



등록특허 10-2765142



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2025년02월07일

(11) 등록번호 10-2765142

(24) 등록일자 2025년02월04일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 8/9717 (2017.01) A61K 31/731 (2006.01)

A61K 36/04 (2006.01) A61K 8/73 (2006.01)

A61P 17/00 (2006.01) A61P 17/18 (2006.01)

A61P 29/00 (2023.01) A61P 39/06 (2006.01)

A61Q 19/00 (2006.01) A61Q 19/02 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61K 8/9717 (2017.08)

A61K 31/731 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2024-0014341

(22) 출원일자 2024년01월30일

심사청구일자 2024년01월30일

(56) 선행기술조사문헌

KR102493311 B1*

KR102493312 B1*

US03907770 A*

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자

조선대학교산학협력단

광주광역시 동구 조선대길 126(서석동, 산학협력단)

(72) 발명자

이숙영

광주광역시 남구 봉선중앙로 46 삼익아파트 108동 201호

최다인

광주광역시 광산구 침단중앙로181번길 42-25 침단선경아파트 105동 801호

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

기술특허법인

전체 청구항 수 : 총 7 항

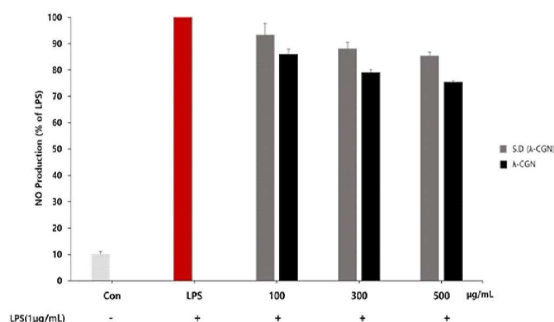
심사관 : 강신건

(54) 발명의 명칭 **해조류 유래 피부재생용 람다카라기난 추출 방법**

(57) 요약

본 발명은 람다-카라기난을 고수율로 얻을 수 있는 람다-카라기난 함유 추출물의 제조 방법, 그리고 그렇게 수득된 추출물을 함유하는 화장품 조성물 또는 약학 조성물에 관한 것이다.

대표도 - 도10



(52) CPC특허분류

- A61K 36/04 (2013.01)
- A61K 8/73 (2013.01)
- A61P 17/00 (2018.01)
- A61P 17/18 (2018.01)
- A61P 29/00 (2023.02)
- A61P 39/06 (2018.01)
- A61Q 19/00 (2013.01)
- A61Q 19/007 (2013.01)
- A61Q 19/02 (2013.01)

김민성

광주광역시 서구 금화로 59 205동 1103호

(72) 발명자

김진

광주광역시 동구 밤실로 150 두암그린파크 105-608

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1425182237
과제번호	S3311074
부처명	중소벤처기업부
과제관리(전문)기관명	중소기업기술정보진흥원
연구사업명	산학연플랫폼협력기술개발
연구과제명	홍조류 유래 천연 다당류를 함유한 피부 재생 및 안정성 강화 점착성 투명 창상피복재 개발
과제수행기관명	조선대학교산학협력단
연구기간	2022.07.01 ~ 2024.06.30

명세서

청구범위

청구항 1

돌가사리, 꼬시래기, 꼬물꼬시래기 및 불등풀가사리를 용매로 가열 추출하는 단계;
상기 추출물을 냉각하며 겔을 분리하여, 추출 용액을 얻는 단계; 및
상기 추출 용액에 알코올을 가하고 침전물을 분리하는 단계;를 포함하고,
상기 용매는 수산화칼슘 및 염화칼륨 수용액이고,
상기 겔의 분리는 추출 용액의 온도 $50 \pm 2^\circ\text{C}$, $45 \pm 2^\circ\text{C}$, $30 \pm 2^\circ\text{C}$, $5 \pm 2^\circ\text{C}$ 에서 각각 수행되는 람다-카라기난 함유 추출물의 수득 방법.

청구항 2

청구항 1에 있어서, 상기 돌가사리, 꼬시래기, 꼬물꼬시래기 및 불등풀가사리는 분말형인 람다-카라기난 함유 추출물의 수득 방법.

청구항 3

청구항 1에 있어서, 상기 추출은 돌가사리 30 내지 50중량부, 꼬시래기 30 내지 50중량부, 꼬물꼬시래기 5 내지 15중량부, 불등풀가사리 5 내지 15중량부의 혼합물을 추출하는 것인 람다-카라기난 함유 추출물의 수득 방법.

청구항 4

삭제

청구항 5

청구항 1에 있어서, 상기 가열은 55 내지 65℃로, 상기 냉각은 0 내지 10℃까지 수행되는 람다-카라기난 함유 추출물의 수득 방법.

청구항 6

삭제

청구항 7

청구항 1 내지 3 및 5 중 어느 한 항의 방법으로 추출된 람다-카라기난 함유 추출물을 포함하는 화장료 조성물.

청구항 8

청구항 8에 있어서, 항산화, 항염증, 피부 주름 개선, 피부 탄력 개선 또는 보습용인 화장료 조성물.

청구항 9

청구항 1 내지 3 및 5 중 어느 한 항의 방법으로 추출된 람다-카라기난 함유 추출물을 포함하는 항산화, 항염증

또는 피부 주름의 예방 또는 개선용 약학 조성물.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 해조류 유래 피부재생용 람다카라기난 추출 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 다세포성 거대조류 (macroalgae)는 빛깔을 바탕으로 녹조류 (green algae), 홍조류 (red algae), 갈조류 (brown algae)로 나뉘며 해조류 (seaweeds)라고 부른다. 홍조류는 김과 우뚝가사리가 대표종 으로서 53-70%의 총 탄수화물 함량과 agarose, carrageenan 및 porphyrin 등의 다당류가 포함되어 있으며 갈조류는 미역, 다시마, 톳, 모자반 등이 대표종으로서 45-60%의 총 탄수화물 함량과 alginate, fucoidan, laminaran 및 mannitol 등의 다당류를 포함하고 있다.

[0004] 홍조 다당류인 카라기난은 Irish moss라고 하는 홍조류인 진두발속(Chondrus), 돌가사리속 (Gigartina)의 해초를 뜨거운 물 또는 뜨거운 알칼리성 수용액으로 추출한 다음 정제한 점질성 다당류를 나타내며 카라기난의 종류는 화학의 구조, 황화 패턴, 황산염 그룹 번호 및 해조류 공급원에 따라 다르며, 젤을 형성하고 친수성을 가지고 있어서 생체 고분자로서 약물전달 시스템으로도 사용되고 있다. 또한 상처 치유에 효과 적인 소재라고 알려져 있다.

선행기술문헌

특허문헌

[0006] (특허문헌 0001) 한국공개특허 2014-0029897

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명은 람다-카라기난을 고수율로 얻을 수 있는 람다-카라기난 함유 추출물의 수득 방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

[0009] 본 발명은 돌가사리, 꼬시래기, 꼬물꼬시래기 및 불등풀가사리를 용매로 가열 추출하는 단계; 상기 추출물을 냉각하며 젤을 분리하여, 추출 용액을 얻는 단계; 및 상기 추출 용액에 알코올을 가하고 침전물을 분리하는 단계;를 포함하는 람다-카라기난 함유 추출물의 수득 방법에 관한 것이다.

[0010] 본 발명의 방법에서, 상기 돌가사리, 꼬시래기, 꼬물꼬시래기 및 불등풀가사리는 분말형일 수 있다.

[0011] 본 발명의 방법에서, 상기 추출은 돌가사리 30 내지 50중량부, 꼬시래기 30 내지 50중량부, 꼬물꼬시래기 5 내지 15중량부, 불등풀가사리 5 내지 15중량부의 혼합물을 추출하는 것일 수 있다.

[0012] 본 발명의 방법에서, 상기 용매는 수산화칼슘 및 염화칼륨 수용액일 수 있다.

[0013] 본 발명의 방법에서, 상기 가열은 55 내지 65℃로, 상기 냉각은 0 내지 10℃까지 수행되는 것일 수 있다.

[0014] 본 발명의 방법에서, 상기 젤의 분리는 추출 용액의 온도 50 ± 2 °C, 45 ± 2°C 1회, 30 ± 2°C, 5 ± 2°C에서 각각 수행되는 것일 수 있다.

[0015] 또한, 본 발명은 상기 중 어느 하나의 방법으로 추출된 람다-카라기난 함유 추출물을 포함하는 화장료 조성물에 관한 것이다.

[0016] 상기 화장료 조성물은 항산화, 항염증, 피부 주름 개선, 피부 탄력 개선 또는 보습용일 수 있다.

[0017] 또한, 본 발명은 상기 중 어느 하나의 방법으로 추출된 람다-카라기난 함유 추출물을 포함하는 약학 조성물에

관한 것이다. 이는 항산화, 항염증 또는 피부 노화의 예방 또는 치료용일 수 있다.

발명의 효과

[0019] 본 발명의 방법은 높은 수율로 람다-카라기난을 추출할 수 있다.

[0020] 본 발명의 방법은 람다-카라기난 대비 우수한 효과를 갖는 람다-카라기난 함유 추출물을 얻을 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0022] 도 1은 각 홍조류 분말을 나타낸 것이다.

도 2는 홍조류로부터 람다-카라기난 함유 추출물을 얻는 공정 개략도이다.

도 3, 4는 대조군과 시험군의 FT-IR 스펙트럼 분석 결과이다.

도 5는 람다-카라기난 함유 추출물의 세포 독성 평가 결과이다.

도 6은 람다-카라기난 함유 추출물 처리에 따른 히알루론산 생성 결과이다.

도 7은 람다-카라기난 함유 추출물의 세포 독성 평가 결과이다.

도 8은 람다-카라기난 함유 추출물의 콜라겐 분해 효소 활성 저해 평가 결과이다.

도 9는 람다-카라기난 함유 추출물의 세포 독성 평가 결과이다.

도 10은 람다-카라기난 함유 추출물의 NO 생성 억제 평가 결과이다.

도 11은 람다-카라기난 함유 추출물의 ROS 소거능 평가 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0023] 이하 본 발명을 상세히 설명한다.

[0025] 본 발명은 람다-카라기난 함유 추출물의 수득 방법에 관한 것이다.

[0026] 본 발명의 방법은 돌가사리, 꼬시래기, 꼬물꼬시래기 및 불등풀가사리를 용매로 가열 추출하는 단계; 상기 추출물을 냉각하며 겔을 분리하여, 추출 용액을 얻는 단계; 및 상기 추출 용액에 알코올을 가하고 침전물을 분리하는 단계;를 포함한다.

[0027] 추출 대상은 홍조류인 돌가사리, 꼬시래기, 꼬물꼬시래기 및 불등풀가사리이다.

[0028] 이는 전초로서 또는 분말의 형태로 사용될 수 있다. 분말은 예를 들면 수세, 탈염, 건조하고 분쇄하여 얻어진 것일 수 있다. 분말은 예를 들면 입경 5mm 이하일 수 있다.

[0029] 돌가사리, 꼬시래기, 꼬물꼬시래기 및 불등풀가사리는 예를 들어, 돌가사리 30 내지 50중량부, 꼬시래기 30 내지 50중량부, 꼬물꼬시래기 5 내지 15중량부, 불등풀가사리 5 내지 15중량부의 혼합비로 사용될 수 있다.

[0030] 추출 용매는 물, 탄소수 1 내지 4의 알코올 또는 이들의 조합일 수 있고, 바람직하게는 물일 수 있다.

[0031] 추출 용매는 수산화칼슘 및 염화칼륨을 용해한 것일 수 있다. 수산화칼슘은 예를 들면 0.005 내지 0.1M, 0.005 내지 0.02M 등의 농도일 수 있다. 염화칼륨은 예를 들면 0.1 내지 0.5중량%, 0.1 내지 0.3중량%, 0.1 내지 0.2중량% 등의 농도일 수 있다.

[0032] 가열은 예를 들면 55 내지 65℃로 수행될 수 있다.

[0033] 추출은 예를 들면 30분 내지 8시간, 30분 내지 4시간, 30분 내지 2시간, 30분 내지 90분 등으로 수행될 수 있다.

[0034] 이후 상기 추출물을 냉각하며 겔을 분리하여, 추출 용액을 얻는다.

[0035] 냉각은 예를 들면 0 내지 10℃까지 수행될 수 있다.

[0036] 추출물을 냉각하면 겔화되는데, 이 겔을 제거하여 추출 용액을 얻을 수 있다.

[0037] 겔의 분리는 상기 냉각 이후에 수행될 수 있다.

- [0038] 겔의 분리는 냉각 중에 단계를 나누어 복수회 수행될 수도 있다. 그 기준은 추출 용액의 온도일 수 있다. 예를 들어, 온도 $50 \pm 2^\circ\text{C}$ 에서 1회, $45 \pm 2^\circ\text{C}$ 에서 1회, $30 \pm 2^\circ\text{C}$ 에서 1회, $5 \pm 2^\circ\text{C}$ 에서 1회 제거할 수 있다. 이에 의해 추출 수율을 높일 수 있다.
- [0039] 이후, 상기 추출 용액에 알코올을 가하고 침전물을 분리한다.
- [0040] 사용되는 알코올은 탄소수 1 내지 4의 알코올일 수 있고, 바람직하게는 에탄올일 수 있다.
- [0041] 알코올을 가하면 침전물이 발생한다. 이는 감마-카라기난 함유 추출물로서, 이를 분리하여 감마-카라기난 함유 추출물을 수득할 수 있다.
- [0042] 알코올은 예를 들면 추출 용액의 2 내지 10부피배, 2 내지 8부피배 등으로 가할 수 있다.
- [0043] 침전은 복수회 수행할 수 있다. 알코올을 1회 가하고 지속 침전시킬 수도 있고, 알코올 추가 및 침전을 복수회 수행할 수도 있다. 복수회는 예를 들면 2회, 3회, 4회, 5회 이상일 수 있고, 20회, 15회, 10회 이하일 수 있다.
- [0044] 필요에 따라, 침전물을 건조할 수 있다.
- [0045] 상기 방법으로 얻어지는 감마-카라기난 함유 추출물은 감마-카라기난을 고함량으로 함유하는 것으로, 본 발명의 방법은 홍조류로부터 감마-카라기난을 고수율로 추출할 수 있다. 또한, 이는 감마-카라기난 외의 성분들이 혼합된 혼합물로서, 동일 농도의 감마-카라기난 대비 콜라게나아제 활성, 항산화, 항염증 활성 등이 우수하다. 이에, 화장료 조성물, 항산화, 항염증용 조성물 등으로 사용될 수 있다.
- [0047] 또한, 본 발명의 상기 방법으로 수득된 감마-카라기난 함유 추출물을 포함하는 화장료 조성물에 관한 것이다.
- [0048] 상기 감마-카라기난 함유 추출물은 콜라겐을 자극하고, 항산화, 항염증, 보습 등의 효과를 나타내어, 화장료 조성물에 포함될 수 있다. 이에, 피부 주름, 탄력 개선, 항산화, 항염증, 보습 등의 기능성을 나타낼 수 있다.
- [0049] 본 발명의 화장료 조성물은 용액, 외용 연고, 크림, 폼, 영양 화장수, 유연 화장수, 향수, 팩, 유연수, 유액, 메이크업 베이스, 에센스, 비누, 액체 세정료, 입욕제, 선 스크린 크림, 선 오일, 현탁액, 유탕액, 페이스트, 겔, 로션, 파우더, 비누, 계면활성제-함유 클렌징, 오일, 분말 파운데이션, 유탕액 파운데이션, 왁스 파운데이션, 패취 및 스프레이로 구성된 군으로부터 선택되는 제형으로 제조할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0050] 본 발명의 화장료 조성물은 일반 피부 화장료에 배합되는 화장품학적으로 허용 가능한 담체를 1 종 이상 추가로 포함할 수 있으며, 통상의 성분으로 예를 들면 유분, 물, 계면활성제, 보습제, 저급 알콜, 증점제, 킬레이트제, 색소, 방부제, 향료 등을 적절히 배합할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.
- [0051] 본 발명의 화장료 조성물에 포함되는 화장품학적으로 허용 가능한 담체는 제형에 따라 다양하다.
- [0053] 또한, 본 발명은 상기 방법으로 수득된 감마-카라기난 함유 추출물을 포함하는 약학 조성물에 관한 것이다.
- [0054] 본 발명의 약학 조성물은 항산화, 항염증, 피부 노화(피부 주름 개선, 피부 탄력 개선 등을 포함) 등의 약효를 나타낼 수 있다.
- [0055] 본 발명의 약학 조성물은, 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀전, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 및 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용될 수 있다. 본 발명의 조성물에 함유될 수 있는 담체, 부형제 및 희석제로는 락토오스(lactose), 텍스트로즈, 수크로스(sucrose), 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. 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 봉해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다. 경구 투여를 위한 고형제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제에는 상기 화합물에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트(calcium carbonate), 수크로스 또는 락토오스, 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 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. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수용성제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제, 좌제가 포함된다. 비수용성제, 현탁제로는 프로필렌글리콜(propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텟솔(witepsol),

마크로콜, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다.

[0056] 본 발명의 약학 조성물의 사용량은 환자의 나이, 성별, 체중에 따라 달라질 수 있으나, 0.01 내지 100mg/kg으로, 바람직하게는 0.1 내지 10mg/kg을 일일 1회 내지 수회 투여할 수 있다. 또한 그 투여량은 투여경로, 질병의 정도, 성별, 체중, 나이 등에 따라서 증감될 수 있다. 따라서 상기 투여량은 어떠한 면으로든 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.

[0058] **실시예**

[0059] **람다-카라기난의 추출**

[0060] 돌가사리 분말, 꼬시래기 분말, 꼬물꼬시래기 분말, 불등풀가사리 분말을 준비하였다(도 1). 분말은 원물을 12 시간에서 24시간 동안 수세 및 탈염한 후 배수가 잘 되도록 걸여둔 다음 수분 함량이 0.05%~ 1% 이내가 되도록 건조하고 0.5mm 이하가 되도록 분쇄하여 제조되었다.

[0061] 제조된 분말을 돌가사리 4: 꼬시래기 4: 꼬물꼬시래기 1: 불등풀가사리 1의 비율로 100g을 준비하였다. 이를 0.01M Ca(OH)₂, 및 15g의 KCl을 녹인 1L 수용액에 첨가하고, 60℃에서 1시간 동안 추출한 후 5℃까지 냉각하였다. 냉각 중에 단계별로 겔을 제거하였다.

[0062] 먼저, 온도 50℃에서 1회, 45℃에서 1회, 30℃에서 1회 제거, 그리고 5℃에서 1회 제거하여 추출 용액만을 얻었다.

[0063] 이후, 추출 용액에 5배 부피의 에탄올을 첨가하여, 침전물을 감마-카라기난으로 간주하여 이를 5회 이상 지속 분리하였고, 이를 동결 건조하였다(도 2).

[0065] **수득률 비교**

[0066] 홍조류 분말의 비율을 달리하며, 상기와 동일한 방법으로 람다-카라기난을 추출하여 그 수득률을 비교하였다. 수득률은 하기 식 1과 같이 계산되었다. 이를 참고하면, 돌가사리 4: 꼬시래기 4: 꼬물꼬시래기 1: 불등풀가사리 1의 비율이 가장 수율이 높은 것을 알 수 있다.

[0068] [식 1]

[0069] 추출수율(Extraction Yield)= [홍조류 4종 추출 동결건조 분말의 무게(g)/ 홍조류 4종의 분말의 무게(g)]*100

표 1

구분	1	2	3
돌가사리	25%	40%	30%
꼬시래기	25%	40%	30%
꼬물꼬시래기	25%	10%	20%
불등풀가사리	25%	10%	20%
수율	8.6	12.2	10.2

[0073] **FT-IR로 람다-카라기난 확인**

[0074] 상기 추출된 람다-카라기난에 대해 FT-IR (Fourier-transform infrared) 6300FV+IRT5000 (Jasco, Tokyo, Japan) 측정을 하였다(도 3, 4).

[0075] (a)는 대조군인 시그마 알드리치사의 람다-카라기난, (b)는 시험군의 FT-IR 스펙트라이다. 추출된 람다-카라기난에서 β-D-galactose-2-sulfate 의 830 cm⁻¹ 지역에서 부근 피크를 포함하여 표준 시그마 제조사 람다카라기난과 유사한 구조가 확인되었다.

[0077] **지표 성분 분석 (λ-carrageenan 구성당 분석 HPLC)**

[0078] 구성당 분석은 HPAEC (High Performance Anion-Exchange Chromatography) (HPAEC-PAD, Dionex, USA)으로 분석하였고 CarboPac PA1 Analytical (4×250 mm), PA1 Guard(4×50 mm) column을 사용하였다.

[0079] 결과, 홍조류 4종에서 분리한 λ-carrageenan 의 동결건조 파우더를 전처리 후 다음과 같은 조건으로 HPLC 분석한 결과 galactose 55%, glucose 25% 비율로 확인되었다.

표 2

Item	Condition
Instrument	HPAEC (High Performance Anion-Exchange Chromatography) (HPAEC-PAD, Dionex , USA)
Detector	PAD (Pulsed Amperometric Detector)
Column	CarboPac PA1 Analytical (4×250 mm), PA1 Guard(4×50 mm)
Temperature	30°C
Injection volume	15 µL
Flow	1.0 mL/min
Solvent	18 mM NaOH

[0081]

표 3

Sample	Galactose	Glucose
λ-carrageenan	55.32	25.14

[0083]

[0085] 세포 유효성 평가

[0086] HaCaT(인간피부각질) 세포 독성평가

[0087] HaCaT(인간피부각질) 세포를 96-well plate에 1×10^4 cells/well 농도로 분주한 후 10% fetal bovine serum(FBS, Gibco, Grand Island, NY)과 1% antibiotic-antimycotic(Gibco, Grand Island, NY)이 첨가된 Dulbecco's Modified Essential Medium(DMEM, Gibco, Grand Island, NY)에 배양하였다. 24시간 후 시료를 DMEM에 희석하여 처리한 후 다시 24시간 동안 배양하였다. 이후 배지를 제거하고 0.5 mg/mL 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2-Diphenyltetrazolium Bromide (MTT, sigma-aldrich, St. Louis, MO, USA)용액 100 µL를 처리한 뒤 10분 동안 배양기에서 배양하였다. 이후 MTT 용액이 포함된 배지를 제거하고 생성된 formazan을 DMSO를 이용해 녹인 다음 540 nm에서 microplate reader(Molecular Devices, San Jose, CA, USA)를 이용하여 흡광도를 측정하였다(도 5).

[0088] Hacat cell 에서 λ-carrageenan 5000 µg/mL(즉 5mg) 까지 세포 독성이 없는 것으로 나타났다. 대조군과 λ-carrageenan 을 50, 100, 300, 500, 700, 1000, 2000, 3000, 5000 µg/mL의 농도로 HaCaT 세포에 처리한 결과, 대조군은 117.81, 118.47, 108.60, 105.79, 96.60, 85.07, 87.03, 71.45, 54.76%, λ-carrageenan 은 113.34, 115.39, 118.78, 112.92, 114.21, 122.57, 113.37, 113.00, 102.93%의 세포 생존율을 나타냈다.

[0089] HaCaT(인간피부각질) 세포에서 Hyaluronic acid 생성량 측정

[0090] HaCaT 세포를 24 well plate에 1×10^4 cells/well의 농도로 분주하여 배양한 후, FBS가 첨가되지 않은 DMEM로 교체하여 18시간 starvation하였다. 각 시료를 농도별로 희석하여 처리하고 24시간 동안 배양하였다. 배양된 세포의 배지를 회수한 후 Enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA) kit(abcam, Cambridge, UK)를 이용하여 제조사의 메뉴얼에 따라 수행한 후 측정하였다(도 6).

- [0091] 세포 독성을 나타내지 않았던 농도 범위에서 각각의 시료를 HaCaT 세포에 처리한 뒤 hyaluronic acid 생성에 미치는 영향을 ELISA를 이용하여 평가하였다. S.D(λ -CGN) 표준물질과 λ -CGN 을 100, 300, 500 μ g/mL의 농도로 24시간 동안 처리한 결과, S.D(λ -CGN) 표준물질은 Control에 비해 41.46%, 59.46%, 74.65% λ -CGN 은 28.08%, 41.38%, 66.70% 농도 의존적으로 증가됨을 확인하였고 표준물질에 비해 유의미한 의미로 hyaluronic acid 생성량이 더 높았다.
- [0092] **CCD-986sk(인간피부섬유모세포) 세포 독성평가**
- [0093] CCD-986sk세포는 10% FBS와 1% antibiotic-antimycotic이 첨가된 Iscove's Modified Dulbecco's Media (IMDM, Gyeongsan, Korea)를 사용하여 37℃, 5% CO₂ 조건이 유지되는 배양기에서 배양하였고 24시간 후 시료를 IMDM 희석하여 처리한 후 다시 24시간 동안 배양하였다. 이후 배지를 제거하고 0.5 mg/mL 3-(4,5-Dimethylthiazol -2-yl)-2-Diphenyltetrazolium Bromide (MTT, sigma-aldrich, St. Louis, MO, USA)용액 100 μ L를 처리한 뒤 10분 동안 배양기에서 배양하였다. 이후 MTT 용액이 포함된 배지를 제거하고 생성된 formazan을 DMSO를 이용해 녹인 다음 540 nm에서 microplate reader(Molecular Devices, San Jose, CA, USA)를 이용하여 흡광도를 측정하였다(도 7).
- [0094] S.D(λ -CGN) 표준물질과 λ -CGN 을 50, 100, 300, 500, 700, 1000, 2000, 3000, 5000 μ g/mL의 농도로 CCD-986sk 세포에 처리한 결과, S.D(λ -CGN) 표준물질은 Control 에 비해 15.52%, 30.02%, 29.01%, 28.30%, 19.65%, 23.39%, 19.96%, 4.11%, 2.31%, λ -CGN은 10.94%, 14.85%, 27.03%, 38.32%, 39.56%, 39.04%, 26.65%, 31.86%, 31.13%의 생존율을 보였다. 결과적으로, 세포 생존율에 영향을 미치지 않고 CCD-986sk 세포에서 λ -CGN 은 5000 μ g/mL(즉 5mg) 까지 cytotoxicity가 없는 것으로 나타났으며 S.D(λ -CGN) 표준물질보다 더 세포 생존율의 안전함을 보였다.
- [0095] **MMP-1(collagenase) 활성 측정**
- [0096] CCD-986sk세포를 48 well plate에 5×10^3 cells/well의 농도로 분주하고 24시간 동안 배양하고 각 시료를 48시간 동안 처리하였다. 배양된 세포의 배지를 회수한 후 Enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA) kit(abcam, Cambridge, UK)를 이용하여 제조사의 매뉴얼에 따라 수행한 후 측정하였다(도 8).
- [0097] 세포 독성을 나타내지 않았던 농도 범위에서 각각의 시료를 CCD-986sk 세포에 처리한 뒤 MMP-1 생성에 미치는 영향을 ELISA를 이용하여 평가함. S.D(λ -CGN) 표준물질과 λ -CGN 를 100, 300, 500 μ g/mL의 농도로 48시간 동안 처리한 결과, S.D(λ -CGN) 표준물질은 control에 비해 6.24%, 16.95%, 22.58%, λ -CGN은 16.92%, 28.19%, 35.7%로 MMP-1 (collagenase) 콜라겐 분해 효소를 저해함을 보였다. 결과적으로 S.D(λ -CGN) 표준물질보다 λ -CGN이 MMP-1 (collagenase) 콜라겐 분해 효소 생성 저해능이 더 높은 것으로 확인하였다.
- [0098] **RAW 264.7 세포 독성 평가**
- [0099] Raw264.7 세포는 10% fetal bovine serum(FBS, Gibco, Grand Island, NY)과 1% antibiotic-antimycotic(Gibco, Grand Island, NY)이 첨가된 Dulbecco's Modified Essential Medium(DMEM, Gibco, Grand Island, NY)를 사용하여 37℃, 5% CO₂ 조건이 유지되는 배양기에서 배양하였다. 24시간 후 시료를 DMDM 희석하여 처리한 후 다시 24시간 동안 배양하였다. 이후 배지를 제거하고 0.5 mg/mL 3-(4,5-Dimethylthiazol -2-yl)-2-Diphenyltetrazolium Bromide (MTT, sigma-aldrich, St. Louis, MO, USA)용액 100 μ L를 처리한 뒤 10분 동안 배양기에서 배양하였다. 이후 MTT 용액이 포함된 배지를 제거하고 생성된 formazan을 DMSO를 이용해 녹인 다음 540 nm에서 microplate reader(Molecular Devices, San Jose, CA, USA)를 이용하여 흡광도를 측정하였다(도 9).
- [0100] S.D(λ -CGN) 표준물질과 λ -CGN 을 50, 100, 300, 500, 700, 1000, 2000, 3000, 5000 μ g/mL의 농도로 Raw264.7 세포에 처리한 결과, S.D(λ -CGN) 표준물질은 control 100%에서 125.12%, 118.68%, 112.70%, 110.59%, 109.73%, 110.59%, 98.80%, 94.84%, 93.40%, λ -CGN은 125.48%, 115.61%, 122.84%, 118.47%, 118.77%, 108.30%, 103.34%, 93.18%, 84.54%의 생존율을 보였다.
- [0101] **NO(Nitric oxide) 생성변화**
- [0102] 세포 독성을 나타내지 않았던 농도 범위에서 각각의 시료를 Raw264.7 세포에 4시간 동안 전처리 한 후 LPS (1 μ g/mL)를 18시간 동안 처리하였다.
- [0103] NO 의 생성 변화를 griess reagent를 이용하여 확인함. S.D(λ -CGN) 표준물질과 λ -CGN을 각각 100, 300, 500

$\mu\text{g/mL}$ 의 농도로 전처리 한 결과, S.D(λ -CGN) 표준물질은 44.03, 41.56, 40.29%, 시험 시료 λ -CGN 은 40.59, 37.33, 35.57 % 로 비슷한 NO 발현 저해능을 보였다(도 10).

[0104] NO 발현양은 LPS 처리로 염증이 유발된 실험군에서 λ -carrageenan의 처리농도가 높아질수록 저해됨을 확인하였다.

[0105] **ABS 라디칼 소거능 평가**

[0106] 겔 제거 공정의 차이를 두어가며, 람다-카라기난을 추출하여 그 효능을 비교하였다.

[0107] 혼합 carrageenan는 60℃에서 시료 100 g을 0.01 M Ca(OH)₂ 수용액 1 L에 15.0 g의 KCl을 혼합한 용액에 1 시간 동안 정치하고 이를 1시간 후부터 냉각하며 겔을 여과하여 제거하였다.

[0108] 여과된 겔화된 성분은 폐기하였으며 여과되어진 용액을 다시 4℃ 이하까지 낮춘 후 4배 이상의 에탄올을 첨가하여 침전되는 물질을 λ -carrageenan으로 간주하고 이 과정을 두 번 더 거쳐서 분리한 후 건조 분말화하여 사용하였다.

[0109] A) 30℃에서 겔 분리

[0110] B) 15℃에서 겔 분리

[0111] C) 5℃에서 겔 분리

[0112] ABTS radical scavenging activity (%)는 아래의 식에 의해 계산하여 나타냈으며, 동일한 조건에서 Trolox로 standard curve를 작성하고 시료와 같은 항산화 력을 나타내는 Trolox의 농도를 계산하여 $\mu\text{M TE}$ (Trolox equivalent)/100mL sample로 표기하였다. IC₅₀ 값은 ABTS radical 소거를 50 % 억제하는데 필요한 시료의 농도이다.

[0113] 겔 분리 공정을 달리하여 동결건조하여 사용한 λ -carrageenan A, B, C 는 항산화를 ABTS Assay 로 측정한 결과, 위 표와 같은 항산화 활성(%)가 나타났으며 효과의 차이는 A, B 조건에 비해 C 조건에서 항산화 효과가 유의미하게 나타났다.

[0115] [식 2]

[0116] Scavenging activity (%) = [(ABSControl - ABSSample) / ABSControl] x 100

표 4

[0118]

Sample concentration	ABTS radical scavenging activity			$\mu\text{M TE1}$ /100 mL sample
	A	B	C	
0.1	1.25 ± 0.25	3.93 ± 0.19	5.82 ± 0.19	10.03 ± 0.76
0.23	2.45 ± 0.15	5.75 ± 0.17	11.02 ± 0.22	23.64 ± 0.47
0.50	4.12 ± 0.31	10.92 ± 0.25	19.12 ± 0.28	46.12 ± 0.83
1.00	6.93 ± 0.26	15.83 ± 0.43	40.93 ± 0.26	100.58 ± 0.78
2.50	10.93 ± 0.26	22.92 ± 0.22	82.93 ± 0.26	292.01 ± 1.55

[0119] IC₅₀ 2) = 1.29 ± 0.01 % 1) Trolox equivalent

[0120] 2) Half maximal inhibitory concentration

[0122] **ROS 소거 활성 평가**

[0123] λ -carrageenan의 세포 내 ROS 소거 활성을 측정하기 위하여 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate(H2DCFDA)가 세포 내에서 활성산소와 반응하여 녹색의 형광물질인 2',7'-dichlorofluorescein(DCF)로 변화되는 원리인 DCFDA assay를 이용하였다.

[0124] CCD-986sk(인간피부섬유모세포) 를 60-mm dish 위에 5×10^5 cells/mL 농도가 되도록 분주한 뒤, 37℃, 5% 배양기에서 24 시간 배양했다. λ -carrageenan 1mg/mL을 1시간 전처리 한 뒤 0.5 mM H₂O₂를 처리하였다. 그 후 20 μM 의 DCF-DA를 처리하여 30분간 반응시킨 뒤, PBS로 3회 세척한 세포를 형광현미경을 이용하여 관찰하였다. 레이저주사현미경의 20X 배율로 이미지를 시각화하였다.

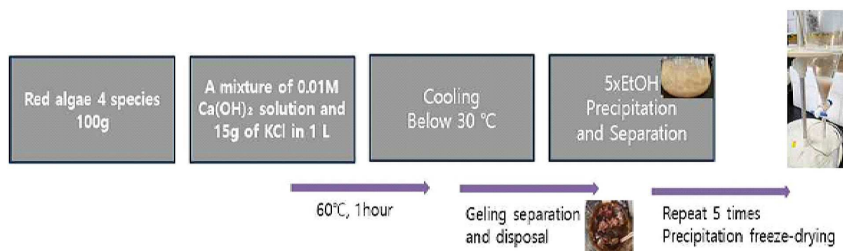
[0125] CCD-986sk(인간피부섬유모세포) 에서 H_2O_2 처리에 의해 유발된 세포 산화적스트레스 조건에 대한 λ -carrageenan 의 세포 보호 효과를 산화적 스트레스 억제제를 통한 효과인지 확인하기 위하여 세포 내 ROS 생성에 미치는 영향을 DCF-DA 형광염색을 통해 활성 산소종의 양을 형광 현미경을 확인하였다. 그 결과 CCD-986sk 세포에 0.5mM H_2O_2 를 처리한 군에서는 초록 형광이 증가하였으나, λ -carrageenan을 1mg/mL 으로 1시간 전처리 후 동일한 농도의 H_2O_2 를 처리시 초록 형광이 감소되는 것으로 나타났다(도 11).

도면

도면1

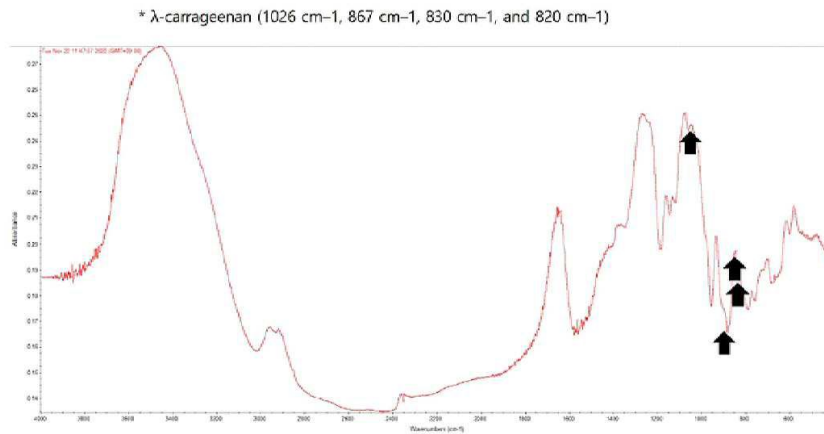


도면2

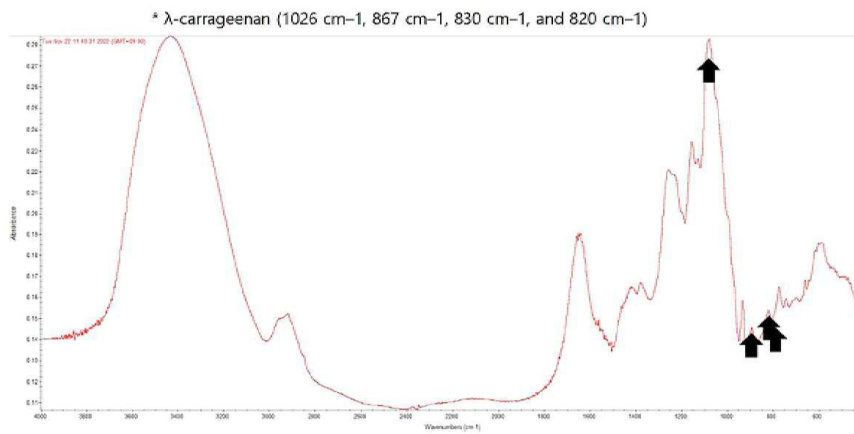


도면3

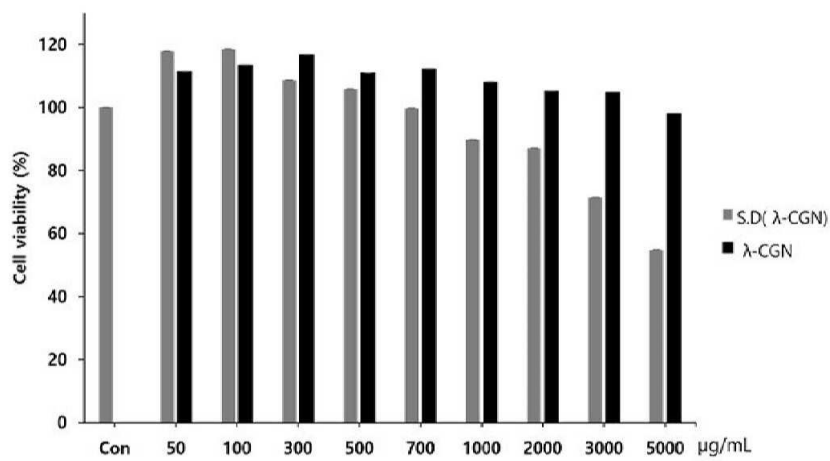
(a)



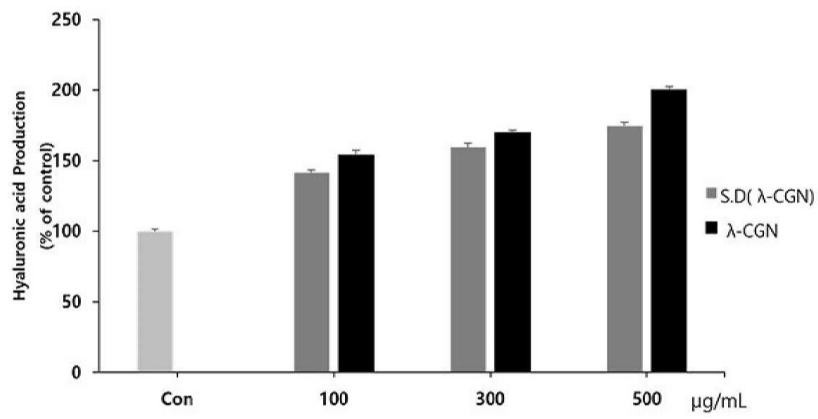
도면4



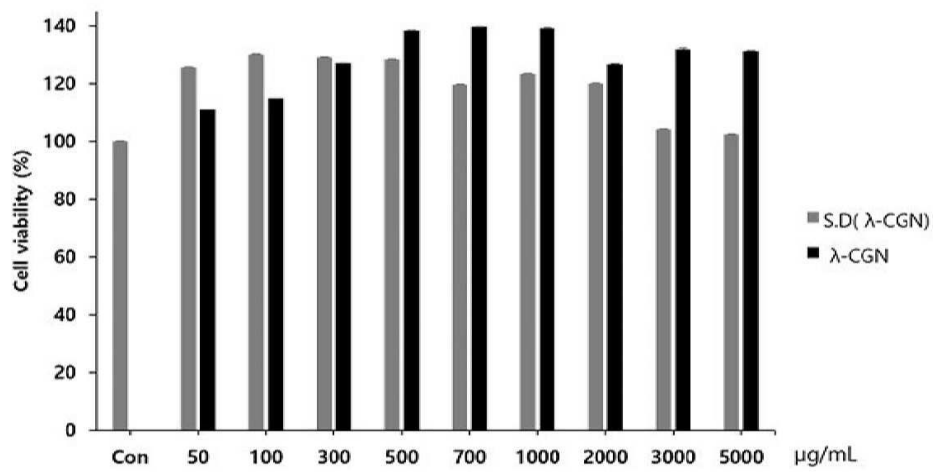
도면5



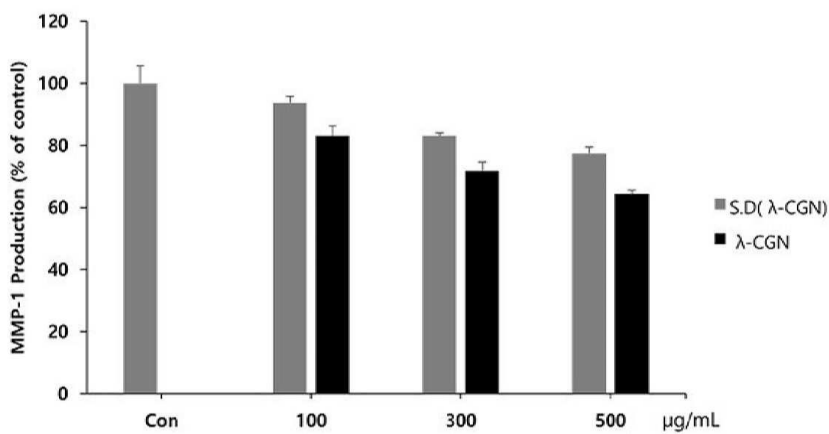
도면6



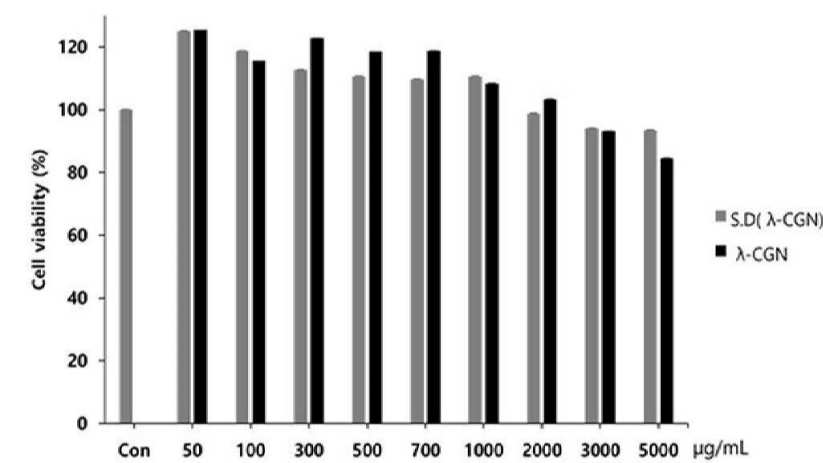
도면7



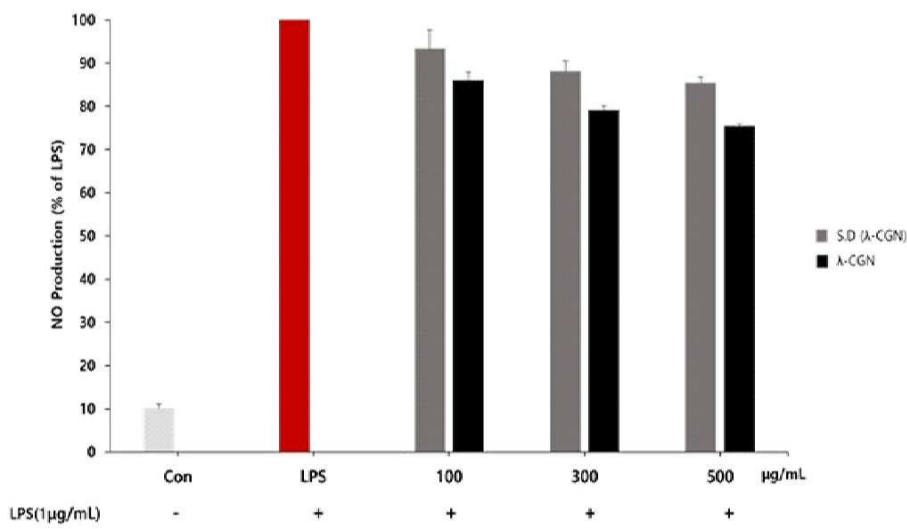
도면8



도면9



도면10



도면11

