않으면서도 가공 부산물을 사용함으로써 원가 절감의 효과를 갖지 않는다.

선행기술문헌

특허문헌

- [0007] (특허문헌 0001) 1. 대한민국 등록특허 제1001566780000호 (등록일: 1998. 7. 23, 공개번호: 제1019970059185호, 공개일: 1997. 8. 12)
- (특허문헌 0002) 2. 대한민국 등록특허 제1005949800000호 (등록일: 2006. 6. 22, 공개번호: 제1020050099159호, 공개일: 2005. 10. 13)
- (특허문헌 0003) 3. 대한민국 등록특허 제1009234740000호 (등록일: 2009. 5. 7, 공개번호: 1020090043658호, 공개일: 2009. 10. 19)

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명에서는 합성 제제의 부작용을 갖지 않으면서도 우수한 항산화 효과 및 ACE 억제 효과를 갖는 전복 열수 추출물(BABs)을 제공하고자 한다.

[0009] 또한, 본 발명에서는 상기 BABs를 유효성분으로 함유하는 고혈압 등의 개선효과를 갖는 기능성 건강식품용 조성물을 제공하고자 한다.

과제의 해결 수단

[0010] 본 발명은 BABs의 라디칼 소거 메카니즘 및 ACE 억제 효과를 규명한다. 보다 구체적으로, BABs가 라디칼 소거 메카니즘을 통해 세포에 대한 산화 관련 손상을 감소시킬 수 있고 ACE를 억제하는데 있어 효과적인 물질임을 실험을 통해 규명한다.

[0011] 본 발명의 BABs는 소수성 아미노산을 함유하여, 지질중 펩타이드의 용해도를 증가시키고, 그 결과 라디칼 종파의 상호작용을 더 촉진시킴으로써 지질 과산화 억제 활성에 일조할 수 있다. 또한, BABs에 함유된 Asp 아미노

산은 생명유지에 관련된 역할을 하고, Leu 아미노산은 항산화 활성에 일조한다. 특히, BABs에 함유된 히스티딘-함유 펩타이드, 예컨대 카로신, 안세린 및 발레닌(오피딘으로도 알려져 있음)은 보다 높은 라디칼-소거 활성을 나타내는데, 이는 히스티딘의 이미다졸 기의 양성자-공여능 때문이다.

[0012] 또한, 본 발명의 BABs는 ACE를 비경쟁적으로 억제하며, ACE 분자와 결합하여 기질 분자와의 결합 여부에 상관 없이 실패복합체(dead-end complex)를 생산한다.

[0013] 본 발명에서는 BABs를 유효성분으로 포함하는 고혈압 증상을 개선시키기 위한 약학 조성물 및 기능성 건강식품용 조성물이 제공된다.

[0014] 본 발명에 따른 약학 조성물은 BABs를 전체 조성물의 중량을 기준으로 0.01 내지 99중량% 포함할 수 있으며, 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 및 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용될 수 있다.

[0015] 본 발명에 따른 약학 조성물에 포함될 수 있는 담체, 부형제 및 희석제로는 락토즈, 텍스트로즈, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 들 수 있다. 제제화 할 경우에는 보통 사용하는 충전제, 증량제, 결합제, 습윤제, 봉해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다. 경구투여를 위한 고형 제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트(calcium carbonate), 수크로스(sucrose) 또는 락토오스(lactose), 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 위텟솔(witepsol), 마크로콜, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다.

[0016] 본 발명의 BABs 또는 이를 함유하는 약학 조성물의 바람직한 투여량은 환자의 상태 및 체중, 질병의 정도, 약물 형태, 투여경로 및 기간에 따라 다르지만, 담당 의사 등에 의해 적절하게 선택될 수 있다.

[0017] 또한, 본 발명에 따른 기능성 건강식품용 조성물은 산제, 정제, 캡슐제, 분말제, 연고조성물, 용액제, 젤, 페이스트, 첩포제, 과립상 중 어느 하나의 제형을 가질 수 있으며, 당업계에서 통상적인 용량으로 복용 또는 투여될 수 있다. 또한, 상기 기능성 건강식품용 조성물은 BABs 유효성분 이외에 감미제, 향료, 착색제와 같은 통상적인 첨가제를 포함할 수 있다.

발명의 효과

[0018] 본 발명의 BABs 및 이를 유효성분으로 함유하는 약학 조성물 및 기능성 건강식품용 조성물은 합성 의약품의 부작용을 갖지 않으므로, 장기 복용이 가능하고, 가공 부산물을 사용하므로 원가비 절감이라는 유익한 효과를 갖는다.

도면의 간단한 설명

[0019] 도 1은 RAW264.7 마크로파지 세포주에 대한 BABs의 세포독성 효과를 나타낸 그래프이다.

도 2는 ESR 분광계를 이용하여 여러 농도의 BABs에서 유리 라디칼 소거 활성을 나타낸 그래프이다.

도 3은 1,000 $\mu\text{g/mL}$, 500 $\mu\text{g/mL}$ 및 100 $\mu\text{g/mL}$ 에서 BABs의 세포 라디칼 소거 활성을 나타낸 그래프이다.

도 4는 BABs에 의한 DNA 산화 보호를 전기적 영동 실험에 의해 나타낸 이미지이다.

도 5는 여러 농도의 BABs에서 ACE 억제 활성을 나타낸 그래프이다.

도 6은 ACE에 대한 BABs의 억제 모드를 결정하기 위한 라인위버-버크(Lineweaver-Burk) 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0020] 이하, 본 발명을 실시예에 의해 보다 구체적으로 설명하지만, 실시예는 본 발명의 예시를 위한 것이므로, 본 발명의 권리범위가 이에 한정되지 않음이 당업자들에게 명백히 이해될 것이다.
- [0021] 재료 및 방법
- [0022] 전복을 끓인 후에 남은 물을 청산 바다 전복 (주) (대한민국 완도 소재)로부터 제공받았다. 상기 물은 전복을 3 시간 이상 끓인 후 남은 부산물이다.
- [0023] 토끼 폐로부터의 ACE (EC 3.4.15.1) 및 ACE 기질 펩타이드인 히푸릴-히스티딜-루이신(hippuryl-histidyl-leucine: HHL)은 시그마 케미칼 캄파니(Sigma Chemical Co., 미국 미주리주 세인트 루이스 소재)에서 구입하였다. 1,1-다이페닐-2-피크릴-하이드라질(DPPH), 5,5-다이메틸-1-피롤리딘-N-옥사이드(DMPO), FeSO₄, H₂O₂, 2,2-아조비스-(2-아미디노프로페인)-하이드로클로라이드(AAPH) 및 (4-피리딜-1-옥사이드)-N-3급-부틸니트론(4-POBN)을 포함한 라디칼 테스트 화합물도 시그마 케미칼 캄파니에서 구입하였다. 세포 배양 배지 및 배양에 필요한 모든 다른 물질은 킵코(Gibco, 미국 뉴욕주 그랜드 아일랜드 소재)에서 구입하였다. 모든 다른 시약은 이용가능한 최고 품질 등급이었다.
- [0024] 제조예 1: 끓인 전복 부산물(BABs)의 제조
- [0025] 전복 끓인 물을 전기투석기(Micro Acilyzer 모델 G3, Asahi Chemical industry Co., 일본 동경 소재)에 의해 탈염하고, 이어서 한외막 시스템에 의해 분류하고 농축하였다 (> 1kDa). 이와 같이 수득한 BABs를 동결 건조하고, 사용하기 전까지 -20 °C에서 보관하였다. 전복을 3시간 이상 가열한 후 상층액을 동결 건조하고, 사용하기 전까지 -20 °C에서 보관하였다.
- [0026] 이와 같이 수득된 BABs의 일반 조성은 AOAC 방법에 의할 때 건조 중량 기준으로 75.1 % (단백질), 3.84 % (지질), 21.06 % (탄수화물)을 갖는 것으로 나타났다.
- [0027] BABs의 아미노산 조성을 결정하기 위해, 진공 하에 24시간동안 110°C에서 0.1% 티오글리콜산을 함유하는 6N HCl에서 BABs (20mg)을 가수분해하였다. 페닐이소티오시아네이트에 의해 유도된 아미노산을 동정하고, 자동 아미노산 분석기(Biochrom 20; Pharmacia Biotech, 스웨덴 옉살라 소재)를 사용하여 정량하였다. 그 결과, 표 1에 나타난 바와 같이, BABs의 아미노산 조성은 His (19.10 % w/w), Cys (16.33 %), ASP/n (12.12 %), Glu/n (7.85 %), Pro (5.12 %), Ala (3.98 %), Gly (3.69 %) 및 Leu (3.41 %)와 같은 소수성의 수소-제공 아미노산으로 구성된 것으로 나타났다:

표 1

아미노산	BABs (%)
Asp.	12.125
Thr.	6.7643
Ser.	5.6870
Glu.	7.8542
Gly.	3.6912
Ala.	3.9809
Cys.	16.339
Val.	2.3543
Met.	0.4603
Ile.	1.6735
Leu.	3.4146
Tyr.	2.4429
Phe.	2.0776
Lys.	3.8717
Trp.	0.0253
His.	19.103

Arg.	3.0129
Pro.	5.1224
전체	100.0000

[0029] 상기 아미노산 중에서 히스티딘, 프롤린, 알라닌 및 루이신을 포함한 일부 아미노산은 유리 라디칼 소거와 관련 되었다고 알려진 것이다.

[0030] 실험예 1: 세포 배양 및 생존도 결정

[0031] RAW264.7 마크로파지는 10 % FBS, 100 μ g/mL 페니실린 및 100 μ g/mL 스트렙토마이신을 함유하는 DMEM에서 37 $^{\circ}$ C 및 5 % CO₂ 가습 공기 분위기 하에 배양하였다. RAW264.7에 대한 BABs의 세포독성 수준은 문헌[Hansen MB, Nielsen SE, Berg K. Re-examination and further development of a precise and rapid dye method for measuring cell growth/cell kill. J. Immunol. Methods. 119: 203-210, 1989] 등에 기재된 바와 같은 MTT 방법을 사용하여 측정하였다. RAW264.7 마크로파지를 24시간동안 웰당 4 x 10³ 세포 밀도로 96-웰 플레이트에 도말하고, 이어서 세척하였다. 다양한 농도(100, 250, 500, 1,000 μ g/mL)의 시료와 함께 세포를 0.5 mg/mL MTT 용액에서 배양하였다. 3시간 후에, 상청액을 제거하고, 마이크로플레이트 리더(Power Wave XS 모델, BioTek Instruments, Inc., 미국 VT 위노스키 소재)를 사용하여 540 nm에서 측정하였다.

[0032] 그 결과, 도 1에 나타난 바와 같이, BABs는 시험 농도에서 RAW264.7 세포에 세포 독성 효과를 갖지 않는 것으로 나타났다. 따라서, BABs의 비독성 농도 (100-1,000 μ g/mL)를 이후 실험에서 사용하였다.

[0033] 실험예 2: 전자 스핀 공명(ESR) 분광에 의한 유리 라디칼 소거 활성의 측정

[0034] 하기 절차에 따라 다양한 라디칼을 발생시키고, JES-FA 전자 스핀 공명 (ESR) 분광계(JEOL Ltd., 일본 동경 소재)를 사용하여 스핀 부가물을 기록하였다. 하기 식을 이용하여 라디칼 소거능을 계산하였고, H 및 H₀는 각각 시료를 갖는 라디칼 신호의 상대 피크 높이 및 시료를 갖지 않는 라디칼 신호의 상대 피크 높이이다.

[0035] 라디칼 소거 활성(%) = $\left[\frac{1-H}{H_0} \right] \times 100$

[0036] DPPH 라디칼 소거 활성

[0037] DPPH 라디칼 소거 활성은 문헌[Nanjo H, Adachi M, Aketa T, Mizoguchi T, Nishihara T, Terada T. The role of cysteine in the alteration of bovine liver dihydrodiol dehydrogenase activity. Biochemistry. 310: 101-107 (1995)]에 기재된 방법을 이용하여 측정하였다. 30 μ L 시료 용액(또는 에탄올 블랭크 등)을 에탄올 중 DPPH (60 μ M) 30 μ L에 추가하였다. 10초동안 격렬하게 혼합한 후에, 상기 용액을 100 μ L들이 석영 모세 시험관으로 옮기고, ESR 분광계를 사용하여 소거능을 측정하였다. 스핀 부가물은 정확하게 2분 후에 ESR 분광계에서 측정하였다. 실험 조건은 다음과 같았다: 자기장 336.5 $\pm$ 5 mT; 전원 5 mW; 변조 주파수 9.41 GHz; 진폭 1 $\times$ 1000; 스위프(sweep) 시간 30초.

[0038] 하이드록실 라디칼 소거 활성

[0039] 철 촉매의 Fenton Haber-Weiss에 의해 하이드록실 라디칼이 발생하고, 발생된 하이드록실 라디칼은 니트론 스핀 트랩(DMPO)과 신속하게 반응하였다. 생성된 DMPO-OH 부가물은 ESR 분광계에 의해 검출가능하였다. 시료 용액 (20 μ L)을 인산염 완충 용액(pH 7.4) 중 DMPO (0.3 M, 20 μ L), FeSO₄ (10 mM, 20 μ L) 및 H₂O₂ (10 mM, 20 μ L)와 혼합한 후에 100 μ L들이 석영 모세 시험관으로 옮겼다. 2.5 분후에, ESR 분광기를 사용하여 ESR 스펙트럼을 기록하였다. 실험 조건은 다음과 같았다: 자기장 336.5 $\pm$ 5 mT; 전원 1 mW; 변조 주파수 9.41 GHz; 진폭 1 $\times$ 200; 스위프 시간 4분.

[0040] 수퍼옥사이드 음이온 라디칼 소거 활성

[0041] UV 조사된 리보플라빈/EDTA 시스템에 의해 수퍼옥사이드 음이온 라디칼을 발생시켰다. 0.3 mM 리보플라빈, 1.6 mM EDTA, 800 mM DMPD 및 시료를 포함하는 반응 혼합물은 365 nm의 UV 램프에서 1 분 미만동안 조사하였다. 반응 혼합물을 측정을 위해 100 μ L들이 ESR 석영 모세 시험관으로 이동시켰다. 실험 조건은 다음과 같았다: 자기장 336.5 ± 5 mT; 전원 10 mW; 변조 주파수 9.41 GHz; 진폭 1×1000 ; 스위프 시간 1분.

[0042] 퍼옥실 라디칼 소거 활성

[0043] 문헌[Hiramoto K, Johkoh H, Sako KI, Kikugawa K. DNA breaking activity of the carbon-centered radical generated from 2,2-azobis-(2-amidinopropane)-hydrochloride (AAPH). Free radic. Res. 19: 323-332 (1993)]에 기재된 방법에 따라 퍼옥시 라디칼을 발생시켰다. 즉, 40 mM 2,2-아조비스(2-아미디노프로판) 다이하이드로클로라이드(AAPH) 20 μ L를 포스페이트 완충 식염수(PBS) 20 μ L, 40mM a-(4-피리딜-1-옥사이드)-N-3급-부틸니트론(4-POBN) 및 시료 용액 20 μ L와 혼합하였다. 상기 혼합물을 30분동안 37℃에서 배양하고, 이어서 100 μ L들이 ESR 석영 모세 시험관으로 이동시켰다. 실험 조건은 다음과 같았다: 실험 조건은 다음과 같았다: 변조 주파수 100 kHz, 마이크로웨이브 전원 10 mW, 마이크로웨이브 주파수 9441 MHz, 자기장 336.5 ± 5 mT; 스위프 시간 30초.

[0044] 도 2는 상기 실험 결과를 나타낸 것으로, 상이한 라디칼 공급원에 대한 4개 군의 유리 라디칼 소거 활성을 나타낸다. 1000 μ g/mL에서 BABs은 DPPH, 하이드록실, 수퍼옥사이드 및 퍼옥실 라디칼 각각의 87.4 %, 88.2 %, 78.2 % 및 72.9 %라는 상당한 소거 활성을 나타내었다. 또한, BABs는 투여량 의존적인 방식으로 4개 군의 유리 라디칼 소거 활성을 나타내었다.

[0045] 실험예 3: DCFH-DA에 의한 세포 ROS 결정

[0046] ROS의 세포내 형성을 산화 민감성 연료인 2',7'-다이클로로플루오레신 다이아세테이트(DCFH-DA)를 기질로 사용하여 측정하였다. 형광 미세적정 96-웰 플레이트에서 배양된 RAW264.7 세포를 헹크 균형 염용액(Hank's balanced salt solution)중 20 μ M DCFH-DA로 로딩하고, 암실에서 20분동안 배양하였다. 비-형광 DCFH-DA 염료는 세포에 자유롭게 침투하여, 세포내 에스테라아제에 의해 2',7'-다이클로로플루오레신(DCFH)로 가수분해하였다. 이어서, 세포를 상이한 농도의 시험 추출물로 처리하고, 1시간동안 배양하였다. 세포를 PBS로 3회 세척한 후에, HBSS에 용해된 300 μ M H₂O₂를 상기 세포에 추가하였다. 다양한 ROS의 존재하에 DCFH 산화로 인한 DCF 형성을 마이크로플레이트 리더를 이용하여 485 nm 여기 파장(Ex) 및 535 nm 방출 파장(Em)에서 30분마다 측정하였다. BAB 처리군의 투여량-의존적 및 시간-의존적인 효과를 그래프에 표시하고, 대조군 및 블랭크(blank) 군의 형광 강도와 비교하였다.

[0047] 세포 환경에서 유리 라디칼 소거능을 확인하기 위하여 세포 라디칼에 대한 BABs의 직접 소거 효과를 연구하였다. 이를 위해, 전술한 형광 프로브 2',7'-다이클로로플루오레신 다이아세테이트(DCFH-DA)로 RAW 264.7 세포를 표지(label)하였다. 도 3에 나타낸 바와 같이, DCFH의 ROS-매개 산화 이후에 DCF에 의해 발생되는 형광을 150분까지 시간경로 증분시켰다. BABs로 전처리하여 투여량- 및 시간-의존적으로 DCF 형광을 감소시켰다. BABs는 30분 후에 100 μ g/mL 농도에서 상당한 라디칼 소거 효과를 나타내었다. 보다 구체적으로, 1,000 μ g/mL 농도에서 BABs는 배양 시간내내 라디칼을 많이 소거하였다(도 3 참조). 이러한 결과는 BABs가 ROS에 의한 산화적 손상으로부터 세포를 보호할 수 있고, 따라서 세포의 ROS 형성을 억제하는 강력한 생체분자로 개발될 수 있음을 의미한다.

[0048] 실험예 4: 게놈 DNA 분리 및 DNA 산화 분석

[0049] Fenton 반응에 의해 생성된 하이드록실 라디칼($\cdot$ OH)은 DNA 가닥에서 산화적 절단을 일으켜서 개방된 환형 또는 이완형(relaxed) 형태를 생성시킨다. 본 실험에서는 게놈 DNA를 RAW 264.7 세포에서 분리하여서, DNA 산화 손상에 대한 BABs의 보호 효과를 연구한다.

- [0050] 표준 페놀/프로테이나아제 K 절차를 약간 변형하여 RAW264.7 세포에서 게놈 고분자량 DNA를 추출하였다. 즉, 10cm 디쉬에서 배양된 세포를 PBS로 2회 세척하고, 5 mM EDTA를 함유한 PBS 1 mL로 급었다. 원심분리 후에, 세포를 RNase (0.5mg/mL), 아세트산 나트륨 (0.2 M), 프로테이나아제 K (10 mg/mL) 및 SDS (10 %)에 용해하였다. 혼합물을 30분동안 37℃로 배양하고, 1시간동안 55℃로 배양하였다. 배양 이후에, 페놀: 클로로포름: 이소아밀 알코올 (25:24:1)을 1:1 비로 첨가하고, 4℃에서 5분동안 12,000 x g로 원심분리하였다. 상층액을 1:1.5 비로 100 % 빙냉 에탄올과 혼합하고, -20 ℃로 15 분동안 보관하였다. 5분동안 12,000 x g로 원심분리한 후에, 펠렛을 TE 완충액에 용해시키고, DNA 순도를 260/280 nm에서 전기분광학적으로 결정하였다. H₂O₂ 매개의 DNA 산화는 문헌[Milne L, Nicotera P, Orrenius S, Burkitt M. Effects of glutathione and chelating agents in copper-mediated DNA oxidation: pro-oxidant and antioxidant properties of glutathione. Arch. Biochem. Biophys. 304: 102-109 (1993)]에 기재된 방법에 따라 결정하였다. 미리 정해진 농도의 테스트 샘플(또는 대조군으로서 동량의 증류수), 최종 농도 200 μM의 FeSO₄ 및 2mM H₂O₂를 50 μg/mL 최종 농도의 DNA에 상기 순서대로 추가하여 100 μL의 DNA 반응 혼합물을 제조하였다. 10mM 최종 농도의 EDTA를 첨가하여서 상기 혼합물을 배양하였다. 약 1μg DNA를 함유하는 반응 혼합물 분액(20 μL)을 100 V에서 30분동안 1% 아가로스 겔 상에서 전기영동하였다. 겔을 1 mg/mL 에티뮴 브로마이드로 염색하고, AlphaEase(등록상표) 겔 이미지 분석 소프트웨어(Alpha Innotech, 미국 캘리포니아주)를 이용하여 UV 빛으로 시각화하였다.
- [0051] 반응 30분 후에, 거의 모든 DNA가 Fe(II)-H₂O₂ 만으로 처리된 대조군에서 분해하였다. 그러나, 명백한 투여량-의존적인 DNA 산화 억제효과는 BABs가 반응 혼합물에 처리되었을 때에만 관찰되었다. 상기 결과에 따르면, 250 내지 1000 μg/mL 농도의 BABs로 처리된 DNA는 하이드록실-라디칼-유도된 DNA 손상을 투여량 의존적으로 보호하였으며, 이는 항산화 효과를 의미한다. 즉, 승온이 Fenton 반응을 하지않은 것과 유사한 정도의 DNA 밴드를 유도하였다(도 4 참조).
- [0052] 실험예 5: ACE 억제 활성 및 억제 패턴의 결정
- [0053] ACE 억제 활성 분석은 문헌[Cushman DW, Cheung HS. Spectrophotometric assay and properties of angiotensin converting enzyme of rabbit lung. Biochem. Pharmacol. 20: 1637-48 (1971)]에 기재된 방법을 약간 변형하여 실시하였다. 상기 반응 혼합물은 50 mM 소듐 보레이트 완충액(pH 8.3)중 기질인 5 mM HHL, 0.3 M NaCl 및 5 mL ACE를 함유하였다. 샘플 (50 μL)을 상기 반응 혼합물 (50 μL)에 첨가하고, 0.5 M NaCl을 함유하는 8.3 mM HHL (150 μL)와 혼합하였다. 30분동안 37℃에서 배양한 후에, 0.1 M HCl (250 μL)을 첨가하여 추가적인 반응을 중지시켰다. 1.5 mL 에틸 아세테이트를 첨가하여서, 결과로 발생된 히푸르산(hippuric acid)을 추출하였다. 원심분리 (800 g, 15 분) 후에, 상층 1 mL를 유리관으로 옮기고, 실온 진공에서 2시간동안 증발시켰다. 히푸르산을 증류수 3.0 mL에 재용해시키고, UV 분광계 (모델 U-3210, Hitachi Co., 일본 동경 소재)를 이용하여 228 nm에서 흡광도를 측정하였다.
- [0054] ACE에 대한 BABs의 억제 메커니즘을 명확히 하기 위해, 문헌[Bush K, Henry PR, Slusarchyk DS. Muraceinsmuramyl peptides produced by Norcardia orientalis as angiotensin converting enzyme inhibitors. J. Antibiot. 37: 330-335 (1984)]에 기재된 방법을 약간 변형하여 각각의 반응 혼합물에 상이한 농도의 BAB를 첨가하였다. 상기 절차에 따라 상이한 농도의 기질(HHL)을 사용하여 효소 활성을 측정하였다. 억제제 존재하에 ACE 역학계수를 Lineweaver-Burk를 표시하여 결정하였다.
- [0055] 그 결과, 도 5에 나타난 바와 같이, BABs는 시험된 모든 농도(125 내지 1000 μg/mL) 중 1,000 μg/mL 농도에서 유의한 ACE 억제 활성(81.8%)이 가장 높은 것으로 나타났다. IC₅₀ 값은 0.62 mg/mL로 결정되었다.
- [0056] 또한, BABs의 ACE 억제 패턴은 Lineweaver-Burk 그래프를 작성하여 연구한 결과, 비경쟁적인 것으로 밝혀졌다(도 6 참조). 이러한 결과는 BABs가 ACE 분자와 결합하여서, 기질 분자와의 결합 여부에 상관없이 실패복합체(dead-end complex)를 생산함을 의미한다.
- [0057] 통계분석
- [0058] 통계 분석 데이터는 평균 ± 표준 오차로 표기하였다(n = 3). 유의 정도(p < 0.05)를 결정하기 위해 스튜던트(Student) t 테스트를 이용하였다.

[0059] 배합예 1: 약학 제제

[0060] BABs 25 mg을 락토오스 26 mg, 아비셀(미결정 셀룰로오스) 3.5 mg, 나트륨 전분 글리코네이트 1.5 mg 및 L-HPC(low-hydrosypropylcellulose) 8 mg과 함께 U형 혼합기에 넣고 20분간 혼합하였다. 혼합이 완료된 후 마그네슘 스테아레이트 1 mg을 추가로 첨가하고 3분간 혼합하였다. 정량 시험과 항습도 시험을 거쳐 타정하고 필름 코팅하여 정제를 제조하였다.

[0061] 배합예 2: 건강식품 제제

[0062] 하기 배합에 따라 당업계에서 통상적인 방법으로 정제 형태의 기능성 건강식품을 제조하였다:

[0063] D-만니톨 44.0 중량%

[0064] 유당 40.0 중량%

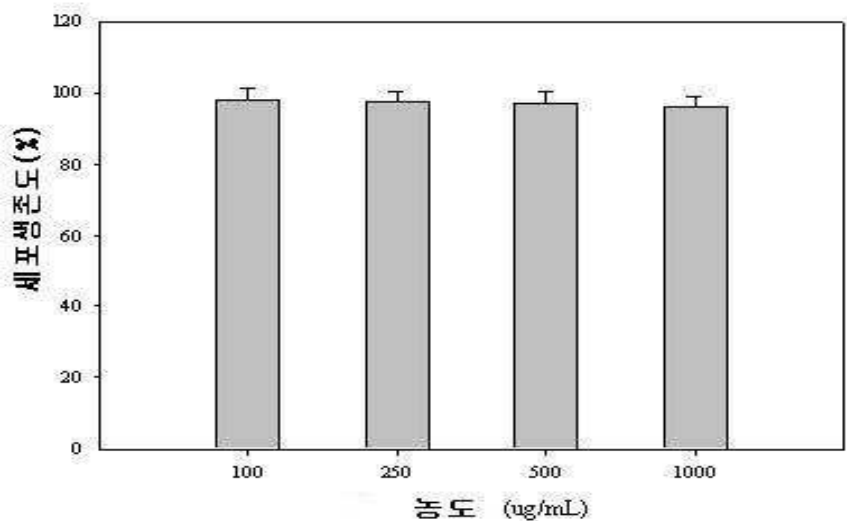
[0065] 결정셀룰로오스 10.0 중량%

[0066] 히드록시프로필셀룰로오스 5.0 중량%

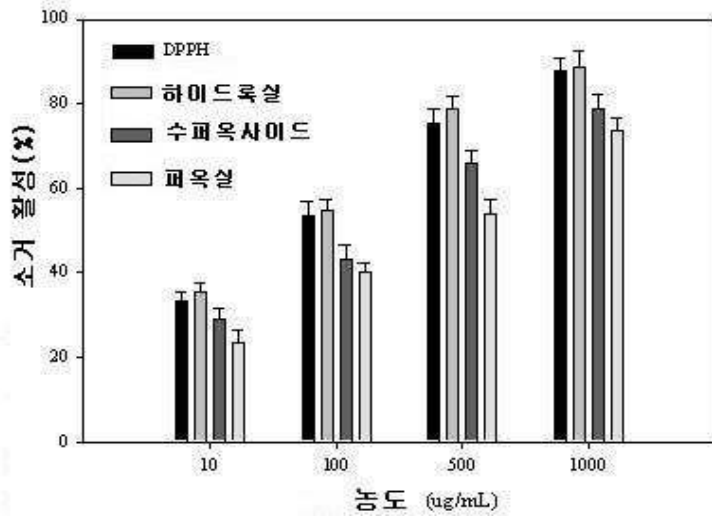
[0067] BABs 1.0 중량%

도면

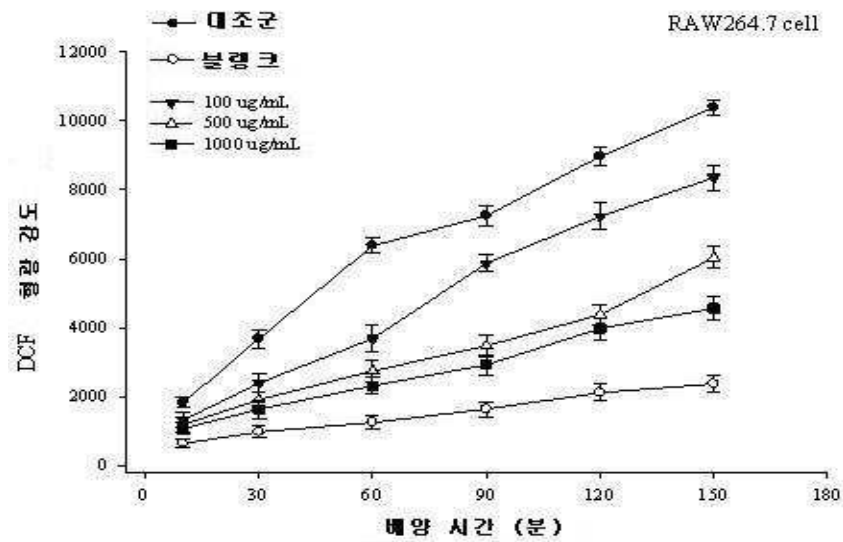
도면1



도면2



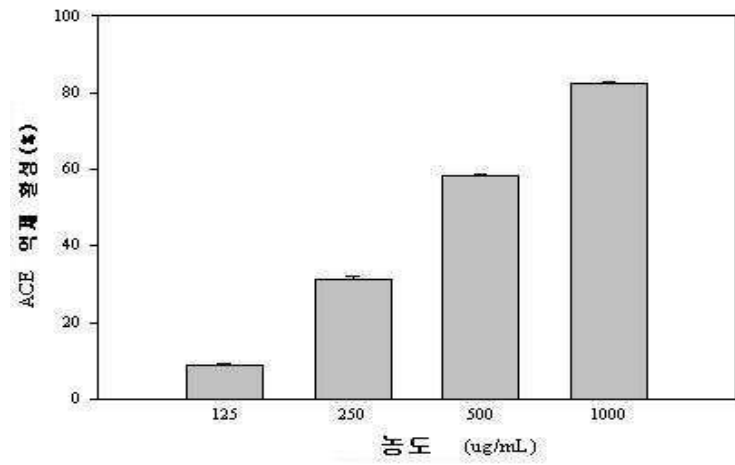
도면3



도면4



도면5



도면6

