



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2021-0089986
(43) 공개일자 2021년07월19일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C07C 225/06 (2006.01) A01N 25/00 (2021.01)
A01N 25/30 (2006.01) A01N 33/02 (2006.01)
A01N 37/36 (2006.01) A01N 37/44 (2006.01)
A01N 43/36 (2006.01) C07D 207/16 (2006.01)

(52) CPC특허분류

C07C 225/06 (2013.01)
A01N 25/00 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2020-0003237

(22) 출원일자 2020년01월09일

심사청구일자 2020년05월12일

(71) 출원인

고려대학교 산학협력단

서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)

(72) 발명자

하덕찬

서울특별시 성북구 안암로 145

심재호

서울특별시 성북구 안암로 145

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

정은열, 김태훈

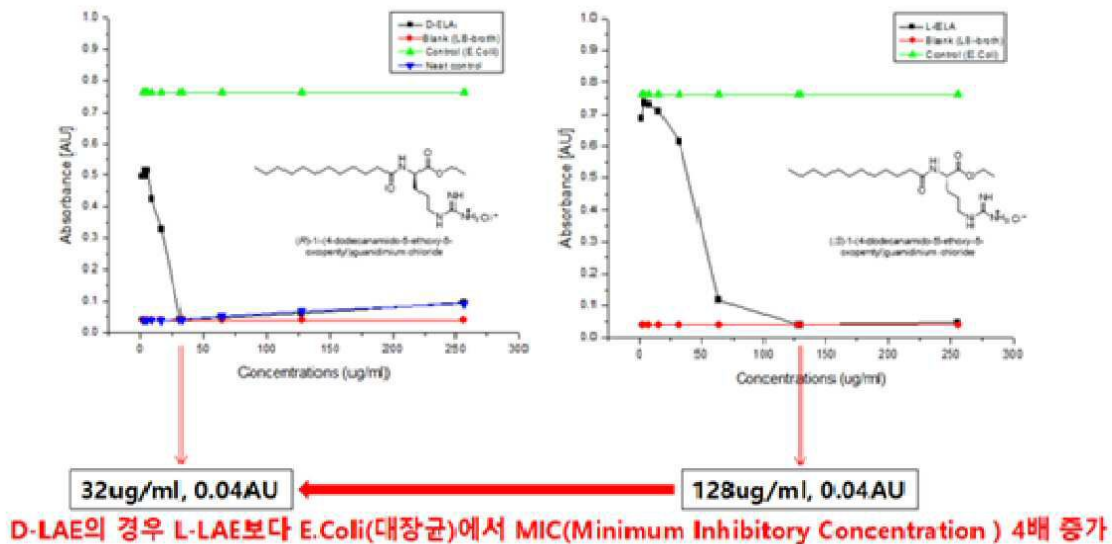
전체 청구항 수 : 총 3 항

(54) 발명의 명칭 아미노산 기반의 항균 항생 계면활성 화합물 및 이를 포함하는 코어-셸 구조의 나노 복합체

(57) 요약

본 발명은 아미노산 기반의 항균 항생 계면활성 화합물과 이를 금 또는 실리카 나노 입자에 도포한 항균 항생 나노 복합체에 관한 것으로서, 천연, 비천연 아미노산 기반의 항균 항생 계면활성 화합물이며, 또한 천연 추출물 유래의 나노입자를 이용한 것으로서, 친환경적으로 합성이 가능하고, 수용성 증가, 세포 독성 감소, 생체이용률 증가, 우수한 항균성을 가져서 신규 항균제, 계면활성제, 방부제, 바이오 나노소재 등으로 유용하게 활용할 수 있다.

대표도 - 도9



(52) CPC특허분류

A01N 25/30 (2013.01)

A01N 33/02 (2013.01)

A01N 37/36 (2013.01)

A01N 37/44 (2013.01)

A01N 43/36 (2013.01)

C07D 207/16 (2013.01)

(72) 발명자

신욱

서울특별시 마포구 토정로31길 23, 107동 1203호

이재환

서울특별시 영등포구 양평로24길 9, 101동 303호

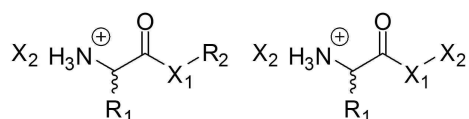
명세서

청구범위

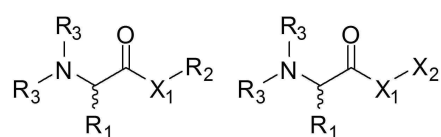
청구항 1

하기 [화학식 1] 내지 [화학식 12]로 표시되는 아미노산 기반의 항균 항생 계면활성제 화합물:

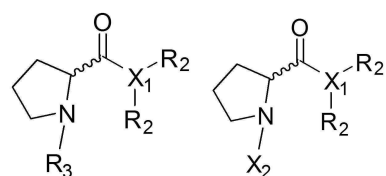
[화학식 1] [화학식 2]



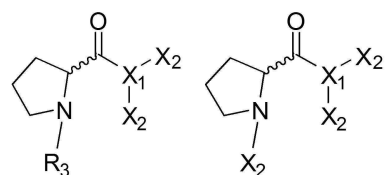
[화학식 3] [화학식 4]



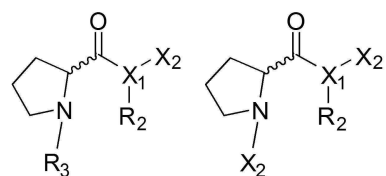
[화학식 5] [화학식 6]



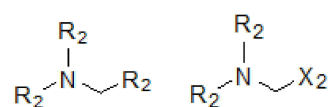
[화학식 7] [화학식 8]



[화학식 9] [화학식 10]



[화학식 11] [화학식 12]



상기 [화학식 1] 내지 [화학식 12]에서,

R₁은 수소, 알킬, 카르복실산, 아민, 알코올, 구아니딘, 페닐, 페놀, 인돌, 이미다졸 및 D-글루코스 중에서 선택되는 어느 하나이고,

R₂는 수소, 알킬, D-글루코스, t-부틸 카바메이트, 벤질 카바메이트, 9-플루오레닐메틸 카바메이트 및 아세트아마이드 중에서 선택되는 어느 하나이며,

R₃은 t-부틸 카바메이트, 벤질 카바메이트, 9-플루오레닐메틸 카바메이트 및 아세트아마이드 중에서 선택되는 어느 하나이고,

X_1 은 N, O, P 및 S 중에서 선택되는 어느 하나이며,

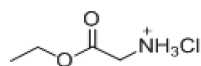
X_2 는 염으로서, 나트륨, 마그네슘, 칼륨 및 칼슘 이온 중에서 선택되는 어느 하나이거나; 클로라이드, 브롬, 요오드, 설퍼네이트 및 아세테이트 이온 중에서 선택되는 어느 하나이다.

청구항 2

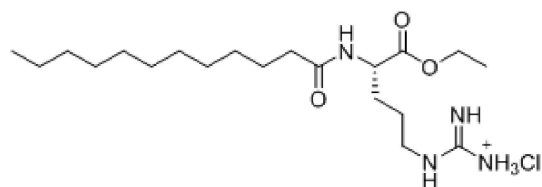
제1항에 있어서,

하기 [화학식 1] 내지 [화학식 12]는 화합물 중에서 선택되는 어느 하나인 것을 특징으로 하는 아미노산 기반의 항균 항생 계면활성제 화합물:

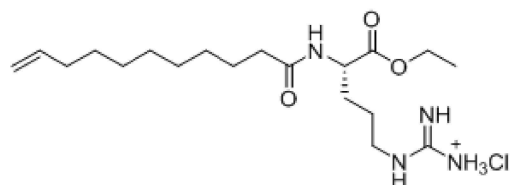
[1a]



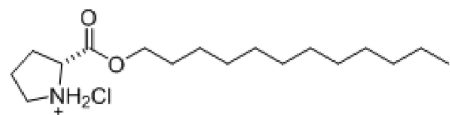
[2a]



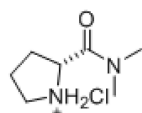
[3a]



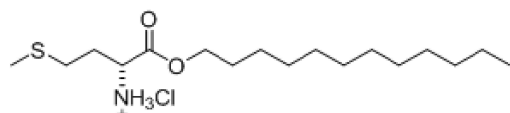
[4a]



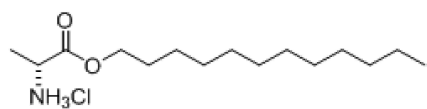
[5a]



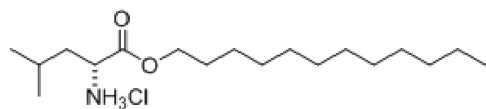
[6a]



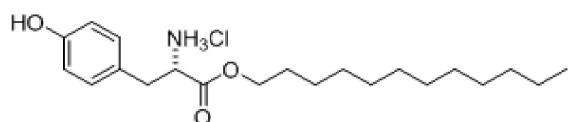
[7a]



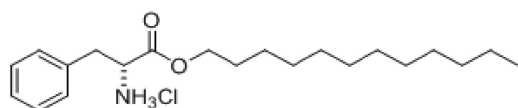
[8a]



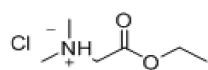
[9a]



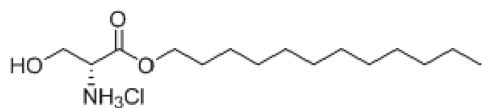
[10a]



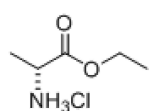
[11a]



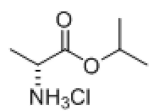
[12a]



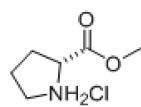
[13a]



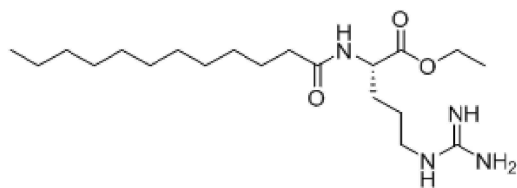
[14a]



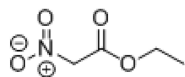
[15a]



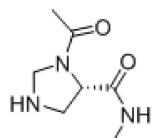
[16a]



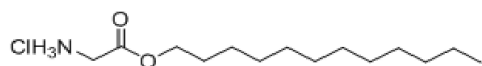
[17a]



[18a]



[19a]



[20a]



청구항 3

제1항에 따른 아미노산 기반의 향균 항생 계면활성제 화합물 및 금(Au) 또는 실리카 (SiO₂) 나노입자를 포함하고,

상기 금(Au) 또는 실리카 (SiO₂) 나노입자에 아미노산 기반의 향균 항생 계면활성제 화합물이 도포되어 코어-셸 구조를 형성하고 있는 것을 특징으로 하는 향균 항생 나노복합체.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 아미노산 기반의 향균 항생 계면활성 화합물과 이를 금 또는 실리카 나노 입자에 도포한 향균 항생 나노 복합체에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 계면활성제는 상간의 경계면 활성화를 통한 표면장력 (surface tension)의 강하능력으로 인해 표면의 습윤, 침투, 기포, 소포, 유화, 가용화, 분산, 응집 및 세정 등의 작용을 가져 모든 세제 (detergents)와 화장품 (cosmetics) 등 최근 전 산업에 필수적으로 사용되는 필수 주원료이다.

[0003] 다만, 최근 환경에 대한 의식의 변화와 상향된 생물학적 안전성 기준들로 인하여 화장품과 같은 산업 분야는 계면활성제를 조심스럽게 선택하고 있으며, 규제와 환경보호의 쟁점으로 인해 계면활성제의 개발에서 이를 해결하는 것이 중요한 문제이다. 또한, 화학 물질에 의한 환경오염이나 인체 유해성이 대두되면서 이를 억제하기 위해서 환경부하 물질이나 유해화학 물질을 지정하여 제조과정, 취급 및 폐기에 이르기까지 여러 가지 법령이나 규제에 의해 사용이 제한되고 있다.

- [0004] 최근 자연물 추출에 의한 천연 또는 생합성의 생물 계면활성제(bio-surfactants)는 양친매성의 생분해성 친환경 기능성 물질로서 종래의 합성 계면활성제를 점차 대체해 나갈 것으로 예상된다.
- [0005] 또한, 인체에 대한 안전성 문제가 주요 해결 과제인데, 분자가 작아 침투력이 강해 피부를 자극하여 아토피 피부염을 유발하고 모세관을 통해 기관으로 들어가면 질병이나 암을 유발할 수도 있다고 보고되고 있으며, 이에 대한 논란도 많이 일어나고 있다.
- [0006] 따라서, 환경 오염 저감은 물론이고 인체 안전성 문제가 해결될 수 있으며, 수용성 증가, 세포 독성 감소, 생체 이용률 증가, 항생 항균 등의 특성도 함께 거둘 수 있는 물질에 대한 개발이 절실히 필요한 실정이다.
- [0007] 특히, 방부제, 항균 항생 계면활성제는 현재 내성으로 인한 문제점과 슈퍼박테리아의 출현으로 새로운 기작을 가지는 제제의 개발이 요구되는 상황이며, 다양한 항균 활성을 지니는 후보 물질을 활용하여 그 문제점을 해결하려는 시도가 이루어지고 있다.

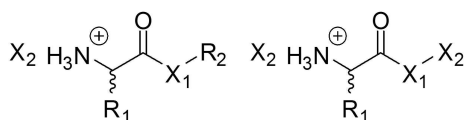
발명의 내용

해결하려는 과제

- [0008] 따라서, 본 발명은 항균성 증진 및 나노 변형 소재의 열적 안정성을 통해 신규 바이오 소재의 적용 가능성을 제 공하고자 하며, 이를 위하여 천연, 비천연 아미노산 기반의 항균 항생 계면활성 화합물과, 천연유래 물질의 나 노입자와 함께 이용한 나노 복합체를 제공하고자 한다.
- [0009] 이를 통하여 생리활성 및 물리적 성능이 증가된 신물질을 친환경적으로 합성하여 신규 항균제, 계면활성제, 방 부제, 바이오 나노소재 등을 개발하고자 한다.

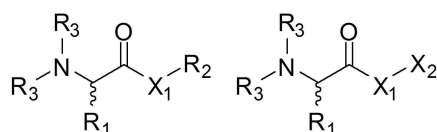
과제의 해결 수단

- [0010] 따라서, 본 발명은 상기 과제를 해결하기 위하여 친환경적인 방법으로, 항균 및 항산화 성능이 뛰어난 천연, 비 천연 아미노산 기반의 항균 항생 계면활성 화합물을 제공한다.
- [0011] 또한, 천연 추출물을 이용하여 합성한 금(Au) 또는 친환경적인 방법을 이용하여 합성한 실리카(SiO₂) 나노입자 에 상기 화합물을 도포한 코어-셸 구조의 항균 항생 계면활성제로 활용할 수 있는 나노 복합체를 제공하고자 한 다.
- [0012] 실리카(SiO₂) 또는 금(Au)을 이용하여 나노 복합체로 형성하여 100 ~ 200 ℃ 이상의 고온에 활용시 항균 항생 화합물의 응집방지 문제를 해결할 수 있으며, 코어의 실리카(SiO₂) 또는 금(Au) 나노입자 성질에 의해 소재의 기능성이 비약적으로 향상될 수 있다.
- [0013] 이를 위하여 본 발명은 하기 [화학식 1] 내지 [화학식 12]로 표시되는 아미노산 기반의 항균 항생 계면활성제 화합물을 제공한다.
- [0014] [화학식 1] [화학식 2]



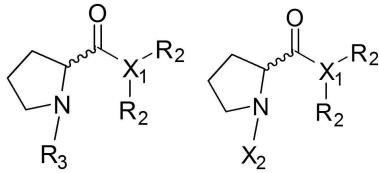
[0015]

[화학식 3] [화학식 4]



[0017]

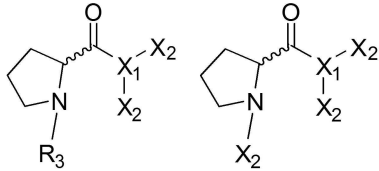
[화학식 5] [화학식 6]



[0019]

[0020]

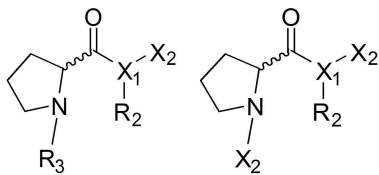
[화학식 7] [화학식 8]



[0021]

[0022]

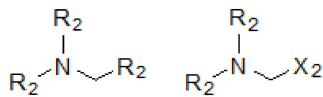
[화학식 9] [화학식 10]



[0023]

[0024]

[화학식 11] [화학식 12]



[0025]

[0026]

상기 [화학식 1] 내지 [화학식 12]의 구체적인 구조, 각 치환기의 정의 및 이에 의하여 구현되는 구체적인 화합물에 대해서는 후술하기로 한다.

[0028]

또한, 본 발명은 상기 아미노산 기반의 항균 항생 계면활성제 화합물 및 금(Au) 또는 실리카(SiO₂) 나노입자를 포함하는 항균 항생 나노복합체를 제공한다.

[0029]

본 발명에 따른 항균 항생 나노복합체는 상기 금(Au) 또는 실리카(SiO₂) 나노입자에 아미노산 기반의 항균 항생 계면활성제 화합물이 도포되어 코어-셸 구조를 형성하고 있는 것을 특징으로 한다.

발명의 효과

[0030]

본 발명에 따른 항균 및 항생 성능을 갖는 계면 활성 화합물 및 이를 이용한 나노복합체는 천연, 비천연 아미노산 기반의 항균 항생 계면활성 화합물이며, 또한 천연 추출물 유래의 나노입자를 이용한 것으로서, 친환경적으로 합성이 가능하고, 수용성 증가, 세포 독성 감소, 생체이용률 증가, 우수한 항균성을 가져서 신규 항균제, 계면활성제, 방부제, 바이오 나노소재 등으로 유용하게 활용할 수 있다.

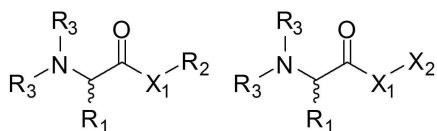
도면의 간단한 설명

[0031]

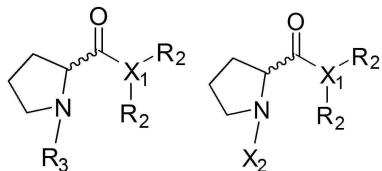
도 1은 미강 추출물, HAuCl₄의 농도 및 계면활성제의 첨가 유, 무에 따른 본 발명에 따른 나노 입자의 모양 및 사이즈를 제어한 합성 결과를 보여주는 도면이다.

도 2는 스피루리나 추출물, HAuCl₄의 농도별에 본 발명에 따른 나노 입자의 모양 및 사이즈를 제어한 합성 결과를 보여주는 도면이다.

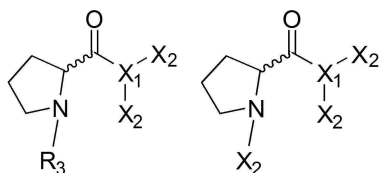
도 3 및 도 4는 각각 본 발명의 일 실시예에 따라 합성한 금 나노입자에 대한 UV 확인 결과 및 PL 확인 결과이다.



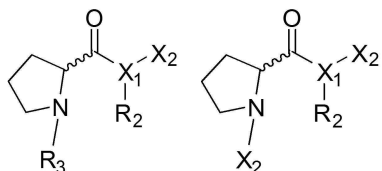
[화학식 5] [화학식 6]



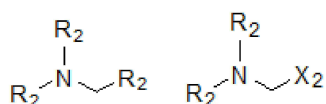
[화학식 7] [화학식 8]



[화학식 9] [화학식 10]



[화학식 11] [화학식 12]



상기 [화학식 1] 내지 [화학식 12]에서,

R₁은 수소, 알킬, 카르복실산, 아민, 알코올, 구아니딘, 페닐, 페놀, 인돌, 이미다졸 및 D-글루코스 중에서 선택되는 어느 하나이다.

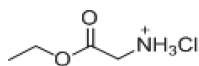
R₂는 수소, 알킬, D-글루코스, t-부틸 카바메이트, 벤질 카바메이트, 9-플루오레닐메틸 카바메이트 및 아세트아마이드 중에서 선택되는 어느 하나이다.

R₃은 t-부틸 카바메이트, 벤질 카바메이트, 9-플루오레닐메틸 카바메이트 및 아세트아마이드 중에서 선택되는 어느 하나이다.

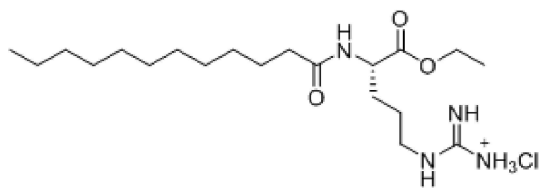
X₁은 N, O, P 및 S 중에서 선택되는 어느 하나이며, X₂는 염으로서, 나트륨, 마그네슘, 칼륨 및 칼슘 이온 중에서 선택되는 어느 하나이거나; 클로라이드, 브롬, 요오드, 설포네이트 및 아세테이트 이온 중에서 선택되는 어느 하나이다.

본 발명의 구체적인 일 실시예에 의하면, [화학식 1] 내지 [화학식 12]는 하기 [화학식 1a] 내지 [화학식 20a] 화합물 중에서 선택되는 어느 하나일 수 있으며, 다만 이에 의하면 본 발명의 범위가 제한되는 것은 아니다.

[1a]

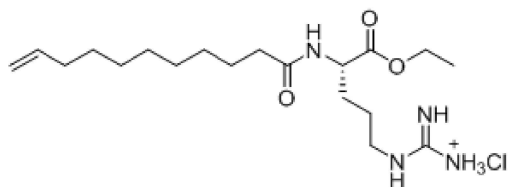


[0055] [2a]



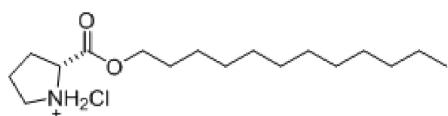
[0056]

[0057] [3a]



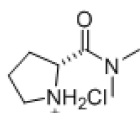
[0058]

[0059] [4a]



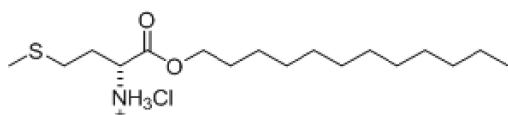
[0060]

[0061] [5a]



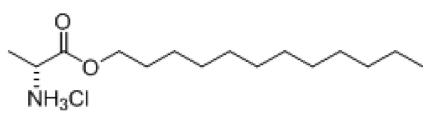
[0062]

[0063] [6a]



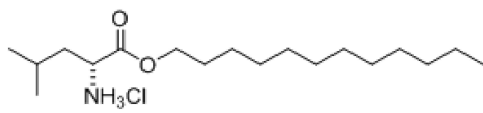
[0064]

[0065] [7a]



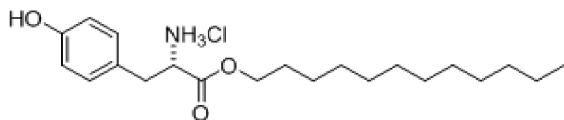
[0066]

[0067] [8a]



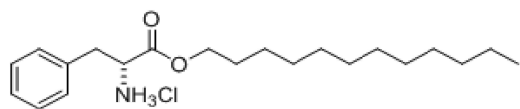
[0068]

[0069] [9a]



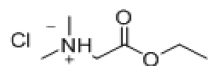
[0070]

[0071] [10a]



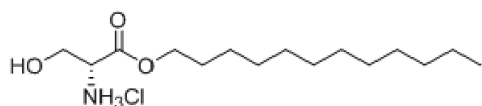
[0072]

[0073] [11a]



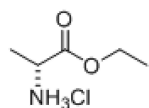
[0074]

[0075] [12a]



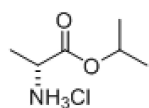
[0076]

[0077] [13a]



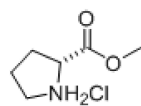
[0078]

[0079] [14a]



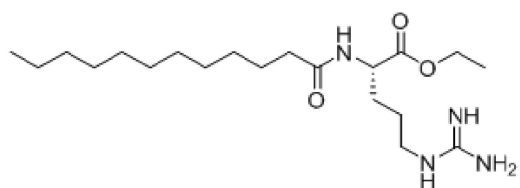
[0080]

[0081] [15a]



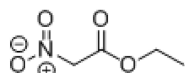
[0082]

[0083] [16a]



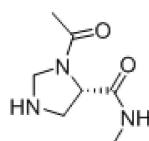
[0084]

[0085] [17a]



[0086]

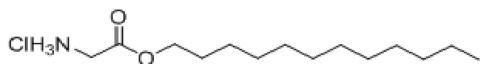
[0087] [18a]



[0088]

[0089] [19a]

[0090]



[0091] [20a]

[0092]



[0094] 또한, 본 발명의 다른 일 측면은 상기 아미노산 기반의 항균 항생 계면활성제 화합물 및 금(Au) 또는 실리카(SiO₂) 나노입자를 포함하는 항균 항생 나노복합에 관한 것이다.

[0095] 본 발명에 따른 항균 항생 나노복합체는 상기 금(Au) 또는 실리카(SiO₂) 나노입자에 아미노산 기반의 항균 항생 계면활성제 화합물이 도포되어 코어-셸 구조를 형성하고 있는 것을 특징으로 한다.

[0097] 이하, 실시예 및 실험예를 통하여 본 발명을 더욱 상세하게 설명하기로 한다. 이러한 실시예 및 실험예는 본 발명을 구체적으로 예시하기 위한 것일 뿐이며, 본 발명의 범위가 이러한 실시예 및 실험예에 의하여 제한되는 것은 아니다.

[0099] <합성예 1>

[0100] 톨루엔 (100 mL) 중 D-아미노산 (5 g, 56.1 mmol)의 교반 용액에 하나의 로트에서 도데칸올 (9.42 g, 50.5 mmol)을 첨가하고, Toluene-4-sulfonic acid monohydrate (pTSA, 톨루엔-4-설폰산일 수화물)(11.75 g, 61.7 mmol)을 첨가한 후에 반응 혼합물의 온도를 서서히 환류 온도로 상승시키고, 물을 공비적으로 분리하고, 반응 혼합물을 TLC로 모니터링하였다. 반응 혼합물을 진공 하에서 농축시키고, 수득된 잔류물을 에틸 아세테이트 (200 mL)에 취하고 5% Na₂CO₃ (3 × 50 mL) 수용액으로 세척 한 다음 염수 용액으로 세척하였다. 유기 층을 NaS 상에서 건조시키고 진공 하에 농축시켜 도데실 화합물 (14.4 g, 수율 : 100 %)을 액체로서 수득하였다. 에틸아세테이트/헥산/MeOH (10:10:1 mL) 중 화합물 (5 g, 17.54 mmol)의 교반된 용액을 0 °C로 냉각시켰다. 반응 혼합물을 1N HCl로 60분 동안 50 °C에서 교반하고, 반응 혼합물을 TLC로 모니터링 하였다. 반응 혼합물을 진공 하에 농축시키고, 수득된 잔류 물을 에틸아세테이트 (3 × 52 mL)에 이어 헥산 (5 × 50 mL)으로 허싱 (hushing) 하여 습식 화합물 (5.5 g)을 반고체로서 수득하였다. 반고체를 에틸 아세테이트/헥산 (10:10 mL)에 넣고 가열하여 환류시키고, 환류에서 30분 동안 교반하였다. 반응 혼합물을 서서히 상온으로 냉각한 다음 0 °C로 냉각시켰다. 수득된 고체를 질소 하에서 여과하고 진공 하에서 건조시켜 백색 흡습성 고체로서 에스테르 염 (3 g 수율 53.5%)을 수득하였다.

[0102] <합성예 2>

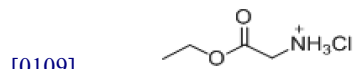
[0103] 톨루엔 (100 mL) 중 아미노산 (12.1 mmol), pTSA (2.30 g, 12.1 mmol) 및 알코올 (C2 ~ C12, 14.5 mmol)의 혼합물을 Dean-Stark 장치를 사용하여 48 시간 동안 가열하였다. 조 생성물을 EtOAc/헥산 (1:2)을 사용하여 실리카 겔상에서 컬럼크로마토그래피로 정제하여 에스테르를 오일로 수득하였다. 이어서, 에스테르를 밀봉된 튜브에서 90 °C에서 EtBr/K₂CO₃를 사용하여 N,N-디에틸 유도체로 전환시켰다. 이어서, 과량의 MeI를 갖는 상응하는 N,N-디에틸 유도체를 90 °C에서 18시간 동안 밀봉된 튜브에서 가열함으로써 합성하였으며, 용매를 진공 하에서 제거하고, 디에틸에테르를 첨가하여 목적하는 4차 암모늄 화합물을 침전시켰다.

[0105] <합성예 3>

[0106] two necks round bottom flask 100 mL에 D-Arginine 2HCl 21 g과 CaCl₂ 20g을 가하고 EtOH 200 mL를 가하여 10 분 동안 교반하고, H₂SO₄ 10 mL을 가하고 100 °C에서 8시간 동안 reflux 하였다. 실온으로 쿨링한 후에, 감압농

축하여 EtOH를 제거하고, 반응 침전물에 증류수 200 mL를 가하여 교반하며 분산시킨다. NaHCO₃ 52 g을 천천히 가한 다음 에틸아세테이트 (EA) 200 mL를 가하여 교반하고, Lauroyl chloride 22 mL를 천천히 가하고 실온에서 3시간 교반한다. 반응 혼합물을 교반하며 진한 염산으로 pH 4 내지 5 사이를 맞추고 EA 200 mL를 더 가한 후, 유기층을 분리한 후에 유기층을 MgSO₄로 수분을 제거하고 필터한 후 감압농축하여 흰색 파우더의 Etyhl lauroyl arginate HCl (95%, 40 g)을 얻는다.

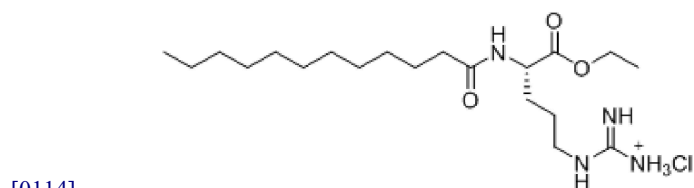
[0108] (1) glycine ethyl ester hydrochloride (1a, Yield 97%)



[0110] ¹H NMR (DMSO-*d*₆), δ (ppm) : 1.21-25 (t, 3H, CH₃), 3.74 (s, 2H, -NH-CHCOO-), 4.16-20 (t, 2H, CH₂O), 8.61 (br s, 3H, NH₃⁺).

[0111] ¹³C NMR δ (ppm) : 14.1 (CH₃), 22.7-31.9 (CH₂)₉, 36.5 (CH₂Ph), 54.3 (CH), 66.6 (OCH₂), 127.5, 128.8, 129.6, 134.3 (C₆H₄), 169.0 (C=O).

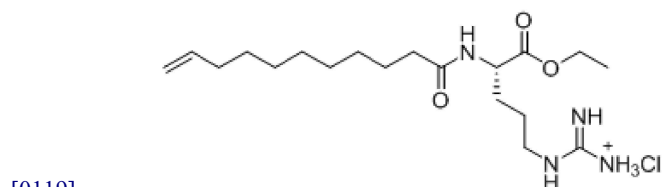
[0113] (2) N-α-Lauroyl-D-Arginine Ethyl ester hydrochloride (2a, Yield 95%).



[0115] White solid, melting point 57 °C, Exact MASS 384.3100 ESI-MS:m/z 385.3172 (m+H);

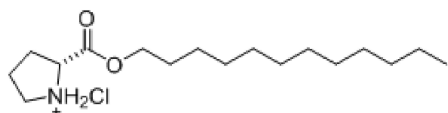
[0116] ¹H NMR : δ H (DMSO-*d*₆), 0.83-87 [t, 3H, (CH₃ alkylchain)], 1.29 [m, 18H, (9CH₂, alkylchain)], 1.62-1.78 [m, 4H, (-CH₂-CH₂-CONH-)], (CH₂-CH₂-NH-C(=NH)-NH₂), 2.03 [s, 1H, (-NH-C(=NH)-NH₂)], 2.29 [t, 2H, (-CH₂CONH-)], 3.08-3.10 [m, 2H, (CH₂-NH-C(=NH)-NH₂)], 4.05-09 [m, 2H, (-OCH₂-CH₃)], 4.18 [1H, (-NH-CHCOO-)], 7.04~39 [3H, (-NH-C(=NH)-NH₂)], 7.87 [1H, (-NH-C(=NH)-NH₂)], 8.27 [1H, (-NH-CH-COO)]

[0118] (3) N-α-Undecenonyl-D-Arginine Ethyl ester hydrochloride (3a, Yield 82%).



[0120] ¹H NMR : δ H (DMSO-*d*₆), 0.83~87 [t, 3H, (CH₃ alkylchain)], 1.29 [m, 18H, (9CH₂, alkylchain)], 1.62-1.78 [m, 4H, (-CH₂-CH₂-CONH-)], (CH₂-CH₂-NH-C(=NH)-NH₂), 2.03 [s, 1H, (-NH-C(=NH)-NH₂)], 2.29 [t, 2H, (-CH₂CONH-)], 3.08-3.10 [m, 2H, (CH₂-NH-C(=NH)-NH₂)], 4.05-4.09 [m, 2H, (-OCH₂-CH₃)], 4.18 [1H, (-NH-CHCOO-)], 7.04~7.39 [3H, (-NH-C(=NH)-NH₂)], 7.87 [1H, (-NH-C(=NH)-NH₂)], 8.27 [1H, (-NH-CH-COO)]

[0122] (4) D-Prolinr dodecyl ester hydrochloride (4a, Yield 87%)

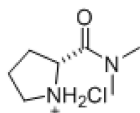


[0123]

[0124] ^1H NMR (CDCl_3), δ (ppm) : 0.87 (t, 3H, CH_3), 1.15–1.19 (t, 3H, CH_3), 1.23–1.27 (m, 18H, $(\text{CH}_2)_9$), 1.56–1.73 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 3.35 (dd, H, J 15.0 Hz, 6.5 Hz, CHCHPh), 3.43 (m, 2H, CHCHPO), 4.05 (t, 2H, J 7.5 $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 4.33 (t, H, J 7.0 Hz, CH), 7.26–7.29 (m, 5H, Ph), 8.61 (br s, 3H, NH_3^+).

[0125] ^{13}C NMR δ (ppm) : 14.1 (CH_3), 22.7–31.9 (CH_2)₉, 36.5 (CH_2Ph), 54.3 (CH), 66.6 (OCH_2), 127.5, 128.8, 129.6, 134.3 (C_6H_4), 169.0 (C=O).

[0127] (5) D-N,N-dimethylpyrrolidine-2-carboxamide hydrochloride (5a, Yield 76%)

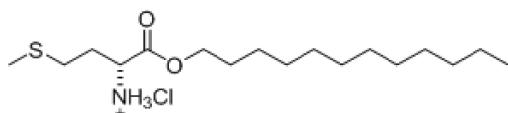


[0128]

[0129] ^1H NMR (CDCl_3), δ (ppm) : 0.87 (t, 3H, J 7.7 Hz, CH_3), 1.28 (m, 18H, $(\text{CH}_2)_9$), 1.48 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 3.35 (dd, H, J 15.0 Hz, J 6.5 Hz, CHCHPh), 3.43 (dd, H, J 15.0 Hz, J 6.5 Hz, CHCHPh), 4.05 (t, 2H, J 7.5 $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 4.33 (t, H, J 7.0 Hz, CH), 7.26–7.29 (m, 5H, Ph), 8.61 (brs, 3H, NH_3^+).

[0130] ^{13}C NMR δ (ppm) : 14.1 (CH_3), 22.7–31.9 (CH_2)₉, 36.5 (CH_2Ph), 54.3 (CH), 66.6 (OCH_2), 127.5, 128.8, 129.6, 134.3 (C_6H_4), 169.0 (C=O).

[0132] (6) D-methionine dodecyl ester hydrochloride (6a, Yield 83%)

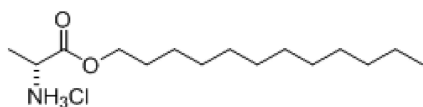


[0133]

[0134] ^1H NMR (CDCl_3), δ (ppm) : 0.87 (t, 3H, J 7.7 Hz, CH_3), 1.28 (m, 18H, $(\text{CH}_2)_9$), 1.48 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 3.35 (dd, H, J 15.0 Hz, J 6.5 Hz, CHCHPh), 3.43 (dd, H, J 15.0 Hz, J 6.5 Hz, CHCHPh), 4.05 (t, 2H, J 7.5 $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 4.33 (t, H, J 7.0 Hz, CH), 7.26–7.29 (m, 5H, Ph), 8.61 (brs, 3H, NH_3^+).

[0135] ^{13}C NMR δ (ppm) : 14.1(CH_3), 22.7–31.9 (CH_2)₉, 36.5 (CH_2Ph), 54.3 (CH), 66.6 (OCH_2), 127.5, 128.8, 129.6, 134.3 (C_6H_4), 169.0 (C=O).

[0137] (7) D-Alanine dodecyl ester hydrochloride (7a, Yield 93%)

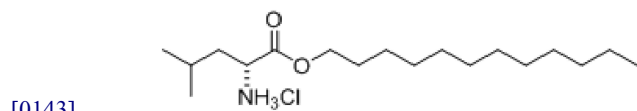


[0138]

[0139] ^1H NMR (CDCl_3), δ (ppm) : 0.87 (t, 3H, J 7.7 Hz, CH_3), 1.28 (m, 18H, $(\text{CH}_2)_9$), 1.48 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 3.35 (dd, H, J 15.0 Hz, J 6.5 Hz, CHCHPh), 3.43 (dd, H, J 15.0 Hz, J 6.5 Hz, CHCHPh), 4.05 (t, 2H, J 7.5 $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 4.33 (t, H, J 7.0 Hz, CH), 7.26–7.29 (m, 5H, Ph), 8.61 (br s, 3H, NH_3^+).

[0140] ^{13}C NMR δ (ppm) : 14.1 (CH_3), 22.7–31.9 (CH_2)₉, 36.5 (CH_2Ph), 54.3 (CH), 66.6 (OCH_2), 127.5, 128.8, 129.6, 134.3 (C_6H_4), 169.0 (C=O).

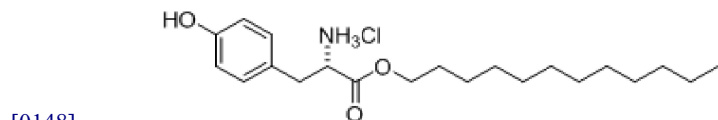
[0142] (8) D-Leucine dodecyl ester hydrochloride (8a, Yield 90%)



[0144] ^1H NMR (CDCl_3), δ (ppm) : 0.87 (t, 3H, J 7.7 Hz, CH_3), 1.28 (m, 18H, $(\text{CH}_2)_9$), 1.48 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 3.35 (dd, H, J 15.0 Hz, J 6.5 Hz, CHCHPh), 3.43 (dd, H, J 15.0 Hz, J 6.5 Hz, CHCHPh), 4.05 (t, 2H, J 7.5 $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 4.33 (t, H, J 7.0 Hz, CH), 7.26–7.29 (m, 5H, Ph), 8.61 (br s, 3H, NH_3^+).

[0145] ^{13}C NMR δ (ppm) : 14.1 (CH_3), 22.7–31.9 (CH_2)₉, 36.5 (CH_2Ph), 54.3 (CH), 66.6 (OCH_2), 127.5, 128.8, 129.6, 134.3 (C_6H_4), 169.0 (C=O).

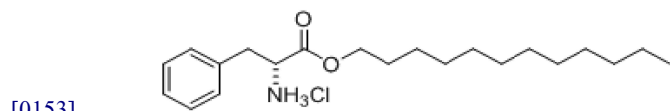
[0147] (9) D-Tyrosine dodecyl ester hydrochloride (9a, Yield 84%)



[0149] ^1H NMR (CDCl_3), δ (ppm) : 0.87 (t, 3H, J 7.7 Hz, CH_3), 1.28 (m, 18H, $(\text{CH}_2)_9$), 1.48 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 3.35 (dd, H, J 15.0 Hz, J 6.5 Hz, CHCHPh), 3.43 (dd, H, J 15.0 Hz, J 6.5 Hz, CHCHPh), 4.05 (t, 2H, J 7.5 $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 4.33 (t, H, J 7.0 Hz, CH), 7.26–7.29 (m, 5H, Ph), 8.61 (br s, 3H, NH_3^+).

[0150] ^{13}C NMR δ (ppm) : 14.1 (CH_3), 22.7–31.9 (CH_2)₉, 36.5 (CH_2Ph), 54.3 (CH), 66.6 (OCH_2), 127.5, 128.8, 129.6, 134.3 (C_6H_4), 169.0 (C=O).

[0152] (10) D-Phenylalanine dodecyl ester hydrochloride (10a, Yield 89%)

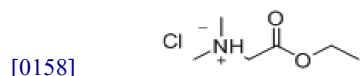


[0154] ^1H NMR (CDCl_3), δ (ppm) : 0.87 (t, 3H, J 7.7 Hz, CH_3), 1.28 (m, 18H, $(\text{CH}_2)_9$), 1.48 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 3.35 (dd, H, J 15.0 Hz, J 6.5 Hz, CHCHPh), 3.43 (dd, H, J 15.0 Hz, J 6.5 Hz, CHCHPh), 4.05 (t, 2H, J 7.5 $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 4.33 (t, H, J 7.0 Hz, CH), 7.26–7.29 (m, 5H, Ph), 8.61 (br s, 3H, NH_3^+).

[0155] ^{13}C NMR δ (ppm) : 14.1 (CH_3), 22.7–31.9 (CH_2)₉, 36.5 (CH_2Ph), 54.3 (CH), 66.6 (OCH_2), 127.5, 128.8,

129.6, 134.3 (C₆H₄), 169.0 (C=O).

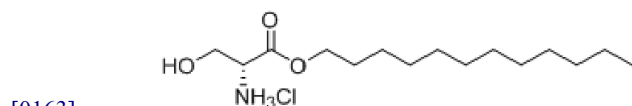
[0157] (11) N,N-Dimethylglycine ethyl ester hydrochloride (11a, Yield 78%)



[0159] ¹H NMR (CDCl₃), δ (ppm) : 0.87 (t, 3H, *J* 7.7 Hz, CH₃), 1.28 (m, 18H, (CH₂)₉), 1.48 (m, 2H, CH₂CH₂O), 3.35 (dd, H, *J* 15.0 Hz, *J* 6.5 Hz, CHCHPh), 3.43 (dd, H, *J* 15.0 Hz, *J* 6.5 Hz, CHCHPh), 4.05 (t, 2H, *J* 7.5 CH₂CH₂CO), 4.33 (t, H, *J* 7.0 Hz, CH), 7.26-7.29 (m, 5H, Ph), 8.61 (brs, 3H, NH₃⁺).

[0160] ¹³C NMR δ (ppm) : 14.1 (CH₃), 22.7-31.9 (CH₂)₉, 36.5 (CH₂Ph), 54.3 (CH), 66.6 (OCH₂), 127.5, 128.8, 129.6, 134.3 (C₆H₄), 169.0 (C=O).

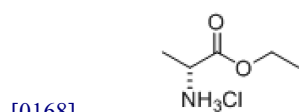
[0162] (12) D-Serine dodecyl ester hydrochloride (12a, Yield 82%)



[0164] ¹H NMR (CDCl₃), δ (ppm) : 0.87 (t, 3H, *J* 7.7 Hz, CH₃), 1.28 (m, 18H, (CH₂)₉), 1.48 (m, 2H, CH₂CH₂O), 3.35 (dd, H, *J* 15.0 Hz, *J* 6.5 Hz, CHCHPh), 3.43 (dd, H, *J* 15.0 Hz, *J* 6.5 Hz, CHCHPh), 4.05 (t, 2H, *J* 7.5 CH₂CH₂CO), 4.33 (t, H, *J* 7.0 Hz, CH), 7.26-7.29 (m, 5H, Ph), 8.61 (brs, 3H, NH₃⁺).

[0165] ¹³C NMR δ (ppm) : 14.1 (CH₃), 22.7-31.9 (CH₂)₉, 36.5 (CH₂Ph), 54.3 (CH), 66.6 (OCH₂), 127.5, 128.8, 129.6, 134.3 (C₆H₄), 169.0 (C=O).

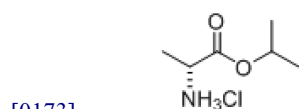
[0167] (13) D-Alanine ethyl ester hydrochloride (13a, Yield 97%)



[0169] ¹H NMR (CDCl₃), δ (ppm) : 0.87 (t, 3H, *J* 7.7 Hz, CH₃), 1.28 (m, 18H, (CH₂)₉), 1.48 (m, 2H, CH₂CH₂O), 3.35 (dd, H, *J* 15.0 Hz, *J* 6.5 Hz, CHCHPh), 3.43 (dd, H, *J* 15.0 Hz, *J* 6.5 Hz, CHCHPh), 4.05 (t, 2H, *J* 7.5 CH₂CO), 4.33 (t, H, *J* 7.0 Hz, CH), 7.26-7.29 (m, 5H, Ph), 8.61 (brs, 3H, NH₃⁺).

[0170] ¹³C NMR δ (ppm) : 14.1 (CH₃), 22.7-31.9 (CH₂)₉, 36.5 (CH₂Ph), 54.3 (CH), 66.6 (OCH₂), 127.5, 128.8, 129.6, 134.3 (C₆H₄), 169.0 (C=O).

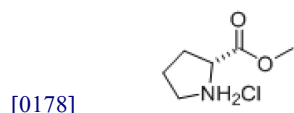
[0172] (14) D-Alanine Isopropyl ester hydrochloride (14a, Yield 93%)



[0174] ^1H NMR (CDCl_3), δ (ppm) : 0.87 (t, 3H, J 7.7 Hz, CH_3), 1.28 (m, 18H, $(\text{CH}_2)_9$), 1.48 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 3.35 (dd, H, J 15.0 Hz, J 6.5 Hz, CHCHPh), 3.43 (dd, H, J 15.0 Hz, J 6.5 Hz, CHCHPh), 4.05 (t, 2H, J 7.5 CH_2CO), 4.33 (t, H, J 7.0 Hz, CH), 7.26-7.29 (m, 5H, Ph), 8.61 (brs, 3H, NH_3^+).

[0175] ^{13}C NMR δ (ppm) : 14.1 (CH_3), 22.7-31.9 ($(\text{CH}_2)_9$), 36.5 (CH_2Ph), 54.3 (CH), 66.6 (OCH_2), 127.5, 128.8, 129.6, 134.3 (C_6H_4), 169.0 (C=O).

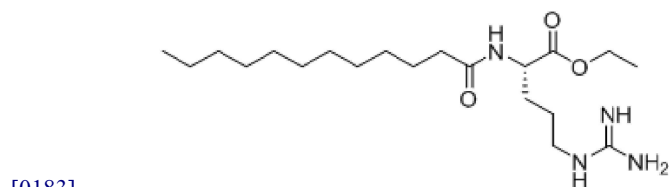
[0177] (15) D-Proline Methyl ester hydrochloride (15a, Yield 96%)



[0179] ^1H NMR (CDCl_3), δ (ppm) : 0.87 (t, 3H, J 7.7 Hz, CH_3), 1.28 (m, 18H, $(\text{CH}_2)_9$), 1.48 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 3.35 (dd, H, J 15.0 Hz, J 6.5 Hz, CHCHPh), 3.43 (dd, H, J 15.0 Hz, J 6.5 Hz, CHCHPh), 4.05 (t, 2H, J 7.5 CH_2CO), 4.33 (t, H, J 7.0 Hz, CH), 7.26-7.29 (m, 5H, Ph), 8.61 (brs, 3H, NH_3^+).

[0180] ^{13}C NMR δ (ppm) : 14.1 (CH_3), 22.7-31.9 ($(\text{CH}_2)_9$), 36.5 (CH_2Ph), 54.3 (CH), 66.6 (OCH_2), 127.5, 128.8, 129.6, 134.3 (C_6H_4), 169.0 (C=O).

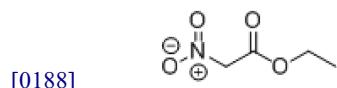
[0182] (16) N- α -Lauroyl-D-Arginine Ethyl ester (16a, Yield 92%)



[0184] ^1H NMR (CDCl_3), δ (ppm) : 0.87 (t, 3H, J 7.7 Hz, CH_3), 1.28 (m, 18H, $(\text{CH}_2)_9$), 1.48 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 3.35 (dd, H, J 15.0 Hz, J 6.5 Hz, CHCHPh), 3.43 (dd, H, J 15.0 Hz, J 6.5 Hz, CHCHPh), 4.05 (t, 2H, J 7.5 CH_2CO), 4.33 (t, H, J 7.0 Hz, CH), 7.26-7.29 (m, 5H, Ph), 8.61 (brs, 3H, NH_3^+).

[0185] ^{13}C NMR δ (ppm) : 14.1 (CH_3), 22.7-31.9 ($(\text{CH}_2)_9$), 36.5 (CH_2Ph), 54.3 (CH), 66.6 (OCH_2), 127.5, 128.8, 129.6, 134.3 (C_6H_4), 169.0 (C=O).

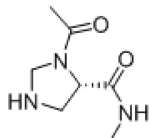
[0187] (17) Nitro Ethyl ester (17a, Yield 97%)



[0189] ^1H NMR (CDCl_3), δ (ppm) : 0.87 (t, 3H, J 7.7 Hz, CH_3), 1.28 (m, 18H, $(\text{CH}_2)_9$), 1.48 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 3.35 (dd, H, J 15.0 Hz, J 6.5 Hz, CHCHPh), 3.43 (dd, H, J 15.0 Hz, J 6.5 Hz, CHCHPh), 4.05 (t, 2H, J 7.5 CH_2CO), 4.33 (t, H, J 7.0 Hz, CH), 7.26-7.29 (m, 5H, Ph), 8.61 (brs, 3H, NH_3^+).

[0190] ^{13}C NMR δ (ppm) : 14.1 (CH_3), 22.7-31.9 (CH_2)₉, 36.5 (CH_2Ph), 54.3 (CH), 66.6 (OCH_2), 127.5, 128.8, 129.6, 134.3 (C_6H_4), 169.0 (C=O).

[0192] (18) (S)-3-acetyl-N-methylimidazolidine-4-carboxamide(Aza-pro-6) (18a, Yield 71%)

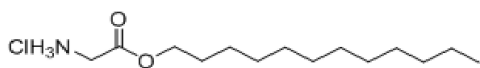


[0193]

[0194] ^1H NMR (CDCl_3), δ (ppm) : 0.87 (t, 3H, J 7.7 Hz, CH_3), 1.28 (m, 18H, (CH_2)₉), 1.48 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 3.35 (dd, H, J 15.0 Hz, J 6.5 Hz, CHCHPh), 3.43 (dd, H, J 15.0 Hz, J 6.5 Hz, CHCHPh), 4.05 (t, 2H, J 7.5 CH_2CO), 4.33 (t, H, J 7.0 Hz, CH), 7.26-7.29 (m, 5H, Ph), 8.61 (brs, 3H, NH_3^+).

[0195] ^{13}C NMR δ (ppm) : 14.1 (CH_3), 22.7-31.9 (CH_2)₉, 36.5 (CH_2Ph), 54.3 (CH), 66.6 (OCH_2), 127.5, 128.8, 129.6, 134.3 (C_6H_4), 169.0 (C=O).

[0197] (19) Glycine Dodecyl ester hydrochloride (19a, Yield 95%)



[0198]

[0199] ^1H NMR (CDCl_3), δ (ppm) : 0.87 (t, 3H, J 7.7 Hz, CH_3), 1.28 (m, 18H, (CH_2)₉), 1.48 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 3.35 (dd, H, J 15.0 Hz, J 6.5 Hz, CHCHPh), 3.43 (dd, H, J 15.0 Hz, J 6.5 Hz, CHCHPh), 4.05 (t, 2H, J 7.5 CH_2CO), 4.33 (t, H, J 7.0 Hz, CH), 7.26-7.29 (m, 5H, Ph), 8.61 (brs, 3H, NH_3^+).

[0200] ^{13}C NMR δ (ppm) : 14.1 (CH_3), 22.7-31.9 (CH_2)₉, 36.5 (CH_2Ph), 54.3 (CH), 66.6 (OCH_2), 127.5, 128.8, 129.6, 134.3 (C_6H_4), 169.0 (C=O).

[0202] (20) N,N-dimethyldodecan-1-amine (20a, Yield 93%)



[0203]

[0204] ^1H NMR (CDCl_3), δ (ppm) : 0.87 (t, 3H, J 7.7 Hz, CH_3), 1.28 (m, 18H, (CH_2)₉), 1.48 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O}$), 3.35 (dd, H, J 15.0 Hz, J 6.5 Hz, CHCHPh), 3.43 (dd, H, J 15.0 Hz, J 6.5 Hz, CHCHPh), 4.05 (t, 2H, J 7.5 CH_2CO), 4.33 (t, H, J 7.0 Hz, CH), 7.26-7.29 (m, 5H, Ph), 8.61 (brs, 3H, NH_3^+).

[0205] ^{13}C NMR δ (ppm) : 14.1 (CH_3), 22.7-31.9 (CH_2)₉, 36.5 (CH_2Ph), 54.3 (CH), 66.6 (OCH_2), 127.5, 128.8, 129.6, 134.3 (C_6H_4), 169.0 (C=O).

[0207] <금 나노입자의 합성예>

[0208] 천연물 10 g을 분쇄하여 증류수 100 mL에 넣고 70 ~ 80 °C에서 1시간 가열 후 상온으로 식힌 후에, 추출 혼합물을 110 mm 여과지를 사용하여 감압 필터를 하고, 14,000 rpm 에서 30분간 원심분리를 한다. 원심분리 후, 침전

과 여액을 분리하여 여액을 재료로 사용한다. 이 시료는 4 °C 이하에서 보관하고 1 주일 이내에 사용한다.

[0209] 추출물 5 mL 1 mM-HAuCl₄ 수용액 95 mL에 가하여 70 °C에서 1시간 반응 시킨다. 입자의 형성 여부를 위해 반응 후 색 변화를 관찰한다. 반응의 완료는 UV, PL, FT-IR, SEM, TEM, EDS, SEAD pattern를 사용하여 확인한다.

[0210] 하기 도 1은 미강 추출물, HAuCl₄의 농도 및 계면활성제의 첨가 유, 무에 따른 본 발명에 따른 나노 입자의 모양 및 사이즈를 제어한 합성 결과로서, A) 1.0 mM Au Conc. in H₂O 0.7 mL + 미강 추출물 0.3 mL, B) 1.0 mM Au Conc. in H₂O 0.5 mL + 미강 추출물 0.5 mL, C) 1.0 mM Au Conc. in H₂O 0.7 mL + 미강 추출물 0.3 mL + 계면활성제 0.1 mL, D) 1.0 mM Au Conc. in H₂O 0.3 mL + 미강 추출물 0.7 mL, E) 1.0 mM Au Conc. in H₂O 0.5 mL + 미강 추출물 0.5 mL + 계면활성제 0.1 mL, F) 1.0 mM Au Conc. in H₂O 0.1 mL + 미강 추출물 0.9 mL, G) 1.0 mM Au Conc. in H₂O 0.9 mL + 미강 추출물 0.1 mL, H) 1.0 mM Au Conc. in H₂O 0.5 mL + 미강 추출물 0.5 mL + NaOH 2M 1 mL이다.

[0211] 도 2는 스피루리나 추출물, HAuCl₄의 농도별에 본 발명에 따른 나노 입자의 모양 및 사이즈를 제어한 합성 결과로서, A) Plant extract (10%) in H₂O, B) 10 mM-HAuCl₄ (90%) in H₂O, C) 0.1 mmol, D) 0.5 mmol, E) 1 mmol, F) 5 mmol, G) 10 mmol이다.

[0212] 하기 도 3은 UV 확인한 결과이며, 도 4는 PL로 확인한 결과이다.

[0214] <실리카 (SiO₂) 나노 에어로겔 입자 (hydrophobic nanoporous silica aerogel (HNSA))의 합성예>

[0215] Silica gel60 (230 ~ 400 mesh) (1 당량)을 증류수에 넣고, NaHCO₃ (2.1당량)을 첨가 후 50 °C에서 1시간 동안 교반한다. 반응 후 서서히 상온으로 식힌 후, 인산 또는 구연산을 첨가하여 pH 4 ~ 5로 맞춘다. 반응의 완료는 UV, PL, FT-IR, SEM, TEM, EDS 를 사용하여 확인한다. 하기 도 5는 실리카 나노입자의 TEM 이미지이며, 하기 도 6은 SEM EDS를 통한 실리카 나노 입자를 확인한 결과이다.

[0217] <실리카 (SiO₂) 나노 에어로겔 입자+계면활성제 (D-LAE) 적용한 합성예>

[0218] Silica gel60 (230 ~ 400 mesh) (1 당량)을 증류수에 넣고, NaHCO₃ (2.1당량)을 첨가 후 50 °C에서 1시간 동안 교반한다. 반응 후, 합성된 D-LAE를 실리카 용액의 0.4% 농도로 첨가해 준 다음, 약 1시간 정도 교반한다. 서서히 상온으로 식힌 후, 인산 또는 구연산을 첨가하여 pH 4 ~ 5로 맞춘다. 반응의 완료는 UV, PL, FT-IR, SEM, TEM, EDS를 사용하여 확인한다. 하기 도 7은 상기 합성예에 따라 합성된 나노 복합체 입자의 TEM 이미지 및 EDS를 확인한 결과이다.

[0220] <실험예>

[0221] (1) 실리카 (SiO₂) 나노 에어로겔 입자에 D-LAE 적용한 본 발명에 따른 나노 복합체를 하기 도 와 같이 액상의 샘플 LSNp 방부제로 하여 각각 대장균, 황색포도상구균 및 칸디다균 각각에 대하여 『KCL-FIR-1002:2018』 시험 방법에 따라 항균 테스트한 실험한 결과는 아래 [표 1]과 같다.

표 1

시험 항목	시험방법	시험결과			환경
		초기농도 (CFU/mL)	24시간후 (CFU/mL)	세균 감소율	

항균시험 대장균	BLANK	KCL-FIR-1002 :2018	1.8×10^4	1.2×10^5	-	37 ± 0.2 ($^{\circ}\text{C}$)
	샘플 LSNp		1.8×10^4	<10	99.9	
황색포도상 구균	BLANK		3.5×10^4	5.9×10^4	-	
	샘플 LSNp		3.5×10^4	<10	99.9	
칸디다균	BLANK		1.9×10^4	1.4×10^5	-	
	샘플 LSNp		1.9×10^4	<10	99.9	

[0223] 상기 [표 1]에 대한 결과 사진을 하기 도 8에 각각 나타내었으며, [표 1] 및 도 8에서 실리카 (SiO_2) 나노 에어로겔 입자에 D-LAE 적용한 본 발명에 따른 나노 복합체가 갖는 항균성능이 매우 우수함을 확인할 수 있다.

[0225] (2) 항균 활성 측정 실험 - Paper disc assay (디스크확산법)

[0226] 본 발명의 조성물에 대한 항균활성 측정방법은 일반적으로 많이 사용되는 Paper disc assay (디스크확산법)을 사용하였으며 항균력 조사는 하기 [표 2]의 14종의 균주를 대상으로 측정하였다. 액체 배지에서 배양한 균 배양액 20 μl 를 평판배지에 고르게 도말하여 흡수시켰다. 배지의 표면에 멸균된 직경 8 mm의 멸균 종이 디스크 (Advantec paper disc)를 올려놓은 뒤, 무균 조건에서 멸균 종이 디스크에 20 μg 의 화합물을 적용하였다. 배양 온도에 맞추어 배양한 후, paper disc의 직경을 포함한 주위의 inhibition zone의 직경을 측정하였다.

표 2

구분	Gram Type	Species	Strain	media
1	negative	<i>V. cholerae</i> N169961	ATCC 39315	LB
2	negative	<i>S. typhimurium</i> CDC 6516-60	ATCC 14028	LB
3	negative	<i>E. coli</i> 0157:H7	ATCC 43889	LB
4	negative	<i>E. coli</i> 0157:H7	ATCC 43890	LB
5	negative	<i>E. coli</i> 0157:H7	ATCC 35150	LB
6	negative	<i>S. boydii</i>	NCCP 14745	TSB
7	negative	<i>S. flexneri</i>	NCCP 14744	TSB
8	negative	<i>P. aeruginosa</i> PA14	ATCC 15692	TSB
9	positive	<i>E. faecalis</i>	MMH594	TSB
10	positive	<i>L. monocytogenes</i> ScottA	ATCC 45954	TSB
11	positive	<i>S. mutans</i>	MT8148	TSB
12	positive	<i>S. aureus</i> (MSSA)	RN6630	TSB
13	positive	<i>S. aureus</i> (MRSA)	MW2	TSB
14	positive	<i>B. subtilis</i>	CCARM 0003	TSB

표 3

Diameter of inhibitory zone (mm)	D-LAE	L-LAE	DL-LAE	D-pro-dode	L-pro-dode
<i>V. cholerae</i>	X	X	X	14.0	14.5 ± 0.5
<i>S. typhimurium</i>	10.0 ± 0.5	11.0 ± 0.5	12.0 ± 0.5	11.0	11.0
<i>E. coli</i> (43889)	11.0 ± 0.5	11.0 ± 0.5	10.5 ± 0.5	10.0	10.0
<i>E. coli</i> (35150)	13.0 ± 0.5	12.5 ± 0.5	12.25 ± 0.25	11.0	11.0
<i>E. coli</i> (43890)	11.25 ± 0.25	10.5	10.5 ± 0.5	10.0	10.0
<i>S. boydii</i>	11.8 ± 0.2	11.3 ± 0.3	11.5 ± 0.5	X	X

<i>S. flexneri</i>	11.5±0.5	11.6±0.5	11.0	10.0	10.0
<i>P. aeruginosa</i>	11.0±0.5	10.6±0.6	11.0	11.75±0.25	11.0
<i>E. faecalis</i>	13.0	12.7±0.3	12.7±0.3	13.75±0.25	13.0
<i>L. monocytogenes</i>	15.0±0.5	14.5±0.5	14.0±0.5	14.5±0.5	13.0
<i>S. mutans</i>	16.0±0.5	15.5±0.5	15.5±0.5	16.0	15.0
<i>S. aureus</i> (MSSA)	16.5±0.5	16.5±0.5	16.25±0.25	14.0	13.5±0.5
<i>S. aureus</i> (MRSA)	15.5±0.5	15.5±0.5	15.5±0.5	13.0	12.0
<i>B. subtilis</i>	14.25±0.25	13.0±0.5	13.0±0.5	12.5	12.0

표 4

[0231]

Diameter of inhibitory zone (mm)	D-meth-dode	D-ala-dode	D-leu-dode	D-tyr-dode	D-phala-dode
<i>V. cholerae</i>	X	13.0	11.0	X	X
<i>S. typhimurium</i>	X	11.0	X	X	X
<i>E. coli</i> (43889)	X	11.5±0.5	X	10.5±0.5	X
<i>E. coli</i> (35150)	X	11.0	X	X	X
<i>E. coli</i> (43890)	X	11.0	X	10.0	10.0
<i>S. boydii</i>	X	10.0	X	X	X
<i>S. flexneri</i>	X	10.0	X	X	X
<i>P. aeruginosa</i>	X	10.0	X	X	X
<i>E. faecalis</i>	10.0	13.0	11.0	X	10.0
<i>L. monocytogenes</i>	10.0	12.0	11.0	X	X
<i>S. mutans</i>	10.0	15.5±0.5	12.5	X	X
<i>S. aureus</i> (MSSA)	10.0	13.0	11.0	X	X
<i>S. aureus</i> (MRSA)	10.0	14.5±0.5	11.0	X	X
<i>B. subtilis</i>	X	10.0	10.0	X	X

[0232]

상기 [표 3]의 Diameter of inhibitory zone (mm)의 경우 각 균주의 항균 활성도가 있는 화합물의 경우 일정 지름의 활성도를 나타내는 경우이며, 다만, X로 표기된 D, L, DL형 LAE의 경우 *V. cholerae* 균에서 항균 활성도를 보이지 않으며, D, L 형 pro-dode의 경우 *S. boydii* 균에서 활성도를 보이지 않는다. [표 4] 역시 X로 표기된 부분은 각 균주에 대하여 항균 활성을 나타내지 않는 경우이다.

[0233]

상기 [표 3]에서 제시한 바와 같이 D-LAE, L-LAE, DL-LAE 화합물이 가장 높은 항균활성을 나타내었으며, 특히 Gram positive 박테리아 항균활성도가 높음을 확인할 수 있다.

[0234]

또한, [표 4]에서 나타난 바와 같이, D-aladode는 Gram positive와 Gram negative 박테리아에 관한 항균활성도를 보인 반면, D-methdode, D-leudode는 Gram positive 박테리아에만 항균활성도를 가진 것을 확인할 수 있다.

[0236]

(3) 최소저해농도 (minimum inhibitory concentration : MIC) 측정

[0237]

다양한 균들의 성장 곡선을 수행하여 본 발명에 따른 화합물의 항균 효과를 2배 연속 희석법을 통한 최소저해농도 (MIC)를 측정하였다. 박테리아의 배양물을 96-웰 플레이트에서 100배 희석하고, 화합물을 다양한 농도로 분주하였다. DMSO만을 대조군으로, 그리고, gentamicin을 양성 대조군으로 하였으며, 박테리아 성장은 24 시간 후에 측정하였다. 모든 실험은 3회 반복 실시하였다. MIC의 수치가 낮을수록 항생제 감수성이 높다는 것을 의미하며, 항생제 감수성이 높다는 것은 항균력이 높음을 의미한다.

표 5

[0238]

MIC (ug/mL)	D-LAE	L-LAE	DL-LAE	D-pro-dode	L-pro-dode
<i>V. cholerae</i>	X	X	X	25-50	50
<i>S. typhimurium</i>	25	50	25-50	50	50
<i>E. coli (43889)</i>	25-50	50	50	50	50
<i>E. coli (35150)</i>	25	50	50	25	25-50
<i>E. coli (43890)</i>	25	25	25	50	50
<i>S. boydii</i>	25	50	50	X	X
<i>S. flexneri</i>	50	50	50	100	100
<i>P. aeruginosa</i>	12.5	12.5	12.5	50	50-100
<i>E. faecalis</i>	25	25	25	25	25-50
<i>L. monocytogenes</i>	12.5	12.5-25	12.5-25	25-50	25-50
<i>S. mutans</i>	12.5	12.5	12.5	12.5	12.5
<i>S. aureus(MSSA)</i>	6.25	6.25	6.25	12.5-25	25
<i>S. aureus(MRSA)</i>	3.13	6.25	6.25	25	25
<i>B. subtilis</i>	12.5	12.5	12.5	50	50

표 6

[0240]

MIC (ug/mL)	D-meth-dode	D-ala-dode	D-leu-dode	D-tyr-dode	D-phala-dode	Gentamicin
<i>V. cholerae</i>	X	50	X	X	X	12.5-25
<i>S. typhimurium</i>	X	50	X	X	X	25
<i>E. coli (43889)</i>	X	100	X	X	X	6.25
<i>E. coli (35150)</i>	X	25	X	X	X	12.5
<i>E. coli (43890)</i>	X	25-50	X	X	X	6.25
<i>S. boydii</i>	X	50	X	X	X	6.25
<i>S. flexneri</i>	X	50	X	X	X	6.25
<i>P. aeruginosa</i>	X	50	X	X	X	25
<i>E. faecalis</i>	X	25	X	X	X	X
<i>L. monocytogenes</i>	X	25-50	X	X	X	3.13
<i>S. mutans</i>	X	12.5	X	X	X	50
<i>S. aureus(MSSA)</i>	X	12.5-50	X	X	X	1.56
<i>S. aureus(MRSA)</i>	X	12.5	X	X	X	1.56
<i>B. subtilis</i>	X	100	X	X	X	3.13

[0241]

상기 [표 5] 및 [표 6]은 본 발명에 따른 화합물의 MIC를 나타내는 결과로서, X로 표기된 부분은 MIC 값이 256 ug/mL 이상이거나, 항균 활성도를 나타내지 않는 경우이다.

[0242]

상기 [표 5]에서 제시한 바와 같이 D-LAE, L-LAE, DL-LAE 화합물이 가장 높은 항균활성을 나타내었으며, 특히 메티실린 내성 황색포도상구균 (MRSA)가 포함된 Gram positive 박테리아 항균활성도가 가장 높음을 확인할 수 있다.

[0243]

또한, [표 6]에서 나타난 바와 같이, D-aladode만이 Gram positive와 Gram negative 박테리아에 관한 항균활성도를 보인다.

[0245]

(4) MBC (Minimum Bactericidal Concentration) 최소살균농도 분석

[0246]

MIC 분석을 위해 배양된 배지를 육안으로 관찰하고, 균주의 성장이 완전히 억제된 배지를 선별하여 96 웰 플레

이트 (well plate)에 도말하였다. 도말된 배지에서 살아있는 균 수를 측정하였다. MBC의 수치 역시 MIC 수치와 마찬가지로 낮을수록 항생제 감수성이 높고 세균에 대한 항균력이 높음을 의미한다.

표 7

MBC (ug/mL)	D-LAE	L-LAE	DL-LAE	D-pro-dode	L-pro-dode
<i>V. cholerae</i>	X	X	X	50	50
<i>S. typhimurium</i>	25	50	50	50	50
<i>E. coli (43889)</i>	50	100	50	50	50
<i>E. coli (35150)</i>	50	50	50	50	25
<i>E. coli (43890)</i>	25	25	25	50	50
<i>S. boydii</i>	50	50	100	X	X
<i>S. flexneri</i>	50	100	50	100	100
<i>P. aeruginosa</i>	50	100	50	50	100
<i>E. faecalis</i>	50	50	25	25	50
<i>L. monocytogenes</i>	25	25	25	50	50
<i>S. mutans</i>	50	50	50	12.5	12.5
<i>S. aureus(MSSA)</i>	25	50	25	25	25
<i>S. aureus(MRSA)</i>	12.5	50	25	25	25
<i>B. subtilis</i>	12.5	12.5	12.5	50	50

표 8

MBC (ug/mL)	D-meth-dode	D-ala-dode	D-leu-dode	D-tyr-dode	D-phala-dode
<i>V. cholerae</i>	X	50	X	X	X
<i>S. typhimurium</i>	X	50	X	X	X
<i>E. coli (43889)</i>	X	X	X	X	X
<i>E. coli (35150)</i>	X	25	X	X	X
<i>E. coli (43890)</i>	X	50	X	X	X
<i>S. boydii</i>	X	50	X	X	X
<i>S. flexneri</i>	X	50	X	X	X
<i>P. aeruginosa</i>	X	50	X	X	X
<i>E. faecalis</i>	X	50	X	X	X
<i>L. monocytogenes</i>	X	50	X	X	X
<i>S. mutans</i>	X	25	X	X	X
<i>S. aureus(MSSA)</i>	X	50	X	X	X
<i>S. aureus(MRSA)</i>	X	50	X	X	X
<i>B. subtilis</i>	X	X	X	X	X

상기 [표 7] 및 [표 8]은 본 발명에 따른 화합물의 MBC를 나타낸 결과로서, X로 표기된 부분은 X로 표기된 부분은 MBC 값이 256 ug/mL 이상이거나, 항균 활성도를 나타내지 않는 경우이다.

(5) 균주는 표준탁도 Mcfarland (0.08 ~ 0.1 = 1×10^8 CFU/mL)로 맞추어 시험에 사용하였으며, 시험샘플의 농도는 4, 8, 16, 32, 64, 128, 256, 512 ug/mL로 제조하여 사용하고, 시험샘플은 멸균된 LB BROTH로 희석하였다. 시험에 사용된 균주의 농도는 표준탁도에 맞추어진 균주를 1×10^6 CFU/mL으로 제조하여 사용하였으며, 균주는 E-coli (ATCC 8739)를 사용하였다. 사용된 배지는 BD DIFCO사의 LB BROTH MILLER를 사용하고, 모두 멸균하여 시험에 적용하였으며, micro plate reader는 PERKIN ELMER사의 VICTORX3모형을 사용하였다.

- [0253] 시험 방법은, 96-well plate에 각 시험샘플 50 μ L를 가하고 1×10^6 CFU/mL 농도의 균주를 50 μ L를 가하고 희석하여 각 시험샘플과 균주의 농도가 1/2로 희석하여 24시간 배양하였다. 시험샘플 농도는 각각 2, 4, 8, 16, 32, 64, 128, 256 μ g/mL이고, 균주의 농도는 5×10^5 CFU/mL이다. 음성 대조군으로 5×10^5 CFU/mL의 농도의 균주를 사용하고, 양성대조군으로 멸균된 LB BROTH를 함께 배양하여 측정에 사용하였다. 배양된 시험시료를 micro plate reader로 570 nm에서 측정하여 탁도를 측정하였다.
- [0255] (6) D형 LAE 와 L형 LAE의 MIC를 대장균에서 비교하였을 때, L 형에 비하여 4배 상승하였으며, 동일 구조에서 카탈성 변경만으로 성질이 달라짐을 확인하였으며, 이를 하기 도 9에서 확인할 수 있다.
- [0257] (7) D형 LAE와 DL형 LAE의 경우를 대장균에서 MIC를 확인한 결과, 같은 MIC 농도 (32 μ g/mL)에서 활성도를 확인할 수 있으나, 다른 농도 (16 μ g/mL)에서 흡광도의 차이가 2배 나는 것을 확인하였으며, 이를 도 10에서 확인할 수 있다.
- [0259] (8) D, DL, L형의 EUA의 MIC를 확인한 결과, 같은 MIC (64 μ g/mL)에서 흡광도가 L, DL, D 형의 순으로 일정하게 증가하는 것을 확인하였으며, 이를 도 11에서 확인할 수 있다.
- [0261] (9) D형 프롤린과, D형 알라닌의 카복실릭 엑시드에 Dodecyl기를 치환하여 HCl로 염처리한 결과 MIC 값의 차이가 8배 이상 났으며, D형 프롤린의 경우 D형 LAE와 같은 MIC를 보이는 것으로 확인하였으며, 이를 도 12에서 확인할 수 있다.
- [0263] (10) 하기 도 13은 LAE의 카이랄성과, 농도별 신장, 피부각질 세포에서의 독성에 대한 평가 결과로서, 이러한 Cell Counting Kit-8(CCK-8)을 이용한 세포 독성 평가방법은 하기 도 14와 같이 반복 절차로 이루어진다.
- [0264] CCK-8 키트의 세포수 계산 및 세포 증식 및 세포 독성 분석에 대한보다 자세한 조작 절차는 다음과 같다.
- [0265] - 셀 번호 결정 프로토콜
- [0266] 1) 96-웰 플레이트에 세포 현탁액 (100 μ L/well)을 넣는다. 또한 알려진 수의 생존 세포가 포함된 well을 준비한다 (5 단계에서 교정 곡선을 그린다). 가습 인큐베이터 (37 $^{\circ}$ C, 5 % CO₂)에서 플레이트를 사전 배양한다.
- [0267] 2) CCK-8을 탁상 위 또는 수조에서 동결된 경우 37 $^{\circ}$ C에서 해동한다.
- [0268] 3) 플레이트의 각 웰에 CCK-8 용액 10 μ L를 첨가한다.
- [0269] 4) 인큐베이터에서 플레이트를 1-4 시간 동안 인큐베이션한다.
- [0270] 5) 마이크로 플레이트 리더를 사용하여 450 nm에서 흡광도를 측정하고, 알려진 수의 생존 세포가 포함된 웰에서 얻은 데이터를 사용하여 보정 곡선을 준비한다.
- [0271] - 세포 증식 및 세포 독성 분석 프로토콜
- [0272] 1) 96-웰 플레이트에 100 μ L의 세포 현탁액 (5000 세포/well)을 분배한다.
- [0273] 2) 가습 인큐베이터 (37 $^{\circ}$ C, 5 % CO₂)에서 24 시간 동안 플레이트를 사전 배양한다.
- [0274] 3) 10 μ L의 다양한 농도의 독성 물질을 플레이트의 배양 배지에 첨가한다.
- [0275] 4) 인큐베이터에서 적절한 시간 동안 (24, 48, 72시간) 플레이트를 배양한다.
- [0276] 5) CCK-8을 벤치 상단 또는 수조에서 동결된 경우 37 $^{\circ}$ C에서 해동시킨다.
- [0277] 6) 플레이트의 각 웰에 10 μ L의 CCK-8 용액을 첨가한다.
- [0278] 7) 인큐베이터에서 1-4 시간 동안 플레이트를 배양한다. 마이크로 플레이트 리더를 사용하여 450 nm에서 흡광도

를 측정한다.

[0280] <나노 입자를 이용한 미생물 이미지 분석>

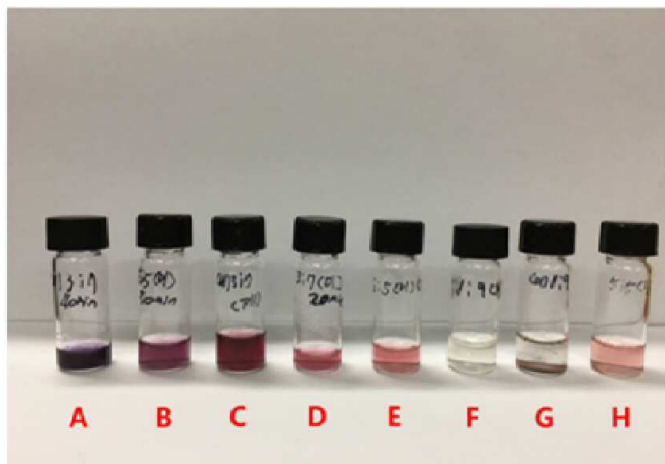
[0281] (1) 선정된 유효 물질을 10 ~ 20 nm 이하의 gold particle 0.1 ~ 1 mM 농도에 본 발명에 따른 화합물 (계면 활성제)를 도포 후 E. Col i(대장균)에 처리한 후 24시간 후 세포내에 흡수 및 작용 위치를 TEM을 이용하여 확인하였다. 하기 도 15 및 도 16을 통하여 금 나노입자에 계면활성제 화합물이 도포되었음을 확인할 수 있다. 또한, 도 17의 TEM EDX를 통하여 본 발명에 따라 합성된 나노 복합체가 금 나노입자에 도포된 것임을 확인할 수 있다.

[0283] (2) 이와 같이 본 발명에 따라 금 나노입자에 화합물을 도포하여 합성한 나노 복합체가 미생물 내에 흡수 및 유효성이 있음을 하기 도 18의 TEM을 통해 확인할 수 있다.

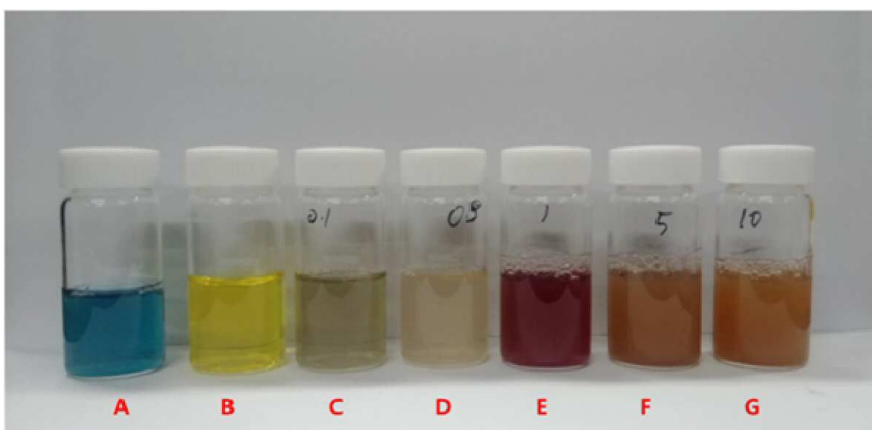
[0285] (3) 또한, 본 발명에 따라 금 나노입자에 화합물을 도포하여 합성한 나노 복합체가 미생물 내에 흡수시에 그 효과가 상승됨을 하기 도 19 및 20의 MIC 결과를 통하여 확인할 수 있다.

도면

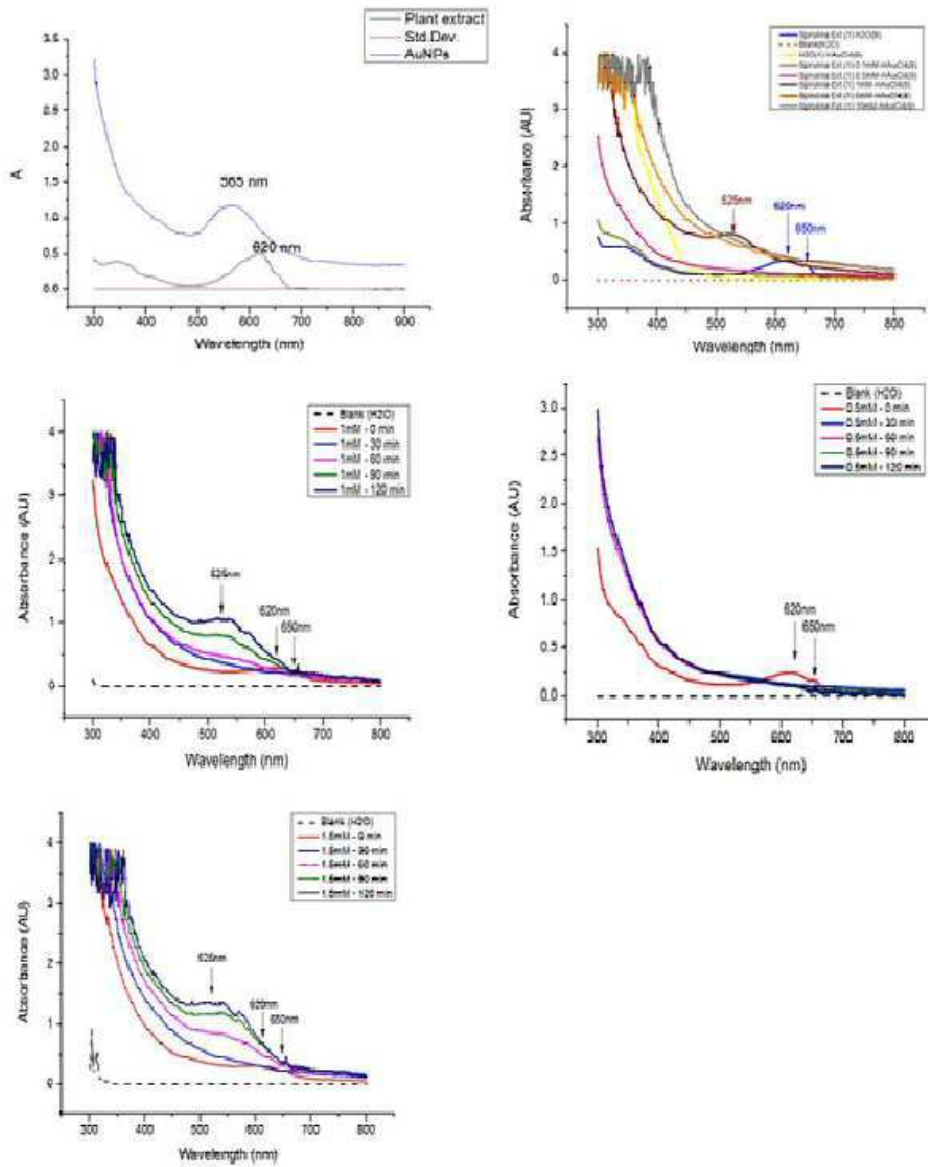
도면1



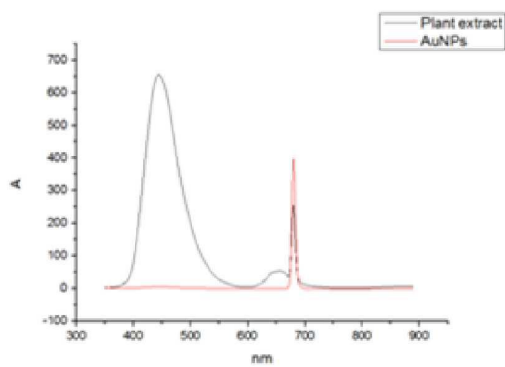
도면2



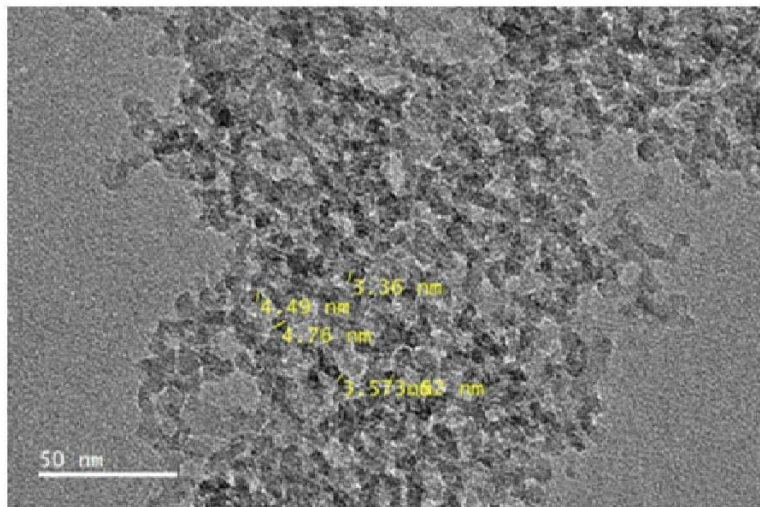
도면3



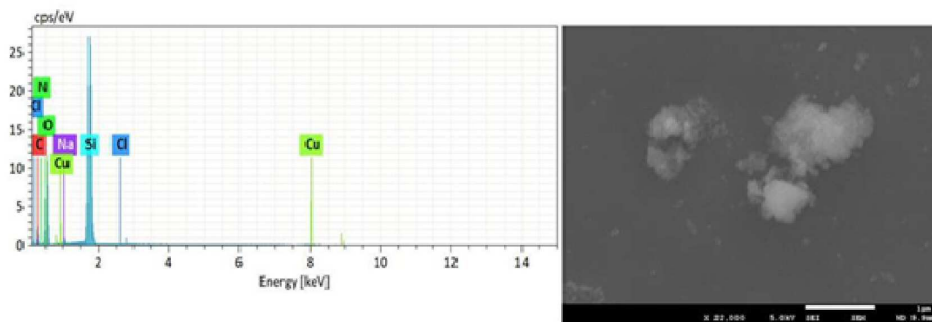
도면4



도면5



도면6



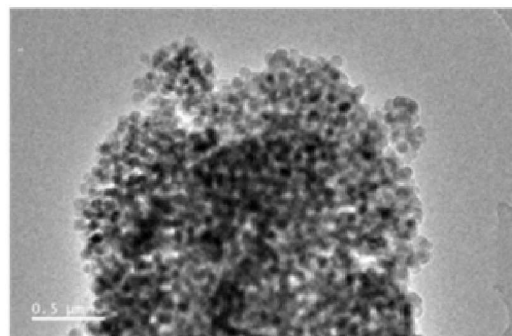
도면7

Spectrum processing :
Peaks possibly omitted : 3.478, 5.434, 9.791 keV

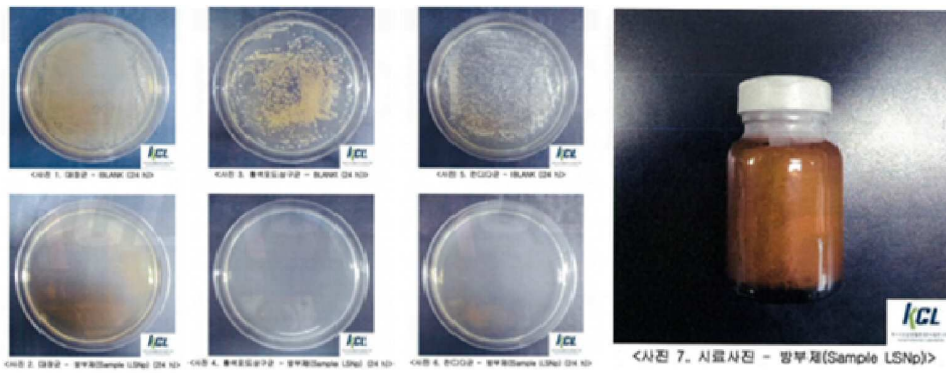
Quantitation method : Cliff Lorimer thin ratio section.
Processing option : All elements analyzed (Normalised)
Number of iterations = 1

Standardless

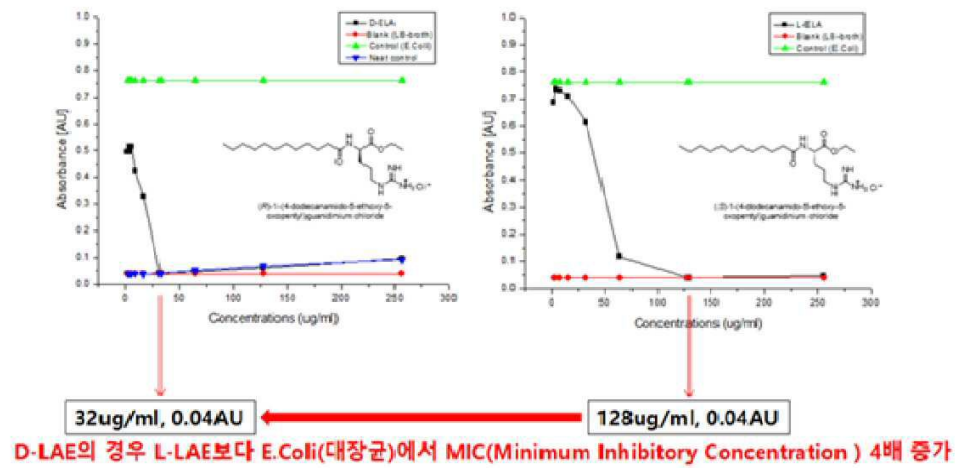
Element	Weight%	Atomic%
C K	-0.61	-1.27
N K	-6.85	-12.25
O K	35.73	55.92
Si K	58.94	52.55
Cu K	12.79	5.04
Totals	100.00	



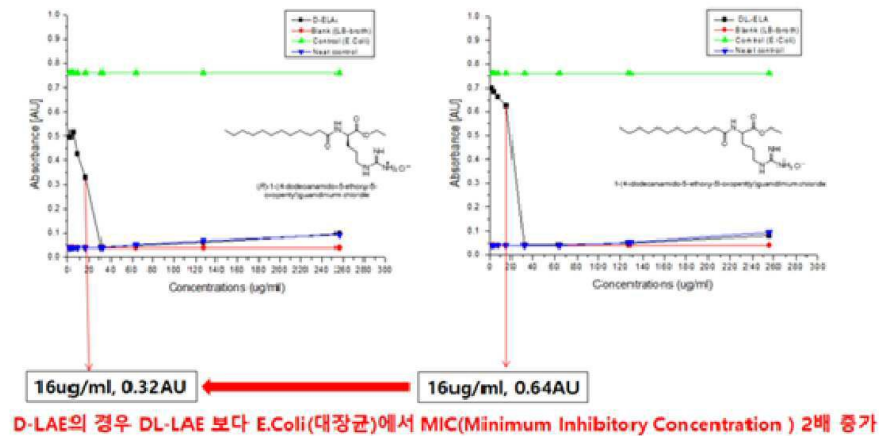
도면8



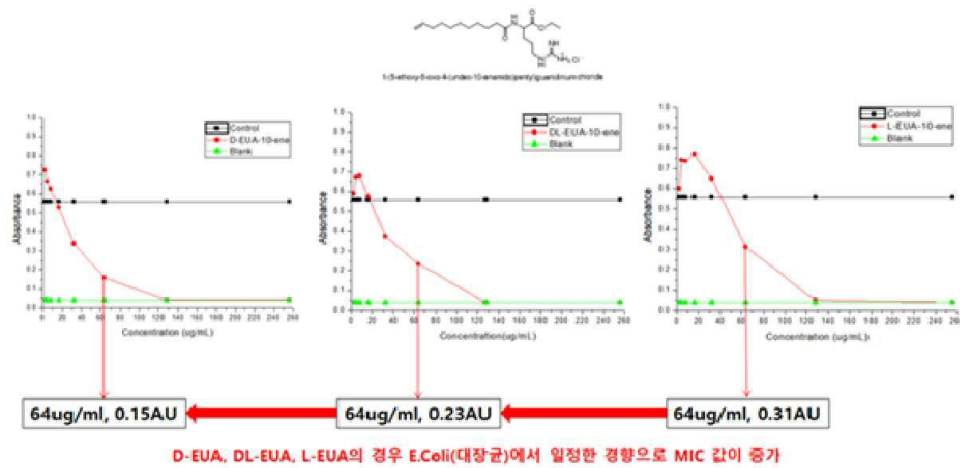
도면9



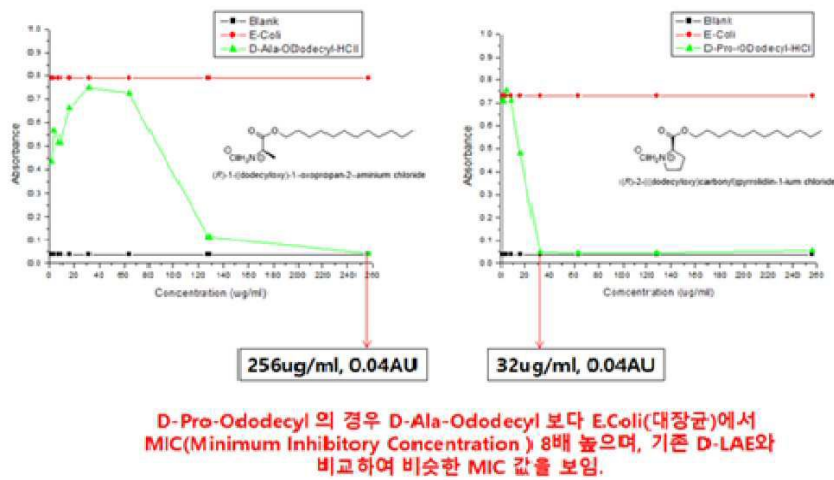
도면10



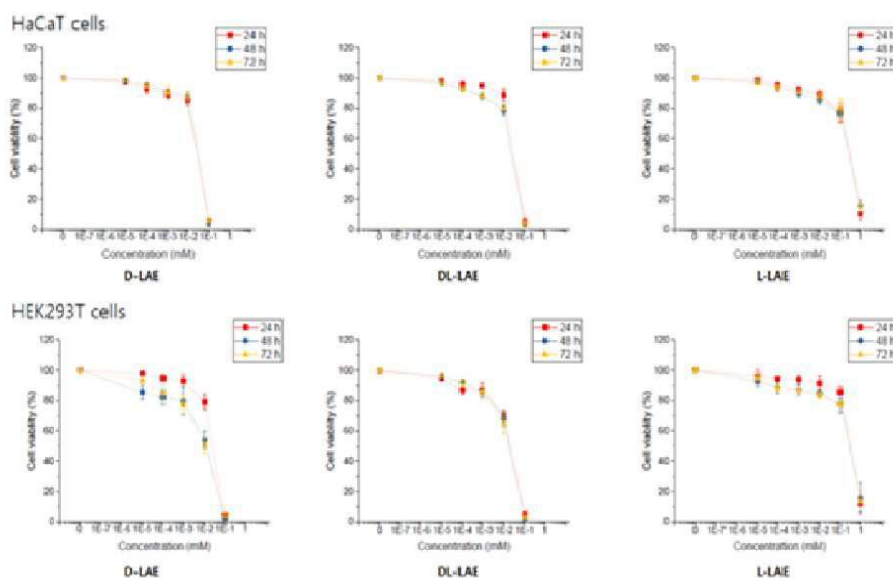
도면11



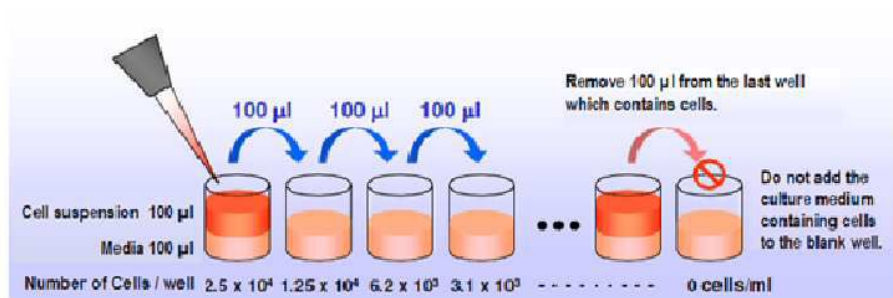
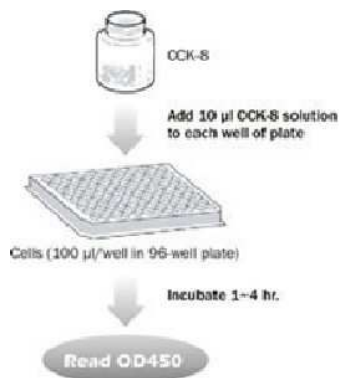
도면12



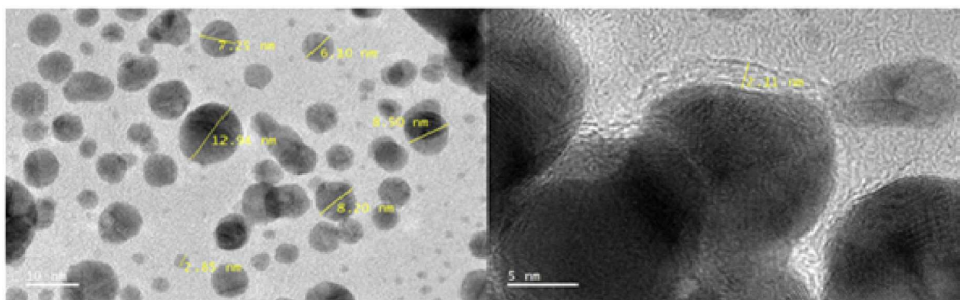
도면13



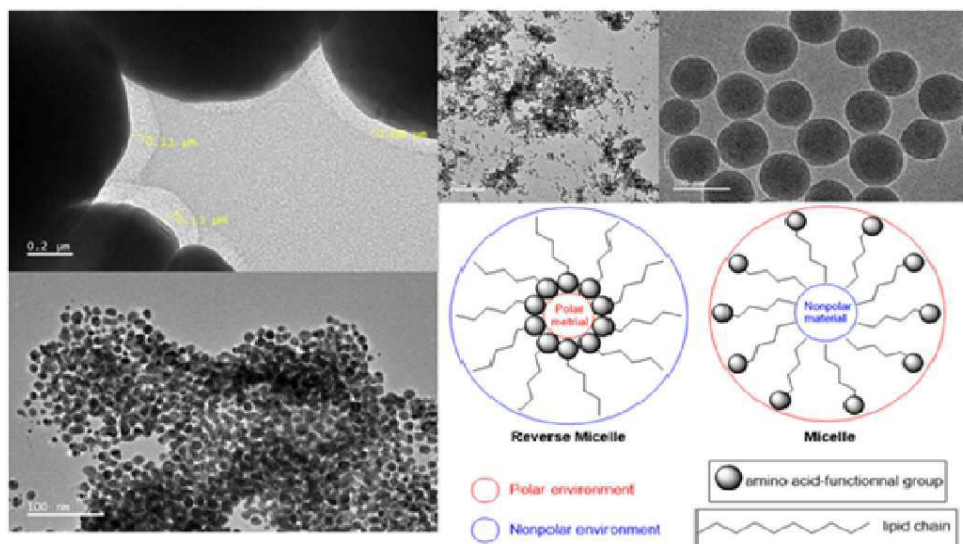
도면14



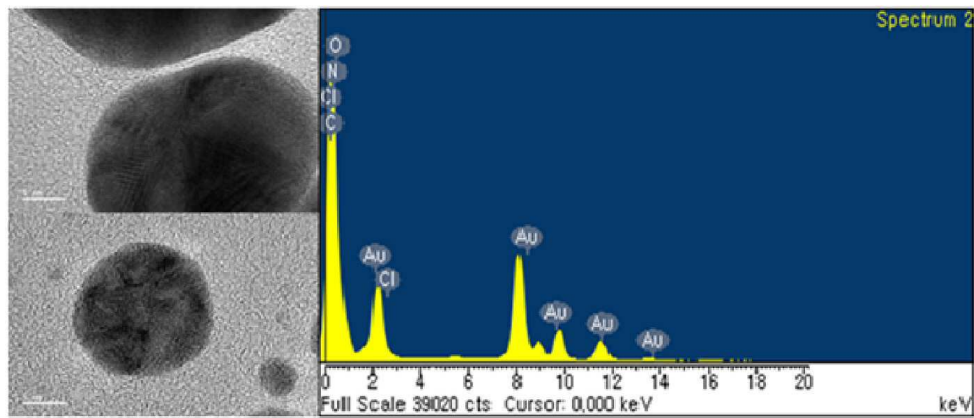
도면15



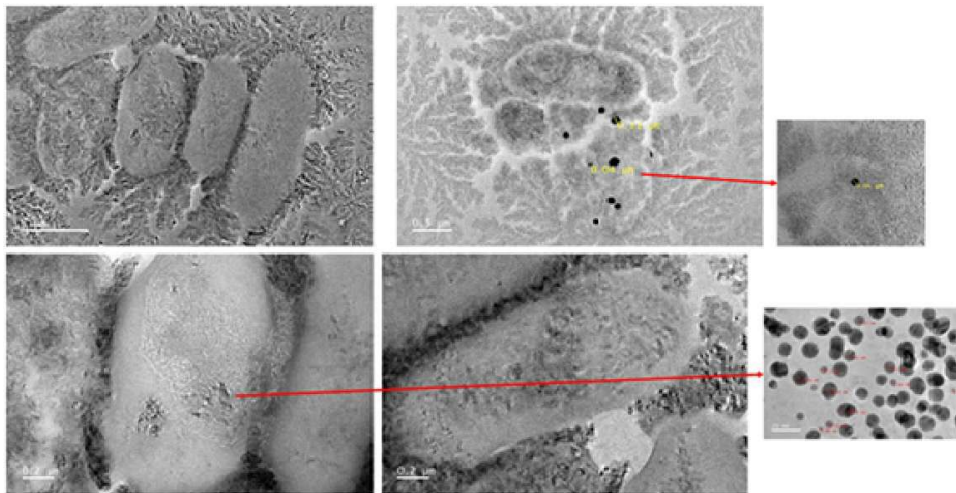
도면16



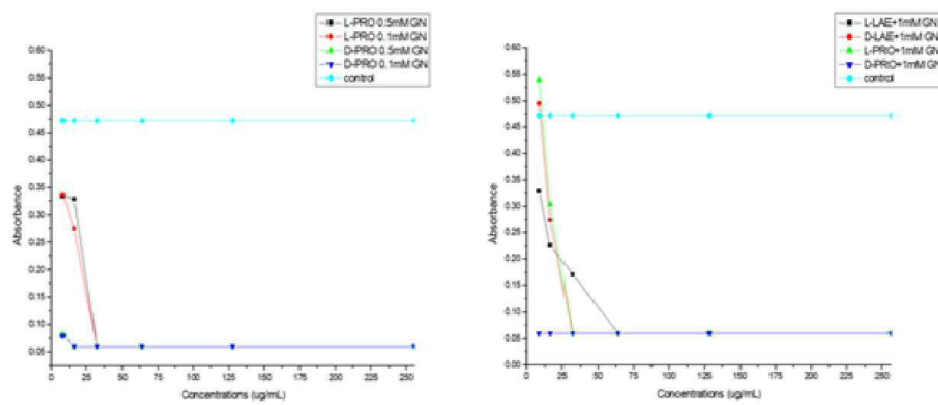
도면17



도면18



도면19



도면20

