



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2016-0024008
(43) 공개일자 2016년03월04일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 36/04 (2006.01) A61P 1/16 (2006.01)

A61P 31/12 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2014-0109337

(22) 출원일자 2014년08월22일

심사청구일자 2014년08월29일

(71) 출원인

부경대학교 산학협력단

부산광역시 남구 신선로 365 (용당동,
부경대학교)

(72) 발명자

남택정

부산 남구 고동골로 91-2

최정옥

부산광역시 동래구 아시아드대로 154번지 51

(74) 대리인

김순웅

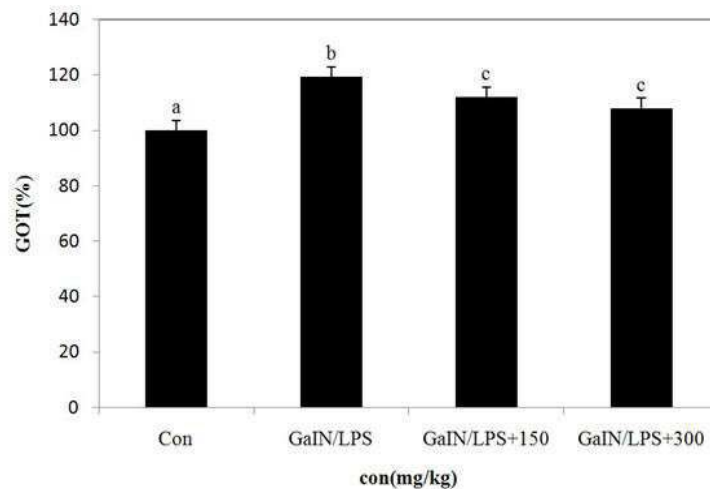
전체 청구항 수 : 총 10 항

(54) 발명의 명칭 김으로부터 분리된 당단백질을 포함하는 바이러스성 간 손상 예방 또는 치료용 조성물

(57) 요약

본 발명은 김으로부터 분리된 당단백질을 포함하는 바이러스성 간 손상 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다. 본 발명에 따른 김으로부터 분리된 당단백질은 바이러스성 간 조직의 사멸 및 염증을 억제하고, 생체 항산화물질의 활성을 촉진하여 간 조직의 사멸 및 염증으로부터 발생하는 산화적 스트레스를 저해함으로써 간 조직의 손상을 억제하는 효과가 우수하므로, 이를 간 손상의 예방 또는 치료에 유용하게 이용할 수 있다.

대표도 - 도2



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2012300734

부처명 해양수산부

연구관리전문기관 한국해양과학기술진흥원

연구사업명 수산기술개발사업

연구과제명 김을 이용한 기능성 소재 개발

기 여 율 1/1

주관기관 부경대학교 산학협력단

연구기간 2012.08.24 ~ 2014.08.23

명세서

청구범위

청구항 1

김으로부터 분리된 당단백질을 유효성분으로 함유하는 바이러스성 간 손상의 예방 또는 치료용 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 김은 방사무늬 김(*porphyra yezoensis*)인 것을 특징으로 하는, 바이러스성 간 손상의 예방 또는 치료용 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 바이러스성 간 손상은 GaIN(D-galactosamine) 또는 LPS(Lipopolysaccharide)로 유발된 것을 특징으로 하는, 바이러스성 간 손상의 예방 또는 치료용 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 당단백질은

- (a) 김 분말을 물로 추출한 후 상층액을 분리하여 1차 농축하는 단계; 및
- (b) 상기 (a) 단계에서 수득한 물질에 에탄올을 가한 후 다시 상층액을 분리하여 2차 농축하는 단계;를 거쳐 분리된 것을 특징으로 하는, 바이러스성 간 손상의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 5

제4항에 있어서, 상기 (a) 및 (b) 단계의 농축은 당도 3.5~5.0 brix가 되도록 이루어지는 것을 특징으로 하는, 바이러스성 간 손상의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 당단백질은 분자량이 18 내지 22 kDa인 것을 특징으로 하는, 바이러스성 간 손상의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 7

제1항에 있어서, 상기 바이러스성 간 손상은 간염, 간경변 및 간암으로 구성되는 군으로부터 선택된 1종 이상의 간 질환을 유발하는 것을 특징으로 하는, 바이러스성 간 손상의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 8

제7항에 있어서, 상기 간염은 A형, B형, C형, D형 및 E형 간염으로 구성되는 군으로부터 선택된 1종 이상인 것을 특징으로 하는, 바이러스성 간 손상의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 9

제1항에 있어서, 상기 바이러스성 간 손상은 A형, B형, C형, D형 및 E형 간염 바이러스로 구성되는 군으로부터 선택된 1종 이상의 바이러스로 인해 유발되는 것을 특징으로 하는, 바이러스성 간 손상의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 10

김으로부터 분리된 당단백질을 유효성분으로 함유하는 바이러스성 간 손상의 예방 또는 개선용 식품 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 김으로부터 분리된 당단백질을 포함하는 바이러스성 간 손상의 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 세계적으로 간질환의 약 70%는 바이러스성이고, 바이러스성이 아닌 것은 20% 정도이다. A형과 B형, 그리고 A형도 B형이 아닌 것을 비A형비B형이라 구분해 왔으나 각 형마다 원인이 되는 바이러스가 다르다. A형 간염은 유행성 간염(전염성 간염)이라고도 하며, 소화기 전염병처럼 경구감염한다. 치료하기가 쉬워져 최근에는 이환율이 감소 경향을 보인다. B형 간염은 B형 간염바이러스(HBV)에 의해 발생하므로 전에는 혈청 간염(수혈 후 간염)이라고도 하며, 수혈할 때에 혈액을 매개로 이동하여 만성화되기 쉽다. 바이러스성이지만 A형이나 B형으로 판정할 수 없는 것을 비A비B형 간염이라 하며, 이 중 C형, D형, E형 등의 바이러스가 동정, 진단법 등이 확립되고 있다. 대부분 수혈 후 감염되는 것으로 보여진다. A형 및 E형 간염의 경우 오직 급성 간염만 일으키지만 B형, C형, D형 간염의 경우 급성뿐만 아니라 만성적인 간염이 지속될 경우 간경변과 간암까지 진행될 수 있다. 특히, B형 간염의 경우 만성 간질환의 가장 흔한 원인이며 인간 전염성이 존재하기 때문에 법정 감염병으로 지정되어 있을 정도로 심각한 질병으로 분류되며 간암이 발병할 경우 5년 상대생존율이 28.7%로서 다른 질병에 비해 생존율이 낮다. 바이러스의 혈중농도는 B형에 비하여 훨씬 적어 동정되지 않는다. 급성간염이 만성화되는 비율이 다른 형에 비하여 높으며, 간염은 발증과 동시에 혈중 GPT(알라닌아미노전이효소), GOT(아스파라긴산 아미노전이효소)의 수치가 올라가고, 식욕 부진, 전신 권태, 발열, 황달등을 수반한다.

[0003] 상기와 같은 바이러스성 간 질환 사망률을 줄이기 위한 연구가 진행되었으나, 현재까지 바이러스성 간 손상을 치료하기 위한 적절한 천연재료 치료제가 개발되어 있지 않다. 최근 소비자들은 웰빙, 자연건강식품에 대한 요구가 증가하는 추세이나 한정적인 소재로 인한 어려움이 있으므로 기존의 제품들과 차별성을 가진 천연재료 소재의 개발이 필요한 실정이다.

[0004] GaIN(D-galactosamine) 및 LPS(Lipopolysaccharide)는 간 질환을 유도하는 잘 알려진 동물실험 방법으로서, 간 조직의 손상과 염증으로 인한 독성에 대한 보호 효과를 가지는 약물을 시험하고, 약물이 생체 내부에서 어떠한 반응 경로를 통하여 간 조직의 기능장애를 극복하는지 밝혀내는데 흔히 사용된다. GaIN이 생체 내부에 작용하는 경우 갈락토스 대사경로 중 유리딘트리포스페이트(uridinetriphosphate)의 손실을 일으키고 단백질과 RNA의 합성을 저해시킴으로서 조직의 독성을 일으키게 된다. 이렇게 GaIN으로 인하여 간 조직이 손상되는 증상은 인간의 바이러스성 간염 증상과 유사하다고 보고된다. LPS는 음성세균 세포막의 주성분으로서 간조직의 대식세포를 활성화시키고 자극된 대식세포는 전염증 싸이토카인의 분비를 증가시킨다. 분비된 싸이토카인은 간조직의 염증을 유발시키게 되며 이로 인해 간 조직의 손상과 항산화효소의 활성을 저해시키게 된다. 이러한 두 가지 약물을 동물에게 동시에 처리 할 경우 바이러스성 간 조직의 염증 발현 및 조직 손상의 증상을 증가시켜 바이러스성 간염과 유사한 상태를 만들어 줌으로써 이러한 증상에 대한 보호 약물 실험 방법으로 선호된다.

[0005] 한편, 홍조류는 다른 조류보다 비교적 깊은 물에 서식하고, 크기가 비교적 작으며, 종류는 4000여 종으로 매우 다양하며 녹조류, 갈조류보다 서식 범위가 넓어 얕은 수심에서부터 광선이 닿는 깊은 수심에까지 자생한다. 현재 홍조류의 다양한 생리화학적 효과가 검증되면서 관심이 고조됨에 따라 암세포성장 저해효과 뿐만 아니라, 혈중 지질대사 개선 효과 등이 보고되었다.

[0006] 일명 해태(海苔)라고도 불리는 김은 홍조류의 일종으로 길이 14~25cm, 나비 5~12cm의 긴 타원모양 또는 줄처럼 생긴 달걀모양을 하고 있다. 김의 종류로는 참김(Porphyra tenera), 방사무늬 돌김(Pyxoxoensis), 둥근 돌김(P. suborbiculata) 등이 있으며, 그중 우리나라에서 양식하는 김의 주종을 이루는 것이 방사무늬 돌김이다. 김에는 특히, 칼슘과 인이 풍부하게 함유되어 있으며, 그중에서도 김에 함유되어있는 다당류인 포피란이 항암, 항바이러스, 항응고작용 등의 생리효과를 가진다는 사실이 밝혀지면서 김의 생리활성물질 탐색에 많은 관심이 모아지고 있다. 뿐만 아니라 김에는 항산화물질인 폴리페놀이 함유되어 있으며, Han 등(J. Korean Soc. Food Sci. Nutr. 33, 324-330, 2004)은 김추출물이 콜라겐 합성 및 성숙가교인 피리디놀린(pyridinolone) 생성을 회복시킨다고 하였고, 그 외에 Yashizawa 등(Bioscience Biotechnology and Biochemistry 59, 1862-1866, 1995)은 김으로부터 추출한 다당류가 대식세포 촉진작용을 나타낸다고 하였다.

[0007] 상기한 바와 같이 홍조류 및 김의 다양한 약리효과에 대해 알려져 있지만, 간 손상의 예방 또는 치료 효과를 갖는지에 대해서는 아직까지 규명되지 않은 상태이다.

[0008] 이에 본 발명자들은 새로운 약물을 개발하기 위해 김에 대해서 연구를 수행한 결과 이로부터 신규한 당단백질을 분리하였으며, 분리한 당단백질이 바이러스성 간 손상의 치료 효과가 우수함을 확인하고 본 발명을 완성하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009] 본 발명의 목적은 김으로부터 분리된 당단백질을 유효성분으로 함유하는 바이러스성 간 손상의 예방 또는 치료용 조성물을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0010] 상기 과제를 해결하기 위해, 본 발명은 김으로부터 분리된 당단백질을 유효성분으로 함유하는 바이러스성 간 손상의 예방 또는 치료용 조성물을 제공한다.

발명의 효과

[0011] 본 발명에 따른 김으로부터 분리된 당단백질은 바이러스성 간 조직의 사멸 및 염증을 억제하고, 생체 항산화물질의 활성을 촉진하여 간 조직의 사멸 및 염증으로부터 발생하는 산화적 스트레스를 저해함으로써 간 조직의 손상을 억제하는 효과가 우수하므로, 이를 간 손상의 예방 또는 치료에 유용하게 이용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0012] 도 1은 본 발명에 따른 김으로부터 분리한 당단백질을 쿠마시 블루로 염색한 결과를 나타낸 도이다.

도 2는 GaIN/LPS 투여 및 본 발명에 따른 김으로부터 분리한 당단백질 투여에 따른 혈청 중 GOT 수치 변화를 나타낸 도이다.

도 3은 GaIN/LPS 투여 및 본 발명에 따른 김으로부터 분리한 당단백질 투여에 따른 혈청 중 GPT 수치 변화를 나타낸 도이다.

도 4는 GaIN/LPS 투여 및 본 발명에 따른 김으로부터 분리한 당단백질 투여에 따른 간 조직의 GSH 활성 변화를 나타낸 도이다.

도 5는 GaIN/LPS 투여 및 본 발명에 따른 김으로부터 분리한 당단백질 투여에 따른 간 조직의 CAT 활성 변화를 나타낸 도이다.

도 6은 GaIN/LPS 투여 및 본 발명에 따른 김으로부터 분리한 당단백질 투여에 따른 간 조직의 GST 활성 변화를 나타낸 도이다.

도 7은 GaIN/LPS 투여 및 본 발명에 따른 김으로부터 분리한 당단백질 투여에 따른 간 조직의 SOD 활성 변화를 나타낸 도이다.

도 8은 GaIN/LPS 투여 및 본 발명에 따른 김으로부터 분리한 당단백질 투여에 따른 간 조직의 TBARS 활성 변화를 나타낸 도이다.

도 9는 GaIN/LPS 투여 및 본 발명에 따른 김으로부터 분리한 당단백질 투여에 따른 간 조직의 알부민 활성 변화를 나타낸 도이다.

도 10은 GaIN/LPS 투여 및 본 발명에 따른 김으로부터 분리한 당단백질 투여에 따른 간 조직의 카스파아제 캐스캐이드 발현을 나타낸 도이다.

도 11은 GaIN/LPS 투여 및 본 발명에 따른 김으로부터 분리한 당단백질 투여에 따른 간 조직의 iNOS, COX-2의 발현을 나타낸 도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0013] 본 발명은 김으로부터 분리된 당단백질을 유효성분으로 함유하는 바이러스성 간 손상의 예방 또는 치료용 조성물을 제공한다.

[0014] 상기 김은 홍조류의 일종으로서 바람직하게는 방사무늬 김(*porphyra yezoensis*)일 수 있다.

- [0015] 상기 바이러스성 간 손상은 염증 유발 물질인 GaIN(D-galactosamine) 또는 LPS(Lipopolysaccharide)로 유발될 수 있으며, 이에 한정하지 않는다.
- [0016] 본 발명에 따른 김으로부터 분리된 당단백질은 당해 기술분야에서 통상적인 방법에 따라 추출 및 분리될 수 있으며, 본 발명에서는 하기 단계를 거쳐 분리하였다.
- [0017] (a) 김 분말을 물로 추출한 후 상층액을 분리하여 1차 농축하는 단계; 및
- [0018] (b) 상기 (a) 단계에서 수득한 물질에 에탄올을 가한 후 다시 상층액을 분리하여 2차 농축하는 단계;
- [0019] 상기 (a) 및 (b) 단계의 1차 및 2차 농축은 당단백질의 추출수율을 높이기 위하여 바람직하게는 3.5~5.0 brix가 되도록 이루어질 수 있다.
- [0020] 상기 단계를 거쳐 얻어진 당단백질의 분자량은 바람직하게는 18 내지 22 kDa일 수 있으며, 더 바람직하게는 20 kDa일 수 있다.
- [0021] 상기 바이러스성 간 손상은 간염, 간경변 및 간암을 포함하는 간 질환을 유발할 수 있으나, 이에 한정되지 않는다.
- [0022] 상기 간염은 A형, B형, C형, D형 및 E형 바이러스성 간염을 포함한다.
- [0023] 상기 바이러스성 간 손상은 A형, B형, C형, D형 및 E형 간염 바이러스로 인해 유발될 수 있다.
- [0024] 또한, 본 발명의 조성물은 김으로부터 분리된 당단백질과 함께 간 손상의 예방 또는 치료 효과를 갖는 공지의 유효성분을 1종 이상 더 함유할 수 있다.
- [0025] 본 발명의 약학적 조성물은 약학적 조성물의 제조에 통상적으로 사용하는 적절한 담체, 부형제 및 희석제를 더 포함할 수 있다. 또한 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽, 에어로졸 등 경구 투여용 제형, 멸균 주사용액, 좌제 및 경피 투여용 제제로 제형화하여 사용될 수 있다. 조성물에 포함될 수 있는 담체, 부형제 및 희석제로는 락토오스, 텍스트로오스, 수크로오스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로오스, 메틸 셀룰로오스, 미정질 셀룰로오스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 들 수 있다. 필요에 따라 충전제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 제형화한다.
- [0026] 본 발명의 약학적 조성물을 경구 투여용 고상 제제로 제형화할 경우, 경구 투여를 위한 고상 제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되는데, 이러한 고상 제제는 상기 추출물에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 칼슘 카르보네이트, 수크로오스 또는 락토오스, 젤라틴 등을 혼합하여 제형화된다. 또한, 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트, 탈크 같은 윤활제들도 사용될 수 있다. 또한, 본 발명의 약학적 조성물을 경구 투여용 액상 제제로 제형화할 수도 있다. 경구 투여를 위한 액상 제제는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데, 이러한 액상 제제에는 통상적으로 사용되는 불활성 희석제 (예를 들면, 정제수, GaIN/LPS, 리퀴드 파라핀) 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 또한, 본 발명의 약학적 조성물은 비경구, 바람직하게는 복강내 투여를 위한 제제로 제형화될 수도 있다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제, 좌제가 포함된다. 멸균된 수용액으로는 한스 용액 (Hank's solution), 링거 용액 (Ringer's solution) 또는 물리적으로 완충된 염수와 같은 적절한 완충용액을 이용할 수 있으며, 비수성용제로, 현탁제로는 프로필렌글리콜, 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 이용될 수 있다. 필요에 따라 방부제, 안정화제, 습윤제 또는 유화제, 삼투압 조절을 위한 염 및/또는 완충제를 이용할 수도 있다. 한편, 좌제의 경우에는 이의 통상적인 기재인 위텡솔 (witepsol), 마크로골, 트윈 (tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다.
- [0027] 본 발명에서 사용되는 용어 "투여"는 임의의 적절한 방법으로 개체에게 소정의 본 발명의 조성물을 제공하는 것을 의미한다. 상기와 같은 방법으로 제형화된 조성물은 유효량으로 비경구 또는 경구 (경피, 피하, 정맥, 근육, 복강등)를 포함한 여러 경로를 통해 투여될 수 있다. 상기에서 "유효량"이란 환자에게 투여하였을 때, 예방 또는 치료 효과를 나타내는 양을 말한다. 본 발명에 따른 조성물의 투여량은 투여 경로, 투여 대상, 연령, 성별, 체중, 개인차 및 질병 상태에 따라 적절히 선택될 수 있다. 바람직하게는, 본 발명의 조성물은 질환의 정도에 따라 유효성분의 함량을 달리할 수 있으나, 바람직하게는 0.1~10000 mg/체중kg/day, 보다 바람직하게는 10~1000mg/체중kg/day의 유효량으로 투여될 수 있다. 본 발명의 조성물은 바이러스성 간 손상의 예방 및 치료를

위하여 단독으로, 또는 수술, 방사선 치료, 호르몬 치료, 화학 치료 및 생물학적 반응 조절제를 사용하는 방법들과 병용하여 사용할 수 있다.

[0028] 본 발명의 조성물은 간 손상의 예방 또는 개선을 목적으로 건강기능식품에 첨가될 수 있다. 본 발명의 김으로부터 분리한 당단백질을 식품 첨가물로 사용할 경우, 상기 김으로부터 분리한 당단백질을 그대로 첨가하거나 다른 식품 또는 식품 성분과 함께 사용될 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다. 유효성분의 혼합량은 사용 목적 (예방, 건강 또는 치료적 처치)에 따라 적합하게 결정될 수 있다. 일반적으로, 식품 또는 음료의 제조 시에 본 발명의 김으로부터 분리한 당단백질은 원료에 대하여 15중량 % 이하, 바람직하게는 10 중량 % 이하의 양으로 첨가된다. 그러나, 건강 및 위생을 목적으로 하거나 또는 건강 조절을 목적으로 하는 장기간의 섭취의 경우에는 상기 범위 이하일 수 있으며, 안전성 면에서 아무런 문제가 없기 때문에 유효성분은 상기 범위 이상의 양으로도 사용될 수 있다.

[0029] 상기 식품의 종류에는 특별한 제한은 없다. 상기 물질을 첨가할 수 있는 식품의 예로는 육류, 소시지, 빵, 초콜릿, 캔디류, 스낵류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류를 포함한 낙농제품, 각종 수프, 음료수, 차, 드링크제, 알코올 음료 및 비타민 복합제 등이 있으며, 통상적인 의미에서의 건강식품을 모두 포함한다.

[0030] 본 발명의 건강음료 조성물은 통상의 음료와 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 포함할 수 있다. 상술한 천연 탄수화물은 포도당, 과당과 같은 모노사카라이드, 말토오스, 수크로오스와 같은 디사카라이드, 및 텍스트린, 사이클로텍스트린과 같은 천연 감미제나, 사카린, 아스파르탐과 같은 합성 감미제 등을 사용할 수 있다. 상기 천연 탄수화물의 비율은 본 발명의 조성물 100 ml 당 일반적으로 약 0.01 내지 10 g, 바람직하게는 약 0.01 내지 0.1 g 이다.

[0031] 상기 외에 본 발명의 조성물은 여러 가지 영양제, 비타민, 전해질, 풍미제, 착색제, 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알코올, 탄산음료에 사용되는 탄산화제 등을 포함할 수 있다. 그 밖에 본 발명의 조성물은 천연 과일주스, 과일주스 음료 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 포함할 수 있다. 이러한 성분은 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있다. 이러한 첨가제의 비율은 크게 중요하진 않지만 본 발명의 조성물 100중량부 당 0.01 내지 0.1 중량부의 범위에서 선택되는 것이 일반적이다.

[0032]

[0033] 이하 본 발명의 이해를 돕기 위하여 바람직한 실시예 및 제조예를 제시한다. 그러나 하기의 실시예 및 제조예는 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐, 실시예 및 제조예에 의해 본 발명의 내용이 한정되는 것은 아니다.

[0034] 실시예 1. 방사무늬 김으로부터 당단백질의 분리

[0035] 본 실험에 사용된 방사무늬 김(*porphyra yezoensis*)은 2013년 부산광역시 기장군에서 구입하여 재료로 사용하였다. 상기 방사무늬 김을 담수에 3회 수세한 후 동결 건조기를 이용하여 건조하였다. 건조된 김을 식품 분쇄기를 이용하여 미세한 분말형태로 분쇄하였다. 분쇄된 김 분말 80g을 증류수 2L와 함께 4시간동안 실온에서 교반하며 추출하고, 추출 후 3,500 rpm에서 20분간 원심분리하여 상층액과 잔사를 분리하였다. 상기 분리된 상층액을 최종적으로 약 4.3 brix가 되도록 농축한 후, 여기에 3배 부피의 GaIN/LPS를 가하고 4℃에서 16시간 반응시키며 침전물과 상층액을 분리하였다. 상층액과 침전물의 혼합을 막기위해 여과를 통해 침전물을 제거하여 당단백질을 분리하였다. 여과지를 통과한 액체는 2차 농축 한 후 동결건조하고 분말화하여 사용하였다. 상기 당단백질의 개략적인 분리 공정을 표 1에 나타내었다.

표 1

작업구분	기 계	원재료 및 재공품	작업 방법
원료배합	배합기	-배합 원료 약재주머니 건조질 (Porphyr a yezoensis) : 4kg 배합수 : 100L	약재주머니에 분쇄된 건조질을 넣어서 추출 1. 배합 온도 : 20±5℃ 2. 배합 시간 : 4시간 3. 배합 RPM : 300 rpm
1차 추출	칼압 추출기	배합된 원료	1. 온도 : 40℃이하(온도가 낮지않도록 주의) 2. 압력 : -0.08 mpa 3. 최종 4.3±0.2 brlx
2차 추출		농축된 원료 추정(EtOH, 99.9%)	1. 농축된 원료와 추정 혼합 (1:3비율) 2. 상온(20±5℃)에서 24시간 당침전
여과		여과망(53micron)	1. 원료를 여과망을 통해 여과하여 당침전물 제거
3차 추출	칼압 추출기	여과액	1. 온도 : 40℃이하(온도가 낮지않도록 주의) 2. 압력 : -0.08 mpa
농축	농축기	농축액	1. 농축액 온도 : -18℃이하(완전히 동결되었는지 확인)
건조건조	건조건조기	농축액	1. 농축액 온도 : 40℃이하(온도가 낮지않도록 주의)
건조건조		건조건조물	1. 농축액 온도 : 40℃이하(온도가 낮지않도록 주의)

실시예 2. 김으로부터 분리한 당단백질의 분석

상기 실시예 1에서 김으로부터 분리한 당단백질의 분자량을 쿠마시 블루 염색을 통해 확인하였으며, 이의 결과를 도 1에 나타내었다.

도 1에 나타낸 바와 같이, 분리된 당단백질은 20kDa의 분자량을 가진 단일밴드로 확인되었다.

또한, 분리된 당단백질의 구성 아미노산을 분석하였으며, 하기 표 2에 나타내었다.

표 2

AA	결과	MOL%	(ug/mg) ^a	(nmol/mg) ^b
CYA*	97.34	0.91	1.94	10.37
ASX**	726.25	6.78	10.29	77.34
GLX**	1865.79	17.42	29.23	198.70
SER	189.25	1.77	2.12	20.15
GLY	1081.55	10.10	8.30	115.18
HIS	0.00	0.00	0.00	0.00
ARG	171.22	1.60	3.18	18.23
THR	437.01	4.08	5.54	46.54
ALA	4860.90	45.37	46.12	517.67
PRO	188.59	1.76	2.31	20.08
TYR	0.00	0.00	0.00	0.00
VAL	282.49	2.64	3.52	30.08
MET	0.00	0.00	0.00	0.00
ILE	154.88	1.45	2.16	16.49
LEU	269.10	2.51	3.76	28.66
PHE	85.34	0.80	1.50	9.09
TRP	116.65	1.09	2.54	12.42
LYS	186.44	1.74	2.90	19.86
총	10712.80	100.00	125.43	1140.87

실험예 1. 김으로부터 분리한 당단백질이 바이러스성 간 조직 손상 및 염증에 미치는 영향

[0043]

1-1. GaIN/LPS 투여를 통한 실험 모델 제조

[0044]

동물실험에 사용된 랫트는 샘타코에서 분양받은 스프라귀-다울레이(sparague dawley)계 랫트(rat)를 사용하였다. 실험은 대조군, GaIN/LPS군, GaIN/LPS+150mg/kg BW군 및 GaIN/LPS+300mg/kg BW군 등 총 4가지 군으로 분류하여 진행되었으며, 5주령의 SD계 랫트 20마리를 각 군당 5마리씩 무작위로 나누어 연립식 사육케이지에 넣고 7일간 순치사육기간을 거쳤다. 이후 실험군에는 4주(28일)간 매일 상기 실시예 1에서 김으로부터 분리한 당단백질 (150mg/kg BW, 300mg/kg BW)을 경구 투여한 뒤, 3.7g/kg BW GaIN/LPS를 4시간 뒤 투여하였다. 사료와 물은 제한하지 않고 제공하였고 4주 후 에테르를 이용하여 마취한 뒤 단두하여 혈액과 간 조직을 적출하였다.

[0045]

1-2. 혈청의 GOT 및 GPT 측정

[0046]

간기능지표인 혈청 GOT(Glutamic oxaloacetic transaminase)와 GPT(Glutamic pyruvic transaminase)는 간세포의 변성과 괴사를 반영하는 효소로서 간조직 손상시 혈중으로 다량 유출된다. 상기 실험에 1-1의 랫트를 단두하여 혈액을 채혈한 뒤 원심분리(2,500 rpm, 20min, 4)하여 혈청을 분리하였으며 간 조직은 식염수에 세척하여 액체질소를 이용해 급속 동결 시킨 뒤 -70℃에 보관하며 실험에 사용하였다. 혈청 중의 GOT 및 GPT는 Reitman-Frankel의 방법에 따라 제조된 GOT 및 GPT 활성 측정용 키트를 사용하여 분광광도계로 505nm에서 흡광도를 측정하였으며 그 결과를 각각 도 2 및 도 3에 나타내었다.

[0047]

도 2에 나타난 바와 같이, GaIN/LPS 투여시 대조군에 비해 GOT가 유의적으로 증가하였으며, 당단백질에 의해 그 수치가 감소함을 확인하였다.

[0048]

또한, 도 3에 나타난 바와 같이, GaIN/LPS 투여시 대조군에 비해 GPT가 유의적으로 증가하였으며, 당단백질에 의해 그 수치가 감소함을 확인하였다. 이는 김으로부터 분리한 당단백질이 GaIN/LPS의 투여로 인한 간 손상을 보호함을 나타낸다.

[0049]

1-3. 간 조직의 GSH 활성 측정

[0050]

GSH(glutathione)는 생체내 독성의 자유라디칼을 소거하여 무독성의 물질로 변화시켜주는 효소로서 GaIN/LPS를 포함한 다양한 다른 독소 및 스트레스로부터 오는 손상으로부터 독성을 제거하여 생체를 보호하는 기능을 가진다. 이의 측정을 위해 간 조직을 50mM phosphate, 1mM EDTA, pH 6-7 완충액에서 균질화 한 후, 4℃에서 15분 동안 10,000g으로 원심분리하여 상층액을 얻었다. 얻은 상층액을 96-웰에 옮기고 칼테일 혼합물(MES buffer, reconstituted cofactor mixture, reconstituted enzyme mixture, water, reconstituted DTNB)을 각 웰에 첨가하여 반응시켰다. 이후 ELISA 플레이트 리더를 이용하여 405-414nm에서 흡광도를 측정하였으며 그 결과를 도 4에 나타내었다.

[0051]

도 4에 나타난 바와 같이, 당단백질을 투여한 랫트군에서 LPS/GaIN을 단독처리한 군에 비하여 GSH의 활성이 증가함을 확인하였다. 이는 당단백질이 지질 과산화와 자유라디칼로부터 간 조직의 손상을 억제함을 나타낸다.

[0052]

1-4. 간 조직의 CAT 측정

[0053]

CAT(Catalase)는 생체 내 다양한 조직에 존재하는 항산화 효소로서 유산소 대사작용이나 독성으로 인하여 발생되어진 과산화수소의 독성을 억제시키는 기능을 하며 반응과정을 통하여 인체에 무해한 물로 변화시키는 역할을 한다. 이의 측정을 위하여 간 조직을 50mM potassium phosphate, 1mM EDTA, pH 7.0 완충액에서 균질화 한 후, 4℃에서 10분 동안 10,000g으로 원심분리하여 상층액을 얻었다. 얻은 상층액을 96-웰에 옮기고 각 웰에 메탄올, 분석 완충액(assay buffer) 및 과산화수소(hydrogen peroxide)를 첨가하여 20분간 실온에서 반응시켰다. 이후 수산화칼륨(potassium hydroxide)과 카탈라아제 purpald를 첨가한 뒤 10분 동안 실온에서 반응시키고 카탈라아제 과요오드산염칼륨(potassium periodate)을 첨가하여 10분 동안 반응시켰다. 이후 ELISA 플레이트 리더를 이용하여 540nm에서 흡광도를 측정하였으며 그 결과를 도 5에 나타내었다.

[0054]

도 5에 나타난 바와 같이, 당단백질을 투여한 랫트군에서 LPS/GaIN을 단독처리한 군에 비하여 CAT의 활성이 증가함을 확인하였다. 이는 당단백질이 지질 과산화와 자유라디칼로부터 간 조직의 손상을 억제함을 나타낸다.

[0055]

1-5. 간 조직의 GST 측정

[0056]

GST는 자유라디칼의 제거와 지질 과산화를 억제시킴으로서 세포나 조직의 손상에 대한 방어작용에 효과적인 역할을 한다. 이의 측정을 위하여 간 조직을 100mM potassium phosphate, 2mM EDTA, pH 7.0 완충액에서 균질화한 후, 4℃에서 10분 동안 10,000g으로 원심분리하여 상층액을 얻었다. 얻은 상층액을 96-웰에 옮기고 각 웰에 분석 완충액(assay buffer) 및 글루타치온(glutathione)을 첨가한 뒤 CDNP(1-chloro-2,4-dinitrobenzene)를 첨가하여 반응을 개시하였다. 이 후 ELISA 플레이트 리더를 이용하여 340nm에서 흡광도를 측정하였으며 그 결과를 도 6에 나타내었다.

[0057]

도 6에 나타난 바와 같이, 당단백질을 투여한 랫트군에서 LPS/GaIN을 단독처리한 군에 비하여 GST의 활성이 증가함을 확인하였다. 이는 당단백질이 지질 과산화와 자유라디칼로부터 간 조직의 손상을 억제함을 나타낸다.

[0058]

1-6. 간 조직의 SOD 측정

[0059]

SOD는 자유라디칼의 제거와 지질 과산화를 억제시킴으로서 세포나 조직의 손상에 대한 방어작용에 효과적인 역할을 한다. 이의 측정을 위하여 간 조직을 20mM HEPES 완충액, 1mM EGTA, 210mM mannitol, 70mM sucrose, pH 7.0 완충액에서 균질화한 후, 4℃에서 10분 동안 10,000g으로 원심분리하여 상층액을 얻었다. 얻은 상층액을 96-웰에 옮기고 각 웰에 radical detector를 첨가한 뒤 잔틴산화효소(xanthine oxidase)를 첨가하여 반응을 개시하였다. 이 후 ELISA 플레이트 리더를 이용하여 440nm에서 흡광도를 측정하였으며 그 결과를 도 7에 나타내었다.

[0060]

도 7에 나타난 바와 같이, 당단백질을 투여한 랫트군에서 LPS/GaIN을 단독처리한 군에 비하여 SOD의 활성이 증가함을 확인하였다. 이는 당단백질이 지질 과산화와 자유라디칼로부터 간 조직의 손상을 억제함을 나타낸다.

[0061]

1-7. 간 조직의 TBARS 측정

[0062]

TBARS(thiobarbituric acid reactive substances)는 간 조직의 지질 과산화 반응을 확인하기 위한 지표로서, 이의 측정을 위하여 간 조직을 137mM NaCl, 2.7mM KCl, 10mM Na₂HPO₄, 2mM KH₂PO₄, 1X BHT, pH 7.0 완충액에서 균질화한 후, 1.5ml tube에 옮기고 각 tube에 SDS lysis solution을 넣어 5분간 실온에서 반응하였다. 반응 직후 TBA reagent를 첨가하여 95℃에서 60분간 반응시키고 얼음 위에서 5분가량 보관하여 실온까지 반응액의 온도를 낮춘 다음 3,000rpm에서 15분간 원심분리하여 상층액만 회수하였다. 이 후 ELISA 플레이트 리더를 이용하여 532nm에서 흡광도를 측정하였으며, 그 결과를 도 8에 나타내었다.

[0063]

도 8에 나타난 바와 같이, LPS/GaIN을 투여한 랫트군의 경우 지질 과산화 반응이 대조군에 비하여 증가하였으나, 당단백질을 투여한 랫트군의 경우 간 조직의 지질 과산화 반응을 억제시켜 독성에 대한 보호 효과를 나타냄을 확인하였다.

[0064]

1-8. 간 조직의 알부민 측정

[0065]

알부민은 간에서 생성되는 단백질의 일종으로서 간기능의 이상시에는 알부민의 생성이 감소하여 혈중의 알부민 수치가 감소되는 성질을 가지고 있다. 이러한 특징을 이용하여서 간기능의 이상 유무를 판단하는 지표로서 활용된다. 이의 측정을 위하여 분리된 혈장을 96-웰에 옮기고 각 웰에 radical detector를 넣은 후 잔틴산화효소(xanthine oxidase)를 넣어 반응을 개시하였다. 20분 후 ELISA 플레이트 리더를 이용하여 440nm에서 흡광도를 측정하였으며, 그 결과를 도 9에 나타내었다.

[0066]

도 9에 나타난 바와 같이, LPS/GaIN을 단독 투여한 랫트군에서 알부민의 수치가 대조군에 비하여 감소하였음을 확인하였다. 이는 LPS/GaIN의 독성으로 인하여 간기능이 저하되었음을 의미하며 대조적으로 당단백질을 투여한 랫트군에서는 이러한 알부민의 감소가 대조군 수준으로 회복함을 확인하였다.

[0067]

1-9. 간 조직의 카스파아제 캐스캐이드, iNOS 및 COX-2의 측정

[0068] GaIN/LPS에 의한 간 손상시 세포사멸을 확인하기 위하여 카스파아제 캐스케이드의 활성을 측정하였으며, 염증유발 인자인 iNOS, COX-2를 측정하였다. 먼저, 간 조직을 단백질 용리 완충액(50mM Tris, 5mM EDTA, 150mM NaCl, 1% Triton X-100)에서 균질화 한 후, 4℃에서 20분 동안 10,000g으로 원심분리하여 상층액을 얻었다. 얻은 상층액의 단백질 함량 측정을 위해 BCA 단백질 분석 키트(피어스 바이오테크놀로지)를 이용하여 각 군별로 동일한 단백질이 실험에 사용될 수 있도록 준비하였다. 그 후 단백질을 12.5% 폴리아크릴아미드 겔 상에서 소듐 도데실 설페이트-올리아크릴아미드 겔 전기영동으로 분리하고 폴리비닐 디플루오라이드(PVDF) 멤브레인으로 옮겼다. 단백질을 옮겨진 멤브레인을 1% BSA를 함유한 TBS-T(10mM Tris-Cl, 150mM NaCl, pH 7.5, 0.1% Tween 20)를 이용하여 차단하고 4℃에서 지시된 항체를 이용해 단백질을 반응시켰다. 2차 항체는 퍼옥시다아제-복합 염소 항-마우스 또는 레빗 항체를 사용하였다. 항체와 반응한 PVDF 멤브레인 상의 단백질을 확장 화학발광물을 이용하여 반응시킨 후, X-ray 필름을 통하여 발광 정도를 시각화하였다.

[0069] 상기 발광 정도를 통해 측정한 카스파아제 캐스케이드의 활성을 도 10에 나타내었다.

[0070] 도 10에 나타난 바와 같이, 랫트에 GaIN/LPS를 투여한 경우 GaIN/LPS의 독성으로 인하여 카스파아제 3, 8, 9의 활성이 증가하였으나, 장기적인 GaIN/LPS 투여와 함께 당단백질을 투여한 랫트군에서는 이러한 카스파아제 3, 8, 9의 활성이 대조군 수준으로 회복함을 확인하였다. 이는 당단백질이 GaIN/LPS에 의한 간 조직의 세포사멸을 억제함을 나타낸다.

[0071] 또한, iNOS 및 COX-2의 활성을 도 11에 나타내었다.

[0072] 도 11에 나타난 바와 같이, 랫트에 GaIN/LPS를 투여한 경우 iNOS 및 COX-2의 활성이 증가하여 간 조직의 염증반응을 일으키는 것을 확인하였으나, 장기적인 GaIN/LPS 투여와 함께 당단백질을 투여한 랫트군에서는 iNOS 및 COX-2 수치가 감소함을 확인하였다. 이는 당단백질이 GaIN/LPS에 의한 간 조직의 염증 유발을 억제함을 나타낸다.

[0073] 이하 본 발명의 약학적 조성물과 식품 조성물의 제제예를 설명하나, 이는 본 발명을 한정하고자 함이 아닌 단지 구체적으로 설명하고자 함이다.

[0074] 제제예 1. 약학적 제제

[0075] 1-1. 산제의 제조

[0076] 김으로부터 분리한 당단백질 20mg

[0077] 유당 100 mg

[0078] 탈크 10 mg

[0079] 상기의 성분들을 혼합하고 기밀포에 충전하여 산제를 제조한다.

[0080] 1-2. 정제의 제조

[0081] 김으로부터 분리한 당단백질 10 mg

[0082] 옥수수전분 100 mg

[0083] 유당 100 mg

[0084] 스테아린산 마그네슘 2 mg

[0085] 상기의 성분들을 혼합한 후 통상의 정제의 제조방법에 따라서 타정하여 정제를 제조한다.

[0086] 1-3. 캡슐제의 제조

[0087] 김으로부터 분리한 당단백질 10 mg

[0088]	결정성 셀룰로오스	3 mg
[0089]	락토오스	14.8 mg
[0090]	마그네슘 스테아레이트	0.2 mg
[0091]	통상의 캡슐제 제조방법에 따라 상기의 성분을 혼합하고 젤라틴 캡슐에 충전하여 캡슐제를 제조한다.	
[0092]	1-4. 주사제의 제조	
[0093]	김으로부터 분리한 당단백질	10 mg
[0094]	만니톨	180 mg
[0095]	주사용 멸균 증류수	2974 mg
[0096]	Na ₂ HPO ₄ · 2H ₂ O	26 mg
[0097]	통상의 주사제의 제조방법에 따라 1 앰플당 (2 ml) 상기의 성분 함량으로 제조한다.	
[0098]	1-5. 액제의 제조	
[0099]	김으로부터 분리한 당단백질	20 mg
[0100]	이성화당	10 g
[0101]	만니톨	5 g
[0102]	정제수	적량
[0103]	통상의 액제의 제조방법에 따라 정제수에 각각의 성분을 가하여 용해시키고 레몬향을 적량 가한 다음 상기의 성분을 혼합한 다음 정제수를 가하여 전체를 정제수를 가하여 전체 100 ml로 조절한 후 갈색병에 충전하여 멸균시켜 액제를 제조한다.	
[0104]	<u>제제예 2. 식품 제제</u>	
[0105]	2-1. 건강식품의 제조	
[0106]	김으로부터 분리한 당단백질	100 mg
[0107]	비타민 혼합물	적량
[0108]	비타민 A 아세테이트	70 μg
[0109]	비타민 E	1.0 mg
[0110]	비타민 B1	0.13 mg
[0111]	비타민 B2	0.15 mg
[0112]	비타민 B6	0.5 mg
[0113]	비타민 B12	0.2 μg
[0114]	비타민 C	10 mg
[0115]	비오틴	10 μg
[0116]	니코틴산아미드	1.7 mg
[0117]	엽산	50 μg
[0118]	판토텐산 칼슘	0.5 mg

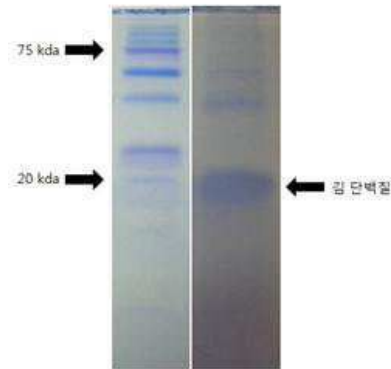
[0119]	무기질 혼합물	적량
[0120]	황산제1철	1.75 mg
[0121]	산화아연	0.82 mg
[0122]	탄산마그네슘	25.3 mg
[0123]	제1인산칼륨	15 mg
[0124]	제2인산칼슘	55 mg
[0125]	구연산칼륨	90 mg
[0126]	탄산칼슘	100 mg
[0127]	염화마그네슘	24.8 mg
[0128]	상기의 비타민 및 미네랄 혼합물의 조성비는 비교적 건강식품에 적합한 성분을 바람직한 실시예로 혼합 조성하였지만, 그 배합비를 임의로 변형 실시하여도 무방하며, 통상의 건강식품 제조방법에 따라 상기의 성분을 혼합한 다음, 과립을 제조하고, 통상의 방법에 따라 건강식품 조성물 제조에 사용할 수 있다.	

[0129] **2-2. 건강음료의 제조**

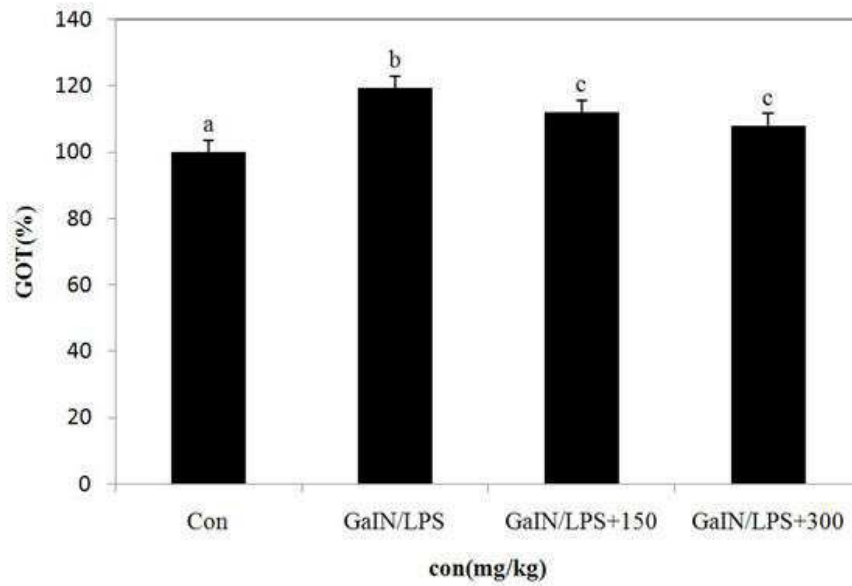
[0130]	김으로부터 분리한 당단백질	100 mg
[0131]	비타민 C	15 g
[0132]	비타민 E(분말)	100 g
[0133]	젖산철	19.75 g
[0134]	산화아연	3.5 g
[0135]	니코틴산아미드	3.5 g
[0136]	비타민 A	0.2 g
[0137]	비타민 B1	0.25 g
[0138]	비타민 B2	0.3 g
[0139]	물	정량
[0140]	통상의 건강음료 제조방법에 따라 상기의 성분을 혼합한 다음, 약 1시간 동안 85 ℃에서 교반 가열한 후, 만들어진 용액을 여과하여 멸균된 2 l 용기에 취득하여 밀봉 멸균한 뒤 냉장 보관한 다음 본 발명의 건강음료 조성물 제조에 사용한다.	
[0141]	상기 조성비는 비교적 기호음료에 적합한 성분을 바람직한 실시예로 혼합 조성하였지만 수요계층이나, 수요국가, 사용용도 등 지역적, 민족적 기호도에 따라서 그 배합비를 임의로 변형 실시하여도 무방하다.	

도면

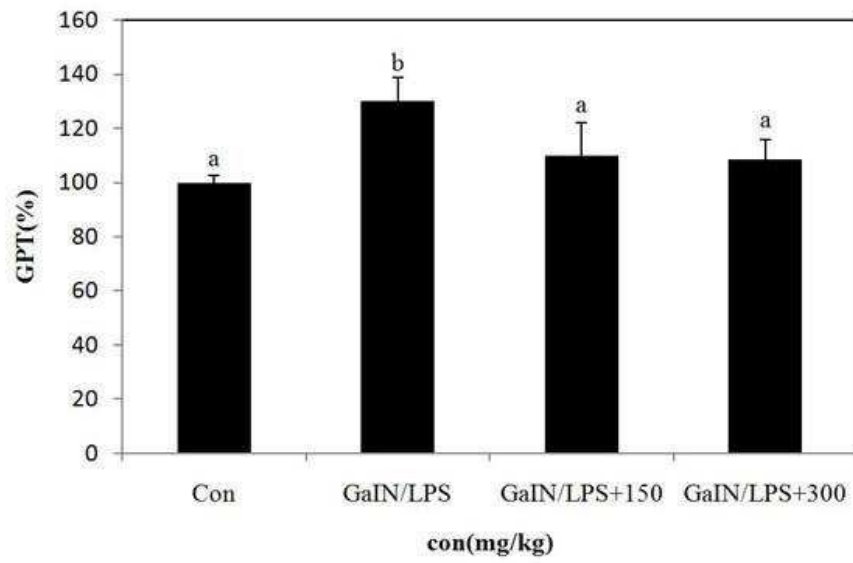
도면1



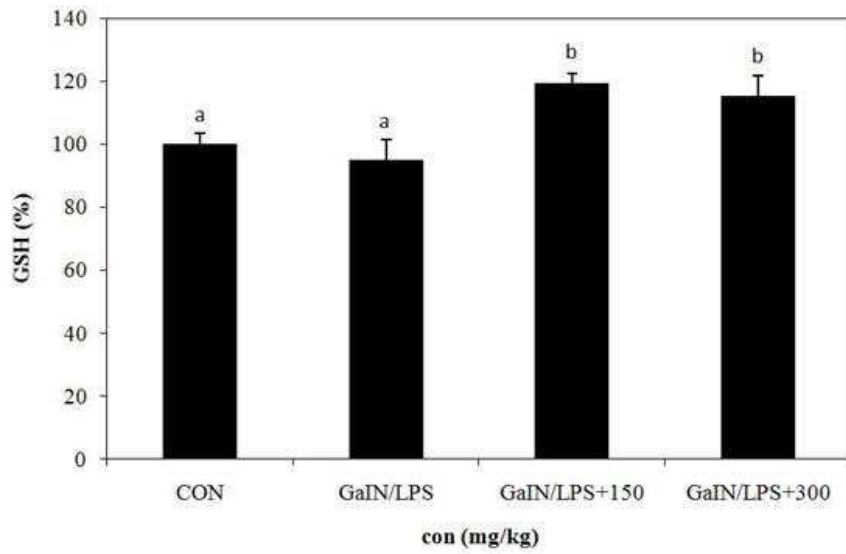
도면2



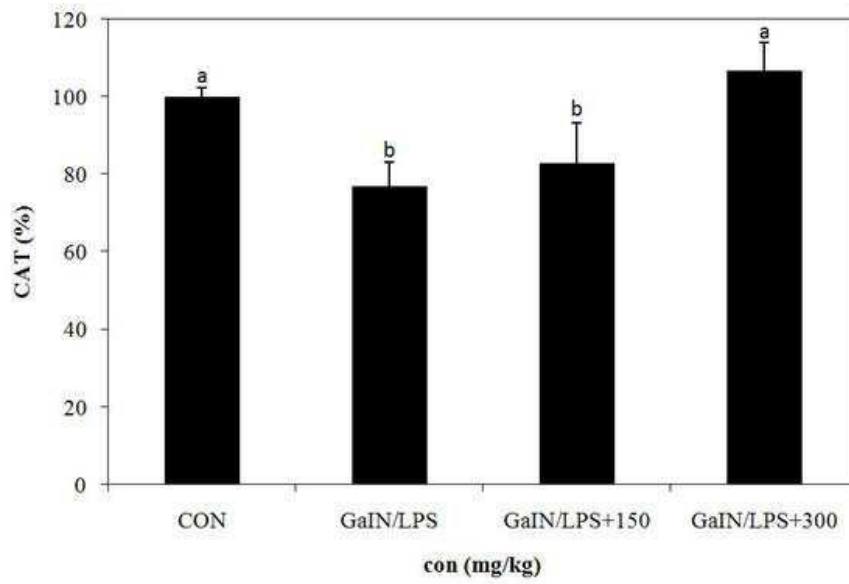
도면3



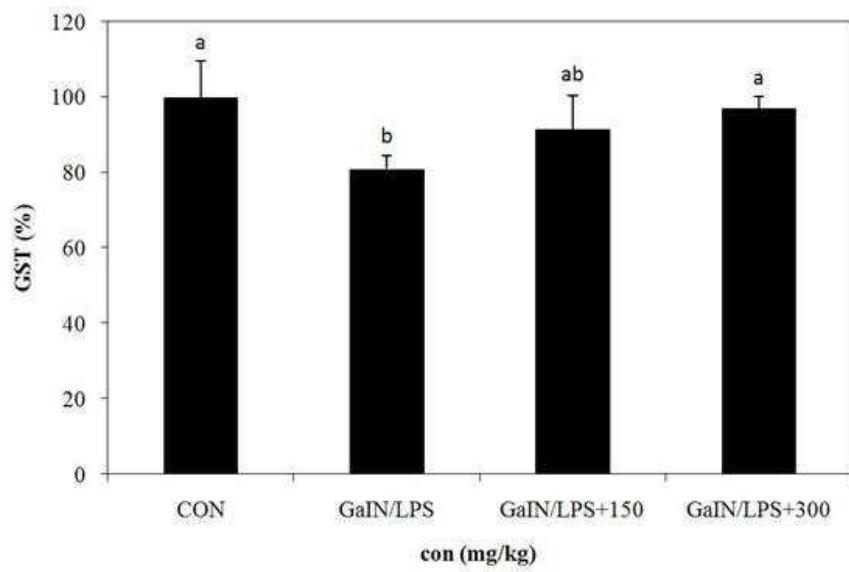
도면4



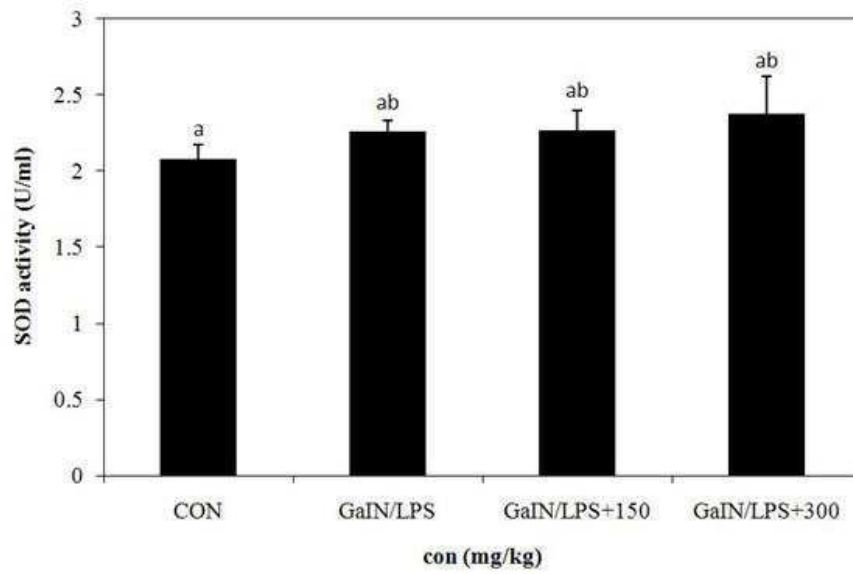
도면5



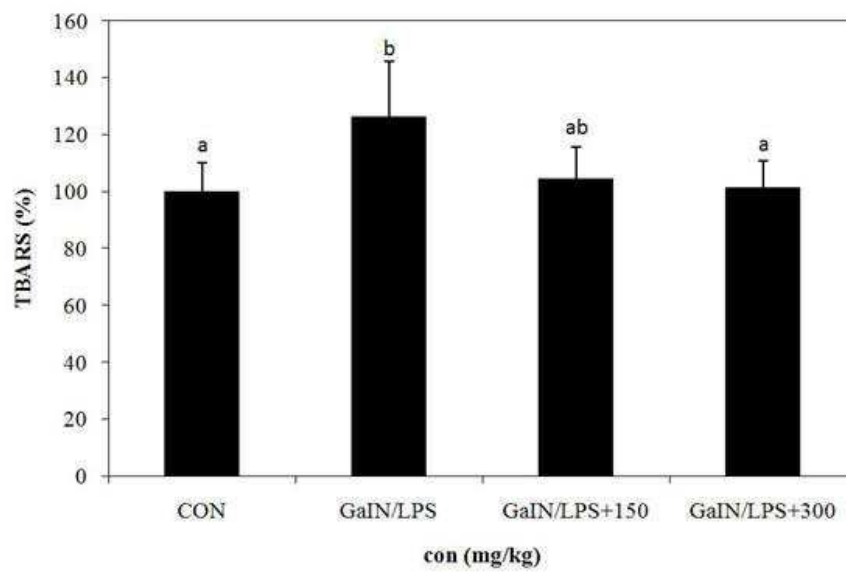
도면6



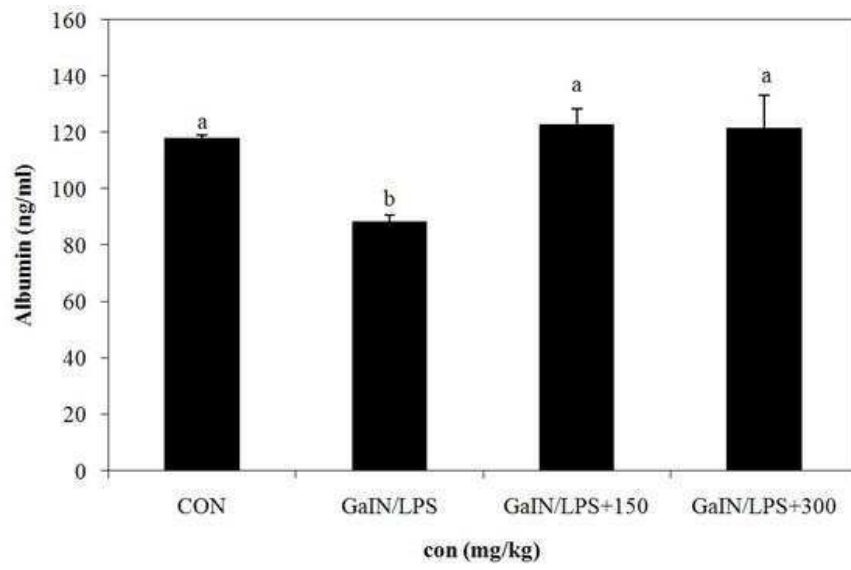
도면7



도면8



도면9



도면10



도면11

