

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)(11) 공개번호 10-2024-0030104
(43) 공개일자 2024년03월07일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A01N 43/16 (2006.01) *A01G 7/06* (2006.01)
A01P 21/00 (2006.01) *C05F 11/00* (2006.01)
C08L 5/04 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A01N 43/16 (2013.01)
A01G 7/06 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2022-0108711

(22) 출원일자 2022년08월29일

심사청구일자 2022년08월29일

(71) 출원인

인천대학교 산학협력단

인천광역시 연수구 갯벌로 27, 인천대학교 이노베이션센터(송도동)

(72) 발명자

김정완

인천광역시 연수구 컨벤시아대로274번길 15, 2304동 2801호(송도동, 송도 더샵 마스터뷰 23-1BL)

다부드바샤 무바락알리

인천광역시 연수구 아카데미로 119, 29동 517호(송도동)

이민호

인천광역시 남동구 구월로 192, 1210동 203호(구월동, 힐스테이트롯데캐슬골드1단지아파트)

(74) 대리인

특허법인이름리온

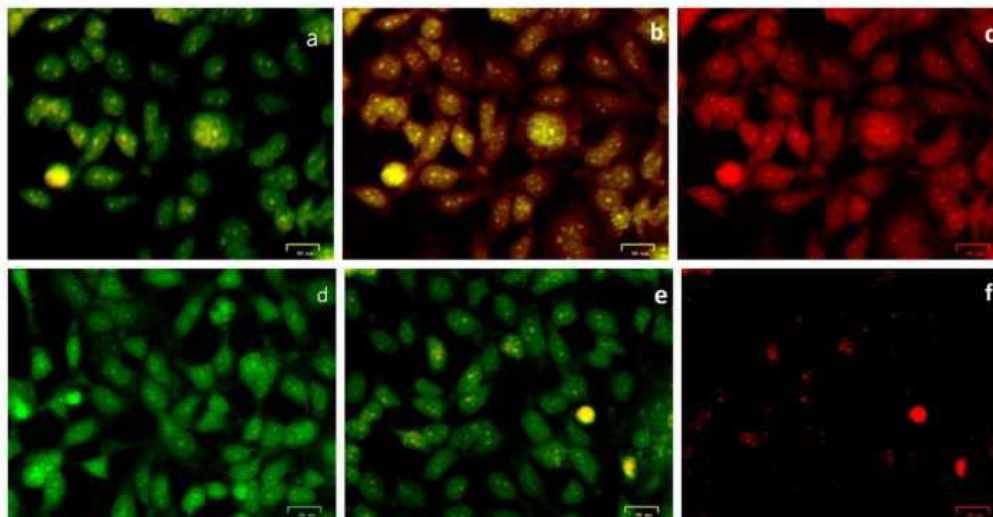
전체 청구항 수 : 총 17 항

(54) 발명의 명칭 **올리고알지네이트를 포함하는 식물체 및 동물세포 생장 촉진용 조성물**

(57) 요약

본 발명은 알지네이트를 해중합 한 올리고알지네이트를 이용한 식물체 및 동물세포 생장 촉진용 조성물에 관한 것으로, 구체적으로는 솔루션 플라즈마 공정 방법을 이용하여 해중합을 진행하였다. 올리고알지네이트는 항산화 활성을 나타내었으며, 식물체 및 동물세포의 성장을 촉진시키는 것을 확인하였다.

대표도 - 도7



(52) CPC특허분류

A01P 21/00 (2021.08)

C05F 11/00 (2013.01)

C08L 5/04 (2013.01)

C12N 5/0602 (2013.01)

C12N 2500/34 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1711167345

과제번호 2020R1A2C110169011

부처명 과학기술정보통신부

과제관리(전문)기관명 한국연구재단

연구사업명 중견연구

연구과제명 유체 플라즈마 공정을 이용한 생체적합성 기능성 식품산업 소재 개발 및 작용 기작

등 특성 규명

기 여 율 1/1

과제수행기관명 인천대학교

연구기간 2020.09.01 ~ 2023.02.28

명세서

청구범위

청구항 1

알지네이트를 해중합하여 생산된 올리고알지네이트를 포함하는 식물체 생장 촉진용 조성물로서, 상기 알지네이트의 해중합은 솔루션 플라즈마 공정 방법을 이용한 것인 식물체 생장 촉진용 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 솔루션 플라즈마 공정은 단극성 전원장치를 펄스 폭 1.5 내지 2.5 μ s 및 주파수 30kHz 내지 40kHz로 700 내지 850V에서 수행되는 것인 식물체 생장 촉진용 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 솔루션 플라즈마 공정은 10분 내지 120분 수행되는 것인 식물체 생장 촉진용 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 올리고알지네이트는 점도 1.0 내지 5.0 cps 인 식물체 생장 촉진용 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 식물체는 국화과 또는 배추과 식물인, 식물체 생장 촉진용 조성물.

청구항 6

제1항에 있어서,

상기 식물체는 식물, 식물의 조직, 세포 및 종자로 이루어진 군에서 선택된 것인, 식물체 생장 촉진용 조성물.

청구항 7

제1항 내지 제6항 중 어느 한 항의 조성물을 식물, 식물의 조직, 세포 및 종자 및 식물 식재 토양으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 1종 이상에 처리하는 단계를 포함하는 식물체 생장 촉진 방법.

청구항 8

제7항에 있어서,

상기 처리 단계는 액체 상태로 식물에 관주 또는 작물의 종자에 침지하는 것인, 방법.

청구항 9

제1항 내지 제6항의 조성물을 포함하는 식물체의 생장 촉진용 비료 조성물.

청구항 10

제1항 내지 제6항의 조성물을 포함하는 식물체의 생장 촉진용 토양 개량제.

청구항 11

알지네이트를 해중합하여 생산된 올리고알지네이트를 포함하는 동물세포 생장 촉진용 조성물로서, 상기 알지네이트의 해중합은 솔루션 플라즈마 공정 방법을 이용한 것인 동물세포 생장 촉진용 조성물.

청구항 12

제11항에 있어서,

상기 솔루션 플라즈마 공정은 단극성 전원장치를 펄스 폭 1.5 내지 2.5 μ s 및 주파수 30kHz 내지 40kHz로 700 내지 850V에서 수행되는 것인 동물세포 생장 촉진용 조성물.

청구항 13

제11항에 있어서,

상기 솔루션 플라즈마 공정은 10분 내지 120분 수행되는 것인 동물세포 생장 촉진용 조성물.

청구항 14

제11항에 있어서,

상기 올리고알지네이트는 점도 1.0 내지 5.0 cps 인 동물세포 생장 촉진용 조성물.

청구항 15

제11항에 있어서,

상기 동물세포는 HEK293(Human Embryonic Kidney Cell), CHO(Chinese Hamster Ovary Cell) 및 Vero(Monkey Kidney Cell)로 이루어진 군에서 선택되는 어느 1종 것인, 동물세포 생장 촉진용 조성물.

청구항 16

제11항 내지 제15항 중 어느 한 항의 조성물을 세포 배양용 배지에 처리하는 단계를 포함하는 동물세포 생장 촉진 방법.

청구항 17

제11항 내지 제14항의 조성물을 포함하는 동물세포 성장 촉진용 배양 첨가제.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 알지네이트를 해중합 한 올리고알지네이트를 이용한 식물체 및 동물세포 성장 촉진용 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 생체적합성과 생분해성의 특별한 특성을 지닌 알지네이트는 갈조류의 세포벽에 존재하는 천연 음이온성 다당류이다. 1,4- β -D-만누론산(mannuronic acid, M)과 이의 C-5 에피머인 α -L-글루론산(guluronic acid, G)가 GG, MM 또는 MG로 반복되어 배열되어 있는 형태이다. 이러한 무독성 고분자 분자는 제약, 화장품, 생명공학 및 농업 산업에서 널리 사용되어 왔다.

[0004] 알지네이트는 효소 분해, 산 가수분해 및 산화 분해, 열처리, 초음파, 자외선 및 γ -선 조사를 포함한 다양한 분해 방법에 의해 해중합될 수 있다. 알지네이트는 Ca^{2+} 및 Mg^{2+} 와 같은 2가 양이온의 존재하에서 다양한 기능, 낮은 독성, 비용 경제성 및 균일한 겔화 능력의 추가적인 이점이 있다. 제약 및 식품 산업을 위한 생체 재료로서 알지네이트 분자의 기능적 특성은 분자량뿐만 아니라 M/G 비율에 크게 의존한다. 분명히 알지네이트는 박테리아의 인지질 층과 상호작용하는 이온화된 카르복실기($-\text{COOH}-$)에 대해 알려진 메커니즘을 통해 항균 활성을 나타내는 다당류 중 하나이다. 흥미롭게도, 단편화에 의해 알지네이트로부터 생성되는 짧은 길이의 알지네이트인 올리고알지네이트는 고분자량 모분자에 비해 독특하고 중요한 기능을 갖는다. 올리고알지네이트의 M/G 잔기의 순서와 비율은 물리화학적 특성을 크게 조절한다. 따라서, 다량의 올리고알지네이트를 생산하기 위해 알지네이트를 분해하는 효과적인 방법을 찾을 필요가 있다. 방사선, 열처리 및 초음파를 사용한 알지네이트의 물리적 분해가 보고되었다. 알지네이트 분해효소를 생성하는 *Vibrio sp.*와 같은 해양세균도 알지네이트의 생물학적 분해에 사용되어 왔다. 물리적 분해 방법과 화학적 분해 방법 모두 막대한 에너지 소비, 매우 힘든 작업, 여러 단계의 화학 반응이 수반되고 추가 정제의 문제와 같은 많은 한계가 있다. 유기 용매, 산 또는 화학적 방법에 사용되는 잠재적으로 유해한 시약은 매우 불리한 생태학적 영향 또는 유기체에 대한 독성을 유발할 수 있어 문제가 되었다.

[0005] SPP(Solution Plasma Process)는 Takai(2008)가 제안한 액체 플라즈마로 나노물질 합성, 표면 개질, 수처리, 유기화합물의 살균 및 해중합에 사용되는 친환경 공정이다. Takai(2008)는 유체에서 생성된 플라즈마가 기체층으로 둘러싸여 있으며 중심에 위치한 플라즈마에 의해 형성된 전자, 라디칼 및 이온이 기체층을 통해 액체상으로 이동하여 유체 내의 분자와 반응한다고 밝혔다.

[0006] 광범위한 사용에 비추어 알지네이트 및 알지네이트 기반 제품의 세계 시장은 크게 증가했으며 2014 년에서 2019 년까지 예상 복합 연간 성장률은 3.8 %이다. 따라서 상업적 가치와 생명공학적 응용이 가능한 알지네이트 기반 제품의 범위는 매우 넓다. SPP와 같은 비용 효율적인 기술이 고분자 알지네이트로부터 더 짧은 길이의 올리고알지네이트의 대규모 합성을 위해 표준화하기 위한 기술이 필요한 실정이다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명의 목적은 알지네이트를 해중합하여 생산된 올리고알지네이트를 포함하는 식물체 및 동물세포 성장 촉진용 조성물로서, 상기 알지네이트의 해중합은 솔루션 플라즈마 공정 방법을 이용한 것인 식물체 및 동물세포 성장 촉진용 조성물을 제공하는 것이다.

[0009] 본 발명의 또다른 목적은, 상기 조성물을 포함하는 식물체의 성장 촉진용 비료 조성물 및 토지 개량제를 제공하는 것이다.

[0010] 본 발명의 또다른 목적은, 상기 조성물을 포함하는 동물세포 성장 촉진용 배양 첨가제를 제공하는 것이다.

[0011] 그러나, 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 이상에서 언급한 과제에 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 당업자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

과제의 해결 수단

[0013] 본 명세서에서 사용한 용어는 단지 설명을 목적으로 사용된 것으로, 한정하려는 의도로 해석되어서는 안 된다. 단수의 표현은 문맥상 명백하게 다르게 뜻하지 않는 한, 복수의 표현을 포함한다. 본 명세서에서, "포함하다" 또는 "가지다" 등의 용어는 명세서 상에 기재된 특징, 숫자, 단계, 동작, 구성요소, 부품 또는 이들을 조합한 것이 존재함을 지정하려는 것이지, 하나 또는 그 이상의 다른 특징들이나 숫자, 단계, 동작, 구성요소, 부품 또는 이들을 조합한 것들의 존재 또는 부가 가능성을 미리 배제하지 않는 것으로 이해되어야 한다. 다르게 정의되지 않는 한, 기술적이거나 과학적인 용어를 포함해서 여기서 사용되는 모든 용어들은 실시예가 속 하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자에 의해 일반적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 가지고 있다. 일반적으로 사용되는 사전에 정의되어 있는 것과 같은 용어들은 관련 기술의 문맥 상 가지는 의미와 일치하는 의미를 가지는 것으로 해석되어야 하며, 본 출원에서 명백하게 정의하지 않는 한, 이상적이거나 과도하게 형식적인 의미로 해석되지 않는다.

[0014] 본 발명자들은 세포 배양 및 농업분야에서 자유 라디칼 소거 및 성장 촉진에 성공적으로 사용하기 위한 솔루션 플라즈마 공정(Solution Plasma Process, SPP) 기술을 채택하여 알지네이트를 짧은 길이의 올리고알지네이트로 분해하는 것을 목표로 하였다. 다양한 농도의 알지네이트를 다양한 시간 동안 SPP를 사용하여 올리고알지네이트로 해중합시켰다. 올리고알지네이트로의 해중합은 DNS, TLC, FT-IR 및 HPAEC 분석에 의해 입증하였으며 점도 감소를 유발했다. 0.5% 알지네이트($100 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)에서 파생된 올리고알지네이트는 시험관 내에서 가장 높은 항산화 활성을 보였다. 올리고알지네이트는 인간 배아 신장(HEK293) 세포의 강화된 성장을 어떠한 독성도 없이 농도 의존적 방식으로 증가시키는 것을 목표로 하였다. 또한, 올리고알지네이트에 의한 상추의 성장 촉진을 확인하였다. 따라서 SPP는 알지네이트를 올리고알지네이트로 분해하여 자유 라디칼 소거, 동물 세포 및 농업 식물의 성장 촉진제로 활용할 수 있는 강력한 기술임을 확인하여 본 발명을 완성하였다.

[0016] 따라서, 본 발명은 알지네이트를 해중합하여 생산된 올리고알지네이트를 포함하는 식물체 성장 촉진용 조성물로서, 상기 알지네이트의 해중합은 솔루션 플라즈마 공정 방법을 이용한 것인 식물체 성장 촉진용 조성물을 제공한다.

[0017] 본 명세서에 있어 '솔루션 플라즈마(Solution Plasma Process, 'SPP') 공정 방법'이란 '용액 플라즈마 공정'과 동일한 의미로 사용되며, 수중에서 플라즈마 방전에 의해 생성된 다양한 이온과 라디칼로 짧은 반응 시간에 매우 효율적으로 용액 내 분자의 화학적 변화를 촉진한다. 본 방법은 화학 물질의 개입 없이 생체 적합성 화합물의 합성 및 분해를 위한 손쉬운 원뿔 공정으로 생물학적 안전성을 보장한다.

[0018] 본 명세서에 있어서 '해중합'은 다당류 형태인 알지네이트를 올리고알지네이트로 생성하기 위한 과정을 의미한다.

[0019] 본 발명에서 이용하는 상기 솔루션 플라즈마 공정은 단극성 전원장치를 펄스 폭 1.5 내지 $2.5 \mu\text{s}$ 및 주파수 30kHz 내지 40kHz로 700 내지 850V에서 수행될 수 있으며, 바람직하게는 펄스 폭 1.8 내지 $2.3 \mu\text{s}$ 및 주파수 32kHz 내지 38kHz로 750 내지 830V에서 수행될 수 있으며, 본발명의 일실시예에서는 펄스 폭 $2 \mu\text{s}$ 및 주파수 35kHz로 800V에서 수행하였다. 상기 범위를 벗어나는 경우, 올리고알지네이트의 해중합이 효율적으로 일어나지 않을 수 있다. 또한, 상기 솔루션 플라즈마 공정은 10분 내지 120분 수행될 수 있으며, 바람직하게는 15분 내지 100분 수행될 수 있고, 가장 바람직하게는 60분동안 수행된 것일 수 있다.

[0020] 단극성 전원장치를 사용했을 때에는 양극성 전원장치를 사용할 때와는 달리 반응이 빠르게 진행되어 본 발명에서는 단극성 전원장치로 60 분간 혹은 그 이상 처리했을 때 알지네이트 분자량이 10 kDa 이하로 감소되는 반면 양극성 전원장치로 60분간 처리했을 때는 분자량이 200 kDa 정도로 감소될 수 있음을 확인하였다. 즉, 단극성 전원장치를 이용하는 경우가 더욱 우수하게 해중합 될 수 있음을 확인하여, 본 발명에서는 단극성 전원장치를 이용하였다.

- [0021] 일 실시예에 있어서, 상기 올리고알지네이트는 점도 1.0 내지 5.0 cps 일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 구체적으로 본원발명의 실시예2에서는 고분자의 알지네이트를 해중합하여 생산한 올리고알지네이트의 점도가 상기 범위인 것을 확인하여, 용이하게 이용가능한 점도임을 확인하였다.
- [0022] 본 발명의 방법에 의해 생장을 촉진할 수 있는 식물체로는 대부분의 식물이 포함될 수 있으며, 바람직하게는 국화과 또는 배추과 식물일 수 있으며, 이에 제한되지 않는다. 더욱 바람직하게는, 국화과 식물로는 상추, 배추과 식물로는 고추냉이일 수 있다.
- [0023] 본 발명의 일 구현 예에 따른 방법에서, 상기 식물의 생장 촉진은 바람직하게는 식물의 지상부 및 뿌리 생장을 촉진하는 것일 수 있으며, 상기 식물의 지상부 생장 촉진은 상추 지상부의 길이에 대한 생체중의 비율을 증가시키는 것일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다
- [0024] 본 명세서에서 의미하는 식물체는 식물, 식물의 조직, 세포 및 종자일 수 있으며, 이에 제한되지 않는다.
- [0025] 본 발명은 또한, 알지네이트를 해중합하여 생산된 올리고알지네이트를 포함하는 식물체 생장 촉진용 조성물을 식물, 식물의 조직, 세포 및 종자 및 식물 식재 토양으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 1종 이상에 처리하는 단계를 포함하는 식물체 생장 촉진 방법을 제공한다.
- [0026] 상기 식물체 생장 촉진용 조성물은 당업자에게 알려진 방법대로 제조되는 것이 바람직하며, 그 처리 방법은 통상 일반적으로 행하고 있는 방법, 즉 살포(예를 들면 분무, 미스팅, 아토마이징, 분말 살포, 과립 살포, 수면시용, 상시용 등), 토양시용(예를 들면 혼입, 관주 등), 표면사용(예를 들면 도포, 도말법, 피복 등), 침지, 독이, 혼연 시용 등에 의해 행할 수 있고, 구체적으로는 액체 상태로 식물에 관주 또는 작물의 종자에 침지하는 것일 수 있다. 침지하는 방법의 경우, 상기 조성물을 식물체 주변의 토양에 붓거나 또는 종자를 조성물에 담가 둘 수 있다. 관주할 경우에는 당해 분야에 널리 공지된 기술로 식물체에 줄줄 흐르도록 살포할 수 있다. 그 사용량은, 그 체형, 피해상황, 적용방법, 적용장소 등에 따라 적절히 결정할 수 있다.
- [0028] 본 발명은 또한, 알지네이트를 해중합하여 생산된 올리고알지네이트를 포함하는 식물체 생장 촉진용 조성물을 포함하는 식물체의 생장 촉진용 비료 조성물을 제공한다.
- [0029] 본 명세서의 용어 '비료'는 식물이 정상적으로 생육하기 위하여 필요한 원소의 하나 혹은 그 이상을 공급하는 모든 물질을 의미하며, 유기비료(분해되는 식물/동물 물질로 이루어짐)와 무기비료(화학 물질 및 무기 물질로 이루어짐) 등으로 구분될 수 있다.
- [0030] 본 발명에 따른 비료 조성물은 일반적인 제형기를 사용하여 적당한 크기의 액상, 분말, 펠렛 또는 과립 등의 다양한 형태로 제형화 될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 상기에서 제형화된 본 발명의 비료 조성물은 그대로 사용되거나 또는 실온에서 풍건하거나 동결 건조 또는 고온 건조 방법으로 건조시켜 사용할 수 있다. 액상 형태의 비료 조성물을 농가에서 적절히 사용하기 위해서는 작물에 사용 가능한 pH 범위로써 침전이 되지 않아야만 한다. 이는 사용하는 원료의 pH, 용해도를 고려하여 배합비를 선정하여야만 한다.
- [0032] 본 발명은 또한, 알지네이트를 해중합하여 생산된 올리고알지네이트를 포함하는 식물체의 생장 촉진용 토양 개량제를 제공한다.
- [0033] 본 명세서의 용어 '토양 개량제(soil conditioner)'는 토양의 물리화학적 성질을 식물생육에 알맞게 개선하여 생산성을 높이기 위해 사용되는 물질을 의미하며, 상기 토양개량제는 본 발명의 솔루션 플라즈마 공정 방법으로 해중합된 올리고알지네이트 및 기존의 화학비료, 벤토나이트(bentonite), 제올라이트(zeolite), 버미큘라이트(vermiculite), 암모늄, 석회염, 벗짚, 보릿짚, 들풀로 이루어진 군에서 선택되는 1종 이상과 혼합하여 사용될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0035] 또한, 본 발명은 알지네이트를 해중합하여 생산된 올리고알지네이트를 포함하는 동물세포 생장 촉진용 조성물로서, 상기 알지네이트의 해중합은 솔루션 플라즈마 공정 방법을 이용한 것인 동물세포 생장 촉진용 조성물을 제공한다.
- [0036] 본 발명에서 '동물세포 생장 촉진'의 의미는, '동물세포의 세포 수 증가', '세포 증식' 및 '정상 세포에서 세포

사멸의 지연'과 동일한 의미로 사용된다.

- [0037] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 동물세포는 HEK293(Human Embryonic Kidney Cell), CHO(Chinese Hamster Ovary Cell) 및 Vero(Monkey Kidney Cell)로 일 수 있으나, 이에 제한되지 않으며, 동물세포라면 제한없이 이용 가능하다. 바람직하게는 HEK293 일 수 있다.
- [0039] 본 명세서에 있어서, 동물세포 생장 촉진용 조성물에 이용되는 솔루션 플라즈마 공정의 방법 및 올리고알지네이트의 점도는 진술한 식물체 생장 촉진용 조성물의 기재와 동일하게 이용될 수 있는바, 그 기재는 생략한다.
- [0041] 본 발명은 상기 올리고알지네이트를 포함하는 동물세포 생장 촉진용 조성물을 세포 배양용 배지에 처리하는 단계를 포함하는 동물세포 생장 촉진 방법을 제공한다.
- [0043] 본 발명은 또한, 상기 올리고알지네이트를 포함하는 동물세포 생장 촉진용 조성물을 포함하는 동물세포 생장 촉진용 배양 첨가제를 제공한다. 본 발명에서 배양 첨가제는 배양 배지의 성분이 되는 것을 의미하고, 일 태양에서는 본 발명에 따라 올리고알지네이트를 필요한 농도로 본 발명의 배양 배지에 제공하도록, 통상적인 상태의 배양 배지에 다량으로 첨가될 수 있다. 물론, 본 발명의 배양 첨가제에 다양한 성분을 첨가함으로써 본 발명의 배양 배지를 형성하도록, 본 발명의 배양 배지를 제조하는 것도 가능하다. 더욱 바람직한 태양에서, 본 발명의 배양 첨가제는 배양 배지 첨가제이다. 더욱 바람직한 태양에서, 배양 배지는 세포 배양 배지이다.
- [0044] 다음의 용어는 동의어이고 동일함을 의미한다: "배양 배지" 및 "세포 배양 배지". "배양 배지"는 세포의 배양에 적합한 배지이다. 이러한 배양 배지는 세포 보전 또는 세포 생존력 또는 세포 성장 또는 세포 생산성을 유지하기 위한 영양소를 함유할 수 있다. 배양 배지로는 액체 배양 배지가 바람직하다. 특히 바람직한 배양 배지는 WO2007/036291에 기술되어 있는 것으로, 본 발명에 사용될 수 있다. 기본 배지는 배양 배지의 특정 태양이고 바람직하게는 다른 성분, 예를 들어 공급 배지와 조합될 수 있다. 특히 바람직한 기본 배지는 세포 성장, 세포 생존력 및 세포 생산성을 위해 필요한 모든 물질을 함유한다.
- [0045] 본 발명의 배양 첨가제가 첨가되는 배양 배지는 통상적인 배양 배지일 수 있다. 본 발명의 배양 배지는 본 발명의 배양 첨가제 이외에, 용매, 이를 테면 물, 비타민, 염, 탄소원 및/또는 질소원, 아미노산, pH 조절제, 미량 원소, 지방산, 뉴클레오티드와 같은 다른 성분을 함유할 수 있다. 특히, 본 발명의 배양 배지는 수성 배지이다. 포유류 세포의 세포 배양은 오늘날에는 과학 교과서 및 매뉴얼에 잘 기술된 통상적인 작업이다. 이것은 예를 들어 R. Ian Fresney, 동물 세포의 배양, 매뉴얼, 4판, Wiley-Liss/N.Y., 2000에서 상세하게 다루고 있다. 본 발명의 배양 첨가제와 조합 사용을 위한, 예를 들어 포유류 세포계용 배양 배지 및 배양 방법은 그 자체로 이 분야에서 잘 알려져 있다. 이러한 배양 배지는 바람직하게는 물과 같은 용매, 탄소원, 질소원, 아미노산, pH 조절제, 미량 원소, 지방산, 뉴클레오티드로 구성된다. 본 발명을 위한 바람직한 배양 배지는 표준 세포 배양 배지인데, 이것은 또한 특정 세포 형태의 요구에 적합할 수 있고, 이에 제한되지 않지만, 로스웰 파크 기념 연구소(RPMI) 1640 배지, L-15 배지, 돌베코 변형 이글 배지(DMEM), 이글 최소 필수 배지(MEM), 햄 F12 배지 또는 이스코브 변형 DMEM을 포함한다. 다른 바람직한 배지는, 예를 들어, 햄 F10 또는 F12 배지인데, 이것은 CHO 세포 배양을 위해 특별히 고안된 것이다. 본 발명을 위한 다른 바람직한 배지는 CHO 세포 배양에 특히 적합한 것으로, 예를 들어 EP 0481791에 기술되어 있다. 또한, 본 발명을 위한 바람직한 배양 배지는 상업적으로 이용가능한 배지, 예를 들어 이에 한정되지 않지만, CD CHO(Gibco, 10743), ProCHO5(BioWhittaker, BE12-766Q), HyQSFM4CHO (HyClone, SH30548.02)일 수 있다.
- [0046] 본 발명의 배양 첨가제 또는 배양 배지는 바람직한 태양에서 하나 이상의 다른 세포 영양소, 즉 탄소원, 예를 들어 포도당, 및 질소원, 예를 들어 아미노산, 및/또는 염을 함유한다. 본 발명에 따르면, 본 발명의 배양 첨가제는 바람직한 태양에서 하나 이상의 모액(stock solution), 예를 들어 하나의 올리고알지네이트를 함유하는 모액 형태일 수 있다. 올리고알지네이트는 바람직하게는 상기 모액에 고농축될 수 있다. 모액은 염 또는 pH 조절제와 같은 부가적인 성분을 함유할 수 있다. 이러한 모액은 본 발명의 배양 배지를 형성하는 배양 배지에 또는 공급 배지에 또는 세포 배양물에 첨가됨으로써 사용될 수 있다.

발명의 효과

[0048]

본 발명에 의한 솔루션 플라즈마 공정을 이용하여 해중합된 올리고알지네이트는 기존에 해중합되지 않은 올리고알지네이트에 비해 자유 라디칼 소거 활성이 뛰어나고, 동물세포 및 식물체의 성장을 촉진하는 능력이 뛰어나다. 본 발명에 의한 올리고알지네이트는 생체 적합성 화합물을 유해하거나 독성이 발생할 수 있는 화학물질의 처리 없이 이용할 수 있어 매우 유용하다.

도면의 간단한 설명

[0050]

도 1은 SPP에 의한 알지네이트의 해중합을 나타낸다. 0-60분 동안 플라즈마 방전 시 0.1%(a), 0.3%(b) 및 0.5%(c) 알지네이트 용액의 색 변화를 나타내며, 농도에 따라 무색에서 노란색으로 변화했다. 0-60분 동안 플라즈마 방전에 의해 해중합된 0.1%(d), 0.3%(e) 및 0.5%(f) 알지네이트의 UV-Vis 스펙트럼은 올리고알지네이트의 형성을 나타내는 265nm에서 피크 상승을 보여준다.

도 2는 플라즈마 방전에 의한 알지네이트 용액의 점도 감소를 확인한 결과이다. (a) 알지네이트 용액의 점도는 15분 동안 24.6에서 1.8cps(0.5%)로 감소했다. 점도의 감소는 플라즈마에 의한 알지네이트 분자의 화학 사슬 분리로 인한 것이다. (b) 다양한 농도(0.1, 0.3, 0.5%)에서 알지네이트의 TLC와 0-60분 동안 플라즈마 처리는 짧은 당을 나타냈다.

도 3은 올리고알지네이트의 FT-IR 분석결과이다. 1602, 1409, 1123 cm^{-1} 에서의 인터페로그램은 C=O 신축, -CO 굽힘 및 알지네이트의 M과 G 단량체 사이의 -C-O-C- 결합에 해당한다. 플라즈마 처리된 알지네이트와 처리되지 않은 알지네이트에서 눈에 띄는 차이는 발견되지 않았다. Interferogram은 IR 스펙트럼에서 동일한 패턴을 보여 0분(녹색), 15분(파란색), 30분(분홍색) 또는 60분(빨간색)의 다양한 방전 시간 동안 플라즈마에 의한 알지네이트 분해가 알지네이트의 화학 구조가 아닌 분자량이 변화하였음을 확인하였다.

도 4는 플라즈마 처리된 알지네이트의 HPAEC 분석결과이다. 0.5% 알지네이트($0.56\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)의 분취량($25\mu\text{L}$)을 30°C 에서 DionexCarboPac PA1 컬럼($250\text{mm} \times 4\text{mm}$)에 주입했다. 샘플을 (a) 탈이온화된 여과수, (b) 100mM NaOH 중 500mM 아세트산나트륨, 및 (c) 100mM NaOH로 $1\text{mL} \cdot \text{min}^{-1}$ 의 유속으로 용출했다. 러닝타임은 52분이었다. guluronic acid와 mannuronic acid의 머무름 시간은 각각 25.13분과 25.75분이었다.

도 5는 올리고알지네이트의 DPPH 소거 활성을 확인한 결과이다.

도 6은 HEK293 세포의 증식에 대한 올리고알지네이트의 효과를 나타낸다. 아무 처리하지 않은 알지네이트(a) 또는 30분(b) 또는 60분(c) 동안 SPP처리한 0.5% 알지네이트 용액에서 얻은 올리고알지네이트($100\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)는 시험관 내에서 HEK293 세포의 성장을 상당히 촉진했다. 올리고알지네이트의 농도가 5에서 $1000\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 로 증가함에 따라 세포 수가 크게 증가했으며 정상 HEK293 세포에 대한 독성이 없었다.

도 7은 HEK 세포에 대한 올리고알지네이트의 독성을 확인한 결과이다. 올리고알지네이트의 세포자멸사 효과를 형광현미경으로 조사하였다. AO/EB 염색된 대조군(상단) 및 올리고알지네이트 처리된(하단) HEK 세포의 이미지는 존재하는 경우 세포자멸사를 나타낸다. 녹색으로 표시된 세포는 생존 가능한 세포(a, d)를 나타낸다. 노란색의 초기 세포사멸 세포(c, e)의 세포; 및 적색 또는 주황색의 세포, 후기 세포자멸사(죽은) 세포(e, f)를 나타낸다.

도 8 상추의 성장에 대한 올리고알지네이트의 영향을 나타낸다. (a)대조군 상추; (b)알지네이트($100\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)이 첨가된 양상추; 및 (c) SPP에 의해 0.5% 알지네이트 용액을 사용하여 제조된 올리고알지네이트($100\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)를 60분 동안 보충한 상추를 나타낸다. 상추의 성장을 촉진하는 올리고알지네이트의 효과는 파종 45일에 관찰하였다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0051]

이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 바람직한 실시예를 제시한다. 그러나 하기의 실시예는 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐, 하기 실시예에 의해 본 발명의 내용이 한정되는 것은 아니다.

- [0053] [준비에]
- [0054] 시약, 식물 및 세포주
- [0055] 3,5-디니트로살리실산, 니트로블루 테트라졸륨(nitroblue tetrazolium), 2,2-디페닐-1-피크릴-히드라질(2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazyl)(DPPH), 포름산(formic acid), n-부탄올, 황산세륨, 황산세륨 결정, 몰리브덴산암모늄 (ammonium molybdate), 황산, 아크리딘 오렌지(acridine orange, $C_{17}H_{19}N_3$), 브롬화에티듐(ethidium bromide, $C_{21}H_{20}BrN_3$), 3-(4,5-디-메틸-2-티아졸릴)-2,5-디페닐-2H-테트라졸륨 브로마이드(MTT), Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), 소 태아 혈청 (FBS) 및 스트렙토마이신은 Sigma-Aldrich(St. Louis, MO, 미국) 및 HiMedia(뮌바이, 인도)에서 구입했다.
- [0056] 인간 배아 신장(HEK) 세포는 인도 푸네에 있는 국립 세포 과학 센터(NCCS)에서 공급받았다. 세포를 CO_2 인큐베이터(Thermo Fisher, 미국)에서 $37^\circ C$ 에서 10% FBS와 스트렙토마이신이 보충된 DMEM에서 배양하여 70-80% 농도에 도달시켰다. 양상추 씨앗은 대한민국 인천의 현지 시장에서 구입했다.

실시예 1

- [0058] **SPP에 의한 해중합 알지네이트의 분광학적 조사**
- [0060] SPP에 의한 OA 분해
- [0061] 알지네이트를 물에 녹이고 SPP를 이용하여 다음과 같이 분해하였다. 플라즈마는 단극 펄스 전원 공급 장치(EnerPlus, 대한민국)를 사용하는 물 냉각기(예스쿨, 대한민국)가 장착된 알지네이트 용액이 포함된 반응기에서 방전되었다. 농도 0.1, 0.3 또는 0.5%(w/v)의 알지네이트를 수성 환경에서 펄스 폭 $2\mu s$ 및 주파수 35kHz로 800V에서 15, 30 또는 60분 동안 플라즈마 방전을 수행했다.
- [0063] 올리고알지네이트의 특성화
- [0064] UV-Vis 분광광도법
- [0065] 알지네이트의 분해는 UV-Vis 분광기(UV3600, UV-Vis NIR spectrophotometer, Shimadzu, 일본)를 사용하여 시각적으로 색상 변화에 대해 주기적으로 모니터링했다. 플라즈마 방전을 거친 알지네이트 용액의 시각적 색상 변화는 알지네이트가 올리고알지네이트로 분해되는 일차 확인을 위해 기록되었다. 알지네이트 용액의 UV-Vis 스펙트럼은 UV-Visible 분광기를 사용하여 200~800 nm 스펙트럼 범위의 실온에서 얻었다.
- [0067] 그 결과, 다양한 방전 시간(0~60분)에서 플라즈마 처리된 다양한 농도의 알지네이트 수용액의 색상 변화 및 UV-Vis 흡수 스펙트럼은 도 1과 같다. 방전 시간 및 알지네이트 농도가 증가함에 따라 무색의 알지네이트 용액이 노란색에서 갈색으로 색깔이 변했다. 0.1% 농도의 알지네이트 용액에서는 0, 15, 30, 60분 방출 시 색 변화가 관찰되지 않았으나 0.3%와 0.5% 알지네이트 용액에서 15~60분 방출 시 색 변화가 관찰되었다(도 1a, b). 방전 시간이 증가함에 따라 색상은 0.5%에서 옅은 노란색에서 밝은 갈색으로 변하여 알지네이트의 화학 구조 변화를 나타냈다(도 1c).
- [0068] 본 발명자들은 각각 0~2400분 및 20~500kGy 동안 알지네이트 분해에 대한 γ 선 조사의 길이와 선량을 조사했다. 분해에 대한 최적 선량은 100 kGy였으며 처리된 알지네이트의 갈변이 관찰되었다. UV-Vis 분광법은 낮은 농도(0.1%)에서 높은 농도(0.5%)까지 265nm에서 피크 강도의 증가를 보여주었다(도 1d-f). 265 nm에서의 피크는 폴리머로부터 올리고머 분자의 형성을 나타내며, 이는 방사선 유발 알지네이트 분해에 대한 이전 보고와 잘 일치하였다. γ 선을 처리한 1.0% 알지네이트 용액은 주쇄 분해 후 이중결합이 형성되어 UV-Vis 분광법에서 265 nm에서 피크를 보였다. 흥미롭게도 본 발명에서 얻은 올리고알지네이트에는 330 및 365 nm에서 피크가 없었으며 이는 깨끗하고 순수함을 나타낸다.

실시예 2

[0070] **올리고알지네이트의 점도, 화학적 유사성 및 크로마토그래피**

[0071] 폴리머의 점도는 일반적으로 Mw 및 농도에 비례한다. 알지네이트 용액의 점도는 용액 내 알지네이트의 농도 및 복잡성에 따라 달라질 수 있다. SPP를 사용하여 처리된 OA 용액의 점도를 조사하였다.

[0073] 점도 분석

[0074] 플라즈마 방전 전후의 알지네이트 용액의 점도는 점도계(Vibro SV-100, A&D Co., 일본)를 사용하여 상온(25℃)에서 측정하였다.

[0075] 그 결과, 알지네이트 용액의 점도는 15분 동안 플라즈마 방전에 의해 급격히 감소했다(도 2a). 용액에서 플라즈마 방전하는 동안 온도가 지속적으로 증가하여 단기간에 90℃에 도달했다. 0.5, 0.3, 0.1%(w/v) 알지네이트 용액의 초기 점도는 각각 24.6, 13.8, 6.3 cps이었으며, 15분 방전 후 2.4, 30분 방전 후 1.8 cps로 감소하였으나, 더 긴 처리 기간 동안 추가 감소가 관찰되었다(도 2). 일반적으로 고분자의 점도는 농도뿐만 아니라 분자량에 비례한다. 즉, 알지네이트 용액의 점도는 알지네이트의 농도와 사슬 내 알지네이트 분자의 복잡성에 따라 달라진다.

[0076] 플라즈마 방전에 의한 해중합으로 인한 점도 감소는 당 분자의 방출을 동반한다. 플라즈마 처리에 의한 환원당의 방출을 입증하기 위해 DNS assay를 수행하였다.

[0078] 알지네이트 분해 확인

[0079] 용액 내 플라즈마 방전에 의한 알지네이트의 분해는 3,5-디니트로살리실산(DNS) 분석, 박층 크로마토그래피(thin-layer chromatography, TLC) 및 고성능 음이온 교환 크로마토그래피(high-performance anionexchange chromatography, HPAEC)로 확인하였다.

[0081] DNS 분석

[0082] DNS 분석은 탄수화물에서 방출되는 환원당의 양을 정량화하는 비특정 방법이다. 알지네이트에서 방출되는 환원당을 검출하기 위해 DNS 용액(수산화나트륨, 페놀, Na₂S₂O₅)과 분해된 알지네이트 혼합물을 끓는 물에 10분 동안 보관하고 상온(25℃)에서 식힌 후 540nm에서 반응 흡광도를 측정하였다. 분해 과정에서 알지네이트로부터 방출된 환원당은 포도당(Sigma-Aldrich, 미국)을 사용하여 작성된 표준 곡선을 사용하여 정량화하였다. 분석은 신뢰성을 위해 3회 수행하였다.

[0084] 그 결과, 도 2에 나타난 바와 같이, 환원당의 방출은 플라즈마 방전 동안 0.1% 및 0.3% 알지네이트 용액 모두에서 유의미하지 않았다. 그러나 0.5% 알지네이트 용액에서 환원당의 양은 플라즈마 방전 15분에 2.28배, 30분에 3.10배, 60분에 4.35배 증가하였다. 15분 이상의 플라즈마 방전 시 알지네이트 용액의 점도에 영향을 미치지 않고 진행 중인 알지네이트의 해중합으로 인해 환원당이 계속 방출되는 것으로 나타났다. 본 발명자들은 점도 변화와 총 당량 간의 상관관계를 연구하고 반응 혼합물의 점도를 낮추면 환원당의 방출이 중단된다는 결론을 내렸다.

[0086] 박층 크로마토그래피(TLC)

[0087] 다양한 방전 시간 동안 분해된 알지네이트의 프로파일을 실리카겔 플레이트(K5F, Merck, 미국)를 사용하여 TLC로 조사하였다. 샘플은 n-부탄올/포름산/물, 4:6:1(v/v/v)의 용매 시스템을 사용하여 현상한 다음, 플레이트를 세륨 설페이트 시약(0.02% 세륨 설페이트 결정, 0.05% 암모늄 몰리브데이트 및 에탄올 중 5% H₂SO₄) 3초 동안

담그고, 100° C에서 10분 동안 가열하였다.

[0088] 박층 크로마토그래피(TLC)도 플라즈마 방전에 의해 생성된 올리고알지네이트를 검출하는데 사용되었으며 방전 시간에 따른 다양한 중합도를 나타내었다. 도 2b에 도시된 바와 같이, 토출 시간이 증가함에 따라 다양한 종류 및 양의 올리고알지네이트가 검출되었다. 올리고알지네이트는 TLC에 의한 플라즈마 방전 60분 후에도 0.1% 알지네이트 용액에서 검출되지 않았다. 한편, 0.3%와 0.5% 알지네이트 용액에서는 G1, G2, G3, G4 및 기타 단당류가 다양한 양으로 검출되었으며, 방출시간이 증가할수록 양이 증가하였다. 그러나 올리고알지네이트는 세균 알지네이트 lyase와 함께 6시간 배양 후에도 검출되지 않았다. 15, 30, 60분 동안 플라즈마와 함께 방출된 0.3% 및 0.5% 알지네이트 용액에서 G1~G7 당의 검출은 알지네이트의 분해 및 다양한 길이의 올리고알지네이트 형성을 보장했다.

[0090] 고성능 음이온 교환 크로마토그래피(high-performance anionexchange chromatography, HPAEC)

[0091] HPAEC도 기존에 알려진 방식으로 수행하였다. 25 마이크로리터의 0.5% 알지네이트(0.56 mg · mL)를 자동 샘플러를 통해 DionexCarboPac PA1(250 mm x 4 mm)에 주입하고 A: 탈이온 여과수, B: 500 mM 아세트산 나트륨이 포함된 100mM NaOH; 및 C: 1mL · min⁻¹의 유속에서 100mM NaOH; 으로 용리했다. 실행 시간은 52분이었다. 글루론산 및 만누론산의 머무름 시간은 표준을 사용하여 결정하였다.

[0093] 따라서 SPP는 단기간에 올리고알지네이트를 생산하는 데 이상적일 수 있음을 확인하였다. 추가 연구를 위해 0.5% 알지네이트 용액에서 생성된 올리고알지네이트를 사용했다.

[0095] FT IR 분광법

[0096] FT-IR은 화합물의 기능적 화학적 결합을 감지하는 데 유용한 기술이다. 이 연구에서 FT-IR은 플라즈마 방전 중 알지네이트의 화학적 변형을 검증하는 데 사용하였다. 플라즈마 처리된 알지네이트와 처리되지 않은 알지네이트의 순도와 기능적 연관성은 알지네이트와 올리고알지네이트를 동결건조한 후 400~650 nm 파장에서 FT-IR 분광계(Agilent Technologies Cary 670 FTIR)를 사용하여 조사했다.

[0097] 플라즈마 처리 전후의 0.5% 알지네이트 용액의 스펙트럼은 도 3에 나타났다. 알지네이트(0분)는 1085 cm⁻¹, 1123 cm⁻¹, 1409 cm⁻¹, 1602 cm⁻¹, 3258 cm⁻¹, 3928 cm⁻¹에서 밴드를 나타낸다. 3258 cm⁻¹의 밴드는 O-H 신축, 1602 cm⁻¹ COO⁻ 신축(비대칭 신축), 1409 cm⁻¹ COO⁻ 신축(대칭 신축), 1085 cm⁻¹ C-O-C 신축을 나타낸다. 3200과 3900 cm⁻¹의 밴드는 각각 카르복실레이트와 하이드록실 그룹의 형성과 관련이 있다. Watthanaphanit and Saito(2013)는 1603과 1408 cm⁻¹에서 COO⁻ 그룹에 해당하는 두 개의 진동을 감지했다. 그들은 또한 FT-IR 결과가 양극성(bipolar) 전력을 사용하는 솔루션 플라즈마에 의해 유발된 알지네이트의 화학 구조에서 측정 가능한 변화가 아니라고 제안했다. 1300 cm⁻¹의 밴드는 골격 구조에 할당되었고 1085 cm⁻¹ 및 1025 cm⁻¹의 밴드는 각각 글루론산의 CO-O-C 신축 및 OH 굽힘에 기인한다.

[0098] 고성능 음이온 교환 크로마토그래피(HPAEC)를 수행하여 SPP를 사용하여 올리고알지네이트 제제에서 글루론산과 만누론산의 존재를 확인했다(도 4). 알지네이트(0분) 및 올리고알지네이트(15, 30 및 60분)의 크로마토그램은 도 4a-d에 나와 있다. 글루론산과 만누론산의 머무름 시간은 각각 25.13분과 25.75분이었다. 신호 강도는 플라즈마 방전 15분부터 지속적으로 증가했다. 25.70분, 25.73분, 25.75분에서 눈에 띄는 피크가 각각 15분, 30분 및 60분 동안 플라즈마를 방전하여 얻은 올리고알지네이트에서 관찰되었다. 피크는 플라즈마 방전에 의해 알지네이트로부터 방출된 만누론산을 나타내는 것으로 보인다. 각 샘플에서 피크의 이동은 알지네이트의 비특이적 절단으로 인한 것일 수 있다. 그러나, 글루론산에 대한 특정 피크는 관찰되지 않았으며, 이는 분 발명의 실시예에 사용된 알지네이트가 글루론산보다 만누론산을 더 많이 함유하고 있음을 시사한다. 24시간 동안 효소 가수분해를 통해 얻은 올리고당의 농도는 HPLC를 이용하여 1.89 mg · mL⁻¹로 측정되었다. 흥미롭게도, 환원당을 기본으로 한 0.56 mg · mL⁻¹ 올리고당이 SPP 60분 후 생성되었다. 따라서, 올리고알지네이트의 빠른 생산이 다시 증명되었다.

실시예 3

[0100] 올리고알지네이트의 항산화 포텐셜 확인

[0101] 산화 스트레스는 인체의 노화를 유도하고 세포 변형을 일으켜 종양과 암을 유발한다. 항산화 반응은 자유 라디칼의 형성을 감소시켜 이러한 부정적인 반응을 억제한다. 분명히, 알지네이트의 분자량이 감소함에 따라 알지네이트의 항산화 활성이 증가한다. mannuronic acid와 guluronic acid의 비율(M/G)은 알지네이트의 항산화 거동을 조절하는데 중요한 인자는 아니지만 올리고알지네이트의 거동은 분자량에 따라 달라진다.

[0103] 올리고알지네이트의 체외 항산화 활성

[0104] 알지네이트와 올리고알지네이트는 자유 라디칼 소거 특성으로 인해 보라색에서 노란색으로 변색되는 DPPH를 측정하여 항산화 활성을 조사했다. 다양한 농도의 샘플을 DPPH를 함유하는 에탄올에 첨가하고 4시간 동안 인큐베이션하였다. 혼합물의 흡광도는 517 nm에서 분광 광도계를 사용하여 측정되었다. 대조군으로 시트르산을 사용하였다. DPPH 라디칼을 소거하는 능력은 하기 식 (1)로 측정하였다. 모든 실험은 삼중으로 수행하였다.

$$[0105] \text{DPPH 소거 활성(\%)} = \frac{A_c - A_s}{A_c} \times 100 \quad \dots\dots\dots \text{식 (1),}$$

[0106] 여기서 Ac는 DPPH 용액 대조군의 흡광도이고 As는 샘플의 흡광도이다.

[0107] SPP를 통해 0.1~0.5% 알지네이트 용액에서 제조된 올리고알지네이트($0.56 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)의 DPPH 라디칼 소거 활성은 최고에 53%였다. 도 5에 나타난 바와 같이, 0.1% 및 0.3% 알지네이트 용액에서 얻은 올리고알지네이트의 항산화 활성은 20%의 억제를 나타내었다. SPP를 통해 0.5% 알지네이트 용액에서 얻은 올리고알지네이트는 처리되지 않은 알지네이트보다 10~36% 더 높은 항산화 활성을 보였다. 일반적으로 탄수화물에서는 전자 이동이 일어나지 않지만 수소 원자 이동은 발생한다. 탄수화물은 일반적으로 이중 결합이나 방향족 고리를 포함하지 않기 때문에 라디칼 첨가는 가능한 메커니즘으로 간주되지 않는다. UV-Vis 분광광도법 및 항산화 활성 분석 결과, 올리고알지네이트의 항산화 활성은 수소 원자 이동 및 라디칼 첨가를 통한 라디칼 소거에 의한 것으로 추정된다. 플라즈마 방전 시간의 함수로서 항산화 활성의 증가는 C-4와 C-5 사이의 이중 결합 형성과 관련될 수 있다.

실시예 4

[0109] 올리고알지네이트가 동물 세포의 생존 및 증식에 미치는 영향

[0110] 올리고알지네이트의 기능은 HEK 세포의 증식을 향상시키는 능력에 대해 추가로 조사하였다.

[0112] 올리고알지네이트의 시험관내 증식 활성

[0113] 세포 생존력 분석

[0114] MTT 기반 분석은 앞서 설명한 대로 HEK293 세포의 생존력을 확인하기 위해 수행하였다. HEK 세포(1×10^4)를 96-웰 플레이트에서 100 μL 의 성장 배지에 접종하고 세포를 30 또는 60분 동안 처리된 다양한 농도의 올리고알지네이트 존재하에, CO₂ 인큐베이터에서 24시간 동안 37°C에서 배양하였다($0\text{--}100 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$). 올리고알지네이트의 최대 치사 농도의 절반(LD50)은 대조군과 비교하여 세포 성장을 50% 억제하는 데 필요한 농도로 계산하였다. 메틸렌 블루를 DMSO로 용출시켜 HEK293 세포에 대한 올리고알지네이트의 세포독성 효과를 조사하였고, 분광광도계를 이용하여 OD595를 측정하였다. 모든 실험은 삼중으로 수행하였다. 세포 생존율의 백분율은 다음 식을 사용하여 계산하였다.

[0115] 세포 생존력(%) = $(\text{Abs}_{\text{Sample}} / \text{Abs}_{\text{Control}}) \times 100$

[0117] 시험관내 증식 분석

[0118] HEK 세포의 형태적 변화를 아크리딘 오렌지와 에티뮴 브로마이드를 이용한 이중 염색으로 조사하였다. 세포를 24-웰 플레이트(1×10^4 세포 $\cdot$ 웰⁻¹)에서 밤새 인큐베이션하였다. LD50에서 올리고알지네이트(30분 또는 60분 동안 플라즈마로 방전)로 처리한 후 세포를 수확하고 PBS로 2회 세척하였다. 에티뮴 브로마이드/아크리딘 오렌지 용액(1:1 비율)을 세포 현탁액(2 μ L)에 첨가하고 형광 현미경을 사용하여 핵의 형태를 평가하였다. 모든 실험은 삼중으로 수행하였다.

[0119] 올리고알지네이트 또는 알지네이트의 존재 또는 부재 하에 인큐베이션 24시간 동안 생존한 세포의 수를 계수함으로써 세포 성장의 백분율을 분석하였다. 0.5% 알지네이트 용액에서 유래된 올리고알지네이트($100 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)는 HEK293 세포의 성장을 촉진시켰다. 올리고알지네이트의 농도가 독성이 없는 정상 HEK293 세포 배양에서 $1000 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 로 증가함에 따라 세포 수는 크게 증가했다(도 6). 올리고알지네이트의 최고 농도($1000 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)에서 세포 수가 40% 이상 증가했다. 한편, 알지네이트는 사용된 최고 농도에서 세포 성장을 20%까지 향상시킬 수 있다. 세포 증식은 올리고알지네이트의 용량에 따라 달라지는데, 이는 본 발명에서 SPP를 사용하여 얻은 올리고알지네이트가 인간 세포의 성장을 지원할 수 있음을 나타냈다. 층 형태의 알지네이트 기반 하이드로겔은 유사한 결과를 나타내어 세포 증식 및 분화 측면에서 줄기 세포의 생물학적 활성을 향상시켰다.

[0120] 또한, 형광현미경을 사용하여 HEK 세포에 흡수된 올리고알지네이트의 독성을 조사했다. 올리고알지네이트를 첨가한 직후에 LIVE/DEAD 분석 키트를 사용하여 세포 생존 및 생존에 대한 올리고알지네이트의 효과를 평가하였다. 이 연구에서 제조된 올리고알지네이트는 정상 세포에서 세포사멸을 지연시킬 수 있다(도 7). 올리고알지네이트가 첨가된 HEK 세포는 녹색 형광으로 균일하게 염색되었고 세포 사멸 특징은 관찰되지 않았으나 대조군에서는 형태학적 변화와 세포 사멸 세포가 관찰되었다(도 7). 생존 가능한 HEK 세포는 녹색 형광으로 염색하였고 죽은 세포는 적색 형광으로 염색하였다. 세포독성의 결과는 AO/EB로 염색된 세포에 대한 관찰과 일치하였다.

실시예 5

[0122] **올리고알지네이트가 상추 성장에 미치는 영향**

[0123] 이후, 이를 활용하기 위해 SPP에 의해 제조된 올리고알지네이트로 $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 의 최적 농도에서 상추의 성장을 촉진하는 것을 확인하였다.

[0125] 올리고알지네이트에 의한 식물 성장 촉진 평가

[0126] 식물 성장에 대한 올리고알지네이트의 영향은 플라즈마 방전에 의해 분해된 0.1-0.5% 올리고알지네이트를 함유한 하이포넥스 용액(0.1%)에서 상추를 15-60분 동안 배양함으로써 시험하였다. 대조군으로 알지네이트(0.1~0.5%)를 함유한 하이포넥스 용액에서 배양한 상추를 사용하였다. 모든 배양물은 주변 조건 하에 유지되었다. 데이터는 주기적으로 수집되었고 최종 수확은 45일 동안 재배한 후 수행하였다.

[0127] 도 8a는 대조 상추, 도 8b는 알지네이트가 첨가된 상추($100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$); 및 도 8c는 0.5% 알지네이트 용액을 사용하여 60분 동안 플라즈마를 방전하여 제조한 올리고알지네이트($100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)를 보충한 상추이다.

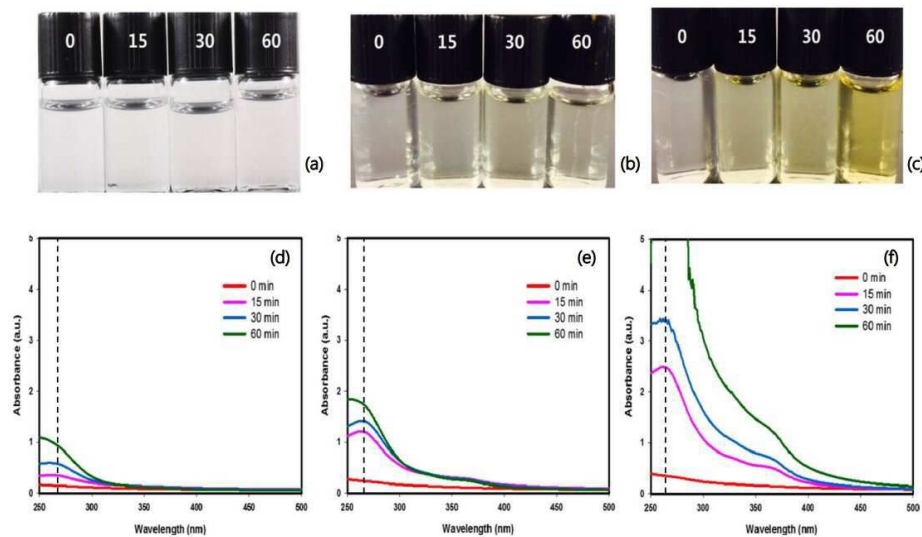
[0128] 재배 45일 동안 상추의 성장에 대한 올리고알지네이트의 영향이 나타났다(도 8c). 올리고알지네이트가 처리된 상추는 대조군과 알지네이트 처리된 상추보다 키가 커졌다. 뿌리는 더 풍부하고 더 길었고 잎은 수와 표면적 모두에서 다른 식물보다 컸다. 알지네이트는 또한 식물의 성장을 촉진하였지만, 올리고알지네이트만큼은 아니었음을 확인하였다.

[0130] 종합하면, 본 발명에서 발명자들은 반응성이 높은 SPP가 매우 짧은 반응 시간 동안 one-pot 반응에서 올리고알지네이트로의 분해에 적용될 수 있음을 확인하였다. 생성된 올리고알지네이트의 물리화학적 특성의 특성화는 올리고알지네이트의 화학 구조가 SPP에 의해 변경되지 않음을 나타내었다. SPP를 이용하여 제조된 올리고알지네이트는 ROS의 quencher 및 식물 및 동물 세포 배양의 안전한 성장 촉진제로 활용할 수 있는 생물학적 기능을 나타냈다.

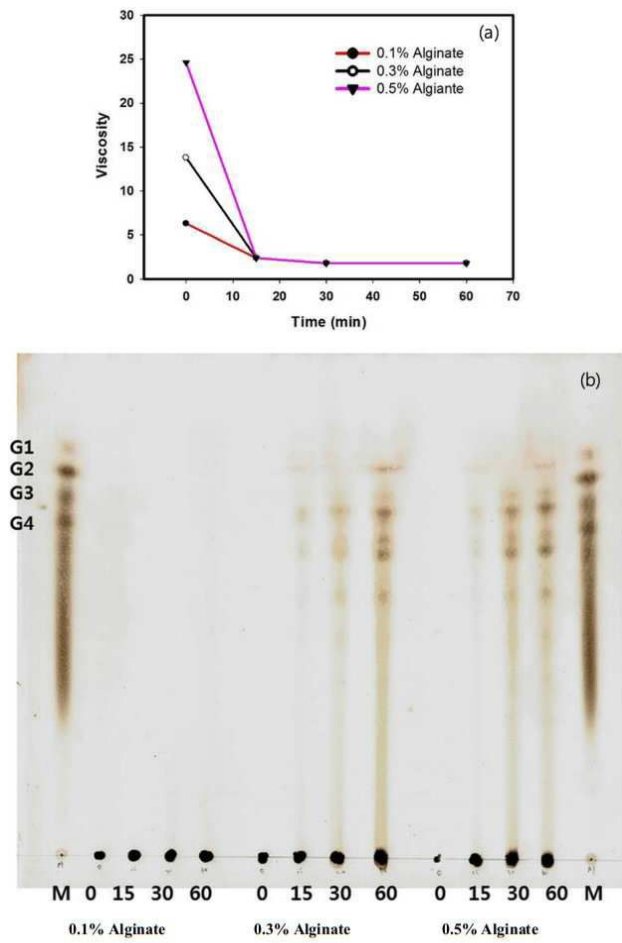
[0132] 이상, 본 발명의 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였지만, 이러한 구체적인 기술은 단지 바람직한 실시 양태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

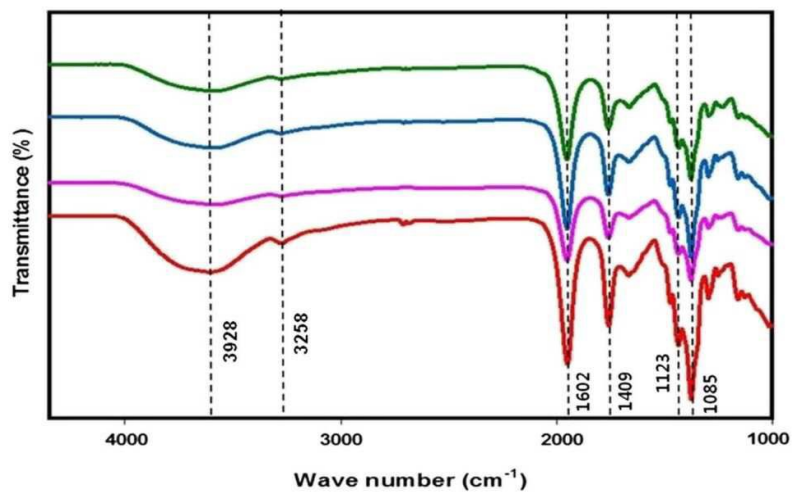
도면1



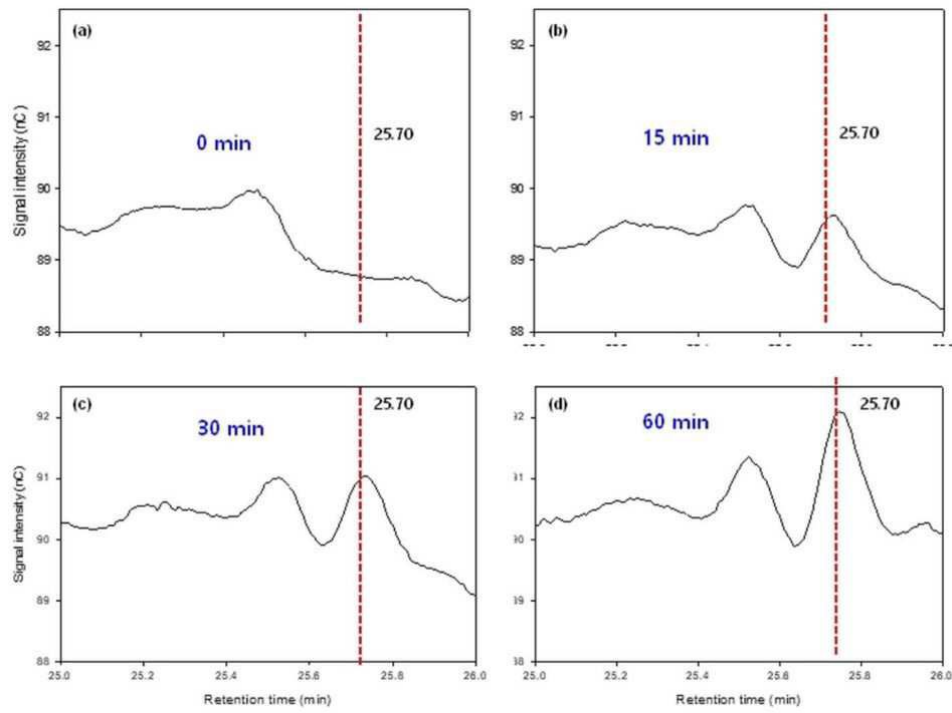
도면2



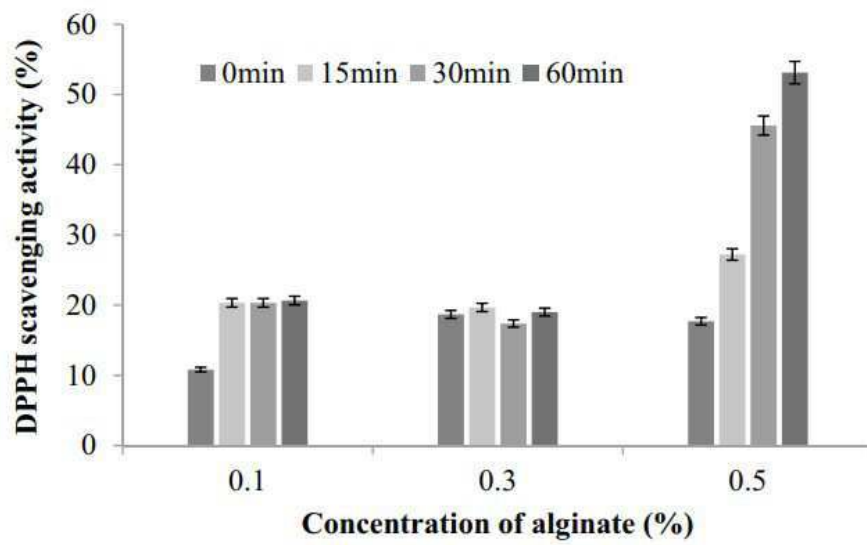
도면3



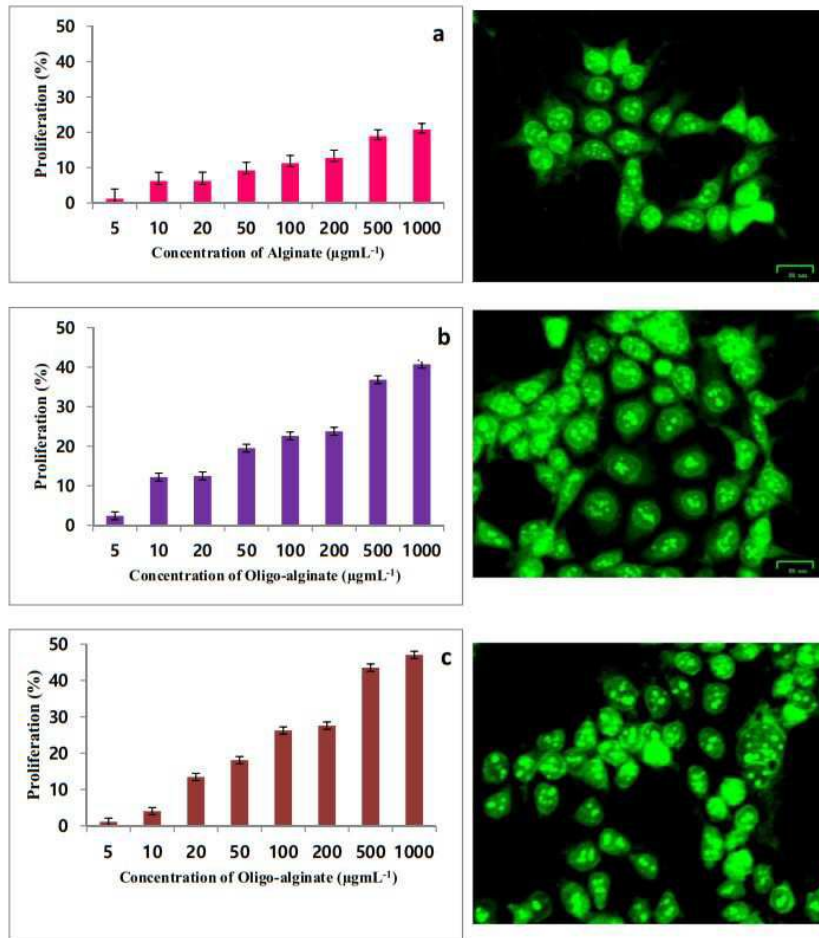
도면4



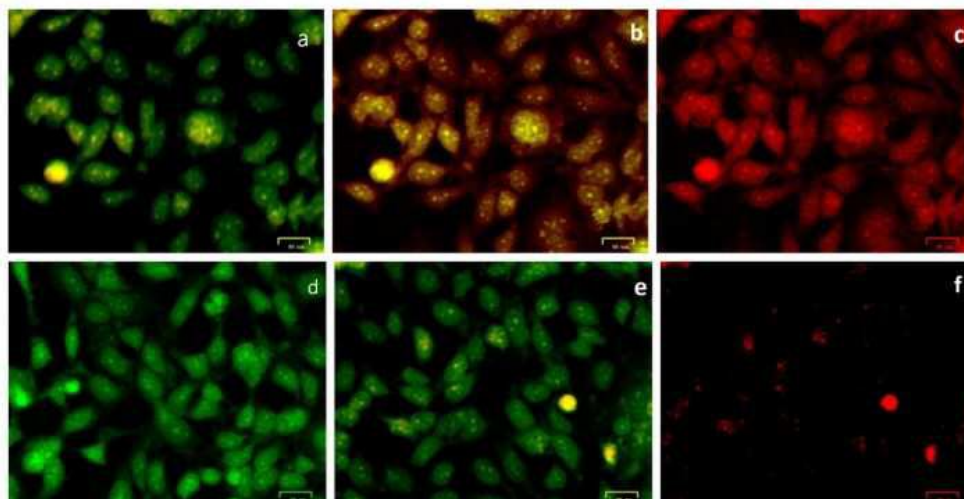
도면5



도면6



도면7



도면8

