(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2014-0130906
(43) 공개일자 2014년11월12일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A23L 1/29 (2006.01) *A23L 1/308* (2006.01)
A23L 1/30 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2013-0049468
(22) 출원일자 2013년05월02일
심사청구일자 2013년05월02일

(71) 출원인
이화여자대학교 산학협력단
서울특별시 서대문구 이화여대길 52 (대현동, 이화여자대학교)
(72) 발명자
권오란
서울 용산구 서빙고로 35, 102동 2303호 (한강로3가, 용산시티파크1단지아파트)
(74) 대리인
이원희

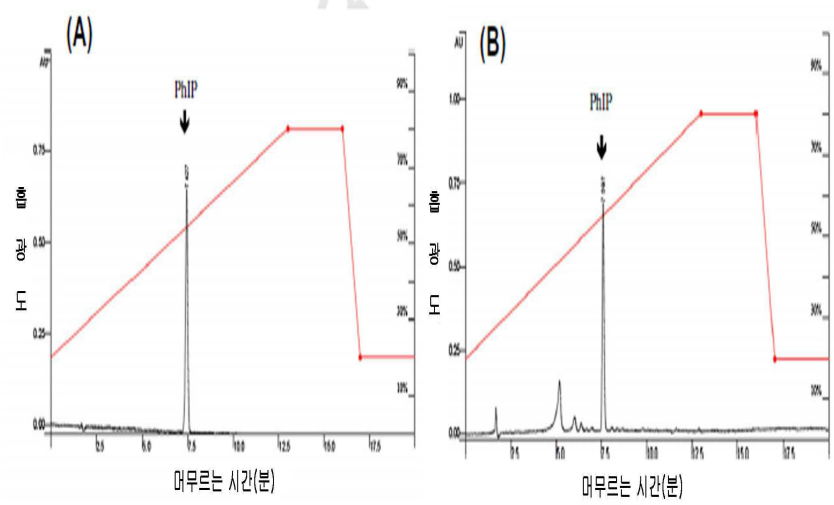
전체 청구항 수 : 총 10 항

(54) 발명의 명칭 **클로렐라를 유효성분으로 함유하는 체내 유해성분 배출 증가용 건강식품 조성물**

(57) 요 약

본 발명은 클로렐라(*chlorella*)를 유효성분으로 함유하는 체내 유해성분 배출 증가용 건강식품 조성물 및 상기 유해성분으로 인해 유발되는 대장암 예방 및 억제용 건강식품 조성물에 관한 것으로, 구체적으로, 클로렐라가 대사되지 않은 PhIP의 배출을 증가시키고, 암의 발달에 중요한 역할을 하는 β-카테닌(β-catenin), 사이클린 D1(cyclin D1), 카스파아제-8(caspase-8) 및 카스파아제-3(caspase-3) mRNA 수준을 감소시키고, DNA 파쇄를 개선함을 확인함으로써. 본 발명의 클로렐라가 체내 유해성분 배출 증가용 및 대장암 예방 및 억제용 건강식품 조성물로 유용하게 사용될 수 있음을 확인하였다.

대 표 도 - 도2



이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 2012M3A9C4048761
부처명 미래창조과학부
연구관리전문기관 한국연구재단
연구사업명 바이오,의료기술개발사업-전통천연물기반유전자-동의보감사업
연구과제명 인체시험기반 MC/MT 효능검증 기술개발
기 여 율 1/1
주관기관 이화여자대학교 산학협력단
연구기간 2012.09.01 ~ 2022.08.31

특허청구의 범위

청구항 1

클로렐라(*chlorella*)를 유효성분으로 함유하는 체내 유해성분 흡착 및 배출용 건강식품 조성물.

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 클로렐라는 클로로필(chlorophyll) 및 식이성 섬유(dietary fiber)를 포함하는 것을 특징으로 하는 체내 유해성분 흡착 및 배출용 건강식품 조성물.

청구항 3

제 2항에 있어서, 상기 클로로필은 전체 조성물 대비 1 내지 5%(w/w)를 포함하는 것을 특징으로 하는 체내 유해성분 흡착 및 배출용 건강식품 조성물.

청구항 4

제 2항에 있어서, 상기 식이성 섬유는 전체 조성물 대비 5 내지 30%(w/w)를 포함하는 것을 특징으로 하는 체내 유해성분 흡착 및 배출용 건강식품 조성물.

청구항 5

제 1항에 있어서, 상기 클로렐라는 클로렐라 불가리스(*Chlorella vulgaris*)로부터 유래한 것을 특징으로 하는 체내 유해성분 흡착 및 배출용 건강식품 조성물.

청구항 6

제 1항에 있어서, 상기 클로렐라는 감압하여 동결건조한 분말인 것을 특징으로 하는 체내 유해성분 배출 촉진용 건강식품 조성물.

청구항 7

제 1항에 있어서, 상기 체내 유해성분은 2-아미노-1-메틸-6-페닐이미다졸(4,5-b)피리딘[2-amino-1-methyl-6-phenylimidazol(4,5-b)pyridine; PhIP) 또는 이의 유사체인 것을 특징으로 하는 체내 유해성분 배출 촉진용 건강식품 조성물.

청구항 8

클로렐라를 유효성분으로 함유하는 대장암 예방 또는 억제용 건강식품 조성물.

청구항 9

클로렐라를 유해성분에 처리하는 단계를 포함하는 유해성분의 흡착 또는 배출방법.

청구항 10

제 9항에 있어서, 상기 유해성분은 PhIP 또는 이의 유사체인 것을 특징으로 하는 유해성분의 흡착 또는 배출방법.

명 세 서

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 클로렐라(*chlorella*)를 유효성분으로 함유하는 체내 유해성분 배출 증가용 건강식품 조성물 및 상기 유해성분으로 인해 유발되는 대장암 예방 및 억제용 건강식품 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 식이요법은 대장암(colon cancer)에서 중요한 역할을 하고 있다. 높은 온도에서 조리된 고기 및 생선으로부터 20종류 이상의 다른 돌연변이 또는 발암의 헤테로사이클릭 아민(heterocyclic amines; HCA)이 확인되었고, 상기 헤테로사이클릭 아민 중에서 2-아미노-1-메틸-6-페닐이미다졸(4,5-b)피리딘[2-amino-1-methyl-6-phenylimidazol(4,5-b)pyridine; PhIP)가 가장 많이 존재하고 있다. PhIP는 F344 수컷 랫에서 음식에 PhIP 25 내지 440 ppm을 간헐적으로 첨가한 후, 이상함몰점(aberrant crypt foci; ACF), 대장암의 추정 종양전 병소(putative preneoplastic lesion), 및 대장암을 유도함이 확인되었다. 또한, 몇몇의 인간 전염병 연구에 있어서, 붉은 육류 및 조리된 육류의 흡수 및 대장암(colorectal cancer) 사이에 관련성이 있음이 보고되었다. PhIP의 농도는 고기의 종류 및 조리방법에따라 매우 다르고, 패스트푸트점에서 조리된 경우 1 ng/g 미만, 상업적으로 조리된 제품에서는 14 ng/g까지, 및 불에서 잘 구워진 고기의 경우 300 ng/g을 초과하는 범위에서 포함되어 있다. 서양식 식이요법에 있어서, PhIP의 하루 평균 흡수량은 72 내지 865 ng으로 추정된다.

[0003] 위장관(gastrointestinal tract)에서 한번 흡수되면 PhIP는 몸 전체로 곧바로 넓게 퍼진다. 이는 주로 간에서 1상 및 2상 효소에 의해 대사적으로 활성화되고, DNA 염기 부가물을 생성한다. PhIP 대사체는 간에서 글루타티온(glutathion) 및 글루타티온 전이효소(glutathione transferase)에 의해서 해독되고, 그 결과로 글루쿠론산염 결합체가 뇨를 통해서 배출된다. 그러나 PhIP는 담즙(bile)으로 또한 배출되고, 장에 서식하는 세균에 의해 상기 글루쿠론산염 결합체의 결합이 떨어지며, 장으로 다시 흡수된다. 이런 장간순환(enterohepatic circulation)은 활성화된 PhIP를 대장 상피세포에 반복적으로 노출하는 결과를 가져온다. 또한, 돌연변이 유발물질, 해독작용 경로의 조절, 및 DNA 수리 메카니즘의 증진을 포함하는 PhIP의 다양한 수준에 대해 최적화된 방어를 위하여 PhIP 흡수의 주요 요소를 확인하여 단순히 회피하거나, PhIP 형성을 최소화하기 위한 다른 조리 방법을 개발하는 등의 계획적 전략이 필요하다.

[0004] 많은 종류의 음식 및 음식의 구성요소는 다양한 메카니즘에 의해서 HCA의 돌연변이 또는 발암 활성에 대한 잠재적인 영향을 준다. 클로로필(chlorophyll)에서 유래한 수용성 동나트륨염(water-soluble sodium copper salts)의 반합성 혼합물(semisynthetic mixture)인 클로로필린(chlorophyllin)은 HCA를 포함하는 넓은 범위의 돌연변이원 또는 발암물질에 대한 효과가 가장 잘 알려져 있는 분자이다. 클로로필린은 HCA와 강한 분자 복합물(molecular complexes)를 형성하고, 이들의 위장 내 흡수를 방해하며, 민감한 조직에 닿는 HCA의 양을 감소시킨다.

[0005] 클로렐라는 녹조류로 담수 중에 증식하는 단세포 식물로, 분류학상 클로로파이세아(chlorophycea) 강, 클로로코쿰(chlorococcum) 목, 클로렐라 속에 속한다. 이들은 보통 연못이나 호수 등 담수에서 생육하며, 직경 2 내지 10 ㎛의 구형 단세포 조류로 하나의 세포는 현미경으로만 볼 수 있는 정도이다. 생식은 무성생식으로 증식하고 물, 공기, 질소와 인산 등의 식물 성장요소가 있으면 빛과 이산화탄소를 이용한 독립 영양적 성장 증식을 한다는 점이 생물학적으로 가장 큰 특징으로, 이는 산업적 대량 배양 공정에서 가장 중요하게 고려되는 사항이다.

클로렐라는 필수 아미노산 조성이 좋은 고 단백질 식품으로 총 아미노산 함량은 쇠고기에 비하여 월등히 높으며 단백질, 지질, 식이섬유, 비타민류와 무기질에 관하여 다른 식품과 비교할 수 없을 만큼 영양학적으로도 균형잡힌 식품이다. 클로렐라는 현재 사료와 식품의 1, 2차적 목적으로 사용되어 영양학적으로 우수성이 확인되었고, 항암 활성외에 3차적 식품으로서 기능성의 탐색이 활발히 진행중에 있다. 특히 최근 연구에 의하면 클로렐라에 카로티노이드와 클로로필이 다량 존재하고 있으며 카로티노이드 성분 중 눈 건강 기능성에 도움을 줄 수 있는 루테인의 함량이 특별히 많음이 밝혀진 바 있다.

[0006] 이에 본 발명자들은 체내 유해성분의 배출을 돕고 대장암을 예방할 수 있는 물질을 연구하던 중, 클로렐라가 대사되지 않은 PhIP의 배출을 증가시키고, 암의 발달에 중요한 역할을 하는 β-카테닌(β-catenin), 사이클린 D1(cyclin D1), 카스파아제-8(caspase-8) 및 카스파아제-3(caspase-3) mRNA 수준을 감소시키고, DNA 파쇄를 개선함을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명의 목적은 클로렐라(*chlorella*)를 유효성분으로 함유하는 체내 유해성분 배출 증가용 건강식품 조성물 및 상기 유해성분으로 인해 유발되는 대장암 예방 및 억제용 건강식품 조성물을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0008] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 클로렐라(*chlorella*)를 유효성분으로 함유하는 체내 유해성분 흡착 및 배출용 건강식품 조성물을 제공한다.

[0009] 또한, 본 발명은 클로렐라를 유효성분으로 함유하는 대장암 예방 또는 억제용 건강식품 조성물을 제공한다.

[0010] 또한, 본 발명은 클로렐라를 유해성분에 처리하는 단계를 포함하는 유해성분의 흡착 또는 배출방법을 제공한다.

발명의 효과

[0011] 본 발명은 클로렐라(*chlorella*)를 유효성분으로 함유하는 체내 유해성분 배출 증가용 건강식품 조성물 및 상기 유해성분으로 인해 유발되는 대장암 예방 및 억제용 건강식품 조성물은 대사되지 않은 PhIP의 배출을 증가시키고, 암의 발달에 중요한 역할을 하는 β-카테닌(β-catenin), 사이클린 D1(cyclin D1), 카스파아제-8(caspase-8) 및 카스파아제-3(caspase-3) mRNA 수준을 감소시키고, DNA 파쇄를 개선함으로써 체내 유해성분 배출 증가용 및 대장암 예방 및 억제용 건강식품 조성물로 유용하게 사용될 수 있음을 확인하였다.

도면의 간단한 설명

[0012] 도 1A는 2-아미노-1-메틸-6-페닐이미다졸(4,5-b)피리딘[2-amino-1-methyl-6-phenylimidazol(4,5-b)pyridine; PhIP)의 구조를 나타내는 도이다.

도 1B는 클로렐라(*chlorella*)의 구조를 나타내는 도이다.

도 2는 클로렐라의 섭취에 의해 대사되지 않은 PhIP가 배설물로 배출되는 것을 나타내는 도이다.

A: PhIP 표준곡선(대조군), 및

B: 배설물로 배출된 PhIP.

도 3은 클로렐라의 섭취에 의해 대장(colon) 조직에서 β-카테닌(β-catenin) 및 사이클린 D1(cyclin D1) mRNA 수준 변화를 나타내는 도이다.

도 4는 클로렐라 섭취에 의한 DNA의 파쇄(fragmentation) 감소를 나타내는 도이다.

A: 마커,

B 및 C: 운반체 대조군(AIG-93G),

D 및 E: PhIP만 처리한 군,

F 및 G: PhIP를 처리한 후, 3%의 클로렐라를 섭취한 군, 및

H 및 I: PhIP를 처리한 후, 5%의 클로렐라를 섭취한 군.

도 5는 클로렐라의 섭취에 의해 대장(colon) 조직에서 카스파아제-8(caspase-8) 및 카스파아제-3(caspase-3) mRNA 수준 변화를 나타내는 도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0013] 이하, 본 발명을 상세하게 설명한다.

[0014] 본 발명은 클로렐라(*chlorella*)를 유효성분으로 함유하는 체내 유해성분 흡착 및 배출용 건강식품 조성물을 제공한다.

[0015] 상기 클로렐라는 클로로필(chlorophyll) 및 식이성 섬유(dietary fiber)를 포함하는 것이 바람직하나 이에 한정하지 않는다. 상기 클로로필은 전체 조성물 대비 1 내지 5%(w/w)로 포함되는 것이 바람직하고, 2 내지 4%(w/w)인 것이 더욱 바람직하며, 2.4%(w/w)인 것이 가장 바람직하나 이에 한정하지 않는다. 또한, 상기 식이성 섬유는 전체 조성물 대비 5 내지 30%(w/w)인 것이 바람직하고, 10 내지 20%(w/w)인 것이 더욱 바람직하며, 본 발명의 바람직한 실시예에 의하면 13%인 것이 가장 바람직하나 이에 한정하지 않는다.

[0016] 또한, 상기 클로렐라는 클로렐라 불가리스(chlorella vulgaris), 클로렐라 피레노이도사(chlorella pyrenoidosa), 클로렐라 레귤라리스(chlorella regularis), 클로렐라 사코로필라(chlorella saccharophila), 클로렐라 소로키니아나(chlorella sorokiniana) 등을 제한없이 포함하며, 식용가능한 모든 클로렐라를 포함한다. 아울러, 상기 클로렐라는 자연산에서 채취하여 가공한 것이나 종묘배양을 통해 자연노지배양 또는 옥내배양, 또는 무균적으로 발효조 배양되어 세정 및 세척한 후 사용하는 것이 바람직하며, 상기 클로렐라를 농축 또는 분말화한 것을 사용한 것이 바람직하나, 본 발명의 바람직한 실시예에 의하면 감압하여 동결건조한 분말인 것이 가장 바람직하나 이에 한정하지 않는다.

[0017] 또한, 상기 체내 유해성분은 2-아미노-1-메틸-6-페닐이미다졸(4,5-b)피리딘[2-amino-1-methyl-6-phenylimidazol(4,5-b)pyridine; PhIP) 또는 이의 유사체인 것이 바람직하나 이에 한정하지 않는다.

[0018] 본 발명의 구체적인 실시예에서, 본 발명자들은 클로렐라를 섭취하지 않은 대조군 및 클로렐라를 섭취한 실험군의 랫에 PhIP를 투여하고, 상기 랫의 배설물 및 대장을 수득하였다. 상기 수득된 배설물 및 대장조직 시료에 있어서, 클로렐라를 섭취한 군에서 PhIP의 배출이 현저하게 증가하는 것을 확인함으로써(도 2 및 표 1 참조), 본 발명의 클로렐라가 체내 유해성분 배출용 건강식품 조성물로 유용하게 사용될 수 있음을 확인하였다.

[0019] 본 발명의 건강식품은 클로렐라를 그대로 첨가하거나 다른 식품 또는 식품 성분과 함께 사용될 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다.

[0020] 상기 건강식품의 종류에는 특별한 제한은 없다. 상기 클로렐라를 첨가할 수 있는 식품의 예로는 육류, 소시지, 빵, 초콜릿, 캔디류, 스넥류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류를 포함한 낙농제품, 각종 스프, 음료수, 차, 드링크제, 알코올음료 및 비타민 복합제 등이 있으며, 통상적인 의미에서의 건강식품을 모두 포함한다.

[0021] 본 발명의 건강음료 조성물은 통상의 음료와 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다. 상술한 천연 탄수화물은 포도당, 과당과 같은 모노사카라이드, 말토스, 슈크로스와 같은 디사카라이드, 및 덱스트린, 사이클로덱스트린과 같은 폴리사카라이드, 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알

콜이다. 감미제로서는 타우마틴, 스테비아 추출물과 같은 천연 감미제나, 사카린, 아스파르탐과 같은 합성 감미제 등을 사용할 수 있다. 상기 천연 탄수화물의 비율은 본 발명의 조성물 100 당 일반적으로 약 0.01 ~ 0.04 g, 바람직하게는 약 0.02 ~ 0.03 g 이다.

[0022] 상기 외에 본 발명의 건강식품은 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 함유할 수 있다. 그 밖에 천연 과일주스, 과일주스 음료 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다. 이러한 성분은 독립적으로 또는 혼합하여 사용할 수 있다. 이러한 첨가제의 비율은 크게 중요하진 않지만 본 발명의 조성물 100 중량부 당 0.01 ~ 0.1 중량부의 범위에서 선택되는 것이 일반적이다.

[0023] 또한, 본 발명은 클로렐라를 유효성분으로 함유하는 대장암 예방 또는 억제용 건강식품 조성물을 제공한다.

[0024] 본 발명의 구체적인 실시예에서, 본 발명자들은 클로렐라를 섭취하지 않은 대조군 및 클로렐라를 섭취한 실험군의 랫에 PhIP를 투여하고, 상기 랫의 배설물 및 대장을 수득하였다. 상기 수득된 배설물 및 대장조직 시료에 있어서, 암 발달에 중요한 β-카테닌(β-catenin) 및 사이클린 D1(cyclin D1) mRNA의 수준이 감소하였으며(도 3 참조), 또한, DNA의 파쇄(fragmentation)가 개선되고(도 4 참조), 카스파아제-8(caspase-8) 및 -3의 발현이 감소하는 것을 확인함으로써(도 5 참조), 본 발명의 클로렐라가 대장암 예방 및 억제용 건강식품 조성물로 유용하게 사용될 수 있음을 확인하였다.

[0025] 또한, 본 발명은 클로렐라를 유해성분에 처리하는 단계를 포함하는 유해성분의 흡착 또는 배출방법을 제공한다.

[0026] 이하, 본 발명을 실시예 및 제조예에 의해 상세하게 설명한다.

[0027] 단, 하기 실시예 및 제조예는 본 발명을 구체적으로 예시하는 것이며, 본 발명의 내용이 하기 실시예 및 제조예에 의해 한정되는 것은 아니다.

[0028] **<실시예 1> 클로렐라(*chlorella*)의 체내 2-아미노-1-메틸-6-페닐이미다졸(4,5-b)피리딘[2-amino-1-methyl-6-phenylimidazol(4,5-b)pyridine; PhIP)의 흡착 및 배출효과 확인**

[0029] **<1-1> 실험동물 및 시료의 준비**

[0030] 본 발명에 사용된 동물모델은 6주령의 수컷 F344 랫(rat)(G-bio, 대한민국)으로 구입 후, 한 마리씩 공기가 잘 통하는 곳에서 온도는 23 ± 1℃, 습도는 45 ± 5%의 환경하에 12시간씩 밤과 낮을 반복하며 가둬두었고, 이때, 물 및 음식은 자유롭게 먹을 수 있게 두었다. 새로운 환경에 적응 1주일 후, 랫은 운반체(vehicle) 대조군(N), 클로렐라(대상, 대한민국)를 섭취하지 않은 군(PC0), 3% 클로렐라를 섭취한 군(PC3), 5% 클로렐라를 섭취한 군(PC5)으로 4개의 군(군당 6마리)으로 임의로 나누었다. 이때, 0, 3 및 5%의 클로렐라가 포함된 AIN-93G은 옥수수녹말(cornstarch), 덱스트린화된 옥수수 녹말(dextrinized corn starch) 및 자당(sucrose)을 포함하는 탄수화물에서 61 내지 64%, 카제인(casein)과 같은 단백질에서 19 내지 21%, 및 옥수수 기름(corn oil)과 같은 지방에서 17%의 에너지를 제공한다. 클로렐라를 섭취한지 22일 후, 각각의 랫을 대사 우리(metabolic cage)에 두고, 랫의 무게를 기준으로 PhIP가 75㎎/㎏가 되도록 1% 다이메틸설폭시화물(dimethylsulfoxide)이 포함된 0.1 ㎖ 옥수수 기름에 첨가하여 위관영양법(gavage)으로 3일 동안 투약하였다. 운반체 대조군은 동량의 운반체를 투약하였다. PhIP 투여 24, 48 및 72시간 후에 배설물을 모으고, -20℃에 보관하였다. PhIP 또는 운반체의 세 번째 투여가 끝난 후, 안락사시킨 랫으로부터 대장(colon)을 꺼내고, 이를 잘라내어 내용물을 PBS로 세척하였으며, 분석때까지 -80℃에 보관하였다.

[0031] **<1-2> 클로렐라 섭취에 의한 대사되지 않은 PhIP의 배출증가 확인**

[0032] 상기 실시예 <1-1>의 방법으로 준비된 시료에서 대사되지 않은 PhIP의 배출을 확인하기 위하여 고성능 액체 크로마토그래피(high-performance liquid chromatography; HPLC)를 수행하였다.

[0033] 구체적으로, HPLC는 자동견본기(autosampler), 컬럼 오븐(column oven) 및 포토다이오드 어레이 검출기(photodiode array detector)를 포함하는 고성능 액체 크로마토그래피 시스템(Varian Inc. 미국)을 사용하였고, 상기 실시예 <1-1>의 방법으로 준비된 시료를 실온에서 해동한 후, 배설물 슬러리(slurry) 2 ㎖을 6N 수산화나트륨(sodium hydroxide) 0.5 ㎖과 혼합하고, 침전물(sediment)을 제거하기 위해 낮은 속도로 원심분리를 수행하였다. 그리고, 상기 추출물에 50% 메탄올 6 ㎖를 첨가하여 오아시스 MCX(30 및 60 mg, Water Co. 미국) 카트리지(cartridge)를 통과시키고, 용리액(eluent) 10 ㎕를 분석용(analytical) 선파이어 C18 컬럼(SunFire C18 column, 4.6 x 150 ㎜, 5olu Waters, 미국)에 주입하였다. 이동상은 3.4 mM 암모늄 포름에이트 완충액(ammonium formate buffer, 포름산으로 조절된 pH 3.5; A 용액) 및 메탄올에 7.5 mM 암모늄 포름에이트가 첨가된 용액(B 용액)이었고, 0 내지 13분 동안 B 용액이 20 내지 80%의 농도구배(gradient), 13 내지 16분 동안 80% B 용액, 16 내지 17분 동안 B 용액이 80 내지 20%의 농도구배, 및 3분 동안 20% B 용액이 사용되었다. 흐름 속도(flow rate)는 1.0 ㎖/min이었고, 컬럼 온도는 30℃였다. 시료 내의 PhIP 내용물은 PhIP의 다양한 투여량으로부터 얻어진 표준곡선(standard curve)으로부터 추정되었다.

[0034] 그 결과, 도 2A에 나타난 바와 같이 대사되지 않은 PhIP를 측정하였고[머무른 시간(retention time): 7.5 분](도 2A), 도 2B에 나타난 바와 같이 몇몇의 작은 피크가 배설물 백그라운드(background)로 확인되었다(도 2B). 또한, 표 1에 나타난 바와 같이 PhIP 투여를 시작한지 24시간 후, 전체 배설물 무게에는 차이가 없었으나, 대사되지 않은 PhIP의 배설물로의 배출이 PC0군과 비교하여 PC5군에서 유의적으로 증가함을 확인하였다(P<0.001). 다음 24시간 동안 PC3군에서 PhIP 배출이 현저하게 증가하였고, 상기 군은 PC0군과 비교하였을 때 세 번째 24시간 동안 최고 수준을 나타냈다(P<0.001). 전체적으로 대사되지 않은 PhIP의 배설물로의 배출은 클로렐라를 투약하지 않은 군과 비교하여 클로렐라를 섭취한 양쪽 군에서 높게 나타났다(P<0.001). 평균 배출량은 PC0군에서 974.7 ㎍, PC3군에서 1643.5 ㎍ 및 PC5군에서 1580.36 ㎍이었다(표 1).

표 1

[0035]

		PC0	PC3	PC5
1일	배설물의 무게(g)[a]	7.26 ± 0.14	7.30 ± 0.07	7.26 ± 0.06
	PhIP 배출(㎍)	115.24 ±63.45[c]	102.34 ± 45.82[c]	429.76 ± 84.82[b]
2일	배설물의 무게(g)	7.13 ± 0.13	7.06 ± 0.06	6.91 ± 0.12
	PhIP 배출(㎍)	543.33 ± 75.24	742.13 ± 81.41	679.02 ± 89.48
3일	배설물의 무게(g)	7.02 ± 0.16	6.99 ± 0.07	6.94 ± 0.09
	PhIP 배출(㎍)	376.42 ± 58.95[c]	799.04 ± 80.17[b]	471.58 ± 38.78[c]
합계	배설물의 무게(g)	21.40 ± 0.38	21.35 ± 0.11	21.11 ± 0.18
	PhIP 배출(㎍)	974.70 ± 117.38[c]	1643.51 ± 118.21[b]	1580.36 ± 101.02[b]

[0036] [a]각각의 값은 평균 ± 표준오차(n=6)을 나타낸다. [b,c]다른 첨자는 사후 던칸 다중비교분석(*post-hoc* Duncan's multiple comparison tests)과 함께 ANOVA에 의해 유의적인 차이가 있다(P < 0.05).

[0037] **<실시예 2> 클로렐라 섭취에 의한 β-카테닌(β-catenin) 및 사이클린 D1(cyclin D1) mRNA의 감소 효과 확인**

[0038] 암의 발달에 중요한 신호경로인 Wnt/β-카테닌 신호경로의 비정상적인 활성을 확인하기 위해서 역전사 PCR(RT-PCR)을 수행하였다.

[0039] 구체적으로, 상기 실시예 <1-1>의 방법으로 준비된 대장 조직에서 트리졸 용액(TRIZOL reagent, Invitrogen, 미국)을 사용하여 RNA를 추출하였고, 상기 추출된 RNA의 농도는 분광광도계(spectrophotometer, BioSpec-nano, 일본)를 사용하여 260/280 nm에서 측정하여 계산하였다. 상기 RNA에서 cDNA의 합성은 cDNA 키트(Applied Biosystems, 미국)를 이용하여 수행하였고, RT-PCR은 TaqMan 실시간 PCR 시스템(TaqMan real-time PCR systems, Applied Biosystems, 미국)을 사용하여 수행하였으며, 이때 사용된 프라이머는 하기의 표 2에 나타내었다. 상기 mRNA의 반응량(reactive amounts)은 β-카테닌으로 보정되었고, 모든 RNA에 대한 상대량(relative amounts)은 비교의 CT 방법(comparative CT method)을 사용하여 계산되었으며, 모든 결과는 대조군 값에 대한 상대 값을 나타내었다.

표 2

[0040]

표적 유전자를 위한 프라이머	분석 ID 번호
β-카테닌	Ctnnb1; Rn00584431_m1(Applied Biosystems, 미국)
사이클린 D1	Ccnd1; Rn00432359_m1(Applied Biosystems, 미국)

[0041] 그 결과, 도 3에 나타난 바와 같이 운반체 또는 PhIP가 처리된 랫의 Wnt/β-카테닌 신호경로와 관련된 유전자의 대장 mRNA에서 대조군과 비교하여 PhIP-처리된 군에서 β-카테닌이 1.5배(P=0.052) 및 사이클린 D1이 2배(P=0.005)정도 과발현하는 것을 확인하였다. 그러나, 클로렐라를 섭취한 군에서는 PhIP-유도된 β-카테닌 및 사이클린 D1의 과발현이 나타나지 않았다(도 3).

[0042] **<실시예 3> 클로렐라 섭취에 의한 DNA 파쇄(fragmentation) 개선효과 확인**

[0043] PhIP 및 클로렐라에 의한 DNA 통합(integrity)에의 영향 및 대장 조직으로부터 분리된 DNA에서 이에 상응하는 전기영동 패턴(electrophoretic pattern)을 확인하였다.

[0044] 구체적으로, 상기 실시예 <1-1>의 방법으로 준비된 대장 조직으로부터 게놈 DNA(genomic DNA)를 추출하였고, 이때 게놈 DNA 추출 키트(Genomic DNA Extraction Kit, iNtRON Biotechnology, 대한민국)를 사용하여 제조사의 설명서에 따라 사용하였다. 파쇄된 DNA는 1.5% 아가로스 겔(agarose gel)에서 5 내지 20 V/cm 전기영동(electrophoresis)으로 TBE 완충액을 사용하여 40분 동안 분리하였고, 브롬화 에티듐(ethidium bromide)으로 염색하였으며, UV 하에서 관찰 및 촬영되었다.

[0045] 그 결과, 도 4에 나타난 바와 같이 대조군(B 및 C)에서는 DNA 파쇄가 관찰되지 않았으나, PhIP를 3회에 걸쳐서 위 내에 투여한 군(D 및 E)에서는 DNA 잘림(DNA shearing) 및 세포자멸사(apoptosis)의 전형적인 특징이 명확히 관찰되었다. PhIP 투여 전에 3% 클로렐라를 섭취한 군(F 및 G) 및 5% 클로렐라를 섭취한 군(H 및 I)은 PhIP만 투여한 군과 비교하여 DNA 파쇄가 감소하는 것을 확인하였다(도 4).

[0046] **<실시예 4> 클로렐라 섭취에 의한 카스파아제-8(caspase-8) 및 -3의 발현 감소 확인**

[0047] 카스파아제 시스테인 단백질 분해효소(caspase cysteine protease)는 세포자멸사의 일반적인 반응제(effector)이고, 이는 개시제(initiator)인 카스파아제-8 및 -9, 및 집행제(executioner)인 카스파아제-3, -6 및 -7로 분리된다. 따라서, 대장 조직에서 카스파아제-8 및 -3의 mRNA를 상기 <실시예 3>의 방법을 사용하여 측정하였다. 이때 사용된 프라이머는 하기의 표 3에 나타내었다.

표 3

[0048]

표적 유전자를 위한 프라이머	분석 ID 번호
카스파아제-8	Casp8; Rn00574069_m1(Applied Biosystems, 미국)
카스파아제-3	Casp3; Rn00563902_m1(Applied Biosystems, 미국)

[0049] 그 결과, 도 5에 나타난 바와 같이 운반체만 처리한 대조군(P=0.012)과 비교하여 PhIP를 처리한 군에서 카스파아제-8 mRNA 수준이 2배 정도 증가한 것을 확인하였다. 그러나 클로렐라를 섭취한 군에서는 카스파아제-8 mRNA의 과발현이 감소하였으나, 카스파아제-3 mRNA의 수준에는 변화가 없음을 확인하였다(도 5).

[0050] **<제조예 1> 건강식품의 제조**

[0051] **<1-1> 밀가루 식품의 제조**

[0052] 본 발명의 클로렐라 0.5 ~ 5.0 중량부를 밀가루에 첨가하고, 이 혼합물을 이용하여 빵, 케이크, 쿠키, 크래커 및 면류를 제조하였다.

[0053] **<1-2> 스프 및 육즙(gravies)의 제조**

[0054] 본 발명의 클로렐라 0.1 ~ 5.0 중량부를 스프 및 육즙에 첨가하여 건강 증진용 육가공 제품, 면류의 수프 및 육즙을 제조하였다.

[0055] **<1-3> 그라운드 비프(ground beef)의 제조**

[0056] 본 발명의 클로렐라 10 중량부를 그라운드 비프에 첨가하여 건강 증진용 그라운드 비프를 제조하였다.

[0057] **<1-4> 유제품(dairy products)의 제조**

[0058] 본 발명의 클로렐라 5~10 중량부를 우유에 첨가하고, 상기 우유를 이용하여 버터 및 아이스크림과 같은 다양한 유제품을 제조하였다.

[0059] **<1-5> 선식의 제조**

[0060] 현미, 보리, 찹쌀, 율무를 공지의 방법으로 알파화시켜 건조시킨 것을 배전한 후 분쇄기로 입도 60 메쉬의 분말로 제조하였다.

[0061] 검정콩, 검정깨, 들깨도 공지의 방법으로 쪄서 건조시킨 것을 배전한 후 분쇄기로 입도 60 메쉬의 분말로 제조하였다.

[0062] 본 발명의 클로렐라를 진공 농축기에서 감압농축하고, 분무, 열풍건조기로 건조하여 얻은 건조물을 분쇄기로 입도 60 메쉬로 분쇄하여 건조분말을 얻었다.

[0063] 상기에서 제조한 곡물류, 종실류 및 본 발명의 클로렐라를 다음의 비율로 배합하여 제조하였다.

[0064] 곡물류(현미 30 중량부, 율무 15 중량부, 보리 20 중량부),

[0065] 종실류(들깨 7 중량부, 검정콩 8 중량부, 검정깨 7 중량부),

[0066] 본 발명의 클로렐라(3 중량부),

[0067] 영지(0.5 중량부),

[0068] 지황(0.5 중량부)

[0069] **<제조예 2> 음료의 제조**

[0070] **<2-1> 건강음료의 제조**

[0071] 액상과당(0.5%), 올리고당(2%), 설탕(2%), 식염(0.5%), 물(75%)과 같은 부재료와 본 발명의 클로렐라 5 g을 균질하게 배합하여 순간 살균을 한 후 이를 유리병, 패트병 등 소포장 용기에 포장하여 제조하였다.

[0072] **<2-2> 야채 주스의 제조**

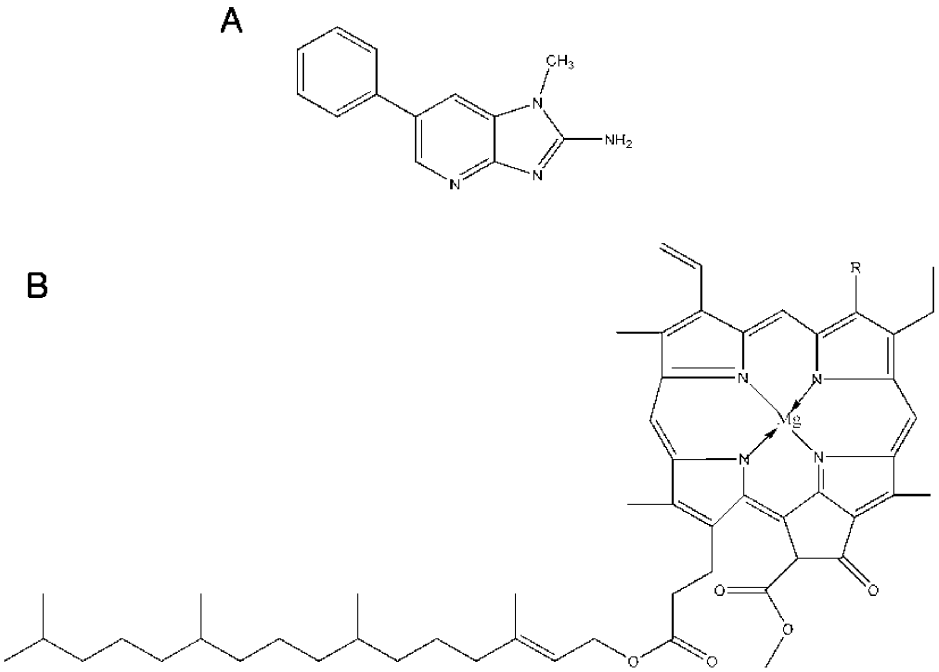
[0073] 본 발명의 클로렐라 5 g을 토마토 또는 당근 주스 1,000 ㎖에 가하여 야채 주스를 제조하였다.

[0074] **<2-3> 과일 주스의 제조**

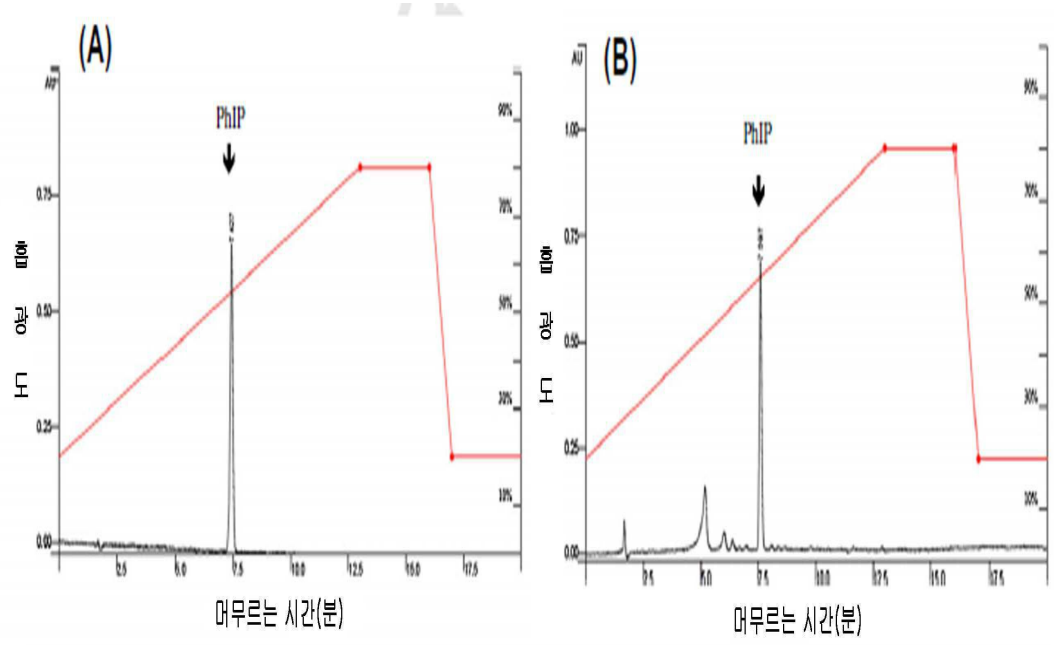
[0075] 본 발명의 클로렐라 1 g을 사과 또는 포도 주스 1,000 ㎖ 에 가하여 과일 주스를 제조하였다.

도면

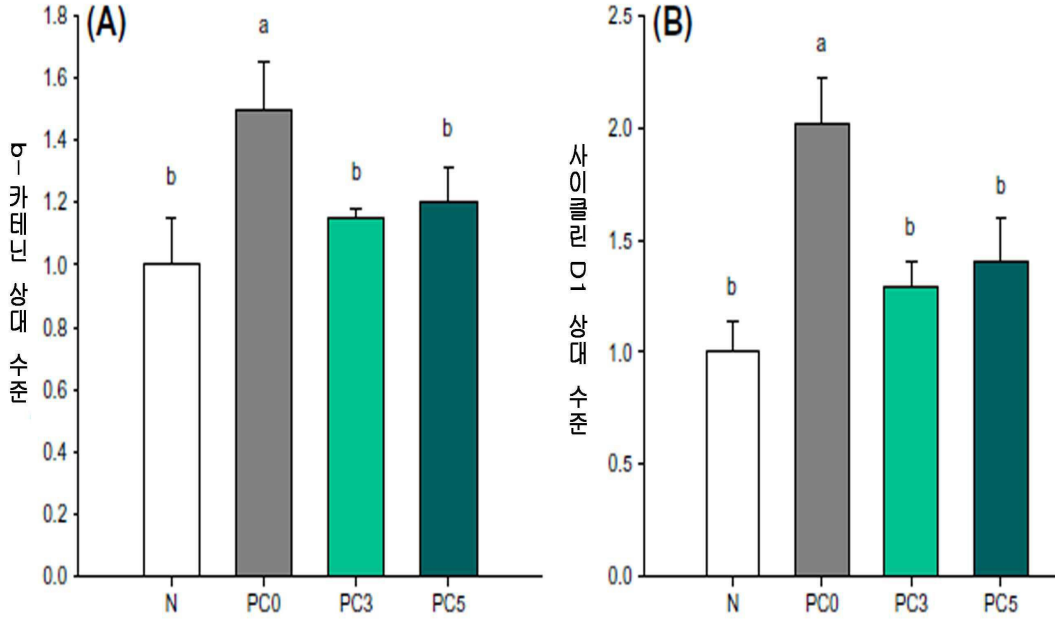
도면1



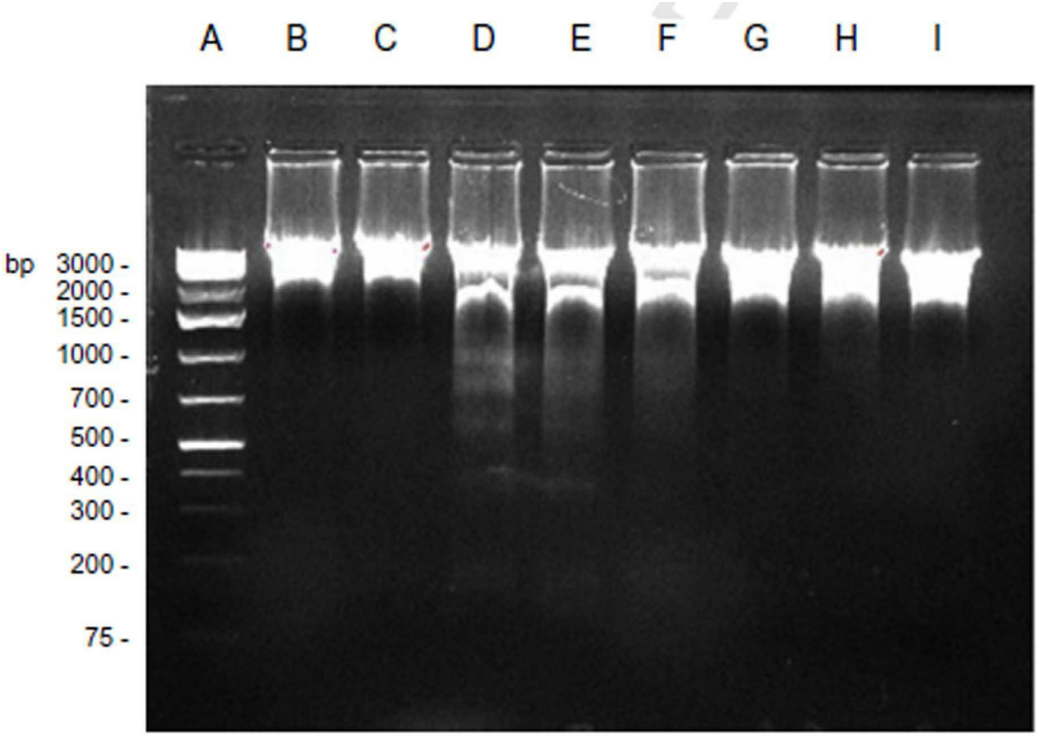
도면2



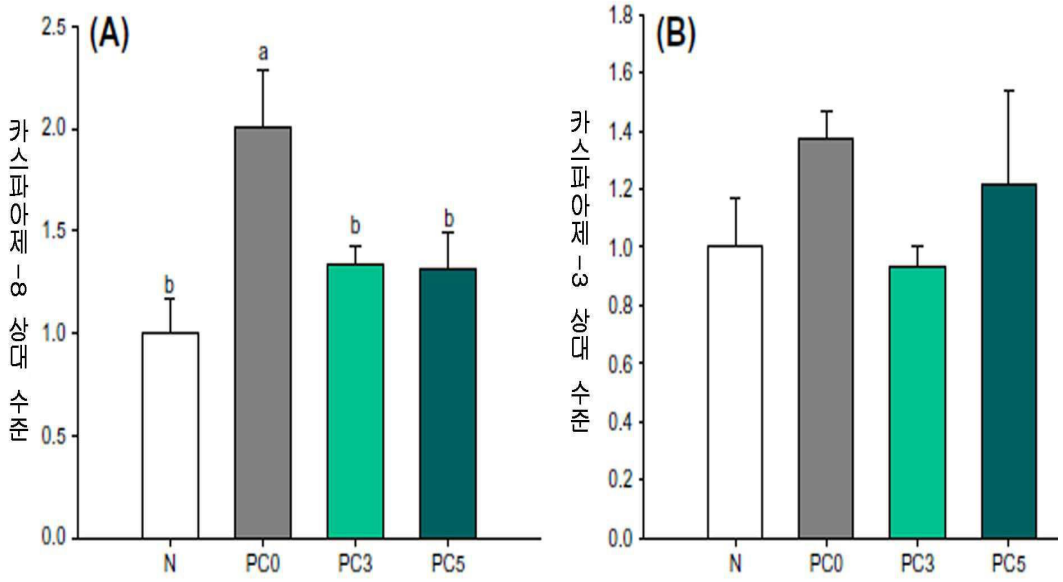
도면3


(A)
β-카테닌 상대 수준
1.8
1.6
1.4
1.2
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
a
b
b
b
N
PC0
PC3
PC5
(B)
사이클린 D1 상대 수준
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
a
b
b
b
N
PC0
PC3
PC5

도면4


A
B
C
D
E
F
G
H
I
bp
3000 -
2000 -
1500 -
1000 -
700 -
500 -
400 -
300 -
200 -
75 -

도면5


(A)
카스파아제-8 상대 수준
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
a
b
b
b
N
PC0
PC3
PC5
(B)
카스파아제-3 상대 수준
1.8
1.6
1.4
1.2
1.0
0.8
0.6
0.4
0.2
0.0
N
PC0
PC3
PC5