



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2021-0119794
(43) 공개일자 2021년10월06일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 35/74 (2015.01) A61K 31/196 (2006.01)
A61K 8/44 (2006.01) A61K 8/99 (2017.01)
A61K 9/00 (2006.01) A61P 17/00 (2006.01)
A61Q 19/02 (2006.01) C12N 1/20 (2006.01)
C12P 13/00 (2006.01) C12R 1/01 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61K 35/74 (2013.01)
A61K 31/196 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2020-0036415

(22) 출원일자 2020년03월25일

심사청구일자 2020년03월25일

(71) 출원인

이화여자대학교 산학협력단

서울특별시 서대문구 이화여대길 52 (대현동, 이화여자대학교)

레드윈테크놀로지 주식회사

전라남도 장성군 진원면 나노산단로 186-16

(72) 발명자

남상집

경기도 광명시 하안로 320, 1012동 607호(하안동, 고층주공아파트)

임경민

경기도 화성시 메타폴리스로 6, 312동 801호(반송동, 동탄시범다운마을 삼성래미안)

박경희

광주광역시 서구 풍암중앙로 68, 101동 1606호(풍암동, 금호아파트)

(74) 대리인

유미특허법인

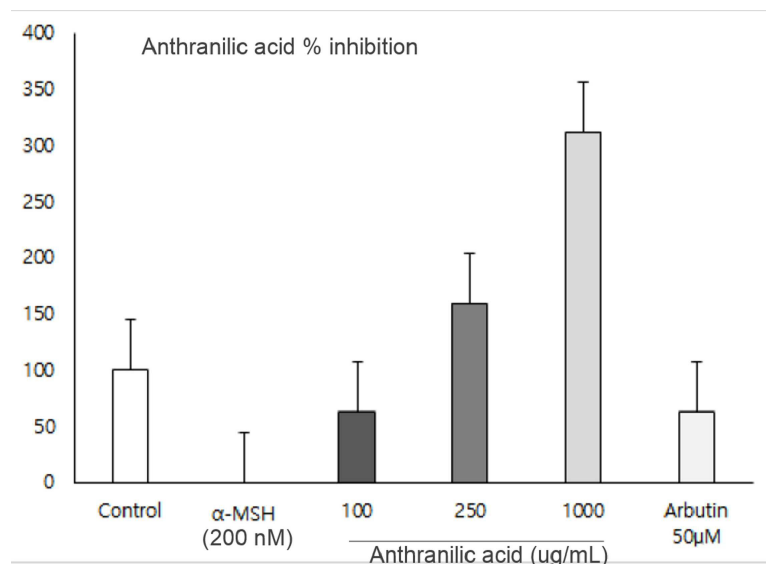
전체 청구항 수 : 총 17 항

(54) 발명의 명칭 알테로모나스 속 균주 및 이를 포함하는 미백용 조성물

(57) 요약

본 발명은 해양 퇴적토로부터 분리된 신규한 알테로모나스속(*Alteromonas* sp) ROA-053 균주, 이를 포함하는 미백용 조성물, 및 이를 이용한 안트라닐산의 제조방법에 관한 것이다.

대표도 - 도2



(52) CPC특허분류

A61K 8/445 (2013.01)
A61K 8/99 (2013.01)
A61K 9/0014 (2013.01)
A61P 17/00 (2018.01)
A61Q 19/02 (2013.01)
C12N 1/20 (2021.05)
C12P 13/001 (2013.01)
C12R 2001/01 (2021.05)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711093243
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	집단연구지원(R&D)
연구과제명	섬유화질환 제어 연구센터
기 여 율	1/1
과제수행기관명	이화여자대학교
연구기간	2019.03.01 ~ 2020.02.29

명세서

청구범위

청구항 1

멜라노마 세포의 멜라닌 생성 저해능을 가지는 알터로모나스 속 균주의 균체, 상기 균주의 배양물; 상기 균주의 파쇄물; 상기 균체의 추출물; 상기 배양물, 파쇄물 또는 균체의 추출물; 및 상기 추출물의 분획물로 이루어지는 군에서 선택된 1종 이상을 포함하는, 미백용 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 미백용 조성물은, 피부 색소 침착 또는 멜라닌 생성을 저해하는 것을 특징으로 하는, 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 미백용 조성물은, 약학적 조성물, 화장품 조성물, 피부 외용제 조성물, 건강기능식품, 또는 의약외품 조성물인 것인, 미백용 조성물.

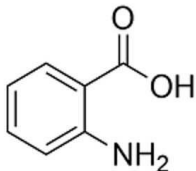
청구항 4

제3항에 있어서, 상기 화장품 조성물은 피부 미백 또는 피부 색소 침착 개선용 화장품 조성물인, 미백용 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 미백용 조성물은 하기 화학식 1의 안트라닐산, 또는 이의 약학적으로 허용 가능한 염을 포함하는 것인, 미백용 조성물:

[화학식 1]



청구항 6

제1항에 있어서, 상기 추출물은 상기 균체, 상기 균주의 배양물, 또는 상기 균주의 파쇄물을 유기용매로 추출하여 얻어지는 것인, 미백용 조성물.

청구항 7

제1항에 있어서, 상기 추출물은 상기 균주의 균체, 상기 균주의 배양물, 또는 상기 균주의 파쇄물을 유기용매로 추출하고, 물 및 알코올로 이루어지는 군에서 선택된 1종 이상을 전개 용매로 사용하여 상기 추출물을 크로마토그래피 분리 및 정제한 분획물로부터 얻어지는 것을 특징으로 하는, 미백용 조성물.

청구항 8

제7항에 있어서, 상기 유기용매는 에틸아세테이트, 메탄올, 에탄올, 프로판올, 이소프로판올, 부탄올, 아세톤, 에테르, 클로로포름, 메틸렌클로라이드, 헥산, 시클로헥산, 및 디클로로메탄으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상인, 미백용 조성물.

청구항 9

제8항에 있어서, 상기 알코올은 메탄올인, 미백용 조성물.

청구항 10

제1항에 있어서, 상기 균주는 수탁번호 KCTC 14115BP로 기탁된 알테로모나스속 (*Alteromonas sp*) ROA-053 균주인 것인, 미백용 조성물.

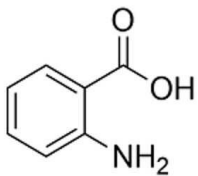
청구항 11

멜라노마 세포의 멜라닌 생성 저해능을 가지는 알테로모나스 속 균주.

청구항 12

제11항에 있어서, 상기 균주는 하기 화학식 1의 안트라닐산을 생성하는 것인, 균주:

[화학식 1]



청구항 13

제11항에 있어서, 상기 균주는, 멜라닌 세포 자극 호르몬 (Melanocyte-Stimulating Hormone, αMSH)의 처리 조건에서 멜라닌 합성을 억제하는 것인, 균주.

청구항 14

제11항에 있어서, 상기 균주는 수탁번호 KCTC 14115BP로 기탁된 알테로모나스속 (*Alteromonas sp*) ROA-053 균주.

청구항 15

제14항에 있어서, 상기 알테로모나스속 (*Alteromonas sp*) ROA-053 균주 (기탁번호: KCTC14115BP)는 서열번호 3의 16 rRNA 염기 서열을 포함하는 것을 특징으로 하는 균주.

청구항 16

알테로모나스속 (*Alteromonas sp*) ROA-053 균주의 균체, 상기 균주를 배양한 배양물, 상기 균주의 파쇄물, 이들의 추출물 및 상기 추출물의 분획물로 이루어지는 군으로부터 선택되는 1종 이상을 포함하는 안트라닐산 제조용 조성물.

청구항 17

- 1) 알테로모나스속 (*Alteromonas sp*) ROA053 (수탁번호: KCTC 14115BP)균주를 배양한 배양액에 추출용매를 가하여 추출하는 단계;
- 2) 상기 얻어진 추출물을 역상 컬럼 크로마토그래피하여 분획물들을 얻는 단계; 및
- 3) 상기 분획물들을 각각 고성능 액체 컬럼 크로마토그래피로 분리 정제 하는 단계를 포함하는, 안트라닐산의 제조방법.

발명의 설명

기술 분야

본 발명은 해양 퇴적토로부터 분리된 안트라닐산 생성능을 갖는 신규한 균주, 이를 이용한 안트라닐산의 제조방법 및 이를 포함하는 미백용 조성물에 관한 것이다.

[0001]

배경 기술

- [0002] 사람의 피부색을 결정하고 기미, 잡티들이 생성되는 현상에는 여러 요인들이 관여하는데, 멜라닌 색소를 만드는 멜라노사이트(melanocyte)의 활동성, 혈관의 분포, 피부의 두께, 카로티노이드, 빌리루빈 등 여러 인자들이 복합적으로 관여되어 있다. 이중에서도 가장 중요한 인자는 인체 내의 멜라노사이트에서 여러 효소들이 작용하여 생성되게 되는 멜라닌 색소다. 이 멜라닌 색소의 형성에는 유전적 요인, 호르몬 분비, 스트레스, 자외선 등과 같은 생리적 요인 및 환경적 요인 등이 영향을 미친다고 알려져 있다.
- [0003] 사람의 피부색을 결정하는 멜라닌(melanin)은 멜라노사이트(melanocyte)에서 생성이 되는데 이 멜라노사이트에는 티로시나제 등의 효소가 존재하며, 이들이 함께 작용하여, 생체 내에 항상 존재하는 티로신(tyrosine)이라는 아미노산을 기질로 중합화 산화반응을 함으로 흑갈색의 색소인 멜라닌을 형성하게 된다. 이렇게 형성된 멜라닌은 멜라노사이트의 수지상 돌기를 통하여 케라티노사이트(keratinocyte)라는 표피 세포로 이동한다. 여기서 멜라닌은 핵 주변에 모자와 같은 구조를 형성하여 자외선으로부터 유전자를 보호하고 자유 라디칼(free radical)을 제거하여 세포 내 단백질을 보호하는 등 중요한 역할을 하게 된다. 생체 내에는 멜라닌을 분해하는 효소가 없고 다만 케라티노사이트가 노화되어 제 기능을 다하고 표피에서 떨어져나갈 때 케라티노사이트와 함께 피부로부터 제거된다. 하지만 멜라닌이 필요 이상으로 과다하게 생성되면 기미나 주근깨, 점 등과 같은 과색소 침착증을 유발한다. 이에 따라 멜라닌의 과다한 생성을 막아 피부에서 색소 침착을 억제하기 위한 미백제에 대한 연구가 이루어졌으며, 코직산(kojic acid), 알부틴(arbutin) 등과 같은 티로시나제 활성을 저해하는 억제제들, 하이드로퀴논(hydroquinone), 비타민 A등을 비롯하여 대표적인 항산화제인 비타민 C 및 이들의 유도체 등이 보고되었다.
- [0004] 그러나 상기와 같은 기존의 미백 물질들은 그 효능이 약하거나 세포 독성 등을 동반하는 경우가 많아 안전하고 미백 효능이 높은 천연물을 발굴하고자 하는 노력이 계속되고 있다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0005] 본 발명자들은 남해안 해양퇴적토에서 분리된 미생물 알테로모나스 속(*Alteromonas sp*) ROA-053 균주를 연구하던 중, 이로부터 안트라닐산 (Anthranilic acid, 2-aminobenzoic acid)를 발견하여 구조를 규명하였고, 안트라닐산이 멜라닌 합성을 효과적으로 저해할 수 있음을 발견하여 본 발명을 완성하였다.
- [0006] 남해안해양퇴적토에서 분리한 미생물인 알테로모나스 속(*Alteromonas sp*) ROA-053 균주는, 해양 그람 음성 미생물 (Marine *Alteromonas*)의 일종으로, 이러한 미생물은 아직까지 밝혀지지 않은 신규한 종들이 다수 존재하며, 이에 신규한 해양 그람 음성 미생물로부터 아직까지 밝혀지지 않았던 새로운 천연물 또한 발견할 수 있을 것으로 기대되고 있다.
- [0007] 화학식 1로 표시되는 화합물인 안트라닐산(Anthranilic acid, 2-aminobenzoic acid)는, 해양 그람 음성 미생물 (Marine *Alteromonas*, ROA053)에서 본 발명자에 의해 처음으로 발견 및 분리되었으며, 이의 활성에 대한 구체적인 연구결과는 아직까지 전혀 보고되지 않아, 안트라닐산의 새로운 활성에 대한 연구가 절실히 필요하다.
- [0008] 따라서 본 발명의 하나의 목적은, 신규 알테로모나스속(*Alteromonas sp*) ROA053 균주를 제공하는 것이다.
- [0009] 또 다른 본 발명의 목적은 상기 알테로모나스속(*Alteromonas sp*) ROA053 균주를 이용하는 안트라닐산 제조 방법을 제공하는 것이다.
- [0010] 또 다른 본 발명의 목적은 상기 알테로모나스속(*Alteromonas sp*) ROA053 균주를 포함하는 피부 미백용 조성물을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0011] 상기 목적을 달성하기 위한 하나의 양태로서, 본 발명은 안트라닐산 생성능을 갖는 신규한 균주에 관한 것으로, 보다 상세하게는 알테로모나스속 (*Alteromonas sp*) ROA-053 안트라닐산 생산 균주(기탁번호: KCTC14115BP)에 관한 것이다.
- [0012] 본 발명의 또 다른 일예는, 상기 알테로모나스속 (*Alteromonas sp*) ROA-053 균주의 균체; 상기 균주의 배양물; 상기 균주의 파쇄물; 상기 균주의 균체, 배양물 또는 파쇄물의 추출물; 및 상기 추출물의 분획물로 이루어지는

군에서 선택된 1종 이상을 포함하는, 미백용 조성물에 관한 것이다.

- [0013] 상기 조성물은 멜라노마 세포의 멜라닌 생성을 저해하는 것일 수 있다.
- [0014] 본 발명의 또 다른 일예는, 알테로모나스속(*Alteromonas sp*) ROA-053 균주의 균체; 상기 균주의 배양물; 상기 균주의 파쇄물; 상기 균주의 균체, 배양물 또는 파쇄물의 추출물; 및 상기 추출물의 분획물로 이루어지는 군에서 선택된 1종 이상을 포함하는, 약학적 조성물, 화장품 조성물, 피부 외용제 조성물, 건강기능식품, 의약품 조성물, 피부 색소 침착의 예방 또는 치료용 약학적 조성물, 또는 피부 색소 침착의 예방 또는 개선용 의약품 조성물에 관한 것이다.
- [0015] 본 발명의 또 다른 일예는, 알테로모나스속(*Alteromonas sp*) ROA-053 균주 또는 상기 균주의 배양액을 유기용매로 추출하는 단계; 및 추출물을 크로마토그래피로 분리 및 정제하는 단계를 포함하는, 미백용 조성물의 제조방법에 관한 것이다.
- [0016] 상기 약학적 조성물은 피부 색소 침착 질환의 예방 또는 치료용 약학적 조성물인 것일 수 있다.
- [0017] 상기 유기용매는 에틸아세테이트, 메탄올, 에탄올, 프로판올, 이소프로판올, 부탄올, 아세톤, 에테르, 클로로포름, 메틸렌클로라이드, 헥산, 시클로헥산, 및 디클로로메탄로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상일 수 있다.
- [0018] 상기 크로마토그래피는 물 및 알코올로 이루어지는 군에서 선택된 1종 이상을 전개 용매로 사용하여 상기 추출물을 분리 및 정제하는 것일 수 있다.
- [0019] 상기 알코올은 메탄올일 수 있다.
- [0021] 이하, 본 발명에 대해 상세히 설명한다.
- [0023] 본 발명의 " 알테로모나스속 (*Alteromonas sp*) ROA053 균주 "(또는 이하에서 알테로모나스 베켈레이 ROA-053 균주로도 불리운다)는 추출물에 안트라닐산을 생성할 수 있는 미생물로, 바람직하게는 남해 해양퇴적토로부터 분리된 것일 수 있다.
- [0024] 본 발명자들은 남해의 해양퇴적토를 채취한 뒤, 클린벤치에서 건조 후 상기 건조물을 멸균된 해수에 현탁하여 1/20으로 희석한 후 마린브로스(Marine broth) 고체배지에 접종하고, 27℃에서 배양하면서 생성된 단일 균주를 마린 브로스(Marine broth) 고체배지에 다시 접종하여 순수한 균주를 분리 및 선별하였다. 이와 같이 분리된 알테로모나스속 (*Alteromonas sp*) ROA-053 균주는 전형적인 알테로모나스 속에 속하는 균주의 형태적 양상이 관찰되었다(도 1 참조).
- [0025] 본 발명의 일예에 따른 알테로모나스속 균주는, 서열번호 3의 16S rRNA 유전자 염기서열을 가지며, 이차대사산물로서 하기의 화학식 1로 표시되는 안트라닐산을 분비하는 것을 특징으로 한다. 상기 균주를 알테로모나스속 (*Alteromonas sp*) ROA053 균주로 명명하고, 2020년 01월 23일자로 한국생명공학연구원 생물자원센터(KCTC, Korean Collection for Type Cultures; 전라북도 정읍시 입신길 181 한국생명공학연구원(Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology(KRIBB)) 소재) 에 기탁하여 KCTC14115BP를 부여받았다.
- [0026] 상기 알테로모나스속 (*Alteromonas sp*) ROA-053 균주는, 하기 (1) 내지 (4) 중 1 이상의 특징을 가지는 것일 수 있다:
- [0027] (1) 미백 활성을 가짐,
- [0028] (2) 멜라노마 세포의 멜라닌 생성을 저해함,
- [0029] (3) 멜라닌 세포 자극 호르몬 (Melanocyte-Stimulating Hormone, α MSH)의 처리 조건에서 멜라닌 합성을 억제함,
- [0030] (4) 화학식 1로 표시되는 화합물 또는 이의 약제학적으로 허용 가능한 염을 분비함.
- [0031] 상기 알테로모나스 속 균주의 상기 (3) 멜라닌 세포 자극 호르몬 (Melanocyte-Stimulating Hormone, α MSH)의 처리 조건에서 멜라닌 합성을 억제하는 억제율은, 알부틴(arbutine) 대비 1배 내지 20배, 1배 초과 내지 20배, 2배 내지 20배, 3배 내지 20배, 4배 내지 20배, 5배 내지 20배, 6배 내지 20배, 7배 내지 20배, 8배 내지 20배, 9배 내지 20배, 10배 내지 20배, 11배 내지 20배, 12배 내지 20배, 13배 내지 20배, 14배 내지 20배, 또

는 15배 내지 20배일 수 있다.

- [0032] 본 발명자들은 해양퇴적토로부터 분리된 알테로모나스속 (*Alteromonas* sp) ROA-053 균주를 액체 배양한 후, 에틸아세테이트를 이용하여 추출물을 조제하였고, 이로부터 화학식 1로 표시되는 안트라닐산 (Anthranilic acid, 2-aminobenzoic acid) 화합물을 분리하여 화합물의 구조를 동정하였고, 또한 상기 화합물들의 미백 효능을 평가함으로써 본 발명을 완성하였다.
- [0033] 본 발명에서는 상기 균주가 안트라닐산 생산능을 가지고 있기 때문에 상기 균주의 균체, 상기 균주를 배양한 배양물, 상기 균주의 파쇄물, 이들의 추출물 및/또는 상기 추출물의 분획물로부터 안트라닐산을 분리 및/또는 정제하여 하기 화학식 1의 안트라닐산을 수득할 수 있는 특징이 있음을 규명하였다.
- [0034] 본 발명에서 선별한 균주는 상기한 본 발명에 따른 미백용 조성물의 유효성분으로 포함되는 안트라닐산을 제조하는데 사용될 수 있다.
- [0035] 본 발명의 또 다른 일 예는, 상기 알테로모나스속 (*Alteromonas* sp) ROA-053 균주를 고체 배지에서 1차 배양한 이후, 이로부터 생성된 콜로니를 액체 배지에 접종하여 대량 액체 배양하는 방법에 관한 것이다.
- [0036] 본 발명의 또 다른 일 예는, 알테로모나스속 (*Alteromonas* sp) ROA-053 균주로부터 화학식 1로 표시되는 화합물을 수득하는 방법에 관한 것이다.
- [0037] 본 발명의 또 다른 일 예는, 상기 알테로모나스 베켈레이 ROA-053 균주, 상기 균주의 배양물, 상기 배양물의 추출물 및 상기 추출물의 분획물, 그리고 이들의 건조물 및 농축물로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상을 유효성분으로 포함하는 미백제 또는 피부 색소 침착 질환의 치료용 조성물에 관한 것이다.
- [0038] 상기 건조물과 농축물은, 상기 배양물 및/또는 이의 추출물을 통상적인 방법으로 건조 또는 농축하여 얻어진 것을 의미한다. 상기 추출물은, 알테로모나스속(*Alteromonas* sp) ROA053 균주의 배양물을, 적절한 추출용매, 바람직하게는 유기용매로서, 예를 들어 에틸아세테이트로, 메탄올, 에탄올, 프로판올, 이소프로판올, 부탄올, 아세톤, 에테르, 클로로포름, 메틸렌클로라이드, 헥산, 시클로헥산, 및 디클로로메탄로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상으로 추출하여 얻어진 추출물일 수 있다.
- [0039] 상기 추출은 공지의 미생물 추출방법을 제한없이 사용할 수 있으며, 초임계추출, 고압추출 또는 초음파추출법 등의 추출장치를 이용한 방법, 또는 셀라이트 또는 폴리스틸렌 또는 폴리아마드 흡착수지를 이용하는 방법으로 대체 가능하나, 이에 한정되지 않는다. 추출 시 용매를 배양액 분량의 1 내지 3 부피 배 첨가하여 추출하는 것이 바람직하며, 상온에서 추출하는 것이 바람직하다. 추출 회수는 1 내지 3회인 것이 바람직하며, 감압건조는 회전진공농축기 (Rotary Vacuum Evaporator)를 사용하는 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다. 상기 감압건조 시 온도는 20 내지 40 ℃가 바람직하고, 더욱 바람직하게는 25 내지 35℃, 예를 들어 30℃인 것이 더욱 바람직하나, 이에 한정되지 않는다. 상기 추출물의 분획물은 유효성분인 안트라닐산을 다량 수득할 수 있는 분획 용매를 사용하여 제조될 수 있으며, 바람직하게는 물과 알코올(예를 들어 탄소수 1-3의 저급 알코올)의 혼합용매로 분획된 분획물, 더욱 바람직하게는 물/메탄올 분획물일 수 있다. 상기 추출물의 물/메탄올 분획물은 상기 유기용매 추출물을 메탄올 20, 40, 50, 60, 70, 80, 100%(v/v) 용액으로 추가로 분획하여 얻어진 소분획물일 수 있다. 상기 분획물 및/또는 소분획물은 화학식 1로 표시되는 화합물을 비롯하여 유용한 이차대사산물을 함유하여 우수한 미백 효과를 나타낼 수 있다.
- [0040] 또 하나의 양태로서, 본 발명은 알테로모나스속 (*Alteromonas* sp) ROA-053 균주의 균체, 상기 균주를 배양한 배양물, 상기 균주의 파쇄물, 이들의 추출물 및/또는 상기 추출물의 분획물로부터 포함하는 안트라닐산 제조용 조성물에 관한 것이다.
- [0041] 상기 배양물은 알테로모나스속(*Alteromonas* sp) ROA-053 균주와 함께 배양 배지를 포함할 수 있다. 배양 배지는 상기 균주를 배양하게 위하여 공지의 적절한 배지를 선택할 수 있으나, 유용한 이차대사산물의 생산에 최적 조건을 제공하기 위하여, 배양 배지는 마린 브로스(Marine broth (BD)), SYP 등일 수 있다. 상기 마린 브로스(Marine broth)의 배지 형태는 고체배지와 액체배지 모두 가능하며, 바람직하게는 액체배지일 수 있다. 배양물을 얻기 위한 배양기간은 유효한 이차대사 산물의 생산이 활발한 약 4일 이상, 바람직하게는 4 내지 20일, 보다 바람직하게는 6 내지 15일로 하는 것이 좋다.
- [0042] 상기 마린 브로스의 배지는 녹말(Soluble starch), 효모 추출물(Yeast extract), 펩톤(Peptone), 해양 소금(sea salt)을 사용한다. 고체배지 같은 경우는 400mL 기준으로 녹말(Soluble starch) 4g, 효모 추출물(Yeast extract) 1.6g, 펩톤(Peptone) 0.3g, 한천 (Agar) 7.2g, 해양 소금(sea salt) 13.9g에 증류수(Distilled

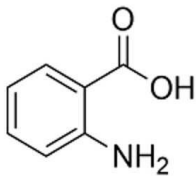
water) 400 mL을 추가한다. 액체배지 같은 경우는 4L 기준으로 녹말(Soluble starch) 40g, 효모 추출물(Yeast extract) 16g, 펩톤(Peptide) 8g, 해양 소금(sea salt) 139g에 증류수 (Distilled water) 4L을 추가한다

[0043] 본 발명에서 상기 건조물과 농축물은 배양물을 통상적인 방법으로 건조 또는 농축하여 얻어진 것을 의미한다.

[0044] 본 발명의 또 다른 일예에 의하면, 알테로모나스속 (*Alteromonas sp*) ROA053 균주의 이차대사산물 중 미백 효능을 갖는 물질이 포함되어 있음을 확인하였다 (실시예 2 및 4). 이러한 유용한 이차대사 산물은 상기 균주의 배양 후 약 6일째부터 생산되는 것으로 나타났다. 따라서, 본 발명의 일예에 의한 미백제 또는 피부 색소 침착 질환의 치료용 조성물의 유효 성분으로, 알테로모나스 ROA-053 균주 뿐만 아니라 알테로모나스속(*Alteromonas sp*) ROA-053 균주의 균체, 상기 균주의 배양물, 상기 균주의 파쇄물, 상기 균체, 배양물 및/또는 파쇄물의 추출물 및 상기 추출물의 분획물, 그리고 이들의 건조물 또는 농축물도 포함될 수 있다. 상기 알테로모나스 ROA-053 균주 뿐만 아니라 알테로모나스 ROA-053 균체, 상기 균주의 배양물, 상기 균주의 파쇄물, 상기 균체, 배양물 및/또는 파쇄물의 추출물 및 상기 추출물의 분획물, 그리고 이들의 건조물 또는 농축물은 안트라닐산을 포함한다.

[0045] 상기 "안트라닐산"는 다음과 같은 화학식 1로 표시되는 물질이다.

[0046] [화학식 1]



[0047]

[0048] 상기 안트라닐산 (Anthranilic acid, 2-aminobenzoic acid)는 멜라닌 생성을 저해하여 피부의 색소 침착을 예방, 치료, 개선할 수 있고, 미백효능을 나타낼 수 있다.

[0049] 본 발명의 일예에 따른 화학식 1로 표시되는 화합물인 "안트라닐산"는 멜라닌 생성을 저해할 수 있다. 상기 "멜라닌 생성 저해"는 피부에서 멜라닌 합성을 억제하는 것, 생성된 멜라닌의 분해를 촉진하는 것과 같이 피부에서 멜라닌의 함량을 낮추고, 색소의 침착을 억제하는 기전을 모두 포함할 수 있다. 예를 들어, 멜라노마 세포의 멜라닌 생성을 저해하거나, 멜라닌 세포 자극 호르몬 (Melanocyte-Stimulating Hormone, αMSH)로 인해 증가된 멜라닌 합성을 억제하는 기전일 수 있다.

[0050] 상기 알테로모나스속 (*Alteromonas sp*) ROA-053 균주 및/또는 이로부터 분리된 상기 화합물 1은, 적은 농도로 강한 미백 효능을 가져 폭넓은 미백제로 사용될 수 있다는 이점을 갖는다.

[0051] 본 발명의 조성물에 포함되는 이하에서 별도의 설명이 없는 한, 유효(활성)성분으로서 상기 화학식 1의 안트라닐산뿐만 아니라, 이의 약제학적으로 허용되는 염, 수화물, 용매화물, 이성질체(바람직하게, 광학 이성질체) 또는 유도체가 모두 포함되며, 이들은 모두 본 발명의 범주에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

[0052] 본 발명의 유효성분인 "안트라닐산"은 염, 특히 약제학적으로 허용 가능한 염의 형태로 존재할 수 있다. 염으로는 당업계에서 통상적으로 사용되는 염을 제한 없이 사용할 수 있다. 본 발명의 용어 "약제학적으로 허용되는 염"은, 환자에게 비교적 비독성이고 무해한 유효작용을 갖는 농도로서 이 염에 기인한 부작용이 안트라닐산의 이로운 효능을 저하시키지 않는 상기 화합물의 임의의 모든 유기 또는 무기 부가염을 의미한다.

[0053] 상기 조성물은 약학적 조성물, 화장품 조성물, 피부 외용제 조성물, 건강기능식품, 또는 의약품 조성물일 수 있으며, 이들은 용액, 연고, 외용연고, 크림, 에센스, 폼, 화장수, 영양화장수, 유연수, 유연화장수, 팩, 유액, 메이크업베이스, 비누, 세정료, 입욕제, 선크림, 선오일, 현탁액, 유탁액, 페이스트, 젤, 로션, 파우더, 비누, 계면활성제 함유 클린싱, 오일, 파운데이션, 분말 파운데이션, 유탁액 파운데이션, 왁스 파운데이션, 패치 및 스프레이로 이루어진 군에서 선택되는 제형을 가질 수 있다.

[0054] 본 발명에서 "미백" 또는 "피부 미백"은 예컨대 기미, 주근깨, 검버섯 및 잡티 등의 예방 또는 개선이 있으나 이에 제한되는 것은 아니며, 피부에서의 색소침착을 예방 또는 개선, 치료하는 모든 활성을 포함한다.

[0055] 본 발명에 따른 조성물에 포함되는 알테로모나스속(*Alteromonas sp*) ROA-053 균주의 균체, 상기 균주의 배양물, 상기 균주의 파쇄물, 상기 균체, 배양물 및/또는 파쇄물의 추출물 및 상기 추출물의 분획물, 그리고 이들의 건

조물 또는 농축물은 안트라닐산을 포함함으로써, 멜라닌 생성을 저해하여 피부에 대한 탁월한 미백 효능을 나타내므로, 피부의 색소 침착 및 이와 관련된 질환, 예를 들어 주근깨, 기미, 자외선 노출 후 과다 색소 침착, 염증 후 과다 색소 침착, 노인흑색점, 갈색반점 또는 검버섯 등과 같은 질환을 예방, 개선, 완화 또는 치료할 수 있다.

[0056] 본 발명의 미백용 조성물에 포함되는 알테로모나스속(*Alteromonas sp*) ROA-053 균주의 균체, 상기 균주의 배양물, 상기 균주의 파쇄물, 상기 균체, 배양물 및/또는 파쇄물의 추출물 및 상기 추출물의 분획물, 그리고 이들의 건조물 또는 농축물의 함량은 미백용 조성물이 제품화되는 형태, 상기 화합물이 피부에 적용되는 방법 및 피부에 머무르는 시간 등에 따라 달라질 것이다. 예컨대, 상기 미백용 조성물이 피부의 과다 색소 침착에 따른 피부과적 치료를 위한 의약품으로 제품화되는 경우에는 일상적으로 피부에 적용하게 되는 화장품으로 제품화되는 경우에 비해 높은 농도로 알테로모나스 ROA-053 균주의 균체, 상기 균주의 배양물, 상기 균주의 파쇄물, 상기 균체, 배양물 및/또는 파쇄물의 추출물 및 상기 추출물의 분획물, 그리고 이들의 건조물 또는 농축물을 포함할 수 있을 것이다. 이에 제한되는 것은 아니나, 상기 미백용 조성물 총 중량 기준으로 알테로모나스 ROA-053 균주의 균체, 상기 균주의 배양물, 상기 균주의 파쇄물, 상기 균체, 배양물 및/또는 파쇄물의 추출물 및 상기 추출물의 분획물, 그리고 이들의 건조물 또는 농축물을 0.001 ~ 50 중량%, 바람직하게는 0.01 ~ 30 중량%, 더욱 바람직하게는 0.1 ~ 10 중량%, 더 더욱 바람직하게는 1 ~ 5 중량% 포함할 수 있다. 그러나 상기 비율은 본 발명의 화장품 조성물이 제조되는 후술한 바의 제형에 따라 또 그것의 구체적인 적용 부위(얼굴, 목 등)나 그것의 바람직한 적용량 등에 따라 달라지는 것이기 때문에, 상기 비율은 어떠한 측면으로든 본 발명의 범위를 제한하는 것으로 이해되어서는 안 된다.

[0057] 바람직하게, 본 발명에 따른 미백용 조성물은 화장품 조성물일 수 있다. 본 실시예의 미백용 화장품 조성물은 상기 안트라닐산, 이의 약학적으로 허용가능한 염, 수화물, 용매화물, 유도체 또는 이성질체 이외에 미용학적으로 허용 가능한 담체 또는 첨가제를 포함할 수 있다.

[0058] 본 발명의 미백용 조성물은 약학적 조성물일 수 있다. 본 발명에 따른 미백용 약학적 조성물은 단독 또는 다른 약학적 활성 화합물과 결합된 형태로 사용될 수 있다. 상기 약학적 조성물은 공지의 경구투여 또는 비경구투여 제제의 제형일 수 있다. 이에 따라, 본 실시예의 미백용 약학 조성물은 상기 알테로모나스속 (*Alteromonas sp*) ROA-053 균주의 균체, 상기 균주의 배양물, 상기 균주의 파쇄물, 상기 균체, 배양물 및/또는 파쇄물의 추출물 및 상기 추출물의 분획물, 그리고 이들의 건조물 또는 농축물 이외에 충전제, 증량제, 결합제, 습윤제, 붕해제, 계면활성제 등의 희석제, 부형제 및/또는 담체를 더 포함할 수 있다. 본 발명에 따른 미백용 약학적 조성물은 랫트, 마우스, 가축, 인간 등의 포유동물에 다양한 경로로 투여될 수 있다. 투여의 모든 방식은 예상될 수 있는데, 예를 들면, 경구, 또는 비경구 투여(복강내, 직장, 정맥, 근육 또는 피하 주사, 또는 경피 투여)에 의해 투여될 수 있다. 이때, 비경구 경로는 경피 투여가 바람직하며, 그 중에서도 국소 도포가 가장 바람직할 수 있다. 본 발명에 따른 미백용 약학 조성물의 바람직한 투여량은 환자의 상태 및 체중, 질병의 정도, 약물형태, 투여 경로 및 기간에 따라 다르지만, 당업자에 의해 적절하게 선택될 수 있다. 그러나, 바람직한 효과를 위해서 본 발명에 따른 미백용 약학 조성물은 0.1 ~ 100 mg/kg의 양을 일일 1회 내지 수회로 나누어 투여될 수 있으나, 이에 제한되지 않는다.

[0059] 본 발명에 따른 구체적인 일 실시예에서, 알테로모나스 ROA-053 균주의 균체, 상기 균주의 배양물, 상기 균주의 파쇄물, 상기 균체, 배양물 및/또는 파쇄물의 추출물 및 상기 추출물의 분획물, 그리고 이들의 건조물 또는 농축물 중에 포함된 안트라닐산은 동일 농도의 알부틴과 비교시, 약 37% 높은 저해 활성도를 보였으며 특히 저농도에서 약 45%의 매우 높은 멜라닌 생성 저해 활성을 나타냄을 확인하였다. 따라서, 본 발명에 따른 미백용 조성물은 탁월한 멜라닌 생성 저해 활성을 나타내어 미백용 제제 또는 화장품에 유용하다.

[0060] 본 발명의 또 다른 예에서, 알테로모나스속 (*Alteromonas sp*) ROA053 균주로부터 상기 화학식 1의 화합물을 분리 정제하여 제조하는 방법이 제공된다. 상기 방법은 다음의 단계를 포함할 수 있다:

[0061] 1) 상기 알테로모나스속 (*Alteromonas sp*) ROA053 균주를 배양한 배양액에 추출용매를 가하여 추출하는 단계;

[0062] 2) 상기 얻어진 추출물을 역상 컬럼 크로마토그래피하여 분획물들을 얻는 단계; 및

[0063] 3) 상기 분획물들을 각각 고성능 액체 컬럼 크로마토그래피로 분리 정제 하는 단계.

[0065] 상기 균주의 배양기간은, 안트라닐산과 같은 유효한 이차대사 산물의 생산이 활발한 약 4일 이상, 바람직하게는

4 내지 20일, 보다 바람직하게는 6 내지 15일로 설정될 수 있다.

[0066] 상기 화학식 1로 표시되는 안트라닐산의 생산에 최적 조건을 제공하기 위하여, 균주의 배양 배지는 Marine broth (BD) 동일 수 있다. 상기 Marine broth 배지 형태는 고체배지와 액체배지 모두 가능하며, 바람직하게는 액체배지일 수 있다. 예를 들어, 상기 제조방법에 있어서 단계 1)의 액체 배양은 Marine broth 액체배지를 사용하여 균주 콜로니 2-3개당 액체배지 20 내지 30 ml의 비율로 접종하여 수행하는 것이 바람직하다.

[0067] 상기 단계 1)에서 사용되는 추출 용매는 알테로모나스속 (*Alteromonas* sp) ROA053 균주에서 안트라닐산을 추출할 수 있는 용매라면 제한없이 공지의 용매에서 적절히 선택할 수 있으나, 유기용매, 예를 들어, 에틸아세테이트, 메탄올, 에탄올, 프로판올, 이소프로판올, 부탄올, 아세톤, 에테르, 클로로포름, 메틸렌클로라이드, 헥산, 시클로헥산, 및 디클로로메탄로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상인 유기용매를 사용할 수 있고, 바람직하게는 에틸아세테이트일 수 있다.

[0068] 상기 추출은 초임계추출, 고압추출 또는 초음파추출법 등의 추출장치를 이용한 방법, 또는 셀라이트 또는 폴리스틸렌 또는 폴리아마드 흡착수지를 이용하는 방법으로 대체 가능하나 이에 한정하지 않는다.

[0069] 상기 배양액의 유기용매 추출 시, 용매를 배양액 분량의 1 내지 3 부피 배 첨가하여 추출하는 것이 바람직하며, 예를 들어 약 2 부피 배 첨가하여 추출하는 것이 더욱 바람직하다. 감압건조는 회전진공농축기(Rotary Vacuum Evaporator)를 사용하는 것이 바람직하나 이에 한정되지 않는다. 상기 감압건조 시 온도는 20 ~ 40℃인 것이 바람직하고 30℃인 것이 더욱 바람직하나 이에 한정되지 않는다.

[0070] 상기 단계 2) 또는 단계 3)의 컬럼 크로마토그래피는 실리카겔, 세파텍스, RP-18, RP-8, RP-4, 폴리아미드, 도요펠 (Toyopearl) 및 XAD 수지로 이루어진 그룹으로부터 선택된 충진제를 이용한 컬럼 크로마토그래피일 수 있다. 컬럼 크로마토그래피는 필요에 따라 적절한 충진제를 선택하여 수차례 실시할 수 있으며, 용매로 클로로포름 (CHCl₃)-메탄올, 초산에틸 (ethyl acetate)-메탄올, 염화메틸렌 (dichloromethane)-메탄올, 메탄올-물 또는 아세토나이트릴-물을 이용할 수 있으나 이에 한정되지 않는다. 바람직하게, 상기 단계 2)에서는 20 내지 100%의 메탄올/물 혼합 용액을 이용하여 C-18 역상 오픈 컬럼 크로마토그래피하여 분획물들을 수득할 수 있다. 또한 상기 단계 3)에서는 상기 단계 2)에서 수득된 분획물들을 전체 또는 일부 선택하여 분리정제할 수 있다. 바람직하게 일부, 예를 들어, 첫 번째와 네 번째 분획물을 각각 선택하여, 아세토나이트릴(Acetonitrile) : H₂O = 30 : 70 용액을 이용하여 고성능 액체 컬럼 크로마토그래피를 통해 분리정제할 수 있다.

[0071] 본 발명의 구체 예에서, 용리 조건에 물과 메탄올을 사용하였으며, 20% 메탄올/80% 물로 시작하여 20, 40, 50, 60, 70, 80, 100%까지 메탄올의 함량을 증가시켰다. 이로부터 얻어진 분획물을 C-18을 이용한 컬럼 크로마토그래피법을 이용하여 주성분을 분석한 결과, 20% 메탄올/80% 물 분획물에서 1종의 화합물이 확인되었다. 상기 분획물에 추가적으로 30% 아세토나이트릴/70% 물 조건 및 분당 2 ml의 유속의 용리조건으로, 10 mm × 250 mm의 RP-18 컬럼을 이용한 역상 액체 크로마토그래피법을 통해 정제하였으며 머무름 시간 11분에 상기 화학식 1로 표시되는 화합물인 안트라닐산(Anthranilic acid, 2-aminobenzoic acid)를 수득하였다.

[0072] 상기 분리한 화합물들을 MS 및 핵분광기를 이용하여 화합물의 구조를 분석하여 화학구조를 동정하였으며, 화합물 안트라닐산(Anthranilic acid, 2-aminobenzoic acid)는 분자량 137이며, 분자식이 C₇H₇NO₂인 연갈색 오일상의 물질인 것을 확인하였다.

[0073] 이상 본 명세서에 기재된 수치값은 달리 명시되어 있지 않은 한 균등범위까지 포함하는 것으로 해석되어야 한다.

발명의 효과

[0074] 본 발명에 따른 미백용 조성물에 포함되는 안트라닐산은 천연물 유래이므로 안전한 물질이며, 멜라닌 생성을 효과적으로 억제함으로써 피부의 색소침착을 예방, 치료 또는 개선할 수 있어 미백용 약학적 제제 또는 화장품 개발을 위한 조성물의 제조에 유용하게 이용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0075] 도 1은 해양퇴적토로부터 분리한 알테로모나스속 ROA-053 균주의 마린(Marine) 고체배지에서의 형태를 나타내는 사진이다.

도 2는 화학식 1로 표시되는 화합물의 농도 의존적 멜라닌 억제 효과를 확인한 결과를 나타낸 도면이다.

도 3a는 실시예 3에서 분리 정제된 화합물의 구조를 동정하기 위해 핵자기공명(NMR) 분석을 수행한 결과를 나타낸 도면이다.

도 3b는 실시예 3에서 분리 정제된 화합물의 구조를 동정하기 위한 질량분석 결과를 나타낸 도면이다.

도 3c는 실시예 3에서 분리 정제된 화합물의 구조를 동정하기 위한 자외선 스펙트럼 결과를 각각 나타낸다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 바람직한 실시예를 제시한다. 그러나 하기의 실시예는 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐, 실시예에 의해 본 발명의 내용이 한정되는 것은 아니다. 이하 실시예에서 사용되는 용어 2-아미노벤조산 또는 2-아미노벤조익엑시드는 안트라닐산을 다르게 지칭하는 명칭이다.

실시예 1. 균주 선별 및 동정

1-1: 퇴적토 내 균주 분리

2016년 5월 2일 남해 포항 인근 해양 퇴적토를 채집하였다. 채집된 퇴적토는 클린벤치에서 건조 후, 건조물을 멸균된 해수에 현탁하여 1/20으로 희석한 뒤 마린 브로스(Marine broth) 고체배지에 접종하고, 27℃에서 배양하면서 생성된 단일 균주를 마린 브로스 (Marine broth) 고체배지에 다시 접종하여 순수한 균주를 분리 및 선별하였다.

순수 분리된 ROA-053 균주는 도 1 과 같이 알테로모나스 속에 속하는 균주들과 같은 형태적 양상이 관찰되었다.

1-2: 균주의 동정

실시예 1-1에서 분리된 균주의 종 동정을 위해 마린브로스(Marine broth) 액체배지에서 4일 동안 27℃에서 배양된 균주 1ml을 취하여 “Tissue Genomic DNA Isolation kit” (Cosmogenetech co, Ltd., Seoul, South Korea)를 이용하여 제조회사 프로토콜에 의하여 genomic DNA를 추출하였다. 종 분석을 위해 16S rRNA 유전자 증폭을 27F 및 1492R 프라이머를 사용하여 PCR을 수행하였다. PCR에 사용한 프라이머 서열은 표 1에 나타내었다.

표 1

종류	서열 (5' → 3')	서열번호
27F	AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG	1
1492R	GGT TAC CTT GTT ACG ACT T	2

PCR 산물은 “PCR purification kit” (Cosmogenetech co, Ltd., Seoul, South Korea)을 이용하여 정제 후, capillary electrophoresis (Applied Biosystems 3730XL)를 이용하여 염기서열을 분석하였다.

ROA-053 균주로부터 얻어진 16S rRNA 유전자 염기서열을 GenBank/EMBL/DDBJ 데이터베이스의 BLAST 서치를 활용하여 이전에 보고된 균주들의 정보와 비교하였다. 그 결과 ROA-053 균주의 16S rRNA 유전자 염기서열은 *Alteromonas marina* SW-47 균주와 99.6% 상동성을 나타내었으며, 본 발명의 ROA-053 균주는 알테로모나스 (*Alteromonas*) 속에 속하는 균주로 판단되었다.

상기 알테로모나스 속 ROA-053 균주의 16S rRNA genes 염기서열을 표 2에 나타내었다 (서열번호 3):

표 2

[0088]	서열번호 3 GATGACGAGTGGCGGACGGGTGAGTAATGCTTGGGAACCTTGCCTTTGCGAGGGGGATAACAGTTGGAACGACTGTTAA TACCGCATAATGTTTTTCGACCAAACGGGGTTTAGGCTCCGGCGCAAAGAGAGGCCCAAGTGAGATTAGCTAGTTGGTA AGGTAACGGCTTACCAAGGCGACGATCTCTAGCTGTTCTGAGAGGAAGATCAGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCCA GACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGAATATTGCACAATGGGGGAAACCTGATGCAGCCATGCCGCGTGTGTGAAGAA GGCCTTCGGGTTGTAAAGCACTTTCAGTTGTGAGGAAAAGTTAGTAGTTAATACCTGCTAGCCGTGACGTTAACAACAG AAGAAGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCAGCCGCGTAATACGGAGGGTGCGAGCGTTAATCGGAATTACTGGGCGTAA AGCGCACGACGGCGTTTGTAAAGCTAGATGTGAAAGCCCCGGGCTCAACCTGGGATGGTCATTTAGAACTGGCAGACT AGAGTCTTGAGAGGGGAGTGAATTCCAGGTGTAGCGGTGAAATGCGTAGATATCTGGAGGAACATCAGTGGCGAAGG CGACTCCCTGGCCAAAGACTGACGCTCATGTGCGAAAGTGTGGGTAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACAC CGTAAACGCTGTCTACTAGCTGTGTGTGCTTTAAGGCGTGCGTAGCGAAGCTAACGCGCTAAGTAGACCGCTGGGGA GTACGGCCCAAGGTTAAACTCAAATGAATTGACGGGGGCCGACACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCGATGCA ACGCGAAGAACCTTACCTACACTTGACATGCTGAGAAGTTACTAGAGATAGTTTCGTGCCTTCGGGAACCTCAGACACAG GTGCTGCATGGCTGTGTCAGCTCGTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTTGTCCTTAGTT GCCAGCCTTAAGTTGGGCACTCTAAGGAGACTGCCGGTGACAAACCGGAGGAAGGTGGGGACGACGTCAGTCATCATG GCCCTTACGTGTAGGGCTACACACGTGCTACAATGGCATTACAGAGGGAAGCGAGACAGTGATGTGGAGCGGACCCCT TAAAGAATGTGCTAGTCCGGATTGGAGTCTGCAACTCGACTCCATGAAGTCGGAATCGTAGTAATCGCAGGTCAGAAT ACTGCGGTGAATACGTTCCCGGCCCTTGTACACACCGCCGTCACACCATGGGAGTGGGATGCAAAAGAAGTAGTTAGT CTAACCTTCGGGAGGACGATTACCACTTTGTGTTTCATGACTGGGGTGAAGTCGTAC
--------	---

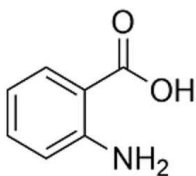
실시예 2. 균주 배양물 및 추출물 제조

[0089]

[0090] 실시예 1에서 동정된 알테로모나스속(*Alteromonas* sp) 균주를 2.5L 배양 용기에 해수가 포함된 1리터 배양액 (10 g/L 전분, 2 g/L 효모 추출물, 4 g/L 펩톤)에 7일 동안 27℃, 130 rpm 조건에서 배양 후, 알테로모나스속 (*Alteromonas* sp) ROA-053 균주의 배양물을 얻었다.

[0091] 알테로모나스속(*Alteromonas* sp) ROA-053 균주의 배양물에 에틸아세테이트 1L를 넣어 두 층을 분리하고 이로부터 에틸아세테이트 층을 얻었다. 이후 에틸아세테이트 층으로부터 진공회전 농축기를 이용하여 유기 용매를 제거하고 이의 추출물을 얻었다. 상기 에틸아세테이트 추출물 (3.0 g)은 H₂O와 MeOH의 20, 40, 50, 60, 70, 80, 100%까지 MeOH의 단계적 구배에 따르는 C-18 실리카를 이용한 역상 칼럼 크로마토그래피로 분획하였다. 그 중 60% 메탄올/ 40% 물로 분획한 네 번째 분획에서 유기 용매를 제거하였으며, 그 분획물을 3ml 메탄올에 녹이고, 그 용액에 대한 고성능 액체 크로마토그래피를 수행하여 최종적으로 순수한 화합물(화학식 1)을 획득하였으며, 알테로모나스속(*Alteromonas* sp) ROA-053 균주의 배양물은 하기 화학식 1로 표시되는 화합물을 포함하는 것을 확인하였다.

[0092] [화학식 1]



[0093]

[0095] 실시예 3. 화합물의 분리 및 정제

[0096] 실시예 2에서 얻은 알테로모나스(*Alteromonas*, ROA-053) 배양액에 에틸아세테이트 1L를 넣어 두 층을 분리하고 이로부터 에틸아세테이트 층을 얻었다. 이후 에틸아세테이트 층으로부터 진공회전 농축기를 이용하여 유기 용매를 제거하고 이의 추출물을 얻었다. 상기 에틸아세테이트 추출물 (3.0 g)은 H₂O와 MeOH의 20, 40, 50, 60, 70, 80 및 100%까지 MeOH의 단계적 구배에 따르는 C-18 실리카를 이용한 역상 칼럼 크로마토그래피로 분획하였다.

[0097] C-18 실리카를 이용한 역상 칼럼 크로마토그래피로 분획하였다. 그 중 80% MeOH 로 분획한 첫 번째 분획에서 유기 용매를 제거하였으며, 그 잔류물들은 3ml 메탄올에 녹이고, 그 용액에 대한 고성능 액체 크로마토그래피를

수행하여 최종적으로 순수한 2-아미노벤조익엑시드(안트라닐산)를 획득하였다.

[0098] 사용한 고성능 액체 크로마토그래피의 조건은 다음과 같다.

[0099] Phenomenex Luna C-18 (2), 250×10.0 mm

[0100] 2.0 mL/분, 5 mm, 100 Å, UV = 210 nm, 아세토나이트릴 (CH₃CN) : 물(H₂O) = 30 : 70

[0101] 상기와 같은 방법에 따라 2-아미노벤조익엑시드(8.3 mg)를 알테로모나스 속(*Streptomyces sp.*) ROA-053 균주로부터 머무름 시간 11분에 분리하였다.

[0103] 실시예 4. 멜라닌 생성 저해능 측정

[0104] 실시예 3에서 분리된 화학식 1로 표시되는 화합물의 멜라닌생성 저해 활성을 이용하여 측정하였다.

[0105] 구체적으로, B16F10 멜라노마 세포(ATCC, USA)를 1×10^4 cells/well로 48 웰 플레이트에 300 μL씩 분주한 후에 인큐베이터에서 하룻밤 동안 배양하였으며, 배지로는 DMEM(Dulbecco's Modified Eagle's Medium)high glucose 배지(ATCC, USA)를 사용하였다. 멜라닌 생성 촉진 자극원인 Alpha-MSH (0.1 uM, Sigma-Aldrich, USA)와 DMSO에 용해시켜 10, 25, 50ppm 농도로 제조한 안트라닐산을 동시에 섞은 배지를 제조하였다. 양성대조군으로는 알부틴 50ppm을 사용하였다. 분주된 웰 내의 배지를 제거한 후에 제조된 배지를 웰 당 450 μL씩 넣어주었다. 72 시간 후 배지를 완전히 제거하고, 1N NaOH 를 웰 당 200 μL씩 넣어준 후 60℃에서 1시간 동안 배양하여 세포로부터 멜라닌을 용해시켰다. 용해된 멜라닌 시료 100 μL를 96 웰 플레이트에 옮겨 담고 마이크로플레이트 리더(Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA) 405nm에서 흡광도를 측정하였다. 흡광도의 차이로부터 멜라닌 생성 저해도는 다음 수학적 식 1과 같이 산출하였다. 멜라닌 생성 저해도 측정 결과를 도 2에 나타내었다.

[0106] [수학적 식 1]

[0107] 멜라닌생성 저해도(%) = $1 - (ODS - ODc) / (ODm - ODc) \times 100$

[0108] ODS: 시험물질(안트라닐산)과 alpha-MSH를 처리한 시료의 흡광도

[0109] ODm: alpha-MSH 만 처리한 시료의 흡광도

[0110] ODc: 시험물질(안트라닐산) 및 alpha-MSH 미처리 음성대조군(1N NaOH 100 μL)의 흡광도

[0112] 그 결과, 도 3에서 확인되는 바와 같이, 화학식 1로 표시되는 화합물 안트라닐산는 10ppm, 25ppm, 50ppm 으로 농도가 증가할수록 멜라닌 생성 저해 효과가 더욱 증가하였다. 특히 동일 농도인 50ppm 에서는 양성대조군인 알부틴과 비교하여 약 42% 높은 저해 활성도를 보였으며, 특히 저농도인 10ppm에서도 약 43%의 높은 멜라닌 생성 저해 활성을 나타내었다.

[0113] 상기와 같은 결과에 따라, 본 발명의 조성물에 포함되는 안트라닐산는 멜라닌 생성 저해 활성이 매우 우수하며, 멜라닌 생성 저해를 통해 피부 색소 침착과 관련된 다양한 질병 및 상태에 적용 가능성을 확인하였다.

수탁번호

[0114]

기탁기관명 : 한국생명공학연구원

수탁번호 : KCTC14115BP

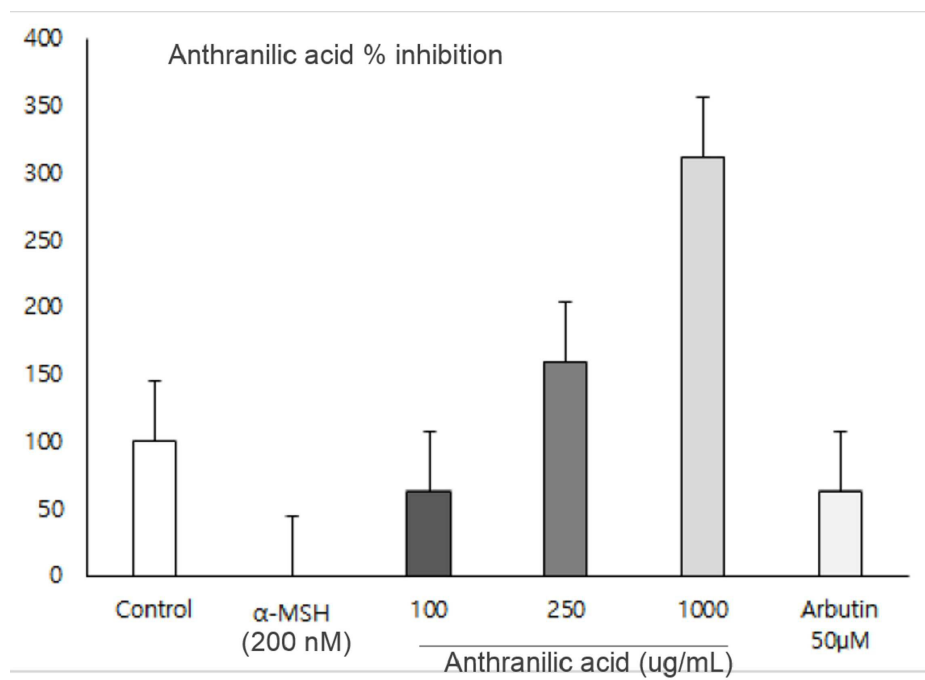
수탁일자 : 20200123

도면

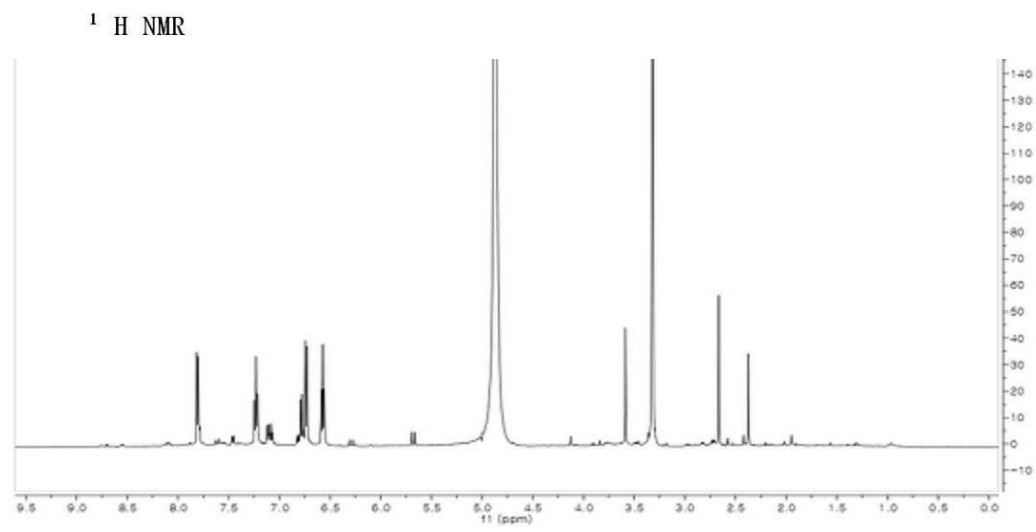
도면1



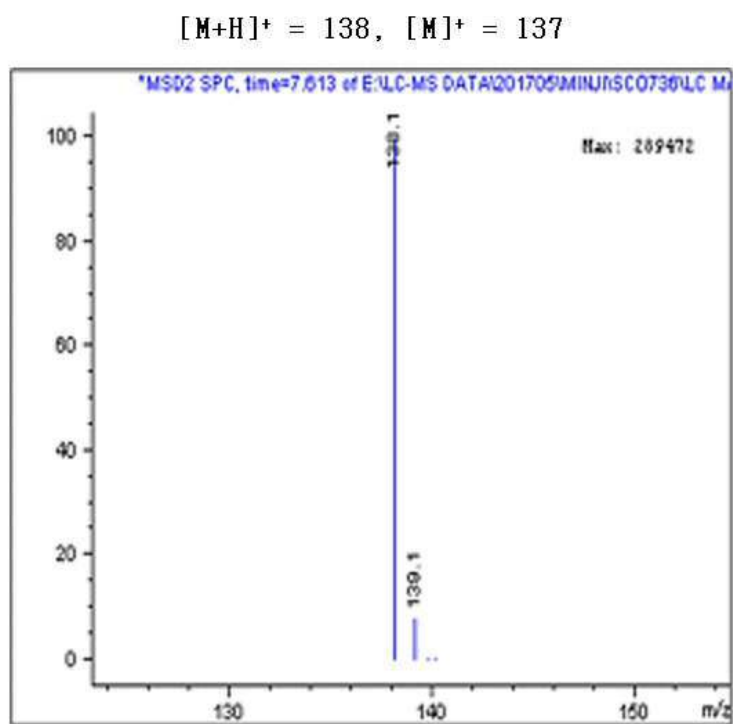
도면2



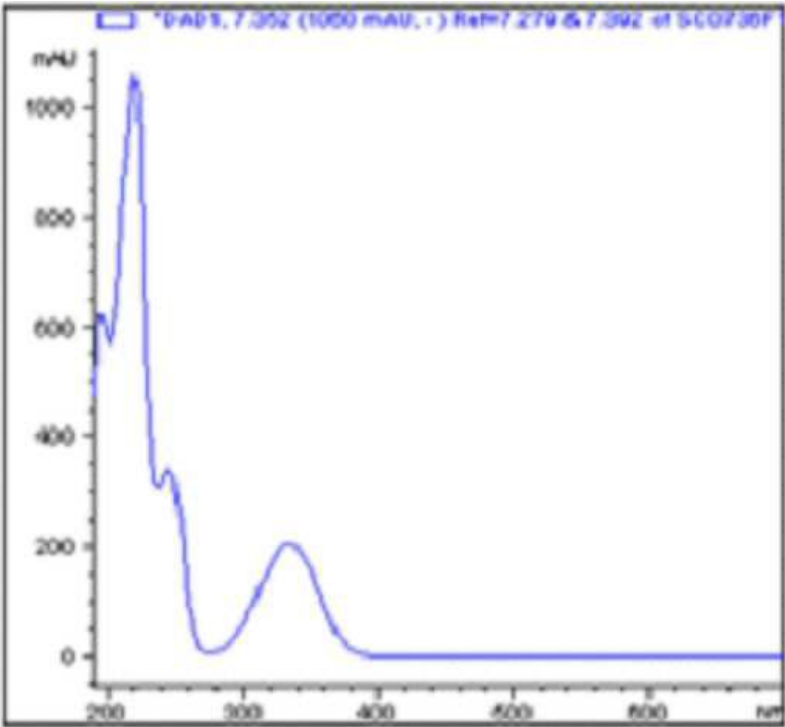
도면3a



도면3b



도면3c



서열 목록

- <110> Ewha University - Industry Collaboration Foundation
REDONE TECHNOLOGIES CO., LTD
- <120> Alteromonas species strain and Composition for Skin Whitening
Containing the same
- <130> DPP20200521KR
- <160> 3
- <170> KoPatentIn 3.0
- <210> 1
- <211> 20
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence
- <220><223> 27F Primer
- <400> 1
agagtttgat cctggctcag
- <210> 2
- <211> 19
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence

20

<220><223>	1492R Primer	
<400>	2	
ggttaccttg ttacgactt		19
<210>	3	
<211>	1400	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	16S rRNA genes of Alteromonas sp. ROA-053	
<400>	3	
gatgacgagt ggcggacggg tgagtaatgc ttgggaactt gcctttgcga gggggataac		60
agttggaaac gactgttaat accgcataat gttttcggac caaacggggt ttaggctccg		120
gcgcaaagag aggcccaagt gagattagct agttggaag gtaacggctt accaaggcga		180
cgatctctag ctgttctgag aggaagatca gccacactgg gactgagaca cggcccagac		240
tcctacggga ggcagcagtg gggaatatgt cacaatgggg gaaaccctga tgcagccatg		300
ccgcgtgtgt gaagaaggcc ttcgggttgt aaagcacttt cagttgtgag gaaaagttag		360
tagttaatac ctgctagccg tgacgttaac aacagaagaa gcaccggcta actccgtgcc		420
agcagccgcg gtaatacgga ggggtcgcgc gttaatcgga attactgggc gtaaagcgca		480
cgcagcgcggt ttgttaagct agatgtgaaa gccccgggct caacctggga tggtcattta		540
gaactggcag actagagtct tggagagggg agtggaaattc cagggtgtagc ggtgaaatgc		600
gtagatatct ggaggaacat cagtggcgaa ggcgactccc tggccaaaga ctgacgtca		660
tgtgcgaaag tgtgggtagc gaacaggatt agataccctg gtagtcaca ccgtaaacgc		720
tgtctactag ctgtgtgtgc ctttaaggcg tgcgtagcga agctaacgcg ctaagtagac		780
cgcctgggga gtacggccgc aagggttaaaa ctcaaataaa ttgacggggg cccgcacaag		840
cgggtggagca tgtggtttta ttcgatgcaa cgcgaagaac cttacctaca cttgacatgc		900
tgagaagtta ctagagatag tttcgtgcct tcgggaactc agacacaggt gctgcatggc		960
tgtcgtcagc tcgtgtcgtg agatgttggg ttaagtcccg caacgagcgc aacccttgtc		1020
cttagttgcc agccttaagt tgggcactct aaggagactg ccggtgacaa accggaggaa		1080
ggtggggacg acgtcaagtc atcatggccc ttacgtgtag ggctacacac gtgctacaat		1140
ggcatttaca gagggaagcg agacagtgat gtggagcgga ccccttaag aatgtcgtag		1200
tccgatttgg agtctgcaac tcgactccat gaagtccgaa tcgctagtaa tcgcaggtea		1260
gaatactgcg gtgaatacgt tcccgggcct tglacacacc gcccgtcaca ccatgggagt		1320
gggatgcaaa agaagtagtt agtctaacct tcgggaggac gattaccact ttgtgtttca		1380

tgactggggt gaagtcgtac

1400