



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2015년03월16일

(11) 등록번호 10-1502359

(24) 등록일자 2015년03월09일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C07K 5/10 (2006.01) C07K 14/405 (2006.01)

A61K 8/64 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2014-0027852

(22) 출원일자 2014년03월10일

심사청구일자 2014년03월10일

(56) 선행기술조사문헌

KR10-2013-0043701 A

KR10-2013-0029595 A

(73) 특허권자

부경대학교 산학협력단

부산광역시 남구 신선로 365 (용당동, 부경대학교)

(72) 발명자

정원교

부산 남구 분포로 111, 128동 2101호 (용호동, 엘지메트로시티아파트)

오건우

광주 동구 필문대로 347, 조은원룸 304호 (학동)

(74) 대리인

이덕록

전체 청구항 수 : 총 3 항

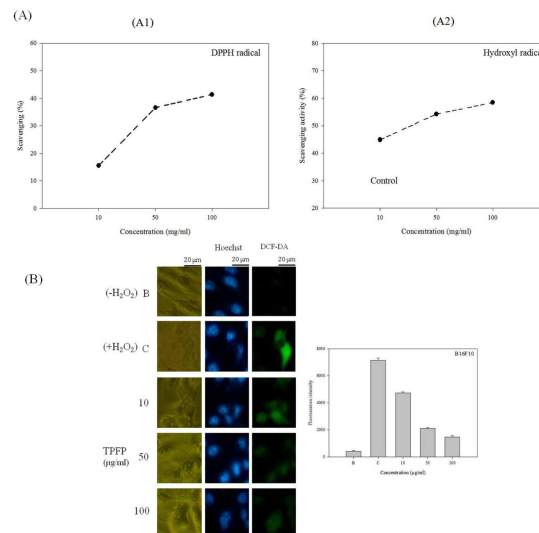
심사관 : 조현경

(54) 발명의 명칭 해양 미세조류 파블로바 루테리 유래의 펩타이드 및 이를 함유하는 멜라닌생성억제기능성 화장품 조성물

(57) 요약

본 발명은 미세조류 파블로바 루테리 발효물을 포함하는 멜라닌생성억제용 조성물에 관한 것으로, 미세조류 파블로바 루테리의 발효물에서 분리정제한 펩타이드의 아미노산 서열을 결정하는 단계와; 상기 단계에서 얻은 펩타이드를 이용하여 세포독성, DNA 보호활성, 라디칼 제거활성 및 멜라닌생성 억제활성을 비교, 평가하는 단계를 통하여 달성한 파블로바 루테리의 신규한 펩타이드를 유효성분으로 함유한 조성물을 제공하는 뛰어난 효과가 있다.

대표도 - 도3



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 2013R1A1A1A05013577

부처명 미래창조과학부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 일반연구지원_신진연구(후속연구지원)

연구과제명 생체적합성 및 조직재생 활성 보유 해양천연기능성소재 융합형 조직재생의료공학용 신소재
연구 및 개발

기 여 율 1/2

주관기관 부경대학교

연구기간 2013.06.01 ~ 2016.05.31

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 312019-5

부처명 농림수산식품부

연구관리전문기관 농림수산식품기술기획평가원

연구사업명 수산실용화기술개발사업

연구과제명 해조류 기능성 소재를 융합한 의료공학용 바이오 신소재 개발

기 여 율 1/2

주관기관 부경대학교

연구기간 2013.08.24 ~ 2017.08.23

특허청구의 범위

청구항 1

파블로바 루테리(*P. luther*) 발효물 유래의 서열번호 1의 아미노산 서열로 표시되는 멜라닌생성억제기능성 펩타이드.

청구항 2

제 1항의 서열번호 1의 아미노산 서열로 표시되는 펩타이드를 유효성분으로 함유하는 것을 특징으로 하는 멜라닌생성 억제기능성 화장품 조성물.

청구항 3

제 1항의 서열번호 1의 아미노산 서열로 표시되는 펩타이드를 유효성분으로 함유하는 것을 특징으로 하는 멜라닌생성 예방 및 억제기능성 건강보조식품 조성물.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 미세조류 파블로바 루테리 발효물로부터 정제분리한 펩타이드와 이를 포함하는 멜라닌생성억제기능성 화장품 조성물에 관한 것이다.

배경기술

[0002] 멜라닌은 피부 기저층에 존재하는 멜라닌세포에서 생성되며, 초기합성단계에서 티로시나아제라는 효소에 의해 합성속도가 조절된다. 생성된 멜라닌은 사람의 머리카락, 눈, 피부색 등을 결정하며 태양으로부터 오는 자외선을 막아 피부를 보호하는 중요한 역할을 한다. 그러나 지나친 자외선에 노출되거나 여러 가지 환경적 요인에 의한 멜라닌의 과다한 생성은 주근깨, 검버섯, 기미 등의 피부 트러블을 일으키게 된다.

[0003] TYR(티로시나아제)는 멜라닌합성의 초기단계에서 멜라닌의 생성을 결정하는 효소로 Microphthalmia-associated transcription factor(MITF)라는 전사인자에 의해 발현된다. MITF는 TYR 뿐만 아니라 멜라닌형성에 필요한 TRP1과 TRP2의 효소의 발현에도 관여하는 중요한 역할을 한다. 상기의 효소들은 '멜라노솜(melanosome)'이라는 멜라닌세포의 세포소기관에서 L-티로신을 유멜라닌 및 페오멜라닌 등 두 가지 유형의 멜라닌으로 전환할 수 있고, 합성된 멜라닌은 주위의 케라틴 세포로의 이동을 통하여 색을 결정하거나 UV로부터 피부를 보호한다.

[0004] 히드록실라디칼(OH[·]), 과산화물 음이온(O₂⁻), 과산화수소(H₂O₂) 등 활성산소(ROS)는 미토콘드리아 내에서 세포대사의 결과로서 발생한다. ROS는 매우 불안정하여 단백질, 지방, DNA 등 인근의 생체 고분자와 빠르게 반응하며, 그 결과 세포 또는 조직 및 기관의 손상을 초래한다. 선행연구에서는 ROS가 멜라닌생성에서 중요한 역할을 한다는 것을 보여주었는데, 멜라닌 세포에서 ROS의 제거 및 생성억제를 통하여 멜라닌의 생성을 조절할 수 있다는 것을 보여주었다. 따라서 항산화제는 멜라닌 세포에서 멜라닌 생성의 억제를 통한 억제제로 사용될 수 있다.

[0005] 해양 미세조류는 해양환경에서 중요한 1차 생산자로 단백질, 지질, 비타민 및 다른 영양 성분이 풍부하여 주로 건강식품으로 생산되어 판매되고 있다. 많은 미세조류 종들, 예컨대 *Chlorella* sp., *Dunaliella* sp., *Scenedesmus obliquus*, *Arthrospira* sp., cyanobacteria *Spirulina* sp.은 단백질 함량이 높다고 알려져 있으며 그로 인하여 이전보다 많은 관심의 대상이 되고 있으나 아직 많은 연구가 이루어지지 않고 있는 실정이다.

[0006] 특정 효모 종은 탄소원 및 에너지로서 오직 메탄올만 이용하는 thermotolerant methylotrophic yeast로 알려져 있다. 그 중 *Hansenula polymorpha* (*Pichia angusta*)는 *Candida boidinii*, *Pichia pastoris*, *Pichia methanolica*, *H. polymorpha* 등 한정된 수의 메탄올 이용 효모종에 속한다. *H. polymorpha*의 독특한 특성은 특히 의약품 분야에서 재조합 단백질, 예컨대 간염 B형 백신, INF- α -2a, 히루딘, 인슐린 및 피타아제 등 약물의 생산을 위한 우수한 기반을 제공한다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0007] 따라서 본 발명의 목적은 멜라닌생성억제용 펩타이드를 제공하는 데 있다.
- [0008] 본 발명의 다른 목적은 상기 펩타이드를 유효성분으로 함유하는 멜라닌생성억제기능성 화장품 조성물을 제공하는 데 있다.
- [0009] 본 발명의 또 다른 목적은 상기 펩타이드를 유효성분으로 함유하는 멜라닌생성 예방 및 억제기능성 식품조성물을 제공하는 데 있다.

과제의 해결 수단

- [0010] 본 발명의 상기 목적은 미세조류 파블로바 루테리(*P. lutheri*)의 발효물에서 분리정제한 펩타이드의 아미노산 서열을 결정하는 단계와; 상기 단계에서 얻은 펩타이드를 이용하여 세포독성, DNA 보호활성, 라디칼 제거활성 및 멜라닌생성 억제활성을 비교, 평가하는 단계를 통하여 달성하였다.

발명의 효과

- [0011] 본 발명은 파블로바 루테리 유래의 신규한 펩타이드와 이를 유효성분으로 함유한 멜라닌생성 억제용 조성물을 제공하는 뛰어난 효과가 있다.

도면의 간단한 설명

- [0012] 도 1은 본 발명에 따른 미세조류 발효물로부터 분리정제된 펩타이드의 서열분석 결과이다.
- 도 2는 본 발명에 따른 펩타이드의 DNA 보호효과를 나타내는 그래프이다.
- 도 3은 본 발명에 따른 펩타이드의 세포내 활성산소 억제능을 나타내는 그래프 및 형광이미지이다.
- 도 4는 본 발명에 따른 펩타이드의 B16F10 세포생존율과 티로시나제 억제활성, 멜라닌생성억제효과를 나타내는 그래프이다.
- 도 5는 본 발명에 따른 펩타이드의 MAPK 신호경로를 나타내는 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0013] 본 발명을 하기 실시예에 의해 보다 구체적으로 설명한다. 그러나 본 발명의 권리범위가 이에 한정되는 것은 아니다.

[0014] 공시시료

- [0015] 본 발명에서 사용된 파블로바 루테리(*Pavlova lutheri* KMCC H-006)는 한국해양미세조류은행(Korea Marine Microalgae Culture Center)에서 공급받았다. 생명자원관리본부(Korea Biological Resource Center)에서 입수한 한세놀라 폴리모르파(*Hansenula polymorpha* KCTC 7538)는 표준 F/2(Guillard) 배지에 보관하였다. 돌베코 변형 이글 배지(Dulbecco's Modified Eagle's Medium: DMEM), trypsin-EDTA, 소태아혈청(FBS), Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide(MTT), 5-(and-6)-carboxy-2',7'-dichlorofluorescein diacetate(carboxy-DCFDA)는 Gibco/Invitrogen(미국)에서 구입하였고 tyrosinase(C-19), MITF(N-15), β -actin(N-21), p-p38(D-8)에 대한 항체들은 Santa Cruz Biotechnology(미국)에서 구입하였다. L-DOPA, α -멜라닌 세포자극호르몬(α -MSH), bisBenzimide H33342 trihydrochloride는 Sigma-Aldrich(미국)에서 구입하였고 알부틴(arbutin)은 Alfa Aesar(독일)에서, 페니실린/스트렙토마이신은 PAA(오스트리아)에서 구입하였다.

[0016] 실시예 1: 미세조류 발효물의 제조

- [0017] 미세조류 분말을 1: 15(w/v)의 비로 Sodium phosphate 완충액(pH 7.0)에 첨가하고 미세조류 양에 근거한 한세놀라 폴리모르파 용액(500:1)을 상기 혼합물에 첨가하였다. 121℃에서 30분 동안 가압멸균처리한 후에 미세조류

용액을 수득하고, 이 용액에 락토바실러스 브레비스(*Lactobacillus brevis*) BJ20 (기탁번호: KCTC 11377BP) 배양액을 1%(v/v) 농도로 첨가하여 충분히 혼합하고 37℃에서 3일, 6일 및 12일 동안 배양하였다. 미세조류 발효물을 회수하여 동결건조한 뒤 110℃ 진공에서 0.1% 티오글리콜산을 함유하는 6N HCl에서 24시간 동안 가수분해하였다. 페닐이소티오시아네이트(phenylisothiocyanate)에 의해 유도된 펩타이드를 정제하기 위하여 고속액체크로마토그래피(HPLC)를 이용하였다.

[0018] 실시예 2: 아미노산 서열 결정

[0019] 정전분사 이온화(ESI) 공급원을 장착한 Q-TOF 질량 분석기(마이크로매스, 영국)를 이용하여 정제된 펩타이드의 정확한 분자량 및 아미노산 서열을 결정하였다. 정제된 펩타이드를 메탄올/물(1:1, v/v)에 용해한 후에 정전분사 공급원에 주입하고, 질량 스펙트럼에서 doubly charged 상태에 의해 결정하였다. 분자량 결정에 이어 단편화할 펩타이드를 자동 선별하고, 탠덤(tandem) 질량 분광분석법에 의해 서열정보를 얻었다.

[0020] 실험 결과, 파블로바 루테리 유래의 정제 펩타이드(TFPF; tetrameric peptide purified from fermented *P. lutheri*)의 아미노산 서열은 첨부하는 서열번호 1(Met-Gly-Arg-Tyr)로 결정되었다(도 1 참조).

[0021] 실시예 3: 세포배양 및 세포생존도 결정

[0022] RAW264.7 마우스 대식세포 및 B16F10 마우스 악성흑색종을 10% 소태아 혈청(FBS), 1% 페니실린/스트렙토마이신을 함유한 둘베코 변형 이글 배지(DMEM)에서 5% CO₂ 및 95% 공기를 함유하는 조건 및 37℃에서 증식시켰다. 상기 세포 상에서 TFPF의 세포독성 효과를 평가하기 위하여 MTT 분석을 이용하였다. 상기 세포를 96-웰 플레이트에서 24시간 동안 배양한 후 신선한 배지로 세척하고 여러 농도의 TFPF와 함께 24시간 동안 5% CO₂를 함유하는 조건 및 37℃에서 배양하였다. 각 웰의 상층액을 제거한 다음 총 50 µL의 MTT 염료용액을 각 웰에 첨가하고 4시간 동안 배양한 후, 포르마잔 결정을 용해하기 위해 120 µL DMSO를 첨가하였다. ELISA 리더기를 이용하여 570nm에서 흡광도를 측정하였다.

[0023] 도 2A에 도시된 바와 같이, TFPF로 처리한 세포 상에서는 임의의 유의한 독성 효과가 관찰되지 않았다.

[0024] 실시예 4: Genomic DNA 추출

[0025] 표준 페놀/단백질분해효소 K 과정을 약간 변형하여 RAW264.7 cell로부터 고분자량의 genomic DNA를 추출하였다. 10cm 디쉬에서 배양한 세포를 PBS로 2회 세척하고 5mM EDTA를 함유한 1mL PBS로 긁어냈다. 원심분리한 다음 세포를 0.5mg/mL RNase, 0.2M sodium acetate, 10mg/mL proteinase K 및 10% SDS에 용해하였다. 상기 혼합물을 37℃에서 30분, 55℃에서 1시간 동안 배양한 후 페놀:클로로포름:이소아밀알코올을 혼합물과 1:1의 비율로 첨가하고, 4℃, 12,000×g로 5분 동안 원심분리하였다. 상층액을 -20℃ ice cold 에탄올과 1:1.5의 비율로 혼합하고 -20℃에서 15분 동안 보관하였다. 12,000×g에서 5분간 원심분리한 다음 펠릿을 TE 버퍼에 용해하고 ELISA 리더기를 이용하여 260/280nm에서 DNA 순도를 결정하였다. 나아가 분리한 DNA의 양은 0.04M 트리스-아세트레이트-0.001M EDTA 버퍼에 넣어 1% 아가로스 젤 전기영동으로 평가하였다.

[0026] 실험예 1: 하이드록실라디칼-유도성 DNA 손상에 대한 TFPF의 보호효과

[0027] Milne *et al*(1993)에서 설명한 방법을 이용하여 TFPF의 DNA 보호효과를 측정하였다. 미리 결정한 농도의 시료, 최종농도 100 µM EDTA를 첨가함으로써 40 µL DNA 반응혼합물을 준비하였다. 1% 아가로스젤 위에서 40분 동안 100V 조건으로 약 1 µg DNA를 함유한 20 µL 반응혼합물을 전기영동하였다. 1mg/mL 에티듐브로마이드로 젤을 염색한 후 UV 빛 아래에서 시각화하였다.

[0028] 도 2B에 도시된 바와 같이, 하이드록실라디칼-유도성 DNA 산화적 손상에 대한 TFPF의 억제효과가 나타났다. DNA 대조구(Line 2)와 비교하여 0.01 mg/mL(Line 6)에서는 보호효과가 나타나지 않았으나, 다양한 농도에서(0.1-1 mg/mL) DNA 보호효과는 시료 투여량 의존적으로 나타났다(Line 3-5).

[0029] **자유라디칼소거능의 측정**

[0030] 상기 과정에 따라 여러 라디칼이 생성되어 JES-FA 전자스핀공명(ESR) 분광기를 이용하여 spin adduct를 기록하였다.

[0031] 라디칼 소거능 = $(1-H/H_0) \times 100\%$

[0032] **DPPH-라디칼 소거능**

[0033] Nango *et al*(1996)에서 설명한 방법을 이용하여 DPPH-라디칼소거능을 측정하였다. 에탄올용액에 30 μ L DPPH(60 μ M)을 넣은 후 30 μ M TFPF 용액(대조군:에탄올)을 첨가하였다. 10초간 격렬하게 섞은 후 용액을 100 μ L quartz 모세관에 옮긴 다음 JES-FA ESR 분석기를 이용하여 DPPH 라디칼에 대한 TFPF의 소거능을 측정하였다. spin adduct는 ESR 분석기에서 정확히 2분 후에 측정하였다. 실험조건은 다음과 같다: magnetic field, 336.5 $\pm$ 5 mT; power, 5 mW; modulation frequency, 9.41 GHz; amplitude, 1 $\times$ 1,000; sweep time, 30 sec.

[0034] DPPH-라디칼 소거능은 상기 식에 의해 계산되었고, H 및 H₀는 시료가 있을 때와 없을 때 라디칼 신호 각각의 상대적인 피크 높이를 나타낸다.

[0035] DPPH-라디칼의 생성에 있어서 TFPF의 소거능은 도 3A1에 나타내었다. TFPF는 100 μ g/mL 농도에서 대조구 신호에 비하여 DPPH-라디칼 신호를 41.4% 감소시켰다.

[0036] **하이드록실라디칼 소거능**

[0037] iron-catalyzed Fenton Haber-Weiss reaction에 의해 하이드록실라디칼이 생성되고, 생성된 하이드록실라디칼은 nitron spin trap DMPO와 빠르게 반응하였다. 그 결과 얻은 DMPO-OH adduct는 ESR 분석기로 검출하였다. TFPF 용액(20 μ L)을 DMPO(0.3M, 20 μ L), FeSO₄(10 mM, 20 μ L) 및 H₂O₂(10 mM, 20 μ L)을 넣은 포스페이트 버퍼 용액(pH 7.4)과 배합한 후 100 μ L quartz 모세관에 옮겼다. 2.5분 후 ESR 분석기를 이용하여 ESR 스펙트럼을 기록하였다. 실험조건은 다음과 같다: magnetic field, 336.5 $\pm$ 5 mT; power, 1 mW; modulation frequency, 9.41 GHz; amplitude, 1 $\times$ 200; sweep time, 4 min.

[0038] 하이드록실라디칼 소거능은 상기 식에 의해 계산되었고, H 및 H₀는 시료가 있을 때와 없을 때 라디칼 신호 각각의 상대적인 피크 높이를 나타낸다.

[0039] 펜톤반응에서 생성된 하이드록실라디칼은 ESR 분석기에 의해 검출되었고 도 3A2에 도시된 바와 같이, TFPF는 100 μ g/mL 농도에서 대조구 신호에 비하여 하이드록실라디칼 신호를 58.5% 감소시켰다.

[0040] **실험예 2: DCF-DA를 이용한 세포내 활성산소(ROS) 형성의 결정**

[0041] B16F10 마우스 악성흑색종을 24-웰 플레이트에 24시간 동안 배양하였다. 세포내 활성산소의 생산은 H₂O₂에 의하여 세포투과성 형광염료 5-(and-6)-carboxy-2',7'-dichlorofluorescein diacetate(carboxy-DCFDA)의 형광성 DCF로의 산화를 통하여 검출하였다. B16F10 세포는 24-웰 플레이트에서 1시간 동안 DCF-DA(40 μ M)와 함께 37 $^{\circ}$ C에서 배양하였다. 상기 세포는 H₂O₂ 및 Hoechst 33342를 1시간 동안 처리하기 전에 37 $^{\circ}$ C에서 1시간 동안 여러 농도의 TFPF를 전처리하였다. 배양한 다음 상기 세포들은 PBS로 2회 세척하고 형광현미경을 이용하여 관찰하였다.

[0042] 실험결과, 도 3B에 도시된 바와 같이, 형광성 DCF는 B16F10 세포에서 다양한 농도의 TFPF에 의해 감소되었다.

[0043] **실험예 3: 멜라닌 함량 결정**

[0044] 세포를 6-웰 플레이트에서 24시간 동안 배양한 다음 α -멜라노사이트-자극호르몬(α -MSH)이 있을 때와 없을 때 상기 세포를 여러 농도의 TFPF와 함께 배양하였다. 48시간 동안 배양한 다음 세포를 회수하고 cold PBS로 2회

세척하였다. 1%(v/v) Triton X-100을 넣은 PBS에 세포펠릿을 용해하고 13,000g에서 10분간 원심분리하였다. 상층액을 제거하고 10% DMSO를 함유한 1M NaOH에 90℃에서 1시간 동안 용해하였다. ELISA 리더기를 이용하여 405 nm에서 흡광도를 측정함으로써 상대적인 멜라닌 함량을 결정하였다.

[0045] 실험결과 도 4B에 도시된 바와 같이 멜라닌 함량은 다양한 농도의 TFPF에 의해 감소되었다.

[0046] 실험예 4: 티로시나제(tyrosinase) 활성

[0047] DOPA로부터 dopachrome의 형성율을 측정함으로써 티로시나제 활성을 평가하였다. 상기 세포는 6-웰 플레이트에서 배양하였다. 24시간 후에 α -MSH가 있을 때와 없을 때 세포를 다양한 농도의 TFPF로 처리하였다. 48시간 동안 배양한 다음 세포를 회수하여 cold PBS로 2회 세척하였다. 1%(v/v) Triton X-100을 함유한 PBS 버퍼에 세포펠릿을 용해한 다음 13,000g에서 10분간 원심분리하였다. 수집한 상층액은 효소연구를 위해 사용하였고 단백질 함량은 표준물질로서 소혈청알부민을 이용하여 BCA에 의해 평가하였다. 세포내 추출물은 2 mM L-DOPA 용액과 함께 96-웰 플레이트에서 37℃로 두었다. ELISA 리더기를 이용하여 적어도 1시간 동안 15분 마다 475 nm에서의 흡광도를 측정하였다.

[0048] 도 4C는 B16F10 세포에서의 티로시나제 억제효과를 보여주었다.

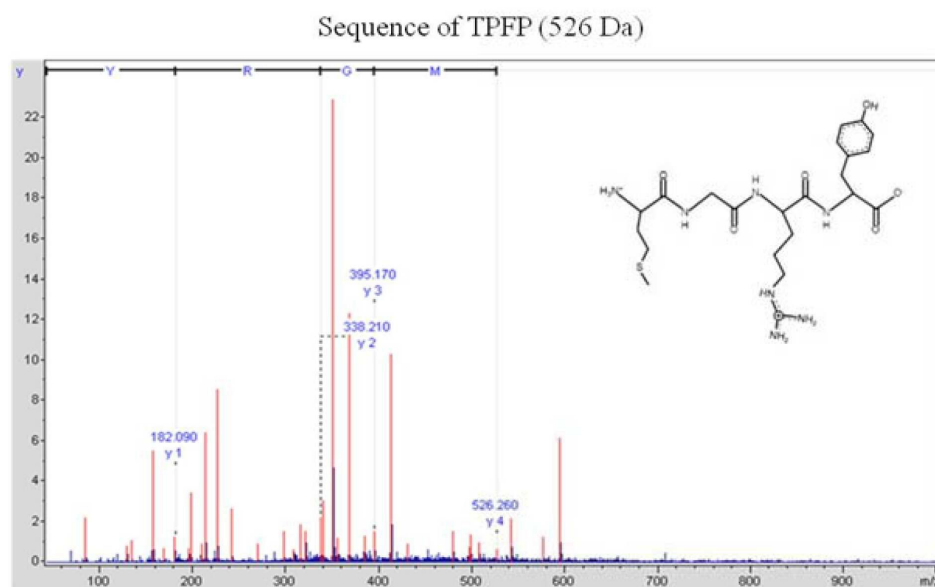
[0049] 실험예 5: 웨스턴 블롯팅 분석

[0050] 6-웰 플레이트에 배양한 세포를 PBS에 2회 세척하고 RIPA 버퍼에 용해시켰다. 10-12% 젤을 이용한 SDS-폴리아크릴아마이드 젤 전기영동에 의해 단백질을 분리하고 PVDF 막에 옮겼다. Tween-20을 함유한 Tris-buffered Saline에서 5% skim milk로 상기 막을 블럭시키고 TBS-T에서 1차 항체와 함께 배양하였다. TBS-T 버퍼와 세척한 다음 막을 2차 항체와 함께 상온에서 2시간 동안 배양하였다. 증강 화학발광기법 및 LAS-4000 이미징 시스템을 이용하여 밴드를 시각화하였다.

[0051] 실험결과 도 5에 도시된 대로 MITF 및 티로시나제 발현이 유의적으로 감소하였다. 또 TFPF 처리 이후, p-p38 MAPK는 감소한 반면에 p-ERK는 증가하였다.

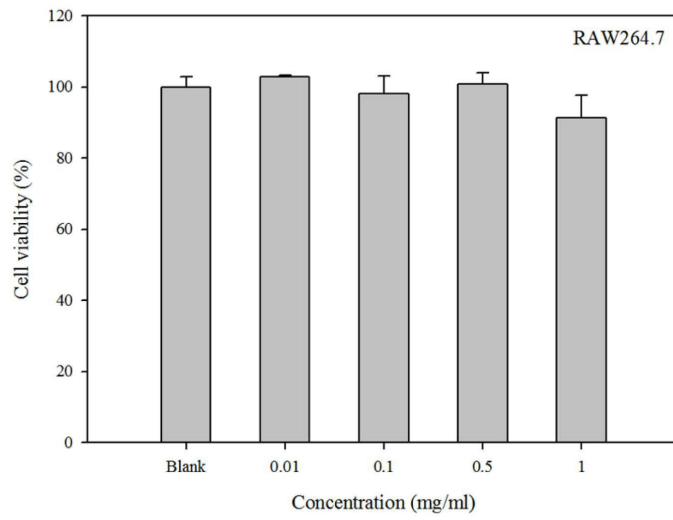
도면

도면1

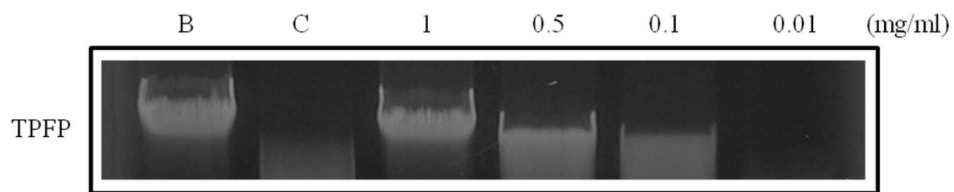


도면2

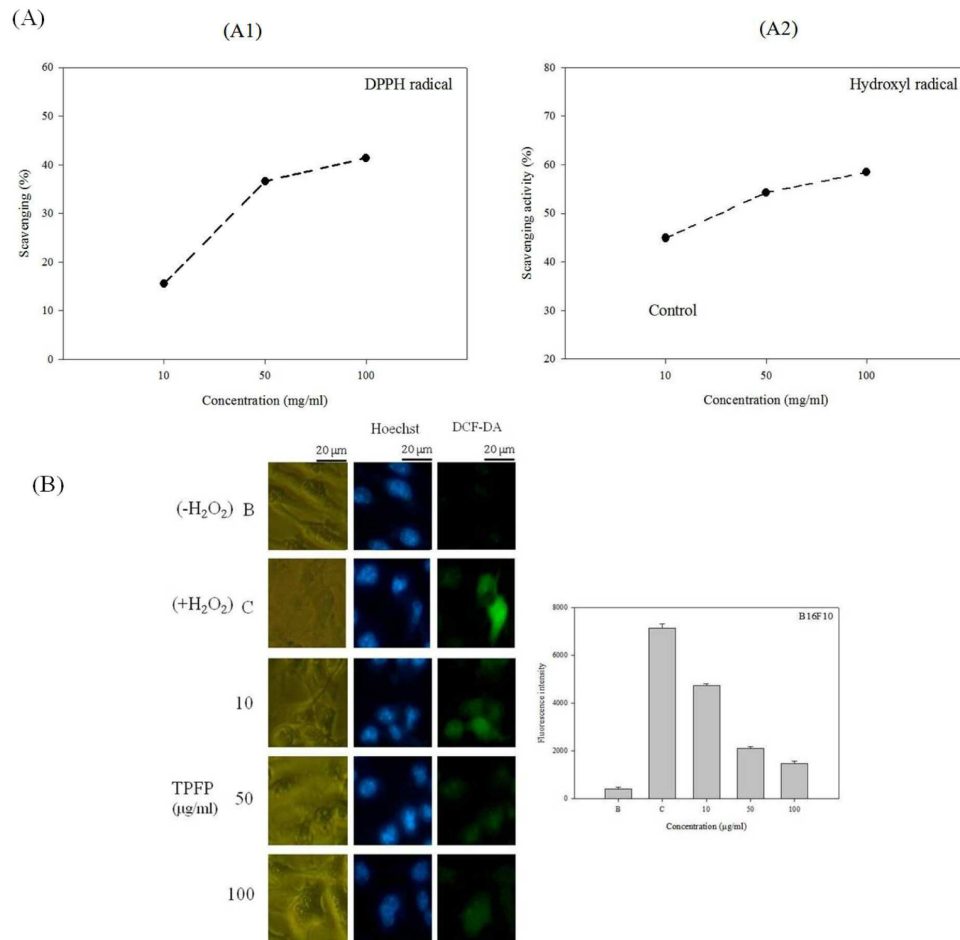
(A)



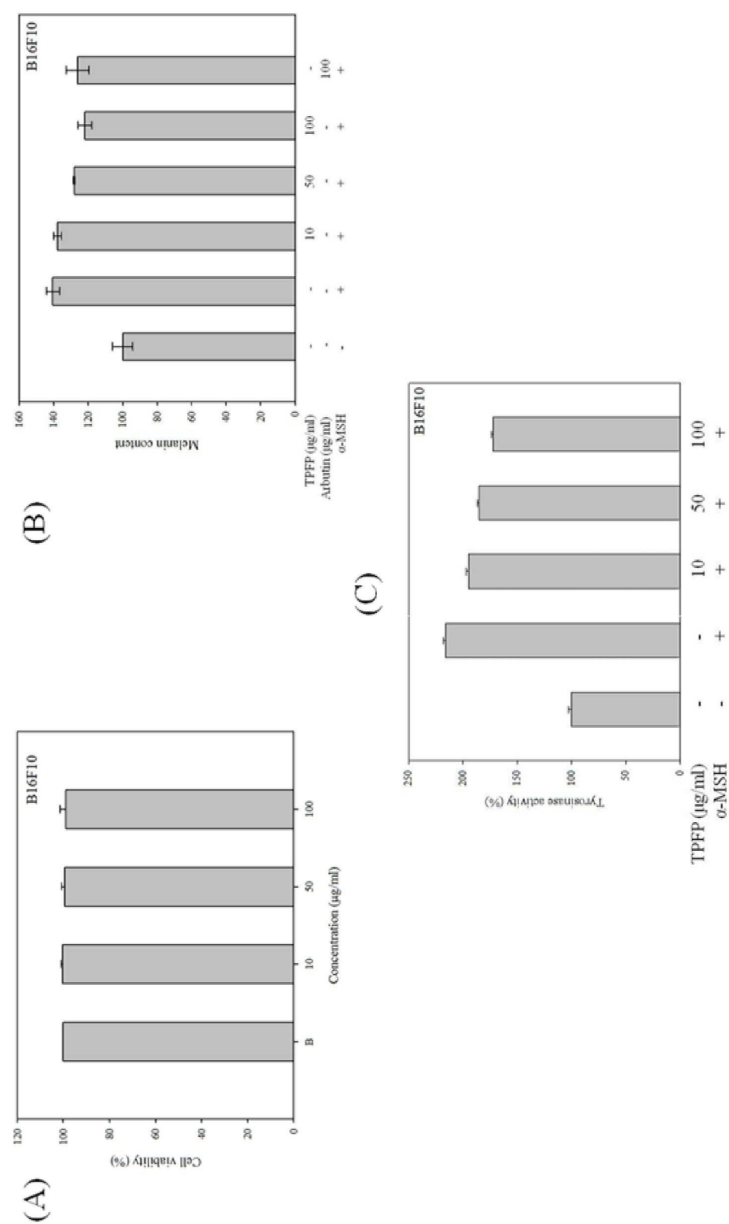
(B)



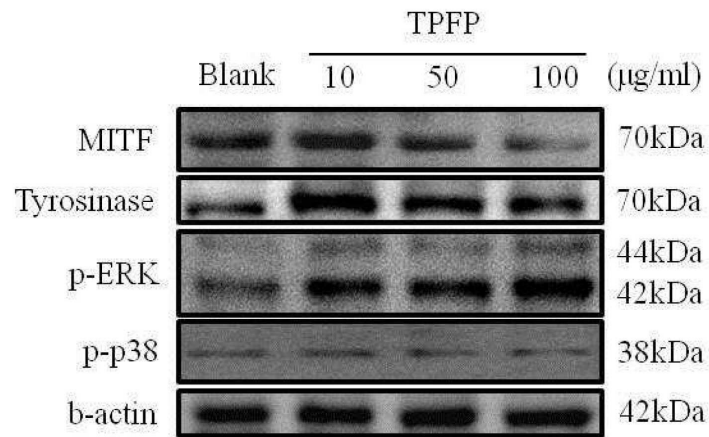
도면3



도면4



도면5



서열 목록

- <110> Pukyong National University Industry-University Cooperation Foundation
 - <120> A peptide derived from fermented marine microalgae pavlova
lutheri and a composition for suppressing production of
melanogenesis comprising the same
 - <130> 1
 - <160> 1
 - <170> KopatentIn 2.0
 - <210> 1
 - <211> 4
 - <212> PRT
 - <213> Artificial Sequence
 - <220><223> peptide derived from fermented pavlova lutheri
 - <400> 1
- Met Gly Arg Tyr

1