

봉화은어의 생리활성 및 기능성 연구

Bioactivity and Functionality of Bonghwa
Sweetfish

KAERI

연 구 기 관
한 국 원 자 력 연 구 원

봉 화 군

제 출 문

문화공수 귀하

본 보고서를 “문화공수의 해외화선 및 기능선 연구” 용역 최종보고서로 제출합니다.

2010. 4.

연구기관명 : 한국원자력연구원

연구책임자 : 김재훈

연구위원 : 이주공

최종인

유민석

공모한

선다공

전원공

요 약 문

I. 제 목

봉화은어의 생리활성 및 기능성 연구

II. 연구개발의 목적 및 필요성

1. 연구개발 최종목표

**봉화은어의 생리활성 및 기능성 평가를 통해 봉화은어를 이용한
가공식품 및 기능성 식품 개발 등 산업화를 위한 기초자료 확보**

2. 연구개발의 필요성

- 은어는 소비기간(7월 ~ 8월)과 소비방법(회, 조림, 매운탕 등)이 한정되어 있어 농가 소득이 지속적이지 못함
- 연중 일반소비자들이 일반매장이나 인터넷을 통해 구입 가능하고 부과적인 조리과정 없이 소비가 가능한 훈제은어 과자류 및 스낵류 등 다양한 제품 개발이 필요함
- 이러한 제품들을 생산하기 위해 보다 효율적이고 체계화된 훈제은어 생산 공정을 개발하는 것이 필수적임
- 최근 급격한 산업사회의 발전과 더불어 식생활의 서구화로 각종 성인병이 크게 증가하고 있으며, 이러한 만성적인 질병을 치료하기 위한 합성의약품이 널리 사용되고 있으나 독성 및 안전성이 문제시 되면서 천연 유래의 보다 안전하고 효능이 있는 생리화합물질의 개발과 더불어 그를 이용한 다양한 기능성식품의 개발이 필요함
- 따라서, 은어 및 그 가공제품의 생리활성에 대한 과학적 근거를 마련하고 이를 토대로 한 기능성식품 개발 기초자료로 활용하고자 함

Ⅲ. 연구개발의 내용 및 범위

- 추출조건에 따른 다양한 생리활성 물질의 분획
- 생리활성 물질 분획물에 따른 항산화, 면역증진, 항암활성, 간손상보호 효능 등 다양한 생리활성 효능 탐색
- 동물실험을 이용한 기능성 입증 연구
- 은어 기능성 물질 성분 분석

Ⅳ. 연구개발결과

- 본 연구는 봉화은어의 생리활성 및 기능성 평가를 통해 은어를 이용한 가공식품 및 기능성식품 개발 등 산업화를 위한 기초자료 확보를 위해 수행되었으며, 연구결과를 요약하면 다음과 같음
- 봉화은어 및 훈제은어의 성분분석 결과 훈제은어는 은어(생물)에 비해 수분함량이 낮기 때문에 열량, 탄수화물, 단백질, 지방과 나트륨, 칼슘의 함량이 높은 것으로 나타남
- 지방산 조성 분석결과 은어는 관절염 및 고혈압에 효과가 있는 것으로 알려져 있는 기능성 물질인 오메가-3 지방산인 DHA와 EPA가 전체 지방산중 약 30% 정도 함유되어 있어, 고등어가 약 20 - 25%인 것을 감안할 때 오메가-3 지방산이 다량함유된 것으로 나타남
- 은어의 생리활성 물질을 탐색하기 위해 은어로부터 단백질을 분리하여 단백질 소화효소를 이용하여 펩타이드를 생산한 후 다양한 생리활성을 분석함. 그 결과 항산화, 항고혈압, 항염증, 미백효과가 존재하는 것으로 나타났으나, 암세포 생육억제 효과는 거의 없는 것으로 나타남. 특히, 은어 단백질과 펩타이드는 항염증 및 미백 효과가 우수한 것으로 나타나 이에 대해 보다 구체적인 실험을 수행함
- 그 결과 은어 단백질 및 펩타이드는 항염증 및 면역조절 활성 즉, 염증반

응인자로서의 산화질소(nitric oxide, NO) 및 사이토카인(종양괴사인자 (TNF)- α , IL-6, IL-1 β)와 프로스타글란딘 E2(prostaglandin, PGE2)의 생성을 억제하고, 사이토카인과 산화질소의 생성을 조절하는 단백질인 iNOS 및 염증 반응의 매개체인 사이클로옥시게나제2(cyclooxygenase, COX-2)등과 같은 단백질을 생성하는 mRNA의 생성을 억제하여 면역조절에 관여하는 대식세포(macrophage)의 기능을 조절하는 효과를 가지고 있어 염증 면역반응에 의한 질환의 예방 및 치료에 매우 유용한 것으로 확인됨

- 또한, 은어 단백질과 펩타이드는 미백효과 즉, 피부의 기미, 주근깨 및 피부 색소 침착의 원인이 되는 물질인 멜라닌 생성을 막아주는 티로시나제 활성 억제효과, 멜라닌 합성 억제효과 및 항산화 효과가 우수한 것으로 나타나 피부 미백 및 노화를 억제할 수 있는 기능성 화장품 원료로 사용될 수 있을 것으로 기대됨

V. 연구개발결과의 활용계획

- 본 연구는 봉화군의 특화 상품인 은어의 생리학적 분석 자료를 제공함과 더불어 다양한 가공식품을 개발함으로써 봉화의 특화 상품의 고부가화가능
- 고부가 기능성 상품 개발로 지역경제 활성화 및 수출에 기여할 수 있는 등 지역발전 및 국가 경쟁력 향상을 도모할 수 있음
- 봉화은어를 이용한 각종 식품 개발로 지역 식품 산업의 확장뿐만 아니라 지역 인지도를 향상하는데 이바지를 할 것임
- 연구결과는 관련 산업계와 연계하여 협력연구 추진으로 실용화 유도 및 개발된 요소기술의 특성과 실용성을 관련 기관 및 산업체와의 조사/정보 교류, 실증시험을 통해 산업화 타당성을 검토

S U M M A R Y

I. Project Title

Bioactivity and Functionality of Bonghwa Sweetfish

II. Objective and Importance of the Project

1. Objective of the research

To evaluate bioactivity and functionality of Bonghwa sweetfish to develop processed and functional foods

2. Justification of the research

- Because consumption time and cooking methods are limited, producers' income is discontinuous
- Various snacks should be developed, using sweetfish, and the products should be available both supermarkets and internet
- To produce the products, efficient and systemic processing is necessary
- Recently, people have been suffered by adult diseases because of westernized food consumption, and thus synthesized pharmaceuticals are generally used for therapeutic purposes. However, the concerns about toxicity and safety of these pharmaceuticals are growing. Hence, biomaterials from natural compounds should be developed and various functional foods should be developed with the biomaterials
- Therefore, objectives of this study was to obtain scientific results about bioactivity of sweetfish and processed foods using sweetfish

III. Scope and Contents of the Project

- Obtaining fraction of biomaterials under various conditions
- Evaluation of the fractions for antioxidation activity, immune activity,

anticancer activity, and damaged liver recovery

- Evaluation of bioactivity of sweetfish using animal model
- Analysis of biomaterials from sweetfish

IV. Results of the Project

- Smoked sweetfish had higher contents of calories, carbohydrate, protein, fat, sodium, and calcium than unsmoked sweetfish
- DHA and EPA which are omega-3 fatty acid and have therapeutic effects on arthritis and high blood pressure
- Proteins and peptide from sweetfish had various bioactivities such as antioxidation, hypertensive, especially for antiinflammatory, and whitening effects. However no anticancer effect was observed
- The proteins and peptide suppressed nitric oxide and cytokines (TNF-alpha, IL-6, IL-1 beta), and prostaglandin (PGE2) productions, and mRNA related iNOS and cyclooxygenase (COX-2), which are related to inflammation
- The proteins and peptide prevented tyrosinase formation, which is related formation of melanin, and also showed preventive effects of melanin synthesis, antioxidation and anti-aging effects. Thus, the proteins and peptides from sweetfish may be useful source for cosmetics

V. Application of the Project Results

- These results can be used to develop processed foods using sweetfish that is specialized products from Bonghwa.
- Production of high value-added products with Bonghwa sweetfish may improve local economic aspect and national competency
- Production of various foods will expand food industry in Bonghwa and improve awareness of Bonghwa
- Commercialization of these results will be tried through the cooperations with the industry, and feasibility will be reviewed a verification test with related agency and the industry

CONTENTS

Chapter 1. Material & Methods	1
1. Extraction of protein from sweet fish	1
2. Extraction of peptide from sweet fish	1
3. Determination of molecular weight	1
4. Determination of antioxidative activity	2
5. Inhibition of tyrosinase activity	3
6. Production of melanin	3
7. Proliferation of macrophage	4
8. Production of nitric oxide (NO)	5
9. Production of cytokines	6
10. Inhibition of PGE2 production	6
11. Production of mRNA	6
12. Western Blotting	7
13. Proliferation of spleen cells	8
14. Analysis of approximate composition	9
Chapter 2. Contents and Results	14
Section 1. Preparation of protein and peptide	14
1. Isolation of protein and peptide from sweet fish	14

Section 2. Physiological activity of sweet fish	15
1. Antioxidant activity	15
2. Whitening effect	16
3. Anti-hypertension activity	21
4. Anti-tumor activity	22
Section 3. Physiological activity of sweet fish in vivo system	23
1. Immunological activity	23
2. Anti-inflammation activity	25
Section 4. Evaluation of functional compounds	30
1. Approximate composition and minerals	30
2. Fatty acid composition	32
Chapter 3. References	34
Attachment. Patents	36
Annex. Publish	88

목 차

제 1 장 연구재료 및 실험방법 1

1. 재료 및 실험방법 1

가. 은어 단백질의 추출	1
나. 은어 펩타이드 제조	1
다. 단백질의 분자량 분포확인	1
라. DPPH법을 이용한 항산화 효과 측정	2
마. 티로시나제의 저해효과 확인	3
바. B16BL6 멜라노사이트를 이용한 멜라닌 생성 억제효과 측정	3
사. 단백질 및 펩타이드 추출물의 대식세포(RAW264.7) 생존율 실험	4
아. LPS 처리에 의해 유도된 산화질소(NO)의 생성억제 활성 실험	5
자. LPS 처리에 의해 유도된 전염증성 사이토카인의 분비억제 활성	6
차. 프로스타글란딘(PG) E ₂ 생성 저해 활성	6
카. RT-PCR을 이용한 세포내 mRNA 발현 측정	6
타. Western Blotting	7
파. 마우스 비장세포의 면역활성	8
하. 일반성분 분석	9

제 2 장 연구개발 수행내용 및 결과 14

1. 추출조건에 따른 다양한 생리활성 물질의 분획 14

가. 은어 단백질 및 펩타이드 분획	14
---------------------------	----

2. 은어의 생리활성 효능 탐색	15
가. 항산화 활성	15
나. 미백 효과	16
다. 항고혈압 효과	21
라. 암세포 독성	22
3. 동물실험을 이용한 기능성 입증 연구	23
가. 면역활성	23
나. 항염증 효과	25
4. 은어의 기능성 성분 분석	30
가. 일반성분 및 미량성분	30
나. 지방산 조성	32
제 3 장 참고문헌	34
[첨부] 특허출원 명세서	36
[별지] 학술논문 발표	88

제 1 장 연구재료 및 실험방법

1. 재료 및 실험 방법

가. 은어 단백질의 추출

실험에 사용된 은어 및 훈제은어는 경상북도 봉화군에서 구입하여, 냉동 동결건조하여 수분을 제거하고, 분쇄기를 사용하여 분쇄하였다. 분쇄된 은어 100 g에 1 L의 인산완충용액(pH 7.4) 가하여 12시간동안 4°C 냉장상태에서 마그네틱바를 사용하여 계속해서 교반하면서 단백질을 추출하였다. 다음으로 원심분리기를 이용하여 교반액을 10,000 rpm으로 30 분간 원심분리하여 지질 및 불용성 부분을 제거 하였다. 이용액을 0.45 μ M 및 0.22 μ M의 크기를 가진 필터로 순차적으로 통과시켜 여과하고 동결건조 하여 은어 단백질로 실험에 사용하였다.

나. 은어 펩타이드 제조

분쇄된 은어 100 g 에 각각의 효소가 첨가된 1 L의 인산완충용액(pH 7.4) 을 가하여 36°C에서 12시간 동안 웨이킹 인큐베이터에서 250 rpm 으로 교반 하면서 보관하여 단백질이 분해된 펩타이드를 얻었다. 교반 후 10분간 100°C 로 가열하여 효소를 불활성화 하여 가수분해 반응을 종결하였다. 다음으로 원심분리기를 이용하여 펩타이드 추출액을 10,000 rpm으로 30분간 원심분리 하여 지질 및 불용성 부분을 제거 하였으며, 이용액을 0.45 μ M 및 0.22 μ M 의 크기를 가진 필터로 순차적으로 통과, 여과시키고 동결건조 하여 은어 펩타이드 추출물로 실험에 사용하였다.

다. 단백질의 분자량 분포확인

시료의 분자량 분포를 측정하기 위하여 SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis)를 실시하였다. 전기영동은 4~

12% polyacrylamide gel에서 실시하였다. 은어 단백질 및 펩타이드를 전기영동용 sample buffer와 1:4로 혼합한 후 70°C에서 10분간 가열하여 시료를 준비하였다. 전기영동은 200 V에서 30분 동안 전개하였다. 전개가 완료된 gel을 Comassie Blue 로 염색함으로써 단백질의 band 및 단백질의 분자량 분포를 확인하였다.

라. DPPH법을 이용한 항산화 효과 측정

은어 단백질 및 펩타이드의 항산화효과를 확인하기 위해 DPPH법을 이용하여 항산화 활성을 측정하였다. DPPH법은 비교적 안정한 라디칼인 DPPH (2,2-Di(4-tert-octylphenyl)-1-picrylhydrazyl free radical)를 사용하여 환원력에 의한 항산화 활성을 측정한다. 피검물질에 의해 DPPH가 환원되어 흡광도가 감소하는 정도를 비교하여 파장 517 nm에서 자유라디칼 소거율을 측정한다. 사용한 시약으로는 DPPH (Aldrich, chem. co., MW=618.76) 0.1 mM 용액으로서 61.88 mg을 메탄올에 용해하여 100 mL로 하여 평가하였다. 96-well plate에 0.1 mM DPPH 용액 0.15 mL에 시료용액 0.15 mL를 가하여 교반하고 25°C에서 10분간 반응시킨 후 517 nm에서 흡광도 St를 측정하였다. 대조군은 시료용액 대신에 증류수를 사용한 것을 상기와 동일하게 조작하여 흡광도 Bt를 측정하고 시료용액의 블랭크(Blank)는 0.1 mM DPPH 용액 대신에 메탄올을 사용해 동일하게 조작하여 흡광도 Bo를 측정하였다. 억제율은 아래의 식에 의하여 계산 하였다.

$$\text{억제율(\%)} = \frac{[1-(St-So)]}{(Bt-Bo)} \times 100$$

St : 시료용액의 자유라디칼 소거 후의 517 nm에서의 흡광도

Bt : 공시험용액의 자유라디칼 소거 후의 517 nm에서의 흡광도

So : 시료용액의 자유라디칼 무침가시 반응 전의 517 nm에서의 흡광도

Bo : 공시험용액의 자유라디칼 무침가시 반응 전의 517 nm에서의 흡광도

마. 티로시나제의 저해효과 확인

티로시나제는 생체내에서 티로신(tyrosine)이라는 물질의 산화과정을 촉진하여 멜라닌이 생성되게 도와주는 효소이다. 본 실험에서는 이 효소의 기능을 억제하여 티로신이 산화되고 멜라닌 형성과정에 의해 생겨나는 흑색의 고분자물질의 멜라닌의 억제 정도를 측정하여 미백효과를 판정하였다.

각 시료들의 티로시나제에 대한 저해활성은 시료 15 μ L를 96-well plate에 넣고, 50 mM 인산 완충액(pH 6.5) 150 μ L, 1.5 mM L-티로신 용액 25 μ L를 넣은 후, 머쉬룸 티로시나제(1,500 units/ml, Sigma) 10 μ L를 첨가하여 37°C에서 20분간 반응시킨 후, 흡광 광도계(microplate reader, ELx800, 미국)를 사용하여 490 nm에서 흡광도를 측정하여 티로시나제에 대한 활성 저해율을 측정하였다. 티로시나제에 대한 활성 저해율(%)은 아래의 식에 의하여 계산하였다.

$$\text{저해율(\%)} = [(D-C)-(B-A)/(D-C)] \times 100$$

A : 시료를 넣은 웰의 반응전 흡광도

B : 시료를 넣은 웰의 반응후 흡광도

C : 시료를 넣지 않은 웰의 반응전 흡광도

D : 시료를 넣지 않은 웰의 반응후 흡광도

바. B16BL6 멜라노사이트를 이용한 멜라닌 생성 억제효과 측정

은어 단백질 및 펩타이드의 미백효과를 확인하기 위해 B16BL6 멜라노사이트에 대한 멜라닌 생성 억제 정도에 따라 미백효과를 판단하였다. 본 실험에 사용된 B16BL6 멜라노사이트는 마우스에서 유래한 세포주이며, 멜라닌이라는 흑색색소를 분비하는 세포이다. 이 세포의 인공배양 중에 α -MSH (melanocyte stimulating hormon)을 처리하여 세포내 멜라닌 합성을 증폭시키고 여기에 시료를 처리하여 멜라닌 흑색색소가 감소하는 정도를 비교 평

가하였다. B16BL6 멜라노사이트는 ATCC(American Type Culture Collection, 기탁번호 : CRL6322)로부터 분양받아 사용하였다.

B16BL6 멜라노사이트를 6-well plate에 각 웰 당 2×10^6 농도로 분주하고 세포를 부착시킨 후 멜라닌의 생합성 유도를 촉진시키기 위하여 α -MSH(melanocyte stimulating hormon)을 웰 당 10 nM을 처리하여 멜라닌의 생합성을 증폭시킨 후, 독성을 유발하지 않는 농도로 은어 단백질 및 펩타이드를 처리하여 72시간동안 배양하였다. 72시간 배양 후 세포를 트립신-EDTA로 떼어낸 후 세포수를 측정한 다음 원심분리하여 세포 펠릿을 얻었다. 얻어진 세포 펠릿을 PBS로 3회 세척한 후 균질화 버퍼(50 mM 소듐 포스페이트, pH 6.8, 1% Triton X-100, 2 mM PMSF) 1 mL를 첨가하여 5분간 와류시켜 세포를 파쇄하였다. 원심분리(3,000 rpm, 10분)하여 얻은 세포 여액에 1 N NaOH를 첨가하여 추출된 멜라닌을 용해한 후 흡광광도계로 405 nm에서 멜라닌의 흡광도를 측정한 다음, 농도별, 흡광도별로 작성된 멜라닌 표준곡선에 대입하여 멜라닌의 농도를 계산하였다.

사. 단백질 및 펩타이드 추출물의 대식세포(RAW264.7) 생존율 실험

은어 단백질 및 펩타이드의 염증억제 반응이 세포독성에서 기인한 비특이적 반응에서 유도되는지를 확인하기 위해 세포생존율에 미치는 효과를 측정하였다. 이 세포의 배양 중에 시료를 처리하고 세포에서 세포 증식(cell proliferation)을 측정하여 판단하였다. RAW 264.7의 세포 증식(cell proliferation) 측정은 다음과 같이 행하였다. RAW 264.7 세포를 96-well plate에 각 웰 당 3×10^4 농도의 세포와 세포배양 배지 100 μ L를 넣고 12시간 동안 세포를 부착시킨 후 은어 단백질 및 펩타이드를 각각 200 μ g/mL의 농도로 시료를 처리하여 24시간동안 배양하였다. 24시간 배양 후 배지를 제거하고, 각 웰 당 MTT 용액(5 mg/ml) 30 μ L를 넣은 후 1시간동안 37°C CO₂ 인큐베이터에서 배양하였다. 배지를 제거하고 DMSO(dimethyl sulfoxide)을 100 μ L씩 넣어주었다. 5분간 진탕하여 세포를 용해시키고, 마이

크로플레이트 판독기에서 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포 생존율 (%)은 아래식에 의해 계산되었다.

$$\text{세포생존율(\%)} = [\text{St} / \text{Bt}] \times 100$$

Bt : 시료를 처리하지 않은 웰을 발색 반응한 웰의 595 nm 흡광도

St : 시료를 처리한 웰을 발색 반응한 웰의 595 nm 흡광도

아. LPS 처리에 의해 유도된 산화질소(NO)의 생성억제 활성 실험

은어 단백질 및 펩타이드 추출물의 항염증 반응을 관찰하기 위하여 대식 세포주인 RAW 264.7 세포에 LPS를 처리하여 염증을 유도한 후 발생하는 염증성 산화질소의 양으로 염증반응이 억제되는 정도를 측정 하였다. 은어 단백질 및 펩타이드의 산화질소 억제효과는 48-well plate에서 RAW264.7 세포(1×10^6 cells/well)에 10% FBS, 페니실린(100 unit/mL), 스트렙토마이신 섀페이트(100 µl/mL)가 포함된 RPMI 1640배지에서 37°C항온 CO₂ 인큐베이터에서 배양하였으며, 각각의 시료(200 µg/mL)를 30 분간 전처리한 후, LPS (1 µg/mL)를 처리하여 24시간 배양하였다. 배양 상등액 100 µL 동량의 그리에스 시약(5%(v/v), 인산 및 0.1% (w/v) 나프틸에틸렌디아민-염산에 용해된 동량의 1% (w/v) 섀파닐아미드) 100 µl에 혼합한 후, 실온에서 10분 동안 반응시켰으며, 그 후 마이크로플레이트 리더를 이용하여 595 nm에서 흡광도를 측정하였다. 신선한 배지는 모든 실험에서 무처리군으로 사용하였다. 시료에서의 산화질소의 양은 배지에서 준비된 소듐 니트라이트(sodium nitrite, NaNO₂) 표준 곡선으로부터 계산되었다.

자. LPS 처리에 의해 유도된 전염증성 사이토카인 TNF- α , IL-6의 분비 억제 활성

TNF- α 및 IL-6는 정상적인 방어응답과 썩티 속, 류머티즘성 관절염, 자가 면역질환과 같은 악성 염증성면역질환과 연결된 다양한 생물학적 활성을 가지는 전염증성 사이토카인으로 알려져 있다. 은어 단백질 및 펩타이드 추출물(200 $\mu\text{g/mL}$)을 RAW264.7 (1×10^6 cells/well) 세포에 30 분간 전처리한 후, LPS(1 $\mu\text{g/mL}$)를 24시간 처리하고 얻어진 배양 상등액으로 부터 RAW264.7 세포에서 분비되는 전염증성 사이토카인 TNF- α , IL-6의 분비량에 관하여 추출물들의 억제효과를 ELISA 방법(Endogen, Cambridge, MA)으로 측정하였다.

차. 프로스타글란딘(PG) E₂ 생성 저해 활성

은어 단백질 및 펩타이드 추출물을 가지고 LPS에 의해 염증이 유도된 RAW 264.7 세포로부터 생성되는 프로스타글란딘 E₂ (PGE₂)의 분비에 미치는 영향을 측정하였다. 프로스타글란딘 E₂(PGE₂)의 억제활성 측정은 48-웰 플레이트에서 대식세포 RAW264.7 (1×10^6 cells/mL)에 10% FBS, 페니실린 (100 unit/mL), 스트렙토마이신 설페이트(100 $\mu\text{g/mL}$)가 포함된 RPMI 1640배지에서 37°C, 5%의 CO₂가 유지되는 인큐베이터에서 배양하였으며, 각각의 추출물(200 $\mu\text{g/mL}$)을 30 분간 전처리한 후, LPS (1 $\mu\text{g/mL}$)를 처리하여 24시간 배양하였다. 배양된 세포 상층액 100 μL 를 PGE₂ 측정 kit(Cayman Chemicals, Ann Arbor, MI, USA)을 사용하여 측정하였다.

카. RT-PCR을 이용한 세포내 mRNA 발현 측정

은어 단백질 및 펩타이드 추출물을 가지고 LPS에 의해 활성화된 RAW 264.7 세포로부터 생성되는 사이토카인(TNF- α , IL-6, IL-1 β), iNOS, COX-2의 mRNA 발현 억제 정도를 측정하였다. RAW 264.7 세포 배양 중에 시료를 처리하고 세포내에서 사이토카인(TNF- α , IL-6, IL-1 β), iNOS, COX-2의 단백

질을 합성하는 mRNA의 발현을 측정하여 판단하였다. RAW 264.7 세포의 mRNA 측정은 다음과 같이 행하였다. RAW 264.7 세포를 6-well plate에 각 웰 당 2×10^6 농도로 분주하고 12시간 동안 세포를 부착시킨 후 각각의 은어 단백질 및 펩타이드 추출물(200 $\mu\text{g}/\text{mL}$)을 30 분간 전 처리한 후, LPS (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$)를 처리하여 6시간 배양하였다. 6시간 배양 후 세포를 트립신-EDTA로 떼어낸 후 원심분리하여 세포를 얻었다. 얻어진 세포에서 mRNA extraction kit를 사용하여 총 mRNA를 추출하였고, PCR을 통해서 cDNA로 변환 시켜준 후, cytokine (TNF- α , IL-6, IL-1 β), iNOS, COX-2의 프라이머와 함께 RT-PCR을 수행하고 이를 1.2%의 agarose젤에 로딩하여 밴드의 인텐시티를 측정하여 세포내 cytokine의 mRNA 발현을 측정하였다. 사이토카인 (TNF- α , IL-6, IL-1 β) 및 iNOS, COX-2의 mRNA 발현은 무처리군(normal) 밴드 대한 처리구의 밴드로 아래식에 의해 밴드의 인텐시티를 측정하였다

$$\text{mRNA intensity fold} = \text{처리구 밴드 intensity} / \text{무처리구 밴드 intensity}$$

다. Western Blotting

전기영동을 위한 단백질을 추출하기 위해 배양된 세포를 ice-cold PBS로 2회 수세한 후 RIPA buffer (50 mM Tris-HCl pH 7.4, 0.1% SDS, 0.1% deoxycholic acid, 1% NP-40, 150 mM NaCl, protease inhibitors, phosphatase inhibitors)를 첨가하여 4°C에서 30분간 반응시키고 $15,000 \times g$ 에서 10 분간 원심분리하여 상층액을 모았다. 동일한 양의 세포질 또는 막 단백질을 12% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)로 분리시킨 후, 분리된 단백질을 nitrocellulose membrane에 transfer하였다. 이 membrane을 blocking buffer (3% non-fat dry milk와 0.1% Tween 20을 함유한 Tris buffered saline (TBS) 용액에서 1시간 동안 반응시켜 비특이적인 단백질의 결합을 방지한 후, 각 단백질에 대한 1차 항체를 blocking buffer로 1:1000으로 희석하여 첨가한 후 1~2시간 동안 반응시켰다. 이어서 0.1% Tween 20을 함유한 TBS 용액으로 10 분씩 3차례 수세한 다음,

peroxidase-conjugated anti-mouse IgG 혹은 anti-rabbit IgG의 2차 항체를 사용하여 1시간 동안 반응 시켰다. 이어서 ECL AdvanceTM western blotting detection kit을 사용하여 발광한 후 이미지화 시스템(MetaMprph)을 이용하여 발현을 측정하였다. 각 시료 단백질의 정량은 BCA protein assay kit를 이용하여 517 nm에서 흡광도를 측정하여 분석하였다.

파. 마우스 비장세포의 면역활성

은어 펩타이드가 비장세포의 활성화에 미치는 영향을 확인하기 위해 다음과 같이 두 가지 실험으로 구분하여 수행하였다. 우선, 은어 펩타이드를 급여하지 않은 정상 마우스로부터 비장 (Spleen)을 적출한 후 세포 분화능 분석을 위해 비장세포를 분리하였다. 즉, 경추탈골법으로 희생시킨 마우스의 비장을 무균적으로 적출하여 RPMI 1640 medium으로 씻은 다음 멸균된 tissue homogenizer로 가볍게 분쇄하여 세포를 유리시켰다. 분리된 세포 현탁액을 1,500 rpm에서 3분간 원심 시킨 후 cell pellet을 Red blood cell lysis buffer (Tris-buffered ammonium chloride; 0.87% NH₃Cl, pH 7.2)에 5분간 현탁시켜 적혈구를 제거하였다. 위의 세포는 다시 RPMI 1640으로 원심분리하고 차가운 PBS (phosphate buffered saline, pH 7.4)를 사용하여 2회 세척한 다음, 10% fetal bovine serum (FBS)이 함유된 RPMI 1640으로 희석하여 사용하였다. 세포분화능 분석을 위한 세포수는 96 well plate에 1×10^6 cells/well을 90 μ L씩 분주하였으며, Cytokine 분석을 위한 세포수는 48 well plate에 2×10^6 cells/well을 450 μ L 씩 분주하고, 렉틴을 최종농도가 2.5~20 μ L/mL이 되도록 희석 한 후 24시간 동안 배양하여 MTT 분석법으로 세포분화능을 분석하였다. 한편, Cytokine 생성량은 48 well plate에 T세포 자극을 위해 Concanavalin A (Con A, 5 μ g/mL)을 첨가하였다. 24시간 동안 배양한 후 상등액을 수거하여 Th-1 type 사이토카인(IFN- γ and IL-2)의 양을 ELISA kit (BD Bioscience, USA.)을 이용하여 측정하였다.

두 번째 실험으로 은어 펩타이드가 비장세포의 활성화에 미치는 영향을 확

인하기 위해 은어 단백질 및 펩타이드를 5일동안 2 mg/head/day로 경구 투여한 마우스를 희생시켜 비장을 적출하고 상기와 동일한 방법으로 면역세포를 분리하고 세포 분화능을 분석하였다. 비장세포 분화능은 비장세포를 96 well plate에 T세포 mitogen인 Concanavalin A (Con A, 5 μ L/mL)는 대조구로 사용하였다. 시료 처리 후로 부터 24, 48시간 배양한 후 MTT 분석을 실시하였다. Cytokine 분석을 위한 세포수는 48 well plate에 1.0×10^6 cells/well을 450 μ L씩 분주하였으며, mitogen으로 Concanavalin A (Con A, 5 μ g/mL)와 Lipopolysaccharide (LPS, 1 μ g/mL)로 각각 처리한 후 24시간 및 48시간 동안 배양하여 세포분화능 및 Cytokine 분비량을 각각 MTT 및 ELISA 방법에 의해 분석하였다.

하. 일반성분 분석

1) 수분함량

칭량병을 104℃의 dry oven (F-600M; Jeio Tech. Co., Seoul, Korea)에서 1시간 30분 건조시킨 후 desicator에서 30분간 방냉한 후 무게를 측정하였다. 그 뒤 1시간을 더 dry oven에서 건조시키고 다시 30분간 desicator에서 방냉한 후 무게를 측정하여 항량이 될 때까지 이를 반복하였다. 이 칭량병에 시료를 약 3 g 넣고 dry oven에서 건조를 시키되 칭량병의 항량을 구할 때와 마찬가지로 건조와 방냉을 반복하여 항량을 구하였다.

$$\text{수분함량 (\%)} = (B-C)/(B-A) \times 100$$

A : 칭량병의 무게 (g)

B : 건조 전 시료와 칭량병의 무게 (g)

C : 건조 후 칭량병의 무게 (g)

2) 조지방

은어의 조지방은 Soxhlet (Poongil Physics & Chemistry Co., Seoul, Korea) 장치를 사용하였다. 조지방에 사용되는 250 ml 수기를 건조와 반냉을 반복해서 수기의 건조량을 구하였다. 원통여지 (Advantec Toyo No. 2, Toyo Roshi Kaisha, Ltd., Japan)에 건조 시료를 넣고 냉각관, 추출관, 플라스크를 연결한 후 수기에 ethyl ether (Samchun Pure Chemical Co., Ltd., Korea)를 150 ml 넣고 가열하여 물의 흐름이 1 분에 80 방울 정도 떨어지게 항온수조 온도와 냉각관을 조절하였다. Siphon 원리에 의해 지방을 녹인 ether만이 재증발되어 시료중의 지방을 용출하고 수기에 지방만을 모았다. 8 ~10시간 후 지방이 모두 추출되면 추출관에서 원통여지를 꺼내고 다시 냉각관을 연결하여 수욕에서 ether를 증발시켰다. 수기를 꺼내어 104℃에서 건조, 방냉하여 수기의 양을 구하였다.

$$\text{조지방 (\%)} = (A-B)/\text{시료무게(g)} \times 100$$

A : 지방 추출 후 수기 무게 (g)

B : 지방 추출 전 건조 수기의 무게 (g)

3) 조단백질

조단백질은 Kjeldahl 질소 정량법인 분해, 증류, 중화, 적정의 네 단계로 측정하였다. 시료 5 g을 정확히 측정하여 플라스크에 넣은 후 sulfuric acid 98% (Showa Chemical Co., Ltd., Japan) 20 ml과 분해촉진제 potassium sulfate (K_2SO_4 ; Yakuri Pure Chemical Co., Ltd., Japan) 와 copper(II) sulfate pentahydrate 99% ($CuSO_4 \cdot 5H_2O$; Samchun Pure Chemical Co., Ltd.)을 9:1로 혼합한 시약을 가해 가열하여, 맑은 녹색이 나온 시점부터 30 ~40 분간 더 반응 시켰다. 250 ml 증류수를 가하여 희석시켜 미량의 암모니아가 공기 중으로 손실되지 않도록 중화 전까지 Teflon 뚜껑으로 막아 보관하였다. 중화는 25 ml 포집수기에 0.1 N H_2SO_4 (Yakuri Pure Chemical Co.,

Ltd.) 표준 용액 15 ml를 취하여 0.1 % methyl red ($C_{15}H_{15}N_3O_3$; Showa Chemical Co., Ltd) alcohol과 0.1 % methylene blue ($C_{16}H_{18}N_3SCl \cdot 3H_2O$; Showa Chemical Co., Ltd) alcohol의 등 (혼합액을 4~5 방울 가하였다. 증류 flaskdp 시료 분해액 20 ml를 넣고 30 % NaOH (Jin Chemaical Co., Ltd., Shehyung, Korea) 10 ml를 넣은 후 수증기 발생 장치에서 발생한 수증기는 증류 플라스크로 유입시켜 증류 플라스크 중의 용액을 비등시켜 증발한 암모니아와 함께 냉각관으로 냉각되어 나오는 물질을 25 ml 포집 수기에 10~15 분간 포집한 후, 0.1 N NaOH로 적정하여 청록색으로 변색한 점을 종말점으로 하였다. 시료 대신 증류수를 이용하여 같은 방법으로 blank test를 하였다.

$$\text{조단백질 (\%)} = 0.0014 \times (A-B) \times F \times D \times N / S \times 100$$

A : blank test의 0.1 N NaOH 적정량 (ml)

B : 시료의 0.1 N NaOH 적정량 (ml)

F : 0.1 N NaOH 용액의 역가

D : 희석 배수

N : 질소계수 (6.25)

S : 시료 채취량 (g)

4) 지방산 조성 분석

은어의 지방 추출은 Bligh와 Dyer(1959) 방법을 변형시켜 지방을 추출하였다. 시료 40 g에 50 mL chloroform (Oriental Chemical Inc., Seoul, Korea), 100 mL methanol (Oriental Chemical Inc.), 12 mL 0.88% KCl (Oriental Chemical Inc.) 용액을 첨가하여 이들의 비율이 시료에 함유된 수분 함량을 포함하여 약 5:10:4가 되도록 조정하였다. 이것을 homogenizer (M133/1281-0; Biospec Products, Inc., Bartlesville, OK, USA)를 사용하여 30

초 동안 균질화한 후, 여기에 50 mL chloroform, 50 mL 0.88% KCl 용액을 추가로 첨가하여 chloroform, methanol, 0.88% KCl 용액의 비율이 약 10:10:9가 되도록 하여 다시 30초 동안 균질화한 후, 원심분리 tube에 옮겨 4000 rpm으로 20분간 원심분리 하였다. 상등액을 분별깔대기에 옮겨 40분간 정치한 후, 하층부분인 chloroform 부분을 삼각플라스크에 분리하였다. 원심 분리 tube에 있는 고형부분과 분별깔대기에 남은 상층부분의 용액을 합하고 100 mL의 chloroform을 첨가하여 30초 동안 균질화한 후 상기와 동일한 방법으로 원심분리 및 분별깔대기를 사용하여 chloroform 층을 분리하였다. 이 chloroform 용액에 550℃의 회화로 (Isotemp Muffle Furnaces 550 Series: Fisher Scientific Co., Pittsburgh, PA, USA)에서 5시간 가열한 후 냉각하여 준비한 Na₂SO₄(Junsei Chemical Co., Ltd., Tokyo, Japan)를 약 15 g 첨가하여 수분을 제거한 후 15 g Na₂SO₄가 있는 filter paper (Whatman No.2; Whatman International Ltd., England)에 통과시켜 여과하고 약 5 mL의 chloroform으로 삼각플라스크 및 filter paper를 씻어 여액을 합하였다. 이 여액을 Eyela aspirator (A-3S; Tokyo Rikakikai Co., Ltd., Tokyo, Japan)에 연결된 Eyela rotary vacuum evaporator (N-N; Tokyo Rikakikai Co., Ltd.)를 사용하여 농축한 뒤, 시험관으로 옮긴 후 4℃ 이하로 사용 전까지 보관하였다.

지방의 methylation은 AOCS Official Method Ce 2-66 (AOCS, 1989) 방법으로 하였다. 지방 약 0.25 g을 50 mL round-bottomed flask에 취하고 이 플라스크에 끓임쪽을 넣고 0.5 N-methanolic NaOH (Jin Chemical Co., Ltd.) 6 mL을 가하여 녹였다. 이 플라스크를 condenser에 연결한 후 지방구가 없어질 때까지 가열기 (SHE-106; Glas-Col Combo Mantle, Terre Haute, USA) 위에 놓고 80 ℃에서 10분간 끓였다. 지방구가 없어지면 condenser를 통해 BF₃-methanol (BDH Laboratory, Poole, England)를 7 mL 넣은 후 2분간 더 끓였다. Condenser를 통해 hexane (Fisher Scientific Co., Fair Lawn, NJ, USA) 5 mL를 가한 후 1분간 더 끓이고 condenser를 제거한 뒤 플라스크를

상온에서 냉각시켰다. Hexane 층이 목 부위로 차오를 때까지 포화 NaCl (Junsei Chemical Co.) 용액을 넣고 목 부위로 차오른 hexane 층을 vial에 옮긴 후 미리 가열하여 수분을 제거한 0.2 g Na₂SO₄를 첨가했다. 이 vial을 -18℃에 보관하였다.

Methylation 시킨 지방은 기체 크로마토그래피를 사용해 지방산 조성을 분석하였으며, 사용한 기기는 Hewlett-Packard 6980 Series Gas Chromatography (Hewlett-Packard Co., Wilmington, DE, USA)였으며, 분석 조건은 다음과 같았다.

Instrument	Hewlett-Packard 6980 Series Gas Chromatography			
	DB-23 (J&W Scientific, Folsom, CA, USA)			
	0.25 mm i.d. × 30 m, 0.25 um film thickness			
Column	Initial	160℃	holding	2min
	3.5℃/min	250℃		5min
	25.0℃/min	260℃		5min
Injector	Temperature	250℃	Split ratio	50:1
Detector	Temperature	260℃	FID detector	
Carrier gas	He	Flow rate: 1.4 ml/min		

제 2 장 연구개발 수행내용 및 결과

1. 추출조건에 따른 다양한 생리활성 물질의 분획

가. 은어 단백질 및 펩타이드 분획

은어(생물)과 훈제은어로부터 단백질 및 펩타이드를 추출한 후 추출물의 단백질 분포를 확인하기 위하여 SDS-PAGE를 수행한 결과(Fig. 1) 은어(생물)은 다양한 분자량을 가지는 단백질들을 확인할 수 있었으나, 훈제은어의 경우 단백질 밴드가 확인하기 어려웠다. 이는 훈제 과정에서 수행하는 열처리에 의해 단백질이 변성되었기 때문이라고 사료된다. 또한, 은어(생물)과 훈제은어로부터 추출한 단백질을 펩신, 트립신, 키모트립신등의 단백질 소화효소로 분해하여 제조한 펩타이드는 저분자의 단백질이 많이 분포하는 것으로 보아 효소에 의한 단백질의 가수분해가 효과적으로 일어났을 것으로 확인되었다. 따라서, 은어의 다양한 생리활성을 평가를 위해 상기에서 획득한 은어 단백질과 효소종류에 따른 은어 펩타이드를 분획하여 시료를 제조하였다.

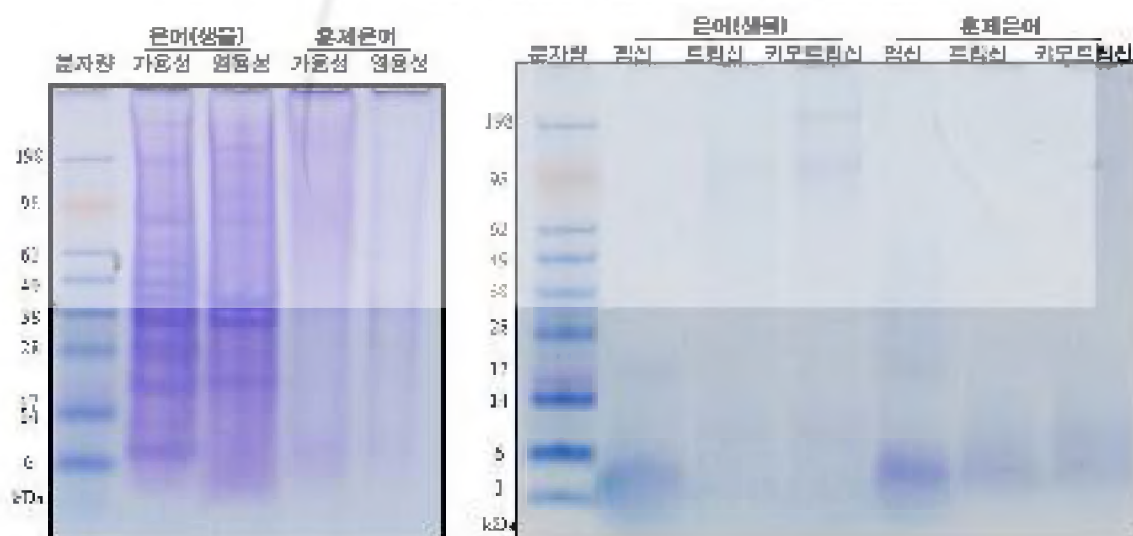


Fig. 1. 은어로부터 추출한 은어 단백질 및 펩타이드의 단백질 분포확인

2. 은어의 생리활성 효능 탐색

가. 항산화 활성

체내의 산화 반응은 활성 산소에 의한 것이 대부분으로 자유 라디칼의 자동 산화 반응에 의해 진행된다. 자유 라디칼의 자동 산화 반응은 연쇄반응이며, 과산화 라디칼이 수소를 받음으로써 반응이 종결된다. 따라서 항산화제는 자동 산화반응에서 수소를 주는 능력 즉, 환원력이 커야 한다. DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl)는 비교적 안정한 라디칼로써 이러한 항산화 물질의 환원력을 평가하는데 가장 널리 이용된다. 은어(생물)과 훈제은어로부터 얻어진 단백질 및 펩타이드에 대한 항산화 효과는 DPPH 라디칼에 대한 소거반응으로 측정하였다. 각각의 단백질에서는 은어(생물)이 29.3 %, 훈제은어는 34.0 %를 보였으며, 두 실험군에 여러 소화효소를 처리한 결과 두 실험군 모두 펩신 (은어(생물): 45.1 %, 훈제은어: 40.9 %)에서 항산화 효과가 높게 나타남을 알 수 있었다(Fig. 2).

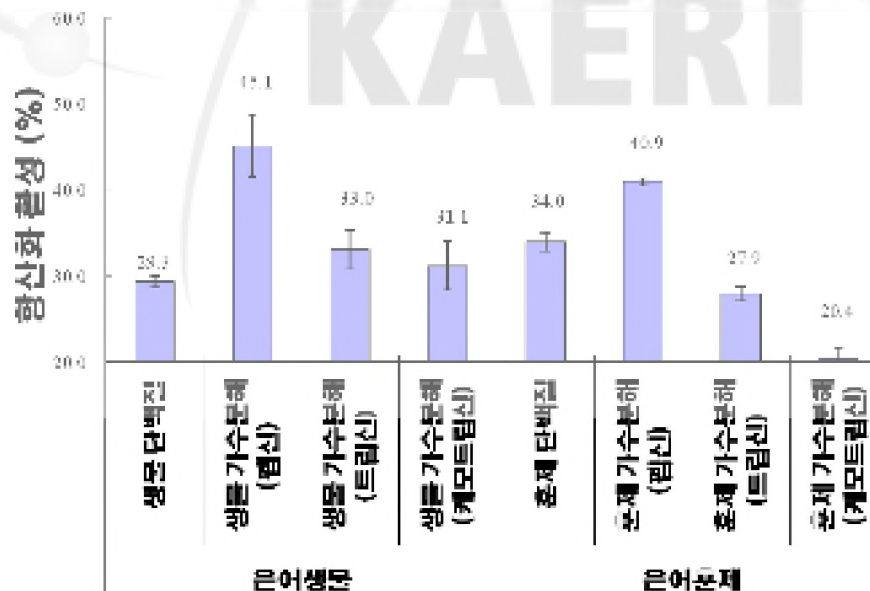


Fig. 2. 은어 단백질 및 펩타이드의 DPPH 라디칼 소거능

나. 미백효과

1) 티로시나제의 저해효과 확인

Tyrosinase는 멜라닌 합성과정에 관여하는 중요한 요소로써, 멜라닌 합성 과정의 초기 단계에 관여하며, Tyrosine을 DOPA로 DOPA를 DOPA quinone으로 변환시키는데 관여하는 것으로 알려져 있다. 이때 생성된 DOPA quinone은 체내에서 다른 여러 가지 반응으로 인하여, 종극에는 멜라닌을 형성하여 피부를 검게 만든다. 따라서 Tyrosinase의 활성을 억제하면 멜라닌 색소의 침착을 막을 수 있다. 즉 직접적으로 멜라닌 색소를 제거 할 수는 없지만 간접적으로 멜라닌 색소의 생성을 막을 수 있어 미백작용을 할 수있는 것이다. 본 실험에서 은어(생물)과 혼제은어에서 추출한 단백질 및 펩타이드의 Tyrosinase억제 활성을 살펴본 결과, 생물과 혼제은어 단백질 추출물에서 Tyrosinase의 저해활성이 높게 나타나는 결과를 얻을 수 있었다(Fig. 3).

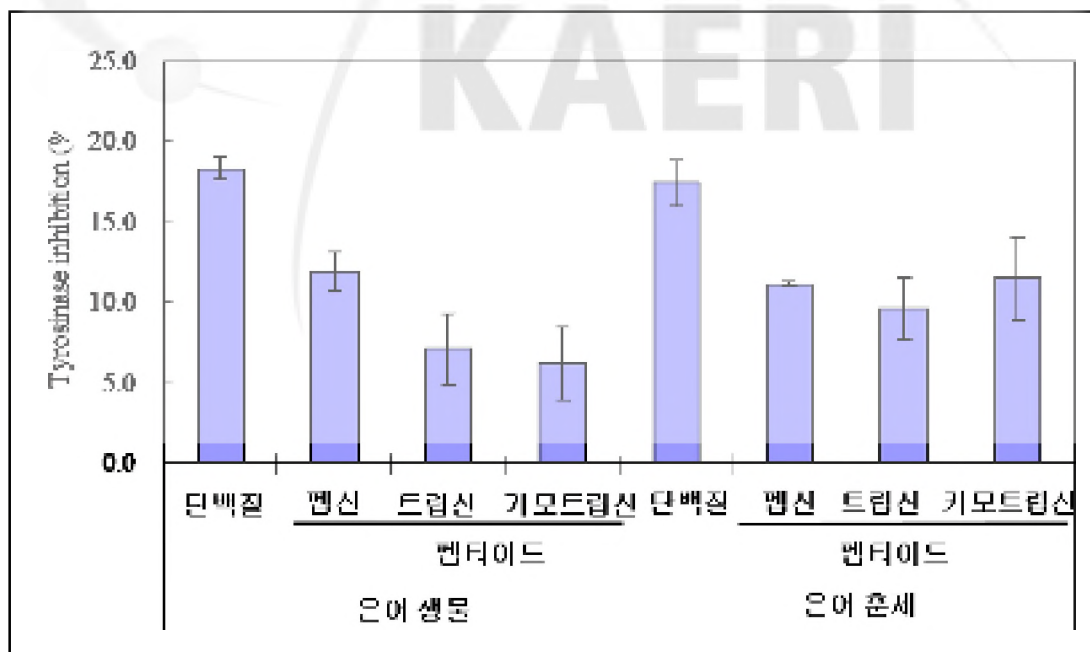


Fig. 3. 은어 단백질 및 펩타이드의 DPPH 라디칼 소거능.

2) 멜라닌 생성 억제효과 측정

세포(melanocyte)내에서 멜라닌 합성 촉진 호르몬으로 알려진 α -MSH와 화장품의 원료로 주로 사용되는 멜라닌 합성 억제 물질인 Arbutin, Kojic acid를 이용 하여 멜라닌을 생성 할 수 있는 B16BL6에 은어 단백질 및 펩타이드를 전처리하고 α -MSH를 처리 하였을 때 생성되는 멜라닌의 양을 측정하여 시료의 멜라닌 합성 억제에 관하여 평가한 결과 α -MSH 무첨가구에 비하여 α -MSH첨가구에서 멜라닌이 2배 이상 증가된 것을 관찰 할 수 있었다(Fig. 4). 또한 시료를 전처리한 실험구에서는 α -MSH단독 처리구에 비하여 멜라닌의 생성량이 억제되는 것을 관찰 할 수 있었다(Fig. 4). 앞선 결과에서 은어 단백질 및 펩타이드는 tyrosinase를 효과적으로 억제한 것으로 관찰되었다(Fig. 3). 또한 본 실험에서 B16BL6의 세포 모델에서도 멜라닌의 생성이 효과적으로 억제되는 것으로 나타났다. 따라서 은어 단백질 및 펩타이드의 미백 효과는 tyrosinase와 밀접한 관련이 있을 것으로 사료된다.

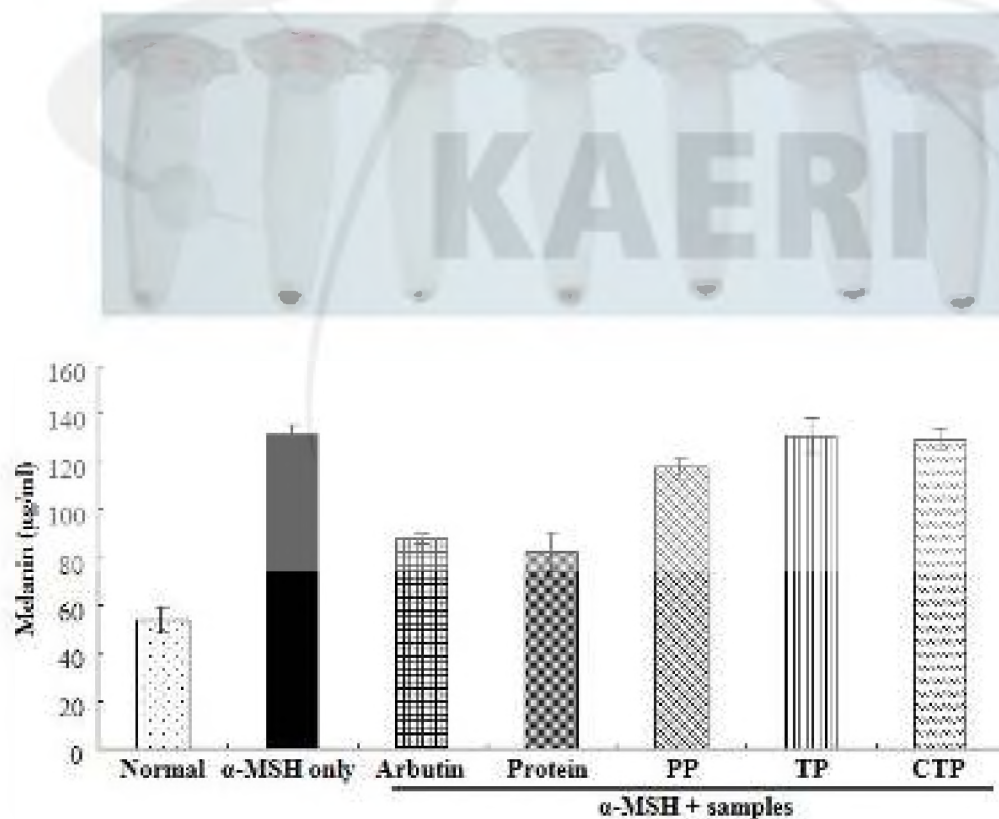


Fig. 4. 은어 단백질 및 펩타이드의 세포(B16BL6)내 Melanin 형성 억제

따라서 이 같은 tyrosinase의 감소에 따른 미백효과를 보다 더 명확하게 측정하기 위하여 B16BL6 세포내 tyrosinase 단백질의 mRNA의 발현을 측정하였다(Fig. 5). 본 실험에서 음성 대조구인 (무처리군; Normal)에 비하여 α -MSH 단독 처리구에서 Tyrosinase의 mRNA의 발현이 크게 증가한 것으로 보아 α -MSH의한 B16BL6의 멜라닌 축진이 효과적으로 이루어진 것으로 사료되며, α -MSH와 은어 단백질 및 펩타이드를 병용하여 처리한 실험구에서는 tyrosinase 단백질의 mRNA의 양이 대폭 감소한 것으로 관찰되어 은어 단백질 및 펩타이드가 tyrosinase 단백질의 mRNA의 형성에 밀접한 관련이 있을 것으로 사료되었다. 이러한 tyrosinase 단백질의 mRNA의 형성이 억제되면 세포질 내에서 tyrosinase 단백질이 만들어 지지 않아 결국 멜라닌 형성이 이루어지지 않는다.

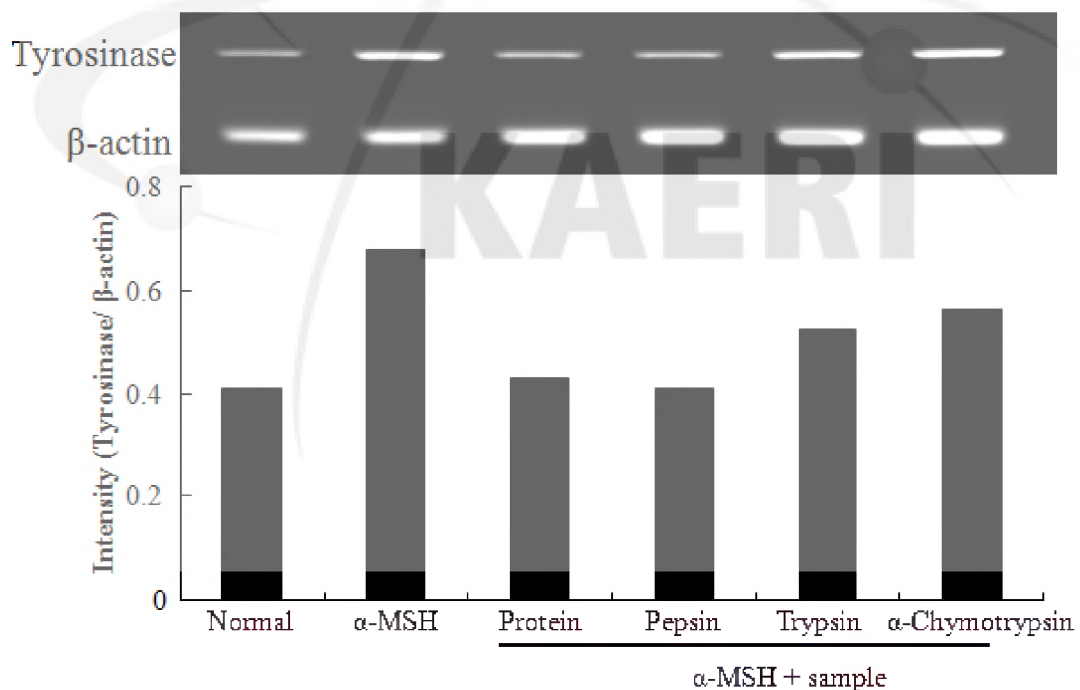


Fig. 5. 은어 단백질 및 펩타이드의 세포(B16BL6)내 Melanin 형성 억제.

Fig. 6은 세포질 내에서 tyrosinase 단백질의 형성을 western blotting을 통해서 알아보았다. Fig. 6에서 보여주는 tyrosinase 단백질 밴드는 Fig.5의 결과와 유사한 경향을 나타내었다. 즉 α -MSH 단독 처리구에서 세포질내의 tyrosinase의 단백질의 발현이 크게 증가한 것으로 나타났고, α -MSH와 은어 단백질 및 펩타이드를 병용하여 처리한 실험구에서는 tyrosinase 단백질의 양이 대폭 감소한 것으로 관찰되었고 그중 은어 단백질 처리구에서 tyrosinase 단백질의 양이 가장 크게 감소한 것으로 나타났다.

멜라닌세포에서의 멜라닌 합성은 tyrosinase, tyrosinase-related protein (TRP)-1, TRP-2 등의 효소가 관여하는 복잡한 과정을 통해 이루어진다. 멜라닌 합성은 다양한 인자에 의해 영향을 받는데 그 중 자외선은 멜라닌 합성을 자극하는 대표적인 외부 인자로서, 직접적으로는 멜라닌 세포에 작용해 멜라닌 합성에 관여하는 효소의 생산과 활성을 증가시키거나 혹은 멜라닌세포의 멜라닌세포 자극 호르몬 수용체를 증가시키며, 간접적으로는 멜라닌세포 주위의 각질 형성 세포나 섬유아세포 등으로부터 다양한 cytokines, endothelin-1, basic fibroblast growth factor (BFGF), 멜라닌 세포 자극 호르몬 등의 paracrine factors의 생산을 유도함으로써 멜라닌 합성을 자극한다고 받아 들여 지고 있다. Fig. 7은 멜라닌 합성의 주된 역할을 담당하는 효소인 tyrosinase이외의 이와 관계된 TRP-1, TRP-2, MITF, PAX-3등의 mRNA의 발현을 RT-PCR을 통하여 관찰하였다. 실험 결과 은어 단백질 및 펩타이드는 TRP-1, TRP-2, MITF, PAX-3의 mRNA의 발현에 미치는 영향은 관찰되지 않았다. 따라서 은어 단백질 및 펩타이드는 tyrosinase의 발현에만 영향을 주는 것으로 사료되며, 추후 추가적인 다양한 연구를 통하여 좀더 세부적인 세포 신호 전달(cell signaling pathway)에 관하여 연구할 필요성이 요구된다.

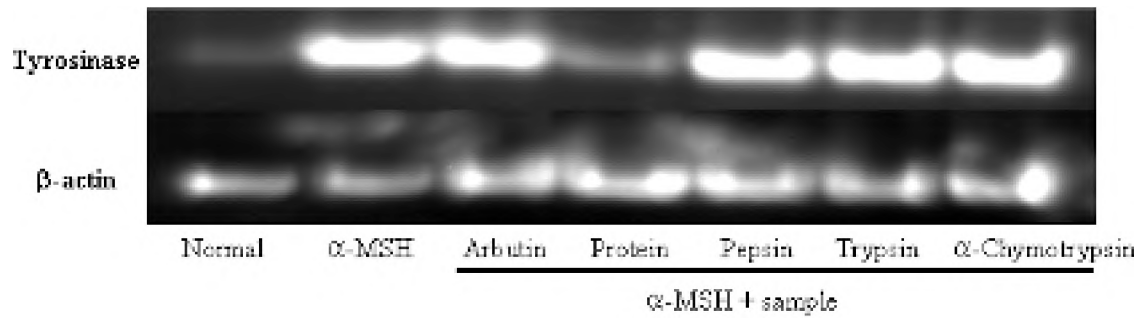


Fig. 6. Western blotting을 통한 세포질 내의 tyrosinase 단백질 정량

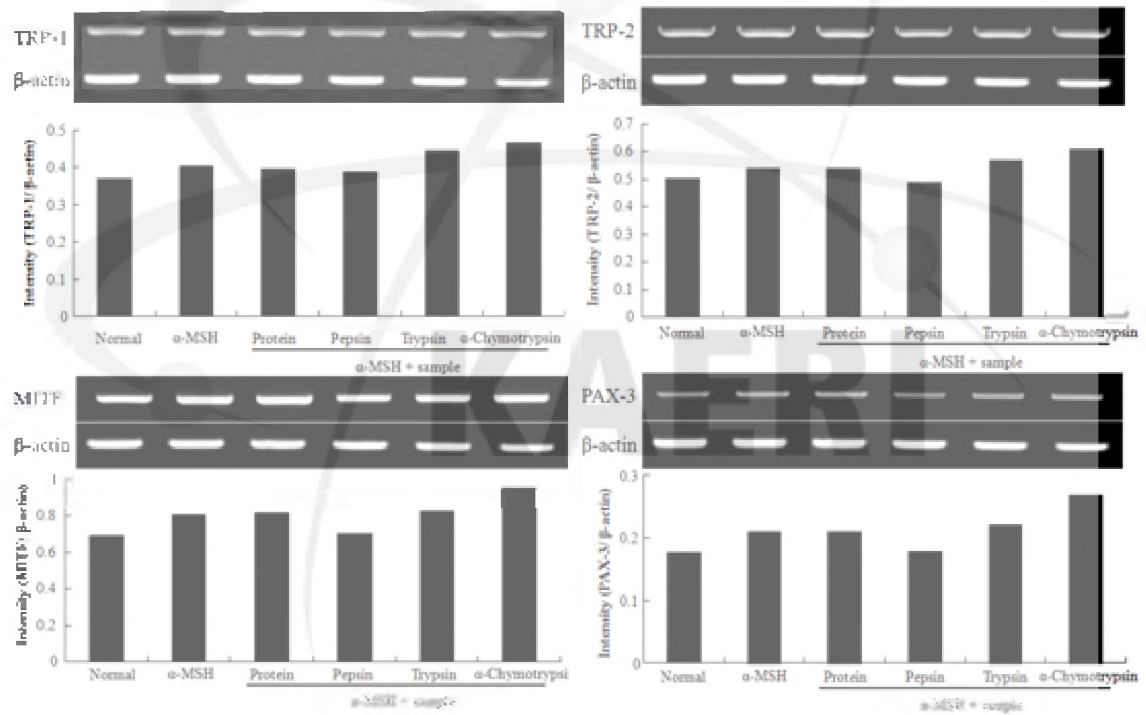


Fig. 7. RT-PCR을 통한 TRP-1, TRP-2, MITF, PAX-3의 mRNA의 발현

다. 항고혈압 활성

고혈압은 전 세계적으로 만연한 질병으로 동맥경화, 뇌졸중, 심근경색, 및 당뇨 등 심각한 만성 질병과 함께 합병증으로 나타날 경우 치사율이 매우 높은 만성퇴행성질환으로 발전하게 된다. Angiotensin Converting Enzyme (ACE)는 혈관과 신장의 근위세뇨관 내피, 심장, 폐, 활성화된 대식세포, 뇌조직 등에서 발견되는 di-carboxy peptidase로서 포유류의 혈압 및 수분균형 조절기전인 renin-angiotensin system (RAS)에서 중요한 역할을 담당하는 고혈압 유발 효소이다. 한편 ACE는 kallikrein-kinin system(KKS)에서 B₂ receptor를 통해 혈관 확장 촉진, 혈소판 흡착 및 평활근세포증식 저해 기능을 하는 bradykinin을 불활성화하기도 한다고 알려져 있다. 식품 성분 중 ACE 저해효과에 대한 연구는 주로 여러 식품 단백질 등의 효소 가수분해물로부터 얻어진 펩타이드류에서 ACE 저해 펩타이드를 분리하여 그것의 활성을 측정하거나 또는 활성을 가진 아미노산 배열을 해석하여 이를 기초로 펩타이드를 화학적으로 합성하여 효과를 검토하는 연구가 이루어지고 있다.

본 실험에서는 은어 단백질 및 펩타이드의 ACE 활성억제 정도를 확인하여 보았다. 실험 결과 은어(생물)과 혼제은어 두 실험군 모두 펩타이드를 처리한 실험군 보다 단백질을 처리한 실험군에서 ACE 억제 활성이 높게 관찰되었다. 이러한 결과는 은어 단백질 및 펩타이드의 섭취가 고혈압 환자에게서 혈압을 강하 시켜줄 수 있는 가능성을 나타낸다고 사료된다.

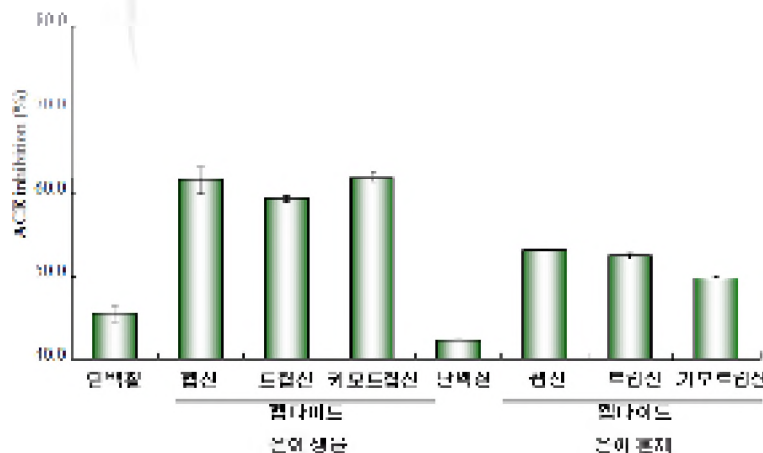


Fig. 8. ACE 억제를 통한 항 고혈압 작용

3. 동물실험을 이용한 기능성 입증 연구

가. 면역활성

은어단백질과 펩타이드를 실험용 마우스에 경구 투여하여 면역활성에 미치는 영향에 관하여 평가 하였다. Fig. 10은 은어단백질 및 펩타이드의 경구 투여 및 비장조직의 분리를 나타낸다. 은어 단백질 및 펩타이드는 2 mg/head/day로 7일 동안 경구로 투여 하였고, 7일후 실험동물로부터 면역 기관인 비장을 분리하여 조직을 파쇄한 뒤 비장세포를 분리하여 비장세포의 분화능과 세포 매개면역에 관여하는 사이토카인인 IL-2와 INF- γ 의 수치를 평가 하였다(Fig11, 12). 실험 결과 단백질 및 펩타이드 투여군에서 비장 세포 분화능과 사이토카인 IL-2 및 IFN- γ 의 수치가 다소 증가된 것을 확인 할 수 있었다. 이러한 결과로 미루어 볼 때 은어 단백질 및 펩타이드의 섭취는 실험동물의 면역활성을 증가 시키는 것으로 사료된다.



Fig. 10. 은어단백질 및 펩타이드의 경구투여 및 비장조직의 분리

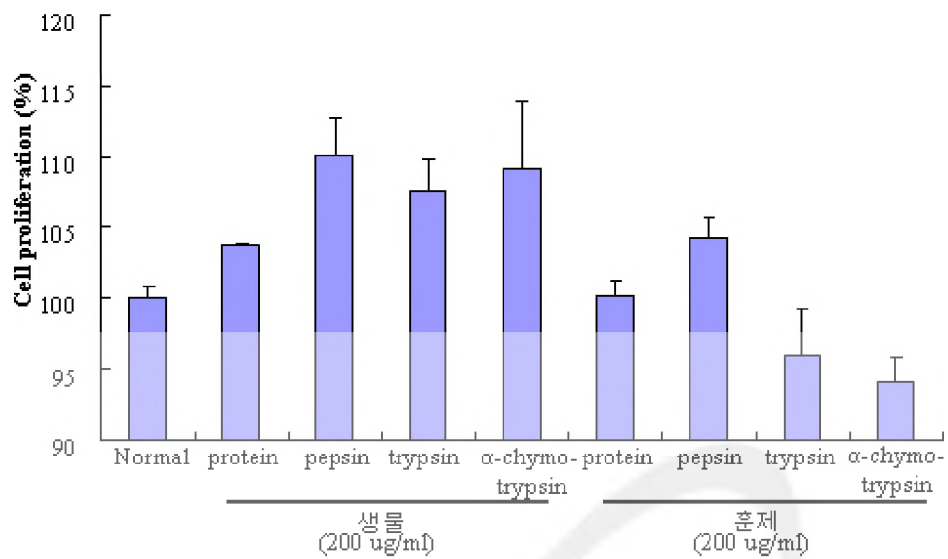


Fig. 11. 은어 단백질 및 펩타이드를 경구투여한 마우스에서 분리한 비장 세포의 세포 분화능

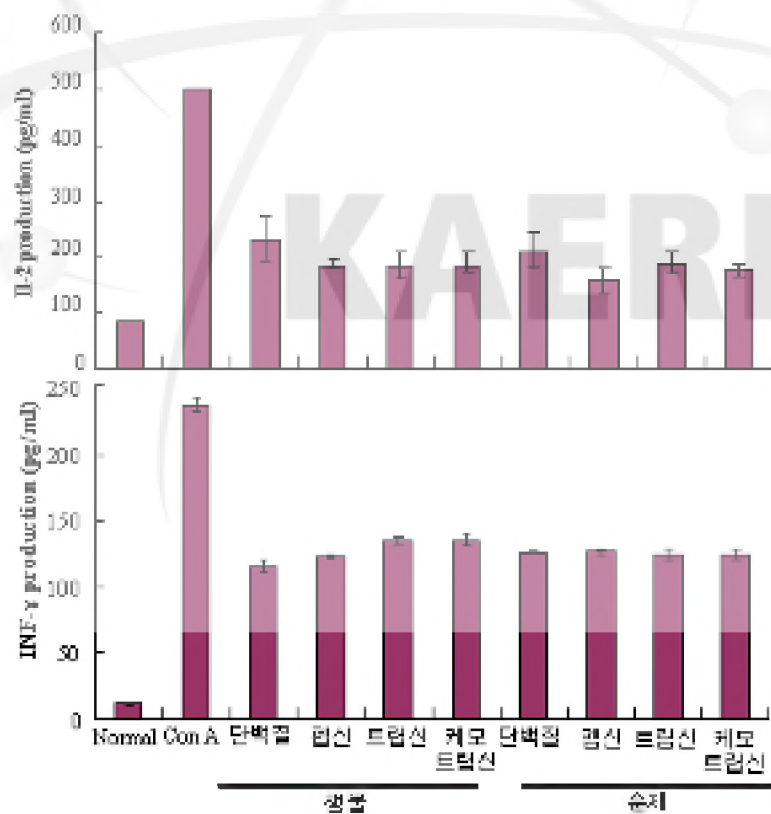


Fig. 12. 은어 단백질 및 펩타이드를 경구투여한 마우스에서 분리한 비장 세포의 사이토카인 생성능

나. 항염증 효과

1) 대식세포주에 대한 세포 독성 및 염증성 사이토카인의 생성 억제

염증반응은 어떤 자극에 대한 생체 조직의 비특이적 면역반응으로 조직의 변성, 순환장애와 삼출, 조직 증식의 세 가지의 복잡한 과정으로 이루어져 있다. 특히, LPS (Lipopolysaccharide)는 강력한 염증유발 물질로써 주로 그람 음성 세균에서 유리되는 것으로 알려져 있다. LPS에 의한 염증 반응은 다양한 사이토카인(cytokine)들에 의해 전개된다. 본 실험에서는 은어로부터 추출한 은어단백질 및 펩타이드의 처리가 LPS로 유발된 대식세포 주(RAW264.7)의 염증 반응에 미치는 영향에 관하여 알아보았다(Fig. 13).

NO(nitric oxide)는 자유라디칼로서 염증성 또는 항염증성의 기능을 동시에 하는 것으로 알려져 있으나, 생체 내 과도한 분비는 오히려 세포독성을 통해 세포를 파괴하고 shock에 의한 혈관 확장 및 염증반응을 촉진하여 조직 손상을 유도하는 것으로 알려져 있다. 또한 염증단계에서는 TNF- α , IL-6와 같은 염증성 사이토카인들이 체내에서 분비되어 염증을 가속화 시킨다. 본 연구결과 은어 단백질 및 펩타이드는 대식세포주인 RAW264.7의 세포 독성에 어떠한 영향을 미치지 않는 것으로 나타났으며, 강력한 염증 물질인 LPS 첨가구에서는 NO, TNF- α , 및 IL-6가 크게 증가하는 것으로 보아 LPS에 의한 염증반응이 성공적으로 이루어졌음을 나타내고, 또한 은어 단백질 및 펩타이드를 LPS와 병행하여 처리한 처리구에서는 LPS에 의한 NO, TNF- α , 및 IL-6의 증가를 감소시키는 것으로 관찰되어 은어 단백질 및 펩타이드의 처리에 의해 염증반응이 상쇄되는 것으로 사료된다. 또한 염증억제 반응은 은어 단백질 처리구 보다 은어 펩타이드 처리구에서 비교적 높게 나타났다. 따라서 본 연구의 결과로 미루어 보아 은어 단백질 및 펩타이드의 섭취는 염증성 물질에 의해서 매개되는 염증반응을 효과적으로 억제 할 것이라고 사료된다.

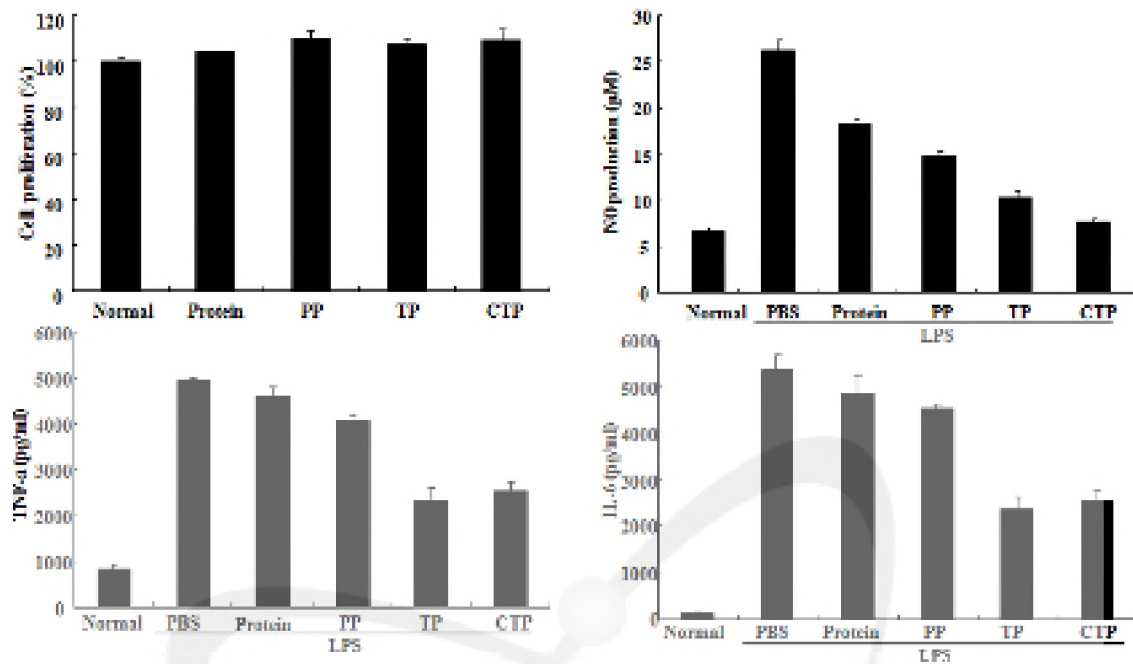


Fig. 13. 은어 단백질 및 펩타이드의 대식세포(RAW264.7)독성 및 LPS로 유발된 대식세포에서 NO, 사이토카인의 생성에 미치는 영향

2) 프로스타글란딘 E₂(PGE₂) 생성 저해 활성

은어 단백질 및 펩타이드의 항염증 반응을 보다 명확하게 관찰하기 위하여, 염증과 관련하여 조직손상이 일어나는 부위에서 생성되어 말초신경 말단 부위에 작용하여 통증에 작용하는 것으로 널리 알려져 있는 Prostaglandin E₂ (PGE₂)의 생성에 관하여 측정 하였다. 본 실험 결과에서도 PGE₂는 LPS 단독 처리구에서 생성량이 가장 높았으며, 은어 단백질 및 펩타이드와 병행하여 처리하였을 때 유의적으로 그 수치가 감소하는 것으로 관찰되었다. 또한 Fig. 14의 결과에서와 유사하게 단백질 처리구 보다는 펩타이드 처리구에서 그 감소 효과가 크게 관찰되었다.

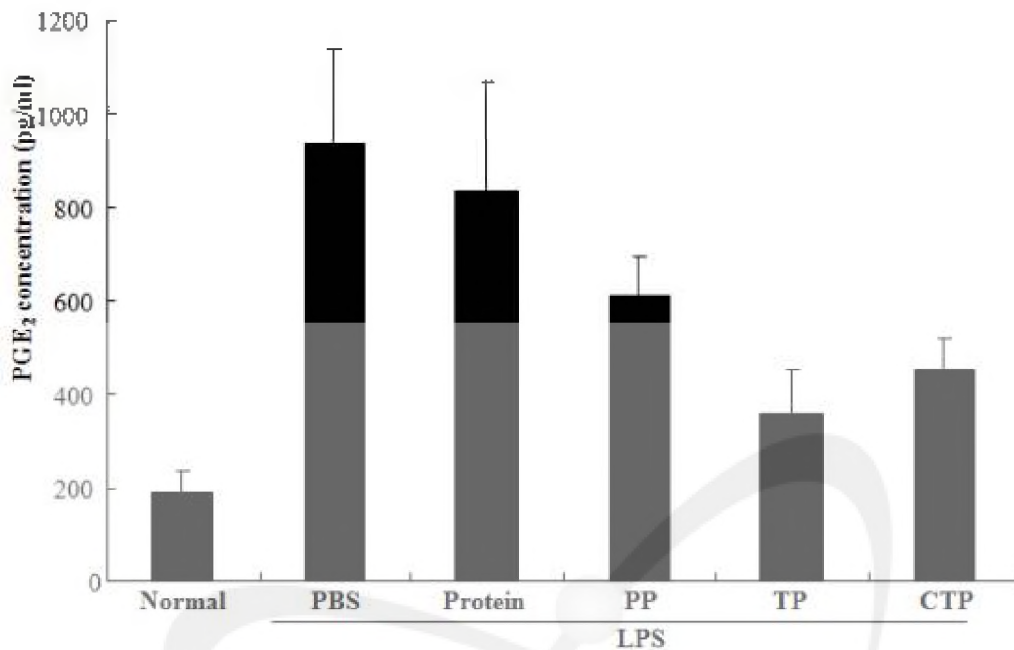


Fig. 14. LPS로 유발된 대식세포의 염증반응에서 은어 단백질 및 펩타이드의 처리가 PGE₂의 생성에 미치는 영향

3) RT-PCR을 통한 염증관련 단백질의 mRNA 확인

Fig. 13과 Fig. 14의 결과에서 은어 단백질 및 펩타이드의 처리가 LPS로 유도된 염증반응에서 NO, TNF- α , IL-6 및 PGE₂의 생성을 효과적으로 감소시킨다는 사실을 알 수가 있었다. 따라서 본 실험에서는 Fig. 13과 Fig. 14에서 항염증 효과가 가장 높게 관찰된 트립신 및 알파케모트립신을 처리하여 제조된 펩타이드에 관하여 세부적으로 자세하게 관찰하기 위하여 LPS와 펩타이드의 병용처리시 유도되는 염증성 사이토카인 및 다양한 염증성 인자들에 관하여 세포내 염증성 mRNA 발현에 관하여 측정하였다(Fig. 15). 실험결과 트립신 및 알파케모트립신 처리하여 얻어진 은어 펩타이드의 처리가 세포내 염증성 mRNA의 발현을 효과적으로 억제하는 것으로 나타났다.

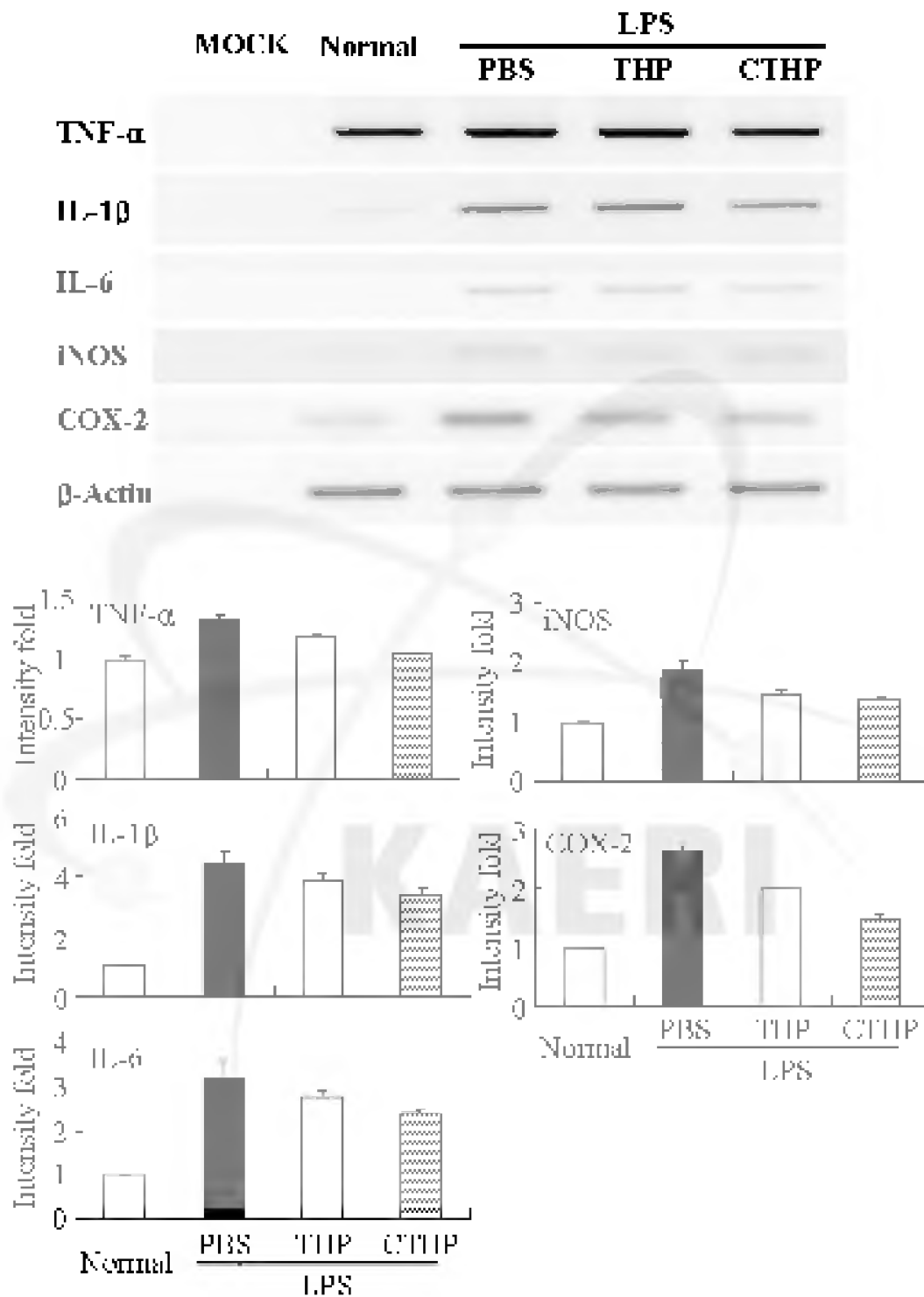


Fig. 15. 염증성 사이토카인 및 다양한 염증성 인자들에 관한 세포내 염증성 mRNA 발현

4) RT-PCR을 통한 염증관련 단백질의 mRNA 확인

은어 단백질 및 펩타이드의 항염증효과가 세포내 핵에 어떠한 영향을 주는가에 관하여 관찰하기 위하여 전사인자인 Transcription factor nuclear factor-kappa B (NF- κ B)에 관하여 관찰하였다 (Fig. 16). NF- κ B는 면역 세포에서 염증 기전에 관여하는 가장 중요한 전사인자 중 하나이다. NF- κ B는 T 세포 수용체, B세포 수용체, CD40등 면역에 관여하는 다양한 수용체의 자극으로 인하여 세포활성 물질과 성장 인자의 발현을 조절한다. 다양한 원인에 의한 비정상적인 NF- κ B의 활성화는 아토피, 알레르기, 루푸스, 관절염 등 여러 가지 자가면역 질환의 기전으로 알려져 왔다. NF- κ B family는 p65(RelA), RelB, c-Rel, p50/p105(NF- κ B1), p52/p100(NF- κ B2)5종으로 보통의 세포에서 동종 혹은 이종 이량체를 형성한다. 이들 NF- κ B 단백질의 특징은 DNA와의 결합에 관여하여 세포내 다양한 염증관련 인자에 영향을 미치게 되는 것이다. 본 실험에서 은어 단백질 및 펩타이드의 처리가 LPS로 유도한 대식세포의 염증반응에서 NF- κ B의 발현에 어떠한 영향을 미치는가에 관하여 관찰한 결과 은어 단백질 및 펩타이드의 병용처리는 전사 인자인 NF- κ B의 핵내 전사를 막아 염증 반응을 억제하는 것으로 판단된다.

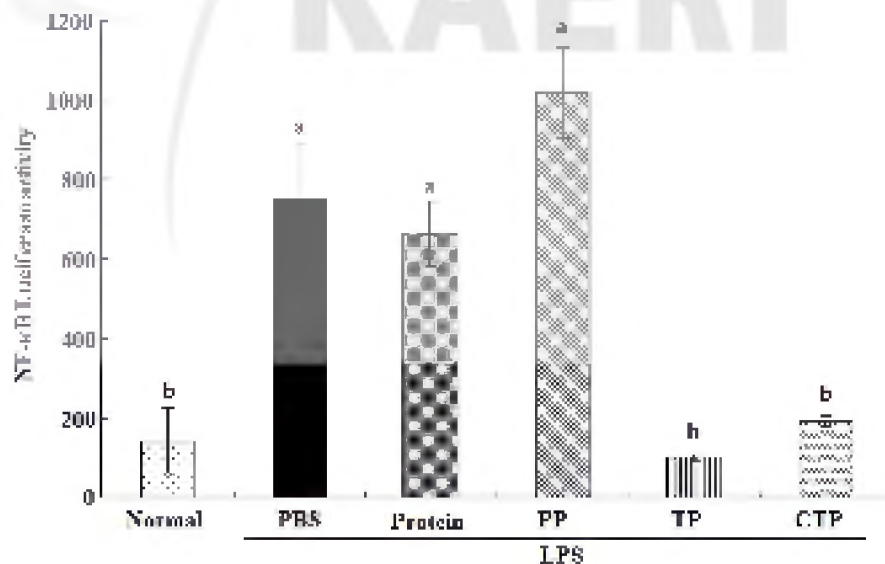


Fig. 16. 은어 단백질 및 펩타이드의 처리가 LPS로 유도한 대식세포의 염증 반응에서 NF- κ B의 발현에 미치는 영향

4. 은어의 기능성 성분 분석

가. 일반성분 및 미량성분

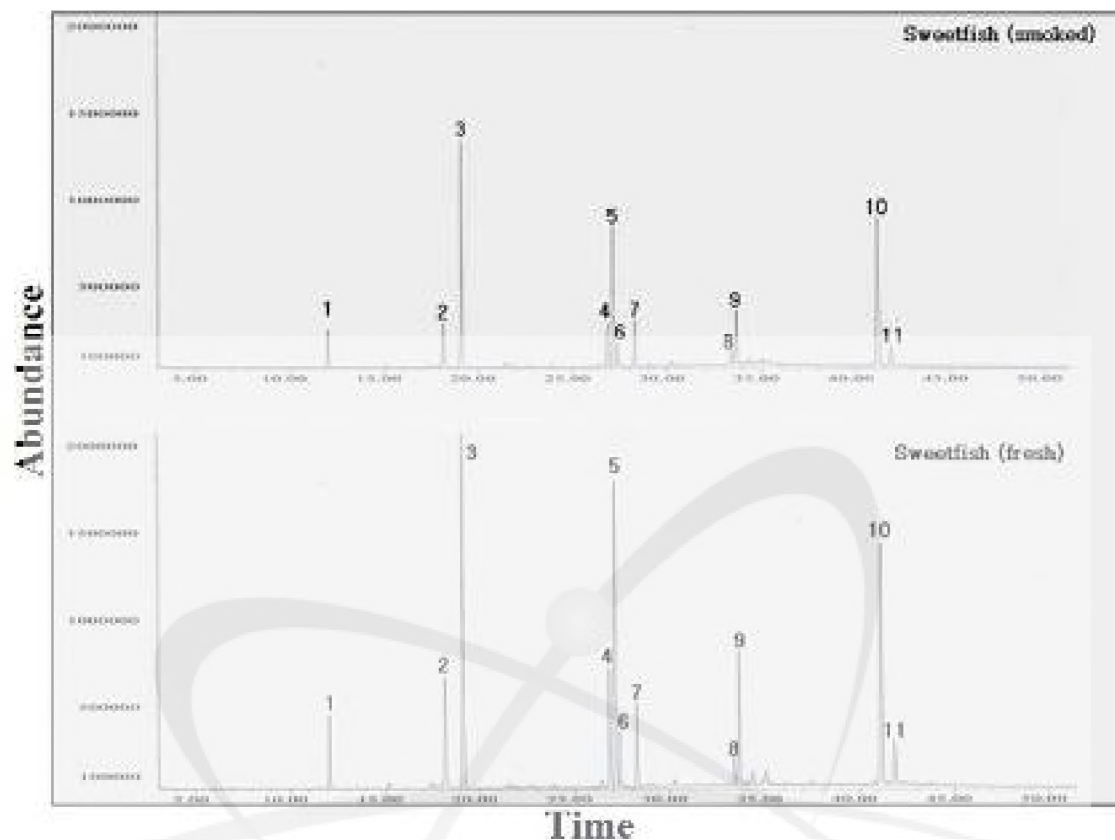
생물 은어 및 훈제은어가 함유하는 일반성분을 분석하기 위하여 은어(생물) 및 훈제은어가 포함하는 열량, 당류, 단백질, 지방, 포화지방, 트랜스 지방, 콜레스테롤, 나트륨, 칼슘, 철성분을 은어 100 g 당 함량으로 나타내었다 (Table 1). 열량의 경우 생물은어는 210 Kcal, 훈제은어는 460 Kcal로 훈제은어에서 약 2.2배 높게 관찰되었다. 당류의 경우 양쪽 모두에서 관찰되지 않았다. 단백질의 경우 14.06g과 43.44g으로 훈제은어가 약 3배 높게 나타났으며, 지방은 생물은어가 14.8g, 훈제은어가 30.7g으로 훈제은어에서 약 2배 정도 높게 나타났고, 포화지방의 비교에서는 6.5g과 12.7g 약 2배 정도 훈제은어에서 높게 관찰되었고, 트랜스지방에서는 생물은어와 훈제은어 모두 관찰되지 않았다. 콜레스테롤 비교는 33.02mg이 나온 생물은어에 비해 훈제은어는 391.57mg으로 약 11.9배 높게 나타났으며, 나트륨은 생물은어가 84.25mg, 훈제은어가 278.03mg으로 약 3.3배 훈제은어가 높게 나타났다. 칼슘은 688.31mg, 2127.30mg으로 훈제은어가 약 3배 높게 나타났고, 철은 생물은어 1.47mg, 훈제은어 1.26mg으로 비슷한 결과를 나타내었다. 생물은어에서는 일반성분의 분석은 훈제은어에서 높게 관찰되었는데, 이는 가공과정에서 훈제은어의 수분이 일부 제거되었기 때문이라고 사료된다.

Table 1. 생물 및 혼제은어의 일반성분 분석

분석항목	은어(생물)	혼제은어
열량(Kcal)	210	460
탄수화물(g/100 g)	9.59	6.05
당류 (g/100 g)	N.D.	N.D.
단백질 (g/100 g)	14.06 ± 0.18	43.44 ± 0.35
지방 (g/100 g)	14.8 ± 0.35	30.7 ± 0.83
포화지방 (g/100 g)	6.5	12.7
트랜스지방 (g/100 g)	0	0
콜레스테롤 (mg/100 g)	33.02	391.57
나트륨 (mg/100 g)	84.25 ± 0.12	278.03 ± 3.47
칼슘 (mg/100 g)	688.31 ± 0.40	2127.30 ± 16.24
철 (mg/100 g)	1.47 ± 0.01	1.26 ± 0.01

나. 지방산 조성

생물 은어 및 훈제은어가 함유하는 지방산을 Gas chromatograph mass (GC mass)를 통하여 분석하였다. 은어가 함유하는 지방산 조성을 분석하기 위하여 생물 및 훈제은어로부터 지방을 분리한 후 GC mass로 지방성분을 분석하였다(Fig. 16). 분석 결과 총 11개의 피크가 관찰되었고, 피크 분석결과를 통하여 myrisic acid, palmitoleic acid, palmitic acid, Octadecadienoic acid, Oleic acid, Vaccenic acid, Stearic acid, Arachidonic acid, Eicosapentaenoic acid(EPA), Docosahexaenoic acid(DHA)들이 검출되었고, 함량은 각각 3.33 ± 0.08 , 5.21 ± 0.12 , 28.69 ± 2.28 , 5.61 ± 0.10 , 17.30 ± 1.03 , 2.76 ± 0.04 , 5.47 ± 0.32 , 1.49 ± 0.03 , 6.01 ± 0.11 , 23.04 ± 2.18 , 1.05 ± 0.03 와 같이 검출되었다. 은어 지방산 조성 분석 결과 palmitic acid가 가장 높게 나타났고, 오메가-3 불포화 지방산인 EPA와 DHA의 수치도 높게 관찰 되었다. 불포화 지방산의 이러한 수치는 고등어에 포함되어 있는 불포화 지방산(20~25%)의 수치보다 높았고, 이러한 불포화 지방산의 함량은 다양한 생리활성을 관여할 것으로 사료된다. 일반적으로 은어 근육으로부터 불포화 지방산을 분석하면, 15~19%로 결과 되어 지는데 본 실험에서 약 30%로 높게 검출된 것은 은어로부터 지방을 분리 할 때 은어의 모든 가용부위를 사용한 결과 때문이라고 사료되며, 실제적으로 어류의 내장 부위에서 불포화 지방산이 많이 검출된다는 연구들이 보고되어 있어 본 실험의 결과를 뒷받침한다.



지방산 (% w/w)	생물 은어	훈제은어
Myristic acid	3.33 ± 0.08	3.22 ± 0.07
Palmitoleic acid	5.21 ± 0.12	6.44 ± 0.09
Palmitic acid	28.69 ± 2.28	23.65 ± 1.34
Octadecadienoic acid	5.61 ± 0.10	7.54 ± 0.24
Oleic acid	17.30 ± 1.03	18.74 ± 1.78
Vaccenic acid	2.76 ± 0.04	2.96 ± 0.08
Stearic acid	5.47 ± 0.32	4.83 ± 0.29
Arachidonic acid	1.49 ± 0.03	1.52 ± 0.05
Eicosapentaenoic acid(EPA)	6.01 ± 0.11	7.59 ± 0.18
Docosahexaenoic acid(DHA)	23.04 ± 2.18	19.99 ± 1.80
Unknown	1.05 ± 0.03	3.49 ± 0.48

Mean ± standard deviation of duplicate

Fig. 16. 생물 은어 및 훈제은어의 지방산 조성

제 3 장 참 고 문 헌

- A. Eigler, B. Sinha, G. Hartmann, S. Endres, *Immunology* 18 (1997) 487-492.
- A. Gildberg, J. Bøggwald, A. Johansen, E. Stenberg, *Comp. Biochem. Physiol.* 114B, (1996) 97-101.
- A. Koerner, J. Pawelek, Mammalian tyrosinase catalyzes three reactions in the biosynthesis of melanin. *Science* 217 (1982) 1163 - 1165.
- A. Rhule, S. Navarro, J.R. Smith, D.M. Shepherd, *J. Ethnopharmacol.* 106 (2006) 121 - 128.
- A.L. Weckmann, J. Alcocer-Varela, *Semin. Arthritis Rheum.* 26 (1996) 539-557.
- A.S. Baldwin, Jr., *Annu. Rev. Immunol.* 14(1996) 649-681.
- B.Y. Jeong, S.K. Moon, W.G. Jeong, H.S. Ha, *Korean Fish. Soc.* 32 (1999) 689-692.
- C. Jimenez-Cervantes, F. Solano, T. Kobayashi, K. Urabe, V.J. Hearing, L.A. Jose, J.C. Garcia-Borron, A new enzymatic function in the melanogenic pathway. *J. Biol. Chem.* 269 (1994) 17993 - 18001
- C.J. Lowenstein, E.W. Alley, P. Raval, A.M. Snowman, S.H. Snyder, S.W. Russell, W.J. Murphy, *Proceedings of the National Academy of Sciences of United States of America* 90 (1993) 9730 - 9734.
- C.Y. Choi, J.Y. Kim, Y.S. Kim, Y.C. Chung, K.-S. Hahm, H.G. Jeong, *Cancer Lett.* 166 (2001) 17 - 25.
- D.D. Kitts, K. Weiler, *Curr. Pharm.Design* 9(2003) 1309 - 1323.
- E.H. Han, Y.P. Hwang, H.G. Kim, H.G. Jeong, *Biochem. Bioph. Res. Co.* 355(4) (2007) 860-865.
- E.T. Rietschel, H. Brade, *Sci. Am.* 267 (1992) 54 - 61.
- H. Korhonen, A. Pihlanto, *Curr Pharm. Design* 9 (2003) 1297 - 1308.
- H.G. Byun, J.K. Lee, H.G. Park, J.K. Jeon, S.K. Kim, *Process Biochem.* 44 (2009) 842-846
- H.T. Oh, M.J. Chung, S.S. Ham, *J. Korean Soc. Food Nurt.* 38 (2009) 142-145
- I.J. Elenkov, G.P. Chrousos, *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 966(2002) 290-303.

- I.J. Jackson, D.M. Chambers, K. Tsukamoto, N.G. Copeland D.J. Gilbert, N.A. Jenkins, V. Hearing, *EMBO J* 11 (1992) 527 - 535.
- J. Bøggwald, R.A. Dalmo, R.M. Leifson, E. Stenberg, A. Gildberg, *Fish Shellfish Immun.* 6 (1996) 3-16.
- J. MacMicking, Q.-W. Xie, C. Nathan, *Annu. Rev. Immunol.* 15 (1997) 323-350.
- J. Zhang, Q. Yan, R. Ji, W. Zou, G. Guo, *Fish Shellfish Immun.* 26 (2009) 864 - 870.
- J.B. Hibbs Jr., R.R. Taintor, Z. Vavrin, *Science* 235 (1987) 473 - 476.
- J.E. Safra, Sweetfish, *The New Encyclopaedia Britannica* 11 (1998) 441.
- K. Nakajima, Y. Yoshie-Stark, M Ogushi, *Food Chem.* 114 (2009) 844-851.
- K. Ohkubo, M. Ikeda, R. Pawankar, M. Gotoh, T. Yagi, M. Okuda, *Rhinology* 34 (1998) 156-161.
- K. Tsukamoto, I.J. Jackson, K. Urabe, P.M. Montague, V.J. Hearing, *EMBO J* 11(1992) 519 - 526
- L. Sautebin, *Fitoterapia* 71 (2000) S48-S57.
- N.J. Sung, E.H. Lee, B.S. Ha, *J. Korean Soc. Food Nurt.* 1 3(1984) 163-168.
- P.A. Ba"uerle, D. Baltimore, NF- κ B: ten years after. *Cell* 87 (1996) 13-20.
- P.A. Baeuerle, V.R. Baichwal, *Adv. Immunol.* 65 (1997) 111 - 137.
- P.J. Barnes, M. Karin,. *The New England Journal of Medicine* 336(1997) 1066-1071.
- Q.W. Xie, Y. Kashiwabara, C. Nathan, *J. Biol. Chem.* 269(1994) 4705 - 4708.
- R. Hartmann, H. Meisel, *Curr. Opin. Biotech.* 18 (2007) 163 - 169.
- R.M. Palmer, D.S. Ashton, S. Moncada, *Nature* 333(1988) 664 - 666.
- S. Ghosh, M.J. May, E.B. Kopp, *Annu. Rev. Immunol.* 16 (1998) 225 - 260.
- S.K. Moon, *Bull. Korean Fish. Soc.* 26 (1993) 235-240.
- T. Kobayashi, K. Urabe, A. Winder, C. Jimenz-Cervantes, G. Imokawa, T. Brewington, F. Solano, J.C. Garcia-Borron, V.J. Hearing, *EMBO J* 13 (1994) 5818 - 5825.
- Y.K. Kim, K.J. Joo, *J. Korean Soc. Food Nutr.* 23(1994) 68-72.
- Y.W. Kim, R.J. Zhao, S.J. Park, J.R. Lee, I.J. Cho, C.H. Yang, S.G. Kim, S.C. Kim, *Brit. J. Pharmacol.* 154 (2008) 165 - 173

[첨부 1] 특허출원 명세서

관 민 생 략 출 원 번 호 통 지 서

출 원 일 자 2010.04.08
특 기 사 형 심사청구(무) 공개신청(무) 관조번호(7973)
출 원 번 호 10-2010-0032421 (접수번호 1-1-2010-0225540-36)
출 원 인 명 칭 통원근(2-1999-902707-0)
대 리 인 성 명 황이남(9-1999-000610-1)
발 명 자 성 명 김재훈 이주은 최종원 송갑석 음은철 성낙우 강윤희 전용하 이승락
발 명 의 명 칭 복어 알렉산 및 클라이드를 함유하는 항염증 활성용 조성물 및 추출방법

특 허 청 장

1. 출원번호통지서 중 발 이후 심사청제 심할 것을 확인하신 후에는 출원번호가 필요하므로 출원번호통지서는 출원일자로부터 2주까지 보관하시기 바랍니다.
2. 2-가, 특허 및 실용신안 출원은 심사청구 후 평균 15개월에 1차 심사절차가 이루어지고, 상표 및 디자인은 출원 후 평균 10개월에 1차 심사가 완료되어 이루어집니다.
2-나, 특허 및 실용신안은 특허청 홈페이지(<http://www.patent.go.kr>)의 "고객지원서비스-리원센터"와 "특허 서비스" 코너에서 1차 심사결과통지 이메일서비스를 신청하시면, 1차 심사절차 당 1개월 간격 해당 출원 번호 1차 심사결과통지 예정시기를 SMS 또는 E-mail 서비스로 제공 받을 수 있습니다.
2-다, 상표 및 디자인을 특허청 홈페이지(공제서방)에 유방 1차 심사결과통지 예정시기를 메일 게시하고 있으며, 특허정보검색서비스 시스템(<http://www.kipns.or.kr>)을 통해 개별 출원번호에 대한 1차 심사결과통지 예정시기를 알리드립니다. 또한, 출원서 1차 심사결과통지 예정시기 알림 서비스를 신청하시면, SMS 또는 E-mail 서비스로 제공해 드립니다.
3. 공개 1차 심사결과통지 예정시기는 사정에 의해 다소 늦거나 빨라 될 수 있습니다.
2-가, 1차 심사결과통지서(심사관이 특허청장의 명분을 송달하기 전 또는 심사관이 최초로 거절이유를 통지할 수 있음)에 그 거절이유를 밝히 전 공 제 2차 심사절차는 특허청에서 최초로 송달된 명세서 또는 보장에 기재된 사항의 범위 내에서 일체로 또는 보충을 보충할 수 있습니다.
특허출원을 출원일로부터 6년 이내에 특허청신청유형 변경 제24호제식에 의거 심사청구를 하고 있으면 그 출원한 출원서류를 것으로 간주하여 처리함을 알려드립니다.
3. 우선심사 특허(신용심사특허)출원 또는 디자인등록출원, 상표등록출원에 대해 조기에 심사문 출하시트 "우선심사특허"를 이용할 수 있습니다.
4. 주소 등 변경신고 출원인의 주소 등을 변경하고자 하는 경우에는 특허청 신청규칙 및 제48조의 2제식에 의한 불변한 정보변경(명칭) 신고서를 제출하여야 합니다.
5. 선행재심판 결정, 항고요청 특허 등 심도심사판을 출원 중에 있는 경우에는 해당 심도재심판 출원요청일 및 심도판 결이 표시하여야 하며, 이를 위반한 경우 특허법 제224조 및 제227조에 의거 처벌 받게 됩니다.
01 특허출원 10-2001-0000001, 실용신안출원 20-2001-0000001, 디자인등록출원 30-2001-0000001, 상표 등록출원 40-2001-0000001
6. 미심판과 미심판중인 출원인이 관20세에 도달하는 경우 출원인의 부모 등 법정대리인의 서명 또는 인을 소명 하고, 출원인의 직급 또는 대리인을 새로이 선임하여 특허에 관한 절차를 밟을 수 있습니다.
7. 문의처 기타 문의사항이 있으시면 특허고려상담센터(1644-8080)에 문의하시거나 특허청 홈페이지(www.patent.go.kr)를 참고하시기 바랍니다.
8. 특허청 주소 302-701 대전광역시 서구 선사로 139 정부대전청사 4동
특허청 서울사무소 주소 136-911 서울특별시 강남구 역삼동 347-9 한국저작권센터
FAX) 대전 : 042-472-7140, 서울 : 02-666-8454

【요약서】

【요약】

본 발명은 은어 단백질 및 펩타이드를 함유하는 항염증 및 면역조절 활성을 가지는 조성물 및 이들의 추출방법에 관한 것이다. 보다 상세하게는 염증반응인자로서의 산화질소(nitric oxide, NO) 및 사이토카인(종양괴사인자(TNF)- α , IL-6, IL-1 β)와 프로스타글란딘 E2(prostaglandin, PGE2)의 생성을 억제하고, 사이토카인과 산화질소의 생성을 조절하는 단백질인 iNOS 및 염증 반응의 매개체인 사이클로옥시게나제2(cyclooxygenase, COX-2)등과 같은 단백질을 생성하는 mRNA의 생성을 억제하여 면역조절에 관여하는 대식세포(macrophage)의 기능을 조절하는 효과를 가지고 있다.

본 발명의 추출물인 은어 단백질 및 펩타이드는 염증면역반응에 의한 질환의 예방 및 치료에 유용한 조성물을 제공한다.

【대표도】

도 1

【명세서】

【발명의 명칭】

은어 단백질 및 펩타이드를 함유하는 항염증 활성용 조성물 및 추출 방법 (Composition for anti-inflammatory activity Containing sweetfish proteins and it's peptides and Method Thereof)

【발명의 상세한 설명】

【발명의 목적】

【발명이 속하는 기술분야 및 그 분야의 종래기술】

본 발명은 항염증 및 면역조절 활성을 나타내는 은어 단백질 및 펩타이드를 함유하는 조성물에 관한 것으로서, 이는 염증반응인자로서의 사이토카인(종양괴사인자(Tumor necrosis factor(TNF)- α , Interleukin(IL)-6, IL-1 β)의 생성 억제, 산화질소(nitric oxide, NO), 프로스타글란딘 E2(prostaglandin, PGE2)의 생성을 억제하고, 사이토카인과 산화질소의 생성을 조절하는 단백질인 iNOS (inducible nitric oxide synthase) 및 염증반응의 매개체인 사이클로옥시게나제-2(cyclooxygenase-2, COX-2)등과 같은 단백질을 생성하는 mRNA의 생성을 억제하여 면역조절에 관여하는 대식세포(macrophage)의 기능을 조절하는 효과를 가지고 있어 면역염증반응 질환의 예방 및 치료를 개선시키는데 유용한 의약품 또는 기능성 식품으로 제공하는데 있다.

은어(銀魚, sweet fish; 학명 *Plecoglossus altivelis*)는 바다빙어목 바다빙어과의 어류로 분류되며, 몸길이가 약 15 cm로 어두운 청록색을 띤 회색으로 배쪽에 이를수록 그 빛깔이 연해진다. 9~10월 사이에 주로 산란하며, 물이 맑은 하천에 주로 서식하고 한국, 일본, 대만, 중국등에 주로 분포한다. 회귀성어류로서 육지와 가까운 바다에서 겨울을 보내고 이듬해 봄에 은어들이 태어난 하천으로 거슬러 올라와 일생을 보낸다. 은어의 수명은 보통 1년이고, 맛이 단백하고 비린내가 나지 않아 생선회, 구이, 조림, 튀김, 훈제 등으로 이용된다.

최근 어류로부터 정제된 다양한 기능성 펩타이드들이 개발되고 있는 추세이다. 그중 가장 대표적인 예로 정어리는 청어과의 바닷물고기로 아미노산이 풍부하며 식품으로 다양하게 이용되는 어류이다. 정어리펩타이드에는 발린(valine), 아르기닌(arginine), 아스파라긴산 (aspartic acid), 글루타민산 (glutamic acid), 프롤린(proline), 라이신(lysine) 등 각종 아미노산이 풍부하다. 혈압조절과 관련된 보고를 보면 여러 펩타이드들 중 바릴타로신(valine-tyrosine) 펩타이드가 혈압을 낮추는 작용이 있는 것으로 보고 되어 있다. 정어리펩타이드는 인체 내에 혈압 조절에 도움을 주는 성분인 바릴티로신(Val-Tyr)이 함유된 원료로 일본에는 특정보건용식품으로 인정되어 판매되고 있다.

염증반응은 조직(세포)의 손상이나 외부감염원(박테리아, 곰팡이, 바이러스, 다양한 종류의 알레르기 유발물질)에 감염되었을 때 국소 혈관과

체액 중 각종 염증 매개인자 및 면역세포가 관련되어 효소 활성화, 염증매개 물질 분비, 체액침윤, 세포 이동, 조직 파괴 등 일련의 복합적인 생리적 반응과 홍반, 부종 발열 통증 등 외적 증상이 나타난다. 정상인 경우 염증반응은 외부감염원을 제거하고 손상된 조직을 재생하여 생명체 기능회복작용을 하지만, 항원이 제거되지 않거나 내부 물질이 원인이 되어 염증반응이 과도하거나 지속적으로 일어나면 오히려 질환의 주요 병리현상 (과민성질환, 만성 염증)이 되며, 수혈, 약물투여, 장기이식 등 치료과정에서도 장애요인이 된다.

생체에 있어서 염증의 발생 원인으로서는 다양한 생화학적인 현상이 관여하고 있으며, 특히 산화질소(nitric oxide; NO)를 발생시키는 효소인 니트릭옥사이드 신타제 (nitric oxide synthase; NOS)와 프로스타글란딘 (prostaglandin; PGs)의 생합성과 관련된 효소들은 염증 반응을 매개하는데 있어서 중요한 역할을 하고 있는 것으로 알려져 있다. 따라서 L-아르기닌 (L-Arginine)으로부터 NO를 생성시키는 효소인 니트릭옥사이드 신타제(NOS)나, 아라키돈산(Arachidonic acid)으로부터 프로스타글란딘류를 합성하는데 관련된 효소인 시클로옥시게나제(COX)는 염증을 차단하는데 있어서 주된 표적이 되고 있다.

최근의 연구 결과에 따르면, 니트릭옥사이드 신타제(nitric oxide synthase; NOS)는 몇 가지 종류가 존재하는데 뇌에 존재하는 bNOS (brain NOS), 신경계에 존재하는 nNOS(neuronal NOS), 혈관계에 존재하는

eNOS(endothelial NOS) 등은 체내에 항상 일정수준으로 발현되고 있으며, 소량 생성되는 NO는 신경전달이나 혈관확장을 유도하는 등 정상적인 신체의 항상성 유지에 중요한 역할을 하는데 반하여, 각종 사이토카인(cytokines)이나 외부 자극물질에 의해 유도되는 iNOS(inducible NOS)는 급격히 과량 생성되는 NO는 세포독성이나 각종 염증반응을 일으키는 것으로 알려져 있으며, 만성 염증은 iNOS 활성의 증가와 관련 있다는 연구가 있다.

또한, 시클로옥시게나제도 2종류의 이소형태가 존재하는데, 시클로옥시게나제-1(cyclooxygenase-1, COX-1)은 세포내에 항상 존재하여 세포보호 작용에 필요한 프로스타글란딘(PGs)을 합성하는 작용을 나타내는 것에 반하여, COX-2는 염증반응 시 세포내에서 급격히 증가되어 염증 반응을 일으키는 데 있어서 중요한 역할을 수행하는 것으로 알려져 있다. NO와 프로스타글란딘(PGs)의 정도를 향상시키는 iNOS 및 COX-2를 포함하는 전사 염증 인자는 다양한 경화(sclerosis), 파킨슨병(parkinson's disease), 알츠하이머병(Alzheimer's disease) 및 결장암(colon cancer)을 포함하는 만성 질환의 병인에 관련한다.

종양괴사인자(Tumor necrosis factor; $\text{TNF-}\alpha$)와 같은 다 기능성 사이토카인(cytokine)은 정상조직에서 발현될 뿐만 아니라 병변 과정에서 그 발현 정도가 증가되며, 특히 암촉진 과정에서 일어나는 피부염증에 중요한 역할을 한다. $\text{TNF-}\alpha$ 가 인간의 염증성 피부질환과 관련이 있음은 이미 많이 보고되고 있다. 여러 염증질환과 알러지 현상에 $\text{TNF-}\alpha$ 에 대한 항체를 처리

하였을 때 증상이 완화되었고, TNF- α 는 호중성 백혈구를 활성화 시켜 과산화수소 생성을 증가시킴으로써 내인성 암촉진제로서의 기능도 하고 있다. 따라서, 발암촉진 단계와 밀접한 관계가 있는 염증단계에 중추적 역할을 하고 있는 사이토카인인 TNF- α 의 발현을 저해시키거나 COX-2 활성저해에 기인하는 프로스타글란딘 PGE2의 생성 억제를 통해 초기염증성 분자(proinflammatory molecule)의 증가를 수반하는 병변 과정을 조절할 수 있을 가능성이 높다.

한편, 대식세포(macrophage)는 혈액의 단핵세포(백혈구)에서 유래한 것으로 특수한 조직세포의 한 종류이다. 대식세포는 세포 파편을 제거하거나 병원성 미생물을 죽이고 림프구 세포로 모여져서 항원작용을 한다. 그러므로 대식세포의 활성화는 효과적인 내적 면역체계에서 중요한 역할을 수행하게 된다. 신체가 병원성 자극이나 손상을 받게 되면 대식세포는 다양한 전염증성 사이토카인(종양괴사인자(TNF)- α , 인터류킨(IL)-1, -2), 세포사이의 신호 전달을 담당하는 케모카인(chemokines), 염증성 분자, 산화질소(NO), 활성산소종(ROS) 및 PGE2를 방출하고, 또한 당단백질(공동자극분자인 CD80 및 CD86, 부착분자)의 표면 수준을 상향조절 한다.

그러나 이러한 대식세포들의 이점들은 숙주의 면역성 반응의 크기에 의존한다. 염증 매개물질에서 유래한 대식세포는 혈액 내에서 양이 많아져 패혈증(septic shock)이나 류머티즘성 관절염, 동맥경화증과 같은 염증성 질병과 관련된 손상을 막을 수 있다. 그렇기 때문에 어떠한 병이 심한 상태

에서 회복이 되느냐하는 것은 대식세포 기능 조절에 달려있다.

현재까지의 항염증 약물의 사용으로 인한 염증의 감소는 흔히 상당한 기간 동안 통증의 완화를 초래해 왔으며, 비마약성 진통제(아스피린 등)의 대부분 역시 항염증 효과를 가지므로 급성 및 만성 염증 질환의 치료에 적절히 사용되어 왔다. 그러나 부작용 때문에 장기적으로 사용하기가 곤란하며, 결과적으로 현재까지의 치료법에 부작용의 심각성이 너무 크기 때문에 새롭거나 개선된 치료제 개발은 필수적이고 시급하다고 할 수 있다. 이러한 부작용을 극복하는 문제와 관련지어 최근에는 민간에서 사용되어지는 천연물에서 그 활성 성분을 찾으려는 노력이 진행되고 있다.

이에 본 발명자들은 항염증 및 면역조절 활성을 가지는 천연물을 연구하던 중, 은어 단백질 및 펩타이드를 함유하는 추출물이 대식세포에서 면역반응을 조절하며 항염증 활성을 나타내어 염증질환을 치료하는데 효과적임을 밝힘으로써 본 발명을 완성하였다.

【발명이 이루고자 하는 기술적 과제】

본 발명의 목적은 항염증 및 면역조절 활성을 가지는 은어 단백질 및 펩타이드를 함유하는 추출물을 제공하는 것이다.

본 발명의 다른 목적은 은어 단백질 및 펩타이드를 함유하는 추출물의 cytokines(종양괴사인자(TNF- α), 인터류킨-6, 인터류킨-1 β) 발현억제, 프로스타글란딘 E2(PGE2) 및 산화질소(NO)의 발현 및 억제활성을 제공하는

것으로서 이들과 관련된 질환을 예방 또는 치료하기 위한 의약품 또는 건강 기능성 식품의 조성물을 제공하는 것이다.

【발명의 구성】

상기와 같은 목적을 달성하기 위하여 본 발명자는 은어 단백질 및 펩타이드를 함유하는 추출물을 선택하여, 이의 면역 활성화와 항염증 효능을 확인하고 그 사용방법을 개발함으로써, 이들과 관련된 질환을 예방 또는 치료하기 위한 다양한 의약품 또는 건강기능성 식품의 조성물을 제공하는 것이다.

본 발명은 은어 단백질 및 펩타이드를 함유하는 조성물에 관한 것이다. 본 발명에 사용된 은어는 경상북도 봉화군에서 양식한 은어를 구입하여 사용하였다.

또한, 본 발명에 따른 상기 추출물은 증류수, 인산완충용액, 생리식염수의 용매를 사용하여 단백질을 추출하고, 인산 완충용액으로는 인산나트륨(sodium phosphate), 인산리튬(lithium phosphate), 인산칼륨(potassium phosphate), 인산루비듐(rubidium phosphate) 및 인산세슘(cesium phosphate)으로 이루어진 그룹중 1종 이상을 사용하여 제조되며, 특히 인산 완충 용액은 인산나트륨인 것을 특징으로 하는 단백질을 추출하는 방법을 사용하며, 펩신, 트립신, 알파키토트립신, 파파인, 알칼레이즈, 뉴트라제 등의 효소중에서 1종 혹은 혼합으로 사용하여 가수분해하여 추출한 펩타이

드 추출물을 포함한다.

본 발명의 조성물은, 조성물 총 중량에 대하여 상기 추출물을 0.1 내지 20 % 중량으로 포함한다. 본 발명의 은어 단백질 및 펩타이드의 추출물을 포함하는 조성물은 통상의 방법에 따른 적절한 담체, 부형제 또는 희석제를 더 포함할 수 있다. 본 발명의 조성물에 포함될 수 있는 담체, 부형제 및 희석제로는 락토즈, 덱스트로즈, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 들 수 있다. 본 발명에 따른 추출물을 포함하는 조성물은, 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 또는 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용될 수 있다. 상세하게는, 제제화 할 경우에는 보통 사용하는 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제될 수 있다. 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 상기 추출물에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 탄산칼슘, 수크로스, 락토오스, 젤라틴 등을 섞어 조제될 수 있다. 또한, 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트, 탈크 같은 윤활제들도 사용될 수 있다. 경구를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽

제 등이 해당되는 데, 흔히 사용되는 단순 희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 등의 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제 및 좌제가 포함된다. 비수성용제, 현탁제로는 프로필렌글리콜, 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 등능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텟솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다.

본 발명의 은어 단백질 및 펩타이드의 추출물을 포함하는 조성물은 염증질환의 예방을 위한 약제, 식품 및 음료 등에 다양하게 이용될 수 있다. 본 발명의 추출물을 첨가할 수 있는 식품으로는, 각종 식품류, 예를 들어, 음료, 껌, 차, 비타민 복합제, 건강보조 식품류 등이 있으며, 환제, 분말, 과립, 침제, 정제, 캡슐 또는 음료인 형태로 사용할 수 있다. 이때, 식품 또는 음료 중의 상기 추출물의 양은, 일반적으로 본 발명의 건강식품 조성물의 경우 전체 식품 중량의 0.01 내지 20 중량%를 로 첨가할 수 있으며, 건강 음료 조성물의 경우 100ml를 기본으로 0.02 내지 10g, 바람직하게는 0.1 내지 1g의 비율로 첨가할 수 있다. 본 발명의 건강 음료 조성물은 제자시된 비율의 범위내에서 로 필수 성분으로서 상기 추출물을 함유하는 외에는 액체성분에는 특별한 제한점은 없으며 통상의 음료와 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다.

그밖에 본 발명의 조성물들은 천연 과일 주스 및 과일 주스 음료 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다. 이러한 성분은 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있다.

본 발명의 은어 단백질 및 펩타이드 추출물은 전염증성 사이토카인($\text{TNF-}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$, IL-6), 산화질소(nitric oxide, NO), 프로스타글란딘 $\text{E}_2(\text{PGE}_2)$ 의 발현 및 생성을 유의적으로 억제시키는 항염증효과를 확인함으로써, 효과적이고 안전한 염증 예방 및 치료용 약학 조성물 및 건강기능식품으로 유용하게 이용될 수 있다.

본 발명은 다음의 실시 예에 의거하여 더욱 상세히 설명되나, 본 발명이 이에 의해 제한되지는 않는다.

<실시예 1~7: 은어 단백질 제조>

경상북도 봉화군에서 양식한 은어를 구입하여, 냉동 동결건조하여 수분을 제거하고, 분쇄기를 사용하여 분쇄하였다. 분쇄된 은어 100g에 1L의 증류수(실시예 1)와 생리식염수(실시예 2) 및 각각의 인산 나트륨(실시예 3), 인산 리튬(실시예 4), 인산 칼륨(실시예 5), 인산 루비듐(실시예 6), 인산 세슘(실시예 7)으로 만들어진 인산 인산완충용액(pH 7.4) 용액을 가하여 12시간 동안 4℃ 냉장 상태에 보관하면서 마그네틱바를 사용하여 계속해서 교반하면서 단백질을 추출하였다. 다음으로 원심분리기를 이용하여 단백

질 추출액을 10,000rpm으로 30분간 원심분리하여 지질 및 불용성 부분을 제거 하였다. 이용액을 0.45 μ M 및 0.22 μ M의 크기를 가진 필터로 순차적으로 여과하고 동결건조 하여 은어 단백질로 실험에 사용하였다. 각각의 추출 용매로 추출된 단백질에 10 mL의 증류수를 가하고 단백질을 정량한 결과 중 인산나트륨(실시예 3)을 이용한 인산 완충용액이 추출 효율이 가장 좋았기 때문에 인산나트륨을 이용하는 인산 완충용액을 사용하여 단백질 및 펩타이드 정제에 이용 하였다(도 1).

표 1. 추출용매

은어 단백질 및 펩타이드 추출용매	
증류수 (실시예 1)	
생리 식염수 (실시예 2)	
인산 완충용액	인산 나트륨 (실시예 3)
	인산 리튬 (실시예 4)
	인산 칼륨 (실시예 5)
	인산 루비듐 (실시예 6)
	인산 세슘 (실시예 7)

<실시예 8~13: 은어 펩타이드 제조>

분쇄된 은어 100g에 각각의 효소가 첨가된 1L의 인산나트륨 완충용액 (실시예 3)을 가하여 36℃에서 12시간 동안 셰이킹 인큐베이터에서 250rpm으로 교반하면서 보관하여 단백질이 분해된 펩타이드를 얻었다(효소, pH 및 완충용액의 조성은 표 1에 나타내었다). 교반 후 10분간 100℃로 가열하여 효소를 불활성화하여 가수분해 반응을 종결하였다. 다음으로 원심분리기를 이용하여 펩타이드 추출액을 10,000 rpm으로 30분간 원심분리하여 지질 및

불용성 부분을 제거 하였다. 이용액을 0.45 μ M 및 0.22 μ M의 크기를 가진 필터로 순차적으로 여과하였고, 동결건조 하여 은어 펩타이드 추출물로 실험에 사용하였다

표 2. 효소 및 완충용액

효소	완충용액	pH
Pepsin (실시예 8)	50 mM Glycine-HCl	2.0
Trypsin (실시예 9)	50 mM Sodium phosphate	8.0
α -Chymotrypsin (실시예 10)	50 mM Sodium phosphate	8.0
Papain (실시예 11)	50 mM Sodium phosphate	6.0
Alcalase (실시예 12)	50 mM Sodium phosphate	7.0
Neutrase (실시예 13)	50 mM Sodium phosphate	8.0

<실시예 14: 단백질 및 펩타이드 추출물의 세포 생존율 실험>

본 실시예에서는 실시예 3와 실시예 8내지 13에서 수득한 은어 단백질 및 펩타이드의 염증억제 반응이 세포독성에서 기인한 비특이적 반응에서 유도되는지를 확인하기 위해 세포생존율에 미치는 효과를 측정하였다.

본 실시예에 사용된 RAW 264.7 세포주는 마우스의 대식세포에서 유래한 세포주이다. 이 세포의 배양중에 시료를 처리하고 세포에서 세포 증식 (cell proliferation)을 측정하여 판단하였다. RAW 264.7의 세포 증식(cell proliferation) 측정은 다음과 같이 행하였다.

RAW 264.7을 96공 평판배양기에 각 웰 당 3×10^4 농도의 세포와 세포배양 배지 100 μ l를 넣고 12시간 동안 세포를 부착시킨 후 은어 단백질 (실시예 7) 및 효소 분해된 펩타이드(실시예 8~12)를 각각 200 μ g/ml의 농

도로 시료를 처리하여 24시간동안 배양하였다. 24시간 배양 후 배지를 제거하고, 각 웰 당 MTT 용액(2.5 mg/ml) 30 μ l를 넣은 후 1시간동안 37°C CO₂ 배양기에서 배양하였다. 배지를 제거하고 DMSO(dimethyl sulfoxide)을 100 μ l씩 넣어주었다. 5분간 진탕하여 세포를 용해시키고, 마이크로플레이트 판독기에서 595nm 흡광도를 측정하였다. 수학적 식 1에 의해 세포생존율(%)을 측정하였다.

【수학적 식 1】

$$\text{세포생존율(\%)} = [\text{St} / \text{Bt}] \times 100$$

Bt : 시료를 처리하지 않은 웰을 발색 반응한 웰의 595 nm 흡광도

St : 시료를 처리한 웰을 발색 반응한 웰의 595 nm 흡광도

표 3. 단백질 및 펩타이드별 세포독성

시료명		농도 (μ g/ml)	Cell proliferation (%)
Normal		-	100
단백질 (실시예 3)		200	103.7
펩타이드	pepsin (실시예 8)	200	110.0
	trypsin (실시예 9)	200	107.5
	α -chymotrypsin (실시예 10)	200	109.2
	Papain (실시예 11)	200	105.3
	Alcalase (실시예 12)	200	103.2
	Neutrase (실시예 13)	200	107.4

표 3에서 확인할 수 있듯이 200 μ g/ml의 농도에서 실시예 3과 실시예 8내

지 13에서 수득한 은어 단백질 및 펩타이드 추출물은 각각 103.7, 110.0, 107.5, 109.2, 105.3, 103.2, 107.4%로 마우스 대식세포주인 RAW 264.7에 관하여 세포독성을 유도하지 않는 것으로 확인되었다.

<실시에 15: 은어 단백질 및 펩타이드 추출물의 LPS 처리에 의해 유도된 산화질소(NO)의 생성억제 활성 실험>

본 실시에에서는 실시에 3와 실시에 8내지 13에서 수득한 은어 단백질 및 펩타이드 추출물을 가지고 LPS에 의해 활성화된 RAW 264.7 세포로부터 생성되어지는 산화질소 억제효과를 측정하였다.

각 시료들의 산화질소 억제효과는 48-웰 플레이트에서 대식세포 RAW264.7 (1×10^6 cells/well)에 10% FBS (fetal bovine serum), 페니실린 (100 unit/ml), 스트렙토마이신 설페이트(100 μ l/ml)가 포함된 RPMI (roswell park memorial institute) 1640 배지에서 37°C, 5% 이산화탄소의 환경에서 배양하였으며, 각각의 은어 단백질 및 펩타이드 추출물(200 μ g/ml)을 30 분간 전처리한 후, LPS (1 μ g/ml)를 처리하여 24시간 배양하였다. 배양된 세포 배지 100 μ l를 그리에스 시약(5%(v/v), 인산 및 0.1% (w/v) 나프틸에틸렌디아민-염산에 용해된 동량의 1% (w/v) 설파닐아미드) 100 μ l에 혼합한 후, 실온에서 10분 동안 배양하였으며, 그 후 마이크로플레이트 리더를 이용하여 595 nm에서 흡광도를 측정하였다. 신선한 배지는 모든 실험에서 무처리군으로 사용하였다. 시료에서의 산화질소의 양은 배지

에서 준비된 소듐 니트라이트(sodium nitrite) 표준 곡선으로부터 계산되었다.

표 4. 단백질 및 펩타이드별 산화질소 농도

시료명		농도 ($\mu\text{g/ml}$)	산화질소 (μM)
Normal		-	6.6
LPS		-	31.5
LPS + 단백질 (실시예 3)		200	18.3
LPS + 펩타이드	pepsin (실시예 8)	200	14.7
	trypsin (실시예 9)	200	10.2
	α -chymotrypsin (실시예 10)	200	7.6
	Papain (실시예 11)	200	9.8
	Alcalase (실시예 12)	200	10.4
	Neutrase (실시예 13)	200	8.5

실험결과, LPS를 단독으로 처리한 그룹에서는 $31.5 \mu\text{M}$ 의 높은 산화질소의 생성이 관찰 되었으나 은어 단백질 및 펩타이드 추출물을 함께 처리한 그룹은 각각 18.3, 14.7, 10.2, 7.6, 9.8, 10.4, $8.5 \mu\text{M}$ 으로써, LPS에 의한 산화질소(nitric oxide, NO)의 발현 및 생성을 유의적으로 억제시키는 것을 알 수 있었다(표 4),

<실시예 16 : 은어 단백질 및 펩타이드 추출물의 LPS 처리에 의해 유도된 전염증성 사이토카인 $\text{TNF-}\alpha$, IL-6의 분비억제 활성>

본 실시예에서는 실시예 3와 실시예 8내지 13에서 수득한 은어 단백질 및 펩타이드 추출물을 가지고 LPS에 의해 활성화된 RAW 264.7 세포로부터 생성되는 전염증성 사이토카인의 분비에 미치는 영향을 측정하였다.

TNF- α 및 IL-6는 정상적인 방어응답과 췌장 속, 류머티즘성 관절염, 자가 면역질환과 같은 악성 염증성면역질환과 연결된 다양한 생물학적 활성을 가지는 전염증성 사이토카인으로 알려져 있다.

은어 단백질 및 펩타이드 추출물(200 $\mu\text{g/ml}$)을 RAW264.7 (1×10^6 cells/well) 세포에 30 분간 전처리한 후, LPS(1 $\mu\text{g/ml}$)를 24 시간 처리하고 얻어낸 상층액으로 부터 RAW264.7 세포에서 생성되는 전염증성 사이토카인인 TNF- α , IL-6의 생성량에 관하여 추출물들의 억제효과를 ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) 방법(Endogen, Cambridge, MA)으로 측정하였다.

표 5. 전염증성 사이토카인의 분비에 미치는 영향

시료명		농도 ($\mu\text{g/ml}$)	TNF- α (pg/ml)	IL-6 (pg/ml)
Normal		-	839.8	115.9
LPS		-	5974.1	6346.1
LPS + 단백질 (실시예 3)		200	4646.8	4862.9
LPS + 펩타이드	pepsin (실시예 8)	200	4093.5	4525.8
	trypsin (실시예 9)	200	2350.6	2350.6
	α -chymotrypsin (실시예 10)	200	2553.8	2553.7
	Papain (실시예 11)	200	2695.3	2832.1
	Alcalase (실시예 12)	200	2897.2	2993.5
	Neutrase (실시예 13)	200	3125.7	3225.8

표 5에서 알 수 있듯이, 실시예 3와 실시예 8내지 13에서 수득한 은어 단백질 및 펩타이드 추출물들은 마우스 대식세포주인 RAW264.7세포에서 LPS로 유도되는 전염증성 사이토카인인 TNF- α 및 IL-6의 우수한 억제 효과

를 나타내는 것을 관찰할 수 있었다(표 4).

<실시에 17: 은어 단백질 및 펩타이드 추출물의 프로스타글란딘 E2 (PGE2) 생성 저해 활성>

본 실시에에서는 실시에 3과 실시에 8내지 13에서 수득한 은어 단백질 및 펩타이드 추출물을 가지고 LPS에 의해 염증이 유도된 RAW 264.7 세포로부터 생성되는 프로스타글란딘 E2(PGE2)의 분비에 미치는 영향을 측정하였다. 프로스타글란딘 E2(PGE2)은 많은 다른 악성 및 만성 염증질환에서 잘 알려진 전염증성 중재자로 프로스타글란딘 E2(PGE2)의 생성에 있어 은어 단백질 및 펩타이드 추출물의 저해활성을 측정한 결과, LPS를 단독으로 처리한 그룹에서는 1193.5 pg/ml의 높은 프로스타글란딘 E2의 생성이 관찰 되었으나 은어 단백질 및 펩타이드 추출물을 함께 처리한 그룹은 각각 836.7, 608.6, 360.9, 450.1, 554.8, 542.9, 601.4 pg/ml로 프로스타글란딘 E2의 생성을 유의적으로 억제시키는 것을 알 수 있었다(표 6).

표 6. 프로스타글란딘 E2의 생성 억제 효과

시료명		농도 ($\mu\text{g/ml}$)	PGE2 (pg/ml)
Normal		–	192.1
LPS		–	1193.5
LPS + 단백질 (실시예 3)		200	836.7
LPS + 펩타이드	pepsin (실시예 8)	200	608.6
	trypsin (실시예 9)	200	360.9
	α -chymotrypsin (실시예 10)	200	450.1
	Papain (실시예 11)	200	554.8
	Alcalase (실시예 12)	200	542.9
	Neutrase (실시예 13)	200	601.4

프로스타글란딘 E2(PGE2)의 억제활성 측정은 48-웰 플레이트에서 대식세포 RAW264.7 (1×10^6 cells/ml)에 10% FBS, 페니실린(100 unit/ml), 스트렙토마이신 설페이트(100 $\mu\text{g/ml}$)가 포함된 RPMI 배지에서 37°C, 5% 이산화탄소의 환경에서 배양하였으며, 각각의 추출물(200 $\mu\text{g/ml}$)을 30 분간 전처리한 후, LPS (1 $\mu\text{g/ml}$)를 처리하여 24시간 배양하였다. 배양된 세포 상층액 100 μl 를 PGE2 측정키트 (Cayman Chemicals, Ann Arbor, MI, USA)를 사용하여 측정하였다.

<실시예 18: RT-PCR을 이용한 세포내 mRNA 발현 측정 >

본 실시예에서는 실시예 3와 실시예 8내지 13에서 수득한 은어 단백질 및 펩타이드 추출물을 가지고 LPS에 의해 활성화된 RAW 264.7 세포로부터 생성되는 사이토카인(TNF- α , IL-6, IL-1 β), iNOS, COX-2의 mRNA 발현 억제 정도를 측정하였다.

RAW 264.7 세포 배양 중에 시료를 처리하고 세포내에서 사이토카인 (TNF- α , IL-6, IL-1 β), iNOS, COX-2의 단백질을 합성하는 mRNA의 발현을 측정하여 판단하였다. RAW 264.7 세포의 mRNA 측정은 다음과 같이 행하였다.

RAW 264.7 세포를 6공 평판배양기에 각 웰당 2×10^6 농도로 분주하고 12시간 동안 세포를 부착시킨 후 각각의 은어 단백질 및 펩타이드 추출물(200 μ g/ml)을 30 분간 전처리한 후, LPS (1 μ g/ml)를 처리하여 6 시간 배양하였다. 6 시간 배양 후 세포를 트립신-EDTA로 떼어낸 후 원심분리하여 세포를 회수하였다. 회수된 세포에서 mRNA extraction kit를 사용하여 총 mRNA를 추출하였고, PCR을 통해서 cDNA로 변환 시켜준 후, cytokines (TNF- α , IL-6, IL-1 β), iNOS, COX-2의 프라이머와 함께 RT-PCR을 수행하고 이를 1.2%의 agarose젤에 로딩하여 밴드의 인텐시티를 측정하여 세포내 cytokines(TNF- α , IL-6, IL-1 β), iNOS, COX-2의 mRNA 발현을 측정하였다 (표 7). 사이토카인(TNF- α , IL-6, IL-1 β) 및 iNOS, COX-2의 mRNA 발현은 무처리군(normal) 밴드 대한 처리구의 밴드로 수학적 2에 의해 밴드의 Intensity를 측정하였다(표 7).

【수학식 2】

mRNA intensity fold = 처리구 밴드 intensity/ 무처리구 밴드 intensity

표 7. 세포내 mRNA 발현 측정 결과

시 료 명		Intensity fold (TNF- α)	Intensity fold (IL-6)	Intensity fold (IL-1 β)	Intensity fold (COX-2)	Intensity fold (iNOS)
Normal		1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
LPS		1.5	4.2	5.4	3.2	2.1
LPS + 은어 단백질 (실시예 3)		1.3	3.1	4.2	2.4	1.9
LPS + 펩타이드	pepsin (실시예 8)	1.3	3.0	3.8	2.1	1.7
	trypsin (실시예 9)	1.2	2.7	3.9	2.0	1.5
	α -chymotrypsin (실시예 10)	1.0	2.4	3.4	1.5	1.3
	Papain (실시예 11)	1.1	2.5	3.3	2.0	1.4
	Alcalase (실시예 12)	1.0	2.6	3.4	1.7	1.3
	Neutrase (실시예 13)	1.2	2.5	3.2	1.6	1.4

표 7에서 알 수 있듯이, 실시예 2와 실시예 7내지 12에서 제조한 은어 단백질 및 펩타이드 추출물들은 마우스 대식세포주인 RAW264.7세포에서 LPS로 유도되는 전염증성 사이토카인(TNF- α , IL-6, IL-1 β)과 COX-2 및 iNOS등의 염증성 인자들의 mRNA의 생성이 억제되는 것을 관찰할 수 있었다.

【발명의 효과】

본 발명의 은어 단백질 및 펩타이드 추출물은 다양한 전염증성 사이토카인의 활성화, 생성 및 발현을 억제하여 항염증 활성을 나타내므로 염증 질환, 염증반응과 관련된 동맥경화 및 이로 인한 순환기 질환의 예방 및 치료용도의 의약품 또는 식품첨가제로 유용하게 사용될 수 있는 효과가 있다.

이상에서는 본 발명의 바람직한 실시예에 대해 설명하였으나 당해 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자라면 본원 발명의 요지를 벗어남이 없이 다양한 변형실시가 가능할 것이며, 이러한 변형실시는 본원 발명의 보호범

위에 속하는 것으로서 본원 발명의 보호범위는 특허청구범위에 기재된 바에 따라 해석되어야 할 것이다.



【특허청구범위】

【청구항 1】

은어 단백질 및 펩타이드를 함유하는 항염증 활성 및 면역조절용 조성물.

【청구항 2】

제1항에 있어서, 상기 은어 단백질 및 펩타이드를 0.01 내지 20 중량% 함유하는 것을 특징으로 하는 조성물.

【청구항 3】

제 1항에서 있어서, 은어 단백질은 인산완충용액 또는 생리식염수를 사용하여 단백질을 추출하고, 그 중 인산 완충용액은 인산나트륨, 인산리튬, 인산칼륨, 인산루비듐 또는 인산세슘(cesium phosphate) 중에서 선택된 1종 또는 2종 이상의 혼합용매로 단백질 및 펩타이드를 추출하여, 현탁액을 여과한 후 얻어진 액상물을 동결 건조하여 은어 단백질 및 펩타이드를 얻는 것을 특징으로 하는 조성물

【청구항 4】

제 1항에 있어서, 은어 펩타이드는 펩신, 트립신, 알파키모트립신, 파파인, 알칼레이즈, 뉴트라제 중에서 선택된 1종 또는 2종이상의 효소를 사용하여 가수분해하여 추출하는 것을 특징으로 하는 조성물.

【청구항 5】

제 1항에 있어서, 상기 은어 단백질 및 펩타이드 추출물을 유효성분

으로 포함하는 관절염, 패혈증, 염증의 염증성 질환 또는 자가면역질환의 예방 및 면역조절의 치료 효과를 갖는 조성물.

【청구항 6】

제 5항에 있어서, 상기 조성물은 LPS(lipopolysaccharide)에 의해 활성화된 대식세포에서 염증발생 인자의 활성화, 발현 및 생성을 억제하는 것을 특징으로 하는 조성물.

【청구항 7】

제 5항에 있어서, 상기 조성물은 산화질소(NO)의 생성을 저해하는 것을 특징으로 하는 조성물.

【청구항 8】

제 5항에 있어서, 상기 조성물은 IL-6, IL-1 β 또는 TNF- α 에서 선택되는 전염증성 사이토카인의 생성을 저해하는 것을 특징으로 하는 조성물.

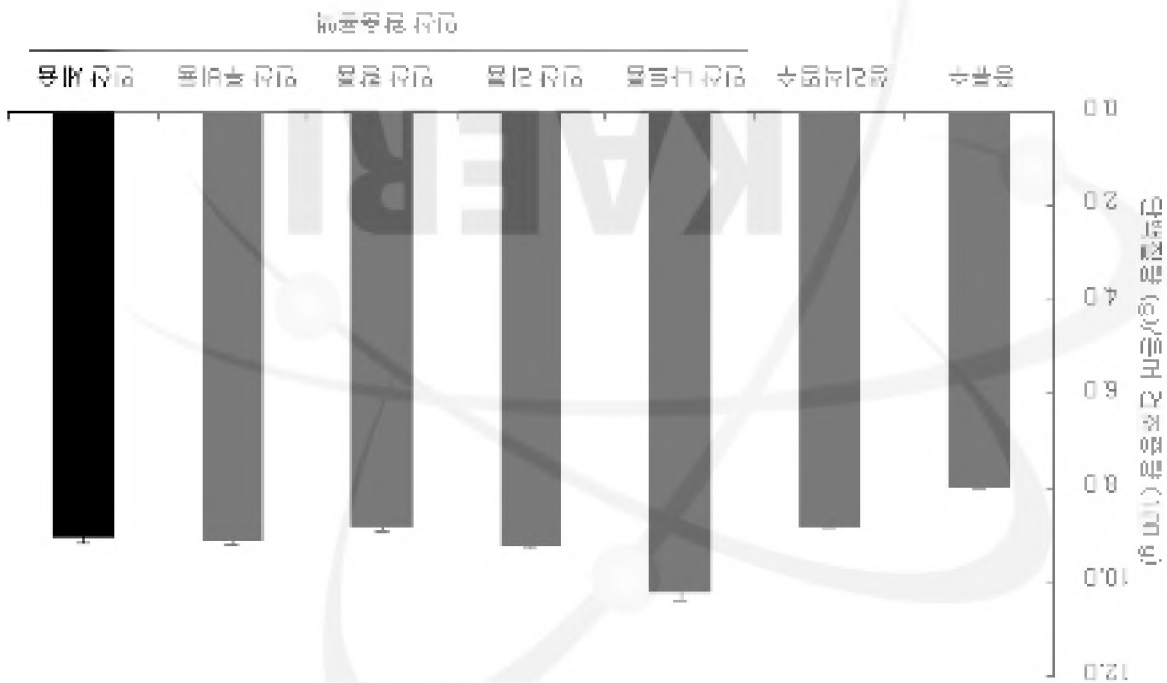
【청구항 9】

제 5항에 있어서, 상기 조성물은 프로스타글란딘 E₂(PGE₂)을 저해하는 것을 특징으로 하는 조성물.

【청구항 10】

제 1항 내지 제9항 선택된 어느 한 항의 은어 단백질 및 펩타이드 추출물을 유효성분으로 함유하는 염증성 질환의 예방 및 개선용 또는 면역조절용 약제학적 조성물.

【청구항 11】



【도 1】

제품 1호 내지 제9호 선택된 어느 한 항목의 경우 단백질 및 펩타이드 총 함량을 유효성분으로 함유하는 영양성 질환의 예방 및 개선용 또는 면역조절을 위한 기능성 식품 조성물.

관인생략

출원번호통지서

출원일자 2010.04.08

특기사항 식사행위(음) 용게상징(무) 피조리호(7972)

출원번호 10-2010-0032417 (정수번호 1-1-2010-0225518-31)

출원인명칭 동원군(2-1999-202707-0)

대리인성명 양이남(9-1990-000610-1)

발명자성명 김지은 이주은 최광일 송법석 원오환 신남은 정필근 권철하 이승락

발명의명칭 손어 단려질 및 필타이드를 함유하는 화장료 조성물

특허청장

1. 특허요청지시 송달 이후 심사청구 상환 등을 확인한 때에는 출원료료가 필요하오니 출원료료통지서를 출원인에게 송달할 필요가 도록 하시기 바랍니다.
2. 특허 및 실용신안 출원은 심사청구 후 평균 16개월에 1차 심사제기와 대응드리고, 양대 및 디자인은 출원 후 평균 10개월에 1차 심사제기와 이루어집니다.
- 2-나. 특허 및 실용신안은 특허청 홈페이지(<http://www.patent.go.kr>)의 "고려지형서비스-특원청지과 정보지 서비스" 코너에서 1차 심사결과통지 에그서비스를 신청하시며, 1차 심사제기와 각 1개월 안에 해당 출원건의 1차 심사결과통지 예정시기를 SMS 또는 E-mail 서비스로 검색 받을 수 있습니다.
- 2-다. 상표 및 디자인은 특허청 홈페이지(공지사항)에 규별 1차 심사결과통지 예정시기를 매일 게시하고 있으며, 특허청정보서비스 시스템(<http://www.kipra.go.kr>)을 통해 해당 출원주에 대한 1차 심사결과통지 예정시기를 알라드립니다. 또한, 출원시 1차 심사결과통지 예정시기 알람 서비스를 신청하시면, SMS 또는 E-mail 서비스로 제공해 드립니다.
- * 상기 1차 심사결과통지 예정시기는 사정에 의해 다소 늦거나 빨라질 수 있습니다.
- 2-다. 1차 심사결과통지시(원사건)에 특허청장의 통보를 송달하기 전 또는 심사관이 최초로 거절이유를 통지한 후 출원인이 그 거절이유를 받기 전 (단, 배심 때)까지 취항처에서 특허청명세서에 피조로 등록될 명세서 또는 도면에 기재된 사항의 변경 한하여 명세서 또는 도면을 보정할 수 있습니다.
- 특정출원은 출원일로부터 6년 이내에 특허청 심사규칙 별지 제24호서식에 의거 심사청구를 하지 않으면 그 출원은 출원취하된 것으로 간주하여 처리함을 알려드립니다.
3. 무선인사 특허(신용신인용특)출원 또는 대차의용특출원, 상표등록출원에 대하여 심사를 원하시면 "무선인사제도"를 이용하실 수 있습니다.
4. 주소등 변경신고 출원인의 주소등을 변경하고자 하는 경우에는 특허청 시행규칙 별지 제4호의 2서식에 의한 출원인 정보변경(경정) 신고서를 제출하여야 합니다.
5. 산업재산권 표시, 광고모형 특허 등 산업재산권을 출원 중에 있는 경우에는 해당 산업재산이 출원상항을 늘 다음과 같이 표시하여야 하며, 이를 위반할 경우 특허법 제224조 및 제227조에 의거 처벌 받게 됩니다.
- (예) 특허출원 10-2001-0000001, 실용신안등록출원 20-2001-0000001, 디자인등록출원 30-2001-0000001, 상표등록출원 40-2001-0000001
6. 미상네지 미상네지인 출원인이 만20세에 도달하는 경우 출원인의 부모 등 법정대리인의 대리인은 소멸하게 되므로, 출원인은 직할 또는 대리인들 사후에 선임하여 특허에 관한 절차를 진행할 수 있습니다.
7. 문의처 기타 문의사항이 있으시면 특허고려상항센터(1544-8080)에 문의하시거나 특허청 홈페이지(www.patent.go.kr)를 참고하시기 바랍니다.
8. 특허청 주소 302-701 대전광역시 서구 신서로 139 정부대전청사 4동
특허청 서울사무소 주소 135-911 서울특별시 강남구 역삼동 547-9 한국지식정보
FAX) 대청 : 042-472-7140, 서울 : 02-566-8454

【요약서】

【요약】

본 발명은 은어 단백질(protein) 및 펩타이드(peptide)를 함유하는 화장료 조성물에 관한 것으로 전체 조성물 총중량을 기준으로 0.01~20.0중량%로 함유되는 것을 특징으로 한다.

본 발명에 따른 은어 단백질 및 펩타이드를 함유한 화장료는 피부 기미, 주근깨 및 피부 색소 침착의 원인이 되는 물질인 멜라닌 생성을 막아주는 티로시나제 (tyrosinase) 활성 억제효과, 멜라닌(melanin) 합성 억제효과 등의 미백효과와 자유라디칼(free radical) 소거능이 우수하여 항산화 효과가 우수하다.

따라서 은어 단백질 및 펩타이드를 함유하는 화장료 조성물을 제조하여 피부 미백효과가 있는 다기능성 화장료 조성물을 제공할 수 있다.

【대표도】

도 1

【명세서】

【발명의 명칭】

은어 단백질 및 펩타이드를 함유하는 화장료 조성물{Composition for whitening activity Containing sweetfish proteins and it's peptides and Method Thereof}

【발명의 상세한 설명】

【발명의 목적】

【발명이 속하는 기술분야 및 그 분야의 종래기술】

본 발명은 은어 단백질(protein) 및 펩타이드(peptide)를 함유하는 화장료 조성물에 관한 것으로 전체 조성물 총중량을 기준으로 0.01~20.0 중량%로 함유하며, 미백효과가 우수한 화장료 조성물에 관한 것이다.

사람의 피부는 노화가 진행됨에 따라서 피부탄력의 상실, 피부 주름의 형성, 피부색의 변화, 피부 베리어 기능상실, 피부면역기능의 상실 등의 물리·화학적 변화 동반한다. 특히 중금속, 황사, 오존, 자외선, 화장품 기재등과 같은 외부 환경의 자극 물질은 피부 세포의 활성 저하, 피부세포의 괴사, 세포 변성 등을 촉진하여 주름형성촉진, 색소침착, 면역기능의 상실, 염증 증가 등을 촉진시키는 주요 인자이다.

은어(銀魚, sweet fish; 학명 *Plecoglossus altivelis*) 는 바다빙어목 바다빙어과의 어류로 분류되며, 몸길이가 약 15 cm로 어두운 청록색을

핀 회색으로 배쪽에 이를수록 그 빛깔이 연해진다. 9~10월 사이에 주로 산란하며, 물이 맑은 하천에 주로 서식하고 한국, 일본, 대만, 중국등에 주로 분포한다. 회귀성어류로서 육지와 가까운 바다에서 겨울을 보내고 이듬해 봄에 은어들이 태어난 하천으로 거슬러 올라와 일생을 보낸다. 은어의 수명은 보통 1년이고, 맛이 단백하고 비린내가 나지 않아 생선회, 구이, 조림, 튀김, 훈제 등으로 이용된다.

최근 어류로부터 정제된 다양한 기능성 펩타이드들이 개발되고 있는 추세이다. 그중 가장 대표적인 예로 정어리는 청어과의 바닷물고기로 아미노산이 풍부하며 식품으로 다양하게 이용되는 어류이다. 정어리펩타이드에는 발린(valine), 아르기닌(arginine), 아스파라긴산 (aspartic acid), 글루타민산 (glutamic acid), 프롤린(proline), 라이신(lysine) 등 각종 아미노산이 풍부하다. 혈압조절과 관련된 보고를 보면 여러 펩타이드들 중 바릴타로신(valine-tyrosine) 펩타이드가 혈압을 낮추는 작용이 있는 것으로 보고 되어 있다. 정어리펩타이드는 인체 내에 혈압 조절에 도움을 주는 성분인 바릴티로신(Val-Tyr)이 함유된 원료로 일본에서는 특정보건용식품으로 인정되어 판매되고 있다.

피부색을 결정하는 가장 중요한 인자는 멜라닌(melanin), 카로틴(carotene), 헤모글로빈(hemoglobin) 등이 있는데 이중 가장 중요한 것은 멜라닌이다. 멜라닌의 생합성은 아미노산의 일종인 티로신(tyrosine)이 멜라노사이트(melanocyte)의 멜라노좀(melanosome)에서 티로시나제

(tyrosinase)에 의해 산화되어 디하이드록시 페닐알라닌(dihydroxy, phenylalanine)으로 전환되는 것을 시작으로 계속되는 일련의 산화과정을 거쳐 갈색(heomelanin), 흑색(eumelanin)의 중합체로 형성된다. 이러한 생합성 과정은 멜라노좀이라는 특수한 형태의 갈색 세포내 소기관에서 진행되며 멜라닌 과립을 포함한 멜라노좀은 핵 주변 부위에서 수지상 돌기 끝부분으로 이동, 케라티노사이트의 식세포작용에 의해 세포질 내로 이동하고 이들은 케라티노사이트의 핵 주변에 축적된다. 멜라닌의 합성과 멜라노좀의 수, 주위의 케라티노사이트로의 이동은 일차적으로 유전적인 영향을 받으며 중금속, 황사, 오존, 자외선등과 같은 외부 환경과 호르몬 계분비 이상 등의 내부 환경의 영향을 받는다.

그 밖에 티로시나제의 발현 및 멜라닌의 합성, 전송에 관여하는 세포내 조절인자인 싸이토카인(cytokine), 구리, 아연, 철 등의 금속 이온 및 인터페론, 프로스타글란딘, 히스타민 등이 관여하는 것으로 알려져 있다(박수남, *대한화장품학회지*, 25: 77-127, 1999). 따라서 피부색을 결정짓는 멜라닌의 합성을 억제하고 이에 관여하는 효소인 티로시나제의 활성을 억제하여 피부의 미백효과를 기대할 수 있다.

종래에는, 기미, 주근깨, 색소침착 등과 같은 피부색소 이상침착 증상과 자외선 노출 등에 의해 발생한 과도한 멜라닌 색소 침착을 치료 또는 경감시켜주기 위해서, 이전부터 아스코르빈산, 코지산, 알부틴, 하이드로퀴논, 글루타치온 또는 이들의 유도체, 티로시나제 저해활성을 가진 물질들을

화장료나 의약품에 배합 사용하여 왔다. 그러나 이들은 불충분한 미백효과, 피부에 대한 안전성 문제, 화장료에 배합시 제형 및 안정성 문제 등으로 인해 그 사용이 제한되고 있다.

한편, 현재 이들 기존 미백 효능 물질들 이외에 천연물 중에서 미백 활성성분을 찾기 위한 연구가 계속 이루어지고 있는데, 그 중 상백피(한국공개특허 제1992-002109호, 제1997-021273호), 감초(한국공개특허 제1992-002109호) 등 다수의 식물추출물이 티로시나제에 작용하여 멜라닌 생성을 억제한다는 사실이 밝혀졌으나, 이들 역시 안전성, 안정성, 변색 가능성 등의 측면에서 화장품이나 의약품에 유효 농도 이상으로 사용하는 데는 많은 문제점을 갖고 있으며 만족할 만한 효과를 내지 못하는 실정이다.

중금속, 황사, 오존, 자외선, 화학물질 등의 외적 자극인자들은 자유 라디칼 경로를 경유하는 것이다. 자유 라디칼들은 피부세포의 활성을 억제하고, 피부세포의 괴사와 변성을 유도하여 피부 콜라겐 등의 결합조직형성 파괴, 세포막 기능저해, DNA 변이촉진, 단백질 작용 변형, 세포간 에너지 전이, 신진대사와 관련된 분자들의 변형 등을 유발하는 것으로 알려져 있다. 노화에 자유 라디칼이 관여한다는 사실은 자유 라디칼을 불활성화 시키는 항산화제 또는 여러 가지 화학적 소거제들을 사용하여 노화과정을 지연시킬 수 있다는 것을 의미한다.

따라서 본 발명자는 천연물에서 미백효과, 항산화 효과가 있는 다기능 화장료를 찾고자 다양한 연구를 수행한 결과 은어 단백질 및 펩타이드의

피부세포에 대한 효능에 주목하게 되었다.

【발명이 이루고자 하는 기술적 과제】

본 발명의 목적은 피부 화장료에 적용 가능하고 화장료에 함유 시 멜라닌의 생성 및 이와 관련된 효소의 활성을 억제하여 우수한 미백효과를 나타내는 은어 단백질 및 펩타이드를 함유하는 화장료 조성물을 제공하는 것이다.

본 발명의 또 하나의 목적은 피부 화장료에 적용 가능하고 화장료에 함유 시 항산화효과를 나타내는 은어 단백질 및 펩타이드를 함유하는 화장료 조성물을 제공하는 것이다.

【발명의 구성】

상기와 같은 목적을 달성하기 위하여 본 발명자는 은어 단백질 및 펩타이드를 함유하는 화장료 조성물을 선택하여, 이의 화장품 원료로서의 효능을 확인하고 그 사용방법을 개발함으로써, 다양한 화장품 원료의 선택범위를 높이고, 피부자극이 없으면서 다기능성 효과를 나타내는 화장품을 제조할 수 있는 방법을 제공한다.

본 발명은 은어 단백질 및 펩타이드를 함유하는 화장료 조성물에 관한 것으로 본 발명에 사용된 은어는 경상북도 봉화군에서 양식한 은어를 구입하여 사용하였다.

또한, 본 발명은 상기 은어 단백질 및 펩타이드가 전체 조성물 총중량을 기준으로 0.01~20.0중량%로 함유되는 것을 특징으로 한다. 또한 본 발명에 따른 화장료 조성물은 상기의 추출물 외에 본 발명이 목적으로 하는 주효과를 손상시키지 않는 범위 내에서 바람직하게는 주효과에 상승효과를 줄 수 있는 다른 성분 등을 함유하는 것도 무방하다.

한편, 상기 은어 단백질 및 펩타이드는 특정의 범위에 한정하는 것은 아니나, 바람직하게는 화장료 총중량에 대해 0.01~20중량% 함유되는 것이 좋는데, 0.01중량% 미만으로 첨가하는 경우에는, 효과를 기대하기 힘들고, 20중량%를 초과하여 첨가되는 경우에는 뚜렷한 효능 효과의 상승이 보이지 않는다.

또한, 본 발명에 따른 은어 단백질 및 펩타이드를 얻기 위한 은어 추출물은 증류수, 인산완충용액, 생리식염수의 용매를 사용하여 단백질을 추출하고, 인산 완충용액으로는 인산나트륨(sodium phosphate), 인산리튬(lithium phosphate), 인산칼륨(potassium phosphate), 인산루비듐(rubidium phosphate) 및 인산세슘(cesium phosphate)으로 이루어진 그룹중 1종 이상을 사용하여 제조되며, 특히 인산완충 용액은 인산나트륨인 것을 특징으로 하는 단백질을 추출하는 방법을 사용하며, 펩신(pepsin), 트립신(trypsin), 알파키모트립신(α -Chymotrypsin), 파파인(papain), 알칼레이즈(alkalase), 뉴트라제(nutrased) 등의 효소중에서 1종 혹은 혼합으로 사용하

여 가수분해하여 추출한 펩타이드 추출물을 포함한다.

뿐만 아니라, 본 발명은 상기 화장료 조성물이 화장수, 젤(gel), 수용성 리퀴드(liquid), 크림(cream), 에센스(essence), 수중유(O/W)형 또는 유중수(W/O)형의 기초화장료 제형과 수중유형 또는 유중수형 메이크업베이스(makeup base), 파운데이션(foundation), 스킨커버(skin cover), 립스틱(lipstick), 립글로스(lipgross), 페이스파우더(face powder), 투웨이케익(twoway cake), 아이섀도(eyeshadow), 치크칼라(chick color) 및 아이브로우 펜슬(eyebrow pencil)류의 색조화장료 제형 중에서 선택되는 것을 특징으로 한다. 본 조성물은 다소 유체일수 있으며, 백색 또는 유색크림, 연고, 밀크로션, 유액(serum), 에센스, 페이스트 또는 무스의 외관을 가질 수 있다. 이는 선택적으로 에어로졸 형태로 피부에 적용될 수도 있고, 고체 형태 예컨대, 스틱의 형태일 수도 있다. 이는 피부용 케어 제품 및/또는 메이크업 제품으로서 사용될 수도 있다.

본 발명에 따른 조성물은 또한 화장 분야에서 통상적인 보조제 예컨대 친수성 또는 친유성 겔화제, 친수성 또는 친유성 활성제, 보존제, 향산화제, 용매, 방향제, 충전제, 차단제, 안료, 흡취제 및 염료를 함유할 수 있다. 이들 다양한 보조제의 양은 당해 분야에서 통상적으로 사용되는 양이며, 예컨대 조성물 총중량에 대해 0.01~70 중량 %이다. 이러한 보조제는 지방상, 수성상, 지질 소포체 및/또는 나노입자에 도입될 수 있다. 어떠한 경우라도 보조제 및 그 비율은 유성 겔화제, 친수성 또는 친의 바람직한 성질

에 악영향을 미치지 않도록 선택될 것이다.

또한 본 발명의 주제는 피부 미백제, 항산화 효과에 사용되는 은어 단백질 및 펩타이드를 함유하는 화장품 조성물의 용도이다.

이하, 실시예를 통해 본 발명을 좀 더 구체적으로 설명한다. 단, 이들 실시예는 본 발명의 예시적인 기재일 뿐이며 본 발명의 범위가 이들 실시예에 국한되는 것은 아니다.

<실시예 1~7 은어 단백질 제조>

경상북도 봉화군에서 양식한 은어를 구입하여, 냉동 동결건조 하여 수분을 제거하고, 분쇄기를 사용하여 뼈를 포함한 은어 전부위를 분쇄하였다.

상기의 분쇄된 은어 100g에 1L의 증류수(실시예 1)와 생리식염수(실시예 2) 및 각각의 인산 나트륨(실시예 3), 인산 리튬(실시예 4), 인산 칼륨(실시예 5), 인산 루비듐(실시예 6), 인산 세슘(실시예 7)으로 만들어진 인산 인산완충용액(pH 7.4) 용액을 가하여 12시간 동안 4℃ 냉장 상태에 보관하면서 마그네틱바를 사용하여 계속해서 교반하면서 단백질을 추출하였다. 추출된 단백질은 SDS-PAGE(Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis)를 통하여 확인하였다.

다음으로 원심분리기를 이용하여 단백질 추출액을 10,000rpm으로 30

분간 원심분리하여 지질 및 불용성 부분을 제거 하였다. 이용액을 0.45 μM 및 0.22 μM 의 크기를 가진 필터로 순차적으로 여과하고 동결건조 하여 은어 단백질로 실험에 사용하였다.

각각의 추출 용매로 추출된 단백질에 10 mL의 증류수를 가하고 단백질을 정량한 결과 중 인산 나트륨(실시예 3)을 이용한 인산 완충용액이 추출 효율이 가장 좋았기 때문에 인산 나트륨을 이용하는 인산 완충용액을 사용하여 단백질 및 펩타이드 정제에 이용 하였다(도 1).

【표 1】 실시예에 따른 추출용매

은어 단백질 및 펩타이드 추출용매	
증류수 (실시예 1)	
생리 식염수 (실시예 2)	
인산 완충용액	인산 나트륨 (실시예 3)
	인산 리튬 (실시예 4)
	인산 칼륨 (실시예 5)
	인산 루비듐 (실시예 6)
	인산 세슘 (실시예 7)

<실시예 8~13: 은어 펩타이드 제조>

분쇄된 은어 100g에 각각의 효소가 첨가된 1L의 인산 나트륨 완충용액(실시예 3)를 가하여 36℃에서 12시간 동안 셰이킹 인큐베이터(shaking incubator)에서 250rpm 으로 교반하면서 보관하여 단백질이 분해된 펩타이드를 얻었다(효소, pH 및 완충용액의 조성은 표 2에 나타내었다). 교반 후 10분간 100℃로 가열하여 효소를 불활성화 하여 가수분해 반응을 종결하였

다. 다음으로 원심분리기를 이용하여 펩타이드 추출액을 10,000 rpm으로 30 분간 원심분리하여 지질 및 불용성 부분을 제거 하였다. 이용액을 0.45 μ M 및 0.22 μ M의 크기를 가진 필터로 순차적으로 여과하였고, 동결건조 하여 은어 펩타이드 추출물로 실험에 사용하였다

【표 2】

실시예	효소	완충용액	pH
실시예 8	Pepsin	50 mM Glycine-HCl	2.0
실시예 9	Trypsin	50 mM Sodium phosphate	8.0
실시예 10	α -Chymotrypsin	50 mM Sodium phosphate	8.0
실시예 11	Papain	50 mM Sodium phosphate	6.0
실시예 12	Alcalase	50 mM Sodium phosphate	7.0
실시예 13	Neutrase	50 mM Sodium phosphate	8.0

<실시예 14: 머쉬룸 티로시나제(mushroom tyrosinase)를 이용한 티로 시나제 활성 억제효과 측정>

본 실시예에서는 실시예 3과 실시예 8 내지 실시예 13에서 수득한 은 어 단백질 및 펩타이드의 미백효과를 확인하기 위해 티로시나제 (tyrosinase) 효소의 기능이 억제되는 정도를 본 후 판단하였다.

티로시나제는 생체내에서 티로신(tyrosine)이라는 물질의 산화과정을 촉진하여 멜라닌이 생성되게 도와주는 효소이다. 본 실시예에서는 이 효소 의 기능을 억제하여 티로신이 산화되어 멜라닌이라는 흑색의 고분자를 형성 하는 것을 억제하는 정도를 측정하는 방법(SH Pomerantz, *J Biol chem*, 241: 161-168, 1966)을 응용해 미백효과를 판정하였다.

실시에 3, 8, 9, 10, 11, 12, 13에서 수득한 은어 단백질 및 펩타이드를 시료로 사용하여 티로시나제 활성 억제효과를 조사하였다. 각 시료들의 티로시나제에 대한 저해활성은 시료 15 μ l를 96공 평판배양기(96-well plate)에 넣고, 50mM 인산 완충액(pH 6.5) 150 μ l, 1.5mM L-티로신 용액 25 μ l를 넣은 후, 머쉬룸 티로시나제(1,500 units/ml, Sigma) 10 μ l를 첨가하여 37°C에서 20분간 반응시킨 후, 흡광 광도계(microplate reader, ELx800, 미국)를 사용하여 490nm에서 흡광도를 측정하여 티로시나제에 대한 활성 저해율을 측정하였다. 티로시나제에 대한 활성 저해율(%)은 수학적 식 1에 의하여 계산하였다.

【수학적 식 1】

$$\text{티로시나제에 대한 활성 저해율(\%)} = [(D-C)-(B-A)/(D-C)] \times 100$$

A : 시료를 넣은 웰의 반응전 흡광도

B : 시료를 넣은 웰의 반응후 흡광도

C : 시료를 넣지 않은 웰의 반응전 흡광도

D : 시료를 넣지 않은 웰의 반응후 흡광도

티로시나제 활성 억제효과를 시험한 결과, 은어 단백질 및 펩타이드의 티로시나제 활성 저해 효과는 200 μ g/ml 농도에서 은어 단백질 및 효소(enzyme)의 종류에 따른 펩타이드에서 각각 48.3%, 31.9%, 37.1%, 36.2%, 34.5%, 30.1%, 29.4%로 기존의 미백제인 알부틴(15.6%)보다 우수한 티로시

나제 활성저해 효과를 나타내었다(표 3 참조).

【표 3】 티로시나제 활성저해 효과

시료명		농도 ($\mu\text{g/ml}$)	티로시나제 활성저해 효과 (%)
알부틴		200	15.6%
은어 단백질(실시예 3)		200	48.3%
은어 펩타이드	Pepsin 가수분해물(실시예 8)	200	31.9%
	Trypsin 가수분해물(실시예 9)	200	37.1%
	α -Chymotrypsin 가수분해물 (실시예 10)	200	36.2%
	Papain(실시예 11)	200	34.5%
	Alcalase(실시예 12)	200	30.1%
	Neutrase(실시예 13)	200	29.4%

<실시예 15: B16BL6 멜라노사이트를 이용한 멜라닌 생성 억제효과 측정>

본 실시예에서는 실시예 3과 실시예 8 내지 실시예 13에서 수득한 은어 단백질 및 펩타이드의 미백효과를 확인하기 위해 B16BL6 멜라노사이트에 대한 멜라닌 생성 억제 정도에 따라 미백효과를 판단하였다.

본 실시예에 사용된 B16BL6 멜라노사이트는 마우스에서 유래한 세포주이며, 멜라닌이라는 흑색색소를 분비하는 세포이다. 이 세포의 인공배양 중에 α -MSH(melanocyte stimulating hormon)을 처리하여 세포내 멜라닌 합성을 증폭시키고 여기에 시료를 처리하여 멜라닌 흑색색소가 감소하는 정도를 비교 평가하였다. 본 실시예에 사용된 B16BL6 멜라노사이트는 ATCC(American Type Culture Collection, 기탁번호 : CRL6322)로부터 분양받아 사용하였다.

B16BL6 멜라노사이트의 멜라닌 생합성 억제효과 측정은 다음과 같이 행하였다. B16BL6 멜라노사이트를 6공 평판배양기에 각 웰당 2×10^6 농도로 분주하고 세포를 부착시킨 후 멜라닌의 생합성 유도를 촉진시키기 위하여 α -MSH(melanocyte stimulating hormon)을 웰당 10 nM을 처리하여 멜라닌의 생합성을 증폭시킨 후, 독성을 유발하지 않는 농도로 시료를 처리하여 72시간 동안 배양하였다. 72시간 배양 후 세포를 트립신-EDTA로 떼어낸 후 세포수를 측정한 다음 원심분리하여 세포를 회수하였다. 세포내 멜라닌의 정량은 다음과 같이 실시하였다. 세포 펠릿을 PBS로 1회 세척한 후 균질화 버퍼액(50mM 소듐 포스페이트, pH 6.8, 1%MSHiton X-100, 2mM PMSF) 1 ml를 첨가하여 5분간 와류하여 세포를 파쇄하였다. 원심분리(3,000rpm, 10분)하여 얻은 세포 여액에 1N NaOH를 첨가하여 추출된 멜라닌을 용해한 후 흡광광도계로 405 nm에서 멜라닌의 흡광도를 측정한 다음, 농도별, 흡광도별로 작성된 멜라닌 표준곡선에 대입하여 멜라닌의 농도를 계산하였다.

B16BL6 멜라노사이트의 멜라닌 생성 억제효과를 시험한 결과 무처리군, α -MSH 단독 처리군, α -MSH에 알부틴, 은어 단백질(실시에 3) 및 은어 단백질을 enzyme의 종류에 따라 분해한 펩타이드를 병용하여 멜라닌의 농도를 측정한 결과 무처리군 ($68.3 \mu\text{g/ml}$)에 비하여 α -MSH를 처리한 군 ($112.9 \mu\text{g/ml}$)에서 멜라닌의 농도가 유의적으로 증가하는 것을 관찰할 수 있었고, 단백질 및 펩타이드 병용 처리구에서는 $63.1 \mu\text{g/ml}$, $74.6 \mu\text{g/ml}$, $73.2 \mu\text{g/ml}$, $73.8 \mu\text{g/ml}$, $75.1 \mu\text{g/ml}$, $72.3 \mu\text{g/ml}$, $71.8 \mu\text{g/ml}$ 로 멜라닌의

농도가 감소하는 것으로 나타났다. 특히 은어 단백질을 병용 처리한 처리구에서 기존에 미백제로 사용되는 알부틴($81.2\mu\text{g/ml}$) 보다 우수한 멜라닌 합성저해 효과를 나타내었다(표 4).

【표 4】 B16BL6 멜라노사이트를 이용한 멜라닌 생성 억제효과

시료명		농도 ($\mu\text{g/ml}$)	멜라닌농도($\mu\text{g/ml}$)
무처리군		200	68.3
α -MSH 처리군		200	112.9
알부틴 + α -MSH		200	81.2
은어 단백질(실시예 3) + α -MSH		200	63.1
은어 펩타이드	pepsin 가수분해물 + α -MSH (실시예 8)	200	74.6
	trypsin 가수분해물 + α -MSH (실시예 9)	200	73.2
	α -chymotrypsin 가수분해물 + α -MSH (실시예 10)	200	73.8
	Papain (실시예 11)	200	75.1
	Alcalase (실시예 12)	200	72.3
	Neutrase (실시예 13)	200	71.8

<실시예 16: B16BL6 멜라노사이트를 이용한 세포독성 측정>

본 실시예에서는 실시예 3과 실시예8 내지 13에서 수득한 은어 단백질 및 펩타이드의 세포독성을 확인하기 위해 B16BL6 멜라노사이트의 세포 증식(cell proliferation)을 측정하여 판단한 것이다.

본 실시예에 사용된 B16BL6 멜라노사이트는 마우스에서 유래한 세포주이며 티로시나제라는 효소를 합성하는 세포이다. 이 세포의 배양 중에 시료를 처리하고 세포에서 세포 증식(cell proliferation)을 측정하여 판단하였다. B16BL6 멜라노사이트의 세포 증식(cell proliferation) 측정은 다음

과 같이 행하였다.

B16BL6 멜라노사이트를 96공 평판배양기에 각 웰 당 3×10^4 농도의 세포와 세포배양 배지 $100\mu\text{l}$ 를 넣고 2시간 동안 세포를 부착시킨 후 은어 단백질 및 펩타이드를 각각 50ppm, 100ppm, 200ppm 농도로 시료를 처리하여 24시간 동안 배양하였다. 24시간 배양 후 배지를 제거하고, 각 웰 당 MTT 용액(2.5mg/ml) $30\mu\text{l}$ 를 넣은 후 1시간 동안 37°C CO_2 배양기에서 배양하였다. 배지를 제거하고 DMSO(dimethyl sulfoxide)을 $100\mu\text{l}$ 씩 넣어주었다. 5분간 진탕하여 B16BL6 멜라노사이트 세포를 용해시키고, 마이크로플레이트 판독기에서 595nm 흡광도를 측정하였다. 수학적 식 3에 의해 B16BL6 멜라노사이트 세포생존율(%)을 측정하였다.

【수학적 식 3】

$$\text{세포생존율}(\%) = [(St-Bo)/(Bt-Bo)] \times 100$$

Bo : 세포배양배지만을 발색 반응한 웰의 450 nm 흡광도

Bt : 시료를 처리하지 않은 웰을 발색 반응한 웰의 450 nm 흡광도

St : 시료를 처리한 웰을 발색 반응한 웰의 450 nm 흡광도

B16BL6 멜라노사이트의 세포독성을 측정한 결과, 은어 단백질(실시예 3) 및 펩타이드(실시예 8~13)는 각각 $50\mu\text{g/ml}$, $100\mu\text{g/ml}$, $200\mu\text{g/ml}$ 농도에서 세포 독성을 보이지 않는 것으로 나타났다(표 5).

【표 5】 B16BL6 멜라노사이트를 이용한 세포독성

시료명		농도 ($\mu\text{g/ml}$)	Cell proliferation (%)
무처리구		-	100
은어 단백질 (실시예 3)		50	106.9
		100	114.8
		200	119.2
은어 펩타이드	Pepsin 가수분해물 (실시예 8)	50	107.9
		100	111.3
		200	117.8
	Trypsin 가수분해물 (실시예 9)	50	102.5
		100	110.3
		200	117.5
	α -Chymotrypsin 가수분해물 (실시예 10)	50	100.5
		100	104.8
		200	114.8
	Papain (실시예 11)	50	101.4
		100	105.7
		200	110.4
	Alcalase (실시예 12)	50	105.8
		100	110.6
		200	118.4
	Neutrase (실시예 13)	50	103.6
		100	109.7
		200	117.4

<실시예 17 : DPPH법을 이용한 항산화 효과 측정>

본 실시예에서는 실시예 3 및 실시예 8 내지 실시예 13에서 수득한 은어 단백질 및 펩타이드의 항산화효과를 확인하기 위해 DPPH법을 이용하여 항산화 활성을 측정하였다.

DPPH법은 DPPH(2,2-Di(4-tert-octylphenyl)-1-picrylhydrazyl free radical)라는 유리기를 사용하여 환원력에 의한 항산화 활성을 측정한다. 피검물질에 의해 DPPH가 환원되어 흡광도가 감소하는 정도를 공시험액의 흡광도와 비교하여 파장 560nm에서 자유라디칼 소거율을 측정한다.

사용한 시약으로는 DPPH(Aldrich, chem. Co., MW=618.76) 0.1mM 용액으로서 61.88mg을 메탄올에 용해하여 100ml로 하여 평가하였다.

실험방법으로는 96-공 평판배양기에 0.1mM DPPH 용액 0.15ml에 시료 용액 0.15ml를 가하여 빨리 교반하고 25℃에서 10분간 반응시킨 후 560nm에서 흡광도 St를 측정하였다. 공시험은 시료용액 대신에 증류수를 사용한 것을 상기와 똑같이 조작하여 흡광도 Bt를 측정하고, 시료용액의 블랭크(Blank)는 0.1mM DPPH 용액 대신에 메탄올을 사용해 똑같이 조작하여 흡광도 Bo를 측정하였다. DPPH 억제율은 수학적식 4에 의하여 산출하였으며, 결과는 표 6에 나타내었다.

【수학적식 4】

$$\text{DPPH 억제율(\%)} = \left[\frac{1 - (St - So)}{Bt - Bo} \right] \times 100$$

St : 시료용액의 자유라디칼 소거 후의 560nm에서의 흡광도

Bt : 공시험용액의 자유라디칼 소거 후의 560nm에서의 흡광도

So : 시료용액의 자유라디칼 무첨가시 반응 전의 560nm에서의 흡광도

Bo : 공시험용액의 자유라디칼 무첨가시 반응 전의 560nm에서의 흡광도

【표 6】 DPPH법을 이용한 항산화 효과 측정

시료명		농도 (mg/ml)	DPPH Radical Scavenging activity (%)
Positive control (vitamin C)		0.5	70.4
		1.0	88.5
		2.0	95.8
은어 단백질(실시예 3)		0.5	21.6
		1.0	50.0
		2.0	72.1
은어 펩타이드	pepsin 가수분해물 (실시예 8)	0.5	37.0
		1.0	58.7
		2.0	75.0
	trypsin 가수분해물 (실시예 9)	0.5	26.6
		1.0	55.3
		2.0	67.7
	α -chymotrypsin 가수분해물 (실시예 10)	0.5	36.8
		1.0	54.0
		2.0	77.9
	Papain (실시예 11)	0.5	30.4
		1.0	49.7
		2.0	61.3
	Alcalase (실시예 12)	0.5	34.9
		1.0	56.2
		2.0	67.3
	Neutrase (실시예 13)	0.5	29.8
		1.0	48.3
		2.0	69.2

<실험예 1>

본 실험예에서는 실시예 3 및 실시예 8 내지 실시예 13에서 수득한 은어 단백질 및 펩타이드를 함유한 화장료를 제조하여 사람을 대상으로 피부 미백효과를 비교예 1과 비교실험을 행하여 평가하였다.

비교실험에 사용된 화장료는 크림형태이고, 그 조성은 표 7에 나타낸 바와 같다. 우선 표 7에 기록되어 있는 나)상을 가열하여 70℃에 보존한다. 이것에 가)상을 가하여 예비유화 후 호모믹서로 균일하게 유화하고 다음에 서서히 냉각하여 크림 (실시예 18 내지 24, 비교예 1)을 제조한다.

【표 7】 조성비(단위 : 중량%)

원료		실시에							비교 예 1
		18	19	20	21	22	23	24	
가	스테아릴알콜	8	8	8	8	8	8	8	8
	스테아린산	2	2	2	2	2	2	2	2
	스테아린산콜레스테롤	2	2	2	2	2	2	2	2
	스쿠알란	4	4	4	4	4	4	4	4
	2-옥틸도데실알콜	6	6	6	6	6	6	6	6
	폴리옥시에틸렌(25몰부가) 알콜에스테르	3	3	3	3	3	3	3	3
나	글리세릴모노스테아린산에스테르	2	2	2	2	2	2	2	2
	은어 단백질 (실시에 3)	5	-	-	-	-	-	-	-
	pepsin 가수분해물 (실시에 8)	-	5	-	-	-	-	-	-
	trypsin 가수분해물 (실시에 9)	-	-	5	-	-	-	-	-
	α -chymotrypsin 가수분해물 (실시에 10)	-	-	-	5	-	-	-	-
	Papain (실시에 11)	-	-	-	-	5	-	-	-
	Alcalase (실시에 12)	-	-	-	-	-	5	-	-
	Neutrase (실시에 13)	-	-	-	-	-	-	5	-
	프로필렌글리콜	5	5	5	5	5	5	5	5
정제수		100 에 대한 나머 지	100 에 대한 나머 지	100 에 대한 나머 지	100 에 대한 나머 지	100 에 대한 나머 지	100 에 대한 나머 지	100 에 대한 나머 지	100에 대한 나머지

실험자(20세~35세의 여성) 30명을 대상으로 얼굴 오른쪽 부위에는 실시에 18 내지 24에서 제조된 크림을, 얼굴 왼쪽 부위에는 비교예 1에서 제조된 크림을 각각 1일 2회씩 연속 2개월간 도포하였다. 시험 완료 후 얼굴 좌우 양편의 도포 부위 피부를 화상분석기 및 피부색의 변화를 크로마메타(Minolta CR300)를 이용하여 색의 밝기 변화(ΔL)를 측정하고, 복수의 숙련

자에 의한 객관적 육안 관찰과 피검자에 의한 주관적 육안관찰을 실시하여 하기 등급 분류에 따라 효과를 측정하였다. 그 결과를 하기 표 7에 나타내었다. 이때 미백효능 정도를 다음의 7등급으로 분류하여 평가하였다.

* 미백효능 평가 기준 -3: 매우 악화 -2: 악화 -1: 약간 악화 0: 변화 없음 1: 약간 개선 2: 개선 3: 매우 개선

표 8에서 나타낸 바와 같이 은어 단백질 및 펩타이드를 함유한 크림을 도포한 실험자의 안면 피부에서 미백효과가 우수함을 알 수 있다.

【표 8】 사람을 대상으로 한 미백효과

실험항목	실시에							비교예 1
	18	19	20	21	22	23	24	
피부색의 밝기 변화(ΔL)	3.8	3.3	3.0	3.4	3.3	3.2	3.3	2.0
숙련자의 객관적 평가	2.7	2.4	2.3	2.5	2.5	2.4	2.3	1.7
피검자의 주관적 평가	2.8	2.5	2.4	2.4	2.4	2.3	2.5	1.8

ΔL = 시험 후 피부 밝기 - 시험 전 피부 밝기

【발명의 효과】

이상에서 설명한 바와 같이, 본 발명에 따른 은어 단백질 및 펩타이드는 기미, 주근깨 및 피부 색소 침착의 원인이 되는 물질인 멜라닌 생성을 막아주는 티로시나제 활성 억제효과, 멜라닌 합성 억제효과 등의 미백효과와 자유라디칼 소거효과 등의 항산화 효과가 우수하다.

따라서 본 발명은 상기의 효능을 갖는 은어 단백질 및 펩타이드를 함유하는 화장수, 크림, 유액, 팩 등의 화장료 조성물을 제조하여 피부 미백 효과가 있는 기능성 화장료 조성물을 제공할 수 있다.

이상에서는 본 발명의 바람직한 실시예에 대해 설명하였으나 당해 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자라면 본원 발명의 요지를 벗어남이 없이 다양한 변형실시가 가능할 것이며, 이러한 변형실시는 본원 발명의 보호범위에 속하는 것으로서 본원 발명의 보호범위는 특허청구범위에 기재된 바에 따라 해석되어야 할 것이다.

KAERI

【특허청구범위】

【청구항 1】

은어 단백질, 은어 펩타이드 중에서 선택된 어느 하나 이상을 함유하는 것을 특징으로 하는 화장료 조성물.

【청구항 2】

제1항에 있어서, 화장료 조성물에 대하여 은어 단백질, 은어 펩타이드 중에서 선택된 어느 하나 이상을 0.01 내지 20 중량% 함유하는 것을 특징으로 하는 화장료 조성물.

【청구항 3】

제1항에 있어서, 은어 단백질은 생리식염수 또는 인산완충용액을 사용하여 단백질을 추출하고, 그 중 인산 완충용액은 인산나트륨, 인산리튬, 인산칼륨, 인산루비듐 또는 및 인산세슘 중에서 선택된 1종 또는 2종 이상의 혼합용매로 단백질 및 펩타이드를 추출하여, 현탁액을 여과한 후 얻어진 액상물을 동결 건조하여 은어 단백질 및 펩타이드를 얻는 것을 특징으로 하는 화장료 조성물.

【청구항 4】

제1항에 있어서, 상기 은어 펩타이드는 펩신, 트립신, 알파키토트립신, 파파인, 알칼레이즈, 뉴트라제 중에서 선택된 1종 또는 2종이상의 효소를 사용하여 가수분해하여 추출하는 것을 특징으로 하는 화장료 조성물.

【청구항 5】

【10】참고문헌

본 것을 특징으로 하는 화상표 조성을
제1항에 있어서, 상기 용액 단백질 및 펩타이드는 화상표 효과를 갖

【9】참고문헌

본 것을 특징으로 하는 화상표 조성을
제1항에 있어서, 상기 용액 단백질 및 펩타이드는 세균독성이 없는

【8】참고문헌

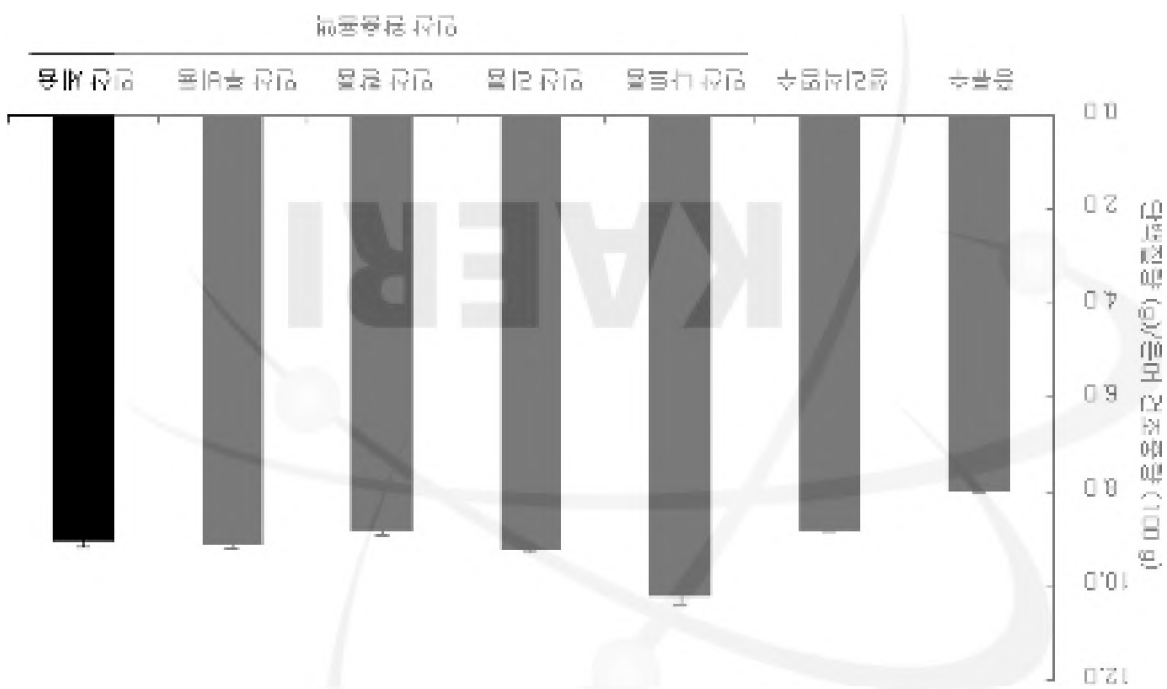
조성을
제1항에 있어서, 상기 용액 단백질 및 펩타이드는 단백질을 생체하는
제1항에 있어서, 상기 용액 단백질 및 펩타이드는 단백질을 생체하는

【7】참고문헌

본 것을 특징으로 하는 화상표 조성을
제1항에 있어서, 상기 용액 단백질 및 펩타이드는 단백질 분해활

【6】참고문헌

본 것을 특징으로 하는 화상표 조성을.
또는 아이비로우펜슬로 이루어진 색조화상표 제형 중에서도 어느 하
간커버, 립스틱, 립그로스, 페이스파우더, 투웨이케이크, 아이섀도, 치크볼라
화상표 제형과 수중유형 또는 유중수형의 에이크렙배이스, 파우더에이센스, 스
(W/O)형의 화상수, 젤, 수용성 리퀴드, 크림 또는 에센스로 이루어진 기초
제1항에 있어서, 화상표 조성을 제형은 수중유(O/W)형 및 유중수



【도 1】

【도 5】

장르 조성물.

원 펄타이드를 함유하고 피부 미백용으로 사용되는 것을 특징으로 하는 화

제1항 내지 제9항 중 선택된 어느 한 화에 있어서, 상기 은어 단백질

[별지]

학술논문 발표

The logo of the Korea Atomic Energy Research Institute (KAERI) is centered in the background. It features a stylized, light gray graphic of an atom or a particle track, with several curved lines intersecting. Overlaid on this graphic is the word "KAERI" in a bold, sans-serif, light gray font.

KAERI

Food for Health and Longevity

2009 International Symposium and Annual Meeting

November 4~6, 2009

Changwon Exhibition Convention Center,
Changwon, Korea

Sponsored by

The Korean Federation of Science and Technology Societies
Ministry for Food, Agriculture, Forestry and Fisheries
Gyeongsangnam-do & Changwon-si
Nongshim Co., Ltd.
Daesang Corp.
Amway Korea Ltd.
Korea Ginseng Corp.
Korea INS Pharm Inc.
Suhung Capsule Co., Ltd.
Pre-ot Group of Hanbang Functional Food (Wonkwang University)
Research Center for Industrial Development of Biofood Materials
Institute of Sunchang Fermented Soybean Products
Center for Changnyeong Onion Bioindustry
The Association of Isoflavone Research
Gyeonggi Dojeon Technopark
Seoul Clinical Laboratories
R&S Center, Silla University
Namhae Gano Research Institute
Sweet Persimmon Export Research Organization
ASA-IM

KFSN The Korean Society of Food Science and Nutrition

KFDA Korea Food & Drug Administration



생물 및 훈제은어(sweet fish)의 일반성분 및 지방산조성에 관한 연구

본 연구는 생물 은어 및 훈제 은어의 일반성분 및 지방산조성에 관하여 연구하였다. 생물 은어의 일반성분 분석결과 탄수화물, 단백질, 지질이 차지하는 비율이 가장 높았으며, 각각 9.59, 14.06, 14.8 g/100g 이었다. 훈제 은어의 경우도 탄수화물, 단백질, 지방이 차지하는 비율이 높게 나타났다(6.05, 43.44, 30.7 g/100g). 이중 지방의 경우 EPA (Eicosapentaenoic acid)는 생물과 훈제 은어 각각 총 지방산 중 6.01% 와 7.59%였으며 DHA (Docosahexaenoic acid)의 경우 23.04%와 19.99%를 보여 높은 함량을 보였다. 이러한 결과는 은어가 영양학적으로 우수한 식품으로 앞으로 식품산업에 유용하게 이용될 수 있을 것이라 사료된다.

생물 및 혼제 온어(sweet-fish)의 일반성분 및 지방산조성에 관한 연구

생낙문, 박재남, 권선규, 정팔문, 김지훈, 최종일, 송병석, 윤유환, 이주은
한국원자력연구원

Abstract

본 연구는 생물 온어 및 혼제 온어의 일반성분 및 지방산조성에 관하여 연구하였다. 생물 온어의 일반성분 분석결과 탄수화물, 단백질, 지질이 차지하는 비율이 각각 26.9%, 14.0%, 54.8 g/100g이었다. 혼제 온어의 경우도 탄수화물, 단백질, 지질이 차지하는 비율의 높게 나타났다(0.06, 43.44, 50.7 g/100g). 이를 지 분석의 경우 EPA (Eicosapentaenoic acid)는 생물 온어 각각을 지방산 중 0.01% 와 0.59%였으며 DHA (docosahexaenoic acid)의 경우 23.04%와 10.04%를 차지 높은 함량을 보였다. 이러한 결과는 온어의 영양학적으로 우수한 식품으로 앞으로 식품산업에 유용하게 이용할 수 있을 것이라고 사료된다.

Objective

본 연구는 생물(sweet-fish)의 영양학적 특성을 위하여 생물 온어 및 혼제 온어의 일반성분 및 지방산 조성에 대하여 연구 하였다.

Materials & Methods

실험재료

- ▶ 실험에 사용된 생물 및 혼제 온어는 국립 수산물품질관리원으로부터 공급받아서 분석하였다.

일반성분 분석

- ▶ 수분은 실험기형 건조로, 단백질을 N (nitrogen) by distillation, 또는 지방은 Soxhlet법으로 측정하였다.

지방산 조성 분석

- ▶ 생물 및 혼제 온어의 지방산 조성은 gas chromatograph-mass spectrometry를 사용하여 분석하였다.

References

1. Arhman HG. 1999 Marine biogenic lipids, fish, and oils. CRC press, Inc., Boca Raton, Florida, pp.3-44.

Results

Table 1. Proximate composition of fresh and sweet-fish.

	Genepet sweet-fish	Fresh sweet-fish	Unit
물량	400.70	210	kg
탄수화물	6.05	8.58	g/100 g
단백	14.0	14.0	g/100 g
지방	43.44±0.35	54.8±0.18	g/100 g
탄수	20.7±0.83	14.8±0.23	g/100 g
단백	12.2	4.5	g/100 g
지방산	0	0	g/100 g
탄수	391.57	33.02	mg/100 g
단백	275.09±1.41	14.2±0.12	mg/100 g
지방	2127.30±6.24	168.3±10.41	mg/100 g
단백	1.28±0.01	1.47±0.01	mg/100 g

Table 2. Fatty acid composition (% total of total extracted from sweet-fish and fresh sweet-fish).

Fatty acid	Fresh sweet-fish	Genepet sweet-fish
Myristic acid	3.33±0.08	3.22±0.07
Palmitic acid	5.21±0.12	6.44±0.16
Stearic acid	28.79±2.28	23.85±1.34
Octadecanoic acid	6.61±0.10	7.54±0.24
Arachidonic acid	17.70±1.01	10.71±1.70
Docosahexaenoic acid	2.31±0.04	2.96±0.08
Stearic acid	5.47±0.12	4.83±0.29
Arachidonic acid	7.48±0.05	1.52±0.05
Eicosapentaenoic acid	0.01±0.11	7.09±0.18
Docosahexaenoic acid	21.04±0.18	11.00±1.80
Unknown	1.05±0.03	3.45±0.36



Fig. 1. (a) chromatograms of fatty acid composition of lipids extracted from sweet-fish and fresh sweet-fish (1) myristic acid, (2) palmitic acid (3) stearic acid (4) octadecanoic acid, (5) arachidonic acid, (6) docosahexaenoic acid (7) stearic acid (8) arachidonic acid, (9) eicosapentaenoic acid, (10) docosahexaenoic acid, (11) unknown.

서 지 정 보 양 식

수행기관보고서번호		위탁기관보고서번호		표준보고서번호		INIS 주제코드	
KAERI/CR-356/2009							
제 목 / 부 제		붕화은어의 생리활성 및 기능성 연구					
연구책임자 및 부서명		김재훈(방사선식품육종연구부)					
연구자 및 부서명		이주운, 최종일, 송범석, 윤요한, 성낙운, 정필문(방사선식품육종연구부)					
출 판 지	대 전	발행기관	한국원자력연구원		발행년	2010년	
페 이 지	91 p.	도 표	있음(●), 없음()		크 기	A4	
참고사항							
공개여부		공개(●), 비공개()		보고서종류		연구보고서	
비밀여부		대외비 (), _ 급비밀					
연구위탁기관				계약 번호			
초록 (15-20줄내외)							
○ 본 연구는 붕화은어의 생리활성 및 기능성 평가를 통해 은어를 이용한 가공식품 및 기능성식품 개발 등 산업화를 위한 기초자료 확보를 위해 수행되었으며, 연구결과를 요약하면 다음과 같음 ○ 붕화은어 및 훈제은어의 성분분석 결과 훈제은어는 은어(생물)에 비해 수분함량이 낮기 때문에 열량, 탄수화물, 단백질, 지방과 나트륨, 칼슘의 함량이 높은 것으로 나타남 ○ 지방산 조성 분석결과 은어는 관절염 및 고혈압에 효과가 있는 것으로 알려져 있는 기능성 물질인 오메가-3 지방산인 DHA와 EPA가 전체 지방산중 약 30% 정도 함유되어 있어, 고등어가 약 20 - 25%인 것을 감안할 때 오메가-3 지방산이 다량함유된 것으로 나타남 ○ 은어의 생리활성 물질을 탐색하기 위해 은어로부터 단백질을 분리하여 단백질 소화효소를 이용하여 펩타이드를 생산한 후 다양한 생리활성을 분석함. 그 결과 항산화, 항고혈압, 항염증, 미백효과가 존재하는 것으로 나타났으나, 암세포 생육억제 효과는 거의 없는 것으로 나타남. 특히, 은어 단백질과 펩타이드는 항염증 및 미백 효과가 우수한 것으로 확인됨 ○ 또한, 은어 단백질과 펩타이드는 미백효과 즉, 피부의 기미, 주근깨 및 피부 색소 침착의 원인이 되는 물질인 멜라닌 생성을 막아주는 티로시나제 활성 억제효과, 멜라닌 합성 억제효과 및 항산화 효과가 우수한 것으로 나타나 피부 미백 및 노화를 억제할 수 있는 기능성 화장품 원료로 사용될 수 있을 것으로 기대됨							
주제명키워드 (10단어내외)		은어, 단백질, 펩타이드, 항산화활성, 미백효과, 항염증효과					

BIBLIOGRAPHIC INFORMATION SHEET

Performing Org. Report No.		Sponsoring Org. Report No.		Standard Report No.		INIS Subject Code	
KAERI/CR-356-/2009							
Title / Subtitle		Bioactivity and Functionality of Bonghwa Sweetfish					
Project Manager and Department		Jae-Hun Kim (Radiation Food and Breeding Research Division)					
Researcher and Department		Ju-Woon Lee, Jong-il Choi, Beom-Seok Song, Yohan Yoon, Nak Yun Sung, Pil-Mun Jeong (Radiation Food and Breeding Research Division)					
Publication Place	Daejeon	Publisher	Korea Atomic Energy Research Institute		Publication Date	2010	
Page	91 p.	Ill. & Tab.	Yes(●), No ()		Size	A4	
Note							
Open	Open(●), Closed()		Report Type		Research Report		
Classified	Restricted(), ___Class Document						
Sponsoring Org.				Contract No.			
Abstract (15-20 Lines)							
○ Smoked sweetfish had higher contents of calories, carbohydrate, protein, fat, sodium, and calcium than unsmoked sweetfish ○ DHA and EPA which are omega-3 fatty acid and have therapeutic effects on arthritis and high blood pressure ○ Proteins and peptide from sweetfish had various bioactivities such as antioxidation, hypertensive, especially for antiinflammatory, and whitening effects. However no anticancer effect was observed ○ The proteins and peptide suppressed nitric oxide and cytokines (α-TNF, IL-6, IL-1 beta), and prostaglandin (PGE2) productions, and mRNA related iNOS and cyclooxygenase (COX-2), which are related to inflammation ○ The proteins and peptide prevented tyrosinase formation, which is related formation of melanin, and also showed preventive effects of melanin synthesis, antioxidation and anti-aging effects. Thus, the proteins and peptides from sweetfish may be useful source for cosmetics							
Subject Keywords (About 10 words)		Sweet fish, Protein, Peptide, Antioxidant activity, Whitening effect, Anti-inflammation activity					