



(19)대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(51) 。 Int. Cl.	(45) 공고일자	2007년02월07일
<i>C07K 1/14</i> (2006.01)	(11) 등록번호	10-0680066
<i>C07K 1/18</i> (2006.01)	(24) 등록일자	2007년02월01일

(21) 출원번호	10-2005-0116681	(65) 공개번호
(22) 출원일자	2005년12월02일	(43) 공개일자
심사청구일자	2005년12월02일	

(73) 특허권자 부경대학교 산학협력단
부산 남구 용당동 산 100번지 부경대학교내

(72) 발명자 김세권
부산 부산진구 연지동 세동한신아파트 105-304
정원교
부산광역시 서구 부용동2가 87-5 신한빌라 202

(74) 대리인 김일성

(56) 선행기술조사문헌
KR1019980034825 A
KR1020050099747 A
* 심사관에 의하여 인용된 문헌

심사관 : 손영희

전체 청구항 수 : 총 2 항

(54) 위-소장 소화분해 시스템을 이용한 가수분해물로부터 홍합항산화 펩타이드 분리방법

(57) 요약

본 발명은 위-소장 소화분해 시스템을 이용한 가수분해물로부터 혼합항산화 펩타이드의 분리방법에 관한 것으로, 더욱 상세하게는, 혼합단백질과 물을 혼합하여 위(胃)의 소화조건과 동일한 pH로 조절한 1차기질에 대하여, 펩신(Pepsin)을 위(胃)의 소화조건과 동일한 조건에서 1차가수분해하고; 1차가수분해를 통해 얻어진 가수분해물에 담즙산염 혼합물, 1M 염화칼슘, 0.25M 비스트리스(Bistris), 0.1% 돼지췌장 리파아제(porcine pancreatic lipase)를 혼합하여 pH를 조절한 2차기질에 대하여, 트립신(trypsin)과 알파-카이모트립신(α -chymotrypsin)을 소장(小腸)의 소화조건과 유사한 환경에서 저분자 펩타이드로 2차가수분해하고; 2차가수분해를 통해 얻어진 가수분해물을 원심분리과정과 투석과정을 거친 후, 동결건조하여 얻어진 위-소장 소화분해 시스템을 거친 혼합 가수분해물을 제조한 후, 이온교환 액체크로마토그래피(Ion exchange LC:Liquid Chromatography), 겔 여과 액체크로마토그래피(Gel filtration LC), 및 C18 역상 액체크로마토그래피(Reversed phase LC)를 이용한 연속적인 3단계의 정제과정을 거쳐; 가장 강한 항산화력을 나타내는 단일 펩티드를 분리하는 것을 특징으로 하여, 종래의 천연항산화제들 보다 우수한 지질 과산화 억제 활성화를 나타낼 뿐만아니라 활성 산소종과 라디칼, 과산화물질의 독성을 효과적으로 완화 혹은 제거할 수 있는 위-소장 소화분해 시스템을 이용한 가수분해물로부터 혼합항산화 펩타이드의 분리방법에 관한 것이다.

대표도

도 1

특허청구의 범위

청구항 1.

항산화 펩타이드의 분리방법에 있어서,

홍합단백질 20 g과 물 100 ml 을 혼합하여 pH를 1.8 - 2.2으로 조절한 1차기질에 대하여, 체온과 같은 35~40℃에서 반응 시간 1시간30분~2시간의 조건하에서 펩신(Pepsin)을 250:1로 반응시켜 1차가수분해하고;

1차가수분해를 통해 얻어진 가수분해물에 담즙산염 혼합물(a bile salt mixture), 1M 염화칼슘(CaCl), 0.25M 비스트리스(Bistris), 0.1% 돼지췌장 리파아제(porcine pancreatic lipase)를 혼합하여 pH를 8.0으로 조절한 2차기질에 대하여, 35~40℃에서 반응시간은 2시간~3시간의 조건하에서 트립신(trypsin)과 알파-카이모트립신(α -chymotrypsin)의 혼합물을 250:1 로 반응시켜 분자량 15kDa이하의 저분자 펩타이드로 2차가수분해하고;

2차가수분해를 통해 얻어진 가수분해물을 10,000 × g에서, 4 ℃의 조건하에서 15분간 원심분리하여 상층액만 회수한 다음, 100 Da 이하 분자량 투과막을 장치한 전기투석장치를 이용하여 투석하여 동결건조하여 홍합 가수분해물을 제조한 후;

제조된 위-소장 소화분해 시스템을 거친 홍합 가수분해물에 이온교환 액체크로마토그래피(Ion exchange LC:Liquid Chromatography), 겔 여과 액체크로마토그래피(Gel filtration LC), 및 C18 역상 액체크로마토그래피(Reversed phase LC)를 이용한 정제과정을 거쳐 단일 펩티드를 분리하는 것을 특징으로 하는 위-소장 소화분해 시스템을 이용한 가수분해물로부터 홍합항산화 펩타이드의 분리방법.

청구항 2.

항산화 펩타이드의 분리방법에 있어서,

홍합단백질 20 g과 물 100 ml 을 혼합하여 pH를 1.8 - 2.2으로 조절한 1차기질에 대하여, 체온과 같은 35~40℃에서 반응 시간 1시간30분~2시간의 조건하에서 펩신(Pepsin)을 250:1로 반응시켜 1차가수분해하고;

1차가수분해를 통해 얻어진 가수분해물에 담즙산염 혼합물(a bile salt mixture), 1M 염화칼슘(CaCl), 0.25M 비스트리스(Bistris), 0.1% 돼지췌장 리파아제(porcine pancreatic lipase)를 혼합하여 pH를 8.0으로 조절한 2차기질에 대하여, 35~40℃에서 반응시간은 2시간~3시간의 조건하에서 트립신(trypsin)과 알파-카이모트립신(α -chymotrypsin)의 혼합물을 250:1 로 반응시켜 분자량 15kDa이하의 저분자 펩타이드로 2차가수분해하고;

2차가수분해를 통해 얻어진 가수분해물을 10,000 × g에서, 4 ℃의 조건하에서 15분간 원심분리하여 상층액만 회수한 다음, 100 Da 이하 분자량 투과막을 장치한 전기투석장치를 이용하여 투석하여 동결건조하여 홍합 가수분해물을 제조한 후;

제조된 위-소장 소화분해 시스템을 거친 홍합 가수분해물에 이온교환 액체크로마토그래피(Ion exchange LC:Liquid Chromatography), 겔 여과 액체크로마토그래피(Gel filtration LC), 및 C18 역상 액체크로마토그래피(Reversed phase LC)를 이용한 정제과정을 거쳐 단일 펩티드를 분리하는 것을 특징으로 하는 위-소장 소화분해 시스템을 이용한 가수분해물로부터 홍합항산화 펩타이드.

명세서

발명의 상세한 설명

발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

본 발명은 위-소장 소화분해 시스템을 이용한 가수분해물로부터 홍합항산화 펩타이드의 분리방법에 관한 것으로, 더욱 상세하게는, 홍합단백질과 물을 혼합하여 위(胃)의 소화조건과 동일한 pH로 조절한 1차기질에 대하여, 펩신(Pepsin)을 위(胃)의 소화조건과 동일한 조건에서 1차가수분해하고; 1차가수분해를 통해 얻어진 가수분해물에 담즙산염 혼합물, 1M 염화칼슘, 0.25M 비스트리스(Bistris), 0.1% 돼지췌장 리파아제(porcine pancreatic lipase)를 혼합하여 pH를 조절한 2차기질에 대하여, 트립신(trypsin)과 알파-카이모트립신(α -chymotrypsin)을 소장(小腸)의 소화조건과 유사한 환경에서 저분자 펩타이드로 2차가수분해하고; 2차가수분해를 통해 얻어진 가수분해물을 원심분리과정과 투석과정을 거친 후, 동결건조하여 얻어진 위-소장 소화분해 시스템을 거친 홍합 가수분해물을 제조한 후, 이온교환 액체크로마토그래피(Ion exchange LC:Liquid Chromatography), 겔 여과 액체크로마토그래피(Gel filtration LC), 및 C18 역상 액체크로마토그래피(Reversed phase LC)를 이용한 연속적인 3단계의 정제과정을 거쳐; 가장 강한 항산화력을 나타내는 단일 펩티드를 분리하는 것을 특징으로 하여, 종래의 천연항산화제들 보다 우수한 지질 과산화 억제 활성화를 나타낼 뿐만아니라 활성 산소종과 라디칼, 과산화물질의 독성을 효과적으로 완화 혹은 제거할 수 있는 위-소장 소화분해 시스템을 이용한 가수분해물로부터 홍합항산화 펩타이드의 분리방법에 관한 것이다.

일반적으로, 항산화제는 산화를 방지하는 물질을 통칭하는 것으로 그 작용기작에 따라 자동산화의 연쇄반응을 제어하는 유리 라디칼 소거제, 과산화물을 비라디칼로 분해하여 불활성화시키는 과산화물 분해제(peroxide decomposer), 미량금속의 산화 촉진작용을 불활성화하는 금속 불활성화제(metal deactivator), 자동산화에 있어서 라디칼저해제와 공존시 항산화작용을 증가시키는 상승제(synergist) 및 각종 활성산소계를 소거하는 일중항산소 제거제 등으로 분류된다. Ingold (1968)는 항산화제를 다시 크게 두 그룹으로 나누었는데, 첫째 일차 또는 연쇄반응-종료 항산화제로서 지질라디칼과 반응하여 더욱 안정한 생성물로 바꾸는 그룹과 둘째 이차 또는 지연 항산화제로서 다른 작용기작에 의해 자동산화를 지연시키는 그룹으로 나누었다. 일차 항산화제는 상대적으로 안정한 라디칼을 만들기 위해 지질 유리라디칼에 수소원자를 제공함으로써 연쇄 반응의 연장을 저지하여 자동산화를 막는다. 이러한 형태의 항산화제는 대부분 페놀 화합물로서 토코페롤, 갈산과 그 유도체, 퀘르세틴(quercetin), 람네티(rhamnetin), 캄페롤(kampferol), 루틴(rutin), 퀘르시트린(quercitrin) 및 카페인산(caffeic acid) 등의 플라보노이드(flavonoid)계가 알려져 있다.

이차 항산화제는 순수한 지질에서 항산화 효과를 나타내지 않지만 일차 항산화제의 효과를 증대시키거나 산화촉진제의 효과를 저해시킨다. 이러한 형태의 항산화제는 토코페롤과 같은 일차 항산화제와 상승작용을 가지는 인지질과 산화촉진 금속이온과 킬레이트되는 구연산 그리고 비타민 C 등이 있다. 대표적인 산화반응인 지질의 산패는 주로 높은 온도나 빛에 의해 생성된 지질 라디칼($L\cdot$)이나 일중항 산소(singlet oxygen)에 의해 과산화물의 생성과 분해가 연쇄적으로 일어나는 반응으로 이들 페놀성 항산화제가 존재시에는 페놀성 히드록시기가 유지의 유리기 수용체로서 작용하여 유지산패의 초기 단계에 생성된 유리기들이 안정한 공명 혼성체를 형성하도록 하여 산화 억제 작용을 하게 된다. 이러한 항산화제는 각종 식물 추출물, 향료, 발효생산물 등에 플라보노이드 또는 페놀계 화합물로 존재한다. 또한 동식물의 단백질을 산이나 각종 효소를 이용하여 가수분해시켜 생산한 올리고펩티드도 항산화활성을 나타낸다고 보고되고 있다(未綱 등, 1989; 本井, 1989). 합성 항산화제로는 입체 장애를 나타내는 큰 치환기를 가져 안정한 라디칼을 형성하여 항산화성을 나타내는 페놀계 화합물과 황계 화합물, 구연산과 그 유도체들, 인산과 그 유도체들(Macrae 등, 1993) 등이 알려져 있다.

현재 항산화제의 연구 방향은 종래의 식품 산화방지제로서의 한정된 연구(大澤, 1985)에서 노화나 발암의 원인이 되는 산소 라디칼이나 산화물 라디칼의 소거제로서의 역할(八木, 1981)과 생체내 지질과산화 반응의 억제 또는 라디칼의 관여로 발생된다고 추정하는 변이원성(大澤, 1982) 및 암원성의 발현억제(大澤, 1983) 등의 효과에 관한 폭넓은 연구가 이루어지고 있다.

합성 항산화제는 동물실험에서 발생과 각종 효소군 등에 영향을 주고, 특히 BHT는 기형발생 또는 암발생에 관여하는 것으로 보고되어(Branen, 1975) 뛰어난 항산화효과에 비해 부작용으로 인해 문제시 되고 있는 반면, 천연 항산화제는 부작용이 거의 없어 식품첨가물 또는 약품으로 현재 널리 이용되고 있다. 그러나 천연 항산화제 중 가장 널리 이용되는 토코페롤의 경우 비싼 가격과 지용성이라는 이용상의 제약을 갖기 때문에 대체 천연 항산화제의 개발이 요망되고 있다.

종래의 천연항산화제는 식품단백질 가수분해물로서 콩단백질인 베타 콩글리신(beta conglycinin)에서 분리한 N 말단에 류신(leucine)이나 발린(valine)을 포함하고 있는 펩티드(peptide), 달걀흰자의 알부민(albumin)에서 유래된 히스티딘(histidine)을 포함하고 있는 펩티드, 소 껍질(bovine skin) 가수분해물에서 분리된 펩티드들이 항산화 효과를 나타내고 있는 것으로 알려져 있다.

그러나 ‘수산물 섭취 비율이 암 발병률 및 사망률과 유의적으로 반비례한다.’라는 사실은 미국 일본 등 수·해양 선진국의 역학적 통계조사에 의하여 널리 알려져 있음에도 그를 뒷받침할 과학적 근거가 부족할 뿐만 아니라, 음식물 섭취 시, 위와 소장의 생리적 소화과정과 동일한 가수분해 시스템하에서 노화나 암, 당뇨 등의 난치성 질환을 억제함을 과학적으로 증명한 사실은 상기 통계자료를 비롯한 어느 문헌에도 찾아볼 수 없는 실정이었다.

발명이 이루고자 하는 기술적 과제

따라서 본 발명의 목적은 상기와 같은 종래의 여러 가지 문제점을 개선시키기 위하여 안출한 것으로, 홍합단백질에서 가장 강한 항산화력을 나타내는 단일 펩티드만 분리하기 위해 2단계의 가수분해과정과 원심분리과정, 투석과정, 동결건조과정, 3단계의 정제과정을 가지는 것을 특징으로 하여 종래의 천연항산화제들 보다 우수한 지질 과산화 억제 활성화를 나타낼 뿐만아니라 활성 산소종과 라디칼, 과산화물질의 독성을 효과적으로 완화 혹은 제거할 수 있는 위-소장 소화분해 시스템을 이용한 가수분해물로부터 홍합항산화 펩타이드의 분리방법을 제공하는데 그 목적이 있다.

발명의 구성

본 발명은 위-소장 소화분해 시스템을 이용한 가수분해물로부터 홍합항산화 펩타이드의 분리방법에 관한 것으로, 더욱 상세하게는, 홍합단백질과 물을 혼합하여 위(胃)의 소화조건과 동일한 pH로 조절한 1차기질에 대하여, 펩신(Pepsin)을 위(胃)의 소화조건과 동일한 조건에서 1차가수분해하고; 1차가수분해를 통해 얻어진 가수분해물에 담즙산염 혼합물, 1M 염화칼슘, 0.25M 비스트리스(Bistris), 0.1% 돼지췌장 리파아제(porcine pancreatic lipase)를 혼합하여 pH를 조절한 2차기질에 대하여, 트립신(trypsin)과 알파-카이모트립신(α -chymotrypsin)을 소장(小腸)의 소화조건과 유사한 환경에서 저분자 펩타이드로 2차가수분해하고; 2차가수분해를 통해 얻어진 가수분해물을 원심분리과정과 투석과정을 거친 후, 동결건조하여 얻어진 위-소장 소화분해 시스템을 거친 홍합 가수분해물을 제조한 후, 이온교환 액체크로마토그래피(Ion exchange LC:Liquid Chromatography), 겔 여과 액체크로마토그래피(Gel filtration LC), 및 C18 역상 액체크로마토그래피(Reversed phase LC)를 이용한 연속적인 3단계의 정제과정을 거쳐; 가장 강한 항산화력을 나타내는 단일 펩티드를 분리하는 것을 특징으로 하여, 종래의 천연항산화제들 보다 우수한 지질 과산화 억제 활성화를 나타낼 뿐만아니라 활성 산소종과 라디칼, 과산화물질의 독성을 효과적으로 완화 혹은 제거할 수 있는 위-소장 소화분해 시스템을 이용한 가수분해물로부터 홍합항산화 펩타이드의 분리방법에 관한 것이다.

본 발명의 구성을 홍합항산화 펩타이드의 분리방법을 나타낸 실시예와, 항산화성을 측정하기 위한 실험예를 통하여 설명하면 다음과 같다.

[실시예] 위 -소장 소화분해 시스템을 이용한 가수분해물로부터 홍합항산화 펩타이드의 분리방법

[가수분해물의 제조]

홍합 단백질을 20g에 물을 100ml 가하고, 위(胃) 소화조건과 동일한 pH 1.8~2.2으로 맞춘 1차기질에 대하여, 펩신(Pepsin, EC 3.4.23.1)을 250:1, 온도 35~40℃, 반응시간 1시간 30분~2시간으로 위(胃)조건과 유사한 환경에서 1차가수분해 시켰다. 1차가수분해물에 담즙산염 혼합물(0.125 M 타우로콜레이트, 0.125 M 글리코데옥시콜릭산), 1M 염화칼슘(CaCl), 0.25M 비스트리스(Bistris, pH 6.5), 0.1%(w/v) 돼지췌장 리파아제(porcine pancreatic lipase, EC 3.1.1.3)들과 함께 섞은 후, pH8.0로 맞춘 2차기질에 대하여, 트립신(trypsin, EC 3.4.21.4)과 알파-카이모트립신(α -chymotrypsin, EC 3.4.21.1)을 250:1, 온도 35~40℃, 반응시간 2시간~3시간으로 소장(小腸) 조건과 유사한 환경에서 2차가수분해 시켰다. 2차가수분해 후, 원심분리(10,000×g, 15분, 4℃)하여 상층액 만 회수한 다음, 100 Da 이하 분자량 투과막을 장치한 전기투석장치(electrodialyzer, Micro Acilyzer model G3, 아사히 화학공업사 제품, 도쿄, 일본)를 이용하여 투석한 다음, 동결 건조하여 위-소장 소화분해 시스템을 거친 홍합 가수분해물로 사용하였다.

홍합을 인체의 위(胃), 소장(小腸)의 생리조건과 동일한 과정을 통해 1, 2차가수분해시킨 결과, 대부분이 분자량 15kDa 이하의 저분자 펩타이드로 가수분해 되었음을 알 수 있었다(도 2 참조).

도 2의 홍합 가수분해물들의 변성조건 폴리아크릴아마이드 겔 (SDS-PAGE)상에서 전기영동결과이며 G는 위(胃)에서 가수분해물(gastric digestion), D는 십이지장에서 가수분해물(duodenal digestion)을 나타낸다.

[항산화성 펩티드의 분리 및 정제]

위-소장 소화분해 시스템을 거친 혼합 가수분해물을 20 mM 소듐아세트이트 완충용액(sodium acetate buffer, pH 4.0) 평형화시킨 음이온 교환수지 충전 칼럼(Hiprep 16/10 DEAE FF anion exchange column)으로 분리하여 얻어진 획분을 투석(제품명 spectraper membrane tubing, 제조사 sartorius, 독일)하여 염을 제거하고 동결건조하였다. 동결건조물의 분획별 항산화성을 측정한 후 항산화력이 높은 획분을 고성능액체크로마토그래피(HPLC) 시스템 상에서 역상크로마토그래피 칼럼 (reversed-phase LC columne) 10.0 × 250mm을 사용하여 용리하였다. 용리속도는 1.0ml/min, 이동상으로는 증류수와 0.1-40%(v/v) 아세토니트릴을 사용하여 선형상 농도구배법으로 215과 280에서 흡광도를 측정하였다.

위-소장 소화분해 시스템을 거친 혼합 가수분해물에서 가장 강한 항산화력을 나타내는 단일 펩티드만 분리하기 위해 3단계의 정제과정, 즉 이온교환 액체크로마토그래피(Ion exchange LC:Liquid Chromatography), 겔 여과 액체크로마토그래피(Gel filtration LC), 및 C18 역상 액체크로마토그래피(Reversed phase LC)를 이용하여 연속적으로 분리하였으며 각각의 지질 과산화 억제효과를 천연 항산화제인 토코페롤(vit E) 및 아스코르브산(vit C)와 비교, 정량화 하였다(도 3참조).

음이온 크로마토그래피의 분획물 중에서 항산화성이 뛰어난 펩티드가 함유되어 있는 획분을 동결건조한 후, 역상 크로마토그래피 컬럼(ODS(octadecylsilane) C18 reversed phase column)이 장착된 고성능액체크로마토그래피(HPLC)를 이용하여 HO와 아세토니트릴(acetonitrile)용액으로 선형상 농도 구배법(0.1-40% 아세토니트릴, 40min)으로 용출시켜(1 ml) 분리한 결과 획분 3개로 나뉘어졌다. 3개로 분획된 획분의 항산화성을 측정한 결과 가장 뛰어난 활성 획분을 전기분무 이온화 tandem 질량분석(ESI-QTOF tandem mass)을 통하여 분자량과 아미노산서열을 확인하였으며, 그 결과 분자량이 1.5kDa인 단일 펩티드, 루신-발린-글라이신-글루타메이트-글루타민-알라닌-발린-프롤린-알라닌-발린-시스틴-발린-프롤린(LVGEQAVPAVCVP)임을 확인되었다(도 4a, 도 4b 참조).

[실험예] 항산화성 측정

[리놀레산 에멀전(linoleic acid emulsion) 제조]

리놀레산 에멀전(linoleic acid emulsion)은 Osawa(1981)의 방법에 따라 제조하였다. 즉, 리놀레산 0.13ml, 에탄올 10ml, 50mM 인산완충용액(pH 7.0) 10ml를 혼합하고, 이 혼합물에 가수분해물을 리놀레산(linoleic acid)에 대해 각각 1%(w/w)의 농도로 첨가하여 40±1℃로 조절된 항온기내에서 저장하여 자동산화를 촉진시켰다.

[페릭치오시아네이트(Ferric thiocyanate) 방법]

페릭치오시아네이트(Ferric thiocyanate) 의한 항산화 활성 측정은 Mitsuda(1966)등의 방법에 따라 실시하였다. 즉, 유지 혼탁액 0.1ml에 75% 에탄올 4.7ml, 30% 암모늄 치오시아네이트(ammonium thiocyanate) 0.1ml 및 2×10⁻³ M 염화제일철(ferrous chloride)/3.5% 염산(HCl) 0.1ml를 가한 후 3분간 실온에서 장치한 후 500 nm에서 흡광도를 측정하였다.

[자유라디칼소거능(Radical scavenging activity) 측정]

본 획분 DPPH 라디칼(radical), 슈퍼옥사이드 라디칼(cuperoxide radical), 하이드록시 라디칼(Hydroxyl radical)을 전자스핀공명 분광광도계(electron spin resonance spectroscopy)를 이용하여 측정한 자유라디칼 소거능의 실험에서 유의적인 활성을 보여주었다(도 5참조).

획분 소거능의 라디칼(radical) 농도 백분율의 계산은 다음과 같다.

1. DPPH 라디칼 소거능(radical scavenging activity) 측정

DPPH 라디칼(radical) 소거기능은 사람명 Nanjo(1996) 등의 방법에 따라 시행하였다. 즉, 60uM DPPH 에탄올 용액 60 μ l 와 60 μ l 가수분해물 용액을 혼합한 후, 혼합한 용액을 quartz capillary tube에 옮긴 후 2분후에 전자스핀공명 분광광도계(electron spin resonance spectroscopy)로 측정하였다. 스펙트럼은 전기장(field): 336.5 ± 5 mT, 파워(power): 5 mW, 진폭(amplitude): 1× 1000, 변조너비(modulation width): 0.8 mT, 일소너비(sweep width): 10 mT, 일소시간(sweep time): 30s의 조건으로 기록하였다. 아래의 식을 이용하여 DPPH 라디칼 소거능력을 계산하였다.

DPPH 라디칼 소거능력, % = [100 - (샘플처리시 전자스핀공명시그널 면적/샘플무처리시 전자스핀공명시그널 면적)] × 100.

2. 슈퍼옥사이드 라디칼 소거능(Superoxide radical scavenging activity) 측정

슈퍼옥사이드 라디칼 소거능력은 Gue(1999)등의 방법에 따라 측정하였다. 즉, 0.3 mM 리보플라빈(riboflavin) 20 μ l, 5.0 mM EDTA 20 μ l, 0.1 M DMPO 20 μ l 와 가수분해물 용액 20 μ l 혼합한 후, 365 nM의 UV 램프로 1분간 쪼이고, 쪼인 용액을 석영모세관(quartz capillary tube)에 옮긴 후, 2분후에 전자스핀공명 분광광도계(electron spin resonance spectroscopy)로 측정하였다. 스펙트럼은 전기장(field): 336.5 $\pm$ 5 mT, 파워(power): 10mW, 진폭(amplitude): 1 $\times$ 1000, 주사너비(scan width): 10 mT, 일소시간(sweep time): 30s의 조건으로 기록하였다. 아래의 식을 이용하여 슈퍼옥사이드 라디칼 소거능력(superoxide radical scavenging activity)를 계산하였다.

슈퍼옥사이드 라디칼 소거능, % = [100 - (샘플처리시 전자스핀공명시그널 면적/샘플무처리시 전자스핀공명시그널 면적)] $\times$ 100.

3. 과산화수소 라디칼 소거능(Hydroxyl radical scavenging activity) 측정

과산화수소 라디칼(Hydroxyl radical) 소거기능은 Rosen G.M (1984)의 방법에 준하여 측정하였다. 즉, 가수분해물 용액 0.2ml에 0.3M 5,5-디메틸-1-피롤린 N-옥사이드 0.2ml (5,5-dimethyl-1-pyrroline N-oxide (DMPO)) 0.2ml 10 mM 황산철(FeSO₄)를 0.2ml, 10 mM HO 0.2ml 혼합한 다음 실온에서 2.5분 방치한 후에 quartz capillary tube에 옮겨 전자스핀공명 분광광도계(electron spin resonance spectroscopy)로 측정하였다. 스펙트럼은 전기장(field): 336.5 $\pm$ 5 mT, 파워(power): 1mW, 진폭(amplitude): 1 $\times$ 200, 조정너비(modulation width): 0.1 mT, 일소너비(sweep width): 10 mT, 일소시간(sweep time): 30s의 조건으로 기록하였다. 아래의 식을 이용하여 과산화수소라디칼의 소거능(hydroxyl radical scavenging activity)를 계산하였다.

과산화수소 라디칼 소거능 = [100 - (샘플처리시 전자스핀공명시그널 면적/샘플무처리시 전자스핀공명시그널 면적)] $\times$ 100.

발명의 효과

전술한 구성 및 작용에 의한 효과를 상세하게 설명하면 다음과 같다.

본 발명의 위-소장 소화분해 시스템을 이용한 가수분해물로부터 혼합 향산화 펩타이드의 분리방법은 혼합단백질의 2단계의 가수분해 과정과 원심분리과정, 투석과정, 동결건조과정, 3단계의 정제과정을 통하여 인체에 해로운 활성 산소종과 라디칼, 과산화물질의 독성을 효과적으로 완화 혹은 제거하는 효과를 가지는 단일 펩타이드를 제공한다.

도면의 간단한 설명

도 1는 본 발명의 위-소장 소화분해 시스템을 이용한 가수분해물로부터 혼합향산화 펩타이드의 분리방법의 제조흐름도

도 2는 본 발명의 혼합 가수분해물들의 변성조건 폴리아크릴아마이드 겔 (SDS-PAGE)상에서의 전기영동결과

도 3은 본 발명의 혼합 가수분해물 정제에 따른 지질과산화 저해효과그래프

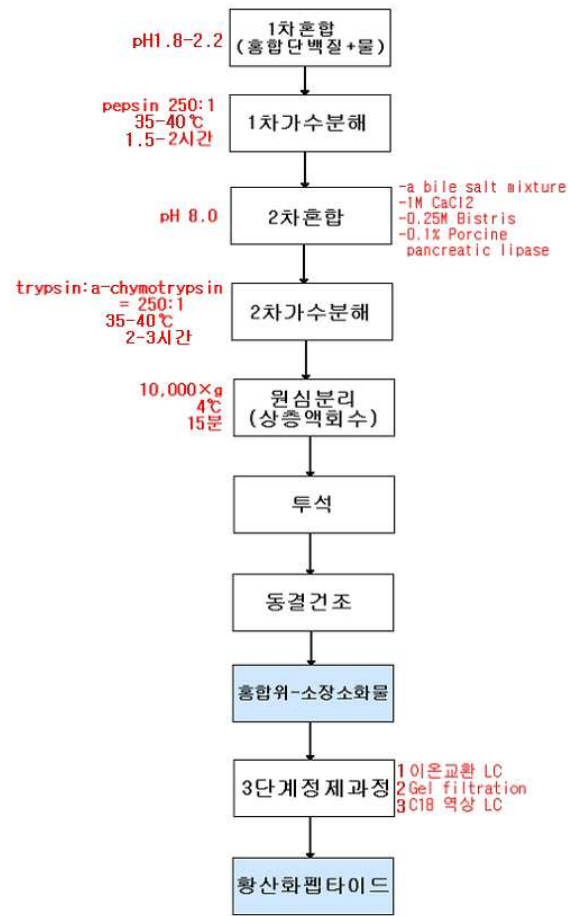
도 4a는 본 발명 활성획분의 전기분무이온화 tandem질량분석기(ESI-QTOF tandem mass)를 이용한 아미노산 서열분석의 최종정제 혼합향산화 펩타이드의 1차이온 피크(peak)그래프

도 4b는 본 발명 활성획분의 전기분무이온화 tandem질량분석기(ESI-QTOF tandem mass)를 이용한 아미노산 서열분석의 2차 이온화 및 분자이온 분석을 통한 아미노산 서열동정그래프

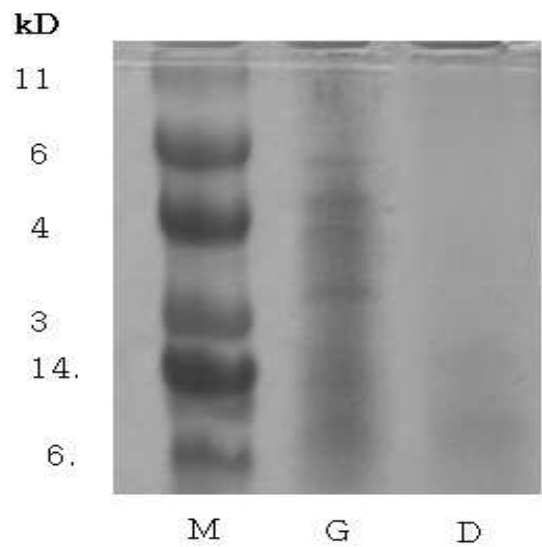
도 5는 본 발명의 혼합 위장관 가수분해물로부터 최종 정제된 향산화 펩타이드의 라디칼 소거능그래프

도면

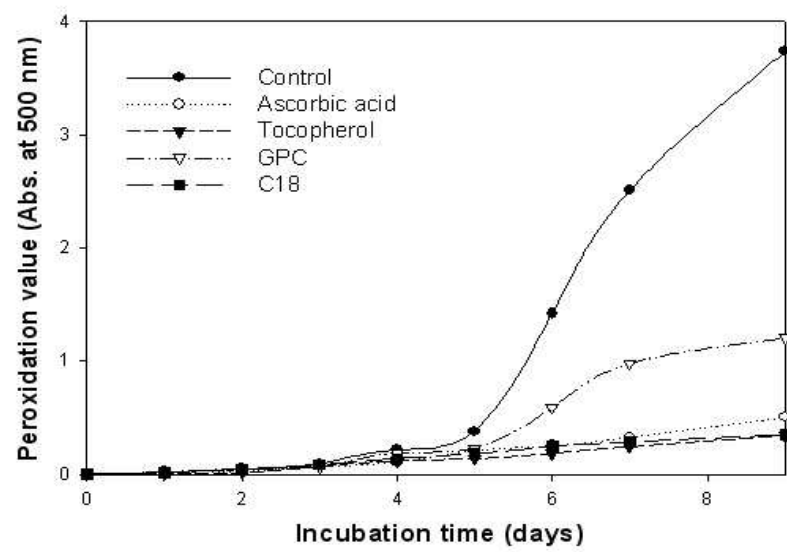
도면1



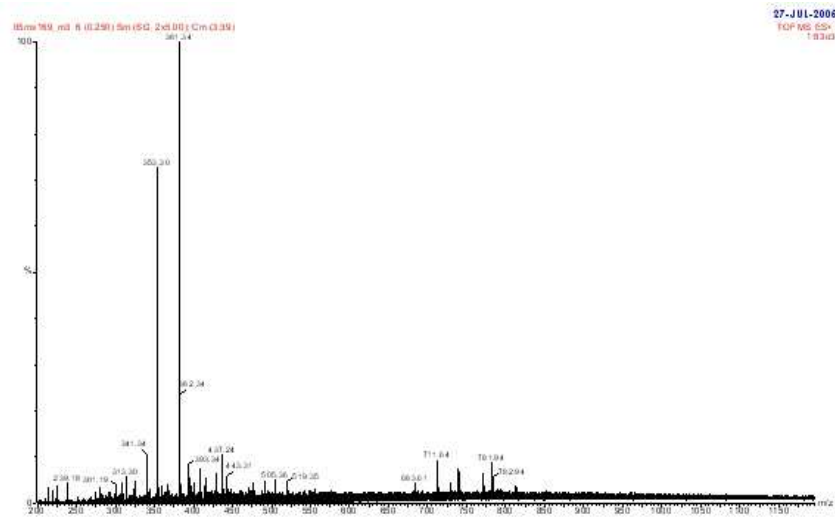
도면2



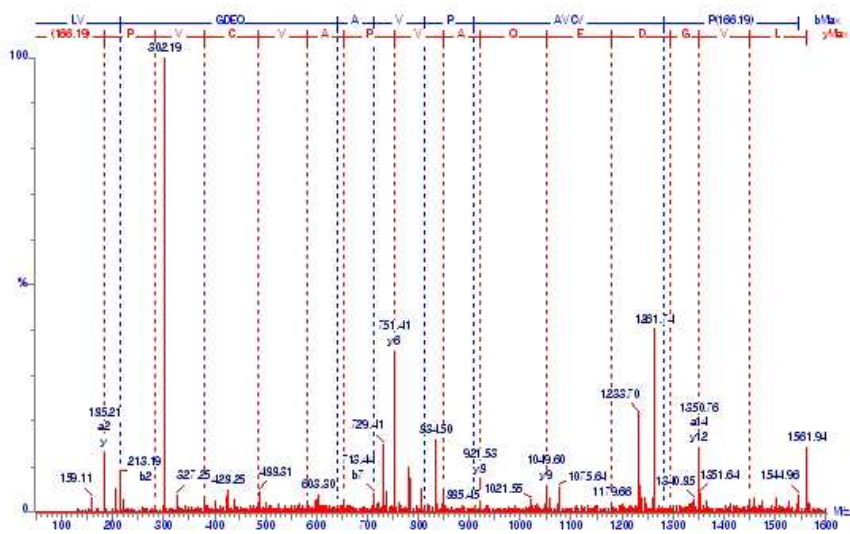
도면3



도면4a



도면4b



도면5

라디칼 농도 백분율	무첨가군	홍합항산화펩타이드 첨가군
과산화수소 라디칼 소거능 Hydroxyl radical scavenging activity : 79.67%		
수퍼옥사이드 라디칼 소거능 Superoxide radical scavenging activity : 14.39%		
DPPH 라디칼 소거능 DPPH radical scavenging activity : 84.88%		