



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2018-0027776
(43) 공개일자 2018년03월15일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A23L 33/00 (2016.01) A23L 1/305 (2006.01)
A23L 17/00 (2016.01) A23L 17/20 (2016.01)
A23L 29/00 (2016.01) A61K 35/60 (2015.01)

(52) CPC특허분류

A23L 33/00 (2016.08)
A23L 17/20 (2016.08)

(21) 출원번호 10-2016-0114837

(22) 출원일자 2016년09월07일

심사청구일자 2016년09월07일

(71) 출원인

부경대학교 산학협력단

부산광역시 남구 신선로 365 (용당동,
부경대학교)

(72) 발명자

안동현

부산광역시 남구 분포로 113, 201동 204호(
용호동, 엘지메트로시티)

김꽃봉우리

부산광역시 사하구 승학로 221, 101동 1507호

김민지

부산광역시 기장군 정관면 방곡로 39, 103동 205
호(가화만사성정관타워)

(74) 대리인

위병갑

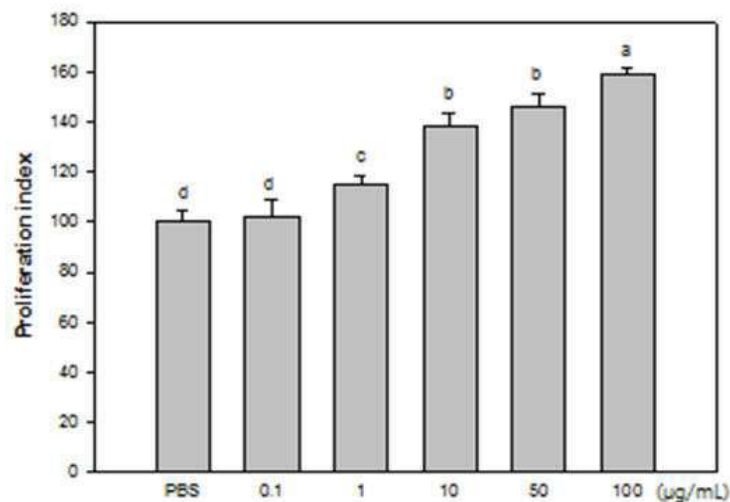
전체 청구항 수 : 총 12 항

(54) 발명의 명칭 참치자숙액의 효소가수분해물을 유효성분으로 포함하는 면역활성 증강용 식품 조성물

(57) 요약

본 발명은 참치자숙액 효소가수분해물을 유효성분으로 포함하는 면역활성 증강용 조성물에 관한 것으로서, 구체적으로 상기 효소가수분해물은 protease, acid alpha amylase, pectinase, pectin methyl esterase 또는 cellulase인 효소를 처리하여 제조되며, 상기 효소가수분해물은 비장 세포의 증식을 유도하고, 비장 세포에서 Th1(T helper cell) 사이토카인의 분비량 및 NK cell의 활성을 증가시킴으로써 면역활성을 증가시키는 효과가 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A23L 17/70 (2016.08)

A23L 29/06 (2016.08)

A23L 33/18 (2016.08)

A61K 35/60 (2013.01)

A23V 2002/00 (2013.01)

A23V 2200/324 (2013.01)

A23V 2300/28 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 20130279

부처명 해양수산부

연구관리전문기관 한국해양과학기술진흥원

연구사업명 수산실용화기술개발사업

연구과제명 수산가공부산물을 이용한 고부가가치 소재 및 식품개발

기 여 율 1/1

주관기관 부경대학교

연구기간 2013.12.24 ~ 2016.12.23

명세서

청구범위

청구항 1

참치자숙액 효소가수분해물을 유효성분으로 포함하는 면역활성 증강용 식품 조성물.

청구항 2

제 1 항에 있어서,

상기 효소가수분해물은 protease, acid alpha amylase, pectinase, pectin methyl esterase 및 cellulase으로 이루어진 그룹에서 선택되는 어느 하나 이상의 효소를 순차적으로 또는 동시에 처리하여 제조되는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 3

제 1 항에 있어서,

상기 참치자숙액 효소가수분해물은 비장 세포의 증식을 유도하는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 4

제 1 항에 있어서,

상기 참치자숙액 효소가수분해물은 비장 세포에서 Th1(T helper cell) 사이토카인의 분비량을 증가시키는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 5

제 4 항에 있어서,

상기 Th1 사이토카인은 IFN- γ (interferon gamma) 또는 IL-6(Interleukin-6) 및 IL-2(Interleukin-2)으로 이루어진 그룹에서 선택되는 어느 하나 이상인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 6

제 1 항에 있어서,

상기 참치자숙액 효소가수분해물은 NK(natural killer) cell의 활성을 증가시키는 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 7

참치자숙액 효소가수분해물을 유효성분으로 포함하는 면역활성 증강용 약학 조성물.

청구항 8

(a) 참치자숙액을 원심분리하여 불용성 물질을 제거하는 단계;

(b) 상기 (a)단계의 참치자숙액을 탈염하는 단계;

(c) 상기 (b)단계의 탈염된 참치자숙액에 효소를 첨가하여 가수분해시키는 단계; 및

(d) 상기 (c)단계의 가수분해물을 건조시키는 단계;를 포함하는 참치자숙액 효소가수분해물의 제조방법.

청구항 9

제 8 항에 있어서,

상기 참치자숙액의 효소가수분해물을 HPMC(hydroxypropyl methylcellulose)로 코팅하는 단계를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 10

제 8 항에 있어서,

상기 (b)단계에서의 탈염은 염도가 0.001% 내지 1%가 되도록 하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 11

제 8 항에 있어서,

상기 (c)단계에서의 효소는 protease, acid alpha amylase, pectinase, pectin methyl esterase 및 cellulase 으로 이루어진 그룹에서 선택되는 어느 하나 이상인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 12

제 8 항에 있어서,

상기 (c)단계에서의 효소는 순차적으로 또는 동시에 처리되는 것을 특징으로 하는 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 참치자숙액의 효소가수분해물을 유효성분으로 포함하는 면역활성 증강용 식품 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 면역은 인체의 주요 방어 기전으로, 외부 물질의 침입이나 감염작용에 대해 다양한 면역세포가 작용하여 인체를 방어하는 기능을 지칭한다. 특이적 면역은 적응면역이라고도 하며, 항원제시세포가 포식 후 제시한 항원 정보를 T 세포가 인식하여 일어나는 면역 반응으로, T 및 B 세포가 관여한다. 특히 CD4+ T 세포는 helper T (Th) 림프 구라고도 하며, 방어 면역에서 가장 중요하게 작용하는 세포로 대식세포와 함께 사이토카인(cytokine) 분비를 통해 면역반응을 유도한다. 이러한 Th 세포는 Th1 및 Th2 세포로 각각 분화되며 서로 다른 면역작용에 관여하게 된다. 그 중 Th1 세포 유도 사이토카인은 IL-2, IL-12, interferon- γ (IFN- γ) 및 TNF- α 가 있으며, 주로 세포매개성 면역작용을 활성화하고, Th2 세포 유도 사이토카인에는 IL-4, IL-5, IL-6, IL-10이 있으며 주로 항체 생성에 의해 매개되는 체액성 면역작용을 활성화한다. 이러한 Th1 및 Th2 세포는 서로 균형을 이루으로써 면역 작용을 조절하게 된다(Liblau et al., 1995; Rengarajan et al., 2000).

[0003] 최근 경제 성장 및 산업화의 추진, 환경오염, 식생활의 변화 등이 인체 내부의 항상성을 변화시킴에 따라 암, 후천성면역결핍증 등의 면역계 질환이 증가되고 있다. 이러한 면역계 질환을 치료하기 위해 예로부터 많은 면역 요법이 행해지고 있으나, 임상적 이용에는 여러 문제점을 가지고 있는 실정이다. 대표적 예로 사이토카인, 림프 카인(lymphokine), 성장인자(growth factor) 등을 직접 투여하여 생체 면역계를 조절하는 방법이 있는데, 체내 에서 사이토카인은 여러 종류가 상호 작용을 통해 서로의 작용을 상승 또는 억제하여 면역작용을 조절하기 때문에, 하나 또는 두가지의 사이토카인을 대량 투입하여도 큰 효과를 기대할 수 없고, 독성이 강하며 혈중 적정 농도를 계속해서 유지하기 어려운 단점이 있다. 따라서 체내에서 여러 면역 세포를 자극함으로써 사이토카인을 유도하는 보다 안전한 생리활성물질 탐색에 대한 노력이 증가되고 있다.

[0004] 한편, 참치(*Katsuwonus pelamis*)는 농어목 고등어과의 바닷물고기로, 고단백 식품으로 영양학적으로 우수하며, EPA (eicosapentaenoic acid, 20:5n-3)와 DHA (docosahexaenoic acid, 22:6n-3)와 같은 고도불포화지방산을 다 량 함유하고 있다. 참치는 우리나라에서 연간 약 26만 톤 정도가 어획되고 있으며, 주로 자숙처리가 동반되는 통조림 및 가쓰오부시 등의 소재로 이용되고 있다. 이러한 가공 공정에서 나오는 참치 자숙액은 연간 약 2만 7 천 톤에 달하며, 단백질, 글리코젠, 기능성 펩타이드와 풍부한 유리 아미노산 및 콜라겐 유래 단백질인 카르노 신(carnosine) 및 타우린(taurine) 등을 다량 함유하여 영양학적으로 우수하나, 이의 활용에 대한 연구로는 항 산화, 항암 및 항고혈압에 대한 연구만이 진행되어 있으며, 면역계 조절 및 면역 증강 작용에 대한 연구는 진행 된 바 없다.

[0005] 또한, 최근에는 단백질보다 펩타이드에서 우수한 생리활성이 보고되고 있으며, 알칼라아제(alcalase) 효소를 이

용하여 자숙액을 효소가수분해시, 항고혈압과 항산화 효과가 증가한다고 보고되고 있다.

선행기술문헌

특허문헌

[0006] (특허문헌 0001) 1. 한국공개특허 제10-2014-0029060호

비특허문헌

[0007] (비특허문헌 0001) 1. Food Technol. Biotechnol. 49 (1) 48-55 (2011)

(비특허문헌 0002) 2. Proceedings of the Nutrition Society (2013), 72 (OCE4), E265

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명의 목적은 참치자숙액 효소가수분해물을 유효성분으로 포함하는 면역활성 증강용 식품 조성물을 제공하는 것이다.

[0009] 본 발명의 또 다른 목적은 참치자숙액 효소가수분해물을 유효성분으로 포함하는 면역활성 증강용 약학 조성물을 제공하는 것이다.

[0010] 본 발명의 또 다른 목적은 (a) 참치자숙액을 원심분리하여 불용성 물질을 제거하는 단계; (b) 상기 (a)단계의 참치자숙액을 탈염하는 단계; (c) 상기 (b)단계의 탈염된 참치자숙액에 효소를 첨가하여 가수분해시키는 단계; 및 (d) 상기 (c)단계의 가수분해물을 건조시키는 단계;를 포함하는 참치자숙액 효소가수분해물의 제조방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0011] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 참치자숙액 효소가수분해물을 유효성분으로 포함하는 면역활성 증강용 식품 조성물을 제공한다.

[0012] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 효소가수분해물은 protease, acid alpha amylase, pectinase, pectin methyl esterase 및 cellulase으로 이루어진 그룹에서 선택되는 어느 하나 이상의 효소를 순차적으로 또는 동시에 처리하여 제조되는 것일 수 있다.

[0013] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 효소상기 참치자숙액 효소가수분해물은 비장 세포의 증식을 유도하는 것일 수 있다.

[0014] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 참치자숙액 효소가수분해물은 비장 세포에서 Th1(T helper cell) 사이토카인의 분비량을 증가시키는 것일 수 있다.

[0015] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 Th1 사이토카인은 IFN- γ (interferon gamma) 또는 IL-6(Interleukin-6) 또는 IL-2(Interleukin-2)인 것일 수 있다.

[0016] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 참치자숙액 효소가수분해물은 NK(natural killer) cell의 활성을 증가시키는 것일 수 있다.

[0018] 또한, 본 발명은 참치자숙액 효소가수분해물을 유효성분으로 포함하는 면역활성 증강용 약학 조성물을 제공한다.

[0020] 또한, 본 발명은 (a) 참치자숙액을 원심분리하여 불용성 물질을 제거하는 단계; (b) 상기 (a)단계의 참치자숙액

을 탈염하는 단계; (c) 상기 (b)단계의 탈염된 참치자숙액에 효소를 첨가하여 가수분해시키는 단계; 및 (d) 상기 (c)단계의 가수분해물을 건조시키는 단계;를 포함하는 참치자숙액 효소가수분해물의 제조방법을 제공한다.

[0021] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 참치자숙액의 효소가수분해물을 HPMC(hydroxypropyl methylcellulose)로 코팅하는 단계를 더 포함하는 것일 수 있다.

[0022] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 탈염은 염도가 0.001% 내지 1%가 되도록 하는 것일 수 있다.

[0023] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 효소는 protease, acid alpha amylase, pectinase, pectin methyl esterase 또는 cellulase인 것일 수 있다.

[0024] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 효소는 순차적으로 또는 동시에 처리되는 것일 수 있다.

발명의 효과

[0025] 본 발명에 따른 참치자숙액 효소가수분해물은 면역과 관련된 비장세포의 증식을 유도하고, 비장세포에서 분비되는 Th1 사이토카인의 분비량 및 NK cell의 활성을 증가시킴을 확인하였고, 이로써 면역활성 증강을 위한 식품 또는 약학적으로 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0026] 도 1은 자숙액 효소가수분해물을 처리한 후 비장세포 증식능(proliferation index)을 비교한 것이다.

도 2는 자숙액 효소가수분해물을 처리한 후 비장세포에서의 IFN- γ 분비량을 측정한 결과를 나타낸 것이다.

도 3은 자숙액 효소가수분해물을 처리한 후 비장세포에서의 IL-6 분비량을 측정한 결과를 나타낸 것이다.

도 4는 자숙액 효소가수분해물을 처리한 후 비장세포에서의 IL-2 분비량을 측정한 결과를 나타낸 것이다.

도 5는 자숙액 효소가수분해물을 마우스에 경구 투여한 후 마우스의 무게를 측정한 결과를 나타낸 것이다.

도 6은 자숙액 효소가수분해물을 마우스에 경구 투여한 후 마우스의 비장 및 흉선 무게를 측정한 결과를 나타낸 것이다.

도 7은 자숙액 효소가수분해물을 마우스에 경구 투여한 후 비장세포 증식능을 비교한 것이다. 세포 배양 조건은 24시간이고, 비장세포에 mitogen인 conA(Concanavalin A, 3 μ g/mL)와 LPS(Lipopolysaccharide, 1 μ g/mL)를 처리하였다.

도 8은 자숙액 효소가수분해물을 마우스에 경구 투여한 후 비장세포 증식능을 비교한 것이다. 세포 배양 조건은 48시간이며, 비장세포에 mitogen인 conA(3 μ g/mL)와 LPS(1 μ g/mL)를 처리하였다.

도 9는 자숙액 효소가수분해물을 마우스에 경구 투여한 후 비장세포에서의 IL-2 분비량을 측정한 결과를 나타낸 것이다. 세포 배양 조건은 24시간이며, 비장세포에 mitogen인 conA(3 μ g/mL)와 LPS(1 μ g/mL)를 처리하였다.

도 10은 자숙액 효소가수분해물을 마우스에 경구 투여한 후 비장세포에서의 IL-2 분비량을 측정한 결과를 나타낸 것이다. 세포 배양 조건은 48시간이며, 비장세포에 mitogen인 conA(3 μ g/mL)와 LPS(1 μ g/mL)를 처리하였다.

도 11은 자숙액 효소가수분해물을 마우스에 경구 투여한 후 비장세포에서의 IFN- γ 분비량을 측정한 결과를 나타낸 것이다. 세포 배양 조건은 24시간이며, 비장세포에 mitogen인 conA(3 μ g/mL)와 LPS(1 μ g/mL)를 처리하였다.

도 12은 자숙액 효소가수분해물을 마우스에 경구 투여한 후 비장세포에서의 IFN- γ 분비량을 측정한 결과를 나타낸 것이다. 세포 배양 조건은 48시간이며, 비장세포에 mitogen인 conA(3 μ g/mL)와 LPS(1 μ g/mL)를 처리하였다.

도 13는 자숙액 효소가수분해물을 마우스에 경구 투여한 후 비장세포에서 YAC-1(target cell)에 대한 NK cell의 세포독성 활성을 측정한 결과를 나타낸 것이다.

도 14는 자숙액 효소가수분해물을 마우스에 경구 투여한 후 혈액에서의 백혈구, 중성구, 림프구, 단핵구, 호산구, 호염구의 수치를 측정한 결과를 나타낸 것이다.

도 15는 자숙액 효소가수분해물을 마우스에 경구 투여한 후 혈액에서의 GOT, GPT, ALP 및 LDH의 분비량을 측정

한 결과를 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0027] 본 발명은 참치자숙액의 효소가수분해물을 유효성분으로 포함하는 면역활성 증강용 식품 조성물을 제공한다. 특히, 본 발명에 따른 참치자숙액의 효소가수분해물은 세포에 독성을 유도하지 않음을 일실시예를 통해 확인할 수 있었다. 따라서 본 발명의 식품 조성물은 유효성분인 참치자숙액의 효소가수분해물을 함유하는 것 외에 통상의 식품 조성물과 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다.
- [0028] 상기 천연 탄수화물의 예는 모노사카라이드, 예를 들어, 포도당, 과당 등; 디사카라이드, 예를 들어 말토스, 슈크로스 등; 및 폴리사카라이드, 예를 들어 텍스트린, 시클로텍스트린 등과 같은 통상적인 당, 및 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알콜이다. 상기 향미제는 천연 향미제 (타우마틴), 스테비아 추출물(예를 들어 레바우디오시드 A, 글리시리히진 등) 및 합성 향미제 (사카린, 아스파르탐 등)를 유리하게 사용할 수 있다.
- [0029] 본 발명의 식품 조성물은 상기 약제학적 조성물과 동일한 방식으로 제제화되어 기능성 식품으로 이용하거나, 각종 식품에 첨가할 수 있다. 본 발명의 조성물을 첨가할 수 있는 식품으로는 예를 들어, 음료류, 육류, 초코렛, 식품류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 사탕류, 아이스크림류, 알코올 음료류, 비타민 복합제 및 건강보조식품류 등이 있다.
- [0030] 또한, 상기 식품 조성물은 유효성분인 참치자숙액의 효소가수분해물 외에 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, 알콜, 탄산음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다. 그밖에 본 발명의 식품 조성물은 천연 과일 주스 및 과일 주스 음료 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다.
- [0031] 본 발명은 참치자숙액의 효소가수분해물을 유효성분으로 포함하는 면역활성 증강용 약제학적 조성물을 제공한다. 본 발명의 약제학적 조성물은 상기 유효성분 이외에 약제학적으로 적합하고 생리학적으로 허용되는 보조제를 사용하여 제조될 수 있으며, 상기 보조제로는 부형제, 봉해제, 감미제, 결합제, 피복제, 팽창제, 윤활제, 활택제 또는 향미제 등을 사용할 수 있다.
- [0032] 상기 약제학적 조성물은 투여를 위해서 상기 기재한 유효성분 이외에 추가로 약제학적으로 허용 가능한 담체를 하나 이상 포함하여 약제학적 조성물로 바람직하게 제제화할 수 있다. 상기 약제학적 조성물의 제제 형태는 과립제, 산제, 정제, 피복정, 캡슐제, 좌제, 액제, 시럽, 즙, 현탁제, 유제, 점적제 또는 주사 가능한 액제 등이 될 수 있다. 예를 들어, 정제 또는 캡슐제의 형태로의 제제화를 위해, 유효 성분은 에탄올, 글리세롤, 물 등과 같은 경구, 무독성의 약제학적으로 허용 가능한 불활성 담체와 결합될 수 있다. 또한, 원하거나 필요한 경우, 적합한 결합제, 윤활제, 봉해제 및 발색제 또한 혼합물로 포함될 수 있다. 적합한 결합제는 이에 제한되는 것은 아니나, 녹말, 젤라틴, 글루코스 또는 베타-락토오스와 같은 천연 당, 옥수수 감미제, 아카시아, 트래커캔스 또는 소듐올레이트와 같은 천연 및 합성 검, 소듐 스테아레이트, 마그네슘 스테아레이트, 소듐 벤조에이트, 소듐 아세테이트, 소듐 클로라이드 등을 포함한다. 봉해제는 이에 제한되는 것은 아니나, 녹말, 메틸 셀룰로스, 아가, 벤토니트, 잔탄 검 등을 포함한다. 액상 용액으로 제제화되는 조성물에 있어서 허용 가능한 약제학적 담체로는, 멸균 및 생체에 적합한 것으로서, 식염수, 멸균수, 링거액, 완충 식염수, 알부민 주사용액, 텍스트로즈 용액, 말토 텍스트린 용액, 글리세롤, 에탄올 및 이들 성분 중 하나 이상을 혼합하여 사용할 수 있으며, 필요에 따라 항산화제, 완충액, 정균제 등 다른 통상의 첨가제를 첨가할 수 있다. 또한, 희석제, 분산제, 계면활성제, 결합제 및 윤활제를 부가적으로 첨가하여 수용액, 현탁액, 유탁액 등과 같은 주사용 제형, 환약, 캡슐, 과립 또는 정제로 제제화할 수 있다. 더 나아가 해당분야의 적절한 방법으로 Remington's Pharmaceutical Science, Mack Publishing Company, Easton PA에 개시되어 있는 방법을 이용하여 각 질환에 따라 또는 성분에 따라 바람직하게 제제화 할 수 있다.
- [0034] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세히 설명하기로 한다. 이들 실시예는 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로서, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다..

[0036] 실시예 1. 재료 및 방법

[0037] 1.1. 실험 동물

[0038] 본 실험에서 비장세포 분리 배양을 위해 생후 6주령의 수컷 BALB/c 마우스를 이용하였다. 마우스는 오리엔트바이오(Orient Co., Seongnam, Korea)에서 구입하여 온도 $20(\pm 2)^{\circ}\text{C}$, 습도 $50(\pm 10)\%$, 12시간의 명암주기가 유지되는 동물 사육실에서 1주일 동안 예비사육한 후 실험에 사용하였다.

[0040] 1.2. 실험 재료

[0041] 참치자숙액을 정제하기 위하여 원심분리하여 불용성 물질을 제거하고, 염도가 1% 이하가 될 때까지 탈염을 한 후, 효소 3종(prozyme 1000L + prozyme 2000P + sumizyme LP50D)을 첨가하여 탈염 참치자숙액을 가수분해(펩타이드화)한 다음 분무건조하여 참치자숙액의 효소가수분해물을 제조하였다. 제조 후 경구 투여 시 위산 및 위에서 작용하는 효소에 영향을 받지 않는 물질인 HPMC(hydroxypropyl methylcellulose)로 코팅하였다.

[0042]

[0043] 1.3. 동물 실험

[0044] HPMC(hydroxypropyl methylcellulose)로 코팅된 참치자숙액 효소가수분해물 분말을 콩기름으로 녹여 사용하였다. 1일 1회 동일한 시간에 각 개체 당 $200\ \mu\text{L}$ 씩 14일 동안 경구투여하였으며 투여농도는 50, 100 및 $200\text{mg/kg} \cdot \text{body weight}$ 로 설정하였다. 대조군은 생리식염수(PBS) 또는 콩기름을 실험군과 동일한 부피로 투여하였다. 투여 후 종료일에는 12시간 절식한 후 비장 및 전혈(whole blood)을 분리하여 실험을 진행하였다.

[0046] 1.4. 마우스, 비장 및 흉선 무게 측정

[0047] 경구투여 종료 후 마취사 하기 전 마우스의 무게를 측정하였다. 마우스를 마취사한 후 비장과 흉선을 채취하여 무게를 측정하였고 마우스의 무게에 대한 비율로 표시하였다.

[0048] 비장 지수(Spleen index) = 비장 무게(spleen weight)/ 마우스 총 무게(body weight)

[0049] 흉선 지수(Thymus index) = 흉선 무게(thymus weight)/ 마우스 총 무게(body weight)

[0051] 1.5. 세포배양

[0052] 비장세포는 Ryu(2014)의 방법을 약간 변형하여 분리하였다. 먼저, 세포 분리를 위해 BALB/c 마우스를 마취사 시킨 후, 비장을 무균적으로 적출하였다. 적출한 비장은 RPMI 1640 배지로 세척한 후, 조직 그라인더(tissue grinder)로 균질화하여 세포를 분리시켰다. 세포 현탁액을 4°C , 18,000 rpm에서 5분간 원심분리한 후, red blood cell lysis buffer에 10분간 정치시켜 적혈구를 제거하였다. 그 후 10% FBS가 포함된 RPMI 1640 배지를 첨가하여 37°C , 5% CO_2 배양기에서 72시간 동안 배양하였다.

[0054] 1.6. 세포 독성 측정

[0055] 참치자숙액 효소가수분해물에 대한 세포독성을 알아보기 위해 MTT 어세이를 실시하였다. 비장세포의 경우 1×10^7 cells/mL의 농도로 96-well 플레이트에 분주하고 시료를 농도별로 첨가한 후 37°C , 5% CO_2 배양기에서 70시간 배양하였다. 배양 후, MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) 시약을 5 mg/mL 농도로 첨가하여 2시간 재 배양하고 이를 4°C , 2,000 rpm에서 10분간 원심분리(UNION 32R, Hanil Co., Incheon, Korea)하여 상층액을 제거하였다. 그 후, 생성된 포마잔(formazan)의 용해를 위해 각 well에 DMSO를 첨가하고 이를 마이크로플레이트 리더(microplate reader, Model 550, Bio-rad, Richmond, CA, USA)로 540 nm에서 흡광도(optical density (O.D.))를 측정하였으며, 세포증식능은 다음 식에 의해 계산하였다.

[0056] 증식능(Proliferation Index, %) = (sample의 흡광도 / control의 흡광도) $\times$ 100

[0058] 1.7. 배양 상층액의 사이토카인(cytokine) 측정

[0059] 참치자숙액 효소가수분해물이 각 세포의 사이토카인(cytokine) 분비에 미치는 영향을 살펴보기 위하여 마우스 비장세포에 시료를 처리하여 배양 상층액의 사이토카인 함량을 측정하였다. 비장세포는 2×10^6 또는 5×10^6 cells/mL로 48-well 플레이트에 접종하고 시료를 처리하여 72시간 배양하였다. 배양 상층액 내의 사이토카인의 분비량은 ELISA kit (Mouse ELISA set, BD Bioscience, San Diego, USA)를 이용하여 측정하였다. ELISA microplate에 capture antibody로 anti-mouse IL-6, IFN- γ , IL-2를 분주하여 4℃에서 하룻밤 동안 코팅(coating)시키고, 이를 0.05% Tween 20이 포함된 PBST로 세척한 후 10% FBS 용액으로 블러킹하였다. PBST로 세척한 뒤, 각 배양 상층액을 분주하고 실온에서 2시간 반응시켰다. 다시 PBST로 세척한 뒤 희석한 각각의 biotinylated anti-mouse detection antibody와 streptavidin-horseradish peroxidase conjugate를 첨가하여 실온에서 1시간 반응시켰다. 그 후, 이를 다시 PBST로 세척한 다음, OPD(o-phenylenediamine dihydrochloride) 용액을 첨가하여 실온에서 30분 동안 암반응 시켰다. 2N H₂SO₄로 반응을 종료시킨 후 마이크로플레이트 리더(microplate reader)를 이용하여 490nm에서 흡광도를 측정하였다.

[0061] 1.8. NK(natural killer) cell) 활성 측정

[0062] 비장세포 현탁액을 1×10^4 cells/well YAC-1(target cell)에 대한 200:1, 100:1, 50:1 비율로 희석하여 96-well 플레이트에 분주한 후 37℃, 5% CO₂ 배양기에서 18시간 배양하였다. 배양 후, 5 mg/mL MTT (thiazol blue tetrazolium bromide, sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA)용액을 첨가하고 4시간 재 배양하여 formazan crystal 형성을 유도하였다. 이를 2,000 rpm, 4℃에서 10분간 원심 분리 한 후, 상층액을 제거하고 DMSO(dimethyl sulfoxide, sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA)를 첨가하고 마이크로플레이트 리더(microplate reader, Model 550, Bio-rad, Richmond, USA)를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. NK cell 활성은 다음 식에 의해 계산하였다.

[0064] NK cell cytotoxicity (%) = $[(OD_T - (OD_{exp} - OD_E)) / OD_T] \times 100$

[0065] OD_{exp} : 실험구 흡광도, OD_T : Target cell(YAC-1) 흡광도, OD_E : Effector cell (splenocyte) 흡광도

[0067] 1.9. 혈구 및 혈액화학치 분석

[0068] 혈구 분석은 참치자숙액 효소가수분해물의 투여(마지막 투여) 후 12시간 동안 마우스를 절식시키고, 희생하여 전혈 하고, 혈액 응고 방지제인 EDTA가 처리된 튜브에 채취된 혈액을 분주하고, 혈구 분석기(HEMAVET HV950, Drew Scientific, Inc., USA)를 이용하여 혈구 수치를 측정하였다. 혈액 화학치 분석은 자숙액 효소가수분해물의 마지막 투여 후 12시간 동안 마우스를 절식시키고, 희생하여 전혈 하고, heparin 처리된 튜브에 분주한 후, 3000 xg로 20분 동안 원심분리하고 혈청을 분리하여 4℃에서 보관하였다. 혈청 중 독성평가의 지표로 사용되는 AST(aspartate aminotransferase), ALT(alanine transaminases), ALP(Alkaline Phosphatase), 및 LDH(lactate dehydrogenase)의 수치는 동물용 자동 혈청분석기(FUGI DRI-CHEM 7000i, Tokyo, Japan)를 통하여 측정하였다.

[0070] 실시예 2. 참치자숙액 효소가수분해물의 면역증진 활성-시험관(in vitro) 실험

[0071] 2.1. 세포 증식능 측정 결과

[0072] HPMC(hydroxypropyl methylcellulose)로 코팅된 참치자숙액 가수분해물을 비장세포에 처리하여 세포증식능을 측정하였다. 비장세포의 증식은 참치자숙액 효소가수분해물을 0.1~100 μ g/mL 농도에서 농도의존적인 증가를 나타내어 비장세포가 증식되었음을 확인하였다 (도 1).

[0074] 2.2. 사이토카인(Cytokine) 분비량 측정 결과

[0075] 비장세포로부터 면역증진 관련 사이토카인 (IFN- γ , IL-2, IL-6) 분비량을 측정한 결과, IFN- γ 및 IL-2 분비량이 100 μ g/mL 처리농도에서 감소함을 보였으나, 전체적으로 PBS 처리구에 비해 샘플 처리구에서 분비량이 증가

됨에 따라 면역증진 활성을 보였다(도 2 내지 도 4). 따라서, 참치자숙액 효소가수분해물은 세포수준에서 면역 증진에 효과가 있는 것으로 확인되었다.

[0077] 실시예 3. 참치 자숙액 효소가수분해물의 면역증진 활성-동물 실험

[0078] 3.1. 쥐무게 및 비장과 흉선 무게 측정 결과

[0079] HPMC(hydroxypropyl methylcellulose)로 코팅된 참치자숙액 가수분해물을 콩기름에 혼합하여 50, 100, 200 mg/kg · body weight로 14일 동안 경구투여한 후 쥐의 무게를 측정한 결과, 샘플 투여군과 비투여군간에 유의한 몸무게 변화를 나타내지 않았다(도 5). 비장과 흉선의 무게에서도 유의적인 증가는 나타나지 않았다(도 6).

[0081] 3.2. 세포 증식능 측정 결과

[0082] HPMC(hydroxypropyl methylcellulose)로 코팅된 참치자숙액 가수분해물을 콩기름에 혼합하여 14일 동안 투여한 후 그룹별 비장 세포의 세포증식률을 비교한 결과, 자숙액 효소가수분해물 투여군에서는 세포증식률이 증가하였다. 24시간 및 48시간 배양한 경우, mitogen free 또는 mitogen (Concanavalin A(ConA) 및 lipopolysaccharide(LPS))을 처리한 배양세포 모두에서 200 mg/kg · body weight로 처리한 경우 가장 높은 세포 증식률을 나타내었다(도 7 및 도 8).

[0084] 3.3. 사이토카인 IL-2 분비량 측정 결과

[0085] HPMC(hydroxypropyl methylcellulose)로 코팅된 참치자숙액 가수분해물을 콩기름에 혼합하여 14일 동안 투여한 후 그룹별 비장 세포의 사이토카인 분비량을 측정하였다. 대표적인 Th1 사이토카인인 IL-2의 분비량을 측정한 결과, 24시간 배양한 경우, mitogen free 및 mitogen(ConA, LPS) 처리한 배양세포 모두 200 mg/kg · body weight 처리군에서 가장 높은 분비량을 나타내어 면역활성을 증진시키는 효과가 있음을 확인하였다(도 9). 48시간 배양한 경우에도 200 mg/kg · body weight 처리군에서 가장 높은 IL-2 분비량을 나타내었다(도 10). IL-2는 세포증식률과 밀접한 관련이 있는 사이토카인이기 때문에 대체적으로 세포증식률 결과와 비교하였을 때 비슷한 증가 양상을 나타내며, 본 결과도 이와 일치하였다.

[0087] 3.4. 사이토카인 IFN- γ 분비량 측정 결과

[0088] 다른 Th1 사이토카인인 IFN- γ 의 분비량을 측정한 결과, 24시간 및 48시간 배양 시, mitogen free 및 mitogen(ConA, LPS) 처리한 배양세포 중 200 mg/kg · body weight 처리군에서 가장 높은 분비량을 나타내어 면역활성을 증진시키는 효과가 있음을 확인하였다(도 11 및 도 12). 전반적으로 IFN- γ 는 외부 침입균이나 바이러스를 무력화시키는 작용에 직접적으로 관여하기 때문에 면역학적으로 중요한 의미를 나타내며 Th1 사이토카인 분비량 증가와도 직접적인 영향을 주는 것으로 파악된다.

[0089] 따라서, 면역활성 증진과 관련된 대표적인 Th1 사이토카인인 IL-2 및 IFN- γ 분비량이 증가되었음을 확인함으로써, 자숙액 효소가수분해물의 투여는 면역활성의 증진에 효과가 있는 것으로 확인되었다.

[0091] 3.5. NK cell 활성 측정 결과

[0092] HPMC(hydroxypropyl methylcellulose)로 코팅된 참치자숙액 가수분해물을 콩기름에 혼합하여 14일 동안 투여한 후, 마우스로부터 분리한 비장세포(Effector cell)와 Yac-1 세포(target cell)를 일정한 비율로 섞어 NK cell 증제의 세포독성(cytotoxicity)을 관찰하였다. 그 결과, 비장세포의 비율이 가장 높은 200:1과 100:1 처리군 (effector cell: target cell ratio)에서 자숙액 효소가수분해물 처리군에 세포독성이 증가하였으며, 특히 200 mg/kg · body weight 처리군에서 가장 높은 세포독성 활성을 보였다(도 13).

[0093] 따라서, 200 mg/kg · body weight 농도의 자숙액 효소가수분해물의 처리 시 다른 면역 증진 관련 인자 증가와 함께 면역 증진에 효과가 있는 것으로 확인되었다.

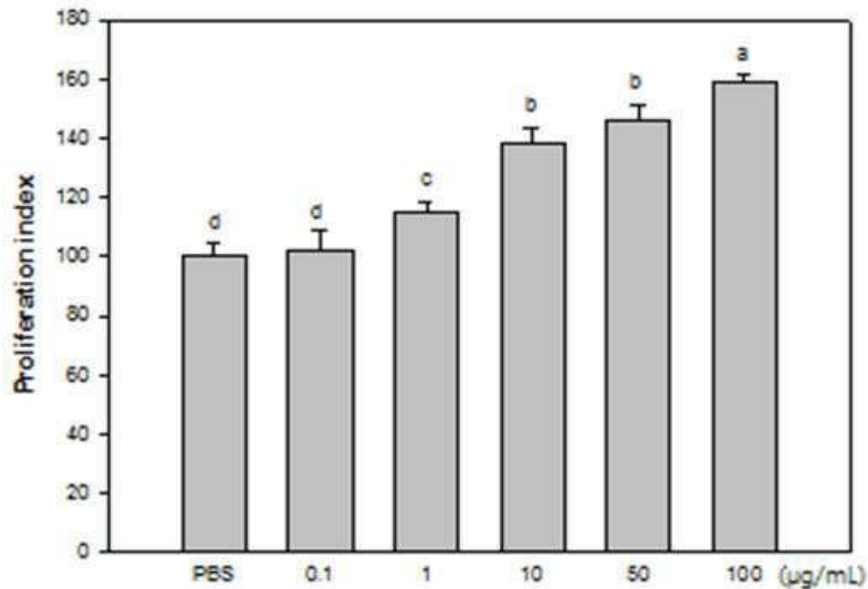
[0095] 3.6. 혈구 및 혈액화학치 분석 결과

[0096] HPMC(hydroxypropyl methylcellulose)로 코팅된 참치자숙액 가수분해물을 콩기름에 혼합하여 14일 동안 투여한 후, 혈구(백혈구, 중성구, 림프구, 단핵구, 호산구, 호염구)의 수치에 미치는 영향을 알아보기 위해 혈액을 채취하여 측정하였다. 그 결과, 백혈구, 림프구, 단핵구가 200 mg/kg · body weight 처리군에서 가장 높은 유의적인 증가를 보였으며, 정상범위 내에서 증가한 것으로 나타났다. 간 독성에 영향을 미치는지 알아보기 위해 혈액에서 간손상 여부를 알 수 있는 효소(GOT(Aspartate transaminase, AST) GPT(Alanine transaminase ALT), ALP(Alkaline phosphatase) 및 LDH(Lactate dehydrogenase))의 화학적인 수치를 검사해 본 결과, 모두 정상 범위를 나타내었으며, 그룹간의 차이는 나타내지 않아 간독성에 영향을 미치지 않는 것으로 확인되었다.

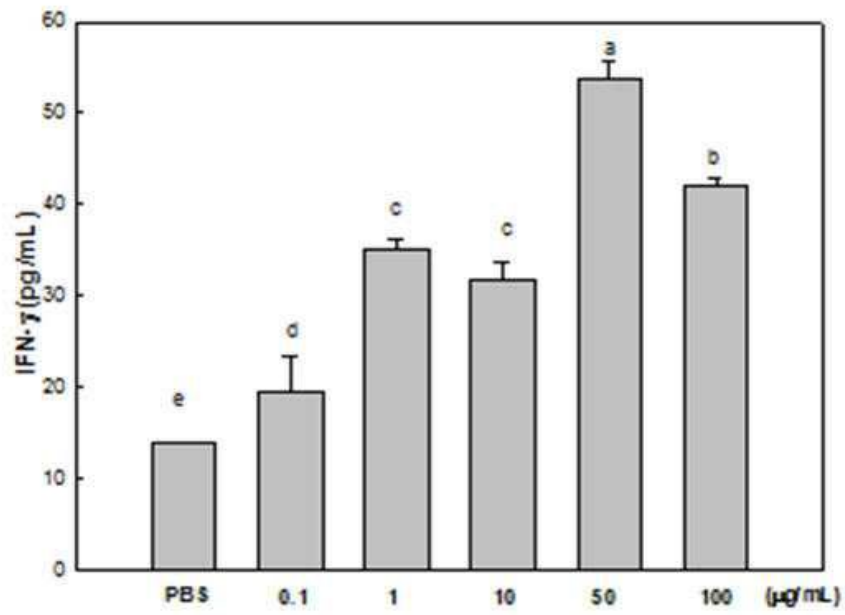
[0097] 따라서, 200 mg/kg · body weight 농도의 참치자숙액 효소가수분해물은 혈구 중 백혈구, 림프구, 단핵구 수치를 증가시켜 면역관련 세포들을 활성화시키는 것으로 확인되었다.

도면

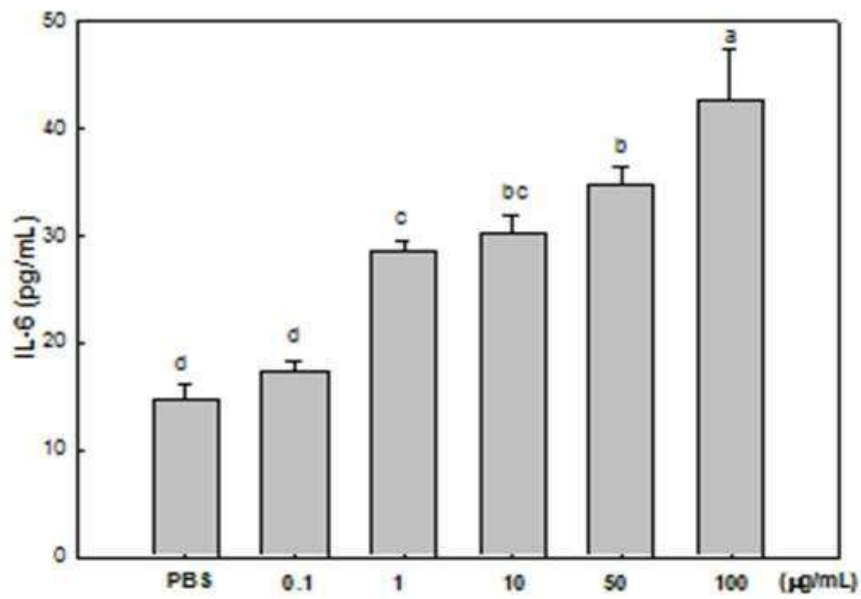
도면1



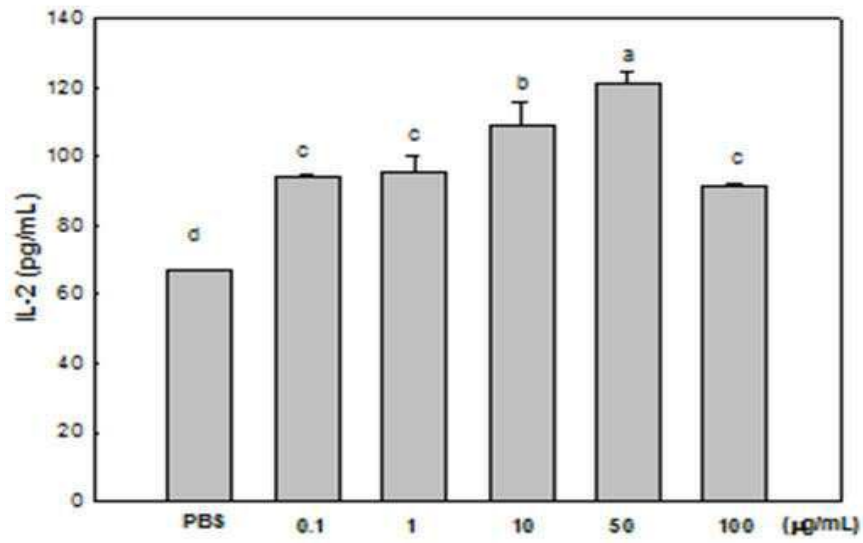
도면2



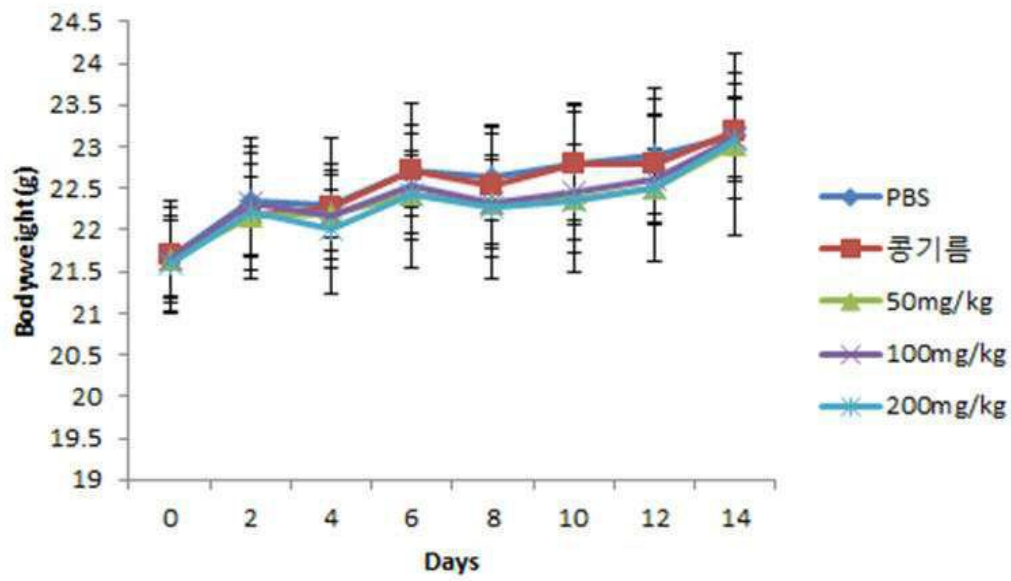
도면3



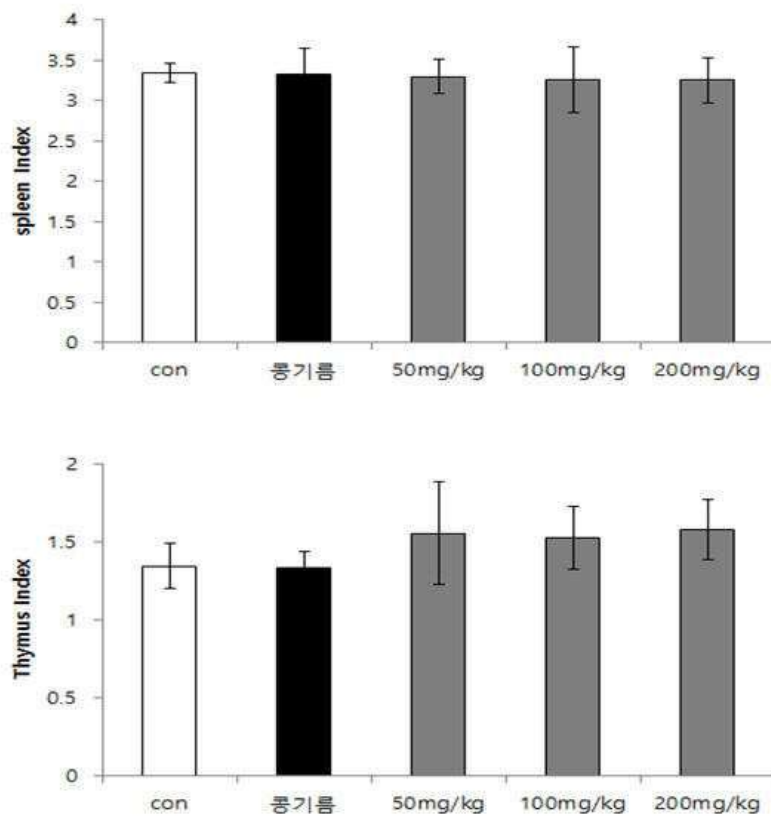
도면4



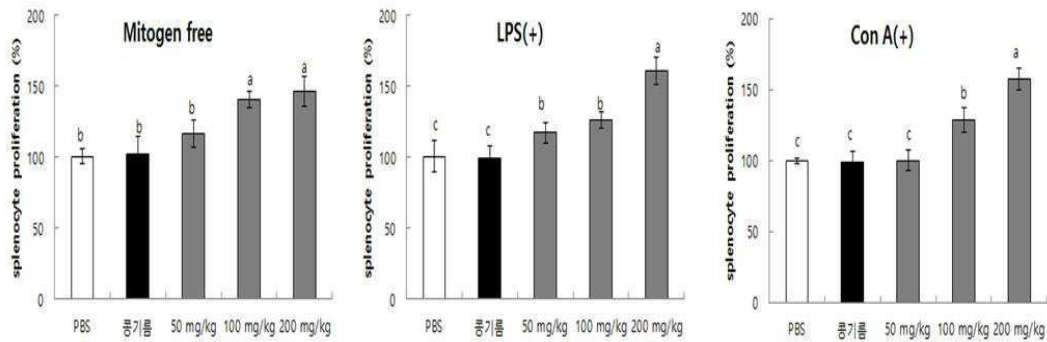
도면5



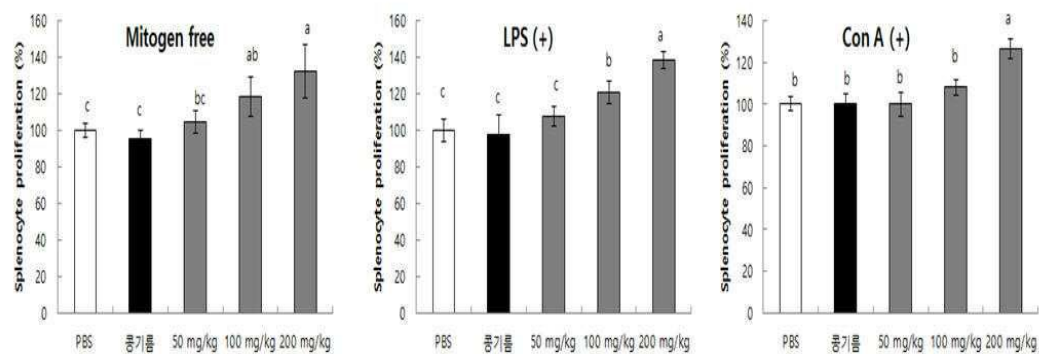
도면6



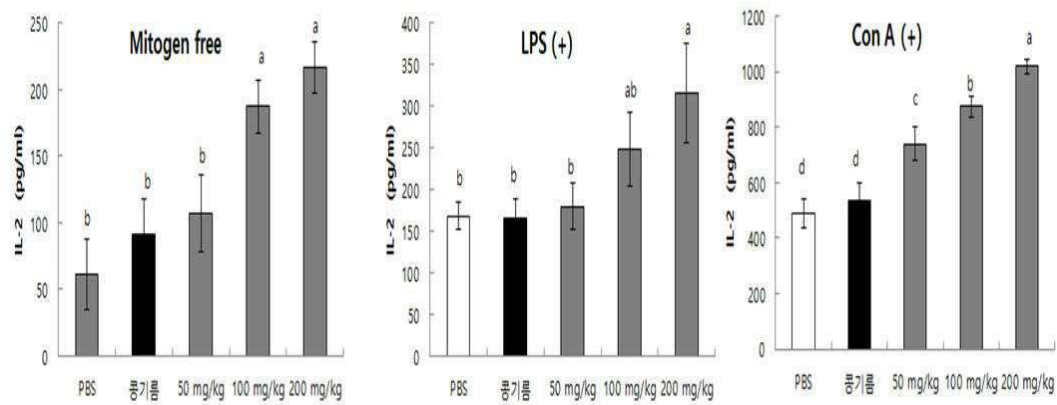
도면7



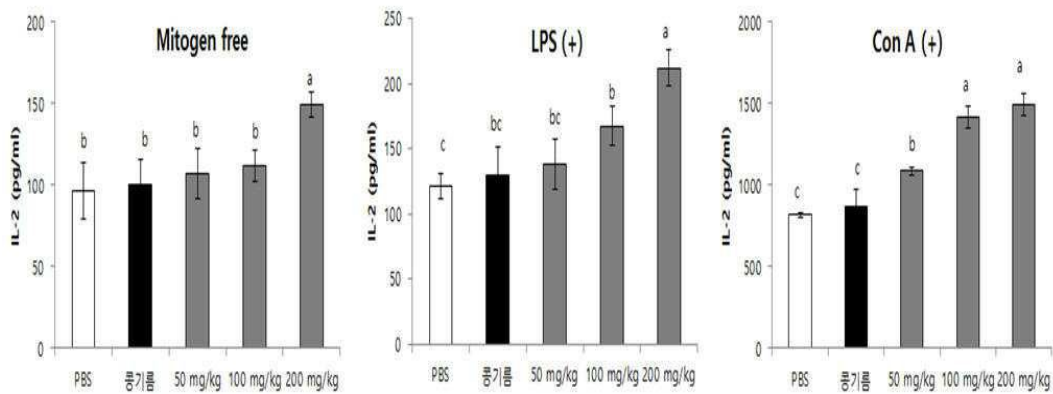
도면8



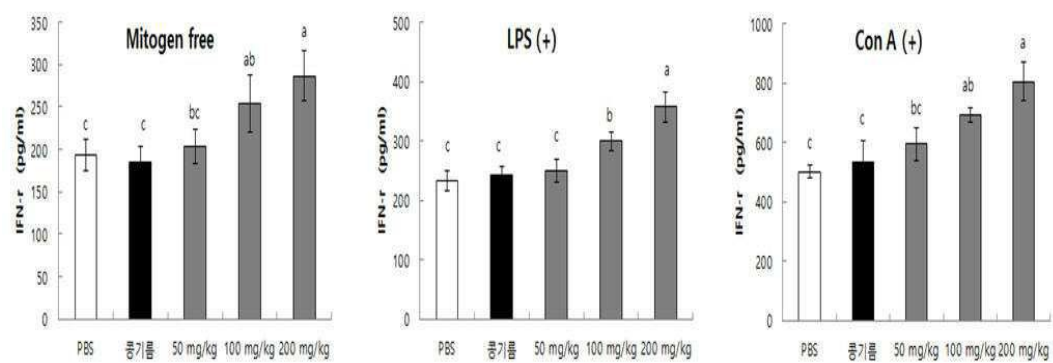
도면9



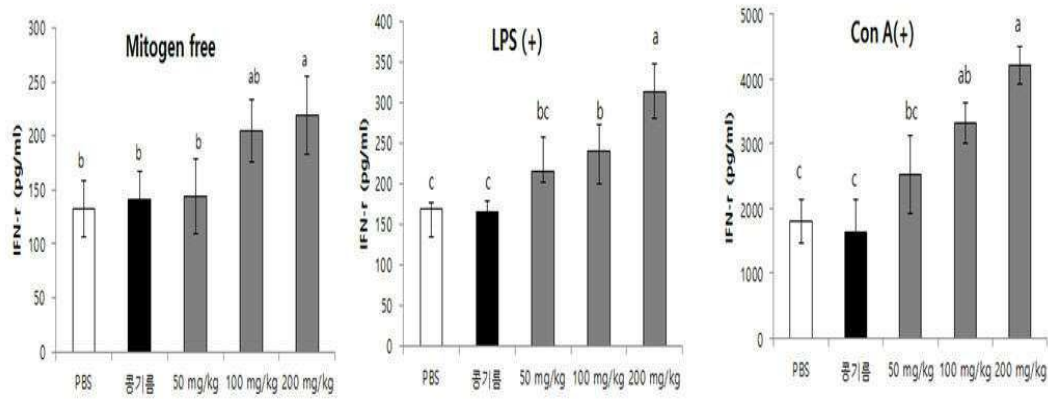
도면10



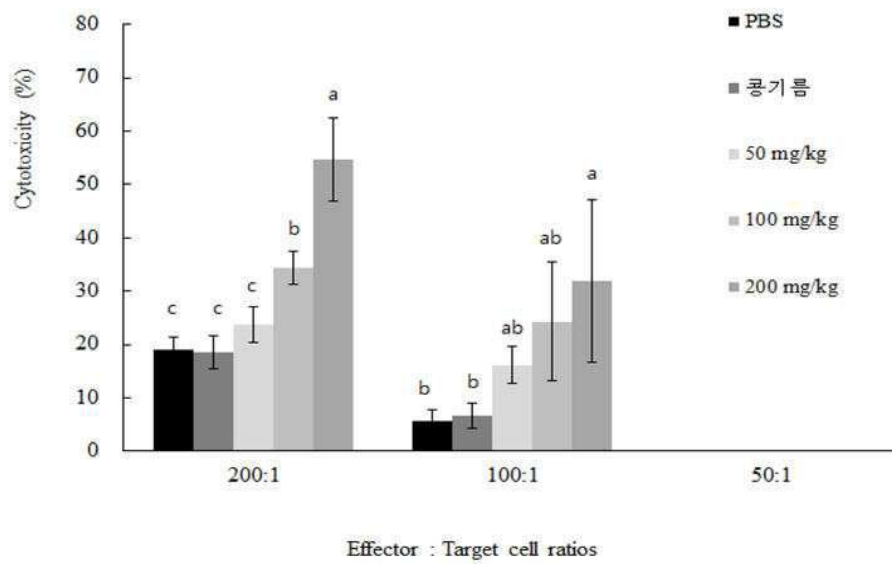
도면11



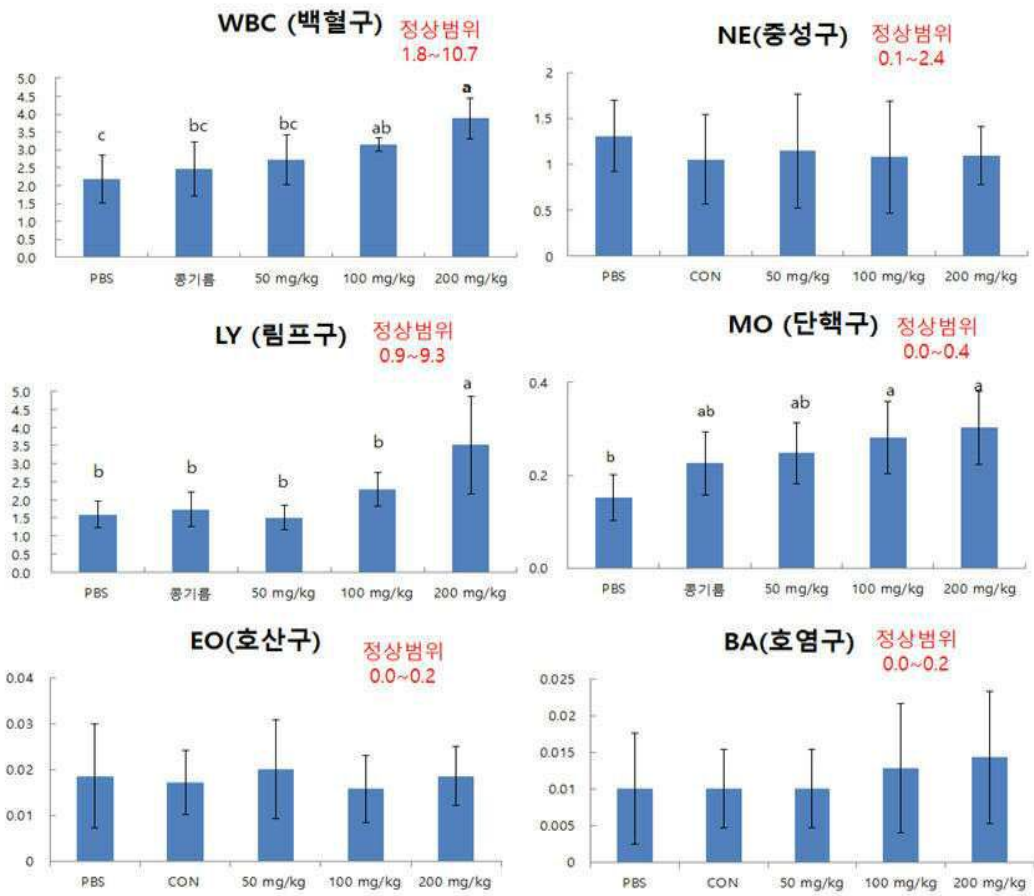
도면12



도면13



도면14



도면15

