(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2015-0039159
(43) 공개일자 2015년04월09일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 8/60 (2006.01) *A61Q 19/02* (2006.01)
C12N 9/16 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 8/60 (2013.01)
A61Q 19/02 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2015-0026300(분할)
(22) 출원일자 2015년02월25일
심사청구일자 2015년02월25일
(62) 원출원 특허 10-2013-0005704
원출원일자 2013년01월18일
심사청구일자 2013년01월18일
(30) 우선권주장
1020120005716 2012년01월18일 대한민국(KR)

(71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)
(72) 발명자
김경헌
서울특별시 성북구 안암로145 고려대학교 생명과학대학
최인걸
서울 동작구 남부순환로263길 34, 501호 (사당동, 태영아트빌)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인다나

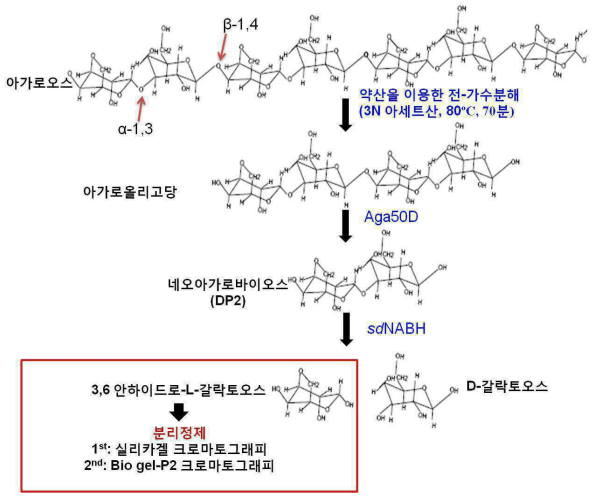
전체 청구항 수 : 총 16 항

(54) 발명의 명칭 **3, 6－안하이드로－L－갈락토오스의 제조방법 및 이의 용도**

(57) 요 약

본 발명은 3,6-안하이드로-L-갈락토오스의 제조방법 및 이의 용도에 관한 것으로, 보다 상세하게는 한천을 구성하는 단당류인 3,6-안하이드로-L-갈락토오스를 화학적, 효소적 방법을 통해 고수율로 생산하고, 이의 미백, 보습, 항산화, 항염증 등의 생리학적 활성을 입증함으로써 산업적으로 이용할 수 있다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류
C12N 9/16 (2013.01)
(72) 발명자
강남주
대구 북구 대학로 80, 농업생명과학대학 식품공학부 (산격동, 경북대학교)
윤은주
서울 금천구 시흥대로 53, 14동 104호 (시흥동, 현대빌라)
이세영
경기 의왕시 호성로 48-7, 103동 1502호 (오전동, 진달래아파트)
김지혜
대구 북구 대학로 80, 농업생명과학대학 3호관 314호 (산격동, 경북대학교)
김영아
대구 북구 대학로 80, 농업생명과학대학 3호관 314호 (산격동, 경북대학교)
김보배
대구 북구 대학로 80, 농업생명과학대학 3호관 314호 (산격동, 경북대학교)
백은지
대구 북구 대학로 80, 농업생명과학대학 3호관 314호 (산격동, 경북대학교)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 112097-3
부처명 농림수산식품부
연구관리전문기관 농림수산식품기술기획평가원
연구사업명 농림기술개발사업
연구과제명 [주관]해조류 우무 유래 무수갈락토오스의 기능성 화장품소재화
기 여 율 1/1
주관기관 고려대학교 산학협력단
연구기간 2012.08.24 ~ 2013.08.23

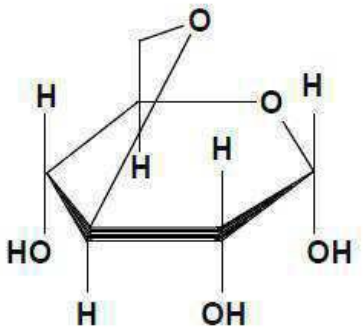
명 세 서

청구범위

청구항 1

하기 화학식 1로 표시되는 3,6-안하이드로-L-갈락토오스(3,6-anhydro-L-galactose)를 포함하는 피부 미백 또는 보습용 화장료 조성물:

[화학식 1]



청구항 2

제1항에 있어서, 3,6-안하이드로-L-갈락토오스는

아가로오스와 0.5 내지 60%(w/v) 농도의 약산을 40 내지 150℃의 온도 범위에서 100 내지 200 rpm의 조건으로 30분 내지 6시간 동안 반응시켜 아가로올리고당을 제조하는 단계; 및

상기 아가로올리고당과 아가로오스 분해효소 및 네오아가로바이오스 가수분해효소를 20 내지 40℃의 온도 범위에서 0 내지 200 rpm 조건으로 30분 내지 7일 동안 반응시키는 단계를 거쳐 제조되는 것인 피부 미백 또는 보습용 화장료 조성물.

청구항 3

제2항에 있어서,

약산은 아세트산(Acetic acid), 포름산(Formic acid), 숙신산(Succinic acid), 시트르산(Citric acid), 말산(Malic acid), 말레산(Maleic acid) 및 옥살산(Oxalic acid)으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상인 피부 미백 또는 보습용 화장료 조성물.

청구항 4

제2항에 있어서,

아가로오스 분해효소는 서열목록 서열번호 1에 기재된 아미노산 서열로 표시되는 피부 미백 또는 보습용 화장료 조성물.

청구항 5

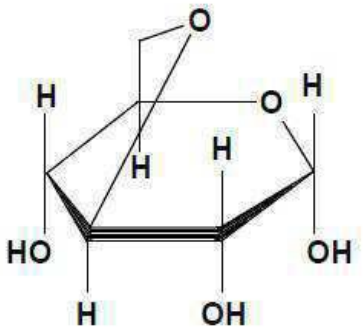
제2항에 있어서,

네오아가로바이오스 가수분해효소는 서열번호 3에 기재된 아미노산 서열로 표시되는 피부 미백 또는 보습용 화장료 조성물.

청구항 6

하기 화학식 1로 표시되는 3,6-안하이드로-L-갈락토오스(3,6-anhydro-L-galactose)를 포함하는 피부 색소 침착 질환의 예방 또는 치료용 약제학적 조성물:

[화학식 1]



청구항 7

제6항에 있어서,

피부 색소 침착 질환은 멜라닌 색소의 합성 증가로 피부에 국소적으로 발생하고, 기미, 주근깨, 흑색점, 모반, 약물에 의한 색소 침착, 염증 후 색소 침착, 또는 피부염에 발생하는 과색소 침착 중 어느 하나인 피부 색소 침착 질환의 예방 또는 치료용 약제학적 조성물.

청구항 8

제6항에 있어서, 3,6-안하이드로-L-갈락토오스는

아가로오스와 0.5 내지 60%(w/v) 농도의 약산을 40 내지 150℃의 온도 범위에서 100 내지 200 rpm의 조건으로 30분 내지 6시간 동안 반응시켜 아가로올리고당을 제조하는 단계; 및

상기 아가로올리고당과 아가로오스 분해효소 및 네오아가로바이오스 가수분해효소를 20 내지 40℃의 온도 범위에서 0 내지 200 rpm 조건으로 30분 내지 7일 동안 반응시키는 단계를 거쳐 제조되는 것인 피부 색소 침착 질환의 예방 또는 치료용 약제학적 조성물.

청구항 9

제8항에 있어서,

약산은 아세트산(Acetic acid), 포름산(Formic acid), 숙신산(Succinic acid), 시트르산(Citric acid), 말산(Malic acid), 말레산(Maleic acid) 및 옥살산(Oxalic acid)으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상인 피부 색소 침착 질환의 예방 또는 치료용 약제학적 조성물.

청구항 10

제8항에 있어서,

아가로오스 분해효소는 서열목록 서열번호 1에 기재된 아미노산 서열로 표시되는 피부 색소 침착 질환의 예방 또는 치료용 약제학적 조성물.

청구항 11

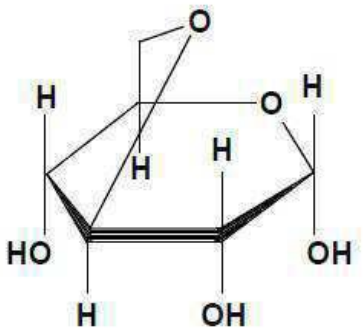
제8항에 있어서,

네오아가로바이오스 가수분해효소는 서열번호 3에 기재된 아미노산 서열로 표시되는 피부 색소 침착 질환의 예방 또는 치료용 약제학적 조성물.

청구항 12

하기 화학식 1로 표시되는 3,6-안하이드로-L-갈락토오스(3,6-anhydro-L-galactose)를 포함하는 염증성 질환의 예방 또는 치료용 약제학적 조성물:

[화학식 1]



청구항 13

제12항에 있어서, 3,6-안하이드로-L-갈락토오스는

아가로오스와 0.5 내지 60%(w/v) 농도의 약산을 40 내지 150℃의 온도 범위에서 100 내지 200 rpm의 조건으로 30분 내지 6시간 동안 반응시켜 아가로올리고당을 제조하는 단계; 및

상기 아가로올리고당과 아가로오스 분해효소 및 네오아가로바이오스 가수분해효소를 20 내지 40℃의 온도 범위에서 0 내지 200 rpm 조건으로 30분 내지 7일 동안 반응시키는 단계를 거쳐 제조되는 것인 염증성 질환의 예방 또는 치료용 약제학적 조성물.

청구항 14

제13항에 있어서,

약산은 아세트산(Acetic acid), 포름산(Formic acid), 숙신산(Succinic acid), 시트르산(Citric acid), 말산(Malic acid), 말레산(Maleic acid) 및 옥살산(Oxalic acid)으로 이루어진 군으로부터 선택된 하나 이상인 염증성 질환의 예방 또는 치료용 약제학적 조성물.

청구항 15

제13항에 있어서,

아가로오스 분해효소는 서열목록 서열번호 1에 기재된 아미노산 서열로 표시되는 염증성 질환의 예방 또는 치료용 약제학적 조성물.

청구항 16

제13항에 있어서,

네오아가로바이오스 가수분해효소는 서열번호 3에 기재된 아미노산 서열로 표시되는 염증성 질환의 예방 또는 치료용 약제학적 조성물.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 화학적, 효소적 방법에 따라 제조된 3,6-안하이드로-L-갈락토오스 및 이의 생리학적 효능을 이용한 산업적 용도에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 홍조류를 구성하는 주요한 다당체인 한천(또는 아가로오스)은 3,6-안하이드로-L-갈락토오스와 D-갈락토오스 두 가지 단당체가 알파 1,3 결합과 베타 1,4 결합이 교차로 연결되어 있는 중합체이다. 아가로오스를 염산과 황산과 아세트 산과 같은 화학적 촉매를 이용한 비특이적인 가수분해를 통해 생산한 아가로올리고당은 항산화, 항염증, 항암, 미백, 항알러지 기능 등 생리학적 활성이 우수한 것으로 널리 알려져 있다. 이런 다양한 생리 활성으로 인하여 아가로올리고당 및 이당체인 네오아가로바이오스는 식품 산업 분야 및 미용 산업 분야에서 기능성 물질로 널리 사용되고 있다.

[0003] 상기 아가로올리고당을 구성하는 단당 중의 하나인 3,6-안하이드로-L-갈락토오스의 경우, 환원 말단이 불안정하여 고 농도의 강산 및 고온 반응 조건에서 하이드록시 메틸 펄퍼럴로 빠르게 전환이 되므로 기존의 화학적 처리를 통해 단당체인 3,6-안하이드로-L-갈락토오스를 생산하는 것은 수율이 매우 낮고 쉽게 과분해가 되는 문제점이 있다(Jol *et al* (1999) *Anal Biochem*. 268, 213-222, Kim *et al* (2010) *Bull Korean Soc*. 31(2) 511-514). 또한 화학적 처리를 통한 가수분해는 생산 비용이 낮고 처리 조건이 단순하므로 상업화에 많이 응용할 수 있다는 장점이 있으나 비특이적으로 결합을 절단하기 때문에 특이적인 결합을 분해하여 원하는 생산물을 얻을 시에는 수율이 매우 낮아진다는 단점이 있다(Chen *et al* (2005) *Food Technol Biotechnol*. 43(1) 29-36). 또한, 3,6-안하이드로-L-갈락토오스 결합을 특이적으로 절단하여 단당을 생산하는 효소도 최근 보고되고 있지만 반응 산물로부터 3,6-안하이드로-L-갈락토오스만을 분리 정제 및 정량화하는 연구는 미비한 실정이다.

선행기술문헌

특허문헌

[0004] (특허문헌 0001) 1. 대한민국 공개특허 제2010-0040438호, 2010.04.20

(특허문헌 0002) 2. 대한민국 공개특허 제2010-0108241호, 2010.10.06

비특허문헌

[0005] (비특허문헌 0001) 1. J.Korean Fish. Soc. 36(1), pp.6-10(2003)

(비특허문헌 0002) 2. Mar. Drugs, vol.8, pp.200-218(2010)

발명의 내용

해결하려는 과제

[0006] 본 발명의 목적은 화학적 처리에 따른 과분해 효과를 최소화하면서 효소적 분해를 통해 고 수율로 3,6-안하이드로-L-갈락토오스를 제조하는 방법을 제공하는 것이다.

[0007] 본 발명의 다른 목적은 상기 3,6-안하이드로-L-갈락토오스의 생리학적 활성을 규명하여 이를 산업적으로 이용하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0008] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 아가로오스와 0.5 내지 60%(w/v) 농도의 약산을 40 내지 150℃의 온도 범위에서 100 내지 200 rpm의 조건으로 30분 내지 6시간 동안 반응시켜 아가로올리고당을 제조하는 단계; 및 상기 아가로올리고당과 아가로오스 분해효소 및 네오아가로바이오스 가수분해효소를 20 내지 40℃의 온도 범위에서 0 내지 200 rpm 조건으로 30분 내지 7일 동안 반응시키는 단계를 포함하는 3,6-안하이드로-L-갈락토오스의 제조방법을 제공한다.

[0009] 상기 아가로오스 분해효소는 아가로오스의 D-갈락토스와 3,6-안하이드로-L-갈락토오스 사이의 β-1,4-글리코사이드 결합을 절단하는 효소일 수 있다. 구체적으로, 서열목록 서열번호 1에 기재된 아미노산 서열로 표시될 수 있다.

[0010] 상기 네오아가로바이오스 가수분해효소는 서열번호 3에 기재된 아미노산 서열로 표시될 수 있다.

[0011] 일 구체예에 따르면, 상기 아가로오스 분해효소 및 네오아가로바이오스 가수분해효소는 사카로파거스 데그라단스(*Saccharophagus degradans*) 2-40에서 유래한 것일 수 있다.

[0012] 본 발명에 따른 3,6-안하이드로-L-갈락토오스의 제조방법은 3,6-안하이드로-L-갈락토오스에 대해 흡착 크로마토그래피 및 젤 투과 크로마토그래피를 순차적으로 실시하여 3,6-안하이드로-L-갈락토오스를 분리 정제하는 단계를 더 포함할 수 있다.

[0013] 본 발명은 또한 3,6-안하이드로-L-갈락토오스(3,6-anhydro-L-galactose)를 포함하는 피부 미백 또는 보습용 화장료 조성물을 제공한다.

[0014] 또한, 본 발명은 3,6-안하이드로-L-갈락토오스의 피부 미백 또는 보습을 위한 미용적 용도를 제공한다.

[0015] 본 발명은 또한 3,6-안하이드로-L-갈락토오스(3,6-anhydro-L-galactose)를 포함하는 피부 색소 침착 질환의 예방 또는 치료용 약제학적 조성물을 제공한다.

[0016] 또한, 본 발명은 피부 색소 침착 질환의 예방 또는 치료를 위한 약제학적 조성물의 제조를 위한 3,6-안하이드로-L-갈락토오스의 용도를 제공한다.

[0017] 본 발명은 또한 3,6-안하이드로-L-갈락토오스의 유효량을 바람직하게는 이를 함유하는 약제학적 또는 화장료 조성물 형태로 투여하는 단계를 포함하는 미백 또는 보습을 필요로 하는 포유동물, 바람직하게는 인간 피부의 미백 또는 보습을 위한 미용 또는 의료방법을 제공한다.

[0018] 본 발명은 또한 3,6-안하이드로-L-갈락토오스를 함유하는 약제학적 또는 화장료 조성물을 피부에 도포하는 단계를 포함하는 색소침착의 조절과 관련되는 피부의 병태, 질환 및/또는 병변, 바람직하게는 멜라닌 색소의 합성 증가로 피부에 국소적으로 발생하고, 기미, 주근깨, 흑색점, 모반, 약물에 의한 색소 침착, 염증 후 색소 침착, 및 피부염에 발생하는 과색소 침착에서 선택된 하나 이상을 치료하는 미용 또는 의료 방법을 제공한다.

[0019] 본 발명은 또한 3,6-안하이드로-L-갈락토오스를 포함하는 염증성 질환의 예방 또는 치료용 약제학적 조성물을 제공한다.

[0020] 또한, 본 발명은 약제학적 유효량의 3,6-안하이드로-L-갈락토오스를 포함하는 염증성 질환의 예방 또는 치료용 조성물을 개체에 투여하는 단계를 포함하는 동물의 염증성 질환 치료 방법을 제공한다.

[0021] 본 발명은 또한 염증성 질환의 예방 또는 치료를 위한 약제학적 조성물의 제조를 위한 3,6-안하이드로-L-갈락토오스의 용도를 제공한다.

발명의 효과

[0022] 본 발명은 화학적 처리에 따른 과분해 효과를 최소화한 마일드한 화학적 처리 조건에서 올리고당을 제조한 후 효소적 처리를 통해 단당인 3,6-안하이드로-L-갈락토오스를 높은 수율로 생산하는 효과가 있다.

[0023] 본 발명은 또한 3,6-안하이드로-L-갈락토오스의 미백, 보습, 항산화, 항염증 등의 생리학적 활성을 최초로 규명함으로써 이를 식품, 화장품, 제약 분야에서 이용할 수 있도록 한다. 따라서, 홍조류 유래 바이오 에너지 생산 시 부산물 또는 발효저해제로 여겨지는 3,6-안하이드로-L-갈락토오스를 바이오에너지 산업에서 고부가가치 물질을 창출해내는 데에 응용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0024] 도 1은 본 발명에 따른 아가로오스에서 3,6-안하이드로-L-갈락토오스를 제조하는 공정을 도시한 것으로, 도면 내 DP는 다당류의 중합도(Degree of polymerization)을 뜻한다.

도 2는 아가로오스에서 3,6-안하이드로-L-갈락토오스를 제조 및 정제하는 과정을 도시한 TLC 결과로서, 진행 단계(Processing step)에서 레인 1은 아가로오스, 레인 2는 아세트산 가수분해물, 레인 3은 Aga50D 반응산물, 레인 4는 sdNABH 반응산물, 레인 5는 실리카 젤 크로마토그래피로 분리한 3,6-안하이드로-L-갈락토오스, 레인 6은 바이오젤 P2 크로마토그래피로 정제한 3,6-안하이드로-L-갈락토오스이고, Y축의 AHG는 3,6-안하이드로 갈락토오스, NAB는 네오아가로바이오스를 지칭한다.

도 3은 3,6-안하이드로-L-갈락토오스 정제 첫 단계인 실리카 젤 크로마토그래피 TLC 결과를 나타낸 것으로, 도면 내 AHG는 3,6-안하이드로 갈락토오스를 지칭한다.

도 4는 D-형태의 3,6-안하이드로갈락토오스의 표준물질(a)과 본 발명을 통해 정제한 3,6-안하이드로-L-갈락토오스(b)의 GC/MS total ion chromatogram를 도시한 것이다.

도 5는 분리 정제한 3,6-안하이드로-L-갈락토오스의 ^{1}H NMR 분석결과를 나타낸 것이다.

도 6은 분리 정제한 3,6-안하이드로-L-갈락토오스의 2D-HSQC NMR 분석결과를 나타낸 것이다.

도 7은 3,6-안하이드로-L-갈락토오스, 네오아가로바이오스, D-갈락토오스 및 3,6-안하이드로-D-갈락토오스의 미백활성 효과를 나타낸 것으로, 도면 내 α-MSG는 α-melanocyte-stimulating hormones, NAB는 네오아가로바이오스, D-AHG 및 L-AHG는 각각 D-form과 L-form의 3,6-안하이드로 갈락토오스를 지칭한다.

도 8은 3,6-안하이드로-L-갈락토오스, 네오아가로바이오스, D-갈락토오스 및 3,6-안하이드로-D-갈락토오스의 항산화 활성 효과를 나타낸 것이다.

도 9는 HEMs에서 α-MSH에 의해 유도된 티로시나아제 발현에 대한 L-AHG의 효과를 나타낸 것으로, A는 L-AHG의 농도 별 처리 후 α-MSH에 노출된 세포의 티로시나아제 발현 결과이고, B는 상기 A의 결과를 β-액틴에 대한 티로시나아제의 상대 강도로 표시한 그래프이다.

도 10은 HEMs에서 α-MSH에 의해 유도된 TRP-1 발현에 대한 L-AHG의 효과를 나타낸 것으로, A는 L-AHG의 농도별 처리 후 α-MSH에 노출된 세포의 TRP-1 발현 결과이고, B는 상기 A의 결과를 β-액틴에 대한 TRP-1의 상대 강도로 표시한 그래프이다.

도 11은 인 비트로에서 티로시나아제 활성에 대한 L-AHG의 효과를 나타낸 것이다.

도 12는 사람 각질세포에서 HAS2 발현에 대한 L-AHG의 효과를 나타낸 것으로, A는 100㎍/mL의 L-AHG의 시간별 처리 후 HAS2 발현 수준이고, B는 L-AHG의 농도 별 처리 후 HAS2 발현 수준이다.

도 13은 사람 각질세포에서 ERK의 인산화에 대한 L-AHG의 효과를 나타낸 것으로, A는 100㎍/mL의 L-AHG의 시간별 처리 후 ERK 인산화 결과이고, B는 L-AHG의 농도 별 처리 후 ERK 인산화 결과이다.

도 14는 사람 각질세포에서 AKT의 인산화에 대한 L-AHG의 효과를 나타낸 것으로, A는 100㎍/mL의 L-AHG의 시간별 처리 후 AKT 인산화 결과이고, B는 L-AHG의 농도 별 처리 후 AKT 인산화 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

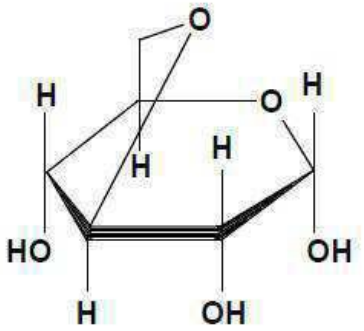
[0025] 이하 본 발명의 구성을 구체적으로 설명한다.

[0026] 본 발명은 아가로오스와 0.5 내지 60%(w/v) 농도의 약산을 40 내지 150℃의 온도 범위에서 100 내지 200 rpm의 조건으로 30분 내지 6시간 동안 반응시켜 아가로올리고당을 제조하는 단계; 및 상기 아가로올리고당과 아가로오스 분해효소 및 네오아가로바이오스 가수분해효소를 20 내지 40℃의 온도 범위에서 0 내지 200 rpm 조건으로 30분 내지 7일 동안 반응시키는 단계를 포함하는 3,6-안하이드로-L-갈락토오스의 제조방법에 관한 것이다.

[0027] 본 발명의 3,6-안하이드로-L-갈락토오스의 제조방법은 약산을 이용한 마일드 조건에서 아가로오스를 가수분해하고, 산가수분해 산물로부터 얻은 아가로올리고당을 이당체를 생산하는 엑소-타입의 아가로오스 분해효소와 반응시켜 네오아가로바이오스를 생산하며, 네오아가로바이오스 가수분해효소와의 추가 반응을 통해 단당체인 갈락토오스와 3,6-안하이드로-L-갈락토오스를 생산하는 것을 특징으로 한다.

[0028] 상기 3,6-안하이드로-L-갈락토오스는 하기 화학식 1의 구조를 가질 수 있다:

[0029] [화학식 1]



[0030]

[0031] 도 1에 도시된 3,6-안하이드로-L-갈락토오스의 제조공정을 참조하여 보다 구체적으로 설명하면 다음과 같다.

[0032] 제1단계는 아가로오스에 약산을 처리하여 아가로올리고당을 제조하는 단계이다.

[0033] 상기 약산은 아세트산(Acetic acid), 포름산(Formic acid), 숙신산(Succinic acid), 시트르산(Citric acid), 말산(Malic acid), 말레산(Maleic acid) 또는 옥살산(Oxalic acid) 등을 단독 또는 2종 이상 사용할 수 있다.

[0034] 상기 약산은 생산단가 및 약산 중화 후 생성되는 염의 분리를 고려하여 0.5 내지 60%(w/v)의 농도로 사용하는 것이 좋다. 보다 구체적으로 20 내지 40% (w/v)의 농도로 사용할 수 있다.

[0035] 상기 아가로오스 및 약산의 반응은 40 내지 150℃의 온도 범위에서 100 내지 200 rpm의 조건으로 30분 내지 6시간 동안 실시할 수 있다. 상기 범위 내일 경우 약산에 의한 아가로오스의 과분해산물을 최소화할 수 있다.

[0036] 상기 반응 후 얻은 반응산물은 아가로올리고당으로 잔존하는 약산과 과분해산물을 제거하기 위해 세척 후 건조하여 분말상태로 수득할 수 있다.

[0037] 상기 세척 용매로 탄소 수 1 내지 6의 저급 알코올을 사용할 수 있으나, 이에 특별히 제한하는 것은 아니다.

[0038] 제2단계는 아가로올리고당의 효소적 분해를 통해 3,6-안하이드로-L-갈락토오스를 제조하는 단계로, 상기 효소적 분해는 엑소 타입의 아가로오스 분해효소를 처리하여 이당체인 네오아가로바이오스를 생산하고, 이어서 네오아가로바이오스 가수분해효소를 처리하여 D-갈락토오스와 3,6-안하이드로-L-갈락토오스로 분해하는 것이다.

[0039] 상기 효소 반응은 20 내지 40℃의 온도 범위에서 0 내지 200 rpm 조건으로 30분 내지 7일 동안 실시할 수 있다.

[0040] 상기 효소 반응을 보다 구체적으로 설명하면 다음과 같다.

[0041] 우선, 아가로올리고당을 분해하여 이당체인 네오아가로바이오스를 생산하는 아가로오스 분해효소는 아가로오스의 D-갈락토스와 3,6-안하이드로-L-갈락토오스 사이의 β-1,4-글리코사이드 결합을 절단하는 효소(이하, 'Aga50D'라 함)를 사용할 수 있다.

[0042] 상기 아가로오스 분해효소는 서열목록 서열번호 1에 기재된 아미노산 서열 및 상기 서열과 서열 동일성이 80% 이상, 85% 이상, 90% 이상, 93% 이상, 94% 이상, 95% 이상, 96% 이상, 97% 이상, 98% 이상 및 99% 이상인 아미노산 서열을 포함할 수 있다.

[0043] 본 발명에서 폴리펩티드가 또 다른 서열에 대하여 특정 비율 (예컨대, 80%, 85%, 90%, 95%, 또는 99%)의 서열 동일성을 가진다는 것은, 상기 두 서열을 정렬시킬 때, 상기 서열들의 비교시에 상기 비율의 아미노산 잔기가 동일함을 의미한다. 상기 정렬 및 백분율 상동성 또는 동일성은, 당업계에 공지된 임의의 적당한 소프트웨어 프로그램, 예를 들어 문헌[CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY (F. M. Ausubel 등 (eds) 1987 Supplement 30 section 7.7.18)]에 기재된 것들을 사용하여 결정할 수 있다. 바람직한 프로그램으로는, GCG Pileup 프로그램, FASTA(Pearson 등 1988 Proc. *Natl Acad. Sci* USA 85:2444-2448), 및 BLAST (BLAST Manual, Altschul 등, Natl. Cent. Biotechnol. Inf., Natl Lib. Med. (NCIB NLM NIH), Bethesda, MD, 및 Altschul 등 1997 NAR25:3389-3402)이 있다. 또 다른 바람직한 정렬 프로그램은 ALIGN Plus(Scientific and Educational Software, PA)로서, 바람직하게는 기본 매개변수를 사용하는 것이다. 사용 가능한 또 다른 서열 소프트웨어 프로그램은 Sequence Software Package Version 6.0 (Genetics Computer Group, University of Wisconsin, Madison, WI)에서 이용 가능한 TFASTA Data Searching Program 이다.

[0044] 본 명세서에서 "단백질" 및 "폴리펩티드"는 본원에서 상호 교환 가능하게 사용된다. 본원에서는 아미노산 잔기에 대하여 통상의 1문자 또는 3문자 코드가 사용된다.

[0045] 상기 효소는 사카로파거스 데그라단스(*Saccharophagus degradans*) 2-40에서 유래한 것일 수 있으나, 이에 특별히 제한하는 것은 아니다.

[0046] 상기 효소는 효소의 코딩 영역 전 및 후의 영역뿐만 아니라 개별 코딩 분절 사이의 개재 서열이 포함된 폴리펩티드를 생산하는데 연관된 DNA 분절, 즉 코딩 유전자를 통해 전사 및 번역될 수 있다. 예컨대, 서열번호 2에 기재된 서열일 수 있으나, 이에 특별히 제한되는 것은 아니다.

[0047] 본 발명의 아가로오스 분해효소는 사카로파거스 데그라단스(*Saccharophagus* degradans)의 배양물의 상등액 또는 상청액으로부터 분리 및 정제할 수 있으며, 유전공학적 재조합 기술을 이용하여 사카로파거스 데그라단스(*Saccharophagus degradans*) 이외 균주 또는 인공적인 화학적 합성법 등에 의하여 생산 및 분리할 수 있다.

[0048] 재조합 기술을 이용하는 경우, 통상적인 재조합 단백질 발현의 용이함을 위하여 사용되는 인자들, 예컨대 항생제 저항성 유전자, 친화성 컬럼 크로마토그래피에 사용될 수 있는 리포터 단백질 또는 펩타이드를 사용할 수 있으며, 이러한 기술은 본원발명이 속하는 기술분야의 당업자라면 용이하게 실시 가능한 범주에 해당된다. 또한 본 발명의 아가로오스 분해효소는 사카로파거스 데그라단스(*Saccharophagus degradans*) 배양물의 상등액 또는 상청액을 대체 이용하거나 또는 식용균주, 예컨대 효모에 형질전환시켜 형질전환된 효모의 배양물 상등액 또는 상청액을 대체하여 이용할 수 있다.

[0049] 본 발명에서 세포, 핵산, 단백질 또는 벡터와 관련하여 사용될 때 용어 "재조합"은, 상기 세포, 핵산, 단백질 또는 벡터가 이종 핵산 또는 단백질의 도입 또는 본래적 핵산 또는 단백질의 변경에 의해 변형되었거나, 또는 상기 세포가 이렇게 변형된 세포로부터 유래한 것을 가리킨다. 즉, 예를 들어, 재조합 세포는 상기 세포의 본래적 (비(非)재조합) 형태 내에서는 발견되지 않는 유전자를 발현하거나 또는, 다르게는 발현 시 비정상적으로 발현되거나 또는 전혀 발현되지 않는 본래적 유전자를 발현한다.

[0050] 본 명세서에서 "핵산"은 단일가닥 또는 이중가닥의 DNA, RNA, 및 이들의 화학적 변형체를 포괄한다. "핵산" 및 "폴리뉴클레오티드"는 본원에서 상호교환가능하게 사용될 수 있다. 유전 암호가 축퇴되어 있기 때문에, 특정 아미노산을 인코딩하기 위해서 하나 이상의 코돈을 사용할 수 있으며, 본 발명은 특정 아미노산 서열을 인코딩하는 폴리뉴클레오티드를 포괄한다.

[0051] 핵산 서열을 세포 내로 삽입하는 용어 "도입"은 "트랜스펙션 (transfection)", 또는 "형질전환" 또는 "형질도입 (transduction)"을 의미하며, 핵산 서열의 진핵 또는 원핵 세포 내로의 통합에 대한 언급이 포함되고, 이때 상기 핵산 서열은 세포의 게놈 (예컨대, 염색체, 플라스미드, 색소체, 또는 미토콘드리아 DNA) 내로 통합되어, 자율 레플리콘으로 전환되거나, 또는 일시적으로 발현된다.

[0052] 상기 아가로올리고당 및 아가로오스 분해효소의 반응은 20 내지 40℃의 온도 범위에서 0 내지 200 rpm 조건으로 30분 내지 7일간 실시할 수 있다. 보다 구체적으로, 25 내지 35℃의 온도 범위에서 100 내지 150 rpm 조건으로 1일 내지 4일 동안 실시할 수 있다.

[0053] 상기 아가로올리고당이 분말상태인 경우 통상의 완충용액에 녹여 사용할 수 있으나, 이에 특별히 제한하는 것은 아니다.

[0054] 다음으로, 상기 효소 반응을 통해 생산된 네오아가로바이오스를 D-갈락토오스와 3,6-안하이드로-L-갈락토오스로 분해할 수 있는 네오아가로바이오스 가수분해효소는 서열번호 3에 기재된 아미노산 서열뿐만 아니라 상기 효소의 하나 이상의 치환, 결손, 전위, 첨가 등의 변이 단백질로서 상기 네오아가로바이오스 가수분해 활성을 가지는 단백질도 본 발명의 효소의 권리범위에 포함되며, 바람직하게는 서열번호 3에 개시된 아미노산 서열과 서열 동일성이 80% 이상, 85% 이상, 90% 이상, 93% 이상, 94% 이상, 95% 이상, 96% 이상, 97% 이상, 98% 이상 및 99% 이상인 아미노산 서열을 포함한다(이하, 'sdNABH'라 함).

[0055] 상기 효소는 사카로파거스 데그라단스(*Saccharophagus degradans*) 2-40에서 유래한 것일 수 있으나, 이에 특별히 제한하는 것은 아니다.

[0056] 상기 효소는 효소의 코딩 영역 전 및 후의 영역뿐만 아니라 개별 코딩 분절 사이의 개재 서열이 포함된 폴리펩티드를 생산하는데 연관된 DNA 분절, 즉 코딩 유전자를 통해 전사 및 번역될 수 있다. 예컨대, 서열번호 4에 기재된 서열일 수 있으나, 이에 특별히 제한되는 것은 아니다.

[0057] 상기 네오아가로바이오스 가수분해효소는 사카로파거스 데그라단스(*Saccharophagus degradans*)의 배양물의 상등액 또는 상청액으로부터 분리 및 정제할 수 있으며, 유전공학적 재조합 기술을 이용하여 사카로파거스 데그라단스(*Saccharophagus degradans*) 이외 균주 또는 인공적인 화학적 합성법 등에 의하여 생산 및 분리할 수 있다.

[0058] 재조합 기술을 이용하는 경우, 통상적인 재조합 단백질 발현의 용이함을 위하여 사용되는 인자들, 예컨대 항생제 저항성 유전자, 친화성 컬럼 크로마토그래피에 사용될 수 있는 리포터 단백질 또는 펩타이드를 사용할 수 있으며, 이러한 기술은 본원발명이 속하는 기술분야의 당업자라면 용이하게 실시 가능한 범주에 해당된다. 또한 본 발명의 네오아가로바이오스 가수분해효소는 사카로파거스 데그라단스(*Saccharophagus degradans*) 배양물의 상등액 또는 상청액을 대체 이용하거나 또는 식용균주, 예컨대 효모에 형질전환시켜 형질전환된 효모의 배양물 상등액 또는 상청액을 대체하여 이용할 수 있다.

[0059] 상기 네오아가로바이오스와 네오아가로바이오스 가수분해효소의 반응은 20 내지 40℃의 온도 범위에서 0 내지 200 rpm의 조건으로 30분 내지 7일 동안 실시할 수 있다. 보다 구체적으로 25 내지 35℃의 온도 범위에서 100 내지 150 rpm 조건으로 1일 내지 4일 동안 실시할 수 있다.

[0060] 또한, 본 발명의 3,6-안하이드로-L-갈락토오스의 제조방법은 네오아가로바이오스의 분해 산물 중 3,6-안하이드로-L-갈락토오스 만을 분리 정제하는 단계를 더 실시할 수 있다.

[0061] 상기 3,6-안하이드로-L-갈락토오스는 흡착 크로마토그래피인 실리카 젤 크로마토그래피 및 젤 투과 크로마토그래피인 바이오 젤 P2 크로마토그래피를 순차적으로 실시하여 대략 96%의 고순도로 분리 정제할 수 있다.

[0062] 정제한 산물은 ^{1}H-NMR과 2D-Heteronuclear Single Quantum Coherence (HSQC) NMR 분석을 시행하여 기존에 보고된 3,6-안하이드로-L-갈락토오스의 ^{1}H ppm와 ^{13}C ppm을 비교하여 구조를 동정할 수 있다.

[0063] 일 구체예에 따르면, 본 발명의 제조방법을 통해 100g의 아가로오스로부터 화학적 가수분해를 통해 76g의 아가로올리고당을 생산하며, Aga50D와 *sd*NABH 효소를 이용하여 37.55g의 네오아가로바이오스와 15.21g의 3,6-안하이드로-L-갈락토오스를 각각 생산하며, 또한 2가지 크로마토그래피를 이용한 정제 과정을 통해 3.98g의 순수한 3,6-안하이드로-L-갈락토오스를 정제할 수 있다.

[0064] 본 발명은 또한 3,6-안하이드로-L-갈락토오스(3,6-anhydro-L-galactose)를 포함하는 피부 미백 또는 보습용 화장료 조성물에 관한 것이다.

[0065] 또한, 본 발명은 3,6-안하이드로-L-갈락토오스의 피부 미백 또는 보습을 위한 미용적 용도를 제공한다.

[0066] 상기 3,6-안하이드로-L-갈락토오스는 기존 미백물질로 가장 널리 알려져 있는 알부틴보다 미백 활성이 더 높으며, 멜라닌 합성을 촉진하는 것과 관련된 티로시나아제, TRP-1 등의 발현을 농도 의존적 방식으로 억제하는 특

징이 있다.

[0067] 본 발명의 일 구체예에 따르면, 인 비트로 티로시나아제 활성 실험에서, 3,6-안하이드로-L-갈락토오스는 티로시나아제 활성을 억제하는 것이 아니라 효소의 발현을 억제함으로써 미백 효과를 나타낸다.

[0068] 또한, 3,6-안하이드로-L-갈락토오스는 히알루론산의 합성에 관여하는 보습 마커인 HAS2 단백질의 발현을 촉진하는 특징이 있다.

[0069] 본 발명의 일 구체예에 따르면, HAS2 발현은 ERK 및 AKT 등의 다양한 염증 신호 전달 경로에 의해 조절되는데, 3,6-안하이드로-L-갈락토오스는 ERK 및 AKT의 인산화를 증가시키고, 증가된 인산화된 ERK 및 AKT는 HAS2 발현을 증가시킬 수 있다.

[0070] 상기 3,6-안하이드로-L-갈락토오스는 합성하여 이용하거나, 본 발명에 따른 3,6-안하이드로-L-갈락토오스의 제조방법에 따라 제조된 것을 제한 없이 사용할 수 있다.

[0071] 유효량을 기준으로, 상기 3,6-안하이드로-L-갈락토오스를 자체 또는 화장품학적으로 허용된 담체를 혼합한 조성물을 기능성 성분으로 포함하는 화장료 또는 화장품을 제공하는데, 일반적인 유화 제형 및 가용화 제형의 형태로 제조할 수 있다. 유화 제형의 화장품으로는 영양화장수, 크림, 에센스 등이 있으며, 가용화 제형의 화장품으로는 유연화장수가 있다. 적합한 화장품의 제형으로는 예를 들면 용액, 겔, 고체 또는 반죽 무수 생성물, 수상에 유상을 분산시켜 얻은 에멀젼, 현탁액, 마이크로에멀젼, 마이크로캡슐, 미세과립구 또는 이온형(리포좀), 비이온형의 소낭 분산제의 형태, 크림, 스킨, 로션, 파우더, 연고, 스프레이 또는 콘실 스틱의 형태로 제공될 수 있다.

[0072] 또한, 포말(foam)의 형태 또는 압축된 추진제를 더 함유한 에어로졸 조성물의 형태로도 제조될 수 있다.

[0073] 이때, 상술한 형태의 화장품 제조방법과 담체는 당업자에게 자명한 사항으로 구체적인 제조방법의 기재는 생략하기로 한다.

[0074] 또한, 상기 화장품은 본 발명의 3,6-안하이드로-L-갈락토오스에 추가로 지방 물질, 유기 용매, 용해제, 농축제 및 겔화제, 연화제, 항산화제, 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.

[0075] 상기 3,6-안하이드로-L-갈락토오스를 식품 또는 식품첨가물로 사용하는 경우, 상기 3,6-안하이드로-L-갈락토오스를 그대로 첨가하거나 다른 식품 또는 식품 성분과 함께 사용될 수 있고, 통상적인 방법에 따라 적절하게 사용될 수 있다. 유효성분의 혼합양은 그의 사용 목적(예방, 건강 또는 치료적 처치)에 따라 적합하게 결정될 수 있다. 일반적으로, 식품 제조 시 본 발명의 조성물은 원료에 대하여 15 중량% 이하, 바람직하게는 10 중량% 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.

[0076] 본 발명은 또한 3,6-안하이드로-L-갈락토오스를 포함하는 피부 색소 침착 질환의 예방 또는 치료용 약제학적 조성물에 관한 것이다.

[0077] 또한, 본 발명은 피부 색소 침착 질환의 예방 또는 치료를 위한 약제학적 조성물의 제조를 위한 3,6-안하이드로-L-갈락토오스의 용도를 제공한다.

[0078] 본 발명의 약제학적 조성물은 약제학적 조성물의 제조에 통상적으로 사용하는 적절한 담체, 부형제 및 희석제를 더 포함할 수 있다.

[0079] 본 발명의 약제학적 조성물은 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀젼, 시럽, 에어로졸 등의 외용제 및 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용될 수 있으며, 바람직하게는 크림, 젤, 패취, 분무제, 연고제, 경고제, 로션제, 리니멘트제, 파스타제 또는 카타플라스마제의 형태로 사용될 수 있다.

[0080] 본 발명의 약제학적 조성물에 포함될 수 있는 담체, 부형제 및 희석제로는 락토즈, 덱스트로즈, 수크로스, 올리고당, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페

이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 및 광물유를 들 수 있다.

[0081] 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제하는 것이 바람직하다.

[0082] 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 상기 화합물에 적어도 하나 이상의 부형제 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트(calcium carbonate), 수크로스(sucrose) 또는 락토오스(lactose), 젤라틴 등을 섞어 조제하는 것이 바람직하다. 또한 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스티레이트 탈크 같은 윤활제들도 사용될 수 있다. 경구를 위한 액상제제로는 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, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조제제, 좌제 등이 포함될 수 있다. 비수성용제, 현탁제로는 프로필렌글리콜 (propylene glycol), 폴리에틸렌 글리콜, 올리브 오일과 같은 식물성 기름, 에틸올레이트와 같은 주사 가능한 에스테르 등이 사용될 수 있다. 좌제의 기제로는 위텝솔(witePSol), 마크로골, 트윈 (tween) 61, 카카오지, 라우린지, 글리세로제라틴 등이 사용될 수 있다.

[0083] 본 발명의 약제학적 조성물은 피부에 적용할 수 있는 피부 외용제 제형으로서 크림, 젤, 패취, 분무제, 연고제, 경고제, 로션제, 리니멘트제, 파스타제 또는 카타플라스마제의 피부 외용제 형태의 약제학적 조성물로 제조하여 사용할 수 있으나, 이에 한정하는 것은 아니다.

[0084] 본 발명의 약제학적 조성물의 바람직한 투여량은 환자의 상태 및 체중, 질병의 정도, 약물형태, 투여경로 및 기간에 따라 다르지만, 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다. 그러나 바람직한 효과를 위해서, 본 발명의 조성물은 1일 0.0001 내지 100㎎/㎏으로, 바람직하게는 0.001 내지 10㎎/㎏으로 투여하는 것이 좋다. 외용투여는 하루에 한번 투여할 수도 있고, 수회 나누어 투여할 수도 있다. 상기 투여량은 어떠한 면으로든 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.

[0085] 본 발명은 또한 3,6-안하이드로-L-갈락토오스의 유효량을 바람직하게는 이를 함유하는 약제학적 또는 화장료 조성물 형태로 투여하는 단계를 포함하는 미백 또는 보습을 필요로 하는 포유동물, 바람직하게는 인간 피부의 미백 또는 보습을 위한 미용 또는 의료방법에 관한 것이다.

[0086] 마찬가지로, 본 발명은 3,6-안하이드로-L-갈락토오스를 함유하는 약제학적 또는 화장료 조성물을 피부에 도포하는 단계를 포함하는 색소침착의 조절과 관련되는 피부의 병태, 질환 및/또는 병변, 바람직하게는 멜라닌 색소의 합성 증가로 피부에 국소적으로 발생하고, 기미, 주근깨, 흑색점, 모반, 약물에 의한 색소 침착, 염증 후 색소 침착, 및 피부염에 발생하는 과색소 침착에서 선택된 하나 이상을 치료하는 미용 또는 의료 방법을 제공한다.

[0087] 3,6-안하이드로-L-갈락토오스를 함유하는 약제학적 또는 화장료 조성물의 도포 빈도는 각각의 피험자의 필요에 따라 상당히 변할 수 있고, 도포 빈도는 매달 내지 1일 10회, 바람직하게는 매주 내지 1일 4회, 더 바람직하게는 1주당 3회 내지 1일 3회, 훨씬 더 바람직하게는 1일 1회 또는 2회가 제안된다.

[0088] 또한, 본 발명은 피부 바람직하게는 얼굴, 목, 목선, 손, 겨드랑이, 사타구니, 팔꿈치 및/또는 무릎의 피부, 더 바람직하게는 얼굴, 목 및/또는 손의 국소 부위의 치료, 관리 및/또는 세정을 위한 약제학적 또는 화장료 조성물의 제조에서 3,6-안하이드로-L-갈락토오스의 용도에 관한 것이다.

[0089] 본 발명은 또한 3,6-안하이드로-L-갈락토오스를 포함하는 염증성 질환의 예방 또는 치료용 약제학적 조성물을 제공한다.

[0090] 또한, 본 발명은 약제학적 유효량의 3,6-안하이드로-L-갈락토오스를 포함하는 염증성 질환의 예방 또는 치료용 조성물을 개체에 투여하는 단계를 포함하는 동물의 염증성 질환 치료 방법을 제공한다.

[0091] 추가로, 본 발명은 염증성 질환의 예방 또는 치료를 위한 약제학적 조성물의 제조를 위한 3,6-안하이드로-L-갈락토오스의 용도를 제공한다.

[0092] 상기 3,6-안하이드로-L-갈락토오스는 아질산염(nitrite, NO_2)의 생성을 억제하는 항산화 활성이 있으며, 이는 해조류를 구성하는 다른 이당 및 단당인 네오아가로바이오스와 갈락토오스, 그리고 D-형태의 3,6-안하이드로 갈락토오스와 비교하였을 때 가장 높게 나타나 염증성 질환의 예방 또는 치료용 약제학적 조성물로 사용할 수 있

다(도 8 참조).

[0093] 상기 염증성 질환 치료 방법에 사용되는 약제학적 조성물 및 투여 방법은 상기에서 설명하였으므로, 이 둘 사이에 공통된 내용은 본 명세서의 과도한 복잡성을 피하기 위하여, 그 기재를 생략한다. 한편, 상기 염증성 질환 예방 또는 치료용 약제학적 조성물을 투여할 수 있는 개체는 모든 동물을 포함한다. 예를 들어, 개, 고양이, 마우스와 같은 인간을 제외한 동물일 수 있다.

[0094] 상기 약제학적 조성물의 유효성분의 유효량은 질환의 치료를 이루는데 요구되는 양을 의미한다. 따라서, 질환의 종류, 질환의 중증도, 조성물에 함유된 유효 성분 및 다른 성분의 종류 및 함량, 제형의 종류 및 환자의 연령, 체중, 일반 건강 상태, 성별 및 식이, 투여 시간, 투여 경로 및 조성물의 분비율, 치료기간, 동시 사용되는 약물을 비롯한 다양한 인자에 따라 조절될 수 있다.

[0095] 또한 '치료'는 증상을 경감시키거나, 증상의 원인을 일시적 또는 영구적으로 제거하거나 증상의 출현 및 상기한 질병, 장애 또는 질환의 진행을 예방 또는 둔화시키는 것을 포함하나 이에 제한되지 않는다.

[0096] 이하, 본 발명을 실시예를 통해 상세히 설명한다. 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐 본 발명의 범위가 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0097] <실시예 1> 아세트산을 이용한 아가로오스의 가수분해

[0098] 해조류를 구성하는 대표적인 다당체인 아가로오스를 아세트산을 사용하여 가수분해하였다. 5% (w/v)의 아가로오스를 3M 아세트산과 80℃에서 70분 동안 반응시킨 후 건조시켜 아세트산을 제거하였다. 또한 에탄올을 사용한 세척과정을 통해 건조 후 잔존해 있는 아세트산 및 가수분해시 생성될 수 있는 과분해물들을 제거하여 순수한 분말상태의 아가로올리고당을 생산하였다(도 2).

[0099] <실시예 2> Aga50D, *sc*NABH를 이용한 3,6-안하이드로-L-갈락토오스의 생산

[0100] 실시예 1로부터 생산한 산 가수분해물로부터 단당체인 D-갈락토오스와 3,6-안하이드로-L-갈락토오스로 분해하기 위하여 엑소형(exo-type)의 이당체 생산 효소인 Aga50D(대한민국 공개특허 제2010-0040438호 참조)와 반응시켰으며, 반응산물로 네오아가로바이오스를 생산하였다.

[0101] Aga50D 반응이 끝난 후에 네오아가로바이오스로부터 단당체인 D-갈락토오스와 3,6-안하이드로-L-갈락토오스를 생산하기 위하여 Aga50D 반응 산물을 *sc*NABH 효소(대한민국 공개특허 제2010-0108241호 참조)와 반응시켰다. 효소 반응 조건은 100mL의 50mM Tris-HCl 완충용액(pH 7.4)에 5%(w/v) 아가로올리고당을 녹인 후 30℃에서 150 rpm 조건으로 3일간 반응시켰다. 효소 반응 시 사용한 효소의 양은 Aga50D는 10mg, *sc*NABH는 2.5mg이었다(도 2).

[0102] <실시예 3> 실리카 젤 크로마토 그래피와 바이오 젤 P2 크로마토그래피를 이용한 분리 정제

[0103] 실시예 1과 2로부터 생산한 반응산물 중에서 3,6-안하이드로-L-갈락토오스만을 분리 정제하기 위하여 크로마토그래피를 실시하였다. 반응 산물을 셀라이트에 흡착시켜 파우더 형태의 샘플을 만든 후에 흡착 크로마토그래피인 실리카 젤 크로마토그래피를 실시하였다. 이동상은 클로로포름: 메탄올: 물을 각각 78:20:2(v/v/v)의 비율로 혼합한 용매를 사용하였으며 전체 이동상의 용매의 부피는 3L였다. 한 분획의 부피는 20mL였으며 총 150 분획의 샘플을 TLC로 분석한 후 그 중 3,6-안하이드로-L-갈락토오스가 있는 분획을 모았다. 추가로 진행할 바이오 젤 P2 크로마토그래피는 분자량에 따라 물질이 분리되므로 3,6-안하이드로-L-갈락토오스가 있는 분획 중에서 3,6-안하이드로-L-갈락토오스와 분자량이 비슷한 D-갈락토오스가 있는 분획은 제외하였다(도 3).

[0104] 바이오 젤 P2 크로마토그래피를 통하여 이당체 및 중합도가 낮은 아가로올리고당으로부터 3,6-안하이드로-L-갈락토오스만을 순수하게 할 수 있다. 이때에 사용한 이동상은 물이었으며 한 분획 당 부피는 2mL이었다. 각 분획들 중 TLC 상에서 3,6-안하이드로-L-갈락토오스 스팟만을 나타내는 분획만을 모아서 고순도의 3,6-안하이드로-L-갈락토오스를 얻었다(도 2).

[0105] 도 2에 나타난 바와 같이, 실시예 1 내지 3을 통해 100g의 아가로스로부터 화학적 가수분해를 통해 76g의 아가

로올리고당을 생산하였으며, Aga50D와 *sc*NABH 효소를 이용하여 37.55g의 네오아가로바이오스와 15.21g의 3,6-안하이드로-L-갈락토오스를 각각 생산하였다. 또한 2가지 크로마토그래피를 이용한 정제 과정을 통해 3.98g의 순수한 3,6-안하이드로-L-갈락토오스를 정제하였다.

[0106] 또한, 도 3에 나타난 바와 같이, 용출 부피(Elution volume) (L)의 0.25-067에서는 아무것도 나타나지 않고, 0.77-1.77에서는 3,6-안하이드로-L-갈락토오스 및 갈락토오스를 제외한 다른 당이 나타나며(농축한 후 바이오겔 P2 크로마토그래피에 사용한 샘플), 1.87-2.67에서는 갈락토오스와 다른 당이 나타났다.

[0107] <실시예 4> GC/MS 분석을 통한 3,6-안하이드로-L-갈락토오스 정성 및 정량

[0108] 실시예 3을 통해 생산한 고순도의 3,6-안하이드로-L-갈락토오스를 GC/MS로 분석하여 정량하였다. GC/MS 분석을 위한 유도체화 과정은 다음과 같다. 정제한 샘플을 스피드 백으로 건조한 후에 50㎕의 2%(w/v)의 O-메틸하이드록실아민 하이드로클로라이드/피리딘(O-methylhydroxylamine hydrochloride in pyridine)을 넣고 75℃에서 30분간 반응시켰다. 그리고 80㎕의 N-메틸-N-(트리메틸실릴)트리플루오로아세타마이드(N-methyl-N-(trimethylsilyl)trifluoroacetamide)를 넣고 40℃에서 150rpm에서 30분간 반응시켰다. GC/MS 분석을 위한 기기 조건은 다음과 같다. 분석 시 사용한 컬럼은 DB5-MS capillary column이며 GC 컬럼 온도 조건은 먼저 100℃에서 3.5분간 유지하고 160℃까지 승온시킨 후 20분간 유지하였다. 그 후 200℃까지 승온한 후 15분간 유지하고 마지막으로 280℃까지 승온한 후에 5분간 유지하였다. 1㎕의 샘플을 9.6의 분할비(split ratio)로 분석하였다(도 4).

[0109] <실시예 5> ^{1}H-NMR과 2D HSQC NMR 분석을 통한 3,6-안하이드로-L-갈락토오스의 구조 규명

[0110] 실시예 1 내지 3을 통해 생산한 고순도의 3,6-안하이드로-L-갈락토오스 화학 구조의 규명을 위하여 NMR 분석을 하였다. 2mg의 3,6-안하이드로-L-갈락토오스 샘플을 D_2O에 녹였으며 화학적 이동(chemical shift)을 계산하기 위해 내부 표준(internal standard)으로 3-(트리메틸실릴)-프로피오닉-2,2,3,3-d4 애시드(3-(trimethylsilyl)-propionic-2,2,3,3-d4 acid)를 넣어주었다. 1H-NMR와 2D HSQC NMR의 화학적 이동은 이 전에 보고된 문헌의 결과 값과 비교하여 구조를 규명하고 확인하였다(Sugano *et al* (1994) *J Bacteriol*. 176(22) 6812-6818, Miller *et al* (1982) *Aust J Chem*. 35(4) 853-856)(도 5 및 6).

[0111] <실시예 6> 분리, 정제한 3,6-안하이드로-L-갈락토오스의 미백효과 및 항산화 활성 조사

[0112] 실시예 1 내지 3으로부터 생산한 고순도의 3,6-안하이드로-L-갈락토오스의 미백활성을 측정하기 위하여 흑색종 세포(melanoma cell)인 B16F10을 배양하였다. 멜라닌 생성을 촉진하는 호르몬인 α-멜라노사이트-스티뮬라틴 호르몬(α-melanocyte-stimulatine hormone)을 처리하기 전에 미백제로 가장 널리 사용하는 알부틴과 홍조류를 구성하는 당류인 네오아가로바이오스, D-갈락토오스, 3,6-안하이드로-D-갈락토오스, 그리고 3,6-안하이드로-L-갈락토오스를 각각 1, 10, 100㎍/mL로 처리한 후에 α-멜라토사이트-스티뮬라틴 호르몬과 반응을 실시하였다. 4일을 함께 배양한 후에 475 nm 흡광도를 측정하여 멜라닌 함량을 분석하였다.

[0113] 그 결과 3,6-안하이드로-L-갈락토오스가 다른 처리군보다 미백활성이 매우 뛰어났으며, 실제 미백활성 기능성 물질로 잘 알려진 알부틴보다 활성이 높게 나타났다(도 7).

[0114] <실시예 7> 분리, 정제한 3,6-안하이드로-L-갈락토오스의 항산화 활성

[0115] 실시예 1 내지 3으로부터 생산한 고순도의 3,6-안하이드로-L-갈락토오스의 항산화 활성을 측정하기 위하여 RAW264.7 세포 배양액의 nitrite(NO_2)의 농도를 Griess 반응 방법으로 측정하였다. 2㎍/mL 농도의 리포폴리사카라이드(lipopolysaccahrides)를 세포에 처리하면서 네오아가로바이오스, 갈락토오스, 3,6-안하이드로-D-갈락토오스, 그리고 3,6-안하이드로-L-갈락토오스를 각각 50, 100, 200 ㎍/mL 농도로 처리한 후에 함께 처리하여 항산화 활성 측정을 하였다. 24시간을 함께 배양한 후에 540 nm 흡광도를 측정하여 항산화 활성 분석하였다.

[0116] 그 결과 3,6-안하이드로-L-갈락토오스가 다른 처리군보다 항산화 활성이 매우 뛰어났으며, 이는 이미 보고된

3,6-안하이드로-D-갈락토오스의 활성보다 높게 나타났다(도 8).

[0117] <실시예 8> 3,6-안하이드로-L-갈락토오스의 사람 표피 멜라닌 세포에서 미백 효과 실험

[0118] 멜라닌은 피부 및 머리카락의 색을 결정하는 천연 색소이다. 멜라닌의 알려진 주요 기능은 흡수 및 산란된 자외선 조사에 의한 자외선에 의한 DNA 손상으로부터 보호하는 것이다. 그러나, 과량의 멜라닌 생성 또는 비정상적인 분포는 기미, 주근깨, 노인성 흑점 등의 불규칙적인 피부 과색소침착을 유발할 수 있다. 자외선 조사는 α-MSH(α-melanocyte-stimulating hormone), ACTH 및 그들의 관련 수용체인 melanocortin 1 receptor(MC1R)의 수준을 증가시켜 티로시나아제 및 티로시나아제 관련 단백질(tyrosinase related proteins (TRPs)를 포함하여 멜라닌 생합성 효소의 발현을 촉진함이 선행 연구에서 밝혀졌다. 구리 함유 당단백질인 티로시나아제는 특정 세포 기관, 즉, 멜라닌 세포에서만 생성되는 멜라닌소체에서 멜라닌 합성을 위한 중요한 속도-조절 단계 효소이다. 따라서, 티로시나아제 발현의 감소는 피부 착색을 억제하기 위한 좋은 전략인 것으로 간주한다.

[0119] 또한, TRP-1은 구조적으로 티로시나아제와 연관되어 있고, ~ 40% 아미노산 상동성을 공유하며, 티로시나아제와 같이 멜라닌 소체에 존재한다. 선행 연구의 보고에 따르면, TRP-1의 돌연변이 결과 창백한 피부 또는 머리카락 색이 나타나며, 안피부백피증의 특정 타입에서 나타난다. 또한, TRP-1은 TRP-1발현 억제는 저색소침착증과 연관되어 있기 때문에 멜라닌 생합성에서 역할을 담당한다고 제시되어 있다.

[0120] 따라서, L-AHG의 피부 미백 활성 가능성을 평가하기 위해, α-MSH에 의해 유도된 티로시나아제 및 TRP-1 발현에 대한 L-AHG의 효과를 조사하였다.

[0121] 이를 위한 세포로 적당히 착색된 신생아 포피 유래의 사람 표피 멜라닌 세포(Human epidermal melanocytes, HEMs, Cascade Biologics (Oregon, USA))를 사용하였다. 세포는 5% CO_2를 포함하는 가습 분위기에서 37℃의 온도 조건에서 배양하였다. HEMs에 대한 생장 배지는 HMGS를 첨가한 Medium 254(Cascade Biologics (Oregon, USA))이다.

[0122] HEM(1×10^5)를 6-cm 디쉬에서 24시간 동안 배양하였다. 며칠 동안 100nM α-MSH(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)에 노출하기 전에 상기 세포에 0, 25, 50 및 100㎍/mL 농도의 3,6-anhydro-L-galactose(L-AHG)를 1시간 동안 처리하였다. 라이시스 버퍼[20mM Tris-HCl (pH 7.5), 150mM NaCl, 1mM Na_2EDTA, 1mM EGTA, 1% Triton X-100, 2.5mM sodium pyrophosphate, 1mM β-glycerophosphate, 1mM Na_3VO_4, 1g/mL leupeptin, 1mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) 및 protease inhibitor cocktail tablet]로 세포를 용해하였다. 단백질 농도는 염료가 결합된 단백질 분석 키트(Bio-Rad Laboratories Inc. Hercules, CA, USA)를 이용하여 제조사의 설명서에 따라 측정하였다. 용해된 단백질(20-40㎍)에 대해 10% SDS-PAGE를 실시하고, 전기영동에 의해 폴리비닐리덴 플루오라이드(polyvinylidene fluoride, PVDF) 멤브레인으로 트랜스퍼하였다(Millipore Corp., Bedford, MA, USA). 블랏팅 후, 5% 스킴 밀크(MB cell, Los Angeles, CA, USA)로 2시간 동안 멤브레인을 블록킹하고 1차 항체(goat anti-mouse IgG-HRP)와 함께 4℃에서 오버나이트 동안 인큐베이션하였다. 이어서, 상기 멤브레인을 2차 항체(goat anti-rabbit IgG HRP-conjugated secondary antibody)와 함께 인큐베이션 하고, 화학발광 검출 키트(Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ)를 이용하여 항체가 결합된 단백질을 검출하였다. 대조군으로 β-액틴의 발현 수준을 측정하였다. 데이터는 2회 독립 실험의 대표값을 나타낸 것이다.

[0123] 인 비트로 티로시나아제 분석은 기 보고된 방법(Ishihara Y et al., *The* journal of antibiotics (Tokyo) 1991;44:25-32; An SM, Koh JS, Boo YC, *Phytotherapy Research* 2010;24:1175-1180)을 약간 변형하여 수행하였다. 간단히 말해, 250㎕의 0.1M 포타슘 포스페이트 버퍼(pH 6.8)를 24-웰 플레이트 상에 넣고, 25㎕의 버섯 유래의 티로시나아제(2000unit/mL), 25㎕의 시료 및 225㎕의 증류수를 상기 웰에 부가하였다. 상기 플레이트는 25℃에서 10분간 인큐베이션하고, 25㎕의 1 mM L-티로신을 상기 웰에 부가하여 기질로 사용하였다. 25℃에서 10분간 인큐베이션한 후, microplate reader (Sunrise-Basic Tecan, Austria)를 이용하여 475 nm에서 각 웰의 흡광도를 측정하였다. 각 측정치는 대조군 대비 변화율(%)로 표시하였다. L-티로신을 기질로 사용하였고, 알부틴을 양성 대조군으로 사용하였다. 결과는 미처리 대조군에 대해 티로시나아제 상대 활성으로 표현하였다.

[0124] 도 9에 나타난 바와 같이, α-MSH에 의해 유도된 티로시나아제 발현을 비교하면, 100㎍/mL의 L-AHG를 처리한 경우 HEMs에서 α-MSH에 의해 유도된 티로시나아제 발현이 유의적으로 감소하였다.

[0125] 또한, L-AHG 처리에 의한 티로시나아제 발현 감소와 유사하게(도 9A), TRP-1 발현은 HEMs에서 L-AHG 농도 의존

적 방식으로 감소하였다(도 10).

[0126] 다음으로, 무세포 분석 시스템을 이용하여 티로시나아제 활성에 대한 L-AHG의 효과를 조사하였다. 많은 보고들에서 버섯 유래의 티로시나아제는 정제 형태로 바로 이용할 수 있어 모델로서 일차적으로 사용하였다고 기재되어 있다. L-티로신의 경쟁적 억제제인 알부틴(Arbutin)은 양성 대조군으로 사용하였고, 이는 버섯의 티로시나아제 활성을 억제한다(도 11). 결과는 미처리 대조군에 대한 티로시나아제의 상대 활성으로 표시하였다. 데이터는 3회 독립 실험으로부터 평균±S.D.로 나타내었고, 단일 통계 비교를 위해 스튜던츠 t 테스트를 사용하였다. 통계적 의의에 대한 기준으로 $p < 0.05$의 유의성 값을 사용하였다. 별표는 미처리 대조군과 비교하여 유의적인 차이($p < 0.05$)를 나타내는 것이다.

[0127] 도 11에 나타난 바와 같이, L-AHG는 버섯의 티로시나아제 활성에서 어떠한 유의적인 감소도 유도하지 않았다. 알부틴은 200μM의 농도에서, 40%까지 티로시나아제 활성을 감소시켰다.

[0128] 상기 결과를 종합하면, L-AHG는 티로시나아제 및 TRP-1의 발현을 억제하는 신규한 저색소침착제임을 시사한다.

[0129] <실시예 9> 3,6-안하이드로-L-갈락토오스의 사람 각질세포에서 보습 효과 실험

[0130] 히알루로난(Hyaluronan, HA)은 D-글루쿠론산 및 N-아세틸-D-글루코사민으로 구성된 글리코사미노글리칸이다. 다량의 물을 보관할 수 있는 능력으로 인해, HA는 수분 밸런스 및 삼투압을 조절하는 데 있어 중요한 역할을 담당한다. AH는 HAS 1, 2 및 3에 의해 세포막에서 합성되고, 특히 HAS2는 사람의 정상 조직에서 나타난다. 선행 연구에서, HAS2의 유전자 결핍은 마우스 모델에서 태아기 치사율을 유발하고, 성인 사람의 피부의 표피 및 진피에서 감소된 HAS2 유전자 발현을 보인다. 따라서, HAS2 발현 증가는 피부 항상성을 유지하기 위한 좋은 전략일 수 있다. HAS2 발현에 대한 L-AHG의 유도 시점 및 농도를 측정하기 위해, 웨스턴 블랏 분석을 수행하였다.

[0131] 이를 위해 사용된 세포는 HaCaT 세포로 10% FBS 및 페니실린/스트렙토마이신이 첨가된 Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, GIBCO® Invitrogen, Auckland, NZ)을 이용하여 5% CO_2 분위기 하에서 37℃에서 배양하였다.

[0132] 세포(1×10^5)를 6-cm 디쉬에서 24시간 동안 배양한 후, 무혈청 배지에서 추가로 24시간 동안 굶겨 키나아제의 활성화에 대한 FBS의 영향을 제거하였다. 그 후, 일정 시간 및 농도로 3,6-anhydro-L-galactose (L-AHG)를 처리하였다. 라이시스 버퍼[20mM Tris-HCl (pH 7.5), 150mM NaCl, 1mM Na_2EDTA, 1mM EGTA, 1% Triton X-100, 2.5mM sodium pyrophosphate, 1mM β-glycerophosphate, 1mM Na_3VO_4, 1g/mL leupeptin, 1mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) 및 protease inhibitor cocktail tablet]로 세포를 용해시켰다. 단백질 농도는 염료가 결합된 단백질 분석 키트(Bio-Rad Laboratories Inc.)를 이용하여 제조사의 설명서에 따라 측정하였다. 용해된 단백질(20-40㎍)에 대해 10% SDS-PAGE를 실시하고, 전기영동에 의해 폴리비닐리덴 플루오라이드(polyvinylidene fluoride(PVDF)) 멤브레인으로 트랜스퍼하였다(Millipore Corp., Bedford, MA, USA). 블랏팅 후, 5% 스킴 밀크로 2시간 동안 멤브레인을 블록킹하고 1차 항체(goat anti-mouse IgG-HRP)와 함께 4℃에서 오버나이트 동안 인큐베이션하였다. 이어서, 상기 멤브레인을 2차 항체(goat anti-rabbit IgG HRP-conjugated secondary antibody)와 함께 인큐베이션 하고, 화학발광 검출 키트(Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ)를 이용하여 항체가 결합된 단백질을 검출하였다. 데이터는 2회 독립 실험의 대표값을 나타내었다.

[0133] 도 12에 나타난 바와 같이, L-AHG는 처리 3시간 후 HAS2 발현을 증가시켰다. 또한, L-AHG는 농도 의존적인 방식으로 HAS2 발현을 증가시켰다.

[0134] HAS2 발현은 MAPKs 및 AKT 등의 다양한 염증 신호 전달 경로에 의해 조절됨이 이미 밝혀져 있다. 따라서, 다양한 염증 신호 전달 경로에서 L-AHG의 효과를 측정하였다.

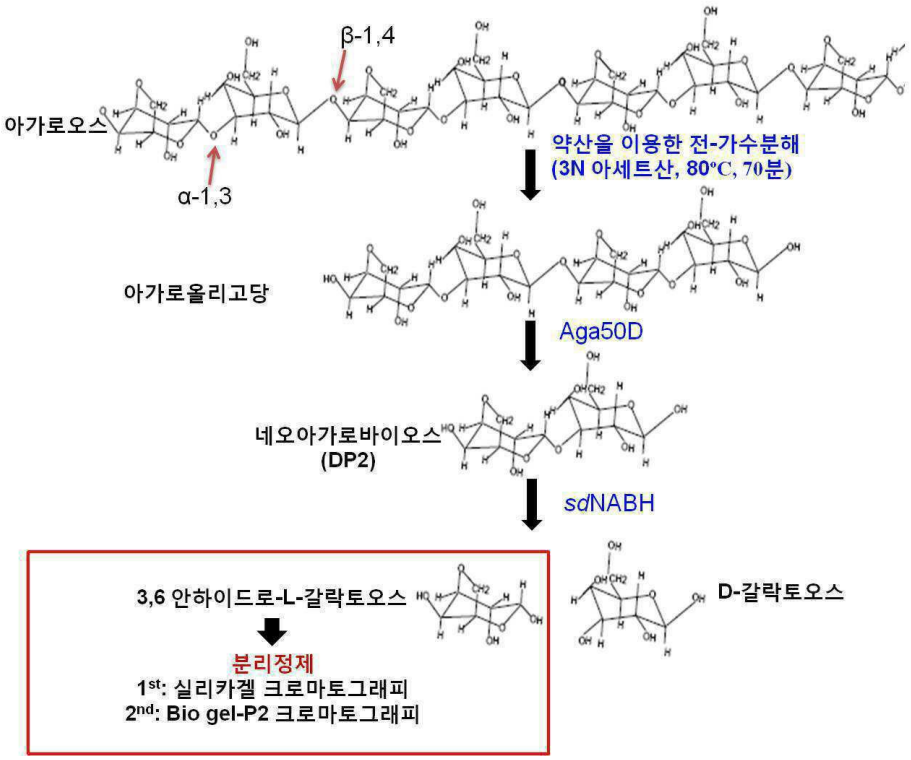
[0135] 도 13A에 나타난 바와 같이, 100㎍/mL의 L-AHG는 처리 3시간 후 ERK의 인산화를 유의적으로 증가하였다. ERK의 인산화에 대한 L-AHG의 농도 의존적인 효과를 측정하기 위해, 25, 50 및 100㎍/mL의 L-AHG를 처리하였다. L-AHG에 의해 유도된 HAS2 발현과 유사하게(도 13B), ERK의 인산화는 L-AHG 농도 의존적인 방식으로 증가하였다.

[0136] 도 14A에 나타난 바와 같이, 100㎍/mL의 L-AHG는 처리 3시간 후 AKT의 인산화를 유의적으로 증가시켰다. AKT의 인산화에 대한 L-AHG의 농도 의존적인 효과를 측정하기 위해, 25, 50 및 100㎍/mL의 L-AHG를 처리하였다. L-AHG는 농도 의존적인 방식으로 AKT의 인산화를 증가시켰다(도 14B).

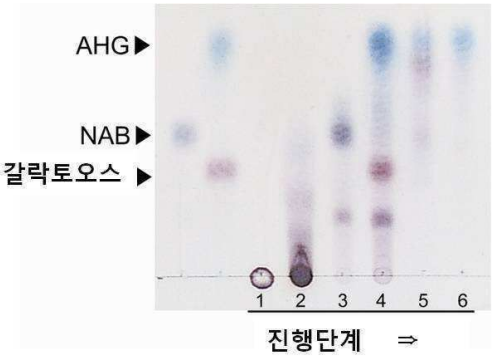
[0137] 상기 결과를 종합하면, L-AHG에 의해 유도된 ERK 및 AKT의 인산화는 L-AHG에 의한 HAS2 발현 증가에 기여하는 것으로 보인다.

도면

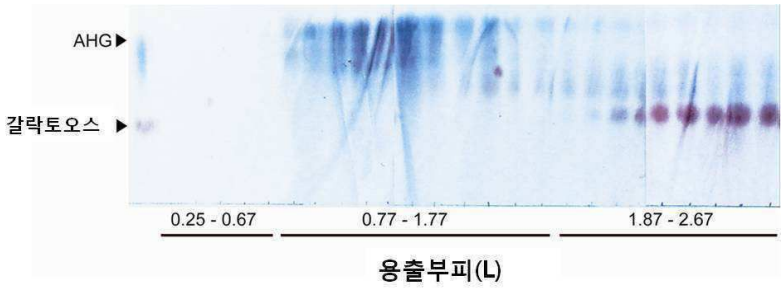
도면1



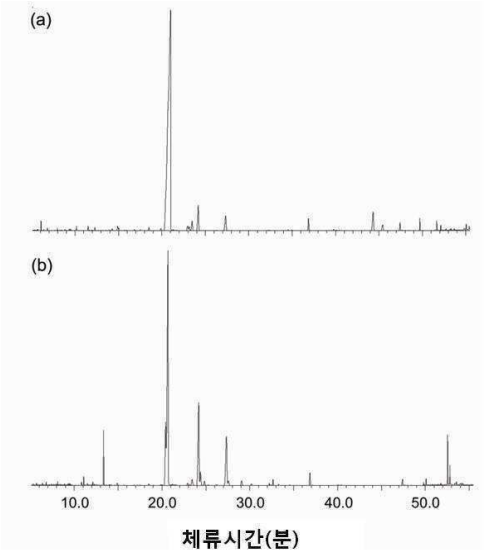
도면2



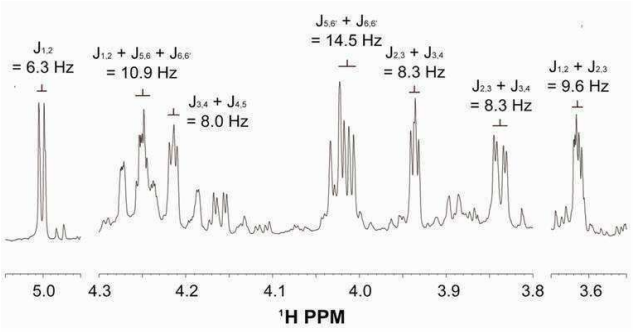
도면3


AHG▶
갈락토오스 ▶
0.25 - 0.67
0.77 - 1.77
1.87 - 2.67
용출부피(L)

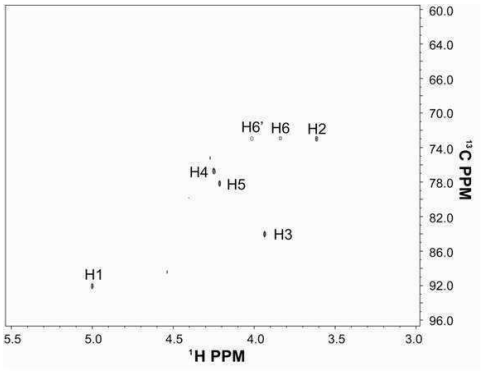
도면4


(a)
(b)
10.0
20.0
30.0
40.0
50.0
체류시간(분)

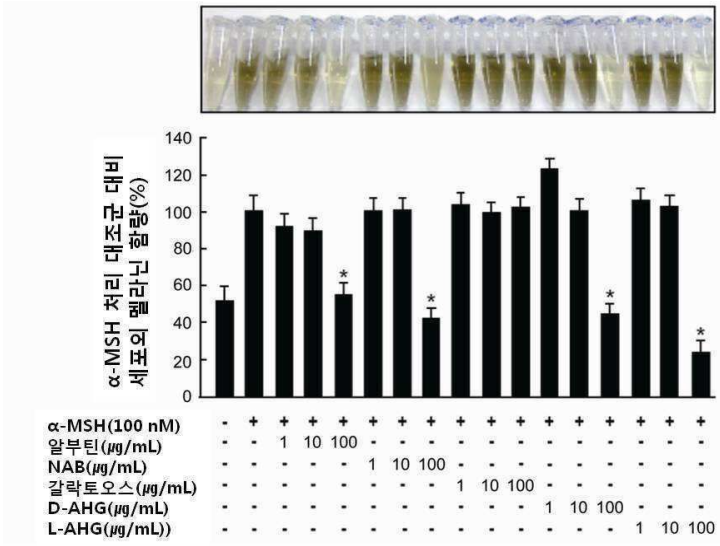
도면5


J1,2 = 6.3 Hz
J1,2 + J5,6 + J6,6' = 10.9 Hz
J3,4 + J4,5 = 8.0 Hz
J5,6' + J6,6' = 14.5 Hz
J2,3 + J3,4 = 8.3 Hz
J2,3 + J3,4 = 8.3 Hz
J1,2 + J2,3 = 9.6 Hz
5.0
4.3
4.2
4.1
4.0
3.9
3.8
3.6
¹H PPM

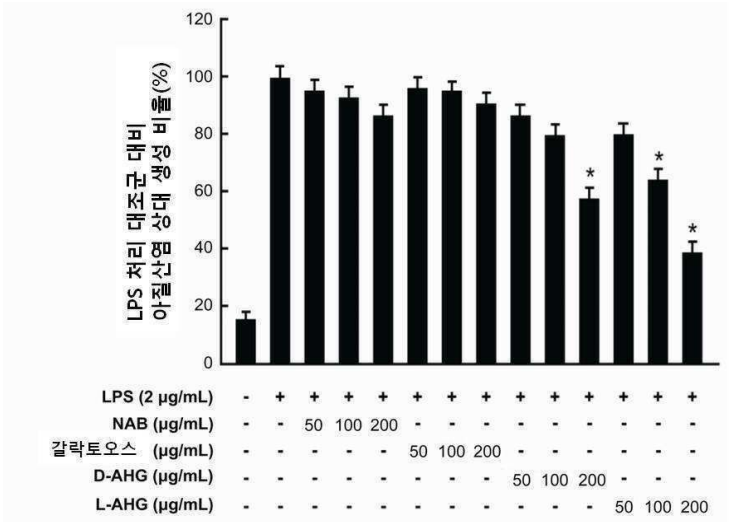
도면6


H6' H6 H2
H4
H5
H3
H1
^{13}C PPM
^{1}H PPM

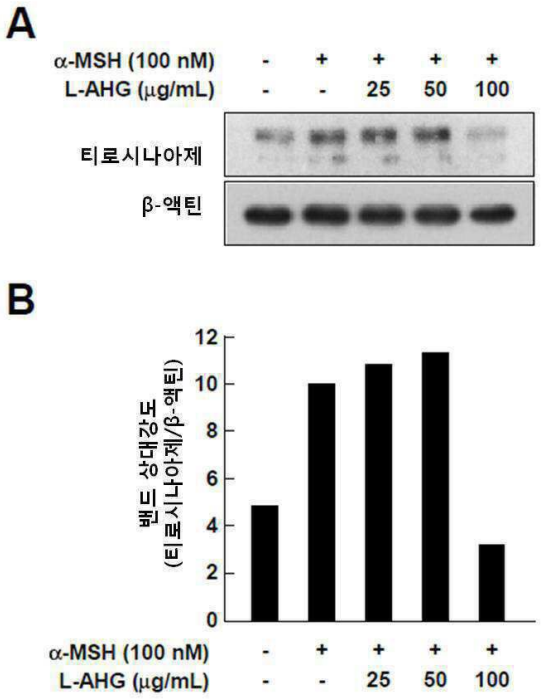
도면7


α-MSH 처리 대조군 대비 세포의 멜라닌 함량(%)
α-MSH(100 nM)
알부틴(μg/mL)
NAB(μg/mL)
갈락토오스(μg/mL)
D-AHG(μg/mL)
L-AHG(μg/mL))

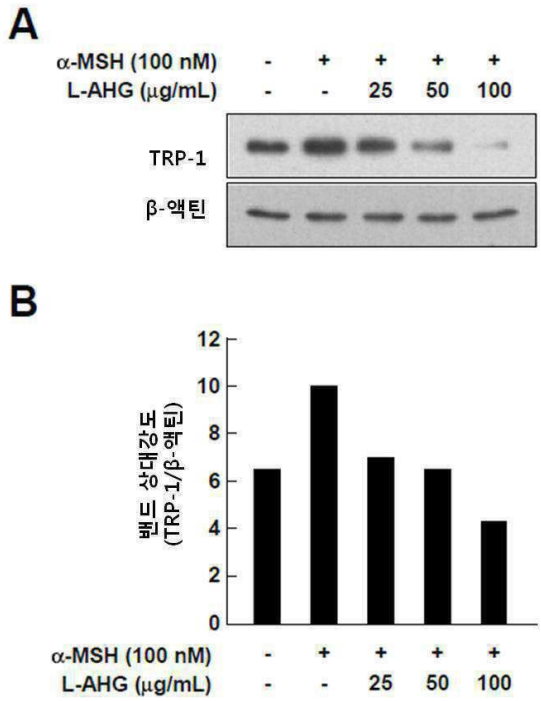
도면8


LPS 처리 대조군 대비 아질산염 상대 생성 비율(%)
LPS (2 μg/mL)
NAB (μg/mL)
갈락토오스 (μg/mL)
D-AHG (μg/mL)
L-AHG (μg/mL)

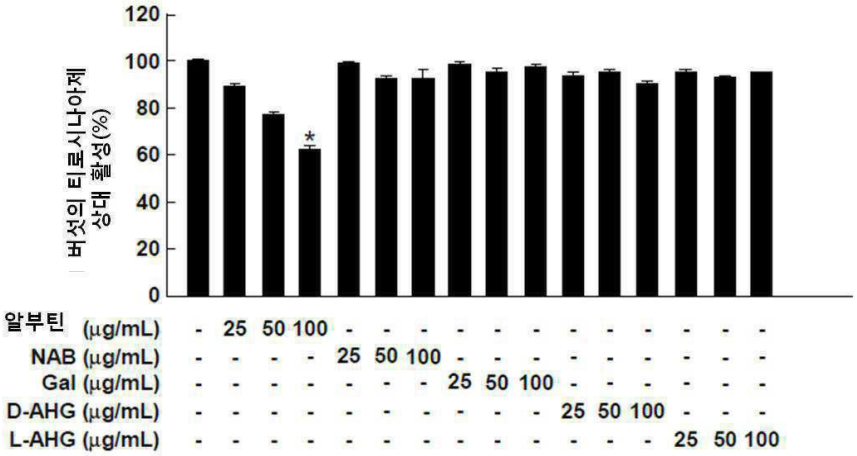
도면9


A
α-MSH (100 nM) - + + + +
L-AHG (μg/mL) - - 25 50 100
티로시나아제
β-액틴
B
밴드 상대강도 (티로시나아제/β-액틴)
12
10
8
6
4
2
0
α-MSH (100 nM) - + + + +
L-AHG (μg/mL) - - 25 50 100

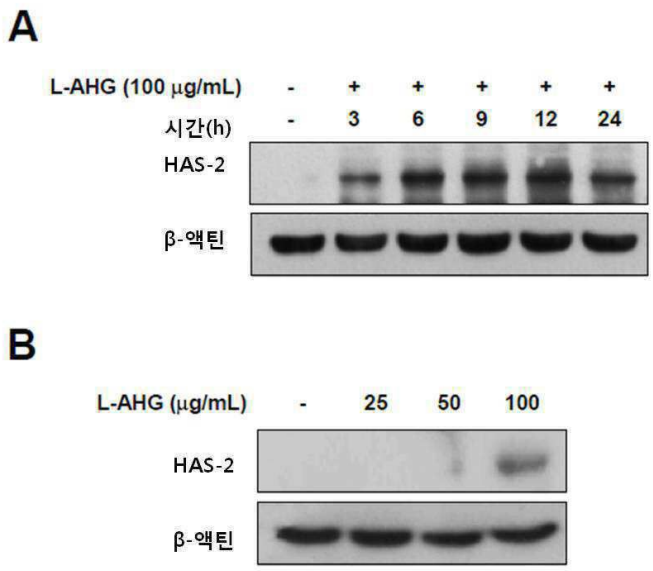
도면10


A
α-MSH (100 nM) - + + + +
L-AHG (μg/mL) - - 25 50 100
TRP-1
β-액틴
B
밴드 상대강도 (TRP-1/β-액틴)
12
10
8
6
4
2
0
α-MSH (100 nM) - + + + +
L-AHG (μg/mL) - - 25 50 100

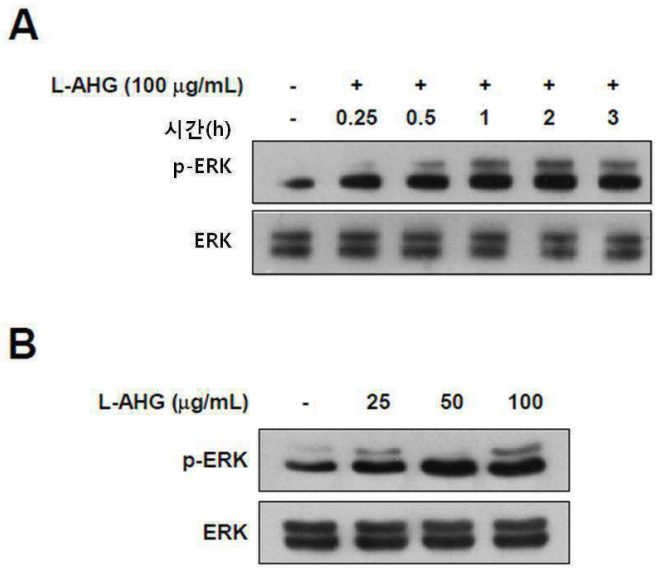
도면11


버섯의 티로시나아제 상대 활성(%)
120
100
80
60
40
20
0
*
알부틴 (μg/mL) - 25 50 100 - - - - - - - - - - - -
NAB (μg/mL) - - - - 25 50 100 - - - - - - - - -
Gal (μg/mL) - - - - - - - 25 50 100 - - - - - -
D-AHG (μg/mL) - - - - - - - - - - 25 50 100 - - -
L-AHG (μg/mL) - - - - - - - - - - - - - 25 50 100

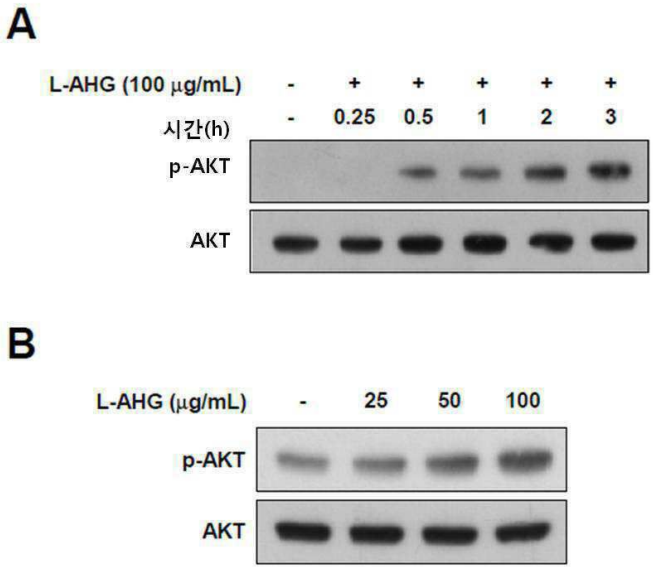
도면12


A
L-AHG (100 μg/mL) - + + + + +
시간(h) - 3 6 9 12 24
HAS-2
β-액틴
B
L-AHG (μg/mL) - 25 50 100
HAS-2
β-액틴

도면13



도면14



서 열 목 록

<110> Korea University Industrial & Academic Collaboration Foundation

<120> Method for preparing 3,6-Anhydro-L-galactose and use of the 3,6-Anhydro-L-galactose

<130> P15U13C0254

<150> 2012-0005716

<151> 2011-01-18

<160> 4

<170> KopatentIn 2.0

<210> 1

<211> 747

<212> PRT

<213> Beta-agarase from Saccharophagus degradans 2-40

<400> 1

Met Leu Phe Asp Phe Glu Asn Asp Gln Val Pro Ser Asn Ile His Phe
1 5 10 15

Leu Asn Ala Arg Ala Ser Ile Glu Thr Tyr Thr Gly Ile Asn Gly Glu
20 25 30

Pro Ser Lys Gly Leu Lys Leu Ala Met Gln Ser Lys Gln His Ser Tyr
35 40 45

Thr Gly Leu Ala Ile Val Pro Glu Gln Pro Trp Asp Trp Ser Glu Phe
50 55 60

Thr Ser Ala Ser Leu Tyr Phe Asp Ile Val Ser Val Gly Asp His Ser
65 70 75 80

Thr Gln Phe Tyr Leu Asp Val Thr Asp Gln Asn Gly Ala Val Phe Thr
85 90 95

Arg Ser Ile Asp Ile Pro Val Gly Lys Met Gln Ser Tyr Tyr Ala Lys
100 105 110

Leu Ser Gly His Asp Leu Glu Val Pro Asp Ser Gly Asp Val Asn Asp
115 120 125

Leu Asn Leu Ala Ser Gly Leu Arg Ser Asn Pro Pro Thr Trp Thr Ser
130 135 140

Asp Asp Arg Gln Phe Val Trp Met Trp Gly Val Lys Asn Leu Asp Leu
145 150 155 160

Ser Gly Ile Ala Lys Ile Ser Leu Ser Val Gln Ser Ala Met His Asp
165 170 175

Lys Thr Val Ile Ile Asp Asn Ile Arg Ile Gln Pro Asn Pro Pro Gln
180 185 190

Asp Glu Asn Phe Leu Val Gly Leu Val Asp Glu Phe Gly Gln Asn Ala
195 200 205

Lys Val Asp Tyr Lys Gly Lys Ile His Ser Leu Glu Glu Leu His Ala
210 215 220
Ala Arg Asp Val Glu Leu Ala Glu Leu Asp Gly Lys Pro Met Pro Ser

225 230 235 240
Arg Ser Lys Phe Gly Gly Trp Leu Ala Gly Pro Lys Leu Lys Ala Thr
245 250 255
Gly Tyr Phe Arg Thr Glu Lys Ile Asn Gly Lys Trp Met Leu Val Asp
260 265 270
Pro Glu Gly Tyr Pro Tyr Phe Ala Thr Gly Leu Asp Ile Ile Arg Leu
275 280 285
Ser Asn Ser Ser Thr Met Thr Gly Tyr Asp Tyr Asp Gln Ala Thr Val
290 295 300

Ala Gln Arg Ser Ala Asp Asp Val Thr Pro Glu Asp Ser Lys Gly Leu
305 310 315 320
Met Ala Val Ser Glu Lys Ser Phe Ala Thr Arg His Leu Ala Ser Pro
325 330 335
Thr Arg Ala Ala Met Phe Asn Trp Leu Pro Asp Tyr Asp His Pro Leu
340 345 350
Ala Asn His Tyr Asn Tyr Arg Arg Ser Ala His Ser Gly Pro Leu Lys
355 360 365
Arg Gly Glu Ala Tyr Ser Phe Tyr Ser Ala Asn Leu Glu Arg Lys Tyr

370 375 380
Gly Glu Thr Tyr Pro Gly Ser Tyr Leu Asp Lys Trp Arg Glu Val Thr
385 390 395 400
Val Asp Arg Met Leu Asn Trp Gly Phe Thr Ser Leu Gly Asn Trp Thr
405 410 415
Asp Pro Ala Tyr Tyr Asp Asn Asn Arg Ile Pro Phe Phe Ala Asn Gly
420 425 430
Trp Val Ile Gly Asp Phe Lys Thr Val Ser Ser Gly Ala Asp Phe Trp
435 440 445

Gly Ala Met Pro Asp Val Phe Asp Pro Glu Phe Lys Val Arg Ala Met

450 455 460

Glu Thr Ala Arg Val Val Ser Glu Glu Ile Lys Asn Ser Pro Trp Cys

465 470 475 480

Val Gly Val Phe Ile Asp Asn Glu Lys Ser Phe Gly Arg Pro Asp Ser

485 490 495

Asp Lys Ala Gln Tyr Gly Ile Pro Ile His Thr Leu Gly Arg Pro Ser

500 505 510

Glu Gly Val Pro Thr Arg Gln Ala Phe Ser Lys Leu Leu Lys Ala Lys

515 520 525

Tyr Lys Thr Ile Ala Ala Leu Asn Asn Ala Trp Gly Leu Lys Leu Ser

530 535 540

Ser Trp Ala Glu Phe Asp Leu Gly Val Asp Val Lys Ala Leu Pro Val

545 550 555 560

Thr Asp Thr Leu Arg Ala Asp Tyr Ser Met Leu Leu Ser Ala Tyr Ala

565 570 575

Asp Gln Tyr Phe Lys Val Val His Gly Ala Val Glu His Tyr Met Pro

580 585 590

Asn His Leu Tyr Leu Gly Ala Arg Phe Pro Asp Trp Gly Met Pro Met

595 600 605

Glu Val Val Lys Ala Ala Ala Lys Tyr Ala Asp Val Val Ser Tyr Asn

610 615 620

Ser Tyr Lys Glu Gly Leu Pro Lys Gln Lys Trp Ala Phe Leu Ala Glu

625 630 635 640

Leu Asp Lys Pro Ser Ile Ile Gly Glu Phe His Ile Gly Ala Met Asp

645 650 655

His Gly Ser Tyr His Pro Gly Leu Ile His Ala Ala Ser Gln Ala Asp

660 665 670

Arg Gly Glu Met Tyr Lys Asp Tyr Met Gln Ser Val Ile Asp Asn Pro

675 680 685

Tyr Phe Val Gly Ala His Trp Phe Gln Tyr Met Asp Ser Pro Leu Thr

690 695 700

Gly Arg Ala Tyr Asp Gly Glu Asn Tyr Asn Val Gly Phe Val Asp Val

705 710 715 720

Thr Asp Thr Pro Tyr Gln Glu Met Val Asp Ala Ala Lys Glu Val Asn

725 730 735

Ala Lys Ile Tyr Thr Glu Arg Leu Gly Ser Lys

740 745

<210> 2

<211> 2244

<212> DNA

<213> Beta-agarase from Saccharophagus degradans 2-40

<400> 2

atgttattcg attttgaaaa cgatcaagtc ccttcaaata ttcatttttt aaatgcgcgt 60

gcaagtatag aaacctatac cggtataaat ggcgagccga gtaaagggtt aaagttggcg 120

atgcagtcca agcagcacag ttatactggc cttgccattg tgccagagca gccttgggat 180

tggagcgagt ttacctctgc tagcttgtat ttcgatatag tcagtgttgg cgatcattcc 240

acacaatttt atttagatgt taccgaccaa aatggcgccg tgtttacccg cagtattgat 300

attccagtgg gtaaaatgca atcgtactac gccaagttaa gcggtcacga tttagaagtg 360

cccgatagtg gagacgttaa cgatttaaac ctcgcctctg gcttgcgttc taacccgcct 420

acatggacat ctgacgatag gcagtttgtt tggatgtggg gagtgaaaaa tttagatttg 480

tcgggcattg ctaaaatatc gctaagtgtg caaagcgcaa tgcacgataa aacagttatt 540

atcgataata ttcgtattca acccaacccg ccgcaagatg aaaacttcct tgtcggtttg 600

gtagacgagt ttggccaaaa cgccaaagtt gattacaagg gtaaaatcca tagtttagaa 660

gaattgcatg cagcgcgcga tgtggaactg gccgagcttg atggcaagcc aatgcctagt 720

cgctctaagt ttggcggttg gttggccggc cccaagctaa aagctacagg gtactttcgc 780

acagaaaaaa ttaacggtaa atggatgcta gtagacccag aagggtaccc ttactttgct 840

acgggtttag acattattcg cctatctaat tcatctacca tgactggtta cgattacgat 900

caagctactg ttgctcagcg ctctgccgac gatgtaacac ctgaagactc aaaaggttta 960

atggcagtga gcgaaaaatc atttgctacg cgccacctag catcgccaac acgagcggca 1020

atgtttaact ggttgccaga ttacgatcac cctctcgcaa atcattataa ctaccgtcgc 1080

tctgcgcatt ccggcccact gaaacgcggt gaagcctaca gcttctacag tgccaacctt 1140

gagcgtaaat acggtgaaac ttaccccggt tcttacttgg ataagtggcg cgaagtaacg 1200

gtagacagaa tgctaaactg gggctttacc tcgctaggca actggactga cccagcatat 1260

tacgacaaca atcgcatacc gtttttcgcg aatggttggg taatagggga ttttaaaacc 1320

gtatctagcg gtgcggattt ttggggcgca atgccagatg tattcgaccc agaatttaaa 1380

gtgcgcgcta tggaaacggc acgcgtggtt tcagaagaaa ttaaaaatag cccttggtgc 1440

gtaggggtat ttatcgataa cgaaaaaagc ttcggtcgcc ccgattccga taaggcgcaa 1500

tacggtattc ccattcatac cctcggtcgc ccaagcgaag gtgtgcctac taggcaggcg 1560

tttagtaagc tgcttaaagc caaatacaaa actatagccg cgttaaacaa tgcctggggg 1620

ttaaagctta gttcttgggc tgagtttgat ttgggcgtag atgtaaaagc gctgccggta 1680

accgatactc tgcgcgcaga ttactcaatg ttactttcgg cctatgcgga ccaatatttt 1740

aaggtggtac acggcgcggt tgaacattac atgccgaacc acttgtattt aggcgcacgc 1800

tttcctgatt ggggaatgcc aatggaggta gtgaaagctg ccgcaaaata cgccgatgtg 1860

gttagctata attcctacaa agagggcttg cctaagcaga agtgggcttt tttagcagag 1920

ctagataagc cgagtataat cggtgagttt cacataggtg ctatggatca cggttcgtat 1980

caccccggtt taattcacgc tgcgtcgcag gccgatagag gtgaaatgta caaagattat 2040

atgcaatcgg taattgataa cccctacttc gtaggcgcgc actggttcca gtatatggat 2100

tcgccattaa cgggcagagc ttatgatggt gaaaactaca atgtgggttt tgtggatgtt 2160

accgacacgc cgtaccaaga aatggtggat gcagcaaaag aagtaaatgc gaaaatatac 2220

accgaaaggc taggcagcaa ataa 2244

<210> 3

<211> 368

<212> PRT

<213> Alpha neoagarobiose hydrolase from Saccharophagus degradans 2-40

<400> 3

Met Ser Asp Ser Lys Val Asn Lys Lys Leu Ser Lys Ala Ser Leu Arg
1 5 10 15

Ala Ile Glu Arg Gly Tyr Asp Glu Lys Gly Pro Glu Trp Leu Phe Glu
20 25 30

Phe Asp Ile Thr Pro Leu Lys Gly Asp Leu Ala Tyr Glu Glu Gly Val
35 40 45

Ile Arg Arg Asp Pro Ser Ala Val Leu Lys Val Asp Asp Glu Tyr His
50 55 60

Val Trp Tyr Thr Lys Gly Glu Gly Glu Thr Val Gly Phe Gly Ser Asp

65 70 75 80

Asn Pro Glu Asp Lys Val Phe Pro Trp Asp Lys Thr Glu Val Trp His

85 90 95

Ala Thr Ser Lys Asp Lys Ile Thr Trp Lys Glu Ile Gly Pro Ala Ile

100 105 110

Gln Arg Gly Ala Ala Gly Ala Tyr Asp Asp Arg Ala Val Phe Thr Pro

115 120 125

Glu Val Leu Arg His Asn Gly Thr Tyr Tyr Leu Val Tyr Gln Thr Val

130 135 140

Lys Ala Pro Tyr Leu Asn Arg Ser Leu Glu His Ile Ala Ile Ala Tyr

145 150 155 160

Ser Asp Ser Pro Phe Gly Pro Trp Thr Lys Ser Asp Ala Pro Ile Leu

165 170 175

Ser Pro Glu Asn Asp Gly Val Trp Asp Thr Asp Glu Asp Asn Arg Phe

180 185 190

Leu Val Lys Glu Lys Gly Ser Phe Asp Ser His Lys Val His Asp Pro

195 200 205

Cys Leu Met Phe Phe Asn Asn Arg Phe Tyr Leu Tyr Tyr Lys Gly Glu

210 215 220

Thr Met Gly Glu Ser Met Asn Met Gly Gly Arg Glu Ile Lys His Gly

225 230 235 240

Val Ala Ile Ala Asp Ser Pro Leu Gly Pro Tyr Thr Lys Ser Glu Tyr

245 250 255

Asn Pro Ile Thr Asn Ser Gly His Glu Val Ala Val Trp Pro Tyr Lys

260 265 270

Gly Gly Met Ala Thr Met Leu Thr Thr Asp Gly Pro Glu Lys Asn Thr

275 280 285

Cys Gln Trp Ala Glu Asp Gly Ile Asn Phe Asp Ile Met Ser His Ile

290 295 300

Lys Gly Ala Pro Glu Ala Val Gly Phe Phe Arg Pro Glu Ser Asp Ser

305 310 315 320

Asp Asp Pro Ile Ser Gly Ile Glu Trp Gly Leu Ser His Lys Tyr Asp

325 330 335

Ala Ser Trp Asn Trp Asn Tyr Leu Cys Phe Phe Lys Thr Arg Arg Gln

340 345 350

Val Leu Asp Ala Gly Ser Tyr Gln Gln Thr Gly Asp Ser Gly Ala Val

355 360 365

<210> 4

<211> 1107

<212> DNA

<213> Alpha neoagarobiose hydrolase from Saccharophagus degradans 2-40

<400> 4

atgagcgatt caaaagtaaa taaaaaattg agtaaagcta gcctgcgagc catagagcgc 60

ggctacgatg aaaaggggcc tgaatggctg tttgagtttg atattacccc actaaaaggc 120

gacttagcct acgaagaagg cgtaattcgt cgagacccca gcgcagtatt aaaggtggac 180

gatgaatatc acgtttggta caccaagggc gaaggtgaaa cagtaggctt cggcagcgac 240

aaccccgaag acaaagtctt cccatgggat aaaacagaag tttggcacgc cacctctaaa 300

gataagatta cttggaaaga aattggccct gccatacaac gcggcgcagc tggggcatat 360

gatgaccgtg cagtgttcac ccccgaagtc ctgcgccata acggcaccta ctaccttgta 420

tatcaaacgg taaaagcgcc ctacttaaac cgatcgctag agcatatagc catcgcatac 480

agcgattccc cctttggccc atggaccaaa tccgatgcgc caattttaag cccagaaaat 540

gacggcgttt gggatacgga cgaagacaat cgatttttag taaaagagaa aggcagtttc 600

gatagccaca aagtacacga cccctgctta atgtttttta acaatcgttt ctacctgtat 660

tacaaaggcg agactatggg cgaaagcatg aacatgggcg gcagagaaat aaaacacggt 720

gtagccattg ccgactcgcc acttgggccc tacaccaaaa gcgaatacaa ccctattacc 780

aatagtggcc atgaagttgc cgtatggccc tacaaaggtg gaatggccac catgctaacc 840

accgacgggc cagaaaaaaa cacctgccag tgggcagaag acggcattaa ctttgacatt 900

atgtcgcata taaaaggcgc accagaagca gtaggttttt ttagaccaga aagcgatagc 960

gacgacccta taagcggcat tgaatggggg ctaagccaca agtacgacgc cagctggaac 1020

tggaactatc tatgcttttt taaaacgcgt cgacaagttt tagatgcagg tagctatcag 1080

caaacaggcg attccggagc agtataa 1107