



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2010-0116051
(43) 공개일자 2010년10월29일

(51) Int. Cl.

C12P 7/64 (2006.01) C12P 19/00 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2009-0034773

(22) 출원일자 2009년04월21일

심사청구일자 2009년04월21일

(71) 출원인

한밭대학교 산학협력단

대전 유성구 덕명동 산16-1

(72) 발명자

김창섭

대전광역시 유성구 지족동 877 열매마을아파트
504동 504호

김영환

대전광역시 유성구 덕명동 191-3 101호

장용

대전광역시 서구 도마2동 109-20

(74) 대리인

최규환

전체 청구항 수 : 총 16 항

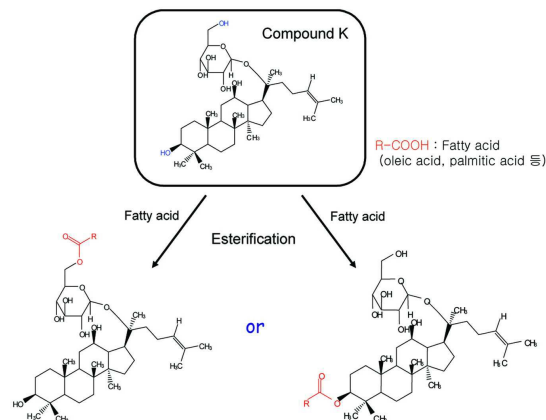
(54) 리파아제를 이용한 진세노사이드 지방산 에스터 화합물의 제조 방법

(57) 요약

본 발명은 유기용매 상에서 리파아제 효소의 존재하에 진세노사이드 또는 이의 대사체(metabolite)와 지방산을 반응시키는 단계를 포함하는 생물전환기술을 활용한 진세노사이드 또는 이의 대사체의 지방산 에스터 화합물의 제조 방법, 상기 방법에 의해 제조된 진세노사이드 지방산 에스터 화합물, 상기 진세노사이드 지방산 에스터 화합물을 함유하는 건강기능식품, 기능성 화장품 및 의약품에 관한 것이다.

본 발명에 따라 제조된 모든 종류의 진세노사이드 지방산 에스터 화합물은 생체 흡수율, 생체 잔류기간 및 생체 내 안정성이 우수한 새로운 약리활성물질로서, 건강기능식품, 기능성 화장품 및 의약품 소재로 활용이 가능하다.

대표도 - 도5



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 108074-03-1-SB010

부처명 농림수산식품부 농림기술관리센터

연구관리전문기관

연구사업명 농림기술개발사업

연구과제명 인삼 진세노사이드 대사체의 지방산 에스터 화합물을 함유하는 기능성 화장품의 개발

기여율

주관기관 한밭대학교 산학협력단

연구기간 2008년 06월 25일 ~ 2009년 06월 24일

특허청구의 범위

청구항 1

유기용매 상에서 리파아제 효소의 존재하에 진세노사이드 또는 이의 대사체(metabolite)와 지방산을 반응시키는 단계를 포함하는 생물전환기술을 활용한 진세노사이드 또는 이의 대사체의 지방산 에스터 화합물의 제조 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 유기용매는 3차(tertiary) 아밀 알코올인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 3

제2항에 있어서, 상기 3차 아밀 알코올은 2-메틸-2-부탄올인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 지방산은 유리 지방산, 알킬 지방산, 비닐 지방산, 트리아실 글리세롤 (triacyl glycerol) 형태의 지방산인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 5

제4항에 있어서, 상기 알킬 지방산은 메틸 지방산 또는 에틸 지방산인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 지방산은 올레산 또는 메틸 팔미테이트인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 7

제1항에 있어서, 상기 진세노사이드 또는 이의 대사체는 인삼 추출물, 홍삼 추출물, 홍삼 가공 추출물 또는 복합 진세노사이드 조성물로부터 유래된 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 8

제1항에 있어서, 상기 진세노사이드는 compound K, Rg2, Rg3, 또는 Rh2인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 9

제1항에 있어서, 상기 리파아제 효소는 고정화된 리파아제인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 10

제1항에 있어서, 상기 효소 반응 시간은 11일~13일인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 11

제1항에 있어서, 상기 효소 반응은 50℃에서 수행되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 12

제1항에 있어서, 상기 진세노사이드는 compound K이며, 지방산은 올레산 또는 메틸 팔미테이트이며, 유기용매는 2-메틸-2-부탄올인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 13

제1항 내지 제12항 중 어느 한 항의 방법에 의해 제조된 진세노사이드 지방산 에스터 화합물.

청구항 14

제13항의 진세노사이드 지방산 에스터 화합물을 함유하는 건강기능식품.

청구항 15

제13항의 진세노사이드 지방산 에스터 화합물을 함유하는 기능성 화장품.

청구항 16

제13항의 진세노사이드 지방산 에스터 화합물을 함유하는 의약품.

명세서

발명의 상세한 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 리파아제를 이용한 진세노사이드 지방산 에스터 화합물의 제조 방법에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 유기용매 상에서 리파아제 효소의 존재하에 진세노사이드 또는 이의 대사체(metabolite)와 지방산을 반응시키는 단계를 포함하는 생물전환기술을 활용한 진세노사이드 또는 이의 대사체의 지방산 에스터 화합물의 제조 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 사포닌의 화학구조를 간단히 정의하면 당부분인 sugar (glycone)와 비당부분인 non-sugar (aglycone)로 구성되어 있는 배당체이다. 특히 사포닌의 비당부분을 사포제닌(sapogenin)이라 부른다. 사포닌은 비당부분의 골격 구조에 따라 트리테르페노이드(triterpenoid) 계 사포닌과 스테로이드 계 사포닌, 2가지로 크게 분류된다. 트리테르페노이드 계 사포닌은 올레아난(oleanane) 계 사포닌이 대부분을 차지하고 있고, 진해, 거담의 목적으로 사용되고 있는 생약인 길경 (도라지), 원지 등에 함유되어 있는 사포닌이 여기에 속한다. 그러나 인삼사포닌은 거의 트리테르페노이드 계의 담마란(dammarane) 계 사포닌으로서 인삼 (*Panaxa*) 속의 식물에만 존재하는 특유의 사포닌이다. 따라서 인삼 사포닌은 특수한 화학구조를 가지고 있고, 비당부분에 따라 4環性의 담마란 사포닌 (거의 대부분임)과 5環性의 올레아난 사포닌 (gisenoside Ro)의 2 종류로 대별된다. 담마란 계 사포닌은 다시 비당부분에 붙어있는 -OH 기의 수에 따라 2개 (3, 12번 탄소)인 경우 프로토파낙사디올(protopanaxadiol) 계 사포닌, 3개인 경우 (3, 6, 12번 탄소) 프로토파낙사트리올(protopanaxatriol) 계 사포닌으로 나누어진다.

[0003] 천연의 진세노사이드는 Rb₁, Rb₂, Rc, Rd, Re, Rg₁ 등이 주성분이며, 그 외 홍삼 등의 가공삼에 Rg₂, Rg₃, Rh₁ 등이 미량 존재한다 (Takino Y., 1994, *Yakugaku Zasshi.*, 114: 550-564). Rb₁, Rb₂, Rc, Rd 등이 디올 계이고, Re, Rg₁ 등은 트리올 계 진세노사이드이다 (도 1 참고) (Hideo Hasegawa, 2004, *J. Pharmacol Sci.*, 95: 153-157).

[0004] 천연 진세노사이드 성분들 중 Rb₁, Rb₂, Rc, Rd 등의 디올계 진세노사이드는 생체 내로 투여된 후 위액 등의 각종 소화액과 장내미생물들의 작용으로 다음과 같은 일련의 분해과정을 거치게 된다. Rb₁→[M10(Rd)]→M5(F₂) 또는 M9→M13]→M1, Rb₂→M6→M2→M1, 그리고 Rc→M7→M3→M1 (도 2 참고) (Hideo Hasegawa, 2004, *J. Pharmacol Sci.*, 95: 153-157).

[0005] 그러나 천연에 존재하는 진세노사이드를 섭취하였을 때 생체 내로의 흡수율은 매우 낮다 (0.1 - 3.7% 정도)는 것이 밝혀지고 있다 (Hasegawa et al., 2000, *Biol. Pharm. Bull.*, 23(3): 298-304). 이 물질들은 장내 미생물들에 의하여 분해가 되어 여러 가지 대사체들로 그 구조가 전환되고, 그 중에 일부 특정 형태만이 체내로 흡수되어 혈액으로 이동하게 되는 것으로 최근의 연구들에서 보고되고 있다.

[0006] 진세노사이드의 분해는 일반적으로 배당체 중 당 성분 (sugar)이 분해되는 과정을 의미하며 이때 몇몇의 구조 이성질체가 생성될 수도 있다. 생체내의 흡수는 일반적으로 당의 수가 적을수록 흡수가 빠르며 체내에서의 잔류시간도 길며 약리활성 또한 강한 것으로 알려져 있다.

[0007] 또 다른 문제는 모든 디올계의 천연 진세노사이드들이 완전하게 M1으로 전환되는 것이 아니고, 생체의 건강상태에 따라 그 분해정도가 달라질 수 있으며, 주로 M1의 형태로 대장에서 체내로 흡수되게 된다는 것이다. 중간대사물질인 다른 구조이성질체들은 흡수가 잘 되지 않는 것으로 알려졌다.

[0008] M1은 항전이효과(anti-metastatic effect) 및 항발암효과(anti-carcinogen effect) 등의 항암 활성을 갖는데 (Sakakibara et al., 1975, *Chem. Pharm. Bull.*, 23: 1009-1061), 이는 진세노사이드 Rb₁, Rb₂, Rc, Rd 등의

물질이 항암효과를 나타내는 것에 대해서도 설명이 가능한 부분이다. M1은 (Hasegawa et al., 1996, *Planta Med.*, 62: 453-457) 관용명으로 compound K, IH901로도 불리며 (Hasegawa et al., 1997, *Arch. Pharm. Res.*, 20: 539-544), 20-O-β-D-Glucopyranosyl 20(S)-protopanaxadiol로 명명된다 (Tanizawa et al., 1993, *Proc 6th Int Ginseng Symp. Seoul.*: 187-194).

[0009] 또한 대장을 통해 혈액으로 흡수된 M1은 선택적으로 그 일부만이 간 (liver)에 축적되고 대부분은 담즙 (bile)의 형태로 배출되게 된다. 그러나 약간의 M1은 스테아르산, 팔미트산, 올레산 등의 여러 가지 종류의 지방산 (fatty acid)과 주로 mono-ester (일부 di-ester)를 이루게 된다 (24 mol% in mouse). 이러한 에스터화된 M1의 구조변환 유도체들은 M1과는 다르게 담즙으로 쉽게 배출되지 않으며 따라서 간에 상대적으로 오래 잔존하는 것으로 최근 보고 되었고, 이들의 생체 내 약리활성은 B16-F10 흑색종 세포에서 세포독성 (cytotoxicity)이 M1에 비해 상대적으로 약했지만 암 성장 (tumor growth) 억제능력은 더 강력했다 (도 3 참조) (Hideo Hasegawa, 2004, *J. Pharmacol Sci.*, 95: 153-157).

[0010] Compound K는 인삼 사포닌 (진세노사이드)을 섭취했을 때 장내에서 분해되어 혈액에 흡수되는 주요 진세노사이드 성분이다. 동물 (mouse) 실험을 통해서도, compound K가 장내에서 흡수되는 주요성분임이 확인되었다. 그리고 암세포 전이억제, 발암억제 등의 항암활성을 갖고 있다 (Shin et al., 2005, *International Immunopharmacology.*, 5: 1183-1191).

[0011] 한편 Re, Rg1 등의 트리올 계 진세노사이드는 장내미생물들의 작용으로 Re→Rg₁→M11(F₁) 또는 M8(Rh₁)→M4 으로의 전환 과정을 거치게 되는데, 그 중에서 주로 M4의 형태로 소장에서 흡수되어 혈액으로 이동하는 것으로 보인다. 장간막 림프 (mesenteric lymph)로 이동한 대부분의 M4는 에스터화된 구조 유도체로 변환되어, 간과 허파와 같은 조직에 축적되었다가 담즙으로 배출된다.

[0012] 결론적으로, 천연 진세노사이드 성분들의 약리효능은 장내미생물들의 당분해작용 (deglycosylation) 정도, 대장에서의 흡수, 간 또는 장간막 림프에서의 지방산의 에스터화, 체내 잔류 정도 (간에서 담즙으로의 배출 정도) 등에 의존하게 됨을 알 수 있다 (Hideo Hasegawa, 2004, *J. Pharmacol Sci.*, 95: 153-157). 이와 같은 선행 연구 결과를 종합해보면 생체에 흡수된 진세노사이드의 실질적인 주요 약리활성 성분은 진세노사이드의 지방산 에스터 구조변환 유도체 화합물이라고 볼 수 있다.

[0013] 현재 우리나라의 많은 건강기능식품이나 화장품에서 인삼과 홍삼을 사용하고 있으나, 잔류 농약과 복합성분의 함유로 인한 부작용 유발 등의 문제로 그 판매가 정체되고 있다. 또한 거의 모든 제품에서 단순 추출물을 첨가하는 형식으로 제품을 생산하고 있어 약재가 지니는 가치를 충분히 평가받지 못하고 있는 현실이다. 약리활성이 검증된 핵심 진세노사이드 (compound K, Rg3, Rh2 등)의 함량이 미비하여, 합리적이고 재현성 있는 약리활성이 우수한 제품으로 한국 및 세계시장을 과학적으로 공략하는데 어려움을 겪고 있다. 최근 들어 일부 국내 화장품 회사를 중심으로 단일 진세노사이드 (진세노사이드 Rg2, Rg3와 compound K, F1)를 함유하는 화장품을 개발하고 있으나, 독자적인 특허기술로 인정받지 못할 뿐만 아니라 낮은 피부 흡수율로 인하여 그 약리효능을 제대로 기대할 수 없는 실정이다.

[0014] Compound K의 경우도 다른 진세노사이드에 비하여 피부 흡수율이 4배가 높은 것으로 보고되고 있으나, 여전히 효율적으로 생체내로 흡수되기는 어려운 화학구조를 가지고 있어, 피부흡수율을 증대하기 위한 보조제를 화장품에 첨가하고 있는 실정이다. 인삼의 합리적 약리활성 효과를 위해서는 약리효능이 뛰어난 특정 진세노사이드의 대량생산이 가능해야할 뿐만 아니라 진세노사이드와 이들의 대사체의 다양한 새로운 구조변환 유도체 생산기술을 독자적으로 개발하여, 생체 흡수도 증가, 약리활성 증강, 생체내 안정성증강 등이 있는 새로운 약리활성물질을 개발하는 것이 중요하다.

[0015] 기존의 연구는 인삼 또는 홍삼에 많이 존재하는 진세노사이드 성분들의 각각의 약리작용, 나아가 이러한 성분들을 미생물 또는 당분해효소를 이용하여 특정 진세노사이드의 대사체로 전환하려는 연구 또는 이들의 약리 작용에 관한 연구 분야에 치중되어 왔었다.

[0016] 그러나 본 발명의 중요한 단서를 제공한 것은 식물의 활성성분 중 하나인 몇몇 플라보노이드의 지방산 에스터 화합물을 리파아제 효소 또는 화학합성법을 이용하여 개발하고자 하는 연구들이다 (Gayot et al., 2003, *J. Biotechnol.*, 101(1): 29-36). 또한 화학합성법으로 제조한 소수성이 증가된 플라보노이드의 지방산 에스터 화합물을 화장품에 적용하려는 기술이 보고된 바 있다 (미국등록특허 제6,471,973호). 플라보노이드의 에스터화 반응에 따라 소수성 증가에 따른 생체흡수도 증가, 안정성 증대 및 효능의 유지가 가능함을 확인하여 주었다. 진세노사이드나 이들의 대사체를 구조적으로 변환시키는 연구는 화학합성법을 이용하여 compound K와

dicarboxylic acid (succinate, glutarate)의 에스터화 유도체를 제조하여 의약품 및 화장품의 원료로 활용하려는 기술에 대한 보고가 유일하다 (미국공개특허 제2006-0234956호). 이러한 결과는 진세노사이드의 다양한 신규 에스터화 유도체의 합성이 가능하며, 보다 우수한 새로운 생체기능성 소재로서 활용할 수 있음을 시사해 주고 있다.

발명의 내용

해결 하고자하는 과제

- [0017] 본 발명은 상기와 같은 요구에 의해 안출된 것으로서, 본 발명은 진세노사이드 및 이의 대사체의 지방산 에스터 화합물을 고정화 리파아제 효소를 사용한 생물전환기술을 이용하여 약리활성이 뛰어난 신규 기능성 생물소재를 세계 최초로 개발한 것이다. 즉, 생체 흡수율 향상, 약리활성 증가와 체내 안정성 증가를 목적으로 한 진세노사이드의 지방산 에스터 화합물의 효소적 합성은 세계적으로도 아직 보고가 되지 않은 기술로서, 건강기능식품, 기능성 화장품소재 및 의약품 소재로 활용이 가능하다.

과제 해결수단

- [0018] 상기 과제를 해결하기 위해, 본 발명은 유기용매 상에서 리파아제 효소의 존재하에 진세노사이드 또는 이의 대사체(metabolite)와 지방산을 반응시키는 단계를 포함하는 생물전환기술을 활용한 진세노사이드 또는 이의 대사체의 지방산 에스터 화합물의 제조 방법을 제공한다.
- [0019] 또한, 본 발명은 상기 방법에 의해 제조된 진세노사이드 지방산 에스터 화합물을 제공한다.
- [0020] 또한, 본 발명은 상기 진세노사이드 지방산 에스터 화합물을 함유하는 건강기능식품, 기능성 화장품 및 의약품을 제공한다.

효 과

- [0021] 본 발명에 따르면, 본 발명은 인삼이나 홍삼의 단순 가공이나 이들의 복합성분 추출물을 이용한 건강식품 및 화장품 시장의 한계를 극복하고, 생체 약리활성의 본체인 진세노사이드 및 이들의 대사체로부터 효소전환 기술을 이용한 새로운 지방산 에스터 화합물을 개발하였다.
- [0022] 또한, 진세노사이드 대사체보다 더 우수한 생체 흡수율, 생체 잔류기간, 약리활성 및 생체내 안정성을 갖는 새로운 약리활성물질을 개발하였으므로, 향후 건강기능식품, 기능성 화장품 및 의약품으로의 상품화가 가능할 것으로 기대된다.

발명의 실시를 위한 구체적인 내용

- [0023] 본 발명의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 유기용매 상에서 리파아제 효소의 존재하에 진세노사이드 또는 이의 대사산물(metabolite)과 지방산을 반응시키는 단계를 포함하는 생물전환기술을 활용한 진세노사이드 또는 이의 대사산물의 지방산 에스터 화합물의 제조 방법을 제공한다.
- [0024] 본 발명의 진세노사이드 또는 이의 대사산물의 지방산 에스터 화합물의 제조 방법은 더욱 구체적으로 유기용매에 진세노사이드 또는 이의 대사체(metabolite)와 지방산을 용해하는 단계 및 상기 용액에 리파아제 효소를 첨가하여 반응시키는 단계를 포함할 수 있다.
- [0025] 효소를 촉매로 하는 반응은 화학적 반응에 비해 온화한 조건에서 특정 반응만을 유도할 수 있는 이점이 있다 (Martineck et al., 1981, *J. appl. Biochem.*, 3: 93). 전통적으로 효소 반응은 주로 생체내의 환경과 비슷한 수용액에서 이루어졌으나, 최근 물이 거의 없는 유기용매 내에서도 효소의 활성 (catalytic activity)이 있는 것이 발견되면서 다양한 응용 가능성이 있어 최근 활발히 연구되고 있는 분야이다.
- [0026] 유기용매 내에서 효소 반응을 수행할 경우 반응 속도에 영향을 미치는 인자로는 반응혼합물에 포함된 수분의 양 (Zaks et al., 1990, *J. Biotechnology*, 14: 15), 반응의 매질로 쓰이는 유기용매 (Riva et al., 1988, *J. Am. Chem. Sci.*, 110: 584), 그리고 담체 및 첨가제의 영향 (Reslow et al., 1988, *Eur. J. Biochem.*, 172: 573) 등을 들 수 있다. 특히 수분의 양은 중요한 인자로서 효소활성을 위해서는 수분이 필수적이다. 그러나 필수적인 미량의 수분이 유기용매 내에 현탁된 효소 입자들을 서로 엉겨 붙게 만드는 효소응집 (enzyme aggregation)을 유도한다는 사실이 여러 논문에서 보고 되고 있다 (Yang et al., *A. J. Biotechnol. Bioeng.*, 47: 60-70). 효소 응집은 유기용매 내에서의 효소 반응에서 소량의 수분에 의해 쉽게 일어날 수 있으며, 효소 입자의 표면적을

감소시켜 반응 속도를 떨어뜨린다.

- [0027] 본 발명의 일 구현예에 따른 제조 방법에서, 상기 유기용매는 3차(tertiary) 아밀 알코올일 수 있으며, 바람직하게는 3차 아밀 알코올은 2-메틸-2-부탄올일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0028] 본 발명의 일 구현예에 따른 제조 방법에서, 상기 지방산은 유리 지방산, 알킬 지방산, 비닐 지방산, 트리아실 글리세롤 (triacyl glycerol) 형태의 지방산일 수 있으며, 상기 알킬 지방산은 메틸 지방산 또는 에틸 지방산일 수 있다. 바람직하게는 상기 지방산은 올레산 또는 메틸 팔미테이트일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0029] 본 발명의 일 구현예에 따른 제조 방법에서, 상기 진세노사이드 또는 이의 대사체는 인삼 추출물, 홍삼 추출물, 홍삼 가공 추출물 또는 복합 진세노사이드 조성물로부터 유래된 것일 수 있으며, 상기 진세노사이드는 바람직하게는 compound K, Rg2, Rg3, Rh2 등일 수 있으며, 더욱 바람직하게는 compound K일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.
- [0030] 본 발명의 일 구현예에 따른 제조 방법에서, 상기 리파아제 효소는 고정화된 리파아제인 것이 바람직하다. 미생물성 리파아제는 racemic 혼합물의 가수분해나 에스테르와 펩타이드의 합성, 지방산의 생산과 가수분해, 식품이나 세제 첨가제 등 응용범위가 매우 다양하여 미생물성 리파아제의 공업적 이용에 관한 연구들이 활발한 진행 중에 있으며 (Han et al., 1998, *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.*, 16(3): 250-258), 현재 라이조푸스 델레마르(*Rhizopus delemar*) 리파아제, 캔디다 실린드라세아(*Candida cylindracea*) 리파아제, 캔디다 파르리폴리티카(*Candida parlipolytica*) 리파아제 등은 공업적으로 생산되어지고 있다 (Park et al., 2004, *Korean J. Biotechnol. Bioeng.*, 19(2): 148-153). 리파아제는 화학적으로 제조된 라세미 에스테르화 입체 선택적 가수분해 반응이나 유기용매 상에서 입체 선택적 에스테르화 반응에 사용된다 (Hong et al., 2002, *Korean J. Biotechnol. Bioeng.*, 17(6): 543-548).
- [0031] 본 발명의 일 구현예에 따른 제조 방법에서, 상기 효소 반응 시간은 11일~13일인 것이 바람직하며, 효소 반응은 45~55℃, 바람직하게는 50℃에서 수행되는 것이 바람직하다. 또한, 200rpm의 조건으로 진탕 배양기(shaking incubator)에서 교반시키며 반응시키는 것이 더욱 바람직하다.
- [0032] 본 발명의 일 구현예에 따른 제조 방법에서, 상기 진세노사이드는 compound K이며, 지방산은 올레산 또는 메틸 팔미테이트이며, 유기용매는 2-메틸-2-부탄올인 것이 바람직하다. 본 발명의 일 실시예는 유기용매 상에서 리파아제를 이용한 진세노사이드인 compound K와 지방산인 올레산(oleic acid)의 에스테르화 반응에 관한 것이다. 최적의 반응을 위하여 에스테르화 반응조건의 변수 즉, 수분의 양, 반응온도, 지방산의 양 등에 관하여 실험하였다. 도 4는 리파아제 효소에 의한 compound K와 지방산의 에스테르화 반응 예상 메커니즘을 나타낸 것으로, 유기용매 상에서 리파아제를 이용한 에스테르화 반응을 수행하기 위해서는, 반응 진행과 함께 물이 생성되는 축합반응이므로 반응혼합물에 포함된 수분의 양을 최소화시켜주는 것이 가장 중요할 것으로 예측할 수 있다. 도 5는 진세노사이드인 compound K와 지방산인 올레산 또는 팔미트산의 리파아제를 이용한 에스테르화 반응 후 예상되는 반응생성물 (compound K의 지방산 에스테르 화합물)의 구조를 나타낸 것이다.
- [0033] 본 발명은 또한, 본 발명의 진세노사이드 또는 이의 대사체의 지방산 에스테르 화합물의 제조 방법에 의해 제조된 진세노사이드 지방산 에스테르 화합물을 제공한다. 상기 방법에 의해 제조된 진세노사이드 지방산 에스테르 화합물은 진세노사이드 대사체보다 더 우수한 생체 흡수율, 생체 잔류기간, 약리활성 및 생체내 안정성을 갖는 새로운 약리활성물질이다.
- [0034] 따라서, 본 발명은 또한, 상기 진세노사이드 지방산 에스테르 화합물을 함유하는 건강기능식품, 기능성 화장품 및 의약품을 제공한다.

[0035] 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0036] 1. 시약 및 기기

[0037] Compound K는 (주)비티진에서 제공받았으며, 고정화 리파아제 효소는 유기용매 내에서 안정성이 확인된 효소로서, 리파아제 GF (CALB; *Candida antarctica* 리파아제 B)이며 (주)제노포커스로부터 제공받았다. 지방산인 올레산과 유기용매인 3차(tertiary) 아밀 알코올 (2-methyl-2-butanol)은 Sigma-Aldrich에서 구입하였다. TLC는 Merck 사의 25 Chromatofolios AL TLC 20×20cm 실리카 겔 60 F₂₅₄와 20 TLC plates 20×20cm 실리카 겔 60 F₂₅₄

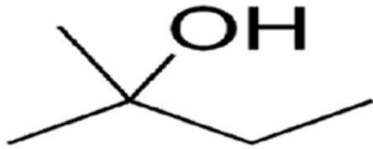
0.5mm를 사용하였다. HPLC system은 Agilent 1100 series (UV detector)에 CAPCELL PAK ODS C18 column (4.6mm×250mm)을 사용하였다.

2. 유기용매와 지방산의 화학구조 및 성질

(1) 3차 아틸 알코올 (2-메틸-2-부탄올)

장뇌의 냄새와 함께 투명하고 무색의 액체이다. 플래시 포인트(Flash point) 70° F, 밀도 0.81 g/cm³ 약간 물에 용해되는 성질을 가진다.

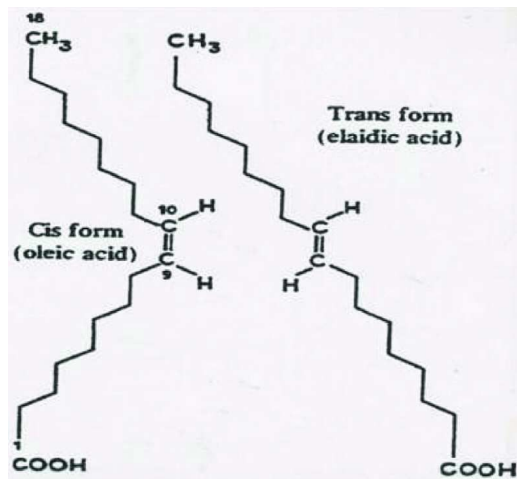
[화학식 1]



(2) 올레산

올레산은 탄소원자 사이에 이중결합을 1개만 가지고 있는 단가 불포화지방산에 속한다. 즉, 올리브오일에 포함되어 있는 지방산의 주성분으로 오메가-9 불포화 지방산으로 분자량 282.47g/mol, 녹는점 13.3℃ 또는 16.2℃, 끓는점 223℃ (10 Torr), 비중 0.89 (25℃)의 성질을 가진다.

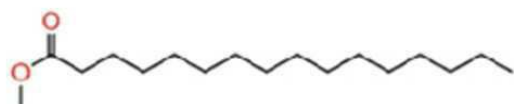
[화학식 2]



(3) 메틸 팔미테이트

메틸 헥사데카노에이트라는 동의어를 가지며, 팔미트산의 카르보닐기에 메틸기가 결합된 지방산의 형태를 가진다. 팔미트산과 메탄올이 에스터 결합된 것이다. 분자량 270.456g/mol, 끓는점 211.5℃ (30mmHg), 밀도 0.85 g/cm³의 성질을 가진다.

[화학식 3]



3. 실험 방법

- [0052] 유기용매 (2-메틸-2-부탄올)에서 리파아제 효소를 이용한 compound K와 올레산의 에스터화 반응
- [0053] (1) Compound K와 올레산 (1.5%)의 에스터화 반응
- [0054] 유기용매 상에서 리파아제를 이용한 에스터화 반응을 수행하기 위해서는, 반응 진행과 함께 물이 생성되는 축합 반응이므로 모든 반응혼합물 (기질, 효소 및 용매)에 포함된 수분의 양을 최소화시켜주는 것이 가장 중요하다.
- [0055] 반응 기질인 compound K 10mg (0.2%)와 올레산 75 μ l (1.5%), 그리고 효소인 리파아제 GF 20mg (0.2%)는, 2일 동안 100℃ 이상의 오븐에서 건조시킨 실리카를 바닥에 깔은 desiccator 안에서 진공 상태로 7일 동안 건조시켰다.
- [0056] 반응 매질인 유기용매 (2-메틸-2-부탄올)에 존재하는 수분을 최대한 제거하기 위하여, 150℃ drying oven에서 24시간 이상 활성화시킨 4Å molecular sieve를 용매 1L 당 100g의 비율로 용매 6mL에 넣어준 후 실온에서 5일 이상 처리하였다.
- [0057] 20mL 들이 갈색의 screw-top glass vial 안에서 2-메틸-2-부탄올 5mL에 compound K 10mg (0.2%)을 첨가하여 녹이고, 올레산 75 μ l (1.5%)를 첨가하여 용해시킨 후 대조구로 사용하기 위하여 혼합용액 50 μ l를 샘플링하였다. 그 후 리파아제 GF 20mg (0.4%)을 첨가하여 50℃에서 200rpm의 조건으로 진탕 배양기(shaking incubator)에서 교반시키며 반응시켰다. 반응 중 생성되는 수분을 최대한 제거하여 초기 반응을 촉진하기 위하여 반응을 시작한 지 24시간이 되었을 때 반응 혼합물에 4Å molecular sieve 100g/L를 넣어주었다. 반응진행 경과는 24시간 마다 glass pipette을 이용하여 반응혼합물을 채취하여 TLC (silica gel 60 F₂₅₄ plate)로 분석하였다. TLC의 전개용매는 헥산 : 에틸 아세테이트 = 20 : 1 을 사용하였고, 10% H₂SO₄에 담근 후 약 250℃에서 가열하여 발색시켰다. 반응혼합물을 원심분리한 후 여과하여 고정화 리파아제 효소를 완전히 제거함으로써 반응을 종결시키고, rotary evaporator에서 반응 용매를 최대한 제거하여 보관하였다.
- [0058] (2) Compound K와 올레산 (3.0%)의 에스터화 반응
- [0059] 1.5% 올레산을 사용한 에스터화 반응과 동일하게 모든 반응혼합물 (기질, 효소 및 용매)에 포함된 수분의 양을 최소화시켜 주기 위한 전처리를 수행하였다. 20mL 들이 갈색의 screw-top glass vial 안에서 2-메틸-2-부탄올 5 mL에 compound K 10mg (0.2%)을 첨가하여 용해시키고, 올레산 150 μ l (3.0%)를 첨가하여 용해시킨 후 대조구로 50 μ l를 샘플링하였다. 그 후 리파아제 GF 20mg (0.4%)을 첨가하여 50℃, 200rpm의 조건으로 진탕 배양기에서 교반시키며 반응시켰다. 반응을 시작한지 24시간이 되었을 때 반응 혼합물에 4Å molecular sieve 100g/L를 넣어주었다. 반응진행 경과는 24시간 마다 샘플링을 하여 동일한 분석조건에서 TLC로 분석하였다.
- [0060] (3) Compound K와 메틸 팔미테이트 (0.5%)의 에스터화 반응
- [0061] 올레산을 사용한 에스터화 반응과 동일하게 모든 반응혼합물 (기질, 효소 및 용매)에 포함된 수분의 양을 최소화시켜 주기 위한 전처리를 수행하였다. 20mL 들이 갈색의 screw-top glass vial 안에서 2-메틸-2-부탄올 5mL에 compound K 10mg (0.2%)을 첨가하여 용해시키고, 메틸 팔미테이트 24.7 μ l (0.5%)를 첨가하여 용해시킨 후 대조구로 50 μ l를 샘플링하였다. 그 후 리파아제 GF 20mg (0.4%)을 첨가하여 50℃, 200rpm의 조건으로 진탕 배양기에서 교반시키며 반응시켰다. 반응을 시작한지 24시간이 되었을 때 반응 혼합물에 4Å molecular sieve 100g/L를 넣어주었다. 반응진행 경과를 24시간 마다 샘플링을 하여 TLC로 분석하였다. TLC의 전개용매는 CHCl₃ : CH₃OH : H₂O= 13 : 2 : 0.3 을 사용하였다.
- [0062] (4) HPLC 분석 조건
- [0063] UV detector가 장착된 Agilent 1100 series HPLC system으로 분석하였다. CAPCELL PAK ODS C18 column (4.6mm ×250mm)을 사용하였고, eluent는 40 ~ 80% ACN을 gradient로 흘려주었으며, 유속은 0.8 ml/min이었다. 203nm에서 UV detector를 이용하여 검출하였다.

[0064] 실시예 1. 용매 선택

[0065] 지방산과 compound K가 잘 용해될 뿐만 아니라, 지방산과 용매와의 에스터화 반응이 일어나지 않는 유기 용매인 3차 아밀 알코올인 2-메틸-2-부탄올을 선택하였다.

[0066] 실시예 2. 효소 선택

[0067] 효소는 리파아제 CCL (lipase from *Candida cylindracea*), 리파아제 GF [GF CalB (immobilized) (*Candida antarctica* 리파아제 B)], 리파아제 L2 [CHIRAZYME L2 carrier fixed (*Candida antarctica* 리파아제 B)], 리파아제 L9 [CHIRAZYME L2 carrier fixed (*Mucor michei* 리파아제)] 중 최적의 용매로 선택한 2-메틸-2-부탄올에서 예비 실험을 통하여 새로운 화합물 생성 정도가 용이한 (주)제노포커스로부터 제공 받은 리파아제 GF를 선택하여 사용하였다. 효소량은 새로운 화합물이 생기는 속도와 생성물의 양이 충분히 빠르고 많도록 20mg으로 정하여 사용하였다.

[0068] 실시예 3. 반응 시간

[0069] 반응시간이 더 길어질수록 지방산이 점점 줄어들고, 줄어든 만큼 새로운 화합물의 양이 더 늘어나기 때문에 새로운 화합물의 양을 충분히 얻기 위해 11일 ~ 13일 반응을 진행하였다.

[0070] 실시예 4. 기질의 함량

[0071] 진세노사이드인 compound K가 고가이기 때문에 반응을 시킬 때의 양을 0.025%로 반응을 시켰다. TLC 분석을 할 때엔 문제가 없지만 HPLC로 분석을 할 때 농도가 너무 높으면 희석을 하여 HPLC 분석을 해야 하는데 희석을 하면서 발생하는 오차를 줄이기 위해 농도가 높지 않은 0.025%로 반응을 진행하였다.

[0072] 실시예 5. 2-메틸-2-부탄올에서 리파아제 효소를 이용한 compound K와 올레산의 에스터화 반응

[0073] 이와 같이 반응용매, 효소, 반응시간, 기질의 함량을 검토한 후 2-메틸-2-부탄올에서 리파아제에 의한 compound K와 올레산의 에스터화 반응을 올레산의 농도를 1.5%와 3.0%로 하여 각각 수행하였다. 반응시간에 따라 TLC (silica gel 60 F₂₅₄ plate)로 분석하였다.

[0074] (1) Compound K와 올레산 (1.5%)의 에스터화 반응

[0075] 13일 동안 반응을 수행하면서 1일 간격으로 샘플링한 반응 혼합물을 대조구와 함께 전개용매를 헥산 : 에틸 아세테이트 = 20 : 1 을 사용하여 TLC를 전개하였고, 10% H₂SO₄에 담근 후 약 250℃에서 가열하여 발색시켰다 (도 6과 7 참고). 새로운 에스터 화합물 스팟은 반응 후 1일부터 관찰되기 시작하여 반응 후 216시간부터는 생성된 에스터 화합물의 양이 늘어나면서 3개 정도의 스팟이 관찰되었다. 이는 반응이 진행됨에 따라 secondary site에도 에스터 반응이 일어난 화합물이 형성될 가능성도 있지만, (주)비티진에서 제공받은 compound K를 HPLC를 통하여 확인한 결과 소량의 3개 정도의 다른 진세노사이드가 함께 존재하는 것으로 보아, 이들의 지방산 에스터 화합물이 형성된 결과로 판단된다. 도 6은 UV를 이용하여 새로운 스팟을 정확히 관찰하기 위하여 촬영한 사진이다.

[0076] (2) Compound K와 올레산 (3.0%)의 에스터화 반응

[0077] 11일 동안 반응을 수행하면서 1일 간격으로 샘플링한 반응혼합물을 대조구와 함께 동일한 분석조건에서 TLC로 분석하였다 (도 8과 9 참고). 새로운 에스터 화합물로 추정되는 스팟은 반응 후 1일부터 관찰되었고 올레산 (1.5%)의 1일 반응양보다 많은 양의 에스터 화합물이 생성되었음을 알 수 있다. 96시간부터는 생성된 에스터 화합물의 양이 현저히 늘어나지는 않았지만, secondary site에도 에스터 화합물이 형성되면서 1개 정도의 스팟이 추가로 관찰되었다.

- [0078] (3) Compound K와 메틸 팔미테이트 (0.5%)의 에스터화 반응
- [0079] 10일 동안 반응을 수행하면서 1일 간격으로 샘플링한 반응혼합물을 전개용매를 $\text{CHCl}_3 : \text{CH}_3\text{OH} : \text{H}_2\text{O} = 13 : 2 : 0.3$ 을 사용하여 TLC로 분석하였다 (도 10 참고). Start line에 가장 가까운 스팟은 compound K이며, 메틸 팔미테이트는 10% H_2SO_4 에 발색되지 않아 스팟을 확인할 수 없었다. 새로운 에스터 화합물의 스팟은 반응 후 120 시간, 168시간의 경우 모두 R_f 값 약 7~8정도로 관찰되었다.
- [0080] 메틸 팔미테이트의 메틸기는 이탈기(leaving group)으로 작용하여 지방산 부위가 비교적 용이하게 compound K와 에스터 결합을 형성할 수 있도록 하는 이점이 있을 것으로 판단된다.
- [0081] (4) Compound K의 HPLC 분석
- [0082] (주)비티진에서 제공받은 반응 기질로 사용한 compound K의 순도를 확인하기 위하여 HPLC 분석을 통하여 확인한 결과, 소량의 3개 정도의 다른 진세노사이드가 함께 존재하는 것으로 보인다 (도 11 참고).
- 도면의 간단한 설명**
- [0083] 도 1은 장내 미생물에 의해 형성된 진세노사이드 및 이의 대사체의 화학 구조를 나타낸다.
- [0084] 도 2는 장내 미생물에 의한 진세노사이드의 당분해 작용을 나타낸다.
- [0085] 도 3은 경구 투여 후에 체내에서 진세노사이드의 추정적인 대사 경로를 보여준다.
- [0086] 도 4는 리파아제 효소에 의한 compound K와 지방산의 에스터화 반응 예상 메커니즘을 나타낸 것이다.
- [0087] 도 5는 리파아제를 이용한 compound K와 지방산의 에스터화 반응 후 예상되는 반응생성물 (compound K의 지방산 에스터 화합물)의 구조를 나타낸 것이다.
- [0088] 도 6은 compound K와 올레산 (1.5%)의 에스터화 반응물의 TLC 분석 (UV를 이용) 결과이다.
- [0089] 도 7은 compound K와 올레산 (1.5%)의 에스터화 반응물의 TLC 분석 결과이다.
- [0090] 도 8은 compound K와 올레산 (3.0%)의 에스터화 반응물의 TLC 분석 (UV를 이용) 결과이다.
- [0091] 도 9는 compound K와 올레산 (3.0%)의 에스터화 반응물의 TLC 분석 결과이다.
- [0092] 도 10은 compound K와 메틸 팔미테이트 (0.5%)의 에스터화 반응 결과이다.
- [0093] 도 11은 반응 기질로 사용한 compound K의 순도를 확인하기 위한 HPLC 분석 결과이다.

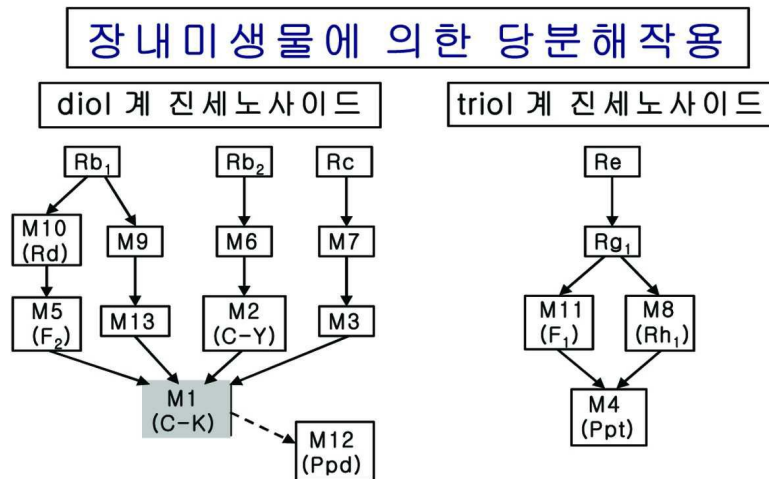
도면

도면1

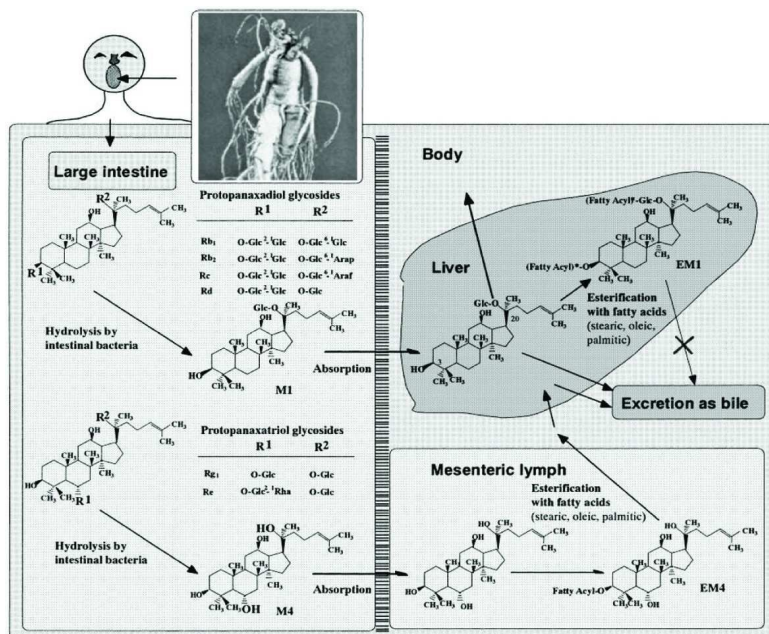
Ginsenoside	R ¹	R ²	R ³
Major ginsenoside			
20S-Protopanaxadiol type:			
Rb ₁	O-Glc ²⁻¹ Glc	H	O-Glc ⁶⁻¹ Glc
Rb ₂	O-Glc ²⁻¹ Glc	H	O-Glc ⁶⁻¹ Arap
Rc	O-Glc ²⁻¹ Glc	H	O-Glc ⁶⁻¹ Araf
Rd	O-Glc ²⁻¹ Glc	H	O-Glc
20S-Protopanaxatriol type:			
Re	OH	O-Glc ²⁻¹ Rha	O-Glc
Rg ₁	OH	O-Glc	O-Glc
Intestinal bacterial metabolite			
20S-Protopanaxadiol type:			
M10 (Rd)	O-Glc ²⁻¹ Glc	H	O-Glc
M9 (Gp-XVII)	O-Glc	H	O-Glc ⁶⁻¹ Glc
M7 (Mb)	O-Glc	H	O-Glc ⁶⁻¹ Araf
M6	O-Glc	H	O-Glc ⁶⁻¹ Arap
M13 (Gp-LXXV)	OH	H	O-Glc ⁶⁻¹ Glc
M5 (F ₂)	O-Glc	H	O-Glc
M3 (Mc)	OH	H	O-Glc ⁶⁻¹ Araf
M2 (C-Y)	OH	H	O-Glc ⁶⁻¹ Arap
M1 (C-K)	OH	H	O-Glc
M12 (aglycone)	OH	H	OH
20S-Protopanaxatriol type:			
M8 (Rh ₁)	OH	O-Glc	OH
M11 (F ₁)	OH	OH	O-Glc
M4 (aglycone)	OH	OH	OH

Glc, β -D-glucopyranose; Arap, α -L-arabinopyranose; Araf, α -L-arabinofuranose; Rha, α -L-rhamnopyranose; Gp, gypenoside; C-K, compound K; C-Y, compound Y.

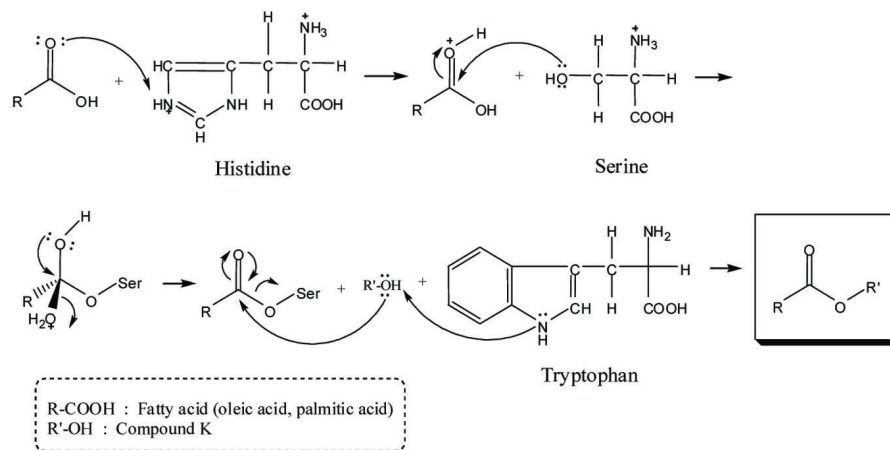
도면2



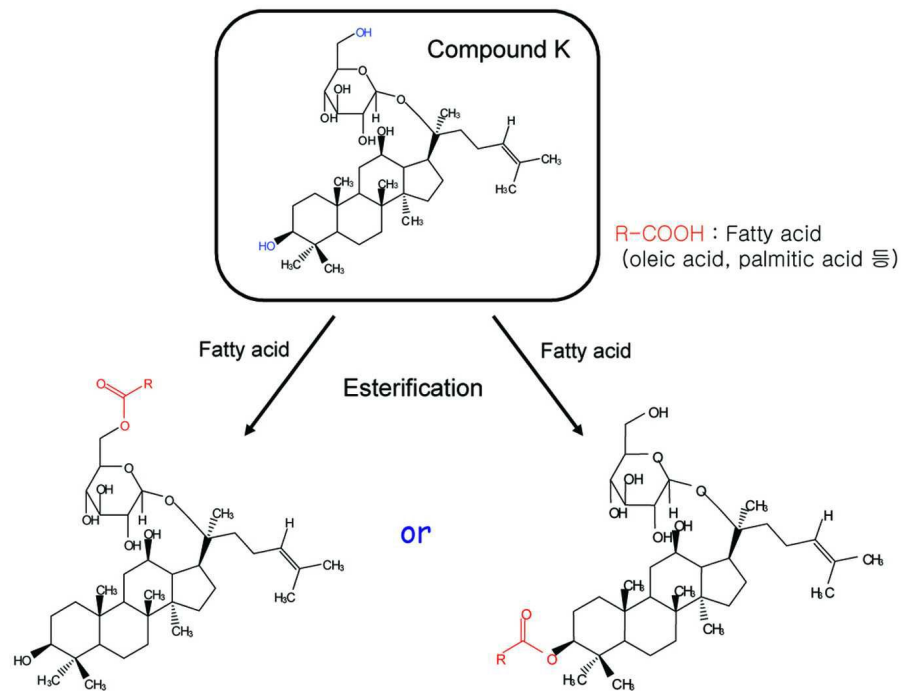
도면3



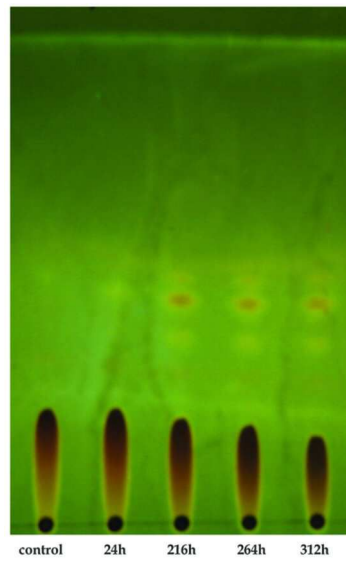
도면4



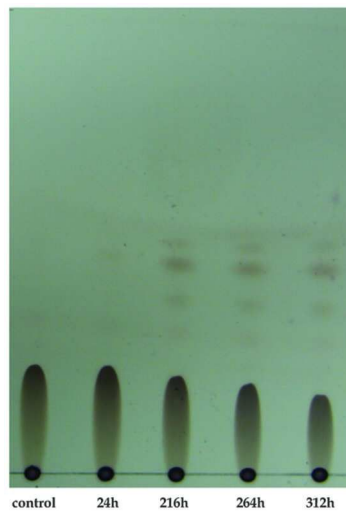
도면5



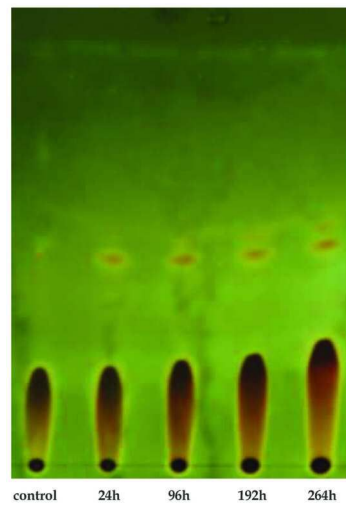
도면6



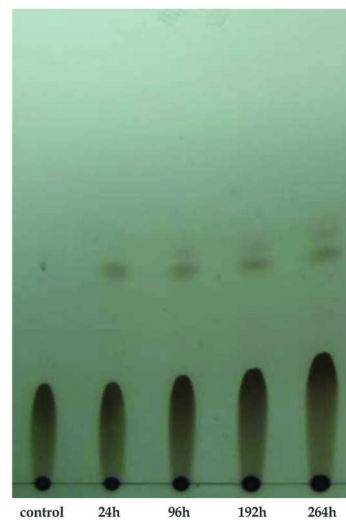
도면7



도면8



도면9



도면10



도면11

