(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2025-0093181
(43) 공개일자 2025년06월24일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A23L 33/105 (2024.08) *A23K 10/30* (2016.01)
A61K 36/03 (2006.01) *A61K 8/9711* (2017.01)
A61P 37/04 (2006.01) *A61Q 19/00* (2006.01)
(52) CPC특허분류
A23L 33/105 (2024.08)
A23K 10/30 (2016.05)
(21) 출원번호 10-2024-0180032
(22) 출원일자 2024년12월06일
심사청구일자 2024년12월06일
(30) 우선권주장
1020230183302 2023년12월15일 대한민국(KR)

(71) 출원인
국립부경대학교 산학협력단
부산광역시 남구 용소로 45, 부경대학교내 (대연동)
(72) 발명자
조승목
부산광역시 남구 용소로 45, 국립부경대학교 A12 1417호(대연동)
김성희
부산광역시 남구 수영로 324, 9층 A-913호 (대연동, 리마크빌 대연)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인충현

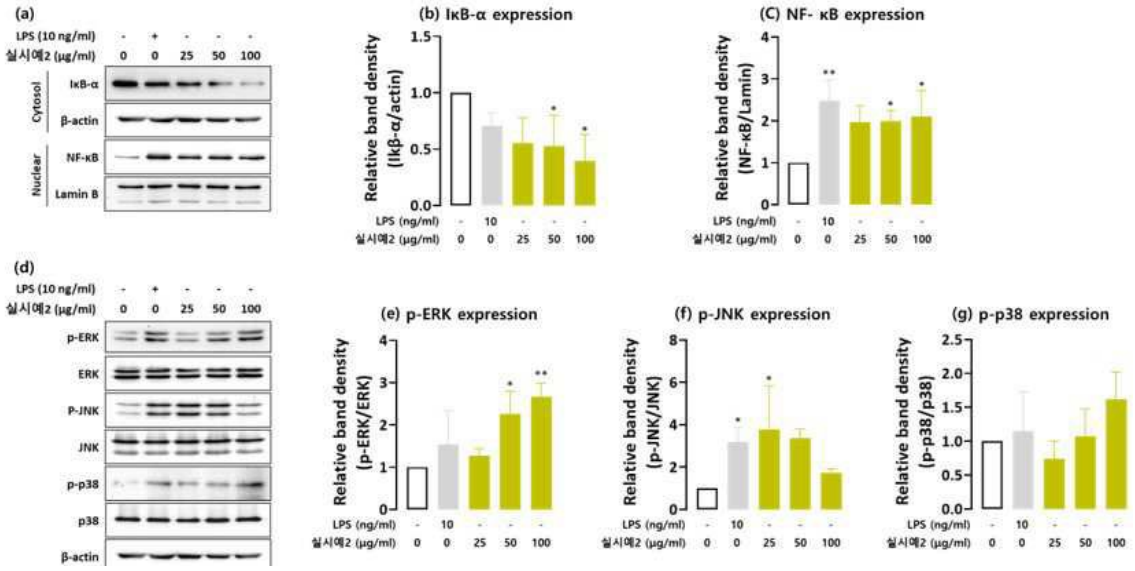
전체 청구항 수 : 총 12 항

(54) 발명의 명칭 **미역 추출물을 유효성분으로 함유하는 면역기능 증진용 조성물**

(57) 요 약

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

대 표 도 - 도5



(52) CPC특허분류
A61K 36/03 (2013.01)
A61K 8/9711 (2017.08)
A61P 37/04 (2018.01)
A61Q 19/00 (2013.01)
A23V 2002/00 (2023.08)
A23V 2200/324 (2013.01)
A23V 2250/202 (2013.01)
A23V 2300/14 (2013.01)

(72) 발명자
박세림
부산광역시 남구 수영로298번길 39-17, 1501호 (대연동)
지선미
경상남도 거제시 능포로8길 13, 나빌레라 2차 404호 (능포동)
유호등
부산광역시 남구 수영로 283, 101동 1013호 (대연동, 벽산e-솔렌스힐)
박소홍
부산광역시 금정구 금강로 502, 204동 1003호 (구서동, 롯데캐슬골드1단지)
오휘원
부산광역시 해운대구 마린시티2로 33, 101동 2212호 (우동, 해운대두산위브더제니스)
김두현
부산광역시 남구 용소로34번길 6-6, 1001호 (대연동)
송준호
부산광역시 금정구 벅구산로 25-1, 101동 410호(남산동, 현대그레이스아파트)
이가현
부산광역시 부산진구 전포대로 148, 2303호 (전포동, 유림노르웨이숲)
최기범
부산광역시 남구 용소로 45, 웅비관 1428호(대연동, 국립부경대학교대연캠퍼스)
최윤진
부산광역시 사하구 신산북로43번길 59, 105동 402호 (신평동, 사하 뷰웰)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	2520000041
과제번호	KS221637
부처명	해양수산부
과제관리(전문)기관명	해양수산과학기술진흥원
연구사업명	수산식품산업맞춤형기술개발사업
연구과제명	수산물 유래 고시형 건강기능식품 및 기능성표시식품 개발
과제수행기관명	국립부경대학교 산학협력단
연구기간	2024.01.01 ~ 2024.12.31

명 세 서

청구범위

청구항 1

미역 추출물을 유효성분으로 함유하는 것을 특징으로 하는 면역기능 증진을 위한 식품 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 미역 추출물은 물, 탄소수 1 내지 4의 저급알코올, 에틸렌글리콜, 에틸에테르 또는 이들의 혼합용매로 추출된 것을 특징으로 하는 면역기능 증진을 위한 식품 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 미역 추출물은 물로 추출된 것을 특징으로 하는 면역기능 증진을 위한 식품 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 추출온도는 20 내지 100 ℃이며, 추출시간은 1 내지 25시간인 것을 특징으로 하는 면역기능 증진을 위한 식품 조성물.

청구항 5

미역 추출물을 유효성분으로 함유하는 것을 특징으로 하는 면역력 저하로 인한 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 면역기능 저하로 기인되는 질환은 감염성 질환, 염증성 질환, 알러지 질환 또는 만성피로로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 면역력 저하로 인한 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물.

청구항 7

미역 추출물을 유효성분으로 함유하는 것을 특징으로 하는 면역기능 증진을 위한 사료 조성물.

청구항 8

미역 추출물을 유효성분으로 함유하는 것을 특징으로 하는 화장료 조성물.

청구항 9

미역의 잎과 줄기를 혼합한 혼합물과 추출용매를 1 : 50 내지 80의 중량비로 혼합하여 20 내지 100 ℃에서 추출하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 면역기능 증진을 위한 미역 추출물의 제조방법.

청구항 10

제9항에 있어서, 추출온도는 25 내지 35 ℃인 것을 특징으로 하는 면역기능 증진을 위한 미역 추출물의 제조방법.

청구항 11

제9항에 있어서, 추출시간은 1 내지 25시간인 것을 특징으로 하는 면역기능 증진을 위한 미역 추출물의 제조방법.

청구항 12

제9항에 있어서, 추출용매는 물인 것을 특징으로 하는 면역기능 증진을 위한 미역 추출물의 제조방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 미역(*Undaria pinnatifida*) 추출물을 유효성분으로 함유하여 면역기능을 향상시킬 수 있는 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[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 방책으로는 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 immunuty)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 발전 및 성장에 중요한 기능을 한다. 사이토카인은 국소부위에 염증을 유발함으로서 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 유발하

기도 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 친화력을 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 제2005-0006533호

(특허문헌 0002) 대한민국 공개특허 제2014-0126087호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0014] 본 발명의 목적은 미역(*Undaria pinnatifida*) 추출물을 유효성분으로 함유하여 면역기능을 증진시킬 수 있는 건강식품 조성물을 제공하는데 있다.

[0015] 또한, 본 발명의 다른 목적은 미역 추출물을 유효성분으로 함유하여 면역력 저하로 인한 질환을 예방 또는 치료할 수 있는 약학적 조성물을 제공하는데 있다.

[0016] 또한, 본 발명의 또 다른 목적은 미역 추출물을 유효성분으로 함유하여 면역기능을 증진시킬 수 있는 사료 조성물을 제공하는데 있다.

[0017] 또한, 본 발명의 또 다른 목적은 미역 추출물을 유효성분으로 함유하여 면역기능을 증진시킬 수 있는 화장료 조성물을 제공하는데 있다.

[0018] 또한, 본 발명의 또 다른 목적은 면역기능 증진을 위한 미역 추출물의 제조방법을 제공하는데 있다.

과제의 해결 수단

[0019] 상기한 목적을 달성하기 위한 본 발명의 면역기능 증진을 위한 건강식품 조성물은 미역 추출물을 유효성분으로 함유할 수 있다.

[0020] 상기 미역 추출물은 물, 탄소수 1 내지 4의 저급알코올, 에틸렌글리콜, 에틸에테르 또는 이들의 혼합용매로 추출된 것일 수 있다.

[0021] 상기 탄소수 1 내지 4의 저급알코올은 20 내지 80%의 메탄올, 에탄올, 부탄올 또는 프로판올일 수 있다.

[0022] 상기 미역 추출물은 물로 추출된 것일 수 있다.

[0023] 상기 추출온도는 20 내지 100 ℃이며, 추출시간은 1 내지 25시간일 수 있다.

[0024] 또한, 상기한 다른 목적을 달성하기 위한 본 발명의 면역력 저하로 인한 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물은 미역 추출물을 유효성분으로 함유할 수 있다.

[0025] 상기 면역기능 저하로 기인되는 질환은 감염성 질환, 염증성 질환, 알러지 질환 또는 만성피로로 이루어진 군으로부터 선택될 수 있다.

[0026] 또한, 상기한 또 다른 목적을 달성하기 위한 본 발명의 면역기능 증진을 위한 사료 조성물은 미역 추출물을 유효성분으로 함유할 수 있다.

[0027] 또한, 상기한 또 다른 목적을 달성하기 위한 본 발명의 면역기능 증진을 위한 화장료 조성물은 미역 추출물을 유효성분으로 함유할 수 있다.

[0028] 또한, 상기한 또 다른 목적을 달성하기 위한 본 발명의 면역기능 증진을 위한 미역 추출물의 제조방법은 미역의

잎과 줄기를 혼합한 혼합물과 추출용매를 1 : 50 내지 80의 중량비로 혼합하여 20 내지 100 ℃에서 추출하는 단계를 포함한다.

발명의 효과

[0029] 본 발명의 미역 추출물은 면역 기능을 증진시키는 효능이 매우 뛰어나며, 독성이 없으므로 장기적으로 일상생활의 식이 및 생활습관을 통하여 면역기능을 향상시킬 수 있다.

[0030] 또한, 본 발명의 미역 추출물은 경쟁력이 있는 면역 증강용 식품, 면역 증강용 화장품, 면역 증강용 사료 및 면역 증강용 의약품 제조에 효과적이다.

도면의 간단한 설명

[0031] 도 1은 본 발명의 실시예 1에 따라 제조된 미역 추출물의 세포 생존율을 측정한 그래프이다.

도 2는 본 발명의 실시예 1 및 실시예 2에 따라 제조된 미역 추출물의 산화질소(NO)의 양을 측정한 그래프이다.

도 3은 본 발명의 실시예 1 및 실시예 2에 따라 제조된 미역 추출물의 탐식능력을 나타낸 그래프이다.

도 4a는 대식세포에서 본 발명의 실시예 1에 따라 제조된 미역 추출물에 대한 iNOS와 COX-2 발현을 나타낸 웨스턴 블럿이며; 도 4b는 상기 도 4a에서 측정된 iNOS 발현량을 정량화한 그래프이고; 도 4c는 상기 도 4a에서 측정된 COX-2 발현량을 정량화한 그래프이다.

도 5a는 대식세포에서 본 발명의 실시예 2에 따라 제조된 미역 추출물에 대한 IκB-α, NF-κB 발현을 나타낸 웨스턴 블럿이며; 도 5b는 상기 도 5a에서 측정된 IκB-α 발현량을 정량화한 그래프이고; 도 5c는 상기 도 5a에서 측정된 NF-κB 발현량을 정량화한 그래프이며; 도 5d는 대식세포에서 본 발명의 실시예 2에 따라 제조된 미역 추출물에 대한 p-ERK, p-JNK, p-p38 발현을 나타낸 웨스턴 블럿이며; 도 5e는 상기 도 5d에서 측정된 p-ERK 발현량을 정량화한 그래프이고; 도 5f는 상기 도 5d에서 측정된 p-JNK 발현량을 정량화한 그래프이며; 도 5g는 상기 도 5d에서 측정된 p-p38 발현량을 정량화한 그래프이다.

도 6은 CON군, CCP군, 홍삼+CPP군 및 실시예 1+CPP군의 NK 세포 활성을 나타낸 그래프이다.

도 7은 CON군, CCP군, 홍삼+CPP군 및 실시예 1+CPP군의 TNF-α 생성량을 나타낸 그래프이다.

도 8은 CON군, CCP군, 홍삼+CPP군 및 실시예 1+CPP군의 흉선 지수를 측정한 그래프이다.

도 9a는 CON군, CCP군, 홍삼+CPP군 및 실시예 1+CPP군의 총 백혈수 수(WBC)를 측정한 그래프이며; 도 9b는 CON군, CCP군, 홍삼+CPP군 및 실시예 1+CPP군의 단핵구 비율(Monocytes)을 측정한 그래프이고; 도 9c는 CON군, CCP군, 홍삼+CPP군 및 실시예 1+CPP군의 중성구 비율(Neutrophil)을 측정한 그래프이다.

도 10a는 CON군, CCP군, 홍삼+CPP군 및 실시예 1+CPP군의 중성구 비율(Neutrophil)을 측정한 그래프이며; 도 10b는 CON군, CCP군, 홍삼+CPP군 및 실시예 1+CPP군의 B 세포를 측정한 그래프이다.

도 11a는 CON군, 홍삼군 및 실시예 1(15.6)군의 과립성백혈구(granulocyte)를 측정한 그래프이며; 도 11b는 CON군, 홍삼군 및 실시예 1(15.6)군의 대식세포(macrophage)를 측정한 그래프이고; 도 11c는 CON군, 홍삼군 및 실시예 1(15.6)군의 헬퍼티세포(Helper T cell)를 측정한 그래프이며; 도 11d는 CON군, 홍삼군 및 실시예 1(15.6)군의 세포독성티세포(Cytotoxic T cell)를 측정한 그래프이고; 도 11e는 CON군, 홍삼군 및 실시예 1(15.6)군의 기억비세포(Memory B cell)를 측정한 그래프이다.

도 12는 CON군 및 실시예 1(15.6)군의 TNF-α 생성량을 나타낸 그래프이다.

도 13a는 CON군, CCP군, Levamisole군 및 실시예 2군의 B cell 유세포 수를 측정한 그래프이며; 도 13b는 CON군, CCP군, Levamisole군 및 실시예 2군의 memory B cell 유세포 수를 측정한 그래프이고; 도 13c는 CON군, CCP군, Levamisole군 및 실시예 2군의 Neutrophil 유세포 수를 측정한 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0032] 본 발명은 미역(*Undaria pinnatifida*) 추출물을 유효성분으로 함유하여 면역기능을 향상시킬 수 있는 조성물에 관한 것이다.

[0034] 이하, 본 발명을 상세하게 설명한다.

[0035] 본 발명의 면역기능 증진을 위한 조성물은 미역(*Undaria pinnatifida*) 추출물을 유효성분으로 함유한다.

[0036] 상기 미역(*Undaria pinnatifida*)은 저열량, 저지방 식품으로서 다이어트에 좋고 식이섬유소가 풍부하여 포만감을 주며 장운동을 활발하게 유도하여 변비를 예방한다.

[0037] 본 발명에서는 미역의 잎과 줄기를 혼합하여 사용하며, 상기 미역의 잎과 줄기의 혼합물은 추출용매와 1 : 50 내지 80의 중량비, 바람직하게는 1 : 55 내지 70의 중량비로 혼합하여, 20 내지 100 ℃에서 1 내지 25시간, 바람직하게는 25 내지 100 ℃에서 3 내지 25시간, 더욱 바람직하게는 25 내지 35 ℃에서 20 내지 24시간 동안 추출한 후 50 내지 60 ℃에서 감압농축을 수행하여 추출물을 제조한다. 상기 미역 혼합물과 추출용매의 중량비가 상기 범위를 벗어나는 경우에는 추출물에 미역 혼합물의 유효성분이 적은 양으로 추출될 수 있다. 추출 시 상기 더욱 바람직한 온도로 추출하는 경우에는 그렇지 않은 경우에 비하여 점성이 있는 분자량이 높은 다당이 추출되어 더욱 우수한 효과를 보일 수 있다.

[0038] 추출온도 및 추출시간이 상기 범위를 벗어나는 경우에는 미역 혼합물의 유효성분이 적은 양으로 추출될 수 있으며, 면역기능 증진 효과가 저하될 수 있다.

[0039] 상기 추출물을 추출하는 추출용매는 물, 탄소수 1 내지 4의 저급알코올, 에틸렌글리콜, 에틸에테르 또는 이들의 혼합용매이다. 상기 저급알코올로는 20 내지 80%의 메탄올, 에탄올, 부탄올 또는 프로판올을 들 수 있다.

[0040] 상기 추출용매로는 특별히 한정하는 것은 아니지만 물이 아닌 저급알코올로 추출하는 경우에는 유효성분이 아닌 다른 물질이 다량으로 추출될 수 있으므로 물로 추출하는 것이 면역기능 증진 효과에 바람직하게 작용한다.

[0042] 또한, 본 발명은 면역기능 증진을 위한 미역 추출물의 제조방법을 제공할 수 있다.

[0043] 본 발명의 면역기능 증진을 위한 미역 추출물의 제조방법은 미역의 잎과 줄기를 혼합한 혼합물과 추출용매를 1 : 50 내지 80의 중량비로 혼합하여 20 내지 100 ℃에서 추출하는 단계를 포함할 수 있다.

[0045] 본 발명에서 사용되는 용어 '추출물'은 상기 용매를 이용하여 미역 혼합물에 포함된 성분을 추출한 추출물, 이들로부터 분획한 분획물, 이들 추출물 또는 분획물을 추가적으로 농축한 농축물, 이를 정제 또는 분리한 정제물도 포함하고, 상기 추출물, 분획물, 농축물 또는 정제물을 건조한 건조물 또는 그를 분쇄한 분말을 포함하는 의미로 사용된다.

[0046] 상기 정제물의 제조를 위해 분자량 컷-오프 값을 갖는 한외 여과막을 통과시키거나, 또는 다양한 크로마토그래피(크기, 전하, 소수성 또는 친화성에 따른 분리를 위해 제작된 것)에 의한 분리 등, 추가적으로 실시된 다양한 정제 방법을 부가할 수 있다.

[0047] 한편, 본 명세서에서 용어 '유효성분으로 함유하는'이란 미역 추출물의 효능 또는 활성을 달성하는 데 충분한 양을 포함하는 것을 의미한다. 일예로, 상기 미역 추출물은 10 내지 1500 ㎍/㎖, 바람직하게는 10 내지 100 ㎍/㎖의 농도로 사용된다. 미역 추출물은 천연물로서 과량 투여하여도 인체에 부작용이 없으므로 본 발명의 조성물 내에 포함되는 미역 추출물의 양적 상한은 당업자가 적절한 범위 내에서 선택하여 실시할 수 있다.

[0048] 본 발명은 미역 추출물을 유효성분으로 포함하는 면역기능 증진을 위한 식품 조성물에 관한 것이다.

[0049] 상기 '식품 조성물'은 유효성분으로 미역 추출물 이외에, 식품 제조에 통상적으로 사용되는 식품의 기준 및 규격('식품공전')에 기재된 식품으로 사용가능한 식품 원료, 식품첨가물 공전에 기재된 식품첨가물을 포함한다.

[0050] 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 덱스트린, 물엿, 사이클로덱스트린 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.

[0051] 상기 미역 추출물을 유효성분으로 식품 조성물을 제조하는 경우 미역 추출물은 면역기능을 증진시킬 수 있는 함

량이면 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.

[0052] 상기 식품 조성물에서 유효성분인 미역 추출물은 섭취자의 상태, 체중, 질병의 유무나 정도 및 기간에 따라 다르지만, 통상의 기술자에 의해 적절하게 선택될 수 있다. 예들 들어 1일 투여량을 기준으로 1 내지 5,000 mg, 바람직하게는 5 내지 2,000 mg, 더욱 바람직하게는 10 내지 1,000 mg, 더더욱 바람직하게는 20 내지 800 mg, 가장 바람직하게는 50 내지 500 mg일 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.

[0053] 상기 식품 조성물은 특별히 한정할 필요는 없으나 예를 들어 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 환제, 엑스제, 젤리제형, 티백 제형 또는 음료 제형일 수 있다.

[0054] 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, 젓갈류, 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.

[0055] 한편, 상기 미역 추출물을 유효성분으로 하는 식품 조성물은 단독으로 “면역기능 증진용 건강기능식품”으로 이용될 수 있다.

[0056] 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 Supplemnet)’, 일본의 ‘보건기능식품’ 또는 ‘특정보건용식품(Food for Special Health Use, FoSHU)’, 중국의 ‘보건식품’ 등에 해당할 수 있다.

[0057] 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.

[0058] 또한, 본 발명은 미역 추출물을 유효성분으로 포함하는 면역력 저하로 인한 질환의 예방 또는 치료용 약학 조성물에 관한 것이다.

[0059] 또한 본 발명은 미역 추출물을 유효성분으로 포함하는 면역력 저하로 인한 질환의 예방 또는 치료용 동물용 약학 조성물에 관한 것이다.

[0060] 또한 본 발명은 인간, 또는 인간을 제외한 동물에게 상기 조성물을 투여하는 면역력 저하로 인한 질환의 치료 방법을 제공한다.

[0061] 또한 본 발명은 면역력 저하로 인한 질환의 예방 또는 치료용 의약, 또는 동물용 의약 제조를 위한 미역 추출물의 신규 용도를 제공한다.

[0062] 상기 ‘약학 조성물’, ‘의약’, ‘동물용 약학 조성물’ 또는 ‘동물용 의약’은 유효성분으로 미역 추출물 이외에, 약학 조성물 등의 제조에 통상적으로 사용하는 적절한 담체, 부형제 및 희석제를 더 포함할 수 있다.

[0063] 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.

[0064] 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.

[0065] 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.

[0066] 상기 약학 조성물, 의약, 동물용 약학 조성물 또는 동물용 의약은 체내에서 활성성분의 흡수도, 배설속도, 환자 또는 치료대상 동물의 연령 및 체중, 성별 및 상태, 치료할 질병의 중증정도 등에 따라 적절히 선택되나, 일반적으로 1일 0.1 내지 2,000 mg/kg, 바람직하게는 300 내지 900 mg/kg, 더욱 바람직하게는 400 내지 900 mg/kg, 가장 바람직하게는 400 내지 800 mg/kg으로 투여하는 것이 바람직하다. 이렇게 제형화된 단위 투여형 제제는 필요에 따라 일정시간 간격으로 수회 투여할 수 있다.

[0067] 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.

[0068] 상기 약학조성물, 의약, 동물용 약학 조성물 또는 동물용 의약은 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 트로키제, 현탁액, 에멀젼, 시럽, 에어로졸 등의 경구 제형으로 제형화하여 사용될 수 있다. 제형화할 경우에는 보통 사용하는 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제될 수 있다.

[0069] 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.

[0070] 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.

[0071] 상기 면역력 저하로 인한 질환을 가진 치료대상 개체 여부는, 면역력 저하로 인한 질환을 가지고 있는 경우일 수 있다.

[0072] 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.

[0073] 또한, 본 발명은 미역 추출물을 유효성분으로 포함하는 면역기능 증진을 위한 사료 조성물에 관한 것이다.

[0074] 상기 '사료 조성물'은 유효성분으로 미역 추출물 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.

[0075] 상기 '사료 조성물'은 '사료 등의 기준 및 규격'에 따른 보조사료 중 추출제일 수 있고, 상기 보조사료를 포함하는 배합사료일 수 있다.

[0076] 상기 미역 추출물을 유효성분으로 사료 조성물을 제조하는 경우 미역 추출물은 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.

[0077] 상기 사료 조성물에서 유효성분인 미역 추출물은 섭취 동물의 상태, 체중, 질병의 유무나 정도 및 기간에 따라 다르지만, 통상의 기술자에 의해 적절하게 선택될 수 있다. 예들 들어 1일 투여량을 기준으로 1 내지 5,000 mg, 바람직하게는 5 내지 2,000 mg, 더욱 바람직하게는 10 내지 1,000 mg, 더더욱 바람직하게는 20 내지 800 mg, 가장 바람직하게는 50 내지 500 mg일 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.

[0078] 또한, 본 발명의 화장료 조성물에는 상기의 미역 추출물과 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.

[0079] 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 겔, 팩, 마사지크림, 마사지겔, 영양크림, 수면크림 및 수분크림으로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나의 제형을 들 수 있다.

[0081] 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.

[0082] **실시예 1.**

[0083] 미역의 잎과 줄기가 혼합된 혼합물에 25배의 정제수를 첨가하여 2회 세척하여 염분을 제거한 후 염분이 제거된 미역 혼합물과 정제수를 1 : 60의 중량비로 혼합하여 90 ℃에서 5시간 동안 추출하였다. 상기 추출한 추출물을 여과한 후 60 ℃에서 감압농축을 수행하여 미역 추출물을 수득하였다.

[0085] **실시예 2.**

[0086] 미역의 잎과 줄기가 혼합된 혼합물에 25배의 정제수를 첨가하여 2회 세척하여 염분을 제거한 후 염분이 제거된 미역 혼합물과 정제수를 1 : 70의 중량비로 혼합하여 25 ℃에서 24시간 동안 추출하였다. 상기 추출한 추출물을 여과한 후 60 ℃에서 감압농축을 수행하여 미역 추출물을 수득하였다.

[0088] **<시험예 I> 생체 외(*In vitro*)**

[0089] 모든 실험은 3번 반복되었으며, 통계분석은 Graphpad Prism 10 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA)을 사용하였고, 실험의 결과는 평균값과 평균의 표준편차로 표시하였다. 처리구간의 특성은 Tukey's post-hoc test와 ANOVA(Analysis of variance)를 통하여 유의성 검정(p<0.05)을 진행하였다.

[0090] 또한, 실시예에서 제조된 미역 추출물은 동결건조하여 이용되었다.

[0091] **시험예 1. RAW 264.7 대식세포 생존율 측정**

[0092] 세포 생존율은 마우스의 대식세포주인 RAW 264.7 cell(KTCC No. 40071)을 한국세포주은행(KCLB)에서 분양받아 사용하였다. 상기 RAW 264.7 세포를 6-well plate에 $5X10^5$ cells/well로 분주하고 37 ℃, 5% CO_2의 조건에서 24시간 동안 배양하였다. 이후 아무것도 처리하지 않은 대조군, lipopolysaccharide (LPS; Sigma-Aldrich) 100 ng/mL의 농도 처리한 양성대조군, 미역 추출물을 각각 12.5, 25, 50, 100 μg/mL의 농도로 처리하여 24시간 배양하였다. 이후 각 well에 500 μg/mL 농도의 MTT 용액을 처리하여 37 ℃, 5% CO_2의 조건에서 2시간 반응시켰다. 이어서 상등액을 제거하고 DMSO를 처리하여 각 well에 형성된 formazan을 녹인 다음 540 nm에서 흡광도 값을 측정하였다.

[0093] 도 1은 본 발명의 실시예 1에 따라 제조된 미역 추출물의 세포 생존율을 측정한 그래프이다.

[0094] 도 1에 도시된 바와 같이, 실시예 1에 따라 제조된 미역 추출물을 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 미역 추출물은 세포에 대한 독성이 없다는 것을 확인하였다.

[0096] **시험예 2. 산화질소(NO) 측정**

[0097] 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-1β 등과 같은 사이토카인을 생산함으로써 이후의 면역반응을 유도한다고 알려져 있고, B세포의 항체생성 세포인 형질세포(plasma cell)의 최종 분화를 유도하는 B세포의 자극인자로써 면역글로불린의 합성을 증진하는 등 다양한 작용을 나타낸

다. 산화질소(NO) 또한 면역계에서 종양세포나 세포내 감염된 미생물에 대한 방어 작용을 하는 중요한 신호전달 물질이다.

[0098] 산화질소 생성능은 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.

[0099] 면역증진 능력을 확인하기 위하여 griess reagent [1% sulfanilamide in 5% phosphoric acid와 0.1% naphthylethylenediamine dihydrochloride]을 이용하여 세포배양액 중에 존재하는 NO_2^-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.

[0100] 이때 양성대조군인 지질다당류(LPS)는 0.01 ㎍/mL로, 실시예 1 및 실시예 2는 각각 50, 100, 200 μg/mL 농도별로 처리하여 생성되는 산화질소(NO) 양을 측정하였다.

[0101] 도 2는 본 발명의 실시예 1 및 실시예 2에 따라 제조된 미역 추출물의 산화질소(NO)의 양을 측정한 그래프이다.

[0102] 도 2에 도시된 바와 같이, 실시예 1 및 2에 따라 제조된 미역 추출물은 농도 의존적으로 대식세포의 NO 분비능을 유의적으로 촉진시키는 것을 확인하였으며, 특히 실시예 2의 미역 추출물이 실시예 1에 비하여 현저히 높은 NO 분비능을 보이는 것으로 확인되었다.

[0104] **시험예 3. 탐식능력(Phagocytosis) 측정**

[0105] 탐식능력을 통한 면역기능 증강을 확인하기 위해서 대식세포를 6-well plate에 well당 $5x10^5$개 농도로 10% fetal bovine serume(FBS)가 포함된 DMEM 배지에 24시간 동안 배양하였다. 이후 1% P/S, 10% FBS가 포함된 DMEM 배지로 교체 후 미역물추출물 및 양성대조군 LPS를 처리하여 24시간 동안 배양하였다. 배양 후 형광 표지된 latex bead-rabbit IgG-FITC complex를 첨가하고 2시간 후 Fluorescence-activated cell sorting(FACs) 기기를 이용하여 유세포 분석하여 형광 강도를 측정하였다.

[0106] 도 3은 본 발명의 실시예 1 및 실시예 2에 따라 제조된 미역 추출물의 탐식능력을 나타낸 그래프이다.

[0107] 도 3에 도시된 바와 같이, 실시예 1 및 2에 따라 제조된 미역 추출물은 농도 의존적으로 대식세포에서 탐식능력이 유의적으로 증가되는 것을 확인하였으며, 특히 실시예 2의 미역 추출물이 실시예 1에 비하여 현저히 높은 탐식능력을 보이는 것으로 확인되었다.

[0109] **시험예 4. 면역관련 효소의 단백질 발현 측정_실시예 1**

[0110] iNOS(inducible nitric oxide synthase)와 COX-2(cyclooxygenase-2)의 발현 정도를 확인하기 위해 RAW 264.7 세포를 100 mm dish에 $2.5X10^6$개의 세포를 분주하고 24시간 배양 후 미역 추출물 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 phenymethylsulfonyl fluoride 및 5 mM dithiothreitol]를 적정량 첨가하여 4 ℃에서 30분간 반응시켰다 (해당 시약은 모두 Sigma-Aldrich Chemical Co.에서 구입하여 사용하였음). 이후 4 ℃에서 14,000 rpm으로 30 분간 원심분리하여 상층액을 얻었으며, 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.

[0111] 동량의 샘플을 sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel을 이용하여 전기 영동을 실시하였고, nitrocellulose membrane (Schleicher and Schuell, Keene, NH, USA)에 전이시켰다. 그 후 5% skim milk를 30분간 처리하였고 1차 항체를 처리하여 4℃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 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.

[0112] 도 4a는 대식세포에서 본 발명의 실시예 1에 따라 제조된 미역 추출물에 대한 iNOS와 COX-2 발현을 나타낸 웨스턴 블럿이며; 도 4b는 상기 도 4a에서 측정된 iNOS 발현량을 정량화한 그래프이고; 도 4c는 상기 도 4a에서 측정된 COX-2 발현량을 정량화한 그래프이다.

[0113] 상기 iNOS는 사이토카인(cytokine), 산화스트레스 및 염증성 반응에 의해 유발되어 NO를 생산하는 유도성 산화질소 합성효소이며, 상기 COX_2는 대식세포 등의 자극에 의해 유도되어 PGE_2를 합성하는 효소이다.

[0114] 도 4a 내지 도 4c에 도시된 바와 같이, 실시예 1에 따라 제조된 미역 추출물은 면역반응 관련 효소인 iNOS 및 COX_2의 단백질 발현이 농도 의존적으로 증가되는 것을 확인하였다.

[0115] 특히, 실시예 1의 미역 추출물의 농도가 25 ug/ml 이상에서는 홍삼에 비해서도 iNOS 및 COX_2 단백질 발현이 높은 것을 확인하였다.

[0117] **시험예 5. 면역관련 효소의 단백질 발현 측정_실시예 2**

[0118] 상기 시험예 4와 동일한 방법으로 실시하였으며, 도 5a에 해당하는 IκB-α, NF-κB 단백질의 경우에는 핵과 세포질 단백질을 분리하는 과정을 추가적으로 진행하였다. 이때 세포를 수확한 후 NE-PER Nuclear and Cytoplasmic Extraction Reagents kit (Thermo Fisher Scientific Inc., Rockford, IL, USA)를 사용하여 제조사가 제시한 방법에 따라 추출 진행하였다. 1차 항체를 처리 후 membrane에 적정 2차 항체를 사용하여 상온에서 1시간 30분 반응시킨 다음 1x PBS-T로 세척하고 Fusion FX Image system (Vilber Lourmat, Torcy, France)을 이용하여 단백질의 발현 양상을 분석하였다. 상기 사용된 1차 항체는 모두 cell signaling Technology, Inc. (Beverly, MA, USA)에서 구입하였으며, 단백질 발현의 정량적 분석은 ImageJ® software(v1.48,NIH,Bethesda,MD,USA)을 사용하여 수행되었다.

[0119] 도 5a는 대식세포에서 본 발명의 실시예 2에 따라 제조된 미역 추출물에 대한 IκB-α, NF-κB 발현을 나타낸 웨스턴 블럿이며; 도 5b는 상기 도 5a에서 측정된 IκB-α 발현량을 정량화한 그래프이고; 도 5c는 상기 도 5a에서 측정된 NF-κB 발현량을 정량화한 그래프이다.

[0120] 또한, 도 5d는 대식세포에서 본 발명의 실시예 2에 따라 제조된 미역 추출물에 대한 p-ERK, p-JNK, p-p38 발현을 나타낸 웨스턴 블럿이며; 도 5e는 상기 도 5d에서 측정된 p-ERK 발현량을 정량화한 그래프이고; 도 5f는 상기 도 5d에서 측정된 p-JNK 발현량을 정량화한 그래프이며; 도 5g는 상기 도 5d에서 측정된 p-p38 발현량을 정량화한 그래프이다.

[0121] 도 5a 내지 도 5c에 도시된 바와 같이, 대식세포에서 실시예 2의 미역 추출물을 처리하여 NF-κB 신호전달경로 단백질 발현을 확인한 결과, 25 내지 100 μg/ml 농도에서 세포질 IκB-α의 발현 수준은 농도 의존적으로 유의적인 감소를 보이는 것을 확인하였으며, 핵 NF-κB의 발현 수준은 농도 의존적으로 유의적인 증가를 보이는 것을 확인하였다.

[0122] 또한 도 5d 내지 도 5g에 도시된 바와 같이, 대식세포에서 실시예 2의 미역 추출물을 처리하여 MAPK 신호전달경로 단백질 발현을 확인한 결과, 25 내지 100 μg/ml 농도에서 ERK, JNK, p38의 발현량은 일정하였고, 인산화된 p-ERK는 농도 의존적으로 유의적인 증가를 보였으며, p-JNK는 농도 의존적인 경향을 보이진 않았지만 가장 낮은 농도에서도 무처리군에 비해 유의적 증가를 보였고, p-p38은 유의적인 결과를 보이진 않았지만 농도 의존적으로 증가하는 것을 확인하였다.

[0123] 전체적으로 무처리군 및 LPS군 보다 높은 단백질 발현을 보이는 것을 확인하였다.

[0124] 실시예 2의 미역 추출물은 NF-κB 및 MAPKs 신호전달 경로의 활성화를 크게 자극하여 농도 의존적으로 유의미한 NO 방출, 사이토카인 분비를 촉진하여 면역 반응을 일으키는 것을 확인하였다.

[0126] **<시험예 Ⅱ> 생체 내(*In vivo*)**

[0127] **동물실험**

[0128] 시험예 6의 경우, 18~22 g의 Balb/c 마우스(5주령)를, 시험예 7-10의 경우 15~20 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 ℃) 및 습도(45~65%)를 유지시켜 주었다. 바뀐 환경에 적응하도록 일주일간 살펴보며 수면주기를 유지하고, 이상행동을 확인하였다.

[0129] 실험동물은 체중변화가 일정하고 건강한 동물만을 선별하여 임의 배치법에 의해 생리식염수를 투여한 CON군, 면역억제 유도제인 시클로포스파미드(cyclophosphamide, CPP)를 투여한 CCP군, 홍삼(시험예 6은 24 mg/100 ml의 사포닌 함량, 시험예 7-10은 48 mg/100 ml의 사포닌 함량)과 CCP를 투여한 홍삼+CPP군, 및 실시예 1의 미역 추출물과 CCP를 투여한 실시예 1+CPP군으로 나누었으며 실험군마다 5마리씩 사용하였다. 시험예 6의 경우, 상기 홍삼 및 실시예 1의 추출물은 21일 동안 매일 투여되었으며, CPP는 시험물질 투여 종료 전 3일 동안 처리되어 19일, 20일, 21일차에 투여되었다. 시험예 7-10의 경우, 상기 홍삼 및 실시예 1의 추출물은 18일 동안 매일 투여되었으며, CCP는 15, 16, 17일차에 투여되었다.

[0130] -4개 군의 마우스(시험예 6)-

[0131] CON군: 생리식염수 21일 투여

[0132] CCP군: 생리식염수 및 CPP 50 mg/kg 투여

[0133] 홍삼+CPP군: 홍삼 400 mg/kg 및 CPP 50 mg/kg 투여

[0134] 실시예 1+CPP군: 실시예 1의 추출물 400 mg/kg 및 CPP 50 mg/kg 투여

[0136] -4개 군의 마우스(실험예 7 내지 10)-

[0137] CON군: 생리식염수 18일 투여

[0138] CCP군: 생리식염수 및 CPP 50 mg/kg 투여

[0139] 홍삼+CPP군: 홍삼 800 mg/kg 및 CPP 50 mg/kg 투여

[0140] 실시예 1+CPP군: 실시예 1의 추출물 800 mg/kg 및 CPP 50 mg/kg 투여

[0141] 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 Sidak's multiple comparison test로 사후검정 실시하였다. 신뢰구간은 95%로 설정하고, 모든 데이터는 mean ± SEM로 표시하였다.

[0143] **시험예 6. NK 세포 활성 측정**

[0144] NK 세포 활성은 NK-sensitive한 YAC-1 세포를 공격하여 유리된 젖산탈수소효소(lactate dehydrogenase)를 측정하는 방법(LDH assay)을 이용하였다. 96-well 둥근바닥 플레이트에 $1X10^4$ cells/100 μL의 YAC-1 세포와 비장세포의 중량비가 1:50이 되도록 넣은 후 37 ℃, 5%, CO2 배양기에서 4시간 동안 배양 후 LDH가 유리된 상층액 50μL를 취해 96-well 플레이트에 옮겼다. Cytoxicity LDH assay kit (MCE, HY-K-1090, USA)를 이용하여 working solution을 50 μL 첨가하고 차광한 후 실온에서 30분간 반응시키고 stop solution 50 μL를 첨가한 다음 490 nm에서 흡광도를 측정하였다. NK 세포 활성은 하기 [수학식 1]을 통해 계산되었다.

[0145] [수학식 1]

[0146] NK cell activity(%) = [(X-Z)/(Y-Z)]X100

[0147] X; Absorbance of Samples - Background control

[0148] Y; Absorbance of High Control - Background Control of High Control

[0149] Z; Absorbance of Low Control - Background Control

[0150] 도 6은 CON군, CCP군, 홍삼+CPP군 및 실시예 1+CPP군의 NK 세포 활성을 나타낸 그래프이다.

[0151] 도 6에 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.

[0152] 실시예 1+CPP군의 NK 세포 활성 증가 정도는 홍삼+CPP군에 비해서도 높은 것을 확인하였다.

[0154] **시험예 7. TNF-α 측정**

[0155] TNF-α는 특이적 항체와 반응시켜 측정되는 단백질 양을 측정하는 방법을 이용하였다. 희생 당일 마우스로부터 전혈을 채취한 후, 혈액 샘플을 4~10분동안 4000 rpm으로 원심분리하여 혈청을 얻었다. 혈청 내 TNF-α의 함량을 확인하기 위해, 마우스 ELISA kit의 지침에 따라 실험을 진행하였다.

[0156] 도 7은 CON군, CCP군, 홍삼+CPP군 및 실시예 1+CPP군의 TNF-α 생성량을 나타낸 그래프이다.

[0157] 도 7에 도시된 바와 같이, CON군과 비교 시 CCP군의 TNF-α 양이 유의적으로 감소했으며, 실시예 1+CPP군의 TNF-α 양은 CCP군에 비하여 증가한 것을 확인하였다.

[0159] **시험예 8. 장기무게 측정(흉선지수)**

[0160] 마우스 시험물질 투여 종료일에 체중을 측정하고, 다음날 마우스를 흡입 마취한 후 즉시 흉선을 채취해 흉선의 무게를 측정하였다.

[0161] [수학식 2]

[0162] 흉선 지수(mg/g) = 흉선 중량(mg)/체중(g)

[0163] 도 8은 CON군, CCP군, 홍삼+CPP군 및 실시예 1+CPP군의 흉선 지수를 측정한 그래프이다.

[0164] 도 8에 도시된 바와 같이, CON군과 비교 시 CCP군의 흉선 지수가 유의하게 낮아졌으며, 실시예 1+CPP군의 흉선 지수는 CCP군에 비하여 증가한 것을 확인하였다.

[0165] 실시예 1+CPP군의 흉선 지수는 홍삼+CPP군에 비해서도 높은 것을 확인하였다.

[0167] **시험예 9. 백혈구 수, 단핵구 비율 및 중성구 비율 측정**

[0168] CBC(Complete blood cell) 검사를 위해, 시험물질 투여가 끝난 마우스의 심장으로부터 혈액을 채취한 후, 혈액이 응고되지 않도록 헤파린으로 충분히 혼합하여 일반 혈액학 분석 장비(HEMAVET950 FS, USA)를 이용해 분석하였다.

[0169] 도 9a는 CON군, CCP군, 홍삼+CPP군 및 실시예 1+CPP군의 총 백혈수 수(WBC)를 측정한 그래프이며; 도 9b는 CON군, CCP군, 홍삼+CPP군 및 실시예 1+CPP군의 단핵구 비율(Monocytes)을 측정한 그래프이고; 도 9c는 CON군, CCP군, 홍삼+CPP군 및 실시예 1+CPP군의 중성구 비율(Neutrophil)을 측정한 그래프이다.

[0170] 도 9a에 도시된 바와 같이, CON군과 비교 시 CCP군의 총 백혈구 수가 감소하였으며, 실시예 1+CPP군의 총 백혈구 수는 CCP군에 비하여 증가한 것을 확인하였다.

[0171] 실시예 1+CPP군의 총 백혈구 수의 증가 정도는 홍삼+CPP군에 비해서도 높은 것을 확인하였다.

[0172] 또한 도 9b에 도시된 바와 같이, CON군과 비교 시 CCP군의 단핵구 비율이 감소하였으며, 실시예 1+CPP군의 단핵구 비율은 CCP군에 비하여 증가한 것을 확인하였다.

[0173] 또한 도 9c에 도시된 바와 같이, CON군과 비교 시 CCP군의 중성구 비율이 감소하였으며, 실시예 1+CPP군의 중성구 비율은 CCP군에 비하여 증가한 것을 확인하였다.

[0174] 이때 실시예 1+CPP군의 중성구 비율은 CON군과 유사한 것을 확인하였다.

[0176] **시험예 10. 중성구 비율 및 B 세포 측정_면역세포**

[0177] 마우스의 비장을 채취한 후, PBS 용액으로 세하고 cell strainer을 이용해 비장 내 세포를 분리하였으며, 이를 5분 동안 1500 rpm으로 원심분리하여 정제하였다. 정제된 세포에 ACK buffer을 첨가해 적혈구를 파괴하고, 같은 조건으로 원심분리하여 정제된 순수한 비장 세포를 획득하였다. 분리된 비장세포는 원심분리 후 세척하고, 표면에 Fc receptor을 발현하는 세포들에 대한 비특이적 반응을 억제하기 위해 Fc blocker을 처리하였다. 이후 CD45+, Gr-1+, Ly6G+, B220+, CD19+ 항체를 반응시켜 CytoFLEX flow cytometer (Beckman Coulter, Inc., Kraemer Blvd, Brea, CA, USA)와 CytExpert Software (version 1.2, Beckman Coulter, Inc.)를 이용하여 세포 분석하였다.

[0178] 도 10a는 CON군, CCP군, 홍삼+CPP군 및 실시예 1+CPP군의 중성구 비율(Neutrophil)을 측정한 그래프이며; 도 10b는 CON군, CCP군, 홍삼+CPP군 및 실시예 1+CPP군의 B 세포를 측정한 그래프이다.

[0179] 도 10a에 도시된 바와 같이, CON군과 비교 시 CCP군의 중성구 비율이 유의적으로 감소하였으며, 실시예 1+CPP군의 중성구 비율은 CCP군에 비하여 증가한 것을 확인하였다.

[0180] 또한 도 10b에 도시된 바와 같이, CON군과 비교 시 CCP군의 B 세포 비율이 유의적으로 감소하였으며, 실시예 1+CPP군의 B 세포 비율은 CCP군에 비하여 증가한 것을 확인하였다.

[0181] 실시예 1+CPP군의 B 세포 비율의 증가 정도는 홍삼+CPP군에 비해서도 높은 것을 확인하였다.

[0183] **<시험예 Ⅲ> 생체 외(*ex vivo*)**

[0184] **동물실험**

[0185] C57BL/6마우스에서 분리한 비장세포를 사용하였다. 비장세포 부유액을 24 well plate에 $2X10^5$개로 분주하고, 홍삼 추출물의 경우 31.3 μg/mL의 농도로, 실시예 1의 경우 15.6, 31.3 μg/mL의 두 농도로 처리하여 12시간 동안 배양하였다.

[0186] **시험예 11. 백혈구 수 및 림프구 수 측정**

[0187] 샘플처리된 배양된 cell을 세척한 후, 표면에 Fc receptor를 발현하는 세포들에 대한 비특이적 반응을 억제하기 위해 Fc blocker을 처리 후 Gr-1+, CD45+, F4/80+, CD3e+, CD8a+, CD4+, B220+, CD62L+ 항체를 반응시켜 CytoFLEX flow cytometer (Beckman Coulter, Inc., Kraemer Blvd, Brea, CA, USA)와 CytExpert Software (version 1.2, Beckman Coulter, Inc.)를 이용하여 세포를 분석하였다.

[0188] 도 11a는 CON군, 홍삼군 및 실시예 1(15.6)군의 과립성백혈구(granulocyte)를 측정한 그래프이며; 도 11b는 CON군, 홍삼군 및 실시예 1(15.6)군의 대식세포(macrophage)를 측정한 그래프이고; 도 11c는 CON군, 홍삼군 및 실시예 1(15.6)군의 헬퍼티세포(Helper T cell)를 측정한 그래프이며; 도 11d는 CON군, 홍삼군 및 실시예 1(15.6)군의 세포독성티세포(Cytotoxic T cell)를 측정한 그래프이고; 도 11e는 CON군, 홍삼군 및 실시예 1(15.6)군의 기억비세포(Memory B cell)를 측정한 그래프이다.

[0189] 도 11a 내지 도 11e에 도시된 바와 같이, 실시예 1(15.6)군은 CON군, 홍삼군에 비하여 과립성백혈구(granulocyte), 대식세포(macrophage), 헬퍼티세포(Helper T cell) 및 기억비세포(Memory B cell) 수가 유의적으로 증가한 것을 확인하였다.

[0190] 반면, 홍삼군은 백혈구 수 및 림프구 수의 유의적 증가가 관찰되지 않았다.

[0192] **시험예 12. TNF-α 측정**

[0193] 샘플처리된 배양된 cell을 세척한 후, 상층액을 분리하여 염증성 사이토카인(TNF-α)의 분비에 미치는 영향을 ELISA kit(Biolegend, San Diego, CA, USA)를 이용하여 제조사에서 제시한 방법에 따라 측정하였다.

[0194] 도 12는 CON군 및 실시예 1(15.6)군의 TNF-α 생성량을 나타낸 그래프이다.

[0195] 도 12에 도시된 바와 같이, 실시예 1(15.6)군 및 실시예 1(31.3)군은 CON군에 비하여 TNF-α의 분비량이 유의적으로 증가하는 것을 확인하였다.

[0197] **<시험예 Ⅳ> 생체 외(*In vivo*)**

[0198] **동물실험**

[0199] 18~22 g의 C57BL/6 마우스(6주령)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 ℃) 및 습도(45~65%)를 유지시켜 주었다. 바뀐 환경에 적응하도록 일주일간 살펴보며 수면주기를 유지하고, 이상행동을 확인하였다.

[0200] 실험동물은 체중변화가 일정하고 건강한 동물만을 선별하여 비장을 채취한 후, PBS 용액으로 세척 다음 cell strainer을 이용해 비장 내 세포를 분리하였으며, 이를 5분 동안 1500 rpm으로 원심분리하여 정제하였다. 정제된 세포에 ACK buffer를 첨가하여 적혈구를 파괴하고, 같은 조건으로 원심분리하여 정제된 순수한 비장 세포를 획득하였다. 분리된 비장세포는 원심분리 후 세척하고, 표면에 Fc receptor를 발현하는 세포들에 대한 비특이적 반응을 억제하기 위해 Fc blocker를 처리하였다. 이후 1차 항체로 B cell antibody(B220+, CD19+), memory B cell antibody(B220+, CD62L+), Neutrophil antibody(Gr-1+, SiglecF-)를 각각 0.25 μg/100 μl 농도로 표면세포에 부착시켜 4 ℃에서 30분 동안 배양하고, 완충액으로 3회 원심분리 세척 후 BD FACSuiteTM, BD bioscience을 이용하여 유세포 분석하였다.

[0201] 임의 배치법에 의해 생리식염수를 투여한 CON군, 면역억제 유도제인 시클로포스파미드(cyclophosphamide, CPP)를 투여한 CCP군, 레바미솔(Levamisole)과 CCP를 투여한 Levamisole군, 및 실시예 2의 미역 추출물과 CCP를 투여한 실시예 2군으로 나누었으며 실험군마다 5마리씩 사용하였다. 상기 실시예 2의 추출물은 17일 동안 매일 투여되었으며, CPP는 시험물질 투여 종료 전 2일 동안 처리되어 14일, 16일차에 투여되었다.

[0202] -4개 군의 마우스-

[0203] CON군: 생리식염수 17일 투여

[0204] CCP군: 생리식염수 및 CPP 50 mg/kg 투여

[0205] Levamisole군: 레바미솔 10 mg/kg 및 CPP 50 mg/kg 투여

[0206] 실시예 2군: 실시예 2의 추출물 400 mg/kg 및 CPP 50 mg/kg 투여

[0208] **시험예 13. 비장 내 면역세포 수 측정**

[0209] 도 13a는 CON군, CCP군, Levamisole군 및 실시예 2군의 B cell 유세포 수를 측정한 그래프이며; 도 13b는 CON군, CCP군, Levamisole군 및 실시예 2군의 memory B cell 유세포 수를 측정한 그래프이고; 도 13c는 CON군, CCP군, Levamisole군 및 실시예 2군의 Neutrophil 유세포 수를 측정한 그래프이다.

[0210] 도 13a에 도시된 바와 같이, CON군과 대비 시 CCP 처리된 마우스의 B cell의 비율이 전체적으로 감소하였으며, 실시예 2의 미역 추출물 투여로 인하여 B cell의 비율이 CCP군에 비하여 유의적으로 증가한 것을 확인하였다. 이때 증가 정도는 대조군인 Levamisole군 보다 더 높은 것을 확인하였다.

[0211] 또한 13b에 도시된 바와 같이, CON군과 대비 시 CCP 처리된 마우스의 memory B cell의 비율이 전체적으로 감소하였으며, 실시예 2의 미역 추출물 투여로 인하여 memory B cell의 비율이 CCP군에 비하여 유의적으로 증가한 것을 확인하였다. 이때 증가 정도는 대조군인 Levamisole군 보다 더 높은 것을 확인하였다.

[0212] 또한 도 13c에 도시된 바와 같이, CON군과 대비 시 CCP 처리된 마우스의 Neutrophil(중성구)의 비율이 전체적으로 감소하였으며, 실시예 2의 미역 추출물 투여로 인하여 Neutrophil(중성구)의 비율이 CCP군에 증가하는 것을 확인하였다. 이때 유의적 수치를 보이진 않았지만, 대조군인 Levamisole군 보다 높은 것을 확인하였다.

[0214] 하기에 본 발명의 분말을 함유하는 조성물의 제제예를 설명하나, 본 발명은 이를 한정하고자 함이 아닌 단지 구체적으로 설명하고자 함이다.

[0215] 제제예 1. 산제의 제조

[0216] 실시예 2에서 얻은 추출물 분말 500 mg

[0217] 유당 100 mg

[0218] 탈크 10 mg

[0219] 상기의 성분들을 혼합하고 기밀포에 충진하여 산제를 제조한다.

[0221] 제제예 2. 정제의 제조

[0222] 실시예 2에서 얻은 추출물 분말 300 mg

[0223] 옥수수전분 100 mg

[0224] 유당 100 mg

[0225] 스테아린산 마그네슘 2 mg

[0226] 상기의 성분들을 혼합한 후 통상의 정제의 제조방법에 따라서 타정하여 정제를 제조한다.

[0228] 제제예 3. 캅셀제의 제조

[0229] 실시예 2에서 얻은 추출물 분말 200 mg

[0230] 결정성 셀룰로오스 3 mg

[0231] 락토오스 14.8 mg

[0232] 마그네슘 스테아레이트 0.2 mg

[0233] 통상의 캡슐제 제조방법에 따라 상기의 성분을 혼합하고 젤라틴 캡슐에 충전하여 캡슐제를 제조한다.

[0235] 제제예 4. 주사제의 제조

[0236] 실시예 2에서 얻은 추출물 분말 600 mg

[0237] 만니톨 180 mg

[0238] 주사용 멸균 증류수 2974 mg

[0239] $Na_2HPO_4,12H_2O$ 26 mg

[0240] 통상의 주사제의 제조방법에 따라 1 앰플 당 상기의 성분 함량으로 제조한다.

[0242] 제제예 5. 액제의 제조

[0243] 실시예 2에서 얻은 추출물 분말 4 g

[0244] 이성화당 10 g

[0245] 만니톨 5 g

[0246] 정제수 적량

[0247] 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 충진하여 멸균시켜 액제를 제조한다.

[0249] 제제예 6. 과립제의 제조

[0250] 실시예 2에서 얻은 추출물 분말 1,000 mg

[0251] 비타민 혼합물 적량

[0252] 비타민 A 아세테이트 70 ㎍

[0253] 비타민 E 1.0 mg

[0254] 비타민 B1 0.13 mg

[0255] 비타민 B2 0.15 mg

[0256] 비타민 B6 0.5 mg

[0257] 비타민 B12 0.2 ㎍

[0258] 비타민 C 10 mg

[0259] 비오틴 10 ㎍

[0260] 니코틴산아미드 1.7 mg

[0261] 엽산 50 ㎍

[0262] 판토텐산 칼슘 0.5 mg

[0263] 무기질 혼합물 적량

[0264] 황산제1철 1.75 mg

[0265] 산화아연 0.82 mg

[0266] 탄산마그네슘 25.3 mg

[0267] 제1인산칼륨 15 mg

[0268] 제2인산칼슘 55 mg

[0269] 구연산칼륨 90 mg

[0270] 탄산칼슘 100 mg

[0271] 염화마그네슘 24.8 mg

[0272] 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.

[0274] 제제예 7. 기능성 음료의 제조

[0275] 실시예 2에서 얻은 추출물 분말 1,000 mg

[0276] 구연산 1,000 mg

[0277] 올리고당 100 g

[0278] 매실농축액 2 g

[0279] 타우린 1 g

[0280] 정제수를 가하여 전체 900 mL

[0281] 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.

[0282] 상기 조성비는 비교적 기호음료에 적합한 성분을 바람직한 실시예로 혼합 조성하였지만, 수요계층, 수요국가,

사용용도 등 지역적, 민족적 기호도에 따라서 그 배합비를 임의로 변형 실시하여도 무방하다.

[0284] 제제예 8: 사료 조성물의 제조

[0285] 실시예 2의 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.

[0287] 제제예 9. 유화 제형의 화장품의 제조

[0288] 영양화장수, 크림, 에센스 등의 유화 제형의 화장품 및 유연화장수 등의 가용화 제형의 화장품을 제조하였다.

[0289] 하기 표 1에 기재된 조성으로 유화제형의 화장품을 제조하였다. 제조방법은 하기와 같다.

[0290] 1) 1 내지 9의 원료를 혼합한 혼합물을 65 내지 70 ℃로 가열하였다.

[0291] 2) 10의 원료를 상기 단계 1)의 혼합물에 투입하였다.

[0292] 3) 11 내지 13의 원료의 혼합물을 65 내지 70 ℃로 가열하여 완전히 용해시켰다.

[0293] 4) 상기 단계 3)을 거치면서, 상기 2)의 혼합물을 서서히 첨가하여 8,000 rpm에서 2 내지 3분간 유화시켰다.

[0294] 5) 14의 원료를 소량의 물에 용해시킨 후 상기 단계 4)의 혼합물에 첨가하고 2분간 더 유화시켰다.

[0295] 6) 15 내지 17의 원료를 각각 평량한 후 상기 단계 5)의 혼합물에 넣고 30초간 더 유화시켰다.

[0296] 7) 상기 단계 6)의 혼합물을 유화 후 탈기과정을 거쳐 25 내지 35 ℃로 냉각시킴으로써 유화제형의 화장품을 제조하였다.

표 1

[0297]

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	증류수	~ 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	실시예 2의 추출물	0.0001	1	10

[0299] 제제예 10. 가용화 제형의 화장품의 제조

[0300] 하기 표 2에 기재된 조성으로 가용화제형의 화장품을 제조하였다. 제조방법은 하기와 같다.

[0301] 1) 2 내지 6의 원료를 1의 원료(정제수)에 넣고 아직 믹서를 이용하여 용해시켰다.

[0302] 2) 8 내지 11의 원료를 7의 원료(알코올)에 넣고 완전 용해시켰다.

[0303] 3) 상기 단계 2)의 혼합물을 상기 단계 1)의 혼합물에 서서히 첨가하면서 가용화시켰다.

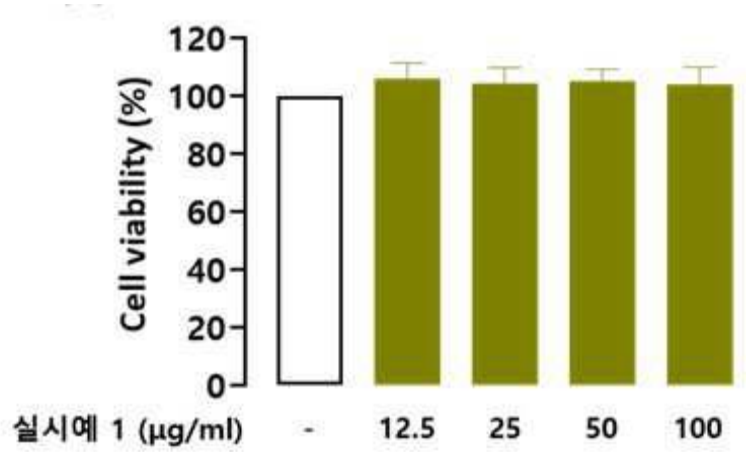
표 2

[0304]

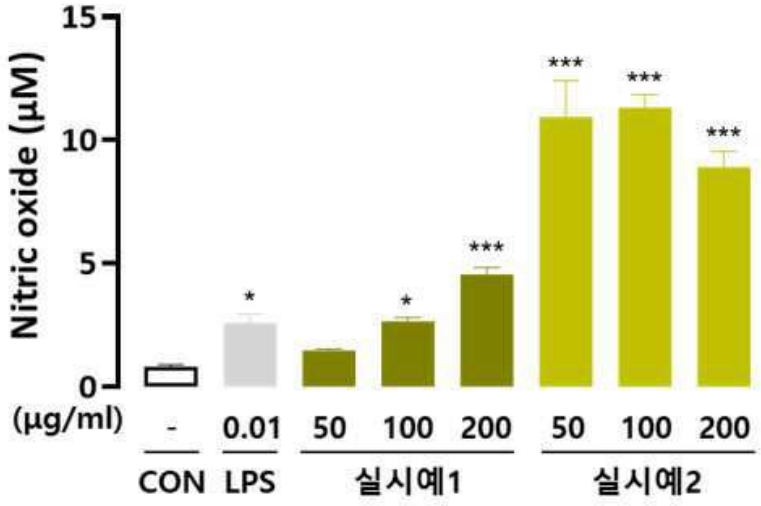
조성		가용화 제형 1	가용화 제형 2	가용화 제형 3
1	정제수	~ 100	~ 100	~ 100
2	농글리세린	3	3	3
3	1,3-부틸렌글리콜	2	2	2
4	EDTA-2Na	0.01	0.01	0.01
5	색소	0.0001	0.0002	0.0002
6	실시예 2의 추출물	0.1	5	5
7	알코올(95%)	8	8	8
8	파라옥시안식향산 메틸	0.1	0.1	0.1
9	폴리옥시에틸렌 하이드로제네이디트에스테르	0.3	0.3	0.3
10	향	0.15	0.15	0.15
11	사이클로메티콘	-	-	2

도면

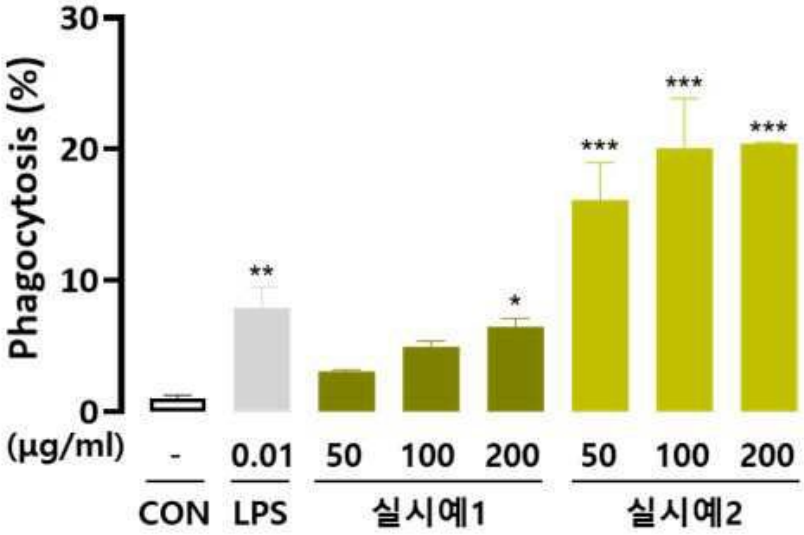
도면1



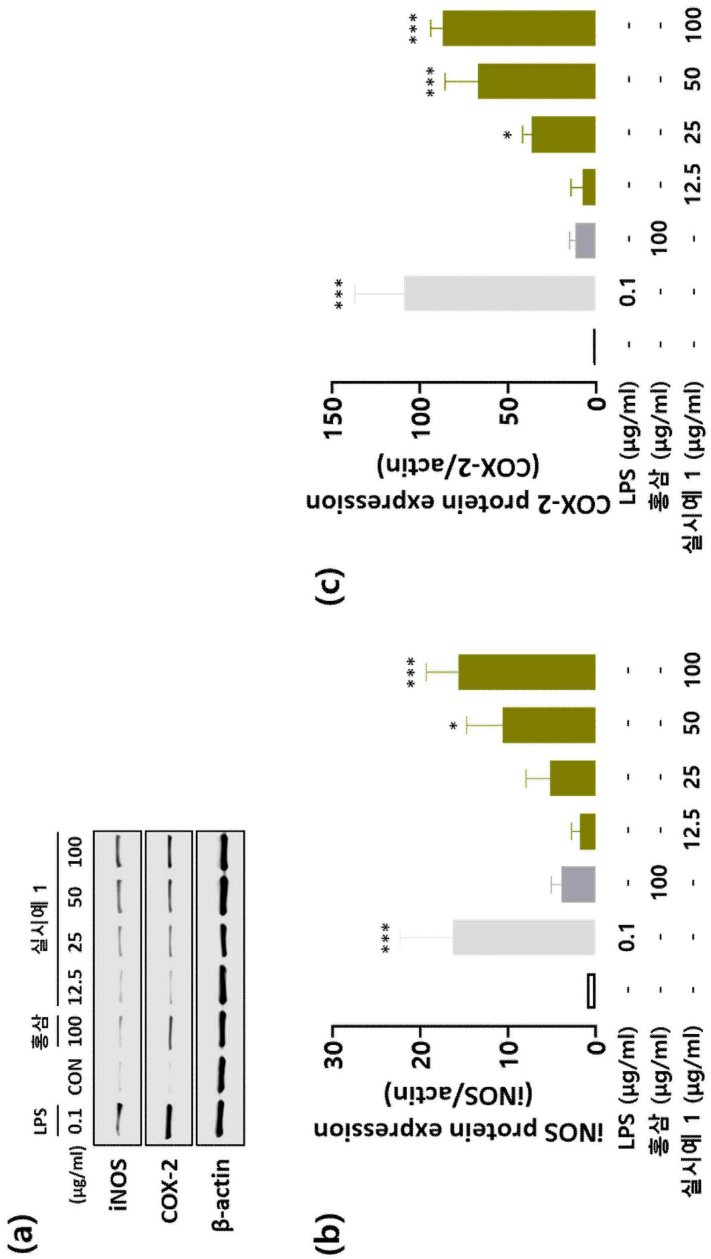
도면2


Nitric oxide (μM)
15
10
5
0
(μg/ml)
-
0.01
50
100
200
50
100
200
CON
LPS
실시예1
실시예2

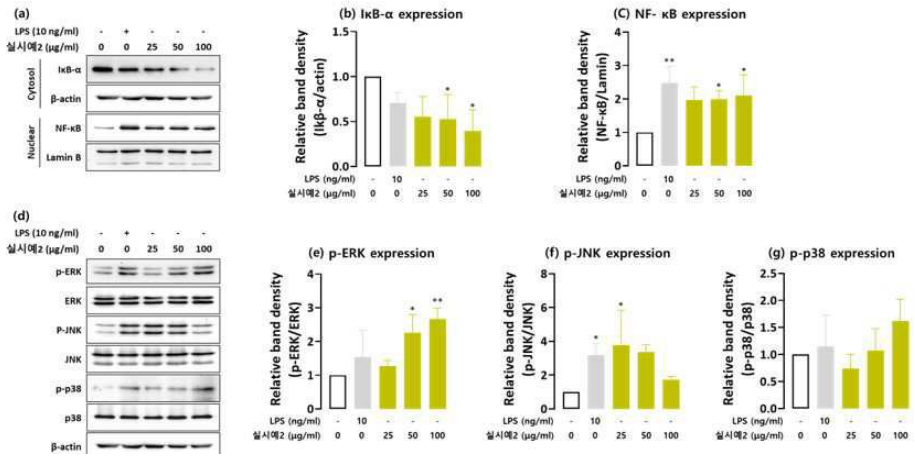
도면3


Phagocytosis (%)
30
20
10
0
(μg/ml)
-
0.01
50
100
200
50
100
200
CON
LPS
실시예1
실시예2

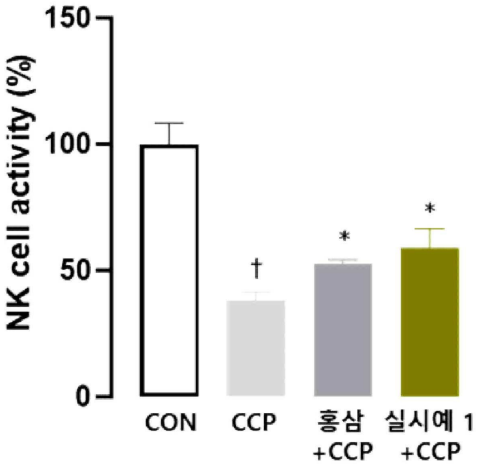
도면4


(a)
LPS
홍삼
실시예 1
0.1
CON
100
12.5
25
50
100
(μg/ml)
iNOS
COX-2
β-actin
(b)
iNOS protein expression
(iNOS/actin)
LPS (μg/ml)
홍삼 (μg/ml)
실시예 1 (μg/ml)
(c)
COX-2 protein expression
(COX-2/actin)
LPS (μg/ml)
홍삼 (μg/ml)
실시예 1 (μg/ml)

도면5

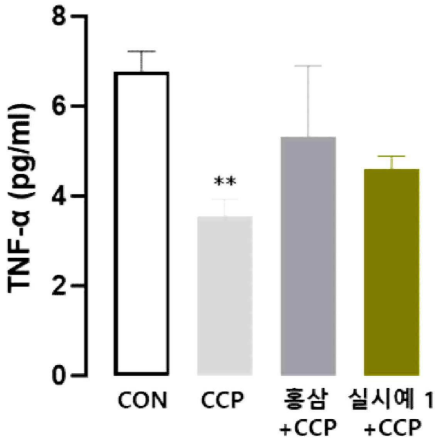

(a)
LPS (10 ng/ml)
실시예2 (μg/ml)
Cytosol
IκB-α
β-actin
Nuclear
NF-κB
Lamin B
(b) IκB-α expression
Relative band density (IκB-α/actin)
(C) NF- κB expression
Relative band density (NF-κB/Lamin)
(d)
p-ERK
ERK
P-JNK
JNK
p-p38
p38
β-actin
(e) p-ERK expression
Relative band density (p-ERK/ERK)
(f) p-JNK expression
Relative band density (p-JNK/JNK)
(g) p-p38 expression
Relative band density (p-p38/p38)

도면6



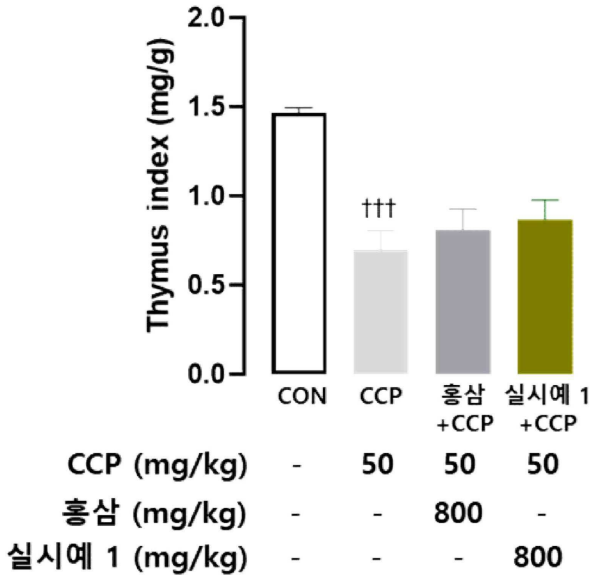
CCP (mg/kg)	-	50	50	50
홍삼 (mg/kg)	-	-	400	-
실시예 1 (mg/kg)	-	-	-	400

도면7

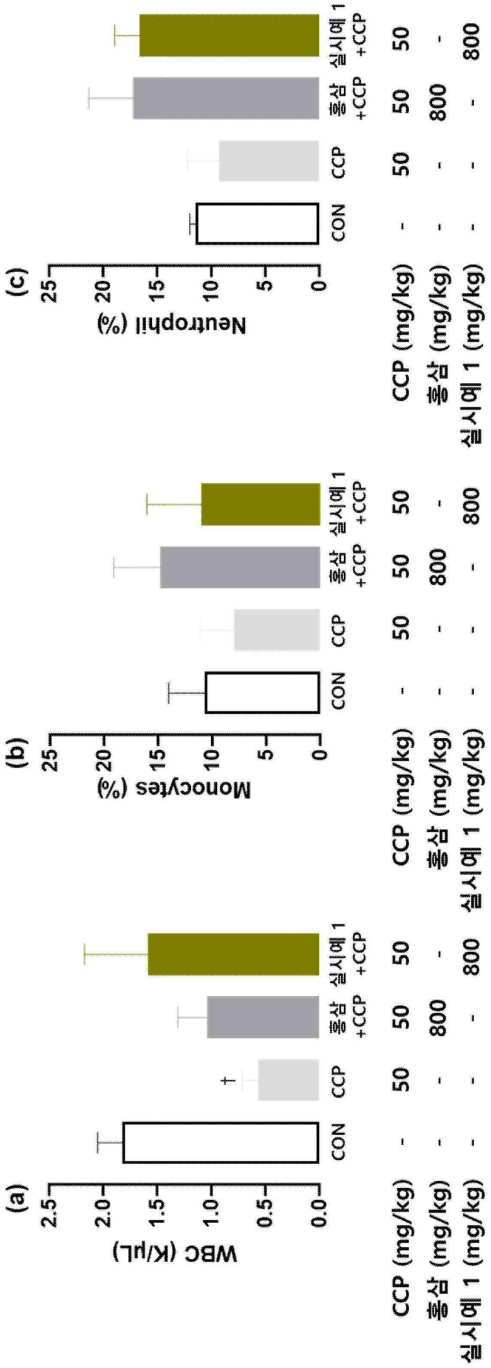


CCP (mg/kg)	-	50	50	50
홍삼 (mg/kg)	-	-	800	-
실시예 1 (mg/kg)	-	-	-	800

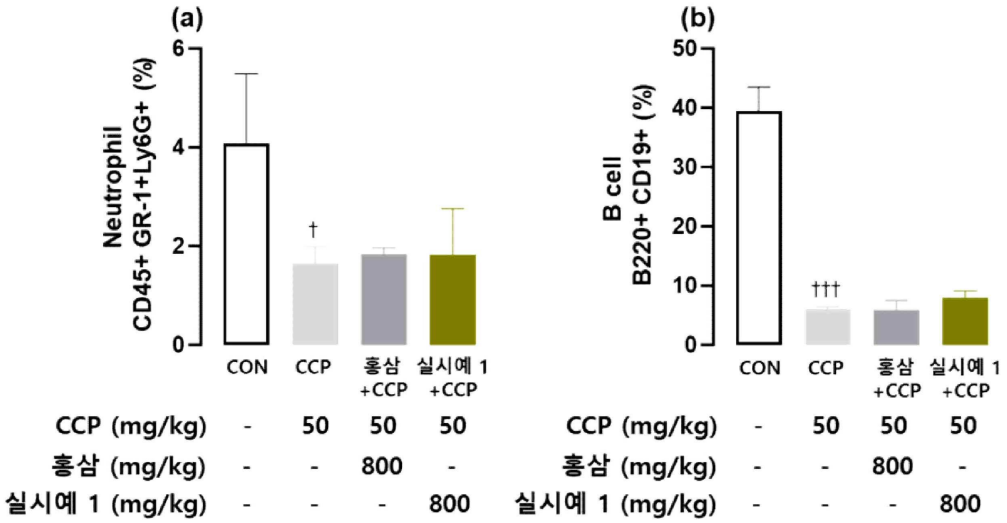
도면8


Thymus index (mg/g)
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
†††
CON
CCP
홍삼 +CCP
실시예 1 +CCP
CCP (mg/kg) - 50 50 50
홍삼 (mg/kg) - - 800 -
실시예 1 (mg/kg) - - - 800

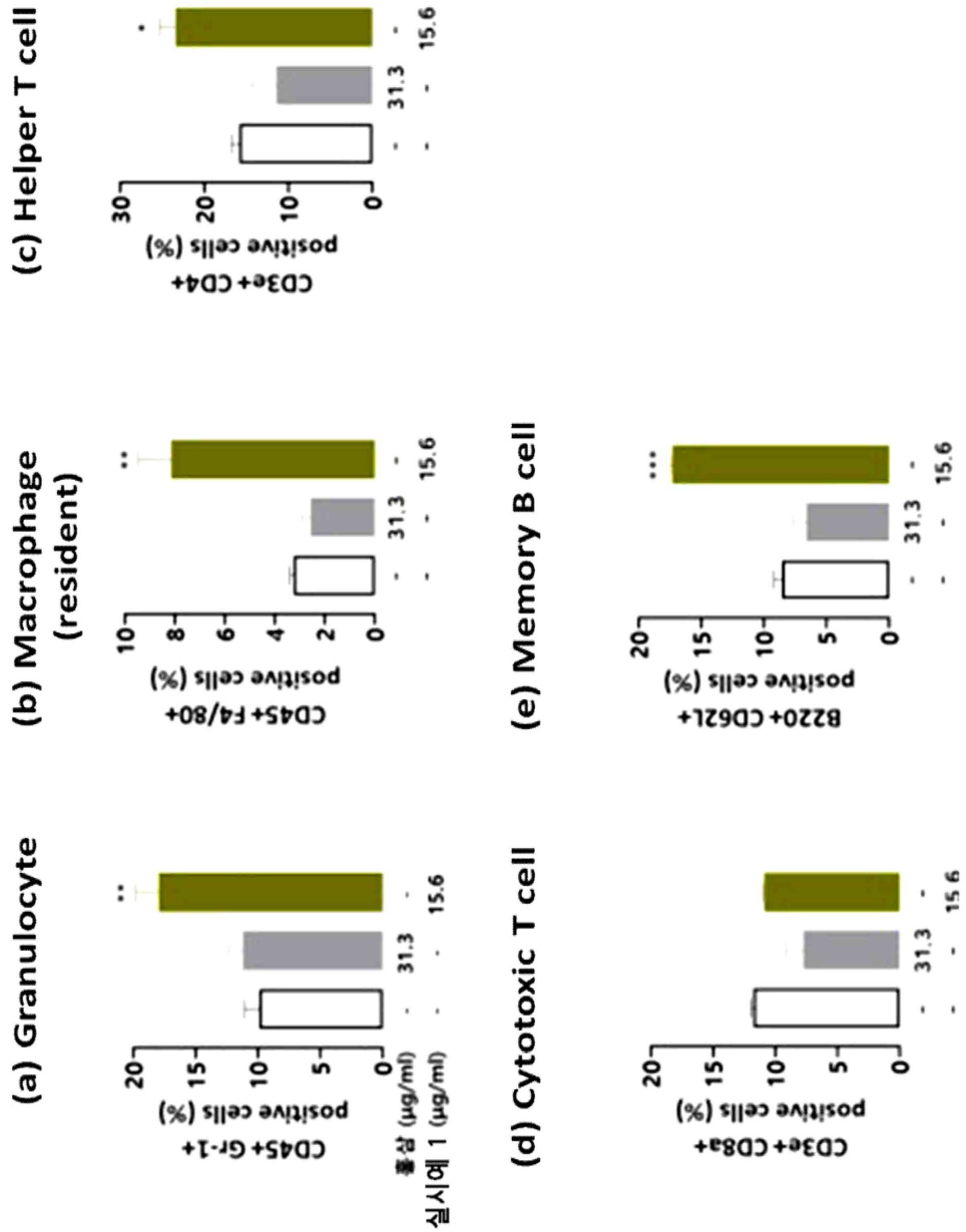
도면9


(a)
WBC (K/μL)
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
CON
CCP
홍삼 +CCP
실시예 1 +CCP
CCP (mg/kg) - 50 50 50
홍삼 (mg/kg) - - 800 -
실시예 1 (mg/kg) - - - 800
(b)
Monocytes (%)
25
20
15
10
5
0
CON
CCP
홍삼 +CCP
실시예 1 +CCP
CCP (mg/kg) - 50 50 50
홍삼 (mg/kg) - - 800 -
실시예 1 (mg/kg) - - - 800
(c)
Neutrophil (%)
25
20
15
10
5
0
CON
CCP
홍삼 +CCP
실시예 1 +CCP
CCP (mg/kg) - 50 50 50
홍삼 (mg/kg) - - 800 -
실시예 1 (mg/kg) - - - 800

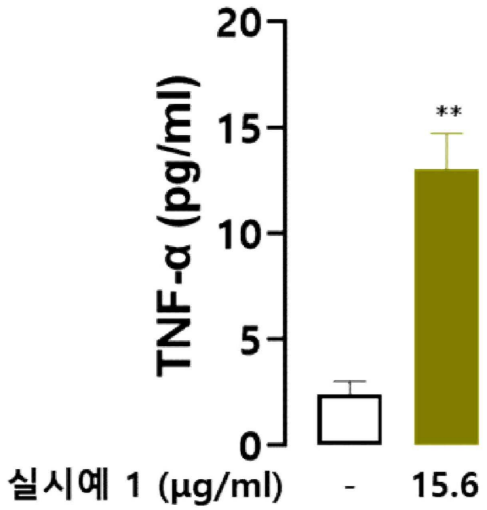
도면10


(a)
Neutrophil
CD45+ GR-1+Ly6G+ (%)
6
4
2
0
†
CON
CCP
홍삼 +CCP
실시예 1 +CCP
CCP (mg/kg) - 50 50 50
홍삼 (mg/kg) - - 800 -
실시예 1 (mg/kg) - - - 800
(b)
B cell
B220+ CD19+ (%)
50
40
30
20
10
0
†††
CON
CCP
홍삼 +CCP
실시예 1 +CCP
CCP (mg/kg) - 50 50 50
홍삼 (mg/kg) - - 800 -
실시예 1 (mg/kg) - - - 800

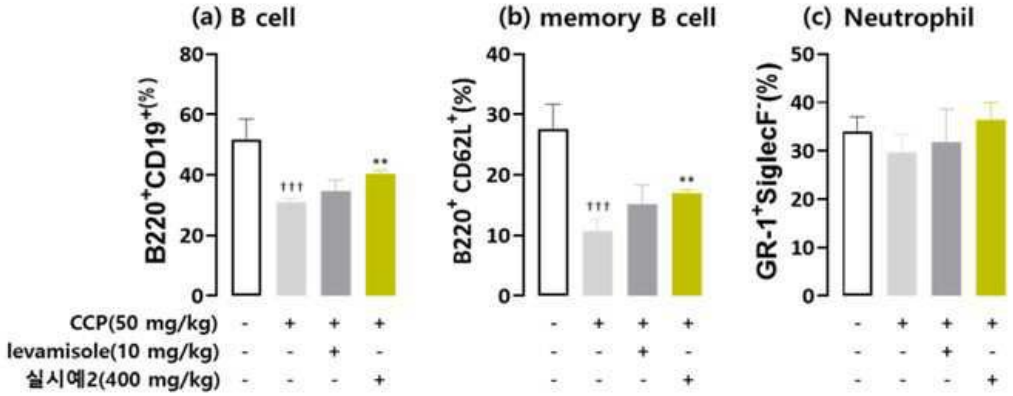
도면11


(a) Granulocyte
CD45+ Gr-1+
positive cells (%)
홍삼 (μg/ml)
실시예 1 (μg/ml)
(b) Macrophage (resident)
CD45+ F4/80+
positive cells (%)
(c) Helper T cell
CD3e+ CD4+
positive cells (%)
(d) Cytotoxic T cell
CD3e+ CD8a+
positive cells (%)
(e) Memory B cell
B220+ CD62L+
positive cells (%)

도면12


TNF-α (pg/ml)
20
15
10
5
0
**
실시예 1 (μg/ml)
-
15.6

도면13


(a) B cell
B220+CD19+(%)
80
60
40
20
0
(b) memory B cell
B220+ CD62L+(%)
40
30
20
10
0
(c) Neutrophil
GR-1+SiglecF-(%)
50
40
30
20
10
0
CCP(50 mg/kg)
levamisole(10 mg/kg)
실시예2(400 mg/kg)