

(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2021-0000002

(43) 공개일자 2021년01월04일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A61K 8/98 (2006.01) A61Q 19/00 (2006.01)

A61Q 19/02 (2006.01)

(52) CPC특허분류

A61K 8/987 (2013.01)

A61Q 19/00 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2019-0074693

(22) 출원일자 2019년06월24일

심사청구일자 2019년06월24일

(71) 출원인

차의과학대학교 산학협력단

경기도 포천시 해룡로 120, 차의과학대학교내 (동교동)

(72) 발명자

최용수

경기도 군포시 군포로 109, 106동 1301호(대야미동, 군포대야미 이-편한세상)

황정욱

세종특별자치시 금남면 황용1길 28-10

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

제일특허법인(유)

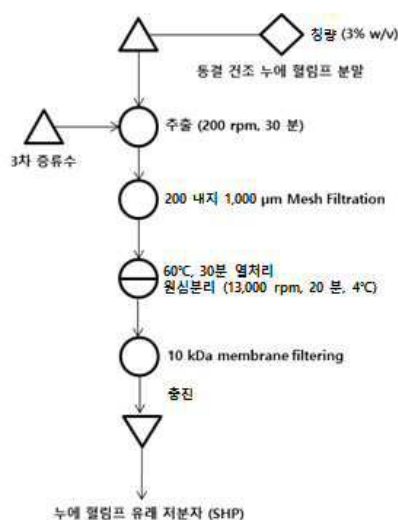
전체 청구항 수 : 총 8 항

(54) 발명의 명칭 누에 혈림프 유래 저분자 물질을 포함하는 화장료 조성물

## (57) 요약

본 발명은 분자량이 10 kDa 미만의 누에 혈림프 유래 저분자 물질을 포함하는 피부 미백 및 항산화용 화장료 조성물에 관한 것이다. 상기 누에 혈림프 유래 저분자 물질은 종래 버려지던 물질을 활용한 것으로 경제성이 우수하고, 피부 안전성이 우수하며, 피부 미백 및 항산화 효과가 우수할 뿐만 아니라, 높은 수율로 생산이 가능하므로 피부 미백 및 항산화용 화장료 조성물로 유용하게 사용될 수 있다.

## 대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

**A61Q 19/02** (2013.01)

**A61K 2800/522** (2013.01)

**A61K 2800/805** (2013.01)

(72) 발명자

**김지광**

경기도 수원시 영통구 효원로 363, 114동 1902호(  
매탄동, 매탄 위브 하늘채)

**최연경**

경기도 용인시 수지구 만현로 95, 172동 1202호(상  
현동, 만현마을 쌍용아파트)

**임현숙**

서울특별시 강남구 영동대로114길 17, 302호(삼성  
동, 아남하이츠빌라)

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

누에 혈림프 유래 저분자 물질을 포함하고,  
상기 누에 혈림프 유래 저분자 물질의 분자량은 10 kDa 미만인 화장료 조성물.

#### 청구항 2

제1항에 있어서,  
상기 저분자 물질의 분자량은 1 kDa 미만인, 화장료 조성물.

#### 청구항 3

제1항에 있어서,  
상기 저분자 물질의 분자량은 258 Da 내지 589 Da인, 화장료 조성물.

#### 청구항 4

제1항에 있어서,  
상기 저분자 물질은, 누에를 동결건조하여 누에 건조물을 제조하는 단계;  
상기 누에 건조물로부터 볼밀을 이용하여 실샘을 제거하고 남은 건조물에서 혈림프를 분리하는 단계;  
상기 분리된 혈림프를 분쇄한 후 분쇄물 중량 기준 1% 내지 5%의 증류수와 혼합한 뒤 100 rpm 내지 300 rpm 조건으로 20분 내지 40분 동안 교반하여 혈림프 용해물을 제조하는 단계;  
상기 혈림프 용해물을 200  $\mu$ m 내지 1,000  $\mu$ m 거름망을 통해 여과시킨 뒤 열처리하고 원심분리하여 상등액을 회수하는 단계; 및  
상기 상등액을 한외여과막(ultrafilter membrane)을 이용하여 누에 혈림프 유래 저분자 물질을 수득하는 단계를 수행하여 수득한, 화장료 조성물.

#### 청구항 5

제4항에 있어서,  
상기 한외여과막은 배제 분자량이 1 kDa 내지 10 kDa인, 화장료 조성물.

#### 청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서,  
상기 화장료 조성물은 향산화 또는 피부 미백용인, 화장료 조성물.

#### 청구항 7

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서,  
상기 화장료 조성물은 화장수, 에센스, 로션, 크림, 팩, 파운데이션, 젤, 연고 및 스프레이로 이루어진 군에서 선택되는 어느 하나의 제형을 갖는, 화장료 조성물.

#### 청구항 8

누에를 동결건조하여 누에 건조물을 제조하는 단계;  
상기 누에 건조물로부터 볼밀을 이용하여 실샘을 제거하고 남은 건조물에서 혈림프를 분리하는 단계;

상기 분리된 혈림프를 분쇄한 후 분쇄물 중량 기준 1% 내지 5%의 증류수와 혼합한 뒤 100 rpm 내지 300 rpm 조건으로 20분 내지 40분 동안 교반하여 혈림프 용해물을 제조하는 단계;

상기 혈림프 용해물을 200  $\mu\text{m}$  내지 1,000  $\mu\text{m}$  거름망을 통해 여과시킨 뒤 열처리하고 원심분리하여 상등액을 회수하는 단계; 및

상기 상등액을 한외여과막(ultrafilter membrane)을 이용하여 누에 혈림프 유래 저분자 물질을 수득하는 단계를 포함하는 누에 혈림프 유래 저분자 물질의 제조 방법.

## 발명의 설명

### 기술 분야

[0001] 본 발명은 분자량이 10 kDa 미만인 누에 혈림프 유래 저분자 물질을 포함하는 화장품 조성물에 관한 것이다.

### 배경 기술

[0002] 피부는 외부 환경과 접촉하여 외부 자극으로부터 신체를 보호하는 가장 기초적인 방어 기관이며, 외적인 아름다움을 표현하는 중요한 기관이다. 사람들의 외부 활동량이 증가함에 따라 태양광선에 장기간 노출되는 경우가 증가하고 있다. 피부가 자외선에 장기간 노출되면 피부노화가 진행되고, 자외선으로부터 피부 내층을 보호하기 위해 생성된 멜라닌 색소로 인해 피부가 검게 변색된다. 현대사회에서 피부를 관리하기 위해 기능성 화장품의 소비가 증가하고 있으며, 백옥같이 하얗고 깨끗하면서, 젊고 탄력이 있는 피부에 대한 요구가 증가하고 있기 때문에, 미백효과와 노화방지 효과가 우수한 성분에 대한 개발이 화장품 산업에서 활발히 이루어지고 있다.

[0003] 화장품의 미백 효과는 사용자의 피부를 희게 하는 것을 말하며, 대부분의 미백 화장품은 멜라닌의 생성을 억제하는 기능을 한다. 멜라닌은 표피 내 기저층에 존재하는 멜라노사이트(melanocyte)에 의해 생성되며, 멜라노사이트의 활동성과 분포는 사람의 피부색을 결정한다. 멜라노사이트 내부에 함유되어 있는 타이로시나제(tyrosinase)라는 효소에 의해 아미노산의 일종인 타이로신(tyrosine)이 도파(DOPA, dihydroxy phenylalanine)로 전환되고, 도파퀴논(dopaquinone)과 도파크롬(dopachrome) 등을 거치는 일련의 산화과정을 통해 최종적으로 중합체인 멜라닌이 생성된다. 따라서 대부분 미백 화장품은 멜라닌 생성의 주요 효소인 타이로시나제의 활성을 저해함으로써 멜라닌의 생성을 억제시키는 원리로 미백 효과가 발휘된다(한국공개특허 제10-2019-0025329호).

[0004] 화장품의 노화방지는 피부노화를 촉진하는 원인들을 차단하거나 제거하는 것이다. 상기 피부노화는 체내의 항산화효소와 비타민 E, C, 글루타티온 및 유비퀴놀 등의 항산화제가 감소되어 산화와 항산화의 불균형으로 인해 야기된다. 노화가 진행됨에 따라 멜라닌 생성반응이 촉진되며, 지질 과산화, 단백질 산화, 단백질 분해효소의 활성화, 콜라겐과 엘라스틴의 사슬절단 및 비정상적인 교차결합, 히알루론산 사슬절단, DNA 산화 등에 의해 생체구성성분들의 손상을 가져오고 결국에는 피부탄력감소, 주름 및 기미, 주근깨 생성 등의 피부노화가 일어나게 된다.

[0005] 따라서 타이로시나제의 활성을 저해함과 동시에 항산화 효과를 가지는 화장품 조성물은 피부의 미백 효과를 효과적으로 유도하면서 피부노화를 방지할 수 있다.

## 선행기술문헌

### 특허문헌

[0006] (특허문헌 0001) 한국공개특허 제10-2019-0025329호

## 발명의 내용

### 해결하려는 과제

[0007] 본 발명자들은 피부의 노화를 억제하고, 피부 미백 효과를 개선시키기 위한 성분에 대하여 연구한 결과, 누에 혈림프 유래 저분자 물질이 피부 미백 및 항산화 효과가 있다는 점을 규명하였다. 또한, 누에 혈림프 유래 저분자 물질은 멜라닌 합성에 관여하는 유전자의 발현을 효과적으로 억제할 수 있고, 항산화 활성을 증대시킬 수 있음

을 밝혀내어 본 발명을 완성하였다.

[0008] 따라서, 본 발명의 목적은 누에 혈림프 유래 저분자 물질을 포함하는 화장료 조성물을 제공하는 것이다.

### 과제의 해결 수단

[0009] 상기 과제를 해결하기 위하여, 본 발명의 일 측면은 10 kDa 미만의 분자량을 가지는 누에 혈림프 유래 저분자 물질을 포함하는 화장료 조성물을 제공한다.

[0010] 또한, 본 발명의 다른 측면은 상기 누에 혈림프 유래 저분자 물질의 제조 방법을 제공한다.

### 발명의 효과

[0011] 누에 혈림프 유래 저분자 물질은 피부 안전성이 우수하고, 피부 미백 및 항산화 효과가 우수할 뿐만 아니라, 높은 수율로 생산이 가능하므로 피부 미백 및 항산화용 화장료 조성물로 유용하게 사용될 수 있다.

### 도면의 간단한 설명

[0012] 도 1은 누에 혈림프 유래 저분자 물질의 제조공정 모식도이다.

도 2는 누에 혈림프 유래 저분자 물질의 분자량을 액체 크로마토그래프 질량분석기를 사용하여 측정한 결과이다.

도 3은 누에 혈림프 유래 저분자 물질의 세포 독성을 평가한 결과이다.

도 4는 누에 혈림프 유래 저분자 물질을 처리한 멜라노마 세포에서 멜라닌 생성량을 마이크로플레이트 리더기를 사용하여 측정한 결과이다.

도 5는 누에 혈림프 유래 저분자 물질을 처리한 멜라노마 세포에서 멜라닌 합성에 관여하는 유전자(타이로시네이즈, TRP-1 및 TRP-2)의 발현을 웨스턴블랏을 통해 측정한 결과이다.

도 6은 누에 혈림프 유래 저분자 물질의 항산화 활성을 DPPH 분석(diphenylpicrylhydrazyl analysis)을 통해 측정한 결과이다.

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0013] 이하, 본 발명을 보다 구체적으로 설명한다.

[0014] 본 발명의 일 측면은 누에 혈림프 유래 저분자 물질을 포함하는 화장료 조성물을 제공한다. 이때, 상기 누에 혈림프 유래 저분자 물질의 분자량은 10 kDa 미만일 수 있다.

[0015] 본 발명에서 상기 "누에(silkworm)"는 나비목 누에나방과에 속하는 누에나방의 유충이다. 본 발명의 일 구체예에서, 상기 누에는 숙잠(熟蠶)일 수 있으며, 상기 숙잠은 익은누에(matured silkworm)를 의미한다. 상기 익은누에는 마지막 영(齡)의 성장이 극도에 달하여 먹이의 섭취를 중지하고 고치를 지을 장소를 찾아 움직이는 누에이다. 누에는 주로 누에고치에서 실을 얻는 용도로 사용되고 있으며, 실을 얻고 난 뒤 남은 누에 조직은 그대로 폐기 처분되거나 곤충세포배양을 위한 배지의 첨가물 정도로 사용되고 있는 실정이다.

[0016] 본 발명에서 상기 "혈림프(hemolymph)"는 체액을 의미한다. 상기 누에와 같은 곤충은 혈관이 없으며, 체액은 영양분을 이동시켜주고, 노폐물을 배출하며, 물과 염의 균형을 유지시켜 준다.

[0017] 본 발명에서 상기 "누에 혈림프 유래 저분자 물질"은 분자량이 10 kDa 미만인 물질을 의미하고, 구체적으로는 분자량이 1 kDa 미만인 물질, 더욱 구체적으로는 분자량이 258 Da 내지 589 Da인 것이다. 본 발명의 일 구체예에서, 상기 저분자 물질은 플라보노이드, 다당류, 단백질, 지질, 당단백질, 당지질일 수 있고, 구체적으로는 2개 내지 5개의 아미노산으로 이루어진 단백질일 수 있으나, 이에 제한되지 않는다. 본 발명의 누에 혈림프 유래 저분자 물질의 분자량이 10 kDa 미만인 경우, 피부 내로의 흡수가 용이하여 피부 미백 및 항산화 효과를 증대시킬 수 있다. 구체적으로, 상기 누에 혈림프 유래 저분자 물질은 도 2 상단의 분자량 패턴을 가질 수 있다.

[0018] 본 발명의 일 구체예에서, 상기 저분자 물질은 상기 누에를 동결건조하여 누에 건조물을 제조하는 단계; 상기 누에 건조물로부터 불밀을 이용하여 실샘을 제거하고 남은 건조물에서 혈림프를 분리하는 단계; 상기 분리된 혈림프를 분쇄한 후 분쇄물 중량 기준 1% 내지 5%의 증류수와 혼합한 뒤 100 rpm 내지 300 rpm 조건으로 20분 내지 40분 동안 교반하여 혈림프 용해물을 제조하는 단계; 상기 혈림프 용해물을 200  $\mu$ m 내지 1,000  $\mu$ m 거름망을

통해 여과시킨 뒤 열처리하고 원심분리하여 상등액을 회수하는 단계; 및 상기 상등액을 한외여과막(ultrafilter membrane)을 이용하여 누에 혈림프 유래 저분자 물질을 수득하는 단계를 수행하여 수득하였다.

- [0019] 상기 한외여과막을 이용하여 저분자 물질을 수득하면, 한외여과막의 배제 분자량을 조절함으로써 여과된 물질의 분자량을 용이하게 조절할 수 있다. 뿐만 아니라, 수득 과정에서 요구되는 시간을 단축할 수 있으며, 비용을 절감할 수 있다는 장점이 있다. 상기 한외여과막의 배제 분자량은 1 kDa 내지 10 kDa일 수 있으며, 본 발명의 일 구체예에서는 10 kDa의 배제 분자량을 갖는 한외여과막을 사용하였다.
- [0020] 본 발명의 일 구체예에서, 본 발명의 누에 혈림프 유래 저분자 물질은 모든 처리 농도에서 진피세포 및 표피세포에 대한 독성이 없는 것으로 확인되었다(도 3).
- [0021] 본 발명의 일 구체예에서, 본 발명의 누에 혈림프 유래 저분자 물질을 멜라노마 세포에 처리하는 경우, 멜라닌 생성량을 효과적으로 억제하였고(도 4) 멜라닌 합성에 관여하는 유전자(타이로시네이즈, TRP-1 및 TRP-2)의 활성을 효과적으로 억제하였다(도 5),
- [0022] 또한, 본 발명의 일 구체예에서, 본 발명의 누에 혈림프 유래 저분자 물질의 항산화 활성이 우수함을 확인하였다(표 2 및 도 6).
- [0023] 따라서, 본 발명의 화장료 조성물은 피부 미백 또는 항산화 용도로 사용될 수 있다.
- [0024] 본 발명에서 사용된 용어, “미백”은 피부색에 영향을 미치는 멜라닌, 산화-환원 헤모글로빈, 카로틴, 멜라노이드 등 다양한 생체 분자의 생성을 억제함으로써 잡티, 주근깨, 기미 등의 피부 색소 침착 현상을 완화시키고, 피부 누런기, 붉은기를 완화시켜 피부 밝기 및 균일도를 향상시키는 효과를 의미한다. 특히, 멜라닌 색소 생성 효소인 타이로시네이즈의 활성을 억제함으로써 피부 톤을 개선할 수 있다.
- [0025] 본 발명의 사용된 용어, “항산화”는 산화를 억제한다는 것으로, 세포의 노화과정에서 발생하는 활성산소(free radical)를 제거하여 세포의 산화를 막아 세포의 노화를 막는 효과를 의미한다.
- [0026] 상기 “화장료 조성물”은 화장수, 에센스, 로션, 크림, 팩, 파운데이션, 젤, 연고 및 스프레이로 이루어진 군에서 선택된 하나로 제형화될 수 있다.
- [0027] 또한, 상기 화장료 조성물은 통상의 방법에 의해 제형화될 수 있다. 피부 외용제의 제형화에 있어서 Remington's Pharmaceutical Science, Mack Publishing Company, Easton PA에 개시되어 있는 내용을 참조할 수 있고, 화장료 조성물의 제형화에 있어서 International cosmetic ingredient dictionary, 6th ed(The cosmetic, Toiletry and Fragrance Association, Inc., Washington, 1995)에 개시되어 있는 내용을 참조할 수 있다.
- [0028] 구체적으로, 상기 화장료 조성물은 일반적인 유화 제형 및 가용화 제형으로 제조할 수 있다. 예컨대, 유연 화장수 또는 영양 화장수 등의 화장수; 웨이셜 로션, 바디로션 등의 유액; 영양 크림, 수분 크림, 아이 크림 등의 크림; 에센스; 화장연고; 스프레이; 젤; 팩; 선 스크린; 메이크업 베이스; 액체 타입, 고체 타입 또는 스프레이 타입 등의 파운데이션으로 제형화될 수 있으나 이에 한정되는 것은 아니다. 또한 상기 피부 외용제는, 연고, 패치, 젤, 크림 또는 분무제로 제형화될 수 있으나 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0029] 상기 화장료 조성물은 각각의 제형에 있어서 상기 필수성분 외에 제형의 종류 또는 사용 목적 등에 따라 본 발명에 따른 목적을 저해하지 않는 범위 내에서 다른 성분들이 적절히 배합될 수 있다.
- [0030] 상기 화장료 조성물은 통상적으로 허용 가능한 담체를 포함할 수 있으며, 예컨대 유분, 물, 계면활성제, 보습제, 저급 알코올, 증점제, 킬레이트제, 색소, 방부제, 향료 등을 적절히 배합할 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.
- [0031] 상기 허용 가능한 담체는 제형에 따라 달리할 수 있다. 예컨대, 연고, 페이스트, 크림 또는 젤로 제형화될 때 담체 성분으로서 동물성 유, 식물성 유, 왁스, 파라핀, 전분, 트라칸트, 셀룰로오스 유도체, 폴리에틸렌 글리콜, 실리콘, 벤토나이트, 실리카, 탈크, 산화아연 또는 이들의 혼합물이 사용될 수 있다.
- [0032] 상기 화장료 조성물은 파우더 또는 스프레이로 제형화될 때, 담체 성분으로서 락토스, 탈크, 실리카, 알루미늄 히드록사이드, 칼슘 실케이트, 폴리아미드 파우더 또는 이들의 혼합물이 사용될 수 있고, 스프레이의 경우 클로로플루오로히드로카본, 프로판, 부탄 또는 디메틸 에테르와 같은 추진제를 더 포함할 수 있다.
- [0033] 상기 화장료 조성물은 용액 또는 유탁액으로 제형화될 때, 담체 성분으로서 용매, 용해화제, 또는 유탁화제가

사용될 수 있고, 예컨대 물, 에탄올, 이소프로판올, 에틸 카보네이트, 에틸 아세테이트, 벤질 벤조에이트, 프로필렌 글리콜, 1,3-부틸글리콜 오일이 사용될 수 있고, 특히, 목화씨 오일, 땅콩 오일, 옥수수 배종 오일, 올리브 오일, 피마자 오일 및 참깨 오일, 글리세롤 지방족 에스테르, 폴리에틸렌 글리콜 또는 소르비탄의 지방산 에스테르가 사용될 수 있다.

[0034] 상기 화장료 조성물은 현탁액으로 제형화될 때, 담체 성분으로서 물, 에탄올 또는 프로필렌 글리콜과 같은 액상의 희석제, 에톡실화 이소스테아릴 알코올, 폴리옥시에틸렌 소르비톨 에스테르 및 폴리 옥시에틸렌 소르비탄 에스테르와 같은 현탁제, 미소결정성 셀룰로오스, 알루미늄 메타히드록시드, 벤토나이트, 아가 또는 트라칸트 등이 사용될 수 있다.

[0035] 상기 화장료 조성물은 최종 제품의 품질이나 기능에 따라 업계에서 통상적으로 사용되는 지방 물질, 유기용매, 용해제, 농축제, 겔화제, 연화제, 항산화제, 현탁화제, 안정화제, 발포제(foaming agent), 방향제, 계면활성제, 물, 이온형 또는 비이온형 유화제, 충전제, 금속이온붕쇄제, 킬레이트화제, 보존제, 차단제, 습윤화제, 필수 오일, 염료, 안료, 친수성 또는 친유성 활성제, 화장품에 통상적으로 사용되는 임의의 다른 성분과 같은 화장품학 또는 피부과학 분야에서 통상적으로 사용되는 보조제를 추가적으로 함유할 수 있다.

[0036] 다만, 상기 보조제 및 그 혼합 비율은 본 발명에 따른 화장료 조성물의 바람직한 성질에 영향을 미치지 않도록 적절히 선택할 수 있다.

[0037] 본 발명의 다른 측면은 누에를 동결건조하여 누에 건조물을 제조하는 단계; 상기 누에 건조물로부터 불밀을 이용하여 실샘을 제거하고 남은 건조물에서 혈립프를 분리하는 단계; 상기 분리된 혈립프를 분쇄한 후 분쇄물 중량 기준 1% 내지 5%의 증류수와 혼합한 뒤 100 rpm 내지 300 rpm 조건으로 20분 내지 40분 동안 교반하여 혈립프 용해물을 제조하는 단계; 상기 혈립프 용해물을 200  $\mu$ m 내지 1,000  $\mu$ m 거름망을 통해 여과시킨 뒤 열처리하고 원심분리하여 상등액을 회수하는 단계; 및 상기 상등액을 한외여과막(ultrafilter membrane)을 이용하여 누에 혈립프 유래 저분자 물질을 수득하는 단계를 포함하는 누에 혈립프 유래 저분자 물질의 제조 방법을 제공한다.

[0038] 이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다. 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명이 하기 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.

#### [0039] 실시예 1. 누에 혈립프 유래 저분자 물질의 제조

[0040] 숙잠 1 kg을 액체질소(-196℃, 70시간)에 처리한 후, 동결건조하여 누에 건조물을 제조하였다. 상기 누에 건조물로부터 직경 1 cm 내지 5 cm의 불밀을 이용하여 실샘을 제거하고 혈립프를 분리하였다. 상기 분리된 혈립프를 분쇄한 다음 분쇄물 중량 대비 3%의 물을 넣은 후 200 rpm 조건으로 30분 동안 교반하여 혈립프 용해물을 제조하였다. 상기 혈립프 용해물은 200  $\mu$ m 내지 1,000  $\mu$ m 거름망을 통해 여과시킨 뒤 독성물질인 도파퀴논을 불활성화 하기 위해 60℃에서 30분 동안 열처리하였다. 이후, 13,000 rpm에서 20분 동안 원심분리하여 상등액을 회수한 뒤, 10 kDa 한외여과막을 이용하여 누에 혈립프 유래 저분자 물질을 여과 분리하였다. 상기 누에 혈립프 유래 저분자 물질의 제조공정 모식도를 도 1에 나타내었다.

[0041] 한편, 여과되지 않은 물질은 Q 컬럼(Q Colum)을 이용하여 누에 혈립프 유래 단백질(Storage Protein 2, SP2)을 제조할 수 있으며, 상기 누에 혈립프 유래 단백질에는 피부 미백 및 항산화 활성이 있는 것으로 알려져 있다(한국등록특허 제10-1501554호 참조).

[0042] 상기 누에 혈립프 유래 단백질(SP2)과 누에 혈립프 유래 저분자 물질의 수율을 평가하였다(표 1).

표 1

| [0043] | 구분                 | 원자재 소비량(g) | 생산량(g) | 수율(%) |
|--------|--------------------|------------|--------|-------|
|        | 누에 혈립프 유래 단백질(SP2) | 30         | 0.05   | 0.16  |
|        | 누에 혈립프 유래 저분자 물질   | 30         | 3      | 10    |

[0044] 그 결과, 표 1을 참조하면, 누에 혈립프 유래 저분자 물질 및 누에 혈립프 유래 단백질(SP2)의 수율은 각각 10% 및 0.16%로, 누에 혈립프 유래 저분자 물질의 생산 수율은 누에 혈립프 유래 단백질 대비 약 62배 높았다.

#### [0045] 실험예 1. 누에 혈립프 유래 저분자 물질의 분자량 측정

[0046] 누에 혈립프 유래 저분자 물질의 분자량을 확인하기 위해 액체 크로마토그래피 질량 분석(liquid chromatograph

mass spectrometry)을 실시하였다.

[0047] 구체적으로, 상기 실시예 1에서 수득한 누에 혈림프 유래 저분자 물질을 50 ng/ml의 농도로 50% 메탄올에 용해한 뒤, 0.45  $\mu$ m 실린지 여과기로 여과하여 20  $\mu$ l를 액체 크로마토그래피 질량분석기에 주입하였다. 또한 분자량이 알려져 있는 아미노산 혼합물(Amino acid standard, #AAS18, Sigma)을 주입하여 대조군으로 사용하였다. 분석 용매의 조건은 0.1% 포름산(formic acid) 조건으로 전자 분무 이온화법으로 분자량을 측정하였다(도 2).

[0048] 그 결과, 도 2를 참조하면, 누에 혈림프 유래 저분자 물질의 크기는 258 Da 내지 589 Da인 것으로 측정되었다.

#### [0049] 실험예 2. 누에 혈림프 유래 저분자 물질의 세포 독성 평가

[0050] 누에 혈림프 유래 저분자 물질의 피부 안정성을 검증하기 위해, 진피세포 (human Dermal fibroblast)와 각질세포(human Keratinocyte)에 대한 MTT assay를 수행하였다.

[0051] 구체적으로, 상기 진피세포와 표피세포는 10% 우태아혈청(FBS)과 1% 페니실린/스트렙토마이신(P/S)이 포함된 DMEM(High Glucose)배지로 37 $^{\circ}$ C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 계대배양하여 실험에 사용하였다. 상기 진피세포와 표피세포를 96 well plate에 5 X 10<sup>3</sup> cells/well의 농도로 각각 분주하였으며, 24시간 동안 배양한 후 상기 실시예 1에서 수득한 누에 혈림프 유래 저분자 물질을 농도별(0, 0.1, 0.2, 0.5, 1, 2 mg/ml)로 처리하여 24시간 동안 배양하였다. 24시간 배양 후 WST-1(ez-cytox)이 10% 함유된 배지로 교체하여 2시간 동안 반응 시킨 뒤 마이크로플레이트 리더기를 이용하여 흡광도 450 nm에서 측정하고 그 결과를 대조군(non-treat)값에 대한 비율로 나타내었다(도 3).

[0052] 그 결과, 도 3을 참조하면, 누에 혈림프 유래 저분자 물질은 진피세포 및 표피세포 모두에서 독성을 나타내지 않았다.

#### [0053] 실험예 3. 피부 미백 활성 평가

##### [0054] 실험예 3.1. 멜라닌 생성량 평가

[0055] 누에 혈림프 유래 저분자 물질의 처리에 따른 멜라닌 생성 억제 효과를 검증하기 위해, 멜라노마 세포(B16F10)에서 멜라닌 생성량을 측정하였다.

[0056] 구체적으로, 상기 멜라노마 세포를 6 well plate에 1 X 10<sup>5</sup> cells/well이 되도록 분주한 뒤 37 $^{\circ}$ C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 3일동안 배양하였다. 배양 후 농도별(0.2 mg/ml, 1 mg/ml 및 2 mg/ml)로 누에 혈림프 유래 저분자 물질을 처리한 뒤 3일 동안 배양하여 세포를 회수한 뒤 2 M NaOH를 각 실험군에 첨가하여 100 $^{\circ}$ C에서 생성된 멜라닌을 용해하였다. 이후 용해된 멜라닌 생성량은 마이크로플레이트 리더기를 이용하여 흡광도 405 nm에서 측정하였다(도 4).

[0057] 한편, 음성대조군으로는 멜라닌세포자극호르몬(melanocyte stimulating hormone,  $\alpha$ -MSH)을 사용하였고, 양성대조군 및 비교군으로는 각각 알부틴 및 상기 실시예 1에서 개시한 누에 혈림프 유래 단백질(SP2)을 사용하였다.

[0058] 그 결과, 도 4를 참조하면, 누에 혈림프 유래 저분자 물질을 처리한 실험군은 대조군 및 비교군과 비교하여 멜라닌 합성을 효과적으로 억제하였다.

##### [0059] 실험예 3.2. 멜라닌 합성 관련 유전자 발현 평가

[0060] 누에 혈림프 유래 저분자 물질의 처리에 따른 멜라닌 생성 억제 효과를 검증하기 위해, 멜라노마 세포(B16F10)에서 멜라닌 합성에 관하여는 유전자의 활성을 측정하였다.

[0061] 구체적으로, 상기 멜라노마 세포를 6 well plate에 1 X 10<sup>5</sup> cells/well이 되도록 분주한 뒤 37 $^{\circ}$ C, 5% CO<sub>2</sub> 배양기에서 3일동안 배양하였다. 배양 후 농도별(0.2 mg/ml, 1 mg/ml 및 2 mg/ml)로 누에 혈림프 유래 저분자 물질을 처리한 뒤 3일 동안 배양하여 세포를 회수한 뒤, 단백질분해효소 억제제(Protein inhibitor cocktail, PPI1015, Quartett)가 포함된 RIPA 버퍼를 처리하여 단백질을 추출하여 웨스턴블롯(western blot)을 통해 타이로시네이즈(tyrosinase), 타이로시네이즈 관련 단백질 1(tyrosinase related protein 1, TRP1) 및 타이로시네이즈 관련 단백질 2(tyrosinase related protein 2, TRP2)의 발현을 분석하였다. 또한, 음성대조군으로는  $\alpha$ -MSH을, 양성대조군으로 알부틴을 사용하였다(도 5).

[0062] 그 결과, 도 5를 참조하면, 누에 혈림프 유래 저분자를 처리한 실험군은 대조군과 비교하여 타이로시네이즈,

TRP1 및 TRP2의 발현을 유의하게 억제하였다. 특히, 2 mg/ml의 누에 혈림프 유래 저분자를 처리한 실험군의 경우, 양성대조군과 비교하더라도 동등하거나 우수한 타이로시네이즈, TRP1 및 TRP2 발현의 억제 활성을 보였다.

#### [0063] 실험예 4. 항산화 활성 평가

[0064] 누에 혈림프 유래 저분자 물질의 처리에 따른 항산화 활성을 검증하기 위해 DPPH 분석(diphenylpicrylhydrazyl analysis)을 수행하였다.

[0065] 구체적으로, 상기 실시예 1에서 제조한 누에 혈림프 유래 저분자 물질을 농도별(0.16  $\mu\text{g/ml}$ , 0.31  $\mu\text{g/ml}$ , 0.62  $\mu\text{g/ml}$ , 1.25  $\mu\text{g/ml}$ , 2.5  $\mu\text{g/ml}$ , 5  $\mu\text{g/ml}$ , 10  $\mu\text{g/ml}$  및 20  $\mu\text{g/ml}$ )로 각각 40  $\mu\text{l}$ 씩 준비한 후, 메탄올에 용해한 0.2 mM DPPH 시약 160  $\mu\text{l}$ 를 넣고 빛을 차단한 후 30분간 반응시켰다. 그 후 마이크로플레이트 리더기(microplate reader)를 이용하여 517 nm에서 흡광도를 측정하였다.

[0066] 비교군으로는 항산화 활성이 우수한 것으로 알려져 있는 상기 실시예 1에서 개시한 누에 혈림프 유래 단백질(SP2), 알부틴 및 비타민 C(ascorbic acid)를 사용하였다(표 2 및 도 6).

표 2

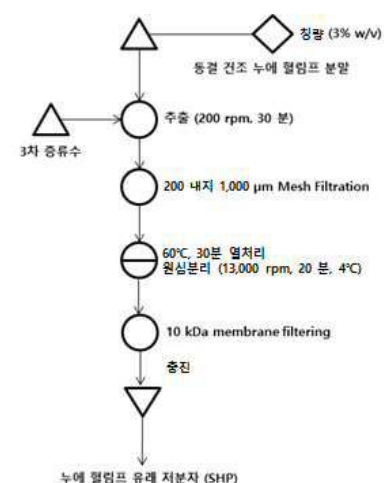
| 구분                 | E.C. 50( $\mu\text{g/ml}$ ) |
|--------------------|-----------------------------|
| 누에 혈림프 유래 저분자 물질   | 0.71                        |
| 누에 혈림프 유래 단백질(SP2) | 35.7                        |
| 알부틴                | 22.80                       |
| 비타민 C              | 0.57                        |

[0068] 그 결과, 표 2 및 도 6을 참조하면, 본 발명의 누에 혈림프 유래 저분자 물질은 비교군과 비교하여 동등하거나 우수한 항산화 활성을 나타내었다.

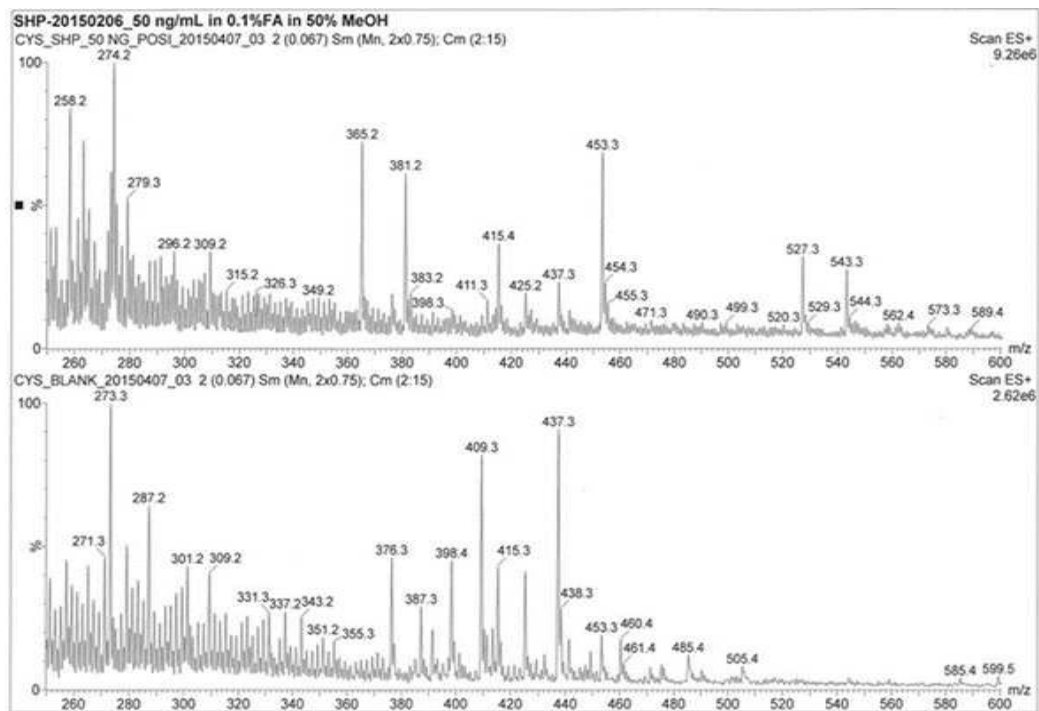
[0069] 이상의 설명으로부터, 본 발명이 속하는 기술분야의 당업자는 본 발명이 그 기술적 사상이나 필수적 특징을 변경하지 않고서 다른 구체적인 형태로 실시될 수 있다는 것을 이해할 수 있을 것이다. 이와 관련하여, 이상에서 기술한 실시예들은 모든 면에서 예시적인 것이며 한정적인 것이 아닌 것으로 이해해야만 한다. 본 발명의 범위는 상기 상세한 설명보다는 후술하는 특허 청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 등가 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

## 도면

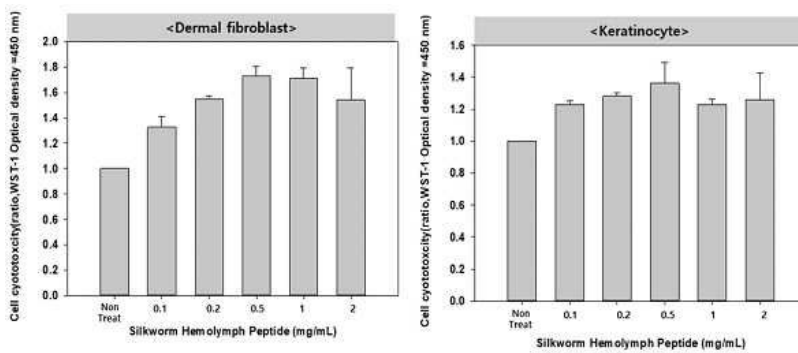
### 도면1



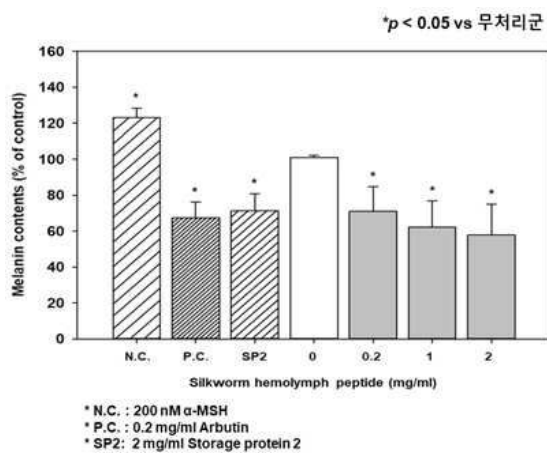
도면2



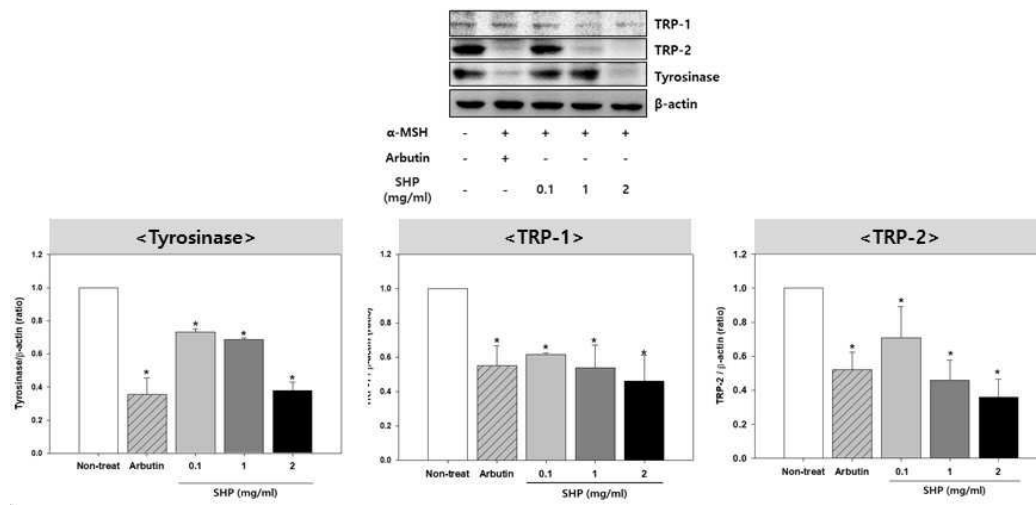
도면3



도면4



도면5



도면6

