(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2009-0043657
(43) 공개일자 2009년05월07일

(51) Int. Cl.
*A61K 38/10* (2006.01) *A61K 35/56* (2006.01)
*A61P 39/06* (2006.01) *A61P 19/02* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2007-0109326
(22) 출원일자 2007년10월30일
심사청구일자 2007년10월30일

(71) 출원인
**부경대학교 산학협력단**
부산 남구 용당동 산 100번지 부경대학교내
(72) 발명자
**김세권**
부산 부산진구 연지동 353-1번지 세동한신아파트105동 304호
**김문무**
부산 수영구 망미2동 1136번지 수영강변3차 이편한세상아파트301동 401호
**천충길**
부산광역시 남구 대연3동 599-1 부경대학교 화학과
(74) 대리인
**이덕록**

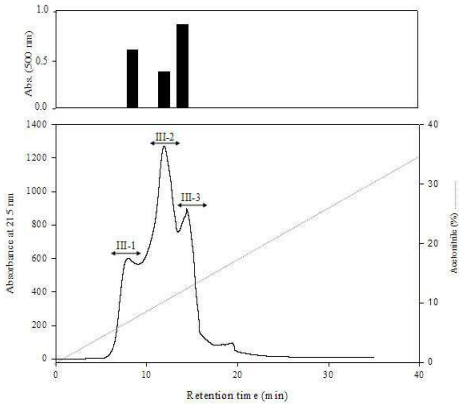
전체 청구항 수 : 총 4 항

# (54) 참굴 유래의 항산화활성을 갖는 펩타이드

## (57) 요 약

참굴(Crassostrea gigas)로부터 in-vitro 위장 내 소화과정을 통하여 펩타이드를 얻고, 이를 FPLC 및 RP-HPLC를 이용하여 정제하고 리놀레산 모델 시스템에서의 항산화 활성, 하이드록실 라디칼(Hydroxyl radical) 및 수퍼옥사이드 라디칼(superoxide radical) 소거(scavenging) 활성을 측정한 후 항산화 활성이 가장 뛰어난 펩타이드를 선정해 아미노산 서열을 밝힘으로써 기능성 식품 개발에 유용하게 사용될 수 있는 천연 항산화 펩타이드에 관한 것으로 항산화활성이 뛰어난 Leu-Lys-Gln-Glu-Leu-Glu-Asp-Leu-Leu-Glu-Lys-Gln-Glu로 구성된 펩타이드 물질을 제공하는 뛰어난 효과가 있다. 또한 본 발명의 정제된 펩타이드는 위장 내 소화과정을 이용하여 단백질 분해효소를 이용하여 대량생산이 용이하며, 종래 합성 항산화제를 대체하고 천연 항산화제인 α-토코페롤보다 높은 지질과산화 억제 활성 및 자유 라디칼 소거능력을 가지며, 세포독성이 없어 인체에 무해하게 사용될 수 있으므로 식품가공산업 및 기능성 식품 분야에서 널리 이용될 수 있는 뛰어난 효과가 있다.

*대 표 도* - 도2



## 특허청구의 범위

### 청구항 1

참굴(Crassostrea gigas) 유래의 항산화 활성을 갖는 펩타이드.

### 청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 펩타이드는 Leu-Lys-Gln-Glu-Leu-Glu-Asp-Leu-Leu-Glu-Lys-Gln-Glu의 아미노산 서열을 가지며, 분자량 16,000Da임을 특징으로 하는 항산화 활성을 갖는 펩타이드.

### 청구항 3

제 1항에 있어서, 펩타이드를 유효성분으로 함유한 항산화용 조성물은, 항산화 활성과 관련된 질환의 상처, 관절염, 염증, 주름, 미백, 당뇨병, 위궤양, 외상, 화상, 치주질환 또는 동맥경화 치료용 조성물.

### 청구항 4

제 1항에 있어서, 항산화용 조성물은 산제, 정제, 캡슐제, 분말제, 연고조성물, 용액제, 젤, 페이스트, 첩포제 또는 과립상인 것을 특징으로 하는 항산화용 조성물.

## 명 세 서

## 발명의 상세한 설명

### 기 술 분 야

<1> 본 발명은 참굴(Crassostrea gigas) 에서 분리한 항산화 펩타이드에 관한 것으로, 보다 상세하게는 참굴로부터 in-vitro 위장 내 소화과정을 통하여 펩타이드를 얻고, 이를 FPLC 및 RP-HPLC를 이용하여 정제하고 리놀레산 모델 시스템에서의 항산화 활성, 하이드록실 라디칼 및 수퍼옥사이드 라디칼 소거 활성을 측정한 후 항산화 활성이 가장 뛰어난 펩타이드를 선정해 아미노산 서열을 밝힘으로써 기능성 식품 개발에 유용하게 사용될 수 있는 천연 항산화 펩타이드에 관한 것이다.

### 배 경 기 술

<2> 수퍼옥사이드 음이온, 하이드록실 라디칼 및 과산화수소와 같은 반응성 산소계열(ROSs)에 의한 지질산화는 지질의 영양가, 안전성 및 외관의 저하를 야기한다. 더욱이 지질산화는 식품의 품질저하의 주요한 원인이며, 산패, 독성 및 생리적 대사에서 중요한 역할을 하는 생화학 성분들의 파괴를 일으킨다. 이러한 라디칼은 매우 불안정하고 신체내의 다른 물질들과 쉽게 반응하여 세포 또는 조직의 손상을 유발한다.

<3> 더욱이 DNA, 단백질, 지질 및 미세 세포분자에 대한 자유 라디칼 관여 변형은 아테롬성 동맥경화증, 관절염, 당뇨, 백내장, 근위축증(筋萎縮症), 폐 장애, 염증성 이상, 조직손상 및 알츠하이머와 같은 신경이상을 포함한 수많은 병리학적 과정과 연관이 있다(Frlich and Riederer, 1995).

<4> 특히 식품에서의 지질과산화는 영양가에 영향을 주고, 잠재적 독성 반응 제품의 섭취 후 질병 상태를 야기할지도 모른다. 따라서, 지난 수십 년간 인간의 영양학 및 생화학 연구는 지질 과산화를 줄일 수 있는 식품 성분으로부터 유래한 항산화제에 초점을 맞춰왔다.

<5> 자유 라디칼 소거제는 예방기능이 있는 항산화제이다. 따라서 항산화제들은 산화적 스트레스에 대한 신체적 예방기능에 있어 중요한 역할을 담당하는 것으로 알려졌다.

<6> 산화의 결과로 발생하는 탈색 및 품질저하를 막기 위하여 더 많은 항산화제들이 식품 보존용으로 사용되고 있다. 이것은 산화적 스트레스가 자유 라디칼 연쇄반응을 촉진함으로써 지질의 손상을 야기하는 많은 대사 중 하나를 설명하고 있다. 이런 관계에 있어서, 지질 과산화는 불쾌한 이취 및 잠재적 독성 반응 제품으로의 발전 가능성 때문에 식품산업과 소비자들에게 가장 중요한 관심이 되고 있다(Maillard et al., 1996).

<7> 현재 비타민 C와 α-토코페롤과 같은 천연 항산화제가 생물학적 작용을 증진시키고 지질 및 지질함유제품의 안정성을 증진시키기 위한 수단으로 지속적으로 사용되고 있다. 하지만, BHA(butylated hydroxyanisole), BHT(butylated hydroxytoluene), TBHQ(tert-butylhydroquinone) 및 PG(propyl gallate )와 같은 합성 항산화

제의 사용은 잠재적인 건강위험으로 인해 엄격한 규제를 받고 있다(Hettiarachchy et al., 1996). 따라서 합성 항산화제의 대체제로 천연항산화제를 탐색하는 것이 지대한 관심을 받고 있다.

<8> 최근 생활성 펩타이드와 관련한 구조적, 조성적 및 서열적 특성 연구에 대한 관심이 증대되고 있으며, 많은 펩타이들이 항산화(Jung et al., 2005; Rajapakse et al., 2005), 항고혈압(Jung et al., 2006; Je et al., 2005; Suetsuna et al., 2004) 및 면역조절 효과(Chen et al., 1995; Tsuruki et al., 2003)와 같은 다양한 종류의 생활성을 나타내었다. 이러한 문헌들은 식품 단백질의 효소분해에 의해 생겨난 생활성 펩타이드가 위장내 소화중 잠재적 생리학적 대사조절물질로 작용할 수 있음을 보여준다.

<9> 생활성 펩타이드는 일반적으로 3 내지 20개의 아미노산 잔기를 가지고 있으며, 그들의 활성은 아미노산 조성과 서열에 근거하여 달라진다 (Pihlanto-Leppala, 2001).

<10> 최근 몇몇 문헌들은 해양 식품에서 얻은 항산화 펩타이드의 in vitro 형성과 대체 항산화제로의 사용가능성에 대하여 기술하였다. 위장내의 단백질분해효소에 의한 소화는 항산화 펩타이드의 생산공정으로 이용될 수 있으며, 형성된 펩타이드는 구강 섭취 후의 생리적 소화를 억제하는 장점이 있다.

<11> 본 발명은 항산화 펩타이드의 형성 및 분해를 일으키는 in vitro 위장내 소화의 상태를 조사하고 펩타이드의 항산화 효과를 밝히기 위한 것이다.

<12> 조개와 젓갈(fish sauces)은 동아시아 및 남동 아시아 지역에서 널리 이용된다. 한국에서는 2005년 기준 252,000 톤의 굴이 생산되는 것으로 추정되고, 불과 소수의 조개와 젓갈만이 지방에서 유지되고 있다. 하지만 조개 및 젓갈은 맛과 향에 대한 소비자 관심이 증가하면서 최근에 다시 회복되고 있다.

<13> 이러한 관점에서, 본 발명은 위장내 소화에 의한 크라쓰오스트레아 기가스로부터 유래한 항산화 펩타이드에 관한 것으로, 이들의 리놀레산 과산화화 및 라디칼 소거에 의한 항산화 효능을 평가하였다.

## *발명의 내용*

### *해결 하고자하는 과제*

<14> 따라서, 본 발명의 목적은 참굴(Crassostrea gigas, 참굴) 에서 위장내 소화과정을 이용하여 펩타이드 성분을 분리, 정제하고, 이들의 리놀레산 과산화화 및 자유라디칼 소거 활성을 조사하여 항산화활성이 뛰어난 펩타이드를 설정하고, 그의 아미노산 서열을 밝힘으로써 기능성 식품에 사용될 수 있는 인체에 무해한 천연 항산화물질을 제공하는 것이다.

### *과제 해결수단*

<15> 본 발명의 상기 목적은 리놀레산 과산화화의 억제 및 자유라디칼 소거 활성이 뛰어난 펩타이드를 분리 및 정제한 후 아미노산 염기서열을 밝힘으로써 달성하였다. 또한 세포독성 실험과 세포내의 라디칼 소거 능력을 조사함으로써 달성하였다.

<16> 본 발명은 참굴(Crassostrea gigas )에서 분리한 항산화 펩타이드를 제공하는 것을 특징으로 한다.

<17> 상기에서 펩타이드의 분리는 바람직하게는 위장 내 소화과정을 응용하여 단백질 분해효소를 이용할 수 있다. 또한 이온 교환 크로마토그래피와 RP-HPLC를 이용하여 좀더 세부적으로 분리할 수 있다.

<18> 항산화 효과는 리놀레산 모델 시스템에서의 과산화화 억제 활성 정도, 하이드록실 라디칼 및 수퍼옥사이드 라디칼의 소거 활성을 측정함으로써 평가할 수 있다.

<19> 또한 본 발명은 Leu-Lys-Gln-Glu-Leu-Glu-Asp-Leu-Leu-Glu-Lys-Gln-Glu의 아미노산 서열을 가지며, 분자량 16,000Da 의 항산화 펩타이드를 제공하는 것을 특징으로 한다.

<20> 상기에서 아미노산 서열 및 분자량 분석은 질량분석기(MS) 및 탠덤 질량분광법에 의하여 얻을 수 있다.

<21> 또한 본 발명은 상기의 펩타이드를 유효성분으로 함유하는 천연항산화용 약제학적 조성물을 제공함을 특징으로 한다.

<22> 상기 조성물은 경구 투여용 제제 등 다양한 형태로 제조될 수 있으며, 또한 감미제, 향미제 등 기타 통상적인 약제학적으로 허용가능한 부형제를 추가로 함유하여 제조될 수 있다.

## 효 과

<23> 본 발명은 참굴(Crassostrea gigas)에서 유래한 항산화 펩타이드에 관한 것으로, 특히 항산화활성이 뛰어난 Leu-Lys-Gln-Glu-Leu-Glu-Asp-Leu-Leu-Glu-Lys-Gln-Glu로 구성된 펩타이드 물질을 제공하는 뛰어난 효과가 있다. 또한 본 발명의 정제된 펩타이드는 위장 내 소화과정을 이용하여 단백질 분해효소를 이용하여 대량생산이 용이하며, 종래 합성 항산화제를 대체하고 천연 항산화제인 α-토코페롤보다 높은 지질 과산화 억제 활성 및 자유 라디칼 소거능력을 가지며, 세포독성이 없어 인체에 무해하게 사용될 수 있으므로 식품가공산업 및 제약 분야에서 널리 이용될 수 있는 뛰어난 발명인 것이다.

## 발명의 실시를 위한 구체적인 내용

<24> 이하 본 발명이 구체적인 방법을 실시예를 들어 상세히 설명하고자 하지만 본 발명의 권리범위는 이들 실시예에만 한정되는 것은 아니다.

<25> 참굴을 대한민국 부산의 참손 식품회사에서 구하였다. 효소가수분해를 위한 단백질분해효소(펩신, 트립신 및 α-키모트립신) , 리놀레산, 암모늄 티오시안산염, α-토코페롤 및 5,5-디메틸-1-피롤린-N-옥사이드(5,5-dimethyl-1-pyrroline-N-oxide, DMPO), 황화철($FeSO_4$),과산화수소와 같은 라디칼 시험 화합물을 시그마 케미컬스 회사에서 구입하였다. (St. Louis, MO, USA). MRC-5(인간 폐 섬유아세포) 와 RAW264.7(마우스 대식세포) 의 세포주는 American Type of Culture Collection(Manassas, VA, USA)에서 얻었다. 세포 배양 배지와 배양에 필요한 다른 물질들은 Gibco BRL, Life Technologies (USA)에서 얻었다. 다른 화합물과 시약들은 상업적으로 이용가능한 분석용 등급이었다.

<26> **실시예 1 : 참굴의 *In vitro* 위장내 소화를 통한 단백질의 분리**

<27> 캅소케팔로우와 밀러 (Kapsokefalou and Miller,1991)에 의해 알려진 방법을 사용하여 참굴의 소화과정을 수행하였다.

<28> 4% (w/v)의 단백질 분리용액 100mL를 1 및 10 M의 황산과 수산화나트륨을 혼합 사용하여 위장 소화를 나타내는 pH로 조정하였다. 펩신을 효소 대 기질 비율 1/100(w/w)으로 첨가한 후 37℃ 쉐이커에서 배양하였다. 2시간 후 소장내 소화 상태를 얻기 위하여 pH를 2.5로 셋팅하였다. 비슷한 방법으로 트립신(EC 3.4.21.4) 과 α-키모트립신(EC 3.4.21.1)을 효소 대 기질 비율 1/100(w/w)으로 보충하였다. 그리고 나서 상기 용액을 37℃ 에서 2.5시간 동안 더 배양하였다. 시작시점과 종료시점에 샘플을 취하였고, 이때 pH를 6.5로 조정하였다. 샘플을 10,000 × g로 4℃에서 15분간 원심분리하였고, 상청액을 -80℃에서 냉동보관하였다. 상기 냉동된 샘플은 연속적으로 동결건조하여 참굴 단백질 건조분말을 얻었다.

<29> **실시예 2 : 참굴 단백질의 FPLC를 이용한 분리 및 FPLC 분획(I,II,III)의 리놀레산 모델 시스템에서 항산화활성의 측정**

<30> 실시예 1에서 수득한 단백질을 FPLC를 이용하여 3개의 분획으로 나누었고 각 분획은 I, II, III로 명명하였다. FPLC는 다음의 방법으로 수행하였다.

<31> 실시예 1에서 수득한 참굴 단백질(20 mg/mL)을 20mM의 아세트산나트륨 버퍼(pH 4.0)에 녹인 후 20mM의 아세트산나트륨 버퍼로 평형조정된 Hiprep 16/10 DEAE FF 음이온 교환 칼럼이 있는 FPLC(fast protein liquid chromatography)에 적재하였고, 시간당 62mL의 류속도의 동일 버퍼상에서 염화나트륨 선형구배를 이용하여 용리(鎔離)하였다.

<32> 도 1에서 나타난 것처럼, 280nm에서 관찰한 결과, 용리 피크 3개를 얻을 수 있었으며, 각 분획을 I, II, III로 명명하고 4mL씩 수집하였다. 수집된 분획은 동결건조하고, 오사와와 나미키(Osawa and Namiki, 1985)의 방법에 따라 리놀레산 모델 시스템에서 크라소오스트레아 기가스 단백질의 항산화 활성을 측정하였다.

<33> 동결건조된 분획 I, II, III를 각각 1.3mg씩 50 mM 인산염 버퍼(pH 7.0) 10mL에 녹인 후 0.13mL의 리놀레산과 10mL의 99.5%의 에탄올을 함유하고 있는 용액에 첨가하였다. 그리고 나서 전체 용량을 증류수를 이용하여 25mL로 조정하였다. 상기 혼합물을 암실에서 40 ±1 ℃의 온도로 스크류 뚜껑이 있는 코니컬 플라스크에서 배양하였고, 산화도는 티오시안산염철(ferric thiocyanate) 수치를 측정하여 평가하였다.

<34> 티오시안산염철 수치는 미쯔타 (Mitsuta et al. (1996))의 방법에 의하여 측정하였다. 리놀레산 모델 시스템에서 배양한 반응용액(100 μL) 을 4.7mL의 75% 에탄올, 0.1mL의 30% 암모늄티오시안산염 및 3.5% 의 염산내

0.1mL의 2 × $10\,M^{-2}$의 염화철용액과 혼합하였다. 염화철과 티오시안산염과의 변색이 있은 후, 40 ±1 ℃에서 배양기간 동안 다른 시간간격으로 3분 후 티오시안산염 수치를 500nm에서 흡광도를 읽음으로써 측정하였다.

<35> 실험결과 분획 III가 지질 과산화(80.15%)를 억제하는 가장 높은 항산화 잠재성을 보여주었다.

<36> **실시예 3 : 분획 I, II, III의 하이드록실 라디칼의 소거 활성**

<37> 참굴 단백질을 FPLC로 분리하여 수득한 분획 I, II, III의 하이드록실 라디칼(hydroxyl radical) 소거활성(scavenging activity)에 대하여 살펴보았다.

<38> 철을 촉매로 한 펜톤 하버-바이스(Fenton Haber-Weiss) 방법에 의하여 하이드록실 라디칼이 생성되었으며, 상기 라디칼은 니트론 스핀 트랩 DMPO (nitrone spin trap DMPO)와 즉각 반응하였다. 결과물인 DMPO-OH 부가물은 ESR 분광기로 검출되었다. 펜타이드 용액 0.2mL을 인산염 버퍼 용액(pH 7.4) 상에서 DMPO (0.3 M, 20 μL), $FeSO_4$ (10 mM, 20 μL) 및 과산화수소 (10 mM, 20 μL) 와 혼합하고 나서, 100 μL 석영 모세관 튜브로 옮겼다. 2분 30초 후에 ESR분광기를 이용하여 분광스펙트럼이 기록되었다. 적용된 실험 조건은 다음과 같다. 자기장 336.5 ± 5 mT, 전력 1 mW, 변조주파수 9.41 GHz, 진폭 1 × 200, 일소시간(sweep time) 4분

<39> 하이드록실 라디칼 소거능은 H 와 $H_0$ 가 각각 샘플이 있을 때와 없을 때의 라디칼 신호의 상대적 피크 높이를 나타내는 다음 방정식을 이용하여 계산하였다.

<40>
$$\text{라디칼 소거 활성} = \frac{1 - H}{H_0} \times 100\%$$

<43> 표 1에서 보듯이, 분획 III이 하이드록실 라디칼에 대하여 상당한 소거활성을 나타내었다.

*표 1*

<44> FPLC 분획의 자유라디칼 소거활성

| | 자유 라디칼 소거 활성(%) | |
|---|---|---|
| | 하이드록실 라디칼 | 수퍼옥사이드 라디칼 |
| 분획 I | 23.28 ± 1.87 | 12.98 ± 2.21 |
| 분획 II | 34.75 ± 2.19 | 21.36 ± 3.21 |
| 분획 III | 55.36 ± 1.24 | 35.23 ± 2.04 |

<45> 소거효과는 0.5mg/mL의 농도에서 시험하였다

<46> **실시예 4 : 분획 I, II, III의 수퍼옥사이드음이온 라디칼 소거 활성**

<47> 참굴 단백질 FPLC 분획 I, II, III의 수퍼옥사이드 음이온 라디칼(superoxide anion radical)에 대한 소거활성을 살펴보았다.

<48> 수퍼옥사이드 음이온 라디칼을 UV 방출 리보플라빈/ EDTA 시스템을 이용하여 생성하였다(Guo et al., 1999).

<49> 0.3mM의 리보플라빈, 1.6mM의 EDTA, 800mM의 DMPO 및 각각의 FPLC 분획 I, II, III을 포함한 상기 반응 혼합물에 365nm의 UV를 1분간 조사(照射)하였다. 그리고 나서 상기 반응혼합물을 100 μL의 석영모세관튜브에 옮겨 ESR 분광기로 측정하였다. 적용된 실험 조건은 다음과 같다. 자기장 336.5 ±5 mT , 전력10 mW , 변조 주파수 9.41 GHz, 진폭 1 ×1,000, 일소시간(sweep time) 1분

<50> 수퍼옥사이드 라디칼 소거능은 H 와 $H_0$ 가 각각 샘플이 있을 때와 없을 때의 라디칼 신호의 상대적 피크 높이를 나타내는 다음 방정식을 이용하여 계산하였다.

<51>
$$\text{라디칼 소거 활성} = \frac{1 - H}{H_0} \times 100\%$$

<53>

<54> 분획 III가 수퍼옥사이드 라디칼에 대하여 상당한 소거 활성을 나타내었다.

<55> **실시예 5 : 분획 III의 RP-HPLC를 이용한 정제**

<56> 가장 항산화 활성이 뛰어났던 분획 III에 대하여 정제를 수행하였다.

<57> 가장 높은 항산화활성을 보이는 분획 III을 RP-HPLC를 이용하여 더욱더 정제하였다. RP-HPLC는 1.0mL/min의 류속도로 0.1%의 트리플루오로아세트산(TFA)를 함유한 아세토니트릴(0-35 % in 35 min) 을 선형구배로 하는 Primesphere 10 $C_{18}$ (20 mm ×250 mm) 칼럼을 이용하였다.

<58> 용리 피크는 215nm에서 관찰하였고, 각각의 피크는 회전증발기를 이용하여 농축하였다. 분석용 칼럼으로 분리한 활성분획은 1.0mL/min의 류속도의 0.1%의 TFA를 함유한 아세토니트릴의 선형구배를 가진 Synchropak RPP-100 분석용칼럼으로 더 정제하였다. 상기 과정에서 활성분획은 상기 실시예 2, 3, 4에서 나타낸 방법으로 실시하여 확인하였다.

<59> 표 2에 나타낸 바와 같이 HPLC 분획 3개를 얻었으며, 각각 III-1, III-2, III-3으로 명명하였다. 그 중 III-2 분획이 가장 활성이 좋은 것으로 나타났다.

*표 2*

<60> HPLC 분획(III-1, III-2, III-3)의 자유라디칼 소거활성

| 분획 | 자유 라디칼 소거 활성(%) | |
|---|---|---|
| | 하이드록실 라디칼 | 수퍼옥사이드 라디칼 |
| III-1 | 48.87 ± 2.07 | 13.20 ± 1.72 |
| III-2 | 87.78 ± 1.31 | 48.36 ± 1.55 |
| III-3 | 69.85 ± 2.13 | 35.29 ± 2.16 |

<61> 소거효과는 0.1mg/mL의 농도에서 시험하였다.

<62> **실시예 6 : 분자량 및 아미노산 서열의 결정**

<63> 실시예 5에서 수득한 III-2 펩타이드의 정확한 분자량과 아미노산 서열을 일렉트로스프레이 이온화 공급원을 갖춘 Q-TOF 질량분석기(Micromass, Altrincham, UK)를 이용하여 결정하였다.

<64> 정제된 펩타이드를 메탄올/물(1:1,v/v)에 용해시킨 후 개별적으로 일렉트로스프레이 공급원에 주입하였고, 질량분석스펙트럼에서 2가로 하전된 상태 $[M+2H]^{+2}$ 로 분자량을 측정하였다. 분자량 결정 후 분획에 대한 펩타이드가 자동적으로 선발되었고, 서열 정보는 탠덤 질량분광법(MS) 분석에 의하여 얻었다.

<65> 정제된 펩타이드의 아미노산 서열은 Leu-Lys-Gln-Glu-Leu-Glu-Asp-Leu-Leu-Glu-Lys-Gln-Glu 였으며, 분자량은 1,600Da로 결정되었다. ESI/MS 분광법으로 결정한 정제된 펩타이드는 상기 서열로부터 이론적으로 계산된 질량과 놀랍게 일치하였다.

<66> **실시예 7 : 정제된 펩타이드의 리놀레산 모델 시스템에서의 항산화활성의 측정**

<67> 상기 실시예 2에 나타낸 것과 같은 방법으로 항산화활성을 측정하였다.

<68> 도 2에서 보듯이, 정제된 펩타이드(III-2)는 in-vitro에서 지질 과산화(84.90 %) 를 매우 높게 억제하였으며, α-토코페롤($P<0.05$) 과 비교하여도 현저히 높았다.

<69> 생활성 펩타이드는 일반적으로 분자당 2 내지 20개의 아미노산 잔기를 함유하고 있으며(Pihlanto-Leppala, 2001), 분자량이 작을수록 소장막을 가로질러 생물학적 효과를 낼 수 있는 가능성이 높아진다(Roberts et al., 1999). 항산화 펩타이드에 관한 종래 문헌은 5 내지 16개의 아미노산 잔기를 가진 펩타이드가 리놀레산의 자동산화를 억제할수 있다는 것을 보여주었다. (Chen et al., 1995). 지질 과산화는 다중불포화지방산에서 라디칼이 관여하여 메틸렌 탄소에서 수소원자를 제거함으로써 발생한다고 여겨진다(Rajapakse et al., 2005).

<70> 정제된 펩타이드 서열 중 약 30%는 소수성 아미노산 잔기인 Leu으로 구성되어 있다. 항산화제의 소수성정도가 소수성 목표물의 접근에 있어 중요하기 때문에 (Chen et al., 1996), 정제된 펩타이드 내에 소수성 아미노산의 존재가 지질에서 펩타이드의 용해도를 높임으로써 라디칼 계열과의 상호작용을 원활하게 함으로 인해 지질산화

억제 활성에 기여하는 것으로 추정된다. 또한 펩타이드 서열의 N-말단에 소수성 아미노산인 Leu이 자리잡는 것이 항산화 활성에 중요하다고 생각되며, 그 이유는 Leu이 펩타이드와 지방산 간의 상호작용을 증가시킬 수 있기 때문이라 추정된다(Chen et al., 1995; Ranathung et al., 2006). 또한, 여러 항산화 펩타이드 서열에서 관찰된 바와 같이, 그 위치에 상관없이 Asp의 존재 여부가 중요한 역할을 하는 것으로 보인다(Rajapakse et al., 2005; Uchida an Kawakishi, 1992).

<71> 대체적으로 특이 아미노산의 존재여부 및 서열상의 특이한 위치가 상기 정제된 펩타이드의 항산화 활성에 기여하는 것일 수 있다.

<72> **실시예 8 : 정제펩타이드(III-2)의 항산화활성**

<73> 실시예 3과 실시예 4에 기술한 방법을 사용하여 III-2 펩타이드의 항산화활성을 측정하였다.

<74> . 정제된 펩타이드의 자유 라디칼 직접 소거 효과를 ESR 스핀 트래핑(spin-trapping) 기술을 이용하여 조사하였다. 2개의 자유 라디칼이 in vitro 상태에서 생성되었다. 하이드록실 라디칼이 펜톤 반응에서 생성되었고, ESR 분광기를 통하여 시각화되었다.

<75> OH에 대하여 DMPO와 경쟁하는 OH 소거제의 존재에 의하여 ESR 신호는 억제되었다. 수퍼옥사이드 라디칼은 리보플라빈/EDTA 용액에 UV를 조사함으로써 생성되었다.

<76> 표 2에서 나타낸 바와 같이, 정제된 펩타이드는 2개의 자유라디칼 공급원을 효율적으로 억제하였다. 특히 정제된 펩타이드는 수퍼옥사이드 라디칼보다 하이드록실 라디칼을 소거함에 있어 더 잠재능이 있었다. 정제된 펩타이드는 각각 28.76 및 78.79 μM 의 $IC_{50}$값으로 하이드록실 라디칼, 수퍼옥사이드 라디칼 순으로 라디칼을 억제하였다.

<77> 표 2에 나타낸 바와 같이, 하이드록실 라디칼 및 수퍼옥사이드 라디칼은 정제 펩타이드 0.1mg/mL의 존재시에 각각 87.78%, 48.36%로 소거되었다.

<78> 하이드록실 라디칼 및 수퍼옥사이드 라디칼을 소거하는 정제 펩타이드 III-2의 $IC_{50}$ 값은 α-토코페롤보다 높았으며(하이드록실, $IC_{50}$: 179.8uM; 수퍼옥사이드, $IC_{50}$ > 1000uM),, 정제 펩타이드 III-2는 더 효율적으로 라디칼을 소거할 수 있었다.

<79> 하이드록실 라디칼의 화학적 활성은 ROS 중에서 가장 강하며 아미노산, 단백질 및 DNA와 같은 생분자와 쉽게 반응한다(Cacciuttolo et al., 1993). 따라서, 하이드록실 라디칼을 제거하는 것이 여러 질병에 대한 생체의 가장 효율적인 방어방법 중 하나일 것이다.

<80> 서열분석 데이터에 근거할 때, 상기 정제 펩타이드는 강한 라디칼 소거 잠재능에 기여할 수 있는 4개의 산성 Leu 잔기 및 1개의 Asp 잔기로 구성되어 있었다.

<81> 수에쯔나와 나카노(Suetsuna and Nakano, 2000)는 카세인에서 유래한 라디칼 소거 펩타이드의 Leu 잔기가 강한 라디칼 소거 잠재능을 보인다고 보고하였다. 또한 라나텅은(Ranathung et al. ,2006)은 분리된 펩타이드 서열에서 강한 라디칼 소거 활성을 가지기 위한 Leu의 중요성에 대하여 기술하였다. 따라서, Leu 잔기가 정제펩타이드의 라디칼 소거 활성에 기여하는 것으로 예상할 수 있다.

<82> **실시예 9 : 정제펩타이드(III-2)의 세포내 라디칼 소거 효과**

<83> 인간의 폐 섬유아세포(MRC-5)와 마우스의 대식세포(RAW 264.7)를 100 U/mL 의 페니실린, 100 μg/mL 의 스트렙토마이신, 10%의 FBS (fetal bovine serum )가 보충된 DMEM배지(Dulbecco's Modification of Eagle's medium, GIBCO, NY, USA)에 배양 및 유지하였으며, 이산화탄소 5%의 습윤 환경하 37℃에서 보관하였다.

<84> 세포독성결정 연구를 위하여 비색(3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) MTT 분석을 수행하였다(Hansen et al., 1989).

<85> 세포들은 혈청이 없는 배지가 담긴 96웰(well)플레이트($1.5 \times 10^5$cell/well) 에서 배양하였고, 37℃ 하 5%의 이산화탄소를 함유한 습한 대기 상태에서 24시간동안 정제된 펩타이드를 다른 농도로 처리하였다. 그 후 20 μL의 MTT 염색용액을 각각의 웰(well)에 첨가하였다.

<86> 4시간 배양 후, 200 μL의 용해/정지 용액을 포르마잔 결정을 녹이기 위하여 첨가하였고, GENions Multifunction Microplate Reader (Tecan, UK)를 이용하여 540nm에서 흡광도를 측정하였다.

<87> 정제된 펩타이드의 세포독성 실험을 인간의 폐 섬유아세포(MRC-5) 및 마우스 대식세포(RAW 264.7) 세포주에 대하여 수행한 결과, 정제된 펩타이드 III-2가 MRC-5와 RAW264.7에 대하여 어떤 세포독성 효과도 보이지 않았다.

<88> **실시예 10 : DCFH-DA에 의한 세포내 ROS 결정**

<89> 세포내 ROS의 형성은 산화에 민감한 염색물질인 DCFH-DA를 형광성 탐침(probe)로서 사용하여 평가하였다(Englemann et al., 2005). 형광성 탐침은 세포내에서 산화작용을 관찰하기 위하여 널리 적용되어 왔다.

<90> 라벨링중에 비형광성 DCFH-DA 염색물질은 쉽게 세포내로 투과되어 세포내 에스터라제에 의하여 DCFH로 가수분해되며, 세포내에 갇힌다(Veerman et al., 2004).

<91> 본 발명에서는 96칸의 플레이트에서 형광성의 96웰플레이트에서 배양중인 RAW264.7 세포에 20μM의 DCFH-DA를 가한후 20분간 어두운 곳에서 배양하였다. 그리고 나서 세포들을 다른 농도의 펩타이드로 처리하였고, 1시간 더 배양하였다. PBS로 3번 세포를 세척한 후 300 μM의 과산화수소를 첨가하였다.

<92> 여러 종류의 ROS 존재시 DCFH의 산화로 인해 DCF가 형성되는데, 상기 DCF는 GENions fluorescence microplate reader 를 이용하여 485nm의 여기 파장과 535nm의 방출파장에서 매 30분 후마다 측정하였다.

<93> 최대 형광도 증가 후, MTT 세포 생존력 분석법을 이용하여 각 웰의 세포 수로 표준화하였다. 처리군의 투여량 의존 및 시간의존 효과를 그래프화 하였으며, 대조군 및 블랭크 군과 형광 강도를 비교하였다.

<94> 실험결과, 도 4에서 보는 바와 같이, ROS 관여 DCFH의 산화 후 DCF에 의해 방출된 형광물질은 2시간까지 시간이 경과하면서 누적되었다. 정제된 펩타이드로 전처리하였더니 전처리 양 및 시간에 비례하여 DCF 형광도가 감소하였다. 정제된 펩타이드는 50 μg/mL의 농도에서 30분 후 상당한 라디칼 소거 효과를 보였다. 더욱 분명하게 100 μg/mL의 농도에서 정제된 펩타이드는 전 배양시간을 통하여 상당수준 라디칼을 소거할 수 있었다.

<95> 상기 결과는 종래 문헌들에서와 같이(Kang et al., 2005) 정제된 펩타이드가 ROS에 의한 산화적 손상으로부터 세포를 보호할 수 있다는 것을 보여주며, 따라서 정제된 펩타이드는 ROS의 형성을 억제하는 잠재적 생분자물질로 발전될 수 있다.

<96> **실시예 11: 정제된 펩타이드의 하이드록실 라디칼 유도 DNA 손상에 대한 보호 효과**

<97> 본 발명에서 정제된 펩타이드의 항산화 효과를 자유라디칼 유도 플라스미드 pBRr 322 DNA 손상에 대한 보호 효과를 평가하는 방법을 사용하여 실시하였다.

<98> 하이드록실 라디칼에 의해 유도된 DNA 손상에 대한 정제된 펩타이드의 보호효과를 연구하기 위하여 50 mM 인산염 버퍼 (pH 7.4)에 녹인 0.5 μL의 PBR 322 DNA, 3 μL의 50 mM 인산염 버퍼 (pH 7.4), 3 μL의 2 mM 황화철($FeSO_4$) 및 다양한 농도의 정제된 펩타이드 2 μL를 함유한 전체 부피 12 μL를 에펜도르프 튜브에서 반응을 시켰다.

<99> 그리고 나서 4μL의 30% 과산화수소를 첨가하였고, 상기 혼합물을 30분간 37℃에서 배양하였다. 상기 혼합물을 0.8%의 아가로스 젤 전기영동을 하였다. DNA밴드는 에티디움 브로마이드(ethidium bromide)로 염색하였다.

<100> 3번 이상의 독립적 실험 후, 데이터를 평균 ± 표준편차로 나타내었으며, 스튜던트의 t-테스트를 사용하여 유의수준을 결정하였다($P<0.05$).

<101> 펜톤 반응에서 생긴 하이드록실 라디칼에 DNA가 노출되면서 DNA는 3가지 형태인 수퍼코일(SC), 열린 원형(OC) 및 선형으로 쪼개졌다.

<102> 정제 펩타이드의 자유 라디칼 유도 DNA 손상에 대한 보호 효과는 도 4에 나타내었다. 플라스미드 DNA 대조군(Line 1)과 비교하여 볼 때, DNA를 2 mM $Fe^{2+}$ 및 30 % 과산화수소(Line 2)로 처리할 때, 펜톤 반응으로부터 생성되는 하이드록실 라디칼로 인하여 DNA 수퍼코일 형태가 열린 원형으로 완전히 변형되었다.

<103> 상기 실시 결과에 의하면, 5.7 내지 45.6 μM 농도의 정제펩타이드로 처리한 DNA는 투여량에 비례하여 하이드록실 라디칼 유도 DNA 손상을 보호하였으며(Line 3-5) 이는 항산화 효능을 나타내는 것이다.

<104> DNA는 ROS 관여 산화적 손상에 있어 또 다른 주요 민감한 생물학적 목표물이기 때문에, 이러한 결과는 산화적 손상에 대한 정제된 펩타이드의 보호 효과를 명확히 설명해준다. (Martinez et al., 2003). 이러한 관찰된 효과는 정제된 펩타이드가 스핀 트래핑 기술을 이용하여 평가한 $IC_{50}$ 28.76 uM에서 하이드록실 라디칼을 효율적으로 소거한다고 관찰한 것과 일치한다. 더 나아가, 본 발명의 실시 결과는 하이드록실 라디칼 유도 DNA 손상으로부

터 보호하는 정제된 펩타이드의 능력을 뒷받침한다.

## 도면의 간단한 설명

<105> 도 1 은 FPLC를 이용하여 참굴 단백질을 분리한 분획의 각 피크에서 리놀레산 에멀젼 시스템에서의 항산화활성을 나타낸 것이다.

<106> 도 2는 HPLC를 이용하여 항산화 활성이 우수한 프랙션 III을 다시 분리하여 각 분획물의 리놀레산 에멀젼 시스템에서 황산화 활성을 나타낸 것이다.

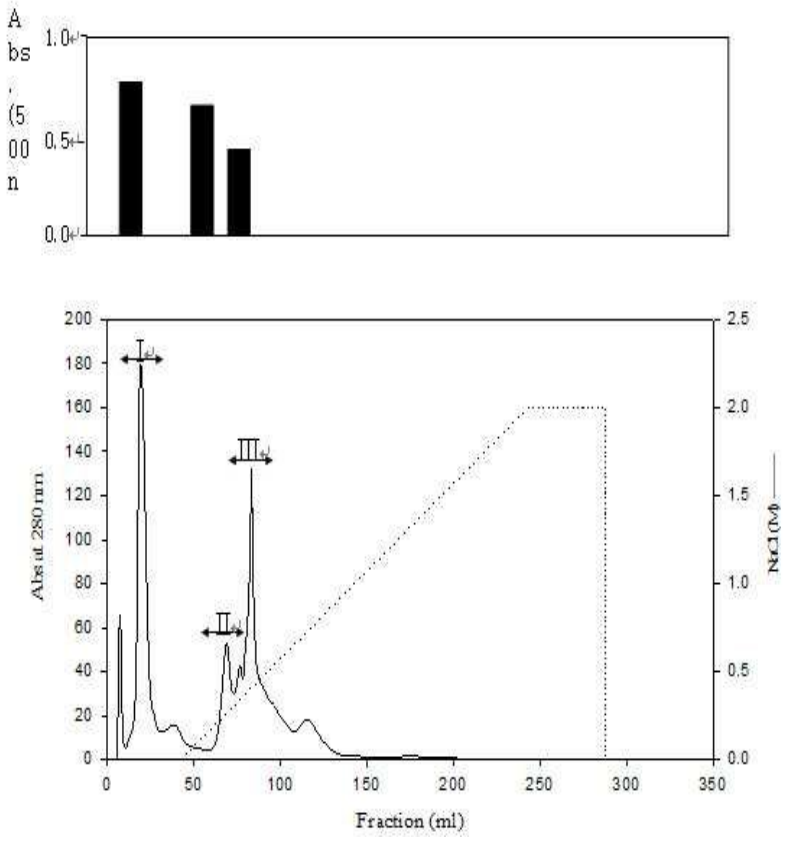
<107> 도 3는 티오시안산염철 방법에 의하여 측정한 리놀레산 에멀젼 시스템에서의 정제된 펩타이드의 항산화활성을 나타낸 것이다. 대조군은 항산화활성 시험 중 어떠한 항산화제도 첨가되지 않은 것을 의미한다.

<108> 도 4은 정제된 펩타이드(III-2)의 세포내 라디칼 소거 활성을 나타낸 것이다.

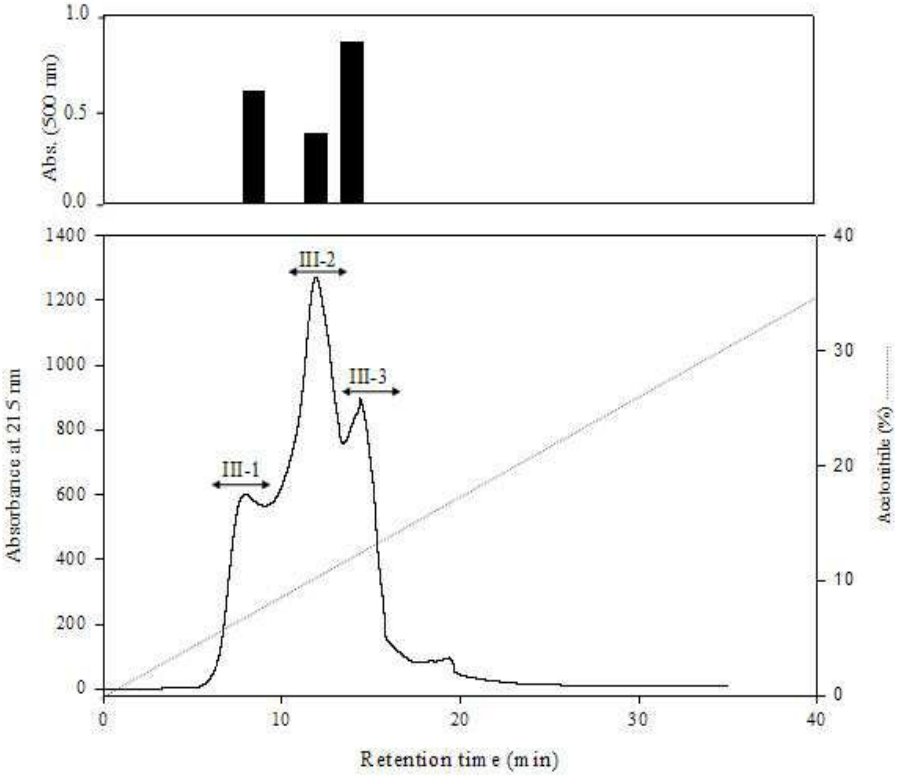
<109> 도 5는 정제된 펩타이드(III-2)의 존재하에 펜톤반응에서 생성된 OH에 의하여 플라스미드 DNA가 쪼개지는 아가로스 젤 전기영동 형태를 나타낸 것이다.

## 도면

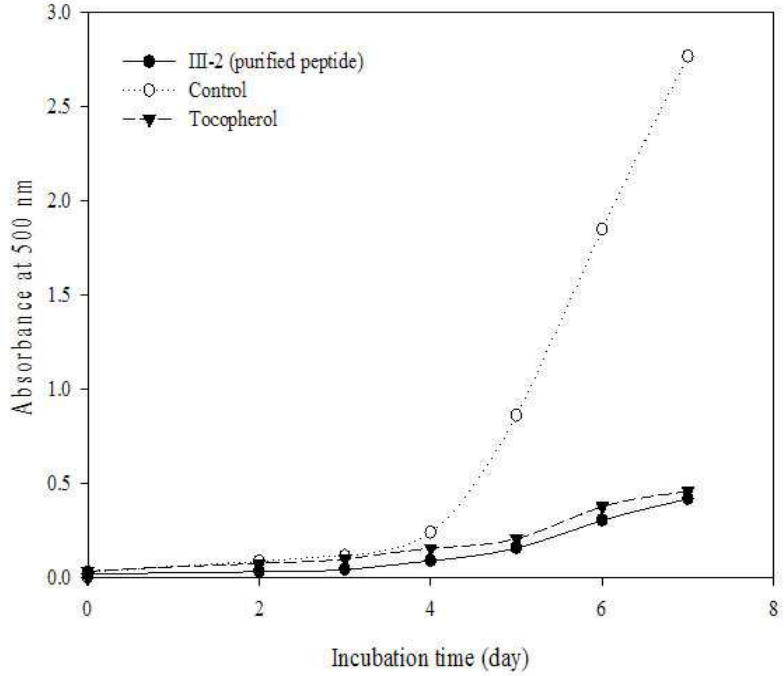
### 도면1



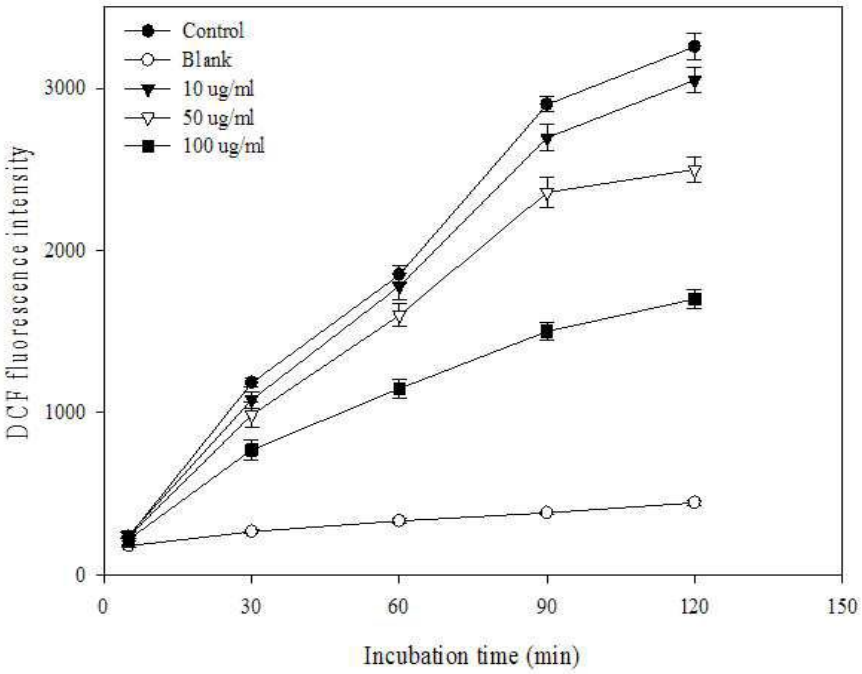
도면2


Abs. (500 nm)
1.0
0.5
0.0
Absorbance at 215 nm
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
III-1
III-2
III-3
40
30
20
10
0
Acetonitrile (%)
0
10
20
30
40
Retention time (min)

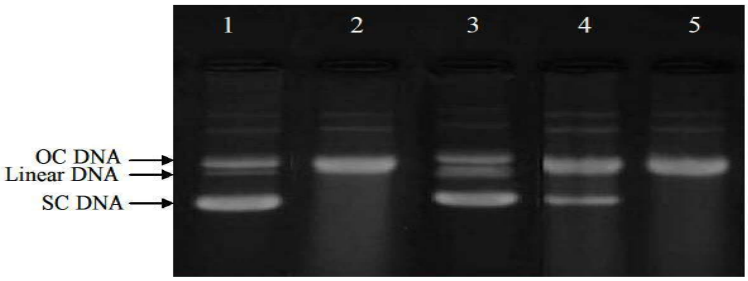
도면3


III-2 (purified peptide)
Control
Tocopherol
Absorbance at 500 nm
3.0
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
0
2
4
6
8
Incubation time (day)

도면4


Control
Blank
10 ug/ml
50 ug/ml
100 ug/ml
DCF fluorescence intensity
3000
2000
1000
0
0
30
60
90
120
150
Incubation time (min)

도면5


1
2
3
4
5
OC DNA
Linear DNA
SC DNA