(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2023-0156896
(43) 공개일자 2023년11월15일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12P 19/04 (2006.01) *A61K 8/73* (2006.01)
A61Q 17/04 (2006.01) *A61Q 19/02* (2006.01)
C08B 37/00 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12P 19/04 (2013.01)
A61K 8/73 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2023-0151755(분할)
(22) 출원일자 2023년11월06일
심사청구일자 2023년11월06일
(62) 원출원 특허 10-2022-0137353
원출원일자 2022년10월24일
심사청구일자 2022년10월24일
(30) 우선권주장
1020210141636 2021년10월22일 대한민국(KR)

(71) 출원인
세종대학교산학협력단
서울특별시 광진구 능동로 209 (군자동, 세종대학교)
(72) 발명자
유상호
서울특별시 송파구 양재대로 1218, 242동 302호 (방이동, 올림픽선수기자촌아파트)
임태규
경기도 성남시 분당구 내정로165번길 35, 517동 1605호(수내동, 양지마을한양아파트)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인리채

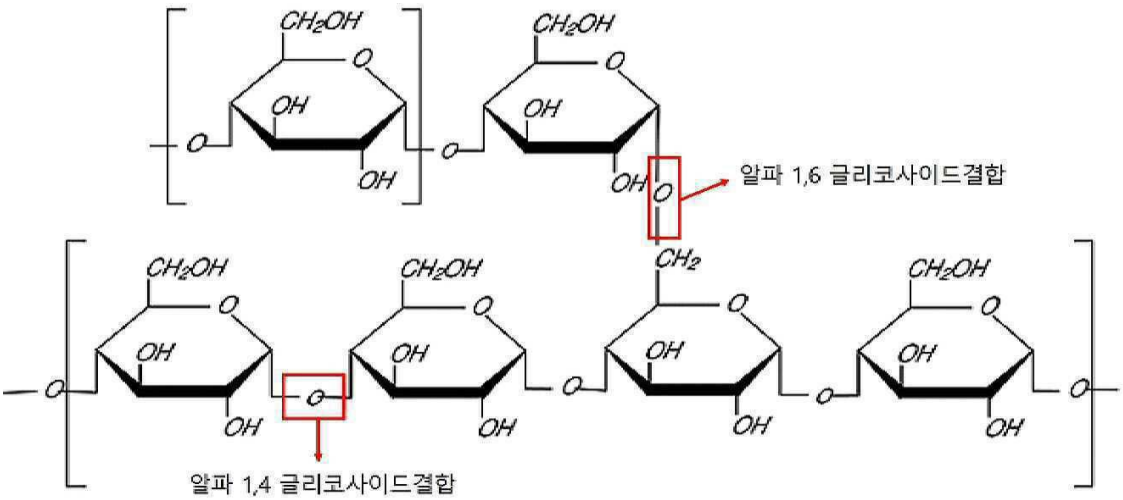
전체 청구항 수 : 총 5 항

(54) 발명의 명칭 **알파-1,4-1,6-글루칸 폴리머를 포함하는 화장료 조성물 및 이의 제조방법**

(57) 요 약

본 발명은 자당을 아밀로수크라아제 및 글리코겐분지효소와 반응시켜 얻은 알파-1,4-1,6-글루칸 폴리머를 포함하는 화장료 조성물 및 이의 제조방법에 관한 것이다. 본 발명의 화장료 조성물은 친환경적이고 우수한 자외선차단능을 가지며, 우수한 피부 미백능을 가지고 있다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류
A61Q 17/04 (2013.01)
A61Q 19/02 (2013.01)
C08B 37/0009 (2013.01)
C12Y 204/01004 (2013.01)
C12Y 204/01018 (2013.01)
A61K 2800/805 (2013.01)

(72) 발명자
박상동
경기도 성남시 분당구 판교역로 109, B동 405호(백현동)

윤혜지
서울특별시 동대문구

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1395072696
과제번호	PJ015894012022
부처명	농촌진흥청
과제관리(전문)기관명	농촌진흥청
연구사업명	미생물활용농업환경문제개선기술개발
연구과제명	효소활성 제어 소재 발굴 및 제어 기작 구명 연구(1주관)
기 여 율	1/1
과제수행기관명	세종대학교 산학협력단
연구기간	2022.01.01 ~ 2022.12.31

명 세 서

청구범위

청구항 1

포도당의 α(1→4) 글리코사이드 결합으로 연결된 직쇄와, 상기 직쇄에 포도당의 α(1→6) 글리코사이드 결합으로 연결된 분지쇄를 포함하고,

평균 분자량이 1×10^{5} 내지 1×10^{7} g/mol인 알파-1,4-1,6-글루칸 폴리머.

청구항 2

청구항 1에 있어서, 상기 평균 분자량은 1×10^{5} 내지 5×10^{5} g/mol인 알파-1,4-1,6-글루칸 폴리머.

청구항 3

청구항 1에 있어서, 회전 반경이 33 내지 40 nm인 알파-1,4-1,6-글루칸 폴리머.

청구항 4

청구항 1에 있어서, 겉보기 밀도가 0.8 내지 3 $g\cdot mol^{-1}\cdot nm^{-3}$인 알파-1,4-1,6-글루칸 폴리머.

청구항 5

청구항 1에 있어서, 중합도(DP)가 다음 표의 1 내지 10 중 어느 하나의 분포를 갖는 알파-1,4-1,6-글루칸 폴리머:

[표]

구분	DP≤5	DP 6-12	DP 13-24	DP 25-36	DP ≥ 37
1	9.43±0.07	58.23±0.77	18.99±0.30	8.05±0.20	5.30±0.35
2	13.37±0.04	71.84±0.18	13.29±0.23	1.38±0.01	0.11±0.01
3	15.03±0.13	72.74±0.26	11.41±0.11	0.84±0.01	-
4	16.31±0.02	72.94±0.21	10.16±0.16	0.62±0	-
5	16.80±0.09	73.95±0.01	9.06±0.10	0.19±0.01	-
6	16.99±0.11	73.90±0.06	8.87±0.06	0.24±0.01	-
7	17.54±0	73.85±0.04	8.45±0.05	0.17±0.01	-
8	18.19±0.19	73.54±0.08	8.10±0.11	0.17±0.01	-
9	18.58±0.03	73.48±0.02	7.77±0.04	0.15±0.01	-
10	18.60±0.12	73.76±023	7.53±0.06	0.10±0.01	-

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 알파-1,4-1,6-글루칸 폴리머를 포함하는 화장료 조성물에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0003] 다당류는 살아있는 시스템에서 가장 풍부하게 존재하는 거대 분자 중 하나이며, 세포벽의 구성 요소이자, 수송, 접착, 면역 반응 및 에너지 저장과 같은 다양한 기능을 갖고 있다. 글리코겐은 박테리아, 균류, 동물 및 식물에 있는 포도당 저장소의 과분지형 호모다당류이다. 천연 자원에서 분리된 글리코겐은 약 10^{7}-10^{9} g · mol^{-1}의 분자량을 가지며, α-1,4-1,6-글리코사이드 결합으로 연결된 D-포도당 잔기의 사슬 골격으로 구성된다.

[0004] 글리코겐의 구성은 다른 하이드로콜로이드에 비해 생체 적합성, 생분해성 및 수용성이 매우 높은 장점이 있으나, 일반적으로 동물 조직의 글리코겐 함량이 매우 낮으며, 동물 조직에서 글리코겐을 추출하는 것이 비경제적이다. 따라서 동물 유래 글리코겐을 생산하는 데는 한계가 있으므로 다양한 합성 방법이 연구되어 왔으며, 아밀로수크라아제와 글리코겐분지효소를 이용하여 전술한 α-1,4-1,6-글리코사이드 결합을 갖는 글리코겐과 유사한 입자를 제조할 수 있다.

[0005] 자외선(UV)은 인간의 피부를 손상시킬 수 있는 환경적 스트레스 요인 중 하나이다. 자외선(100-400 nm)은 파장에 따라 UVA, UVB, UVC로 구분된다. 특히, UVB(280-320 nm)는 표피층에 흡수되어 피부를 손상시키는 주요 인자이다(Piao, M. J., Hyun, Y. J., Cho, S. J., Kang, H. K., Yoo, E. S., Koh, Y. S., Hyun, J. W. (2012). An ethanol extract derived from Bonnemaisonia hamifera scavenges ultraviolet B (UVB) radiation-induced reactive oxygen species and attenuates UVB-induced cell damage in human keratinocytes. Marine drugs, 10(12), 2826-2845.). UVA(320-400 nm)는 피부 깊숙이 침투하여 주름 형성과 피부 노화를 일으킨다. 따라서 자외선으로 인한 건강 문제를 예방하기 위해서는 자외선 차단제를 통해 자외선을 차단하는 것이 중요하다. 그러나 현재 자외선 차단제 성분으로 널리 사용되는 옥시벤존(2-히드록시-4-메톡시벤조페논)은, 많은 연구에서 옥시벤존 및 옥티녹세이트와 같은 화학 물질이 건강과 환경에 해로울 수 있다고 밝혀져 문제가되고 있다. 미국 환경단체 EWG에 따르면 접촉성 피부염이나 호흡기 장애가 생길 위험이 있고, 남성 호르몬인 테스토스테론 감소를 일으켜 성인 남성의 호르몬 불균형이나 여성의 불임을 유발할 수 있음을 경고하였고, 최근 하와이 주에서 옥시벤존과 옥티녹세이트가 함유된 자외선 차단제의 판매를 금지하는 법률이 통과되기도 하였다. 따라서, 환경도 보호하고 건강도 보호할 수 있으며, 자외선 차단능을 가진 물질이 필요한 실정이다.

[0006] 또한, 멜라닌은 표피의 기저층에 존재하는 멜라닌 세포의 멜라노솜이라는 세포 소기관에서 생합성된다. 멜라닌은 표피 멜라닌 세포에 의해 생성되는 인간 피부의 색소 침착과 관련이 있고, 멜라닌의 생성은 외부 환경인 유해한 자외선 손상으로부터 피부를 보호하는 중요한 피부 방어 기작 중 하나이다. 그러나 과발현된 멜라닌은 기미, 기미, 암과 같은 피부질환을 유발할 수 있다. 멜라닌이 합성되는 과정에서 티로시나아제는 멜라닌 합성을 촉진하는 효소이며, 멜라닌 색소의 생합성은 티로시나아제 효소를 비롯한 다양한 효소에 의해 조절된다. 그 중 티로시나아제는 티로신을 산화시켜 L-도파퀴논으로 전환하는 초기 생합성 과정에 관여하고, 그 후 dihydroxyindole을 산화시켜 멜라닌을 합성에 관여한다(Decker & Tuczek, 2000; Iozumi, Hoganson, Pennella, Everett, & Fuller, 1993; Jimenez-Atienzar, Escribano, Cabanes, Gandía-Herrero, & Garcia-Carmona, 2005). 따라서 미백화장품의 개발에서 티로시나아제를 억제하여 멜라닌 합성을 조절하기 위한 많은 연구가 이루어지고 있다.

선행기술문헌

특허문헌

[0008] (특허문헌 0001) 한국등록특허 제 10-1561231호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009] 본 발명은 알파-1,4-1,6-글루칸 폴리머를 포함하는, 친환경적이고 우수한 자외선차단 효능을 갖는 화장료 조성물 및 그 제조방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.

[0010] 본 발명은 알파-1,4-1,6-글루칸 폴리머를 포함하는, 친환경적이고 우수한 피부미백 효능을 갖는 화장료 조성물 및 그 제조방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

[0012] 1. 기질인 자당을 아밀로수크라아제 및 글리코겐분지효소와 반응시켜 알파-1,4-1,6-글루칸 폴리머를 얻는 단계를 포함하는 포함하는 화장료 조성물의 제조 방법.

[0013] 2. 위 1에 있어서, 상기 아밀로수크라아제는 서열번호 1 내지 3 중 어느 하나의 아미노산 서열로 이루어진 것인 화장료 조성물의 제조방법.

[0014] 3. 위 1에 있어서, 상기 글리코겐분지효소는 서열번호 4 내지 6 중 어느 하나의 아미노산 서열로 이루어진 것인 화장료 조성물의 제조방법.

[0015] 4. 위 1에 있어서, 상기 아밀로수크라아제와 글리코겐분지효소의 활성 비율은 1: 0.8 내지 5.2인 화장료 조성물의 제조방법.

[0016] 5. 위 1에 있어서, 상기 화장료 조성물은 피부 미백용 또는 자외선 차단용인 화장료 조성물의 제조방법.

[0017] 6. 위 1 내지 4 중 어느 하나의 방법으로 제조된 화장료 조성물.

[0018] 7. 위 6에 있어서, 피부 미백용 또는 자외선 차단용인 화장료 조성물.

발명의 효과

[0020] 본 발명의 제조방법으로 제조된 화장료 조성물은 독성이 없어 피부에 안전하고, 자외선차단 효과가 우수하다.

[0021] 본 발명의 제조방법으로 제조된 화장료 조성물은 피부세포의 멜라닌 합성을 억제함으로써, 피부미백 효과가 우수하다.

도면의 간단한 설명

[0023] 도 1은 포도당 단위체들이 알파-1,4 글리코사이드 결합 및 알파-1,6 글리코사이드 결합을 형성하고 있는 알파-1,4-1,6-글루칸 폴리머의 일부 모습을 나타낸다.

도 2은 아밀로수크라아제와 글리코겐분지효소를 동시에 적용하여 글루칸폴리머(GLP)를 제조하는 방법을 도식화한 것이다.

도 3 및 4는 Np/Vv GLP의 가지 사슬 길이의 분포를 나타낸다. 도 3의 (A)는 r1의 Np/Vv GLP; (B)는 r2의 Np/Vv GLP; (C)는 r3의 Np/Vv GLP; (D)는 r4의 Np/Vv GLP의 가지 사슬 길이 분포를 나타낸다. 도 4의 (E)는 r5의 Np/Vv GLP; (F)는 r6의 Np/Vv GLP; (G)는 r7의 Np/Vv GLP; (H)는 r8의 Np/Vv GLP; (I)는 r9의 Np/Vv GLP; (J)는 r10의 Np/Vv GLP; (K)는 oyster glycogen의 가지 사슬 길이의 분포를 나타낸다.

도 5 내지 8은 여러 종류의 아밀로수크라아제(As)와 글리코겐분지효소(GBE)의 활성 비율에 따른 알파-1,4-1,6-글루칸 폴리머(GLP)의 자외선 흡수율을 나타낸다.

도 5는 Np 유래 As와 Vv 유래 GBE 활성 비율에 Np/Vv GLP의 자외선 흡수율을 나타낸다. ●는 옥시벤존, △는 글리코겐, ○는 Np/Vv GLP r1, ▼는 Np/Vv GLP r2, ■는 Np/Vv GLP r5 조건을 의미한다.

도 6은 Bt 유래 As와 Bt 유래 GBE 활성 비율에 따른 Np/Vv GLP의 자외선 흡수율을 나타낸다. ○은 옥시벤존, ●은 글리코겐, ▼은 Np/Vv GLP r1, △은 Np/Vv GLP r3, ■은 Np/Vv GLP r5 조건을 의미한다.

도 7은 Bt 유래 As와 Ro 유래 GBE 활성 비율에 따른 Bt/Ro GLP의 자외선 흡수율을 나타낸다. ■은 옥시벤존, ●은 글리코겐, ○은 Bt/Ro GLP r1, ▼은 Bt/Ro GLP r3, △은 Bt/Ro GLP r5 조건을 의미한다.

도 8은 Ns 유래 As와 Bt 또는 Ro 유래 GBE 활성 비율에 따른 Ns/Bt GLP 및 Ns/Ro GLP의 자외선 흡수율을 나타낸다. ○은 옥시벤존, ●은 글리코겐, ▼은 Ns/Bt GLP r1, △은 Ns/Bt GLP r3, ■은 Ns/Bt GLP r5, □은 Ns/Ro GLP r5 조건을 의미한다.

도 9는 아밀로수크라아제와 글리코겐분지효소의 활성 비율을 달리하여 제조한 Np/Vv GLP의 농도별 세포독성을 나타낸다. Control은 아무것도 처리하지 않은 대조군이다.

도 10 및 11은 여러 종류의 아밀로수크라아제(As) 및 글리코겐분지효소(GBE)의 활성 비율을 달리하여 제조한 알파-1,4-1,6-글루칸 폴리머의 농도별 티로시나아제 활성 억제율을 나타낸다.

도 10은 Np/Vv GLP의 활성 비율 및 농도별 티로시나아제 활성 억제율을 나타낸다. Control은 티로시나아제 효소와 증류수만 처리한 대조군이다.

도 11은 Bt/Ro GLP, Ns/Ro GLP, Bt/Bt GLP, Ns/Bt GLP 및 Np/Vv GLP의 활성 비율 및 농도별 티로시나아제 활성 억제율을 나타낸다. NC는 티로시나아제 효소와 증류수만 처리한 음성 대조군이며, PC는 티로시나아제 효소와 L-DOPA 및 DW을 넣은 양성 대조군이다.

도 12 및 13은 아밀로수크라아제와 글리코겐분지효소의 활성 비율을 달리하여 제조한 알파-1,4-1,6-글루칸의 처리 농도에 따른 B16F10 melanoma cell의 멜라닌 생성 억제율을 나타낸다. B16F10 melanoma cell에 100 nM의 α-MSH와 함께 본 발명의 알파-1,4-1,6-글루칸 폴리머(GLP)를 처리하고 CO_2 인큐베이터에서 72시간 배양한 후 세포가 합성하는 멜라닌의 양을 측정하였다. B16F10 melanoma cell에 a-MSH만 처리한 경우 멜라닌 생성량을 100%로 설정하였다. Control은 melanoma cell에 아무것도 처리하지 않은 대조군이다.

도 12는 Np/Vv GLP를 농도별(0.625%(w/v), 0.125%(w/v), 0.25%(w/v))로 처리하였을 때 세포가 합성하는 멜라닌의 양을 측정 결과를 나타낸다.

도 13은 Ns/Bt GLP, Ns/Ro GLP, Bt/Bt GLP 또는 Bt/Ro GLP를 0.125%(w/v) 농도로 처리하였을 때 세포가 합성하는 멜라닌의 양을 측정한 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0024] 본 발명은 기질인 자당을 아밀로수크라아제(Amylosucrase, AS) 및 글리코겐분지효소(Glycogen branching enzyme, GBE)와 반응시켜 알파-1,4-1,6-글루칸 폴리머를 얻는 단계를 포함하는 화장료 조성물의 제조 방법에 관한 것이다.

[0025] 상기 알파-1,4-1,6-글루칸 폴리머는 포도당 단위체들의 알파-1,4 및 알파-1,6 글리코사이드 결합으로 이루어진 폴리머로, 자당에 아밀로수크라아제와 글리코겐분지효소를 반응시킴으로써 얻을 수 있다. 알파-1,4 글리코사이드 결합은 포도당으로부터 선형 글루칸 폴리머가 형성되도록 한다. 알파-1,6 글리코사이드 결합은 선형 글루칸의 내부 포도당 단위체와 다른 선형 글루칸의 포도당 단위체와의 결합으로, 선형 글루칸에 분지가 형성되도록 한다. 또한, 선형 글루칸에 형성된 분지에 또 다른 선형 글루칸이 결합할 수 있으며, 이에 따라 도 2에 도시된 바와 같은 다수의 곁가지를 가진 알파-1,4-1,6 글루칸 폴리머가 형성될 수 있다.

[0026] 상기 아밀로수크라아제는 자당을 기질로 하여 자당을 포도당과 과당으로 가수분해한 다음, 다른 알파 1,4 글리코사이드 결합을 가지고 있는 수용체 물질에 포도당을 전이시켜주는 효소로써 불용성 또는 수용성 다당체를 생산하며, 본 명세서에서 용어 "AS"는 달리 나타내지 않는 한 아밀로수크라아제를 뜻한다.

[0027] 상기 아밀로수크라아제는 예를 들어 Neisseria Polysaccharea(Np), Bifidobacterium thermophilum(Bt) 또는 Neisseria subflava(Ns)에서 유래한 것일 수 있다.

[0028] 상기 아밀로수크라아제는(As) 예를 들어 서열번호 1 내지 3 중 어느 하나의 아미노산 서열로 이루어진 것일 수 있다. 서열번호 1 내지 3은 각각 순서대로 Neisseria Polysaccharea(Np), Bifidobacterium thermophilum(Bt), Neisseria subflava(Ns) 유래 아밀로수크라아제(As)의 아미노산 서열이다.

[0029] 상기 글리코겐분지효소(GBE)는 알파 1,4 글리코사이드 결합을 가지는 직쇄형의 글루칸을 가수분해하여 수용체 물질에 알파 1,6 글리코사이드 결합으로 전이시켜주는 효소이다.

[0030] 상기 글리코겐분지효소는 예를 들어 Vibrio vulnificus(Vv), Rhodothermus obamensis(Ro), Bifidobacterium thermophilum(Bt), Deinococcus geothermalis(Dg), 또는 Synechocytis에서 유래한 것일 수 있다.

[0031] 상기 글리코겐분지효소는 예를 들어 서열번호 4 내지 6 중 어느 하나의 아미노산 서열로 이루어진 것일 수 있다. 서열번호 4 내지 6은 각각 순서대로 vulnificus(Vv), Rhodothermus obamensis(Ro), Bifidobacterium thermophilum(Bt) 유래 글리코겐분지효소의 아미노산 서열이다.

[0032] 상기 아밀로수크라아제 및 글리코겐분지효소는 기질인 자당에 동시 처리되어 단일공정으로(one-pot synthesis) 알파-1,4-1,6-글루칸 폴리머를 제조하는 것일 수 있다.

[0033] 상기 알파-1,4-1,6-글루칸 폴리머는 아밀로수크라아제와 글리코겐 분지효소의 효소 활성 비율을 조절함으로써 제조되는 알파-1,4-1,6-글루칸 폴리머의 분지 길이를 조절할 수 있다. 아밀로수크라아제 대비 글리코겐 분지효소의 효소 활성이 클수록 짧은 길이의 분지가 많이 형성된다.

[0034] 본 발명에서 아밀로수크라아제 효소 활성은 기질인 자당과 반응시켜 환원당의 생성량을 이용해 측정하였다. 35℃에서 0.1M 자당과 0.1%(w/v) 찰옥수수 전분이 포함된 50mM Tris-HCl 완충액(pH 7.0)에서 10분 동안 수행한 다음 500μL DNS 용액을 첨가하여 반응을 종결시켰다. 그 후 끓는 물에서 5분 동안 가열하여 반응 혼합물을 착색시켰다. 색상 안정화를 위해 혼합물을 얼음 위에서 냉각시켰다. 575 nm에서의 흡광도 변화(Dabs)는 분광광도계(Beckman DU 730; CA)를 사용하여 측정하였다. 효소활성단위 1 unit (1U)은 분당 1unit의 흡광도 변화(Dabs)를 유발하는 효소의 양으로 정의했다.

[0035] 본 발명에서 글리코겐분지효소의 효소 활성은 감자 아밀로스 유형 3(Sigma-Aldrich chemical Co., St. Louis, MO)을 사용하여 측정했다. 30° C의 50 mM Tris-HCl (pH 7.0)에서 0.05%(w/v)의 감자 아밀로스 유형 3(Sigma-Aldrich chemical Co., St. Louis, MO)을 사용하여 20분 동안 효소 반응을 수행하였다. 그 후, 반응한 혼합물을 0.02% Lugol 용액과 혼합하고 용액의 흡광도변화(Dabs)를 620 nm에서 측정하였다. 효소활성단위 1 unit (1U)은 분당 1unit의 흡광도 변화를 유발하는 효소의 양으로 정의했다.

[0036] 상기 아밀로수크라아제와 글리코겐분지효소의 효소 활성 비율은 1: 0.8 내지 5.2일 수 있다. 예컨대 1: 0.8 내지 3.2일 수 있고, 바람직하게는 1: 0.8 내지 1.2일 수 있다.

[0037] 본 발명의 일 실시예에서 아밀로수크라아제와 글리코겐분지효소의 효소 활성 비율이 1: 1 내지 3 범위에서 제조된 알파-1,4-1,6-글루칸의 자외선흡수능이 우수하고, 그 중 1:1에서 자외선 흡수능이 가장 우수함을 확인하였다(도 5 내지 8).

[0038] 본 발명의 일 실시예에서 아밀로수크라아제와 글리코겐분지효소의 효소 활성 비율이 1: 1 내지 5 범위에서 멜라닌 합성 억제 효과가 우수하고, 그 중 1:1에서 멜라닌 합석 억제 효과가 가장 우수함을 확인하였다(도 12 및 13).

[0039] 상기 기질인 자당과 아밀로수크라아제 및 글리코겐분지효소를 반응시키는 시간, 온도 및 pH 조건 등은 당업자에 의해 적절히 조절될 수 있다.

[0040] 상기 반응 온도는 25 내지 50℃, 30 내지 50℃, 40 내지 55℃ 또는 30 내지 45℃일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0041] 상기 기질인 자당과 아밀로수크라아제 및 글리코겐분지효소의 반응 시간은 10시간, 20시간, 30시간, 40시간 이상, 50시간 이하, 60시간 이하일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0042] 상기 제조된 알파-1,4-1,6-글루칸 폴리머는 평균 분자량이 1×10^5 내지 1×10^7 g/mol, 1×10^5 내지 1×10^6 g/mol 또는 1×10^5 내지 5×10^5 g/mol 일 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0043] 상기 방법에 따라 제조된 알파-1,4-1,6-글루칸 폴리머는 자외선흡수율이 뛰어나므로, 이를 포함하는 화장료 조성물은 자외선으로부터 피부를 보호할 수 있다.

[0044] 상기 방법에 따라 제조된 알파-1,4-1,6-글루칸 폴리머는 피부세포의 멜라닌 합성 억제능이 우수하므로(도 12 및 13), 이를 포함하는 화장료 조성물은 피부 미백 효 능을 갖는다.

[0045] 본 발명은 앞서 설명한 방법으로 제조된, 피부 미백 또는 자외선 차단용 화장료 조성물을 제공한다.

[0046] 앞서 설명한 방법으로 제조된 화장료 조성물은 멜라닌 생성 억제를 통한 피부 미백효과가 우수하다.

[0047] 앞서 설명한 방법으로 제조된 화장료 조성물은 자외선 차단 효과가 우수하다.

[0048] 본 발명에 따라 제조된 알파-1,4-1,6-글루칸 폴리머를 포함하는 화장료 조성물은 항산화제, 안정화제, 용해화제, 비타민, 안료 및 향료와 같은 통상적인 보조제 및 담체를 포함할 수 있으며, 당업계에서 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 제형화될 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 보다 상세하게는, 유연 화장수, 영양 화장수, 영양 크림, 맛사지 크림, 에센스, 아이크림, 헤어토닉, 샴푸, 린스, 클렌징 크림, 클렌징 포옴, 클렌징 워터, 팩, 스프레이 또는 파우더의 제형으로 제조될 수 있다.

[0049] 본 발명의 제형이 페이스트, 크림 또는 겔인 경우에는 담체 성분으로서 동물성유, 식물성유, 왁스, 파라핀, 전분, 트라칸트, 셀룰로오스 유도체, 폴리에틸렌 글리콜, 실리콘, 벤토나이트, 실리카, 탈크 또는 산화아연 등이 이용될 수 있다.

[0050] 본 발명의 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 또는 디메틸 에테르와 같은 추진체를 포함할 수 있다.

[0051] 본 발명의 제형이 용액 또는 유탁액인 경우에는 담체 성분으로서 용매, 용해화제 또는 유탁화제가 이용되고, 예컨대 물, 에탄올, 이소프로판올, 에틸 카보네이트, 에틸 아세테이트, 벤질 알코올, 벤질 벤조에이트, 프로필렌 글리콜, 1,3-부틸글리콜, 글리세롤 지방족 에스테르, 폴리에틸렌 글리콜 또는 소르비탄의 지방산 에스테르가 있다.

[0052] 본 발명의 제형이 현탁액인 경우에는 담체 성분으로서 물, 에탄올 또는 프로필렌 글리콜과 같은 액상의 희석제, 에톡실화 이소스테아릴 알코올, 폴리옥시에틸렌 소르비톨 에스테르 및 폴리옥시에틸렌 소르비탄 에스테르와 같은 현탁제, 미소 결정성 셀룰로오스, 알루미늄 메타히드록시드, 벤토나이트, 아가 또는 트라칸트 등이 이용될 수 있다.

[0053] 본 발명의 제형이 계면-활성제 함유 클렌징인 경우에는 담체 성분으로서 지방족 알코올 설페이트, 지방족 알코올 에테르설페이트, 설포숙신산 모노에스테르, 이세티오네이트, 이미다졸리늄 유도체, 메틸타우레이트, 사르코시네이트, 지방산 아미드 에테르 설페이트, 알킬아미도베타인, 지방족 알코올, 지방산 글리세리드, 지방산 디에탄올아미드, 식물성유, 라놀린 유도체 또는 에톡실화 글리세롤 지방산 에스테르 등이 이용될 수 있다.

[0054] 본 발명의 제형이 로션인 경우에는 천연에센스 오일, 보습제를 포함할 수 있다.

[0055] 천연에센스 오일로서는 라벤더 오일, 올리브 오일, 호호바 오일, 마카다미아 오일을 포함하는 식물성 오일로 이루어진 군으로부터 1종 이상 선택되는 것을 사용하는 것이 바람직하나, 이에 제한되지 않는다.

[0056] 보습제로서는 수용성 저분자 보습제, 지용성 분자 보습제, 수용성 고분자, 지용성 고분자 등을 들 수 있다.

[0057] 수용성 저분자 보습제로서는 세린, 글루타민, 솔비톨, 만니톨, 피롤리돈-카르복실산나트륨, 글리세린, 프로필렌글리콜, 1,3-부틸렌글리콜, 에틸렌글리콜, 폴리에틸렌글리콜B(중합도 n = 2 이상), 폴리프로필렌글리콜(중합도 n = 2 이상), 폴리글리세린B(중합도 n = 2 이상), 락트산, 락트산염 등을 들 수 있다.

[0058] 지용성 저분자 보습제로서는 콜레스테롤, 콜레스테롤에스테르 등을 들 수 있다.

[0059] 수용성 고분자로서는 카르복시비닐폴리머, 폴리아스파라긴산염, 트라가칸트, 크산탄검, 메틸셀룰로오스, 히드록시메틸셀룰로오스, 히드록시에틸셀룰로오스, 히드록시프로필셀룰로오스, 카르복시메틸셀룰로오스, 수용성 키틴, 키토산, 덱스트린 등을 들 수 있다.

[0060] 지용성 고분자로서는 폴리비닐피롤리돈·에이코센 공중합체, 폴리비닐피롤리돈·헥사데센 공중합체, 니트로셀룰로오스, 덱스트린지방산에스테르, 고분자 실리콘 등을 들 수 있다.

[0061] 본 명세서에서 용어 “GLP”는 글리코겐유사입자(Glycogen-like particles)의 약어로, 알파-1,4-1,6-글루칸 폴리머를 의미한다. 또한, 용어 “A/B GLP”는 자당과 A 생물 유래 아밀로수크라아제(As) 및 B 생물 유래 글리코겐분지효소(GBE)를 반응시켜 얻은 알파-1,4-1,6-글루칸 폴리머를 의미한다. 예를 들어 “Np/Vv GLP”는 자당을 NpAS 및 VvGBE와 반응시켜 얻은 알파-1,4-1,6-글루칸 폴리머이다.

[0062] 본 명세서에서 용어 “rX (X는 임의의 숫자)”는 아밀로수크라아제와 글리코겐분지효소의 효소 활성 비율이 1:

X인 것을 의미한다. 예를 들어 “Np/Vv GLP rX”는 NpAs와 VvGBE의 활성 비율을 1:X로하여 얻은 알파-1,4-1,6-글루칸 폴리머이다. 즉, Np/Vv GLP r1은 NpAs와 VvGBE의 효소활성 비율을 1:1로 조절하여 얻은 알파-1,4-1,6-글루칸 폴리머이고, Np/Vv GLP r5는 NpAs와 VvGBE의 효소활성 비율을 1:5로 조절하여 얻은 알파-1,4-1,6-글루칸 폴리머이다.

[0064] 이하, 실시예를 통해 본 발명을 보다 상세하게 설명한다.

[0066] **실험방법**

[0067] **1. 재료**

[0068] 자당, 감자 아밀로스 및 굴 글리코겐은 Sigma-Aldrich Chemical Co.(St. Louis, MO)에서 구입하였다. 밀랍 옥수수 전분은 대상(서울, 한국)에서 제공받았다. Pullulan 표준 P-20은 Showa Denko KK(Tokyo, Japan)에서 입수했다.

[0070] **2. 효소의 발현 및 정제**

[0071] Neisseria polysaccharea(Np, ATCC 43768), Bifidobacterium thermophilum(Bt, ATCC 25525), Neisseria subflava(Ns, ATCC 49275) 유래 아밀로수크라아제 유전자와 Rhodothermus obamensis(Ro), Bifidobacterium thermophilum(Bt, JCM 1207), Vibrio vulnificus (Vv, MO6-24/O) 유래 GBE 유전자를 이전 연구에서 보고된 방법에 따라 클로닝하여 발현시켰다(Wang et al., 2012; Palomo et al., 2009; Jo et al., 2015; Lee et al., 2008). 즉, 재조합 As 및 GBE 플라스미드를 클로닝 및 발현을 위해 E. coli BL21(DE3) 숙주 세포로 형질전환시켰다.

[0072] Rhodothermus obamensis에서 분리한 GBE는 Novozymes(Bagsvaerd, Denmark)에서 상용 제품(Branchzyme®)을 사용했다.

[0073] 상기 As 및 GBE 유전자를 보유하는 E. coli BL21 세포를 50 μg·mL^{-1}의 암피실린이 보충된 LB 배지에서 37℃에서 성장시켰다. 세포 배양의 600 nm에서 Abs가 0.6-0.8에 도달하면 0.2 M IPTG를 첨가하고 18℃에서 18시간 더 배양하여 효소 단백질의 발현을 유도했다.

[0074] E. coli BL21 세포는 항생제(50 μg·mL^{-1} ampicillin 또는 50 μg·mL^{-1} of kanamycin)가 첨가된 LB broth에서 30℃에서 성장하였고, 동일한 IPTG 유도에 의해 단백질이 발현되었다. 원심분리(4℃에서 10분 동안 5,000 × g)로 수확한 세포 펠릿을 50mM Tris-HCl 완충액(pH 7.0)에 재현탁하고 얼음 배쓰 위에서 소니케이터(VibraTM Cell VC 750 disruptor, Sonics Materials, Inc, Newtown, CT)를 사용하여 파쇄했다. 파괴된 세포를 원심분리하고(4℃에서 20분 동안 10,000 x g) 0.45μm 주사기 필터를 통해 여과했다. 세포에서 추출한 효소는 니켈-니트릴로트리아세트산(Ni-NTA) 친화성 컬럼 크로마토그래피(Qiagen, Hilden, Germany)를 적용하여 정제하였다.

[0075] Amicon ultra-15 원심분리 필터(MWCO=30kDa; Merck Millipore, Carrigtwohill, Ireland)와 원심분리기를 이용하여 정제된 효소 용액을 원심분리(25° C에서 20분 동안 5,000rpm)하여 농축했다.

[0077] **3. 효소활성검사**

[0078] NpAS의 Amylosucrase(ASase) 활성은 sucrose 기질에 대한 반응 중 환원당의 생성량을 측정하여 판단하였다. 효소 반응은 35℃에서 0.1M 자당과 0.1%(w/v) 찰옥수수 전분이 포함된 50mM Tris-HCl 완충액(pH 7.0)에서 10분 동안 수행한 다음 500μL DNS 용액을 첨가하여 반응을 종결시켰다. 그 후 끓는 물에서 5분 동안 가열하여 반응 혼합물을 착색시켰다. 색상 안정화를 위해 혼합물을 얼음 위에서 냉각시켰다. 575 nm에서의 흡광도 변화(Δabs)는 분광광도계(Beckman DU 730; CA)를 사용하여 측정하였다. VvGBE의 효소 활성을 측정하기 위해, 효소 반응을 0.05%(w/v)의 감자 아밀로스 type 3(Sigma-Aldrich chemical Co., St. Louis, MO)가 첨가된 50mM Tris-HCL (pH 7.0)에서 20분 동안 수행했다. 그 후 반응 혼합물을 0.02% Lugol 용액과 혼합하고 용액의 Dabs를 620 nm에서 측정하였다. NpAS 및 VvGBE에서 모두 효소활성단위 1 unit(1U)은 분당 1 unit의 흡광도변화(Δabs)를 유발하

는 효소의 양을 의미한다.

[0080] **4. 아밀로수크라아제(AS) 및 글리코겐분지효소(GBE)를 이용한 글리코겐 유사입자(GLP)의 제조**

[0081] 글리코겐 유사 입자(GLP)를 생산하기 위해 AS와 GBE의 원 포트 효소 반응을 50mM HCl-Tris 완충액(pH7.0)에서 30 ℃에서 48시간 동안 0.7M 자당을 기질로 사용하여 수행했다. AS 활성 수준은 6U/mL로 고정시키고, 0.001U에서 0.01U까지 0.001U씩 증가시키며 10가지 다른 활성 수준의 GBE를 적용하여 GBE/ASase 활성비율 변화에 따른 효과를 평가했다. 효소 반응 후, 샘플 혼합물을 10분 동안 끓여 효소를 불활성화시켰다. 과당, 단당, 이당 및 올리고당과 같은 부산물을 제거하기 위해 반응 혼합물을 Amicon μLtra-15 원심분리 필터 튜브(100 kDa MWCO, Merck Millipore Ltd, Burlington, MA). 잔류물을 일반 원심 튜브로 옮기고 원심 분리(25 ℃에서 10분 동안 10,000 xg) 전에 75%(v/v) 에탄올과 혼합하여 잔류 부산물에서 GLP를 완전히 회수하고 분리했다. 동결건조 후 GLP의 수율은 기질로 사용된 초기 자당 중량에 대한 생성물 중량의 비율을 기준으로 계산하였다.

[0083] **5. GLP의 화학적 구조 분석**

[0084] **5.1. HPAEC 및 HPSEC 분석을 위한 GLP 용액 준비**

[0085] GLP 분산액의 제조는 약간의 변형을 가한 전분 제조 방법에 따라 수행하였다. 50 mg의 분말 GLP를 1%(w/v) 농도의 90% DMSO에 용해시켰다. 용해된 샘플을 1시간 동안 끓이고 밤새 교반하였다. 2mL의 분취량을 6배 부피의 무수 에탄올(12mL)과 혼합했습니다. 침전된 GLP 샘플을 원심분리하고(5,000g ,25℃, 20분), 상층액을 제거했다. 샘플 페이스트를 동량의 에탄올로 재현탁하고, 에탄올 침전 단계를 2회 반복하였다.

[0087] **5.2. HPAEC-PAD에 의한 GLP 분지 패턴 결정**

[0088] 에탄올 침전 단계에 의해 제조된 GLP 펠렛을 0.5%(w/v) 농도로 예열된 40mM의 아세트산나트륨 완충액(pH 3.5)을 첨가하여 재현탁시키고 1시간 동안 교반하면서 끓였다. 분지형 α-글루칸을 형성할 때 분지 반응 패턴을 확인하기 위해 분지형 α-글루칸 제품에 아이소아밀라제(EC 3.2.1.68; 500 unit/240 mg; Megazyme International Ireland Ltd, Wicklow, Ireland)를 첨가했다. 탈분지 반응은 40mM 아세트산나트륨 완충액(pH 3.5)에서 40℃에서 24시간 동안 수행하였다. 효소 반응 후, 효소 불활성화를 위해 샘플 혼합물을 10분 동안 끓였다. 그후 시료의 염분을 제거하기 위해 활성수지 IRA-200C와 IRA-67을 1:1 비율로 혼합하였다. 물을 제거한 후 시료 1ml당 0.2g을 넣고 2분간 부드럽게 흔든다. 샘플 용액을 0.45 um 주사기 필터(Whatman, Maidstone, UK)를 통해 여과하고 25 μL의 샘플을 펄스 전류 측정 검출과 결합된 고성능 음이온 교환 크로마토그래피(HPAEC-PAD, Dionex Dx-300, Sunnyvale, CA)에 주입했다. 사용된 컬럼은 30 ℃에서 유지되는 CarboPac PA200 분석 컬럼(3 x 250mm, Dionex, Sunnyvale, CA)이었다. 용리액 A는 150mM의 수산화나트륨이었으며, 용리액 B는 아세트산나트륨 500mM 아세트산나트륨을 포함하는 150mM 수산화나트륨이고, 아세트산나트륨의 변화(135분 동안 0에서 500mM)에 따른 유속은 0.5mL · min-1이었다.

[0090] **5.3. HPSEC-RI-MALS에 의한 분자량 및 크기 분포 측정**

[0091] 에탄올 침전 단계에 의해 제조된 GLP 펠릿을 0.5%(w/v) 농도로 예열된 물에 재현탁하고 교반하면서 1시간 동안 끓였다. 재현탁된 GLP 용액을 5μm 주사기 필터(Whatman, Maidstone, UK)를 통해 여과하여 다중 레이저 광산란 시스템(HPSEC-RI-MALS)이 장착된 고성능 크기 배제 크로마토그래피에 주입했다. Shodex OH pak SB-806 HQ 및 SB-804 HQ 컬럼(8.0 mm ID x 300 mm, Showa, Denko, Japan)은 50℃로 설정된 오븐에서 분석 컬럼으로 사용되었다. K5 flow cell과 Wyatt Technology Corporation(Santa Barbara, CA)의 GaAs 레이저(λ = 658 nm)가 장착된 Dawn Heleos MALLS 시스템과 Shimadzu(Kyoto, Japan)의 RID-10A 굴절계가 탐지에 사용되었다. 분자량 및 크기 분포는 Astra 소프트웨어(Windows용 버전 5.3.4.20, Wyatt Technology Corporation, Santa Barbara, CA)에 의해 계산되었다. 굴절률 증분(dn/dc) 값은 0.145 mL · g^{-1}이었고, 저분자량의 풀루란을 표준으로 하였다(P20은 포토다이오드의 정규화를 달성하기 위해 사용됨).

[0093] **6. GLP 화장료 조성물**

[0094] **6.1. 세포배양**

[0095] HaCaT 세포와 B16F10 흑색종 세포를 10% 열불활성화 소태아혈청(FBS)과 1% 페니실린 스트렙토마이신이 첨가된 Dulbecco의 변형 이글 배지(DMEM)에서 37 ℃의 가습 5% CO_2 인큐베이터에서 배양했다.

[0097] **6.2. GLP의 세포독성 평가**

[0098] 세포 생존력은 Cell Titer 96 AQueous one solution 세포 증식 검정(Promega)에 의해 평가되었다. HaCaT 세포를 96-well 세포 배양 플레이트에 well당 2 x 10^5로 시딩하고 2일 동안 배양하였다. 세포를 5% CO_2 인큐베이터에서 24시간 동안 37 ℃에서 1.25 및 2.5 mg/mL 농도(0.125%, 0.25%)의 글리코겐 유사 입자(GLP)에 노출시켰다. 20 μL MTS [3-(4,5-디메틸티아졸-2-일)-5-(3-카르복시메톡시페닐)-2-(4-술포페닐)-2H-테트라졸륨] 용액을 각 well에 첨가한 후, 세포를 가습된 5% CO_2 인큐베이터에서 37 ℃에서 2시간동안 배양했다. 세포 이미징 다중 모드 판독기(Biotek, Cytation 1)를 사용하여 490 nm에서 세포 생존율을 측정했다.

[0100] **6.3. In vitro에서 GLP의 버섯 티로시나아제(tyrosinase) 활성억제능 평가**

[0101] 각각의 샘플 40 μL을 20 μL의 버섯 티로시나아제(0.02 mg/ml)와 함께 실온에서 10분 동안 사전 배양했다. 1mM L-DOPA(L-3,4-dihydroxyphenylalanine)를 첨가하고 상온에서 30분간 배양한 후 cell imaging multi-mode reader(Biotek, Cytation 1)를 이용하여 475nm에서 흡광도를 측정하여 dopachrome 형성을 검출하였다.

[0103] **6.4. GLP와 멜라닌함량 평가**

[0104] B16F10 흑색종 세포를 24-well 세포 배양 플레이트에 웰당 2 x 10^5로 시딩하고 가습된 5% CO_2 인큐베이터에서 37 ℃에서 24시간 동안 배양했다. 세포를 샘플로 처리하고 1시간 동안 인큐베이션하였다. 이후 100 nmol의 α-MSH(α-melanocyte-stimulating Hormone)를 첨가하여 멜라닌을 생성하고 3일간 배양하였다. 배양 배지를 제거하고 세포를 수집하였다. 수집된 세포를 2회 원심분리(1분 동안 12,000rpm)하고 상층액을 제거하였다. 남은 펠릿에 1N NaOH 200μL를 첨가하고 힛블럭(heat block) 상에서 90 ℃에서 20분간 처리하여 펠릿을 용해시켰다. 멜라닌 함량은 세포 이미징 다중 모드 판독기(Biotek, Cytation 1)를 사용하여 490 nm에서 측정되었다.

[0106] **6.5. GLP의 UV 보호효과**

[0107] 자외선 차단 효과를 위해 200~400 nm 파장대에서 GLP 용액과 옥시벤존의 흡광도를 분광광도계(Beckman DU 730; CA, U.S.A.)를 이용하여 측정하였다.

[0109] **7. 통계적분석**

[0110] 모든 통계 분석은 SPSS 소프트웨어를 사용하여 수행되었다. 평균은 분산 분석을 사용하여 평가되었다. 평균은 유의 수준의 5%에서 Tukey's honestly significant difference procedure에 따라 비교되었다.

[0112] **결과**

[0113] **1. Np/Vv GLP의 생산 수율 및 화학 구조**

[0114] 이 연구에서 생합성 글리코겐 유사 입자(GLP)는 이 두 효소의 최적 반응 조건이 NpAS의 경우 pH 7.0, 35 ℃, VvGBE의 경우 pH 7.0-8.0 및 30 ℃로 약간 다르기 때문에, 이를 고려하여 pH 7.0과 30 ℃에서 합성했다. VvGBE/NpAS(ref)의 비율을 조절함으로써 GLP의 다른 화학 구조가 예상되었고, VvGBE/NpAS의 활성 비율은 1(r1)에서 10(r10)으로 조정하였다. 이러한 반응 매개변수를 고려하여 동시 모드에서 NpAS와 VvGBE의 공동 반응에

의해 GLP를 합성했다. 그 결과, GLP 수율은 VvGBE/NpAS 비율에 따라 r1(27.54%)에서 r10(38.40%)의 범위에 있었다.

[0115] GBE 활성 수준의 증가는 동일한 반응 시간 내에 비환원 말단을 갖는 더 많은 수의 분지쇄를 생성하여 NpAS에 대해 더 많은 반응 부위를 제공하였다. 이는 차례로 GBE와 다시 반응할 만큼 충분히 긴 선형 글루칸의 성장 속도를 가속화하여 GLP 질량을 더 크게 증가시켰다.

[0116] 기존에 두 가지 다른 활성 수준의 VvGBE로 생성된 Np/Vv GLP는 다른 박테리아 GBE 공급원으로 합성된 GLP와 비교할 때 상대적으로 짧은 사슬 길이 분포 패턴을 보였다. 이 결과는 중합도(Degree of polymerization, DP) 3-5의 매우 짧은 사슬을 더 많이 전달한 VvGBE의 고유한 특성으로 설명될 수 있다. VvGBE/NpAS의 활성 비율이 r1에서 r10으로 증가함에 따라 최대 피크의 DP가 8에서 6으로 감소하고 상대적 비율이 증가했다. 또한 VvGBE 활성과 함께 최대 검출 가능한 DP가 각각 60에서 26으로, 13.37에서 8.01로, 9.17에서 7.01로 점차 감소했다(표 1).

[0117] VvGBE/NpAS 효소활성 비율에 따른 Np/Vv GLP의 분지 길이 분포

표 1

[0118]

구분	중합도(Degree of polymerization, DP) (%)							Detectable DP
	DP≤5	DP 6-12	DP 13-24	DP 25-36	DP ≥ 37	DP_w 1)	DP_n 2)	
Glycogen oyster	16.70±0.22^{d}	39.49±0.06^{d}	35.20±0.04^{a}	8.02±0.13^{a}	0.59±0.01^{b}	12.76	7.86	41±0^{b}
*r*1	9.43±0.07^{g}	58.23±0.77^{c}	18.99±0.30^{b}	8.05±0.20^{a}	5.30±0.35^{a}	13.37	9.17	60±0^{a}
*r*2	13.37±0.04^{f}	71.84±0.18^{a}	13.29±0.23^{c}	1.38±0.01^{b}	0.11±0.01^{b}	9.13	7.68	38±0^{c}
*r*3	15.03±0.13^{e}	72.74±0.26^{ab}	11.41±0.11^{d}	0.84±0.01^{c}	-	8.71	7.43	35±0^{d}
*r*4	16.31±0.02^{d}	72.94±0.21^{ab}	10.16±0.16^{e}	0.62±0^{cd}	-	8.48	7.18	33±0^{e}
*r*5	16.80±0.09^{d}	73.95±0.01^{a}	9.06±0.10^{f}	0.19±0.01^{e}	-	8.28	7.18	28±0^{f}
*r*6	16.99±0.11^{cd}	73.90±0.06^{a}	8.87±0.06^{fg}	0.24±0.01^{de}	-	8.25	7.21	28±0^{f}
*r*7	17.54±0^{bc}	73.85±0.04^{a}	8.45±0.05^{fgh}	0.17±0.01^{e}	-	8.17	7.16	27±0^{g}
*r*8	18.19±0.19^{ab}	73.54±0.08^{ab}	8.10±0.11^{hi}	0.17±0.01^{e}	-	8.10	7.05	27±0^{g}
*r*9	18.58±0.03^{a}	73.48±0.02^{ab}	7.77±0.04^{i}	0.15±0.01^{e}	-	8.05	7.03	27±0^{g}
*r*10	18.60±0.12^{a}	73.76±023^{a}	7.53±0.06^{i}	0.10±0.01^{e}	-	8.01	7.01	26±0^{h}

[0120] 보다 구체적으로, VvGBE/NpAS의 비율이 r5에 도달했을 때, 개별 사슬 길이, 평균 DP 및 검출가능한 DP의 비율이 평준화되는 것으로 나타났다. GBE 비율을 더 높이면 더 이상 질량 축적이 관찰되지 않고 GLP의 크기가 더 이상 증가하지 않았다. 실제로 r5까지 실험된 활성비 내에서 질량 축적이 증가함에 따라 GLP 크기가 작아져 GLP 구조

의 겉보기 밀도가 그에 따라 증가함을 보였다. 이러한 VvGBE/NpAS 활성의 비율 지점을 통과한 후, 매우 밀도가 높은 GLP 구조 때문에 유의한 질량 퇴적물이 관찰되지 않았고, 이로 인해 효소는 물리적으로 환원하지 않는 말단의 반응 부위에 접근할 수 없었다. 전반적으로 GBE 활성이 증가함에 따라 사슬 길이 DP≥13의 양은 줄어들고 사슬 길이 DP≤12의 상대적인 양은 증가하는 경향을 보였다. 활발하게 성장하는 GLP에서 자유롭게 접근할 수 있는 DP≥13 사슬은 효과적으로 글루코실화되는 것으로 간주되어 DP≤12의 상대적 양이 증가했다(도 2). 이러한 결과는 VvGBE/NpAS 비율을 제어하여 Np/Vv GLP의 분지 패턴을 정확하게 관리할 수 있음을 나타낸다.

[0121] 합성된 모든 Np/Vv GLP의 분자량은 굴에서 얻은 천연 글리코겐의 분자량보다 낮았다. Np/Vv GLP 제품의 HPSEC-RI 피크 폭은 GBE/ASase의 비율이 증가함에 따라 좁아졌으며(도 3), 이는 GLP의 다분산성(polydispersity)이 감소했고 분자 구조와 크기가 더 균질해질 수 있음을 나타낸다. 이러한 생합성 조건에서 GLP의 분자량은 동물 유래 천연글리코겐에 도달하지 못했으며, 이들 중 Rz's는 지속적으로 더 커서 겉보기 밀도(α_{app})가 유의미하게 낮아졌다. 이러한 GLP의 구조적 매개변수는 이러한 시험관내 효소 합성이 천연 글리코겐과는 상당히 다른 분지 구조를 생성한다는 것을 시사했다. VvGBE의 활성도가 높아짐에 따라, 더 작은 공간에 잘 맞는 짧은 체인 길이 전달로 인해 동일한 부피의 공간에서의 패킹 질량(packing mass)으로 인해 GLP의 분자량이 증가하는 것으로 보였고, 따라서 밀도가 증가하여 더욱 콤팩트한 구조가 되었다(표 2). 그러나 분자량이 일정 수준 이상으로 크게 증가하지는 않아 효소가 self-enzymatically 형성된 고분자 입자를 기질로 더 이상 활용할 수 없음을 알 수 있었다. 표 2는 Np/Vv GLP의 평균 분자량, 회전반경 및 겉보기 밀도를 나타낸다.

표 2

[0122]

구분		분자량	회전반경 (Gyration radius)	겉보기밀도 (Apparent density)
		(M_w, $g \cdot mol^{-1}$)	(R_z, nm)	(ρ_{app}, $g \cdot mol^{-1} \cdot nm^{-3}$)
Oyster glycogen		$2.64 \pm 0.03 \times 10^7$	28.60±0.80	270±0.21
Np/Vv GLP	r1	$2.30 \pm 0.04 \times 10^5$	39.75±0.45	0.88±0.02
	r2	$3.06 \pm 0.00 \times 10^5$	36.95±0.25	1.45±0.03
	r3	$3.25 \pm 0.00 \times 10^5$	35.65±0.05	1.72±0.00
	r4	$3.27 \pm 0.00 \times 10^5$	35.00±0.40	1.82±0.05
	r5	$3.70 \pm 0.08 \times 10^5$	35.60±0.40	1.96±0.02
	r6	$3.70 \pm 0.08 \times 10^5$	35.80±0.35	1.91±0.02
	r7	$3.70 \pm 0.04 \times 10^5$	35.35±0.65	2.00±0.08
	r8	$3.70 \pm 0.00 \times 10^5$	35.55±0.25	1.97±0.04
	r9	$3.82 \pm 0.02 \times 10^5$	35.45±0.05	2.05±0.00
	r10	$3.82 \pm 0.01 \times 10^5$	33.15±0.05	2.51±0.01

[0124] **2. GLP의 자외선차단효과**

[0125] 화학 처리 없이 자당과 효소를 사용하여 합성한 GLP의 UV 차단 효과를 조사하기 위해 200~400 nm 파장에서 흡광도를 측정했다(도 5 내지 8). 도 5 내지 8은 옥시벤존과 GLP 간의 UV 차단 효과를 비교한 것이다. 다양한 아밀로수크라아제 및 글리코겐분지효소의 조합으로 제조된 GLP는 효소 활성비율이 r1 내지 r3인 경우 자외선 차단능이 우수하였고, r1인 경우 자외선 차단능이 가장 우수함을 확인하였다. 특히, Np/Vv GLP r1은 일반적으로 사용되는 자외선 차단제 소재인 옥시벤존과 유사한 자외선 차단 효과를 나타냈다. 이를 통해, GLP는 잠재적으로 알레르기를 유발할 수 있고 호르몬 불균형을 유발하는 옥시벤존의 대체재로 활용될 수 있음을 확인하였다.

[0127] **3. GLP의 피부 미백효과**

[0128] **(1) 세포 독성 평가**

[0129] Np/Vv GLP의 멜라닌 생성 억제능을 알아보기 전, GLP가 인간 피부에 독성이 있는지 확인하기 위해 인간 각질형성세포(HaCaT 세포)를 사용하여 세포독성을 측정했다(도 9). HaCaT 세포에 1.25 및 2.5 mg/mL(0.125%, 0.25%)의 Np/Vv GLP를 처리한 결과, 세포 독성은 나타나지 않았다.

[0131] **(2) 티로시나아제 활성 억제능 평가**

[0132] Np/Vv GLP가 티로시나아제 활성을 억제하여 멜라닌 합성을 조절할 수 있는지 여부를 조사하기 위해, 버섯 티로시나아제 활성을 측정하였다(도 10 및 11). HaCaT 세포에 각 샘플 1.25 및 2.5 mg/mL(0.125, 0.25%(w/v))를 첨가한 결과 글리코겐(천연)을 제외하고 농도 의존적 방식으로 티로시나아제 활성이 억제되었다. 특히, 2.5 mg/mL(0.25%(w/v))의 농도에서 r1, r2 및 r5는 각각 22.2, 20.1 및 14.4%의 티로시나아제 활성 억제율을 나타냈다.

[0133] 또한, 다른 종류의 아밀로수크라아제 및 글리코겐분지효소를 이용하였을 때의 티로시나아제 활성 억제능을 확인하기 위해, Bt/Ro GLP, Ns/Ro GLP, Bt/Bt GLP 및 Ns/Bt GLP의 활성 비율(r1, r3, r5) 및 농도별(1.25 및 2.5 mg/mL) 티로시나아제 활성 억제율을 측정하였다. 그 결과, 다른 종류의 아밀로수크라아제 및 글리코겐분지효소를 이용하였을 때는 농도 의존적으로 티로시나아제 활성이 억제 된다거나, 글리코겐분지효소 활성 비율이 커질수록 티로시나아제 활성이 억제되는 등의 공통된 특징을 확인할 수는 없었다(도 11).

[0135] **(3)멜라닌 생성 억제능 평가**

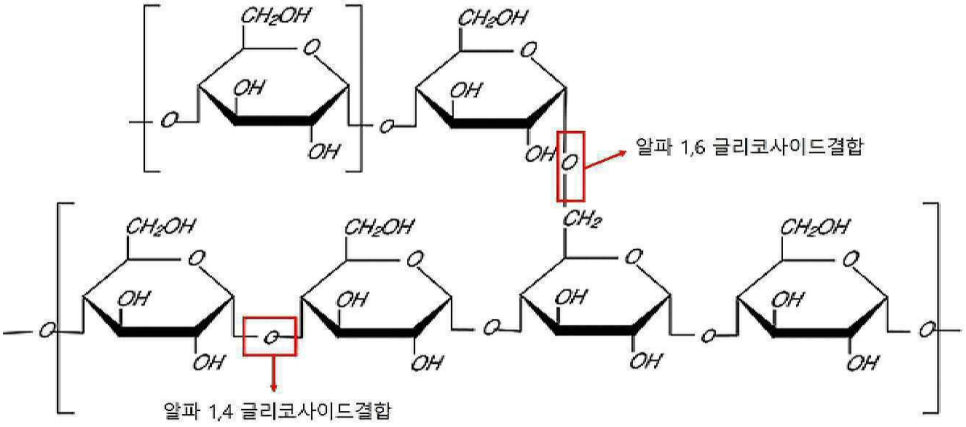
[0136] B16F10 흑색종 세포에서 α-MSH에 의해 유도된 멜라닌 생성량에 대한 GLP의 효과를 평가하였다(도 12 및 13). 세포에 100 nM의 α-MSH와 함께 Np/Vv GLP를 0, 0.625, 1.25, 2.5 mg/mL(0, 0.0625, 0.125, 0.25%(w/v))농도별로 처리하고 CO_2 인큐베이터에서 72시간 배양한 후 멜라닌의 양을 측정하였다(도 12). 도 12는 Np/Vv GLP 처리 시 농도 의존적 방식으로 멜라닌 합성이 억제됨을 보여주었다. r1, r2 및 r5의 2.5mg/mL(0.25%(w/v)) 농도에서 멜라닌 합성이 각각 45%, 33% 및 32% 억제되었다. 즉, Np/Vv GLP는 α-MSH에 의해 유도되는 멜라닌 합성 억제 효과를 나타냈으며, 특히 Np/Vv GLP r1은 강력한 멜라닌 합성 억제 활성으로 인해 피부 미백에 효과적인 물질로 사용될 수 있음을 보였다. 이러한 결과는 NpAS에 대한 VvGBE의 비율이 낮고 장쇄 비율이 높을수록 멜라닌 합성 억제 효과가 높음을 의미했다.

[0137] 또한, B16F10 흑색종 세포에 100 nM의 α-MSH와 함께 다양한 아밀로수크라아제/글리코겐분지효소 조합으로 제조된 GLP(Ns/Bt GLP, Ns/Ro GLP, Bt/Bt GLP, Bt/Ro GLP)를 1.25mg/ml(0.125%(w/v)) 농도로 처리한 후 멜라닌 분비량을 측정하였다.

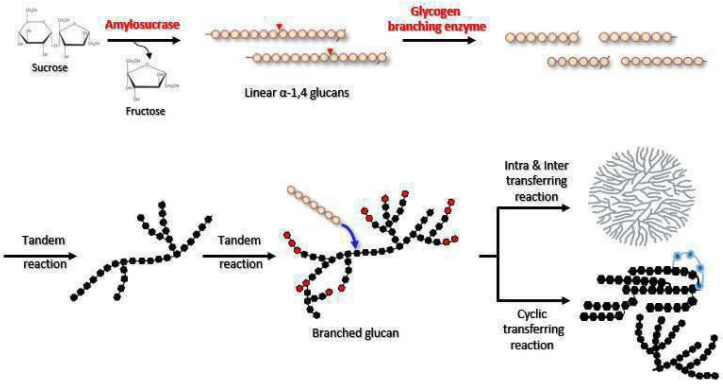
[0138] 그 결과, “티로시나아제 억제능 평가”에서 확인한 것처럼 티로시나아제 활성 억제 효과가 없는 GLP의 경우에도 멜라닌 합성 억제 효과는 우수함을 확인하였으며, 티로시나아제의 i) 발현량 자체가 적은 경우, ii) 발현되더라도 활성이 억제되는 경우 피부세포의 멜라닌 합성이 억제될 수 있다는 사실에 비추어 볼 때, 본 발명의 GLP는 티로시나아제 활성을 억제하기 보다는 티로시나아제의 발현량 자체를 억제하여 멜라닌 합성을 억제하였음을 알 수 있었다.

도면

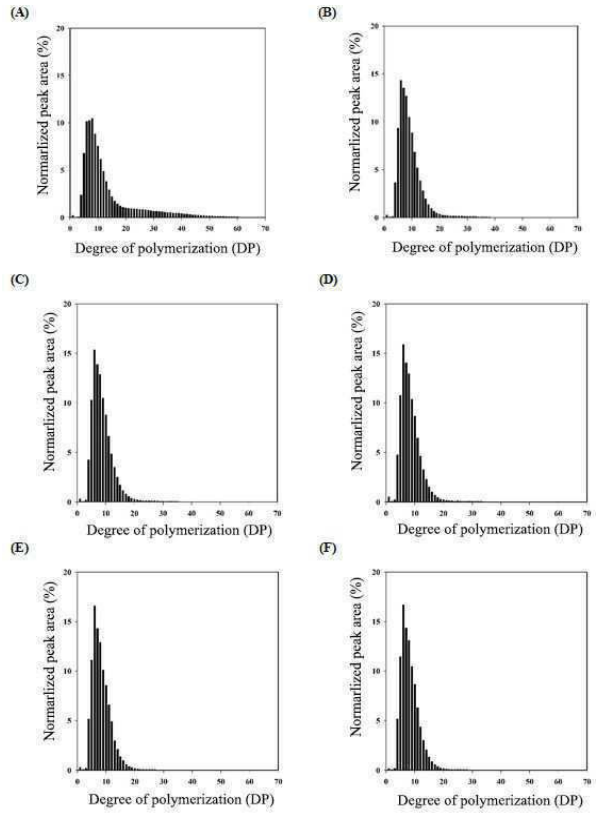
도면1


알파 1,6 글리코사이드결합
알파 1,4 글리코사이드결합

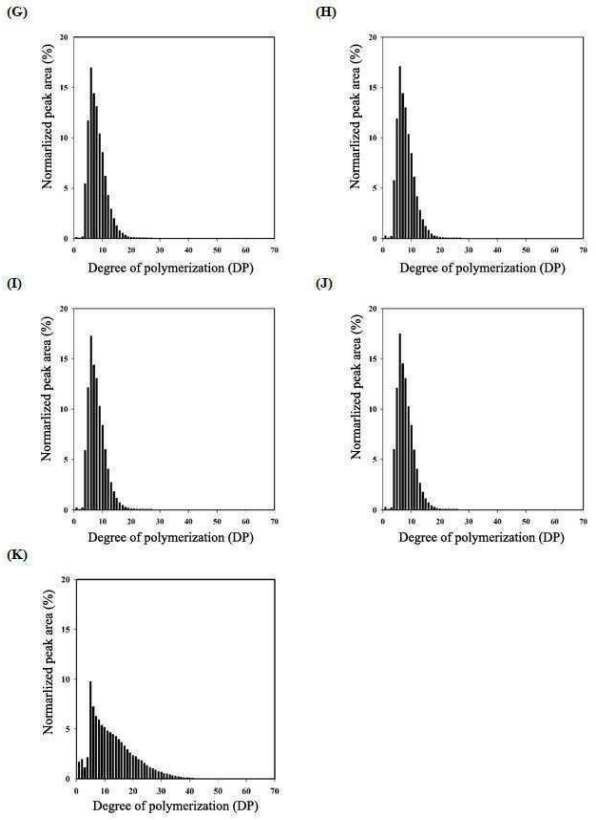
도면2


Amylosucrase
Sucrose
Fructose
Linear α-1,4 glucans
Glycogen branching enzyme
Tandem reaction
Tandem reaction
Branched glucan
Intra & Inter transferring reaction
Cyclic transferring reaction

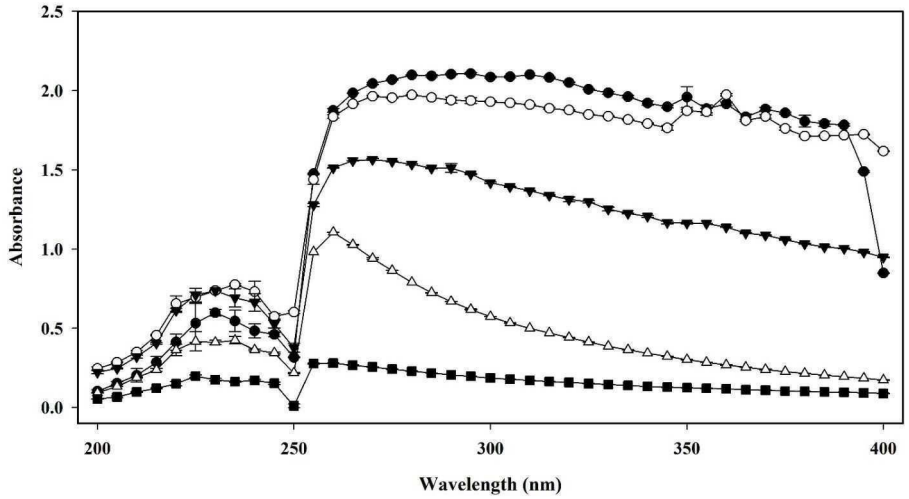
도면3


(A)
(B)
(C)
(D)
(E)
(F)
Normarlized peak area (%)
Degree of polymerization (DP)

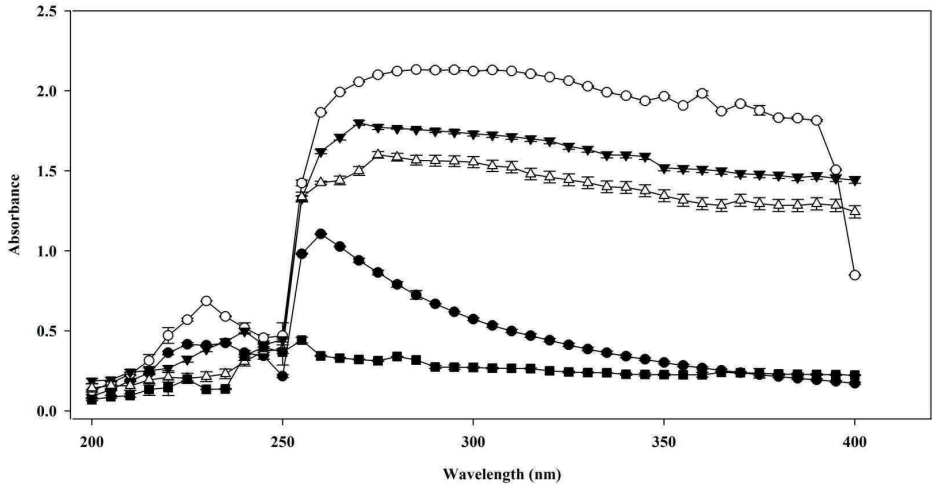
도면4


(G)
(H)
(I)
(J)
(K)
Normarlized peak area (%)
Degree of polymerization (DP)

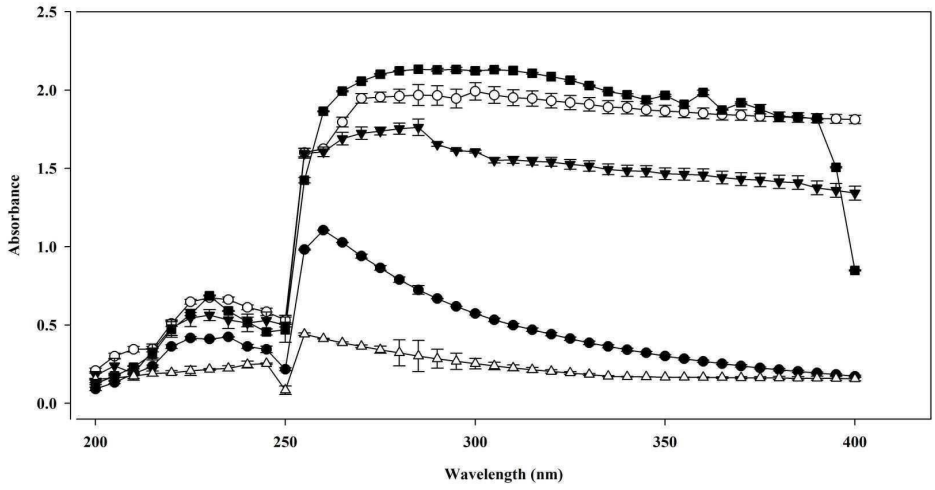
도면5


Absorbance
Wavelength (nm)
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
200
250
300
350
400

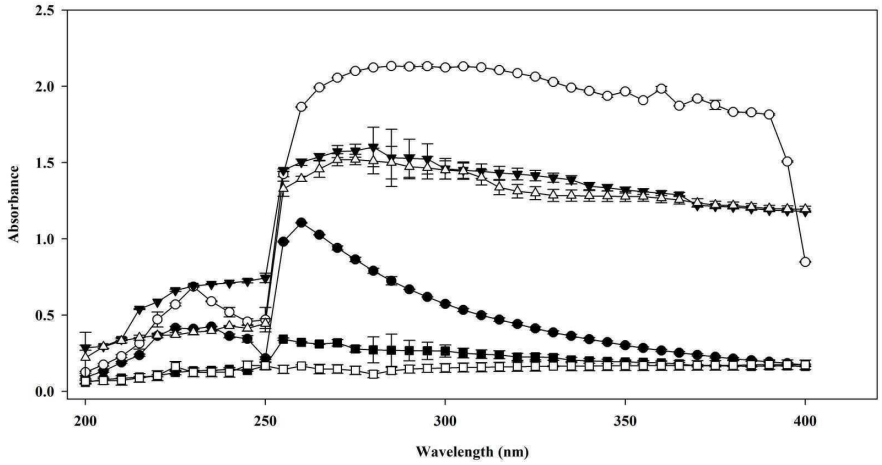
도면6


Absorbance
Wavelength (nm)
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
200
250
300
350
400

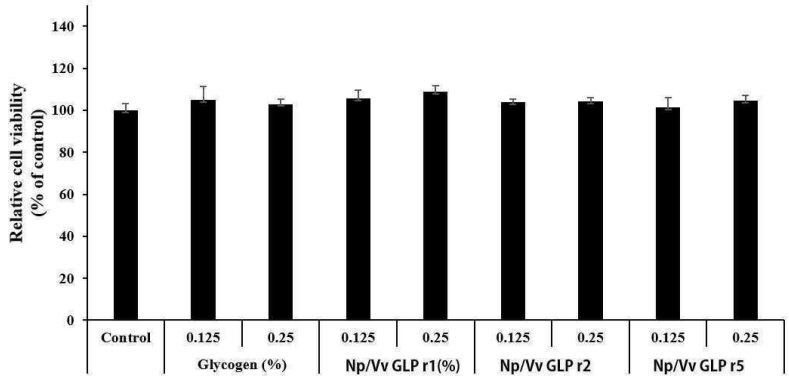
도면7


Absorbance
Wavelength (nm)
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
200
250
300
350
400

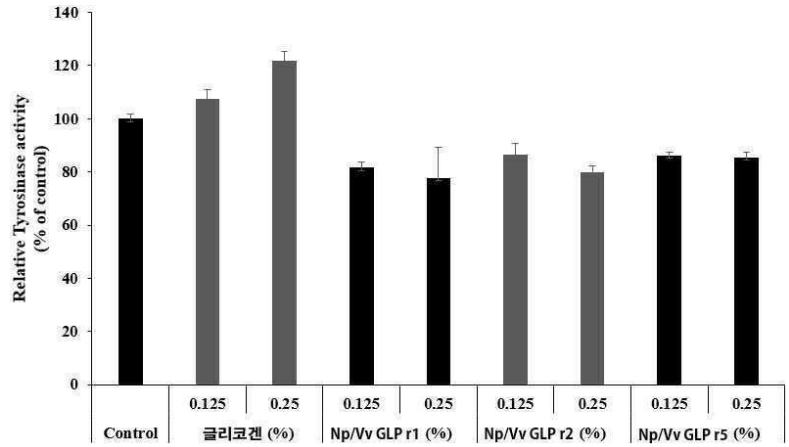
도면8


Absorbance
Wavelength (nm)
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
200
250
300
350
400

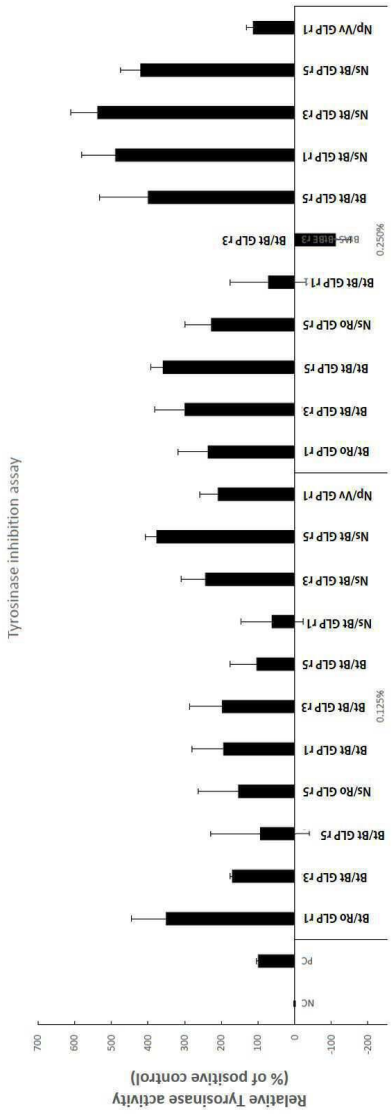
도면9


Relative cell viability
(% of control)
140
120
100
80
60
40
20
0
Control
0.125
0.25
Glycogen (%)
Np/Vv GLP r1(%)
Np/Vv GLP r2
Np/Vv GLP r5

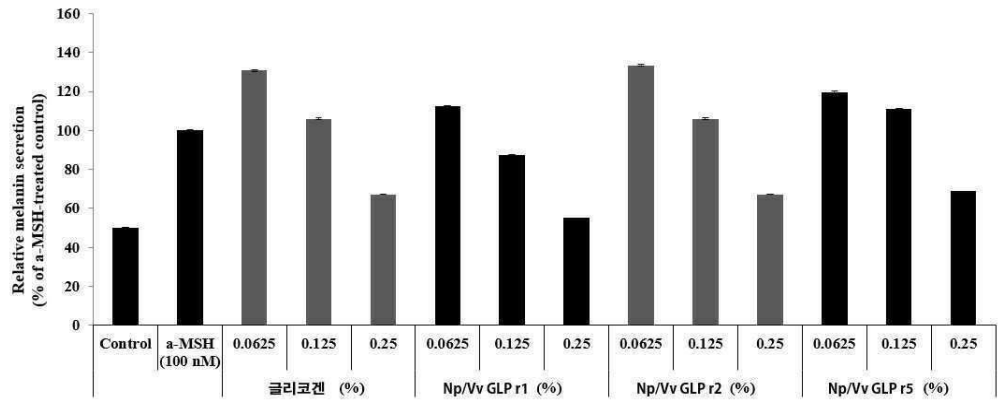
도면10


Relative Tyrosinase activity
(% of control)
140
120
100
80
60
40
20
0
Control
0.125
0.25
글리코겐 (%)
Np/Vv GLP r1 (%)
Np/Vv GLP r2 (%)
Np/Vv GLP r5 (%)

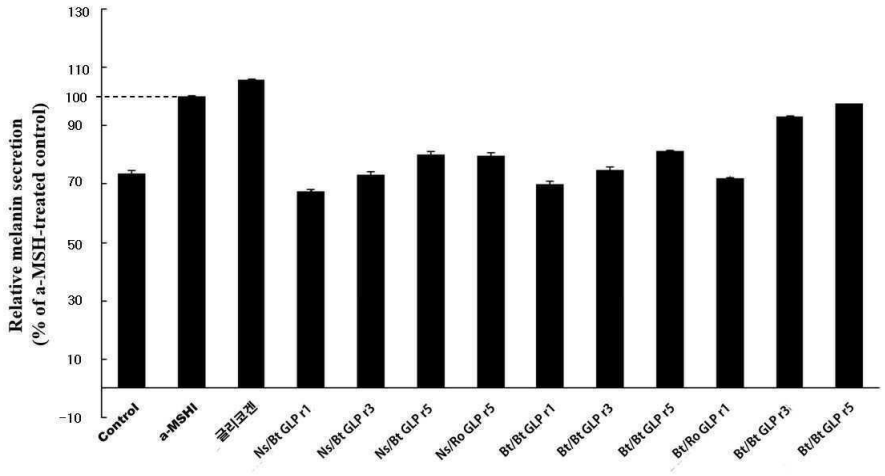
도면11


Tyrosinase inhibition assay
Relative Tyrosinase activity
(% of positive control)
700
600
500
400
300
200
100
0
-100
-200
NC
PC
Bt/Ro GLP r1
Bt/Bt GLP r3
Bt/Bt GLP r5
Ns/Ro GLP r5
Bt/Bt GLP r1
Bt/Bt GLP r3
Bt/Bt GLP r5
Ns/Bt GLP r1
Ns/Bt GLP r3
Ns/Bt GLP r5
Np/Vv GLP r1
Bt/Ro GLP r1
Bt/Bt GLP r3
Bt/Bt GLP r5
Ns/Bt GLP r1
Ns/Bt GLP r3
Ns/Bt GLP r5
Np/Vv GLP r1
0.250%
0.125%

도면12


Relative melanin secretion
(% of a-MSH-treated control)
160
140
120
100
80
60
40
20
0
Control
a-MSH
(100 nM)
0.0625
0.125
0.25
글리코겐 (%)
Np/Vv GLP r1 (%)
Np/Vv GLP r2 (%)
Np/Vv GLP r5 (%)

도면13


Relative melanin secretion
(% of a-MSH-treated control)
130
110
100
90
70
50
30
10
-10
Control
a-MSHI
글리코겐
Ns/Bt GLP r1
Ns/Bt GLP r3
Ns/Bt GLP r5
Ns/Ro GLP r5
Bt/Bt GLP r1
Bt/Bt GLP r3
Bt/Bt GLP r5
Bt/Ro GLP r1
Bt/Bt GLP r3
Bt/Bt GLP r5

서 열 목 록 (첨부)



아이콘을 클릭하시면 서열목록 파일이 열립니다.

본 공보 PDF는 첨부파일을 가지고 있습니다. Acrobat Reader PDF뷰어를 제공하지 않는 브라우저(크롬, 파이어폭스, 사파리 등)의 경우 첨부파일 열기가 제한되어 있으므로 Acrobat Reader PDF뷰어 설치 후 공보 PDF를 다운로드 받아 해당 뷰어에서 조회해주시기 바랍니다.