



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2013-0106493
(43) 공개일자 2013년09월30일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07K 14/415 (2006.01) C07K 1/30 (2006.01)
A61K 38/16 (2006.01) A61K 8/64 (2006.01)
(21) 출원번호 10-2012-0028065
(22) 출원일자 2012년03월20일
심사청구일자 2012년03월20일
기술이전 희망 : 기술양도, 실시권허여, 기술지도

(71) 출원인
부경대학교 산학협력단
부산광역시 남구 신선로 365 (용당동,
부경대학교)
(72) 발명자
공인수
부산광역시 해운대구 해운대해변로 83 101동 204
호(우동, 경남마리나아파트)
김은영
부산광역시 금정구 서금로 41-5(서동)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
위병갑

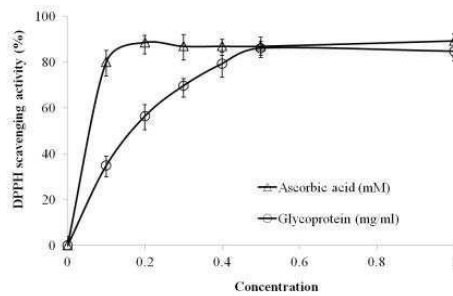
전체 청구항 수 : 총 7 항

(54) 발명의 명칭 다시마로부터 분리한 당단백질의 항산화 및 DNA 보호제로서의 용도

(57) 요약

본 발명은 다시마(*Saccharina japonica*)로부터 분리한 약 10 kDa 크기의 당단백질의 용도에 관한 것이다. 구체적으로 본 발명은 항산화 및 DNA 보호 효과를 갖는 당단백질을 다시마(*Saccharina japonica*)로부터 분리하는 방법을 제공하며, 본 발명의 방법에 따라 분리된 당단백질은 우수한 항산화 효과 및 DNA 손상 보호 효과를 나타냈다. 따라서 본 발명의 당단백질은 산화적 스트레스 또는 DNA 손상 관련 질환을 예방 및 치료할 수 있는 의약품, 식품, 화장품 등으로 이용될 수 있다.

대표도 - 도2a



(72) 발명자

김유리

부산광역시 사상구 강선로 10(덕포동)

남택정

부산광역시 남구 진남로220번가길 3-9 B동 101호(문현동, 부광주택)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 C-D-2011-0528

부처명 국토해양부

연구사업명 지역MT특성화사업

연구과제명 부산 인근 해역에서 생산되는 해양식물로부터 신기능성 단백질 소재 개발 (제2세부과제-Proteomic 분석 및 유전공학 기법을 통한 해조류 유래 기능성 당단백질 연구)

주관기관 한국해양과학기술진흥원

연구기간 2008.12.30 ~ 2011.12.29

특허청구의 범위

청구항 1

다시마(*Saccharina japonica*)로부터 항산화 및 DNA 보호 효과를 갖는 당단백질을 분리하는 방법에 있어서,
건조된 다시마(*Saccharina japonica*)를 증류수에 넣고 실온에서 배양하는 단계;
상기 배양물을 원심분리하고 상층액을 수거하는 단계;
상기 상층액에 3배 부피의 에탄올을 가하고 실온에서 배양하는 단계;
상기 배양물을 여과하는 단계; 및
상기 여과물을 동결건조시키는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 2

제1항에 있어서,
상기 동결건조시킨 시료를 증류수로 재현탁하고, 투석하는 단계; 및
상기 투석한 시료에 대해 SDS-PAGE를 수행하여 9-11 kDa 사이의 단일 밴드를 검출함으로써 당단백질의 존재를 확인하는 단계를 추가로 포함하는 방법.

청구항 3

제1항 또는 제2항의 방법으로 분리된 당단백질.

청구항 4

제3항의 당단백질을 유효성분으로 함유하는 산화적 스트레스 관련 질환의 예방 및 치료용 조성물.

청구항 5

제3항의 당단백질을 유효성분으로 함유하는 DNA 손상 관련 질환의 예방 및 치료용 조성물.

청구항 6

제3항의 당단백질을 함유하는 식품 조성물.

청구항 7

제3항의 당단백질을 함유하는 화장품 조성물.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 다시마(*Saccharina japonica*)로부터 분리한 약 10 kDa 크기의 당단백질의 용도에 관한 것이다. 구체적으로 본 발명은 다시마로부터 항산화 및 DNA 보호 효과를 갖는 당단백질을 추출하는 방법, 및 그 방법으로 추출한 당단백질을 유효성분으로 함유하는 항산화제 및 DNA 보호제에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 신체의 노화와 질병은 산화로부터 시작된다. 산소 분자가 외부로부터 호기성 생물체 내부로 들어가서, 미토콘드리아 호흡, 면역 세포의 방어, 자외선, 오존 및 흡연에의 노출 등의 과정을 거치면서 ROS가 생성된다. $O_2^{\cdot-}$, HO, $1O_2$, H_2O_2 및 HOCl 과 같은 ROS는 정상적인 생리적 대사 과정에서 항산화 물질에 의해 제거될 수 있다(Aruoma, O.I., 1998, Free radicals, oxidative stress, and antioxidants in human health and disease. Journal of

the American Oil Chemists' Society, 75, 199.212). 뛰어난 항산화 효과와 낮은 비용 때문에 종래 뷰틸레이티드 하이드록시톨루엔(butylated hydroxytoluene) 및 뷰틸레이티드 하이드록시아니솔(butylated hydroxyanisole)과 같은 합성 항산화제들이 널리 사용되었으나, 발암, 간 비대화 등과 같은 여러 문제들이 발생함에 따라 그 사용이 제한되어 왔다(Ito, N., et al. (1983). Carcinogenicity of butylated hydroxyanisole in F344 rats. Journal of the National Cancer Institute, 70, 343-347). 따라서 식물이나 해조류와 같은 자연 물질에서 항산화제를 분리하는 방법이 안전성 측면에서 최근 각광받고 있다. 자연적인 항산화 물질들은 채소나 과일을 포함한 다양한 식품에서 발견된다(Moon, J. & Shibamoto, T. (2009). Antioxidant assays for plant and food components. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 57, 1655-1666.). 구체적으로, 다양한 항산화 물질들이 해조류에서 다당류,식이섬유, 미네랄, 단백질, 아미노산, 비타민, 폴리페놀, 및 카로테노이드의 형태로 존재한다는 것이 보고되었다(Burtin, P. (2003). Nutritional value of seaweeds. Electronic Journal of Environmental Agricultural and Food Chemistry, 2, 498-503).

[0003] *Saccharina japonica*는 동아시아, 특히 일본, 중국 및 한국에서 흔히 발견되는 갈조류로서, 주로 식용으로 사용된다(Jia, J. & Chen, J. (2001). FAO Fisheries Technical Paper, No. 418: Sea Farming and Sea Ranching in China. Pp. 71. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations). UN 식량 및 농업기구에 따르면, 매년 약 4백만 톤의 *S. japonica*가 생산되며, 그것의 98%는 양식에서 나온다. *S. japonica*는 대사에 중요한 유기 물질을 함유하며, 그 중에서도 요오드는 갑상선 호르몬 및 다당류의 주된 구성분이다(Cumashi, A., et al. (2007). A comparative study of the anti-inflammatory, anticoagulant, antiangiogenic, and antiadhesive activities of nine different fucoidans from brown seaweeds. Glycobiology, 17, 541-552.; Zhao, X., Xue, C.H. & Li, B.F. (2008). Study of antioxidant activities of sulfated polysaccharides from Laminaria japonica. Journal of Applied Phycology, 20, 431-436.). 해조류에서 분리된 여러 탄수화물들이 항산화, 항바이러스, 항생, 항암 및 면역 등과 같은 다양한 생화학적 기능을 나타냈기 때문에, 지금까지 대부분의 연구들은 거대조류의 탄수화물 성분에만 주목하였다(Noda, H., Amano, H., Arashima, K. & Nisizawa, K. (1990). Antitumor activity of marine algae. Hydrobiologia, 204, 577-584.; Haroun-Bouhedja, H., Ellouali, M., Siquin, C. & Boisson-Vidal, C.(2000). Relationship between sulfate groups and biological activities of fucans. Thrombosis Research, 100, 453-459; Funahashi, H., et al. (2001). Seaweed prevents breast cancer Japanese Journal of Cancer Research, 92, 483-487; Cumashi et al., 2007). 반면에, 거대조류 단백질의 생리적 또는 대사적 효과에 대해서는 거의 연구된 바가 없고, *S. japonica* 역시 중요한 해조류에 속함에도 아직 그 단백질 분석은 이루어지지 않고 있다. 최근에 본 발명자들은 2D-PAGE를 이용하여 *S. japonica*의 단백질 패턴을 분석한바 있다(Kim, E.Y., et al. (2011). An improved method of protein isolation and proteome analysis with *Saccharina japonica* (Laminariales) incubated under different pH conditions. Journal of Applied Phycology, 23, 123-130). 이에 나아가 본 발명자들은 공지의 방법을 변형하여 *S. japonica*로부터 약 10 kDa 크기의 당단백질을 분리하고 그 효과를 확인함으로써 본 발명을 완성하게 되었다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0004] 본 발명의 목적은 다시마(*Saccharina japonica*)로부터 분리된 항산화 및 DNA 보호 효과를 갖는 당단백질 및 이의 분리방법을 제공하는 것이다.
- [0005] 또한, 본 발명의 다른 목적은 상기 다시마로부터 분리한 당단백질을 유효성분으로 함유하는 산화적 스트레스 또는 DNA 손상 관련 질환의 예방 및 치료용 조성물을 제공하는 것이다.
- [0006] 또한, 본 발명의 다른 목적은 상기 다시마로부터 분리한 당단백질을 함유하는 식품 조성물을 제공하는 것이다.
- [0007] 또한, 본 발명의 다른 목적은 상기 다시마로부터 분리한 당단백질을 함유하는 화장품 조성물을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0008] 상기한 목적을 달성하기 위하여 본 발명은 다시마(*Saccharina japonica*)로부터 항산화 및 DNA 보호 효과를 갖는 당단백질을 분리하는 방법을 제공한다. 본 발명의 방법은, 건조된 다시마(*Saccharina japonica*)를 증류수에 넣고 실온에서 배양하는 단계; 상기 배양물을 원심분리하고 상층액을 수거하는 단계; 상기 상층액에 3배 부피의

에탄올을 가하고 실온에서 배양하는 단계; 상기 배양물을 여과하는 단계; 및 상기 여과물을 동결건조시키는 단계를 포함한다.

[0009] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 방법은 추가로 상기 동결건조시킨 시료를 증류수로 재현탁하고, 투석하는 단계; 및 상기 투석한 시료에 대해 SDS-PAGE를 수행하여 9-11 kDa 사이의 단일 밴드를 검출함으로써 당단백질의 존재를 확인하는 단계를 포함할 수 있다. 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 단일 밴드는 약 10 kDa 크기 근처에서 형성되는 것이 바람직하다.

[0010] 또한, 본 발명은 상기 본 발명의 방법으로 분리된 당단백질을 제공한다.

[0011] 또한, 본 발명은 상기 본 발명의 방법으로 분리된 당단백질을 유효성분으로 함유하는 약학적 조성물을 제공한다. 본 발명의 약학적 조성물은 산화적 스트레스 관련 질환 또는 DNA 손상 관련 질환의 예방 및 치료용 조성물이 될 수 있다.

[0012] 또한, 본 발명은 상기 본 발명의 방법으로 분리된 당단백질을 함유하는 식품 조성물을 제공한다. 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 식품 조성물은 산화적 스트레스 또는 DNA 손상 관련 질환의 예방 또는 치료 효과를 갖는 기능성 식품으로 이용될 수 있다.

[0013] 또한, 본 발명은 상기 본 발명의 방법으로 분리된 당단백질을 함유하는 화장품 조성물을 제공한다. 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 화장품 조성물은 피부노화를 포함하여 산화적 스트레스 또는 DNA 손상 관련 증상을 예방 또는 치료할 수 있는 기능성 화장품으로 이용될 수 있다.

발명의 효과

[0014] 본 발명의 방법에 따라 다시마(*Saccharina japonica*)로부터 분리된 당단백질은 여러 실험들에서 모두 우수한 항산화 효과를 보였고, 추가로 DNA를 손상으로부터 보호하는 효과도 나타냈다. 따라서 본 발명의 당단백질은 산화적 스트레스 또는 DNA 손상 관련 질환을 예방 및 치료할 수 있는 의약품, 식품, 화장품 등으로 이용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0015] 도 1은 *S. japonica*로부터 분리한 본 발명의 당단백질의 전기영동 프로파일이다. 각각의 추출물을 15% 폴리아크릴아마이드 겔에 투입하고 은; Coomassie brilliant blue (CBB) 및 periodic acid-Schiff로 염색하였다. 레인 (lane) M, 분자량 표준; 레인 1, 은 염색; 레인 2, CBB 염색; 레인 3, periodic acid-Schiff 염색.

도 2는 본 발명의 당단백질의 항산화 활성을 보여준다. 아스코르브산을 양성 대조군으로 사용하였다. (a) 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) 소거 활성; (b) 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonic acid) (ABTS) 소거 활성; (c) superoxide dismutase-like activity (SODA) 어세이; (d) superoxide radical scavenging (SORS) activity; (e) ferric reducing . antioxidants power (FRAP) 활성.

도 3은 본 발명의 당단백질의 잔틴 산화효소 억제 활성 및 NO 라디칼 소거 어세이 결과이다. 아스코르브산을 양성 대조군으로 사용하였다. (a) NO 라디칼 소거 활성; (b) 잔틴 산화효소 억제 어세이.

도 4는 본 발명의 당단백질의 DNA 보호 효과를 나타낸다. 레인 1, 손상 받지 않은 DNA; 레인 2, Cu(II)-ascorbic acid에 노출된 DNA; 레인 3, 본 발명의 당단백질을 처리한 Cu(II)-ascorbic acid에 노출된 DNA.

도 5는 다양한 온도, pH 및 금속 이온에 노출된 본 발명의 당단백질의 활성을 나타낸다. (a) 동일한 양의 당단백질을 Tris-HCl 버퍼에 녹이고 30℃에서 100℃로 서서히 가열하였다; (b) 당단백질을 다양한 pH(6-10)의 버퍼 용액에 현탁하였다; (c) EDTA를 처리하거나 처리하지 않은 조건에서 당단백질을 CaCl₂, MnCl₂ 또는 MgCl₂와 함께 2시간 동안 반응시켰다. 당단백질의 활성을 DPPH 어세이로 측정하였다.

도 6은 불활성화 물질을 처리한 당단백질의 활성을 보여준다. 당단백질에 pronase E 또는 NaIO₄를 처리하였다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0016] 본 발명은 *Saccharina japonica*로부터 분리한 당단백질의 용도에 관한 것이다. 본 발명자들은 *S. japonica*로부터 당단백질을 분리하기 위하여, 공지된 방법(Go et al., 2009a, Glycoprotein extraction from *Laminaria japonica* promotes IEC-6 cell proliferation. International Journal of Molecular Medicine, 24, 819-824)을 변형한 방법을 사용하였다. 상기 방법에서는 증류수(DW), 에탄올(ethanol) 및 황산암모늄(ammonium

sulphate) 침전의 연속적인 세 공정을 사용하였다. 그러나 황산암모늄을 사용할 경우 생산물(당단백질)을 섭취할 때 안전하지 못한 문제가 있어 식품 산업에서는 적당하지 않은 방법이다. 따라서, 본 발명자들은 황산암모늄 없이 증류수와 에탄올 처리 공정만을 사용하였고, 정제에 있어서는 아무런 차이가 없음을 확인하였다. 상기 두 번째 공정 이후에는 거름종이(Whatman paper)(3 mm)를 사용하여 여과하였다. CBB 및 은 염색 후에 젤 상에 10 kDa의 단일 밴드가 나타났다(도 1). 추가로 PAS를 사용하여 위 밴드가 당단백질을 확인하였다(도 1). 4 g의 *S. japonica*로부터 약 10.79 ± 0.2 mg의 당단백질을 정제하였으며, 수율은 0.27%였다. 또한 페놀황산법을 사용하여 측정된 총 탄수화물 양은 4.59 ± 0.08 mg이었다. 이전의 연구(Go, et al. (2009a) 및 Go, et al. (2009b). A glycoprotein from Laminaria japonica induces apoptosis in HT-29 colon cancer cells. Toxicology in Vitro, 24, 1546-1553)에서는 같은 양의 *S. japonica*로부터 약 4.2 ± 0.5 mg의 당단백질을 얻어, 수율이 0.11%였다. 이것은 본 발명의 분리 방법이 위 공지의 방법에 비하여 2배 이상의 당단백질을 *S. japonica*로부터 생산해냈음을 보여준다.

- [0017] *S. japonica*에서 분리한 본 발명의 당단백질은, 식물로부터 추출한 당단백질에 비하여 상대적으로 분자량이 작았다(약 10 kDa). 식물의 당단백질은 넓은 분자량 분포를 나타냈다. *Curcuma longa*, *Dioscorea batatas*, *Geranium sibiricum* 및 *Gardenia jasminoides* Ellis 식물에서 추출한 당단백질의 분자량은 각각 28, 30, 18 및 27 kDa이었다(Lee, S.J., et al., 2006, Glycoprotein isolated from Gardenia jasminoides Ellis has a scavenging activity against oxygen radicals and inhibits the oxygen radical-induced protein kinase C alpha and nuclear factor-kappa B in NIH. 3T3 cells. Environmental Toxicology and Pharmacology, 21, 8-21; Oh, P.S. & Lim, K.T., 2008, Antioxidant activity of Dioscorea batatas Decne glycoprotein. European Food Research and Technology, 226,375-387; Shim, J.U. & Lim, K.T., 2009, Antioxidant activity of glycoprotein isolated from Geranium sibiricum Linne. Natural Product Research, 23, 507-515; Ramadas, D. & Srinivas, L., 2011, Antioxidant effects of 28 kDa antioxidant protein from turmeric (Curma longa L). Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research, 4, 119-123). 다양한 생물체에서 분리한 대부분의 당단백질들은 항산화 활성을 나타내었다. 저 분자량(LMW)의 항산화물질들은 세포에서 자유라디칼 또는 산화물질들과 상호작용함으로써 항산화 방어 기작에서 중요한 역할을 하는 것으로 보고되었다(Grune, T., Schroder, P. & Biesalski, H.K. (2005). Low molecular weight antioxidants. The Handbook of Environmental Chemistry. Pp. 77.90. Vol. 2, Part O. Springer, Verlag Berlin Heidelberg. DOI 10.1007/b101147). *S. japonica*에서 분리한 본 발명의 당단백질도 유사한 항산화 활성을 나타내는지 알아보기 위하여, 본 발명자들은 항산화 효과에 관한 여러 분석을 수행하였다.
- [0018] 본 발명자들은 DPPH 라디칼 소거, ABTS 라디칼 소거, FRAP 및 효소적 항산화제에 대한 SODA 어세이 뿐만 아니라 비효소적 항산화제에 대한 SORS 어세이를 사용하여, 본 발명의 당단백질의 항산화 활성을 측정하였다. 또한, 항산화 활성 이외에 추가로 잔틴(xanthine) 산화효소 억제 활성 및 NO 소거 어세이도 수행하였다.
- [0019] 당단백질의 항산화 활성은 EDA를 통하여 DPPH 라디칼 소거 정도를 측정함으로써 확인하였다. 측정 결과 0.5 mg/mL까지는 비례적으로 증가하였고 그 이후부터는 85%로 일정하였다(도 2a). 아스코르브산(ascorbic acid)을 양성 대조군으로 사용하였다. 0.1mM의 아스코르브산에서는 $82 \pm 5\%$ 활성을 나타냈고, 0.2 mM 이상에서는 90% 억제를 나타냈다. 본 발명의 당단백질 0.5 mg/mL은 0.1mM 아스코르브산에서와 비슷한 수준의 항산화 활성을 나타냈다. 또한, ABTS 라디칼 소거 기술을 사용하여, 저 농도의 당단백질에서 증가한 항산화 활성을 관찰하였다. 0.01 mg/mL에서 시작하여 활성은 급격하게 증가하였고, 0.08 mg/mL에서 $95 \pm 6\%$ 에 이르렀으며, 그 이상의 농도에서 거의 100%까지 증가하였다(도 2b). 아스코르브산을 사용하였을 때 최대 억제는 0.3 mM 농도 이상에서 나타났고, 이는 0.1 mg/mL 당단백질의 억제 활성과 유사하였다.
- [0020] SODA 어세이(assay)는 피로갈롤(pyrogallol)을 사용하여 항산화 활성을 간접적으로 측정하는 방법으로서, 갈색 잔여물을 생성하기 위해 물에서 초과산화 라디칼과 산화반응이 일어나고; 항산화 물질에 의해 산화가 지연된다. SODA 어세이에서 당단백질의 농도가 0부터 1mg/mL까지 변환에 따라, 항산화 활성은 0%에서부터 20%까지 증가하였다. 0부터 3mM의 아스코르브산을 사용한 활성은 0-93%까지 측정되었다(도 2c). 1 mg/mL 당단백질의 활성은 $20 \pm 0.5\%$ 이었고, 이것은 0.3 mM 아스코르브산에 대한 측정 결과($21 \pm 0.3\%$)와 유사하였다. 2 mg/mL 이상의 농도에서는 항산화 활성이 높았고($50 \pm 0.5\%$), 0.6 mM 아스코르브산에서 관찰한 결과($50 \pm 0.7\%$)와 유사하였다.
- [0021] SORS 어세이는 초과산화 라디칼(O_2)과 NBT (nitro blue tetrazolium) 사이의 반응에 기초한 방법이다(Liu, F., et al. (1997). Free radical scavenging activities of mushroom polysaccharide extracts. Life Sciences,

60, 763-771). 당단백질의 농도가 0에서 2 mg/mL로 변함에 따라, 항산화 활성은 급격하게 증가하였다(도 2d). 2 mg/mL의 당단백질은 4 mM 아스코르브산에 대한 것과 유사한 수준의 항산화 활성을 나타내었다.

[0022] FRAP (ferric reducing/antioxidants power)은 Fe(III)의 Fe(II)로의 환원으로 측정하였고, 이것은 593 nm 흡광도의 증가를 가져오며, 항산화 활성의 증가를 의미한다. 당단백질의 농도가 증가함에 따라, 광밀도(OD) 값이 증가하였고, 0.9 mg/mL을 초과하는 농도에서 OD값은 거의 100%였다(도 2e). 이 값은 1mM 아스코르브산에 대해 관찰한 결과와 유사하였다. 아스코르브산에 대하여, 최대값은 1 mM을 초과하는 농도에서 관찰되었다.

[0023] DPPH, ABTS, SODA, SORS 및 FRAP 어세이로 측정한 당단백질의 IC₅₀ 값은 각각 0.12, 0.05, 1.2, 1.2 및 0.3 mg/mL이었다.

[0024] 정제된 당단백질의 NO 소거 어세이에서는 Griess 시약을 사용하여 아질산염(nitrite)을 측정하였다. 당단백질의 농도가 증가함에 따라 억제 또는 소거 능력이 증가하였다. 1 mg/mL에서, 활성 수준이 20 ± 0.5%에 이르렀다(도 3a). 이 수치는 1 mM 아스코르브산에 대하여 관찰한 결과(13 ± 2%) 보다 높은 값이지만, 2 mM 아스코르브산에 대하여 관찰한 결과(40 ± 0.5%) 보다는 낮다.

[0025] 퓨린(purine) 산화의 속도제한효소(rate-limiting enzyme)인 잔틴 산화효소(xanthine oxidase)는 초과산화 라디칼 또는 과산화수소와 같은 산화물질의 공급원으로 기능한다. 잔틴 산화효소에 의한 초과산화 음이온 억제는 초과산화 음이온 제거 및 잔틴 산화효소 억제에 의해 발생한다. 0.2 mg/mL의 당단백질 농도에서는 70% 억제 활성을 나타내었고, 최대 효소 억제는 0.5 mg/mL에서 나타났으며, 이것은 3 mM 아스코르브산에 대하여 실험한 것과 같은 결과이다(도 3b).

[0026] 지금까지 항산화 활성에 관한 대부분의 연구들은 *S. japonica*의 조추출물(crude 또는 semi-crude extracts)의 사용에 초점을 맞춰왔으며, 몇몇 연구들만이 정제된 항산화 물질들에 대해 조사하였다. 예컨대, Ahn et al. (Ahn, S.M., Hong, Y.K., Kwon, G.S. & Sohn, H.Y., 2011, Evaluation of antioxidant and nitrite scavenging activity of seaweed extracts. Journal of Life Science, 21, 576-583)은 *S. japonica* 메탄을 추출물의 항산화 활성이 DPPH 어세이에서 26.45 ± 0.25%, ABTS 어세이에서 37.71 ± 0.01%라는 것을 밝혔다. 그러나 이러한 활성은 양성 대조군인 아스코르브산에 대한 측정 결과(DPPH, 47.94 ± 3.67%; ABTS, 87.97 ± 2.33%)의 절반 수준이었다. Park & Han (Park, M.J. & Han, J.S., 2006, Radical scavenging and antioxidant activities of fermented Laminaria japonica extracts. Journal of Food Science and Nutrition, 11, 10-16)은 항산화 활성을 측정하기 위하여, *S. japonica*의 물, 에탄올-용해성 및 에탄올-비용해성 분획을 사용하여 DPPH 어세이를 수행하였고, 활성 수준은 각각 20%, 40% 및 10%였다. 그 이외에도, 여러 연구들이 *S. japonica*에서 추출한 여러 물질들의 항산화 활성을 보고하였다. 예컨대, Zhao et al.(Zhao, X., Xue, C.H. & Li, B.F. (2008). Study of antioxidant activities of sulfated polysaccharides from Laminaria japonica. Journal of Applied Phycology, 20, 431-436)은 *S. japonica*의 황산화 다당류(sulphated polysaccharide) 분획의 항산화 활성을 조사하였다. 위 문헌에 따르면, *S. japonica*의 푸코이단(fucoidan)으로부터 LM1 (1.5 kDa) 및 LM2 (8 kDa)를 분리할 수 있으며, 이들은 의료용으로 사용될 수 있다.

[0027] 그 밖에도 *S. japonica* 이외의 여러 식물들에서 분리된 당단백질들의 항산화 활성이 보고되었는데, *C. longa*, *D. batatas*, *G. sibiricum* 및 *G. jasminoides*에서 분리한 당단백질에서 DPPH 결과, 각각 0.9 nM에서 82%, 0.5 mg/mL에서 80%, 0.05 mg/mL에서 90% 및 0.1 mg/mL에서 90%의 항산화 활성을 나타내었다(Lee, S.J., et al. (2006). Glycoprotein isolated from Gardenia jasminoides Ellis has a scavenging activity against oxygen radicals and inhibits the oxygen radical-induced protein kinase C alpha and nuclear factor-kappa B in NIH. 3T3 cells. Environmental Toxicology and Pharmacology, 21, 8-21.; Oh, P.S. & Lim, K.T. (2008). Antioxidant activity of Dioscorea batatas Decne glycoprotein. European Food Research and Technology, 226, 375-387; Shim, J.U. & Lim, K.T. (2009). Antioxidant activity of glycoprotein isolated from Geranium sibiricum Linne. Natural Product Research, 23, 507-515.; Ramadas, D. & Srinivas, L. (2011). Antioxidant effects of 28 kDa antioxidant protein from turmeric (Curma longa L). Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research, 4, 119-123). *S. japonica*의 당단백질은 0.5 mg/mL에서 85%의 항산화 활성을 나타내었고, 이는 *D. batatas*에서 분리한 당단백질의 것과 유사한 수준이다. 항산화 효소 및 많은 생물학적 물질들을 포함한 다양한 라디칼 소거 시스템은 산화적 손상으로부터 식물 세포를 보호할 수 있다고 보고되었다(Kakkar, R.J. & Sawheny, V.K., 2002, Polyamine research in plants-a changing perspective. Physiologia Plantarum, 116, 281-292).

[0028] 한편, 당단백질은 항산화 효과뿐만 아니라, DNA의 하전(charge)을 중성화시키고 구조 변화를 통해 DNA 손상을

막는 기능도 있음이 보고되었으므로(Kohen, R. & Niska, A. (2002). Oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification. Toxicologic Pathology, 30, 620-650), 본 발명자들은 본 발명의 당단백질의 DNA 손상 보호 활성을 실험하였다. DNA 손상은 대사 과정 동안 구리(Cu) 독성을 비롯한 여러 가지 요인들에 의하여 발생한다. Cu가 DNA 염기에 결합할 경우 이중나선 구조는 풀리고 DNA에 손상을 일으킨다. 그 결과 세포들은 죽거나 돌연변이가 발생한다. 하지만, 구리는 전자전달계, 호흡 및 성장 등 생물체에서 중요한 역할을 수행한다. 당단백질의 DNA 보호 효과를 확인하기 위하여, 당단백질이 있거나 없는 조건에서 아스코르브산(ascorbic acid) 및 Cu (II) sulphate를 사용하여 라디칼-유도 DNA 손상을 실험하였다. 반응 후에, 시료들을 1% 아가로오스 겔에서 전기영동시킨 결과, 당단백질-처리 시료들에서는 λ DNA 밴드가 명확하게 나타난 반면, 무처리군에서는 나타나지 않았다(도 4). 이 결과는 분리된 당단백질이 산화적 손상으로부터 DNA를 보호한다는 것을 보여준다.

[0029] 또한, 본 발명자들은 본 발명의 당단백질의 안정성을 실험하였다. 당단백질의 활성은 넓은 온도 범위(30-80℃)에서 상대적으로 안정하였다(도 5a). 상기 온도 범위 내에서 DPPH 라디칼 소거 활성은 80 - 100% 사이에서 다양한 반면에, 활성 수준은 100℃에서 63%에 불과하였다. 다른 pH 조건(pH 4.9)에서, 당단백질 항산화 활성은 80 - 100%로 다양했다(도 5b). pH 4.6에서 약 80%의 항산화 활성이 유지되었다. pH 10에서, 당단백질은 그것의 상대적인 활성의 1%만은 나타냈고, 이것은 당단백질과 단백질 사이의 화학 결합이 약산, 중성 또는 약염기 조건에서 안정할 수 있음을 의미한다. EDTA 처리 당단백질은 그것의 DPPH 라디칼 소거 활성을 잃지 않았으나, EDTA 처리 또는 무처리 조건에서 당단백질과 금속 이온 사이의 반응은 DPPH 라디칼 소거 활성의 소멸을 나타냈다(도 5c). Ca^{2+} , Mn^{2+} 및 Mg^{2+} 와 반응한 당단백질의 활성 수준은, 당단백질을 단독 처리한 경우(100%)에 비하여, EDTA가 없는 조건에서 각각 14%, 36% 및 18% 수준으로, EDTA가 존재하는 조건에서 21%, 39% 및 21%로 상당히 감소하였다. 이러한 결과들은 당단백질의 활성이 EDTA에 의해 영향 받지 않음을 보여준다. 당단백질의 항산화 활성은, 다른 자유라디칼과 킬레이트 복합체를 형성하는 그것의 음성 또는 양성 하전된 잔기들에 달려 있다. EDTA의 양(+)으로 하전된 당단백질 잔기에의 결합은 그것의 활성에 아무런 영향을 미치지 않았고, 대신에 그것의 항산화 활성 감소는 2가(divalent) 금속 이온의 음 하전 잔기들에의 결합 때문일 것이다.

[0030] 또한, 프로나아제(pronase) E 및 NaIO_4 를 처리한 당단백질의 활성 수준은 무처리 시료들에 비하여 상당히 낮았다. 0.5 mg/mL의 농도까지 무처리 당단백질은 0-80%의 활성을 유지한 반면에, 프로나아제 E 및 NaIO_4 를 처리한 시료들은 0-10%의 활성만을 유지하였다(도 6). 당단백질은 선형 및 분지형을 모두 갖는 그것의 3차 구조 때문에 순수한 단백질 또는 핵산과 구별된다(Nelson, D.L. & Cox, M.M. (2000). Carbohydrates and glycobiology. In: Leninger Principles of Biochemistry, 3rd edn. Pp. 311-318. New York: Worth publishers). 이러한 구조적 다양성으로 인해 잠재적인 생물학적 기능들을 갖고 있으며, 대사, 면역 및 항상성 유지 등에 영향을 미친다. 또한 당단백질 3차 구조의 변형은 그것의 항산화 및 자유 라디칼 소거 기능에 영향을 미칠 수 있다. 프로나아제 E 및 NaIO_4 의 경우, 본래의 구조를 변형시킬 수 있는 단백질의 가수분해 및 탄수화물의 산화가 당단백질의 기능에 영향을 미치고 활성의 감소를 가져온 것으로 생각된다.

[0031] 상기와 같이 본 발명의 방법에 따라 생산된 본 발명의 당단백질은 항산화 효과 및 DNA 보호 활성을 가질 뿐만 아니라 안정성도 확인되었으므로, 항산화제 또는 DNA 손상 보호용 물질로서 하기와 같은 다양한 형태로 사용될 수 있다.

[0032] 또한, 본 발명의 당단백질 자체뿐만 아니라 이의 유도체, 나아가 이의 약학적으로 허용 가능한 염 또한 본 발명의 조성물로 사용될 수 있음은 당업자에게 자명하다. 제형화에 있어 적절한 유도체 또는 약학적으로 허용가능한 염의 사용은 본 발명의 당단백질 자체보다 수용성 또는 유용성을 향상시킬 수 있는 장점이 있다. 여기에서, 유도체란 자연계에서 생화학적으로 또는 인위적으로 발생할 수 있는 모든 형태의 유도체를 포함하며, 이에 제한되는 것은 아니지만, 예를 들어, 알콜에스테르기를 갖는 유도체, 지방산에스테르기를 갖는 유도체, 알콕시기를 갖는 유도체, 알콕시메틸기를 갖는 유도체, 또는 배당체 등을 들 수 있다. 또한, 상기 유도체를 다시 유도체화하여 그들의 염을 사용할 수도 있다. 상기 약학적으로 허용가능한 염은 통상적으로 음식물 또는 의약 조성물로 이용되고 있는 염이라면 특별히 한정되지 않고, 예를 들어 나트륨, 칼륨 등의 알칼리 금속염, 칼슘, 마그네슘 등의 알칼리토류 금속염, 암모니아, 메틸아민, 디메틸아민, 에틸아민, 디에틸아민, 프로필아민, 부틸아민 등의 알킬아민염, 에탄올아민, 디에탄올아민, 프로판올아민, 디프로판올아민, 이소프로판올아민, 디이소프로판올아민 등의 알카놀아민염, 피페라딘, 피페리딘 등의 기타 유기아민염, 알기닌, 히스티딘, 트립토판 등의 염기성 아미

노산염 등의 염을 들 수 있다.

- [0033] 제1양태로서, 본 발명의 당단백질은 이를 유효성분으로 함유하는 약학적 조성물의 형태로 사용될 수 있다. 본 발명의 약학적 조성물은 산화적 스트레스 관련 질환 또는 DNA 손상 관련 질환의 예방 및 치료용 조성물이 될 수 있다. 상기 산화적 스트레스 관련 질환은, 예를 들어 알츠하이머, 파킨슨병, 근위축증 등의 신경퇴행성 질환, 심근경색이나 뇌경색 등의 허혈성 질환, 색소성 망막증, 백내장, 황반변성 등의 안구 질환, 관절염, 혈관염, 사구체신염, 홍반성 루푸스 등의 염증 질환을 포함하는 세포의 산화적 손상과 관련된 질환, 고지혈증 등의 지질대사질환, 동맥경화증, 심부전증, 고혈압성 심장질환, 부정맥 심근경색증, 협심증 등의 심장질환뿐만 아니라 주름살, 기미, 주근깨 등의 피부노화, 면역질환, 암 등을 포함하나, 이에 제한되는 것은 아니다. 또한 상기 DNA 손상 관련 질환은 상기 산화적 스트레스에 의해서도 유발될 수 있으나, 그 외 병원성 미생물, 화학물질 또는 방사선 조사 등에 의해 발생할 수 있는 질환을 포함한다. 여기에서, '유효성분으로서 함유'한다는 것은, 산화적 스트레스 관련 질환 또는 DNA 손상 관련 질환의 예방 및 치료 효과를 나타낼 수 있을 정도로 함유한다는 의미로서, 구체적인 함량이 특별히 제한되는 것은 아니며, 섭취의 빈도나 섭취량, 음식물의 종류, 섭취하는 사람의 체중, 성별 등에 따라 적절히 조절할 수 있다. 예를 들어, 직접 경구 섭취하는 경우에는 비교적 저농도가 좋고, 음식물의 원료 등에 사용하는 경우는 고농도가 바람직할 수 있다.
- [0034] 본 발명의 당단백질을 유효성분으로 포함하는 약학적 조성물은 임상적으로 경구 또는 비경구로 투여할 수 있다. 경구 투여용 제형으로는, 예를 들면, 정제, 트로키제(troches), 로젠지(lozenge), 수용성 또는 유성현탁액, 조제분말 또는 과립, 에멀전, 하드 또는 소프트 캡슐, 시럽 또는 엘릭실제(elixirs)로 제제화될 수 있다. 또한, 정제 및 캡슐 등의 제형으로 제제화하기 위해 락토오스, 사카로오스, 솔비톨, 만니톨, 전분, 아밀로펙틴, 셀룰로오스 또는 젤라틴과 같은 결합제; 디칼슘 포스페이트와 같은 부형제; 옥수수 전분 또는 고구마 전분과 같은 붕괴제; 스테아린산 마그네슘, 스테아린산 칼슘, 스테아릴푸마르산 나트륨 또는 폴리에틸렌글리콜 왁스와 같은 윤활유가 함유될 수 있다. 캡슐제형의 경우는 상기에서 언급한 물질 이외에도 지방유와 같은 액체 담체를 함유할 수 있다. 또한, 본 발명의 약학적 조성물은 비경구로 투여할 수 있으며, 비경구 투여는 피부 외용제, 주사제 등의 제형을 의미한다.
- [0035] 본 발명의 약학적 조성물은 약제학적으로 허용 가능한 첨가제를 더 포함할 수 있으며, 이때 약제학적으로 허용 가능한 첨가제로는 전분, 젤라틴화 전분, 미결정셀룰로오스, 유당, 포비돈, 콜로이드알실리콘디옥사이드, 인산수소칼슘, 락토스, 만니톨, 엷, 아라비아고무, 전호화전분, 옥수수전분, 분말셀룰로오스, 히드록시프로필셀룰로오스, 오파드라이, 전분글리콜산나트륨, 카르나우바 납, 합성규산알루미늄, 스테아린산, 스테아린산마그네슘, 스테아린산 알루미늄, 스테아린산칼슘, 백당, 텍스트로스, 소르비톨 및 탈크 등이 사용될 수 있다.
- [0036] 본 발명의 약학적 조성물에 있어서 당단백질의 유효투입량은 환자의 나이, 신체적 조건, 몸무게 등에 의해 다양화될 수 있지만, 일반적으로 성인에게 1일에 10 ~ 500 mg, 바람직하게는 50 ~ 300 mg의 양이 투여되도록 하는 것이 바람직하며, 의사 또는 약사의 판단에 따라 일정시간 간격으로 1일 수회, 바람직하게는 1회 내지는 6회 분할 투여할 수 있다.
- [0037] 제2양태로서, 본 발명의 당단백질은 식품 조성물로 이용될 수 있다. 본 발명에 따른 식품 조성물은 본 발명의 당단백질을 함유하기 때문에 산화적 스트레스 관련 질환 또는 DNA 손상 관련 질환의 예방 및 치료 효과를 기대할 수 있다. 본 발명의 기능성 식품 조성물은 상기 효과를 배가시키기 위하여 다른 생리적 활성 성분, 즉 안전성이 검증된 천연의 항산화 물질 등을 추가적으로 배합하여 제조할 수 있다.
- [0038] 본 발명의 식품 조성물은, 이에 제한되는 것은 아니나, 예를 들어 정제, 과립, 분말, 캡슐, 액상의 용액 및 환으로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나의 제형으로 제조될 수 있다. 본 발명의 식품 조성물은 그 형태에 있어서 특별히 제한은 없으며, 예를 들어 통상의 형태 이외에, 유동식품, 경장영양식품, 건강식품, 유소아 식품 등의 형태로 제조될 수 있다. 계속적 섭취의 측면에서는 쌀밥이나 각종 조미료, 조합 유지나 마가린, 쇼트닝, 마요네즈, 드레싱 등의 유지 가공품이 가능하다. 또한, 형태는 고체 형상, 반고체 형상, 겔 형상, 액체 형상, 분말 형상 등 당업계에서 통상 사용되는 어떠한 형태도 이용가능하다. 또한, 본 발명의 식품 조성물은 과자, 가공식품, 조합 유지, 유제품, 음료, 비타민 복합제, 건강 기능성 식품류 등의 형태로 상품화할 수 있다. 추가로, 본 발명의 식품 조성물은 본 발명의 당단백질 이외에 여러 가지 영양제, 비타민, 전해질, 풍미제, 착색제 및 증진제, 펙트산, 알긴산, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알콜, 탄산음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있으며, 이러한 성분은 독립적으로 또는 조합하여 사용할 수 있다.

- [0039] 제3양태로서, 본 발명의 당단백질은 화장료 조성물로 이용될 수 있다. 본 발명의 당단백질을 함유한 화장료 조성물은 산화적 스트레스로 인한 증상, 예컨대 주름을 포함한 피부 노화 등을 억제 및 개선하는 효과를 나타낼 수 있다.
- [0040] 본 발명의 화장료 조성물은 본 발명의 당단백질에 추가적으로 피부학적으로 허용된 담체를 혼합하여 제조될 수 있다. 상기 피부학적으로 허용된 담체는 정제수, 오일, 왁스, 지방산, 지방산 알코올, 지방산 에스테르, 계면활성제, 흡습제, 증점제, 항산화제, 점도 안정화제, 킬레이팅제, 완충제, 방부제, 저급 알코올 등이 포함될 수 있지만, 이에 한정되는 것은 아니며, 그 종류와 농도는 다양하고, 당업자가 본 발명의 범위 내에서 변경할 수 있는 부분을 포함한다. 또한, 필요에 따라 기능적 물질, 예컨대, 미백제, 보습제, 항염증제, 항박테리아제, 향진균제, 비타민, 자외선 차단제, 향생제, 여드름 방지제, 향수, 염료가 포함될 수도 있으며, 이들은 화장품 분야에서 통상적으로 사용되는 양으로 본 발명에 따른 화장용 조성물에 포함될 수 있다. 본 발명의 화장료는 그 기능적 효과를 증대시키기 위하여 본 발명의 당단백질에 추가로 동일 또는 유사한 기능을 나타내는 항산화 활성 성분을 1종 이상 함유할 수 있다.
- [0041] 본 발명의 화장료 조성물로부터 제조되는 화장품은 일반적인 유화 제형 및 가용화 제형의 형태로 제조할 수 있다. 유화 제형의 화장품으로는 영양화장수, 크림, 에센스 등이 있으며, 가용화 제형의 화장품으로는 유연화장수가 있다. 상기 화장품은 본 발명의 당단백질 이외에도 피부학적으로 허용된 매질 또는 기제를 함유함으로써 당업계에서 통상적으로 사용되는 국소 적용 또는 전신 적용할 수 있는 보조제 형태로 제조될 수도 있다. 적합한 화장품의 제형으로는 예를 들면, 용액, 겔, 고체 또는 반죽 무수 생성물, 수상에 유상을 분산시켜 얻은 에멀전, 현탁액, 마이크로에멀전, 마이크로캡슐, 미세과립구 또는 이온형(리포솜), 비이온형의 소낭 분산제의 형태, 크림, 스킨, 로션, 파우더, 연고, 스프레이 또는 콘실 스틱(conceal stick)의 형태로 제공될 수 있다. 또한, 포말(foam)의 형태 또는 압축된 추진제를 더 함유한 에어로졸 조성물의 형태로도 제조될 수 있다. 본 발명의 화장료 조성물을 첨가할 수 있는 제품으로는, 예를 들어, 수렴화장수, 유연화장수, 영양화장수, 각종 크림, 에센스, 팩, 파운데이션 등과 같은 화장품류와 클렌징, 세안제, 비누, 트리트먼트 또는 미용액 등이 있다. 구체적인 제형으로서는 스킨로션, 스킨 소프너, 스킨토너, 아스트린젠트, 로션, 밀크로션, 모이스처 로션, 영양로션, 맛사지크림, 영양크림, 모이스처 크림, 핸드크림, 에센스, 영양에센스, 팩, 비누, 샴푸, 클렌징 폼, 클렌징로션, 클렌징크림, 바디로션, 바디클렌저, 유액, 프레스파우더, 루스파우더 또는 아이섀도 등의 제형을 포함한다.
- [0042] 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명하기로 한다. 그러나 이들 실시예는 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로서, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.
- [0043] <실시예 1>
- [0044] *S. japonica*로부터의 당단백질의 분리
- [0045] 건조된 *S. japonica*를 부산의 시장에서 구입하였다. *S. japonica*의 당단백질은 공지 방법(Go et al.(2009a). Glycoprotein extraction from Laminaria japonica promotes IEC-6 cell proliferation. International Journal of Molecular Medicine, 24, 819-824)을 변형하여 분리하였다. *S. japonica* 4g을 증류수 100 mL와 혼합하고 4시간 이상을 실온에서 배양하였다. 배양물을 12,000 rpm으로 30분간 원심분리하고, 상층액을 수거하였다. 상기 수거한 상층액에 3배 부피의 에탄올을 가하고 실온에서 6시간 이상 배양하였다. 응집된 부분은 와트만지(Whatman paper) (GE Healthcare, UK)를 사용하여 제거하였다. 여과물은 처음 회전증발기(rotary evaporator) (EYELA, Japan)로 부피를 줄이고 동결건조시켰다. 동결건조시킨 시료를 증류수(DW)로 재현탁하고, 투석한 뒤 실험에 사용하였다. 당단백질의 존재를 확인하기 위해 분리된 시료에 대해 15% 폴리아크릴아마이드 겔을 사용한 SDS-PAGE를 하고, CBB (Coomassie brilliant blue), 은 염색 및 PAS (periodic acid-Schiff staining)를 하였다. 또한, 280 nm에서 측정된 흡광도를 이용하여 분리된 당단백질의 단백질 농도를 측정하였고, 페놀황산법을 이용하여 총 탄수화물 양을 측정하였다(Dubois, M., et al. (1956). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. Analytical Chemistry, 28, 350-356).
- [0046] <실시예 2>

[0047] **항산화 활성 측정**

[0048] **<2-1> 항산화 활성**

[0049] 본 발명의 당단백질의 항산화 활성은 다음의 5가지 방법으로 측정하였다:

[0050] ① DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) 라디칼을 사용한 당단백질의 전자공여능력(EDA) 측정(Blois, M.S. (1958). Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. Nature, 181, 1199-1200);

[0051] ② ABTS (2,2'-azino-bis (3-ethylbenz-thiazoline-6-sulphonic acid)) 라디칼 소거 어세이(Re, R., et al. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. Free Radical Biology and Medicine, 26, 1231-1237);

[0052] ③ FRAP (ferric reducing/antioxidants power) 어세이(Benzie, I.F. & Strain, J.J. (1996). The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of 'antioxidant power': the FRAP assay. Analytical Biochemistry, 239, 70-76);

[0053] ④ SORS (superoxide radical.scavenging) 어세이(Liu, F., Ooi, V.E.C. & Chang, S.T. (1997). Free radical scavenging activities of mushroom polysaccharide extracts. Life Sciences, 60, 763-771); 및

[0054] ⑤ 피로갈롤(pyrogallol)을 사용한 SODA (superoxide dismutase-like activity) 어세이(Marklund, S. & Marklund, G. (1975). Involvement of superoxide aminoradical in the oxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. European Journal of Biochemistry, 47, 468-474).

[0055] DPPH 소거 활성, ABTS 소거 활성, SORS 활성 및 SODA 활성의 백분율은 다음의 식을 이용하여 계산하였다:

[0056] 억제율(%)=[(대조군의 흡광도 - 시료의 흡광도) / 대조군의 흡광도] × 100.

[0057] IC₅₀ 값은 최대 소거 능력의 50%를 얻는데 필요한 농도이다. 위 5개 어세이의 IC₅₀ 값은 공지의 방법(Kim, D.O., et al. (2002). Vitamin C equivalent antioxidant capacity (VCEAC) of phenolic phytochemicals. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 50, 3713-3717)으로 측정하였다.

[0058] 모든 실험 및 분석은 적어도 3반복으로 수행하였고, 본 발명의 모든 실험예에서 아스코르브산을 표준으로 사용하였다.

[0059] **<2-2> 산화질소(nitric oxide) 소거 어세이**

[0060] 공지의 방법(Jagetia, G.C., et al. (2004). The evaluation of nitric oxide scavenging activity of certain herbal formulations in vitro: a preliminary study. Phytotherapy Research, 18, 561-565.)을 약간 변형하여 NO 소거 어세이를 수행하였다. 다른 농도의 당단백질 50 μ l를 450 μ l의 SNP (sodium nitroprusside) (10 mM)와 혼합하고, 4시간 동안 배양하였다. 그 후 동일한 양의 그리스(Griess) 시약을 첨가하고 실온에서 10분간 반응시켰다.

[0061] **<2-3> 잔틴 산화효소 억제 활성**

[0062] 공지의 방법(Parejo, I., et al. (2002). Comparison between the radical scavenging activity and antioxidant activity of six distilled and nondistilled Mediterranean herbs and aromatic plants. Journal of Agriculture and Food Chemistry, 50, 6882-6890)을 약간 변형하여 잔틴(xanthine) 산화효소 억제 활성을 측정하였다. 먼저, 다른 농도의 당단백질 100 μ l를, 50 μ M 잔틴 및 0.1 mM EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid)를 함유한 200mM 인산염 버퍼(pH 7.5) 500 μ l와 혼합시켰다. 그 후, 100 μ l의 잔틴 산화효소(4.5 U/mL)를 혼합물에 첨가하고 37℃에서 1시간 이상 배양하였다. 배양 후에, 100 μ l의 0.58 N HCl 을 첨가하고, 290 nm에서 흡광도를 측정하였다. 아스코르브산을 양성 대조군으로 사용하였고, 결과들은 처리 및 무처리 시료들 모두에 대해 백분율로 나타내었다.

[0063] <실시예 3>

[0064] DNA 보호 효과

[0065] 산화를 유발하기 위하여, 1 mM 아스코르브산 및 100 μ M Cu(II) 황산염 (sulphate)을 처리하여 히드록실 (hydroxyl) 라디칼을 만들었다. 상기 반응용액에 λ DNA를 첨가한 후에, 50 μ l의 당단백질(1 mg/mL)을 첨가하였다. 증류수를 대조군으로 사용하였다. 상기 용액을 37℃에서 1시간 동안 반응시킨 후, DNA 분해 여부를 1% 아가 로오스 겔을 사용한 전기영동으로 확인하였다.

[0066] <실시예 4>

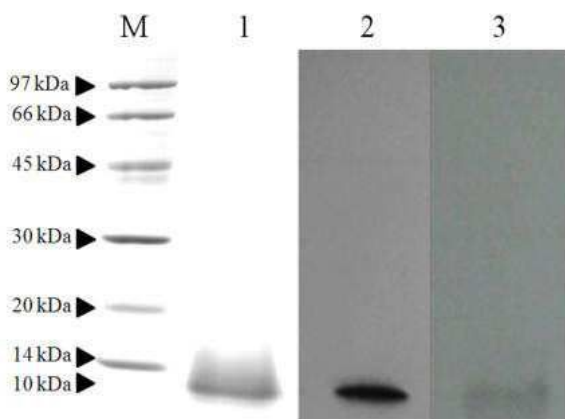
[0067] 당단백질의 항산화 안정성 측정

[0068] *S. japonica*에서 분리한 본 발명의 당단백질의 항산화 활성에 대해 온도, pH, 금속 이온, 프로나아제(pronase) E 및 NaIO₄가 미치는 영향을 공지의 방법(Oh & Lim, 2008)을 약간 변형하여 측정하였다. 온도가 미치는 영향을 측정하기 위하여, 각각의 당단백질을 30-100℃에서 1시간 동안 배양한 후에 DPPH 어세이를 수행하였다. pH에 대해서는, 100 μ l의 당단백질(1 mg/mL)을 각각의 버퍼(50 mM sodium acetate-acetic acid (pH 4-5); 50 mM maleic acid-NaOH (pH 6); 50 mM Tris-HCl (pH 7-8); 및 50 mM glycine-NaOH (pH 9-10)) 900 μ l에 녹이고, 1시간 동안 실온에서 배양하였다. 상기 반응은 2배 부피의 0.3 N NaCl을 가하여 멈추었다. 금속 이온의 영향을 실험하기 위해, 800 μ l의 10mM EDTA를 100 μ l의 당단백질(1 mg/mL)과 혼합하고, 4℃에서 20시간 동안 배양한 후, 20 mM Tris.HCl (pH 8.0)을 사용하여 오버나이트로 투석하였다. 투석된 시료를 2mM 금속 이온을 함유한 각각의 버퍼 (CaCl₂, MnCl₂, MgCl₂)와 혼합하고 2시간 동안 실온에서 반응시켰다. 프로나아제 E 및 과요오드산 나트륨 (sodium periodate) (NaIO₄)이 당단백질에 미치는 영향은 Shim & Lim (2009)에 따라 확인하였다. 처리 후에, DPPH 어세이를 수행하였다.

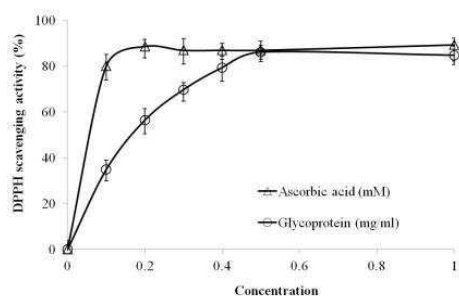
[0069] 이제까지 본 발명에 대하여 그 바람직한 실시예들을 중심으로 살펴보았다. 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자는 본 발명이 본 발명의 본질적인 특성에서 벗어나지 않는 범위에서 변형된 형태로 구현될 수 있음을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 개시된 실시예들은 한정적인 관점이 아니라 설명적인 관점에서 고려되어야 한다. 본 발명의 범위는 전술한 설명이 아니라 특허청구범위에 나타나 있으며, 그와 동등한 범위 내에 있는 모든 차이점은 본 발명에 포함된 것으로 해석되어야 할 것이다.

도면

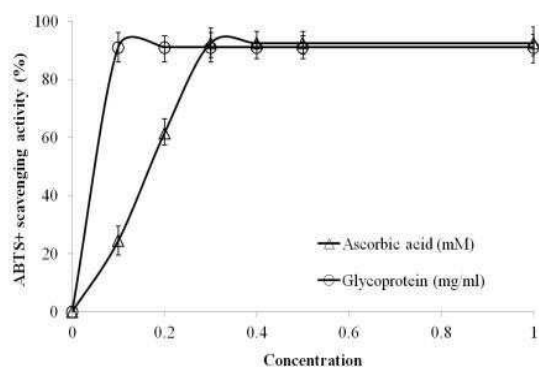
도면1



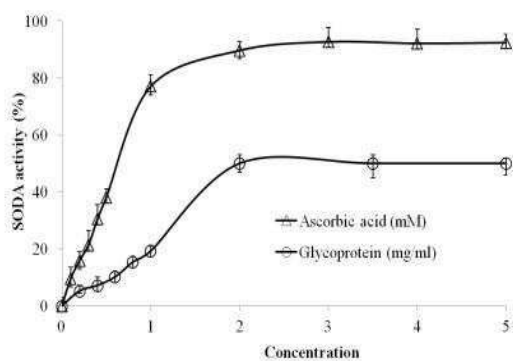
도면2a



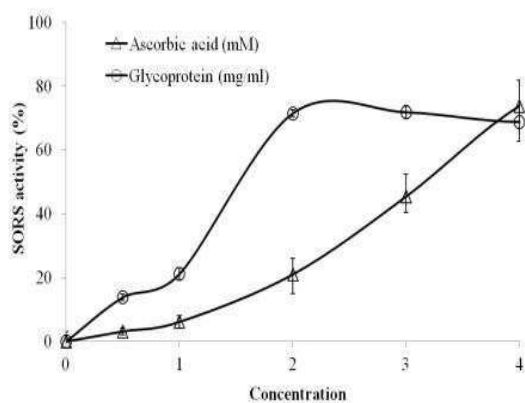
도면2b



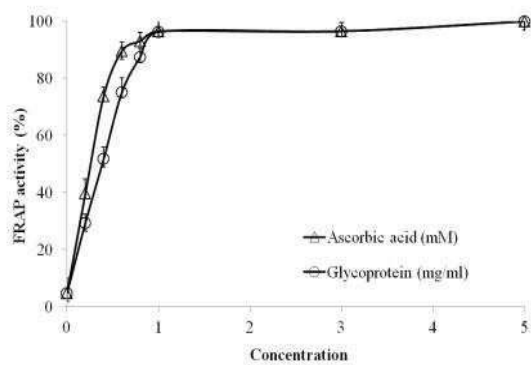
도면2c



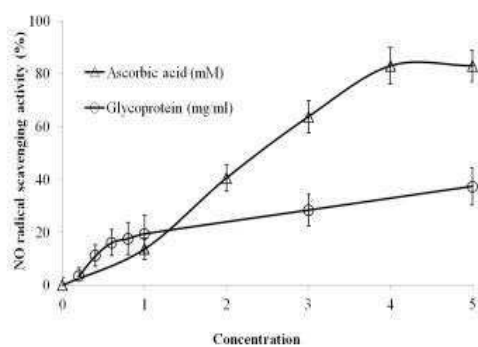
도면2d



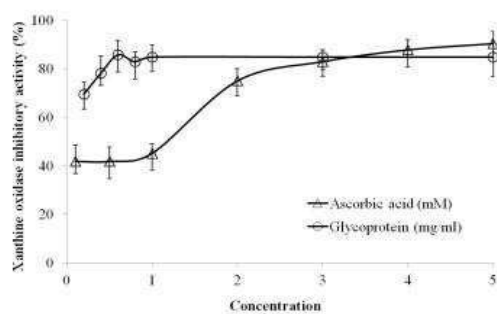
도면2e



도면3a



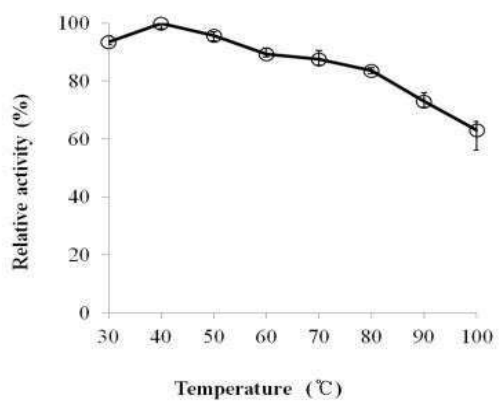
도면3b



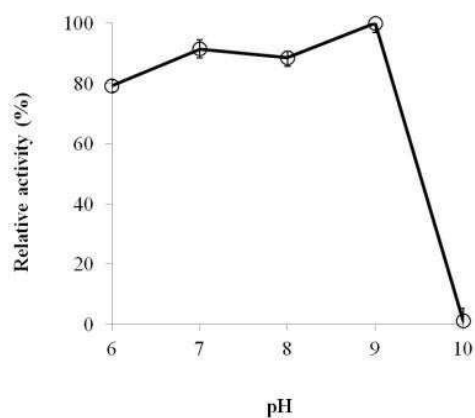
도면4



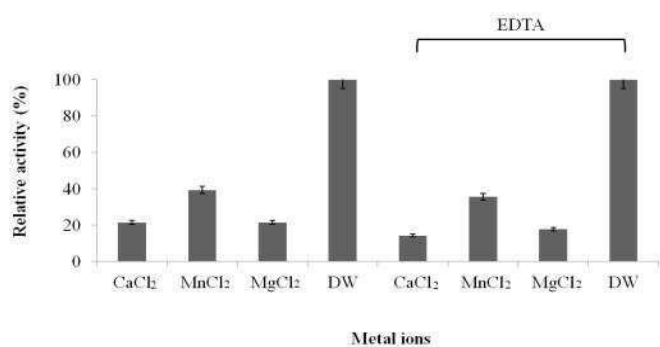
도면5a



도면5b



도면5c



도면6

