



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0133487
(43) 공개일자 2022년10월05일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A23L 33/10 (2022.01) A61K 36/04 (2006.01)
A61K 8/9717 (2017.01) A61P 1/00 (2006.01)
A61P 29/00 (2006.01) A61Q 19/00 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A23L 33/10 (2022.01)
A61K 36/04 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2021-0038650

(22) 출원일자 2021년03월25일

심사청구일자 2021년03월25일

기술이전 희망 : 기술양도

(71) 출원인

경상국립대학교산학협력단

경상남도 진주시 진주대로 501 (가좌동)

(72) 발명자

허호진

경상남도 진주시 초장로 120, 504동 501호(초전동, 이지더원 아파트)

박선경

경상남도 통영시 운하1길 25, 216호(미수동, 천우운하맨션)

(74) 대리인

위병갑

전체 청구항 수 : 총 13 항

(54) 발명의 명칭 참깁 추출물을 유효성분으로 포함하는 초미세먼지로 인한 염증성 장질환 예방 또는 치료용 조성물

(57) 요약

본 발명은 참깁(*Porphyra tenera*) 추출물을 유효성분으로 포함하는 초미세먼지로 인한 염증성 장질환의 예방 또는 치료용 조성물을 제공하는 것을 목적으로 하며, 더욱 상세하게는 참깁(*Porphyra tenera*) 추출물은 초미세먼지로 유도된 염증성 장질환 동물모델에서 장 길이 개선 및 단쇄지방산 생성에 있어서의 개선효과를 나타냈고, 프로

(뒷면에 계속)

대표도 - 도1a



바이오틱스(Prebiotics)로서의 효과를 나타냄을 확인하였으며, NGS 분석에서 유익균의 성장을 촉진시키고 유해균의 성장은 억제하는 것을 확인하였다. 또한, 초미세먼지로 인한 염증성 바이오마커의 정량적인 발현 수준을 유의적으로 감소시켰으며, 장 세포의 투과성에 관련된 바이오마커의 발현 수준 역시 개선시킴을 확인하여 본 발명을 완성하였다. 이는 초미세먼지로 인한 장질환에 대한 예방 또는 치료용 약학적 조성물, 초미세먼지로 인한 장질환에 대한 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물 또는 초미세먼지로 인한 장질환에 대한 예방 또는 개선용 화장료 조성물로 이용될 수 있다.

(52) CPC특허분류

A61K 8/9717 (2017.08)

A61P 1/00 (2018.01)

A61P 29/00 (2018.01)

A61Q 19/00 (2013.01)

A23V 2002/00 (2013.01)

A23V 2200/32 (2013.01)

A23V 2200/324 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1345313660

과제번호 2018R1D1A3B07043398

부처명 교육부

과제관리(전문)기관명 한국연구재단

연구사업명 개인기초연구(지역대학우수과학자지원사업)

연구과제명 (초)미세먼지 유도성 염증 발생과 뇌신경세포 기능저하와의 연계기전 및 개선 기작
연구

기 여 율 1/1

과제수행기관명 경상대학교

연구기간 2020.03.01 ~ 2021.02.28

명세서

청구범위

청구항 1

참김 추출물을 유효성분으로 포함하는, 미세먼지로 인한 염증성 장질환 예방 또는 개선용 건강기능성식품 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 추출물은 물 또는 유기용매 추출법으로 추출되는 것을 특징으로 하는, 미세먼지로 인한 염증성 장질환 예방 또는 개선용 건강기능성식품 조성물.

청구항 3

제2항에 있어서,

상기 유기용매 추출법은 30 내지 90% 에탄올을 이용한 것을 특징으로 하는, 미세먼지로 인한 염증성 장질환 예방 또는 개선용 건강기능성식품 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 참김 추출물은 참김 70 내지 90% 에탄올 추출물 및 참김 물 추출물을 5:5 내지 9:1의 중량비로 혼합한 것인, 미세먼지로 인한 염증성 장질환 예방 또는 개선용 건강기능성식품 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 염증성 장질환은 궤양성 대장염, 크론병, 과민성 대장증후군, 만성변비 및 단장증후군 중 어느 하나인 것인, 미세먼지로 인한 염증성 장질환 예방 또는 개선용 건강기능성식품 조성물.

청구항 6

제1항에 있어서,

상기 조성물은 미세먼지 노출로 인해 감소된 대장의 길이를 회복 시키는 것을 특징으로 하는, 미세먼지로 인한 염증성 장질환 예방 또는 개선용 건강기능성식품 조성물.

청구항 7

제1항에 있어서,

상기 조성물은 미세먼지로 노출로 인해 변화된 장내 균총을 개선시키는 것을 특징으로 하는, 미세먼지로 인한 염증성 장질환 예방 또는 개선용 건강기능성식품 조성물.

청구항 8

제1항에 있어서,

상기 조성물은 미세먼지 노출로 인해 감소된 단쇄지방산을 증가시키는 것을 특징으로 하는, 미세먼지로 인한 염증성 장질환 예방 또는 개선용 건강기능성식품 조성물.

청구항 9

제1항에 있어서,

상기 조성물은 NF- κ B 경로 활성을 억제시키는 것을 특징으로 하는, 미세먼지로 인한 염증성 장질환 예방 또는 개선용 건강기능성식품 조성물.

청구항 10

제1항에 있어서,

상기 조성물은 IL-6, IL-12, IFN- γ , TNF- α 및 MCP-1의 발현을 억제시키는 것을 특징으로 하는, 미세먼지로 인한 염증성 장질환 예방 또는 개선용 건강기능성식품 조성물.

청구항 11

제1항에 있어서,

상기 조성물은 Occludin 및 Claudin-1의 발현을 증가시키는 것을 특징으로 하는, 미세먼지로 인한 염증성 장질환 예방 또는 개선용 건강기능성식품 조성물.

청구항 12

참김 추출물을 유효성분으로 포함하는 미세먼지로 인한 염증성 장질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물에서, 상기 염증성 장질환은 궤양성 대장염, 크론병, 과민성 대장증후군, 만성변비 및 단장증후군 중 어느 하나인 것인, 약학적 조성물.

청구항 13

참김 추출물을 유효성분으로 포함하는 미세먼지로 인한 염증성 장질환 예방 또는 개선용 화장료 조성물에서, 상기 염증성 장질환은 궤양성 대장염, 크론병, 과민성 대장증후군, 만성변비 및 단장증후군 중 어느 하나인 것인, 화장료 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 참김(*Porphyra tenera*) 추출물을 유효성분으로 포함하는 초미세먼지로 인한 염증성 장질환(Inflammatory Bowel diseases)의 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 본 발명은 참김(*Porphyra tenera*; *P. tenera*) 추출물을 유효성분으로 포함하는 초미세먼지로 인한 염증성 장질환의 예방 또는 치료용 조성물에 관한 것으로서, 상기 염증성 장질환의 종류로는 궤양성 대장염, 크론병, 과민성 대장증후군, 만성변비 또는 단장증후군이 있다.

[0003] 한편, 최근 미세먼지(Particulate matter, PM)의 농도가 증가하고 지속기간이 증가됨에 따라 미세먼지에 의한 인체영향성에 대한 관심이 증가되고 있는 추세이다(Kim 등, 2017). 미세먼지는 우리나라의 오랜 역사와 함께 해 왔으며, 예로부터 몽고와 중국 사막지역 및 황화강 유역에서 발원된 황사의 영향을 받았고, 최근에는 우리나라 및 동북아시아 국가들의 급격한 산업화가 미세먼지의 주요 발생 원인으로 보고되고 있다(Myung, 2016).

[0004] 초미세먼지(PM_{2.5})는 공기역학적 지름이 2.5 μ m 이하인 미세먼지를 의미하며, 대기 오염 발생원에서 직접 배출되어지는 1차 오염물질과 대기에서 반응하여 생성되는 2차 대기오염 물질(NO₃⁻, SO₄⁻, NH₄⁻, polyaromatic hydrocarbon(PAH), quinone 등)이 주를 이룬다(Kim 등, 2017). 세계보건기구(World Health Organization, 2013)에 의하면, PM₁₀(공기역학적 지름이 10 μ m 이하인 미세먼지)에 장기 노출될 경우 호흡기관 관련 질환과 사망률이 증가하게 되는데, PM_{2.5}는 이보다 더 강한 위험 인자로 작용한다고 보고하였다.

[0005] 지름 5~10 μ g/m³ 이하의 먼지는 코 점막을 통해 체내에 흡수가 가능하며 2~5 μ g/m³ 이하는 기도(호흡기)를 통과하고, 0.1~1 μ g/m³는 폐포 손상까지 유발하게 된다. 미세먼지가 인체에 흡입되었을 경우, 충돌·중력침강·확

산·정전기적 흡착 등과 같은 다양한 기전에 의해서 조직에 침착될 수 있으며, 일부는 혈액을 따라서 전신을 순환하기도 한다.

[0006] 특히, 체내에 침착된 미세먼지는 산화적 스트레스와 염증 반응을 유도하고 호흡계 및 순환계 질환의 급성 악화를 유발하는 것으로 보고되고 있다(Myung, 2016). 또한, 후각상피세포를 거치면 혈관 뇌 장벽(Blood-Brain Barrier; BBB)을 거치지 않고도 뇌로 직접 도달 할 수 있으며, 자성을 띄는 입자의 경우 뇌조직에 직접 침착됨으로써 미세아교세포(Microglia)를 활성화 하여 Pro-inflammatory cytokines(IL-1, TNF- α 및 IFN- γ) 등을 생산함으로써 뇌신경 염증을 유도하고 더 나아가 인지장애를 유도하는 것으로 보고되었다(Block, 2004). 따라서, 이러한 미세먼지로 유도될 수 있는 인체 내 산화적 스트레스 억제 및 염증반응을 억제시켜 줄 수 있는 천연 식품 소재에 대한 연구가 필요하다고 사료된다.

[0007] 한편, 최근 육상자원고갈로 해양자원을 활용한 연구가 주목을 받고 있으며, 특히 해조류는 다양한 생리활성물질의 함유한 식품소재로서 연구 중요성이 대두되고 있다(Lee 등, 2017). 우리나라 연안에 분포하는 해조류는 약 600여 종이며 그 중 김은 2014년도 기준으로 397천 톤으로 전체 해조류의 36.2%으로 가장 높은 생산량을 가지고 있다. 참김(*Porphyra tenera*; *P. tenera*)은 보라털목 보라털과 김속에 속하는 홍조류로 해태(海苔), 해의(海衣), 해우라고도 부르며, 아시아 지역인 우리나라, 일본, 중국 등지에서 널리 섭취되고 있다(Lee 등, 2017). 김에는 비타민 A, 칼슘 및 요오드를 포함하는 무기질, 콜레스테롤을 낮추는 타우린(Taurine) 등이 풍부하며, 다른 해조류와 달리 트레오닌(Threonine), 트립토판(Tryptophan), 메티오닌(Methionine)과 같은 필수 아미노산이 풍부하다. 더불어 단백질 함량이 높고 열량이 낮아 식물성 고단백식품으로 알려져 있다(An과 Koo, 2017; Noda, 1993). 또한, 김에 함유된 페놀성 화합물, 플라보노이드는 항산화 활성 및 아질산염 소거능을 가지는 것으로 보고되고 있다(Heo 등, 2006). 김에 존재하는 복합당당체에는 3,6-anhydro-L-galactose와 에스테르황산(Ester sulfate)으로 구성된 포피란(Porphyrin)이 가장 대표적이며, 자일로스(Xylose), 만노스(Mannose)로 이루어진 헤미셀룰로스(Hemicellulose)와 같은 김 고유의 복합당 또한 보고되고 있다(An과 Koo, 2017). 특히, 포피란(Porphyrin)이 나타내는 항산화, 대식세포(Macrophage) 활성화, 혈중 콜레스테롤 저하, 항암, 면역활성 및 항염증에 대한 연구들이 보고되고 있으며, 식품 이상의 가치를 지닌 기능성 소재로의 가능성이 대두되고 있다(An과 Koo, 2017; Jiang 등, 2017; Lee 등, 2015). 따라서, 본 연구에서는 참김(*Porphyra tenera*)을 활용하여 초미세먼지에 노출된 다양한 세포 및 동물 조직에서 그 보호효과를 검증함으로써 초미세먼지 유도성 관련 염증성 장질환 예방 또는 치료용 소재로의 가능성을 확인하고 이를 산업화 기초자료로 활용하고자 하였다.

[0008] 따라서, 본 연구에서는 참김(*Porphyra tenera*) 추출물의 초미세먼지로 유도된 염증성 장질환 동물모델에서의 염증반응에 대한 개선효과를 검증하였다. 더욱 구체적으로는 참김(*Porphyra tenera*) 추출물은 초미세먼지로 유도된 염증성 장질환 동물모델에서 장 길이 개선 및 단쇄지방산 생성에 있어서의 개선효과를 나타냈고, 프로바이오틱스(Prebiotics)로서의 효과를 나타냄을 확인하였으며, NGS 분석에서 유익균의 성장을 촉진시키고 유해균의 성장은 억제하는 것을 확인하였다. 또한, 초미세먼지로 인한 염증성 바이오마커의 정량적인 발현 수준을 유의적으로 감소시켰으며, 장 세포의 투과성에 관련된 바이오마커의 발현 수준 역시 개선시킴을 확인하였다. 즉, 상기 실험 내용들에 의거하여 참김(*Porphyra tenera*) 추출물을 유효성분으로 포함하는 초미세먼지로 인한 염증성 장질환의 예방 또는 치료용 조성물을 완성하기에 이르렀다.

선행기술문헌

특허문헌

[0009] (특허문헌 0001) 대한민국 등록특허 제10-1055-4470000호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0010] 본 발명은 상기와 같은 문제를 해결하기 위해, 참김(*Porphyra tenera*; *P. tenera*) 추출물을 유효성분으로 포함하는 초미세먼지로 인한 염증성 장질환의 예방 또는 치료용 조성물을 제공하는 것을 목적으로 하며, 더욱 상세하게는 참김 추출물이 초미세먼지로 유도된 염증성 장질환 동물모델에서의 염증반응에 대한 개선효과를 확인하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0011] 상기한 과제를 해결하기 위하여, 본 발명은 참김 추출물을 유효성분으로 포함하는, 미세먼지로 인한 염증성 장질환 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물을 제공한다.
- [0012] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 본 발명의 “추출물”은 물 또는 유기용매 추출법으로 추출되는 것을 특징으로 하는 것 일 수 있으나 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0013] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 본 발명의 “유기용매 추출법”은 휘발성 용제를 이용하여 유기용매 추출법에 의해 추출될 수 있고, 바람직하게는 30 내지 90% 에탄올을 이용할 수 있으며, 더욱 바람직하게는 80% 에탄올을 이용할 수 있으나 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0014] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 본 발명의 “추출물”은 참김 70 내지 90% 에탄올 추출물 및 참김 물 추출물을 5:5 내지 9:2의 중량비로 혼합한 것을 특징으로 할 수 있고, 바람직하게는 8:2의 중량비로 혼합된 것을 특징으로 할 수 있으나 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0015] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 본 발명의 “초미세먼지로 인한 염증성 장질환”은 궤양성 대장염, 크론병, 과민성 대장증후군, 만성변비 및 단장증후군 중 어느 하나인 것을 특징으로 할 수 있으나 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0016] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 본 발명의 “조성물”은 미세먼지 노출로 인해 감소된 대장의 길이를 회복시키는 것을 특징으로 할 수 있으나 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0017] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 본 발명의 “조성물”은 미세먼지로 노출로 인해 변화된 장내 균총을 개선시키는 것을 특징으로 할 수 있으나 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0018] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 본 발명의 “조성물”은 미세먼지 노출로 인해 감소된 단쇄지방산을 증가시키는 것을 특징으로 할 수 있으나 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0019] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 본 발명의 “조성물”은 NF- κ B 경로 활성을 억제시키는 것을 특징으로 할 수 있으나 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0020] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 본 발명의 “조성물”은 IL-6, IL-12, IFN- γ , TNF- α 및 MCP-1의 발현을 억제시키는 것을 특징으로 할 수 있으나 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0021] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 본 발명의 “조성물”은 Occludin 및 claudin-1의 발현을 증가시키는 것을 특징으로 할 수 있으나 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0022] 또한, 본 발명은 참김 추출물을 유효성분으로 포함하는 미세먼지로 인한 염증성 장질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물에서, 상기 염증성 장질환은 궤양성 대장염, 크론병, 과민성 대장증후군, 만성변비 및 단장증후군 중 어느 하나인 것인, 약학적 조성물을 제공한다.
- [0023] 아울러, 본 발명은 참김 추출물을 유효성분으로 포함하는 미세먼지로 인한 염증성 장질환 예방 또는 개선용 화장료 조성물에서, 상기 염증성 장질환은 궤양성 대장염, 크론병, 과민성 대장증후군, 만성변비 및 단장증후군 중 어느 하나인 것인, 화장료 조성물을 제공한다.

발명의 효과

- [0024] 본 발명의 참김(*Porphyra tenera*; *P. tenera*) 추출물은 초미세먼지로 인한 염증성 장질환에 대해 예방, 개선 또는 치료 효과가 뛰어나므로 초미세먼지로 인한 장질환에 대한 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물, 초미세먼지로 인한 장질환에 대한 예방 또는 치료용 약학적 조성물 또는 초미세먼지로 인한 장질환에 대한 예방 또는 개선용 화장료 조성물로 유용하게 활용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0025] 도 1은 본 발명 참김 추출물의 초미세먼지(PM_{2.5})로 유도된 동물모델에서 대장 길이 개선 효과를 나타낸 도이다.
- 도 2는 본 발명 참김 추출물의 초미세먼지(PM_{2.5})로 유도된 동물모델에서 장내 미생물 균총 변화를 측정한 도이다.

도 3은 본 발명 참김 추출물의 초미세먼지(PM_{2.5})로 유도된 동물모델 분변의 단쇄지방산(Short-chain fatty acids)을 분석한 도이다.

도 4는 본 발명 참김 추출물의 초미세먼지(PM_{2.5})로 유도된 염증반응에 대한 대장조직에서의 항염증 효과를 나타낸 도이다.

도 5는 본 발명 참김 추출물의 초미세먼지(PM_{2.5})로 유도된 대장 조직의 tight-junction의 보호 효과를 나타낸 도이다.

도 6은 본 발명 참김 추출물의 주요한 생리활성물질을 분석한 결과를 나타낸 도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0026] 본 발명은 참김(*Porphyra tenera*) 추출물을 유효성분으로 포함하는 초미세먼지(PM_{2.5})로 인한 염증성 장질환 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물 제공을 목적으로 한다.
- [0027] 또한, 본 발명은 참김(*Porphyra tenera*) 추출물을 유효성분으로 포함하는 초미세먼지(PM_{2.5})로 인한 염증성 장질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물 제공을 목적으로 한다.
- [0028] 마지막으로, 본 발명은 참김(*Porphyra tenera*) 추출물을 유효성분으로 포함하는 초미세먼지(PM_{2.5})로 인한 염증성 장질환 예방 또는 개선용 화장료 조성물 제공을 목적으로 한다.
- [0030] 이하, 첨부된 도면을 참조하여 본 발명의 구현예로 본 발명을 상세히 설명하기로 한다. 다만, 하기 구현 예는 본 발명에 대한 예시로 제시되는 것으로, 당업자에게 주지 저명한 기술 또는 구성에 대한 구체적인 설명이 본 발명의 요지를 불필요하게 흐릴 수 있다고 판단되는 경우에는 그 상세한 설명을 생략할 수 있고, 이에 의해 본 발명이 제한되지는 않는다. 본 발명은 후술하는 특허 청구범위의 기재 및 그로부터 해석되는 균등 범주 내에서 다양한 변형 및 응용이 가능하다.
- [0031] 또한, 본 명세서에서 사용되는 용어(Terminology)들은 본 발명의 바람직한 실시 예를 적절히 표현하기 위해 사용된 용어들로서, 이는 사용자, 운용자의 의도 또는 본 발명이 속하는 분야의 관례 등에 따라 달라질 수 있다. 따라서 본 용어들에 대한 정의는 본 명세서 전반에 걸친 내용을 토대로 내려져야 할 것이다. 명세서 전체에서, 어떤 부분이 어떤 구성요소를 “포함” 한다고 할 때, 이는 특별히 반대되는 기재가 없는 한 다른 구성요소를 제외하는 것이 아니라 다른 구성 요소를 더 포함할 수 있는 것을 의미한다.
- [0032] 본 명세서 전체에 걸쳐, 특정 물질의 농도를 나타내기 위하여 사용되는 ‘%’는 별도의 언급이 없는 경우, 고체/고체는(w/w) %, 고체/액체는(w/v) %, 그리고 액체/액체는(v/v) %이다.
- [0034] 일 측면에서, 참김(*Porphyra tenera*) 추출물을 유효성분으로 포함하는 초미세먼지(PM_{2.5})로 인한 염증성 장질환 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물에 관한 것이다.
- [0035] 본 발명에 따른 추출물은 당업계에 공지된 추출 및 분리방법을 사용하여 천연으로부터 추출 및 분리하여 수득한 것을 사용할 수 있으며, 본 발명에서 정의된 “추출물”은 적절한 용매를 이용하여 참김(*Porphyra tenera*)으로부터 추출한 것이며, 예를 들어, 조추출물, 극성용매 가용 추출물 또는 비극성용매 가용 추출물을 모두 포함한다. 상기 참김(*Porphyra tenera*)으로부터 추출물을 추출하기 위한 적절한 용매로는 식품학/약학/화장품학적으로 허용되는 유기용매라면 어느 것을 사용해도 무방하며, 물 또는 유기용매를 사용할 수 있으며, 이에 제한되지는 않으나, 예를 들어, 정제수, 메탄올(Methanol), 에탄올(Ethanol), 프로판올(Propanol), 이소프로판올(Isopropanol), 부탄올(Butanol) 등을 포함하는 탄소수 1 내지 4의 알코올, 아세톤(Acetone), 에테르(Ether), 벤젠(Benzene), 클로로포름(Chloroform), 에틸아세테이트(Ethyl acetate), 메틸렌클로라이드(Methylene chloride), 헥산(Hexane) 및 시클로헥산(Cyclohexane) 등의 각종 용매를 단독으로 혹은 혼합하여 사용할 수 있다. 추출 방법으로는 열수추출법, 냉침추출법, 환류냉각추출법, 용매추출법, 수증기증류법, 초음파추출법, 용출법, 압착법 등의 방법 중 어느 하나를 선택하여 사용할 수 있다. 또한, 목적하는 추출물은 추가로 통상의 분획 공정을 수행할 수도 있으며, 통상의 정제 방법을 이용하여 정제될 수도 있다.

- [0036] 본 발명의 추출물의 제조방법에는 제한이 없으며, 공지되어 있는 어떠한 방법도 이용될 수 있다. 예를 들면, 본 발명의 조성물에 포함되는 추출물은 상기한 열수 추출 또는 용매 추출법으로 추출된 1차 추출물을, 감압 증류 및 동결 건조 또는 분무 건조 등과 같은 추가적인 과정에 의해 분말상태로 제조할 수 있다. 또한 상기 1차 추출물을 실리카겔 컬럼 크로마토그래피(Silica gel column chromatography), 박층 크로마토그래피(Thin layer chromatography), 고성능 액체 크로마토그래피(High performance liquid chromatography) 등과 같은 다양한 크로마토그래피를 이용하여 추가로 정제된 분획을 얻을 수도 있다. 따라서 본 발명에 있어서 추출물은 추출, 분획 또는 정제의 각 단계에서 얻어지는 모든 추출액, 분획 및 정제물, 그들의 희석액, 농축액 또는 건조물을 모두 포함하는 개념이다.
- [0037] 본 발명의 건강기능식품 조성물은 유효성분인 추출물을 함유하는 것 외에 통상의 식품 조성물과 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다.
- [0038] 상술한 천연 탄수화물의 예는 모노사카라이드, 예를 들어, 포도당, 과당 등; 디사카라이드, 예를 들어 말토스, 슈크로스 등; 및 폴리사카라이드, 예를 들어 텍스트린, 시클로텍스트린 등과 같은 통상적인 당, 및 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알콜이다. 상술한 향미제는 천연 향미제(타우마틴), 스테비아 추출물(예를 들어 레바우디오시드 A, 글리시리히진 등) 및 합성 향미제(사카린, 아스파르탐 등)를 유리하게 사용할 수 있다. 본 발명의 식품 조성물은 상기 약학적 조성물과 동일한 방식으로 제제화되어 기능성 식품으로 이용하거나, 각종 식품에 첨가할 수 있다. 본 발명의 조성물을 첨가할 수 있는 식품으로는 예를 들어, 음료류, 육류, 초코렛, 식품류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 사탕류, 아이스크림류, 알코올 음료류, 비타민 복합제 및 건강보조식품류 등이 있다.
- [0039] 또한, 상기 식품 조성물은 유효성분인 추출물 외에 여러 가지 영양제, 비타민, 광물(전해질), 합성 풍미제 및 천연 풍미제 등의 풍미제, 착색제 및 증진제(치즈, 초콜릿 등), 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알콜, 탄산음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다. 그밖에 본 발명의 식품 조성물은 천연 과일 주스 및 과일 주스 음료 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다.
- [0040] 본 발명의 기능성 식품 조성물은, 정제, 캡슐, 분말, 과립, 액상, 환 등의 형태로 제조 및 가공될 수 있다. 본 발명에서 '건강기능식품 조성물'이라 함은 건강기능식품에 관한 법률 제6727호에 따른 인체에 유용한 기능성을 가진 원료나 성분을 사용하여 제조 및 가공한 식품을 말하며, 인체의 구조 및 기능에 대하여 영양소를 조절하거나 생리학적 작용 등과 같은 보건용도에 유용한 효과를 얻을 목적으로 섭취하는 것을 의미한다. 본 발명의 건강기능성식품은 통상의 식품 첨가물을 포함할 수 있으며, 식품 첨가물로서의 적합 여부는 다른 규정이 없는 한, 식품의약품안전처에 승인된 식품 첨가물 공전의 총칙 및 일반시험법 등에 따라 해당 품목에 관한 규격 및 기준에 의하여 판정한다. 상기 '식품 첨가물 공전'에 기재된 품목으로는 예를 들어, 케톤류, 글리신, 구연산칼슘, 니코틴산, 계피산 등의 화학적 합성물; 감색소, 감초추출물, 결정셀룰로오스, 고량색소, 구아검 등의 천연첨가물; L-글루타민산나트륨 제제, 면류첨가알칼리제, 보존료 제제, 타르색소제제 등의 혼합제제류 등을 들 수 있다. 예를 들어, 정제 형태의 건강기능성식품은 본 발명의 유효성분을 부형제, 결합제, 봉해제 및 다른 첨가제와 혼합한 혼합물을 통상의 방법으로 과립화한 다음, 활택제 등을 넣어 압축성형하거나, 상기 혼합물을 직접 압축 성형할 수 있다. 또한 상기 정제 형태의 건강기능성식품은 필요에 따라 교미제 등을 함유할 수도 있다. 캡슐 형태의 건강기능성식품 중 경질 캡슐제는 통상의 경질 캡슐에 본 발명의 유효성분을 부형제 등의 첨가제와 혼합한 혼합물을 충전하여 제조할 수 있으며, 연질 캡슐제는 본 발명의 유효성분을 부형제 등의 첨가제와 혼합한 혼합물을 젤라틴과 같은 캡셀기체에 충전하여 제조할 수 있다. 상기 연질 캡셀제는 필요에 따라 글리세린 또는 소르비톨 등의 가소제, 착색제, 보존제 등을 함유할 수 있다. 환 형태의 건강기능성식품은 본 발명의 유효성분과 부형제, 결합제, 봉해제 등을 혼합한 혼합물을 기존에 공지된 방법으로 성형하여 조제할 수 있으며, 필요에 따라 백당이나 다른 제피제로 제피할 수 있으며, 또는 전분, 탈크와 같은 물질로 표면을 코팅할 수도 있다. 과립 형태의 건강기능성식품은 본 발명의 유효성분의 부형제, 결합제, 봉해제 등을 혼합한 혼합물을 기존에 공지된 방법으로 입상으로 제조할 수 있으며, 필요에 따라 착향제, 교미제 등을 함유할 수 있다.
- [0042] 일 측면에서, 참김(*Porphyra tenera*) 추출물을 유효성분으로 포함하는 초미세먼지(PM_{2.5})로 인한 염증성 장질환 예방 또는 치료용 약학적 조성물에 관한 것이다.
- [0043] 본 발명의 약학 조성물에는 유효성분 이외에 보조제(Adjuvant)를 추가로 포함할 수 있다. 상기 보조제는 당해

기술분야에 알려진 것이라면 어느 것이나 제한 없이 사용할 수 있다.

- [0044] 본 발명에 따른 약학 조성물은 유효성분을 약학적으로 허용된 담체에 혼입시킨 형태로 제조될 수 있다. 여기서, 약학적으로 허용된 담체는 제약 분야에서 통상 사용되는 담체, 부형제 및 희석제를 포함한다. 본 발명의 약학 조성물에 이용할 수 있는 약학적으로 허용된 담체는 이들로 제한되는 것은 아니지만, 락토스, 텍스트로스, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로스, 메틸 셀룰로스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 들 수 있다.
- [0045] 본 발명의 약학 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.
- [0046] 제제화할 경우에는 통상 사용하는 충전제, 증량제, 결합제, 습윤제, 봉해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제될 수 있다. 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 그러한 고형 제제는 유효성분에 적어도 하나 이상의 부형제, 예를 들면 전분, 칼슘 카르보네이트, 수크로스, 락토오스, 젤라틴 등을 섞어 조제될 수 있다. 또한, 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트, 탈크 같은 윤활제들도 사용될 수 있다. 경구투여를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데, 일반적으로 사용되는 희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수용성용제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제 및 좌제가 포함된다. 비수용성용제, 현탁제로는 프로필렌 글리콜, 폴리에틸렌 글리콜, 올리브유와 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텝솔(Witepsol), 트윈(Tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로젤라틴 등이 사용될 수 있다.
- [0047] 본 발명에 따른 약학 조성물은 개체에 다양한 경로로 투여될 수 있다. 투여의 모든 방식이 예상될 수 있는데, 예를 들면 경구, 정맥, 근육, 피하, 복강내 주사에 의해 투여될 수 있다.
- [0048] 상기 약학 조성물은 다양한 경구 또는 비경구 투여 형태로 제형화될 수 있다.
- [0049] 경구 투여용 제형으로는 예를 들면 정제, 환제, 경질, 연질 캡슐제, 액제, 현탁제, 유화제, 시럽제, 과립제 등이 있는데, 이들 제형은 유효성분 이외에 희석제(예: 락토즈, 텍스트로스, 수크로스, 만니톨, 솔비톨, 셀룰로스 및/또는 글리신), 활택제(예: 실리카, 탈크, 스테아르산 및 그의 마그네슘 또는 칼슘염 및/또는 폴리에틸렌 글리콜)를 추가로 포함할 수 있다. 또한, 상기 정제는 마그네슘 알루미늄 실리케이트, 전분 페이스트, 젤라틴, 트라가칸스, 메틸셀룰로스, 나트륨 카복시메틸셀룰로스 및/또는 폴리비닐피롤리돈과 같은 결합제를 함유할 수 있으며, 경우에 따라 전분, 한천, 알긴산 또는 그의 나트륨 염과 같은 봉해제 또는 비등 혼합물 및/또는 흡수제, 착색제, 향미제 및 감미제를 함유할 수 있다. 상기 제형은 통상적인 혼합, 과립화 또는 코팅 방법에 의해 제조될 수 있다.
- [0050] 또한, 비경구 투여용 제형의 대표적인 것은 주사용 제제이며, 주사용 제제의 용매로서 물, 링거액, 등장성 생리식염수 또는 현탁액을 들 수 있다. 상기 주사용 제제의 멸균 고정 오일은 용매 또는 현탁 매질로서 사용할 수 있으며 모노-, 디-글리세라이드를 포함하여 어떠한 무자극성 고정오일도 이러한 목적으로 사용될 수 있다.
- [0051] 또한, 상기 주사용 제제는 올레산과 같은 지방산을 사용할 수 있다.
- [0053] 일 측면에서, 참김(*Porphyra tenera*) 추출물을 유효성분으로 포함하는 초미세먼지(PM_{2.5})로 인한 염증성 장질환 예방 또는 개선용 화장료 조성물에 관한 것이다.
- [0054] 본 발명의 “화장료 조성물”은 상술한 본 발명의 참김(*Porphyra tenera*)에서 추출한 추출물의 화장품학적 유효량(Cosmetically effective amount) 및 화장품학적으로 허용되는 담체를 포함하여 제조할 수 있다.
- [0055] 본 명세서에서 용어 “화장품학적 유효량”은 상술한 본 발명의 조성물의 미세먼지로 인한 염증성 장질환 개선 효능을 달성하는 데 충분한 양을 의미한다.
- [0056] 화장료 조성물의 외형은 화장품학 또는 피부과학적으로 허용 가능한 매질 또는 기제를 함유한다. 이는 국소적용에 적합한 모든 제형으로, 예를 들면, 용액, 겔, 고체, 반죽 무수 생성물, 수상에 유상을 분산시켜 얻은 에멀전, 현탁액, 마이크로에멀전, 마이크로캡슐, 미세과립구 또는, 이온형(리포솜) 및 비이온형의 소낭 분산제의 형태로, 또는 크림, 스킨, 로션, 파우더, 연고, 스프레이 또는 콘실 스틱의 형태로 제조될 수 있다. 이들 조

성물은 당해 분야의 통상적인 방법에 따라 제조될 수 있다. 본 발명에 따른 조성물은 또한 폼(Foam)의 형태로 또는 압축된 추진제를 더 함유한 에어로졸 조성물의 형태로도 사용될 수 있다.

[0057] 본 발명의 일 실시예에 따른 상기 화장료 조성물은 그 제형에 있어서 특별히 한정되는 바가 없으며, 예를 들면, 유연화장수, 수렴화장수, 영양화장수, 영양크림, 마사지크림, 에센스, 아이크림, 아이에센스, 클렌징크림, 클렌징폼, 클렌징워터, 팩, 파우더, 바디로션, 바디크림, 바디오일 및 바디에센스 등의 화장품으로 제형화될 수 있다.

[0058] 본 발명의 화장료 조성물의 제형이 페이스트, 크림 또는 겔인 경우에는 담체 성분으로서 동물섬유, 식물섬유, 왁스, 파라핀, 전분, 트라칸트, 셀룰로오스 유도체, 폴리에틸렌 글리콜, 실리콘, 벤토나이트, 실리카, 탈크 또는 산화아연 등이 이용될 수 있다.

[0059] 본 발명의 화장료 조성물의 제형이 파우더 또는 스프레이인 경우에는 담체 성분으로서 락토스, 탈크, 실리카, 알루미늄히드록시드, 칼슘 실리케이트 또는 폴리아미드 파우더가 이용될 수 있고, 특히 스프레이인 경우에는 추가적으로 클로로플루오로히드로카본, 프로판/부탄 또는 디메틸 에테르와 같은 추진체를 포함할 수 있다.

[0060] 본 발명의 화장료 조성물의 제형이 용액 또는 유탁액의 경우에는 담체 성분으로서 용매, 용매화제 또는 유탁화제가 이용되고, 예컨대 물, 에탄올, 이소프로판올, 에틸 카보네이트, 에틸 아세테이트, 벤질 알코올, 벤질 벤조에이트, 프로필렌글리콜, 1,3-부틸글리콜 오일, 글리세롤 지방족 에스테르, 폴리에틸렌 글리콜 또는 소르비탄의 지방산 에스테르가 있다.

[0061] 본 발명의 화장료 조성물의 제형이 현탁액인 경우에는 담체 성분으로서 물, 에탄올 또는 프로필렌 글리콜과 같은 액상 희석제, 에톡실화 이소스테아릴 알코올, 폴리옥시에틸렌 소르비톨 에스테르 및 폴리옥시에틸렌 소르비탄 에스테르와 같은 현탁제, 미소결정성 셀룰로오스, 알루미늄 메타히드록시드, 벤토나이트, 아가 또는 트라칸트 등이 이용될 수 있다.

[0062] 본 발명의 화장료 조성물의 제형이 계면-활성제 함유 클린징인 경우에는 담체 성분으로서 지방족 알코올 설페이트, 지방족 알코올 에테르 설페이트, 설포숙신산 모노에스테르, 이세티오네이트, 이미다졸리늄 유도체, 메틸타우레이트, 사르코시네이트, 지방산 아미드 에테르 설페이트, 알킬아미도베타인, 지방족 알코올, 지방산 글리세리드, 지방산 디에탄올아미드, 식물성 유, 리놀린 유도체 또는 에톡실화 글리세롤 지방산 에스테르 등이 이용될 수 있다.

[0063] 본 발명의 화장료 조성물은 스킨, 로션, 크림, 에센스, 팩, 파운데이션, 색조화장품, 선크림, 투웨이케이크, 페이스파우더, 콤팩트, 메이크업베이스, 스킨커버, 아이섀도우, 립스틱, 립글로스, 립픽스, 아이브로우 펜슬, 화장수 등의 화장품 및 샴푸, 비누 등의 세정제에 적용될 수 있다.

[0064] 본 발명의 일 실시예에 따른 화장료 조성물에는 상기 참김(*Porphyra tenera*)에서 추출한 추출물 이외에 기능성 첨가물 및 일반적인 화장료 조성물에 포함되는 성분이 추가로 포함될 수 있다. 상기 기능성 첨가물로는 수용성 비타민, 유용성 비타민, 고분자 펩티드, 고분자 다당, 스팅고 지질 및 해조 엑기스로 이루어진 군에서 선택된 성분을 포함할 수 있다.

[0065] 본 발명의 화장료 조성물에는 또한, 상기 기능성 첨가물과 더불어 필요에 따라 일반적인 화장료 조성물에 포함되는 성분을 배합해도 된다. 이외에 포함되는 배합 성분으로서는 유지 성분, 보습제, 에몰리엔트제, 계면 활성제, 유기 및 무기 안료, 유기 분체, 자외선 흡수제, 방부제, 살균제, 산화 방지제, 식물 추출물, pH 조정제, 알콜, 색소, 향료, 혈행 촉진제, 냉감제, 제한(制汗)제, 정제수 등을 들 수 있다.

[0067] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 보다 자세히 설명한다. 다만, 상기 실시예 및 실험에는 본 발명에 대한 예시로 제시되는 것으로, 당업자에게 주지 저명한 기술 또는 구성에 대한 구체적인 설명이 본 발명의 요지를 불필요하게 흐릴 수 있다고 판단되는 경우에는 그 상세한 설명을 생략할 수 있고, 이에 의해 본 발명이 제한되지는 않는다. 본 발명은 후술하는 특허청구범위의 기재 및 그로부터 해석되는 균등 범주 내에서 다양한 변형 및 응용이 가능하다.

[0069] <준비예 1> 참김(*Porphyra tenera*) 추출물의 제조

[0070] 본 실험에 사용된 참김(*Porphyra tenera*)는 2018년 2월 전라남도 완도에서 채취된 것을 구입하였으며, 염분 및

불순물 제거를 위하여 흐르는 물에 수세하였다. 수세된 김은 동결 건조기(Ilshin Lab Co., Ltd., Yangju, Korea)를 이용하여 건조시키고 분말화하여 냉동보관(-20° C)하였다. 참김 추출물은 건조분말 10 g에 물(증류수)과 80% 에탄올을 각각 500 mL를 첨가하여, 40℃에서 2시간 동안 환류냉각기를 사용하여 추출하였다. 추출물은 No.2 거름종이(Whatman Inc., Kent, UK)를 사용하여, 진공여과하였다. 여과액은 회전진공농축기(N-N series, EYELA Co., Tokyo, Japan)를 이용하여 농축 후, 동결건조하여 냉동보관(-20℃)하며 실험에 사용하였다. 이하의 실험에서 참김 추출물의 혼합물(Mix)은 참김 80% 에탄올 추출물 및 물 추출물을 8:2의 중량비로 혼합하여 실험에 사용하였다.

[0072] <준비에 2> 동물실험 디자인

[0073] 본 실험에 사용된 동물은 6주령의 수컷 BALB/c 마우스(Samtako, Osan, Korea)로부터 구입하였으며, 온도 22±2℃, 상대습도 50±5%를 유지하며 충분한 물과 사료를 지급하는 일정한 사육환경을 유지하였다. 모든 실험은 경상대학교 동물실험 윤리위원회(IACUC 승인번호: GNU-180927-M0050)의 승인하에 수행하였다. 실험동물은 반입 1주일 동안의 적응 기간을 거친 뒤 정상대조군(Normal control; NC), 미세먼지 노출군(PM_{2.5}) 및 참김 추출물 식이군으로 나누어 사육하였다. 미세먼지 군과 참김 추출물 식이 군은 Whole body exposure 챔버 내에서 미세먼지에 노출시켰으며, 정상 대조군은 여과된 공기를 주입시켰다. 참김 물 추출물(Water extract from *P. tenera*; WP)과 참김 혼합물(80% Ethanol extract : Water extract = 8:2; Mix)은 음용수에 녹인 후, 노출 전 50, 200 mg/kg of body weight 농도(WP50, WP200, Mix50, Mix200)로 경구 투여하였다.

[0075] <실험예 1> 대장 길이 개선효과

[0076] 대장 길이는 PBS를 이용하여 장내 대변 및 노폐물 제거 후, 결장에서 직장까지의 길이를 측정하였다. 미세먼지 노출된 마우스의 장관의 변화를 확인하기 위하여, 대장의 길이를 측정한 결과는 도 1과 같다. 대장의 길이는 PM_{2.5}노출군(7.66 cm)에서 정상 대조군(9.80 cm) 대비 약 11.37% 감소를 나타냈다. 반면, 물 추출물 식이군(WP200; 8.43 cm)과 혼합물 식이군(Mix200; 9.10 cm)은 정상 대조군과 비교시 통계적으로 유의적인 수준으로 대장의 길이가 회복되는 것으로 나타났다(도 1a 및 1b).

[0078] <실험예 2> 장내 미생물 군총 변화 측정

[0079] 장내균총(Gut microbiome)의 변화는 동결시킨 대변을 QIAamp DNA stool mini kit(QiagenCanada, Mississauga, ON, Canada)를 사용하여 DNA를 추출하였다. 이후 추출된 DNA는 Next-generation sequencing(NGS) 16S rRNA sequencing 분석법을 사용하여 장내균총을 분석하였다.

[0080] 장내 미생물 군총 변화를 확인한 결과 Phylum에서는 미세먼지 노출에 의해 우점종 군주인 Firmicutes의 감소와 Bacteroidetes의 증가가 관찰되었지만, 물추출물(WP200)과 혼합물(Mix200)의 식이에 의한 개선은 관찰되지 않았다(도 2a).

[0081] Family 에서의 우점 군주로 Lactobacillaceae는 감소된 경향을 나타냈으며, Rikenellaceae는 증가된 경향을 나타냈다. 물 추출물(WP200)과 혼합물(Mix200) 식이는 Lactobacillaceae, Rikenellaceae 유의적인 개선을 나타내는 것을 확인 할 수 있었다(도 2b).

[0082] Genus에서는 미세먼지 노출에 의하여 Lactobacillus(Family; Lactobacillaceae), Alistipes(Family; Rikenellaceae) 군총이 증가하는 변화가 관찰되었다(도 2c). 특히, 대표적인 유익균으로 알려진 Lactobacillus는 미세먼지 노출(1.21%)에 의해 정상 대조군 대비(59.12%) 현저히 감소되는 결과를 나타낸 반면, 물 추출물(WP200; 6.14%)과 김 혼합물(Mix200; 20.06%) 식이를 통하여 개선된 결과를 나타냈다.

[0083] Species에서는 통계적으로 유의적인 차이를 나타내는 53개 군주가 검출되었으며, 그 중 *Lactobacillus murinus* group(Firmicutes; Lactobacillaceae; Lactobacillus)는 정상대조군 57.79%로 우점종으로 나타났다(도 2d). 미세먼지 처리군에서는 1.15%로 현저히 감소된 결과를 나타냈으며, 물 추출물 식이군(WP200; 6.03%)과 혼합물 식이군(Mix200; 19.71%)에서는 다소 개선된 결과를 나타냈다.

[0084] 이러한 결과들은 김추출물 식이가 장내에서 유익균(*Lactobacillus murinus* group)을 높여 줌으로써 효과적으로

미세먼지로 변화된 장내 균총을 개선시키는 것으로 판단된다.

[0086] <실험예 3> 단쇄지방산(Short-chain fatty acids) 분석

[0087] 동결된 대변은 5 mM NaOH를 이용하여 균질화 후, 원심분리(12,000 ×g for 10 min at 4℃)하여 상등액을 취하였다. 상등액 2-ethylbutric acid, propanol/pridine(3:2) 및 Propyl chloromate을 첨가하여 실온에서 1분간 반응시키고, 이를 Hexane으로 추출하여 DB-5MS column(5% phenyl methyl siloxane, 30 m × 0.25 mm, thickness 0.25 μm)과 GC-MS(GC-MS-TQ 8030 triple quadrupole mass spectrometer, Shimadzu, Kyoto, Japan)를 이용하여 분석하였다. 분석 조건은 다음과 같이 진행하였다; Split ratio 50:1, Injection temp 260℃, Column oven temp 60℃, Flow rate 1.0 mL/min. Initial temperature은 40℃에서 5분간 유지하며, 310℃ 가 될 때까지 10℃/min의 비율을 유지하였다.

[0088] 장내 유익 Metabolite인 단쇄 지방산(Acetate, Propionate, Butyrate)을 측정된 결과는 도 3과 같다. PM_{2.5}노출 군(Acetate; 4.16 mM, Propionate; 0.27 mM, Butyrate; 0.42 mM)에서는 정상 대조군(Acetate; 5.39 mM, Propionate; 0.32 mM, Butyrate; 0.70 mM) 대비 Acetate와 Propionate가 감소된 결과를 나타냈고(도 3a 및 도 3b), Butyrate 함량은 통계적으로 유의적인 차이가 없는 것으로 확인되었다(도 3c). 반면, 김 물 추출물 식이군(WP 200; acetate; 9.08 mM, Propionate; 0.38 mM, Butyrate; 2.07 mM)과 김 혼합물 추출물(Acetate; 9.11 mM, Propionate; 0.35 mM, Butyrate; 4.30 mM) 식이군 모두 정상 대조군과의 비교시에도 매우 높은 단쇄지방산 함량을 나타냈다.

[0090] <실험예 4> 초미세먼지 유도성 염증반응에 대한 대장조직에서의 항염증 효과

[0091] 4-1. Western blot법을 활용한 단백질 발현측정

[0092] 조직에서의 단백질 발현은 1% Protease inhibitor cocktails(Thermo Fisher Scientific, Rockford, IL, USA)이 함유되어 있는 ProtinExTM Animalcell/tissue(GeneAll Biotechnology, Seoul, Korea)로 균질화 시켰다. 균질액은 원심분리(13,000 ×g, 12분, 4℃) 시킨 후, 상층액은 Bradford 시약(Bio-rad)을 사용하여 동량의 단백질이 되도록 맞추었다. 이 후, Laemelli buffer(5X)를 첨가하여 95℃에서 5분간 반응시켜, Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel(SDS-PAGE)을 통하여 분리한다. 분리된 단백질은 Polyvinylidene difluoride membrane(Millipore, Billerica, MA, USA)으로 Transfer시켜 5% 탈지유를 사용하여 Blocking 하였다. Blocking 시킨 Membrane은 4℃에서 1:1000로 희석한 1차 항체(Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA)와 함께 반응시켰다. Overnight 후, membrane을 1:5000로 희석한 2차 항체와 함께 실온에서 2시간 동안 반응시켰고, ProNATM ECL Ottimo(TransLab, Daejeon, Korea)를 첨가하여 ChemiDoc(Korea Biomix, Seoul, Korea)를 통해 검출하였다.

[0094] 4-2. Cytokine 분석

[0095] 염증성 Cytokine(IL-6, IL-12(p70), IFN-γ, MCP-1 TNF-α) 분석은 Milliplex MAP mouse high sensitivity T cell magnetic bead panel kit(Merck Millipore, Darmstadt, Germany)를 사용하였으며, MAGPIX[®] instrument(Luminex Corporation, Austin, TX, USA) 분석장비와 xMAP technology and xPONENT 4.2 software를 활용하여 분석하였다.

[0097] 4-3. 결과

[0098] 대장 조직에서의 미세먼지 유도성 염증반응에 대한 참김 추출물의 효과를 측정된 결과는 도 4와 같다. 미세먼지 노출로 인하여 대장 내 Toll-like receptor(TLR)-4의 발현증가 하였으며, 이는 Inhibitor kappa B-alpha(IκB)의 인산화를 유도함으로써 Nuclear factor(NF)-κB와의 결합을 분리하였다. 미세먼지 노출에 의한 NF-κB 경로의 활성화는 염증반응을 유도하는 결과를 나타냈다(도 4a). 대장 조직에서의 NF-κB 경로 활성화는 염증성 Cytokine(IL-6, IL-12, IFN-γ, TNF-α 및 MCP-1) 방출이 증가되는 것으로 나타나 미세먼지 노출에 의한 대장 조직에서의 염증반응이 유도됨을 확인 할 수 있었다(도 4b). 물 추출물 식이군(WP200)과 혼합물 식이군(Mix20

0)은 NF- κ B 경로 활성 억제제를 통해 최종적으로 염증성 cytokine들(IL-6, IL-12, IFN- γ , TNF- α 및 MCP-1)의 방출을 효과적으로 조절함으로써 대장 조직의 염증반응을 효과적으로 조절하는데 도움을 줄 수 있을 것으로 판단된다.

[0100] <실험예 5> 대장 조직의 tight-junction의 보호효과

[0101] Tight-junction은 내재성 막단백질인 오클루딘(Occludin), 클라우딘(Claudins), Junctional adhesion molecular 및 리셀루린(Ricellulin)과 구조 표면 막단백질인 폐쇄 소대(Zonula occluden)로 이루어져 있다. 이는 세포 외부와 내부사이의 물질수송에 관여하는 장벽의 기능을 함으로써 감염이나 염증으로부터 방어하는 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 하지만, 외적인 스트레스에 의해 Tight-junction이 손상되면 투과도가 증가되면, 체내로 독소를 유입하게 된다. 따라서, 미세먼지에 노출된 대장 조직에서 Tight-junction 구성 단백질인 Occludin, Claudin-1의 발현량을 측정하였고, 그 결과는 도 5와 같다. 미세먼지 노출에 의해 occludin와 Claudin-1의 발현이 감소되었으며, 물추출물 식이군(WP200)은 Occludin, Claudin-1의 발현을 모두 개선시키는 것으로 나타났으며, 혼합물 식이군(Mix200)에서는 Occludin의 발현량을 증가 시키는 결과를 나타냈다. 이러한 결과는 미세먼지 유도성 Tight-junction 손상을 참김 추출물이 효과적으로 개선시켜 줌으로써 대장의 기능에 도움을 줄 수 있는 결과로 판단된다.

[0103] <실험예 6> 주요생리활성 물질 분석

[0104] 6-1. 평균 분자량(Molecular weight; Mw) 측정

[0105] 참김 추출물에 함유되어 있는 총 Polysaccharide 함량은 페놀-황산(Phenol-sulfuric acid)법을 변형하여 측정하였다. 추출물에 5% Phenol 용액, 진한 황산을 넣어 20분간 실온에 방치한 후 470 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준물질 Glucose 이용하여 표준곡선을 작성하고, 이에 대입하고 계산하여 나타냈다(표 1).

표 1

Total polysaccharide (%)	Mw (kDa)	sulfate (%)	Relative Area (%)					
			Fucose	Rhamnose	Galactose	Glucose	Xylose	Others
46.23 $\pm$ 0.39	220.49	43.25	6.52	7.83	44.24	-	23.18	18.23

[0109] 6-2. 총 폴리사카라이드(Polysaccharide) 함량 측정

[0110] 참김 추출물의 평균 분자량은 Gel permeation chromatography(HLC-8320, Tosoh Bioscience, Stuttgart, Germany)를 이용하여 측정하였다. 시료는 증류수에 용해시켜 0.45 μ m Nylon filter(Millipore Co., Bedford, MA, USA)로 여과하였다. Tskgel guard PWx1, 2 x TSKgel GMPWx1, TSKgel G2500PWx1(7.8 $\times$ 300 mm, Tosoh Bioscience, Stuttgart, Germany)가 결합된 Column을 사용하여 0.1 M NaNO₃를 이동상으로 하여 1 mL/min으로 RI-detector로 분석하였다(표 1).

[0112] 6-3. 황산염(Sulfate) 함량 측정

[0113] 참김 추출물 0.2 mL에 4% TCA용액 3.8 mL 및 BaCl₂-gelatin시약 1 mL를 첨가하여 교반하고 20분간 방치한 후 360 nm에서 흡광도를 측정하였다. 표준 검량선은 K₂SO₄로 작성하여 황산기 함량을 정량하였다(표 1).

[0115] 6-4. 구성당 분석

[0116] 참김 추출물에 함유되어 있는 구성당 분석은 HPAEC-PAD system(Dionex, Sunnyvale, CA, USA)를 이용하여 측정

하였다. 시료는 Trifluoroacetic acid로 가수분해한 후, 동결건조하고 증류수에 용해시켜 0.45 μ m membrane filter(Millipore Co., Bedford, MA, USA)로 여과하였다. CarboPacTM PA1 column(0.4 $\times$ 25 cm, Dionex, Sunnyvale, CA, USA)을 사용하여 18 mM NaOH/200 mM NaOH를 이동상으로 하여 1 mL/min으로 RI detector로 분석하였다. 구성당의 동정·확인 은 당류 표준품(Fucose, Rhamnose, Galactose, Glucose, Xylose)의 머무름시간(Retention time, Rt)과 비교·검증하여 나타내었다(표 1).

[0118] <실험예 7> UPLC Q-TOF MS를 활용한 생리활성물질 분석

[0119] 주요 생리활성 물질을 동정하기 위해 UPLC IMS-QTOF/MS(Vion, Waters, Milford, MA, USA)를 이용하여 분석하였으며, 시료는 50% 메탄올에 용해한 후 0.2 μ m filter를 이용하여 여과하였다. 컬럼은 C18 column(100 $\times$ 2.1 mm, 3.5 μ m, Agilent, Santa Clara, CA, USA)을 사용하였으며, 이동상 용매로는 0.1% Formic acid가 혼합된 3차 증류수(A)와 0.1% Formic acid가 혼합된 Acetonitrile(B)을 사용하였고, B 용매의 비율 조건은 다음과 같다: 0.1-25% 0-2분, 25-50% 2-8분으로 총 8분간 분석하였다. Electrospray ionization(ESI)의 Positiveion 모드를 사용하여 다음 조건으로 수행되었다: 시료 온도, 100 $^{\circ}$ C; Desolvation line 온도, 400 $^{\circ}$ C; 램프 충돌 에너지, 10-30 v; 모세관 전압, 2.5 kV. 검출된 물질들은 50-1500 m/z 범위 내에서 분석되었다.

[0120] 참김 물 추출물의 주요한 생리활성물질을 분석한 결과는 도 6 및 표 2와 같다. Peak 1과 Peak 2(0.85, 1.58 min); Porphyra-334 isomer(m/z 347.1450; 303, 244, 227, 186), Peak 3(4.36 min); Palythene(m/z 285.1438; 241, 197), Peak 4(4.93 min); Palythenic acid(m/z 329.1333; 279, 253, 233, 205, 187, 150), Peak 5(9.92 min); Pheophorbide a(m/z 593.2760; 533, 460, 447)로 5가지 물질이 동정 및 검출되었다. Porphyra-334, Palythene, Palythenic acid는 해조류에 존재하는 것으로 알려진 Mycosporine-like Amino acids 계열의 생리활성 물질이며, Phaophorbide a는 Chlorophyll a 유래의 항산화물질로 확인되었다.

표 2

Retention time (min)	ESI+ (m/z)	Collision energy (eV)	Fragment ion	Identified compounds
0.85	347.1450	25	303, 244, 227, 200, 186	porphyra-334 isomer
1.58	347.1450	25	303, 244, 227, 200, 186	porphyra-334 isomer
4.36	285.1438	25	241, 197	palythene
4.93	329.1333	20	279, 253, 233, 205, 187, 150	palythenic acid
9.92	593.2760	40	533, 460, 447	pheophorbide a

[0124] <실험예 8> 통계처리

[0125] 모든 실험은 반복 실행 후, mean $\pm$ SD로 나타냈다. 실험 결과의 통계적 유의성은 SAS software(Version 9.1, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA)를 이용하여 평균값에 대한 유의성 검증은 One-way analysis of variance(ANOVA)에 의하여 계산되었으며, 각 그룹 간의 유의성은 Duncan의 다중범위검정법(Duncan's new multiple-range test)으로 유의차를 5% 수준($p < 0.05$)에서 검증하였다.

[0127] 이제까지 본 발명에 대하여 그 바람직한 실시 예들을 중심으로 살펴보았다.

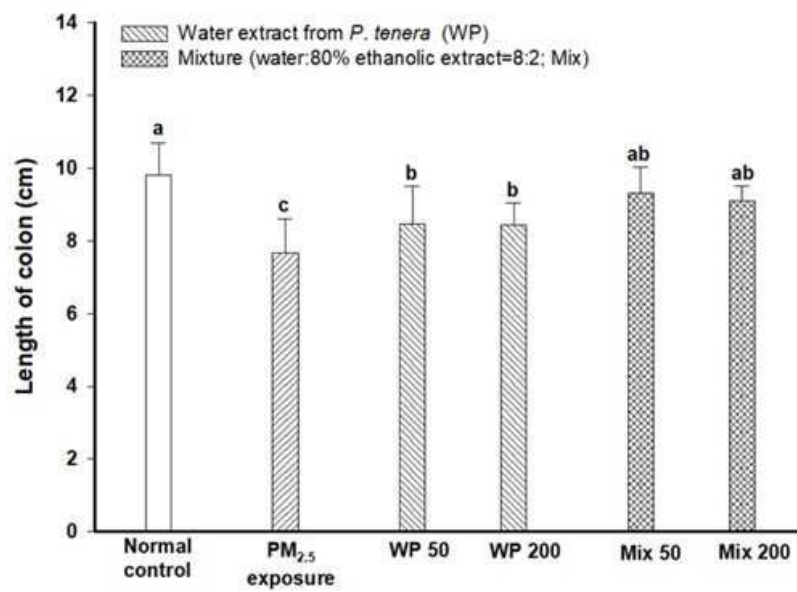
[0128] 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자는 본 발명이 본 발명의 본질적인 특성에서 벗어나지 않는 범위에서 변형된 형태로 구현될 수 있음을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 개시된 실시 예들은 한정적인 관점이 아니라 설명적인 관점에서 고려되어야 한다. 본 발명의 범위는 전술한 설명이 아니라 특허청구 범위에 나타나 있으며, 그와 동등한 범위 내에 있는 모든 차이점은 본 발명에 포함된 것으로 해석되어야 할 것이다.

도면

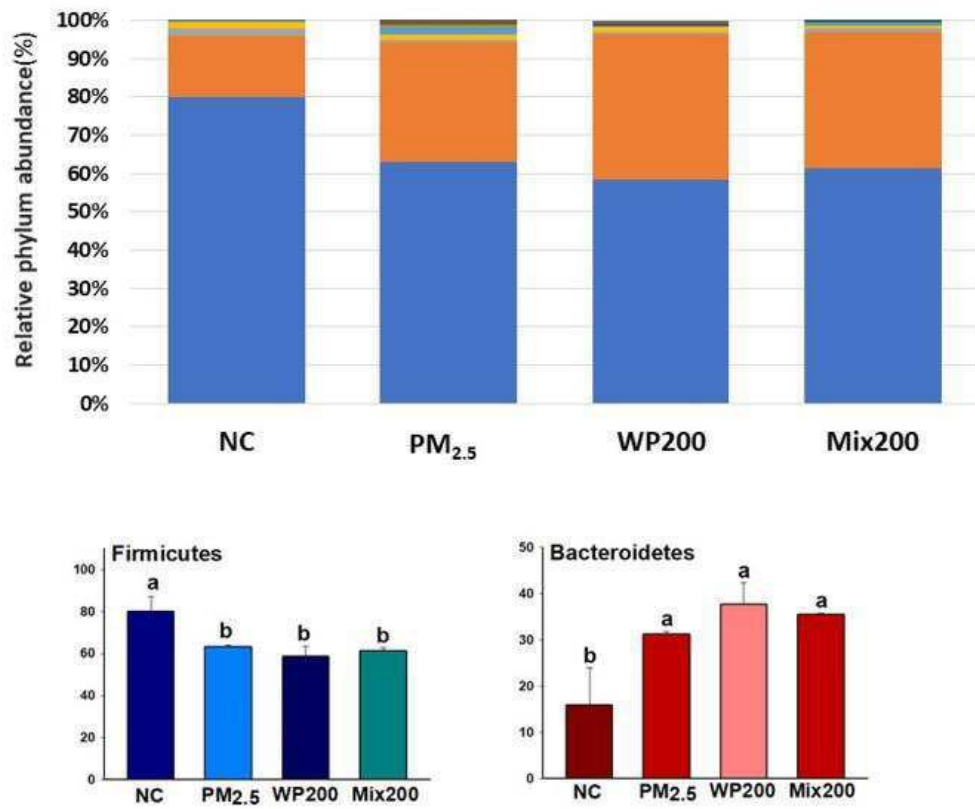
도면1a



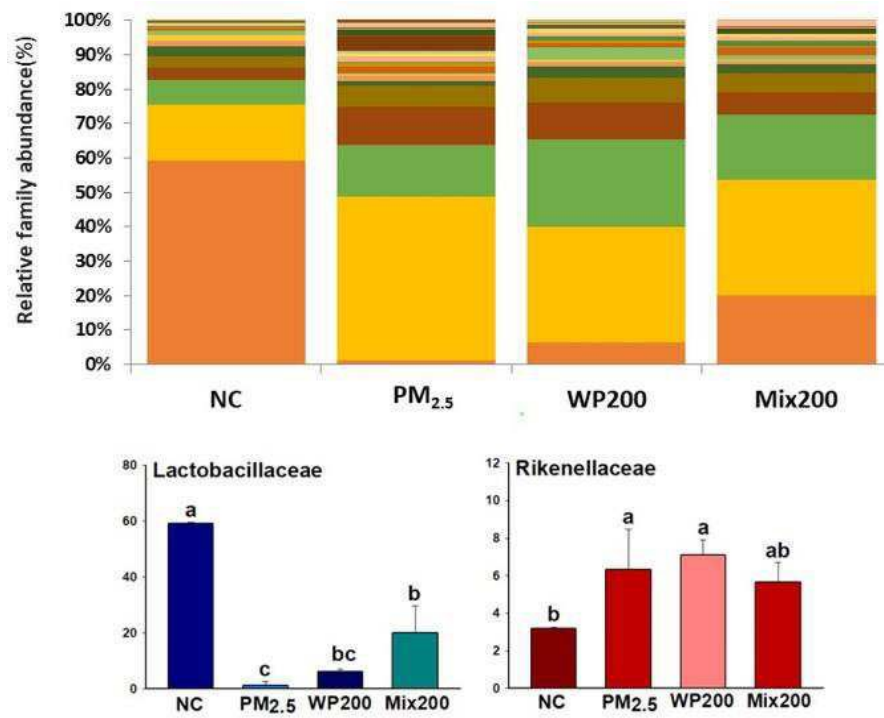
도면1b



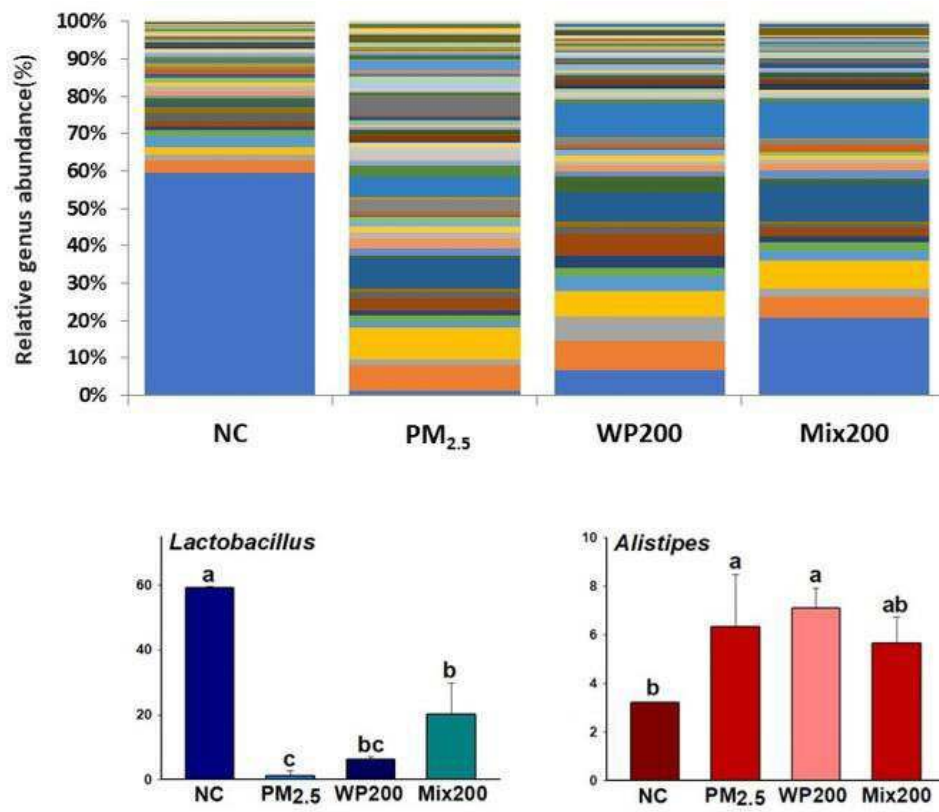
도면2a



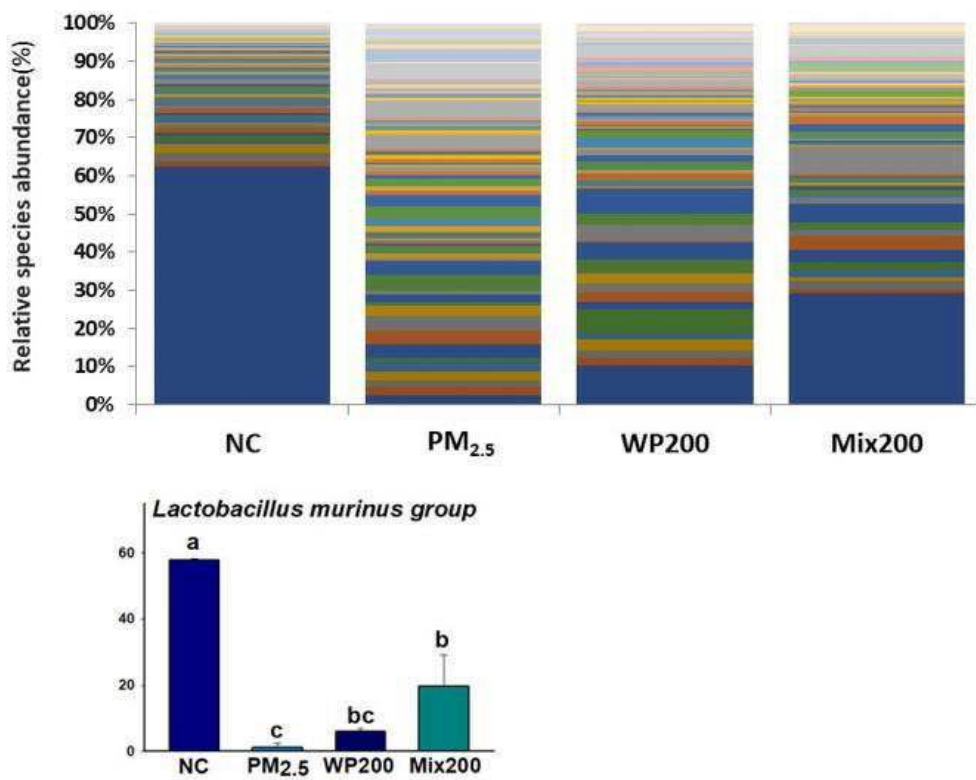
도면2b



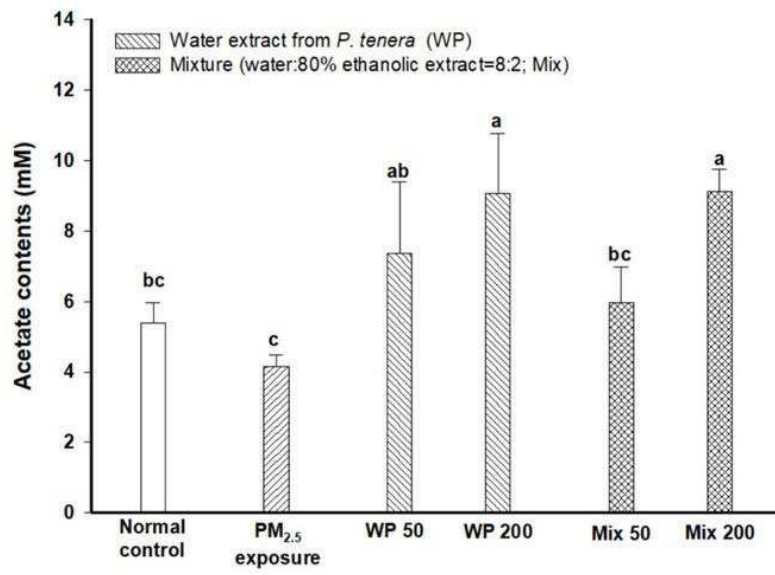
도면2c



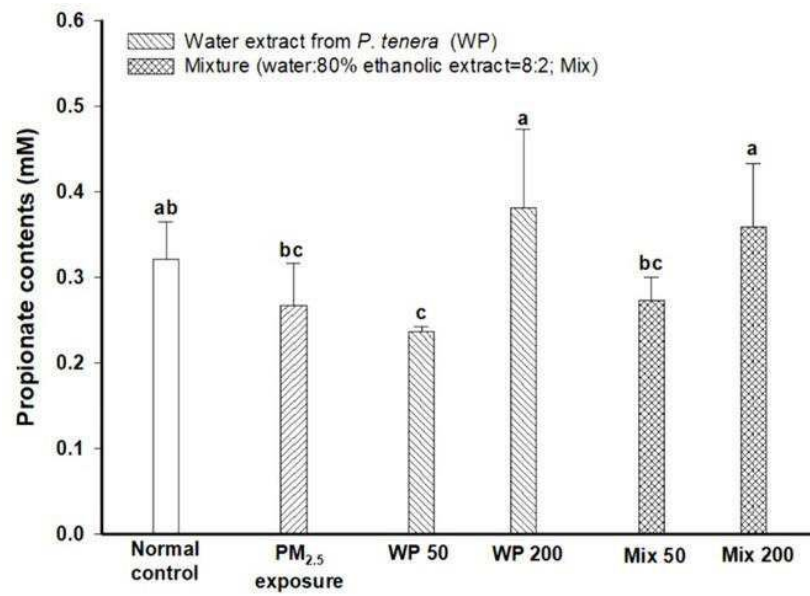
도면2d



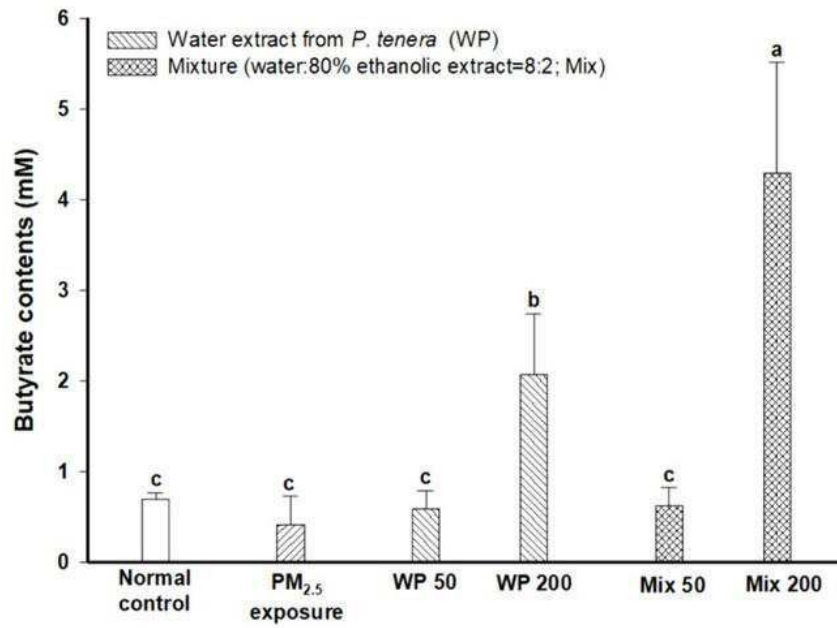
도면3a



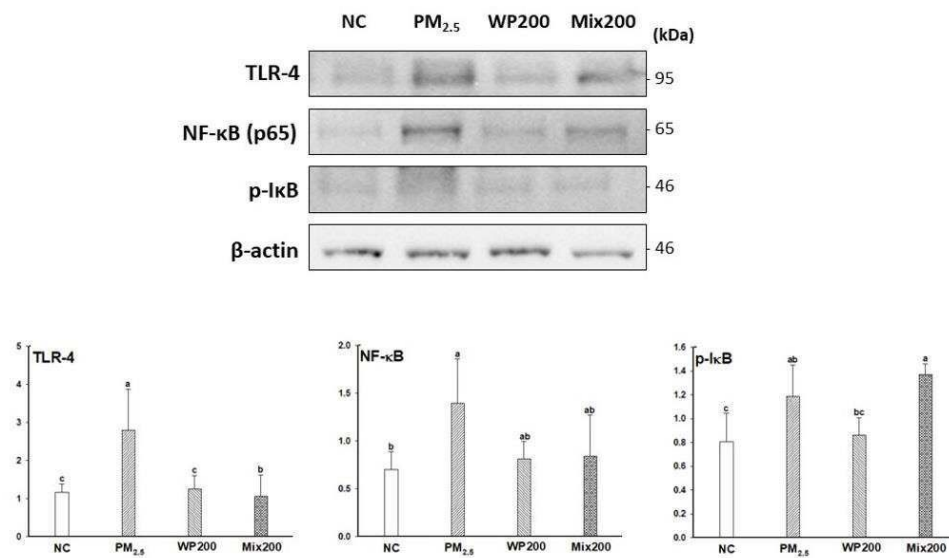
도면3b



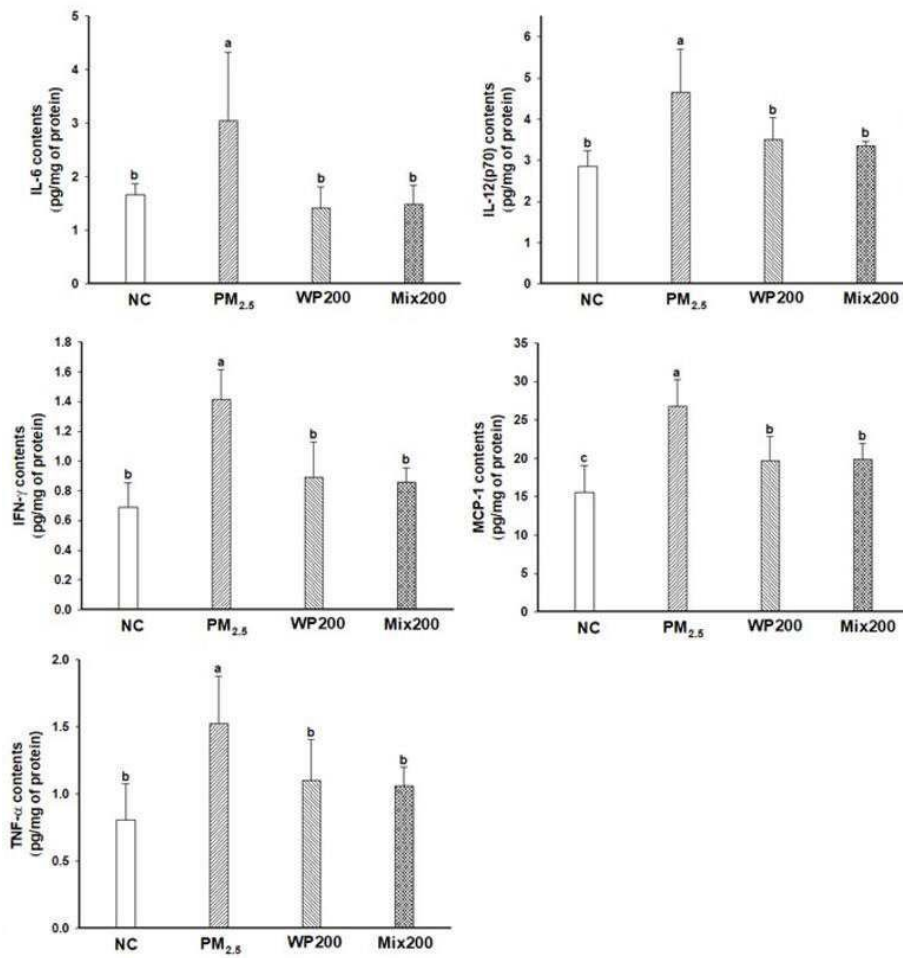
도면3c



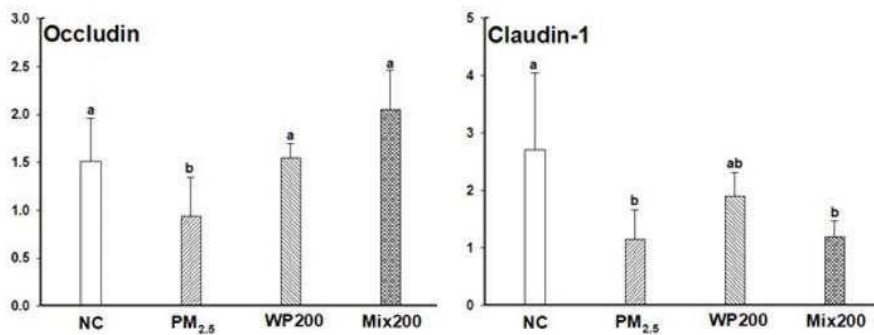
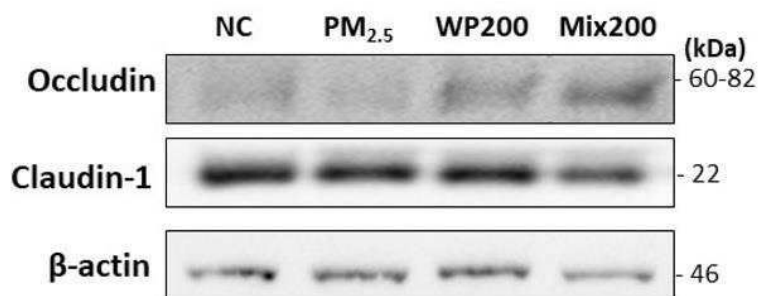
도면4a



도면4b



도면5



도면6

