



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2013-0054518
(43) 공개일자 2013년05월27일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A23L 1/337 (2006.01) A23L 3/44 (2006.01)

A23L 1/30 (2006.01) A61K 36/04 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2011-0119926

(22) 출원일자 2011년11월17일

심사청구일자 2012년11월07일

(71) 출원인

조선대학교산학협력단

광주광역시 동구 서석동 375 조선대학교 내

광주대학교산학협력단

광주광역시 남구 효덕로 277 (진월동)

(72) 발명자

김성준

광주광역시 남구 금당로3길 8-3, 101동 901호 (진월동, 협진훼밀리)

최봉석

광주광역시 북구 능안로29번길 5 (오치동)

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

최성용

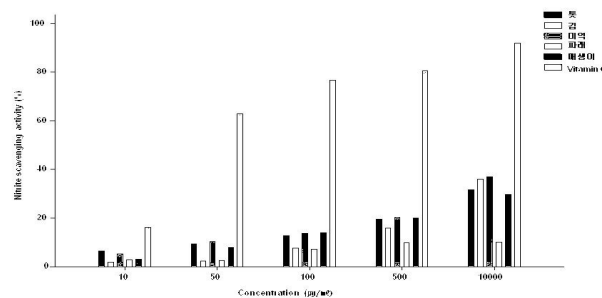
전체 청구항 수 : 총 3 항

(54) 발명의 명칭 **해조류 추출물을 포함하는 식품 조성물 및 그의 용도**

(57) 요약

본 발명은 해조류의 메탄올 추출물을 유효성분으로 포함하는 식품 조성물 및 그의 용도에 관한 것으로, 더욱 구체적으로는 해조류를 열수 추출에 의해 분리된 성분을 포함하는 기능성 식품 및 그의 미백제, 항산화제 및 항염증제로서의 용도에 관한 것이다. 본 발명의 해조류 추출물을 포함하는 기능성 조성물은 미백 효과가 뛰어날 뿐만 아니라 항산화 효능 및 항염증 효능이 있어서 식품, 화장품 또는 의약으로 효율적으로 사용될 가능성이 매우 높다.

대표도 - 도1



(72) 발명자

최준희

광주광역시 북구 운암동 현대아파트 101-1410

박세은

광주광역시 북구 삼정소로길 57-1 (두암동)

전홍성

광주 북구 문흥1동 현대아파트 102-203

박으뜸

광주광역시 북구 용두동 성진아파트 1동 204호

김승

광주광역시 서구 풍암동 1132 풍암우미아파트
102-309

이효정

광주 서구 풍암동 1093 금호아파트 204-1103

특허청구의 범위

청구항 1

- a) 김(*Porphyra yezoensis*), 미역(*Undaria pinnatifida*), 툇(*Hizikia fusiformis*), 매생이(*Capsosiphon fulvescens*), 파래(*Enteromorpha Linza*)를 채취하는 단계,
 - b) 각각의 해조류를 세척한 다음, 건조시킨 후 100g에 대하여 70% MeOH 500ml에 침지시킨 후 1주일 동안 추출하는 단계,
 - c) 상기 추출액을 여과지를 이용하여 여과하는 단계, 및
 - d) 상기 여과물을 증발기를 이용하여 농축한후 동결건조시키는 단계
- 를 포함하는 단계에 의해 얻어진 것을 특징으로 하는 항산화용 건강 기능성 식품.

청구항 2

- a) 김(*Porphyra yezoensis*), 미역(*Undaria pinnatifida*), 툇(*Hizikia fusiformis*), 매생이(*Capsosiphon fulvescens*), 파래(*Enteromorpha Linza*)를 채취하는 단계,
 - b) 각각의 해조류를 세척한 다음, 건조시킨 후 100g에 대하여 70% MeOH 500ml에 침지시킨 후 1주일 동안 추출하는 단계,
 - c) 상기 추출액을 여과지를 이용하여 여과하는 단계, 및
 - d) 상기 여과물을 증발기를 이용하여 농축한후 동결건조시키는 단계
- 를 포함하는 단계에 의해 얻어진 것을 특징으로 하는 미백용 화장품.

청구항 3

- a) 김(*Porphyra yezoensis*), 미역(*Undaria pinnatifida*), 툇(*Hizikia fusiformis*), 매생이(*Capsosiphon fulvescens*), 파래(*Enteromorpha Linza*)를 채취하는 단계,
 - b) 각각의 해조류를 세척한 다음, 건조시킨 후 100g에 대하여 70% MeOH 500ml에 침지시킨 후 1주일 동안 추출하는 단계,
 - c) 상기 추출액을 여과지를 이용하여 여과하는 단계, 및
 - d) 상기 여과물을 증발기를 이용하여 농축한후 동결건조시키는 단계
- 를 포함하는 단계에 의해 얻어진 것을 특징으로 하는 항염증용 제약조성물.

명세서

기술분야

- [0001] 본 발명은 해조류의 메탄올 추출물을 유효성분으로 포함하는 식품 조성물 및 그의 용도에 관한 것으로, 더욱 구체적으로는 해조류를 메탄올 추출에 의해 분리된 성분을 포함하는 기능성 식품 및 그의 미백제, 항산화제 및 항염증제로서의 용도에 관한 것이다.

배경기술

- [0002] 인간수명의 증가에 따라 삶의 질 향상에 대한 욕구 또한 증가하고 있다. 이에 따라서 화학적 방법을 통해 개발된 제품들이 이용되어 왔지만 이들이 가지고 있는 장시간 사용으로 인한 문제점, 부작용 등의 문제로 약효와 안정성이 보장된 천연물 유래 신약 개발에 대한 관심의 증대로 나타나고 있다. 천연물을 이용한 생약 혹은 기능성 제품은 근래에 전 세계의 대부분 국가들에서 고대부터 전해지고 있는 전통요법에 대한 신뢰를 얻으면서 점차 사용량과 범위가 증가하고 있다. 이와 관련하여 전통의 생약제제나 기타 동식물 혹은 미생물로부터 활성물질을 분리, 규명하여 이들을 토대로 의약품, 향장품, 기타 산업적 소재를 연구개발하려는 시도들이 지속적으로 증가하

고 있다.

[0003] 선진국에서는 이미 1960년대부터 신물질 및 유용물질의 중요한 원천으로서 해양생물을 인식하고 많은 연구투자를 하여 왔다. 더욱이 오랜 기간 천연물의 보고이었던 육지생물로부터 유용물질의 개발이 근래에 한계를 나타내며, 점차 정체되는 경향을 나타냄에 따라 해양생물의 중요성이 더욱 부각되어 집중적인 연구를 하고 있으며 엄청난 성과를 얻고 있다. 많은 연구들을 통해서 기술적인 측면에서는 관련분야인 육상천연물에 근접하고 있으며 천연물을 활용하는 생화학, 생물유기화학, 유기합성화학 등의 분야에서도 해양천연물을 대상으로 하여 이루어진 연구결과가 무수히 보고되는 실정이다. 미국, 일본 등에서는 21세기 생물 산업을 주도할 핵심 분야의 하나로써 해양생물의 대사물질을 인정하고 막대한 연구투자를 하고 있다. 최근 중국, 인도, 칠레 등 개발도상국에서도 해양천연물에 대한 연구가 점차 활발하여지고 있으며 기술적으로 우수한 연구결과가 상당 수 보고되고 있다.

[0004] 해양생물 중에서 녹조류 (Chlorophyta), 갈조류 (Phaeophyta), 홍조류 (Rhodophyta)를 비롯한 해조류들은 1970년대부터 주로 탐색되어 왔으며 acetogenins, oxylipins, polyphenyl ethers, terpenoids, steroids, nucleosides 등 2,500 여 물질이 보고된바 있으며, polysaccharides나 haloperoxidase 등 고분자물질도 다수 알려져 있다. 이들 중에서 상당수는 강력한 항균, 항암, 항바이러스, 효소활성저해 등의 생리활성을 나타내어 curacin A, 등은 의약품으로 개발되기 위한 임상단계에 진입해 있다. 해조류 천연물의 미백, 보습, 항산화 등의 활성을 이용하여 최근에는 프랑스, 일본 등을 중심으로 해조류 추출물이나 분획이 기능성 화장품의 활성성분으로 널리 활용되고 있다. 한편 국내에서는 해조류를 비롯한 다양한 생물이 근해에 서식함에도 불구하고 천연물연구의 대상이 육지의 식물과 미생물에 집중되어 있어서 이 분야의 연구가 미미한 실정이다. 그러나 최근 제주도에 서식하는 갈조류인 감태로부터 강력한 항산화 활성을 나타내는 씨놀을 분리하여 최근 국내의 대학과 연구소를 중심으로 이 분야의 연구가 점차 활성화되고 있으나, 아직 대체적인 수준은 활성물질의 탐색에 머물러 있다.

[0005] 해양천연물연구의 발전은 국내의 천연물 및 생물소재연구의 기술수준의 향상과 더불어 연구대상의 확대측면에서도 매우 중요하다. 또한 유용 해양천연물 및 이를 생산하는 생물소재에 대한 연구는 신물질의 개발뿐만 아니라 국내의 정밀화학과 생명공학의 기반기술의 균형적인 발전 측면에서 중요하며 날로 가열되고 있는 국가 간의 생물자원의 개발경쟁에 있어서 기술력의 중요성을 고려할 때 이 분야의 연구는 대단히 시급하다고 볼 수 있다.

선행기술문헌

특허문헌

[0006] (특허문헌 0001) 해조류 추출물의 기능성에 관한 기술로는 특허출원 제2009-29440호에 미역쇠, 꼬마모자반, 미끈뽀대그물말 및 바위수염의 추출물을 포함하는 미백제 조성물이 기재되어 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 본 발명자들은 우리나라 연안의 해조류를 대상으로 새로운 기능성 성분을 개발하고자 예의 연구한 결과, 후술하는 바의 해조류의 메탄올 추출물이 항산화 효능, 미백 효능 및 항염증 효능 등의 다양한 생리활성을 나타냄을 발견하고 이들이 건강 기능성 식품, 미백용 화장품 및 제약 조성물로 효율적으로 이용될 수 있음을 확인하고 본 발명을 완성하기에 이르렀다.

과제의 해결 수단

[0008] 따라서, 본 발명은

[0009] a) 김(*Porphyra yezoensis*), 미역 (*Undaria pinnatifida*), 톳 (*Hizikia fusiformis*), 매생이 (*Capsosiphon fulvescens*), 과래 (*Enteromorpha Linza*)를 채취하는 단계,

[0010] b) 각각의 해조류를 세척한 다음, 건조시킨 후 100g에 대하여 70% MeOH 500ml에 침지시킨 후 1주일 동안 추출하는 단계,

[0011] c) 상기 추출액을 여과지를 이용하여 여과하는 단계, 및

- [0012] d) 상기 여과물을 증발기를 이용하여 농축한후 동결건조시키는 단계
- [0013] 를 포함하는 단계에 의해 얻어지는 해조류의 메탄올 추출물을 포함하는 것을 특징으로 하는 항산화용 건강 기능성 식품, 미백용 화장품 및 항염증용 제약 조성물을 제공한다.

발명의 효과

- [0014] 본 발명의 해조류 추출물을 포함하는 기능성 조성물은 미백 효과가 뛰어날 뿐만 아니라 항산화 효능 및 항염증 효능이 있어서 식품, 화장품 또는 의약으로 효율적으로 사용될 가능성이 매우 높다.

도면의 간단한 설명

- [0015] 도 1은 다양한 해조류 추출물의 아질산염 소거능을 나타내는 그래프도.
- 도 2는 해조류 추출물이 위암 세포 생존율에 미치는 효과를 나타내는 그래프도.
- 도 3은 해조류 추출물이 피부암 세포 생존율에 미치는 효과를 나타내는 그래프도.
- 도 4는 해조류 추출물이 뇌소교 세포 생존율에 미치는 효과를 나타내는 그래프도.
- 도 5는 해조류 추출물이 대장암 세포 생존율에 미치는 효과를 나타내는 그래프도.
- 도 6은 해조류 추출물이 피부각질 세포 생존율에 미치는 효과를 나타내는 그래프도.
- 도 7은 해조류 추출물이 피부각질 세포 생존율에 미치는 효과를 나타내는 그래프도.
- 도 8은 해조류 추출물이 쥐섬유아세포 생존율에 미치는 효과를 나타내는 그래프도.
- 도 9는 해조류 추출물이 대식 세포 생존율에 미치는 효과를 나타내는 그래프도.
- 도 10은 해조류 추출물이 비만 세포 생존율에 미치는 효과를 나타내는 그래프도.
- 도 11은 해조류 추출물이 신경모세포종 세포 생존율에 미치는 효과를 나타내는 그래프도.
- 도 12는 해조류 추출물이 위암 세포 생존율에 미치는 효과를 나타내는 그래프도.
- 도 13은 다양한 해조류 추출물의 UV 흡광도를 나타내는 그래프도.
- 도 14는 다양한 해조류 추출물의 버섯 티로시나아제 활성에 미치는 효과를 나타내는 그래프도.
- 도 15는 다양한 해조류 추출물의 B16 멜라노마 세포에서 티로시나아제에 미치는 효과를 나타내는 그래프도.
- 도 16은 다양한 해조류 추출물의 B16 멜라노마 세포에서 멜라닌 함량에 미치는 효과를 나타내는 그래프도.
- 도 17은 RBL-2H3 세포로 부터 β -헥소스아미니다아제 방출에 미치는 다양한 해조류 추출물의 효과를 나타내는 그래프도.
- 도 18은 다양한 농도의 해조류 추출물의 Raw 264.7 세포에서 산화 질소의 생산에 미치는 효과를 나타내는 그래프도.
- 도 19는 다양한 농도의 해조류 추출물의 BV2 세포에서 산화 질소의 생산에 미치는 효과를 나타내는 그래프도.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0016] 본 발명은, 일면에 있어서
- [0017] a) 김(*Porphyra yezoensis*), 미역 (*Undaria pinnatifida*), 툇 (*Hizikia fusiformis*), 매생이 (*Capsosiphon fulvescens*), 파래 (*Enteromorpha Linza*)를 채취하는 단계,
- [0018] b) 각각의 해조류를 세척한 다음, 건조시킨 후 100g에 대하여 70% MeOH 500ml에 침지시킨 후 1주일 동안 추출하는 단계,
- [0019] c) 상기 추출액을 여과지를 이용하여 여과하는 단계, 및
- [0020] d) 상기 여과물을 증발기를 이용하여 농축한후 동결건조시키는 단계

- [0021] 를 포함하는 단계에 의해 얻어지는 해조류의 메탄올 추출물을 포함하는 것을 특징으로 하는 항산화용 건강 기능성 식품, 미백용 화장품 및 항염증용 제약 조성물을 제공한다.
- [0022] 상기 해조류의 메탄올 추출물은 화학 합성제가 아닌 천연 물질의 추출물을 포함하고 있으므로 후술하는 실시예 및 시험예의 결과로부터 잘 알 수 있는 바와 같이 피부에 대한 자극성이나 독성이 없어서 안정성이 우수하며, 피부미백 등에 탁월한 효과 등의 기능성이 있으므로 이러한 기능성을 요하는 화장품이나 식품의 성분으로 사용될 수 있다.
- [0023] 본 발명에 따른 식품 조성물의 제형은, 미백 기능성 식품으로 이용시에 당해 분야에서의 통상적인 방법에 따라, 예를 들면 경구제, 파우치제, 또는 드링크제 등의 음료수의 형태로 제형화시켜 사용할 수 있다.
- [0024] 본 발명의 식품 조성물의 복용량은, 그 제제 형태, 투여 방법, 사용 목적 및 이것에 적용되는 개인의 연령, 체중, 증상에 따라서 적절히 설정되고, 일정하지 않지만 일반적으로는 제제 중에 함유되는 유효성분의 양은 성인 1일당 예컨대 1 mg~2000 mg/kg이다. 물론 복용량은, 각종 조건에 의해서 변동하기 때문에, 상기 범위 보다 적은 양으로 충분한 경우도 있고, 또는 범위를 초과하여 필요한 경우도 있다.
- [0025] 본 발명에 따른 식품 조성물은 원하는 조성물의 형태에 따라 통상의 보조제 또는 첨가제, 또는 감미료, 예를 들면 감초, 비타민 C, 구연산, 니코틴산, 안식향산나트륨, 아스파탐, 사카린, 펙틴, 말리톨, 솔비톨, 자일리톨, 구아검, 탈지분유 및 올리고당으로 이루어진 군 중에서 선택되는 하나 이상의 성분을 추가하여 기호도나 미감을 증대시킬 수 있다.
- [0026] 이들은 본 발명의 조성물의 전체 중량을 기준으로 약 0.01~20 중량%로 사용하는 것이 적절하다.
- [0027] 음료수는, 예를 들면, 상기 해조류의 메탄올 추출물을 0.01~20 중량%로 넣고, 감초 0.01~2 중량%, 구연산을 0.01~2 중량%, 사과산 0.01~2 중량%, 타우린 0.1~2 중량%, 비타민 C 0.01~2 중량%, 비타민 B1 0.01~2 중량%, 바이오틴 0.01~2 중량%, 액상과당 0.01~2 중량% 등을 단독 또는 혼합하여 첨가하여 기능성 음료수로 제조할 수 있다.
- [0028] 본 발명의 미백 화장품 조성물은 그 제형에 있어서 특별히 한정되는 바가 없으며, 예를 들면, 유연화장수, 수렴화장수, 영양화장수, 아이크림, 영양크림, 마사지크림, 클렌징크림, 클렌징 폼, 클렌징 워터, 파우더, 에센스, 팩 등의 제형으로 제조하여도 좋다.
- [0029] 상기 화장품의 제형은 화장품 제조 분야에서 잘 알려진 통상적인 방법에 의해 제조할 수 있다.
- [0030] 상기한 바와 같은 기능성 화장품들은 목적하는 기능성을 더욱 향상시키기 위한 보조 성분으로서, 이들에 한정되지 않고, 쌀눈, 쌀겨, 미역 분말, 죽염, 쌀겨, 대나무 숯 등을 적당량으로 배합하여 기능성을 더욱 증대시킬 수 있다.
- [0031] 이러한 보조 성분이 단독 또는 혼합하여 첨가되는 경우에 이들의 첨가량은 전체 조성물의 중량을 기준으로 0.1 ~ 10 중량%로 배합하여 사용하는 것이 적합하다.
- [0032] 이들 화장품의 부형제로서는 사용 목적에 따라 달라질 수 있으나, 일반적으로 글리세린, 부틸렌글리콜, 프로필렌글리콜, 알코올류 등의 방부제 또는 식물성 방부제, 정제수, 보습제, 벌크화제, 크림제, 계면활성제, pH 조정제, 향료 등을 적량 혼합하여 원하는 제형의 형태에 따라 제조하는 것이 바람직하다. 또한 안정화제, 용해화제, 비타민, 안료 및 향료와 같은 통상적인 보조제, 그리고 담체를 포함할 수 있다. 또한, 본 발명의 미백제는 기능의 향상, 특히 미백 효과의 상승적인 향상, 미백 효과의 보조, 흡수성의 향상 등을 목적으로, 그 외의 생리 활성 성분 등과 조합하여 사용할 수 있다. 특별히 제한은 없지만, 예를 들어 상승적인 효과를 기대할 수 있는 그 외의 경구 미백제, 간접적으로 미백 효과의 기여가 있는 항산화제, 체내에서의 흡수성을 향상시켜 효과의 효율을 올리기 위한 유성 성분, 영양강화를 위한 각종 비타민류, 미네랄류, 아미노산류 등을 들 수 있다.
- [0033] 이들은 본 발명의 조성물의 전체 중량을 기준으로 약 0.01~90 중량(%)로 사용하는 것이 적절하다.
- [0034] 본 발명은, 더욱 추가의 일면에 있어서, 상기 해조류의 메탄올 추출물의 용도, 특히 항산화제 및 항염증제로서의 용도를 제공한다.
- [0035] 본 발명자들은 해조류의 메탄올 추출물이 생리 활성에 미치는 영향을 연구하던 중, 상기 추출물이 항산화 및 항염증 효능을 가지고 있음에 주목하게 되었는데, 상기 추출물은 사람이나 동물의 노화방지나 건강유지에 사용될 수 있는 기능성 건강보조 물질이나 약품으로 개발될 수 있을 것으로 판단된다.

[0036] 본 발명에 따른 항산화 효능 및 항염증 효능의 유효성분으로 함유되는 해조류 추출물은 약학적으로 허용가능한 결합제(예, 폴리비닐피롤리돈, 하이드록시프로필셀룰로오스), 붕해제(예, 카복시메틸셀룰로오스칼슘, 전분글리콜산나트륨), 희석제(예, 옥수수전분, 유당, 콩기름, 결정셀룰로오스, 만니톨), 활택제(예, 스테아린산 마그네슘, 탈크), 감미제(예, 백당, 과당, 솔비톨, 아스파탐), 안정제(카복시메틸셀룰로오스나트륨, 알파 또는 베타 사이클로덱스트린, 비타민 C, 구연산, 백납), 보존료(예, 파라옥시안식향산메틸, 파라옥시안식향산프로필, 안식향산나트륨) 및 향료(예, 에틸바닐린, 마스크후레바, 멘톨후라보노, 허브향)와 혼합하여 정제, 캡셀제, 연질캡셀제, 액제, 연고제 또는 주사제와 같은 약학적 제제로 제조될 수 있다. 본 발명의 제약 조성물은 비경구제의 형태로 투여하는 것이 바람직할 수 있다.

[0037] <유효량>

[0038] 본 발명에 있어서의 약제학적 조성물 중 유효성분인 해조류 추출물의 투여량은 환자의 연령, 성별, 증상, 투여 방법 또는 예방목적에 따라, 체중 kg 당 6 내지 30mg을 일일 1회 내지 3회 분복할 수 있다. 특히 증상을 나타내는 환자에 대한 투여용량 수준은 환자의 체중, 연령, 성별, 건강상태, 식이, 투여 시간, 투여 방법, 배설율, 질환의 중증도 등에 따라 당업자가 투여량을 변화시킬 수도 있다.

[0039] <실시예>

[0040] 이하, 본 발명은 다음의 대표적인 실시예에 의하여 더욱 구체적으로 설명되나, 본 발명이 이들 실시예에 의하여 어떤 식으로든 제한되는 것은 아니다.

[0041] 실시예 1: 해조류 추출물의 제조

[0042] 홍조류-김 (*Porphyra yezoensis*), 갈조류-미역 (*Undaria pinnatifida*), 톳 (*Hizikia fusiformis*), 녹조류-매생이 (*Capsosiphon fulvescens*), 파래 (*Enteromorpha Linza*)를 채취하고, 각각의 해조류를 세척한 다음, 건조시킨 후 100g씩 70% MeOH 500ml에 침지시킨 후 1주일 동안 추출하였다. 추출액은 3MM paper를 이용하여 여과한 후, 증발기를 이용하여 농축한 후 동결건조 하였다. 동결건조한 후 DMSO에 녹여 실험에 이용하였다.

[0043] 시험예 1: 항산화 효과

[0044] 1) DPPH(1,1-diphenol-2-picrylhydrazyl) radical 제거 효능 검색

[0045] Free-radical인 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl(DDPH)는 자주색을 띠며 515nm에서 최대 흡광도를 보이므로 free radical 제거 작용을 가지고 있는 물질과 반응 시 노란색이 되면서 흡광도 값이 낮아지는 것을 이용하여 항산화 효과를 측정한다.

[0046] DPPH(1-diphenyl-2-picrylhydroazyl)를 이용한 유리 라디칼 소거 반응으로 각 해조류 추출물의 항산화 능력을 측정 하였다. 대조군으로는 Vitamin C와 BHT를 사용하였다. 녹조류인 파래와 매생이가 갈조류와 홍조류들 보다 높은 radical 제거 능력을 나타냈다. 각 추출물의 IC50 값은 다음과 같다(표 1참조)

표 1

[0047]

해조류	DPPH (IC50, $\mu\text{g/ml}$)
톳	192.12 $\pm$ 2.17
김	425.92 $\pm$ 5.18
미역	350.74 $\pm$ 2.05
파래	103.92 $\pm$ 1.04
매생이	156.08 $\pm$ 2.35

[0048] 시험예 2: 총 폴리페놀 함량 및 총 플라보노이드 함량 분석

[0049] 총 폴리페놀 함량은 공지된 Folin-Denis법에 따라 추출물 0.1 g에 methanol 10 ml을 가하여 70℃에서 30분 동안 추출한 후 1 mg/ml로 희석하여 사용하였다. 검액 50 μl 에 증류수 650 μl 를 넣은 후 Folin-Denis reagent를 50

μl 가하여 3분 동안 실온에서 반응시킨다. 반응시킨 후 10% Na_2CO_3 포화용액을 100 μl 을 첨가하고, 최종 볼륨을 1 ml로 맞추기 위해 증류수 150 μl 을 넣어 잘 혼합시켰다. 37°C water bath에서 1시간 반응시킨 후 UV/Vis spectrophotometer를 이용하여 725 nm에서 흡광도를 측정하였다. 공시험은 시료 용액 대신 methanol 용액을 동일하게 처리하였으며, 표준 곡선은 tannic acid의 농도를 0~500 $\mu\text{g/ml}$ 이 되도록 하고 이로부터 총 페놀 함량을 구하였다.

[0050] 총 플라보노이드 함량은 Davis 등의 방법에 따라, 추출물 0.1 g에 methanol을 10 ml을 가하여 70°C에서 30분 동안 추출 한 후 1 mg/ml로 만들어 사용하였다. 검액 100 μl 에 1 ml의 diethylene glycol을 첨가하고 다시 1N NaOH 100 μl 을 넣어 잘 혼합시켜 37°C water bath에서 1시간 반응시킨 후 UV-Vis spectrophotometer를 사용하여 420 nm에서 흡광도를 측정하였다. 공시험은 시료 용액 대신 methanol 용액을 동일하게 처리하였으며, 표준곡선은 naringin의 농도를 0~300 $\mu\text{g/ml}$ 이 되도록 하여 작성하고 이로부터 총 플라보노이드 함량을 구하였다.

[0051] 각 해조류 추출물의 총 페놀 함량 및 총 플라보노이드 함량을 분석한 결과는 표 2에 나타난 바와 같다. 총 페놀 함량은 Tannic acid로 환산하였으며, 총 플라보노이드 함량은 Pyrogallol을 이용하여 환산하였다. 총 페놀함량의 경우 톳이 가장 높게 나타났으며 총 플라보노이드 함량의 경우에는 DPPH 결과와 같이 파래가 가장 높게 나타났다.

표 2

해조류	Total phenol (mg/g)	Total flavonoid (mg/g)
톳	31±1.92	46±1.97
김	3±1.08	25±1.53
미역	33.50±0.95	25.07±1.05
파래	28±2.61	59±0.21
매생이	26.68±2.05	46.21±1.36

[0053]

[0054] **시험예 3:** 아질산염 소거능

[0055] NaNO_2 용액(1 mM) 2 mL에 각 추출물 용액 1 mL (60 mg)을 첨가하고 여기에 0.1 N HCl 및 0.2 M 구연산 완충용액을 사용하여 반응액의 pH를 2로 조정 한 다음 반응용액의 최종부피를 10 mL로 하였다. 반응액을 37 °C에서 1 h 반응시킨 다음 반응액을 각각 1 mL 취하고 여기에 acetic acid (2%) 5 mL, Griess시약과 naphthylamine (1%)를 1 : 1 비율로 혼합한 용액 0.4 mL를 가하여 잘 혼합 시켜 15 min 간 실온에서 방치시킨 후 흡광도를 520 nm에서 측정하여 잔존하는 아질산염량을 구하였다. 대조구는 Griess시약 대신 증류수를 0.4 mL를 가하여 측정하였다.

[0056] 해조류 추출물의 아질산염 소거능의 결과는 도 1에 나타난 바와 같다. 도 1은 다양한 해조류 추출물의 아질산염 소거능을 나타내는 그래프이다. 대조군으로는 vitamin c를 사용하였다. DPPH나 총 플로보노이드 함량의 결과와 달리 파래에서 가장 낮은 소거능을 보였으며 미역에서 가장 높은 아질산염 소거능을 나타냈다.

[0057] **시험예 4:** 동물세포주의 배양

[0058] SH-SY5Y (신경모세포종 세포), NIH-3T3 (쥐섬유아세포), HeLa (자궁경부암세포종), SNU601 (위암세포), CT26 (대장암 세포), BV (뇌소교세포), B16F10 (피부암세포), Raw264.7 (대식세포), RBL-2H3 (비만세포), AGS (위암 세포), HaCat (피부각질세포) 등의 동물세포주는 한국세포주은행으로부터 분양받아 공지된 DMEM, MEM, RPMI1640, DMEM/F12 등의 배지를 이용하여 각각의 배양조건에 맞추어 37°C, 5% CO_2 , 습도 95%에서 배양하며, 48 시간을 주기로 배지를 교체한다. 70 ~ 80% 정도 자랐을 때, Trypsin/EDTA를 이용하여 계대하여 실험에 이용하였다. 상기 세포주에 추출물을 일정한 dose-dependent와 time-dependent 방식으로 처리하였다. 이를 후속의 시험에 사용하였다.

[0059] **시험예 5:** 세포 독성 분석-MTT assay

- [0060] 각 세포주를 1×10^5 cell/ml씩 96 well plate에 0.1 ml씩 분주하여 하룻밤 배양하고, 각 추출물을 농도별로 처리한 후 24시간 동안 반응 시킨다. 처리 후, MTT 용액(최종 농도: $500 \mu\text{g/ml}$)을 배지로 희석하여 각 웰에 넣어 준 후 37°C 에서 4시간 동안 반응시켜 formazan을 형성시킨다. 형성된 formazan은 0.1 ml DMSO를 이용하여 녹여 준 후 microplate reader를 이용하여 540nm에서 흡광도를 측정한다.
- [0061] 각 해조류 추출물들의 세포 독성을 알아보기 위하여 동물 세포주를 이용하여 MTT assay를 수행하였다. 각 세포 주들을 96well에서 배양한 후 추출물을 0, 10, 50, 100, 200, 300, 500 $\mu\text{g/ml}$ 농도로 희석하여 5% CO_2 인큐베이션에서 37°C 에서 24시간 동안 처리한 후 세포 생존율 변화를 관찰하였다. 모든 추출물에서 10 $\mu\text{g/ml}$ 까지는 세포 생존율에서 큰 변화를 나타내지는 않았다. 그러나 김, 톳, 미역과 달리 파래나 매생이의 경우 모든 세포주에서 10 $\mu\text{g/ml}$ 까지는 세포 생존율에서 큰 변화를 나타내지는 않았지만 그 이상의 농도에서는 농도가 증가할수록 세포 생존율이 급격하게 감소하는 것을 확인할 수 있었다.
- [0062] 김의 경우에는 B16F10, HaCat, SH-SY5Y, Raw264.7 세포에서 50 $\mu\text{g/ml}$ 이상의 농도로 처리하였을 세포 생존율 감소를 나타냈으며 나머지 세포주에서는 100 $\mu\text{g/ml}$ 이상에서 세포 생존율 감소가 나타났다. 톳의 경우에는 대부분의 세포주에서 100 $\mu\text{g/ml}$ 이상의 농도에서 세포 생존율 감소가 나타났다. 미역의 경우에는 톳과 마찬가지로 대부분의 세포주에서 100 $\mu\text{g/ml}$ 이상의 농도에서 세포 생존율 감소가 나타났다. 추출물 농도에 따른 각 세포주들의 세포 생존율 변화는 도 2 내지 12에 나타낸 바와 같다. 도 2는 해조류 추출물이 위암 세포 생존율에 미치는 효과를 나타내는 그래프도이고, 도 3은 해조류 추출물이 피부암 세포 생존율에 미치는 효과를 나타내는 그래프도이며, 도 4는 해조류 추출물이 뇌소교 세포 생존율에 미치는 효과를 나타내는 그래프도이고, 도 5는 해조류 추출물이 대장암 세포 생존율에 미치는 효과를 나타내는 그래프도이며, 도 6은 해조류 추출물이 피부각질 세포 생존율에 미치는 효과를 나타내는 그래프도이고, 도 7은 해조류 추출물이 피부각질 세포 생존율에 미치는 효과를 나타내는 그래프도이며, 도 8은 해조류 추출물이 쥐섬유아세포 생존율에 미치는 효과를 나타내는 그래프도이고, 도 9는 해조류 추출물이 대식 세포 생존율에 미치는 효과를 나타내는 그래프도이며, 도 10은 해조류 추출물이 비만 세포 생존율에 미치는 효과를 나타내는 그래프도이고, 도 11은 해조류 추출물이 신경모세포 종 세포 생존율에 미치는 효과를 나타내는 그래프도이며, 도 12는 해조류 추출물이 위암 세포 생존율에 미치는 효과를 나타내는 그래프도이다.
- [0063] **시험예 6: 미백 효과 시험**
- [0064] ① 자외선 흡수도
- [0065] 추출물을 1 mg/ml 로 희석하여 UV/visible spectrophotometer를 이용하여 UVA (320-400 nm), UVB (280-320 nm) 및 UVB (280-200 nm) 에서 scanning하여 추출물의 최대흡수파장을 얻었다. 대조군으로는 Rutin을 사용하였다.
- [0066] 해조류 추출물의 UVA(320-400 nm), UVB(280-320 nm) 및 UVB(280-200 nm) 에 대한 흡수도는 도 13에 나타나 있다. 도 13은 다양한 해조류 추출물의 UV 흡광도를 나타내는 그래프도이다. 표준 물질로서 Rutin이 사용되었다. 모든 추출물들은 Rutin과 비교하였을 때 UVA/B/C 모두에 대해 흡수도가 미미하였다.
- [0067] ② 추출물에 의한 Mushroom tyrosinase 억제 효과
- [0068] Tyrosinase 활성 측정시 기질은 L-DOPA를 사용하였다. 기질 농도로 L-DOPA는 2 mg/ml를 potassium phosphate buffer(0.1 M, pH 6.8)로 완전히 녹이고 tyrosinase는 125 units/ml를 사용하였다. L-tyrosine (0.3 mg/ml)과 L-DOPA (2 mg/ml)를 가하고 해조류 추출물을 농도별로 가한 후, Tyrosinase 50 μl 를 가한 후 실온에서 2분간 반응시켰다. 반응을 종결시킨 후 microplate reader를 이용하여 475 nm에서 흡광도를 측정하였다.
- [0069] 세포내에서 미백효과를 확인하기 위하여 먼저 melanin 생성에 중요한 작용을 하는 tyrosinase에 해조류 추출물이 직접 작용하여 활성을 억제시키는지를 확인하였다. 대조군으로 알부틴을 사용하였으며 각 추출물은 10, 50, 100, 500, 1000 $\mu\text{g/ml}$ 로 희석하여 사용하였다. 도 14는 다양한 해조류 추출물의 버섯 티로시나아제 활성에 미치는 효과를 나타내는 그래프도이다. 10 $\mu\text{g/ml}$ 에서는 모든 추출물이 tyrosinase 억제효과가 미미하였지만 농도가 증가할수록 점차 억제 효과 역시 증가하였다. mushroom tyrosinase 억제 효과는 파래, 매생이, 톳, 미역, 김 순으로 효과가 나타났으며 추출물 모두에서 tyrosinase를 직접적으로 억제하는 것을 확인할 수 있었다.

- [0070] ③ 세포내 멜라닌 생성 및 tyrosinase 활성 억제 효과
- [0071] 세포를 24well plate에 접종하여 배양한 후, 멜라닌 생성 유도 호르몬인 200nM α -MSH (α -Melanocyte stimulating hormones)과 추출물을 3일 동안 처리하여 5% CO₂ 인큐베이터에서 37℃에서 배양하였으며, 대조군으로 미백제인 알부틴을 사용하였다. 배양이 끝난 후, 1% (w/v) triton X-100을 함유한 10 mM phosphate buffer (pH 6.8)를 100 μ l을 각 well에 처리하여 5분간 shaking 한 후에 세포와 용액을 원심 분리하여 상층액은 tyrosinase 활성과 단백질 정량에 이용하고, cell pellet은 멜라닌 정량에 사용하였다. 96 well plate에 triton X-100 처리 후 얻은 상층액 40 μ l를 분주하고 0.1M sodium phosphate buffer (pH 7.2)에 녹인 2 mg/ml L-DOPA 200 μ l를 가하여 37℃에서 30분 동안 반응 시켰다. Tyrosinase에 의해 생성된 DOPA chrome은 microplate reader 를 이용하여 475 nm에서 흡광도를 측정하였다. Cell pellet은 1N NaOH 100 μ l와 증류수 200 μ l를 가하고 60℃에서 1시간 방치하여 melanin을 완전히 녹인 후 96 well plate에 200 μ l를 옮긴 후 microplate reader를 이용하여 405 nm에서 흡광도를 측정하였다.
- [0072] melanin을 생성하는 세포 수준에서 미백효과가 있는 지를 확인하기 위하여 α -melanocyte stimulating hormone(α -MSH)로 자극한 B16 melanoma 세포내에서의 tyrosinase 활성과 melanin 생성을 관찰하였다. B16 melanoma 세포에서 MSH는 tyrosinase 활성과 melanin 생성을 유의하게 증가시켰다(도 15 및 16 참조). 도 15는 다양한 해조류 추출물의 B16 멜라노마 세포에서 티로시나아제에 미치는 효과를 나타내는 그래프도이고, 도 16은 다양한 해조류 추출물의 B16 멜라노마 세포에서 멜라닌 함량에 미치는 효과를 나타내는 그래프도이다. 이러한 MSH에 의한 tyrosinase 활성과 melanin 생성에서 톳 추출물이 가장 높은 효과를 나타냈으며 mushroom tyrosinase 억제에서 가장 높은 효과를 나타냈던 파래는 그다지 톳 추출물에 비해서 낮게 나타났다. 대조군으로 사용한 arbutin 비교하였을 때, tyrosinase 활성과 melanin 생성 억제에서 유사하거나 높은 효과를 나타내는 것을 확인할 수 있었다.
- [0073] **시험예 6: 항염증 효과**
- [0074] (1) 6-Hexosamidase 분비 억제 효과 시험
- [0075] 24-well plates에 RBL-2H3 세포를 10% FBS와 DMEM 배지에 현탁 시킨 후 24-well plate에 2×10^5 cells/ml 세포와 dinitrophenyl-ImmunoglobulinE (DNP-IgE) (0.5 μ g/ml)를 분주한 뒤 37℃, 5% CO₂ 배양기에서 12시간 배양하였다. 각 well의 세포들을 Siraganian buffer (119 mM NaCl, 5mM KCl, 5.6mM glucose, 0.4mM MgCl₂, 25mM, PIPES, 1 mM CaCl₂, 0.1% BSA, pH 7.2)로 2회 세척한 다음 37℃, 5% CO₂ 배양기에서 10분간 반응시킨 후 Siraganian buffer에 추출물을 농도별로 처리하여 37℃, 5% CO₂ 배양기에서 30분 동안 반응시켰다. 이후 dinitrophenyl-Human Serum Albumin (DNP-HSA) (0.2 μ g/ml)을 가하여 37℃, 5% CO₂ 배양기에서 15분 동안 반응시키고, 얼음에서 냉각시키고 반응을 종결시켰다. 상층액 40 μ l를 96 well plate에 옮기고 substrate buffer (4-p-nitrophenyl-N-acetyl- β -D-glucosaminide 2mM, sodium citrate, 0.05M, pH 4.5) 40 μ l를 넣고 37℃에서 1시간 동안 반응시킨 다음 각 well 에 stop solution (0.1 M NaCO₃/NaHCO₃) 200 μ l를 첨가하여 반응을 종결시키고 microplate reader 를 이용하여 405nm에서 흡광도를 측정하였다.
- [0076] 추출물의 항염증 효과를 살펴보기 위해 먼저 비만 세포나 호염구 세포의 분비과립에 초래하는 β -hexosaminidase분비에 미치는 영향을 RBL-2H3 basophilic 세포에서 측정한 결과는 도 17에 나타난 바와 같다. 도 17은 RBL-2H3 세포로부터 β -헥소스아미니다아제 방출에 미치는 다양한 해조류 추출물의 효과를 나타내는 그래프도이다. 각 추출물을 1, 5, 10 μ g/ml로 처리하여 측정한 결과 농도가 증가할수록 분비 억제 효과가 증가하는 것을 확인할 수 있었다. 추출물중 톳에서 가장 높은 분비 억제 효과를 나타냈다.
- [0077] (2) Nitric oxide(NO) 분비억제 효과 시험
- [0078] NO의 농도는 Griess reagent를 이용하여 배양액 내의 nitrite 농도를 측정한다. 세포를 DMEM 배지를 이용하여 1.5×10^5 cells로 조절한 후 24 well plate 에 접종하고, 5% CO₂ 항온기에서 18시간 배양 한 후 추출물을 1시간 동안 전처리 한 후 LPS를 처리하여 24시간 배양하였다. 배양액을 분리하고 원심 분리하여 얻은 상층액 100 μ l을 Griess reagent 100 μ l를 더해준 후 상온에서 10분간 반응시킨다. 반응 시킨 후 microplate reader를 이용하여

540 nm에서 흡광도를 측정한다.

[0079] 추출물의 항염증 효과를 살펴보기 위해 염증 반응에서 중요한 역할을 하는 세포내 NO의 분비 억제 효과를 측정하였다. 각 추출물을 1, 5, 10 $\mu\text{g/ml}$ 로 처리하였으며, Raw 264.7과 BV2 세포를 이용하여 측정하였으며 결과는 다음과 같다. (도 18 및 19 참조). 도 18은 다양한 농도의 해조류 추출물의 Raw 264.7 세포에서 산화 질소의 생산에 미치는 효과를 나타내는 그래프도이고, 도 19는 다양한 농도의 해조류 추출물의 BV2 세포에서 산화 질소의 생산에 미치는 효과를 나타내는 그래프도이다. 농도가 증가할수록 NO의 분비 억제 효과가 증가하는 것을 확인할 수 있었으며, Raw 264.7에서는 톳, BV2에서는 미역이 가장 높은 분비 억제 효과를 나타냈다.

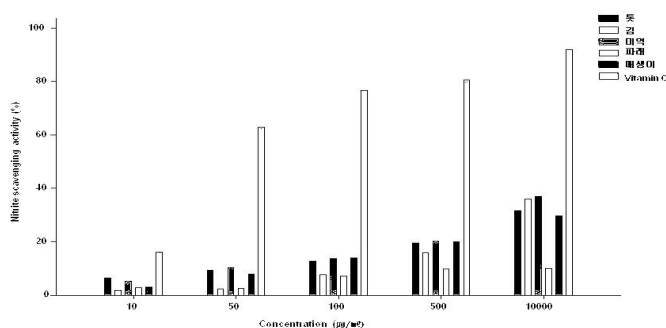
[0080] **시험예 7: 산화적 스트레스에 대한 세포 보호 효과**

[0081] 세포내 산화적 스트레스에 대한 각 추출물의 세포 보호효과를 보기 위해 신경세포주인 SH-SY5Y를 이용하여 측정하였다. 세포내 산화적 스트레스를 유발하기 위한 H_2O_2 , Rotenone, 6-OHDA를 사용하였다. H_2O_2 와 6-OHDA는 세포내 직접 superoxide radical을 생성시키며, Rotenone은 세포내 미토콘드리아의 전자전달계를 방해하여 세포내 산화적 스트레스를 유도하여 세포 사멸을 일으킨다. 세포 생존율에 영향을 미치지 않았던 10 $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 각 추출물을 전처리한 후 H_2O_2 (150 μM), Rotenone (5 μM), 6-OHDA (40 μM)을 24시간 동안 처리하여 생존율 변화를 측정하여 다음과 같은 결과를 나타냈다(도 20, 21, 22 참조). 도 20은 SH-SY5Y 세포에서 다양한 해조류 추출물의 H_2O_2 -유발 세포독성에 미치는 보호효과를 나타내는 그래프도이고, 도 21은 SH-SY5Y 세포에서 다양한 해조류 추출물의 6-OHDA-유발 세포독성에 미치는 보호효과를 나타내는 그래프도이며, 도 22는 SH-SY5Y 세포에서 다양한 해조류 추출물의 Rotenone-유발 세포독성에 미치는 보호효과를 나타내는 그래프도이다.

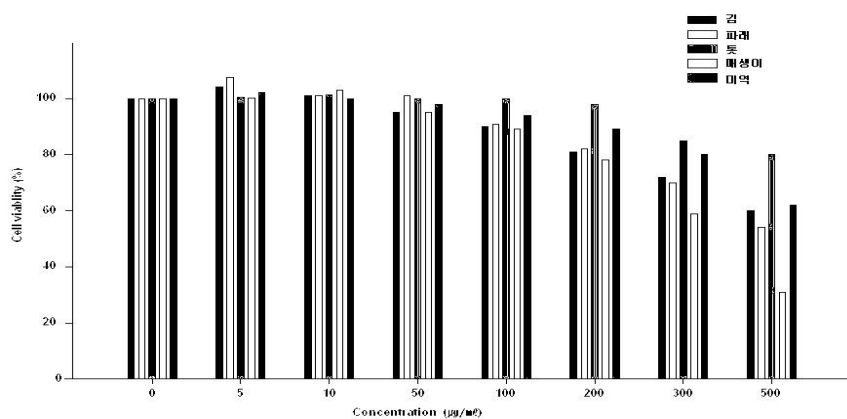
[0082] H_2O_2 을 처리하였을 때는 추출물의 처리 농도가 증가하여도 H_2O_2 만 처리한 경우와 비교하였을 때 세포 생존율이 증가되지 않음을 확인 할 수 있었다. 6-OHDA를 처리하였을 때는 10 $\mu\text{g/ml}$ 을 처리하였을 때 세포 생존율을 증가됨을 확인할 수 있었으며 톳에서 가장 높은 세포 보호효과를 나타냈다. Rotenone을 처리하였을 때도 역시 10 $\mu\text{g/ml}$ 을 처리하였을 때 세포 생존율을 증가됨을 확인할 수 있었으며 미역에서 가장 높은 세포 보호효과를 나타냈다.

도면

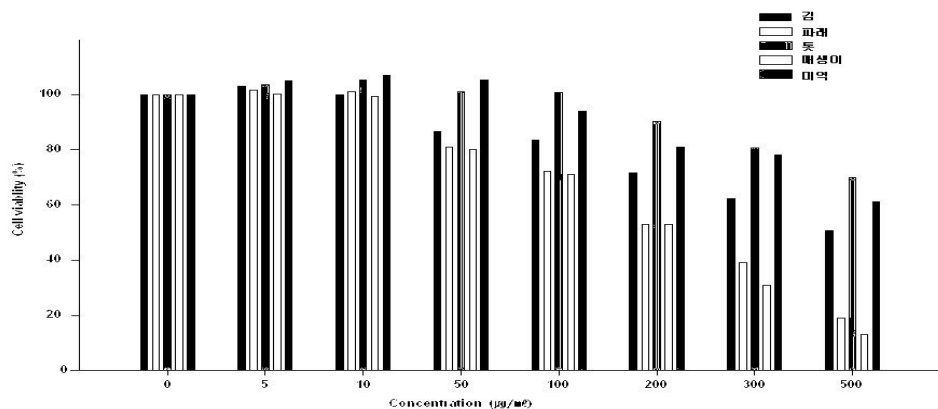
도면1



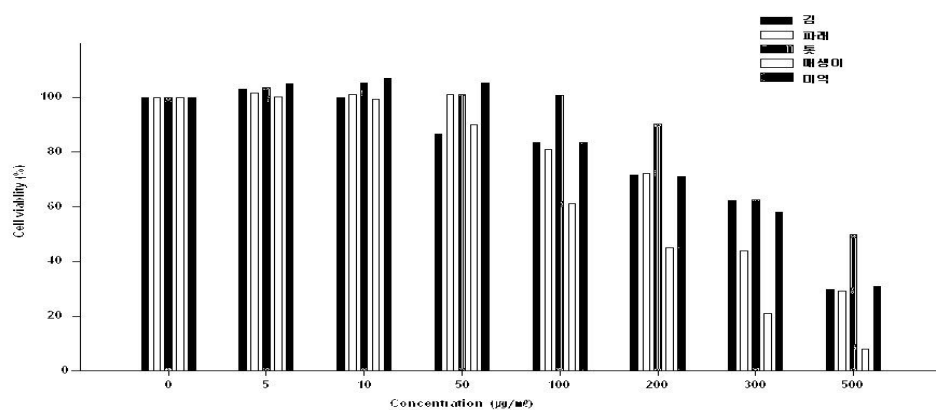
도면2



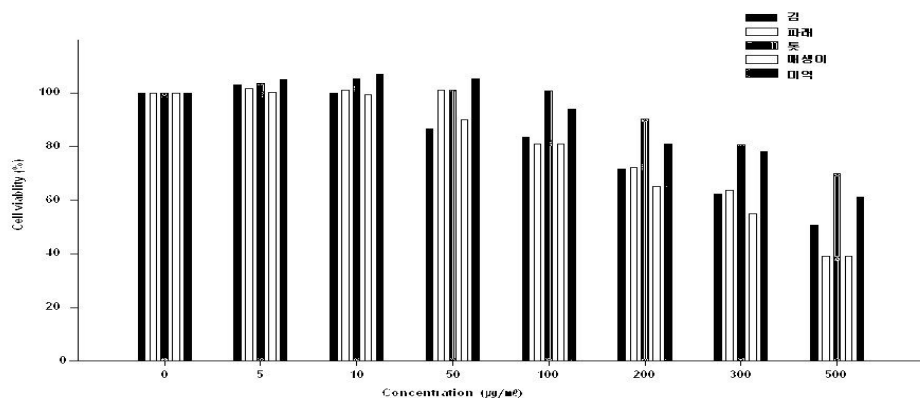
도면3



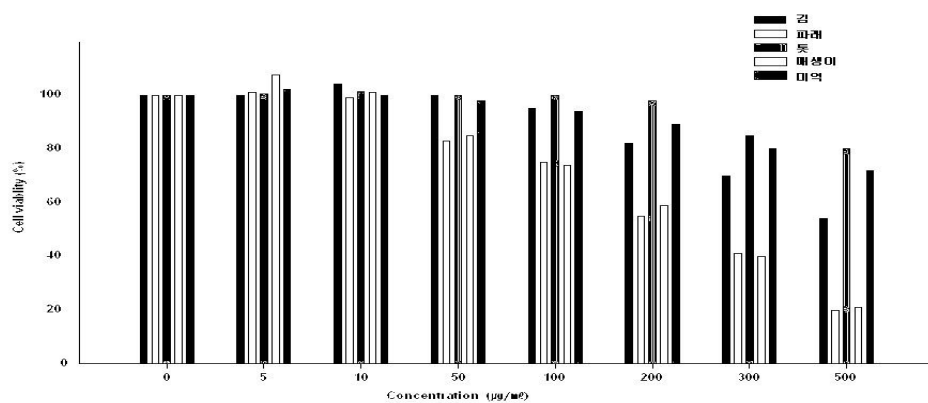
도면4



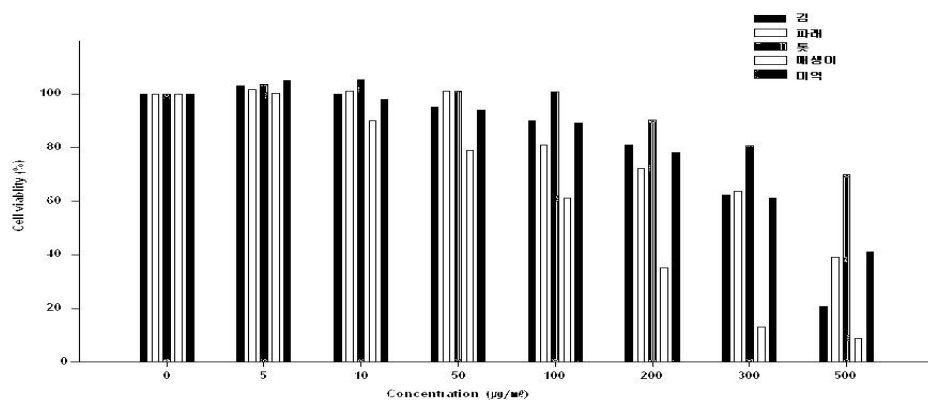
도면5



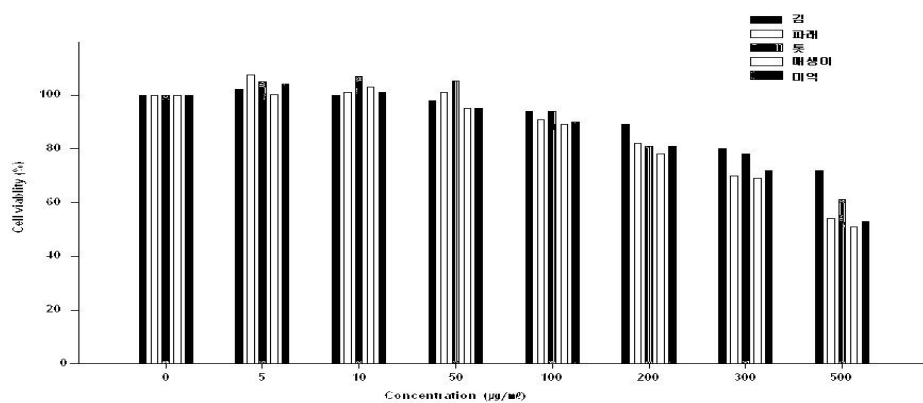
도면6



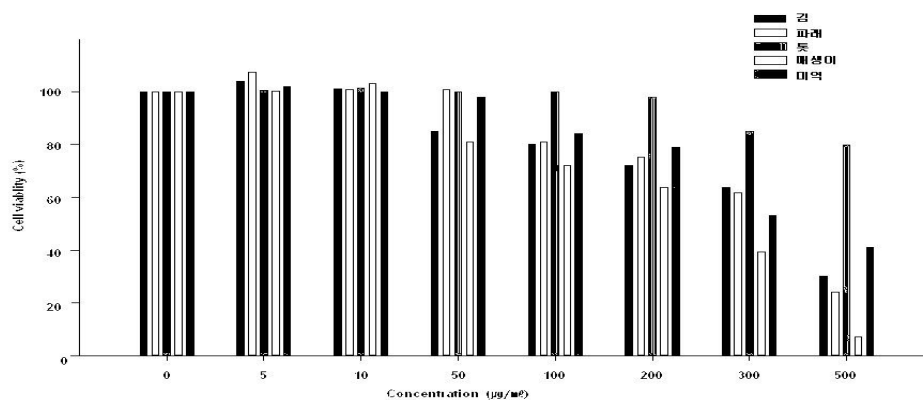
도면7



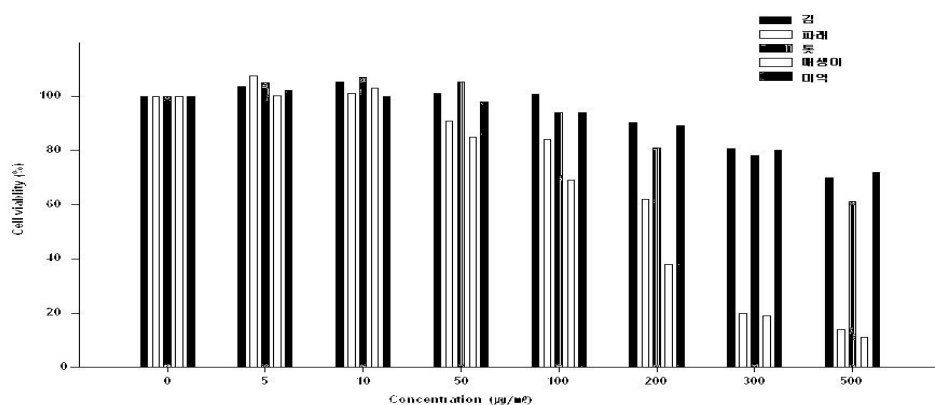
도면8



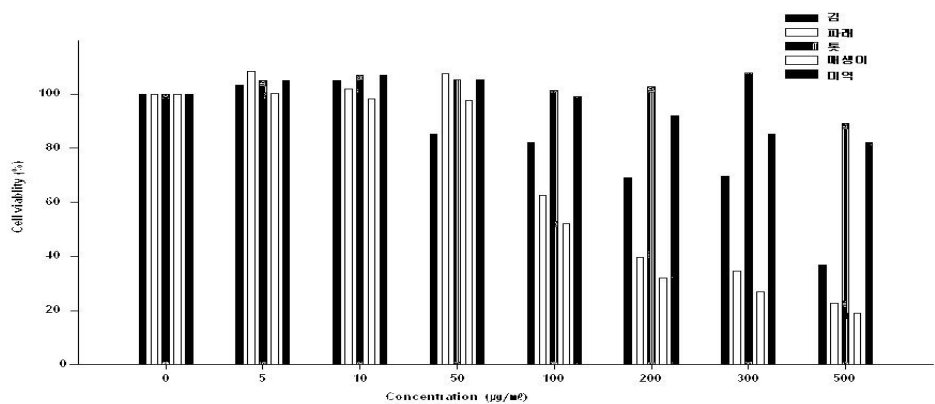
도면9



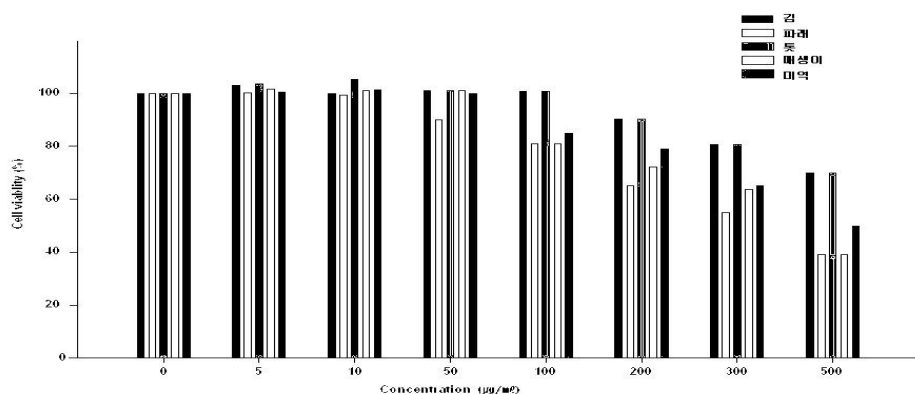
도면10



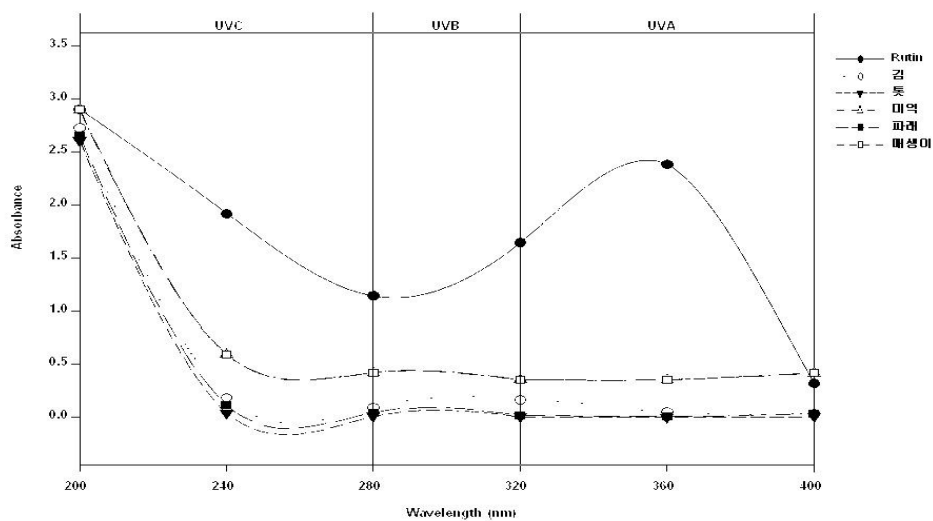
도면11



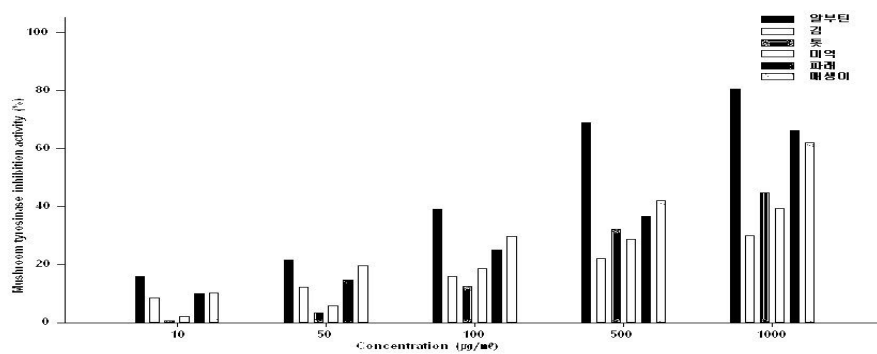
도면12



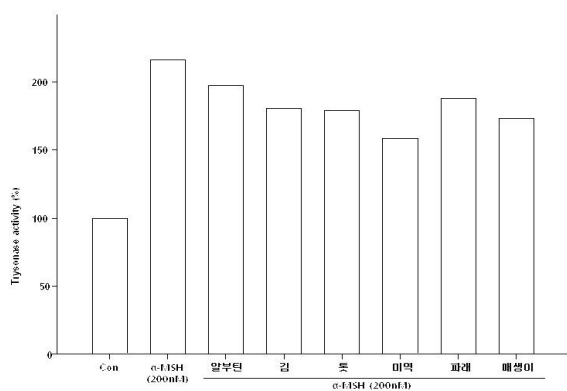
도면13



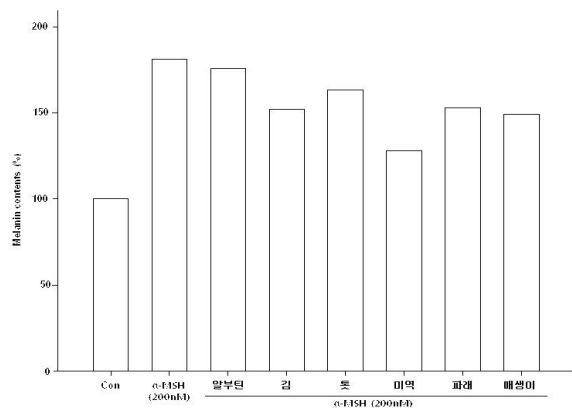
도면14



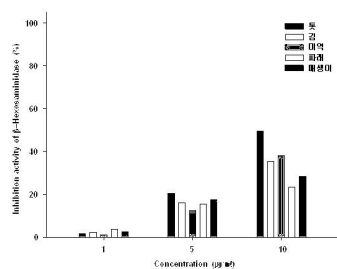
도면15



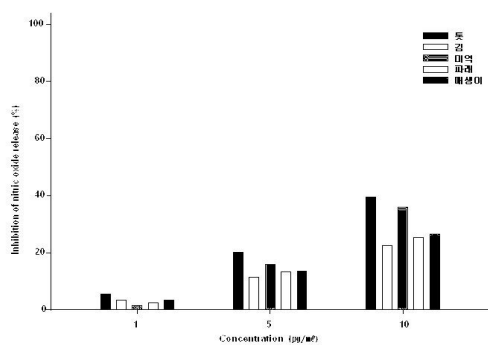
도면16



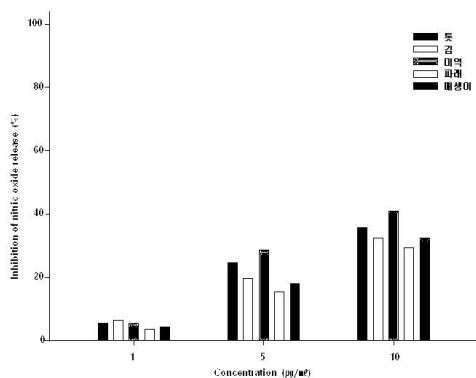
도면17



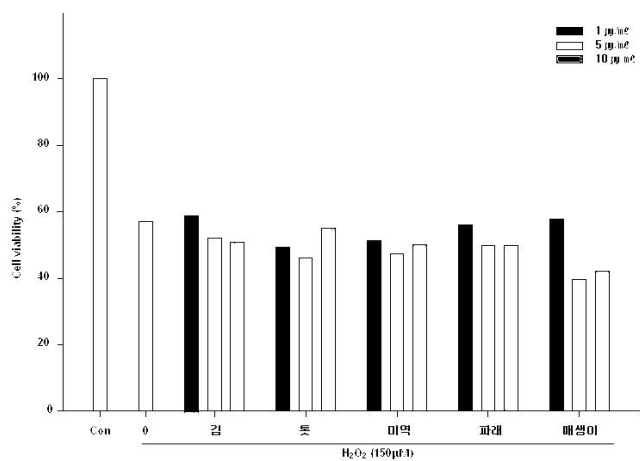
도면18



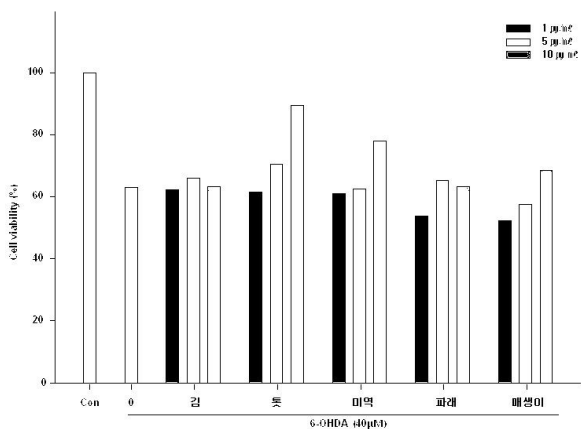
도면19



도면20



도면21



도면22

