



**(19) 대한민국특허청(KR)**  
**(12) 공개특허공보(A)**

(11) 공개번호 10-2023-0090440  
(43) 공개일자 2023년06월22일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
A61K 36/05 (2006.01) A61P 29/00 (2023.01)  
(52) CPC특허분류  
A61K 36/05 (2013.01)  
A61P 29/00 (2023.02)  
(21) 출원번호 10-2021-0179040  
(22) 출원일자 2021년12월14일  
심사청구일자 2021년12월14일

(71) 출원인  
재단법인 환동해산업연구원  
경상북도 울진군 죽변면 해양과학길 22  
(72) 발명자  
우정희  
경북 울진군 울진읍 월변1길 12-5, 한울빌 501호  
박년호  
경북 울진군 근남면 노음5길 7, 가동 301호  
(뒷면에 계속)  
(74) 대리인  
최경수

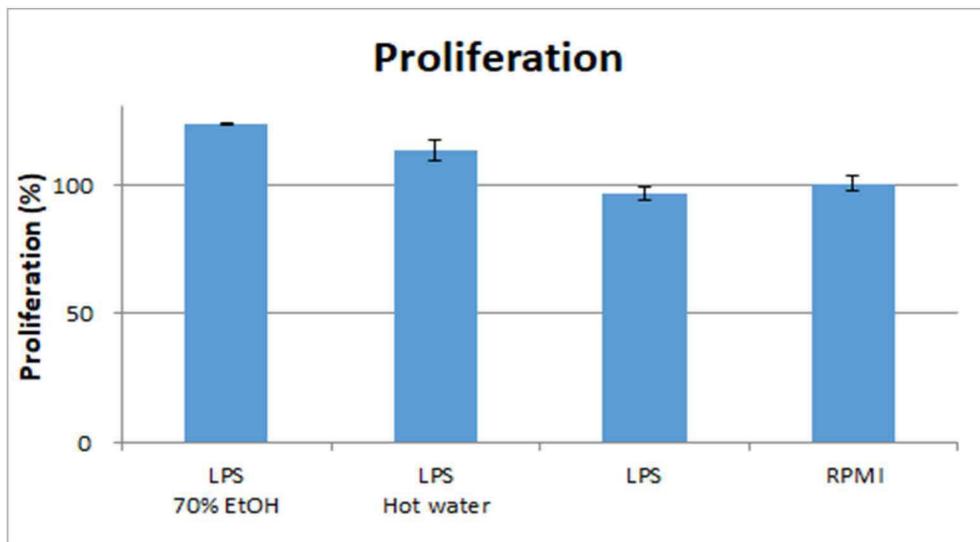
전체 청구항 수 : 총 5 항

(54) 발명의 명칭 생리활성을 가지는 사카이대마디말 추출물 및 그 제조방법

(57) 요약

본 발명은 생리활성을 가지는 사카이대마디말 추출물 및 그 제조방법에 관한 발명으로, 천연에서 채취한 사카이대마디말을 유효성분으로 포함하는 생리활성을 가지는 사카이대마디말 추출물을 구성하며, 사카이대마디말 추출물은 70% 에탄올 또는 열수 중에서 선택된 추출용매로 추출한 것으로 이루어지고, 항염, 항균, 항비만 작용을 하도록 구성함에 따라 기존에 각종 염증성 질환 치료에 사용되는 항염증제(NSAIDs)와 같은 화학요법제가 가진 부작용 및 약물저항성 문제를 극복할 수 있는 것이 특징이다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류  
A61K 2236/30 (2013.01)

(72) 발명자

**김해선**

경북 울진군 북면 울진북로 2149, 217동 1101호

**이재광**

전라북도 전주시 만성로 147 만성에코르1단지 104동 206호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1405005093
과제번호	2021407D10-2125-0101
부처명	해양수산부, 산림청
과제관리(전문)기관명	한국임업진흥원
연구사업명	농림해양기반 스마트 헬스케어(RnD)
연구과제명	해양치유자원의 활용현황 및 관리항목 도출
기 여 율	1/1
과제수행기관명	고려대학교산학협력단
연구기간	2021.04.01 ~ 2021.12.31

---

**명세서**

**청구범위**

**청구항 1**

사카이대마디말을 유효성분으로 포함하는 생리활성을 가지는 사카이대마디말 추출물.

**청구항 2**

제 1 항에 있어서,

상기 사카이대마디말 추출물은, 70% 에탄올 또는 열수 중에서 선택된 추출용매로 추출한 것을 특징으로 하는 생리활성을 가지는 사카이대마디말 추출물.

**청구항 3**

제 1 항에 있어서,

상기 사카이대마디말 추출물은, 항염, 항균, 항비만 작용을 하는 것을 특징으로 하는 생리활성을 가지는 사카이대마디말 추출물.

**청구항 4**

바다에서 채취한 사카이대마디말 원물을 세척 후 동결건조하고 분쇄하여 사카이대마디말 분말을 수득하는 단계와,

상기 사카이대마디말 분말에 70% 에탄올을 첨가하여 진탕 추출하고 원심분리를 통해 잔사를 제외한 상등액을 필터로 여과하여 1차 사카이대마디말 추출물을 수득하는 단계와,

상기 사카이대마디말 잔사에 70% 에탄올을 첨가하여 재차 진탕 추출하고 원심분리 및 필터를 통해 상등액으로 2차 사카이대마디말 추출물을 수득하는 단계와,

상기 1차 사카이대마디말 추출물 및 2차 사카이대마디말 추출물을 혼합하고 혼합물의 중량대비 70%로 진공 농축하는 단계와,

상기 농축된 사카이대마디말 추출물을 동결 건조하여 생리활성을 가지는 사카이대마디말 추출물을 수득하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 생리활성을 가지는 사카이대마디말 추출물 제조방법.

**청구항 5**

바다에서 채취한 사카이대마디말 원물을 세척 후 동결건조하고 분쇄하여 사카이대마디말 분말을 수득하는 단계와,

상기 사카이대마디말 분말에 3차 증류수를 첨가하고 90 ~ 100℃에서 가열하여 1차 사카이대마디말 추출물을 수득하는 단계와,

1차 사카이대마디말 추출물을 상온에서 식힌 후 원심분리를 통해 잔사를 제외한 상등액을 필터로 여과하여 2차 사카이대마디말 추출물을 수득하는 단계와,

상기 2차 사카이대마디말 추출물을 중량대비 50%로 진공 농축하는 단계와,

상기 1, 2차 농축된 사카이대마디말 추출물을 합쳐서 동결 건조하여 생리활성을 가지는 사카이대마디말 추출물을 수득하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 생리활성을 가지는 사카이대마디말 추출물 제조방법.

**발명의 설명**

**기술 분야**

본 발명은 생리활성을 가지는 사카이대마디말 추출물 및 그 제조방법에 관한 발명으로서, 더욱 상세하게는 천연

[0001]

에서 채취한 사카이대마디말로부터 인체에 유익한 생리활성을 가지는 유효성분을 함유하는 추출물을 제공함으로써 기존의 화학요법제의 사용에 따른 제반 문제점을 극복하게 하는 추출물과 그 제조방법에 관한 것이다.

### 배경 기술

- [0002] 일반적으로, 염증은 특정 조직의 손상 또는 감염에 대한 생체 내 면역반응으로서 면역세포는 이러한 조직의 손상을 최대한 억제하도록 작용한다.
- [0003] 면역세포의 일종인 대식세포(macrophage)는 종양괴사인자알파(tumor necrosis factor- $\alpha$ :TNF- $\alpha$ ), 인터루킨 1 $\beta$ (interleukin-1 $\beta$ :IL-1 $\beta$ ), IL-6와 같은 염증성 사이토카인(cytokine)을 생성, 분비한다.
- [0004] 또한, 대식세포를 자극하여 사이토카인을 방출시키는 염증 수용체 중 하나인 리포다당류(Lipopolysaccharide:LPS)는 염증 반응 인자를 활성화시켜 인듀시드 산화질소 합성효소(inducible Nitric oxide synthase:iNOS), 시클로옥시게나제-2(cyclooxygenase-2:COX-2)를 발현시키고, 염증성 매개물질인 산화질소(Nitric oxide:NO)와 프로스타글란딘 E2(Prostaglandin E2:PGE2)를 생성하여 염증반응을 촉진한다.
- [0005] 특히 iNOS는 고농도의 NO를 생산하여 질산화 반응, 산화 반응을 일으키는 등 항염 및 항균 작용에 깊게 관여하는 것으로 알려져 있다.
- [0006] 그러나, 이러한 염증성 사이토카인 및 염증성 매개물질이 인체 내에 과도하게 생성되면 염증 반응의 항진으로 인해 정상 세포 및 조직의 괴사를 심화하고 패혈증, 신경조직의 손상, 자가 면역 질환 등의 만성 염증성 질환을 유발하여 생체에 유해한 작용을 일으킨다.
- [0007] 기존에는 이와 같은 다양한 염증성 질환 치료제로서 스테로이드와 비스테로이드성 항염증제(NSAIDs)가 주로 사용된다.
- [0008] 종래 공지된 기술을 참고하여 항염증제의 구성 및 작용을 개략적으로 살펴보면, 한국공개특허 제 10 - 2002 - 0086945 호에는 파라세타몰 또는 비스테로이드성 항염증제(NSAID), 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염 또는 용매화물, 및 다른 약제와 필요에 따라 1종 이상의 약학적으로 허용 가능한 담체를 포함하는 조합물로서, 다른 약제가 미르타자핀, 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염 또는 용매화물로 이루어지는 비스테로이드성 항염증제를 포함하는 약제조합물을 제공한다.
- [0009] 다른 예로서, 한국공개특허 제 10 - 2016 - 0046138 호에는 아스피린, 나프록센, 이부프로펜, 아세클로페낙, 멜록시캄, 텍시부프로펜, 세타미노펜, 디플루니살, 살살라테, 나트륨 살리실레이트, 신녹시캄, 피록시캄, 테녹시캄, 디클로페낙, 에토돌락, 케노롤락, 슬린닥, 펜부펜, 플루르비프로펜, 케토프로펜, 트리아프로펜산, 페노프로펜, 옥사프로진, 플루페남산, 메페남산, 메클로페나메이트, 툴페남산, 에토페나메이트 및 인도메타신으로 이루어진 군으로부터 선택되는 비스테로이드성 항염증제를 함유하는 병원성 미생물에 의한 감염성 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물을 개시한다.
- [0010] 한편, 또 다른 종래 기술에서는 천연 유래 물질을 원료로 하는 항염 등에 활성을 가지는 제제들에 관한 기술이 공지된 바, 예컨대 한국등록특허 제 10 - 0530274 호에는 삼백초 추출물 및 이를 함유하는 조성물에 관한 것으로서, 다양한 자극에 의해 발현하는 염증 인자의 활성화를 억제하고, 항염증 메커니즘을 증대하는 효소들을 저해하여 통증(급성 통증, 만성 통증, 염증성 통증, 신경병적 통증, 수술 후 통증, 편두통, 관절통) 및 염증성 질환의 예방 및 치료에 효과적이고 안전한 조성물이 개시되어 있다.

### 선행기술문헌

#### 특허문헌

- [0011] (특허문헌 0001) 한국공개특허 제 10 - 2002 - 0086945 호 (2002.11.20)
- (특허문헌 0002) 한국공개특허 제 10 - 2016 - 0046138 호 (2016.04.28)
- (특허문헌 0003) 한국등록특허 제 10 - 0530274 호 (2005.11.22)
- (특허문헌 0004) 한국등록특허 제 10 - 0878331 호 (2009.01.14)

**발명의 내용**

**해결하려는 과제**

- [0012] 상술한 바와 같이 종래에는 다양한 염증성 질환 치료 및 개선을 위해 스테로이드, 비스테로이드성 항염증제 (NSAIDs)를 기본적으로 사용하고 있다.
- [0013] 그러나, 이러한 화학요법제들은 항염증 효과의 이면에, 각종 심혈관계나 소화계 등에 심각한 부작용 발생 우려가 있다.
- [0014] 특히, 항염증제의 광범위한 사용으로 인해 약물저항성 문제가 심각하게 제기되면서 대안 치료의 필요성이 대두되고 있다.
- [0015] 따라서, 본 발명은 항염, 항균, 및 항비만에 대한 생리활성을 가지는 유효성분을 포함하는 추출물을 제조하여 기존의 화학요법제가 가진 각종 부작용 및 약물저항성 문제를 극복하고자 한다.

**과제의 해결 수단**

- [0016] 이에 본 발명은 상술한 바와 같은 종래 기술의 문제점을 해결하기 위하여 발명한 것으로서,
- [0017] 천연에서 채취한 사카이대마디말을 유효성분으로 포함하는 생리활성을 가지는 사카이대마디말 추출물을 구성한다.
- [0018] 상기 사카이대마디말 추출물은, 70% 에탄올 또는 열수 중에서 선택된 추출용매로 추출한 것으로 구성한다.
- [0019] 상기 사카이대마디말 추출물은, 항염, 항균, 항비만 작용을 하도록 구성한다.
- [0020] 또한, 생리활성을 가지는 사카이대마디말 추출물 제조방법으로서, 바다에서 채취한 사카이대마디말 원물을 세척 후 동결건조하고 분쇄하여 사카이대마디말 분말을 수득하는 단계와,
- [0021] 상기 사카이대마디말 분말에 70% 에탄올을 첨가하여 진탕 추출하고 원심분리를 통해 잔사를 제외한 상등액을 필터로 여과하여 1차 사카이대마디말 추출물을 수득하는 단계와,
- [0022] 상기 사카이대마디말 잔사에 70% 에탄올을 첨가하여 재차 진탕 추출하고 원심분리 및 필터를 통해 상등액으로 2차 사카이대마디말 추출물을 수득하는 단계와,
- [0023] 상기 1차 사카이대마디말 추출물 및 2차 사카이대마디말 추출물을 혼합하고 혼합물의 중량대비 70%로 진공 농축하는 단계와,
- [0024] 상기 농축된 사카이대마디말 추출물을 동결 건조하여 생리활성을 가지는 사카이대마디말 추출물을 수득하는 단계를 포함한다.
- [0025] 또한, 생리활성을 가지는 사카이대마디말 추출물 제조방법으로서, 바다에서 채취한 사카이대마디말 원물을 세척 후 동결건조하고 분쇄하여 사카이대마디말 분말을 수득하는 단계와,
- [0026] 상기 사카이대마디말 분말에 3차 증류수를 첨가하고 90 ~ 100℃에서 가열하여 1차 사카이대마디말 추출물을 수득하는 단계와,
- [0027] 1차 사카이대마디말 추출물을 상온에서 식힌 후 원심분리를 통해 잔사를 제외한 상등액을 필터로 여과하여 2차 사카이대마디말 추출물을 수득하는 단계와,
- [0028] 상기 1, 2차 사카이대마디말 추출물을 혼합하여 중량대비 50%로 진공 농축하는 단계와,
- [0029] 상기 농축된 사카이대마디말 추출물을 동결 건조하여 생리활성을 가지는 사카이대마디말 추출물을 수득하는 단계를 포함하여 구성함으로써,
- [0030] 기존에 각종 염증성 질환 치료에 사용되는 항염증제(NSAIDs)와 같은 화학요법제가 가진 부작용 및 약물저항성 문제를 극복할 수 있는 목적 달성이 가능하다.

**발명의 효과**

- [0031] 본 발명은 천연에서 채취한 사카이대마디말로부터 인체에 유익한 생리활성을 가지는 유효성분을 함유하는 추출

물을 제공한다.

[0032] 특히, 본 발명은 종래 다양한 염증성 질환에 사용되는 스테로이드, 비스테로이드성 항염증제(NSAIDs)에 의한 약제 저항성, 또는 약물 내성 균주의 출현에 따른 제반 문제점을 극복하도록 천연 사카이대마디말을 이용해 항염, 항균, 항비만 등의 작용에 생리활성을 가지는 추출물을 제공하는 효과가 있다.

[0033] 또한, 본 발명은 종래의 화학요법제가 가진 각종 부작용, 예컨대 각종 심혈관계나 소화계 장애 등의 문제를 최소화하고 천연 제제로서 약물저항성의 우려가 없으면서 염증 증상의 완화는 물론 비만 개선 효과를 도모할 수 있는 이점이 있다.

**도면의 간단한 설명**

[0034] 도 1은 본 발명에 따른 생리활성을 가지는 사카이대마디말 추출물의 면역세포 증식 및 독성 분석에 의한 항염 활성 실험 결과 그래프.

도 2는 본 발명에 따른 생리활성을 가지는 사카이대마디말 추출물의 NO 생성 억제능 분석에 의한 항염 활성 실험 결과 그래프.

도 3은 본 발명에 따른 생리활성을 가지는 사카이대마디말 추출물의 유전자 발현 분석에 의한 항염 활성 실험 결과 그래프.

도 4는 본 발명에 따른 생리활성을 가지는 사카이대마디말 추출물의 항균 활성 실험 결과 이미지.

도 5 및 도 6은 본 발명에 따른 생리활성을 가지는 사카이대마디말 추출물의 항비만 활성 실험 결과 그래프.

도 7은 본 발명에 따른 생리활성을 가지는 사카이대마디말 추출물의 제 1의 방법을 도시하는 흐름도.

도 8은 본 발명에 따른 생리활성을 가지는 사카이대마디말 추출물의 제 2의 방법을 도시하는 흐름도이다.

**발명을 실시하기 위한 구체적인 내용**

[0035] 이하, 본 발명의 생리활성을 가지는 사카이대마디말 추출물 및 그 제조방법의 바람직한 실시 예에 따른 구성과 작용을 첨부 도면을 참조하여 상세히 설명하면 다음과 같다. 하기의 설명에서 당해 기술분야의 통상의 기술자가 용이하게 구현할 수 있는 부분에 대한 구체적인 설명은 생략될 수 있다.

[0036] 아울러 하기의 설명은 본 발명에 대하여 바람직한 실시 예를 들어 설명하는 것이므로 본 발명은 하기 실시 예에 의해 한정되는 것이 아니며 본 발명의 범주를 벗어나지 않는 범위 내에서 다양한 변형이 제공될 수 있음은 당연하다 할 것이다.

[0037] 본 발명의 기술이 적용되는 생리활성을 가지는 사카이대마디말 추출물 및 그 제조방법은 천연에서 채취한 사카이대마디말로부터 인체에 유익한 생리활성을 가지는 유효성분을 함유하는 추출물에 관한 것임을 주지한다.

[0038] '사카이대마디말(Cladophora sakaii Abbott)'은 녹조강 대마디말목 대마디말과의 해양식물로서 북태평양 서안에 주로 분포하며 우리나라에서는 동해 연안의 울릉도, 독도, 주문진, 울진, 영일만 등지에서 생육하는 종이다.

[0039] 사카이대마디말은 짙은 녹색의 식물체를 형성하고 실다발 형태로 가지를 이룬다. 뿌리를 암반에 부착하여 약 5 ~ 22cm 높이로 성장하며 중, 상부에서 세포 분열에 의해 생장이 이루어진다.

[0040] 본 발명의 생리활성을 가지는 사카이대마디말 추출물은 천연 사카이대마디말로부터 추출용매를 이용해 유효성분을 추출하여 농축한 건조분말로서 항염, 항균, 항비만에 대한 생리활성 작용을 하도록 구성한다.

[0041] 본 발명의 사카이대마디말 추출물은 70% 에탄올 또는 열수 중에서 선택된 추출용매로 추출하여 형성하는바, 이하에서는 본 발명의 기술이 적용된 사카이대마디말 추출물 제조방법은 하기와 같다.

[0042] [ 에탄올 추출을 이용한 추출방법 ]

[0043] 70% 에탄올 추출용매를 이용하여 생리활성을 가지는 사카이대마디말 추출물을 추출하기 위한 단계들은 다음과 같다.

[0044] (a) 사카이대마디말 분말을 수득하는 단계에서는, 바다에서 채취한 사카이대마디말 원물을 세척 후 동결건조하고 분쇄하여 사카이대마디말 분말을 수득(S10)한다.

[0045] (b) 1차 사카이대마디말 추출물을 수득하는 단계에서는, 상기 사카이대마디말 분말에 70% 에탄올을 첨가하여 진

탕 추출하고 원심분리를 통해 잔사를 제외한 상등액을 필터로 여과하여 1차 사카이대마디말 추출물을 수득(S20)한다.

- [0046] (c) 2차 사카이대마디말 추출물을 수득하는 단계에서는, 상기 사카이대마디말 잔사에 70% 에탄올을 첨가하여 재차 진탕 추출하고 원심분리 및 필터를 통해 상등액으로 2차 사카이대마디말 추출물을 수득(S30)한다.
- [0047] (d) 진공 농축하는 단계에서는, 상기 1차 사카이대마디말 추출물 및 2차 사카이대마디말 추출물을 혼합하고 혼합물의 중량대비 70%로 진공 농축(S40)한다.
- [0048] (e) 사카이대마디말 추출물을 수득하는 단계에서는, 상기 농축된 사카이대마디말 추출물을 동결 건조하여 최종 사카이대마디말 추출물을 수득(S50)한다.
- [0049] [ 열수 추출을 이용한 추출방법 ]
- [0050] 열수 추출용매를 이용하여 사카이대마디말 추출물을 추출하기에 적합한 방법의 바람직하고도 본 발명에 의하여 검증된 단계들은 다음과 같다.
- [0051] (a) 사카이대마디말 분말을 수득하는 단계에서는, 바다에서 채취한 사카이대마디말 원물을 세척 후 동결건조하고 분쇄하여 사카이대마디말 분말을 수득(S110)한다.
- [0052] (b) 1차 사카이대마디말 추출물을 수득하는 단계에서는, 상기 사카이대마디말 분말에 3차 증류수를 첨가하고 90 ~ 100℃에서 가열하여 1차 사카이대마디말 추출물을 수득(S120)한다.
- [0053] (c) 2차 사카이대마디말 추출물을 수득하는 단계에서는, 1차 사카이대마디말 추출물을 상온에서 식힌 후 원심분리를 통해 잔사를 제외한 상등액을 필터로 여과하여 2차 사카이대마디말 추출물을 수득(S130)한다.
- [0054] (d) 진공 농축하는 단계에서는, 상기 1, 2차 사카이대마디말 추출물을 합쳐서 중량 대비 50%로 진공 농축한다.
- [0055] (e) 사카이대마디말 추출물을 수득하는 단계에서는, 상기 농축된 사카이대마디말 추출물을 동결 건조하여 최종 사카이대마디말 추출물을 수득(S140)한다.
- [0056] 이하에서는 본 발명을 포함하는 실시 예를 구성하여 그에 따른 효과를 보다 면밀하게 파악하고자 한다.
- [0057] <실시 예 1 - 사카이대마디말 원료 준비>
- [0058] 경북 포항 방석리에서 채취한 사카이대마디말(*Cladophora sakaii* Abbott 1972) 원물을 수돗물로 깨끗이 세척한 후 동결건조하고 분쇄한 분말을 수득한다.
- [0059] <실시 예 2 - 70% 에탄올 추출용매 사카이대마디말 추출물 제조>
- [0060] 사카이대마디말 원료 분말 25g에 추출용매로서 70% 에탄올 250ml를 첨가한 것을 2개 반복(총 500ml)하고 25℃에서 진탕하여 1차 추출한 후 원심분리 및 페이퍼 필터를 통해 상등액을 수득한다.
- [0061] 잔사에 재차 70% 에탄올 250ml를 첨가하여 동일한 조건에서 2차 추출을 실시하였다.
- [0062] 1차 사카이대마디말 추출물 및 2차 사카이대마디말 추출물을 혼합하여(약 800ml 정도) 진공감압농축기로 70% 이상 농축한 후, 동결건조하여 에탄올 용매 사카이대마디말 추출물 분말을 회수하였다.
- [0063] <실시 예 3 - 열수 추출용매 사카이대마디말 추출물 제조>
- [0064] 사카이대마디말 원료 분말 40g을 삼각플라스크에 투입하고 추출용매로서 열수 2000ml를 첨가한 다음 약 90 ~ 100℃에서 30분간 가열한다.
- [0065] 상온으로 식힌 후 원심분리 및 페이퍼 필터를 통해 잔사를 제거하고 상등액을 수득한다. 상등액을 진공감압농축기로 50% 이상 농축한 후, 동결건조하여 열수 용매 사카이대마디말 추출물 분말을 회수하였다.
- [0066] <실시 예 4.1 - 면역세포 증식 및 독성 분석에 의한 항염 활성 실험>
- [0067] 상기 실시 예 2 및 실시 예 3에서 수득한 에탄올 용매 사카이대마디말 추출물 분말과 열수 용매 사카이대마디말 추출물 분말을 이용해 면역세포 증식 및 독성 분석 실험을 실시하였다.
- [0068] 마우스 유래 면역세포인 RAW 264.7 cell을 배양하여 96 웰(well)의 세포배양플레이트(cell culture plate)에  $1 \times 10^6$  cell/mL로 시딩(seeding)하였다.

- [0069] 세포를 24시간 동안 37℃, 5% CO<sub>2</sub> 조건에서 배양하였다.
- [0070] 그 후 1ug/ml 농도의 LPS를 처리하여 세포를 활성화시키고, LPS-induce 된 RAW 264.7 셀(cell)에 10ug/ml, 50ug/ml, 100ug/ml의 사카이대마디말 추출물을 처리하였다.
- [0071] 5시간 반응시킨 후 상층액을 제거하고, 세포에 이즈사이토스(ez-cytox: DoGen사(社)제품)를 처리하고 한 시간 반응 후 450nm에서 흡광도를 측정하였다.
- [0072] 면역세포 증식 및 독성 분석에 의한 항염 활성 실험 결과는 하기 도 1의 그래프와 같다. 사카이대마디말 70% 에탄올 추출물과 열수 추출물 모두 RAW 264.7 셀에 독성을 나타내지 않음을 확인할 수 있다.
- [0073] <실시 예 4.2 - 항염증 효과 분석에 의한 항염 활성 실험(Nitric oxide 생성 억제능)>
- [0074] 상기 실시 예 2 및 실시 예 3에서 수득한 에탄올 용매 사카이대마디말 추출물 분말과 열수 용매 사카이대마디말 추출물 분말을 이용해 Nitric oxide 생성 억제능을 확인하기 위한 실험을 실시하였다.
- [0075] 마우스 유래 면역세포인 RAW 264.7 셀을 배양하여 96 웰 세포배양플레이트에 1x10<sup>6</sup> cell/mL로 시딩하였다.
- [0076] 세포를 24시간 동안 37℃, 5% CO<sub>2</sub> 조건에서 배양하였다.
- [0077] 그 후 1ug/ml 농도의 LPS를 처리하여 세포를 활성화시키고, LPS-induce된 RAW 264.7 cell에 10ug/ml, 50ug/ml, 100ug/ml의 사카이대마디말 추출물을 처리하였다.
- [0078] 5시간 반응시킨 다음 상층액을 다른 플레이트에 100ul씩 옮겨준 후,
- [0079] 그리스시약(Griess reagent)를 100ul씩 처리하고, 30분 후 540nm 파장에서 흡광도를 측정하였다.
- [0080] NO의 농도는 아질산나트륨(NaNO<sub>2</sub>, Sigma-Aldrich)을 사용하여 얻은 표준 직선과 비교하여 산출하였다.
- [0081] Nitric oxide 생성 억제능 분석에 의한 항염 활성 실험 결과는 하기 도 2의 그래프와 같다. 사카이대마디말 70% 에탄올 추출물에서 NO 생성이 억제되었음을 확인할 수 있다.
- [0082] <실시 예 4.3 - 항염증 효과 분석에 의한 항염 활성 실험(유전자 발현 분석)>
- [0083] 상기 실시 예 2 및 실시 예 3에서 수득한 에탄올 용매 사카이대마디말 추출물 분말과 열수 용매 사카이대마디말 추출물 분말을 이용해 역전사 중합효소 연쇄반응(RT-PCR: Reverse transcription PCR) 실험을 실시하였다.
- [0084] 상기 실시 예 4.2와 같은 방법으로 LPS-induce RAW 264.7 셀에 10ug/ml, 50ug/ml, 100ug/ml의 사카이대마디말 추출물을 처리하였다.
- [0085] 5시간 반응 후, 상층액을 제거하고 트리졸시약(Trizol reagent)를 이용하여 세포로부터 RNA를 분리하였다. 그 후 RNA를 cDNA로 합성시켜준 후, 하기 표 1의 TNF- $\alpha$ , IL-6, iNOS,  $\beta$ -actin의 프리미어(primer)로 cDNA를 증폭한다.

**표 1**

Gene		Sequences
TNF- $\alpha$	Forward	AGGTTCTGTCCCTTTCACCTACTG
	Reverse	AGAAGACCTGGGAGTCAAGGTA
IL-6	Forward	TTCCTCTCTGCAAGAGACT
	Reverse	TGTATCTCTCTGAAGGACT
iNOS	Forward	CTGCAGCACTGGATCAGGAACCTG
	Reverse	GGGAGTAGC CTGTGTGCACCTGGAA
$\beta$ -actin	Forward	ATGTGCAAAAAGCTGGCCTTG
	Reverse	ATTTGTGGTGGATGATGGAGG

- [0087] 증폭된 각 단편은 아가젤(Agar gel)에 로드하고 전기영동(electrophoresis)을 통해 발현되는 밴드의 진하기를 확인하였다.

- [0088] 유전자 발현 분석에 의한 항염 활성 실험 결과는 하기 도 3의 그래프와 같다.
- [0089] 사카이대마디말 70% 에탄올 추출물의 농도가 증가할수록 염증성 사이토카인인 TNF- $\alpha$ , IL-6와, 염증성 매개물질인 NO를 생산하는 iNOS가 대조군인  $\beta$ -actin에 비해 감소되었음을 확인할 수 있다.
- [0090] 상술한 바와 같은 실시 예 4.1 내지 4.3을 통해 본 발명의 사카이대마디말 추출물은 TNF- $\alpha$ , IL-6과 같은 사이토카인을 방출시키는 LPS와, LPS에 의해 유도되는 염증 물질인 iNOS 유전자의 발현을 효과적으로 제어하여 염증성 매개물질인 NO의 생성을 억제시키는 작용에 효과가 있음을 확인하였다.
- [0091] <실시 예 5 - 항균 활성 실험>
- [0092] 사카이대마디말 추출물 시료를 다이메틸 설펑사이드(DMSO)로 녹여 20mg/ml(0.6mg/30ul)의 농도로 제작하였다. 병원균 8종(그람 음성 4종: E. coli, K. pneumoniae, V. parahaemolyticus, P. aeruginosa, 그람 양성 4종: S. aureus, L. monocytogenes, B. cereus, S. typhi) LB 배지에 37°C로 오버나이트 배양한 후 6X6 사각접시에 300ul 스프레딩한다.
- [0093] 8mm 종이 디스크에 시료 30ul씩 점적하였다.
- [0094] 시료가 충분히 스며들면 멸균된 핀셋으로 사각접시에 옮긴다. 37°C에서 오버나이트 후 클리어 존을 관찰하였다.
- [0095] 항균 활성 실험 결과는 하기 도 4와 같다. 사카이대마디말 70% 에탄올 추출물에서 바실루스 세레우스(B.cereus)에 대한 항균성이 관찰되었다.(붉은 상자, 종이디스크, 직경 11mm)
- [0096] <실시 예 6 - 항비만 활성 실험>
- [0097] 3T3-L1 섬유아세포(Fibroblast)가 배양 플라스크 면적의 70~80% 정도 차지하면 배지를 인산완충생리식염수(PBS)로 세척한다.
- [0098] 0.05% 트립신 EDTA(trypsin-EDTA)를 처리하여 세포를 떼 후, 배지로 중화시킨다.
- [0099] 세포를 시험관에 모아 1,000rpm, 3분 동안 원심분리한 후, 상층액을 제거하고 새 배지를 넣어 세포를 풀어준다. 세포수를 측정 한 후, 6 웰 플레이트에 웰 당 5 X 10<sup>5</sup> 셀이 되도록 분주한다. 세포가 부착되면 배지를 교환해주고 꼭 찰 때까지 배양한다.
- [0100] 메틸이소부틸산틴(Methylisobutylxanthine), 인슐린(insulin), 덱사메타손(dexamethasone)이 함유된 10% FBS/DMEM 분화용 배지로 교환하여 2일 더 배양한다. 1ug/ml 인슐린이 함유된 10% FBS/DMEM 배지로 교환하여 2일간 더 배양한다.
- [0101] 인슐린 함유 배지로 교환한 뒤부터 세포내에 지방구가 차는 것을 관찰할 수 있다.
- [0102] 10% FBS/DMEM 배지로 교환하여 2일 더 배양한다. 이 과정을 한 번 더 반복하고 2~3일 후 완전히 분화된 지방세포를 관찰할 수 있다.
- [0103] 분화가 종료되면 웰에 담긴 배지를 버리고 10% 포르말린을 1ml씩 넣고 5분간 둔다. 10% 포르말린을 버린 뒤 다시 10% 포르말린을 각 웰에 1ml씩 넣고 1시간 고정시킨다.
- [0104] 각 웰에 담긴 10% 포르말린을 버리고 60% 이소프로필 알코올(isopropyl alcohol)을 2ml씩 넣고 세척한 후 버리고 건조시킨다.
- [0105] 준비해둔 오일레드 0 염색시약(oil-red O working solution:ORO stock : 0.7g 오일레드(oil red) 0 + 200ml 이소프로필 알코올(isopropyl alcohol), 4°C보관, ORO working solution : ORO stock과 물을 6:4의 비율로 섞은 뒤, 상온에서 20분간 방치 후 주사기 필터(0.2um)를 사용하여 필터함)을 각 웰 당 1ml씩 넣고 10분간 둔다. ORO working solution을 버리고 물로 4번 씻어준다.
- [0106] 물이 있는 상태에서 현미경으로 관찰하고 사진을 찍는다.
- [0107] 물을 버리고 건조시킨다. 염색된 세포를 플레이트 상태로 사진 찍는다.
- [0108] 100% 이소프로필 알코올(isopropyl alcohol) 1ml을 넣어 염색된 ORO를 용출시킨다. 96 웰 플레이트에 300ul씩 나누어 담고 510nm에서 흡광도를 측정한다.
- [0109] 항비만 활성 실험 결과는 하기 도 5 및 도 6과 같다.

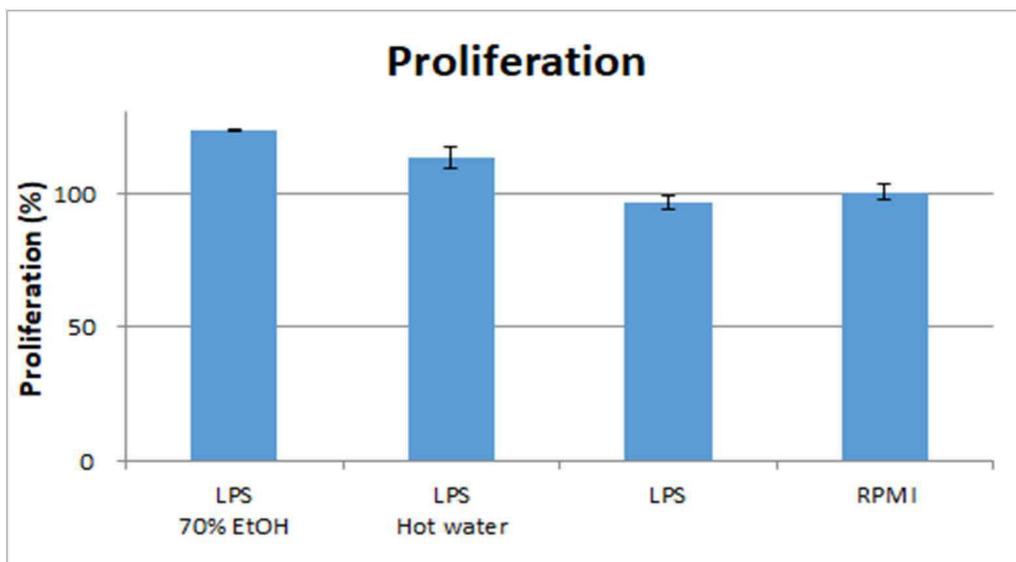
- [0110] 사카이대마디말 열수 추출물에서 성숙세포(Mature cell) 대비 77% 수준의 지방세포가 분화되어 항비만 효과 나타났음을 확인할 수 있다.
- [0111] 이상에서와 같은 본 발명에 따른 생리활성을 가지는 사카이대마디말 추출물 및 그 제조방법은 천연에서 채취한 사카이대마디말로부터 인체에 유익한 생리활성을 가지는 유효성분을 함유하는 추출물을 제공한다.
- [0112] 특히, 본 발명은 종래 다양한 염증성 질환에 사용되는 스테로이드, 비스테로이드성 항염증제(NSAIDs)에 의한 약제 저항성, 또는 약물 내성 균주의 출현에 따른 제반 문제점을 극복하도록 천연 사카이대마디말을 이용해 항염, 항균, 항비만 등의 작용에 생리활성을 가지는 추출물을 제공하는 효과가 있다.
- [0113] 또한, 본 발명의 생리활성을 가지는 사카이대마디말 추출물은 종래의 화학요법제가 가진 각종 심혈관계나 소화계 장애 등의 부작용 문제를 최소화하고 천연 제제로서 약물저항성의 우려가 없으면서 염증 증상의 완화는 물론 비만 개선 효과를 도모할 수 있는 이점이 있다.
- [0114] 따라서, 본 발명에 따른 생리활성을 가지는 사카이대마디말 추출물을 이용하여 각종 염증성 질환의 예방, 개선, 또는 치료를 위한 의약품, 의약외품, 건강기능식품 등에 사용할 수 있을 것으로 기대된다.

**부호의 설명**

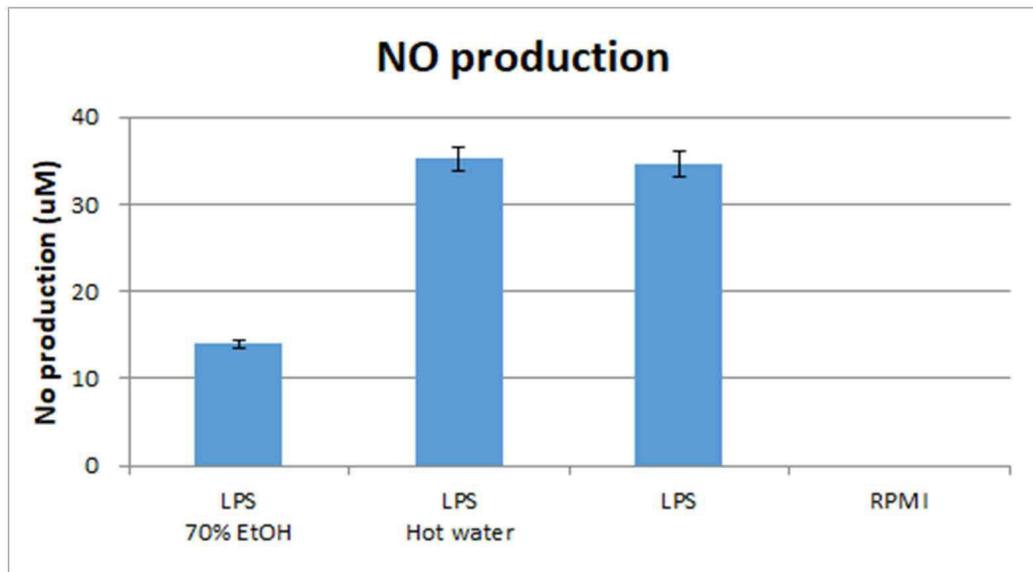
- [0115] 해당 없음.

**도면**

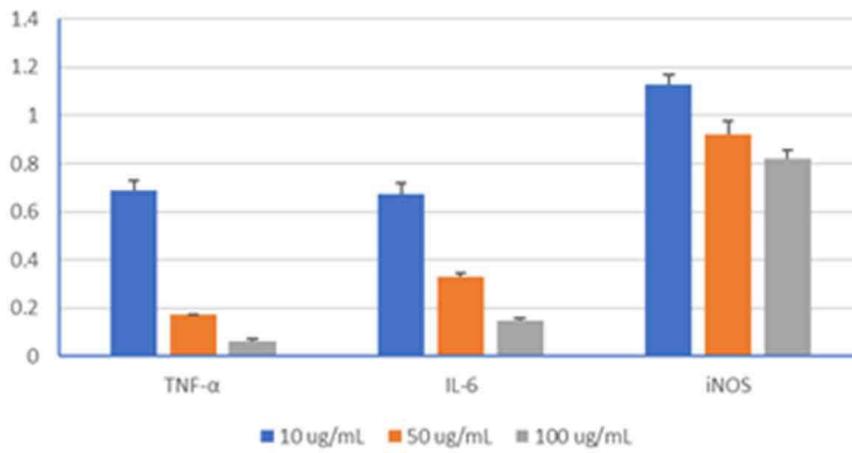
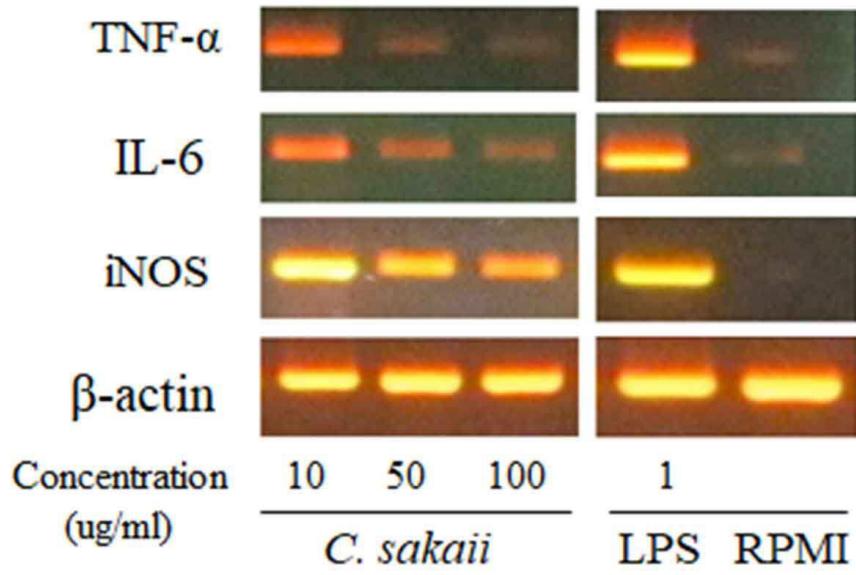
**도면1**



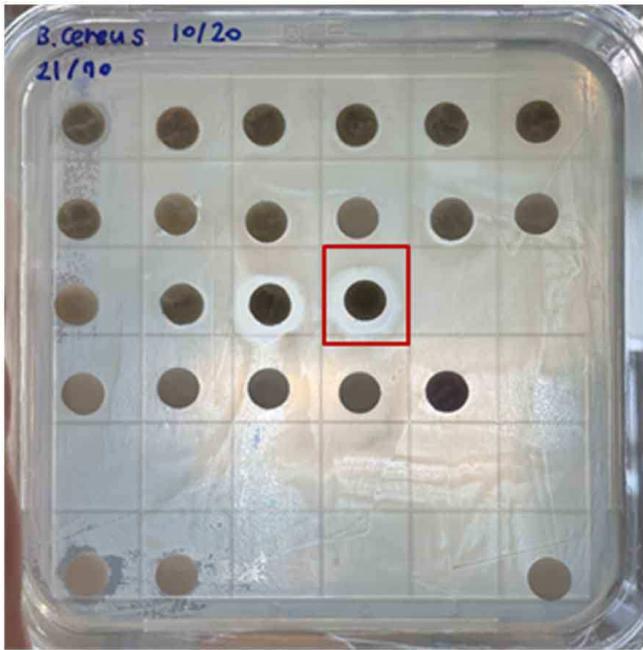
도면2



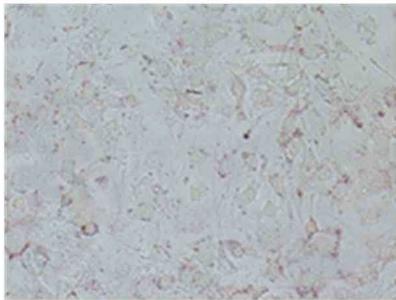
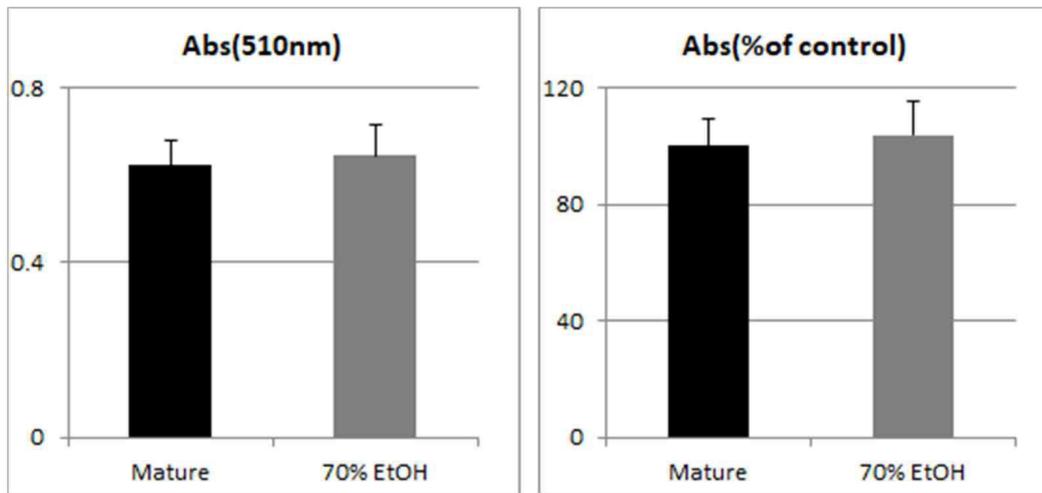
도면3



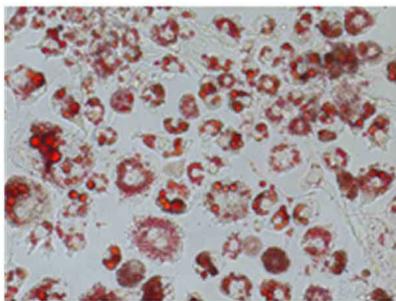
도면4



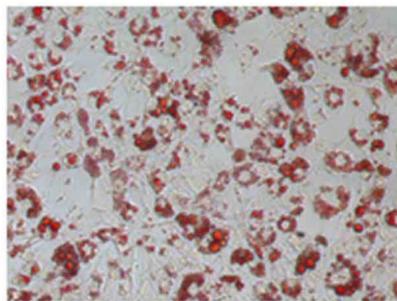
도면5



pre

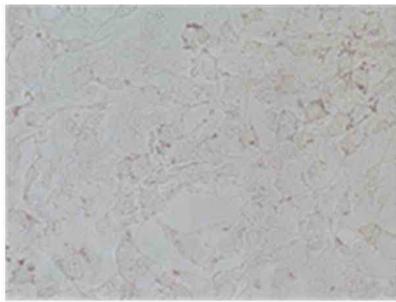
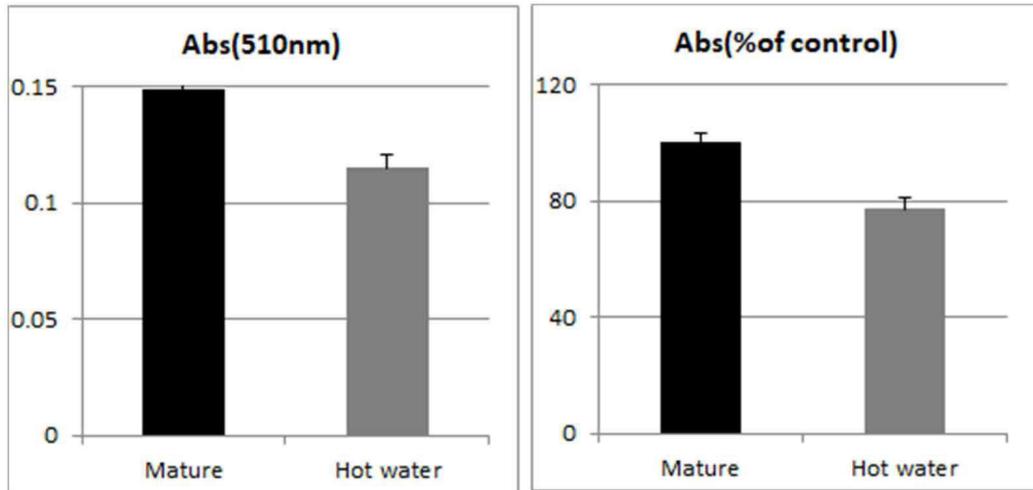


mature

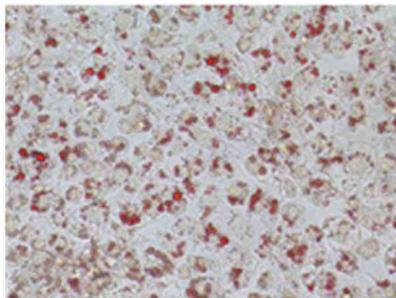


#70% EtOH

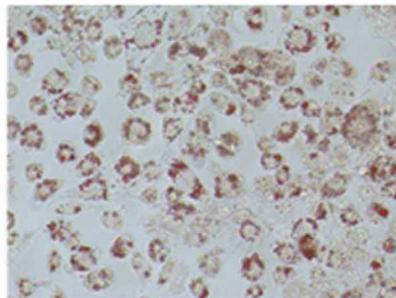
도면6



pre

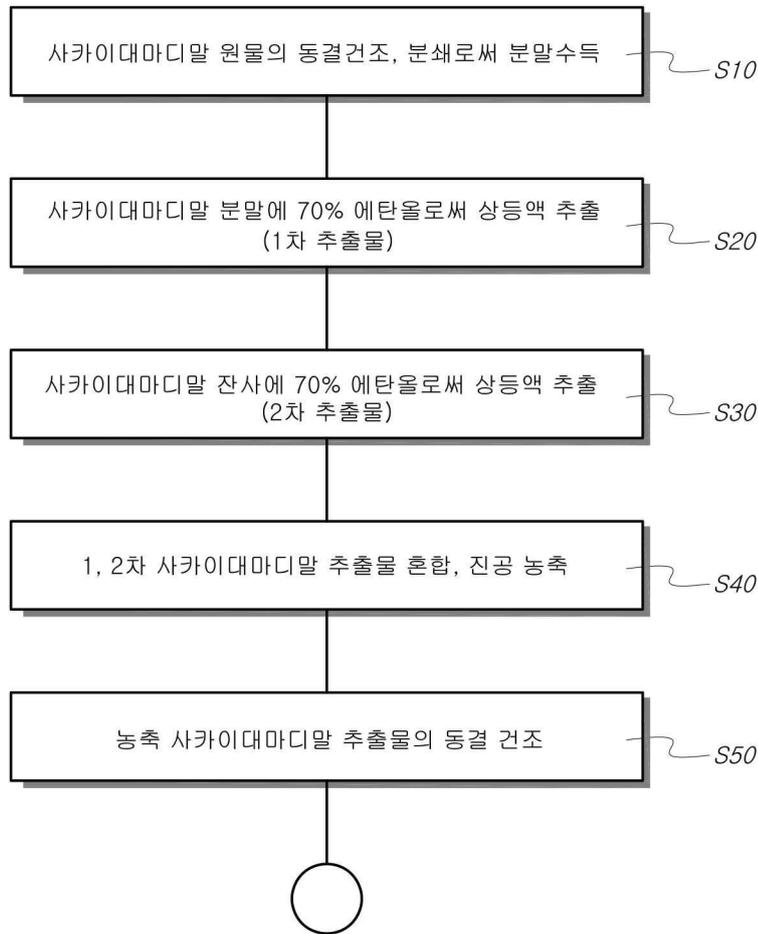


mature



#Hot water

도면7



도면8

