(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2021-0023230
(43) 공개일자 2021년03월04일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C08B 37/08 (2006.01) *A23L 33/125* (2016.01)
A61K 8/73 (2006.01) *A61Q 19/00* (2006.01)
C08B 37/00 (2006.01) *C12P 19/26* (2006.01)
(52) CPC특허분류
C08B 37/0072 (2013.01)
A23L 33/125 (2020.05)
(21) 출원번호 10-2019-0103161
(22) 출원일자 2019년08월22일
심사청구일자 2019년08월22일

(71) 출원인
경상대학교산학협력단
경상남도 진주시 진주대로 501 (가좌동)
(72) 발명자
최병대
경상남도 통영시 진남2길 43-10, 905호 (미수동, 장원썬비치아파트)
(74) 대리인
김종선

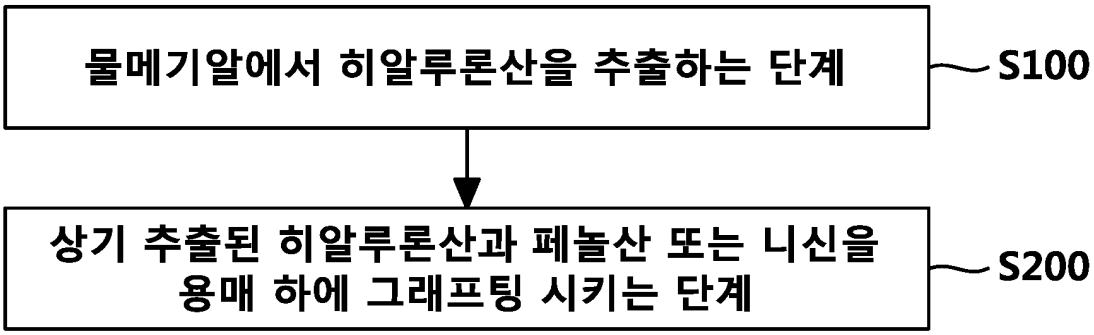
전체 청구항 수 : 총 13 항

(54) 발명의 명칭 **히알루론산 유도체 및 이의 제조 방법**

(57) 요 약

본 발명은 히알루론산 유도체에 대한 것으로, 페놀산 또는 니신이 그래프팅된 히알루론산을 포함하며, 상기 히알루론산 100 중량부를 기준으로 상기 페놀산 또는 상기 니신은 80 중량부 내지 200 중량부로 포함되고, 상기 페놀산은 갈산(gallic acid), 카페산(caffeic acid), 페룰산(ferulic acid) 및 이들의 조합들로 이루어진 군으로부터 선택된 물질을 포함하는 것이다. 상기 히알루론산 유도체는 물메기 알로부터 추출됨으로써 자원을 재활용하는데 효과적이며, 페놀산 또는 니신이 그래프팅됨으로써 항산화, 항염증 등의 다기능성을 갖게 되는 것이다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류
A61K 8/735 (2013.01)
A61Q 19/00 (2013.01)
C08B 37/0003 (2013.01)
C12P 19/26 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1345303352
부처명	한국연구재단
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	이공학개인기초연구지원사업
연구과제명	물메기 알에서 정제한 히알루론산의 페놀 화합물 grafting을 통한 기능성 향상
기 여 율	1/1
과제수행기관명	경상대학교 산학협력단
연구기간	2016.11.01 ~ 2019.10.31

명 세 서

청구범위

청구항 1

페놀산 또는 니신이 그래프팅된 히알루론산을 포함하며,

상기 히알루론산 100 중량부를 기준으로 상기 페놀산 또는 상기 니신은 80 중량부 내지 200 중량부로 포함되고,

상기 페놀산은 갈산(gallic acid), 카페산(caffeic acid), 페룰산(ferulic acid) 및 이들의 조함들로 이루어진 군으로부터 선택된 물질을 포함하는 것인, 히알루론산 유도체.

청구항 2

제 1 항에 있어서,

상기 히알루론산은 물메기 알(Liparis tessellatus egg)로부터 추출되는 것인, 히알루론산 유도체.

청구항 3

제 2 항에 있어서,

상기 히알루론산은 상기 물메기알에 단백질 가수분해효소를 투입하여 추출된 것인, 히알루론산 유도체.

청구항 4

제 1 항에 있어서,

상기 페놀산 또는 상기 니신이 그래프팅됨으로써 항산화 효과를 갖는 것인, 히알루론산 유도체.

청구항 5

물메기 알(Liparis tessellatus egg)에서 히알루론산을 추출하는 단계;

상기 추출된 히알루론산과 페놀산 또는 니신을 용매 하에서 그래프팅 시키는 단계;를 포함하며,

상기 히알루론산 100 중량부를 기준으로 상기 페놀산 또는 상기 니신은 80 중량부 내지 200 중량부로 포함되는 것인, 히알루론산 유도체의 제조 방법.

청구항 6

제 5 항에 있어서,

상기 용매는 라디칼 생성 또는 상기 히알루론산을 에스테르화(ester) 시키는 것인, 히알루론산 유도체의 제조 방법.

청구항 7

제 5 항에 있어서,

상기 페놀산은 갈산(gallic acid), 카페산(caffeic acid), 페룰산(ferulic acid) 및 이들의 조함들로 이루어진

군으로부터 선택된 물질을 포함하는 것인, 히알루론산 유도체의 제조 방법.

청구항 8

제 5 항에 있어서,

상기 추출하는 단계는 상기 물메기 알에 단백질 가수분해효소를 투입하여 상기 히알루론산을 추출하는 것인, 히알루론산 유도체의 제조 방법.

청구항 9

제 5 항에 있어서,

상기 용매는 과산화수소, 비타민 C, N-하이드록시석신이미드, 물, 에탄올, 메탄올, 에틸에테르, 톨루엔, 아세톤, 이소프로필알코올, 벤젠, 자일렌, N-메틸피롤리돈, 테트라하이드로퓨란, 니트로벤젠, N,N-디메틸포름아미드, 디메틸설폭사이드, 디에틸카보네이트, 벤질 아세테이트, 디메틸 글루타레이트, 에틸아세토아세테이트, 이소부틸 이소부타노에이트, 이소부틸 아세테이트, 메타-크레졸 및 이들의 조합들로 이루어진 군에서 선택된 용매를 포함하는 것인, 히알루론산 유도체의 제조 방법.

청구항 10

제 5 항에 있어서,

상기 그래프팅 시키는 단계는 10 분 내지 12 시간 동안 이루어지는 것인, 히알루론산 유도체의 제조 방법.

청구항 11

제 5 항에 있어서,

상기 그래프팅 시키는 단계는 10℃ 내지 100℃의 온도 하에서 이루어지는 것인, 히알루론산 유도체의 제조 방법.

청구항 12

제 1 항 내지 4 항 중 어느 한 항에 따른 히알루론산 유도체를 포함하는, 화장품 조성물.

청구항 13

제 1 항 내지 4 항 중 어느 한 항에 따른 히알루론산 유도체를 포함하는, 건강 식품 조성물.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 히알루론산 유도체 및 이의 제조 방법에 관한 것이다. 구체적으로, 물메기 알로부터 추출한 히알루론산을 페놀산 또는 니신과 그래피팅함으로써 항산화, 항염증 등의 기능성을 개선한 히알루론산 유도체에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 다당류는 대표적인 천연물 유래 소재로 인간이 지금까지 섭취해 왔다는 안전성에 대한 믿음과 최근 건강한 삶을 영위하고자 하는 소비자 니즈와 함께 산업적으로도 널리 확산되어 왔다. 다당류의 대표적인 5대 소재인 키토산,

콘드로이틴황산, 히알루론산, 베타글루칸, 후코이단은 기능성 건강식품 분야를 비롯한 미용, 의료분야에 널리 사용되고 있다.

[0003] 히알루론산은 다당류로 인체의 대부분의 기관에 일정량이 포함되어 있으며, 히알루론산 한 분자당 214개의 물 분자를 끌어당기는 특성이 있어 피부의 수분을 유지하고 피부의 볼륨과 탄력성을 유지하는데 중요한 역할을 한다. 또한, 히알루론산은 동물성 단백질이 아닌 다당질이므로 피부반응 검사 없이 사용해도 안전한 장점을 가지고 있다. 더욱이, 히알루론산으로 만들어진 레스틸렌과 힐라폼 등의 효과는 대개 6개월 후에도 주입량의 60~70%가 남아 있어 지속성에도 뛰어난 특징을 보이고 있다.

[0004] 이러한 히알루론산의 추출 및 정제는 닭 벼슬이나 소 눈의 유래 액을 재료로 활용하였으나, 광우병, 조류 독감 등 전세계적인 질병의 확산으로 안전성에 대한 우려와 소재 확보가 어려운 단점이 있다.

[0005] 한편, 전 세계의 양식 및 어획 수산물은 약 1억 3천만톤에 이르고 있으며 이 중 폐기물로 버려지는 부산물은 35% 이상이다. 부산물로서 버려지는 뼈, 머리, 내장 등으로부터 유용한 성분을 분리하거나 정제하여 활용하려는 노력은 기후변화에 따른 자원 재활용 측면에서 매우 긍정적인 방법의 하나이다. 따라서 연안의 환경오염을 줄이고 수산물의 가공 효율을 높이며 저 비용 고효율의 환경 친화적인 기술개발은 전 인류의 식량자원을 보존하고 재생산하는 측면에서 적극적으로 추진해야 될 사항이다.

[0006] 통영 연안에서 생산되는 물메기는 최근 인공부화 기술이 개발되어 연간 12억 개체가 부화되어 방류되고, 이들 중 일부가 성어로 성장하여 추도와 같은 섬은 물메기를 포획하거나 가공하여 건어물로 판매하여 지역 어민의 큰 소득원으로 자리잡고 있다. 가공 시 부산물로 생산되는 물메기 알의 일부분은 수거되어 수자원연구소에서 부화시켜 방류하나, 어촌계에서 포획되는 물메기는 대부분이 건조되어 판매되고 대부분의 알은 식당으로 판매되거나 폐기되고 있는 실정이다.

[0007] 물메기 알에는 다른 어류의 알과는 달리 글리코사미노글리칸(GAGs)의 원료가 되는 다당류의 함량이 20%에 이르고 있어 이를 활용하는 방안을 강구해야 됨과 동시에 부가가치를 높이는 기술 개발이 필요하다.

선행기술문헌

특허문헌

[0008] (특허문헌 0001) 공개특허공보 KR 제10-2016-0057083호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009] 본원은 전술한 종래 기술의 문제점을 해결하기 위한 히알루론산 유도체에 대한 것으로서, 물메기 가공 중 발생되는 부산물로부터 기능성 물질을 정제하고 이를 산업화할 수 있다. 이를 통해 자원의 재활용뿐만 아니라 지역 주민으로부터 폐기물을 수거함으로써 연안오염을 줄이고 소득 창출을 통하여 지역 주민의 소득을 증대시켜 지속가능한 어업 생태계를 유지해 갈 수 있다.

[0010] 더욱이, 뛰어난 보습효과를 가지면서 안전성이 확보된 히알루론산에 항산화 및 항균성 물질을 그래프트 시켜 부가가치를 높일 수 있다.

[0011] 또한, 본 발명은 상기 히알루론산 유도체를 포함하는 화장품 조성물을 제공한다.

[0012] 또한, 본 발명은 상기 히알루론산 유도체를 포함하는 건강 식품 조성물을 제공한다.

[0013] 또한, 본 발명은 상기 히알루론산 유도체를 포함하는 약학 조성물을 제공한다.

과제의 해결 수단

[0014] 상기한 기술적 과제를 달성하기 위한 본 발명의 히알루론산 유도체는 페놀산 또는 니신이 그래프팅된 히알루론산을 포함하며, 상기 히알루론산 100 중량부를 기준으로 상기 페놀산 또는 상기 니신은 80 중량부 내지 200 중량부로 포함되고, 상기 페놀산은 갈산(gallic acid), 카페산(caffeic acid), 페룰산(ferulic acid) 및 이들의 조합들로 이루어진 군으로부터 선택된 물질을 포함한다.

[0015] 상기 히알루론산은 물메기 알(Liparis tessellatus egg)로부터 추출되는 것 일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0016] 상기 히알루론산은 상기 물메기알에 단백질 가수분해효소를 투입하여 추출된 것 일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0017] 상기 페놀산 또는 상기 니신이 그래프팅됨으로써 항산화 효과를 갖는 것 일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0018] 히알루론산 유도체의 제조 방법은 물메기 알(Liparis tessellatus egg)에서 히알루론산을 추출하는 단계; 상기 추출된 히알루론산과 페놀산 또는 니신을 용매 하에서 그래프팅 시키는 단계;를 포함하며, 상기 히알루론산 100 중량부를 기준으로 상기 페놀산 또는 상기 니신은 80 중량부 내지 200 중량부로 포함된다.

[0019] 상기 용매는 라디칼 생성 또는 상기 히알루론산을 에스테르화(ester) 시키는 것 일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0020] 상기 페놀산은 갈산(gallic acid), 카페산(caffeic acid), 페룰산(ferulic acid) 및 이들의 조함들로 이루어진 군으로부터 선택된 물질을 포함하는 것 일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0021] 상기 추출하는 단계는 상기 물메기 알에 단백질 가수분해효소를 투입하여 상기 히알루론산을 추출하는 것 일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0022] 상기 용매는 과산화수소, 비타민 C, N-하이드록시석신이미드, 물, 에탄올, 메탄올, 에틸에테르, 톨루엔, 아세톤, 이소프로필알코올, 벤젠, 자일렌, N-메틸피롤리돈, 테트라하이드로퓨란, 니트로벤젠, N,N-디메틸포름아미드, 디메틸설폭사이드, 디에틸카보네이트, 벤질 아세테이트, 디메틸 글루타레이트, 에틸아세토아세테이트, 이소부틸 이소부타노에이트, 이소부틸 아세테이트, 메타-크레졸 및 이들의 조합들로 이루어진 군에서 선택된 용매를 포함하는 것 일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0023] 상기 그래프팅 시키는 단계는 10 분 내지 12 시간 동안 이루어지는 것 일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0024] 상기 그래프팅 시키는 단계는 10℃ 내지 100℃의 온도 하에서 이루어지는 것 일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0025] 상기 히알루론산 유도체를 포함하는 화장품 조성물을 제공한다.

[0026] 상기 히알루론산 유도체를 포함하는 건강 식품 조성물을 제공한다.

[0027] 상기 히알루론산 유도체를 포함하는 약학 조성물을 제공한다.

[0028] 상술한 과제 해결 수단은 단지 예시적인 것으로서, 본원을 제한하려는 의도로 해석되지 않아야 한다. 상술한 예시적인 실시예 외에도, 도면 및 발명의 상세한 설명에 추가적인 실시예가 존재할 수 있다.

발명의 효과

[0029] 개시된 기술은 다음의 효과를 가질 수 있다. 다만, 특정 실시예가 다음의 효과를 전부 포함하여야 한다거나 다음의 효과만을 포함하여야 한다는 의미는 아니므로, 개시된 기술의 권리범위는 이에 의하여 제한되는 것으로 이해되어서는 아니 될 것이다.

[0030] 전술한 본원의 과제 해결 수단에 의하면, 본원에 따른 히알루론산 유도체는 물메기 알로부터 추출된 히알루론산과 페놀산 또는 니신을 그래피팅된 물질이다. 물메기 가공 중 발생되는 부산물로부터 기능성 물질을 정제함으로써 자원의 재활용뿐만 아니라 지역주민으로부터 폐기물을 수거함으로써 연안오염을 줄이고 소득 창출을 통해 지역 주민의 소득을 증대시켜 지속 가능한 어업 생태계를 유지해 갈 수 있는 효과를 달성할 수 있다. 또한, 상기 페놀산 또는 상기 니신이 그래프팅 됨으로써 항균성, 항산화 활성 등 다기능성을 나타낼 수 있다. 종래의 히알루론산의 보습효능과 동시에 항균성 및 항산화 활성을 동시에 나타냄으로써 상처치료용 드래싱, 기능성 필러, 식품의 보존제, 항산화제 등의 원료로 응용될 수 있다.

[0031] 또한, 대표적인 다당류의 일종인 키토산의 경우, 수용화가 어려운 특징으로 인해 활용범위가 제약적이었다. 하지만 히알루론산은 수용성으로서 상기 페놀산과 그래프팅이 용이하며 상기 그래프팅을 통해 용해성과 항산화 활성을 증진시킬 수 있다.

[0032] 나아가, 본원에 따른 상기 히알루론산 유도체는 종래의 보톡스에 비하여 부작용이 적고 생체 적합성이 좋으며, 그래프팅으로 기능성이 향상되어 필러 제품으로 응용될 수 있다.

[0033] 더욱이, 상기 히알루론산에 상기 페놀산 또는 상기 니신과 같은 다른 물질을 그래프팅 시키더라도, 상기 히알루론산의 기존의 활성과 그래프팅되는 물질의 활성이 동시에 작용할 수 있다. 즉, 기존의 히알루론산의 기능에 상기 그래프팅을 통해서 상기 페놀산 또는 상기 니신의 활성 기능이 동시에 발현할 수 있는 것이다.

도면의 간단한 설명

[0034] 도 1은 본원의 일 구현예에 따른 히알루론산 유도체의 제조 방법의 순서도이다.

도 2의 (a) 및 (b)는 본원의 일 구현예에 따른 그래프팅의 메커니즘을 나타낸 도면이다.

도 3a 및 3b은 본 실시예에 따라 제조된 히알루론산 유도체 및 비교예의 히알루론산의 FT-IR(Fourier Transform Infrared spectoscopy) 그래프이다.

도 4a는 비교예의 히알루론산, 도 4b 내지 4e는 본 실시예에 따라 제조된 히알루론산 유도체의 히알루론산의 핵자기공명(nuclear magnetic resonance, NMR) 그래프이다.

도 5는 본 실시예에 따라 제조된 히알루론산 유도체 및 비교예의 히알루론산에 대한 항균성을 확인한 사진이다.

도 6은 본 실시예에 따라 제조된 히알루론산 유도체의 세포주의 생존율을 나타낸 그래프이다.

도 7은 본 실시예에 따라 제조된 히알루론산 유도체의 NO의 생산량을 나타낸 그래프이다.

도 8은 본 실시예에 따라 제조된 히알루론산 유도체의 PGE2 생산량을 나타낸 그래프이다.

도 9는 본 실시예에 따라 제조된 히알루론산 유도체의 DPPH 라디칼 소거활성을 나타낸 그래프이다.

도 10은 본 실시예에 따라 제조된 히알루론산 유도체의 ABTS 라디칼 소거활성을 나타낸 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0035] 본 발명은 다양한 변경을 가할 수 있고 여러 가지 실시예를 가질 수 있는바, 특정 실시예들을 도면에 예시하고 상세한 설명에 구체적으로 설명하고자 한다. 그러나 이는 본 발명을 특정한 실시 형태에 대해 한정하려는 것이 아니며, 본 발명의 사상 및 기술 범위에 포함되는 모든 변경, 균등물 내지 대체물을 포함하는 것으로 이해되어야 한다.

[0036] 각 도면을 설명하면서 유사한 참조부호를 유사한 구성요소에 대해 사용한다. 제 1, 제 2등의 용어는 다양한 구성요소들을 설명하는데 사용될 수 있지만, 상기 구성요소들은 상기 용어들에 의해 한정되어서는 안 된다. 상기 용어들은 하나의 구성요소를 다른 구성요소로부터 구별하는 목적으로만 사용된다.

[0037] 예를 들어, 본 발명의 권리 범위를 벗어나지 않으면서 제 1 구성요소는 제 2 구성요소로 명명될 수 있고, 유사하게 제 2 구성요소도 제 1 구성요소로 명명될 수 있다. "및/또는" 이라는 용어는 복수의 관련된 기재된 항목들의 조합 또는 복수의 관련된 기재된 항목들 중의 어느 항목을 포함한다.

[0038] 다르게 정의되지 않는 한, 기술적이거나 과학적인 용어를 포함해서 여기서 사용되는 모든 용어들은 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자에 의해 일반적으로 이해되는 것과 동일한 의미가 있다.

[0039] 일반적으로 사용되는 사전에 정의되어 있는 것과 같은 용어들은 관련 기술의 문맥상 가지는 의미와 일치하는 의미가 있는 것으로 해석되어야 하며, 본 출원에서 명백하게 정의하지 않는 한, 이상적이거나 과도하게 형식적인 의미로 해석되지 않아야 한다.

[0040] 본원 명세서 전체에서, 어떤 부재가 다른 부재 "상에", "상부에", "상단에", "하에", "하부에", "하단에" 위치하고 있다고 할 때, 이는 어떤 부재가 다른 부재에 접해 있는 경우뿐 아니라 두 부재 사이에 또 다른 부재가 존재하는 경우도 포함한다.

[0041] 본원 명세서 전체에서, 어떤 부분이 어떤 구성요소를 "포함" 한다고 할 때, 이는 특별히 반대되는 기재가 없는 한 다른 구성요소를 제외하는 것이 아니라 다른 구성 요소를 더 포함할 수 있는 것을 의미한다.

[0042] 본 명세서에서 사용되는 정도의 용어 "약", "실질적으로" 등은 언급된 의미에 고유한 제조 및 물질 허용오차가 제시될 때 그 수치에서 또는 그 수치에 근접한 의미로 사용되고, 본원의 이해를 돕기 위해 정확하거나 절대적인

수치가 언급된 개시 내용을 비양심적인 침해자가 부당하게 이용하는 것을 방지하기 위해 사용된다. 또한, 본원 명세서 전체에서, "~ 하는 단계" 또는 "~의 단계"는 "~를 위한 단계"를 의미하지 않는다.

[0043] 본원 명세서 전체에서, 마쿠시 형식의 표현에 포함된 "이들의 조합"의 용어는 마쿠시 형식의 표현에 기재된 구성 요소들로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상의 혼합 또는 조합을 의미하는 것으로서, 상기 구성 요소들로 이루어진 군에서 선택되는 하나 이상을 포함하는 것을 의미한다.

[0044] 이하에서는 본원의 히알루론산 유도체 및 이의 제조 방법에 대하여 구현예 및 실시예와 도면을 참조하여 구체적으로 설명하도록 한다. 그러나, 본원이 이러한 구현예 및 실시예와 도면에 제한되는 것은 아니다.

[0046] 본원은, 페놀산 또는 니신이 그래프팅된 히알루론산을 포함하며, 상기 히알루론산 100 중량부를 기준으로 상기 페놀산 또는 상기 니신은 80 중량부 내지 200 중량부로 포함되고, 상기 페놀산은 갈산(gallic acid), 카페산(caffeic acid), 페룰산(ferulic acid) 및 이들의 조합들로 이루어진 군으로부터 선택된 물질을 포함하는 히알루론산 유도체에 관한 것이다.

[0047] 상기 히알루론산 100 중량부를 기준으로 상기 페놀산 또는 상기 니신이 80 중량부 미만 또는 200 중량부 초과일 경우 그래프팅의 효율이 낮아질 수 있다.

[0048] 상기 히알루론산은 물메기 알(Liparis tessellatus egg)로부터 추출되는 것 일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0049] 상기 히알루론산은 상기 물메기알에 단백질 가수분해효소를 투입하여 추출된 것 일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0050] 상기 단백질 가수분해효소는 알칼레이즈(Alcalase), 플라보르자임(Flavourzyme), 프로타멕스(Protamex) 및 이들의 조합들로 이루어진 군으로부터 선택된 효소를 포함하는 것 일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0051] 상기 알칼레이즈는 바실루스 리케니포르미스균(Bacillus licheniformis)에서 분리한 내열성 액화 효소로서, 55℃ 내지 70℃의 온도 및 6.5 내지 8.5의 pH에서 활성이 가장 우수하며 전분당, 물엿, 약주 등의 제조에 사용될 수 있다.

[0052] 상기 플라보르자임은 누룩곰팡이(Aspergillus oryzae)에서 기원된 복합효소로서 N-말단에서부터 단백질을 아미노산 단위로 분해하는 효소이다. 50℃ 내지 70℃의 온도 및 5.0 내지 7.0의 pH에서 활성을 나타낸다.

[0053] 상기 프로타멕스는 간균(bacillus) 균주에서 분리한 프로테아제(Protease complex)로 구성된 내열성 액화 효소로 식품내 단백질의 가수분해 및 새로운 식품 개발에 주로 이용되며, 35℃ 내지 60℃의 온도 및 5.5 내지 7.5의 pH에서 활성을 나타낸다.

[0054] 상기 페놀산 또는 상기 니신이 그래프팅됨으로써 항산화 효과를 갖는 것 일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0055] 상기 그래프팅(grafting)은 하나의 선상 고분자에 다른 종류의 고분자를 가지상태로 공중합시키는 것을 의미하며, 이 때 중합된 고분자를 그라프트 중합물이라고 한다. 또한, 상기 그래프팅은 그래프트, 그래프트화, 수식 등 다양한 표현으로서 나타낼 수 있다.

[0056] 상기 페놀산은 식물에서 추출된 것 일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0057] 상기 페놀산은 항균 및 항산화 활성이 높아 상기 페놀산을 상기 히알루론산과 그래프팅함으로써 항균활성, 항산화활성, 콜라게나제(collagenase) 및 티로시나아제(tyrosinase)의 활성 증대 등 다기능성을 나타내는 히알루론산 유도체를 얻을 수 있다.

[0058] 상기 니신은 항균물질로 알려져 있는 펩타이드로 34개의 아미노산으로 구성되어 있으며 1988년 미국 FDA에서 GRAS 품목으로 인정된 후 현재 47개국에서 식품 첨가제로 사용되고 있다.

[0059] 상기 니신을 상기 히알루론산과 그래프팅함으로써 항균성이 향상된 히알루론산 유도체를 수득할 수 있으며 상처치료용 드래싱, 기능성 필러, 식품의 보존제, 항산화제 등의 원료로 응용할 수 있다.

[0060] 대표적인 다당류의 일종인 키토산의 경우, 수용화가 어려운 특징으로 인해 활용범위가 제약적이었다. 하지만 히알루론산은 수용성으로서 상기 페놀산과 그래프팅이 용이하며 상기 그래프팅을 통해 용해성과 항산화 활성을 증

진시킬 수 있다.

[0061] 본원에 따른 상기 히알루론산 유도체는 종래의 보톡스에 비하여 부작용이 적고 생체 적합성이 좋으며, 그래프팅으로 기능성이 향상되어 필러 제품으로 응용될 수 있다.

[0062] 더욱이, 상기 히알루론산에 상기 페놀산 또는 상기 니신과 같은 다른 물질을 그래프팅 시키더라도, 상기 히알루론산의 기존의 활성과 그래프팅되는 물질의 활성이 동시에 작용할 수 있다. 즉, 기존의 히알루론산의 기능에 상기 그래프팅을 통해서 상기 페놀산 또는 상기 니신의 활성 기능이 동시에 발현할 수 있는 것이다.

[0063] 상기 히알루론산은 보수력, 점탄성, 비면역원성, 생체 적합성, 생분해성 등의 생리활성을 갖고 있다.

[0064] 나아가 본원에 따른 히알루론산의 유도체는 물메기알로부터 추출되는 것을 사용한다. 물메기 알은 1년생이므로 활용하지 않으면 전량 폐기해야 한다. 이러한 물메기 알을 활용함으로써 자원을 재활용하는 데 효과적이며 친환경적이다.

[0065] 본원은 물메기 알(Liparis tessellatus egg)에서 히알루론산을 추출하는 단계; 상기 추출된 히알루론산과 페놀산 또는 니신을 용매 하에서 그래프팅 시키는 단계;를 포함하며, 상기 히알루론산 100 중량부를 기준으로 상기 페놀산 또는 상기 니신은 80 중량부 내지 200 중량부로 포함되는 히알루론산 유도체의 제조 방법에 관한 것이다. .

[0066] 도 1은 본원의 일 구현예에 따른 히알루론산 유도체의 제조 방법의 순서도이다.

[0067] 먼저, 물메기 알에서 히알루론산을 추출한다(S100).

[0068] 상기 추출하는 단계는 상기 물메기 알에 단백질 가수분해효소를 투입하여 상기 히알루론산을 추출하는 것 일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0069] 상기 단백질 가수분해효소는 알칼레이즈(Alcalase), 플라보르자임(Flavourzyme), 프로타멕스(Protamex) 및 이들의 조합들로 이루어진 군으로부터 선택된 효소를 포함하는 것 일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0070] 상기 추출하는 단계는, 물메기 알을 수거하여 효소가수분해 한 다음 단백질을 제거하고 DEAE-Sepharose 컬럼 크로마토그래피로 활성성분을 분획하고 동결 건조하여 실험에 사용하는 것 일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0071] 구체적으로, 물메기 알에 단백질 가수분해효소를 투입한 후 분해된 단백질을 제거하기 위하여 50% 내지 80%의 황산암모늄$(NH_4)_2SO_4$를 첨가하여 상기 단백질을 침전시킨다. 이 후 0℃ 내지 10℃의 온도의 냉장상태에서 12시간 내지 48시간 방치 후 원심분리기를 이용하여 상기 단백질을 분리한다. 상기 원심분리기를 이용해서 수득한 상등액을 염의 함량이 0.1% 이하로 감소할 때까지 증류수를 이용하여 투석한다. 상기 희석된 용액을 브릭스(Brix) 9 내지 11이 될 때까지 농축한 후 농축한 양의 3배의 알코올을 가하여 히알루론산을 침전시킨다.

[0072] 상기 히알루론산을 동결 건조 후 마쇄하고 지질 제거를 위해 아세톤에 침지한 후 탈이온수로 여러 번 세척하고 동결 건조한다.

[0073] 상기 히알루론산을 완충용액에 용해시킨 후 DEAE-Sepharose 컬럼크로마토그래피를 이용하여 활성성분을 분획하고 동결 건조하여 사용하는 것 일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0074] 이어서, 상기 추출된 히알루론산과 페놀산 또는 니신을 용매 하에서 그래프팅 시킨다(S200).

[0075] 상기 히알루론산 100 중량부를 기준으로 상기 페놀산 또는 상기 니신은 80 중량부 내지 200 중량부로 포함되는 것 일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0076] 상기 히알루론산 100 중량부를 기준으로 상기 페놀산 또는 상기 니신이 80 중량부 미만 또는 200 중량부 초과로 포함되는 경우 상기 그래프팅의 효율이 낮아질 수 있다.

[0077] 상기 페놀산은 갈산(gallic acid), 카페산(caffeic acid), 페룰산(ferulic acid) 및 이들의 조함들로 이루어진 군으로부터 선택된 물질을 포함하는 것 일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0078] 도 2의 (a) 및 (b)는 본원의 일 구현예에 따른 그래프팅의 메커니즘을 나타낸 도면이다.

[0079] 도 2의 (a)를 참고하면, 상기 페놀산은 라디칼 반응으로 상기 히알루론산과 그래프팅되는 것이다.

[0080] 상기 라디칼 반응은 히드록실 라디칼(hydroxyl radical)에 의해 이루어지는 것 일 수 있으나, 이에 제한되는 것

은 아니다.

[0081] 도 2의 (b)를 참고하면, 상기 용매로 인해 상기 히알루론산이 에스테르화 함으로써 상기 니신의 고분자화(polymerization)을 막으면서 상기 니신의 아미노(amino)그룹과 상기 에스테르 그룹이 반응하여 아미드화합물로서 상기 히알루론산과 상기 니신이 결합되는 것이다.

[0082] 상기 용매는 라디칼 생성 또는 상기 히알루론산을 에스테르화(ester) 시키는 것 일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0083] 상기 용매는 과산화수소, 비타민 C, N-하이드록시석신이미드, 물, 에탄올, 메탄올, 에틸에테르, 톨루엔, 아세톤, 이소프로필알코올, 벤젠, 자일렌, N-메틸피롤리돈, 테트라하이드로퓨란, 니트로벤젠, N,N-디메틸포름아미드, 디메틸설폭사이드, 디에틸카보네이트, 벤질 아세테이트, 디메틸 글루타레이트, 에틸아세토아세테이트, 이소부틸 이소부타노에이트, 이소부틸 아세테이트, 메타-크레졸 및 이들의 조합들로 이루어진 군에서 선택된 용매를 포함하는 것 일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0084] 예를 들면, 비타민 C와 과산화수소가 반응하여 히드록실 라디칼이 생성되는 것 일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0085] 예를 들면, 상기 히알루론산과 N-하이드록시석신이미드(N-hyroxysuccinimide, NHS)이 반응하여 상기 히알루론산의 카르복시 그룹이 에스테르화하는 것 일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0086] 상기 그래프팅 시키는 단계는 10 분 내지 12 시간 동안 이루어지는 것 일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0087] 상기 그래프팅 시키는 단계가 10 분 미만일 경우, 반응이 충분히 일어나지 않아 그래프팅 효율이 낮아질 수 있다. 또한 상기 그래프팅 시키는 단계가 12 시간 초과일 경우, 부산물이 발생하여 순도가 떨어질 수 있다.

[0088] 상기 그래프팅 시키는 단계는 10℃ 내지 100℃의 온도 하에서 이루어지는 것 일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0089] 상기 그래프팅 시키는 단계가 10℃ 미만의 온도 하에서 이루어지는 경우, 그래프팅화가 충분히 일어나지 않을 수 있고, 100℃ 초과의 온도 하에서 이루어지는 경우 물질들이 분해될 수 있다.

[0090] 상기 그래프팅 시키는 단계를 통해서 수득하는 히알루론산 유도체의 수득률(그래프팅 효율, grafting rate)은 10% 내지 99.9%인 것 일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0091] 본원은 상기 히알루론산 유도체를 포함하는 화장품 조성물을 제공한다.

[0092] 상기 화장품 조성물은 피부 미백, 피부 세포 재생, 피부 노화 지연, 피부 주름 개선 등의 목적으로 피부에 도포될 수 있다.

[0093] 상기 화장품 조성물에 포함되는 성분은 유효성분으로서 상기 유효성분 이외에 화장품 조성물에 통상적으로 이용되는 성분들을 포함할 수 있으며, 예를 들면 항산화제, 안정화제, 용해화제, 비타민, 안료, 향료 및 이들의 조합들로 이루어진 군에서 선택된 물질을 포함할 수 있다.

[0094] 상기 화장품 조성물은 당 업계에서 통상적으로 제조되는 어떠한 제형으로도 제조될 수 있으며, 예를 들어, 용액, 현탁액, 유탁액, 페이스트, 겔, 크림, 로션, 파우더, 비누, 계면활성제-함유 클렌징, 오일, 분말 파운데이션, 유탁액 파운데이션, 왁스 파운데이션 및 스프레이 등으로 제형화 되는 것 일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 보다 상세하게는, 유연 화장수, 영양 화장수, 영양 크림, 마사지 크림, 에센스, 아이 크림, 클렌징 크림, 클렌징 폼, 클렌징 워터, 팩, 스프레이 또는 파우더의 제형으로 제조될 수 있다.

[0095] 상기 화장품 조성물의 제형이 페이스트, 크림 또는 겔인 경우에는 담체 성분으로서 동물성유, 식물성유, 왁스, 파라핀, 전분, 트라칸트, 셀룰로오스 유도체, 폴리에틸렌 글리콜, 실리콘, 벤토나이트, 실리카, 탈크, 산화아연 및 이들의 조합들로 이루어진 군에서 선택된 물질을 이용할 수 있다.

[0096] 상기 화장품 조성물의 제형이 파우더 또는 스프레이인 경우에는 담체 성분으로서 락토스, 탈크, 실리카, 알루미늄 히드록시드, 칼슘 실리케이트 또는 폴리아미드 파우더가 이용될 수 있고, 특히 스프레이인 경우에는 추가적으로 클로로플루오로히드로카본, 프로판, 부탄, 디메틸 에테르 및 이들의 조합들로 이루어진 군에서 선택된 추진체를 포함할 수 있다.

[0097] 상기 화장품 조성물의 제형이 용액 또는 유탁액인 경우에는 담체 성분으로서 용매, 용해화제 또는 유탁화제가

이용될 수 있고, 예를 들면, 물, 에탄올, 이소프로판올, 에틸 카보네이트, 에틸 아세테이트, 벤질 알코올, 벤질 벤조에이트, 프로필렌글리콜, 1,3-부틸글리콜 오일, 글리세롤 지방족 에스테르, 폴리에틸렌 글리콜, 소르비탄의 지방산 에스테르 및 이들의 조합들로 이루어진 군에서 선택된 물질을 이용할 수 있다.

[0098] 상기 화장품 조성물의 제형이 현탁액인 경우에는 담체 성분으로서 물, 에탄올 또는 프로필렌 글리콜과 같은 액상의 희석제, 에톡실화 이소스테아릴 알코올, 폴리옥시에틸렌 소르비톨 에스테르 또는 폴리옥시에틸렌 소르비탄 에스테르와 같은 현탁제, 미소 결정성 셀룰로오스, 알루미늄 메타히드록시드, 벤토나이트, 아가 또는 트라칸트 등이 이용될수 있다.

[0099] 상기 화장품 조성물의 제형이 계면-활성제 함유 클렌징인 경우에는 담체 성분으로서 지방족 알코올 설페이트, 지방족 알코올 에테르 설페이트, 설포숙신산 모노에스테르, 이세티오네이트, 이미다졸리늄 유도체, 메틸타우레이트, 사르코시네이트, 지방산 아미드 에테르 설페이트, 알킬아미도베타인, 지방족 알코올, 지방산 글리세리드, 지방산 디에탄올아미드, 식물성 유, 라놀린 유도체, 에톡실화 글리세롤 지방산 에스테르 및 이들의 조합들로 이루어진 군에서 선택된 물질이 이용될 수 있다.

[0100] 상기 화장품 조성물은 단독 또는 중복 도포하여 사용하거나, 본원에 따른 상기 화장품 조성물 이외의 다른 화장료 조성물과 중복도포하여 사용할 수 있다. 또한 상기 화장품 조성물은 피부 보호 효과가 우수하며 통상적인 사용방법에 따라 사용될 수 있으며, 사용자의 피부 상태 또는 취향에 따라 그 사용횟수를 달리할 수 있다.

[0101] 상기 화장품 조성물이 비누, 계면활성제 함유 클렌징 또는 계면활성제 비함유 클렌징 제형일 경우, 피부에 도포한 후 닦아내거나 떼거나 물로 씻어낼 수도 있다. 구체적인 예로서, 상기 비누는 액상비누, 가루비누, 고형 비누 및 오일비누이며, 상기 계면활성제 함유 클린징 제형은 클렌징폼, 클렌징 워터, 클렌징 수건 및 클렌징 팩이며, 상기 계면활성제 비함유 클렌징 제형은 클렌징크림, 클렌징 로션, 클렌징 워터 및 클렌징 겔이며, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0102] 상기 히알루론산 유도체를 포함하는 건강 식품 조성물을 제공한다.

[0103] 상기 건강 식품 조성물은 일반적인 식품의 제조 방법으로 제조할 수 있다.

[0104] 상기 제조 방법으로 성형 조립, 유동층 조립, 교반 조립, 압출 조립, 전동 조립, 기류 조립, 압축 성형 조립, 파쇄 조립, 분무 조립, 분사 조립, 조립 방법, 팬 코팅, 유동층 코팅, 건식 코팅, 코팅 방법, 퍼프드라이, 과잉수증기법, 폼 매트 방법, 마이크로파 가열 방법, 팽화 방법 및 이들의 조합들로 이루어진 군에서 선택된 방법으로 제조하는 것 일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0105] 상기 건강 식품 조성물에는 상기 히알루론산 유도체가 0.01 중량% 내지 50 중량% 함유하도록 첨가되는 것 일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0106] 상기 건강 식품 조성물은 건강 식품, 건강 음료, 쥬스류, 청량 음료수, 스프류, 차류, 유산균 음료, 발효유, 빙과, 버터, 치즈, 요구르트, 가공유, 탈지 분유 등의 유제품, 햄, 소세지, 햄버거 등의 축육 제품, 어육 혼합 제품, 계란말이, 달걀 두부 등의 알제품, 쿠키, 젤리, 스낵 과자, 츄잉껌 등의 과자류, 빵류, 국수류, 김치류, 훈제품, 건물, 해산물 조림, 조미료 및 이들의 조합들로 이루어진 군에서 식품을 포함하는 것 일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0107] 상기 건강 식품 조성물은 분말 식품, 시트상 식품, 병조림 식품, 통조림 식품, 레토르트 식품, 캡슐 식품, 정제상 식품, 유동 식품, 드링크제 및 이들의 조합들로 이루어진 군에서 선택된 형태인 것 일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0108] 상기 건강 식품 조성물은 감미료, 착색료, 보존료, 증점 안정제, 산화 방지제, 발색제, 표백제, 곰팡이 방지제, 껌베이스, 고미료, 효소, 광택제, 산미료, 조미료, 유화제, 강화제, 제조용 제제, 향료, 향신료 추출물 및 이들의 조합들로 이루어진 군에서 선택된 첨가물을 포함하는 것 일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0109] 상기 감미료는 아스파탐, 감초, 스테비아, 크실로오스 및 이들의 조합들로 이루어진 군에서 선택된 물질을 포함하는 것 일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0110] 상기 착색료는 카로티노이드나 쿠르쿠민 색소, 후라보노이드, 카라멜 색소, 시콘 색소, 스피룰리나 색소, 엽록소, 퍼플스윗 감자(purple sweet potato) 색소, 퍼플 스윗 산감자 색소, 들깨(perilla) 색소, 블루베리 색소 및 이들의 조합들로 이루어진 군에서 선택된 물질을 포함하는 것 일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0111] 상기 보존료는 아황산나트륨, 벤조산류, 독활(aralia cordata) 추출물, 에고노기 추출물, 사철쑥 추출물, 소르

빈산류,프로피온산류 및 이들의 조합들로 이루어진 군에서 선택된 물질을 포함하는 것 일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0112] 상기 증점 안정제는 아라비아 검이나 크산탄 검 등의 검류, 알긴산류, 키틴, 키토산, 알로에 추출물, 구아 검, 히드록시프로필셀룰로오스, 카제인나트륨, 옥수수 전분, 카르복시메틸셀룰로오스류, 젤라틴, 한천, 텍스트린, 메틸셀룰로오스,폴리비닐알코올, 미소 섬유상 셀룰로오스, 미결정 셀룰로오스, 해초 셀룰로오스, 폴리아크릴산소다, 폴리인산나트륨,카라기난, 효모 세포벽, 곤약 감자 추출물, 나타드코코(Nata de coco), 만난 및 이들의 조합들로 이루어진 군에서 선택된 물질을 포함하는 것 일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0113] 상기 산화 방지제는 비타민 C, 에틸렌디아민 사아세트산나트륨, 에틸렌디아민 사아세트산칼슘, 에리소르빈산, 오리자놀, 카테친(catechin), 퀘르세틴(quercetin), 클로브 추출물, 효소 처리 루틴, 사과 추출물, 참기름 추출물, 디부틸히드록시톨루엔, 회향 추출물, 서양고추냉이 추출물, 미나리 추출물, 차 추출물, 템페 추출물, 약모밀 추출물, 토코트리에놀, 토코페롤류, 평지 기름 추출물, 원두 커피 추출물, 해바라기 종자, 페룰산, 부틸히드록시아니솔, 블루베리잎 추출물, 프로폴리스 추출물, 고사리은행나무 추출물, 헤스페리틴, 후추 추출물, 봉선화 추출물, 갈산, 소귀나무 추출물,유칼립투스 추출물, 로즈마리 추출물 및 이들의 조합들로 이루어진 군에서 선택된 물질을 포함하는 것 일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0114] 상기 발색제는 아질산나트륨, 아황산나트륨, 오르토페닐페놀 및 이들의 조합들로 이루어진 군에서 선택된 물질을 포함하는 것 일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0115] 상기 껌베이스는 아세틸리시놀산메틸, 옻 왁스, 에스테르 검, 엘레미(elemi) 수지, 오우리큐우릴로우, 오조케라이트(ozokerite), 오포파낙스(opopanax) 수지, 카우리 검, 카르나우바 왁스, 구아이악(guaiac) 수지, 구타카츄, 구타한칸, 구타페르카(guttapercha), 글리세린지방산 에스테르, 고래 왁스, 코파오바 발삼, 코팔(copal) 수지, 고무, 라이스 왁스, 사탕수수 왁스, 쉘락, 젤톤, 슈크로오스지방산 에스테르, 소르바, 소르비탄산지방산 에스테르, 탈크, 탄산칼슘, 담마(dammar) 검, 치클(chicle), 치르테, 쯔누(tunu), 저분자 고무, 파라핀 오일, 퍼발삼, 프로필렌글리콜지방산 에스테르, 분말 펄프, 분말 벼겨, 호호바 오일, 폴리이소부틸렌, 폴리부텐, 마이크로크리스탈 왁스, 유향수(mastic), 맛사란드쵸콜 레이트, 황랍, 인산칼슘 및 이들의 조합들로 이루어진 군에서 선택된 물질을 포함하는 것 일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0116] 상기 고미료는 이소 알파 고미산, 카페인, 구름버섯 추출물, 키나(kina) 추출물, 황다랑어 추출물, 겐티아나 추출물, 향신료 추출물, 효소 처리 나린진, 쟈마이카 카시아 추출물, 데오브로민, 나린진, 비가끼 추출물, 약쑥 추출물, 방아풀 추출물, 아가리쿠스 버섯, 버섯 추출물, 보라페트, 메틸티오아데노신, 영지 추출물, 올리브차, 광귤 추출물, 홉 추출물, 머그워트(mugwort) 추출물 및 이들의 조합들로 이루어진 군에서 선택된 물질을 포함하는 것 일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0117] 상기 효소는 아밀라아제, 트립신, 린넷, 유산균 및 이들의 조합들로 이루어진 군에서 선택된 물질을 포함하는 것 일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0118] 상기 광택제는 옻 왁스, 목랍 및 이들의 조합들로 이루어진 군에서 선택된 물질을 포함하는 것 일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0119] 상기 산미료는 아디프산, 이타콘산, 시트르산류, 숙신산류, 아세트산나트륨, 타르타르산류, 이산화탄소, 락트산, 피린산, 푸마르산, 말산, 인산 및 이들의 조합들로 이루어진 군에서 선택된 물질을 포함하는 것 일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0120] 상기 조미료는 아스파라긴, 아스파라긴산류, 글루탐산, 글루타민, 알라닌, 이소류신, 글리신, 세린, 시스틴, 티로신, 류신, 프롤린 등의 아미노산, 이노신산나트륨, 우리딜산나트륨, 구아닐산나트륨, 시티딜산나트륨, 리보뉴클레오티드 칼슘, 리보뉴클레오티드 나트륨 등의 핵산, 시트르산, 숙신산 등의 유기 산, 염화칼륨, 염수 호수 저염 나트륨액, 조제(粗製) 해수 염화칼륨, 유청 미네랄, 인산삼칼륨, 인산수소이칼륨, 인산이수소칼륨, 인산수소이나트륨,, 인산이수소나트륨, 인산삼나트륨, 클로렐라 추출물 및 이들의 조합들로 이루어진 군에서 선택된 물질을 포함하는 것 일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0121] 상기 유화제는 지방산 모노글리세라이드, 소르비탄 지방산 에스테르 및 이들의 조합들로 이루어진 군에서 선택된 물질을 포함하는 것 일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0122] 상기 강화제는 아연 염류, 비타민 C, 각종 아미노산, 5-아데닐산, 염화철, 헤스페리딘, 각종 소성 칼슘, 각종 미소성 칼슘, 디벤조일티아민, 수산화칼슘, 탄산칼슘, 티아민염산염, 듀나리에라 카로틴, 토코페롤, 니코틴산,

당근 카로틴, 팜유카로틴, 판토텐산칼슘, 비타민 A, 히드록시프롤린, 피롤린산이수소칼슘, 피롤린산 제1철, 피롤린산 제2철, 페리틴, 햄철, 메나퀴논, 엽산, 리보플라빈 및 이들의 조합들로 이루어진 군에서 선택된 물질을 포함하는 것 일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0123] 상기 제조용 제제는 아세톤, 이온 교환 수지 등의 가공 조제, 무화과 나뭇잎 추출물, 볏짚 재 추출물, 카올린, 글리세린지방산 에스테르, 뽕나무 추출물, 골회, 들깨 추출물, 생강 추출물, 각종 탄닌, 파파야 추출물, 포도종자 추출물, 에탄올 및 이들의 조합들로 이루어진 군에서 선택된 물질을 포함하는 것 일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0124] 상기 향신료 추출물은 고추 추출물, 마늘추출물 및 이들의 조합들로 이루어진 군에서 선택된 물질을 포함하는 것 일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다

[0125] 상기 건강 식품 조성물은 1일 1회 내지 5회로 나누어 섭취하는 것 일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0126] 상기 히알루론산 유도체를 포함하는 약학 조성물을 제공한다.

[0127] 본 발명에 따른 약학 조성물은 약학 조성물의 제조에 통상적으로 사용하는 적절한 담체, 부형제 또는 희석제를 더 포함할 수 있다.

[0128] 본 발명에서 사용가능한 담체, 부형제 또는 희석제로는, 락토즈, 덱스트로즈, 수크로스, 솔비톨, 만니톨, 자일리톨, 에리스리톨, 말티톨, 전분, 아카시아 고무, 알지네이트, 젤라틴, 칼슘 포스페이트, 칼슘 실리케이트, 셀룰로즈, 메틸 셀룰로즈, 미정질 셀룰로스, 폴리비닐 피롤리돈, 물, 메틸히드록시벤조에이트, 프로필히드록시벤조에이트, 탈크, 마그네슘 스테아레이트 또는 광물유 등을 들 수 있다.

[0129] 상기 약학 조성물은, 각각 통상의 방법에 따라 산제, 과립제, 정제, 캡슐제, 현탁액, 에멀젼, 시럽, 에어로졸 등의 경구형 제형, 외용제, 좌제 및 멸균 주사용액의 형태로 제형화하여 사용될 수 있다.

[0130] 제제화할 경우에는 보통 사용하는 충진제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제된다. 경구투여를 위한 고형제제에는 정제, 환제, 산제, 과립제, 캡슐제 등이 포함되며, 이러한 고형제제는 상기 화합물은 적어도 하나 이상의 부형제, 예를 들면, 전분, 칼슘카보네이트(calcium carbonate), 수크로스(sucrose) 또는 락토오스(lactose), 젤라틴 등을 섞어 조제한다.

[0131] 또한 단순한 부형제 이외에 마그네슘 스테아레이트, 탈크 같은 윤활제들도 사용된다. 경구를 위한 액상 제제로는 현탁제, 내용액제, 유제, 시럽제 등이 해당되는데 흔히 사용되는 단순희석제인 물, 리퀴드 파라핀 이외에 여러 가지 부형제, 예를 들면 습윤제, 감미제, 방향제, 보존제 등이 포함될 수 있다.

[0132] 비경구 투여를 위한 제제에는 멸균된 수용액, 비수성용제, 현탁제, 유제, 동결건조 제제, 좌제가 포함된다. 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.

[0133] 상기 약학 조성물의 사용량은 환자의 나이, 성별, 체중에 따라 달라질 수 있으며, 약효가 충분히 발휘될 수 있도록 일일 1회 내지 수회 투여할 수 있다.

[0134] 또한, 이러한 약학 조성물의 투여량은 투여경로, 질병의 정도, 성별, 체중, 나이 등에 따라서 증감될 수 있다. 따라서, 상기 투여량은 어떠한 면으로든 본 발명의 범위를 한정하는 것은 아니다.

[0135] 상기 약학 조성물은 쥐, 생쥐, 가축, 인간 등의 포유동물에 다양한 경로로 투여될 수 있다. 투여의 모든 방식은 예상될 수 있는데, 예를 들면, 경구, 직장 또는 정맥, 근육, 피하, 비강흡입, 자궁내 경막 또는 뇌혈관내(intracerebroventricular)주사에 의해 투여될 수 있다.

[0137] 이하 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세하게 설명하고자 하나, 하기의 실시예는 단지 설명의 목적을 위한 것이며 본원의 범위를 한정하고자 하는 것은 아니다.

실 시 예 1

[0138] 먼저, 물메기 알에 단백질 가수분해 효소로서 알칼레이즈를 투입하여 60℃, pH 7.0의 조건에서 24시간동안 가수분해하였다. 상기 분해된 단백질을 제거하기 위해 70%의 황산암모늄$(NH_4)_2SO_4$를 첨가하여 상기 단백질을 침전시

켰다. 이 후 5℃ 온도의 냉장상태에서 12시간 동안 방치 후 원심분리기를 이용하여 상기 단백질을 분리하였다. 상기 원심분리기를 이용해서 수득한 상등액을 염의 함량이 0.1% 이하로 감소할 때까지 증류수를 이용하여 투석하였다. 상기 희석된 용액을 브릭스(Brix) 10이 될 때까지 농축한 후 농축한 양의 3배의 알코올을 가하여 히알루론산을 침전시켰다. 상기 히알루론산을 동결 건조 후 마쇄하고 지질 제거를 위해 아세톤에 침지한 후 탈이온수로 여러 번 세척하고 동결 건조하였다. 상기 지질이 제거된 히알루론산 2 g 을 50 mM의 인산염(phosphate) 완충액에 1.34%(w/v)의 비율로 침지한 후 48℃, pH 6.6의 조건에서 27시간 동안 가수분해한 후 효소 활성을 억제하기 위해 90℃의 온도에서 10분간 가열한 다음 원심분리기를 이용하여 상등액을 수득하였다. 상기 수등액에 대하여 60%의 농도가 되도록 황산나트륨(Na_2SO_4)을 첨가한 후 원심분리기를 이용하여 상등액을 수득하였다. 상기 상등액을 감압진공농축기를 사용하여 40℃이하의 온도에서 브릭스가 10이 될 때까지 농축한 후 농축한 양의 3배의 알코올을 가하여 히알루론산을 침전시켰다. 상기 히알루론산을 동결 건조하였다.

[0139] 상기 히알루론산을 완충용액에 용해시킨 후 DEAE-Sepharose 컬럼크로마토그래피를 이용하여 활성성분을 분획하고 동결 건조하였다.

[0140] 이어서, 상기 히알루론산 0.5 g을 50 ml의 탈이온수에 용해하여 반응용기에 넣고 0.1 g의 비타민C와 갈산(gallic acid) 0.8 g을 첨가하고 질소 분위기 하에서 30분간 반응시켰다. 상기 반응용기에 5M의 과산화수소(H_2O_2) 2 ml를 첨가한 후 질소 분위기 하에서 12시간 동안 반응시켰다. 상기 반응을 통해 수득한 반응물을 분자량 14,000 Da의 여과막을 사용하여 히알루론산 유도체를 수득하였다.

실 시 예 2

[0141] 갈산 대신 카페산(caffeic acid)을 사용하는 것을 제외하고, 실시예 1과 동일한 방법으로 히알루론산 유도체를 제조하였다.

실 시 예 3

[0142] 갈산 대신 페룰산(ferulic acid)을 사용하는 것을 제외하고, 실시예 1과 동일한 방법으로 히알루론산 유도체를 제조하였다.

실 시 예 4

[0143] 물메기 알로부터 추출한 상기 히알루론산 100 mg을 40 ml의 완충용액(phosphate buffered saline, PBS, pH 7.4)에 용해시킨 후 12시간 동안 방치시켰다. 상기 용액 500 μl에 N-하이드록시석신이미드(N-hyroxysuccinimide, NHS) 및 1-(3-디메틸아미노프로필)-N-에틸-카르보디이미드 하이드로클로라이드(1-(3-dimethylaminopropyl)-N-ethyl-carbodiimide hydrochloride, EDC) 각각을 니신(nisin) 1 eq 당 1:1의 몰비로 첨가한 후 30분동안 반응시켰다. 0.02 M 염산(HCl)을 상기 용액에 첨가하여 0.01 eq 농도의 히알루론산 유도체를 제조하였다.

[0144] [비교예 1]

[0145] 비교예로서 히알루론산을 사용하였다.

[0146] [평가]

[0147] **1. 히알루론산 유도체의 구조 분석**

[0148] 상기 실시예 1 내지 4에서 제조한 히알루론산 유도체의 특성을 관찰하였고 그 결과를 도 3 및 4로서 나타내었다.

[0149] 도 3a 및 3b는 본 실시예에 따라 제조된 히알루론산 유도체 및 비교예의 히알루론산의 FT-IR(Fourier Transform Infrared Spectoscopy) 그래프이다.

[0150] 도 3a에 나타난 결과에 따르면, 히알루론산에 페놀산인 갈산, 카페산, 페룰산이 그래프팅된 것을 확인할 수 있으며, 도 3b에 나타난 결과에 따르면, 히알루론산에 니신이 그래프팅된 것을 확인할 수 있다.

[0151] 도 4a는 비교예의 히알루론산, 도 4b 내지 4e는 본 실시예에 따라 제조된 히알루론산 유도체의 히알루론산의 핵자기공명(nuclear magnetic resonance, NMR) 그래프이다.

[0152] 구체적으로, 도 4b는 실시예 1, 도 4c는 실시예 2, 도 4d는 실시예 3, 도 4e는 실시예 4의 히알루론산 유도체의

핵자기공명(nuclear magnetic resonance, NMR) 그래프이다.

[0153] 도 4에 나타난 결과에 따르면, 비교예인 히알루론산 유도체는 7 ppm 부근에서 피크(peak)들이 나타나지 않았으나, 도 4b 내지 4e를 보면, 그래프팅된 이후 7 ppm 부근에서 피크들이 나타나는 것을 통해서 그래프팅이 잘 이루어졌음을 확인할 수 있다.

[0154] 그래프팅의 효율을 측정하여 하기 표 1로서 나타내었다.

표 1

[0155]

시료	그래피팅 효율(mg/g 시료)(%)
실시예 1	62.6±0.86
실시예 2	94.2±0.44
실시예 3	15.6±0.63
실시예 4	80.6±1.2

[0156] 상기 표 1에 나타난 결과에 따르면, 갈산의 그래프팅 효율은 62.6%, 카페산의 그래프팅 효율은 94.2%, 페룰산의 그래프팅 효율은 15.6% 니신의 그래프팅 효율은 80.6%인 것으로 확인할 수 있다.

[0157] 제타 전위(Zeta potential)을 측정하기 위해 상기 실시예 1 내지 4와 비교예의 히알루론산 각각을 0.5 mg/ml의 농도로 증류수(Milli-Q)에 용해하여 실온에서 24시간 동안 방치 후 0.1 M KOH를 이용하여 pH 5.5로 조정하였다. 25℃의 온도에서 Zetasizer Nano-S(Malvern Instruments, Malvern)를 이용하여 3회 측정 후 평균 값으로 제타 전위를 구하였다. 상기 제타 전위를 하기 표 2로서 나타내었다.

표 2

[0158]

시료	제타 전위(mV)			
	1회	2회	3회	평균
비교예	-68.4	-70.2	-67.0	-68.5±1.6
실시예 1	-55.5	-50.0	-49.9	-51.8±3.2
실시예 2	-64.3	-55.8	-58.7	-59.6±4.3
실시예 3	-59.6	-58.2	-58.4	-58.7±0.8
실시예 4	-54.2	-52.3	-58.1	-54.9±3.0

[0159] 상기 표 2에 나타난 결과에 따르면, 비교예의 값이 가장 낮은 -68.5 mV로 나타났고, 실시예 1은 -51.8 mV, 실시예 2는 -59.6 mV, 실시예 3은 -58.7 mV, 실시예 4는 -54.9 mV로 나타났다. 일반적으로 전위차의 절대값이 클수록 분산상태가 좋으며, 분자의 크기가 작은 것으로 볼 수 있다. 즉, 실시예는 그래프팅 되면서 분자의 크기가 커져 전위차의 절대값이 작아진 것으로 볼 수 있다.

[0160] **2. 히알루론산 유도체의 항균활성 분석**

[0161] 녹농균(Pseudomonas aeruginosa)(-), 황색포도상구균(Staphylococcus aureus)(+), 장염균(Salmonella enteritidis)(-) 및 대장균(Escherichia coli)(-)의 그람 양성 또는 음성 균에 대한 항균활성을 검정하였다.

[0162] 항균성 시험을 위해 배지(nutrient broth)에서 중균하여 두었다가 10^9 CFU/ml 농도로 희석한 균 배양액 1 ml를 표준 한천 배지(plate count agar, PCA)에 접종하여 항균성 모니터링에 사용하였다. 실시예 1 내지 4 및 비교예의 용액을 각각 일정량 취하여 직경 0.8 cm의 페이퍼 디스크에 흡습시킨 후 이를 건조하여 고초균 배양액을 넣어 굳힌 PCA 페트리 디쉬에 부착시킨 후 30℃의 온도에서 24시간 동안 배양하여 생육 저지원의 형성 유무 및 크기를 측정하였다.

[0163] 도 5는 본 실시예에 따라 제조된 히알루론산 유도체 및 비교예의 히알루론산에 대한 항균성을 확인한 사진이다.

[0164] 균에 대한 활성을 하기 표 3으로서 나타내었다.

표 3

[0166]

세균주		시료				
	농도	비교예	실시예 1	실시예 2	실시예 3	실시예 4
녹농균	10 μg	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
	20 μg	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
	30 μg	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
황색포도상구균	10 μg	(-)	(+)(8.0mm)	(+)(8.0mm)	(+)(8.0mm)	(+)(10mm)
	20 μg	(-)	(+)(8.5mm)	(+)(8.5mm)	(+)(8.5mm)	(+)(11mm)
	30 μg	(-)	(+)(9.0mm)	(+)(9.0mm)	(+)(9.0mm)	(+)(12mm)
장염균	10 μg	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
	20 μg	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
	30 μg	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
대장균	10 μg	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
	20 μg	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
	30 μg	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)

[0167] 상기 도 5 및 표 3에 나타난 결과에 따르면, 물메기 알에서 추출된 히알루론산 유도체의 농도에 따른 항균활성을 측정한 결과 히알루론산은 항균활성을 나타내지 않았고, 표 3에 나타난 바와 같이 황색포도상구균에서는 히알루론산의 유도체 10, 20 및 30 ug의 농도에서 각각의 유도체들이 농도에 따른 항균활성을 나타내었으며, 10 ug에서도 충분한 항균활성을 보여주었다. 즉, 히알루론산에 페놀산 또는 니신을 그래프팅하면서 항균활성을 나타낸 것을 확인할 수 있다.

[0168] **3. 히알루론산 유도체의 항염증 활성 분석**

[0169] 염증은 생체나 조직에 물리적 작용이나 화학적 물질, 세균 감염 등의 어떠한 기질적 변화를 가져오는 침습이 가해질 때 그 손상부위를 재생하려는 기전으로서 염증반응이 지속적으로 또는 과도하게 일어나면 여러 염증성 질환이나 다양한 질환의 원인이 된다. 식균작용(phagocytosis)은 선천성, 적응성 면역반응으로 병원균 감염에 대한 첫 번째 방어라인으로 작용한다. 식균작용이 일어날 때 대식세포의 막이 항원을 완전히 둘러싸서 식포(phagosome)가 되면 상기 대식세포의 안으로 들어가서 리소좀(lysosome)과 융합되어 파골라이소좀(phagolysosome)을 형성하여 안에 있는 항원을 분해한다. 또한 식균작용은 염증 매개체의 분비와 항원의 침입으로 인해 자극된다. 따라서 염증 매개체의 분비가 증가할수록 식균작용도 증가하므로 만성적으로 지속되는 염증을 억제하기 위해서는 식균작용을 억제시켜야 한다.

[0170] 3.1 대식세포에서의 세포 독성 확인

[0171] 한국세포주은행(KCLB)에서 세포주(RAW264.7)을 분양받아 사용하였다. 배지는 10% 페탈 보빈 세럼(Fetal Bovine Serum, FBS) 배지(medium)를 함유한 성장배지를 이용하였다. 상기 세포주를 습도 95%, 이산화탄소 5%, 37℃의 온도로 조절된 배양기에서 배양하였으며, 이 때 미생물의 오염이나 증식을 억제하기 위해 배지용 항생지(Penicillin streptomycin, Gibco, CA, USA)를 사용하였다. 상기 세포주가 디쉬(dish)를 80% 정도 덮으면 완충용액(phosphated-buffered saline-EDTA, PBS-EDTA)으로 세척한 후 배지 1 ml 내지 2 ml를 디쉬에 분주한 후 스크래퍼(scrapper)를 이용하여 상기 디쉬 바닥에 부착되어있는 상기 세포를 긁어서 떼어내 계대 배양하였으며, 배지는 48 시간마다 교환하여 세포를 배양하였다.

[0172] 상기 세포주의 생존율은 MTS (CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay, Promega, USA)시약을 이용하여 세포의 생존율을 측정하였다. 상기 시약 1 ml에 배지(DMEM high glucose, free FBS) 9 ml을 넣어 희석한 후 시료처리가 완료된 웰(well) 당 실시예 1 내지 4에 따라 제조한 히알루론산 유도체를 각각 100 ul씩 처리하였다. 37℃에서 60 분간 반응 후 마이클로플레이트 리더(microplate reader)(Molecular Devices, VersaMax ELISA Microplate Reader, USA)를 이용하여 490 nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포의 생존율은 시료를 처리하지 않은 대조군에 대비한 시료 처리군의 흡광도로 표시하였다.

[0173] 도 6은 본 실시예에 따라 제조된 히알루론산 유도체의 세포주의 생존율을 나타낸 그래프이다.

[0174] 도 6에 나온 결과값을 하기 표 4로서 정리하여 나타내었다.

표 4

[0175]

시료 농도 (㎍/ml)	실시예 2	실시예 3	실시예 1	실시예 4
1	99.4 ± 1.6	100.7 ± 2.6	98.7 ± 3.4	97.4 ± 1.0
10	99.1 ± 0.7	99.6 ± 2.4	95.9 ± 3.7	98.7 ± 1.2
50	101.0 ± 0.9	98.8 ± 1.0	98.7 ± 1.4	101.1 ± 3.6
100	98.9 ± 1.6	100.4 ± 1.1	100.8 ± 0.7	100.4 ± 3.1
200	100.5 ± 0.4	103.1 ± 1.8	100.9 ± 3.2	-

[0176] 상기 도 6 및 표 4에 나타난 결과에 따르면, 실시예에 따라 제조된 히알루론산 유도체는 모든 농도에서 대식세포에 대한 독성을 나타내지 않는 것으로 확인되었다.

[0177] 3.2 대식세포에서의 산화질소(Nitric Oxide, NO) 활성 확인

[0178] 대식세포는 선천면역뿐만 아니라 획득면역 등 다양한 숙주반응에 관여하여 항상성 유지에 관여하는 것으로 알려져 있으며, 염증반응 시에는 NO와 사이토카인(cytokine)을 생산하여 감염초기에 생체방어에 중요한 역할을 한다. 뿐만 아니라 대식세포는 사이토킨을 생산하여 감염초기에 생체방어에 중요한 역할을 한다

[0179] 염증 상태에서 iNOS에 의해 과잉 생산된 NO는 혈관 투과성, 부종 등의 염증 반응을 촉진시킬 뿐만 아니라 염증매개체의 생합성을 촉진하여 염증을 심화시키는 것으로 알려져 있다.

[0180] 대식세포주에 LPS(Lipopolysaccharide)를 처리한 군의 NO 생성량에 대한 대식세포주에 LPS와 함께 상기 실시예 1 내지 4에서 제조한 히알루론산 유도체를 처리한 군의 NO의 생성량을 측정하여 상기 히알루론산 유도체의 NO 생성 저해 효능을 측정하였다.

[0181] 구체적으로, 대식세포(RAW 264.7) 세포주를 96 well에 분주한 후 상기 세포가 바닥의 약 80% 이상 자랄 때까지 배양하였다. 염증을 유발하기 위해 LPS를 1 ug/ml의 농도로 처리하였다. 시료의 항염증 효능을 확인하기 위해 LPS 와 함께 상기 실시예 1 내지 4에서 제조한 히알루론산 유도체를 알맞은 농도로 배지에 녹여 24시간동안 배양하였다.

[0182] NO 생성량은 그리스(Griess) 시약을 사용하여 측정하였다. 상기 그리스 시약은 2.5%의 인산염(phosphate) 용액에 1% 설파닐아미드(sulfanilamide)와 0.1% 나프틸렌-디아민-디하이드로클로라이드(naphthylethylene-diamine-dihydrochloride)를 혼합하여 만들었다. 상기 배양한 세포의 상등액 50 ul를 96 well plate에 취하고 여기에 상기 그리스 시약 50 ul를 가해 15분 동안 실온에서 반응시킨 후 마이크로플레이트 리더(microplate reader)(Molecular Devices, VersaMax ELISA Microplate Reader, USA)를 이용하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다.

[0183] 도 7은 본 실시예에 따라 제조된 히알루론산 유도체의 NO의 생산량을 나타낸 그래프이다.

[0184] 도 7에 나타난 결과에 따르면, 실시예 1 내지 3에 따라 제조된 히알루론산 유도체의 농도가 증가함에 따라 NO의 함량이 감소하는 것을 확인할 수 있다. 이는 대식세포가 탐식하는 작용을 감소시켜 만성적으로 일어나는 염증을 억제시키는 것이다. 반면, 실시예 4에 따라 제조된 히알루론산 유도체의 경우 농도가 증가함에 따라 NO의 함량이 증가하였다. 일반적으로 NO의 형성은 박테리아를 죽이거나 종양을 제거시키는 중요한 역할을 한다. 즉, 니신과 그래프팅한 히알루론산 유도체의 경우, 대식세포에서 면역증진에 기여하는 NO를 활성화시키는 효능을 나타내는 것이다.

[0185] 3.3 대식세포에서의 프로스타클란딘 E2(Prostaglandin, PGE2)의 활성 확인

[0186] PGE2는 통증, 발열에 관여하는 염증 매개체로 염증반응과 면역반응에 관여하고 신생혈관(angiogenesis)을 촉진시켜 암 발생 등에 깊이 관여하고 있는 것으로 알려져 있다.

[0187] PGE2의 측정은 PGE2 EIA Kit를 Cayman Chemical Company(Ann Arbor, Michigan, USA)에서 구매하여 사용하였으며, 측정 방법은 제조회사의 분석방법에 따라 정량하였다. 즉, 대식세포(RAW 264.7 세포)에 상기 실시예 1 내지 4에서 제조한 히알루론산 유도체와 LPS (1 ug/ml)를 24시간 전 처리 후 세포 배양 상층액을 PGE2 측정에 사용하였다. 배양액을 goat anti-mouse로 코팅된 96well plate에 각각 배양액을 50 ul씩 첨가하였다. 이 후 프라이머리 안티바디 용액(primary antibody solution) 50 ul와 PGE2 콘쥬게이트(conjugate) 50 ul씩 첨가하여 4℃에서

18시간 동안 반응시킨 후, 완충용액(Washing buffer)으로 5회 세척 한 후 Ellman's 시약을 200 ul씩 처리하여 60분 내지 90분간 교반하면서 반응 시킨 후, 405-420 nm에서 흡광도를 측정하였다.

[0188] 도 8은 본 실시예에 따라 제조된 히알루론산 유도체의 PGE2 생산량을 나타낸 그래프이다.

[0189] 도 8에 나타난 결과를 하기 표 5로서 나타내었다.

표 5

[0190]

시료 농도 (㎍/ml)	LPS (1 ㎍/ml)	PGE2 (pg/ml)			
		실시예 2	실시예 3	실시예 1	실시예 4
-	-	77.5 ± 7.8*			
-	+	348.8 ± 4.8			
1	+	245.9 ± 8.9*	288.6 ± 13.4*	329.4 ± 4.8	320.4 ± 11.9
10	+	164.1 ± 16.9*	170.5 ± 18.6*	313.4 ± 8.5*	387.7 ± 0.4*
50	+	82.0 ± 2.6*	109.4 ± 11.3*	257.5 ± 14.5*	417.4 ± 5.1*
100	+	67.5 ± 10.3*	88.1 ± 4.0*	164.0 ± 11.7*	458.3 ± 7.4*
200	+	41.8 ± 7.5*	37.4 ± 0.6*	54.0 ± 5.4*	-

[0191] 도 8 및 표 5에 나타난 결과에 따르면, LPS로 자극된 대식세포에서 실시예 1 내지 3에 따라 제조된 히알루론산 유도체의 농도가 증가함에 따라 PGE2의 생성을 억제하는 것으로 나타났다. 이는 NO의 생산량과 유사한 결과를 보이는 것이며, 대식세포가 탐식하는 작용을 감소시켜 만성적으로 일어나는 염증을 억제시키는 것이다. 반면, 실시예 4에 따라 제조된 히알루론산 유도체는 농도가 증가함에 따라 PGE의 함량이 증가하였다. 즉, 니신과 그래프팅한 실시예 4의 경우 대식세포에서 NO와 PGE2의 생성을 촉진시키는 효능을 보여준다.

[0192] **4. 히알루론산 유도체의 항산화 활성 분석**

[0193] 4.1 DPPH(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) 라디칼 소거능 확인

[0194] 생체 내의 물질대사에 의하여 활성산소가 발생하지만 이는 체내의 항산화 시스템에 의하여 제거된다. 하지만 스트레스 등에 의하여 과다하게 발생하는 활성산소는 세포막에 있는 불포화지방산과 결합하여 지질과 산화를 야기하여 세포 내 구조적, 기능적 피해를 준다. 이러한 지질과 산화를 일으키는 자유라디칼에 전자를 공여하여 산화를 억제하는 능력인 DPPH의 전자공여능을 측정하는 방법을 이용하여 천연물질의 항산화 활성을 조사하는 방법이 많이 이용되고 있다.

[0195] DPPH는 짙은 자색을 띄는 화학적으로 유도되는 비교적 안정한 radical로서, 항산화 물질에 의해 전자를 공여 받으면 환원되어 고유의 자색이 엷어지면서 노란색으로 탈색되는 성질을 가지고 있다. 일종의 전자공여능을 측정하는 방법으로 DPPH의 환원 정도를 기준으로 측정물질의 환원력과 항산화력을 측정할 수 있다.

[0196] 96well plate의 콘트롤(control)에는 추출한 용매를 12 ul, 시험군에는 상기 실시예 1 내지 4에 따라 제조된 히알루론산 유도체를 12 ul 씩 각각 넣었다. 상기 모든 well에 에탄올을 6 ul씩 넣은 후 222 ul의 DPPH (0.03 mM 1,1-diphenyl-2-picrylhy- drazy l(DPPH)/ethanol) 용액을 가하여 혼합하였다. 25℃의 실온에서 30분 동안 반응시킨 후 517 nm에서 흡광도를 측정하였다. 용매만을 첨가한 대조군에 대한 추출물의 라디칼 소거능을 백분율로 나타내었다. DPPH 라디칼 소거활성은 하기 수학식 1로서 구할 수 있다.

수학식 1

[0197]

$$\text{DPPH 라디칼 소거활성}(\%) = \frac{1 - \text{시료 첨가시의 흡광도}}{\text{대조구 흡광도}} \times 100$$

[0198] 도 9는 본 실시예에 따라 제조된 히알루론산 유도체의 DPPH 라디칼 소거활성을 나타낸 그래프이다.

[0199] 하기 표 6은 실시예에 따라 제조된 히알루론산 유도체의 라디칼이 50% 저해되는 농도(IC_{50})를 나타낸 것이다.

표 6

[0200]

	실시예 2	실시예 3	실시예 1	실시예 4
IC_{50} (mg/ml)	8.5	19.1	8.3	47.5

[0201] 도 9 및 표 6에 나타난 결과에 따르면, DPPH 라디칼 소거활성은 니신보다는 페놀산을 그래프팅화한 실시예 1 내지 3의 활성이 높은 것으로 나타났다.

[0202] 4.2 ABTS(2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid)) 라디칼 소거능 확인

[0203] ABTS를 페록시다아제(peroxidase), 과산화수소(H_2O_2)와 반응시켜 활성 양이온인 ABTS를 형성하여 항산화에 의한 소거작용을 측정하는 것이며, 유리기들(hydroxyl, peroxyl, alkoxyl, inorganic radical)과 반응하여 상대적으로 안정한 활성 양이온 ABTS+ 를 형성하게 된다.

[0204] 7 mM ABTS 5 mL와 140 mM 과황산칼륨(potassium persulfate) 88 ㎕를 섞은 후 상온에서 16 시간 빛을 차단하여 ABTS 양이온을 형성시켰다. 이후 이 용액을 414 nm에서 흡광도 값이 1.5가 되도록 PBS로 희석하였다. 상기 조제된 희석용액 190 ul와 상기 실시예 1 내지 4에 따라 제조한 히알루론산 유도체 10 ul를 각각 혼합한 후 상온에서 6분간 반응시킨 후 734 nm에서 흡광도를 측정하였다. 용매를 대조군으로 하여 대조군에 대한 라디칼 소거능을 백분율로 나타내었다. ABTS 라디칼 소거활성은 하기 수학식 2로서 구할 수 있다.

수학식 2

[0205]
$$\text{ABTS 라디칼 소거활성}(\%) = \frac{\text{대조구 흡광도} - \text{시료 첨가시의 흡광도}}{\text{대조구 흡광도}} \times 100$$

[0206] 도 10은 본 실시예에 따라 제조된 히알루론산 유도체의 ABTS 라디칼 소거활성을 나타낸 그래프이다.

[0207] 하기 표 7은 실시예에 따라 제조된 히알루론산 유도체의 라디칼이 50% 저해되는 농도(IC_{50})를 나타낸 것이다.

표 7

[0208]

	실시예 2	실시예 3	실시예 1	실시예 4
IC_{50} (mg/ml)	0.5	0.4	0.6	17.4

[0209] 도 10 및 표 7에 나타난 결과에 따르면, 본 실시예에 따라 제조된 히알루론산 유도체는 상기 DPPH 라디칼 소거활성보다 ABTS의 소거 활성 효과가 더 좋은 것으로 나타났다. ABTS 라디칼 소거능은 유리기들과 반응하여 만들어진 활성 양이온 ABTS+가 항산화물질에 의해 환원되어 얼마나 소거되는지를 흡광도를 이용하여 측정하는 것이다. DPPH는 주로 소수성 물질의 항산화능을 측정하는데 비해 ABTS는 친수성과 소수성 물질의 항산화능을 다 측정할 수 있다는 차이가 있다. 따라서 본 실시예에 따라 제조된 히알루론산 유도체의 항산화능은 소수성 물질보다 친수성 물질에서 기인되는 것이다.

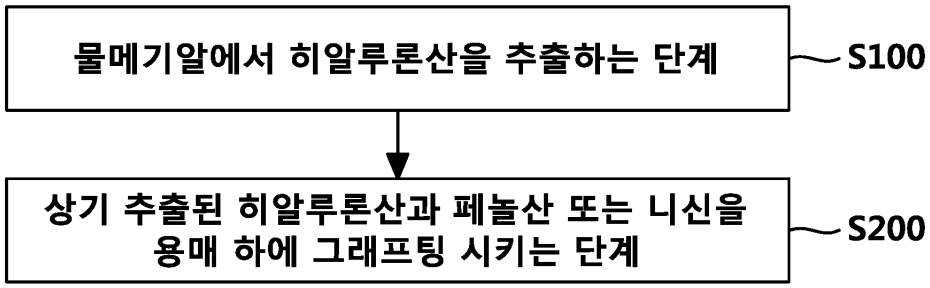
[0210] 상기 실시예를 분석한 결과에 따르면, 본 실시예에 따라 제조된 히알루론산 유도체는 항균 활성, 항염증 활성, 항산화 활성을 나타내고 있는 것을 확인할 수 있다. 이는 히알루론산에 페놀산 또는 니신을 그래프팅화함으로써 종래의 히알루론산에서는 나타나지 않거나 효율이 떨어지는 기능이 부가된 것으로 볼 수 있다. 즉, 본원에 따른 히알루론산 유도체를 화장품 조성물, 건강 식품 조성물, 약학 조성물 등에 응용할 수 있다.

[0212] 전술한 본원의 설명은 예시를 위한 것이며, 본원이 속하는 기술분야의 통상의 지식을 가진 자는 본원의 기술적 사상이나 필수적인 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 쉽게 변형이 가능하다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적이 아닌 것으로 이해해야만 한다. 예를 들어, 단일형으로 설명되어 있는 각 구성 요소는 분산되어 실시될 수도 있으며, 마찬가지로 분산된 것으로 설명되어 있는 구성 요소들도 결합된 형태로 실시될 수 있다.

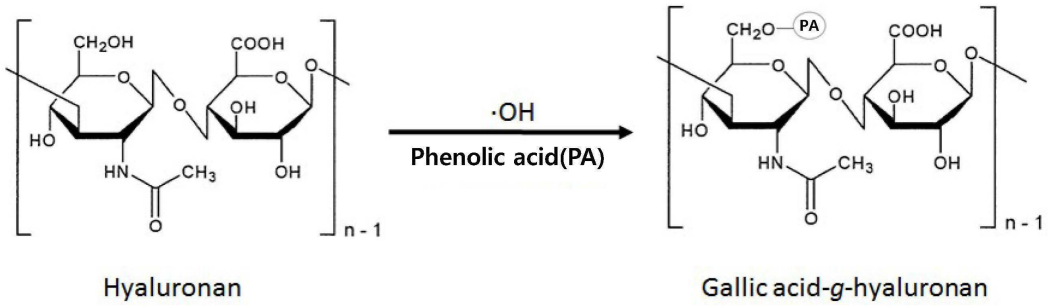
[0213] 본원의 범위는 상기 상세한 설명보다는 후술하는 특허청구범위에 의하여 나타내어지며, 특허청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 균등 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본원의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

도면

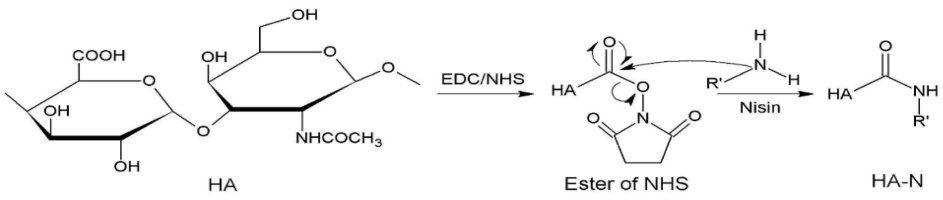
도면1



도면2

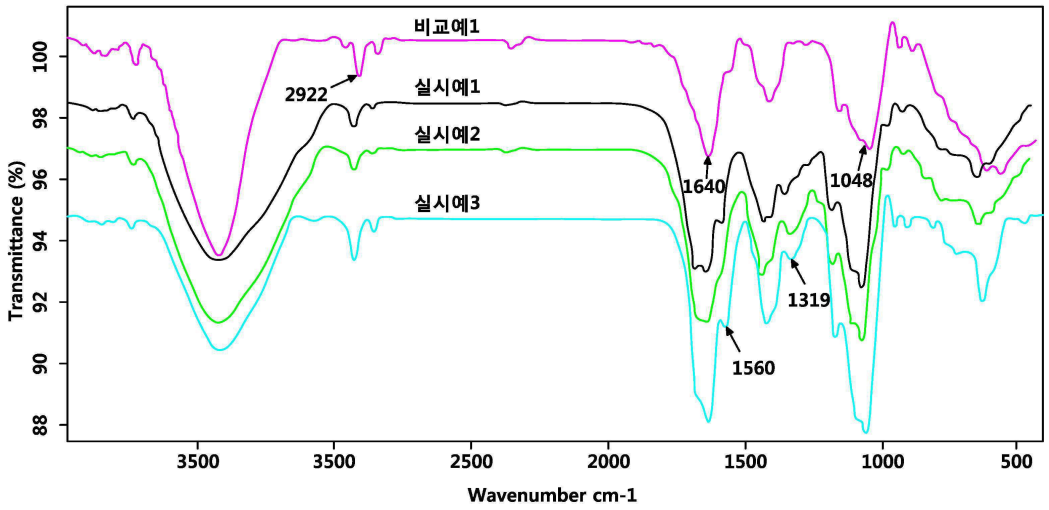


(a)

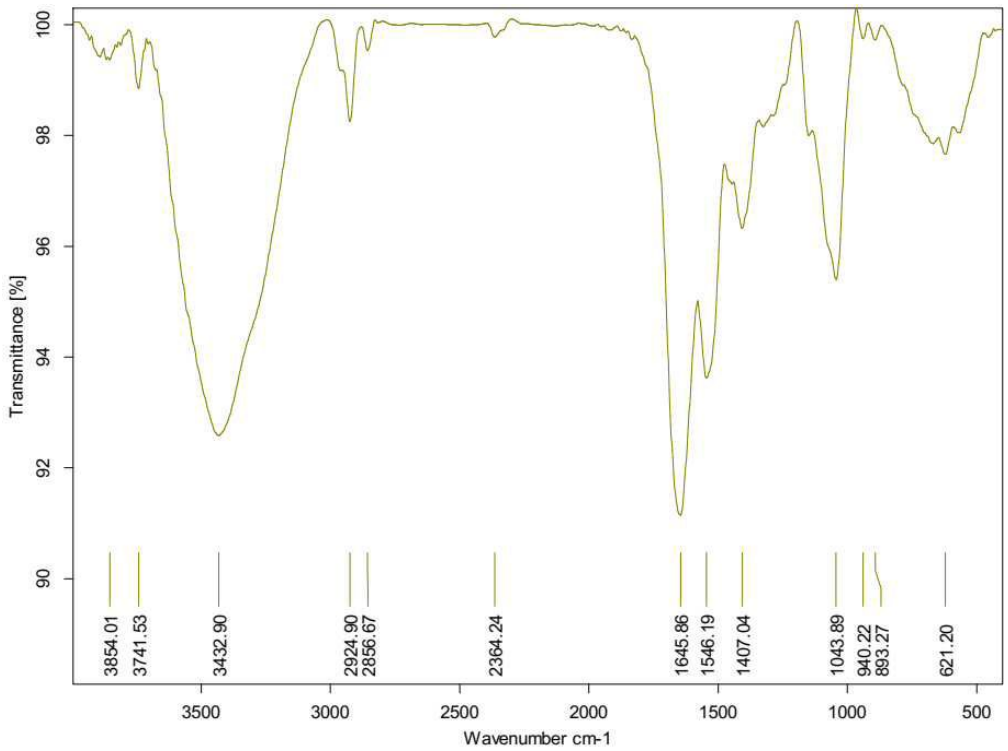


(b)

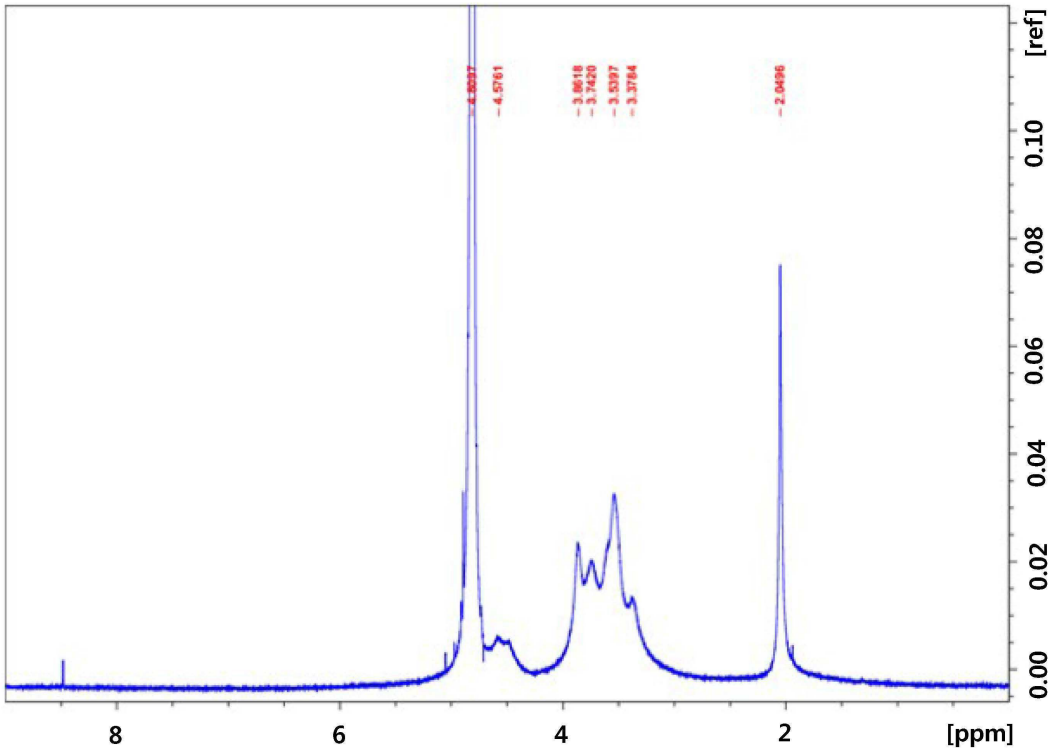
도면3a


비교예1
실시예1
실시예2
실시예3
2922
1640
1048
1319
1560
Transmittance (%)
Wavenumber cm-1

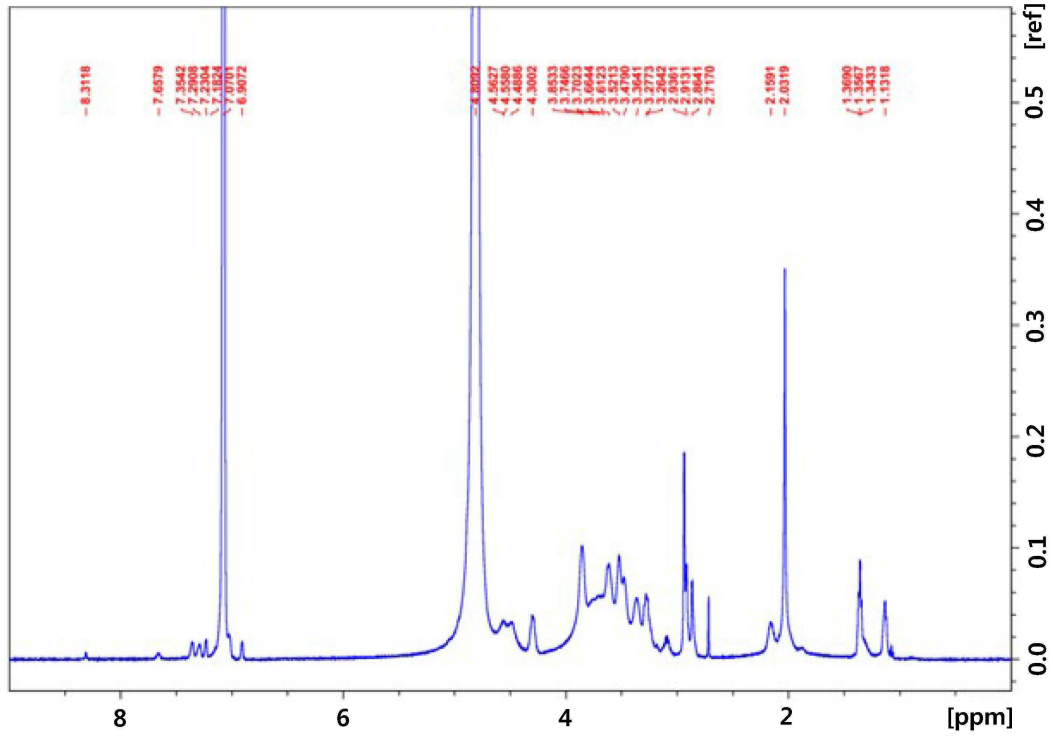
도면3b


Transmittance [%]
Wavenumber cm-1
3854.01
3741.53
3432.90
2924.90
2856.67
2364.24
1645.86
1546.19
1407.04
1043.89
940.22
893.27
621.20

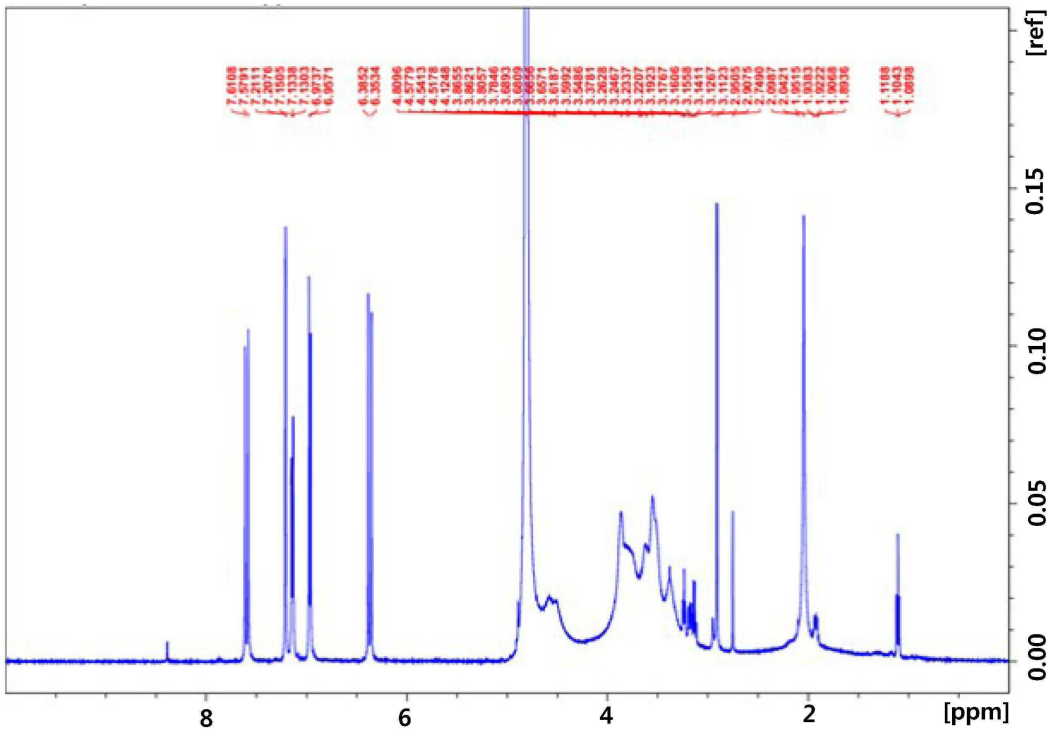
도면4a


4.5761
3.8618
3.7420
3.5397
3.3764
2.0496
[ref]
0.10
0.08
0.06
0.04
0.02
0.00
8
6
4
2
[ppm]

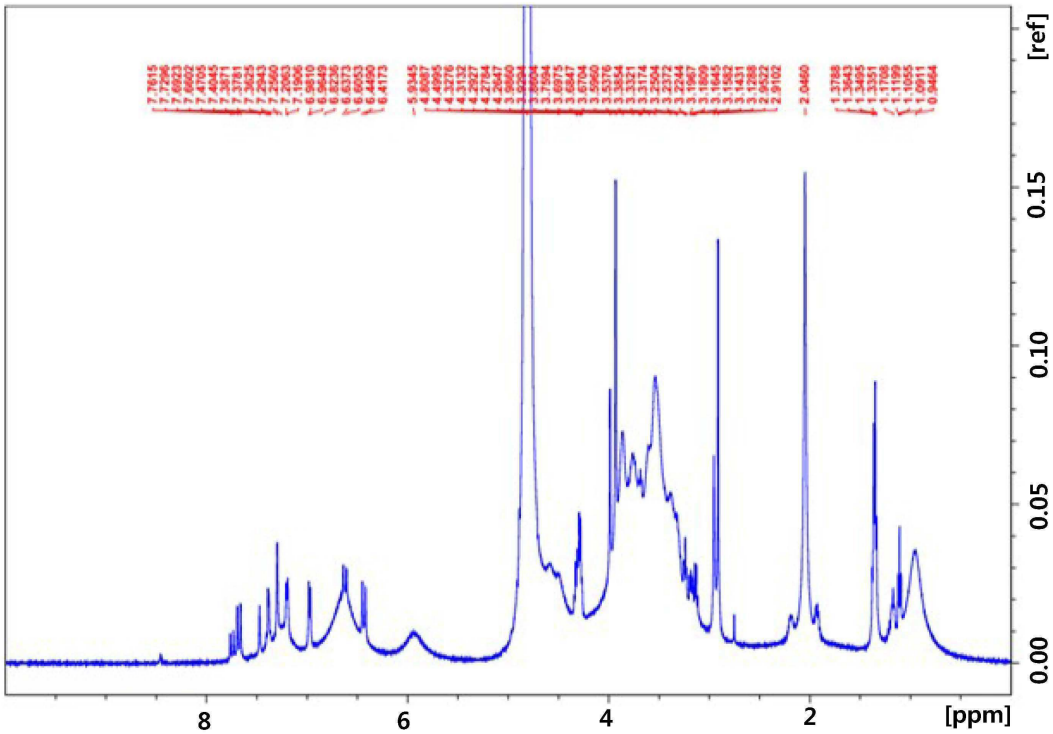
도면4b


8.3118
7.6579
7.3542
7.2908
7.2304
7.1824
7.0701
6.9072
4.5627
4.5580
4.4886
4.3002
3.8533
3.7466
3.7023
3.6644
3.6123
3.5213
3.4790
3.3641
3.2773
3.2544
3.2361
2.9131
2.8641
2.7170
2.1591
2.0319
1.3690
1.3567
1.3453
1.1318
[ref]
0.5
0.4
0.3
0.2
0.1
0.0
8
6
4
2
[ppm]

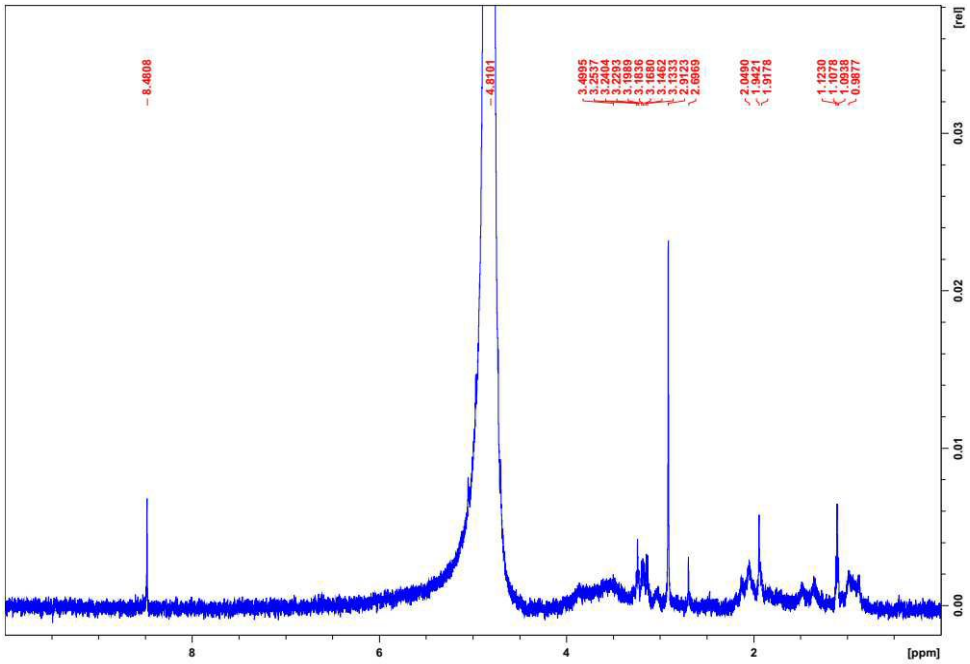
도면4c



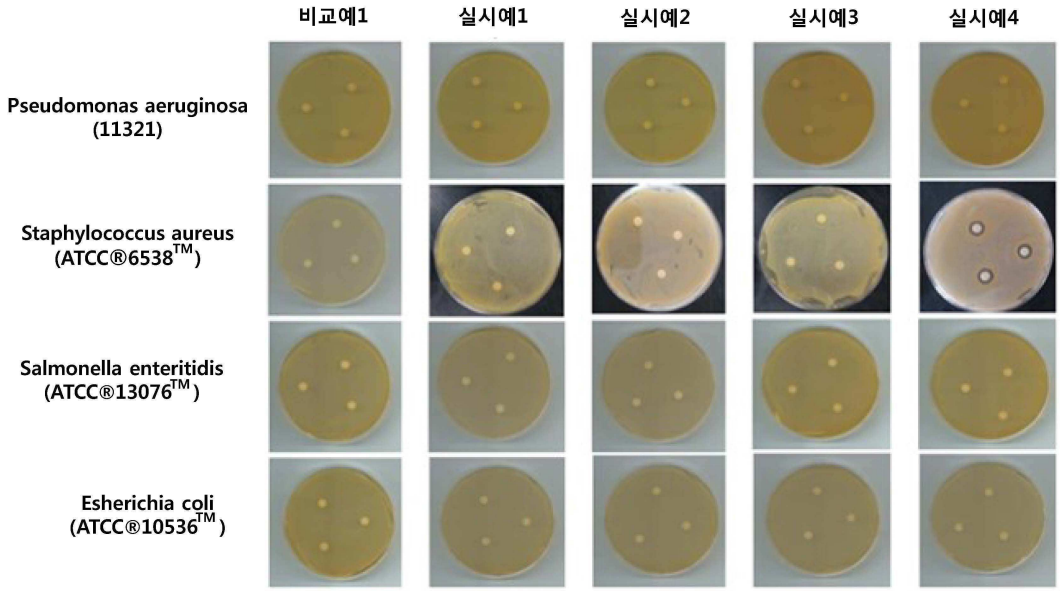
도면4d



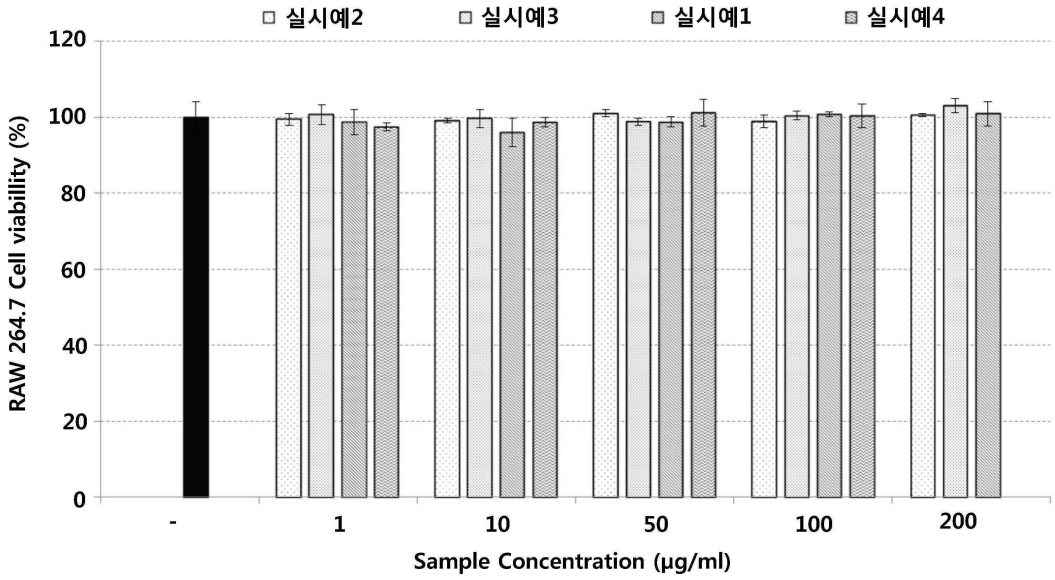
도면4e


8.4808
4.8101
3.4995
3.2537
3.2404
3.2293
3.1969
3.1836
3.1680
3.1462
3.1133
3.0973
2.8969
2.0490
1.9471
1.9778
1.1230
1.1078
1.0938
0.9877
[rel]
0.03
0.02
0.01
0.00
8
6
4
2
[ppm]

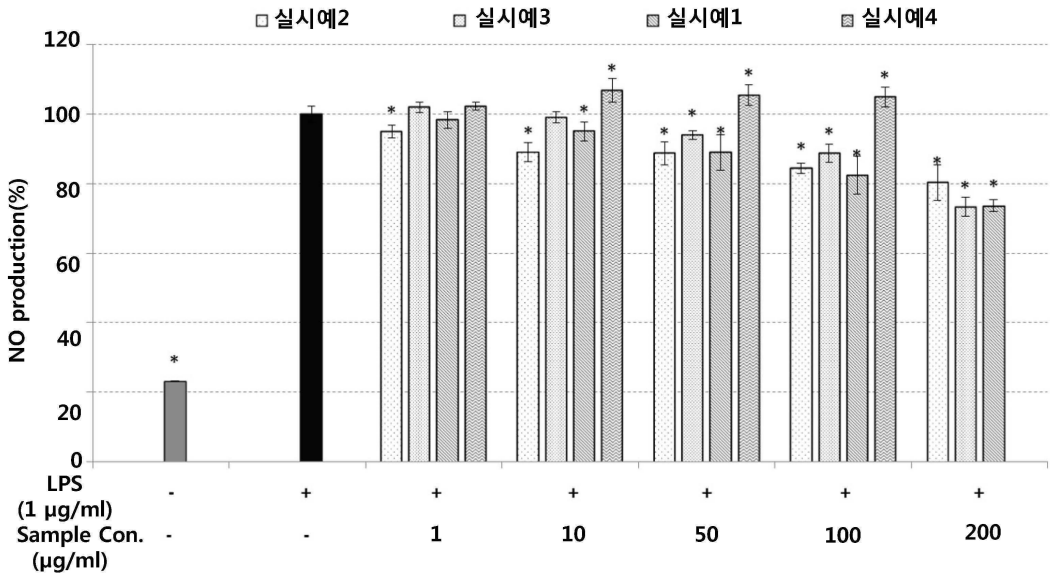
도면5


비교예1
실시예1
실시예2
실시예3
실시예4
Pseudomonas aeruginosa (11321)
Staphylococcus aureus (ATCC®6538™)
Salmonella enteritidis (ATCC®13076™)
Esherichia coli (ATCC®10536™)

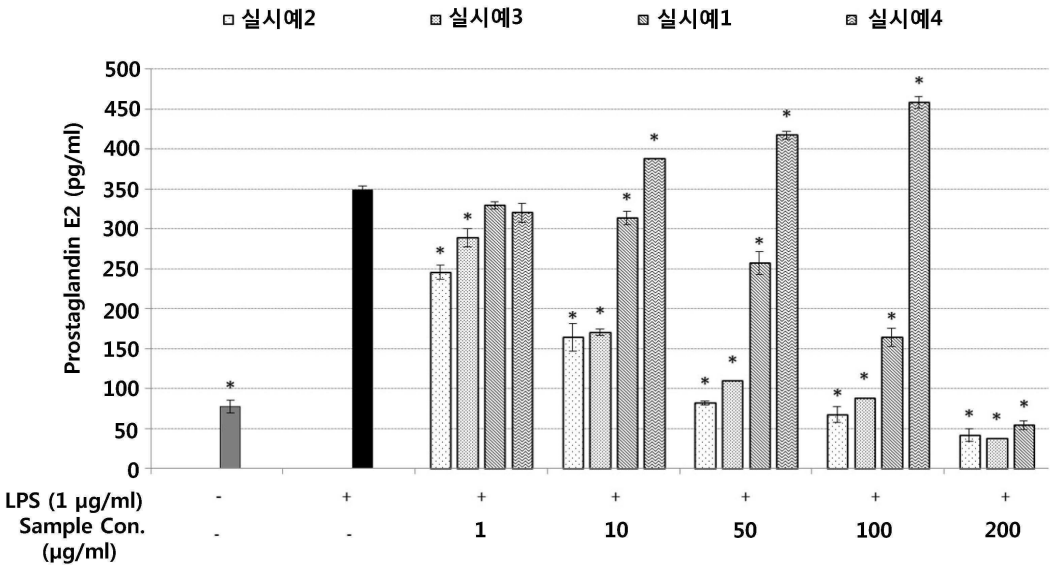
도면6


실시예2
실시예3
실시예1
실시예4
RAW 264.7 Cell viability (%)
120
100
80
60
40
20
0
-
1
10
50
100
200
Sample Concentration (μg/ml)

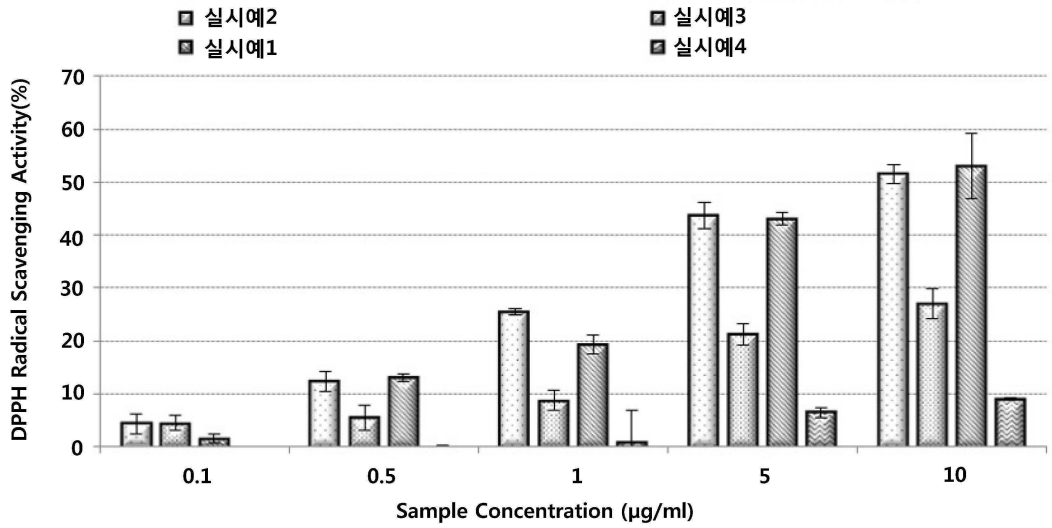
도면7


실시예2
실시예3
실시예1
실시예4
NO production(%)
120
100
80
60
40
20
0
LPS
(1 μg/ml)
Sample Con.
(μg/ml)
-
+
+
+
+
+
+
-
-
1
10
50
100
200

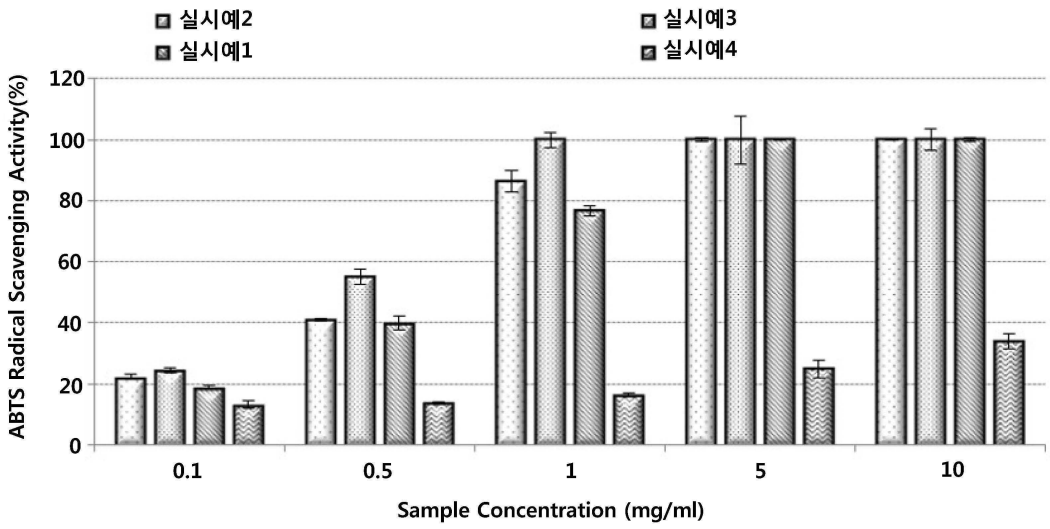
도면8


실시예2
실시예3
실시예1
실시예4
Prostaglandin E2 (pg/ml)
500
450
400
350
300
250
200
150
100
50
0
LPS (1 μg/ml)
Sample Con. (μg/ml)
1
10
50
100
200

도면9


실시예2
실시예1
실시예3
실시예4
DPPH Radical Scavenging Activity(%)
70
60
50
40
30
20
10
0
0.1
0.5
1
5
10
Sample Concentration (μg/ml)

도면10


실시예2
실시예3
실시예1
실시예4
ABTS Radical Scavenging Activity(%)
120
100
80
60
40
20
0
0.1
0.5
1
5
10
Sample Concentration (mg/ml)