



**(19) 대한민국특허청(KR)**  
**(12) 등록특허공보(B1)**

(45) 공고일자 2012년01월03일  
(11) 등록번호 10-1100682  
(24) 등록일자 2011년12월23일

(51) Int. Cl.

A61K 36/07 (2006.01) A61P 9/12 (2006.01)

A61P 9/00 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2010-0037940

(22) 출원일자 2010년04월23일

심사청구일자 2010년04월23일

(65) 공개번호 10-2011-0118378

(43) 공개일자 2011년10월31일

(56) 선행기술조사문헌

JP2005306775 A\*

\*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자

경기도

경기 수원시 팔달구 매산로3가 1

(72) 발명자

김정한

경기도 성남시 분당구 야탑동 209

장정훈

경상북도 포항시 북구 두호동 대원맨션 801호

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

특허법인세아

전체 청구항 수 : 총 7 항

심사관 : 강형석

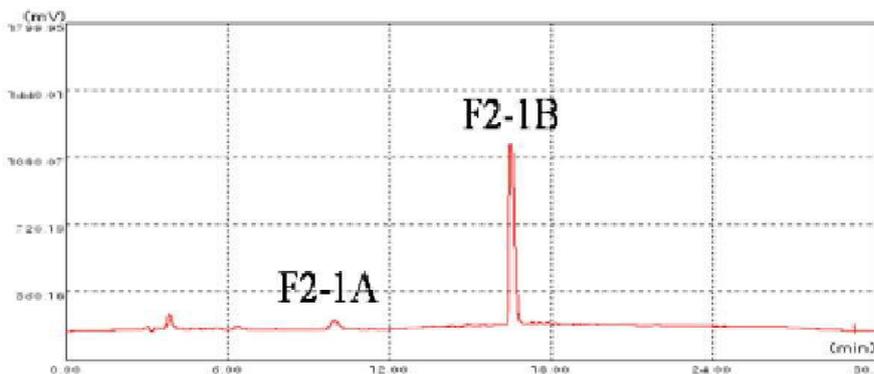
**(54) 혈압강하기능을 가진 노랑느타리 추출물의 제조방법, 상기 방법으로 추출된 추출물, 신규 ACE 저해제, 이들이 함유된 건강식품**

**(57) 요약**

본 발명은 노랑느타리로부터, 보다 상세하게는 천연식품인 노랑느타리로부터 추출하고, 분리 정제하여 수득한 ACE 저해활성을 갖는 추출물 및 상기 추출방법, 상기 추출물로부터 분리 정제한 신규 ACE(엔지오텐신 변환효소, Angiotensin I Converting Enzyme)저해제 또는 그 ACE 저해제를 유효성분으로 함유하는 혈압 강하제의 약제조성물, 이들을 함유하는 건강식품에 관한 것이다.

종래 캡토프릴(Captopril) 또는 이너라프릴(Enalapril) 등과 같은 약제는 현기증, 메스꺼움, 갈증, 과도한 진정 등의 부작용이 있었으나, 본 발명은 노랑느타리는 버섯류의 천연식품의 일종으로 오랫동안 식품으로 검증이 되어 있어 약제의 안정성이 뛰어나고, 항고혈압의 효과가 탁월하면서도 건강식품으로 용이하게 섭취할 수 있고, 또한 상기 추출물을 정제한 신규물질, 올리고펩타이드를 이용하여 경구 투여 약제로 제조할 수 있는 효과가 기대된다.

**대표도 - 도1**



(72) 발명자

**이종수**

대전광역시 유성구 전민동 엑스포아파트 305-202

**이윤혜**

경기도 성남시 분당구 서현동 174

**주영철**

경기도 화성시 반월동 신영통현대2차 아파트

204-1501

**특허청구의 범위**

**청구항 1**

삭제

**청구항 2**

노랑느타리를 추출용 용액으로 추출한 상층부 추출액을 얻는 추출공정을 행하고, 상기 상층부에 추출된 노랑느타리 추출액에 대해 한외여과(ultrafiltration), 컬럼 크로마토그래피, 고체상 추출법, 그리고 역상 고속액체크로마토그래피법에 의한 분리정제에 의해 제조되는 것을 특징으로 하는 혈압강하기능을 가진 노랑느타리 추출물의 제조방법에 있어서,

상기 상층부에 추출된 노랑느타리 추출액은 물 수용액으로 30 ℃에서 24시간 동안 추출하는 것을 특징으로 하는 혈압강하기능을 가진 노랑느타리 추출물의 제조방법.

**청구항 3**

제 2항에 있어서,

상기 분리정제 공정 중, 고체상 추출법은 C<sub>18</sub> 고체상 추출법을 이용하여 25% 아세토나이트릴(acetonitrile)에서 용출하여 분리 정제된 것을 특징으로 하는 혈압강하기능을 가진 노랑느타리 추출물의 제조방법.

**청구항 4**

제 2항의 기재방법으로 제조되는 혈압강하기능을 가진 노랑느타리 추출물.

**청구항 5**

제4항에 있어서,

상기 방법으로 추출되고 분리 정제되는 노랑느타리 추출물은 노랑느타리 자실체로부터 분리 정제하여 분획된 두개의 올리고펩타이드로서,

상기 올리고펩타이드 중 F2-1은 Arg-Leu-Pro-Ser-Glu-Phe-Asp-Leu-Ser-Ala-Phe-Leu-Arg-Ala이고, 또 하나의 올리고펩타이드 F2-2는 Arg-Leu-Ser-Gly-Gln-Thr-Ile-Glu-Val-Thr-Ser-Glu-Tyr-Leu-Phe-Arg-His으로 이루어진 것을 특징으로 하는 혈압강하기능을 가진 노랑느타리 추출물.

**청구항 6**

제5항에 있어서,

상기 F2-1 올리고펩타이드는 1622.85 Da 분자량이고, F2-2 올리고펩타이드는 2037.26 Da 분자량인 것을 특징으로 하는 혈압강하기능을 가진 노랑느타리 추출물.

**청구항 7**

제5항 기재의 노랑느타리 추출물로 분리 정제된 상기 두 올리고펩타이드(F2-1, F2-2)로 이루어진 신규 엔지오텐신 변환효소(ACE) 저해제.

**청구항 8**

제2항의 방법으로 추출되는 노랑느타리 추출물이 함유된 건강식품.

**청구항 9**

삭제

**명세서**

**기술분야**

[0001] 본 발명은 노랑느타리로부터 추출하고, 분리 정제하여 수득한 앤지오텐신 변환효소(Angiotensin I Converting Enzyme, 이하 ‘ACE’ 라 한다) 저해활성을 갖는 추출물의 분리 제조방법, 상기 방법으로 추출된 추출물, 신규 ACE 저해제, 이들이 함유된 건강식품 및 상기 신규 ACE 저해제를 유효성분으로 함유하는 약제조성물에 관한 것이다.

**배경기술**

[0002] 고혈압은 모든 순환기계 질병의 원인이 되는 동시에 뇌출혈, 심장병 등과 합병증으로 나타날 경우에는 치사율이 매우 높은 만성 퇴행성 질환으로 40대 이후의 중년층 또는 노년층에서 유병율이 15 내지 20 %로 추정되고 있다. 이러한 고혈압의 종류에는 원인이 불명인 본태성 고혈압과 원인질환에 의한 속발성 고혈압으로 나뉘며 80% 이상이 본태성 고혈압에 속하는 것으로 알려져 있다.

[0003] 고혈압은 주로 레닌-앤지오텐신(renin-angiotensin)계에 의한 생리 생화학적 기전으로 알려져 있다. 생체 내에서의 승압계의 하나이며, 사람의 중요한 혈압 조절계로서 알려진 레닌-앤지오텐신(renin-angiotensin)계는 앤지오텐신 변환효소(Angiotensin I Converting Enzyme, ACE)가 앤지오텐신-I에 작용하여 강한 혈압상승작용을 갖는 앤지오텐신-II를 발생시키므로, ACE의 활성을 억제하는 작용을 갖는 물질이 혈압 강하제로서 본태성 고혈압증 등의 치료에서 실용화되고 있다.

[0004] 그러나 캡토프릴(Captopril) 또는 이너라프릴(Enalapril) 등과 같은 약제는 현기증, 일어났을 때의 어지러움, 메스꺼움, 갈증, 과도한 진정 등의 부작용을 피할 수 없는 것이 현실이다. 이러한 부작용을 해결하기 위해, 1971년에 노마 등[M. Noma et al., Tetrahedron Letters, No.22, pp2017-2020(1971)]은 담뱃잎 중에서 추출된 니코틴아민(nicotinamine)을 순수 정제하는데 성공한 바 있다. 상기 니코틴아민(nicotinamine)은 천연 화합물으로써 장기 복용 등에 의한 부작용의 우려가 적음과 동시에 ACE의 활성을 억제하는 작용을 갖고 있으며, 혈압강하 작용을 갖고 있을 것으로 추정되었다. 본 발명과 관련한 니코틴아민의 제조방법은 일본국 특허 공개공보 평 5-246865호에 기재되어 있다.

[0005] 또 다른 공지 발명으로써, 대한민국 공개특허 공보 제10-2006-0008987호에 천연 추출물인 메밀 추출물이 알려져 있는데, 레닌-앤지오텐신계와 메밀의 관계에 대해서, 메밀 열수(熱水) 추출물이나 메밀 단백질 가수분해물이 ACE 저해능을 갖는 것이 보고되었다.

[0006] 이와 관련하여, 본 발명자들도 천연식품 등의 추출물과 관련한 ACE 저해활성능력, 즉 혈압강하 기능을 가진 추출물을 연구하던 중, 경기도농업기술원 버섯연구소에서 재배한 노랑느타리 자실체의 추출물이 ACE 저해활성 능력이 있음을 발견하게 되었다.

[0007] 본 발명자들이 연구한 상기 노랑느타리(*Pleurotus cornucopiae*)는, 담자균류 느타리과 버섯의 일종으로써, 버섯 갓은 지름 2~8cm로 콩팥모양이나 또는 깔때기 형태이고 그 색은 황색이 밝게 나타난다. 버섯의 조직은 백색으로 자라며, 여름부터 가을에 걸쳐 활엽수의 그루터기에 군생하는 목재 백색 부후성 버섯으로 식용버섯에 해당한다 (도 6 참조).

**발명의 내용**

**해결하려는 과제**

[0008] 본 발명의 목적은 천연식품인 노랑느타리로부터 추출하고, 분리 정제하여 수득한 ACE 저해활성을 갖는 추출물 및 상기 추출방법, 상기 추출물로부터 분리 정제한 신규 ACE(앤지오텐신 변환효소, Angiotensin I Converting Enzyme)저해제 또는 그 ACE 저해제를 유효성분으로 함유하는 혈압 강하제의 약제조성물, 이들을 함유하는 건강식품을 제공하는데 있다.

**과제의 해결 수단**

[0009] 이하, 본 발명을 상세히 설명하면 다음과 같다.

[0010] 본 발명은 노랑느타리 시료를 추출용 용액에 의해 추출한 상층부 추출액을 얻는 추출공정을 행하고, 이어서 이 추출액에 대해 한외여과(ultrafiltration), 컬럼 크로마토그래피, 고체상 추출법, 그리고 역상 고속액체크로마

토그래피법에 의한 상기 추출물의 분리정제에 의해 엔지오펜신 변환효소 저해활성을 갖는 획분을 얻는 분리정제 공정을 행하는 것을 특징으로 하는 혈압강화기능을 가진 노랑느타리 추출물의 제조방법에 관한 것이다.

[0011] 또한 상기 추출용 용매는 메탄올 수용액 또는 물인 것을 특징으로 하지만, 바람직하게는 노랑느타리 자실체의 물 추출물을 30 ℃에서 24시간 추출했을 때, 엔지오펜신 변환효소(Angiotensin I Converting Enzyme) 저해능이 뛰어난 노랑느타리 추출물의 제조방법에 관한 것이다.

[0012] 다른 발명은, 상기 한외여과(ultrafiltration), 컬럼 크로마토그래피, 고체상 추출법, 그리고 역상 고속액체크로마토그래피법에 의한 분리정제 중에서, 상기 고체상 추출법은 C<sub>18</sub> 고체상 추출법을 이용하여 25% 아세토나이트릴(acetonitrile)에서 용출된 F2 분획물인 것을 특징으로 하는 혈압강화기능을 가진 노랑느타리 추출물의 제조방법에 관한 것이다.

[0013] 또 다른 발명은, 상기 기재방법으로 제조되는 추출물로서, 혈압강화기능을 가진 노랑느타리 추출물에 관한 것이다. 그리고 상기 추출물에 관련하여 더 구체적으로 기재하면, 상기 추출물은 노랑느타리 자실체로부터 분리 정제하여 분획된 두개의 올리고펩타이드(본 발명에서는 'F2-1' 과 'F2-2' 로 명명함), 상기 F2-1 은 "Arg-Leu-Pro-Ser-Glu-Phe-Asp-Leu-Ser-Ala-Phe-Leu-Arg-Ala" 으로 14개의 아미노산으로 구성되며, 상기 F2-2는 "Arg-Leu-Ser-Gly-Gln-Thr-Ile-Glu-Val-Thr-Ser-Glu-Tyr-Leu-Phe-Arg-His" 으로 17개의 아미노산인 것을 특징으로 하는 혈압강화기능을 가진 노랑느타리 추출물에 관한 것이고, 또한 상기 F2-1은 올리고펩타이드로써 1622.85 Da의 분자량을 가지고, F2-2는 올리고펩타이드로써 2037.26 Da의 분자량인 것을 특징으로 하는 혈압강화기능을 가진 노랑느타리 추출물에 관한 것이다.

[0014] 또 다른 발명은, 상기 기재의 노랑느타리 추출물로부터 분리 정제된 두개의 올리고펩타이드(F2-1, F2-2) 또는 신규 ACE 저해제에 관한 것이고 또한 노랑느타리의 추출물 또는 상기 기재의 노랑느타리 추출물로부터 분리 정제된 상기 두 올리고펩타이드(F2-1, F2-2)를 함유하는 혈압강화기능을 가진 건강식품에 관한 것이다.

[0015] 그리고 또한, 본 발명은 상기 신규 ACE 저해제를 유효성분으로 함유하는 약제조성물에 관한 것이다.

### 발명의 효과

[0016] 본 발명의 구성에 따르면,

[0017] 종래의 캡토프릴(Captopril) 또는 이너라프릴(Enalapril) 등과 같은 약제는 현기증, 메스꺼움, 갈증, 과도한 진정 등의 부작용이 있었다. 이러한 문제점을 해결하기 위한 본 발명은 천연식품인 노랑느타리 자실체로부터 추출한 추출물 또는 상기 추출물로부터 분리 분획된 두개의 올리고펩타이드(본 발명에서는 'F2-1' 과 'F2-2' 로 명명함), 상기 F2-1은 "Arg-Leu-Pro-Ser-Glu-Phe-Asp-Leu-Ser-Ala-Phe-Leu-Arg-Ala" 으로 14개의 아미노산으로 구성되며, 상기 F2-2는 "Arg-Leu-Ser-Gly-Gln-Thr-Ile-Glu-Val-Thr-Ser-Glu-Tyr-Leu-Phe-Arg-His" 으로 17개의 아미노산인 것을 특징으로 하는 혈압강화기능을 가진 노랑느타리 추출물을 추출하였다.

[0018] 노랑느타리 버섯류는 천연식품의 일종으로서, 상기 노랑느타리에서 추출한 신규물질은 이미 오랫동안 섭취해 온 식품으로 검증이 되어 있어 안전하게 섭취할 수 있고, 또한 상기 추출물 또는 분리 정제된 두개의 올리고펩타이드(F2-1, F2-2) 또는 신규 ACE 저해제는 약제로서의 안정성이 뛰어난 것으로 예상되고, 아울러 고혈압 환자가 장기간 섭취할 수 있는 기능성 건강식품으로 개발할 수 있는 장점이 있다. 특히 노랑느타리 버섯의 추출물은 냉동 건조하여 분말화하거나 또는 일반인이 쉽게 음용할 수 있는 음료, 그리고 장기간 복용할 수 있는 기능성 건강식품으로 제품화할 수 있는 장점이 있다. 또한 상기 추출물 또는 분리 정제된 두개의 올리고펩타이드(F2-1, F2-2), 신규 ACE 저해제는 항고혈압의 기능이 탁월하여 상기 추출물을 정제된 신규물질을 이용하여 경구 투여 약제조성물로 제조할 수 있고, 이를 약제조성물로 제조할 경우 고혈압 환자가 겪고 있는 현기증, 메스꺼움, 갈증, 과도한 진정 등의 부작용을 최소화할 수 있는 효과가 있다.

### 도면의 간단한 설명

- [0019] 도 1은 본 발명에 따라, 노랑느타리의 활성 분획 F2-1(10mM)의 HPLC 크로마토그램을 도시한 것이고,  
 도 2는 본 발명에 따라, HPLC MS/MS를 이용하여 노랑느타리로부터 정제된 ACE 저해제의 아미노산서열 및 분자량 측정(a, RLPSEFDLSAFLRA; b, RLSGQTIEVTSEYLFRRH)을 도시한 것이고,  
 도 3은 본 발명에 따라, Lineweaver-Burk plot을 이용한 ACE 저해제의 저해패턴(a, F2-1A; b, F2-1B; ●, control; ▼, 5 µg of inhibitor; ○, 15 µg of inhibitor)을 도시한 것이고,  
 도 4는 본 발명에 따라, F2-1과 F2-2에 대해 위액처리(SGF)와 위액 및 장액처리(SGF & SIF)후의 HPLC 크로마토그램을 도시한 것이고,  
 도 5는 본 발명에 따라, 본태성 고혈압쥐(SHR)를 대상으로 노랑느타리 추출물의 경구투여에 의한 혈압변화(경구 투여는 1회 투여시 쥐 체중 kg당 시료 600mg 수준이며 경구투여후 0, 0.5, 1, 2 및 4 시간 후 혈압을 측정)를 도시한 것이고,  
 도 6은 본 발명에 따라 나타낸 노랑느타리의 사진이다.

**발명을 실시하기 위한 구체적인 내용**

[0020] 이하, 본 발명을 하기 실시예에 의하여 더욱 상세히 설명하면 다음과 같다. 하기 실시예에는 단지 본 발명을 통상의 기술자 수준에서 상세하고 명백히 설명하는 것으로, 본 발명의 권리범위가 하기 실시예 및 도면 등에 의해 한정되는 것은 아니다.

[0021] **실시예 1**

[0022] 1. 실험방법

[0023] (1) 재료(Materials)

[0024] 노랑느타리는 경기도농업기술원 버섯연구소에서 획득하였다. 이 연구에 사용된 ACE는 300 mM 염화 나트륨(NaCl)을 함유한 100 mM 붕산염 소듐염 버퍼(sodium borate buffer) (pH 8.3)를 4 °C 온도에서 이용하여, 래빗 령(rabbit-lung) 아세톤 파우더로부터 24시간 추출하였다. 상기 ACE 저해 활성을 측정하기 위한 기질로 Hippuric acid- Histidine- Leucine(Hip-His-Leu, Sigma Chemical Co., St. Louis, USA)을 사용하였다. 별도의 규정이 없는 한 모든 케미컬과 솔벤트는 분석용 등급을 사용했다. Sephadex G-25는 Pharmacia Fine Chemicals (Uppsala, Sweden), trifluoroacetic acid, 폼산 암모늄(ammonium formate), 아세트나이트릴은 Sigma Chemical Co. (St. Louis, USA)로 부터 구입하였다.

[0025] 본태성 고혈압쥐(Spontaneously hypertensive male rats, SHR/NCrljOri)는 180-200g의 10주령이며, 오리엔트바이오(Orientbio Co., Korea)로 부터 구입하였다.

[0026] (2) ACE 저해인자 추출(Extraction of ACE inhibitor)

[0027] 노랑느타리(버섯) 건조 자실체(100g)는 분말화 시킨 뒤, 3 L의 물 또는 메탄올을 각각 첨가하여 30 °C 이하에서 24시간 동안 교반하여 추출하였다. 노랑느타리(버섯) 건조 자실체(100g)의 추출물은 5,000×g 에서 30분 동안 원심분리 한 후, 여과지(Whatman No.41 filter paper)로 필터링하였고, 그로부터 추출된 상등액(추출물)은 본 발명의 분석을 위해 동결 건조시켰다.

[0028] (3) ACE 저해 활성 측정 (Assay of the ACE inhibitory activity)

[0029] Cushman과 Cheung의 방법을 일부 변형하여 다음과 같이, 상기 ACE 저해활성을 측정하였다. 시료 50 µL에 ACE 용액 150 µL(2.8unit), 그리고 100mM 붕산염 소듐염 버퍼(sodium borate buffer) (pH 8.3) 100 µL를 가한 후, 37 °C 온도 하에서 10분간 프리인큐베이션(preincubation)시켰다. 여기에 기질로서 Hip-His-Leu 용액 50 µL를 가한 후, 다시 37 °C 온도 하에서 30분간 반응시킨 후, 1N 염산(HCl) 250 µL을 가하여 반응시킨 후 정지시켰다. 여기에 에틸 아세테이트(ethyl acetate) 1 mL를 가하여 30초간 볼텍싱(vortexing)한 다음, 3,000 ×g로 15분간 원심분리 후, 분리된 상층액(추출물) 0.8mL를 취하였다. 이 상층액을 Speed Vac 농축기에 넣어 완

전히 건조시킨 뒤, 동일조건의 붕산염 소디움 버퍼(sodium borate buffer) 1mL를 가하여 용해시켜 228nm에서 흡광도를 측정하여 ACE 저해활성을 계산하였다. 또한 이 ACE 저해활성의 50%를 나타내는데 필요한 시료 추출물 함량을 IC<sub>50</sub>값으로 표시하였다.

[0030] (4) 노랑느타리로부터 ACE 저해인자의 정제(Purification of ACE inhibitor from *P. cornucopiae*)

[0031] 물 추출물은 5,000 MW 필터로 한외여과 되었고, 여과물의 ACE 저해활성을 측정하였다. 활성 부분은 동결 건조하고, 그것을 Sephadex G-25 컬럼에 사용하였다. 컬럼은 증류수를 이용하여 평형화시켰고 0.5ml/min의 유속의 동일한 용액으로 용출시켰다. 그 다음, 활성부분을 가지고 C18 고정상 추출을 하였고 5% 아세트나이트릴을 사용하여 평형화시켰다. 농도 기울기는 아세트나이트릴 5, 25, 50, 100% 순으로 기울기를 주었다. 그리고 그것의 활성 부분은 동결 건조하여 SCX 고정상 추출을 하였고, 10mM 폼산 암모늄(ammonium formate)를 이용하여 평형화시켰고, 폼산 암모늄(ammonium formate) 10 mM, 30 mM, 50 mM, 100 mM 및 200 mM 순으로 용출시켰다. 그리고 그것의 활성 부분을 분석하기 위하여 역상 HPLC를 하였고, 5% 아세트나이트릴을 사용하여 컬럼을 평형화시켰다. 농도의 직선기울기는 0.1% TFA를 포함하고 있는 5% 아세트나이트릴에서 25% 아세트나이트릴까지 농도 기울기를 주었다. 그리고 그것의 활성 부분은 수집된 즉시 동결건조 하였다.

[0032] (5) ACE 저해인자의 아미노산 서열 및 분자량(Molecular weight and amino acid sequence of the ACE inhibitor)

[0033] OMV 단백질은 12% SDS-PAGE와 잉겔 다이제스천(Ingel digestion)에 의해 분리가 되었다. 분리된 OMV 단백질을 0.5%의 초산에 0.02%의 폼산(formic acid)이 함유되어 있는 15ml에 용해시켰다. 펩타이드 샘플(Peptide sample)은 MGU30-C<sub>18</sub>trapping column과 nano column을 유속 120nL/min의 속도로 흘려주었다. 그 후에 펩타이드(peptide)들은 아세트나이트릴 0 내지 65%의 기울기로 80분 동안, 동일한 유속으로 사용해 컬럼으로부터 용출되었다. LCQ-Deca ESI 이온 트랩 매스 스펙트로미터(ion trap mass spectrometer)의 모든 MS와 MS/MS 스펙트럼은 데이터 의존성(data-dependent) 모드로 하여서 얻었다. 단백질 동정을 위한 MS/MS 스펙트럼 또한 SEQUEST 소프트웨어(software)를 사용하여 찾았다.

[0034] (6) ACE 저해 패턴의 결정(Determination of the inhibition pattern on ACE)

[0035] ACE 저해 패턴을 분석하기 위해, ACE 저해활성은 Lineweaver-Burk plot을 이용하여 기질의 다양한 농도에서 저해활성을 측정하였다.

[0036]

[0037] (7) 정제된 ACE 저해제의 항고혈압 특성(Antihypertensive action of the purified ACE inhibitor)

[0038] 노랑느타리 자실체(ACE 저해제 함유)로부터 추출한 추출물을 본태성 고혈압 쥐에 600 mg/kg 투여수준으로 경구 투여하였다(분리 정제한 2개의 펩타이드는 그 양이 매우 적어 경우 투여할 양이 되지 못했기 때문). 동물의 혈압은 쥐 꼬리에 특별히 고안된 혈압 모니터링 시스템으로부터 투여 전과 투여 후의 0.5 h, 1 h, 2 h, 4h 동안 측정하였다. 각 실험군은 5 마리의 본태성 고혈압 쥐로 구성되어 있으며, 네가티브(negative)와 포지티브(positive) 컨트롤 군(control group)이 포함되었다. 상기 포지티브 컨트롤 군은 상업용 항고혈압제 Captopril (ACE inhibitor)투여군으로, 투여수준은 100mg/kg이다. 반면에 네가티브 컨트롤 군은 식염수를 투여하였다. SHR의 투여 이전에는 하루에 네 번 혈압을 측정하고, 시험에서는 이들의 평균 혈압이 사용되었다. 반면에 ACE 저해제가 투여되었을 때에는 각 시험군의 평균혈압은 매번 세 번씩 측정되었다.

[0039]

[0040] **2. 실험결과**

[0041] (1) 노랑느타리 추출물의 ACE 저해 활성 측정(The ACE inhibitory activities of various extracts from *P. cornucopiae*)

[0042] 먼저 노랑느타리 자실체로부터 추출한 추출물에 대하여 그들의 ACE 저해 활성을 측정하였다. 추출할 때 사용한 유기용매는 물과 메탄올이었고, 그 중 물 추출물의 ACE 저해활성은 78%로 메탄올 추출물(55%)과 비교하여 높은 활성을 보여주었다. 부가적으로 노랑느타리 자실체로부터 ACE 저해제의 최적 추출 조건은 30 °C와 50 °C에서 12, 24, 48시간 조사되었다. 특히 노랑느타리 자실체의 물 추출물을 30 °C에서 24시간 추출했을 때 가장 높은 ACE 저해활성(83.3%, IC<sub>50</sub>:6mg/mL)을 보여주었다.

[0043] 본 발명의 연구 시험결과 50 °C 온도에서 추출한 추출물은 낮은 활성을 보여주었는데, 이것에 대한 이유로는 상기 노랑느타리 자실체의 추출물, ACE 저해제는 하기 아미노산으로 구성된 두 개의 올리고펩타이드 성분으로써 높은 온도에서는 이 성분들이 분해되는 것으로 추정된다. 따라서, 노랑느타리 자실체의 물 추출물은 30 °C에서 24시간 추출했을 때 가장 높은 ACE 저해활성(83.3%, IC<sub>50</sub>:6mg/mL)을 가지기 때문에 위의 조건이 바람직하다 할 수 있다.

표 1

노랑느타리 자실체의 추출시 온도의 영향

추출온도(°C)	추출시간 (h)			
	6	12	24	48
30	47.2±0.7	78.3±0.4	83.3±0.8	81.8±1.1
50	50.5±0.9	69.8±0.7	67.5±1.1	68.1±0.9

(ACE 억제 활성 (inhibitory activity); %)

[0044]

[0045] (2) 노랑느타리의 추출물의 ACE 저해제의 분리 정제 (Purification of the ACE inhibitor)

[0046] 상기 노랑느타리(버섯)의 물 추출물은 5,000MW cut-off 필터를 이용하여 한외여과를 실시하였고, 그 필터물에 대해서 ACE 저해활성을 측정하였다. 필터물의 ACE 저해활성은 IC<sub>50</sub>5.3mg/mL이었다. 활성 필터물은 Sephadex G-25 컬럼크로마토그래피로 실시한 후, ACE 저해활성은 IC<sub>50</sub>3.86mg/mL을 분획물을 얻었다. 활성 분획물은 C<sub>18</sub> 고체상 추출법을 이용하여 아세트나이트릴 5%에서 100%의 농도로 용출시켰다. 25% 아세트나이트릴에서 용출된 F2 분획물이 71.3%, (IC<sub>50</sub>:1.5mg/mL)의 높은 ACE 억제 활성을 보여주었다. 활성 분획물은 SCX 고체상 추출법을 이용하여 10 mM ~ 200 mM의 폼산 암모늄(ammonium formate)으로 용출시킨 후, 10mM의 폼산 암모늄(ammonium formate) 농도에서 활성 분획(F2-1) IC<sub>50</sub>1mg/mL을 획득하였다. 그 뒤에 활성 분획 분리를 위해 두 번의 역상 고속액체크로마토그래피를 수행하여, 두 개의 정제된 ACE 저해 분획 F2-1A 와 F2-1B를 획득하였으며(도 1), 이들의 ACE 저해활성은 각각 IC<sub>50</sub>0.46mg/mL, 1.14 mg/mL이었다(표 2).

표 2

노랑느타리의 추출물의 ACE inhibitor 분리 정제 공정의 요약

정제 순서 (Purification steps)	ACE 저해활성 (inhibitory activity, IC <sub>50</sub> :mg/mL)
물추출(Water extract)	0.300
한외여과(ultrafiltration)	0.265
Sephadex G-25	0.193
C <sub>18</sub> Solid phase extraction	0.075
SCX solid phase extraction	0.050
RP-HPLC	0.023

[0047]

- [0048] (3) ACE 저해제의 아미노산 서열(Amino acid sequence of the ACE inhibitor)
- [0049] 두 개의 ACE 저해 분획(F2-1A and F2-1B) 펩타이드를 분석하였으며, F2-1B 두 타입의 올리고펩타이드를 얻었다. 이 두 올리고펩타이드(F2-1, 2)는 ACE 저해활성을 측정하기 위해 정제되었다. 이 두 올리고펩타이드의 아미노산 서열 중, 첫째, 14개의 올리고펩타이드(F2-1)의 아미노산 서열은 Arg-Leu-Pro-Ser-Glu-Phe-Asp-Leu-Ser-Ala-Phe-Leu-Arg-Ala이고, 두 번째, 17개의 올리고펩타이드(F2-2)의 아미노산 서열은 Arg-Leu-Ser-Gly-Gln-Thr-Ile-Glu-Val-Thr-Ser-Glu-Tyr-Leu-Phe-Arg-His이었다.
- [0050] 상기 두 올리고펩타이드는 새로운 ACE 저해제로서 이전의 어떠한 단백질 가수분해물 또는 유리 펩타이드에서 볼 수 없었다. 이것은 영지버섯의 triterpene과 감태의 당단백질과 폴리페놀 복합체 이외에 거의 모든 ACE 저해제는 펩타이드라는 것을 알려준다. ACE 저해제의 다양한 아미노산 서열이 보고되어왔는데 디펩타이드에서 올리고펩타이드 범위이다.
- [0051]
- [0052] (4) 정제된 ACE 저해제의 분자량(Molecular weight of the purified ACE inhibitors)
- [0053] 정제된 ACE 저해제의 분자량은 LC-MS/MS 분석을 통해 1622.85 Da (F2-1)과 2037.26 Da (F2-2)일 것으로 추정된다.
- [0054]
- [0055] (5) 정제된 ACE 저해제의 저해패턴(Determination of ACE inhibitory pattern)
- [0056] 정제된 ACE 저해제의 저해패턴은 Lineweave-Burk plot (도 4)을 이용하여 분석하였다. 거의 모든 정제된 ACE 저해제는 큰 양송이, 잎새버섯, 그리고 피브리노겐 펜타펩타이드(fibrinogen pentapeptides), 카제인 조각들(casein fragments), 포르신 플라즈마 트리펩타이드(porcine plasma tripeptides)와 투나 근육 옥타펩타이드(tuna muscle octapeptides)를 제외하고는 비경쟁적 저해 패턴을 가진다.
- [0057]
- [0058] (6) 위 또는 장의 protease에 대한 저항성(Resistance to gastric and intestinal fluids)
- [0059] 정제된 ACE 저해 펩타이드는 위 또는 장의 protease에 대하여 저항성을 조사하였다. 상기 ACE 저해제인 올리고펩타이드는 위액의 펩신과 장액의 판크레아틴에 의해 거의 모두 가수분해 되었다(도 5).
- [0060] 하기 표 3에서 위액 처리 이후에 가수분해물의 ACE 저해활성은 무처리 올리고펩타이드의 활성보다 높았다. 이 결과 위액의 펩신처리에 의해 새로운 ACE 저해 펩타이드가 만들어졌다. 정제된 ACE 저해 펩타이드에 대하여 위액 및 장액 동시처리는 정제된 ACE 저해 펩타이드의 위액 단독 처리보다는 저해활성이 비록 낮을지라도 ACE 저해활성을 증가시켰다. 이 결과 노랑느타리버섯으로부터 정제된 ACE 저해 펩타이드는 소화기관의 분해를 통해서 더욱 강한 ACE 저해제의 역할을 하며 생체 내로 흡수될 것으로 판단된다.

**표 3**

위액 처리 이후에 가수분해물의 ACE 저해활성 (Unit: mg/mL of IC<sub>50</sub>)

정제된 ACE 저해제	비처리	SGF처리	SGF와 SIF 처리
F2-1	1.17	0.085	0.56
F2-2	3.1	2.2	n.d <sup>a</sup>

<sup>a</sup>n.d; not detected

- [0061]
- [0062] (7) ACE 저해제의 항고혈압 효과(Antihypertensive action of the ACE inhibitor)
- [0063] 상기 정제된 ACE 저해제의 항고혈압 활성은 SHR을 이용하였다. 도 5와 같이 SHR의 저해 그룹의 SHR의 평균 혈압은 ACE 저해제의 경구투여 전에 180mmHg이었다. ACE 저해제 600 mg/kg 쥐(rat) 수준으로 경구투여 2시간 후에 혈압은 130mmHg으로 감소되었으며, 평균혈압은 약간 증가하였다. 이러한 사실은 상업적 항고혈압제 Captopril과

비슷하였다. 이 결과 부분 정제된 ACE 저해제는 SHR 600 mg/kg 식이로 확실한 항고혈압 효과를 보여주었다.

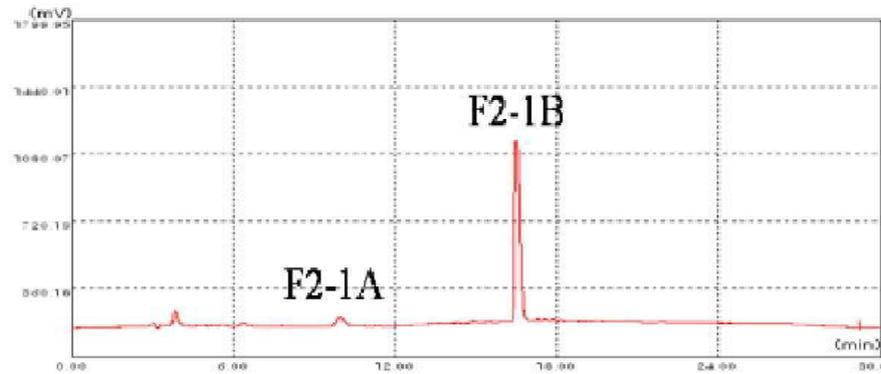
[0064]

[0065]

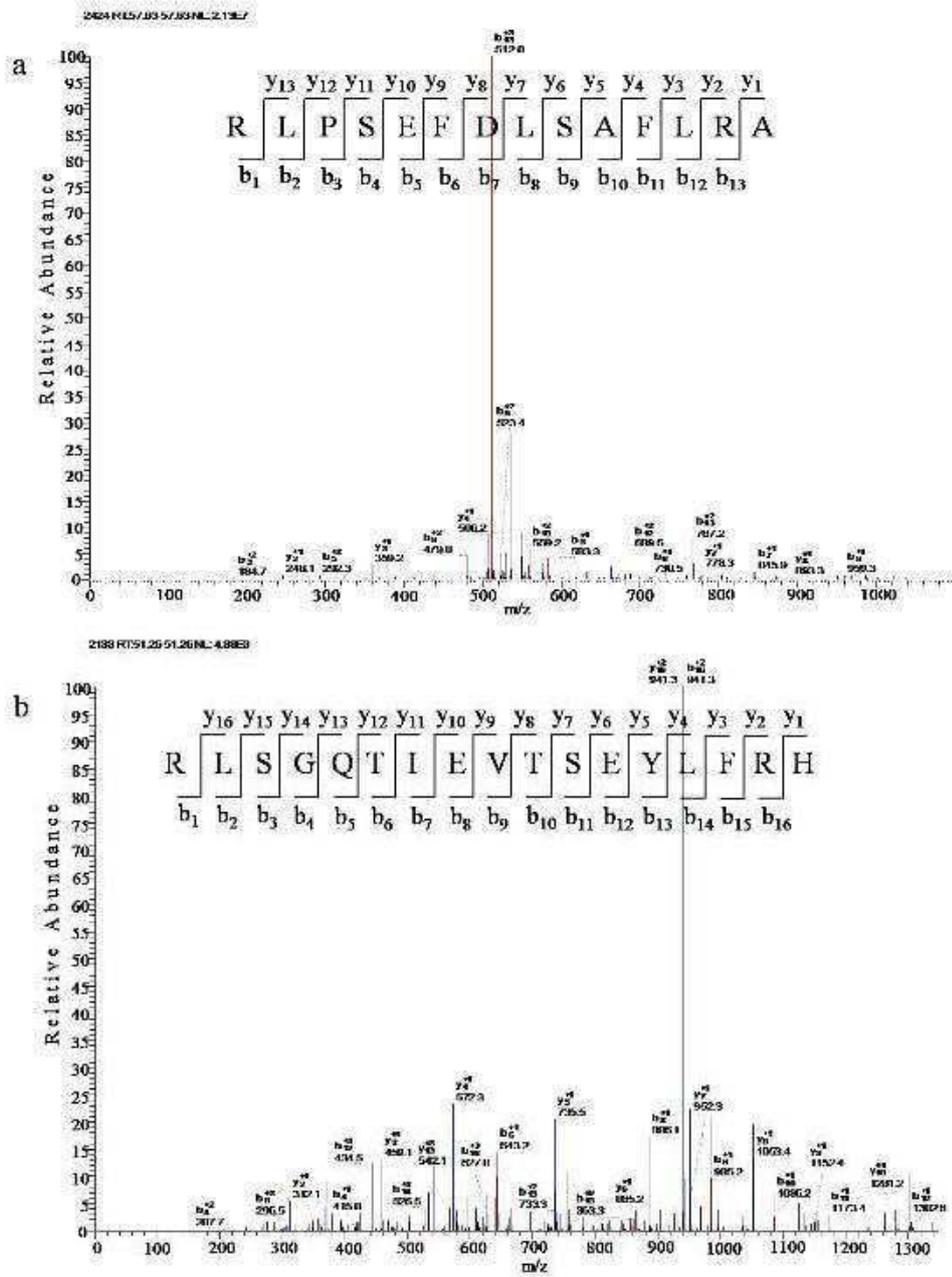
이 연구결과에 따라 식용 노랑느타리 버섯으로부터 항고혈압 ACE 저해제를 추출과 특성을 조사하였다. 결국에, 본 발명에서는 두 가지 형태의 새롭게 정제된 ACE 저해제, 저해활성  $IC_{50}$  값 52  $\mu$ M (F2-1), 1079  $\mu$ M (F2-1))를 획득하였다. 이들 ACE 저해 펩타이드는 비교적 분자량이 크더라도, 이들은 건강소재 및 생물활성 물질로 이용할 수 있을 것으로 생각된다.

**도면**

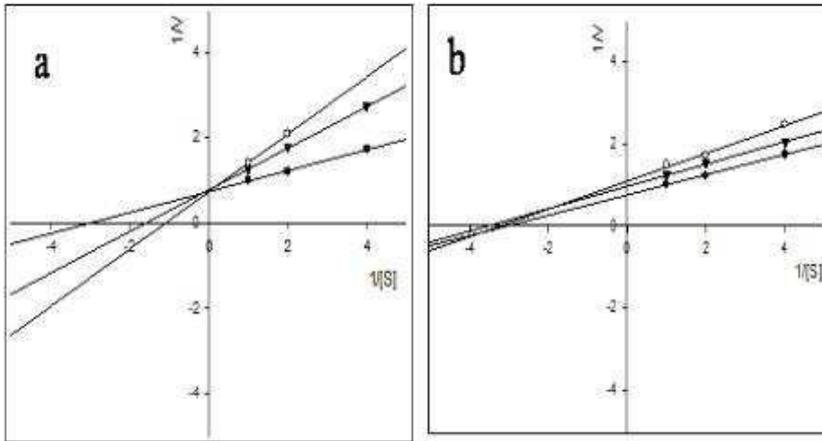
**도면1**



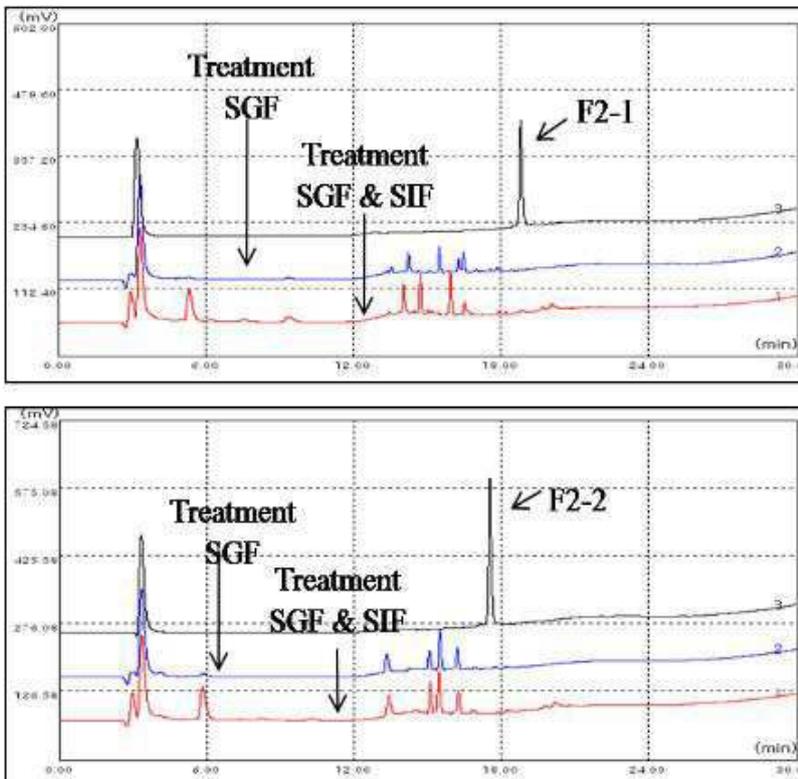
도면2



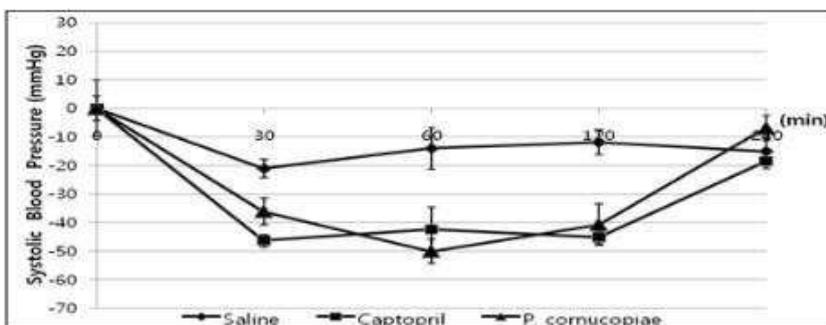
도면3



도면4



도면5



도면6

