



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2009-0009513  
(43) 공개일자 2009년01월23일

(51) Int. Cl.<sup>9</sup>

A61K 31/716 (2006.01) A61K 31/70 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2007-0072859

(22) 출원일자 2007년07월20일

심사청구일자 2007년07월20일

(71) 출원인

한국원자력연구원

대전 유성구 덕진동 150-1

(72) 발명자

변명우

전북 정읍시 상동 대우드림채아파트 102동 1307호

이주운

전북 정읍시 상동 수목토아파트 102동 1503호

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

이원희

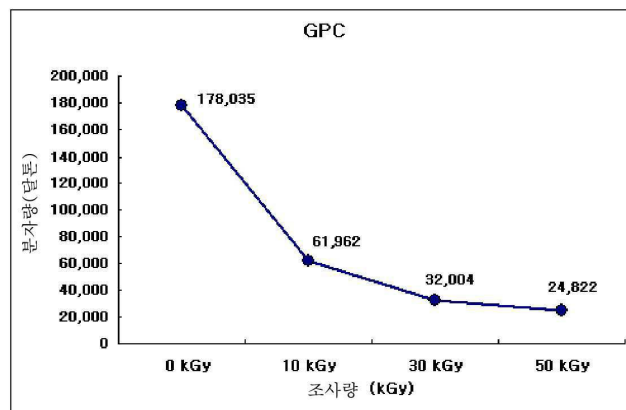
전체 청구항 수 : 총 21 항

(54) 방사선 조사에 의한 저 분자량의 베타글루칸의 제조 방법 및 방사선 조사에 의하여 제조된 저 분자량의 베타글루칸

**(57) 요약**

본 발명은 방사선 조사를 이용한 저 분자량의 베타글루칸(beta-glucan)을 제조하는 방법 및 이에 의하여 제조된 저 분자량의 베타글루칸에 관한 것으로서, 더욱 상세하게는 본 발명의 방사선 조사를 이용하여 얻어진 저 분자량의 베타글루칸은 모든 베타글루칸 구조들이 효과적으로 절편화가 되어 점도가 감소하고 용해도가 증가하며, 항산화 활성 및 면역세포 활성의 효과가 우수함을 확인함으로써 기능성 식품, 화장품 및 의약품 등의 원료로 유용하게 사용할 수 있다.

**대표도 - 도1**



(72) 발명자

**최종일**

서울 영등포구 신길7동 삼환 아파트 108-1504

**김재훈**

전북 정읍시 수성동 부영 아파트 205동 405호

**송범석**

서울 중랑구 신내동 시영 아파트 601동 807호

**변의홍**

전북 정읍시 상동 대우드림채 아파트 102동 1307호

**성낙윤**

충남 연기군 금남면 신촌리 109

## 특허청구의 범위

### 청구항 1

- 1) 베타글루칸을 용매에 용해하는 단계; 및
- 2) 단계 1)의 용해물을 방사선으로 조사하는 단계를 포함하는 저 분자량의 베타글루칸을 제조하는 방법.

### 청구항 2

제 1항에 있어서, 단계 2)의 용해물을 추가적으로 건조하는 단계를 포함하는 저 분자량의 베타글루칸을 제조하는 방법.

### 청구항 3

제 1항에 있어서, 상기 용매는 완충용액(buffer), 배양액(medium), 알코올(alcohol) 및 증류수로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나인 것을 특징으로 하는 방법.

### 청구항 4

제 1항에 있어서, 상기 방사선은 감마선, 전자선 및 X선으로 이루어진 군으로부터 선택된 어느 하나를 이용하는 것을 특징으로 하는 방법.

### 청구항 5

제 4항에 있어서, 상기 방사선은 감마선을 이용하는 것을 특징으로 하는 방법.

### 청구항 6

제 5항에 있어서, 상기 감마선은 코발트(Co)-60, 크립톤(Kr)-85, 스트론튬(Sr)-90 및 세슘(Cs)-137으로 이루어진 군으로부터 선택되는 어느 하나의 방사성 동위원소로부터 방출되는 것을 특징으로 하는 방법.

### 청구항 7

제 6항에 있어서, 상기 감마선은 코발트(Co)-60 방사성 동위원소로부터 방출되는 것을 특징으로 하는 방법.

### 청구항 8

제 1항에 있어서, 상기 방사선은 흡수선량이 10 ~ 100 kGy인 것을 특징으로 하는 방법.

### 청구항 9

제 8항에 있어서, 상기 방사선은 흡수선량이 30 ~ 50 kGy인 것을 특징으로 하는 방법.

### 청구항 10

제 1항에 있어서, 단계 2)의 저 분자량의 베타글루칸은 분자량이 100 kDa에서 1 kDa인 것을 특징으로 하는 방법.

### 청구항 11

제 10항에 있어서, 단계 2)의 저 분자량의 베타글루칸은 분자량이 60 kDa에서 25 kDa인 것을 특징으로 하는 방법.

### 청구항 12

제 1항의 제조 방법에 의해 제조된 저 분자량의 베타글루칸.

### 청구항 13

제 12항에 있어서, 상기 저 분자량의 베타글루칸은 조사된 흡수선량에 비례하여 점도가 감소하는 것을 특징으로 하는 저 분자량의 베타글루칸.

**청구항 14**

제 12항에 있어서, 상기 저 분자량의 베타글루칸은 조사된 흡수선량에 비례하여 용해도가 증가하는 것을 특징으로 하는 저 분자량의 베타글루칸.

**청구항 15**

제 12항의 저 분자량의 베타글루칸을 유효성분으로 함유하는 면역 증진용 약학적 조성물.

**청구항 16**

제 15항에 있어서, 상기 저 분자량의 베타글루칸은 조사된 흡수선량에 비례하여 비장 세포의 T세포 활성을 증가시키는 것을 특징으로 하는 면역 증진용 약학적 조성물.

**청구항 17**

제 16항에 있어서, 상기 저 분자량의 베타글루칸은 조사된 흡수선량에 비례하여 비장 세포의 사이토카인 분비를 증가시키는 것을 특징으로 하는 면역 증진용 약학적 조성물.

**청구항 18**

제 17항에 있어서, 상기 사이토카인은 IFN-r 또는 IL-2인 것을 특징으로 하는 면역 증진용 약학적 조성물.

**청구항 19**

제 12항의 저 분자량의 베타글루칸을 유효성분으로 함유하는 항산화용 조성물.

**청구항 20**

제 12항의 저 분자량의 베타글루칸을 유효성분으로 함유하는 면역증진용 건강식품.

**청구항 21**

제 12항의 저 분자량의 베타글루칸을 유효성분으로 함유하는 아토피 예방 및 개선용 기능성 화장품.

**명세서**

**발명의 상세한 설명**

**기술분야**

<1> 본 발명은 방사선 조사를 이용한 저 분자량의 베타글루칸(beta-glucan)을 제조하는 방법 및 이에 의하여 제조된 저 분자량의 베타글루칸에 관한 것이다.

**배경기술**

<2> 방사선 조사란 아주 다량의 방사선을 물질에 조사함으로써 화학반응을 일으키게 하거나 생물의 세포를 파괴하거나 또는 세균을 사멸시키는 효과를 이용하는 방법의 총칭이다. 감마선 조사란 코발트-60 방사성 동위원소에서 나오는 단파장 빛인 감마선을 식품이나 의료용품 등에 쬐어 치명적인 전염병 세균들이나 기생충 및 해충들을 완전히 사멸시킬 수 있는 유익하고 효과적인 방법이 감마선 조사기술이다. 감마선은 수 센티미터의 콘크리트를 투과할 정도로 고(高)침투력을 가진 파장이기 때문에 보건의료제품을 완전 밀봉한 상태로 조사 처리하여도 무균 제품을 생산할 수 있다. 코발트-60에서 방출되는 감마선은 전자와 같은 하전입자에 비하면 투과력이 강하기 때문에 액체나 고체의 내부까지 조사하는 데 적합하다. 의료기구 살균이나 식품조사 목적에는 코발트-60 선원이 이용되고 있다. 대한민국 특허 10-0458965-0000에, 소, 돼지 도축혈액 혈장단백질 파우더를 감마선 조사하여 위생적 혈분을 제조하는 방법이 제시되어 있고, 대한민국 특허 10-0156439-0000에, 옥수수 전분에 일정조건의 감마선을 조사하여 전분의 물리화학적 성질을 단계적으로 변화시키는 방법이 제시되어 있다.

<3> 일반적으로, 방사선 조사기는 이리듐-192 등의 방사성 동위원소를 캡슐에 내장하고 이를 나선이 형성된 나선부재(현장에서 피그테일(pig tail)이라 불림) 즉, 피그테일의 일단에 연결하고, 피그테일의 나머지 일단에 커넥터(connector)를 연결한 구성으로 이루어진 방사선원 어셈블리, 방사선원 어셈블리를 차폐상태로 내부에 보관하기

위한 소스컨테이너와, 방사선원 어셈블리와 연결하여 방사선원 어셈블리를 이동시키기 위한 제어케이블 어셈블리와, 소스컨테이너에 연결되어 검사 시 검사대상물체의 위치까지 방사선원 어셈블리를 안내하는 소스가이드 튜브장치로 이루어져 있다. 소스컨테이너에는 방사선원의 방사선을 차폐하기 위한 방사선 차폐물질이 설치되어 있으며, 내부에 S자 형태의 방사선원 어셈블리 보관부가 형성되어 있다. 제어케이블 어셈블리의 튜브 내부와 소스가이드 튜브장치의 튜브 내부에는 피그테일이 회전하면서 이동할 수 있도록 나선이 형성되어 있다. 제어케이블 어셈블리는 튜브와 기어, 핸들 등으로 이루어져 있다. 상기와 같은 방사선원 어셈블리, 소스컨테이너, 제어케이블 어셈블리, 소스가이드튜브장치의 구성은 일반적인 내용이므로 여기에서 자세히 설명하지는 않는다. 상기와 같은 방사선 조사기의 구성과 동작과정은 특허 공개번호 2003-0029317호 등을 참조하면 자세히 알 수 있다.

- <4> 베타글루칸(beta-glucan)은 다당류의 일종으로서 인간의 정상적인 세포조직의 면역기능을 활성화시켜 암세포의 증식과 재발을 억제하고 면역세포의 기능을 활발하게 하는 인터루킨(interleukin) 및 인터페론(interferon)의 생성을 촉진시킨다. 활성 베타글루칸은 암세포가 있는 체내로 들어가 사이토카인(cytokine)을 생산시킴으로써 면역 세포인 T 세포와 B 세포의 활동을 지원하여 세포조직의 면역기능을 활성화 시켜준다.
- <5> 베타글루칸은 미생물, 버섯류 또는 곡류 등에서 추출하여 사용하고 있으며 그 종류도 다양하다. 베타글루칸을 생산하는 미생물로는 미국특허문헌 제 5,504,079호에 1-3 결합 베타글루칸을 생산하는 사카로마이세스 세레비지에(*Saccharomyces cerevisiae*) R4 계통과 미국특허문헌 제 5,509,191호에는 1-3 결합 베타글루칸을 생산하는 아그로박테리움(*Agrobacterium*)의 변이주에 대해 공지되어 있다.
- <6> 다당의 일종인 글루칸은 D-글루코오스만을 구성당으로 하는 포도당 중합체로서 연결 형태에 따라 베타(beta) 혹은 알파(alpha)형으로 구분된다. 특히 베타글루칸(beta-glucan)은 포도당 단위체가 1, 3번 위치에 베타(beta)-글리코시드 결합으로 연결된 기본 골격에 4번(1, 4결합) 혹은 6번(1, 6 결합) 탄소에 측쇄를 가지며, 이러한 측쇄 유무에 의해 구조적인 차이와 함께 물리화학적 성질을 좌우하는 것으로 알려져 있다. 버섯, 효모와 식물로부터 분리된 베타글루칸은 일반적으로 널리 분포되어 있고, 킬로-달톤(kilo-Daltons)에서부터 메가-달톤(mega-Daltons)까지의 분자량범위를 가지고 있는 고분자량 다당류이다(H Yamada, *Paulsen, B.S. (Ed), Proceedings of the Phytochemical Society of Europe, vol.44, p. 15, 2000*). 베타글루칸은 겔화 능력과 수용액에서의 높은 점성 때문에 소규모 식품 산업에서만 이용하고 있다(Dawkins, N. L. et.al., *Food hydrocolloids* 9, 1-7 1995). 또한 베타글루칸은 미국에서 차세대 기능성 건강식품으로 상당한 판매량을 보이고 있으며 1983년 미국 FDA가 규정하는 일반 안전 기준(GRAS 규격 title 21, vol 3)에 기재되어 있다.
- <7> 그러나 베타글루칸은 인체의 경구 투여시 흡수되는 비율이 상당히 떨어진다. 이는 베타글루칸이 기본적인 당 단위체들이 엇갈려 연결된(cross-linked) 중합체를 포함하여 거대한 분자로 이루어지기 때문이다. 베타글루칸은 물에 불용성이고 항산화 특징이 있으며, 경구로 투여했을 때 거대한 분자량 때문에 위에서 흡수가 방해된다. 이런 거대한 분자의 베타글루칸의 흡수성은 거대한 분자를 소화시키는 위장내부 경로에서 특정 효소의 부족으로 낮다. 이는 분자량이 크고, 물에 불용성인 글루칸 전구체들이 면역 조절 인자로서 효율적이기 위해 높은 농도에서 특정 수용체에 결합하고 세포 내로 흡수되는 것이 잘 되지 않는 것으로 여겨진다.
- <8> 또한, 베타글루칸의 높은 점성은 기능성 식품의 첨가제로 어려움을 가지고 있다. 예를 들어 맥아 제조를 방해하고, 맥즙의 분리를 저해하며, 맥주의 여과 분리, 소스, 셀러드 드레싱 및 아이스크림 생산을 어렵게 하고, 바람직하지 않은 침전물을 형성한다(Carr, J.M. et.al., *Cereal Chem.* 67, 226, 1990). 이러한 식품 첨가제로 사용의 어려움은 베타글루칸의 높은 점도 때문이다(Wood, P. J., *Webster, F. H. (Ed.), Oats: Chemistry and technology*, pp. 121-152, 1986). 베타글루칸의 높은 점도는 분자량 및 높은 농도에 관련이 있다(Beer, M. U. et.al., *Cereal chemistry* 73, 58-62. 1996). 그래서 다당류의 특별한 분자량 적용이 요구되었다.
- <9> 베타글루칸을 식품 및 의약품 등 다양한 이용을 위해서는 낮은 분자량, 물에 대한 수용성 및 흡수성 증가뿐만 아니라 면역학적 반응에 효율적인 베타글루칸이 요구되었다. 따라서, 분자량이 상대적으로 작고 수용성이며, 적절한 수용체에 최적으로 결합하며, 위장내벽에서 전체적인 흡수를 향상시키기 위한 베타글루칸을 제조하는 방법이 요구되었으며, 인체에서 면역학적 기능이 향상된 면역 조절 인자로서 저분자량의 베타글루칸이 요구되었다.
- <10> 선행 연구에서 고분자들은 산 처리(Hasegawa et al., *Carbohydr. Polym.* 20(4), 279-283, 1993), 효소 처리, 물리적 처리(Ilyina et al., *Process Biochem.* 35(6), 563-568, 2000)에 의하여 베타글루칸의 분자량을 감소시킬 수 있었다. 그러나 이러한 방법들은 초기 반응에 첨가물을 사용하고 그리고 부생성물들(side products)을 형성하기 때문에 그 이상으로 정제가 필요하다.

- <11> 하지만 감마선 조사기술은 초기 반응에 첨가물 사용과 그리고 부생성물들(side products)의 형성이 없으므로 위와 같은 방법보다 간단하며, 더욱 환경 친화적이다. 감마선 조사기술의 경우 중요한 장점은 조사된 물질의 최종 생물학적 멸균이고(Hugo, *Internat. Biodet. Biodegrad.* 36(3.4), 197-217, 1995), 생물학적 상품 제조를 위해 쉽게 사용할 수 있다. 고분자를 저분자화 시키는 방사선의 중요한 장점은 화학적 반응 시약의 첨가와 그 밖의 온도, 환경, 첨가물의 조절과 같은 특별한 조작이 필요 없이 재연성과 양적 변화를 촉진하는 능력을 가지고 있다(Charlesby, *Radiat. Phys. Chem.* 18 (1.2), 59-66, 1981).
- <12> 따라서 본 발명의 목적은 베타글루칸을 더욱 효과적이고 안전한 식품첨가제로 사용하기 위해 감마선 조사기술을 적용하여 구조적인 특성에서 단점 없이 점성과 분자량의 감소, 용해도 및 미생물학적 안전성을 개선하는 데에 있다.
- <13> 이에 본 발명자는 저 분자량의 베타글루칸의 제조 방법에 대해 연구하던 중 베타글루칸 용액에 감마선을 조사하면 베타글루칸의 분자량이 감소하며, 고 분자량의 베타글루칸보다 방사선 조사에 의하여 얻어진 저 분자량의 베타글루칸이 점성이 감소하고 용해도가 증가하며, 환원당 변화능, 항산화성, 비장세포 증식능 및 사이토카인(cytokine) 분비량 등이 증가한다는 것을 확인하고 본 발명을 완성하였다.

**발명의 내용**

**해결 하고자하는 과제**

- <14> 본 발명은 방사선 조사를 이용한 저 분자량의 베타글루칸(beta-glucan)을 제조하는 방법 및 이에 의하여 제조된 저 분자량의 베타글루칸을 제공한다.

**과제 해결수단**

- <15> 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 방사선 조사를 이용하여 저 분자량의 베타글루칸을 제조하는 제조 방법을 제공한다.
- <16> 또한, 본 발명은 상기 제조 방법에 의하여 제조된 저 분자량의 베타글루칸을 제공한다.
- <17> 또한, 본 발명은 상기 제조 방법에 의하여 제조된 저 분자량의 베타글루칸을 유효성분으로 함유하는 면역 증진용 약학적 조성물을 제공한다.
- <18> 또한, 본 발명은 상기 제조 방법에 의하여 제조된 저 분자량의 베타글루칸을 유효성분으로 함유하는 항산화용 조성물을 제공한다.
- <19> 또한, 본 발명은 상기 제조 방법에 의하여 제조된 저 분자량의 베타글루칸을 유효성분으로 함유하는 면역증진용 건강식품을 제공한다.
- <20> 아울러, 본 발명은 상기 제조 방법에 의하여 제조된 저 분자량의 베타글루칸을 유효성분으로 함유하는 아토피 예방 및 개선용 기능성 화장품을 제공한다.

**효과**

- <21> 본 발명에 따른 감마선 조사에 의한 저 분자량의 베타글루칸은 점도가 감소하고 수용성이 증가하는 물리적 특성과 항산화 활성, 비장세포 증식과 사이토카인(cytokine)의 분비능이 증가하는 등의 우수한 생물학적 특성으로, 식품, 의약품 및 화장품 소재로 유용하게 사용될 수 있다.

**발명의 실시를 위한 구체적인 내용**

- <22> 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.
- <23> 본 발명의 저 분자량의 베타글루칸은 하기의 단계로 이루어진 제조방법에 의해 제조된다.
- <24> 1) 베타글루칸을 용매에 용해하는 단계; 및
- <25> 2) 단계 1)의 용해물을 방사선으로 조사하는 단계,
- <26> 상기 제조 방법에 있어서, 단계 1)의 베타글루칸은 미생물, 버섯류 또는 곡류 등에서 얻을 수 있으며, 또는 시판되는 베타글루칸을 구입하여 사용할 수 있다.

- <27> 상기 제조 방법에 있어서, 단계 1)의 용매는 증류수, 완충용액(buffer), 배양액(medium) 또는 알코올(alcohol)을 모두 사용할 수 있으나 이에 한정하는 것은 아니다. 본 발명의 실시예에서는 증류수를 이용하였다.
- <28> 상기 제조 방법에 있어서, 단계 2)의 방사선은 방사선원으로 감마선, 전자선 또는 X-선을 모두 사용할 수 있으며, 감마선을 사용하는 것이 바람직하다(Dauphin JF et.al., *Elsevier Scientific*, pp. 131-220)
- <29> 상기 감마선은 코발트(Co)-60, 크립톤(Kr)-85, 스트론튬(Sr)-90 또는 세슘(Cs)-137 등의 방사성 동위원소로부터 방출되는 감마선을 사용하여 조사하는 것이 바람직하며, 코발트(Co)-60 방사선 동위원소로부터 방출되는 것이 더 바람직하나 이에 한정되지 않는다. 상기 방사선의 흡수선량은 10 ~ 100 kGy인 것이 바람직하며, 30 ~ 50 kGy인 것이 더 바람직하나 이에 한정되지 않는다. 100 kGy이상의 선량에서는 베타글루칸의 분자량의 너무 감소하여 원하는 면역 활성이 나타나지 않으며, 10 kGy이하에서는 분자량의 감소가 미미하게 나타나기 때문에 상기와 같은 흡수선량을 설정하였다.
- <30> 상기 제조방법에 의해 제조된 저 분자량의 베타글루칸은 분자량이 100 kDa에서 1 kDa인 것을 특징으로 한다. 본 발명의 실시예에서는 베타글루칸의 분자량을 측정된 결과, 베타글루칸의 비조사구 분자량은 170 kDa 이상으로 나타난 반면, 베타글루칸에 감마선 조사를 10 및 30 kGy 하였을 경우 60 ~ 30 kDa 범위로 분자량이 감소하였으며, 50 kGy 이상의 감마선 조사에서는 25 kDa 이하 분자량의 베타글루칸이 얻어진 것을 확인함으로써, 감마선 조사에 의해 다당류인 베타글루칸이 일정 부분 분해되어 저 분자화 되었음을 확인할 수 있다.
- <31> 본 발명은 상기 제조 방법에 의하여 제조된 저 분자량의 베타글루칸을 제공한다.
- <32> 효소처리는 베타글루칸을 저 분자화 하는데 효과적이지만 베타-1,3-글루칸 및 베타-1,4-글루칸 구조는 분해가 쉽지만 베타-1,6-글루칸 구조를 끊기는 매우 어렵다. 하지만 방사선 조사기술은 모든 구조를 랜덤하게 분해시켜 주었다. 따라서 방사선 조사에 의해 얻어진 저 분자화된 베타글루칸은 효소 처리와는 다른 분자 구조를 가지게 된다(Ilyina, A.V. et.al., *Process Biochem.* 35(6), 563-568, 2000; Shimokawa, T. et.al., *Biosci. Biotech. Biochem.* 60(9), 1532-1534, 1996).
- <33> 본 발명의 실험예에서는 상기 제조방법에 의해 제조된 저 분자량의 베타글루칸의 점도, 용해도 및 환원당을 측정하였다. 그 결과, 조사된 저 분자량의 베타글루칸의 점도는 증류수에 녹인 처리구에서 방사선 조사 선량이 증가함에 따라 감소하였으며, 50 kGy에서 현저하게 감소하였다. 이러한 다당류의 점도변화는 감마선 조사선량에 의존한 다당류 분자의 절단현상 때문으로 알려져 있다. 또한, 조사된 저 분자량의 베타글루칸의 용해도는 증류수에 녹인 처리구에서 방사선 조사 선량이 증가함에 따라 증가하였으며, 50 kGy에서 현저하게 증가하였다. 이러한 감마선 조사에 의한 용해도 증가는 분자구조의 파괴와 변성에 의하여 저분자 입자를 생성하기 때문으로 알려져 있다(Graham, J.A. et.al., *Journal of Science Food Agriculture* 82, 1599-1605, 2002). 아울러, 조사된 베타글루칸의 환원당은 증류수에 녹인 처리구에서 방사선 조사 선량이 증가함에 따라 증가하였으며, 50 kGy에서 현저하게 증가하였다. 환원당이 증가하였다는 것은 폴리머들이 방사선에 영향을 받아서 잘렸다는 의미이고, 잘려진 당들의 말단부위의 즉 환원력을 가진 부위를 측정한 것이다. 따라서 환원당 함량의 증가는 해중합반응(depolymerization)에 의한 글루코즈(glucose)와 같은 저 분자량 당이 생성되기 때문이란 것을 알 수 있다.
- <34> 상기 제조방법에 의해 제조된 저 분자량의 베타글루칸은 베타-1,3-글루칸, 베타-1,4-글루칸 및 베타-1,6-글루칸의 모든 베타글루칸의 구조가 무작위로 단편화된 것을 특징으로 한다. 즉 효소처리는 베타-1,3-글루칸 및 베타-1,4-글루칸의 구조와 같은 약한 구조는 쉽게 분해하지만, 베타-1,6-글루칸의 구조는 분해하기 어렵다. 하지만 방사선 조사는 이러한 베타-1,6-글루칸의 구조도 쉽게 절단을 한다.
- <35> 본 발명의 실험예에서는 베타-1,3-글루칸(beta-1,3-glucan), 베타-1,4-글루칸(beta-1,4-glucan) 및 베타-1,6-글루칸(beta-1,6-glucan)의 함량을 측정된 결과, 조사된 베타글루칸은 베타-1,3-글루칸(beta-1,3-glucan), 베타-1,4-글루칸(beta-1,4-glucan) 및 베타-1,6-글루칸(beta-1,6-glucan)의 함량이 모두 감소하였다. 하지만, 효소나 산 처리의 방법은 베타-1,6-베타-1,3-글루칸(beta-1,6-beta-1,3-glucans)을 효과적으로 가수분해하기 어렵다고 보고되어 있다(Shin, H.J. et.al., *J. biotechnol. Bioeng.* 18(5), 352-355, 2003). 따라서 방사선 조사에 의하여 임의적으로 글루칸(glucan) 구조가 절단된 베타글루칸을 얻을 수 있다는 사실을 확인할 수 있었다.
- <36> 본 발명은 상기 제조 방법에 의하여 제조된 저 분자량의 베타글루칸을 유효성분으로 함유하는 면역 증진용 약학적 조성물을 제공한다.
- <37> 상기 제조방법에 의해 제조된 저 분자량의 베타글루칸은 비장 세포의 T세포 활성을 증가시키는 것을 특징으로

한다. 본 발명의 실험예에서는 시험관내 및 생체내에서 베타글루칸의 T세포 활성을 측정된 결과, 조사된 베타글루칸의 T세포 활성은 증류수에 녹인 처리구에서 방사선 조사 선량이 증가함에 따라 증가하였으며, 특히 50 kGy의 방사선량으로 조사된 베타글루칸의 T세포 활성을 현저하게 증가시킴을 확인하였다.

- <38> 상기 제조방법에 의해 제조된 저 분자량의 베타글루칸은 비장 세포의 사이토카인(cytokine)의 분비를 증가시키는 것을 특징으로 한다. 본 발명의 실험예에서는 시험관내 및 생체내에서 베타글루칸의 사이토카인 분비능을 측정된 결과, 조사된 베타글루칸의 Th 1에서 나오는 사이토카인인 IFN-r 및 IL-2는 베타글루칸에 감마선 조사가 증가함에 따라 유의적으로 사이토카인(cytokine)의 분비가 증가하는 것을 확인할 수 있었다.
- <39> 그러므로, 본 발명에 따른 방사선이 조사된 저 분자량의 베타글루칸이 우수한 면역조절 기능을 갖는다는 사실을 알 수 있다.
- <40> 본 발명은 상기 제조 방법에 의하여 제조된 저 분자량의 베타글루칸을 유효성분으로 함유하는 항산화용 조성물을 제공한다.
- <41> 상기 제조방법에 의해 제조된 저 분자량의 베타글루칸은 DPPH 라디칼 소거 능력이 증가하는 것을 특징으로 한다. 본 발명의 실험예에서는 DPPH 라디칼 소거 능력을 측정된 결과, 조사된 베타글루칸의 DPPH 라디칼 소거 능력이 높게 나타났으며, 조사선량이 증가함에 따라 유의적으로 증가하였다
- <42> 본 발명의 상기 저 분자량의 베타글루칸을 의약품으로 사용하는 경우, 추가로 동일 또는 유사한 기능을 나타내는 유효성분을 1종 이상 함유할 수 있다.
- <43> 상기 저 분자량의 베타글루칸은 임상 투여 시에 경구 또는 비경구로 투여가 가능하며 일반적인 의약품 제제의 형태로 사용될 수 있다.
- <44> 즉, 본 발명의 저 분자량의 베타글루칸은 실제 임상 투여 시에 경구 및 비경구의 여러 가지 제형으로 투여될 수 있는데, 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충전제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다. 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 본 발명의 저 분자량의 베타글루칸에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트(Calcium carbonate), 수크로스(Sucrose) 또는 락토오스(Lactose), 젤라틴 등을 섞어 조제된다. 또한 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스티레이트 탈크 같은 윤활제들도 사용된다. 경구를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데 흔히 사용되는 단순희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다. 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수용성제, 현탁제, 유제, 동결건조제, 좌제가 포함된다. 비수용성제, 현탁용제로는 프로필렌글리콜(Propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텡솔(witepsol), 마크로골, 트윈(tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다.
- <45> 저 분자량의 베타글루칸의 투여량은 환자의 체중, 연령, 성별, 건강상태, 식이, 투여시간, 투여방법, 배설물 및 질환의 중증도에 따라 그 범위가 다양하며, 일일 투여량은 저 분자량의 베타글루칸의 양을 기준으로 0.1 내지 100 mg/kg이고, 바람직하게는 30 내지 86 mg/kg이고, 더욱 바람직하게는 50 내지 60 mg/kg이며, 하루 1 ~ 6 회 투여될 수 있다.
- <46> 본 발명의 저 분자량의 베타글루칸은 단독으로, 또는 수술, 방사선 치료, 호르몬 치료, 화학 치료 및 생물학적 반응 조절제를 사용하는 방법들과 병용하여 사용할 수 있다.
- <47> 본 발명은 상기 제조 방법에 의하여 제조된 저 분자량의 베타글루칸을 유효성분으로 함유하는 면역증진용 건강 식품을 제공한다.
- <48> 본 발명의 상기 저 분자량의 베타글루칸을 식품첨가물로 사용하는 경우, 상기 저 분자량의 베타글루칸을 그대로 첨가하거나 다른 식품 또는 식품 성분과 함께 사용될 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다. 유효 성분의 혼합양은 그의 사용 목적(예방, 건강 또는 치료적 처치)에 따라 적합하게 결정될 수 있다. 일반적으로, 식품 또는 음료의 제조시에 본 발명의 조성물은 원료에 대하여 15 중량부 이하, 바람직하게는 10 중량부 이하의 양으로 첨가된다. 그러나, 건강 및 위생을 목적으로 하거나 또는 건강 조절을 목적으로 하는 장기간의 섭취의 경우에는 상기 양은 상기 범위 이하일 수 있으며, 안전성 면에서 아무런 문제가 없기 때문에 유효성분은 상기 범위 이상의 양으로도 사용될 수 있다.
- <49> 상기 식품의 종류에는 특별한 제한은 없다. 상기 물질을 첨가할 수 있는 식품의 예로는 육류, 소세지, 빵, 초코



렛, 캔디류, 스넥류, 과자류, 피자, 라면, 기타 면류, 껌류, 아이스크림류를 포함한 낙농제품, 각종 스프, 음료수, 차, 드링크제, 알콜 음료 및 비타민 복합제 등이 있으며, 통상적인 의미에서의 건강식품을 모두 포함한다.

<50> 본 발명의 건강음료 조성물은 통상의 음료와 같이 여러 가지 향미제 또는 천연 탄수화물 등을 추가 성분으로서 함유할 수 있다. 상술한 천연 탄수화물은 포도당, 과당과 같은 모노사카라이드, 말토스, 슈크로스나 같은 디사카라이드, 및 텍스트린, 사이클로덱스트린과 같은 폴리사카라이드, 자일리톨, 소르비톨, 에리트리톨 등의 당알콜이다. 감미제로서는 타우마틴, 스테비아 추출물과 같은 천연 감미제나, 사카린, 아스파르탐과 같은 합성 감미제 등을 사용할 수 있다. 상기 천연 탄수화물의 비율은 본 발명의 조성물 100 ml당 일반적으로 약 0.01 ~ 0.04 g, 바람직하게는 약 0.02 ~ 0.03 g 이다.

<51> 상기 외에 본 발명의 저 분자량의 베타글루칸은 여러가지 영양제, 비타민, 전해질, 풍미제, 착색제, 펙트산 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알콜, 탄산 음료에 사용되는 탄산화제 등을 함유할 수 있다. 그밖에 본 발명의 저 분자량의 베타글루칸은 천연 과일 주스, 과일주스 음료 및 야채 음료의 제조를 위한 과육을 함유할 수 있다. 이러한 성분은 독립적으로 또는 혼합하여 사용할 수 있다. 이러한 첨가제의 비율은 크게 중요하진 않지만 본 발명의 저 분자량의 베타글루칸 100 중량부당 0.01 ~ 0.1 중량부의 범위에서 선택되는 것이 일반적이다.

<52> 본 발명은 상기 제조 방법에 의하여 제조된 저 분자량의 베타글루칸을 유효성분으로 함유하는 아토피 예방 및 개선용 기능성 화장품을 제공한다.

<53> 베타글루칸은 면역기능 증진작용을 통해 피부염증완화, 보습작용 효과를 나타내어 아토피 질환의 예방 및 개선 효과가 있다(pillai, R. et.al., *Research Disclosure* 499. 1278-1279, 2005). 본 발명은 거대분자인 베타글루칸을 저분자량으로 제조하여 경피에서 흡수율이 증대되므로, 아토피 질환의 예방 및 개선용 기능성 화장품으로서 유용하게 사용될 수 있다.

<54> 본 발명의 상기 저 분자량의 베타글루칸을 화장품으로 사용하는 경우, 상기 저 분자량의 베타글루칸을 유효성분으로 함유하여 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.

<55> 적합한 화장품의 제형으로는 예를들면 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 스틱의 형태로 제공될 수 있다. 또한, 포말(foam)의 형태 또는 압축된 추진제를 더 함유한 에어로졸 조성물의 형태로도 제조될 수 있다.

<56> 또한, 상기 화장품은 본 발명의 저 분자량의 베타글루칸에 추가로 지방 물질, 유기 용매, 용해제, 농축제 및 겔 화제, 연화제, 향산화제, 현탁화제, 안정화제, 발포제(foaming agent), 방향제, 계면활성제, 물, 이온형 또는 비이온형 유화제, 충전제, 금속이온봉쇄제 및 킬레이트화제, 보존제, 비타민, 차단제, 습윤화제, 필수 오일, 염료, 안료, 친수성 또는 친유성 활성제, 지질 소낭 또는 화장품에 통상적으로 사용되는 임의의 다른 성분과 같은 화장품학 분야에서 통상적으로 사용되는 보조제를 함유할 수 있다.

<57> 이하, 본 발명을 실시예, 실험예 및 제제예에 의하여 상세히 설명한다.

<58> 단, 하기 실시예, 실험예 및 제제예는 본 발명을 구체적으로 예시하는 것이며, 본 발명의 내용이 실시예, 실험예 및 제제예에 의해 한정되는 것은 아니다.

<59> <실시예> 감마선 조사에 의한 저 분자량의 베타글루칸 제조

<60> 본 발명에서 사용된 베타글루칸은 ACE BIOTECH(Korea)에서 구입하였다. 베타글루칸 시료는 흰색 가루 형태이고 폴리사카라이드(polysaccharide)의 함량은 97.2 %이며, 베타글루칸의 함량은 80 % 이상이다. 증류수에 베타글루칸을 10 % 농도(w/v)로 용해하여 실험에 사용하였다.

<61> 다양한 농도로 제조된 베타글루칸 시료는 한국원자력연구원 정읍 방사선과학연구소의 코발트-60 방사선 조사 장치(cobalt-60 irradiator)에서 조사되었다. 선원의 크기는 약 100 kCi이었으며 선량율은 시간당 10 kGy이었다. 흡수선량 확인은 5 mm 직경 알라닌 약량계(diameter alanine dosimeters)(Bruker Instruments, Rheinstetten, Germany)로 하였으며, 선량 측정(Dosimetry) 시스템은 국제원자력기구(IAEA)의 규격에 준용하여 표준화한 후 사용하였으며, 적용된 조사선량은 실온에서 0, 10, 30 및 50 kGy로 조사되었다.

<62> <실험예 1> 분자량 측정

- <63> 감마선 조사 후 베타글루칸의 분자량 측정은 겔 침투 크로마토그래피(gel permeation chromatography, GPC)를 이용하여 측정되었다. GPC는 워터스 515 펌프(Waters 515 pump), 2 x PLaqagel OH 혼합된(7.8 x 300mm) 컬럼, 워터스 2410 굴절률 검출기(Waters 2410 refractive index detector)의 워터스(Waters) GPC 시스템 장비를 사용하였다. 시료는 10 mg/ml의 농도로 물에 희석한 후 100  $\mu$ l을 투여하였다. 컬럼(Column)은 1.0 ml/min의 유속으로 40 ° C에서 작동되었다. 분자량 분포는 0.1 % w/w의 농도로 다양한 텍스트란(dextrans)을 사용하여 구경 측정(calibration) 하였다. 분자량 계산을 위한 분석은 밀레니엄(Millennium) 3.05.01을 사용하였다.
- <64> 도 1은 감마선 조사에 의한 베타글루칸의 분자량을 나타낸 것이다. 비조사된 베타글루칸의 분자량은 178,035 Da인 반면에 10, 30, 50 kGy로 감마선 조사된 베타글루칸의 분자량은 각각 61,962 Da, 32,004 Da, 24,822 Da로 분자량이 감소하였다. 이미 조사된 연구보고서에 따르면 베타글루칸의 분자량이 100 kDa 이상이면 고분자이며 50 kDa 이하이면 저 분자라고 알려져 있다(Bohn, J.A. et.al., *Carbohydrate Polymers*. 28(1), 3-14, 1995). 감마선에 의한 이러한 변화는 글리코시드 결합(glycosidic bond)의 파괴로 분자의 작용기(functional group) 안에서 변화가 일어나기 때문이라고 판단되며, 글리코시드 결합(glycosidic bonds)의 분열로 인하여 일어나는 분자량의 큰 감소는 낮은 분자량의 당들을 형성한다고 보고되고 있다(Sokhey, A.S. et.al., *Food Struct.* 12, 397-410, 1983).
- <65> <실험예 2> 점도 측정
- <66> 감마선 조사된 베타글루칸의 점도는 S21번 스피들(spindle)을 이용하여 180 rpm에서 브룩필드 점도계(Brookfield viscometer)(DV-II+ pro, Brook-field Engineering Laboratories, MA, USA)로 측정하였다. 점도는 실온에서 측정하였다.
- <67> 도 2는 감마선 조사된 베타글루칸의 점도를 나타내었다. 조사 선량이 증가함에 따라 베타글루칸 용액의 점도는 감소하는 경향을 보였다. 비조사된 베타글루칸 용액의 점도는 191.93(cp)으로 나타났으며 10 및 30 kGy로 감마선 조사된 베타글루칸 용액의 점도는 135.5(cp) 및 75.81(cp)로 감소하였고, 50 kGy로 조사한 베타글루칸의 점도는 43.9(cp)으로 점도가 감소하였다.
- <68> <실험예 3> 용해도 측정
- <69> 감마선 조사된 베타글루칸의 수용성은 베타글루칸 용액을 동결건조하고 동결건조된 베타글루칸 시료를 20분 동안 증류수에 용해한 후, 3500 rpm에서 20분 동안 원심분리한 후 상등액을 얻어낸다. 그 다음 분리된 상등액을 2시간 동안 100°C에서 건조한 후 건조된 시료의 무게를 측정하였다.
- <70> 용해도(%)={ (접시+용해 후 건조된 시료)-접시 } / 동결건조된 시료 \* 100
- <71> 도 3은 감마선 조사된 베타글루칸의 용해도를 나타내었다. 비조사된 베타글루칸의 용해도는 51.23 %로 나타났으며 10 및 30 kGy의 낮은 선량으로 감마선 조사된 베타글루칸은 55.76 % 및 75.81 %로 용해도가 증가하였다. 50 kGy로 조사한 베타글루칸의 용해도는 81.72 %로 비조사구와 비교하였을 때 용해도가 가장 높게 증가한 것으로 나타났다.
- <72> <실험예 4> 환원당 측정
- <73> 환원당은 3,5-디니트로살리실산(3,5-dinitrosalicylic acid)(DNSA) 방법(Miller, G. L. 1959)에 의하여 측정되었다. 시료 1 ml을 15 ml 시험관에 옮기고 DNSA 시약(0.5 g 디니트로살리실산(dinitrosalicylic acid), 8 g sodium hydrate, 150 g rochell salt을 증류수 500 ml에 용해) 2 ml 을 첨가하였다. 그 혼합용액을 5초 동안 혼합한 후 90°C에서 10분간 반응한 다음 냉각하였다. 시료의 환원당 수치는 스펙트로포토미터(spectrophotometer)(UV-1601 PC, Shimadzu Co., Tokyo, Japan)를 이용하여 550 nm에서 측정하였다.
- <74> 도 4는 감마선 조사된 베타글루칸의 환원당을 측정하였다. 베타글루칸 환원당 R<sup>2</sup> 값은 0.9383일 때, 비조사구 베타글루칸의 환원당은 0.917 %인 반면에 10 및 30 kGy의 낮은 선량으로 감마선 조사된 베타글루칸은 1.128 % 및 1.973 %로 환원당이 증가하였다. 50 kGy로 조사한 베타글루칸의 용해도는 비조사구와 낮은 감마선 조사구와 비교하였을 때 2.173 %로 가장 높게 증가하였다.
- <75> <실험예 5> 베타글루칸 구조 변화
- <76> 감마선 조사된 베타글루칸은 농축된 염산(37 %, 10N) 에 녹인 후 100°C에서 2 시간 동안 1.3 N HCl에서 가수분해되었다. 산 가수분해된 베타글루칸은 베타-D-글루코즈 분석 키트(beta-D-glucose assay kit)(Megazyme International Ireland Limt.에서 구입)를 이용하여 베타-1,3-글루칸(beta-1,3-glucan), 베타-1,4-글루칸

(beta-1,4-glucan), 베타-1,6-글루칸(beta-1,6-glucan)의 함량을 측정하였다.

<77> 표 1은 방사선 조사에 의해 저 분자화된 베타글루칸에서의 베타-1,3-글루칸, 베타-1,4-글루칸 및 베타-1,6-글루칸의 함량을 나타내었다.

**표 1**

<78> **방사선 조사에 의해 저 분자화된 베타글루칸에서의 베타-1,3-글루칸, 베타-1,4-글루칸, 베타-1,6-글루칸의 함량**

방사선 흡수선량(kGy)	베타-글루칸(%)			총량 (%)
	베타-1,3-글루칸	베타-1,4-글루칸	베타-1,6-글루칸	
0	35.79	36.24	11.01	83.04
10	30.21	30.43	9.50	70.14
30	25.96	25.81	8.66	60.43
50	24.88	24.14	7.78	56.80

<79> 표 1에서 보여지듯이 방사선 조사에 의해 얻어진 저 분자량의 베타글루칸은 베타-1,3-글루칸, 베타-1,4-글루칸 및 베타-1,6-글루칸의 함량이 모두 감소하였다. 따라서 방사선 조사에 의하여 임의적으로 글루칸 구조가 절단된 베타글루칸을 얻을 수 있다는 사실을 확인할 수 있었다.

<80> **<실험예 6> 감마선 조사된 저 분자량의 베타글루칸의 시험관내(in vitro) T 세포 활성화 측정**

<81> 비장세포 증식능력은 MTT(3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromide)에 의해 측정되었다. PBS를 이용하여 5 mg/mL의 농도가 되도록 녹인 MTT용액은 24시간 동안 배양된 비장세포에 30 $\mu$ l을 넣고 37 $^{\circ}$ C 인큐베이터(incubator)에서 2시간 반응을 시킨 후 원심분리 하였다. 상등액을 제거하고 100  $\mu$ l의 디메틸설폭사이드(dimethylsulfoxide)(DMSO, Sigma)를 넣어 세포를 용해시킨 후 37 $^{\circ}$ C 인큐베이터에서 5분간 방치한 다음 마이크로플레이트 ELISA 리더(microplate ELISA reader)를 이용하여 595 nm에서 흡광도를 측정하였다.

<82> 도 5에서는 감마선 조사에 따른 베타글루칸의 T 세포 활성을 나타냈다. 마우스의 비장세포의 T 세포 활성화는 비장세포에 비조사구와 조사된 베타글루칸을 처리한 다음 24시간 배양 후 MTT 분석에 의하여 측정되었다. 본 발명에서 비조사된 베타글루칸보다 조사된 베타글루칸과 함께 배양한 비장 세포안의 T 세포 활성이 크게 증가하는 것을 관찰할 수 있었다. 0, 10, 30 및 50 kGy로 조사된 베타글루칸을 처리한 마우스의 비장세포 T 세포 활성 값은 각각 109, 116, 122 및 127 % 로 확인할 수 있었으며, 50 kGy로 조사된 베타글루칸을 처리된 비장세포의 T 세포 활성이 비조사구와 비교시 가장 높은 활성 수치를 확인할 수 있었다.

<83> **<실험예 7> 감마선 조사된 저 분자량의 베타글루칸의 시험관내(in vitro) 사이토카인 분비능 측정**

<84> 사이토카인(cytokine)분석을 위하여 비장세포(spleen cell)의 단일 세포 현탁(single cell suspensions)은 웰 당 1 $\times$ 10<sup>6</sup> 세포들(cells/well)의 농도로 96-웰 조직 배양 플레이트(well tissue cultures plates)에 놓여졌다. 사용된 배지는 최종 농도 웰 당 1 $\times$ 10<sup>6</sup> 세포들에 10% 우태혈청(fetal bovine serum, FBS), 100 U/ml 페니실린(penicillin), 100 U/ml 스트렙토마이신(streptomycin)이 첨가된 RPMI-1640 배양액(medium)을 사용하였으며, 5% CO<sub>2</sub>, 37 $^{\circ}$ C에서 배양되었다. 세포는 0 ~ 2.5  $\mu$ g/ml 농도의 베타글루칸으로 처리되었으며, 24시간 배양 후 채취되었다. 분석에 사용되기 전까지 -70 $^{\circ}$ C에 보관되었다.

<85> 본 발명에서는 시험관내 시스템(in vitro system)에서 Th 1로부터 나오는 사이토카인(cytokine)을 가지고 비조사구와 조사된 베타글루칸의 면역기능 검사를 시도하였다. T 세포(cytotoxic 및 Th1)와 자연 살해세포(NK cells)은 인터페론-감마(interferon gamma, IFN- $\gamma$ )를 분비한다. 이것의 주요기능은 포식세포의 활성화 인자이다. Th 1에서 나오는 사이토카인의 변화는 IL-2 및 IFN- $\gamma$  항체, 및 BD OptEIA<sup>TM</sup> 세트(BD Biosciences, San Jose, CA)를 사용하는 ELISA 방법에 의하여 측정하였으며, 도 6에서는 비조사구와 조사된 베타글루칸의 자극에 의한 비장세포로부터 분비하는 사이토카인인 Th 1 세포의 IFN- $\gamma$ 를 측정하였다. Th 1 세포로부터 분비하는 사이토카인인 IFN- $\gamma$ 는 비조사구 베타글루칸과 비교하였을 때 감마선 조사선량이 증가함에 따라 IFN- $\gamma$ 의 분비량이 증가하는 것을 확인할 수 있었고 30, 50 kGy로 조사된 베타글루칸이 0, 10 kGy로 조사된 베타글루칸 보다 사이토카인의 분비량이 더욱 높게 나타난 것을 확인하였다.

<86> 도 7에서는 비조사구와 조사된 베타글루칸의 자극에 의한 비장세포로부터 분비하는 사이토카인인 Th 1 세포의

IL-2를 측정하였으며, IFN-r과 동일하게 Th 1 세포로부터 분비하는 사이토카인인 IL-2 는 비조사구 베타글루칸 과 비교하였을 때 현저하게 감마선 조사선량이 증가함에 따라 IFN-r의 분비량이 증가하는 것을 확인할 수 있었고, 30, 50 kGy로 조사된 베타글루칸이 0, 10 kGy로 조사된 베타글루칸 보다 사이토카인의 분비량이 더욱 높게 나타난 것을 확인할 수 있었다.

<87> <실험예 8> 감마선 조사된 저 분자량의 베타글루칸의 시험관내(*in vitro*) DPPH(2,2-Diphenyl-1-picryl-hydrazyl) 라디칼 소거 능력 측정

<88> 본 발명에 따른 감마선이 조사된 베타글루칸의 라디칼 소거 능력은 Amarowiczdml 등의 방법으로 측정하였다 (Amarowicz, R. et.al., *Food Chemistry* 84, 4,551-562, 2004).

<89> 도 8에서는 감마선 조사된 베타글루칸의 항산화 효과를 나타내었다. 감마선 조사 처리된 베타글루칸의 DPPH 라디칼 소거능력은 처리된 베타글루칸의 모든 농도에서 비조사구 베타글루칸 보다 높게 나타났으며, 위 실험 결과에서 감마선 조사선량이 증가함에 따라 항산화 능력은 유의적으로 증가하였다.

<90> <실험예 9> 감마선 조사된 저 분자량의 베타글루칸의 생체내(*in vivo*) T 세포 활성 측정

<91> 본 발명에서 BALB/c 마우스(6 ~ 7주)들은 Orient Inc.(Charles River Technology; Seoul, Korea)에서 구입하였다. 마우스는 22±2℃ 8℃의 실내온도와 12시간 간격으로 밤과 낮이 변화는 사용장의 폴리카보네이트 우리 (polycarbonate cage)에서 사육하였고 사료(animal diet)와 물을 자유롭게(*ad libitum*) 주며 사육하였다. 동물 들은 비조사구(normal control), 0 kGy, 10 kGy, 30 kGy, 50 kGy으로 처리된 5개 그룹으로 분류하여 7일 동안 50 mg/kg 체중(body wt)의 농도로 경구투여 하여 실험을 진행하였다. 마우스의 비장을 분리한 후 비장세포를 분석 하기 전에 RPMI 배양액(medium) 안에서 즉시 유지시킨다. 본 발명에서의 동물실험은 국내 농림부의 '동물 부양 활동(Animal Care Act)'에 따라 시행하였다.

<92> 비장 림프구들(Spleenic lymphocytes)은 마우스의 비장(female BALB/c mice)에서 일반적인 분열방법으로 획득 하였다. 비장세포들(Splenocytes)은 37℃의 5% CO2 인큐베이터에서 RPMI-1640 배양액과 10% 우태혈청(fetal bovine serum), 100 U/ml 페니실린(penicillin), 100 U/ml 스트렙토마이신(streptomycin)과 함께 유지시켰다.

<93> 도 9에서는 비조사구와 조사된 베타글루칸을 투여한 마우스의 비장세포 활성을 측정하였다. 본 발명에서는 생 체내(*in vivo*)에서 비장세포의 면역조절을 알아보기 위하여 마우스의 비장세포 활성측정은 비조사구와 조사된 베타글루칸을 7일 동안 투여한 마우스의 비장세포를 24 시간 배양 후 MTT 분석으로 세포활성을 측정하였다. 비 조사구와 조사된 베타글루칸을 투여한 마우스의 비장세포 활성은 비조사구와 비교하였을 때 활성이 높은 것을 확인할 수 있었다. 10 kGy로 조사된 베타글루칸을 투여한 마우스의 비장세포 활성수치는 128.5 %이고, 30 및 50 kGy로 조사된 베타글루칸을 투여한 마우스의 비장세포 활성수치는 139.3 % 및 183.8 %으로 크게 증가된 것을 확인하였다.

<94> <실험예 10> 감마선 조사된 저 분자량의 베타글루칸의 생체내(*in vivo*) 사이토카인 분비능 측정

<95> 본 발명에서는 생체내(*in vivo*)에서 비조사구와 조사된 베타글루칸의 면역자극 기능을 알아보기 위해 실험을 진행하였으며, Th 1에서 나오는 사이토카인은 ELISA 방법에 의하여 측정하였다. 도 10과 도 11에서는 비조사구와 조사된 베타글루칸의 자극에 의한 비장세포로부터 나오는 사이토카인인 Th 1 세포의 IFN-r 및 IL-2를 측정하였 다.

<96> Th 1에서 나오는 사이토카인인 IFN-r 및 IL-2는 베타글루칸에 감마선 조사가 증가함에 따라 유의적으로 사이토 카인의 분비가 증가하는 것을 확인할 수 있었다. 7일 동안 50 kGy로 조사된 베타글루칸을 투여한 마우스의 사이 토카인 분비량은 대조구와 10, 30 kGy로 조사된 베타글루칸을 투여한 마우스보다 가장 많은 양의 사이토카인을 분비하였다.

<97> 하기에 본 발명의 저 분자량의 베타글루칸을 위한 제제예를 예시한다.

<98> <제제예 1> : 약학적 제제의 제조

<99> 1. 산제의 제조

<100> 저 분자량의 베타글루칸 2 g

<101> 유당 1 g

<102> 상기의 성분을 혼합하고 기밀포에 충전하여 산제를 제조하였다.

- <103> 2. 정제의 제조
- <104> 저 분자량의 베타글루칸 100 mg
- <105> 옥수수전분 100 mg
- <106> 유 당 100 mg
- <107> 스테아린산 마그네슘 2 mg
- <108> 상기의 성분을 혼합한 후, 통상의 정제의 제조방법에 따라서 타정하여 정제를 제조하였다.
- <109> 3. 캡슐제의 제조
- <110> 저 분자량의 베타글루칸 100 mg
- <111> 옥수수전분 100 mg
- <112> 유 당 100 mg
- <113> 스테아린산 마그네슘 2 mg
- <114> 상기의 성분을 혼합한 후, 통상의 캡슐제의 제조방법에 따라서 젤라틴 캡슐에 충전하여 캡슐제를 제조하였다.
- <115> 4. 환의 제조
- <116> 저 분자량의 베타글루칸 1 g
- <117> 유당 1.5 g
- <118> 글리세린 1 g
- <119> 자일리톨 0.5 g
- <120> 상기의 성분을 혼합한 후, 통상의 방법에 따라 1 환 당 4 g이 되도록 제조하였다.
- <121> 5. 과립의 제조
- <122> 저 분자량의 베타글루칸 150 mg
- <123> 대두 추출물 50 mg
- <124> 포도당 200 mg
- <125> 전분 600 mg
- <126> 상기의 성분을 혼합한 후, 30% 에탄올 100 mg을 첨가하여 섭씨 60℃에서 건조하여 과립을 형성한 후 포에 충전하였다.
- <127> <제제예 2> : 식품의 제조
- <128> 본 발명의 저 분자량의 베타글루칸을 포함하는 식품들을 다음과 같이 제조하였다.
- <129> 1. 조리용 양념의 제조
- <130> 본 발명의 저 분자량의 베타글루칸 20~95 중량부로 건강 증진용 조리용 양념을 제조하였다.
- <131> 2. 밀가루 식품의 제조
- <132> 본 발명의 저 분자량의 베타글루칸 0.5~5.0 중량부를 밀가루에 첨가하고, 이 혼합물을 이용하여 빵, 케이크, 쿠키, 크래커 및 면류를 제조하여 건강 증진용 식품을 제조하였다.
- <133> 3. 스프 및 육즙(gravies)의 제조
- <134> 본 발명의 저 분자량의 베타글루칸 0.1~5.0 중량부를 스프 및 육즙에 첨가하여 건강 증진용 육가공 제품, 면류의 수프 및 육즙을 제조하였다.
- <135> 4. 그라운드 비프(ground beef)의 제조
- <136> 본 발명의 저 분자량의 베타글루칸 10 중량부를 그라운드 비프에 첨가하여 건강 증진용 그라운드 비프를 제조하

였다.

- <137> 5. 유제품(dairy products)의 제조
- <138> 본 발명의 저 분자량의 베타글루칸 5~10 중량부를 우유에 첨가하고, 상기 우유를 이용하여 버터 및 아이스크림과 같은 다양한 유제품을 제조하였다.
- <139> 6. 선식의 제조
- <140> 현미, 보리, 찹쌀, 율무를 공지의 방법으로 알파화시켜 건조시킨 것을 배전한 후 분쇄기로 입도 60 메쉬의 분말로 제조하였다.
- <141> 검정콩, 검정깨, 들깨도 공지의 방법으로 찌서 건조시킨 것을 배전한 후 분쇄기로 입도 60 메쉬의 분말로 제조하였다.
- <142> 본 발명의 저 분자량의 베타글루칸을 진공 농축기에서 감압농축하고, 분무, 열풍건조기로 건조하여 얻은 건조물을 분쇄기로 입도 60 메쉬로 분쇄하여 건조분말을 얻었다.
- <143> 상기에서 제조한 곡물류, 종실류 및 저 분자량의 베타글루칸의 건조분말을 다음의 비율로 배합하여 제조하였다.
- <144> 곡물류(현미 30 중량부, 율무 15 중량부, 보리 20 중량부),
- <145> 종실류(들깨 7 중량부, 검정콩 8 중량부, 검정깨 7 중량부),
- <146> 저 분자량의 베타글루칸의 건조분말(3 중량부),
- <147> 영지(0.5 중량부),
- <148> 지황(0.5 중량부)

**<제제예 3> : 음료의 제조**

- <150> 1. 건강음료의 제조
- <151> 저 분자량의 베타글루칸 1000 mg
- <152> 구연산 1000 mg
- <153> 올리고당 100 g
- <154> 매실농축액 2 g
- <155> 타우린 1 g
- <156> 정제수를 가하여 전체 900 ml

통상의 건강음료 제조방법에 따라 상기의 성분을 혼합한 다음, 약 1시간 동안 85℃에서 교반 가열한 후, 만들어진 용액을 여과하여 멸균된 2 l 용기에 취득하여 밀봉 멸균한 뒤 냉장 보관한 다음 본 발명의 건강음료 조성물 제조에 사용한다.

<158> 상기 조성비는 비교적 기호 음료에 적합한 성분을 바람직한 실시예로 혼합 조성하였지만, 수요계층, 수요국가, 사용 용도 등 지역적, 민족적 기호도에 따라서 그 배합비를 임의로 변형 실시하여도 무방하다.

- <159> 2. 야채주스의 제조
- <160> 본 발명의 저 분자량의 베타글루칸 5 g을 토마토 또는 당근 주스 1,000 ml에 가하여 건강 증진용 야채주스를 제조하였다.

- <161> 3. 과일주스의 제조
- <162> 본 발명의 저 분자량의 베타글루칸 1 g을 사과 또는 포도 주스 1,000ml 에 가하여 건강 증진용 과일주스를 제조하였다.

**<제제예 4>: 저 분자량의 베타글루칸을 이용한 화장품의 제조**

<164> 본 발명의 저 분자량의 베타글루칸을 유효성분으로 함유하는 면역강화용 기능성 화장품을 제조할 수 있다. 본 발명자들은 저 분자량의 베타글루칸을 함유하는 면역강화용 기능성 화장품으로 영양화장수, 크림, 에센스 등의

유화 제형의 화장품 및 유연화장수 등의 가용화 제형의 화장품을 제조하였다.

<165> <1-1> 유화 제형의 화장품 제조

<166> 표 2에 기재된 조성으로 유화제형의 화장품을 제조하였다. 제조 방법은 하기와 같다.

- <167> 1) 1 내지 9의 원료를 혼합한 혼합물을 65~70℃로 가열하였다.
- <168> 2) 10의 원료를 상기 단계 1)의 혼합물에 투입하였다.
- <169> 3) 11 내지 13의 원료의 혼합물을 65~70℃로 가열하여 완전히 용해시켰다.
- <170> 4) 상기 단계 3)을 거치면서, 상기 2)의 혼합물을 서서히 첨가하여 8,000 rpm에서 2~3분간 유화시켰다.
- <171> 5) 14의 원료를 소량의 물에 용해시킨 후 상기 단계 4)의 혼합물에 첨가하고 2분간 더 유화시켰다.
- <172> 6) 15 내지 17의 원료를 각각 평량한 후 상기 단계 5)의 혼합물에 넣고 30초간 더 유화시켰다.
- <173> 7) 상기 단계 6)의 혼합물을 유화 후 탈기과정을 거쳐 25~35℃로 냉각시킴으로서 유화제형의 화장품을 제조하였다.

표 2

<174> 유화 제형 1, 2, 3의 조성

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	저 분자량의 베타글루칸	0.0001	1	10

<175> <1-2> 가용화 제형의 화장품 제조

<176> 표 2에 기재된 조성으로 가용화 제형의 화장품을 제조하였다. 제조 방법은 하기와 같다.

- <177> 1) 2 내지 6의 원료를 1의 원료(정제수)에 넣고 아식믹서를 이용하여 용해시켰다.
- <178> 2) 8 내지 11의 원료를 7의 원료(알코올)에 넣고 완전용해시켰다.
- <179> 3) 상기 단계 2)의 혼합물을 상기 단계 1)의 혼합물에 서서히 첨가하면서 가용화시켰다.

표 3

<180> 가용화 제형 1, 2, 3의 조성

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	저 분자량의 베타글루칸	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	-	-	0.2

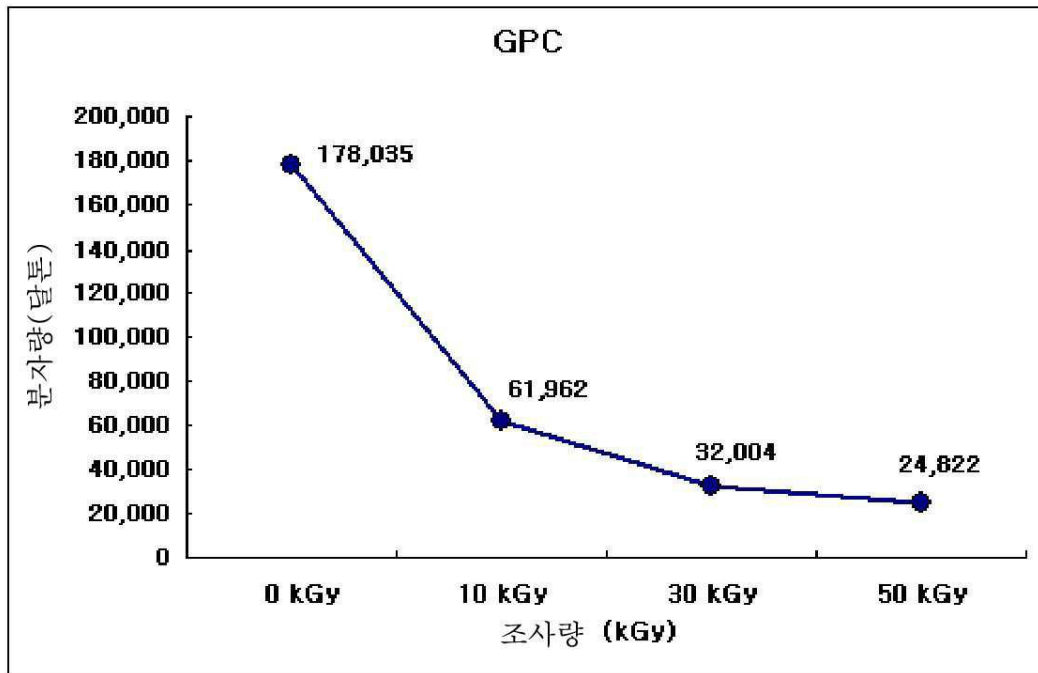
**도면의 간단한 설명**

- <181> 도 1은 감마선 조사에 의한 베타글루칸의 분자량 감소를 나타내는 그래프이고,
- <182> 도 2는 감마선 조사에 의한 베타글루칸의 점도 감소를 나타내는 그래프이고,
- <183> 도 3은 감마선 조사에 의한 베타글루칸의 용해도 증가를 나타내는 그래프이고,
- <184> 도 4는 감마선 조사에 의한 베타글루칸의 환원당 변화 증가를 나타내는 그래프이고,
- <185> 도 5는 감마선 조사된 베타글루칸에 의한 비장 세포의 T 세포 활성 증가(*in vitro*)를 나타내는 그래프이고,
- <186> 도 6은 감마선 조사된 베타글루칸에 의한 비장 세포로부터의 INF-r 분비능의 증가(*in vitro*)를 나타내는 그래프이고,
- <187> 도 7은 감마선 조사된 베타글루칸에 의한 비장 세포로부터의 IL-2 분비능의 증가(*in vitro*)를 나타내는 그래프이고,
- <188> 도 8은 감마선 조사된 베타글루칸의 2,2-디페닐-1-피크릴-하이드라질(2,2-Diphenyl-1-picryl-hydrazyl, DPPH) 라디칼 소거 능력의 증가를 나타내는 그래프이고,
- <189> 도 9는 감마선 조사된 베타글루칸에 의한 비장 세포의 T 세포 활성 증가(*in vivo*)를 나타내는 그래프이고,
- <190> 도 10은 감마선 조사된 베타글루칸에 의한 비장 세포로부터의 INF-r 분비능의 증가(*in vivo*)를 나타내는 그래프이고,
- <191> 도 11은 감마선 조사된 베타글루칸에 의한 비장 세포로부터의 IL-2 분비능의 증가(*in vivo*)를 나타내는 그래프이다.

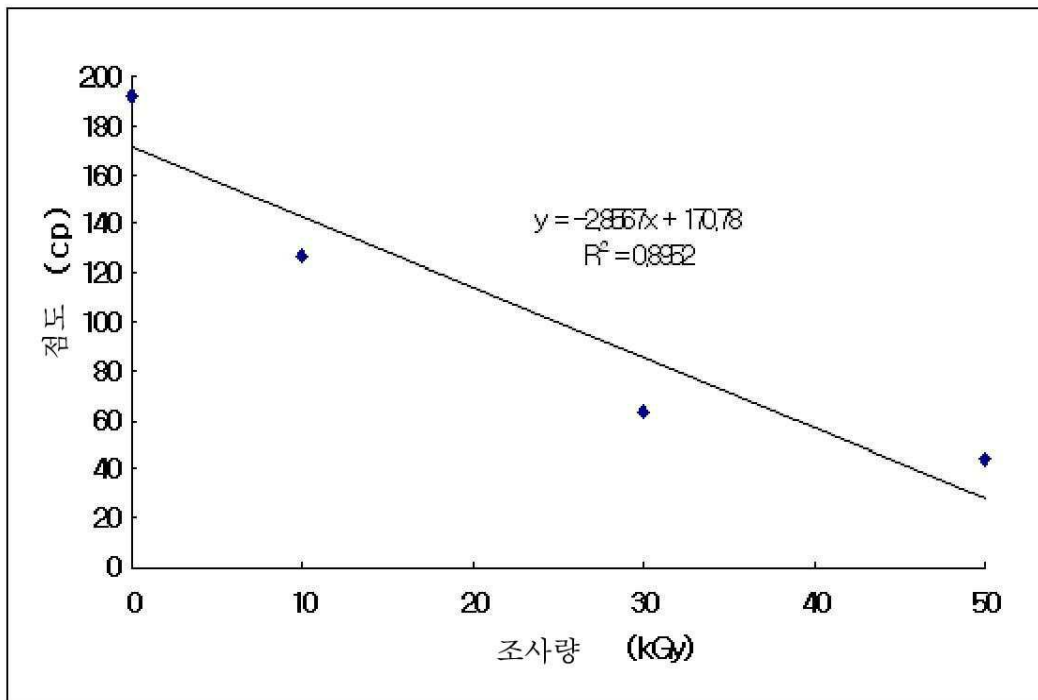


도면

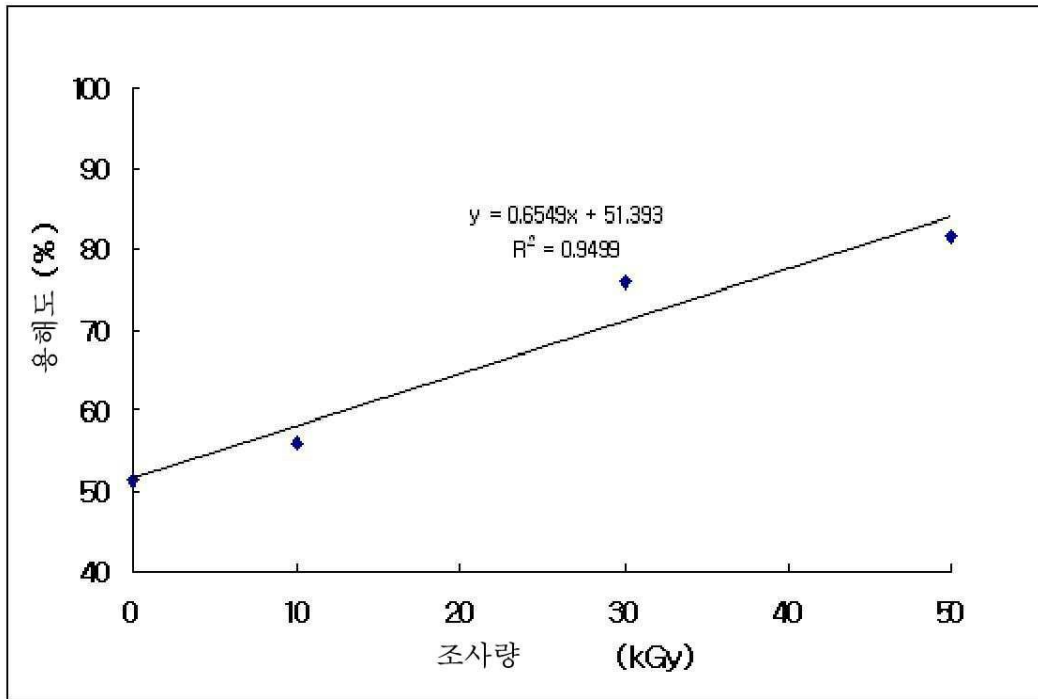
도면1



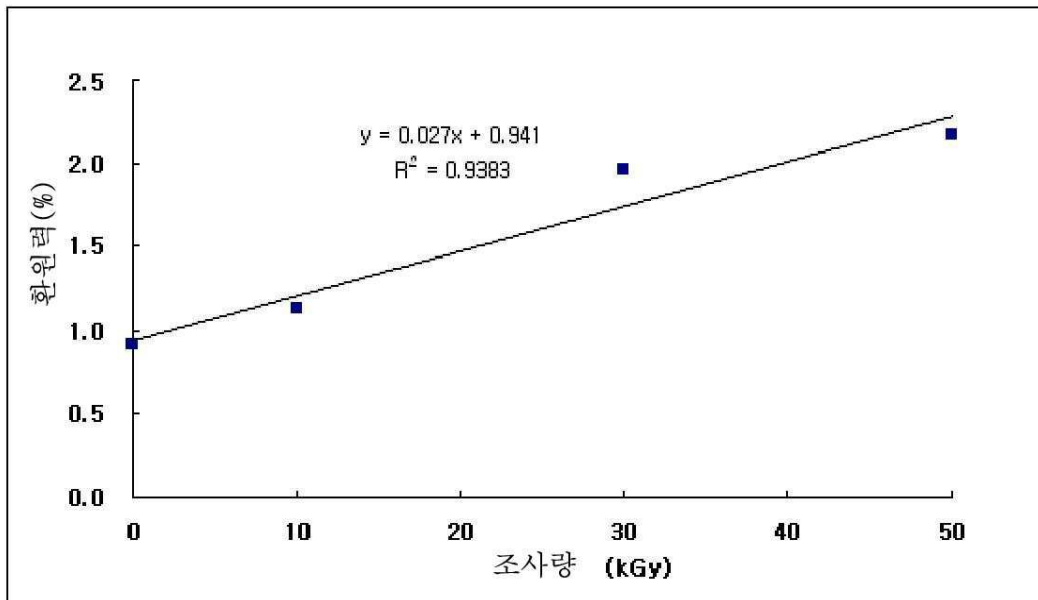
도면2



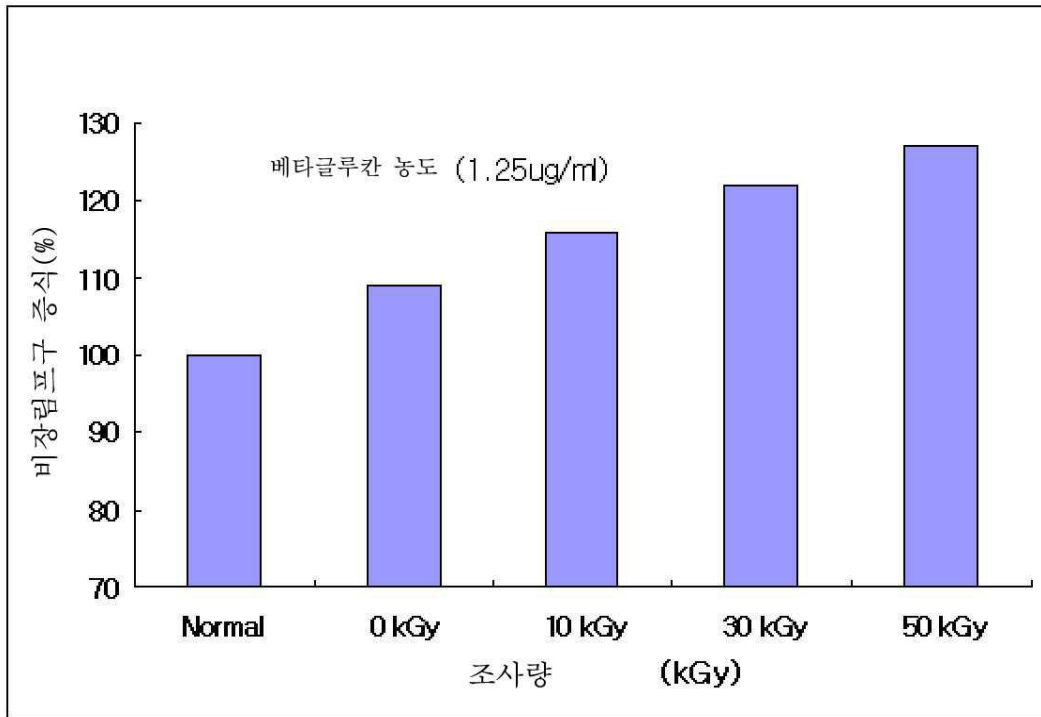
도면3



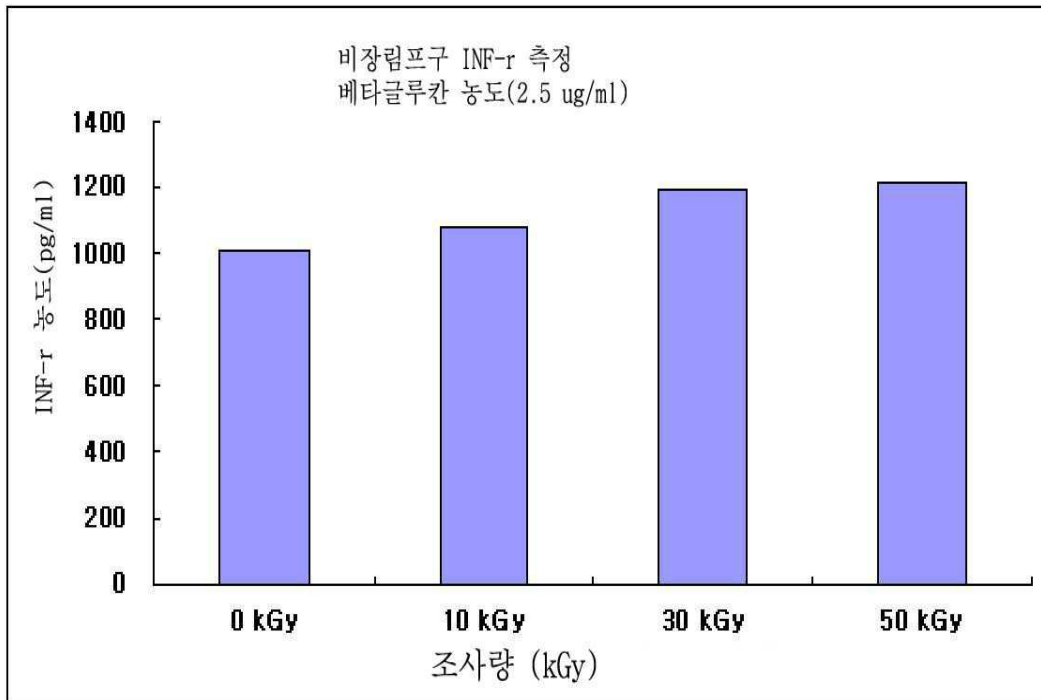
도면4



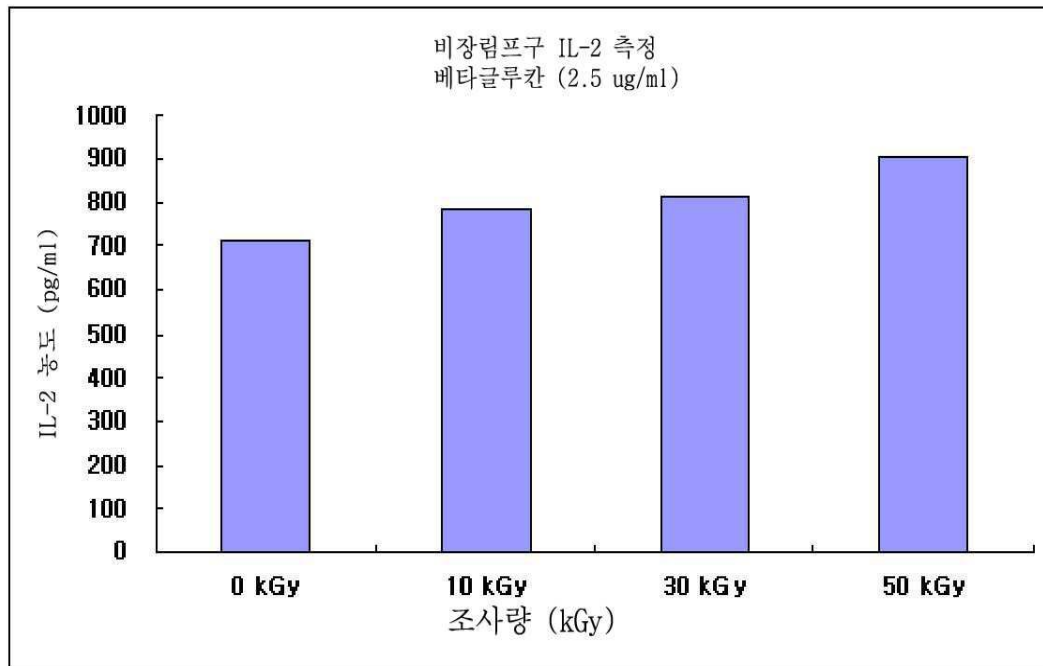
도면5



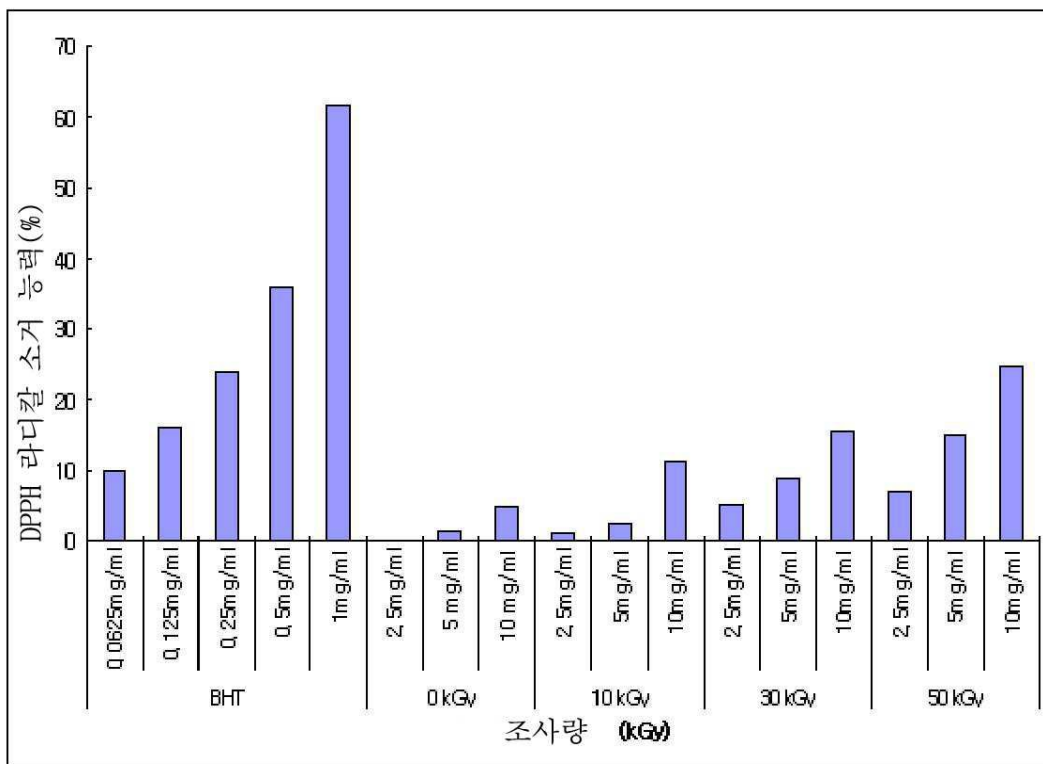
도면6



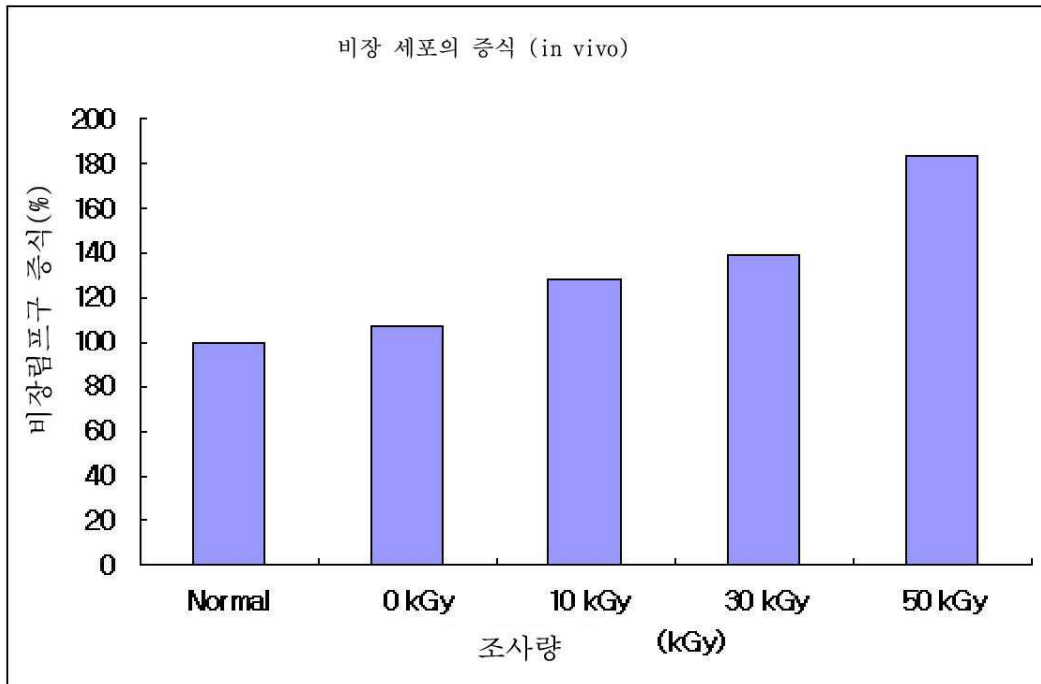
도면7



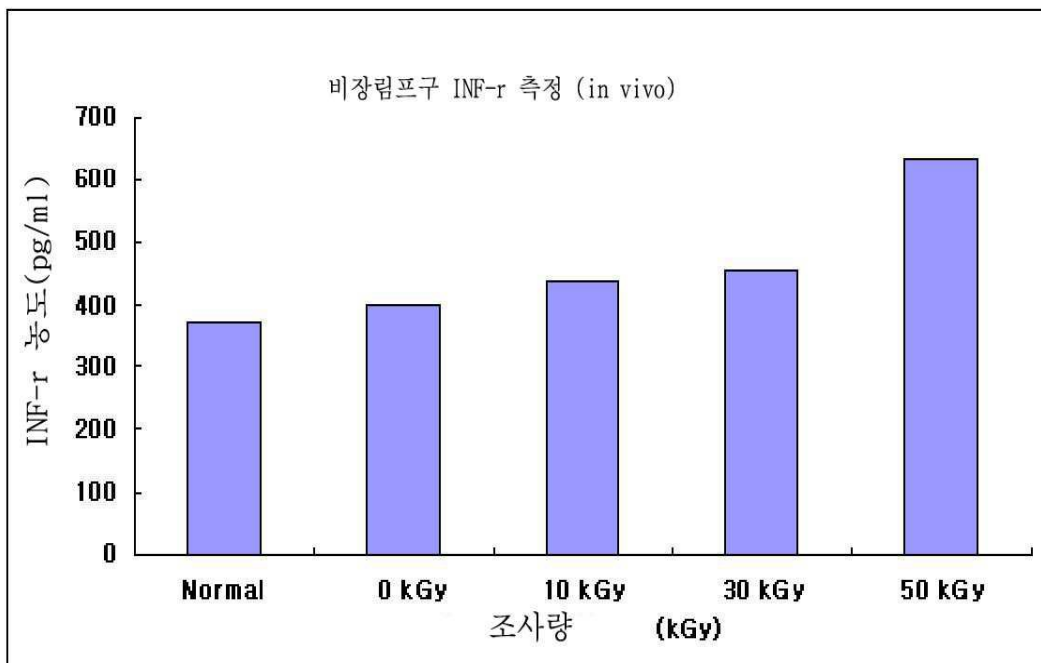
도면8



도면9



도면10



도면11

