



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2024-0159178
(43) 공개일자 2024년11월05일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 35/64 (2015.01) A61K 38/01 (2006.01)

A61P 29/00 (2023.01)

(52) CPC특허분류

A61K 35/64 (2013.01)

A61K 38/012 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2023-0056130

(22) 출원일자 2023년04월28일

심사청구일자 없음

(71) 출원인

함께크는식품 협동조합

부산광역시 강서구 낙동남로1013번길 58 (명지동)

경상국립대학교산학협력단

경상남도 진주시 진주대로 501 (가좌동)

(72) 발명자

최재석

부산광역시 해운대구 선수촌로 95 센텀대림아파트 106동 2501호

김은지

부산광역시 기장군 철마면 고촌로44번길 16, 103동 406호

박정민

부산광역시 강서구 과학산단2로20번길 91, 103동 2202호

(74) 대리인

특허법인 천지

전체 청구항 수 : 총 10 항

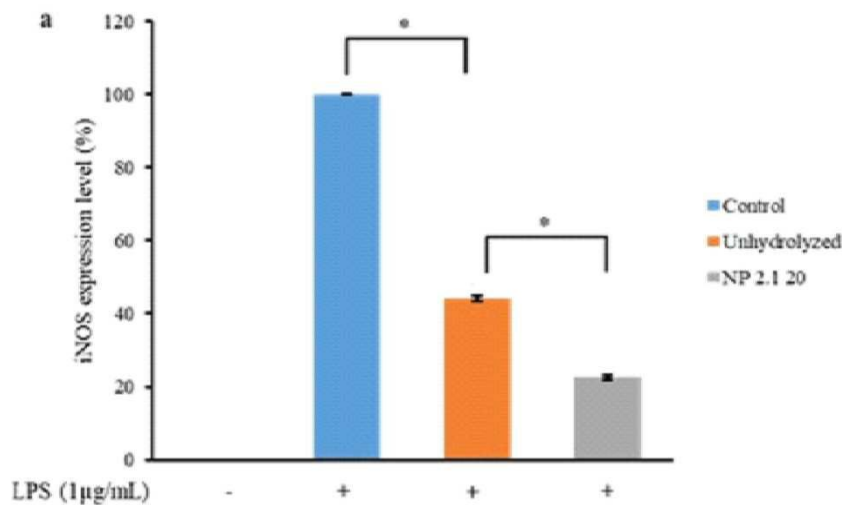
(54) 발명의 명칭 수벌번데기 가수분해물을 유효성분으로 포함하는 항염 조성물

(57) 요약

본 발명은 항염 조성물 또는 항염증용 약학 조성물에 관한 것이다. 상기 조성물은 수벌번데기 가수분해물, 구체적으로 수벌번데기를 단백가수분해효소로 가수분해한 가수분해물을 유효성분으로 포함하는 것이다. 상기 수벌번데기 가수분해물은 알칼라제(alkalase), 뉴트라제(neutrase) 및 프로타맥스(protamax)로 이루어진 군 중에서 선택된 1종 이상인 것, 구체적으로는 뉴트라제(neutrase) 및 프로타맥스(protamax)를 혼합한 혼합물로 처리하여 가수분해한 것일 수 있다.

본 발명의 항염 조성물은 기존의 항염 물질과 달리 식용으로 사용될 수 있는 안전한 천연물인 수벌번데기에서 비롯하여 부작용 등이 문제되지 아니하고, 안전성이 우수할 뿐만 아니라, COX-2의 발현을 효과적으로 억제할 수 있고, NO 생성을 억제할 수 있으므로, 항염 효과를 가지는 것으로 확인되었다.

대표도 - 도1a



(52) CPC특허분류

A61P 29/00 (2023.02)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1425166357
과제번호	S3228349
부처명	중소벤처기업부
과제관리(전문)기관명	중소기업기술정보진흥원
연구사업명	창업성장기술개발사업 디딤돌
연구과제명	수벌번데기 단백질 가수분해물을 이용한 기능성 반려동물 간식 소재 개발 및 상품화
기 여 율	1/1
과제수행기관명	함께크는식품협동조합
연구기간	2022.05.02 ~ 2023.05.01

명세서

청구범위

청구항 1

수벌번데기 가수분해물을 유효성분으로 포함하는 항염 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 수벌번데기 가수분해물은 수벌번데기를 단백가수분해효소로 가수분해한 것을 특징으로 하는 항염 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 수벌번데기는 서양종 꿀벌(*Apis mellifera*) 수벌번데기인 것을 특징으로 하는 항염 조성물.

청구항 4

제2항에 있어서,

상기 단백가수분해효소는 알칼라제(alcalase), 뉴트라제(neutrased) 및 프로타맥스(protamax)로 이루어진 군 중에서 선택된 1종 이상인 것을 특징으로 하는 항염 조성물.

청구항 5

제4항에 있어서,

상기 단백가수분해효소는 뉴트라제(neutrased) 및 프로타맥스(protamax) 혼합물인 것을 특징으로 하는 항염 조성물.

청구항 6

제1항에 있어서,

상기 수벌번데기 가수분해물은 서양종 꿀벌(*Apis mellifera*) 수벌번데기를 뉴트라제(neutrased) 및 프로타맥스(protamax)의 처리량을 효소활성단위를 기준으로 2:1(뉴트라제 : 프로타맥스)의 비율로 처리하여, 가수분해시켜 수득한 것을 특징으로 하는 항염 조성물.

청구항 7

수벌번데기를 단백가수분해효소로 가수분해한 수벌번데기 가수분해물을 유효성분으로 포함하는 항염증용 약학 조성물.

청구항 8

제7항에 있어서,

상기 수벌번데기는 서양종 꿀벌(*Apis mellifera*) 수벌번데기인 것을 특징으로 하는 항염증용 약학 조성물.

청구항 9

제7항에 있어서,

상기 단백가수분해효소는 알칼라제(alcalase), 뉴트라제(neutrased) 및 프로타맥스(protamax)로 이루어진 군 중에서 선택된 1종 이상인 것을 특징으로 하는 항염증용 약학 조성물.

청구항 10

제7항에 있어서,

상기 수벌번데기 가수분해물은 서양종 꿀벌(*Apis mellifera*) 수벌번데기를 뉴트라제(neutrase) 및 프로타맥스(protamax)의 처리량을 효소활성단위를 기준으로 2:1(뉴트라제 : 프로타맥스)의 비율로 처리하여, 가수분해시켜 수득한 것을 특징으로 하는 항염증용 약학 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 항염 효과가 있는 조성물 또는 항염증제, 구체적으로 천연물 유래 성분을 유효성분으로 하는 항염 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 염증은 외부에서 들어온 해로운 물질이나 유기체 등과 같은 여러 요인에 의하여 세포나 조직이 손상을 입거나 파괴되었을 때 그 손상을 최소화하고 손상된 부위를 원상으로 회복시키기 위하여 국소적으로 일어나는 면역반응으로서, 생체를 보호하고 조직 손상으로 생성된 산물들을 제거하는데 유용한 방어 메카니즘이다. 상기 방어 메카니즘에 의해, 결과적으로 통증, 부종, 발적 또는 발열 등이 일어나 기능장애가 유발되기도 한다. 상기 염증을 유발하는 여러 요인에는 외상, 화상, 동상, 방사능 등에 의한 물리적 요인, 산(acid)과 같은 화학물질에 의한 화학적 요인 및 항체반응에 의한 면역학적 요인들이 있으며, 그 외에 혈관이나 호르몬 불균형에 의해 발생되기도 한다.

[0003] 상기 염증은 정상적인 경우에는 생체 내에서 염증반응을 통하여 발병 요인을 중화시키거나 제거하고 상한 조직을 재생시켜서 정상적인 구조와 기능을 회복시키는 작용을 하지만, 염증의 정도가 일정 수준 이상이 되거나 만성화되어 만성염증과 같은 질병 상태로 진행되는 경우 문제가 된다. 임상질환 가운데 거의 모든 질환에서 염증반응을 관찰할 수 있을 뿐만 아니라, 암발생과정(carcinogenesis)에서도 염증 반응과 관련된 요소들이 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다.

[0004] 최근 밝혀진 바에 의하면, 체내에서의 염증반응의 진행은 COX(cyclooxygenase) 효소 활성화와 관련된 것으로 알려져 있다. 상기 COX 효소는 생체 내에 존재하는 프로스타그란딘(prostaglandin)의 생합성에 관련하는 주 효소로서(Smith 등, J. Biol.Chem., 271, 33157(1996)), 두 종류의 이성 효소인 COX-1과 COX-2가 존재하는 것으로 알려져 있다. 상기 COX-1은 위나 신장과 같은 조직에 일정하게 존재하며, 정상적인 항상성을 유지하는데 관여하는 반면, 상기 COX-2는 염증이거나 기타 면역 반응 시 세포분열인자(mitogen)나 사이토카인(cytokines)류에 의해 세포 내에서 일시적이고 빠르게 발현되는 효소이다.

[0005] 또 하나의 강력한 염증 매개물인 나이트릭 옥사이드(Nitric oxide, NO)는 NO 합성효소(NOS)에 의해 L-알지닌으로부터 생성되며, UV와 같은 외부 스트레스나 엔도톡신 또는 사이토카인과 같은 물질에 의해 많은 종류의 세포에서 생성된다. 상기와 같은 염증 자극들은 세포 내의 유도성 NOS(iNOS)의 발현을 증가시키고, 이를 통하여 세포 내에서 NO 생성을 유도하여, 대식 세포를 활성화시킴으로써 염증 반응을 일으킬 수 있다.

[0006] 따라서, 최근 효과적인 염증 완화를 위하여, NO의 생성을 억제할 수 있는 물질에 대한 연구가 진행되고 있다. 그러나, 이러한 연구에 의해 개발된 항염물질의 경우 몇 가지 부작용이 문제되고 있다. 일 예로, 급성 또는 류마티스성 관절염과 같은 만성 염증 질환의 치료에 사용되는 비스테로이드성 소염 약물들은 COX-2 효소를 억제할 뿐만 아니라 COX-1 효소도 억제함으로써 위장관 장애와 같은 부작용을 나타내는 것으로 알려져 있다.

[0007] 한편, 일상생활에 사용되는 화장품은 피부를 보호하고 미화 청결을 위해 사용되는 제품이지만 화장품 조성물을 살펴보면 피부 보호 목적과는 상이한 성분들이 제품 형성에 필수 불가결한 존재로서 사용된다. 예를 들어, 계면활성제, 방부제, 향료, 자외선 차단제, 색소 및 기타 효능이나 효과를 부여하기 위해 쓰이는 여러 가지 성분들을 들 수 있다. 상기 화장품 제조에 필수적으로 사용되는 성분은 일반적으로 피부에 염증이거나, 뾰루지 또는 부종 등과 여러 가지 부작용을 발생시키는 것으로 알려져 있다.

[0008] 또한, 체내로부터 배출되는 피지 성분, 땀 성분 및 화장품 성분 중의 지방산, 고급 알코올, 단백질 등이 피부 상에 존재하는 피부 상재 균들에 의해 독성이 강한 물질로 분해되면, 이들에 의해 피부 염증이 유발될 수도 있으며, 태양으로부터 나오는 자외선에 의해서도 피부 염증이 유발된다는 것은 잘 알려진 사실이다.

[0009] 이렇듯 화장품에 있어서 피부 부작용 유발요인은 항상 잠재되어 있으며 이를 해결 하고자 여러 가지 연구가 진

행되어 왔다. 현재까지 흥반이나 부종 같은 자극완화 및 염증 완화 목적으로 이용되고 있는 물질로는 비스테로이드계로 플루페나믹산(flufenamic acid), 이부프로펜(ibuprofen), 벤지다민(benzydamine), 인도메타신(indomethacin)등이 있고, 스테로이드계로는 프레드니솔론(prednisolone), 덱사메타손(dexamethasone) 등이 있으며, 알란토인, 아즈렌, ϵ -아미노키프론산, 하이드로코티손, 감초산 및 그 유도체(β -글리칠레친산, 글리칠레친산 유도체) 등이 항염증에 효과가 있는 것으로 알려져 있다.

[0010] 그러나, 일반적으로 항염제로 쓰이는 상기 인도메타신은 화장료에는 사용할 수 없는 물질이고, 상기 하이드로코티손은 사용량이 제한되어 있으며, 감초산 및 그 유도체는 안정화시키기 어렵거나 용해도가 좋지 않아 실제 적용 시 농도의 제한으로 인하여 실질적인 효과를 거두기가 어려운 점이 있는 등 지금까지 알려진 항염제는 피부 안전성 면이나 화장료 배합시의 안정성 면에서 대부분 문제점을 가지고 있어서 그 사용이 제한되고 있다.

[0011] 그러므로, 천연물질 유래 물질로 이러한 부작용이나 세포독성에 대한 위험이 없거나 적으면서, 효과적으로 COX-2 효소를 억제할 뿐만 아니라, NO의 생성을 억제할 수 있어 항염효과가 우수하여, 부작용 없이 염증을 억제할 수 있을 뿐만 아니라 그 함량의 제한 없이 화장품에 사용될 수 있는 물질의 개발이 요구되고 있다.

[0012] 특히, 최근에는 소비자들의 욕구에 부응하기 위하여 천연 원료를 이용한 화장료에 대한 연구개발이 활발히 진행되고 있는 실정이다.

[0013] 전술한 배경기술은 발명자가 본 발명의 도출을 위해 보유하고 있었거나, 본 발명의 도출 과정에서 습득한 기술 정보로서, 반드시 본 발명의 출원 전에 일반 공중에게 공개된 공지기술이라 할 수는 없다.

선행기술문헌

특허문헌

- [0014] (특허문헌 0001) 10-1403396B
(특허문헌 0002) 10-1702621B
(특허문헌 0003) 10-2171133B
(특허문헌 0004) 10-2353372B
(특허문헌 0005) 1020170120269A

발명의 내용

해결하려는 과제

[0015] 본 발명의 목적은 상기와 같은 종래기술의 문제점을 해결하기 위한 것으로서, 본 발명은 부작용과 관련된 문제가 발생될 가능성이 적은 천연물 유래 물질을 유효성분으로 하는 항염 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.

[0016] 또한, 기존의 항염물질과 달리 천연물, 구체적으로 식품으로 사용되는 수벌번데기에서 비롯한 것으로, 세포 독성이 없어 안전성이 우수할 뿐만 아니라, 염증과 관련하여 COX-2의 발현을 효과적으로 억제할 수 있고, NO 생성을 억제할 수 있음이 확인되어, 염증 질환의 치료, 개선 또는 예방을 위한 항염증 조성물 또는 화장품 조성물을 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

[0017] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 천연물 유래 성분, 구체적으로 수벌번데기 가수분해물을 유효성분으로 포함하는 항염 조성물을 제공한다.

[0018] 또한, 상기 항염 조성물은 염증질환 치료, 예방 또는 개선용 조성물인 것일 수 있다.

[0019] 상기 수벌번데기 가수분해물은 수벌번데기를 단백가수분해효소로 가수분해한 것일 수 있다.

[0020] 상기 수벌번데기는 서양종 꿀벌(Apis mellifera) 수벌번데기인 것일 수 있다.

[0021] 상기 단백가수분해효소는 알카라제(alcalase), 뉴트라제(neutrase) 및 프로타맥스(protamax)로 이루어진 군 중에서 선택된 1종 이상일 수 있으며, 바람직하게는 뉴트라제(neutrase) 및 프로타맥스(protamax) 혼합물인 것일

수 있다.

- [0022] 보다 구체적으로, 상기 수벌번데기 가수분해물은 서양종 꿀벌(*Apis mellifera*) 수벌번데기를 뉴트라제(neutrase) 및 프로타맥스(protamax)의 처리량을 효소활성단위를 기준으로 2:1(뉴트라제 : 프로타맥스)의 비율로 처리하여, 가수분해시켜 수득한 것일 수 있다.
- [0023] 다른 측면에서, 본 발명은 수벌번데기를 단백질가수분해효소로 가수분해한 수벌번데기 가수분해물을 유효성분으로 포함하는 항염증용 약학 조성물을 제공한다.
- [0024] 상기 수벌번데기는 서양종 꿀벌(*Apis mellifera*) 수벌번데기인 것일 수 있다.
- [0025] 상기 단백질가수분해효소는 알칼라제(alcalase), 뉴트라제(neutrase) 및 프로타맥스(protamax)로 이루어진 군 중에서 선택된 1종 이상인 것일 수 있다.
- [0026] 보다 구체적으로, 상기 수벌번데기 가수분해물은 서양종 꿀벌(*Apis mellifera*) 수벌번데기를 뉴트라제(neutrase) 및 프로타맥스(protamax)의 처리량을 효소활성단위를 기준으로 2:1(뉴트라제 : 프로타맥스)의 비율로 처리하여, 가수분해시켜 수득한 것일 수 있다.
- [0027] 상기 항염증용 약학 조성물은 연고제, 크림제, 겔제, 로션제, 액제, 드레싱제, 패취제, 수포제, 테이프제, 연무제, 외용산제 및 스프레이제로 이루어진 군으로부터 선택된 1종 이상으로 제형화되는 것일 수 있다.
- [0028] 또 다른 측면에서, 본 발명은 상기 목적을 달성하기 위하여 항염증용 화장료 조성물을 제공한다.
- [0029] 상기 수벌번데기는 서양종 꿀벌(*Apis mellifera*) 수벌번데기인 것일 수 있다.
- [0030] 상기 단백질가수분해효소는 알칼라제(alcalase), 뉴트라제(neutrase) 및 프로타맥스(protamax)로 이루어진 군 중에서 선택된 1종 이상인 것일 수 있다.
- [0031] 보다 구체적으로, 상기 수벌번데기 가수분해물은 서양종 꿀벌(*Apis mellifera*) 수벌번데기를 뉴트라제(neutrase) 및 프로타맥스(protamax)의 처리량을 효소활성단위를 기준으로 2:1(뉴트라제 : 프로타맥스)의 비율로 처리하여, 가수분해시켜 수득한 것일 수 있다.
- [0032] 상기 항염증용 화장료 조성물은 용액, 현탁액, 유탁액, 페이스트, 로션, 파우더, 비누, 계면활성제 함유 클린싱 오일, 분말 파운데이션, 유탁액 파운데이션, 왁스 파운데이션, 샴푸, 린스, 토닉 및 스프레이로 이루어진 군 중에서 선택된 어느 하나의 제형을 갖는 것일 수 있다.
- [0034] 본 명세서에서 사용한 단수의 표현은 문맥상 명백하게 다르게 뜻하지 않는 한, 복수의 표현을 포함한다.
- [0035] 본 명세서에서 특별한 언급이 없는 한, 포함하다 또는 가지다 등의 용어는 명세서 상에 기재된 특징, 숫자, 단계 또는 이들을 조합한 것이 존재함을 지정하려는 것이지, 하나 또는 그 이상의 다른 특징들이나 숫자, 단계 또는 이들을 조합한 것들의 존재 또는 부가 가능성을 미리 배제하지 않는 것으로 이해되어야 한다.
- [0036] 본 명세서에서 특별한 언급이 없는 한, 유효성분이란 조성물, 구체적으로 항염 조성물 또는 항염증용 약학 조성물에 있어서 특정 효과를 부여하기 위해 제공하는 성분을 의미한다.
- [0037] 본 명세서에서 특별한 언급이 없는 한, 유효성분이란 단독으로 목적하는 활성을 나타내거나 또는 그 자체는 활성이 없는 담체와 함께 활성을 나타낼 수 있는 성분을 의미하며, 구체적으로 약학조성물, 식품 조성물 또는 화장료 조성물에 있어서 항염 효과 또는 염증 질환의 치료, 개선 또는 예방 효과를 제공하는 성분을 의미한다.
- [0038] 본 명세서에서 특별한 언급이 없는 한, 가수분해물이란 단백질 분해 후 생산되는 물질로, 단백질가수분해산물이 라고도 하고, 수벌번데기 가수분해물이란 수벌번데기 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.
- [0039] 본 명세서에서 특별한 언급이 없는 한, 약학적으로 혹은 식품학적으로 허용 가능한 담체란 생물체를 자극하지 않고 투여 가수분해물의 생물학적 활성 및 특성을 저해하지 않는 담체, 부형제 또는 희석제를 말한다.
- [0040] 본 명세서에 있어서, 치료란 본 발명에 따른 유효성분을 포함하는 조성물의 투여로 상기 질환의 증세가 호전되거나 이롭게 변경하는 모든 행위를 의미한다.

- [0041] 본 명세서에 있어서, 예방이란 본 발명에 따른 유효성분을 포함하는 조성물의 투여로 상기 질환의 발병을 억제 또는 지연시키는 모든 행위를 의미한다.
- [0042] 본 명세서에 있어서, 염증성 질환이란 외부의 물리, 화학적 자극 또는 박테리아, 곰팡이, 바이러스, 각종 알레르기 유발 물질 등 외부 감염원의 감염에 대한 국부적 또는 전신적 생체 방어 반응으로 특징되는 어떠한 상태로 서 정의될 있다. 이러한 반응은 각종 염증 매개 인자와 면역세포와 관련된 효소(예컨대 iNOS, COX-2 등)의 활성화, 염증 매개 물질의 분비(예컨대, NO, TNF- α , IL-6, IL-1 β , PGE2의 분비), 체액 침윤, 세포 이동, 조직 파괴 등의 일련의 복합적인 생리적 반응을 수반하며, 홍반, 통증, 부종, 발열, 신체의 특정 기능의 저하 또는 상실 등의 증상에 의해 외적으로 나타난다. 상기 염증성 질환은 급성, 만성, 궤양성, 알레르기성 또는 과사성을 띌 수 있으므로, 어떠한 질환이 상기와 같은 염증성 질환의 정의에 포함되는 한 그것이 급성이든지, 만성이든지, 궤양성이든지, 알레르기성이든지 또는 과사성이든지를 불문한다.
- [0043] 구체적으로, 상기 염증성 질환에는 천식, 알레르기성 및 비-알레르기성 비염, 만성 및 급성 비염, 만성 및 급성 위염 또는 장염, 궤양성 위염, 급 성 및 만성 신장염, 급성 및 만성 간염, 만성 폐쇄성 폐질환, 폐섬유증, 과민성 대장 증후군, 염증성 통증, 편 두풍, 두통, 허리 통증, 섬유 근육통, 근막 질환, 바이러스 감염(예컨대, C형 감염), 박테리아 감염, 곰팡이 감 염, 화상, 외과적 또는 치과적 수술에 의한 상처, 프로스타글라딘 E 과다 증후군, 아테롬성 동맥 경화증, 통풍, 관절염, 류머티스성 관절염, 강직성 척추염, 호지킨병, 췌장염, 결막염, 홍채염, 공막염, 포도막염, 피부염(아토피성 피부염 포함), 습진, 다발성 경화증 등이 포함될 것이다.
- [0045] 이하, 본 발명을 더욱 상세하게 설명한다.
- [0046] 본 발명은 수벌번데기 가수분해물을 유효성분으로 포함하는 항염 조성물에 관한 것이다.
- [0047] 본 발명의 발명자들은 부작용이 문제되지 아니한 안전한 소재를 대상으로 항염 조성물 개발을 위해 다양한 소재를 연구하던 중, 식용으로 사용될 수 있는 수벌번데기를 선택하여, 상기 수벌번데기를 단백가수분해효소로 가수분해한 가수분해물의 항산화 효과와 항염 효과를 확인하였으며, 이러한 항염 효과를 확인한 결과, 특정 단백가수분해효소의 조합으로 가수분해한 가수분해물이 다른 가수분해물에 비하여 현저하게 우수한 항염 효과를 가짐을 확인하여, 이로부터 본 발명을 완성하였다.
- [0048] 본 발명은 수벌번데기 가수분해물을 유효성분으로 포함하는 항염 조성물에 관한 것이다.
- [0049] 상기 수벌번데기는 수벌의 번데기(male pupa)를 말하며, 15 일 내지 25일령, 바람직하게는 16 내지 20일령의 수벌 번데기일 수 있다.
- [0050] 상기 수벌번데기는 식용으로 사용되는 누에 번데기의 2배에 달하는 함량의 단백질 및 비타민 B, D, E, 식이섬유 및 엽산의 다양한 영양소를 함유하고 있으며, 생활사에 따라 수벌의 유충, 성충과는 비타민, 아미노산 조성, 지방산 함량 등의 조성이 상이하여 상호 상이한 생리학적 활성을 나타내는 것일 수 있다.
- [0051] 상기 수벌 번데기는 재래꿀벌 (동양종), 양봉 꿀벌(서양종), 호박벌, 어리별쌍살벌, 말벌, 왕벌, 미동정된 벌 등을 모두 포함할 수 있고, 분류학상 배벌과, 대모벌과, 호리병벌과, 말벌과, 꿀벌상과 등에 속하는 모든 벌을 포함할 수 있으나, 바람직하게는 서양종 꿀벌(*Apis mellifera*)의 수벌번데기일 수 있다.
- [0052] 상기 수벌번데기 가수분해물은 육상 동물, 일 예로 수벌 또는 수벌번데기 등의 가수분해물 제조를 위한 통상의 제조방법에 따라 제조된 것일 수 있으며, 바람직하게는 효소를 이용한 가수분해에 의해 제조된 것일 수 있다. 더욱 바람직하게는 본 발명의 수벌번데기 가수분해물은 급속냉동 후 해동한 수벌번데기를 유수에서 세척한 다음, 열풍건조하고 분쇄하여 수벌번데기 분쇄물을 제조하는 수벌번데기 분쇄물 제조단계; 상기 수벌번데기 분쇄물에 완충용액을 혼합하여 1 내지 10% (w/v), 바람직하게는 3 내지 5% (w/v)의 기질 용액을 제조하는 기질 용액 제조단계; 상기 기질 용액을 가열하여 기질 용액에 포함된 자가 효소를 불활성화시키는 효소 불활성화단계; 상기 기질 용액에 단백질가수분해효소를 기질 용액의 0.1 내지 1% (w/w)가 되도록 처리하여 가수분해물을 제조하는 가수분해단계; 상기 제조된 가수분해물을 가열하여 단백질가수분해효소를 불활성화시킨 다음, 원심분리하고 상등액을 분리하여 수득하는 상등액 제조단계; 및 상기 상등액을 여과하여 수벌번데기 가수분해물을 수득하는 수벌번데기 가수분해물 제조단계를 포함하는 수벌번데기 가수분해물 제조방법으로 제조된 것일 수 있다.
- [0053] 상기 가수분해단계에서 상기 단백질가수분해효소는 알칼라제(alcalase), 뉴트라제(neutrased) 및 프로타맥스(protamax)로 이루어진 군 중에서 선택된 1종 이상일 수 있으며, 바람직하게는 뉴트라제(neutrased) 및 프로타맥스(protamax) 혼합물인 것일 수 있으며, 더욱 바람직하게는 뉴트라제(neutrased) 및 프로타맥스(protamax)의 처

리량을 효소활성단위를 기준으로 2:1(뉴트라제 : 프로타맥스)의 비율로 혼합한 혼합물일 수 있다.

- [0054] 보다 구체적으로, 상기 수벌번데기 가수분해물은 서양종 꿀벌(*Apis mellifera*) 수벌번데기를 뉴트라제(neutrase) 및 프로타맥스(protamax)의 처리량을 효소활성단위를 기준으로 2:1(뉴트라제 : 프로타맥스)의 비율로 처리하여, 가수분해시켜 수득한 것일 수 있다.
- [0055] 본 발명의 일 실시예에 의하면, 상기 수벌번데기 가수분해물은 염증을 직접적으로 유도할 수 있는 NO의 분비와 관련하여, NOS(iNOS)의 발현을 효과적으로 억제할 수 있고, COX-2 효소를 억제하는 것으로 확인되었다.
- [0056] 따라서, 상기 수벌번데기 가수분해물을 유효성분으로 포함하는 항염 조성물은 염증을 억제하거나 염증 또는 염증질환을 치료, 개선 또는 예방하기 위하여 사용될 수 있다.
- [0057] 상기 염증은 일반적인 염증질환을 포함하는 개념이며, 일 예로 상기 염증질환은 각종 피부염, 알레르기, 전신성 홍반성 낭창, 망막염, 위염, 간염, 장염, 췌장염, 관절염 및 신장염으로 이루어진 군 중에서 선택된 1종 이상일 수 있고, 상기 알레르기는 과민증(anaphylaxis), 알러지성 비염(allergic rhinitis), 천식(asthma), 알러지성 결막염, 알러지성 피부염, 아토피성 피부염(atopic dermatitis), 접촉성 피부염, 두드러기(urticaria), 곤충 알러지, 식품 알러지 및 약물 알러지를 포함한다.
- [0058] 상기 항염 조성물은 염증을 유발하는 NOS(iNOS)의 발현을 효과적으로 억제하고, COX-2 효소를 억제하여, 염증을 치료, 개선 또는 예방하기 위하여 사용될 수 있다.
- [0059] 따라서, 본 발명의 항염 조성물은 항염증용 약학 조성물 또는 염증질환의 치료 또는 예방용 의약조성물로 응용되거나, 상기 염증질환의 예방 또는 개선용 식품조성물로 응용될 수 있다. 상기 식품조성물은 일 예로 상기 염증질환의 예방 또는 개선을 위한 건강기능성식품 조성물일 수 있다.
- [0060] 이러한 측면에서, 상기 항염증용 약학 조성물은 수벌번데기 가수분해물을 유효성분으로 포함하는 것일 수 있다.
- [0061] 상기 수벌번데기 가수분해물을 유효성분으로 포함하는 항염증용 약학 조성물은 인간을 포함한 동물에 직접 적용될 수 있다. 상기 동물은 식물에 대응하는 생물군으로 주로 유기물을 영양분으로 섭취하고, 소화기관, 배설기관 및 호흡기관이 분화되어 있는 것을 말하며, 바람직하게는 포유류, 더욱 바람직하게는 인간일 수 있다.
- [0062] 상기 수벌번데기 가수분해물은 상기 항염 조성물 내에 단독으로 사용될 수 있으며, 그 외 약리학적으로 허용가능한 담체, 부형제, 희석제 또는 부성분을 추가로 포함할 수 있다. 보다 상세하게는, 상기 수벌번데기 가수분해물을 포함하는 조성물이 약제로 사용되거나, 의약 또는 약학적 용도로 사용되는 경우, 상기 수벌번데기 가수분해물은 통상적인 방법에 따라 약학적으로 허용되는 담체 또는 부형제와 혼합하거나 희석제로 희석하여 사용될 수 있다.
- [0063] 이 경우 상기 조성물 내 수벌번데기 가수분해물의 함량은 0.001 중량 % 내지 99.9 중량 %, 0.1 중량% 내지 99 중량% 또는 1 중량% 내지 50 중량%일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니며, 조성물의 사용태양 및 사용방법에 따라 상기 화합물의 함량은 바람직한 함량으로 적절히 조절하여 사용될 수 있다.
- [0064] 상기 약학적으로 허용되는 담체, 부형제 또는 희석제의 예로는, 락토즈, 텍스트로즈, 수크로즈, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로즈, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸하이드록시벤조에이트, 프로필하이드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유, 프로필하이드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유, 텍스트린, 칼슘카보네이트, 프로필렌글리콜, 리퀴드 파라핀 및 생리식염수로 이루어진 군에서 선택된 1 이상을 들 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니며 통상의 담체, 부형제 또는 희석제 모두 사용가능하다. 또한, 상기 약학 조성물은 통상의 충전제, 증량제, 결합제, 붕해제, 항응집제, 윤활제, 습윤제, pH 조절제, 영양제, 비타민, 전해질, 알긴산 및 그의 염, 펙트산 및 그의 염, 보호성 콜로라이드, 글리세린, 향료, 유화제 또는 방부제 등을 추가로 포함할 수 있다. 상기 성분들은 상기 유효성분인 수벌번데기 가수분해물에 독립적으로 또는 조합하여 추가될 수 있다.
- [0065] 또한, 본 발명의 조성물은 상기 유효성분 이외에 공지의 항염효과가 있는 것으로 인정된 물질, 일 예로 COX-2 저해제, NO 저해제 또는 항염증제 등으로 사용되는 물질을 더욱 포함할 수 있다.
- [0066] 상기 조성물이 약제로 사용하는 경우 투여방법은 경구 또는 비경구 모두 가능하며, 일 예로는 경구, 경피, 피하, 정맥 또는 근육을 포함한 여러 경로를 통해 투여될 수 있다.
- [0067] 또한, 상기 조성물의 제형은 사용방법에 따라 달라질 수 있으며, 포유동물에 투여된 후 활성 성분의 신속, 지속

또는 지연된 방출을 제공할 수 있도록 본 발명이 속하는 기술분야에 잘 알려진 방법을 사용하여 제형화될 수 있다. 일반적으로는, 경구 투여를 위한 고형제제에는 정제(TABLETS), 알약, 연질 또는 경질 캡셀제(CAPSULES), 환제(PILLS), 산제(POWDERS) 및 과립제(GRANULES) 등이 포함되고, 이러한 제제는 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트(calcium carbonate), 수크로스(sucrose) 또는 락토오스(lactose), 젤라틴 등을 섞어 조제될 수 있다. 또한, 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트, 탈크 같은 윤활제들도 사용될 수 있다. 경구를 위한 액상 제제로는 현탁제(SUSPENSIONS), 내용액제, 유제(EMULSIONS) 및 시럽제(SYRUPS) 등이 해당되는데, 흔히 사용되는 단순희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제 예를 들면, 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다.

[0068] 비경구투여를 위한 형태는 크림(CREAM), 로션제(LOTIONS), 연고제(ONITMENTS), 경고제(PLASTERS), 액제(LIQUIDS AND SOULTIONS), 에어로솔제(AEROSOLS), 유동엑스제(FRUIDEXTRACTS), 엘릭서(ELIXIR), 침제(INFUSIONS), 향낭(SACHET), 패취제(PATCH) 또는 주사제(INJECTIONS) 등의 형태일 수 있다.

[0069] 더 나아가, 본 발명의 조성물은 당해 기술 분야의 공지된 적절한 방법을 사용하여 또는 레밍턴의 문헌(Remington's Pharmaceutical Science(최근판), Mack Publishing Company, Easton PA)에 개시되어 있는 방법을 이용하여 제형화될 수 있다.

[0070] 상기 조성물의 투여량은 투여방법, 복용자의 연령, 성별, 환자의 증정도, 상태, 체내에서 활성 성분의 흡수도, 불활성물 및 병용되는 약물을 고려하여 결정할 수 있으며, 일 예로 1일 유효성분을 기준으로 하였을 때 0.1 mg/kg(체중) 내지 500 mg/kg(체중), 0.1 mg/kg(체중) 내지 400 mg/kg(체중) 또는 1 mg/kg(체중) 내지 300 mg/kg(체중)으로 투여할 수 있으며, 1회 또는 수회로 나누어 투여할 수 있다. 상기 투여량은 어떠한 면으로든 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.

[0071] 다른 측면에서, 상기 염증질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물은 수벌번데기 가수분해물을 유효성분으로 포함하는 것일 수 있다.

[0072] 상기 수벌번데기 가수분해물을 유효성분으로 포함하는 염증질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물은 인간을 포함한 동물에 직접 적용될 수 있다.

[0073] 상기 건강기능식품은 식품에 물리적, 생화학적, 생물공학적 수법 등을 이용하여 해당 식품의 기능을 특정 목적에 작용, 발현하도록 부가 가치를 부여한 식품군이나 식품 조성이 갖는 생체방어리듬조절, 질병방지와 회복 등에 관한 제조절기능을 생체에 대하여 충분히 발현하도록 설계하여 가공한 식품을 의미한다. 상기 건강기능식품에는 식품학적으로 허용 가능한 식품 보조 첨가제를 포함할 수 있으며, 건강기능식품의 제조에 통상적으로 사용되는 적절한 담체, 부형제 및 희석제를 더욱 포함할 수 있다.

[0074] 본 발명의 염증질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물은 상기 수벌번데기 가수분해물을 전체 식품 중량의 0.001 중량% 내지 99.9 중량% 또는 0.01 중량% 내지 50 중량% 또는 0.1 중량% 내지 30 중량% 또는 0.1 중량% 내지 15 중량% 포함될 수 있다.

[0075] 본 발명은 또한, 상기 수벌번데기 가수분해물을 유효성분으로 포함하는 화장품 조성물을 제공한다.

[0076] 상기 수벌번데기 가수분해물은 천연물질 유래로 세포독성이 없을 뿐만 아니라, 염증 억제 효과가 뛰어나기 때문에 항염 및 항자극 활성이 뛰어나므로, 화장품에 포함된 성분들에 의해 유도되는 염증 및 외부 환경에 의해 유도되는 염증을 효과적으로 제어할 수 있다. 따라서, 상기 상기 수벌번데기 가수분해물은 염증 개선 및 완화효과를 갖는 화장품 조성물의 유효성분으로 사용될 수 있다.

[0077] 상기 화장품 조성물은 기초 화장품, 메이크업 화장품, 바디 화장품, 두발용 화장품, 두피용 화장품, 면도용 화장품 또는 구강용 화장품의 용도로 제공될 수 있다.

[0078] 상기 기초 화장품의 예로는 크림, 화장수, 팩, 마사지 크림, 유액 등이 있고, 상기 메이크업 화장품의 예로는 파운데이션, 메이크업 베이스, 립스틱, 아이섀도, 아이라이너, 마스카라, 아이브로우 펜슬 등이 있으며, 상기 바디 화장품의 예로는 비누, 액체 세정제, 입욕제, 선스크린 크림, 선 오일 등이 있고, 상기 두발용 화장품의 예로는 샴푸, 린스, 헤어 트리트먼트, 헤어 무쓰, 헤어 리퀴드, 폼마드, 헤어 칼라제, 헤어 블리치제 또는 칼라 린스 등이 있으며, 상기 두피용 화장품의 예로는 헤어 토닉 또는 스칼프 트리트먼트 등이 있고, 상기 면도용 화장품의 예로는 애프터셰이브로션 또는 셰이빙 크림 등이 있으며, 상기 구강용 화장품의 예로는 치약 또는 마우스 워셔 등이 있다.

[0079] 상기 화장품 조성물에는 유효성분 외에 사용용도 및 화장품 조성물의 성질에 따라 통상 화장품 조성물에 배합되

고 있는 성분, 일예로 보습제, 자외선 흡수제, 비타민류, 동식물 추출성분, 소화제, 미백제, 혈관확장제, 수렴제, 청량제, 호르몬제 등을 추가로 배합될 수 있다. 또한, 상기 화장료 조성물은 약물 또는 유효성분을 피부조직으로 침투 또는 이행시키기 위해서 필요한 기제를 추가로 포함할 수 있다.

[0080] 상기 화장료 조성물의 제형은 사용용도 및 화장료 조성물의 성질에 따라 적절한 형태를 취할 수 있으며, 일예로 수용액제, 가용화제, 유화제, 유액제, 겔제, 페이스트제, 연고제, 에어줄제, 물-기름 2층제 또는 물-기름-분말 3층제일 수 있으며, 상기 제형의 예는 단순한 예시일 뿐, 상기 예시에 의해 본 발명의 화장료 조성물의 제형 및 형태가 제한되는 것은 아니다.

[0081] 상기 유효성분인 수벌번데기 가수분해물은 상기 화장료 조성물 총 중량을 기준으로 0.001 중량% 내지 50 중량%로 포함될 수 있으며, 바람직하기로는 0.01 중량% 내지 20 중량%일 수 있으나, 상기 함량은 제형 또는 화장료 조성물에 함유되는 유효성분외의 성분의 함량에 따라 적절히 조절할 수 있으며, 상기 함량에 의해 본 발명에 포함되는 유효성분의 함량이 제한되는 것은 아니다.

[0082] 본 발명은 또한, 상기 수벌번데기 가수분해물의 제조방법을 제공한다.

[0083] 구체적으로, 상기 수벌번데기 가수분해물 제조방법은 수벌번데기 분쇄물 제조단계; 기질 용액 제조단계; 효소 불활성화단계; 가수분해단계; 상등액 제조단계; 및 수벌번데기 가수분해물 제조단계를 포함하는 것일 수 있다.

[0084] 더욱 구체적으로, 상기 수벌번데기 가수분해물 제조방법은 급속냉동 후 해동한 수벌번데기를 유수에서 세척한 다음, 열풍건조하고 분쇄하여 수벌번데기 분쇄물을 제조하는 수벌번데기 분쇄물 제조단계; 상기 수벌번데기 분쇄물에 완충용액을 혼합하여 1 내지 10% (w/v), 바람직하게는 3 내지 5% (w/v)의 기질 용액을 제조하는 기질 용액 제조단계; 상기 기질 용액을 가열하여 기질 용액에 포함된 자가 효소를 불활성화시키는 효소 불활성화단계; 상기 기질 용액에 단백질가수분해효소를 기질 용액의 0.1 내지 1% (w/w)가 되도록 처리하여 가수분해물을 제조하는 가수분해단계; 상기 제조된 가수분해물을 가열하여 단백질가수분해효소를 불활성화시킨 다음, 원심분리하고 상등액을 분리하여 수득하는 상등액 제조단계; 및 상기 상등액을 여과하여 수벌번데기 가수분해물을 수득하는 수벌번데기 가수분해물 제조단계를 포함하는 것일 수 있다.

[0085] 상기 가수분해단계에서 상기 단백질가수분해효소는 알칼라제(alcalase), 뉴트라제(neutrase) 및 프로타맥스(protamax)로 이루어진 군 중에서 선택된 1종 이상일 수 있으며, 바람직하게는 뉴트라제(neutrase) 및 프로타맥스(protamax) 혼합물인 것일 수 있으며, 더욱 바람직하게는 뉴트라제(neutrase) 및 프로타맥스(protamax)의 처리량을 효소활성단위를 기준으로 2:1(뉴트라제 : 프로타맥스)의 비율로 혼합한 혼합물일 수 있다.

[0086] 이하, 제조에 및 실험예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 오로지 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로서, 본 발명의 요지에 따라 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의해 제한되지 않는다는 것은 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 있어서 자명할 것이다.

발명의 효과

[0087] 본 발명의 수벌번데기 가수분해물은 천연물 유래 물질로서 염증과 관련하여 세포 내의 유도성 NOS(iNOS)의 발현을 억제함으로써 NO 분비를 억제할 수 있고, 프로스타그란딘 생합성과 관련된 COX-2를 억제하여, 효과적으로 염증을 저해할 수 있는 것으로 확인되었다. 따라서, 상기 수벌번데기 가수분해물을 유효성분으로 포함하는 항염 조성물은 염증을 억제하여 염증과 관련된 질병을 치료 또는 예방하기 위한 항염증제 또는 항염증용 약학조성물 및 특정 제형 등과 관련하여 화장품 제조에 필수적으로 사용되는 성분 또는 외부환경으로 인한 피부의 염증을 효과적으로 억제할 수 있는 특징을 갖는 항염증용 화장료 조성물 등에 응용될 수 있다. 그러므로, 본 발명은 염증과 관련된 질병에 대한 치료와 관련된 의료산업 및 피부염증의 제어와 관련된 화장품 산업의 분야에서 널리 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0088] 도 1은 본 발명의 일 실시예에 수벌번데기 효소 가수분해물이 LPS 유도 RAW 264.7 세포에서 iNOS 발현에 미치는 영향을 확인한 것으로, 도 1b는 iNOS 발현 여부를 확인한 Western blot 분석결과이고, 도 1a는 상기 Western blot 분석결과의 평균값(n = 3, p < 0.05)을 수벌번데기 건조물 처리구(Unhydrolyzed)과 수벌번데기 효소 가수분해물 처리구(NP, 2.1, 20) 및 수벌번데기 미처리구(Control)를 그래프로 나타낸 것이다.

도 2는 본 발명의 일 실시예에 수벌번데기 효소 가수분해물이 LPS 유도 RAW 264.7 세포에서 COX-2 발현에 미치는 영향을 확인한 것으로, 도 2b는 COX-2 발현 여부를 확인한 Western blot 분석결과이고, 도 2a는 상기

Western blot 분석결과 COX-2 발현 여부 평균값($n = 3$, $p < 0.05$)을 수벌번데기 미처리구(Control)를 기준으로(100%) 수벌번데기 건조물 처리구(Unhydrolyzed)과 수벌번데기 효소 가수분해물 처리구(NP, 2.1, 20)의 정도를 확인한 그래프로 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0089] 이하, 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자가 용이하게 실시할 수 있도록 본 발명의 실시예에 대하여 상세히 설명한다. 그러나 본 발명은 여러 가지 상이한 형태로 구현될 수 있으며 여기에서 설명하는 실시예에 한정되지 않는다.
- [0091] **제조예. 수벌번데기 가수분해물의 제조**
- [0092] 본 발명의 실시예에서 사용된 서양종 꿀벌(*Apis mellifera* L.) 수벌번데기는 광주광역시 및 경상남도의 양봉장에서 사육중인 서양종 꿀벌 봉군을 이용하여 산란 후 16일 내지 20일령 사이의 수벌번데기를 사용하였으며, 채집된 수벌번데기는 급속냉동기(DF3503S, ㈜일신바이오, 대한민국)를 이용하여 급속동결하여 실험까지 -20°C 에 보관하여 사용하였다.
- [0093] 상기 냉동 보관중인 수벌번데기는 냉동실에서 꺼내자마자 흐르는 수돗물에 빠르게 해동한 후 찌꺼기와 이물질을 제거하기 위해 해동된 수벌번데기를 체에 올려놓고 흐르는 수돗물로 한번 더 씻은 후 마지막으로 증류수로 씻었다. 상기 세척된 수벌번데기는 페이퍼 타올로 물기를 제거하였다. 상기 물기를 제거한 수벌번데기는 열풍건조기(P-IOV864, Labmate, 대한민국)를 이용하여 70°C 에서 8시간 열풍건조한 다음 분쇄기(HMF-3100S, Hani Electric Co. Ltd., 대한민국)에 넣고 10분간 분쇄하였다.
- [0094] 상기 분쇄한 수벌번데기 분쇄물을 이용한 실험에 사용된 분석용 시약과 유기용매는 Sigma-Aldrich Co.(USA)로부터 구입하여 사용하였다.
- [0095] 상기 열풍건조한 수벌번데기 열풍건조분말에 10 mM sodiumphosphate buffer (pH 8)를 가하여 4%(w/v, 수벌번데기 열풍건조분말 / sodiumphosphate buffer)의 기질용액을 제조하고, 상기 기질용액을 항온수조를 이용하여 90°C 에서 20분 동안 처리하여 자가 효소를 불활성화시켰다.
- [0096] 식품용 단백질 가수분해 효소인 알카라제(alcalase, Alc), 프로타맥스(protamax, Pro) 및 뉴트라제(neutrase, Neu) 3종과 그 혼합물을 사용하였다. 상기 혼합물은 알카라제 및 프로타맥스 혼합물(alc+protamax, Alc+Pro, AP), 알카라제 및 뉴트라제 혼합물(alc+neutrase, Alc +Neu, AN), 뉴트라제 및 프로타맥스 혼합물(neutrase+protamax, Neu+Pro, NP)이었고, 상기 혼합물의 혼합비는 효소활성단위(AU)를 기준으로 각각 1:0, 1:1, 1:2, 2:1으로 혼합하여 총 12개 처리구로 구성하였EK.
- [0097] 상기 자가 효소를 불활성화시킨 기질용액에 상기 효소 또는 상기 효소 혼합물을 기질용액의 0.5%(w/w)가 되도록 첨가하고, 55°C 및 150 rpm의 조건에서 0분 내지 30분 동안 가수분해 처리하였고, 가수분해가 각 시간 별로 종료되면 90°C 에서 10분간 가열하여 처리 효소를 불활성화시켰다.
- [0098] 이 후, 4°C 에서 냉각시킨 후, $4,000 \times g$ 의 조건에서 15분간 원심분리하여 상등액인 단백질을 새로운 튜브로 옮긴 후, $0.45 \mu\text{m}$ cellulose acetate syringe filters (FJ25ASCCA00AFL01, GVS Life Sciences, USA)를 이용하여 여과하고 여과물을 최종 시료로 수득하여, 실험에 사용하기 전까지 -20°C 에 저장하였다.
- [0100] **실시예 1. 수벌번데기 가수분해물의 항산화 효과 확인**
- [0101] 상기 제조예에서 제조된 수벌번데기 가수분해물의 항산화 효과를 확인하기 위하여, DPPH 라디칼 소거능 및 ABTS 라디칼 소거능을 확인하였다.
- [0102] 우선, DPPH 라디칼 소거능(Radical scavenging activity)을 확인하기 위해, Blis(1958)의 방법을 변형하여 수행하였다.
- [0103] 구체적으로, 96 well plate에 에탄올(EtOH)로 용해시킨 0.4 mM DPPH 용액 100 μl 와 상기 제조예에서 제조된 수벌번데기 가수분해물을 10 mM sodiumphosphate buffer (pH 8)에 $1\mu\text{g/mL}$ 의 농도로 녹인 용액 100 μl 를 혼합하고 암실에서 30분간 반응시킨 후 520 nm에서 Microplate Reader(Multiskan GO, Thermo Scientific, 핀란드)를 이용하여 흡광도를 측정하였다. 상기 측정결과를 하기 계산식 1을 통해 DPPH 라디칼 소거능을 계산하였다.

DPPH 라디칼 소견능 확인을 위해 양성 대조군(positive control)은 L-ascorbic acid(aa) 10 μ g/mL를 사용하였다. 상기 계산결과를 하기 표 1에 나타내었다.

[0104] [계산식 1]

[0105] 계산식 = ((Control - Blank) - (Sample O.D - Blank))/((Control - Blank)*100

표 1

time	AN 1:0	AN 1:1	AN 1:2	AN 2:1
0	21.96 $\pm$ 4.14	26.47 $\pm$ 2.32	27.15 $\pm$ 9.50	25.36 $\pm$ 21.25
2.5	30.01 $\pm$ 4.32	30.20 $\pm$ 11.64	33.03 $\pm$ 0.20	34.23 $\pm$ 17.72
5	31.05 $\pm$ 1.55	44.29 $\pm$ 9.01	42.37 $\pm$ 1.01	35.96 $\pm$ 16.18
7.5	38.41 $\pm$ 2.55	44.89 $\pm$ 10.79	44.02 $\pm$ 0.11	36.90 $\pm$ 20.15
10	51.72 $\pm$ 8.58	45.46 $\pm$ 7.35	44.36 $\pm$ 0.11	37.68 $\pm$ 5.05
15	60.72 $\pm$ 2.07	45.85 $\pm$ 9.01	44.61 $\pm$ 0	38.97 $\pm$ 7.97
20	60.50 $\pm$ 2.61	47.58 $\pm$ 14.40	44.74 $\pm$ 10.22	39.49 $\pm$ 7.49
30	59.04 $\pm$ 5.05	47.36 $\pm$ 10.91	44.70 $\pm$ 2.39	39.06 $\pm$ 20.40
aa (10 μ g)	30.96 $\pm$ 0.06	29.76 $\pm$ 6.00	30.74 $\pm$ 0.11	30.70 $\pm$ 1.64

time	AP 0:1	AP 1:1	AP 1:2	AP 2:1
0	21.36 $\pm$ 1.15	20.22 $\pm$ 1.53	23.95 $\pm$ 2.62	22.18 $\pm$ 0.57
2.5	31.75 $\pm$ 3.06	34.97 $\pm$ 11.76	54.71 $\pm$ 4.54	48.36 $\pm$ 4.23
5	36.00 $\pm$ 1.15	39.31 $\pm$ 7.80	55.26 $\pm$ 3.13	50.99 $\pm$ 7.44
7.5	42.96 $\pm$ 5.24	40.30 $\pm$ 9.59	55.35 $\pm$ 2.23	52.13 $\pm$ 10.20
10	47.71 $\pm$ 0.31	46.68 $\pm$ 0.57	57.47 $\pm$ 1.53	53.49 $\pm$ 1.47
15	50.69 $\pm$ 1.72	46.95 $\pm$ 6.71	59.15 $\pm$ 0.70	54.49 $\pm$ 8.53
20	50.37 $\pm$ 1.66	46.45 $\pm$ 11.51	58.29 $\pm$ 6.01	59.89 $\pm$ 3.20
30	50.28 $\pm$ 4.60	46.63 $\pm$ 0.51	58.51 $\pm$ 2.36	56.21 $\pm$ 4.04
aa (10 μ g)	31.39 $\pm$ 1.02	30.81 $\pm$ 0.38	29.84 $\pm$ 3.00	31.85 $\pm$ 0.25

time	NP 1:0	NP 1:1	NP 1:2	NP 2:1
0	22.82 $\pm$ 1.66	23.47 $\pm$ 1.09	22.44 $\pm$ 0.44	20.98 $\pm$ 2.18
2.5	42.32 $\pm$ 2.30	28.47 $\pm$ 9.25	45.48 $\pm$ 3.20	47.52 $\pm$ 15.45
5	43.00 $\pm$ 7.50	27.93 $\pm$ 2.05	54.81 $\pm$ 1.28	53.37 $\pm$ 1.92
7.5	43.95 $\pm$ 8.20	41.92 $\pm$ 1.02	54.95 $\pm$ 2.24	55.594 $\pm$ 1.98
10	50.12 $\pm$ 1.66	41.74 $\pm$ 1.41	55.26 $\pm$ 1.53	56.22 $\pm$ 2.37
15	52.56 $\pm$ 2.05	40.33 $\pm$ 1.67	56.39 $\pm$ 3.26	59.90 $\pm$ 4.10
20	52.16 $\pm$ 5.19	39.33 $\pm$ 3.92	59.84 $\pm$ 0.70	61.03 $\pm$ 1.47
30	49.25 $\pm$ 6.60	30.93 $\pm$ 2.89	59.38 $\pm$ 0.70	58.08 $\pm$ 1.92
aa (10 μ g)	31.98 $\pm$ 1.02	23.47 $\pm$ 2.69	29.39 $\pm$ 3.57	29.87 $\pm$ 2.18

[0106]

상기 표 1에 나타난 바와 같이, 실험결과 알카라제 및 뉴트라제를 효소활성단위를 기준으로 1:0으로 혼합한 혼합물(alcase+neutrase, Alc +Neu, AN)을 이용하여 가수분해한 가수분해물 중, 15분 및 20분 처리한 처리구와 뉴트라제 및 프로타맥스를 효소활성단위를 기준으로 2:1로 혼합한 혼합물(neutrase+protamax, Neu+Pro, NP)을 이용하여 가수분해한 가수분해물 중, 20분 처리한 처리구의 DPPH의 활성도가 60 이상으로 대조구인 ascorbic acid(10 μ g)에 비해 약 2배 높은 것으로 확인되었다.

[0108] 또한, ABTS 라디칼 소거능을 확인하기 위해, Miller등과 Dudonne 등의 방법을 변형하여 수행하였다.

[0109] 구체적으로, 7 mM ABTS와 2.45 mM Potassium persulfate(1/1, v/v)을 실온에서 16시간 반응시켰다. 반응시켜 생성된 ABTS는 흡광도 734 nm에서 0.7 $\pm$ 0.02가 될 때까지 에탄올로 희석하였으며 96well plate에 상기 제조예에서 제조된 수벌번데기 가수분해물을 10 mM sodiumphosphate buffer (pH 8)에 1 μ g/mL의 농도로 녹인 용액 20 μ l와 ABTS용액 180 μ l를 넣은 뒤 10 내지 20초간 균질하게 섞고 실온에서 5분간 방치한 뒤 734 nm에서 Microplate Reader(Multiskan GO, Thermo Scientific, 핀란드)를 이용하여 흡광도를 측정하였다. 상기 측정결과를 하기 계산식 2를 통해 ABTS 라디칼 소거능을 계산하였다. ABTS 라디칼 소견능 확인을 위해 양성 대조군(positive control)은 L-ascorbic acid(aa) 10 μ g/mL를 사용하였다. 상기 계산결과를 하기 표 2에

나타내었다.

[0110] [계산식 2]

[0111] 계산식 = ((Control - Blank) - (Sample O.D - Blank))/((Control - Blank)*100

표 2

time	AN 1:0	AN 1:1	AN 1:2	AN 2:1
0	31.33 ± 1.54	30.39 ± 3.53	31.33 ± 3.76	30.16 ± 3.20
2.5	47.60 ± 4.42	48.77 ± 0.33	49.16 ± 0.66	48.46 ± 0.33
5	50.57 ± 2.65	56.43 ± 0.99	52.45 ± 2.21	51.51 ± 4.20
7.5	54.87 ± 0.55	57.84 ± 0.33	55.57 ± 0.44	53.93 ± 0.11
10	60.74 ± 0.88	69.18 ± 0.88	58.08 ± 0.66	56.59 ± 0.77
15	66.91 ± 0.55	70.82 ± 0.99	60.11 ± 0.66	57.92 ± 0.66
20	72.31 ± 1.32	70.75 ± 0.44	67.85 ± 0.55	64.49 ± 0.44
30	72.62 ± 0.66	70.04 ± 0.77	67.85 ± 0.33	64.18 ± 0.22
aa (10 ug)	16.86 ± 0.99	16.86 ± 0.99	16.86 ± 0.99	16.86 ± 0.99

time	AP 0:1	AP 1:1	AP 1:2	AP 2:1
0	24.77 ± 1.02	23.51 ± 1.02	26.03 ± 0.25	25.13 ± 0.76
2.5	48.67 ± 0.89	46.78 ± 0.76	50.57 ± 0.25	47.14 ± 0.25
5	52.82 ± 0.38	50.39 ± 0.51	54.26 ± 0.38	49.93 ± 0.38
7.5	55.26 ± 1.78	54.26 ± 1.4	57.87 ± 0.38	53.99 ± 1.02
10	64.28 ± 0.76	62.47 ± 2.04	64.91 ± 0.38	62.29 ± 0.25
15	66.62 ± 0.76	64.46 ± 0.51	70.41 ± 0.51	64.55 ± 0.63
20	69.33 ± 0.51	66.17 ± 1.4	69.96 ± 1.14	68.70 ± 0.89
30	69.15 ± 0.25	65.72 ± 1.27	69.51 ± 1.02	68.52 ± 0.89
aa (10 ug)	18.64 ± 1.02	18.64 ± 1.02	18.64 ± 1.02	18.64 ± 1.02

time	NP 1:0	NP 1:1	NP 1:2	NP 2:1
0	31.42 ± 0.69	30.44 ± 0.69	32.07 ± 0.92	31.26 ± 0.23
2.5	42.30 ± 1.50	40.83 ± 0.81	43.53 ± 0.23	45.49 ± 0.46
5	46.89 ± 0.57	43.45 ± 0.34	49.83 ± 1.04	52.53 ± 0.46
7.5	52.53 ± 0.69	49.91 ± 2.54	58.18 ± 1.04	63.66 ± 0.46
10	55.07 ± 0.57	52.94 ± 0.81	59.90 ± 0.69	65.54 ± 1.27
15	60.22 ± 0.46	56.21 ± 0.57	62.11 ± 0.34	69.72 ± 0.69
20	59.08 ± 0.23	55.48 ± 0.69	64.64 ± 0.69	75.12 ± 0.92
30	59.08 ± 0.69	55.31 ± 0.46	63.66 ± 0.46	74.54 ± 1.04
aa (10 ug)	17.59 ± 0.57	17.59 ± 0.57	17.59 ± 0.57	17.59 ± 0.57

[0112]

[0113] 상기 표 2에 나타난 바와 같이, 뉴트라제 및 프로타맥스를 효소활성단위를 기준으로 2:1로 혼합한 혼합물을 이용하여 가수분해한 가수분해물 중, 20분 및 30분 처리한 처리구의 ABTS 라디칼 소거능의 활성도가 70이상으로 대조구인 ascorbic acid(10 ug)에 비해 약 2배 높은 것으로 확인되어, 12개의 가수분해물 중 가장 항산화 활성이 높은 것으로 확인되었다.

[0114] 상기 실험결과를 바탕으로 항산화활성이 가장 우수한 것으로 확인된, 뉴트라제 및 프로타맥스를 효소활성단위를 기준으로 2:1로 혼합한 혼합물을 이용하여 가수분해한 가수분해물의 항염 효과를 확인하였다.

[0116] 실시예 2. 수벌번데기 가수분해물의 iNOS 및 COX-2 단백질 발현 억제 효과 확인

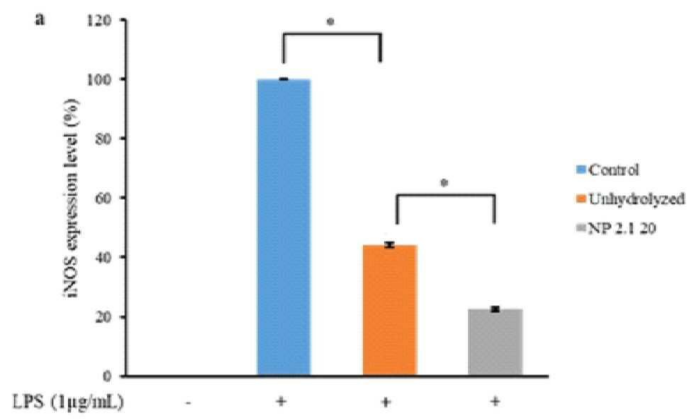
[0117] 상기 실시예 1에서 항산화활성이 가장 우수한 것으로 확인된, 뉴트라제 및 프로타맥스를 효소활성단위를 기준으로 2:1로 혼합한 혼합물을 이용하여 가수분해한 수벌번데기 가수분해물의 항염 효과를 마우스 유래 대식세포인 RAW264.7 세포(KCLB NO.40071, 한국세포주은행)에서 iNOS 및 COX-2의 단백질 발현 억제를 살펴보기 위하여 문헌

(Kim *et al.*, European Journal of Pharmacology, 721, pp. 267 - 276(2013))의 방법을 이용하여 실험을 진행하고, 그 결과를 도 1 및 도 2에 나타내었다.

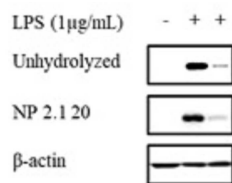
- [0118] 구체적으로, 60 mm 디쉬에 3×10^6 cells/ml 농도로 상기 실시예 1의 마우스 유래 대식세포인 RAW264.7 세포를 분양하고 12시간 배양한 후, 상기 실시예 1에서 분리된 수벌번데기 가수분해물을 20 μ g/ml 농도로 첨가하고 3 시간 동안 전처리한 후, 리포폴리싸카라이드(lipopolysaccharide; LPS)를 1 μ g/ml 처리하고 24시간 배양하여 염증반응을 유발한 다음, 24시간 동안 37℃ 및 5% 이산화탄소 조건에서 배양기를 이용하여 배양하였다. 상기 배양 후, lysis buffer(RIPA(89900, Thermo))를 첨가하고, 4℃에서 30분간 반응시킨 뒤, 4℃ 및 12,000 rpm의 조건에서 20분 동안 원심분리하여, 상등액을 분리하였다. 상기 분리된 상등액에서 단백질 정량은 BSA 단백질 실험 키트(Pierce Biotechnology)를 이용하여 수행하였다.
- [0119] 본 실험에서 사용한 iNOS, COX-2와 GAPDH 항체는 Cell signaling technology (USA) 및 Santa Cruz(USA)에서 구매하여 사용하였다. 하기 웨스턴 블롯 분석법 수행을 위해 2차 항체로 사용된 peroxidase-labeled donkey anti-rabbit과 peroxidase-labeled sheep anti-mouse immunoglobulin은 Sigma-aldrich(USA)에서 구매하여 사용하였다.
- [0120] 이후, 항염 단백질의 발현 여부는 웨스턴 블롯 분석법(western blot analysis)을 통해 확인하였다. 구체적으로, 상기 분리된 상등액을 7.5% 또는 12% SDS-폴리아크릴아마이드겔(polyacrylamide gel)을 이용하여 2 시간 동안 전기영동한 후, 나이트로셀룰로스 멤브레인(Nitrocellulose membrane, NC membrane)를 이용하여 상기 폴리아크릴아마이드겔로부터 전사하였다. 상기 전사된 나이트로셀룰로스 멤브레인을 5% 무지방유(skim-milk)가 포함된 신선한 블로킹 버퍼(blocking buffer, 0.1% Tween 20 in Tris-buffered saline)에서 1시간 동안 반응을 정지시켰다. 상기 반응 정지 후, 상기 멤브레인을 PBST(PBS, 0.1% Tween 20)로 10분에 1회씩 3회 세척한 후에, iNOS(SC-650, Santacruz biotechnology, USA), COX-2(SC-1745, Santacruz biotechnology, USA)의 항체(Ab)를 1:1000으로 희석하여 넣고 1시간 동안 반응을 수행하였다. 반응 후, 상기 PBST로 10분에 1회씩 3회 세척하고, 2차 항체(Anti-rabbit IgG, SC-2004, Santacruz biotechnology, USA)를 1:1000으로 희석하여 넣고 1 시간 동안 반응을 수행하였다.
- [0121] 반응 후, PBST로 10분에 1회씩 3회 세척한 다음, ECL(Amersham Pharmacia Biotech) 용액을 1:1로 잘 섞어서 나이트로셀룰로스 멤브레인(Nitrocellulose membrane, NC membrane) 위에 부어서 발광시키고, 암실에서 X선 필름에 감광한 후 현상하였다. 동일한 방법으로 액틴(Actin)에 대한 항체(SC-1616, Santacruz biotechnology, USA)를 이용하여 액틴(Actin)의 함량을 측정하였다.
- [0122] 상기 측정결과, 구체적으로 수벌번데기 가수분해물의 iNOS 단백질 발현량 억제 효과(도 1a 및 도 1b) 및 COX-2 단백질 발현량 억제 효과(도 2a 및 도 2b)를 확인하여, 이를 도 1 및 도 2에 나타내었다.
- [0123] 상기 도 1에 나타난 바와 같이, 수벌번데기 건조물을 첨가한 것과 비교하여 수벌번데기 가수분해물을 첨가한 경우, LPS 유도 RAW 264.7 세포에서 iNOS 발현이 현저하게 감소된 것이 확인되었으며(도 1a), COX-2 발현도 현저하게 감소되는 것이 확인되었다(도 2a).
- [0125] 이상에서 본 발명의 바람직한 실시예에 대하여 상세하게 설명하였지만 본 발명의 권리범위는 이에 한정되는 것은 아니고 다음의 청구범위에서 정의하고 있는 본 발명의 기본 개념을 이용한 당업자의 여러 변형 및 개량 형태 또한 본 발명의 권리범위에 속하는 것이다.

도면

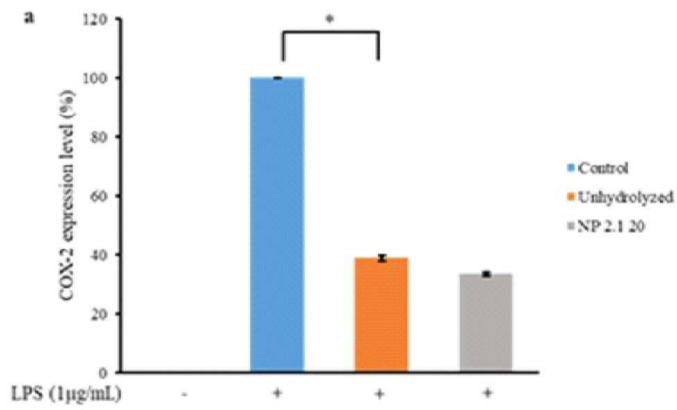
도면1a



도면1b



도면2a



도면2b

