(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2012-0130024
(43) 공개일자 2012년11월28일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
*A61K 36/05* (2006.01) *A61K 36/04* (2006.01)
*A61K 36/03* (2006.01) *A61P 9/00* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2011-0048097
(22) 출원일자 2011년05월20일
심사청구일자 2011년05월20일

(71) 출원인
**강릉원주대학교산학협력단**
강원도 강릉시 죽헌길 7(지변동)
(72) 발명자
**김상무**
강원도 강릉시 화부산로111번길 24, 롯데캐슬 아파트 204동 205호 (교동)
**최승화**
강원도 강릉시 하슬라로232번길 14-8, 202호 (교동)
**김진경**
경상북도 경산시 하양읍 무학로 6, 동신아파트 102동 906호
(74) 대리인
**특허법인다나**

전체 청구항 수 : 총 11 항

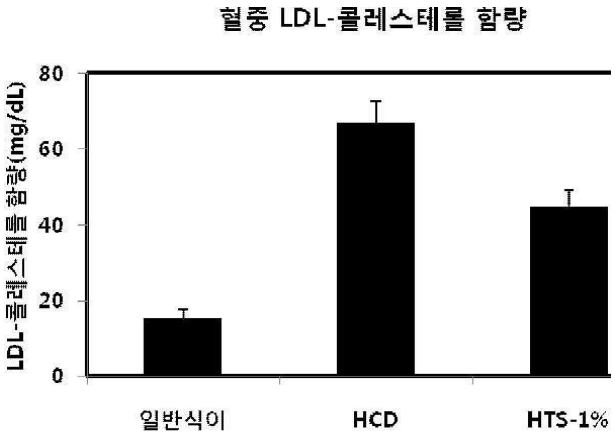
(54) 발명의 명칭 **미세조류 단백질 가수분해물을 포함하는 콜레스테롤 강하용 조성물**

## (57) 요 약

본 발명은 미세조류의 단백질을 가수분해시킨 단백질 가수분해물을 포함하는 콜레스테롤 강하용 조성물 및 이의 제조방법에 관한 것이다.

본 발명에 의한 콜레스테롤 강하용 조성물은 천연물인 미세조류 유래 단백질 가수분해물을 활용함으로써 부작용이 없으며, 초음파를 사용함으로써 생산 수율을 상승시킬 수 있다.

*대 표 도* - 도1



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

| | |
|---|---|
| 과제고유번호 | B0008559 |
| 부처명 | 지식경제부 |
| 연구사업명 | 지방기술혁신산업 |
| 연구과제명 | 해양조류를 활용한 유용물질 상용화 기술 개발 |
| 주관기관 | 강릉원주대학교 |
| 연구기간 | 2010.07.01 ~ 2011.06.30 |

## *특허청구의 범위*

**청구항 1**

미세조류의 단백질 가수분해물을 포함하는 콜레스테롤 강하용 조성물.

**청구항 2**

제1항에 있어서, 상기 미세조류는 녹조류(Chlorophyte), 갈조류(Phaeophyceae), 홍조류(Rhodophyte), 남조류(Cyanophyta), 규조류(Bacillariophycea), 와편모조류 (Dinophyta) 또는 착편모조류 (Haptophyta) 인 것을 특징으로 하는 콜레스테롤 강하용 조성물.

**청구항 3**

제2항에 있어서, 와편모조류는 테트라셀미스 수에시카(*Tetrselmis suecica*)인 것을 특징으로 하는 콜레스테롤 강하용 조성물.

**청구항 4**

a)미세조류에 초음파처리를 하여 단백질을 용출시키는 단계; 및

b)상기 단백질에 단백질 분해효소를 이용하여 단백질 가수분해물 제조하는 단계;

를 포함하는 콜레스테롤 강하용 조성물의 제조방법.

**청구항 5**

제4항에 있어서, 상기 미세조류는 녹조류(Chlorophyte), 갈조류(Phaeophyceae), 홍조류(Rhodophyte), 남조류(Cyanophyta), 규조류(Bacillariophycea), 와편모조류 (Dinophyta) 또는 착편모조류 (Haptophyta) 인 것을 특징으로 하는 콜레스테롤 강하용 조성물의 제조방법.

**청구항 6**

제5항에 있어서, 와편모조류는 테트라셀미스 수에시카(*Tetrselmis suecica*)인 것을 특징으로 하는 콜레스테롤 강하용 조성물의 제조방법.

**청구항 7**

제4항에 있어서, 상기 a) 단계의 초음파처리는 초음파 발생기에서 90-100 kHz 주파수로 4-5 시간 동안, 26~28℃에서 처리하는 것을 특징으로 하는 콜레스테롤 강하용 조성물의 제조방법.

**청구항 8**

제4항에 있어서, 상기 b) 단계의 가수분해물은 pH 6-7, 50-60분간, 45~60℃에서 가수분해하여 생성되는 것을 특징으로 하는 콜레스테롤 강하용 조성물의 제조방법.

**청구항 9**

제4항에 있어서, 상기 b) 단계의 단백질 분해효소는 알칼라 아제(alcalase) 인 것을 특징으로 하는 콜레스테롤 강하용 조성물의 제조방법.

**청구항 10**

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 따른 조성물을 1~5% 포함하는 콜레스테롤 강하용 약학 조성물.

**청구항 11**

제1항 내지 제3항 중 어느 한 항에 따른 조성물을 1~5% 포함하는 콜레스테롤 강하용 식품 조성물.

# 명 세 서

## 기 술 분 야

[0001] 본 발명은 미세조류의 단백질을 가수분해시킨 단백질 가수분해물을 포함하는 콜레스테롤 강하용 조성물 및 이의 제조방법에 관한 것이다.

## 배 경 기 술

[0002] 콜레스테롤은 세포를 구성하는 필수 성분으로 세포의 성장, 분화 및 발육에 중요한 역할을 담당하고 있다. 또한, 부신피질 호르몬이나 성호르몬, 소화효소인 담즙산을 만드는 재료가 되며, 혈관의 강화 유지에 중요한 역할을 하고 있다.

[0003] 그러나, 콜레스테롤을 과다 섭취하게 되면, 혈액 속 콜레스테롤이 혈관의 가장 안쪽을 덮고 있는 막안으로 침투하고 이로 인해 다양한 물질이 분비되면서 동맥의 내막은 점점 증식하여 두꺼워진다. 또 콜레스테롤과 이를 섭취한 세포 등이 쌓이면서 혈관 안쪽으로 튀어나오는데 이를 죽상동맥경화라고 하며, 콜레스테롤에 의한 동맥경화의 대표적인 사례이다.

[0004] 동맥경화와 같은 순환기계 질환은 1970년대부터 우리나라 인구 사망의 주원인으로 부각되고 있다. 또한 콜레스테롤은 비만 등과 같은 성인병을 유발하고, 콜레스테롤에서 유래되는 지질 과산화물은 생체 내에서 퇴생성 과정을 야기하고, 암, 노화, 생체막의 변화 및 파괴 등 생체 기능에 부의 효과를 내는 것으로 알려져 있다. 따라서 이러한 지질들의 생체 내외에서의 제어는 서구화된 식단, 즉 동물성 식단이 증대된 현대인에게 매우 중요하다.

[0005] 이러한 혈중 콜레스테롤을 저하할 목적으로 니코틴산, 트리파라놀, 부티로페논과 같은 혈중 콜레스테롤 강하제가 개발되어 왔으나, 이는 후천선 어린선 등의 부작용을 유발할 수 있기 때문에 부작용이 없는 천연물에서 혈중 콜레스테롤 저하제를 찾는 시도가 이루어지고 있다.

## 발명의 내용

### 해결하려는 과제

[0006] 이에 본 발명자는 천연물인 미세조류 유래 단백질 가수분해물을 활용한 혈중 콜레스테롤 강하용 조성물을 개발하기에 이르렀다.

[0007] 본 발명은 미세조류 유래 단백질 가수분해물을 포함하는 콜레스테롤 강하용 조성물 및 이의 제조방법을 제공하고자 한다.

### 과제의 해결 수단

[0008] 본 발명은 미세조류의 단백질 가수분해물을 포함하는 콜레스테롤 강하용 조성물에 관한 것이다.

[0009] 또한, 본 발명은 a)미세조류에 초음파처리를 하여 단백질을 용출시키는 단계; 및

[0010] b)상기 단백질에 단백질 분해효소를 이용하여 단백질 가수분해물 제조하는 단계;

[0011] 를 포함하는 콜레스테롤 강하용 조성물의 제조방법에 관한 것이다.

[0012] 또한, 본 발명은 상기 조성물을 1~5% 포함하는 콜레스테롤 강하용 약학 조성물 및 식품 조성물에 관한 것이다.

### 발명의 효과

[0013] 본 발명에 의한 콜레스테롤 강하용 조성물은 천연물인 미세조류 유래 단백질 가수분해물을 활용함으로써 부작용이 실질적으로 없으며, 초음파를 사용함으로써 생산 수율을 상승시킬 수 있다.

### 도면의 간단한 설명

[0014] 도 1은 4주간의 식이섭취가 미치는 혈중 LDL-콜레스테롤 함량 변화를 나타낸다.

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0015] 본 발명은 미세조류의 단백질 가수분해물을 포함하는 콜레스테롤 강하용 조성물을 제공한다.

[0016] 본 발명의 명세서에서 “미세조류”란 담수 및 해수에서 서식하는 부유생물로써 남조류, 규조류, 와편모조류, 녹조류, 홍조류, 황갈색편모조류 및 은편모조류 등이 있으며, 전세계적으로 약 35,000종이 보고되어 있으나, 잠재적으로 약 200,000종 이상이 존재한다고 추정하고 있다. 미세조류들은 일반적인 식물들과 마찬가지로 광합성을 하며 내부에서 당질 및 단백질을 생합성하기 때문에 담수 및 해양에서 기초생산을 담당하고 있으며, 먹이사슬의 생산자로써 중요한 위치를 차지하고 있다.

[0017] 본 발명에서 미세조류의 단백질 가수분해물이란 미세조류에 초음파를 처리하여, 단백질을 용출시키고, 상기 용출된 단백질에 단백질 분해효소를 이용하여 생성된 가수분해물을 말한다. 또한, 상기 미세조류 특히, 미세조류의 세포벽에 초음파를 처리하여 단백질을 용출 시킬 수 있다.

[0018] 본 발명에서 상기 미세조류는 녹조류(Chlorophyte), 갈조류(Phaeophyceae), 홍조류(Rhodophyte), 남조류(Cyanophyta), 규조류(Bacillariophycea), 와편모조류 (Dinophyta) 또는 착편모조류 (Haptophyta)를 포함할 수 있으며, 상기 와편모조류는 테트라셀미스 수에시카(*Tetrselmis suecica*)일 수 있다.

[0019] 또한, 본 발명은 미세조류 단백질 가수분해물을 포함하는 콜레스테롤 강하용 조성물의 제조방법을 제공한다. 보다 구체적으로,

[0020] a)미세조류에 초음파처리를 하여 단백질을 용출시키는 단계; 및

[0021] b)상기 단백질에 단백질 분해효소를 이용하여 단백질 가수분해물을 제조하는 단계;

[0022] 를 포함하는 콜레스테롤 강하용 조성물의 제조방법을 제공한다.

[0023] 상기 미세조류의 세포벽에 초음파 처리를 하여 단백질을 용출 시킬 수 있다.

[0024] 상기 미세조류는 이에 제한되지 않으나, 녹조류(Chlorophyte), 갈조류(Phaeophyceae), 홍조류(Rhodophyte), 남조류(Cyanophyta), 규조류(Bacillariophycea), 와편모조류 (Dinophyta) 또는 착편모조류 (Haptophyta)를 포함할 수 있다.

[0025] 또한, 상기 와편모조류는 테트라셀미스 수에시카(*Tetrselmis suecica*)를 포함할 수 있다.

[0026] 본 발명에서는 상기 a) 단계에서 단백질의 용출(또는 추출)의 추출 주파수, 초음파 추출시간 및 추출온도의 최적조건을 산출할 수 있으며, 본 발명의 일실시예에서는 반응표면분석법(Response Surface Methodology, RSM)을 이용하여 산출할 수 있다. 즉, 추출 주파수, 초음파 추출시간 및 추출온도를 독립변수로 하여 산출한 결과, 초음파처리는 초음파 발생기에서 90-100 kHz 주파수로 4-5 시간 동안, 26~28℃에서 처리할 수 있다.

[0027] 또한, 본 발명에서 상기 b) 단계의 가수분해의 최적조건을 반응표면분석법(Response Surface Methodology, RSM)을 이용하여 산출할 수 있다. 즉, 가수분해시간 및 pH를 독립변수로 하여 산출한 결과 가수분해시간은 50~60분간, pH는 6~7일 수 있다.

[0028] 상기 단백질 분해효소는 알칼라아제(alcalase) 인 것을 포함할 수 있으며, 상기 알칼라아제를 2~3L 사용할 수 있으며, 45~60 ℃에서 가수분해 될 수 있다.

[0029] 또한, 본 발명은 상기 미세조류의 단백질 가수분해물을 포함하는 콜레스테롤 강하용 조성물을 1~5% 포함하는 콜레스테롤 강하용 약학 조성물을 제공한다. 미세조류의 단백질 가수분해물을 포함하는 콜레스테롤 강하용 조성물을 1% 미만 포함하거나 5% 초과하여 포함하면, 혈당강하효과가 낮아질 수 있는 문제점이 있다.

[0030] 상기 약학 조성물은 상기 미세조류 유래 단백질 가수분해물 외에 추가로 영양제, 비타민, 전해질, 풍미제, 착색제, 중진제, 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알코올, 탄산 음료에 사용되는 탄산화제 등을 추가로 함유할 수 있다. 또한, 담체, 부형제 또는 희석제로는 락토스, 덱스트로스, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 자이리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아키시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로오스, 메틸 셀룰로오스, 미정질 셀루로오스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸하이드록시벤조에이트, 프로필하이드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유, 덱스트린, 칼슘카보네이드, 프로필렌글리콜, 리퀴드 파라핀, 생리식염수로 이루어진 군에서 선택된 1이상 일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니며 통상의 담체, 부형제 또는 희석제 모두 사용 가능하다.

[0031] 또한, 본 발명의 약학 조성물은 통상의 충진제, 증량제, 결합제, 붕해제, 계면활성제, 항응집제, 윤활제, 습윤제, 향료, 유화제 또는 방부제 등을 더욱 포함할 수 있으며, 경구 또는 비경구 모두 사용 할 수 있다.

[0032] 구체적으로 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 상기 조성물에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트(calcium carbonate), 수크로스(sucrose) 또는 락토오스(lactose), 젤라틴 등을 섞어 조제된다.

[0033] 또한, 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트, 탈크 같은 윤활제들도 사용된다. 경구를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데, 흔히 사용되는 단순희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제 예를 들면, 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다.

[0034] 또한, 본 발명의 약학 조성물의 제형은 사용방법에 따라 바람직한 형태일 수 있으며, 특히 포유동물에 투여된 후 활성 성분의 신속, 지속 또는 지연된 방출을 제공할 수 있도록 당업계에 공지된 방법을 채택하여 제형화할 수 있다. 구체적인 제형의 예로는 경고제, 과립제, 로션제, 리니멘트제, 리모나데제, 산제, 시럽제, 안연고제, 액제, 에어로솔제, 엑스제(EXTRACTS), 엘릭실제, 연고제, 유동엑스제, 유제, 현탁제, 전제, 침제, 점안제, 정제, 좌제, 주사제, 주정제, 캡슐제, 크림제, 환제, 연질 또는 경질 젤라틴 캡슐 등이 있다.

[0035] 더 나아가 본 발명의 약학 조성물은 당해 기술 분야의 공지된 적절한 방법을 사용하여 또는 레밍턴의 문헌(Remington's Pharmaceutical Science(최근판), Mack Publishing Company, Easton PA)에 개시되어 있는 방법을 이용하여 바람직하게 제형화될 수 있다.

[0036] 본 발명인 상기 약학 조성물의 투여량은 상태 및 체중, 질병의 정도, 약물형태, 투여경로 및 기간에 따라 다르지만, 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다. 본 발명의 미세조류의 단백질 가수분해물을 포함하는 콜레스테롤 강하용 조성물을 기준으로 1일 0.0001 내지 12g/kg으로, 0.01 내지 10g/kg으로 투여하는 것이 좋다. 투여는 하루에 한번 투여할 수도 있고, 수회 나누어 투여할 수도 있다. 상기 투여량은 어떠한 면으로든 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.

[0037] 또한, 본 발명은 미세조류의 단백질 가수분해물을 포함하는 콜레스테롤 강하용 조성물을 1~5% 포함하는 콜레스테롤 강하용 식품 조성물을 제공한다.

[0038] 상기 미세조류의 단백질 가수분해물을 포함하는 콜레스테롤 강하용 조성물을 1% 미만 포함하거나 5% 초과하여 포함하면, 혈당강하효과가 낮아질 수 있는 문제점이 있다.

[0039] 본 명세서에서 식품이란 함은 영양소를 한 가지 또는 그 이상 함유하고 있는 천연물 또는 가공품을 의미하며, 어느 정도의 가공 공정을 거쳐 직접 먹을 수 있는 상태가 된 것을 의미하며, 통상적인 의미로서, 식품, 식품 첨가제, 건강 기능성 식품 및 음료를 모두 포함하는 의도이다.

[0040] 본 발명의 미세조류의 단백질 가수분해물을 포함하는 콜레스테롤 강하용 조성물을 첨가할 수 있는 식품으로는 예를 들어, 각종 식품류, 음료, 껌, 차, 비타민 복합제, 기능성 식품 등이 있다. 추가로, 본 발명에서 식품에는 특수영양식품(예, 조제유류, 영, 유아식 등), 식육가공품, 어육제품, 두부류, 묵류, 면류(예, 라면류, 국수류 등), 건강보조식품, 조미식품(예, 간장, 된장, 고추장, 혼합장등), 소스류, 과자류(예, 스넥류), 유가공품(예, 발효유, 치즈 등), 기타 가공식품, 김치, 절임식품(각종 김치류, 장아찌 등), 음료(예, 과실, 채소류 음료, 두유류, 발효음료류 등), 천연조미료를 포함하나 이에 한정되지 않는다. 상기 식품, 음료 또는 식품첨가제는 통상의 제조방법으로 제조될 수 있다.

[0041] 본 발명에서 기능성 식품이란 식품에 물리적, 생화학적, 생물공학적 수법 등을 이용하여 해당 식품의 기능을 특정 목적에 작용, 발현하도록 부가가치를 부여한 식품군이나 식품 조성이 갖는 생체방어리듬조절, 질병방지와 회복 등에 관한 체조절 기능을 생체에 대하여 충분히 발현하도록 설계하여 가공한 식품을 의미한다. 상기 기능성 식품에는 식품학적으로 허용 가능한 식품 보조 첨가제를 포함할 수 있으며, 기능성 식품의 제조에 통상적으로 사용되는 적절한 담체, 부형제 및 희석제를 더욱 포함할 수 있다.

[0042] 본 발명에서 음료란 갈증을 해소하거나 맛을 즐기기 위하여 마시는 것의 총칭을 의미하며 기능성 음료를 포함하는 의도이다. 상기 음료는 지시된 비율로 필수 성분으로서 상기 조성물을 포함하는 것 외에 다른 성분에는 특별한 제한이 없으며 통상의 음료와 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다. 상기의 천연 탄수화물의 예는 모노사카라이드, 예를 들어 포도당, 과당 등; 디사카라이드, 예를 들어 말토스, 수크로스 등; 및 폴리사카라이드, 예를 들어 덱스트린, 시클로덱스트린 등과 같은 통상적인 당, 및 자일

리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알콜이다. 상기 이외의 향미제로서 천연 향미제(타우마틴, 스테비아 추출물(예를 들어 레바우디오시드 A, 글리시르히진 등) 및 합성 향미제(사카린, 아스파르탐 등)를 유리하게 사용할 수 있다.

[0043] 상기 외에 본 발명의 미세조류의 단백질 가수분해물을 포함하는 콜레스테롤 강하용 조성물은 여러 가지 영양제, 비타민, 광물(전해질), 합성 풍미제 및 천연 풍미제 등의 풍미제, 착색제 및 중진제(치즈, 초콜릿 등), 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알코올, 탄산 음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다. 이러한 성분을 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있다. 이러한 첨가제의 비율은 그렇게 중요하지 않지만, 본 발명의 미세조류의 단백질 가수분해물을 포함하는 콜레스테롤 강하용 조성물100 중량부 당 0 내지 20000 중량부, 10 내지 2000 중량부, 100 내지 200중량부 범위에서 선택될 수 있다.

[0044] 본 발명에서 기능성 음료란 음료에 물리적, 생화학적, 생물공학적 수법 등을 이용하여 해당 음료의 기능을 특정 목적에 작용, 발현하도록 부가가치를 부여한 음료 군이나 음료 조성이 갖는 생체방어리듬조절, 질병방지와 회복 등에 관한 체 조절 기능을 생체에 대하여 충분히 발현하도록 설계하여 가공한 음료를 의미한다.

[0045] 상기 기능성 음료는 지시된 비율로 필수 성분으로서 본 발명의 미세조류의 단백질 가수분해물을 포함하는 콜레스테롤 강하용 조성물을 포함하는 것 외에는 다른 성분에는 특별한 제한이 없으며 통상의 음료와 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다. 상기 천연 탄수화물의 예는 모노사카라이드, 예를 들어 포도당, 과당 등; 디사카라이드, 예를 들어 말토스, 수크로스 등; 및 폴리사카라이드, 예를 들어 덱스트린, 시클로덱스트린 등과 같은 통상적인 당, 및 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알콜이다. 상기 한 것 이외의 향미제로서 천연 향미제(타우마틴, 스테비아 추출물(예를 들어 레바우디오시드 A, 글리시르히진 등) 및 합성 향미제(사카린, 아스파르탐 등)를 유리하게 사용할 수 있다.

[0046] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 실시예를 들어 상세하게 설명하기로 한다. 다만 하기의 실시예는 본 발명의 내용을 예시하는 것일 뿐 본 발명의 범위가 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 실시예는 당업계에서 평균적인 지식을 가진 자에게 본 발명을 보다 완전하게 설명하기 위해 제공되는 것이다.

[0047] **<실시예 1> 미세조류 단백질 가수분해물의 제조**

[0048] **실시예 1-1. 미세조류 고형분의 제조**

[0049] 실험에 사용한 미세조류인 *Tetraselmis suecica*는 해양생물연구교육센터 (강릉, 강원도)에서 직접 배양하여 사용하였다. 상기 구입 및 배양한 미세조류는 원심분리하여 배양액을 제거하였다. 보다 자세하게는 상기 구입 및 배양한 미세조류를 7,000 rpm에서 15분 동안 원심분리하여 상층액과 고형분을 분리하고 상층액을 제거한 뒤 고형분만을 사용하였고, 상기 수득한 미세조류는 실험 전까지 -40 ℃에서 보관하였다.

[0050] **실시예 1-2. 미세조류 유래 단백질의 추출 및 가수분해**

[0051] 상기 수득한 미세조류의 고형분에 초음파 처리하여 내부 단백질을 추출한 후 단백분해효소를 첨가하여 가수분해하였다.

[0052] 보다 상세하게는, 100 g에 900 mL의 물을 첨가하고, 97.78 kHz의 주파수, 26.22 ℃의 온도로 4.49 hr 시간 동안 추출한 후 추출액 및 추출 후 남은 고형분을 혼합하여 52.5 ℃의 항온수조에 10분간 예열시켰다. 이후 pH를 6.01로 조정하고 2.91 g의 alcalase 2.4L을 첨가한 다음 58.53분 동안 가수분해하였다. 이후 7,000 rpm에서 15분간 원심 분리하여 고형분을 제거한 뒤 -80 ℃에서 동결건조하여 *Tetraselmis suecica* 단백질 가수분해물 14.2 g을 제조하였다.

[0053] **<실시예 2> 실험동물의 사육 처리 및 시료 채취**

[0054] **2-1. 시험동물의 사육 및 식이조성**

[0055] 실험동물은 생후 6주된 C57BL/6J 웅성 마우스를 (주)중앙실험동물에서 구입하여 사용하였다. 온도 22±2℃, 습

도 50±5%, 명암주기 12시간 (08:00~20:00)으로 자동 설정된 SPF(specific pathogen free)-동물실험실에서 사육하였으며, 사료 조성표는 하기 표 1과 같다.

표 1

[0056] (g/100g diet)

| | Normal diet | High-cholesterol diet | | |
|---|---|---|---|---|
| | - | - | HTS-1% | HTS-5% |
| Starch | 10 | 10 | 10 | 10 |
| Casein | 20 | 20 | 19.3 | 16.6 |
| Cellulose | 5 | 5 | 5 | 5 |
| Sucrose | 50 | 50 | 50 | 49 |
| Vitamin mix | 1 | 1 | 1 | 1 |
| Mineral mix | 3.5 | 3.5 | 3.5 | 3.5 |
| DL-methionine | 0.3 | 0.3 | 0.3 | 0.3 |
| Choline bitartrate | 0.2 | 0.2 | 0.2 | 0.2 |
| Corn oil | 10 | 5 | 5 | 5 |
| Lard | - | 5 | 5 | 5 |
| Cholesterol | - | 1.25 | 1.25 | 1.25 |
| Sodium cholate | - | 0.25 | 0.25 | 0.25 |
| HTS | - | - | 1 | 5 |

[0057] 첫 1주간은 정상 식이사료(AIN-76 based modified diet)를 섭취하도록 하여, 적응기간을 두었고, 2주째는 마우스의 체중을 측정하여 군 분리를 진행하였다. 군의 분리는 다음과 같이 진행하였다.

[0058] ①콜레스테롤이 포함되지 않은 정상 식이군,

[0059] ②콜레스테롤이 포함된 고콜레스테롤 식이 대조군(cholesterol 1.25% + cholic acid 0.25%)

[0060] ③고콜레스테롤 사료에 *Tetraselmis suecica* 가수분해물을 1% 포함한 군

[0061] (HTS-1%)

[0062] ④콜레스테롤 사료에 *Tetraselmis suecica* 가수분해물을 5% 포함한 군

[0063] (HTS-5%)

[0064] 실험 자료의 통계처리는 GraphPad Prism(Version 4.0)을 이용하여 나타내었고, 각 실험군의 유의성 검증을 위하여 unpaired t-test로 분석하였다.

[0065] **2-2. 시험동물의 처리 및 시료채취**

[0066] 각 4주간과 8주간 시험물질을 포함한 실험식이를 섭취시킨 후, 실험 종료 이틀 전 각 군의 실험동물을 대사케이지(metabolic cage)에 넣어 적응시키고 분변을 채취하였다. 채취한 분변은 분석 전까지 4℃에 보관하였다.

[0067] 해부 전 12시간 동안 절식시킨 다음, 마취제를 이용하여 마취하고 안와채혈 하였다. 채혈한 혈액은 BD SST tube에 담아 30분간 상온에서 방치한 후 원심분리(3000g, 15분)하여 상층액의 혈청을 분리하여, 자동 생화학 분석기로 분석하였다. 안와채혈 뒤, 동물은 CO2 가스를 이용하여 안락사 시키고 간과 신장을 적출하였다. 적출한 장기는 PBS로 세척하고, 거름종이로 표면의 혈액을 제거한 후 무게를 측정하였다. 간 조직은 지질 분석을 위해 분석 전까지 -70℃에 보관하였다.

[0068] **<실시예 3> 체중, 식이섭취량, 식이효율 및 음수량 측정**

[0069] 실험 식이는 4주간 및 8주간 섭취시켰으며, 시험기간 동안 사료와 물은 자유 급식하였고, 매주 일정한 시간에 체중, 식이섭취량, 음수량을 측정하였다. 식이효율(Food efficiency ratio, FER)은 체중 증가량을 같은 기간 동

안의 식이섭취량으로 나누어 계산하였으며 결과는 표 2와 같다.

표 2

[0070]

| Content | Feeding period | Normal diet | High-cholesterol diet | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | | HCD[2] | HTS-1%[3] | HTS-5%[4] |
| Body Weight (g) | 0 weeks | 20.83±±0.27 | 20.94±±0.36 | 20.79±±0.28 | 20.82±±0.28 |
| | 4 weeks | 24.46±±0.30 | 24.69±±0.53 | 24.01±±0.48 | 24.82±±0.35 |
| | 8 weeks | 26.98±±0.54 | 27.78±±0.81 | 27.70±±0.67 | 27.18±±0.34 |
| Food Intake (g/day) | 4 weeks | 2.17±±0.04 | 2.41±±0.05* | 2.48±±0.12* | 2.59±±0.03***, # |
| | 8 weeks | 2.43±±0.16 | 2.52±±0.01 | 2.67±±0.17 | 2.77±±0.23 |
| FER[1] | 4 weeks | 6.06±±0.40 | 5.67±±0.45 | 5.09±±0.40 | 5.98±±0.45 |
| | 8 weeks | 4.88±±0.38 | 5.27±±0.61 | 5.10±±0.41 | 4.20±±0.26 |
| Water intake (ml/day) | 4 weeks | 3.21±±0.16 | 3.06±±0.16 | 2.89±±0.13 | 4.17±±0.25*, ## |
| | 8 weeks | 3.19±±0.13 | 3.08±±0.24 | 2.91±±0.15 | 4.30±±0.01*, # |

[0071] [1]FER(Food efficiency ratio) = (Weight gain(g) ÷ food intake(g)) × 100

[0072] [2]HCD, High cholesterol diet control group

[0073] [3]HTS-1%, High cholesterol diet including 1% enzymatic *Tetraselmis suecica* hydrolysate diet group

[0074] [4]HTS-5%, High cholesterol diet including 5% enzymatic *Tetraselmis suecica* hydrolysate diet group

[0075] - Data are presented as means ± SEM.

[0076] - * ; significant vs Normal diet (*; $p$ <0.05, **; $p$ <0.01, ***; $p$ <0.001)

[0077] - # ; significant vs High-cholesterol diet (#; $p$ <0.05, ##; $p$ <0.01, ###; $p$ <0.001)

[0078]

[0079] 고콜레스테롤 식이 및 HTS를 포함한 식이에 의한 체중 증감효과는 관찰되지 않았으며, 식이섭취량에 대한 체중 증가량을 나타내는 식이효율(Food efficiency ratio, FER)도 군 간에 차이가 없었다.

[0080] **<실시예 4> 간 지질 성분 분석**

[0081] 간의 지질은 Folch 방법으로 추출하여 분석하였으며 방법은 다음과 같다. 간조직 100mg에 3배의 0.9% NaCl을 첨가하여 homogenizer로 균질화 시켰다. 여기에 3배 양의 Folch solution (Chloroform:methanol = 2:1)을 첨가하여 homogenizer로 갈아주고, 이를 3번 반복한 후 원심분리(3000rpm, 10분)하여 물 층인 상층을 제거하고, 하층은 새 튜브로 이동시켰다. Chloroform을 제거하기 위해 일정량을 새로운 튜브에 담아 질소가스를 이용하여 완전히 건조한 다음, 10% Triton X-100/isopropanol 용액에 녹였다. 그리고 일정량의 시료를 취해 LabAssay™ triglyceride kit, LabAssay™ Cholesterol kit (Wako, Japan)를 이용하여 측정하였으며 결과는 표 3과 같다.

표 3

[0082] (mg/g)

| | Indicator | Feeding period | Normal diet | High-cholesterol diet | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | HCD[1] | HTS-1%[2] | HTS-5%[3] |

| | | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Liver | Tri-glyceride | 4 weeks | 21.78±±1.58 | 22.86±±1.35 | 25.73±±1.27 | 25.98±±1.30 |
| | | 8 weeks | 20.19±±1.53 | 25.12±±2.28 | 25.32±±2.16 | 22.29±±1.41 |
| | Total cholesterol | 4 weeks | 7.28±±1.08 | 21.55±±0.90*** | 20.01±±1.57*** | 25.96±±0.69***,## |
| | | 8 weeks | 7.56±±0.67 | 22.02±±0.76*** | 20.38±±1.09*** | 22.37±±0.59*** |

[0083] 1)HCD, High cholesterol diet control group

[0084] 2)HTS-1%, High cholesterol diet including 1% enzymatic *Tetraselmis suecica* hydrolysate diet group

[0085] 3)HTS-5%, High cholesterol diet including 5% enzymatic *Tetraselmis suecica* hydrolysate diet group

[0086] - Data are presented as means ± SEM.

[0087] - * ; significant vs Normal diet (*; $p$ <0.05, **; $p$ <0.01, ***; $p$ <0.001)

[0088] - # ; significant vs High-cholesterol diet (#; $p$ <0.05, ##; $p$ <0.01, ###; $p$ <0.001)

[0089] 간 조직중의 중성지질 함량은 고콜레스테롤 식이 및 HTS 섭취에 의해 유의적인 증감은 없었다. 간 조직중의 총콜레스테롤 함량은 정상 식이군에 비해 고콜레스테롤 식이시 유의적으로 증가하였으며($p$<0.001), 4주간 HTS-5%를 섭취한 군에서 고콜레스테롤 식이 대조군에 비해 간 조직중의 총콜레스테롤 함량이 유의적으로 높았다($p$<0.01).

[0090] **<실시예 5> 분변 지질 성분 분석**

[0091] 분변의 지질은 간지질의 추출방법과 동일한 방법으로 추출하고, 중성지질과 총콜레스테롤 함량을 측정하였으며 결과는 표 4와 같다.

표 4

[0092] (mg/g)

| | Indicator | Feeding period | Normal diet | High-cholesterol diet | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | | | HCD1) | HTS-1%2) | HTS-5%3) |
| Feces | Triglyceride | 4 weeks | 1.45±±0.33 | 2.72±±0.51 | 2.23±±0.61 | 3.31±±0.21** |
| | | 8 weeks | 0.79±±0.04 | 3.42±±0.73 | 2.02±±0.67 | 4.67±±0.77** |
| | Total cholesterol | 4 weeks | 5.30±±1.42 | 93.35±±3.39*** | 78.21±±6.44*** | 93.07±±2.89*** |
| | | 8 weeks | 10.35±±1.46 | 84.93±±4.51*** | 79.52±±5.97*** | 86.46±±4.23*** |

[0093] 1)HCD, High cholesterol diet control group

[0094] 2)HTS-1%, High cholesterol diet including 1% enzymatic *Tetraselmis suecica* hydrolysate diet group

[0095] 3)HTS-5%, High cholesterol diet including 5% enzymatic *Tetraselmis suecica* hydrolysate diet group

[0096] - Data are presented as means ± SEM.

[0097] - * ; significant vs Normal diet (*; $p$ <0.05, **; $p$ <0.01, ***; $p$ <0.001)

[0098] - # ; significant vs High-cholesterol diet (#; $p$ <0.05, ##; $p$ <0.01, ###; $p$ <0.001)

[0099] 분변 중의 중성지질 함량은 고콜레스테롤 식이시 정상 식이군에 비해 증가되는 경향을 보이나 유의적이지는 않았다. HTS-5%를 4주와 8주간 섭취한 경우, 정상 식이군에 비해 중성지질 함량이 유의적으로 증가하였지만($p<0.01$), 고콜레스테롤 식이 대조군과는 유의적인 차이를 관찰할 수 없었다.

[0100] 분변 중의 총콜레스테롤 함량은 정상식이군에 비해, 고콜레스테롤 식이를 섭취한 군에서 유의적으로 증가하였다($p<0.001$). 반면, HTS의 섭취군과 고콜레스테롤 식이군의 유의적인 차이는 관찰되지 않았다.

[0101] 고콜레스테롤혈증 조절의 한 기전으로, 체내의 고농도로 존재하는 콜레스테롤의 배출 작용을 촉진시켜, 혈청과 간 내 지질 함량을 낮추는 기전이 있으나, 위와 같은 결과로 유추해 볼 때, HTS에 의한 콜레스테롤 배설 촉진 작용은 미비한 것으로 사료된다.

[0102] **<실시예 6> 혈청 지질 성분 분석**

[0103] 혈청 지질 성분은 자동 생화학 분석기(Automated chemistry analyzer, Konelab 20XT, Thermo)를 이용하여, 지질 성분(총콜레스테롤, 중성지질, HDL-콜레스테롤, LDL-콜레스테롤)을 분석하였으며 결과는 표 5 및 도 1과 같다.

*표 5*

[0104] (mg/dL)

| Indicator | Feeding period | Normal diet | High-cholesterol diet | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | | HCD[1)] | HTS-1%[2)] | HTS-5%[3)] |
| Triglyceride | 4 weeks | 55.84±±6.31 | 23.86±±1.37$^{**}$ | 32.44±±3.32$^{*,\#}$ | 22.20±±2.06$^{***}$ |
| | 8 weeks | 64.08±±4.90 | 32.08±±3.04$^{***}$ | 31.55±±3.93$^{***}$ | 23.21±±2.06$^{***,\#}$ |
| Total cholesterol | 4 weeks | 158.20±±7.90 | 147.50±±18.22 | 135.80±±8.85 | 146.40±±11.81 |
| | 8 weeks | 138.50±±6.93 | 138.10±±7.08 | 143.40±±3.89 | 160.90±±12.44 |
| HDL cholesterol | 4 weeks | 74.19±±3.53 | 60.84±±6.15 | 56.78±±2.55$^{**}$ | 58.71±±4.92$^{*}$ |
| | 8 weeks | 65.84±±2.91 | 57.45±±2.83 | 59.45±±1.48 | 61.06±±3.54 |
| LDL cholesterol | 4 weeks | 15.22±±2.37 | 66.65±±5.97$^{***}$ | 44.74±±4.50$^{***,\#}$ | 70.85±±6.77$^{***}$ |
| | 8 weeks | 9.78±±1.20 | 52.88±±1.74$^{***}$ | 44.28±±6.77$^{***}$ | 59.71±±2.08$^{***,\#}$ |

[0105] [1)]HCD, High cholesterol diet control group

[0106] [2)]HTS-1%, High cholesterol diet including 1% enzymatic *Tetraselmis suecica* hydrolysate diet group

[0107] [3)]HTS-5%, High cholesterol diet including 5% enzymatic *Tetraselmis suecica* hydrolysate diet group

[0108] - Data are presented as means ± SEM.

[0109] - * ; significant vs Normal diet (*; $p$ <0.05, **; $p$ <0.01, ***; $p$ <0.001)

[0110] - # ; significant vs High-cholesterol diet (#; $p$ <0.05, ##; $p$ <0.01, ###; $p$ <0.001)

[0111] 혈청 중 중성지질 함량은 고콜레스테롤 식이에 의해 유의적으로 감소하였고 (4주차; $p<0.01$, 8주차; $p<0.001$), 4주간 HTS-1%를 섭취한 군에서 고콜레스테롤 식이 대조군에 비교하여 중성지질 함량이 유의적으로 증가하였다($p<0.05$). 8주간 식이시 HTS-1%를 섭취한 군과 고콜레스테롤 식이 대조군과 유의적인 차이는 없으며, HTS-5%를 섭취한 군에서 중성지질 함량이 유의적으로 감소하였다($p<0.05$).

[0112] 혈청 중 총콜레스테롤 함량은 정상 식이, 고콜레스테롤 식이 및 HTS를 함유한 식이를 섭취한 모든 군에서 유의적인 차이가 없었다.

[0113] 혈청 중 HDL-콜레스테롤 함량은 고콜레스테롤 식이 섭취에 의해 감소하는 경향을 보이나 유의적인 차이는 없으

며, 4주간 HTS-1%, -5%를 섭취한 군에서 정상 식이군에 비해 유의적으로 감소하였으나($p<0.05$), 콜레스테롤 식이 대조군과 비교시 유의적인 차이는 없었다.

[0114] LDL-콜레스테롤 함량은 정상 식이군에 비해 고콜레스테롤 식이시 유의적으로 증가하였으며, 4주간 HTS-1%를 섭취한 군에서 고콜레스테롤 식이 대조군과 비교하여 유의적인 감소를 나타냈다($p<0.05$). 8주간 HTS-5%를 섭취한 군은 고콜레스테롤 식이 대조군과 비교하여 유의적인 증가를 나타냈다($p<0.05$).

[0115] 이상의 결과를 종합하여 볼 때, 미세조류 단백질 가수분해물은 간에서의 총콜레스테롤 합성 저해능 및 변 중으로의 배설 증가에는 크게 영향을 미치지 못하나, 4주간 HTS-1% 섭취가 일반 고 콜레스테롤 식이를 섭취한 군에 비하여 혈중 LDL-콜레스테롤이 유의적으로 감소시켜, 혈중 콜레스테롤 감소 효과를 나타냈다.

[0116] **<실시예 7> 미세조류의 단백질 가수분해물을 포함하는 콜레스테롤 강하용 조성물 포함하는 제형예**

[0117] 하기에 상기 조성물의 제제예를 설명하나, 본 발명은 이를 한정하고자 함이 아니라 단지 구체적으로 설명하고자 함이다.

[0118] **제제예 1. 정제의 제조**

[0119] 미세조류의 단백질 가수분해물을 포함하는 콜레스테롤 강하용 조성물.....100 mg

[0120] 옥수수 전분.....68 mg

[0121] 락토오즈.....90 mg

[0122] 미세결정질 셀룰로즈.....40 mg

[0123] 마그네슘 스테아레이트.....2 mg

[0124] 통상적인 정제의 제조 방법에 따라, 상기 성분들을 제시된 함량으로 첨가하여 균일하게 혼합하고, 교반한 후, 과립화하였다. 건조 후 타정기를 사용하여 1 정당 미세조류의 단백질 가수분해물을 포함하는 콜레스테롤 강하용 조성물이 100 mg씩 포함되어 있는 목적하는 정제를 제조하였다.

[0125] **제제예 2. 캡슐의 제조**

[0126] 미세조류의 단백질 가수분해물을 포함하는 콜레스테롤 강하용 조성물.....100 mg

[0127] 옥수수 전분.....68 mg

[0128] 락토오즈.....90 mg

[0129] 미세결정질 셀룰로즈.....40 mg

[0130] 마그네슘 스테아레이트.....2 mg

[0131] 통상적인 캡슐의 제조 방법에 따라, 상기 성분들을 제시된 함량으로 첨가하여 균일하게 혼합한 후, 1 캡슐 당 100 mg의 미세조류의 단백질 가수분해물을 포함하는 콜레스테롤 강하용 조성물이 포함되도록 적절한 크기의 젤라틴 캡슐에 충진하여 목적하는 캡슐제를 제조하였다.

[0132] **제제예 3. 음료의 제조**

[0133] 미세조류의 단백질 가수분해물을 포함하는 콜레스테롤 강하용 조성물.....100 mg

[0134] 농축 과즙.....2 g

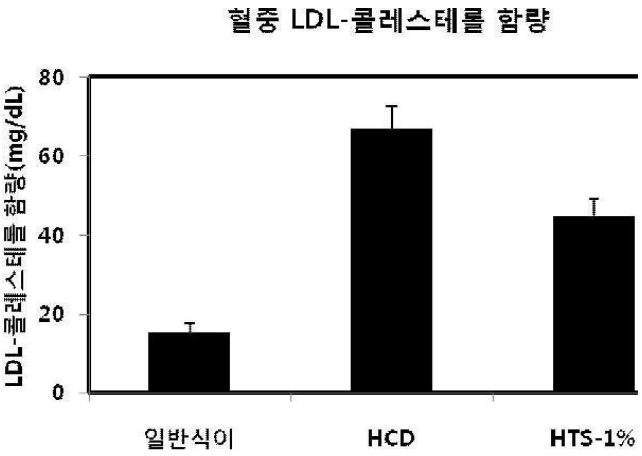
[0135] 슈크로즈.....12 g

[0136] 시트르산 나트륨.....100 mg

[0137] 향료.....70 mg

[0138] 물.....적당량

[0139] 통상적인 음료의 제조 방법에 따라, 상기 성분들을 제시 된 함량으로 적당량의 물에 혼합하고, 가열하여 용해시킨 후, 냉각시키고 용기에 충전하여 200 ml 용량의 음료 1병당 100 mg의 미세조류의 단백질 가수분해물을 포함하는 콜레스테롤 강하용 조성물을 포함하는 음료를 제조하였다.

## 도면

### 도면1