



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2012-0021450
(43) 공개일자 2012년03월09일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C07K 14/46 (2006.01) *A61K 38/17* (2006.01)

A61P 39/06 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2010-0074373

(22) 출원일자 2010년07월30일

심사청구일자 2010년07월30일

(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, 협성앰파
이어 아파트 101동 2703호 (광안동, 광안)

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

이덕록

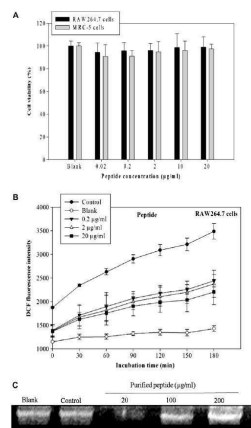
전체 청구항 수 : 총 2 항

(54) 발명의 명칭 나일 틸라피아로부터 분리된 항산화 펩티드 및 이를 포함하는 항산화 조성물

(57) 요약

본 발명은 나일 틸라피아(*Oreochromis niloticus*)로부터 분리한 항산화 펩티드에 관한 것으로, 수산 산업의 부산물인 나일 틸라피아의 비늘의 젤라틴으로부터 분리, 정제한 우수한 항산화 활성을 나타내는 펩티드 및 이를 포함하는 항산화 조성물을 제공한다.

대표도 - 도5



(72) 발명자

다이-홍 엔고

부산광역시 남구 용소로 45, 대연캠퍼스 해양바이
오프로세스연구단 (대연동, 부경대학교)

중-지 첸

부산광역시 남구 용소로 45, 대연캠퍼스 해양바이
오프로세스연구단 (대연동, 부경대학교)

특허청구의 범위

청구항 1

나일 틸라피아(Oreochromis niloticus) 비늘 젤라틴으로부터 분리된, 서열번호 1의 아미노산 서열을 갖는 항산화 펩티드.

청구항 2

제1항의 항산화 펩티드를 유효성분으로 포함하는 항산화 조성물.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 나일 틸라피아(Oreochromis niloticus)로부터 분리한 항산화 펩티드에 관한 것으로 더욱 상세하게는 나일 틸라피아 비늘 젤라틴으로부터 분리된 항산화 펩티드 및 이를 포함하는 항산화 조성물에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 산화 스트레스는 모든 주요 세포 성분의 손상에 원인이 되므로 조직에서 과도하게 발생하는 활성산소(reactive oxygen species; ROS)는 세포사를 야기한다. 게다가, ROS는 세포성 생체물질의 산화와 직접적 및 간접적 관계를 가지며 신경퇴행성, 고혈압, 염증, 당뇨, 암 및 노화와 같은 많은 건강상 장애에 관련되어 있다(Calabrese, V., Lodi, R., Tonon, C., D'Agata, V., Sapienza, M., Scapagnini, G., Mangiameli, A., Pennisi, G., Giuffrida Stella, A.M., Butterfield, D.A. (2005). Oxidative stress, mitochondrial dysfunction and cellular stress response in Friedrich's ataxia. Journal of the Neurological Sciences, 233, 145-162; Je, J. Y., Park, P. J., & Kim, S. K. (2004). Free radical scavenging properties of hetero-chitoooligosaccharides using an ESR spectroscopy. Food and Chemical Toxicology, 42, 381-387). 따라서, 유해한 효과를 갖는 산화를 저해하기 위해 식물, 동물, 미생물 및 식품과 같은 자연원을 사용하여 신규한 항산화 화합물을 발견하고자 하는 많은 연구가 이뤄지고 있다.

[0003] 몇몇 어류 젤라틴 가수분해물이 주목할만한 항산화, 항고혈압, 항암 및 항균 효과뿐만 아니라 염증-조절 및 콜레스테롤-저하 효과를 나타냄이 발견되었다. 최근에, 많은 연구에서 다양한 어류 젤라틴 가수분해물로부터 유래된 펩티드가 잠재적인 항산화제로서 작용함을 밝혀냈다. 이러한 연구들 중 림피쉬(lumpfish)(Osborne, K., Voight, M. N., & Hall, D. E. (1990). Utilization of lumpfish (Cyclopterus lumpus) carcasses for production of gelatin. In M. N. Voight & J. K. Botta (Eds.), Advances in fisheries technology and biotechnology for increased profitability (pp. 145-150). Lancaster, PA, USA: Technomic Publishing Co.), 흰붕장어(conger eel)(Kim, J. S., & Cho, S. Y. (1996). Screening for raw material of modified gelatin in marine animal skins caught in coastal offshore water in Korea. Agricultural and Chemical Biotechnology, 39, 134-139), 대구(Gudmundsson, M., & Hafsteinsson, H. (1997). Gelatin from cod skins as affected by chemical treatments. Journal of Food Science, 62, 37-39), 상어(Yoshimura, K., Terashima, M., Hozan, D., Ebato, T., Nomura, Y., Ishii, Y., & Shirai, K. (2000). Physical properties of shark gelatin compared with pig gelatin. Journal of Agricultural Food Chemistry, 48, 2023-2027), 광어(megrim)(Sarabia, A. I., Gomez-Guillen, M. C., Solas, M. T., & Montero, P. (2001). Effect of microbial transglutaminase on the functional properties of megrim (Lepidorhombus boscii) skin gelatin. Journal of the Science of Food and Agriculture, 81, 665-673), 틸라피아(tilapia)(Jamilah, B., & Harvinder, K. G. (2002). Properties of gelatins from skins of fish-black tilapia (Oreochromis mossambicus) and red tilapia (Oreochromis nilotica). Food Chemistry, 77, 81-84), 대구류(Pollack)(Je, J. Y., Park, P. J., & Kim, S. K. (2005). Antioxidant activity of a peptide isolated from Alaska pollack (Theragra chalcogramma) frame protein hydrolysate. Food Research International, 38, 45-50) 및 참치(Cho, S. M., Gu, Y. S., & Kim, S. B. (2005). Extracting optimization and physical properties of yellowfin tuna (Thunnus albacares) skin gelatin compared to mammalian gelatins. Food Hydrocolloids, 19, 221-229)로부터 추출한 어류 젤라틴이 널리 연구되고 있다.

[0004] 틸라피아는 담수 수산양식에서 중요한 어종으로 잉어 및 연어류 다음으로 3번째로 가장 널리 양식되고 있다. 틸라피아 양식은 1990년에 383,654 메트릭톤에서 2002년에 1,505,804 메트릭톤으로 증가되었으며 양식 틸라피아의 가치 또한 1984년에 US\$154,000,000달러에서 2002년에 US\$1,800,000,000달러로 증가되었다. 이와 같이 수산 양식 규모가 성장함에 따라 수산 가공 공정에서 어육을 발라내는 펠렛 작업으로부터 남은 부산물인 어류의 피부 및 뼈가 대량 발행하고 있으므로 이의 폐기또는 처리가 새로운 문제로 대두되고 있다. 어류의 피부 및 뼈는 콜라겐을 많이 함유하고 있으며 이를 젤라틴 생산에 사용할 수 있는데, 이 젤라틴으로부터 항산화 물질과 같은 새로운 물질을 분리하고자 하는 연구가 더욱 요구되고 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0005] 본 발명은 상기와 같은 점들을 감안하여 안출한 것으로, 수산 산업의 부산물인 나일 틸라피아의 비늘의 젤라틴으로부터 분리, 정제한 우수한 항산화 활성을 나타내는 펩티드 및 이를 포함하는 항산화 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

[0006] 본 발명의 상기 목적은 나일 틸라피아 비늘의 젤라틴을 효소적으로 가수분해하고 이들로부터 항산화 활성이 높은 펩티드를 이온교환 크로마토그래 및 HPLC로 정제하여 아미노산 배열을 결정함으로써 신규한 항산화 펩티드를 분리하였으며, 이의 자유 라디칼 소거능 및 라디칼-매개 DNA 손상 저해 효과를 측정하여 항산화 활성을 확인함으로써 달성하였다.

발명의 효과

[0007] 본 발명은 수산 가공 산업에서 부산물로 취급되는 나일 틸라피아 비늘의 젤라틴으로부터 우수한 항산화 활성을 갖는 펩티드를 분리하여 생산함으로써, 비용 및 효능 면에서 뛰어난 효과가 있다.

도면의 간단한 설명

[0008] 도 1은 RAW 264.7 세포 (A) 및 MRC-5 세포 (B)의 생존도에 대한 젤라틴 가수분해물의 세포독성 효과를 나타낸 그래프이다.

도 2의 (A)는 발생된 H_2O_2 를 검출하는 DCFH-DA에 의해 측정된 세포의 세포내 ROS 발생 수준을 나타낸 것이다. 결과는 3회의 독립적 실험의 평균 $\pm$ 평균오차로 나타났다. (B)는 알칼라아제-유래 가수분해물에 의한 DNA 산화성 손상 보호를 나타낸 것이다.

도 3의 (A)는 HiPrep 16/10 DEAE FF 이온-교환 컬럼 상에 로딩된 가수분해물(2 ml)의 FPLC 크로마토그램(상위 패널) 및 ESR 분광법에 의해 측정된 자유 라디칼에 대한 이의 항산화 활성(하위 패널)을 나타낸 것이다. (B)는 항산화 펩티드의 정제 시의 RP-HPLC (Primesphere 10 C_{18} 컬럼) 크로마토그램을 나타낸 것이다

도 4는 ESI 소스와 TOF-MS/MS를 사용한 정제된 펩티드의 분자량 및 아미노산 서열 확인을 나타낸 것이다. 활성 펩티드의 서열결정은 50-2500의 m/z 범위로 이루어졌으며 PepSeq denovo sequencing algorithm을 사용하여 서열결정하였다.

도 5의 (A)는 RAW 264.7 세포 및 MRC-5 세포의 생존도에 대한 정제된 펩티드의 세포독성 효과를 나타낸 것이다. 결과는 3회의 독립적 실험의 평균 $\pm$ 평균오차로 나타났다. (B)는 발생된 H_2O_2 를 검출하는 DCFH-DA에 의해 측정된 세포의 세포내 ROS 발생 수준을 나타낸 것이다. 결과는 3회의 독립적 실험의 평균 $\pm$ 평균오차로 나타났다. (C)는 정제된 펩티드에 의한 DNA 산화성 손상 보호를 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0009] 젤라틴은 Geltech Co.(Busan, South Korea)에서 구입하였다. 형광 프로브 2',7'-디클로로플루오레신 디아세테이트(DCFH-DA)는 Molecular Probes Inc.(Eugene, OR, US)에서 구입하였으며 알칼라아제는 Novozymes Co.(Bagsvaerd, Denmark)에서 구입하였다.

[0010] 1,1-디페닐-2-피크릴히드라질(DPPH), 5,5-디메틸-1-피롤린 N-옥사이드 (DMPH), FeSO_4 , H_2O_2 , 리보플라빈 및 EDTA와 같은 라디칼 시험용 화합물 및 MTT (3-(4,5-디메틸-2-일)-2,5-디페닐테트라졸리움 브로마이드), 아가로스, 우태아혈청 (FBS), 프로나아제 E, 펩신 및 트립신은 Sigma Chemical Co.(St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다.

[0011] 마우스 대식세포(RAW 264.7) 인간 폐 섬유아세포 (MRC-5) 세포주는 ATCC(American Type Culture Collection)(Manassas, VA, USA)에서 입수하였다. DMEM(Dulbecco's Modified Eagle medium), 페니실린/스트렙토마이신 및 그의 세포배양에 필요한 물질은 Gibco BRL, Life Technologies(Grand Island, NY, USA)로부터 입수하였다. 그의 모든 시약들은 시판되는 가장 높은 등급의 것이다.

[0012] 실시예 1. 효소적 가수분해물의 제조

[0013] 나일 틸라피아(O. niloticus) 비늘 젤라틴으로부터 생활성 펩티드를 추출하기 위해, 최적 조건 하에서 다양한 시판 효소(알칼라아제, 프로나아제 E, 펩신 및 트립신)를 사용하여 효소적 가수분해를 실시하였다. 1/100(w/w)의 비율로 1% 기질에 효소를 혼합하였다. 혼합물을 각 최적 온도 하에서 교반하면서 4시간 동안 배양한 후 끓는 물 수조에서 10분간 가열하여 효소를 불활성화시켰다. 동결건조된 가수분해물을 -80°C 에서 사용 전까지 보관하였다.

[0014] 실시예 2. 항산화 펩티드의 정제 및 서열결정

[0015] 이온 교환 크로마토그래피

[0016] 항산화 펩티드를 HiPrep 16/10 DEAE FF 이온-교환 컬럼 (1.6 x 10 cm, Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, USA) 상에서 FPLC(fast protein liquid chromatography) (FPLC AKTA, Amersham Bioscience Co., Uppsala, Sweden)를 사용하여 효소적 가수분해물로부터 정제하였다. 가수분해물을 20 mM 아세트산나트륨 완충용액 (pH 4.0)으로 평형화시킨 HiPrep 16/10 DEAE FF 이온-교환 컬럼 상에 부하시키고, 62 ml/h 유속으로 동일 완충용액에서 NaCl (0-2 M)의 선형구배로 용출시켰다. 각 분획을 280 nm에서 확인하고, 4 ml 부피로 수집하고 회전 증발기를 사용하여 농축시켰다; 항산화 활성 또한 확인하였다. 강한 항산화 분획을 동결건조하고 이온 교환 크로마토그래피를 다음 단계로서 사용하였다.

[0017] HPLC(High performance liquid chromatography)

[0018] 항산화 활성을 나타내는 분획을 2 ml/분의 유속으로 0.1% 트리플루오로아세트산(TFA)을 함유하는 아세토니트릴의 선형 구배(0-40%, 40분)로 Primesphere 10 C18 (10mm ϕ 250 mm, Phenomenex, Cheshire, England) 컬럼 상에서 역-상 고성능 액체 크로마토그래피 (RP-HPLC, Dionex Korea Ltd., Sunnyvale, CA, USA)를 사용하여 추가 정제하였다. 용출 피크를 215 nm에서 검출하고, 활성 피크를 회전 증발기를 사용하여 농축시켰다. 활성 피크 (표적 피크, 데이터는 나타내지 않음)를 폴링하여 즉시 동결건조시켰다. 분석 컬럼으로부터의 활성 분획을 1.2 ml/분의 유속으로 0.1% 트리플루오로아세트산(TFA)을 함유하는 아세토니트릴의 선형 구배(15%, v/v, 20분)로 SynChropak RPP-100 컬럼 (4.6mm ϕ 250 mm, SynChrom, Inc., Lafayette, Indiana, USA) 상에 추가로 적용시켰다. 마지막으로, 나일 틸라피아 (O. niloticus) 비늘 젤라틴의 알칼라아제-분해로부터 정제된 펩티드를 이의 아미노산 서열로 분석하였다.

[0019] 아미노산 서열 결정

[0020] 정제된 펩티드의 정확한 분자량 및 아미노산 서열을 전자분무 이온화(ESI; electrospray Ionization) 소스와 함께 Q-TOF 질량분석기(Micromass, Altrincham, UK)를 사용하여 확인하였다. 정제된 펩티드를 메탄올/물 (1:1, v/v)에 용해시킨 후에 전자분무 소스 내로 개별적으로 주입시키고 이의 분자량을 질량 스펙트럼에서 이중 전하 ($M + 2H$)+2 상태에 의해 결정하였다. 분자량 결정 후에, 펩티드는 단편화를 위해 자동적으로 선택되었으며, 서열 정보를 이중 MS 분석에 의해 입수하였다.

[0021] 자유 라디칼 소거능을 고려하여, 알칼라아제-유래 가수분해물을 항산화 펩티드의 정제 및 확인에 사용하였다. 우선, 알칼라아제-유래 가수분해물을 아세트산나트륨 완충용액(20 mM, pH 4.0)에 20 mg/ml로 용해시키고 FPLC를 사용하여 NaCl의 선형구배(0-2M)로 HiPrep 16/10 DEAE FF 이온-교환 컬럼 상에 로딩시켰다. 용출 피크를 280 nm에서 확인하고 세 부분으로 분획화시킨 후 이들의 항산화 활성을 자유 라디칼을 소거능을 사용하여 측정하였다(도 3A). 분획 3은 각각 72.04%, 42.80% 및 18.03%로 히드록시, DPPH 및 과산화 라디칼을 제지하였다. 강한 라디칼 소거능을 갖는 분획 3을 동결건조시키고 아세토니트릴의 선형 구배(0-40%)를 사용하여 Primesphere 10 C₁₈ 컬럼 상에서 RP-HPLC를 실행하였다. 각 분획을 풀링하고 동결건조한 후 항산화 활성을 측정하였다. 활성 분획을 분석적 HPLC 컬럼 상에 최종적으로 정제하고 Q-TOF ESI 질량분석법으로 Asp-Pro-Ala-Leu-Ala-Thr-Glu-Pro-Asp-Pro-Met-Pro-Phe(1382.57 Da)를 결정하였다(도 4). 아미노산 서열에서 프롤린, 알라닌 및 아스파르트산이 각각 4, 2 및 2회 발견되었다.

[0022] 실시예 3. 전자스핀공명(Electron spin resonance; ESR) 분광법 검정

[0023] DPPH 라디칼에서의 소거능

[0024] DPPH 라디칼 소거능을 Nanjo등의 문헌(Nanjo, F., Goto, K., Seto, R., Suzuki, M., Sakai, M., & Hara, Y. (1996). Scavenging effects of tea catechins and their derivatives on 1,1,-diphenyl-2-picrylhydrazyl radical. Free Radical Biology and Medicine, 21, 895-902)에 기재된 방법을 사용하여 측정하였다. 30 μ l의 시료 용액(또는 대조군으로 증류수)를 메탄올 용액에 용해된 30 μ l의 DPPH(60 μ M)에 첨가하였다. 10초간 강하게 혼합한 후, 용액을 50 μ l 석영 모세관으로 옮기고 DPPH 라디칼에서 가수분해물의 소거능을 JES-FA ESR 분광계(JEOL Ltd., Tokyo, Japan)를 사용하여 측정하였다. 스핀 부가물을 ESR 분광계로 정확히 2분 후에 측정하였다. 분광계를 다음과 같이 설정하였다: 자기장, 336.5 $\pm$ 5 mT; 파워, 5 mW; 변조 주파수, 9.41 GHz; 진폭, 1 x 1000; 변조 폭, 0.8 mT; 스위프(sweep) 폭, 10 mT; 스위프 시간 30초. DPPH 라디칼 소거능을 하기 식에 따라 계산하였다. H 및 H₀은 각각 시료 존재 및 시료 부재시의 라디칼 시그널의 상대적 피크 높이를 나타낸다.

[0025] 라디칼 소거능 (%) = (H₀-H)/H₀ x 100%

[0026] 히드록시 라디칼 소거능

[0027] 히드록시 라디칼을 펜톤 반응(Fenton reaction)으로 생성하고 DMPO nitron spin trap(Rosen & Rauckman, 1984)를 사용하여 수집하였다. 결과적으로 생산된 DMPO-OH 부가물을 ESR 분광계로 검출하였다. 시료 용액(15 μ l)를 인산염 완충용액(pH 7.4)에서 DMPO(0.3M, 15 μ l), FeSO₄(10 mM, 15 μ l) 및 H₂O₂(10 mM, 15 μ l)와 혼합한 후 50 μ l 석영 모세관에 옮겼다. 2.5분 후에 ESR 스펙트럼을 ESR 분광계를 사용하여 측정하였다. 분광계를 다음과 같이 설정하였다: 자기장, 336.5 $\pm$ 5 mT; 파워, 1 mW; 변조 주파수, 9.41 GHz; 진폭, 1 x 200; 변조 폭, 0.1 mT; 스위프(sweep) 폭, 10 mT; 스위프 시간 30초. 히드록시 라디칼 소거능을 하기 식에 따라 계산하였다. H 및 H₀은 각각 시료 존재 및 시료 부재시의 라디칼 시그널의 상대적 피크 높이를 나타낸다.

[0028] 라디칼 소거능 (%) = (H₀-H)/H₀ x 100%

[0029] 과산화물 라디칼 음이온 소거능

[0030] 과산화물 라디칼 음이온을 UV 방사능처리 리보플라빈/EDTA 시스템(Guo, Q., Zhao, B., Shen, S., Hou, J., Hu, J., & Xin, W. (1999). ESR study on the structure-antioxidant activity relationship of tea catechins and their epimers. Biochimica et Biophysica Acta, 1427, 13-23)으로 생성하였다. 0.3 mM 리보플라빈, 1.6 mM EDTA, 800 mM DMPO 및 지정농도의 시료를 포함하는 반응 혼합물을 365 nm에서 UV 램프 하에서 1분 동안 방사능 처리하였다. 반응 혼합물을 측정을 위해 ESR 분광계의 50 μ l 석영 모세관으로 옮겼다. 분광계를 다음과 같이

설정하였다: 자기장, 336.5 ± 5 mT; 파워, 10 mW; 변조 주파수, 9.41 GHz; 진폭, 1×1000 ; 변조 폭, 0.1 mT; 스위프(sweep) 폭, 10 mT; 스위프 시간 1분. 과산화물 라디칼 소거능을 하기 식에 따라 계산하였다. H 및 H_0 은 각각 시료 존재 및 시료 부재시의 라디칼 시그널의 상대적 피크 높이를 나타낸다.

[0031] 라디칼 소거능 (%) = $(H_0 - H) / H_0 \times 100\%$

[0032] **실시예 4. 젤라틴 가수분해물의 제조 및 이의 항산화 특성**

[0033] 젤라틴은 알칼라아제, 프로나아제 E, 펩신 및 트립신과 같은 다양한 효소로 순차적으로 가수분해하였다. 물질의 항산화 활성을 산화 시스템에서 자유 라디칼의 소거능을 실험하여 정확하게 구분할 수 있다. 그 결과, 가수분해물을 실시예 3에서와 같이 전자스핀공명 기술을 사용하여 DPPH, 히드록시 및 과산화 라디칼의 자유 라디칼 소거능을 평가하였다. 표 1에 나타난 바와 같이, 히드록시 라디칼의 소거능이 DPPH 및 과산화 라디칼보다 더 효과적이었다. 가수분해물 중에서, 알칼라아제-유도 과산화물이 다른 효소 가수분해물에 비해 가장 높은 항산화 활성을 나타냈다. DPPH, 히드록시 및 과산화 라디칼 소거에서 알칼라아제 가수분해물의 IC₅₀ (50% 라디칼 소거능에 대한 가수분해물 농도)수치는 각각 660 ± 0.40 , 263 ± 0.31 및 720 ± 0.35 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 이었다. 가수분해 반응은 단백질 분자의 물리학적 구조 뿐만 아니라 효소 공격이 집중되는 민감성 펩티드 결합의 유효성에 기인한다 (Diniz and Martin, 1998). 알칼라아제는 *Bacillus licheniformis*로부터 제조된, 산업적으로 사용되는 알칼리 프로테아제로 활성 부위에서 아미노산 중 하나가 세린이다. 펩티드 결합에 대한 다소 광범위한 범위의 특이성을 갖고 있어 천연 단백질을 가수분해하는데 사용될 때 항산화 펩티드의 생산을 야기할 수 있어 생활성 펩티드를 생산할 수 있다. 알칼라아제에 의해 생성된 생활성 펩티드는 펩신, 트립신 및 프로나아제 E와 같은 분해 효소에 저항성을 가지고 있어 이러한 부류의 가수분해물이 존재할 때 흡수된다. 게다가, 관련 연구에서 알칼라아제가 항산화 활성을 포함하는 다양한 생활성에 반응하는 말단 아미노산 서열 뿐만 아니라 좀 더 짧은 펩티드를 생산함을 명확하게 나타내고 있다.

표 1

[0034] DPPH, 히드록시 및 과산화물 라디칼을 소거하는 가수분해물의 IC₅₀ 수치

가수분해물	IC ₅₀ ($\mu\text{g}/\text{ml}$) ^a		
	DPPH	히드록시	과산화물
알칼라아제	660 ± 0.40	263 ± 0.31	720 ± 0.350
프로나아제 E	1020 ± 0.13	500 ± 0.05	740 ± 0.002
트립신	860 ± 0.42	320 ± 0.30	720 ± 0.440
펩신	920 ± 0.24	420 ± 0.12	1150 ± 0.500

[0035] ^a 각각의 라디칼 ESR 신호 강도의 50%를 저해하는데 필요한 가수분해물의 농도

[0036] **실시예 5. 정제된 펩티드의 자유 라디칼에 대한 직접 소거 효과**

[0037] 실시예 3과 같은 ESR 기술을 사용하여 다른 자유 라디칼원에 대한 정제된 펩티드의 자유 라디칼 소거 효과를 실험하였다. DPPH는 정적인 자유 라디칼이며 전자 또는 수소 라디칼을 받아들여 정적인 반자성 분자가 된다. 따라서, DPPH는 항산화물의 효능을 평가하기 위해 기질로서 주로 사용된다. 히드록시 라디칼은 펜톤 작용에서 생성되며 ESR 분광계에 의해 시각화되었다. ESR 신호는 *OH에 대하여 DMPD와 경쟁하는 *OH 스캐빈저의 존재에 의해 저해되었다. 과산화물 라디칼은 리보플라빈/EDTA 용액의 UV 조사에 의해 발행하였다. 표 2에 나타난 바와 같이, 펩티드는 각각 7.56, 8.82 및 17.83 μM 의 IC₅₀ 수치로 히드록시, DPPH 및 과산화물 라디칼을 소거하였다. 항산화 펩티드는 다른 라디칼보다 히드록시 라디칼에 대해 좀더 역동적이었다. 히드록시 라디칼의 화학 반응성은 ROS 중에서 가장 강하였다. 이는 아미노산, 단백질 및 DNA와 같은 생체분자와 쉽게 반응한다. 결과적으로, 히드

록시 라디칼의 제거는 다른 질병에 대항하는 생체의 가장 효과적인 방어책 중 하나일 것이다. 티로신, 메티오닌, 리신 및 트립토판과 같은 여러 아미노산이 몇몇 경우에서 친-산화 효과를 나타냄에도 불구하고 (Marcuse, R. (1962). The effect of some amino acids on the oxidation of linoleic acid and its methyl ester. Journal of the American Oil Chemists' Society, 39, 97-103; Yamaguchi, N. (1971). Studies on antioxidative activities of amino compounds on fats and oils. Part I. Oxidation of methionine during course of autoxidation of linoleic acid. Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi, 18, 313-318) 일반적으로 항산화 화제로서 받아들여지고 있다. 많은 항산화 펩티드가 펩티드의 N-말단에 발린 또는 루이신과 같은 소수성 아미노산 잔기를 포함한다고 알려져 있다 (Chen, H. M., Muramoto, K., & Yamauchi, F. (1995). Structural analysis of antioxidative peptides from soybean b-conglycinin. Journal of Agricultural Food and Chemistry, 43, 574-578; Uchida, K., & Kawakishi, S. (1992). Sequence-dependent reactivity of histidine-containing peptides with copper(II)/ascorbate. Journal of Agricultural and Biological Chemistry, 40, 13-16). 나일 틸라피아 (*O. niloticus*) 비늘 젤라틴으로부터의 펩티드는 소수성 아미노산이 풍부하다 (>69%). 사실, 젤라틴 펩티드 서열에 방향족 아미노산이 소량 존재하며 글리신 및 프롤린이 풍부하다. 그러므로, 히드록시, DPPH 및 과산화물 라디칼에 대한 나일 틸라피아 (*O. niloticus*) 비늘 젤라틴 단백질의 관찰된 강력한 소거 활성이 알라닌, 프롤린, 발린 및 루이신과 같은 비-방향족 아미노산에 기인한 것일 수 있다 (Mendis, E., Rajapakse, N., Byun, H. G., & Kim, S. K. (2005a). Investigation of jumbo squid (*Dosidicus gigas*) skin gelatin peptides for their in vitro antioxidant effects. Life Sciences, 77, 2166-2178 ;Mendis, E., Rajapakse, N., & Kim, S. K. (2005b). Antioxidant properties of a radical scavenging peptide purified from enzymatically prepared fish skin gelatin hydrolysate. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 53, 581-587).

[0038] 실시예 6. 세포 배양 및 생존도 확인

[0039] MRC-5 세포 및 RAW 264.7 세포를 37°C에서 5% (v/v) FBS, 100µg/ml 페니실린-스트렙토마이신 및 5% CO2를 포함하는 DMEM 배지에 배양하였다.

[0040] 세포에서 시료의 세포독성 수준을 Hansen 등의 문헌(Hansen, M. B., Nielsen, S. E., & Berg, K. (1989). Re-examination and further development of a precise and rapid dye method for measuring cell growth/cell kill. Journal of Immunological Methods, 119, 203-210)에 기재된 바와 같은 MTT 방법을 사용하여 측정하였다. 세포를 5×10^3 세포/웰의 밀도로 96-웰 플레이트에 배양하였다. 24시간 후에 세포를 신선한 배지로 세척하고 다른 농도의 시료를 처리하였다. 48시간 배양 후에 세포를 재세척하고 50 µl MTT (5 mg/ml)를 첨가하고 4시간 동안 배양하였다. 마지막으로 200µl 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.

[0041] MRC-5 및 RAW 264.7 세포를 다른 농도의 젤라틴 가수분해물로 처리하여 추가 실험을 위한 비-세포독성 농도를 상기 방법을 통해 결정하였다. 세포 생존도 데이터는 젤라틴 가수분해물이 RAW 264.7 세포 (도 1A) 및 MRC-5 세포 (도 1B) 둘 다에서 비-세포독성임을 확인할 수 있었다. 이에 따라, 이러한 젤라틴 가수분해물을 추가 실험에 사용할 수 있음을 확인하였다.

[0042] MRC-5 및 RAW 264.7 세포를 다른 농도의 정제된 펩티드로 처리하여 추가 실험을 위한 비-세포독성 농도를 상기 방법을 통해 결정하였다. 세포 생존도 데이터는 정제된 펩티드가 RAW 264.7 세포 및 MRC-5 세포 둘 다에서 비-세포독성임을 확인할 수 있었다(도 5A). 그러므로, 이러한 젤라틴 가수분해물을 추가 실험에 사용할 수 있음을 확인하였다.

[0043] 실시예 7. DCFH-DA 표지를 사용한 ROS의 세포내 형성의 확인

[0044] ROS의 세포내 형성을 기질로서 산화 민감성 염료 DCFH-DA를 사용하여 Engelmann 등의 문헌(Engelmann, J., Volk, J., Leyhausen, G., & Geurtsen, W. (2005). ROS formation and glutathione levels in human oral fibroblasts exposed to TEGDMA and camphorquinone. Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials, 75B, 272-276)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 µM DCFH-DA로 표지하고 암실에서 20분간 유지시켰다. 세포 내로 자유롭게 투과되는 비-형광 DCFH-DA 염료는 세포내 에스테

라아제에 의해 2',7'-디클로로디하이드로플루오레세인(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 디클로로플루오레세인(DCF)의 형성을 485 nm의 여기 파장 및 528 nm의 방출파장에서 매 30분 마다 관독하였다(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.

[0045] 다른 효소로부터의 젤라틴 가수분해물 (알칼라아제, 프로테나아제 E, 트립신 및 펩신)은 도 2A에서 보여지는 바와 같이 대조(H₂O₂ 처리 및 비-젤라틴 가수분해물)에 비해 단지 30분간의 배양 후에도 자유 라디칼 소거 효과를 나타낸다. 가수분해물 중에서, 알칼라아제-유래 가수분해물이 다른 효소 가수분해물 중에서 가장 높은 자유 라디칼 소거 효과를 나타낸다. 이러한 결과는 이들의 항산화능이 다양한 농도의 젤라틴 가수분해물 (100, 200, 1000 μ g/ml) 및 그외 효소 가수분해물과는 상이함을 나타낸다. 알칼라아제로 처리된 젤라틴 가수분해물의 모든 실험 농도에서의 DNA 손상은 도 2B에서 나타난 바와 같이 DNA 크기에 기초하여 약 80% 저해되었다. 그러므로, 알칼라아제-유래 가수분해물이 RAW 264.7 세포에서 투여량-의존 및 시간-의존 방식으로 자유 라디칼을 소거시킴을 확인하였다.

[0046] 세포성 라디칼에 대한 펩티드의 직접적 소거 효과를 세포 환경에서 자유 라디칼을 소거하는 능력을 통해 확인하였다. 이를 위해, RAW 264.7 세포를 상기 기재된 바와 같은 DCFH-DA 형광 프로브로 표지하였다. DCFH-DA는 ROS(reactive oxygen species)에 대한 특이 프로브이다. 이 검정의 원리는 DCFH-DA가 세포막을 통해 확산되어 에스테라아제에 의해 효소적으로 가수분해되어 DCFH가 되고 ROS와 반응하여 형광 물질인 DCF를 형성하는 것이다. 세포를 DCFH-DA로 표지하고 DCFH가 세포 내부로 포획되도록 한 후 H₂O₂와 함께 30분간 배양했을 때, DCF 형광 강도의 급격한 증가는 세포내 라디칼에 의한 DCFH의 산화를 나타낸다 (도 5B). 3시간 동안 30분 마다 DCF 형광 강도의 확인으로 배양 시간에 따라 라디칼 매개 산화가 증가함을 나타냈다. 그러나, 정제된 펩티드로 전처리했을 때는 시간 경과에 따라 DCF 형광이 감소하였다. 다양한 농도의 정제된 펩티드 (0.2, 2, 및 20 μ g/ml)은 도 5B에 나타난 바와 같이 대조 (H₂O₂ 처리 및 비-펩티드)에 비해 단지 30분간의 배양 후에도 자유 라디칼 소거 효과를 나타냈다. 이러한 결과는 정제된 펩티드의 농도에 따라 항산화 효과가 변화하며 20 μ g/ml 농도의 정제된 펩티드의 자유 라디칼 소거 효과가 다른 실험 농도보다 더 높음을 나타낸다. 이에 따라, RAW 264.7 세포에서 펩티드가 투여량 및 시간 의존 방식으로 자유 라디칼을 소거함을 확인할 수 있었다.

[0047] 실시예 8. 게놈 DNA 분리

[0048] 고분자량 게놈 DNA를 약간 변형시킨 표준 페놀/프로테나아제 K 방법(sambrook & Russell, 2001)을 사용하여 RAW 264.7 세포로부터 추출하였다. 10 cm 배양접시에서 배양한 세포를 PBS로 2회 세척하고 10 mM EDTA를 함유하는 1 ml PBS 내로 긁어냈다. 원심분리한 후에 세포를 RNase(0.03 mg/ml), NaOAC(0.175 M), 프로타나아제 K(0.25 mg/ml) 및 SDS(6%)에 용해시켰다. 혼합물을 37°C에서 30분간 그리고 55°C에서 1시간 동안 배양하였다. 배양 후에 페놀/클로로포름/이소아밀 알코올알 1:1(v/v) 비율로 첨가하고 혼합물을 4°C에서 5분 동안 6000g로 원심분리하였다. 상층액을 100% 냉 에탄올과 1:1.5(v/v) 비율로 혼합하고 -20°C에서 15분간 유지시켰다. 12,000g에서 5분간 원심분리한 후 펠렛을 10 mM TE 완충용액(pH 7.5)에 용해시키고 DNA 순도를 260/280 nm에서 분광광도법으로 확인하였다. 추가로, 분리된 DNA를 0.04 M 트리스-아세트이트, 0.001 M EDTA 완충용액(pH 7.5)에서 1% 아가로스 겔 전기영동을 사용하여 정성분석하였다.

[0049] 실시예 9. 라디칼-매개 DNA 손상 확인

[0050] 과산화수소 매개 DNA 산화를 Milne 등의 문헌(Milne, L., Nicotera, P., Orrenius, S., & Burkitt, M. J. (1993). Effects of glutathione and chelating agents on copper-mediated DNA oxidation: Pro-oxidant and antioxidant properties of glutathione. Archives of Biochemistry and Biophysics, 304, 102-109)에 따라 확인하였다. 40 μ l DNA 반응 혼합물을 동일한 순서로 미리 결정된 농도의 실험 시료 (또는 대조로서 동일 부피

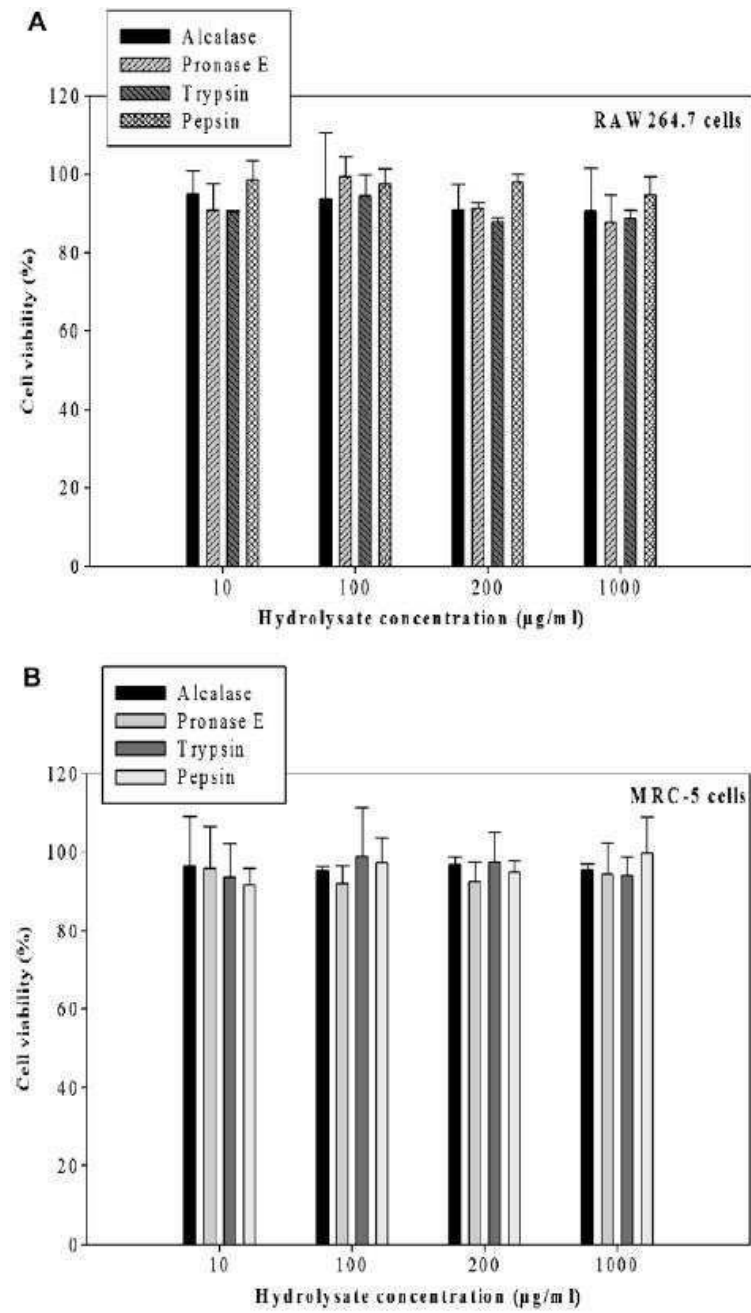
의 증류수), 100 μM 최종 농도의 FeSO_4 , 0.1 mM 최종 농도의 H_2O_2 및 5 μl 의 분리된 게놈 DNA를 첨가하여 준비하였다. 혼합물을 실온에서 10분 동안 배양하고 10 mM 최종 농도의 EDTA를 첨가하여 반응을 종결시켰다. 약 1 μg 의 DNA를 포함하는 분취량(20 μl)의 반응 혼합물을 100 V에서 1% 아가로스 겔에 40분 동안 전기영동시켰다. 그런 다음 겔을 1 mg/ml Et-Br(ethidium bromide)로 염색하고 AlphaEase gel image analysis software (Alpha Innotech, St. San Leandro, CA, USA)를 사용하여 UV광 하에서 시각화시켰다.

[0051]

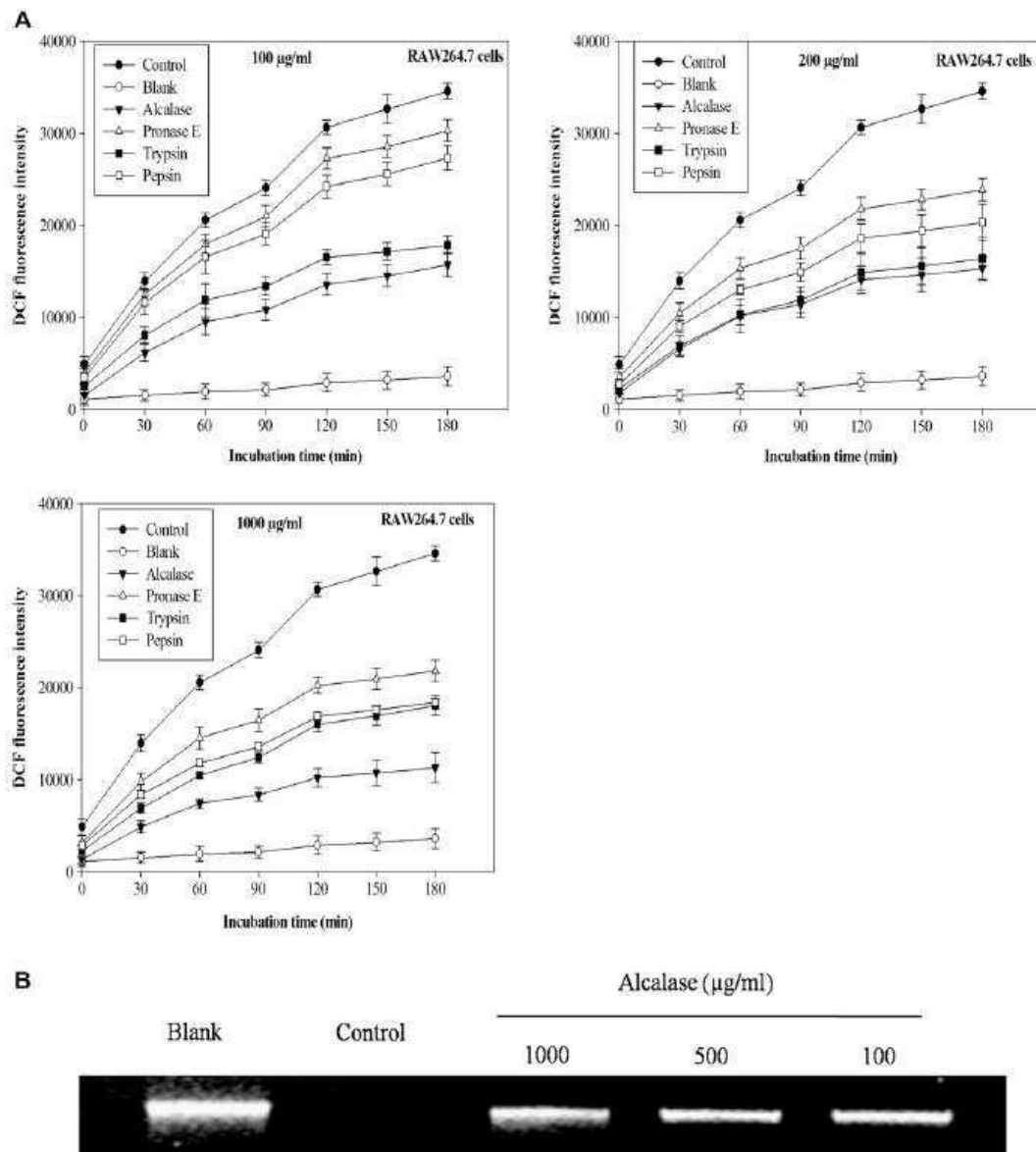
펜톤 반응에 의해 생산된 히드록시 라디칼 (*OH)은 DNA 가닥에 산화 손상을 발생시켜 DNA를 개방 환상 형태 또는 완화 형태로 만드는 것으로 알려져 있다 DNA 산화 손상에 대한 펩티드의 보호 효과를 확인하기 위해 게놈 DNA를 RAW 264.7 세포로부터 분리하였다. 이 실험에서 게놈 DNA의 완전성에 대한 100 μM FeSO_4 및 0.1 mM H_2O_2 의 조합 효과를 펩티드 존재 및 부재 하에서 DNA 전기영동하여 측정하였다. 10분간 반응시킨 후에, Fe (II)- H_2O_2 만을 처리한 대조군에서 거의 모든 DNA가 분해되었다. 이는 펩티드가 DNA의 산화 손상을 상당히 저해시킴을 나타내는 것이다 (도 5C). DNA 손상은 모든 실험 농도의 펩티드에 의해 DNA 밴드의 강도를 근거로 하였을 때 약 70% 저해되었다. 이러한 결과는 DNA가 Fe (II)/ H_2O_2 에 의해 발행한 *OH에 노출되었을 때 펩티드가 DNA의 산화 손상을 방지할 수 있음을 명확하게 설명해주는 것이다. Fe^{2+} 가 H_2O_2 의 전환을 촉매하며, 이는 생체 시스템에서 *OH의 생합성의 주요 경로이다. *OH는 퓨린 및 피리미딘 염기 및 디옥시리보스 골격을 포함하는 DNA 분자의 모든 성분과 반응하여 DNA 손상을 발생시킨다. 이러한 손상은 세포의 DNA에 대한 자유 라디칼 공격을 증가시키며, 이는 돌연변이, 암 및 노화에 관련된다. 그러나 본 발명의 펩티드는 생세포에서 DNA 산화에 대한 저해 효과를 나타내어 이러한 질환을 예방하는데 기여할 수 있다.

도면

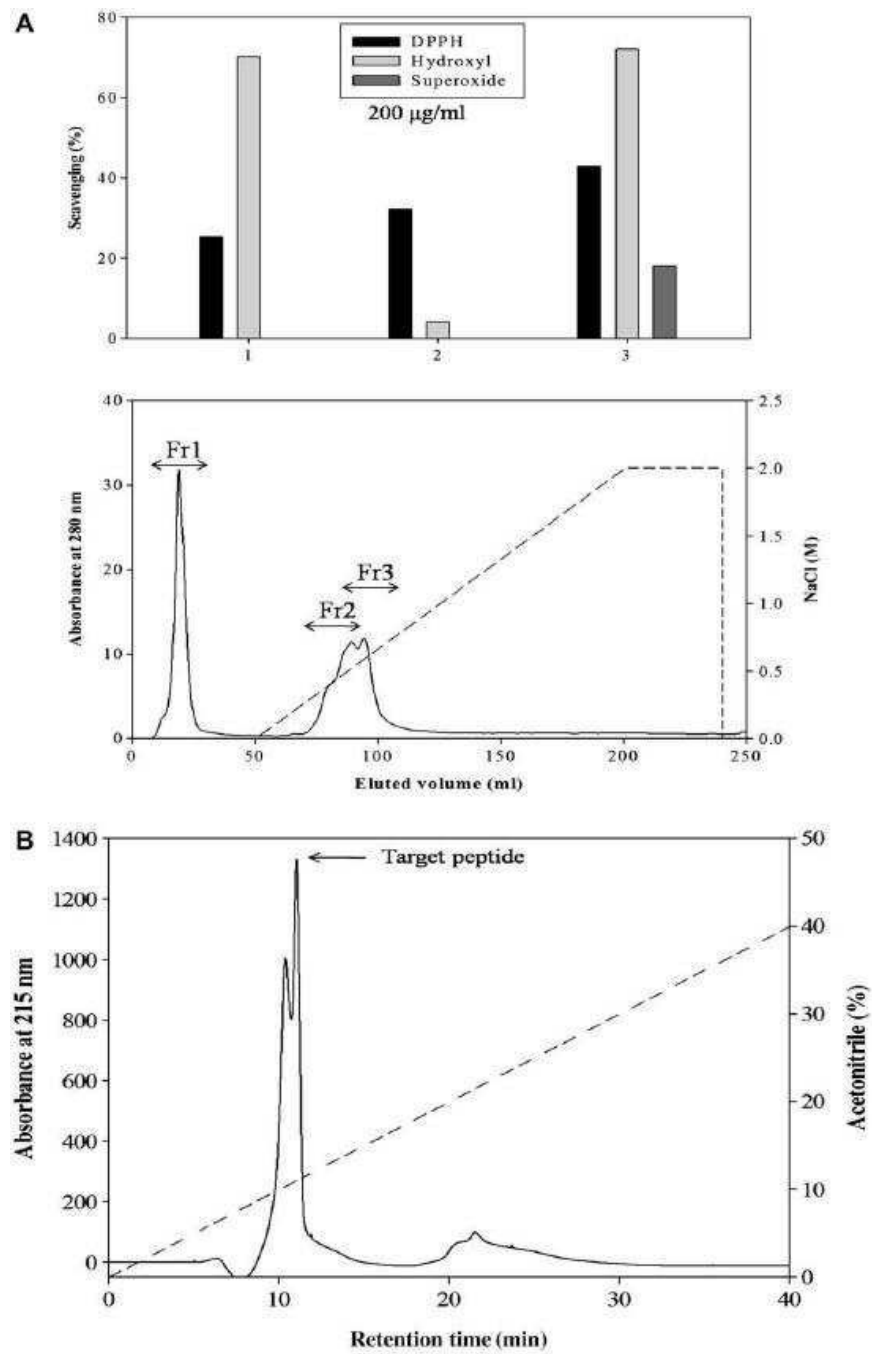
도면1



도면2

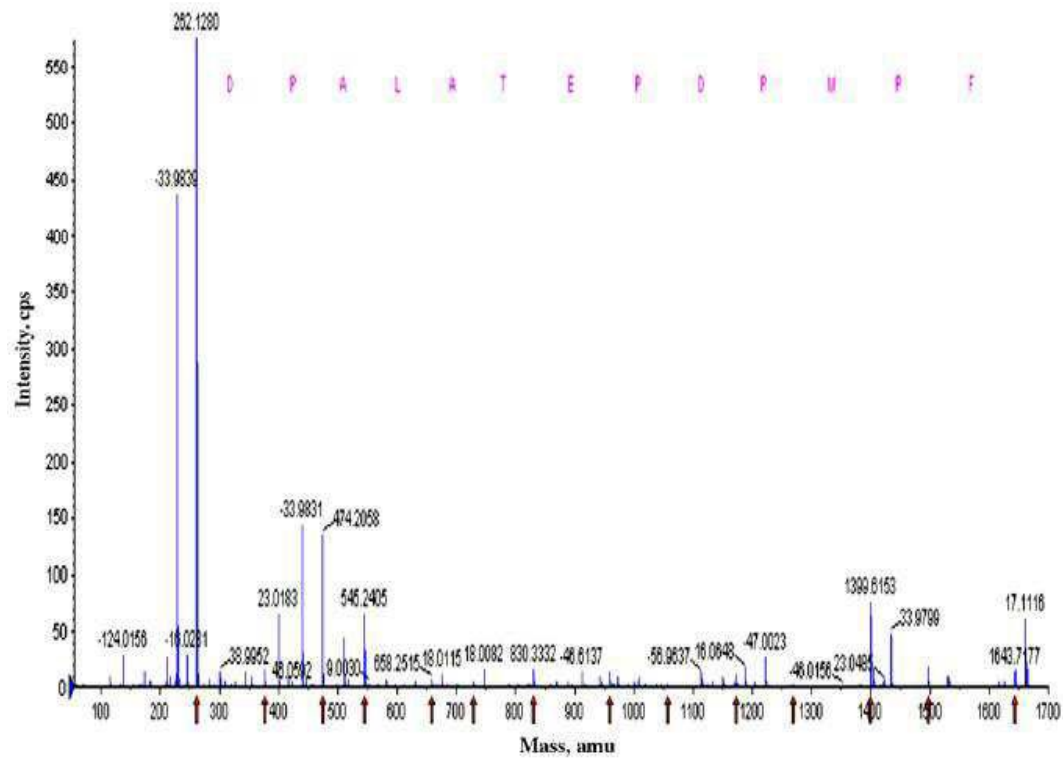


도면3

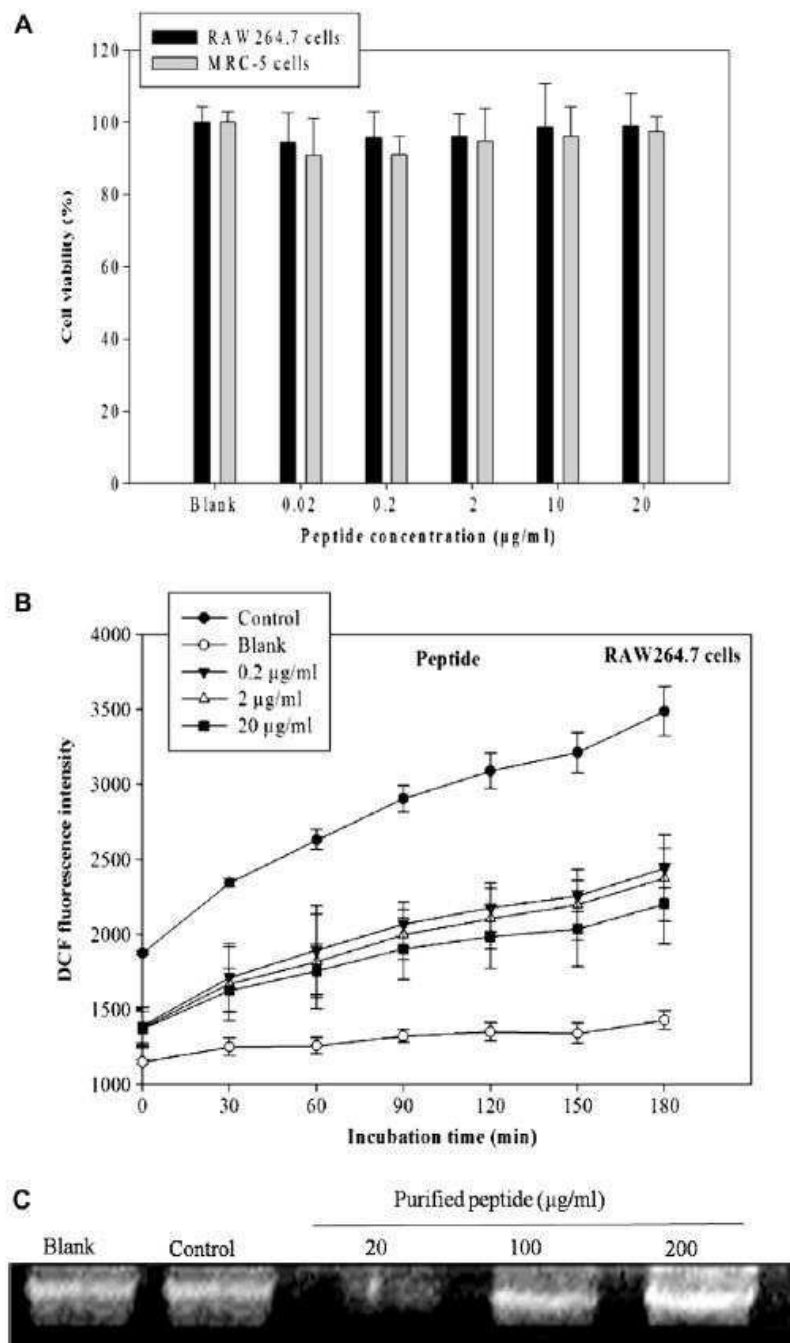


도면4

Sequence: Asp-Pro-Ala-Leu-Ala-Thr-Glu-Pro-Asp-Pro-Met-Pro-Phe (1,382.57 Da)



도면5



서열 목록

- <110> Pukyong National University Industry-University Cooperation Foundation
- <120> Antioxidant peptide isolated from Nile tilapia and antioxidant composition comprising of the same
- <160> 1
- <170> KopatentIn 1.71
- <210> 1

<211> 13

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220><223> peptide

<400> 1

Asp Pro Ala Leu Ala Thr Glu Pro Asp Pro Met Pro Phe

1

5

10