(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0152675
(43) 공개일자 2022년11월17일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C07H 17/04 (2006.01) *A61K 8/60* (2006.01)
A61Q 19/00 (2006.01) *C07H 1/00* (2006.01)
(52) CPC특허분류
C07H 17/04 (2013.01)
A61K 8/60 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2021-0059886
(22) 출원일자 2021년05월10일
심사청구일자 2021년05월10일

(71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)
(72) 발명자
김경헌
서울특별시 서초구 서초중앙로 200, 삼풍아파트 18동 805호
윤은주
서울특별시 금천구 시흥대로 53, 14동 104호(시흥동, 현대빌라)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인다나

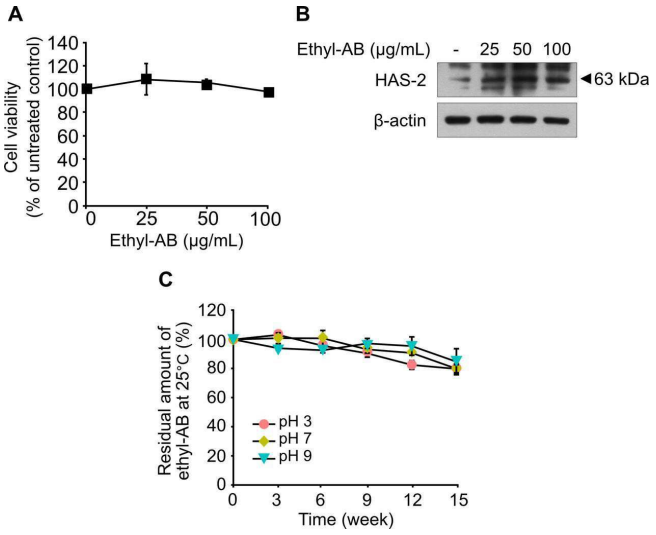
전체 청구항 수 : 총 10 항

(54) 발명의 명칭 **해조류 유래 신규 알킬-아가로바이오사이드, 이의 제조방법, 또는 이의 용도**

(57) 요 약

본 발명은 아가로바이오스의 보습 생리 활성을 확인하고 아가로바이오스의 보습 활성을 유지하면서 pH 및 온도 안정성을 동시에 확보하기 위한 신규 물질인 알킬-아가로바이오사이드, 및 이의 제조방법을 제공한다. 본 발명에 따라, 식품, 의약품 및 화장품의 우수한 보습 소재로써 알킬-아가로바이오사이드를 비용 경제적으로 생산할 수 있다.

대 표 도 - 도6



(52) CPC특허분류
A61Q 19/00 (2013.01)
C07H 1/00 (2013.01)
(72) 발명자
이선희
서울특별시 동작구 매봉로 134, 1동 206호(본동, 신동아아파트)
강남주
대구광역시 북구 대학로 80, 경북대학교 농업생명과학대학 식품공학부

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1525010555
과제번호	202003672
부처명	해양수산부
과제관리(전문)기관명	해양수산과학기술진흥원
연구사업명	해양바이오 전략소재 개발 및 상용화 지원
연구과제명	홍조류를 이용한 유해균 저해 천연 항균 기능성 소재 개발
기 여 율	1/1
과제수행기관명	고려대학교산학협력단
연구기간	2020.05.27 ~ 2021.05.31

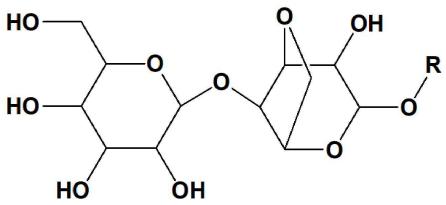
명 세 서

청구범위

청구항 1

하기 화학식 1로 표시되는 화합물, 이의 유도체, 또는 이의 염:

[화학식 1]



화학식 1에서,

상기 R은 C_{1-5}의 알킬기이다.

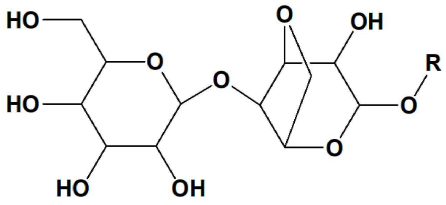
청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 R은 에틸기인 화학식 1로 표시되는 화합물, 이의 유도체, 또는 이의 염.

청구항 3

아가(agar) 또는 아가로스(agarose)에 강산 및 알칸올(alkanol)을 처리하는 단계; 상기 단계의 생성물을 중화시키는 단계; 및 상기 중화된 생성물로부터 하기 화학식 1로 표시되는 화합물을 분리 정제하여 수득하는 단계를 포함하는, 하기 화학식 1로 표시되는 화합물의 제조방법:

[화학식 1]



화학식 1에서,

상기 R은 C_{1-5}의 알킬기이다.

청구항 4

제 3항에 있어서, 상기 강산은 염산, 황산 및 질산 중 하나 이상인 것인 방법.

청구항 5

제 3항에 있어서, 1 내지 20%(w/v) 아가 또는 아가로스에 10 내지 100mM의 강산을 처리하는 것인 방법.

청구항 6

제 3항에 있어서, 상기 강산 및 알칸올은 순서와 관계없이 순차적으로 또는 동시에 처리되는 것인 방법.

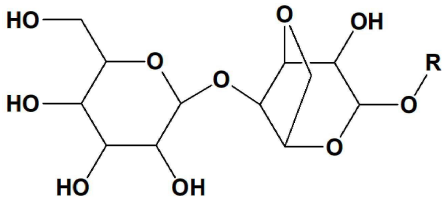
청구항 7

제 3항에 있어서, 상기 알칸올은 에탄올이고, 상기 R은 에틸기인 방법.

청구항 8

하기 화학식 1로 표시되는 화합물, 이의 유도체, 또는 이의 염을 포함하는 보습용 조성물:

[화학식 1]



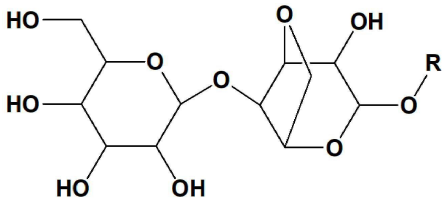
화학식 1에서,

상기 R은 C_{1-5}의 알킬기이다.

청구항 9

하기 화학식 1로 표시되는 화합물, 이의 유도체, 또는 이의 염을 포함하는 보습용 화장료 조성물:

[화학식 1]



화학식 1에서,

상기 R은 C_{1-5}의 알킬기이다.

청구항 10

제 8항 또는 제 9항에 있어서, 상기 알킬기는 에틸기인 조성물.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 해조류로부터 유래한 아가로바이오사이드인 알킬 아가로바이오사이드(alkyl-agarbioside), 이의 제조 방법, 또는 이의 용도에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 홍조류를 구성하는 주요한 다당체는 아가로스이며, 아가로스는 3,6-안하이드로-L-갈락토오스(이하 'AHG'라 함)와 D-갈락토오스가 알파-1,3-결합과 베타-1,4-결합이 교차적으로 번갈아 가며 연결되어 있는 중합체이다(Chi,W.-J et al (2012) Applied Microbiology and Biotechnology. 94(4): 917-930; Yun, E. J et al (2017) Applied Microbiology and Biotechnology. 101(14): 5581-558).

[0003] 이 중 L-AHG는 육상생물에 존재하지 않는 희귀한 당으로서 미백 및 보습 효과가 뛰어나 화장품 소재로 사용될 수 있으며, 항염증, 항충치 및 대장암 예방 효과를 가진 복합 기능성 고부가가치 소재이다. 이런 L-AHG의 기능성 때문에 고부가가치 소재로 사용하기 위해 홍조류로부터 L-AHG를 생산하기 위한 연구가 많이 진행되고 있다(Kim, D. H (2018) Journal of Agricultural and Food Chemistry. 66(46): 12249-12256).

[0004] 뿐만 아니라, L-AHG를 환원말단에 지니고 있는 이당류인 아가로바이오스(agarobiose; 이하 'AB'라 함) 역시 뛰어난 항충치 효과를 지니고 있다고 알려져 있다(Sora Yu et al (2019) Journal of Agricultural and Food Chemistry. 67: 7297-7393).

[0005] 그러나 이런 복합기능성을 지니고 있는 고부가가치 소재임에도 불구하고 L-AHG는 산업적으로 이용하기가 어렵다. 그 이유는 L-AHG가 고온 및 산 조건에서 매우 불안정하여 5-hydroxymethylfurfural(5-HMF) 등으로 쉽게 전환되어 그 기능성을 상실하는 큰 문제점이 있기 때문이다(Yang, B et al (2009) The FEBS Journal. 276(7): 2125-2137; Jeong, G.-T (2015) Bioprocess and Biosystems Engineering. 38(2): 207-217).

[0006] 이러한 문제점을 해결하기 위해서 본 발명자는 이전 연구에서 아가로스 또는 아가에 대해 산 가수분해 및 중화 과정을 거쳐 고농도의 아가로바이오스(AB)를 생산할 수 있는 최적 조건을 확립하였다(국내 등록특허 제10-1864800호). 그러나, 아가로바이오스의 효능 및 안정성에 대한 연구는 현재 이루어진 바 없다.

선행기술문헌

특허문헌

[0007] (특허문헌 0001) 국내 등록특허 제10-1864800호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명자들은 아가로바이오스의 새로운 생리활성기능을 확인하고 아가로바이오스의 생리활성기능을 유지하면서 안정성도 확보할 수 있는 방법 및 이로부터 제조된 신규 화합물을 제공하고자 하였다.

[0009] 본 발명의 목적은 알킬 아가로바이오사이드, 이의 유도체, 또는 이의 염을 제공하는 것이다.

[0010] 본 발명의 다른 목적은 알킬 아가로바이오사이드를 제조하는 방법을 제공하는 것이다.

[0011] 본 발명의 또 다른 목적은 알킬 아가로바이오사이드를 유효성분으로 포함하는 조성물, 구체적으로 보습용 화장료 조성물을 제공하는 것이다.

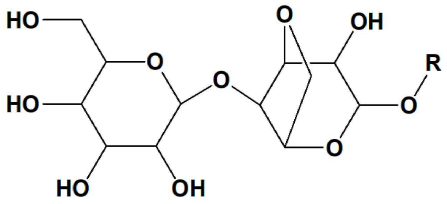
과제의 해결 수단

[0012] 본 발명자들은 선행기술(국내 등록특허 제10-1864800호)의 아가로바이오스 생산 방법에 따라 생산된 아가로바이오스가 피부세포인 HaCaT 세포에서 보습 효과를 나타냄을 확인하였으나, 산성이나 중성 조건과 달리, 염기성(pH 9) 조건에서는 6주 안에 아가로바이오스가 분해되는 것을 는 것을 확인함으로써 아가로바이오스를 화장품으로 제형화하거나 인체에 적용시 안정성 부분에 있어서의 문제점을 확인하였다.

[0013] 상기 문제점을 해결하기 위하여 본 발명자들은 아가로바이오스에 알킬기를 도입하여 알킬 아가로바이오사이드를 제조하였고, 상기 알킬 아가로바이오사이드가 아가로바이오스와 동일한 보습 활성을 나타냄과 동시에 다양한 pH 조건에서 아가로바이오스 대비 안정성이 우수함을 확인함으로써 본 발명을 완성하였다.

[0014] 이에 따라, 본 발명은 하기 화학식 1로 표시되는 화합물, 이의 유도체, 또는 이의 염을 제공한다:

[0015] [화학식 1]



[0016]

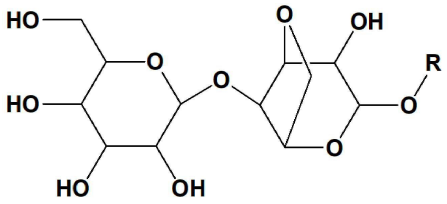
[0017] 화학식 1에서,

[0018] 상기 R은 C_{1-5}의 알킬기일 수 있고, 바람직하게는 C_{1-3}의 알킬기, 더욱 바람직하게는 에틸기일 수 있다.

[0019] 본 발명에서, 상기 화학식 1로 표시되는 화합물은 알킬-아가로바이오사이드(alkyl-agarobioside)로 지칭될 수 있고, 구체적인 일 실시예에서, 상기 R이 에틸기인 화합물은 에틸-아가로바이오사이드(ethyl-agarobioside, ethyl-AB)로 지칭될 수 있다.

[0020] 또한, 본 발명은 하기 화학식 1로 표시되는 화합물의 제조방법을 제공한다:

[0021] [화학식 1]



[0022]

[0023] 화학식 1에서,

[0024] 상기 R은 C_{1-5}의 알킬기일 수 있고, 바람직하게는 C_{1-3}의 알킬기, 더욱 바람직하게는 에틸기일 수 있다.

[0025] 구체적으로, 상기 방법은 아가(agar) 또는 아가로스(agarose)에 강산 및 알칸올(alkanol)을 처리하는 단계; 상기 단계의 생성물을 중화시키는 단계; 및 상기 중화된 생성물로부터 화학식 1로 표시되는 화합물을 분리 정제하여 수득하는 단계를 포함할 수 있다.

[0026] 구체적으로, 1 내지 20%(w/v) 아가 또는 아가로스에 1 내지 100 mM 강산 및 알칸올을 반응하여 원스텝으로 산 촉매 알코올리시스를 유발시켜 알킬-아가로바이오사이드를 제조할 수 있다.

[0027] 상기 강산 및 알칸올은 순서와 관계 없이 순차적으로 또는 동시에 처리될 수 있다.

[0028] 보다 구체적으로, 상기 강산은 염산, 질산 및 황산 중 하나 이상일 수 있으며, 바람직하게는 황산을 사용하는 경우, 알킬-아가로바이오사이드의 수득율을 보다 높일 수 있다. 또한, 상기 아가 또는 아가로스에 강산 처리 시 1 내지 100 mM 농도, 더 구체적으로, 7 내지 70 mM 농도의 강산을 사용할 수 있다. 상기 농도의 범위인 경우, 산 촉매 알코올리시스에 의한 아가 또는 아가로스로부터 고농도의 알킬-아가로바이오사이드의 생산이 가능하다.

[0029] 산 촉매 알코올리시스(acid catalyzed alcoholysis)에 사용되는 기질인 아가 또는 아가로스의 함량은 건조중량 기준으로 1 내지 20%(w/v), 더 구체적으로 1 내지 10%(w/v), 보다 구체적으로 1 내지 5(w/w)로 사용될 수 있다. 상기 범위 내일 경우 90%, 95%, 또는 98% 이상의 액화율을 나타낼 수 있다. 상기 범위를 벗어나는 경우, 기질의 분해율이 현저히 저하될 수 있다.

[0030] 상기 산 촉매 알코올리시스는 50 내지 140℃에서 12시간 내지 24시간 동안 반응시키는 것일 수 있다. 구체적으로 60 내지 100℃에서 16 내지 20시간 동안 반응시키는 것일 수 있다.

[0031] 상기 중화시키는 단계는 산 촉매 알코올리시스가 일어난 생성물에 강염기를 부가하여 pH 5 내지 7이 되도록 중화시키는 것을 말한다. 여기에 사용되는 강염기로, NaOH, KOH, $Ca(OH)_2$ 또는 $Ba(OH)_2$ 등을 사용할 수 있으나, 이에 제한하지는 않는다.

[0032] 상기 방법은 기존 선행기술(국내 등록특허 제10-1864800호)에서 증명된 바와 같이, 아가로스로부터 고농도의 아가로바이오스를 제조하는 최적화된 방법을 기반으로 하여 알코올리시스가 동시에 유발되도록 설계됨으로써, 기

존 선행기술의 장점을 공유하여 아가로스로부터 알킬-아가로바이오스를 고농도로 얻을 수 있다.

[0033] 본 발명의 또 다른 측면은, 상기 본 발명의 알킬-아가로바이오사이드 화합물, 이의 유도체 또는 이의 염을 유효성분으로 포함하는 피부 보습용 조성물에 관한 것이다.

[0034] 특히, 본 발명은, 상기 신규한 아가로바이오사이드 화합물을 제조하였다는 것과 그의 제조방법을 제공하는 것에 그치는 것이 아니라, 아가로바이오스 또는 본 발명에서 제조된 알킬-아가로바이오사이드의 화장품 용도로서의 피부 보습 효능·효과를 확인하고 이를 완성한 것에도 있다. 따라서, 청구항에 개시된 물질 그 자체가 신규한 물질인지와는 별론으로, 이들의 피부 보습 등과 같은 화장품으로서의 용도를 발견한 것에도 큰 기술적 의의가 부여되어야 할 것이다.

[0035] 특히, 본 발명의 상기 제조방법에 의해 제조된 알킬-아가로바이오사이드는 아가로바이오스와 비교하여 동일한 피부 보습 활성을 나타냄과 동시에 pH 안정성 면에서 우수함을 확인하였다. 또한, 구체적인 실시예에서, 도 8에 나타나는 바와 같이, 상기 방법에 따라 제조된 에틸-아가로바이오사이드는 다양한 조건의 온도(4° C, 30° C, 45° C)에서 안정성을 유지하는 것을 확인하였다., 다만, 다른 온도 조건과는 달리, 45° C 이상의 고온에서 성분을 확인한 결과, 에틸-아가로바이오사이드 및 아가로바이오스가 공존하고 있음을 확인하였는데, 이것은 에틸-아가로바이오사이드가 아가로바이오스로 전환되어 아가로바이오스 상태에서 더 이상 열변환되지 않고 유지되는 것임을 확인하였다(도 9). 이러한 결과에 따라, 에틸-아가로바이오사이드는 pH 안정성이 우수할 뿐만 아니라, 고온에서는 동일한 보습 활성을 나타내면서 온도 안정성이 우수한 아가로바이오스로 전환됨으로써 에틸-아가로바이오사이드을 유효성분으로 포함하는 조성물의 보습 활성에는 영향이 없을 뿐만 아니라 온도 안정성 또한 높게 유지할 수 있다. 이에 대한 보다 상세한 이해는, 후술할 실시예 및 실험예를 통하여 행하여 질 수 있을 것이다.

[0036] 본 발명에 있어서, '보습 또는 피부 보습' 이라 함은 피부에 수분감을 증가시켜주고, 촉촉한 상태를 유지시키는 것을 의미한다. 피부 보습 효과는 피부의 주름개선, 탄력도 증가에 도움을 줄 수 있다.

[0037] 본 발명에 따른 화장료 조성물에 있어, 상기 화합물, 이의 유도체또는 이의 염의 함량은 화장료 조성물 전체 중량 대비 0.00001 내지 10 중량%인 것이 바람직하다.

[0038] 본 발명의 " 염"은 바람직하게는 산 또는 염기 부가 염을 포함하며, 상기 염기 부가 염은 나트륨, 칼륨, 칼슘, 암모늄, 마그네슘 또는 유기 아미노로 이루어진 염을 포함하나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0039] 본 발명의 화합물은 수화물, 에탄올화물 등의 형태를 포함하는 용매화된 형태뿐만 아니라 비-용매화된(unsolvated) 형태로 존재할 수도 있다. 본 발명의 알킬 아가로바이오사이드는 결정형 또는 무정형 형태로 존재할 수 있으며, 이러한 모든 물리적 형태는 본 발명의 범위에 포함된다.

[0040] 본 발명에 따른 피부 보습용 화장료 조성물은 용액, 외용연고, 크림, 폼, 영양화장수, 유연화장수, 팩, 유연수, 유액, 메이크업베이스, 에센스, 비누, 액체 세정료, 입욕제, 선 스크린크림, 선오일, 현탁액, 유탁액, 페이스트, 겔, 로션, 파우더, 비누, 계면활성제-함유 클린싱, 오일, 분말 파운데이션, 유탁액 파운데이션, 왁스 파운데이션, 패취 및 스프레이로 구성된 군으로부터 선택되는 제형으로 제조할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0041] 또한, 본 발명의 화장료 조성물은 일반 피부 화장료에 배합되는 화장품학적으로 허용 가능한 담체를 1종 이상 추가로 포함할 수 있으며, 통상의 성분으로 예를 들면 유분, 물, 계면활성제, 보습제, 저급 알코올, 증점제, 킬레이트제, 색소, 방부제, 향료 등을 적절히 배합할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

발명의 효과

[0042] 본 발명은 아가로바이오스의 보습 생리 활성을 확인하고 아가로바이오스의 보습 활성을 유지하면서 pH 및 온도 안정성을 동시에 확보하기 위한 신규 물질인 알킬-아가로바이오사이드, 및 이의 제조방법을 제공하여, 식품, 의약품 및 화장품의 우수한 보습 소재로써 알킬-아가로바이오사이드를 비용 경제적으로 생산할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0043] 도 1은 AB의 인간 피부세포인 HaCaT 세포에서 HAS2 발현 효과 및 pH 안정성을 테스트한 결과를 나타낸 것이다: (A) AB의 농도에 따른 세포 독성 결과. (B) AB의 농도에 따른 HaCaT 세포에서 HAS2 발현 수준. (C) AB에 대한 pH안정성 결과.

도 2는 황산 농도에 따른 생산된 에틸-아가로바이오사이드를 측정한 결과이다: (A) 황산 농도에 따른 생산된 에

틸-아가로바이오사이드 농도 결과; (B) 황산 농도에 따른 생산된 에틸-아가로바이오사이드의 HPLC 결과.

도 3은 강산의 종류에 따라 생산된 에틸-아가로바이오사이드의 HPLC 크로마토그래피 결과이다.

도 4는 G-10 레진을 이용한 크기배제 크로마토그래피(size exclusion chromatograph)를 이용하여 정제한 에틸-아가로바이오사이드를 측정한 결과이다: (A) 아가로즈에 황산과 에탄올 분해 반응을 하여 얻은 생성물, (B) G-10레진을 이용한 크기배제 크로마토그래피 분리 및 정제한 결과.

도 5는 분리 정제한 에틸-아가로바이오사이드의 LC-HRMS 및 2D-HSQC NMR 분석 결과를 나타낸 것이다: (A)분리 정제한 에틸-아가로바이오사이드의 LC-HRMS 분석 결과; (B)2D-HSQC NMR 분석결과.

도 6은 에틸-아가로바이오사이드의 인간 피부세포인 HaCaT 세포에서 HAS2 발현 효과 및 pH 안정성을 확인한 결과이다: (A) 에틸-아가로바이오사이드의 농도에 따른 세포 독성 결과, (B) 에틸-아가로바이오사이드의 농도에 따른 HaCaT 세포에서 HAS2 발현 수준; (C) 에틸-아가로바이오사이드에 대한 pH안정성 결과.

도 7은 L-AHG, AB, 에틸-아가로바이오사이드를 인간 피부세포인 HaCaT 세포에 100 ㎍/mL 처리 했을 때 HAS2 발현 수준을 비교한 결과이다.

도 8은 AB 및 에틸-아가로바이오사이드의 온도안정성을 비교한 결과를 나타낸 것이다.

도 9는 에틸-아가로바이오사이드의 온도 안정성을 확인하기 위한 온도별 AB 및 에틸-아가로바이오사이드의 농도 변화를 비교한 것이다:(A) 4° C, (B) 30° C 및 (C) 45° C.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0044] 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0045] **[실시예 1] AB의 인간 피부세포인 HaCaT 세포에서 보습 효과 실험**

[0046] 선행기술(대한민국특허 등록 10-1864800)에 따라 해조류에서 AB를 생산하였고, 생산한 AB는 인간 피부세포인 HaCaT 세포에서 보습 효과 확인 및 pH에 대한 안정성을 확인하였다(도 1).

[0047] 세포독성 테스트는 MTT(3-4,5-dimethylthiazol-2yl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide) 측정법을 이용하여 수행하였다. HaCaT는 10% (V/V) FBS, 페니실린 100 U/mL 및 스트렙토마이신 100 g/mL의 항생제를 포함하는 Dulbecco's modified Eagle's media (DMEM) 배지를 사용하여 실험실에서 37° C, 5% CO_2 공급조건을 갖춘 동물 세포 배양기에서 배양하였다. 생산한 AB를 DMSO에 용해시켜 0-100 g/mL로 배양액에 첨가하고, 상기배양액에서 세포를 24시간 동안 배양하였다. MTT 용액(5 mg/mL)을 처리하여 4시간 더 배양 시킨 다음, 생성된 청색 결정인 포르마잔의 양을 ELISA 판독기를 이용하여 595 nm에서 흡광도를 측정하였다. 세포에 대한 독성은 각각의 대조구의 평균 흡광도 값에 대한 백분율로 나타냈다. HaCaT 각질세포에서 AB의 세포독성을 조사하기 위하여 0-100 g/mL 농도의 AB를 처리하였을 때, 대조군인 DMSO만을 처리한 것과 비교하여 세포증식의 변화 정도를 계산하여 세포독성을 조사하였다. 실시예 1의 결과를 도 1A에 나타내었다.

[0048] 도 1B는 발명의 실시예에 따른 AB를 HaCaT 각질형성세포에 처리 했을 때 세포독성 효과의 유무를 보여준다. AB 100 g/mL에서 세포 생존율이 100% 이상인 것으로 측정되었다. 따라서 AB 100 g/mL 이하에서는 세포 독성이 없는 것으로 확인하였다.

[0049] 히알루로난(Hyaluronan, HA)은 D-글루쿠론산 및 N-아세틸-D-글루코사민으로 구성된 글리코사미노글리칸이다. 다량의 물을 보관할 수 있는 능력으로 인해, HA는 수분 밸런스 및 삼투압을 조절하는 데 있어 중요한 역할을 담당한다. AH는 HAS 1, 2 및 3에 의해 세포막에서 합성되고, 특히 HAS2는 사람의 정상 조직에서 나타난다. 선행 연구에서, HAS2의 유전자 결핍은 마우스 모델에서 태아기 치사율을 유발하고, 성인 사람의 피부의 표피 및 진피에서 감소된 HAS2 유전자 발현을 보인다. 따라서, HAS2 발현 증가는 피부 항상성을 유지하기 위한 좋은 전략일 수 있다. HAS2 발현에 대한 AB의 유도 시점 및 농도를 측정하기 위해, 웨스턴 블랏 분석을 수행하였다. 이를 위해 사용된 세포는 HaCaT 세포로 10% FBS 및 페니실린/스트렙토마이신이 첨가된 DMEM을 이용하여 5% CO_2 분위기 하에서 37° C에서 배양하였다. 세포(1×10^5)를 6-cm 디쉬에서 24시간 동안 배양한 후, 무혈청 배지에서 추가로 24시간 동안 굶겨 키나아제의 활성화에 대한 FBS의 영향을 제거하였다. 그 후, 일정 시간 및 농도로 AB를 처리하였다. 라이시스 버퍼[20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 150 mM NaCl, 1 mM Na_2EDTA, 1 mM EGTA, 1% Triton X-100, 2.5

mM sodium pyrophosphate, 1 mM β-glycerophosphate, 1 mM Na_3VO_4, 1 g/mL leupeptin, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) 및 protease inhibitor cocktail tablet]로 세포를 용해시켰다. 단백질 농도는 염료가 결합된 단백질 분석 키트(Bio-Rad Laboratories Inc.)를 이용하여 제조사의 설명서에 따라 측정하였다. 용해된 단백질(20-40 μg)에 대해 10% SDS-PAGE를 실시하고, 전기영동에 의해 폴리비닐리덴 플루오라이드 (polyvinylidene fluoride(PVDF)) 멤브레인으로 트랜스퍼하였다(Millipore Corp., Bedford, MA, USA). 블랏팅 후, 5% 스킴 밀크로 2시간 동안 멤브레인을 블록킹하고 1차 항체(goat anti-mouse IgG-HRP)와 함께 4° C에서 오버나이트 동안 인큐베이션하였다. 이어서, 상기 멤브레인을 2차 항체(goat anti-rabbit IgG HRP-conjugated secondary antibody)와 함께 인큐베이션 하고, 화학발광 검출 키트(Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ)를 이용하여 항체가 결합된 단백질을 검출하였다. 데이터는 2회 독립 실험의 대표값을 나타내었다. 도 1B에 나타난 바와 같이, AB는 처리 3시간 후 HAS2 발현을 증가시켰다. 또한, AB는 농도 의존적인 방식으로 HAS2 발현을 증가시켰다. 이를 통해 AB의 보습 활성을 확인하였다.

[0051] **[실시예 2] AB의 pH안정성**

[0052] AB의 pH에 대한 안정성 여부를 테스트하였다(도 1C). 실험 방법은 25° C에서 pH 3(20 mM citrate), 7(20 mM Tris-HCI) 및 9(20 mM Tris-HCI)의 조건에서 각각의 물질들이 시간에 지남에 따라 변성되는 정도를 측정하였다. 도 1C에 나타난 바와 같이, pH 3, 7 조건에서는 물질이 시간이 지나도 안정적이지만, pH 9 조건에서는 6주 이내에 물질이 완전히 변성되는 것을 확인하였다. pH 3 조건에서 버퍼와 AB 피크가 HPLC로 분리되지 않아 AB는 GC/MS 분석을 통해 정량하였다. GC/MS 분석을 위한 유도체화 과정은 다음과 같다. 정제한 샘플을 스피드 백으로 건조한 후에 10 μL 의 40 mg/mL의 O-메틸하이드록실아민 하이드로클로라이드/피리딘(O-methylhydroxylamine hydrochloride in pyridine)을 넣고 30 ° C, 200 rpm, 90분 조건으로 반응시켰다. 그리고 45 μL의 N-메틸-N-(트리메틸실릴)트리플루오로아세타마이드(N-methyl-N-(trimethylsilyl)trifluoroacetamide)를 넣고 37° C, 200 rpm, 30분 조건으로 반응시켰다. GC/MS 분석을 위한 기기 조건은 다음과 같다. 분석 시 사용한 컬럼은 DB5-MS capillary column이며 GC 컬럼 온도 조건은 먼저 50° C 에서 1분간 유지하고 280° C까지 승온한 후에 5분간 유지하였다. 1 μL 의 샘플을 splitless 모드로 분석하였다. pH 7, pH 9 조건에서의 아가로오스 농도는 HPLC로 분석하였다. 이때 사용한 컬럼은 HPX-87H이며, 컬럼 온도 65° C조건 및 0.5 mL/min의 유속으로 샘플을 분석하였다. 이때 사용한 이동상은 0.005 M 황산이다.

[0054] **[실시예 3] 홍조류인 아가로스에서 에틸-아가로바이오사이드의 생산**

[0055] 해조류를 구성하는 대표적인 다당체인 아가로스를 황산, 염산 및 질산과 같은 강산을 이용하여 분해하였다. 2% (w/v)의 아가로스를 12.5 mM 황산과 100 mL 에탄올을 이용하여 70° C에서 오버나이트(약 18시간)로 원팟 반응하여 에틸-아가로바이오사이드를 제조했다. 에틸-아가로바이오사이드를 사용하기 위해 중화 및 황산을 제거하기 위해 3차 증류수와 수산화칼슘($Ca(OH)_2$)를 이용하였다. 또한, 에틸-아가로바이오사이드를 많이 생산할 수 있는 황산의 농도를 알기 위해 3.125 mM, 6.25 mM, 12.5 mM, 25 mM, 50 mM, 100 mM을 조건으로 각각 실험하여 생산된 에틸-아가로바이오사이드를 정량한 결과 12.5 mM 황산일 때 에틸-아가로바이오사이드가 가장 많이 생성되는 것을 확인하였다(도 2). 아울러, 20mL 반응 볼륨으로 하여 상기 황산과 동일한 실험 조건으로 아가로스에 염산(12.5 mM) 또는 질산(12.5 mM, 25 mM)을 처리한 결과, 동일하게 에틸-아가로바이오사이드가 생성됨을 확인하였다(도 3).

[0057] **[실시예 4] 크기배제 크로마토그래피를 이용한 발효산물로부터 에틸-아가로바이오사이드 분리 및 정제**

[0058] 실시예 3에서 생산한 에틸-아가로바이오사이드를 분리 및 정제하기 위해서 크기배제 크로마토그래피를 이용하였다. 레진은 Sephadex G-10(GE Healthcare)를 이용하였으며, 이동상은 증류수를 사용하였다(도 4).

[0060] **[실시예 5] LC-HRMS와 2D HSQC NMR 분석을 통한 에틸-아가로바이오사이드의 분자량 및 구조 규명**

[0061] 실시예 3 내지 4를 통해 생산한 에틸-아가로바이오사이드의 분자량 확인 및 화학 구조의 규명을 위하여 LC-HRMS와 2D HSQC NMR 분석을 하였다(도 5). LC-HRMS 분석 결과, 아가로스에서 에틸-아가로바이오사이드로 변환되면

분자량은 352.14가 된다. 여기에 수소이온이 빠지면서 실제 측정되는 분자량은 351이 된다. 2 mg의 에틸-아가로바이오사이드 샘플을 D_2O에 녹였으며 화학적 이동(chemical shift)을 계산하기 위해 내부 표준(internal standard)으로 3-(트리메틸실릴)-프로피오닉-2,2,3,3-d4 액시드(3-(trimethylsilyl)-propionic-2,2,3,3-d4 acid)를 넣어주었다. 2D HSQC NMR의 화학적 이동은 이전에 보고된 문헌의 결과 값과 비교하여 구조를 규명하고 확인하였다(Anatoly I. Usov et al (1980) Biopolymers, 19: 977-990; Cyrille Rochas (1986) Carbohydrate Research, 148: 199-207 ; E.Murano (1992) Carbohydrate Polymers. 18: 171-178).

[0063] **[실시예 6] 에틸-아가로바이오사이드의 인간 피부세포인 HaCaT 세포에서 보습 효과 실험**

[0064] 실시예 1과 동일하게 실험을 진행하였고, 에틸-아가로바이오사이드도 인간 피부세포인 HaCaT 세포에서 독성이 나타나지 않고 보습 활성이 나타나는 것을 확인하였다(도 6A, 도 6B).

[0066] **[실시예 7] 에틸-아가로바이오사이드의 pH 안정성**

[0067] 실시예 2와 동일하게 실험을 진행하였고, 에틸-아가로바이오사이드의 pH 3, pH 7, pH 9 조건에서 안정성이 유지되는 것을 확인하였다. GC-MS 및 HPLC를 이용하여 에틸-아가로바이오사이드의 농도를 측정하였다(도 6C).

[0069] **[실시예 8] L-AHG, AB 및 에틸-아가로바이오사이드의 인간 피부세포인 HaCaT 세포에서 HAS2 발현 비교 실험**

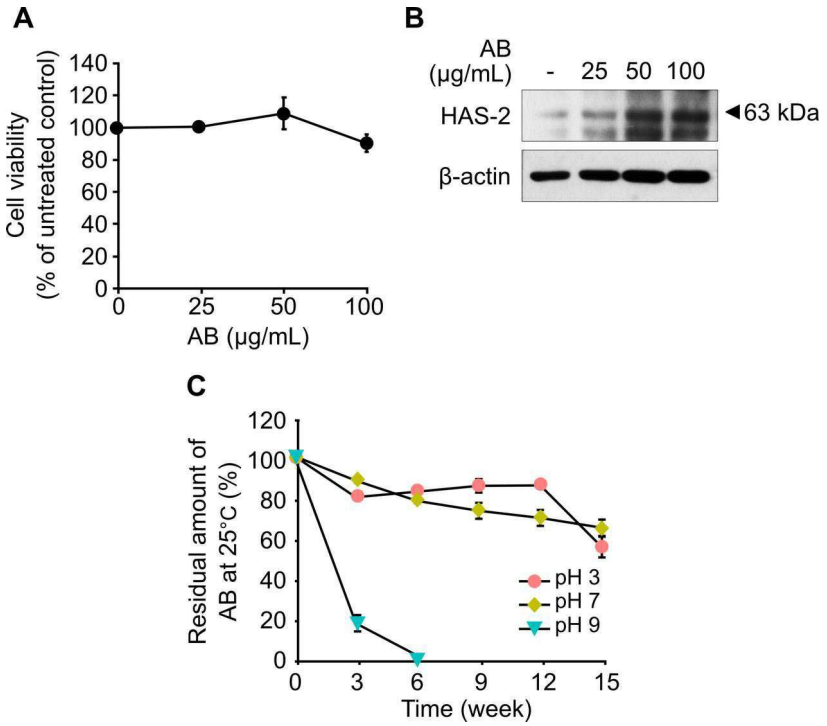
[0070] 실시예 1과 동일하게 실험을 진행하였다. 이전 연구를 통해 L-AHG가 (국내 등록특허 제10-1525298호) 인간 피부세포인 HaCaT 세포에서 보습 활성이 있음을 보고하였는데, 본 발명에서 AB 및 에틸-아가로바이오사이드를 인간 피부세포인 HaCaT 세포에 동일 농도로 처리했을 때 HAS2 발현 조절에 미치는 영향을 L-AHG와 비교해 보았다. 그 결과, 기존에 보습 효과를 나타낸 L-AHG 보다 AB 및 에틸-아가로바이오사이드의 처리에 의해 HAS2의 발현이 더 증가하는 것을 확인함으로써 보습 효과가 더 우수할 것으로 예상할 수 있었다(도 7).

[0072] **[실시예 9] AB 및 에틸-아가로바이오사이드의 온도 안정성**

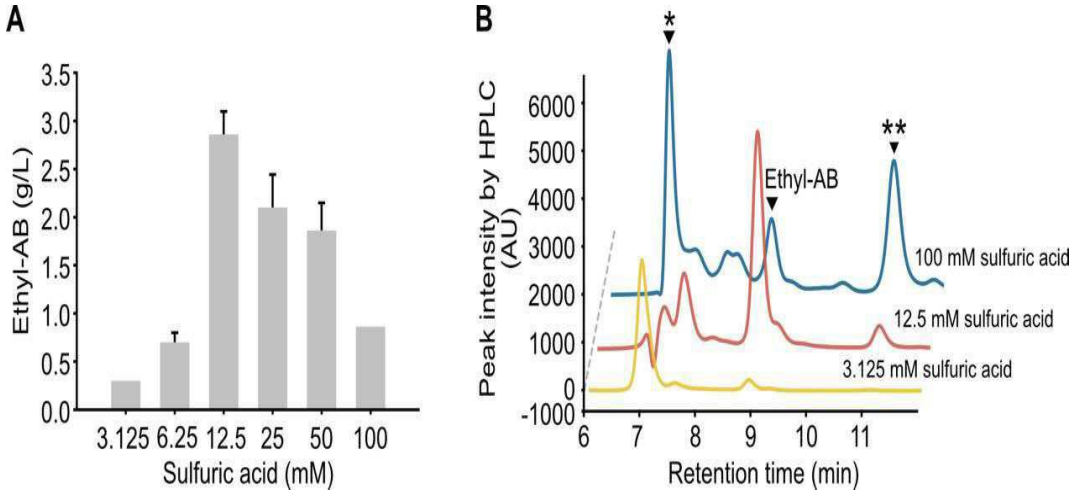
[0073] 아가로바이오스의 온도에 대한 안정성을 테스트하였다. 실험 방법은 4° C, 30° C, 45° C 조건에서 각각의 물질들이 시간에 지남에 따라 변성/분해되는 정도를 측정하였다. 도 8에 나타난 바와 같이, AB는 4° C, 30° C 조건에서 15주 동안 안정적인 것이 확인되었고 45° C 조건에서는 안정도가 천천히 떨어지는 것을 확인하였다. 에틸-아가로바이오사이드는 4° C, 30° C 조건에서 15주 동안 안정적으로 유지되는 것을 확인하였으나 45° C 조건에서는 6주 이후에는 AB 보다 안정성이 떨어지는 것을 확인하였다. AB 및 에틸-아가로바이오사이드는 HPLC를 이용하여 정량하였다. 45° C 에서 에틸-아가로바이오사이드의 반응물 성분을 HPLC로 분석한 결과, 초기에 존재하지 않던 AB가 생성되어 있음을 확인하였고, 온도가 상승함에 따라 에틸-아가로바이오사이드가 AB로 전환되어 함께 공존함을 확인하였다. 이를 통해 비록 45° C 이상의 고온에서 에틸-아가로바이오사이드는 동일한 보습 활성을 나타내는 AB로 전환되기 때문에 에틸 아가로바이오사이드를 포함하는 화장료 조성물의 그 기능성에는 영향을 없을 뿐만 아니라, 조성물의 고온에서의 온도 안정성 또한 확보될 수 있을 것으로 판단할 수 있었다.

도면

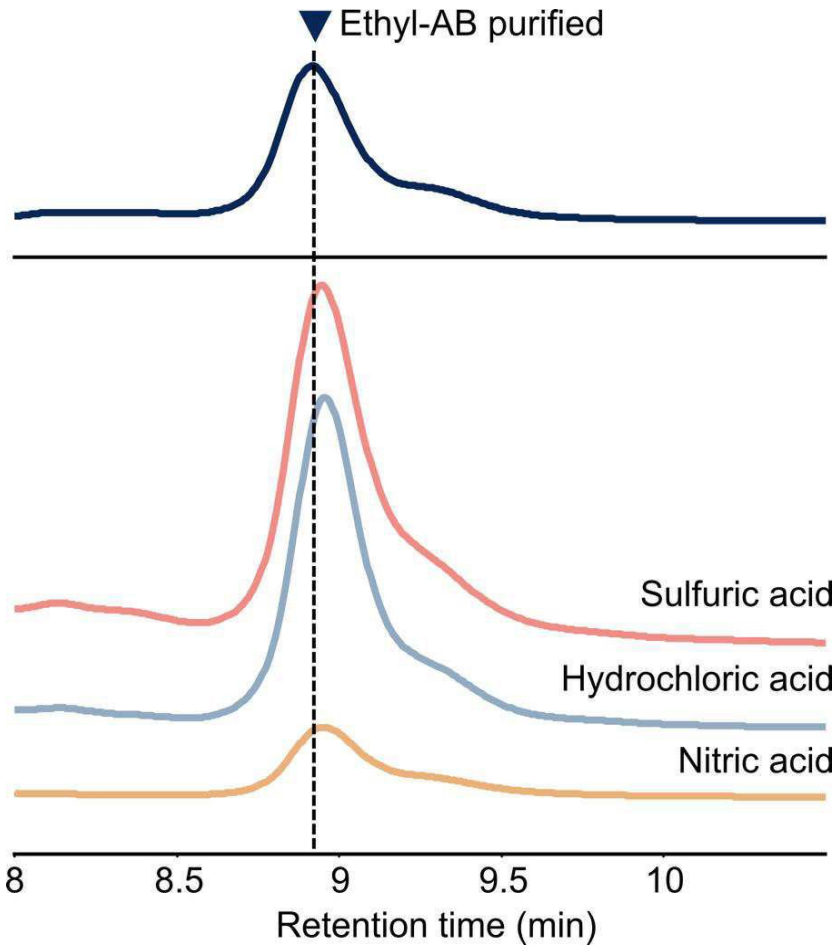
도면1


A
Cell viability (% of untreated control)
140
120
100
80
60
40
20
0
0
25
50
100
AB (μg/mL)
B
AB (μg/mL)
-
25
50
100
HAS-2
63 kDa
β-actin
C
Residual amount of AB at 25°C (%)
120
100
80
60
40
20
0
0
3
6
9
12
15
Time (week)
pH 3
pH 7
pH 9

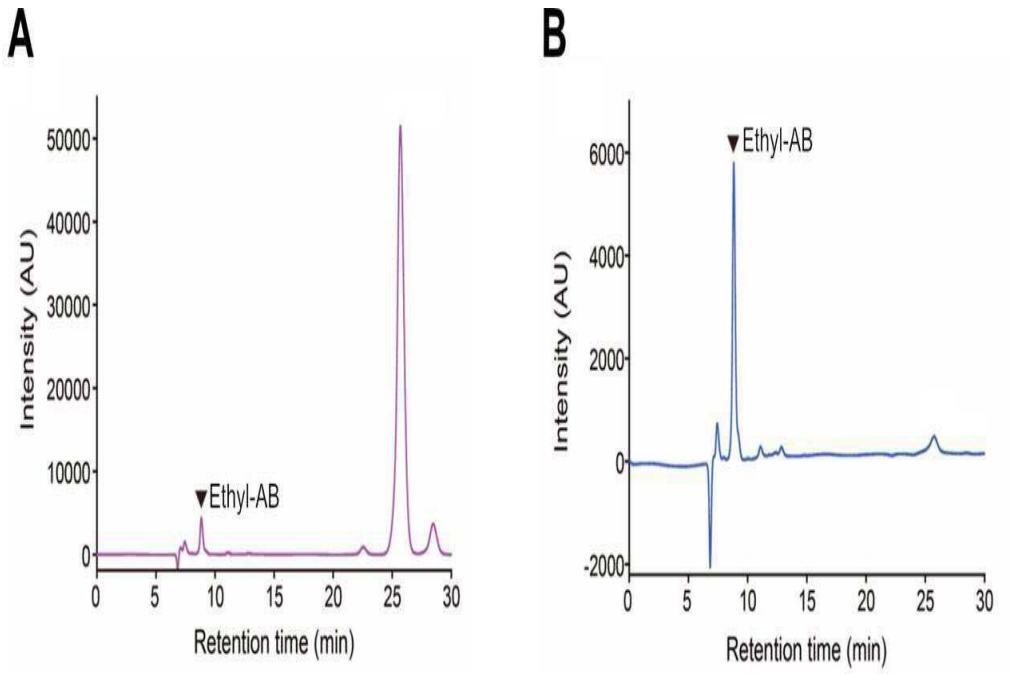
도면2


A
Ethyl-AB (g/L)
3.5
3.0
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
3.125
6.25
12.5
25
50
100
Sulfuric acid (mM)
B
Peak intensity by HPLC (AU)
6000
5000
4000
3000
2000
1000
0
-1000
6
7
8
9
10
11
Retention time (min)
*
**
Ethyl-AB
100 mM sulfuric acid
12.5 mM sulfuric acid
3.125 mM sulfuric acid

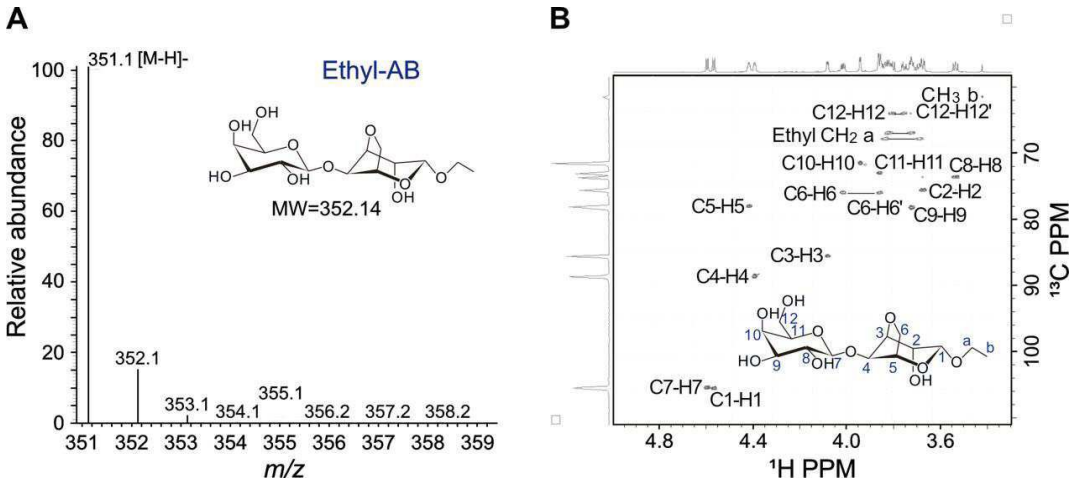
도면3


Ethyl-AB purified
Sulfuric acid
Hydrochloric acid
Nitric acid
8
8.5
9
9.5
10
Retention time (min)

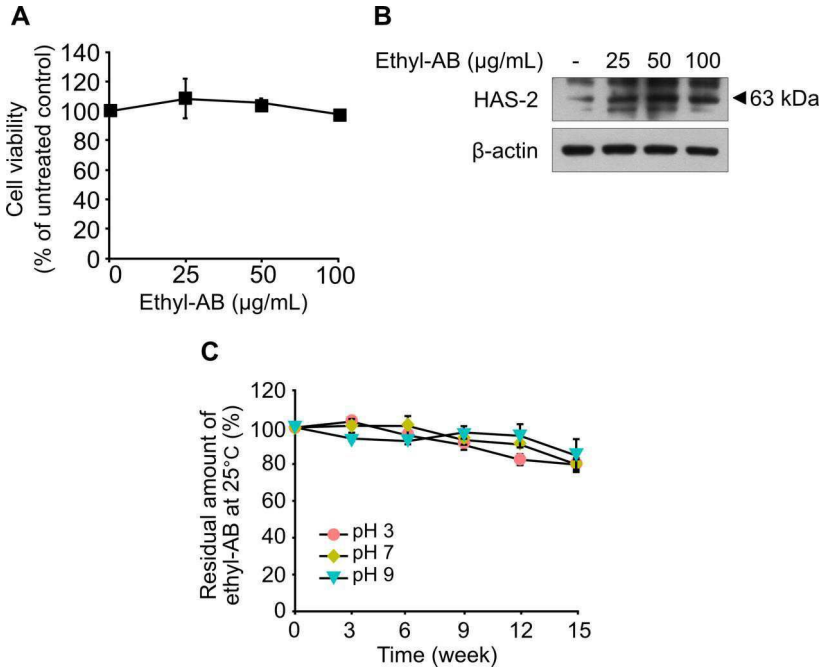
도면4


A
Intensity (AU)
50000
40000
30000
20000
10000
0
Ethyl-AB
0
5
10
15
20
25
30
Retention time (min)
B
Intensity (AU)
6000
4000
2000
0
-2000
Ethyl-AB
0
5
10
15
20
25
30
Retention time (min)

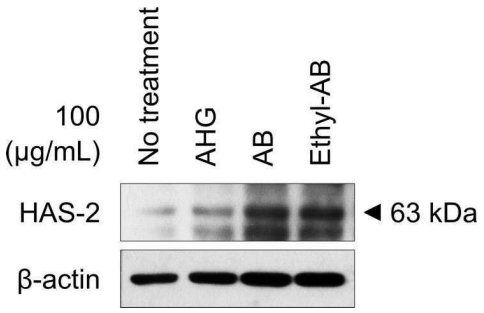
도면5


A
B
351.1 [M-H]-
Ethyl-AB
MW=352.14
Relative abundance
m/z
352.1
353.1
354.1
355.1
356.2
357.2
358.2
CH3 b
C12-H12
C12-H12'
Ethyl CH2 a
C10-H10
C11-H11
C8-H8
C6-H6
C2-H2
C5-H5
C6-H6'
C9-H9
C3-H3
C4-H4
C7-H7
C1-H1
13C PPM
1H PPM

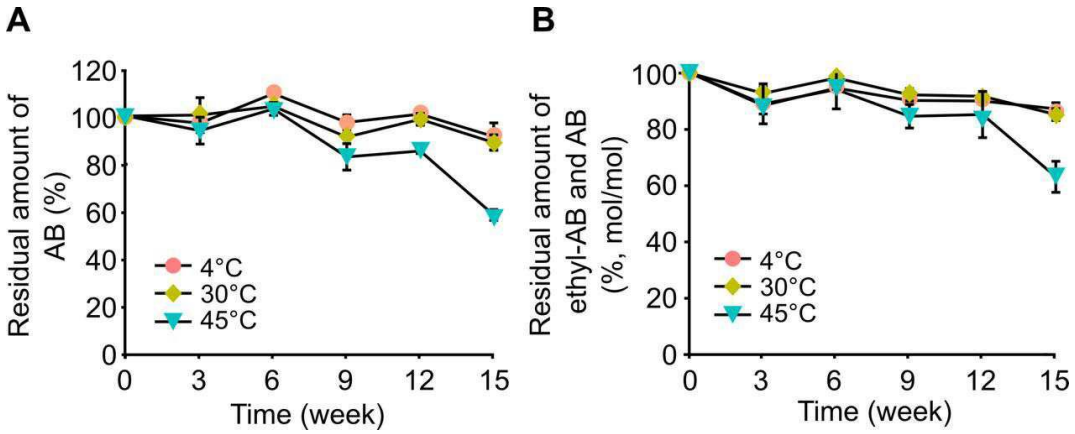
도면6


A
Cell viability
(% of untreated control)
Ethyl-AB (μg/mL)
B
Ethyl-AB (μg/mL) - 25 50 100
HAS-2
63 kDa
β-actin
C
Residual amount of
ethyl-AB at 25°C (%)
pH 3
pH 7
pH 9
Time (week)

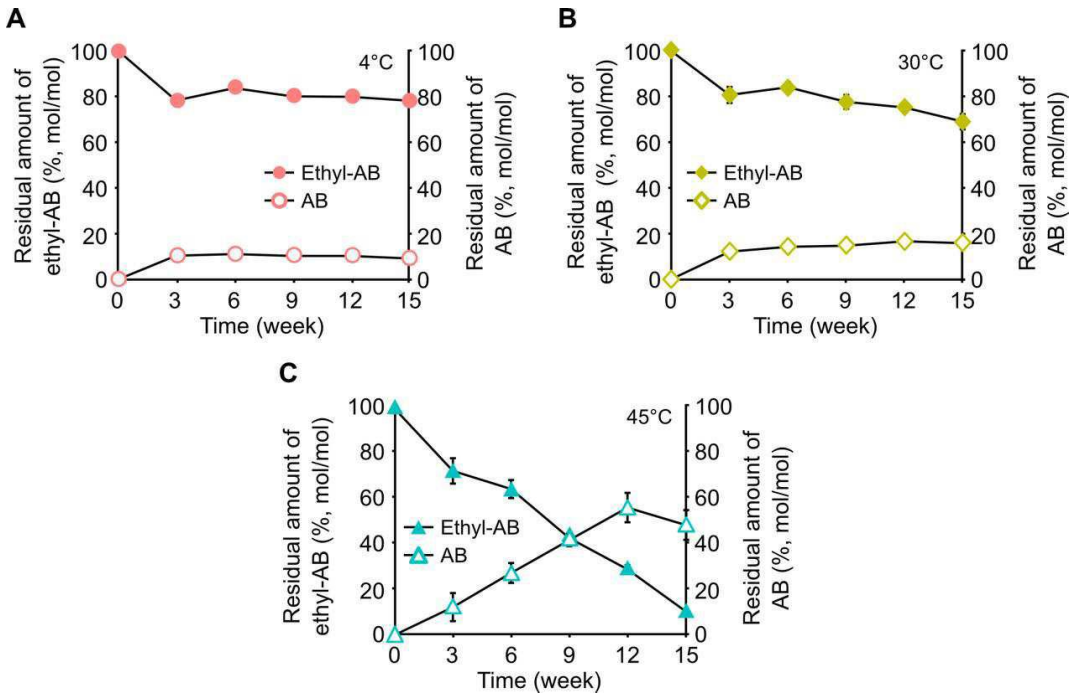
도면7


100
(μg/mL)
No treatment
AHG
AB
Ethyl-AB
HAS-2
63 kDa
β-actin

도면8


A
Residual amount of AB (%)
120
100
80
60
40
20
0
4°C
30°C
45°C
0
3
6
9
12
15
Time (week)
B
Residual amount of ethyl-AB and AB (%, mol/mol)
100
80
60
40
20
0
4°C
30°C
45°C
0
3
6
9
12
15
Time (week)

도면9


A
Residual amount of ethyl-AB (%, mol/mol)
Residual amount of AB (%, mol/mol)
4°C
Ethyl-AB
AB
100
80
60
40
20
0
0
3
6
9
12
15
Time (week)
B
Residual amount of ethyl-AB (%, mol/mol)
Residual amount of AB (%, mol/mol)
30°C
Ethyl-AB
AB
100
80
60
40
20
0
0
3
6
9
12
15
Time (week)
C
Residual amount of ethyl-AB (%, mol/mol)
Residual amount of AB (%, mol/mol)
45°C
Ethyl-AB
AB
100
80
60
40
20
0
0
3
6
9
12
15
Time (week)