



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2015-0140382
(43) 공개일자 2015년12월15일

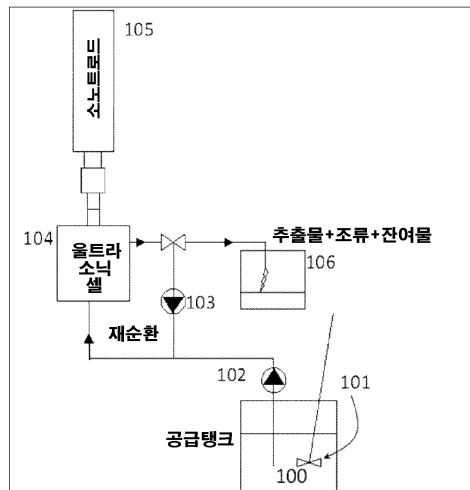
- (51) 국제특허분류(Int. C1.)
A61K 8/97 (2006.01) *A23L 1/30* (2006.01)
A61K 36/03 (2006.01) *A61K 8/34* (2006.01)
A61K 8/73 (2006.01) *A61K 8/96* (2006.01)
A61Q 19/00 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
A61K 8/975 (2013.01)
A23L 1/3002 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2015-7032242
- (22) 출원일자(국제) 2014년04월10일
심사청구일자 없음
- (85) 번역문제출일자 2015년11월10일
- (86) 국제출원번호 PCT/ES2014/070288
- (87) 국제공개번호 WO 2014/167162
국제공개일자 2014년10월16일
- (30) 우선권주장
P201330523 2013년04월12일 스페인(ES)
- (71) 출원인
유니버시다데 데 산티아고 데 콤포스텔라
스페인 E-15782 산티아고 데 콤포스텔라 캠퍼스
비다 에디피시오 엠프렌디아
- (72) 발명자
시네이루 또레스, 호르헤
스페인, (라 꼬루냐) 이-15782 산티아고 데 콤포스텔라 캠퍼스 비다 에디피시오 엠프렌디아
산체스 게레로, 마리엘
스페인, (라 꼬루냐) 이-15782 산티아고 데 콤포스텔라 캠퍼스 비다 에디피시오 엠프렌디아
누세스 가르시아, 마리아 호세
스페인, (라 꼬루냐) 이-15782 산티아고 데 콤포스텔라 캠퍼스 비다 에디피시오 엠프렌디아
- (74) 대리인
특허법인주원

전체 청구항 수 : 총 7 항

(54) 발명의 명칭 갈색 거대조류로부터의 산화방지제 추출물 및 그의 수득 방법

(57) 요 약

본 발명은 초음파-기반의 연속적 수성 추출을 이용하는 거대조류로부터 산화방지제 추출물을 수득하는 방법에 관한 것이다. 상기 공정은 신선한 조류 또는 건조 조류를 물에 재현탁시킨 후 이들을 이용하여 실행될 수 있다. 물에서의 조류의 혼탁액은 10 내지 30% 고체농도로 준비된다. 상기 혼합물은 초음파 파괴 시스템으로 넣어진다. 상기 추출물은 여과 및 동결건조되고, 총 폴리페놀 농도가 *Bifurcaria bifurcat*와의 동결건조물의 62.4 mg eq 폴로로글루시놀/g 및 *Ascophyllum nodosum*와의 동결건조물의 44 mg eq. 폴로로글루시놀/g 를 얻는다. 상기 추출물은 화장품 및 음식 제제들에서 구성요소로서 사용될 수 있다.

대 표 도 - 도1

(52) CPC특허분류

A61K 36/03 (2013.01)
A61K 8/347 (2013.01)
A61K 8/73 (2013.01)
A61K 8/96 (2013.01)
A61Q 19/00 (2013.01)
A23V 2200/00 (2013.01)
A61K 2800/10 (2013.01)
A61K 2800/522 (2013.01)
A61K 2800/82 (2013.01)

명세서

청구범위

청구항 1

하기의 특징을 가지는 갈색 거대조류로부터 수득된 수성의 산화방지제 추출물 및 그의 동결건조된 유도체:

- a) 탄수화물 함량은 한번(once) 동결건조된 추출물의 33 내지 156 mg 글루코오스/g 이고;
- b) 후코이단은 상기 샘플의 분해 후의 총 황산염으로 표현되며, 후코이단 함량은 한번(once) 동결건조된 추출물의 44 내지 118 mg 황산염/g 이고;
- c) 플로로타닌은 플로로글루시놀로 표현되며, 플로로타닌 함량은 한번(once) 동결건조된 추출물의 12 내지 62.4 mg 등가물 플로로글루시놀/g 이고; 및
- d) 알긴산염 함량은 한번(once) 동결건조된 추출물의 10 내지 55 mg 등가물 글루쿠론산/g 임.

청구항 2

제1항에 있어서, 자외선 영역에서 최대 흡광도는 260-280 nm 인 것을 특징으로 하는 추출물.

청구항 3

제1항에 있어서, 17.7 내지 23.7 mg 추출물/ml 인 EC₅₀ 값을 가지는 DPPH 라디칼의 저해능력을 특징으로 하는 추출물.

청구항 4

제1항 내지 제3항에 있어서, 상기 갈색 거대조류는 *Bifurcaria bifurcata*, *Ascophyllum nodosum*, *Saccorhiza polyschides* 및 *Sargassum muticum* 인 추출물.

청구항 5

하기 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 제1항 내지 제4항에 따른 신선한 또는 건조 갈색 거대조류로부터의 산화방지제 추출물의 수득방법:

- a) 신선한 거대조류를 이용할 경우 상기 거대 조류를 물로 세척하는 단계;
- b) 상기 거대조류를 액체/고체 (L/S) 비율 3 내지 5 g/g 로 물과 혼합하는 단계;
- c) 상기 혼합물을 분쇄하여 3 mm 미만의 입자크기의 분쇄된 거대조류를 얻는 단계;
- d) 상기 분쇄된 거대조류를 순수 에탄올 또는 1:1 v/v 비율의 에탄올:물 혼합물을 포함하는 액체 용제와 혼합하는 단계로, 액체/고체(L/S) 비율이 신선한 거대조류로부터 출발할때는 5 내지 15 (g/g) 이고 건조 거대조류로부터 출발할때는 50 내지 150 (g/g)인 단계;
- e) 상기 혼합물을 3 내지 13 W/cm³ 출력밀도(power density)의 초음파의 연속적 적용에 의한 세포 파괴 공정으로 이행시키는 단계;
- f) 이전 단계에서 얻은 상기 고체 조류 잔여물을 침전 및 이후의 원심분리 또는 여과에 의해 분리하는 단계;
- g) 상기 에탄올 또는 50%의 물을 40°C 미만의 온도의 진공하에서 제거하고, 농축된 추출물을 얻는 단계; 및
- h) 상기 농축된 추출물을 동결건조하여 동결건조된 추출물을 얻는 단계.

청구항 6

제 5항에 있어서, 상기 분쇄된 입자 크기는 건조 거대조류에 대해 0.5 내지 2 mm 이고 신선한 거대조류에 대해 0.5 내지 3 mm 인 방법.

청구항 7

제1항 내지 제4항에 따른 산화방지제 추출물의 화장품 및 식품 제제에서의 구성요소로서의 용도.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 해조류로부터 화합물들의 추출에 관한 것이다. 더욱 특별하게는, 본 발명은 갈색 거대조류로부터 산화 방지제의 추출에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 산화방지제들은 대형조류, 식물들, 및 특별히 과일들에 존재하는 2차 대사물질들이다. 그들은 기질의 산화를 저해 또는 예방하는 화합물들이다. 식품에서, 제약학적 및 화장품 산업들이 부틸레이티드 히드록시톨루엔(BHT), 프로필 갈레트(propyl gallate) 또는 부티로히드록시아니졸(BHA)과 같은 합성 산화방지제 화합물들이 주로 사용되었다. 포도 추출물, 로즈마리 추출물, 코코아 추출물, 등으로부터 비롯되는 것과 같은 천연의 산화방지제들은 그들의 낮은 독성 및 높은 산화방지 활성으로 인해 더 나은 것으로 받아들여지고 있다. 산화방지제 화합물들의 큰 패밀리(large family)는 우수한 항산화 활성을 나타내는 대형조류에 존재하는 플로로타닌(phlorotannins)이다.

[0003] 플로로타닌의 추출을 위한 몇몇의 프로토콜이 제안되어 왔으며, 그중에서 다음과 같은 크로마토그래피 컬럼들 (Antioxidant Effects of Phlorotannins Isolated from Ishige okamurae in Free Radical Mediated Oxidative Systems), Yanping, Z., Zhong-Ji Q., Yong L., Moon-Moo K., Sang-Hoon, L. & Se-Kwon K., J. Agric. Food Chem., 56, 7001-7009, 2008; Phenolic Compounds in the Brown Seaweed *Ascophyllum nodosum*: Distribution and Radical-scavenging Activities, Audibert, L., Fauchon, M., Blanc, N., Hauchard, D. & Ar Galla, E., Phytochemical analysis, 21, 399-405, 2010; Chemical components and its antioxidant properties in vitro: an edible marine brown alga *Ecklonia cava*, Li, Y., Qian, Z.J., Ryu, B., Lee, S.H., Kim, M.M. and Kim, S.K., Bioorg Med Chem 17, 1963-1973, 2009; Distribution and radical scavenging activity of phenols in *Ascophyllum nodosum* (Phaeophyceae), Breton, F., Cerantola, S. & Ar Gall E., Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, 399, 167-172, 2011,)에서 정제뿐 만 아니라, 메탄올, 헥산(hexane), 디클로로메탄, 클로로포름, 에틸 아세테이트 및 부탄올과 같은 유기 용제들을 주로 사용하는 순차적 액체-액체 분배를 언급하는 것이 가능하다. 그러나 이러한 공정들은 메탄올 또는 오가노할로겐(organohalogen) 화합물들과 식품 및 화장품에서 허용되지 않는 잔여물들(residues)을 생성한다. 게다가, 만일 물의 극성보다 더 낮은 극성이 요구되면, 상기 히드로알콜릭 혼합물(hydroalcoholic mixtures)이 석유 용제(petroleum solvent s)와는 반대되는 선택이다.

[0004] 용제로서 70% 아세톤 및 에틸 아세테이트의 이용이 "Phlorotannins as Radical Scavengers from the Extract of *Sargassum ringgoldianum*, Nakai, M., Kageyama, N., Nakahara, K. & Miki, W., Marine Biotechnology, 8, 409-414, 2006)"에서 보고되었다. 헥산을 이용한 제 1 지질 물질 제거상태 및 70%에서의 아세톤-물로의 차후의 플로로타닌의 추출이 갈조류 *Fucus vesiculosus*로부터 플로로타닌의 고성능 액체성 크로마토그래피 분석에 이용되었다(Koivikko, R., Loponen, J., Pihlaja, K. and Jormalainen, V., Phytochem. Anal. 18, pp. 326-332, 2007.) 순수 에탄올 및 60% 에탄올이 *Ascophyllum nodosum* 및 *Fucus vesiculosus* 과 같은 종들에서의 프로로타닌의 추출을 위하여 사용되었고, 석유(petroleum)나 디클로로메탄으로의 액체-액체 분획이 따랐다.(Evaluation of quantitative methods for the determination of polyphenols in algal extracts, Parys, R., Rosenbaum, A., Kehraus, S., Reher, G., Glombitza, K-W and K?nig, G.M. J. Nat. Prod., 1865-1870, 2007.)

발명의 내용

과제의 해결 수단

[0005] *Bifurcaria bifurcata* 및 *Ascophyllum nodosum* 와 같은 갈색 거대조류의 가공으로부터 얻어진 추출물들은 그들의 후코이단 및 플로로타닌 내용물로 인하여 식품, 화장품 및/또는 제약학적 이용을 위하여 적용될 수 있다. 높은 후코이단 함량은 이를 추출물들이 피부에 수분보유능력(wetting capability)을 갖도록 하며, 반면에 항산화 능력은 플로로타닌의 존재에 기인한다.

[0006] 강한 특징적인 향기를 가지지 않는 천연의 산물을 얻는 것이 다른 원하는 용도들을 방해하지 않기 위한 화장품 재료로서 이용을 위하여 바람직하며, 수성 추출 및 유기 용제를 사용하지 않는 것이 바람직하다. 추출물들의 추출 공정의 또 다른 바람직한 특징은 값이 싸고, 재생가능하게 사용되며, 독성이 작거나 없는 용제에 대한 것과, 위험하지 않은 그 조작에 관한 것이다. 조 추출물(Crude extracts) 또는 분리된 부분들은 종종 BHA (butyrohydroxyanisole) 또는 BHT (butyrohydroxytoluene)와 같은 합성 산화방지제들보다 더 큰 항산화 활성을 나타낸다.

[0007] 본 발명의 방법 목적은 조작 및 다른 생산물들을 첨가하기 쉽고 극소량의 용제가 없는 안정한 생산물을 얻기 위하여 물을 사용하도록 한다.

[0008] 갈색 거대조류로부터 산화방지제의 추출 방법은 다음을 포함한다:

[0009] a) 신선한(fresh) 대형조류를 사용할 경우 흐르는 물에 세척하고, 모래 및 착생식물(epiphytes)을 제거한 후에, 흡수용 종이(absorbent paper)로 건조시킨다. 건조 조류를 사용할 경우, 물로 세척하는 공정은 필요 없다.

[0010] b) 그리고 나서 건조조류 또는 신선한 조류를 물과 3 내지 5 g/g의 액체/고체(L/S) 비율로 혼합한다.

[0011] c) 이전 단계로부터의 혼합물은 그 후, 바람직하게는 블레이드 그라인더(blade grinder)에서, 건조 대형조류에 있어서 0.5 내지 2 mm, 신선한 대형조류에 있어서 0.5 내지 3 mm의 입자크기로 감소될 때 까지 분쇄 공정을 거친다.

[0012] d) 상기 분쇄된 거대조류를 순수 에탄올 또는 1:1 v/v 비율의 에탄올:물 혼합물을 포함하는 액체 용제와 혼합하는 단계로, 신선한 거대조류로부터 출발할 때는 5 내지 15 (g/g)이며 건조 거대조류로부터 출발할 때는 50 내지 150 (g/g)의 액체/고체 (L/S)비율을 가지며;

[0013] e) 상기 혼합물은 연속해서 적용되는 초음파에 의한 세포파괴 공정을 거친다.

[0014] f) 이전 단계에서 얻은 상기 고체 조류 잔여물을 침전 및 이후의 원심분리 또는 여과에 의해 분리시킨다.

[0015] g) 에탄올 또는 50%의 물은, 물이 사용된 경우에 한해, 40°C를 넘지 않는 진공하에서 제거된다.

[0016] h) 상기 농축된 추출물은 고체 추출물을 얻기 위해 동결건조된다.

[0017] 상기 생산물은 변형되는 것을 방지하기 위하여 5°C 이하에서 냉각되고 빛으로부터 차단되어 저장된다.

[0018] 또 다른 측면에서, 본 발명은 갈색 거대조류, 보다 구체적으로는 *Bifurcaria bifurcata*, *Ascophyllum nodosum*, *Saccorhiza polyschides* 및 *Sargassum muticum* 종의 거대조류의 가공으로부터 얻은 안정한 산화방지제 추출물에 관한 것이다.

도면의 간단한 설명

[0019] 도면에서 자세히 나타낸 실시형태들은 제한되지 않는 실시예의 방식으로 설명된다.

도 1은 연속적 거대조류 공급 시스템에서의 초음파-지원의 세포 붕괴에 대한 도식을 나타낸다.

도 2는 C18 역전-상태(reversed-phase) 컬럼 HPLC에 의한 플로로타닌의 탐지를 나타낸다.

도 3은 플로로글루시놀의 프로파일과 유사한 특유의 플로로타닌 프로파일과 함께 *Bifurcaria bifurcata* 추출물의 자외선 프로파일을 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0020] 본 발명의 특별한 실시형태에서 본 발명은 하기의 특징을 가지는 갈색 거대조류로부터 얻은 수성의 산화방지제 추출물에 관한 것이다. a) 탄수화물 함량은 동결건조물(lyophilizate)의 33 내지 156 mg 의 글루코오스/g ; b) 후코이단 함량, 상기 후코이단은 상기 샘플의 소화 후 총 황산염(sulfates)으로 표현되고, 동결건조물의 44 내지 118 mg 의 황산염(sulfates)/g 이고; c) 플로로타닌 함량, 상기 플로로타닌은 플로로글루시놀로서 표현되며, 동결건조물의 12 내지 62.4 mg 의 플로로글루시놀/g 등가물이며; 그리고 d) 알긴산(alginate)은 동결건조물의 10 내지 55 mg 등가물의 글루쿠론산(glucuronic acid)/g 이다.

[0021] 또 하나의 측면에서, 본 발명은 본 발명의 목적인 산화방지제 추출물을 포함하는 화장품 및/또는 식품 조성물에 관한 것이다.

- [0022] *Bifucaria Bifurcata*로부터 산화방지제의 추출방법 출원의 실시예는 실시예의 방식 및 보호범위에 제한이 없이 언급된다. 상기 추출은 항산화력 또는 추출될 화합물들의 양의 감소를 방지하기 위하여 연속적이며 40°C 미만의 온도 조건에서 수행된다.
- [0023] 도 1은 통과액 셀(flow-through cell)(104)에 배열된 소노트로드(sonotrode) (105)를 포함하는 초음파 생성 유닛으로 구성되며, 이는 주된 연동 펌프(peristaltic pump) (102) 및 또다른 재순환펌프(recirculating pump) (103)에 의해 공급되는 연속적 거대조류 공급 시스템에서의 초음파-지원된 세포 봉괴에 대한 도표를 타나낸다.
- [0024] 본 발명의 특별한 실시형태에서 수성 항산화 화합물의 추출 공정은 하기의 단계들을 포함한다:
- [0025] a) 120 g 의 신선한 거대조류를 음용 적합한 물 및 그후에 중류수로 세척하였다.
- [0026] b) 300 ml 의 물을 가하였다.
- [0027] c) 상기 거대조류를 10분동안 블레이드 믹서를 작동하여 사전 분쇄하여 3 mm 미만의 입자크기를 얻었다.
- [0028] d) 물을 이전의 단계에서 얻은 물질(preparation)에 L/S 비율 10이 되도록 가하였고, 이를 공급 탱크(100)에 도입하고 교반기(101)로 혼합하였다.
- [0029] 표 1에 기재된 추출 조건들 중 하나가 선택되었고, 이는 4 중심점들(center points)을 갖는 2^2 계승실험계획(factorial experimental design)을 요약한다.
- [0030] e) 연속적 초음파 추출 조건들은 출력의 파라미터들(적용된 공칭 출력(nominal power)의 진폭 또는 퍼센티지로서) 및 조류 브로스(broth)의 통과액 셀(소니케이션 또는 초음파 셀) (104) 내로의 유입량의 재순환 사이의 비율을 고려하였고, 소노트로드(sonotrode)(105)는 3 내지 13 W/cm³ 범위의 출력밀도를 가지고 상기 혼합물에 초음파를 연속적으로 적용한다. 표 1은 실험 설계를 위해 수행된 처리들(treatment)의 조합을 요약한다. 상기 추출 구성(set-up)은 도 1에서 보여진 하나와 같은 초음파 - 지원 추출 시스템을 필요로 한다.
- [0031] f) 상기 침전의 고체 잔여물이 남아 가라앉고 디캔팅에 의해 상청액으로부터 분리되었다.
- [0032] g) 다음 단계는 상기 상청액을 다시 원심분리 및 분리하는 것으로 구성되었다. 상기 상청액은 1200 ml 부피를 가지며, 이는 30°C 또는 실온에서 진공증발에 의해 500 ml 로 감소되었다.
- [0033] h) 동결 건조된 추출물(106)을 얻었고, 이러한 특별한 실시형태에서 이는 총부피 1400 ml 를 포함하며 마침내 고체 및 건조 추출물을 얻는다.

표 1

진폭	재순환 비	파워 W/cm ³	세포 내 체류시간(s)
1	1	13	9.2
1	-1	13	6.9
-1	1	7.2	9.2
-1	-1	7.2	6.9
0	0	10.1	8.28
0	0	10.1	8.28
0	0	10.1	8.28
0	0	10.1	8.28

- [0035] 표 1.- 4 중심점, 2^2 실험 설계. 진폭 조정(adjustment) 코드 -1, 0 및 1 은 진폭 50%, 70% 및 90%에 해당한다. 재순환 비 코드 -1, 0 및 +1 은 1, 1.5 및 2에 해당하며, 재순환 흐름 속도는 300 ml/분으로 일정하다.
- [0036] 신선한 거대조류로부터의 습기 기준(wet basis) 상의 추출물의 수확량은 2.9 - 6.6% (w/w) 범위 내이며; 반면 건조조류에 대한 추출물의 수확량은 27.7 내지 57.3% (w/w) 범위 이내이다; 각 조류 종류에 대한 분석된 수확량들은 표 2에 포함되어 있다.
- [0037] 동결건조되고 이후에 물에 재용해된 이 추출물의 워터 블랭크(water blank) 에 대한 최대 흡광도는 도 3에 나타낸 바와 같이 250 nm 내지 280 nm 이다.

[0038] **총 폴리페놀 함량:**

[0039] 폴리페놀이라는 용어는 식물들에 존재하는 화합물들의 모든 패밀리(family)를 의미하는 것으로 이해되며 벤조산 유도체들, 계피산(cinnamic acid) 유도체들, 플라보노이드들, 등과 같은 폐놀기를 포함하거나 폐놀기로부터 유도된다.

[0040] 상기 방법의 약간의 변형이 포스포몰리브딕 포스포텅스틱 산(phosphomolybdic phosphotungstic acid) 시약들과 함께 전체 석탄산(phenolics)의 비색법(Colorimetry)에서 제안되었다. Singleton & Rossi, Singleton, V. L.; Rossi, J. J. Am. J. Enol. Vitic., 16, 144-158, 1965 가 상기 수득된 추출물의 폴리페놀 함량을 알아내는데 이용되었다. 따라서, 물에 용해된 $500 \mu\text{l}$ 의 샘플이 사용되었고, 여기에 2.5 ml 의 폴린-시오칼투(Folin-Ciocalteu) 시약 및 2.0 ml 의 Na_2CO_3 가 첨가되었다. 상기 샘플들을 45°C 에서 15분 동안 배양한 후 흡광도는 765 nm 로 판독되었다.

표 2

종	수득률 (%), w/w) _{d.b.}	수득률 (%), w/w) _{w.b.}
<i>Ascophyllum nodosum</i>	38.0	6.6
<i>Bifurcaria bifurcata</i>	27.7	4.8
<i>Saccorhiza polyschides</i>	42.0	4.9
<i>Sargassum muticum</i>	57.3	2.9

[0042] 표 2.- 건조 및 습기 기준에서 수성 추출물들의 수득률. d.b.: $24 \text{ h} \times 45^\circ\text{C}$ 건조 고려

[0043] "항산화능을 평가하기 위한 자유 라디칼 방법의 이용(Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity)", Brand-Williams W, Cuvelier ME, Berset C. LWT Food Sci Technol 28:5-30 18 (1995)"에서 제안된 DPPH 라디칼의 저해 분석이 상기 추출물의 양자-공여 능력을 확인하는데 이용되었다. 상기 방법은 설명한 바와 같이 약간의 변형을 가지고 적용되었고 여기서, 상기 추출물의 수성 용액 $20 \mu\text{l}$ 가 상기 라디칼($6.9 \times 10^{-5} \text{ mol/l}$)의 메탄올 용액(methanolic solution) $980 \mu\text{l}$ 에 첨가되었다. 흡광도의 하락은 16분 이후 515 nm 로 기록되었다. DPPH 라디칼의 저해 퍼센티지가 공란의 기록과 대하여 계산되었다. *Ascophyllum nodosum* and *Bifurcaria bifurcata* 추출물들의 5 내지 40 mg/ml 의 농도범위들이 EC50을 결정하기 위하여 평가되었고, 그 결과는 각각 $23.73 \pm 3.83 \text{ mg}$ 추출물/ml 및 $17.68 \pm 2.2 \text{ mg}$ 추출물/ml 였다. 갈륨산 등가물들(gallic acid equivalents (GAE))로서 표현된 이러한 동일한 값들은 각각 1.08 ± 0.16 및 $1.04 \pm 0.13 \text{ mg GAE/ml}$ 에 해당한다.

표 3

종	총 당류	황산염	우론산 (Uronic acid)	총 폴리페놀	미량원소					
					Na	K	Mg	P	Ca	S
$\text{mg/g} \text{ 추출물}$										
<i>Ascophyllum nodosum</i>	115	50	47	44	70	46	9	2	6	18
<i>Bifurcaria bifurcata</i>	156	118	55	62.4	20	71	3	1	4	36
<i>Saccorhiza polyschides</i>	33	44	10	3	48	180	6	4	3	12
<i>Sargassum muticum</i>	122	70	40	12	44	87	23	4	5	19

[0045] 표 3. 4가지 갈조류 품종들로부터의 동결건조된 추출물들의 특징.

[0046] **다당류 함량**

[0047] 다당류라는 용어는 당류, 주로 헥소오스(hexoses) 및/또는 펜토오스(pentoses)로부터 형성된 폴리머들을 의미

하는 것으로 이해되며, 구조적 구성 요소 및 에너지 저장소로서 기능한다.

[0048] 상기 다당류 함량은 "Colorimetric method for determination of sugars and related substances, Dubois, M.; Gilles, K. A.; Hamilton, J. K.; Rebers, P. A.; Smith, F. Anal. Chem., 28, 350-356, 1956"에서 제안된 폐놀-황산법(phenol-sulfuric acid method)에 의해 결정되었다. macroalga *Bifurcaria bifurcata*로부터 수득된 추출물의 평균 탄수화물 함량 156.7 mg 의 글루코오스/g 가 수득되었고, 유사한 조건에서 *Ascophyllum nodosum* 의 함량보다 29% 더 크다. 후코이단은, 조류의 다당류 특성의 패밀리를 의미하는 것으로 이해되며, 이는 황산화 당류인 푸코오스의 유도체의 중합에 의해 형성된다.

[0049] 평균 후코이단 함량은 "Determination of inorganic sulphate in studies on the enzymic and non-enzymic hydrolysis of carbohydrate and other sulphate esters, Dodgson, Dodgson, K. S., Biochem. J., 78, pp. 312-317, 1961"에서 설명된 방법에 의해 확인되며, 이는 상기 샘플을 분해한 후 총 황산염으로서 표현된다. *Bifurcaria bifurcata* 추출물에서 평균값은 리포필레이트의 118 mg 의 황산염/g이며, 유사한 조건들에서 수득한 *Ascophyllum nodosum* 추출물보다 134% 더 많다. ICP-OES 테크닉들(평균 동결건조물의 36.3 mg S/g)에 의해 확인된 황 수준들은 *Ascophyllum nodosum* (평균 18.14 mg/g)에 대하여 수득된 수준들보다 두배이다.

[0050] 조류에서의 주요 다당류들은 소위 알긴산염(alginates)이며 주로 글루쿠론산의 중합에 의해 형성된다.

[0051] 상기 알긴산염 함량은 "New method for quantitative determination of uronic acids, Blumenkrantz et al., Blumenkrantz, N. and Asboe-Hansen, G. Anal. Biochem, 54, pp. 484-489, 1973"에서 제안된 방법에 따라서 우론산(uronic acids) 함량으로부터 평가되었다. *Bifurcaria bifurcata* 추출물은 우론산으로 표현되며 글루쿠론산을 표준으로 이용하여 동결건조물의 55.1 mg/g 인 평균 알긴산염 함량을 나타냈고, 동일한 조건에서 수득한 *Ascophyllum nodosum* 추출물보다 15% 더 많다.

총 폴리페놀의 분광광도법적 측정(Spectrophotometric determination)

[0053] 총 폴리페놀의 측정을 위한 폴린-시오칼투(Folin-Ciocalteu) 방법이 플로로글루시놀을 기준으로 이용하여 사용되었다. *Bifurcaria bifurcata* 추출물에서 평균 총 폴리페놀 함량은, 상기 폴리페놀은 주로 플로로타닌이었고, 동결건조물의 62.4 mg 등가물의 플로로글루시놀/g이며, *Ascophyllum nodosum* 으로부터 수득된 것보다 7.3% 더 많다.

플로로타닌의 크로마토그래피적 탐지:

[0055] 플로로타닌 용어는 플로로글루시놀(1,3,5-trihydroxybenzene)의 중합에 의해 생성된 폴리머들을 의미하는 것으로 이해되며, 카테킨/에피카테킨 및 그 유도체들의 중합에 의해 형성된 탄닌(tannin)과 유사하다. 탄닌들은 식물에서 세포벽 구성요소이며 플로로탄닌들은 거대조류에서 세포벽 구성요소이다.

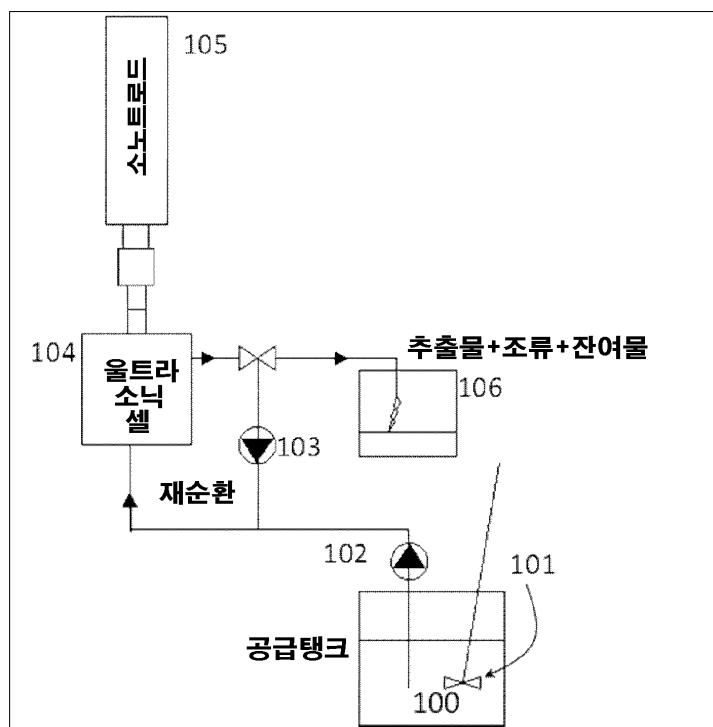
[0056] 플로로타닌은 "High-performance liquid chromatographic analysis of phlorotannins from the brown alga *Fucus vesiculosus* Phytochem, Koivikko et al., 2007, Koivikko, R., Loponen, J., Pihlaja, K. and Jormalainen, V., Anal. 18, pp. 326-332, 2007"에서 제안된 방법론에 따라서 동결건조된 추출물로부터 추출되었고, 그 중 헥산(hexane)으로 세척하는 단계들은 제거되었다.

[0057] 95 mg 의 *Bifurcaria bifurcata* 추출물이 계량되고 25 ml의 물에 용해되었다; 플로로타닌은 이후 10 ml 의 아세톤/물: 7/3 혼합물로 4회 추출되었다. 샘플은 원심분리하고 상청액을 분리하였다. 상청액 부분들을 모으고 아세톤은 N₂ 스트림으로 제거하였다. 잔여물을 물에 재현탁하고 이후 동결건조하였다. 상기 동결건조물을 1 ml의 증류수에 고성능 액체 크로마토그래피(high-performance liquid chromatography) 장비로 주입할 준비를 하였다. 크로마토그래피 분리 방법은 "Toxicity and antioxidant activity in vitro and in vivo of two *Fucus vesiculosus* extracts, Zaragoza, M.C., Lopez, D., Saiz, M. P., Poquet, M., Perez, J., Puig-Parellada, P., Marmol, F., Simonetti, P., Gardana, C., Lerat, Y., Burtin, P., Inisan, C., Rousseau, I., Besnard, M., and Mitjavila, M.T. J. Agric. Food Chem, 56, pp. 7773-7780, 2008"에서 제안된 하나이다.

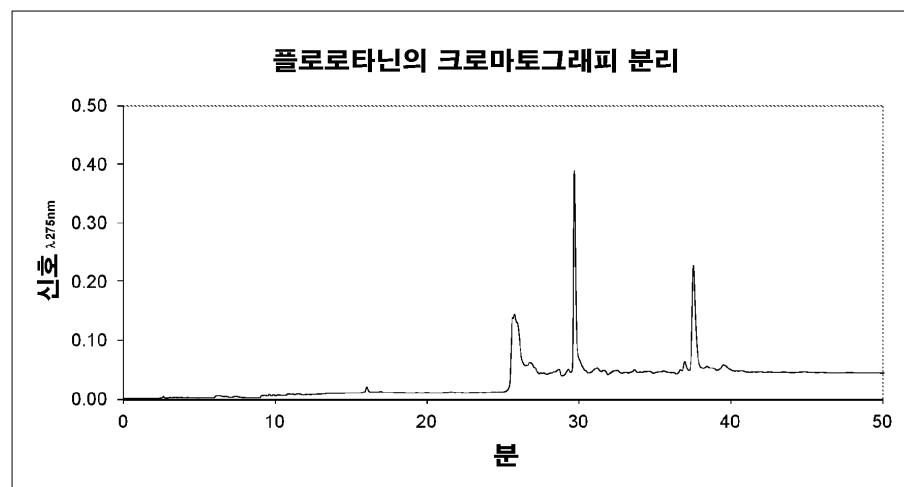
[0058] 도 2는 중심 피크들(5-6, 11 및 18)을 나타내며 그 신호는 25-26, 30 및 37 분에서 각각 탐지된다. 플로로타닌 혼합물의 최대 흡광도는 도 3에 나타낸 바와 같이 273 nm에서 관찰된다. 상기 자외선-가시광선(UV-Visible) 스펙트럼 프로파일은 플로로글루시놀 분자 기준의 프로파일과 일치한다.

도면

도면1



도면2



도면3

