



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2020-0049187
(43) 공개일자 2020년05월08일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A61K 8/9789 (2017.01) A23L 33/105 (2016.01)
A61Q 19/08 (2006.01)
(52) CPC특허분류
A61K 8/9789 (2017.08)
A23L 33/105 (2016.08)
(21) 출원번호 10-2018-0132144
(22) 출원일자 2018년10월31일
심사청구일자 2018년10월31일

(71) 출원인
인하대학교 산학협력단
인천광역시 미추홀구 인하로 100(용현동, 인하대학교)
(72) 발명자
이향복
인천광역시 남동구 석산로 35 (간석동, 간석마을
풍림아이원아파트) 108동 2003호
김은기
서울특별시 영등포구 당산로 214 (당산동5가, 당
산 삼성 래미안) 423동 904호
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
이원희

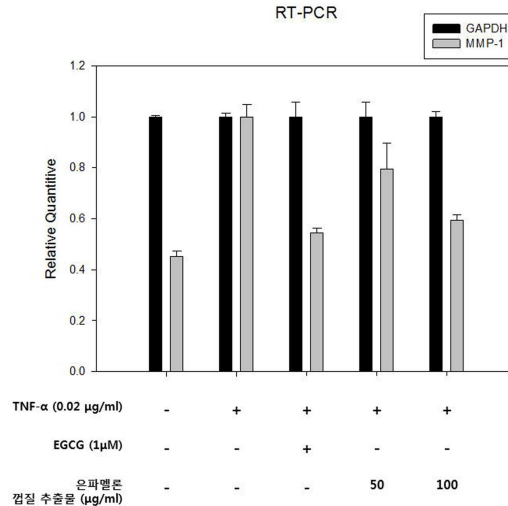
전체 청구항 수 : 총 10 항

(54) 발명의 명칭 은파멜론 추출물을 유효성분으로 포함하는 피부 노화 예방 또는 개선용 화장품 조성물

(57) 요약

본 발명은 은파멜론 추출물을 유효성분으로 포함하는 피부 노화 예방 또는 개선용 화장품 조성물에 관한 것으로, 본 발명의 은파멜론 추출물은 세포 독성이 없을 뿐만 아니라, 콜라겐 분해효소인 MMP-1(matrix metalloproteinase-1) 발현을 억제하고 ROS(reactive oxygen species, 활성 산소종)을 제거하는 항산화 활성을 나타내므로 피부 노화 예방 또는 개선에 유용하게 사용될 수 있다.

대표도 - 도2



(52) CPC특허분류

A61Q 19/08 (2013.01)

A23V 2002/00 (2013.01)

A23V 2200/318 (2013.01)

(72) 발명자

김가영

전라북도 군산시 변영로 86 (경장동,
오르빌아파트) 101동 1501호

오혜리

서울특별시 도봉구 도당로29길 51 (방학동) 1층

명세서

청구범위

청구항 1

은파멜론 추출물을 유효성분으로 포함하는 피부 노화 예방 또는 개선용 화장품 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 은파멜론 추출물은 물, C₁ 내지 C₂의 저급 알코올 또는 이들의 혼합 용매로 추출되는 것인, 피부 노화 예방 또는 개선용 화장품 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 은파멜론은 은파멜론의 껍질, 과육 및 씨로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상인, 피부 노화 예방 또는 개선용 화장품 조성물.

청구항 4

제3항에 있어서, 상기 은파멜론은 은파멜론의 껍질인, 피부 노화 예방 또는 개선용 화장품 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 은파멜론 추출물은 섬유아세포의 MMP-1(matrix metalloproteinase-1)의 발현을 억제하는, 피부 노화 예방 또는 개선용 화장품 조성물.

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 은파멜론 추출물은 항산화 활성을 나타내는, 피부 노화 예방 또는 개선용 화장품 조성물.

청구항 7

은파멜론 추출물을 유효성분으로 포함하는 피부 노화 예방 또는 개선용 피부 외용제.

청구항 8

제7항에 있어서, 상기 은파멜론은 은파멜론의 껍질, 과육 및 씨로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상인, 피부 노화 예방 또는 개선용 피부 외용제.

청구항 9

은파멜론 추출물을 유효성분으로 포함하는 피부 노화 예방 또는 개선용 건강기능식품.

청구항 10

제9항에 있어서, 상기 은과멜론은 은과멜론의 껍질, 과육 및 씨로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상인, 피부 노화 예방 또는 개선용 건강기능식품.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 은과멜론 추출물을 유효성분으로 포함하는 피부 노화 예방 또는 개선용 화장품 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0003] 피부는 크게 표피(epidermis), 진피(dermis) 및 피하지방(hypodermis)의 세 층으로 구성되어 있고, 표피층은 주로 표피세포(keratinocytes)로 이루어져 있으며, 진피층은 주로 진피 섬유아세포(dermal fibroblasts)로 이루어져 있다. 표피 중 가장 외층인 각질층은 피부장벽의 역할을 함으로써 피부로부터 수분과 전해질 등이 손실되는 것을 억제하며, 진피층은 콜라겐(collagen) 및 엘라스틴(elastin) 합성을 통하여 피부 탄력을 유지하고 구조를 지지하는 역할을 한다. 콜라겐 및 엘라스틴은 섬유아세포에서 생성되는 주요 단백질로 피부의 기계적 견고성, 조직의 결합력 및 탄력성 등에 관여한다(Moskowitz, R W et al, Semin Arthritis Rheu, 30: 87, 2000).

[0004] 피부의 노화는 자연적 혹은 유전자와 같은 내적 요인에 의한 내인성 노화와 태양 노출, 중력, 흡연, 자외선 등의 외부 요인으로 인한 광노화 등의 외인성 노화로 분류할 수 있다. 피부 노화 시 진피의 기질을 구성하는 콜라겐과 엘라스틴의 합성 및 분해가 활발히 일어나지 못해 기질의 견고함이 저하되고 피부 탄력이 떨어지며 주름이 생성된다. 진피에서의 콜라겐의 광범위한 분해는 콜라겐 분해효소인 MMP-1(matrix metalloproteinase-1)과 염증성 사이토카인인 TNF- α (Tumor necrosis factor- α)의 상향 조절에 의해 발생하는 피부 노화의 큰 특징이다.

[0005] 피부의 노화를 유발하는 가장 중요한 요인 중 하나는 활성 산소종(reactive oxygen species, ROS)이다. 수퍼옥사이드 음이온 라디칼(superoxide anion radical), 과산화수소(hydrogen peroxide), 히드록실라디칼(hydroxyl radical), 일중항 산소(singlet oxygen) 등을 포함하는 활성 산소종은 UVA(320~400 nm)과 UVB(290~320 nm)에 노출된 피부에서 형성되는데, 이러한 요인들은 피부 노화를 유발한다.

[0006] 한편, MMPs(matrix metalloproteinase)는 활성 중심부에 아연을 갖는 금속단백 분해효소로 생체 내에서 잠재성 전효소(zymogen) 형태(pro-MMP)로 분비된다. MMPs는 피부의 각질형성세포 및 섬유아세포를 포함하는 다양한 세포에서 분비되며, 분비된 전효소 상태에서 구조적 변형이 일어나 아미노 말단 부위가 절단되면 활성화된다. 피부에서는 주로 MMP-1, MMP-2, MMP-3 및 MMP-9 등이 작용을 하며, 콜라겐 분해와 관련하여 가장 근본적으로 작용하는 효소는 MMP-1으로 알려져 있다. 이러한 MMPs의 활성화는 자외선 조사 또는 염증성 사이토카인인 TNF- α (Tumor necrosis factor- α)의 상향 조절에 의해 증가되어 피부 내 현저한 콜라겐 분해를 유도하는 것으로 알려져 있다.

[0007] 한편, 은과멜론(실버웨이브, Cucumis melo)은 아시아종묘 김제육종연구소에서 육종한 멜론 품종 중 하나로, 흰 바탕에 녹색 무늬가 있는 단타원형 멜론이다. 은과멜론은 당도가 높고 향이 좋으며 저장성이 과육의 발효가 거의 없는 멜론이다. 멜론은 다양한 무기물질, 2차 대사 산물 등을 포함하고 있어, 진통제, 항암제, 항균제 등의 효능이 있는 것으로 알려져 있으나, 멜론 껍질의 생리학적 활성에 대해서는 연구된 바가 없다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009] 본 발명의 목적은 은과멜론 추출물을 유효성분으로 포함하는 피부 노화 예방 또는 개선용 화장품 조성물을 제공하는 것이다.

[0010] 본 발명의 다른 목적은 은과멜론 추출물을 유효성분으로 포함하는 피부 노화 예방 또는 개선용 피부 외용제를 제공하는 것이다.

[0011] 본 발명의 또 다른 목적은 은파멜론 추출물을 유효성분으로 포함하는 피부 노화 예방 또는 개선용 건강기능식품을 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0013] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 은파멜론 추출물을 유효성분으로 포함하는 피부 노화 예방 또는 개선용 화장품 조성물을 제공한다.

[0014] 또한, 본 발명은 은파멜론 추출물을 유효성분으로 포함하는 피부 노화 예방 또는 개선용 피부 외용제를 제공한다.

[0015] 또한, 본 발명은 은파멜론 추출물을 유효성분으로 포함하는 피부 노화 예방 또는 개선용 건강기능식품을 제공한다.

발명의 효과

[0017] 본 발명의 은파멜론 추출물은 세포 독성이 없을 뿐만 아니라, 콜라겐 분해효소인 MMP-1(matrix metalloproteinase-1) 발현을 억제하고 ROS(reactive oxygen species, 활성 산소종)을 제거하는 항산화 활성을 나타내므로 피부 노화 예방 또는 개선에 유용하게 사용될 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0019] 도 1은 은파멜론 추출물이 처리된 인간 섬유아세포(Human dermal fibroblast)의 세포 생존율을 나타낸 결과이다.

도 2는 Real-time PCR을 통해 은파멜론 추출물이 처리된 인간 섬유아세포(Human dermal fibroblast)의 MMP-1 발현량을 측정한 결과이다.

도 3은 은파멜론 추출물의 항산화 활성을 측정한 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0020] 이하, 본 발명을 상세히 설명한다.

[0021] 본 발명은 은파멜론 추출물을 유효성분으로 포함하는 피부 노화 예방 또는 개선용 화장품 조성물을 제공한다.

[0022] 상기 은파멜론 추출물은 하기의 단계들을 포함하는 제조방법에 의해 제조될 수 있다:

[0023] 1) 은파멜론에 추출 용매를 가하여 추출하는 단계;

[0024] 2) 단계 1)의 추출물을 여과하는 단계; 및

[0025] 3) 단계 2)의 여과한 추출물을 감압 농축한 후 건조하는 단계.

[0026] 상기 방법에 있어서, 단계 1)의 은파멜론은 재배한 것 또는 시판되는 것 등 제한없이 사용할 수 있다.

[0027] 상기 제조방법에서, 은파멜론은 은파멜론의 껍질, 과육 및 씨로 구성된 군으로부터 선택된 어느 하나 이상일 수 있다. 본 발명의 구체적인 실시예에 의하면, 은파멜론의 껍질을 이용하는 것이 가장 바람직하다.

[0028] 또한, 상기 단계 1)의 추출 용매는 물, C₁ 내지 C₂의 저급 알코올 또는 이들의 혼합 용매일 수 있고, 구체적으로 상기 C₁ 내지 C₂의 저급 알코올은 메탄올 또는 에탄올일 수 있다. 본 발명의 구체적인 실시예에 의하면 에탄올로 추출하는 것이 가장 바람직하다.

[0029] 상기 단계 1)의 추출 방법은 진탕추출, Soxhlet 추출 또는 환류추출일 수 있다. 이때, 추출 온도는 20 내지 60℃일 수 있고, 구체적으로 30 내지 50℃, 더 구체적으로 35 내지 45℃, 더 구체적으로 38 내지 42℃일 수 있으나 이에 한정하지 않는다. 또한, 상기 추출 용매는 추출에 사용되는 은파멜론의 중량 대비 2 내지 10배, 구체적으로 4 내지 8배, 구체적으로 5 내지 7배로 첨가될 수 있으나, 이에 한정되지 않는다. 또한, 추출 시간은 24 내

지 120시간일 수 있고, 구체적으로 48 내지 96시간일 수 있고, 더 구체적으로 60 내지 84시간일 수 있고, 더 구체적으로 66 내지 78시간일 수 있으나, 이에 한정하지 않는다. 아울러, 추출 횟수는 1 내지 5회일 수 있고, 구체적으로 1 내지 3회일 수 있으나 이에 한정되는 것은 아니다. 상기 추출 온도, 추출 시간 또는 추출 횟수의 조건을 벗어난 범위에서는 추출이 충분히 이루어지지 않아 은파멜론 추출물 내에 유효성분의 함량이 미미할 수 있다. 또는 더 이상 추출 수율이 증가하지 않아 추출 작업의 효율이 떨어질 수 있다.

[0030] 상기 단계 3)의 감압 농축은 진공감압농축기 또는 진공회전증발기를 이용할 수 있다. 또한, 상기 건조는 감압건조, 진공건조, 비등건조, 분무건조 또는 동결건조일 수 있다.

[0031] 상기 추출물은 섬유아세포의 MMP-1(matrix metalloproteinase-1)의 발현을 억제할 수 있다. 또한, 상기 추출물은 항산화 활성을 나타낼 수 있다.

[0032] 본 발명의 구체적인 실시예에서, 본 발명자들은 은파멜론의 껍질을 에탄올로 추출하여 은파멜론 껍질 추출물을 제조하였고, 상기 은파멜론의 껍질 추출물은 세포 독성이 없을 뿐만 아니라(도 1 참조), 콜라겐 분해효소인 MMP-1(matrix metalloproteinase-1) 발현을 억제하고(도 2 참조) ROS(reactive oxygen species, 활성 산소종)를 제거할 수 있음을 확인하였다(도 3 참조).

[0033] 따라서, 본 발명의 은파멜론 추출물은 피부 노화 예방 또는 개선용 화장품 조성물에 유용하게 사용될 수 있다.

[0035] 본 발명의 조성물은 상기 추출물에 추가로 동일 또는 유사한 기능을 나타내는 유효성분을 1종이상 포함할 수 있다.

[0036] 또한, 본 발명의 화장품 조성물의 구체적인 제형으로는 스킨로션, 스킨 소프너, 스킨토너, 아스트린젠트, 로션, 밀크로션, 모이스처 로션, 영양로션, 맛사지크림, 영양크림, 모이스처 크림, 핸드크림, 에센스, 영양에센스, 팩, 비누, 샴푸, 클렌징폼, 클렌징로션, 클렌징크림, 바디로션, 바디클렌저, 유액, 프레스파우더, 루스파우더, 아이섀도 등의 제형을 포함한다.

[0037] 또한, 상기 화장품 조성물은 본 발명의 혼합 추출물에 추가로 지방 물질, 유기 용매, 용해제, 농축제 및 겔화제, 연화제, 항산화제, 현탁화제, 안정화제, 발포제(forming agent), 방향제, 계면활성제, 물, 이온형 또는 비이온형 유화제, 충전제, 금속이온봉쇄제 및 킬레이트화제, 보존제, 비타민, 차단제, 습윤화제, 필수 오일, 염료, 안료, 친수성 또는 친유성 활성제, 지질 소나 또는 화장품에 통상적으로 사용되는 임의의 다른 성분과 같은 화장품 분야에서 통상적으로 사용되는 보조제를 함유할 수 있다.

[0038] 본 발명의 조성물에서 상기 추출물은 조성물 총 중량에 대하여 0.005 내지 90 중량% 함유되는 것이 바람직하지만, 피부 노화 예방 또는 개선 효과가 있고 독성이 나타나지 않는 범위에서 사용 용도에 따라서 상기 범위 이상 또는 이하로도 사용될 수 있다.

[0040] 또한, 본 발명은 은파멜론 추출물을 유효성분으로 포함하는 피부 노화 예방 또는 개선용 피부外用제를 제공한다.

[0041] 본 발명에 따른 은파멜론 추출물은 상기 서술한 바와 같다. 일례로, 상기 은파멜론 추출물은 물, C₁ 내지 C₂의 저급 알코올 또는 이들의 혼합 용매로 추출될 수 있고, 구체적으로 상기 C₁ 내지 C₂의 저급 알코올은 메탄올 또는 에탄올일 수 있다. 상기 은파멜론은 은파멜론의 껍질, 과육 및 씨로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상일 수 있고, 구체적으로 은파멜론의 껍질일 수 있다. 상기 은파멜론 추출물은 섬유아세포의 MMP-1의 발현을 억제할 수 있고, 항산화 활성을 나타낼 수 있다.

[0042] 상기 추출물을 피부外用제로 사용하는 경우, 추가로 지방 물질, 유기 용매, 용해제, 농축제 및 겔화제, 연화제, 항산화제, 현탁화제, 안정화제, 발포제(forming agent), 방향제, 계면활성제, 물, 이온형 또는 비이온형 유화제, 충전제, 금속이온봉쇄제 및 킬레이트화제, 보존제, 비타민, 차단제, 습윤화제, 필수 오일, 염료, 안료, 친수성 또는 친유성 활성제, 지질 소나 또는 화장품에 통상적으로 사용되는 임의의 다른 성분과 같은 화장품 분야에서 통상적으로 사용되는 보조제를 함유할 수 있다. 또한, 상기 성분들은 피부 과학 분야에서 일반적으로 사용되는 양으로 도입될 수 있다.

- [0044] 또한, 본 발명은 은파멜론 추출물을 유효성분으로 포함하는 피부 노화 예방 또는 개선용 건강기능식품을 제공한다.
- [0045] 본 발명에 따른 은파멜론 추출물은 상기 서술한 바와 같다. 일례로, 상기 은파멜론 추출물은 물, C₁ 내지 C₂의 저급 알코올 또는 이들의 혼합 용매로 추출될 수 있고, 구체적으로 상기 C₁ 내지 C₂의 저급 알코올은 메탄올 또는 에탄올일 수 있다. 상기 은파멜론은 은파멜론의 껍질, 과육 및 씨로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상일 수 있고, 구체적으로 은파멜론의 껍질일 수 있다. 상기 은파멜론 추출물은 섬유아세포의 MMP-1의 발현을 억제할 수 있고, 항산화 활성을 나타낼 수 있다.
- [0046] 본 명세서의 "건강기능식품"이란 일상 식사에서 결핍되기 쉬운 영양소나 인체에 유용한 기능을 가진 원료나 성분을 사용하여 제조한 식품으로, 인체의 건강을 유지하는데 도움을 주는 식품을 의미하나 이에 한정되지 않으며 통상적인 의미의 건강식품을 모두 포함하는 의미로 사용한다.
- [0047] 건강기능식품의 형태 및 종류는 특별히 제한되지 않는다. 구체적으로, 상기 건강기능식품은 정제, 캡슐, 분말, 과립, 액상 및 환의 형태일 수 있다. 상기 건강기능식품은 추가성분으로서 여러 가지 향미제, 감미제 또는 천연 탄수화물을 포함할 수 있다. 상기 감미제는 천연 또는 합성 감미제일 수 있고, 천연 감미제의 예로는 타우마틴, 스테비아 추출물 등이 있다. 한편, 합성 감미제의 예로는 사카린, 아스파르탐 등이 있다. 또한, 상기 천연 탄수화물은 모노사카라이드, 디사카라이드, 폴리사카라이드, 올리고당 및 당알코올 등일 수 있다.
- [0048] 본 발명의 건강기능식품은 상기 서술한 추가성분 외에, 영양제, 비타민, 전해질, 풍미제, 착색제, 펙스탄 및 그의 염, 알긴산 및 그의 염, 유기산, 보호성 콜로이드 증점제, pH 조절제, 안정화제, 방부제, 글리세린, 알코올 등을 더 포함할 수 있다. 이러한 성분은 독립적으로 또는 조합으로 사용될 수 있다. 상기 첨가제의 비율은 본 발명의 조성물의 100 중량부당 0.01 내지 0.1 중량부의 범위에서 선택될 수 있다.
- [0049] 본 발명의 은파멜론 추출물은 식품에 그대로 첨가하거나 다른 식품 또는 식품 성분과 함께 사용될 수 있다. 이때, 첨가되는 유효성분의 함량은 목적에 따라 결정될 수 있다. 일반적으로, 건강기능식품 중의 함량은 전체 식품 중량의 0.01 내지 90 중량부일 수 있다. 그러나 건강 및 위생을 목적으로 하거나 또는 건강 조절을 목적으로 하는 장기간의 섭취의 경우에는 상기 양은 상기 범위 이하일 수 있으며, 안전성 면에서 아무런 문제가 없다면 유효성분은 상기 범위 이상의 양으로도 사용될 수 있다.
- [0051] 이하, 본 발명을 하기 실시예에 의해 상세히 설명한다.
- [0052] 단, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 의하여 한정되는 것은 아니다.
- [0053] **<실시예 1> 은파멜론의 껍질 추출물 제조**
- [0054] 은파멜론(Cucumis melo)을 깨끗하게 씻어 껍질을 분리한 후, 40℃의 오븐에서 48시간 동안 건조하였다. 건조한 은파멜론 껍질 150 g에 에탄올 1 L를 가하여 40℃에서 3일 동안 추출하였다. 여과지(Whatman filter paper No.1)를 이용해 추출물을 여과한 후 감압하여 은파멜론 껍질 추출물을 얻었다.
- [0056] **<실시예 2> 인간 섬유아세포 배양**
- [0057] 세포주는 인간 섬유아세포(Human dermal Fibroblast (Hs68 (ATCC®CRL1635™)))를 사용하였다. 세포 배양은 10% FBS(fetal bovine serum), 1% 페니실린이 포함되어 있는 DMEM(Dulbecco's Modified Eagle's Media, Invitrogen Corp(미국)) 배지를 이용하여 37℃, 5% CO₂ 항온기에서 배양하였다.
- [0059] **<실험예 1> 은파멜론 껍질 추출물이 인간 섬유아세포 생존율에 미치는 영향 확인**
- [0060] 5×10⁴ 세포수/ml의 인간 섬유아세포를 60π 디쉬에 5 ml씩 접종하고, 37℃, 5% CO₂ 항온기에 48시간 전배양한 후, DMSO에 녹인 실시예 1의 은파멜론 껍질 추출물을 50 및 100 μg/ml 농도로 각각 처리하였다. 24시간 후, 배양된 세포에 MTT 시약(5 mg/ml)을 처리한 후, 형성된 포르마잔(formazan)을 DMSO로 녹이고 ELISA 마이크로플레이트 리더기를 이용하여 540 nm의 파장의 흡광도를 측정하였다.

[0061] 그 결과, 은파멜론 껍질 추출물은 50 내지 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 의 농도로 처리시 인간 섬유아세포에서 독성을 나타내지 않음을 확인하였다 (도 1).

[0063] <실험예 2> 은파멜론 껍질 추출물이 MMP-1 발현에 미치는 영향 확인

[0064] 은파멜론 껍질 추출물이 피부 노화를 유발하는 콜라겐 분해효소 MMP-1(matrix metalloproteinase-1)의 발현을 저해하는지 확인하였다.

[0065] 구체적으로, 실험예 1과 동일한 방법으로 배양한 인간 섬유아세포에 DMSO에 녹인 실시예 1의 은파멜론 껍질 추출물을 50 및 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 농도로 각각 처리하였다. 음성 대조군으로 DMSO를 처리하였고, 양성 대조군으로 EGCG(Epigallocatechin gallate)를 처리하였다. ROS(활성 산소종, reactive oxygen species) 생성 및 MMPs(matrix metalloproteinase) 활성을 증가시켜 노화를 유도하는 TNF- α (0.02 $\mu\text{g}/\text{ml}$)를 음성 대조군을 제외한 나머지 모든 세포에 처리하고 37℃, 5% CO₂ 항온기에 24시간 동안 배양하였다. 각 제조사의 프로토콜에 따라 배양된 인간 섬유아세포로부터 RNA를 추출하였다(RNeasy mini kit(Qiagen, 독일)). 추출한 총 RNA 1 μg , TransScript All-in-One First-Strand cDNA Synthesis SuperMix for qPCR, with One-Step gDNA Remover(Transgen Biotech, 중국)의 All-Mix 4 μl 와 리무버(remover) 1 μl 를 혼합하고, Uvigen(Uvitech)를 이용하여 42℃에서 15분, 85℃에서 5초, 4℃에서 3분 반응시켜 cDNA를 합성하였다. 합성된 cDNA 1 μl , 표 1의 정방향 및 역방향 프라이머 각각 0.5 μl , DDW(Double distilled water) 8 μl 및 SYBR Green(Qiagen, 독일) 10 μl 을 혼합하여 전체 부피를 20 μl 로 맞추고, 하기 표 2의 반응 조건에 따라 real-time PCR(PikoReal Real-Time PCR, Thermo)을 수행하여 MMP-1 및 GAPDH 유전자를 증폭하였다. MMP-1의 발현량은 GAPDH의 발현량과 상대적으로 비교하여 정량하였다.

표 1

	정방향 프라이머	역방향 프라이머
GAPDH	5'-GG CTC TCC AGA ACA TCA TCC-3' (서열번호 1)	5'-GG GTG TCG CTG TTG AAG TCA-3' (서열번호 2)
MMP-1	5'-GA TGT GGA GTG CCT GAT GTG-3' (서열번호 3)	5'-TG CTT GAC CCT CAG AGA CCT-3' (서열번호 4)

표 2

온도	시간	사이클
95℃	5분	1회
95℃	30초	40회
60℃	30초	
60℃	5분	

[0069] 그 결과, 인간 섬유아세포에 TNF- α 처리 시 콜라겐 분해효소인 MMP-1의 발현이 유도되었고, 양성 대조군 EGCG 실험군에서는 MMP-1 발현이 저해된 것을 확인할 수 있었다. 은파멜론 껍질 추출물을 각각 50 및 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 로 처리할 경우, MMP-1 발현이 각각 20% 및 40% 감소하는 것으로 나타났다 (도 2).

[0071] <실험예 3> 은파멜론 껍질 추출물의 항산화 활성 확인

[0072] 은파멜론 껍질 추출물이 피부 노화를 유발하는 ROS(활성 산소종, reactive oxygen species)를 제거하는지 확인하고자 DPPH 어세이를 수행하였다.

[0073] 구체적으로, 1,000, 2,500, 5,000, 10,000 및 25,000 ppm의 각 은파멜론 껍질 추출물을 96-웰 플레이트에 100 μl 씩 넣고, 1.2 mg/ml의 에탄올에 녹인 DPPH(2,2 diphenyl-1-picryl-hydrazyl) 용액을 100 μl 씩 첨가하였다. 음성 대조군으로 DMSO, 양성 대조군으로 비타민 C(L-아스코르브산)를 사용하였다. 37℃의 암실에서 30분 동안

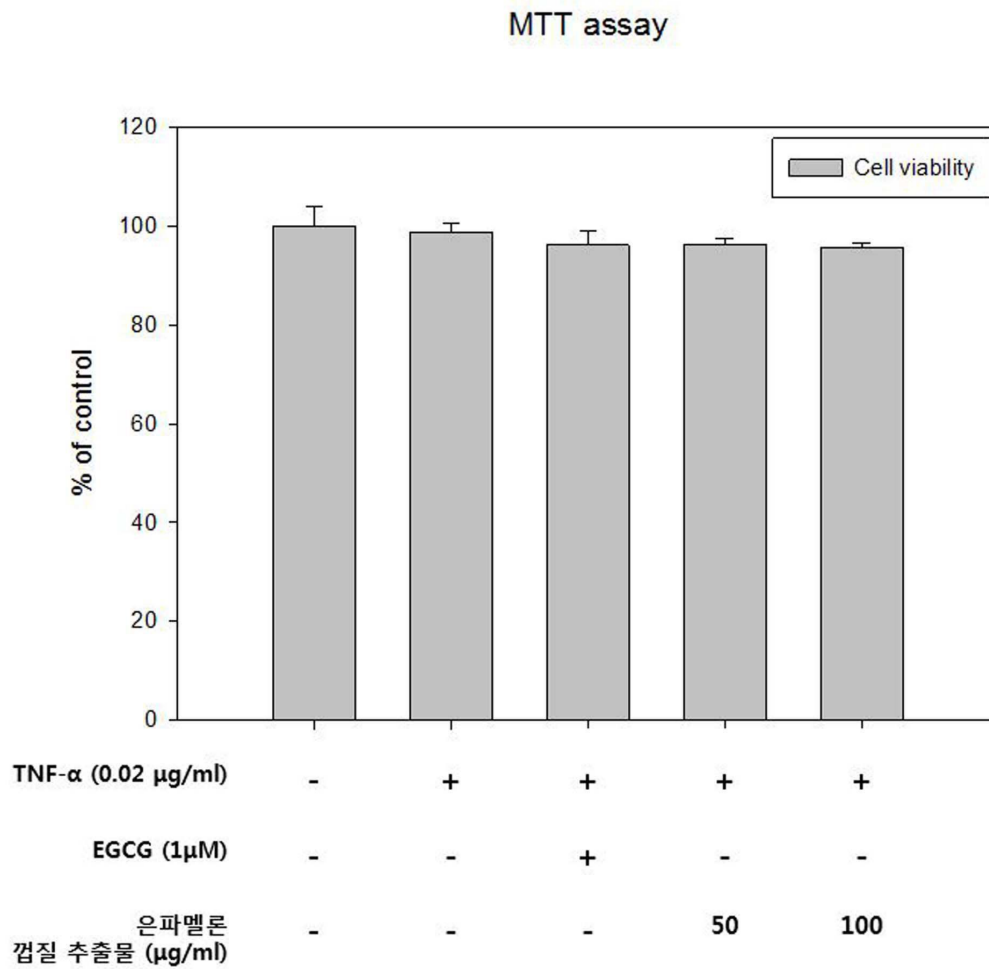
반응시킨 후, 517 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다.

[0074]

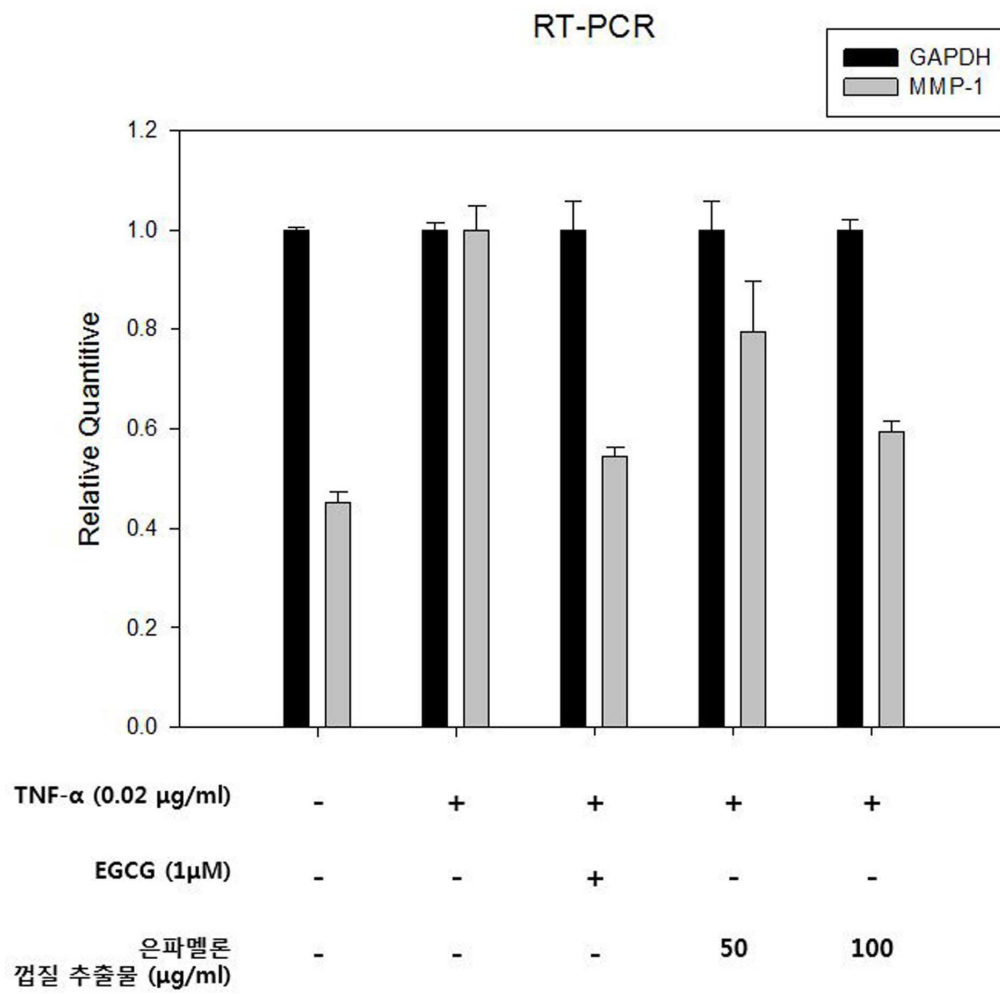
그 결과, 음성 대조군은 항산화 활성이 없는 것으로 나타났고, 은파멜론 껍질 추출물은 1,000, 2,500, 5,000, 10,000 및 25,000 ppm에서 각각 58%, 83%, 87%, 90% 및 90%의 라디칼 소거 활성(%)을 나타내었다 (도 3).

도면

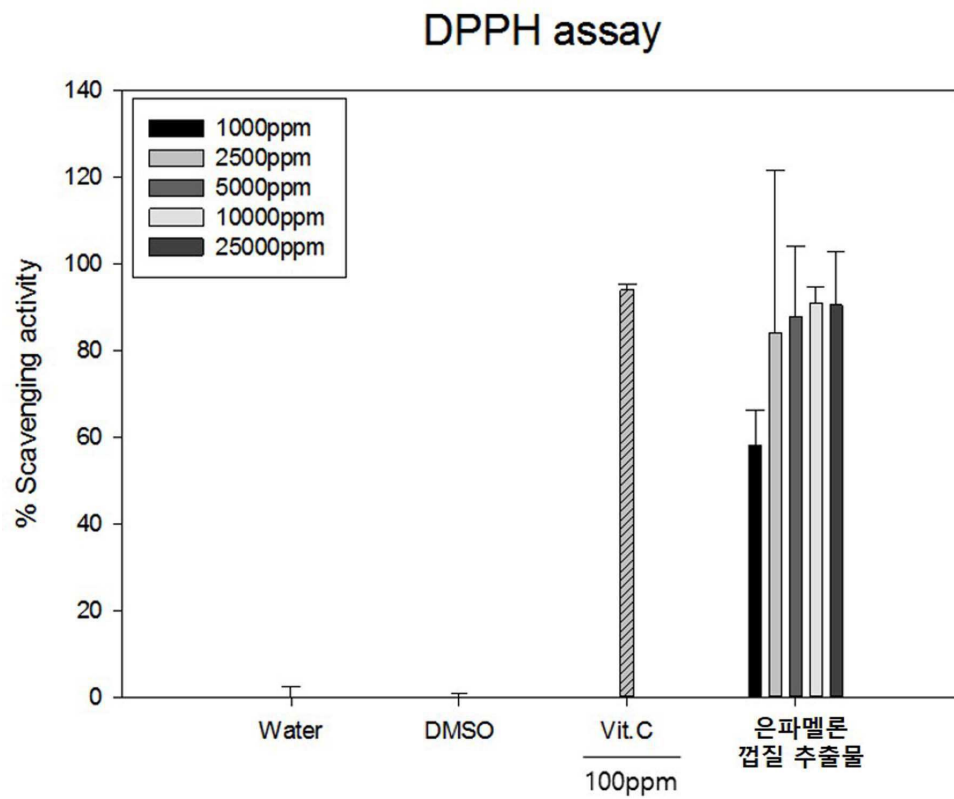
도면1



도면2



도면3



서열 목록

- <110> INHA-INDUSTRY PARTNERSHIP INSTITUTE
- <120> Composition for skin anti-aging comprising extract of silverwave melon(*Cucumis melo*)
- <130> 2018P-10-025
- <160> 4
- <170> KoPatentIn 3.0
- <210> 1
- <211> 20
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence
- <220><223> GAPDH Forward primer
- <400> 1
- ggctctccag aacatcatcc
- <210> 2
- <211> 20
- <212> DNA
- <213> Artificial Sequence

<220><223> GAPDH Reverse primer

<400> 2

gggtgtcgct gttgaagtca

20

<210> 3

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> MMP-1 Forward primer

<400> 3

gatgtggagt gcctgatgtg

20

<210> 4

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220><223> MMP-1 Reverse primer

<400> 4

tgcttgaccc tcagagacct

20