



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2012년03월06일
(11) 등록번호 10-1115041
(24) 등록일자 2012년02월03일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A23J 3/34 (2006.01) A23L 1/305 (2006.01)

A61P 9/00 (2006.01) A61P 1/16 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2011-0001680

(22) 출원일자 2011년01월07일

심사청구일자 2011년07월13일

(56) 선행기술조사문헌

US20040162244 A1

US6767900 B

JP20050281137 A

KR1020060083452 A

(73) 특허권자

경남과학기술대학교 산학협력단

경상남도 진주시 동진로 33 (칠암동)

경상대학교산학협력단

경상남도 진주시 가좌동 900

(72) 발명자

최영준

경상남도 통영시 미수해안로 36, 103동 805호 (미수동, 현대아파트)

진상근

경상남도 진주시 평거동 401번지 동신2차 아파트 101호 903호

(74) 대리인

특허법인이지

전체 청구항 수 : 총 3 항

심사관 : 김현주

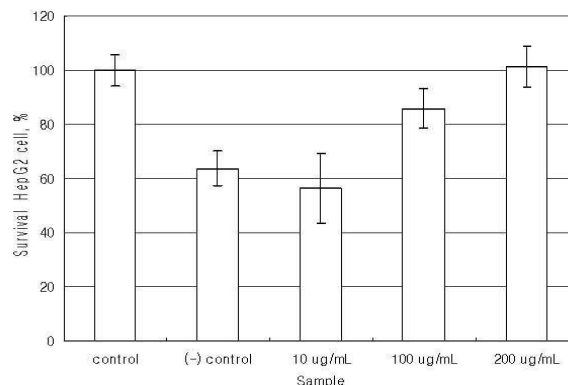
(54) 발명의 명칭 계육 가수분해물을 포함하는 기능성 조성물 및 이의 제조방법

(57) 요약

본 발명은 계육에 2종의 가수분해효소를 처리하여 제조된 기능성을 갖는 계육 가수분해물의 제조방법 및 상기 제조방법에 의해 제조된 계육 가수분해물에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 상기 계육 가수분해물을 유효성분으로 포함하는 심혈관계 질환 개선 또는 예방용 조성물에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 상기 계육 가수분해물을 유효성분으로 포함하는 간 보호 및 간 손상 예방용 식품 조성물에 관한 것이다.

상기 계육 가수분해물은 항산화활성이 우수하고, 안지오텐신 전환효소의 저해활성을 가지며, 간 세포 보호 효능이 인정되고, 식용으로 사용되는 천연물로부터 수득한 것이므로 부작용 등이 문제되지 아니하며, 부산물로 사용범위가 제한되던 계육 가공 부산물, 구체적으로 기계 발골 계육의 고부가가치화를 통해 계육 농가의 수익 향상에 이바지할 수 있다는 점에서 산업적 효과가 매우 크다 할 것이다.

대표도 - 도2



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 03-2010-0264

부처명 농림수산식품부

연구사업명 농림기술개발사업

연구과제명 회수단백질을 이용한 조미소재 및 생리활성 펩티드 특성 규명

주관기관 진주산업대학교

연구기간 2010.04.10 ~ 2011.04.09

특허청구의 범위

청구항 1

기계 발골 계육을 물에 담구어 혈액을 제거하는 단계;

상기 혈액을 제거한 계육에 물을 첨가하고 분쇄한 후에, pH를 pH 9 내지 pH 11의 범위로 조정하여 단백질을 용해시키고 원심분리하여 가용성 단백질을 회수하는 단계;

상기 회수한 단백질에 프로타맥스(Protamex)를 처리하여 1차 단백질 가수분해물을 제조하는 단계;

상기 1차 단백질 가수분해물에 브로멜라인(bromelain)을 처리하여 2차 단백질 가수분해물을 제조하는 단계;

상기 2차 단백질 가수분해물을 열처리하여, 효소를 불활성화 시키는 단계; 및

상기 효소를 불활성화 시킨 2차 단백질 가수분해물로부터 계육 가수분해물

을 수득하는 단계를 포함하는 향산화능, 안지오텐신전환효소 저해능 및 간세포 보호능을 갖는 계육 가수분해물의 제조방법.

청구항 2

제1항의 제조방법에 의해 제조된 계육 가수분해물.

청구항 3

제2항에 있어서,

상기 계육 가수분해물은 향산화능, 안지오텐신전환효소 저해능 및 간세포 보호능으로 이루어진 군 중에서 선택된 1종 이상의 기능성을 갖는 것을 특징으로 하는 계육 가수분해물.

청구항 4

삭제

청구항 5

삭제

청구항 6

삭제

청구항 7

삭제

청구항 8

삭제

명 세 서

기술 분야

[0001] 본 발명은 천연물의 가수분해물을 유효성분으로 포함하는 기능성 조성물 및 이의 제조방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 한국인의 1인당 계육의 소비량은 1990년 4.9kg에서 2000년에 7.0kg, 2003년에 7.9kg으로 10여 년간 120% 이상 꾸준히 증가하고 있다. 이는 외식산업 및 즉석식품이 발달하게 되고, 계육을 재료로 한 계육 가공품의 종류가 다양해지면서 젊은 층의 소비가 증가하였을 뿐 아니라, 계육이 가지는 저지방, 저칼로리, 저콜레스테롤 및 고단

백 특성으로 인해 소비자에게 매우 우수한 식품으로 인식된 것이 소비가 증가하게 되는 이유 중 하나라고 할 수 있다. 그리고, 최근 빈번히 발생하고 있는 광우병과 돼지의 구제역 및 콜레라 또한 계육을 선호하게 된 원인이 될 수 있다.

[0003] 계육의 경우 최근 특정 부위에 대한 수요의 증가와, 인건비의 증가 및 요구되는 위생수준의 향상 등으로 인해 기계를 이용하여 제조하는 경향이 증가되고 있다. 상기 기계를 이용하여 부분육을 제조하는 경우, 즉, 닭고기를 부분육으로 가공할 때 발생하는 기계 발골 계육(MDCM)은 닭 생체당 약 21%가 발생하는 것으로 알려져 있다. 상기 기계 발골 계육의 발생량에 대한 정확한 자료는 없으나, 국내 닭 부분육의 생산량이 2005년도에 약 10만 6천 톤으로 추정되는 것을 감안할 때 상당량이 발생할 것으로 예상된다.

[0004] 현재, 상기 기계 발골 계육은 식품의 주재료로는 많이 이용되지 않고, 일부가 햄버거용 고기나 가축 사료의 증량제로 사용되고 있다. 따라서, 상기 기계 발골 계육의 사용방법 특히, 고부가가치가 가능한 방법의 개발이 요구되고 있다.

[0005] 또한, 급속한 경제발전과 더불어 질병양상도 크게 변하여 고혈압, 허혈성 심질환 및 뇌혈관질환 등 순환기계 질환의 중요성이 더욱 커지고 있다. 최근 통계청이 발표한 자료에 의하면, 2005년 총인구 중에서 65세 이상 노령인구의 비율은 9.1%를 차지하고 있고, 14세 이하 유년인구의 비중은 점차 줄어들고 있으며, 65세 이상 인구의 비중은 지난 2000년에 7.2%를 기록하여 우리 사회는 이미 고령화 사회로 진입한 것으로 평가된다. 또한, 2003년 기준으로 우리나라 국민의 평균수명은 77.5세로 노령인구가 급격하게 증가되고 있는 추세이다. 한편, 통계청이 발표한 우리나라 1인당 GNI는 2004년 14,162 달러였으며, 매년 10% 이상 증가하고 있어 삶의 질은 점차 나아지고 있다고 할 수 있다.

[0006] 이러한 사회적 조건의 변화에 의해, 과거 주요한 사망원인인 전염성 질병에 의한 사망자 수는 급격하게 줄어들고 있는 반면에 암, 고혈압, 뇌혈관질환, 당뇨병 등의 퇴행성 질환에 의한 사망자 수는 꾸준히 증가하고 있다.

[0007] 고혈압은 만성 순환기계 질환 중 발생빈도가 가장 높은 질환으로 비교적 증상이 없는 편이지만 뇌졸중, 심부전, 관상동맥질환 등 치명적인 합병증을 유발할 수 있기 때문에 보다 적극적인 관리와 치료가 요구된다.

[0008] 특히, 본태성 고혈압은 고혈압의 80%에 해당하며 유전적 인자와 환경적 인자의 복합적인 산물로서 고혈압의 가족력, 인종, 염분의 섭취량, 인슐린의 저항성, 비만 그리고 과도한 음주 및 노화 등이 관여하는 것으로 생각되고 있다.

[0009] 혈압 상승의 중요한 기전인 레닌-안지오텐신계(Renin-Angiotensin System, RAS)의 일반적인 생리활성은 다음과 같다. 우선, 신장에서 혈류량, 나트륨의 감소, 교감신경계의 활성화증가에 의해 레닌-안지오텐신계가 활성화되고, 신장동맥의 방사구체세포(juxtaglomerular cell)에서 분비된 레닌이 안지오텐신을 안지오텐신 I으로 분해시키며, 이는 다시 안지오텐신 전환효소(angiotensin converting enzyme, ACE)에 의해 안지오텐신 II로 전환된다. 상기 안지오텐신 II가 결과적으로 신경조절과 알도스테론 합성 증가를 통하여 혈압을 조절한다.

[0010] 따라서, 안지오텐신 전환효소의 저해물질 또는 안지오텐신 전환효소 저해제(ACE inhibitor)는 고혈압, 심장병, 동맥경화 또는 뇌출혈 등의 심혈관계 질환이나 신장병 등을 치료 또는 예방할 수 있는 것으로 보고되고 있으며, 이에 대한 많은 연구가 진행되고 있다. 구체적으로, 만성신장병, 동맥경화, 심장발작과 그로 인한 사망 등을 효과적으로 감소시킬 수 있음을 확인하여 주는 여러 임상연구 및 임상실험의 결과가 보고되고 있다.

[0011] 현재 이러한 결과에 기초하여, 라미프릴(ramipril), 캅토프릴(captopril), 에날라프릴(enalapril), 리시노프릴(lisinopril), 포시노프릴(fosinopril)이나 스피라프릴(spirapril) 등과 같은 화학적으로 합성된 많은 안지오텐신 전환효소 저해제가 고혈압 치료제로 사용되고 있다. 그러나 이러한 화합물들은 약학적 투여 형태에서 쉽게 분해되어 즉, 안정성이 떨어질 뿐만 아니라 다른 세포에도 작용하여 전신에 힘이 빠지거나, 백혈구 감소, 혈관 부종, 간기능 이상, 구토, 마른 기침, 두통, 식욕부진, 및 미각이상을 일으키는 등 부작용과 관련된 문제가 있는 것으로 보고되고 있다.

[0012] 또한, 간은 우리 몸에서 가장 큰 장기로서 각종 대사작용, 해독, 분해, 합성 및 분비를 담당하는 매우 중요한 장기이다. 보다 구체적으로, 에너지 대사를 관리하는 기능이 있어 음식물에서 흡수된 모든 영양소들이 간에서 에너지를 생산할 수 있는 물질로 대사되어 전신에 공급되거나 저장되며, 약 2,000여종의 효소, 알부민, 응고인자들의 혈청단백, 담즙산, 인지질, 콜레스테롤 등의 지방 등이 간에서 합성되고 저장되며 분배된다.

[0013] 또한, 해독 및 분해 기능으로서 간에서 약물, 술, 독성물질 등을 해독시키므로, 간세포는 손상되기 쉽고 따라서 약물성, 독성, 알코올성 간질환 등이 흔히 발생할 수 있다. 또한, 간은 각종 대사산물을 담관을 통해 십이지장

으로 배설하는 기능 및 면역기능이 있어 우리의 생명유지에 중요한 역할을 하고 있다.

- [0014] 상기한 바와 같이, 간은 전신을 방어하는 기능을 수행하고 있으며, 영양소 이외에도 많은 독성물질에 노출될 위험이 다른 장기보다 많아 그만큼 손상될 확률도 매우 높다.
- [0015] 간은 재생능력이 우수한 장기로 약간의 손상이 있을 경우에는 충분히 정상으로 회복되지만, 손상이 지속될 경우에는 간 조직의 일부가 완전히 파괴되고 간 기능도 저하되는 등 정상 간으로의 회복이 어려운 상태가 된다. 이러한 간 손상이 만성화되면 그 원인에 상관없이 간 섬유화 또는 간경화, 간암으로 진행된다. 간 섬유화, 간경화, 간암 등은 현재 뚜렷한 치료제 및 치료법이 없는 질환으로 그 사망률 또한 높은 질환이다.
- [0016] 그러므로, 간 손상이 만성화되기 전에 이러한 간 손상을 예방 및 치료하는 것이 간 섬유화, 간경화 또는 간암으로의 진행을 억제하는데 매우 중요하다.
- [0017] 간은 질환초기에는 자각증상이 없고 간 손상 정도가 심한 정도에 이르러서야 자각증상이 나타남으로써 간 질환의 조기 발견은 그만큼 어렵다.
- [0018] 현재 간염, 간경화의 예방 및 치료를 위해 가장 일반적으로 사용하는 약제로는 우르소데옥시콜린산, 면역자극제, 항바이러스제, 실리마린, 운지다당체, 비타민 B군, 메티오닌 등이 사용되고 있으나 이 약제들 중 어느 것도 아직까지 임상적으로 만족스러운 효과를 제공하는 것은 없었다. 따라서 최근에는 평상시 용이하게 섭취하여 간에 부담을 주지 않으면서도 간 손상을 치료 또는 예방할 수 있는 방법을 찾고자 하는 노력이 진행되고 있다.
- [0019] 따라서, 이러한 문제점을 해결하기 위하여, 부작용이 문제되지 아니하고 안전성이 확보되는 천연물질 유래 기능성 물질의 개발이 시급히 요구되고 있다. 특히, 식품으로 사용되는 천연물 유래의 물질 유래의 기능성 물질은 안전성 확보가 용이하므로, 상기 천연물 유래 물질로부터 항산화효과가 있거나, 안지오텐신 전환효소 저해효과가 있거나, 산화적 스트레스에 의한 간손상을 예방할 수 있고, 간세포를 보호할 수 있는 물질을 개발하는 것이 시급한 실정이다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0020] 상기와 같은 요구에 부응하기 위하여, 본 발명은 천연물 유래 물질로서 부작용 등이 문제되지 아니하고, 안전성이 우수한 물질을 대상으로, 항산화능, 안지오텐신 전환효소 저해능 및 간세포 보호능과 관련된 기능성을 갖는 물질을 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

- [0021] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 기능성, 구체적으로 항산화능, 안지오텐신 전환효소 저해능 및 간세포 보호능으로 이루어진 군 중에서 선택된 1종 이상의 기능성을 갖는 계육 가수분해물의 제조방법을 제공한다. 또한, 본 발명은 상기 제조방법에 의해 제조된 계육 가수분해물을 제공한다.
- [0022] 또한, 본 발명은 항산화능이 뛰어나고 안지오텐신 전환효소를 효과적으로 저해할 수 있을 뿐만 아니라 천연물에서 비롯하여 부작용 등이 문제되지 아니하고, 안전성이 우수한 계육 가수분해물을 유효성분으로 포함하는 심혈관계 질환 개선 또는 예방용 식품 조성물을 제공한다.
- [0023] 또한, 본 발명은 항산화능이 뛰어나고 간세포 보호능을 가질 뿐만 아니라 천연물에서 비롯하여 부작용 등이 문제되지 아니하고, 안전성이 우수한 계육 가수분해물을 유효성분으로 포함하는 간 보호 및 간 손상 예방용 식품 조성물을 제공한다.
- [0024] 구체적으로 본 발명은 계육 가수분해물의 제조방법 및 그 제조방법에 의해 제조된 계육 가수분해물에 관한 것이다.
- [0025] 보다 구체적으로, 본 발명은 기계 발골 계육을 물에 담구어 혈액을 제거하는 단계; 상기 혈액을 제거한 계육에 물을 첨가하고 분쇄한 후에, pH를 pH 9 내지 pH 11의 범위로 조정하여 단백질을 용해시키고 원심분리하여 가용성 단백질을 회수하는 단계; 상기 회수한 단백질에 프로타맥스(Protamex)를 처리하여 1차 단백질 가수분해물을 제조하는 단계; 상기 1차 단백질 가수분해물에 브로멜라인(bromelain)을 처리하여 2차 단백질 가수분해물을 제조하는 단계; 상기 2차 단백질 가수분해물을 열처리하여, 효소를 불활성화 시키는 단계; 및 상기 효소를 불활성

화 시킨 2차 단백질 가수분해물로부터 계육 가수분해물을 수득하는 단계를 포함하는 항산화능, 안지오텐신전환 효소 저해능 및 간세포 보호능을 갖는 계육 가수분해물의 제조방법에 관한 것이다. 또한, 본 발명은 상기 제조 방법에 의해 제조된 계육 가수분해물에 관한 것이다. 상기 계육 가수분해물은 항산화능, 안지오텐신전환효소 저해능 및 간세포 보호능으로 이루어진 군 중에서 선택된 1종 이상의 기능성을 갖는 것을 특징으로 할 수 있다.

[0026] 또한, 본 발명은 계육 가수분해물을 유효성분으로 포함하는 심혈관계 질환 개선 또는 예방용 식품 조성물에 관한 것이다. 상기 계육 가수분해물은 상기 제조방법으로 제조된 것일 수 있다. 상기 심혈관계 질환은 고혈압 또는 고혈압성 심장질환인 심혈관계 질환일 수 있다.

[0027] 또한, 본 발명은 계육 가수분해물을 유효성분으로 포함하는 간 보호 및 간 손상 예방용 식품 조성물에 관한 것이다. 상기 계육 가수분해물은 상기 제조방법으로 제조된 것일 수 있다.

[0028] 본 발명자들은 식품으로 이용되는 천연물의 경우 부작용이나 내성 등과 관련된 안전성이 문제될 가능성이 기존 화학적으로 합성된 약물에 비하여 훨씬 적다는 점에 착안하여, 천연물 유래 조성물 특히, 식용으로 이용되는 동물의 가수분해물의 약리효과에 대해 연구하던 중, 닭 고기(CHICKEN MEAT) 즉, 계육의 가수분해물이 항산화 활성을 가지고, 안지오텐신 전환효소의 저해활성을 통하여 확인한 결과 항고혈압효과가 우수하며, 간세포 보호능을 통하여 확인한 결과 간 보호 및 간 손상 예방이 있다는 것을 확인하여, 이를 유효성분으로 포함하는 상기 조성물은 심혈관계 질환을 예방 또는 개선하거나 간 보호 및 간 손상을 예방할 수 있다는 것을 확인하여 본 발명을 완성하였다.

[0029] 이하, 본 발명을 보다 상세하게 설명한다.

[0030] 본 발명은 계육 가수분해물을 유효성분으로 포함하는 심혈관계 질환의 치료 또는 예방용 조성물에 관한 것이다.

[0031] 본 발명에서 계육(CHICKEN MEAT)은 닭으로부터 유래된 고기 또는 닭에서 생산된 고기를 의미하며, 일 예로 기계 발골 계육(MDCM)일 수 있다.

[0032] 본 발명에서 가수분해물이란 단백질 분해 후 생산되는 물질로, 단백질 가수분해산물이라고도 하고, 계육 가수분해물이란 계육 단백질이 단백질 가수분해효소에 의해 가수분해되어 생산되는 물질을 의미한다. 상기 단백질 가수분해효소는 단백질 분자 속의 펩티드 결합 등을 가수분해하여 단백질을 아미노산 또는 펩티드 혼합물로 만드는 화학반응을 수행하는 효소를 의미한다.

[0033] 본 발명의 계육 가수분해물은 계육 가수분해물 제조를 위한 통상의 제조방법에 따라 제조된 것일 수 있으며, 바람직하게는 효소를 이용한 가수분해에 의해 제조된 것일 수 있다. 더욱 바람직하게는 본 발명의 계육 가수분해물은 계육 일 예로, 기계 발골 계육을 물에 담구어 혈액을 제거하는 단계; 상기 혈액을 제거한 계육에 물을 첨가하고 분쇄한 후에, pH를 pH 9 내지 pH 11의 범위로 조정하여 단백질을 용해시키고 원심분리하여 가용성 단백질을 회수하는 단계; 상기 회수한 단백질에 프로타맥스(Protamex)를 처리하여 1차 단백질 가수분해물을 제조하는 단계; 및 상기 1차 단백질 가수분해물에 브로멜라인(bromelain)을 처리하여 2차 단백질 가수분해물을 제조하는 단계를 포함하는 계육 가수분해물 제조방법에 의해 제조된 것일 수 있다. 상기 제조방법에는 상기 2차 단백질 가수분해물을 제조한 후에, 효소를 불활성화 시키고, 계육 가수분해물을 수득하는 공정이 더욱 포함될 수 있다.

[0034] 상기 브로멜라인은 파인애플에 함유되어 있는 프로테아제(EC 3.4.22.4.)을 의미한다.

[0035] 기계 발골 계육을 물에 담구어 혈액을 제거하는 단계는 계육을 유수에서 씻거나, 물에 담구어 놓는 방법으로 수행할 수 있으며, 상기 혈액을 제거한 후에 체 등을 이용하여 물기를 제거하는 공정을 수행할 수 있다.

[0036] 상기 혈액을 제거한 계육에 물을 첨가하고 분쇄하는 과정은 상기 계육 100 중량부를 기준으로 물, 일 예로 증류수 또는 수도수를 100 중량부 내지 300 중량부, 바람직하게는 150 중량부 내지 250 중량부 첨가할 수 있고, 상기 계육의 분쇄과정은 통상의 분쇄기를 사용하여 수행할 수 있으며, 예를 들어 균질기 또는 가정용 믹서기를 이용할 수 있고, 상기 균질기를 이용하는 경우 2000 rpm 내지 4000 rpm, 바람직하게는 2500 rpm 내지 3500 rpm의 조건에서 분쇄 또는 마쇄를 수행할 수 있다.

[0037] 상기 가용성 단백질을 회수하는 공정은 상기 분쇄물에 알칼리, 일 예로 알칼리가 용해되어 있는 알칼리 용액, 일 예로 5N NaOH 용액을 첨가하여 pH를 pH 9 내지 pH 11의 범위로 조정하여 단백질을 용해시키고, 원심분리하여 가용성 단백질을 회수하는 방법으로 수행할 수 있다.

[0038] 본 발명의 가수분해물을 제조하는 단계와 관련하여, 본 발명의 발명자는 실험에 의하여 동일한 대상물질에 대해

서도 어떠한 종류의 가수분해효소를 사용하는가에 따라 가수분해물이 갖는 활성의 종류 및 정도가 상이함을 확인하였고, 계육의 경우 프로타맥스와 브로멜라인을 순차적으로 사용하는 것이 가장 활성이 우수함을 확인하여, 다음과 같이 단백질 가수분해 과정을 2단계로 수행하였다.

- [0039] 상기 가수분해 과정을 수행하기에 앞서, 상기 가용성 단백질에 산, 일 예로 산이 용해되어 있는 산성 용액, 일 예로 5N HCl 용액을 첨가하여 pH를 pH 6 내지 pH 8의 범위로 조정한 후에, 단백질 가수분해 효소를 첨가하여 단백질 가수분해 과정을 수행할 수 있다.
- [0040] 우선, 1차 단백질 가수분해물을 제조하는 단계는 상기 회수한 단백질에 프로타맥스를 처리하는 방법으로 수행할 수 있고, 상기 프로타맥스의 첨가량은 상기 분쇄하기 전 계육 1kg 당 바람직하게는 1g 내지 15g, 더욱 바람직하게는 4g 내지 10g, 더더욱 바람직하게는 5g 내지 8g을 첨가할 수 있다.
- [0041] 2차 단백질 가수분해물을 제조하는 단계는 상기 회수한 단백질에 브로멜라인을 처리하는 방법으로 수행할 수 있고, 상기 브로멜라인의 첨가량은 상기 분쇄하기 전 계육 1kg 당 바람직하게는 0.1g 내지 5g, 더욱 바람직하게는 0.5g 내지 3g, 더더욱 바람직하게는 1g 내지 2g을 첨가할 수 있다.
- [0042] 상기 효소 반응은 효소의 종류에 따라 적절하게 수행되질 수 있으며, 바람직하게는 30℃ 내지 70℃ 더욱 바람직하게는 40℃ 내지 60℃의 교반 배양기(shaking incubator)에서 10분 내지 6시간, 바람직하게는 30시간 내지 3시간, 더욱 바람직하게는 45분 내지 1시간 30분을 반응시킬 수 있다.
- [0043] 상기 2차 단백질 가수분해물을 제조한 후에, 효소를 불활성화 시키고, 계육 가수분해물을 수득하는 공정을 더 수행할 수 있다.
- [0044] 상기 효소를 불활성화시키는 공정은 상기 효소의 불활성화는 효소의 종류에 따라 적절하게 선택된 통상의 방법으로 수행되질 수 있고, 80℃ 내지 100℃, 바람직하게는 85℃ 내지 95℃에서 10분 이상, 일 예로 10분 내지 60분 또는 20분 내지 40분 동안 가열처리하여 수행할 수 있다.
- [0045] 상기 계육 가수분해물을 수득하는 공정은 상기 효소를 불활성화시킨 2차 단백질 가수분해물에 에탄올 또는 에탄올 수용액, 일 예로 50% 내지 70% 에탄올 수용액을 첨가하여 단백질을 침전시키고, 7000 rpm 내지 9000 rpm에서 10분 내지 50분, 바람직하게는 20분 내지 40분 동안 원심분리하고, 여과지를 이용하여 여과한 후, 에탄올을 증발시키는 방법으로 수행할 수 있다. 또한, 상기 에탄올을 증발시킨 후, 필터를 이용한 여과과정 및/또는 한외여과막을 이용한 한외여과과정을 추가로 수행하여 여과액을 수득하는 방법을 추가로 수행할 수 있다.
- [0046] 상기 수득한 계육 가수분해물 또는 여과과정을 수행하여 수득한 여과액은 급속 냉동 냉장고(deep freezer)를 이용하여 보관할 수 있다.
- [0047] 또한, 상기 계육 가수분해물은 수득된 가수분해물을 농축 및 동결건조를 통하여 수분 또는 용매가 완전히 제거된 것일 수 있다.
- [0048] 상기 계육 가수분해물은 또한, 산업화를 위하여 상기 계육 가수분해물에 크로마토 그래피, 일 예로 이온교환크로마토그래피나(Ion-Exchange Chromatography) 또는 중압액체크로마토그래피(Middle Pressure Liquid Chromatography, MPLC) 및/또는 전기투석 장치를 이용하여 NaCl을 제거하는 공정을 추가로 수행한 것일 수 있다.
- [0049] 본 발명에 따른 계육 가수분해물 또는 계육 가수분해물의 분획물은 항산화활성이 우수하고, 안지오텐신 전환효소의 저해능이 뛰어나며, 간세포 보호능이 우수할 뿐만 아니라, 식용으로 사용될 수 있는 천연물을 이용하여 제조한 것이므로 부작용 등이 문제되지 아니하고, 안전성이 우수하므로, 상기 계육 가수분해물 또는 상기 계육 가수분해물의 분획물은 심혈관계 질환 개선 또는 예방용 식품 조성물 또는 간 보호 및 간 손상 예방용 식품 조성물의 유효성분으로 사용될 수 있다.
- [0050] 일 태양에 의하면, 본 발명은 계육 가수분해물을 유효성분으로 포함하는 심혈관계 질환의 개선 또는 예방용 식품 조성물에 관한 것이다.
- [0051] 본 발명에서 있어서, 심혈관계 질환이란 심장질환과 혈관질환을 포함한 질환으로, 고혈압, 고혈압성 심장질환, 심장병, 부정맥, 뇌졸중, 혈전증, 협심증, 심부전, 심근경색, 죽상경화증 및 동맥경화로 이루어진 군중에서 선택된 어느 하나일 수 있으며, 바람직하게는 고혈압 또는 고혈압성 심장질환일 수 있다.
- [0052] 보고된 자료에 의하면, 안지오텐신II는 부신, 혈관평활근세포, 신장, 심장 등에 존재하는 4종의 AT 수용체(AT receptor)에 작용하며, 이들은 혈관수축, 알도스테론(aldosterone)과 바소프레신(vasopressin) 방출, 세뇨관의

나트륨 흡수, 신장으로의 혈류량 감소 등을 유발함으로써 심혈관, 신장 및 중추신경 부위에 여러 가지 병변을 가져올 수 있으므로, 안지오텐신 전환효소의 저해물질 또는 안지오텐신 전환효소 저해제(ACE inhibitor)는 고혈압, 심장병, 동맥경화 또는 뇌출혈 등의 심혈관계 질환을 치료, 개선 또는 예방할 수 있다.

[0053] 본 발명에서 혈압이란 혈액이 혈관 벽에 가하는 힘을 말한다. 혈압을 읽을 때에는 수축기 혈압(최고혈압)과 확장기 혈압(최저혈압)으로 나누어서 읽는다. 수축기 혈압은 심장이 수축하면서 혈액을 내보낼 때 혈관에 가해지는 압력이고, 확장기 혈압은 심장이 확장(이완)하면서 혈액을 받아들일 때 혈관이 받는 압력이다.

[0054] 상기 고혈압이란 18세 이상의 성인에서 수축기 혈압이 140mmHg 이상이거나 확장기 혈압이 90mmHg 이상인 질환으로, 원인이 발견되지 않는 경우를 본태성(일차성) 고혈압과 원인이 밝혀져 있고 이에 의해 고혈압이 발생하는 경우으로 구분되며, 전체 고혈압 환자의 약 95%는 본태성 고혈압이다. 상기 고혈압에 의해 유발되는 질병으로는 고혈압심장병(hypertensive heart disease) 등이 있다.

[0055] 상기 동맥경화는 동맥의 벽이 두꺼워져 동맥의 탄력이 저하되는 질환을 의미한다. 상기 동맥경화가 발병되면 경화된 동맥으로부터 혈액을 공급받던 장기에 대한 혈액 공급이 감소하게 되어, 추가적인 질병이 발병될 수 있다. 이와 관련된 대표적인 질병의 예는 심장의 근육에 혈액을 공급하는 심장동맥에 동맥경화의 변화가 오는 심장동맥병 등이 있다.

[0056] 상기 계육 가수분해물 또는 상기 계육 가수분해물의 분획물은 안지오텐신 전환효소를 저해할 수 있고, 혈압강화능이 있으므로, 심혈관계 질환의 치료, 예방 또는 개선용 조성물로 사용될 수 있다.

[0057] 상기 심혈관계 질환이란 심장질환과 혈관질환을 포함한 질환으로, 고혈압, 고혈압성 심장질환, 심장병, 부정맥, 뇌졸중, 혈전증, 협심증, 심부전, 심근경색, 죽상경화증 및 동맥경화로 이루어진 군중에서 선택된 어느 하나일 수 있으며, 바람직하게는 고혈압 또는 고혈압성 심장질환일 수 있다.

[0058] 상기 고혈압은 혈관관련 질병으로, 주로 동맥의 혈압이 높은 동맥성 고혈압일 수 있다. 상기 고혈압은 동맥경화나 고혈압심장병(hypertensive heart disease) 등을 유발할 수 있다.

[0059] 또한, 안지오텐신 전환효소는 혈관과 신장의 근위세뇨관, 내피, 심장, 폐, 활성화된 대식세포, 뇌조직 등에서 발견되는 디카르복실 펩타이드(dicarboxyl peptides)의 하나로, 혈관수축, 알도스테론(aldosterone)과 바소프레신(vasopressin) 방출, 세뇨관의 나트륨 흡수 및 신장으로의 혈류량 감소 등을 유발함으로써 심혈관, 신장 및 중추신경 부위에 여러 가지 병변을 가져올 수 있는 것으로 보고되고 있다. 따라서, 상기 안지오텐신 전환효소의 저해물질 또는 안지오텐신 전환효소 저해제(ACE inhibitor)는 고혈압, 심장병, 동맥경화 또는 뇌출혈 등의 심혈관계 질환이나 신장병 등을 치료 또는 예방할 수 있는 것으로 보고되고 있으며, 구체적으로 임상연구 및 임상실험 결과에 의하면, 안지오텐신 전환효소 저해제는 고혈압, 만성신장병, 동맥경화, 심장발작과 그로 인한 사망 등을 효과적으로 감소시킬 수 있는 것으로 보고되고 있다.

[0060] 상기 계육 가수분해물은 안지오텐신 전환효소를 유효하게 저해하고, 동물 실험을 통하여 확인한 결과 혈압강화능이 있으므로, 고혈압 및 심장병, 동맥경화 또는 뇌출혈 등의 심혈관계 질환에 치료, 예방 또는 개선 효과가 있다.

[0061] 상기 계육 가수분해물을 유효성분으로 포함하는 심혈관계 질환 개선 또는 예방용 조성물은 인간을 포함한 동물에 직접 적용될 수 있다. 상기 동물은 식물에 대응하는 생물군으로 주로 유기물을 영양분으로 섭취하고, 소화나 배설 및 호흡기관이 분화되어 있는 것을 말하며, 바람직하게는 포유류, 더욱 바람직하게는 인간일 수 있다.

[0062] 본 발명의 계육 가수분해물을 유효성분으로 포함하는 심혈관계 질환의 개선 또는 예방용 조성물은 계육 가수분해물을 단독으로 포함할 수 있으며, 이외 제형, 사용방법 및 사용목적에 따라 약제학적으로 허용가능한 담체, 부형제 또는 희석제를 더욱 포함할 수 있다.

[0063] 상기 계육 가수분해물을 유효성분으로 포함하는 심혈관계 질환의 개선 또는 예방용 조성물에 유효성분인 계육 가수분해물 외에 다른 성분이 첨가된 혼합물로 제공되는 경우, 상기 계육 가수분해물을 유효성분으로 포함하는 심혈관계 질환의 개선 또는 예방용 조성물 총 중량에 대하여 상기 계육 가수분해물을 0.001 중량% 내지 99.9 중량%, 바람직하게는 0.1 중량% 내지 99 중량%, 더욱 바람직하게는 1 중량% 내지 50 중량% 포함할 수 있다.

[0064] 또 다른 태양에 의하면, 본 발명은 계육 가수분해물을 유효성분으로 포함하는 간 보호 및 간 손상 예방용 식품 조성물에 관한 것이다.

[0065] 본 발명은 또한, 상기 제조방법에 의해 제조된 계육 가수분해물은 간 세포 보호 활성 및, 항산화능을 가지므로,

간 보호, 간 손상 예방 및 간 기능 개선 활성이 있는 것으로 확인되었다.

- [0066] 상기 계육 가수분해물을 유효성분으로 포함하는 간 보호 및 간 손상 예방용 조성물은 인간을 포함한 동물에 직접 적용될 수 있다. 상기 동물은 식물에 대응하는 생물군으로 주로 유기물을 영양분으로 섭취하고, 소화나 배설 및 호흡기관이 분화되어 있는 것을 말하며, 바람직하게는 포유류, 더욱 바람직하게는 인간일 수 있다.
- [0067] 본 발명의 계육 가수분해물을 유효성분으로 포함하는 간 보호 및 간 손상 예방용 조성물은 계육 가수분해물을 단독으로 포함할 수 있으며, 이외 제형, 사용방법 및 사용목적에 따라 약제학적으로 허용가능한 담체, 부형제 또는 희석제를 더욱 포함할 수 있다.
- [0068] 상기 계육 가수분해물을 유효성분으로 포함하는 간 보호 및 간 손상 예방용 조성물에 유효성분인 계육 가수분해물 외에 다른 성분이 첨가된 혼합물로 제공되는 경우, 상기 계육 가수분해물을 유효성분으로 포함하는 간 보호 및 간 손상 예방용 총 중량에 대하여 상기 계육 가수분해물을 0.001 중량% 내지 99.9 중량%, 바람직하게는 0.1 중량% 내지 99 중량 %, 더욱 바람직하게는 1 중량% 내지 50 중량% 포함할 수 있다.
- [0069] 본 발명의 식품 조성물의 예로는 식품, 식품첨가제, 음료 또는 음료첨가제를 들 수 있다.
- [0070] 상기 계육 가수분해물을 유효성분으로 포함하는 심혈관계 질환의 개선 또는 예방용 식품 조성물 또는 상기 계육 가수분해물을 유효성분으로 포함하는 간 보호 및 간 손상 예방용 식품 조성물은 그 제조에 통상적으로 사용하는 적절한 담체, 부형제 및 희석제를 더욱 포함할 수 있다.
- [0071] 본 명세서에서 식품이란 함은 영양소를 한 가지 또는 그 이상 함유하고 있는 천연물 또는 가공품을 의미하며, 바람직하게는 어느 정도의 가공 공정을 거쳐 직접 먹을 수 있는 상태가 된 것을 의미하며, 통상적인 의미로서, 식품, 식품 첨가제, 건강 기능성 식품 및 음료를 모두 포함하는 의도이다.
- [0072] 본 발명의 식품 조성물의 유효성분인 상기 계육 가수분해물이 포함될 수 있는 식품으로는 예를 들어, 각종 식품류, 음료, 껌, 차, 비타민 복합제, 기능성 식품 등이 있다. 추가로, 본 발명에서 식품에는 특수영양식품(예, 조제유류, 영, 유아식 등), 식육가공품, 어육제품, 두부류, 목류, 면류(예, 라면류, 국수류 등), 건강보조식품, 조미식품(예, 간장, 된장, 고추장, 혼합장 등), 소스류, 과자류(예, 스낵류), 유가공품(예, 발효유, 치즈 등), 기타 가공식품, 김치, 절임식품(각종 김치류, 장아찌 등), 음료(예, 과일, 채소류 음료, 두유류, 발효음료류, 아이스크림류 등), 천연조미료(예, 라면 스프 등), 비타민 복합제, 알코올 음료, 주류 및 그 밖의 건강보조식품류를 포함하나 이에 한정되지 않는다. 상기 식품, 음료 또는 식품첨가제는 통상의 제조방법으로 제조될 수 있다.
- [0073] 본 발명에서 기능성 식품이란 식품에 물리적, 생화학적, 생물공학적인 수법 등을 이용하여 해당 식품의 기능을 특정 목적에 작용, 발현하도록 부가가치를 부여한 식품군이나 식품 조성이 갖는 생체방어리듬조절, 질병방지와 회복 등에 관한 체조절기능, 보다 구체적으로 항고혈압기능을 생체에 대하여 충분히 발현하도록 설계하여 가공한 식품 또는 간세포 보호 또는 간기능 개선기능을 생체에 대하여 충분히 발현하도록 설계하여 가공한 식품을 의미한다. 상기 기능성 식품에는 식품학적으로 허용 가능한 식품 보조 첨가제를 포함할 수 있으며, 기능성 식품의 제조에 통상적으로 사용되는 적절한 담체, 부형제 및 희석제를 더욱 포함할 수 있다.
- [0074] 본 발명에서 음료란 갈증을 해소하거나 맛을 즐기기 위하여 마시는 것의 총칭을 의미하며 기능성 음료를 포함하는 의도이다. 상기 음료는 지시된 비율로 필수 성분으로서 상기 계육 가수분해물을 유효성분으로 포함하는 것 외에 다른 성분에는 특별한 제한이 없으며 통상의 음료와 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다. 상기의 천연 탄수화물의 예는 모노사카라이드, 예를 들어 포도당, 과당 등 디사카라이드, 예를 들어 말토스, 수크로스 등 및 폴리사카라이드, 예를 들어 텍스트린, 시클로텍스트린 등과 같은 통상적인 당, 및 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알콜이다. 상기한 것 이외의 향미제로서 천연 향미제(타우마틴, 스테비아 추출물(예를 들어 레바우디오시드 A, 글리시르히진 등) 및 합성 향미제(사카린, 아스파르탐 등)를 유리하게 사용할 수 있다. 상기 천연 탄수화물의 비율은 본 발명의 조성물 100ml 당 일반적으로 약 1 내지 20g, 바람직하게는 5 내지 12g일 수 있다. 그밖에 본 발명의 조성물은 천연 과일 주스, 과일 주스 음료, 야채 음료의 제조를 위한 과육을 추가로 함유할 수 있다.
- [0075] 상기 외에 본 발명의 조성물은 여러 가지 영양제, 비타민, 광물(전해질), 합성 풍미제 및 천연 풍미제 등의 풍미제, 착색제 및 증진제(치즈, 초콜릿 등), 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알코올, 탄산 음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다. 이러한 성분을 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있다. 상기 첨가제는 본 발명의 유효성분인 계육 가수분해물 100 중량부 당 0 내지 20 중량부, 바람직하게는 0.00001 내지 15 중량부 일 수 있으나, 이에 한정되는

것은 아니다.

- [0076] 본 발명에서 기능성 음료란 음료에 물리적, 생화학적, 생물공학적 수법 등을 이용하여 해당 음료의 기능을 특정 목적에 작용, 발현하도록 부가가치를 부여한 음료 군이나 음료 조성이 갖는 생체방어리듬조절, 질병방지와 회복 등에 관한 체조절기능을 생체에 대하여 충분히 발현하도록 설계하여 가공한 음료를 의미한다.
- [0077] 상기 기능성음료는 지시된 비율로 필수 성분으로서 본 발명의 유효성분인 상기 계육 가수분해물을 함유하는 외에는 다른 성분에는 특별한 제한이 없으며 통상의 음료와 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다. 상기 천연 탄수화물의 예는 모노사카라이드, 예를 들어 포도당, 과당 등 디사카라이드, 예를 들어 말토스, 수크로스 등 및 폴리사카라이드, 예를 들어 텍스트린, 시클로텍스트린 등과 같은 통상적인 당, 및 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알콜이다. 상기한 것 이외의 향미제로서 천연 향미제(타우마틴, 스테비아 추출물(예를 들어 레바우디오시드 A, 글리시르히진 등) 및 합성 향미제(사카린, 아스파르탐 등)를 유리하게 사용할 수 있다. 상기 천연 탄수화물은 본 발명의 조성물 100 중량부 당 0 중량부 내지 20 중량부, 바람직하게는 1 중량부 내지 18 중량부, 더욱 바람직하게는 5 중량부 내지 12 중량부 포함될 수 있다.
- [0078] 또한, 상기 계육 가수분해물을 유효성분으로 포함하는 심혈관계 질환의 질병의 개선 또는 예방용 식품 조성물 또는 상기 계육 가수분해물을 유효성분으로 포함하는 간 보호 및 간 손상 예방용 식품 조성물에 있어서, 상기 계육 가수분해물의 양은 전체 식품 중량의 0.00001 중량% 내지 50 중량%로 포함될 수 있으며, 음료 조성물의 경우 식품 전체의 부피 100 ml 를 기준으로 0.001 g 내지 50 g, 바람직하게는 0.01 g 내지 10 g의 비율로 포함될 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0079] 본 발명의 조성물은 항산화 효과가 우수하고, 안지오텐신 전환효소를 저해할 수 있어 고혈압을 포함한 심혈관계 질환의 치료, 개선 또는 예방에 도움이 되며, 간 세포 보호 기능이 인정되어, 간 보호, 간 손상 예방 및 간기능 개선 효과가 인정되고, 식용으로 사용되는 천연물로부터 제조된 것이므로 안전성에 문제가 없어, 심혈관계 질환을 갖는 환자, 상기 질병의 위험성이 있는 사람 또는 간 손상과 관련된 질환에 노출될 수 있는 사람에 유용하게 사용될 수 있을 것으로 판단된다.
- [0080] 또한, 본 발명은 기능성, 구체적으로 심혈관계 질환 개선 또는 예방효과와 간 세포 보호 및 간기능 개선 효과가 있는 계육 가수분해물의 제조방법을 제공한다.
- [0081] 상기 계육 가수분해물의 제조방법은 기계 발골 계육을 물에 담구어 혈액을 제거하는 단계; 상기 혈액을 제거한 계육에 물을 첨가하고 분쇄한 후에, pH를 pH 9 내지 pH 11의 범위로 조정하여 단백질을 용해시키고 원심분리하여 가용성 단백질을 회수하는 단계; 상기 회수한 단백질에 프로타맥스(Protamex)를 처리하여 1차 단백질 가수분해물을 제조하는 단계; 상기 1차 단백질 가수분해물에 브로멜라인(bromelain)을 처리하여 2차 단백질 가수분해물을 제조하는 단계; 상기 2차 단백질 가수분해물을 열처리하여, 효소를 불활성화 시키는 단계; 및 상기 효소를 불활성화 시킨 2차 단백질 가수분해물로부터 계육 가수분해물을 수득하는 단계를 포함하는 방법으로 수행할 수 있다.
- [0082] 상기 방법에 의하여 제조된 계육 가수분해물은 항산화능이 뛰어나고, 안지오텐신 전환효소 저해능이 우수하며, 간 세포 보호능이 있으므로, 심혈관계 질환 또는 간 손상과 관련된 질환과 관련하여 환자 또는 질환이 발생할 수 있는 예비군에 속하는 사람에게 유용하게 사용될 수 있다는 장점이 있다.

발명의 효과

- [0083] 본 발명의 계육 가수분해물은 항산화능이 뛰어나고, 안지오텐신 전환효소를 저해할 수 있어 고혈압을 포함한 심혈관질환의 치료, 예방 또는 개선에 유효하다. 또한, 본 발명의 계육 가수분해물은 항산화능이 우수하여, 체내의 자유라디칼을 소거하여 산화적 스트레스에 의한 간손상을 예방 또는 개선할 수 있을 뿐만 아니라, 간 세포 보호능을 가져, 간 보호, 간 손상 예방 및 간기능 개선을 위하여 사용될 수 있다.
- [0084] 뿐만 아니라, 본 발명의 계육 가수분해물은 기존의 고혈압 치료, 개선에 사용되거나 간 보호 또는 간 손상 예방에 사용되는 인공 화합물질과 달리 천연물질을 유효성분으로 하는 것으로 부작용 등의 문제가 발생되지 아니하며, 나아가 최근 기계 발골에 의하여 발생되는 계육 부산물을 이용하여 고부가가치 상품을 제조할 수 있으므로 경제적으로도 유리하고, 특히 계육 농가에 도움이 될 수 있으므로, 산업적으로 그 효과가 매우 크다 할 것이다.

도면의 간단한 설명

- [0085] 도 1은 본 발명의 일 실시예에 따른, 계육 가수분해물의 세포 독성을 확인한 그래프이다.

도 2는 본 발명의 일 실시예에 따른, 계육 가수분해물의 간 세포 손상회복 효과를 나타낸 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0086] 이하, 본 발명을 더욱 구체적으로 설명하기 위하여 제조예 및 실시예를 제시한다. 그러나, 하기 제조예 및 실시예는 본 발명의 이해를 돕기 위하여 예시한 것을 뿐, 여러 가지 다른 형태로 변형될 수 있으며, 본 발명의 범위가 하기 예들에 한정되는 것은 아니다.
- [0087] **[실시예]**
- [0088] **실시예 1. 계육 가수분해물의 제조**
- [0089] 대한민국 경상남도 진주시역의 닭 처리시설에서 입수한 기계 발골 계육에서 2단계로 단백질 가수분해효소를 처리하여 가수분해물을 수득하였다.
- [0090] 보다 구체적으로, 단백질원인 상기 기계 발골 계육 1kg을 수도수에 담구어 혈액을 제거한 다음 가는 눈금에 체를 사용하여 물기를 제거하고 원료의 2 배량에 해당하는 수도수 즉, 2 L의 수도수를 가한 후, 균질기(homogenizer)를 이용하여 3000 rpm에서 충분히 마쇄하였다. 상기 마쇄물에 5N NaOH 용액을 첨가하여 pH를 11로 조정하여 단백질을 용해시키고, 원심분리하여 가용성 단백질을 회수하였다.
- [0091] 상기 회수된 단백질에 5N HCl 용액을 처리하여 가용성 단백질의 pH를 7로 조정한 후, Novozyme Korea에서 구입한 Protamex와 Bromelain을 처리하였다. 보다 구체적으로, 상기 가용성 단백질에 Protamex를 6.7 g 첨가하고, 50℃의 온도 범위에서 1 시간 동안 가수분해하였다. 이어서 1.34 g의 bromelain을 첨가하여 같은 온도에서 1 시간 동안 2차 가수분해를 수행하였다.
- [0092] 상기 가수분해 후, 95℃에서 30분 동안 효소를 불활성시킨 후, 8000 rpm에서 25분간 원심분리하고, 상층액을 수득하였다. 상기 상층액에 60% 에탄올을 첨가하여, 단백질을 침전시키고, 8000 rpm에서 25분간 원심분리하고 이를 여과지로 여과하였다.
- [0093] 상기 여과액에서 에탄올을 증발시키고 0.45 um 필터로 여과한 후, 5 kDa 한외여과막(ultra membrane, cut off limit : 5kDa)을 이용하여 한외여과(Ultra filtration, 10)를 실시하였다. 상기 여과액을 건조하여 -20℃에서 저장하였다. 상기 제조된 기능성 계육 가수분해물을 MDCM_PB라 하였다.
- [0094] 상기 방법에 의해 제조된 계육 가수분해물 제조의 산업화를 위해 대량제조(Scale-up)이 요구되며, 이를 위해 이온교환크로마토그래피와 전기투성장치를 이용한 NaCl 제거 과정이 사용될 수 있다.
- [0095] 상기 이온교환 크로마토그래피 (공업용 수지)를 이용하여 하전의 정도를 이용한 분리방법으로는 이온교환수지를 50 mM citrate 완충액(pH 3.0)으로 수지를 평행시키고, 기계 발골육 가수분해물을 수지에 주입한 후, 50 mM citrate 완충액(pH 3.0), 0.5 M NaCl을 포함하는 50 mM citrate 완충액, 1.0 M NaCl을 포함하는 50 mM citrate 완충액으로 각각 용출한다.
- [0096] 상기 이온교환 크로마토그래피는 다음 조건에서 수행될 수 있다.
- [0097] Column - HiLoad superdex 30 prep grade(1.6x60 cm)
- [0098] Elution buffer - 0.1M NaCl-20 mM Tris-HCl(pH 7.5)
- [0099] Flow rate -2.0 mL/min
- [0100] Detector - 254 nm
- [0101] Injection volume -2.0 mL
- [0102] 상기 전기투성장치를 이용한 NaCl 제거 과정은 전기투석 장치를 사용하여 각각의 용출액에서 NaCl을 제거하는 방법으로 수행하였다. 투석이 완료된 용출액은 용액을 그대로 사용하거나 혹은 최종제품의 제형에 따라 건조단계를 거칠 수 있다.
- [0103] **실시예 2. 기능성 가수분해물의 세포 독성**

[0104] 상기 실시예 1의 방법으로 제조한 계육 가수분해물의 세포 독성 여부를 HepG2 cell line을 이용하여 측정하였으며, 그 결과를 도 1에 나타내었다.

[0105] 상기 도 1에 나타난 바와 같이, 실시예 1에서 제조된 계육 가수분해물(MCDCM_PB)은 200 ug/mL 농도까지에 대하여 세포독성을 보이지 않았다.

[0106] 실시예 3. 기능성 가수분해물의 DPPH 라디칼 소거능 및 항산화 효과

[0107] 상기 실시예 1의 방법으로 제조한 계육 가수분해물의 DPPH 라디칼 소거능은 Park 등의 방법(2005)에 따라 측정하였다. 구체적으로, 시험관에 시료 용액 500 μ L를 넣고, 500 μ L의 ethanol과 250 μ L의 0.5 mM 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl(DPPH)/ethanol 용액을 첨가하여 25℃의 실온에서 30분 동안 방치한 후, 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. 대조구는 시료 대신 500 μ L의 탈이온수를 사용하였으며, Blank 시험은 DPPH와 증류수 대신 750 μ L의 ethanol을 사용하였다. Antiradical 활성은 하기 계산식 1에 따라 DPPH 탈색의 %로 계산하였고, 그 결과를 하기 표 1에 나타내었다.

[0108] [계산식 1]

[0109] DPPH 제거능 = (1-시료의 흡광도)/대조구의 흡광도X 100

[0110] 상기 실시예 1의 방법으로 제조한 계육 가수분해물의 항산화능은 Linoleic acid의 항산화 활성 측정법, 구체적으로 Chen 등의 방법(1996)을 다소 변형한 Ferric thiocyanate법으로 측정하였다. 보다 구체적으로, 산화를 위해 1 mL의 0.1 M sodium phosphate(pH 7.0)과 0.25 mL의 시료 용액, 0.25 mL의 탈이온수, 1.0 mL의 50 mM linoleic acid/ethanol 용액을 유리 시험관에서 혼합하고 뚜껑을 닫아 밀봉한 다음, 어두운 60℃의 항온 수조에서 산화시켰다. 이때 대조구 시료는 시료 대신 탈이온수를 사용하였다. 산화 후 4시간 간격으로 적당량의 시료를 들어내어, 반응 혼합 용액 50 μ L에 75% ethanol 2.35 mL, 30% ammonium thiocyanate 용액 50 μ L, 20 mM ferrous chloride/3.5% HCl 용액 50 μ L를 첨가하고 실온에서 3분 동안 방치하고 500 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이때 공시험은 반응 혼합 용액 대신 50 μ L의 탈이온수를 사용하였다. 항산화 활성은 하기 계산식 2에 따라 계산하였고, 그 결과를 하기 표 1에 나타내었다.

[0111] [계산식 2]

[0112] 항산화활성 = (1-시료의 흡광도)/대조구의 흡광도X 100

표 1

[0113]	기능성	활성
	DPPH 라디칼 소거능	EC ₅₀ =1.3 mg/mL
	항산화 효과	10 mg/mL ≒ 5mg/mL 알파-토코페롤

[0114] 상기 표 1에 나타난 바와 같이, 상기 계육 가수분해물은 정제과정을 거치기 전 단계에서도 현저하게 우수한 항산화활성을 갖는 것으로 확인되었다.

[0115] 실시예 4. 기능성 가수분해물의 ACE 저해효과

[0116] 상기 실시예 1의 방법으로 제조한 계육 가수분해물의 안지오텐신 전환효소(ACE) 저해능은 Janitha 등의 방법(2002)에 따라 기질로 hippuryl-His-Leu(HHL)을 사용하여 고속액체 크로마토그래피(HPLC, Hitachi, Japan)의 hippuric acid의 함량을 측정하는 방법으로 수행하였다. 보다 구체적으로, 시약 조제를 위한 완충액은 0.1 M Borate buffer(pH 8.3)을 사용하였다. 시험관에 시료 용액 40 μ L와 ACE(25 mU/mL) 150 μ L를 가한 후 37℃ 항온 수조에서 10분간 반응 한 후, 5 mM HHL-0.3 M NaCl/0.1 M Borate buffer(pH 8.3) 100 μ L를 첨가하여 다시 30분 동안 반응시킨 후, 1 M HCl 150 μ L를 가하여 ACE 활성을 중지시킨 다음 HPLC로 hippuric acid의 함량을 측정하였다. Hippuric acid(HA)의 정량을 위해 guard column(Bonclone C18, 10 μ m, 50 x 1.0 mm, Phenomenex Co., Torrance, CA, USA)와 C18 역상 칼럼(Bondclone C18, 5 μ m, 250 x 4.6 mm)를 장착한 HPLC에 반응중지 용액 20 μ L를 주입하고, 0.1% TFA/DW 와 0.1%/acetonitril 용액으로 용출하면서 228 nm에서 검출하였다. 대조

구 용액은 시료 대신 40 μ L의 완충액을 사용하며, 효소 저해 %는 하기 계산식 3으로 계산하였고, 그 결과를 하기 표 2에 나타내었다. 시료 농도별로 ACE 저해 활성을 측정하여 농도별 저해 활성을 선형 회귀분석한 후 ACE 활성의 50%를 저해하는 데 필요한 시료 농도를 IC₅₀으로 정의하였다.

[0117] [계산식 3]

[0118] ACE 저해활성 = (대조구의 HA-시료의 HA)/대조구의 HA X 100

표 2

[0119]	기능성	활성
	ACE 저해능	IC ₅₀ =0.032 mg/mL

[0120] 상기 표 2에 나타낸 바와 같이, 상기 계육 가수분해물은 정제과정을 거치기 전 단계에서도 우수한 안지오텐신 전환효소 저해능을 갖는 것으로 확인되었다.

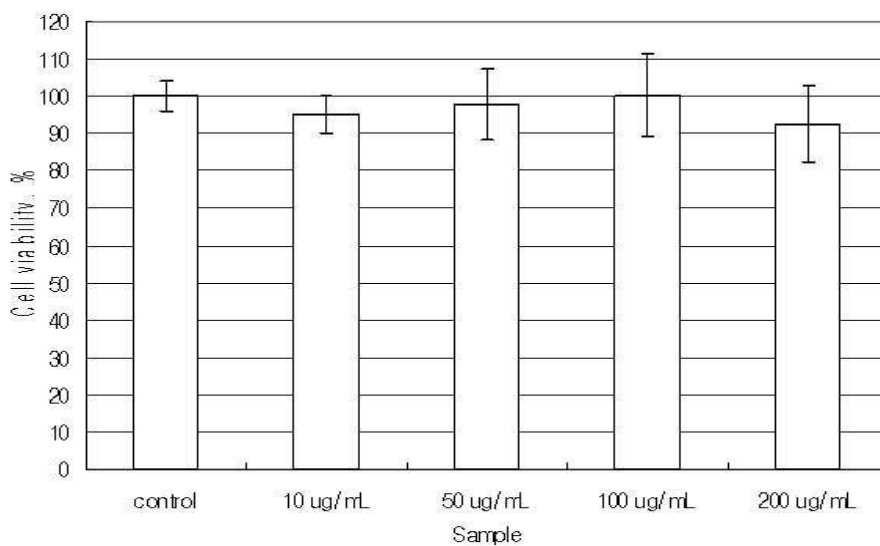
[0121] 실시예 5. 기능성 가수분해물의 간 세포 손상 회복 효과

[0122] 상기 실시예 1의 방법으로 제조한 계육 가수분해물의 간 세포 손상회복 효과는 20% 알코올로 간 세포(HepG2 Cell)를 손상 시킨 후, 배양하는 방법으로 수행하였다. 알코올을 처리하지 않은 양성대조군(Control) 및 20% 알코올로 처리하고 가수분해물을 처리하지 않은 음성대조군(Negative Control)의 간 세포 생존 정도를 비교하였고, 그 결과를 도 2에 나타내었다.

[0123] 상기 도 2에 나타내 바와 같이, 100 μ g/mL를 처리한 경우에도 아무런 시료를 처리하지 않은 군에 비하여 현저한 간 세포 생존 효과가 확인되었고, 독성 실험에서 독성이 없는 것으로 확인된, 100 μ g/mL를 처리한 경우 알코올을 처리하지 않은 양성대조군과 유사한 정도가 확인이 되어서, 상기 실시예 1의 방법으로 제조한 계육 가수분해물은 알코올성 간 손상에 대한 높은 간세포 손상 회복 효과를 갖는 것으로 확인되었다. 상기 가수분해물의 간 세포 손상 회복 효과는 도 2에서 확인된 바와 같이, 농도의존적으로 증가함이 확인되었다.

도면

도면1



도면2

