



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2020-0091904
(43) 공개일자 2020년07월31일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C07J 9/00 (2006.01) A23L 31/00 (2016.01)
A61K 31/704 (2006.01) A61K 8/99 (2017.01)
A61P 17/14 (2006.01) A61P 3/04 (2006.01)
A61P 3/06 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)
A61P 39/06 (2006.01) A61P 9/10 (2006.01)
A61Q 19/00 (2006.01)

(52) CPC특허분류

C07J 9/00 (2013.01)
A23L 31/00 (2020.05)

(21) 출원번호 10-2020-7018861

(22) 출원일자(국제) 2018년05월31일

심사청구일자 없음

(85) 번역문제출일자 2020년06월30일

(86) 국제출원번호 PCT/JP2018/021018

(87) 국제공개번호 WO 2019/106865

국제공개일자 2019년06월06일

(30) 우선권주장

JP-P-2017-231961 2017년12월01일 일본(JP)

(71) 출원인

고쿠리쓰다이가쿠호진 규슈다이가쿠

일본국 후쿠오카현 후쿠오카시 니시쿠 모토오카 744

가부시기가이샤 유그레나

일본국 도쿄도 미나토구 시바 5초메 29번 11고

(72) 발명자

이토 마코토

일본 8190395 후쿠오카현 후쿠오카시 니시쿠 모토오카 744 고쿠리쓰다이가쿠호진 규슈다이가쿠 내

와타나베 타카시

일본 8190395 후쿠오카현 후쿠오카시 니시쿠 모토오카 744 고쿠리쓰다이가쿠호진 규슈다이가쿠 내

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

특허법인와이에스장

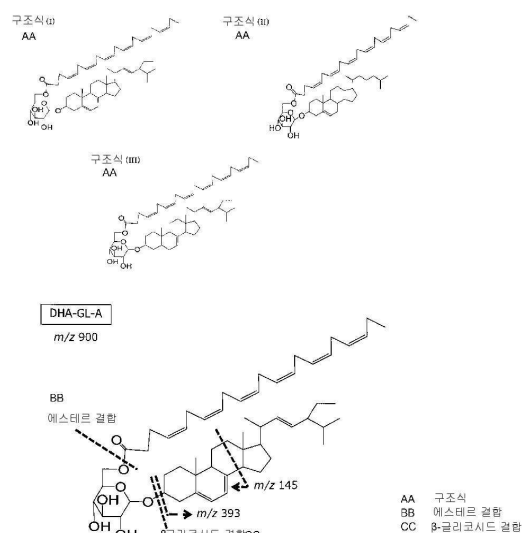
전체 청구항 수 : 총 18 항

(54) 발명의 명칭 아실스테릴글루코시드, 아실스테릴글루코시드의 제조 방법, 조성물, 향산화제, 발모 또는 육모제, 혈중 지질 저하제, 항비만제, 항종양제 및 아테롬성 동맥경화증의 예방 또는 치료제

(57) 요약

참신한 아실스테릴글루코시드 및 라비린톨라를 원료로 하는 아실스테릴글루코시드의 제조 방법을 제공한다. 하기 구조식(I), 구조식(II) 또는 구조식(III)으로 표시되는 아실스테릴글루코시드.

대표도



(52) CPC특허분류

A61K 31/704 (2013.01)
A61K 8/99 (2013.01)
A61P 17/14 (2018.01)
A61P 3/04 (2018.01)
A61P 3/06 (2018.01)
A61P 35/00 (2018.01)
A61P 39/06 (2018.01)
A61P 9/10 (2018.01)
A61Q 19/00 (2013.01)

(72) 발명자

우에무라 스즈미

일본 8190395 후쿠오카켄 후쿠오카시 니시쿠 모토
오카 744 고쿠리쓰다이가쿠호진 규슈다이가쿠 내

스즈키 켄고

일본 2300046 가나가와켄 요코하마시 츄루미쿠 오
노초 75반 1고 리딩벤처플라자 1고칸 4카이 가부시
키가이샤 유그레나 내

스기모토 료타

일본 2300046 가나가와켄 요코하마시 츄루미쿠 오
노초 75반 1고 리딩벤처플라자 1고칸 4카이 가부시
키가이샤 유그레나 내

하야시 마사히로

일본 8892192 미야자키켄 미야자키시 가쿠엔키바나
다이니시 1초메 1반치 고쿠리쓰다이가쿠호진 미야
자키다이가쿠 내

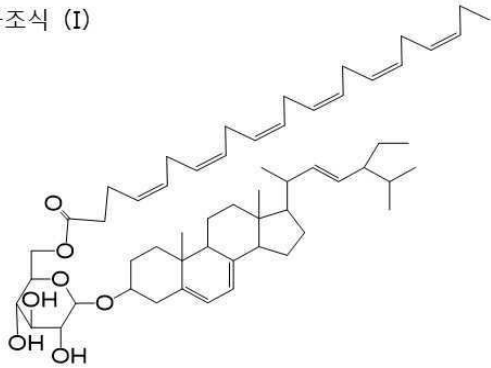
명세서

청구범위

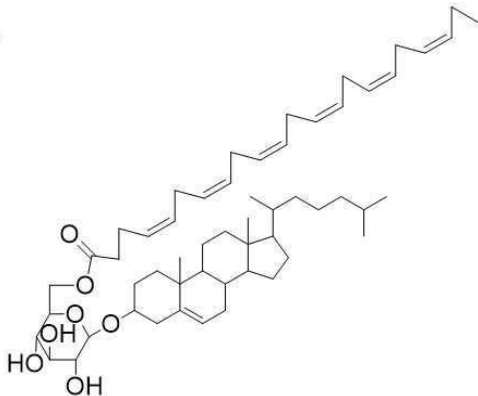
청구항 1

하기 구조식(I), 구조식(II) 또는 구조식(III)으로 표시되는 아실스테릴글루코시드.

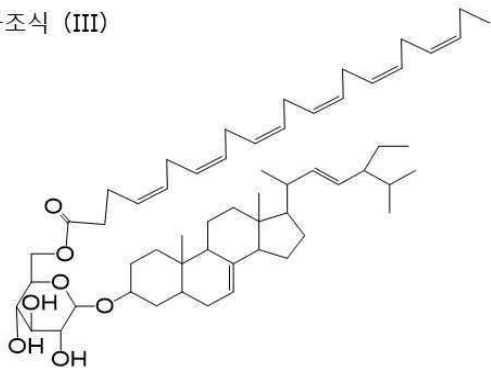
구조식 (I)



구조식 (II)



구조식 (III)



청구항 2

라비린톨라를 준비하는 라비린톨라 준비 공정과,

상기 라비린톨라로부터 아실스테릴글루코시드를 함유하는 아실스테릴글루코시드 획분을 분리하는 분리 공정과,

상기 분리 공정에서 분리한 상기 아실스테릴글루코시드 획분으로부터 상기 아실스테릴글루코시드를 정제하는 정제 공정

을 행하는 것을 특징으로 하는 아실스테릴글루코시드의 제조 방법.

청구항 3

제 2 항에 있어서, 상기 아실스테릴글루코시드는 스테릴글루코시드에 도코사헥사엔산 또는 팔미틴산이 에스테르 결합한 것인 것을 특징으로 하는 아실스테릴글루코시드의 제조 방법.

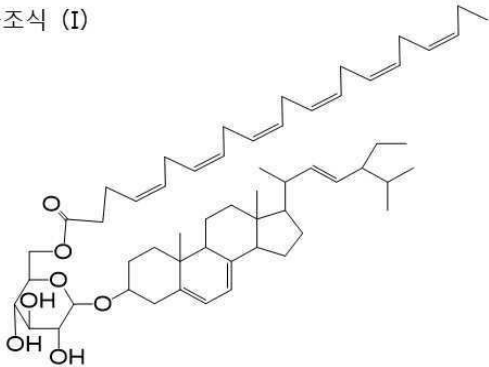
청구항 4

제 3 항에 있어서, 상기 아실스테릴글루코시드는 스테릴글루코시드에 도코사헥사엔산이 에스테르 결합한 것인 것을 특징으로 하는 아실스테릴글루코시드의 제조 방법.

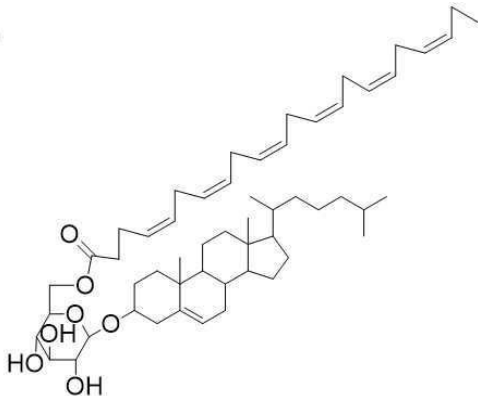
청구항 5

제 4 항에 있어서, 상기 아실스테릴글루코시드는 하기 구조식(I), 구조식(II) 또는 구조식(III)으로 표시되는 1 종 이상인 것을 특징으로 하는 아실스테릴글루코시드의 제조 방법.

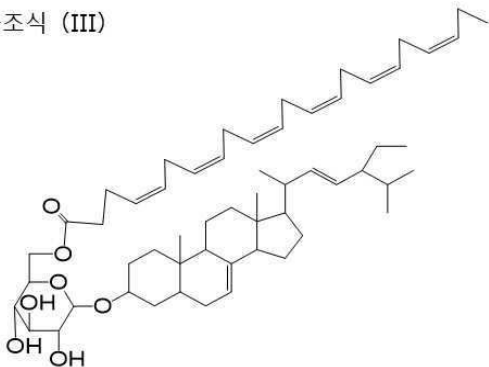
구조식 (I)



구조식 (II)



구조식 (III)



청구항 6

라비린톨라 유래의 아실스테릴글루코시드를 함유하고,

식품 조성물, 의약 조성물, 화장품 조성물로부터 선택되는 조성물인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 7

제 6 항에 있어서, 상기 아실스테릴글루코시드는 스테릴글루코시드에 도코사헥사엔산 또는 팔미틴산이 에스테르

결합한 것인 것을 특징으로 하는 조성물.

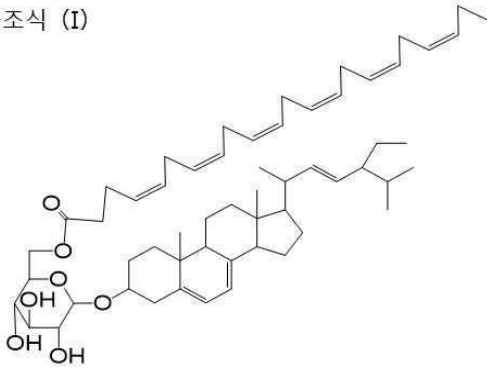
청구항 8

제 7 항에 있어서, 상기 아실스테릴글루코시드는 스테릴글루코시드에 도코사헥사엔산이 에스테르 결합한 것인 것을 특징으로 하는 조성물.

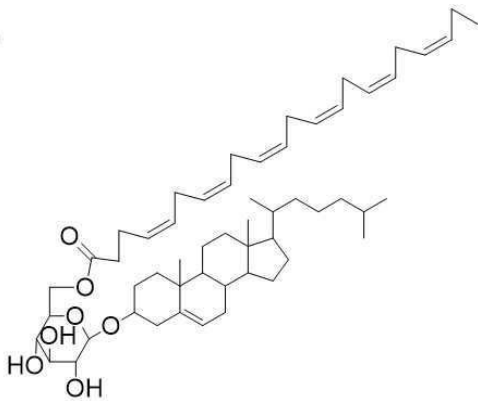
청구항 9

제 8 항에 있어서, 상기 아실스테릴글루코시드는 하기 구조식(I), 구조식(II) 또는 구조식(III)으로 표시되는 1 종 이상인 것을 특징으로 하는 조성물.

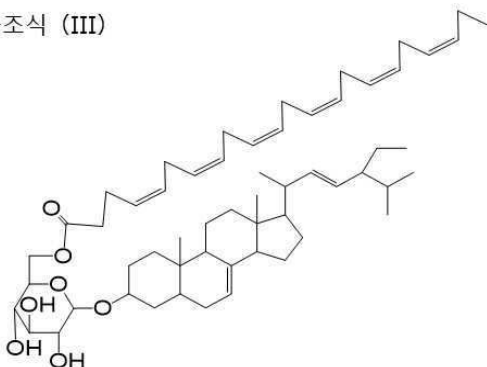
구조식 (I)



구조식 (II)



구조식 (III)



청구항 10

제 6 항 내지 제 9 항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 조성물이 식품 조성물인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 11

제 6 항 내지 제 9 항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 조성물이 의약 조성물인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 12

제 6 항 내지 제 9 항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 조성물이 화장료 조성물인 것을 특징으로 하는 조성물.

청구항 13

라비린톨라 유래의 아실스테릴글루코시드를 유효 성분으로서 함유하는 항산화제.

청구항 14

라비린톨라 유래의 아실스테릴글루코시드를 유효 성분으로서 함유하는 발모 또는 욱모제.

청구항 15

라비린톨라 유래의 아실스테릴글루코시드를 유효 성분으로서 함유하는 혈중 지질 저하제.

청구항 16

라비린톨라 유래의 아실스테릴글루코시드를 유효 성분으로서 함유하는 항비만제.

청구항 17

라비린톨라 유래의 아실스테릴글루코시드를 유효 성분으로서 함유하는 항종양제.

청구항 18

라비린톨라 유래의 아실스테릴글루코시드를 유효 성분으로서 함유하는 아테롬성 동맥경화증의 예방 또는 치료제.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 아실스테릴글루코시드, 아실스테릴글루코시드의 제조 방법, 조성물, 항산화제, 발모 또는 욱모제, 혈중 지질 저하제, 항비만제, 항종양제 및 아테롬성 동맥경화증의 예방 또는 치료제에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 라비린톨라류는 해양에 생식하는 진핵성 미생물이며, 염록체를 가지지 않고, 해양의 유기물을 분해, 흡수하는 종속성의 단세포 생물이다. 라비린톨라류는 분류학적으로는 원생생물에 속하고, 난균류 등과 함께 스트라메노파일류라고 불리는 일대계통군을 구성하고 있다. 라비린톨라류는 혐의의 라비린톨라과와 트라우스토키트리움과로 구성되고, 전자는 라비린톨라속 1속, 후자는 아우란티오키트리움속, 트라우스토키트리움속, 파리에티키트리움속 등의 11속으로 분류되어 있다.

[0003] 라비린톨라류는 DHA 등의 고도 불포화 지방산, 팔미탄산 등의 포화 지방산, 스쿠알렌 등의 탄화수소, 스펅고지질 등의 지질의 생산력이 우수하고, 그들을 세포 내의 유구(油球)(유적(油滴))에 대량으로 축적할 수 있다. 그 때문에 의약품, 기능성 식품, 바이오 에너지의 생산원으로서 산업적으로도 깊은 관심이 쏠리고 있다(특허문헌 1).

[0004] 예를 들면 라비린톨라류의 1종인 아우란티오키트리움은 석유를 만드는 해초로서 주목되고 있으며, 청어로부터 공업적으로 생산되고 있는 n-3 고도 불포화 지방산의 대체 생산원으로서도 개발이 진행되고 있다.

[0005] 라비린톨라류에 포함되는 당지질로서, 스테롤에 글루코오스가 결합한 스테릴글루코시드(SG)가 동정되어 있다. 예를 들면 오키나와켄 하테루마지마의 연안해수로부터 분리한 A. limacinum mh0186주에 있어서, 스테릴글루코시드로서 4개의 물질이 동정되어 있다. 구체적으로는 GL-A(3-O-b-D-glucopyranosyl-stigmasta-5,7,22-triene)과 GL-B(3-O-b-D-glucopyranosyl-4-a-methyl-stigmasta-7,22-diene)라는 2종의 스테릴글루코시드(SG)가 이차원 NMR에 의해 구조 결정되고, 또한 고속 액체 크로마토그래피-질량분석계(LC-MS) 해석에 의해 GL-C(3-O-b-D-glucopyranosyl-stigmasta-7,22-diene)과 콜레스테릴글루코시드(CG)의 존재가 나타나 있다(도 1).

[0006] 스테릴글루코시드(스테롤 배당체)나 아실스테릴글루코시드(스테롤 배당체 에스테르)는 천연 유지 성분으로서 유지 중에 함유되어 있고, 그 용도로서 예를 들면 발모·욕모(특허문헌 2), 혈중 지질의 저하(특허문헌 3), 비만 예방(특허문헌 4) 등의 각종 용도가 보고되어 있다.

[0007] 스테릴글루코시드나 아실스테릴글루코시드는 수요가 높은 유용 성분이지만, 자연계에서는 희소하며, 그 공급원은 한정되어 있다. 또 종래, 라비린톨라류에 아실스테릴글루코시드가 포함되는 것은 알려져 있지 않았다.

선행기술문헌

특허문헌

[0008] (특허문헌 0001) 일본 특개 2010-200690호 공보
(특허문헌 0002) 일본 특개 평7-101835호 공보
(특허문헌 0003) 일본 특개 평7-118159호 공보
(특허문헌 0004) 일본 특개 평7-107939호 공보

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009] 본 발명은 상기한 과제를 감안하여 이루어진 것으로, 본 발명의 목적은, 라비린톨라류를 원료로서 사용하는 참신(또는 신기(新奇))한 아실스테릴글루코시드의 제조 방법을 제공하는 것에 있다.

[0010] 또 본 발명의 다른 목적은, 라비린톨라류 유래의 아실스테릴글루코시드를 함유하는 식품 조성물, 의약 조성물, 화장품 조성물 등의 조성물을 제공하는 것에 있다.

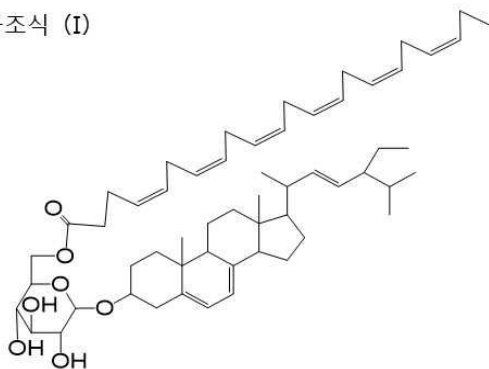
[0011] 또 본 발명의 또 다른 목적은, 라비린톨라류 유래의 아실스테릴글루코시드를 유효 성분으로서 함유하는 항산화제, 발모 또는 육모제, 혈중 지질 저하제, 항비만제, 항종양제 및 아테롬성 동맥경화증의 예방 또는 치료제를 제공하는 것에 있다.

과제의 해결 수단

[0012] 본 발명자들은 상기 과제를 해결하기 위해 예의 연구한 결과, 라비린톨라류에 스테릴글루코시드 이외에 구조 미지의 당지질이 포함되는 것을 알아내어, 본 발명을 완성시키기에 이르렀다.

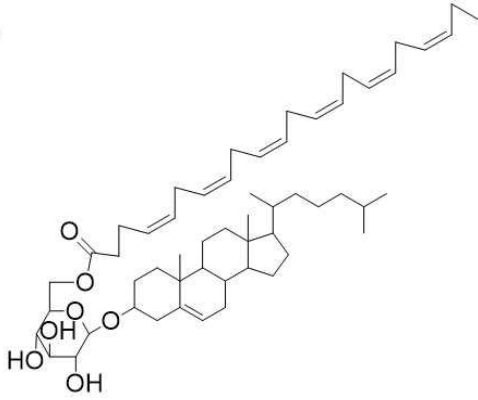
[0013] 따라서, 상기 과제는, 본 발명에 의하면, 하기 구조식(I), 구조식(II) 또는 구조식(III)으로 표시되는 아실스테릴글루코시드에 의해 해결된다.

구조식 (I)

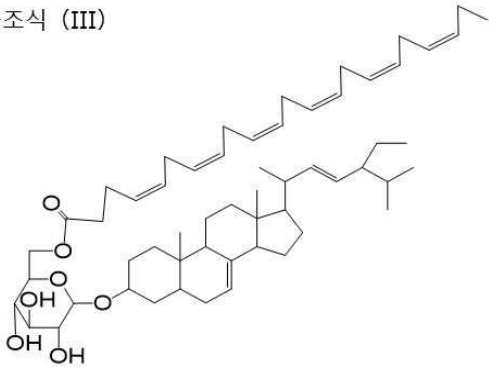


[0014]

구조식 (II)



구조식 (III)



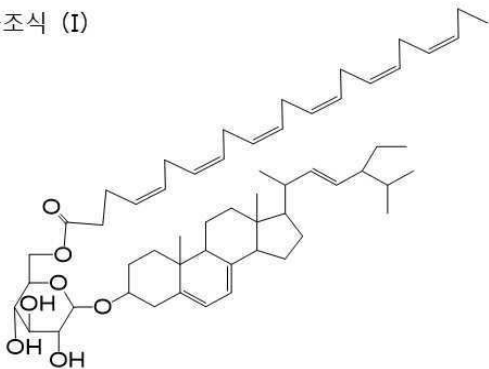
또 상기 과제는, 본 발명에 의하면, 라비린톨라를 준비하는 라비린톨라 준비 공정과, 상기 라비린톨라로부터 아실스테릴글루코시드를 함유하는 아실스테릴글루코시드 획분을 분리하는 분리 공정과, 상기 분리 공정에서 분리한 상기 아실스테릴글루코시드 획분으로부터 상기 아실스테릴글루코시드를 정제하는 정제 공정을 행하는 것을 특징으로 하는 아실스테릴글루코시드의 제조 방법에 의해 해결된다.

이 때, 상기 아실스테릴글루코시드는 스테릴글루코시드에 도코사헥사엔산 또는 팔미틴산이 에스테르 결합한 것이면 된다.

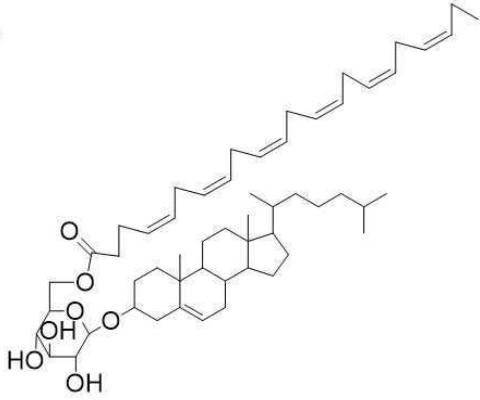
이 때, 상기 아실스테릴글루코시드는 스테릴글루코시드에 도코사헥사엔산이 에스테르 결합한 것이면 된다.

이 때, 상기 아실스테릴글루코시드는 하기 구조식(I), 구조식(II) 또는 구조식(III)으로 표시되는 1종 이상이면 된다.

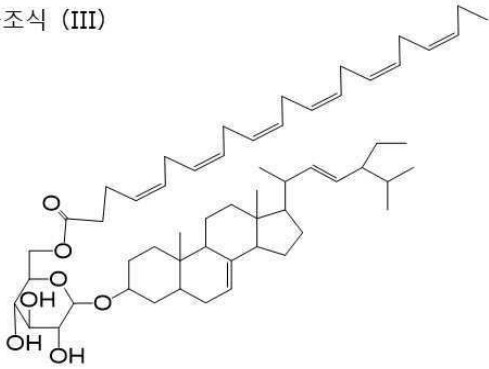
구조식 (I)



구조식 (II)



구조식 (III)



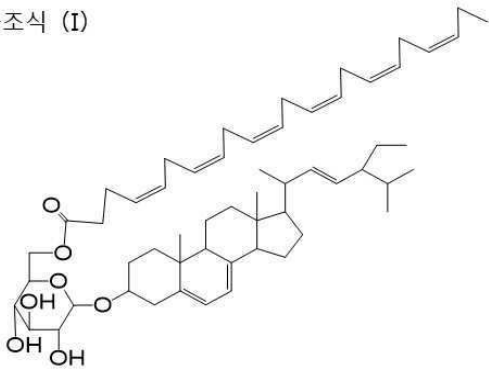
또 상기 과제는, 본 발명에 의하면, 라비린톨라 유래의 아실스테릴글루코시드를 함유하고, 식품 조성물, 의약 조성물, 화장품 조성물로부터 선택되는 조성물에 의해 해결된다.

이 때, 상기 아실스테릴글루코시드는 스테릴글루코시드에 도코사헥사엔산 또는 팔미틴산이 에스테르 결합한 것이면 된다.

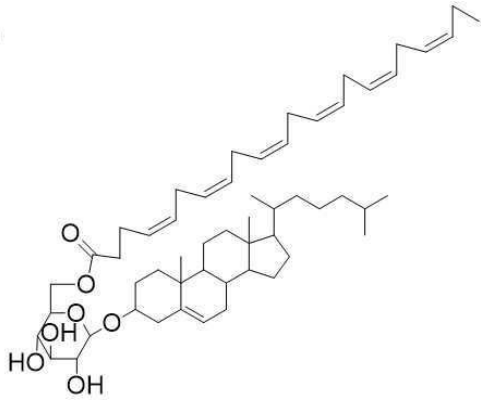
이 때, 상기 아실스테릴글루코시드는 스테릴글루코시드에 도코사헥사엔산이 에스테르 결합한 것이면 된다.

이 때, 상기 아실스테릴글루코시드는 하기 구조식(I), 구조식(II) 또는 구조식(III)으로 표시되는 1종 이상이면 된다.

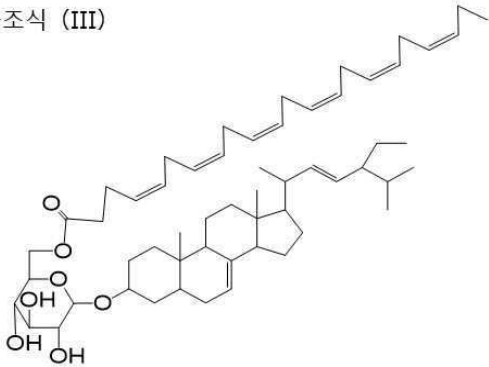
구조식 (I)



구조식 (II)



구조식 (III)



이 때, 상기 조성물이 식품 조성물이면 된다.

이 때, 상기 조성물이 의약 조성물이면 된다.

이 때, 상기 조성물이 화장품 조성물이면 된다.

또 상기 과제는, 본 발명의 항산화제에 의하면, 라비린톨라 유래의 아실스테릴글루코시드를 유효 성분으로서 함유함으로써 해결된다.

또 상기 과제는, 본 발명의 발모 또는 육모제에 의하면, 라비린톨라 유래의 아실스테릴글루코시드를 유효 성분으로서 함유함으로써 해결된다.

또 상기 과제는, 본 발명의 혈중 지질 저하제에 의하면, 라비린톨라 유래의 아실스테릴글루코시드를 유효 성분으로서 함유함으로써 해결된다.

또 상기 과제는, 본 발명의 항비만제에 의하면, 라비린톨라 유래의 아실스테릴글루코시드를 유효 성분으로서 함유함으로써 해결된다.

또 상기 과제는, 본 발명의 항종양제에 의하면, 라비린톨라 유래의 아실스테릴글루코시드를 유효 성분으로서 함유함으로써 해결된다.

또 상기 과제는, 본 발명의 아테롬성 동맥경화증의 예방 또는 치료제에 의하면, 라비린톨라 유래의 아실스테릴글루코시드를 유효 성분으로서 함유함으로써 해결된다.

발명의 효과

본 발명에 의하면, 참신한 아실스테릴글루코시드를 제공할 수 있다.

본 발명의 아실스테릴글루코시드의 제조 방법에 의하면, 대량 배양이 가능한 조류 비이오매스인 라비린톨라류를 이용하여, 유용 물질인 아실스테릴글루코시드를 제조하는 것이 가능하게 된다.

또 라비린톨라 유래의 아실스테릴글루코시드를 식품 조성물, 의약 조성물, 화장품 조성물 등의 조성물로서 이용하는 것이 가능하다.

또 본 발명에 의하면, 라비린톨라 유래의 아실스테릴글루코시드를 유효 성분으로서 함유하는 항산화제, 발모 또는 육모제, 혈중 지질 저하제, 항비만제, 항종양제나 아테롬성 동맥경화증의 예방 또는 치료제를 제공할 수 있

다.

도면의 간단한 설명

[0044]

도 1은 A. limacinum mh0186주에 포함되는 스테릴글루코시드를 나타내는 도면이다.

도 2는 본 실시형태의 아실스테릴글루코시드의 제조 방법을 나타내는 플로우도이다.

도 3은 시험 1에 있어서의 박층 크로마토그래피(TLC)의 결과를 나타내는 사진이다. 미지 당지질을 화살표로 나타낸다. 표품에는 시토스테릴글루코시드, 아실스테릴글루코시드를 사용하고, 1레인에 2mg의 건조 세포로부터 추출한 지질을 공시했다. 전개 용매로는 클로로포름/메탄올/물=65/25/4를 사용하고, 오르시놀황산으로 밴드를 검출했다.

도 4A는 시험 2에 있어서의 고속 액체 크로마토그래피 질량분석계(LC-MS)의 결과이다.

도 4B는 시험 2에 있어서 특정된 아실스테릴글루코시드의 구조를 나타내는 도면이다(DHA-GL-A, 구조식(I)).

도 5A는 시험 2에 있어서의 고속 액체 크로마토그래피 질량분석(LC-MS)의 결과이다.

도 5B는 시험 2에 있어서 특정된 아실스테릴글루코시드의 구조를 나타내는 도면이다(DHA-CG, 구조식(II)).

도 6은 시험 3에 있어서 아실스테릴글루코시드(ASG)에 결합하고 있는 지방산의 조성을 가스 크로마토그래피(GC)로 해석한 결과를 나타내는 그래프이다.

도 7은 시험 4에 있어서 아실스테릴글루코시드(ASG)에 있어서의 스테릴글루코시드(SG)와 지방산의 조합을 고속 액체 크로마토그래피 질량분석계(LC-MS)로 해석한 결과를 나타내는 그래프이다.

도 8은 시험 5에서 행한 결합 해석(약알칼리 분해와 β 글루코시다아제(EGCrP2) 처리)의 흐름을 나타내는 설명도이다.

도 9는 시험 5에 있어서의 ASG의 지방산과 당의 결합 해석의 결과를 나타내는 박층 크로마토그래피(TLC)의 사진이다.

도 10은 시험 6에 있어서의 A. limacinum mh0186의 세포의 증식 곡선을 나타내는 그래프이다.

도 11은 시험 6에 있어서의 배양액에 포함되는 글루코오스 농도의 시간 경과에 따른 변화를 나타내는 그래프이다.

도 12는 시험 6에 있어서 검토를 행한 A. limacinum mh0186의 세포에 포함되는 스테릴글루코시드(SG)량의 시간 경과에 따른 변화를 나타내는 그래프이다.

도 13은 시험 6에 있어서 검토를 행한 A. limacinum mh0186의 세포에 포함되는 아실스테릴글루코시드(ASG)량의 시간 경과에 따른 변화를 나타내는 그래프이다.

도 14는 추정되는 ASG 합성 과정을 나타내는 설명도이다. (a)가설 1: TG 리파아제가 지방산을 SG로 전이한다. (b)가설 2: 포스포리파아제가 지방산을 SG로 전이한다.

도 15는 올레인산 첨가에 의한 SG와 ASG량의 변화. (a)EG(에르고스테릴글루코시드)의 양, (b)AEG(아실에르고스테릴글루코시드)의 양, (c)총AEG량. Mean $\pm$ SE(n=3), n.d는 not detected를 의미한다.

도 16은 시험 1 내지 6으로부터 동정된 라비린톨라에 포함되는 참신한 아실스테릴글루코시드(ASG)의 구조의 설명도이다.

도 17은 라비린톨라에 있어서 아실스테릴글루코시드(ASG), 중성지질, 인지질이 DHA 축적의 리저버로서 작용하고 있는 것을 나타내는 도면이다.

도 18은 시험 8에서 측정을 행한 박층 크로마토그래피(TLC)의 결과를 나타내는 사진이다.

도 19는 시험 8에서 측정을 행한 고속 액체 크로마토그래피 질량분석(LC-MS)의 결과를 나타내는 그래프이다.

도 20은 시험 9에서 검토를 행한 DHA-SG와 DHA의 산화 측정의 결과를 나타내는 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0045] 이하, 본 발명의 실시형태(본 실시형태)에 대해, 도 1 내지 20을 참조하면서 설명한다.
- [0046] 본 실시형태는 아실스테릴글루코시드, 아실스테릴글루코시드의 제조 방법, 조성물, 항산화제, 발모 또는 육모제, 혈중 지질 저하제, 항비만제, 항종양제 및 아테롬성 동맥경화증의 예방 또는 치료제에 관한 것이다.
- [0047] 본 명세서에 있어서 사용하는 약어는 이하와 같다.
- [0048] ASG : 아실스테릴글루코시드(acyl steryl glucoside)
- [0049] DCW : 건조 세포 중량(dry cell weight)
- [0050] DHA : 도코사헥사엔산(docosahexaenoic acid)
- [0051] EG : 에르고스테릴글루코시드(ergosteryl glucoside)
- [0052] LC-MS : 액체 크로마토그래피-질량분석(liquid chromatography mass spectrometry)
- [0053] LPC : 리소포스파티딜콜린(lysophosphatidyl choline)
- [0054] LPE : 리소포스파티딜에탄올아민(lysophosphatidyl ethanolamine)
- [0055] PC : 포스파티딜콜린(phosphatidyl choline)
- [0056] PE : 포스파티딜에탄올아민(phosphatidyl ethanolamine)
- [0057] SE : 스테롤에스테르(sterol ester)
- [0058] SG : 스테릴글루코시드(steryl glucoside)
- [0059] TG : 트리아실글리세롤(triacylglycerol)
- [0060] TLC : 박층 크로마토그래피(thin layer chromatography)
- [0061] <라비린툴라>
- [0062] 본 실시형태의 아실스테릴글루코시드는 해양성 진핵 미생물인 라비린툴라류를 배양하고 분리, 정제함으로써 얻을 수 있다.
- [0063] 본 실시형태에 있어서, 「라비린툴라」란 동물학이나 식물학의 분류에서 라비린툴라류로 분류되는 미생물, 그 변종, 그 변이종의 전부를 포함한다.
- [0064] 라비린툴라류로서는, 라비린툴라속(Labyrinthula), 알토르니아속(Althornia), 아플라노키트리움속(Aplanochytrium), 야포노키트리움속(Japonochytrium), 라비린툴로이데스속(Labyrinthuloides), 시조키트리움속(Schizochytrium), 트라우스토키트리움속(Thraustochytrium), 오블롱기치트리움속(Oblongichytrium), 파리에티키트리움속(Parietichytrium), 또는 울케니아속(Ulkenia), 아우란티오키트리움속(Aurantiochytrium)을 들 수 있고, 바람직하게는 아우란티오키트리움속에 속하는 미생물이며, 특히 바람직하게는 아우란티오키트리움·리마시넘(Aurantiochytrium limacinum)을 들 수 있다. 이들은 보존 기관으로부터 분양된 균주, 또는 그 계대배양 균주여도 되고, 예를 들면 A. limacinum mh0186주가 예시된다.
- [0065] 라비린툴라류 A. limacinum mh0186주(수탁 번호 FERM P-19755)는 오키나와켄 하테루마지마 연안에서 단리되며, 배양 온도가 10~35℃로 폭넓은 온도에서 생육 가능하기 때문에, 본 실시형태의 아실스테릴글루코시드의 제조 방법에 적합하게 사용할 수 있다.
- [0066] 라비린툴라류는 해양 특히 연안역의 해수역이나, 하구 등의 기수역에 널리 분포되어 있고, 이들로부터 분리하여 사용해도 되고, 또 이미 단리되어 있는 임의의 라비린툴라류를 사용해도 된다.
- [0067] 라비린툴라류는 그 모든 변이주를 포함한다. 또 이들 변이주 중에는 유전적 방법, 예를 들면 재조합, 형질도입, 형질전환 등에 의해 얻어진 것도 함유된다.
- [0068] 라비린툴라류의 배양은 통상 사용되는 고체배양지 또는 액체배양지 등에서 상법에 의해 배양한다. 이 때, 사용되는 배지로서는 예를 들면 탄소원으로서 글루코오스, 프룩토오스, 수크로오스, 전분, 글리세린 등, 또 질소원으로서 효모엑기스, 콘 스티프 리퀴, 폴리펩톤, 글루타민산나트륨, 요소, 아세트산암모늄, 황산암모늄, 질산암모늄, 염화암모늄, 질산나트륨 등, 또 무기염으로서 인산칼륨 등, 그 밖에 필요한 성분을 적절히 조합한 배지이며, 라비린툴라류를 배양하기 위해서 통상 사용되는 것이면 특별히 한정되지 않지만, 특히 바람직하게는 효모엑

기스·글루코오스 배지(GY 배지)가 사용된다. 배지는 조제 후, pH를 3.0~8.0의 범위 내로 조정한 후, 오토클레이브 등에 의해 살균하여 사용한다. 배양은 10~40℃, 바람직하게는 15~35℃에서, 1~14일간, 통기 교반 배양, 진탕 배양, 또는 정지 배양으로 행하면 된다.

[0069] 라비린툴라류의 배양은 광을 조사하지 않고 행할 수 있는데, 태양광을 직접 이용하는 오픈 폰드 방식, 집광 장치로 집광한 태양광을 광 파이버 등으로 보내고, 배양조에서 조사시켜 광합성에 이용하는 집광 방식 등에 의해 행해도 된다.

[0070] 또 라비린툴라류의 배양은 예를 들면 공급 배치법을 사용하여 행해질 수 있는데, 플라스크 배양이나 발효조를 사용한 배양, 회분 배양법, 반회분 배양법(유가 배양법), 연속 배양법(관류 배양법) 등 어느 액체배양법에 의해 행해도 된다.

[0071] 라비린툴라류의 분리는 예를 들면 배양액의 원심분리, 여과 또는 단순한 침강에 의해 행해진다.

[0072] <스테릴글루코시드 및 아실스테릴글루코시드>

[0073] (스테릴글루코시드)

[0074] 스테릴글루코시드(SG)는 당지질의 1종이며, 스테롤 골격에 글루코오스가 α- 또는 β-글루코시드 결합한 구조를 취한다. 스테릴글루코시드는 세포 분화나 스트레스 응답에 있어서의 지질성 메디에이터로서 기능할 가능성이 시사되고 있다. 또 스테릴글루코시드는 예를 들면 바이러스 감염 및 세균 감염의 치료제, 발모제, 욕모제, 혈중 지질 저하제, 항비만제, 항스트레스제, 영양 성분 흡수 촉진제 등의 유효 성분으로서 알려져 있다.

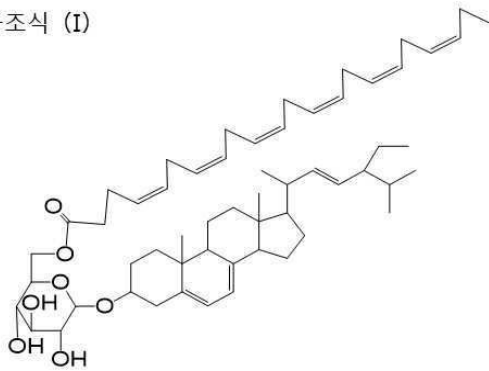
[0075] (아실스테릴글루코시드)

[0076] 아실스테릴글루코시드(ASG)는 스테릴글루코시드(SG)에 지방산이 에스테르 결합한 물질의 총칭이다.

[0077] 여기서, 본 실시형태의 아실스테릴글루코시드는 스테릴글루코시드(SG)에 도코사헥사엔산(DHA)이나 팔미틴산이 에스테르 결합하고 있다.

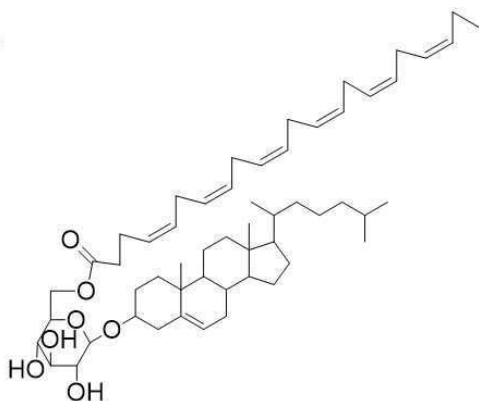
[0078] 본 실시형태의 아실스테릴글루코시드는 스테릴글루코시드(SG)에 DHA가 에스테르 결합한 하기 구조식(I)(DHA-GL-A), 구조식(II)(DHA-CG) 또는 구조식(III)(DHA-GL-C)으로 표시되는 것이다.

구조식 (I)



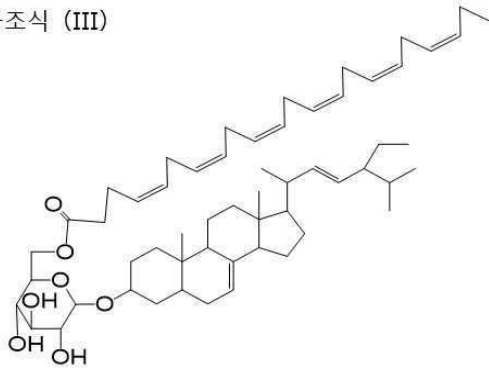
[0079]

구조식 (II)



[0080]

구조식 (III)



[0081]

[0082]

아실스테릴글루코시드(ASG)의 기능성으로서, 인간 유방암 세포주(MCF7)를 스테릴글루코시드(SG)보다 잘 죽이는 것(Wimmerova et al, Improved enzyme-mediated synthesis and supramolecular self-assembly of naturally occurring conjugates of β -sitosterol, Steroids 117 (2017) 38-43), 상승한 LDL 콜레스테롤을 감소시키는 것(Ito et al, Rice bran extract containing acylated sterol glucoside fraction decreases elevated blood LDL cholesterol level in obese Japanese men, The Journal of Medical Investigation, 62 (2015) 80-84), 아테롬성 동맥경화증 리스크를 저감시키는 것(Nhung et al, Rice Bran Extract Reduces the Risk of Atherosclerosis in Post-Menopausal Vietnamese Women., Journal of Nutritional Science and Vitaminology, 62 (2016) 295-302) 등이 보고되어 있다.

[0083]

<아실스테릴글루코시드의 제조 방법>

[0084]

본 실시형태의 아실스테릴글루코시드의 제조 방법은 라비린톨라를 준비하는 라비린톨라 준비 공정과, 상기 라비린톨라로부터 아실스테릴글루코시드를 함유하는 아실스테릴글루코시드 획분을 분리하는 분리 공정과, 상기 분리 공정에서 분리한 상기 아실스테릴글루코시드 획분으로부터 상기 아실스테릴글루코시드를 정제하는 정제 공정을 행하는 것을 특징으로 한다.

[0085]

이하, 각 공정에 대해서, 도 2를 참조하여 상세하게 설명한다.

[0086]

(라비린톨라 준비 공정)

[0087]

라비린톨라 준비 공정에서는 아실스테릴글루코시드의 원료가 되는 라비린톨라류를 준비한다(스텝 S1).

[0088]

원료가 되는 라비린톨라로서는 아실스테릴글루코시드의 분리·정제의 관점에서 라비린톨라 세포의 건조품을 사용하는 것이 바람직한데, 이것에 한정되는 것은 아니다. 본 실시형태에 있어서, 라비린톨라 생세포를 동결 건조 처리나 스프레이 건조 처리하여 얻은 라비린톨라의 건조체를 원료로서 사용하면 적합하다.

[0089]

또 배양 후에 원심분리, 여과 또는 침강 등에 의해 회수한 라비린톨라 생세포를 원료로 할 수도 있다. 라비린톨라 생세포는 배양조로부터 수확 후 그대로의 상태로 사용할 수도 있지만, 물 혹은 생리식염수로 세정하는 것이 바람직하다. 또 라비린톨라 조체가 배양액이나 물 등의 액체에 분산된 분산액의 상태로 사용해도 된다.

[0090]

또한 라비린톨라 세포를 초음파 조사 처리나 호모게나이즈 등의 기계 처리를 행함으로써 얻은 조체의 기계적 처리물을 원료로 해도 된다. 또 기계적 처리물에 건조 처리를 시행한 기계적 처리물 건조물을 원료로 해도 된다.

[0091]

(분리 공정)

[0092]

분리 공정에서는 라비린톨라 준비 공정에서 준비한 라비린톨라로부터 아실스테릴글루코시드를 함유하는 아실스테릴글루코시드 획분을 분리한다(스텝 S2).

[0093]

아실스테릴글루코시드 획분을 분리할 수 있으면, 분리(분획)의 방법은 특별히 한정되는 것은 아니지만, 예를 들면 적당한 분리 수단(예를 들면 분배 추출, 겔 여과법, 실리카겔 크로마토법, 역상 혹은 순상의 고속 액체 크로마토그래피(HPLC) 등)에 의해 아실스테릴글루코시드 함유량이 높은 획분을 분획하여 얻는 방법이나, 분쇄된 라비린톨라 및 아실스테릴글루코시드를 포함하는 추출물의 추출 혼합물을 여과하여, 추출액과 잔사로 분리하고, 추출액을 농축시켜 액체 크로마토그래피에 의해 분획하는 방법을 들 수 있다.

[0094]

라비린톨라 준비 공정에서, 배양한 라비린톨라를 포함하는 배양액을 준비한 경우, 배양액의 원심분리 또는 단순한 침강, 막여과 등의 공지의 방법에 의해 라비린톨라 조체를 회수하고, 라비린톨라 조체를 세정 후, 공지의 건조 방법(진공 동결 건조, 분무 건조, 가열 진공 건조 등)으로 건조시킴으로써 라비린톨라의 조체 건조물을 분리

공정에서 사용해도 된다.

- [0095] 또 라비린톨라 준비 공정에서 준비한 라비린톨라를 초음파 파쇄기 등의 공지의 분쇄 방법으로 분쇄해도 된다.
- [0096] 분리 공정에서 사용하는 추출 용매는 아실스테릴글루코시드를 추출할 수 있고, 그 후의 정제를 용이하게 행할 수 있는 용매이면 특별히 한정되지는 않지만, 예를 들면 메탄올, 에탄올, 프로판올, 이소프로판올, 부탄올, 프로필렌글리콜, 부틸렌글리콜 등의 알코올류, 아세트산메틸, 아세트산에틸, 아세톤, 클로로포름, 톨루엔, 펜탄, 헥산, 시클로헥산 등을 단독 또는 2종 이상을 조합하여 사용할 수 있다.
- [0097] 특히, 클로로포름/메탄올 혼합 용매를 사용하여 아실스테릴글루코시드를 추출하는 것이 바람직하다. 이 때, 용매의 혼합비는 임의로 설정하면 되는데, 클로로포름:메탄올=50vol%:50vol%~90vol%:10vol%의 용매를 사용하는 것이 바람직하고, 클로로포름:메탄올=60vol%:40vol%~70vol%:30vol%의 용매를 사용하는 것이 보다 바람직하며, Folch 분배 즉 클로로포름:메탄올=2:1(체적비)의 용매를 사용하는 것이 특히 바람직하다.
- [0098] (정제 공정)
- [0099] 정제 공정에서는 상기 분리 공정에서 분리한 상기 아실스테릴글루코시드 획분으로부터 상기 아실스테릴글루코시드를 정제한다(스텝 S3).
- [0100] 목적으로 하는 아실스테릴글루코시드를 정제할 수 있으면, 정제의 방법은 특별히 한정되는 것은 아니지만, 예를 들면 적절한 분리 칼럼이나 재결정에 의해 아실스테릴글루코시드를 정제하는 방법을 들 수 있다.
- [0101] <용도>
- [0102] 라비린톨라 유래의 아실스테릴글루코시드는 다른 스테릴글루코시드(SG)나 아실스테릴글루코시드(ASG)와 마찬가지로, 그 기능성을 이용하여, 각종 용도에 사용하는 것이 가능하다.
- [0103] (항산화제)
- [0104] 도코사헥사엔산(DHA) 등의 다가 불포화 지방산은 항산화 작용을 가지고 있어, 스테릴글루코시드(SG)에 도코사헥사엔산(DHA)이 에스테르 결합한 라비린톨라 유래의 아실스테릴글루코시드는 항산화제로서 사용하는 것이 가능하다.
- [0105] (발모제, 육모제)
- [0106] 라비린톨라 유래의 아실스테릴글루코시드는 발모제나 육모제로서 사용하는 것이 가능하다(일본 특개 평7-101835호 공보).
- [0107] (혈중 지질 저하제)
- [0108] 라비린톨라 유래의 아실스테릴글루코시드는 혈중에 있어서의 콜레스테롤, 중성지질, 인지질 등의 지질을 저하시키기 위해서 사용되는 혈중 지질 저하제로서 사용하는 것이 가능하다(일본 특개 평7-118159호 공보, Ito et al, The Journal of Medical Investigation, 62 (2015) 80-84).
- [0109] (항비만제)
- [0110] 라비린톨라 유래의 아실스테릴글루코시드는 비만의 치료나 예방을 위해 사용되는 항비만제로서 사용하는 것이 가능하다(일본 특개 평7-107939호 공보).
- [0111] (항종양제)
- [0112] 라비린톨라 유래의 아실스테릴글루코시드는 암세포를 죽이는 작용을 가지고 있어, 종양의 증식을 억제하고 암을 치료하기 위한 항종양제(항유방암제)로서 사용하는 것이 가능하다(Wimmerova et al, Steroids 117 (2017) 38-43).
- [0113] (아테롬성 동맥경화증의 예방 또는 치료제)
- [0114] 라비린톨라 유래의 아실스테릴글루코시드는 아테롬성 동맥경화증 리스크를 저감시키는 작용을 가지고 있어, 아테롬성 동맥경화증을 예방 또는 치료하기 위한 아테롬성 동맥경화증의 예방 또는 치료제로서 사용하는 것이 가능하다(Nhung et al, Journal of Nutritional Science and Vitaminology, 62 (2016) 295-302).
- [0115] <조성물>
- [0116] 본 실시형태에 따른 라비린톨라 유래의 아실스테릴글루코시드를 유효 성분으로서 함유하는 항산화제, 발모 또는

육모제, 혈중 지질 저하제, 항비만제, 항종양제 및 아테롬성 동맥경화증의 예방 또는 치료제는, 건강 식품 등의 식품 조성물, 의약 조성물, 화장품 조성물로서 구성되어 생체에 투여된다.

- [0117] (식품 조성물)
- [0118] 본 실시형태의 라비린톨라 유래의 아실스테릴글루코시드는 식품에도 사용하는 것이 가능하다.
- [0119] 본 실시형태의 식품 조성물은 식품의 분야에서는 각종 작용을 유효하게 발휘할 수 있는 유효한 양의 라비린톨라 유래의 아실스테릴글루코시드를 식품 소재로서 각종 식품에 배합함으로써, 당해 작용을 가지는 식품 조성물을 제공할 수 있다.
- [0120] 또 라비린톨라 유래의 아실스테릴글루코시드를 특정 보건용 식품, 영양 기능 식품, 기능성 표시 식품, 병원 환자용 식품, 서플리먼트 등과 조합하여 식품 조성물을 제공하는 것도 가능하다.
- [0121] 당해 식품 조성물로서는 예를 들면 조미료, 축육 가공품, 농산 가공품, 음료(청량 음료, 알코올 음료, 탄산 음료, 유음료, 과즙 음료, 차, 커피, 영양 드링크 등), 분말 음료(분말 주스, 분말 스프 등), 농축 음료, 과자류(캔디(목캔디), 쿠키, 비스킷, 건, 구미, 초콜릿 등), 빵, 시리얼 등을 들 수 있다. 또 특정 보건용식품, 영양 기능 식품, 기능성 표시 식품 등의 경우, 캡슐, 트로키, 시럽, 과립, 분말 등의 형상이어도 된다.
- [0122] 여기서 특정 보건용 식품이란 생리학적 기능 등에 영향을 주는 보건 기능 성분을 포함하는 식품으로서, 소비자청 장관의 허가를 얻어 특정 보건 용도에 적합한 취지를 표시 가능한 것이다.
- [0123] 또 영양 기능 식품이란 영양 성분(비타민, 미네랄)의 보급을 위해 이용되는 식품으로서, 영양 성분의 기능을 표시하는 것이다. 영양 기능 식품으로서 판매하기 위해서는, 1일당 섭취 기준량에 포함되는 영양 성분량이 정해진 상한값, 하한값의 범위 내에 있을 필요가 있고, 영양 기능 표시 뿐만아니라 주의 환기 표시 등도 할 필요가 있다.
- [0124] 또 기능성 표시 식품이란 사업자의 책임에 있어서 과학적 근거에 기초한 기능성을 표시한 식품이다. 판매 전에 안전성 및 기능성의 근거에 관한 정보 등이 소비자청 장관에게 신고된 것이다.
- [0125] 본 실시형태에 따른 식품 조성물에는 라비린톨라 유래의 아실스테릴글루코시드에 더해, 통상 식품 조성물에 사용할 수 있는 성분을 1종 또는 2종 이상 자유롭게 선택하여 배합하는 것이 가능하다. 예를 들면 각종 조미료, 보존제, 유효제, 안정제, 향료, 착색제, 방부제, pH 조정제 등의 식품 분야에서 통상 사용할 수 있는 모든 첨가제를 함유시킬 수 있다.
- [0126] 본 실시형태에 따른 식품 조성물에는 라비린톨라 유래의 아실스테릴글루코시드에 각종 작용이 있는 것이 알려져 있는 그 밖의 물질을 1종 이상 첨가하는 것도 가능하다.
- [0127] (의약 조성물)
- [0128] 본 실시형태의 라비린톨라 유래의 아실스테릴글루코시드는 의약 조성물로서 이용할 수 있다.
- [0129] 본 실시형태의 의약 조성물은 각종 작용을 유효하게 발휘할 수 있는 양의 라비린톨라 유래의 아실스테릴글루코시드와 함께, 약학적으로 허용되는 담체나 첨가제를 배합함으로써, 당해 작용을 가지는 의약 조성물이 제공된다. 당해 의약 조성물은 의약품이어도 되고 의약부외품이어도 된다.
- [0130] 당해 의약 조성물은 외용적으로 적용되어도 되고, 또 내용적으로 적용되어도 된다. 따라서, 당해 의약 조성물은 내복제, 피하 주사, 정맥 주사, 피내 주사, 근육 주사 및/또는 복강내 주사 등의 주사제, 경점막 적용제, 경피 적용제 등의 제제 형태로 사용할 수 있다.
- [0131] 당해 의약 조성물의 제형으로서의 적용의 형태에 따라 적당히 설정할 수 있는데, 예를 들면 액제, 현탁제 등의 액상 제제, 연고제, 또는 겔제 등의 반고형제, 정제, 과립제, 캡슐제, 분말제, 산제 등의 고형 제제를 들 수 있다.
- [0132] 본 실시형태에 따른 의약 조성물에는 약학적으로 허용되는 첨가제를 1종 또는 2종 이상 자유롭게 선택하여 함유시킬 수 있다.
- [0133] 예를 들면 본 실시형태에 따른 의약 조성물을 경구제에 적용시키는 경우, 예를 들면 부형제, 결합제, 붕괴제, 계면활성제, 보존제, 착색제, 교미제, 향료, 안정화제, 방부제, 산화방지제 등의, 의약 제제의 분야에서 통상 사용할 수 있는 모든 첨가제를 함유시킬 수 있다. 또 드럭 딜리버리 시스템(DDS)을 이용하여, 서방성 제제 등

으로 할 수도 있다.

- [0134] 본 실시형태에 따른 의약 조성물에는 라비린톨라 유래의 아실스테릴글루코시드 이외에, 각종 작용이 있는 것이 알려져 있는 그 밖의 물질을 1종 이상 첨가하는 것도 가능하다.
- [0135] (화장료 조성물)
- [0136] 본 실시형태의 라비린톨라 유래의 아실스테릴글루코시드는 각종 작용을 이용하여 화장료 조성물로 적합하게 사용할 수 있다.
- [0137] 이 화장료 조성물은 모든 형태의 화장료에 적용할 수 있다. 예를 들면 로션, 유액, 크림, 미용액 등의 스킨케어 화장료, 파운데이션, 컨실러, 화장 베이스, 립스틱, 블러셔, 아이섀도우, 아이라이너 등의 메이크업 화장료, 햇빛 그을음 방지 화장료 등에 적용할 수 있다.
- [0138] 본 실시형태에 따른 화장료 조성물에는 라비린톨라 유래의 아실스테릴글루코시드에 더해, 통상 화장료 조성물에 사용할 수 있는 성분을 1종 또는 2종 이상 자유롭게 선택하여 배합하는 것이 가능하다.
- [0139] 예를 들면 기재, 보존제, 유화제, 착색제, 방부제, 계면활성제, 자외선흡수제, 산화방지제, 보습제, 자외선흡수제, 향료, 방부방미제, 체질 안료, 착색 안료, 알코올, 물 등의, 화장품 분야에서 통상 사용할 수 있는 모든 첨가제를 함유시킬 수 있다.
- [0140] 본 실시형태에 따른 화장료 조성물에 있어서, 라비린톨라 유래의 아실스테릴글루코시드의 함유량은 특별히 한정되지 않고, 목적에 따라 자유롭게 설정하는 것이 가능하다.
- [0141] (실시에)
- [0142] 이하, 구체적 실시예에 기초하여 본 발명을 구체적으로 설명하는데, 본 발명은 이들에 한정되는 것은 아니다.
- [0143] 이하의 실시예에서는 라비린톨라류인 *Aurantiochytrium limacinum* mh0186주의 총지질 획득으로부터, Sep-pak plus silica 칼럼을 사용하여 미지 당지질을 분리하고, 질량분석계, 약알칼리 분해, β 글루코시다아제 처리에 의해 구조를 해석했다. 또 당지질은 액체 크로마토그래프 질량분석계(LC-MS)로 정량했다.
- [0144] <재료>
- [0145] SG와 ASG는 Matreya LCC로부터 구입했다. TG(12:0/12:0/12:0), PC(11:0/11:0), LPC(13:0), PE(12:0/12:0), LPE(13:0), SE(16:0-d7 cholesterol), d7 cholesterol은 Avanti Polar Lipids로부터 구입했다. 인공 해수(SEALIFE)는 니혼카이사이로부터 구입했다. LC-MS 해석에 사용한 유기 용매는 와코순야쿠로부터 구입했다.
- [0146] <시험 1 미지 당지질의 분리·정제>
- [0147] (*A. limacinum* mh0186의 배양)
- [0148] 라비린톨라로서 *A. limacinum* mh0186주를 사용했다. 3ml의 0.1% vitamin mixture, 0.2% element solution 함유 GY 배지(3.1%(w/v)D-glucose, 1.0%(w/v)Yeast Extract, 1.75%(w/v) SEALIFE)에서 전배양한 세포 중 100 μ l를, 100ml의 GY 배지(300ml 용량 삼각 플라스크, 0.1% vitamin mixture, 0.2% element solution 함유)에 가하여 3일간 진탕 배양했다(150rpm, 25℃). 여기서, vitamin mixture의 조성은 0.2% (w/v) vitamin B₁, 0.001% (w/v) vitamin B₂, 0.001% (w/v) vitamin B₁₂이다. element solution의 조성은 3% (w/v) EDTA do-sodium, 0.145% (w/v) FeCl₃·6H₂O, 3.42% (w/v) H₃BO₃, 0.43% (w/v) MnCl₂·4H₂O, 0.1355% (w/v) ZnSO₄·7H₂O, 0.013% (w/v) CoCl₂·6H₂O, 0.01% (w/v) CuSO₄·5H₂O이다.
- [0149] (지질 추출)
- [0150] 3일간 배양한 100ml의 배양액을 원심분리(4℃, 3,000×g, 5min)하여 상청을 제거했다. 1.75% SEA LIFE로 세정 후 다시 원심분리하여 세포를 회수하고, 동결 건조에 의해 건조 세포를 얻었다. 얻은 건조 세포의 중량을 측정하고, 등량의 물과 200배량의 chloroform(C)/methanol(M)=2/1을 가하여 초음파로 지질을 추출했다. 농축 건조시키고, C/M/water(W)=8/4/3을 가하여 원심분리(600×g, 5min)하여, 하층을 회수, 건조시킨 것을 총지질로 했다.
- [0151] (미지 당지질의 분리·정제)
- [0152] Sep-Pak plus silica cartridge(Waters사제)에 메탄올, 아세톤, 클로로포름을 순서대로 흘려 컨디셔닝했다.

회수한 총지질을 3ml의 클로로포름에 용해시키고, 전량을 Sep-Pak plus silica 칼럼에 공시했다. 10ml의 클로로포름에 의해 중성지질을 용출한 후, C/acetone(A)=80:20(vol%)으로 용출했다.

[0153] (박층 크로마토그래피(TLC) 해석)

[0154] Sep-Pak plus silica 칼럼으로 분취한 용출액을 건조시킨 후, C/M=2/1로 용해시키고, 2mg DCW분의 지질을 TLC 플레이트(TLC Silica Gel 60, Merck)에 부하했다.

[0155] C/M/W=65/25/4(v/v/v)를 전개 용매로 하고, 오르시놀황산(0.2% 오르시놀, 11.4% 황산)으로 발색시켰다.

[0156] (시험 1의 결과)

[0157] A. limacinum mh0186의 총지질을 TLC로 검출하면, 미지 당지질의 밴드는 중성지질의 밴드와 매우 이동도가 가깝고, 중성지질이 지나치게 많기 때문에, 밴드가 보이지 않게 되었다. 그 때문에 Sep-Pak plus silica 칼럼을 사용하여, A. limacinum mh0186의 총지질로부터 중성지질, 당지질, 인지질을 분리했다. 그 결과, SG와 함께 아세톤 희분에서 검출되었다. 이어서 Sep-Pak plus silica 칼럼을 사용하여 SG를 포함하지 않는 미지 당지질의 분리 방법을 검토한 결과, 클로로포름/아세톤=80/20으로 용출하면 미지 당지질이 분리되었다(도 3). 또 이 밴드는 표품의 ASG의 Rf값과 일치하고 있었다.

[0158] <시험 2 미지 당지질의 LC-MS 해석>

[0159] (미지 당지질의 실리카로부터의 긁어내기)

[0160] 미지 당지질을 TLC 플레이트에 어플라이(2mg DCW분×7레인)하고, 시험 1과 마찬가지로의 조건으로 전개, 밴드를 검출했다. 검출한 밴드를 스캐폴러로 긁어냈다.

[0161] (스핀 칼럼을 사용한 실리카의 제거)

[0162] 긁어낸 실리카에 C/M/W=65/25/4(v/v/v)를 가하여 초음파 처리에 의해 지질을 추출했다. 원심분리(600×g, 5min)한 후, 상청을 회수하여 건조시켰다. 400 μl의 C/M=1/2와 800 μl의 M/0.45% NaCl=1/1을 가하여 현탁시키고, MonoSpin C18 FF(GL Sciences사제)에 공시했다. 원심분리(1,000×g, 1min)하여 폐액을 제거하고, 이 조작을 3회 행했다. 칼럼에 200 μl의 초순수를 첨가하여 원심분리(1,000×g, 1min)하고, 폐액을 제거했다. 칼럼에 100 μl의 메탄올을 첨가하여 원심분리(1,000×g, 1min)하고, 용출액을 얻었다.

[0163] (LC-MS 해석)

[0164] 미지 당지질은 LC-MS(3200 Q TRAP, AB SCIEX사제)에 의해 구조를 해석했다. 유속 200 μl/min로 흘리고, 칼럼에 InertSustain C18(2.1×150mm, 5 μl, GL Science사제)을 사용하여 인지질, 중성지질과 당지질을 분리했다. 용리액은 A(Acetonitrile/Methanol/H₂O=19/19/2(v/v/v), 0.1% Formic acid, 0.028% Ammonia)와 buffer B(IPA, 0.1% Formic acid, 0.028% Ammonia)를 사용했다. 그라디언트 조건은 3분간 3%B 후, 21분간에 걸쳐서 40%B, 1분간에서 70%B로 하고, 70%B를 7분간 유지하고, 마지막으로 3%B로 되돌려 7분간 유지했다. A:100%, B:0%(3min)→A:60%, B:40%(21min)→A:30%, B:70%(1min)→A:30%, B:70%(7min)로 설정했다.

[0165] (시험 2의 결과)

[0166] 결과를 도 4A 및 도 5A에 나타낸다. 미지 당지질은 어느 쪽도 스테롤 골격부분의 질량수와 일치하는 값이 검출되었다. 또한 MS/MS/MS 해석한 결과, 각각의 스테롤 골격에 특징적인 부분의 질량수와 일치하는 값이 검출되었다. 이들 결과로부터, A. limacinum mh0186에는 GL-A(3-O-b-D-glucopyranosyl-stigmasta-5,7,22-triene)이나 CG(콜레스테릴글루코시드)에 DHA가 부가된 아실스테릴글루코시드(ASG)가 존재하는 것이 명확하게 되었다(도 4B, 도 5B). 구체적으로는 GL-A에 DHA가 부가된 DHA-GL-A(도 4B, 구조식(I))와, CG에 DHA가 부가된 DHA-CG(도 5B, 구조식(II))가 존재하는 것을 알 수 있었다.

[0167] <시험 3 ASG의 지방산의 가스 크로마토그래피(GC) 해석>

[0168] 아실스테릴글루코시드(ASG)에 결합하고 있는 지방산의 조성을 가스 크로마토그래피(GC)로 해석했다.

[0169] (시험 3의 결과)

[0170] 결과를 도 6에 나타낸다. 미지 당지질에는 DHA(C22:6)나 팔미틴산(C16:0)이 많이 존재하는 것을 알 수 있었다.

[0171] <시험 4 ASG의 분자중 해석>

- [0172] 아실스테릴글루코시드(ASG)에 있어서의 스테릴글루코시드(SG)와 지방산의 조합을 LC-MS로 해석했다.
- [0173] (시험 4의 결과)
- [0174] 결과를 도 7에 나타낸다. DHA가 부가된 ASG가 가장 많고 특히 DHA-CG(도 5B), DHA-GL-A(도 4B)가 많이 존재하고 있었다. 또 DHA-GL-C(구조식(III))도 존재하고 있었다. 또한 SG는 GL-A, GL-B, GL-C, CG의 순서로 많이 존재하고 있었다.
- [0175] DHA가 부가된 아실스테릴글루코시드(ASG)는 지금까지 보고가 없는 참신한 구조였다.
- [0176] <시험 5 ASG의 지방산과 당의 결합 해석>
- [0177] LC-MS의 해석 결과로부터, 미지 당지질은 SG에 지방산이 결합한 아실스테릴글루코시드(ASG)라고 생각되었다. 식물에서는 ASG는 글루코오스 6위의 탄소에 지방산이 에스테르 결합한 구조가 보고되어 있다. 그래서, A. limacinum mh0186의 ASG도 마찬가지로 SG에 지방산이 에스테르 결합한 구조인지 여부를 명확하게 하기 위해 약알칼리 분해와 β 글루코시다아제(EGCrP2)로 처리를 했다(도 8).
- [0178] (약알칼리 분해)
- [0179] 정제한 미지 당지질(4mg 동결 건조 세포 중량)에 90 μ l의 C/M=1/2와 10 μ l의 NaOH를 가하고, 37℃에서 인큐베이트했다. 2시간 후, 상온으로 되돌려 6 μ l의 메탄올로 10배 희석한 아세트산을 가하여 중화한 후 질소 건조시켰다.
- [0180] (미지 당지질의 정제)
- [0181] 건조시킨 반응 후의 미지 당지질을 200 μ l의 C/M=1/2에 용해하고, 시험 2와 마찬가지로의 방법으로 탈염했다. 추출액을 질소 건조시켰다.
- [0182] (β 글루코시다아제 처리)
- [0183] 약알칼리 분해한 미지 당지질에 전량 20 μ l가 되도록 50mM의 Acetate buffer(pH 5.0), 0.025% Sodium Cholate와 500ng의 리콤비넨트 EGCrP2를 가하여, 37℃에서 24시간 반응시켰다. 네가티브 컨트롤로서, 자비한 EGCrP2를 가한 것도 준비하고, 마찬가지로의 조건으로 반응시켰다. 반응 종료 후, 증발 건조시켰다.
- [0184] (TLC 해석)
- [0185] 건조시킨 지질을 5 μ l의 C/M=2/1에 용해하고, 전량을 TLC 플레이트에 어플라이했다. C/M/W=65/25/4를 전개 용매로 하여 전개하고, 오르시놀황산으로 발색시켰다.
- [0186] (시험 5의 결과)
- [0187] 약알칼리 분해와 β 글루코시다아제 처리의 결과, 미지 당지질은 EGCrP2에 내성이지만, 약알칼리 분해함으로써 EGCrP2에 의해 분해되었다(도 9). 본 시험의 결과로부터, 미지 당지질이 스테릴글루코시드(SG)에 지방산이 에스테르 결합한 아실스테릴글루코시드(ASG)인 것을 알 수 있었다.
- [0188] <시험 6 배양 시기에 있어서의 SG·ASG량의 비교>
- [0189] 시험 6에서는 A. limacinum mh0186의 배양 시기에 있어서의 SG와 ASG량의 변화를 LC-MS로 해석했다.
- [0190] (A. limacinum mh0186의 배양과 증식 곡선의 제작)
- [0191] 3ml의 GY 배지(0.1% vitamin mixture, 0.2% element solution)에서 전배양한 세포를 초기 농도가 OD₆₀₀=0.02가 되도록 100ml의 GY 배지(300ml 용량 삼각 플라스크, 0.1% vitamin mixture, 0.2% element solution 함유)에 가하여 진탕 배양했다(150rpm, 25℃). 24시간마다 OD₆₀₀을 측정했다.
- [0192] (글루코오스 농도의 측정)
- [0193] 1ml의 배양액을 24시간마다 회수하고, 원심분리(4℃, 3,000×g, 5min)하여 상청을 회수했다. 초순수로 배양 1일째의 상청을 100배, 2일째, 3일째의 상청을 50배, 4일째의 상청을 10배, 5~9일째의 상청을 5배로 희석했다. 또 검량선 작성을 위해 글루코오스 표준액(200mg/dL)의 2배 희석 계열을 제작하고, 10 μ l씩 나누어 부었다.
- [0194] 96 구멍 플레이트의 각 웰에 10 μ l의 희석 완료 배양액과 발색 시약(글루코오스CII테스트, Wako)을 가하고, 실

온에서 15분간 인큐베이트한 후, MULTISKAN FC(Thermo SCIENTIFIC사제)로 OD₄₉₂를 측정했다.

- [0195] (세포의 회수와 지질 추출)
- [0196] 1ml의 배양 배지를 24시간마다 회수하고, 원심분리(4℃, 3,000×g, 5min)하여 상청을 제거했다. 1.75% SEALIFE로 세정 후, 동결 건조 세포를 얻었다. 4mg의 건조 세포를 측정하여 취하고, 300 μl의 인터널 스탠더드(20 μM EG, 10 μM ASG(18:0-sitosteryl glucoside), TG(12:0/12:0/12:0), PC(11:0/11:0), LPC(13:0), PE(12:0/12:0), LPE(13:0), SE(16:0-d7 cholesterol), d7 cholesterol) 함유 C/M=2/1을 가하고, 10분간 초음파로 지질을 추출했다. 원심분리(4℃, 15,000rpm, 5min)하고, 상청을 회수한 후, 75 μl의 초순수를 가하여 원심분리(4℃, 15,000rpm, 5min)하고, 하층을 회수했다.
- [0197] (LC-MS 해석)
- [0198] 회수한 하층 중 100 μl를 900 μl의 2-프로판올을 넣은 오토 샘플러 바이알에 가하고, 5 μl를 LC-MS에 공시했다. LC-MS 조건은 시험 2와 마찬가지로이다.
- [0199] (시험 6의 결과)
- [0200] 결과를 도 10 내지 13에 나타낸다. 도 10은 세포의 증식 곡선이며, 도 11은 배양액에 포함되는 글루코오스 농도의 시간 경과에 따른 변화, 도 12는 스테릴글루코시드(SG)량의 시간 경과에 따른 변화, 도 13은 아실스테릴글루코시드(ASG)량의 시간 경과에 따른 변화를 나타낸다.
- [0201] 아실스테릴글루코시드(ASG)는 대수 증식기에 증가하고, 정상기 이후에서 감소했지만, 스테릴글루코시드(SG)는 정상기 이후에 증가 경향이 있었다.
- [0202] 이러한 결과로부터, 탄소원이 충분히 있을 때는 DHA는 SG에 결합하여 체 내에 축적되지만, 글루코오스가 고갈되어 영양이 없다면, SG에 결합하고 있던 DHA가 유리하고, 에너지원이 되는 것이 생각되었다. 따라서, 아실스테릴글루코시드(ASG)가 스테릴글루코시드(SG)의 리저버로서 작용하고 있을 가능성이 시사되었다.
- [0203] <시험 7 출아효모에 있어서의 ASG 합성 효소의 탐색>
- [0204] ASG 합성 효소에 관하여, TG 리파아제가 지방산을 SG로 전이하고(가설 1, 도 14(a)), 또는 포스포리파아제가 지방산을 SG로 전이한다(가설 2, 도 14(b))는 2개의 가설을 생각했다. 2개의 가설 중 가설 1을 출아효모를 사용하여 검증했다.
- [0205] (출아효모에 있어서의 올레인산 첨가에 의한 SG와 ASG량의 비교)
- [0206] 출아효모는 배지에 올레인산을 첨가함으로써 큰 유적을 만든다. 그래서, 배지에 올레인산을 첨가하여, 큰 유적을 만들게 함으로써 출아효모가 가지는 TG량을 증가시키고, SG와 ASG량의 변화를 LC-MS로 해석했다. 또 출아효모 야생주는 SG를 거의 가지고 있지 않기 때문에, 본 시험에서는 출아효모의 주요 스테롤인 에르고스테롤에 UDP-Glc로부터 Glc를 전이하고, 에르고스테릴글루코시드(EG)를 합성하는 Ugt51을 과잉발현시킨 EG 과잉 축적주를 사용했다.
- [0207] (출아효모 UGT51OE/egh1KO주의 배양)
- [0208] UGT51OE/egh1KO주를 사용하고, 3ml의 YPD 배지(2.0% (w/v) D-glucose, 1.0% (w/v) Polypeptone, 1.0%(w/v) Yeast Extract)에서 전배양한 세포를 초기 농도 OD₆₀₀=0.2가 되도록 3ml의 YPD 배지에 가했다. YPD 배지에 에탄올에 용해한 3 μl의 1 μg/μl 올레인산을 첨가하고, 24시간 진탕 배양했다(150rpm, 30℃). 네가티브 컨트롤로서 3 μl의 에탄올만을 첨가한 것도 준비하고, 마찬가지로의 조건으로 배양했다.
- [0209] (세포의 회수와 지질 추출)
- [0210] 24시간 배양한 3ml의 배양 배지를 원심분리(4℃, 3,000×g, 5min)하여 상청을 제거했다. PBS 용액으로 세정 후, 다시 원심하여 세포를 회수하고, 동결 건조에 의해 건조 세포를 얻었다. 4mg의 건조 세포를 측정하여 취하고, 300 μl의 인터널 스탠더드(20 μM CG, 10 μM ASG(18:0-sitosteryl glucoside), TG(12:0/12:0/12:0), PC(11:0/11:0), LPC(13:0), PE(12:0/12:0), LPE(13:0), SE(16:0-d7 cholesterol), d7 cholesterol) 함유 C/M=2/1을 가하고, 10분간 초음파로 파쇄했다. 원심분리(4℃, 15,000rpm, 5min)하여 상청을 회수했다. 75 μl의 초순수를 가하여 원심분리(4℃, 15,000rpm, 5min)하고, 하층을 회수했다.
- [0211] (LC-MS 해석에 의한 SG·ASG량의 측정)

- [0212] 회수한 전량의 하층을 오토 샘플러 바이알에 넣고, 5 μ l를 LC-MS에 공시했다. LC-MS 조건은 시험 2와 마찬가지로이다.
- [0213] (TG 리파아제(tgl3, 4, 5) 결손주의 SG·ASG량의 측정)
- [0214] TG 리파아제(tgl3, tgl4, tgl5) 결손주를 사용했다. 3ml의 YPD 배지에서 전배양한 세포를 초기 농도 OD₆₀₀=0.02가 되도록 3ml의 YPD 배지에 가하고, 24시간 진탕 배양했다(150rpm, 30℃). 상기 서술한 방법으로 지질 추출을 하여 LC-MS에 의해 SG·ASG의 함유량을 해석했다.
- [0215] (TG 리파아제 결손주에 있어서의 AEG량 해석)
- [0216] TG 리파아제가 AEG 합성 효소이면, TG 리파아제를 결손시킴으로써 AEG량이 감소된다고 생각했다. 그래서, 출아효모는 주요한 TG 리파아제로서 Tgl3, Tgl4, Tgl5를 가지므로, tgl3, tgl4, tgl5 결손주에 있어서의 ASG량을 측정했다.
- [0217] (시험 7의 결과)
- [0218] 결과를 도 15에 나타낸다. LC-MS 해석의 결과, EG와, EG에 지방산이 부가된 아실EG(AEG)는 야생주에서는 검출되지 않았지만, EG 과잉 축적주에서는 EG와 AEG가 함께 검출되었다(도 15(a)). AEG의 지방산의 종류는 16:0, 16:1, 18:0, 18:1이었다(도 15(b)). 또 EG 과잉 축적주에서는 올레인산의 유무에 따라 EG는 거의 변화하지 않았지만(도 15(a)), AEG는 올레인산 첨가에 의해 증가 경향이 있었다(도 15(b)). 이러한 결과로부터, 출아효모에 있어서 TG의 양이 늘어나는 것이 AEG량의 증가와 관계되어 있는 것, 또 출아효모가 AEG 합성 효소를 가지고 있는 것이 시사되었다.
- [0219] 또 LC-MS 해석의 결과, tgl3, tgl4, tgl5를 결손시키면 AEG량은 감소 경향이 있었다(도 15(c)). 이 결과는 TG 리파아제가 지방산을 SG로 전이한다는 가설 1을 지지하고 있었다.
- [0220] <시험 1~7의 정리>
- [0221] (1. 미지 당지질의 구조 결정)
- [0222] 미지 당지질은 클로로포름:아세톤=80:20에서 용출했다.
- [0223] 미지 당지질을 LC-MS, 약알칼리 분해, β 글루코시다아제 처리로 해석한 결과, 미지 당지질은 스테릴글루코시드(SG)의 글루코오스에 DHA나 팔미틴산 등의 지방산이 에스테르 결합한 아실스테릴글루코시드(ASG)였다.
- [0224] DHA가 스테릴글루코시드(SG)에 부가된 아실스테릴글루코시드(ASG)는 참신한 구조였다(도 16).
- [0225] (2. 배양 시기에 있어서의 SG·ASG량의 비교)
- [0226] 아실스테릴글루코시드(ASG)는 대수 증식기에 증가하고 정상기 이후에서 감소했다. 한편, 스테릴글루코시드(SG)는 글루코오스 고갈 후, 증가 경향이 있었다.
- [0227] 아실스테릴글루코시드(ASG)가 중성지질이나 인지질과 마찬가지로, DHA 축적의 리저버로서 작용하고 있을 가능성이 시사되었다(도 17).
- [0228] <시험의 고찰>
- [0229] 라비린톨라류의 당지질에 관하여, SG에 대해서는 구조 결정과 생물 기능의 해명이 진행되고 있다. 그러나, 라비린톨라류에는 SG와는 별개로 구조가 불명한 미지 당지질이 존재하고 있어, 본 연구에서는 이 미지 당지질의 구조 결정과 합성 효소의 해명을 목적으로 했다.
- [0230] 미지 당지질의 구조 결정의 결과, 미지 당지질은 DHA나 팔미틴산이 SG에 부가된 ASG였다(도 4B, 도 5B, 도 6, 도 7). ASG는 지금까지 라비린톨라류에 있어서 보고는 없고, 또 DHA가 부가된 구조는 지금까지 타생물에 있어서도 보고가 없는 참신한 구조였다.
- [0231] 라비린톨라류는 DHA 등의 고도 불포화 지방산을 TG나 SE로서 유적에 축적하는 특징이 있다. 본 시험에 있어서 배양 시기에 있어서의 SG와 ASG량을 측정한 결과, SG량은 배양 시기에 따른 변화가 거의 보이지 않은 것에 대해, ASG는 대수 증식기에 증가하고, 정상기에 들어간 후에 감소하고 있었다(도 12, 도 13). 이 점에서, ASG가 TG나 SE와 마찬가지로 DHA의 리저버로서 작용하고 있을 가능성이 있다.
- [0232] DHA에는 항염증 효과 등이 있는 것이 알려져 있는데, 쌀겨 추출유에 포함되는 ASG에는 상승한 혈중 LDL-콜레스

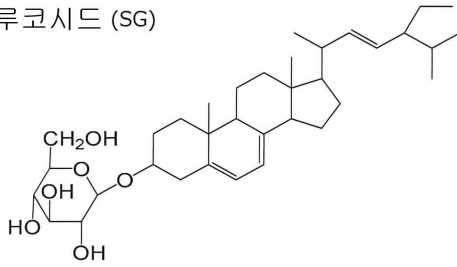
테를을 저하시키는 역할이 있는 것이 보고되어 있는 점에서, DHA가 결합한 ASG는 DHA의 기능성 뿐만아니라 ASG로서의 기능성의 양쪽을 살려, 건강 식품이나 서플리먼트로서 인간에게 응용 가능하다.

- [0233] 라비린톨라류의 SG는 적어도 4종류 존재한다(도 1). 지금까지, 진균류나 인간 섬유아세포에서 SG는 열 스트레스로 증가하는 것이 보고되어 있다. 라비린톨라류에 있어서도 SG가 열 스트레스에 의해 증가하는 점에서, 라비린톨라류가 가지는 환경 적응 기구의 발달에 SG가 중요한 역할을 가지는 것이 시사되어 있고, ASG도 마찬가지로 환경 적응 기구에 관련된 기능을 가질 가능성이 생각된다.
- [0234] <시험 8 A. limacinum 유래 DHA-GL-C의 리파아제에 의한 분해>
- [0235] (시험 8의 방법)
- [0236] DHA-GL-C와 25U의 돼지 췌장 리파아제를 혼합하고, 서모 믹서로 37℃, 750rpm으로 반응시키고, C/M=2:1을 가하여 반응을 정지시켰다.
- [0237] (A) 28시간 리파아제와 반응시킨 분해물을 TLC에 없고, C/M/W=65/16/2로 전개하고, 황산구리 시약(3% 황산구리를 15% 인산 용액에 용해)으로 발색시켰다(도 18에 있어서 사각으로 둘러싼 라인). 비교 대조로서 트리아실글리세롤(TG)을 동량의 리파아제로 분해했다(우측 2개의 라인).
- [0238] (B) 반응의 시간 경과 후, 반응물을 LC-MS로 정량했다.
- [0239] (시험 8의 결과)
- [0240] 결과를 도 18 및 19에 나타낸다.
- [0241] (A) DHA-GL-C는 리파아제에 의해 분해를 받아, DHA와 SG(GL-C)가 유리했다(도 18, +는 리파아제 첨가, -는 무첨가).
- [0242] (B) DHA-GL-C의 리파아제에 의한 분해는 반응 시간에 의존하고, 반응 시간의 경과와 함께 DHA-GL-C가 감소하고, 유리 SG(GL-C)가 증가했다(도 19).
- [0243] <시험 9 A. limacinum 유래 DHA-GL-C와 DHA의 산화 측정>
- [0244] (시험 9의 방법)
- [0245] 1mg 건조 세포 중량으로부터 정제한 DHA-GL-C 또는 DHA(5nmol)에 100 μ l의 50mM 인산 버퍼 pH 7.3을 가하고, 용기의 덮개를 연 상태로 UV 조사(254nm, 51 μ W/cm², 램프로부터 샘플까지 35cm, 23℃).
- [0246] 조사 종료 후, 200 μ l의 C/M=2/1을 가하여 지질을 추출, LC-MS로 DHA-GL-C와 DHA를 정량했다.
- [0247] (시험 9의 결과)
- [0248] 결과를 도 20에 나타낸다. DHA는 UV 조사 1시간에서 약 50%가 산화되었지만, DHA-GL-C는 조사 3시간에서도 전혀 산화되지 않았다. 따라서, DHA-GL-C 쪽이 DHA보다 산화되기 어려운 것이 나타났다.
- [0249] UV 조사에 의한 산화 시험의 결과, DHA가 에스테르 결합하고 있는 ASG는 체 내에서 안정된 형태로 존재하고, 리파아제로 분해되면 유리 DHA와 마찬가지로 레졸빈, 프로텍틴 등의 기능성 대사물로 변환될 가능성이 있는 것을 알 수 있었다.

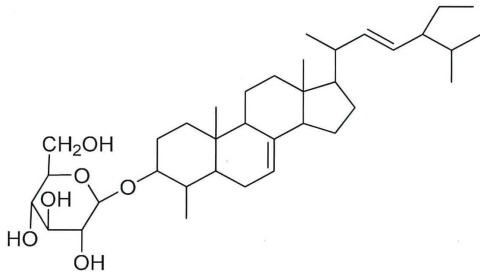
도면

도면1

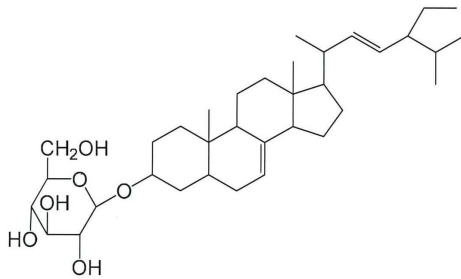
스테릴글루코시드 (SG)



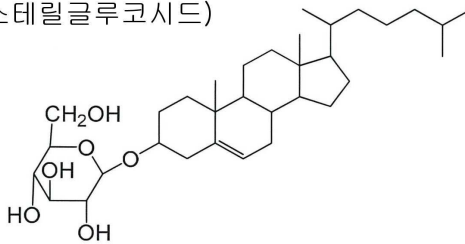
GL-B



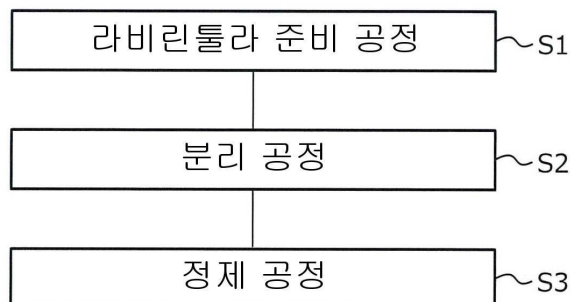
GL-C



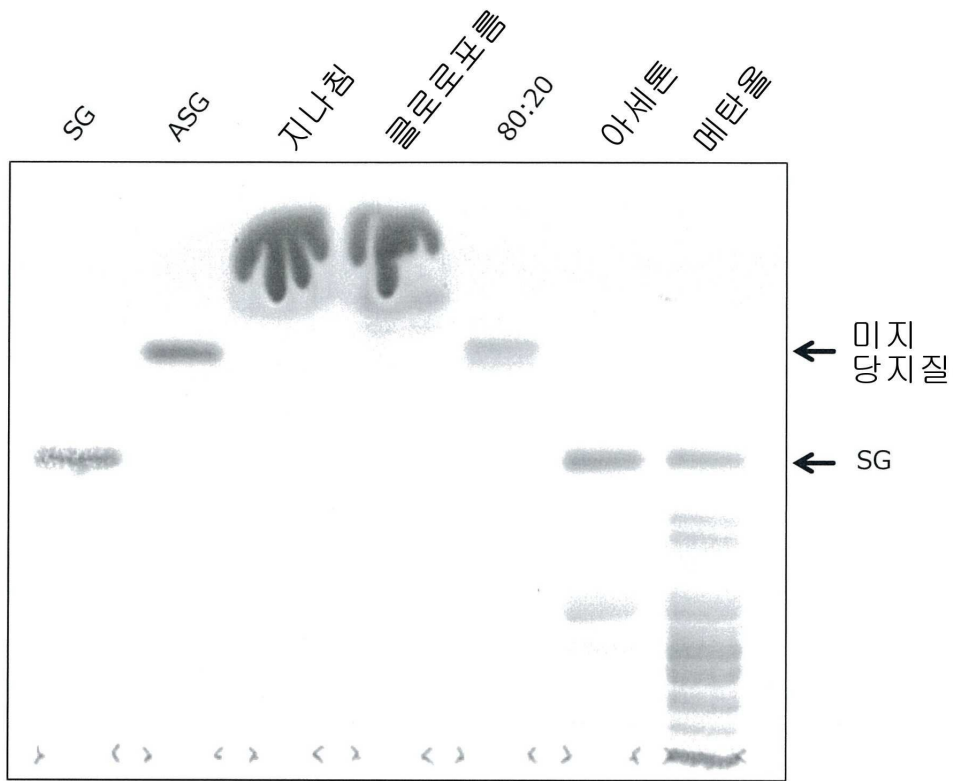
CG
(콜레스테릴글루코시드)



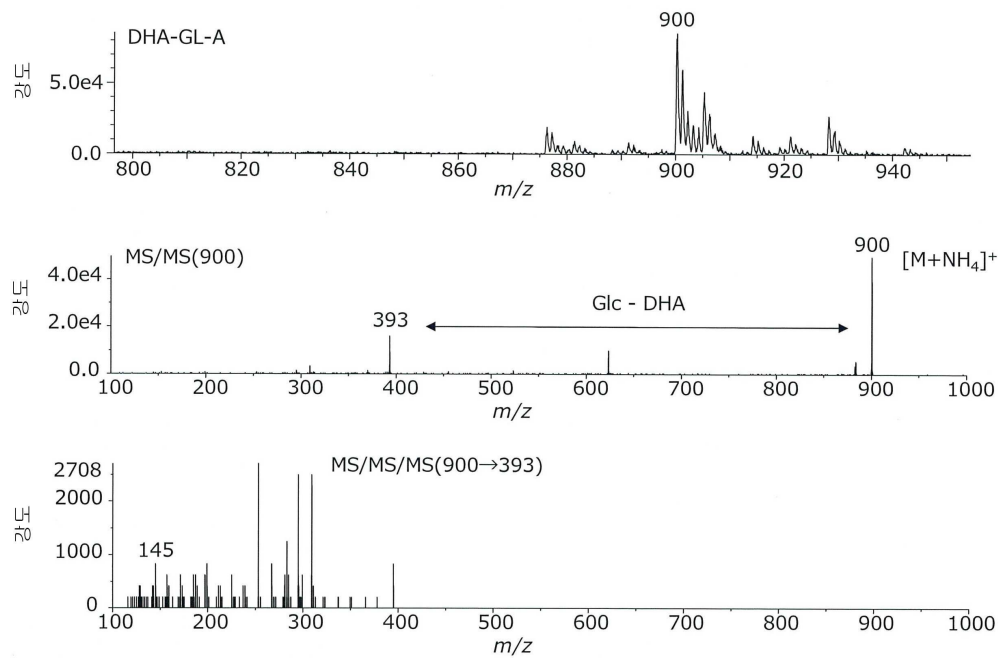
도면2



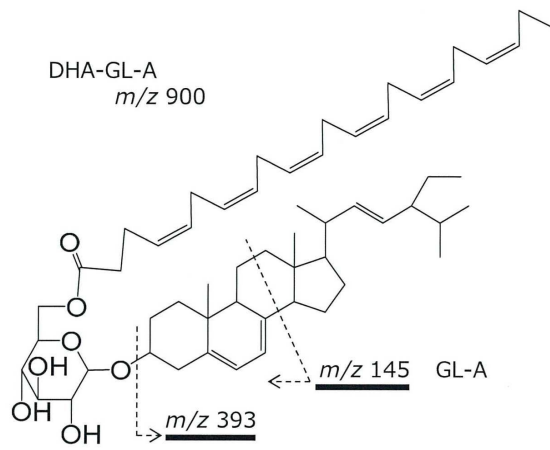
도면3



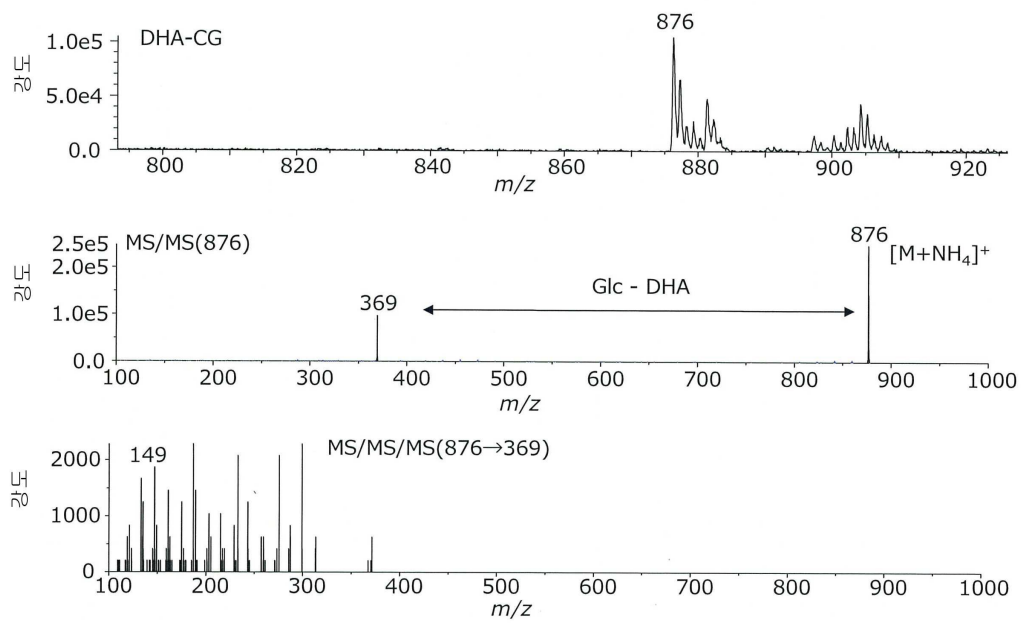
도면4a



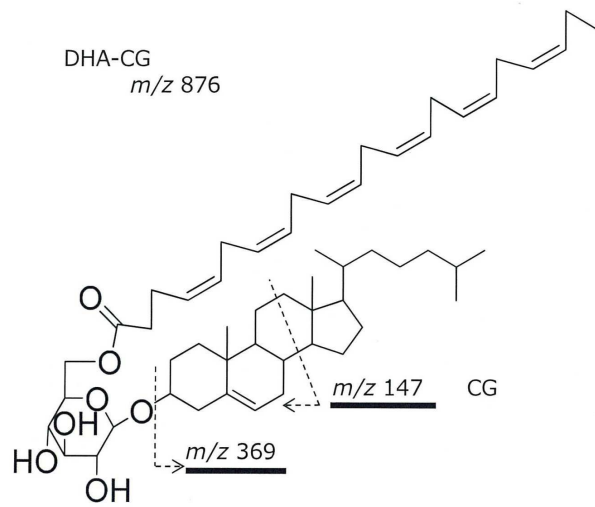
도면4b



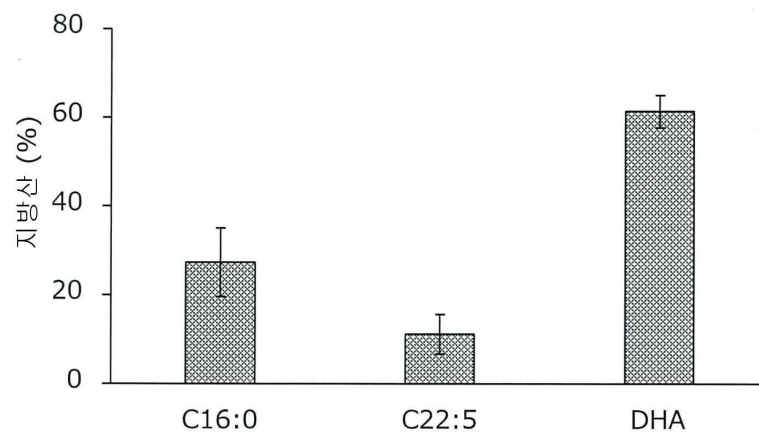
도면5a



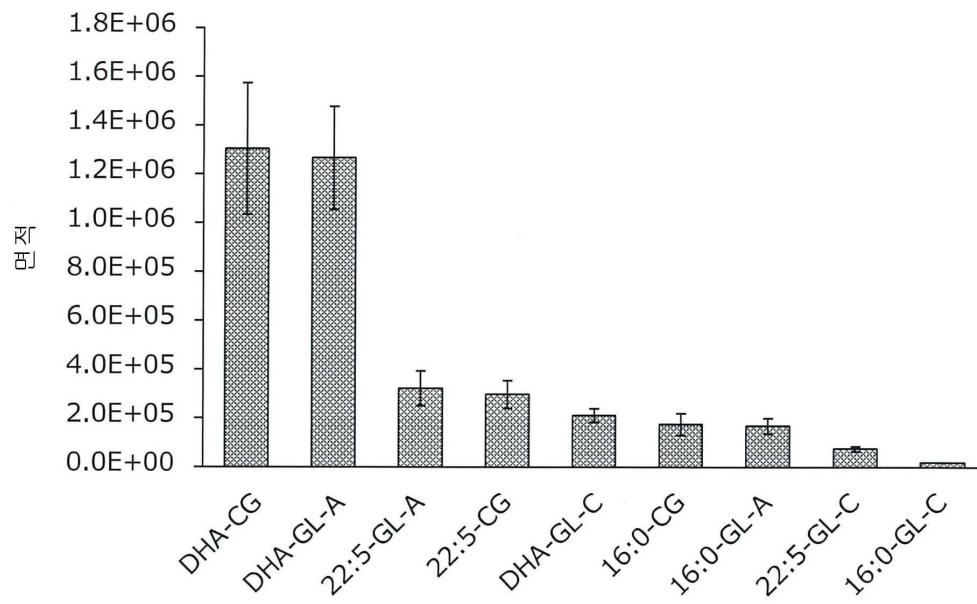
도면5b



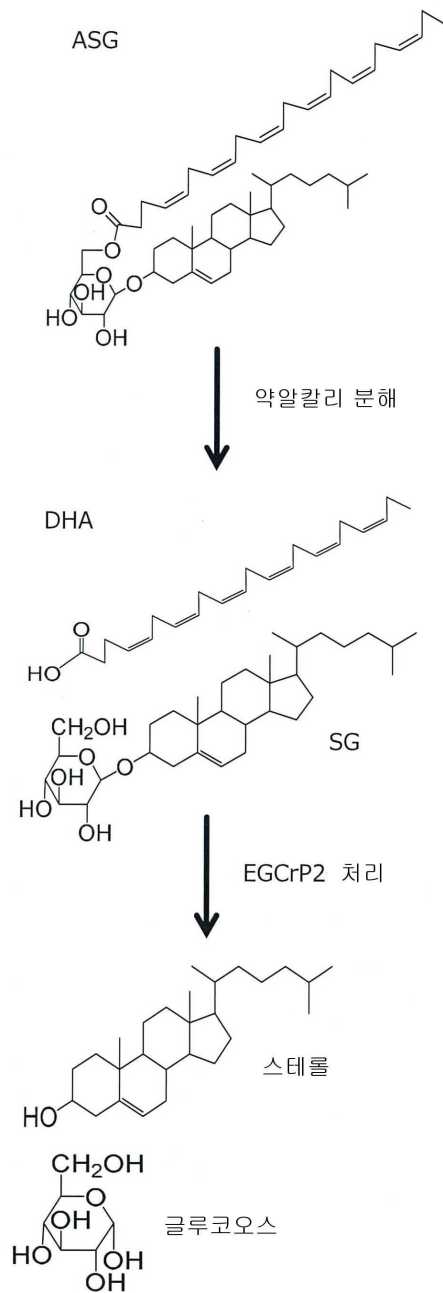
도면6



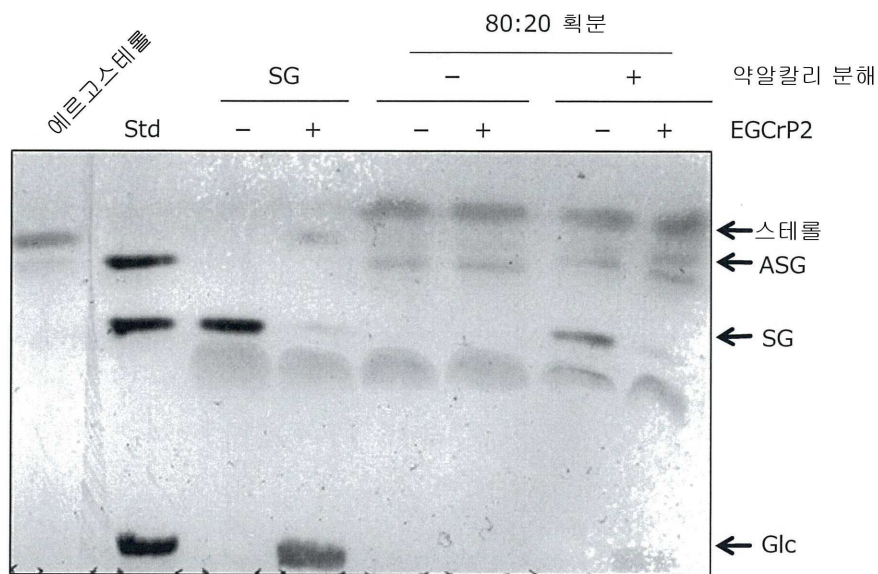
도면7



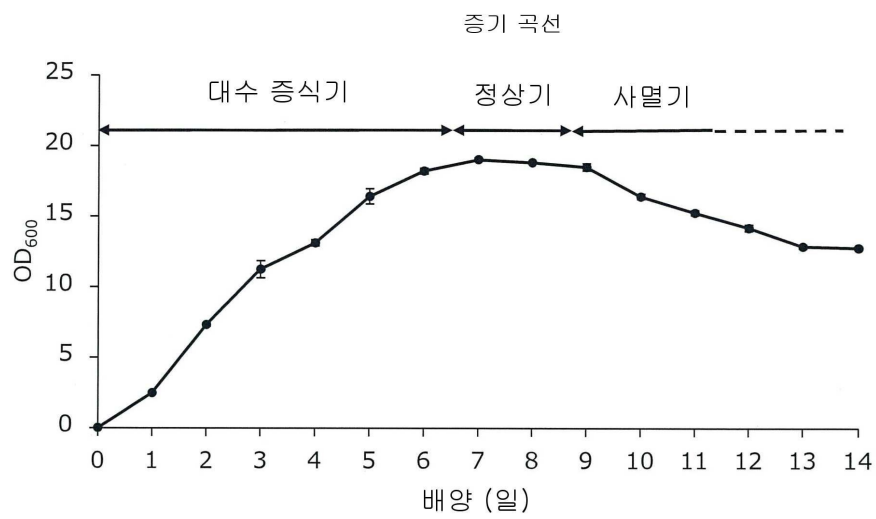
도면8



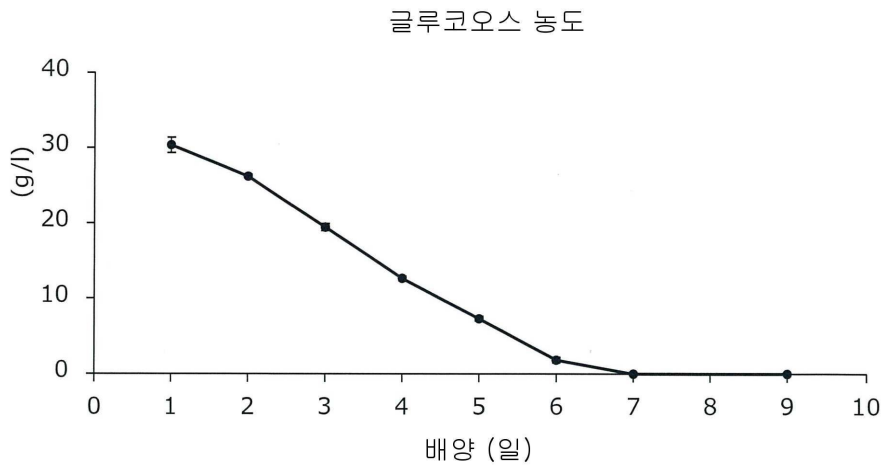
도면9



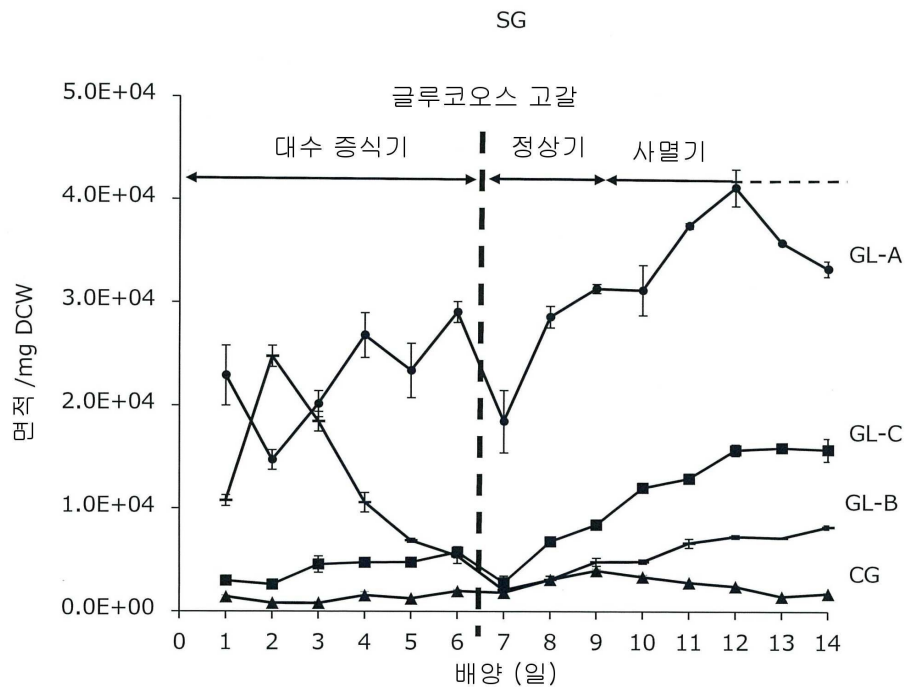
도면10



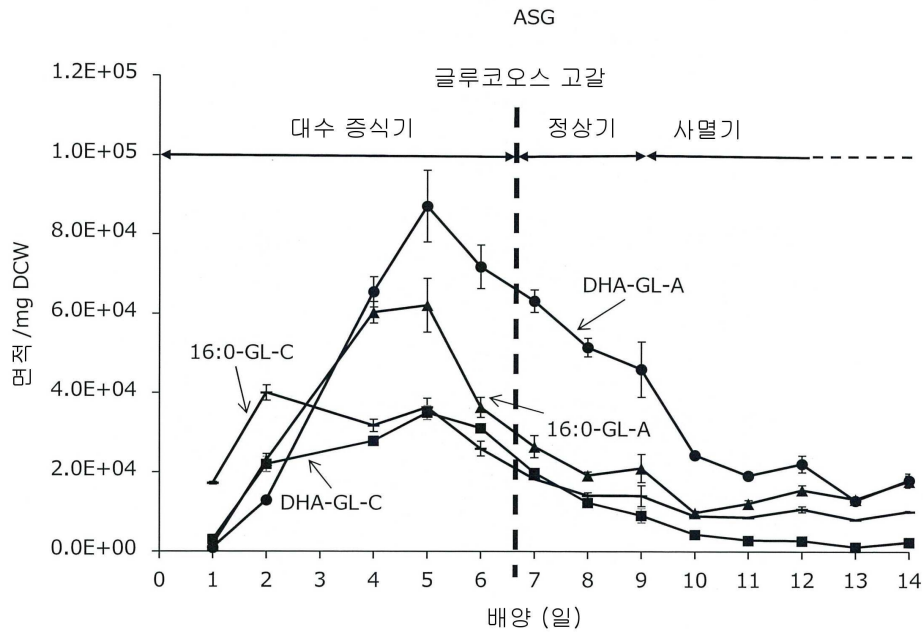
도면11



도면12



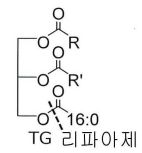
도면13



도면14

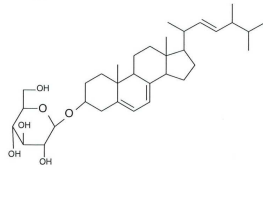
(a)

TG



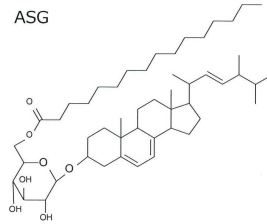
+

SG



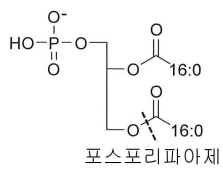
→

ASG



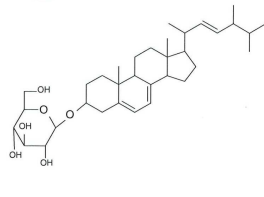
(b)

포스파티딘산



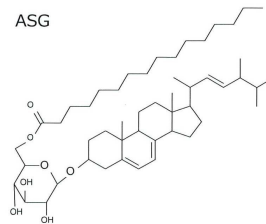
+

SG

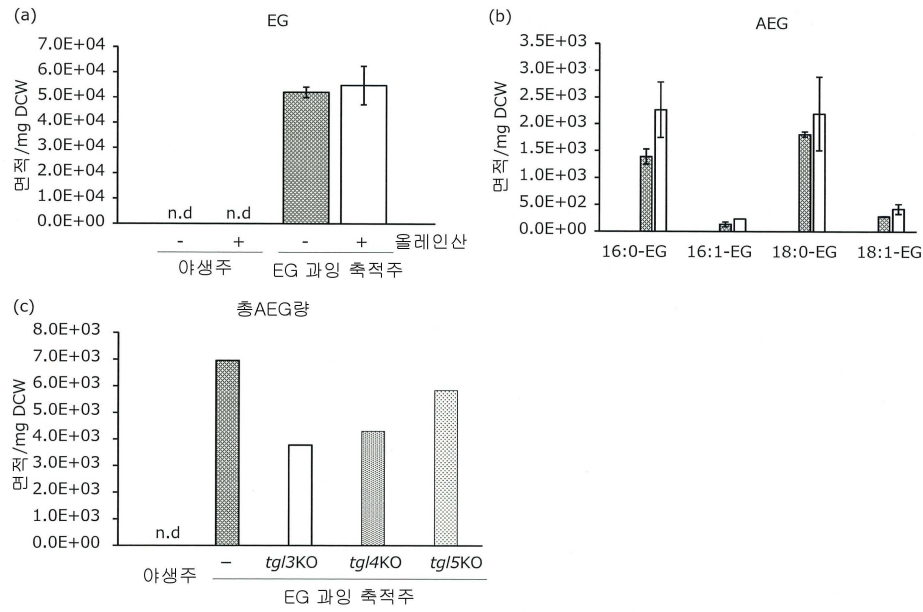


→

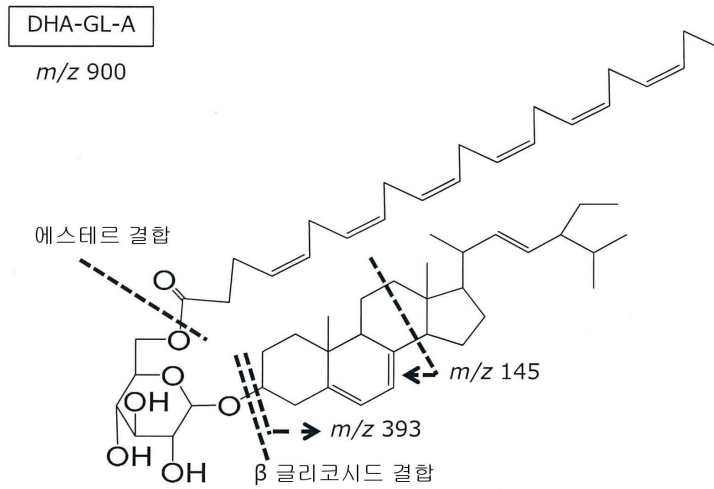
ASG



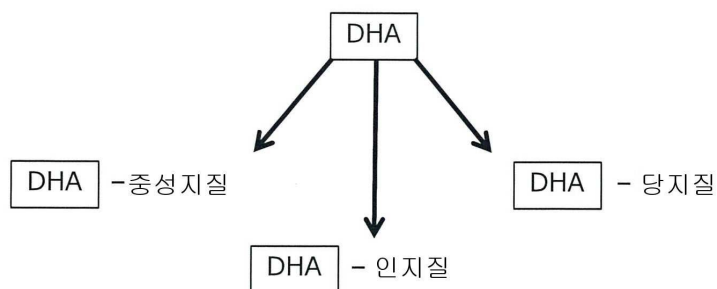
도면15



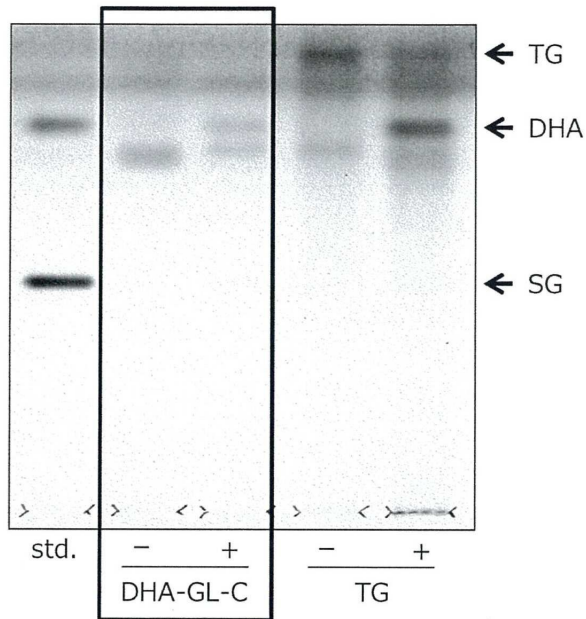
도면16



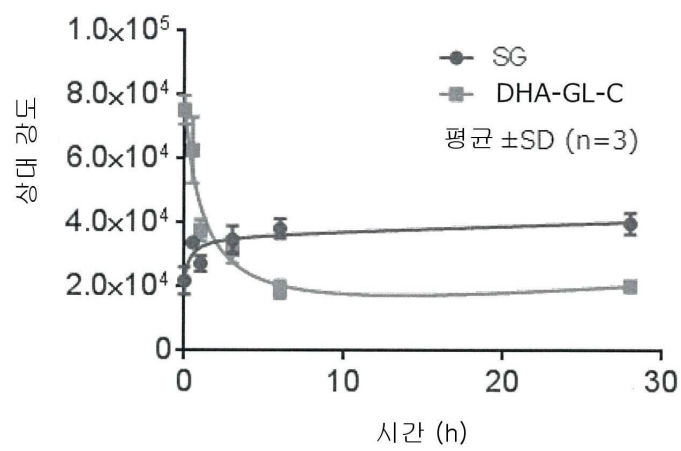
도면17



도면18



도면19



도면20

