



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2012-0092735
(43) 공개일자 2012년08월22일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 36/05 (2006.01) A61P 9/12 (2006.01)

A61P 3/10 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2010-0134374

(22) 출원일자 2010년12월24일

심사청구일자 2010년12월24일

(71) 출원인

조선대학교산학협력단

광주광역시 동구 서석동 375 조선대학교 내

(72) 발명자

이중현

서울특별시 강남구 도곡로93길 12, 우성2차아파트
206동 903호 (대치동)

김현우

광주광역시 북구 중문로10번길 41-1 (우산동)

(74) 대리인

특허법인세신

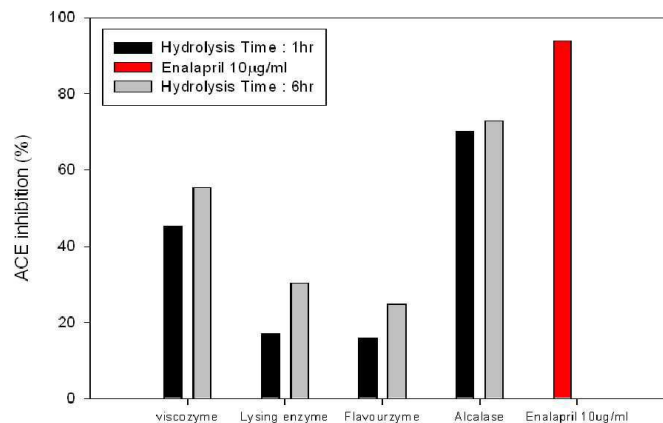
전체 청구항 수 : 총 8 항

(54) 발명의 명칭 **매생이 효소 처리 추출물, 이의 분획물 또는 이들의 혼합물을 함유하는, 안지오텐신 전환 효소 저해용, 항고혈압 또는 항당뇨 조성물**

(57) 요약

본 발명은 매생이를 다당류 분해 효소, 단백질 분해 효소 및 이들의 혼합물로 이루어진 군 중에서 선택되는 효소로 처리하여 얻은 매생이 효소 처리 추출물, 상기 매생이 효소 처리 추출물의 분획물과, 이들의 혼합물로 이루어진 군 중에서 선택되는 것을 유효 성분으로 함유하는, 안지오텐신 전환 효소 저해용, 항고혈압 또는 항당뇨 조성물에 관한 것이다.

대표도 - 도6



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	70007098
부처명	지식경제부
연구사업명	지역전략기획개발사업
연구과제명	매생이 기능성(항당뇨, 혈압강하) 물질 탐색 및 제품화
주관기관	조선대학교산학협력단
연구기간	2009.10.01 ~ 2012.09.30

특허청구의 범위

청구항 1

매생이를 다당류 분해 효소, 단백질 분해 효소 및 이들의 혼합물로 이루어진 군 중에서 선택되는 효소로 처리하여 얻은 매생이 효소 처리 추출물, 상기 매생이 효소 처리 추출물의 분획물과, 이들의 혼합물로 이루어진 군 중에서 선택되는 것을 유효 성분으로 함유하는, 안지오텐신 전환 효소 저해용 조성물.

청구항 2

매생이를 다당류 분해 효소, 단백질 분해 효소 및 이들의 혼합물로 이루어진 군 중에서 선택되는 효소로 처리하여 얻은 매생이 효소 처리 추출물, 상기 매생이 효소 처리 추출물의 분획물과, 이들의 혼합물로 이루어진 군 중에서 선택되는 것을 유효 성분으로 함유하는, 항고혈압 조성물.

청구항 3

매생이를 다당류 분해 효소, 단백질 분해 효소 및 이들의 혼합물로 이루어진 군 중에서 선택되는 효소로 처리하여 얻은 매생이 효소 처리 추출물, 상기 매생이 효소 처리 추출물의 분획물과, 이들의 혼합물로 이루어진 군 중에서 선택되는 것을 유효 성분으로 함유하는, 항당뇨 조성물.

청구항 4

제1항 내지 제3항 중 어느 하나의 항에 있어서, 상기 다당류 분해 효소는 셀룰라스트(Cellulast), 비스코자임(Viscozyme), 라이싱 엔자임(Lysing enzyme), 펙티넥스(pectinex), 셀룰레이즈(Cellulase), 아라바네이즈(Arabanase), 글루카네이즈(Glucanase) 및 이들의 혼합물로 이루어진 군 중에서 선택되는 것임을 특징으로 하는 조성물.

청구항 5

제1항 내지 제3항 중 어느 하나의 항에 있어서, 상기 단백질 분해 효소는 플라보르자임(Flavourzyme), 알칼라아제(Alcalase), 엔도프로테아제(Endo-Protease), 엑스포테아제(Exo-Protease), 엑소펩티데이즈(Exo-Peptidase) 및 이들의 혼합물로 이루어진 군 중에서 선택되는 것임을 특징으로 하는 조성물.

청구항 6

제 1항 내지 제3항 중 어느 하나의 항에 있어서, 상기 매생이 효소 처리 추출물의 분획물은 완충 용액, 염화나트륨 수용액 및 물로 이루어진 군 중에서 선택되는 용출 용매를 사용하여 겔 침투 크로마토그래피를 수행하여 얻은 것임을 특징으로 하는, 조성물.

청구항 7

제1항 내지 제3항 중 어느 하나의 항에 있어서, 상기 조성물은 약학 조성물인 것인 조성물.

청구항 8

제1항 내지 제3항 중 어느 하나의 항에 있어서, 상기 조성물은 식품 조성물인 것인 조성물.

명 세 서

기술 분야

본 발명은 매생이를 다당류 분해 효소, 단백질 분해 효소 및 이들의 혼합물로 이루어진 군 중에서 선택되는 효소로 처리하여 얻은 매생이 효소 처리 추출물, 상기 매생이 효소 처리 추출물의 분획물과, 이들의 혼합물로 이루어진 군 중에서 선택되는 것을 유효 성분으로 함유하는, 안지오텐신 전환 효소 (Angiotensin Converting Enzyme: ACE) 저해용, 항고혈압 또는 항당뇨 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0001]

- [0002] 우리나라의 해조류 생산량은 전체 수산물 생산량 중 대략 25%를 차지하는 대규모 수산 자원이지만, 이러한 해조류의 가공 방법은 주로 소건품, 자건품, 염장품, 조미 구이 제품 등 단순 가공 위주로만 이루어지고 있다.
- [0003] 또한, 국내 해조류를 이용한 기능성 식품 생산 산업은 개발 초기 단계로써 해조류를 이용한 건강 보조 식품 등의 상품화가 주로 벤처 기업 위주로 추진되고 있으며 대기업의 관련 분야 투자 및 연구는 매우 미미한 형편이다.
- [0004] 그러나, 최근 웰빙 식품 및 기능성 식품에 대한 관심이 확대되는 추세를 고려하면, 해조류 유래 당 생물학과 해조류 유래의 당 구조를 밝히고 합성 및 분해 방법을 다루는 당 화학, 탄수화물의 실용화를 연구하는 당 공학은 향후 해양 생명 공학의 첨단 분야가 될 것으로 인식된다.
- [0005] 매생이(*Capsosiphon fulvescens*, 별명: 매산, 매산태)는 녹조식물 문 (Chlorophyta), 갈파래 목, 갈파래 과, 매생이 속에 속하는 녹조류로서, 전세계에 분포한다. 크기는 15cm, 굵기는 2-5 mm로 몸은 짙은 녹색을 띠고 관상 대롱 모양이다. 일반적으로 이러한 매생이는 11월 중순에 어린 개체가 나타나고 2월에 가장 번식하여 암식 표면에 밀생하다가 4-5월에 소실한다. 즉, 매년 12월 내지 2월까지 생산되는 식품으로서 특유한 향기와 맛을 지니고 있어 오래 전부터 식용으로 애용되어 왔다. 이러한 매생이는 무기질과 비타민이 풍부하고 어린이의 성장 발육에 좋을 뿐 아니라 콜레스테롤을 저하하고 고혈압도 효과적으로 예방하는 해조류로 알려져 있다.
- [0006] 이러한 매생이는 이전에는 소량으로 생산되어 왔으나, 최근 생산량이 급격히 증가되고 있기에 매생이의 고부가가치화를 위한 해조류의 효율적인 활용, 고부가가치화 및 생리 기능성 소재 개발을 위하여 매생이의 건강 기능성에 관한 연구가 진행되고 있다.
- [0007] 나아가 이러한 매생이 구성 영양소에는 풍부한 당 성분이 포함되어 있으므로, 이러한 풍부한 당을 포함하는 매생이의 활용 분야가 새로운 기능성 분야 및 의약 적용 분야까지 확대되고 있다.
- [0008] 한편, ACE 활성은 고혈압 및 동맥경화증의 발생과 밀접하게 관련되기 때문에, ACE의 시험관 내 저해는 고혈압 및 동맥경화증의 치료제를 스크리닝하는데 이용되어 왔다. 합성 ACE 저해제는 매우 강력하며, 일반적으로 안전하지 않다고 고려되는 부작용을 가진다. 따라서, 부작용이 적은 천연물로부터의 ACE 저해제를 개발하여 의약품, 식품 소재로의 개발 가능성에 대한 수요가 커지고 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0009] 본 발명자들은 매생이의 다양한 추출물 중 특히 다당류 분해 효소 또는 단백질 분해 효소 및 이들의 혼합물로 이루어진 군 중에서 선택되는 효소로 처리하여 얻은 매생이 효소 처리 추출물, 상기 매생이 효소 처리 추출물의 분획물과, 이들의 혼합물의 안지오텐신 전환 효소 저해 효과, 항고혈압 및 항당뇨 효과가 우수한 것을 확인하여, 본 발명을 통하여 이들을 유효 성분으로 하는 안지오텐신 전환 효소 저해용, 항고혈압 또는 항당뇨 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

- [0010] 상기한 바와 같은 본 발명의 목적은, 매생이를 다당류 분해 효소, 단백질 분해 효소 및 이들의 혼합물로 이루어진 군 중에서 선택되는 효소로 처리하여 얻은 매생이 효소 처리 추출물, 상기 매생이 효소 처리 추출물의 분획물과, 이들의 혼합물로 이루어진 군 중에서 선택되는 것을 유효 성분으로 함유하는, 안지오텐신 전환 효소 저해용 조성물에 의하여 달성된다.
- [0011] 또한, 본 발명의 목적은, 매생이를 다당류 분해 효소, 단백질 분해 효소 및 이들의 혼합물로 이루어진 군 중에서 선택되는 효소로 처리하여 얻은 매생이 효소 처리 추출물, 상기 매생이 효소 처리 추출물의 분획물과, 이들의 혼합물로 이루어진 군 중에서 선택되는 것을 유효 성분으로 함유하는, 항고혈압 조성물에 의하여 달성된다.
- [0012] 또한, 본 발명의 목적은, 매생이를 다당류 분해 효소, 단백질 분해 효소 및 이들의 혼합물로 이루어진 군 중에서 선택되는 효소로 처리하여 얻은 매생이 효소 처리 추출물, 상기 매생이 효소 처리 추출물의 분획물과, 이들의 혼합물로 이루어진 군 중에서 선택되는 것을 유효 성분으로 함유하는, 항당뇨 조성물에 의하여 달성된다.
- [0013] 바람직하게는, 상기 다당류 분해 효소는 셀룰라라스트(Cellulast), 비스코자임(Viscozyme), 라이싱 엔자임(Lysing enzyme), 펙티넥스(pectinex) 셀룰레이즈(Cellulase), 아라바네이즈(Arabanase), 글루카네이즈

(Glucanase) 및 이들의 혼합물로 이루어진 군 중에서 선택될 수 있다.

- [0014] 바람직하게는, 상기 단백질 분해 효소는 플라보르자임(Flavourzyme), 알칼라아제(Alcalase), 엔도프로테아제(Endo-Protease), 엑스포프로테아제(Exo-Protease), 엑소펩티다제(Exo-Peptidase) 및 이들의 혼합물로 이루어진 군 중에서 선택될 수 있다.
- [0015] 바람직하게는, 상기 매생이 효소 처리 추출물의 분획물은 완충 용액, 염화나트륨 수용액 및 물로 이루어진 군 중에서 선택되는 용출 용매를 사용하여 겔 침투 크로마토그래피를 수행하여 얻은 것일 수 있다.
- [0016] 바람직하게는, 상기 조성물은 약학 조성물 또는 식품 조성물일 수 있다.

발명의 효과

- [0017] 이러한 본 발명에 의하여 현저한 안지오텐신 전환 효소 저해 효과를 비롯하여 항고혈압 및 항당뇨 효과를 보이는 조성물을 제공할 수 있고, 이러한 조성물을 약학 또는 식품 조성물로 이용할 수 있어 고혈압, 동맥경화증 또는 당뇨병의 예방을 위한 약제 또는 식품을 제공할 수 있는 효과를 얻을 수 있다.
- [0018] 이러한 효과를 가져오는 본 발명의 유효 성분이 매생이로부터 얻어지므로 이러한 본 발명에 의하여 매생이의 고부가가치화가 달성될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0019] 도 1은 표준 물질(Dextran)의 분자량에 따른 크로마토그램을 보이는 도면이다.
- 도 2는 매생이 열수 추출물(비교예 3), 매생이 산 추출물(비교예 1), 매생이 알칼리 추출물(비교예 2), 매생이 초음파 추출물(비교예 4) 중의 올리고머의 분자량을 비교한 결과를 보이는 것이다.
- 도 3은 매생이 효소 처리 추출물, 구체적으로는 효소로서 다당류 분해 효소인 Viscozyme(실시에 1) 및 Lysing enzyme(실시에 2)와, 단백질 분해 효소인 Flavourzyme(실시에 3) 및 Alcalase(실시에 4)로 처리하여 얻은 매생이 효소 처리 추출물 중의 올리고머의 분자량을 비교한 결과를 보이는 것이다.
- 도 4는 매생이 감마선 조사 추출물(비교예 6) 중의 올리고머의 분자량을 측정된 결과를 보이는 것이다.
- 도 5는 매생이 알칼리 추출물(비교예 2), 매생이 효소(Viscozyme) 처리 추출물(실시에 1) 및 매생이 감마선(120kGy) 조사 추출물(비교예 6) 중의 올리고머의 분자량을 측정된 결과를 보이는 것이다.
- 도 6은 본 발명의 매생이 효소 처리 추출물의 ACE 저해 활성을 보이는 그래프이다. Enalapril은 양성 대조군으로 사용한 것으로서, 시판되고 있는 ACE 저해제이다.
- 도 7a 내지 도 7c는 실시에 1 내지 4의 추출물 및 비교예 1 내지 6의 추출물의 DPP-4의 저해 활성 실험 결과를 보이는 그래프이다. Ile-Pro-Ile은 양성 대조군으로 사용한 것으로서, 시판되고 있는 DPP-4 억제제이다.
- 도 8은 실시에 4의 매생이 효소 처리 추출물을 사용하고, 이를 prep-LC 시스템을 이용하여 GPC 컬럼(W252-W253, 20×500 mm) 통해 분리하여 얻은 결과를 보이는 그래프이다.
- 도 9는 실시에 5에서 분리한 분획 B를 동결 건조하고 증류수에 용해시켜 이온 교환 (Sartobind® Q-75) 막 칼럼으로 용출시켜 얻은 결과를 보이는 그래프이다.
- 도 10a 내지 도 10e는 실시에 4 내지 6에서 얻은 추출물 또는 분획물을 HPLC를 활용하여 분석하여 얻은 크로마토그램이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0020] 본 발명은 매생이를 다당류 분해 효소, 단백질 분해 효소 및 이들의 혼합물로 이루어진 군 중에서 선택되는 효소로 처리하여 얻은 매생이 효소 처리 추출물, 상기 매생이 효소 처리 추출물의 분획물과, 이들의 혼합물로 이루어진 군 중에서 선택되는 것을 유효 성분으로 함유하는, 안지오텐신 전환 효소 저해용, 항고혈압 또는 항당뇨 조성물에 관한 것이다.
- [0021] 이하에서는 우선 매생이 효소 처리 추출물 및 이러한 매생이 효소 처리 추출물의 분획물의 제조 방법과, 이에 의하여 얻은 추출물 및 분획물에 관하여 설명하고, 그런 후에 이들을 유효 성분으로 함유하는, 안지오텐신 전환 효소 저해용, 항고혈압 또는 항당뇨 조성물에 관하여 설명한다.

- [0022] 매생이 효소 처리 추출물로는 매생이를 다당류 분해 효소로 처리하여 얻는 것, 매생이를 단백질 분해 효소로 처리하여 얻은 것과, 매생이를 다당류 분해 효소 및 단백질 분해 효소의 혼합물로 처리하여 얻은 것이 있다.
- [0023] 이러한 매생이 효소 처리 추출물을 제조하는 방법은 다음과 같다.
- [0024] 매생이를 채취하여 여러 차례 수세하고 동결 건조하여 입자 크기가 200 메쉬보다 작도록 분말화하여 매생이 분말을 얻는다. 이렇게 얻은 매생이 분말에 다당류 분해 효소, 단백질 분해 효소 또는 이들의 혼합물을 함유하는 완충 용액을 첨가하여 혼합한 후 100 내지 300 rpm의 속도로 30 내지 60 °C의 온도에서 1 내지 10 시간 동안 반응시킨다.
- [0025] 상기한 다당류 분해 효소로는 셀룰라스트(Celluclast), 비스코자임(Viscozyme), 라이싱 엔자임(Lysing enzyme), 펙티넥스(pectinex), 셀룰레이즈(Cellulase), 아라바네이즈(Arabanase), 글루카네이즈(Glucanase) 또는 이들의 혼합물 등을 사용할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0026] 상기한 단백질 분해 효소로는 플라보르자임(Flavourzyme), 알칼라아제(Alcalase), 엔도프로테아제(Endo-Protease), 엑소프로테아제(Exo-Protease), 엑소펩티데아제(Exo-Peptidase) 또는 이들의 혼합물 등을 사용할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0027] 상기한 완충 용액으로는 아세트산나트륨 완충 용액, 인산나트륨 완충 용액, 인산칼륨 완충 용액 또는 이들의 혼합물 등을 사용할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0028] 상기한 매생이 분말과 효소의 혼합 비율은 중량 비율로 5:1 내지 20:1인 것이 바람직하다. 매생이 분말과 효소의 혼합 비율이 5:1인 경우보다 효소가 많이 들어가는 경우에는 효소의 추가로 인한 뚜렷한 효과의 증가가 나타나지 않고, 매생이 분말과 효소의 혼합 비율이 20:1인 경우보다 매생이 분말이 많이 들어가는 경우에는 효소 처리가 제대로 이루어지지 않는 문제점이 있다.
- [0029] 상기한 반응을 시킨 후 90 내지 120 °C의 온도에서 10분 내지 20분간 가열하여 효소를 불활성화시키고 그런 후에 9,000 내지 15,000 rpm의 속도로 5분 내지 20분의 시간 동안 원심 분리하여 상등액만을 취하며, 상기 상등액을 여과지로 여과시킨 다음, 여과액을 동결 건조시켜 매생이 효소 처리 추출물을 얻는다.
- [0030] 이러한 방법에 의하여 얻는 본 발명의 매생이 효소 처리 추출물은 안지오텐신 전환 효소 저해 효과 및 항고혈압 효과가 현저하고, 또한, 현저한 항당뇨 효과를 보이는데, 이러한 효과를 실험예에서 더욱 자세히 설명한다.
- [0031] 또한, 안지오텐신 전환 효소 저해 효과, 항고혈압 및 항당뇨 효과는 상기한 매생이 효소 처리 추출물의 분획물에서 더욱 현저하며, 이러한 분획물의 제조 방법에 대하여 설명하면 다음과 같다.
- [0032] 상기한 방법에 의하여 얻은 본 발명의 매생이 효소 처리 추출물을 완충 용액, 염화나트륨 수용액 및 물로 이루어진 군 중에서 선택되는 용출 용매를 사용하여 겔 침투 크로마토그래피를 수행한 후 이를 여과 및 동결 건조시켜 매생이 효소 처리 분획물을 얻는다. 이때 상기한 완충 용액으로는 일반적인 완충 용액이라면 모두 사용할 수 있고, 특히, 아세트산나트륨 완충 용액, 인산나트륨 완충 용액, 인산칼륨 완충 용액 등을 사용할 수 있다.
- [0033] 바람직하게는 상기 매생이 효소 처리 추출물의 분획물은 매생이 효소 처리 추출물을 0.1M 아세트산나트륨 완충 용액(pH 4.5), 0.1M 인산나트륨 완충 용액(pH 7.0), 0.1M 인산칼륨 완충 용액(pH 7.0), 0.1M 아세트산나트륨 완충 용액(pH 5.5), 0.1M 인산나트륨 완충 용액(pH 8.0), 0.1M 인산칼륨 완충 용액(pH 8.0), 10mM 염화나트륨 수용액 또는 물을 용출 용매로 사용하여 겔 침투 크로마토그래피를 수행하여 매생이 효소 처리 추출물의 분획물을 얻는다.
- [0034] 더욱 바람직하게는, 상기 매생이 효소 처리 추출물의 분획물은 매생이 효소 처리 추출물을 물을 용출 용매로 사용하여 겔 침투 크로마토그래피를 수행하여 얻는다.
- [0035] 더욱 바람직하게는, 상기 매생이 효소 처리 추출물의 분획물은 매생이 효소 처리 추출물을 물을 용출 용매로 사용하여 겔 침투 크로마토그래피를 수행하여 3개의 분획물을 얻고 이러한 3개의 분획물 중의 2번째 분획물일 수 있다.
- [0036] 가장 바람직하게는, 상기 매생이 효소 처리 추출물의 분획물은 매생이 효소 처리 추출물을 물을 용출 용매로 사용하여 겔 침투 크로마토그래피를 수행하여 3개의 분획물을 얻고, 이러한 3개의 분획물 중의 2번째의 분획물을 다시 용출 용매로 물을 사용하고 1-3M 염화나트륨 수용액을 이용한 이온 교환 크로마토그래피를 수행하여 5개의 분획물을 얻으며, 이러한 5개의 분획물 중 3번째 또는 5번째 분획물일 수 있다.

- [0037] 이와 같은 본 발명의 매생이 효소 처리 추출물, 이의 분획물 또는 이들의 혼합물을 유효 성분으로 함유하는, 안지오텐신 전환 효소 저해용, 항고혈압 또는 항당뇨 조성물에 대하여 설명하면 다음과 같다.
- [0038] 본 발명의 안지오텐신 전환 효소 저해용, 항고혈압 또는 항당뇨 조성물은 상기한 바와 같은 매생이 효소 처리 추출물, 이의 분획물 또는 이들의 혼합물을 유효 성분으로서 함유한다.
- [0039] 이러한 본 발명의 조성물은 상기한 매생이 효소 처리 추출물, 이의 분획물 또는 이들의 혼합물을 상기 조성물의 총 중량을 기준으로 0.00001 내지 20 중량%, 바람직하게는 0.0001 내지 10 중량%, 더욱 바람직하게는 0.001 내지 5 중량%의 함량으로 함유한다. 상기한 매생이 효소 처리 추출물 등을 조성물의 총 중량을 기준으로 0.00001 중량% 미만으로 함유하는 경우에는 매생이 효소 처리 추출물 등의 함유로 인한 안지오텐신 전환 효소 저해 효과, 항고혈압 효과 또는 항당뇨 효과를 거의 기대할 수 없고, 상기한 매생이 효소 처리 추출물 등을 조성물의 총 중량을 기준으로 20 중량%를 초과하도록 함유하는 경우에는 함유량 증가에 따른 뚜렷한 효과의 증가가 나타나지 않는다.
- [0040] 이러한 본 발명의 조성물은 약학 조성물 또는 식품 조성물일 수 있다.
- [0041] 본 발명의 매생이 효소 처리 추출물, 이의 분획물 또는 이들의 혼합물을 함유하는 안지오텐신 전환 효소 저해용, 항고혈압 또는 항당뇨 약학 조성물은, 약학 조성물의 제조에 통상적으로 사용하는 적절한 담체, 부형제 및 희석제를 더 포함할 수 있고, 본 발명의 매생이 효소 처리 추출물, 이의 분획물 또는 이들의 혼합물을 함유하는 약학 조성물의 약학적 투여 형태는 단독으로 또는 타 약리적 활성 화합물과 결합뿐만 아니라 적당한 집합으로 사용될 수 있다.
- [0042] 본 발명의 매생이 효소 처리 추출물, 이의 분획물 또는 이들의 혼합물을 함유하는 안지오텐신 전환 효소 저해용, 항고혈압 또는 항당뇨 약학 조성물은, 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 및 멸균 주사 용액의 형태로 제형화하여 사용될 수 있다.
- [0043] 상기 본 발명의 약학 조성물에 포함될 수 있는 담체, 부형제 및 희석제로는 락토오스, 텍스트로오스, 수크로오스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알제네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로오스, 메틸셀룰로오스, 미정질 셀룰로스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유 등을 들 수 있다.
- [0044] 본 발명의 약학 조성물을 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제될 수 있다.
- [0045] 본 발명의 약학 조성물의 경구 투여를 위한 고형 제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함될 수 있으며, 이러한 고형 제제는 상기 매생이 효소 처리 추출물, 이의 분획물 또는 이들의 혼합물에 적어도 하나 이상의 부형제, 예를 들면, 전분, 칼슘 카보네이트, 수크로오스 또는 락토오스, 젤라틴 등을 섞어 조제될 수 있다. 또한, 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트, 탈크 같은 윤활제들도 사용될 수 있다.
- [0046] 본 발명의 약학 조성물의 경구를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데, 이에 흔히 사용되는 단순 희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면, 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다.
- [0047] 본 발명의 약학 조성물의 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성 용제, 현탁제, 유제, 동결 건조 제제, 좌제가 포함될 수 있다. 비수성 용제, 현탁제로는 프로필렌글리콜, 폴리에틸렌글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있고, 좌제의 기제로는 위텝솔(witepsol), 마크로골(macrogol), 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로젤라틴 등이 사용될 수 있다.
- [0048] 본 발명의 약학 조성물의 바람직한 투여량은 환자의 상태 및 체중, 질병의 정도, 약물 형태, 투여 경로 및 기간에 따라 다르지만, 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다. 그러나, 바람직한 효과를 위해서, 본 발명의 조성물은 1일 0.0001 내지 100 mg/kg으로 투여하는 것이 좋다. 투여는 하루에 한번 투여할 수도 있고, 수회 나누어 투여할 수도 있다. 상기 투여량은 어떠한 면으로든 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.
- [0049] 본 발명의 약학 조성물은 쥐, 생쥐, 가축, 인간 등의 포유 동물에 다양한 경로로 투여될 수 있다. 투여의 모든 방식은 예상될 수 있는데, 예를 들면, 경구, 정맥, 근육 또는 피하 주사에 의해 투여될 수 있다.

- [0050] 본 발명의 매생이 효소 처리 추출물, 이의 분획물 또는 이들의 혼합물을 함유하는 안지오텐신 전환 효소 저해용, 항고혈압 또는 항당뇨 조성물은 상기와 같은 제형으로 안지오텐신 전환 효소 저해용, 항고혈압 또는 항당뇨를 위한 약학 조성물로서 뿐 아니라, 식품 및 음료 등에 다양하게 이용될 수 있다.
- [0051] 본 발명의 매생이 효소 처리 추출물, 이의 분획물 또는 이들의 혼합물을 함유하는 식품 조성물을 첨가할 수 있는 식품으로는, 예를 들어, 각종 식품류, 음료, 껌, 차, 비타민 복합제, 건강 기능성 식품류 등이 있다.
- [0052] 본 발명의 매생이 효소 처리 추출물, 이의 분획물 또는 이들의 혼합물을 함유하는 조성물은 독성 및 부작용이 거의 없으므로 고혈압, 당뇨, 동맥경화증 등의 예방 목적으로 장기간 복용시에도 안심하고 사용할 수 있다.
- [0053] 본 발명의 매생이 효소 처리 추출물, 이의 분획물 또는 이들의 혼합물을 함유하는 조성물은 고혈압, 당뇨, 동맥경화증 등의 예방을 목적으로 식품 또는 음료에 첨가될 수 있는데, 이때 식품 또는 음료 중의 상기 매생이 효소 처리 추출물, 이의 분획물 또는 이들의 혼합물을 함유하는 조성물의 양은 전체 식품 중량의 0.00001 내지 20 중량%로 가할 수 있으며, 건강 음료는 100 ml를 기준으로 0.02 내지 5 g, 바람직하게는 0.3 내지 1 g의 비율로 가할 수 있다.
- [0054] 본 발명의 식품용 조성물로서, 특히 건강 기능성 음료로 사용되는 조성물은 지시된 비율로 필수 성분으로서 상기 매생이 효소 처리 추출물, 이의 분획물 또는 이들의 혼합물을 함유하는 외에는 다른 성분에는 특별한 제한이 없으며 통상의 음료와 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 더 포함할 수 있다. 이때, 상기 천연 탄수화물은 예를 들어, 포도당, 과당 등의 모노사카라이드; 말토오스, 수크로오스 등의 디사카라이드; 및 텍스트린, 시클로텍스트린 등의 폴리사카라이드 등과 같은 통상적인 당, 및 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알코올 등이 있다. 또한, 향미제로는 천연 향미제(타우마틴, 스테비아 추출물, 예를 들어, 레바우디오시드 A, 글리시리히진 등) 및 합성 향미제(사카린, 아스파르탐 등)를 유리하게 사용할 수 있다. 상기 천연 탄수화물의 비율을 본 발명의 조성물 100 ml 당 일반적으로 약 1 내지 20g, 바람직하게는 약 5 내지 12g이다.
- [0055] 상기 외에 본 발명의 매생이 효소 처리 추출물, 이의 분획물 또는 이들의 혼합물을 함유하는 식품 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, 탄산음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다.
- [0056] 그밖에 본 발명의 매생이 효소 처리 추출물, 이의 분획물 또는 이들의 혼합물을 함유하는 식품 조성물은 천연 과일 주스 및 과일 주스 음료 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있으며, 이러한 성분을 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있다. 또한, 상기 첨가제의 비율은 그렇게 중요하진 않지만 본 발명의 매생이 효소 처리 추출물, 이의 분획물 또는 이들의 혼합물 100 중량부 당 0 내지 약 20 중량부의 범위에서 선택되는 것이 일반적이다.
- [0057] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 구체적으로 설명하지만, 이러한 실시예는 본 발명을 좀더 명확하게 이해하도록 제시하는 것일 뿐 본 발명의 범위를 제한하는 목적으로 제시하는 것은 아니며, 본 발명은 후술하는 특허 청구 범위의 기술적 사상의 범위 내에서 정해될 것이다.
- [0058] 매생이 분말의 제조
- [0059] 본 발명에서는 전남 강진 일대에서 생산되는 매생이를 겨울철에 채취하여 여러 차례 수세하고 이를 동결 건조한 후 이를 200 mesh로 분말화하여 매생이 분말을 얻었다.
- [0060] 실시예 1 내지 4: 매생이 효소 처리 추출물의 제조
- [0061] 상기한 매생이 분말을 사용하여 아래의 표 1과 같은 조건에 따라 효소 처리를 수행하여 본 발명의 매생이 효소 처리 추출물을 제조하였다.
- [0062] 즉, 매생이 분말 100 mg에 아세트산나트륨 완충 용액 또는 인산나트륨 완충 용액 9 ml를 넣고, 각각의 효소를 10 mg/ml로 함유하는 아세트산나트륨 완충 용액 또는 인산나트륨 완충 용액 1 ml를 첨가하여 혼합한 후, 150 rpm의 속도로, 50 ℃의 온도에서 6시간 동안 반응시켜 매생이 가수분해물을 얻었다. 그런 후에 상기 매생이 가

수분해물을 100 ℃의 온도에서 15분간 가열하여 효소를 불활성화시키고, 12,000 rpm의 속도에서 10분간 원심 분리하여 상등액만을 취하며, 상기 상등액을 여과지로 여과시킨 다음, 여과액을 동결 건조시켜 본 발명의 매생이 효소 처리 추출물을 얻었다.

표 1

	효소 종류	효소	완충 용액	pH	온도 (℃)	효소 특성
실시예 1	다당류 분해 효소	Viscozyme	0.1M 아세트산나트륨	4.5	50	arabanase, cellulase, glucanase, hemi-cellulase, xylanase
실시예 2	다당류 분해 효소	Lysing enzyme	0.1M 아세트산나트륨	4.5	50	glucanase, cellulase, protease, chitinase
실시예 3	단백질 분해 효소	Flavourzyme	0.1M 인산나트륨	7.0	50	endoprotease, exopeptidase
실시예 4	단백질 분해 효소	Alcalase	0.1M 인산나트륨	8.0	50	endoprotease

비교예 1: 매생이 산 추출물

매생이 분말 200 mg에 0.1N HCl 20 ml를 첨가하여 150 rpm의 속도로 진탕하면서 3시간 추출하고, 여과지를 이용하여 여과하며, 잔류물에 0.1N HCl를 첨가하여 재추출하여 여과하고, 여과액을 모아 동결 건조하여 매생이 산 추출물을 얻었다.

비교예 2: 매생이 알칼리 추출물

매생이 분말 200 mg에 0.1N NaOH 20 ml를 첨가하여 150 rpm의 속도로 진탕하면서 3시간 추출하고, 여과지를 이용하여 여과하며, 잔류물에 0.1N NaOH를 첨가하여 재추출하여 여과하고, 여과액을 모아 동결 건조하여 매생이 알칼리 추출물을 얻었다.

비교예 3: 매생이 열수 추출물

매생이 분말 200 mg에 증류수 20 ml를 첨가하고 환류 장치를 이용하여 100 ℃, 3시간 추출하고, 여과지를 이용하여 여과하며, 여과액을 모아 동결 건조하여 매생이 열수 추출물을 얻었다.

비교예 4: 매생이 초음파 추출물

매생이 분말 200 mg에 증류수 20ml를 첨가하고 초음파 장치를 이용하여 40 kHz, 3시간 추출하고, 여과지를 이용하여 여과하며, 여과액을 모아 동결 건조하여 매생이 초음파 추출물을 얻었다.

비교예 5: 매생이 유기 용매 추출물

매생이 분말 2g에 70% 에탄올 수용액 200 ml를 가하고 3시간 추출하고 여과하여 여액만을 취하고 여기에 헥산,

클로로포름, 에틸 아세테이트, 부탄올을 각각 가하여 분획 추출하고, 여과지를 이용하여 여과하며, 여과액을 동결 건조하여 매생이 유기 용매 추출물을 얻었다.

[0074] 비교예 6: 매생이 감마선 조사 추출물

[0075] 감마선 조사 추출 방법은 한국 원자력 연구원 정읍 방사선 과학 연구소에 있는 감마선 조사 시설(선원: Co-60, 390 kCi)을 이용하여 조사하였다. 즉, 매생이 분말 1g에 증류수 50 ml를 넣고 실온에서 시간당 일정 선량률로 1 ~ 200 kGy의 총 흡수량을 얻도록 감마선을 조사하였다. 그런 후에 12,000 rpm에서 15분간 원심 분리하여 상등액을 취하며, 상기 상등액을 여과지로 여과시킨 다음, 여과액을 동결 건조시켜 매생이 감마선 조사 추출물을 얻었다.

[0076] 이러한 실시예 1 내지 4 및 비교예 1 내지 6의 추출물 뿐 아니라 후술하는 실시예 5 및 6의 분획물에 대하여 하기의 실험예에서 활성을 측정할 때에는 증류수에 동일한 농도로 용해시켜 사용하였다(5mg/ml). 다만, 실험예 2, 4 및 5에서 항고혈압 활성을 측정할 때에는 봉산나트륨 완충 용액에 동일한 농도로 용해시켜 사용하였다(5mg/ml).

[0077] 실험예 1: 실시예 1 내지 4 및 비교예 1 내지 6의 추출물 중의 올리고머 분자량 측정

[0078] 상기의 실시예 1 내지 4 및 비교예 1 내지 6의 추출물 중의 올리고머의 분자량을 GPC(Gel Permeation Chromatography) 컬럼을 이용하고 RI(Refractive Index) 검출기를 통해 분석하였으며, 표준물질로 Dextran(Fluka, Dextran Mw : 670, 150, 50, 12, 5 kDa)을 사용하여 상대적인 분자량을 측정하였다.

[0079] 도 1은 표준물질 (Dextran)의 분자량에 따른 크로마토그램을 보이는 도면이고, 아래의 표 2는 이러한 표준물질 (Dextran)의 Retention Time(RT)별 분자량을 보이는 것이다.

표 2

[0080]

RT(min)	MW(Da)	RT(min)	MW(Da)	RT(min)	MW(Da)
9.0	55790.9	10.0	7717.2	11.0	1067.5
9.1	45777.6	10.1	6332.1	11.1	875.9
9.2	37561.4	10.2	5195.6	11.2	718.7
9.3	30819.9	10.3	4263.1	11.3	589.7
9.4	25288.4	10.4	3498.0	11.4	483.8
9.5	20749.6	10.5	2870.1	11.5	397.0
9.6	17025.5	10.6	2355.0	11.6	325.8
9.7	13969.8	10.7	1932.3	11.7	267.3
9.8	11462.5	10.8	1585.5	11.8	219.3
9.9	9405.2	10.9	1301.0	11.9	180.0

[0081] 도 2는 매생이 열수 추출물(비교예 3), 매생이 산 추출물(비교예 1), 매생이 알칼리 추출물(비교예 2), 매생이 초음파 추출물(비교예 4) 중의 올리고머의 분자량을 비교한 결과를 보이는 것으로서, 열수(비교예 3) 및 초음파

(비교예 4) 처리시 처리 전의 분자량(매생이 분말을 증류수에 녹여 여과지로 여과 후 겔 침투 크로마토그래피로 측정된 결과 분자량이 높은 올리고머(RT: 6.8분)의 분자량)과 유사한 크기를 보였으나, 산(비교예 1) 및 알칼리(비교예 2) 처리시 저분자량으로 분해됨을 알 수 있었으며, 알칼리(비교예 2) 처리시 더 많이 분해됨을 알 수 있다.

[0082] 또한, 11분 대의(Mw : 900-1,100Da) peak가 보이는데, 이로 인하여 고분자량의 다당류가 올리고머의 형태로 전환되었음을 확인할 수 있다. 또한, 올리고머의 함량은 산(비교예 1) 추출에 비해 알칼리(비교예 2) 추출 시 높은 함량을 나타낸 것으로 보아, 알칼리 처리 시 더 많은 다당류가 생성되었을 것으로 사료된다.

[0083] 도 3은 매생이 효소 처리 추출물, 구체적으로는 효소로서 다당류 분해 효소인 Viscozyme(실시예 1) 및 Lysing enzyme(실시예 2)와, 단백질 분해 효소인 Flavourzyme(실시예 3) 및 Alcalase(실시예 4)로 처리하여 얻은 매생이 효소 처리 추출물 중의 올리고머의 분자량을 비교한 결과를 보이는 것으로서, 다당류 분해 효소인 Viscozyme(실시예 1) 및 Lysing enzyme(실시예 2) 처리시 유사한 분포를 보였으며 Viscozyme(실시예 1) 처리시 저분자량의 높은 함량을 보임을 확인할 수 있다. 또한, 단백질 분해 효소인 Flavourzyme(실시예 3) 및 Alcalase(실시예 4) 처리시 다양한 분자량 분포를 보임을 확인할 수 있다.

[0084] 도 4는 매생이 감마선 조사 추출물(비교예 6) 중의 올리고머의 분자량을 측정된 결과를 보이는 것으로서, 감마선의 조사선량이 증가할수록 저분자화됨을 알 수 있고, Dextran으로부터 상대적인 분자량을 산출했을 때 약 700kDa(RT, 7.5min)의 초기 다당류가 선량의 증가함에 따라 약 50 kDa까지 분자량이 감소함을 보이는 것을 알 수 있다. 이는 선량의 증가에 따라 분자간의 결합이 끊어져 분자량이 감소하는 것으로 이해된다.

[0085] 이러한 실험 결과를 종합하면(도 5 참조), 알칼리(비교예 2), 효소(Viscozyme)(실시예 1) 및 감마선(120kGy)(비교예 6) 처리의 분자량 분포를 비교했을 때 효소(Viscozyme) 처리시 다당류 (150-300Da)의 peak가 보여 다른 처리 보다 저분자화 공정에 적합함을 확인할 수 있다.

[0086] 실험예 2: 실시예 1 내지 4 및 비교예 1 내지 6의 추출물의 항고혈압 활성 측정(Angiotensin I Converting Enzyme inhibition)

[0087] 안지오텐신 전환 효소(Angiotensin converting enzyme, Kinase peptidyl dipeptide hydrolase, EC 3.4.15.1)은 불활성 데카펩타이드(decapeptide)인 안지오텐신(Angiotensin)의 C 말단 디펩타이드(His-Leu)를 절단하여 혈관벽 평활근 수축 등의 작용에 의하여 강한 혈압 상승 작용을 나타내는 옥타펩타이드인 안지오텐신을 생성하는 한편, 강한 혈관 확장 작용을 가지는 노나펩타이드인 브라디키닌(bradykinin)을 불활성화시킴으로써 혈압을 상승시키는 역할을 한다고 알려져 있다.

[0088] 이러한 안지오텐신 전환 효소의 저해 활성, 즉 ACE 저해 활성 측정은 합성 기질인 HHL(hippuryl-histidyl-leucine)로부터 유리되는 HA(Hippuric acid)를 HPLC로 분리하여 그 양을 측정함으로써 확인할 수 있다.

[0089] 즉, 0.1M 소듐 보레이트 완충 용액(pH 8.3) 50 μ l에 2.5mM HHL(Hippuryl-His-Leu) 150 μ l와 시료 용액, 즉 실시예 1 내지 4 및 비교예 1 내지 6의 추출물 50 μ l를 가하여 vortex로 잘 교반한 후 37 °C에서 10분간 pre-incubation시켰다. 여기에 ACE(100mU) 50 μ l를 넣고 37 °C에서 30분간 반응시킨 후 1N HCl 200 μ l를 가하여 반응을 중지시켰다. 대조군은 상기 시료 용액 대신 완충 용액을 사용하였다. 반응 중지 후 0.2 μ m syringe filter로 필터링하여 HHL(Hippuryl-His-Leu)로부터 유리되는 HA(Hippuric acid)를 다음의 표 3의 조건에 따라 HPLC로 분석하였다.

표 3

[0090]

조건	
기구	LC-10AD (Shimadzu)
칼럼	Xterra RP 15, 4.6 x 100mm (waters)
이동상	sol. A : 0.05% TFA in water
	sol. B : 0.05% TFA in ACN

흐름 속도	1ml/min
검출기	UV 228 nm

[0091] ACE 저해 활성은 대조군의 HA(Hippuric acid) peak 면적 값과 시료 용액의 HA peak 면적 값의 차이를 백분율로 계산하여 얻었다.

$$ACE\ inhibitory\ activity(\%) = \frac{(Control - Sample)}{Control} \times 100$$

[0092]

[0093] ACE 저해 활성을 측정한 결과 다음과 같다.

[0094] 매생이 열수 추출물(비교예 3), 매생이 산 추출물(비교예 1), 매생이 알칼리 추출물(비교예 2), 매생이 초음파 추출물(비교예 4), 매생이 유기 용매 추출물(비교예 5) 및 매생이 감마선 조사 추출물(비교예 6)의 ACE 저해 활성은 보이지 않았으며, 그 결과를 별도로 나타내지는 않는다.

[0095] 도 6은 본 발명의 매생이 효소 처리 추출물의 ACE 저해 활성을 보이는 그래프로서, 이에 의하면 특히 실시예 1(Viscozyme 처리)과 실시예 4(Alcalase 처리)의 추출물에서 50% 이상의 ACE 저해 활성을 보였으며, 실시예 4(Alcalase 처리)의 추출물에서 70% 이상의 ACE 저해 활성을 보임을 확인할 수 있다.

[0096] 실험예 3: 실시예 1 내지 4 및 비교예 1 내지 6의 추출물의 항당뇨 활성 측정(Dipeptidylpeptidase-4 inhibition, DPP-4)

[0097] 제2형 당뇨병의 발생 기전에 인슐린 저항성 및 상대적인 인슐린 결핍 이외에도 인크레틴 호르몬의 분비 및 작용의 감소 또한 중요 한 기전인 것이 밝혀지면서 인크레틴 관련 약물들이 개발되기 시작하였고, 경구 약물인 dipeptidylpeptidase-4(DPP-4) 억제제와 주사제인 glucagon like peptide-1 유사제가 임상에 사용되고 있다.

[0098] 인크레틴은 음식을 섭취했을 때 위장관에서 분비되는 호르몬으로 혈당 수치에 의존적으로 인슐린 분비를 강화시키는 작용을 보이며 현재 대표적으로 알려진 것은 GLP-1과 glucose-dependent insulintropic polypeptide (GIP)이 다. GLP-1은 전장관에서 분비되지만 주로 회장과 대장점막의 L-세포에서 분비되며 GIP는 십이지장과 공장 K-세포에서 분비된다. 분비된 인크레틴 중 활성화 형태는 혈중에서 반감기가 수분에 지나지 않는데 주로 DPP-4에 의해 2개의 아미노산이 떨어져 나가면서 불활성화 형태로 바뀌게 되고 이후 대부분이 신장으로 배설되게 된다.

[0099] 실시예 1 내지 4 및 비교예 1 내지 6의 추출물의 항당뇨 효과를 확인하기 위하여 이들 추출물의 DPP-4 저해 활성 실험을 수행하였으며, 이러한 DPP-4 저해 활성 실험은 DPP-4 inhibitor screening assay kit (cayman chem.)를 사용하여 측정하였다.

[0100] 즉, 96 well plate에 시료 용액, 즉 실시예 1 내지 4 및 비교예 1 내지 6의 추출물 10 μ l, Human recombinant DPP-4 10 μ l, 완충 용액 (20mM Tris-HCl, pH 8.0) 30 μ l와 기질 (H-gly-pro-AMC) 50 μ l를 혼합하여 30 $^{\circ}$ C에서, 30분 반응시키고, 기질인 H-gly-pro-AMC로부터 유리되는 AMC를 fluorescence Ex 350-360 nm, Em 450-465 nm로 측정하였다. 대조군은 시료 용액 대신 완충 용액 (20mM Tris-HCl, pH 8.0) 10 μ l, Human recombinant DPP-4 10 μ l, 완충 용액 (20mM Tris-HCl, pH 8.0) 30 μ l와 기질 (H-gly-pro-AMC) 50 μ l를 혼합하여 30 $^{\circ}$ C에서, 30분 반응시켜 측정하였다.

[0101] DPP-4 저해 활성은 대조군과 시료 용액의 Fluorescence intensity 값의 차이를 백분율로 계산하여 얻었다.

[0102] 실시예 1 내지 4 및 비교예 1 내지 6의 추출물의 항당뇨 활성을 측정한 결과는 다음과 같다.

[0103] 도 7a 및 7c는 비교예 1 내지 6의 추출물의 DPP-4의 저해 활성 실험 결과를 보이는 그래프로서, 도 7a에 의하면, 헥산, 클로로포름, 에틸 아세테이트, 부탄올의 유기 용매를 사용하여 얻은 매생이 유기 용매 추출물(비교예 5)은 30% 이하의 DPP-4 저해 활성을 보이고, 매생이 산 추출물(비교예 1), 매생이 알칼리 추출물(비교예 2)은 16% 정도의 낮은 DPP-4 저해 활성을 보임을 확인할 수 있다. 또한, 도 7c에 의하면, 매생이 감마선 조사 추출물(비교예 6)에 있어서는 감마선 처리선량의 증가에 따라 그 DPP-4 저해 활성이 증가됨을 보였으나 최고

의 DPP-4 저해 활성이 30% 정도로 낮은 저해 활성을 보였다.

[0104] 도 7b는 실시예 1 내지 4의 추출물의 DPP-4의 저해 활성 실험 결과를 보이는 그래프로서, 특히 효소로서 단당류 분해 효소인 Flavourzyme(실시예 3)와 Alcalase(실시예 4)를 사용하여 얻은 추출물에서 60% 이상의 DPP-4 저해 활성을 보이고 있음을 확인할 수 있다.

[0105] 실시예 5: 매생이 효소 처리 추출물의 분획물 1 - 분취용 크로마토그래피를 이용한 올리고머 분리

[0106] 매생이 효소 처리 추출물의 분획물을 얻기 위하여 대용량 분취용 크로마토그래피(prepare-LC, JAI, Japan)를 이용하였다. 분획물, 즉 올리고머의 분리 조건은 다음의 표 4와 같다.

표 4

조건	
기기	JAI LC-9104
칼럼	W252-W253 (20×500 mm)
이동상	물
흐름 속도	3.5 ml/min
검출기	RI

[0108] 상기 실험예 2의 결과를 참고하면, 실시예 1 내지 4의 추출물 중에서 효소로서 Alcalase(실시예 4)를 처리하여 얻은 매생이 효소 처리 추출물이 높은 ACE 저해 활성을 보였으므로, 실시예 4의 매생이 효소 처리 추출물을 사용하고, 이를 prepare-LC system을 이용하여 GPC 컬럼(W252-W253, 20×500 mm) 통해 분리하였다. 유속 3.5 ml/min으로 흘려주었으며 RI 검출기로 3개의 주요 peak를 확인하였으며, 그 분획(A, B, C)을 모아 동결 건조하여 본 발명의 매생이 효소 처리 추출물의 분획물을 얻었다 (도 8 참조).

[0109]

[0110] 실험예 4: 실시예 5의 분획물의 항고혈압 활성 측정 및 항당뇨 활성 측정

[0111] 시료 용액, 즉 실시예 1 등의 추출물 대신 실시예 5의 분획물을 사용하는 것을 제외하고는 상기한 실험예 2의 측정 방법과 동일한 방법으로 항고혈압 활성을 측정한 결과, 두번째 분획, 즉 B 분획에서 72.3%의 ACE 저해 활성을 보였다.

[0112] 또한, 시료 용액, 즉 실시예 1 등의 추출물 대신 실시예 5의 분획물을 사용하는 것을 제외하고는 상기한 실험예 3의 측정 방법과 동일한 방법으로 항당뇨 활성을 측정한 결과, 역시 두번째 분획, 즉 B 분획에서 65.3%의 DPP-4 저해 활성을 보였음을 확인할 수 있다.

[0113] 각각의 분획물에 대한 ACE 저해 활성 및 DPP-4 저해 활성을 측정한 결과를 다음의 표 5에 나타내었다.

표 5

분획	ACE 저해 (%) 시료 5 mg 기준	IC ₅₀ (mg)	분획	DPP-4 저해 (%) 시료 5 mg 기준	IC ₅₀ (mg)
A 분획	26.4		A 분획	17.5	
B 분획	72.3	1.6	B 분획	65.3	2.2

C 분획	59.3	4.7	C 분획	55.8	4.4
Enalapril (10 μ g)	98.7		Ile-Pro-Ile (100 μ g)	84.6	

[0115] 실시예 6: 매생이 효소 처리 추출물의 분획물 2 - 이온 교환 (Sartobind® Q-75) 막 컬럼을 이용한 분리

[0116] 상기 실시예 5에서 분리한 분획 B를 동결 건조하고 증류수에 용해시켜 Ion-exchange (Sartobind® Q-75) Membrane column에 0.5ml Loading하고 0.5 ml/min 유속으로 증류수를 흘려주었으며 0-3M NaCl gradient 이용하여 step gradient 방법으로 용출시켜 5개의 주요 분획을 얻었다. 분획은 1.0ml 씩 받았으며, phenol-sulfuric acid 방법을 이용하여 490 nm 측정한 결과, 5개의 주요 peak를 확인하였으며, 그 분획(B-1, B-2, B-3, B-4, B-5)을 모아 동결 건조하여 본 발명의 매생이 효소 처리 추출물의 분획물을 얻었다 (도 9 참조).

[0117] 실험예 5: 실시예 6의 분획물의 항고혈압 활성 측정 및 항당뇨 활성 측정

[0118] 시료 용액, 즉 실시예 1 등의 추출물 대신 실시예 6의 분획물을 사용하는 것을 제외하고는 상기한 실험예 2의 측정 방법과 동일한 방법으로 항고혈압 활성을 측정한 결과, 항고혈압 활성은 B-3와 B-5 분획에서 80% 이상의 저해 활성을 보였다.

[0119] 또한, 시료 용액, 즉 실시예 1 등의 추출물 대신 실시예 6의 분획물을 사용하는 것을 제외하고는 상기한 실험예 3의 측정 방법과 동일한 방법으로 항당뇨 활성을 측정한 결과, 항비만 활성은 B-3와 B-5 분획에서 각각 71.3% 및 68.4%의 저해 활성을 보였음을 확인할 수 있다.

[0120] 각각의 분획물에 대한 ACE 저해 활성 및 DPP-4 저해 활성을 측정한 결과를 다음의 표 6에 나타내었다.

표 6

분획	ACE 저해 (%) 시료 5 mg 기준	IC ₅₀ (mg)	분획	DPP-4 저해 (%) 시료 5 mg 기준	IC ₅₀ (mg)
B-1	24.0		B-1	10.2	
B-2	36.8		B-2	8.7	
B-3	82.6	0.58	B-3	71.3	1.2
B-4	41.9		B-4	19.2	
B-5	87.7	0.39	B-5	68.4	1.7
Enalapril (10 μ g)	98.7		Ile-Pro-Ile (100 μ g)	84.6	

[0122] 실험예 6: GPC 컬럼을 사용한 매생이 효소 처리 추출물의 분획물의 분자량 측정

[0123] 상기 실시예 4 내지 6에서 얻은 추출물 또는 분획물을 HPLC를 활용하여 분석하였으며, 그 결과 도 10a 내지 도 10e의 크로마토그램을 얻었다.

[0124] 도 10a는 Alcalase를 사용하여 추출한 매생이 효소 처리 추출물(실시예 4)에 대한 크로마토그램이고, 도 10b는 실시예 5에서 얻은 A 분획물의 크로마토그램이며, 도 10c는 실시예 5에서 얻은 B 분획물의 크로마토그램이고, 도 10d는 실시예 5에서 얻은 C 분획물의 크로마토그램이며, 도 10e는 실시예 6에서 얻은 B-3 분획물의 크로마토그램이다.

[0125] 분석 조건은 다음의 표 7과 같다.

표 7

[0126]

조건	
기기	Shimadzu LC-10AD
칼럼	Suprema 1,000 Å
이동상	0.05% NaN ₃
흐름 속도	1.0 ml/min
검출기	RI

[0127]

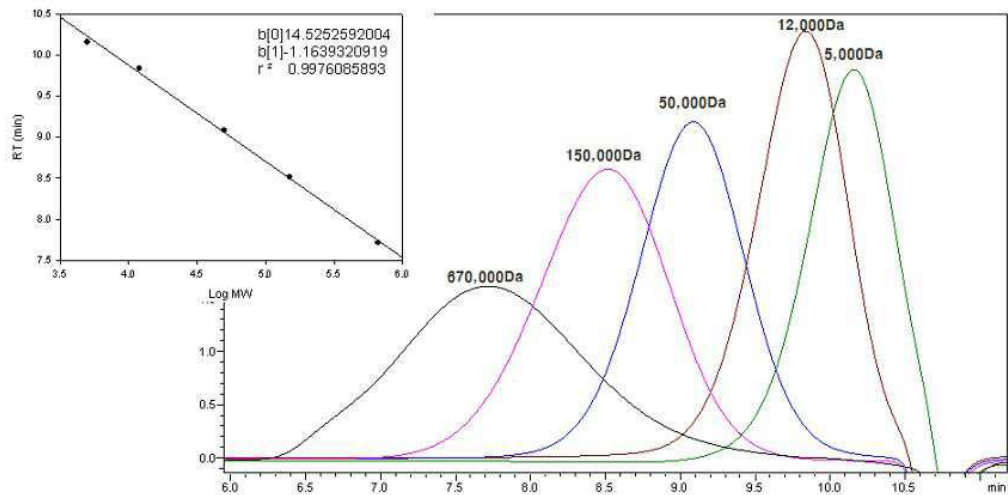
도 10a 내지 도 10e의 크로마토그램을 참고하면, 효소로서 Alcalase를 사용하여 추출한 매생이 효소 처리 추출물(실시예 4, 도 10a)에는 분자량이 다양한 성분이 함유되어 있으나, Prep-LC를 활용하여 분리한 분획물(도 10b 내지 도 10e)에는 완전하게 분리되지는 않았지만 각 분자량 별로 나뉘어 분획된 결과를 볼 수 있다. 특히, 높은 ACE 저해 활성 및 DPP-4 저해 활성을 보인 실시예 5의 B 분획(도 10c)에서는 8,000 Da와 1,000 Da의 분자량이 주로 나타났으며, 이온 교환 컬럼으로 분리한 실시예 6의 B-3 분획(도 10e)에서는 1,000Da의 분자량을 보였다.

[0128]

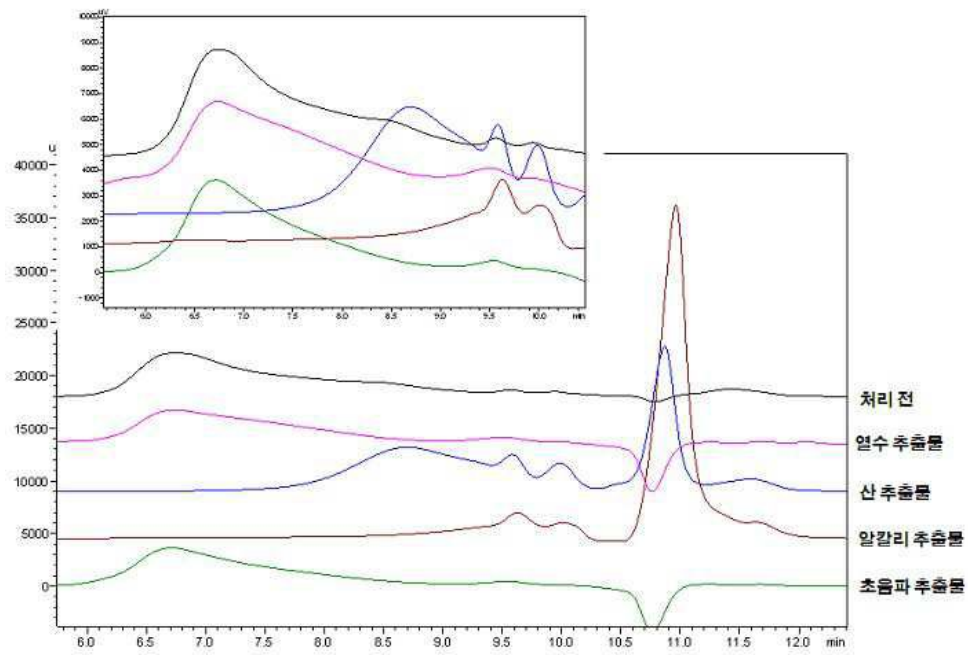
따라서, 생리 활성과 분획물의 조성을 비교한 결과 우수한 생리 활성을 보유한 분획은 분자량 약 1,000 Da 정도의 물질인 것으로 판단된다.

도면

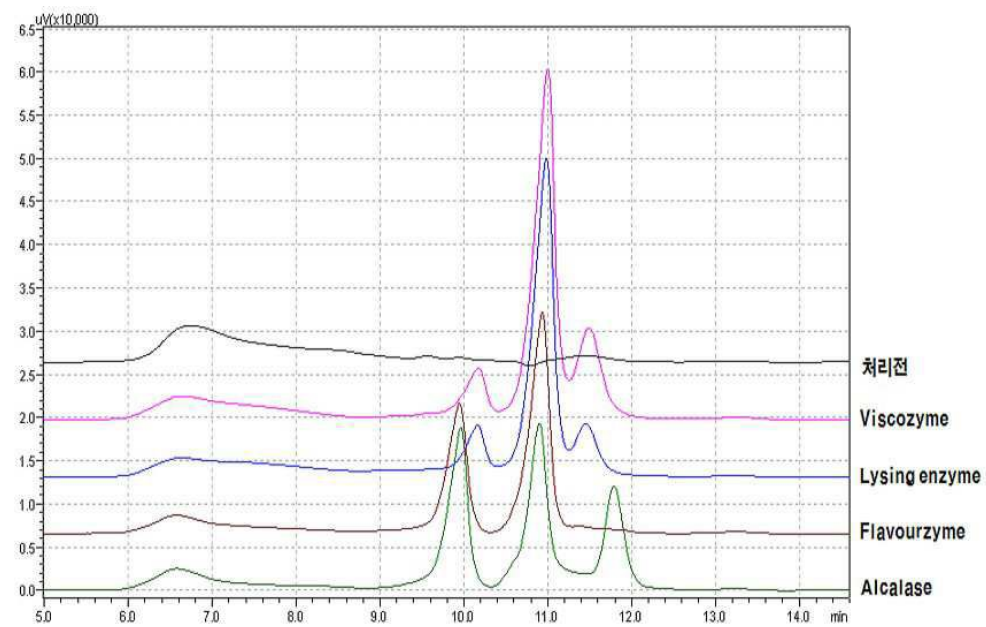
도면1



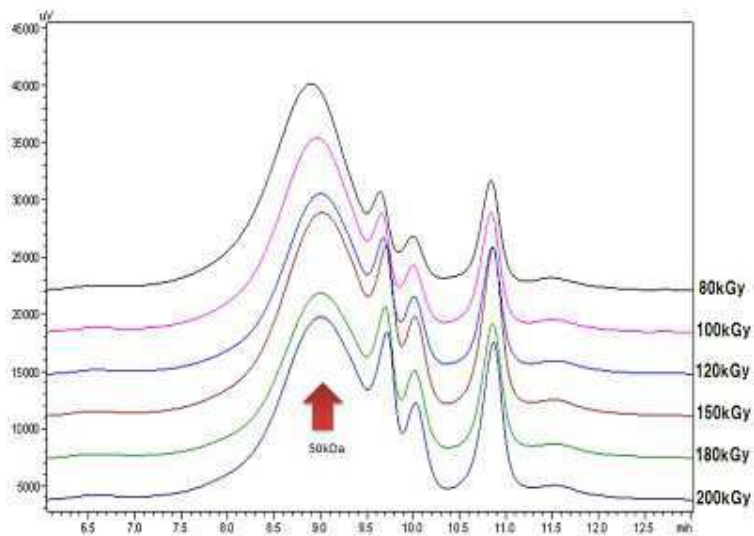
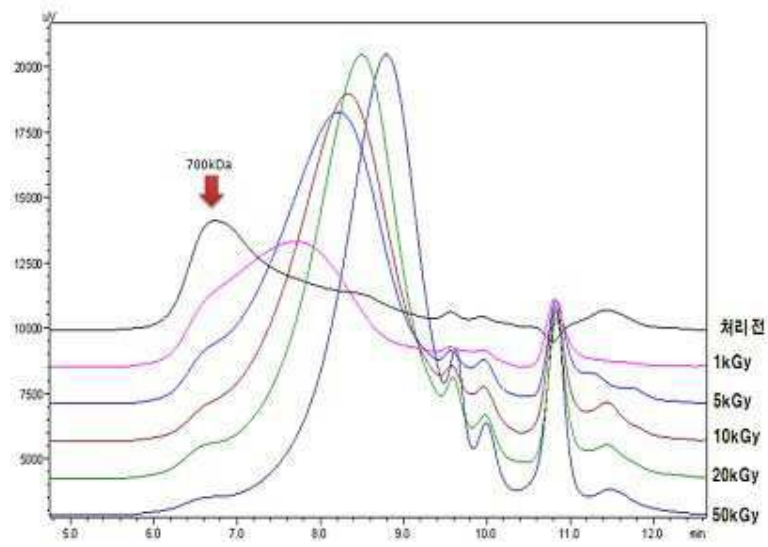
도면2



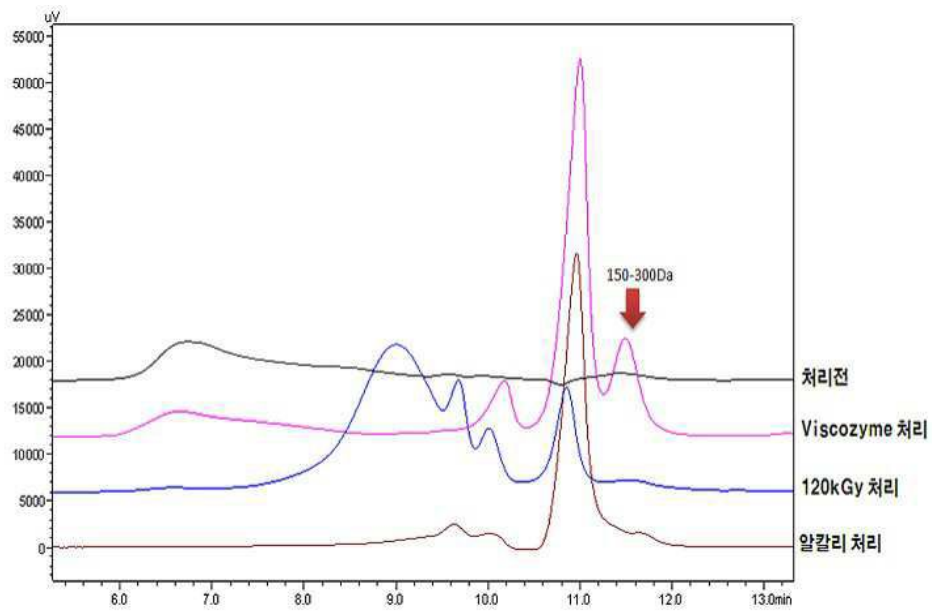
도면3



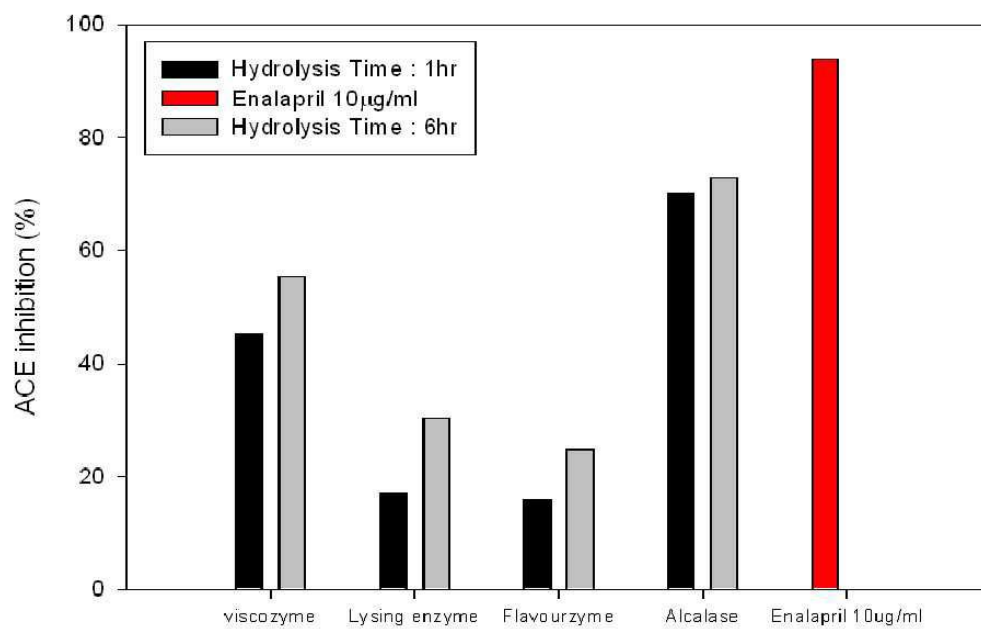
도면4



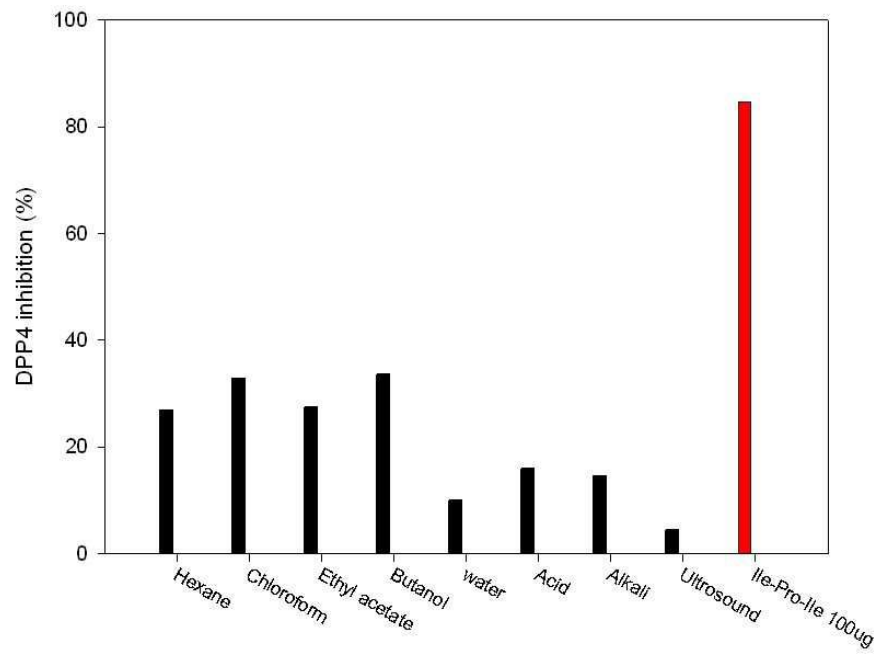
도면5



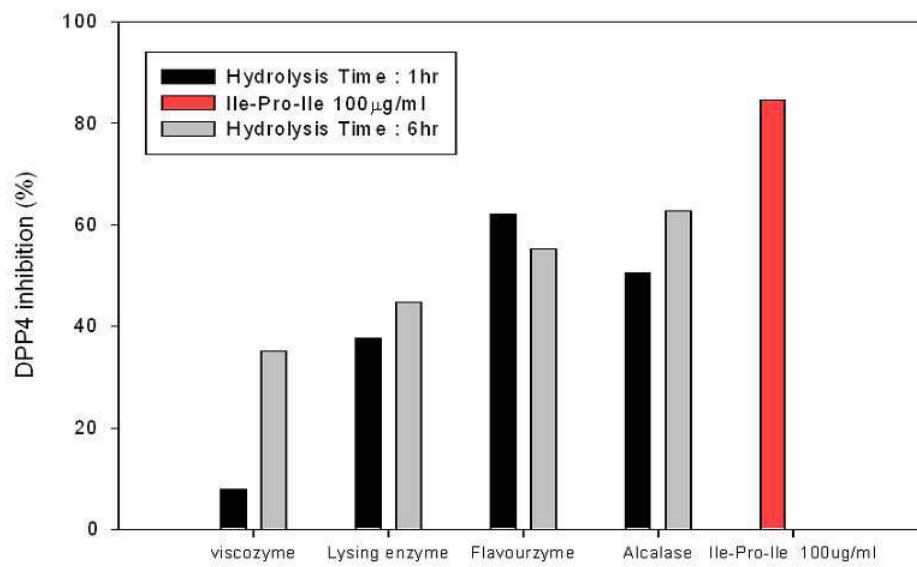
도면6



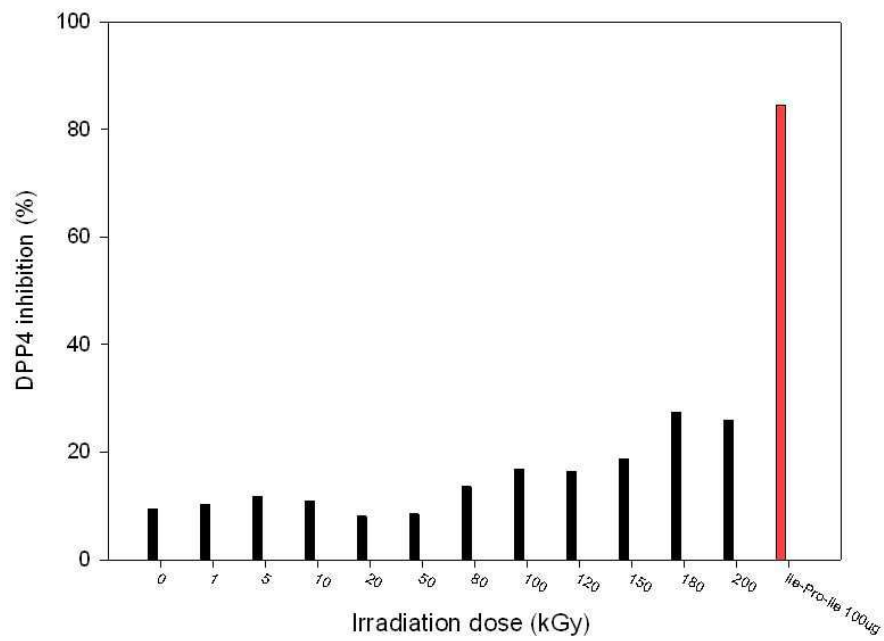
도면7a



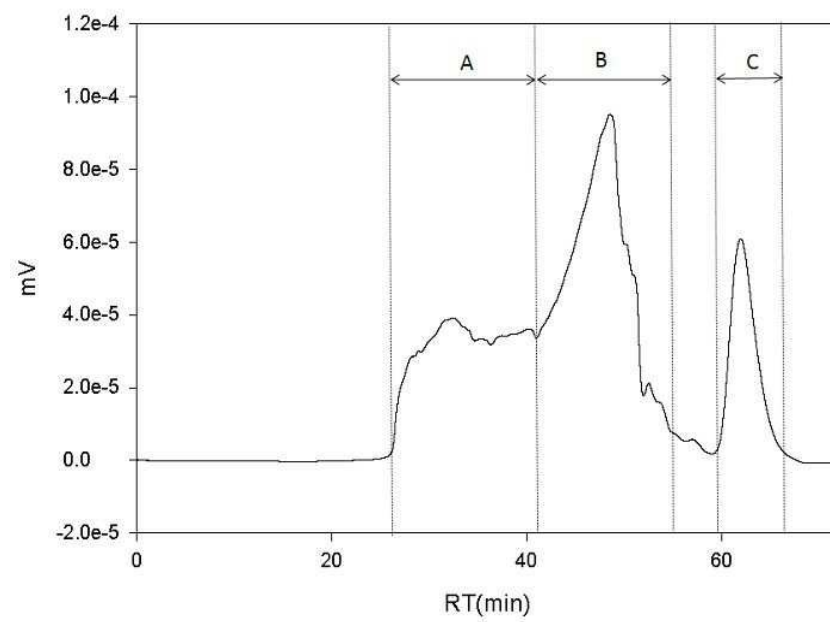
도면7b



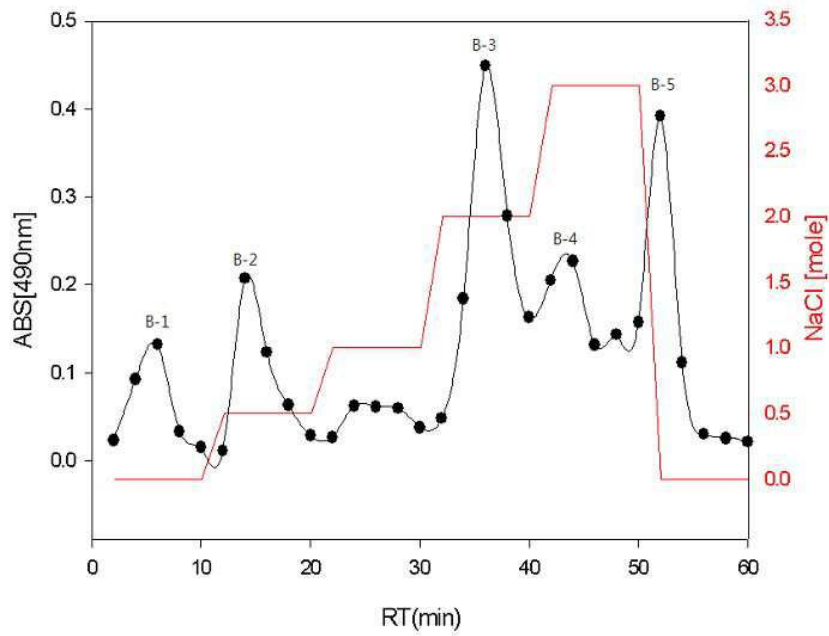
도면7c



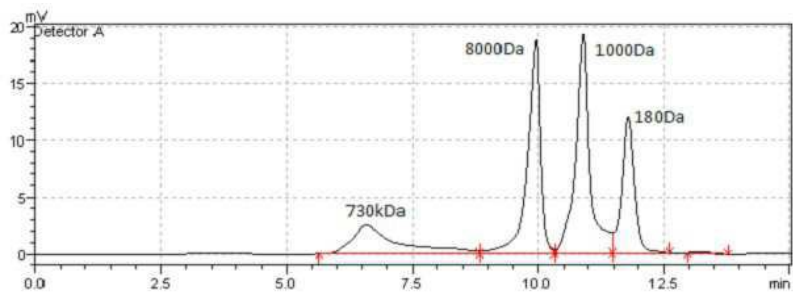
도면8



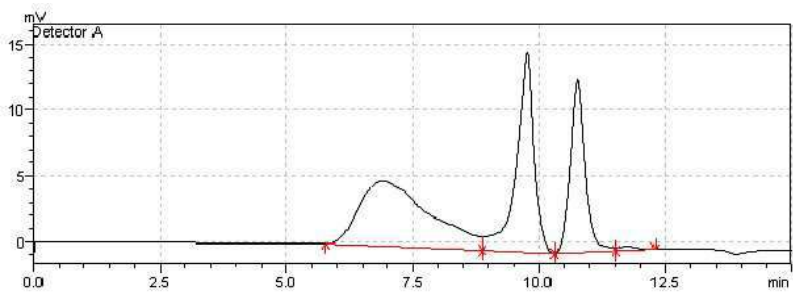
도면9



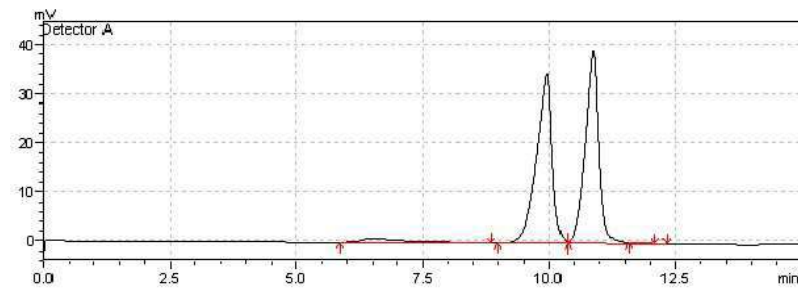
도면10a



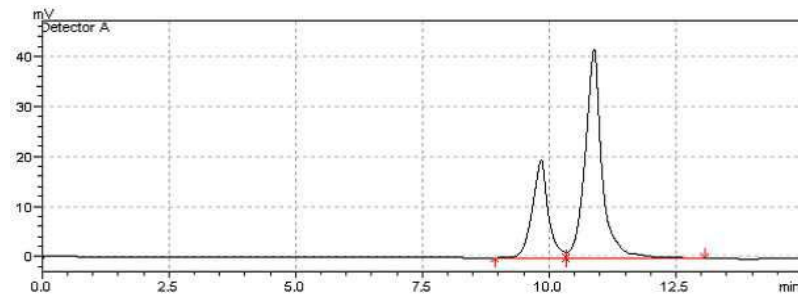
도면10b



도면10c



도면10d



도면10e

