



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2018년09월19일
(11) 등록번호 10-1898508
(24) 등록일자 2018년09월07일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A23L 33/145 (2016.01)

(52) CPC특허분류

A23L 33/145 (2016.08)

A61K 36/06 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2017-0056246

(22) 출원일자 2017년05월02일

심사청구일자 2017년05월02일

(56) 선행기술조사문헌

KR1020060131559 A*

CN103951727 A*

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자

한림대학교 산학협력단

강원도 춘천시 한림대학길 1, 한림대학교(옥천동)

(주)메디언스

강원도 춘천시 소양강로 32, 301호(후평동, 생물
산업벤처타운)

(72) 발명자

강영희

강원도 춘천시 옥천동 한림대학길 1 한림대학교
생명과학관 8513호

박상재

경기도 용인시 수지구 만현로 25, 107-1702(상
현동, 만현마을1단지 롯데캐슬아파트)

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

특허법인태동

전체 청구항 수 : 총 10 항

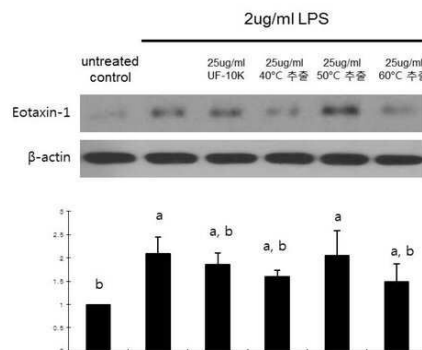
심사관 : 엄금희

(54) 발명의 명칭 효모 전기 자극 추출물을 포함하는 천식 개선용 식품 조성물 또는 천식 치료 또는 예방용 약
학 조성물

(57) 요약

본 발명은 효모에 전기 자극을 가한 후, 효모로부터 추출한 효모 전기 자극 추출물을 포함하는 것을 특징으로 하
는 천식 개선용 식품 조성물 또는 천식 치료 또는 예방용 약학 조성물에 관한 것으로, 본 발명의 전기 자극 효모
추출물은 인체에 사용시 부작용이 없고, 알레르기성 천식의 예방, 치료 및 완화에 효과를 발휘한다.

대표도 - 도4



(52) CPC특허분류

A23V 2002/00 (2013.01)
A23V 2200/314 (2013.01)
A23V 2300/12 (2013.01)
A23V 2300/14 (2013.01)
A61K 2236/30 (2013.01)
Y10S 514/826 (2013.01)

왕윤경

강원도 춘천시 후만로98번길 9, 주공4단지 410동
305호 (후평동)

(72) 발명자

김윤호

강원도 춘천시 옥천동 한림대학길 1 한림대학교 생
명과학관 8512호

김경희

강원 춘천시 후평동 198-53 생물동 203호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	RGW16001
부처명	산업통상자원부
연구관리전문기관	한국산업단지공단
연구사업명	산단R&BD역량강화사업 지원사업
연구과제명	생리활성물질 TRX 함유 기능성 소재의 개발
기 여 율	1/1
주관기관	(주)메디언스
연구기간	2016.05.25 ~ 2017.05.24

명세서

청구범위

청구항 1

효모에 전기 자극을 가하고 추출한 후, 효모를 제거하고 MWC0 10kDa 한외 여과막을 이용하여 여과하여 여과액을 제거한 효모 전기 자극 추출물을 포함하며,

상기 효모 전기 자극 추출물은 티오레독신의 함량이 증대된 것을 특징으로 하는 천식 개선용 식품 조성물.

청구항 2

효모에 전기 자극을 가하는 단계 (a);

상기 단계 (a) 후, 물을 가하고 교반하면서 효모를 추출하는 단계 (b);

상기 단계 (c) 후, 효모를 제거하고, MWC0 10kDa 한외 여과막을 이용하여 여과액을 제거하여 효모 전기 자극 추출물을 제조하는 단계 (c);를 포함하고,

상기 효모 전기 자극 추출물은 티오레독신의 함량이 증대되는 것을 특징으로 하는 천식 개선용 식품 조성물의 제조방법.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 효모는,

효모 배양액인 것을 특징으로 하는 천식 개선용 식품 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 전기 자극은,

0.001~20V의 전기로 0.001~10시간 동안 자극을 가하는 것을 특징으로 하는 천식 개선용 식품 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 효모로부터 추출시,

효모의 농도가 1~10%(w/v)가 되도록 물을 가하고 교반 추출하는 것을 특징으로 하는 천식 개선용 식품 조성물.

청구항 6

효모에 전기 자극을 가하고 추출한 후, 효모를 제거하고 MWC0 10kDa 한외 여과막을 이용하여 여과하여 여과액을 제거한 효모 전기 자극 추출물을 포함하며,

상기 효모 전기 자극 추출물은 티오레독신의 함량이 증대된 것을 특징으로 하는 천식 치료 또는 예방용 약품 조

성물.

청구항 7

효모에 전기 자극을 가하는 단계 (a);

상기 단계 (a) 후, 물을 가하고 교반하면서 효모를 추출하는 단계 (b);

상기 단계 (c) 후, 효모를 제거하고, MWCO 10kDa 한외 여과막을 이용하여 여과액을 제거하여 효모 전기 자극 추출물을 제조하는 단계 (c);를 포함하고,

상기 효모 전기 자극 추출물은 티오레독신의 함량이 증대되는 것을 특징으로 하는 천식 치료 또는 예방용 약학 조성물의 제조방법.

청구항 8

제6항에 있어서,

상기 효모는,

효모 배양액인 것을 특징으로 하는 천식 치료 또는 예방용 약품 조성물.

청구항 9

제6항에 있어서,

상기 전기 자극은,

0.001~20V의 전기로 0.001~10시간 동안 자극을 가하는 것을 특징으로 하는 천식 치료 또는 예방용 약품 조성물.

청구항 10

제6항에 있어서,

상기 효모로부터 추출시,

효모의 농도가 1~10%(w/v)가 되도록 물을 가하고 교반 추출하는 것을 특징으로 하는 천식 치료 또는 예방용 약품 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 효모 전기 자극 추출물을 포함하는 천식 개선용 식품 조성물 또는 천식 치료 또는 예방용 약학 조성물에 관한 것으로서, 더욱 상세하게는 효모에 전기 자극을 가한 후, 효모로부터 추출한 효모 전기 자극 추출물을 포함하는 것을 특징으로 하는 천식 개선용 식품 조성물 또는 천식 치료 또는 예방용 약학 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 기관지 천식은 한번 이환되면 일평생 치료를 지속해야 하는 만성질환으로 국민 보건상 부담이 큰 질환이다. 특히 고혈압, 당뇨 등의 다른 만성질환은 중년 이상의 성인에서 발생하는 것과 달리 기관지 천식은 소아부터 노년층에 이르기까지 전 연령층에서 일어나는 질환이다.

[0004] 급속한 산업화로 인한 생활환경의 변화 등으로 인해 알레르기성 천식의 유병률이 지속적으로 증가하고, 2조원에 육박하는 막대한 사회적 비용이 소요되는 것으로 추정되고 있다. 또한, 온난화로 인한 지구의 온도, 이

산화탄소 수치가 상승함에 따라 인간에게 알레르기를 일으킬 수 있는 식물이 다양해져 꽃가루 알레르기과 천식에 걸릴 위험도 높아지는 것으로 보고되고 있다.

[0005] 알레르기성 천식은 병의 원인이 확실치 않아 환경요법, 기관지 확장제와 알레르기 염증을 치료하는 항염증제제를 이용한 약물요법, 알레르기 체질을 개선하는 면역요법 등이 시도되고 있으나, 만성적이고 재발성이어서 치료가 쉽지 않은 실정이다.

[0006] 알레르기성 천식은 알레르겐에 의하여 기관지가 과민하게 반응함으로써 기관지 수축, 점액 과분비 등에 의해 호흡곤란이 생기는 질환이다. 이 중 점액의 과분비 증상은 기도에 집먼지 진드기나 꽃가루와 같은 항원에 의해 발생한다. 항원이 기도에 침투하면 체내 면역계가 이를 감지하여 항체 IgE를 생성하게 된다.

[0007] IgE는 기관지 상 비만 세포의 수용체로 작용하며, 추후 항원의 재침투시, 비만 세포가 항원에 반응하여 히스타민과 같은 기도의 염증 반응을 일으키는 여러 물질을 분비하게 한다. 이러한 염증성 물질들로 인해 점막에 염증이 생겨 과다한 점액 분비로, 기도 저항이 증가하며, 폐의 과 팽창 등 호흡곤란을 일으키게 된다.

[0008] 알레르기성 천식이 유발되면, 정상적인 기도 세포들인 섬유모세포(fibroblast), 근섬유모세포(myofibroblast), 상피세포, 평활근세포 등은 만성 기도 염증과 연관된 사이토카인과 성장인자들을 분비한다.

[0009] 상피세포는 호산구성 염증을 유지시키고, 비만세포 성장 인자를 분비시키는 사이토카인과 케모카인(GM-CSF, eotaxin-1, RANTES 등)을 분비한다. 이에 대한 기전은 아직 명확하진 않으나, 알레르기성 천식 환자에게서 많이 발생하고 있다. 또한, 천식 환자들 호흡기 점액에서 주로 발견되는 MUC5AC의 분비형 점소의 과다 생성은 천식, 만성 기관지염, 폐기종, 기관지 확장증, 낭포성 섬유증 등의 기도 질환을 악화시키는 주된 요인으로 알려져 있다.

선행기술문헌

특허문헌

[0011] (특허문헌 0001) 대한민국 특허공개번호 제10-2016-0033995호 (공개일자 2016.03.29)에는, 황칠나무(Dendropanax moribifera) 추출물 또는 이의 활성 분획물을 유효성분으로 함유하는 천식 또는 염증성 질환 예방 및 치료용 약학적 조성물이 기재되어 있다.

(특허문헌 0002) 대한민국 특허공개번호 제10-2016-0114811호 (공개일자 2016.10.06)에는, 상백피, 오가피, 및 천문동으로 구성된 군으로부터 선택된 2개 이상의 조합 추출물을 유효성분으로 함유하는 염증, 알레르기 또는 천식 질환의 예방 및 치료용 조성물이 기재되어 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0012] 본 발명은 알레르기성 천식으로 발생한 염증성 케모카인인 Eotaxin-1과 호흡기 점액에서 주로 발견되는 MUC5AC의 분비형 점소의 발현을 억제하는 성분을 개발함으로써, 알레르기성 천식의 개선 및 예방 또는 치료를 위한 조성물을 개발하여 제공하고자 한다.

과제의 해결 수단

[0014] 본 발명은 효모에 전기 자극을 가한 후, 효모로부터 추출한 효모 전기 자극 추출물을 포함하는 것을 특징으로 천식 개선용 식품 조성물을 제공한다.

[0015] 본 발명의 천식 개선용 식품 조성물에 있어서, 상기 효모 전기 자극 추출물은, 바람직하게 효모로부터 추출하고 난 다음, 효모를 제거하고, MWCO 5~10 kDa 한외 여과막을 이용하여 여과하여 여과액을 제거한 것일 수 있다.

[0016] 본 발명의 천식 개선용 식품 조성물에 있어서, 상기 효모는, 바람직하게 효모 배양액일 수 있다.

[0017] 본 발명의 천식 개선용 식품 조성물에 있어서, 상기 전기 자극은, 바람직하게 0.001~20V의 전기로 0.001~10시간 동안 자극을 가하는 것이 좋다.

- [0018] 본 발명의 천식 개선용 식품 조성물에 있어서, 상기 효모로부터 추출시, 바람직하게 효모의 농도가 1~10%(w/v) 되도록 물을 가하고 교반 추출하는 것이 좋다.
- [0019] 한편, 본 발명은 효모에 전기 자극을 가한 후, 효모로부터 추출한 효모 전기 자극 추출물을 포함하는 것을 특징으로 천식 치료 또는 예방용 약품 조성물을 제공한다.
- [0020] 본 발명의 천식 치료 또는 예방용 약품 조성물에 있어서, 상기 효모 전기 자극 추출물은, 바람직하게 효모로부터 추출하고 난 다음, 효모를 제거하고, MWCO 5~10 kDa 한외 여과막을 이용하여 여과하여 여과액을 제거한 것일 수 있다.
- [0021] 본 발명의 천식 치료 또는 예방용 약품 조성물에 있어서, 상기 효모는, 바람직하게 효모 배양액일 수 있다.
- [0022] 본 발명의 천식 치료 또는 예방용 약품 조성물에 있어서, 상기 전기 자극은, 바람직하게 0.001~20V의 전기로 0.001~10시간 동안 자극을 가하는 것이 좋다.
- [0023] 본 발명의 천식 치료 또는 예방용 약품 조성물에 있어서, 상기 효모로부터 추출시, 바람직하게 효모의 농도가 1~10%(w/v) 되도록 물을 가하고 교반 추출하는 것이 좋다.

발명의 효과

- [0025] 본 발명의 방법에 의하여 제조한 전기 자극 효모추출물은 인체에 사용시 부작용이 없고, 알레르기성 천식의 예방, 치료 및 완화에 효과를 발휘함이 확인되었다. 더욱 구체적으로, 본 발명의 전기 자극 효모추출물은 알레르기성 천식으로 발생하는 염증성 케모카인 Eotaxin-1의 발현과 점액 분비형 점소인 MUC5AC의 발현을 억제하는 효과가 있는 것으로 확인되었다. 따라서, 본 발명의 전기 자극 효모추출물은 LPS로 유발된 알레르기성 천식의 염증반응의 예방과 치료용 조성물, 화장품 소재 및 기능성 식품의 신소재로 활용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0027] 도 1은 본 발명 전기 자극 효모추출물의 추출 방식에 따른 세포독성효과에 대한 결과 (도 1의 a는 전기 자극 효모추출물 단독 처리, 도 1의 b는 LPS와 함께 처리)와 Eotaxin-1, ICAM-1, MUC5AC의 발현 양상(도 1의 c)을 보여주고 있다.
- 도 2는 본 발명 전기 자극 효모추출물의 추출온도에 따른 세포독성효과에 대한 결과를 보여주고 있다.
- 도 3은 본 발명 전기 자극 효모추출물의 추출온도에 따른 티오레독신의 함유량을 보여주고 있다.
- 도 4는 본 발명 전기 자극 효모추출물의 추출온도에 따른 Eotaxin-1의 발현량을 보여주고 있다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0028] 본 발명에서는 효모에 외부 자극을 가하여 효모가 이 자극에 대한 반응으로써 티오레독신을 합성 및 분비하게 하는 과정에 의하여 티오레독신의 함유량을 현저하게 증가시킨 효모 전기 자극 추출물을 제공한다.
- [0029] 효모에 가해지는 외부 자극으로는 전기, 압력, rpm, 초음파, 온도 등 다양한 요인이 있는데, 본 발명에서는 전기를 주요 인자로 적용하여 티오레독신의 함유량을 증가시킨 효모추출물을 완성하였다. 효모에 가하여 주는 전기는 전압을 기준으로 효모슬러리에 0.001~20V 이내로, 시간은 0.001~10시간 동안 적용하였는데, 이와 같은 조건에서 천식에 우수한 효과를 나타내는 효모추출물을 수득할 수 있었다. 다만, 추출 조건 중 온도는 일반적인 범위에서 거의 영향을 주지 않는 것으로 확인되었다.
- [0030] 본 발명의 전기 자극 효모 추출물은, 전기 자극을 가한 후 물을 추가로 가하여 효모의 농도가 1~10%(w/v)가 되도록 한 다음, 교반기로 교반하면서 추출하고, 이를 원심분리하여 효모를 제거하여 1차 추출액을 얻고, 분자량 크기(MWCO) 5 kDa 또는 10 kDa를 걸러내는 한외여과막을 이용하여 사용하여 부피를 1/10으로 줄였다. 한외여과막을 통과한 액은 제거하고 한외여과 후 남은 농축액을 회수하여 본 발명의 효모추출물로 제조하기 위하여 동결건조하고, 최종적으로 얻은 황색의 분말을 얻었다. 최종적으로 얻어지는 수율은 원료인 건조효모분말을 기준으로 1~5%(w/w)의 범위였다.
- [0031] 이상의 과정을 정리한, 본 발명의 효모 전기 자극 추출물을 수득하기 위한 바람직한 일 실시예는, 효모에 0.001~20V의 전기로 0.001~10시간 동안 전기 자극을 가하는 단계 (a); 상기 단계 (a) 후 물을 추가로 가하여 효모의 농도가 1~10 (w/v)이 되도록 조정하는 다음, 교반하면서 추출하는 단계 (b); 상기 단계 (b) 후, 효모를 제

거하고, MWCO 5~10 kDa 한외 여과막을 이용하여 여과액을 제거함으로써 추출물을 농축하는 단계 (c); 를 포함하는 과정이다.

[0032] 이와 같은 과정을 통하여 농축된 본 발명의 효모추출물에 함유된 티오레독신은 분자량을 기준으로 SDS-PAGE를 이용하여 정성적인 분리를 통하여 확인하였고, 이를 다시 ELISA를 통하여 정량하였다. 최종적으로 함유된 티오레독신의 함량은 0.01~3%(w/w)의 범위였고, 이와 같은 수치는 일반적인 효모추출물에서 불검출인 것과 비교하면 현저하게 높은 함량임을 알 수 있었다.

[0033] 한편, 본 발명의 조성물에 있어서, 기관지 알러지에 유효한 효과를 얻기 위해서는 상기 전기 자극 효모추출물의 농도가 10~50 $\mu\text{g/ml}$ 인 것이 좋으며, 더욱 바람직하게는 25~50 $\mu\text{g/ml}$ 인 것이 좋다. 상기 범위를 만족할 시, 기도 상피세포에서 Eotaxin-1, MUC5AC의 발현을 억제할 수 있어, 알레르기성 천식의 개선에 현저히 우수한 효과를 발휘할 수 있기 때문이다.

[0034] 본 발명의 천식 개선용 식품 조성물은 일 예로, 드링크류, 카페인 음료, 일반음료, 초콜렛, 빵류, 스낵류, 과자류, 사탕, 피자, 젤리, 면류, 껌류, 유제품류, 아이스크림류, 알코올성 음료, 술, 비타민 복합체 및 그 밖의 건강 보조식품류 중 선택되는 어느 하나일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0035] 한편, 본 발명의 천식 치료 또는 예방용 약학 조성물은 상기 본 발명의 전기 자극 효모추출물 외에 약제학적으로 허용 가능한 담체, 희석제 또는 부형제를 더욱 포함할 수 있다. 사용가능한 담체, 부형제 또는 희석제로는, 락토즈, 텍스트로즈, 수크로즈, 솔비톨, 만니톨, 자이리톨, 에리트리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀로로즈, 메틸 셀로로즈, 미정질 셀룰로즈, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸하이드록시벤조에이트, 프로필하이드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물 유가 있으며, 이 중 선택되는 하나 이상을 사용할 수 있다.

[0036] 한편, 본 발명의 천식 치료 또는 예방용 약학 조성물의 제형은 사용방법에 따라 바람직한 형태일 수 있으며, 특히 포유동물에 투여된 후 활성 성분의 신속, 지속 또는 지연된 방출을 제공할 수 있도록 당업계에 공지된 방법을 채택하여 제형화 하는 것이 좋다. 구체적인 제형의 예로는 경고제(PLASTERS), 과립제(GRANULES), 로션제(LOTIONS), 리니먼트제(LINIMENTS), 리모나데제(LEMONADES), 산제(POWDERS), 시럽제(SYRUPS), 액제(LIQUIDS AND SOLUTIONS), 에어로솔제(AEROSOLS), 엑스제(EXTRACTS), 엘릭실제(ELIXIRS), 연고제(OINTMENTS), 유동엑스제(FLUIDEXTRACTS), 유제(EMULSIONS), 현탁제(SUSPENSIONS), 전제(DECOCTIONS), 정제(TABLETS), 좌제(SUPPOSITORIES), 주사제(INJECTIONS), 주정제(SPIRITS), 카타플라스마제(CATAPLASMA), 캡셀제(CAPSULES), 크림제(CREAMS), 트로키제(TROCHES), 토크제(TINCTURES), 파스타제(PASTES), 환제(PILLS), 연질 또는 경질 젤라틴 캡셀 중 선택되는 어느 하나일 수 있다.

[0037] 한편, 본 발명의 천식 치료 또는 예방용 약학 조성물의 투여량은 투여방법, 복용자의 연령, 성별, 체중, 및 질환의 중증도 등을 고려하여 결정하는 것이 좋다. 일 예로, 본 발명의 천식 치료 또는 예방용 약학 조성물은 유효성분을 기준으로 하였을 때, 1일 0.00001 내지 100 mg/kg(체중)으로 1회 이상 투여 가능하다. 그러나 상기의 투여량은 예시하기 위한 일 예에 불과하며, 복용자의 상태에 따라 의사의 처방에 의해 변화될 수 있다.

[0038] 본 발명은 전기 자극 효모추출물을 함유하는 조성물은 알레르기성 천식을 예방, 치료 및 개선시킬 수 있다. 또한, 본 발명의 전기 자극 효모추출물은 알레르기성 천식으로 발생하는 염증을 억제하여 알레르기성 천식의 예방과 치료에 기능성 신소재로 활용될 수 있다.

[0039] 본 발명의 전기 자극 효모추출물은 알레르기 천식에 의해 발현되는 염증성 케모카인인 Eotaxin-1을 억제하며, 점액 점소 분비형 단백질인 MUC5AC 발현 억제 효과를 보인다. 더욱 구체적으로 본 발명의 전기 자극 효모추출물을 UF 10K을 사용하여 저분자 물질들을 제거하고 60°C로 추출한 결과, 세포 독성을 보이지 않을뿐더러, Eotaxin-1의 발현을 억제함이 확인되었다.

[0040]

[실시예 1: 효모에 외부 자극으로 전기 충격을 가하여 효모 내 티오레독신 함량 증진]

[0042] 본 실험에서는 효모 (*Saccharomyces cerevisiae*)에 외부 자극을 가하여 효모가 이 자극에 반응함으로써 티오레독신을 합성하여 분비하는 과정을 탐구함으로써, 티오레독신의 함량을 현저하게 증가시킨 효모 추출물을 개발하고자 하였다.

[0043] 효모에 다양한 외부 자극을 가할 수 있는데, 본 실시예에서는 외부 자극으로 전기를 가하여 티오레독신

의 함량이 증가하는지 여부를 확인하고자 하였다.

[0044] 효모에 가하여 주는 전기는 전압을 기준으로 효모슬러리(yeast slurry, 효모를 배양한 배양액)에 10V로 시간은 5시간 동안 적용하였고, 온도는 40℃ 또는 60℃에서 수행하였다.

[0045] 한편, 효모 추출물은 하기의 과정을 통해 수득하였다. 우선, 상기의 전기 자극 후, 물을 추가로 가하여 효모의 농도가 5%(w/v)가 되도록 한 다음, 교반기로 교반하면서 추출하였다. 그 후, 원심분리하여 효모를 제거하여 1차 추출액을 얻고, 이를 한외여과막을 이용하여 분자량 크기(MWCO) 5 kDa (이하, 'UF-5K'라 함) 또는 10 kDa (이하, 'UF-10K'라 함)을 사용하여, 부피를 1/10으로 줄였다. 이후, 한외여과막을 통과한 액은 제거하고, 한외여과 후 남은 농축액을 회수하여, 동결건조하고 최종적으로 얻은 황색의 분말을 얻었다. 최종적으로 얻어지는 수율은 원료인 건조효모분말을 기준으로 1~5%(w/w)의 범위였다.

[0047] **[실험예 1: 본 발명 전기 자극 효모추출물에 함유된 티오레독신 함량 측정]**

[0048] 상기 실시예 1에서 수득한 본 발명의 전기 자극 효모추출물에 함유된 티오레독신은 분자량을 기준으로 SDS-PAGE를 이용한 정성적인 분리를 통하여 확인하였고, 이를 다시 ELISA를 통하여 정량하였다.

[0049] 전기 자극 효모추출물에 최종적으로 함유된 티오레독신의 함량은 0.01~3%(w/w)의 범위였고, 이는 일반적인 효모추출물에서 불검출인 것과 비교하면, 현저하게 높은 함량임을 확인할 수 있었다.

[0051] **[실험예 2: 본 발명 전기 자극 효모추출물의 천식 효과 확인]**

[0052] **1. 실험 방법**

[0053] **(1) 기도상피세포 배양실험**

[0054] 기도상피세포는, 10% FBS(fetal bovin serum), L-글루타민 2 mmol/L, 페니실린 100 KU/L, 인슐린 2.5 mg/L가 보충된 스트렙토마이신 100 mg/L, 하이드로코르티손 0.361 mg/L, 아포트랜스페린 2.5 mg/L와 상피성장인자 20 µg/L가 포함된 25 mmol/L의 HEPES-buffered M199 배지에서 배양되었다. BEAS-2B 세포는 37℃ 5% CO₂ 인 큐베이터에서 배양하였으며, 48시간 주기로 배양액을 교체하였다.

[0055] **(2) 세포생존률 조사**

[0056] 기도상피세포를 LPS와의 세포배양실험을 거친 후, 세포 생존률을 측정하기 위하여 자동 마이크로플레이트 리더 스펙트로포토미터 (microplate reader spectrophotometer)를 이용한 MTT 분석이 이루어졌다. 이 분석법은 테트라질리움(tetrazlium) MTT 염 (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-di-phenyltetrazolium bromide)이 미토콘드리아 효소인 숙시네이트 데하이드로지나아제 (succinate dehydrogenase)에 의하여 불용성의 포르마잔(formazan)으로 변하는 과정을 이용함으로써 측정하였다.

[0057] 기도상피세포를 전기 자극 효모추출물(CPI) 및 LPS로 배양실험을 거친 후 세척한 다음, MTT(5mg/ml stock solution)가 첨가된 페놀 레드 (phenol red)가 들어있지 않는 배지에서 3시간 배양시켰다. 그 후에, 이소프로필 알코올 (isopropyl alcohol)을 가하여 조심스럽게 흔들어서 주면서 형성된 포르마잔(formazan)을 용해시키고 λ=570nm에서 흡광도를 측정하였다.

[0058] **(3) 웨스턴블랏팅**

[0059] 기도상피세포로부터 10% SDS, 1% 글리세로포스페이트(glycerophosphate), 0.1 mol/L Na₃VO₄, 0.5 mol/L NaF와 프로테아제 억제제 카테일 (protease inhibitor cocktail)이 포함된 1 mol/L, Tris-HCl (pH 6.8) 라이시스 버퍼 (lysis buffer)를 이용하여 세포용해물을 얻은 후, 로우리 어세이 (Lowry assay) 방법을 이용하여 단백질 함량을 정량하였다.

[0060] 세포용해액은 5X dye와 혼합하여 95℃에서 10분간 끓인 후 8~15% SDS-폴리아크릴아미드 겔에 전기영동하여 단백질을 분리하였다. 전기영동이 끝난 후 니트로셀룰로오스 멤브레인 (nitrocellulose membrane)에 전이시켰다.

[0061] 멤브레인은 5% 탈지 건조 우유 (nonfat dry milk)와 보바인 시럼 알부민 (bovine serum albumin)에서 3시간 블로킹(blocking)하고, 특정 1차 항체를 붙인 후 4℃에서 오버나이트하였다. TBS-T로 세척한 후 이차항체 anti-goat, anti-mouse IgG conjugated horse-radish peroxidase와 1시간 반응시킨 후, ECL 용액을 이용하여 X-ray 필름으로 밴드 사진을 촬영하였다.

[0062] (4) 쿠마시블루 염색

[0063] 추출온도를 다르게 한 효모추출물을 15% SDS-폴리아크릴아미드 겔에 전기영동하여 단백질을 분리하였다. 전기영동이 끝난 후 쿠마시블루 용액을 이용하여 1시간 염색 후 데스타인(destain) 버퍼로 1시간 RT로 세척한 후 크기별로 분리된 단백질을 확인하였다.

[0065] 2. 실험 결과

[0066] 실험 결과는 도 1 내지 4와 같이 나타났다.

[0067] 도 1은 전기 자극 효모추출물을 단순추출, UF-5K, UF-10K로 추출하여 기도 상피세포에 단독 (도 1의 a) LPS와 함께 처리 (도 1의 b)한 결과로써, UF-10K 저분자로 추출한 물질의 경우, 세포 독성이 없는 것으로 확인되었다. 또한, Eotaxin-1, ICAM-1, MUC5AC의 발현을 UF-10K 추출물에서 억제하는 것을 확인할 수 있었다 (도 1의 c).

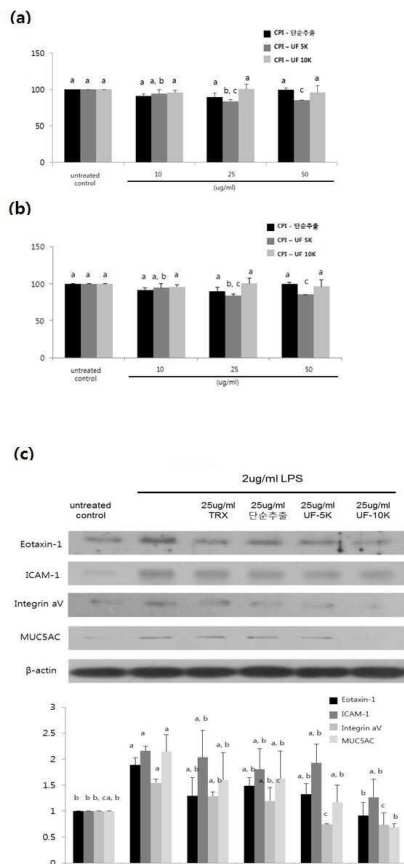
[0068] 도 2는 추출온도에 따른 전기 자극 효모 추출물의 세포 독성을 확인한 결과로써, 40~60℃에서 세포 독성이 없는 것을 확인할 수 있었다.

[0069] 도 3은 추출온도에 따른 전기 자극 효모 추출물 내 티오레독신의 함유량을 측정한 결과로써, 티오레독신의 함유량이 60℃에서 높은 것을 확인할 수 있었다.

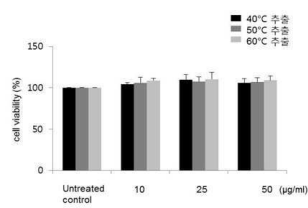
[0070] 도 4는 추출온도 40℃, 60℃에서, 본 발명 전기 자극 효모추출물이 천식 마커인 Eotaxin-1의 발현을 억제하는 것을 보여준다.

도면

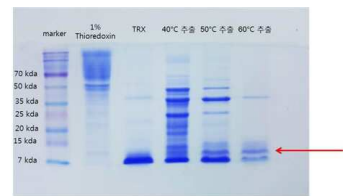
도면1



도면2



도면3



도면4

