



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2017년09월06일
 (11) 등록번호 10-1774701
 (24) 등록일자 2017년08월29일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A23L 1/305 (2006.01)

(52) CPC특허분류
A23L 33/18 (2016.08)
A23V 2002/00 (2013.01)

(21) 출원번호 **10-2016-0094491**
 (22) 출원일자 **2016년07월26일**
 심사청구일자 **2016년07월26일**

(56) 선행기술조사문헌
 KR1020130141877 A*
 KR1020120032893 A
 백장미 외 4명, '홍어 껍질을 이용한 고기능성 콜라겐 펩타이드 소재 개발', Journal of Environmental Science International, 25(4), 579~588쪽, 2016년 4월.*
 정재훈 외 4명, '홍어 껍질을 이용한 콜라겐 펩타이드 추출 및 산업화에 관한 연구', 한국환경과학회 정기학술대회 발표논문집 제23권, 261-264쪽, 2104년.*
 *는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자
재단법인 전남생물산업진흥원
 전남 나주시 동수농공단지길 30-5, (동수동)

(72) 발명자
최철웅
 광주광역시 서구 풍암순환로 10 호반중흥1단지 아파트 105동 203호

반상오
 전남 화순군 화순읍 대리길 41 광신프로그램스 101동 1805호
 (뒷면에 계속)

(74) 대리인
최석진

전체 청구항 수 : 총 1 항

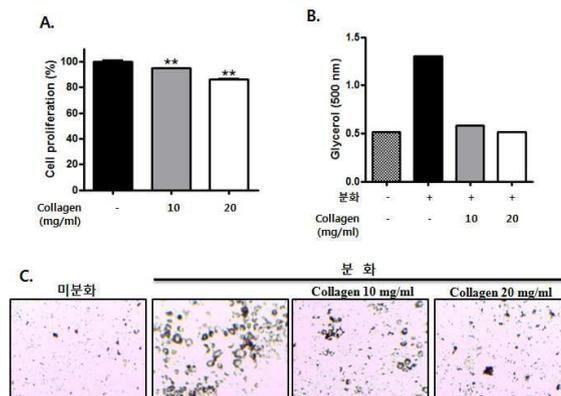
심사관 : 하혜경

(54) 발명의 명칭 **항비만 활성을 갖는 홍어 콜라겐 펩타이드**

(57) 요약

본 발명은 지방세포화 전사인자인 C/EBP β 와 PPAR γ 의 발현을 효과적으로 억제하여 3T3-L1 지방전구세포로의 분화를 감소시키고, 또한 혈액 내에 있는 콜레스테롤이나 중성지방의 생성을 감소시키고, 지질 축적 억제 활성 효과가 있는 항비만 활성을 갖는 홍어 콜라겐 펩타이드를 제공한다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A23V 2200/332 (2013.01)
 A23V 2200/3324 (2013.01)
 A23V 2250/5422 (2013.01)
 A23V 2250/543 (2013.01)
 A23V 2250/55 (2013.01)

(72) 발명자

김재용

전라남도 순천시 왕궁길 60 (조례동, 중흥3차아파트) 304동 207호

강후원

전라남도 나주시 영산포로 205-7 (영산동)

이규욱

전라남도 장흥군 장흥읍 우드랜드길 136 성은연립주택 101동 404호

박성윤

전라남도 화순군 화순읍 광덕로 215 부영6차아파트 606동 705호

신자원

전라남도 장흥군 장흥읍 진골목길 4, 리치빌 306호

최학준

광주광역시 동구 동계로15번길 1-23 (동명동)

조아라

광주광역시 남구 백양로 39번길 7-2, 푸르지오 301호

김춘성

광주광역시 남구 서문대로 678번길 7 대주1차아파트 101동 1002호

백장미

부산광역시 사상구 모라로 192번길 20-21, 314동 301호

강건희

전남 나주시 영산포로 205-7

김상호

부산광역시 동래구 중앙대로 1473번길 13, 102동 1701호

노정숙

부산광역시 부산진구 성지로150번길 21 (초읍동)

정갑섭

부산광역시 수영구 광안해변로 141 2동 202호 (남천동, 협진태양아파트)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 R0003950
 부처명 산업통상자원부
 연구관리전문기관 한국과학기술진흥원(KIAT)
 연구사업명 산업기술거점기관지원사업
 연구과제명 바이오상용기술고도화 플랫폼 구축 사업
 기여율 1/1
 주관기관 (재)전남생물산업진흥원 천연자원연구센터
 연구기간 2015.04.01 ~ 2020.03.31

공지예외적용 : 있음

명세서

청구범위

청구항 1

홍어 가공시 배출되는 몸통살, 연골, 껍질 중에서 선택되는 하나 이상의 부산물을 Alcalase 효소를 사용하여 1차 가수분해하고,

상기 1차 가수분해된 반응물에 Protease type X 효소로 2차 가수분해하여 얻어지는 콜라겐 펩타이드를 유효성분으로 포함하는 것을 특징으로 하는 지질개선 또는 항비만 예방 효과를 갖는 조성물

청구항 2

삭제

청구항 3

삭제

청구항 4

삭제

청구항 5

삭제

청구항 6

삭제

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 항비만 활성을 갖는 홍어 콜라겐 펩타이드에 관한 것으로, 보다 상세하게는 홍어 가공 시 발생하는 부산물로부터 추출하여 구성되며, 지방전구세포의 분화억제 및 지질 개선과 항비만 활성 효과를 갖는 홍어 콜라겐 펩타이드에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 비만(Obesity)은 사회적인 경향성을 갖는 질병으로 선진국에서 신흥국으로 급속히 확산되는 추세이며, 전 세계적으로 21억 명이 비만 및 과체중인 것으로 나타나면서 세계보건기구(WHO)는 비만을 '21세기 신종 전염병'으로 지목하였다. 국내에서는 과체중 (BMI $\geq 25\text{kg}/\text{m}^2$) 이상 인구의 비율은 총 31.8%이며, 그중 BMI $\geq 30\text{kg}/\text{m}^2$ 이상의 고도비만 환자는 2013년 기준(19세 이상) 약 50만 명(5%)으로 매년 증가하는 추세이다(초고도비만(BMI $\geq 35\text{kg}/\text{m}^2$) 환자 : 5만 명이상). 비만은 단순히 체중 증가나 외형적 문제가 아닌 심각한 질병을 일으킬 수 있는 상태로 심혈관 질환 (고혈압, 이상지질혈증), 당뇨병, 암 등 각종 성인병의 발병률을 2배 이상 증가시키며, 이에 따른 사회, 경제적 지출비용 또한 증가시키고 있다.

[0003] 또한, 비만은 유전적 요인, 환경적 요인, 식습관, 생활습관 및 개인의 건강상태 등과 같은 다양한 원인에 의하여 유발되는 것으로 알려져 있으며, 에너지 섭취 및 소비의 불균형에 의하여 유발되는 비정상적인 체내 에너지 대사 조절에 의한 지방의 과다 축적으로 발생하는 대사성 질환이다.

[0004] 지방세포를 형성하는 adipogenesis 과정은 myocytes, osteoblast(조골세포) 또는 adipocytes(지방세포)를 형성할 수 있는 mesenchymal stem cells에서 시작하는 multistage process이다. 또한 지방전구세포가 분비하는

insulin-like growth factor 1(IGF-1), glucocorticoid와 같은 adipogenic inducer들에 의해 분화가 유도되면 분화 초기전사인자로 CCAAT/enhancer-binding protein (C/EBP) β 와 C/EBP β 가 발현되고 이는 cascade 반응으로 C/EBP α 와 peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) γ 를 발현시키는 것으로 보고되었다. 이 두 전사인자는 지방세포 분화를 이끄는 주된 전사인자로서 서로가 서로의 발현을 증가시키게 되고, 이렇게 과량 발현된 C/EBP α 와 PPAR γ 는 adipocyte fatty acid binding protein(aP2)나 adiponectin과 같은 adipocyte 특이적 유전자들을 발현시켜 형태학적으로나 세포의 기능적으로 변화되어진 adipocyte를 형성한다.

[0005] 지방전구세포에서 발현되는 Wnt10b는 세포내 조절인자로서 지방세포 분화에 중요 전사인자인 C/EBP α 와 PPAR γ 의 발현을 억제함으로써, 지방세포 특이 유전자가 발현되지 못해 지방세포 형성을 막는다. 또한 Wnt10b가 증가시키는 세포내 β -catenin 양과 PPAR γ 간의 균형조절이 지방세포 분화에 중요하다고 알려져 있으며, 이 두 단백질간의 균형은 glycogen synthase kinase 3 beta(GSK3 β)에 의한 β -catenin의 인산화를 통한 단백질 분해에 의존적으로 조절된다고 보고되어 있다. 따라서 지방세포로의 분화를 차단시킬 수 있는 최상위 전사 조절인자의 발현 제어와 이에 연계된 유전자들의 발현 조절의 탐색 과정을 통해 지방세포의 분화 억제제 개발이 필요하다.

[0006] 한편, 콜라겐은 의약품, 화장품 및 식품분야에서 다양하게 이용되어 왔으며, 최근에는 피부노화 방지 및 탄력개선, 관절염 예방 등으로 확대되고 있다. 현재 유통되고 있는 콜라겐 제품은 주로 소, 돼지 등 육상동물에서 유래한 것으로 식품 알레르기를 유발할 수 있으며, 최근 광우병 및 구제역 발생으로 인한 위험으로부터 안정성을 확보하기 위하여 육상동물 이외의 해양생물 자원을 이용한 연구가 활발히 진행되고 있다.

[0007] 한편, 홍어류(Skate, Raja kenoeji)는 홍어목, 가오리과에 속하는 편평한 체형의 연골어류를 지칭하는데, 열대에서 북극 근해의 수역에 걸쳐 얕은 곳에서 2,700 미터 이상의 수심까지 세계 전역에서 발견된다. 우리나라에서는 남서해 및 일본 아오모리현 이남 근해와 동중국해에 주로 분포하며, 예로부터 목포 등지에서는 전통 발효식품으로 애용되고 있다. 이와 같이, 우리나라에서는 홍어회와 같은 발효식품으로 애용되고 있어서 홍어 발효식품에 대한 영양학적 분석에 대한 연구가 주로 이루어지고 있었으며, 홍어 발효식품으로 사용되지 않는 내부 장기나 껍질 등은 전량 폐기되고 있다.

[0008] 해양생물 자원 중 하나인 홍어는 우리나라를 비롯한 일부 동양권에서 즐겨먹는 연골어류로서 다른 어류보다 질소화합물인 요소와 TMAO 등이 많이 함유되어 있어 숙성 중에 효소에 의해 암모니아, TMA 등이 생성되어, 일부 애호가들을 제외하고는 소비에 한계를 나타내고 있는 실정이다. 또한 홍어껍질 중에는 많은 양의 콜라겐이 함유되어 있으나, 홍어 가공 시 배출되는 회(40%), 애 또는 간 등(10%)의 가식부에 비해 몸통살(30%), 연골(10%), 껍질(10%)과 같은 부산물의 경우에는 그 이용도가 극히 낮아 자원낭비는 물론, 별도의 과정 없이 폐기처리 되고 있어 이는 악취와 해충번식 등의 환경오염을 초래하고 있다. 따라서 환경오염의 원인이 되는 홍어 부산물을 이용한 연구 개발이 활발히 이루어져야 할 것이다.

선행기술문헌

특허문헌

[0009] (특허문헌 0001) 국내 등록특허 제10-1230650호에서는 홍어 껍질에서 유래한 단백질 가수분해 산물을 유효 성분으로 함유하는, 알츠하이머 질환과 같은 퇴행성 뇌질환에 관여하는 베타-세크레타제의 활성을 억제할 수 있는 약리학적, 식품공학적 조성물 및 이들을 제조하는 방법을 제안하고 있다. 본 발명에 따라 얻어지는 홍어 껍질 유래의 펩타이드 추출물은 베타-세크레타제의 활성을 크게 억제할 수 있어, 종래 식용으로도 활용되지 못하고 폐기되었던 홍어 껍질로부터 전술한 약리학적 기능을 갖는 조성물을 의약품 또는 건강 보조 식품으로도 응용될 수 있는 홍어 껍질 유래의 알츠하이머 질병의 억제 또는 예방을 위한 조성물을 개시하고 있다.

(특허문헌 0002) 국내 등록특허 제10-1449804호에서는 홍어 껍질로부터 분리한 젤라틴 추출물의 가수분해물을 유효성분으로 포함하는 고혈압 예방 및 치료용 약학적 조성물, 항고혈압 활성을 갖는 홍어 껍질 유래 젤라틴 추출물의 가수분해물 제조방법 및 상기 가수분해물로부터 분리 및 정제한 항고혈압 활성을 갖는 신규 펩타이드의 용도에 관한 것으로서, 홍어 껍질 유래 젤라틴 추출물 및 상기 추출물로부터 분리한 펩타이드를 유효성분으로 포함하는 항고혈압 조성물을 개시하고 있다.

(특허문헌 0003) 국내 등록특허 제10-1451971호에서는 대량생산 공정에 적합하면서도 품질이 우수한 어류껍질 유래 콜라겐 펩타이드를 제조하는 방법에 관한 것으로, 구체적으로는 어류껍질 원료를 전처리하는 제 1공정; 상기 전처리한 원료에 물을 가하고 가압열처리한 후, 여과 및 냉각하여 젤라틴을 추출하는 제 2공정; 상기 추출된

젤라틴에 효소를 첨가하여 가수분해시킴으로써 저분자화된 콜라겐 펩타이드를 제조하는 제 3공정; 상기 제조된 콜라겐 펩타이드를 탈색 및 탈취하고, 여과 및 농축시키는 제 4공정; 및 상기 농축된 콜라겐 펩타이드를 살균처리하고 급속 동결 시킨 다음, 분무 건조하여 분말화 시키는 제 5공정;을 포함하는 어류껍질 유래 콜라겐 펩타이드를 제조하는 방법과 상기에서 제조된 어류껍질 유래 콜라겐 펩타이드를 이용하여 유용성 콜라겐 펩타이드를 제조하는 방법을 개시하고 있다.

(특허문헌 0004) 국내 공개특허 제10-2005-0007020호에서는 발효된 홍어를 가공 처리 중에 발생하는 부산물을 이용하기 위해 껍질을 분리한 후 이를 이용하여 기능성 식품 소재로서 널리 이용되어지는 젤라틴을 제조함에 있어 알칼리 용액에서의 침지시간, 침지농도, 추출용액의 pH, 온도 그리고 추출시간을 달리하여 동결 건조시켜 젤라틴을 제조하여 최적 추출조건을 개발 그 품질 특성을 조사하였다. 그 결과, 최적조건인 침지농도 1.5%에서 48시간 침지 후 pH 6.0의 추출 용액을 이용 50℃에서 4시간의 추출 시간을 거친 후 활성탄에서 여과하여 동결 건조하는 방법을 개발함으로써, 이와 같은 추출방법을 통해 기존 연구 방법보다 전처리 시간을 단축시킬 수 있었으며, 제조된 젤라틴의 경우 높은 수율과 품질을 지님에 따라 보다 효율적 생산 및 제조물의 산업화의 이용 가능성을 제시한 홍어껍질로부터 젤라틴 추출 기술 개발에 대해 개시하고 있다. 그러나 상기 선행기술들은 본 발명에서 목적으로 하는 홍어 부산물로부터 항비만 활성을 가진 콜라겐 펩타이드와는 발명의 구성과 효과에서 차이가 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0010] 본 발명은 홍어 가공시 배출되는 몸통살, 연골, 껍질 등의 부산물을 이용하여 지방전구세포의 분화억제 및 지질개선과 항비만 활성 효과와 관련된 콜라겐 펩타이드 조성물을 개발함으로써 지질개선 또는 항비만 예방 효과를 갖는 건강기능성 식품조성물 또는 약학적 조성물로의 활용을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

[0011] 상기에 기재된 발명의 목적을 위해 본 발명은 지방전구세포의 분화 억제와 지방세포화 전사인자인 C/EBPβ와 PPARγ의 발현을 효과적으로 억제하여 glycerol이나 중성지방의 생성을 감소시킴으로써 지방세포의 분화를 억제시키는 홍어 콜라겐 펩타이드를 제공하고자 한다.

발명의 효과

[0012] 본 발명에 따른 항비만 활성을 갖는 홍어 콜라겐 펩타이드가 C/EBPβ와 PPARγ의 발현을 효과적으로 억제하여 3T3-L1 지방세포로의 분화를 감소시키며, 고지방 식이에 의한 체지방 및 중성지방이 증가한 경우 홍어 콜라겐 펩타이드를 급여함으로써 혈중 LDL/VLDL 콜레스테롤 및 중성지방을 낮추고, 지질축적 억제 활성 효과를 갖는다. 또한, 이용도가 극히 낮아 폐기 처리 되던 홍어의 부산물을 이용하여 콜라겐 펩타이드를 추출하기 때문에 자원의 낭비를 막는 경제성과 환경오염의 원인을 줄일 수 있는 효과가 있다.

도면의 간단한 설명

[0013] 도 1은 지방전구세포 분화에 대한 홍어 콜라겐 펩타이드의 영향을 나타낸 도면이다.
 도 2는 지방전구세포 전사인자의 발현에 대한 홍어 콜라겐 펩타이드의 영향을 나타낸 도면이다.
 도 3은 홍어 콜라겐 펩타이드 급여에 따른 식이섭취량 및 체중 증가량을 나타낸 도면이다.
 도 4는 홍어 콜라겐 펩타이드 급여에 따른 총 지방 중량 및 각 부위의 지방 중량 변화를 나타낸 도면이다.
 도 5는 홍어 콜라겐 펩타이드 급여에 따른 혈액 내 콜레스테롤 및 중성지방의 검사 결과를 나타낸 도면이다.
 도 6은 홍어 콜라겐 펩타이드 급여에 따른 간의 콜레스테롤 및 중성지방의 검사 결과를 나타낸 도면이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0014] 본 발명은 홍어 부산물을 이용하여 콜라겐 펩타이드를 제조하고 3T3-L1 지방전구세포의 adipogenesis 과정에서 항비만 효과와 고지방 사료로 비만을 유도한 흰 쥐에 대해 지방무게 및 지질 대사 효과를 확인하였다.
- [0015] 본 발명의 지방전구세포 분화와 지방세포 전사인자의 발현, 그리고 항비만에 대한 홍어 콜라겐 펩타이드의 영향을 알아보기 위한 실험의 구체적인 재료 준비 과정 및 방법을 상세히 설명한다.
- [0016] **I. 재료 준비 과정 및 방법**
- [0017] 1. 홍어 콜라겐 펩타이드 및 세포배양
- [0018] 실험에 사용한 홍어 콜라겐 펩타이드는 (주)영산홍어에서 제공받아 사용하였으며, 항비만 활성 분석에 사용되는 3T3-L1은 American Type Culter Collection(ATCC, USA)로부터 구입하여 10% fetal bovine serum (FBS) 및 penicillin/streptomycin이 포함된 DMEM 배지에서 배양하였다.
- [0019] 1.1 홍어 부산물을 이용한 콜라겐 펩타이드 제조방법
- [0020] 홍어 부산물의 불순물을 제거하기 위하여 물로 여러 차례 세척하고, 가위를 이용하여 3cm × 1cm의 간격으로 자른다. 그리고 피하지방 및 콜라겐 이외의 단백질과 같은 이물질을 제거하기 위하여 3일 동안 1% Ca(OH)₂에 침지하였다. 이후, 간단히 세척을 하고 자른 홍어부산물 부피의 4배에 해당하는 물을 water bath에 첨가한 후, pH 6.0, 65℃의 온도에서 6.5시간 동안의 열수추출 과정과 12,000 x g의 속도로 10분 동안의 원심분리 과정을 수행하여 추출물을 수득하였다. 이를 다시 탈염 처리하여 홍어 부산물로부터 젤라틴 추출물을 수득하였고, 건조시켜 분말화하였다.
- [0021] 이처럼 수득한 홍어부산물의 젤라틴 추출물에 2개의 효소를 순차적으로 사용하여 가수분해를 수행하였다. 먼저, 1차 가수분해는 Alcalase 효소(시그마 구입)를 사용하여 50℃ 및 pH 7 조건으로 1시간 동안 반응시켰고, 이때 효소(Alcalase)와 기질(분말화된 젤라틴 추출물)의 비율은 1:100(w/w)의 비율로 혼합하여 수행하였다.
- [0022] 이후, 2차 가수분해는 상기 반응물에 다른 효소인 Protease type X(시그마 구입)를 사용하여 37℃ 및 pH 7 조건으로 4시간 동안 반응시켰고, 이때, 효소(Protease type X)와 기질(분말화된 젤라틴 추출물)의 비율은 1:100(w/w)의 비율로 혼합하여 수행하였다. 가수분해 반응이 완료된 다음, 열수조에서 10분 동안 가열하여 효소를 불활성화 시켰고, 효소 불활성화 후, 효소로부터 가수분해물을 분리한 후 동결 건조시켰다. 동결 건조된 가수분해물은 사용 전까지 -80℃에서 보관하였다.
- [0023] 상기 홍어부산물로부터 수득한 젤라틴 추출물의 2차 가수분해물에 함유된 항비만 활성을 갖는 기능성 펩타이드를 분리하기 위해 2차 가수분해물을 대상으로 FPLC(Fast protein liquid chromatography)를 이용하여 gel filtration 컬럼을 통해 활성 펩타이드를 분리하였다.
- [0024] 2. 세포독성 평가
- [0025] 3T3-L1 지방전구세포를 5 X 10³ cells/well의 농도가 되도록 희석하여 96 well culture plate에 분주한 후, 37℃, 5% CO₂ 조건하에서 24시간 배양하고 홍어 콜라겐 펩타이드를 농도별로 처리한 후 24시간 동안 배양하였다. 그 후, 0.5mg/ml의 Tetrazolium bromide salt(MTT; Sigma Chemical Co., St. Louis MO, USA)를 20 μl/well씩 첨가한 후, 동일 조건에서 4시간 배양하였다. 배지를 제거하고 Dimethylsulfoxide(DMSO; Sigma Chemical Co., St. Louis MO, USA)를 넣어 세포내에 생성된 formazan을 15분간 교반하여 용출한 후, ELISA reader를 이용하여 570 nm에서 흡광도를 측정하였다. 각 실험은 Triplicate로 수행하였으며, 이에 대한 평균값과 표준오차를 분석하여 세포독성 여부를 확인하였다.
- [0026] 3. in vitro 세포분화 유도
- [0027] 3T3-L1 세포를 2 X 10⁵ cells/well의 농도로 희석시켜 12 well plate에 분주한 후 배양하였다. 세포가 90% 정도

성장하였을 때, 배지를 분화유도 배지(DMEM/F12, 10% FBS(Fetal Bovine Serum; GibcoBRL, USA), 10 μM Dexamethasone (Sigma Co. USA), 0.5mM methyl isobutylxanthine (IBMX;Sigma, USA), 10 μg/ml Insulin(Sigma, USA))로 바꿔준 뒤, 홍어 콜라겐 펩타이드를 농도별로 처리한 후, 37°C, 5% CO₂ 조건하에서 2일간 배양하였다. 그 후, 10 μg/ml Insulin만 들어간 DMEM/F12로 바꿔준 후, 다시 홍어 콜라겐 펩타이드를 농도별로 처리하고 2일 후 DMEM/F12로 바꿔준 후, 다시 홍어 콜라겐 펩타이드를 농도별로 처리하여 추가적으로 2일 배양하였다.

[0028] 4. Oil Red-O staining를 통한 중성지방 확인

[0029] 홍어 콜라겐 펩타이드가 3T3-L1 세포의 분화를 억제하는지 여부를 확인하기 위하여 지방전구세포가 지방세포로 분화되어 형성하는 중성지방을 특이적으로 염색시키는 Oil red-O 염색법을 이용하였다. 먼저 배양중인 세포에서 배지를 제거하고, 3% paraformaldehyde를 1ml/well씩 넣어 5분간 실온에서 세포를 고정하였다. paraformaldehyde를 제거하고 2ml의 새로운 4% paraformaldehyde를 넣어주었다. 4% paraformaldehyde는 제거하고 60% isopropanol을 이용하여 3회 washing한 후, 각 well이 완전히 마를 때까지 정치하였다. 그 후, 각 well에 Oil red-O working solution(0.5% Oil Red-O in 70% Isopropanol)을 첨가 하고 20분간 교반 염색하였다. Oil Red-O working solution을 제거하고 즉시 D.W.를 이용하여 4회 세척한 후, 지방이 축적된 세포 사진을 촬영하였다.

[0030] 5. Free glycerol의 측정

[0031] 분화된 3T3-L1 세포에 홍어 콜라겐 펩타이드를 농도별로 처리한 후 배지를 eppendorf tube에 넣고 70°C에서 10분간 가열하여 세포로부터 유리된 효소들을 불활성화 시켰다. 50 μl의 배지를 glycerol reagent에 첨가하여 1분간 반응시킨 후 흡광도 540nm에서 측정하였다.

[0032] 6. Reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR)에 의한 mRNA의 분석

[0033] 홍어 콜라겐 펩타이드를 처리하면서 분화시킨 3T3-L1 지방전구세포에 TRIzol reagent 을 이용하여 세포 내 총 RNA를 추출하였다. 1 μg의 총 RNA를 oligo(dT) primer와 M-MLV역전사효소(Enzymomics Co.)와 함께 반응시켜 1차 cDNA를 제작하였다. PCR반응은 1 μg의 cDNA와 각각의 primer를 첨가하여 25~30 cycles로 PCR 반응시킨 다음 1.5% agarose gel에 전기 영동하였고, Image J를 통하여 정량 분석하였다.

[0034] PCR에 사용된 primer set은 다음과 같다. GAPDH, GTTCTACCCCAATGTGT (forward) 및 TGTGAGGGAGA TGCTCAGTG (reverse); C/EPB β, CGCCTTAGACCCATGGAAGTGG (forward) 및 AGGTTGCGCATCTTGGCCTGTGCG (reverse); PPAR γ, AGCATGGTGCCTTCGCTGATGCA (forward) 및 CAGACTCTGGGTTC GCTGGTCGA (reverse); AP2 γ, TGATGCCTTTGTGGGAACCT (forward) 및 GCAAAGCCCACTCCACTT (reverse); Leptin, TTCACACGCGAGTCGG TAT (forward) 및 CTCAAAGCCACCCTCTGT (reverse)

[0035] 7. 실험동물 선정 및 고지방식이 제조 및 공급

[0036] 홍어 콜라겐 펩타이드의 in vivo 항비만 활성을 측정하기 위해 체중 30g 전후의 ICR/mice를 사용하였으며, 1주일간 표준사료로 사육하여 적응시킨 후 식이를 조절하여 공급하였다. 동물실험실은 온도 22±1°C, 습도 55±5%를 유지하고 12시간 간격으로 light-dark cycle 을 유지하였다. 항비만 실험을 위해 Lard을 12% 첨가한 고지방 식이를 사용하였고, 동결 건조한 홍어 콜라겐 펩타이드를 식이에 고농도 1g/Kg, 중농도 0.5g/Kg, 저농도 0.1g/Kg 로 각각 첨가하여 자유식으로 7주 동안 급여하여 항비만 효과 확인하였다.

[0037] 8. 체중 및 식이섭취량의 변화

[0038] 체중은 시험 개시일과 개시 후 매주 1회 간격으로 측정하였다. 사료섭취량은 각 군별로 통합하여 매일 측정하였다.

- [0039] 9. 혈액채취, 간 중량, 지방조직 무게 측정 및 간 조직 준비
- [0040] 혈액 채취는 시험 종료일에 Zoletil : Rumpun(4:1)으로 마취(복강주사 50 μ L/100 gbody weight) 후 심장 채혈 하여 2,000xg에서 20분간 원심 분리한 혈청을 분리하여 -80° C에 보관 사용하였다. 마지막 날 간 중량을 측정하고, 100mg으로 절단하여 chloroform : isopropanol : NP-40 을 각각 7 : 11 : 0.1 로 섞어서 2ml 씩 넣고 homogenizer 로 분쇄한 후 15,000xg에서 10분간 원심분리하고 50 $^{\circ}$ C에서 건조시켜 사용하였다. 총 지방조직의 중량을 측정하기 위해 피하지질, 부고환 지질, 내장지질의 중량을 각각 측정하고 이를 합하여 사용하였다.
- [0041] 10. 혈액 및 간 조직을 이용한 혈액생화학적 검사
- [0042] 혈청을 이용하여 다음과 같은 생화학적 검사를 하였다. Total cholesterol 은 Total Cholesterol Assay Kit (STA-390, Cell Biolabs, INC), HDL(high-density lipoprotein), LDL(low-density lipoprotein), VLDL (very-low density lipoprotein cholesterol)은 HDL and LDL/VLDL Cholesterol Assay Kit (STA-391, Cell Biolabs, INC), Triglyceride는 중성지방 측정용 시액 (AM 157S-K, 아산제약) 으로 각각 분석하였다.
- [0043] 11. 통계처리
- [0044] 실험 결과는 평균값과 표준편차로 나타내었으며, 통계처리는 GraphPad Prism (GraphPad Software; La Jolla, CA)를 이용하여 one way ANOVA 분석을 실시한 후 Dunnett's multiple comparison test 및 two way ANOVA 분석을 실시한 후 Bonferroni post test 로 유의성을 $p < 0.05$ 수준에서 검증하였다.
- [0045] 이하, 본 발명의 지방전구세포 분화와 지방세포 전사인자의 발현, 그리고 항비만에 대한 홍어 콜라겐 펩타이드의 영향을 알아보기 위한 실험결과를 관련된 도면과 설명하면 다음과 같다.

[0046] **II. 실험결과**

- [0047] 1.1. In vitro 지방전구세포 분화에 대한 홍어 콜라겐 펩타이드의 영향
- [0048] 홍어 콜라겐 펩타이드 10mg/ml 및 20mg/ml을 처리하여 3T3-L1 지방전구세포의 독성을 확인한 결과, 각각 5% 및 14%의 세포성장 억제 효과가 관찰되었다 (도1-A). 동일 농도에서 3T3-L1 지방전구세포의 지방세포 분화에 홍어 콜라겐 펩타이드를 처리하여 glycerol 양과 Oil Red-O staining 을 통한 중성지방을 측정한 결과, 분화시키지 않은 미분화 세포와 유사하게 분화가 억제되었다(도1-B, 도1-C).
- [0049] 도 1은 3T3-L1 지방전구세포의 증식과 글리세롤과 형태 변화, 지질 축적에 대한 홍어 콜라겐 펩타이드의 효과를 나타내고 있다. 도 1의 그래프(A)에서는 세포를 24시간 동안 콜라겐 농도별로 처리하고 생존율을 MTT 분석으로 측정하였다. 데이터는 삼중 실험의 평균 \pm 표준 편차로 표현된다. 그래프(B)에서는 글리세롤 함량 홍어 콜라겐 펩타이드를 10mg/ml 및 20mg/ml로 처리한 후에 멀티 플레이트 판독기를 이용하여 540nm에서 측정하였다.
- [0050] 데이터는 삼중 실험의 평균 \pm 표준 편차로 표현된다. 이때, 미분화 세포 제어 및 콜라겐 펩타이드를 처리한 세포는 각각 ($P < 0.05$)에서 유의한 차이를 보인다. 그래프(C)에서 3T3-L1 지방전구세포의 분화는 MDI 처리를 통해 콜라겐 펩타이드를 10mg/ml 및 20mg/ml로 처리되지 않은 5% FBS를 함유하는 DMEM/F12 배지에서 유지되었다. 2일 후, 세포를 고정시키고 Oil Red O로 염색하였다. 이후 형태학적 변화와 지질 축적은 반전 현미경(X200)을 사용하여 관찰하였다.
- [0051] 1.2. 지방세포 전사인자의 발현에 대한 홍어콜라겐 펩타이드의 영향
- [0052] 지방전구세포에서 지방세포로 분화되는 지방세포화 과정에 관여하는 전사인자는 C/EBP β 와 PPAR γ 등이 있으며, 또한 이들은 분화 후기에 높게 발현되어 AP2 γ 와 같은 지방세포화 종결 표지자의 발현을 유도한다고 알려져 있다. 도2에 나타난 바와 같이 분화를 유도하면 C/EPB β , PPAR γ 및 AP2 γ 가 증가하며, 홍어 콜라겐 펩타이드를 처리하면 지방세포화 전사인자인 C/EPB β , PPAR γ 의 발현이 효과적으로 감소하였다는 것을 알 수 있다 (도2-A, 도2-B). 하지만, 비만 정도에 따라 높아진다고 알려져 있는 식욕을 조절하는 호르몬인 렙틴은 변화가 없었으며, 종결 표지자로 알려진 AP2 γ 는 10mg/ml에서는 0.93배 감소하였으나, 20mg/ml에서는 1.4배 증가하였다

(도 2-A, 도2-B).

- [0053] 도 2는 지방 생성과 관련된 유전자에 콜라겐 펩타이드를 처리하였을 때의 효과를 나타낸다. 도2의 그래프(A)에서는 3T3-L1 세포를 24시간 동안 MDI 처리 없이 콜라겐 펩타이드를 10mg/ml 및 20mg/ml로 처리하였다. 총 RNA를 준비하고, 상기 재료 준비 과정 및 방법에서 설명한 바와 같이 특정의 프라이머 쌍을 이용하여 관련 유전자 발현을 RT-PCR로 분석하였다. 도 2의 그래프(B)에서는 ImageJ (National Institutes of Health software)을 GAPDH 전사체와 정규화 후의 차분배 유전자 발현을 나타내는 상대 단위를 계산하기 위해 사용되었다.
- [0054] 이하, *in vivo* 항비만 실험에 앞서 한국화학융합시험연구원(KTR)에 의뢰하여 단회경구투여독성시험 및 미생물복귀돌연변이시험을 의뢰하였다. KTR에서 안전하다고 보고된 농도인 2g/kg 보다 작은 양인 1g/kg, 0.5g/kg, 0.1g/kg 를 쥐에 급여하여 항비만 실험을 실시하였다.
- [0055] 1.3. *In vivo* 항비만 실험
- [0056] 1.3.1. 식이섭취량 및 체중증가량
- [0057] 정상군 및 고지방식이(HFD)군과 고지방식이와 홍어 콜라겐 펩타이드 1g/kg, 0.5g/kg, 0.1g/kg을 7주간 동시 급여한 군(n=10)들의 식이섭취량 및 체중증가를 확인하였다. 고지방식이와 비교하여 홍어 콜라겐 펩타이드 1g/kg 군에서는 식이 섭취량이 8.9% 감소하였으며, 다른 농도에서는 고지방식이와 유사하거나 높게 나타났다(도3-A). 체중증가량의 경우, 고지방식이와 홍어 콜라겐 펩타이드를 동시에 급여한 급여군은 모든 농도에서 체중증가량이 억제되었으며, 특히 최종일까지 증가된 몸무게의 경우, 고지방식이군과 비교하여 홍어 콜라겐 펩타이드 고농도 군인 1g/kg 의 경우, 56.3%의 체중증가가 통계적으로 유의하게 억제되었고, 0.5g/kg 및 0.1g/kg의 경우는 각각 17.3%, 14.1%의 체중감소가 관찰되었지만, 통계적 유의성은 없었다(도3-B, 도3-C). 최종일 쥐의 몸무게는 고지방식이군에 비해 홍어 콜라겐 펩타이드 1g/kg, 0.5g/kg, 0.1g/kg 을 급여한 결과 각각 14.6%, 4.0%, 7.7%의 몸무게 억제효과가 나타났으며, 고농도인 1g/kg 의 경우에만 통계적으로 유의한 결과가 관찰되었다(도3-D).
- [0058] 도 3에서는 콜라겐 펩타이드의 만성 경구 치료는 쥐의 HFD에 인한 체중 증가를 감소시키는 것을 알 수 있다. 도 3의 그래프(A), (B), (C), (D)는 각각 48일간 콜라겐 펩타이드 1g/kg, 0.5g/kg, 0.1g/kg을 공급한 HFD-fed C57BL/6J 쥐의 일상 식사량(A), 체중 변화(B), 증가 체중(C), 최종 체중(D)을 나타내고 있다.
- [0059] 1.3.2. 총 지방 중량 및 각 부위의 지방 중량 변화
- [0060] 정상군 및 고지방식이군과 고지방식이와 홍어 콜라겐 펩타이드 1g/kg, 0.5g/kg, 0.1g/kg을 7주간 동시 급여한 군(n=10)들의 피하지방, 부고환지방, 내장 지방의 각 중량을 확인하고 이들을 모두 합한 총 지방을 확인하였다. 그 결과 총 지방 중량은 고지방식이군과 비교하여 홍어 콜라겐 펩타이드 급여군은 각각 42.5%, 24.1%, 24.7% 감소하였으며, 1g/kg에서만 통계적 유의성을 확인하였다(도4-A). 피하지방의 무게를 조사한 결과, 고지방식이군과 비교하여 지방조직무게가 58.0%, 41.2%, 33.8% 각각 감소하였으며, 1g/kg, 0.5g/kg 군은 통계적으로 유의한 결과가 나타났다(도4-B). 부고환 지방무게는 27.2%, 8.1%, 9.6% 각각 감소하였으며, 통계적 유의성은 확인 할 수 없었다(도4-C). 내장 지방무게는 49.1%, 29.4%, 42.7% 각각 감소하였으며, 1g/kg, 0.1g/kg 군은 통계적으로 유의하게 감소하였다(도4-D).
- [0061] 이와 같이 고지방식이의 급여에 의해 비만 유도된 쥐의 경우, 중성지방의 증가에 따른 체지방의 비정상적인 증가와 혈중 콜레스테롤 증가 및 지방간이 형성되는 특징이 있다. 고지방식이만 급여한 군과 비교하여 홍어 콜라겐 펩타이드 1g/kg를 동시에 급여하면 56.3% 통계적으로 유의한 몸무게 감소가 나타났다.
- [0062] 도 4에서는 콜라겐 펩타이드의 만성 경구 치료는 쥐의 HFD에서 유도된 지방을 감소시키는 것을 알 수 있다. 도4의 그래프(A), (B), (C), (D)는 각각 48일간 콜라겐 펩타이드 1g/kg, 0.5g/kg, 0.1g/kg을 공급한 HFD-fed C57BL/6J 쥐의 총 지방 중량(A), 피하지방의 무게(B), 부고환 지방 무게(C), 내장 지방 무게(D)을 나타내고 있다.
- [0063] 1.3.3. 혈액 내 콜레스테롤 및 중성지방 검사
- [0064] 정상군 및 고지방식이군과 고지방식이와 홍어 콜라겐 펩타이드 1g/kg, 0.5g/kg, 0.1g/kg 을 7주간 동시 급여한

군(n=10)들의 혈액을 채취하여 혈액 생화학적 검사를 실시하였다. 총 콜레스테롤은 고지방식이군과 비교하여 홍어 콜라겐 펩타이드 급여군이 18.0%, 15.4%, 4.3% 각각 감소하였으며, 1g/kg군에서만 통계적으로 유의한 결과가 나타났다(도5-A). HDL 콜레스테롤은 홍어 콜라겐 펩타이드 급여시 변화가 없었다(도5-B). LDL/VLDL 콜레스테롤은 43.1%, 40.6%, 33.1% 각각 감소하였으며, 모든 군에서 통계적으로 유의하게 감소하였다(도5-C). 또한, 혈중 중성지방은 홍어 콜라겐 펩타이드를 급여한 모든 군에서 각각 37.3%, 34.6%, 31.1%의 통계적 유의한 결과가 나타났다(도5-D). 따라서 홍어 콜라겐 펩타이드는 혈중 LDL/VLDL 콜레스테롤과 혈중 중성지방을 억제함으로써 지방형성이 감소하는 항비만 작용이 나타남을 알 수 있었다.

[0065] 도 5에서는 콜라겐 펩타이드의 만성 경구 치료는 쥐의 HFD에서 유도된 콜레스테롤을 감소시키는 것을 알 수 있다. 도5의 그래프(A), (B), (C), (D)는 각각 48일간 콜라겐 펩타이드 1g/kg, 0.5g/kg, 0.1g/kg을 공급한 HFD-fed C57BL/6J 쥐의 총 콜레스테롤(A), HDL 콜레스테롤(B), LDL/VLDL 콜레스테롤(C), 혈중 중성지방(D)을 나타내고 있다.

[0066] 1.3.4. 간에서 콜레스테롤 및 중성지방 검사

[0067] 정상군 및 고지방식이군과 고지방식이와 홍어 콜라겐 펩타이드 1g/kg, 0.5g/kg, 0.1g/kg 을 7주간 동시 급여한 군(n=5) 들의 간 중량 및 간에서의 콜레스테롤과 중성지방을 검사하였다. 간 중량은 11.6%, 11.1%, 16.9% 각각 감소하였으며, 0.1g/kg 군은 통계적으로 유의하게 감소하였다(도6-A). 간 조직을 분쇄하여 총 콜레스테롤 및 중성지방을 검사한 결과, 총 콜레스테롤은 16.3%, 30.7%, 15.9% 각각 감소하였으나, 통계적 유의성은 없었고(도6-B), 간에서의 중성지방은 1g/kg, 0.5g/kg에서 각각 48.4%, 21.5% 감소하였으나, 0.1g/kg에서는 21.5% 증가하였으며, 모든 군에서 통계적 유의성은 관찰되지 않았다 (도6-C).

[0068] 간조직은 체내 항상성의 유지에 중요한 기관으로 지방산의 합성과 산화에 불균형이 초래될 경우 간조직 내 지방 축적이 불가피하다. 더욱이 비알콜성 지방간 환자의 90% 이상에서 심혈관계 질환, 비만 및 2형 당뇨 등과 같은 대사성 질환을 보이는 것으로 알려져 있으며, 지방간은 쉽게 치료되기도 하지만, 장기간에 걸쳐 심각성을 깨닫지 못하고 방치하게 되면 간 섬유증이나 간암 등의 만성 간질환으로도 진행될 수 있으므로 간조직 내 지질축적과 비만의 관계에 대한 관심은 점차 고조되고 있다. 본 실험에서 고지방식이만 급여한 군과 비교하여 홍어 콜라겐 펩타이드를 급여하면 간 중량, 간내 총 콜레스테롤 및 중성지방이 감소한 경향이 있으나 통계적으로 유의하지는 않음을 알 수 있었다.

[0069] 도 6에서는 콜라겐 펩타이드의 만성 경구 치료는 쥐의 HFD에서 유도된 간 지방을 감소시키는 것을 알 수 있다. 도6의 그래프(A), (B), (C), (D)는 각각 48일간 콜라겐 펩타이드 1g/kg, 0.5g/kg, 0.1g/kg을 공급한 HFD-fed C57BL/6J 쥐의 간 중량(A), 간 콜레스테롤(B), 간의 중성지방(C)을 나타내고 있다.

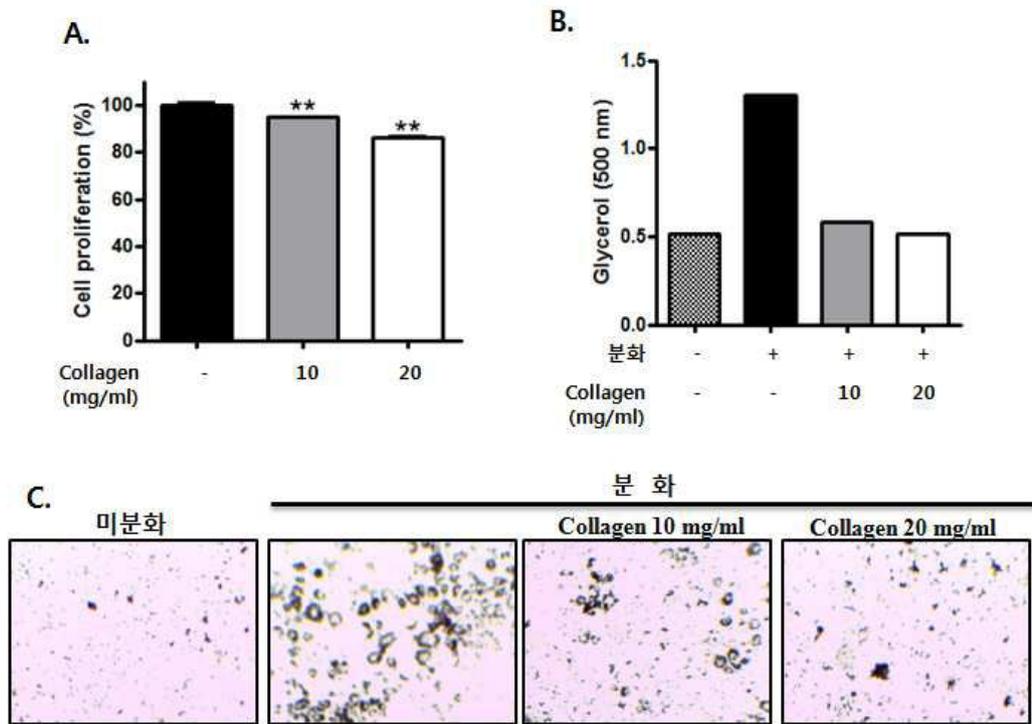
[0070] 이와 같은 결과로부터 홍어 가공시 배출되는 부산물을 가수분해하여 얻어지는 콜라겐 펩타이드를 유효성분으로 포함하는 지질개선 또는 항비만 예방 효과를 갖는 건강기능성 식품조성물 또는 약학적 조성물로 활용이 가능하다.

산업상 이용가능성

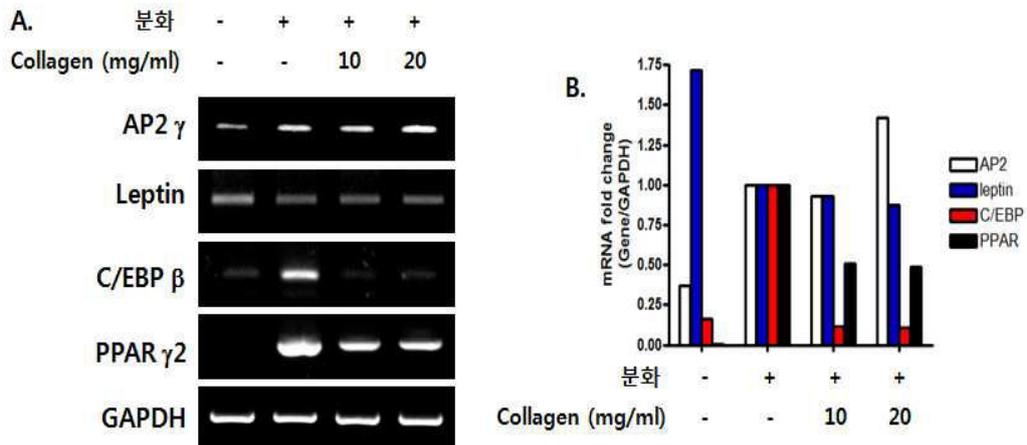
[0071] 본 발명에 따른 항비만을 활성을 갖는 홍어 콜라겐 펩타이드는 홍어를 가공하고 남은 부산물을 재이용한다는 점에서 경제적이며, 이로부터 추출한 홍어 콜라겐 펩타이드는 지방세포 분화에 중요 전사인자인 C/EBP β 와 PPAR γ 의 발현을 효과적으로 억제하여 3T3-L1 지방세포로의 분화를 감소시키고, 또한 콜레스테롤 및 중성지방을 낮추었으며, 지질이 축적되는 것을 억제하는 활성을 확인하였다. 이는 향후 지질 개선과 항비만 활성과 관련된 홍어 콜라겐 펩타이드 건강 기능성 식품 또는 약학조성물 제품개발의 산업적 이용 가능성이 있다.

도면

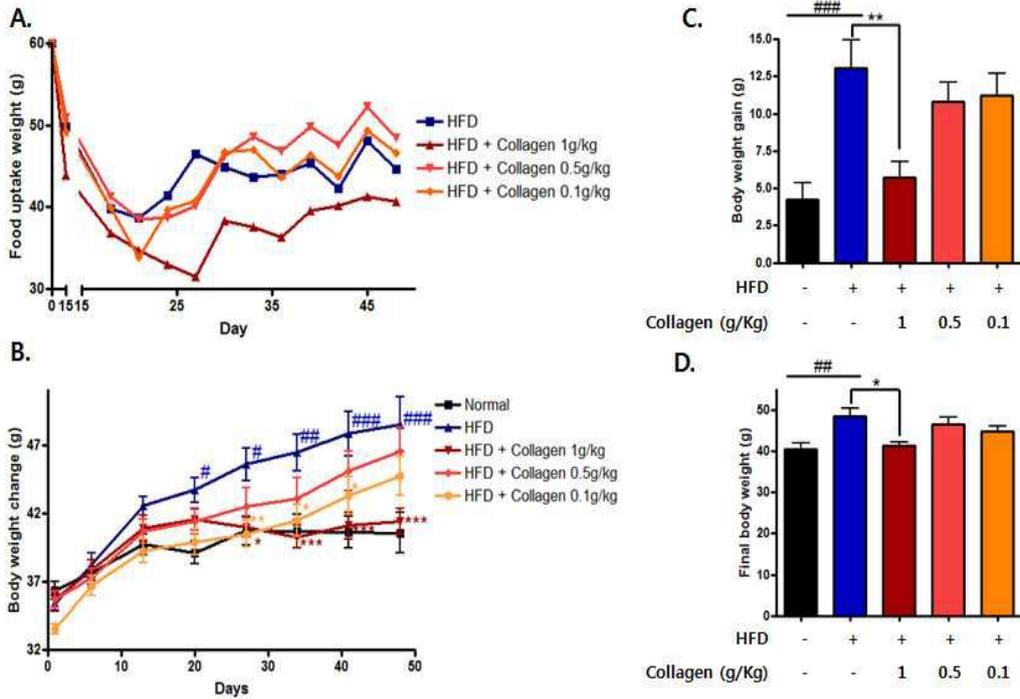
도면1



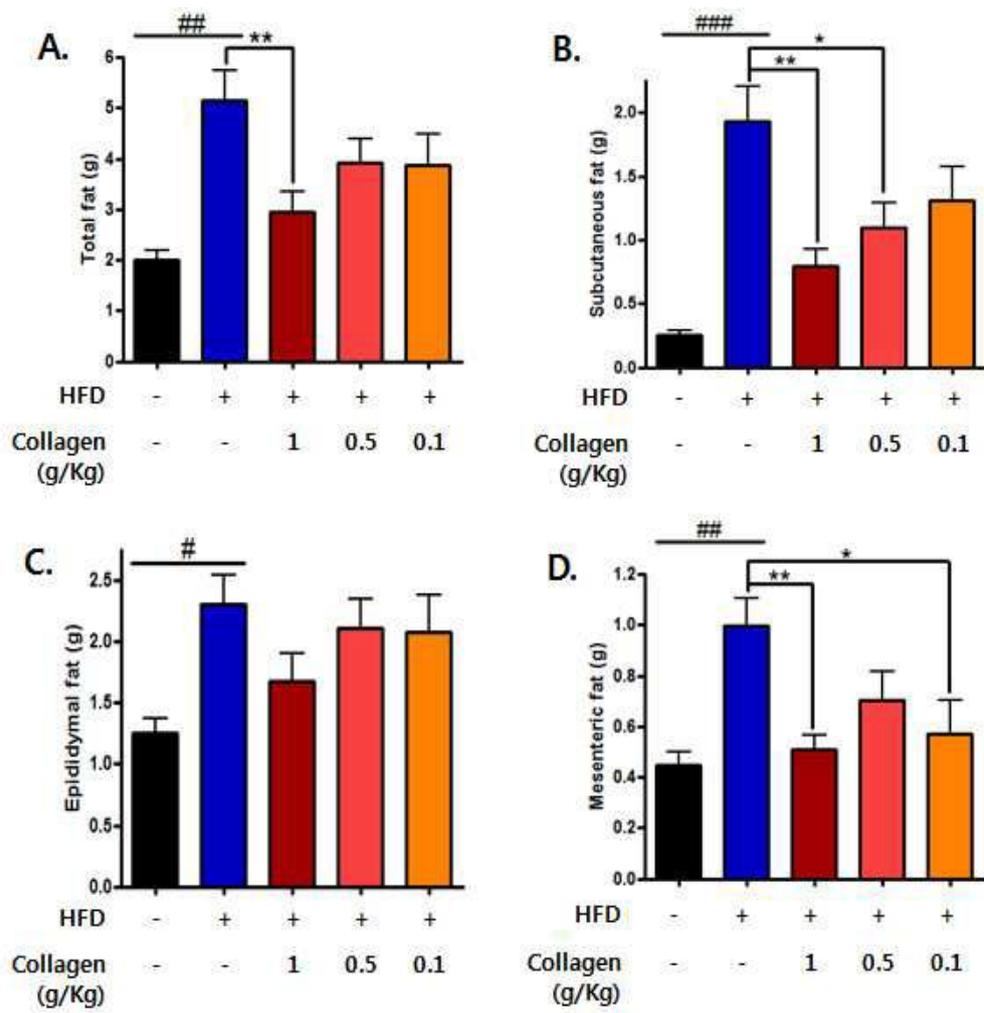
도면2



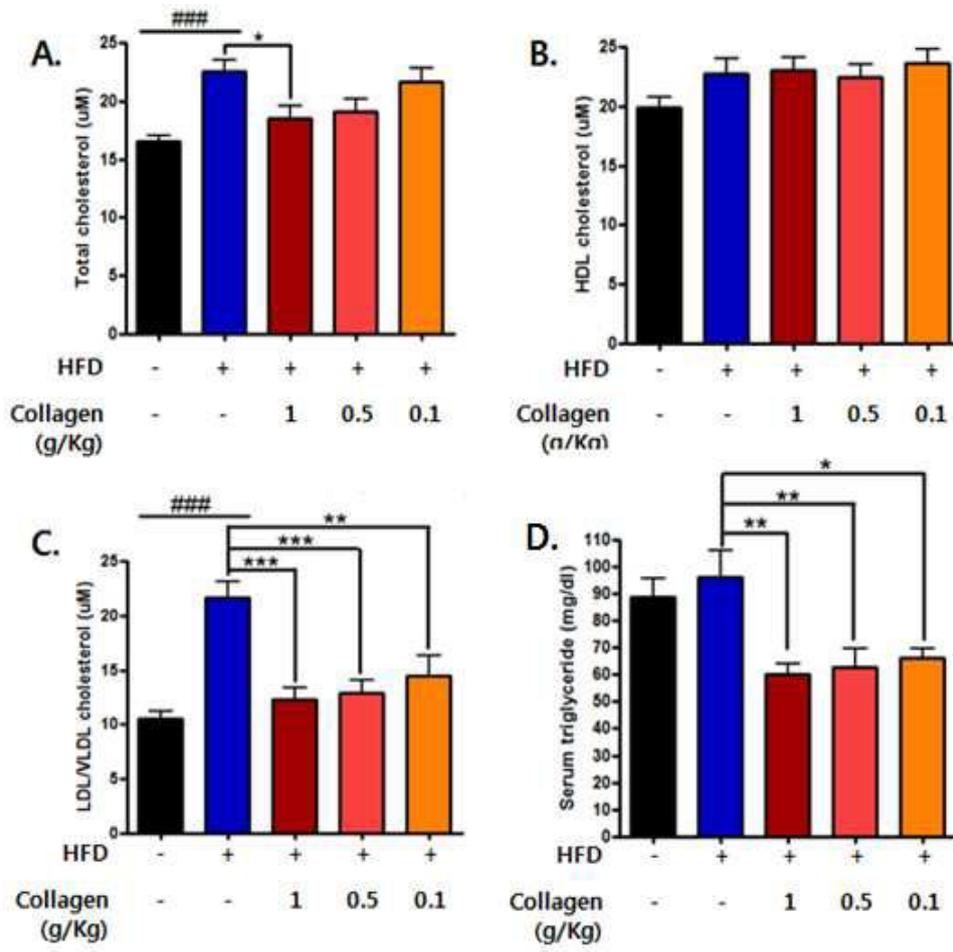
도면3



도면4



도면5



도면6

