



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2014-0096194
(43) 공개일자 2014년08월05일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 38/08 (2006.01) A61K 38/17 (2006.01)

A61P 9/12 (2006.01) A61P 9/00 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2013-0000237

(22) 출원일자 2013년01월02일

심사청구일자 2013년01월02일

기술이전 희망 : 기술양도, 실시권허여, 기술지도

(71) 출원인

조선대학교산학협력단

광주광역시 동구 필문대로 309 (서석동)

(72) 발명자

정원교

광주광역시 서구 풍암1로 53, 104동 302호(풍암동, 현대삼환아파트)

천충길

전라남도 완도군 신지면 명사십리61번길 220 (조선대학교 해양생물연구교육센터)

(74) 대리인

위병갑

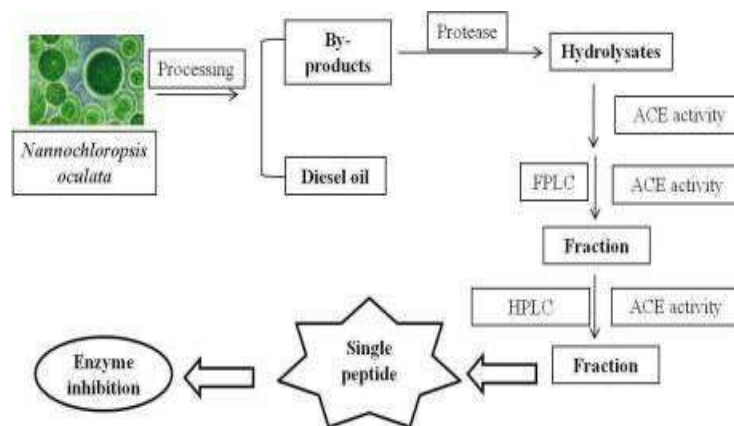
전체 청구항 수 : 총 7 항

(54) 발명의 명칭 해양 미세조류의 바이오디젤 부산물로부터 분리된 펩티드를 유효성분으로 함유하는 고혈압의 예방 또는 치료용 약학적 조성물

(57) 요약

본 발명은 해양 미세조류의 바이오디젤 부산물로부터 분리된 펩티드를 유효성분으로 함유하는 고혈압의 예방 또는 치료용 약학적 조성물 및 상기 유효성분을 포함하는 건강 기능 식품에 관한 것이다. 본 발명에 따른 약학적 조성물 및 건강 기능 식품은 엔지오텐신 I 전환효소(angiotensin I converting enzyme, ACE)의 저해 활성을 나타냄으로써 고혈압의 예방 또는 치료에 우수한 효과를 갖는다.

대표도 - 도1



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 312019-5

부처명 농림수산식품부

연구사업명 수산실용화기술개발사업

연구과제명 해조류 기능성 소재를 융합한 의료공학용 바이오 신소재 개발

기 여 율 1/1

주관기관 조선대학교

연구기간 2012.08.24 ~ 2017.08.23

특허청구의 범위

청구항 1

Leu-Val-Thr-Val-Met의 아미노산으로 이루어진 펩티드를 유효성분으로 함유하는 고혈압의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 2

제 1항에 있어서,

상기 펩티드는 해양 미세조류로부터 유래된 것임을 특징으로 하는 약학적 조성물.

청구항 3

제2항에 있어서,

상기 해양 미세조류는 난노클로롭시스 오쿨라타(*Nannochloropsis oculata*)인 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.

청구항 4

제 1항에 있어서,

상기 펩티드는 난노클로롭시스 오쿨라타(*Nannochloropsis oculata*)의 바이오디젤 부산물로부터 분리된 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.

청구항 5

제 1항에 있어서,

상기 펩티드는 난노클로롭시스 오쿨라타(*Nannochloropsis oculata*)의 바이오디젤 부산물의 효소적 가수분해물로부터 분리된 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.

청구항 6

제 1항에 있어서,

상기 펩티드는 엔지오텐신 I 전환효소(angiotensin I converting enzyme, ACE)의 저해 활성을 갖는 것을 특징으로 하는 약학적 조성물.

청구항 7

Leu-Val-Thr-Val-Met의 아미노산으로 이루어진 펩티드를 유효성분으로 함유하는 고혈압 개선용 건강 기능 식품.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 해양미세 조류의 바이오디젤 부산물로부터 분리된 펩티드를 유효성분으로 함유하는 고혈압의 예방 또는 치료용 약학적 조성물 및 상기 유효성분을 포함하는 건강 기능 식품에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 해양 미세조류, 또는 식물성 플랑크톤은 대부분 해양 생물을 대표하며, 가장 잘 알려진 것은 규조류(규조문 Bacillariophyta), 쌍편모조류(와편모조식물문 Dinophyta), 녹조류(녹조식물문 Chlorophyta) 및 남조류(남조식물문 Cyanophyta)이다. 미세조류 중에 따라, 예를 들어, 색소, 항산화제, β -카로틴, 다당류, 트리글리세리드(triglyceride), 지방산, 비타민 및 기타 사용 가능한 바이오매스 등의 가치가 높은 다양한 천연 화합물들을 추출할 수 있다. 이러한 것들은 주로 다양한 산업 분야에서 범용물질로 사용된다(예를 들어, 제약, 화장품, 기능성 식품, 바이오 연료). 온대기후에서 육상식물은 1% 이하로만 광변환 효율을 가지는 반면, 미세조류는 태양에

너지를 화학에너지로 5%까지 변환할 수 있다(Rosch et al, 2012). 미세조류는 효율적으로 태양에너지를 지질, 단백질, 탄수화물, 색소 및 비타민 등의 대사 물질로 변환한다. 뿐만 아니라, 미세조류는 메탄, 바이오수소, 바이오디젤과 같은 다양한 유형의 재생가능한 에너지를 공급할 수 있다(Borges et al, 2011). 따라서, 미세조류는 식품, 사료, 천연 합성물, 또는 수경재배 분야와 바이오연료 분야에 적용될 수 있다.

[0003] 난노클로롭시스 오쿨라타(*Nannochloropsis oculata*)는 주로 해양 환경뿐만 아니라 깨끗한 담수에서 발견되는 것으로 알려진 미세조류이다. 난노클로롭시스 오쿨라타(*Nannochloropsis oculata*)는 아스타크산틴, 제아잔틴, 칸타잔틴과 같은 다양한 색소를 고농도로 만들 수 있고, 생장이 쉽고, 주로 불포화지방산 및 상당한 비율의 팔미트산으로 된 높은 오일 함유량(건조 중량의 28.7%)으로 인하여 조류 바이오연료 생산에 적합한 것으로 알려져 왔다. 또한, 난노클로롭시스 오쿨라타(*Nannochloropsis oculata*)는 양질의 바이오디젤을 위한 불포화지방산, 리놀렌산, 다가불포화지방산을 충분하게 함유하고 있다. 뿐만 아니라, 난노클로롭시스 오쿨라타(*Nannochloropsis oculata*)는 탄수화물뿐만 아니라 높은 비율의 단백질을 포함하고 있다(Banerjee et al., 2011). 일반적으로, 이러한 잔여물의 획득 및 처분은 어렵고, 비용이 많이 든다. 만약 케이크(cakes)가 적절하게 처분되지 않는다면, 환경 위험과 오염이 유발될 수도 있다. 미세조류에서 추출하는 저비용 연료 생산 기술이 개발됨에 따라, 조류 잔해물의 활용은 향후에 보다 중요해질 것으로 예상된다.

[0004] 한편, 엔지오텐신 전환효소 I 전환효소(angiotensin I converting enzyme, ACE, peptidyl carboxy peptidase, EC 3.4.15.1)는 다기능 아연 함유 효소이며, 생체 내에서 서로 다른 조직에 위치해 있다. 이 효소는 레닌-엔지오텐신 시스템을 통하여 혈압 조절의 중요한 생리적 역할을 한다. ACE는 비활성 형태의 데카펩티드(decapeptide)인 엔지오텐신 I 을 강한 혈관수축 옥타펩티드인 엔지오텐신 II 로 전환시키며, 브래디키닌의 촉매 기능을 비활성화시킨다. 따라서, ACE의 저해제는 고혈압을 관리하는데 있어서 중요한 치료요법으로 여겨진다. 다수의 연구자들은 합성 의약 대체물에 상당한 관심을 가지고 있기 때문에 수많은 연구들이 비독성 ACE 저해제를 조사하여 왔으며, 수많은 천연 ACE 저해제가 기능성 식품과 천연 바이오 자원에서 추출되어 왔다.

[0005] 모단백질(parent protein)의 시퀀스 내에서 비활성화되어 있는 바이오활성 펩티드는 효소 가수분해로 생산될 수 있으며, 다양한 조절 효과(예를 들어, 항산화제, 면역 체계, 오피오이드 및 고혈압 방지 활성)를 나타낸다. 바이오활성 펩티드는 보통 3~20개의 아미노산 잔기를 포함하고 있으며, 이러한 펩티드의 활성은 그 아미노산 구성과 시퀀스를 기반으로 하고 있다. 이러한 바이오활성 펩티드를 함유하고 있는 천연물 또는 ACE 저해 펩티드의 고혈압 환자에 대한 고혈압 방지 효과는 수많은 보고서에서 입증되어 왔다.

선행기술문헌

특허문헌

[0006] (특허문헌 0001) 특허문헌 1. KR10-2011-0022472 A

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명에서 해결하고자 하는 과제는 미세조류 난노클로롭시스 오쿨라타(*Nannochloropsis oculata*)의 바이오디젤 부산물로부터 효소적 가수분해에 의하여 분리된 펩티드를 유효성분으로 함유하는 고혈압의 예방 또는 치료용 약학적 조성물 및 건강 기능 식품을 제공하고자 하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0008] 상기와 같은 과제를 해결하기 위하여, 본 발명은 Leu-Val-Thr-Val-Met 로 이루어진 펩티드를 유효성분으로 함유하는 고혈압의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0009] 상기 펩티드는 난노클로롭시스 오쿨라타(*Nannochloropsis oculata*)로부터 유래된다.

[0010] 상기 펩티드는 난노클로롭시스 오쿨라타(*Nannochloropsis oculata*)의 바이오디젤 부산물로부터 분리된다.

[0011] 상기 펩티드는 난노클로롭시스 오쿨라타(*Nannochloropsis oculata*)의 바이오디젤 부산물의 효소적 가수분해물로부터 분리된다.

[0012] 상기 펩티드는 엔지오텐신 I 전환효소(angiotensin I converting enzyme, ACE)의 저해 활성을 갖는다.

[0013] 또한, 본 발명은 Leu-Val-Thr-Val-Met로 이루어진 펩티드를 유효성분으로 함유하는 고혈압 개선용 건강 기능 식품을 제공한다.

발명의 효과

[0014] 본 발명에 따른 약학적 조성물 및 건강 기능 식품은 엔지오텐신 I 전환효소(angiotensin I converting enzyme, ACE)의 저해 활성을 나타냄으로써 고혈압의 예방 또는 치료에 우수한 효과를 갖는다.

도면의 간단한 설명

[0015] 도 1은 난노클로롭시스 오쿨라타(*Nannochloropsis oculata*)의 바이오디젤 부산물로부터 ACE 저해 펩티드를 분리하는 순서를 나타낸 것이다.

도 2a는 난노클로롭시스 오쿨라타(*Nannochloropsis oculata*)의 바이오디젤 부산물로부터의 효소적 가수분해물의 ACE 저해 활성을 나타내고, 도 2b는 다양한 농도의 alcalase hydrolysates의 ACE 저해 활성을 나타낸다.

도 3a는 Hiprep 16/10 DEAE FF ion-exchange column에 로딩된 바이오디젤 부산물의 FPLC 크로마토그래피 결과를 나타내고, 도 3b는 FPLC 분획물(F1, F2, F3)의 0.2mg/ml 농도에서의 ACE 저해 활성을 나타낸 것이다.

도 4a는 YMC-Pack Pro C18(250×20mm) column 상에 로딩된 FPLC로부터의 활성 분획물(F2)의 역상 HPLC 크로마토그래피 결과를 나타내고, 도 4b는 0.1mg/ml 농도에서 HPLC 분획(F2-1, F2-2, F2-3 및 F2-4)의 ACE 저해 활성을 나타내고, 도 4c는 Synchropak RPP-100 column 상에서 활성 분획(F2-3)의 역상 HPLC 크로마토그래피 결과를 나타내며, 도 4d는 Q-TOP mass spectrometer를 사용하여 분리된 펩티드(NAIP)의 분자량 및 아미노산 서열을 확인한 결과를 나타낸다.

도 5a는 분리된 펩티드(NAIP)의 ACE 저해 활성의 IC₅₀ 값을 나타내고, 도 5b는 ACE에 대한 NAIP의 저해 양상을 결정하기 위한 Lineweaver-Burk plot을 나타낸다.

도 6은 MTT assay를 사용하여 NAIP의 MRC-5 cell lines 생존에 대한 영향을 보여준다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0016] 이하, 본 발명을 상세하게 설명한다.

[0017] 본 발명의 발명자들은 난노클로롭시스 오쿨라타(*Nannochloropsis oculata*)로부터 얻은 바이오디젤 부산물을 효소 처리하여 효소적 가수분해물을 얻고, 상기 효소적 가수분해물 중 특정 펩티드 성분이 고혈압과 관련있는 엔지오텐신 I 전환효소에 대한 저해 효과가 있음을 확인하고 본 발명을 완성하였다.

[0018] 따라서, 본 발명은 Leu-Val-Thr-Val-Met의 아미노산 서열(분자량 561Da)을 갖는 펩티드를 유효성분으로 함유하는 고혈압의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 제공한다.

[0019] 상기 펩티드는 난노클로롭시스 오쿨라타(*Nannochloropsis oculata*), 구체적으로는 난노클로롭시스 오쿨라타(*Nannochloropsis oculata*)의 바이오디젤 부산물, 보다 구체적으로는 난노클로롭시스 오쿨라타(*Nannochloropsis oculata*)의 바이오디젤 부산물의 효소적 가수분해물로부터 분리된다. 상기 본 발명의 펩티드의 분리 과정은 도 1에 모식적으로 나타내었다.

[0020] 상기 펩티드는 엔지오텐신 I 전환효소(angiotensin I converting enzyme, ACE)의 저해 활성을 갖는다.

[0021] 본 발명의 약학적 조성물은 각각의 사용 목적에 맞게 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁제, 에멀전, 시럽, 에어로졸 등의 경구 제형, 멸균 주사용액의 주사제 등 다양한 형태로 제형화하여 사용할 수 있으며, 경구 투여하거나 정맥 내, 복강 내, 피하, 직장, 국소 투여 등을 포함한 다양한 경로를 통해 투여될 수 있다.

[0022] 이러한 약학적 조성물에는 추가적으로 담체, 부형제 또는 희석제 등이 더 포함될 수 있으며, 포함될 수 있는 적합한 담체, 부형제 또는 희석제의 예로는 락토오스, 텍스트로오스, 수크로오스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리트리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로스, 메틸 셀룰로스, 비정질 셀룰로스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸하이드록시벤조에이트, 프로필하이드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유 등을 들 수 있다. 또한, 본 발명의 약학적 조성물은 충전제, 향

응집제, 윤활제, 습윤제, 향료, 유화제, 방부제 등을 추가로 더 포함할 수도 있다.

- [0023] 바람직한 구체예로서, 경구 투여를 위한 고형 제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형 제제는 상기 약학적 조성물에 적어도 하나 이상의 부형제, 예를 들면, 전분, 탄산칼슘, 수크로오스, 락토오스, 젤라틴 등을 혼합하여 제형화한다. 또한, 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트, 탈크 등과 같은 윤활제가 사용될 수도 있다.
- [0024] 바람직한 구체예로서, 경구용 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 예시될 수 있으며, 흔히 사용되는 단순 희석제인 물, 액체 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면, 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다.
- [0025] 바람직한 구체예로서, 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액제, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조제, 좌제 등을 예시할 수 있다. 비수성용제, 현탁제에는 프로필렌글리콜, 폴리에틸렌글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 포함될 수 있다. 주사제에는 용해제, 등장화제, 현탁화제, 유화제, 안정화제, 방부제 등과 같은 종래의 첨가제가 포함될 수 있다.
- [0026] 본 발명의 약학적 조성물은 약제학적으로 유효한 양으로 투여한다. 본 발명에서, "약제학적으로 유효한 양"은 의학적 치료에 적용 가능한 합리적인 수혜/위험 비율로 질환을 치료하기에 충분한 양을 의미하며, 유효 용량 수준은 환자의 질환의 종류, 중증도, 약물의 활성, 약물에 대한 민감도, 투여 시간, 투여 경로 및 배출 비율, 치료 기간, 동시 사용되는 약물을 포함한 요소 및 기타 의학 분야에 잘 알려진 요소에 따라 결정될 수 있다. 본 발명의 약학적 조성물은 개별 치료제로 투여하거나 다른 치료제와 병용하여 투여될 수 있고, 종래의 치료제와 순차적으로 또는 동시에 투여될 수 있으며, 단일 또는 다중 투여될 수 있다. 상기한 요소들을 모두 고려하여 부작용 없이 최소한의 양으로 최대 효과를 얻을 수 있는 양을 투여하는 것이 중요하며, 이는 당업자에 의해 용이하게 결정될 수 있다.
- [0027] 바람직한 구체예로서, 본 발명의 약학적 조성물에서 상기 아미노산 서열로 표시되는 펩티드의 유효량은 환자의 나이, 성별, 체중에 따라 달라질 수 있으며, 일반적으로는 체중 kg 당 1 내지 5,000mg, 바람직하게는 100 내지 3,000mg을 매일 또는 격일 투여하거나 1일 1 내지 3회로 나누어 투여할 수 있다. 그러나, 투여 경로, 질병의 중증도, 성별, 체중, 연령 등에 따라서 증감될 수 있으므로 상기 투여량이 어떠한 방법으로도 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.
- [0028] 본 발명의 약학적 조성물은 다양한 경로를 통하여 대상에 투여될 수 있다. 투여의 모든 방식은 예상될 수 있는데, 예를 들면, 경구, 직장 또는 정맥, 근육, 피하, 자궁내 경막 또는 뇌혈관내(intracerebroventricular) 주사에 의해 투여될 수 있다.
- [0029] 본 발명에서 "투여"는 임의의 적절한 방법으로 환자에게 소정의 물질을 제공하는 것을 의미하며, 본 발명의 약학적 조성물의 투여 경로는 목적 조직에 도달할 수 있는 한 일반적인 모든 경로를 통하여 경구 또는 비경구 투여될 수 있다. 또한, 본 발명의 조성물은 유효성분을 표적 세포로 전달할 수 있는 임의의 장치를 이용해 투여될 수도 있다.
- [0030] 본 발명에서 "대상"은, 특별히 한정되는 것은 아니지만, 예를 들어, 인간, 원숭이, 소, 말, 양, 돼지, 닭, 칠면조, 메추라기, 고양이, 개, 마우스, 쥐, 토끼 또는 기니아 피그를 포함하고, 바람직하게는 포유류, 보다 바람직하게는 인간을 의미한다.
- [0031] 또한, 본 발명은 상기 본 발명의 펩티드를 유효성분으로 함유하는 고혈압 개선용 건강 기능 식품을 제공한다.
- [0032] 본 발명의 건강 기능 식품은 고혈압의 예방 또는 개선에 효과적인 식품 및 음료 등에 다양하게 이용될 수 있다. 본 발명의 펩티드를 포함하는 식품으로는, 예를 들어, 각종 식품류, 음료, 껌, 차, 비타민 복합제, 건강보조 식품류 등이 있고, 분말, 과립, 정제, 캡슐 또는 음료인 형태로 사용할 수 있다.
- [0033] 본 발명의 펩티드는 일반적으로 전체 식품 중량의 0.01 내지 15중량%로 가할 수 있으며, 건강음료 조성물은 100ml를 기준으로 0.02 내지 10g, 바람직하게는 0.3 내지 1g의 비율로 가할 수 있다.
- [0034] 본 발명의 건강 기능 식품은 지시된 비율로 필수 성분으로서 상기 화합물을 함유하는 것 외에 식품학적으로 허용 가능한 식품보조 첨가제, 예컨대, 천연 탄수화물 및 다양한 향미제 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다.
- [0035] 상기 천연 탄수화물의 예로는 포도당, 과당 등의 단당류, 말토오스, 수크로오스 등의 이당류 및 텍스트린, 시클로텍스트린 등의 다당류와 같은 통상적인 당 및 자일리톨, 소르비톨, 에리쓰리톨 등의 당알코올이 있다.

[0036] 상기 향미제로는 타우마틴, 레바우디오시드 A 또는 글리시르히진과 같은 스테비아 등의 천연 향미제 및 사카린, 아스파르트암 등의 합성 향미제를 사용할 수 있다. 상기 천연 탄수화물의 비율은 본 발명의 건강 기능 식품 100ml 당 일반적으로 약 1 내지 20g, 바람직하게는 약 5 내지 12g을 사용한다. 상기 외에 본 발명의 건강 기능 식품은 여러 가지 영양제, 비타민, 광물, 합성 풍미제 및 천연 풍미제 등의 풍미제, 착색제 및 증진제, 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알코올, 탄산음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다. 그 밖에 본 발명의 건강 기능 식품은 천연 과일 주스 및 과일 주스 음료 및 야채 음료 등의 제조를 위한 과육을 함유할 수도 있다. 이러한 성분은 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있다. 이러한 첨가제의 비율은 본 발명의 눈개승마 추출물 100중량부 당 0.01 내지 약 20중량부의 범위에서 선택되는 것이 일반적이다.

[0037] 이하, 본 발명의 구체적인 방법을 실시예를 통하여 보다 상세하게 설명한다. 하기 실시예는 본 발명의 바람직한 하나의 구체예일 뿐이며, 본 발명의 권리범위가 하기 실시예의 범위로 한정되는 것은 아니다.

[실시예]

1. 재료 및 방법

1-1. 재료

[0041] Human fetal lung fibroblast(MRC-5) 세포주는 American Type of Culture Collection(Manassas, VA, USA)에서 구입하였다. Dulbeccos Modified Eagle's Medium(DMEM), trypsin-EDTA, penicillin/streptomycin/amphotericin(각각 10,000U/ml, 10,000g/ml 및 2,500g/ml) 및 소태아혈청(FBS)은 Gibco BRL(Life Technology, USA)에서 구입하였다. MTT(3-(4,5-dimethyl-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) 시약, ACE (토끼 폐 기원) 및 기질 펩티드(Hip-His-Leu)는 Sigma Chemical Co.(St. Louis, MO, USA)에서 구입하였다. 소화 단백질분해효소(Alcalase, Neutrase, Flavourzyme, PTN 및 Protamex)는 Novozymes(Bagsvaerd, Denmark)에서 구입하였다. 이 연구에서 사용된 다른 모든 시약은 분석용 품위였다.

1-2. 해양 미세조류(*nannochloropsis oculata*)로부터 얻은 바이오디젤 부산물의 효소적 가수분해물의 제조

[0043] 미세조류(*N. oculata*)는 National Research Institute of Aquaculture Fisheries Research Agency(Kanagawa, Japan)로부터 입수하였고, Jeju Center of Korea Basic Science Institute(Korea)에서 성장 및 바이오매스 생산을 위하여 스크리닝하였다.

[0044] 총지질을 함유하고 있는 바이오디젤은 이전의 보고서에서 사용한 방법을 약간 수정하여, CHCl₃:MeOH(2:1)의 혼합물을 사용하여 *Nannochloropsis oculata*에서 3회 추출하였다. 이후 이 추출물을 30분 동안 3000xg로 원심분리하였고, 상등액을 3배의 0.9% NaCl 용액에 넣었다. 상기 추출물의 바닥층은 바이오디젤의 정식 분석을 위하여 사용되었다.

[0045] 해양 미세조류의 바이오디젤 부산물에서 ACE 저해 펩티드를 추출하기 위하여, 다양한 상업용 효소(Alcalase, Neutrase, Flavourzyme, PTN, 및 Protamex)를 최적의 상태로 사용하여 효소적 가수분해를 시행하였다. 1/100(w/w)의 효소/기질 비에 의거하여 1% 기질과 효소를 혼합하였다. 이 혼합물을 각각의 최적 온도로 8시간 동안 스테어링하면서 인큐베이션한 후, 10분 동안 끓는 물로 가열하여 효소를 비활성화시켰으며, 감압동결건조된 가수분해물을 사용할 때까지 -80℃에서 저장하였다.

[0046] 1-3. 일반 조성 분석

[0047] AOAC(1990)법을 약간 수정하여 FMP(12)의 수분, 회분, 단백질, 및 지질 함유량을 조사하였으며, 페놀-황산법을 사용하여 탄수화물 함유량을 조사하였다.

[0048] 1-4. ACE 저해 활성 측정

[0049] Cushman 및 Cheung법 수정판을 약간 변형하여 ACE 저해 활성 검정을 시행하였다. 반응 혼합물은 50mM Dodium borate buffer(pH 8.3)에 기질로서 5mM Hip-His-Leu, 0.3M NaCl 및 5 μ l ACE를 포함하였다. 상기 반응 혼합물(50 μ l)에 샘플(50 μ l)을 첨가하고, 0.5M NaCl을 함유한 8.3mM Hip-His-Leu(150 μ l)을 혼합하였다. 37°C에서 60분 동안 인큐베이션한 후, 0.1N HCl(250 μ l)을 첨가하여 추가 반응을 중단시켰다. 결과의 hippuric acid는 1.5ml ethyl acetate를 첨가하여 추출하였다. 원심분리(800xg, 15분)후, 1ml의 상등액을 유리 튜브로 옮겼으며, 진공 상태에서 2시간 동안의 실온으로 증발시켰다. 3.0ml의 증류수에 hippuric acid를 재현탁하였고, 분광광도계(모델 U-3210, Hitachi, Japan)를 사용하여 228nm에서 흡광도를 측정하였다. IC₅₀ 값은 50%의 ACE 저해 활성에 필요한 저해제 농도로 정해졌다.

[0050] 1-5. ACE 저해 펩티드의 정제

[0051] 1-5-1. 이온 교환 크로마토그래피

[0052] 20mM sodium acetate buffer(pH 4.0, CH₃COONa3H₂O)로 equilibration된 Hiprep 16/10 DEAE FF 음이온 교환 컬럼에 동결건조된 바이오디젤 부산물(20mg/ml)을 로딩하였으며, fast protein liquid chromatography(FPLC, AKTA, Amersham Bioscience Co., Uppsala, Sweden)를 사용하여 이 부산물을 62ml/h의 유량으로 동일한 완충제에서 NaCl(0~2M)의 선형 경사로 분리하였다. 각 분획은 280nm로 관찰되었으며, 4ml의 양으로 획득되었으며, 염을 제거한 후 회전 증발기를 사용하여 농축시켰다. 최고의 ACE 저해 활성을 갖는 동결건조된 분획은 다음 정제 단계에 사용하였다.

[0053] 1-5-2. 고성능 액체 크로마토그래피(HPLC)

[0054] 2ml/min의 유량으로 0.1% 트리플루오로아세트산을 함유한, 아세트니트릴의 선형 경사(50분 동안 0~50%)를 가진 YMC-Pack C18((250x20mm) YMC America, Inc.)칼럼에서 역상 HPLC를 사용하여 최고의 ACE 저해 활성을 나타내는 피크를 추가로 정제하였다. 용리제의 흡광도는 215nm에서 관찰되었다. 최고의 활성을 나타내는 ACE 저해 활성 분획을 수거하여 즉시 동결건조시켰다. 20분 동안 1.0ml/min의 유량으로 0.1% TFA를 함유한 20% 아세트니트릴을 가진 Synchropak RPP-100 분석 컬럼(4.6x250mm, Eprogen, Inc., Chicago, IL, USA)에 분석 칼럼의 활성 분획을 추가로 적용시켰다. 최종적으로 정제된 펩티드를 아미노산 서열 분석에 사용하였다.

[0055] 1-6. 정제된 펩티드의 아미노산 서열 결정

[0056] Electrospray ionisation(ESI) 소스와 함께 Q-TOF mass spectrometer(Micromass, Altrincham, UK)를 사용하여, 난노클로롭시스 오쿨라타(*Nannochloropsis oculata*)의 바이오디젤 부산물로부터 분리된 펩티드(NAIP)의 아미노산 서열과 분자량을 측정하였다. 메탄올/물(1:1 v/v)로 녹인 정제 펩티드를 ESI 소스에 주입하였으

며, 질량 스펙트럼에서 2배로 하전된 $(M + 2H)^{2+}$ 상태로 분자량을 측정하였다. 분자량 측정 이후, 펩티드는 fragmentation을 위하여 자동적으로 선택되었으며, tandem MS 분석을 통하여 서열 정보를 얻었다.

[0057] 1-7. ACE에서 저해 양상 결정

[0058] Qian 등의 방법을 약간 수정하여 각 반응 혼합물에 서로 다른 농도의 ACE 저해 펩티드를 추가하였다. 서로 다른 농도의 기질을 활용하여 효소 활성을 측정하였다. 저해제의 존재 하에서 ACE 저해 양상을 Lineweaver-Burk plot 으로 결정하였다.

[0059] 1-8. 세포 배양 및 MTT assay를 이용한 세포독성 평가

[0060] MRC-5(인간의 허파 섬유아세포 세포주)를 100 µg/ml penicillin-streptomycin 및 10% 소태아혈청(FBS)을 함유한 Dulbecco's modified eagle's medium(DMEM, GIBCO, New York, USA)에서 5% CO₂를 지닌 습기 찬 환경 하에서 37°C에서 배양하였다. Hansen 등이 설명한 MTT(3-(4,5-dimethyl-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide)법을 약간 수정하여, 정제된 펩티드의 MRC-5의 세포독성을 측정하였다. 5×10^3 cells/well의 밀도로 96-well plate에서 MRC-5 세포를 배양시켰다. 24시간 후, 새 배지로 세포를 세척하였으며, 서로 다른 농도의 NAIP를 사용하여 이 세포를 처리하였다. 24시간 배양 후, PBS를 사용하여 세포를 2회 세척하였으며, 각 well에 100 µl의 MTT 용액(1mg/ml)을 첨가하였다. 4시간 배양 후, 100 µl의 dimethyl sulfoxide(DMSO)를 첨가하여 formazan salt를 용해시켰다. UV microplate reader(Tecan Austria GmbH, Groedig, Austria)를 사용하여 540nm에서 광학밀도를 측정하였다. 세포 생존도를 미처리 공백 그룹과 비교하여 계산하였다. 결과는 최소 3회의 실험의 평균으로 표시하였다.

[0061] 1-9. 통계 분석

[0062] 모든 자료들은 평균 $\pm$ 표준편차로 나타내었다. 평균값들은 새롭게 준비된 시약을 사용하여 다른 날에 수행된 최소한 3회의 독립적인 실험으로부터 구한 자료를 바탕으로 계산하였다. 통계분석은 스튜던트 t-검정을 사용하여 수행하였다. 통계적 유의성은 $p < 0.05$ 이면 달성된 것으로 간주하였다.

[0063] 2. 결 과

[0064] 2-1. 해양 미세조류(*N. oculata*)의 일반 조성

[0065] 바이오디젤(부산물)을 추출한 후, 미세조류의 수분, 조단백질, 조지질, 회분 및 탄수화물 함유량을 측정하여 표 1에 나타내었다.

표 1

성분	바이오디젤	바이오디젤
	추출 전(%)	추출 후 부산물 (%)
지질	20.5±1.2	0.8±0.2
단백질	30.4±1.8	38.6±1.5
탄수화물	37.1±1.7	44.3±2.1
미네랄, 섬유소 등	11.1±0.8	16.1±1.1

[0066]

[0067]

바이오디젤을 추출하는 동안 수분(미네랄) 함량이 11.1~16.1%로 변화하였다. 바이오디젤을 추출하는 동안 조단백질과 탄수화물 함유량은 30.4에서 38.68% 및 37.1에서 44.3%로 각각 증가하였다. 그러나, 조지질 함유량은 20.5에서 0.8%로 감소하였다.

[0068]

2-2. 해양 미세조류 기원의 바이오디젤 부산물로부터의 효소적 가수분해물 제조 및 ACE 저해 활성 측정

[0069]

ACE 저해 펩티드를 얻기 위하여, 다양한 상업용 소화 효소를 활용하여 *N. oculata*의 바이오디젤 부산물을 개별적으로 가수분해시켰다. Alcalase, Neutrase, Flavourzyme, PTN 및 Protamex 등의 5가지 단백질 분해 효소를 선정하여 *N. oculata* 바이오디젤 부산물의 효소적 가수분해물의 ACE 저해 활성을 측정하였다. ACE 저해 활성 측정 결과, 알칼라제-단백질 가수 분해물은 1mg/ml의 농도로 테스트를 거친 가수분해물(Neutrase, Flavourzyme, PTN 및 Protamex) 중 가장 높은 ACE 저해 활성(77.6%)을 나타내었다(도 2a). 또한 도 2b에 나타난 바와 같이, 알칼라제-단백질 가수분해물은 투여량 의존적 방식(0.05-1mg/ml)으로 ACE 저해 활성을 가지고 있는 것으로 나타났다. 따라서, 본 발명자들은 ACE 저해 펩티드 정제를 위해 알칼라제-단백질 가수분해물을 선정하였다.

[0070]

[0071]

2-3. ACE 저해 펩티드(NAIP) 정제

[0072]

FPLC를 사용하여 Hiprep 16/10 DEAE FF 음이온 교환 칼럼에서 해양 미세조류 부산물의 알칼라제-단백질 가수분해물을 분획시켰다. 도 3a에 나타나는 바와 같이, 280nm에서 3개의 주요 흡수 피크가 있었으며, 피크와 연관 있는 3개의 부분(F1, F2 및 F3)을 모아서 ACE 저해활성 측정을 위해 동결건조시켰다. 20-30% NaCl(2M)로 용리된 F2는 0.2mg/ml의 농도에서 강한 활성(70.5%)을 보였다(도 3b). 동결건조된 활성 부분인 F2를 0.1% TFA를 함유한 아세트니트릴의 선형 경사(50분 동안 0-50%)와 함께 YMC-Pack Pro C18(250 x 20mm)에서 역상 HPLC를 사용하여 추가 분리시켰다. 펩티드의 용리 프로파일은 도 4a에 나타나 있다. HPLC 피크를 4개 부분(F2-1, F2-2, F2-3 및 F2-4)으로 분리시켰으며, ACE 저해 활성 측정을 위해 각 부분을 모아서 동결건조시켰다. F2-3은 0.1mg/ml의 농도로 가장 강한 ACE 저해 활성(80.2%)을 나타냈다. 정제된 펩티드를 얻기 위해, 0.1% TFA를 함유한 20% 아세트니트릴과 함께 SynChropak RPP-100 분석용 칼럼(4.6mm x 250mm)에서 역상 HPLC를 사용하여 F2-3을 추가 정제하였다(도 4c). 2번의 크로마토그래피 이후, 최종적으로 정제 펩티드(NAIP)를 얻었고, N-터미널 아미노산 서열을 분석하였다(도 4d). 여기에 따르면, NAIP는 다섯 가지 아미노산(Leu-Val-Thr-Val-Met(MW: 561Da))으로 이루어져 있었다.

[0073]

일반적으로, ACE 저해제는 아연 결합 리간드(보통 인산염 혹은 카르복시산염 산소 혹은 티올 황), 수소결합 주체 및 카르복시기-터미널 그룹과 같은 하나 이상의 분자 기능성을 가지고 있다. ACE의 서로 다른 펩티드 저해제들 중 구조-활성 관계는 ACE에 대한 결합이 기질의 C-터미널 트리펩티드 시퀀스로 인해 크게 영향을 받고 있다는 것을 나타낸다. 그리고, 이러한 입장에서 소수성 아미노산을 함유하고 있는 펩티드가 강한 저해제라고 판단

된다. 알라닌, 발린, 류신 그리고 메타오닌의 결 사슬은 소수성 상호작용을 이용하여 단백질 구조를 안정화시키면서, 단백질 내에 모이는 경향이 있다. 본 연구에서, 해양 미세조류 가수분해물의 바이오티셀 부산물로부터 추출한 신규한 ACE 저해 펩티드(NAIP)는 ACE 저해 활성을 유발할 수 있는 C-터미널과 N-터미널 트리펩티드 시퀀스에서 Leu, Val, 및 Met 그리고 소수성 아미노산을 가짐을 확인하였다.

[0074] 2-4. 정제된 펩티드(NAIP)의 저해 패턴과 ACE 저해 활성

[0075] 3단계 분리 이후 5가지 아미노산으로 구성된 신규한 ACE 저해 펩티드 NAIP를 얻었으며, NAIP의 IC_{50} 값은 $18.0 \mu M$ 이었다(도 5a). 돼지 해골, 윤충, 황소개구리 근육, 눈다랑어의 갈색근, 튜나 프레임, 대서양 대구의 피부 젤라틴, 그리고 조류 단백질 폐기물과 같은 다양한 천연 자원의 효소적 가수분해물에서 추출한 몇몇 펩티드는 ACE 저해 활성을 가지고 있으며, 동물 실험에서 고혈압 저해 활성을 나타낸다고 알려져 있다. 밝혀진 ACE 저해 펩티드는 돼지 해골 가수분해물 유래의 Arg-Met-Leu-Gly-Gln-Thr-Pro-Thr-Lys($IC_{50} = 34 \mu M$), 윤충 유래의 Asp-Asp-Thr-Gly-His-Asp-Phe-Glu-Asp-Thr-Gly-Glu-Ala-Met($IC_{50} = 9.64 \mu M$), 황소개구리 근육 유래의 Gly-Ala-Ala-Glu-Leu-Pro-Cys-Ser-Ala-Asp-Trp-Trp($IC_{50} = 10.95 \mu M$), 눈다랑어 갈색근 유래의 Trp-Pro-Glu-Ala-Ala-Glu-Leu-Met-Met-Glu-Val-Asp-Pro($IC_{50} = 21.6 \mu M$), 튜나 프레임 유래의 Gly-Asp-Leu-Gly-Lys-Thr-Thr-Thr-Val-Ser-Asn-Trp-Ser-Pro-Pro-Lys-Try-Lys-Asp-Thr-Pro($IC_{50} = 11.28 \mu M$), 대서양 대구 피부 젤라틴 유래의 Leu-Leu-Met-Leu-Asp-Asn-Asp-Leu-Pro-Pro($IC_{50} = 35.7 \mu M$), 그리고 조류 단백질 폐기물 유래의 Val-Glu-Cys-Tyr-Gly-Pro-Asn-Arg-Pro-Gln-Phe($IC_{50} = 29.6 \mu M$)이다.

[0076] 본 발명에서 분리된 ACE 저해 펩티드 NAIP는 Leu-Val-Thr-Val-Met로 이루어져 있었으며(MW: 561Da), 다른 보고서와 동등 또는 그 이상의 활성($IC_{50} = 18.0 \mu M$)을 나타내었다.

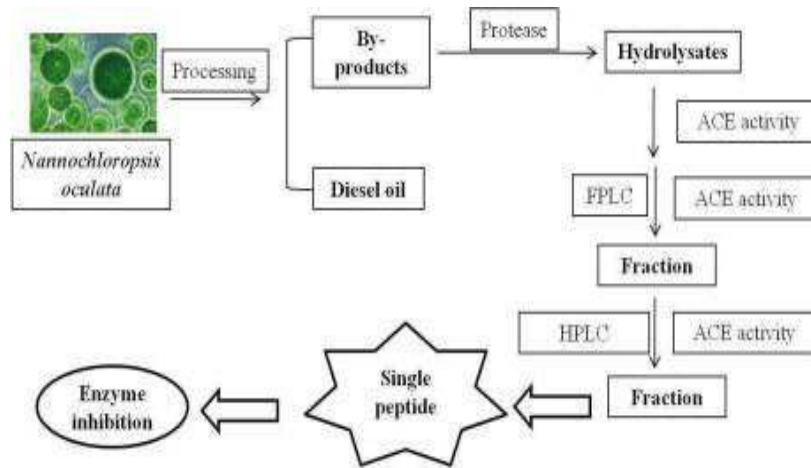
[0077] 또한, Lineweaver-Burk 플롯을 활용하여 NAIP의 ACE 저해도를 산출하였으며, non-competitive라고 밝혀졌다(도 5b). 이것이 의미하는 바는, NAIP는 기질 분자가 결합되어 있든 혹은 그렇지 않은 상관없이 효소 분자(ACE)와 결합하여 실패복합체(dead end complex)를 만들 수 있다는 것을 암시한다.

[0078] NAIP의 세포독성을 평가하기 위해, 여러 가지 농도를 가지고 NAIP를 처리한 이후 MTT 검정을 활용하여 인간 배아 허파 섬유아세포(MRC-5)의 세포 생존가능성을 검정하였다. NAIP는 MRC-5에서 $150 \mu M$ 까지 독성이 없는 것으로 나타났다(도 6).

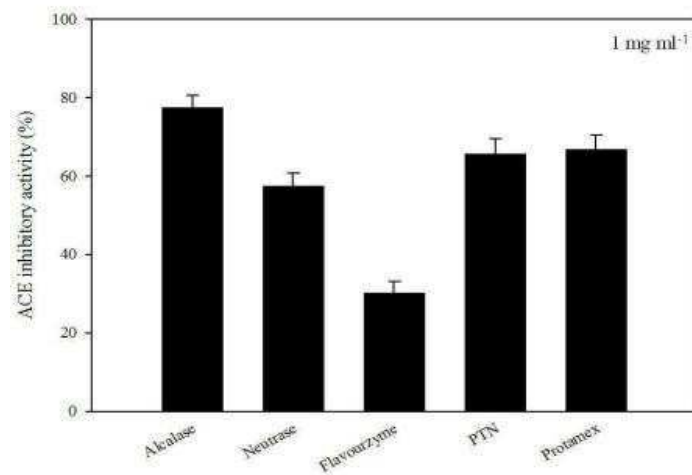
[0079] 이제까지 본 발명에 대하여 그 바람직한 실시예들을 중심으로 살펴보았다. 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자는 본 발명이 본 발명의 본질적인 특성에서 벗어나지 않는 범위에서 변형된 형태로 구현될 수 있음을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 개시된 실시예들은 한정적인 관점이 아니라 설명적인 관점에서 고려되어야 한다. 본 발명의 범위는 전술한 설명이 아니라 특허청구범위에 나타나 있으며, 그와 동등한 범위 내에 있는 모든 차이점은 본 발명에 포함된 것으로 해석되어야 할 것이다.

도면

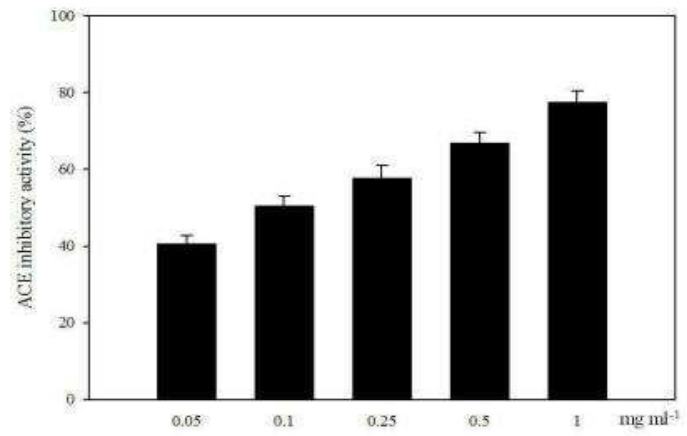
도면1



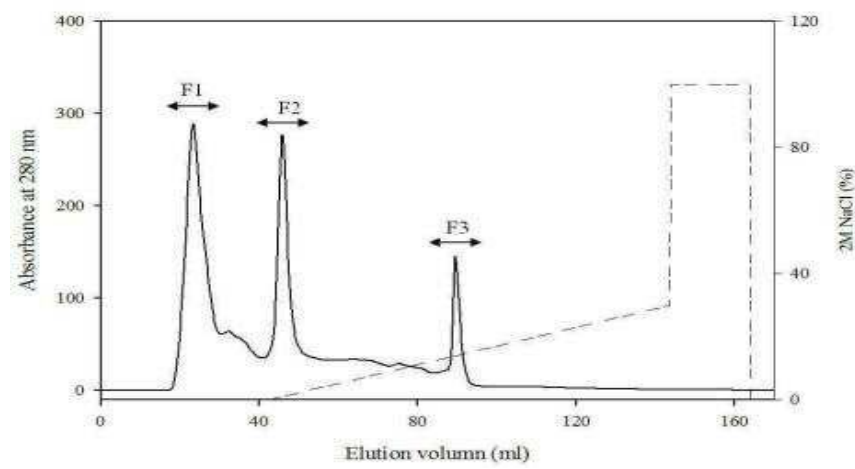
도면2a



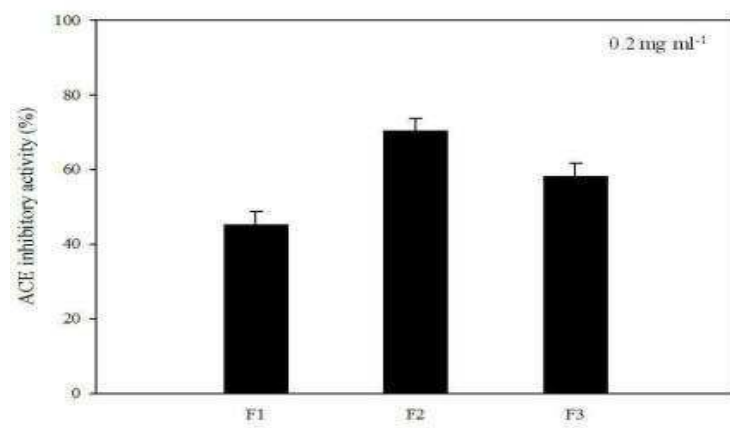
도면2b



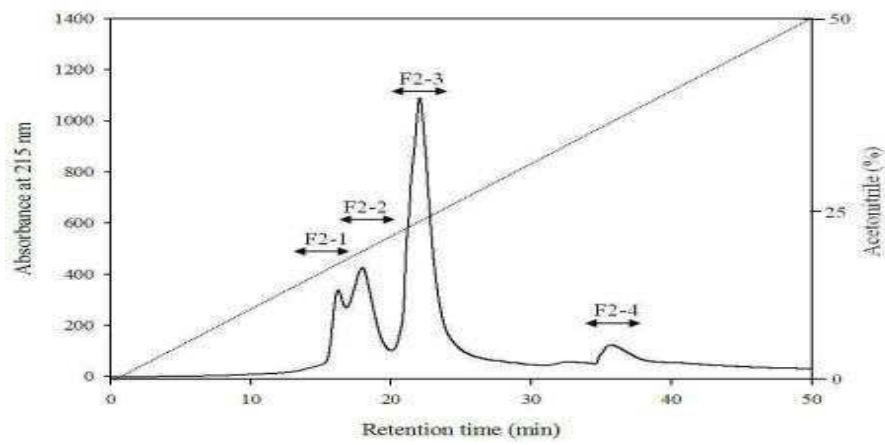
도면3a



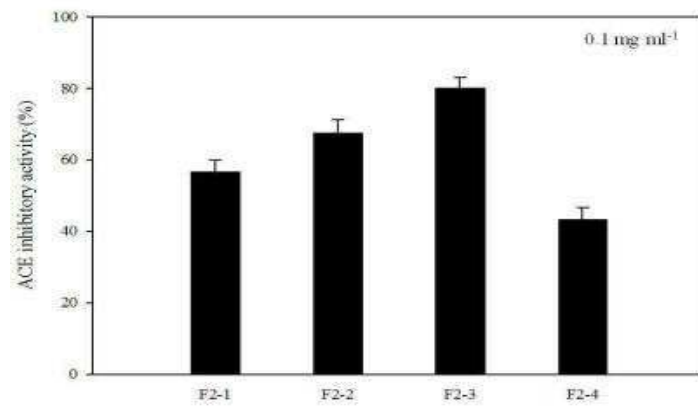
도면3b



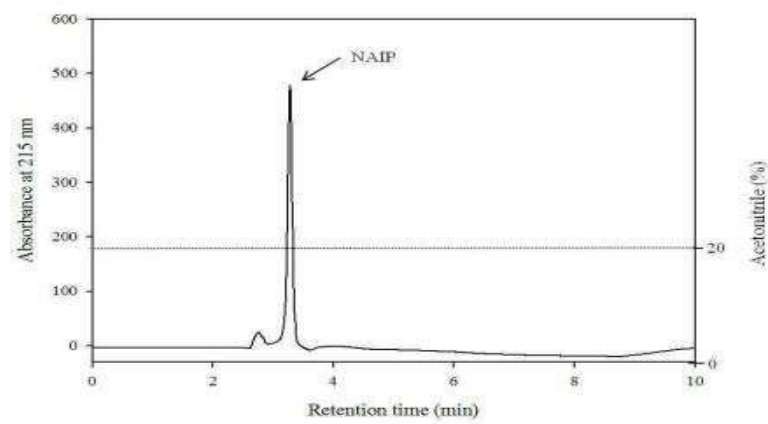
도면4a



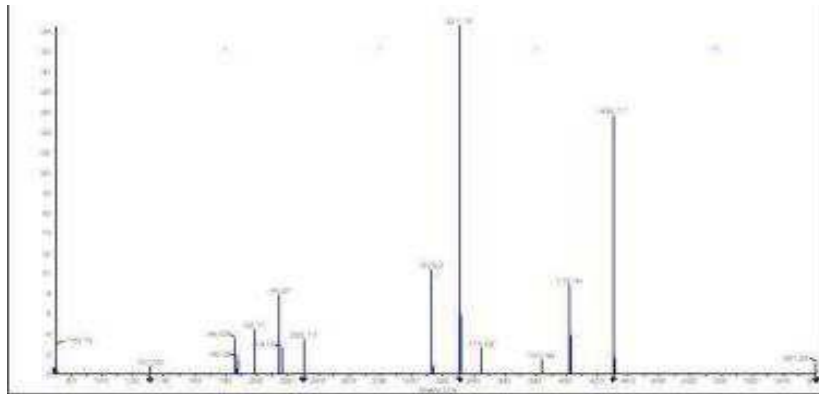
도면4b



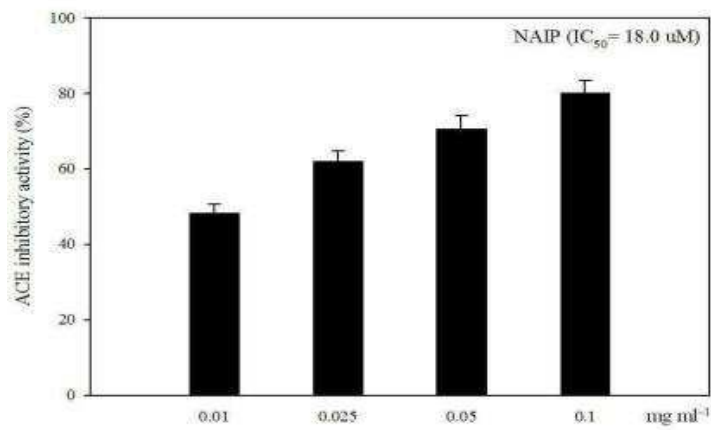
도면4c



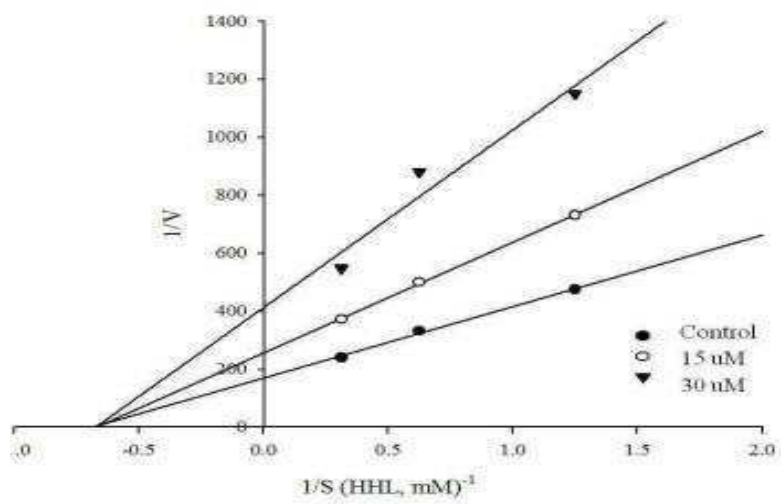
도면4d



도면5a



도면5b



도면6

