

(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)(11) 공개번호 10-2020-0134585
(43) 공개일자 2020년12월02일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
 A61K 8/66 (2006.01) A61K 8/22 (2006.01)
 A61K 8/34 (2006.01)
- (52) CPC특허분류
 A61K 8/66 (2013.01)
 A61K 8/22 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2019-0060228
 (22) 출원일자 2019년05월22일
 심사청구일자 2019년05월22일
- (71) 출원인
 울산과학기술원
 울산광역시 울주군 언양읍 유니스트길 50
- (72) 발명자
 김용환
 울산광역시 울주군 언양읍 유니스트길 50
 성호준
 울산광역시 울주군 언양읍 유니스트길 50
 박성훈
 울산광역시 울주군 언양읍 유니스트길 50
- (74) 대리인
 리앤목특허법인

전체 청구항 수 : 총 16 항

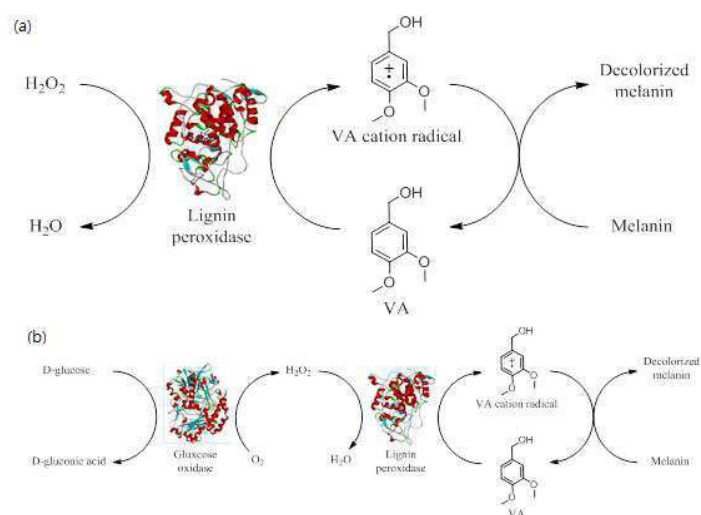
(54) 발명의 명칭 리그닌 과산화효소를 포함하는 피부 미백용 화장품 조성물 및 이를 이용한 피부 내 멜라닌의 탈색 방법

(57) 요약

리그닌 과산화효소(Lignin Peroxidase)를 포함하는 피부 미백용 화장품 조성물은 피부 부작용이 매우 적으며, 멜라닌을 선택적으로 탈색할 뿐만 아니라 멜라닌 탈색 효율이 매우 뛰어나다. 나아가, 포도당 산화효소를 포함하는 조성물의 경우, 저농도의 과산화수소의 연속적인 공급을 통해 멜라닌의 탈색 효율이 더욱 증진되므로, 상기 조성물을 피부 미백용도로 이용할 수 있다.

또한, 상기 조성물을 이용한 피부 내 멜라닌의 탈색 방법 또한, 멜라닌을 선택적으로 탈색시키며, 그 효율이 우수하여 적용된 개체의 피부 미백 효과를 달성할 수 있다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

A61K 8/34 (2013.01)

A61Q 19/02 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	20002810
부처명	지식경제부
과제관리(전문)기관명	한국산업기술평가관리원
연구사업명	바이오산업원천기술개발
연구과제명	고안정성 멜라닌 분해탈색 효소 기반 저자극 미백 바이오 코스메틱 개발
기 여 율	1/1
과제수행기관명	울산과학기술원
연구기간	2018.09.01 ~ 2019.05.31

명세서

청구범위

청구항 1

리그닌 과산화효소(Lignin Peroxidase)를 포함하는 피부 미백용 화장료 조성물.

청구항 2

청구항 1에 있어서, 상기 리그닌 과산화효소는 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 단백질인, 피부 미백용 화장료 조성물.

청구항 3

청구항 1에 있어서, 베라트릴 알코올(Veratryl Alcohol) 및 과산화수소(H_2O_2)를 더 포함하는 피부 미백용 화장료 조성물.

청구항 4

청구항 3에 있어서, 상기 과산화수소의 조성물 내 농도는 200 μM 내지 300 μM 인, 피부 미백용 화장료 조성물.

청구항 5

청구항 1에 있어서, 상기 조성물의 pH는 3.5 내지 4.5인, 피부 미백용 화장료 조성물.

청구항 6

청구항 1에 있어서, 포도당 산화효소(Glucose Oxidase)를 더 포함하는 피부 미백용 화장료 조성물.

청구항 7

청구항 6에 있어서, 상기 포도당 산화효소는 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진 단백질인, 피부 미백용 화장료 조성물.

청구항 8

청구항 6에 있어서, 상기 포도당 산화효소의 조성물 내 농도는 0.2 U/ml 내지 0.3 U/ml인, 피부 미백용 화장료 조성물.

청구항 9

청구항 6에 있어서, 포도당을 더 포함하는 피부 미백용 화장료 조성물.

청구항 10

청구항 9에 있어서, 상기 포도당의 조성물 내 농도는 100 mM 내지 500 mM인, 피부 미백용 화장료 조성물.

청구항 11

청구항 6에 있어서, 산소(O_2)를 더 포함하는 피부 미백용 화장료 조성물.

청구항 12

개체의 피부에 청구항 1 내지 11 중 어느 한 항의 조성물을 적용하는 단계를 포함하는 피부 내 멜라닌의 탈색 방법.

청구항 13

개체의 피부에 리그닌 과산화효소, 베라트릴 알코올 및 과산화수소를 적용하는 단계를 포함하는 피부 내 멜라닌

의 탈색 방법.

청구항 14

청구항 13에 있어서, 상기 과산화수소의 적용은 80 μM 내지 300 μM 의 과산화수소 용액을 적용하는 것인, 피부 내 멜라닌의 탈색 방법.

청구항 15

청구항 13에 있어서, 상기 과산화수소의 적용은 과산화수소 용액을 1회 내지 30회로 적용하는 것인, 피부 내 멜라닌의 탈색 방법.

청구항 16

청구항 13에 있어서, 상기 과산화수소의 적용은 과산화수소 용액을 1분 내지 90분의 간격으로 적용하는 것인, 피부 내 멜라닌의 탈색 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 리그닌 과산화효소를 포함하는 피부 미백용 화장품 조성물 및 이를 이용한 피부 내 멜라닌의 탈색 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 멜라닌은 자외선으로부터 피부를 보호하는 데 중요한 역할을 하는데, 이는 멜라닌이 자외선을 포함한 대부분의 파장의 빛을 여과하는 것이다. 이러한 이유로, 멜라닌의 대부분은 표피에 위치하고 피부의 색을 결정한다. 멜라닌에는 유멜라닌과 페오멜라닌 두 종류가 있으며, 유멜라닌은 검은색 또는 갈색을 나타내며, 페오멜라닌은 빨간색 또는 노란색을 나타낸다.

[0003] 한편, 피부에 존재하는 멜라닌은 멜라닌 합성 경로에서 L-DOPA (L-3,4-dihydroxyphenylalanine)는 도파 퀴논으로 전환되고, 티로시나아제에 의해 생성된다. 이에 따라, 현재까지 미백화장품에 다양한 종류의 티로시나아제 억제제가 세포에서 멜라닌 생성을 줄이기 위해 가장 활발히 연구되고 있다. 그러나 이러한 티로시나아제의 화학적 저해제는 백반증과 같은 많은 잠재적 부작용을 나타냈으며, 대표적으로 많은 사람들이 강력한 티로시나아제 억제제인 rhododenol로 인해 고통 받고 있다.

[0004] 이러한 이유로, 효소가 피부 표면에 존재하는 멜라닌을 선택적으로 탈색시키기 위해 화학 물질 대신 효소를 사용하여 멜라닌을 탈색시키는 연구가 진행되고 있다. 라카아제(laccase), dye-decolorizing peroxidase, 망간 과산화효소(manganese peroxidase) 및 리그닌 과산화효소(lignin peroxidase)와 같은 다른 과산화효소들은 이미 테스트를 거쳤으나, 망간 과산화효소는 효율적인 멜라닌 탈색을 위해 망간 중금속 이온 또는 합성 매개체를 필요로 하며, 이들은 인간의 피부에 독성을 나타낼 수 있다. 리그닌 과산화효소는 이러한 물질을 필요로 하지 않으며, 심지어 베라틸 알콜을 산화시킬 수 있는 높은 산화 환원 전위를 나타내기 때문에 다른 효소보다 훨씬 효과적으로 멜라닌을 탈색시키는 유망한 촉매제이다. 그에 비하여 다른 효소는 멜라닌을 산화시키기에 덜 효과적인 산화 환원 전위를 나타낸다. 그러나 멜라닌 탈색 효소로서 높은 잠재력을 지니고 있음에도 불구하고, 리그닌 과산화효소는 백색 부후균류(Phanerochaete chrysosporium)로부터 최대 17개의 다른 동종 효소를 생합성되기 때문에 발현 및 정제의 어려움으로 인해 정제되지 않은 미정제 효소로만 연구되고 사용되어 왔다. 또한, 리그닌 과산화효소는 과도한 양의 과산화수소(H_2O_2)에 의해 쉽게 불활성화 될 수 있는데, 이는 효소를 비활성화시켜 멜라닌 탈색 효율을 증가시키는 것을 억제하는 주요 장애물이었다.

[0005] 이에 따라, 정제된 리그닌 과산화효소를 이용하여 단시간 내에 선택적으로 피부 내 멜라닌을 탈색할 뿐만 아니라 멜라닌 탈색 효율을 증진시켜 미백화장품의 주요 소재 및 기술로 적용하고자 한다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0006] 일 양상은 리그닌 과산화효소(Lignin Peroxidase)를 포함하는 피부 미백용 화장품 조성물을 제공하는 것이다.
- [0007] 다른 양상은 개체의 피부에 상기 조성물을 적용하는 단계를 포함하는 피부 내 멜라닌의 탈색 방법을 제공하는 것이다.
- [0008] 또 다른 양상은 개체의 피부에 리그닌 과산화효소, 베라트릴 알코올 및 과산화수소를 적용하는 단계를 포함하는 피부 내 멜라닌의 탈색 방법을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

- [0009] 일 양상은 리그닌 과산화효소(Lignin Peroxidase)를 포함하는 피부 미백용 화장품 조성물을 제공한다.
- [0010] 상기 리그닌 과산화효소는 베라트릴 알코올과 과산화수소(H_2O_2)가 반응하여 물(H_2O)과 베라트릴 알코올 양이온 라디칼을 생성하는 반응을 촉매한다.
- [0011] 상기 생성된 베라트릴 알코올 양이온은 멜라닌과 반응하여 베라트릴 알코올 형성과 동시에 멜라닌을 탈색시켜, 피부 미백 효과를 달성할 수 있다.
- [0012] 상기 조성물은 멜라닌을 선택적으로 탈색할 뿐만 아니라 멜라닌 탈색 효율이 매우 우수하여 피부 미백 효과가 우수하며, 피부 부작용이 매우 적다.
- [0013] 상기 리그닌 과산화효소는 천연으로부터 유래될 수도 있고, 당해 분야에서 널리 공지된 다양한 단백질 합성 방법으로 획득할 수 있다. 일례로서, 폴리뉴클레오티드 제조합과 단백질 발현 시스템을 이용하여 제조하거나 단백질 합성과 같은 화학적 합성을 통하여 시험관 내에서 합성하는 방법 및 무세포 단백질 합성법 등으로 제조될 수 있다. 또한, 일례로서, 상기 리그닌 과산화효소는 펩티드, 식물 유래 조직이나 세포의 추출물, 미생물(예를 들어 세균류 또는 진균류, 그리고 특히 효모)의 배양으로 얻어진 생산물일 수 있다.
- [0014] 용어 "단백질(Protein)"은 아마이드 결합 (또는 펩티드 결합)으로 연결된 2개 이상의 아미노산으로 이루어진 폴리머를 의미한다.
- [0015] 상기 리그닌 과산화효소는 리그닌 과산화효소의 아미노산 서열과 각각 약 70% 이상, 약 75% 이상, 약 80% 이상, 약 85% 이상, 약 90% 이상, 약 92% 이상, 약 95% 이상, 약 97% 이상, 약 98% 이상, 또는 약 99% 이상의 서열 상동성을 갖는 단백질을 포함할 수 있다. 예를 들어, 상기 리그닌 과산화효소는 리그닌 과산화효소 동질효소일 수 있다. 구체적으로 상기 리그닌 과산화효소는 백색부후균(*Phanerochaete chrysosporium*) 유래 리그닌 과산화효소일 수 있다. 보다 구체적으로 백색부후균(*Phanerochaete chrysosporium*) 유래 리그닌 과산화효소 동질효소 H8(Lignin Peroxidase isozyme H8: LiPH8)일 수 있고, 이는 서열번호 1의 아미노산 서열로 이루어진 단백질일 수 있다.
- [0016] 용어 "상동성(Homology)"은 야생형 아미노산 서열과의 유사한 정도를 나타내기 위한 것으로서, 이러한 상동성의 비교는 당업계에서 널리 알려진 비교 프로그램을 이용하여 수행할 수 있으며, 2개 이상의 서열간 상동성을 백분율(%)로 계산할 수 있다.
- [0017] 또한, 보다 나은 화학적 안정성, 강화된 약리 특성(반감기, 흡수성, 역가, 효능 등), 변경된 특이성(예를 들어, 광범위한 생물학적 활성 스펙트럼), 감소된 항원성을 획득하기 위하여, 상기 리그닌 과산화효소의 N- 또는 C-말단에 보호기가 결합되어 있을 수 있다. 상기 보호기는 아세틸기, 플루오레닐 메톡시 카르보닐기, 포르밀기, 팔미토일기, 미리스틸기, 스테아릴기 또는 폴리에틸렌글리콜(PEG)일 수 있으나, 상기 리그닌 과산화효소의 개질, 특히 리그닌 과산화효소의 안정성 증진시킬 수 있는 성분이라면, 제한없이 포함할 수 있다.
- [0018] 상기 용어 "안정성"은 생체 내 단백질 절단효소의 공격으로부터 상기 리그닌 과산화효소를 보호하는 인 비보(in vivo) 안정성 뿐만 아니라, 저장 안정성(예컨대, 상온 저장 안정성)도 의미하는 것일 수 있다.
- [0019] 아울러, 상기 리그닌 과산화효소는 표적화 서열, 태그(tag), 표지된 잔기를 위한 특정 목적으로 제조된 아미노산 서열도 추가적으로 포함할 수 있다.
- [0020] 상기 리그닌 과산화효소의 조성물 내 농도는 0.04 U/ml 내지 0.08 U/ml, 0.05 U/ml 내지 0.08 U/ml, 0.04 U/ml 내지 0.07 U/ml, 0.05 U/ml 내지 0.07 U/ml일 수 있다.
- [0021] 또한, 상기 조성물은 베라트릴 알코올(Veratryl Alcohol) 및 과산화수소(H_2O_2)를 더 포함할 수 있다.
- [0022] 상기 베라트릴 알코올의 조성물 내 농도는 1 mM 내지 3 mM, 1 mM 내지 2.5 mM, 1.5 mM 내지 3 mM, 1.5 mM 내지

2.5 mM, 1.75 mM 내지 3 mM, 1.75 mM 내지 2.5 mM, 1.75 mM 내지 2.25 mM, 1.5 mM 내지 2.25 mM, 1 mM 내지 2.25 mM일 수 있다.

[0023] 상기 과산화수소의 조성물 내 농도는 200 μ M 내지 300 μ M, 200 μ M 내지 275 μ M, 225 μ M 내지 300 μ M, 225 μ M 내지 275 μ M, 240 μ M 내지 300 μ M, 240 μ M 내지 275 μ M, 240 μ M 내지 260 μ M, 200 μ M 내지 260 μ M, 225 μ M 내지 260 μ M일 수 있다.

[0024] 상기 과산화수소의 조성물 내 농도가 200 μ M 미만인 경우, 리그닌 과산화효소의 비활성이 떨어짐에 따라 멜라닌 탈색 효율이 좋지 않을 수 있고, 상기 과산화수소의 조성물 내 농도가 300 μ M 초과인 경우, 리그닌 과산화효소의 비활성은 우수할 수 있으나, 멜라닌 탈색 효율이 좋지 않을 수 있다.

[0025] 또한, 상기 조성물의 pH는 3.5 내지 4.5, 3.5 내지 4.25, 3.75 내지 4.5, 3.75 내지 4.25, 3.9 내지 4.5, 3.9 내지 4.25, 3.9 내지 4.1, 3.5 내지 4.1, 3.75 내지 4.1일 수 있다.

[0026] 상기 조성물의 pH가 3.5 미만인 경우, 리그닌 과산화효소의 비활성(specific activity)은 우수할 수 있으나, 베라트리알코올 양이온 라디칼이 멜라닌과 접하지 못하며, 리그닌 과산화효소와 멜라닌이 결합되어 침전되어 멜라닌의 탈색효율이 좋지 않을 수 있다. 또한, 상기 조성물의 pH가 4.5 초과하는 경우, 리그닌 과산화효소의 비활성이 매우 떨어짐에 따라 멜라닌 탈색 효율이 좋지 않을 수 있다.

[0027] 또한, 상기 조성물은 포도당 산화효소(Glucose Oxidase)를 더 포함할 수 있다.

[0028] 상기 포도당 산화효소는 포도당 및 산소가 반응하여 글루콘산 및 과산화수소가 생성되는 반응을 촉매하며, 생성된 과산화수소는 상기 리그닌 과산화효소가 촉매하는 베라트리알코올과의 반응에 사용될 수 있다. 이 때, 포도당 및 산소의 반응을 촉매하는 포도당 산화효소를 이용한 과산화수소의 생성은 리그닌 과산화효소에 저농도로 연속적으로 공급될 수 있어, 멜라닌 탈색 효율이 매우 우수하고, 이에 따라 상기 조성물의 피부 미백 효과가 더욱 우수해질 수 있다.

[0029] 상기 포도당 산화효소는 천연으로부터 유래될 수도 있고, 당해 분야에서 널리 공지된 다양한 단백질 합성 방법으로 획득할 수 있다. 일례로서, 폴리뉴클레오타이드 재조합과 단백질 발현 시스템을 이용하여 제조하거나 단백질 합성과 같은 화학적 합성을 통하여 시험관 내에서 합성하는 방법 및 무세포 단백질 합성법 등으로 제조될 수 있다. 또한, 일례로서, 상기 포도당 산화효소는 펩티드, 식물 유래 조직이나 세포의 추출물, 미생물(예를 들어 세균류 또는 진균류, 그리고 특히 효모)의 배양으로 얻어진 생산물일 수 있다.

[0030] 상기 포도당 산화효소는 포도당 산화효소의 아미노산 서열과 각각 약 70% 이상, 약 75% 이상, 약 80% 이상, 약 85% 이상, 약 90% 이상, 약 92% 이상, 약 95% 이상, 약 97% 이상, 약 98% 이상, 또는 약 99% 이상의 서열 상동성을 갖는 단백질을 포함할 수 있다. 구체적으로 상기 포도당 산화효소는 검정곰팡이(*Aspergillus niger*) 유래 포도당 산화 효소(Glucose Oxidase: GOx)일 수 있고, 보다 구체적으로 서열번호 2의 아미노산 서열로 이루어진 단백질일 수 있다.

[0031] 또한, 보다 나은 화학적 안정성, 강화된 약리 특성(반감기, 흡수성, 역가, 효능 등), 변경된 특이성(예를 들어, 광범위한 생물학적 활성 스펙트럼), 감소된 항원성을 획득하기 위하여, 상기 포도당 산화효소의 N- 또는 C-말단에 보호기가 결합되어 있을 수 있다. 상기 보호기는 아세틸기, 플루오레닐 메톡시 카르보닐기, 포르밀기, 팔미토일기, 미리스틸기, 스테아릴기 또는 폴리에틸렌글리콜(PEG)일 수 있으나, 상기 포도당 산화효소의 개질, 특히 포도당 산화효소의 안정성 증진시킬 수 있는 성분이라면, 제한없이 포함할 수 있다.

[0032] 상기 용어 "안정성"은 생체 내 단백질 절단효소의 공격으로부터 상기 포도당 산화효소를 보호하는 인 비보(in vivo) 안정성 뿐만 아니라, 저장 안정성(예컨대, 상온 저장 안정성)도 의미하는 것일 수 있다.

[0033] 아울러, 상기 포도당 산화효소는 표적화 서열, 태그(tag), 표지된 잔기를 위한 특정 목적으로 제조된 아미노산 서열도 추가적으로 포함할 수 있다.

[0034] 상기 포도당 산화효소의 조성물 내 농도는 0.2 U/ml 내지 0.3 U/ml, 0.2 U/ml 내지 0.275 U/ml, 0.225 U/ml 내지 0.3 U/ml, 0.225 U/ml 내지 0.275 U/ml, 0.24 U/ml 내지 0.3 U/ml, 0.24 U/ml 내지 0.275 U/ml, 0.24 U/ml 내지 0.26 U/ml, 0.2 U/ml 내지 0.26 U/ml, 0.225 U/ml 내지 0.26 U/ml일 수 있다. 상기 포도당 산화 효소의 범위 내에서 멜라닌 탈색 효율이 우수할 수 있다.

[0035] 또한, 상기 포도당은 조성물이 적용될 개체 내 존재하거나 개체 내에서 발생하는 포도당일 수 있으나, 조성물에 포함될 수도 있다.

- [0036] 용어 "개체"란 멜라닌을 보유할 수 있는 인간을 포함한 쥐, 생쥐, 가축, 세포 등의 모든 생물을 의미한다. 구체적인 예로, 인간을 포함한 포유동물일 수 있고, 인 비보(in vivo) 뿐만 아니라 인 비트로(in vitro)의 상태도 포함한다.
- [0037] 상기 포도당이 조성물에 포함되어 있는 경우, 조성물 내 농도는 100 mM 내지 500 mM, 100 mM 내지 400 mM, 200 mM 내지 500 mM, 200 mM 내지 400 mM, 100 mM 내지 350 mM, 200 mM 내지 350 mM, 250 mM 내지 350 mM, 250 mM 내지 500 mM, 250 mM 내지 400 mM일 수 있다. 상기 포도당의 농도 범위 내에서 멜라닌 탈색 효율이 우수할 수 있다.
- [0038] 또한, 상기 조성물은 상기 포도당 과산화효소에 추가적으로 산소(O_2)를 더 포함할 수 있다. 상기 조성물의 포도당 및 포도당 산화효소는 공기 중 또는 외부의 산소와 반응하여 과산화수소를 생산할 수 있으며, 조성물 내 산소와 반응하여 과산화수소를 생산할 수도 있다.
- [0039] 또한, 상기 화장료 조성물은 화장료 조성물에 통상적으로 첨가되는 성분, 예컨대 향산화제, 안정화제, 가용화제, 비타민, 안료 및 향료와 같은 통상적인 보조제 및 담체를 추가적으로 포함할 수 있다.
- [0040] 상기 화장료 조성물은 당업계에서 통상적으로 제조되는 어떠한 제형으로도 제조될 수 있으며, 예를 들어, 용액, 현탁액, 유탁액, 페이스트, 젤, 크림, 로션, 파우더, 비누, 계면활성제-함유 클린싱, 오일, 분말 파운데이션, 유탁액 파운데이션, 왁스 파운데이션 및 스프레이 등으로 제형화될 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다. 보다 상세하게는, 유연 화장수 또는 영양 화장수 등과 같은 화장수, 웨이셜 로션, 바디로션 등과 같은 유액, 영양 크림, 수분 크림, 아이 크림 등과 같은 크림, 에센스, 화장연고, 스프레이, 젤, 팩, 선 스크린, 메이크업 베이스, 액체 타입, 고체 타입 또는 스프레이 타입 등의 파운데이션, 파우더 등의 제형으로 제조될 수 있다. 이 경우 상기 화장료 조성물은 유화제, 비누산, 용매, 착색제, 보존제, 향산화제, 소포제, 향균제, 향재침착제, 효소, 식물 또는 미네랄 오일, 지방, 형광물질, 살진균제, 굴수성 유발물질, 보습제, 방향제, 방향제 담체, 보존제, 단백질, 실리콘, 용해화제, 당 유도체, 일광차단제, 비타민, 식물 추출물, 왁스 등을 포함하는 부형제를 함유할 수 있다.
- [0041] 상기 화장료 조성물의 제형이 페이스트, 크림 또는 젤인 경우에는 담체 성분으로서 동물성유, 식물성유, 왁스, 파라핀, 진분, 트라가칸트, 셀룰로오스 유도체, 폴리에틸렌 글리콜, 실리콘, 벤토나이트, 실리카, 탈크 또는 산화아연 등이 이용될 수 있다.
- [0042] 상기 화장료 조성물의 제형이 파우더 또는 스프레이인 경우에는 담체 성분으로서 토스, 탈크, 실리카, 알루미늄 히드록시드, 칼슘 실리케이트 또는 폴리아미드 파우더가 이용될 수 있고, 특히 스프레이인 경우에는 추가적으로 클로로플루오로히드로카본, 프로판/부탄 또는 디메틸 에테르와 같은 추진체를 포함할 수 있다.
- [0043] 상기 화장료 조성물의 제형이 용액 또는 유탁액인 경우에는 담체 성분으로서 용매, 가용화제 또는 유탁화제가 이용되고, 예컨대 물, 에탄올, 이소프로판올, 에틸 카보네이트, 에틸 아세테이트, 벤질 알코올, 벤질 벤조에이트, 프로필렌글리콜, 1,3-부틸글리콜 오일, 글리세롤 지방족 에스테르, 폴리에틸렌 글리콜 또는 소르비탄의 지방산 에스테르가 있다.
- [0044] 상기 화장료 조성물의 제형이 현탁액인 경우에는 담체 성분으로서 물, 에탄올 또는 프로필렌 글리콜과 같은 액상의 희석제, 에톡실화 이소스테아릴 알코올, 폴리옥시에틸렌 소르비톨 에스테르 및 폴리옥시에틸렌 소르비탄 에스테르와 같은 현탁제, 미소결정성 셀룰로오스, 알루미늄 메타히드록시드, 벤토나이트, 아가 또는 트라가칸트 등이 이용될 수 있다.
- [0045] 다른 양상은 개체의 피부에 상기 조성물을 적용하는 단계를 포함하는 피부 내 멜라닌의 탈색 방법을 제공한다.
- [0046] 용어 "적용"은 손가락, 브러쉬, 스킨치, 패드, 스프레이, 스폰지, 면봉, 롤-온(roll-on) 등에 의한 적용과 같이, 개체의 피부에 투여 또는 도포하는 방법을 포함한다. 해당 분야의 통상의 기술자는 적용하는 적절한 방법을 용이하게 결정할 수 있다.
- [0047] 상기 조성물은 전술한 범위 내의 조성물일 수 있으며, 상기 조성물을 적용을 통해 전술한 바와 같이 피부 내 멜라닌의 탈색을 통해 적용된 개체의 피부 미백 효과를 달성할 수 있다.
- [0048] 또 다른 양상은 개체의 피부에 리그닌 과산화효소, 베라트릴 알코올 및 과산화수소를 적용하는 단계를 포함하는 피부 내 멜라닌의 탈색 방법을 제공한다.
- [0049] 상기 "리그닌 과산화효소", "베라트릴 알코올", "과산화수소" 등은 전술한 범위 내일 수 있다.

- [0050] 상기 피부 내 멜라닌의 탈색 방법에 있어서, 상기 과산화수소의 적용은 80 μ M 내지 300 μ M의 과산화수소 용액을 적용하는 것일 수 있다.
- [0051] 상기 과산화수소 용액은 용질로서 과산화수소를 포함하고 있는 용액을 의미하며, 상기 용액의 용매에는 제한되지 않으나, 예를 들어, 물일 수 있고, 구체적으로 증류수일 수 있고, 보다 구체적으로 3차 증류수일 수 있다.
- [0052] 상기 과산화수소 용액의 농도는 80 μ M 내지 300 μ M, 100 μ M 내지 300 μ M, 80 μ M 내지 250 μ M, 100 μ M 내지 250 μ M, 80 μ M 내지 200 μ M, 100 μ M 내지 200 μ M, 150 μ M 내지 200 μ M, 150 μ M 내지 300 μ M, 150 μ M 내지 250 μ M일 수 있다.
- [0053] 또한, 상기 피부 내 멜라닌의 탈색 방법에 있어서, 상기 과산화수소의 적용은 과산화수소 용액을 1분 내지 90분의 간격으로 적용하는 것일 수 있고, 구체적으로 1분 내지 90분, 5분 내지 90분, 1분 내지 60분, 5분 내지 60분, 1분 내지 30분, 5분 내지 30분, 10분 내지 30분, 10분 내지 90분, 10분 내지 60분의 간격으로 이루어지는 것일 수 있다.
- [0054] 또한, 상기 피부 내 멜라닌의 탈색 방법에 있어서, 상기 과산화수소의 적용은 상기 과산화수소의 적용은 과산화수소 용액을 1회 내지 30회로 적용하는 것일 수 있고, 구체적으로 1회 내지 30회, 1회 내지 25회, 5회 내지 30회, 5회 내지 25회, 1회 내지 20회, 5회 내지 20회, 10회 내지 20회, 10회 내지 30회, 10회 내지 25회로 적용되는 것일 수 있다.
- [0055] 전술한 바와 같이 리그닌 과산화효소는 베라트리알 알코올 및 과산화수소가 반응하여 베라트리알 알코올 양이온 라디칼 및 물을 생성시키는 반응을 촉매한다. 상기 베라트리알 알코올 양이온 라디칼은 피부 내 멜라닌과 작용하여 멜라닌을 탈색시킬 수 있다. 이를 통해 적용된 개체의 피부 미백 효과를 달성할 수 있다.

발명의 효과

- [0056] 리그닌 과산화효소(Lignin Peroxidase)를 포함하는 피부 미백용 화장품 조성물은 피부 부작용이 매우 적으며, 멜라닌을 선택적으로 탈색할 뿐만 아니라 멜라닌 탈색 효율이 우수하다. 나아가, 포도당 산화효소를 포함하는 조성물의 경우, 저농도의 과산화수소의 연속적인 공급을 통해 멜라닌의 탈색 효율이 더욱 증진되므로, 상기 조성물을 피부 미백용도로 이용할 수 있다.
- [0057] 또한, 상기 조성물을 이용한 피부 내 멜라닌의 탈색 방법 또한, 멜라닌을 선택적으로 탈색시키며, 그 효율이 우수하여 적용된 개체의 피부 미백 효과를 달성할 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0058] 도 1은 리그닌 과산화효소에 의한 멜라닌 탈색의 기전 설명에 관한 것으로, (a)는 산화 환원 매개체인 VA 양이온 라디칼을 이용하여 리그닌 과산화효소가 촉매 작용을 하는 멜라닌 탈색 기전을 나타낸 도이고, (b)는 포도당 산화 효소에 의해 발생된 H_2O_2 로 리그닌 과산화효소 촉매 멜라닌 탈색 기전을 나타낸 도이다.
- 도 2는 veratryl alcohol을 이용한 pH 의존적 멜라닌 탈색 효율 및 LiPH8의 특이적 활성을 나타낸 도이다.
- 도 3은 veratryl alcohol에 대한 멜라닌의 탈색 효율과 LiPH8의 활성에 미치는 H_2O_2 농도의 영향을 나타낸 도이다.
- 도 4는 간헐적으로 H_2O_2 를 첨가하여 일어나는 멜라닌 탈색 반응을 나타낸 도이다.
- 도 5는 GO_x 와 함께 촉매된 LiPH에 의한 시간에 따른 멜라닌 탈색 효율을 나타낸 도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0059] 이하 본 발명을 실시예를 통하여 보다 상세하게 설명한다. 그러나, 이들 실시예는 본 발명을 예시적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.
- [0060] **실시예**
- [0061] **실시예 1. 제조합 리그닌 과산화효소의 생산 및 분리 정제**
- [0062] 백색부후균(*Phanerochaete chrysosporium*) 유래 리그닌 과산화효소 동질효소 H8(Lignin Peroxidase isozyme

H8: LiPH8, 서열번호 1)를 암호화하는 합성 유전자는 Bioneer 회사(한국)을 통해 준비하였다(유전자 및 단백질의 염기 서열은 UniPortKB entry: P06181에 나타나 있음). 리폴딩 및 정제 방법은 이전에 발표된 논문을 준용하였다(W.A. Doyle, A.T. Smith, Expression of lignin peroxidase H8 in Escherichia coli: folding and activation of the recombinant enzyme with Ca^{2+} and haem, Biochem J 315(1) (1996) 15-19.).

[0063] **실시예 2. 리그닌 과산화효소 활성화에 대한 최적 pH 조건의 결정**

[0064] 리그닌 과산화효소는 베라트리알 알코올(Veratryl Alcohol: VA)를 VA 양이온 라디칼($\text{VA}^{\cdot+}$)로 산화시키고, 이는 멜라닌을 탈색시키는 산화 환원 매개체로서 작용한다(도 1(a)). VA는 백색부후균류에서 생산된 천연 화합물로서, 합성 매개체보다 잠재적인 부작용이 적으므로, VA를 이용하는 리그닌 과산화효소를 사용하였고, 본 실시예에서는 멜라닌의 LiPH8 촉매 탈색에 대한 pH 효과를 조사하였다.

[0065] 구체적으로, 멜라닌의 탈색은 50 mg/L 합성 멜라닌, 2 mM veratryl alcohol, 250 μM H_2O_2 및 0.06 U/ml LiPH8 BR 완충액에서 1시간 동안 수행하였고, 효소의 활성화는 2 mM veratryl alcohol, BR 완충액 내 250 μM H_2O_2 를 사용하여 측정하였다.

[0066] 그 결과, LiPH8은 도 2에 나타난 바와 같이 산성 조건(pH 3.0) 하에서 VA에 대해 가장 높은 비활성(specific activity)을 나타내었다. 그러나 pH 3 완충액에서 멜라닌 탈색이 일어나지 않고, 멜라닌 침전이 나타났다. 또한, 이러한 멜라닌 침전물의 형성은 효소가 첨가됨으로써 가속화되었다. 이는 고체 멜라닌과 효소 사이의 복합체 형성이 일어났다는 것을 의미한다. 따라서, 멜라닌의 적절한 탈색을 위해서는 멜라닌과 산화 환원 매개체 사이의 직접적인 접촉이 중요한 것을 알 수 있었다. 산화 환원 매개체인 VA 양이온 라디칼은 매우 짧은 수명을 갖기 때문에 멜라닌과 VA 양이온 라디칼 사이의 직접적인 접촉이 없으면 멜라닌의 탈색이 이루어지지 않는다는 것을 알 수 있었다.

[0067] 또한, pH 4.0에서 LiPH8은 1시간 내에 30% 이상의 가장 높은 멜라닌 탈색 효율을 나타냈고, LiPH8은 pH 5.0 및 6.0에서 멜라닌 탈색 효율이 감소한 반면, LiPH8의 비활성은 pH 4.0에 비해 현저하게 감소된 것을 확인할 수 있었다. 결론적으로, LiPH8의 멜라닌 탈색 효율은 pH 4.0에서 가장 높다는 것을 알 수 있었고, 이후의 모든 멜라닌 탈색 반응은 pH 4.0 완충액에서 수행하였다.

[0068] **실시예 3. 최적의 과산화수소 농도 및 주입 방식의 결정**

[0069] 도 1(a)에 나타난 바와 같이 리그닌 과산화효소는 VA와 과산화수소가 반응하여 물과 VA 양이온 라디칼로 생성되는 반응을 촉매한다. 따라서, 리그닌 과산화효소의 멜라닌 탈색 반응은 과산화수소를 필요로 하나, 리그닌 과산화효소는 헴 구조의 과열 또는 비활성 compound III의 형성을 통해 과도한 농도의 H_2O_2 에 의하여 쉽게 불활성화되기도 한다. 이에, 본 실시예는 멜라닌 탈색 반응의 높은 효율을 얻기 위한 리그닌 과산화효소의 기질인 과산화수소의 최적의 농도를 파악하기 위해 수행되었다.

[0070] 구체적으로, 멜라닌의 탈색은 50 mg/L 합성 멜라닌, 2 mM veratryl alcohol 및 0.06 U/ml LiPH8 BR 완충액(pH 4.0)에서 1시간 동안 수행하였고, 효소의 활성화는 BR 완충액(pH 3.0) 내 2 mM veratryl alcohol로 측정하였다.

[0071] 그 결과, 비록 H_2O_2 가 멜라닌 탈색 동안 최종 전자 수용체로서 필수적인 기질임에도 불구하고, 멜라닌 탈색 효율은 H_2O_2 농도가 증가함에 따라 점차적으로 감소하며, 250 μM H_2O_2 에서 30% 이상의 최고 수준에 근접했다. 그러나, VA에 대한 초기 비활성은 H_2O_2 농도가 높을수록 꾸준히 증가하였다(도 3).

[0072] 이는 H_2O_2 가 단기간의 효소활성도(1분 이내)에는 중요한 기질이나, 장기간 반응 시(1시간 이내)에는 도리어 효소의 활성을 억제하였다는 것을 의미한다. 높은 멜라닌 탈색 효율을 위해서는 역설적으로 동시에 효소의 억제제로 작용할 수 있음에도 불구하고 높은 농도의 H_2O_2 가 필요하므로, 전체 멜라닌 탈색 효율을 향상시키는 저농도의 H_2O_2 의 연속적인 공급을 생각할 수 있었다.

[0073] 지속적인 H_2O_2 공급에 의한 낮은 수준의 H_2O_2 유지가 멜라닌 탈색 효율을 향상시킬 수 있는지 확인하기 위해 H_2O_2 의 간헐적 첨가를 수행하였다. 도 3에 도시된 결과에 기초하여, LiPH8을 불활성화시킬 수 있는 H_2O_2 의 임계 농도는 300 내지 350 μM 으로 가정하였다. 구체적으로, 멜라닌의 탈색은 pH 4.0의 BR 완충액에서 합성 멜라닌 50 mg/L, veratryl alcohol 2 mM 및 LiPH8 0.06 U/ml로 수행하였다.

[0074] 총 H_2O_2 를 1시간 내에 60, 30, 20, 15 및 12 분 간격으로 균등하게 나누어 공급하였는데, 이는 구체적으로 총 반응 부피 2 ml 기준으로, 과산화수소 용액이 총 10 μ l 공급되었다. 과산화수소 용액은 30% 과산화수소 (9.8 M)를 3차 증류수에 희석해서 사용하였다. 과산화수소 용액은 3차 증류수에 반응 농도의 200배 (1200 μ M의 경우 240 mM)로 준비하였다. 1회당 공급되는 과산화수소의 부피는 공급 시간 간격마다 다른데, 60분 간격의 경우 1회 공급되므로 1회당 10 μ l, 30분 간격의 경우 2회 공급되므로 1회당 5 μ l, 20분 간격의 경우 3회 공급되므로 1회당 3.33 μ l, 15분 간격의 경우 4회 공급되므로 1회당 2.5 μ l, 12분 간격의 경우 5회 공급되므로 1회당 2 μ l 씩 공급하였다.

[0075] 그 결과, H_2O_2 농도가 1400 μ M이고 시간 간격이 12분인 경우, 순간 H_2O_2 농도가 280 μ M에 불과 함에도 불구하고 억제 효과가 관찰되었다(도 4). 본 실시예에서 첨가된 LiPH8은 12분 이내에 280 μ M의 H_2O_2 를 소비하기에 충분하지 않았을 것으로 생각되었다. 그럼에도 불구하고 멜라닌 탈색 효율은 약 1000 μ M 및 1200 μ M H_2O_2 에서 포화되어 70%에 다다랐기 때문에 12분당 280 μ M의 H_2O_2 를 소비할지라도 더 많은 효소를 첨가하는 것은 효율적이지 않았다. 이를 제외하고는 300 μ M 미만의 H_2O_2 의 순간 농도는 멜라닌 탈색에 대한 어떠한 억제 효과도 나타내지 않았다.

[0076] 이는 과도한 H_2O_2 로 인한 LiPH8의 불활성화를 억제함으로써 멜라닌 색소 탈색을 개선시키는데 일정 시간 간격으로 H_2O_2 를 간헐적으로 공급하는 것이 매우 효과적이라는 것을 나타내었다. 그러나 미백용 화장품의 경우, 시간 간격에 따라 간헐적으로 H_2O_2 를 공급하는 것이 거의 불가능하며, 이는 LiPH8에 대해 저농도의 H_2O_2 를 동시에 연속적으로 생성할 필요가 있음을 의미한다.

[0077] **실시예 4. 포도당 산화효소(Glucose Oxidase:GOx)에 의한 과산화수소 생산을 위한 최적 포도당 산화효소 활성 결정**

[0078] 본 실시예에서는 연속적인 저농도의 H_2O_2 의 in-situ 생성을 위해 분자 O_2 를 사용하여 β -D-포도당의 산화를 촉매하여 D-글루콘산과 H_2O_2 를 생산하는 검정곰팡이(*Aspergillus niger*) 유래 포도당 산화 효소(Glucose Oxidase:GOx, Sigma Aldrich, #G6766, 서열번호 2)(유전자 및 단백질의 염기 서열은 UniPortKB entry: P13006에 나타나 있음)를 사용하였다. 생성된 H_2O_2 는 전자 수용체로서 멜라닌을 탈색시키기 위해 리그닌 과산화효소에 의해 이용되었다(도 1(b)).

[0079] 구체적으로, 멜라닌의 탈색은 pH 4.0의 BR 완충액에서 합성 멜라닌 50 mg/L, veratryl alcohol 2 mM, LiPH8 0.06 U/ml로 수행하였다.

[0080] 그 결과, GOx는 또한 pH 4.0 ~ 7.0에서 활성을 유지했는데, 이는 pH 4.0에서 멜라닌 탈색에 적용 가능하다는 것을 의미한다. 필요한 GOx의 최적 양은 표 1에 나타난 바와 같이 다양한 GOx 단위로 멜라닌 탈색 효율에 의해 결정하였다. GOx의 단위가 증가함에 따라 탈색 효율이 비례하여 증가했다. 그러나, GOx의 첨가없이, LiPH8은 멜라닌 탈색에 대한 어떠한 활성도 나타내지 않았다(표 1). 이러한 결과는 GOx가 LiPH8 촉매 멜라닌 탈색에 필수적인 H_2O_2 를 공급하고 있다는 것을 분명하게 나타낸다.

표 1

Glucose oxidase Unit (U/ml)	Melanin decolorization efficiency (%)
0	0
0.03	31.94 $\pm$ 0.42
0.06	49.70 $\pm$ 0.63
0.12	57.01 $\pm$ 2.96
0.24	63.43 $\pm$ 1.06

[0082] **실시예 5. 포도당 산화효소에 의한 과산화수소 생산을 위한 최적 포도당 농도 결정**

[0083] 생성된 H_2O_2 의 양은 고정된 GOx 농도에 의해 사용된 포도당 농도에 의존하기 때문에 본 실시예에서는 멜라닌 탈색을 초기 포도당 농도를 변화시키면서 수행하였고, 구체적으로 멜라닌의 탈색은 pH 4.0의 BR 완충액에서 합성 멜라닌 50 mg/L, veratryl alcohol 2 mM, LiPH8 0.06 U/ml 및 0.24 U/ml 포도당 산화 효소로 수행하였다.

또한, 고농도의 포도당이 과산화수소를 고농도로 생성할 수 있으므로, 포도당 농도를 0 내지 300 mM까지 테스트하였다. 구입한 포도당 산화효소의 특성 중 Km 수치가 30 ~ 100 mM이었고, 일반적으로 Km 수치의 3배 만큼 기질을 넣으면 최대 활성이 유지되는 것으로 알려져 있어, 최대치인 300 mM까지 테스트하였다.

[0084] 그 결과, 포도당의 농도가 증가함에 따라 멜라닌 탈색 효율이 증가하였고, 약 100 mM의 포도당 농도에서 포화된 것으로 나타났다(표 2). 그러나 1 mM 미만의 매우 낮은 포도당 농도에서 멜라닌 색소 제거 효율은 음의 값을 나타내었고, 이는 멜라닌 색소의 색이 멜라닌의 불충분한 산화로 인해 진하게 되었음을 의미한다. 또한, 최적 GOx 농도는 0.24 U/ml였고(표 1), 최적의 포도당 농도는 100 mM 내지 300 mM임을 알 수 있었다(표 2). 이는 충분한 양의 GOx와 포도당이 멜라닌 탈색에서 다른 영향을 일으키지 않았기 때문이다.

표 2

Glucose concentration (mM)	Melanin decolorization efficiency (%)
0	0
0.1	-2.35 ± 0.44
0.5	-0.78 ± 0.44
1	-0.78 ± 0.44
5	21.35 ± 1.11
10	47.10 ± 0.67
20	57.30 ± 0.44
100	62.48 ± 0.22
300	62.17 ± 4.22

[0086] 실시예 6. 포도당 산화효소 및 재조합 리그닌 과산화효소 이용 반응시간에 따른 멜라닌 탈색

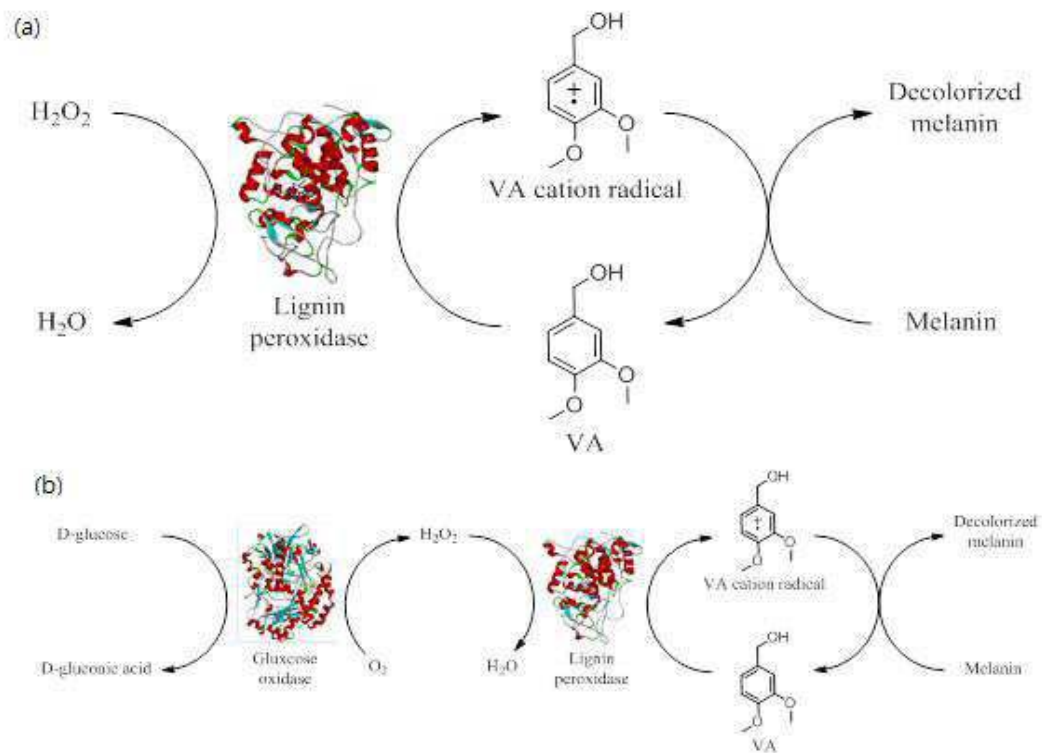
[0087] 본 실시예에서는 멜라닌 탈색을 위한 최적의 포도당 산화효소 및 포도당 농도로 멜라닌 탈색을 실시하였다.

[0088] 구체적으로, 멜라닌의 탈색은 pH 4.0의 BR 완충액에서 합성 멜라닌 50 mg/L, veratryl alcohol 2 mM, LiPH8 0.06 U/ml, 300 mM β-D-glucose 및 0.24 U/ml 포도당 산화 효소로 수행하였다.

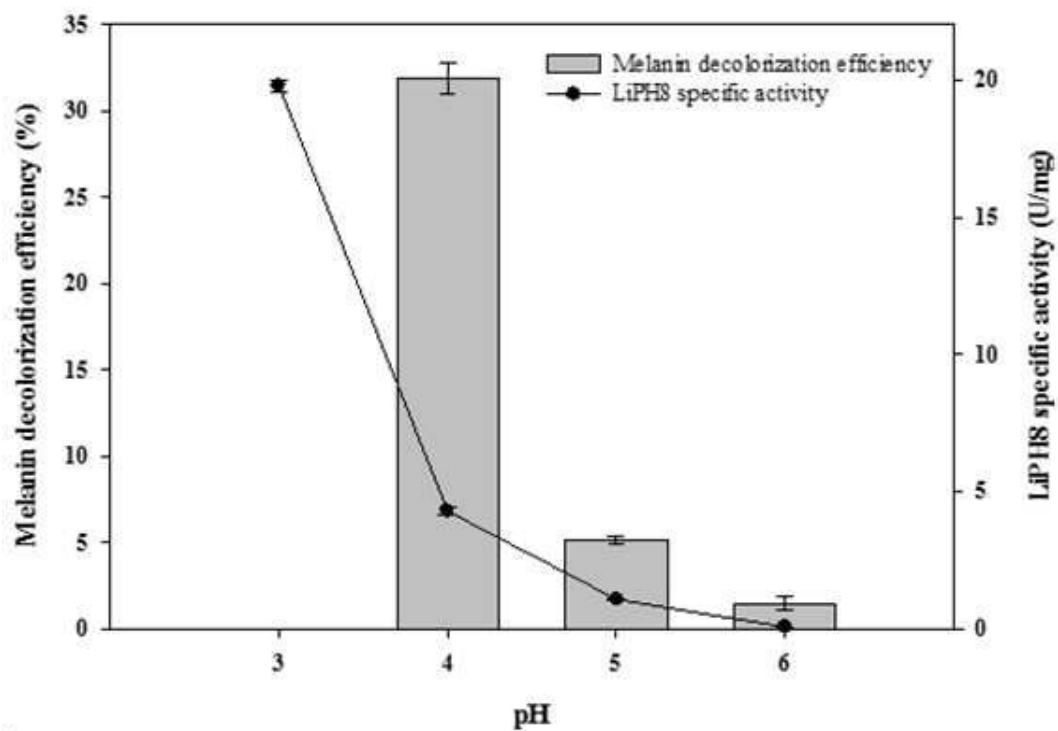
[0089] 그 결과, 멜라닌 탈색 효율은 도 5에서 나타낸 바와 같이 멜라닌 용액의 색이 시간이 지남에 따라 분명히 밝아지며, 점차적으로 증가하였다(도 5의 사진들은 왼쪽에서부터 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60분 후 반응 용액의 사진이다). 총 40%의 멜라닌 색소 제거 효율이 20분 이내에 달성되었으며, 전체 효율은 1시간에 약 60%에 도달했다. 20분 후에 멜라닌 농도가 낮기 때문에 탈색 속도가 느려지더라도 효소는 23시간 후 80%를 달성하기에 충분한 활성을 보였다. 이는 GOx에 의한 H₂O₂의 생성이 LiPH8의 활성을 유지하는데 매우 효과적임을 나타낸다.

도면

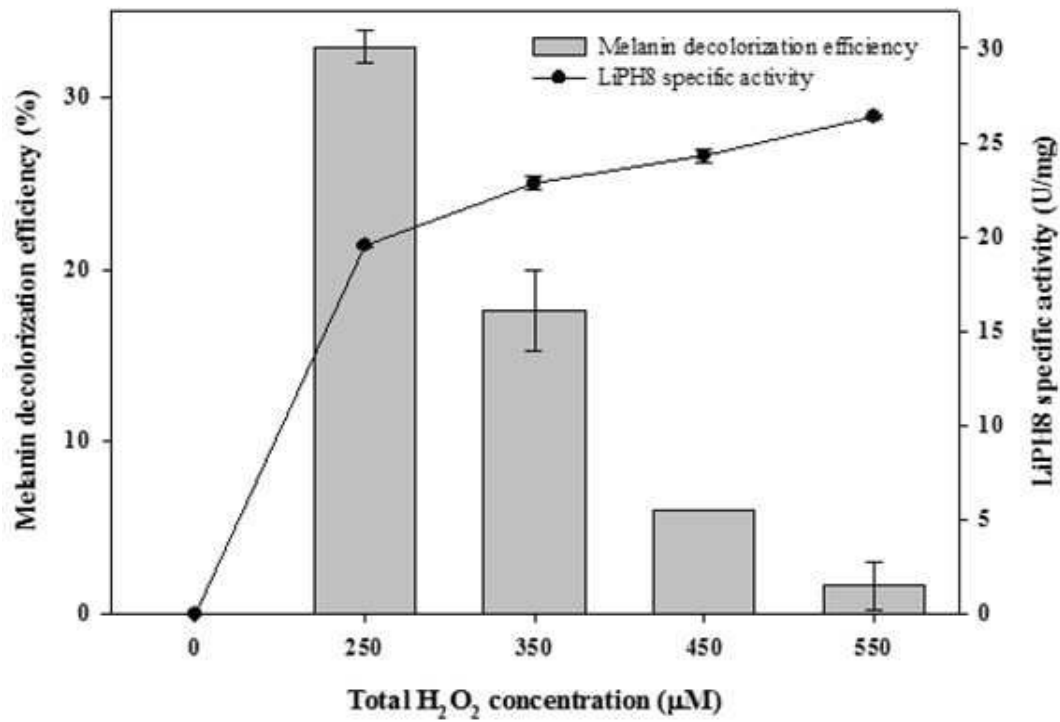
도면1



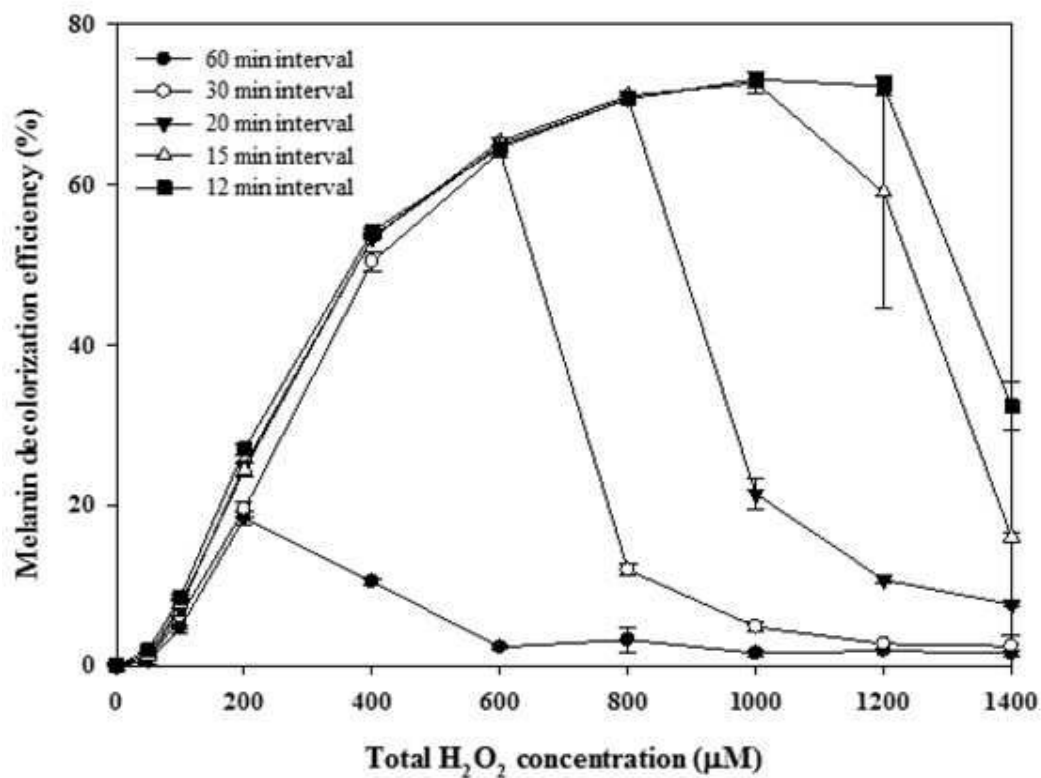
도면2



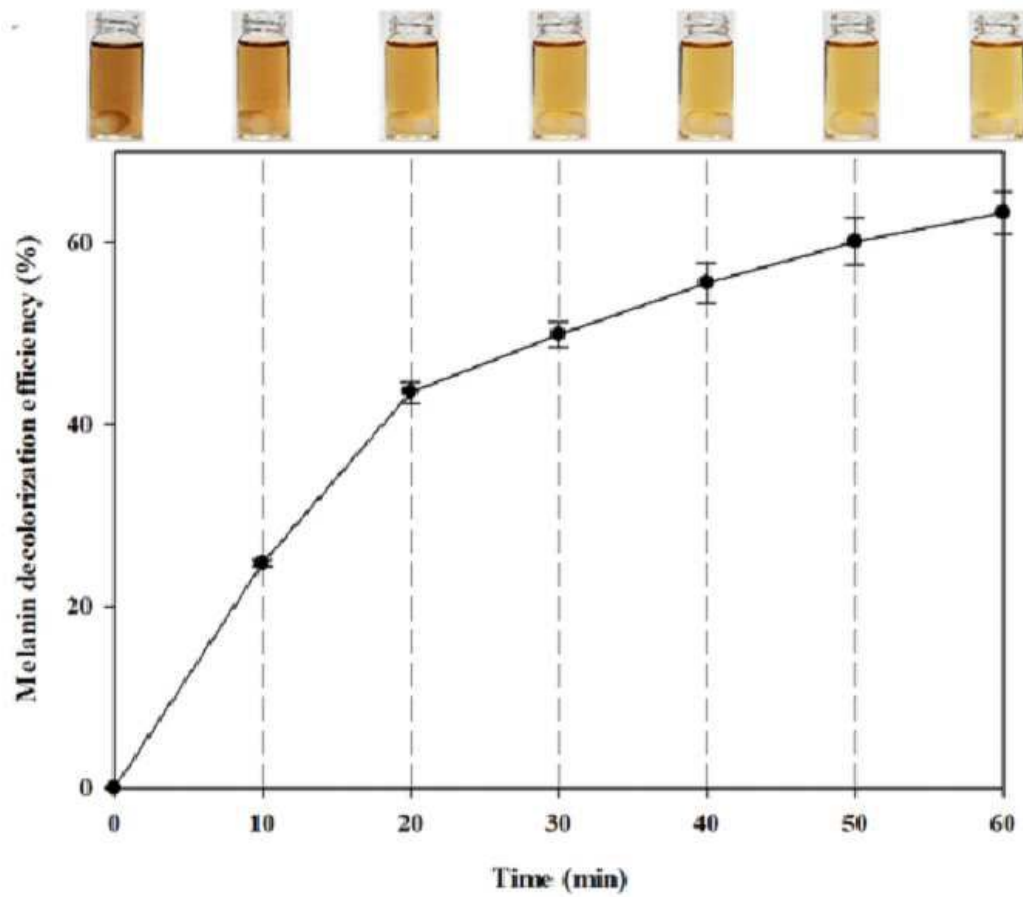
도면3



도면4



도면5



서열 목록

- <110> ULSAN NATIONAL INSTITUTE OF SCIENCE AND TECHNOLOGY
- <120> COSMETIC COMPOSITION FOR SKIN WHITENING COMPRISING LIGNIN
PEROXIDASE AND DECOLORIZING METHOD OF MELANIN IN SKIN USING THE
SAME
- <130> UTP19140KR
- <160> 2
- <170> KoPatent In 3.0
- <210> 1
- <211> 372
- <212> PRT
- <213> Phanerochaete chrysosporium
- <220><221> MISC_FEATURE
- <222> (1)..(372)
- <223> Lignin Peroxidase isozyme H8
- <400> 1

Met Ala Phe Lys Gln Leu Phe Ala Ala Ile Ser Leu Ala Leu Leu Leu

1 5 10 15
Ser Ala Ala Asn Ala Ala Ala Val Ile Glu Lys Arg Ala Thr Cys Ser
20 25 30
Asn Gly Lys Thr Val Gly Asp Ala Ser Cys Cys Ala Trp Phe Asp Val
35 40 45
Leu Asp Asp Ile Gln Gln Asn Leu Phe His Gly Gly Gln Cys Gly Ala
50 55 60
Glu Ala His Glu Ser Ile Arg Leu Val Phe His Asp Ser Ile Ala Ile
65 70 75 80

Ser Pro Ala Met Glu Ala Gln Gly Lys Phe Gly Gly Gly Gly Ala Asp
85 90 95
Gly Ser Ile Met Ile Phe Asp Asp Ile Glu Thr Ala Phe His Pro Asn
100 105 110
Ile Gly Leu Asp Glu Ile Val Lys Leu Gln Lys Pro Phe Val Gln Lys
115 120 125
His Gly Val Thr Pro Gly Asp Phe Ile Ala Phe Ala Gly Arg Val Ala
130 135 140
Leu Ser Asn Cys Pro Gly Ala Pro Gln Met Asn Phe Phe Thr Gly Arg

145 150 155 160
Ala Pro Ala Thr Gln Pro Ala Pro Asp Gly Leu Val Pro Glu Pro Phe
165 170 175
His Thr Val Asp Gln Ile Ile Asn Arg Val Asn Asp Ala Gly Glu Phe
180 185 190
Asp Glu Leu Glu Leu Val Trp Met Leu Ser Ala His Ser Val Ala Ala
195 200 205
Val Asn Asp Val Asp Pro Thr Val Gln Gly Leu Pro Phe Asp Ser Thr
210 215 220

Pro Gly Ile Phe Asp Ser Gln Phe Phe Val Glu Thr Gln Leu Arg Gly
225 230 235 240
Thr Ala Phe Pro Gly Ser Gly Gly Asn Gln Gly Glu Val Glu Ser Pro

245 250 255
 Leu Pro Gly Glu Ile Arg Ile Gln Ser Asp His Thr Ile Ala Arg Asp
 260 265 270
 Ser Arg Thr Ala Cys Glu Trp Gln Ser Phe Val Asn Asn Gln Ser Lys
 275 280 285
 Leu Val Asp Asp Phe Gln Phe Ile Phe Leu Ala Leu Thr Gln Leu Gly

290 295 300
 Gln Asp Pro Asn Ala Met Thr Asp Cys Ser Asp Val Ile Pro Gln Ser
 305 310 315 320
 Lys Pro Ile Pro Gly Asn Leu Pro Phe Ser Phe Phe Pro Ala Gly Lys
 325 330 335
 Thr Ile Lys Asp Val Glu Gln Ala Cys Ala Glu Thr Pro Phe Pro Thr
 340 345 350
 Leu Thr Thr Leu Pro Gly Pro Glu Thr Ser Val Gln Arg Ile Pro Pro
 355 360 365

Pro Pro Gly Ala

370

<210> 2

<211> 605

<212> PRT

<213> Aspergillus niger

<220><221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(605)

<223> Glucose Oxidase

<400> 2

Met Gln Thr Leu Leu Val Ser Ser Leu Val Val Ser Leu Ala Ala Ala

1 5 10 15

Leu Pro His Tyr Ile Arg Ser Asn Gly Ile Glu Ala Ser Leu Leu Thr

20 25 30

Asp Pro Lys Asp Val Ser Gly Arg Thr Val Asp Tyr Ile Ile Ala Gly

35 40 45

Gly Gly Leu Thr Gly Leu Thr Thr Ala Ala Arg Leu Thr Glu Asn Pro

50 55 60
 Asn Ile Ser Val Leu Val Ile Glu Ser Gly Ser Tyr Glu Ser Asp Arg
 65 70 75 80
 Gly Pro Ile Ile Glu Asp Leu Asn Ala Tyr Gly Asp Ile Phe Gly Ser
 85 90 95
 Ser Val Asp His Ala Tyr Glu Thr Val Glu Leu Ala Thr Asn Asn Gln
 100 105 110

 Thr Ala Leu Ile Arg Ser Gly Asn Gly Leu Gly Gly Ser Thr Leu Val
 115 120 125
 Asn Gly Gly Thr Trp Thr Arg Pro His Lys Ala Gln Val Asp Ser Trp
 130 135 140
 Glu Thr Val Phe Gly Asn Glu Gly Trp Asn Trp Asp Asn Val Ala Ala
 145 150 155 160
 Tyr Ser Leu Gln Ala Glu Arg Ala Arg Ala Pro Asn Ala Lys Gln Ile
 165 170 175
 Ala Ala Gly His Tyr Phe Asn Ala Ser Cys His Gly Val Asn Gly Thr

 180 185 190
 Val His Ala Gly Pro Arg Asp Thr Gly Asp Asp Tyr Ser Pro Ile Val
 195 200 205
 Lys Ala Leu Met Ser Ala Val Glu Asp Arg Gly Val Pro Thr Lys Lys
 210 215 220
 Asp Phe Gly Cys Gly Asp Pro His Gly Val Ser Met Phe Pro Asn Thr
 225 230 235 240
 Leu His Glu Asp Gln Val Arg Ser Asp Ala Ala Arg Glu Trp Leu Leu
 245 250 255

 Pro Asn Tyr Gln Arg Pro Asn Leu Gln Val Leu Thr Gly Gln Tyr Val
 260 265 270
 Gly Lys Val Leu Leu Ser Gln Asn Gly Thr Thr Pro Arg Ala Val Gly
 275 280 285
 Val Glu Phe Gly Thr His Lys Gly Asn Thr His Asn Val Tyr Ala Lys
 290 295 300
 His Glu Val Leu Leu Ala Ala Gly Ser Ala Val Ser Pro Thr Ile Leu

305 310 315 320
 Glu Tyr Ser Gly Ile Gly Met Lys Ser Ile Leu Glu Pro Leu Gly Ile

 325 330 335
 Asp Thr Val Val Asp Leu Pro Val Gly Leu Asn Leu Gln Asp Gln Thr
 340 345 350
 Thr Ala Thr Val Arg Ser Arg Ile Thr Ser Ala Gly Ala Gly Gln Gly
 355 360 365
 Gln Ala Ala Trp Phe Ala Thr Phe Asn Glu Thr Phe Gly Asp Tyr Ser
 370 375 380
 Glu Lys Ala His Glu Leu Leu Asn Thr Lys Leu Glu Gln Trp Ala Glu
 385 390 395 400

 Glu Ala Val Ala Arg Gly Gly Phe His Asn Thr Thr Ala Leu Leu Ile
 405 410 415
 Gln Tyr Glu Asn Tyr Arg Asp Trp Ile Val Asn His Asn Val Ala Tyr
 420 425 430
 Ser Glu Leu Phe Leu Asp Thr Ala Gly Val Ala Ser Phe Asp Val Trp
 435 440 445
 Asp Leu Leu Pro Phe Thr Arg Gly Tyr Val His Ile Leu Asp Lys Asp
 450 455 460
 Pro Tyr Leu His His Phe Ala Tyr Asp Pro Gln Tyr Phe Leu Asn Glu

 465 470 475 480
 Leu Asp Leu Leu Gly Gln Ala Ala Ala Thr Gln Leu Ala Arg Asn Ile
 485 490 495
 Ser Asn Ser Gly Ala Met Gln Thr Tyr Phe Ala Gly Glu Thr Ile Pro
 500 505 510
 Gly Asp Asn Leu Ala Tyr Asp Ala Asp Leu Ser Ala Trp Thr Glu Tyr
 515 520 525
 Ile Pro Tyr His Phe Arg Pro Asn Tyr His Gly Val Gly Thr Cys Ser
 530 535 540

 Met Met Pro Lys Glu Met Gly Gly Val Val Asp Asn Ala Ala Arg Val
 545 550 555 560

Tyr	Gly	Val	Gln	Gly	Leu	Arg	Val	Ile	Asp	Gly	Ser	Ile	Pro	Pro	Thr
				565					570				575		
Gln	Met	Ser	Ser	His	Val	Met	Thr	Val	Phe	Tyr	Ala	Met	Ala	Leu	Lys
				580					585				590		
Ile	Ser	Asp	Ala	Ile	Leu	Glu	Asp	Tyr	Ala	Ser	Met	Gln			
				595				600				605			