



등록특허 10-2788126



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2025년04월01일

(11) 등록번호 10-2788126

(24) 등록일자 2025년03월25일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A23L 33/105 (2016.01) A23L 17/60 (2016.01)
A61K 31/737 (2006.01) A61K 36/03 (2006.01)
A61K 8/73 (2006.01) A61K 8/9711 (2017.01)
A61P 29/00 (2023.01) A61P 31/00 (2006.01)
A61P 37/02 (2006.01) A61P 37/08 (2006.01)
A61Q 19/00 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A23L 33/105 (2016.08)
A23L 17/60 (2016.08)

(21) 출원번호 10-2024-0079108

(22) 출원일자 2024년06월18일

심사청구일자 2024년06월18일

(56) 선행기술조사문헌

KR1020130012417 A*

신지연. 톳의 면역 증진 효능 검증과 추출방법에 따른 후코이단 정성분석. 경희대학교 대학원 석사 학위 논문. 2013년 1부.*

KR1020100001375 A

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자

국립부경대학교 산학협력단

부산광역시 남구 용소로 45, 부경대학교내 (대연동)

제주대학교 산학협력단

제주특별자치도 제주시 제주대학로 102 (아라일동, 제주대학교)

(72) 발명자

조승목

부산광역시 남구 용소로 45, 응비관 1417호(대연동, 국립부경대학교대연캠퍼스)

김성희

부산광역시 남구 수영로 324, 9층 A-913호 (대연동, 리마크빌 대연)

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

특허법인충현

전체 청구항 수 : 총 13 항

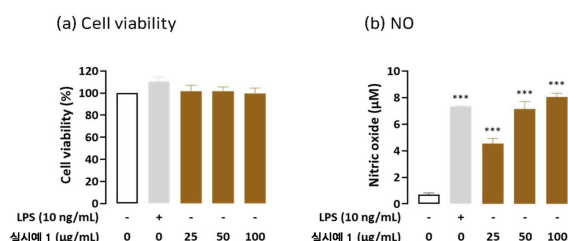
심사관 : 김현주

(54) 발명의 명칭 톳 후코이단을 유효성분으로 함유하는 면역기능 증진용 조성물

(57) 요약

본 발명은 면역기능 증진용 조성물에 관한 것으로서, 톳 후코이단을 유효성분으로 함유함으로써, 면역기능이 우수하게 향상되며 독성이 없으므로 식품의 형태로 섭취할 수 있어 장기적으로 일상생활의 식이 및 생활습관을 통하여 면역기능을 향상시킬 수 있다.

대표도 - 도7



(52) CPC특허분류

A61K 31/737 (2013.01)
A61K 36/03 (2013.01)
A61K 8/73 (2013.01)
A61K 8/9711 (2017.08)
A61P 29/00 (2023.02)
A61P 31/00 (2018.01)
A61P 37/02 (2018.01)
A61P 37/08 (2018.01)
A61Q 19/00 (2013.01)

(72) 발명자

박세림

부산광역시 남구 수영로298번길 39-17, 1501호 (대연동)

최윤진

부산광역시 사하구 신산북로43번길 59, 105동 402호 (신평동, 사하 뷰웰)

김두현

부산광역시 남구 용소로34번길 6-6, 1001호 (대연동)

최기범

부산광역시 남구 용소로 45, 웅비관 1428호(대연동, 국립부경대학교대연캠퍼스)

유호등

부산광역시 남구 수영로 283, 101동 1013호 (대연동, 벽산e-솔렌스힐)

박소홍

부산광역시 금정구 금강로 502, 204동 1003호 (구서동, 롯데캐슬골드1단지)

오회원

부산광역시 해운대구 마린시티2로 33, 101동 2212호 (우동, 해운대두산위브더제니스)

지선미

경상남도 거제시 능포로8길 13, 나빌레라 2차 404호 (능포동)

이가현

부산광역시 부산진구 전포대로 148, 2303호 (전포동, 유럽노르웨이숲)

전유진

제주특별자치도 제주시 월산남2길 92, 아너서클 2동(해안동)

제준건

제주특별자치도 제주시 신설동길 66, C동 204호 (이도이동, 수선화시영연립주택)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1525013763
과제번호	202204882
부처명	해양수산부
과제관리(전문)기관명	해양수산과학기술진흥원
연구사업명	수산식품산업맞춤형기술개발사업
연구과제명	수산물 유래 고시형 건강기능식품 및 기능성표시식품 개발
과제수행기관명	국립부경대학교 산학협력단
연구기간	2022.04.01 ~ 2026.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

톳 후코이단을 유효성분으로 함유하되,

상기 톳 후코이단은 (A) 건조된 톳 분말을 용매에 3 내지 10시간 동안 침지시키는 단계; (B) 상기 침지된 톳 분말을 건져내어 pH 8-10의 염기성 용액에 투입하여 1 내지 5시간 동안 전처리하는 단계; (C) 상기 전처리된 톳 분말을 세척한 후 효소분해를 수행하는 단계; (D) 상기 효소분해된 톳 효소분해물을 pH 6-7의 용액에 투입하여 10 내지 20시간 동안 처리하여 알긴산을 침전시키는 단계; 및 (E) 상기 알긴산이 제거된 톳 효소분해물의 탈염을 위해 여과 후 농축시키는 단계;를 포함하여 제조되어,

전체 톳 후코이단 중에서 푸코오스(fucose) 20 내지 35 중량%, 갈락토오스(galactose) 2 내지 6 중량%, 자일로오스(xylose) 1 내지 3 중량% 및 만노오스(mannose) 1 내지 3 중량%로 이루어진 중성당(neutral sugar); 및 1 내지 20 중량%의 우론산(uronic acid)을 포함하는 것을 특징으로 하는 면역기능 증진을 위한 식품 조성물.

청구항 2

삭제

청구항 3

삭제

청구항 4

삭제

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 우론산(uronic acid)은 만누론산(mannuronic acid)인 것을 특징으로 하는 면역기능 증진을 위한 식품 조성물.

청구항 6

삭제

청구항 7

제1항에 있어서, 상기 (A)단계에서 침지시키는 용매는 물, 탄소수 1 내지 4의 저급알코올 또는 이들의 혼합용매인 것을 특징으로 하는 면역기능 증진을 위한 식품 조성물.

청구항 8

제1항에 있어서, 상기 (B)단계에서 pH 8-10의 염기성 용액은 탄산수소나트륨인 것을 특징으로 하는 면역기능 증진을 위한 식품 조성물.

청구항 9

제1항에 있어서, 상기 (C)단계에서 효소는 상기 효소는 IUBMB 효소 명명 클래스 EC 3.2.1.4의 효소인 것을 특징으로 하는 면역기능 증진을 위한 식품 조성물.

청구항 10

제9항에 있어서, 상기 IUBMB 효소 명명 클래스 EC 3.2.1.4의 효소는 트리코더마 레세이(Trichoderma reesei) ATCC 26921 미생물로부터 추출한 1,4-(1,3:1,4)-β-D-글루칸 4-글루카노 가수분해효소(1,4-(1,3:1,4)-β-D-Glucan 4-glucano-hydrolase)인 것을 특징으로 하는 면역기능 증진을 위한 식품 조성물.

청구항 11

제10항에 있어서, 상기 트리코더마 레세이(*Trichoderma reesei*) ATCC 26921 미생물로부터 추출한 1,4-(1,3:1,4)- β -D-글루칸 4-글루카노 가수분해효소(1,4-(1,3:1,4)- β -D-Glucan 4-glucano-hydrolase)는 셀룰라스트(Celluclast)인 것을 특징으로 하는 면역기능 증진을 위한 식품 조성물.

청구항 12

제1항에 있어서, 상기 (D)단계에서 pH 6-7의 용액은 염화칼슘인 것을 특징으로 하는 면역기능 증진을 위한 식품 조성물.

청구항 13

제1항에 있어서, 상기 (E)단계에서는 여과하여 분자량이 12 kDa 이하인 것을 제거하는 것을 특징으로 하는 면역기능 증진을 위한 식품 조성물.

청구항 14

투스 후코이단을 유효성분으로 함유하되,

상기 톨 후코이단은 (A) 건조된 톨 분말을 용매에 3 내지 10시간 동안 침지시키는 단계; (B) 상기 침지된 톨 분말을 건져내어 pH 8-10의 염기성 용액에 투입하여 1 내지 5시간 동안 전처리하는 단계; (C) 상기 전처리된 톨 분말을 세척한 후 효소분해를 수행하는 단계; (D) 상기 효소분해된 톨 효소분해물을 pH 6-7의 용액에 투입하여 10 내지 20시간 동안 처리하여 알긴산을 침전시키는 단계; 및 (E) 상기 알긴산이 제거된 톨 효소분해물의 탈염을 위해 여과 후 농축시키는 단계;를 포함하여 제조되어,

전체 톨 후코이단 중에서 푸코오스(fucose) 20 내지 35 중량%, 갈락토오스(galactose) 2 내지 6 중량%, 자일로오스(xylose) 1 내지 3 중량% 및 만노오스(mannose) 1 내지 3 중량%로 이루어진 중성당(neutral sugar); 및 1 내지 20 중량%의 우론산(uronic acid)을 포함하므로 감염성 질환, 염증성 질환, 알러지 질환 또는 만성피로로 이루어진 군으로부터 선택되는 면역력 저하로 인한 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 15

삭제

청구항 16

투스 후코이단을 유효성분으로 함유하되,

상기 톨 후코이단은 (A) 건조된 톨 분말을 용매에 3 내지 10시간 동안 침지시키는 단계; (B) 상기 침지된 톨 분말을 건져내어 pH 8-10의 염기성 용액에 투입하여 1 내지 5시간 동안 전처리하는 단계; (C) 상기 전처리된 톨 분말을 세척한 후 효소분해를 수행하는 단계; (D) 상기 효소분해된 톨 효소분해물을 pH 6-7의 용액에 투입하여 10 내지 20시간 동안 처리하여 알긴산을 침전시키는 단계; 및 (E) 상기 알긴산이 제거된 톨 효소분해물의 탈염을 위해 여과 후 농축시키는 단계;를 포함하여 제조되어,

전체 톨 후코이단 중에서 푸코오스(fucose) 20 내지 35 중량%, 갈락토오스(galactose) 2 내지 6 중량%, 자일로오스(xylose) 1 내지 3 중량% 및 만노오스(mannose) 1 내지 3 중량%로 이루어진 중성당(neutral sugar); 및 1 내지 20 중량%의 우론산(uronic acid)을 포함하는 것을 특징으로 하는 면역기능 증진을 위한 사료 조성물.

청구항 17

투스 후코이단을 유효성분으로 함유하되,

상기 톨 후코이단은 (A) 건조된 톨 분말을 용매에 3 내지 10시간 동안 침지시키는 단계; (B) 상기 침지된 톨 분말을 건져내어 pH 8-10의 염기성 용액에 투입하여 1 내지 5시간 동안 전처리하는 단계; (C) 상기 전처리된 톨 분말을 세척한 후 효소분해를 수행하는 단계; (D) 상기 효소분해된 톨 효소분해물을 pH 6-7의 용액에 투입하여 10 내지 20시간 동안 처리하여 알긴산을 침전시키는 단계; 및 (E) 상기 알긴산이 제거된 톨 효소분해물의 탈염을 위해 여과 후 농축시키는 단계;를 포함하여 제조되어,

전체 톨 후코이단 중에서 푸코오스(fucose) 20 내지 35 중량%, 갈락토오스(galactose) 2 내지 6 중량%, 자일로

오스(xylose) 1 내지 3 중량% 및 만노오스(mannose) 1 내지 3 중량%로 이루어진 중성당(neutral sugar); 및 1 내지 20 중량%의 우론산(uronic acid)을 포함하는 것을 특징으로 하는 면역기능 증진을 위한 화장료 조성물.

청구항 18

- (A) 건조된 톳 분말을 용매에 3 내지 10시간 동안 침지시키는 단계;
- (B) 상기 침지된 톳 분말을 건져내어 pH 8-10의 염기성 용액에 투입하여 1 내지 5시간 동안 전처리하는 단계;
- (C) 상기 전처리된 톳 분말을 세척한 후 효소분해를 수행하는 단계;
- (D) 상기 효소분해된 톳 효소분해물을 pH 6-7의 용액에 투입하여 10 내지 20시간 동안 처리하여 알긴산을 침전시키는 단계; 및
- (E) 상기 알긴산이 제거된 톳 효소분해물의 탈염을 위해 여과 후 농축시키는 단계;를 포함하는 것을 특징으로 하는 톳 후코이단의 제조방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 톳 후코이단을 유효성분으로 함유하여 면역기능을 향상시킬 수 있는 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 최근 생활수준이 높아지고 식생활이 서구화되면서 영양과잉, 운동부족 등으로 인한 비만, 당뇨, 고혈압 및 심장병 등과 같은 생활 습관병(성인병) 발병이 높아지고 있다. 또한, 평균수명 연장으로 인한 노령화 사회로의 진입 속도가 빨라지면서 건강증진에 대한 관심이 높아지고 있다.

[0003] 건강증진(health promotion)이란 질병, 특히 만성 퇴행성질환이나 감염증, 계속되는 스트레스에 대한 저항력의 증가 그리고 일상의 활동력 증대를 꾀하는 것으로서, 그 방법으로는 영양의 개선, 면역기능 강화, 적절한 운동과 휴식, 정신적 활동의 지속 등 생활양식 전반에 미치는 관리가 필요하다.

[0004] 특히, 면역력이 높으면 평소에 질병이 잘 걸리지 않으며, 설혹 질병에 걸리더라도 회복이 빠르다. 이러한 건강한 상태를 지속적으로 유지하면서 나이를 먹으면 수명이 연장되는 것은 자명한 일이다. 따라서 면역력은 인간의 건강과 수명에 직결되어 있으며, 건강을 유지하고 수명을 연장하기 위해서는 면역력을 관리하는 것이 필수적이라고 할 수 있겠다.

[0005] 면역(Immune)이란, 인간 및 동물의 체내에서 외래성 및 내인성 이물질을 생리적으로 인식하여 배제하고, 항상성을 유지시키기 위한 기작을 일컫는다. 여기에서 이물질을 항원(antigen)이라고 하며, 이를 제거하는 과정에 수많은 종류의 백혈구 세포와 단백질이 관여한다. 면역은 크게 태어날 때부터 지니고 있는 선천면역과 후천적으로 생활 등에 적응되어 얻어지는 획득면역으로 구분된다.

[0006] 선천면역(innate immunity)은 자연면역, 자연저항이라고도 한다. 항원에 대해 비특이적으로 반응하며 특별한 기억작용은 없다. 선천적인 면역체계로는 항원의 침입을 차단하는 피부·점액조직, 강산성의 위산, 혈액에 존재하는 보체(complement) 등이 있다. 세포로는 식균작용을 담당하는 대식세포(macrophage)와 다형핵 백혈구(polymorphonuclear leukocyte), 감염세포를 죽일 수 있는 K세포 등이 있다. 또한, 대식세포에 의해 생산되는 사이토카인(cytokine)이 있다. 실제로 대부분의 감염은 상기 선천면역에 의해 방어된다.

[0007] 획득면역(acquired immunity)은 선천면역을 보강하는 역할을 하며 후천면역, 적응면역(adaptive immunity)이라고도 한다. 항원이 체내에 침입하면 림프구에 의한 면역반응이 일어나 항원에 대한 강한 저항성이 기억되어 다시 항원이 침입할 때 특이적으로 반응하여 효과적으로 항원을 제거할 수 있다. 여기에서 림프구(lymphocytes)는 척추동물 및 포유류에서 면역 반응을 맡고 있는 백혈구 가운데 하나로 전체 백혈구 중 약 25% 정도를 차지하고 있으며, 흉선(thymus)에서 성숙되고 변형되어 면역항체를 보유하고 있어서 항원이 체내에 침입하면 그 항원이 몸 안에서 해로운 반응을 하지 못하도록 인체의 면역반응에 일차적으로 반응하는 세포이다.

[0008] 획득면역에는 두 종류의 림프구가 있는데 세포성 면역(cellular immunity)을 담당하는 T세포와 체액성 면역(humoral immunity)을 담당하는 B세포로 크게 구분된다. T세포는 가슴샘의 상피세포에서 특수한 내부 환경과 흉선의 액성인자에 의해 림프구로 분화하는 세포로, B세포에 항체생산 자극을 주고 종양 세포 등의 항원을 직접

공격한다. B세포는 가슴샘과는 독립되어 골수에서 림프구로 분화하는 세포로, 항원자극 및 T세포를 매개로 한 자극에 따라 항체생산세포로 성숙하여 IgM, IgG, IgA, IgE의 항체를 생산하고 분비한다.

[0009] 항원 감염에 대한 최초의 인식은 주로 대식세포(macrophage)가 수행한다. 대식세포가 항원을 탐식하는 과정에서 면역반응을 매개하는 사이토카인(cytokine)이 생산된다.

[0010] 사이토카인은 신체의 방어체계를 제어하고 자극하는 신호물질로 사용되는 당단백질로 면역, 감염병, 조혈기능, 조직회복, 세포의 발진 및 성장에 중요한 기능을 한다. 사이토카인은 국소부위에 염증을 유발함으로써 면역세포가 감염부위에 모이게 하는 기능을 가지고 있어, 염증성 사이토카인(inflammatory cytokine)이라 불리기도 한다. 가장 중요한 면역기능은 인터루킨(Interleukin-1,-6,-12), 인터페론 감마(IFN- γ), 종양괴사인자(TNF)로 알려진 사이토카인의 집단에 의해 수행된다.

[0011] 종양괴사인자인 TNF(tumor necrosis factor)는 세균벽에서 나오는 내독소인 지질다당체에 의해 T세포에서 분비되는 종양을 괴사시키는 물질을 말하는 것으로, 가장 중요한 염증인자이며 때때로 중증의 전신적 염증을 유발하기도 한다. 그러나 면역학적 측면에서 TNF는 감염부위로 혈액 내 백혈구인 호중구 및 단핵구를 집합시키고 감염세포의 살해능을 가지는 작동세포로의 분화 및 활성화를 유도하는 것으로 보고 있다. 이러한 TNF의 기능은 화학주성을 가지는 사이토카인의 생산 유도능과 함께 혈관내피세포 및 백혈구 간의 부착분자(adhesionmolecule)의 진화력을 높이는 기능에 의한다.

[0012] 이와 같이 면역기능은 대식세포, 림프구(T세포, B세포) 등의 매우 다양한 세포와 인터루킨, TNF 등의 사이토카인과 같은 단백질의 작용에 의해 이루어진다.

선행기술문헌

특허문헌

[0013] (특허문헌 0001) 대한민국 공개특허 제2010-0001375호

(특허문헌 0002) 대한민국 공개특허 제2015-0132946호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0014] 본 발명의 목적은 톱 후코이단을 유효성분으로 함유하여 면역기능을 증진시킬 수 있는 식품 조성물을 제공하는 데 있다.

[0015] 또한, 본 발명의 다른 목적은 톱 후코이단을 유효성분으로 함유하여 면역력 저하로 인한 질환을 예방 또는 치료할 수 있는 약학적 조성물을 제공하는 데 있다.

[0016] 또한, 본 발명의 또 다른 목적은 톱 후코이단을 유효성분으로 함유하여 면역기능을 증진시킬 수 있는 사료 조성물을 제공하는 데 있다.

[0017] 또한, 본 발명의 또 다른 목적은 톱 후코이단을 유효성분으로 함유하여 면역기능을 증진시킬 수 있는 화장품 조성물을 제공하는 데 있다.

과제의 해결 수단

[0018] 상기한 목적을 달성하기 위한 본 발명의 면역기능 증진을 위한 식품 조성물은 톱 후코이단을 유효성분으로 함유할 수 있다.

[0019] 상기 톱 후코이단은 전체 톱 후코이단 대비 중성당(neutral sugar) 25 내지 50 중량% 및 우론산(uronic acid) 1 내지 20 중량%를 포함할 수 있다.

[0020] 상기 중성당(neutral sugar)은 푸코오스(fucose), 갈락토오스(galactose), 자일로오스(xylose) 및 만노오스(mannose)를 포함할 수 있다.

[0021] 상기 푸코오스(fucose)는 전체 톱 후코이단 대비 20 내지 35 중량%로 함유될 수 있다.

- [0022] 상기 우론산(uronic acid)은 만누론산(mannuronic acid)일 수 있다.
- [0023] 상기 톳 후코이단은 (A) 건조된 톳 분말을 용매에 3 내지 10시간 동안 침지시키는 단계; (B) 상기 침지된 톳 분말을 건져내어 pH 8-10의 염기성 용액에 투입하여 1 내지 5시간 동안 전처리하는 단계; (C) 상기 전처리된 톳 분말을 세척한 후 효소분해를 수행하는 단계; (D) 상기 효소분해된 톳 효소분해물을 pH 6-10의 용액에 투입하여 10 내지 20시간 동안 처리하여 알긴산을 침전시키는 단계; 및 (E) 상기 알긴산이 제거된 톳 효소분해물의 탈염을 위해 여과 후 농축시키는 단계;를 포함할 수 있다.
- [0024] 상기 (A)단계에서 침지시키는 용매는 물, 탄소수 1 내지 4의 저급알코올 또는 이들의 혼합용매일 수 있다.
- [0025] 상기 (B)단계에서 pH 8-10의 염기성 용액은 탄산수소나트륨일 수 있다.
- [0026] 상기 (C)단계에서 효소는 상기 효소는 IUBMB 효소 명명 클래스 EC 3.2.1.4의 효소일 수 있다.
- [0027] 상기 IUBMB 효소 명명 클래스 EC 3.2.1.4의 효소는 트리코더마 레세이(*Trichoderma reesei*) ATCC 26921 미생물로부터 추출한 1,4-(1,3:1,4)- β -D-글루칸 4-글루카노 가수분해효소(1,4-(1,3:1,4)- β -D-Glucan 4-glucano-hydrolase)일 수 있다.
- [0028] 상기 트리코더마 레세이(*Trichoderma reesei*) ATCC 26921 미생물로부터 추출한 1,4-(1,3:1,4)- β -D-글루칸 4-글루카노 가수분해효소(1,4-(1,3:1,4)- β -D-Glucan 4-glucano-hydrolase)는 셀루클라스트(Celluclast)일 수 있다.
- [0029] 상기 (D)단계에서 pH 6-10의 용액은 염화칼슘일 수 있다.
- [0030] 상기 (E)단계에서는 여과하여 분자량이 12 kDa 이하인 것을 제거할 수 있다.
- [0031] 또한, 상기한 다른 목적을 달성하기 위한 본 발명의 면역력 저하로 인한 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물은 톳 후코이단을 유효성분으로 함유할 수 있다.
- [0032] 상기 면역기능 저하로 기인되는 질환은 감염성 질환, 염증성 질환, 알러지 질환 또는 만성피로로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다.
- [0033] 또한, 상기한 또 다른 목적을 달성하기 위한 본 발명의 면역기능 증진을 위한 사료 조성물은 톳 후코이단을 유효성분으로 함유할 수 있다.
- [0034] 또한, 상기한 또 다른 목적을 달성하기 위한 본 발명의 면역기능 증진을 위한 화장품 조성물은 톳 후코이단을 유효성분으로 함유할 수 있다.

발명의 효과

- [0035] 본 발명의 톳 후코이단은 면역 기능을 증진시키는 효능이 매우 뛰어나며, 독성이 없으므로 장기적으로 일상생활의 식이 및 생활습관을 통하여 면역기능을 향상시킬 수 있다.
- [0036] 또한, 본 발명의 톳 후코이단은 경쟁력이 있는 면역 증강용 식품, 면역 증강용 화장품, 면역 증강용 사료 및 면역 증강용 의약품 제조에 효과적이다.

도면의 간단한 설명

- [0037] 도 1은 본 발명의 실시예 1에 따라 제조된 톳 후코이단의 평균 분자량을 측정한 그래프이다.
- 도 2는 본 발명의 실시예 1에 따라 제조된 톳 후코이단의 구조를 분석하기 위해 수행한 전처리 방법을 나타낸 흐름도이다.
- 도 3은 본 발명의 실시예 1에 따라 제조된 톳 후코이단의 단량체를 MALDI-TOF MS로 측정한 그래프이다.
- 도 4는 본 발명의 실시예 1에 따라 제조된 톳 후코이단의 단량체를 UPLC-Q-TOF-MS/MS로 측정한 그래프이다.
- 도 5는 본 발명의 실시예 1에 따라 제조된 톳 후코이단에서 분리한 각 단량체 (A) $\text{Fuc}_1(\text{SO}_3)_1$, (B) $\text{Fuc}_2(\text{SO}_3)_1$, (C) $\text{Xyl}_1\text{Fuc}_2(\text{SO}_3)_1$, (D) $\text{Hex}_5\text{Fuc}_1(\text{SO}_3)_1$ 를 MS/MS spectrum으로 측정한 그래프이다.
- 도 6은 본 발명의 실시예 1에 따라 제조된 톳 후코이단에서 분리한 각 단량체 (A) $\text{Fuc}_1(\text{SO}_3)_1$, (B) $\text{Fuc}_2(\text{SO}_3)_1$,

(C) $Xy_1Fuc_2(SO_3)_1$, (D) $Hex_5Fuc_1(SO_3)_1$ 의 구조 및 조성비를 나타낸 것이다.

도 7a는 본 발명의 실시예 1에 따라 제조된 톳 후코이단의 세포 생존율을 측정한 그래프이며; 도 7b는 본 발명의 실시예 1에 따라 제조된 톳 후코이단의 산화질소(NO)의 양을 측정한 그래프이다.

도 8a는 대식세포에서 본 발명의 실시예 1에 따라 제조된 톳 후코이단에 대한 iNOS와 COX-2 발현을 나타낸 웨스턴 블롯이며; 도 8b는 상기 도 8a에서 측정된 iNOS 발현량을 정량화한 그래프이고; 도 8c는 상기 도 8a에서 측정된 COX-2 발현량을 정량화한 그래프이다.

도 9는 무처리군, LPS군 및 실시예 1에 따라 제조된 톳 후코이단을 25, 50, 100 ug/ml의 농도로 처리 시 대식세포의 모양을 촬영한 사진이다.

도 10a는 대식세포에서 본 발명의 실시예 1에 따라 제조된 톳 후코이단으로 처리 시 탐식능력을 나타낸 그래프이며; 도 10b는 본 발명의 실시예 1에 따라 제조된 톳 후코이단의 탐식능력정도를 나타낸 그래프이고; 도 10c는 본 발명의 실시예 1에 따라 제조된 톳 후코이단으로 처리 시 형광강도는 나타낸 사진이다.

도 11a는 본 발명의 실시예 1에 따라 제조된 톳 후코이단으로 처리 시 TNF- α 분비량을 측정한 그래프이며; 도 11b는 본 발명의 실시예 1에 따라 제조된 톳 후코이단으로 처리 시 IL-6 분비량을 측정한 그래프이고; 도 11c는 본 발명의 실시예 1에 따라 제조된 톳 후코이단으로 처리 시 IL-1 β 분비량을 측정한 그래프이다.

도 12a는 본 발명의 실시예 1에 따라 제조된 톳 후코이단으로 처리 시 I κ B- α 및 NF- κ B 단백질의 발현을 나타낸 웨스턴 블롯이며; 도 12b는 상기 도 12a에서 측정된 I κ B- α 단백질의 발현량을 정량화한 그래프이고; 도 12c는 상기 도 12a에서 측정된 NF- κ B 단백질의 발현량을 정량화한 그래프이며; 도 12d는 본 발명의 실시예 1에 따라 제조된 톳 후코이단으로 처리 시 p-ERK, p-JNK, p-p38 단백질의 발현을 나타낸 웨스턴 블롯이고; 도 12e는 상기 도 12d에서 측정된 p-ERK 단백질의 발현량을 정량화한 그래프이며; 도 12f는 상기 도 12d에서 측정된 p-JNK 단백질의 발현량을 정량화한 그래프이고; 도 12g는 상기 도 12d에서 측정된 p-p38 단백질의 발현량을 정량화한 그래프이다.

도 13a는 CON군, CCP군, 홍삼+CPP군 및 실시예 1+CPP군의 체중변화를 나타낸 그래프이며; 도 13b는 CON군, CCP군, 홍삼+CPP군 및 실시예 1+CPP군의 NK 세포 활성을 나타낸 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0038] 본 발명은 톳 후코이단을 유효성분으로 함유하여 면역기능을 향상시킬 수 있는 조성물에 관한 것이다.
- [0039] 후코이단은 끈적끈적한 점질 구조의 황산염화한 다당류로서, 푸코오스(fucose) 등의 기본당과 황산기가 결합된 것을 의미한다.
- [0041] 이하, 본 발명을 상세하게 설명한다.
- [0042] 본 발명의 면역기능 증진을 위한 조성물은 톳 후코이단을 유효성분으로 함유한다.
- [0043] 상기 톳(*Sargassum fusiforme*)은 모자반과에 속하는 갈조류 바닷말의 일종으로서, 식이섬유가 풍부하고 아이오딘, 칼슘, 철분 등 여러 무기염류가 아주 풍부해 빈혈에 좋다.
- [0044] 본 발명의 톳 후코이단은 중성당(neutral sugar), 우론산(uronic acid), 플라보노이드, 탄수화물, 폴리페놀, 단백질 등을 함유하며, 전체 톳 후코이단 대비 상기 중성당은 25 내지 50 중량%, 바람직하게는 30 내지 40 중량%; 및 우론산 1 내지 20 중량%, 바람직하게는 2 내지 5 중량%를 포함한다.
- [0045] 상기 중성당은 푸코오스(fucose), 갈락토오스(galactose), 자일로오스(xylose) 및 만노오스(mannose)로 이루어지며; 상기 우론산은 만누론산(mannuronic acid)으로 이루어진다.
- [0046] 상기 중성당은 푸코오스(fucose) 20 내지 35 중량%, 갈락토오스(galactose) 2 내지 6 중량%, 자일로오스(xylose) 1 내지 3 중량% 및 만노오스(mannose) 1 내지 3 중량%로 함유되는 것으로서, 중성당 중에서 푸코오스가 가장 높은 비중을 차지한다.
- [0047] 본 발명의 톳 후코이단은 (A) 건조된 톳 분말을 용매에 3 내지 10시간 동안 침지시키는 단계; (B) 상기 침지된 톳 분말을 건져내어 pH 8-10의 염기성 용액에 투입하여 1 내지 5시간 동안 전처리하는 단계; (C) 상기 전처리된 톳 분말을 세척한 후 효소분해를 수행하는 단계; (D) 상기 효소분해된 톳 분말을 pH 6-7의 용액에 투입하여 10 내지 20시간 동안 처리하여 알긴산을 침전시키는 단계; 및 (E) 상기 알긴산이 제거된 톳 효소분해물의 탈염을

위해 여과 후 농축시키는 단계;를 포함하여 제조된다.

- [0048] 먼저, 상기 (A)단계에서는 건조된 톳 분말과 용매를 1 : 20 내지 60 중량비로 혼합하여 3 내지 10시간, 바람직하게는 5 내지 7시간 동안 침지시키므로 잔여 염분을 제거하여 효소 분해 공정 시 원하는 효과를 얻을 수 있는 유효성분을 효과적으로 다량 생성되도록 한다.
- [0049] 상기 침지용매로는 물, 탄소수 1 내지 4의 저급알코올 또는 이들의 혼합용매를 들 수 있으며; 상기 물은 특별히 한정되지 않지만 예를 들어 지하수, 정제수, 증류수, 탈이온수 등이 이용될 수 있다.
- [0050] 상기 탄소수 1 내지 4의 저급알코올은 특별히 한정할 필요는 없으나, 바람직하게는 메탄올, 에탄올, 프로판올, 부탄올, 노말-프로판올, 이소-프로판올 또는 노말-부탄올을 들 수 있다.
- [0051] 상기 혼합용매는 특별히 한정할 필요는 없으나, 바람직하게는 20 내지 80 부피%의 메탄올, 에탄올, 부탄올 또는 프로판올 수용액을 들 수 있다.
- [0052] 침지시간이 상기 하한치 미만인 경우에는 잔여 불순물에 의해 이후 공정이 원활이 수행되지 못할 수 있으며, 상기 상한치 초과한 경우에는 잔여 불순물이 남지 않지만 오히려 톳이 변질되어 면역기능 증진 효과가 현저히 저하될 수 있다.
- [0053] 다음으로, 상기 (B)단계에서는 상기 침지된 톳 분말을 건져내어 pH 8-10의 염기성 용액에 투입하여 65 내지 85 ℃, 바람직하게는 70 내지 80 ℃에서 1 내지 5시간, 바람직하게는 1 내지 2시간 동안 전처리를 수행하므로 이후 효소분해 반응 시 면역기능 증진 효과를 더욱 향상되도록 한다.
- [0054] 상기 pH 8-10의 염기성 용액은 특별히 한정되지 않지만, 바람직하게는 탄산수소나트륨을 들 수 있으며, 상기 pH 범위를 만족하도록 희석하여 사용될 수 있다. pH가 상기 범위를 만족하지 못하는 경우에는 이후 효소분해 반응 시 면역기능 증진 효과가 향상되지 못할 수 있다.
- [0055] 염기성 용액으로 처리 시 온도 및 시간이 상기 하한치 미만인 경우에는 불순물이 제거되지 않아 이후 효소처리 시 원하는 유효성분을 수득하지 못하여 면역기능 증진 효과가 없을 수 있으며, 상기 상한치 초과인 경우에는 톳이 변질되어 면역기능 증진 효과가 현저히 저하될 수 있다.
- [0056] 다음으로, 상기 (C)단계에서는 상기 전처리된 톳 분말을 세척한 후 효소분해를 수행하므로 톳의 세포벽을 효과적으로 파괴하여 면역기능 증진 효과를 향상시킬 수 있는 유효성분을 다량 생성시킨다.
- [0057] 구체적으로 pH는 4.0-4.5가 되도록 조절하며, 전처리된 톳 분말 100 중량부에 대하여 효소 3 내지 6 중량부 및 정제수 150 내지 250 중량부로 첨가하여 40 내지 60 ℃, 바람직하게는 45 내지 50 ℃에서 15 내지 30시간, 바람직하게는 20 내지 25시간 동안 효소분해를 수행한다.
- [0058] 상기 효소는 IUBMB 효소 명명 클래스 EC 3.2.1.4의 효소일 수 있으며; 상기 IUBMB 효소 명명 클래스 EC 3.2.1.4의 효소는 트리코더마 레세이(Trichoderma reesei) ATCC 26921미생물로부터 추출한 1,4-(1,3:1,4)-β-D-글루칸 4-글루카노 가수분해효소(1,4-(1,3:1,4)-β-D-Glucan 4-glucano-hydrolase)로서, 셀룰라스트(Cellulast)일 수 있다.
- [0059] 상기 효소를 사용하지 않고 펙티나아제(Pectinase), 비스코자임(Viscozyme) 등의 다른 효소를 사용할 경우에는 효소분해가 원활히 이루어지지 않아 조성물의 면역기능 증진 효과가 없거나 현저히 낮을 수 있다.
- [0060] 효소의 함량이 상기 하한치 미만인 경우에는 효소 분해가 충분히 이루어지지 않아 면역기능 증진 효과를 향상시킬 수 있는 유효성분이 생성되지 못할 수 있으며, 상기 상한치를 초과하여도 추가적인 효소 분해는 일어나지 않아 제조비용만 상승할 뿐 면역기능 증진 효과의 상승을 기대할 수 없다.
- [0061] 또한, 온도 및 시간이 상기 범위를 벗어나는 경우에는 효소가 잘 작동되지 않아 효소분해가 수행되지 않을 수 있다.
- [0062] 다음으로, 상기 (D)단계에서는 상기 효소분해된 톳 효소분해물을 불활성화시킨 후 상온에서 냉각하고 여과한 다음 pH 6-10의 용액에 투입하여 10 내지 20시간, 바람직하게는 12 내지 15시간 동안 처리하여 알긴산을 침전시킨다.
- [0063] 상기 톳 효소분해물에 함유된 알긴산을 침전시켜 제거하므로 면역기능 증진 효과를 향상시킬 수 있다.
- [0064] 상기 pH 6-10의 용액은 알긴산을 침전시킬 수 있는 것이라면 한정되지 않지만, 바람직하게는 염화칼슘을 들 수

있으며, 상기 pH 범위를 만족하도록 희석하여 사용될 수 있다.

- [0065] 상기 pH 6-10의 용액은 톳 효소분해물 100 중량부에 대하여 10 내지 30 중량부, 바람직하게는 15 내지 20 중량부로 사용된다. pH 6-10의 용액의 함량이 상기 하한치 미만인 경우에는 알긴산이 침전되지 않을 수 있으며, 상기 상한치 초과인 경우에는 톳 효소분해물이 변성되어 원하는 효과를 얻을 수 없다.
- [0066] 다음으로, 상기 (E)단계에서는 상기 알긴산이 제거된 톳 효소분해물을 여과하여 분자량이 12 kDa 이하인 것을 제거한다.
- [0067] 상기 알긴산이 제거된 톳 효소분해물에서 분자량이 12 kDa 이하인 것을 제거하므로 염분을 다량 제거하며, 원하는 유효성분의 순도를 높여 면역기능 증진 효과를 더욱 향상시킬 수 있다.
- [0068] 상기 여과방법은 특별히 한정되지 않지만, 한외여과법, 정밀여과법 또는 나노여과법을 사용할 수 있으며, 바람직하게는 한외여과법을 들 수 있다.
- [0070] 또한, 본 발명은 톳 후코이단을 유효성분으로 함유하여 면역력 저하로 인한 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물, 면역기능 증진을 위한 사료 조성물, 또는 면역기능 증진을 위한 화장품 조성물을 제공할 수 있다.
- [0072] 면역기능 조절 및 염증성 장질환의 예방 또는 개선용 사료 조성물, 면역기능 조절 및 염증성 장질환의 예방 또는 치료를 위한 동물용 약학 조성물 또는 장기능 개선용 식품 조성물을 제공할 수 있다.
- [0073] 상기 면역기능 저하로 기인되는 질환은 감염성 질환, 염증성 질환, 알러지 질환 또는 만성피로로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다.
- [0075] 본 명세서에서 용어 ‘유효성분으로 함유하는’이란 톳 후코이단의 효능 또는 활성을 달성하는 데 충분한 양을 포함하는 것을 의미한다. 일례로, 상기 톳 후코이단은 10 내지 1500 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 바람직하게는 10 내지 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 사용된다. 톳 후코이단은 천연물로서 과량 투여하여도 인체에 부작용이 없으므로 본 발명의 조성물 내에 포함되는 톳 후코이단의 양적 상한은 당업자가 적절한 범위 내에서 선택하여 실시할 수 있다.
- [0076] 본 발명은 톳 후코이단을 유효성분으로 포함하는 면역기능 증진을 위한 식품 조성물에 관한 것이다.
- [0077] 상기 ‘식품 조성물’은 유효성분으로 톳 후코이단 이외에, 식품 제조에 통상적으로 사용되는 식품의 기준 및 규격(‘식품공전’)에 기재된 식품으로 사용가능한 식품 원료, 식품첨가물 공전에 기재된 식품첨가물을 포함한다.
- [0078] 특별히 한정할 필요는 없으나 예를 들어 단백질, 탄수화물, 지방, 영양소, 조미제 및 향미제를 포함한다. 상기 탄수화물은 단당류, 예를 들어, 포도당, 과당 등; 이당류, 예를 들어 말토스, 설탕, 유당 등; 올리고당 또는 폴리사카라이드, 예를 들어 텍스트린, 물엿, 사이클로텍스트린 등; 당알코올, 예를 들어 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등을 사용할 수 있다. 상기 향미제는 천연 향미제[타우마틴, 스테비아 추출물(예를 들어 레바우디오시드 A, 글리시르히진 등)] 및 합성 향미제(사카린, 아스파르탐 등)를 사용할 수 있다.
- [0079] 상기 톳 후코이단을 유효성분으로 식품 조성물을 제조하는 경우 톳 후코이단은 면역기능을 증진시킬 수 있는 함량이면 특별히 한정할 필요는 없으나, 예를 들어 0.1 내지 99 중량%, 0.5 내지 95 중량%, 1 내지 90 중량%, 2 내지 80 중량%, 3 내지 70 중량%, 4 내지 60 중량%, 5 내지 50 중량%로 포함될 수 있다.
- [0080] 상기 식품 조성물에서 유효성분인 톳 후코이단은 섭취자의 상태, 체중, 질병의 유무나 정도 및 기간에 따라 다르지만, 통상의 기술자에 의해 적절하게 선택될 수 있다. 예를 들어 1일 투여량을 기준으로 0.1 내지 50 g, 바람직하게는 0.5 내지 20 g, 더욱 바람직하게는 1 내지 10 g, 더더욱 바람직하게는 1.2 내지 8 g, 가장 바람직하게는 1.5 내지 5 g일 수 있고, 투여 횟수는 특별히 한정할 필요는 없으나 1일 3회 내지 1주일에 1회의 범위 내에서 통상의 기술자가 조절할 수 있다. 건강 및 위생을 목적으로 하거나 또는 건강 조절을 목적으로 하는 장기간의 섭취의 경우에는 상기 범위 이하일 수 있다.
- [0081] 상기 식품 조성물은 특별히 한정할 필요는 없으나 예를 들어 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 환제, 엑스제, 젤리 제형, 티백 제형 또는 음료 제형일 수 있다.
- [0082] 또한 일반 식품에 면역기능을 증진시키기 위한 기능성을 부여하기 위하여 상기 미역 추출물을 첨가할 수 있으며, 첨가가 가능한 식품은, 특별히 한정할 필요는 없으나 예를 들어 식품위생법 제7조에 따른 식품의 기준 및 규격(‘식품공전’)에 예시된 과자류, 빵 또는 떡류, 코코아가공품류 또는 초콜릿류, 식육 또는 알가공품, 어육가공품, 두부류 또는 묵류, 면류, 다류, 커피, 음료류, 특수용도식품, 장류, 조미식품, 드레싱류, 김치류,

것갈류, 절임식품, 조림식품, 주류, 건포류, 기타 식품류 등에 첨가될 수 있다. 또한 축산물위생관리법 제4조에 따른 축산물의 가공기준 및 성분규격(‘축산물공전’)에 예시된 유가공품, 식육가공품 및 포장육, 알가공품에 첨가될 수 있다.

- [0083] 한편, 상기 톳 후코이단을 유효성분으로 하는 식품 조성물은 단독으로 “면역기능 증진용 건강기능식품”으로 이용될 수 있다.
- [0084] 상기 ‘건강기능식품’은 인체에 유용한 기능성을 가진 원료나 성분을 사용하여 법적 기준에 따라 제조(가공을 포함)한 식품(건강기능식품에 관한 법률 제3조 제1호)을 말한다. 상기 ‘건강기능식품’은 국가마다 용어나 범위에 차이가 있을 수 있으나, 미국의 ‘식이 보충제(Dietary Supplement)’, 유럽의 ‘식품 보충제(Food Supplement)’, 일본의 ‘보건기능식품’ 또는 ‘특정보건용식품(Food for Special Health Use, FoSHU)’, 중국의 ‘보건식품’ 등에 해당할 수 있다.
- [0085] 상기 식품 조성물 또는 건강기능식품은 식품첨가물을 추가로 포함할 수 있으며, 식품첨가물로서의 적합여부는 다른 규정이 없는 한 ‘식품첨가물공전’의 총칙 및 일반시험법 등에 따라 해당 품목에 관한 규격 및 기준에 따른다.
- [0086] 또한, 본 발명은 톳 후코이단을 유효성분으로 포함하는 면역력 저하로 인한 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물에 관한 것이다.
- [0087] 또한 본 발명은 톳 후코이단을 유효성분으로 포함하는 면역력 저하로 인한 질환의 예방 또는 치료용 동물용 약학 조성물에 관한 것이다.
- [0088] 또한 본 발명은 인간, 또는 인간을 제외한 동물에게 상기 조성물을 투여하는 면역력 저하로 인한 질환의 치료 방법을 제공한다.
- [0089] 또한 본 발명은 면역력 저하로 인한 질환의 예방 또는 치료용 의약, 또는 동물용 의약 제조를 위한 톳 후코이단의 신규 용도를 제공한다.
- [0090] 상기 ‘약학 조성물’, ‘의약’, ‘동물용 약학 조성물’ 또는 ‘동물용 의약’은 유효성분으로 톳 후코이단 이외에, 약학 조성물 등의 제조에 통상적으로 사용하는 적절한 담체, 부형제 및 희석제를 더 포함할 수 있다.
- [0091] 상기 ‘담체’는 세포 또는 조직 내로의 화합물의 부가를 용이하게 하는 화합물이다. 상기 ‘희석제’는 대상 화합물의 생물학적 활성 형태를 안정화시킬 뿐만 아니라, 화합물을 용해시키게 되는 물에서 희석되는 화합물이다.
- [0092] 상기 담체, 부형제 및 희석제로는 특별히 한정할 필요는 없으나 예를 들어, 유당, 포도당, 설탕, 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 광물유 등을 들 수 있다.
- [0093] 상기 약학 조성물, 의약, 동물용 약학 조성물 또는 동물용 의약의 사용량은 환자 또는 치료대상 동물의 나이, 성별, 체중에 따라 달라질 수 있으며, 무엇보다도, 치료대상 개체의 상태, 치료 대상 질환의 특정한 카테고리 또는 종류, 투여 경로, 사용되는 치료제의 속성에 의존적일 것이다.
- [0094] 상기 약학 조성물, 의약, 동물용 약학 조성물 또는 동물용 의약은 체내에서 활성성분의 흡수율, 배설속도, 환자 또는 치료대상 동물의 연령 및 체중, 성별 및 상태, 치료할 질병의 중증정도 등에 따라 적절히 선택되나, 일반적으로 1일 0.1 내지 50 g, 바람직하게는 0.5 내지 20 g, 더욱 바람직하게는 1 내지 10 g, 더더욱 바람직하게는 1.2 내지 8 g, 가장 바람직하게는 1.5 내지 5 g으로 투여하는 것이 바람직하다. 이렇게 제형화된 단위 투여형 제제는 필요에 따라 일정시간 간격으로 수회 투여할 수 있다.
- [0095] 상기 약학 조성물, 의약, 동물용 약학 조성물 또는 동물용 의약은 개별적으로 예방제 또는 치료제로서 투여하거나 다른 치료제와 병용하여 투여될 수 있고, 종래의 치료제와는 순차적 또는 동시에 투여될 수 있다.
- [0096] 상기 약학조성물, 의약, 동물용 약학 조성물 또는 동물용 의약은 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 트로키제, 현탁액, 에멀전, 시럽, 에어로졸 등의 경구 제형으로 제형화하여 사용될 수 있다. 제형화할 경우에는 보통 사용하는 충전제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제될 수 있다.

- [0097] 경구 투여를 위한 고형 제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제, 트로키제 등이 포함되며, 이러한 고형 제제는 상기 화합물에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 칼슘 카보네이트, 설탕 또는 유당, 젤라틴 등을 섞어 조제될 수 있다. 또한 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트, 탈크 같은 윤활제들도 사용될 수 있다. 경구를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데 흔히 사용되는 단순 희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다.
- [0098] 상기 면역력 저하로 인한 질환의 치료방법은 인간, 또는 인간을 제외한 동물, 특히 포유동물에게 상기 조성물을 투여 하는 것으로, 예를 들어 면역력 저하로 인한 질환을 가진 치료대상 개체에게 상기 조성물을 투여하는 것이다.
- [0099] 상기 면역력 저하로 인한 질환을 가진 치료대상 개체 여부는, 면역력 저하로 인한 질환을 가지고 있는 경우일 수 있다.
- [0100] 상기 치료를 위한 투여량, 투여 방법 및 투여 횟수는 상기 약학 조성물, 의약, 동물용 약학 조성물 또는 동물용 의약의 투여량, 투여 방법 및 투여 횟수를 참고할 수 있다.
- [0101] 또한, 본 발명은 톱 후코이단을 유효성분으로 포함하는 면역기능 증진을 위한 사료 조성물에 관한 것이다.
- [0102] 상기 ‘사료 조성물’은 유효성분으로 톱 후코이단 이외에, 식품의 기준 및 규격(‘식품공전’)에 기재된 식품으로 사용가능한 식품 원료, 식품첨가물 공전에 기재된 식품첨가물을 사용할 수 있고, 식품으로 사용가능한 식품 원료 또는 식품첨가물이 아니더라도 ‘사료 등의 기준 및 규격’ 별표 1의 단미사료의 범위에 해당하는 원료, 별표 2의 보조사료의 범위에 해당하는 원료를 사용할 수 있다.
- [0103] 상기 ‘사료 조성물’은 ‘사료 등의 기준 및 규격’에 따른 보조사료 중 추출제일 수 있고, 상기 보조사료를 포함하는 배합사료일 수 있다.
- [0104] 상기 톱 후코이단을 유효성분으로 사료 조성물을 제조하는 경우 톱 후코이단은 면역기능 증진을 나타내는 함량이면 특별히 한정할 필요는 없으나, 예를 들어 0.1 내지 99 중량%, 0.5 내지 95 중량%, 1 내지 90 중량%, 2 내지 80 중량%, 3 내지 70 중량%, 4 내지 60 중량%, 5 내지 50 중량%로 포함될 수 있다.
- [0105] 상기 사료 조성물에서 유효성분인 톱 후코이단은 섭취 동물의 상태, 체중, 질병의 유무나 정도 및 기간에 따라 다르지만, 통상의 기술자에 의해 적절하게 선택될 수 있다. 예를 들어 1일 투여량을 기준으로 0.1 내지 50 g, 바람직하게는 0.5 내지 20 g, 더욱 바람직하게는 1 내지 10 g, 더더욱 바람직하게는 1.2 내지 8 g, 가장 바람직하게는 1.5 내지 5 g일 수 있고, 투여 횟수는 특별히 한정할 필요는 없으나 1일 3회 내지 1주일에 1회의 범위 내에서 통상의 기술자가 조절할 수 있다. 건강 및 위생을 목적으로 하거나 또는 건강 조절을 목적으로 하는 장기간의 섭취의 경우에는 상기 범위 이하일 수 있다.
- [0106] 또한, 본 발명의 화장료 조성물에는 상기의 톱 후코이단과 더불어 필요에 따라 통상 화장료에 배합되는 다른 성분을 배합할 수 있으며, 이러한 배합 성분으로서는 물, 유분, 계면활성제, 보습제, 점증제, 방향제, 보존제, 중화제, 에몰리언트제, 피부보호제 및 피부컨디셔닝제로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상을 들 수 있다.
- [0107] 또한, 상기 화장료 조성물은 당업계에서 통상 사용되는 유화 제형 및 가용화 제형의 형태로 제조될 수 있으며, 그 예로 스킨, 유액, 에센스, 로션, 미용액, 바디로션, 바디젤, 바디에센스, 바디세정제, 클렌징폼, 클렌징크림, 클렌징 젤, 팩, 마사지크림, 마사지젤, 영양크림, 수면크림 및 수분크림으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나의 제형을 들 수 있다.
- [0109] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 바람직한 실시예를 제시하나, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐 본 발명의 범주 및 기술사상 범위 내에서 다양한 변경 및 수정이 가능함은 당업자에게 있어서 명백한 것이며, 이러한 변형 및 수정이 첨부된 특허청구범위에 속하는 것도 당연한 것이다.
- [0110] **실시예 1. 톱 후코이단**
- [0111] 건조된 톱 분말과 정제수를 1 : 50의 중량비로 혼합하여 상온에서 6시간 동안 침지시킨 후 정제수에서 건져낸 상기 침지된 톱 분말과 1% 탄산수소나트륨 용액을 1 : 33의 중량비로 혼합하여 75 ℃에서 2시간 동안 교반하여 전처리하였다. 상기 전처리된 톱 분말을 정제수로 3회 세척한 후 10000rpm으로 10분 동안 원심분리를 수행하여 잔사의 수분을 제거한 다음 원심분리한 톱 분말 100 중량부에 대하여 셀룰클라스트 1.5L(Celluclast, Novozyme) 5 중량부, 정제수 200 중량부를 혼합하여 50 ℃에서 24시간 동안 처리하여 효소분해를 수행한 다음 상기 효소분

해된 톳 효소분해물을 100 ℃에서 30분 동안 처리하여 효소를 불활성화시키고 30분 동안 상온에 방치하여 냉각시킨 후 10000rpm으로 10분 동안 원심분리를 수행하여 상층액을 수득하여 이를 여과하였다. 상기 여과된 톳 효소분해물 100 중량부에 6 M 염화칼슘 용액 18 중량부를 투입하여 4 ℃에서 12시간 동안 처리한 후 10000rpm으로 10분 동안 원심분리를 수행하여 알긴산이 침전된 침전물이 제거된 상층액만을 수득하여 톳 효소분해물로부터 알긴산을 제거하고 상기 알긴산이 제거된 톳 효소분해물의 탈염을 위해 한외여과(UF)하여 분자량이 12 kDa 이하인 것을 제거하므로 분자량이 12 kDa 초과인 톳 후코이단(염도 30 ppm 미만)을 수득하여 농축하였다.

[0113] <시험예 I>

[0114] 모든 실험은 3번 반복되었으며, 통계분석은 GraphPad Prism 9 software (GraphPad Software Inc., Boston, USA)을 사용하였고, 실험의 결과는 평균값과 평균의 표준편차로 표시하였다. 처리구간의 특성은 samples t-test 와 ANOVA(Analysis of variance)를 통하여 유의성 검정($p<0.05$)을 진행하였다.

[0115] 시험예 1. 후코이단의 지표성분 분석

[0116] 실시예 1에서 제조된 톳 후코이단 외에 팽생이모자반 후코이단, 큰잎모자반 후코이단 및 지층이 후코이단의 총 당 함량, 황산기 함량 및 후코오스 함량을 측정하였다. 상기 팽생이모자반 후코이단, 큰잎모자반 후코이단 및 지층이 후코이단은 상기 실시예 1과 동일한 방법을 수득되었다.

[0117] 1-1. 총 당 함량: Agilent사의 고성능 액체 크로마토그래피(HPLC) 시스템으로 LC 분석을 통해 수행되었으며, 이 과정에서 HPLC를 위해 Agilent Poroshell 120 EC-C18 4.6 x 100 mm, 4 um 컬럼이 사용되었다. 단당류 조성물은 최적 분리조건(용출액: 10 mM Ammonium acetate/ACN; 유속: 1 mL/분; 주입량: 10 μL)하에서 검출되었고, 표준 혼합물(Fucose, Glucose, Galactose, Xylose, Mannose, Guluronic acid, Mannuronic acid)을 사용하였다.

[0118] 1-2. 황산기 함량: 표준품은 Ammonium sulfate을 사용하였고, BaCl2/gelation method을 이용하여 함량을 측정하였다.

[0119] 1-3. 후코오스 함량: 시료를 각 10 mg/ml의 농도로 제조한 후 4 M TFA와 1대 1일의 비율로 섞은 후(시료의 농도 5 mg/ml) 105 ℃ 오븐에서 4시간동안 가수분해하였다. 가수분해물에서 200 ul을 e-tube에 옮긴 후 TFA를 제거하기 위하여 감압여과장치를 이용하여 제거하였고 정제수 1 ml를 넣어서 시료를 1 mg/ml의 농도로 제조하였다.

표 1

구분	총 당(중량%)	황산기(중량%)	후코오스(중량%)
톳 후코이단(실시예 1)	62.50±2.48 ^a	20.50±3.11 ^a	20.80±1.77 ^a
팽생이모자반 후코이단	52.75±3.04 ^{ab}	23.91±2.15 ^a	18.80±2.14 ^{ab}
큰잎모자반 후코이단	45.23±1.47 ^b	19.54±1.09 ^b	18.70±1.85 ^{ab}
지층이 후코이단	43.21±2.09 ^b	18.47±2.43 ^b	18.83±1.67 ^{ab}

[0121] 위 표 1에 나타난 바와 같이, 본 발명의 실시예 1에 따라 제조된 톳 후코이단은 팽생이모자반 후코이단, 큰잎모자반 후코이단 및 지층이 후코이단에 비하여 총 당, 황산기 및 후코오스의 함량이 더 많은 것을 확인하였다.

[0123] 시험예 2. 톳 후코이단의 조성 분석

[0124] 중성당 및 우론산 함량은 상기 시험예 1과 동일한 방법으로 측정되었다.

[0125] 하기 [표 1]에서 우론산(uronic acid)은 만누론산(mannuronic acid)을 지칭하는 것이며, 중성당 및 우론산을 구성하는 당들은 전체 톳 후코이단 조성을 기준으로 성분의 함량을 표시한 것이다.

표 2

구분	실시예 1(중량%)
중성당(neutral sugar)	fucose
	galactose
	glucose
	xylose
	mannose

우론산(Uronic acid)	glucuronic acid	-
	mannuronic acid	2.5

[0127] 위 표 2에 나타난 바와 같이, 본 발명의 실시예 1에 따라 제조된 톳 후코이단은 중성당 중에서 푸코오스(fucose)의 함량이 높으며, 글루코오스(glucose)는 검출되지 않는 것을 확인하였다.

[0128] 또한, 우론산으로는 만누론산(mannuronic acid)만 검출되는 것을 확인하였다.

[0130] 시험예 2. 평균 분자량 측정

[0131] 후코이단은 분자량이 큰 다량체의 형태로 구성되어 있어 평균 분자량을 측정하였다.

[0132] 본 발명의 실시예 1에 따라 제조된 톳 후코이단은 DEAE-cellulose 처리를 거쳐 평균 분자량을 분석하였다. 상기 과정에서는 DAWN Heleos II 다각도 광산란 장비와 Optilab T-rEX 굴절률 검출기(MALS-RI, Wyatt Technology, Santa Barbara, CA, USA)가 사용되었다. 분석에 적용된 이동상은 0.5 M NaCl 수용액으로서, 유속은 0.5 mL/분으로 설정되었다. 분석용 시료는 2 mg/mL 농도로, 0.5 M NaCl로 용출하여 0.22 μ m의 기공 크기를 가진 멤브레인 필터를 통과시켜 준비하였으며, 상기 모든 데이터는 Astra 6.1 소프트웨어(Wyatt Technology Corporation, Santa Barbara, CA, USA)를 사용하여 수집 및 분석되었다.

[0133] 도 1은 본 발명의 실시예 1에 따라 제조된 톳 후코이단의 평균 분자량을 측정한 그래프이다.

[0134] 도 1에 도시된 바와 같이, 실시예 1에 따라 제조된 톳 후코이단의 평균 분자량은 266.1 kDa인 것을 확인하였다.

[0136] 시험예 3. 구조분석

[0137] 3.1 전처리

[0138] 실시예 1에 따라 제조된 톳 후코이단의 구조분석은 톳 후코이단을 0.01 M HCl에 18 시간 동안 60 $^{\circ}$ C의 인큐베이터에서 산 가수분해를 진행하였다. 상기 가수분해가 완료된 시료에 0.01 M NaOH를 넣어 중성화를 진행한 후 PGC-SPE를 사용하여 Conditioning, Sample loading, Washing(Desalting), Elution을 진행하였다(도 2). 전처리가 끝난 시료는 글리칸 컬럼(Glycan column)을 사용하여 MALDI-ToF, UPLC-Q-TOF-MS/MS를 이용하여 분석하였다.

[0140] 3.2 단량체 분석 결과

[0141] 실시예 1에 따라 제조된 톳 후코이단은 분자량이 큰 다량체로서 이들이 구성되어 있는 단량체를 분석하기 위하여 MALDI-TOF MS를 이용하여 분석하였다.

[0142] 구체적으로, 상기 전처리된 시료를 물에 용해시켜 준비하고, 상기 용해된 시료 1 μ L를 스테인리스 스틸 타겟판에 도포하였다. 이후 50% weight/weight ACN에 용해된 2,5-dihydroxybenzoic acid(50 mg/mL) 용액 0.8 μ L를 추가하였으며, 균일한 결정화는 진공하에서 시료를 빠르게 건조시켜 이루어졌다. 그 후 MALDI-ToF MS 분석은 Bruker autoflex MAX 시스템(Bruker Daltonics, Portland, OR)을 사용하여 음이온 반사 모드로 진행되었다. 각 스펙트럼은 시료의 다섯 곳에서 무작위로 선택된 위치마다 800번의 레이저 샷(1 kHz 레이저 사용)을 통해 얻어진 신호들이 결합되어, 총 4000번의 레이저 샷을 나타내었다. 질량 스펙트럼은 100-5000 m/z 범위에서 기록되었다.

[0143] 도 3은 본 발명의 실시예 1에 따라 제조된 톳 후코이단의 단량체를 MALDI-TOF MS로 측정한 그래프이다.

[0144] 도 3에 도시된 바와 같이, 톳 후코이단에는 하나의 푸코오스(fucose)와 황산기(SO₃)가 결합된 구조에서 푸코오스(fucose)가 반복적으로 증가되는 패턴 (Fuc₁(SO₃)₁ + Fuc_n); 자일로오스(xylose), 2개의 푸코오스(fucose), 황산기(SO₃)가 결합되어 푸코오스(fucose)가 반복적으로 증가되는 패턴 (Xyl₁Fuc₂(SO₃)₁ + Fuc_n); 및 헥소오스(Hexose), 푸코오스(fucose), 황산기가 결합되어 헥소오스(Hexose)가 반복적으로 증가되는 패턴 (Hex₁Fuc₁(SO₃)₁ + Hex_n);이 확인되었다.

[0145] 상기 헥소오스(Hexose)는 단당 분석 결과에 따라 갈락토오스(galactose)와 만노오스(mannose)로 확인되지만 검출된 결과에서 이들을 구분하기 어려워 헥소오스(Hexose)로 나타내었다.

[0147] 3.3 단량체 조성 분석 결과

[0148] 단량체 조성은 UPLC-Q-ToF MS/MS를 사용하여 분석하였다. 상기 전처리된 시료를 사용하였으며, 사용된 분석 장

비는 Waters Xevo G2-XS Q-ToF(Waters, 34 Maple Street Milford, MA, USA)였고, 컬럼은 SupelTMCarbonLC컬럼 (2.1*100 mm, 2.7 μ m)을 사용하였다. 이동상은 10 mM ABC DW 및 90% ACN을 포함한 gradient 방법(유속: 0.2 mL/min)으로 진행되었다.

[0149] 질량 분석은 negative 모드에서 Q-ToF MS/MS를 통해 수행되었으며, 충돌 가스로는 헬륨을 사용하였다. MS 크로마토그램과 MS/MS 스펙트럼은 MassLynx v4.1(Waters Corporation, Wilmslow, UK)과 UNIFITM v1.8.0(Waters Corp.) 소프트웨어를 사용하여 얻었다. UNIFITM는 원소 구성, 화학 구조 등을 포함한 과학적 라이브러리를 제공하였다.

[0150] 후코이단 라이브러리를 생성하여 사용했으며, 다양한 후코이단 구조의 화학식을 요약하여 라이브러리를 완성하였다. 이는 Microsoft Excel을 통해 UNIFI 라이브러리 형식에 맞춰 작성하였다.

[0151] 도 4는 본 발명의 실시예 1에 따라 제조된 톳 후코이단의 단량체를 UPLC-Q-TOF-MS/MS로 측정된 그래프이다.

[0152] 도 4에 도시된 바와 같이, 상기 도 3에 나타난 결과와 마찬가지로 ($\text{Fuc}_1(\text{SO}_3)_1 + \text{Fuc}_n$), ($\text{Xyl}_1\text{Fuc}_2(\text{SO}_3)_1 + \text{Fuc}_n$), 및 ($\text{Hex}_1\text{Fuc}_1(\text{SO}_3)_1 + \text{Hex}_n$)가 관찰되었다.

[0154] 도 5는 본 발명의 실시예 1에 따라 제조된 톳 후코이단에서 분리한 각 단량체 (A) $\text{Fuc}_1(\text{SO}_3)_1$, (B) $\text{Fuc}_2(\text{SO}_3)_1$, (C) $\text{Xyl}_1\text{Fuc}_2(\text{SO}_3)_1$, (D) $\text{Hex}_3\text{Fuc}_1(\text{SO}_3)_1$ 를 MS/MS spectrum으로 측정된 그래프이다.

[0155] 도 5에 도시된 바와 같이, $\text{Fuc}_1(\text{SO}_3)_1$ 는 243.02 m/z, $\text{Fuc}_2(\text{SO}_3)_1$ 는 389.08 m/z, $\text{Xyl}_1\text{Fuc}_2(\text{SO}_3)_1$ 는 521.11 m/z, $\text{Hex}_3\text{Fuc}_1(\text{SO}_3)_1$ 는 1052.32 m/z에서 측정되는 것을 확인하였다.

[0157] 도 6은 본 발명의 실시예 1에 따라 제조된 톳 후코이단에서 분리한 각 단량체 (A) $\text{Fuc}_1(\text{SO}_3)_1$, (B) $\text{Fuc}_2(\text{SO}_3)_1$, (C) $\text{Xyl}_1\text{Fuc}_2(\text{SO}_3)_1$, (D) $\text{Hex}_3\text{Fuc}_1(\text{SO}_3)_1$ 의 구조 및 조성비를 나타낸 것이다.

[0158] 도 6에 도시된 바와 같이, 본 발명의 실시예 1에 따라 제조된 톳 후코이단의 조성 분석 결과 $\text{Fuc}_1(\text{SO}_3)_1$ 단량체가 가장 많은 후코이단임을 확인하였다.

[0160] <시험예 II> 생체 외(In vitro)

[0161] 모든 실험은 3번 반복되었으며, 통계분석은 Graphpad Prism 10 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA)을 사용하였고, 실험의 결과는 평균값과 평균의 표준편차로 표시하였다. 처리구간의 특성은 Dunnett's post-hoc test와 ANOVA(Analysis of variance)를 통하여 유의성 검정($p < 0.05$)을 진행하였다.

[0162] 시험예 4. RAW 264.7 대식세포 생존율 및 산화질소(NO) 측정

[0163] 대식세포는 체내 거의 모든 조직에 분포하며 이물질이나 노폐물을 탐식, 제거하는 역할을 하는데, 이 과정에서 대식세포는 여러 가지 사이토카인(cytokine)과 산화질소(nitric oxide, NO)를 분비하여 면역 반응을 조절한다. 즉, 활성화된 대식세포는 선천성 면역 반응의 중요인자로 여겨지는 TNF- α , IL-6 및 IL-1 β 등과 같은 사이토카인을 생산함으로써 이후의 면역반응을 유도한다고 알려져 있고, B세포의 항체생성 세포인 형질세포(plasma cell)의 최종 분화를 유도하는 B세포의 자극인자로서 면역글로불린의 합성을 증진하는 등 다양한 작용을 나타낸다. 산화질소(NO) 또한 면역계에서 종양세포나 세포내 감염된 미생물에 대한 방어 작용을 하는 중요한 신호전달 물질이다.

[0164] 4-1. 세포 생존율: 마우스의 대식세포주인 RAW 264.7 cell(KTCC No. 40071)은 한국세포주은행(KCLB)에서 분양받아 사용하였다. 상기 RAW 264.7 세포를 6-well plate에 5×10^5 cells/well로 분주하고 37 $^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2 의 조건에서 24시간 동안 배양하였다. 이후 아무것도 처리하지 않은 대조군, lipopolysaccharide (LPS; Sigma-Aldrich) 100 ng/mL의 농도 처리한 양성대조군, 톳 후코이단을 각각 12.5, 25, 50, 100 $\mu\text{g/mL}$ 의 농도로 처리하여 24시간 배양하였다. 이후 각 well에 500 $\mu\text{g/mL}$ 농도의 MTT 용액을 처리하여 37 $^{\circ}\text{C}$, 5% CO_2 의 조건에서 2시간 반응시켰다. 이어서 상등액을 제거하고 DMSO를 처리하여 각 well에 형성된 formazan을 녹인 다음, 540 nm에서 흡광도 값을 측정하였다.

[0165] 4-2. 산화질소 생성능: 대식세포가 활성화되면 산화질소(NO) 및 TNF- α 등의 사이토카인을 분비하는데, 이때 산화질소(NO)의 생성은 면역계에서 종양세포나 세포내 감염된 미생물에 대한 방어 작용을 하는 중요한 신호전달 물질로 알려져 있다. 이때, 산화질소(NO)의 과량 생성은 전신적 염증을 유발하여 생체에 여러 부정적인 영향을

미치나 적정량의 산화질소(NO)의 생성은 오히려 선천성 면역의 중요한 인자로써 여겨진다.

[0166] 면역증진 능력을 확인하기 위하여 griess reagent [1% sulfanilamide in 5% phosphoric acid와 0.1% naphthylethylenediamine dihydrochloride]을 이용하여 세포배양액 중에 존재하는 NO₂⁻의 생성농도를 측정하였다. 즉, 상기 배양이 완료된 세포배양 상등액 100 μL와 동량의 Griess reagent를 처리하여 상온에서 15분 반응시킨 후 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이때, 아질산소듐(sodium nitrite)을 이용하여 작성한 표준곡선으로부터 산화질소(NO) 농도를 구하여 환산하였다.

[0167] 이때 양성대조군인 지질다당류(LPS)는 100 ng/mL, 실시예 1은 12.5, 25, 50, 100 μg/mL 농도별로 처리하여 생성되는 산화질소(NO) 양을 측정하였다.

[0168] 도 7a는 본 발명의 실시예 1에 따라 제조된 톱 후코이단의 세포 생존율을 측정한 그래프이며; 도 7b는 본 발명의 실시예 1에 따라 제조된 톱 후코이단의 산화질소(NO)의 양을 측정한 그래프이다.

[0169] 도 7a에 도시된 바와 같이, 실시예 1에 따라 제조된 톱 후코이단을 농도 별로 처리 시 모든 농도에서 100% 이상의 세포 생존율을 나타내는 것을 확인하였다. 일반적으로 세포생존율이 80% 이상일 때 세포독성이 없다고 판정하므로 실시예 1에 따라 제조된 톱 후코이단은 세포에 대한 독성이 없다는 것을 확인하였다.

[0170] 또한 도 7b에 도시된 바와 같이, 실시예 1에 따라 제조된 톱 후코이단은 농도 의존적으로 대식세포의 NO 생성량이 증가되는 것을 확인하였으며, 특히 50 μg/mL 이상의 농도에서 LPS와 유사한 수준인 것을 확인하였다.

[0172] 시험예 5. 면역관련 효소의 단백질 발현 측정

[0173] 5-1. iNOS(inducible nitric oxide synthase)와 COX-2(cyclooxygenase-2)의 발현 정도를 확인하기 위해 RAW 264.7 세포를 100 mm dish에 2.5X10⁶ 개의 세포를 분주하고 24시간 배양 후 톱 후코이단 및 양성대조군 물질을 처리하였다. 처리 후 수확된 세포를 3000 rpm에서 5분 동안 원심분리한 다음 pellet에 1X lysis buffer [25 mM Tris-Cl (pH 7.5), 250 mM NaCl, 5 mM ethylene-diamine-tetraacetic acid, 1% Nonidet P40, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride 및 5 mM dithiothreitol]를 적정량 첨가하여 4 °C에서 30분간 반응시켰다 (해당 시약은 모두 Sigma-Aldrich Chemical Co.에서 구입하여 사용하였음). 이후 4 °C에서 14,000 rpm으로 30분간 원심 분리하여 상층액을 얻었으며, 단백질 농도는 Bio-Rad 단백질 정량시약(Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA)을 이용하여 정량하였고, 동량의 Laemli sample buffer (Bio-Rad Laboratories, Inc.)를 혼합하여 단백질 샘플을 만들었다. 동량의 샘플을 sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel을 이용하여 전기영동을 실시하였고, nitrocellulose membrane (Schleicher and Schuell, Keene, NH, USA)에 전이시켰다. 그 후 5% skim milk를 30분간 처리하였고 1차 항체를 처리하여 4 °C에서 over night 시킨 다음 1x PBS-T (PBS with Tween 20)로 10분간 3번 세척하였다. 그 후 membrane에 적정 2차 항체를 사용하여 상온에서 1시간 30분 반응시킨 후 1x PBS-T 로 세척 후 Fusion FX Image system (Vilber Lourmat, Torcy, France)를 이용하여 단백질의 발현 양상을 분석하였다. 본 연구에 사용된 1차 항체는 iNOS의 경우 BD Biosciences (Franklin Lakes, NJ, USA), COX-2의 경우 Cell Signaling Technology, Inc. (Beverly, MA, USA)에서 구입하였으며, 단백질 발현의 정량적 분석은 ImageJ[®] software (v1.48, NIH, Bethesda, MD, USA)을 사용하여 수행되었다.

[0174] 5-2. 대식세포에 본 발명의 톱 후코이단을 농도별로 처리했을 때의 TNF-α, IL-1β 및 IL-6 발현량을 측정하였으며, 사이토카인(TNF-α, IL-6 및 IL-1β)의 발현 수준을 확인하기 위해 ELISA(Enzyme-linked immunosorbent assay) 키트를 이용하였다.

[0175] 도 8a는 대식세포에서 본 발명의 실시예 1에 따라 제조된 톱 후코이단에 대한 iNOS와 COX-2 발현을 나타낸 웨스턴 블롯이며; 도 8b는 상기 도 8a에서 측정된 iNOS 발현량을 정량화한 그래프이고; 도 8c는 상기 도 8a에서 측정된 COX-2 발현량을 정량화한 그래프이다.

[0176] 상기 iNOS는 사이토카인(cytokine), 산화스트레스 및 염증성 반응에 의해 유발되어 NO를 생산하는 유도성 산화질소 합성효소이며, 상기 COX₂는 대식세포 등의 자극에 의해 유도되어 PGE₂를 합성하는 효소이다.

[0177] 도 8a 내지 도 8c에 도시된 바와 같이, 실시예 1에 따라 제조된 톱 후코이단을 처리 시 25 내지 100 ug/ml의 농도에서 면역반응 관련 효소인 iNOS 및 COX₂의 단백질 발현이 유의적으로 증가하는 것을 확인하였다.

[0179] 시험예 6. 대식세포 형태학적 변화를 통한 면역증강 효과 확인

- [0180] RAW 264.7 세포 100 mm dish에 분주하여 배양 후 LPS 또는 톡 후코이단을 처리하여 24시간 동안 배양한 다음 광학현미경으로 관찰하였다.
- [0181] 도 9는 무처리군, LPS군 및 실시예 1에 따라 제조된 톡 후코이단을 25, 50, 100 ug/ml의 농도로 처리 시 대식세포의 모양을 촬영한 사진이다.
- [0182] 도 9에 도시된 바와 같이, 대조군의 세포는 매끄러운 원형으로서 세포 활성화가 관찰되지 않았으나, LPS군의 세포는 불규칙한 방추형으로 세포 활성화가 관찰되었다. 실시예 1에 따라 제조된 톡 후코이단을 처리 시 25 내지 100 ug/ml의 농도에서 불규칙한 방추형 세포들이 많아짐에 따라 농도가 높아질수록 세포 활성화가 증가되는 것을 확인하였으며, 특히 100 μ g/mL의 농도에서 LPS와 유사하거나 더 높은 수준의 세포 활성화가 관찰되었다.
- [0184] **시험예 7. 식세포작용 활성화 정도를 통한 면역증강 효과 확인**
- [0185] 탐식능력(식세포작용)은 외부로부터 들어온 유해물질들을 세포 내로 흡수해 제거시키는 과정으로 면역 시스템의 핵심 기능 중 하나이므로, 탐식능력 정도를 확인함으로써 면역활성화 정도를 판별할 수 있다.
- [0186] 탐식능력은 Phagocytosis Assay Kit를 이용하여 분석하였다. RAW 264.7 세포를 4-well chamber slide에서 배양 후 LPS 또는 톡 후코이단(25, 50 및 100 μ g/ml)을 처리하여 24시간 배양한 다음 형광 표지된 Latex Beads-Rabbit IgG-FITC complex를 각 well에 첨가하여 반응시켰다. 30분 동안 반응 후 assay buffer로 세포를 수세하고 세포 분석기(Becton Dickinson, San Jose, CA, USA)를 이용하여 식작용이 일어난 세포의 형광 강도를 정량적으로 측정하였다. 아울러 assay buffer로 세척된 세포를 2.5 μ M의 4',6'-diamidino-2-phenylindole (DAPI, Sigma-Aldrich Chemical Co.) 용액으로 염색 후, 세포를 cover glass에 도말하였다. phosphate buffered saline로 다시 세포를 수세 후 형광 강도를 형광현미경(Carl Zeiss, Oberkochen, Germany)을 이용하여 관찰하였다.
- [0187] 도 10a는 대식세포에서 본 발명의 실시예 1에 따라 제조된 톡 후코이단으로 처리 시 탐식능력을 나타낸 그래프이며; 도 10b는 본 발명의 실시예 1에 따라 제조된 톡 후코이단의 탐식능력정도를 나타낸 그래프이고; 도 10c는 본 발명의 실시예 1에 따라 제조된 톡 후코이단으로 처리 시 형광강도는 나타낸 사진이다.
- [0188] 도 10a에 도시된 바와 같이, 실시예 1에 따라 제조된 톡 후코이단을 처리 시 농도 의존적으로 탐식능력이 증가하였으며, LPS군 역시 유의적으로 증가하는 것을 확인하였다. 특히, 톡 후코이단 100 μ g/ml의 농도로 처리 시 LPS보다 3배 이상 우수한 탐식능력을 보이는 것을 확인하였다.
- [0189] 또한 도 10b에 도시된 바와 같이, 형광 표지된 FITC-접합 라텍스 비드 복합체의 강도가 실시예 1에 따라 제조된 톡 후코이단의 농도가 증가함에 따라 증가하는 것을 확인하였다.
- [0190] 또한 도 10c에 도시된 바와 같이, 실시예 1에 따라 제조된 톡 후코이단을 처리 시 FITC-IgG 양성 식세포의 형광 물질 강도가 증가하는 것을 확인하였다. 무처리군에서는 형광물질이 감지되지 않았고, LPS군에서는 형광물질이 감지되는 것을 확인하였다.
- [0192] **시험예 8. 사이토카인 분비량을 통한 면역증강 효과 확인**
- [0193] 면역 활성화와 관련된 신호전달 물질인 사이토카인(TNF- α , IL-6, IL-1 β)의 분비량을 측정하여 면역증강 효과를 확인하였다.
- [0194] 사이토카인 분비량을 측정하기 위해 ELISA kit를 사용하여 TNF- α , interleukin-6(IL-6), interleukin-1 beta(IL-1 β) 수준을 측정하였다. 6 well plate에 RAW 264.7 세포를 5×10^5 개씩 분주해 24시간 배양하고, 톡 후코이단을 25, 50, 100 μ g/ml 농도로 24시간 처리하였다. 이후 상등액을 분리하여 정해진 매뉴얼에 따라 사이토카인 수준을 측정하였으며, 시험에 사용된 모든 ELISA kit는 R&D System(Minneapolis, MN, USA)을 사용하였다.
- [0195] 도 11a는 본 발명의 실시예 1에 따라 제조된 톡 후코이단으로 처리 시 TNF- α 분비량을 측정한 그래프이며; 도 11b는 본 발명의 실시예 1에 따라 제조된 톡 후코이단으로 처리 시 IL-6 분비량을 측정한 그래프이고; 도 11c는 본 발명의 실시예 1에 따라 제조된 톡 후코이단으로 처리 시 IL-1 β 분비량을 측정한 그래프이다.
- [0196] 도 11a에 도시된 바와 같이, RAW 264.7 대식세포에 실시예 1에 따라 제조된 톡 후코이단 처리 시 25 내지 100 μ g/ml 농도에서 감염에 대응하는 전염증성 사이토카인인 TNF- α 의 분비량이 증가하는 것을 확인하였다.
- [0197] 또한 도 11b에 도시된 바와 같이, RAW 264.7 대식세포에 실시예 1에 따라 제조된 톡 후코이단 처리 시 50 내지 100 μ g/ml 농도에서 세포독성 T세포 분화 촉진 및 B세포 활성화를 유도하는 IL-6의 분비량이 증가하는 것을 확

인하였다.

[0198] 또한 도 11c에 도시된 바와 같이, RAW 264.7 대식세포에 실시예 1에 따라 제조된 톳 후코이단 처리 시 25 내지 100 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 감염에 의한 염증 및 면역반응 조절이 가능한 IL-1 β 의 분비량이 증가하는 것을 확인하였다.

[0200] **시험예 9. 신호전달경로 단백질 발현을 통한 면역 활성화 기전 확인**

[0201] 면역 반응을 일으키는 신호전달경로 단백질의 발현을 측정하였다.

[0202] 톳 후코이단의 면역 활성화 관련 기전 연구를 위한 단백질 발현의 조사를 위하여 RAW 264.7 세포를 100 mm dish에 2.5×10^6 개의 세포를 분주하고 24시간 배양 후 톳 후코이단 및 LPS를 처리하였다. 처리 후 수확된 세포를 3000 rpm에서 5분 동안 원심분리한 다음 pellet에 1X lysis buffer [25 mM Tris-Cl (pH 7.5), 250 mM NaCl, 5 mM ethylene-diamine-tetraacetic acid, 1% Nonidet P40, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride 및 5 mM dithiothreitol]를 적정량 첨가하여 4 $^{\circ}\text{C}$ 에서 30분간 반응시켰다. 이후 4 $^{\circ}\text{C}$ 에서 14,000 rpm으로 30분간 원심 분리하여 상층액을 얻었다. 핵과 세포질 단백질을 분리하기 위해서는 세포를 수확한 후 NE-PER Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagents kit (Thermo Fisher Scientific Inc., Rockford, IL, USA)를 사용하여 제조사가 제시한 방법에 따라 추출하였다. 단백질 농도는 Bio-Rad 단백질 정량시약(Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA)을 이용하여 정량하였고, 동량의 Laemilni sample buffer (Bio-Rad Laboratories, Inc.)를 혼합하여 단백질 샘플을 만들었다. 동량의 샘플을 sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel을 이용하여 전기영동을 실시하였고, nitrocellulose membrane (Schleicher and Schuell, Keene, NH, USA)에 전이시켰다. 그 후 5% skim milk를 30분간 처리하였고 1차 항체를 처리하여 4 $^{\circ}\text{C}$ 에서 over night 시킨 다음 1x PBS-T (PBS with Tween 20)로 10분간 3번 세척하였다. 그 후 membrane에 적정 2차 항체를 사용하여 상온에서 1시간 30분 반응시킨 후 1x PBS-T 로 세척한 다음 Fusion FX Image system (Vilber Lourmat, Torcy, France)를 이용하여 단백질 발현 양상을 분석하였다. 1차 항체는 iNOS의 경우 BD Biosciences (Franklin Lakes, NJ, USA), COX-2의 경우 Cell Signaling Technology, Inc. (Beverly, MA, USA)에서 구입하였으며, 단백질 발현의 정량적 분석은 ImageJ[®] software (v1.48, NIH, Bethesda, MD, USA)를 사용하여 수행되었다.

[0203] 도 12a는 본 발명의 실시예 1에 따라 제조된 톳 후코이단으로 처리 시 I κ B- α 및 NF- κ B 단백질의 발현을 나타낸 웨스턴 블롯이며; 도 12b는 상기 도 12a에서 측정된 I κ B- α 단백질의 발현량을 정량화한 그래프이고; 도 12c는 상기 도 12a에서 측정된 NF- κ B 단백질의 발현량을 정량화한 그래프이며; 도 12d는 본 발명의 실시예 1에 따라 제조된 톳 후코이단으로 처리 시 p-ERK, p-JNK, p-p38 단백질의 발현을 나타낸 웨스턴 블롯이고; 도 12e는 상기 도 12d에서 측정된 p-ERK 단백질의 발현량을 정량화한 그래프이며; 도 12f는 상기 도 12d에서 측정된 p-JNK 단백질의 발현량을 정량화한 그래프이고; 도 12g는 상기 도 12d에서 측정된 p-p38 단백질의 발현량을 정량화한 그래프이다.

[0204] 도 12a 내지 도 12c에 도시된 바와 같이, NF- κ B 경로를 측정한 결과 RAW 264.7 대식세포에 실시예 1에 따라 제조된 톳 후코이단을 처리시 25 내지 100 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 세포질 I κ B- α 의 발현 수준이 유의적으로 감소하지 않았으나 핵 NF- κ B의 발현이 유의적으로 증가한 것을 확인하였다.

[0205] 또한 도 12d 내지 도 12g에 도시된 바와 같이, MAPK 경로를 측정한 결과 RAW 264.7 대식세포에 실시예 1에 따라 제조된 톳 후코이단을 처리시 25 내지 100 $\mu\text{g/ml}$ 농도에서 ERK, JNK, p38의 발현량이 일정하였고, 인산화된 ERK, JNK, P38의 발현 수준이 유의적으로 증가하는 것을 확인하였다.

[0206] 실시예 1에 따라 제조된 톳 후코이단의 처리는 NF- κ B 및 MAPKs 신호전달 경로의 활성화를 크게 자극하여 농도 의존적으로 유의미한 NO방출, iNOS 및 COX₂ 발현, 사이토카인 분비를 촉진하여 면역 반응을 일으키는 것을 확인하였다.

[0208] **<시험예 III> 생체 내(In vivo)**

[0209] **동물실험**

[0210] 시험예 6의 경우, 18~22 g의 Balb/c 마우스(5주령)를, 시험예 7~10의 경우 18~22 g의 C57BL/6 마우스(3주령)를 실험에 사용하였다. 아크릴 케이지(45 X 60 X 25 cm)에서 사육되었으며, 충분한 사료와 물이 공급되며 적절한 인공조도로 12시간의 낮, 밤을 조절하였다(am 8:00부터 낮). 그리고 일정한 온도(20~24 $^{\circ}\text{C}$) 및 습도(45~65%)를 유지시켜 주었다. 바뀐 환경에 적응하도록 일주일간 살펴보고 수면주기를 유지하고, 이상행동을 확인하였다.

- [0211] 실험동물은 체중변화가 일정하고 건강한 동물만을 선별하여 임의 배치법에 의해 생리식염수를 투여한 CON군, 면역억제 유도제인 시클로포스파미드(cyclophosphamide, CPP)를 투여한 CCP군, 홍삼(24 mg/100 ml의 사포닌 함량)과 CCP를 투여한 홍삼+CPP군, 및 실시예 1의 톱 후코이단과 CCP를 투여한 실시예 1+CPP군으로 나누었으며 실험군마다 5마리씩 사용하였다. 상기 홍삼 및 실시예 1의 추출물은 21일 동안 매일 투여되었으며, CPP는 시험물질 투여 종료 전 3일 동안 처리되어 19일, 20일, 21일차에 투여되었다.
- [0212] -4개 군의 마우스-
- [0213] CON군: 생리식염수 21일 투여
- [0214] CCP군: 생리식염수 및 CPP 50 mg/kg 투여
- [0215] 홍삼+CPP군: 홍삼 400 mg/kg 및 CPP 50 mg/kg 투여
- [0216] 실시예 1+CPP군: 실시예 1의 추출물 400 mg/kg 및 CPP 50 mg/kg 투여
- [0217] 모든 수치 자료는 GraphPad prism 통계 프로그램 (Ver. 10.1.1)을 이용하여 통계분석을 수행하였다. multi-group 간의 유의성 검증은 데이터의 정규성 검정 후 parametric one-way ANOVA test로 분석 시행한 뒤 Fisher's PLSD로 사후검정 하였다. 신뢰구간은 95%로 설정하고, 모든 데이터는 mean $\pm$ SEM로 표시하였다.
- [0219] **시험예 11. 체중변화 및 NK 세포 활성 측정**
- [0220] 11-1. 체중변화: 시험물질 투여 동안 주 2회 체중을 측정해 그룹 내 개체 간 오차 변동계수를 확인하였으며, CPA 처리 기간인 17, 18, 19일 차에는 3일 모두 체중을 측정하였다. 이때 변동계수 허용 범위 기준은 「ICH M10 on bioanalytical method validation - Scientific guideline」을 따른다.
- [0221] 11-2. NK 세포 활성: NK-sensitive한 YAC-1 세포를 공격하여 유리된 젖산탈수소효소(lactate dehydrogenase)를 측정하는 방법(LDH assay)을 이용하였다. 96-well 둥근바닥 플레이트에 1×10^4 cells/100 μ L의 YAC-1 세포와 비장 세포의 중량비가 1:50이 되도록 넣은 후 37 $^{\circ}$ C, 5%, CO₂ 배양기에서 4시간 동안 배양 후 LDH가 유리된 상층액 50 μ L를 취해 96-well 플레이트에 옮겼다. Cytotoxicity LDH assay kit (MCE, HY-K-1090, USA)를 이용하여 working solution을 50 μ L 첨가하고 차광한 후 실온에서 30분간 반응시키고 stop solution 50 μ L를 첨가한 다음 490 nm에서 흡광도를 측정하였다. NK 세포 활성은 하기 [수학식 1]을 통해 계산되었다.
- [0222] [수학식 1]
- [0223]
$$\text{NK cell activity(\%)} = [(X-Z)/(Y-Z)] \times 100$$
- [0224] X; Absorbance of Samples - Background control
- [0225] Y; Absorbance of High Control - Background Control of High Control
- [0226] Z; Absorbance of Low Control - Background Control
- [0227] 도 13a는 CON군, CCP군, 홍삼+CPP군 및 실시예 1+CPP군의 체중변화를 나타낸 그래프이며; 도 13b는 CON군, CCP군, 홍삼+CPP군 및 실시예 1+CPP군의 NK 세포 활성을 나타낸 그래프이다.
- [0228] 도 13a에 도시된 바와 같이, 각 군에서 개체 간 오차 변동계수가 20% 이내인 것을 확인하였다.
- [0229] 또한 도 13b에 도시된 바와 같이, CON군과 비교 시 CCP군의 NK 세포 활성이 유의적으로 감소한 것을 확인하였으며, 실시예 1+CPP군의 NK 세포 활성은 CCP군에 비하여 유의적으로 증가한 것을 확인하였다.
- [0230] 실시예 1+CPP군의 NK 세포 활성 증가 정도는 홍삼+CPP군에 비해서도 높은 것을 확인하였다.
- [0232] 하기에 본 발명의 분말을 함유하는 조성물의 제제예를 설명하나, 본 발명은 이를 한정하고자 함이 아닌 단지 구체적으로 설명하고자 함이다.
- [0233] 제제예 1. 산제의 제조
- | | | |
|--------|-------------------|--------|
| [0234] | 실시예 1에서 얻은 추출물 분말 | 500 mg |
| [0235] | 유당 | 100 mg |
| [0236] | 탈크 | 10 mg |

[0237]	상기의 성분들을 혼합하고 기밀포에 충전하여 산제를 제조한다.	
[0239]	<u>제제예 2. 정제의 제조</u>	
[0240]	실시에 1에서 얻은 추출물 분말	300 mg
[0241]	옥수수전분	100 mg
[0242]	유당	100 mg
[0243]	스테아린산 마그네슘	2 mg
[0244]	상기의 성분들을 혼합한 후 통상의 정제의 제조방법에 따라서 타정하여 정제를 제조한다.	
[0246]	<u>제제예 3. 캡슐제의 제조</u>	
[0247]	실시에 1에서 얻은 추출물 분말	200 mg
[0248]	결정성 셀룰로오스	3 mg
[0249]	락토오스	14.8 mg
[0250]	마그네슘 스테아레이트	0.2 mg
[0251]	통상의 캡슐제 제조방법에 따라 상기의 성분을 혼합하고 젤라틴 캡슐에 충전하여 캡슐제를 제조한다.	
[0253]	<u>제제예 4. 주사제의 제조</u>	
[0254]	실시에 1에서 얻은 추출물 분말	600 mg
[0255]	만니톨	180 mg
[0256]	주사용 멸균 증류수	2974 mg
[0257]	Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O	26 mg
[0258]	통상의 주사제의 제조방법에 따라 1 앰플 당 상기의 성분 함량으로 제조한다.	
[0260]	<u>제제예 5. 액제의 제조</u>	
[0261]	실시에 1에서 얻은 추출물 분말	4 g
[0262]	이성화당	10 g
[0263]	만니톨	5 g
[0264]	정제수	적량
[0265]	통상의 액제의 제조방법에 따라 정제수에 각각의 성분을 가하여 용해시키고 레몬향을 적량 가한 다음 상기의 성분을 혼합한 다음 정제수를 가하여 전체를 정제수를 가하여 전체 100g으로 조절한 후 갈색병에 충전하여 멸균시켜 액제를 제조한다.	
[0267]	<u>제제예 6. 과립제의 제조</u>	
[0268]	실시에 1에서 얻은 추출물 분말	1,000 mg
[0269]	비타민 혼합물	적량
[0270]	비타민 A 아세테이트	70 μg
[0271]	비타민 E	1.0 mg
[0272]	비타민 B1	0.13 mg
[0273]	비타민 B2	0.15 mg
[0274]	비타민 B6	0.5 mg
[0275]	비타민 B12	0.2 μg

[0276]	비타민 C	10 mg
[0277]	비오틴	10 μ g
[0278]	니코틴산아미드	1.7 mg
[0279]	엽산	50 μ g
[0280]	판토텐산 칼슘	0.5 mg
[0281]	무기질 혼합물	적량
[0282]	황산제1철	1.75 mg
[0283]	산화아연	0.82 mg
[0284]	탄산마그네슘	25.3 mg
[0285]	제1인산칼륨	15 mg
[0286]	제2인산칼슘	55 mg
[0287]	구연산칼륨	90 mg
[0288]	탄산칼슘	100 mg
[0289]	염화마그네슘	24.8 mg
[0290]	상기의 비타민 및 미네랄 혼합물의 조성비는 비교적 과립제에 적합한 성분을 바람직한 실시예로 혼합 조성하였지만, 그 배합비를 임의로 변형 실시하여도 무방하며, 통상의 과립제 제조방법에 따라 상기의 성분을 혼합한 다음, 과립을 제조하고, 통상의 방법에 따라 건강기능식품 조성물 제조에 사용할 수 있다.	
[0292]	<u>제제예 7. 기능성 음료의 제조</u>	
[0293]	실시예 1에서 얻은 추출물 분말	1,000 mg
[0294]	구연산	1,000 mg
[0295]	올리고당	100 g
[0296]	매실농축액	2 g
[0297]	타우린	1 g
[0298]	정제수를 가하여	전체 900 mL
[0299]	통상의 건강음료 제조방법에 따라 상기의 성분을 혼합한 다음, 약 1 시간 동안 85 ℃에서 교반 가열한 후, 만들어진 용액을 여과하여 멸균된 2 L 용기에 취득하여 밀봉 멸균한 뒤 냉장 보관한 다음 본 발명의 기능성 음료 조성물 제조에 사용한다.	
[0300]	상기 조성비는 비교적 기호음료에 적합한 성분을 바람직한 실시예로 혼합 조성하였지만, 수요계층, 수요국가, 사용용도 등 지역적, 민족적 기호도에 따라서 그 배합비를 임의로 변형 실시하여도 무방하다.	
[0302]	<u>제제예 8: 사료 조성물의 제조</u>	
[0303]	실시예 1의 추출물 분말 0.1 kg, 옥수수 25.5 kg, 소맥 15.04 kg, 소맥분 8.15 kg, 미강 7.4 kg, 대두박 18 kg, 옥구르텐 1kg, 닭부산물 14 kg, 동물성유지 9 kg, 가공염 0.3 kg, 인산제삼칼슘 0.3 kg, 석회석 1 kg, 염화콜린 0.01 kg, 비타민 0.05 kg, 미네랄 0.05 kg 및 소화효소제 0.1 kg을 혼합하여 동물(개, 애완견) 사료 조성물을 제조하였다.	
[0305]	<u>제제예 9. 유화 제형의 화장품의 제조</u>	
[0306]	영양화장수, 크림, 에센스 등의 유화 제형의 화장품 및 유연화장수 등의 가용화 제형의 화장품을 제조하였다.	
[0307]	하기 표 3에 기재된 조성으로 유화제형의 화장품을 제조하였다. 제조방법은 하기와 같다.	
[0308]	1) 1 내지 9의 원료를 혼합한 혼합물을 65 내지 70 ℃로 가열하였다.	

- [0309] 2) 10의 원료를 상기 단계 1)의 혼합물에 투입하였다.
- [0310] 3) 11 내지 13의 원료의 혼합물을 65 내지 70 ℃로 가열하여 완전히 용해시켰다.
- [0311] 4) 상기 단계 3)을 거치면서, 상기 2)의 혼합물을 서서히 첨가하여 8,000 rpm에서 2 내지 3분간 유화시켰다.
- [0312] 5) 14의 원료를 소량의 물에 용해시킨 후 상기 단계 4)의 혼합물에 첨가하고 2분간 더 유화시켰다.
- [0313] 6) 15 내지 17의 원료를 각각 평량한 후 상기 단계 5)의 혼합물에 넣고 30초간 더 유화시켰다.
- [0314] 7) 상기 단계 6)의 혼합물을 유화 후 탈기과정을 거쳐 25 내지 35 ℃로 냉각시킴으로써 유화제형의 화장품을 제조하였다.

표 3

[0315]

조성		유화제형 1	유화제형 2	유화제형 3
1	스테아린 산	0.3	0.3	0.3
2	스테알리 알콜	0.2	0.2	0.2
3	글리세릴 모노스테아레이트	1.2	1.2	1.2
4	밀납	0.4	0.4	0.4
5	폴리옥시에틸렌솔비탄 모노라우린산 에스테르	2.2	2.2	2.2
6	파라옥시안식향산 메틸	0.1	0.1	0.1
7	파라옥시안식향산 프로필	0.05	0.05	0.05
8	세틸에틸헥사노에이트	5	5	5
9	트리글리세라이드	2	2	2
10	사이클로메티콘	3	3	3
11	중류수	~ 100	~ 100	~ 100
12	농글리세린	5	5	5
13	트리에탄올아민	0.15	0.15	0.15
14	폴리아크릴산 중합체	0.12	0.12	0.12
15	색소	0.0001	0.0001	0.0001
16	향	0.10	0.10	0.10
17	실시에 1의 추출물	0.0001	1	10

[0317] 제제예 10. 가용화 제형의 화장품의 제조

[0318] 하기 표 4에 기재된 조성으로 가용화제형의 화장품을 제조하였다. 제조방법은 하기와 같다.

- [0319] 1) 2 내지 6의 원료를 1의 원료(정제수)에 넣고 아직 믹서를 이용하여 용해시켰다.
- [0320] 2) 8 내지 11의 원료를 7의 원료(알코올)에 넣고 완전 용해시켰다.
- [0321] 3) 상기 단계 2)의 혼합물을 상기 단계 1)의 혼합물에 서서히 첨가하면서 가용화시켰다.

표 4

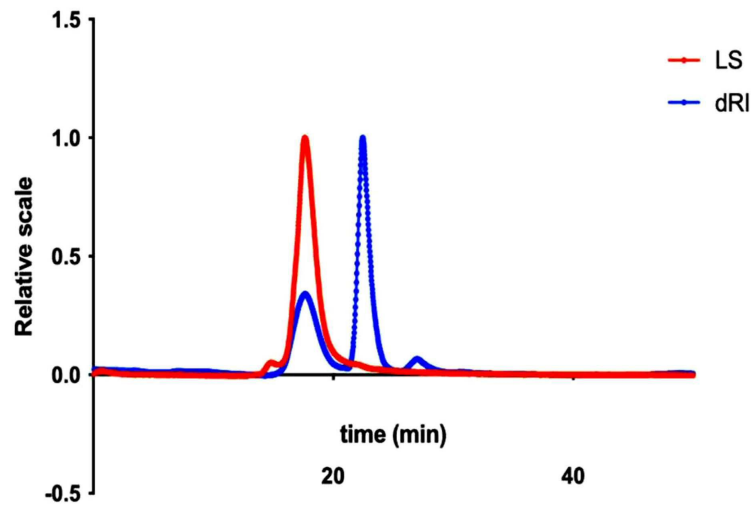
[0322]

조성		가용화 제형 1	가용화 제형 2	가용화 제형 3
1	정제수	~ 100	~ 100	~ 100
2	농글리세린	3	3	3
3	1,3-부틸렌글리콜	2	2	2
4	EDTA-2Na	0.01	0.01	0.01
5	색소	0.0001	0.0002	0.0002
6	실시에 1의 추출물	0.1	5	5
7	알코올(95%)	8	8	8
8	파라옥시안식향산 메틸	0.1	0.1	0.1
9	폴리옥시에틸렌 하이드로제네이디트에스 테르	0.3	0.3	0.3
10	향	0.15	0.15	0.15

11	사이클로메티콘	-	-	2
----	---------	---	---	---

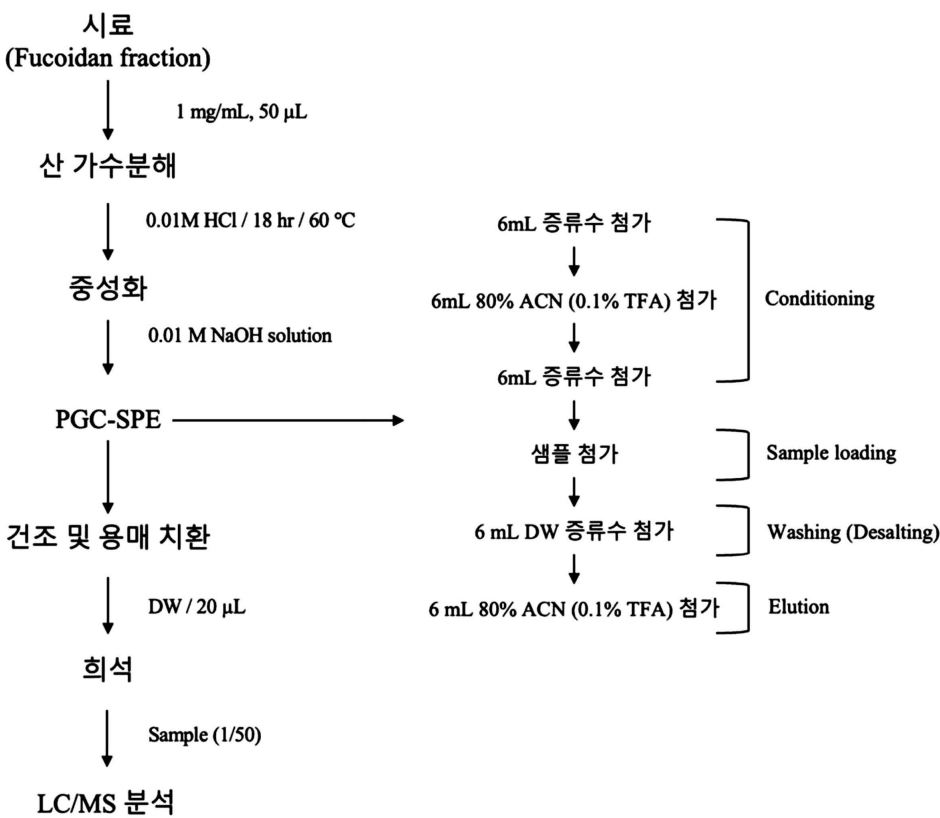
도면

도면1

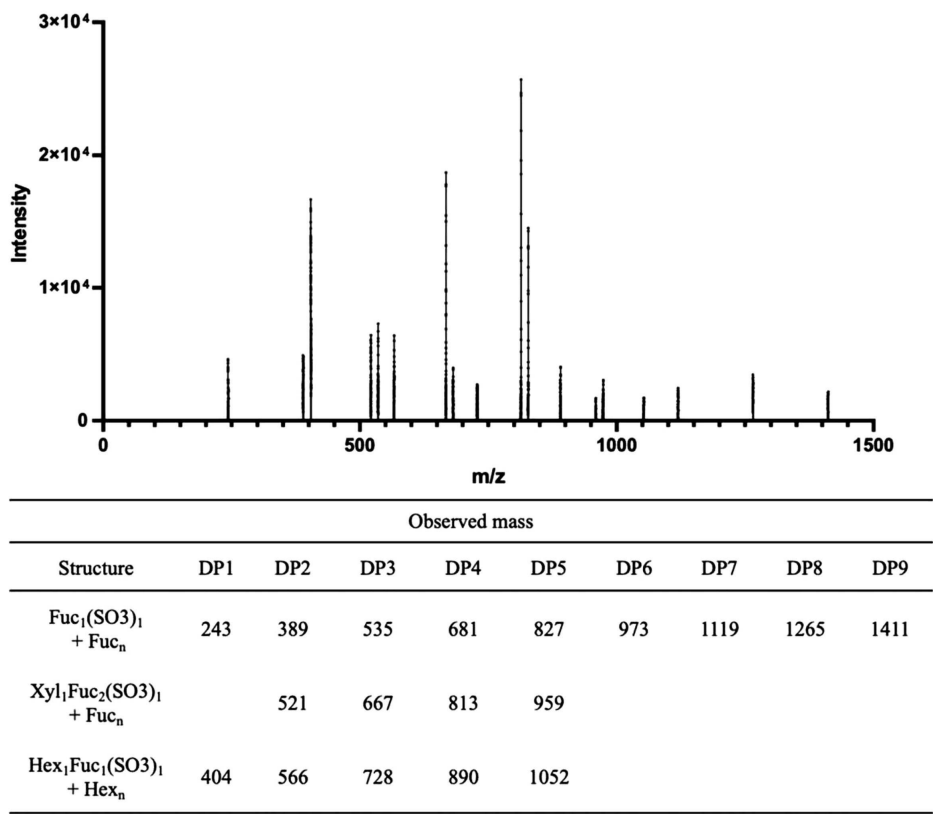


	g/mol
Mw ^a	2.661*10 ⁵
Mp ^b	3.355*10 ⁵
Mn ^c	2.571*10 ⁵
Mz ^d	2.750*10 ⁵

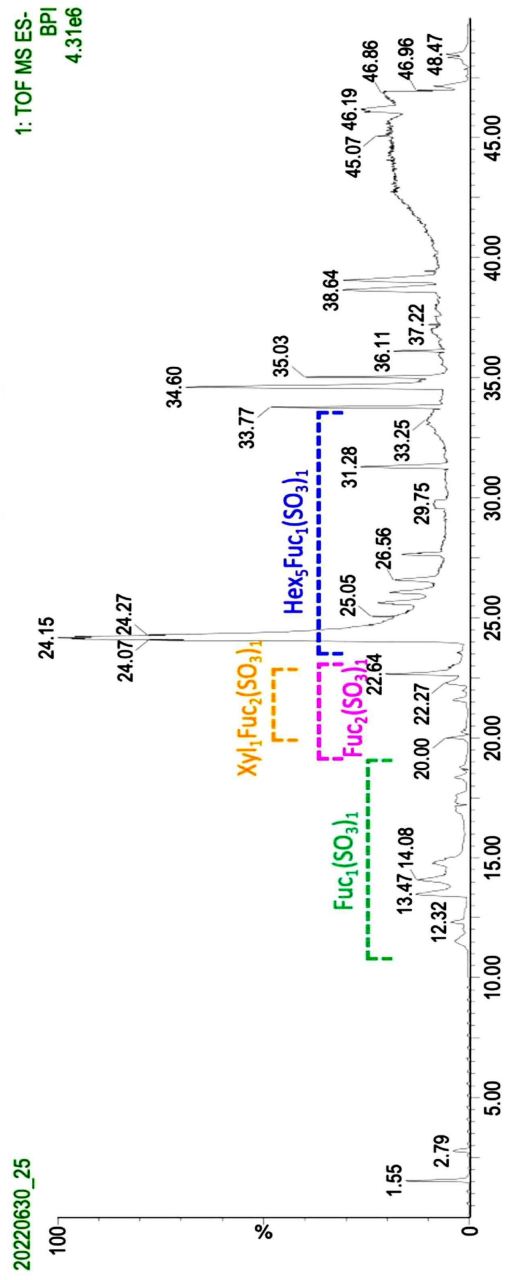
도면2



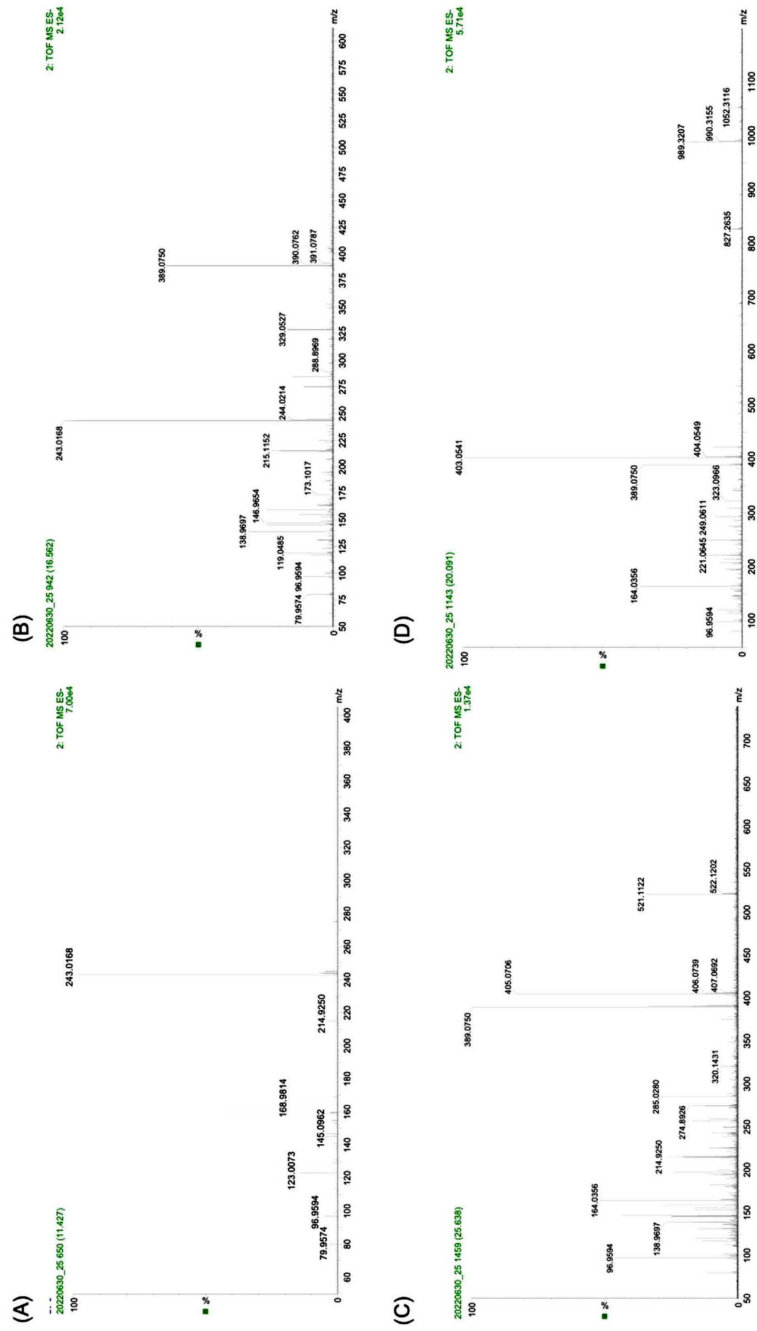
도면3



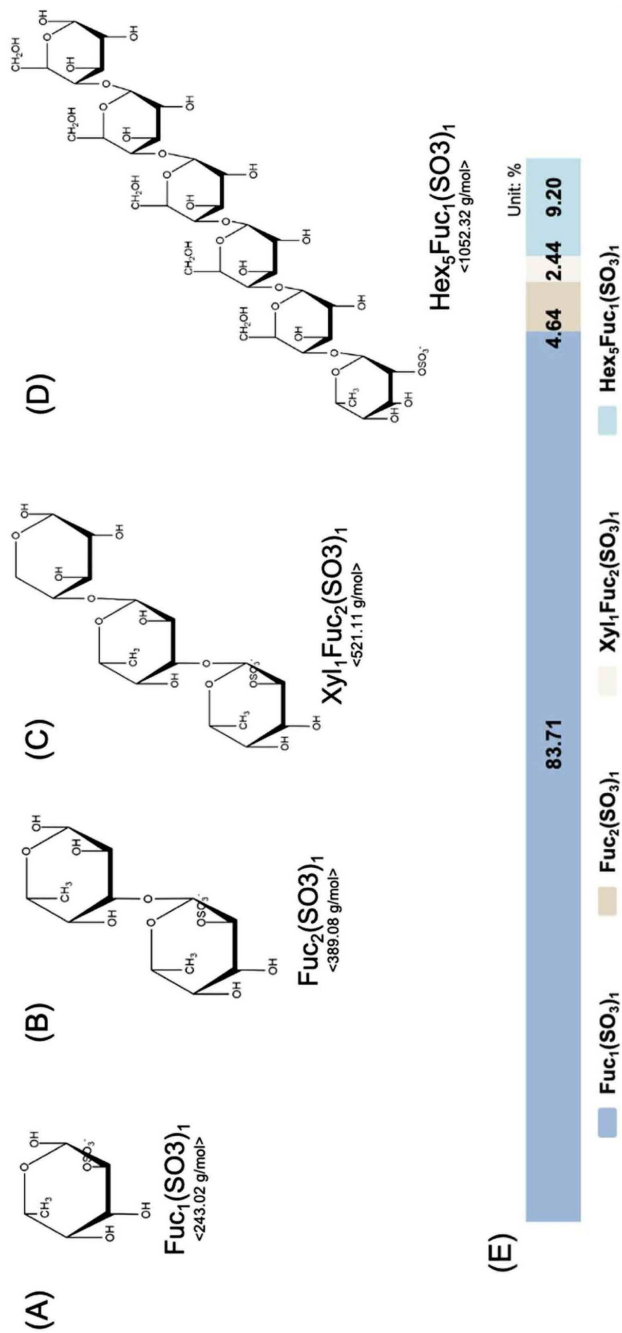
도면4



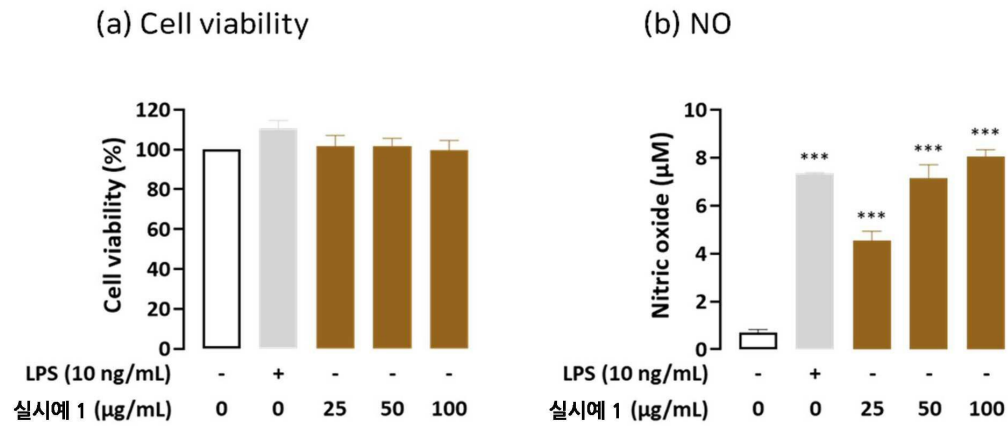
도면5



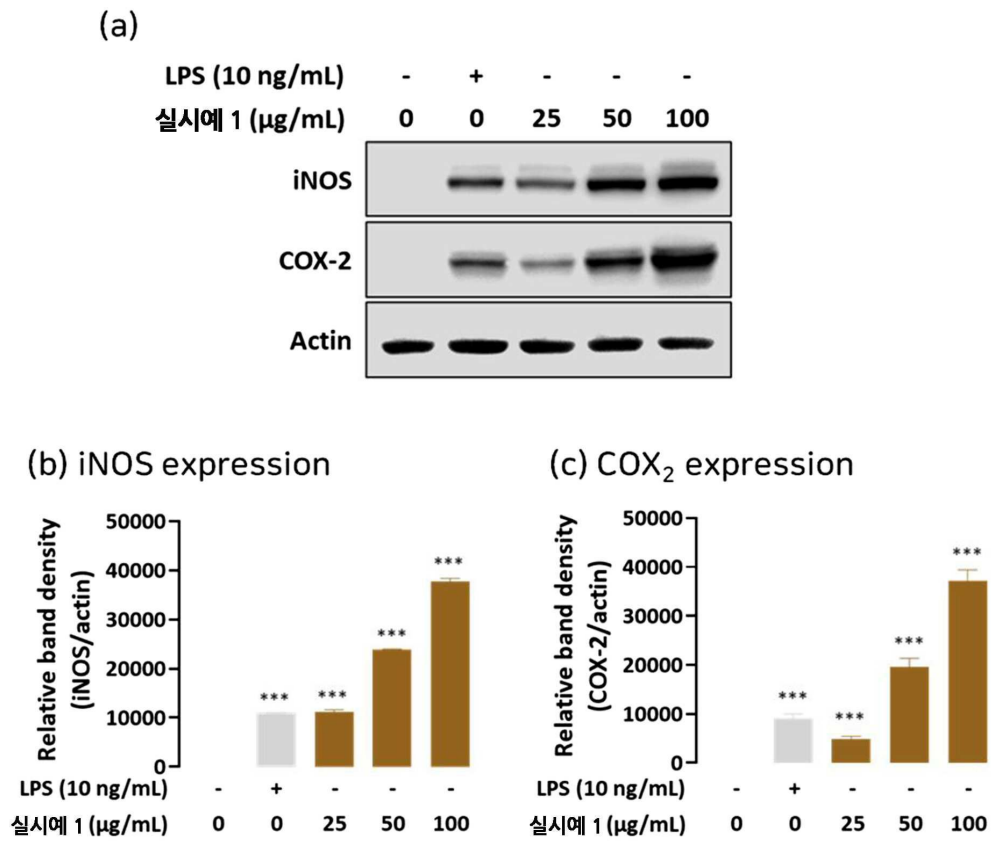
도면6



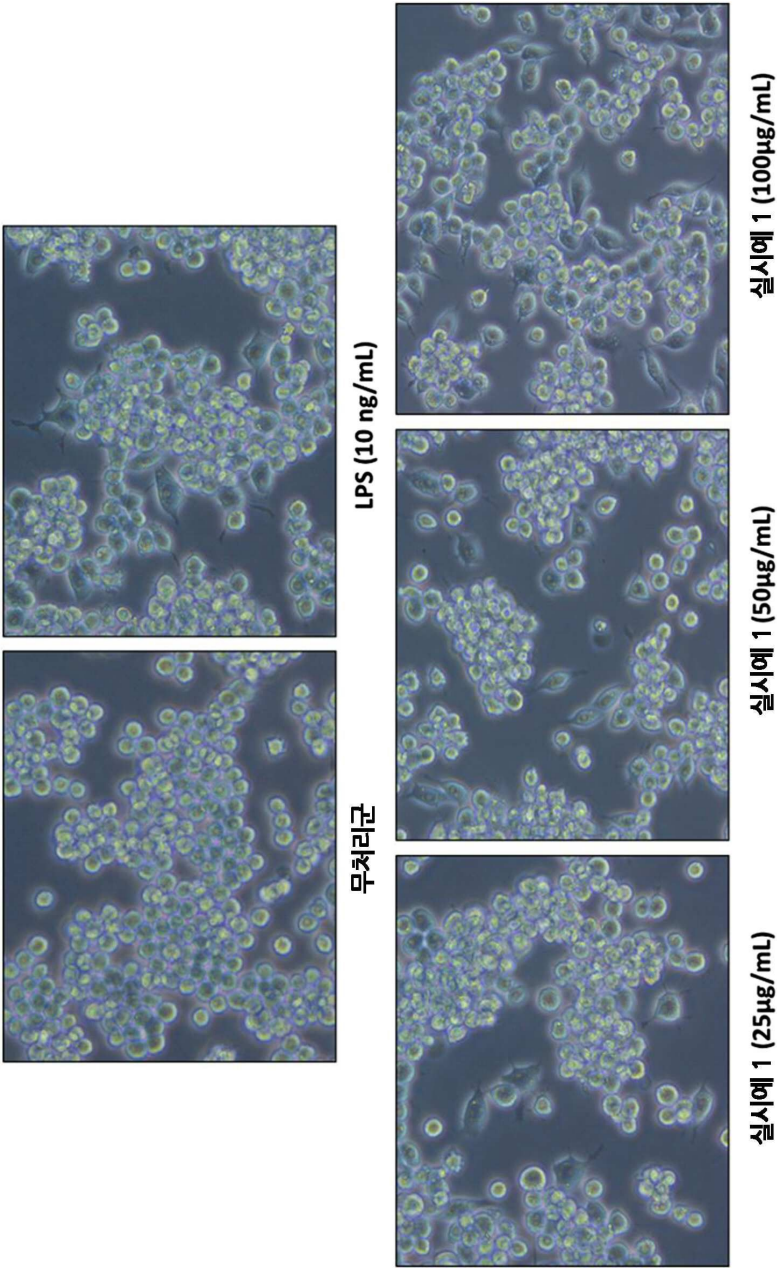
도면7



도면8

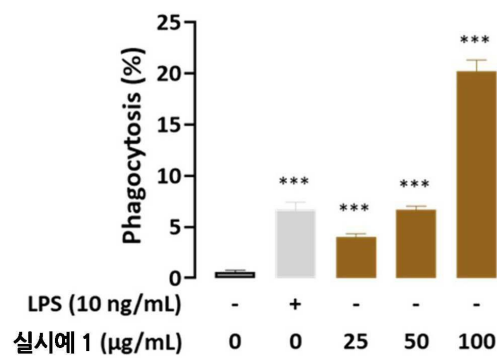


도면9

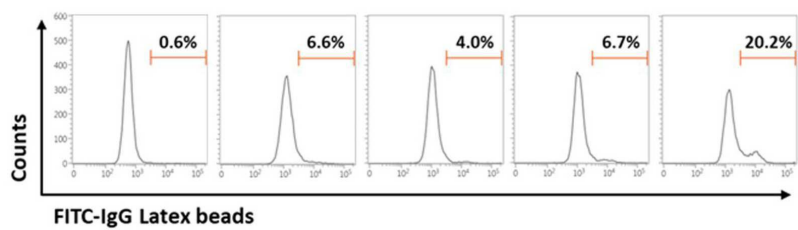


도면10

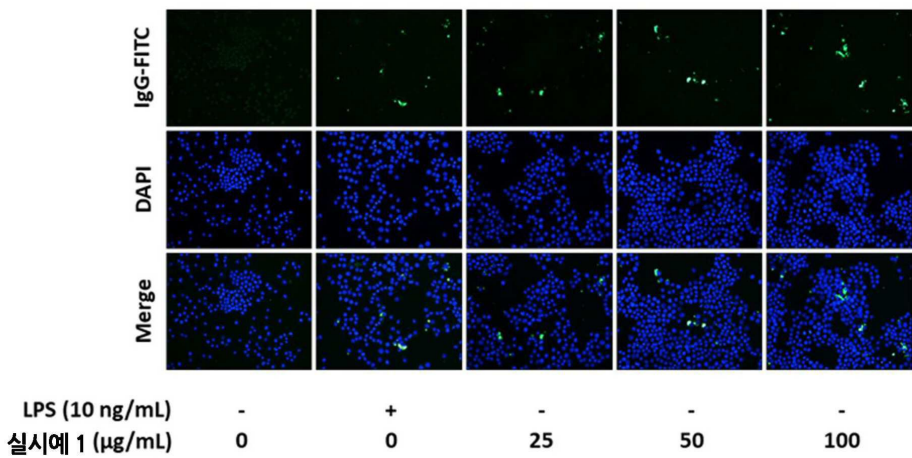
(a) Phagocytosis rate



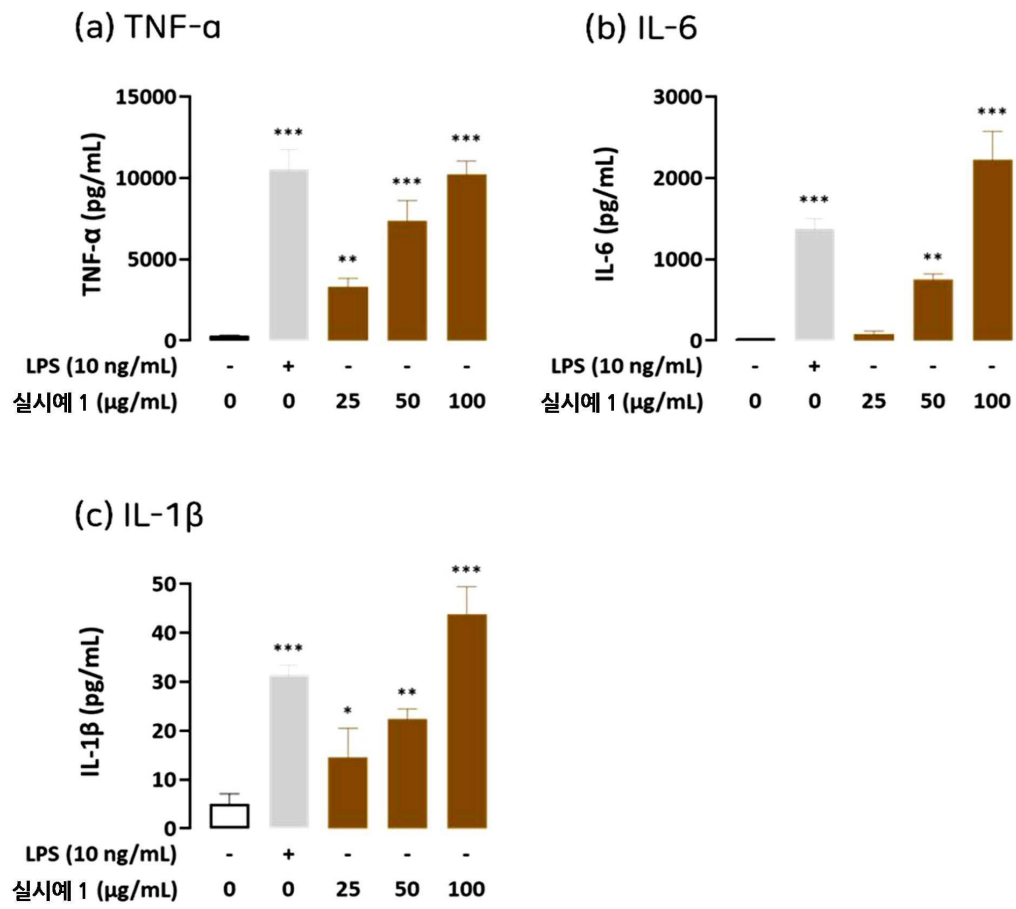
(b) Flow cytometry histograms



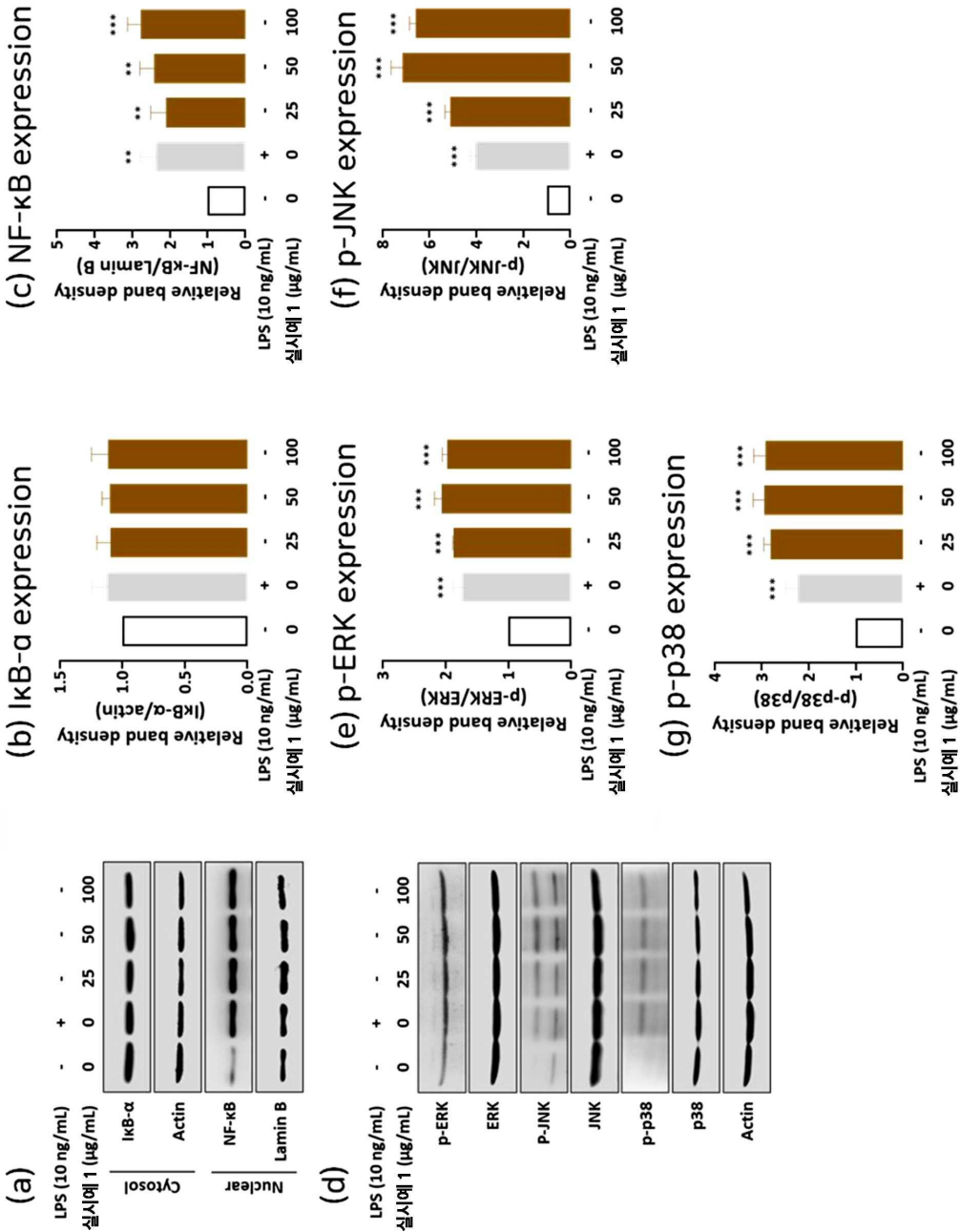
(c) Fluorescence intensity



도면11



도면12



도면13

